

安全性に関するトピックの動向

S1: がん原性試験(見直し)*4

西川 秋佳*1, 野中 瑞穂*2, 小川 久美子*3

1. S1 EWG 出席者

2012年11月にSan Diegoで行われたS1 EWG会合の出席者をTable 1に示します。MHLWからは筆者を含め、小川氏と野中氏が出席しました。前回の会合と異なるのは、オブザーバーとしてシンガポールから1名が出席しました。また前回から引き続きBIOからも出席しています。

2. これまでの流れ

全体の流れを分かりやすくするために、概略を説明します。まず、がん原性試験の見直しの発端となる解析結果が2011年に報告されました¹⁾。一定の要件を満たせば、がん原性試験を省略できる場合があるといったコンセプトの論文です。

ただし、これはすべてレトロスペクティブな解析に基づくものであり、未知の医薬品に対して、本当にその要件が十分であるかをプロスペクティブに検証する必要があるということで、現在RND (Regulatory Notice Document)を作成しています。目標としては2013年1月中旬に発出し、パブコメを求め、それを集約して、RNDをファイナライズする作業をしているのが現在の段階です(平成25年1月31日発出)²⁾。そして、それを受けてRNDを最終化した後のがん原性評価文書(Carcinogenicity Assessment Document, CAD)の提出を申請者に求め、約2~3年の経過後にStep 2のドキュメントを作る予定です。

3. 福岡会合とSan Diego会合の間の達成目標

前回(2012年6月)の福岡会合と今回のSan Diego会合の間に数回電話会議を行い、San Diego会合までに何をしたらよいかを決めました。

一つ目は、Steering Committee (SC)にStep 4に至る過程を確認することです(後述)。

二つ目は、RND(案)に記載されているWeight of Evidence (WoE)のAppendix(案)に関して各極間で概略の連携を図ることです。

三つ目は、今回のSan Diego会合でのface-to-face meetingの前にRND, WoE及び4種類のカテゴリーに対応する模擬的ながん原性評価文書(CADs)の草案を作成することです。

これらが満たされたので、11月のSan Diego会合に臨みました。

Step 4に至る過程をFig. 1に示します。San Diego会合でRNDのドラフトを完成し、その後のパブコメについて、日本では原文を和訳し、寄せられたコメントを更に英訳するという作業があります。パブコメの期間は90日間とありますが、日本では60日間以内の期間しか設けられないことを米国とEUの規制担当者に確認したところ、期間は各極で決めてよいということでした。なお、EUの場合は120日間、FDAは通常60日間か90日間のパブコメの期間を設けていますので、そのどちらかになると聞いています。

パブコメの主たる目的は、S1見直しの提案及びそれに

*1 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター 東京都世田谷区上用賀1-18-1(〒158-8501)

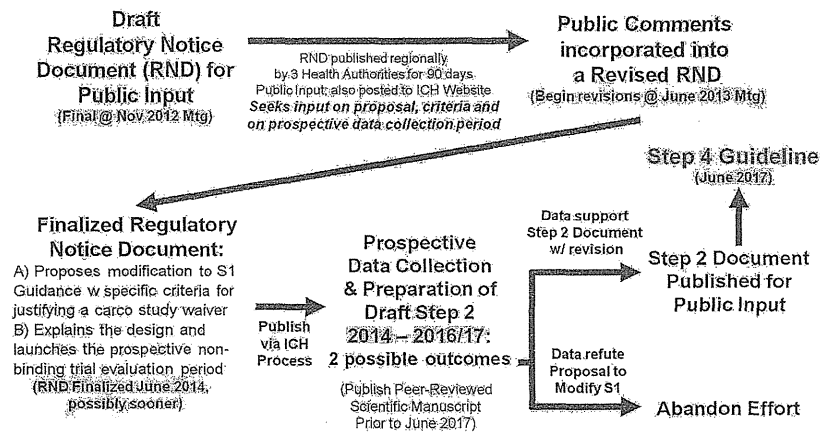
*2 独立行政法人医薬品医療機器総合機構新薬審査第四部 東京都千代田区霞が関3-3-2(〒100-0013)

*3 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部 東京都世田谷区上用賀1-18-1(〒158-8501)

*4 当財団主催の第27回ICH即時報告会(平成24年12月14日:東京)における講演による。

Table 1 Nov 2012 S1 EWG 出席者

| 所属 | 出席者 | 立場 |
|---------------|-------------------------|------------------------------|
| BIO | Shawn Heidel | Interested Party |
| DRA Singapore | Toh Tiong | Expert |
| EFPIA | Ulrich Deschl | Topic Leader |
| | Johannes Harleman | Deputy Topic Leader |
| EFTA | Claudine Faller | Observer |
| EU | Jan Willem van der Laan | Topic Leader |
| FDA | Todd Bourcier | Deputy Topic Leader |
| Health Canada | Celia Lourenco | Observer |
| JPMA | Shigeru Hisada | Topic Leader |
| | Toyohiko Aoki | Deputy Topic Leader |
| MHLW | Akiyoshi Nishikawa | Topic Leader |
| | Kumiko Ogawa | Deputy Topic Leader |
| | Mizuho Nonaka | Topic Expert |
| PhRMA | Frank Sistare | EWG Rapporteur, Topic Leader |
| | Michael Graziano | Deputy Topic Leader |



(注) 最新のタイムラインでは、Step 4到達が少し遅くなることが想定されている。

Fig.1 Step 4 へ至る過程

関連する判定基準，更にプロスペクティブなデータを収集する期間についての妥当性に対してコメントを求めることです。2013年6月に各極が集めたパブコメが集約され、RNDの改訂作業が始まります。その改訂作業は1年間かけて行われる予定です。RNDがファイナライズされた後、前述したCADsを申請者から提出していただくことになります。そのCADs評価期間は2～3年を見込んでいます。結果として提出されたCADsのデータ解析の結果がS1の見直しをサポートするものであれば、Step 2からStep 4に移行するでしょうし、そうでない場合はこの努力が無に帰すこととなります。

4. San Diego で合意されたこと

RND中に添付されているAppendix 1にWoEの要素が記載されており、それを含むRNDの最終化が今回の

San Diego 会合で合意されました。

それ以外の追加データのレビューとして、1つ目は腫瘍発生に及ぼす薬理作用に関するデータベース上の再解析を行うこと、2つ目は曝露マージンに関するデータベース上の解析を行うことです。これは今回出てきたことで、曝露マージンによって成績が異なる場合があるため、曝露マージンについての検討が必要であるということが説明されました。3つ目は2年間ラット試験における非腫瘍性病変の再解析を継続すること、4つ目はICH S6 ガイダンスのCADsに関するFDAの経験を参考にすること、5つ目は低分子医薬品のCADs(案)の代表例のレビューをすることが合意された内容です。

RNDの目的には、発がん性評価法の見直し提案を検証するプロスペクティブな評価期間であり、CADsに含まれるWoE各要素の妥当性についてパブコメを求める通知文書であることが明記されています。

5. RND 記載のカテゴリ分類

RND 記載のがん原性試験の省略に関するカテゴリは四つに分類されています。従前は1, 2, 3, 4でしたが、内容的には変わらず、名称だけ1, 2, 3a, 3bといった分類に変更されました。

カテゴリ1は、主に薬理作用等からヒトに対する発がん性があると予測される場合で、「ヒトに対する発がん性があり」とラベルすることによって、2年間のラットのがん原性試験は省略可能というものです。カテゴリ2は、ヒトに対する発がん性が不明と予測される場合で、この場合はラットのがん原性試験を実施する価値があります。カテゴリ3aは、仮にラットに発がん性があるとしても、ヒトに外挿できないメカニズムと予測される場合で、2年間の試験を実施する価値はありません。カテゴリ3bは、ラット及びヒトに発がん性なしと予測される場合で、当然2年間のがん原性試験を省略できます。

これらの各カテゴリについて、現在見本となるCADを作成しています。1と2については特に問題ありませんが、3aと3bについての良い例示がまだできていません。ヒトに外挿できないというメカニズムは、 α_{2u} グロブリン絡みの腎発がんくらいしか想定できないと思いますが、量的にはヒトとラットで相当の開きがあるという場合もあります。当初、いわゆるNEG CARCラットにおいて慢性毒性試験で発がんリスク要因がないこと、遺伝毒性がなく、ホルモン作用もないという場合は、ヒトに対する発がん性がないと予測できるのではないかということでしたが、実際その例を挙げようとすると、なかなか困難な所があります。

6. Appendix 1 における WoE の要素

Table 2 に RND の Appendix 1 に記載されている WoE の主要要素を示します。薬理作用、遺伝毒性試験、反復投

Table 2 Appendix 1 における WoE の要素

- 当該医薬品の標的及び経路の薬理作用、二次的及び標的外的薬理作用、標的分布に関するラット及びヒトにおける知見
- 遺伝毒性試験の成績
- ラット反復投与毒性試験の病理組織学的評価
- ラット慢性毒性試験における曝露マージン
- ホルモンかく乱作用の証拠
- 免疫抑制作用
- 特殊な試験及びエンドポイント
- 非げっ歯類毒性試験の成績
- 遺伝子改変マウス試験

与毒性試験の病理組織学的評価、曝露マージン、ホルモンかく乱作用の証拠などがあります。つまり、当初のNEG CARCラットでは遺伝毒性試験と反復投与毒性試験の成績、ホルモンかく乱作用の証拠の三つが挙げられていたが、更にいくつかの項目が付け加わっています。特に1番目の薬理作用がNEG CARCラットに大きく加わった項目です。

