

平成 21 年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「治療効果の高い新規バイオ医薬の早期実用化に向けたプロセスの研究開発」

研究開発成果報告

委 託 者 近畿経済産業局

委 託 先 特定非営利活動法人 近畿バイオインダストリー振興協会

再委託先 株式会社 TSD Japan
株式会社アメフレック
ジェノメディア株式会社
大阪大学大学院医学系研究科
産業技術総合研究所・関西センター

目次

第1章 研究開発全体の成果概要	- 3 -
1. 研究開発の背景、目的、及び目標	- 4 -
1 - 1. 研究開発の背景	- 4 -
1 - 2. 研究の目的	- 4 -
1 - 3. 研究の目標設定	- 4 -
1 - 4. 研究結果	- 6 -
1 - 5. 考察	- 10 -
2 - 1. 研究組織(全体)	- 11 -
2 - 2. 管理体制	- 11 -
2 - 3. 管理員及び研究員	- 11 -
2 - 4. 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名	- 12 -
3. 当該研究開発の連絡窓口	- 13 -
第2章 各研究機関の研究成果	- 14 -
1. 株式会社 TSD Japan の研究成果	- 15 -
1. 株式会社 TSD Japan の研究成果	- 15 -
1 - 1. 研究担当項目	- 15 -
1 - 2. 研究目的及び目標	- 15 -
1 - 3. 研究成果	- 15 -
1 - 4. 考察	- 16 -
1 - 5. 当該研究開発の連絡窓口	- 16 -
2. 株式会社アメフレックの研究成果	- 16 -
2 - 1. 研究担当項目	- 16 -
2 - 2. 研究目的及び目標	- 16 -
2 - 3. 研究成果	- 16 -
2 - 4. 考察	- 19 -
2 - 5. 当該研究開発の連絡窓口	- 19 -
3. ジェノメディア株式会社の研究成果	- 19 -
3 - 1. 研究担当項目	- 19 -
3 - 2. 研究目的及び目標	- 19 -
3 - 3. 研究成果	- 20 -
3 - 4. 考察	- 27 -
3 - 5. 当該研究開発の連絡窓口	- 28 -
4. 大阪大学大学院医学系研究科の研究成果	- 28 -
4 - 1. 研究担当項目	- 28 -
4 - 2. 研究目的及び目標	- 28 -
4 - 3. 研究開発の背景	- 28 -
4 - 4. 研究目的及び目標	- 28 -
4 - 5. 研究の成果	- 29 -
4 - 6. 考察	- 29 -
4 - 7. 当該研究開発の連絡窓口	- 30 -
5. 産業技術総合研究所・関西センターの研究成果	- 30 -
5 - 1. 研究担当項目	- 30 -
5 - 2. 研究目的及び目標	- 30 -
5 - 3. 研究成果	- 30 -
5 - 4. 考察	- 31 -
5 - 5. 当該研究開発の連絡窓口	- 31 -

第1章 研究開発全体の成果概要

特定非営利活動法人 近畿バイオインダストリー振興協会

1. 研究開発の背景、目的、及び目標

1 - 1. 研究開発の背景

医薬品業界では、従来のように低分子医薬品を画一的に大量製造・販売するモデルから、バイオ医薬をテーラーメイド的に少量・多品種開発・製造するモデルへの転換が図られている。これにより、病気の種類・状態に適した治療薬を創れるようにすれば、がんのように従来の医薬品では治療が難しい病気の克服に繋がり、医薬品業界全体が活性化される。

テーラーメイド的バイオ医薬を普及させるためには、各地に簡便に輸送や保存ができるように安定化を行う必要がある。その安定化には真空維持技術(凍結乾燥技術)の利用が最適である。しかし、テーラーメイド的バイオ医薬の早期実用化のための真空維持技術開発には、以下の2つの課題を解決する必要がある。

第一の課題は、厚生労働省の医薬ガイドラインの基準に適合する必要がある事で、無菌性・均質性(高品質)、治療効果維持(高性能)、再現性(高信頼性)を高度化し、それらを厳密に管理できるようにする必要がある。これは、半導体の不良品発生率(歩留まり)の低下を目的に金属イオンやダストを管理するクリーンルームの考え方とは異なる技術である。またテーラーメイド的バイオ医薬は、人間の体内に注射する事が想定されるため、食品の凍結乾燥技術よりも高度な無菌化技術が必要である。そこで、新規に真空維持技術を高度化する必要がある。

第二の課題は、従来の医薬品用技術のように大量で画一的な製造を目的とする技術とは異なり、少量で多品種の製造に適した技術が必要な事で、テーラーメイド的な種々の製造に適宜柔軟に対応できる事(最適化)、最少人数での製造に適した操作性(操作容易性)について高度化が必要である。また、主に中小のバイオ企業で進められるバイオ医薬の初期開発には、大企業向けの多額な設備投資を伴う技術ではなく、中小企業向けの低コストの工業化プロセス・システムを確立する必要がある。

そこで、本事業では上記のようなバイオ医薬の安定化に関する課題を解決する技術の確立を目指して研究開発を実施した。

1 - 2. 研究の目的

本事業では、テーラーメイド的バイオ医薬の製造上の課題解決を目的として、「高度化指針」において定める高度化目標である 生産装置最適化(高品質、高性能、高信頼性、最適化、操作容易性)に従い、テーラーメイド的バイオ医薬向けの製造に適した工業化プロセス・システム(高度無菌凍結乾燥技術)を確立した。

高品質、高性能、高信頼性の目標設定については、医薬ガイドラインに準拠して技術の高度化を実施することを研究目的とした。一方、最適化、操作容易性に関しては、少量・多品種の製造に柔軟に対応出来るように技術の高度化を実施することを研究目的とした。

1 - 3. 研究の目標設定

本事業においては、以下の から の項目について研究開発を行った。それぞれの研究項目について設定した数値目標は以下の通りである。

真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、株式会社アメフレック)

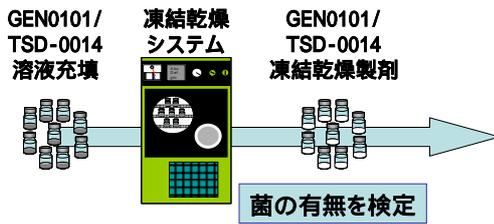
無菌化の目標設定については、システムが作り出す無菌環境のレベルと、システムを用いて製造される製造物の無菌性について目標を設定した。無菌環境のレベルとしては医薬ガイドラインで求められるレベル以上となるクリーン環境達成を目標とした。

一方、製造物の無菌性については、医薬ガイドラインで規定される無菌試験(図1 - 3 - 1

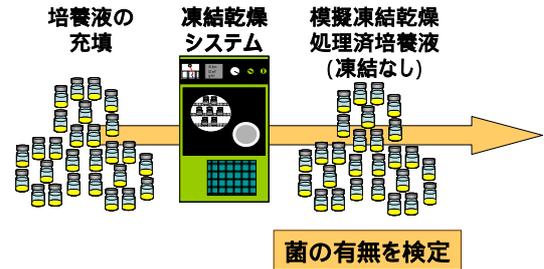
左)、培地充填試験(図1 - 3 - 1右)の両試験に適合する事とした。

図1 - 3 - 1. 無菌性実証に関する研究

1. 無菌試験(製造物用)



2. 培地充填試験(製造プロセス用)



高品質化の実証(品質管理試験)

(再委託先: 株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、国立大学法人大阪大学、産総研・関西センター)

高品質化の目標設定に関しては、実際に確立した工業化プロセスで製造した製造物が、医薬ガイドラインの規定に従って設定される製品規格に適合する事とした。(図1 - 3 - 2)。

