

1 宿主細胞由来タンパク質試験法

2 宿主細胞由来タンパク質(HCP)は、医薬品製造に用いた宿主
3 細胞に由来するタンパク質の総称である。本参考情報では、遺
4 伝子組換え技術を用いて製造されたタンパク質医薬品(組換え
5 タンパク質医薬品)に残留するHCPに関する試験について述べ
6 べる。

7 組換えタンパク質医薬品に残留したHCPは、それ自身が抗
8 原として免疫反応を引き起こす原因となる可能性があり、また、
9 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る。

10 したがって、組換えタンパク質医薬品の有効性と安全性を確保
11 するために、製造工程の開発においては、HCPを安全性に影
12 響のないレベルまで減少させる製法を確立することが必要であ
13 る。また、工程内試験でHCPが恒常的に除去できていること
14 の検証、あるいは、原薬の純度試験の設定により、HCP残留
15 量を適切に管理しなければならない。

1. HCP試験法の選択

17 HCP試験法としては、通常、HCPを抗原とする抗体(抗HCP
18 抗体)を用いたサンドイッチ免疫学的測定法が用いられ、検出
19 系として酵素免疫測定法(ELISA)、電気化学発光免疫測定法
20 (ECLIA)、時間分解蛍光免疫測定法(TRFIA)などが用いられる。
21 本参考情報においては、サンドイッチ免疫学的測定法について
22 扱うが、他の試験法を排除するものではない。

23 組換えタンパク質医薬品の製造で残留するHCPは、複数種
24 類のタンパク質から構成される集団で、そのプロファイルは、
25 宿主細胞の違いだけでなく、製造条件によっても異なると考え
26 られている。HCP試験法は、使用目的や試験に用いる抗HCP
27 抗体の調製方法に対する考え方の違いから、汎用試験法、製品
28 特異的試験法、プラットフォーム試験法に分類される。汎用試
29 験法は、同様の宿主細胞[例えば、CHO(チャイニーズハムスタ
30 ー卵巣)細胞に由来するCHO-K1細胞やCHO-DG44細胞]を用い
31 て製造される医薬品に対し広く使用できることを目的とし、宿
32 主細胞全体のタンパク質(細胞抽出液あるいは培養上清)を免疫
33 原として作製された抗HCP抗体を用いて構築された試験法で
34 ある。市販されているHCP測定用の試薬やキットは、通常、
35 汎用試験法に該当し、使用する際には、その妥当性を確認する
36 必要がある。製品特異的試験法は、特定の製品のHCPを管理
37 することを目的として、当該製品の製造工程の特徴を考慮して
38 開発されるものである。プラットフォーム試験法は、プラット
39 フォーム化された製造方法で生産される組換えタンパク質医薬
40 品(十分な経験のあるモノクローナル抗体など)に適用すること
41 を目的として開発されるものである。

42 汎用試験法は、宿主細胞全体のタンパク質を抗原とすること
43 で、広範囲のHCPに対する抗体を網羅的に得ることを意図し
44 たものである。しかし、抗原として用いる個々のタンパク質の
45 存在比率や免疫原性の違いにより、全てのHCPに対する抗体
46 を得ることは困難であること、製造工程の違いによって残留す
47 るHCPのプロファイルが異なることがあるため、実際の製造
48 工程で残存するHCPのカバー率が十分でない可能性に留意す
49 る必要がある。一方、製品特異的試験法では、残留する可能性
50 の高いHCPを抗原とするため、汎用試験法よりも実際の製造
51 工程において残留するHCPを検出可能な抗HCP抗体が調製で
52 きることが期待される。ただし、製造工程の変更によって残留

53 するHCPのプロファイルが変動する可能性に留意する必要が
54 ある。プラットフォーム試験法は、これらの試験法の中間的な
55 考え方に位置するもので、プラットフォーム化された製造方法
56 を用いて製造される様々な製品に適用可能であるという利点を
57 有するが、抗HCP抗体の作製に用いる抗原の調製方法によっ
58 て、汎用試験法あるいは製品特異的試験法と同様の課題を含む
59 可能性がある。

