

用医薬品に対しては、対象動物や使用時期その他使用者が遵守すべき事項が定められていることである。

抗生剤、合成抗菌剤、寄生虫駆除剤などの動物用医薬品が対象となっており、使用方法、使用量、使用禁止期間な

どの使用基準が定められている。

また食品衛生法で食品中の残留基準が定められており、残留基準値を超えて医薬品が残留した場合、回収や廃棄の対象となる。

(奥田晴宏)

第5章 第1節 製品領域ごとに見る関連規制と対応の留意点

[2] バイオ医薬品（組換えタンパク質医薬品）の
品質関連規制と対応の留意点

石井 明子

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第2室 室長 博士(薬学)

川崎 ナナ

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長 薬学博士

(株)技術情報協会

2014年4月発刊

「最新動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術」抜刷

第1節 [2] バイオ医薬品（組換えタンパク質医薬品）の品質関連規制と対応の留意点

はじめに

組換えタンパク質を有効成分とするバイオ医薬品は、目的物質の遺伝子を導入した細胞の培養により製造されるもので、これまでにエリスロポエチン、インターフェロン、抗体医薬品等、医療上重要な多くの製品が上市されている。バイオ医薬品の品質管理では、その複雑な品質特性と有効性・安全性の関連を理解し、原材料管理、工程パラメータ管理、工程内管理試験、規格及び試験方法等からなる品質管理戦略を適切に構築することが肝要である。バイオ医薬品の製造に用いられる細胞は、細胞基材と呼ばれ、原材料の一つに位置付けられる。細胞基材の特性や培養工程パラメータは、生産される組換えタンパク質の翻訳後修飾や不純物プロファイル等に影響するため、それらの管理は、最終製品の品質の確保において重要な要素となる。本節では、バイオ医薬品製造に用いられる細胞基材、バイオ医薬品の品質関連規制、及び、バイオ医薬品の品質管理における細胞培養関連の留意事項について概説する。

1. バイオ医薬品の製造に用いられる細胞基材

バイオ医薬品の製造工程は、目的物質の遺伝子を導入した細胞から、医薬品製造に適したクローンを選択、増幅して作製したセル・バンクから始まる。種培養～拡大培養、生産培養、培養上清の回収、精製、製剤化が、バイオ医薬品製造の主なステップである（図1）。

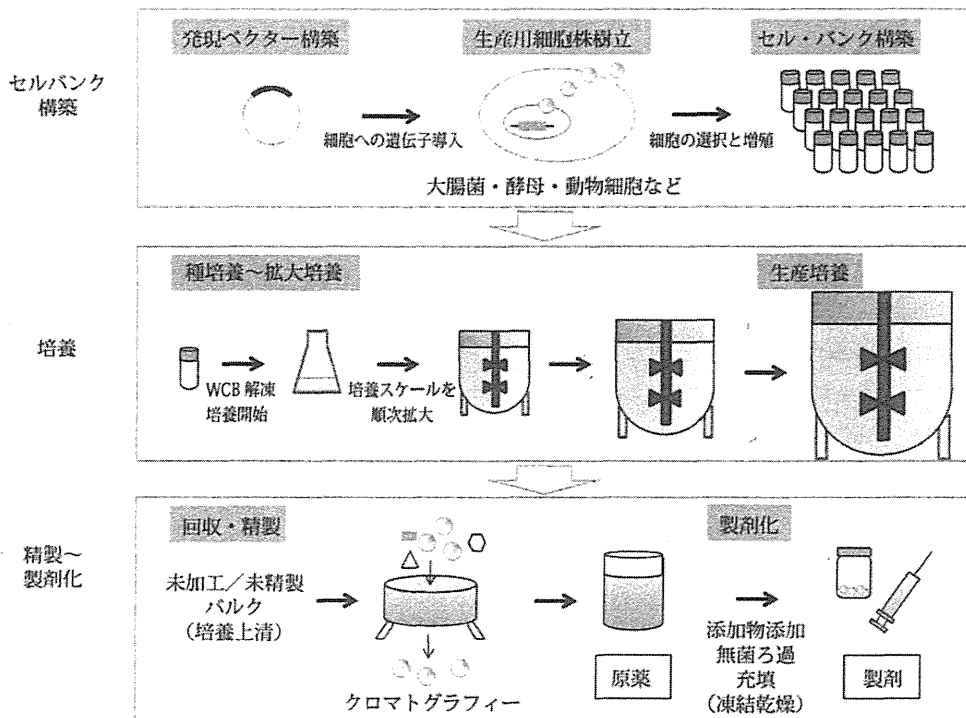


図1 バイオ医薬品の製造工程概略

バイオ医薬品の製造には、これまで、動物細胞、大腸菌、酵母の他、昆虫細胞、植物細胞等が用いられている。日本で現在市販されているバイオ医薬品の製造に用いられている細胞の内訳を図2に示した¹⁾。動物細胞を用いて製造される品目が半数以上である。動物細胞は、糖タンパク質の製造に適用可能なことが特徴で、近年、開発品目の増加が著しい抗体医薬品等の製造に用いられている。動物細胞の内訳では、CHO細胞が最も多く、全体の約3分の2を占めている。

