

2013 2805/A

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

がんワクチン等の品質及び有効性評価手法の検討に関する
レギュラトリーサイエンス研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成 26(2014)年 3 月

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

がんワクチン等の品質及び有効性評価手法の検討に関する
レギュラトリーサイエンス研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
がんワクチンの有効性評価手法に関する研究	1
山口 照英	
II. 分担研究報告書	
1. ペプチドワクチン等の品質評価手法の検討	15
川崎 ナナ	
2. がんワクチンの有効性評価手法に関する研究	23
山口 照英	
資料 1. Cancer Vaccine NIH Clinical Study Protocol	33
資料 2. 案 1. 治療用がんワクチンの評価における考慮事項に関するガイドライン (案)	277
資料 2. 案 2. 治療用がんワクチンの評価における考慮事項に関するガイドライン (案)	295
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	313
IV. 研究成果の刊行物・別刷	—

がんワクチンの有効性評価手法に関する研究

研究代表者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨

がんワクチンの開発が急速に進んでいるが、がんワクチンは従来の細胞障害性の抗がん剤と異なる作用メカニズムで臨床効果を発揮すると考えられ、がんワクチンに特化した評価が必要とされている。

本年度は、がんワクチンの臨床評価や品質に関して次のような点を明らかにした。

1) NIH Clinical Trial に掲載されているがんワクチンプロトコールやがんワクチンの臨床試験報告から、がんワクチンによって惹起される抗腫瘍免疫反応を評価するために複数の免疫評価指標が用いられることが必要と考えられる。免疫応答性の評価では、がん抗原特異的な細胞障害性 T 細胞やがん抗原特異的なヘルパー T 細胞数の解析、機能解析に加えて液性免疫応答性も評価されることが多い。また、がんによる免疫抑制反応からの解除を目指して抗体医薬や特定の抗がん剤が用いられており、患者の免疫抑制に関わる Treg 細胞数や免疫応答性の強さを評価する目的として遅延型アナフィラキシー応答性などが評価されている。またがんワクチンの投与方法や投与スケジュール、投与量の設定がこれまでの抗がん剤の臨床試験とは異なっていることが明らかになった。2) がんワクチンでは従来の最大耐性投与量や毒性制限投与量の設定は不要な場合が多いと想定されるが、いくつかの臨床試験では MTD や DLT を主用評価項目や副次評価項目としているプロトコールもある。3) これらの成果に基づいて昨年作成したがんワクチンの評価ガイダンスの素案の再検討を行った。ガイダンスでは臨床初期に絞った記載とし、特に免疫応答に対する評価や投与量の設定などを中心に書き、臨床後期での有効性の評価については、他のがん治療と大きな差異はないと考えられるために簡略な記載とし、がんワクチン特有の留意点のみを記載することとした。

がんワクチンの品質管理の考え方を明らかにする目的で、有効成分として用いられる組換えタンパク質およびペプチドの品質管理手法について考察した。

分担研究者

川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所・部長

協力研究者

多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所・室長

佐藤大作 医薬品医療機器総合機構・部長

井口豊崇 医薬品医療機器総合機構・審査役

朝倉 渡 医薬品医療機器総合機構・審査役

野中孝浩 医薬品医療機器総合機構・主任専門員

甘粕晃平 医薬品医療機器総合機構・審査専門員

老邑温子 医薬品医療機器総合機構・審査専門員

秦 利幸 医薬品医療機器総合機構・審査専門員

A. 研究目的

近年患者自身の免疫能を賦活化することにより抗腫瘍効果を発揮させる治療法が開発されつつある。樹上細胞の機能をはじめ、がんに対する基礎的研究の進展やがんによる免疫抑制効果についての解析が進むと共に、強力な腫瘍免疫法が開発され、がん免疫療法に期待が持てる成果が得られ始めている。

米国 NIH の臨床研究ウェブページによると既に 1000 を超えるがん免疫療法が登録されており、年々増加の一途であり、ペプチドワクチンをはじめ、タンパク質、組換えウイルスなど多様な製品を複雑に組み合わせた治療もおこなわれている。それぞれの製品の製法や特性解析、品質管理などは各種ガイドラインや指針に従った解析や管理が求められると考えられるが、非臨床試験や臨床試験では、安全性や有効性の評価において様々な課題が存在する。

非臨床試験では免疫応答性の種差もあり、必ずしも適切なモデル動物が存在するわけではないし、ヒト化モデルマウスを用いた検討も行われているが、必ずしもヒトに外装できるデータが得られるとは限らない。

また、臨床試験では特に従来の抗がん剤と異なり、MTD や DLT が見られないケースも多い。またがん抗原を発現していない患者に対してはがんワクチンの効果がない可能性があり、そのためにがん抗原の発現を評価するためのコンパニオン診断薬の

開発も必要と思われる。また、治験初期で行われる多様ながん種の患者に対する試験の必要性についても、がん抗原の発現性の観点から再考する必要がある。

本年度は、種々のがんワクチンを用いたがん免疫治療に関して臨床試験に関する国際的な登録情報やその臨床試験結果に関する論文等について調査し、臨床試験でどのような免疫応答性を評価しているかを明らかにしたうえで、有効性評価との関連についても明らかにした。また、品質、非臨床試験において考慮すべき事項について解析した。これらの成果から、がんワクチンガイドラインに取り込むべき要素について明らかにすると共に、がんワクチンガイドライン作成のための案を提示した。

本研究ではがんワクチンの品質管理の考え方を明らかにする目的で、有効成分として用いられる組換えタンパク質およびペプチドの品質管理手法について考察した。

B. 研究方法

2013年時点で、がんワクチンの臨床開発を目指してNIH Clinical Trialのウェブページに約1300の臨床プロトコルが掲載されている。これらのプロトコルの調査では、パピローウイルスやがん患者の感染症防御のためのワクチンに関する研究もあり、それらを除いた上で、どのような免疫応答性について臨床試験で明らかにしようとしているかを調査した。ペプチド/タンパク質を用いた開発のみならず、糖脂質を用いた開発、さらには細胞治療、遺伝子治療として分類される臨床開発が行われている。また併用薬としてもアジュバント、核酸医薬、低分子化学医薬品など様々な取り組みが行われている。このような併用薬を含めた治療レジメンとその免疫応答性の評価の関係についても調査した。

さらに治療レジメンに関しても多岐にわたっている。このような現在実施されている臨床プロトコルの解析を行うと共に、FDAのがんワクチンガイドラインや公表文献等も含め調査の対象とした。

また、患者での免疫応答性を評価する国際的な標準化プロジェクトから出されたT細胞のバイオアッセイガイドライン (Minimal Information about T Cell Assays (MIATA) ガイドライン) の有用性についても取り上げた。

各種ガイドライン及び文献情報等を参考にバイオ医薬品の規格及び試験方法についてまとめた。これをもとにがんワクチンの有効成分として用い

られる組換えタンパク質およびペプチドの品質管理手法について考察した。

(倫理面への配慮)

本研究は調査研究であるため、倫理面への配慮を必要としない。

C. 研究結果

C-1. がんワクチンの臨床プロトコール

米国NIHのNIH Clinical Trial ウェブページには2013年現在で1200を超えるがんワクチンプロトコルが掲載されている。がん抗原ペプチドとして短鎖ペプチド及び長鎖ペプチドの他、がん抗原ペプチドとKLHなどのスーパー抗原との融合タンパク質なども用いられている。がん抗原タンパク質そのもののみならずがん抗原タンパク質をコードする遺伝子を導入するためのプラスミドやウイルスベクターの他、がん抗原でパルス刺激した樹上細胞による細胞治療も行われている。さらに、自己や同種がん細胞を放射線照射などにより増殖能を失わせた細胞製品なども用いられている。このような細胞製品にがん抗原をより強く発現させるためにがん抗原の遺伝子を搭載したプラスミドやmRNAを導入して投与したり、さらに免疫応答性を刺激するためにGM-CSFやインターフェロン γ 等のサイトカインの遺伝子を導入するなどの改変が行ったうえで、患者に投与することも行われている。

このように多様な製品が投与されるばかりでなく、投与レジメンとしてウイルスベクターによるワクチン投与に引き続いてがん抗原ペプチドによる追加免疫やサイトカインによる刺激を行ったり、さらに数ヶ月から数年にわたる免疫刺激を行うことも試みられている。また、このような投与スケジュールのみならず、投与量、投与ルート、併用薬などについても様々な試みが行われている。このような情報を明らかにした上で、免疫応答性の評価項目、評価スケジュール、有効性の評価項目、評価スケジュールについて整理した(資料1)。

C1.1. 製品群の多様性

図1に、NIH Clinical Protocolのデータベースの収載されているプロトコルで用いられている製品を分類してみた。最も多いのはペプチドであるが、この中には短鎖ペプチドと長鎖ペプチドが含まれる。また、KLHなどのキャリアタンパク質との融合ペプチドも含まれている。次に多いのが自己由来細胞であるが、この中には自己樹状細胞と自己のがん細胞に遺伝子導入などの何らかの処理をした後に、抗原として投与される場合も

含まれる。樹状細胞を用いたプロトコールが非常に多いが、この中には樹状細胞を刺激するペプチドやタンパク質、mRNA、プラスミドなども含まれている。タンパク質の中には、特定のがん抗原のイディオタイプ抗体なども含まれる。

遺伝子治療の中にはウイルスベクターを用いるケースからプラスミドやプラスミドをリポソームに封入した製品も含まれる。

またペプチドをスーパー抗原と結合させたり、がん抗原タンパク質をリポソームなどに封入することにより免疫応答性を高める製剤の開発も行われている。キャリアタンパク質が用いられるケースでは、キャリアタンパク質に対する免疫応答性を評価し、がんによる免疫抑制からどの程度回復しているのかについての解析も平行して行われることがある。

このほかに統計データとしては含めていないシアルルイスXなどの糖鎖抗原やGD1、GD2などの糖脂質抗原などをターゲットした試験が実施されている。

C1.2. 併用薬

がんワクチンの併用薬として、免疫賦活化作用を有する顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) や IL-2、インターフェロン γ の他、がんによる免疫抑制に関与する Treg 細胞を抑制すると考えられているシクロフォルファミドやフルダラビン、Treg 細胞の機能を抑制するためのアンチセンス核酸や siRNA などが用いられている。

近年、がんによる免疫抑制解除に抗体医薬品を用いる試みが行われており、大きな成功を収めている。代表的な例として、Treg 細胞の発現する CTLA4 やケモカインレセプター CCR4 をターゲットとした抗体医薬品としてイピリムマブやモガムリズマブ、がん細胞に発現する免疫抑制性のリガンドである PDL-1 や PDL-1 に結合する PD-1 に対する抗体医薬品などが利用されており、イピリムマブや抗 PD-1 抗体では高い有効性が得られたとの報告がある。

併用薬の効果とがんワクチンの効果が同じであれば臨床的な応答性について区別して評価する必要はないが、例えば Treg 細胞の抑制を評価する場合には、Treg 細胞集団のどれほど低下したのか評価する必要があるかもしれない。

また、Treg 細胞のようにいくつかのサブセットが存在する場合には、サブセットを区別して解析することも有用であると考えられる。

C.1.3. 臨床開発初期での安全性

従来の細胞傷害性の抗がん剤と異なり、僅かな例外を除いてがんワクチンで最大耐性毒性が同定されたことは無いと考えられる。がんワクチンの臨床試験では、投与可能な最大投与量は毒性というより製品の製造上の限界や投与部位の物理的あるいは解剖学的な観点からの制限を受けることになると考えられる。従って従来の 3+3 用量試験を用いて最大耐用毒性 (MTD) や用量制限毒性 (DLT) を明らかにする必要がないと考えられる。

一方で、がんワクチンの臨床試験のデザインにかんする調査では、MTD や DLT を明らかにすることを主用評価項目や副次評価項目に挙げているプロトコールもある。がんワクチンの製品は非常に多用であり、これらの中には細胞製剤やアジュバントを用いたプロトコールが含まれており、そのためにこのような MTD や DLT を明らかにすることを目指しているとも考えられる。

C.1.4. がんワクチンの免疫応答性評価

がんワクチンの有効性を予測可能な PD マーカーのとして、抗原特異的な細胞性免疫の活性測定や液性免疫反応の評価が行われてきている。また非特異的な免疫応答性として標準抗原に対する遅延型アナフィラキシー反応の強度を測定することも行われている。

細胞性免疫の応答性の評価に当たってはがんワクチンの投与スケジュール等を考慮する必要がある。すなわちがんワクチンの投与では、ウイルスベクター等による持続刺激がある場合を除いて 1-2 ヶ月の反復投与から、3-4 年といった長期にわたる反復投与を行うプロトコールも試みられている。また免疫応答性の評価ポイントも投与スケジュールに応じて数ヶ月から数年という長期の評価を行う場合もある。従って長期にわたる細胞を用いた評価を行うのに際して、異なる日時での測定データの比較可能な結果が得られるような標準化が重要となる。

主とした有効性を示唆する細胞免疫応答性の評価項目としては、細胞傷害性 T 細胞やヘルパー T 細胞の増減をテトラマーアッセイや ELISPOT アッセイ、サイトカイン産生能をフローサイトメトリーで解析する方法など複数の方法で解析されている。

テトラマーアッセイ、ELISPOT アッセイ、サイトカイン産生フローサイトメトリーアッセイについては国際的なタスクフォースで標準化が試みられており、参考になる部分が多い。

(1) クラス I あるいはクラス II の MHC ポリマーを用いた抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) あるいは抗原特異的 CD4+細胞の定量

ウイルス感染細胞やがん細胞の除去に免疫学的に重要な役割を担っている細胞傷害性 T 細胞は、抗原提示細胞の MHC クラス I 分子と結合した抗原ペプチドを認識し、標的細胞を特異的に攻撃、排除するとされている。この MHC 主要組織適合遺伝子複合体のクラス I 分子上に抗原ペプチドを提示することが出来る。さらに、CD8+の細胞傷害性 T 細胞は HLA-I 分子に結合したがん抗原ペプチドを T 細胞受容体 (TCR) が認識し、刺激を受けた抗原を発現している標的細胞を攻撃するようになる。抗原が特定されたがんワクチンの臨床試験評価では、がんワクチンの接種により増加するがん抗原特異的 CTL ががん細胞を攻撃すると想定されており、特異ペプチドを結合した HLA class-1 複合体を用いて、その血中の抗原特異的 CTL 数を測定することが PD マーカーとなると考えられる。

しかし、MHC Class-1/ペプチド複合体は、単量体では TCR への結合親和性が低いために、抗原特異的な CTL の検出に HLA class-1/ペプチド複合体を利用するには、HLA の多量体化が必要とされている。すなわち、がん特異的なペプチドと MHC-class1 ポリマーを作製し、さらにそのペプチドポリマー複合体を蛍光標識したものをを用いて、フローサイトメーターにより CD8 陽性でかつポリマーとの結合能をもつ陽性ゲートの T 細胞数を測定することにより、抗原特異的 CTL 数を算出する。さらに、蛍光標識された MHC Class-1/ペプチド複合体は、CTL の特異的 T 細胞受容体 (TCR) との結合能を有するが、一方で MHC は CD8 とも非特異的に結合する性質があるために、特異結合を抑制する必要があるとされている。このために非特異的な HLA の結合部位に変異を導入する方法も考案されている。

(2) MHC-class2/がん特異的ペプチド複合体の 4 量体を用いたヘルパー T 細胞 (CD4 陽性) の検出

クラス 2 分子は、HLA のクラス II (HLA-2) 領域にコードされる α 鎖と β 鎖から構成されており、HLA-DR、DQ、DP がある。ヘルパー T 細胞は、HLA-2 分子に結合した抗原ペプチドを、TCR/CD3 複合体が認識し、同時に抗原提示細胞の補助刺激分子 (インテグリンリガンド; CD86) を補助受容体が (CD28) が認識することにより抗原特異的な活性化が起こる。抗原刺激によって活性化された抗原特異的ヘルパー T 細胞は、CTL の活性化のみならずがん組織

への浸潤にも必要とされていることから、血中における抗原特異的ヘルパー T 細胞の濃度を測定することにより、がんワクチンの有効性を予測可能な指標となるとされている。

抗原特異的ヘルパー T 細胞の測定では、細胞傷害性 T 細胞と同様に MHC Class-2 とペプチド複合体の 4 量体やポリマーに蛍光物質で標識し、患者由来血液細胞等と反応させ、同時に蛍光標識した CD4 抗体とのダブルラベルを行い、CD4 陽性でかつ MHC Class-1/ペプチドの反応性の細胞をフローサイトメーターにて定量する。測定では MHC Class-2/ペプチド複合体ポリマーとの非特異反応性を排除することである。

テトラマーアッセイのフローサイトメトリーを用いた解析において細胞傷害性 T 細胞の表現系について同時測定が可能である。しかし、長期保存中にテトラマーの立体構造が変化しやすいことが知られており、安定性について十分な評価が必要である。また検出した細胞傷害性 T 細胞の機能的な面の評価ができないという欠点がある。また末梢血中で目的とする T 細胞の検出感度としては 0.01 から 0.2% であり、これより少ない T 細胞の検出が難しい。このために *in vitro* で抗原刺激を与え目的とする細胞傷害性 T 細胞を増幅させることにより感度を増加させる工夫も行われている。

さらに混合リンパ球反応を利用した細胞傷害性 T 細胞の *in vitro* での増幅法も用いられており、単なる抗原刺激よりも増幅能が高いとされている。しかし、*in vitro* 刺激を加えても感度は 100 倍ほど増加するが、それより少ない T 細胞集団を検出することは技術困難とされている。

(3) 特異的抗原刺激によって活性化された CD4+または CD8+T 細胞数の ELISPOT による計測、あるいは細胞内サイトカイン染色による解析

がん抗原特異的に反応する CD4 陽性や CD8 陽性細胞を測定するもので、Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT) では、特異抗原刺激によりこれらの T 細胞が産生するインターフェロン γ (IFN- γ) の産生を測定するものである。IFN- γ は CD4、CD8、NK 細胞などが産生するサイトカインであり、炎症免疫反応の調整に関与すると考えられ、抗原刺激を受けたこれらの細胞の反応性を検出することが可能とされる。産生また、細胞内サイトカインアッセイでは、抗原刺激により T 細胞我が活性化され産生するサイトカインを細胞内に蓄積させサイトカイン陽性細胞を定量するものである。

(3-1) ELISPOT アッセイ

がんワクチンの投与を行った患者末梢血より白血球を分離し、リンパ球層あるいは、CD8 や CD4 細胞を分離して、一定期間抗原刺激を与えながら培養を行う。その際、培養プレートを抗 IFN- γ コーとしておき、T 細胞が産生する IFN- γ をトラップ可能としておく。所定の培養期間を経過した後、T 細胞やリンパ球を除去した後、トラップした IFN- γ 量を酵素免疫反応により検出する。細胞から産生される IFN- γ は培養プレートをコートされた抗 IFN- γ により効率よくトラップされ、IFN- γ 産生細胞が存在した部位のみがプラーク状に染色される。この染色パターンから IFN- γ 産生細胞量の推定が可能となる。培養プレートのスポットとして検出されるために、定量範囲がそれほど広がらないが、機器を用いなくても解析可能な測定法である。

ELISPOT アッセイの感度は 0, 01% とされている。ELISPOT アッセイでは細胞傷害性 T 細胞の機能面の評価も可能であるが、陽性細胞傷害性 T 細胞の回収が出来ないために、その機能や抗原特異性などについて詳細な検討が出来ない。

(3-2) 細胞内サイトカインアッセイ

フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカインアッセイは、ELISPOT と同様にがん抗原特異的な T 細胞の機能情報に着目したアッセイ法である。抗原刺激に応答して、CD4 細胞や CD8 細胞が産生するサイトカイン（インターロイキン 2；IL-2）を産生するが、その IL-2 再生している細胞を特異的に染色する。このために、Monensin や Brefeldin-A などの細胞内タンパク質輸送を阻害する薬剤を用いて抗原刺激を行い、細胞内に蓄積された IFN- γ や IL-2 を膜透過処理を行ったうえで蛍光免疫染色により検出する。同時に、CD4 及び CD8 抗体を用いて蛍光免疫染色し、CD4 陽性/IL-2 陽性、あるいは CD8 陽性/IL-2 陽性の細胞をフローサイトメーターにより解析する。細胞内サイトカインアッセイの特徴は、抗原刺激による機能（サイトカイン産生）を測定できるだけでなく、CD4 と CD8 陽性の細胞を同時に測定することも可能とされている。

細胞内サイトカインアッセイの感度は 0. 02% ほどであり、感度の点が課題となっている。

(4) がん抗原の特異性が不明な場合

がん抗原タンパク質やこれをコードするような遺伝子を発現させる製品では、抗原のどの部位に対する免疫応答が惹起されるか不明であり、また MHC-1 と MHC-2 の両方に別々の抗原ペプチドが呈

示される可能性がある。さらに、複数の MHC に異なるがん抗原ペプチドが提示される可能性がある。従って、がん抗原タンパク質の中の複数のペプチドに対する免疫応答性を評価することが有用と考えられる。

このために、導入したがん抗原タンパク質をコードするプラスミド等を導入した抗原提示細胞を用いて複数の抗原ペプチドを MHC 上に発現させることも行われている。例えば、複数のがんペプチド発現する抗原提示細胞と患者由来のリンパ球分画を *in vitro* で同時に反応させ、抗原提示細胞からの刺激を受けた特異的な細胞傷害性 T 細胞や CD4 陽性細胞のサイトカイン放出を ELISPOT アッセイにより検出するというものである。

一方で、抗原タンパク質の全体を網羅するようにペプチドライブラリーを合成し、ELISPOT アッセイやサイトカインフローサイトメトリーアッセイを行うものである。

(5) 制御性 T 細胞の測定

以上のがんワクチンの免疫応答性の評価では、がん組織は様々な因子を放出したりすることにより、がんに対する免疫応答を抑制する機構があることが知られている。このがんによる免疫抑制機構の中で重要な役割を果たしているのが制御性 T 細胞（Treg 細胞）といわれている（図 2）。また、がん細胞は肝臓などに発現される PD-L1 を発現することがあり、この PD-L1 は免疫細胞の PD-1 に結合し、免疫細胞を不活化することが知られている。

このために Treg 細胞上に発現する機能タンパク質である CTLA4 やケモカイン受容体である CCR4 に対する抗体や、PD-L1 や PD-1 に対する抗体を用いてがんによる免疫抑制を回避する方策が試みられている（図 2）。

また Treg 細胞の抑制効果があるとされるサイクロヘキシミド(CHX)投与などの投与ががんワクチンの併用薬として用いられている。

このような免疫抑制からの解除を評価することもがんワクチンの効果を評価する上で非常に重要とされる。例えば Treg 細胞の血中濃度やがん組織やリンパ節内での Treg 細胞の量を測定することも有用と考えら得る。また、Treg 細胞の活性化状態に関しては、末梢血中の Treg 細胞数や Treg 細胞のサブタイプの解析、さらには腫瘍内に浸潤している Treg 細胞数やそのサブタイプ解析が行われている。また、特異抗原に対する免疫応答性のみならず、がんには関連しない非特異的な標準抗原に対する免疫応答性とした遅延型アナフィラキシー応答性の評価も行われている。

(6) 抗原提示細胞によるがん抗原のクロスプレゼンテーション

MHC-1 は基本的に全ての細胞に発現しており、内在性タンパク質がプロテアソームにより分解され生成したペプチドが抗原処理関連トランスポーター (TAP) 依存的に小胞体に運ばれ MHC-1 と結合して細胞外へ提示されるようになる。一方で外来性抗原はカテプシン S などの分解を受け、分解されたペプチドは抗原提示細胞特異的に発現される MHC-2 に発現される。

ナイーブな CD8 陽性細胞が外来抗原への応答性を誘導するためには抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞) により外来性抗原がその MHC-1 に提示される必要がある (クロスプレゼンテーション: 図 3) とされている。いくつかの概念的な仮説も含め、外来性抗原に対する細胞傷害性 T 細胞誘導の機能をになうのがどのような細胞なのか明確にはされていない。本来内在性抗原を提示する MHC-1 に外来性抗原を提示するクロスプレゼンテーションが惹起されることにより細胞傷害性 T 細胞の強力な誘導が起こり、高い抗腫瘍効果が発揮されると考えている研究者も多い。

クロスプレゼンテーションに関わる抗原提示細胞としては、*in vitro* での解析結果から樹状細胞がその主役とされているが、どの樹状細胞サブタイプがその役割を担っているのか明確でない状況で、クロスプレゼンテーションの誘導を評価することを求めるのは時期尚早の感がある。また抗原提示に関わる樹状細胞が局在すると想定される腫瘍内から樹状細胞を収集することも想定されるが、少なくともクロスプレゼンテーションに関わる樹状細胞が特定される必要があったが、近年の解析でその候補となる樹状細胞が特定されつつある。

マウスでの樹状細胞の解析結果から、リンパ節に常在するレジデント樹状細胞 (cDC)、タイプ 1 インターフェロンを産生する形質細胞様樹状細胞 (pDC)、移住性樹状細胞 (mDC) のサブタイプが知られている。さらに、cDC は CD8 α 陽性 (CD8 α +cDC 細胞) の CD8 α 陰性 (CD8 α -cDC 細胞) の 2 種類があり、クロスプレゼンテーションに関与する樹状細胞は CD8 α +cDC 細胞とされている。このマウスの CD8 α +cDC 細胞に相当するヒト細胞について最近の研究で DC antigen-3 (BDCA3) 陽性 (CD141 陽性) 細胞であるとする報告がされつつある。

しかし BDCA3+細胞はリンパ節や骨髄等でも非常に僅かなポピュレーションしかない細胞であり、クロスプレゼンテーションの有無の指標として

BDCA3+細胞の抗原提示能を指標とした場合に測定法として成立するのかが問題となる。

マウス DC8 α +cDC やヒト BDCA3+細胞は高い IL-12 やインターフェロン β 産生能をもつと共に トールライク授与体 3 (TLR3) や TLR7 を発現している。

マウス DC8 α +cDC やヒト BDCA3+細胞は MHC-1 上に外来性抗原を提示できるされるが、TLR3 に 2 本鎖 RNA や polyI:C などが結合すると MHC-1 への抗原提示が活性化され、細胞傷害性 T 細胞の誘導のが上昇する。また、産生する IL-12 やインターフェロン β を介してこの細胞傷害性 T 細胞の分化誘導を亢進させる能力を持つとされている (図 3)。

クロスプレゼンテーション能を持つヒト樹状細胞 (BDCA3+細胞) はがん免疫療法のキーとなる細胞と想定されている。樹状細胞を用いた抗腫瘍細胞製剤として FDA が唯一承認している Sipleucel-T (Provence) もこのような観点からの承認であると理解される。ただし、Provence で得られている患者の全生存率の延長は対象に比べて統計的有意さはあるものの僅かであり、様々な改善の余地があるとされている。

例えば投与される樹状細胞の刺激因子、投与する樹状細胞量、投与頻度、投与ルート、投与部などである。このような解析が進展し、BDCA3+樹状細胞が真にがん免疫応答の中心に位置することが明らかになり、さらにその解析手法が確立することが期待される。

従って、樹状細胞に関するこのような解析が進めば、がんワクチンにおけるクロスプレゼンテーションの評価の意義もさらに明確になると考えられる。

C.1.5. がんワクチンガイドライン案

以上の調査研究を通じて得られた情報を基に、がんワクチンガイドラインに盛り込むべき要素を検討した。24 年度に実施した特別研究でがんワクチンガイドラインの素案を作成しているが、本年度に明らかにした要素をこの素案に追加した。また、後期臨床評価での全生存期間の延長等の有効性評価はがんワクチン特有の課題ではないことから、特にがんワクチンに特化した記載のみに限定することとした (資料 2)。

C.2. がんワクチンの品質管理手法

がんワクチンの有効成分として用いられる組換えタンパク質及びペプチドの品質管理にあたっては、バイオ医薬品 (組換えタンパク質医薬品) で設定

される規格及び試験方法が参考にできる。以下ではバイオ医薬品の規格及び試験方法を参考に、組換えタンパク質及びペプチドにおいて設定することが予想される規格及び試験方法について概説する。

規格及び試験方法は、品質管理のための方策の一部であり、品質は、原材料の管理、適切な製造工程の設定および管理などとあわせて全体として確保される。規格及び試験方法は、試験項目、分析方法および規格値／判定基準からなり、試験項目は、医薬品の有効性および安全性を確保するために必要な特性（重要品質特性）と、その範囲および分布が確認できることを考慮して選択される。製造工程で生じうる特性の変化の範囲、医薬品の安定性及び有効性・安全性との関連等を明らかにすることにより、重要品質特性の範囲や分布が設定され、適切な規格及び試験方法を設定することが可能となる。表1にバイオ医薬品の原薬において設定される規格及び試験方法の項目の例を示す。製剤においては、同様の項目が設定されることが多いが、添加剤による試験への影響や製剤化工程により生じる変化を勘案して適宜項目が追加・簡略化されるほか、製剤試験として、無菌試験、エンドトキシン試験、不溶性微粒子試験および不溶性異物検査、質量偏差試験／含量均一性試験、ならびに凍結乾燥製剤に対する含湿度試験などが設定されることもある。組換えタンパク質医薬品は一般的に不安定であり、保存中に力価の低下や分解物および変化物が生じる可能性がある。そこで、外観、純度、力価およびその他の分子特性など複数の指標により安定性評価が可能となるよう適切に規格及び試験方法を組み合わせることが必要である。以下に、主な項目の概略を述べる。

(1) 構造式

ペプチドおよびタンパク質性医薬品では、アミノ酸配列に加えて、ジスルフィド結合および糖鎖などの翻訳後修飾の構造およびその結合部位などを明記する。

(2) 分子式と分子量

均一なペプチドおよびタンパク質性医薬品では、分子式および分子量を記載する。糖鎖修飾などの翻訳後修飾により、分子式や分子量が不均一な場合は、タンパク質部分の分子式・分子量のみを記載し、修飾を含むおおよその分子量は、基原に記載する。

(3) 性状

固体、液体などの形状および色についての定性的な記述が必要である。保存中に変化する場合には、その変化について検討を行い、適切な規格を設定する。

(4) 確認試験

確認試験は、有効成分などをその特性に基づいて確認する試験である。類似した構造をもつ物質と識別できるような特異性の高い方法が望ましい。純度試験や定量試験など確認試験以外の試験と内容が重複する場合は、確認試験として設定する必要はない。確認試験は有効成分の特性を考慮して2つ以上設定すべきとされている。理化学手法としては、ペプチドマッピング、質量分析などが、免疫学的手法としては、ウエスタンブロット法やELISAなどが利用される。通常のバイオ医薬品では生物学的手法として、動物や細胞を用いた方法、酵素活性および結合性などを利用した方法が用いられるが、がんワクチンの場合にはこれらの生物学的手法を用いた試験の設定が困難な場合も想定される(考察の項を参照)。

(5) 示性値

示性値に相当するものとして、等電点、分子量・分子サイズ、分子吸光係数、アミノ酸組成、比活性、結合性、アイソフォームの不均一性、N末端の不均一性、糖含量、および糖鎖プロファイルなどがあげられる。医薬品の有効性および安全性を確保するために、必要に応じて、等電点、アミノ酸組成、比活性、糖鎖不均一性などのように設定する。確認試験、純度試験として設定されることもある。

(6) 純度および不純物試験

純度試験は、目的物質の純度、もしくは混在物の種類およびその量を規定する試験である（ウイルス等を除く）。組換えタンパク質医薬品に含まれる不純物は、製造工程由来不純物、目的物質由来不純物（保存中の分解物および変化物を含む）および混入汚染物質に分類される。組換えタンパク質医薬品は保存中に変化しやすいことを考慮し、分解物や凝集体等の評価が可能な試験方法を設定する必要がある。また、組換えタンパク質医薬品においては、糖鎖付加、酸化や脱アミド化などの分子変化、あるいはそのほかに起因する不均一性が存在するため、純度を決定することは容易ではなく、得られる純度は試験方法に依存したものになるので、一般的に複数の方法により評価する。不純物に関する規格値は、不純物ごとに個別に、もしくは不純物の総量で設定される。製剤化工程において生じる不純物については、製剤において管理する。

(7) 定量法

定量法では、成分の含量をタンパク質含量や力価として適切な方法を用いて測定する。定量法として分解物および変化体などに対する特異性が十分でない場合は、適切な純度試験とあわせて、規

格全体として有効成分含量を測定できるものとなるよう考慮する。製剤の場合には、添加物や保存中に出現する分解生成物によって妨害されることのない特異的な原薬含量の測定法を設定する必要がある。タンパク質含量は、日本薬局方第十六改正（日局）一般試験法<2.04>たん白質のアミノ酸分析法、<2.01>液体クロマトグラフィー、または参考情報 たん白質定量法、を参考に測定することができる。

(8) 力価

力価とは、生物学的性質に関連する特性に基づいて、適切な生物学的試験により測定され、生物活性を定量的に表す尺度のことである。組換えタンパク質医薬品の力価は、適切な標準物質／標準品を基に検定した活性の単位で表わされることが多い。力価の測定は、定量試験のほか、目的物質が意図する生物活性を有することの確認を目的として実施される。目的物質が適切な高次構造を保持していることの推定にもなる。おのおのの医薬品によりその生物活性は異なることから、それぞれの医薬品において適切な試験方法を構築する。生物活性は、その作用または作用機序に基づいて、結合性試験（リガンドー受容体結合など）、生化学的試験（酵素反応など）、細胞応答性試験（細胞レベルでの生化学的または生理学的応答）、*in vivo*試験（生体の生物学的応答）などにより測定される。力価と臨床効果との相関は、薬力学試験または臨床試験において確認しておく必要がある。がんワクチンの場合には臨床効果と相関のある力価試験を設定することが困難な場合があることに留意すべきである（考察の項を参照）。

(9) 標準物質／標準品

標準品あるいは標準物質は、定量、確認試験または純度試験において基準として用いるために調製された物質であり、目的の用途に適した品質を有している必要がある。組換えタンパク質医薬品では、構造の複雑さおよび不均一性などにより、適切な試験の規格／判定基準を設定することが難しい。また、操作条件ならびに使用する試薬のわずかな変化が分析結果に影響を及ぼしうることから、操作が適切に行われていることの評価が必要である。そこで、定量法に加え、さまざまな試験で、標準物質を試料と同様に操作し、得られた結果を利用することにより試験結果を評価することが多い。組換えタンパク質医薬品の力価は、適切な標準物質の力価に関係づけて表すべきであり、生物学的試験において、標準物質／標準品の設定は特に重要である。「国際標準品」や「国内標準品」が入手可能であれば、それらを利用可能である。また、代表的な生産ロットから調製し、適切な特性

解析を行ったものを用いて、「国際標準品」や「国内標準品」を参照として検定を行い、「自家標準物質」を確立することができる。「標準品」が存在しない場合は、適切に特性解析がなされた「自家標準物質」を確立する必要がある。標準物質／標準品の新設・更新にあたっては、十分に特性解析を行うとともに、力価の連続性の確保ならびにトレーサビリティを考慮することが重要である。

D. 考察

D.1. がんワクチンのガイドラインにもりこむべき要素に関する研究

本年度は、NIH Clinical Trial プロトコルや公表文献、MIATA プロジェクトガイドライン等を中心に調査を行った。これらの成果に基づいて、昨年作成したがんワクチンガイドライン素案に追記すべき内容として次のような要素が考えられた。

1. ガイドライン作成に当たっての方向性

がんワクチンの対象として、ペプチドを長鎖ペプチドと単鎖ペプチドに分類して書き分けること。また単鎖ペプチドの役割は内在性のメモリーT細胞の増幅能を期待している点、長鎖ペプチドやがん抗原免疫タンパク質を投与する場合には抗原提示細胞でのプロセッシングが期待されること。

2. ガイダンス案作成のポイント

(非臨床)

・有効性を示唆するデータをモデル動物で実施することの困難さと局所認容性などの点。その中で、薬理試験については、HLAの構造は動物種差が大きく、薬理的活性発現メカニズムの観点から、適切な実験動物種は存在しないこと等に留意が必要。

・毒性試験については、合成ペプチドの場合には化学合成由来の不純物や意図しない化合物の混在による安全性リスクが懸念されることから、これを確認する上で動物試験も有用性への言及。

(臨床)

・投与方法

皮下、皮内、腫瘍内、リンパ節内など様々な投与方法が試みられている→投与部位／投与方法の説明（非臨床試験から）とその妥当性

・至適用量等

MTDやDLTについてはがんワクチンではこれまで殆ど報告されてこなかったことから、必ずしもMTDやDLTを明らかにすることは求めないこと。また、用量増加方法について従来の3+3用

量を踏襲する必要がない点。

- ・投与スケジュール

長期にわたるワクチン投与（追加免疫の実施）も想定される。投与スケジュールの妥当性の説明。追加免疫では、異なるがんワクチンが投与されることもありうる。

- ・併用薬の記載

後述する免疫活性化薬、免疫抑制解除のための抗体／低分子薬；GM-CSF やインターロイキン2 などの免疫活性化剤。抗CTLA4 抗体、抗PD-1 抗体、抗腫瘍抗原抗体などの抗体医薬品の併用。シクロホスファミドや他の Treg 抑制抗がん剤。TGF-β 等に対するアンチセンスや siRNA などの核酸医薬。

- ・免疫応答性の評価

抗原特異的免疫応答性（MIATA-P；テトラマーアッセイ、エリスポットアッセイ、フローサイトメトリー）の評価のポイントと抗原ペプチドが特製されない場合の対応について。

- ・免疫抑制状態の評価

評価方法:標準抗原を用いた遅延型アナフィラキシー応答性、末梢血 Treg 細胞数、腫瘍内 Treg 細胞数、Treg 細胞のサブタイプの評価。

- ・HLA

適合する HLA 型を有する被験者を対象とするのが一般的であるが、がん抗原タンパク質では HLA 型の特定が出来ないことが想定される。

同じ標的抗原であっても、被験者の HLA 型により選択すべきペプチドが異なる。治験を実施する際は、ペプチド1つ1つではなく血清 HLA グループ型毎（例 A19（A29、A30、A31、A32、A33、A74））で計画するなど工夫が必要。

D.2. がんワクチンの品質管理

有効成分として不均一性が高く比較的精製度の低い抗原（不活化病原体等）が用いられる非組換えの感染症ワクチンとは異なり、がんワクチンでは有効成分として高度に精製された組み換えタンパク質やペプチドが用いられる。これらの品質管理の上で重要となる規格及び試験方法の設定にあたっては、化学合成されたペプチドを有効成分とする場合には、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン Q6A²⁾が参考になる。また、組換えタンパク質やペプチドが有効成分であるが

がんワクチンの品質管理においては、ICH ガイドライン Q6B³⁾及び、既存のバイオ医薬品の規格及び試験方法を参考にすることができる。原薬の規格として設定すべき項目は概ねバイオ医薬品と同様であると考えられるが、バイオ医薬品とがんワクチンとでは、有効成分に求められる生物活性が大きく異なることに注意が必要である。品質管理戦略の構築においては、十分な特性解析により当該医薬品の有効性・安全性を確保するために必要な特性（重要品質特性）を明らかにし、それに基づいた規格及び試験方法を設定することが重要である。バイオ医薬品では有効成分とする組換えタンパク質あるいはペプチドそのものが生理活性物質として薬理作用を発揮することが期待される。このため、薬理作用メカニズムに基づいた適切な生物活性試験（ホルモン類の場合には受容体結合試験、細胞応答性試験など）を構築することにより、有効性に関わる品質特性とその範囲の特定に活用できる。一方、がんワクチンの有効成分である組換えタンパク質やペプチドは、それ自体は薬理作用を発揮せず、抗原提示細胞に提示されることにより、それらのタンパク質を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導あるいは亢進することを目的とする。がんワクチンの場合、*in vivo* においてはがん抗原特異的細胞障害性 T 細胞（Cytotoxic T Lymphocyte；CTL）の誘導が良い薬力学的マーカーとなると考えられている一方で、CTL の誘導を評価できる頑健な *in vitro* 試験系の構築は困難である。がんワクチンの有効成分となる組換えタンパク質の重要品質特性の特定にあたっては、樹状細胞等の抗原提示細胞への取り込みや抗原提示能、ペプチドの場合には MHC との結合能などを指標とした特性解析が有用であると考えられる。また、がんワクチンの薬理作用は種特異性が高いため、*in vivo* の薬理作用との相関を明らかにすることは困難であると思われるが、組換えタンパク質のように複雑な高次構造を有する有効成分の品質管理の上では、これらの *in vitro* の評価系を生物活性試験（示性値）として適用することも有用であると考えられる。

不純物管理の考え方は、化学合成されたペプチドを有効成分とする場合には、ICH ガイドライン Q3A⁴⁾（原薬）、Q3B⁵⁾（製剤）及び Q6A²⁾が参考になる。1 日最大投与量が 2 g 以下の場合には、構造決定の必要な不純物の閾値は 0.10%又は 1 日摂取量 1.0 mg のどちらか低い方、安全性確認の必要な閾値は 0.15%又は 1 日摂取量 1.0 mg のどちらか低い方とされている。一方、組換えタンパク質あるいはペプチドを有効成分とする場合には、不純物管理の考え方はケースバイケースである。

組換えタンパク質医薬品の不純物としては、宿主細胞由来タンパク質 (HCP) 等の「製造工程由来不純物」、凝集体や切断体等の「目的物質由来不純物」が挙げられる。特に分子量の大きい組換えタンパク質を有効成分とする場合には、酸化体や脱アミド体、糖鎖バリエーションなど様々な分子種が混在し、不均一性を有することに留意が必要である。これらの分子変化体の管理の考え方については、ICH ガイドライン Q6B³⁾が参考になる。目的物質に由来する分子変化体のうち、生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質のそれに匹敵する性質を持つものは、「目的物質関連物質」として考える。適切な生物活性試験等に基づく特性解析は、それらが「目的物質関連物質」に該当するか、あるいは「目的物質由来不純物」に該当するかを判断する上で有用である。上に述べたように、がんワクチンの有効成分である組換えタンパク質やペプチドの薬理作用を直接的に評価する生物活性試験系の構築は困難であると思われるが、それらの作用機序に基づいた試験(抗原提示細胞への取り込み、MHC との結合能等)の実施は、管理すべき不純物の特定においても有用であると考えられる。

以上を踏まえて、組換えタンパク質・ペプチドを有効成分とするがんワクチン(原薬)の規格及び試験方法の設定の例と留意事項について表2に記載した。なおがんワクチンの場合、投与時にアジュバントと混合して用いられることが一般的である。従来、アジュバントは製剤の添加物として取り扱われるが、がんワクチンの場合には特に有効性に密接に関与する成分であると考えられるため、アジュバントの規格を独立に設定することも考慮する必要があると考えられる。

E. 結論

1) NIH Clinical Trial に収載されているがんワクチンプロトコルやがんワクチンの臨床試験報告から、がんワクチンによって惹起される抗腫瘍免疫反応を評価するために複数の免疫評価指標が用いることが必要と考えられる。免疫応答性の評価では、がん抗原特異的な細胞障害性 T 細胞やがん抗原特異的なヘルパー T 細胞数の解析、機能解析に加えて液性免疫応答性も評価されることが多い、また、がんによる免疫抑制反応からの解除を目指して抗体医薬や特定の抗がん剤が用いられており、患者の免疫抑制に関わる Treg 細胞数や免疫応答性の強さを評価する目的として遅延型アナフィラキシー応答性などが評価されている。またがんワクチンの投与方法や投与スケジュール、投与量の設定がこれまでの抗がん剤の臨床試験とは異なっていることが明らかになった。2) がんワク

チンでは従来の最大耐性投与量や毒性制限投与量の設定は不要な場合が多いと想定されるが、いくつかの臨床試験では MTD や DLT を主用評価項目や副次評価項目としているプロトコルもある。3) これらの成果に基づいて昨年作成したがんワクチンの評価ガイダンスの素案の再検討を行った。ガイダンスでは臨床初期に絞った記載とし、特に免疫応答に対する評価や投与量の設定などを中心に書き、臨床後期での有効性の評価については、他のがん治療と大きな差異はないと考えられるために簡略な記載とし、がんワクチン特有の留意点のみを記載することとした。

組換えタンパク質・ペプチドを有効成分とするがんワクチンの品質管理においては、規格及び試験方法について概ね既存のバイオ医薬品と同様の考え方が適用できる一方で、生物活性に関する考え方が異なること、それに基づいた重要品質特性の特定と、規格及び試験方法の設定が重要であることを明らかにした。

参考文献

- 1) 原園 景, 橋井則貴, 多田 稔: バイオ医薬品の規格及び試験方法.
Pharm Tech Japan 2012;28:1835-44.
- 2) ICH ガイドライン Q6A
新医薬品の規格及び試験方法の設定
http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6a_01_5_1.pdf
- 3) ICH ガイドライン Q6B
生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定
http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b_01_5_1.pdf
- 4) ICH ガイドライン Q3A
新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン
http://www.pmda.go.jp/ich/q/q3ar_02_12_16.pdf
- 5) ICH ガイドライン Q3B
新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン
http://www.pmda.go.jp/ich/q/q3br_03_6_24.pdf

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
- 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-2 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

図. 1 製品群別のがんワクチンプロトコール数

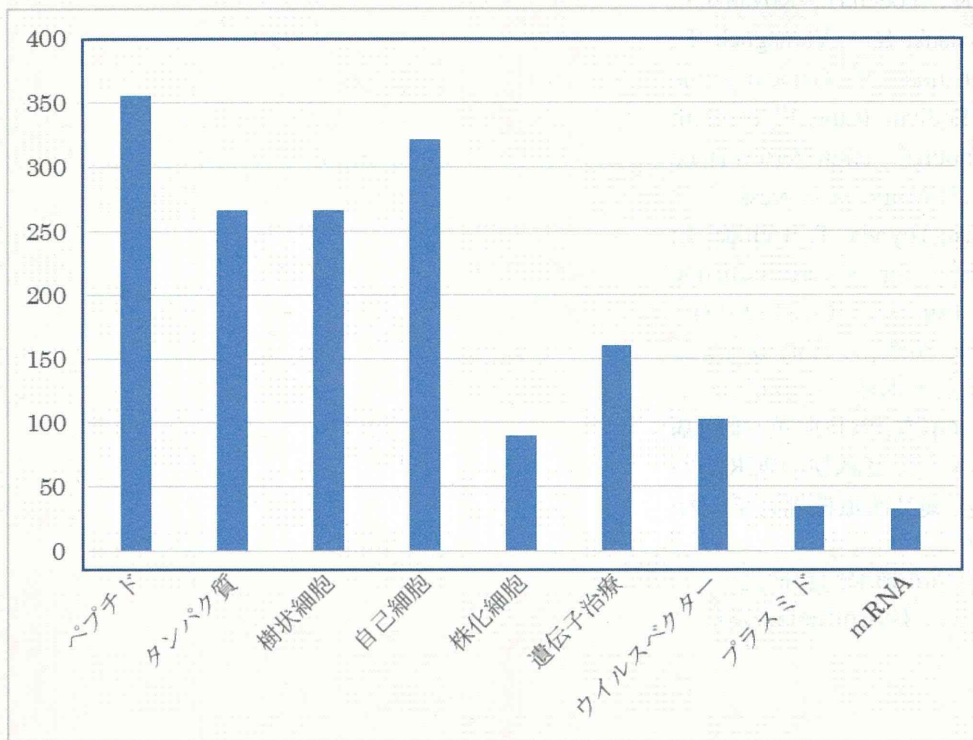


図2. Treg 細胞とその機能分子

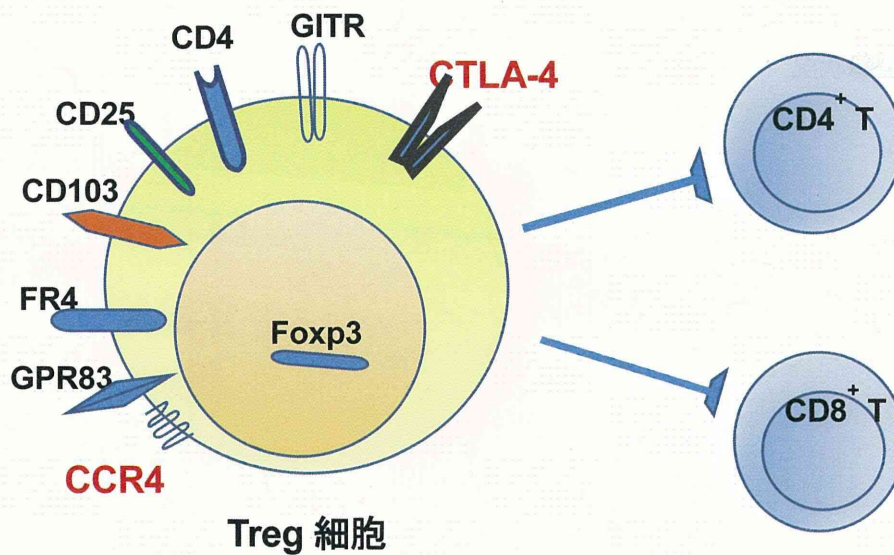


図3.樹状細胞のクロスプレゼンテーションと CTL 活性化

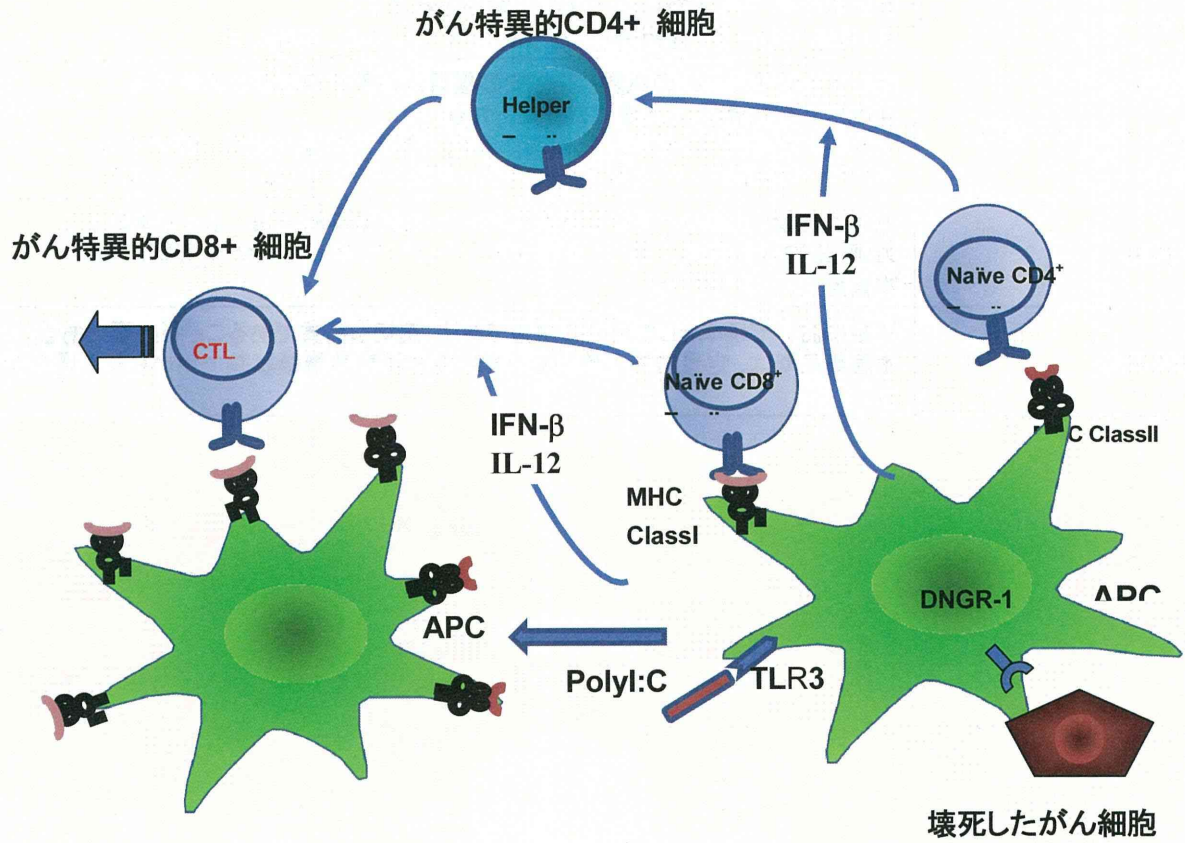


表1 バイオ医薬品の原薬において設定される規格及び試験方法の項目の例

項目	内容
名称	一般的名称(JAN)、国際一般的名称(INN)及び販売名。
構造式	アミノ酸配列並びにジスルフィド結合や糖鎖修飾などの翻訳後修飾の情報を記載する。
分子式及び分子量	その分子式及び分子量を記載する。糖鎖など不均一な修飾を含む場合には、タンパク質部分の分子式及び分子量を記載する。
基原	本質(由来、分類、構造、物性、活性など)を記載する。
含量規格	含量、濃度又は比活性を記載する。
性状	物理的状态(例えば、固体、液体)及び色を定性的に規定する。
確認試験	有効成分などをその特性に基づいて確認するための試験。分子構造上の特徴、特有な性質に基づき設定する。 例)理化学試験:ペプチドマッピング、質量分析;生物学的試験:生物活性;免疫学的試験:ウエスタンブロット法、ELISA
示性値	安定性、有効性及び安全性に関与する物理的・化学的性質等を設定する。
不均一性	翻訳後修飾や構造の不均一性の恒常性を評価する。 例)糖鎖不均一性:糖鎖分析、グリコフォーム分析、単糖分析
純度と不純物の試験	純度を規定するための試験。混在物の種類及びその存在量を測定する。純度は一般に複数の方法にて評価される。 不純物の規格値は、それぞれ個別に及び/または総量で適切に設定する。 例)サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、SDS-PAGE
定量法	成分の含量、力価などを物理的・化学的または生物学的方法によって測定する。 力価:生物学的性質に基づく生物活性(バイオアッセイ、結合性、細胞応答性) 物質質量:タンパク質含量
標準物質	試験において標準として用いる物質であり、適切な品質であることが必要である。バイオ医薬品では、定量法での使用以外に、確認試験や糖鎖試験で用いられる場合がある。

がんワクチン等の品質及び有効性評価手法の検討に関するレギュラトリーサイエンス研究
「ペプチドワクチン等の品質評価手法の検討」

研究分担者 川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長

研究要旨

近年、生体が元来有するがん細胞に対する免疫応答を賦活化することにより抗腫瘍活性を發揮するがん免疫療法に適応される医薬品の開発が進展している。このうちがんワクチンの品質管理においては組換えタンパク質を有効成分とする従来のバイオ医薬品の品質管理の考え方が参考に出来る一方で、がんワクチンに固有の特性を踏まえた品質管理手法の構築が重要であると考えられる。本研究ではがんワクチンの品質管理の考え方を明らかにする目的で、有効成分として用いられる組換えタンパク質およびペプチドの品質管理手法について考察した。

研究協力者

多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第三室 室長

A. 研究目的

抗悪性腫瘍薬として数々の分子標的薬が開発されているが、日本人の死因第一位は依然としてがんであり、長期寛解によりがん患者の QOL を向上できる新薬開発のニーズは高い。近年、がん細胞を直接的に殺傷することを目的とした従来の抗悪性腫瘍薬とは異なり、生体が元来有するがん細胞に対する免疫応答を賦活化することにより抗腫瘍活性を發揮するがん免疫療法に適応される医薬品の開発が進展している。がんワクチン療法は、腫瘍細胞に発現する分子等をワクチンとして投与することにより、腫瘍細胞に対する患者の免疫応答を賦活化して腫瘍の退縮を図るものである。米国では 2010 年に、患者から採取した樹状細胞にがん抗原を提示させたものを有効成分とする PROVENCE (sipuleucel-T) が前立腺癌の治療薬として承認されているほか、がん細胞に発現するタンパク質やその部分ペプチドを有

効成分とする医薬品の開発が国内外で進められている。

本研究ではがんワクチンの品質管理の考え方を明らかにする目的で、有効成分として用いられる組換えタンパク質およびペプチドの品質管理手法について考察した。

B. 研究方法

各種ガイドライン及び文献情報等を参考にバイオ医薬品の規格及び試験方法についてまとめた。これをもとにがんワクチンの有効成分として用いられる組換えタンパク質およびペプチドの品質管理手法について考察した。

（倫理面への配慮）

本研究は調査研究であるため、倫理面への配慮を必要としない。

C. 研究結果

がんワクチンの有効成分として用いられる組換えタンパク質及びペプチドの品質管理にあたっては、バイオ医薬品（組換えタンパク質医薬品）

で設定される規格及び試験方法が参考にできる。以下ではバイオ医薬品の規格及び試験方法を参考に、組換えタンパク質及びペプチドにおいて設定することが予想される規格及び試験方法について概説する。

規格及び試験方法は、品質管理のための方策の一部であり、品質は、原材料の管理、適切な製造工程の設定および管理などとあわせて全体として確保される。規格及び試験方法は、試験項目、分析方法および規格値／判定基準からなり、試験項目は、医薬品の有効性および安全性を確保するために必要な特性（重要品質特性）と、その範囲および分布が確認できることを考慮して選択される。製造工程で生じる特性の変化の範囲、医薬品の安定性及び有効性・安全性との関連等を明らかにすることにより、重要品質特性の範囲や分布が設定され、適切な規格及び試験方法を設定することが可能となる。表1にバイオ医薬品の原薬において設定される規格及び試験方法の項目の例を示す。製剤においては、同様の項目が設定されることが多いが、添加剤による試験への影響や製剤化工程により生じる変化を勘案して適宜項目が追加・簡略化されるほか、製剤試験として、無菌試験、エンドトキシン試験、不溶性微粒子試験および不溶性異物検査、質量偏差試験／含量均一性試験、ならびに凍結乾燥製剤に対する含湿度試験などが設定されることもある。組換えタンパク質医薬品は一般的に不安定であり、保存中に力価の低下や分解物および変化物が生じる可能性がある。そこで、外観、純度、力価およびその他の分子特性など複数の指標により安定性評価が可能となるよう適切に規格及び試験方法を組み合わせることが必要である。以下に、主な項目の概略を述べる。

(1) 構造式

ペプチドおよびタンパク質性医薬品では、アミノ酸配列に加えて、ジスルフィド結合および糖鎖などの翻訳後修飾の構造およびその結合部位などを明記する。

(2) 分子式と分子量

均一なペプチドおよびタンパク質性医薬品では、分子式および分子量を記載する。糖鎖修飾などの翻訳後修飾により、分子式や分子量が不均一な場合は、タンパク質部分の分子式・分子量のみを記載し、修飾を含むおおよその分子量は、基原に記載する。

(3) 性状

固体、液体などの形状および色についての定性的な記述が必要である。保存中に変化する場合には、その変化について検討を行い、適切な規格を設定する。

(4) 確認試験

確認試験は、有効成分などをその特性に基づいて確認する試験である。類似した構造をもつ物質と識別できるような特異性の高い方法が望ましい。純度試験や定量試験など確認試験以外の試験と内容が重複する場合は、確認試験として設定する必要はない。確認試験は有効成分の特性を考慮して2つ以上設定すべきとされている。理化学手法としては、ペプチドマッピング、質量分析などが、免疫学的手法としては、ウエスタンブロット法やELISAなどが利用される。通常バイオ医薬品では生物学的手法として、動物や細胞を用いた方法、酵素活性および結合性などを利用した方法が用いられるが、がんワクチンの場合にはこれらの生物学的手法を用いた試験の設定が困難な場合も想定される(考察の項を参照)。

(5) 示性値

示性値に相当するものとして、等電点、分子量・分子サイズ、分子吸光係数、アミノ酸組成、比活性、結合性、アイソフォームの不均一性、N末端の不均一性、糖含量、および糖鎖プロファイルなどがあげられる。医薬品の有効性および安全性を確保するために、必要に応じて、等電点、アミノ酸組成、比活性、糖鎖不均一性などのように設定する。確認試験、純度試験として設定されることもある。

(6) 純度および不純物試験

純度試験は、目的物質の純度、もしくは混在物の種類およびその量を規定する試験である(ウイル

ス等を除く)。組換えタンパク質医薬品に含まれる不純物は、製造工程由来不純物、目的物質由来不純物（保存中の分解物および変化物を含む）および混入汚染物質に分類される。組換えタンパク質医薬品は保存中に変化しやすいことを考慮し、分解物や凝集体等の評価が可能な試験方法を設定する必要がある。また、組換えタンパク質医薬品においては、糖鎖付加、酸化や脱アミド化などの分子変化、あるいはそのほかに起因する不均一性が存在するため、純度を決定することは容易ではなく、得られる純度は試験方法に依存したものである。一般的に複数の方法により評価する。不純物に関する規格値は、不純物ごとに個別に、もしくは不純物の総量で設定される。製剤化工程において生じる不純物については、製剤において管理する。

(7) 定量法

定量法では、成分の含量をタンパク質含量や力価として適切な方法を用いて測定する。定量法として分解物および変化体などに対する特異性が十分でない場合は、適切な純度試験とあわせて、規格全体として有効成分含量を測定できるものとなるよう考慮する。製剤の場合には、添加物や保存中に出現する分解生成物によって妨害されることのない特異的な原薬含量の測定法を設定する必要がある。タンパク質含量は、日本薬局方第十六改正（日局）一般試験法<2.04>たん白質のアミノ酸分析法、<2.01>液体クロマトグラフィー、または参考情報 たん白質定量法、を参考に測定することができる。

(8) 力価

力価とは、生物学的性質に関連する特性に基づいて、適切な生物学的試験により測定され、生物活性を定量的に表す尺度のことである。組換えタンパク質医薬品の力価は、適切な標準物質／標準品を基に検定した活性の単位で表わされることが多い。力価の測定は、定量試験のほか、目的物質が意図する生物活性を有することの確認を目的として実施される。目的物質が適切な高次構造を保持していることの推定にもなる。おのおのの

医薬品によりその生物活性は異なることから、それぞれの医薬品において適切な試験方法を構築する。生物活性は、その作用または作用機序に基づいて、結合性試験（リガンド—受容体結合など）、生化学的試験（酵素反応など）、細胞応答性試験（細胞レベルでの生化学的または生理学的応答）、*in vivo* 試験（生体の生物学的応答）などにより測定される。力価と臨床効果との相関は、薬力学試験または臨床試験において確認しておく必要がある。がんワクチンの場合には臨床効果と相関のある力価試験を設定することが困難な場合があることに留意すべきである（考察の項を参照）。

(9) 標準物質／標準品

標準品あるいは標準物質は、定量、確認試験または純度試験において基準として用いるために調製された物質であり、目的の用途に適した品質を有している必要がある。組換えタンパク質医薬品では、構造の複雑さおよび不均一性などにより、適切な試験の規格／判定基準を設定することが難しい。また、操作条件ならびに使用する試薬のわずかな変化が分析結果に影響を及ぼしうることから、操作が適切に行われていることの評価が必要である。そこで、定量法に加え、さまざまな試験で、標準物質を試料と同様に操作し、得られた結果を利用することにより試験結果を評価することが多い。組換えタンパク質医薬品の力価は、適切な標準物質の力価に関係づけて表すべきであり、生物学的試験において、標準物質／標準品の設定は特に重要である。「国際標準品」や「国内標準品」が入手可能であれば、それらを利用可能である。また、代表的な生産ロットから調製し、適切な特性解析を行ったものを用いて、「国際標準品」や「国内標準品」を参照として検定を行い、「自家標準物質」を確立することができる。「標準品」が存在しない場合は、適切に特性解析がなされた「自家標準物質」を確立する必要がある。標準物質／標準品の新設・更新にあたっては、十分に特性解析を行うとともに、力価の連続性の確保ならびにトレーサビリティを考慮することが重要である。