7. 腫瘍発生に及ぼす薬理作用に関する再解析 (EU EMA/SWP)

EU が紹介したのは、薬理作用で腫瘍発生が予測できる場合があることであり、1997年のヨーロッパの合計221化合物のデータに基づく解析の結果です³⁾。このうち181化合物にはマウス及びラットの試験があります。また、同年の同じ雑誌に掲載された米国のデータ解析では、合計282化合物、このうち229化合物は既承認のものが用いられています⁴⁾。

これらの評価に供した欧米のデータベースは重複等を除いて370の医薬品について再解析されました (Table 3)。

Table 4 は薬理学的な作用で分類した医薬品の数であり、結果としてラットにがん原性ありと評価されたものです。がん原性陽性となる率は高いですが、こういったもの

Table 3 評価したデータベース

| Class of compounds | number |
|--------------------------|--------|
| CNS | 74 |
| Cardiovascular | 103 |
| Antiviral | 8 |
| Hormonal | 11 |
| Metabolic | 19 |
| Antimicrobiological | 39 |
| Respiratory | 28 |
| Immunological and NSAIDs | 30 |
| Remaining | 58 |
| Total (EU + FDA) | 370 |

Table 4 解析結果 —薬理的作用—

| Related to pharmacology | No. compounds | positive in rats |
|---------------------------|---------------|------------------|
| Dopamine agonists | 4 | 4 (uterus) |
| D2-antagonists | 8 | 6 (mammary) |
| Vasodilators | 11 | 7 (kidney) |
| Ca-antagonists | 11 | 6 (ging hyperpl) |
| Steroid hormones | 11 | 8 (mam/testes) |
| Beta-2-agonists | 10 | 6 (mesovarian) |
| Acid secretion inhibitors | 3 | 2 (stomach) |
| Corticosteroids | 5 | 5 (various) |
| Fibrates | 4 | 4 (liver) |
| Statines | 4 | 4 (forestomach) |

Table 5 解析結果－肝臓の組織学的変化－

| Associated with liver pathology | No. compounds | positive in rats |
|---------------------------------|---------------|------------------|
| Antiepileptics | 14 | 6 |
| 5HT3 agonists | 2 | 1 |
| Anxiolytics | 21 | 9 |
| Ca-antagonists | 11 | 6 |
| Antivirals | 8 | 4 |
| Antifungals | 7 | 6 |

Table 6 解析結果－がん原性がないと予測される場合－

| Negative classes | No. compounds | positive in rats |
|---------------------------|---------------|------------------|
| Opiates | 5 | 0 |
| Antidepressants | 10 | 3 |
| Other 5HT related | 2 | 0 |
| Remain CNS | 8 | 1 |
| Alpha-2 agonists | 6 | 0 |
| ACE-inhibitors | 11 | 2 |
| Beta-blockers | 22 | 2 |
| Alpha-1 blockers | 6 | 2 |
| Antidiabetics (sulphonyl) | 11 | 3 |
| Remain Respiratory | 13 | 3 |
| Antiinflammatory | 28 | 6 |
| H1 antihistamines | 17 | 2 |

をすべてラベルすることで、がん原性試験が省略できるかどうかは、十分に議論する必要があると思います。

Table 5 は肝臓の組織学的変化があるグループで、これもがん原性試験を行うと、比較的陽性になる率が高いのですが、肝臓の病理組織変化を一つにまとめて評価してよいかといった懸念があります。

Table 6 はがん原性がないであろうと予測できるグループです。このグループではラットにおけるがん原性が陽性になる率は非常に低く、ゼロとなっているものもありますが、ほとんどの医薬品はまったくゼロではありません。がん原性陽性の判断基準が示されていないので、よく精査する必要がありますが、この解析結果のみでがん原性がないと予測できるかといいますと、やはり難しい面があると考えられます。

8. 2年間ラット試験における非腫瘍性病変の再解析 (MHLW)

筆者らが調査した、2年間のラットの試験でのみ検出された非腫瘍性病変についての解析結果について説明します。

そのデータは2007年から2010年に厚労省で承認された59の医薬品に関するものであり、それらの添付文書を調査して、ラット2年間がん原性試験における非腫瘍性病変の発生状況を検討しました。すべて承認されたものですので、開発を中止した医薬品の結果は含まれていません。

結果は、2年間の試験でのみ非腫瘍性病変が観察され、それに関連しそうな臨床上的有害影響が認められた例はありましたが、後述するようにプレガバリンを除いてそれらの有害影響は薬理作用又は慢性毒性試験の成績から予測可能と考えられました。

一つ目のグループは、6カ月の試験で予測可能であった医薬品です (Table 7)。トルバプタンの2年間の試験では非腫瘍性病変として、腎盂拡張、肝細胞肥大、胃の壊死といった所見が見られ、臨床上的有害影響として腎不全、悪心、下痢、便秘、肝機能異常が認められますが、ラットの6カ月試験で尿検査の異常や肝機能の異常があり、概ね6カ月の試験での予測可能と考えられます。

2例目はテリパラチドで、非腫瘍性病変として慢性進行性腎症が2年間の試験で見られ、それに関連する臨床所見として腎結石、頻尿、クレアチニン上昇等がありました。これについても6カ月試験で腎臓の変化という記載がありますので、予測可能と判断しました。

3例目のイルベサルタンは、非腫瘍性病変として腎臓の慢性炎症及び尿細管過形成が2年間の試験で見られ、それに関連する臨床上の副作用として腎不全がありました。しかし、ラットの6カ月試験で傍糸球体装置の過形成が認められていますので、おおむね予測が可能であったと考えています。

二つ目のグループは、薬理作用及び6カ月試験の成績で予測可能であったものです (Table 8)。その1例目がステロイド (モメタゾンフランカルボン酸水和物) で、臨床的

Table 7 6カ月試験の成績で予測可能

| 医薬品 | 薬理作用 | 2年間試験の投与経路 | 非腫瘍性病変 | 臨床上的副作用 | 備考 |
|---------|-----------------------|------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| トルバプタン | バゾプレシリン V2-受容体遮断 | 経口 | 腎盂拡張、肝細胞肥大、胃壊死 | 腎不全、悪心、下痢、便秘、肝機能異常 | ラット6カ月試験で尿検査異常、肝機能異常 |
| テリパラチド | 上皮小体ホルモン (適応症：骨粗しょう症) | 皮下 | 慢性進行性腎症 (ラットの加齢性病変) | 腎結石、頻尿、クレアチニン上昇 | ラット6カ月試験で腎臓の変化 |
| イルベサルタン | 血圧降下 | 経口 | 腎臓の慢性炎症、腎尿細管過形成 | 腎不全 | ラット6カ月試験で傍糸球体装置過形成 |

Table 8 薬理作用及び6カ月試験の成績で予測可能

| 医薬品 | 薬理作用 | 2年間試験 の投与経路 | 非腫瘍性病変 | 臨床上の副作用 | 備考 |
|----------------------|--------------------------------------|----------------|---------------|---------|---------------------------------------|
| モメタゾンフラン カルボン酸水和物 | ステロイド | 吸入 | 白内障、眼内の炎症、角膜炎 | 眼内圧亢進 | 緑内障（ステロイドの効果として） |
| アンブリセンタン | エンドセリン受容体アンタゴ ニスト | 経口 | 心筋肥大 | 心不全 | ラット6カ月試験で心 房肥大 |
| デュタステライド | ジヒドロテストステロン合成 阻害剤（適応症：前立腺肥大 症） | 経口 | 精巣萎縮・変性 | 性機能異常 | イヌ6カ月試験で精囊 と前立腺の萎縮、精巣 上体上皮の空胞変性 |

Table 9 関連性は不明

| 医薬品 | 薬理作用 | 2年間試験 の投与経路 | 非腫瘍性病変 | 臨床上の副作用 | 備考 |
|----------------------------|-----------|----------------|--------------------------|-----------|----|
| 合成プロゲステロン； エチニルエストラジオール | ホルモン経口避妊薬 | 経口 | 肝臓における色素沈着マクロ ファージ | 肝機能異常 | |
| アログリプチン | 適応症：糖尿病 | 経口 | 肝細胞空胞変性 | 肝機能異常、黄疸 | |
| リファブチン | 抗酸菌症治療薬 | 経口 | 皮膚褐色化、胃粘膜線維化、 筋線維空胞変性 | 皮膚炎、胃炎、筋炎 | |
| エベロリムス | mTOR 阻害剤 | 経口 | 骨格筋萎縮 | 筋肉痛 (<1%) | |

に眼内圧の亢進が認められています。それに関連するよう
に2年間の試験で白内障、眼内の炎症、角膜炎といった所
見がありますが、ステロイドのクラス効果として緑内障が
起こることが知られていますので、薬理作用で予測が可能
です。

2例目のアンブリセンタンは、非腫瘍性病変として心筋
肥大が見られ、臨床症状として心不全が見られた例で、こ
れにおいてもラットの6カ月試験で心房の肥大が見られた
といった記載がありますので、心不全はおおむね予測可能
であったと考えられます。

3例目のデュタステライドは、非腫瘍性病変として精巢
の萎縮、変性が見られ、臨床的に性機能の異常が認められ
ています。イヌの6カ月試験で精巢そのものには変化はあ
りませんが、精囊と前立腺の萎縮、精巣上体の空胞変性が
見られますので、概ね予測可能と考えられます。