後述するように、動物細胞を用いる場合、大腸菌や酵母等の微生物では必要とされないウイルス安全性確保の対策が必要となる点に注意が必要である。

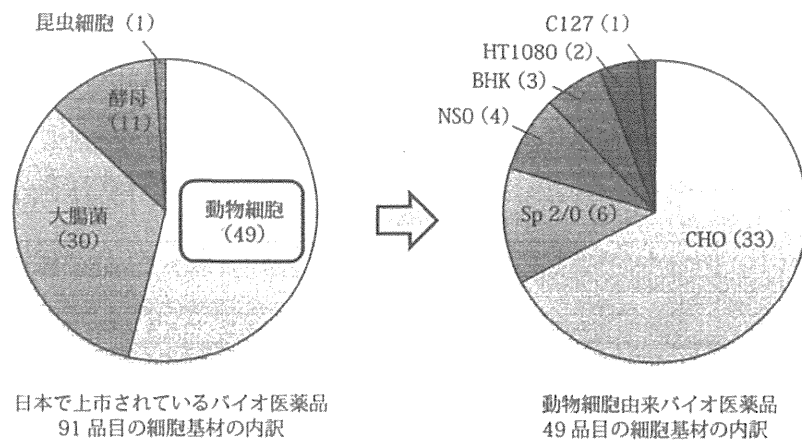


図2 バイオ医薬品の製造に用いられている細胞基材

2. バイオ医薬品の品質関連規制

2.1 バイオ医薬品の品質管理に関するガイドライン

バイオ医薬品の品質関連の規制文書として、表1に示すようなガイドライン類が整備されている²⁾。平成17年までに整備されたICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）ガイドラインQ5シリーズ、及び、Q6Bにおいて、バイオ医薬品に特化した品質管理の考え方が示されている。その後に策定されたQ8～Q11ガイドラインでは、リスクマネジメントの考え方を取り入れた品質管理戦略の構築を含む考え方が述べられており、原材料、原薬、製剤を評価対象とした各論であるQ5シリーズ及びQ6Bをベースに、Q8～Q11を参照することで、品質特性と有効性・安全性を科学的に関連付けた合理的な品質管理戦略の構築が可能となる。また、日本独自の指針として、感染性物質の混入回避のために、生物由来原料基準が定められている。その他、プロセスバリデーション、GMP、承認申請書の記載に関しても、参考となるガイドライン類が策定されている。これらの他に、我が国に流通する医薬品の品質に関する規範書である日本薬局方には、バイオ医薬品の品質評価に用いられる試験法のいくつかについて、基本的な考え方や留意事項がまとめられており、特性解析の実施や、規格及び試験方法の設定の際には、有用な参考資料となる。

2.2 バイオ医薬品の品質管理

医薬品の品質管理の目的は、医薬品の品質特性を一定の範囲内に保つことにより、開発過程で確認された有効性・安全性を、市販後も継続して保証することにある。図3に示すように、品質管理戦略の構築においては、製造された原薬及び製剤について、特性解析を実施して品質特性を明らかにすること、特性解析結果、及び、非臨床・臨床試験結果や文献情報等の知見をもとに、有効性・安全性を担保するために優先的に管理すべき品質特性（重要品質特性）を選択し、その管理目標を設定すること、さらに、重要品質特性の管理戦略を構築すること、が中心的課題となる。品質管理戦略は、通例、原材料管理、工程パラメータ管理、プロセス評価、工程内管理試験、原薬／製剤の規格及び試験方法等から構成される。

表1 バイオ医薬品の品質管理に関する主なガイドライン類

分類		ガイドライン・通知・事務連絡		
特性解析, 品質管理		ICH Q6B	平成 13 年 5 月 1 日 医薬審発第 571 号	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
原材料	遺伝子発現構成体	ICH Q5B	平成 10 年 1 月 6 日 医薬審第 3 号	組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析について
	セル・バンク	ICH Q5D	平成 12 年 7 月 14 日 医薬審第 873 号	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）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について
	生物由来原料		平成 15 年 5 月 20 日 厚生労働省告示第 210 号	生物由来原料基準
			平成 21 年 3 月 27 日 厚生労働省審査管理課事務連絡	生物由来原料基準の規定を満たさないマスター・セル・バンク又はマスターシードを使用した医薬品等の取扱いについて
		平成 21 年 3 月 27 日 厚生労働省審査管理課事務連絡	生物由来原料基準に規定する原材料の取扱いについて	
原材料・工程管理	ウイルス安全性	ICH Q5A	平成 12 年 2 月 22 日 医薬審第 329 号	ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について
製法変更	同等性/同質性評価	ICH Q5E	平成 17 年 4 月 26 日 薬食審査発第 0426001 号	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）の製造工程の変更にもなる同等性/同質性評価について
製法開発	原薬の製造と開発	ICH Q11	平成 23 年 6 月 28 日 厚生労働省医薬食品局審査管理課	原薬の開発と製造（化学薬品とバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）ガイドライン（案）
	製剤開発	ICH Q8	平成 22 年 6 月 28 日 薬食審査発第 0628 第 1 号	製剤開発に関するガイドラインの改定について
品質管理システム	品質リスクマネジメント	ICH Q9	平成 18 年 9 月 1 日 薬食審査発第 0901004 号 薬食監麻発第 0901005 号	品質リスクマネジメントに関するガイドライン
	品質システム	ICH Q10	平成 22 年 2 月 19 日 薬食審査発 0219 第 1 号 薬食監麻発 0219 第 1 号	医薬品品質システムに関するガイドラインについて
プロセス・バリデーション	バリデーション基準		平成 17 年 3 月 30 日 薬食監麻発第 0330001 号	薬事法及び採血及び供血あつせん業取締法の一部を改正する法律の施行に伴う医薬品、医療機器等の製造管理及び品質管理（GMP/QMS）に係る省令及び告示の制定及び改廃について
GMP	原薬の GMP	ICH Q7	平成 13 年 11 月 2 日 医薬発第 1200 号	原薬の GMP ガイドラインについて
承認申請書	承認申請書における製造工程の記載		平成 17 年 2 月 19 日 薬食審査発第 0210001 号	改正薬事法に基づく医薬品等の製造販売承認申請書記載事項に関する指針について
承認申請添付資料	CTD における製造工程の記載	ICH M4Q	平成 15 年 7 月 1 日	医薬品の承認申請のための国際共通化資料 コモン・テクニカル・ドキュメント CTD - 品質に関する文書の作成要領に関するガイドライン
特性解析規格及び試験方法			平成 23 年 3 月 24 日 厚生労働省告示第 65 号	第十六改正日本薬局方
			平成 26 年 2 月 28 日 厚生労働省告示第 47 号	第十六改正日本薬局方第二追補

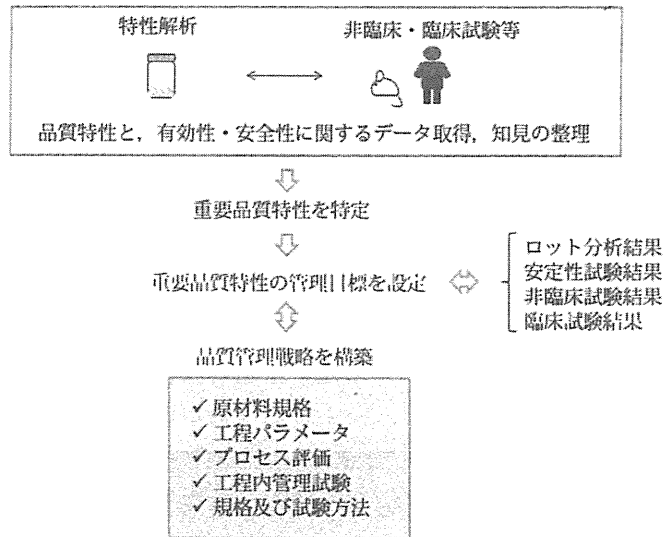


図3 バイオ医薬品の品質管理戦略構築の流れ

2.2.1 特性解析

バイオ医薬品の開発過程では、製造された原薬あるいは製剤について、構造、物理的・化学的性質、生物学的性質、免疫化学的性質、純度及び不純物に関する広範かつ詳細な特性解析を行い、その特性を明らかにする。表2に、バイオ医薬品の品質特性として代表的なものを示した。品質特性は、原薬／製剤に含まれる目的物質の分子変化体や、それらの物理的・化学的性質、あるいは、存在が想定される不純物等として表される。

