

会，大分，2013年10月5日

6. 中村秀文：ARO発医薬品開発と今後の展望「成  
育医療センターの試み」。10<sup>th</sup> Annual Meeting

DIA Japan，東京，2013年11月7日

7. 中村秀文：小児臨床試験の特性。研究倫理研修  
セミナー，東京，2013年12月2日

## －遺伝子治療薬に関する研究－

研究分担者：山口 照英（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部・主任研究官）

### 研究要旨

遺伝子治療薬のFirst-in-human（FIH）までに実施すべき非臨床試験及び承認時までに取得すべき非臨床試験について、EMAで昨年承認されたりポタンパク質リパーゼ（LPL）欠損症による重篤な高脂血漿治療薬であるGlyberaの評価レポートを調査すると共に、EMAで承認されなかった2つの遺伝子治療薬の非臨床試験の報告と比較した。1）インビボ試験でヒトと同様の病態を示すモデル動物で、ヒトでの有効性を示唆するデータを明らかにすることを求めた。2）特にモデル動物の選択に当たっては、高脂血漿の動態や黄色腫のみならずLPL欠損患者で臨床上、最も問題となる急性膵炎がモデル動物で発症することや血中トリグリセリド上昇などを考慮してマウス、ネコ、ウサギが選択された。その結果、Glybera投与により血中トリグリセリドの正常化とその持続性が示されている。3）毒性試験では、3用量での単回毒性試験が実施され、急性炎症と筋肉の退行性反応が認められたが、これは発現しているLPLの種差のためとされた。NOELが10<sup>11</sup>gc/kg体重とされた。4）遺伝毒性試験やがん原性試験は実施されていないが、挿入変異や挿入変異に基づく造腫瘍性試験が実施されており、挿入変異により造腫瘍性のリスクは少ないとされている。

Glyberaの評価レポートからEMAが臨床試験前と承認時にどのような非臨床試験を求めたのかが理解でき、わが国でも遺伝子治療薬の安全性や臨床試験に結びつけるための有効性をどのようにモデル動物で示すべきかの参考になる。

キーワード：遺伝子治療、アデノ随伴ウイルス（AAV）、リポタンパク質リパーゼ（LPL）、先天性遺伝性疾患

### A. 目的

2012年に先進国として初めて遺伝子治療薬がEMAにより承認された。一方で遺伝子治療薬として用いられるベクターは当初アデノウイルスやレトロウイルスベクター、あるいはプラスミドを用いた開発が多かったが、近年はアデノ随伴ウイルス（AAV）やレンチウイルスを用いたベクター開発が多くなってきている。これは免疫原性や挿入変異などの有害事象を回避するための方策として、より最適なベクターの模索が行われた結果といえる。また対象とする疾患についても、当初はがんが多かったが最近で

はX-SCID、ADA-SCID、WAS、CGDといった希少疾患を対象とした開発が多くなってきている。また、レーバー病のように投与手技（機器）の開発により、これまで困難とされていた疾患にも適用が可能になりつつある。

このように遺伝子治療薬の実用化が本格化するに従い、これまでとは異なるベクターや対象疾患の変遷があり、新規ベクターや新規ターゲット分子遺伝子を搭載したベクターの開発が行われようとしている。従って、新規遺伝子治療薬の臨床開始（First-in-human; FIH）までに、どのようなデータが

取得されていなければならないかについて多くの議論がなされている。既にICH遺伝子治療専門家会議でもFIHに関する見解作成に着手していたが、ICH GT DGでのガイドライン作成が中断したためにFIH見解作成も中断している。一方で、EMAやFDAは既に遺伝子治療治験薬のFIHまでに取得しておくべき非臨床試験データについてのガイドラインあるいはその案を作成している。

一方、我が国でも、センダイウイルスやサル免疫不全ウイルス（SIV）を用いた独自のウイルスベクターを開発しつつある。また先天性代謝疾患など新規遺伝子を用いた開発も行われている。このような国内動向を受けて、我が国で開発されてくる遺伝子治療薬のFIHで求められるデータを明らかにしておくことは、国内遺伝子治療開発の促進にもつながり、かつ被検者の安全確保の観点からも急務である。

本研究では、リポタンパク質リパーゼ（LPL）欠損による高脂血症の治療薬として先進国で最初に遺伝子治療薬GlyberaがEUで承認され、その審査での評価レポートを公開していることから、この評価レポートを対象として治験開始時までに実施すべき非臨床試験と承認時に提出すべき臨床試験データについてEUの考え方を整理した。Glyberaはアデノ随伴ウイルス（AAV）をベースにした組換えウイルスベクターであり、ヒトLPL遺伝子を発現する。この報告書と、これまでEMAが承認をしなかった2つの遺伝子治療薬の報告とも比較しながら、非臨床試験でどのようなデータをEUが求めているのかを明らかにし、今後のわが国でのガイドライン改定や審査における参考となることを目指した。

## B. 方法

EMAが先進国で最初に承認した遺伝子治療薬であるGlyberaと、EMAが承認しなかった2つの遺伝子治療薬について、その審査に関する報告書を解析した。特に、非臨床試験について承認時、承認申請時にどのようなデータを求めたのか、他のバイオ医薬品等との考え方の差異についても調査した。

## C. 結果

### C.1. EUで承認されたGlyberaと承認の推奨を受けなかった2つの遺伝子治療製品の比較

EMAはGlyberaの承認前にも複数の遺伝子治療薬の承認申請を受け、審査を行っており、いずれも承認を推奨していない。現在、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子（HSV-tk）を発現するアデノウイルスベクターであるCereproとp53発現アデノウイルスベクターであるContusogene Ladenovec Genduxの審査における評価状況が入手可能である。そこでGlyberaとこれらの承認を得られなかった2製品の非臨床試験の評価を比較し、遺伝子治療薬としての承認に必要と考えられている要素を解析してみた。

Cereproはアデノウイルス5型のE1領域とE3領域の一部を欠損、悪性グリオーマを対象とし、Cereproが導入されたグリオーマが、ガンシクロビル投与によりHSV-tkにより代謝されたガンシクロビルリン酸になり細胞毒性を発揮する。

動物モデルで、Cereproの有効性が十分説明されていない。科学的にはHSV-tkを発現している細胞ではガンシクロビル投与により細胞死を導くことができることは理解できることが了解されるとされた。しかし、手術でグリオーマを除去した後に残存しているグリオーマそれぞれに非増殖性のアデノウイルスベクターが到達できるか不明であることや、申請者が提唱しているバイスタンダー効果についても明確な実証はなく、更なる検討が必要であるとされている。有効性を示唆する試験の評価としては十分ではないと結論されている。

毒性試験では単回投与のみの試験が行われており、またその投与量も限定的なものであったとされている。これは、マウス脳内に投与可能な量が限られているためであり、また反復投与毒性試験は手技的に実施が困難とされている。一方、ワーストシナリオを評価する目的で、静脈内投与が実施されている。これらの結果から、試験の実施が困難な面はやむを得ないとしながらも十分な安全性評価が行われているとの結論には至っていない。

Contusugene Ladenovec Genduxは頸頭部再発扁平上皮がんを対象として開発が進められてきたアデノウイルスベクターであり、増殖性アデノウイルスに関する試験から、増殖性ウイルスの残存があることが示されている。Contusugene Ladenovec Genduxの薬力学試験として、インビトロ及びインビボ試験が実施されている。対象とするp53を搭載していないベクターでも抗腫瘍効果が認められたが、このような対照ベクターでの抗腫瘍効果はContusugene Ladenovec Genduxの有効性を評価するのを困難にしているとの評価がなされている。さらに残存しているRCAでも臨床効果が認められたとする結果も提出されているが、再現性が認められていない。

毒性試験は正常マウス及びラットを用いて実施されている。ワーストシナリオとして、皮下投与が採用されており、コアバッテリー器官に対する影響が慎重に観察されている。これらの結果から、NOELレンジは臨床投与量の1/100と推定されている。

反復投与毒性試験も実施されているが、投与量や投与回数に関して十分な評価データではないとされている。さらに細胞傷害作用としてリンパ球の低下が認められたとされた。以上の結果から、安全性面では一定の評価が可能とされている。

## C. 2. Glyberaの承認時に発出された評価レポートにおける非臨床試験の観点

Glyberaの承認を推奨するEMAの評価レポートでは提出された非臨床試験結果についての評価が示されており、その詳細について以下に示す。

### C2-1. 序言

中心となる非臨床安全性試験はGLPに従って実施されることが期待される。また関連する試験についてもできる限りGLPに準拠して実施されることが求められる。GLPへの準拠については特別な懸念がないとされた。

