

表 1 同定されたタンパク質のリスト (4/4)

354468793	PREDICTED: leukocyte elastase inhibitor A [Cricetulus griseus]	12.66	12					3	0	3	1	3	0	0	0
350538007	proliferating cell nuclear antigen [Cricetulus griseus]	15.33	12					2	0	2	2	2	0	0	0
354479983	PREDICTED: malate dehydrogenase, cytoplasmic-like [Cricetulus griseus]	14.97	12					2	0	2	2	1	0	0	0
354481358	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3-like [Cricetulus griseus]	30.52	12					2	0	2	2	1	0	0	0
354503829	PREDICTED: protein CTLA-2-beta-like [Cricetulus griseus]	33.00	12					2	0	2	2	1	0	0	0
354480275	PREDICTED: protein CREG1-like [Cricetulus griseus]	19.09	12					2	0	1	2	1	0	0	0
354491897	PREDICTED: nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	15.31	11					4	0	2	1	4	0	0	0
350540068	low-density lipoprotein receptor [Cricetulus griseus]	6.09	11					3	0	2	3	1	0	0	0
354488503	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like [Cricetulus griseus]	12.15	11					2	0	2	2	2	0	0	0
354478166	PREDICTED: protein disulfide-isomerase A6-like [Cricetulus griseus]	10.00	10					3	0	2	3	2	0	0	0
354476481	PREDICTED: semaphorin-3B [Cricetulus griseus]	8.01	10					3	0	3	2	2	0	0	0
354476647	PREDICTED: acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A-like [Cricetulus griseus]	11.74	10					2	0	1	2	2	0	0	0
354494845	PREDICTED: lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma [Cricetulus griseus]	10.65	10					2	0	2	1	2	0	0	0
354472158	PREDICTED: enhancer of rudimentary homolog [Cricetulus griseus]	26.92	10					2	0	1	1	2	0	0	0
354476736	PREDICTED: phospholipid transfer protein [Cricetulus griseus]	12.78	9					3	0	2	3	3	0	0	0
354477936	PREDICTED: adenosylhomocysteinase [Cricetulus griseus]	13.89	9					3	0	2	2	3	0	0	0
354470785	PREDICTED: acid ceramidase-like [Cricetulus griseus]	10.38	9					3	0	1	2	3	0	0	0
354480675	PREDICTED: hypothetical protein LOC100760484 [Cricetulus griseus]	9.14	9					3	0	2	1	3	0	0	0
350538667	sialidase-1 [Cricetulus griseus]	11.95	9					2	0	2	2	2	0	0	0
354466878	PREDICTED: amyloid-like protein 2-like [Cricetulus griseus]	3.56	9					2	0	0	2	2	0	0	0
354503661	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 [Cricetulus griseus]	9.69	9					2	0	1	1	2	0	0	0
354496692	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-6-like, partial [Cricetulus griseus]	24.09	8					3	0	2	3	3	0	0	0
354497813	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-5-like [Cricetulus griseus]	21.99	8					3	0	3	1	1	0	0	0
354488115	PREDICTED: tissue factor pathway inhibitor-like [Cricetulus griseus]	15.05	8					2	1	0	2	1	0	1	1
354475135	PREDICTED: hsp90 co-chaperone Cdc37-like [Cricetulus griseus]	13.98	8					2	0	2	2	2	0	0	0
350539633	beta-2-microglobulin [Cricetulus griseus]	10.92	8					2	0	1	2	2	0	0	0
354477958	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 6 [Cricetulus griseus]	19.59	8					2	0	1	2	2	0	0	0
354501914	PREDICTED: beta-glucuronidase [Cricetulus griseus]	6.64	8					2	0	1	2	2	0	0	0
354506235	PREDICTED: pigment epithelium-derived factor-like [Cricetulus griseus]	9.52	8					2	0	1	2	2	0	0	0
354478868	PREDICTED: glucosylceramidase [Cricetulus griseus]	6.80	8					2	0	2	2	1	0	0	0
354480589	PREDICTED: ran-specific GTPase-activating protein-like [Cricetulus griseus]	10.00	8					2	0	2	2	1	0	0	0
354487679	PREDICTED: lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase-like [Cricetulus griseus]	10.33	8					2	0	2	2	1	0	0	0
354504707	PREDICTED: sialate O-acetyltransferase-like [Cricetulus griseus]	9.27	8					2	0	1	2	1	0	0	0
354475788	PREDICTED: galactin-3-like [Cricetulus griseus]	21.84	7					4	0	1	1	4	0	0	0
354489619	PREDICTED: isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic-like [Cricetulus griseus]	12.80	7					3	0	3	1	2	0	0	0
354501876	PREDICTED: F-actin-capping protein subunit alpha-1-like [Cricetulus griseus]	12.90	7					2	0	1	2	2	0	0	0
354495381	PREDICTED: transaldolase [Cricetulus griseus]	10.68	7					2	0	2	1	2	0	0	0
350537691	aldose reductase-related protein 2 [Cricetulus griseus]	12.34	7					2	0	1	1	2	0	0	0
354469573	PREDICTED: profilin-1-like [Cricetulus griseus]	18.57	7					2	0	1	1	2	0	0	0
354475851	PREDICTED: acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B-like [Cricetulus griseus]	11.07	7					2	0	1	1	2	0	0	0
354486298	PREDICTED: proteasome subunit beta type-1-like [Cricetulus griseus]	15.42	7					2	0	1	2	1	0	0	0
354502777	PREDICTED: ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 [Cricetulus griseus]	3.38	6					3	0	0	1	3	0	0	0
354468505	PREDICTED: WD repeat-containing protein 1-like [Cricetulus griseus]	11.17	6					3	0	1	3	2	0	0	0
354474966	PREDICTED: glutathione reductase, mitochondrial-like [Cricetulus griseus]	8.70	6					2	0	2	1	2	0	0	0
354477950	PREDICTED: glutathione synthetase-like [Cricetulus griseus]	6.12	6					2	0	2	1	2	0	0	0
354475471	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: inorganic pyrophosphatase-like [Cricetulus griseus]	10.48	6					2	0	1	1	2	0	0	0
354496954	PREDICTED: TAR DNA-binding protein 43-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	20.34	6					2	0	1	2	1	0	0	0
354478978	PREDICTED: protein S100-A6-like [Cricetulus griseus]	39.23	6					2	0	0	2	1	0	0	0
354494229	PREDICTED: SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein-like [Cricetulus griseus]	27.19	6					2	0	2	1	1	0	0	0
354489228	PREDICTED: glyoxalase domain-containing protein 4-like [Cricetulus griseus]	8.05	5					2	0	1	1	2	0	0	0
354488597	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-1-like [Cricetulus griseus]	10.27	5					2	0	2	0	2	0	0	0
354485879	PREDICTED: palmitoyl-protein thioesterase 1-like [Cricetulus griseus]	16.34	5					2	0	2	2	1	0	0	0
350537471	hypoxia up-regulated protein 1 [Cricetulus griseus]	3.00	5					2	0	0	2	1	0	0	0
354479086	PREDICTED: PC4 and SFRS1-interacting protein-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	11.14	5					2	0	2	1	1	0	0	0
354466759	PREDICTED: c-C motif chemokine 2-like [Cricetulus griseus]	11.89	4					2	1	0	1	2	1	0	0
354474875	PREDICTED: LIM and SH3 domain protein 1-like [Cricetulus griseus]	23.79	4					2	0	0	2	2	0	0	0
354484233	PREDICTED: microtubule-associated protein 4 [Cricetulus griseus]	3.32	4					2	0	0	2	1	0	0	0
350540096	lysosome-associated membrane glycoprotein 1 [Cricetulus griseus]	5.65	3					2	0	0	1	2	0	0	0
354506607	PREDICTED: reticulocalbin-3-like [Cricetulus griseus]	12.92	3					2	0	0	1	2	0	0	0
354497505	PREDICTED: putative phospholipase B-like 2 [Cricetulus griseus]	4.27	3					2	0	1	2	0	0	0	0
354488693	PREDICTED: small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha-like [Cricetulus griseus]	8.28	3					2	0	0	2	0	0	0	0
354467683	PREDICTED: mammalian ependymin-related protein 1-like [Cricetulus griseus]	7.77	3					2	0	2	1	0	0	0	0
354485024	PREDICTED: synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog, partial [Cricetulus griseus]	10.73	2					2	0	2	0	0	0	0	0

ショットガンプロテオミクスの手法による解析で注意すべき点として、ペプチド断片の組み合わせのみでタンパク質の存在を判断している点が挙げられる。これに関連した事項のひとつに、外来タンパク質の混入に留意する必要がある。PrA-HCPからのみ同定された25個のタンパク質のうち12個については、keratinであったことは注意すべき事項と考えた。Keratinは、コンベンショナルな実験室においては、実験者に由来する脱落皮膚片として環境中に飛散しており、サンプル調製中に混入する恐れがあることが知られている。今回の解析は、コンベンショナルな実験室で実施していることから、同定されたタンパク質が混入によるものかを検討するために、ヒトのタンパク質データベース (Swiss-Prot-Human) に対する検索を試みた。CHO細胞の由来動物であるハムスターとヒトにおいては、keratinの相同性が高いものの、一部に異なる配列が存在する。この違いを利用して検討した結果、keratinとして同定されたうち10個については、ヒトのkeratinと共通する配列であり、かつ、ヒトに特徴的な配列を有するペプチドのみ同定されていることから、ヒトに由来したものと判断した。2個については、CHO細胞に特徴的な配列のペプチドが検出されていることから、ヒト由来のkeratinが混入していることは排除できないが、CHOのHCPが含まれていたものと判断した。したがって、今回実施したショットガンプロテオミクスの手法による解析の結果、PrA-HCPから40個のHCPが同定され、このうちPrA-HCPからのみ同定されたHCPは、15個と結論付けた (図8)。

