

バイオ医薬品の品質評価

ファーマ大阪事業所 石川 城路・大久保 貴裕 / バイオ技術センター 岩田 美紀・前田 由貴子

1 はじめに

現在、医薬品ビジネスは変革の時を迎えている。2010年前後にこれまで世界の大手製薬会社を支えてきた、ブロックバスターと呼ばれる1剤で年商1000億円を超える医薬品が相次いで特許失効を迎え、製薬会社の収益の悪化が懸念されており、新興市場の開拓、既存医薬品の延命やブロックバスターに頼らないビジネスモデルの模索などと併行して、新たな医薬品の種を探すことが急務になっている。しかし、従来型の医薬品（本稿では以下、低分子医薬品とする）で、新たに画期的な新薬を創造することは難しくなっている。このような中、バイオテクノロジーを応用した医薬品（以下、バイオ医薬品）は、新たな創薬技術に基づく医薬品として注目を集めている。表1に2000年及び2007年の品目別の売上ランキングを示した。バイオ医薬品は2000年に上位10品目中、プロクリット1品目のみであったのに対し、2007年には4位リツキサン/マブセラをはじめ、5～7位のエボジェン/プロクリット/エスポー、エンブレル及びレミケードと上位10品目中4品目を占めている。それ以外の品目を見てみると、売り上げ上位を占める低分子医薬品の多くが、特許期限を迎えていることが分かる。2007年以降、バイオ医薬品は常に

4～5品目が上位10品目に含まれており、医薬品市場におけるバイオ医薬品の存在感が高まってきている事が分かる。バイオ医薬品は疾患部位への特異性が高く、効果に対して副作用が少ないうえ、がんや自己免疫疾患など、従来の医薬品が苦手としていた治療満足度の低いスペシャリティ領域をターゲットとしており、今後も市場の拡大が続くと期待されている。

このように盛り上がりを見せるバイオ医薬品だが、有効成分の多くは糖タンパク質であるため、品質管理には、低分子医薬品で行ってきた物理的・化学的手法に加え、免疫学的、生物学的方法を用いた分析手法が求められる。

本稿ではバイオ医薬品の承認申請において求められる品質評価技術について、実施例も交えて紹介する。

2 バイオ医薬品の特徴

バイオ医薬品は、細胞から産生されたタンパク質であるという定義に加えて、ICH*¹ガイドラインのQ6Bにおいて次のように分類されている。

【目的物質 (Desired Product)】

- (1) 予期した構造を有するタンパク質
- (2) DNA塩基配列から期待されるタンパク質
- (3) しかるべき翻訳後修飾（グリコフォームの生成を含む）から期待されるタンパク質

(4) 生物活性分子を生産するのに必要な、意図的な加工・修飾操作から期待されるタンパク質

具体的には、(1)は抗体のような基本構造がほぼ同様のタンパク質、(2)は糖鎖修飾のないタンパク質（例：ヒトインスリン）、(3)は糖鎖修飾された糖タンパク質など（例：エリスロポエチン）、(4)は活性や薬効の持続性を増強するために、化学修飾や可溶性のための改変を施したタンパク質など、を指す。

これらのバイオ医薬品には次の特徴がある。

①作用部位の分子構造が同じであれば、医薬品として機能する。

培養細胞で生産されるバイオ医薬品は、製造工程のわずかな培養条件の違いによって翻訳後修飾に違いが生じ、構造上異なる分子（アイソフォーム）が生成される。バイオ医薬品の多様性を示す例を紹介すると、抗体の場合は、脱アミノ化、酸化の有無、N末端のピログルタミル化の有無、C末端のリジン残基の欠損、糖鎖修飾の有無、糖鎖の還元末端のシアル酸付加の有無など、非常に多くのアイソフォームが存在する可能性がある。作用部位（抗体の場合、抗原結合部位）が同じアイソフォームは同等の機能を有し、有効成分である「目的物質関連物質」として扱われるため、原薬・製剤は分子構造上不均一となる。

②変性し立体構造がとれなくなると医薬品としての機能が失われる。

バイオ医薬品は、低分子医薬品より熱やpH変化に対して不安定で、変性しやすい性質がある。日常的な振動や光刺激などの要因に加え、常温であっても凝集や分解によりその機能を失うこともある。

