

# 第1章

---

プレフィルドシリンジ/キット製品の  
最新情報と今後の課題

## はじめに

近年、多くのバイオリジカル技術利用製剤が治療に用いられてきており、その中においてプレフィルドシリンジは、投与形態の第一選択になってきているといっても過言ではない。ここでは、医療市場におけるプレフィルドシリンジの状況および蛋白製剤の凝集対応、品質保証の課題となる完全性試験、自己投与課題および品質管理システムについて述べてみたい。

## 1. 医療市場におけるプレフィルドシリンジの現状

抗体医薬品の世界では、次々と製品が開発され、さらには、バイオシミラーも上市され開発も盛んに行われている。

Darby<sup>1)</sup>は、レミケード、アバスチン、エンブレル、ハーセプチン、ヒュミラ、リツキサンおよびランタスの7抗体医薬品の世界の売上が6兆円に達し、これらの抗体医薬のバイオシミラーが24品目許可されており、同じ対象のバイオシミラーが112品目開発され続けていることを報告している。世界のバイオ製剤の開発の流れは止まらない。

一方で日本の新薬承認通知の中にも〇〇〇シリンジという名称のバイオ製剤が次々と承認されている。

表1～表3に平成28年度から30年度12月までにシリンジの新薬として承認されている製剤<sup>2)</sup>をリストアップした。この表の日本での新薬としての承認リストは、新有効成分含有医薬品のみならず、新効能、新用量、剤形追加等の製剤が含まれており、その薬物のシリンジ製剤として初めての承認のリストではない。そこで承認の右欄にその日米欧での上市時期および初上市における剤形を各製剤のインタビューフォームの情報からまとめて一覧とした。

この表からバイオ医薬品は、多くの製剤がプレフィルドシリンジを上市しており、最初の承認申請でプレフィルドシリンジ製剤の申請を行っていることがわかる。3年間でバイオ医薬品で初上市製剤がバイアルとなっている化合物はアクテムラとベリムマブの2品目である。この2品目も後にプレフィルドシリンジ製剤を上市している。他に初上市がシリンジとなっていないオプチレイは造影剤で、プレセデックスは鎮静剤であり、共にバイオ医薬品ではない。

日本製薬工業協会政策研究所の赤羽<sup>3)</sup>は、2000年代前半においてはバイアル液剤より凍結乾燥製剤がやや多く、その後2000年代後半よりプレフィルドシリンジで上市される品目が登場

表2 平成29年度にシリンジとして新薬承認された品目

承認日	販売名 (会社名, 法人番号)	承認	成分名 (下線: 新有効成分)	備考	初上市時の剤形	米国承認年月	欧州承認年月	日本承認年月
H29.8.26	アクテムラ皮下注162 mgシリンジ 同 皮下注162 mgオートインジェクター (中外製薬(株), 5011501002900)	一変 一変	トシルズマブ (遺伝子組換え)	既存治療で効果不十分な関節リウマチ (関節の構造的損傷の防止を含む)を 効能・効果とする <b>新用量医薬品</b>	バイアル	2010年1月	2009年1月	2005年4月 バイアル, 2013年3月 シリンジ
H29.8.25	アクテムラ皮下注162 mgシリンジ 同 皮下注162 mgオートインジェクター (中外製薬(株), 5011501002900)	一変 一変	トシルズマブ (遺伝子組換え)	既存治療で効果不十分な高安静脈炎・ 巨細胞性動脈炎の効能・効果を追加と する <b>新効能・新用量医薬品</b> 【希少疾病用医薬品】	上記の通り	上記の通り	上記の通り	上記の通り
H29.7.3	プラリア皮下注60 mgシリンジ (第一三共(株), 1010001095640)	一変	デノスマブ (遺伝子組換え)	関節リウマチに伴う骨びらんの進行抑 制の効能・効果を追加とする <b>新効能・ 新用量医薬品</b>	シリンジ	2010年6月	2010年5月	2013年3月
H29.8.27	ケプザラ皮下注150 mgシリンジ 同 皮下注200 mgシリンジ 同 皮下注150 mgオートインジェクター 同 皮下注200 mgオートインジェクター (中ノファイ(株), 7011101037279)	承認 承認	サリルマブ (遺伝子組換え)	既存治療で効果不十分な <b>新効能・ 新用量医薬品</b>	シリンジ	2017年5月	2017年6月	2017年9月
H29.9.27	ペンリスタ点滴静注用120 mg 同 点滴静注用400 mg 同 皮下注200 mgオートインジェクター 同 皮下注200 mgシリンジ (グラクソ・スミスクライン(株), 2011001026329)	承認 承認	ペリルマブ (遺伝子組換え)	既存治療で効果不十分な全身性エリテ マトーアーツを効能・効果とする <b>新有効 成分含有医薬品</b>	バイアル	2011年3月	2011年7月	2017年9月
H30.1.19	デュピクセント皮下注300 mgシリンジ (中ノファイ(株), 7011101037279)	承認	デュピルマブ (遺伝子組換え)	既存治療で効果不十分な <b>新有効成分 含有医薬品</b>	シリンジ	2017年3月	2017年9月	2018年1月
H30.1.19	ファセンラ皮下注30 mgシリンジ (アステラゼネカ(株), 91200001073652)	承認	ペンララリスマブ (遺伝子組換え)	既存治療で効果不十分な <b>新有効成分 含有医薬品</b>	シリンジ	2017年11月	2018年1月	2018年1月
H30.3.23	トレムフィア皮下注100 mgシリンジ (ヤンセンファーマ(株), 40100001089128)	承認	グセルクマブ (遺伝子組換え)	既存治療で効果不十分な尋常性乾癬・ 関節症性乾癬・膿疱性乾癬・乾癬性紅 皮症を効能・効果とする <b>新有効成分 含有医薬品</b>	シリンジ	2017年7月	2017年11月	2018年3月
H30.1.19	エタネルセプトHS皮下注10 mg[MA] 同 皮下注25 mg[MA] 同 皮下注25 mgシリンジ 0.5 mL[MA] 同 皮下注50 mgシリンジ 1.0 mL[MA] 同 皮下注50 mg<math>\times</math>1.0 mL[MA] (特田製薬(株), 9011101021173)	承認	エタネルセプト (遺伝子組換え) [エタネルセ プト後継]	既存治療で効果不十分な、関節リウマ チ(関節の構造的損傷の防止を含む) 及び多関節に活動性を有する若年性特 発性関節炎を効能・効果とする <b>バイオ 後継品</b>	シリンジ			2018年1月

