

cell therapy holds promise for myocardial infarction treatment in the future. The study did not clarify any superiority difference between BM-MNCs and selected CD34⁺ cells for the treatment of myocardial infarction.

Generally, CD34⁺ cells that are purified from BM-MNCs or PB-MNCs contain HSC and EPC. During culture, CD34⁺ cells form multiple cell clusters and EPC-like attaching cells with endothelial cell lineage markers (CD31, vascular endothelial cadherin).¹⁰ The major population of collected CD34⁺ cells does not express CD31 and other endothelial cell markers, suggesting that they can differentiate into EPCs. Therefore administered CD34⁺ cells may be expected to differentiate into EPCs, which could contribute to vascularization. A challenge to develop CD34⁺ cell therapy for ischemic diseases is a relative low basal density of CD34⁺ cells in the circulation. Although G-CSF is well known to mobilize CD34⁺ cells from bone marrow into circulation, the concentration of mobilized CD34⁺ cells may not be enough to treat ischemia.

4. IN VITRO INDUCTION AND EXPANSION OF EPCs

Whereas cell therapy using EPCs has been widely performed to rescue tissue damage due to critical ischemia, the population of EPCs that can be purified from PB-MNCs or BM-MNCs is limited. Therefore *in vitro* expansion and differentiation of EPCs have been attempted.²⁰

EPCs are thought derived from several kinds of cells; cells characterized as CD34⁺/AC133⁺/CD14⁺ are also thought to differentiate into EPCs. EPCs may release angiogenic factors such as interleukin-8 (IL-8), G-CSF, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor (VEGF). To obtain a sufficient number of EPCs for treatment purposes may be very important in cell therapy for critical ischemia.

4.1. Endothelial Progenitor Cells Derived from CD34⁺ or AC133⁺ Cells EPCs were first isolated as CD34⁺ cells, and magnetically sorted CD34⁺ cells containing HSCs differentiated into endothelial cells *in vitro*.¹ CD34⁺ cells are thought to stimulate angiogenesis either by their ability to differentiate into endothelial cells or by enhancing the formation and repair of endothelium and vascularization through paracrine stimuli.^{1,21-25} AC133-positive cells, which are typical HSCs, also can differentiate into EPCs and endothelial cells. A challenge for development for cell therapy using EPCs or endothelial cells is to collect sufficient amounts of EPCs or cell sources for EPC/endothelial cells. EPCs are thought derived from CD34⁺ or AC133⁺ cells that do not express endothelial-lineage markers. If CD34⁺ cells collected from peripheral blood or BM-MNCs are expanded and efficiently differentiated into EPCs *in vitro*, sufficient amounts of EPC could be obtained for the treatment of ischemic diseases.

A common barrier against characterization and subsequent utilization of putative EPCs is the poor number of cells obtained after purification from peripheral or cord blood. EPCs represent a very small subset of PB-MNCs, ranging at 0.002–0.01% in peripheral blood and 0.2–1% in umbilical cord blood.¹² According to the cell numbers that have been used for systemic infusion of allogenic EPCs in patients,^{17,18} this would have required a significant amount of blood if the cells were not previously expanded *in vitro*.⁵

Factors affecting expansion and differentiation of EPCs are thought to include several endothelial cell growth factors

such as VEGF and fibroblast growth factor (FGF) and cytokines such as c-kit, Flt-3, IL-3, and IL-6. Other cytokines are thought to contribute to expansion of HSCs, suggesting that expanded HSCs will differentiate into EPCs. Growth factors are essential for proliferation, differentiation and function of endothelial cells. These biological cocktails may stimulate the propagation of HSCs of which partial populations can differentiate into EPCs.

The extracellular matrix (ECM) may also affect *in vitro* expansion and differentiation of EPCs from CD34⁺ or AC133⁺ cells. ECM is critical for all aspects of vascular biology. Vascular endothelial cells require adhesion to ECM for migration; endothelial cells migration is important for angiogenesis, particularly during sprouting of new blood vessels from existing vasculature. Evidence from *in vitro* experiments indicates that many of the interstitial and provisional ECM components that are encountered during angiogenesis including interstitial fibrin and collagen I are capable of supporting chemotactic migration.

On the other hand, *in vitro* induction and expansion of EPCs to form HSCs (CD34⁺ or AC133⁺ cells) have been reported efficiently induced on fibronectin (FN) as ECM. As judged by positive staining for endothelial markers vWF and VE-cadherin, the combination of VEGF with FN produced significantly more endothelial colonies than collagens I or IV or vitronectin.^{26,27} Considering that FN also enhanced VEGF-mediated CD34⁺ cell migration, Wijelath *et al.* concluded that VEGF and FN together significantly promote migration and differentiation of CD34⁺ cells into EPCs. These results also indicate that essential ECM for the induction and expansion EPCs is different from mature endothelial cells.

Concerning induction of EPCs, thrombopoietin (TPO) is reported to enhance proliferation of EPCs from AC133⁺ cells. TPO is a well-known cytokine for megakaryocyte growth and development factor. Collected AC133⁺ HSC cells do not express TPO receptor. When AC133⁺ cells were cultivated in the condition of EPC differentiation, a part of AC133⁺ cells expressed TPO receptor and markedly proliferated (Fig. 1). TPO induced a fourfold increase in EPCs (CD31^{bright} cells). This result suggests that efficient induction of EPCs *in vitro* with TPO contributes further to development of cell therapy for critical ischemic diseases.

4.2. Early and Late EPCs At first, EPCs were thought a source of endothelial cells.¹ A number of studies have described therapeutic applications of EPCs against ischemic diseases. Two types of EPCs have been described *in vitro*; early EPCs and late EPCs (also called endothelial outgrowth

Table 1. Comparison of Early EPC and Late EPC (Out Growth EPC: OEC)

	Early EPC	OEC
Morphology	Spindle shape	Cobble stone
Appearance	1w–3w	3w–
Proliferation	Low	High
Vessel formation in matrigel	Negative or weak	Positive
Cytokine release	High	Low
Cell (surface) marker	CD31, eNOS KDR, CD14, VE cadherin (weak)	CD31, eNOS KDR, VE cadherin

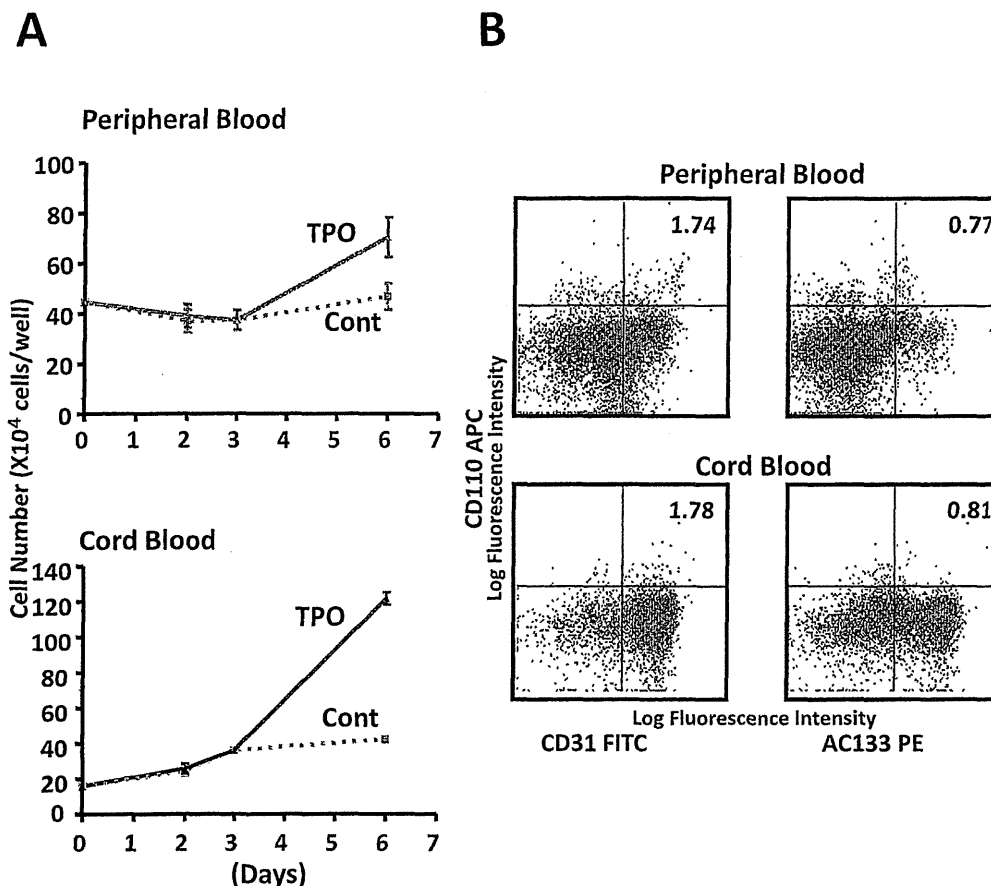


Fig. 1. Time-Course Analysis of TPO-Treated AC133⁺ Cells and Expression of TPO Receptor (CD110)

Alteration of cell number was counted at 2, 3, and 6 d. Solid and dotted lines indicate TPO-treated cells and control (VEGF alone) cells, respectively. The results represent mean \pm S.E. of triplicate wells. (B) Flow cytometric analysis of CD110 expression on AC133⁺ cells cultured for 3 d. The y-axis represents log fluorescence intensity of CD110-APC; x-axis, CD31-FITC (left panels) and AC133-PE (right panels). The number in the flow cytometric dot blot indicates the percent CD110⁺CD31⁺ and CD110⁺AC133⁺ populations, respectively. Upper panels, peripheral blood; lower panels, cord blood (*J. Biol. Chem.*, Kanayasu-Toyoda *et al.*, 2007).