表2 バイオ医薬品原薬の品質特性の例

有効成分関連	製造工程由来不純物 混入汚染物質関連
アミノ酸配列 (N/C 末など) ジスルフィド結合 高次構造 糖鎖 脱アミド体 酸化 糖化 凝集体 断片	宿主細胞由来タンパク質 宿主細胞由来 DNA 培地成分 緩衝液成分 カラム樹脂 (protein A など) 試薬 エンドトキシン 微生物 ウイルス

2.2.2 重要品質特性の特定と許容範囲設定

特性解析により明らかになった各品質特性について、非臨床・臨床試験で得られたデータや、関連する製品の情報等をもとに、有効性・安全性との関連付けを行う。その際、各品質特性について、生物活性、薬物動態、薬理作用、抗薬物抗体産生、有害事象発生等への影響と、その不確かさを考慮したリスク分析が有用である³⁾。リスク分析結果に基づき、優先的に管理すべき重要品質特性を特定する。重要品質特性が特定されれば、ロット分析結果、安定性試験結果、非臨床・臨床試験結果をもとに、有効性・安全性を担保できる範囲として、各々の重要品質特性の管理の目標を設定する。

2.2.3 品質管理戦略の構築

品質管理戦略は、重要品質特性が許容範囲に収まるよう、原材料の管理、工程パラメータ、プロセス評価、工程内管理試験、規格及び試験方法等を組み合わせて構築する。工程ごとに重要品質特性への影響、逸脱の頻度・検出性を考慮して管理方法を選択し、組み合わせる手法が有用である。品質管理戦略構築の際には、重要品質特性に影響する原材料特性、工程パラメータ等を明らかにし、それらの許容範囲を設定する。工程内管理試験は、培養上清や中間体等を対象に実施される試験であり、主として、原薬での試験より上流での管理が合理的である品質特性の管理に用いられる。工程内管理試験を実施することにより、製造工程の途中の段階で、製品の品質特性が目標とする管理の範囲内にあることを確認することができる。規格及び試験方法は、原薬及び製剤を対象に、重要品質特性が許容範囲内にあることを直接確認するもので、品質管理戦略の要である。規格及び試験方法は、出荷判定にも用いられる。

品質管理戦略として、一つの品質特性について、上記の管理手法のうち、複数のものが設定されることが多く、例えば、重要品質特性とされた糖鎖構造を、原材料の管理、工程パラメータの管理、並びに、規格及び試験方法により管理する、という戦略が考えられる。

設定された管理戦略の妥当性及び工程の再現性は、プロセスバリデーションにより確認する。プロセスバリデーションでは、原則3ロットの実生産スケールでの製造を行い、設定された稼働条件で、製造工程の各パラメータ、工程内管理試験結果、及び、製造された原薬及び製剤の特性が、予め設定された範囲内に入ることを確認する。

3. バイオ医薬品の品質管理における細胞培養関連の留意事項

バイオ医薬品の品質管理において、細胞基材及び培養工程に関連して、特に留意すべきポイントを表3にまとめた。これらは、2.2.3で述べた品質管理戦略の要素のうち、原材料の管理、工程パラメータ管理、工程内管理試験に相当する。

表3 バイオ医薬品の製造工程における細胞培養関連の留意事項

<p><u>原材料管理</u></p> <p>遺伝子発現構成体</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 構築過程, 塩基配列, 細胞構築の履歴の保存 <p>セルバンク</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ MCB, WCB の構築 ✓ 特性解析試験, 純度試験 (ウイルス試験を含む), 安定性評価 ✓ 医薬品生産に用いることのできる世代数の規定 ✓ 更新方法及び更新時の基準の設定 <p>培地・培地添加物</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 市販品であっても受け入れ基準を設定し, 原材料特性の一定性を確保 <p>生物由来原料基準への適合性</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 細胞, 培地添加物等 <p><u>工程パラメータ</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 重要工程パラメータの特定と範囲設定 <p><u>工程内管理試験</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 必要に応じ, 生産されるタンパク質の特性に関する試験, ウイルス試験等の設定 <p><u>ウイルス安全性</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ セルバンクのウイルス試験 ✓ 未加工/未精製バルクのウイルス試験 ✓ 細胞以外の生物由来原料の管理 <p><u>製法変更時の対応</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 同等性/同質性評価
--

3.1 原材料の管理

バイオ医薬品製造の原材料には、培養工程で用いる細胞（遺伝子発現構成体が導入されたもの）、培地、培地添加物、精製・加工工程で用いる試薬類、カラム樹脂、水等がある。原材料の特性は、最終製品の品質特性に影響するため、原材料特性と製品の品質特性の関連を明らかにし、原材料に関しても、適切な基準を設定して管理する必要がある。

3.1.1 遺伝子発現構成体

組換えタンパク質をコードする配列を含むベクターは、遺伝子発現構成体とよばれる。遺伝子発現構成体の特性は、目的物質の構造や発現量に影響するため、細胞基材の構築に用いられる遺伝子発現構成体は、構築過程、及び、全塩基配列が明らかなものでなければならない。遺伝子導入に始まる細胞基材の構築過程を含めて、情報を適切に整理、保管しておく。

3.1.2 セル・バンク

細胞基材の特性は、目的物質の翻訳後修飾構造や不純物プロファイルに影響するため、バイオ医薬品の品質の恒常性確保のためには、各製造バッチで同じ細胞基材を用いることが望ましい。そのため、目標とする組換えタンパク質の生産に適した細胞株として樹立された細胞基材をセル・バンク・システムにより管理し、開発段階から市販後まで、常に単一の細胞プールに由来する細胞から製造工程を開始する。通例、セル・バンクとして、マスター・セル・バンク (MCB)、及び、ワーキング・セル・バンク (WCB) の2種類が作製される。

(1) セル・バンクの評価・管理

作製された MCB, WCB については、特性解析試験、及び、純度試験により、その特性を明らかにし、医薬品製造に適した細胞であることを確認する (表4)⁴⁾。特性解析試験では、宿主細胞の確認、遺伝子発現構成体が導入され、目