今まで述べたように、色々な試験法が提案されてきてはいるが、内容物や形状、原理的な課題も残されており、その保証範囲や、操作時間等で絶対的なものはないので、個別に何をどこまで確認できるかを明らかにして、試験を行う必要がある。

## 4. プレフィルドシリンジの自己投与について

今までインシュリンや血液製剤に限定されていた自己投与が、多くのプレフィルドシリンジに対して認められてきている。その対象は関節リウマチ薬や乾癬用、抗がん剤等多岐にわたってきている。自己注射用の機器も多数開発されてきており、それに伴って使用説明書、ガイドンス、ホームページによる使い方説明画像の提供等対策がとられているが、今まで医療従事者が行ってきた注射剤の投与に対するハードルは高いものがあり、患者の多くが不安を感じていると思われる。

コンビネーション製品に対する厚生労働省からの各種通知が出された背景には、これらの医薬品たるコンビネーション製品の医療機器部分の不具合情報を入手して対応することがあると考えられる。

コンビネーション医薬品の機械器具部分の不具合の内容の中には、使用者への情報伝達が充分に行われていないケースも多数存在すると考えられ、プレフィルドシリンジに続くオートインジェクター等自己投与デバイスの普及には、手指を十分に動かすことが困難な患者の不具合への対応以外にも、日本の医療習慣や医療制度からの観点で海外とは異なった対応が必要となっていると感じており、海外の医療機器で求められているユーザビリティの評価もそのような観点で実施していくべきであると感じている。

## 5. 医療製品製造業者のGMP & QMS管理について

プレフィルドシリンジのGMPあるいはQMSでよく問題となる点として、どの基準で何を管理すればよいかという点があるが、私は、ISO9001をベースとする品質管理システムを基に各工程での品質管理および製造管理システムを構築することで、一本化が図られると考えている。

2019年に行われる予定のGMP省令の改正では、ICH Q10 医薬品品質システムの導入がされようとしている。医療機器の審査のための品質システムISO13485は、もともとISO9001をベースとしている規格である。

ISO9001の品質システムをベースとした品質システムは、日本が加盟しているPIC/SのGMPのベースとなっている規格でもある。

# 第3章

---

プレフィルドシリンジの材質特性と設計  
～設計時の留意点や必要な試験項目について～

## はじめに

バイオ医薬品の市場規模は年々拡大しており、1986年から始まり毎年刊行されている日経バイオ年鑑((株)日経BP)によると、日本国内だけでも2018年には3兆6,725億円(前年度比3.7%増)に達すると考えられている<sup>1)</sup>。これはバイオ医薬品の有効性が示され続けていることもあるが、医薬品の安全性に配慮して不断の研究開発を行っている、各製薬会社・各医療機器メーカーの努力の成果であると考えられる。近年では、期限切れの特許を活用して開発したバイオ医薬品の後発品である、バイオシミラー製剤の上市も増え始めている。このような、新薬の上市、そしてバイオシミラー製剤の上市による既存薬の価格帯の低下に伴い、医薬品市場全体に対するバイオ医薬品の比率は年々高まりつつある<sup>2)</sup>。

このような市場規模の拡大は、バイオ医薬品の安全性に対する関心がより一層強まり、安全、安定な製剤の供給が求められていくことにつながっている。

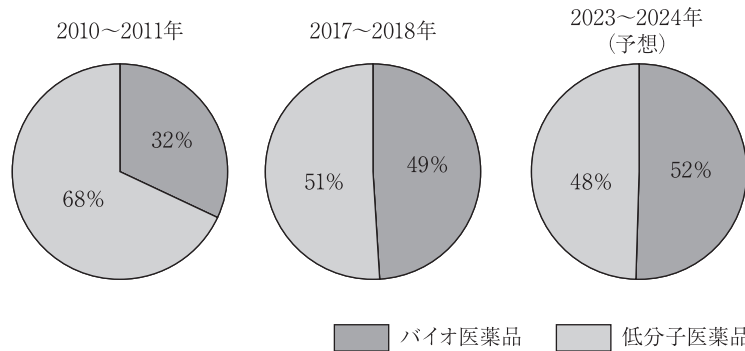


図1 全世界の処方箋薬・OTC薬の売り上げにおけるバイオ医薬品と低分子医薬品の割合 (参考文献<sup>2)</sup>から一部改変して引用)