図1 - 3 - 2. 高品質化の実証に関する研究

高度化するシステムで
製造するバイオ医薬



システムの品質実証

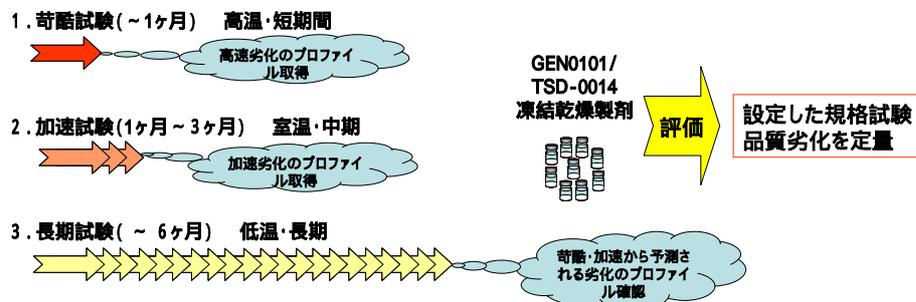
1. 試験法の信頼性実証
2. 品質規格への適合の実証

安定性の実証に関する研究開発

(再委託先: 株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、国立大学法人大阪大学、産総研・関西センター)

高性能化に関しては、製造物を用いて医薬ガイドラインに従ってデザインされた長期保存安定性試験データを取得し、長期安定性を実証する事を数値目標とした(図1 - 3 - 3)。

図1 - 3 - 3. 工業化プロセスの性能実証(製造物の長期保存安定性実証)



性能の実証に関する研究

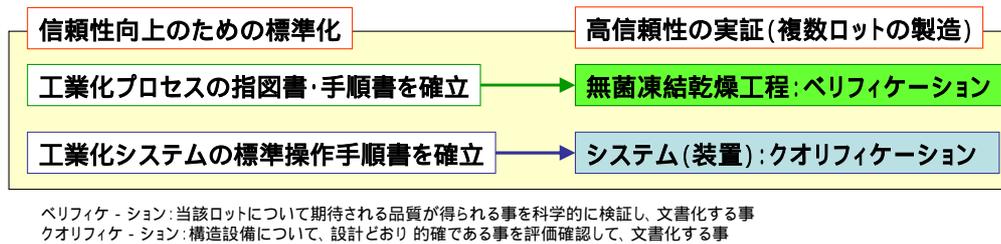
(再委託先: 株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、国立大学法人大阪大学)

新規真空維持技術を高性能化に関しては、がん動物モデルを用いた有効性実証試験(信頼性基準レベル)で統計的に有意差のある抗腫瘍効果を実証する事、医薬ガイドラインに準拠したGLPレベルの安全性試験(GLP: Good Laboratory Practice = 医薬品安全性試験実施基準)で安全性を実証する事、有効投与量と毒性用量との乖離を実証する事、の3項目を数値目標とした。

ベリフィケーション(信頼性の実証)

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社)

図1-3-4.信頼性の高度化の用語及び内容の説明



高信頼性に関しては、高度化する真空維持技術(凍結乾燥技術)が、医薬ガイドラインに準拠した信頼性を有することを実証する事とした。具体的には、新規に確立する無菌凍結乾燥プロセスが、厚生労働省の医薬ガイドラインのペリフィケーションに適合する事を数値目標とした。

クオリフィケーション

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、株式会社アメフレック)

クオリフィケーションとして行う工業化システムの信頼性向上は、無菌凍結乾燥システムが、医薬ガイドラインのクオリフィケーションに適合する再現性を有する事の実証を数値目標とした。

製造スケールの評価

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社)

製造スケールの変動に柔軟に対応出来ることを実証する。具体的には、1回の製造でガラス瓶(バイアル)で数百本の製造スケールで製造物が規格試験に適合する事を数値目標とした。

容器サイズの評価

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社)

容器サイズ変動についても対応できる事を実証した。具体的には、2種類のサイズのガラス瓶(バイアル)を用いた製造で、サイズが変動しても規格試験に適合する事を数値目標とした。

少人数化・時間短縮

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、株式会社アメフレック)

少人数の作業員で短時間に製造作業を完了出来るよう操作容易性を向上し、最終的に数百本以上を、2名で2時間以内で完了できる操作性を実証することを数値目標とした。

低コスト化の評価

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、株式会社アメフレック)

中小バイオ企業が工業化システム・プロセスを利用できるよう、数百万円レベルで工業化システムを構築する事を数値目標とした。

1-4. 研究結果

実施した10項目の研究開発についてそれぞれ以下のような研究成果を得た。

真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、株式会社アメフレック)

無菌システムについては、株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社が医薬ガイドラインに従って株式会社アメフレックと共同でシステムデザインの構築を進め、無菌レベル高度化が可能な範囲、省スペース性、作業性の面で図1-4-1に示す基本デザイン(パーティション型)の優位性が高いと判断されたため、この基本デザインでシステム構築進めた。

採用したデザインでシステムの構築を進め、性能評価のために無菌環境のレベルの測定を実施した結果、全ての測定ポイントで数値は「0」であり、設定していた数値目標レベルを上回るレベルであり、高度化した新規無菌システムの性能が実証された。一方、製造物の無菌性については、医薬ガイドラインで規定されている無菌試験と培地充填試験により実証を行った結果、表1-4-1.に示すように培地充填試験、無菌試験のいずれについても評価結果は適合であり、目標として設定していた製造物の無菌性についても実証された。

図1 - 4 - 1 .採用を決定した無菌システムの基本デザイン

小型無菌凍結乾燥システム(1):
パーテーション型(空間分割)

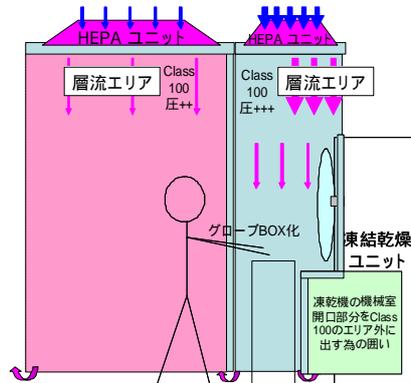


表1 - 4 - 1 .培地充填試験の結果

	第一回	第二回	第三回
菌混入の有無	陰性	陰性	陰性
無菌性の判定	適合	適合	適合

高品質化の実証(品質管理試験)

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、国立大学法人大阪大学、産総研・関西センター)

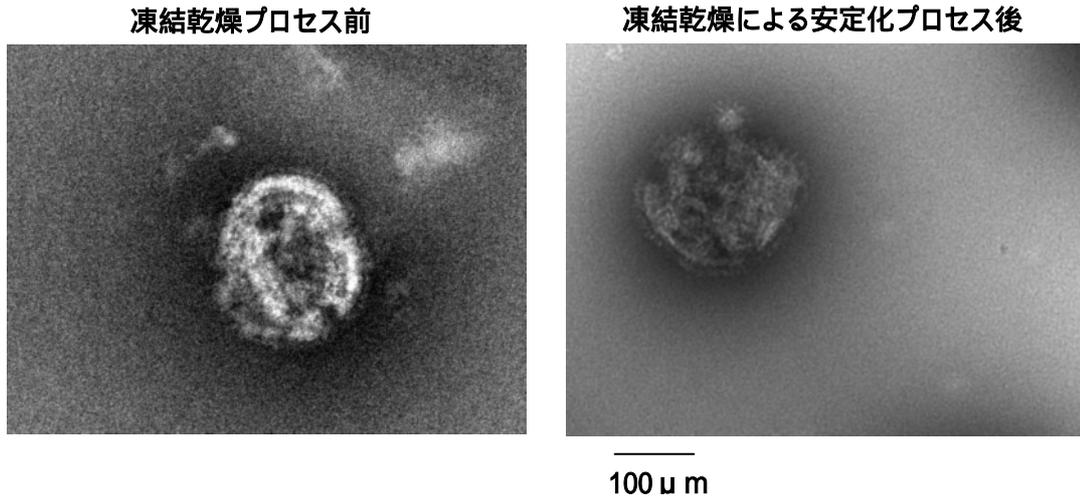
高度化の実証のため製造物に関する品質管理試験を行った。医薬ガイドラインに従って、表1 - 4 - 2 .の「設定規格」に示すように医薬ガイドラインに従って品質規格の設定を行った結果、表1 - 4 - 2 .の「製造物の品質」に示すように、全ての品質規格に適合しており、製造物が医薬ガイドラインの規定に従って設定される品質規格に適合する事が実証された。

また、バイオ医薬の活性を保持するには、その高次構造を維持する事が重要であるため、製造物の状態を電子顕微鏡撮影により直接観察した。その結果、図1 - 4 - 2 .に示すように、直径約200ナノメートルの粒子構造が保持されている事を示す観察像が得られ、高度無菌化凍結乾燥技術によるプロセス前後で、バイオ医薬の高次構造は保持される事が実証された。