本研究で実施した解析において、CM-HCPと比べてPrA-HCPの同定数は少なかった。しかし、PrA-HCPからのみ同定されたHCPが、15個であった点は、特筆できる。これらのHCPは、培養上清中の含量が少なかったため同定されなかったが、PrAカラムクロマトグラフィーで残留性HCPが濃縮された結果、検出されたものと考えられる。2次元電気泳動のパターンの差異と合わせて考えると、培養上清中のHCPの一部が、カラム基材等に吸着性で残留していることが示唆される。すなわち、管理すべきHCPは、残留性HCPであると結論付けられる。したがって、HCP

のMRMを行うための定量用ペプチドのMSスペクトル情報を得るための解析ソースとして、部分精製により得た残留性HCPを用いることは有用であると考えられた。また、ショットガンプロテオミクスの手法による解析で得られたペプチド情報を基とし、MRMを用いたHCPの管理手法の開発が、今後の課題となった。

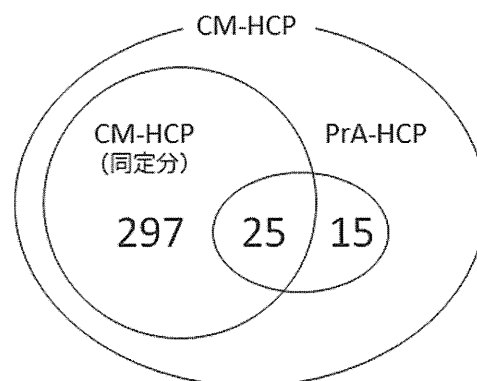


図8 同定されたタンパク質数を示したベン図。

CM-HCPから237個、PrA-HCPから40個のタンパク質が同定された。このうち、PrA-HCPからのみ同定されたタンパク質は、15個であった。

#### D. 結論

- 1) 抗体医薬品親和性ペプチド固定化スピンカラムを用いることで、様々な抗体医薬品を簡便かつ迅速に高収率で回収できることが明らかとなった。また、血漿中のgolimumabを高収率で回収できることが確認された。本カラムは、血中で安定な抗体医薬品の糖鎖を解析するための前処理方法として有用である。
- 2) ショットガンプロテオミクスの手法による解析を実施し、いくつかの残留性HCPを同定した。今後、定量用ペプチドプローブリストを作成する予定である。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

## 2. 学会発表

- 1) 川崎ナナ：バイオ医薬品の品質管理. クオリティ・バイ・デザインと質量分析. BMSコンファレンス (2013. 7. 8-10) (宮崎市)
- 2) 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) (つくば市)
- 3) Hyuga, M., Takakura, D., Hashii, N., Ishii, A.,

Niimi, N., Kawasaki, N., Shotgun proteomics of residual host cell derived proteins in Protein A chromatography eluate, Measurement of Residual Host Cell Protein and DNA in Biotechnology Products Workshop (2013.6)(Rockville, MD, USA)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
平成25年度分担研究報告書

ーバイオ医薬品において免疫原性が有効性及び安全性に及ぼす影響ー

研究分担者：新見 伸吾（国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部）

研究要旨

バイオ医薬品において免疫原性が有効性及び安全性に及ぼす影響について研究を行い以下の点を明らかにした。

IFN- $\beta$ 製剤、natalizumab、infliximab、adalimumab、alglucosidase alfa、血液凝固第Ⅷ因子製剤で、有効性が低下した。即効型遺伝子組換え活性型第Ⅶ因子製剤であるvatreptacog alfaの臨床第Ⅲ相試験において、患者一人で中和抗体が出現した。

Cetuximab、adalimumabでⅠ型アレルギーの発症が示された。Infliximab、trastuzumab、rituximabでⅠ型アレルギーの発症が示唆された。alglucosidase alfa、infliximab、natalizumabでⅢ型アレルギー反応が報告されている。Rituximab、infliximab、alglucosidase alfa、natalizumabで抗体産生が原因とみられるインフュージョン反応が報告されている。PEG-rHuMGDF、アメリカ以外で販売されたある特定のエポエチン $\alpha$ 製剤（Eprex<sup>®</sup>）でそれらと相同性を有する内在性タンパク質の中和による重篤な自己免疫疾患が起こった。

キーワード：バイオ医薬品、免疫原性、有効性、安全性

A. 研究目的

これまでに多くのバイオ医薬品が医療の現場に提供され患者が恩恵を受けているが、有効性と安全性の観点から現在最も問題となっているのが免疫原性である。FDAの安全性情報に基づいたバイオ医薬品による抗体の産生率に関する報告では、患者の多くでバイオ医薬品に対する抗体が産生され、高いものでは約40%に達する場合がある。ほとんどのバイオ医薬品では、産生された抗体により有効性の低下及び有害事象の発症は起こらないが、中和抗体が産生され、治療効果が低下する場合もある。また、バイオ医薬品に対する抗体による有害事象については、Ⅰ型アレルギー、Ⅲ型アレルギー、インフュージョン反応及びバイオ医薬品に対応する内在性タンパク質の中和による重篤な自己免疫疾患などがある。そこで、本研究においては、①免疫原性が有効性に及ぼす作用、②免疫原性が安全性に及ぼす作用につい

て明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

文献及び海外のコンフェレンスの資料等を基に調査及び研究を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 免疫原性が有効性に及ぼす作用

以下に、バイオ医薬品に対して産生された抗体によりバイオ医薬品の有効性の低下が示された例あるいは示唆された例を示す。

IFN- $\beta$ 製剤はバイオ医薬品の中で患者における中和抗体の陽性率が高く、Betaseron、Rebif、Avonexで、それぞれ、28～47%、5～38%、2～14%である[1]。Betaseron及びRebifにおける罹患率（1年間で再発する患者の数の一定の患者当たりの割合）が中和抗体陽性及び陰性患者で比較された[2]。その結

果、Betaseronでは中和抗体陰性患者で0.56、中和抗体陽性患者で1.08であった。また、Rebifでは中和抗体陰性患者で0.6、中和抗体陽性患者で1.0であった。IFN- $\beta$ 製剤で抗体が産生されやすいのは、IFN- $\beta$ が免疫反応を促進する性質を有していること、凝集体を形成しやすいことによると考えられる。Rebifに比べてBetaseronで中和抗体陽性率が高いのは、Betaseronを大腸菌で産生させているため、安定性及びT細胞エピトープの遮蔽などに関与する糖鎖が付加されていないこと、アミノ酸の欠失及び置換によりヒトIFN- $\beta$ と一部のアミノ酸配列が異なっていること、賦形剤として凝集体の形成促進への関与が示されているヒト血清アルブミンが添加されていることによると考えられる[3、4]。

抗体医薬品では以下のような知見が得られている。二つの無作為二重盲検プラセボコントロール試験で、再発性寛解型多発性硬化症の患者においてnatalizumabの有効性及び安全性が評価された[5]。その結果、患者の9%が抗体陽性で、そのうち一過性の陽性が3%、持続性の陽性が6%であった。3～6ヵ月において有効性の低下を示すEDSSスコアを陰性患者と比較すると、持続的な抗体陽性患者では約3倍、一過性の抗体陽性患者では約2倍増加した。一過性の抗体は6ヵ月後には陰性となり、それに伴い6～9ヵ月において指数は陰性患者と同じレベルに低下した。一方、持続的な陽性患者では高値が維持された。一過性の抗体陽性患者におけるトラフ値は12週から増加し48週後抗体陰性患者の値まで回復した。一方、持続的な抗体陽性患者におけるトラフ値は84週までは10分の1以下に低下し、その後120週まで約30%のレベルで維持された。

Infliximabによる治療で反応性を消失あるいは不寛容であったクローン病の患者において、adalimumabの有効性及び安全性が評価された[6]。その結果、有効性がみられない患者の割合は、抗体陰性患者及び抗体陽性患者で、それぞれ、15%及び80%であった。関節リウマチ患者においてadalimumabの有効性が評価された[7]。その結果、治療不良により投与が中止された患者の割合は、抗体陽性患者及び抗体陰性患者で、それぞれ、約50%及び約20%であ

った。有効性の指標の一つである最小疾患活動性の150週における達成率は、抗体陰性患者及び陽性患者で、それぞれ、約6割及び約2割であった。156週までのfollow-upにおける抗体陽性率は28%であり、そのうち67%は最初の24週で陽性となった。132週における抗体陽性患者の血中adalimumab濃度を抗体価により2段階に分けて抗体陰性患者と比べると、抗体価に依存して濃度が低下し、高い抗体価の患者では12分の1以下に低下した。硬直性脊椎炎の患者において、有効性が評価された[8]。その結果、抗体陽性患者の割合は31%であった。また、抗体陽性患者の反応者及び非反応者に占める割合は、それぞれ、約10%及び約50%であった。抗体陽性患者において、血清adalimumab濃度は、減少しているか検出できなかった。

Infliximabで治療したクローン病の患者において、トラフ値、抗infiximab抗体、有効性が評価された[9]。有効性は、有効性を確保するために投与に必要な投与期間を指標として評価され、この期間は中和抗体が産生されると短くなる。その結果、この期間は、抗体濃度が8.0  $\mu\text{g/mL}$ 以下及び以上において、それぞれ、71日及び35日であった。一方、抗体濃度が8.0  $\mu\text{g/mL}$ 以下及び以上のトラフ値は、それぞれ、11.56  $\mu\text{g/mL}$ 及び6.60  $\mu\text{g/mL}$ であった。また、infiximabで治療したリウマチ患者において、トラフ値、抗infiximab抗体、有効性が評価された[10]。その結果、抗体陽性患者の割合は約30%であり、抗体価は良好あるいは適度な反応者より非反応者で高く、抗体陽性患者の生存期間の中央値は抗体陰性患者の半分であった。投与1年後におけるトラフ値は、非反応者では検出されなかったのに対し、反応者では、平均約1800  $\text{ng/mL}$ であった。投与1年後において反応者では抗体は検出されなかったのに対し、非反応者では約200抗体単位/mLであった。Infiximabへの抵抗性のため、投与量を増加するか投与期間を短くする必要のある患者の割合は、抗体陽性患者及び抗体陰性患者で、それぞれ、約70%及び約40%であった。リウマチ患者及び脊椎関節炎の患者で抗体とトラフ値が評価された。その結果、Infiximab投与6週後のリウマチ患者における平均トラフ値は、抗体陽性患者