しかしながら、従来の低分子医薬品に比べてバイオ医薬品の多くは、物理的・化学的に安定であるとはいいがたく、低分子医薬品では問題にならなかった様々なトラブルが報告されている。多くのバイオ医薬品の有効成分はタンパク質であり、外部からの熱・光・衝撃などによって変性、変質しやすく、製造、輸送、保管、そして投与までの一連の取り扱いには細心の注意が求められる。以前は、バイオ医薬品などのタンパク質製剤は、凍結乾燥製剤がバイアルに充填され供給されることが多かった。しかし、昨今では後述する要因により、製造の段階で薬液を注射筒に充填するプレフィルドシリンジ(PFS)製剤として供給されるケースが増えてきている。

PFS剤型では薬液製造時にPFS部材へ医薬品が充填され、その状態のまま輸送、保管、さらに投与されるため、アンプル品・バイアル品と異なり投与器材と薬液の接触時間が著しく長い。そのためPFS製剤においては、部材が薬液に与える影響を考慮する必要がある。

薬液を除いたPFSの部材には、ガラス、プラスチック、ゴムなどが使われている。PFS部材の一覧を表1に示す。

表1 PFSに用いられている部材の一覧

	部材	材質
薬液接触部材	バレル	ガラス、プラスチック
	プランジャーストッパー	ゴム、エラストマー
	注射針	ステンレス
薬液非接触部材	針シールド	ゴム、エラストマー
	チップキャップ (ルアーロックバレルのみ)	ゴム、エラストマー
	プランジャーロッド	プラスチック
	ラベルシール	フィルム、接着剤
	外部包材	プラスチック、フィルム、紙

## 1. バイオ医薬品のプレフィルド化

本稿では、今後拡大が予想されるPFS化バイオ医薬品に使用されているこれらPFS部材について、シリンジを製造する立場から記述する。ここで紹介するプラスチック、ゴム、金属の性能は、広く知られている情報、すなわち、一般的と思われる知見に基づいたものである。各メーカーは性能を特化させた複数のグレードを持っていることが多く、加えて素材の利点を伸ばす・欠点を補う技術の開発を日進月歩で行っている。そのため、実際にPFSを開発する際には各素材データの時節に沿った正確な数値を、各メーカーと協議したうえで把握することが重要になる。

### 1.1 バイオ医薬品をプレフィルド化するメリット

PFS製剤は、細菌汚染・異物混入の防止、投薬調製時の過誤の防止、救急使用時の迅速対応など、医療現場の様々なニーズに応えることができる剤型であり、従来のアンプル品、バイアル品にはない特徴を持っている。特に患者や医療従事者の利便性向上においては、使用時には

## 6. テルモ(株)におけるバイオ医薬品に適したプレフィルドシリンジ開発の事例

本章の最後に、筆者が所属するテルモ(株)で行った、バイオ医薬品に適したPFS(PLAJEX<sup>®</sup>)開発の事例を紹介する。

テルモ(株)では1990年代に輸液バッグ中の成分調製を行うPFSとして、「メディジェクト<sup>®</sup>シリーズ」を上市しているが、そのころからバイオ医薬品に適したPFS部材を求める声が高まりつつあった。バイオ製剤には低分子医薬品では見られなかった課題がいくつも報告されており、これらはプレフィルド化への懸念材料であった。1.2項で示したプレフィルド化したバイオ医薬品における課題(表2)を分析した結果、「バイオ医薬品に適した」PFS部材を実現するためには、少なくとも下記の3つの要件をすべて満たすことが必要だと考えられた。

- ①シリコンオイルフリーであること
- ②プラスチックシリンジであり、かつ低浸出性であること
- ③バイオ医薬品酸化への対策を確立すること

### 6.1 シリコンオイルフリー

プランジャーストッパーは、ラミネートや特殊コーティングを施さない限り、バレル内での摺動性が非常に悪い。そのため、従来はバレル内面にシリコンオイルを塗布して摺動性を確保してきた。これは、低分子医薬品では問題にならなかったが、バイオ医薬品のPFS化に際し、シリコンオイルが存在することによって、バイオ医薬品中のタンパク質成分が凝集する、という問題が報告された。凝集のメカニズムは他章で詳細に記述されると思うのでここには記さないが、タンパク質凝集は免疫原性という重大な障害へとつながる可能性があるため、可能な限り避けるべき課題である。

我々は、プランジャーストッパーに特殊なコーティングを施すことで、シリコンオイルフリーシステムを実現できると考え、研究開発を進めてきた。その結果の1つとして、2005年に初めてシリコンオイルフリーシステムのプレフィルドシリンジ製剤(商品名: ミノフィット<sup>®</sup>)を送り出した。その後、コーティング剤を独自に研究、開発し、重合を含む化学的プロセスによってプランジャーストッパー表面に強靱で柔軟、かつ均質なシリコン樹脂層を形成させる技術確立し、2012年にシリコンオイルフリー技術“i-coating<sup>®</sup>”を完成させるに至った。i-coatingによりコートしたプランジャーストッパーによりシリコンオイルフリーのPFSが実現できたのである。