③バイオ医薬品は低分子医薬品とは異なる構成成分からなる。

バイオ医薬品の原薬の構成成分は、有効成分である目的物質と目的物質関連物

表1 大型医薬品世界売上ランキング（上位10品目）

順位	製品名	
	2000年	2007年（特許期限）
1	ロゼック / オメプラール	リビトール
2	ゾコール	ブラビックス (2008年)
3	リビトール	セレタイド / アドベア (2010年)
4	ノルバスク	リツキサン / マブセラ
5	メパロチン / プラバコール	エボジェン / プロクリット / エスポー
6	クラリチン	エンブレル
7	タケブロン	レミケード
8	プロクリット	ネクシウム (2012年)
9	セレブレックス	ティオバン / ニシス (2012年)
10	プロザック	ジブレキサ (2010年)

色つき部分：バイオ医薬品
経済産業省 製造産業局 [バイオ・イノベーション研究会報告書] より引用

質、有効性が失われた目的物質変化体である目的物質由来不純物に加えて、宿主細胞由来タンパク質・宿主細胞由来 DNA や、精製工程で混入する可能性のある Protein A などの製造工程由来不純物からなる。そして原薬に安定化剤や pH 調整剤などが添加されたものが製剤となる。従って、原薬・製剤どちらにも、規定限度内の予期せぬ混入汚染物質が含まれていると考えられる。

このため、承認申請のためのバイオ医薬品の品質評価には、低分子医薬品と同様の試験項目に加え、製造工程やその後の環境要因で生じる不均一性を確認するために特有の試験項目が実施される。

3 バイオ医薬品の品質評価試験について

品質評価の試験項目に関しては ICH ガイドライン Q6B に記載があるが、そこに挙げられている試験項目全てを実施しなければならないということではない。対象となる医薬品の標準物質との同等性評価に適した項目を選択する。外観・性状・pH といった定性的に物理的状態を規定する項目に加え、確認試験、純度試験、力価試験、物質質量（タンパク質量）、日本薬局方に一般試験法として収載されている無菌試験、エンドトキシン試験、微生物限度試験、実容量試験などが実施される（これらに限ったわけではない）。確認試験、純度試験、力価試験の項目では以下に挙げた目的で分析試験項目を決定する。

①確認試験：同一性を確認するための試験で、原薬・製剤に極めて特異的である必要がある。定性的な分析法でよいが、不均一性が存在するなど同一性の確認が必要な場合には、異なる原理の分析法を用いて、多角的に分析する必要がある。「ペプチドマップ」、「オリゴ糖パターン」、「糖組成」、「電気泳動パターン」といった各種クロマトグラフィーや電気泳動技術、「ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)」、「ECL (Electrochemiluminescence)」といった免疫学化学手法を用いた項目から選択する。

表2 バイオ医薬品の品質試験項目

低分子医薬品でも実施する項目	外観・性状、液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、エンドトキシン、微生物限度試験
バイオ医薬品特有の項目	物質質量（タンパク質量）、液体クロマトグラフィー（SEC など） [◆] 、SDS-PAGE、ペプチドマップ、糖鎖マップ、等電点電気泳動、キャピラリー電気泳動 [◆] 、ELISA、細胞バイオアッセイ [◆]

◆：バイオ医薬品以外でも、まれに実施する事がある項目

②純度試験：目的物質由来不純物、目的物質関連物質の確認、不純物の存在の程度を正しく把握することを目的とする。一般的には各種カラムクロマトグラフィーや、「ELISA」、「ECL」といった免疫化学手法を用いた項目から選択する。

③力価試験：タンパク質は本来の立体高次構造をとれなくなると機能が失われ、その医薬品は物質質量として十分であっても有効性を失う。理化学尺度である物質質量に加え、生物活性を定量的に測定する力価試験は、必ず実施される。力価試験項目は、動物を用いた「*in vivo* バイオアッセイ」、「ELISA」、「細胞バイオアッセイ」の中から選択される。

続いて、表 2 にバイオ医薬品の品質試験でよく実施される項目をまとめた。

4 分析技術例

確認試験、純度試験として実施されるキャピラリー電気泳動法、確認試験として実施されるペプチドマップ法、力価試験として実施される ELISA 法および細胞バイオアッセイ法を紹介する。

(1) キャピラリー電気泳動法 (CE)

糖鎖は、物理化学的性質、生物活性、体内動態などに影響を及ぼす場合があることが知られており、糖タンパク質のバイオ医薬品の場合、品質評価のパラメーターとして糖鎖不均一性の確認が求められるなど、糖鎖の評価が重要視されつつある。キャピラリー電気泳動は毛細管（キャピラリー）内を分離の場とする電気泳動の総称であり、いくつ