及び抗体陰性患者で、それぞれ、0.3 ng/mL及び15.4 ng/mLであった。同様に、脊椎関節炎の患者における平均トラフ値は、抗体陽性患者及び抗体陰性患者で、それぞれ、11.9 ng/mL及び29.5 ng/mLであった。トラフ値を抗体陽性及び陰性患者で比較した結果、投与回数が多くなるにつれて、抗体陽性患者において低下が顕著であった。

これら抗体医薬品に対して抗体が産生されるのは、キメラ抗体及びヒト化抗体ではマウス由来の配列が免疫原性を有するため、ヒト抗体では特に相補性決定領域がヒトによっては免疫原性を有することによって考えられる[11、12]。

Alglucosidase alfaについては、二つの臨床試験で89%の患者がIgG抗体陽性であり、抗体価が持続的に高い患者は、治療に対する臨床反応が低下するか運動機能が消失することを示唆する知見がある[13]。なお、血中濃度は治療後1週から12週で50%低下する。Alglucosidase alfaの適用疾患であるポンペ病とは、ライソゾームで働く酵素である酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼの遺伝子異常により、この酵素を欠損しているかあるいはその産生量が少ないため、グリコーゲンが蓄積され様々な疾患を発症する病気である。そのため、特に欠損している場合は、alglucosidase alfaが異種タンパク質として認識され、中和抗体が産生されやすい。なお、alglucosidase alfaを投与したポンペ病の患者における人口呼吸器フリーの生存率は、内在性酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼが発現している場合、30ヵ月で約7割に低下しその後一定であるのに対し、欠損している場合、約25ヵ月で0%に低下する[14]。このように、内在性酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼを欠損している患者の予後は極めて不良である。

血液凝固第Ⅷ因子製剤に対する抗体はインヒビターと呼ばれ、重症血友病A患者の20～30%に出現する[15]。インヒビターは血液凝固第Ⅷ因子と結合し、構造及び機能に異常を起こすと共にクリアランスを亢進させる[16]。そのため、止血効果は著しく低下又は消失し、出血の危険性に曝されることになる[17]。血友病Aは、X連鎖性劣性遺伝性の先天性凝固障害症であり、第Ⅷ因子遺伝子異常のため血液凝固第Ⅷ因子が欠損あるいは不足している。そのため、投与された血液凝固第Ⅷ因子製剤が異物として認識され抗体が産生されやすい。

即効型遺伝子組換え活性型第Ⅶ因子製剤であるvatreptacog alfaの臨床第Ⅲ相試験において、本品に対する抗体が数人で産生され、そのうちの患者一人で中和抗体が出現した[18]。一方、市販の活性型第Ⅶ因子製剤であるNovoSevenでは中和抗体は産生されない。結果的に、本製品の開発は中止された。なお、血液凝固系のカスケードにおいて、活性型第Ⅶ因子は、第Ⅷ因子の活性化を介して第Ⅹ因子を活性化するだけでなく、第Ⅹ因子を直接活性化する。

## 2. 免疫原性が安全性に及ぼす作用

### 2.1 I型アレルギー

バイオ医薬品の投与により、ヘルパーT細胞依存的にIgE抗体が産生され、マスト細胞表面のIgE受容体に結合する。以降、ヘルパーT細胞はT細胞と略す。バイオ医薬品を再投与すると、IgE抗体に結合し、IgE受容体を介して細胞内にシグナルが伝えられる。その結果、細胞膜や細胞内の酵素が活性化され、ヒスタミン、好酸球走化因子などの化学物質が放出され、I型アレルギーを発症する(図1)。さらに、好酸球

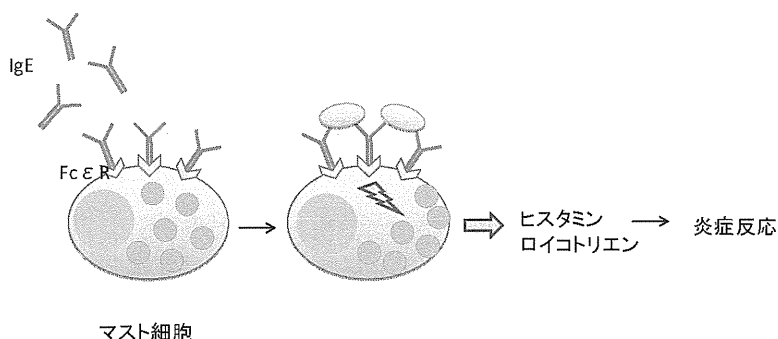


図1 I型アレルギー

走化因子及びサイトカインに呼び集められた好酸球が、I型アレルギー反応を増悪させる。I型アレルギーの主な症状は、アナフィラキシーショック、気管支喘息、アレルギー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、アレルギー性鼻炎である。Cetuximabが投与され過敏症を発症した患者で、抗IgE抗体が検出され、I型アレルギーの発症が示された[19]。しかし、血中のIgE濃度は、他の免疫グロブリン濃度の1/1000程度と低く、その中で抗体医薬品に対して産生されたIgE抗体を検出することは、感度の問題から通常困難である。Infliximabが投与され過敏症を発症した患者8人のうち5人において、皮膚試験の結果から、I型アレルギーの発症が示唆された[20]。Infliximabが投与され過敏症を発症した6人の患者うち4人において、皮膚試験の結果から、I型アレルギーの発症が示唆された[21]。Trasutuzumabが投与され過敏症を発症した3人の患者において、皮膚試験の結果から、I型アレルギーの発症が示唆された[21]。Rituximabが投与され過敏症を発症した9人の患者のうち6人において、皮膚試験の結果から、I型アレルギーの発症が示唆された[21]。Adalimumabが投与され投与部位反応が悪化した患者において、皮膚試験及び末梢血白血球を用いたヒスタミン遊離試験の結果から、I型アレルギーの発症が示された[22]。

## 2.2 III型アレルギー

III型アレルギーの主な発症機構は以下の通りである。バイオ医薬品によりT細胞依存的に抗体が産生される。バイオ医薬品と抗体が結合した免疫複合体が、食細胞に処理しきれないため組織に沈着し、補体が結合し活性化される。補体は、細胞膜を破壊して組織を傷害する。あるいは、補体が好中球を集積させ、免疫複合体を貪食する際に、好中球から放出されるタンパク質分解酵素あるいは活性酸素により組織が傷害される(図2)。

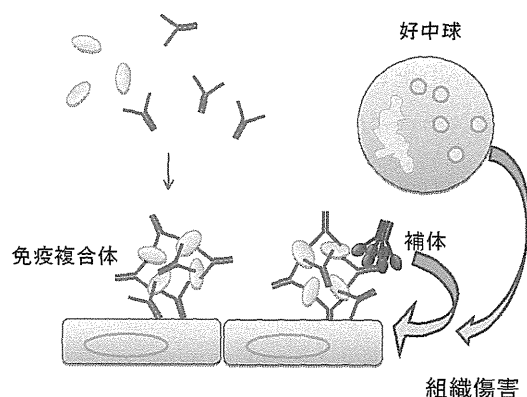


図2 III型アレルギー

III型アレルギーの主な疾患は、血清病(発熱、皮疹、リンパ節腫脹、関節痛)、慢性関節リウマチ、免疫複合型糸球体腎炎、全身性エリトマトーデスSLE(関節痛、微熱、疲労、口腔潰瘍、リンパ節腫脹、脾臓節腫、光線過敏、食欲不振など)である。

Alglucosidase alfaで報告されているIII型アレルギーの症状は、皮膚潰瘍、皮膚壊死、関節痛、関節腫脹、ネフローゼ症候群、タンパク尿、血尿である[13]。一方、infliximab[23、24]、natalizumab[25]で血清病および血清病様III型アレルギー反応が報告されている。

## 2.3 インフュージョン反応

インフュージョン反応とは、薬剤投与中または投与開始後24時間以内に発現する症状の総称である。24時間以降、また2回目の投与以降に発現することもある。なお、インフュージョン反応はI型アレルギーと混同して使用されている場合がある。本稿では、インフュージョン反応とは、主に初回投与時に起こるが、2回目の投与以降でも起こる場合があるアレルギー様反応で、バイオ医薬品に対する抗IgE抗体が原因ではないと考えられるものを指す。

インフュージョン反応の症状は、I型アレルギーの症状と類似している。軽度又は中程度の場合、発熱、悪寒、嘔気、嘔吐、頭痛、めまい、発疹などが認められる。重度の場合、アナフィラキシー様症状、肺障害、呼吸困難、低酸素症、気管支痙攣、肺炎(間質性肺炎、アレルギー性肺炎など)、心障害、低血圧、頻脈、顔面浮腫、血管浮腫、心筋梗塞、心室細動、

心原性ショックなどが認められる。通常、注入速度を緩めるか中止し、必要に応じて抗ヒスタミン薬、副腎皮質ステロイド剤などの投与により対処が可能である[26]。

インフュージョン反応の発症機構は明らかになっていないが、上記のI型アレルギーとは異なると考えられる。抗体医薬品における発症機構としては、標的細胞表面に存在する標的分子との結合により、あるいは、抗体医薬品のFc領域とNK細胞及び好中球などの細胞表面に存在するFc受容体との結合により、細胞内にシグナルが伝達されて、サイトカインの発現亢進が起これ、一過性の炎症やアレルギー様反応が引き起こされる可能性が考えられる。