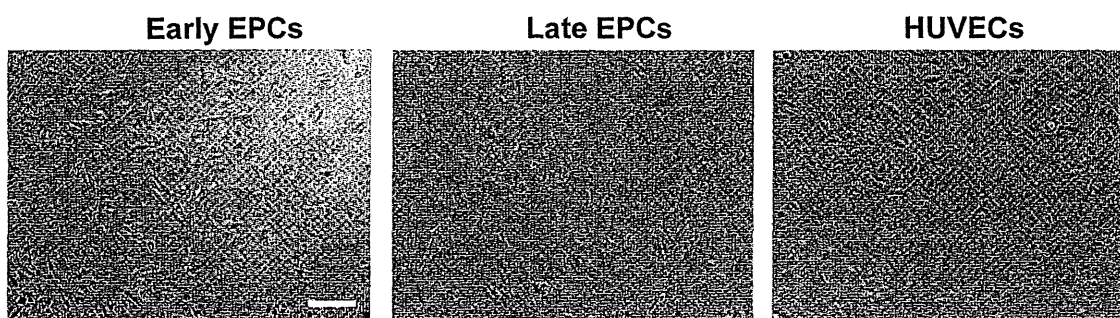


Fig. 2. Comparison of Morphology of Early EPCs, Late EPCs, and HUVECs

Morphology of early EPCs (left), late EPCs (middle), and HUVECs (right) by microscopy. Scale bar, 100 μ m.

cells) (Table 1). Although early EPCs and late EPCs express common features such as expression of CD31, LDL uptake, and other endothelial markers, they have distinct characteristics with respect to morphology (Fig. 2), proliferation ability, and *in vitro* function such as vascular tube formation.^{25,28-31} The characteristics of early EPCs are different from typical endothelial phenotype; for example they exhibit weak ability for neovascularization *in vitro*, but early EPCs produce angiogenic paracrine factors.³²

During *in vitro* culture of CD34⁺ or AC133⁺ cells, early EPCs appeared relatively rapidly (within 1 week) as fibroblastic cells that express CD31, KDR, or other endothelial lineage

marker. The appearance of late EPCs is delayed in comparison with that of early EPCs, and these cells' proliferation ability is much higher than that of either endothelial cells or early EPCs. The different abilities of these EPCs suggest the hypothesis that early EPCs migrate into ischemic regions and contribute to vascularization by recruiting circulating endothelial cells whereas late EPCs secrete angiogenic factors and thus integrate into neovascularization. This synergistic model remains to be fully elucidated.

The origin of EPCs raises controversial discussion.³³ Concerning the origin of early EPCs, Rehman *et al.*²⁵ reported that these cells are derived from monocytes/macrophages

and secrete angiogenic growth factors. The reasoning of this hypothesis is that early EPCs express not only endothelial lineage markers but also CD45, common leukocyte antigen. Timmermans *et al.* reported that the CD34⁺/CD45⁺ HSC cell fraction did not generate late EPCs, but differentiated into EC-like cells through a CD14⁺ monocytic pathway.³⁴ On the other hand, Kanayasu-Toyoda *et al.* reported that early EPCs are differentiated from AC133⁺ cells not through CD14 expression. The precise origin of early EPCs needs further investigation.

5. CONCLUSION

Cell therapies for severe ischemic diseases have been developed alongside clarification of the biology of EPCs. Many sources of EPCs have been proposed; MNCs fraction containing CD34⁺ or CD133⁺, isolated CD34⁺ and AC133⁺ cell, and *in vitro* induction and differentiation EPCs from HSCs. Many *in vitro*, *in vivo*, and clinical studies have looked at these cells. However, the origin of these cells remains to be elucidated, and *in vivo* mechanisms by which EPCs contribute to neovascularization should be clarified in future.

REFERENCES

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, **275**, 964–967 (1997).
- Shi Q, Rafi S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, **92**, 362–367 (1998).
- Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ. Res.*, **110**, 624–637 (2012).
- Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, Yamamoto Y, Onodera R, Teramukai S, Fukushima M, Matsubara H, TACT Follow-up Study Investigators. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am. Heart J.*, **156**, 1010–1018 (2008).
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T, Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, **360**, 427–435 (2002).
- Onodera R, Teramukai S, Tanaka S, Kojima S, Horie T, Matoba S, Murohara T, Matsubara H, Fukushima M, BMMNC Follow-Up Study Investigators M-PBMNC Follow-Up Study Investigators. Bone marrow mononuclear cells versus G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells for treatment of lower limb ASO: pooled analysis for long-term prognosis. *Bone Marrow Transplant.*, **46**, 278–284 (2011).
- Huang PP, Yang XF, Li SZ, Wen JC, Zhang Y, Han ZC. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb. Haemost.*, **98**, 1335–1342 (2007).
- Horie T, Onodera R, Akamastu M, Ichikawa Y, Hoshino J, Kaneko E, Iwashita C, Ishida A, Tsukamoto T, Teramukai S, Fukushima M, Kawamura A, Japan Study Group of Peripheral Vascular Regeneration Cell Therapy (JPRCT). Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis*, **208**, 461–466 (2010).
- Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 208–216 (2008).
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, **103**, 2776–2779 (2001).
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.*, **7**, 430–436 (2001).
- Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J. Clin. Invest.*, **106**, 571–578 (2000).
- Li S, Zhou B, Han ZC. Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34⁺ and CD34-mononuclear cells. *Thromb. Haemost.*, **95**, 301–311 (2006).
- Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation*, **109**, 3154–3157 (2004).
- Rosenzweig A. Cardiac cell therapy—mixed results from mixed cells. *N. Engl. J. Med.*, **355**, 1274–1277 (2006).
- Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Zak V, Asahara T, Losordo DW. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*, **114**, 2163–2169 (2006).
- Tendera M, Wojakowski W, Ruzyłło W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, Musiałek P, Piwowarska W, Nessler J, Buszman P, Grajek S, Breborowicz P, Majka M, Ratajczak MZ, REGENT Investigators. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34⁺CXCR4⁺ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur. Heart J.*, **30**, 1313–1321 (2009).
- Mackie AR, Losordo DW. CD34-positive stem cells: in the treatment of heart and vascular disease in human beings. *Tex. Heart Inst. J.*, **38**, 474–485 (2011).
- Jiang M, He B, Zhang Q, Ge H, Zang MH, Han ZH, Liu JP, Li JH, Zhang Q, Li HB, Jin Y, He Q, Gong XR, Yin XY. Randomized controlled trials on the therapeutic effects of adult progenitor cells for myocardial infarction: meta-analysis. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **10**, 667–680 (2010).
- Ahrens I, Domeij H, Topcic D, Haviv I, Merivirta RM, Agrotis A, Leitner E, Jowett JB, Bode C, Lappas M, Peter K. Successful *in vitro* expansion and differentiation of cord blood derived CD34⁺ cells into early endothelial progenitor cells reveals highly differential gene expression. *PLoS ONE*, **6**, e23210 (2011).
- Dimmeler S. Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30**, 1088–1093 (2010).
- Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1584–1595 (2008).
- Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*

- Biol.*, **23**, 1185–1189 (2003).
- 24) Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **45**, 530–544 (2008).
- 25) Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, **107**, 1164–1169 (2003).
- 26) Wijelath ES, Rahman S, Murray J, Patel Y, Savidge G, Sobel M. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. *J. Vasc. Surg.*, **39**, 655–660 (2004).
- 27) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Hayakawa T. CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *J. Cell. Physiol.*, **195**, 119–129 (2003).
- 28) Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, Tolla-Le Port C, Leboeuf M, Charbord P, Bikfalvi A, Uzan G. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*, **103**, 2577–2584 (2004).
- 29) Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Heibel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.*, **105**, 71–77 (2000).
- 30) Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*, **109**, 1801–1809 (2007).
- 31) Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, Kim TY, Cho HJ, Kang HJ, Chae IH, Yang HK, Oh BH, Park YB, Kim HS. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*, **112**, 1618–1627 (2005).
- 32) Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing *ex vivo* expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells. *J. Biol. Chem.*, **282**, 33507–33514 (2007).
- 33) Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.*, **95**, 343–353 (2004).
- 34) Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, Gillebert TC, Plum J, Vandekerckhove B. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133⁺ cells or CD45⁺ hematopoietic precursors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, 1572–1579 (2007).