# 第4章



プレフィルドシリンジのデザイン

## 第2節 製薬企業から見たプレフィルドシリンジ・デバイスの安全性 ～実際の報告事例と適正使用に向けた企業活動～

中外製薬(株) 高野 淳一 渡邊 勝博 伊藤 毅 山中 祐治 中曾根 彩子  
横山 大輔 山下 勝久 加藤 博之 長島 秀之

### はじめに

注射剤等医療用デバイスの開発は、実際に市場に出る発売時の医療環境や発売後の状況を十分踏まえ開発にあたらなければならない。なぜなら、デバイス開発には年数を要し、また当時最新の技術で開発を進めていても上市時には真新しいものではなくなっていることや他領域では普通に使われていることがあるからである。実際、本稿で紹介するアクテムラ皮下注射剤は、2008年からプレフィルドシリンジ(PFS)とオートインジェクター(AI：ペン型タイプ)の検討を開始し、発売時の2013年5月まで約5年を費やした。関節リウマチ(RA)市場では国内初のAIであったため新規性が高く、古い感じはなかったが、既に世界では早くからTNF製剤でペン型製剤が登場しており、またインスリン注射剤では1988年には国内で登場していた。

いずれにしてもデバイス開発は、対象となる疾患の特徴的病態や患者の年齢層、実際に使用される医療者や自己注射する患者自身、更にはその家族が使いやすく安全であることが重要であり、かなり早い段階から検討を進めなければならないデバイス開発において、各企業の開発者、設計者の役割は大きい。

そもそもひとつの医薬品が世の中に誕生するのに、9～17年の歳月、開発費用は500億円、場合によっては1,000億円以上を要するのに対し、開発成功率は3万分の1といわれており、投資効果の判断に難渋することは少なくない。現在、RA治療薬を含め生物学的製剤と呼ばれるBio製剤が多く開発、発売されているが、日経バイオ年鑑2018によると、世界で売上高1,000億円を超える医薬品(ブロックバスター)は2016年で121品目あり、その市場は33兆7,485億円で、うちBio製剤の売上高合計は15兆3,420億円で、RA治療薬が売上高ランキングの1、2、3位を独占していた。日本市場の売上高総額は3兆4,047億円で、国内売上高TOP10にRA治療薬は1製剤だがTOP5だと4製剤が入ってくる市場である。

国内RA治療薬の皮下注射剤に目を向けると2019年1月現在でその数は8種類あるが、多くの製剤にAIタイプが発売されており、インスリン製剤同様に充足されてきている。その背景には、関節リウマチ特有の手や指の不自由さから簡便かつ安全に注射できるデバイスの開発ニーズが高いものがあったからである。

当社では、2005年にキャッスルマン病にオーファンドラッグとして承認を取得し発売した抗体製剤アクテムラという製品を持つ。ここでは製品紹介に加え、開発から市販後、特に皮下注製剤の自己注射とその注意点等、適正使用の観点から発売6年が経過した皮下注製剤のデバイスについて総括する。

## 1. 製品紹介 抗体製剤アクテムラとは

アクテムラ(トシリズマブ)は、日本で開発されたIgG<sub>1</sub>サブクラスのヒト化抗ヒトインターロイキン6(IL-6)レセプターモノクローナル抗体である。遺伝子組換え技術により、可変領域の中でも特に抗原との親和性が高い相補性決定領域(CDR)をマウス型ヒトIL-6レセプターモノクローナル抗体とし、その他の部分をIgG<sub>1</sub>としてチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いて創製された。IL-6は、1982年に吉崎らによりB細胞を抗体産生細胞に分化誘導する因子として発見された後<sup>1)</sup>、1986年に平野、岸本らによりクローニングされた<sup>2)</sup>。その後の研究によりIL-6は炎症反応、種々の細胞の分化誘導や増殖、免疫反応の調節、血小板増多等、非常に多様な生理作用を有することがわかり、関節リウマチや全身型若年性特発性関節炎等の病態に深く関わる事が明らかとなった。

アクテムラは、IL-6の生物学的作用を阻害することによりその薬効を示すことが期待され、1999年より関節リウマチをはじめとしたIL-6が関与する疾患の治療薬として国内外で開発が進められてきた。その結果、世界で初めてヒト化抗ヒトIL-6モノクローナル抗体として2005年4月に日本で点滴静注用がキャッスルマン病に対する承認を取得し(希少疾病医薬品に指定)<sup>3)</sup>、更に2008年4月に関節リウマチ(関節の構造的損傷の防止を含む)(RA)<sup>4,5)</sup>、多関節に活動性を有する若年性特発性関節炎(pJIA)<sup>6)</sup>、全身型若年性特発性関節炎(sJIA)<sup>7)</sup>に対する効能・効果が追加承認された。またRAにおいては、2013年3月に点滴静注に加え、皮下注製剤(アクテムラ皮下注162 mgシリンジ、アクテムラ皮下注162 mgオートインジェクター)の2つのタイプが世界で初めて承認された(図1)<sup>8)</sup>。その後2017年6月、RAにおいて投与間隔を短縮した週1回投与の承認(QW)<sup>9)</sup>、続いて、同年8月に高安静脈炎(TAK)、巨細胞性動脈炎(GCA)という指定難病への適応を拡大した<sup>10,11)</sup>。更に2019年3月には、点滴静注用製剤においてCAR-T療法と呼ばれる新しいT細胞がん治療の補助治療としてサイトカイン放出症候群(CRS)<sup>12,13)</sup>、同年5月に成人スチル病(ASD)<sup>14)</sup>の承認を取得した。その他にも炎症性サイトカインのIL-6阻害による治療の可能性として難病を中心にいくつか開発が進んでいる。

## 6. 報告事例への対策と結果

はじめに取り組んだのは、AIのボタンが押せない、うまく投与できないという事象への改善策である。原因の多くは、AI先端の安全カバーが押し込みきれずボタンが押せないことへの対応で、発売1年半後の2014年10月に、アタッチメントを製作した(図7)。AIの先端部にアタッチメントを装着することで皮膚への接着面積が広くなり、安全カバーを押し込みやすくし、安全カバーのロックを外しやすくしたものである。