表1 - 4 - 2 .高度化した無菌凍結乾燥システムと工業化プロセスで製造した製造物の高品質化

項目	設定規格	製造物の品質
1.性状・溶状	白色の塊又は粉末、溶解後に微白色～白色である	白色の塊であった 微白色であった
2. 確認試験 試験(1) 試験(2)	参照品と等しい 陽性	等しかった 陽性であった
3. 浸透圧比	規定値±一定値以内	適合した
4. pH	規定値±一定値以内	適合した
5. 特有(物質産生量)	規定濃度以上	適合した
6. 水分	適合含量(%) 以下	適合した
7. エンドトキシン	規定値未満	適合した
8. 不溶性異物	適合する	適合した
9. 無菌	適合する	適合した
10. 定量	含有量に対して一定範囲以内	適合した

図1 - 4 - 2. 電子顕微鏡撮影による高次構造の評価



安定性の実証に関する研究開発

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、国立大学法人大阪大学、産総研・関西センター)

高性能化に関しては、本事業で確立される技術がバイオ医薬の安定化技術である事から医薬ガイドラインに従ってデザインされた長期保存安定性試験を行った結果、表1 - 4 - 3. に示すように、想定される保存条件で品質の劣化は認められなかった。

表1 - 4 - 3. バイオ医薬の安定性を指標とした高性能化の実証

試験項目	規格	0ヶ月	6ヶ月	6ヶ月
温度条件			想定保存温度	加速温度
確認試験(1)	参照品と等しい	変化なし	変化なし	変化なし
確認試験(2)	陽性	陽性	陽性であった	陽性であった
特有試験	規定濃度以上	適合した	適合した	適合した
定量試験	含有量に対して一定範囲以内	適合した	変化なし	変化なし

性能の実証に関する研究

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、国立大学法人大阪大学)

新規真空維持技術による高性能化を実証するために動物の疾患モデルを用いた有効性実証試験(信頼性基準レベル)と、医薬ガイドラインに準拠した GLP レベルの安全性試験(GLP: Good Laboratory Practice = 医薬品安全性試験実施基準)の安全性試験を実施した。

ヒトがん細胞をマウスに移植したモデル動物で抗腫瘍効果と生存期間の延長を指標として評価した結果、統計学的に有意差のある有効性が認められた。このことから、目標として設定していた統計学的に有意差のある有効性を信頼性基準に準拠した試験で実証する事が出来た。

更に、バイオ医薬としての安全性を評価するために、小動物であるラットと、より人間に近いカニクイザルの安全性試験を実施した結果、ラット、カニクイザルのいずれにおいても、重篤な毒性は認められず、製造物に関して目標としていた GLP レベルの安全性を実証する事が出来た。

ベリフィケーション(信頼性の実証)

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社)

高信頼性に関しては、確立した真空維持技術(工業化用の凍結乾燥プロセス)が、医薬ガイドラインに準拠した信頼性を有することをベリフィケーション実施により評価した。ベリフィケーションとは、期待される品質が得られる事を科学的に検証し、文書化する事とされている。

その結果、確立した真空維持技術が、医薬ガイドラインのベリフィケーションに適合する再現性を有する事が明らかとなり、目標として設定した高信頼性の実証された(表1 - 4 - 4.)。

表1 - 4 - 4 . 確立したシステムとプロセスの高信頼性の実証

試験項目	規格	ロット番号:A
性状・溶状	白色の塊又は粉末	白色の塊であった
	溶解後に微白色～白色である	微白色であった
確認試験(1)	参照品と等しい	等しかった
確認試験(2)	陽性	陽性であった
浸透圧比	規定値±一定値以内	適合した
pH	規定値±一定値以内	適合した
特有	規定値(濃度)以上	適合した
水分	規定値(%)以下	適合した
エンドキシン	規定値未満	適合した
不溶性異物	適合する	適合した
無菌	適合する	適合した
定量	規格設定範囲以内	適合した

クオリフィケーション

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、株式会社アメフレック)

確立した工業化システム(無菌凍結乾燥システム)の信頼性に関しては、最近定義された医薬レベルのクオリフィケーションにより評価を行った。クオリフィケーションとは、構造設備(設備、装置、機器、ユティリティ等)について設計どおり的確である事を評価確認し、文書化する事である。まず、工業化システムの操作手順を標準化するための標準操作手順書(SOP)作成と、このようにして標準化された手順に従って信頼性の評価を進めた結果、確立した工業化システムは医薬ガイドラインのクオリフィケーションに適合しており、目標とする信頼性を有する事が実証された(表1 - 4 - 5.)。

表1 - 4 - 5 . クオリフィケーションによる工業化システム信頼性実証

測定ポイント	浮遊微粒子 (0.5 μm 以上, ft ³)	浮遊菌 (細菌/真菌, m ³)	付着菌 (一般細菌, 25cm ²)
充填エリア	0	0/0	0

製造スケールの評価

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社)

確立した工業化システム・工業化プロセスが、製造スケールの変動に柔軟に対応出来ることを実証するために、表1 - 4 - 6 . に示すように数十本から数百本の本数のガラス瓶(バイアル)を用いて製造を実施して性能を評価した結果、確立した工業化システム・工業化プロセスは、数値目標としていた範囲を上回る製造スケールに対しても対応可能である事が明らかとなった。

表1 - 4 - 6 . 製造スケールへ柔軟に対応出来るかどうかの評価結果

評価試験	本数	規格への適合
評価試験 1*	数百本	適合
評価試験 2*	数百本	適合
評価試験 3*	数百本	適合
評価試験 4	数十本	適合
評価試験 5	数十本	適合
評価試験 6*	数百本	適合

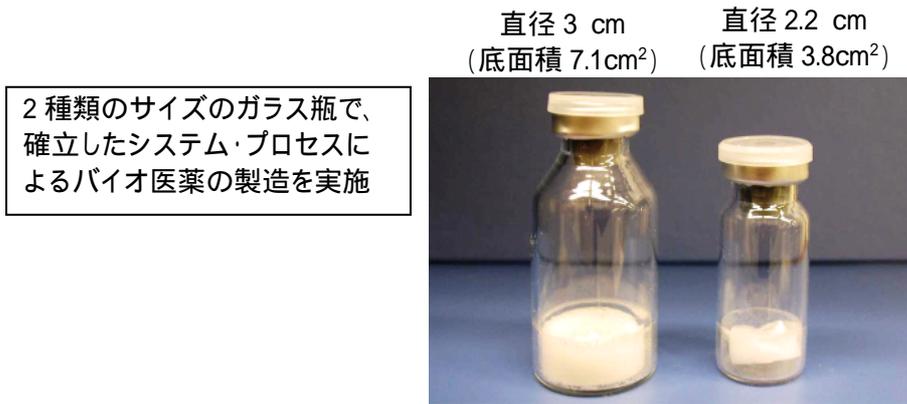
* 評価1、2、3、6は無菌性の試験(培地充填試験、無菌試験)のみを実施した結果を示す。

容器サイズの評価

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社)

2種類のサイズのガラス瓶(バイアル)を用いて製造を実施し、規格試験で評価を行った結果、使用したガラス瓶間で品質に差異が認められないことが明らかとなった。この結果から、確立した工業化システム・プロセスは、種々の容器サイズの製造に柔軟に対応出来ることが実証された(図1 - 4 - 3.)。

図 1 - 4 - 3 . 製造容器のサイズ変動に柔軟に対応出来るかどうかの評価結果



少人数化・時間短縮

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、株式会社アメフレック)

中小企業でテーラーメイド的なバイオ医薬を少量多品種製造際の操作容易性を向上するために、グローブボックス設置方法、充填の自動化に関して技術開発を実施した結果、目標としていた「2名の作業員で200本の製造を2時間以内に完了」を実証した(表1-4-7)。

表 1 - 4 - 7 . 作業員 2 名で実施した場合の作業時間

	作業1	作業2	作業3	作業4	平均
バイアル本数	400 本以上	200 本以上	400 本以上	400 本以上	
200 本あたりの作業時間	1 時間 12 分	1 時間 24 分	1 時間 06 分	1 時間 03 分	1 時間 11 分

