

第5章

バイオ医薬品の混入汚染物質・ウイルス安全性
の管理手法



サイエンス&テクノロジー

慶應義塾大学病院 尾山 和信

第一三共(株) 平澤 竜太郎

はじめに

バイオ医薬品の製造においては、原材料もしくは作業員や作業環境を介したウイルス混入のリスクを完全にゼロにすることはできず、リスクは常に存在する。特に、医薬品の安全性という観点から、ヒトに感染性・病原性を示すウイルスが最終製品に混入するようなことはあってはならず、予期せぬウイルス汚染により感染リスクを患者が負うことのないよう、科学的根拠に基づいたウイルス混入防止策を講じ、製品の安全性を確保する必要がある。また、ヒトに感染リスクのないウイルス種であっても、培養中の細胞基材のウイルス汚染は製品品質に大きな影響を及ぼすため、全量製品廃棄等のビジネスリスクにつながるおそれもある。

バイオ医薬品におけるウイルス安全性確保については、日本薬局方の参考情報「日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件」¹⁾に基本的な考え方が記載されているほか、国際的に調和されたガイドラインとしてICH Q5A²⁾が発出されている。ウイルスの種類は多種多様であり、その検出方法や不活化・除去に有効な手段もウイルス種ごとに異なるため、使用する原材料や製造方法によりケースバイケースでのリスク管理が求められる。培養工程中で顕在化しないようなケースもあるため、「どのようなウイルスも混入しうる可能性がある」という心構えを持ち、対応することが重要であろう。

本章では、最近の規制動向や技術的な話題を織り交ぜながら、バイオ医薬品製造におけるウイルス安全性確保に関する基本的な考え方を概説する。なお、本章における「原材料」とは、セルバンクの樹立や製造工程で使用される物質全般を指して用いており、各ガイドラインの用語の定義とは少々異なることに留意いただきたい。

1. バイオ医薬品製造における外来性ウイルス混入事例

ウイルス安全性確保の考え方は、実際の混入事例に学びながらアップデートされていくことも多い。本来あってはならないことだが、ウイルスが混入した最終製品がヒトに投与されてしまった事例としては、非加熱血液製剤による薬害事件や後述するロタウイルスワクチンの事例がよく知られており、これらの経験は関係者の意識を大きく変えるきっかけとなった。バイオ医薬品においては、最終製品がウイルス汚染されたという報告はないものの、製造工程におい

て外来性ウイルスの混入が発覚した事例は複数報告されている(表1)³⁻⁵⁾。混入経路は様々であり、原因の特定に至らなかったケースもあるが、多くは培地成分が原因又は疑わしいと考察されている。

生産培養工程におけるウイルス混入は、培養液のpH低下等、培養パラメータの異常により発覚することが多い。しかし、培養パラメータに影響が表れないケースも報告されており、生産培養終了時点やバルクハーベストにおいてウイルス試験を実施していなければウイルス混入を発見できなかったと考えられる事例もある⁴⁾。いずれにせよ、培養段階でウイルス混入が発覚した場合は、通常は廃棄等の適切な対応が行われるため、最終製品の汚染に至ることは想定されない。

ウイルスワクチンもバイオ医薬品と同様に培養細胞を用いて製造されることから、外来性ウイルス混入防止の管理戦略を学ぶ上で良いケーススタディとなりうる。2010年には、経口弱毒生ヒトロタウイルスワクチンの市販製品からPCV-1が検出されたと報告されており⁶⁾、その後の調査では、ウイルスシードの増殖に用いるVero細胞のセルバンクの汚染が判明し、細胞継代時に使用されたブタ由来トリプシンが汚染源であった可能性が高いと考察されている⁷⁾。なお、PCV-1混入発覚のきっかけが次世代シーケンシング(Next Generation Sequencing : NGS)解析であったことから、これを機にウイルス安全性評価におけるNGS利用の有用性について本格的に議論されることになった。

表1 バイオ医薬品の製造における外来性ウイルス混入事例
文献等で報告がある主な事例を示した。ワクチン等も含めるとさらに多くのウイルス混入事例が報告されている³⁻⁵⁾。

企業	発生年	細胞基材	ウイルス名
Bioferon	1988	CHO	EHDV
Genentech	1993, 1994	CHO	MVM
BioReliance	2000, 2003, 2004	CHO	CVV
Boehringer Ingelheim	2003	CHO	Vesivirus 2117
Amgen	2006	CHO	MVM
BioReliance	2006年以前	CHO	Reovirus
Genzyme	2008, 2009	CHO	Vesivirus 2117
Merrimack Pharmaceuticals	2009	CHO	MVM
Eli Lilly	2010年以前	HEK293	hAdV

