

Watanabe Y., Ibrahim M.S., Ellakany H.F., Kawashita N., Daidoji T., Takagi T., Yasunaga T., Nakaya T., Ikuta K.	Antigenic analysis of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 sublineage co-circulating in Egypt.	J. Gen. Virol.	93	2215-2226	2012
Settappamote, C., Sasaki T., Puiprom O., Limkittikul K., Pitaksajjakul P., Pipattanaboon C., Sasayama M., Leuangwutiwong P., Phumratanaprapin W., Chamnachanan S., Kusolsuk T., Jitmittraphap A., Asai A., Arias J.F., Hirai I., Kuhara M., Okuno Y., Kurosu T., Ramasoota P., Ikuta K.	Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	423	867-872	2012
Li Y.G., Siripanyaphinyo U., Tumkosit U., Noranate N., A-Nuegoonpipat A., Pan Y., Kameoka M., Takeshi K., Ikuta K., Takeda N., Anantapreecha S.	Poly(I:C), an agonist of toll-like receptor-3, inhibits replication of the Chikungunya virus in BEAS-2B cells.	Virol. J.	9	114	2012
Sakudo A., Ikuta K.	A technique for capturing broad subtypes and circulating recombinant forms of HIV-1 based on anionic polymer-coated magnetic beads.	Int. J. Mol. Med.	30	437-442	2012
Matsumoto Y., Hayashi Y., Omori H., Honda T., Horie M., Ikuta K., Fujino K., Nakamura S., Schneider U., Chase G., Yoshimori T., Schwemmler M., Tomonaga K.	Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection.	Cell Host Microbe	11	492-503	2012
Sakudo A., Kuratsune H., Kato Y.H., Ikuta K.	Visible and near-infrared spectra collected from the thumbs of patients with chronic fatigue syndrome for diagnosis.	Clin. Chim. Acta	413	1629-1632	2012
Ramadhany R., Yasugi M., Nakamura S., Daidoji T., Watanabe Y., Takahashi K., Ikuta K., Nakaya T.	Tropism of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus.	Front. Microbiol.	3	128	2012

Nagatani N., Yamanaka K., Ushijima H., Koketsu R., Sasaki T., Ikuta K., Saito M., Miyahara T., Tamiya E.	Detection of influenza virus using a lateral flow immunoassay for amplified DNA by a microfluidic RT-PCR chip.	Analyst	137	3422-3426	2012
Boonsathorn N., Kanai Y., Punjumba J., Bai G., Chittaganpitch M., Petphuwadee U., Jampangern W., Sawanpanyalert P., Ikuta K., Teerasut C.	Neutralization titers against influenza A (H3N2) and influenza B viruses among a non-vaccinated population from Thailand.	Southeastern Asian J. Trop. Med. Public Health	43	674-679	2012
Yasugi M., Nakamura S., Daidoji T., Ramadhany R., Yang C.-S., Yasunaga T., Iida T., Horii T., Ikuta K., Takahashi K., Nakaya T.	Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009-2010.	PLoS One	7	e30946	2012
Sakudo A., Suganuma Y., Sakima R., Ikuta K.	Diagnosis of HIV-1 infection by near-infrared spectroscopy: Analysis using molecular clones of various HIV-1 subtypes.	Clin. Chim. Acta	413	467-472	2012
Sakudo A., Onodera T., Shitani H., Ikuta K.	Dengue virus presence and surveillance in Okinawa.	Exp. Ther. Med.	3	15-17	2012
Hagiwara K., Ando T., Koiwa M.	The Influence of Borna Disease Viral Infection on Dairy Cow Reproduction.	J Vet Med Sci.	74(4)	419-421	2012
Kanai Y., Miyasaka S., Uyama S., Kawami S., Kato-Mori Y., Tsujikawa M., Yunoki M., Nishiyama S., Ikuta K., Hagiwara K.	Hepatitis E virus in Norway rats (<i>Rattus norvegicus</i>) capture around a pig farm	BMC Res Notes	5(1)	4	2012
Hagiwara K., Kawami S., Kato-Mori Y., Kubota-Koketsu R., Tsujikawa M., Urayama T., Yunoki M., Takahashi K., Ikuta K.	Protective Role of Human Intravenous Immunoglobulin from Influenza A Virus Infection in Mice.	The Open Hematology Journal	6	8-11	2012
Yusa S., Oliveira-Martins J. B., Sugita-Konishi Y., Kikuchi Y.	Cellular Prion Protein: From Physiology to Pathology.	Viruses	4	3109-3131	2012

研究成果の刊行物・別刷

(書籍)

～欧・米・中、日本を中心とした～

世界への薬事申請書の書き方 成功へのバイブル

第7章 バイオ医薬品の規制対応と開発指針
第1章 品質評価試験に関する規制と申請対応

原園 景¹、川崎 ナナ²

1. 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第一室 主任研究官 博士(薬学)
2. 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長 薬学博士

(株)技術情報協会
2012年12月発刊書籍 抜刷

第1章 品質評価試験に関する規制と申請対応

はじめに

バイオ医薬品の有効性・安全性をライフサイクル全般にわたり品質面から担保するためには、臨床試験で有効性及び安全性が確認された治験薬の主要ロットと同等の品質を市販開始後も継続して確保する必要がある。適正な品質を有する製品を一貫して供給するための方策を考えるにあたっては、その製品の重要品質特性を明らかにする必要がある。重要品質特性とは、要求される製品品質を保証するため、適切な限度内、範囲内、分布にあるべき特性または性質のことである¹⁾。既存の知識、特性解析、安定性試験、非臨床試験及び臨床試験などの結果を基に重要品質特性を特定し、それらを満たすように製造方法を設計し品質管理戦略を構築する。品質管理戦略には、通常、原材料の管理、工程内管理試験、工程内パラメータ設定、並びに、規格及び試験方法等が含まれる。徹底的な特性解析及び重要品質特性の特定等の品質評価は、製造方法が重要品質特性へ及ぼす影響の解明、並びに適切な規格及び試験方法設定などの品質管理戦略の構築に必須である。また、特性解析で用いた分析方法は、工程内管理試験並びに規格及び試験方法に、そのまま、もしくは改良して利用される。本章では、バイオ医薬品における品質評価試験及び品質管理試験について概説する。

1. 特性解析

原薬及び製剤について、ICH Q6B ガイドライン「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」（平成13年5月1日付医薬審発第571号厚生労働省医薬局審査管理課長通知）を参考に特性解析を実施し、構造、物理的・化学的性質、免疫化学的性質、生物学的性質、純度及び不純物を明らかにする（表1）²⁾。