低コスト化の評価

(再委託先:株式会社TSD Japan、ジェノメディア株式会社、株式会社アメフレック)

中小バイオ企業が利用する事を想定しているため、低コスト化を実施した結果、目標としていた数百万円レベルでの工業化システムの構築を達成した。

1 - 5 . 考察

本事業の成果により、テーラーメイド的なバイオ医薬の製造に必要な無菌凍結乾燥システムと製造プロセスが開発された。確立された工業化システムは、無菌レベルの実測値で目標としていたクラスの性能を達成し、システムを利用して製造された製造物についても医薬ガイドラインに従って実施された培地充填試験と無菌試験に適合する事が明らかとなった。

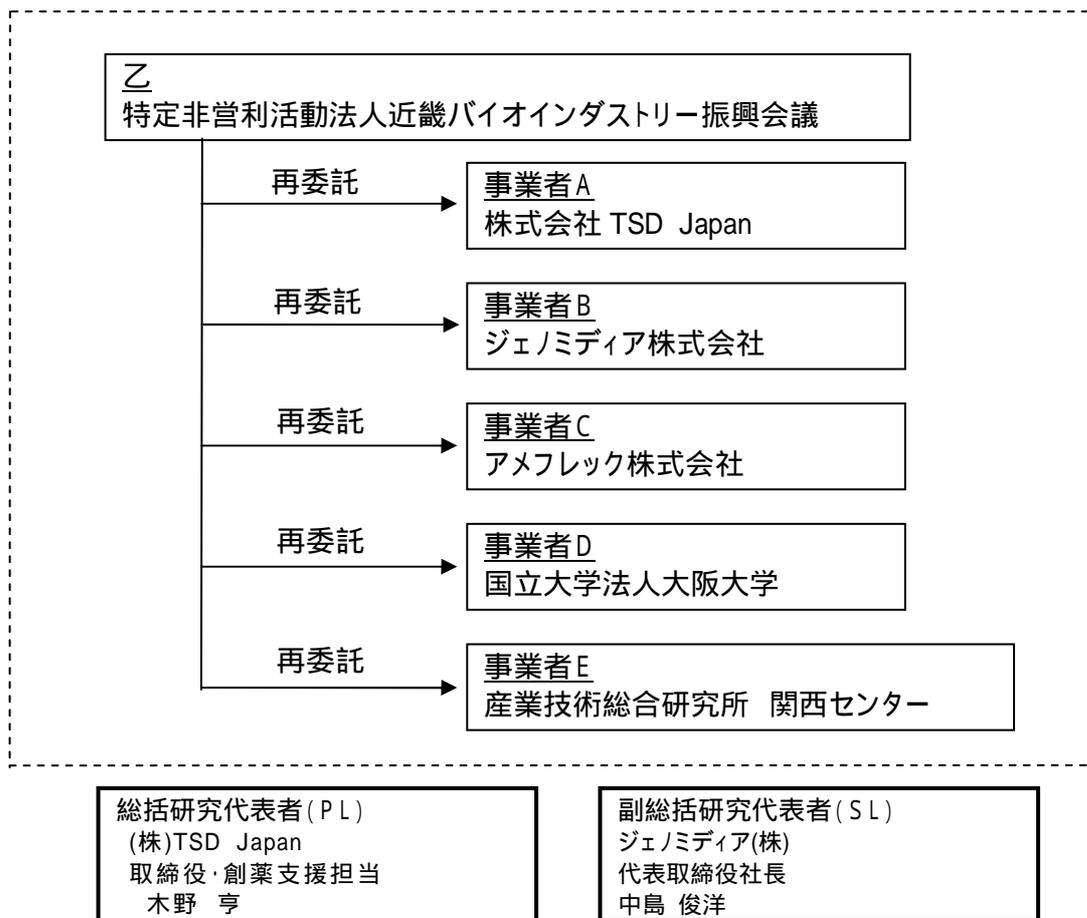
そのため、開発した技術を利用してバイオ医薬の製造(無菌凍結乾燥による安定化)を実施したところ、医薬ガイドラインに従って設定された品質規格に適合する事が明らかとなった。また、複数の製造を実施して性能評価の再現性を検証したところ、医薬ガイドラインに従って実施したベリフィケーション、クオリフィケーションに適合するレベルの高い信頼性が実証された。

そこで、次に多彩な製造条件に対応出来るかどうか(最適化)、中小のバイオ企業向けの製造目的に適合するか(操作容易性、低コスト化)について検証を行った。その結果、広い範囲の製造スケール、容器サイズの変動に柔軟に対応出来る事、最低限の作業員数(2名)でも支障なく製造可能である事が実証された。また、コスト面でも数百万円レベルの設備投資で設置可能であり、中小企業向けの製造に汎用的に利用できる事が明らかとなった。以上のように本事業で実施した研究開発により、目的としていたテーラーメイド的なバイオ医薬向けの製造に適した工業化プロセス・システム(高度無菌凍結乾燥技術)を確立し、その性能の実証を達成した。性能面では、数値目標として設定していたレベル以上の性能を得た項目も認められた。

以上のようにして少量多品種のテーラーメイド的なバイオ医薬の製造に適した技術開発を達成したので、今後は技術の普及により、テーラーメイド的なバイオ医薬の開発促進に貢献する。

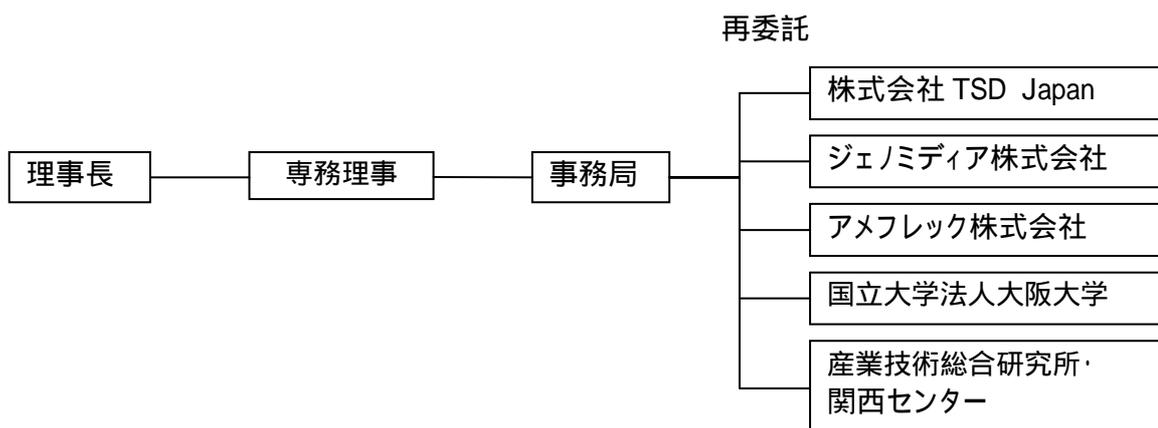
2. 研究体制

2 - 1. 研究組織(全体)



2 - 2. 管理体制

[特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議]



2 - 3. 管理員及び研究員

2 - 3 - 1. 管理員

[事業管理者] 特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
遠山 伸次	専務理事、クラスター・マネージャー	
井上 了	理事・事務局長	
塚谷 有希	事務局員	

2 - 3 - 2 . 研究員

【再委託先】

株式会社 TSD Japan

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
木野 亨	取締役	}
浜島 良	製剤技術部長	
佐藤 巖	開発薬事部長	

国立大学法人 大阪大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
金田 安史	大学院医学系研究科 遺伝子治療学 教授	、

ジェノメディア株式会社

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
中島 俊洋	代表取締役社長	}
長澤 鉄二	製造部長	
井岡 進一	製造部 グループリーダー	
山内 利栄	製造部・前臨床研究部 研究員	
三輪 輝彦	製造部 研究員	
吉田 洋	品質管理部 マネージャー	}
宮地 和恵	品質管理部 研究員	
成尾 薫	品質管理部 研究員	
吉村 綾子	品質管理部 研究員	
板井 利満	前臨床研究部薬効・薬理グループ マネージャー	

株式会社アメフレック

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
川本 光一	設備エンジニアリング部 エネルギーソリューションG グループ長	、