インフュージョン反応を高頻度に発症するrituximabの検討では、大半の患者で投与90分後にサイトカインが高値を示し、サイトカインが高値な症例ほど高頻度にgrade 3、4のインフュージョン反応が起こる[27]。ほとんどの抗体医薬品でインフュージョン反応が認められ、インタビューフォームのⅧ.安全性（使用上の注意など）に関する項目に、インフュージョン反応に対する注意喚起が記載されている。

以下に示すケースは、抗体産生の誘導によりインフュージョン反応が増加する可能性を示すものである。Infliximabの場合、抗体陽性患者の割合は2回目の投与で最大になり約60%に達した。一方、インフュージョン反応は初回投与で起きないが、抗体陽性患者の割合の増加と相関して増加し、最大で約20%に達した。InfliximabのACCENT I無作為試験では、54週後のインフュージョン反応が起きる患者の割合は、抗体陰性患者及び抗体陽性患者で、それぞれ、24%及び38%であった[28]。Infliximabの約9年にわたる投与における抗体価の最大値は、インフュージョン反応が起きない患者に比べて起きる患者では2倍高かった[10]。Infliximab投与を一定期間継続して行っている期間と、一旦終了して一定期間後に再開した期間において、インフュージョン反応の陽性率が抗体の陽性率と比較された。その結果、最初の持続治療及び2回目の持続治療におけるインフュージョン反応の陽性率は、それぞれ、3%と17%であ

った[29]。インフュージョン反応を起こした患者における抗体価は、再開前よりも再開後で増加した。Alglucosidase alfaでは、高い抗体価の患者15人のうち8人でインフュージョン反応が起き、抗体陰性の患者3人では起きなかった[13]。Natalizumabにおいて、インフュージョン反応が起こる患者の割合は、持続的な抗体陽性の患者、一過性の抗体陽性患者及び抗体陰性患者で、それぞれ、76%、25%及び20%であった[5]。

抗体産生の誘導によりインフュージョン反応が増加する理由については明らかではないが、上記の仮説に基づくと、特に抗体医薬品の場合は抗体医薬品とそれに対する抗体の複合体がFc受容体に結合しFc受容体がクロスリンクされ、抗体医薬品単独の場合よりも強いシグナルを細胞に伝達する可能性が考えられる。

## 2.4 内在性タンパク質の中和による重篤な自己免疫疾患

### 2.4.1 PEG化組換えヒトMGDF

血小板産生を促進する可能性のある因子として、生体のグリコシル化されたヒトトロンボポエチンThrombopoetin (TPO) の最初から163アミノ酸を有するペグ化した非グリコシル化タンパク質であるPEG-rHuMGDFの臨床試験が血小板減少症、特に骨髓非破壊的前処置化学療法の設定で行われた[30、31]。これらの臨床試験でPEG-rHuMGDFはほとんどの患者で安全で血栓症とは関連しなかった。しかし、2回あるいは3回投与を受けた健常ボランティアの325名のうち13人、多数の投与および集中非骨髓機能廃絶化学療法を受けた癌患者650人のうち4人で持続的な血小板減少症（血小板数 $\leq 100 \times 10^9/L$ ）が起こった。そこで最も重篤な血小板減少症の患者3人でPEG-rHuMGDFに対する抗体と血小板減少症との関連が調べられた[32]。その結果、PEG-rHuMGDFで治療した患者で内在性TPOに対する中和抗体が検出され、TPOの最初の163アミノ酸のエピトープに対して結合した。患者の2人で内在性TPOレベルが増加したが、抗TPO抗体と結合した生物学的に不活性型の免疫複合体であった。患者のHLA、血小板の表現



型およびTPOのcDNAは正常であった。500名以上の癌化学療法患者のrHuTPOを用いた臨床研究で一人の患者で部分的な中和抗体が出現した以外は抗TPO抗体に起因する血小板減少症は報告されていない[33、34]。PEG-rHuMGDFで免疫原性が生じた原因の可能性として①グリコシル化されていないこと②コンフォメーションの不安定性をペグ化が防御できなかったこと③ rHuTPOは静脈投与でPEG-rHuMGDFは皮下投与のため、投与方法の違いによる可能性が考えられる。

#### 2.4.2 組み換えヒトエリスロポエチン

エリスロポエチンは幅広く使用されているにもかかわらず、それに対する中和抗体の出現長年非常にまれな合併症であった。そのような例は1998年まではわずか3例しか公表されていなかった[35、36]。それ以来、報告された数は劇的に増加した[37、38]。そのほとんどはアメリカ以外で販売されたある特定のエポエチン $\alpha$ 製剤 (Eprex<sup>®</sup>) で治療した慢性腎不全の患者で起きた。その増加は1998年に狂牛病の恐れを回避するためにヨーロッパで勧告に従いEprex<sup>®</sup>の剤形がヒト血清アルブミンからポリソルベート80とグリシンに処方の変更されたことがきっかけとなった。結果的にPRCAの増加はその処方がエリスロポエチンの免疫原性を増加させ、投与されたおよび内因性エリスロポエチンが不活化されることによるものであった。しかし、剤形変更により免疫原性が増加した原因については以下に示すように複合的要因が考えられる。

最初に考えられた原因はポリソルベート80とEprex<sup>®</sup>によるミセルの形成の可能性である。Eprex<sup>®</sup>に処方されたポリソルベート80の濃度は0.03w/vであり臨界ミセル濃度をはるかに越える。一方、他のエポエチン $\beta$ では臨界ミセル濃度を若干しか超えない0.01w/vが含まれている。そこでミセル表面に暴露された多くのエピトープが免疫原性の増加の原因であるという仮説が立てられた。実際にEprex<sup>®</sup>をゲル濾過クロマトグラフィーで分離するとモノマーのエポエチンだけでなく高分子画分に溶出する多量のタンパク質が検出された[39]。一方、エポエチン $\beta$ ではそのような高分子画分に溶出する物質は検出され

なかった。

二番目の可能性としてEprex<sup>®</sup>を充填したシリンジに使用する未コートゴムストッパーからポリソルベート80により有機化合物が滲出しアジュバントとして働く可能性が考えられた。この有機化合物はゴムの硬化剤として通常使用されるフェノール誘導体であることが明らかになった。さらに、滲出物はEprex<sup>®</sup>製剤のポリソルベート80製剤あるいはコートしていないゴムストッパーで予め充填したシリンジのプラセボで見つかったが、コートしていないシリンジストッパーのEprex<sup>®</sup>HSA処方あるいはFluroTec<sup>®</sup>コートしたシリンジストッパーのポリソルベート80処方ではみつからなかった[40]。浸出物がアジュバントとして働くかどうか確立するために実施された動物実験で未コートゴムストッパーからの浸出物と共にオブアルブミンを皮下投与するとオブアルブミン単独よりも濃度依存的に免疫反応がより強く促進された[41]。さらに、オブアルブミンをエポエチン $\alpha$ に交換した場合、浸出物のアジュバント効果はヘマトクリット値と関連しており、RPCAの兆候と一致していた。

三番目の可能性として不適切なハンドリングと保存の可能性が考えられた。Epoetin $\alpha$ のHSAフリーの製剤はストレス条件で変性あるいは凝集体の形成を受けやすく、免疫原性を増加させる。これらストレス条件には温度の劇的な変化、明るい光に対する長期間の暴露、バイアルあるいはシリンジの過度の振動が含まれる。以下に述べるように、このように製剤の不適切なハンドリングと保存はPRCAの急増に大きな役割を果たした可能性がある。この不適切なハンドリングおよび保存は自己投与のために入手した患者によって行われた可能性がある。PRCAの発生頻度が最も高いフランスでは、患者は個人の薬局で製剤を入手し、投与まで自己保存する。従って患者の入手以降では低温流通体系が崩壊するリスクを生じる。一方、PRCAの例の数が少ないドイツとイタリアではEprex<sup>®</sup>は通常透析スタッフにより投与される。これに関連し、未コート充填シリンジの滲出物の濃度は推奨保存温度2-8℃でも保存時間と共に増加するが、46℃で2日間暴露後の製品で検出さ

れた滲出物の量はコントロールとして2-8℃で保存したものよりも高かった[40]。

四番目の可能性として投与方法として皮下注射を用いたことが考えられる。先に示した様々な可能性はいずれも免疫原性を増強させるものである。従って、免疫原性が皮下投与によりさらに促進された可能性がある。

2003年にポリソルベート80で処方した製品の全てで予め充填されたシリンジをFluroTec®コートしたストッパーへ変更すると共に、低温流通体系の厳密なコントロールがなされ、慢性腎不全の患者に静脈投与する勧告がなされた。その後報告されたPRCAの例数は急速に低下した。この低下は先ほど述べた単一あるいは複数の変更によると思われるが、全ての変更がほぼ同時に行われたため、その原因を特定することは困難である。

#### D. 結論

上記の知見を基にバイオ医薬品の承認における免疫原性の評価ポイントを考えてみると、以下のようになる。バイオ医薬品に対して抗体が産生されても、有効性及び安全性に影響を及ぼさない場合は、承認の妨げとはならないと思われる。また、抗体により有効性及び安全性が低下した場合においても、患者が受けるリスクとベネフィットの観点からケースバイケースで総合的に承認の可否が判断される。承認申請の段階では試験した患者数が少ないため、免疫原性と有効性及び安全性との関連を統計学的に評価することが困難であり、市販後に継続的な調査を求められる場合もある。最も重要な点は安全性に及ぼす影響であるが、頻度、重篤度及びその後の対処が可能かどうかの観点から総合的に判断されると思われる。一方、vatreptacog alfaの開発中止で示されるように、既に同種同効医薬品が存在する場合、新たに開発したバイオ医薬品の免疫原性が有効性及び安全性に及ぼす作用は、少なくとも先発品と同様の程度であることが要求される場合があるかもしれない。