表 1 特性解析の項目および主な分析法

特性解析	項目		主な分析法		
構造, 組成	アミノ酸組成		プレカラム法 (誘導体化/HPLC/UV または FL), ポストカラム法 (HPLC/誘導体化/UV または FL)		
	末端アミノ酸 配列	N 末端	エドマン分解法, LC/MS/MS		
		C 末端	アミノ酸分析法, LC/MS/MS		
	ペプチドマップ		LC/MS, LC/MS/MS		
	スルフヒドリル基		比色定量法 ¹⁾		
	ジスルフィド結合		SDS-PAGE, LC/MS		
	糖鎖	単糖	中性糖・アミノ糖	HPAEC/PAD, 誘導体化/HPLC/UV または FL	
			シアル酸	HPAEC/PAD, 誘導体化/HPLC/FL	
糖鎖プロファイル		HPAEC/PAD, 誘導体化/HPLC/FL, 誘導体化/CE/FL, 誘導体化/LC/MS または MS/MS			
部位特異的糖鎖構造及び分布		LC/MS, LC/MS/MS			
物理的 化学的 性質	分子量・分子サイズ		MS, HPLC ²⁾ , 超遠心分析法, SDE-PAGE		
	不均一性/ アイソフォーム パターン	目的物質	グリコフォーム	IEF, CE, HPLC, MS	
			意図的修飾	HPLC, CE, LC/MS, LC/MS/MS	
		分子変異体	ジスルフィド結合ミスマッチ体	LC/MS, LC/MS/MS, HPLC, SDS-PAGE	
			酸化体	LC/MS, LC/MS/MS	
	脱アミド体及びアスパラギン酸の異性体		HPLC, IEF, LC/MS, LC/MS/MS		
	分光学的性質		NMR, X線結晶構造解析法, CD, FTIR		
構造安定性		DSC			
生物学的 性質	生化学的試験		酵素活性		
	結合性試験		RIA, ELISA, SPR, FCM		
	細胞応答性試験		細胞増殖, 分化, 細胞死, タンパク質発現, レポーター遺伝子発現		
	動物試験		動物を用いたバイオアッセイ		

HPLC, 高速液体クロマトグラフィー; UV, 紫外検出; FL, 蛍光検出; LC/MS-MS, 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析; LC/MS, 液体クロマトグラフィー/質量分析; SDS-PAGE, ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動; HPAEC/PAD, 高速陰イオン交換クロマトグラフィー/パルスアンペロメトリー検出; CE, キャピラリー電気泳動; IEF, 等電点電気泳動; NMR, 核磁気共鳴; CD, 円偏光二色性測定; FTIR, フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定; DSC, 示差走査カロリメトリー; RIA, ラジオイムノアッセイ; ELISA, エンザイムノアッセイ; SPR, 表面プラズモン共鳴; FCM, フローサイトメトリー
¹⁾ エルマン反応 ²⁾ 主としてサイズ排除クロマトグラフィー

1.1 構造, 物理的・化学的性質

(1) アミノ酸組成³⁾

アミノ酸組成が目的物質をコードする遺伝子配列から推定されるアミノ酸組成と一致することを確認するために行われる。目的物質がペプチドや分子量の大きくないタンパク質の場合は、有用な構造情報が得られる。定量的なアミノ酸分析のデータは、目的物質の定量にも利用される。

(2) 末端アミノ酸配列分析

N 末端及び C 末端のアミノ酸配列を明らかにするために行われる。不均一性に関する情報が得られる場合もある。通常、N 末端アミノ酸配列分析にはエドマン分解法やペプチドマッピングが用いられる。C 末端アミノ酸配列分析には、カルボキシペプチダーゼで順次アミノ酸を遊離させて分析する方法、C 末端アミノ酸をアルキルチオヒダントイン誘導体として順次遊離させて分析する方法、H₂O¹⁸ 中で酵素消化することにより C 末端を含むペプチドを LC/MS により特定する方法などがある。

(3) ペプチドマッピング³⁾

ペプチドマッピングは、主に目的物質のアミノ酸配列が遺伝子配列から期待されるアミノ酸配列に一致することを確認するために行われる。ペプチドマッピングは、タンパク質消化酵素などによるタンパク質の(特異的な)断片化、HPLC などによる断片化ペプチドの分離・検出及びデータ解析で構成される。最近では、ペプチドの分離とペプチドの同定がオンラインでできる LC/MS を用いたペプチドマップが一般的である。ピークは、測定された質量を酵素の特異性から予想されるペプチドの質量と照合することにより、更には、MS/MS で得られたフラグメントパターンをペプ

チドの予想フラグメントパターンと照合することにより帰属する。

(4) スルフヒドリル基及びジスルフィド結合

システイン残基が存在する場合は、スルフヒドリル基とジスルフィド結合の結合位置を可能な範囲で決定する。スルフヒドリル基は、比色定量法（エルマン反応）などにより定量することができる。ジスルフィド結合の有無は、還元及び非還元試料の SDS-PAGE により確認する。ジスルフィド結合位置は、還元及び非還元試料のペプチドマップの比較により同定する。

(5) 糖鎖

単糖組成分析は、N-及びO-結合型糖鎖の存在、タンパク質あたりの糖鎖結合量、結合糖鎖の特徴を明らかにするためにされる。中性糖（マンノース、ガラクトース及びフコース）及びアミノ糖（N-アセチルグルコサミン及びN-アセチルガラクトサミン）、シアル酸（N-アセチルノイラミン酸、及びN-グリコリルノイラミン酸）などが分析対象となる。体内動態への影響及び非ヒト型糖鎖混在の可能性の点から、シアル酸の定量が重要となることがある。

目的タンパク質にN-結合型糖鎖のコンセンサス配列（Asn-Xaa-Ser/Thr；XaaはPro以外のアミノ酸残基）がある場合には、N-結合型糖鎖が結合する可能性がある。ペプチド-N^d-(N-アセチル-β-グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼなどで遊離した糖鎖をそのまま、又は誘導体化した後、HPLC、キャピラリー電気泳動（CE）及びMSなどにより分析する。糖鎖構造の推定は、MSによる質量情報、エキソグリコシダーゼ感受性、HPLCによる既知の糖鎖との保持時間の比較、MS/MSによるフラグメント情報などによって行う。

O-結合型糖鎖の有無をアミノ酸配列から推測することは難しい。ペプチドマッピングにより、もしくはβ脱離やヒドラジン分解によりO-結合型糖鎖を遊離させたのち分析する。