Table 9は、関連性が不明の医薬品です。

また、末梢性の神経痛に適応を有するプレガバリンにつ
いては、4週間、13週間及び52週間のラットの反復投与
試験において網膜の病変は観察されませんが、2年間の
ラットの試験においてのみ網膜変性又は萎縮が確認されて
います。本邦の臨床試験において目に関する副作用である
かすみ目や視力の低下といった所見が認められ、関連は否
定できないと考えられます。ただし、これらの眼に対する
影響は、ラットの2年間がん原性試験の終了前に臨床試験
で気づかれていましたので、大きな影響はなかったこと
になります。

9. 2年間ラット試験における非腫瘍性病変の解析 (FDA)

一方、FDAからも、非腫瘍性病変についての報告があ
りました。従前は2年間の試験のみで見られた非腫瘍性病
変はそれほど重視する必要はないと繰り返し主張していま
しましたが、今回逆のことを言い始めました。CASE 1は抗肥
満薬で、2年間試験の途中の58週で脳に壊死が見られま
した。途中の段階ですので検索動物数は少ないのですが、
高用量群のみに脳の壊死が見られ、この現象は6カ月の
ラットの試験、1年のイヌの試験、6カ月のマウスの試験
でも観察されませんでしたので、2年間の試験でのみで見
られた変化となります。結果として、この薬剤は開発が中
断していると聞いています。

CASE 2は骨粗鬆症に対する薬です。2年間の試験で関
節症が見られました。完全には用量相関していませんが、
繊維軟骨の変性が高用量群に集まっています。これは雄雌
ともに共通です。

胸骨では、軟骨の変性が同様に見られました。このよう
な変化は6カ月のラットの試験あるいは1年のサルの試験
では観察されていないので、無視できないことが強調され
ました。なお、当薬剤は、開発が中止になったと報告され
ています。

2年間ラット試験における非腫瘍性病変のFDAのまと
めとして、2年間のラットがん原性試験において重要な新
規の非腫瘍性病変が発生するが、スポンサー及びFDAは
所見を予測できないため、このような事例は見逃されるこ

とになります。したがって、仮に2年間のラットのがん原性試験を省略した場合、このような非腫瘍性病変を検出するような何らかの方策が必要と考えられます。そうしますと、S4の見直しにも影響が及ぶ可能性があります。

10. がん原性評価文書

CADに記載すべき内容としてTable 10に示すものがが必要です。更にごがん原性試験の結果が実際に出た後、CADとして提出された予測との比較において評価されますが、その評価のポイントをTable 11に示します。

Table 10 CADに記載すべき内容

- WOEの要素の記載
- 計画中/進行中の2年間ラットがん原性試験について予測される試験結果（陽性/腫瘍発生に対する標的臓器、又は陰性）
- がん原性試験に関する総合評価及びヒトに対するリスク評価における2年間ラットがん原性試験の実施意義の予測
- 1) 2年間ラットがん原性試験の実施、又は2) 2年間試験の免除申請のどちらを裏付けるのかについての明確な記述及び説明と、それぞれの化合物のカテゴリー分類

Table 11 2年間ラットがん原性試験結果の受領後のCADの再評価

- CADに記載されたWOEに基づく2年ラットがん原性試験での腫瘍発生予測と実際の結果を比較し、予測が正確であったかどうか
- 実施されたがん原性試験の総合的な結果と比較し、企業及び各DRA当局が行ったカテゴリー分類が正確であったかどうか
- 腫瘍発生予測と実際の腫瘍発生に差異があった場合、規制にどのような影響を及ぼすか

11. 次のステップとタイムライン

S1 EWGの規制側の代表は、各極において、2013年1月中旬にパブコメのためのRNDを公表します（公表済み）²⁾。そして、次回のface-to-face会合前の2013年6月までにパブコメを集約します。

RNDの公表前には特に必要はありませんが、現在議論している非腫瘍性病変やCADの例示等を可能な限り科学雑誌に論文として掲載する予定です。

最後にはお願いですが、RNDに対するコメントを提出していただきたいということ、製薬メーカーにあっては、CADの提出にご協力をお願いします。

12. 質疑応答

質問1 ガイドラインを作成する場合、今までのICHの手順は、一般的データがあって、それからStep 1のガイドライン、Step 2、パブコメ、Step 4と進みますが、本トピックは、あまり耳慣れないRegulatory Notice Document (RND)といった様々な言葉が出てきます。

専門家であれば理解できると思いますが、それ以外の人はなかなか難しいと思いますので、もう少し違った視点で、例えばいわゆる規制上、がんの予測性に関するイシューと、ガイドラインの作業について今の説明と違った言い方で説明をしたらより分かりやすいと思います。

私の理解ですが、通常はそういったStepで進みますが、予測性に関してはどうしてもレトロスペクティブだけでは不完全であり、その対応として、プロスペクティブにすること、そのためにデータを集めます。そのデータは例えば試験をする前にこういうふうを考え、結果こうなります。その結果を踏まえた上で、ではガイドラインを具体的に作成しましょうという流れでよろしいのでしょうか。

回答 そのとおりです。

質問2 非腫瘍性病変で、2年間のがん原性試験を行わなければ見つからなかったものがあるかもしれないという話になってしまいますと、6カ月を超える臨床使用のものは6カ月でよいという話と合わせますと、どう考えればよいのでしょうか。

回答 どう考えるかは議論の中身によるとと思いますが、先ほど述べたように、もしかしたらS4（反復投与毒性試験）に影響を及ぼす可能性があります。つまり、2年間のがん原性試験を行わない場合、6カ月以降に出てくる非腫瘍性病変が見つからないこととなりますので、2年間の試験を省略した場合には、1年間の反復投与毒性試験は必要という方向にも向かう可能性があると思います。

FDAは2年間の試験で見つかる非腫瘍性病変はほとんど意味がないといったことをこれまで言っていましたが、そのFDAが今回の会議で2年間の試験でかなり重篤な非腫瘍性病変が見つかったと報告しているので、これからどう動くようになるかはまだ分かりません。

文 献

- 1) Sistare, F.D.; Morton, D., Alden, C. *et al.* An analysis of pharmaceutical experience with decades of rat car-

- cinogenicity testing: support for a proposal to modify current regulatory guidelines. *Toxicologic Pathology*. 2011, 39 (4), p.716-744.
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課 「医薬品のげっ歯類がん原性試験の変更(案)」に関する意見の募集について。事務連絡，平成 25 年 1 月 15 日。
 - 3) Van Oosterhouta, J.P.J.; Van Der Laana, J.W.; De Waala, E.J.; Olejniczakb, K.; Hilgenfeldb, M.; Schmidtb, V.; Bassb, R. The utility of two rodent species in carcinogenic risk assessment of pharmaceuticals in Europe. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1997, 25 (1), p.6-17.
 - 4) Contrera, J.F.; Jacobs, A.C.; DeGeorge, J.J. Carcinogenicity testing and the evaluation of regulatory requirements for pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1997, 25 (2), p.130-145.

Review

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

石井明子

Current Status of Development of the Guideline on Bioanalytical
Method Validation Using Ligand Binding Assay

Akiko Ishii-Watabe

*Division of biological chemistry and biologicals, National Institute of Health Sciences**1-18-1 kamiyoga, setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan***Abstract**

Ligand binding assay (LBA) is a method for detecting an analyte using binding reagents such as antibodies against an analyte. Currently, LBA is used as a standard method for the bioanalysis of therapeutic peptides or proteins. In this review, the principle and examples of LBAs used for bioanalysis as well as the reason why LBA is used as a standard method for large molecule bioanalysis is described. In addition, current situation of the development of Japanese bioanalytical method validation guideline for LBA is mentioned. This review is based on of the presentation at the 20th Chromatography symposium workshop held in Kobe in June 5th 2013.

Keywords: Ligand Binding Assay, Bioanalytical Method Validation, Guideline

緒言

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析は、対象薬物やその代謝物の有効性及び安全性を評価する上で、臨床薬物動態試験や非臨床薬物動態試験に活用され、得られた生体試料中薬物濃度は、体内動態、バイオアベイラビリティ、生物学的同等性及び薬物間相互作用等の評価に利用されている[1]。生体試料中薬物濃度分析には、一連の分析過程を通して妥当性が適切に確認され、十分な信頼性を有する方法を用いることが必要である[1]。

2013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」[1]が発出

され、我が国においても、生体試料中薬物濃度分析法（バイオアナリシス）の信頼性確保の要件が明確化された。このガイドラインは、対象薬物の中心が低分子医薬品であり、主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を対象としている（表1）。以下、低分子LCガイドラインと略記する。

一方、近年、承認品目が増えている高分子医薬品（ペプチド及びタンパク質医薬品等）では、生体試料中薬物濃度分析において、リガンド結合法（Ligand Binding Assay: LBA）が標準的な分析法として用いられている。バイオアナリシスに関する欧米のガイドライン[2-4]では、ガイドラインの項目

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1
TEL/FAX: 03-3700-9084
E-mail: watabe@nihs.go.jp

表1. ガイドラインの適用範囲

| | 低分子LCガイドライン | リガンド結合法 ガイドライン案 |
|--------|--|---|
| 試験 | トキシコキネティクス試験 臨床試験 | トキシコキネティクス試験 臨床試験 |
| 対象薬物 | 低分子化合物が中心 | ペプチド及びタンパク質が中心 リガンド結合法を用いて分析する低分子 化合物 |
| 分析対象物質 | 薬物またはその代謝物 | 薬物 |
| 分析法 | 主に, 液体クロマトグラフィー (LC) ガスクロマトグラフィー (GC) 又は それらと質量分析法 (MS) を組み合わ せた分析法 | リガンド結合法 |