#### E. 参考文献

- [1] M.M. van Beers, W. Jiskoot, H. Schellekens, On the role of aggregates in the immunogenicity of recombinant human interferon beta in patients with multiple sclerosis, *J Interferon Cytokine Res* 30 (2010) 767-775.
- [2] Subramanyam M: Clinical immunogenicity program design and implementation, *Immunogenicity Summit* 2011.
- [3] L. Runkel, W. Meier, R.B. Pepinsky, M. Karpusas, A. Whitty, K. Kimball, M. Brickelmaier, C. Muldowney, W. Jones, S.E. Goelz, Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta), *Pharm Res* 15 (1998) 641-649.
- [4] Thorpe R.: Unwanted immunogenicity of biosimilars and non-innovator biologicals. *Immunogenicity Summit* 2011.
- [5] P.A. Calabresi, G. Giovannoni, C. Confavreux, S.L. Galetta, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D.H. Miller, P.W. O'Connor, J.T. Phillips, C.H. Polman, E.W. Radue, R.A. Rudick, W.H. Stuart, F.D. Lublin, A. Wajgt, B. Weinstock-Guttman, D.R. Wynn, F. Lynn, M.A. Panzara, The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL, *Neurology* 69 (2007) 1391-1403.
- [6] R.L. West, Z. Zelinkova, G.J. Wolbink, E.J. Kuipers, P.C. Stokkers, C.J. van der Woude, Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease, *Aliment Pharmacol Ther* 28 (2008) 1122-1126.
- [7] G.M. Bartelds, C.L. Krieckaert, M.T. Nurmohamed, P.A. van Schouwenburg, W.F. Lems, J.W. Twisk, B.A. Dijkmans, L. Aarden, G.J. Wolbink, Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up, *Jama* 305 (2011) 1460-1468.
- [8] M.K. de Vries, E. Brouwer, I.E. van der Horst-Bruinsma, A. Spoorenberg, J.C. van Denderen, A. Jamnitski, M.T. Nurmohamed, B.A. Dijkmans, L.A. Aarden, G.J. Wolbink, Decreased clinical response to

- adalimumab in ankylosing spondylitis is associated with antibody formation, *Ann Rheum Dis* 68 (2009) 1787-1788.
- [9] F. Baert, M. Noman, S. Vermeire, G. Van Assche, D.H. G, A. Carbonez, P. Rutgeerts, Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease, *N Engl J Med* 348 (2003) 601-608.
- [10] D. Pascual-Salcedo, C. Plasencia, S. Ramiro, L. Nuno, G. Bonilla, D. Nagore, A. Ruiz Del Agua, A. Martinez, L. Aarden, E. Martin-Mola, A. Balsa, Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with infliximab in rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford)* 50 1445-1452.
- [11] <http://www.hesiglobal.org/files/public/Committee%20Presentations/PATC/Fry-for%20website-APPROVED.pdf#search='PROIMMUNE+Adalimumab'>. .
- [12] F.A. Harding, M.M. Stickler, J. Razo, R.B. DuBridge, The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions, *MAbs* 2 (2011) 256-265.
- [13] [http://www.myozyme.com/patients/what\\_is\\_myozyme/pompe\\_disease.aspx](http://www.myozyme.com/patients/what_is_myozyme/pompe_disease.aspx).
- [14] Amy S. Rosenberg: Immune Tolerance Induction for Protein Therapeutics: Indications and Mechanism, Immunogenicity part of the Eight Annual PEGS Summit (2012).
- [15] A. Iorio, S. Halimeh, S. Holzhauer, N. Goldenberg, E. Marchesini, M. Marcucci, G. Young, C. Bidlingmaier, L.R. Brandao, C.E. Ettingshausen, A. Gringeri, G. Kenet, R. Knofler, W. Kreuz, K. Kurnik, D. Manner, E. Santagostino, P.M. Mannucci, U. Nowak-Gottl, Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review, *J Thromb Haemost* 8 (2010) 1256-1265.
- [16] S. Lacroix-Desmazes, A.M. Navarrete, S. Andre, J. Bayry, S.V. Kaveri, S. Dasgupta, Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A, *Blood* 112 (2008) 240-249.
- [17] P.M. van Helden, S.D. Van Haren, K. Fijnvandraat, H.M. van den Berg, J. Voorberg, Factor VIII-specific B cell responses in haemophilia A patients with inhibitors, *Haemophilia* 16 35-43.
- [18] <http://www.fiercebiotech.com/story/novo-nordisk-scuttles-late-stage-hemophilia-drug-over-patient-risk/2012-09-28>.
- [19] C.H. Chung, B. Mirakhur, E. Chan, Q.T. Le, J. Berlin, M. Morse, B.A. Murphy, S.M. Satinover, J. Hosen, D. Mauro, R.J. Slebos, Q. Zhou, D. Gold, T. Hatley, D.J. Hicklin, T.A. Platts-Mills, Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose, *N Engl J Med* 358 (2008) 1109-1117.
- [20] I. Puxeddu, L. Giori, V. Rocchi, L. Bazzichi, S. Bombardieri, A. Tavoni, P. Migliorini, I. Del Corso, Hypersensitivity reactions during treatment with infliximab, etanercept, and adalimumab, *Ann Allergy Asthma Immunol* 108 (2012) 123-124.
- [21] P.J. Brennan, T. Rodriguez Bouza, F.I. Hsu, D.E. Sloane, M.C. Castells, Hypersensitivity reactions to mAbs: 105 desensitizations in 23 patients, from evaluation to treatment, *J Allergy Clin Immunol* 124 (2009) 1259-1266.
- [22] M. Paltiel, L.M. Gober, A. Deng, J. Mikdashi, I. Alexeeva, S.S. Saini, A.A. Gaspari, Immediate type I hypersensitivity response implicated in worsening injection site reactions to adalimumab, *Arch Dermatol* 144 (2008) 1190-1194.
- [23] R.M. Gamarra, S.D. McGraw, V.S. Drelichman, L.C. Maas, Serum sickness-like reactions in patients receiving intravenous infliximab, *J Emerg Med* 30 (2006) 41-44.
- [24] R.E. Schutgens, Rituximab-induced serum sickness, *Br J Haematol* 135 (2006) 147.
- [25] M. Krumbholz, H. Pellkofer, R. Gold, L.A. Hoffmann, R. Hohlfeld, T. Kumpfel, Delayed allergic reaction to natalizumab associated with early formation of neutralizing antibodies, *Arch Neurol* 64

- (2007) 1331-1333.
- [26] H.J. Lenz, Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions, *Oncologist* 12 (2007) 601-609.
- [27] U. Winkler, M. Jensen, O. Manzke, H. Schulz, V. Diehl, A. Engert, Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8), *Blood* 94 (1999) 2217-2224.
- [28] S.B. Hanauer, B.G. Feagan, G.R. Lichtenstein, L.F. Mayer, S. Schreiber, J.F. Colombel, D. Rachmilewitz, D.C. Wolf, A. Olson, W. Bao, P. Rutgeerts, Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial, *Lancet* 359 (2002) 1541-1549.
- [29] C. Steenholdt, M. Svenson, K. Bendtzen, O.O. Thomsen, J. Brynskov, M.A. Ainsworth, Severe infusion reactions to infliximab: aetiology, immunogenicity and risk factors in patients with inflammatory bowel disease, *Aliment Pharmacol Ther* 34 (2011) 51-58.
- [30] D.J. Kuter, L.T. Goodnough, J. Romo, J. DiPersio, R. Peterson, D. Tomita, W. Sheridan, J. McCullough, Thrombopoietin therapy increases platelet yields in healthy platelet donors, *Blood* 98 (2001) 1339-1345.
- [31] R.L. Bassler, J.E. Rasko, K. Clarke, J. Cebon, M.D. Green, A.P. Grigg, J. Zalcberg, B. Cohen, J. O'Byrne, D.M. Menchaca, R.M. Fox, C.G. Begley, Randomized, blinded, placebo-controlled phase I trial of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor with filgrastim after dose-intensive chemotherapy in patients with advanced cancer, *Blood* 89 (1997) 3118-3128.
- [32] J. Li, C. Yang, Y. Xia, A. Bertino, J. Glaspy, M. Roberts, D.J. Kuter, Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin, *Blood* 98 (2001) 3241-3248.
- [33] S. Vadhan-Raj, C.F. Verschraegen, C. Bueso-Ramos, H.E. Broxmeyer, A.P. Kudelka, R.S. Freedman, C.L. Edwards, D. Gershenson, D. Jones, M. Ashby, J.J. Kavanagh, Recombinant human thrombopoietin attenuates carboplatin-induced severe thrombocytopenia and the need for platelet transfusions in patients with gynecologic cancer, *Ann Intern Med* 132 (2000) 364-368.
- [34] S. Vadhan-Raj, L.J. Murray, C. Bueso-Ramos, S. Patel, S.P. Reddy, W.K. Hoots, T. Johnston, N.E. Papadopolous, W.N. Hittelman, D.A. Johnston, T.A. Yang, V.E. Paton, R.L. Cohen, S.D. Hellmann, R.S. Benjamin, H.E. Broxmeyer, Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer, *Ann Intern Med* 126 (1997) 673-681.
- [35] R. Peces, M. de la Torre, R. Alcazar, J.M. Urra, Antibodies against recombinant human erythropoietin in a patient with erythropoietin-resistant anemia, *N Engl J Med* 335 (1996) 523-524.
- [36] S.S. Prabhakar, T. Muhlfelder, Antibodies to recombinant human erythropoietin causing pure red cell aplasia, *Clin Nephrol* 47 (1997) 331-335.
- [37] N. Casadevall, J. Nataf, B. Viron, A. Kolta, J.J. Kiladjian, P. Martin-Dupont, P. Michaud, T. Papo, V. Ugo, I. Teyssandier, B. Varet, P. Mayeux, Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin, *N Engl J Med* 346 (2002) 469-475.
- [38] S.K. Gershon, H. Luksenburg, T.R. Cote, M.M. Braun, Pure red-cell aplasia and recombinant erythropoietin, *N Engl J Med* 346 (2002) 1584-1586; author reply 1584-1586.
- [39] S. Hermeling, H. Schellekens, D.J. Crommelin, W. Jiskoot, Micelle-associated protein in epoetin formulations: a risk factor for immunogenicity?, *Pharm Res* 20 (2003) 1903-1907.
- [40] B. Sharma, Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 1: impact of product handling, *Biotechnol Adv* 25 (2007) 310-317.
- [41] M.H. Ryan, G.A. Heavner, M. Brigham-Burke, F. McMahon, M.F. Shanahan, S.R. Gunturi, B. Sharma,

F.X. Farrell, An *in vivo* model to assess factors that may stimulate the generation of an immune reaction to erythropoietin, *Int Immunopharmacol* 6 (2006) 647-655.