かの分離モードがある。今回はヨーロッパ薬局方においてエリスロポエチンの標準試験法としても掲載されているキャピラリーゾーン電気泳動法について紹介する。

キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) は、キャピラリー内に試料を注入し、両端に電圧をかけることにより、成分を荷電・大きさに基づく移動度の差異で分離する技術である。糖鎖構造やシアル酸付加数の違いで分離できるため、バイオ医薬品のグリコフォーム（糖鎖アイソフォーム）解析に応用されている。以下に、CZE による糖タンパク質（エリスロポエチン標準品）と抗体医薬品の分析例を示す（図 1、図 2）。

①エリスロポエチン

標準品と試料を同様の条件で脱塩処理後、同様の泳動条件で分析し、得られたエレクトロフェログラムを比較する。エリスロポエチン標準品で得られる 8 本のピークは、付加している糖鎖の種類が異なる糖鎖アイソフォームを示している（図 1）。

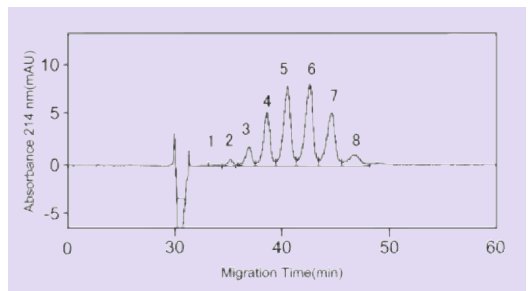


図1 エリスロポエチン（標準品EPO-BRP）のCZE分析

表3 アイソフォームピークの注入再現性 (n=3)

Isoform	相対移動時間の相対標準偏差 (%)
1	0.7
2	0.7
3	0.7
4	0.7
5	0.8
6	0.8
7	0.9
8	1.0

なお、本分析法の注入再現性について表3に示す。各ピークの相対移動時間の相対標準偏差(%)として算出した結果、全ピークにおいて1%以内と良好であった(表3)。

②抗体医薬品

品質試験では、標準品と試料を同様の条件で還元処理後、同様の泳動条件で分析する。検出される軽鎖、糖鎖の付加している重鎖、糖鎖の付加していない重鎖の3本のピークのピーク比率を算出し、糖鎖付加の不均一性の同等性を評価する(図2、表4)。

なお、本分析における注入再現性について表4に示す。各ピークの移動時間の相対標準偏差(%)について算出した結果、いずれも1%以内となり、注入再現性は良好であった(表4)。

最近では、CZEとは異なる分離モードであるキャピラリー等電電気泳動法(CIEF)やキャピラリーSDSゲル電気泳動法(CE-SDS)も、分離能や再現性の良さ、測定時間が短く少量のサンプルで分析できる等の優位性から、従来のゲル電気泳動法の代替法としてバイオ医薬品の品質評価に応用されている。

(2) ペプチドマップ法

米国薬局方、ヨーロッパ薬局方、日本薬局方の3極間で国際調和がなされた試験法の一つである。タンパク質を酵素消化して加水分解し、断片化したペプチドをHPLCで分離し検出する技術で、1アミノ酸の違いも確認できる。同様に処理した標準品/標準物質のクロマトグラムと主要なピークの保持時間やピーク強度を比較することで、アミノ酸配列の変化を容易に検出することが出来るため、製造工程の恒常性及び遺伝子安定性の評価が可能である。以下に、抗体医薬品を用いた実施例を紹介する(図3)。

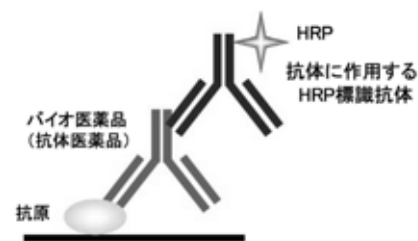
なお、この分析法についての注入再現性を表5に示す。基準ピーク(図3、1~5)の相対保持時間及びピーク高さの相対標準偏差(%)により確認したところ、いずれも良好な結果を示した(表5)。

抗体医薬品の場合、他のバイオ医薬品と比べて分子量約15万と大きいため、クロマトグラムには多くの断片化したペプチドのピークが検出される。特異性があり、再現性のよいクロマトグラムを得るためには、分析対象の抗体医薬品に応じた消化酵素の選択、酵素処理条件及びHPLC送