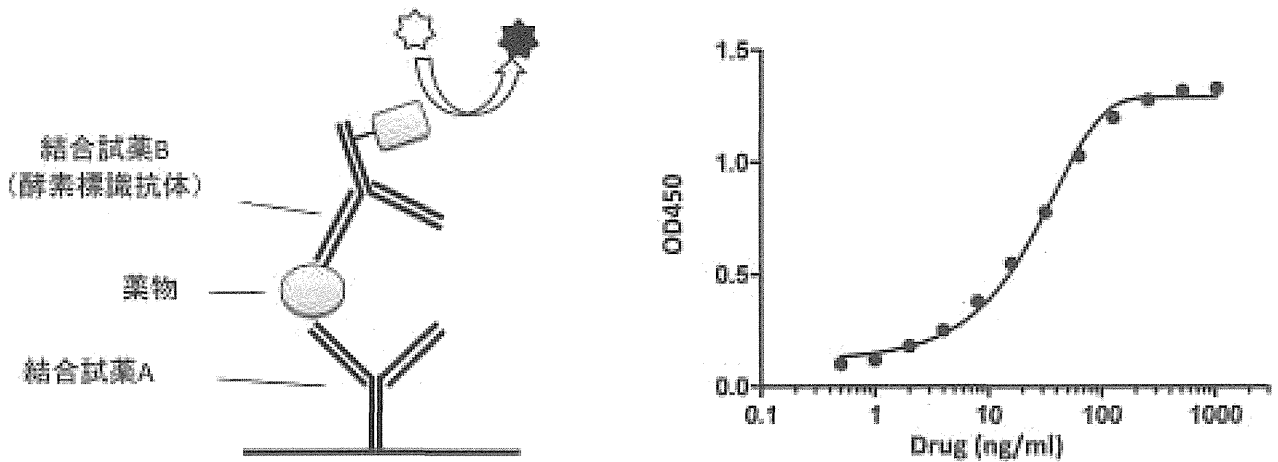


図1. 非競合 ELISA による薬物濃度測定系と検量線の例

の一つとしてリガンド結合法が含まれているが、日本では、低分子 LC ガイドラインから独立した形で、リガンド結合法を用いたバイオアナリシスに関するガイドライン案の作成が進んでいる。

本稿では、日本初のバイオアナリシスガイドラインとなった低分子 LC ガイドライン発出に先駆けて、2013年6月5日に神戸大学百年記念館六甲ホールで開催された第20回クロマトグラフィーシンポジウムワークショップ“日本のバイオアナリシス分析法バリデーションに関する『産・官・学』の取り組み”において、リガンド結合法を用いたバイオアナリシスとそのガイドラインに関して、著者が講演した内容を紹介する。

1. リガンド結合法の概要

リガンド結合法は、薬物に対して特異的に結合する「結合試薬 (リガンド)」を利用して、薬物を定量する方法である。結合試薬として、薬物に対する抗体が用いられることが多

く、リガンド結合法の多くは、抗原抗体の結合を利用した免疫学的な測定法 (イムノアッセイ) である。対象薬物が抗体医薬品の場合は、抗体医薬品の標的となる抗原が結合試薬の一つとして用いられることもある。

リガンド結合法の中で、最もよく用いられているものは、酵素標識抗体を用いた EIA (enzyme immunoassay: 酵素免疫測定法) である。EIA 中でも、最も一般的な方法は、非競合 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (図1) であり、通例、結合試薬を固相化したプレートに試料を添加して薬物を結合させ、さらに、もう一つの結合試薬 (酵素標識抗体) を結合させて、発色、発光あるいは蛍光基質の変換により得られるレスポンスを指標として、固相に結合した薬物を検出する。標準物質を用いて作成した検量線により、試料中薬物濃度が求められる。

これまでに生体試料中薬物濃度分析に用いられているリガンド結合法には、結合試薬として酵素標識抗体を利用する

EIA の他、放射性同位元素標識抗体を利用する RIA (radio immunoassay: 放射免疫測定法)、Ru 標識抗体を利用する ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay: 電気化学発光免疫測定法)、ランタノイド標識抗体を利用する TRFIA (time-resolved fluorescence immunoassay: 時間分解蛍光免疫測定法) 等がある。

リガンド結合法の多くはプレート上で結合試薬と薬物を結合させ、プレートリーダーにより光学的なレスポンスを検出する分析法であるが、連続フロー方式による SPR (surface plasmon resonance: 表面プラズモン共鳴) 測定装置のように、流路を持つ分析機器が用いられる場合もあり、プレートをを用いる分析法に限定されるものではない。

2. リガンド結合法が用いられる背景

表 2 に、低分子医薬品および高分子医薬品の特徴を記した。低分子医薬品は、分子量が数百程度のもが多いため、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により、生体試料中の薬物濃度に見合う感度と選択性を持つ分析法を構築することができる。低分子医薬品では、プロドラッグのように代謝物が薬理活性の本体である場合や、代謝物が薬理活性や毒性を示す場合もあるので、薬物のみならず代謝物の濃度測定が必要となる場合もあるが、これらの方法は、構造が類似している薬物と代謝物を識別して定量するためにも適した方法である。

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、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であろう。

3. リガンド結合法に関するガイドラインの策定状況と要点

2012年9月に、リガンド結合法ガイドライン作成に関するワーキンググループが組織され、ガイドライン案の作成が開始された。ワーキンググループは、バイオアナリシスフォーラム (JBF) リガンド結合法タスクフォース、日本製薬工業協会、国立医薬品食品衛生研究所のメンバーで構成され、オブザーバーとして厚生労働省からも参加頂いており、著者が座長を拝命している。2014年の完成を目指し、現在、タスクフォースを中心に、ガイドライン案の改訂作業を進めているところである。

表 3 に、リガンド結合法ガイドライン案の項目を示す。下線部分は、リガンド結合法に特有の留意点が多く含まれる項目である。

以下に、若干の解説を加えながら、これらの評価項目の概要を述べる。

[バリデーションにおける評価項目]

特異性

特異性とは、分析対象物質を類縁物質等と識別して検出する能力のことである (表 4)。リガンド結合法の場合、結合

表 2. 低分子及び高分子医薬品とその生体試料中薬物濃度分析の特徴

| | 低分子医薬品 | 高分子医薬品 |
|----------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 分子量 | 数百 | 数千～数十万 |
| 代謝物 | 薬理活性の本体である場合や、毒性を示す場合がある | アミノ酸にまで分解されるため、薬理活性や毒性を示す懸念は少ない |
| 主な分析対象物質 | 薬物及び代謝物 | 薬物 |
| 分画などの前処理による粗精製 | 除タンパク質、液相または固相抽出などが標準的手法として用いられている | リガンド結合法では、通常は行われない |
| LC, GC, LC/MS, GC/MS による定量 | 標準的手法として用いられている | LC/MS に関して、技術開発途中 |
| リガンド結合法による定量 | 適用されることはあるが、例は多くない | 標準的手法として用いられている |

表3. リガンド結合法ガイドライン案の目次

| | |
|---------------------|--------------------|
| 1. はじめに | 5.1. 検量線 |
| 2. 適用 | 5.2. QC 試料 |
| 3. 標準物質 (標準品) | 5.3. ISR |
| 4. 分析法バリデーション | 6. 注意事項 |
| 4.1. フルバリデーション | 6.1. 定量範囲 |
| 4.1.1. <u>特異性</u> | 6.2. 再分析 |
| 4.1.2. <u>選択性</u> | 6.3. キャリーオーバー |
| 4.1.3. <u>検量線</u> | 6.4. <u>クロストーク</u> |
| 4.1.4. 真度及び精度 | 6.5. <u>重要試薬</u> |
| 4.1.5. <u>希釈直線性</u> | 6.6. <u>干渉物質</u> |
| 4.1.6. 安定性 | 7. 報告書の作成と記録等の保存 |
| 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 | |
| 5. 実試料分析 | |

表4. 特異性

| | 低分子 LC ガイドライン | リガンド結合法ガイドライン案 |
|----------|-------------------------------------|--|
| 解説 | — (特異性は選択性の究極の形としてこれらを区別する指摘もある) | 分析対象物質を類縁物質等と識別して検出する能力 |
| 評価に用いる試料 | — | ・ブランク試料 ・ブランク試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料 ・低濃度及び高濃度付近の QC 試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料 |
| 判定基準 | — | ブランク試料が定量下限未満を示し、類似物質を添加した QC 試料の定量値の真度が理論値のそれぞれ±20%以内 (定量下限及び定量上限の場合は±25%以内) |

試薬が分析対象物質と特異的に結合し、試料中に共存する類似物質 (分析対象物質と構造的に類似した物質) と交差反応性を示さないことが重要である。類縁物質は、例えば、分析対象物質がインスリンの改変体である場合、類似物質の一つにインスリンが挙げられる。

特異性は、ブランク試料 (分析対象物質を添加しないマトリックス試料)、ブランク試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料、並びに、低濃度及び高濃度付近の QC 試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料を用いて評価する。

選択性

選択性とは、試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質を区別して検出することができる能力のことである (表5)。前述の特異性と異なり、選択性の評価において影響を考えるべき「試料中の他の成分」とは、薬物と構造が類似し