#### F. 健康危険情報

該当しない

#### G. 研究発表

##### 1. 講演

1. Shingo Niimi Immunogenicity evaluation of biotechnology-derived drugd including biosimilar therapeutic monoclonal antibodies. URI/Epivax Westin Immunogenicity Seminar (9 May 2013

Tokyo)

2. 新見伸吾 免疫原性の予測、リスク因子、臨床における有効性、安全性に及ぼす影響 第40回日本毒性学会学術年会 ワークショップ4バイオ医薬品の免疫原性評価（平成25年6月18日千葉）

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

該当しない

##### 2. 実用新案登録

該当しない

##### 3. その他

該当しない

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）  
平成25年度分担研究報告書

－バイオ後続品の評価に関する研究－

研究分担者：石井 明子（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室）

研究協力者：西村 和子（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室）

研究要旨

国内外で開発が活発化しているバイオ後続品に関して、日米欧における製品開発とガイドライン整備の動向を調査した。2013年は、世界で初めて、抗TNF抗体、及び、卵胞刺激ホルモンの後続品が欧州で承認された他、日本でもフィルグラスチムの後続品が承認され、バイオ後続品の承認件数がこれまでで最多であった。欧州では、総論、及び、非臨床・臨床ガイドラインの改訂案、ならびに、新たな品目別ガイドラインが発出された。これまでの知見の蓄積を踏まえ、日本においても指針の改定を考える時期にきていると思われる。これらの動向の他、バイオ後続品の評価において薬物動態の比較が重要となることを踏まえ、ペプチド及びタンパク質医薬品のバイオアナリシスの現状と課題に関して調査を行った。ほとんどの品目でリガンド結合法が用いられており、真度、精度等の分析能パラメータは、概ね、バイオアナリシスガイドラインで求められる水準であった。リガンド結合法の特徴として、目的物質と類似物質の識別が困難な場合があること、一部の医薬品では溶血の影響が生じる場合があること等から、生体試料中の薬物濃度測定結果を正しく評価するためには、分析法の特徴を十分に理解しておくことが重要と考えられた。

キーワード：バイオ後続品、薬物動態、バイオアナリシス

A. 研究目的

バイオ後続品は、先行品の独占的販売期間終了後に、先行品と同等／同質の品質・有効性・安全性を有する医薬品であることを示すデータに基づき、承認される。2006年以降、欧州を中心に、ソマトロピン、エポエチン アルファ、フィルグラスチムのバイオ後続品が承認されてきた。バイオ後続品に関するガイドラインも欧州が先行して整備を進め、現在は、総論、品質、非臨床・臨床ガイドラインの改訂作業が進められている他、各論ガイドラインの新たな策定が行われている。

バイオ後続品の開発では、新有効成分含有医薬品の開発と同様の品質特性解析に加え、品質の比較試験が必要である。品質比較試験の結果に応じて、非

臨床・臨床試験が行われ、先行品との同等性／同質性が評価される。バイオ後続品の有効性・安全性を確保しつつ、効率的な開発を推進するには、これらの試験の内容や実施方法について、蓄積しつつある知見をもとに、具体的な要件を明らかにしていくことが有用と考えられる。

本研究では、バイオ後続品の製品開発とガイドラインに関する最新の知見をもとに、バイオ後続品の開発に求められる要件を明らかにし、開発や審査の迅速化に資する日本の指針改定に関して考察することを目的とする。今年度は、ガイドラインの記載内容について国際比較を行った昨年度の調査研究に続き、日米欧における製品開発とガイドライン整備の国際動向を調査した。また、バイオ後続品の開発に

において、臨床試験における薬物動態 (PK) の比較が必ず実施されていることから、薬物動態試験結果の評価に必要な要件を明らかにするため、ペプチド及びタンパク質医薬品のバイオアナリシス (生体試料中薬物濃度分析法) の現状と課題を調査した。

## B. 研究方法

バイオ後続品の承認状況は、医薬品医療機器総合機構、FDA、及び、EMAの医薬品情報提供サイトから情報を収集した。

バイオアナリシスに関しては、医薬品医療機器総合機構の医療用医薬品の承認審査情報サイト (<http://www.info.pmda.go.jp/approvalSrch/PharmacySrchInit?>) に掲載されているペプチドおよびタンパク質医薬品の申請資料概要および審査報告書から情報を収集した。

薬物動態データについては、該当する医薬品の添付文書から日本人における薬物動態データを中心に収集した。

## C. 研究結果

### C.1 バイオ後続品の製品開発とガイドライン整備の国際的動向

#### C.1.1 日米欧におけるバイオ後続品の承認状況

2013年には、欧州において、somatropin (Genotropin<sup>®</sup>) のバイオシミラー Somatopin Biopartners<sup>®</sup>、filgrastim (Neupogen<sup>®</sup>) のバイオシミラー Grastofil<sup>®</sup>、抗TNF $\alpha$ 抗体 infliximab (Remicade<sup>®</sup>) のバイオシミラー Inflectra<sup>®</sup>及び Remsima<sup>®</sup>、卵胞刺激ホルモン follitropin alfaのバイオシミラー Ovaleap<sup>®</sup>、日本では、フィルグラスチムの後続品フィルグラスチム [フィルグラスチム後続2] (フィルグラスチムBS注「NK」<sup>®</sup>、同「テバ」<sup>®</sup>) の計6製品が承認された (表1)。米国では、バイオシミラーに関するガイダンス案の公表後、これに沿った製品の承認例はない。

図1に示すとおり、バイオ後続品の承認件数は、2007年に最初のピークがあった後、減少傾向にあったが、2013年は、承認件数が顕著に増加した。抗体医薬品や卵胞刺激ホルモンのように、新たな製品群

が加わったことが特徴である。

表1 日米欧におけるバイオ後続品の開発動向

一般名	商品名	バイオ後続品/バイオシミラー 商品名	開発企業	欧州	承認年	日本
insulin glargine	Lantus		Sandoz-Aventis		申請中	-
somatropin	Genotropin	Omnitrope	Sandoz		2006	2006
somatropin	Humatrope	Valtropin	Biopartners, LG Life		2006	2007
somatropin	Genotropin	Somatropin Biosimilars	Biopartners, LG Life		2013	-
ソマトロピン	ソマトロピン	ソマトロピンBS注「サンゾ」	サンゾ		-	2009
-	Eprex/Eprex	Bioscon	Sandoz		2007	-
-	Eprex/Eprex	Epovelin alfa Hexal	Hexal Biotech		2007	-
-	Eprex/Eprex	Albeonmed	Medicine Arzneimittel		2007	-
epoetin zeta	Eprex/Eprex	Silapo	Sada Arzneimittel		2007	-
epoetin zeta	Eprex/Eprex	Retaron	Hospira		2007	-
エポエチン	カッパ [エポエチン アルファ後続1]	エスビー	エポエチン アルファBS注「JCR」		-	2010
filgrastim	Neupogen	Tevograsim	Teva Genesys		2008	-
filgrastim	Neupogen	Biograsim	CT Arzneimittel		2008	-
filgrastim	Neupogen	Ratograsim	Ratopharm		2008	-
filgrastim	Neupogen	Filgrastim Ratopharm	Ratopharm		2008	-
filgrastim	Neupogen	Zanxo	Sandoz		2009	-
filgrastim	Neupogen	Filgrastim Hexal	Hexal Biotech		2009	-
filgrastim	Neupogen	Hivesta	Hospira		2010	-
filgrastim	Neupogen	Grastofil	Apotec Europe		2013	-
フィルグラスチム [フィルグラスチム後続1]	グラン	フィルグラスチムBS注「モテグ」, 同「F」	特田 富士		-	2012
フィルグラスチム [フィルグラスチム後続2]	グラン	フィルグラスチムBS注「NK」, 同「テバ」	日本化薬, テバ		-	2013
フィルグラスチム [フィルグラスチム後続3]	グラン	フィルグラスチムBS注「サンゾ」	サンゾ		-	2014
follitropin alfa	Gonal-F	Ovaleap	Teva Pharma		2013	-
follitropin alfa	Gonal-F		Merck Serono		申請中	-
infliximab	Remicade	Inflectra	Hospira		2013	-
infliximab	Remicade	Remsima	Celltrion		2013	-
インフリキシマブ	レミケード		日本化薬		-	申請中