複数のロットのAMT-010（プラスミド由来製品）が試験に用いられ、また非臨床試験のブリッジング試験としてAMT-010とAMT-011（バキュロウイルス

由来製品）を用いた比較試験が実施された。

薬理的試験は、LPL欠損マウスを用いて実施され、薬物動態試験がネコ、マウス、ウサギを用いた動物試験が実施されている。一般毒性試験は、マウスを用いて実施された。がん原性試験は実施されていない。遺伝毒性とがんを引き起こす可能性に関する懸念については、遺伝子挿入リスクと変異原性を明らかにする目的の試験が実施された。さら遺伝子治療ベクターに関する文献データについても調査・解析が行われた。

### C2-2. 薬理学試験

有効性を示唆するためにAMT-010（プラスミド由来）を投与し治療できることを示す試験が、LPL欠損（LPL<sup>-/-</sup>）マウスおよびネコを用いて実施された。高グリセロール血漿が持続するとLPL<sup>-/-</sup>マウスで見られるように総コレステロールの増加とHDL量の低下を伴う。しかしLPL<sup>-/-</sup>欠損のヒトで最も重篤な症状として見られる急性膵炎がLPL<sup>-/-</sup>マウスでは見られない。2番目に動物モデルとして選択されたのは自然発症のLPL欠損ネコであり、AMT-010を用いた薬理的試験が実施された。ヒトの病態と比較して、LPL<sup>-/-</sup>欠損ネコは黄色腫、網膜高脂血漿に加え最も重篤な症状である膵炎も発症する。

LPL欠損患者で繰り返し再発する膵炎のメカニズムは十分に解明されていない。しかし、血中のカイロミクロンやトリグリセリドを低下させることにより生命の危険に及ぶような症状が起こるリスクを下げられるという事実がある。従って血中トリグリセリドを持続的に低下させることができるのであれば、Glyberaの非臨床試験における有効性の指標の代替マーカーとして使用することが許容される。

遺伝子治療薬を投与した動物の血漿中のトリグリセリドを低下させることは、その活性を評価するうえでの主要薬力学的マーカーとされた。薬力学的活性を証明するためにLPL欠損マウスとネコを用いた試験が実施された。用いたLPL欠損動物はヒトと同

様にその血漿は異常な乳白がみられる。乳白色様の血漿、黄色腫、網膜高脂血漿といったヒトLPL欠損症と同じ表現型を示す飼育されているネコの群れが知られており、このネコはトリグリセリド濃度の高い血漿をもつ。このようなネコにAMT-010を投与すると重篤なトリグリセリド血漿や高脂血漿を3-4日で正常化できる。このためにこの効果が認められるに必要な投与量がヒトにおいても効果が認められる可能性があることと結論されている。ただし異種動物への投与によって引き起こされる免疫反応により効果が喪失されることが懸念された；従って、免疫抑制により効果の喪失を遅らせることができるのではないかと推察がされた。

ヒトとネコの病態と異なり、LPL<sup>-/-</sup>マウスは生後24時間以上生存できないが、これは高脂血漿のみならずこのマウスでは、生後、授乳を開始できないためと考えられている。しかし、LPL<sup>-/-</sup>マウスに生後すぐにヒトLPL遺伝子を発現するアデノウイルスを投与すると生後24時間を越えて生存することができるようになる。このアデノウイルスによるトランスジェニックマウス系を用いてLPL欠損をレスキューする試験がLPL<sup>-/-</sup>マウスで行われ、この系では、アデノウイルスベクター投与によりGlyberaを投与していないマウスでもヒトLPLの発現が検出される（アデノウイルスの発現は一過性であり、その後発現は減弱していく）。このモデル動物では、LPL発現アデノウイルスが生後短時間の間発現しているために、ヒトLPLに対してナイーブではなくなっており免疫寛容になると期待された。

これらのマウスにAMT-010を投与してもLPLに対する抗体は出現せず、局所投与によってもLPLに対する免疫寛容が破壊されることはないことが明らかである。

多くの患者では活性はないもののLPLタンパク質の発現は認められることから、Glyberaに対してもこれらのマウスと同様に免疫寛容の状態が期待される。

生後すぐにヒトLPL発現アデノウイルスベクターの投与によりレスキュー処理された飼育されたLPL<sup>-/-</sup>マウスを用いて、AMT-010の有効投与量を明らかにする試験が行われ、主要な有効性を評価する項目として血漿中のトリグリセリドの定量を行うと共に、追加項目として血漿中あるいは組織中のヒトLPL量の測定が行われた。

非臨床試験がAAV2ベクターとAAV1のキャプシドを発現するAAV2ベクターを使用して実施された。投与量設定のための試験と、効果の持続性に関する試験が実施された。これらの試験では、再投与の影響を調べる1つの試験の他は、筋肉内への単回投与が行われた。

効果はLPL<sup>+/-</sup>マウスと比較して実施された。

AMT-010の複数のバッチを用いて比較が行われると共に、AMT-010とAMT-011の効果を比較するブリッジング試験が実施されたが、この比較試験では非常に少数のマウスしか用いられていないために試験結果から得られる結論は限定的なものである。

411-002試験では、AMT-010投与後52週での血漿中のLPL量が測定され、非投与群と比較され優位な差異が認められており、血漿の高脂肪状態の完璧かつ持続的改善が認められている。

申請者は、投与後52週で認められたLPLの残存量や残存活性は血漿トリグリセリドを低減化できるだけ十分なものであると議論している。しかし残存しているLPLタンパク質量と活性のベースラインは（アデノウイルス投与を行った）若年性のLPL<sup>-/-</sup>マウスと同程度であった。

これらの試験から次のような結論が導かれている：

— AMT-010投与により血漿トリグリセリド量が低減化され、99.2%の低減化率が達成できたとされ

ている。

— AMT-010投与により定量可能なヒトLPL活性が検出され、さらにタンパク質としての発現が認められ、その発現量は投与量に依存していた

— AMT-010投与によるLPLの発現は、持続性が認められるものの、時間経過と共に発現が低下していき52週では活性が低下していた。ただ、血漿中のヒトLPL量は非投与群に比べて有意な活性が認められた。

— AMT-010投与部位の筋肉では定量可能なレベルのヒトLPL活性が検出された；この発現により1年以上にわたる持続的かつ十分な／高脂肪血漿の改善が認められた。

— AMT-010を投与した部位の筋肉の免疫組織化学解析が行われ、LPLの発現部位は筋膜外部に認められており、これは正常のLPLの筋肉での発現と同等であった。

— AMT-010の2つの投与量によるLPLタンパク質の発現の比較が筋肉の4箇所あるいは36箇所からサンプリングして解析が行われたが、2つの投与量でタンパク質発現に差異が認められなかった；これは、筋肉内ではLPLの発現に上限値があることが推定され、その一方で、マウスではこの発現量で少なくとも高トリグリセリド及びリポプロテインの血漿循環レベルを低減化できることが示された。

— 脂肪の静脈内投与によりLPL<sup>-/-</sup>マウスは血漿トリグリセリド量が増加する；すなわち、この系でAMT-010を投与するとにより、非投与群と比較して脂肪投与により増加するはずの血漿トリグリセリド量の改善が認められた。

— AMT-010の再投与試験が実施されたが、再投与によりAAV1キャプシドに対する中和抗体の発現といった反応を引き起こすことはなかった。

AAVに対する持続的な抗体産生が起こるとGlyberaを投与した場合に導入遺伝子の持続的な発現が抑制される可能性がある。同様の状況はAAV1型の自然感染が起こった際にも考えられる懸念である。このために、AAVキャプシド（他のAAVに対しても交差反応を起こす可能性がある）に対する液性免疫の反応性の有無を、AMT-010の投与に先立って全ての被験者で調べる必要があるとされた。

LPL遺伝子導入したトランスジェニックマウス（Tg動物）を用い、筋肉内でのLPLを正常の11-24倍、過剰発現させその毒性試験が実施された。Tg動物を用いても毒性所見が確認され、AMT-010及びAMT-011を用いた毒性試験の評価において参考にされた。

411-008試験、411-009試験、411-010試験を通じて申請者はAMT-010投与に比べAMT-011投与ではLPLの発現が抑制されていることを確認しており、特に411-010試験ではその傾向が顕著であった。高用量の投与によりLPLの局所での発現増加が認められる場合であっても生物学的な効果の増加は認められなかったとされた。ただし高用量では生物活性効果でより持続性が認められた。AMT-011添加により、インビトロのLPL発現がAMT-010に比べて全てのロットで1/4程度に低下していた。

