

# バイオ医薬品・バイオマーカー測定技術

株式会社住化分析センター 医薬事業本部 バイオ技術センター  
岡嶋 孝太郎 曾根原 和彦\*

## はじめに

医薬品の開発では、探索から、非臨床・臨床開発、申請、市販後の長きに亘る期間で、さまざまな局面が発生するが、その時々判断材料となるのは、信頼度の高い分析データである。したがって医薬品開発における分析の果たす役割は重要である。

従来の医薬品は低分子化合物が中心であったが、特異性に優れ、有効性、安全性が高い新しい化合物を見出す確率は年々低下している。一方、低分子医薬品に代わり、特定の受容体などを標的とした高機能な生理活性タンパクや抗体医薬品などのタンパク性バイオ医薬品が登場してきた。バイオ医薬品は疾患部位への作用の特異性が高く、生体成分を模倣したものでは副作用も比較的少ないことから、薬物療法に新たな選択肢を提供するとともに、製薬企業のパイプラインとして重要な位置付けを占めるようになってきた。更に特定の遺伝子発現を制御する核酸を利用した核酸医薬品開発も進んでおり、2010年代末までに、タンパク性バイオ医薬品や核酸医薬品などの高分子医薬品が世界の新薬の30~50%を占められると予測されている<sup>1)</sup>。バイオ医薬品、核酸医薬品の分析では、生体成分と類似の高分子であるため、従来の低分子医薬品に用いていたHPLC、GC/MSやLC/MS/MSなどのカラム分析機器を用いるのとは異なる分析法・技術の開発が必要になる。当社では、バイオ医薬品のこれからの発展性に注目し、それらの分析法開発に、いち早く取り組んでいる。

バイオマーカーは、生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療に対する薬理学的反応の正確な指標として用いられるもの<sup>2),3)</sup>と定義されている。医薬品開発プロセスにおいては、疾患・診断マーカー、薬効マーカー、毒性マーカーとして用いられ、これらを駆逐することによって、非臨床段階における薬効・毒性評価、解析レベルの向上、臨床段階においては従来

困難であったヒトの薬効・安全性の評価、予測精度の格段の向上が期待されている。

近年、オミックス技術 (genomics, proteomics, metabolomics) の発展・普及により、測定可能なバイオマーカーが増えており、医薬品開発における成功確率の向上、上市の迅速化のためのツールのひとつとして、医薬品開発には欠かせない測定対象となっている。

今回は1. バイオ医薬品の生体試料分析 (PK/TK測定)、2. 抗体価測定、3. バイオマーカー測定について当社で行った測定例の一部を紹介する。

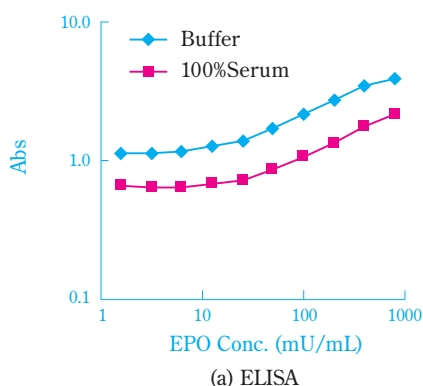
## 1. バイオ医薬品の生体試料分析

糖タンパク質や抗体などのバイオ医薬品の生体試料分析は、免疫学的手法 (イムノアッセイ) の抗原-抗体反応を利用したELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法、ECL (Electrochemi-luminescence ; 電気化学発光) 法、SPR (Surface Plasmon Resonance ; 表面プラズモン共鳴) 法を用いて実施している。ここでは、ECL法の特徴と測定例について紹介する。