第6章

バイオ医薬品における
製剤安定化のためのタンパク質凝集抑制手法



サイエンス&テクノロジー

1. タンパク質の凝集メカニズム

バイオ医薬品は、低分子化合物と比較し、分子量がはるかに大きく複雑な構造を有する。化学合成ではなくバイオテクノロジーを用いて細胞により生産されるため、全く同じ品質のバイオ医薬品を作るとはほぼ不可能である。バイオ医薬品において、目的物質に関する成分には、目的物質、目的物質関連物質、目的物質由来不純物が含まれる。目的物質由来不純物に分類される凝集体は、活性を低下させるだけでなく、免疫原性に関与している可能性があることから、凝集体の適切な管理、さらには抑制が求められる。

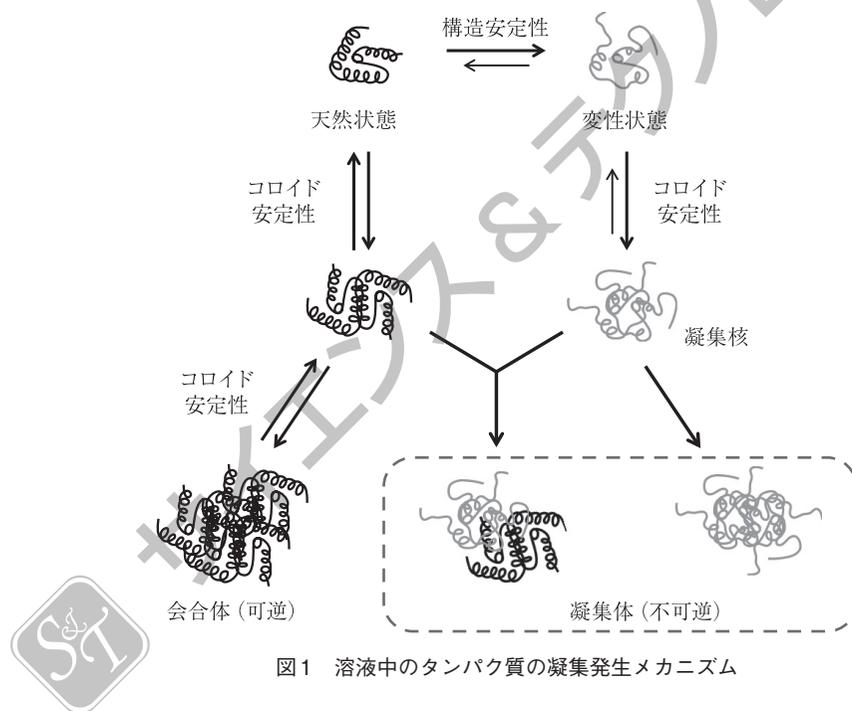


図1 溶液中のタンパク質の凝集発生メカニズム

バイオ医薬品の主成分であるタンパク質は、DNAによってコード化された、アミノ酸の直列配列からなる。この配列に応じて、タンパク質は折り畳まれ、機能する。タンパク質の溶液中における凝集体発生メカニズムを図1に示す。タンパク質の溶液中での物理化学的安定性には、構造安定性とコロイド安定性が寄与する¹⁻⁴⁾。正しく折り畳まれた天然状態のタンパク質は、本来の構造とは部分的、もしくは全体的に構造が異なる変性状態に変化することがある。このような変化は、化学ストレス、温度変化ストレス、メカニカルストレス、界面ストレス等

の、単独もしくは複数のストレスによって引き起こされる。変性状態のタンパク質は、内部に埋もれていた疎水性アミノ酸が外側に露出することにより、別のタンパク質分子と会合し、凝集体形成を促進する凝集核を形成することがある⁵⁾。凝集核にはさらに他の分子が会合し、大きな凝集体へと成長する。なお、厳密な定義は存在しないが、不可逆的な会合状態である場合に凝集体と呼び、可逆的である場合は会合体と呼ぶことが多い。