液条件の検討を実施し、試験設計することが重要となる。

(3) ELISA 法

ELISAは、特異性の高い抗原抗体反応を利用して測定対象物質を捕捉し、その検出に酵素反応に基づく発色・発光等を利用する手法であり、バイオ医薬品の定量試験や力価試験に用いられている。ELISAには直接吸着法、サンドイッチ法、競合法といった測定法があり、測定対象となる物質や、試験目的に応じて選択し、品質評価試験に適用できる。本稿では直接吸着法で実施した、抗体医薬品の力価測定について紹介する。



プレートに測定対象のバイオ医薬品(抗体)の抗原を固相化し、バイオ医薬品を結合させ、さらに検出抗体(2次抗体)

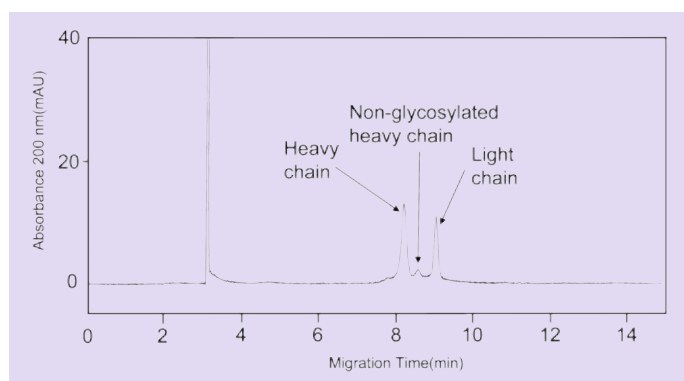


図2 抗体医薬品のCZE分析

表4 抗体医薬品のCZE分析における各ピークの注入再現性 (n=12)

移動時間 (min)	Hc 8.2 ± 0.0	NGHc 8.6 ± 0.0	Lc 9.0 ± 0.0
移動時間の相対標準偏差 (%)	0.3	0.4	0.4
ピーク比率 (%)	58.0 ± 1.3	3.7 ± 0.2	38.3 ± 1.3
ピーク構成比率の相対標準偏差 (%)	2.2	6.2	3.5

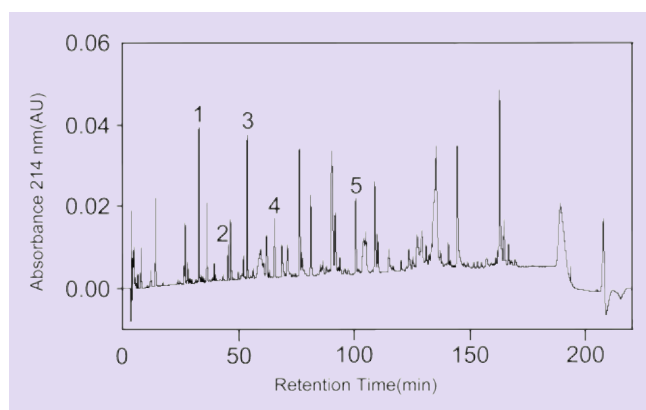


図3 リシルエンドペプチダーゼ処理後の抗体医薬品のクロマトグラム

表5 基準ピークの注入再現性 (n=6)

ピーク番号	1	2	3	4	5
保持時間 (min)	32.2	44.6	53.7	64.7	100.3
相対保持時間の相対標準偏差 (%)	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
ピーク高さの相対標準偏差 (%)	5.9	6.5	5.4	6.9	5.1

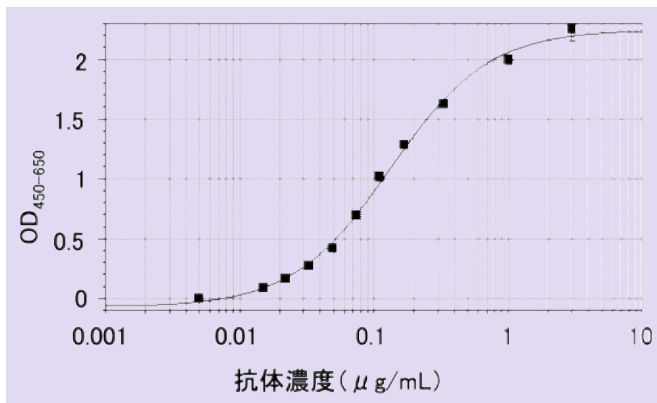


図4 抗体医薬品の検量線

を結合させる。検出抗体は酵素 (Horse Radish Peroxidase (HRP) など) で標識しているので、酵素の基質を加えると、酵素反応により発色する。吸光度は図4のように濃度に応じて増加するので、あらかじめ検量線を作成することで、抗体医薬品の力価や量を測定することができる。