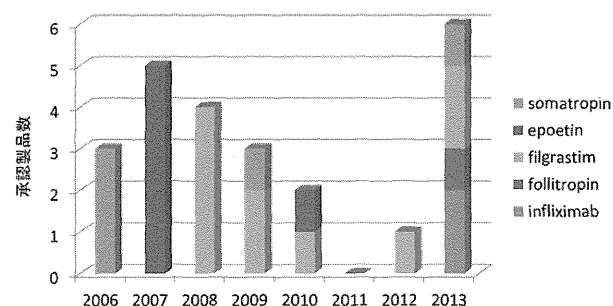


図1 日米欧におけるバイオ後続品の承認件数

フィルグラスチムのバイオ後続品は、2013年までに日本では、フィルグラスチム [フィルグラスチム後続1]、及び、フィルグラスチム [フィルグラスチム後続2] が承認されている。いずれも、臨床試験では、健康成人を被験者として、PKの比較、及び、薬力学 (PD) の比較が行われ、患者を対照とした有効性の同等性を検証する試験は行われていない。好中球数増加作用、及び造血幹細胞の末梢血中への動員作用が、臨床有効性を適切に反映するPDマーカーであるとの考えのもと、これらの同等性の評価結果に基づく判断がなされたものと思われる。

#### C.1.2 バイオ後続品に関するガイドライン策定状況

欧州では、2013年に総論ガイドライン、非臨床・臨床ガイドライン、及び、低分子量ヘパリンの非臨床・臨床ガイドラインの改訂案が公表された。また、インターフェロン ベータの非臨床・臨床ガイドラ

イン、卵胞刺激ホルモンの非臨床・臨床ガイドラインが新たに策定された（図2）。

日本では、2012年にバイオ後続品の一般的名称に関する通知が出されたが、バイオ後続品の指針自体は改訂されていない。また、米国では、ガイドライン案が公表された後、最終版は発出されていない。

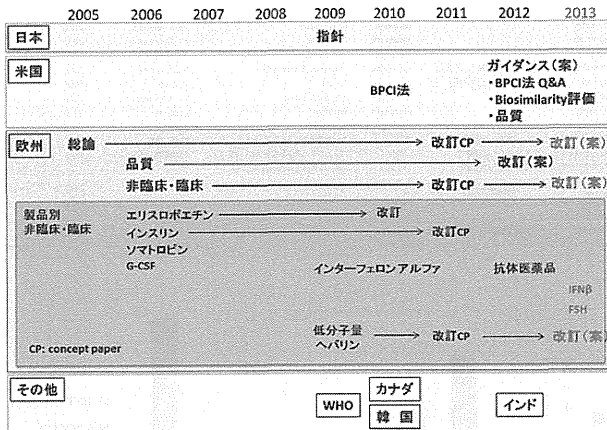


図2 バイオシミラーに関するガイドラインの策定動向

## C.2 ペプチド及びタンパク質医薬品のバイオアナリシス

バイオ後続品の臨床試験では、PKの比較が必ず行われている。PKの比較においては、血中薬物濃度の経時的推移の比較が行われるため、薬物濃度測定結果の信頼性が、PKの適切な比較には必須である。近年、日米欧において、バイオアナリシス分析法バリデーションに関するガイドライン策定が進み、日本でも2013年7月にはクロマトグラフィーを用いるバイオアナリシスを対象としたガイドラインが公表された。これらの背景のもと、バイオ後続品のPK試験の要件に関連して、日本におけるペプチド及びタンパク質医薬品のバイオアナリシスに関する現状と課題を調査した。

### C.2.1 調査対象資料

2013年6月までに国内で承認されたペプチドおよびタンパク質医薬品103品目のうち、2001年以降の申請資料概要および審査報告書に生体試料中薬物濃度分析法に関する記載があった76品目を調査対象とした（表2）。

表2 調査対象とした医薬品

	承認品目数	調査対象品目数(2001年～)
ペプチド	13	11
ホルモン類	21	13
酵素類	11	10
血液凝固因子類	5	3
血清タンパク質	1	1
インターフェロン類	11	4
エリスロポエチン類	5	4
サイトカイン類	8	3
抗体	24	23
融合タンパク質	4	4

調査対象とした資料の申請区分は、(1)新有効成分含有医薬品、(2)新医療用配合剤、(3)新投与経路医薬品、(4)新効能医薬品、(5)新剤形医薬品、(6)新用量医薬品、(7)バイオ後続品、7つの区分であった。

### C.2.2 分析法

76品目の生体試料中薬物濃度は、延べ85件の分析方法で測定されていた。抗体に結合した放射性核種の放射能を測定した1件（イブリツモマブチウセキタン）と生物活性を測定した9件（ペプチド1件、酵素4件、血液凝固因子類2件、インターフェロン類2件）以外は、リガンド結合法（Ligand Binding Assay: LBA）を利用したバイオアナリシスによる分析がなされていた。

最も多く使用されたのはELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）で44件あった。抗体、サイトカイン、エリスロポエチン、融合タンパク質のほとんどがELISAによる分析がなされていた。ペプチドやホルモン類ではRIA（radio immunoassay：放射免疫測定法）が多く使用されていた。そのほかECLIA（electrochemiluminescence immunoassay：電気化学発光免疫測定法）、TRFIA（time-resolved fluorescence immunoassay：時間分解蛍光免疫測定法）、SPR（surface plasmon resonance：表面プラズモン共鳴）、抗体捕獲バイオアナリシス、免疫抗体法が使用されていた（図3）。

76品目の中には、臨床試験の途中で、薬物濃度分析法を改良・変更したものもあった。インフリキシマブのELISAによる測定では、固相に用いた抗体を



ウサギ・ポリクローナル抗体からマウス・モノクローナル抗体に変更することにより定量限界値を低くしていた。バシリキシマブの場合、当初RIAで測定したが、RIAは内因性可溶性IL-2レセプターにより測定値が影響されるので、影響を受けにくいELISAに変更されていた。

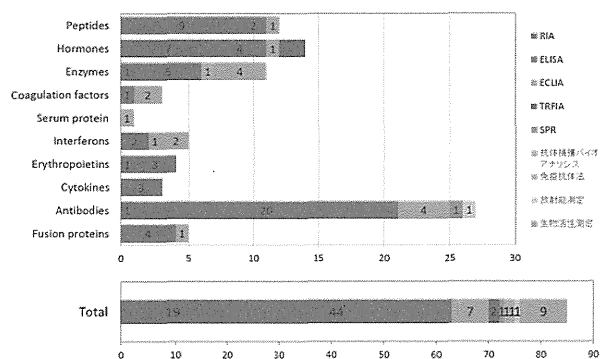


図3 ペプチド及びタンパク質医薬品のバイオアナリシスに用いられた分析法

リキシセナチドのように国際ガイドラインに従って、マトリックスを臨床試験となるべく類似したものに変更した例もあった。また、リキシセナチドでは初期の臨床第I相の1試験でLC/MSによる測定も試みられたが、必要な感度が得られず、それ以降は使用されなかった。

そのほか、次のような問題点も指摘されている。ペグインターフェロン アルファ-2aで、標準試料中のPEG化位置異性体組成の相違による測定値への影響が認められた。ラニブズマブでは、臨床検体をELISAで測定時、連続希釈で直線性が認められない例があったが、ECLIA法を開発し、バリデーションを実施して解決していた。

また、溶血の影響が問題となる例があった。例えば、インスリン デテムルでは溶血試料では赤血球からインスリン分解酵素が放出され、薬物濃度が低下することが報告されていた。

インスリン類では、赤血球由来の酵素により、薬物の分解が生じる可能性が指摘されている。インスリン デグルデグの測定では、溶血が測定結果に影響することを踏まえ、溶血の程度が高い試料は欠損値として処理するという対応がなされ、さらに、ISR

(Incurred samples reanalysis) として、実試料の再分析が行われていた。リラグルチドでも溶血した試料は高値が認められるため、測定値を除外するという対応がとられていた。

表3 分析法における問題と対処の例

項目	医薬品	問題とその対策
標準試料	ペグインターフェロン アルファ-2a	標準試料中のPEG化位置異性体組成の相違が測定値に影響する
平行性	ラニブズマブ	臨床検体をELISA法で測定時、連続希釈で直線性が認められない例があった (ECLIA法を開発し、バリデーションを実施して解決)
溶血の影響	インスリンデテムル	赤血球からインスリン分解酵素が放出され薬物濃度が低下
安定性・マトリックスの影響(選択性)	インスリンデグルデグ インスリンアスパルト	⇒溶血●%超のサンプルは、欠損値として処理
	リラグルチド	溶血したサンプルは高値が認められた ⇒溶血したサンプルの測定値は除外

これらの他、アダリムマブ、オマリズマブ、ウスデキヌマブ、ゴリムマブ等、いくつかの抗体では、ADA (抗薬物抗体) の存在が測定値を過小評価させる可能性も示唆されていた。

### C.2.2 バリデーション

76品目、85件の分析方法のほとんどで分析方法に関する詳細なバリデーション結果が報告されていた。同じ測定法であっても、捕捉抗体や検出抗体の組み合わせを変えることにより、測定感度が大きく異なるものがあった。そのような場合、測定間でクロスバリデーションが行われていた。分析法の性能については、分析内・分析間ともに、概ね真度は±20%以内、精度は20%以内であり、一般的にバイオアナリシスに求められる水準をみたしていた。

ホルモン類が分析対象物質となるバイオアナリシスのバリデーションにおいて、特異性の評価を調べた例を表4に示す。

インスリン アスパルト、インスリン グラルギン、リラグルチド、メトレレプチンでは、目的物質と、天然型の内因性タンパク質が識別されず、薬物と内因性物質の総和を測定する分析法が用いられていた。リラグルチドでは、前処理により内因性物質を分解することにより、薬物のみを測定する方法がとられていた。