全体を通じて申請者はLPL<sup>-/-</sup>マウスを用いてAMT-010及びAMT-011薬力学的試験のデータを得ている。単回投与試験であってもヒトLPL遺伝子の長期にわたる持続的な発現が確認されており、病態の進行により上昇するトリグリセリドを顕著に低下させる効果が確認されている。この作用は薬効の代替となる薬力学的マーカーとして受け入れられるものと考えられる。用量依存性が確認されているが、免疫抑制を行っても導入遺伝子の発現は改善されることは無かった。この点は臨床投与方法を決定するのに重要な示唆を与える。すなわち、免疫抑制を行うことによりAAV感染によって引き起こされる抗体産生を抑制するための免疫抑制の使用の是非に関連

する事項であり、多くのヒトがAAVに対する抗体を持っていることへの対応に関連する。

LPL-/-マウスを用いて本剤の有効性に関する重要なデータが得られたとしている。複数の試験で、申請者は血漿トリグリセリドが大きく低下することを示しており、これにより有効性を示唆するデータが得られたとしている。有効性が認められる投与量としては $10^{11}$ – $10^{13}$ ゲノムコピー(gc)/kgであり、想定されるヒト投与量としては $1 \times 10^{12}$ gc/kgに相当するとしている。

以上の試験より、AMT-011は生物学的に活性なヒトLPLを導入できるとする結論が得られたとされた。

#### 副次評価項目として薬力学的試験。

副次評価項目のための薬力学的試験は実施されていない。Glyberaの特殊性を考慮し、遺伝子治療薬ガイドラインであるEMA/CHMP/GTWP/587488/2007及び遺伝子治療薬の第1相臨床試験を実施する前までに必要とされる非臨床試験ガイドラインであるEMA/CHMP/GTWP/12459/2006で求められている本試験を実施しないことをCAT及びCHMPは了解した。

#### 他剤との薬力学的相互作用

AMT-011と免疫抑制剤を併用することの効果を確認するために、治験薬投与と免疫抑制剤と同時に投与した場合の薬力学的試験が実施された。これについては既に議論をした。

#### C2-3. 薬物動態試験

ヒト及び動物組織中のAMT-011を検出するための複数のPCR法についてバリデーションが行われている。ウサギゲノムDNAの検出における定量的PCRのバリデーションに関するより十分な情報が審査の過程で要求された。

#### 吸収

吸収を解析するための試験は実施されていない。

製品は筋肉内に投与され、Glyberaに搭載された遺伝子が筋肉内で発現することが期待された。

#### 分布

分布に関して5つのGLP準拠の試験が実施された。この試験においてコントロール検体で陽性反応を示したが、申請者は剖検に際して、あるいはDNA調製の際のコンタミネーションが起こったものと説明した。

ベクターの生体内分布に関しては、ネコ、マウス、及びウサギで用いて実施された。関連ガイダンス(遺伝子治療薬開発で臨床試験に入るまでに実施しなければならない非臨床試験のガイドラインEMA/CHMP/GTWP/12459/2006)に従い、生体内分布、持続性、動員、排出について評価が行われた。生体内分布と発現の持続性については動物を用いて試験が行われた。排出については、動物を用いた非臨床試験は行われず臨床試験で患者由来の試料を解析することにより評価された。申請者はヒトへの投与後10週間にわたってベクターの排出がなくなること示そうとした。この点については臨床試験の項で議論をする。ベクターの動員(ターゲットとした組織細胞から出て、他の組織や細胞に取り込まれること)についての試験は実施されていないが、ベクターは血中及び投与されていない組織の中にも検出された。

ベクターDNAが検出される主な組織は、投与した筋肉、肝臓、脾臓、鼠径部リンパ節であった。

ネコにおいて、AMT-010ベクターDNAが、精巣、副睾丸、運動性のある精子に検出されたことより、ベクターは動物の生殖腺に分布することが示された。マウスにおいては、経時的な発現の消失が明らかにされ長期にわたる発現は高用量で認められた。しかし、180日間もの観察を行ったにもかかわらず完全な発現消失は確認されなかった。投与した筋肉内で発現がより低下していくものの持続性が確認され、また鼠径部リンパ節でも発現が残存していた。

## 代謝

ベクターの代謝を解析するための試験は実施されていない。Glyberaの特殊性を考慮して遺伝子治療薬ガイドラインであるEMA/CHMP/GTWP/587488/2007及び遺伝子治療薬の第1相臨床試験を実施する前までに必要とされる非臨床試験ガイドラインであるEMA/CHMP/GTWP/12459/2006で求められている本試験を実施しないことをCAT及びCHMPは了解した。

ベクターの動員、排泄を明らかにするための試験は実施されていない。排出に関する試験は臨床試験で実施された。分布の項で述べたように、ウサギ精液にベクターDNAが検出されることが明らかにされた。

## 他の薬剤との併用による薬物動態試験

他の薬剤との併用による薬物動態試験については実施されていない。Glyberaの特殊性を考慮して遺伝子治療薬ガイドラインであるEMA/CHMP/GTWP/587488/2007及び遺伝子治療薬の第1相臨床試験を実施する前までに必要とされる非臨床試験ガイドラインであるEMA/CHMP/GTWP/12459/2006で求められている本試験を実施しないことをCAT及びCHMPは了解した。

## C2-4. 毒性試験

全ての毒性試験は正常マウスを用いてGLPに準拠して実施された。毒性評価のために一種類の動物で試験でも良いとするのは、遺伝子治療薬ガイドラインEMA/CHMP/GTWP/587488/2007及び遺伝子治療薬の第1相臨床試験を実施する前までに必要とされる非臨床試験ガイドラインEMA/CHMP/GTWP/12459/2006に従ったものである。

Glybera毒性試験プログラムには90日までの観察期間が設定されたAMT-010を用いた単回投与毒性試験、180日及び105日までの観察期間が設定されたAMT-011を用いた2つの単回投与毒性試験が含まれており、さらにAMT-011を用いて生殖発生毒性試験

と発達毒性試験がひとつの試験で実施された。

## 単回投与毒性試験

一般毒性試験がマウスに筋肉内投与し、観察期間を変えて最大180日までホローアップの観察を行っている。プラスミド由来AMT-010 1バッチ及びバキエロウイルス由来AMT-011の複数のバッチを $1 \times 10^{11}$ から $1 \times 10^{13}$ gc/kgの投与した単回投与試験が実施された。

Glyberaの非臨床毒性試験は、単一種の動物を用いた試験でよいとされた。

臨床投与を想定した単回投与属性試験のデザインは筋肉内（臨床投与）及び静脈内（ワーストシナリオ）経路でAMT-011を投与して評価された。単回投与毒性試験では想定している臨床投与量（ $1 \times 10^{12}$ gc/kg）の10倍を超える投与量まで段階的に増量して（ $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ gc/kg）実施された。

さらに、目的遺伝子の長期に亘る発現を考慮して、単回投与後、6ヶ月に亘る動物の観察がAMT-011を投与して行われた。AMT-011とサイクロスポリンA或はmycophenolate mofetil (MMF)の免疫抑制剤との併用による単回投与毒性試験が実施され、免疫抑制状態におけるAMT-011の毒性が影響を受けないか検討された。

単回投与毒性試験では、投与された動物に、いかなる致死的、全身毒性、壊死等の影響も認められなかった。さらに、動物の病態的な兆候や全ての動物で認められるような変化、摂食障害、臓器重量の変化などは認められなかった。免疫抑制状態でAMT-010と投与した場合はAMT-011を投与した場合も体重増加の減少が認められた。対照マウスに比較して高用量のAMT-010を投与した場合に、わずかではあるが脾臓内の微小リンパの過形成が認められた。この兆候は91日目にも認められた。さらに、尿量及びクレアチンホスホキナーゼの低下がAMT-010の単回投与毒性試験で認められたが、AMT-011の単



回投与毒性試験では観察されなかった。

投与部位に関して、筋肉の退縮変化や皮内反応を含む組織病理的兆候が $1 \times 10^{12}$ や $1 \times 10^{13}$ gc/kgのAMT-010を投与した場合に認められ、さらにAMT-011を投与した全ての単回投与試験でも常に認められた。AMT-011投与群で認められる軽度の亜急性炎症反応の発症と同様に筋退縮は加齢と共に対照群のマウスでも観察されるが、中用量と大用量を投与した時に両性の動物で重篤な筋肉の退行やそれに付随するような明らかに投与に伴う変化が認められた。AMT-011投与後180日に渡ってホローアップの観察を行った試験で、既に述べたような遺伝子治療薬を投与した筋肉部位に組織病理学的な変性が起きており、その変化は投与量に相関して重篤度が増加していた。また、投与した筋肉部位の退縮が観察された。さらに一般毒性試験では機能的な影響は認められることはなく、また筋肉の機能試験でもなんらの機能低下の兆候も認められなかった。