産総研・関西センター

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
小島 正己	バイオインターフェース研究グループ長	、

2 - 4 . 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議

(経理担当者) 事務局員

塚谷 有希

(業務管理者) 専務理事、クラスター・マネージャー

遠山 伸次

(再委託先)

株式会社 TSD Japan

(経理担当者) 管理本部 本部長 兼 財務部長

松本 芳史

(業務管理者) 取締役・創薬支援担当

木野 亨

国立大学法人 大阪大学

(経理担当者) 医学系研究科 事務部長
(業務管理者) 大学院医学系研究科 教授

和田 榮史
金田 安史

ジェノメディア株式会社

(経理担当者) 研究進捗管理部 部長
(業務管理者) 代表取締役社長

中島 俊洋
中島 俊洋

アメフレック株式会社

(経理担当者) 経理部 経理部長
(業務管理者) 設備エンジニアリング部 エネルギーソリューションG グループ長

林 邦治
川本 光一

産業技術総合研究所 関西センター

(経理担当者) 研究業務推進部 会計室 室長
(業務管理者) バイオインターフェース研究グループ長

上野 治
小島 正己

3. 当該研究開発の連絡窓口

管理法人

住所: 〒550-0004 大阪市西区靱本町1丁目7番18号 旭センチュリービル7階
名称: 特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議
連絡担当者所属役職・氏名: 専務理事 クラスター・マネージャー 遠山 伸次
Tel: 06 - 6459 - 6795 Fax: 06 - 6447 - 7011
E-mail: tohyama@kinkibio.com

統括研究者(PL)

(フリガナ): キノ トオル

氏名: 木野 亨

所属組織名: 株式会社 TSD Japan

所属役職: 取締役・創薬支援担当

住所: 大阪府大阪市淀川区西中島1-15-2

Tel: 06 6309 5200 Fax: 06 6309 5203

E-mail: kino@tsd-japan.co.jp

副統括研究者(SL)

(フリガナ): ナカジマ トシロ

氏名: 中島 俊洋

所属組織名: ジェノメディア株式会社

所属役職: 代表取締役社長

住所: 大阪府池田市緑丘1-8-31

Tel: 072-751-1143 Fax: 072-751-1176

E-mail: tnakajima@anges-mg.com

第 2 章 各研究機関の研究成果

1. 株式会社 TSD Japan
2. 株式会社アメフレック
3. ジェノメディア株式会社
4. 大阪大学大学院医学系研究科
5. 産業技術総合研究所・関西センター

1. 株式会社 TSD Japan の研究成果

1-1. 研究担当項目

本事業では から の10項目の研究開発を実施した。そのうちで株式会社 TSD Japan が研究を担当したのは以下の項目である。

- 真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化
- 高品質化の実証(品質管理試験)
- 安定性の実証に関する研究開発
- 性能の実証に関する研究
- ベリフィケーション(信頼性の実証)
- クオリフィケーション
- 製造スケールの評価
- 容器サイズの評価
- 少人数化・時間短縮
- 低コスト化の評価

1-2. 研究目的及び目標

テララーメード的バイオ医薬の普及のために必要となる、少量多品種の製造に柔軟に対応でき、かつ医薬ガイドラインに準拠したレベルの無菌性を持つ凍結乾燥システムとそれを利用したプロセスの開発を行う。各研究項目の数値目標は以下の通りである。

真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化

- 1) システムが作り出す無菌環境レベルが実測値で一定レベル以下
- 2) 製造物が医薬ガイドラインで規定される無菌試験と、培地充填試験に適合

高品質化の実証(品質管理試験)

確立した工業化プロセスで製造した製造物が品質試験に適合

安定性の実証に関する研究開発

医薬ガイドラインに従ってデザインされた安定性試験で長期安定性を実証

性能の実証に関する研究

動物モデルを用いた有効性実証試験(信頼性基準レベル)で統計的有意差

ベリフィケーション(信頼性の実証)

工業化プロセスが、厚生労働省の医薬ガイドラインのベリフィケーション適合

クオリフィケーション

工業化システムが、厚生労働省の医薬ガイドラインのクオリフィケーション適合

製造スケールの評価

製造スケールを変更して製造を実施した場合でも規格試験適合

容器サイズの評価

サイズの異なる容器を用いて製造した製造物が規格試験適合

少人数化・時間短縮

200本以上の製造スケールで、2名、2時間以内に製造プロセスを完了

低コスト化の評価

中小バイオ企業でも利用できる数百万円レベルで工業化システムを構築

1-3. 研究成果

研究項目の から のうち、項目 の性能の実証に関する研究以外は、弊社の製剤技術部長・浜島良が品質管理責任者の立場から、各研究開発項目について計画立案から実施、報告書作成まで指導・監督・承認業務を遂行した。詳細な研究成果についてはジェノミディア株式会社の各項目に記載した。

研究項目の 性能の実証に関する研究については、TSD Japan が担当して予備試験データを取得した。その結果、腫瘍体積平均値は対照群では測定期間を通じて著明に増加したが、投薬群では対照群に比べて低い値で推移し、t検定の結果、有効性の指標に関して投薬群と対照群に有意差が認められた。

1 - 4 . 考察

動物モデルで有効性の指標に関して Student の t 検定を実施した結果、製造物の投与群では Day 25 から Day 45 までのすべての測定ポイントにおいて媒体投与群に対して有意差が認められた。この結果より、新規真空維持技術を用いたテラーメード的バイオ医薬の有効性が劣化しないことを実証できた。

また各投与群の体重変化率の推移から、本薬の投与による体重増加への負の影響はほぼ無かったと結論され、観察期間中に死亡動物は出現せず、一般状態に異常を示す動物も認められなかったことから、安全性についても問題なかった。

1 - 5 . 当該研究開発の連絡窓口

株式会社 TSD Japan 取締役・創薬支援担当 木野 亨

住所:大阪府大阪市淀川区西中島1 - 15 - 2 Tel:06 6309 5200 Fax:06 6309 5203

2 . 株式会社アメフレックの研究成果

2 - 1 . 研究担当項目

本事業では から の 10 項目の研究開発を実施した。そのうちで株式会社アメフレックが研究を担当したのは以下の項目である。

- 真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化
- クオリフィケーション
- 少人数化・時間短縮
- 低コスト化の評価

2 - 2 . 研究目的及び目標

テラーメード的バイオ医薬の普及のために必要となる、少量多品種の製造に柔軟に対応でき、かつ医薬ガイドラインに準拠したレベルの無菌性を持つ凍結乾燥システムとそれを利用したプロセスの開発を行う。各研究項目の数値目標は以下の通りである。

真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化

- 1) システムが作り出す無菌環境レベルが実測値で一定レベル以下
- 2) 製造物が医薬ガイドラインで規定される無菌試験と、培地充填試験に適合

クオリフィケーション

工業化システムが、厚生労働省の医薬ガイドラインのクオリフィケーション適合

少人数化・時間短縮

200 本以上の製造スケールで、2 名、2 時間以内に製造プロセスを完了

低コスト化の評価

中小バイオ企業でも利用できる数百万円レベルで工業化システムを構築

2 - 3 . 研究成果

真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化

無菌医薬品の製造環境は、第 15 改正 日本薬局方の「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」に明記されており、高度無菌化凍結乾燥システム(以下、システム)の構築においては、この基準に適合するようデザインした。また、バイオ医薬品の製造装置の場合は、滅菌ガスによる燻蒸、消毒液・滅菌水などによる洗浄・殺菌、帯電の防止を考慮し、それらの処理に耐えうる素材、形状を開発する必要がある。そのため、耐久性に優れた素材を多用してシステム構築を行った。