ていない成分で、例えば、タンパク質分解酵素、脂質、溶血した試料での混入が懸念される赤血球由来の成分等が考えられる。

選択性は、通例、少なくとも10個体から得られた個別のブランク試料及び個別のブランク試料を用いて調製した定量下限付近の QC 試料を用いて評価する。

上記のように、特異性 (Specificity) と選択性 (Selectivity) を別項目として評価する点は、リガンド結合法を用いるバイオアナリシスのバリデーションに特有の考え方である。クロマトグラフィーを用いたバイオアナリシスでは、選択性の評価の際に、マトリックス中に含まれる類縁物質の影響も含めて試料中の他の成分の影響について評価されるため、低分子 LC ガイドラインでは選択性のみがバリデーションにおける評価項目として挙げられている (表4、5)。

なお、クロマトグラフィーを用いる分析法を含め、品質に

表5. 選択性

| | 低分子 LC ガイドライン | リガンド結合法ガイドライン案 |
|----------|---|---|
| 解説 | 試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質及び内標準物質を区別して検出することができる能力 | 試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質を区別して検出することができる能力 |
| 評価に用いる試料 | ・少なくとも6個体から得られた個別のブランク試料 | ・少なくとも10個体から得られた個別のブランク試料 ・個別のブランク試料を用いて調製した定量下限付近の QC 試料 |
| 判定基準 | ブランク試料において妨害物質に由来するレスポンスが認められない、又は妨害物質に由来するレスポンスが定量下限における分析対象物質の20%以下及び内標準物質の5%以下 | ブランク試料の80%以上が定量下限未満を示し、定量下限付近の QC 試料の80%以上において定量値の真度が理論値の±20%以内（定量下限の場合は±25%以内） |

関する分析法バリデーションガイドライン (ICH Q2 ガイドライン)[5]では、「特異性」という言葉が使われている。低分子 LC ガイドラインにおける「選択性」と Q2 ガイドラインにおける「特異性」に関して、低分子 LC ガイドラインの Q&A において説明されているので、以下に引用する。

参考：低分子 LC ガイドラインにおける「選択性」に関する解説

平成25年7月11日 厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡「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ガイドライン質疑応答集 (Q&A)」について

Q. 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？

A. 本ガイドラインでは、分析法バリデーションで確認すべき項目として、試料中の他の成分の存在下で分析対象物質等を区別して検出できる能力である「選択性」は、「分析法バリデーションに関するテキスト (実施項目) について」(平成7年7月20日付け薬審第755号厚生労働省薬務局審査課長通知)に記載されている「特異性」に相当する評価項目である。クロマトグラフィーを用いた生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションにおいては、「選択性」という用語が広く使用され、海外の関連ガイドラインでも「選択性 (Selectivity)」という用語が採用されているものである。したがって、既に取得した資料中、特異性という用語が使用されていても、本ガイドラインの選択性に相当する評価項目として取扱うことができる。

量線は、定量下限及び定量上限を含む6濃度以上の検量線用標準試料、及びブランク試料から構成される。クロマトグラフィーと異なり、リガンド結合法の検量線は直線にならず、図1に例示したような、一般的には4又は5-パラメーターロジスティックモデルで回帰されるシグモイド型の曲線となることが多い。カーブフィッティングを向上させる目的で、定量下限未満の濃度及び検量線の定量上限を超える濃度のアンカーポイントを設定しても良い。

希釈直線性

希釈直線性の評価は、検量線の定量上限を超える試料の濃度を適切に分析できることを確認するために実施する。希釈直線性は、定量上限を超える試料及びこの試料をブランクマトリックスで段階希釈した複数濃度の試料を分析することによって評価される。

リガンド結合法では、高濃度試料でのレスポンス低下(プロゾン、フック効果)が見られることがあるため、レスポンス低下が認められた場合には、実試料分析に影響を及ぼさないような手段を考慮する必要がある。

[注意事項]

クロストーク

クロストークとは、プレートを用いた分析において、蛍光あるいは発光等が隣接するウェルに漏れ、定量値に影響を与えることである。クロストークの回避が困難な場合には、その程度を検討し、実際の実試料分析に影響を及ぼさないような手段を考慮する。クロストークが実試料中の分析対象物質の定量分析に影響を及ぼすと懸念される場合には、実試料分析中にクロストークを評価し、定量値への影響について考察し、必要に応じて回避できる方策を考案する。

重要試薬

重要試薬とは、リガンド結合法による生体試料中薬物濃度

検量線

検量線の作成には、可能な限り実試料と同じマトリックスを使用し、既知濃度の分析対象物質を添加して作成する。検

分析において分析結果に直接影響する試薬を指し、主に結合試薬（抗体及びその標識体等）が該当する。

重要試薬は、分析対象物質に対する特異性に留意して選択し、品質が維持できる条件で保存する。重要試薬の品質は、分析法バリデーション並びに実試料分析に使用される期間を通じて適切に保証される必要がある。使用する期間中の検量線及びQC試料の分析結果を評価することにより、重要試薬の品質を確認することが望ましい。また、重要試薬のロット変更の際には原則としてパーシャルバリデーションが必要である。

干渉物質

干渉物質とは、薬物の可溶性リガンドあるいは抗薬物抗体等、実試料分析において定量値に影響を及ぼす可能性のあるものをいう。干渉物質が実試料中に存在する可能性がある場合には、定量値への影響の程度を検討しておくことが望ましい。

おわりに

以上、リガンド結合法の概略、リガンド結合法が用いられる背景、ガイドライン策定状況と要点を概説した。リガンド結合法に関しても、既に発出された低分子LCガイドラインと同様、日本におけるバイオアナリシスの信頼性確保に貢献すべく、ワーキンググループでの作業を継続しており、ガイドライン案の完成に向けて、多方面からのご意見を賜りたいと考えている。

謝辞

バイオアナリシスに関する一連のガイドライン作成は、厚生労働科学研究費補助金 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業「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（研究代表者：大野泰雄、研究分担者：香取典子）」の活動を基盤としたものであり、リガンド結合法ガイドライン案は、下記ワーキンググループのメンバーが中心となって作成されています。ガイドライン案作成にご尽力されている諸先生方に敬意を表すると共に、深く感謝申し上げます。

JBF-LBA タスクフォース

谷口 佳隆 (株)東レリサーチセンター
今里 真実 ノバルティスファーマ(株)
掛樋 真彰 武田薬品工業(株)
中村 隆広 (株)新日本科学
南出 善幸 (株)島津テクノリサーチ
宮 和弘 中外製薬(株)
細木 淳 協和発酵キリン(株)

日本製薬工業協会

片島 正貴 アステラス製薬(株)
前川浩太郎 久光製薬(株)

国立医薬品食品衛生研究所

奥田 晴宏 副所長
香取 典子 薬品部
川崎 ナナ 生物薬品部
新見 伸吾 医療機器部

厚生労働省（オブザーバー）

光岡 俊成 医薬食品局審査管理課

参考資料

- [1] 「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」について 厚生労働省医薬食品局審査管理課 薬食審査発0711第1号 平成25年7月11日
- [2] Guideline on bioanalytical method validation EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 (21 July 2011)
- [3] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, FDA (May 2001)
- [4] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (DRAFT), FDA (Sep 2013)
- [5] 分析法バリデーションに関するテキスト（実施項目）について 厚生省薬務局審査管理課長通知 薬審第755号 平成7年7月20日



抗体医薬品の分子設計

石 井 明 子* Akiko Ishii-Watabe
 鈴 木 琢 雄 Takuo Suzuki
 多 田 稔 Minoru Tada
 川 崎 ナ ナ Nana Kawasaki

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

1. はじめに

マウスモノクローナル抗体作製技術の開発を発端に、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体と進化した抗体医薬品は、IgG サブクラス置換、アミノ酸置換、糖鎖改変、薬物修飾、低分子化、PEG 化等の分子設計技術の応用により、多様化している。抗体医薬品の分子設計では、目的とする適応疾患、剤形、投与経路等を念頭に、有効性・安全性を得るために必要な薬理作用、薬物動態、ならびに、製剤化を考え、構造の至適化が進められるが、その他に、有効性低下や有害反応発生につながる可能性のある免疫原性、さらには、製造工程についても考慮する必要がある。本稿では、IgG の構造と機能に基づき、抗体医薬品の薬理作用及び薬物動態に関して概説した上で、抗体医薬品の分子設計においてポイントと考えられる事項を述べ、生物薬剤学の観点で重要となる薬物動態の至適化を目的とした分子設計の例を紹介する。

2. 抗体医薬品とは

抗体医薬品は、免疫グロブリンを医薬品としたものである。古くからヒト血漿より精製した免疫グロブリン製剤が用いられていたが、近年、開発が盛んな抗体医薬品は、ハイブリドーマ法やファージディ

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第二室室長。京都大学大学院薬学研究科修士課程修了(衛生化学教室), 博士(薬学)。研究テーマ: バイオ医薬品の品質評価。連絡先: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 E-mail: watabe@nihs.go.jp