(4) 細胞バイオアッセイ (Cell Based Assay) 法

細胞バイオアッセイは培養細胞を使い、細胞レベルでの生化学的または生理学的応答を測定する技術で、バイオ医薬品の品質試験においては力価定量の分析法の一つである。一般的に、医薬品や化粧品、化学製品などの毒性分析等において、動物実験の代替的な位置づけで実施されてきた。バイオ医薬品の力価測定の指標となる生物活性が、臨床期待される生物活性と同様・類似のものである必要はない。但し、指標とした生物活性と臨床期待される生物活性との相関は、薬力学試験又は臨床試験において確認しておかなければならない。

以下に、細胞増殖能を指標とした力価試験を紹介する。ヒト赤白血病細胞 TF-1 は、エリスロポエチンや GM-CSF (顆粒球単球コロニー刺激因子、白血病減少治療剤) 等の生体因子による細胞増殖活性を有することが知られており、その濃度に応じて増殖するため、図に示すように GM-CSF による TF-1 細胞の増殖曲線を作成することが出来る (図5)。品質試験

では GM-CSF 標準品の力価と比較することで、GM-CSF の力価を評価する。

5 おわりに

当社では、バイオ医薬品の品質評価で実施される試験項目について、従来の低分子医薬品と同様、GLP/GMP で実施できる体制を構築している。また、バイオ医薬品用に大型の安定性試験用保存室を導入し、医薬品の申請業務を総合的に受託することが可能となった。今後は、さらに測定可能な項目を増やし、より広いニーズに応えられるようにしていきたい。

注 釈

*1 International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米EU医薬品規制調和国際会議)

文 献

- 1) 八木崇, バイオ医薬品を取り巻く環境, PHARM TECH JAPAN, Vol 26, No.4 (2010)
- 2) 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について, 平成13年5月1日医薬審発第571号, ICHQ6B
- 3) 早川堯夫, バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保, エル・アイ・シー (2007)
- 4) 酒井恒行, 化学と生物, 32, No.7, 456-462 (1994)
- 5) Erythropoietin concentrated solution, European Pharmacopoeia, Volume 2, Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, Strasbourg, sixth ed., 1813-1814(2008)
- 6) 前田瑛起, 北荘一郎, 中世古みなみ, 木下充弘, 田邊豊重, 大庭澄明, 早川堯夫, 掛樋一晃, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41, No.6, 477-489 (2010).

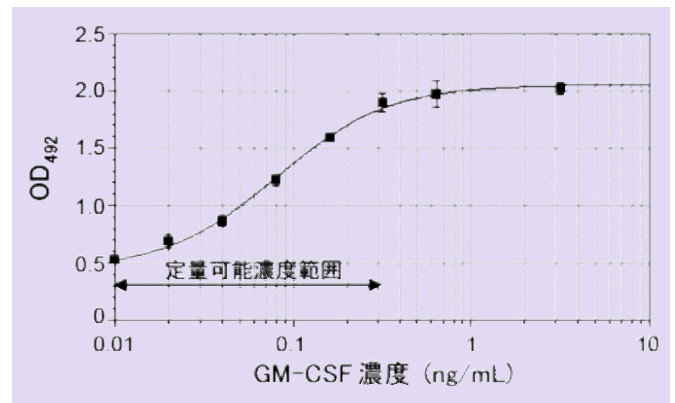
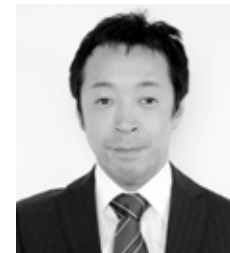


図5 TF-1細胞を用いたGM-CSFの検量線

- 7) 中谷圭吾, 疋田昌義, バイオ医薬品の品質評価の紹介~ペプチドマップ法~ SCAS NEWS 2009-I (Vol. 29)
- 8) 勝村泰彦, 福澤時秀, 今野由信, 内田和久, 阿部聡, 岡村元義, 村上聖, 難波勝, 稲川淳一, 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英, 荒戸照世, 川上浩司, 抗体医薬品における規格試験法・製造と承認申請, S&T (2009)

石川 城路
(いしかわ じょうじ)
ファーマ大阪事業所大久保 貴裕
(おおくぼ たかひろ)
ファーマ大阪事業所岩田 美紀
(いわた みき)
バイオ技術センター前田 由真子
(まえだ ゆきこ)
バイオ技術センター