炎症部位にCD8+T細胞は検出されなかったことより筋肉内に浸潤している細胞に細胞障害性T細胞は含まれていないことが確認された。

腫瘍形成や特定の肝毒性は観察されなかった。肝臓の過形成が観察されたが、これは対照群でも同程度の頻度で出現していた。これらの試験から決定された筋肉内投与でのAMT-011の無影響用量は、 $1 \times 10^{11}$ gc/kgであった。ベクターの生体内分布に関する試験より、投与部位である筋肉のみならず、流入領域リンパ節及び肝臓にもAMT-011が高濃度に分布することが確認された。AMT-011を静脈に投与した場合には、肝臓以外にも精巣や副睾丸などに高濃度にAMT-011が検出された。

#### 反復投与毒性試験

単回で複数個所に投与されるGlyberaでは反復投与毒性試験の実施はされていなかった。この臨床投与方法の観点から、反復投与毒性試験の実施が不要とする考えは受け入れられた。これは遺伝子治療薬

ガイドラインCPMP/BWP/3088/99に従った判断である。

#### 遺伝毒性

従来の化学薬品に適用される通常の遺伝毒性試験はこのような遺伝子治療薬では引き起こされることはなく、適用する必要はないとされた。この考え方は、CAT及びCHMPでも受け入れられるものとされ、考察にも書かれている。

#### 挿入変異と造腫瘍性

申請者が報告した試験結果からは挿入変異及び造腫瘍性に関する危険があることは示されていないが、染色体への挿入について十分に解析できてはいえない。文献情報から組換えAAVベクターを用いた筋肉内投与及び挿入変異に関する多くの論文が出されている。一般的なコンセンサスとして組換えAAVベクターのゲノムはエピゾーマルに存在し、ヒト染色体に組み込まれる確立は少なく、造腫瘍性はないとされている。

申請者は最初、Schnepf (2003) らによって報告されたDNA配列をランダムに増幅する方法 (B1-PCR) を用いて挿入変異に関する試験を実施した;しかし、B1配列がゲノム内に不均一に分布しているためにゲノム内への挿入部位の検出は十分な結果ではなかった。次にWangらが提唱した反復アンカー挿入部位トラップPCR (RAIC-PCR) 法についても議論をしている。Wangらの方法は、B1或は増幅産物をトラップするためにビオチン化したプライマーを用いてB1からB1-PCR産物を調製する方法である。しかし、B1-PCR RAICも陰性の結果しか与えずrAAVベクターの挿入が起こっていないことを示すにはデータが不十分であり、申請者もこれらの方法により得られた結果は十分なものではないと考えている。

LAM-PCRもまた抽出した総DNAから挿入されたAMT-011配列を検出することはできなかったことから、申請者は制限酵素を用いないLAM-PCR法を次世代DNAシーケンシング法と組み合わせて適用するこ

ととした。

インビトロ試験の報告で申請者の結論は、挿入変異による発がんのリスクを評価するのにインビトロ試験で十分、かつ適切な方法であるとしている。特に、文献で報告されたデータからAAVベクターの長期にわたる持続発現は環状エピゾーマルの形態をとっていると考えられるとしている。ゲノムDNAの選択的制限酵素分解による解析法を用いた結果からAMT-011はゲノムに挿入されることはなく、エピゾーマルな形で存在するとされた。インテグレーション解析結果からは、特定のホットスポットに挿入されることはなく、AMT-011がゲノムへ挿入されることによる変異を起こすようなクローナルな増幅を引き起こすこともないとされた。染色体挿入が起こるのは2%以下の確率であり、かつランダムにゲノムに挿入されるとされた。

#### がん原性

がん原性試験は実施されていない。申請者は、ベクターの挿入に関する評価の試験でがん原性を評価するのに十分であるとした。

#### WPRE (woodchuck post-transcriptional regulatory element) 配列を含んでいることとがん原性との関連

Glyberaは挿入遺伝子の発現を増幅させる作用があるとされるwoodchuck post-transcriptional regulatory element (WPRE) を含んでおり、WPREの作用としてその増幅促進能に依存して腫瘍形成を引き起こす可能性がある。WPREはwoodchuck hepatitis virus (WHV) に由来する。WPREはWHVのXタンパク質の発現を更新する因子を持ち、WHVが感染したマームットに肝がんを引き起こす作用がある。

WPREは十分な目的遺伝子の発現を引き出すために必須の因子となることが多い。その遺伝子配列の一部はWHVのX配列と重複しており、このために被験者に肝がん発症のリスクがないか懸念されたが、Glyberaは、WPRE配列の中の発ガンのイニシエーションに関連するとされる2次的エンハンサー配列で

あるWe2配列を持たない。GlyberaがWe2配列を持たないことから申請者はGlyberaに含まれるWe2配列は腫瘍原性を増加させることはないと考えられている。肝がん発症に関連するWHxの想定されるリスクはHBVウイルスのXタンパク質 (HBx) との類似性からくるものである。HBVウイルスと肝がん発症の相関についてはよく知られており、肝がん発症のコファクターとして作用するHBxによって介在されるといわれている。Dandri等 (1996) の報告にあるようにWHxタンパク質はWHVの急性感染から回復した動物では持続的に発現することではなく、持続感染している場合にのみ発現しているたんぱく質である。WHxを発現している細胞はそれだけで腫瘍化することではなく、抗がん剤に暴露されることにより腫瘍化することから、WHxそのものにはがん原性の能力はないと考えられるが腫瘍化を促進する可能性はあるとされた。

AAVベクターを2つの異なる細胞株に導入した後、WHxタンパク質の発現を調べたがタンパク質の発現は認められなかった。Glyberaを投与して105日間及び180日間にわたって観察した動物試験で、肝臓や他の組織でも特に腫瘍発症リスクの増大は認められなかったとされている。申請者は、WPREに関連する腫瘍原性の報告は文献上のみのものであると考えている。Embury等 (2008) によるWPREを含むAAVベクターの報告があるものの、多くはKingsman等 (2005) や他の研究者による報告で、レンチウイルスにWPREを搭載した報告である。Embury等の報告では肝門脈からの投与にもかかわらず、肝臓の造腫瘍性のリスクがあるという兆候は見られておらず、16の腫瘍が確認されたが肝臓で見つかったのは4例のみであり、他は胃や小腸である。肝臓で見つかった腫瘍は同時に他の部位にも腫瘍が見つかった。腫瘍が起こる機構としては、フェニルアラニン脱水素酵素とXタンパク質の融合タンパク質の遺伝子発現が形成されることによりフェニルアラニン尿症の作用メカニズムに同じことがおこっていると考えられている。申請者は、Embury等が用いたモノクローナル抗体を用いて、HBxとWHxの交差反応性について

て評価を行っており、その結果からモノクローナル抗体はHBxとは交差するがWHxとは交差しないと結論している。したがって、現在得られているデータからは腫瘍発生にWHxが関与する証拠は得られていないとしている。

### 生殖発生毒性

雌性マウスを用いて交配4週間前にAMT-011を投与した場合にはベクターDNAが胎児に伝達されることはなかったことから、Glyberaは母体の生殖細胞から子孫への伝達は起こらないと結論している。ベクターが雄性の生殖腺に検出されることから、ベクターが生殖細胞に導入されるか検討が行われ、これらの生殖細胞の染色体に組み込まれるリスクがあるとされた。ベクターシグナルがネコ、マウス、ウサギの生殖腺に持続的に検出されることから生殖腺内のどの細胞に導入されるのか、特に精子細胞の取り込まれる可能性について、細胞分画法を用いて解析された。ベクターが精液及び精子に検出されたことから、ベクターがF1世代に伝達される可能性について評価するために交配試験が実施された。臨床試験においても患者精液中にベクターシグナルが検出されたことより、さらなる動物試験が必要とされた。

雄性動物を通じての生殖細胞へベクターの伝達は試験されておらず、生殖細胞への暴露があることからベクターの生殖細胞への組み込みのリスクについては十分な評価がなされていない。

生殖発生毒性は、妊娠マウスを用いて実施され、雌性マウスの妊娠や胎児の発達に特に問題は認められなかった。しかし妊娠中の投与は避けるべきとの慎重な配慮を求めるとされた。

### 局所認容性

局所認容性に関する試験が一般毒性試験の一部として実施された。推奨臨床投与量で投与量に依存した進行性の筋肉への毒性所見が認められた。これは回復性のある毒性であった。