スプレイ法等を利用して作製されたモノクローナル抗体をリード抗体とし、必要に応じて、様々な分子設計に基づく改変を施したものである。

2.1 IgG の構造と機能

図 1 にヒト IgG1 の構造と機能を示す。IgG1 は、2 本の H 鎖及び 2 本の L 鎖からなる分子量約 150,000 の糖タンパク質で、CH2 ドメインの Asn297 に N-結合型糖鎖付加部位が存在する¹⁾。可変部の配列が各抗体により異なり、可変部に含まれる相補性決定部 (CDR) が抗原結合に関わる。定常部は、遺伝子多型による数個のアミノ酸残基の違いを除き、IgG サブクラスが同じ抗体に共通する配列である。可変部と定常部の間はヒンジ部と呼ばれ、H 鎖間のジスルフィド結合が位置する (図 1A)。

ヒンジ部の一部、CH2、及び CH3 ドメインからなる Fc ドメインは、Fc γ 受容体や補体との結合能を持ち、Fc γ 受容体の活性化による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性、及び、補体の活性化による補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性に関与している (図 1B-i)。

また、Fc ドメインは、IgG の輸送担体である新生児型 Fc 受容体 FcRn との結合能を持ち、FcRn によるリサイクリングあるいはトランスサイトーシスに関与する²⁾ (図 1B-ii)。非特異的飲作用であるピノサイトーシス等により細胞に取り込まれた IgG は、エンドソーム内で FcRn に結合し、細胞外にリサイクルされる。この機構により、IgG がリソソームへの輸送と分解を免れるため、ヒト生体内 IgG の血中半減期は約 20 日と極めて長い。IgG は、FcRn により

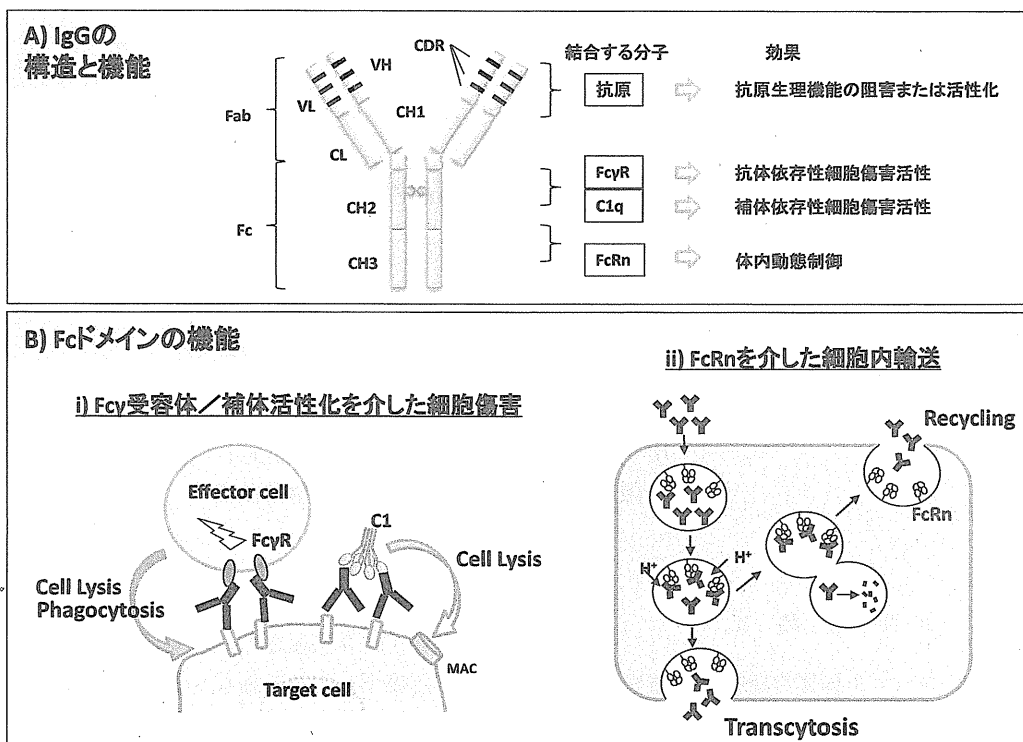


図 1 IgG の構造と機能

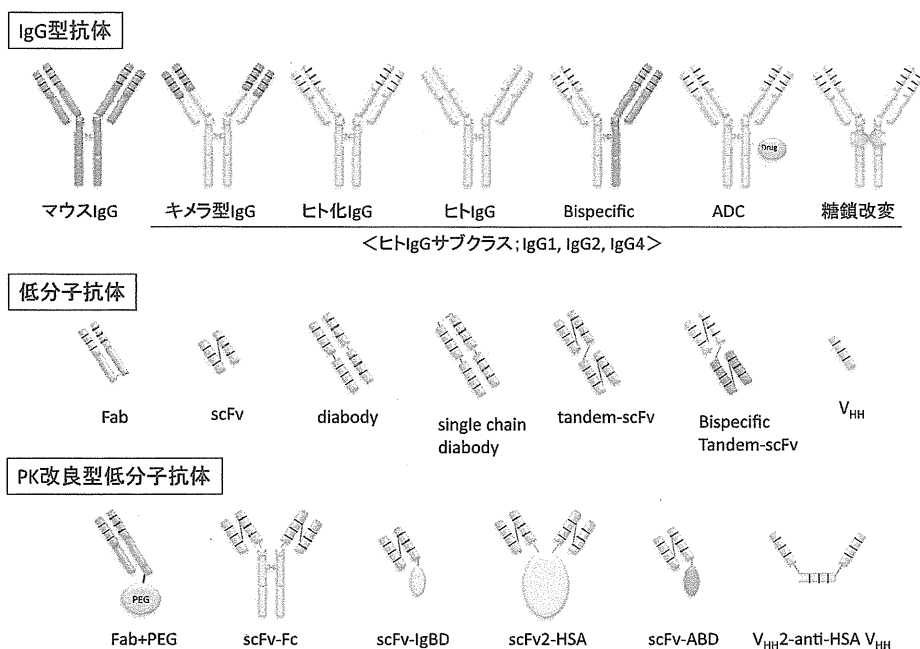


図 2 抗体医薬品の骨格構造の例

トランスサイトシスされることも知られており、胎盤では、IgG が FcRn を介して母親から胎児に輸送される。

2.2 抗体医薬品の構造

図 2 に、IgG 型抗体、低分子抗体、PK 改良型低

分子抗体に分類して、抗体医薬品の骨格を図示した。IgG 型抗体には、典型的な IgG 型抗体としてマウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体があり、その他に、二重特異性抗体、抗体薬物複合体、糖鎖改変抗体、アミノ酸配列改変抗体等がある。キメラ

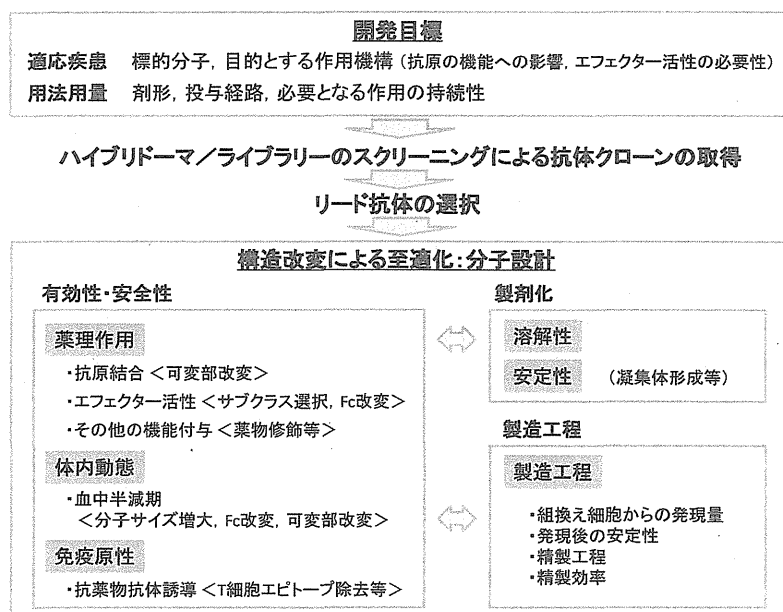


図3 開発目標に応じた抗体医薬品の分子設計において考慮すべき主な事項

抗体は、マウス抗体の定常部をヒト抗体に置換したもの、ヒト化抗体は、マウス抗体のCDR以外を全てヒト抗体に置換したものである。キメラ抗体やヒト化抗体は、マウスIgG配列をヒトIgG配列に置換することにより、免疫原性の低減とヒトFcRn結合能の付与を実現したもので、抗体医薬品の実用化に大きく貢献した分子設計である。

低分子抗体には、可変部と定常部CL及びCH1ドメインからなるFabの他、可変部のみからなるscFv、2つのscFvが会合したdiabody、2つのscFvをリンカーでつないだtandem-scFv、1本鎖で抗原結合能を持つラマ由来抗体可変部V_{HH}などがある。これら低分子抗体においても、キメラ化やヒト化等、免疫原性を低減する改変が行われている。また、低分子抗体では、PEG化やFcRn結合性の付与等、血中半減期延長に寄与する修飾が行われることがあり、図2では、これらをPK改良型低分子抗体として示している。現在のところ、日米欧で承認されている抗体医薬品の中で、低分子抗体は、Fabが2品目、PEG化Fab'が1品目であり、IgG型抗体と比較すると少ない。抗体医薬品をはじめ、バイオ医薬品の承認品目については、国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部HPにて情報提供している (<http://www.nih.go.jp/dbcb/mabs.html>)。