結合部位ごとの糖鎖構造は、糖ペプチドを分析することで推定される。ペプチドマッピングにおいて、LC/MS及びLC/MS/MSを用いて糖ペプチドを直接分析するか、HPLCで糖ペプチドを分取し、MS及びMS/MSにより、または糖鎖を切り出して結合糖鎖の構造を明らかにする。目的のタンパク質が多くの糖鎖結合部位を含む場合には、全ての糖鎖結合部位の糖ペプチドを検出することは難しいが、可能な範囲にて解析を行う。

(6) 意図的修飾

ポリエチレングリコール（PEG）などの高分子、放射性同位元素を配位させるためのキレート化合物及び薬物などの低分子化合物を結合させたタンパク質においては、修飾分子の結合数と結合位置、さらに、修飾により生じた分子種の不均一性を明らかにする。修飾分子及び修飾方法の特徴に応じて解析方法を選択する。PEG化タンパク質の場合、結合数はサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）にて、修飾分子が特徴的なUVスペクトルを示す場合には、吸光度測定法により、また、抗薬物抗体が入手可能な場合はELISAにより、おおよその結合数を求められる。また、結合部位については、ペプチドマッピングにて解析を行う。

(7) 分子量・分子サイズ

分子量・分子サイズの測定には、MS、SEC、超遠心分析法、動的光散乱検出法、フィールドフローフラクショネーション（FFF）及びSDS-PAGEなどが利用される。分子量については、MSを用いて質量を直接測定する例が増えており、質量の異なる分子変異体やグリコフォームを識別することができる場合がある。凝集体の測定にはSEC及び超遠心分析法が、分解物などの測定にはSDS-PAGEが利用されることが多い。

(8) 不均一性/アイソフォームパターン

分子内に翻訳後修飾等が含まれる場合、修飾等の差異による不均一な分子の集合体として製造されることが多い。これらのうち、予期した構造、しかるべき翻訳後修飾を持つタンパク質は目的物質と呼ばれる。また、製造過程で、脱アミド化、酸化、凝集化及び断片化などの分子変異体が生じることもある。分子変異体の中で、生物活性を有し、安全性及び有効性に影響を及ぼさないものは目的物質関連物質、また、生物活性、有効性及び安全性の観点から目的物質に匹敵する特性を持たないものは目的物質由来不純物と呼ばれる。存在する分子種の構造及び生物活性を可能な範囲で明らかにすること、また有効性及び安全性との関係を考察し、目的物質、目的物質関連物質、及び目的物質由来不純物を分類すること、さらにそれら分子変異体の分布を明らかにすることが重要である。

(9) 分光学的性質及び構造安定性（高次構造）

目的物質の高次構造を、核磁気共鳴（NMR）、X線結晶構造解析、円偏光二色性及びフーリエ変換赤外吸収スペクトルなどにより必要に応じて検討する。

1.2 生物学的性質

(1) 生化学的試験

目的物質が酵素の場合は、反応により発光あるいは蛍光を呈する合成基質等を利用して酵素活性を測定することができる。比活性の測定や速度論的解析を行う。

(2) 結合性試験

受容体などの標的分子との結合が作用機構に含まれるホルモン、サイトカイン、抗体などでは、標的分子との結合性を評価する。放射性同位体標識リガンドを用いる方法、ELISA、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリーなどが用いられる。

(3) 細胞応答性試験

目的物質が受容体を介して作用するタンパク質の場合は、細胞応答を指標に生物活性を評価する。目的物質が中和活性を持つ抗体である場合は、標的分子を介して惹起される細胞応答の抑制を指標とした評価を行う。細胞応答の例には、細胞の増殖、分化、細胞死、細胞内情報伝達物質の産生、特異的タンパク質の発現、生理活性物質の分泌など多岐にわたっている。また、受容体遺伝子やレポーター遺伝子を導入した細胞を構築して、生物活性測定に用いることもできる。

(4) 動物試験

ホルモン類では、動物を用いるバイオアッセイが実施されることがあった。しかし、最近はこの試験方法に置き換えられている例が多い。

1.3 純度及び不純物

(1) 目的物質由来不純物の分析と評価

目的物質の分子変化体について、目的物質関連物質と目的物質由来不純物のどちらに分類されるかは、分子変化体ごとに生物活性、安全性、有効性の観点から検討を行い判断する。目的物質由来不純物と分類される可能性のある主な分子変化体は、ジスルフィド結合ミスマッチ体、メチオニン酸化体、アスパラギンの脱アミド化体、アスパラギン酸の異性化体、切断体、その他電荷の異なる物質などがある。分子変化体を評価する方法として、分子サイズの違いにより分離するSEC、各分子種の質量を求めるMS、電荷の違いにより分離するイオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動、キャピラリー電気泳動などが、変化が起きた位置を特定するにはペプチドマッピングが利用される。凝集体は免疫原性の原因となる可能性が懸念されるため、目的物質由来不純物と取り扱われる。SEC、超遠心分離法、FFF、SDS-PAGE、動的光散乱などが凝集体測定法として利用される。

(2) 製造工程由来不純物の分析と評価

製造工程由来不純物は、細胞基材に由来するもの、細胞培養液に由来するもの、細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するものの3つに分類される（表2）。原薬や製剤中に残存あるいは混入する可能性がある不純物を考え、測定項目を決定する。これを基に、原材料の評価、工程中間体や原薬あるいは製剤中の不純物の評価、及び精製工程の不純物クリアランス能の評価を実施する。

残存する不純物が安全性確保の観点から許容できるレベルであることについては、非臨床・臨床試験結果から評価する。臨床試験開始前や初期臨床試験の段階では、既承認製品での経験や文献・ガイドラインの情報等の既存の知識も活用して残存許容量を考える。

表2 製造工程由来不純物の例

由来	不純物の例
細胞基材	宿主細胞由来タンパク質 核酸 (例: 宿主ゲノム由来, ベクター由来, 総 DNA)
細胞培養液	培地成分 添加物 (例: インスリン, トランスフェリン, メトトレキサート) 血清由来成分 (例: アルブミン) 抗生物質 (例: テトラサイクリン, ゲンタマイシン) 細胞からの分泌物
抽出・分離・加工・精製工程	酵素 化学的・生化学的試薬 (例: 臭化シアン, グアニジン, 酸化剤, 還元剤) 無機塩 (例: 重金属, ヒ素, 非金属イオン) 溶媒 クロマトグラフ用担体 アフィニティークロマトグラフ用担体のリガンド (例: モノクローナル抗体, プロテイン A) その他の漏出物

