

GMP 準拠国産ウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の 実施とその支援体制の構築

国立成育医療研究センター研究所
小野寺 雅史

研究要旨 小児難治性疾患の慢性肉芽腫症（CGD）に対する造血幹細胞遺伝子治療の実施に向け、本年度は実施施設である当研究センターの体制整備や次期の遺伝子治療で用いられるレンチウイルスベクターの製造条件の検討を行った。また、対象疾患である CGD の病態解析として、CGD 患者の炎症性サイトカインのプロファイル解析ならびにヒト由来 iPS 細胞を用いた治療用ベクターのプロモーター解析を行った。なお、CGD に対する遺伝子治療臨床研究は、現在、適当な被検者の検討が終了し、遺伝子治療臨床研究評価判定委員会の了承の下、遺伝子治療を開始する予定である。

研究組織

- (1) 国立成育医療研究センター 河合利尚
- (2) 東京大学医科学研究所 大津 真
- (3) タカラバイオ株式会社 峰野純一

A. 研究目的

小児の難治性疾患の多くは単一の遺伝子異常により病状が発症する単一遺伝病であり、治療遺伝子を患者に投与することで疾患の治療にあたる遺伝子治療はその治療概念から、これら遺伝性疾患に対する治療法として極めて理に叶っている。実際、欧米を中心に数多くの遺伝子治療臨床研究が行われ、現在では遺伝子治療がこれら難治性疾患に対する有効な治療法として認識されつつある。ただ、実際に遺伝子治療を実施するには数多くの問題が山積し、例えば小児難病が稀少疾患であるが故の患者登録や全国の専門機関との連携、遺伝子治療を行う際の規制の問題ならびに遺伝子治療を医療機関で安全性にかつ円滑に行うための体制整備が必要となり、これら問題を一研究テーマとして解決していくことは極めて困難である。よって、本研究ではこれら課題のうち企業連携として進めていくのが極めて効果的と思われる臨床用ウイルスの製造や分子生物学的手法を駆使した安全性評価系の確立に主体を置く。また、当センターで実際に遺伝子治療を実施する際に諸事項が円滑に進むようスタッフとの密な連携さらに治験実施も視野に入れたデータの収集・管理体制にも焦点を当て研究を進めた。

B. 研究方法

1. 遺伝子治療実施体制の整備

当センター病院内に遺伝子治療臨床研究準備委員会を設置し、看護部、薬剤部、臨床検査部、

院内感染対策チーム（ICT）、臨床研究センター、血液腫瘍科、総合診療部などの代表者が構成メンバーとなり、各々の状況において必要となる手順書（SOP）を作成し、電子カルテシステムへの取り込みを行った。

2. レンチウイルスベクターの製造条件の検討

2-1) 高タイターのレンチウイルスベクター開発

新規レンチウイルスベクター内に Rev-RRE（Rev response element）システムを導入するため gag/pol プラスミド上に RRE 配列を追加したプラスミドを構築し、HEK293 細胞に transfection した。使用したレンチウイルスベクターは蛍光タンパクとして AcGFP 遺伝子が組み込まれた pLVX-AcGFP-NI-SINI であり、このようにして産生されたウイルス上清を HT-1080 に感染させ、そのウイルス力価を測定した。

2-2) 臨床用ウイルスベクターの精製法

本研究では製造したウイルス上清の精製法としてイオン交換クロマトグラフィーと無菌ろ過工程について検討した。イオン交換クロマトグラフィーの条件は Wash バッファーが 25mM Hepes、1mM MgCl₂・6H₂O、5% glycerol、300mM NaCl であり、Elution バッファーとして 25mM Hepes、1mM MgCl₂・6H₂O、5% glycerol、1500mM NaCl を用いた。使用した filter は polyvinylidene fluoride（PVDF）フィルター（直径 33mm、膜面積 4.5cm²）と polyethersulfone（PES）フィルター（直径 47 mm、膜面積 17.3 cm²）であり、pore size は 0.2μm である。

3. CGD の炎症性サイトカイン・プロファイル

当センターで診療を受けている X 連鎖 CGD 患者 10 名の血清炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-6、IL-8) の濃度を測定した。また、患者末梢血より単核球を分離培養し、刺激による炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-6、IL-8) の産生能も測定した。さらに、CGD 患者のミトコンドリア由来 ROS 産生能に関しても検討した。

4. ヒト由来 iPS 細胞を用いた CGD の病態解析

gp91phox 欠損患者由来 iPS 細胞に Grez 博士、Schambach 博士より供与を受けたレンチベクターにて iPS 細胞に遺伝子導入を行った。ベクター骨格は EF-1 α プロモーターあるいは SFFV プロモーターの下流にコドン最適化 CYBB cDNA が挿入されたものである。また、puromycin 耐性遺伝子を IRES の下流に配置し、薬剤選択にて好中球分化誘導して異なるプロモーター、MOI (multiplicity of infection) 条件下における分化効率、機能回復 (活性酸素産生能) 効率の比較を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療臨床研究に向けた研究においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 16 年 2 月 19 日) に従って準備し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成 14 年 3 月 27 日、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正) に基づいて行った。実施計画書作成に必要な前臨床研究の一部では、臍帯血等の造血幹細胞を利用しているが、それら一連の研究は施設内の倫理委員会の承認を受けている。動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「動物愛護管理法の一部を改正する法律」「国立成育医療研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守して行う。また、挿入部位同定に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき行い、得られたデータの管理に関しては、連結可能匿名化にて、個人情報保護法を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 遺伝子治療実施体制の整備

本遺伝子治療臨床研究で使用する「患者情報」、「検査結果」、「有害事象」、「評価判定」のテンプレートが当センター病院で採用している電子カルテシステムで使用できるよう一部システムに変更を加えた。また、各工程に関する詳細な手順書として、1) 自家末梢血幹細胞採取の際の SOP、2) 病棟管理の SOP、3) 患者排泄物の SOP、4) 入院後の被験者への説明の際に用いる「入院のしお

り」や、「遺伝子治療パンフレット」等を作成した。

2. レンチウイルスベクターの製造条件の検討

2-1) 高タイターのレンチウイルスベクター開発

製造したレンチウイルスベクター上清を用いて HT1080 に感染実験したところ 30 倍希釈上清で 90.2%、90 倍希釈上清で 64.8% と高い遺伝子導入効率が得られた。一方、RRE 配列非搭載 gag/pol プラスミドでは、30 倍希釈上清で 1.0%、90 倍希釈上清で 0.6% の感染効率であったことから、その比は 100 倍以上と考えられた。

2-2) 臨床用ウイルスベクターの精製法

本イオン交換クロマトグラフィーによる感染効率の低減は特に認めなかった。また、無菌ろ過工程に使用した 3 種類のフィルターで感染効率に大きな差を認めなかったが、直径 47 mm、膜面積 17.3 cm² の PVDF フィルターが最も活性ロスが少なかった。

3. CGD の炎症時サイトカイン・プロファイル

CGD では健常人と比較して恒常的に血清の炎症性サイトカインが高値を示し、また、分離・培養した単核球においても刺激にて高い炎症性サイトカインの産生を認めた。そして、ミトコンドリア由来 ROS 産生抑制実験から、炎症性サイトカイン産生シグナル経路において、ミトコンドリア由来 ROS が伝達分子として重要であり、NADPH 由来 ROS が抑制分子として作用することが示された。

4. ヒト由来 iPS 細胞を用いた CGD の病態解析

CGD-iPS に gp91phox の遺伝子導入を行い、puromycin の薬剤選択下で好中球に分化誘導したところ、一部の細胞で健常人由来細胞と同程度の機能回復を認めたが、大半は活性酸素の産生量が不完全であった。そして、その機能回復は終末分化細胞における gp91phox の発現量に相関しており、完全な機能回復には十分量の治療遺伝子発現が必須と考えられた。さらに、これらの “partially-corrected” 細胞においては好中球分化に伴う NADPH の構成因子 p47phox、p67phox の発現量増加が不十分であり、一方で遺伝子非導入 CGD-iPSC では、これらの因子の十分量の発現が観察されたことから、治療用 gp91phox の非生理的な発現が正常な好中球分化を妨げる可能性が示唆された。

CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療の現状

当センターにおいて X-CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療を実施するため、同実施計画書ならびに患者説明書・同意書を作成し、当センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会に平成 22 年 1 月

22日に提出した。その後、平成23年5月31日、同年12月20日に審査委員会が開催され、最終的に平成23年2月24日付で承認された。その後、審議は厚生労働省科学審議会（遺伝子治療臨床研究作業委員会等）に移り、その審議会が平成24年1月13日開催された。そこで審議をもって、平成24年3月28日に開催された厚生科学審議会科学技術部会にて了承され、最終的に平成24年6月14日付けで厚生労働大臣に承認された。現在、適当な被検者の検討が終了し、遺伝子治療臨床研究評価判定委員会の了承の下、遺伝子治療を開始する予定である。

D. 考察

本研究の目的は、我が国に適した遺伝子治療を実施していくための支援体制を構築することにあるが、その方法として実際にCGDに対する造血幹細胞遺伝子治療を行い、その中で起こりうる問題点や課題を解決することで、実施に必要なインフラを整備することである。特に、企業連携として進めていくのが極めて効果的と思われる臨床用ウイルスの製造や分子生物学的手法を駆使した安全性評価系の確立に主体を置く。なお、当該遺伝子治療臨床研究は平成24年6月14日に最終的な承認が得られ、現在、適当な被検者を選定しており、近々に開催される当センターの「遺伝子治療臨床研究適当・判定委員会」のその適合性が諮られる、そこでの承認をもって遺伝子治療臨床研究は開始される。

さて、本年度の研究成果であるが、まずは実施施設である当センターの実施体制整備を昨年に同様に行った。特に、本年度は当センターの電子カルテシステムに患者管理（Case Report Form: CRF）を導入し、本臨床研究が極力治験に近いかたちで行えるようにした（GMP準拠）。このことは次の段階としての国際共同治験の実施を可能にする。さらに、現在、遺伝子治療臨床研究が生物多様性条約において第一種認定であることから、通常の臨床研究では行われない野生型ウイルスの排泄有無の確認が必要であり、そのための特殊な被検者排泄物管理SOPも作成した。次に、レンチウイルスベクターの製造についてであるが、これは、かつては遺伝子治療臨床研究において使用されるウイルスベクターの大半がマウス白血病ウイルス由来のレトロウイルスベクターであったが、2000年に行われたX連鎖重症複合免疫不全症において白血病の有害事象が発症したため、現在では使用ベクターをHIVウイルス由来のレンチウイルスベクターに変更し、遺伝子治療が実施されるようになってきている。よって、本研

究においても次期の遺伝子治療を見据えてレンチウイルスベクターの臨床開発研究を行った。今回の研究にてRRE配列を有するgag/polが高力価のウイルス上清を製造することができることが示された。今後は、本研究で別に示したイオン交換クロマトグラフィーによる精製法と合わせてその臨床応用化を目指していく。

CGDに対する遺伝子治療を効率良く行うための基礎的研究として、実際のCGD患者における血清あるいは患者単球の炎症性サイトカイン・プロファイルを検討した。その結果、健常人と比べて血清の炎症性サイトカイン値は極めて高く、また、刺激により患者由来の単核球は高度に炎症性サイトカインを産生した。このことはCGD患者の細胞が常に刺激（感染等）を受け、活性化してことを意味し、このことが移植や遺伝治療における投与細胞の骨髄生着を困難にしている可能性がある。また、これまでの臨床結果で見られたようにCGD遺伝子治療における前処置が通常のSCID遺伝子治療で行われる前処置と比べてより強度に行う必要があることも意味していると思われる。次に、gp91phoxの発現に関してであるが、その発現には一定の閾値が存在し、その閾値を超えることで好中球はその機能を発揮するようである。逆にいえば、たとえ患者細胞に効率良くgp91phox遺伝子を導入できても一定の閾値を超える程のgp91phoxの発現が得られなければ患者好中球は有効には機能しない。よって、今回使用したEF-1 α 等のプロモーターではその活性が弱い可能性があり、CGD遺伝子治療における至適プロモーターの選択が重要となってくる。また、このことは今後のCGD遺伝子治療におけるウイルスベクターの選択基準にも大きく関わり、過去の臨床研究でレトロウイルスベクターが一定の治療成績を示していることから単純なレンチウイルスベクターへの移行が正しい選択かは現時点で不明である。