IV 特 論

バイオシミラーについて

Perspective on regulation of biosimilar products

山口 照英

Key words : バイオシミラー, バイオ後続品, バイオ医薬品, 同等性

はじめに

バイオテクノロジー応用医薬品の開発が急速に進展しており、新薬開発の中でもバイオ医薬品(Biologics)の占める割合が急速に高まっている。2010年代の後半にはバイオ医薬品は新薬として承認される医薬品の中の30%をこえると予測されている。エリスロポエチンやインターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子などサイトカイン類をはじめとして、血液凝固因子類、インスリンやヒト成長ホルモンなどのホルモン類など、多岐にわたるバイオ医薬品が市販され、医療現場において必須の医薬品となっている。更に、C型肝炎の治療率の飛躍的向上に貢献したポリエチレングリコール修飾インターフェロンやインスリンの持続性をコントロールするために様々な修飾体が開発され、生体タンパク質を改変することにより、臨床効果や副作用の低減など様々な改変が行われるようになっている。

特にバイオ医薬品の中でもモノクローナル抗体医薬品の開発が急速に拡大しており、バイオ医薬品開発の伸びはモノクローナル抗体医薬品によっていると考えるもよい。例えば、インフリキシマブやアダリムマブに加え、抗インターロイキン-6(IL-6)モノクローナル抗体(トシリツマブ)などがクローン病や関節リウマチなどの自己免疫疾患に用いられている。また、抗体ではないが、TNF II型受容体(p75)とヒトIgG1

のFc部分の融合タンパク質であるエタネルセプトも同様の自己免疫疾患を対象とした治療薬として用いられている。これらの抗体医薬品の出現により関節リウマチやクローン病の治療戦略も大きく変わってきている。

また、幾つかのがん細胞で特異的に発現している抗原をターゲットとしたモノクローナル抗体医薬品が開発され、例えばハーセプチン(トラスツズマブ, 抗EGF受容体)、リツキシマン(リツキシマブ, 抗CD20抗体)や、血管新生の阻害を目的としたアバスタチン(ベバシズマブ, 抗VEGF抗体)が市販されている。生体内分子と結合し、その作用を中和することによる臨床効果を目的として、抗IgEモノクローナル抗体(オマリズマブ)や抗C5aモノクローナル抗体(エクリズマブ)が承認されている。これらの抗体医薬品の作用機序は多様であり、細胞傷害性の薬効を高めるためにアイソトープ標識や薬剤標識した製品もある。

このように従来型の生体内微量タンパク質を大量生産したバイオ医薬品に加え、抗体医薬品や抗体関連タンパク質の登場により患者の治療選択が大きくなり、医療の大きな進歩をもたらしている。しかしその一方で、これらのバイオ医薬品は、培養設備や精製工程などの施設が高価であり、また抗体医薬品のように大量投与が必要な製品では患者の負担も化学薬品と比べて非常に大きくなっている。

バイオ医薬品の医療費の増大に対する懸念が言われ始めたときと呼応するように、2000年以降初期に承認された多くのバイオ医薬品の特許が消滅する状況が出てきた。このために化学薬品のジェネリック医薬品がバイオ医薬品でも創生できるのではないかと考えられるようになった。いち早くバイオ医薬品のジェネリックバージョンを承認するための規制環境を作ったのがEUである¹⁻³⁾。EUでは既に10品目を超えるバイオシミラー(Biosimilar product)が承認されているが、これと平行してバイオシミラー(我が国ではバイオ後続品(Follow-on biologics)とされている)ガイドラインをいくつも発出している。我が国でもバイオ後続品指針を作成⁴⁾し、既にエリスロポエチンとヒト成長ホルモンを承認している。更にこの2製品以外に顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)やインスリン、フォリトロピン刺激因子(FSH)、インターフェロンなどバイオシミラーの開発が進められている。一方で、このような生理活性物質のみならずモノクローナル抗体医薬品のバイオシミラー開発も精力的に進められている。

バイオシミラーの開発では、国内で既承認のバイオ医薬品を参照として品質・安全性・有効性の比較を行い同等の製品であることを立証することが求められており、更に既承認バイオ医薬品の特許や再審査期間が終了していることが必要とされている。すなわち、バイオシミラーの承認にあたっては、既承認のバイオ医薬品と高い品質特性の類似性をもつことが前提であり、そのような品質の高い類似性を示すことにより、先行バイオ医薬品の経験を利用することにより、少ない非臨床試験や臨床試験で承認に必要なデータを作成することが可能と考えられている。

バイオ医薬品の中でも典型的な分子標的医薬品であるモノクローナル抗体医薬品に関しては、2010年代に入って特許期間や再審査期間が終了しつつある製品が出てきており、今後2015-2020年にかけて多くの抗体医薬品の特許が終了するとされている。そのためにモノクローナル抗体バイオシミラーの開発タイムスケジュールとしては、この特許期間の終了を目指した基

礎検討や臨床試験が計画されている。しかし、抗体医薬品のバイオシミラーに関しては、その分子そのものの複雑性に加え薬理作用そのものが複雑であり、臨床的にどの薬理作用が臨床効果と直接結びついているか十分に解明できていない面もあり、開発の難しさが指摘されている。EUでは既にモノクローナル抗体のバイオシミラー製品ガイドライン案が発出されており、また抗体のバイオシミラー製品に関するワークショップを開催し意見の集約を行っている^{5,6)}。

本稿では、開発が進むバイオシミラーの承認要件のポイントをまず議論し、そのうえで今後のバイオシミラー開発で注目されるモノクローナル抗体バイオシミラーを中心に品質、安全性、有効性に関してどのような要件が求められるのかを概説する。またバイオシミラーに関していち早くガイドラインを作成したEUでバイオシミラー開発が進んでおり、製品ごとのバイオシミラーガイドラインの作成や品質や非臨床試験/臨床試験ガイドラインの改定も行われている⁷⁾。この改定作業は、バイオシミラーの承認審査や開発相談などでの経験が積み重なってきた成果とされている。EUや日本以外にも各国でバイオシミラーガイドラインが策定されており、バイオ後続品/バイオシミラーの開発は各国に広がっている。また、バイオ後続品/バイオシミラーの法的整備の具体的なガイドライン策定が遅れていたFDAも2012年2月にバイオシミラーガイドライン案⁸⁾を公表し、現在パブリックコメント中である。

このようなバイオシミラー開発に対応する世界の規制当局の動きについても概説し、各国でどのような要件が求められているのか、また課題となっている点についても考察してみたい。

1 バイオシミラー開発の要件

まずバイオシミラーと後発品で求められる要件の差異について議論を進めてみる。基本的には、化学合成薬品とバイオ医薬品の特性の差異が、これらの製品群の評価にあたっての要件の差異になっていると考えられる。すなわちバイ

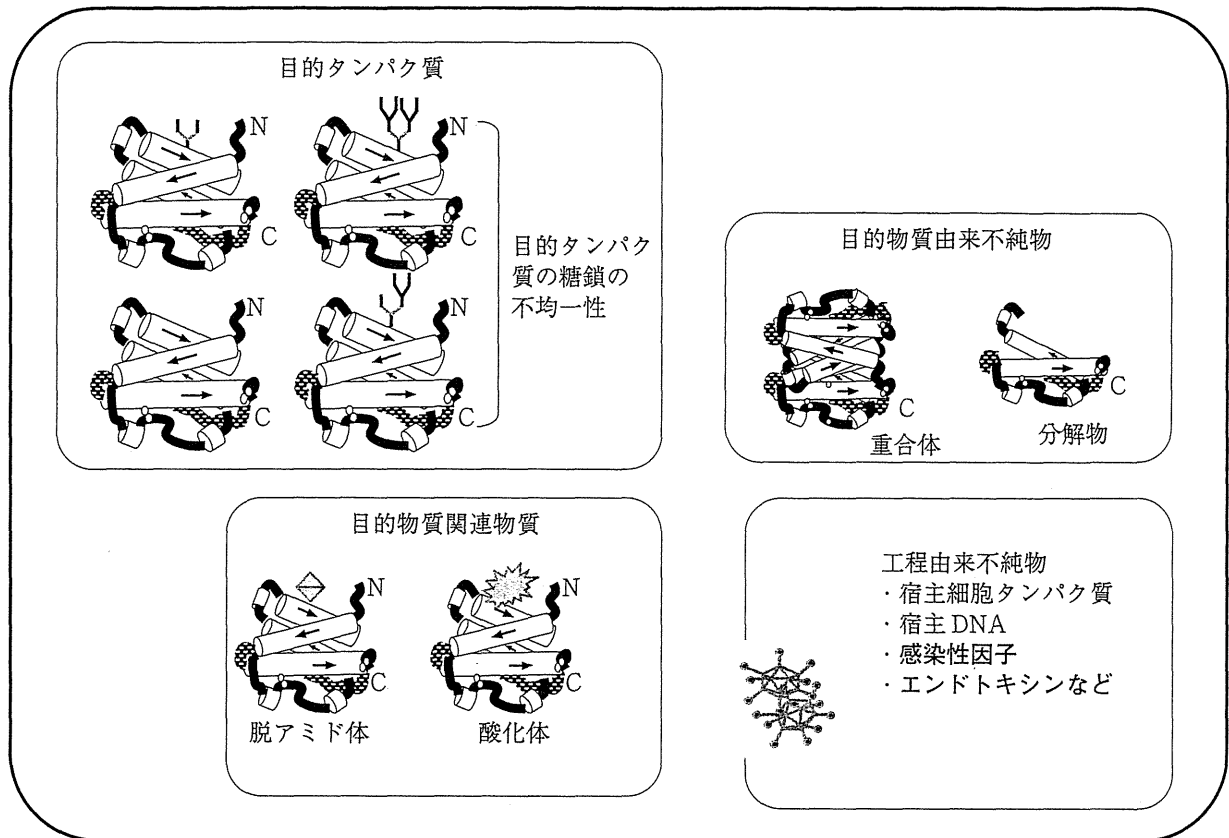


図1 バイオ医薬品は品質特性

バイオ医薬品の品質特性は目的タンパク質の不均一性のみならず目的物質関連物質や目的物質由来不純物など多様な成分から構成される。

バイオ医薬品は、化学合成医薬品と異なり非常に複雑な品質特性をもち、かつ糖タンパク質医薬品などでは極めて多様な分子から構成されており(図1)、現在の解析技術によってその品質特性のすべてを明らかにすることは困難とされている。この点が構造解析によって先行バイオ医薬品との同一性を立証可能とするジェネリック医薬品と大きく異なる点である。更にタンパク質性医薬品の糖鎖修飾のように、培養条件をわずかに変更しただけで糖鎖の不均一性が変化することが知られており、製法の差異がどの程度品質特性へ影響するのかをあらかじめ予測することが困難であるとされている。したがって製法そのものが異なるバイオシミラーの同等性(Comparability)の評価にあたっては、糖鎖の不均一性や類縁物質の差異、工程由来不純物の差異など品質特性の差異となる点をどのように評価するかがポイントとなり、また同一性を立証