的物質が発現していることの確認、ならびに、細胞に保持されている遺伝子発現構成体の配列やコピー数の解析等を行う。純度試験では、微生物学的純度、及び、他の細胞の混入に関して試験を行い、ヒト・動物細胞では、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、ウイルス安全性試験（後述）等を実施する。

また、生産に使用可能な *in vitro* 細胞齢を規定し、*in vitro* 細胞齢の上限を超えて培養した細胞（CAL：cells at the limit of *in vitro* cell age used for production）についても同様の試験を行い、各バッチの培養期間を通じた細胞基材の安定性を確認する。バンクの凍結保存中の安定性についても評価が必要であるが、保存期間が長期にわたるため、予め保存期間を設定することは現実的でない。定期的にバンクの一部を解凍して予め設定された基準に適合することを評価し、継続して保存・使用が可能であることを確認していく。

(2) セル・バンクの更新

MCB, WCB の使用予定に応じて、更新方法、及び、更新時の規格を設定する。通例、WCB の更新は MCB から行われる。MCB は更新予定がないとされる場合もある。医薬品の供給が途絶えることがないように、不測の事態に備えて、バンクは複数の施設に分割して保存する。

表4 セル・バンクの評価・管理（主な試験項目の例）

	遺伝子発現構成体	特性解析試験	純度試験	保存中の安定性、及び培養期間中の安定性
MCB	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 目的タンパク質をコードする部分の塩基配列 ➢ 遺伝子発現構成体のコピー数、挿入と欠失、組込み部位の数 ➢ プラスミド保持率（染色体外発現の場合） 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 目的タンパク質の発現 ➢ アイソザイム解析等による由来する種の確認 ➢ 選択培地での増殖 ➢ 生存率 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 細菌・真菌の否定試験 ➢ マイコプラズマ否定試験 ➢ 内在性及び非内在性のウイルスに関する試験 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 保存期間
WCB	—	—	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 細菌・真菌の否定試験 ➢ マイコプラズマ否定試験 ➢ 外来性ウイルスに関する試験 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 保存期間 ➢ 目的タンパク質発現の安定性
CAL	➢ MCB と同じ内容の試験	—	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 内在性及び外来性ウイルスに関する試験 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 目的タンパク質発現の安定性

3.1.3 培地、及び、培地添加物

培地や培地添加物は、細胞の増殖や産生される組換えタンパク質の特性に影響する。市販品を使用する場合でも、受け入れ基準等を設定して管理し、原材料特性が一定に保たれるよう、留意する。

3.1.4 生物由来原料基準への適合性

ウイルス等のヒト感染性物質の混入を回避するため、バイオ医薬品の製造に用いる生物由来原料は、生物由来原料基準に適合したものをを用いる。生物由来原料に該当するものとして、細胞、培地成分、培地添加物等が考えられる。

生物由来原料基準では、細胞の入手方法について明らかにすること、細胞株や培養終了後の細胞についてウイルス試験を行うこと等が求められている。細胞以外の生物由来原料についても、健康な動物に由来するものであること、製造工程で真菌・細菌・ウイルス等を不活化又は除去する処理を行うこと等が必要とされている。また、各原材料については、品質及び安全性の確保上必要な情報が確認できるよう、原材料の作製の記録やロット番号を保存することが求められている。ウシ由来の原材料については、伝達性海綿状脳症伝播の回避のため、使用可能な原産国が限定されている。

生物由来原料基準に適合しない原材料は、薬事食品衛生審議会における個別製品毎のリスク評価等を経て、承認書に記載した上で使用可能な場合があるが、製品の添付文書での情報提供が必要となる。血清については、マスター・セル・バンク樹立の際にのみ用いられた場合は、一定の要件が満たされれば、添付文書への記載は求められない。

最近では、無血清培養によるバイオ医薬品製造が一般的になっており、製造工程で血清を用いるケースは減っている。細胞以外に生物由来原料を使わない製造方法を確立することは、製品への感染性物質混入の危険を低減することのみならず、品質管理の合理化にもつながると考えられる。

3.2 工程パラメータ管理

細胞培養工程において管理すべき工程パラメータの例として、温度、培地添加物濃度、溶存酸素濃度、溶存二酸化炭素濃度、pH、攪拌速度、細胞密度、生存率、培養時間等があげられる。培養工程のパラメータと品質特性や工程特性との関連については、培地成分濃度と糖鎖付加パターン、溶存酸素濃度と糖鎖付加の割合、剪断応力あるいは溶存二酸化炭素濃度と目的物質発現量の関連等、多数の例が報告されており、培養工程のパラメータは、種々の品質特性に影響する重要な要素である⁵⁾。

重要品質特性を一定の範囲に保つために優先管理すべき工程パラメータ（重要工程パラメータ）の特定には、重大性、頻度、検出性を考慮したスコア付の手法を用いることができる。各パラメータの許容範囲は、それまでの製造実績や一つの工程パラメータを変動させた一変量実験、あるいは、複数の工程パラメータを変動させた多変量実験の結果に基づいて設定する。複数のパラメータの相互の関係が品質特性に影響する場合、工程パラメータの許容範囲は、複数の工程パラメータの組合せからなるデザインスペースとして設定する。

3.3 工程内管理試験の設定

工程内管理試験は、培養上清や中間体等を対象に実施される。工程内管理試験を実施することにより、製造工程の途中の段階で、製品の品質特性が目標とする管理の範囲内にあることを確認することができる。細胞培養工程で行われる工程内管理試験の例として、生産培養終了後の培養上清（未加工/未精製バルク）のウイルス試験があげられる。生産される組換えタンパク質の特性に関する試験等も、必要に応じ、設定される。工程内管理試験として設定されない場合でも、適宜、モニタリングを実施することが工程の恒常性を確認するために有用である。

3.4 ウイルス安全性

バイオ医薬品では、これまでにウイルス汚染による健康被害の報告はないが、動物細胞はヒト感染性ウイルスの宿主になり得ること、培養工程で原材料等からウイルスが混入し、増幅される可能性も想定されることから、製造工程への感染性因子混入は避けなければならない。培養工程でウイルス混入事故が生じると、製造の停止、原因の究明、除染等に、多大な時間と労力が費やされるばかりでなく、医薬品の供給停止にもつながる。過去に、ウイルス汚染事故が何件か起きており、製品の供給停止に至った例もあることから⁶⁾、ウイルス安全性の確保は、製品の安全性確保と安定供給の両側面から重要である。