### 他の毒性試験

AMT-011にはバキュロウイルスDNAの混入による毒性について理論的な評価が行われている。AMT-011はバキュロウイルスを昆虫細胞へ感染させて製造される。申請者は、バキュロウイルス由来DNAの含量についての評価が行われ、患者投与量当たりのバキュロウイルスDNAの混入量は代々投与量で3.3 IUと計算された。申請者は、文献上の観点からバキュロウイルスDNAによるリスクはヒト細胞当たり10粒子ウイルスDNAが混入するリスクとした。バキュロウイルスは昆虫細胞に感染し、殺虫剤等に用いられてきたが、ヒトに対しては病原性がないとされてきた。野生型のバキュロウイルスは補体依存性の分解を受けること、細胞に感染する際のウイルス受容体については知られておらず、哺乳類細胞への感染性については比較的感染性は低いとされてきた。また、細胞内へ入った場合には、エンドゾームでの分解感受性があり、核内には移行しないと考えられている。申請者は、バキュロウイルスに含まれる初期プロモータがバキュロウイルス独自の遺伝子を活性化する可能性を定量評価し、11%以上と計算している。しかし、機能的なウイルス由来DNA断片が他のゲノムや宿主ゲノムに挿入される確立は、おそらく $8 \times 10^{-11}$ %程度であると計算している。これらの推定から、バキュロウイルス由来のDNA挿入されるリスクは殆どないと結論している。

### C2-5. 非臨床試験の考察

薬理学試験から単回投与でも動物内のヒトLPL遺伝子を発現させることにより長期にわたるトリグリセリドの持続的低下をもたらすことができるとされた。

組織病理学的解析によって投与した動物に急性炎症及び退縮性の筋肉ダメージと再生変化が常に認められた。このような変化はヒトLPLの発現量と関連しているように考えられた。申請者に、このような反応に可逆性があるのか非可逆なものなのか明確にするように求めた。また、対照のAAV1ベクターとGlyberaの影響を比較することによって、このような

反応が局所で過剰発現しているLPLの影響なのかどうか、あるいはAAVに対する免疫応答の結果なのかを区別するためにさらなる検討をする必要がないか妥当性を説明するように求めた。

申請者によれば、AMT-011を投与した後180日間のホローアップを行った試験から、投与部位の筋肉の退行が認められたものの一般毒性試験ではマウスに機能的な影響を与えることもなく、筋肉の機能試験でも影響は認められなかったとされている。

文献データからLPLを過剰発現したマウスは同様の反応性を示したものの、トランスジェニックウサギを用いてLPLを過剰発現させても同様の反応性は示されなかった。従って、申請者はマウスで認められたこのような反応性はヒトとの種の違いによって、もたらされたものとされ結論した。

この種差によってもたらされる差異は、ウサギとマウス間の脂質代謝やリポタンパク質の組成の違いといった生化学的な面に影響を与える可能性がある。申請者はLPLの過剰発現によってもたらされる過剰な遊離脂肪酸の増加はAMT-011によって引き起こされる筋毒性をもたらしているものと考えており、LPL過剰発現による直接作用ではないと考察している。

申請者はマウスに認められる組織病理学的変化とヒトにおける変化は同等であると考えている；両種の変化は進行性の退行反応であると考えられ、再生反応も認められたとされ、その過程には炎症細胞はほとんど見られなかったとしている。

申請者は両種のAAVに対する免疫応答性や脂質代謝における種差も含めてマウスでの解析データをヒトに外挿できると考えている。

CAT委員会は申請者の説明に全面的に同意したわけではなく、LPLを過剰発現した時の影響を試験するために対照のAAVとAMT-011の比較を行う追加試

験が不足していると判断した。しかし、そのような検討を行ってもCATの懸念点が解消されるわけではないと考えられ、そのために最終的には追加の試験を実施しないことに同意し、この問題については解決した。

薬物動態試験では主要評価として、組織分布とその分布の持続性について解析している。AMT-011を投与された動物の投与部位の筋肉には顕著な発現が長期に亘って認められ、また肝臓やリンパ節も同様の持続発現が認められた。この発現は時間経過と共に低下していった。両性のマウスの生殖腺にベクターの発現が認められたが、妊娠マウスや胎児への暴露は認められなかった。

CAT委員会の要求により、医薬品市販承認取得者(MAH)によって雄性のCD-1マウスを用いた繁殖試験が実施され、AMT-011の子孫への伝播はないとされた。従ってAMT-011の次世代への伝播リスクも比較的低いと考えられるとされている。

インビボ造腫瘍性試験は実施されていない。申請者は、挿入変異や腫瘍原性を適切に評価可能と考えられる試験法はないと考えられるとし、いずれの試験デザインも有用性に疑問があるとしている。申請者は、rAAVの染色体への挿入とマウスでの肝がん発症に関する論文を引用して、そのリスクについて議論をしている。肝がん発症が起こる可能性について慎重に考察が行われており、申請者は新生児モデルを用いた試験が推奨されていることを認識した上で、げっ歯類を用いた2年間に亘る他の試験法を含め新生児マウスには増殖能の高い細胞が多く含まれ、生体マウスとは異なる特性を持つ系であり、これを適用することに疑問があるとしている。

全体の議論を通じてCATとCHMPは造腫瘍性の懸念は低いとする申請者のデータに同意した。造腫瘍性や造腫瘍性のリスクを評価する他の実施可能の方法は現時点ではなく、今得られているデータからはそのリスクは無いが、あったとしても極めて低いと

考えられる。Glyberaが染色体に挿入され、腫瘍を引き起こす理論的な可能性はあるものの、CATとCHMPはこれらの懸念についてさらに検討するための動物試験や他の試験を実施する必要性はないとする申請者の考えに同意した。

## C2-6. 非臨床試験全般の結論

Glyberaは造腫瘍性を引き起こす可能性のあるエレメントであるマーモット翻訳後因子と挿入変異を引き起こす可能性のある2つのエレメントを持っている。申請者にはこれらの2つの因子に関する十分な試験と、結論を導くには十分なデータが得られないとしても、その試験結果を踏まえた考察を求め、またリスクに対する対応を明らかにするよう求めた。

AAVは理論的な染色体への挿入リスクとそれによる増腫瘍性リスクが存在するが、次のような理由からそのリスクは小さいと考えられた；1、rAAVは長期に亘って核内に存在し続けるとしても殆ど染色体には挿入されずエピゾーマルの形で存在する；2、生体げっ歯類、イヌ、霊長類を用いた文献データから、染色体への挿入が起こっても、発がんとは関連しないとされている；3、発がん、ヒトにAAVへの血清反応性が既にある場合でもAAV感染が腫瘍形成には関連しないと考えられていることなどである。本疾患の患者にGlyberaを投与する場合に、その安全性プロファイルは担保されていると考えられる。

全体を通じて、CATとCHMPは、提出された全てのデータから造腫瘍性の懸念は無いとすることに同意した。造腫瘍性に関する他の試験法やそのリスクを評価可能な他の方法はなく、今得られている証拠からはそのリスクは無いか極めて小さいと考えられる。Glyberaは染色体へ挿入され、それによる腫瘍を引き起こす理論的なリスクはあるが、CATはこの懸念について解析を進める意味のあるさらなる動物試験や実験は必要ないとする申請者の意見に同意した。申請者のデータについて同意することができ、CATが最初に提起した問題点については解決した。

WHxが発現することによるがん化のリスクと挿入変異についてのリスクは解決したと考えられる。

以上のような評価に基づいて従って非臨床試験で得られたデータからGlyberaの承認に関して反対する理由はないとする結論に至っている。

## D. 考 察

リポタンパク質リパーゼ（LPL）欠損による高脂血症の治療薬として先進国で最初に遺伝子治療薬GlyberaがEUで承認された。Glyberaはアデノ随伴ウイルス（AAV）をベースにした組換えウイルスベクターであり、ヒトLPL遺伝子を発現する。ヨーロッパ医薬品庁（EMA）はGlyberaの審査における評価レポートを公開している。この評価レポートで、EMAが遺伝子治療薬の非臨床試験で、1）インビボ試験でヒトと同様の病態を示すモデル動物で、ヒトでの有効性を示唆するデータを明らかにすることを求めた。2）特にモデル動物の選択に当たっては、高脂血症の動態や黄色腫のみならずLPL欠損患者で臨床最上、最も問題なる急性膵炎がモデル動物で発症することなどを考慮してマウス、ネコ、ウサギが選択され、Glybera投与により血中トリグリセリドの正常化とその持続性が示されている。3）毒性試験では、3用量での単回毒性試験が実施され、急性炎症と筋退縮性の反応が認められたがこれは発現しているLPLの種差のためとされた。NOELが $10^{11}$ gc/kg体重とされた。4）遺伝毒性試験やがん原性試験は実施されていないが、挿入変異や挿入変異に基づく造腫瘍性試験が実施されており、挿入変異により造腫瘍性のリスクは少ないとされている。

Glyberaの評価レポートからEMAが臨床試験前と承認時にどのような非臨床試験を求めたのかが理解でき、わが国でも遺伝子治療薬の安全性や臨床試験に結びつけるための有効性をどのようにモデル動物で示すべきかの参考になる。