2. 製造工程開発・管理

要求される品質を満たす製品を恒常的に作り出すことのできる製造工程管理方法を確立する。製造工程/パラメータが品質特性に与える影響を理解すること及び適切に管理できる試験法を設定することが重要である。

(1) 原材料の管理

製造工程で用いられる全ての原材料に関して規格を設定して管理する。特にセル・バンクの管理は重要である⁴⁾。血清や酵素等、生物由来原料を用いる場合は、生物由来原料基準に適合するものを用いる⁵⁾。

(2) 工程パラメータの管理

培養工程のパラメータは目的物質の発現量や特性に影響する可能性がある。また、精製工程のパラメータは目的物質の不均一性プロファイルや不純物除去に影響することがある。そこで、工程パラメータの許容範囲を適切に設定し管理することが必要である。

(3) 工程内管理試験

工程内管理試験を実施することにより、工程が適切に稼働していることを確認することができる。製造工程由来不純物含量などは工程内での管理が適切な場合もある。重要品質特性に影響を与える工程は重要工程とし、必要に応じて工程内管理試験を設定する。また、最終製品の品質への影響が大きい中間体は重要中間体とし、工程管理試験を設定して品質管理を行うことが有用な場合もある。規格及び試験方法における試験と同様、バリデーションが適切に実施されている必要がある。

(4) プロセス・バリデーション/プロセス評価

設定パラメータ内で稼働する工程が、規格及び品質特性に適合した中間体・原薬を製造するために効果的かつ再現性良く機能しているかどうかを確認するために実施する⁶⁾。

(5) 製法変更

バイオ医薬品の開発過程において、原材料や工程パラメータの変更、製造スケールの拡大、工程の改良など製法の変更が行われる。その場合は、ICH Q5E ガイドラインに従って、製法変更前後での同等性/同質性の評価が必要である⁷⁾。

3. 規格及び試験方法

規格及び試験方法は、試験項目、分析方法及び規格値/判定基準からなる²⁾。試験項目は、製造工程及び工程内管理試験と合わせて、重要品質特性がその限度・範囲・分布内に収まることが担保されるように選択する。重要品質特性の範囲や分布、並びに医薬品の安定性等を明らかにすることにより、適切な規格及び試験方法を設定することが可能となる。

3.1 規格及び試験法の項目の例

(1) 確認試験

確認試験は、有効成分などをその特性に基づいて確認する試験である。類似した構造を持つ物質と識別できるような特異性の高い方法が望ましい。ヘプチドマッピング、質量分析、動物や細胞を用いた試験、結合性や細胞応答性を指標とした試験、ウェスタンブロット法及びELISAなどが利用される。

(2) 示性値

示性値を設定する特性として、等電点、分子量・分子サイズ、分子吸光係数、アミノ酸組成、比活性、結合性、アイソフォームの分布、末端のアミノ酸配列、糖含量、及び糖鎖プロファイルなどが挙げられる。確認試験、純度試験として設定されることもある。

(3) 純度及び不純物試験

純度試験は、目的物質の純度、もしくは混在物の種類及びその量を規定する試験である（ウイルス等を除く）。生物薬品は保存中に変化しやすいことを考慮し、分解物や凝集体等の評価が可能な試験法を設定する必要がある。生物薬品においては、純度を決定することは容易ではなく、得られる純度は試験方法に依存したものになるので、一般的に複数の方法により評価する。不純物に関する規格値は、不純物ごとに個別に、もしくは不純物の総量で設定される。

(4) 定量法

定量法では、有効成分の含量を物質質量や力価として適切な方法を用いて測定する。定量法が有効成分並びにその分解物及び変化体などに対する特異性が十分でない場合は、適切な純度試験と合わせて、規格全体として有効成分含量を測定できるものとなるよう考慮する。力価とは、生物活性を定量的に表す尺度のことであり、適切な標準物質／標準品を基に検定した活性の単位で表わされることが多い。各々の医薬品において適切な試験法を構築する。

(5) 標準品及び標準物質

標準品あるいは標準物質は、定量、確認試験又は純度試験において基準として用いるために調製された物質であり、目的の用途に適した品質を有している必要がある。「標準品」が存在しない場合は、代表的な生産ロットから調製し、適切な特性解析を行ったものを調製し、「自家標準物質」を確立する。

3.2 規格及び試験方法の妥当性

(1) 分析法バリデーション^{3,3,9)}

医薬品の試験に用いる分析法について、分析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確率が許容できる程度であることをバリデーションにより立証する。

(2) システム適合性試験³⁾

試験法を適用する際に、分析システムが全体として適切な状態にあることを確認するための方法及び適合要件を試験方法の中に規定する必要がある。設定すべきシステム適合性の項目は、試験の目的と用いられる分析法のタイプによって異なる。適切なシステム適合性試験用溶液を設定し、簡便に実施できる試験とする。