図7 アクテムラ専用アタッチメント

続いて行ったのが、針曲りへの対策である。キャップを真っ直ぐ引き抜きやすくできるようなPFS先端部にガイド構造を作り、多少斜めから引き抜く動作が発生しても針が曲がりにくい構造にしたことである。また、キャップが固いために力を入れてしまうことで、引き抜く力が斜めになってしまっていることが予測されたため、同時にキャップ自体にもつまみやすくするための深い溝を作り、キャップを外しやすいように改良した。更にAIでは軽くねじるとAI本体側とキャップ側にある楕円形の溝によって、キャップが外れやすくする構造になっている。これらのデバイス改良によって、針曲りとキャップが固い報告はほぼなくなった。

またホールド時間を短縮させるために、27G針の太さをそのままに針の内径を広くしたタイプの注射針(Thin wall needle)を導入し、ホールド時間を開発当初の20秒から現在の15秒に短くした。実際にはそれよりも早く注入できているようだが、冷所保存から室温に十分戻しきれなかった場合や、投与時の室温や季節等異なる環境も鑑み、何度も重ねた実験において確実に投与できる時間として予備の時間を設けている。更にその1年半後、輸送および落下時の破損リスクや医療廃棄物等の問題を踏まえ、プラスチック化を行った。まとめると、発売早期から報告があがってきた事例をもとに、両剤型ともシリンジ容器に対して、ガイドの設置、キャップの変更、Thin wall needleへの変更、プラスチック化とデバイス改良を行った。発売から2年半にわたっての改良である。

## 第5章

---

バイオ医薬品における安全性向上と効果的な  
プレフィルドシリンジ製剤の供給に向けて

## 第2節 バイオ医薬品の凝集体の最小化 ～抗体医薬品の凝集体除去と凝集化抑制～

(国研)産業技術総合研究所 本田 真也 千賀 由佳子

### はじめに

凝集体は投与時の支障や効能低下のみならず、免疫原性の上昇により患者の免疫反応を惹起し有害事象に導くことが懸念されている。バイオ医薬品の凝集体と免疫原性の因果関係については、アメリカ食品医薬品局(FDA)のガイダンスでも警鐘が鳴らされており、凝集体の適切な評価と管理は、有効性と安全性が保証されたバイオ医薬品の開発製造にとって不可欠となっている。本節では、主に抗体医薬品(治療用モノクローナル抗体)に焦点を当て、バイオ医薬品の凝集体の最小化に関して解説する。前半は、凝集体に関する基本的事項を整理したうえで、抗体医薬品の凝集体除去および凝集化抑制に実用されている既存技術について概説する。後半は、新たな凝集体除去/凝集化抑制技術の開発動向の一例として筆者らの研究を紹介する。

### 1. バイオ医薬品の凝集

バイオ医薬品は化学合成医薬品に比べて不安定であり、物理的・化学的ストレスに曝されると容易に凝集する。本項ではまず、バイオ医薬品の凝集体に関する基本的事項として、免疫原性に対する懸念、凝集体に関する規制当局の警鐘と推奨、凝集体の定義と分類、製造プロセスにおける凝集体の発生と原因、タンパク質の安定性と凝集化のメカニズム、品質管理のための凝集体分析法について解説する。次いで、抗体医薬品の生産工程として現在利用されている凝集体除去技術および凝集化抑制技術について記す。

#### 1.1 規制当局の警鐘と推奨

免疫原性はバイオ医薬品の開発において留意すべき重要項目の一つである。バイオ医薬品が免疫原性を有してしまうと、投与されたバイオ医薬品は患者の免疫システムにおいて異物として認識され、抗原となり患者の免疫反応を誘導する。その結果、バイオ医薬品は異物として患者から排除され、本来の目的である治療効果を発揮することが期待できなくなる。さらには、アナフィラキシーやサイトカイン放出シンドロームなどの深刻な有害事象との関連が報告されており、安全性に悪影響を及ぼす可能性が懸念されている。

2014年にFDAは、Guidance for Industry：Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Productsと題するガイダンスを公開した<sup>1)</sup>。この中で、バイオ医薬品の免疫原性に影響を及ぼしうる因子に関して、患者由来の属性と製品由来の属性に分けて、近年の学術研究の成果を整理している。製品由来の属性としては9つの項目が整理されており、その1つが凝集体である。

凝集体の免疫原性に関する懸念は決して新しいものではない。古くは1960年代に、免疫グロブリン製剤中の可溶性凝集体が免疫反応を誘導する可能性があることが報告されている<sup>2)</sup>。しかし、抗体医薬品の開発の成功と需要の拡大に伴い、その懸念は近年大きくクローズアップされた。アメリカ薬学会は2005年にProtein Aggregation and Immunogenicity Focus Groupを組織し、定期的なワークショップを主催するなど、継続的な議論を促してきた。その影響もあり、この問題の認知は世界的に広がり、産学官それぞれの立場で精力的な取り組みがなされるようになってきた。しかしながら、凝集体と免疫原性の科学的因果関係や治療時の臨床的帰結については依然不明瞭な点が多い。この状況を鑑み、FDAは上記ガイダンスの中で以下の5点を推奨している<sup>1)</sup>。

- ・ 製造者は凝集体の残留を可能な限り最小化すること
- ・ 有効期限の設定では保管中の変性あるいは分解に伴う凝集体の増加を考慮すること
- ・ 種々のサイズ、性状に応じた選択的で高感度な分析法を利用すること
- ・ 凝集体の分析法は常に改良し進化させること
- ・ 日常的な出荷試験に適切なアッセイ法を確立し、同等性の確認に利用すること

バイオ医薬品の有効性と安全性を保証するために、凝集体に留意した開発、製造、管理が今後より強く求められるようになるであろう。中でも凝集体の最小化は、最優先すべき課題である。

## 1.2 凝集体の定義と分類

上記のFDAガイダンスでは、タンパク質凝集体を「自己会合したタンパク質からなるあらゆる化学種」と定義している。したがって、数ナノメートルのダイマー(二量体)から数百マイクロメートルの可視粒子までが「凝集体」の定義に含まれることになる。両者のサイズの比は、500円硬貨と東京タワーの大きさの関係に対応する。凝集体という同じ語を用いながらも多様な粒子が存在し、それらのサイズの隔たりはとてつもなく大きい。サイズのみならず、この定義がカバーする対象の幅広さは常に意識する必要がある。



## 2. 抗体医薬品の凝集体に関する新たな技術の開発

前項では、バイオ医薬品の凝集体に関する基本的事項を解説した。その冒頭、FDA ガイダンスに記載されている凝集体についての推奨事項を列記した。筆者らは、この推奨事項の実現を目指し、基盤となる研究開発を展開している。「凝集体の分析法は常に改良し進化させること」に寄与するため、従来とは全く異なる新たな抗体医薬品凝集体の分析技術を開発している<sup>52,53</sup>。また、「日常的な出荷試験に適切なアッセイ法を確立し、同等性の確認に利用すること」を意識して、開発した分析技術を用いたハイスループットアッセイ系の構築を行っている<sup>54</sup>。さらに、「有効期限の設定では保管中の変性あるいは分解に伴う凝集体の増加を考慮すること」を念頭に、長期保存安定性の予測理論の構築を目指して、抗体医薬品の凝集化メカニズム解明を進めている<sup>10,11,13,55,56,57</sup>。加えて、「製造者は凝集体の残留を可能な限り最小化すること」に貢献するための新たな技術の開発も行っている<sup>60</sup>。本項では、凝集体の除去と凝集化の抑制に関する筆者らの研究開発の内容を紹介する。

### 2.1 人工タンパク質を用いた抗体医薬品の凝集体除去と凝集化抑制

抗体医薬品は、生産、輸送、保管などの過程でさまざまな物理的・化学的ストレスに曝されて凝集体を形成する。実験室において、製造工程を模したストレス条件下に抗体をおくと、天然型の立体構造は部分的にあるいは完全に変性し、非天然型の立体構造になる。この非天然型の立体構造の抗体(以後、非天然型構造抗体という)は可逆的あるいは不可逆的に集合してナノメートルサイズの小さな凝集体(ダイマー、トリマー、オリゴマーを含む)を形成する。その後、時間依存的に大きな凝集体が通常不可逆的に発生する<sup>11,53,54</sup>。マイクロメートルサイズやミリメートルサイズの目に見える凝集体は、目視では確認できないナノメートルサイズの凝集体が徐々に成長した結果であると考えられている<sup>58,59</sup>。

一方、抗体医薬品の製造工程では、1.7項で述べたように、凝集体の除去を目的とした複数の操作が実際に行われている。しかし、課題も残っている。HICやCECによる凝集体除去では、凝集体の含有量を完全にゼロにすることが困難である。また、メンブレンフィルターによる膜分離では、原理的に孔径より小さいサイズの凝集体を除去することができない。これより、微量のナノメートルサイズの小さな凝集体が最終製品内に残留することになる。これらは大きな凝集体の素となる。即ち、製造時に除去され、出荷時には検出されなかったとしても、長期間の保管中に大きな凝集体が再び出現する可能性が生じる。

そこで筆者らは、抗体医薬品の安全性をより確実にするために、メンブレンフィルターの孔径より小さな凝集体に焦点を当てた新たな技術開発に取り組んだ。その結果、抗体医薬品中の



凝集体を選択的に除去し、保管中の凝集体発生を抑制する技術の開発に成功した<sup>60)</sup>。図1はこの技術の概念を示したものである。実現の鍵となったのは非天然型構造抗体を認識する人工タンパク質である。

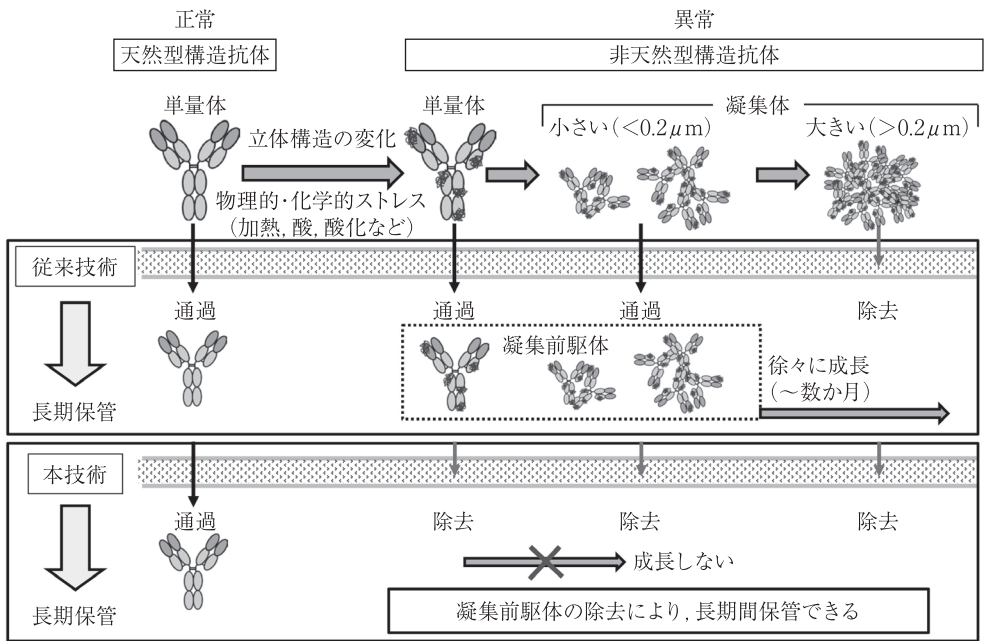


図1 本技術の概要図：凝集前駆体の除去による新たな凝集体の発生抑制

### 2.1.1 非天然型構造抗体を認識する人工タンパク質

筆者らは、基礎工学的関心から進化分子工学の新しい方法論の研究を進めていた<sup>61-63)</sup>。その過程で作出した人工タンパク質AF.2A1を調べていたところ、AF.2A1に特徴的な分子特性が備わっていることを見出した。そこで、これを抗体医薬品の製造管理技術に応用することを着想した。

AF.2A1は25アミノ酸残基で構成される人工タンパク質である。短鎖であるが水溶液中でフォールドし固有の立体構造を形成する。天然型の立体構造を維持した抗体には親和性を示さないが、加熱や酸処理などの物理的・化学的ストレスを受けて天然型の立体構造を部分的に失った非天然型構造抗体に対して特異的に結合する。AF.2A1は、非天然型構造抗体が会合して凝集体を形成しても結合できる。凝集体のサイズに依存せず、すべからく認識する。少なくとも粒径 $1\mu\text{m}$ 以下の凝集体に対して結合することが明らかになっている<sup>53,54)</sup>。そこで、筆者らは、このAF.2A1の稀有な性質を利用して、メンブレンフィルターでは除去が困難なサイズの

### 第3節 培養プロセスにおけるタンパク質医薬品凝集と制御について ～抗体生産CHO細胞を中心に～

徳島大学 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合 鬼塚 正義

#### はじめに

バイオ医薬品を代表する製品の1つとして、抗体医薬品が挙げられる。抗体は、重鎖、軽鎖の四量体からなる分子量15万の大きなタンパク質であり、さらにそのFc領域にN-型糖鎖が結合している糖タンパク質でもある。近年、抗体医薬品市場は急速に拡大しており、安全性の高い高品質な抗体医薬品を生産するプロセス開発は社会的ニーズであるといえる。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞はバイオ医薬品生産において生産宿主として多用されている工業用動物細胞であり、CHO細胞を利用した生産プロセス開発は抗体医薬品生産におけるde fact standardとなっている<sup>1)</sup>。抗体タンパク質は均一な構造ではなく、N-型糖鎖の不均一性、電荷異性体、凝集化や断片化などの化学構造や立体構造の不均一性を示すことが知られている<sup>2)</sup>。抗体医薬品の工業生産の現場では樹立した細胞株の種類(クローナリティー)や培養条件、培地成分などにより、生産抗体の不均一性の程度は変動する。抗体の化学構造や立体構造の不均一性は抗体品質の変動要因となるために、工業生産ではこれら不均一性を制御した製造プロセス構築が望まれる。

近年、抗体医薬品の製剤溶液中に含まれる凝集化抗体が問題視されるようになってきた。本節で取り扱う抗体医薬品の凝集は、凝集化により発生する抗薬物抗体(Anti-drug antibodies : ADAs)に由来する薬効喪失や免疫原性の誘発などのリスクを含んでいる<sup>3)</sup>。抗体医薬品の凝集化は製造プロセスにおいてアップストリーム(生産培養)やダウンストリーム(精製)、製剤化、長期保存などの様々なプロセスで発生することが知られている<sup>4,5)</sup>。精製プロセスにおける酸性溶液への暴露による凝集化はよく研究されており<sup>6-8)</sup>、凝集抑制のための精製法などが開発されている。製剤化や長期保存中では緩衝液のデザインによりタンパク質のコロイド安定性を制御することが、凝集抗体の発生を抑えるために重要である<sup>9,10)</sup>。

一方、精製プロセスや製剤化などと異なり、抗体医薬品を生産現場としての細胞培養プロセスにおける凝集化抗体の発生に関しては理解が立ち遅れている。組換えタンパク質として生産される抗体医薬品は細胞内の生合成反応を生産に利用していることから、分子構造上不均一な抗体が生産されることが広く知られている。生合成反応の現場であるバイオプロセス(抗体生産CHO細胞の細胞内や細胞培養過程)では不均一性として、凝集化やミスフォールディング