60 製品によっては、目的物質に結合する特定のHCPが存在す
61 る可能性、あるいは、目的物質の発現に伴って産生量が著しく
62 増加するHCPが生じる可能性等も考えられる。このような
63 HCPの残留が認められた場合は、当該HCPに対する他の試験
64 法の設定の必要性を考慮する。

65 以上のような各HCP試験法の特徴を踏まえ、宿主細胞の性
66 質、製造工程の特徴、HCPの免疫原性に関する知識、製品の
67 開発段階等を考慮して、適切な試験法を選択する。

2. 試薬の調製と特性解析

2.1. HCP抗原/HCP標準物質

70 製品中のHCPを特異的に検出する抗体を産生させるための
71 抗原として、目的物質を含まないHCPの調製が必要である。

72 通常、ヌル細胞を用い、試験法の目的に応じたHCPが網羅的
73 に含まれていることに留意して調製する。また、HCPは抗原
74 として用いるだけでなく、定量用の標準物質としても用いるほ
75 か、抗HCP抗体のアフィニティークロマトグラフィーによる
76 精製のリガンドとして用いる場合もある。

2.1.1. HCP抗原/HCP標準物質の調製

78 試験法の種類によって、HCP抗原/HCP標準物質の調製方
79 法が大きく異なる。各試験法における抗HCP抗体作製用抗原
80 あるいはHCP標準物質として用いるHCPの調製法と留意点に
81 ついて以下に示す。

82 汎用試験法に用いるHCPは、培養上清あるいは細胞を溶解
83 又は破碎したもとのから、構成タンパク質種の保持に留意し、濃
84 縮や透析等、最小限の操作に留めて調製する。実生産における
85 培養工程と異なる条件で調製するため、製品に残留するHCP
86 とは異なるプロファイルを示すことに注意が必要である。

87 製品特異的試験法に用いるHCPは、ヌル細胞を起源として、
88 製品の製造工程を適用して調製する。通常、広範囲のHCPを
89 確保するため、精製工程の適用は最小限に留める。ただし、測
90 定すべきHCPに対する抗体が十分に得られない場合は、HCP
91 の調製条件を検討する、あるいは、特定のHCPを排除したも
92 のを調製するなど、適切なHCP抗原の調製が必要になる場合
93 がある。

94 プラットフォーム試験法に用いるHCPは、ヌル細胞を起源
95 として、複数の製品で用いられているプラットフォーム化され
96 た製造方法を適用して調製する。通常、他の試験法と同様に、
97 広範囲かつ十分量のHCPを確保するため、精製工程の適用は
98 最小限に留める。また、製造条件の僅かな違いによるHCPス
99 ベクトルの差異をカバーするために、複数の条件で調製した
100 HCPを混合したものをを用いることも可能である。

101 製品特異的試験法及びプラットフォーム試験法用のHCPの
102 調製に用いるヌル細胞としてモック細胞を用いることは、選択
103 マーカーとして発現されるタンパク質が抗原中に含まれること、
104 実際の製造工程により類似した培養条件下で細胞が培養でき
105 ることなどの利点を有している。一方、同一の細胞株であっても、
106 各クローンの細胞増殖速度等の性質が必ずしも一致しないこと、

107 また、目的物質の産生の有無などの違いによって、異なる
108 HCPプロファイルを示す可能性に留意する必要がある。

109 2.1.2. HCP抗原/HCP標準物質の特性解析

110 調製したHCPについて、以下の事項について解析する。

111 1) タンパク質濃度

112 HCPの調製方法によっては、宿主由来の核酸や培養液成分
113 が含まれることに留意して、適切な測定法でタンパク質濃度を
114 求める。具体的な測定方法と留意点については、参考情報「タ
115 ンパク質定量法」が参考になる。

116 2) HCPプロファイル

117 通常、一次元電気泳動法(SDS-PAGE)又は二次元電気泳動法
118 を用い、調製したHCPに製造工程や原薬に残留すると予測さ
119 れるHCP種が含まれることを確認する。質量分析法を用いた
120 HCP種の同定も有用な手法である。