(3) 判定基準

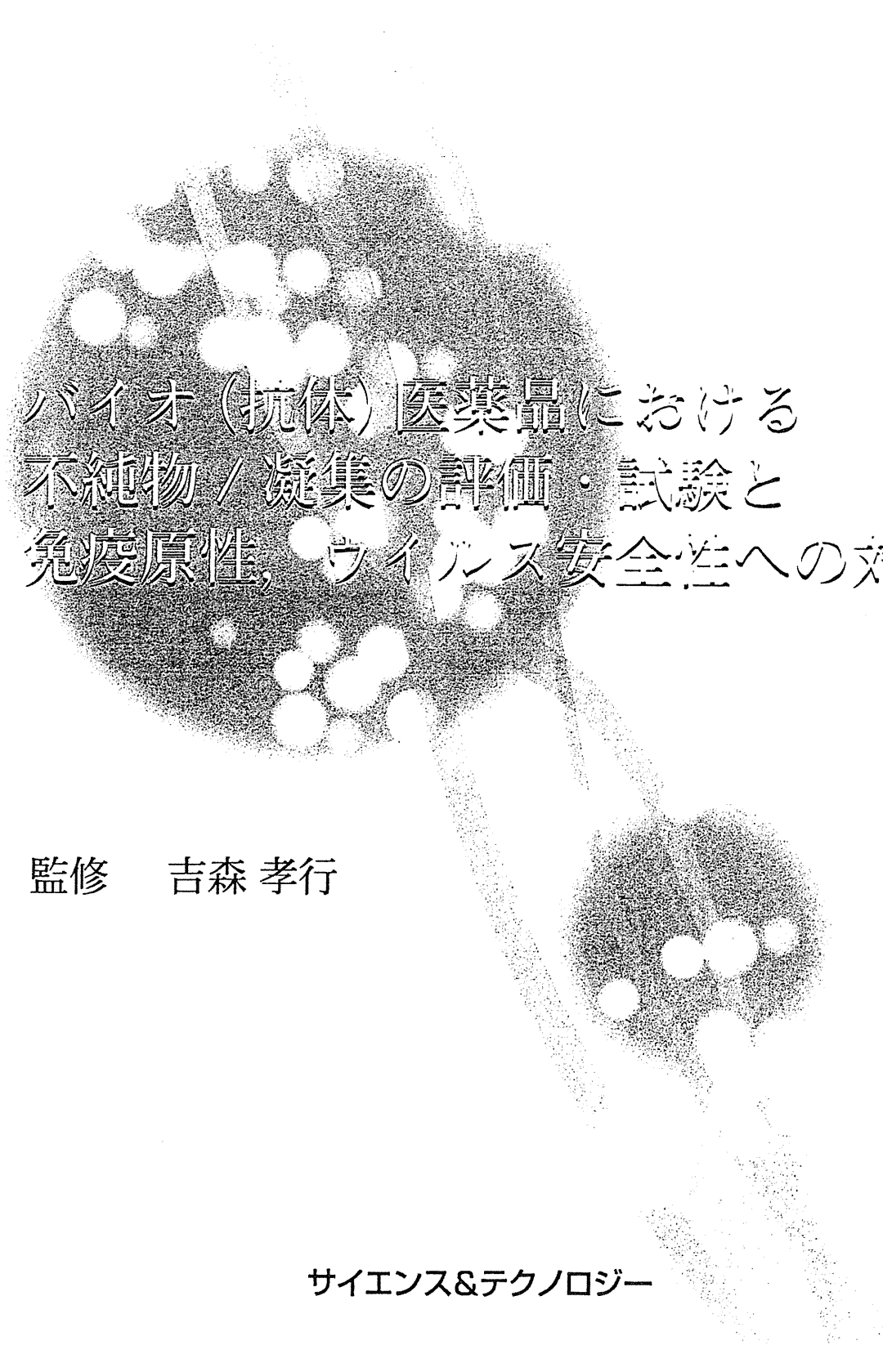
判定基準は、開発段階における関連するデータ、非臨床及び臨床試験に用いられた原薬及び製剤のロットの試験データ、安定性試験の結果などに基づいて立証する必要がある。分析及びロット間のばらつきについて、妥当な範囲を考察する。

文 献

- 1) 平成22年6月28日、医薬審発第0628号第1号、製剤開発に関するガイドラインの改定について（ICH Q8R2）
- 2) 平成13年5月1日、医薬審発第571号、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について（ICH Q6B ガイドライン）
- 3) 厚生労働省、第十六改正日本薬局方
- 4) 平成12年7月14日、医薬審第873号、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）製造

用細胞基剤の由来，調製及び特性解析について（ICH Q5D ガイドライン）

- 5) 平成 15 年 5 月 20 日，厚生労働省告示，第 210 号，生物由来原料基準
- 6) 平成 13 年 11 月 2 日，医薬発第 1200 号，Q7A，原薬 GMP のガイドライン
- 7) 平成 17 年 4 月 26 日，薬食審査発第 0426001 号，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）の製造工程の変更にもなう同等性／同質性評価について（ICH Q5E ガイドライン）
- 8) 平成 7 年 7 月 20 日，薬審第 755 号，分析法バリデーションに関するテキスト（実施項目）について（ICH Q2A ガイドライン）
- 9) 平成 9 年 10 月 28 日，医薬審第 338 号，分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）について（ICH Q2B ガイドライン）

A large, circular, grayscale electron micrograph showing numerous small, bright, spherical particles of varying sizes, some appearing to be clustered or aggregated. The background is dark and grainy, typical of a micrograph.

バイオ（抗体）医薬品における
不純物／凝集の評価・試験と
免疫原性，ウイルス安全性への対応

監修 吉森 孝行

サイエンス&テクノロジー

**バイオ(抗体) 医薬品における
不純物 / 凝集の評価・試験と
免疫原性, ウイルス安全性への対応**

監修 吉森 孝行

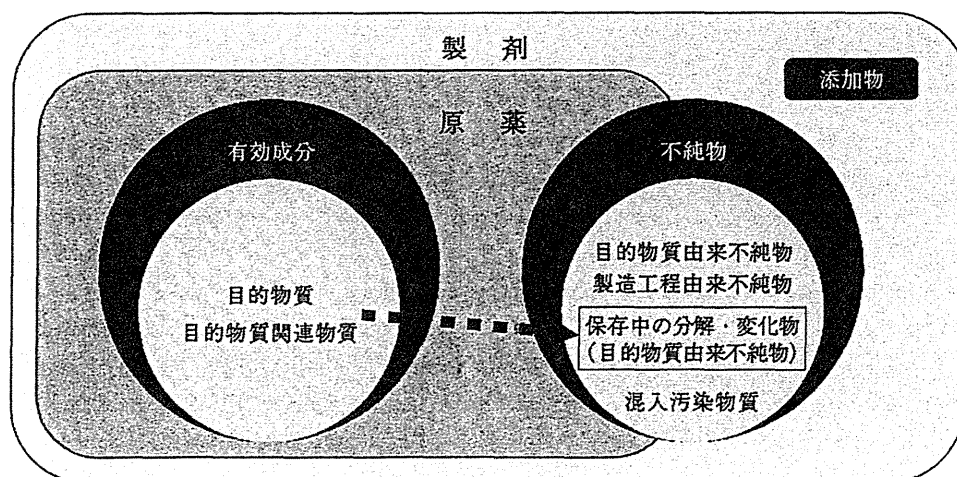
サイエンス&テクノロジー

第6章 液体クロマトグラフィー/質量分析によるバイオ医薬品由来不純物の解析

国立医薬品食品衛生研究所 橋井 則貴 川崎 ナナ

はじめに

バイオ医薬品は、構造が複雑かつ多様な高分子量の分子からなる不均一な集合体であり、有効成分(目的物質)、目的物質の分子変化体で、目的物質に匹敵する生物活性及び有効性を有する成分(目的物質関連物質)、目的物質の分子変化体で、生物活性及び有効性の点で目的物質に匹敵する特性を持たない成分(目的物質由来不純物)、製造工程に由来する不純物(製造工程由来不純物)、混入汚染物質、及び添加物から構成される(図1)¹⁾。この中でバイオ医薬品由来不純物に該当するものは、目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物である。これらの成分の分布及び構造を解析するために、近年最も利用されることが多い手法は、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)である。本稿では、LC/MSを用いて分子変化体及び製造工程由来不純物を解析した例をいくつか紹介し、LC/MSを用いて不純物を解析するときの留意点等を概説する。