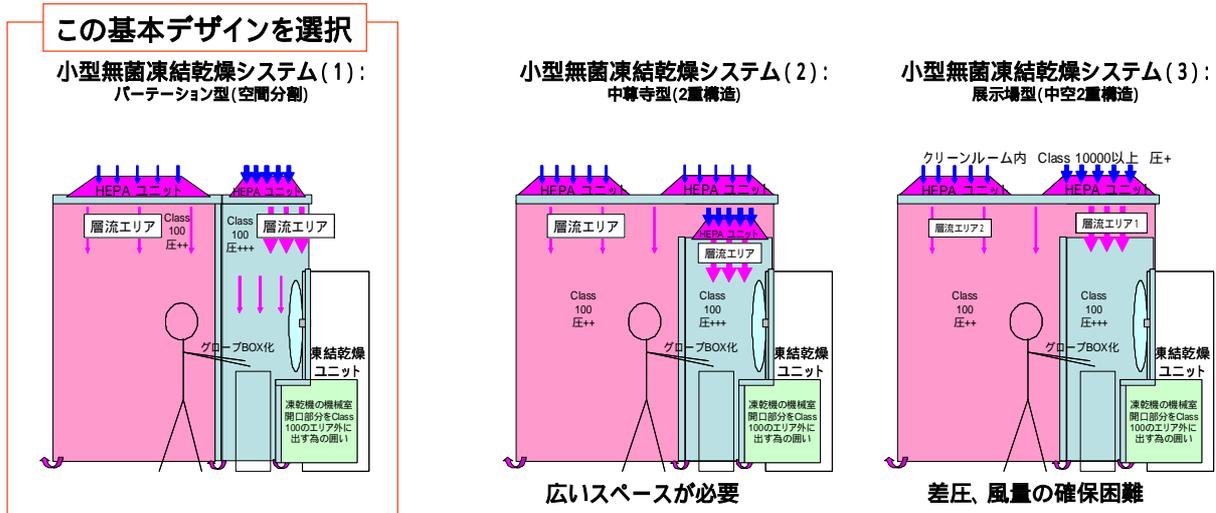
基本デザインとしては、当初図 2 - 3 - 1 . に示すような 3 種類のパターンを想定した。それらの基本デザインの中で、最終的には乱流が発生を防止し、クリーン度の確保が容易となる「パーティション型」を採用した。採用した基本デザインをもとにして HEPA ユニットの配置・構成、無菌空間を構成する構造体、差圧確保のためのダンパー、エリア内の乱流処理デザインを新規に開発して、求められるレベルのクリーン環境を達成できるシステム構築デザインを進めた。

最終的にはシステムの構造の骨格やパネルにはサニタリー性を重視した素材を使用し、作業性を確保するために透明な部材のパネルを使用することで、無菌化のための清掃を容易にした。

更に、充填エリアの作業台に加工を施す事で気流の乱れを防止すると共に、何らかの事故によ

り充填エリアの気密が保たれなくなった場合も、製品の無菌性の保持に十分な高気圧状態を維持できる差圧制御により、製品の汚染リスクを低減する仕様とした。

図2 - 3 - 1 . 高度無菌化凍結乾燥システムの基本デザイン案 (3 種類のパターンから選択)



このようにして設計を行った後に、仕様の適格性を検証するために Design Qualification (DQ) を実施した。DQ とは医薬ガイドラインに規定された検証作業であり、施工する構造設備について、目標とする医薬ガイドライン (治験薬 GMP) の要求する仕様を満たすものかどうか、設計図面等の文書を評価・検証し、その結果を文書として記録することである。設定した評価項目に従って検証作業を実施した結果、いずれの項目についても適合と判断されたため、設計したシステムの施工を開始した。その後、設置したシステムが設計どおりの性能を持つことを実証するために医薬ガイドラインで規定された Operation Qualification (OQ) により検証を行った。本システムにおいては、無菌環境のレベルが設定目標を達成する事が重要であるため、OQ の具体的な内容は、第三者機関の検査員により、システム運転中の環境モニタリングを行い、浮遊塵埃、室間差圧、気流が設計仕様通りであることを実証する事である。その結果、構築したシステムがデザイン時に想定された要求仕様を満たしており、高度な無菌環境を維持できる事が実証された (表2 - 3 - 1. と図2 - 3 - 2.)。

表2 - 3 - 1 . 第三者機関によるシステムの環境測定結果

エリア	28.3L (1立方フィート) あたりの微粒子数
システム内部 (作業員エリア)	0 個
システム内部 (充填エリア)	0 個

図2 - 3 - 2 . 充填エリアの差圧計 (左) と排気口の陽圧ダンパー (右)



製品を開放して扱う充填エリアは+20Pa以上の高気圧状態により差圧制御されており、それは差圧調整用の陽圧ダンパーにより実現されている。陽圧ダンパーは風圧の発生しない非稼働時は内部の重りにより、密閉される。

クオリフィケーション:

テラーメード的なバイオ医薬の製造においては、少量・多品種の製造を繰り返し実施する事が想定されるため、構築したシステムが常に仕様通りの性能を発揮できる事が重要である。そのた

め、上記のようにして構築を行った高度無菌凍結乾燥システムの高い信頼性を有しており、目的とする性能を常時発揮するかを検証した(性能に関する再現性の検証)。

そのため、実際にバイオ医薬の製造作業を実施した場合に、設計仕様の通りに無菌環境レベルを維持しているかを検証した。検証は、医薬ガイドラインで規定されているクオリフィケーション(構造設備について、設計どおりの確である事を評価確認して、文書化する事)として実施する必要があるため、先ずシステム操作手順を標準化し、標準操作手順書(SOP)として文書化した。その後、ジェノメディア社によって実施された模擬製造(培地充填試験)における充填作業時に、システムの無菌環境レベルを測定する事で検証作業を行った。

その結果、表2-3-2.に示すように、特に無菌レベルの高度化が必要な充填エリアにおいては、製造作業を行っている状況でも無菌環境レベルは目標とするクラス10以下(浮遊微粒子数が10以下)である事が明らかとなった。また、同時に測定を実施した、システム内を浮遊している微生物数、及びシステム内に付着している微生物の汚染レベルについても数値は「0」であり、第15改正 日本薬局方収載の「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」にある清浄度規格に適合するレベルであった。また、システム内の作業員エリアについても、無菌レベルではクラス100以下、微生物数は浮遊、付着のいずれも数値は「0」であり、充填エリアと同様に第15改正 日本薬局方収載の「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」にある清浄度規格に適合するレベルであった。以上の結果から、確立した高度無菌凍結乾燥システムは、高い信頼性を有しており医薬ガイドラインで規定されたレベルの無菌環境を再現性よく維持できる事が実証された。

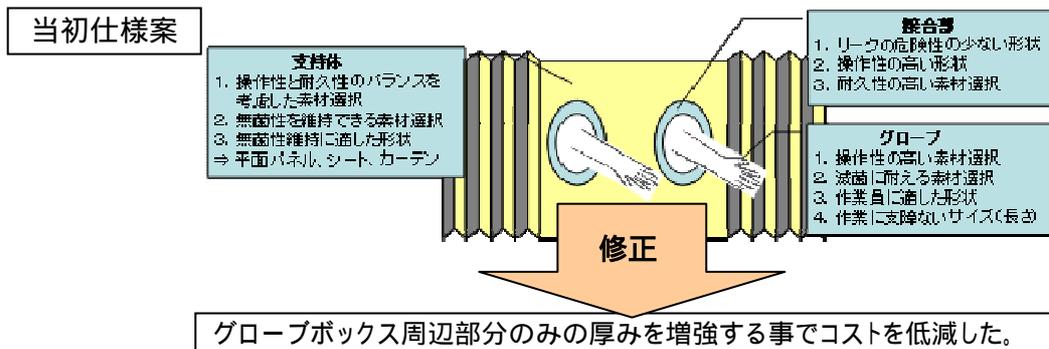
表2-3-2. 充填作業中の無菌レベルの測定結果

エリア	浮遊微粒子数 (0.5 μm 以上、ft ³)	浮遊菌 (細菌 / 真菌、m ³)	付着菌 (一般細菌、25cm ²)
システムの外部エリア(充填作業室)	17	0 / 0	0
システム内部(作業員エリア)	27	0 / 0	0
システム内部(充填エリア)	0	0 / 0	0

少人数化・時間短縮の評価

本事業で確立するシステムは、中小バイオ企業の利用を想定し、最低限の作業員数である2名でも作業できる事を実証する必要がある。また、バイオ医薬の製造は、製品の品質劣化を防ぐために迅速な作業が要求される。そこで、少人数の作業員で短時間に製造作業を完了出来るよう操作容易性を向上した。図2-3-3.に示すように、グローブ周りはサニタリー性の確保が困難なことから、当初の計画にあった蛇腹形状の可動部分を排除し、高強度な硬質アクリルパネルで封鎖する仕様とした。グローブとアクリルパネルの接合部はボルトで固定し、間隙をシリコンコーキングによって密閉した。グローブはディスポーザブル仕様であり、強力な金属バンドで密着させている。バンドを外せば脱着・交換も可能である。また、グローブは耐薬品性の高いハイパロンゴムできており、高濃度な滅菌ガスを使用しても劣化が少ない。作業性においても柔らかく滑りにくい特性を持ち、適度な伸縮性と十分な長さがあるため、作業エリア全体をカバーできている。