## E. 結 論

Glyberaの評価レポートからEMAが臨床試験前と承認時にどのような非臨床試験を求めたのかが理解

でき、わが国でも遺伝子治療薬の安全性や臨床試験に結びつけるための有効性をどのようにモデル動物で示すべきかの参考になる。

#### F. 業績

- 1) K. Sakai-Kato, K. Nanjo, T. Yamaguchi, H. Okuda, and T. Kawanishi, High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods* 5, 5899-5902 (2013)
- 2) Itoh, S., Hiruta, Y., Ashii, N., Fujita, N., Natsuga, T., Hattori, T., Bandoc, A., Sekimoto, Y., Miyata, K., Namekawa, H., Mabuchi, K., Sakai, T., Shimahashi, H., Kawai, K., Yoden, H., Koyama, S., Odgaard Herr, S., Natsuka, S., Yamaguchi, T., Kawasaki, N.: Determination of Galactosamine Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography. *Biologicals*, in press
- 3) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic

Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)

- 4) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 印刷中
- 5) 山口照英: バイオ医薬品の効率的製造に向けた世界動向と規制状況. *BioIndustry*, 30, 47-54 (2013)

#### G. 学会発表

- 1) Kishioka, Y., Sakurai, K., Yamaguchi, T.: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. *APEC International Symposium Soul Korea*, (2013)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- H-1 特許取得 なし  
H-2 実用新案登録 なし  
H-3 その他 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

ーバイオアナリシス（生体試料分析）バリデーションに関する研究ー

研究分担者：香取 典子（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第三室長）

研究要旨

生体試料中の薬物、バイオマーカー等の定量分析技術は、現在の創薬や臨床開発過程に欠くことのできない科学技術として重要性を増している。すでにこれら科学技術は生体試料分析バリデーション（Bioanalytical Method Validation、BMV）という概念のもとに確立され、欧米ではBMVのガイダンス、ガイドラインがそれぞれ整備されつつあり、日本においてもBMVガイドライン策定に関して早急な取り組みが必要であり、この調査研究においては、日本におけるBMV指針作成に寄与することを目的とする。昨年度は、バイオアナリシスフォーラム（JBF）より提出されたガイドライン素案を元に討議を重ね、H25年3月に厚生労働省にガイドライン案（対象：低分子、LC/MS<sup>n</sup>）を提出し、さらに、リガンド結合アッセイ（LBA）のBMVを対象としたガイドラインを作成するため、新たにワーキンググループを立ち上げた。本年度は4月に意見公募されたBMVガイドライン案（クロマトグラフィー、低分子）に対し集まったパブリックコメントを整理し、7月にガイドライン正式版とQ&Aが発出された。また、LBAに関するガイドライン案についてもH25年12月に厚生労働省に提出された。今後は新たに立ち上げられた高分子MSワーキンググループにおいて、ガイドライン策定を視野に入れた議論を行う予定である。

キーワード：bioanalytical method validation (BMV), Japanese guideline for BMV,  
Ligand binding assay (LBA), Japan Bioanalysis Forum (JBF)

研究協力者：

石井 明子（国立医薬品食品衛生研究所）	立木 秀尚（東和薬品（日本ジェネリック薬協））
井上 則子（JCLバイオアッセイ（安研協））	谷口 佳隆（東レリサーチセンター、JBF-LBA）
今里 真実（ノバルティスファーマ、JBF-LBA）	富樫 一天（住化分析センター（安研協））
岩田 大祐（医薬品医療機器総合機構）	中村 隆広（新日本科学、JBF-LBA）
大住 孝彦（大塚製薬（株）、JBF-SC）	中山 聡（味の素製薬、JBF-GL）
奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所）	細木 淳（協和発酵キリン（株）、JBF-LBA）
掛樋 真彰（武田薬品工業（株）、JBF-LBA）	松永 雄亮（医薬品医療機器総合機構）
片島 正貴（アステラス製薬（製薬協））	間渕 雅成（田辺三菱製薬（株）、JBF-SC）
川崎 ナナ（国立医薬品食品衛生研究所）	南出 善幸（島津テクノリサーチ、JBF-LBA）
小林 信博（第一三共（株）、JBF-SC）	宮 和弘（中外製薬、JBF-LBA）
酒井 和明（帝人ファーマ（製薬協））	米山 智城（武田薬品工業、JBF-GL）
佐藤 玲子（医薬品医療機器総合機構）	

## A. 研究目的

薬物動態 (PK) 試験、トキシコキネティクス (TK) 試験および生物学的同等性 (BE) 試験の際には、血漿や組織中の薬物濃度を求めるため、LC/MS/MSや免疫学的測定法が用いられるが、生体由来成分が測定に影響を与えるため、分析結果が大きな変動を示す。特に、LC/MSでは、このような現象を「Matrix Effect」と呼んでいる。この、生体試料中の薬物定量分析は、医薬品開発において安全性有効性を判定する上で重要であり、高い信頼性が要求されるため、BMVが重要となる。

現在、日本で出されている分析法バリデーションの行政文書は、「分析法バリデーションに関するテキスト」(1997年、ICH Q2A、B) および日本薬局方の参考情報「分析法バリデーション」だが、これらは原薬・製剤の品質試験を念頭に置いたものであり、生体試料中の薬物濃度分析には十分対応していないと考えられる。

すでにFDA、EMAのガイダンス、ガイドラインが出揃い、欧米のみならず中国、インド、ブラジルなどがこれに追随しようという状況では、日本においてもBMVガイドライン策定に関して早急な取り組みが必要であり、この調査研究においては、日本におけるBMV指針作成に寄与することを目的とする。

## B. 研究方法

ガイドライン策定を目的とした打合せ会議を、厚労省、PMDA、関連する業界団体および国立医薬品食品衛生研究所からなるメンバーで行い、まず、各企業団体により、BMVガイドライン案への意見を集約してもらい、同時にガイドラインのQ&Aに採用すべき質問事項を募った。また、LBAを対象としたBMVガイドライン素案の作成を、現状では日本で唯一のBMVの科学的な議論のための団体である、バイオアナリシスフォーラム (JBF) の協力により行う。

また、国際会議・学会の際には、何らかの発表を行い本研究班からのデータ・意見の発信、およびフィードバックの収集に務めた。

## C. 研究結果

昨年度、JBFから提出されたガイドライン素案を元に議論を重ね、得られたBMVガイドライン案 (低分子、クロマトグラフィー) がH25年4月5日から2ヶ月間意見公募された。英文版が公表されたこともあり、国内外から150を超すコメントが寄せられた [添付資料2]。その中から重要と思われるものについて吟味し、内容をガイドラインに反映すると共に、これらの疑問に答えるための適切なQ&A作成を行い、最終的に7月11日に通知として発出された [添付資料3、4]。また、今回のガイドラインとQ&Aは英訳され、事務連絡 [添付資料5] として9月13日に発出された。このガイドラインは海外からも注目され高く評価がされた。評価された原因の一つは、それまでの欧米のガイドラインが分子量でカテゴライズされていたのに比べ、日本ではクロマトグラフィーと、リガンド結合アッセイ (LBA) と言うように、手法でカテゴライズしたことが、合理的であるとの評価を受けた。9月にFDAがBMVガイダンスの改訂版を出したが、日本のカテゴライズを踏襲したものであった。

また、LBAガイドラインについても、国立医薬品食品衛生研究所の石井室長を座長とした、LBAワーキンググループによって、H25年3月に出されたJBF素案について関連団体 (製薬協、安研協) からのコメントが集約された。得られたコメントを元にLBAガイドラインが改訂され、さらにPMDA等の規制当局からの意見を反映させた後、2013年12月末に厚労省に提出され、H26年1月10日より1ヶ月間意見公募された [添付資料6]。現在、集まったコメントを元にガイドラインの改定作業が行われている。

今後は、国立医薬品食品衛生研究所の川崎部長を座長とし、H26年2月6日より活動を開始した高分子MSワーキンググループにおいて、高分子MSガイドライン策定を視野においた議論を重ね、指針となる文書の完成を目指す。

## D. 考察

研究班の活動を通じて、様々な関連団体に対しBMVガイドラインの存在と重要性を広く知らしめ、



医薬品開発におけるPKデータの信頼性確保について一定の理解が得られたと考えられる。また、研究班の議論の中で企業からのメンバーと規制当局からのメンバーが意見の交換を行うことにより、お互いの誤解が解け、より有意義なコミュニケーションが行われたことは、今後の薬事行政に良い影響をもたらすものと考えられる。しかし、高分子MSやバイオマーカーを対象とした分析バリデーションに関しては、未だ議論が続けられており、今後はさらに広く意見を収集し、集中的な議論を行うことが必要と考えられる。