目的物質関連物質…目的物質の分子変化体のうち目的物質に匹敵する特性を持つもの
目的物質由来不純物…目的物質の分子変化体のうち目的物質に匹敵する特性を持たないもの
製造工程由来不純物…細胞基材、細胞培養液、抽出・分離・加工・精製工程に由来する不純物
混入汚染物質…製造工程に本来存在しないはずの外来性物質

図1 バイオ医薬品の構成成分¹⁾

1. 不純物解析とLC/MS

MSは、分子をイオン化させ、質量(m)を電荷数(z)で割った m/z に応じてイオンを分離し、検出する方法であり、分子の質量を求めることができる。タンデム質量分析(MS/MS)は、一段階目の分析部で選択した前駆イオンを解離させ、生じたプロダクトイオンを二段階目の分析部で分離し、検出する手法であり、観測したプロダクトイオンの m/z により、構造の確認や推定を行うことができる。タンパク質のMS/MSにおいては、主にb-及びy-イオンが、並びに糖鎖のMS/MSにおいては、主にB-及びY-イオンが検出されるので、それらを利用して、それぞれアミノ酸配列、並びに単糖配列をある程度推定することができる(図2)²⁻⁴⁾。ペプチド及びタンパク質医薬品においてMS及びMS/MSは、分子変化体の有無の確認、及び構造解析などに利用されることが多い。

LC/MSは、高速液体クロマトグラフィーにより分離した成分を、直接MS装置に導入するシステムである。バイオ医薬品不純物の解析における利点は、LC部分で成分の分布を明らかにし、MS部分で各成分の特性を明らかにできること、及びLC部分で主成分と微量成分を分離することにより、目的物質などの主要成分の影響を排除して、微量成分である不純物の質量測定ができることである⁵⁾。

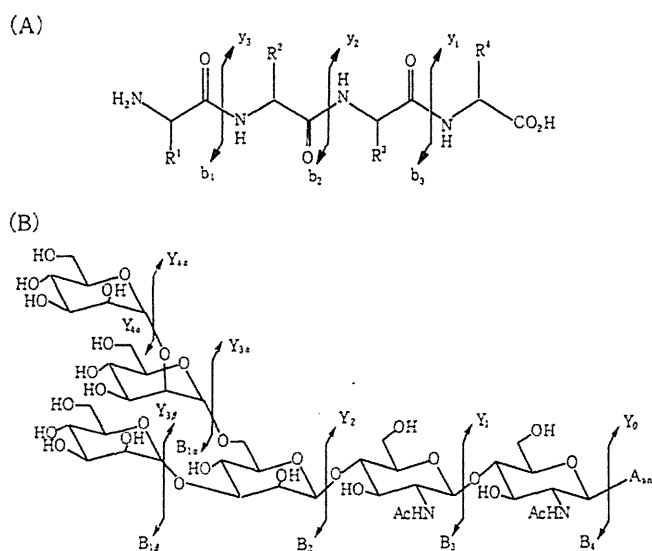


図2 MS/MSによるペプチド(A)及び糖鎖(B)の主な開裂様式⁴⁾

2. LC/MSによるバイオ医薬品の分子変化体の解析

バイオ医薬品の分子変化体として、N末端及びC末端の変化、脱アミド体、酸化体、ジスルフィド結合ミスマッチ体、切断体、凝集体、及び糖化体などが生成する可能性がある。これらの分子変化体について、分布を明らかにすること、構造を明らかにすること、生物活性及び有効性の点で目的物質に匹敵する特性があるか否かを明らかにすること、また、安全性に影響する可能性を検討することが重要である。分子変化体ではないが、糖鎖が有効性・安全性に大きく影響する糖タンパク質で、糖鎖非付加体が含まれるとき、及び抗体薬物複合体で、薬物非結合抗体が含まれているとき、それらが目的物質関連物質か不純物かを明らかにしておく必要がある。LC/MSを用いて分子変化体等の構造を解析した例を以下に示す。

2.1 N末端及びC末端の変化

N末端の配列はエドマン分解やLC/MSによって確認する。N末端の分子変化体として、グルタミン酸もしくはグルタミン残基のピログルタミンへの変換、及びプロセシングなどがある。低分子量のペプチドの場合は、LC/MSにより、また、高分子量のタンパク質の場合は、適切な酵素を用いてペプチド断片とし、LC/MSを用いたペプチドマッピングを行うことにより、それぞれ質量17もしくは18 Daの減少、及びN末端アミノ酸残基に相当する質量の減少として観測される。シグナルペプチドが予定外の位置で切断された場合もペプチドマッピングによりN末端を含むペプチドを解析することにより、切断位置を明らかにすることができる⁶⁾。

C末端配列は、LC/MSを用いたペプチドマッピングにより解析する。また、カルボキシペプチダーゼの反応条件を調節することによって鎖長の異なるC末端ペプチドを調製し、MSで得られたペプチド間の質量差からC末端ペプチドを同定した例も報告されている(ラダーシーケンス法)^{7,8)}。C末端において見られる主な分子変化は、プロセシングである。抗体医薬品ではH鎖のリシン残基のほとんどが脱離されていることが知られているが、C末端リシン残基欠失体は、目的物質として扱われることが多いようである。図3は、あるモノクローナル抗体医薬品をトリプシンで消化してペプチド断片とし、LC/MSにより得られたペプチドマップである。H鎖C末端を含む2種類のペプチドが、異なる位置に溶出されている。これらは、衝突誘起解離(CID)を用いたMS/MSにより、生じたb-及びy-イオンのピークを帰属することにより、リシン残基が保持されているペプチド1、及び脱離されたペプチド2と同定された。リソソーム酵素医薬品もC末端のプロセシングが生じやすいタンパク質であり、1個から複数個のC末端側アミノ酸残基が欠失しているケースが知られている。このケースでは、MSを用いて、完全長C末端ペプチドに対する断片化ペプチドの割合が求められている。