最後に本センターにてCGDに対する遺伝子治療臨床研究を行っていくが、その際生ずる種々の問題に対して本研究の枠組みの中でも検討していきたいと考えている。

E. 結論

1. 当センターでのCGD遺伝子治療臨床研究実施に対する体制（電子カルテへの導入やSOP作成）を整備した。
2. 新規ベクターとしてのレンチウイルスベクターの作製とその精製法を検討した。
3. CGD患者では炎症性サイトカインが健常人と比較して高値であることが示された。

4. 患者好中球が遺伝子導入により正常に機能するためには一定の gp91phox 発現が必要であり、それに適したベクターの選択が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawai T et al. Thalidomide Attenuates Excessive Inflammation without Interrupting Lipopolysaccharide-driven Inflammatory Cytokine Production in Chronic Granulomatous Disease. *Clinical Immunology* 147: 122-128, 2013.
- 2) Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, et al.: Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis* doi: 10.1136
- 3) Akagi K, Kawai T, Watanabe N, et al.: A case of macrophage activation syndrome developing in a patient with chronic granulomatous disease-associated colitis. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2013 May 3.
- 4) Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T et al. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther* 21:1424-1431, 2013.
- 5) Saka K, Kawahara M, Teng J et al. Top-down motif engineering of a cytokine receptor for directing ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Journal of biotechnology* 168:659-665, 2013.
- 6) Saito T, Yano F, Mori D et al. Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS One* 8:e74137, 2013.
- 7) Razak SR, Ueno K, Takayama N et al. Profiling of MicroRNA in Human and Mouse ES and iPS Cells Reveals Overlapping but Distinct MicroRNA Expression Patterns. *PLoS One* 8:e73532, 2013.
- 8) Nishimura S, Manabe I, Takaki S et al. Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metabolism* 2013. doi: 10.1016/j
- 9) ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *American journal of human genetics* 92:431-438, 2013.
- 10) Hirose S, Takayama N, Nakamura S et al. Immortalization of Erythroblasts by c-MYC and BCL-XL Enables Large-Scale Erythrocyte Production from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports* 1:499-508, 2013.
- 11) Hamanaka S, Ooehara J, Morita Y et al. Generation of transgenic mouse line expressing Kusabira Orange throughout body, including erythrocytes, by random segregation of provirus method. *BBRC* 435: 586-591, 2013.

2. 学会発表

- 1) ONODERA M: Dry run of ex vivo transduction and expansion of human hematopoietic

stem/progenitor cells toward stem cell therapy for chronic granulomatous disease. 19th JSGT meeting at Okayama July.

- 2) 小野寺雅史:造血幹細胞を標的とした慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究に向けたガイドラインの実施。第 21 回食細胞機能異常症研究会 (2013 年 12 月、東京)
- 3) 勝屋友幾、放生雅章、河合利尚、ほか: 慢性肉芽腫症に過敏性肺炎を合併し腫瘍性陰影を呈した一例、第 63 回日本アレルギー学会、東京、2013/11/29
- 4) Kawai T, Nakazawa Y, Uchiyama T, et al.: Effects of chronic granulomatous disease-associated bowel inflammation on microbial gut flora. 第 13 回アジア汎太平洋小児栄養消化器肝臓学会 (第 40 回日本小児栄養消化器肝臓学会)、東京、2013/11/2
- 5) Nakazawa Y, Kawai T, Uchiyama T, et al.: Effect of Thalidomide Therapy on Bowel Inflammation in Chronic Granulomatous Disease. 第 13 回アジア汎太平洋小児栄養消化器肝臓学会 (第 40 回日本小児栄養消化器肝臓学会)、東京、2013/11/2
- 6) 河合利尚、中澤裕美子、田村英一郎、ほか: 第 45 回日本小児感染症学会、単球の活性酸素産生能低下による肉芽腫性腸炎、札幌、2013/10/27
- 7) 河合利尚、中澤裕美子、渡辺信之、ほか: 慢性肉芽腫症における肺間質性炎症、第 23 回日本小児リウマチ学会、埼玉、2013/10/12
- 8) Alpharetroviral Vectors: Demonstration of Safe and Efficacious Gene Therapy Using X-CGD iPSCs. Huan-Ting Lin et al. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy. 2013, Okayama.
- 9) Elucidation of Pathophysiological Mechanisms in Wiskott Aldrich Syndrome Using Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC). Mozghan Khalaj Amirhosseini, et al. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy. 2013, Okayama.
- 10) A Possible Therapeutic Strategy for Genetic Diseases Using Hematopoietic Stem Cells Generated From Induced Pluripotent Stem Cells.
- 11) Makoto Otsu, et al. The 21st Annual Congress of the European Society of Gene Therapy. 2013, Madrid.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

システムアプローチの構築による創薬ターゲットの同定と医療への応用

独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所 システム発生・再生医学研究部
高田 修治

研究要旨

MGC ライブラリを使用したハイスループット遺伝子導入アッセイにより、得られた IL-6 の安定化に関わる候補因子について過剰発現細胞をレンチウイルスの作製、感染、薬剤選択により作製し、機能を詳細に解析した。その結果、IL-6 の発現誘導後、この候補因子が IL-6 の発現の安定化に関わることを示唆する結果を得た。更なる解析が必要であるが、本研究により炎症性疾患の有力な新規創薬ターゲットを同定した。

研究組織

- (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 システム発生・再生医学研究部
高田 修治、浅原 弘嗣
- (2) 慶應義塾大学医学部 分子生物学
塩見 春彦
- (3) 日本臓器製薬株式会社生物活性科学研究所
薬理研究部
内木 充
- (4) 参天製薬株式会社リウマチ研究開発センター
青野 浩之

A.研究目的

世界的に高齢化社会を迎えることから、今後さらに老年者が増加する中で、変形性関節症 (Osteoarthritis: OA)、リウマチ疾患 (Rheumatoid arthritis: RA) の発症率は増加が継続と推定される。OA や RA による関節の破壊は、患者に局所の苦痛に加え運動に制限が加わるため、はかりしれない苦痛を与える。近年、OA や RA に対する新規治療法や診断法の発見には注力され、革新的かつ効力の高い治療薬の開発が待たれている。生物学的製剤の登場はこれらの疾患治療にパラダイムシフトをもたらし、道を拓いたが、副作用の問題等、未だ解決すべき点が多い。移植、再生を含む根本的治療の開発が待たれているが、骨・軟骨の発生、分化を制御する分子メカニズムなど依然解決されていない部分が数多く残されている。

関節炎治療市場は 2010 年には 210 億ドルの規模になると予測され、新薬の開発は、製薬企業にとっては医療への高い貢献だけでなく、また新しい市場機会が与えられていると言える。しかし、創薬において、従来の手法では、すでにほとんど

の探索 (スクリーニング) が終わっており、新規の創薬ターゲットを見出すには、これまでにない新規のスクリーニング法により探索する必要がある。

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所、システム発生・再生医学研究部が運用しているハイスループット遺伝子導入スクリーニングは、疾患遺伝子の発現に関与する因子を、網羅的かつ効率的に探索することができるシステムの一つであり、既存の方法ではできない新しい側面での創薬ターゲットを高効率で見出すことの出来るシステムである。集積されたデータの解析・利用により、創薬をはじめ、あらゆる分野で極めて重要なデータが得られることが期待できる。また、このアッセイ系は、遺伝子導入する cDNA の代わりに、低分子化合物を用いたスクリーニングにも利用でき、より創薬に向けた研究開発、さらには、新しいポストゲノムの複合的機能的遺伝子スクリーニングとして、他の疾患治療研究のモデルとなることが期待される。

本研究では、このハイスループット遺伝子導入アッセイシステムを運用し、炎症性疾患に関わる遺伝子の発現を制御している遺伝子を探索することで疾患遺伝子のスクリーニングを行い、創薬ターゲットの同定を目指す。本年度では、昨年度までに得られた候補因子の一つについて IL-6 の発現制御を中心とした詳細な機能の解析を行った。

B.研究方法

(1) 培養細胞による候補因子の機能解析

昨年度までに、IL-6 の mRNA 安定化に関わる AU-rich element (ARE) を含む 3' 非翻訳領域

(UTR:Untranslated region) を繋いだレポーター・プラスミドと Mammalian Gene Collection (MGC) ライブラリの約 6,000 因子の発現プラスミドを用いたハイスループット遺伝子導入アッセイを行っている。その結果得られた候補因子について、遺伝子データベースの Gene Ontology 情報に基づいて候補因子の絞り込みを行ない、絞り込んだ候補は、IL-6 の 3'UTR より、ARE を含む領域と含まない領域をそれぞれ繋いだレポーターベクターを作製してルシフェラーゼアッセイを行ない、候補因子を同定した。

この候補因子を過剰発現する細胞を作製するため、レンチウィルスベクターを設計、作製し、得られたベクターによりレンチウィルスを作製した。このウィルスは候補因子に加えピューロマイシンの耐性遺伝子も同時に発現するように設計しており、ヒト単球細胞株 THP-1 細胞に感染させたのち、ピューロマイシンにより薬剤選択を行ない、候補因子を過剰に発現する安定細胞株を得た。

得られた細胞を用いて LPS 刺激により IL-6 の発現を誘導させてからアクチノマイシン D 添加により転写を阻害し、IL-6 の mRNA の安定化についての機能について検討した。

(2) 候補因子のトランスジェニックマウスによる解析

候補因子を全身で過剰発現するトランスジェニックマウスを作製するため、CMV プロモーターの下流に候補因子の cDNA を繋いだプラスミドを作製し、制限酵素処理により線状化し、トランスジーンを作製した (図 1)。得られたトランスジーンはマイクロインジェクション法によりマウス胚に導入し、トランスジェニックマウスを作製した。

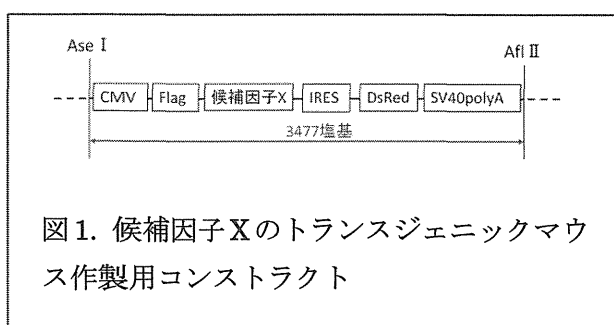


図 1. 候補因子 X のトランスジェニックマウス作製用コンストラクト

(倫理面への配慮)

本研究においては、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が行われた。しかし、ヒトクローン胚、ヒト ES 細胞などは使用せず、患者サンプルのヒト遺伝子解析は行っていない。遺伝子治療などの臨床・疫学研究はこれを行っていない。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において

生命倫理、安全管理を厳重に審査し、倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行した。また、独立行政法人国立成育医療研究センターの動物実験委員会の承認を得ている。遺伝子組み換え実験については、当センターの規約に則り、申請者は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号、平成 16 年 2 月 19 日より施行) を遵守して行うことを誓約し、許可を得ている。