3. 抗体医薬品の分子設計において考慮すべきこと

開発目標に応じた抗体医薬品の分子設計において重要と考えられる主な事項を図3にまとめた。抗体医薬品の開発では、まず、目的とする適応疾患に応じて抗原が選択され、ハイブリドーマやファージディスプレイライブラリー等のスクリーニングにより、目的とする抗原への結合能を持つ抗体クローンが取得される¹⁾。得られた抗体クローンの中から、抗原との結合親和性や特異性、及び、抗原の生理機能への影響を評価して、開発候補となるリード抗体が選択される¹⁾。

選択されたリード抗体の至適化においては、(1)有効性・安全性に関連する薬理作用、薬物動態、免疫原性、(2)製剤化に関連する溶解性、安定性、さらに、(3)製造工程を考慮して、構造の至適化が行われる。

3.1 有効性・安全性

3.1.1 薬理作用

抗体医薬品の薬理作用は、抗原との結合、及び、エフェクター活性に寄与するFcγ受容体や補体との結合に依存するため、これらの結合能を至適化するための改変が行われる。また、目的とする薬理作用に応じ、二重特異性抗体への改変や、化学薬品による修飾等が行われることもある。

(1) 抗原結合の至適化

抗原結合には、可変部の構造が関与する。リード抗体の抗原結合親和性が不十分な場合や、ヒト化に伴い親和性が低下した場合、あるいは、特異性の向上が必要となる場合、CDR 及びその周辺のフレームワーク部のアミノ酸置換が行われる³⁾。

1つの抗体が2種類の抗原に結合することで薬理作用の発揮が期待できる場合、1つの抗体に2種類の可変部を持たせ、二重特異性抗体とすることがある⁴⁾。二重特異性抗体の例として、腫瘍細胞表面抗原とT細胞表面抗原に結合する抗体があり、腫瘍細胞近傍でT細胞を活性化することで、抗腫瘍効果を示す。

(2) エフェクター活性の至適化

ADCC 活性や CDC 活性等のエフェクター活性には、Fcドメインのアミノ酸配列及び糖鎖構造が関与している。通例、細胞傷害活性を期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を増強、中和のみを期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を低減する方向で改変が行われる。

エフェクター活性を考慮した至適化において、まず、IgG サブクラスの選択が行われ、さらに、必要に応じて、Fc γ 受容体や補体結合に関与するアミノ酸残基の改変が行われる。ヒト IgG には、IgG1~4 のサブクラスがあり、これまでに承認されている抗体医薬品の多くでは、IgG1 サブクラスが用いられているが、IgG2, IgG4, あるいは、IgG2 と 4 のキメラ定常領域が用いられている例がある。IgG4 はエフェクター活性が弱く、特に補体活性化能が低い点が特徴で、中和のみを目的とする抗体に選択される。IgG3 はエフェクター活性が強いという特徴を持つが、ヒンジ領域が長く分子間ジスルフィド結合の数が多いことや、遺伝子多型が多いこと等が懸念され、これまでのところ、抗体医薬品に使われている例はない。

糖鎖構造改変の例として、Asn297 に結合する N 結合型糖鎖において、フコシル化された糖鎖の含量を低減することで Fc γ RIII への結合親和性を上げ、ADCC 活性を増強する技術が日本で開発されている。抗 CCR4 抗体モガムリズマブがこの例である(表 1)。

(3) 化学薬品による修飾

抗腫瘍効果を期待する抗体医薬品では、抗体と強

力な細胞傷害作用を持つ薬物を共有結合させた抗体薬物複合体 (ADC) として開発されることがある。細胞表面抗原に結合した ADC は、抗原の細胞内移行に伴いエンドソームに移行し、酸加水分解、酵素消化等により、薬物が放出される。薬物の放出性はリンカーの構造に依存するため、ADC の分子設計においてはリンカーの設計が重要である。

3.1.2 薬物動態

化学薬品では、薬物動態の制御における製剤設計の重要性が高いが、抗体医薬品では、有効成分の構造が薬物動態に関わるため、その分子設計において、薬物動態を考慮することになる。抗体医薬品は、それ自身が標的指向性を持っているため、薬物動態に関しては、血中滞留性や組織移行性が課題となる。本章第 4 節 (抗体医薬品の体内動態制御のための分子設計) で述べるように、IgG 抗体では、Fcドメインの改変による FcRn 結合親和性向上や、可変部の改変による遊離型抗体のリサイクリング等を目的とした分子設計が行われている。低分子抗体では、主に、血中半減期延長のための分子設計が行われる。

3.1.3 免疫原性

免疫原性は、*in vivo* で免疫応答を生じさせる性質であり、抗体医薬品を含むバイオ医薬品の有効性・安全性確保に関する懸念事項の一つとなっている。投与された医薬品が免疫原性を示し、抗薬物抗体が産生されると、薬物の血中半減期への影響や、有効性の低下、免疫応答による有害作用発生につながる可能性がある。ヒトに対する免疫原性の程度は、臨床試験を実施しなければ分からないが、臨床試験段階で免疫原性の問題が生じると、開発の続行が危ぶまれるため、分子設計の段階で、免疫原性に寄与する構造についても考慮する。

免疫原性の回避について、今のところ定型化された手法はないが、分子設計に寄与する情報を得る方法として、抗原提示に関わる MHC クラス II 分子に結合するペプチド配列 (T細胞エпитープ) を推定することや、リード抗体選択に際し、ヒト T細胞の活性化を指標とした *in vitro* アッセイを利用すること等が考えられる。

3.2 製剤化

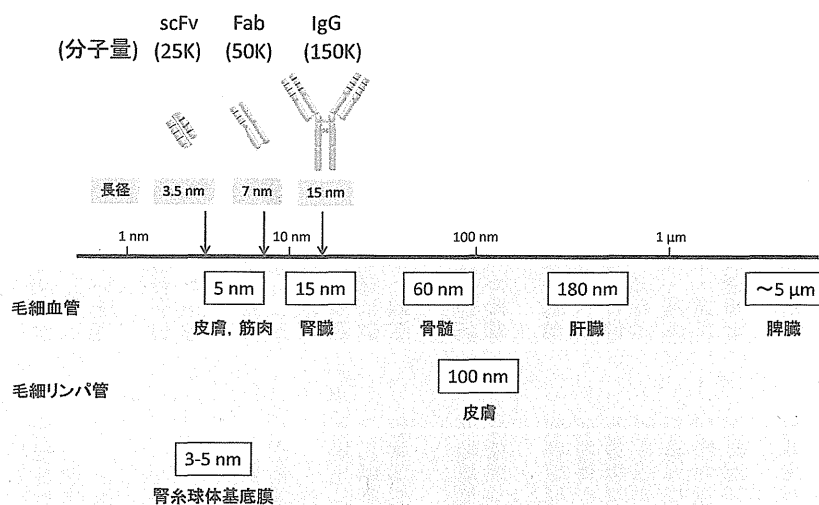
3.2.1 溶解性

これまでに承認されている抗体医薬品は、全て注射剤であり、投与経路は、抗腫瘍薬では点滴静注、

表1 日本で承認された抗体医薬品

| 構造 | 標的分子 | 一般名 | 販売名 | 剤形 | 投与経路 | 主な適応疾患 |
|---|-------------------|----------------|--------------|----------|----------|----------------|
| 抗腫瘍薬 | | | | | | |
| マウス IgG1k (MX-DTPA : ⁹⁰ Y 標識) | CD20 | イブリツモマブ チウキセタン | ゼヴァリン イットリウム | 溶液 | 点滴静注 | B細胞性非ホジキンリンパ腫 |
| キメラ IgG1k | CD20 | リツキシマブ | リツキサン | 溶液 | 点滴静注 | B細胞性非ホジキンリンパ腫 |
| キメラ IgG1k | EGFR | セツキシマブ | アービタックス | 溶液 | 点滴静注 | 結腸・直腸がん |
| ヒト化 IgG1k | VEGF | ベバシズマブ | アバスチン | 溶液 | 点滴静注 | 結腸・直腸がん |
| ヒト化 IgG1k | HER2 | ベルツズマブ | パージェタ | 溶液 | 点滴静注 | 乳がん |
| ヒト化 IgG1k | HER2 | トラスツズマブ | ハーセプチン | 凍結乾燥 | 点滴静注 | 転移性乳がん |
| ヒト化 IgG1k (糖鎖改変) | CCR4 | モガムリズマブ | ポテリジオ | 溶液 | 点滴静注 | 成人T細胞白血病リンパ腫 |
| ヒト化 IgG4k (カリケアマイシン修飾) | CD33 | ゲムツズマブオゾガマイシン | マイロターグ | 凍結乾燥 | 点滴静注 | 急性骨髄性白血病 |
| ヒト IgG1k | CD20 | オフアツムマブ | アーゼラ | 溶液 | 点滴静注 | 慢性リンパ性白血病 |
| ヒト IgG2k | EGFR | パニツムマブ | ベクティビックス | 溶液 | 点滴静注 | 結腸・直腸がん |
| 免疫調節薬 | | | | | | |
| キメラ IgG1k | TNF α | インフリキシマブ | レミケード | 凍結乾燥 | 点滴静注 | 関節リウマチ |
| キメラ IgG1k | CD25 | バシリキシマブ | シムレクト | 凍結乾燥 | 静脈内 | 腎移植後の急性拒絶反応抑制 |
| ヒト化 IgG1k | IL6R | トシリズマブ | アクテムラ | 溶液 | 点滴静注, 皮下 | 関節リウマチ |
| ヒト化 IgG1k | IgE | オマリズマブ | ゾレア | 凍結乾燥 | 皮下 | 気管支喘息 |
| ヒト化 IgG1k | RSウイルス | バリビズマブ | シナジス | 凍結乾燥, 溶液 | 筋肉内 | RSウイルス感染 |
| ヒト化 Fab' (PEG化低分子抗体) | TNF抗体 | セルトリズマブ ペゴル | シムジア | 溶液 | 皮下 | 関節リウマチ |
| ヒト IgG1k | TNF α | アダリムマブ | ヒュミラ | 溶液 | 皮下 | 関節リウマチ |
| ヒト IgG1k | IL12/ IL23-p40 | ウステキヌマブ | ステラーラ | 溶液 | 皮下 | 尋常性乾癬 |
| ヒト IgG1k | TNF α | ゴリムマブ | シンボニー | 溶液 | 皮下 | 関節リウマチ |
| ヒト IgG1k | IL-1 β | カナキヌマブ | イラリス | 凍結乾燥 | 皮下 | クリオピリン関連周期性症候群 |
| ヒト IgG2/4k | 補体 C5 | エクリズマブ | ソリリス | 溶液 | 点滴静注 | 発作性夜間ヘモグロビン尿症 |
| その他 | | | | | | |
| ヒト化 Fab (低分子抗体) | VEGF | ラニビズマブ | ルセンチイス | 溶液 | 硝子体内 | 加齢黄斑変性症 |
| ヒト IgG2 | RANKL | デノスマブ | ランマーク, プラリア | 溶液 | 皮下 | 骨病変, 骨粗鬆症 |