など抗体の構造変化に由来する立体構造不均一性，糖鎖修飾に代表される細胞内翻訳後修飾の多様性に由来する化学構造不均一性，さらに断片化抗体や未成熟抗体成分の発生などの目的物質(抗体)由来不均一性，などが知られている。製剤後長期保存の研究と異なり，バイオプロセスにおける立体構造不均一性(抗体凝集化・ミスフォールディング)は抗体タンパク質自身の動的構造変化の特性に加えて，化学構造や目的物質由来の不均一性も複合的な要因として大きく影響する。細胞外に分泌された抗体の物性は細胞培養中のプロセスパラメーターである培地pH, 培養温度，溶存酸素濃度，浸透圧などの要因により影響を受けると同時に，これらのパラメーターは細胞自体にも影響を与える結果，細胞内の抗体生合成にも影響を与え分泌される抗体の特性を変化させるとされる。従って抗体医薬品の根源的な高品質化にはバイオプロセスを対象とした抗体の凝集化やミスフォールディング研究が必要であるが，残念ながらこのような基盤研究は国内では行われておらず理解が大きく立ち遅れている。

報告されているケーススタディーを次項以降で紹介するが，細胞培養プロセスにおける抗体凝集化機構の包括的な理解は進んでいない。本節では凝集抑制が可能なバイオプロセス構築を目的として，抗体凝集化機構の理解と制御について筆者自身の研究も交えて紹介したい。尚，本節では抗体医薬品生産のde fact standardの宿主細胞として使用されているCHO細胞生産系の事例，かつ実生産で行われている無血清浮遊培養の研究例に限定して紹介する。

## 1. 細胞培養プロセスにおけるタンパク質凝集のケーススタディー

### 1.1 培養液中(細胞外)におけるタンパク質凝集

文献に基づく報告では細胞培養プロセスにおけるタンパク質凝集の現象は2006年にCromwellらによってはじめて発表されている<sup>4)</sup>(正確には前年の国際会議で発表されていると推測される)。詳細な実験条件は述べられていないが，細胞培養プロセスにおいて培養日数に依存して凝集抗体の相対量が増加することを報告している。さらに細胞培養の途中で除細胞を行い，抗体を含む培地上清を細胞培養時と同条件でインキュベーションし，サンプリング，精製後の抗体溶液をサイズ排除クロマトグラフィー(Size exclusion chromatography : SEC)で分析している。結果，SEC分析では抗体のピーク面積自体は変化しない(インキュベーション中に抗体濃度は変化しない)が，凝集体抗体のピーク面積は増加し続けることを報告している。即ち，Cromwellらの報告では細胞培養プロセスにおいて細胞外に分泌された抗体は培地中で凝集体へと変化する現象を観測しており，この報告に基づき培養液中の分泌抗体の凝集を防ぐ研究がスタートしたのではないかとと思われる。

培養中の凝集体形成を抑制する試みとしてシスチンを培養培地に加えることで凝集体量が減

カルボキシペプチダーゼD(Carboxypeptidase D : CpD)がある。カルボキシペプチダーゼはタンパク質のC末端からアミノ酸を遊離させる加水分解酵素であり、生産抗体の電荷異性体の原因の1つである重鎖のC末端リジン残基(Lys)のプロセシングに関与していると考えられてきた。Genentech社のグループではCHO細胞で発現している5種類のカルボキシペプチダーゼの中でCpDがLysプロセシングに関与していることを見出し、CpDのノックアウトによりLysプロセシングのほとんどを抑制できることを報告している<sup>31)</sup>。

## 2. CHO細胞培養プロセスにおける凝集抗体の形成機構

### 2.1 ケミカルシャペロン添加による難発現性抗体の凝集抑制の試み

本項以降では筆者の研究報告例を紹介したい。我々は抗体凝集抑制が可能な手法としてケミカルシャペロン効果をもつ添加物としてトレハロースに着目した。トレハロースはタンパク質安定化剤・凝集抑制剤として実績がある“ケミカルシャペロン”の一種である。抗体ではないが培養中のタンパク質凝集の抑制を目的としてglycerol<sup>32)</sup>やNaCl<sup>33)</sup>を添加した報告があるが、積極的な改善を目指した添加例は存在しなかった。トレハロースは自然界に広く分布している二糖であり、細胞のストレス耐性に関連する細胞内蓄積物として知られていることから、CHO細胞に対して大きな毒性は示さない可能性があった。我々はトレハロースの抗凝集作用に着目し培地に積極的に添加することで、培養中にも生じていると考えられる抗体の凝集を防止する凝集抑制効果について検討した。対象としたモデル抗体として、東北大学の熊谷先生、浅野先生(現 東京農工大学)との共同研究で用いている一本鎖二重特異性抗体(Bispecific single chained diabody-Fc : scDb-Fc)を用いた。scDb-Fcは2種類の抗原認識部位を有する高機能多価性抗体であり、次世代型抗体医薬品として大きな期待が寄せられている<sup>34)</sup>。一方、我々の結果では、通常のIgG抗体と比較して、凝集性が高いという問題も有しており、凝集抑制を考慮した生産プロセスの例題としては最適であると考えられた。結果の詳細については著書及び文献<sup>35-37)</sup>を参照いただきたいが、トレハロースを添加した培養では抗体生産量の向上と凝集抑制が認められた。抗体比生産速度(1細胞あたりの抗体分泌生産能力)の増加は抗体の転写レベル上昇に起因すると考えられるが、トレハロース添加との因果関係は現在のところ明確にはなっていない。一方、同時に最大細胞濃度の減少が認められたが、これは高浸透圧培地における増殖挙動として普遍的であり、本研究ではトレハロース添加により培地浸透圧が319 mOsm/kgから480 mOsm/kgへと急激に上昇していた。抗体凝集に関して、CHO細胞培養上清からProtein AクロマトグラフィーによりscDb-Fcを精製し、SEC分析と精製を行い培養培地中における凝集性を評価した。scDb-Fcは単量体(Monomer)、二量体(Dimer)及び高分子