C. 研究結果

(1) 培養細胞による候補因子の機能解析

昨年度までに炎症性サイトカインである IL-6 の mRNA 安定化に関わる AU-rich element (ARE) を含む 3'非翻訳領域 (UTR:Untranslated region) を繋いだレポーター・プラスミドを用いて、MGC ライブラリの発現プラスミドを高密度に配置した 384 ウェルプレートと自動分注機を用いてハイスループット遺伝子導入アッセイを行った。その後、直接 IL-6 の 3'UTR に結合して発現を制御する因子を創薬ターゲットとして同定するため、遺伝子データベースに登録されているそれぞれの候補因子の Gene Ontology を調べ、nucleotide binding が付与されている因子をおよび機能未知の因子に絞り、二次スクリーニングの対象とした。二次スクリーニングとしては、mRNA の安定化に重要な ARE 配列に直接作用するか検討するため、IL-6 の 3'UTR の ARE 配列が含まれる領域と含まれない領域を繋いだレポーターベクターを作製し、これらのベクターを使用してレポーターアッセイを行なった。これらのスクリーニングにより、RNA 結合ドメインを持つ候補因子 X を有力な創薬ターゲットとして同定している。

この候補因子は IL-6 の mRNA の安定性に関わる因子のスクリーニングにより得られた候補であることから、この候補因子 X の機能の解析を細胞と実験動物を用いて行い、IL-6 の発現亢進に伴う炎症反応にどのように作用するかについて検討する計画を立てた。

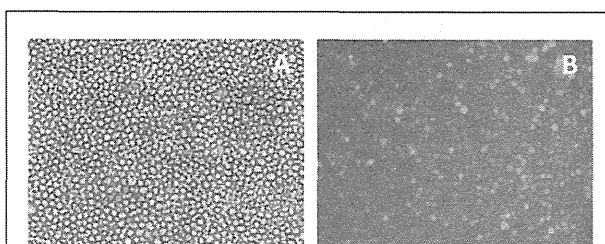


図 2. ウィルス感染、薬剤選択により作製した GFP 過剰発現の安定細胞株

GFP を過剰に発現する THP-1 細胞を明視野 (A) と暗視野 (B: GFP) で観察した。

細胞においてはヒト細胞株に候補因子 X の過剰発現および発現抑制を行ない、IL-1 β や TNF- α 、LPS 刺激等による IL-6 の発現誘導における影響について調べることを計画した。そのため、まず、候補因子 X を発現させるレンチウイルスベクターの設計を行ない、作製した。このベクターを使用してレンチウイルスを作製し、ヒト単球細胞株である THP-1 細胞に感染させた。作製したレンチウイルスベクターは候補因子 X とともに抗生物質であるピューロマイシンの薬剤耐性遺伝子も同時に発現するように設計しており、候補因子 X を過剰発現する安定細胞株を、ピューロマイシンを加えた培養液で培養することで取得した。

得られた細胞株の候補因子 X の発現を確認したところ、コントロールとして同様にレンチウイルスの感染、ピューロマイシンによる薬剤選択により作製した GFP を過剰に発現する細胞株(図 2)に比べ、ウェスタンブロットによる検出により、候補因子 X が高発現していることが確認できた(図 3)。

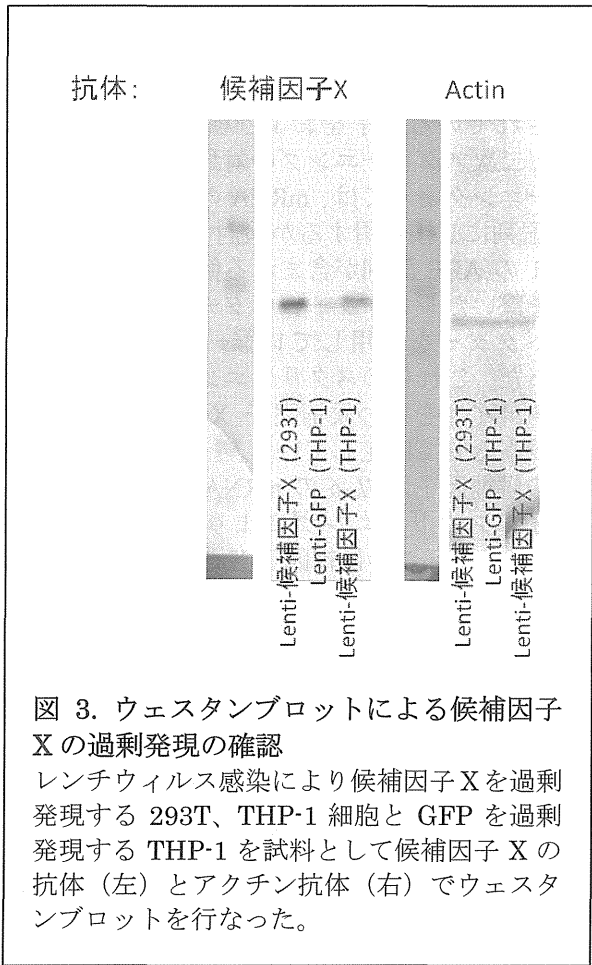


図 3. ウェスタンブロットによる候補因子 X の過剰発現の確認

レンチウイルス感染により候補因子 X を過剰発現する 293T、THP-1 細胞と GFP を過剰発現する THP-1 を試料として候補因子 X の抗体(左)とアクチン抗体(右)でウェスタンブロットを行なった。

候補因子 X の過剰発現を確認した細胞は、LPS を加えた培養液で一定時間培養することにより IL-6 の発現を誘導、蓄積させた後、転写阻害剤であるアクチノマイシン D を培養液に加えて培養

することで細胞内の転写を停止させ、一定時間培養して IL-6 の安定化への影響を調べた。その結果、コントロールとして GFP を過剰発現させている細胞ではアクチノマイシン D 添加後 3 時間で約 80% の IL-6 の発現量の低下が観察されるが、候補因子 X を過剰発現させた細胞では約 40% のみの低下を示した(図 4)。この結果は、候補因子 X が、IL-6 の mRNA が安定化に関わることを示している。

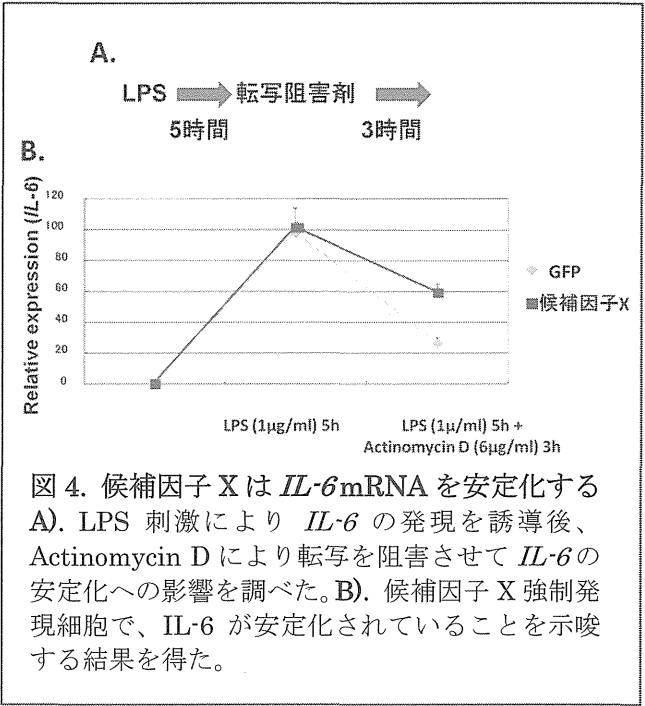


図 4. 候補因子 X は IL-6 mRNA を安定化する
A). LPS 刺激により IL-6 の発現を誘導後、Actinomycin D により転写を阻害させて IL-6 の安定化への影響を調べた。B). 候補因子 X 強制発現細胞で、IL-6 が安定化されていることを示唆する結果を得た。

(2) 候補因子のトランスジェニックマウスによる解析

in vivo での炎症反応における影響を解析することを目的とし、候補因子を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、解析を行なうことを計画した。このため、候補因子 X を過剰に発現するトランスジーンを設計し、マイクロインジェクション法によりマウス胚に導入した。生まれてきたマウスのゲノム DNA を試料としてトランスジーンに特異的なプライマーを用いた PCR により、目的の DNA 断片が組み込まれた個体を識別した。得られたトランスジェニックマウスは個体形成において大きな異常はなく、繁殖も可能であった。

このトランスジェニックマウスを用いて、これまでに関節炎モデルによる実験動物を用いた *in vivo* での炎症反応への候補因子 X の影響について調べる予備実験を行なっている。使用した個体数や実験数等、不十分ではあるが、トランスジェニックマウスで野生型マウスに比べ関節炎の遷延化が起こることを示唆する結果を得ている。

D.考察

これまで、遺伝子発現は転写因子等による転写調節を中心に解析されてきているが、近年、転写後に発現が調節されることの重要性が明らかになってきている。転写後調節とは転写後の mRNA の安定化、スプライシングの制御、翻訳の調節等、遺伝子が遺伝子産物（タンパク質）の形成に至るまでに受ける調節のことであり、これらの制御により、実際に機能するタンパク質の合成量が調整されている。

AREは多くの mRNA の 3'UTR に存在し、mRNA の安定化に関わることが報告されている（Chen CY., et al., Trends Biochem Sci. 1995）。この領域に様々な RNA 結合タンパク質が結合することで、mRNA を安定化あるいはその逆に不安定化（分解）へと導くことになる。炎症反応においては、重要な炎症性サイトカインである *TNF- α* と *IL-6* の 3'UTR に存在する ARE が、それらの mRNA の安定化に関わることが示されており（Neininger A., et al., J Biol Chem. 2002）、*IL-6* の ARE に TTP が結合し、mRNA を不安定化することが報告されている（Zhao W., et al., J Interferon Cytokine Res. 2011）。しかしながら、これらの炎症性サイトカインの mRNA の安定化・不安定化に関わる因子とその制御メカニズムはそのほとんどが未解明のままである。これらの炎症性サイトカインの発現は変形性関節症やリウマチ疾患を含む様々な炎症性疾患の病態に関わることから、これらの mRNA の安定化・不安定化に関わる新たな因子が解明されれば病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定に極めて有用である。

本研究では *IL-6* の ARE を含む 3'UTR を繋いだレポーター・プラスミドと約 6,000 因子の発現プラスミドを使用してハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、*IL-6* の mRNA の安定化に関わる因子を探索し、新規の *IL-6* の発現制御因子候補を複数見出した。また、遺伝子情報による更なる絞り込みや 2 次スクリーニングを行い、有力な創薬ターゲットとして候補因子 X を *IL-6* の新規発現制御因子として同定した。この候補因子は二次構造として RNA 結合ドメインを持つことから、直接 *IL-6* の 3'UTR に結合し、*IL-6* の発現制御に関わると考えられる。*IL-6* の異常産生はリウマチをはじめとした炎症性疾患に深く関わることから、この候補因子 X は *IL-6* の発現制御を介してこれらの疾患に関わる可能性が考えられる。本研究の候補因子 X を安定に発現する培養細胞を用いた検討では、*IL-6* の mRNA の安定化に作用することを示唆する結果を得ている。つまり、この候補因子 X は *IL-6* の発現を安定に維持することにより、病態の形成や病状の悪性化、慢性化に関わるかもしれない。実際に、本研究で作製したトランスジェニックマウスを用いた我々の予備実

験では、実験的に一過性の関節炎を誘発させると候補因子 X を過剰発現するトランスジェニックマウスで、関節炎の遷延化が起こることを示唆する結果を得ている。

今後、gain-of-function に加え、loss-of-function の実験を行ない、*IL-6* の産生にどの程度関わるか、実際に炎症性疾患の病態に関わるか等について詳細に調べ、これらの解析により新たな病態メカニズムを病状のバイオマーカーという側面も含めて明らかにする。また、自己免疫疾患モデル動物を使用した候補因子 X の発現抑制を行なうことで治療効果を検討し、創薬ターゲットとしての可能性について検討する。これらにより、新規治療法や診断法の開発を目指す。