することが困難であり、むしろ類似性の立証であるとの根拠ともなっている。

1) バイオシミラーの開発の基本

バイオシミラーの開発では、まず公開されている数々の情報から参照する先行バイオ医薬品と同じアミノ酸配列をもつ製品を製造するためのベクターや細胞基材の選択に続いて、培養法や精製法をデザインすることからスタートし、恒常性と頑健性のある製法を確立する必要がある。そのうえで、独自に新薬と同様の品質特性解析を行うことが求められる。更に参照品である先行バイオ医薬品との品質特性の同等性評価(高い類似性を示す)を行う必要がある。もし品質の類似性が十分でない場合には製法を見直し、類似性の高い製品が得られるように最適化することが求められるであろう。また、品質特性に差異がある場合であっても、例えば糖鎖プロファイルのわずかな差異やデアミド体や酸化体

などの含量に若干の差異が認められるような場合であっても、多くの公知データなどから臨床上有効性や安全性に影響が出ないことが予想されれば、臨床試験により有効性や安全性に影響がなく临床上、同等な医薬品と見なせることを示すことにより開発を進めていくという戦略も可能である。

バイオシミラーの開発で品質の高い類似性を示すことができれば、先行バイオ医薬品の治験開発や市販後の有効性や安全性の経験を利用することを可能というコンセプトが成立している。この先行バイオ医薬品の経験を生かすというコンセプトはジェネリック医薬品と同じ発想であり、違いはジェネリック医薬品では同一の品質の製品ということが比較的容易に実証可能とされているのに対して、バイオシミラーでは同一ではなく類似性であり、何らかの差異があることを前提に、その差異の部分为非臨床試験や臨床試験を通じて同様の医薬品として、ヒトに使用可能であることを示すことが求められていると考えてよい。

製法開発では上記したように、目的タンパク質を発現させるためのベクターや宿主細胞も異なっていることから、単純タンパク質の場合には目的タンパク質そのものに差異が生じる可能性は少ないが、翻訳後修飾などによるデアミド体や酸化体などの生成については生産基材や設計した発現ベクター、精製法により異なるプロファイルを示す可能性がある。また、糖タンパク質の場合には目的タンパク質有効成分そのものが不均一性をもっており、宿主細胞の挿入された位置やコピー数、作製されたセルバンクなどに依存して異なる糖鎖プロファイルを示す可能性がある。更に、糖鎖結合部位が複数存在する場合には糖鎖結合部位ごとの糖鎖の不均一性が異なってくる可能性がある。これらのプロファイルの高い類似性を示すには様々な角度からの特性解析が必要となる。

品質の類似性が十分に実証されていない場合には、バイオシミラーとしての開発が難しいという場合もある。あるいは、より臨床で同等性を示すための多くの試験が必要とされることに

なるであろう。

2) 同等性評価

先行バイオ医薬品との品質の同等性評価では、様々な角度からの比較試験が求められるが、実施する試験としてはそれぞれ製品の特性を考慮して考える必要がある。また、おそらく入手可能な先行バイオ医薬品としては製剤として入手することになるであろうことから、試験の適用に一定の制限がつくことも考慮しなければならない。例えば安定化剤として糖が添加されている場合には、糖組成分析では添加剤の影響を排除するような処理が必要となるであろう。また、抗体や血液凝固第VIII因子のような分子量の大きいバイオ医薬品では立体構造の類似性を示す手法が必ずしもすべて適用可能ではない。むしろ立体構造の違いが生物活性に反映すると想定されることから、適用可能なインビトロでの生物活性試験を網羅的に実施することで生物活性のみならず立体構造の高い類似性を示すことが可能であるともいえる。

バイオ医薬品の品質特性解析では、日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)ガイドラインであるICH Q6B⁹⁾を参考に試験を実施することが求められている。バイオシミラー開発における同等性評価においてもICH Q6Bが参考になると思われるが、表1に想定される同等性評価で実施される可能性の高い品質特性試験項目を例示してみた。ただ表1は単に例示であって、これらの項目は実施すべき全ての試験を表しているのでもなければ、これらの試験の全てを実施する必要があるというわけでもない。例えば抗体や血液凝固第VIII因子などの分子量の大きいタンパク質ではNMRなどの構造解析は現時点では適用できないとされている。このような大きな分子では、多面的な生物活性の比較分析が有用であろう。

アミノ酸の一次配列が一致していることがバイオシミラーの要件となっており、また多くのバイオ医薬品の一次構造は公知になっていることを考え合わせれば、必ずしも比較評価が必要とはならないであろう。ただLC-MSやLC-MS/MSを用いた比較では、一次構造のみなら

表 1 同等性評価で実施される可能性の高い品質特性試験項目

一次構造解析	ペプチドマッピング/質量分析(MS) : LC/MS ペプチドマッピング/MS/MS 分析 アミノ酸組成分析 アミノ酸配列分析
ジスルフィド結合	非還元条件下のペプチドマッピング/MS
高次構造	円二色性スペクトル解析(遠紫外/近紫外) 円二色性スペクトル解析 FT 赤外スペクトル解析 核磁気共鳴スペクトル解析 X線結晶解析
他の品質特性	等電点電気泳動
糖鎖構造	キャピラリー等電点電気泳動 非還元条件下の IEX-HPLC など 糖鎖分析/糖組成分析 糖鎖結合部位解析 部位ごとの糖鎖構造解析
生物活性	結合活性(ELISA, 表面プラズモン解析など) 細胞アッセイ(細胞増殖解析) ADCC や CDC 活性 インビボアッセイ
類縁物質	RP-HPLC, IEX-HPLC, キャピラリー電気泳動など
工程由来不純物	宿主タンパク質分析(ELISA など) 宿主 DNA 分析

ずC末端やN末端アミノ酸の欠失や修飾などの解析も可能であり, これらの解析により構造比較が有用である。また円二色性スペクトル解析やフーリエ変換赤外スペクトル解析などでは吸収スペクトルパターンの類似性を示すことが求められる。

一方, 生物活性や糖鎖プロファイルの比較では測定上のバラツキやロット間のバラツキを想定し, これらのバラツキを前提とした同等性の評価が必要となる。したがって, 可能な限り参照とする先行バイオ医薬品の複数のロットを入手し, 開発を目指すバイオシミラーの複数ロットの比較が有用となる。

更に, バイオシミラーは先行バイオ医薬品が承認されてから一定の期間を経て開発が可能になることから, その間の科学的進歩により不純物の精製度などが向上している可能性が高い。したがって, 目的物由来不純物や工程由来不純物については多くの場合先行バイオ医薬品より

低減化されていることも想定される。このような場合には同等性評価を適用することはあまり意味がないようにも考えられる。ただし, 一部の不純物が先行バイオ医薬品より多く含まれる可能性もあり, このような場合にはその不純物のヒトへの影響について評価することが求められる。

3) 臨床試験

バイオシミラーの臨床試験では, 薬物動態(PK)試験の実施が求められるが, PK試験では基本的にはクロスオーバー二重盲検試験であることが求められる。また, 投与量として臨床投与量の範囲で, 差異が最も検出しやすい投与量を選択することが可能である。安全性が担保されることを前提に健常人を対象とした試験を実施することになるであろう。しかし, 抗体医薬品のように血中半減期が長い医薬品では, 健常人での試験が困難な場合も想定される。患者を対象とした試験, 特になん患者などではターゲ

ット分子の発現が異なっているなど被検者集団の均一性が問題となり、可能な限り均一な患者集団を対象とした試験が望ましい。

薬力学的(PD)試験では、適切なPDマーカーを用いた試験の実施が求められるが、エンドポイントの判定が長期にわたる場合などでは、クロスオーバー試験が困難なケースも想定される。また、PK/PD試験をデザインすることも可能であるが、一方の試験が成立しなかった場合には、いずれのデータも評価資料として用いることが困難になることも想定される。

PK試験やPD試験を通じて臨床的な有効性を含めた高い類似性が説明できるのであれば、有効性についての臨床試験を実施することなく承認申請することも可能な場合がある。ただし安全性に関するデータが不足している場合などでは、臨床比較試験ではなく、安全性に関する単独の試験を実施することもありえる。

2 バイオシミラーに関する世界の動向

バイオシミラーは後発医薬品(ジェネリック医薬品)と異なり、既承認の先行バイオ医薬品と同一の製品というコンセプトではなく、先行バイオ医薬品と高い類似性をもっており臨床適用において有効性や安全性が同等の製品と位置づけられている。これは各国のガイドラインでも同様の考え方が示されており、参照とする先行バイオ医薬品との品質の高い類似性を示した上で、非臨床試験や臨床試験を通じて臨床上的有効性や安全性も有意な差異がない(類似している)ことを示す必要があるとされている。このために最近発出されたFDAのバイオシミラーガイドライン案¹⁰⁾ではBiosimilarityというバイオ医薬品としての類似性を表す新しい造語が使われており、意図しているところは先行バイオ医薬品との品質・安全性・有効性の類似性を意味していると考えられる。

これまで多くの国でバイオシミラーに関するガイドライン^{11,12)}が発出されてきており、ガイドラインなどは作成を行わないものの、バイオシミラーの開発のためのパスウェイが示され