両親媒性の高分子であるタンパク質は、溶液条件に応じ、異なるサイズに自己会合することがある^{6,7)}。高濃度では、分子間の距離が縮まるため、より速いタンパク質の凝集核形成につながることを示唆されている⁸⁾。タンパク質の自己会合には静電相互作用等のタンパク質間相互作用が関与している。コロイド安定性は、タンパク質の分散状態を表す。単分散状態を示しやすい状態の場合、コロイド安定性が高く、会合しやすく多分散状態をとる場合にはコロイド安定性が低い、と呼ばれる。コロイド安定性は、静電相互作用や双極子-双極子相互作用、水素結合、ロンドン分散力、ファン・デル・ワールス力等の、分子間に働く複数の力の総和により決定される¹⁾。このように、タンパク質の凝集体形成は、タンパク質の構造安定性及び、もしくはコロイド安定性によって制御され得る。

2. バイオ医薬品の凝集を引き起こす原因

バイオ医薬品の凝集を引き起こす原因は様々である。化学ストレスでは、pH変化による変性や、酸素や光による酸化、金属との相互作用による変性、凝集等があげられる。また、バイオ医薬品は、温度変化によるストレスにも敏感である。振動、衝撃、圧力、攪拌、剪断力等のメカニカルストレスによっても凝集が引き起こされる。さらに、気液界面や固液界面等、界面との接触によるストレスで凝集することもある。これらストレスのいくつかの例を紹介する。

まず、バイオ医薬品へのpHの影響を述べる。一般的に、pH4以下、pH7以上はアミノ酸のグルタミン、アスパラギンの脱アミドが加速するといわれている^{9,10)}。また、アスパラギン酸は酸性領域でペプチド結合の切断やラセミ化を引き起こすことが知られている^{11,12)}。ジスルフィド結合は、タンパク質の立体構造を確立、維持するのに重要な役割を担っている。ジスルフィド結合が、本来とは異なる位置で形成された場合を、ジスルフィド結合のスクランプリングと呼ぶ。中性からアルカリ性では、ジスルフィド結合のスクランプリングが起りやすくなることが報告されている¹³⁾。これらの化学的安定性を考慮すると、タンパク質の保存には、pH4～7.5付近が好ましいといえる。

次に、ネットチャージについて説明する。タンパク質のネットチャージはpHで大きく変化する¹⁴⁾。pHが等電点より低い酸性溶液中では、タンパク質は正の電荷を有し、pHが等電点よ

第7章

CHO細胞と組換え抗体の不均一性
～細胞開発と培養プロセスについて～



サイエンス&サービス

(株)日本バイオデータ 東京農工大学 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合

緒方 法親

(株)日本バイオデータ 松田 朋子

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

抗体医薬品に代表されるタンパク質医薬品は、組換えDNA技術で製造されるバイオ医薬品の代表例である。IgG型抗体は重鎖，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ある。抗体等の高分子量タンパク質の生産・製造では動物細胞，特にチャイニーズハムスター卵巣(Chinese hamster ovary: CHO)細胞が用いられており，日本国内で承認されている抗体医薬品(抗体薬物複合体，Fc融合タンパク質を含む)では，8割近くがCHO細胞を宿主とした製造となっている¹⁾。医薬品として組換えタンパク質が用いられる場合，その品質保証・安全性が最も重要視される。製造工程で発生する「不純物」は，抗体等組換えタンパク質の品質や安全性に影響を与えうる。例えば宿主由来タンパク質(Host cell proteins: HCPs)は不純物の代表例であり，ヒトにとっては異種タンパク質であるため，製剤中への混入は少ない方が望ましい。また，目的物質(組換えタンパク質・抗体)由来の不純物である凝集体が製剤に混入しヒトへ投与されると，体内で免疫原性の原因となり抗薬物抗体の発生や細胞性免疫等が誘発される²⁾。これらの不純物は，目的物質である組換えタンパク質・抗体を生産する宿主細胞の性質(不均一性)や生産培養の方法と，どのような関連性があるのだろうか。筆者はアカデミア機関に所属しており，実際のバイオ医薬品製造現場とはかけ離れていることを承知の上で，CHO細胞や組換え抗体の不均一性・不純物に関して紹介したい。

1. CHO細胞の不均一性

1.1 生産細胞樹立時の不均一性・クローニング・モノクローナリティ

組換え抗体生産細胞を樹立の際，はじめにCHO細胞に抗体発現ベクターを遺伝子導入する。その後ベクターに対応する薬剤選択マーカー(抗生物質)を加えて細胞を培養する。生存したCHO細胞には抗体発現ベクターが染色体上に組込まれている(インテグレートされている)ことになる。この状態は(ヘテロ)プール細胞等と呼ばれており，染色体上の抗体発現ベクター導

入位置や導入されるベクターコピー数等によって、様々な特性を持つ(不均一性を持つ)細胞の集団である。バイオ医薬品生産におけるガイドライン ICH Q5D³⁾には「組換え DNA 技術応用医薬品の場合、「細胞基材」とは、目的の遺伝子配列が導入された形質転換細胞であり、さらに、単一の前駆細胞からクローニングされたものである」とある。即ち、プール細胞から細胞をクローニングし、一定の特性を有する単一クローン由来の細胞を樹立する必要がある。その際、高い抗体生産能力を持つクローン細胞の樹立が望まれるのはいうまでもないが、実際には高性能細胞の樹立は難しい。図1に動物細胞コロニーピッキングシステム ClonePix™ 2(モレキュラーデバイス社製)を用いたクローン細胞樹立の実例を示す。

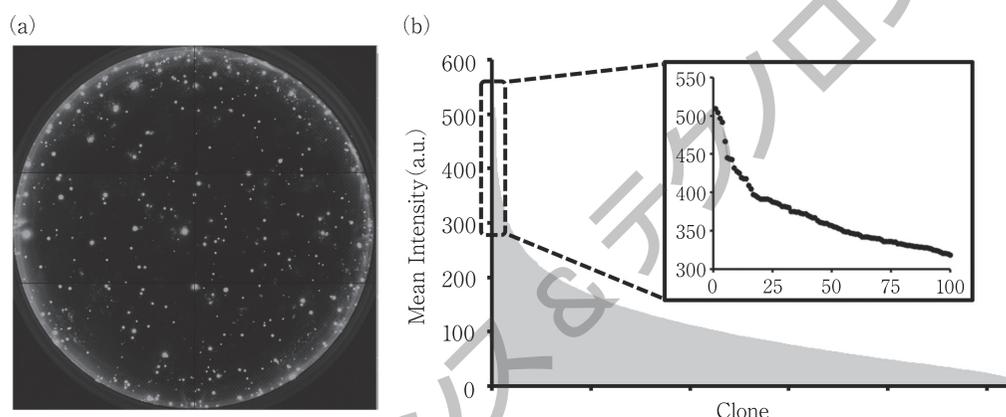


図1 コロニーピッキングシステムを利用したクローン細胞樹立の実例

非組換え CHO 細胞に抗体発現ベクターを遺伝子導入後、薬剤選択マーカールを含んだ培地でセレクションしたプール細胞からクローン細胞を樹立した。(a) 半固形培地上に形成した CHO 細胞コロニーの蛍光イメージング画像。蛍光強度の高いコロニーは抗体生産能が高いコロニーと判定される。(b) 蛍光強度のランクプロット。検出コロニーされた 5,200 個程度のコロニー (X 軸) を蛍光強度 (Y 軸) の高い順からランキングして表示した。蛍光強度はコロニーサイズに応じて平均化している。グラフ内に蛍光強度の高いコロニーを拡大して表示した。

蛍光強度のランキングプロット(図1(b))からわかるように、組換え抗体を高発現する細胞コロニーはプール細胞中ごく僅かであるため、高性能細胞の樹立は特別な手法を用いなければ難しい。このような CHO 細胞の不均一性が生じる原因は、ランダムインテグレーション(ランダム導入)により抗体発現ベクターが染色体上の様々な箇所に導入され、導入位置やベクターコピー数が細胞ごとに異なるためである。染色体上には転写活性が活発なユークロマチン領域と抑制されているヘテロクロマチン領域があり、クロマチンを構成するヒストンタンパク質の修飾状態(メチル化/アセチル化)等により、クロマチン構造の凝集状態と転写活性が制御されている。ユークロマチン領域に抗体発現ベクターが運良く導入されると、転写活性が活発なために高性能細胞への可能性が高まる。しかしながら、導入直後は転写活性が活発であって

第8章

宿主由来タンパク質(HCP)の測定法と
その留意点



サイエンス&テクノロジー

はじめに

宿主細胞由来タンパク質(HCP)は、バイオ医薬品の製造工程由来不純物のひとつである。バイオ医薬品の製法開発や製造管理において、HCPが恒常的に除去できていることの検証、工程内試験の設定、あるいは原薬の純度試験を設定することにより、適切に残留HCP量を管理しなければならない¹⁾。

本章では、HCPの評価の必要性、代表的なHCP測定法と実施上の留意点、管理の考え方などについて概説する。

1. HCPの評価の必要性

組換えタンパク質医薬品は、宿主細胞としてチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞などの動物細胞や大腸菌に目的物質をコードする遺伝子を導入、安定に発現させた細胞(組換え細胞)を用いて製造される。例えば、組換えサイトカインを安定発現するCHO細胞を培養すると、細胞外に分泌され、組換えサイトカインを含む培養上清溶液として回収できる。あるいは、インスリンのような単純タンパク質は、大腸菌で産生させることができ、大腸菌の溶解物として組換えインスリンを得ることができる。

目的とする組換えタンパク質を含む培養上清や細胞溶解液には、宿主細胞に由来する、数百から数千種類のタンパク質(HCP)が含まれている。HCPは、それ自身が抗原として免疫反応を引き起こすだけでなく、抗薬物抗体を誘導するアジュバントとなることが懸念されている。また、目的物質や製剤の成分を分解する酵素活性を持つHCPは、目的物質の失活や凝集体の形成を惹起することが明らかとなっている。したがって、各種クロマトグラフィーを組み合わせることで、可能な限りHCPを減少させることが必須であり、十分除去されていることを確認する試験を設定することが必要となる。

2. HCP測定法の概要

2.1 HCPの代表的な測定方法

HCPは、多種類のタンパク質の混合物であるため、全てのHCP種を個別に測定することは、実務上不可能である。そこで、HCP種を区別せず、全てのHCPをまとめて測定するELISA

(HCP-ELISA) が用いられるようになった。HCP-ELISA に用いる抗体は、個々のHCP種を単離せず、混在したものをHCP抗原として動物に免疫することで、全てのHCP種と反応しうる抗HCPポリクローナル抗体を用いる。例えば、CHO細胞を宿主細胞として分泌タンパク質として生産するケースであれば、目的物質の遺伝子を導入していないCHO細胞の培養上清を抗原とする。標準物質としてHCP抗原とし、抗HCPポリクローナル抗体を補足抗体及び検出抗体として用いたサンドイッチELISAを確立することで、HCP混合物の総量として測定することができる。現在、HCP-ELISAは、標準的なHCP定量法として用いられており、日本薬局方に指針が示されている¹⁾。

HCP-ELISAを実施するためには、HCP抗原の調製、抗HCP抗体の作製、さらに測定系の確立が必要で、数ヶ月から年単位の準備期間を要するため、バイオ医薬品の製法開発期間に影響する。ただし、CHO細胞や大腸菌のように、汎用されている宿主細胞については、開発済の測定キットとして入手可能であるため、開発初期の製法開発の段階など、製法が確立されていない段階では、「汎用試験法」活用することが可能である。

バイオ医薬品の精製工程の開発は、残留HCPを限りなく減らすように工夫され、原薬の段階ではHCP-ELISAの定量下限に到達することもあるが、汎用試験法を用いた場合は、測定結果の解釈に留意が必要である。例えば、CHO細胞を用いたバイオ医薬品の培養条件と、ELISAキットのHCP抗原の調製条件の違いによって、HCPのプロファイルが異なり、測定から漏れるHCP種が少なくなく、測定値が過小評価されている可能性がある。したがって、製法開発が完了し、臨床試験に移行する段階には、培養工程を反映したHCP抗原を用いた抗HCP抗体を調製し、「製品特異的試験法」を確立して、試験法を変更することが望ましい。なお、抗体医薬品などプラットフォーム化された製造方法で類似の製品を開発する際は、「プラットフォーム試験法」を用いることができる。

HCP-ELISAの測定値は、試験法に用いる抗HCP抗体の性能に依存して変動する。一般的に、汎用試験法から製品特異的試験法に移行する際、測定値の上昇が観察される。このことは、HCPの検出力が高まったことを意味している。ロット間の残留HCP量の変動を正しく評価するためには、測定できるHCP-ELISAを適宜選択することが望ましい。定量下限未満の測定値が達成された場合は、HCP-ELISAに用いている抗HCP抗体が適格で、十分にHCPが除去された結果であるか、測定できていない可能性がないか、注意深く判断する必要がある。

2.2 HCP-ELISA に用いる抗HCP抗体の適格性評価方法と留意点

HCP-ELISAの重要試薬である抗HCP抗体は、個々のHCP種が混在したものを抗原として免疫して調製されるため、各HCPの抗原性の違いや免疫動物の個体差などにより、抗HCP抗