また、一次スクリーニングから二次スクリーニングに進むにあたり、有力な候補因子に絞り込むため、直接 *IL-6* の 3'UTR に結合して制御に関わりそうにない因子は除外したため、多くを解析対象から除外している。しかしながら、これらの因子も *IL-6* の発現制御因子候補であることから創薬ターゲットとなり得る。これらの候補因子群については、スクリーニング結果の再現性を検討して、更なる解析により *IL-6* の発現制御因子であることを確認することで、*IL-6* の発現制御を中心とした炎症性疾患の病態メカニズムの解明につなげる。

E.結論

全長 cDNA ライブラリを使用したハイスループット遺伝子導入スクリーニングシステムを用いて、*IL-6* の 3'UTR に作用し、その発現制御に関わる因子を探索した。このシステムにより、短時間で効率よく、網羅性の高いスクリーニングが行えた。スクリーニングにより得られた候補因子の一つを詳細に検討した結果、この候補因子が *IL-6* の発現を安定に維持することにより、炎症性疾患の病態の形成や病状の悪性化、慢性化に関わることを示唆する結果を得た。今後、更なる解析を続け、新規治療薬の開発を試みる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請中

「miR-140 の発現を制御する DNA 及び該 DNA

を利用した薬剤のスクリーニング方法」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

バイオ医薬品の合理的品質管理技術の開発と標準化

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
川崎 ナナ

研究要旨 バイオ医薬品の QbD 実現に向け、(1) 分子変化体評価のための PAT 手法の開発、酸性オリゴ糖及びグリコフォーム分析の標準化、並びに競合法 ELISA による結合活性試験法の標準化を行った。(2)カイク由来抗体の品質確保には、糖鎖構造の管理が重要であることを明らかにした。さらに、バンク化による Tg カイク系統維持手法の改良を行った。(3)マウスパルボウイルスを用いた新規蛍光標識ウイルス粒子を開発し、ウイルス感染性評価に利用可能であることを実証した。(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化を行った。

研究組織

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化

- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| 1) 国立衛研 | 川崎 ナナ, 橋井 則貴, 原園 景, 鈴木 琢雄 |
| 2) 協和発酵キリン(株)生産本部 | 柳原 繁弘 |
| 3) 中外製薬(株)CMC 開発部 | 寺島 勇 |
| 4) 一般財団法人 化学及血清療法研究所 | 鳥飼 正治 |
| 5) アステラス製薬(株)バイオ・イノベーション | 山口 秀人 |
| 6) 大日本住友製薬(株)技術研究本部 | 佐藤 貴之 |
| 7) 一般社団法人 日本血液製剤機構 | 村上 弘次 |
| 8) 第一三共(株)研究開発本部 | 古賀 淳一 |
| 9) (株)住化分析センターファーマ大阪事業所 | 岩田 美紀 |
| 10) 武田薬品工業(株)CMC 研究センター | 濱地 芳典, 山田 英丙 |
| 11) (株)東レリサーチセンター | 水野 保子 |
| 12) 持田製薬(株)製剤研究所 | 大庭 澄明 |

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質管理方法の開発

- | | |
|--------------------|-------|
| 1) 国立衛研 | 石井 明子 |
| 2) 東レ(株)愛媛工場動物薬室 | 田中 貴 |
| 3) (独)農業生物資源研究所 | 瀬筒 秀樹 |
| 4) 徳島大学大学院 HBS 研究部 | 伊藤 孝司 |
| 5) 群馬大学大学院工学研究科 | 武田 茂樹 |

(3) ウイルス安全性評価方法の開発

- | | |
|--------------------|-------|
| 1) 国立衛研 | 遊佐 敬介 |
| 2) 一般社団法人 日本血液製剤機構 | 坂井 薫 |

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化

- | | |
|-------------------|-------|
| 1) 国立衛研 | 新見 伸吾 |
| 2) 中外製薬(株)臨床企画推進部 | 西宮 一尋 |

A. 研究目的

ICH Q8-11 が調和されたことにより、バイオ医薬品の開発と製造においても、サイエンスとリスクマネジメントプロセスを取り入れたクオリティ・バイ・デザイン (QbD) の考えが導入されるようになってきた。バイオ医薬品開発においては、有効成分の特性、分子変化体、工程由来不純物、

及びウイルス等の混入汚染物質等が、予め設定された限度、範囲、分布を超えたときに、PK, PD, 免疫原性、及び毒性等に与える影響の不確かさを考慮して品質管理の優先度を定めること、また、影響の大きさ、逸脱頻度、及び検出能力を基に品質管理戦略、すなわち原材料管理、工程パラメータ、工程内管理試験、プロセス評価、並びに規格及び試験方法等の選択及び組み合わせを考えることが肝要である。前例の少ないバイオ医薬品の QbD の実現に向けて、産官学での理解の共有化、特性解析、特性と PK, PD, 免疫原性、毒性との関係の解明、及び品質管理のための技術開発と標準化が不可欠である。本研究では、バイオ医薬品の QbD への適用を目指して以下の(1)~(4)の研究を行った。

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化：

①PAT 開発 製造条件の最適化やデザインスペース構築で利用可能なプロセス解析工学 (PAT) 手法として、液体クロマトグラフィー／質量分析 (LC/MS) を用いたバイオ医薬品の分子変化体モニタリングシステムを開発する。

②糖鎖試験法 グリコフォーム分析の標準化及び試験に求められる要件の明確化、抗体医薬品の APTS CE/FL の標準化及び、昨年度最適化した酸性オリゴ糖の糖鎖試験法の併行精度の確認を行う。これまでの検討より得られた知見を総合して、日局糖鎖試験法原案を作成する。

③結合活性試験法 結合活性試験法の標準化の一環として、競合法 ELISA を対象とし、多機関で試験デザイン、データ解析方法、及び試験成立条件の最適化を行う。研究結果を基に日局参考情報 ELISA 原案を作成する。

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質管理方法の開発：モデルタンパク質の試験的製造と特性解析を通じて、バイオ医薬品生産用基材とし

での Tg カイコの有効性評価、Tg カイコ由来抗体の品質管理要件の特定、及び、バンク化による系統維持手法の改良を行う。

(3) ウイルス安全性評価方法の開発：バイオ医薬品汚染事例があり、ウイルスクリアランス試験に最もよく使われるマウスパルボウイルス (MVM,) をモデルとして、新規蛍光標識ウイルス粒子を作製する。その宿主域と安定性を評価して、感染性評価法としての有用性を検証する。

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化：抗薬物抗体の出現は有効性や安全性に影響を与える可能性があるが、バイオ医薬品に対する抗薬物抗体の評価は容易ではなく、様々な手法が用いられている。そこで、抗薬物抗体測定法の標準化を目的として、電気化学発光法の有用性を評価する。

B. 研究方法

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化：

①PAT 開発 修飾トリプシンを固定化した樹脂をポリイミドコートフューズドシリカキャピラリーチューブ (外径 0.375 mm, 内径 0.1 mm) に充填して、LC/MS 用トリプシン固定化カラムを作製した。

②糖鎖試験法

1) グリコフォーム分析の標準化

Fc 融合体を用い、等電点電気泳動 (IEF)、キャピラリーIEF (cIEF)、イメージング cIEF (icIEF)、キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)、イオン交換クロマトグラフィー (IEX) 及び質量分析 (MS) を各機関で分担して分析条件の最適化を行った。N-及び O-結合型糖鎖分析並びに糖ペプチド分析を行った。

2) 抗体医薬品の APTS CE/FL の標準化

多機関共同研究にて、昨年度最適化した抗体医薬品の APTS CE/FL 法の室間再現性を評価した。

3) 酸性オリゴ糖の糖鎖試験法の標準化

α1 酸性糖タンパク質由来酸性オリゴ糖を用いて、最適化した各種糖鎖試験法の併行精度を確認した。

③結合活性試験法 H24年度は非競合法 ELISA を対象とし、1) DOE を用いた試験条件設定に関する検討、2) 試験デザイン及びデータ解析手法に関する検討、3) 試験成立条件設定に関する検討を行った。H25年度は競合法 ELISA を対象とし、試験デザイン及びデータ解析手法や、試験成立条件について、非競合法 ELISA と同様の考え方が適用可能か検討した。競合法 ELISA は、分析対象物質の分子量が比較的小さく、特異的に結合する分子を 2 種類用意することが難しい場合に加え、抗体薬物

複合体のように検出用抗体との結合性にロット間差が生じる可能性があり、非競合法による定量が難しい場合等に用いられる。そこで、抗体薬物複合体モデルとしてビオチン化抗体、検出用抗体としてペルオキシダーゼ標識抗体を作製し、共同研究参加各機関でそれぞれ測定条件を設定した後、6 回測定を行った。測定結果をもとに、良好な結果を得るための試験デザイン及びデータ解析手法、試験成立条件について検討した。本結果と H24 年度に実施した非競合法 ELISA に関する検討結果を基に、ELISA を品質管理試験法として用いる際の留意点をまとめた。

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質管理方法の開発：

①モデルタンパク質を発現する Tg カイコを作製し、組換えタンパク質を発現、精製して、特性解析を行った。

②Tg カイコの卵巣及び精子採取技術の改良、及び、採取組織からの個体作出効率の検証を行った。

(3) ウイルス安全性評価方法の開発：

ウイルスの蛍光標識は、Alexa Fluor 488 を用いた。MVM を動物細胞に感染させ、培養上清中のウイルス DNA のコピー数を qPCR 法によって測定して、宿主域と安定性を評価した。

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化：

抗モデル抗体医薬品 (mAb) 血清を購入して、アフィニティークロマトグラフィーにより抗 mAb 抗体を精製した。ヒト血清を添加した試料を調製して、電気化学発光法による抗体価測定を多機関で行い、分析能パラメータを評価した。

(倫理面への配慮)

市販品を試料として用いていること、動物を使用していないことから、特に配慮を必要としない。

C. 研究結果

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化：

①PAT 開発 試料の前処理、LC/MS 測定、解析、並びにレポートの作成を全て自動化した分子変化体分析システムの開発を行った (図 1)。自動翻訳後修飾同定ソフトのプログラミング言語を選定するために、複数の言語のソフトウェア開発速度、及び実行速度を検討した結果、中間コード型言語である Java や C# が提起していることが明らかとなった。また、本システムにより、抗体のメチオニンの酸化やグルタミンの脱アミド化など複数の翻訳後修飾を確認することができた。

②糖鎖試験法

1) グリコフォーム分析の標準化

共同研究参加 9 機関で IEF, cIEF, icIEF, CZE,

IEX 及び MS により、Fc 融合タンパク質のグリコフォームの分離を試みた (図 2)。IEF (図 2A) においては、pI 4.6~5.5 にピークが認められ、アルカリ側にスミアなピークが認められた。cIEF において図 2 B-1~B-3 では、大きなひとかたまりのピークとそのアルカリ側にブロードなピークが認められた。B-4 では、タンパク質を収束させた後、B-1~B-3 とは逆に酸性側に移動させて検出した。多数のピークが重なったパターンが認められた。icIEF (図 2B-5) ではいくつかのピークが認められるが、十分な分離は得られていない。CZE (図 2C) 及び IEX (図 2D) では、ひとかたまりのピークとして検出された。MS では、良好なマススペクトルは取得できなかった (図 2E)。以上、いずれの方法も、グリコフォームの十分な分離はできなかった。なお、これらの分析条件は、別のタンパク質ではピークを分離できる条件または、それを元に最適化を試みた条件である。