ている規制当局もある(表2)。表2はWHOやAPECバイオシミラーワークショップなどの国際会議などで公表された公開資料に基づいて作成しているが、すべてにわたる詳細な確認ができていないわけではない。また具体的要件に関して、各国の規制当局により違いがあるものと考えられるが、そのすべてが明確にされているわけではない。例えば我が国では承認された新薬は製造販売承認から一定期間後にその有効性、安全性などの再確認のための審査(再審査・再評価期間)が設定されるが、この間はジェネリック医薬品が承認されることはなく、先発薬の保護期間となっている。バイオシミラーについても同様に再審査・再評価期間が終了するまでは承認されることはなく、いわゆる先行バイオ医薬品の保護期間として機能している。米国では先行薬の独占期間(exclusive-period)が設定されており、明確に先行製品の保護期間となっている。またそれぞれの保護期間の長さも国によって異なっており、このような薬事制度の違いが存在する。

1) 参照医薬品(先行バイオ医薬品)

バイオシミラー開発では、まず新薬と同様に製法の確立と製造したバイオシミラー候補の品質特性解析が行われ、そのうえで参照医薬品との品質の類似性を評価することになる。もちろん類似性が低いと判断される場合には、より高い類似性をもつように培養条件や精製条件といった製法の見直し、変更が行われることになると考えられる。バイオシミラーの開発はステップワイズに行われるべきとされているが、高い類似性の製品を恒常的に製造できるように、製法改良・最適化へと常に品質解析とのキャッチボールをしながら製造方法の確立が行われる。

参照医薬品としての先行バイオ医薬品について、我が国の指針やEUのバイオシミラーガイドラインでは、国内(域内)で既に承認されているバイオ医薬品であることを求めている。これは、先行バイオ医薬品の経験を生かすことにより少ないデータで承認に必要な充足性を確保する点からは当然の措置と考えられる。

一方で、WHOのガイドラインでは、参照す

表 2 各国のバイオ後続品の規制状況

国名	ガイドラインないしは規制状況	発出日
EU	2004/27/EU 指令(2001/83/EU 指令の修正)やガイドラインの改定作業も行われている	多数のガイドライン
日本	バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針及び Q & A	2009 年 3 月 4 日
米国	法案が議会で承認, ガイドライン案を発表	2012 年 3 月
WHO	Guideline on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs)	2009 年 10 月発表
カナダ	Information and submission requirements for subsequent entry biologics (SEBs)	2009 年発表
オーストラリア	EU ガイドラインを適用	2008 年 8 月
インド	既承認のバイオ医薬品との比較でバイオ後続品の開発が可能. バイオ医薬品ガイドライン	2008 年 7 月 11 日
ベネズエラ	ガイドライン: 既承認の組換えタンパク質医薬品やモノクローナル抗体, 抗体製品との比較	2000 年 8 月 3 日
中国	医薬品承認申請書の各条の追補 III により規制. バイオ後続品の品質基準を公定書に記載	ガイドラインはない
ブラジル	"Technical rules for registration of biological products." 海外の先行バイオ医薬品との比較も可能	2005 年 10 月 26 日
韓国	バイオ後続品ガイドラインを発表, 国によるバイオ後続品開発の推進	2009 年 7 月 1 日
アルゼンチン	Draft guideline: Registration and registry modification of biological medicinal products	2008 年 7 月
キューバ	Position paper on biosimilar. 基本的にバイオ医薬品は新薬. 場合によってバイオ後続品の適用もあり	2009 年 3 月
サウジアラビア	Draft guideline: Drug master file requirement for the registration of biosimilar.	2008 年 8 月
マレーシア	Guideline document and guideline for registration of biosimilars in Malaysia	2008 年 7 月 30 日

る先行バイオ医薬品の要件については各国の規制当局の判断によるとされている。これは、多くの発展途上国では必ずしも多くのバイオ医薬品が承認されているわけではなく、国民の所得レベルなどから市販されていてはすべての国民がバイオ医薬品にアクセス可能ではないという判断からである。ある意味 WHO の考え方の中には、バイオシミラーの開発を通じて、後進国では入手しにくいバイオ医薬品が広く国民に行き渡ることを目指しているとも考えられる。

一方、FDA のガイドライン案や Health Canada のガイドラインでも基本的には国内で既承認のバイオ医薬品を参照することを求めているが、条件によっては海外承認品との比較も許容する内容となっている。ただし、海外承認品を

参照として比較試験を行った場合には、別途国内承認品と比較対照とした海外承認品との同等性を示すことを求めている。いわばブリッジングにより海外承認品との比較を可能にしている。

この背景にあるのは、バイオシミラー開発が一国にとどまらずグローバルな開発が志向されるようになってきたことにより、開発で国際共同治験が組まれることがあるためであろう。このような場合、各国ごとに比較対象とする先行バイオ医薬品を設定することは事実上不可能である。すなわち、参照品を統一するためにいずれかの国で承認された製品を用いた比較試験が必要となっている。

我が国でも同様のことが想定されており、バイオ後続品の指針に対する Q & A でそのよう

な場合を想定して規制当局に相談することを推奨している。

2) 同等性評価と非劣性評価

バイオシミラーには臨床的な同等性(類似性)が求められるが、例えばPD試験での類似性の検証では、検出感度を規定したうえで先行バイオ医薬品と一定の許容域に入ることが求められる。この許容域については対象とするバイオ医薬品の特性やPD試験の内容によっても変わるものであり、必ずしも一律に規定されるものではない。例えば後発品の同等性許容域として用いられている80-125%という値も使われることがある。いわば同等性では下限と上限を規定して、その中に入ることが求められる。

バイオ医薬品の中でも、インスリンのようにその活性を十分にコントロールされなければ患者の安全性上重大な結果を招く製品では、活性がある幅に入らねばならないことが十分に理解されるが、活性が高すぎたとしても臨床上大きな影響がないとされるバイオ医薬品も想定されている。そのために必ずしも同等性評価ではなく、先行バイオ医薬品に対する非劣性を証明するという考え方もあった。WHOのガイドライン作成でも非劣性をよいとする意見も出されていた。

しかし、バイオシミラーは臨床上の有効性が担保されるということのみならず、先行バイオ医薬品と同等の医薬品であることの立証が必要であり、同等性を前提として先行バイオ医薬品の長年の経験を利用して開発が可能とされている。非劣性を容認することになると、必ずしも同等とはいえなくなり、先行バイオ医薬品の経験を生かすという戦略を適用できないことにもなる。

3) 抗原性評価

化学合成薬品と異なるバイオ医薬品の特徴として、抗原性が挙げられる。抗原性については血液凝固第VIII因子のインヒビターの出現やエリスロポエチン(EPO)の容器の変更による溶出物がEPOと結合して抗原性を高めてしまったことによる抗EPO抗体の出現¹²⁾など、目的とするバイオ医薬品の有効性の減弱や内在性タン

パク質への阻害作用から重篤な副作用が出現するリスクが知られている。また、バイオシミラーとして初めてEUで承認されたヒト成長ホルモン(オムニトロープ)の臨床開発初期に抗ヒト成長ホルモン抗体が出現したことなどもあり、各国のガイドラインでもどのように抗原性の評価を行うべきかが議論されている。

動物試験では種の違いもあり、ヒトでの抗原性を予測することはできないとされており、あくまでも臨床試験においてどのように抗原性を評価すべきかがポイントとなっている。EMAのバイオシミラー非臨床/臨床ガイドラインでは、抗原性を評価するために臨床試験で1年以上の観察期間を求めている。一方、FDAは抗原性を臨床試験の初期に評価すべきとしており、この点はEMAのガイドラインと視点が異なっている。EMAのガイドラインでは必ずしも初期の臨床試験での観察を求めているわけではない。我が国のガイドラインでは、必ずしも1年にこだわる必要はなく、バイオ医薬品の特性に合わせて適切な期間としている。

3) モノクローナル抗体バイオシミラー

バイオ医薬品の中で典型的な分子標的薬であるモノクローナル抗体のバイオシミラー開発が国内外で急速に進められている。ただ、抗体特有の分子の複雑さ、機能面での多様性などから他のバイオ医薬品よりも開発のハードルが高いといわれている。抗体医薬品のバイオシミラー開発における課題について考察してみる。

1) モノクローナル抗体バイオシミラーの特徴

現在まで承認されているモノクローナル抗体医薬品は種類としてはIgGのみであり、またIgGのサブタイプとしてはIgG1, IgG2, IgG4のみが開発されている。これらの抗体医薬品の中には抗腫瘍効果を増強するためにアイソトープ標識された標識抗体もある。開発中の製品としては標識抗体のバリエーションは更に大きく、またIgMモノクローナル抗体の開発も行われている。バイオシミラーの開発を考える場合に

は承認されている製品を絞って考えるべきであることから、既承認製品を前提に考察していく。

承認されている抗体の薬効は主として免疫制御医薬品と抗腫瘍抗体医薬品に分類される。それ以外にも抗ウイルス抗体や補体 C5a の中和抗体などが挙げられるが、目的とする標的分子への結合以降の作用として多様な機作が含まれると考えられている。この中には、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC)、補体依存性細胞傷害活性 (CDC)、受容体への結合を介したアポトーシスの誘導、シグナル伝達障害による増殖抑制、受容体への結合による受容体のシェディング(排出)など極めて多様な作用が複合的に機能していると考えられているが、臨床的にそれぞれの作用がどの程度臨床効果に直結しているのかについては必ずしも明確ではない。したがってモノクローナル抗体バイオシミラーの開発では、期待される作用機作ばかりでなく多面的な生物活性の比較解析が重要である。