121 2.2. 抗HCP抗体

122 2.2.1. 抗HCP抗体の調製

123 HCPは、多種多様なタンパク質から構成されているため、
124 試験に用いる抗HCP抗体として、それらを網羅的に検出でき
125 るポリクローナル抗体を取得する。免疫に用いる動物種は、ウ
126 サギ、ヤギ、ヒツジがよく用いられる。免疫の際は、アジュバ
127 ントを用いて免疫応答を増強させることが有用である。HCP
128 を構成する個々のタンパク質の免疫原性の程度は異なるため、
129 抗原となるタンパク質の量に関わらず、抗体が誘導される時期
130 や産生量は一定ではない。また、免疫に用いた動物の個体差に
131 よっても、誘導される抗体のプロファイルは同一とならない。
132 通常、複数回の免疫が必要で、各段階の抗血清を用いたウエス
133 タンブロット等で、誘導された抗体のHCPとの反応性を確認
134 した後、全血清を回収する。複数の個体に由来する抗HCP抗
135 体を混合することは、十分な抗体量を確保するためだけでなく、
136 HCPプロファイルの偏りの解消に寄与することが期待できる。
137 得られた抗血清から、プロテインA又はプロテインGクロマト
138 グラフィーを用いて抗HCP抗体を精製する。いずれの場合
139 も、カラムから抗体を溶出させるために酸性条件を用いている
140 ため、一部の抗体から凝集体が生成されることがある。抗体の
141 凝集体は、測定を妨げる原因となることが懸念されるため、適
142 切な方法で除去することが有用である。

143 抗HCP抗体は、HCPをリガンドとしたアフィニティークロ
144 マトグラフィーで精製することもできる。この精製によって、
145 HCPに特異的な抗体が濃縮されるため、非特異的な反応を排
146 除することが期待できるが、低親和性の抗体が吸着されにくい
147 ことや極めて高親和性の抗体が溶出されにくいことで抗HCP
148 抗体の多様性が低下する可能性に留意する必要がある。

149 2.2.2. 抗HCP抗体の適格性評価

150 抗HCP抗体は、製造工程や原薬に残留すると予測される広
151 範囲の電荷及び分子量を持つHCPを網羅的に認識するもので
152 なければならないが、各HCP種の抗原性の違いにより、一部
153 のHCPに対する抗体が誘導されにくい場合もあるため、得ら
154 れた抗HCP抗体の適格性を確認しなければならない。通常、
155 抗原カバー率で評価する。具合的な評価方法の一例を、以下に
156 示す。HCPを二次元電気泳動法で分離後、ゲルの総タンパク
157 質を染色する。同様に実施した二次元電気泳動について、抗
158 HCP抗体を用いたウエスタンブロットを行う。各染色で得た
159 スポットパターンを比較し、総タンパク質染色のスポット数に
160 対する、ウエスタンブロットで検出されたスポット数の割合を

161 抗原カバー率とする。

162 2.3. 試薬類の保存

163 HCP標準物質や抗HCP抗体は、安定性に留意して保存する。
164 これらの試薬の安定性は、標準物質の用量反応曲線のパラメー
165 ター等を継時的に観察することで確認できる。

166 3. HCP試験法のバリデーション

167 HCP試験法としてサンドイッチ免疫学的測定法を用いる場
168 合、バリデーションの基本的な要件は、参考情報「分析法バリ
169 デーション」等が参考になる。ただし、HCP試験法は、単一
170 の抗原を定量する一般的なサンドイッチ免疫学的測定法とは異
171 なり、多様なHCP種の混合物を抗原として作製した抗体を用
172 いることで、各HCP種を区別することなく同時に測定する手
173 法であるため、HCP標準物質で直線性が確認された定量範囲
174 であっても、精製が進んだ試料においては、試料の希釈率に応
175 じた濃度変化(希釈直線性)を示さないことがある。この現象は、
176 個々のHCPの精製工程での除去率の違いにより、測定試料中
177 で一部のHCPの比率が高まるため、それらに対する抗体が不
178 足することに起因すると考えられており、HCP濃度を実際よ
179 りも過少に評価してしまう可能性がある。