ウイルス安全性確保の対策は、主として、①セル・バンクのウイルス試験、②未加工/未精製バルクのウイルス試験、③精製工程のウイルス不活化/除去能の評価、からなる。①セル・バンクのウイルス試験では、評価対象となるウイルス、及び、試験方法、試験すべき細胞、試験検体について、表5に示す内容が推奨されている。②未加工/未精製バルクのウイルス試験では、表5の試験法のうち、*in vitro*試験が主に用いられる。③は、培養工程で万が一ウイルスの混入があった場合でも、最終製品にウイルスが混入しないよう、モデルウイルス等を用いて、精製工程のウイルス除去

表5 ウイルス試験の概要

評価対象	試験方法	試験すべき細胞	試験検体
レトロウイルス 及び 内在性ウイルス	感染性試験	MCB, CAL	細胞を含まない培養上清
	電子顕微鏡観察	MCB, CAL	生細胞/ 細胞を含まない培養上清
	逆転写酵素活性	MCB ^a , CAL ^a	細胞を含まない培養上清
	細胞種特異ウイルス試験	MCB ^b , CAL ^b	
非内在性ウイルス 及び 外来性ウイルス	<i>In vitro</i> 試験	MCB, CAL	溶解処理後の細胞/培養液
	<i>In vivo</i> 試験	MCB, CAL	溶解処理後の細胞/培養液
	抗体産生試験	MCB ^c	溶解処理後の細胞/培養液
	細胞種特異的ウイルス試験	MCB ^b	

a：レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要

b：細胞株の起源・由来から存在が予測されるウイルスを検出するための試験を適宜実施

c：げっ歯類由来の細胞について試験法が確立されている

CHO, C127, BHK 細胞等では、内在性レトロウイルス様粒子の存在が知られている。
(ウイルス汚染に起因する安全上の問題は報告されていない。)

不活化能を定量的に評価しておくものである。詳細については、ICH Q5A ガイドラインに記されており、生物由来原料基準におけるウイルス試験に関する要求事項もこれに合致している。

セル・バンク以外の原材料についても、ウイルス安全性が確保されたものを用いる必要があることは言うまでもない。過去に海外で起こった培養工程のウイルス汚染事故では、血清等の生物由来原料が汚染源であったとされており⁶⁾、ウイルス安全性確保には、その他の原材料の管理も重要である。

3.5 製造方法の変更前後での同等性/同質性評価

上記のような留意事項を踏まえて、品質管理戦略が構築されるが、バイオ医薬品の開発過程や市販後には、新技術の導入や製造規模の拡大のため、製造に用いる原材料や工程パラメータが変更されることがある。バイオ医薬品の品質は製造工程の影響を受けるため、それまでに実施した有効性・安全性の評価結果が、製法変更後も引き続き有効であることを示すために、ICH Q5E ガイドラインに従い、製法変更前後の製品について同等性/同質性評価を行う必要がある。

同等性/同質性とは、必ずしも変更前後の製品の品質特性が全く同じであるということの意味するものではなく、変更前後の製品の類似性が高いこと、ならびに、品質特性に何らかの差異があったとしても、既存の知識から最終製品の安全性や有効性には影響を及ぼさないであろうことが十分に保証できることを意味する。ICH Q5E では、いくつかのケースに分けて同等性/同質性評価における対応が示されている（図 4）。品質の比較試験により、製法変更前後での同等性/同質性が担保されない場合、開発ステージに応じて、非臨床試験や臨床試験の実施が必要となることもある。製法変更前後で同等性/同質性が確保されないと判断された場合、変更後の製法を採用しないか、新有効成分含有医薬品として製法変更後の製品で全ての試験をやり直すかのいずれかとなる。製造方法の変更には、慎重な対応が必要である。

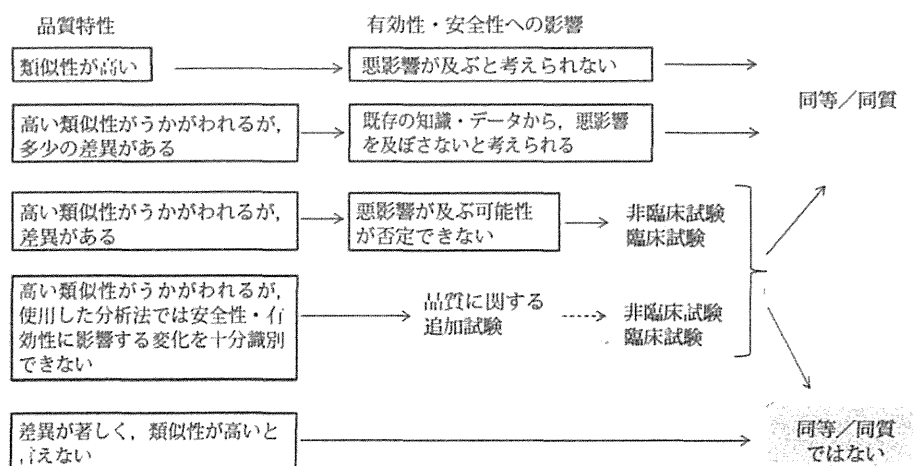


図 4 バイオ医薬品の製造工程の変更にもなう同等性/同質性評価

おわりに

細胞基材及び培養工程を中心に、バイオ医薬品の品質管理について概説した。医薬品の製造工程には、要求される品質を満たす製品を、医薬品のライフサイクル全体にわたって恒常的に作り出す能力が求められる。細胞培養の工程は、品質特性を創り出す工程であり、重要品質特性への影響も大きい。有効性・安全性との関連を考慮し、適切な製法開発と管理戦略の構築が行われることが望まれる。

文 献

- 1) 我が国で承認されたバイオ医薬品：国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 HP

http://www.nihs.go.jp/dbcb/approved_biologicals.html

- 2) 石井明子, 多田稔, 川崎ナナ, バイオ医薬品の製造工程管理 Pharm Tech Japan, 28 (8), 59-70 (2012)
- 3) 川崎ナナ, 石井明子, 奥田晴宏, バイオ医薬品のクオリティーバイデザイン Pharm Tech Japan, 28 (12) : 107-17 (2012)
- 4) 石井明子, 多田稔, 川崎ナナ, バイオ医薬品の生産用基材 Pharm Tech Japan, 28 (7), 67-76 (2012)
- 5) Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. MAbs, 2 (5), 466-79 (2010)
- 6) 遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴, バイオ医薬品の外来性感染性物質について Pharm Tech Japan, 28 (5), 65-70 (2012)