2) バイオ後続モノクローナル抗体製造の プラットフォーム技術

モノクローナル抗体医薬品は抗原との結合部位がそれぞれの抗体ごとに特異的な構造をもつものの、共通した基本骨格をもち、物理的・化学的特性には共通点が多いことから、製造方法や特性解析などについて共通した製造技術や解析技術が適用できるとされている。特に複数の抗体医薬品の製造経験をもっている場合に、異なるモノクローナル抗体であっても、蓄積した製造経験や解析技術を新たな製品の開発に適用できると考えられている。この、モノクローナル抗体医薬品に共通して適用できる製造工程や特性解析法があるというコンセプトは、抗体医薬品のプラットフォーム技術と呼ばれている¹³⁾。

モノクローナル抗体バイオシミラーの開発においても、遺伝子コンストラクトの作製や培養法の最適化、精製法などの確立においてこのプラットフォーム技術が適用可能であろう。精製法としては多くの抗体医薬品、バルクハーベストについてプロテイン A カラムによるアフィニティー精製工程、イオン交換クロマトグラフィーや疎水性クロマトグラフィーなどの複数のカラ

ムクロマトグラフィー工程、ならびにウイルス除去のナノ濾過工程が用いられている。また、特性解析では、ペプチドマッピングや高次構造解析、生物活性測定などに関しても共通した試験法が適用可能であるばかりでなく、純度や特性データの先行バイオ医薬品との比較においてこのプラットフォーム技術が適用できる場合が多い。

3) モノクローナル抗体バイオシミラーの 安全性確保

免疫制御能をもつモノクローナル抗体医薬品では、その免疫抑制の作用が過剰になった場合に、感染症の発症¹⁴⁾や潜在している JC ウイルスや HBV の再燃による重篤な副作用^{15,16)}を引き起こす可能性があり、先行モノクローナル抗体製品の安全情報を十分考慮した臨床開発が必要となる。また、抗 CD28 抗体の TGN1412 の治験にみられたインフュージョン反応^{17,18)}のような急性の有害事象が起こりうるモノクローナル抗体医薬品もある。こういった製品の臨床試験においては慎重な投与が必要となる。

また、ハーセプチンのように一部の患者で目的としない臓器への望ましくない作用^{19,20)}を示す製品もあり、ヒト組織への反応性を評価しておくことが望ましい。特に他の製剤と併用される場合に毒性がみられる場合があることから、先行バイオ医薬品のオフターゲット効果についても審査報告書や安全性情報を十分に検討し、適切な治験デザインを実施することが必要である。

おわりに

バイオ後続品/バイオシミラー製品が EU で初めて承認されて 6 年が経つ。我が国でも、バイオシミラー開発が本格化しており、現時点では 2 製品が承認されているだけであるが、今後多くのバイオシミラーが開発されてくる可能性が高い。今後の特許の消滅状況を考えると、2010 年代の終わりには多くのモノクローナル抗体バイオシミラーが開発されてくる可能性があり、バイオ医薬品の飛躍的な増大の中で、バイオシミラーの存在感がいっそう増してくる可

能性がある。

またバイオシミラーの開発のみならず審査の
経験が蓄積されてくるに従い、科学レベルや実

際の開発状況に即したバイオ後続品の指針の改
訂も必要となってくるであろう。

文献

- 1) Moran N: Fractured European market undermines biosimilar launches. *Nat Biotechnol* **26**: 5–6, 2008.
- 2) Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues: EMEA/CHMP/BWP/49348/2005 (22 Feb. 2007).
- 3) Schneider CK, Lalinke U: Toward biosimilar monoclonal antibodies. *Nature* **26**: 985–990, 2008.
- 4) 「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(平成21年3月4日付薬食審査発第0304007号).
- 5) Reichert JM, et al: European Medicines Agency workshop on biosimilar monoclonal antibodies: July 2, 2009, London, UK. *MAbs* **1**: 394–416, 2009.
- 6) Reichert JM: Next generation and biosimilar monoclonal antibodies: essential considerations towards regulatory acceptance in Europe. February 3–4, 2011, Freiburg, Germany. *MAbs* **3**: 223–240, 2011.
- 7) Zuñiga L, Calvo B: Regulatory aspects of biosimilars in Europe. *Trends Biotechnol* **27**: 385–387, 2009.
- 8) FDA Draft Guideline: Guidance for Industry Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Protein Product, 2012.
- 9) ICH Q6B: 生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定, 2001.
- 10) Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SEBs). WHO, 2009. [http://www.biosimilars.ca/docs/BIO_THERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf]
- 11) Guidance for Sponsors: Information and submission requirements for subsequent entry biologics (SEBs), Health Canada, 2010.
- 12) Casadevall N, et al: Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* **346**: 469–475, 2002.
- 13) Draft guideline; guideline on production and quality control of monoclonal antibodies and related substances. EMEA/CHMP/BWP/157653/2007, 2007.
- 14) Sgro C: Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology* **105**: 23–29, 1995.
- 15) Westhoff TH, et al: Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy. *Blood* **102**: 1930, 2003.
- 16) [http://www.mhra.gov.uk/home/idcplg?IdcService=GET_FILE & dDocName=CON033504&RevisionSelectionMethod=LatestReleased](http://www.mhra.gov.uk/home/idcplg?IdcService=GET_FILE&dDocName=CON033504&RevisionSelectionMethod=LatestReleased)
- 17) Tuma RS: Phase I antibody risks, trial safety examined. *J Natl Cancer Inst* **98**(14): 956–968, 2006.
- 18) Stebbings R, et al: “Cytokine storm” in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to Improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol* **179**(5): 3325–3331, 2007.
- 19) Slamon DJ, et al: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* **344**: 783–792, 2001.
- 20) Perik PJ, et al: Serum HER2 levels are increased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Failure* **9**: 173–177, 2007.

第十六局方第一追補に収載された生物薬品と 関連する試験法について

独立行政法人医薬品医療機器総合機構／国立医薬品食品衛生研究所

山口照英

TERUHIDE YAMAGUCHI

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency/National Institute of Health Sciences

はじめに

第十六局方第一追補の生物薬品委員会での各条審議および参考情報について、次のような新規収載および改定が行われた。

- ①新規に顆粒球コロニー刺激因子5品目とエリスロポエチン類2品目が収載された。これらの先行製品すべてが局方に収載されたことになり、USPやEPと比較しても画期的なことである。
- ②6品目の改正が行われ、ヘパリンナトリウムおよびヘパリンカルシウムに関しては過酸化コンドロイチン硫酸の混入によるヘパリンの重篤な有害事象が多発したことを受けて緊急改正のフォローアップとしてタンパク質および核酸の純度試験の改定を行った。
- ③一般試験法〈2.62〉質量分析法が改定されたことを受け、参考情報G3のペプチドおよびタンパク質の質量分析の見直しを行った。

1. 生物薬品委員会の局方収載における各条審議のポイントと基本方針

生物薬品委員会では、タンパク質性／ペプチド性医薬と高分子多糖類医薬品の新規収載の審議および既収載品目についての改正作業を行っている。さらに、生物薬品に関連する試験法についても審議を行い、新規収載や改

正を行っている。生物薬品に関連する試験法は急速に進歩しており、適宜最新の科学技術の進歩を基盤とする試験法の収載や改正を行うことを基本方針としている。

第十六局方の第一追補が2012年10月に発出されたが、第一追補の収載に当たっては第十七局方への大改正に向けて表1に示した基本方針に従って審議がなされてきた。特に第十七局方での大改正に向けて、局方収載に当たっての基本原則である医療上汎用性のある必要性の高い医薬品であることや優先審査のなされた医薬品などとして広く使われている重要なバイオテクノロジー応用医薬品の策定・充実化を図ることを目指している。また、動物愛護の観点から3Rの原則に従って、インビボ試験法からインビトロ試験法へ変更を進めている。適切な理化学的試験法の採用を進め、生物薬品の品質を確保していくことを目指している。

この原則に基づいて、新規収載各条の審議および既収載各条の科学進歩に即応した改正を行うこととし、委員会審議により出された疑義の照会などをすばやく原案作成会社へ問い合わせる取り組みを行うことなどにより審議の迅速化を進めている。各条の整備に当たっては比活性の独立示性値としての設定や範囲のある含量規格の設定を行うこと、さらに収載した各条は開発が進められているバイオ後続品の規範となることを念頭に審議を進めている。

さらに生物薬品委員会では、生物薬品に関連する一般試験法や参考情報の設定や改正に取り組んでおり、特に科学進歩を積極的に取り込むことを目指している。生物

⑤ 第十六局方第一追補に記載された生物薬品と関連する試験法について

表1 生物薬品委員会での審議方針

- 1) 各条全体としての合理性に基づく規格及び試験方法の設定と国際調和の推進
- 2) 試験動物の使用削減の3原則, Replacement(代替), Reduction(削減), Refinement(改善) (3R)の観点からみた動物試験の低減化と代替試験法の設定
- 3) 生物薬品のさらなる安全性確保
- 4) 技術の進歩に対応した適切な理化学試験法の採用とそれを用いた生物薬品の品質確保
- 5) 不純物に関するさらなる安全性確保と科学進歩を取り入れた試験法の設定
- 6) 同種同効医薬品の収載に当たっての方針を策定するとともに、ファミリーモノグラフに対する考え方の整理
- 7) 第十七局方に向けて、先端バイオ医薬品等の新規収載品目の策定、充実化

薬品に関連する試験法については、局方を参照すれば、バイオ医薬品の品質・安全性確保に関する適切な情報が得られるようにすることを目指している。特に生物薬品に関する試験法は急速に進歩していることから、最近の科学レベルに適応した試験法の参考情報への取り入れを行い、参考情報の積極的な活用も行うこととしている。