## E. 結 論

これまではFDA、EMAのガイダンス、ガイドラインが出揃い、欧米のみならず中国、インド、ブラジルなどがこれに追随しようという状況において、BMVに関して何の規制文書も持たない日本は、今後PK、TKデータの信頼性を担保することが困難になると予想されたが、研究班の活動により発出された日本版BMVガイドラインによって、日本における薬物動態関連のデータの国際的な信頼性が高まることになった。このことから、グローバルな医薬品開発の促進に寄与すると考えられ、今後の国際調和により一層貢献できると期待される。

## 添付資料

1. 大野班バイオアナリシス分科会のこれまでの活動状況 (H25年度)
2. 「医薬品開発における生体試料中薬物定量濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン (案)」に関する意見の募集に対して寄せられた御意見について
3. 「医薬品開発における生体試料中薬物定量濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」発行 (薬食審査発0711第1号、審査管理課長通知)
4. 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン 質疑応答集 (Q&A)」(事務連絡、平成25年7月11日)

5. 「Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development, Q&A」(事務連絡、平成25年9月13日)
6. 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法 (リガンド結合法) のバリデーションに関するカイドライン案 (厚労省提出版)

## 研究成果発表

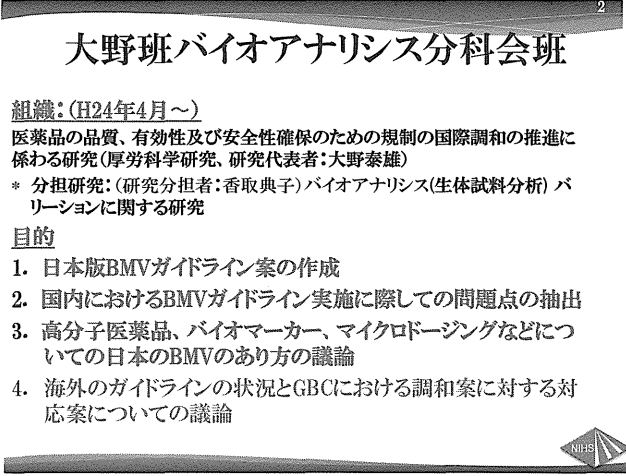
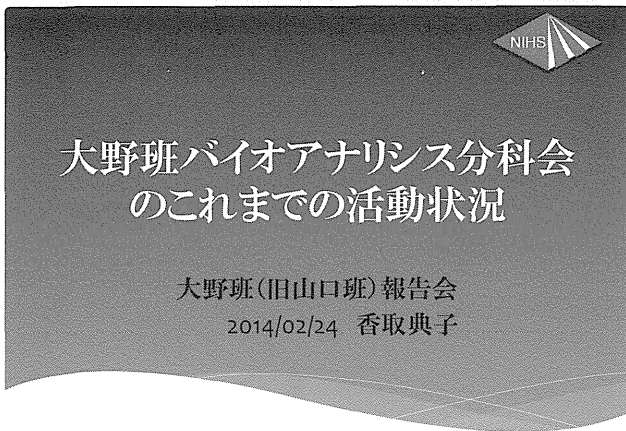
### 誌上発表

1. Lauren Stevenson, Mario Rocci, Fabio Garofolo,, Binodh DeSilva, Lakshmi Amaravadi, Noriko Katori, et al. 2013 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: “Hybrid” - the best of LBA & LCMS. *Bioanalysis*. 5(23), 2903-2918 (2013)
2. 香取典子; バイオアナリシスフォーラム (JBF) の活動と日本における規制バイオアナリシス, *薬剤学*, 73(5) 296-301 (2013)
3. Katori N. Regulated bioanalysis in Japan: where do we come from and where are we going?. *Bioanalysis*. 5(11): 1321-1323. (2013)
4. 香取 典子; 日本におけるバイオアナリシス分析法バリデーションガイドラインについて, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 44(7), 543-549 (2013)

### 口頭発表

1. N. Katori\*; Japan’s perspective on Partial-validation in Small Molecule Regulated Bioanalysis - Method Transfer and Life Cycle Management -, 8th Workshop on Recent Issues in Bioanalysis (8th WRIB), (Los Angeles/Universal City, CA, USA, March 10 - 14, 2014) .
2. A. Ishii; The Japanese Draft BMV Guideline for LBA , , 8th Workshop on Recent Issues in Bioanalysis (8th WRIB), (Los Angeles/Universal City, CA, USA, March 10 - 14, 2014) .
3. 香取典子; Involvement in the pharmacokinetics and the history of regulated bioanalysis in Japan, 第28回日本薬物動態学会年会 (JSSX2013)、東京 (2013.10)

4. 香取典子; 日本におけるBMVガイドラインの状況とこれからの動き, 第26回バイオメディカル分析化学シンポジウム (BMAS2013)、東京 (2013.08)
5. 香取 典子; 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法バリデーション (BMV) に関するガイドライン, 日本ジェネリック製薬協会 第19回 製剤研究会、東京 (2013.07)
6. 香取 典子; 日本の BMV 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、神戸 (2013.06)
7. N. Katori\*; The Guidelines for BMV in Japan - update of status and main items, 7th Workshop on Recent Issues in Bioanalysis (7th WRIB), (Long Beach, CA, USA, April 8 - 11, 2013) .



# 大野班バイオアナリシス分科会 のこれまでの活動状況

大野班(旧山口班) 報告会  
2014/02/24 香取典子

# 大野班バイオアナリシス分科会班

組織：(H24年4月～)

医薬品の品質、有効性及び安全性確保のための規制の国際調和の推進に係わる研究(厚労科学研究, 研究代表者:大野泰雄)

\* 分担研究: (研究分担者:香取典子) バイオアナリシス(生体試料分析) パーリションに関する研究

## 目的

1. 日本版BMVガイドライン案の作成
2. 国内におけるBMVガイドライン実施に際しての問題点の抽出
3. 高分子医薬品、バイオマーカー、マイクロドージングなどについての日本のBMVのあり方の議論
4. 海外のガイドラインの状況とGBCにおける調和案に対する対応案についての議論

## 大野班バイオアナリシス分科会班の活動(前年度まで)

- 2011年10月6日 第1回班会議(旧大野班) JBFに日本版BMVガイドライン素案の作成を依頼
- 2011年12月7日 第2回班会議(旧大野班) JBFが素案のScopeと項目名を提出
- 2012年2月20日 第3回班会議(旧大野班) JBFから素案の作成状況が報告(3月末に)
- 2012年3月8日 第2回JBFシンポジウムでJBF素案の概略について説明
- 2012年3月末日 日本版BMVガイドライン/JBF素案(低分子LQ)が研究班に提出された。
- 2012年4月中旬 製薬協、GE薬協、安研協などにJBF素案へのコメント提出を依頼。
- 2012年7月17日 第1回班会議 コメントへの対応、今後の進め方などを中心に議論が行われた。
- 2012年9月27日 第2回班会議 LBAガイドライン 策定のためのWGが出来た。
- 2012年11月5日 第3回班会議 BMVガイドライン案に関する最終確認。
- 2013年1月11日 第4回班会議 BMVガイドライン案へのPMDAの意見への対応、パブコメ案発出までのスケジュール確定。JBFからのLBAガイドラインJBF素案提出を2月末とする。
- 2013年3月末日 日本版BMVガイドライン案(意見公募用)が研究班より厚労省へ提出された。

## 大野班バイオアナリシス分科会班の活動(H25年度)

- 2013年4月5日 BMVガイドライン(低分子、クロマトグラフィ)案パブリックコメント開始(2ヶ月間)
- 2013年5月16日 第1回班会議 BMVガイドライン公布は6月末を目途。QAの作成方針決定。LBAガイドライン/JBF素案を関係団体に送ることとなった。
- 2013年6月19日 集まったパブリックコメントへの対応についての検討会が低分子TFを中心に開かれた。
- 2013年6月25日 第2回班会議 パブリックコメントの集積状況を報告。発出までの作業確認。
- 2013年7月初旬 製薬協、GE薬協、安研協などにLBAガイドラインJBF素案へのコメント提出を依頼。
- 2013年7月11日 BMVガイドライン(低分子、クロマトグラフィ)およびQAが発出された。
- 2013年8月13日 英訳版BMVガイドライン(低分子、クロマトグラフィ)およびQAが発出された。
- 2013年9月27日 第3回班会議 LBAガイドラインJBF素案への関係各団体からのコメントおよびLBA-WGでの議論が紹介された。LBAガイドラインのパブリックコメントは今年度末を目指す。
- 2013年12月17日 第4回班会議 LBAガイドラインの発出までのスケジュール確定、3月末を目途とする。高分子MSワーキンググループの立ち上げについて報告。
- 2013年12月末日 LBAガイドライン案(意見公募用)が研究班より厚労省へ提出された。
- 2014年1月10日 LBAガイドライン案パブリックコメント開始(1ヶ月間)。英訳版は1月中旬頃。
- 2014年2月6日 高分子MSワーキンググループのキックオフミーティング
- 2014年2月25日 第5回班会議 LBAガイドライン発出までのスケジュール確認。