本試料について、別に、N-及び O-結合型糖鎖の分析、並びに糖ペプチド分析を行った。糖ペプチドから糖鎖を遊離した機関では、トリシアロ糖鎖が認められたが (図 2F)、変性タンパク質から遊離した機関では検出されなかった。O-結合型糖鎖の分析において、ヒドラジン分解にて糖鎖を遊離したとき、ピーリング反応産物が認められた (図 2G)。糖ペプチド分析では、N-結合型糖鎖結合部位を含む糖ペプチド 2 種類及び O-結合型糖鎖結合部位を含む糖ペプチド 1 種類について検出し、主要な糖ペプチドのピーク強度比の精度が約 5% 程度であることを確認した (図 2H)。

2) 抗体医薬品の APTS CE/FL の標準化

昨年度最適化を行った分析法 (図 3) について、6 機関で精度の確認を行った。併行精度は、いずれの機関も良好であり、微少なピークや分離が難しいピークを除き、ピーク面積比又はピーク強度比の相対標準偏差は 10% 以内であった (表 1)。機関間で類似したプロファイルが得られていたが、そのばらつきは比較的大きく、主要ピーク (ピーク 7, 8, 9, 12) を除き、相対標準偏差が 20% 以上であった。問題点として、試料調製に由来する非特異的なピークが認められる場合があった (後述)。

3) 酸性オリゴ糖の糖鎖試験法の標準化

昨年度最適化を行い酸性オリゴ糖の試験法として利用可能であると判断された分析法 (2AB HILIC/FL, 2AA IEX HILIC/FL, HPAEC/PAD, 2AA CE/FL) は、良好な併行精度を示すことを確認した (図 4)。

4) 日局糖鎖試験法原案の作成

これまで検討してきたことを踏まえて、糖鎖試験法の要件及び留意事項をまとめ、日局一般試験

法及び参考情報原案を作成した。

③結合活性試験法 競合法 ELISA を用いた生物活性試験法に関し、試験デザイン、データ解析手法、及び、試験成立条件について検討した。

1) 試験デザイン及びデータ解析手法

共同研究参加 6 機関でそれぞれ条件設定して実施した競合法 ELISA の結果を用い、試験デザイン及びデータ解析手法として、以下の方法について検討した (図 5)。

方法 1: 1 もしくは 3 濃度の抗体試料について、標準物質の用量反応曲線 (検量線) をもとに、標準物質に対する相対的な濃度を算出し、標準物質に対する相対活性とする方法

方法 2: 標準物質と試料それぞれについて用量反応曲線を取得し、最大レスポンスの 50% に相当するレスポンスを与える用量 (競合法では IC_{50}) の比から標準物質に対する相対活性を算出する方法 (IC_{50} シフト)

方法 3: IC_{50} 付近で用量反応を直線で近似できる領域を用いて、同じレスポンスを生じる用量比をもとに標準物質に対する相対活性を算出する方法 (平行線法)

各機関の測定結果を上記の方法で解析した場合の試料の真度の一覧を表 2 に示した (機関 C, D については条件の最適化前のデータのため、参考値として示した)。検量線を用いた方法及び平行線法で良い結果が得られた測定条件もあったが、最も良い結果が得られたのは IC_{50} シフトにより相対結合活性を算出した場合であった。 IC_{50} シフトによる定量には、標準物質と試料の回帰曲線の形状を同一とする場合 (制約あり)、しない場合 (制約なし)、重み付けの有無等、種々の回帰方法がある。それぞれの方法で解析を行ったところ測定条件により、適した回帰方法は異なっていた (表 3)。なお、4-パラメータ回帰と 5-パラメータ回帰ではほぼ同等の結果であった。

2) 各試験デザインに適した試験成立条件

昨年度の実験 ELISA と同様に、下記 (a)~(f) による試験成立条件について検討した。

(a) QC 試料 (既知濃度試料) を用いた試験成立の判定

(b) 試料の測定濃度の CV 値を用いた試験成立判定

(c) 検量線を用いて back-calculation した検量線用標準物質濃度の真度・精度を用いた試験成立判定

(d) 検量線の形状による試験成立判定

(e) 標準物質と試料の用量反応曲線の類似性

(f) 直線性、平行性の判定

検量線を用いた方法 (方法 1) では主に (a)~(d) が使用されるが、(a) に関しては、良好な試験成立判定が可能と考えられるケースもあったものの、

多くのケースでは試験デザインや解析手法によらず、試料の真度と QC 試料の真度には乖離が見られた (図 6)。また、非競合 ELISA と同様に (b), (c) では良好な判定が可能と考えられたが、(d) では検量線の形状を決める各パラメータの数値のばらつきが大きく、試験成立条件としての汎用性が低かった。IC₅₀ シフトを用いた方法 (方法 2) の試験成立条件として使用される (e) については、extra sum of square 法 (標準物質と試料に共通する回帰式を適用した場合と、個別の回帰を適用した場合の残差分散を、分散分析で比較する方法)、及び、equivalence test (回帰式のパラメータ等に予め許容範囲を設定する方法) について検討した。extra sum of square 法ではデータのばらつきが大きいほど判定が甘くなるため (図 7)、equivalence test が有用であると考えられた。また、平行線法 (方法 3) で使用される (f) についても、分散分析を用いた場合、データのばらつきが判定に影響した。

3) 日局 ELISA 参考情報原案の作成

ELISA を用いた結合性試験について、測定様式、操作法、品質管理試験への応用、試験成立条件に関する解説と留意点をまとめ、日局参考情報原案を作成した。

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質管理方法の開発 :

1) 抗 CD20 抗体, TNFR-Fc 融合タンパク質, カテプシン A, がん抗原 MAGE, ネコインターフェロン等のモデルタンパク質を発現する Tg カイコを作製し、組換えタンパク質の試験的製造と特性解析を行った。抗 CD20 抗体の特性解析においては、Tg カイコ由来の抗体が哺乳動物細胞由来の抗体と比較して、より強い Fc γ RIIIa 結合能及び活性化能を有し、著しく強い抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を発揮することが明らかになった (図 8)。一方で補体依存性細胞傷害活性 (CDC) は哺乳動物細胞由来のものに比べて減弱していた (図 9)。抗体 Fc 領域に付加する N-結合型糖鎖構造の解析の結果、Tg カイコ由来の抗体では還元末端にフコースの付加する糖鎖構造が著しく少ないこと、非還元末端にガラクトースの付加する糖鎖が存在しないことが明らかとなった (図 10)。

2) 昨年度に続き、Tg カイコのバンク化による維持管理手法の開発を進めた。ニュートラルレッドを用いた卵巣の識別法、卵巣採取移植器具の改良、卵巣移植法について検討し、作業効率の向上に成功した。また、カイコ成虫の雄から精液を採取する方法に関して、従来より短時間で効率的に採取可能な方法を見出した。

(3) ウイルス安全性評価方法の開発 :

MVM は、試験した全ての動物種細胞に感染し、複製することが確認された。特に、CHO 細胞で高い感染性とウイルス産生能が認められた。また、MVM の Alexa Fluo 488 による蛍光標識体及び未標識体の感染宿主域を CPE、ウイルス DNA コピー数の測定により評価し、蛍光標識体を用いた場合でも、ウイルス感染を追跡することができることを明らかにした。さらに細胞種による感染性の違いは、ウイルスの核周辺への集積能力と関連することが明らかとなった (図 11 及び 12)。

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化 :

ヒト血清存在下の抗 mAb 抗体について、電気化学発光法により抗体価を測定した結果 (図 13)、ヒト血清は 10% までほとんど感度を低下させなかった。特異性のカットポイントとして、個別ヒト血清あるいは抗 mAb 抗体 $\pm$ mAb の値に基づき設定された阻害率を設定している機関が多かった (表 4)。変動係数はいずれの機関でも通常許容値とされる 20% 以内であった。感度は全ての機関で FDA が推奨している 250~500 ng/mL 以下であった。

D. 考察

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化 :

①PAT 開発 本システムは、自作のトリプシン固定化カラムを使用していることから、PAT システムとして活用するためには、今後、システムの頑健性等について検証することが重要である。

②糖鎖試験法

1) グリコフォーム分析の標準化

Fc 融合タンパク質は、分子量が大きく (92 kDa)、不均一性が高い (N-及び O-結合型糖鎖結合部位がそれぞれ、6 及び 4 カ所) ため、IEF, cIEF, icIEF, CZE, IEX, MS のいずれの方法でも十分な分離は得られなかった。グリコフォーム分析では、試料の構造の複雑さ、分子量、その他の性質特性により、分離が難しい場合があり、分子量が大きい場合には適用が難しく、標準化は難しいと思われた。電荷不均一性の分析において、cIEF と IEX でプロファイルが異なる場合があること、変性剤の添加でパターンが異なるなど、電荷の不均一性だけでなく、ジスルフィド結合や高次構造などの違いが反映される。この場合、実際に何を評価しているのか不明という問題が生じる。そこで、グリコフォーム分析の要件としては対象医薬品ごとに、有効性及び安全性に関与する糖鎖構造の違いを反映したプロファイル取得を検討することが重要と思われた。

2) 抗体医薬品の APTS CE/FL の標準化

APTS CE/FL 法の再現性を評価したところ、良好な併行精度が得られること及び機関間で類似したプロファイルが得られることを確認した。しかし、非特異的なピークが生じる場合があることが確認され、PNGase F を用いて糖鎖を遊離する際の pH により糖鎖の異性化が生じることが分かった (Anal Chem. 2009 15; 81: 6823- 6829)。今後、適切な遊離条件を確認し、標準的分析法として報告する予定である。

3) 酸性オリゴ糖の糖鎖試験法の標準化

2AB HILIC/FL, 2AA IEX HILIC/FL, HPLC/PAD 及び 2AA CE/FL は、適切な特異性及び精度を持つことを確認した。これらの方法は、酸性オリゴ糖鎖の試験方法として利用可能であると思われた。

4) 日局糖鎖試験法原案の作成

糖鎖試験設定における要件、各種分析法の特徴と留意点、並びに糖鎖の同定法、標準物質、及びシステム適合性などに関する考え方をまとめ、二回のグループ会議での議論を経て、日局一般試験法、及び参考情報 糖鎖試験法原案を作成した。グループ会議では、微量の糖鎖をどこまで分析する必要があるか、糖鎖分析の真度をどの様に求めるか、O-結合型糖鎖分析の問題点、規格をどの様にたてるか等について議論した。O-結合型糖鎖の試験法については今後の課題となった。

③結合活性試験法 本研究で明らかになった、競合法 ELISA に関する試験デザイン及びデータ解析手法の概要を表 5 に示した。競合法でも非競合法と同様に IC₅₀ シフト (非競合法では EC₅₀ シフト) を用いた方法が最も、良好な結果が得られた。しかし、重み付けの効果は非競合法と比較して小さくなく、測定条件により適した回帰方法を選択することが重要であると考えられた。また、各試験成立条件に関する検討結果の概要を表 6 に示した。各試験成立条件には問題点もあり、複数の条件により補完することも必要である。なお、競合法 ELISA と非競合法 ELISA で適した試験成立条件は大きく異ならず、共通の考え方で試験を設定することが可能であると考えられた。本年度及び昨年度の研究成果を基に作成した ELISA に関する日局参考情報原案は、日局原案審議委員会生物薬品委員会に提出予定である。

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質管理方法の開発：

1) Tg カイコ由来抗体の生物活性及び糖鎖構造解析の結果から、糖鎖構造が Tg カイコ由来の高 ADCC 活性、低 CDC 活性に影響していることが明らかになり、カイコ由来抗体の品質管理におい

ては、糖鎖構造の管理が重要であると考えられた。

2) 改良器具を用いた卵巣採取・移植実験では、卵巣移植後、非常に良好な産卵数及び孵化頭数が得られ、実際に遺伝子組換え系統から採取した凍結卵巣からの復帰も可能であることが実証されたことから、考案した改良法が有用であると考えられた。

(3) ウイルス安全性評価方法の開発：

感染性評価のモデルウイルスとして多用される MVM について、その蛍光標識体の挙動をモニターできるようになったことから、新規ウイルス安全性評価系の構築が可能になる可能性がある。