国際調和された試験法は参考情報として収載されているが、この国際調和試験法を一般試験法へ取り込むことを目指している。

2 生物薬品の各条新規収載品目

以上のような基本原則に基づき第一追補に向けて、新規収載および改正の審議を行った。新たに収載された品目は表2に示す7品目であり、改正は6品目である。新規収載品目は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の原薬3品目、製剤2品目の合わせて5品目とエリスロポエチン原薬2品目である。G-CSFは抗がん剤治療において末梢血好中球が減少することにより感染症が発症することを防ぐために好中球の動員等に用いられる。また、エリスロポエチンはエリスロポエチンの産生器官である腎臓が腎不全により、エリスロポエチンを産生できなくなった患者に赤血球増加作用を期待して投与される。いずれも重篤な感染症の予防や重篤な貧血の治療に用いられる重要な医薬品であり、その恩恵にあずかる患者も非常に多い。

ただ、EUではフィルグラスチムが収載されているが他のG-CSFは収載されていない。USPではG-CSFは収載されていない。EPではファミリーモノグラフとしてエリスロポエチンが収載されているが、USPでは収載されていない。今回このように原体としてわが国で市販されているすべてのG-CSFが収載され、また、エリスロポエチンの先行製品がすべて局方収載されるというのは

表2 第十六局方第一追補に記載された新規生物薬品

新規収載品目
・フィルグラスチム(遺伝子組換え)
・フィルグラスチム注射液
・レノグラスチム(遺伝子組換え)
・ナルトグラスチム(遺伝子組換え)
・注射用ナルトグラスチム
・エポエチンアルファ(遺伝子組換え)
・エポエチンベータ(遺伝子組換え)
改正品目
・ヒト下垂体性腺刺激ホルモン
・バソプレシン注射液
・パルナバリン
・ヘパリンカルシウム
・ヘパリンナトリウム
・ヘパリンナトリウム注射液

画期的なことといえる。

(1) 顆粒球コロニー刺激因子

G-CSFは好中球前駆細胞に作用し、その分化や増殖させる作用を有するとともに、好中球の骨髄からの誘導を促進させる作用をもつ^{1, 2)}。また、末梢血中への造血幹細胞の動員作用を有するとされている。効能・効果は製品ごとに違いが見られるが、主にはがん化学療法による好中球減少症、先天性・特発性好中球減少症、骨髄移植時の好中球数の増加促進があげられ、さらには、造血幹細胞の末梢血中への動員やヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症の治療に支障を来す好中球減少症、骨髄異形成症候群に伴う好中球減少症があげられる。

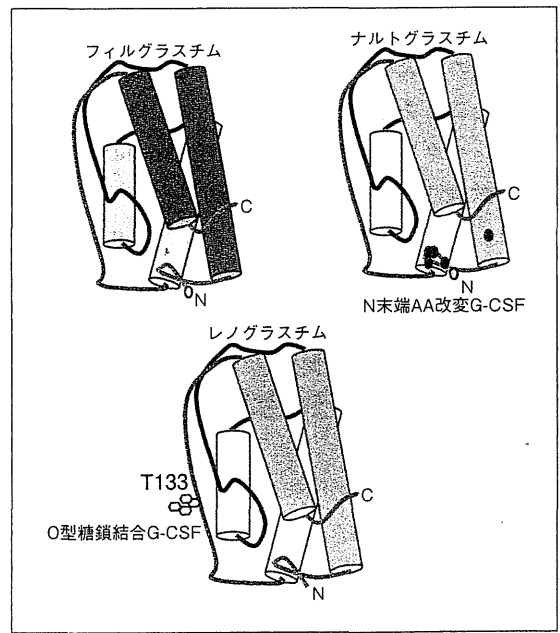


図1 新規収載されたG-CSF3品目のモデル構造

表3 新規収載したG-CSF原薬の規格試験法の比較

	フィルグラスチム	レノグラスチム	ナルトグラスチム
基原	含量と比活性	含量と比活性	含量と比活性
性状	無色澄明の液	無色澄明の液	無色澄明の液
確認試験	SDS-PAGE ペプチドマップ	液体クロマトグラフィー法 ペプチドマップ 単糖組成分析	抗原抗体反応 ペプチドマップ
pH	3.7~4.3	7.7~8.3	7.0~7.5
純度試験	オリゴマー チャージアイソマー 宿主タンパク質* DNA*	類縁物質 宿主由来タンパク質* DNA*	類縁物質(0.1%以下) 宿主タンパク質* DNA*
類縁体の組成比率			*
定量法	タンパク質含量 (SE-HPLC) 比活性	タンパク質含量 (SE-HPLC) 比活性	タンパク質含量 (UV法) 比活性

*: 別に規定するとされた試験

3品目はそれぞれ構造的な違いがあり、フィルグラスチムは*E.coli*で製造されN末端アミノ酸がMetになっている。レノグラスチムはCHO細胞で製造されるThr133にO型糖鎖が結合している天然型G-CSFである。ナルトグラスチムはN末端アミノ酸配列に5つの変異を導入した改変型G-CSFである(図1)。

G-CSFは3つの原薬と2つの製剤が収載されている。原薬の基原では、いずれの製品も含量と比活性が規定されている(表3)。確認試験では複数の試験が設定されているが、いずれもペプチドマッピングが設定されている。従来は確認試験でアミノ酸分析が設定されることもあったが、G-CSFは分子量が約20,000のタンパク質であり、確認試験としてはペプチドマッピングが採用されることが多い。後述するエポエチン類も確認試験ではペプチドマッピングが設定されている。ペプチドマッピングは適切なタンパク質分解酵素を選択することにより、分子の変化についても検出可能であり、抗体医薬品などでも確認試験として頻用されている。

純度試験では類縁物質やオリゴマー/チャージアイソマーなどの目的物質由来の類縁物質が設定されている。一方、宿主由来タンパク質や宿主DNAについては「別に規定する」とされた。これは、近年バイオ医薬品の品質管理において工程管理としての評価の有用性が指摘されるようになり、特にこのような工程由来不純物については工程が進むに従い精製度が上昇していき、場合によっては、最終製品では検出限界以下になることもある。したがって、必ずしも最終製品で評価することが適切とはいえず、むしろ工程内管理試験として設定するほうが合理的である場合もある。しかし、どのステージで品質を管理するにしても品質管理としては必須の項目であり、

最終製品での試験を適用するかどうかの判断も含めて別に規定するとした。

このような不純物についての品質は、規格試験で管理するよりも工程内管理で行うほうが合理的とする考え方が適用できるバイオ医薬品が多くなりつつある。近年、バイオテクノロジー応用医薬品の製造でタンパク質性成分を含まない効率的な培養法が多く開発されるようになり、さらに動物細胞を用いた培養でも無血清化が進んでおり、生産培養から回収されたバルクハーベストでの目的成分の純度が非常に高い製法が確立されていることも要因である。局方で工程管理について、どのように取り入れていくかについては今後の課題であるが、今回の第一追補で「別に規定」とした記載の意図は今後の議論の基礎となるであろう。

定量法はゲルろ過液体クロマトグラフィーあるいは紫外吸収スペクトル法を用いたタンパク質定量法が採用されている。いずれのG-CSF製品も臨床投与はタンパク質量で行われている。また、タンパク質量とともに生物活性が設定されている。生物活性の測定では、G-CSF依存的に増殖するマウスの細胞(NFS-60ないしは32D clone3)を用いた試験が設定されている。

製剤の定量法では、用量がタンパク質量であることから液体クロマトグラフィー法によるタンパク質量の測定が設定されている。フィルグラスチムは、製剤は液剤であるが、ナルトグラスチムは凍結乾燥製品である。

(2) エポエチンアルファとエポエチンベータ

第一追補で、国内承認されているエリスロポエチン製品2品目が収載された。エリスロポエチンのバイオ後続品がエポエチンアルファを先行バイオ医薬品として2010

⑤ 第十六局方第一追補に記載された生物薬品と関連する試験法について

年に承認されているが、一般名称が異なることから別各条となる。

エリスロポエチンは赤芽球系前駆細胞に特異的に作用し、赤血球系細胞の分化・増殖を促進する作用を持っている³⁾。用法としては、透析施行中の腎性貧血、透析導入前の腎性貧血、未熟児貧血の他、多くの効能を持っている。

エポエチンアルファもエポエチンベータも一次構造は同一であり、3つのN型結合糖鎖と1つのO型結合糖鎖を持つ糖タンパク質である。糖鎖がインビボ活性に重要な役割を果たすことが知られており、シアル酸の含量とインビボ生物活性が相関することが明らかにされている⁴⁾。さらにN結合型糖鎖はその分岐により、2本鎖、3本鎖、

4本鎖に分類されるが、分岐鎖の含量が高いほどインビボ生物活性が高いことが知られている⁵⁾。エリスロポエチン依存性に増殖する細胞を用いたインビトロ生物活性測定法が確立されているが、インビボ生物活性とは相関しないことが知られている(図2)。

したがって、エリスロポエチンの生物活性に糖鎖が重要な働きをすることから糖鎖に関する規格試験が必須となる。エポエチンアルファ・ベータとも糖鎖プロファイルおよびシアル酸含量試験が設定されている。糖組成分析も糖鎖の恒常性の確認に用いられる方法であるが、エリスロポエチンのような複雑な糖鎖を持つ医薬品では、糖鎖の恒常性を必ずしも精度よく検出する方法とはいえないであろう。

エポエチンアルファ・ベータとも臨床投与量は生物活性単位に基づいている。生物活性は正常マウスを用いてエリスロポエチンを投与することにより、末梢血中に増加してくる網状赤血球をセルカウンターを用いて測定する方法が採用されている。このインビボアッセイ法はわが国で開発された方法であり、多施設共同検定によりバリデーションがなされている。

確認試験ではG-CSF同様に複数の試験が用いられているが、いずれもペプチドマッピングが採用されている。宿主タンパク質およびDNAはG-CSFと同様の理由により「別に規定する」とされている。