第4章

生体試料薬物濃度分析（リガント結合法）における バリデーションのガイドラインのポイントおよび実施の注意点

はじめに

リガンド結合法 (Ligand Binding Assay) は、薬物に対して特異的に結合する結合試薬を利用して、薬物を定量する方法であり、主に、タンパク質医薬品等の高分子量医薬品の定量に用いられている。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イムノアッセイである。平成 26 年 4 月 1 日、「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ガイドライン」が発出され、リガンド結合法を用いた生体試料中薬物濃度分析の信頼性確保の要件が示された。本稿では、本ガイドラインの要点、及び、実務応用における留意点について概説する。

1. ガイドラインの概略

本ガイドラインには、医薬品の製造販売承認申請に用いる試験成績の評価のために、リガンド結合法による生体試料中薬物濃度分析法が十分な信頼性を有することを保証するためのバリデーション、及び、その分析法を用いた実試料分析に関して推奨される一般的な指針が示されている¹⁾。ガイドラインの項目は、図 1 に示すとおりである。ガイドラインと同時に発出された Q&A²⁾ の中に、本文に関連する補足的な説明が書かれており、ガイドライン案への意見募集に対して寄せられた意見への回答³⁾ の中にも、本ガイドライン作成の意図を理解するために役立つ説明がある。

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	6. 注意事項
4.1.1. 特異性	6.1. 定量範囲
4.1.2. 選択性	6.2. 再分析
4.1.3. 検量線	6.3. キャリーオーバー
4.1.4. 真度及び精度	6.4. クロストーク
4.1.5. 希釈直線性	6.5. 重要試薬
4.1.6. 安定性	6.6. 干渉物質
4.2. パーシャルバリデーション	7. 報告書の作成と記録等の保存
4.3. クロスバリデーション	関連ガイドライン一覧
	用語解説

図 1 「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ガイドライン」目次

本ガイドラインの策定に先立ち、平成 25 年 7 月 11 日、生体試料中薬物濃度分析に特化したガイドラインとして日本では初めて、「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」⁴⁾が発出されている。このガイドラインは、クロマトグラフィーを用いる生体試料中薬物濃度分析法に関するもので、低分子薬物を主な対象としている（以下、BMV クロマトグラフィーガイドラインと表記。BMV は、Bioanalytical Method Validation の略）。リガンド結合法に関するガイドラインは、BMV クロマトグラフィーガイドラインで確立された考え方を基本に、リガンド結合法に特有の要件を取り入れ、近年の分析技術の進展や海外ガイドライン等の国際的な動向も考慮して、定められたものである。

2. ガイドラインの適用範囲

本ガイドラインの適用となる薬物は、ペプチド及びタンパク質が中心であり、リガンド結合法を用いて分析する薬物であれば低分子化合物も対象となる。BMV クロマトグラフィーガイドラインでは内因性物質が適用対象外となっているが、ペプチド及びタンパク質を有効成分とする医薬品の中には、内因性物質とアミノ酸配列が同じ薬物が少なくないことから、本ガイドラインではこれらも適用対象とされ、真度の評価等、分析の際の留意事項が Q&A に記載されている。

ガイドラインの適用となる試験は、トキシコキネティクス試験及び臨床試験である。GLP の対象とならない非臨床試験で使用される分析法は、本ガイドラインの適用対象ではないが、ガイドラインの内容を参考に必要なバリデーション等を実施してよいとされている。

3. ガイドラインの要点と実務応用における留意点

3.1 標準物質（標準品）

標準物質（標準品）は、分析対象物質を定量分析する上で基準となるものであり、検量線用標準試料及び Quality Control(QC) 試料の調製に用いられる。標準物質の品質は測定データに影響を及ぼすため、品質が保証された標準物質を使用しなければならない。

欧州医薬品庁 EMA ガイドライン⁵⁾において、リガンド結合法が用いられる高分子薬物では、標準物質のロットと投与ロットを一致させることが推奨されているが、日本のガイドラインでは、分析証明書等の内容から両者が同一の品質規格に適合していることが確認できれば、異なるロットを使用することも可能であるとされた。通例、投与ロットの品質試験にリガンド結合法の結合試薬との結合性の評価は含まれないが、有効性・安全性を考慮した品質管理が行われていれば、結合試薬との結合性も同等になるという考えに基づく。ただし、品質規格が定まっていない場合は、標準物質ロットと投与ロットを同一ロットにすることが望ましく、異なるロットを使用する場合

には、それぞれのロットで同等の結果が得られることをリガンド結合法により確認する必要がある。

3.2 分析法バリデーション

新たに分析法を確立する場合の他、市販されているキットを使用する場合や、文献等で公表された分析法を使用する場合にも、施設ごとにフルバリデーションの実施が必要である。フルバリデーションでは、特異性、選択性、検量線、真度、精度、希釈直線性、安定性を評価する。バリデーションに必要な各項目の評価に用いる試料、及び、適否の判定基準は、表1のように定められている。各判定基準は、概ね、欧米のガイドライン^{5,7)}におけるリガンド結合法を用いた分析法のバリデーションでの要求と一致している。

フルバリデーションを実施した分析法に軽微な変更を施す場合は、パーシャルバリデーションが必要である。パーシャルバリデーションで評価する項目は、分析法の変更の程度とその性質に応じて設定する。

同一の試験内で複数の分析施設で分析する場合、又は異なる試験間で使用された分析法を比較する場合には、クロスバリデーションが必要である。クロスバリデーションでは、同一のQC試料または同一の実試料を分析し、分析結果を比較する。