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化：

Cut Point の設定条件、及び評価基準等の試験条件については各機関により異なっていたが、それらは全て許容できると考えられる。

E. 結論

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化：

①PAT 開発

試料の酵素消化及び還元化等の前処理、LC/MS 測定、解析、並びにレポート作成を全て自動化した分子変化体分析システムを開発した。

②糖鎖試験法

グリコフォーム分析の適用可能性及び要件を明らかにした。中性糖鎖の APTS CE/FL 法及び酸性オリゴ糖の糖鎖試験法を標準化した。日局一般試験法及び参考情報原案を作成した。

③結合活性試験法

競合法 ELISA を対象に、良好な結果を得るための試験デザイン及びデータ解析手法、各試験デザインで適した試験成立条件を明らかにした。また、ELISA に関する日局参考情報原案を作成した。

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質管理方法の開発：

モデルタンパク質の発現と特性解析により、Tg カイコが組換えタンパク質発現系として有用である可能性を示した。カイコ由来抗体は、アフコシル化糖鎖含量が高く、高 ADCC 活性を示したことから、カイコ由来抗体の品質管理においては、糖鎖構造の管理が重要であることを明らかにした。バンク化による Tg カイコの維持管理手法開発のため、卵巣及び精子の採取ならびに移植の手法改良を行った。

(3) ウイルス安全性評価方法の開発：

ウイルス感染性評価に利用可能な MVM を用いた新規蛍光標識ウイルスを開発した。本ウイルスの感染性は、ウイルスの核周辺への集積効率と関

係していることを明らかにした。

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化：

各機関で確立された抗体価測定法の分析能パラメータは良好であり、抗薬物抗体の評価における妥当性が示された。

F. 研究発表

1) 海外

原著論文による発表	4 件
総説等の発表	0 件
学会発表	3 件

2) 国内

原著論文による発表	0 件
総説等の発表	3 件
学会発表	12 件

3) 政策提言

2 件

主な研究発表

海外：原著論文

- 1) Takakura D., *et al.*: Selective glycopeptide profiling by acetone enrichment and LC/MS. *Journal of Proteomics*. in press
- 2) Takakura D., *et al.*: An improved in-gel digestion method for efficient identification of protein and glycosylation analysis of glycoproteins using guanidine hydrochloride. *Proteomics*. in press
- 3) Hashii N., *et al.*: Characterization of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* in press

海外：学会発表

- 1) Kawasaki N.: Current situation and issues in Japanese Pharmacopoeia. 10th Annual Meeting DIA Japan 2013 (2013. 11) Tokyo
- 2) Niimi S.: Government-private Sector Joint Research Project to Establishment and Standardize Immunogenicity Assays in Japan. Id. (2014.1) San Diego

国内：総説等

- 1) 原園 景ら：抗体医薬品の標準的糖鎖試験法：2-アミノベンザミド誘導体化及び親水性相互作用クロマトグラフィー／蛍光検出：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 44, 357-361 (2013)

国内：学会発表

- 1) 伊藤孝司ら：ガラクシアリドーシス治療薬候

補としてのトランスジェニックカイコ由来ヒトカテプシン A の解析. 第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会 (2013.5) 徳島.

- 2) 伊藤孝司ら：バイオ医薬品の生産基材としてのトランスジェニックカイコとネオグライコバイオロジクス創製への応用. 日本糖質学会第 32 回年会 (2013.8) 大阪
- 3) 瀬筒秀樹ら：トランスジェニックカイコ絹糸腺由来ヒトカテプシン A の糖鎖修飾と機能評価. 同上(2013.8) 大阪
- 4) 橋井則貴：抗体医薬品高親和性ペプチドカラムの開発とバイオアナリシスへの応用. 第 61 回質量分析総合討論会 (2013.9) つくば
- 5) 多田稔ら：トランスジェニックカイコを用いて生産された抗 CD20 抗体の特性解析. 第 86 回日本生化学会 (2013.9) 横浜
- 6) 伊藤孝司ら：ガラクシアリドーシス治療薬候補としてのトランスジェニックカイコ由来ヒトカテプシン A の解析. 同上(2013.9)
- 7) 伊藤 孝司：ネオバイオロジクスの精製とリソソーム病治療薬開発へのアプローチ. 第 5 回全国共同利用・共同研究「酵素学研究拠点」シンポジウム(2013.11) 徳島
- 8) 伊藤孝司ら：リソソーム病治療薬候補としてのトランスジェニックカイコ絹糸腺由来組換えヒトカテプシン A の機能解析と分子装飾. 第 4 回グライコバイオロジクス研究会 (2013.11) 札幌.
- 9) 川崎ナナ：バイオ医薬品の糖鎖試験の現状と課題. 第 24 回クロマトグラフィー科学会議 (2013.11) 東京
- 10) 森脇有加ら：医薬品承認申請を念頭においた抗体医薬の分析技術. 同上 (2013.11) 東京
- 11) 武田茂樹, 瀬筒秀樹, 他 6 名：インスリン分泌促進物質の精製と解析. 第 36 回日本分子生物学会 (2013.12) 神戸

政策提言

- 1) 糖鎖試験法 日局一般試験法, 及び参考情報 日本薬局方原案審議委員会生物薬品委員会：同上 (2014 年 3 月提出予定)
- 2) ELISA 法 日局参考情報原案:同上 (2014 年 3 月提出予定)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

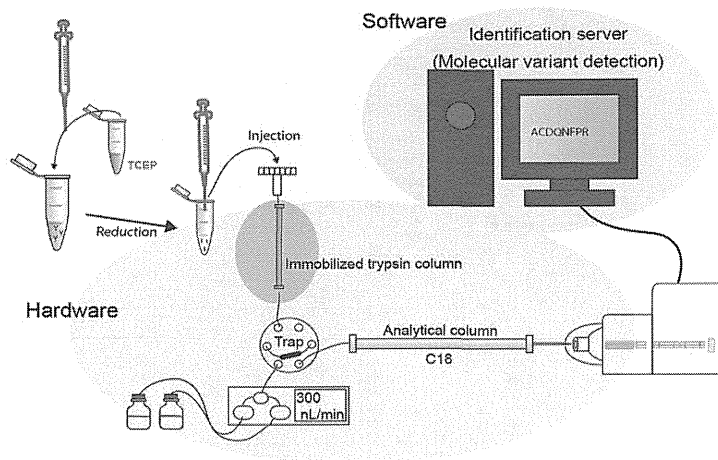


図 1. 分子変化体モニタリングシステムの概略図

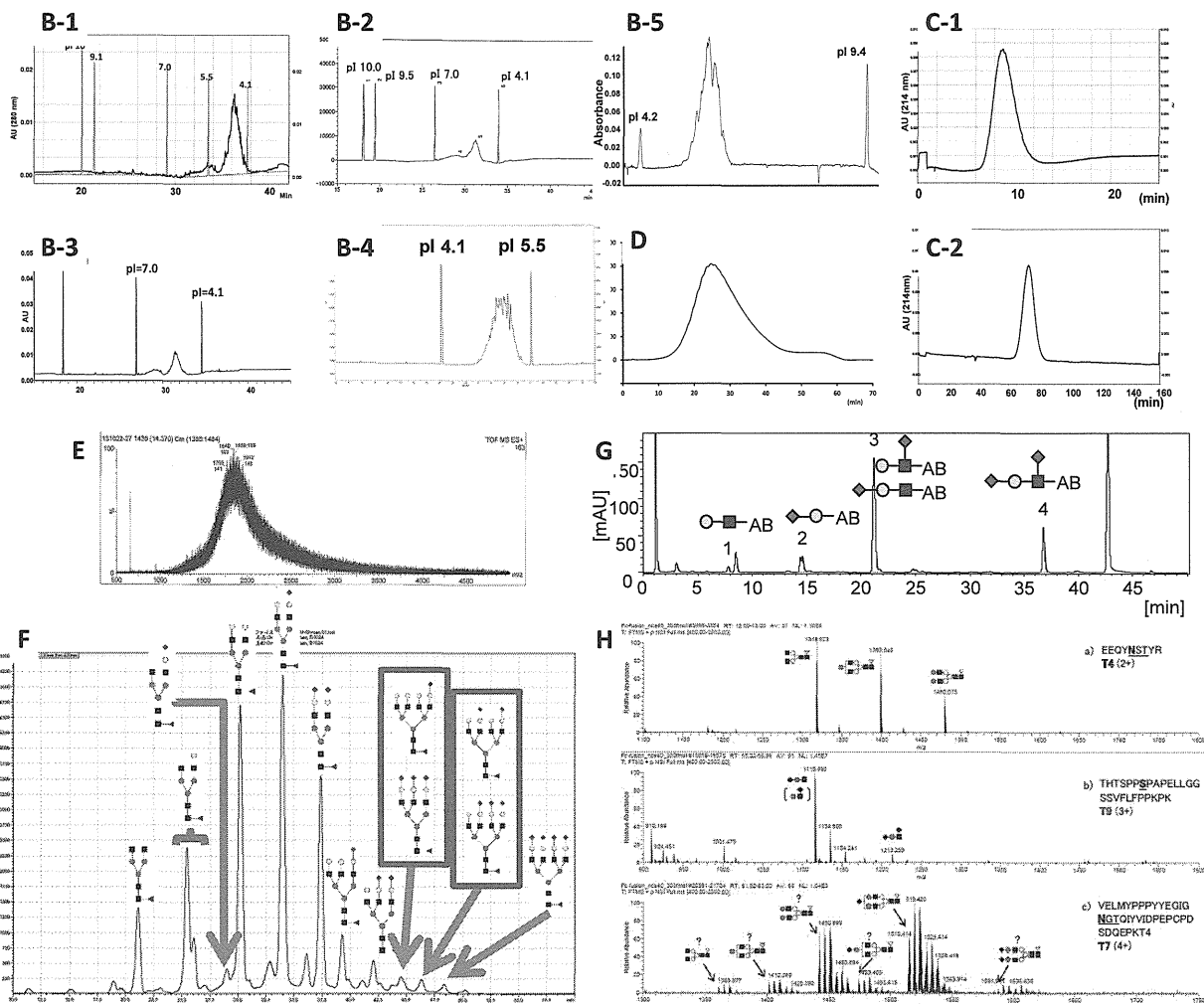
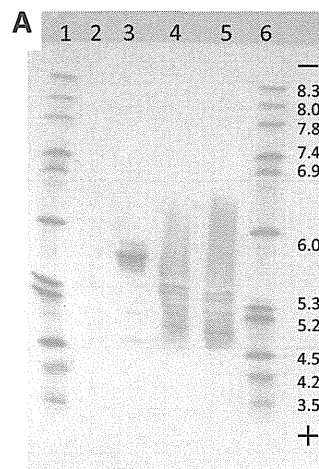


図 2. Fc 融合タンパク質のグリコフォーム分析, 及び N-及び O-結合同型糖鎖分析及糖ペプチド分析
A : IEF (レーン 1, 2, 3, 4, 5 : マーカー, シアリダーゼ, シアリダーゼ消化物, 対照, 無処理), B1-4 :
cIEF, B-5 : icIEF, C : CZE, D : IEX, E : MS, F : N-糖鎖分析, G : O-糖鎖分析, H : 糖ペプチド