(3) 改正品目

第一追補では表2にあげた6品目の改正が行われた。

2007年11月から米国において、ヘパリンナトリウムの大量投与を受けた多くの患者がアナフィラキシー様症状

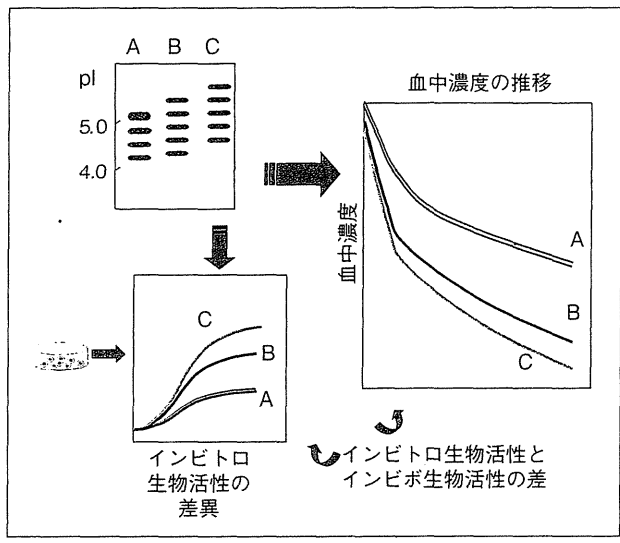


図2 EPOはインビトロとインビボ活性が相関しない

表4 ヘパリンナトリウムUSP, EPおよびJPの比較

		USP 1/10/09	EP(予定)	日局平成24年改正
確認試験	ヘパリン	NMR	NMR	
		陰イオン交換HPLC	陰イオン交換HPLC	陰イオン交換HPLC
	Na	炎色試験	抗凝固活性	
純度試験	GalN含有多糖	HPLC/PAD	未定	HPLC・FD
	その他の類縁物質			陰イオン交換HPLC
	タンパク質	ローリー法以下	280nm	TCA→ローリー法
	核酸	260nm	260nm	260nm(新規設定)
	重金属	○	○	
	OSCS	NMR	未定	NMR
		陰イオン交換HPLC		
	N	○(1.3-2.5%)	○(2.5%)	○(3%)
Ba			BaSO ₄	
活性	抗Xa/抗IIa活性	抗Xa/抗IIa活性	Xa活性*	
エンドトキシン	○	○	(発熱性物質)	
乾燥減量	○(5%)	○(8.0%)	○(10%)	

を呈して亡くなった。その原因物質として、過酸化コンドロイチン硫酸 (OSCS) が特定され、このOSCSの混入を排除するために、第十六局方改正ではNMRを用いた限度試験が設定された。さらにNMRを用いた限度試験の高感度化を行い、OSCSの検出限界を0.1%とした。また、NMRのみならず弱イオン交換HPLCによる純度試験の設定を行った。

今回の第一追補では、より高い品質のヘパリンナトリウムおよびヘパリンカルシウムの純度試験として、タンパク質および核酸試験法の改正を行った。また、NMRによる限度試験の改定を行った。

ただし、表4に示すように、現行の規定では生物活性試験としてはファクターXaの阻害活性のみが規定されている。USPのようにファクターIIa阻害活性を測定し、Xa阻害活性との比を規定する必要性が指摘されている。今後、第二追補ないしは第十七局方改正に向けた課題となっている。

3

生物薬品に関連する試験法 および参考情報の改定

一般試験法〈2.62〉質量分析法が改定されたことを受け、参考情報G3のペプチドおよびタンパク質の質量分析で用いられている用語等を全面的に見直した。

今後の一般試験法や参考情報の改定等に関しては、タンパク質のアミノ酸分析法〈2.04〉の記載事例の提示、マイコプラズマ否定試験の改定や、糖鎖分析法、表面プラズモン共鳴等の参考情報への掲載の検討が予定されている。

参考情報のマイコプラズマ試験法は細胞基材のマイコプラズマ否定試験について、細胞培養法、DNA染色法が記載されており、補助的な役割としてPCR法があげられている。一方、マイコプラズマ否定試験は細胞基材の試験のみならず、培養や精製での工程管理や細胞治療など当初想定されていなかった分野で利用されている。工程管理では次の工程への移行を迅速に判断する必要がある。また、細胞治療などでは臨床投与において迅速な判定が求められている。局方参考情報が異種分野で利用される典型的な例となっており、局方の有用性を高めるためにPCR等の核酸増幅法 (NAT) を適用できるかについて検討を行うこととしている。

糖鎖分析法は糖タンパク質の品質特性や製品の一定性の確保等に重要な試験であり、第一追補で新規掲載され

たエリスロポエチンでは糖鎖がその活性に重要であることから、糖鎖プロファイルやシアル酸含量の試験が設定されている。このような事例を考慮して、糖鎖分析法を参考情報で取り上げることを目指している。

4 今後の生物薬品の課題

抗体医薬品をはじめとして、生物薬品/バイオ医薬品の開発が急速に進展しており、2010年代の終わりには新薬の30%がバイオ医薬品になるとの予測もある。このように、新たに開発されてくるバイオ医薬品の規格試験法の規範となることも局方の役割として期待されていることであろう。一方で、局方収載品目のなかではそれほど多くの位置を占めているわけではない。また、再審査期間が終了したバイオ医薬品がすべて局方に収載されているわけではない。これは再審査期間が終了した低分子化学薬品の後発品の開発もあり、重要な医薬品が局方に収載されているといったシステムがないためと考えられる。バイオ後続品がこれに類するかというと、そこまでの開発が進んでいないのが現状であろう。しかし、今後次々とバイオ後続品の開発が進むと予想され、その規範とするためにも、バイオ医薬品の再審査期間が終了した抗体医薬品等の重要な医薬品の収載に向けた検討が必要になっていると考えられる。

バイオ医薬品に関連する科学技術の進展は急速である。USPなどでは、各条に特性解析や製法管理に関連するような試験法についても積極的にGeneral Chapterに掲載をしている。バイオ医薬品でも科学技術の進展に即応した生物薬品関連試験法の掲載が必要とされている。

■参考文献

- 1) Asano, S, Ueda, A, Okabe, N, et al. : Demonstration of granulopoietic factor (s) in the plasma of nude mice transplanted with a human lung cancer and in the tumor tissue., *Blood*, 49, 845-852(1977)
- 2) Nagata, S, Tsuchiya, M, Asano, S, et al. : The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor., *EMBO J.*, 5, 575-581(1986)
- 3) Lin, FK, Suggs, S, Lin, CH, et al. : Cloning and expression of the human erythropoietin gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7580-7584(1985)
- 4) Imai, N, Higuchi, M, Kawamura, A., et al. : Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro., *Eur. J. Biochem.*, 194, 457-462(1990)
- 5) Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, TW, et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7819-7822(1989)



バイオ医薬品の効率的製造に向けた世界動向と規制状況

Global Regulatory Aspects of Biotechnology Products and Current Topics of Manufacturing Technology

山口照英*

1. バイオ医薬品の生産技術の開発動向

1980年代に組換えヒトインスリンや組換えヒト成長ホルモンが開発され、バイオ医薬品の新しい生産技術が確立されていった。それまでのタンパク質医薬品はヒトや動物から製造するか、あるいは微生物を用いて製造される酵素類などを精製して用いられていた。生体由来タンパク質は有効な薬理作用が明らかにされていた場合でも、大量に精製することは原材料の量的な観点から治療に用いるには大きなハードルとなっていた。ところが、組換えDNA技術の確立と共に細胞培養技術なども急速に進歩し、生体微量タンパク質を大量に生産することが可能になり、バイオ医薬品の開発が急速に進んだ。表1に挙げるように既に世界の医薬品販売の多くをバイオ医薬品が占めるようになっており、従来の化学合成医薬品をしのぐ勢いで開発が進められている。2010年代の終わりには、新薬の30%がバイオ医薬品になると予想されている。特に、モノクローナル抗体医薬品やエタネルセプトなどの抗体関連医薬品（抗体医薬品等と略）の開発は目覚ましいものがあり、2010年以降のバイオ医薬品の中でも抗体医薬品等の占める割合が非常に高くなっており、さらに販売額でも非常に大きな位置を占めるようになっていく。

一方で、このようなモノクローナル抗体医薬品を中心としたバイオ医薬品の開発の進展により医療経済上の危機感が増してきており、英国保険機構は高額な薬価に見合う患者のメリットが無いとして2つのモノクローナル抗体医薬品の保険適用を拒否することを決めた（表1）。また、FDAはアバスタチンの乳がん患者への適用拡大申請に対して、その適用拡大を認めない決定をした。いくつか挙げられている理由の一つに薬価の高さに見合うほどの効果が示されていないとしている。これについてはまだ議論が続いているようだが、抗体医薬品の適用に当たってその薬価の高さが非常に重要な問題になっていることは否めない。バイオ医薬品の開発の勢いは今後も続くと考えられ、拡大を続けるバイオ医薬品の今後のあり方をどのようにしていくのかが問われている。

全く異なる視点ではあるが、我が国発のモノクローナル抗体に関する新規技術が相次いで発表されている。ひとつは抗体のFc領域のコンセンサスN型糖鎖のFucoseを除去することにより（Fucoseを結合させない糖鎖改変）、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）を増強する技術である¹⁾。この低Fucose化技術により、抗腫瘍作用がこれまでの50-100分の1の抗体量で達成されると報告されており、従来のモノクローナル抗体よりもはるかに少ない抗体により抗腫瘍効果が発揮され

*Teruhide Yamaguchi 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員