表 1 分析法バリデーションにおける評価項目と適否の判定基準

項目	試料	判定基準
特異性	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） 実試料に含まれると想定される濃度の類似物質を添加したブランク試料 定量下限付近及び検量線の定量上限付近のQC試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料	ブランク試料及び類似物質を添加したブランク試料が定量下限未満 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 $\pm 20\%$ 以内（定量下限及び定量上限の場合は $\pm 25\%$ 以内）
選択性	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	ブランク試料の80%以上が定量下限未満 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 $\pm 20\%$ 以内（定量下限の場合は $\pm 25\%$ 以内）
検量線	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	回帰式から求められた各濃度の真度が $\pm 20\%$ 以内（定量上限・下限では25%以内） アンカーポイントを除く検量線用試料の75%以上、かつ、定量上限・下限を含む6濃度以上が上記の基準を満たす。
真度及び精度	検量線の定量範囲内で、最低5濃度（定量下限、低濃度、中濃度、高濃度、定量上限）のQC試料	各濃度における分析単位内及び分析単位間の平均の真度が $\pm 20\%$ 以内（定量上限・下限では25%以内） 各濃度における分析単位内及び分析単位間の定量値の精度が20%以下（定量上限・下限では25%以下） 各濃度におけるTotal errorが30%以下（定量上限・下限では40%以下）
希釈直線性	検量線の定量上限を超えるQC試料、及び、この試料を段階希釈した複数濃度の試料	試料の定量値を希釈倍率で補正した後の真度が理論値の $\pm 20\%$ 以内、精度が20%以下
安定性	標準原液及び標準溶液中の安定性評価 実際に保存する溶液のうち、最高濃度付近及び最低濃度付近の溶液 マトリックス中の安定性の評価 低濃度及び高濃度のQC試料	原則として各濃度における平均真度を指標として、理論値の $\pm 20\%$ 以内

3.2.1 分析法バリデーションにおける留意点

(1) MRD : minimum required dilution

MRDとは、リガンド結合法での分析用に調製された試料において、緩衝液により生体試料が希釈される倍率である。全ての試料でマトリックスの影響を一定にするため、検量線用標準試料、QC試料及び実試料は、同一のMRDで調製されなければならない。MRDは、“minimum” required dilutionの略であるが、必ずしも最小の希釈倍数である必要はなく、緩衝液による希釈をしない場合を含め、適切な倍数であればよい。MRDは最小である希釈倍数を示すものではないので、最小希釈倍数と日本語に訳さず、ガイドライン本文でもMRDと表記されている。

バリデーション、及び、実試料分析は、分析法開発の際に設定されたMRDに従い緩衝液で希釈した試料を調製して実施する。バリデーション報告書や実試料分析の要約に分析方法を記載する際には、MRDに関しても記載する必要がある。また、MRDを変更する場合は、パーシャルバリデーションの実施が必要である。EMAガイドライン⁵⁾では、バリデーションにおける評価項目にMRDが含まれているが、本ガイドラインではMRDは分析条件の一つと位置付け、バリデーションにおける評価項目とはしていない。

3.2.2 フルバリデーションにおける評価項目と留意点

(1) 特異性 : specificity

特異性とは、分析対象物質を類似物質（分析対象物質と構造的に類似した物質）等と識別して検出する能力のことである（図2）。リガンド結合法における特異性は、主に、結合試薬の特性に依存する。結合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と交叉反応性を示さないことが重要であるが、生体内に類似物質が存在する場合、分析対象物質のみに結合する結合試薬が得られない場合もある。生体内に類似物質が存在すると想定される場合には、類似物質との交叉反応性を評価し、類似物質が分析対象物質の測定に与える影響の程度を明らかにしておく必要がある。例えば、内因性物質とアミノ酸配列の一部が異なる医薬品が分析対象物質である場合、生体試料中薬物濃度の分析結果を解釈する上で、内因性物質との交叉反応性に関する評価結果は、極めて重要な情報となる。

クロマトグラフィーを用いた分析法では、特異性は選択性の一部と考えられ、バリデーション項目には挙げられていない。バリデーション項目に特異性が含まれるのは、リガンド結合法の特徴の一つである。

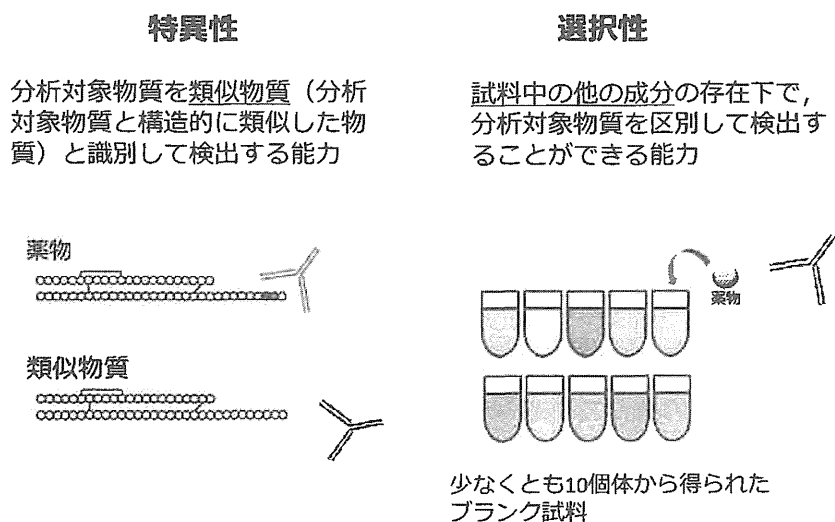


図2 特異性と選択性

(2) 選択性 : selectivity

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（図2）。分析結果に影響する可能性のある試料中の他の成分として、薬物の可溶性リガンドあるいは抗薬物抗体等の干渉物質が考えられる。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。クロマトグラフィーを用いる分析法と異なり、リガンド結合法では、抽出等の前処理が行われない場合が多いことから、選択性評価に用いる試料数は、クロマトグラフィーを用いる場合の6個体と比較して、多く設定されている。

疾患由来マトリックス、溶血あるいは高脂肪マトリックスなどで、通常のマトリックスと異なる結果が得られる可能性が考えられる場合、必要に応じて、これらのマトリックスを用いた選択性の評価も実施しておく。

(3) 検量線 : calibration curve

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。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。アンカーポイントには、適否の判定基準が設定されていない。検量線の回帰式は、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が用いられる。報告書には、用いた回帰式及び重み付け条件を記載する。

(4) 真度及び精度 : accuracy and precision

真度及び精度は、QC試料、すなわち分析対象物質濃度が既知の試料を分析することによって評価する。QC試料は、検量線の定量範囲内で、最低5濃度(定量下限、低濃度、中濃度、高濃度及び定量上限)を調製する。

QC試料の濃度については、低濃度は定量下限の3倍以内、中濃度は検量線の間近付、高濃度は検量線の定量上限の3分の1以上であるものとする。中濃度が検量線の間近付とは、定量範囲の間近付のことであり、一般的には定量下限と定量上限の幾何平均付近を指すが、QC試料の濃度配置のバランスを考慮して算術平均付近に接近させてもよい。高濃度が検量線の定量上限の3分の1以上とは、分析対象物質濃度を対数表示として検量線を描いた場合に、QC試料の濃度を検量線範囲内に均等に分散させることを意図している。QC試料全体のバランスによっては定量上限の75%程度の値でもよい。