図2-3-3. 操作容易性向上のための仕様設計の変更



その他の技術開発部分は、充填エリアのコンパクト化、完全密閉化である。このことで、システムの洗浄、滅菌時間を短縮できる上、充填エリアのみのガス滅菌で製品汚染を防止できるように

なり、毒性の高い滅菌ガスの使用量を10分の1に低減出来るようになった。更に製品と作業者が物理的に隔離されるので、作業時の更衣を簡素化しても製品汚染のリスクを軽減できる。これらの仕様の開発は、環境負荷低減、作業者の作業性と安全性の向上に繋がる成果であった。

低コスト化の評価

中小バイオ企業の利用を想定し、出来る限り汎用品を利用した仕様とすることで低コスト化を図った結果、通常は数千万円程度の費用がかかるアイソレーターと同レベルの性能を数百万円のコストで構築できるようになった。これにより、テーラーメイド的バイオ医薬の製造のように小規模な製造において経済的な負担を軽減する事ができることを実証した。

2 - 4 . 考察

以上のように、医薬ガイドラインに規定されるDQ、OQによる検証作業を実施し、新規の高度無菌凍結乾燥システムの構築を行い、目的とする無菌環境レベルと、その再現性を実証した。更に、中小バイオ企業向けの普及のために少人数で効率よく製造出来る仕様を開発した結果、数百万円レベルの設備でも、作業員2名で、200本のスケールの製造を2時間で実施できるようになった。

今後は、開発したシステムの普及を進めるため、バイオ医薬の製造実績を蓄積する予定である。

2 - 5 . 当該研究開発の連絡窓口

株式会社アメフレック エスピープラント事業部 関西営業技術部 陳 トン、西村 貴美子
住所：兵庫県尼崎市水堂町 2-40-10

3 . ジェノメディア株式会社の研究成果

3 - 1 . 研究担当項目

本事業では から の10項目の研究開発を実施した。そのうちでジェノメディア株式会社が研究を担当したのは以下の項目である。

- 真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化
- 高品質化の実証(品質管理試験)
- 安定性の実証に関する研究開発
- 性能の実証に関する研究
- ベリフィケーション(信頼性の実証)
- クオリフィケーション
- 製造スケールの評価
- 容器サイズの評価
- 少人数化・時間短縮
- 低コスト化の評価

3 - 2 . 研究目的及び目標

本事業では、テーラーメイド的バイオ医薬で想定される少量・多品種の製造を、医薬ガイドラインに準拠したレベルで簡便に実施する事を可能にする高度無菌凍結乾燥システムと製造プロセスの開発を実施する。そのために、それぞれの研究項目について以下のような目標設定を行い、研究開発を実施した。

真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化

- 1) システムが作り出す無菌環境レベルが実測値で一定レベル以下
 - 2) 製造物が医薬ガイドラインで規定される無菌試験と、培地充填試験に適合
- 高品質化の実証(品質管理試験)
 - 確立した工業化プロセスで製造した製造物が品質試験に適合
 - 安定性の実証に関する研究開発
 - 医薬ガイドラインに従ってデザインされた安定性試験で長期安定性を実証
 - 性能の実証に関する研究
 - 動物モデルを用いた有効性実証試験(信頼性基準レベル)で統計的有意差
 - ベリフィケーション(信頼性の実証)
 - 工業化プロセスが、厚生労働省の医薬ガイドラインのベリフィケーション適合

クオリフィケーション
 工業化システムが、厚生労働省の医薬ガイドラインのクオリフィケーション適合
 製造スケールの評価
 製造スケールを変更して製造を実施した場合でも規格試験適合
 容器サイズの評価
 サイズの異なる容器を用いて製造した製造物が規格試験適合
 少人数化・時間短縮
 200本以上の製造スケールで、2名、2時間以内に製造プロセスを完了
 低コスト化の評価
 中小バイオ企業でも利用できる数百万円レベルで工業化システムを構築

3-3. 研究成果

真空維持技術(凍結乾燥技術)の無菌化: [1] 高品質化に関する研究開発の項目 [1-1]

本事業で研究開発を実施する高度無菌凍結乾燥システムは、バイオ医薬製造用使用するシステムであることから、医薬ガイドラインに準拠してデザイン、構築を実施する必要がある。医薬ガイドラインで規定される無菌医薬品の製造環境は、第15改正 日本薬局方の「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」に明記されており、高度無菌化凍結乾燥システム(以下、システム)の構築においては、この基準に適合するようにアメフレック社と共同でデザインを実施した。

デザインの適格性や仕様が治験薬製造の要件を満たしているかをDQ(Design Qualification)で、DQで承認されたデザインに基づき施工されたシステムが期待通りに動作するかをOQ(Operation Qualification)でそれぞれ実証した後、最終的な無菌レベルを無菌環境(クラス)測定、無菌試験、培地充填試験で検証した結果、全て設定目標レベルに適合した。

高品質化の実証(品質管理試験): [1] 高品質化に関する研究開発の項目 [1-2]

モデルとするバイオ医薬の品質規格は、「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」(医薬審発第571号、平成13年5月1日)を参考に設定した(表3-3-1.)。また、各試験の標準操作手順書については、医薬ガイドラインに従って文書化を行い、品質管理試験を実施した。エンドキシン試験は、日本薬局方及びFDAガイドラインに準拠したエンドキシン試験法のゲル化転倒法に最適な電子式ドライパスであるエンドキシン測定機器を用いた(図3-3-1.)。また、無菌試験について、無菌試験用ポンプを用いてクローズドディスプレイブル無菌試験キット(図3-3-2.)によるメンブランフィルター法を実施した。

表3-3-1. 品質管理試験項目の設定

試験項目	規格
性状・溶状	白色の塊又は粉末
	溶解後に微白色～白色である
確認試験(1)	参照品と等しい
確認試験(2)	陽性
浸透圧比	規定値±一定値以内
pH	規定値±一定値以内
特有	規定濃度以上
水分	規定値(%)以下
エンドキシン	規定値未満
不溶性異物	適合する
無菌	適合する
定量	含有量に対して一定範囲以内

図3 - 3 - 1. エンドトキシン測定機器



図3 - 3 - 2. クローズドディスプレイザブル無菌試験キット



無菌試験用ポンプについては、表3 - 3 - 2. に示す項目設定で予め適格性確認作業を実施した結果、すべての項目で目的とする性能規格に適合していた(表3 - 3 - 3. と図3 - 3 - 3.)。

また、純度試験(1)[表3 - 3 - 4. 参照]に用いるリアルタイム定量 PCR 装置(図3 - 3 - 4.)が、機器として必要とされる性能を維持し、純度試験(1)のアッセイに必要な真度及び精度を有しているかを「PCR 稼動性確認」試験として実施した結果、目的とする項目の全てで適合し、装置が期待される性能を機器として維持していることが確認された。上記のようにして設定した品質管理項目について、測定技術・測定装置の適合性が実証されたため、実際の製造物について品質確認試験実施計画書を作成して各試験の標準操作手順書に従って試験を実施した結果、全ての品質規格に適合した(表3 - 3 - 4.)。この結果から、新規真空維持技術により製造された製造物が、医薬ガイドラインに準拠するレベルの規格試験(品質確認試験)に適合することが実証された。

表3 - 3 - 2. 適格性確認の項目

据付時適格性確認	稼動性能適格性確認
1. 納入製品確認	1. ポンプ動作確認
2. 添付書類確認	2. 安全機能確認
3. 使用電源の確認	3. ポンプ性能確認
4. 各部品の装着確認	

表3 - 3 - 3. ポンプ性能確認

目盛	ビーカー-A(g)	ビーカー-B(g)	ビーカー-A、Bの誤差(%)	ビーカー-A、Bの合計採取(g/min)
「2」	247	248	1.6	125
「6」	388	385	2.5	403
「8」	467	461	2.9	558