## H25大野班香取分担バイオアナリシス分科会メンバー

- |  |  |
|--|--|
| <p>製薬協</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 酒井 和明(非臨床) 帝人ファーマ(株)</li> <li>・ 片島 正貴(臨床) アステラス製薬(株)</li> </ul> <p>ジェネリック薬協</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 立木 秀尚 東和薬品(株)</li> </ul> <p>安研協</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 富樫 一天(株)住化分析センター</li> <li>・ 井上 則子(株)JCL/バイオアッセイ</li> </ul> <p>JBF</p> <p>SCメンバー</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 間瀬 雅成 田辺三愛製薬(株)</li> <li>・ 大住 孝彦 大塚製薬(株)</li> <li>・ 小林 信博 第一三共(株)</li> </ul> <p>GLタスクフォース</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 米山 智城 武田薬品工業(株)</li> <li>・ 中山 聡 味の素製薬株式会社</li> </ul> <p>LBAタスクフォース (7名)</p> <p>高分子MSタスクフォース (7名)</p> | <p>PMDA</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 佐藤 玲子 PMDA 新薬審査第二部審査役</li> <li>・ 岩田 大祐 PMDA 新薬審査第四部専門員</li> <li>・ 松永 雄亮 PMDA 再生医療製品等審査部</li> </ul> <p>国立衛研</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 奥田 晴宏 副所長</li> <li>・ 川崎 ナナ 生物薬品部長</li> <li>・ 石井 明子 生物薬品部 第2室長</li> <li>・ 香取 典子 薬品部 第3室長</li> </ul> <p>オブザーバー</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 光岡 俊成 医薬食品局審査管理課</li> <li>・ 倉持 憲路 PMDA RS推進部長</li> <li>・ 細木 るみこ PMDA RS推進部 研究課長</li> <li>・ 永井 尚美 PMDA スペシャリスト(薬物動態担当)</li> <li>・ 仁後 知子 PMDA 一般薬等審査部</li> <li>・ 染谷 仁 PMDA 信頼性保証部</li> <li>・ 瀬戸 宏裕 PMDA 信頼性保証部</li> <li>・ 榎田 綾子 PMDA 規格基準部医薬品基準課</li> <li>・ 新田 晃子 PMDA 規格基準部医薬品基準課 (敬称略)</li> </ul> |
|--|--|

## H25大野班香取分担バイオアナリシス分科会 LBA-ワーキンググループ

座長：国立衛研 石井 明子 生物薬品部 第2室長

### メンバー：

- |   |  |
|---|--|
| <p>製薬協</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>前川 浩太郎 久光製薬(株)</li> <li>片島 正貴 アステラス製薬(株)</li> </ul> | <p>国立衛研</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>奥田 晴宏 副所長</li> <li>川崎 ナナ 生物薬品部長</li> <li>新見 伸吾 代謝生化学部長</li> <li>香取 典子 薬品部 第3室長</li> </ul> |
|---|--|

### JBF LBA-TF

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>谷口 佳隆 (株)東レリサーチセンター</li> <li>今里 真実 ノバルティスファーマ(株)</li> <li>掛樋 真彰 武田薬品工業(株)</li> <li>中村 隆広 (株)新日本科学</li> <li>南出 善幸 (株)島津テクノリサーチ</li> <li>宮 和弘 中外製薬(株)</li> <li>細木 淳 協和発酵キリン(株)</li> </ul> | <p>オブザーバー：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>光岡 俊成 厚労省医薬食品局審査管理課</li> </ul> |
|--|--|

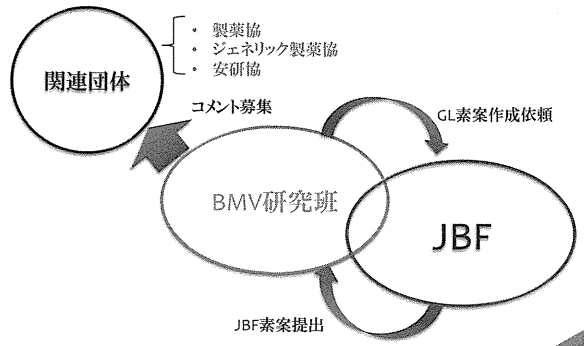
H25大野班香取分担バイオアナリシス分科会  
高分子LC/MSワーキンググループ

座長：国立衛研 川崎 ナナ 生物薬品部長

メンバー：

製薬協	国立衛研
官井 裕子 わかもと製薬(株)・製薬協	橋井 則貴 生物薬品部 第1室長
安研協	石井 明子 生物薬品部 第2室長
勸藤 雅裕 (株)新日本化学	香取 典子 薬品部 第3室長
小島 克典 (株)lg-M	
JBF LBA-TF	オブザーバー：
合田 竜彰 第一三共 (株)	厚生労働省
後藤 理恵子 JCL (株)	光岡 俊成 厚労省医薬食品局審査管理課
清水 久夫 武田薬品工業 (株)	
高村 不二子 アステラス (株)	
星野 雅輝 三菱化学メディエンス (株)	JBF-SC
宮 和弘 中外製薬(株)	若干名
山口 健 (株)住化分析センター	

BMV研究班とJBF



医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリ  
デーションに関するガイドライン発出の経緯

- H25年3月末 厚生労働省研究班からパブコメ用ガイドライン案が提出
- H25年4月5日 パブリックコメント開始
- H25年4月15日 パブリックコメント英訳版リリース
- H25年6月4日 募集期限 22機関(個人を含む)、約150を超すコメントが集まった。
- H25年7月11日 BMVガイドライン(低分子、クロマトグラフィー)発出
  - 「医薬品開発における生体試料中薬物定量濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」発行(薬食審査発0711第1号、審査管理課長通知)
  - H25年7月11日「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン質疑応答集(Q&A)」(事務連絡)
  - 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーション」に関する意見募集の回答について(22機関、139件)
- H25年9月13日 ガイドライン英訳版が事務連絡として発出
  - 「Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development」(事務連絡)
- H26年4月1日～ 施行

BMVガイドライン(低分子、クロマトグラフィー)・発出版  
(2013.07.11)の内容

- |                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| 1. はじめに           | 5. 実試料分析          |
| 2. 適用             | 5.1. 検量線          |
| 3. 標準物質(標準品)      | 5.2. QC試料         |
| 4. 分析法バリデーション     | 5.3. ISR          |
| 4.1. フルバリデーション    | 5.4. キャリーオーバー     |
| 4.1.1. 選択性        | 6. 注意事項           |
| 4.1.2. 定量下限       | 6.1. 定量範囲         |
| 4.1.3. 検量線        | 6.2. 再分析          |
| 4.1.4. 真度及び精度     | 6.3. クロマトグラムの波形処理 |
| 4.1.5. マトリックス効果   | 6.4. システム適合性      |
| 4.1.6. キャリーオーバー   | 6.5. 回収率          |
| 4.1.7. 希釈妥当性      | 7. 報告書の作成と記録等の保存  |
| 4.1.8. 安定性        | 関連ガイドライン一覧        |
| 4.2. パーシャルバリデーション | 用語解説              |
| 4.3. クロスバリデーション   | 附録 段階的アプローチの利用    |

質疑応答集(Q&A)

- Q1. 標準物質の有効期間が明らかでない場合には、どのように対応したらよいのか？
- Q2. 分析法バリデーションで取得する項目として選択性が挙げられているが、特異性とは異なるか？
- Q3. 安定性の評価に平均真度以外の指標を用いることは可能か？
- Q4. 凍結融解安定性はどのように評価したらよいのか？
- Q5. 異なる試験間で使用された分析法を比較する場合は、どのような場合か？
- Q6. 判断基準が「各濃度における平均真度が原則として理論値の±20%以内」となっている理由はあるか？
- Q7. 尿試料のISRは必要か？
- Q8. トキシコキネティクス試験のISRはどのように実施したらよいのか？
- Q9. 臨床試験において、ISRはどのように実施したらよいのか？
- Q10. 臨床試験において、分析法バリデーションを行う際に臨床試験から取得した実試料が存在する場合、それをISRの試料として利用できるか？
- Q11. ISR全体として判断基準を満たしている場合に、乖離度が±20%以内との判断基準を逸脱した個別の実試料について、再分析は必要か？
- Q12. ISRの結果は報告書のどこに記載すべきか？
- Q13. 分析法バリデーションでキャリーオーバーを検証しているのに、実試料分析でも評価を繰り返す必要はあるか？
- Q14. 薬物動態学的な理由での再分析ではどのようなことに注意すべきか？
- Q15. 内因性物質の分析法バリデーションはどのように行えばよいのか？

BMVガイドラインの法的な位置づけ