一般名の (遺伝子組換え) は省略して表記した。



(参考文献: Klein JS et al. JBC 106, 7385, 2009; Sarin H, J Angiogenesis Res 2, 13, 2010, Bagby TR et al. Pharmaceutics 4, 276, 2012, Moeller MJ and Tenten V Nat. Rev. Nephrol. 9, 266, 2013)

図4 抗体医薬品の分子量・分子サイズと、細胞間隙経路の大きさ

免疫調節薬では皮下投与が多い(表1)。免疫調節薬が用いられる慢性疾患では、自己注射が可能な皮下投与製剤が好まれる傾向が強くなっており、静脈内投与製剤が承認されて数年後に、皮下投与製剤が開発・承認される例も出てきている。言うまでもなく、皮下投与製剤では液量が限られ、高濃度の溶液が必要となる。抗体医薬品の投与量は高く、数十 mg/mL 程度の高濃度の溶液が必要になることもあり、製剤処方最適化のみでは目的とする濃度での溶液製剤の作製が困難な場合もあり得るため、分子設計の段階から、製剤化を考慮した分子の選択が必要になる。

3.2.2 安定性

抗体医薬品製剤は、溶液製剤または凍結乾燥製剤で、通例、4°C で保存される。有効期間の設定には、実時間実保存条件での安定性試験が必要であり、最終的な評価には長時間を要する。安定性の評価項目は、有効性・安全性に影響する品質特性となるが、製剤の保存中にもその含量が増加し得る凝集体は、免疫原性等、安全性への影響が懸念される不純物であるので、製剤の安定性を考える上で、特に注意が必要とされる。また、脱アミドや酸化等の化学的な修飾、高次構造変化等も有効性・安全性に影響する品質特性として、安定性の評価項目になる可能性が高い。安定性試験結果で問題が生じる事態を避けるため、分子設計の段階で、凝集体形成や化学修飾の懸念が少ないアミノ酸配列を選択することが望ましい。凝集体形成を起こしやすいアミノ酸配列を予測

する方法が検討されており⁵⁾、これらに一致する配列を回避する等の分子設計が考えられる。

3.3 製造工程

IgG 骨格を持つ典型的な抗体医薬品の製造工程としては、プラットフォーム化された技術があり、分子設計の際に考慮すべきことは多くない。しかし、その他では、個別に対応すべき問題を考慮して、分子設計を行う必要がある。代表的な例は二重特異性抗体である。抗原 A に結合する H 鎖, L 鎖, 抗原 B に結合する H 鎖, L 鎖からは、10 通りの分子種が生じ得るため、目的とする抗体の収率は低い。これを回避するため、2 種類の H 鎖にそれぞれ鍵と鍵穴となるアミノ酸置換を施し、目的とする H 鎖の会合を促進する方法や、L 鎖の共通化等の分子設計が行われている。また、Fc ドメインを持たない低分子抗体の精製には、IgG 型抗体で汎用される Protein A カラムを用いることができないため、別のアフィニティーカラムに結合させるためのアミノ酸配列が導入される例もある。培養上清中の安定性が悪い等、大量生産に適さない抗体は、除外すべきである。

4. 抗体医薬品の体内動態制御のための分子設計

抗体医薬品の体内動態には、有効成分の分子サイズ、荷電、及び、FcRn 結合性⁶⁾等が関与する。図4に、抗体医薬品の分子サイズと、組織毛細血管、リンパ管、及び、腎糸球体基底膜の細胞間隙の大きさを示した。皮下投与の際、低分子抗体は、毛細血管

及びリンパ管から吸収される大きさで、IgG型抗体はリンパ管から吸収される大きさである。低分子抗体は、糸球体ろ過を受けるサイズであるため、消失には、糸球体ろ過の寄与が大きい。IgG型抗体は、糸球体ろ過されず、その消失には、細胞への非特異的取り込みに伴う分解、及び、標的介在性の薬物消失 (Target mediated drug disposition)、さらに、これらに対するFcRnの抑制効果が関与する(図1B-ii)。

4.1 IgG型抗体

IgG型の抗体医薬品では、他のタンパク質医薬品と比較して血中滞留性はよいが、標的介在性の薬物消失等により、血中半減期が2~5日程度のものである。また、一度、抗原に結合した抗体医薬品は、リサイクルされても、再度別の抗原に結合することはできず、生体内に存在しても機能を発揮できない。

これらの課題を踏まえ、血中半減期の延長や、抗原の結合していない遊離型抗体をリサイクルさせるための分子設計が行われている。血中半減期の延長には、Fcドメインのアミノ酸置換により、FcRn結合親和性を上昇させる分子設計が行われており、動物実験では、野生型の4倍程度までの血中半減期の延長がみられている⁷⁾。遊離型抗体のリサイクリングには、細胞内エンドソームの酸性条件下で荷電状態が変わるHis残基をCDRに導入する手法が開発されており、この手法を用いると、抗原抗体複合体が細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内で抗原が抗体から解離するため、遊離型抗体のみがFcRnによりリサイクルされる⁸⁾。これらの分子設計による体内動態改良は、投与量や投与頻度の低減につながり、皮下投与製剤の開発可能性も高めるものと考えられる。

4.2 低分子抗体

IgG型の抗体医薬品とは対照的に、Fcドメインを持たない低分子抗体医薬品は、FcRnによるリサイクリングを受けず、また、糸球体ろ過により消失するため、半減期が数時間程度と短い⁹⁾。血中半減期を延長し、有効血中濃度を維持するための分子設計として、Fcドメイン、あるいは、IgGに結合するペプチドと低分子抗体を融合することで、直接あるいは間接的にFcRn結合性を付与する試みがなされている⁷⁾。また、FcRnには、IgGのみならず、アルブミンも結合するため、Fcに代わり、アルブミンを

利用することも試みられている(図2)。

4.2.1 直接的FcRn結合性付与

低分子抗体-Fc融合タンパク質として、scFv、あるいは、二重特異性scFvとFcの融合タンパク質等の作製が報告されており、scFvでは3.5時間であった血中半減期が、scFv-Fcでは93時間に延長された例もある¹⁰⁾。また、低分子抗体-アルブミン融合タンパク質として、scFv、あるいは、single chain diabodyとアルブミンの融合タンパク質、また、diabodyとアルブミンドメインIII融合タンパク質等の分子設計の例がある。

4.2.2 間接的FcRn結合性付与

IgG結合配列として、IgG結合性を持つタンパク質であるProtein A、Protein G、あるいはProtein L由来のペプチド配列を低分子抗体に付与する方法が開発されており、低分子抗体-IgG結合性ペプチド融合タンパク質として、scFv、あるいは、single chain diabodyとIgG結合性ペプチドの融合タンパク質等が報告されている。IgG上のProtein A及びProtein G結合部位は、FcRn結合部位に近いので、IgGのFcRnへの結合を阻害しないペプチド配列を選択することが重要となる。ペプチドを利用する方法では、Fcドメインやアルブミンとの融合タンパク質とする場合と比べ、分子量が大きくなるため、組織浸透性を保てる可能性が高くなると考えられる。

4.2.3 その他

他のバイオ医薬品の血中半減期延長のために用いられているPEG化は、低分子抗体医薬品にも応用されており、PEG化されたFab構造を持つセルトリズマブペゴルがその例である(表1)。有効成分の構造を改変する手法の他、開発中の製品では、ポンプを用いて低分子抗体を持続注入する方法も用いられており、投与デバイスの工夫で有効血中濃度を維持する手法も含め、体内動態の制御には、様々な手法が考えられる。

5. おわりに

抗体医薬品の分子設計において考慮すべきポイントについて、薬理、薬物動態、免疫原性、溶解性、安定性、製造工程の観点から考察した。抗体医薬品の分子設計は、生産用細胞株の樹立、治験薬製造、非臨床試験、臨床試験等からなる一連の開発過程の入り口である。アミノ酸配列が一つでも異なれば別