180 したがって、HCP試験法においては、真度、精度、特異性、
181 検量線、定量範囲及び希釈直線性についてバリデーションを実
182 施する。

183 (1) 真度及び精度

184 真度及び精度は、測定対象となる精製工程ブールあるいは原
185 薬に対するHCP標準物質の添加回収試験を実施し、HCP標準
186 物質の回収率及び定量値の変動係数によって示す。

187 (2) 特異性

188 HCP試験法においては、大量の目的物質を含む試料中に残
189 留する微量のHCPを測定する必要があるため、目的物質や試
190 料溶液中の成分による干渉がないことを確認する。

191 (3) 検量線及び定量範囲

192 段階希釈したHCP標準物質を用いて検量線を作成し、回帰
193 式を求め、決定係数等で妥当性を示す。回帰式から各濃度の標
194 準物質の定量値を求め、許容できる真度及び精度が得られた濃
195 度域を定量範囲とし、その最少濃度を定量下限とする。

196 (4) 希釈直線性

197 測定対象となる精製工程ブールあるいは原薬等について、検
198 量線の定量範囲内まで希釈した試料の定量値が直線性を示す試
199 料の希釈倍数の範囲を確認する。

200 4. HCP試験法の設定

201 HCP試験法は、製造工程のHCP除去状況の確認あるいは原
202 薬の純度試験として用いられる。HCP試験法の操作手順やデ
203 ータ解析等の基本的な考え方については、参考情報「酵素免疫
204 測定法」が参考になる。

205 HCP試験の結果は、通常、目的物質に対する含有率で評価
206 する。別途、試料のタンパク質濃度を測定することで、タンパ
207 ク質量当たりのHCP含量率を求めることができる。例えば、
208 タンパク質濃度が2 mg/mL、HCP濃度が20 ng/mLであった場
209 合、HCP含有率は10 ng/mgと記載する。

210 5. その他

211 5.1. 製法変更時の留意点

212 組換えタンパク質医薬品の製造工程を変更した場合、残留す
213 るHCPのプロファイルに影響を及ぼす可能性があるため、製
214 法変更後においても適切にHCPが測定できていることを確認

215 する必要がある。HCPプロファイルが変化し、製法変更前の
216 HCP試験法を適用することが適切でないと考えられた場合は、
217 改めてHCP試験法を構築しなければならない。HCPプロファ
218 イルの変化は、二次元電気泳動法、あるいは、質量分析法等の
219 解析手法で確認することができる。

220 5.2. 試験用試薬等の変更時の留意点

221 重要試薬であるHCP抗原／HCP標準物質及び抗HCP抗体は、
222 製品のライフサイクルを考慮し、可能な限り十分量を確保して
223 おくことが望ましい。新たにHCP抗原／HCP標準物質や抗
224 HCP抗体を調製した場合は、二次元電気泳動法、ウエスタン
225 プロット法、質量分析法等の解析手法で、それらの特性につい
226 て、更新前後での同等性を確認する。また、必要な項目につい
227 て試験法のバリデーションを改めて実施し、更新前の試薬と試
228 験法との一貫性を確認した上で使用する。

229 汎用試験法を採用する場合、適格性が確認された市販キット
230 製品を用いることもできる。ただし、市販キット製品を用いた
231 試験の一貫性と品質を確保するためには、試薬のロット更新な
232 どの情報が提供されていることが必要で、適宜、重要試薬の特
233 性解析と試験法のバリデーションを実施する。

234 6. 用語

235 **モック細胞**：宿主細胞に目的物質をコードする遺伝子を持たな
236 い発現ベクターを導入して樹立された細胞。

237 **ヌル細胞**：目的物質を発現しない宿主細胞で、親細胞及びモッ
238 ク細胞を含む。

239 **抗原カバー率**：抗HCP抗体がHCPを構成するタンパク質の検
240 出率である。例えば、HCPを二次元電気泳動法で分離し、総
241 タンパク質染色で得たスポット数と抗HCP抗体によるウエス
242 タンプロット染色で得たスポット数から算出する。

243