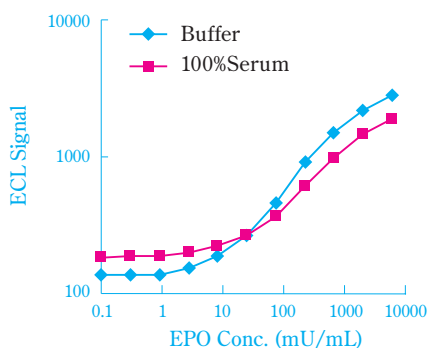
### ECL法によるヒト血清中エリスロポエチンの定量

ECL法はあらかじめ検出抗体に標識したSulfo-Tagと呼ばれるルテニウム錯体の電解酸化、還元による発光の検出を原理とする測定方法である。プレート底面に電気を流し、底面に固定化した抗体分子の近傍で起こる結合のみを検出することから、プレート側面等の非特異吸着によるバックグラウンドの影響を受けず、一般的にELISA法よりも高感度に測定することが可能である。ヒト血清中のエリスロポエチン定量をモデル実験としてECL法とELISA法とを比較したところ、ECL法は定量範囲、感度に優れ、マトリックス効果が少なく、短時間での測定が可能であり、しかも使用するサンプル量が少なくすむという結果が得られた (Fig. 1, Table 1)。この結果から、ECL法はバイオ医薬品のPK測定において非常に有用な分析法であり、今後ますます需要が伸びると考えられる。

\* 現所属：ファーマ大阪事業所



(a) ELISA



(b) ECL

**Fig. 1** Calibration curve of EPO using ELISA (a) and ECL (b)

## 2. 抗体価測定

投与されたバイオ医薬品に対して体内で抗体が産生すると、①抗体との結合による濃度レベル低下や、

**Table 1** Comparative results of ECL and ELISA assay

	ECL	ELISA
Sensitivity&range (mU/mL in human serum)	2.74~6000	50 ~ 400
Matrix effect (human serum/buffer ratio at LLOQ)	2.74/2.74 = 1	50/12.5 = 4
Time (h)	4 ~ 5	6 ~ 7
Sample expenditure (μL)	25	100

可逆性結合の結果として持続性発現など、製剤の薬物動態、PK/PDが変化する、②他の類似タンパク製剤での治療が困難となる、③製剤類似の内源性ホルモンや情報伝達物質の活性が消失することがあるといった様々な問題が生じ、稀に生命に関わるほどの重篤な副作用につながるため、免疫原性の評価は必須である。現在までに、インターフェロンやエリスロポエチンといったタンパク製剤のみならず、REOPRO®やRemicade®といった抗体医薬品においても免疫原性が確認されている<sup>4)-9)</sup>。免疫原性を評価する方法として、ELISA法、ECL法、SPR法などが知られているがそれぞれメリットとデメリットがある (Table 2)。なお、アッセイ法についての規制は現在国際調和の途上ではあるが、EMAガイドライン<sup>10)</sup>、FDAドラフトガイダンス<sup>11)</sup>並びにWhite paper<sup>12)</sup>を参考に、多段階評価 (スクリーニングアッセイ、確認アッセイ、アイソタイピング、

**Table 2** Comparison of immunogenicity assay

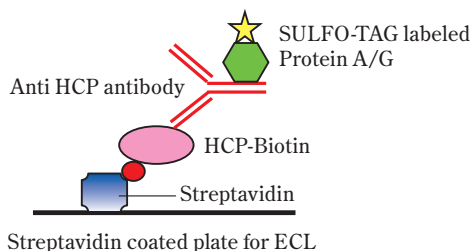
	ECL	ELISA	SPR・Biacore
Characteristics	Applied plate assay	Popular plate assay	Real-time flow-based detection
	High sensitive	Established method	Label-free
Pros	Wide range	High sensitive	Can detect Low-affinity Abs (early immune response)
	Can detect Low-affinity Abs	Inexpensive equipment	Characterize detected Abs
	High throughput	High throughput	—
	Not yet established	High background	Not yet established
Cons	May not detect all low-affinity Abs?	Limited in ability to detect low-affinity Abs	Moderate Sensitivity
	—	—	Expensive equipment
	—	—	Low throughput relatively
Sensitivity (detection of low-affinity Abs)	570 ± 370 ng/mL	26000 ± 9020 ng/mL	3900 ng/mL