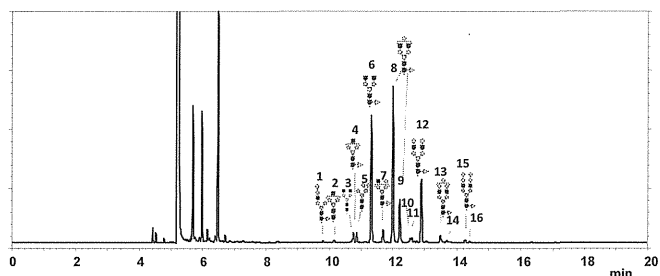


図 3. 抗体医薬品の APTS CE/FL

機関	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8	Peak 9	Peak 10	Peak 11	Peak 12	Peak 13	Peak 14	Peak 15	Peak 16
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
対ピーク面積比																
A	1.2	0.1	2.4	0.0	1.2	0.0	7.5	0.1	7.0	0.1	100.0	0.0	9.2	0.2	116.3	0.2
B	1.1	0.0	2.0	0.1	1.5	0.1	7.0	0.1	7.5	0.0	100.0	0.0	10.1	0.2	123.3	3.7
C	1.2	0.1	2.3	0.1	1.1	0.2	7.6	0.3	7.2	0.2	100.0	0.0	8.7	0.4	116.1	1.2
D	2.3	0.2	1.4	0.2	1.3		10.8	1.4	6.4	1.1	100.0	0.0	10.1	0.4	120.2	6.1
E	1.3	0.1	2.8	0.2			9.1	0.2	9.7	1.0	100.0	0.0	9.4	0.3	116.1	2.4
F	1.1	0.1	2.2	0.2	1.0	0.3	7.2	0.4	9.5	0.6	100.0	0.0	10.4	0.3	125.6	3.1
総平均	1.4		2.2		1.2		8.2		8.1		100.0		9.6		119.6	
精度 (機関間)		1.1		1.2		0.4		3.6		3.1			1.5		10.1	
精度 (機関内)		0.1		0.3		0.2		0.6		0.6			0.3		3.4	
対ピーク高さ比																
A	1.3	0.0	1.8	0.0	1.1	0.0	7.4	0.1	7.1	0.1	100.0	0.0	9.4	0.0	121.7	0.13
B	1.4	0.0	2.0	0.0	0.2	0.3	7.5	0.0	7.8	0.0	100.0	0.0	9.7	0.0	121.7	0.52
C	1.3	0.1	1.8	0.0	0.9	0.1	7.4	0.1	7.3	0.2	100.0	0.0	9.3	0.2	122.1	1.01
D	2.3	0.2	1.5	0.8	0.0	0.0	9.3	1.2	6.8	1.2	100.0	0.0	9.5	0.0	117.4	3.51
E	1.4	0.1	2.5	0.2			7.8	0.2	9.8	0.9	100.0	0.0	9.5	0.2	117.0	2.25
F	1.4	0.1	2.1	0.2	1.1	0.1	7.5	0.2	9.9	0.6	100.0	0.0	9.9	0.1	124.7	0.14
総平均	1.5		2.0		0.6		7.8		8.3		100.0		9.5		120.8	
精度 (室間)		0.9		0.8		1.1		1.8		3.2			0.5		7.3	
精度 (機関内)		0.1		0.3		0.1		0.5		0.5			0.1		1.8	

Peak6のピーク強度を100とした。
ピークが検出できない、もしくは分離できなかった場合があった。

表 1. 抗体医薬品の APTS CE/FL のピーク強度比の再現精度 (6 機関, 6 回測定)

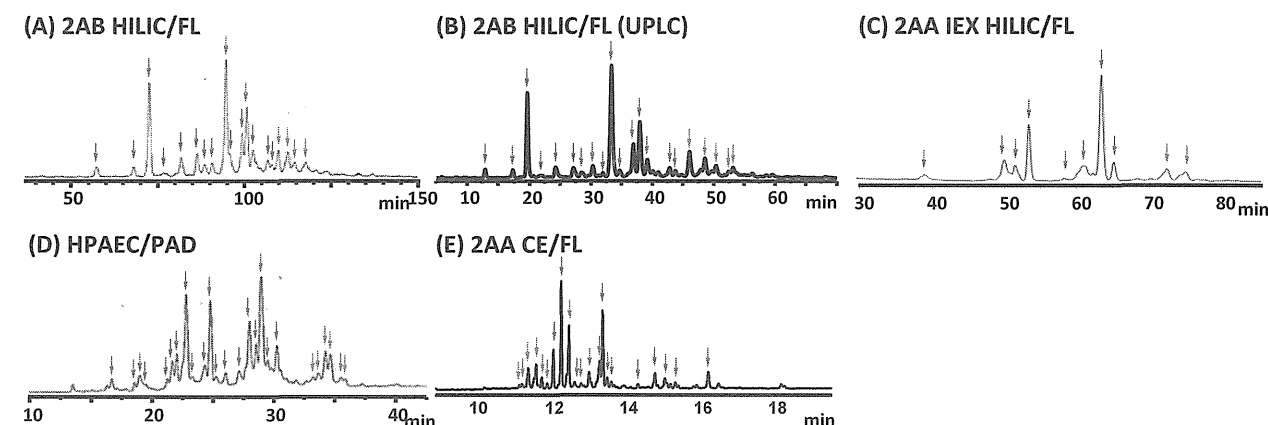


図 4. α 1 酸性糖タンパク質糖鎖の代表的な糖鎖プロファイル

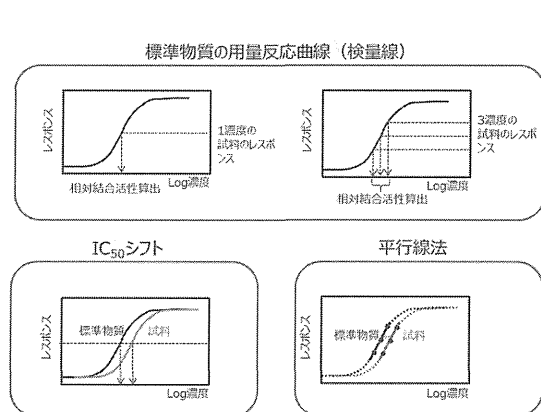


図 5. 競合法 ELISA の試験デザイン及び解析手法

		標準物質の用量反応曲線（検量線）				IC ₅₀ シフト**				平行線法
		4-parameter		5-parameter		4-parameter		5-parameter		
		1濃度の 試料	3濃度の 試料 (平均値)	1濃度の 試料	3濃度の 試料 (平均値)	制約 なし	制約 あり	制約 なし	制約 あり	
機関A	平均	103.8	103.1	101.2	102.1	104.7	99.5	107.3	99.5	100.9
	SD	1.3	2.1	1.4	1.9	7.8	1.6	23.4	1.6	1.1
機関B	平均	105.5	103.0	104.2	102.4	104.7	101.4	103.6	101.4	103.6
	SD	13.1	7.4	11.1	6.4	11.3	5.5	16.0	5.4	5.6
機関C*	平均	93.1	100.5	94.2	103.8	102.9	106.5	106.8	106.6	101.4
	SD	14.1	14.2	17.0	15.5	14.3	15.4	19.2	17.0	16.5
機関D*	平均	115.1	112.7	112.3	115.4	129.8	119.6	127.2	116.2	114.3
	SD	12.1	12.8	13.0	14.6	21.4	22.0	22.1	22.5	13.7
機関E	平均	110.3	111.3	110.4	111.5	100.1	114.7	101.0	114.7	111.0
	SD	3.7	4.6	3.8	4.8	4.0	9.3	11.6	9.3	5.8
機関F	平均	89.2	96.8	85.7	99.0	83.3	91.5	86.7	91.4	87.8
	SD	6.8	9.0	7.7	8.8	7.7	3.5	7.1	3.5	4.3

*: C,Dの数値は参考値
 **: 全て重み付けなし
 制約なし: 標準物質と試料の用量反応曲線を個別に回帰
 制約あり: 標準物質と試料の用量反応曲線の形状を同一として回帰
 赤字: 測定結果の中で良好な数値

表 2. 競合法 ELISA の各機関での 6 回測定における真度の平均及び真度の SD

		4-parameter				5-parameter			
		制約なし		制約あり		制約なし		制約あり	
		重み付けなし	重み付け1/Y ²	重み付けなし	重み付け1/Y ²	重み付けなし	重み付け1/Y ²	重み付けなし	重み付け1/Y ²
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
機関A	平均	104.7	7.8	106.2	12.9	99.5	1.6	101.5	2.1
	SD	104.7	11.3	104.8	13.3	101.4	5.5	103.5	9.0
機関B	平均	104.7	7.8	106.2	12.9	99.5	1.6	101.5	2.1
	SD	104.7	11.3	104.8	13.3	101.4	5.5	103.5	9.0
機関C*	平均	102.9	14.3	104.7	16.7	106.5	15.4	104.6	16.1
	SD	102.9	14.3	104.7	16.7	106.5	15.4	104.6	16.1
機関D*	平均	129.8	21.4	128.5	8.0	119.6	22.0	107.5	7.2
	SD	129.8	21.4	128.5	8.0	119.6	22.0	107.5	7.2
機関E	平均	100.1	4.0	103.7	5.3	114.7	9.3	110.8	5.5
	SD	100.1	4.0	103.7	5.3	114.7	9.3	110.8	5.5
機関F	平均	83.3	7.7	84.5	8.8	91.5	3.5	97.7	3.1
	SD	83.3	7.7	84.5	8.8	91.5	3.5	97.7	3.1