表4 ホルモン類のバイオアナリシスにおける特異性の評価結果

医薬品	内因性タンパク質との構造の違い	測定法	内因性タンパク質との交差反応性	内因性タンパク質と外因性タンパク質の判別方法
インスリン アスバルト	1aa	RIA	有(インスリン)	総インスリン濃度を測定し、外因性インスリン濃度をCペプチド補正法で算出
インスリン グラルギン	3aa	RIA	有(インスリン)	
インスリン デテムル	2aa+側鎖	ELISA	無	
インスリン グルリジン	3aa	RIA	無	
インスリン デグルデク	1aa+側鎖	ELISA	無	
リラグルテド	1aa+側鎖	ELISA	有(GLP-1)	試料を37℃でブレインキューベーションし、内因性GLP-1を分解
メトレプレテン	1aa	ELISA, RIA	有(レプレテン)	なし

C.2.3 薬物動態データ

添付文書による用法は、ペプチド、ホルモン、インターフェロン類、融合タンパク質のほとんどが反復皮下投与であった。抗体は、点滴静注と、皮下投与が多かった。

添付文書中に記載された薬物動態データにおいて、最高血中濃度 (Cmax)、反復投与時の血中トラフ値を抜粋し、測定法バリデーションの定量範囲と比較検討した (表5)。

表5 ペプチドおよびタンパク質医薬品の薬物動態データ

分類	医薬品(一般名)	分子量	測定方法	マトリックス	定量範囲	薬物動態				
						対象	投与量・経路	C <sub>max</sub> (またはC <sub>24hr</sub> )	C <sub>min</sub>	t <sub>1/2</sub>
ペプチド	エキセチナド	4,187	RIA	血清	1.0~500 µg/ml	日本人女性糖尿病患者 8例	5mg 1回皮下投与	20pg/ml*	121pg/ml	1.35hr
	リキシセチナド	4,858	ELISA	血清	10~160 µg/ml	日本人糖尿病患者 5例	10µg 単回皮下投与	10pg/ml*	63pg/ml	2.01hr
ホルモン	オレレプタン	16,155	ELISA	血清	0.04~10 ng/ml	外国人健康成人 31例	0.05mg/kg 単回皮下投与	0.05ng/ml*	11ng/ml	4.2hr
	フォリトロン ベータ	10,206 12,485	HRFA	血清	0.05 IU/L~	日本人健康成人 5例	200IU 単回筋肉内投与	0.01IU (216IU)*	6 IU/L	38.4hr
インターフェロン	ペグインターフェロンアルファ2b	32,000	ECLIA	血清	50~2185pg/ml	C型肝炎患者 15例	1.5mg/kg 週1回皮下投与 1回目	95pg/ml	874pg/ml	40.2hr
	エリスロポエチン	36,000	ELISA	血清	150~4000 pg/ml	日本人血液透析患者 10例	200µg 単回皮下投与	0.2ng/ml*	9ng/ml	34.5hr
抗体	セツキシマブ	151,800	SPR	血清	0.10~1.521 µg/ml	日本人膵臓がん患者 6例	400mg/kg 単回皮下投与	5µg/ml*	297µg/ml	10.1hr
	パニツムマブ	147,000	ECLIA	血清	78~2500 ng/ml	日本人 1例	8mg/kg 単回皮下投与	19.8ng/ml	118ng/ml	6.70day
融合タンパク質	ゴムマブ	150,000	ECLIA	血清	20~1000 ng/ml	日本人健康男性 12例	100mg/kg 単回皮下投与	0.2 µg/ml*	6.72 µg/ml	12.6 day
	ア19セプト	92,000	ELISA	血清	1~20 ng/ml	日本人患者 28例	125mg/kg 1回皮下投与	31~39ng/ml (mean±SD)	43pg/ml	13.2day
融合タンパク質	ロズステム	55,000	ELISA	血清	10~500 µg/ml	慢性炎症性血小板減少性紫斑病患者 4例	5~7mg/kg 反復皮下投与	25~100µg/ml	36~501 µg/ml	10~116 hr

ペプチド類の皮下投与時のCmaxは0.1~10ng/ml (20pM~5 nM)、ホルモン類は約100ng/ml (約10nM)であった。抗体では、皮下投与時のCmaxは2~20µg/ml (0.02~0.5µM)、点滴静注時は20~500µg/ml (0.1~5 µM)であった。定量範囲を超えるものが多く、生体試料を希釈して測定したと考えられる。トラフ値は、ほとんどの品目で定量範囲の中にあり、適切な定量範囲が設定されていたと考えられる。ただ、インターフェロンアルファコン-1の臨床試験で、健康成人に900万IUを単回皮下投与したとき、全例で定量限界未満であったという記載があった。(感度向上目的で生物活性測定法を新たに確立したが、試

料保存期間が長くなったため、薬物動態データは参考資料扱いとされた)

D. 考察

D.1 バイオ後続品ガイドラインについて

日本の指針の特徴として、以下の点が挙げられる。

- 1) 海外ガイドラインと概ね同じ方向であり、国際的整合性が保たれている。
- 2) 参照品を日本承認製品に限定している。
- 3) 臨床試験における非劣性試験の適用可能性に関する記載がない。
- 4) 免疫原性評価について、具体的な期間などは明示されていない。
- 5) 代替・混用に関する記載があるが、運用実態が不明である。
- 6) バイオ後続品の命名ルールが確立している。

日本においても、バイオ後続品の開発、審査の経験が蓄積してきていることから、2)~5)について、これまでの知見をもとに指針を見直すことが、バイオ後続品の開発と審査の迅速化、適正使用、普及促進の一助になると考えられる。

D.2 バイオアナリシスについて

ペプチドおよびタンパク質医薬品の生体試料中薬物濃度測定には、リガンド結合法が標準的手法として用いられていた。

低分子医薬品では、分子量が数百程度のものが多いため、除タンパク質や液相抽出、固相抽出等の前処理、ならびに、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、又はそれらと質量分析法を組み合わせた方法が標準的手法として用いられている。これに対して、高分子医薬品の場合は、液相抽出等の前処理により薬物を夾雑タンパク質から分離することが容易でないこともあり、低分子医薬品で確立されているような方法での生体試料中薬物濃度分析は一般に困難である。しかしその一方で、タンパク質の場合、それ自身が免疫原性を示し得るため、薬物を動物に免疫することにより、薬物に特異的に結合する抗体を調製することができる。また、薬物の

分子量が大きいため、結合試薬どうしの競合を起さずに、複数の結合試薬を用いたリガンド結合法による分析法を構築することもできるなど、高分子医薬品は、リガンド結合法の構築に適した性質を持っている。ホルモン、サイトカイン等の生理活性タンパク質やその類縁体を医薬品とする場合、有効血中濃度が低いものが少なくないが、リガンド結合法では、それら医薬品の生体試料中濃度に見合う感度の分析法を構築することが可能である。

すなわち、高分子医薬品では、低分子医薬品で標準的手法として用いられているクロマトグラフィーを利用した分析法の構築が難しい一方で、抗体等の結合試薬の調製に適した分子量を持ち、結合試薬を利用することで、求められる性能を有する分析法の構築が可能である、という背景から、リガンド結合法が標準的な手法として用いられていると言えるだろう。

今回、国内で承認されたペプチドおよびタンパク質医薬品の申請資料概要および審査報告書中に記載されているバイオアナリシスについての情報を得て、測定上問題となった点やその解決法について考察した。併せて、薬物動態データを収集し、実際の測定データとの関連について考察した。

リガンド結合法を使った測定では、不均一性の高い薬物では、ロットにより薬物濃度分析に用いる結合試薬との結合性が異なる場合があり、注意が必要である。マトリックス中の妨害物質の影響を考慮し、平行性の評価が必要となる場合がある。また、インスリン等では試料の溶血の影響に留意する必要がある。内因性物質と構造が類似している医薬品では、内因性タンパク質との交叉反応性が認められる場合も多くある。内因性タンパク質との総濃度も必要な情報ではあるが、薬物のみ濃度の測定を可能にするためには、より特異性の高い分析法（LC/MSとのハイブリッド法など）の開発が望まれる。

## E. 結論

1) バイオ後続品の開発は、欧州および日本で進んでおり、2013年は今までに承認件数が最も多か

った。欧州ではガイドラインの改訂が進んでおり、日本においても、これまでの知見の蓄積のもとに、指針の見直しが必要と考えられる。

2) バイオ後続品の臨床試験でも重要となる薬物動態試験に用いられるバイオアナリシスについては、概ね、信頼性が確保されていることを示すバリデーション結果が示されていた。しかし、目的物質と類似物質の識別が困難な場合があること、一部の医薬品では溶血の影響が生じる場合があること等から、生体試料中の薬物濃度測定結果を正しく評価するためには、分析法の特徴を十分に理解しておくことが重要と考えられた。

## F. 研究発表

学会発表

- 1) 石井明子：バイオ後続品／バイオシミラーに関する国内外の規制動向と開発の課題 代々木会特別講演会（2013.5.29）東京
- 2) 石井明子：日本のBMV（リガンド結合法）ガイドライン策定状況 第20回クロマトグラフィーシンポジウムワークショップ（2013.6.5）神戸
- 3) 石井明子，西村和子，鈴木琢雄，多田 稔，川崎ナナ：ペプチド及びタンパク質医薬品のバイオアナリシス 日本薬物動態学会 第28回年会（2013.10）（東京）
- 4) Akiko Ishii-Watabe, Kazuko Nishimura, Nana Kawasaki: Regulated bioanalysis of therapeutic peptides and proteins in Japan, Immunogenicity summit 2013 (2013.11) (Washington DC)
- 5) Akiko Ishii Japanese LBA guideline 8<sup>th</sup> Workshop on Recent Issues in Bioanalysis (2014.3.11-13) LA Universal City

総説

- 1) 川崎ナナ，石井明子：バイオ後続品の今後の動向 医薬ジャーナル 50, S-1, 36-42 (2014) 新薬展望2014

- 2) 石井明子：リガンド結合法を用いた生体試料中薬物濃度分析法に関するガイドラインの策定状況 Chromatography 4(3), 151-156 (2013)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし