

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）
分担研究報告書

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 PROVENGE（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¹⁾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。

D. 考察

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

本研究では、バイオ医薬品の規格及び試験方法をもとに、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・ペプチドの品質管理手法について考察した。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。

F. 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

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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	物理的状態(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關与する物理的・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、グライコフォーム分析、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。

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、濃度を記載する。	がんワクチンにおいては比活性を規格とすることは困難であると考えられる。
性状	物理的状態(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。	
示性値	安定性、有効性及び安全性に關与する物理的・化学的性質等を設定する。	がんワクチンの場合、管理すべき品質特性の特定において留意が必要。抗原提示細胞への取り込み、抗原提示能等を評価する生物活性試験が有用な場合もある。
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。	
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。	
定量法	成分の含量を物理的・化学的方法によって測定する。	がんワクチンにおいては生物活性(力価)を定量法とすることは困難であると考えられる。
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。	

表2 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において設定することが想定される規格及び試験方法の項目の例