* : C,Dの数値は参考値

□ : 全ての解析結果で最も良い数値

赤字 : 重み付け1/Y²により改善

表 3. IC₅₀ シフト解析における重み付けの効果

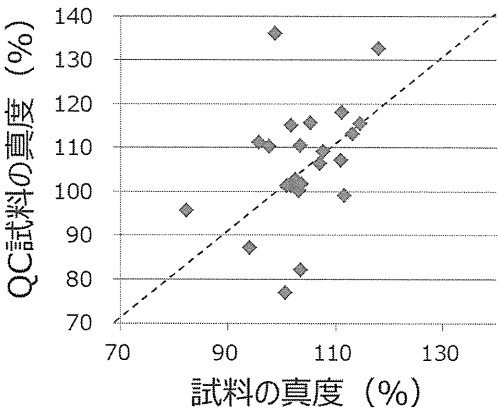


図 6. QC 試料の真度と試料の真度 (3 濃度の試料より検量線を用いて計算した値) の比較

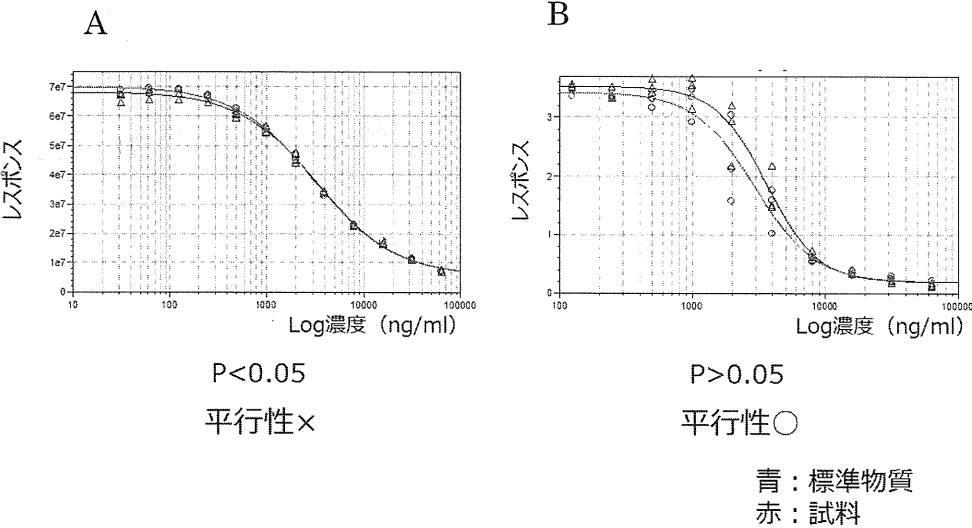


図 7. 分散分析を用いた平行性の判定結果. A 良好な測定結果だが、平行でないと判定されたケース; B, 良好な測定結果ではないが、平行と判定されたケース

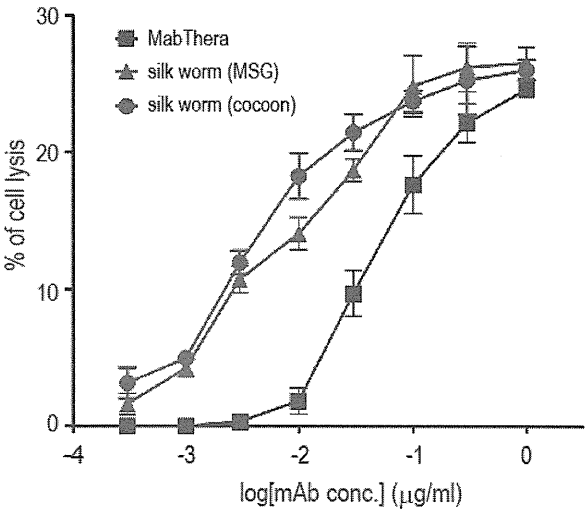


図 8. Tg カイコ及び CHO 細胞で生産された抗 CD20 抗体の ADCC 活性

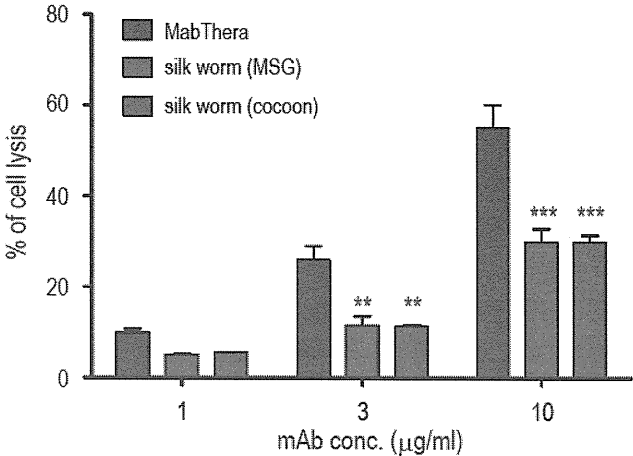
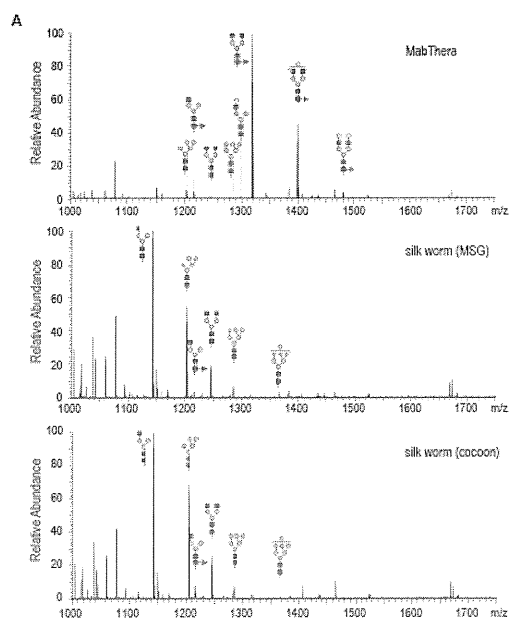


図 9. Tg カイコ及び CHO 細胞で生産された抗 CD20 抗体の CDC 活性



B

MabThera	0.5	62.2	27.0	2.2	-	2.7	-	3.5	-
silk worm (MSG)	10.0	-	-	-	48.8	1.1	9.3	26.4	2.9
silk worm (cocoon)	10.9	0.5	-	-	43.8	3.0	6.8	31.0	3.2

図 10. Tg カイコ及び CHO 細胞由来抗 CD20 抗体の糖鎖構造解析

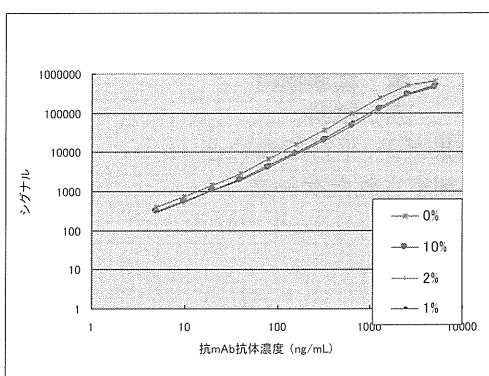


図 13. ヒト血清濃度がアッセイの感度に及ぼす影響（電気化学発光測定）

方法	留意点
検量線 ○	複数濃度の試料より定量結果を得る 4-PL, 5-PLは適宜選択
EC50シフト ◎	重み付け等の回帰方法は適宜選択する 4-PL, 5-PLで結果は同等
平行線法 ○	広い濃度範囲で直線であることが必要

表 5. 競合法 ELISA の試験デザイン、データ解析手法に関する概要

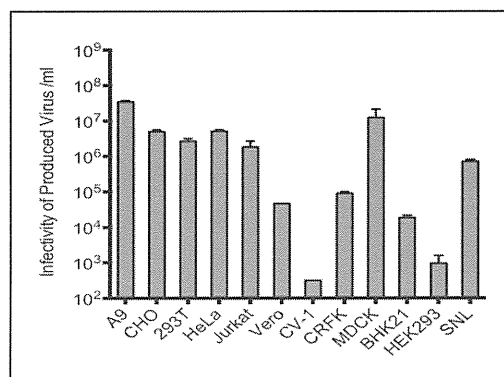


図 11. 細胞種による MVM の感染性の違い

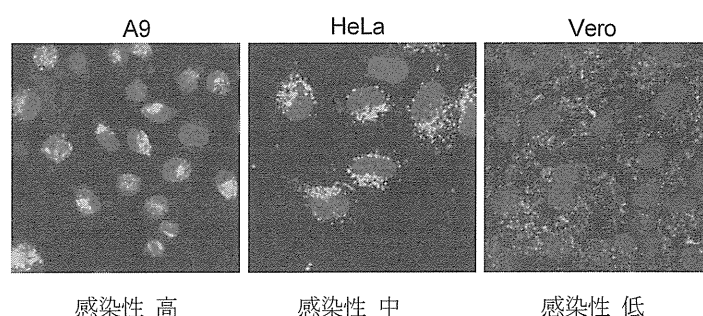


図 12. 細胞種による MVM の感染性の違いは蛍光標識ウイルスの核周辺への集積の違いと粗関する

機関	条件	評価
A	50 人の個別ヒト血清 ± mAb (100 µg/mL), 3 runs/analyst×2 analysts, n=1	特異性 Cut Point (阻害率 (%)) =平均 + 2.33×SD
B	50 人の個別ヒト血清 ± mAb (10 µg/mL), 1 run/analyst×1 analyst, n=1	特異性 Cut Point >56.6% (阻害率) 偽陽性率=0.1%
C	50 人の個別ヒト血清 ± mAb (350 µg/mL), 3 runs/analyst×1 analyst, n=1	上限 99.9% (エクセル関数)
D	50 人の個別ヒト血清 ± mAb (50 µg/mL), 1 run/analyst×3 analysts, n=1	特異性 Cut Point (阻害率 (%)) =平均 + 3.09×SD
E	50 人の個別ヒト血清あるいはプールヒト血清 ± 抗 mAb 抗体 (50, 500 ng/mL) ± mAb (50 µg/mL), n=1	陽性コントロールサンプルにおける 特異性 Cut Point (50 ng/mL) → >30% (阻害率)
F	陽性コントロール (抗 mAb 抗体をプールヒト血清で 5×10 あるいは 10 に希釈) ± mAb (500 µg/mL), n=1	特異性 Cut Point → >70% (阻害率)

表 4. 特異性カットポイントの設定

方法	条件	結果	留意点
検量線	試料の相対結合活性の CV 値 設定濃度範囲における検量線用標準物質の真度の CV 値 設定濃度範囲における検量線用標準物質の真度	○ ○ ○	試験デザインとして CV 値を小さく出来ないケースでは判定不能 試験デザインとして CV 値を小さく出来ないケースでは判定不能
検量線の各パラメータの数値	QC 試料の真度	△	多くのケースで試料の真度と乖離 試料の希釈方法、プレート配置が重要 ばらつきが大きい (特に 5-PL)
IC50 シフト	パラメータの比を用いた equivalence test 残差分散の比較	○ △	5-PL では値が大きく外れることがある データのばらつきが大きいほど判定が甘い
平行線法	QC 試料の真度 標準物質・試料の回帰曲線パラメータの数値	△ △	多くのケースで試料の真度と乖離 試料の希釈方法、プレート配置が重要 ばらつきが大きい (特に 5-PL)
	直線性、平行性	△	パラメータによっては使用できる可能性あり 分散分析ではデータのばらつきが大きいほど判定が甘い

表 6. 競合法 ELISA の試験成立条件に関する概要

製剤特性評価及び製造工程管理に基づく機能性製剤等の総合品質管理戦略確立に関する先端的評価科学研究

国立医薬品食品衛生研究所

奥田晴宏

研究要旨 QbD アプローチによる医薬品製剤開発の実現に不可欠な製剤特性を解析するための適切な評価法が定まっていない(1) ナノ DDS 製剤, (2) 機能性製剤, (3) 超難溶性薬物製剤等について製剤特性評価法の開発を行い, また, (4) これらの製剤の製造工程をリアルタイム, 超高速に管理する製造工程管理手法を検討した.

研究組織

(1) 国立医薬品食品衛生研究所

奥田晴宏; 加藤くみ子; 四方田千佳子;
柴田寛子; 阿曾幸男; 宮崎玉樹; 香取典
子; 小出達夫; 坂本知昭

(2) 東京大学大学院薬学系研究科 楠原洋之

(3) 東京工業大学資源化学研究所 西山伸宏

(4) 千葉大学大学院薬学研究院 山本恵司

(5) 東邦大学薬学部 寺田勝英

(6) 帝京大学薬学部 丸山一雄

(7) 日本化薬株式会社 中西健

(8) 興和株式会社 小崎雅人

(9) アステラス製薬株式会社

山梨繁行; 瀧本直人

(10) 東和薬品株式会社 立木秀尚

(11) ニプロパッチ株式会社 山内仁史

(12) 富士フィルム株式会社 大野誠

(13) 塩野義製薬株式会社

村主教行; 日裏深雪

(14) 第一三共株式会社 脇山尚樹

(15) 武田薬品工業株式会社

池田幸弘; 廣島高志; 手島浩一郎

(16) 株式会社パウレック 高嶋武志

(17) 参天製薬株式会社

池井辰夫; 西岡和幸

(18) 日揮株式会社

木村格

(19) 田辺三菱製薬株式会社

夜久晃治

A. 研究目的

最新の医薬品開発では、医薬品のライフサイクルを通じて品質確保を図るために、品質・安全性・有効性に関連する目標製品品質プロファイル (QTPP) を設定し、そのプロファイルを満足する重要品質特性 (CQA) となりうる特性 (potential CQA) を選択し、その特性を体系的・科学的に研究し、CQA を最終的に特定する。その上で、最終製品の品質試験 (スペック) および製造工程管理を組み合わせる品質管理戦略を立案し、製品品質の恒常性が確保される。さらに製造工程を管理するためには、プロセス解析工学 (PAT) の手法を取り入れ、リアルタイムに工程をモニターすることによりより頑健かつ科学的な製造工程管理を実現することが望まれている。このような科学的・体系的な取り組みは QbD アプローチとも呼ばれ、ICH でも推奨されている。

ミセル製剤やナノ粒子製剤に代表される機能性製剤は製剤特性や製造方法が複雑・高度化しており、QbD アプローチで取り組むには下記の様な課題が存在する。① 設定される QTPP の評価法の開発, ② CQA が QTPP に及ぼす作用機序の解明, ③ 機能性製剤の品質特性の解析手法, ④ CQA と製造工程の機能的関連を解析するリアルタイム測定技術などである。

本研究計画は上記の研究課題に対応し、4 分担研究課題から構成される。第一課題は、ナノ DDS