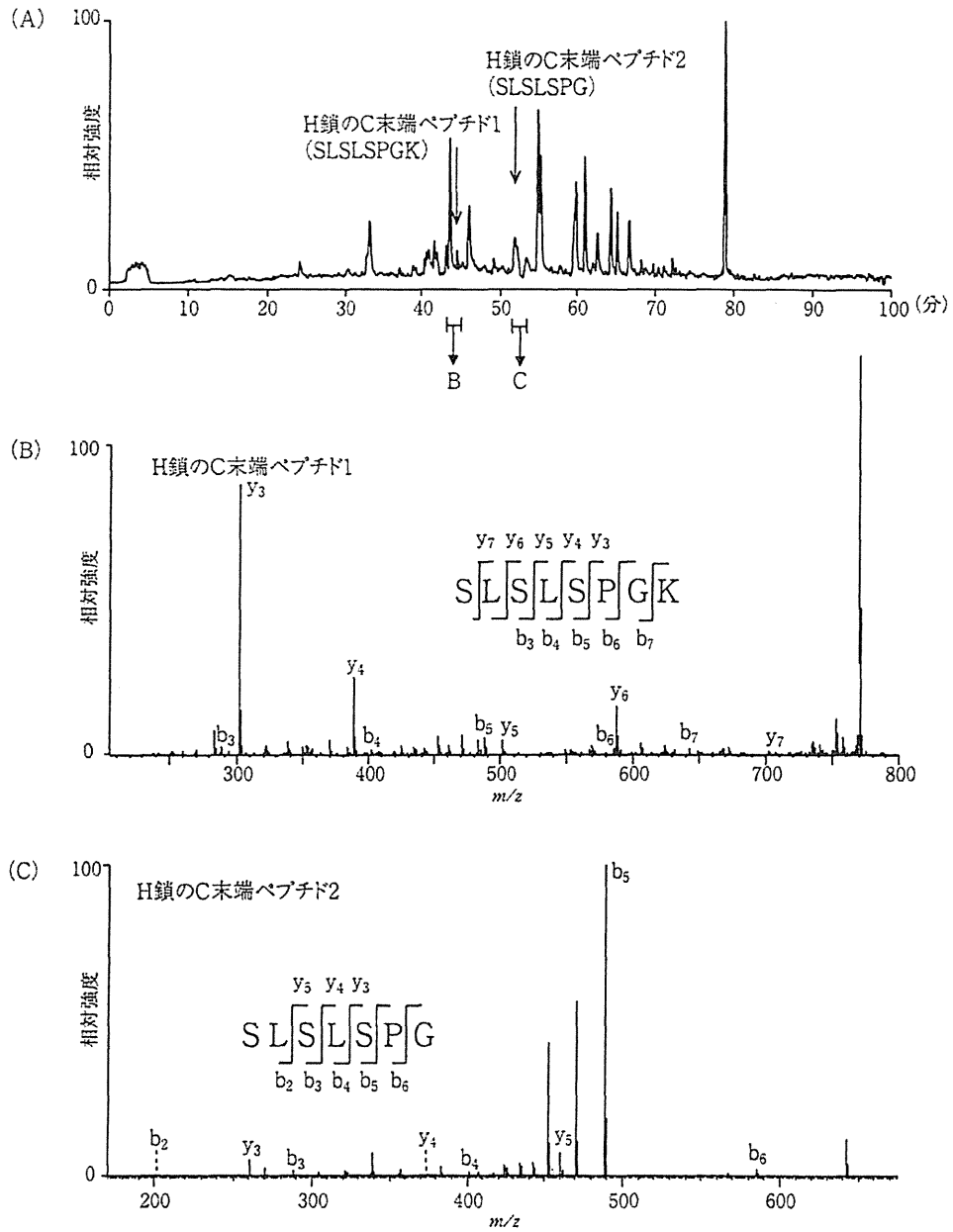


図3 MS/MSによるモノクローナル抗体医薬品のH鎖C末端ペプチドの解析⁴⁾
 (A) モノクローナル抗体医薬品のトリプシン消化物のLC/MSにより得られたトータルイオンカレントクロマトグラム(TIC), (B) リシン残基が保持されたH鎖C末端ペプチドのプロダクトイオンスペクトル, (C) リシン残基が欠失したH鎖C末端ペプチドのプロダクトイオンスペクトル

2.2 アスパラギン残基の脱アミド化, 及びアスパラギン酸残基の異性化

アスパラギン残基の脱アミド化は, タンパク質医薬品に共通して生じる非酵素的な翻訳後修飾であり, 立体的に露出しているアスパラギン残基の隣がグリシン残基(NG配列)のときに起こりやすい⁹⁾。脱アミド化反応は, L-アスパラギンの α アミド基の側鎖カルボニル基への吸核反応により開始される(図4)¹⁰⁾。この反応によりスクシンイミド中間体が形成され, その α あるいは β カルボニル基が加水分解されてL-アスパラギン酸あるいはL-イソアスパラギン酸となる(脱アミド化)。一方, アスパラギン酸がスクシンイミド中間体となった後, 不斉中心が異性化し, α または β カルボニル基が加水分解されるとそれぞれD-アスパラギン酸またはD-イソアスパラギン酸となる(異性化)。ある種の抗体医薬品では, 超可変領域(CDR)の脱アミド化及び異性化により生物活性が低下することが報告されている^{11,12)}。

アスパラギンの脱アミド化及びイソアスパラギン酸への異性化の有無は, LC/MS を用いたペプチドマッピングにより確認することができる。脱アミド化は, クロマトグラム上の当該ピークの保持時間の変化, 及びマススペクトル上の質量1 Daの変化として表れる。アスパラギン酸の異性化は, クロマトグラム上の保持時間の変化として確認するか, イソアスパラギン酸を消化できないペプチジル-Aspメタロエンドペプチダーゼ(ASPN)を用いたとき, アスパラギン酸残基のアミノ基側で切断されないペプチドが検出されることにより確認できる。