真度及び精度は、分析単位を少なくとも6回繰り返し分析することによって評価する。分析単位内の精度を1分析単位の結果から算出する場合は、少なくとも3回の繰り返し(n=3)が必要である。分析単位間の精度を算出する場合は、分析単位内では1回の測定でも許容される。また、分析単位内の繰り返し回数を2回以上として、分析単位内及び分析単位間を区別せずに分散分析などの手法を用いて評価してもよい。

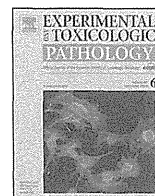
真度及び精度には、それぞれの判定基準の他、トータルエラーに関する判定基準が設定されて

いる(表1)。トータルエラーは、真度から100%を引いた値の絶対値と精度の和で示される。真度から100%を引いた値の絶対値は測定における系統的誤差(systematic error)、精度は偶然誤差(random error)を反映し、トータルエラーの評価によって、各定量値の真値からの乖離やばらつきが大きくその信頼性に問題を有するような分析法を早期に排除することができる。リガンド結合法では、クロマトグラフィーを用いる分析法と比較して、真度及び精度の許容範囲が広く設定されており、分析結果の信頼性を確保する上で、真度及び精度の双方が許容基準値に近い分析法を極力排除するためにトータルエラーに関する判定基準が設定されている。

(5) 希釈直線性 : dilution linearity

希釈直線性は、検量線の定量上限を超える濃度の試料がフック効果又はプロゾーンの影響を受けずに適切に分析できること、及び、検量線内においても定量値に希釈による影響がないことを示す指標である(図3)。希釈直線性の評価では、検量線の定量上限を超えるQC試料、及び、この試料を段階希釈した複数濃度の試料を分析する。上記試料において、レスポンス低下(フック効果又はプロゾーン)の有無を確認し、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。

BMVクロマトグラフィーガイドラインでは、バリデーションにおいて、希釈の妥当性(dilution integrity)という評価項目が設定されている。希釈の妥当性の評価は、希釈操作が定量値に影響を与えないことを確認するために実施するが、希釈直線性の評価は、希釈の妥当性に加え、フック効果またはプロゾーンの有無を確認する目的も含む。



A medium-term *gpt* delta rat model as an *in vivo* system for analysis of renal carcinogenesis and the underlying mode of action



Kohei Matsushita^{a,b}, Yuji Ishii^a, Shinji Takasu^a, Ken Kuroda^a, Aki Kijima^a, Takuma Tsuchiya^a, Hiroaki Kawaguchi^b, Noriaki Miyoshi^b, Takehiko Nohmi^c, Kumiko Ogawa^a, Akiyoshi Nishikawa^c, Takashi Umemura^{a,*}

^a Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^b Laboratory of Veterinary Histopathology, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-8508, Japan

^c Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2014

Accepted 26 September 2014

Keywords:

Medium-term animal model

Chemical carcinogenicity

Kidney

gpt Delta rat

In vivo mutagenicity

Tumor-promoting activity

ABSTRACT

The kidney is a major target site of chemical carcinogenesis. However, a reliable *in vivo* assay for rapid identification of renal carcinogens has not been established. The purpose of this study was to develop a new medium-term *gpt* delta rat model (the GNP model) to facilitate identification of renal carcinogens. In this model, we carried out an *in vivo* mutation assay using unilaterally nephrectomized kidney tissue and a tumor-promoting assay using residual kidney tissue, with diethylnitrosamine (DEN) as the renal tumor initiator. To clarify the optimal time of DEN injection after nephrectomy, time-dependent changes in bromodeoxyuridine-labeling indices in the tubular epithelium of nephrectomized rats were examined. The optimal dose of DEN injection and sufficient duration of subsequent nitrilotriacetic acid treatment were determined for detection of renal preneoplastic lesions. The standard protocol for the GNP model was determined as follows. Six-week-old female *gpt* delta rats were treated with test chemicals for 4 weeks, followed by a 2-week washout period, and 40 mg/kg DEN was administered intraperitoneally to initiate renal carcinogenesis. Unilateral nephrectomy was performed 48 h before DEN injection, followed by *gpt* assays using excised kidney tissues. One week after DEN injection, rats were further exposed to test chemicals for 12 weeks, and histopathological analysis of renal preneoplastic lesions was performed as an indicator of tumor-promoting activity in residual kidney tissue. Validation studies using aristolochic acid, potassium dibasic phosphate, phenylbutazone, and *d*-limonene indicated the reliability of the GNP model for predicting renal carcinogens and the underlying mode of action.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Carcinogenicity is a key factor in safety assessments of environmental chemicals because resulting neoplastic lesions can be irreversible and often fatal. The kidney receives an abundant supply of blood in order to perform its vital roles in metabolism and excretion of xenobiotics, which may increase the risk of carcinogen exposure (Radford et al., 2013). In addition, as the kidney

possesses phase I and phase II detoxification mechanisms, it is highly probable that DNA damage can be caused by reactive metabolites or oxidative stress generated during chemical metabolism (Choudhary et al., 2005; Mizerovská et al., 2011; Priestap et al., 2012; Kakehashi et al., 2013). Indeed, National Toxicology Program (NTP) background data for lifetime bioassays using rodents demonstrated that the kidney is the second organ targeted by chemical carcinogenesis after the liver (National Toxicology Program, 2014). However, because tremendous amounts of time and large numbers of animals are required in lifetime bioassay using rodents, the International Conference on Harmonisation (ICH) guideline recommends alternative *in vivo* studies, including medium-term rat liver animal models, e.g., the Ito model, or 6-month carcinogenicity models using transgenic mice, such as *rasH2* and *p53*-deficient mice (International Conference on Harmonisation, 1997). In particular, quantitative analysis of glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) foci, which is used as a preneoplastic hepatocyte marker in the Ito model, is very

Abbreviations: UN, unilateral nephrectomy; PH, partial hepatectomy; GST-P, glutathione *S*-transferase placental form; DEN, diethylnitrosamine; AT, atypical tubule; AH, atypical hyperplasia; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; PCT, proximal convoluted tubule; PST, proximal straight tubule; DT, distal tubule; NTA, trisodium nitrilotriacetic acid; AA, aristolochic acid; PDP, potassium dibasic phosphate; PBZ, phenylbutazone; DL, *d*-limonene; DW, distilled water; MF, mutant frequency; LIs, labeling indices.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9819; fax: +81 3 3700 1425.

E-mail address: umemura@nihs.go.jp (T. Umemura).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2014.09.006>

0940-2993/© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.