中和抗体アッセイなど)の分析法を構築することが求められている。

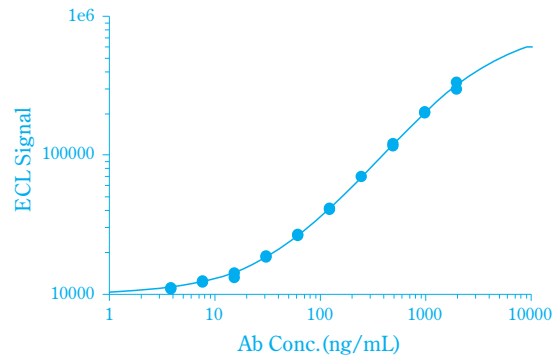
EMAガイドライン<sup>10)</sup>においては、偽陰性を避けるためにECL法、SPR法を用いることを推奨していることから、近年はECL法、SPR法が主流となっている。ここでは、ECL法の利用例として、宿主細胞由来タンパク(HCP, Host Cell Protein)に対する抗HCP抗体の測定を、SPR法の利用例としてヒト血清中抗G-CSF抗体測定について述べる。

### ECL法による抗HCP抗体の測定

動物細胞等を用いて製造されるバイオ医薬品では、製造時の宿主細胞(Host Cell)由来の不純物であるHCP(Host Cell Protein)が混入することで、重篤な免疫反応や、主剤の免疫原性亢進が引き起こされることがある<sup>13)</sup>。そのため、量的な規格だけではなく、臨床試験で抗体の産生が認められた場合など、影響管理が必要なHCPについて、医薬品医療機器総合機構(PMDA)により抗HCP抗体の測定を求められる場合がある。HCPは不特定かつ多様な異種タンパク混合物であることから、免疫原としての性質も多様となり、対する抗HCP抗体も、エピトープ、アイソタイプ・サブクラスの多様なものとなる。この多様な抗体を網羅的に検出するために、我々は幅広いアイソタイプ・サブクラスの抗体のFc部位と親和性を有するProteinA/Gに着目した。HCPを固相化したプレートに試料を添加した後、Sulfo-Tagで標識したProteinA/Gを検出試薬として使用したところ(Fig. 2)、動物種差に影響されずに抗HCP抗体をECL法で検出可能となった。定量範囲は100%ヒト血清中濃度換算で390~2.0×10<sup>5</sup> ng/mLであり、FDAドラフトガイダンス<sup>11)</sup>で求められる250~500 ng/mLの定量下限濃度を確保した測定法を確立した(Fig. 3)。



**Fig. 2** Assay principle of detection of anti-HCP antibodies



**Fig. 3** Calibration curve of anti HCP antibodies in 1% human serum

### SPR法によるヒト血清中抗G-CSF抗体測定とそのアイソタイピング

SPR法は、測定を通じて抗原-抗体反応の様子をリアルタイムでモニターすることができることから、低親和性抗体を確実に検出できる唯一の方法である。また、免疫原性試験においては産生された抗体のアイソタイプを評価することが求められるが、SPR法では検体添加後に二次抗体を順次注入するという非常に簡便な方法でアイソタイピングを行うことができる。さらに、陽性対照抗体は結合するものが1種類あればよく、標識の必要もない。一方で、装置が非常に高価であること、また、タンパク質を化学的に固定化することから立体構造が変化し、思うように抗原-抗体反応を観察できないことが稀に見られる。

モデル実験として行ったヒト血清中抗G-CSF抗体測定のバリデーションでは、検量線の真度が0.39から25 µg/mLの範囲で-0.6~4.1%と良好な結果が得られた。一方、再現性の面で、SPR法では、測定ごとに抗原を固定化したセンサーチップを洗浄(再生)させる必要があり、センサーチップに固定化したタンパクが測定回ごとに劣化するため、何回まで再生溶液の曝露に耐えられるかを評価しておく必要がある。測定直後におけるQC試料の定量値と112回から117回で測定したQC試料の定量値を比較し、その回収率を評価したところ、両濃度ポイントにおいてほぼ100%の回収率が得られた。従って、このセンサーチップでは少なくとも117回までは安定に測定が可能であると判断した。

次いで生成抗体のアイソタイプを評価した。ここで、試料添加後、抗IgM抗体、抗IgA抗体、抗IgE抗体、抗IgG抗体を順に添加しているが、その際のブランク試料

とQC試料におけるレスポンスの変動差に注目する。抗IgM抗体、抗IgA抗体、抗IgE抗体の添加によりブランク試料、QC試料においてほぼ同じレスポンスの変動が見られたが、抗IgG抗体を添加した際、ブランク試料において93.5 RUの上昇が観測されたのに対して、QC試料では1029 RUとブランク試料に比較して有意なレスポンスの上昇が観測された (Fig. 4)。すなわち、センサーチップに固定化されたタンパクに結合したQC試料中の抗体に対して抗IgG抗体が結合したことを意味している。従ってQC試料に含まれる抗体のクラスがIgGであると判断できる。

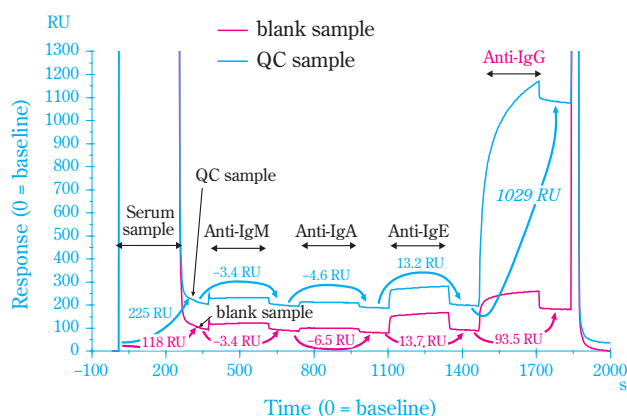


Fig. 4 Sensorgrams of isotyping

### 3. バイオマーカー測定

当社もオミックス技術によるプラットフォームの充実に注力しており、例えば、mRNA発現解析やSNPs解析はリアルタイムPCR法、液性タンパクはECL法、ピーズアレイ法、LC-MS/MS法、細胞内・表面タンパクはフローサイトメトリー (FCM) 法、低分子はGC-MS法といったように、各種バイオマーカーの性質にあわせた様々な測定プラットフォームを用いて、各種バイオマーカーの測定を行っている。

一方、現状ではバイオマーカー測定に体系的に定められた規制はなく、マーカーの品目・分子種および申請資料における位置付けや、参考となる医薬品のガイドライン<sup>14)-17)</sup>を勘案の上、妥当な測定を行うことが求められる。

ここでは、細胞表面のバイオマーカー解析などに有用なFCM法について紹介する。

### FCM法によるヒト白血病T細胞へのアポトーシス誘発確認

FCM法は、細胞や微小粒子にレーザー光を照射して得られる散乱光や蛍光を利用し、個々の粒子特性を解析する技術である。医薬品開発においても、免疫細胞を中心とする生体内の浮遊細胞や、浮遊系の細胞株を用いた細胞特性解析の有力なツールである。細胞表面の抗原発現量の解析、細胞内のサイトカイン・リン酸化タンパク質の存在量の解析、細胞内DNA含量による細胞周期解析などが可能となる。

ヒトT細胞白血病株 Jurkat cellへの抗がん剤・ビンブラスチン曝露により誘導されたアポトーシスを、細胞膜構造の変化、すなわち、ホスファチジルセリンの細胞膜表面出現を、アネキシンVとの結合反応を利用したアネキシンV法で、FCM法を用いて解析し、がん細胞が抗がん剤の作用により、膜構造の変化・細胞の断片化を経て、細胞死に至るアポトーシス誘発が確認できた (Fig. 5)。

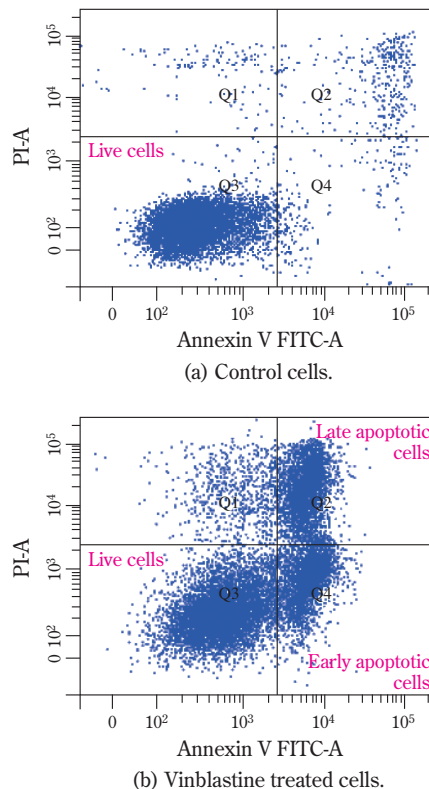


Fig. 5 Apoptosis detection by flow cytometry of (a) control and (b) vinblastine treated cells



## おわりに

以上、ますます需要が増加すると推定されるバイオ医薬品及びバイオマーカー測定技術について紹介した。今後、製薬企業のニーズに適合したサービスを作り上げるべく、商品開発と、既存の技術・商品を組み合わせたパッケージ化を進め、医薬品開発に貢献していきたい。

## 引用文献

- 1) 西村 尚子, “新たなバイオ医薬品開発—最前線レポート”, Nature 日本語版FOCUS, Nature 2011年6月30日号, <http://www.natureasia.com/japan/nature/ad-focus/110630.php>
- 2) “Biomarkers and Surrogate Endpoints: Clinical Research and Applications”, G. J. Downing (編), Elsevier (2000).
- 3) FDA critical path initiative report.
- 4) S. Porter, *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1 (2001).
- 5) P. Chamberlain and A.R Mire-Sluis, *Dev Biol Basel*, **112**, 3 (2003).
- 6) A. S. Rosenberg, *Dev Biol. Basel*, **112**, 15 (2003).
- 7) H. Schellekens and N. Casadevall, *Dev Biol. Basel*, **112**, 23 (2003).
- 8) H. Frost, *Toxicology*, **209**, 155 (2005).
- 9) A. Kromminga and H. Schellekens, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1050**, 257 (2005).
- 10) European medicines Agency, “Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins, 13 Dec 2007”, [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003946.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003946.pdf)
- 11) Food and Drug Administration, “draft Guidance for Industry: Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins, December 2009”, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM192750.pdf>
- 12) E. Koren, H. W. Smith, E. Shores, G. Shankar, D. Finco-Kent, B. Rup, Y. C. Barrett, V. Devanarayan, B. Gorovits, S. Gupta, T. Parish, V. Quarmby, M. Moxness, S. J. Swanson, G. Taniguchi, L. A. Zuckerman, C. C. Stebbins and A. Mire-Sluis, *J. Immunol. Methods*, **333**, 1 (2008).
- 13) E. Koren, L. A. Zuckerman and A. R Mire-Sluis, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **3**, 349 (2002).
- 14) Food and Drug Administration, “Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, May 2001”, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>
- 15) European Medicines Agency, “Guideline on bioanalytical method validation, 21Jul 2011”, [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)
- 16) J. W. Lee, V. Devanarayan, Y. C. Barrett, R. Weiner, J. Allinson, S. Fountain, S. Keller, I. Weinryb, M. Green, L. Duan, J. A. Rogers, R. Millham, P. J. O'Brien, J. Sailstad, M. Khan, C. Ray and J. A. Wagner, *Pharm. Res.*, **23**, 312 (2006).
- 17) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長, 薬食審査発0120第1号, 平成23年1月20日, “医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー: 適格性確認のための資料における用法の記載要領、資料の構成及び様式”, [http://www.pmda.go.jp/ich/e/e16\\_11\\_1\\_20.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/e/e16_11_1_20.pdf)

株式会社 住化分析センター ホームページ  
URL <http://www.scas.co.jp/>

お問い合わせ先：  
株式会社 住化分析センター 医薬事業本部  
医薬事業部営業部 大阪  
〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-6-17  
住化不動産横堀ビル  
TEL：06-6202-1801  
医薬事業部営業部 東京  
〒113-0033 東京都文京区本郷3-22-5  
住友不動産本郷ビル  
TEL：03-5689-1217