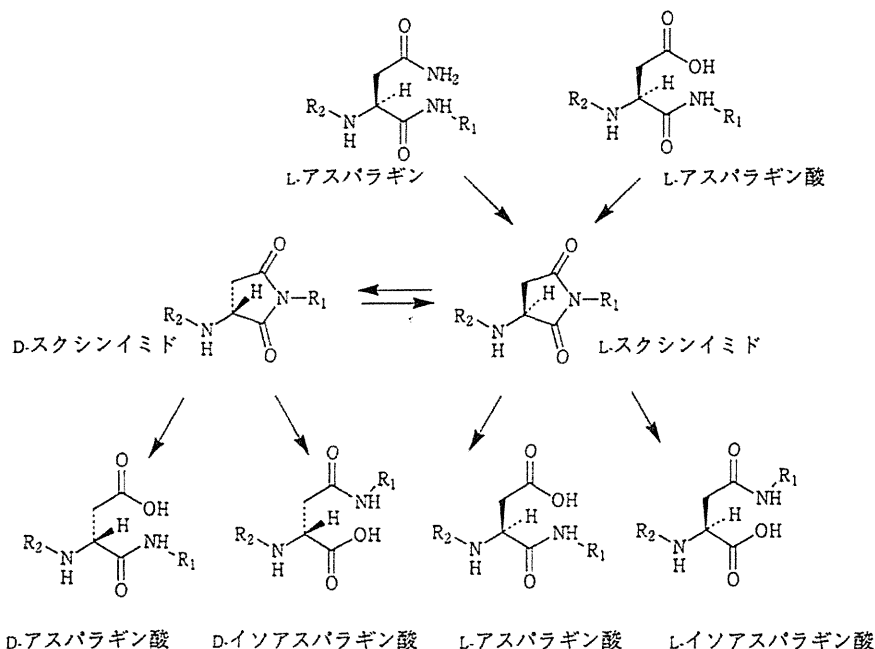
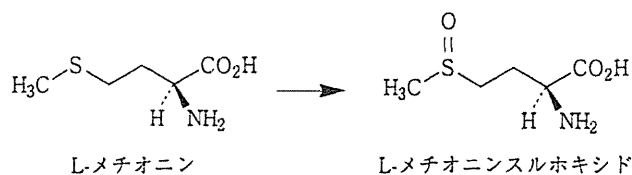


図4 アスパラギン残基の脱アミド化, 及びアスパラギン酸残基の異性化¹⁰⁾

2.3 酸化

酸化は、培養、精製、製剤化工程、及び保存中など様々なステップで生じる。酸化されやすいアミノ酸残基はメチオニン、トリプトファン、ヒスチジン及びチロシンであり、中でもメチオニン残基が最も酸化されやすい(図5)¹⁰⁾。メチオニン酸化体は、生物活性及び安定性の低下、血中半減期の減少、さらには免疫原性にも関係することが示唆されている¹³⁻¹⁶⁾。リガンド分子や受容体との結合領域にメチオニン残基がある場合、酸化体形成により結合活性が低下する可能性があるため、酸化体の解析は特に重要である。

酸化体の有無は、LC/MS によって確認することができる。酸化体が生成されると、異なる保持時間に、質量16 Da増加したピークが表れる。図6は、LC/MSを用いてバソプレシンの酸化体の存在を確認した例であり、質量16 Da増加したピークが複数検出されていることがわかる。分子量が大きいタンパク質の場合は、分解能の高い質量分析装置を用いてインタクトのまま質量測定を行い、デコンボリューション処理することにより、マスペクトル上に酸化に由来する16 Da間隔のピークを確認することができる¹⁷⁾。メチオニン酸化の位置は、LC/MS及びMS/MSを用いたペプチドマッピングにより確認できることがある。酸化されやすいアミノ酸残基の位置については、H₂O₂や*tert*-ブチルヒドロペルオキシド等の酸化剤、あるいは紫外線照射等により酸化処理した後、LC/MSを用いたペプチドマッピングを行うことにより予測した例が報告されている^{18,19)}。

図5 メチオニン残基の酸化¹⁰⁾

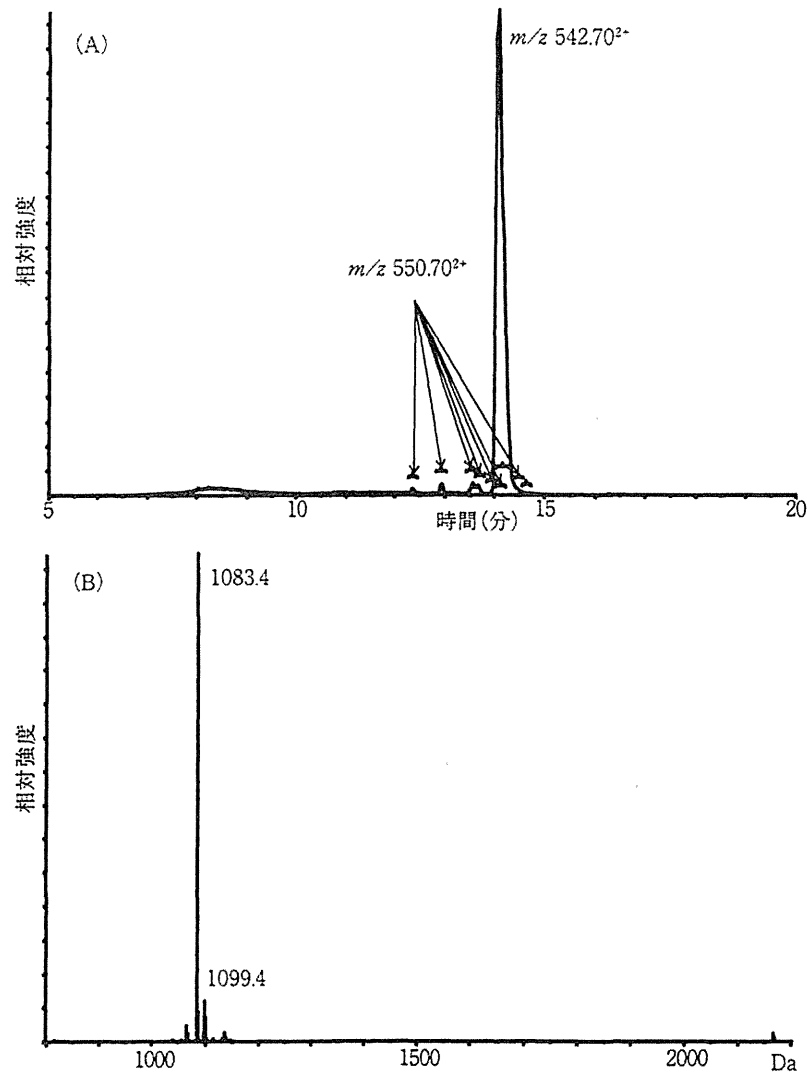


図6 LC/MSによるインスリンの酸化体の解析⁶⁴⁾
 (A) LC/MSにより得られたTIC, (B) 11~18分付近のデコンボリューション質量スペクトル。
 インスリン(1083.4 Da) 及び酸化体(1099.4 Da) が観測されている

2.4 ジスルフィド結合ミスマッチ

タンパク質の生物活性や体内動態等は、ジスルフィド結合のミスマッチにより変化することがあるので、ジスルフィド結合の位置を同定し、ミスマッチ体の有無とその結合位置を明らかにすることが重要である²⁰⁾。ジスルフィド結合同定法として最も一般的な手法は、LC/MSを用いたペプチドマッピングである。非還元及び還元した試料のペプチドマップを比較することにより、ジスルフィド結合に関するシステイン残基を含むペプチドを特定する。さらに、