空ビーカーの重量(g) ビーカー-A:184、ビーカー-B:186

図3 - 3 - 3. 無菌試験用ポンプ



注射用水で溶解した製剤を洗浄液に添加



培地の送液

図3 3 - 4 .リアルタイム定量 PCR 装置



表3 3 - 4 .品質管理試験結果

試験項目	規格	ロット番号:A
性状・溶状	白色の塊又は粉末	白色の塊であった
	溶解後に微白色～白色である	微白色であった
確認試験(1)	参照品と等しい	等しかった
確認試験(2)	陽性	陽性であった
浸透圧比	規定値±一定値以内	適合した
pH	規定値±一定値以内	適合した
特有	規定濃度以上	適合した
水分	規定値(%)以下	適合した
エンドキシン	規定値未満	適合した
不溶性異物	適合する	適合した
無菌	適合する	適合した
定量	含有量に対して一定範囲以内	適合した

安定性向上に関する研究開発: [2] 高性能化に関する研究開発の項目 [2-1]

医薬品の場合、安定性の評価は製造物の有効期限の設定に不可欠であり、長期安定性試験や加速試験等を実施することと定められている。そこで、図3 - 3 - 5 . に示すように苛酷及び加速条件で凍結乾燥した製造物への影響及び安定性を確認するための予備試験を実施した。

図3 - 3 - 5 . 安定性実証試験のステップ(1.、2.の予備試験実施後に3.の本試験を実施)

1. 苛酷試験(～1ヶ月) 高温・短期間



2. 加速試験(1ヶ月～3ヶ月) 室温・中期

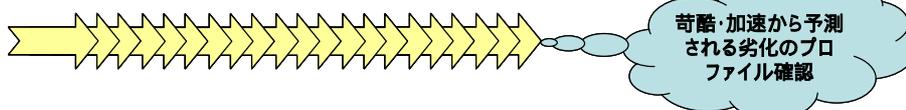


GEN0101/
TSD-0014
凍結乾燥製剤



設定した規格試験
品質劣化を定量

3. 長期試験(6ヶ月～3年) 低温・長期



予備試験における加速試験と苛酷試験の結果を表3 3 - 5 . 及び表3 3 - 6 . に示す。製造物は、加速試験及び苛酷試験で、0ヶ月点に対し劣化は認められなかった。このことから、想定される保存温度においては、長期間安定して保存できる可能性が示唆された。そこで、長期安定性試験を実施した結果、想定保存温度及び加速温度のいずれにおいても有意な劣化は認められず

安定である事が明らかとなった(表3-3-7、表3-3-8)。これらの結果により、製造物は想定保存温度と加速温度において目標とする長期安定性を確保できる事が実証された。

表3-3-5. 予備加速試験

試験項目	規格	0ヶ月	1ヵ月	2ヶ月	3ヶ月
外観		適合した	適合した	適合した	適合した
確認試験(1)	参照品と等しい	等しかった	等しかった	等しかった	等しかった
特有	規定濃度以上	適合した	適合した	適合した	適合した
定量	0ヶ月に対して一定範囲以内	100%	一定範囲以内	一定範囲以内	一定範囲以内
pH	規定値±一定値以内	適合した			適合した
エンドトキシン	規定値未満	適合した			適合した
生菌数	陰性	陰性			陰性

表3-3-6. 予備苛酷試験

試験項目	規格	0ヶ月	1ヵ月
外観		適合した	適合した
確認試験(1)	参照品と等しい	等しかった	等しかった
特有	規定濃度以上	適合した	適合した
定量	0ヶ月に対して一定範囲以内	一定範囲以内	一定範囲以内
pH	規定値±一定値以内	適合した	適合した
生菌数	陰性	陰性	陰性

表3-3-7. 長期保存試験の結果(想定保存温度)

試験項目	規格	0ヶ月	6ヶ月
確認試験(1)	陽性	陽性	陽性
確認試験(2)	参照品と等しい	等しかった	等しかった
特有	規定値(濃度)以上	適合した	適合した
定量	0ヶ月に対して一定範囲以内	100%	一定範囲以内
外観		適合した	
pH	規定値±一定値以内	適合した	
水分	規定値以下	適合した	
エンドトキシン	規定値未満	適合した	
生菌数	陰性	陰性	

表3-3-8. 長期加速試験の結果(加速温度)

試験項目	規格	0ヶ月	6ヶ月
確認試験(1)	陽性	陽性であった	陽性であった
確認試験(2)	参照品と等しい	等しかった	等しかった

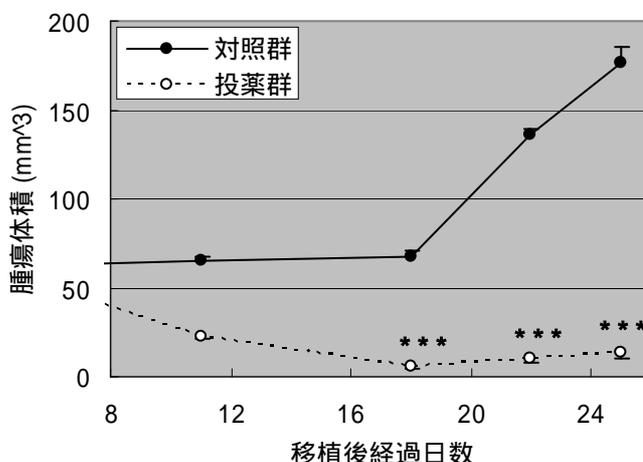
特有	規定濃度以上	適合した	適合した
定量	0ヶ月に対して 一定範囲以内	100%	一定範囲以内

性能の実証に関する研究：[2]高性能化に関する研究開発の項目 [2-2]

a) 有効性の実証

モデルとして選択したバイオ医薬の製造物に関して、その有効性をマウスのがんモデルで実証した。有効性実証試験は、対応する医薬ガイドラインに準拠したレベルで実施し、製造物であるバイオ医薬投与群と、媒体のみを投与した対照群の2群間の抗腫瘍効果を測定し、その差異を統計学的に検定した。各群8匹のモデルマウスに、製造物を一定回数投与した結果、投薬群の腫瘍体積平均値は媒体対照群のそれよりも明らかに低い値で推移した(図3 - 3 - 6)。対応のないt検定の結果、投薬群と対照群との腫瘍体積平均値には有意差が認められ、製造物であるバイオ医薬の有効性が実証された。

図3 - 3 - 6 . ヒトのがんを移植したマウスモデルによる有効性実証試験の結果
腫瘍増殖抑制効果(Error bar: SEM, ***: P<0.001, **: P<0.01 vs. Control)



b) 安全性の実証

モデルとして選択したバイオ医薬の製造物の安全性を実証するため、先ず小動物であるラットを用いて安全性を検討した。製造物の中用量及び高用量投与群と、溶媒のみを投与した対照群に対して、各群8匹の雄ラットにそれぞれ単回投与を実施し、投与前並びに投与後の状態をWBP法(Whole Body Plethysmography)により検証した。その結果、製造物の投与群において、安全性に關与するパラメーターにサンプル投与に起因した変化はみられなかった。そこで、よりヒトに類縁のカニクイザルを用いた試験で安全性の実証を続けた。モデルとして選択したバイオ医薬の投与限界量をカニクイザルに単回投与して安全性を評価した結果、一般状態で、投与後24時間に2例全例に少量の残餌が認められたものの、安全性に關与するパラメーターには変化は認められず、カニクイザルを用いた単回投与においても、安全性が実証された。

また、有効性実証試験において有効性を認めた1回あたりの投与用量は、同じげっ歯類であるラットにおける安全性実証試験で影響を認めなかった用量の1/10量に一致していたことから、有効用量と安全用量との乖離幅が10倍以上あることが実証された。

ベリフィケーション：[3]高信頼性に関する研究開発の研究項目 [3-1]

確立した工業化プロセスが、高い信頼性を有する事を実証するために、医薬ガイドラインに規定されたベリフィケーションを実施した。ベリフィケーションとは、確立した製造プロセスについて期待される品質が得られる事を科学的に検証し、それを文書化する事とされており、信頼性実証のために実施される検証作業である。そこで、構築した高度無菌化凍結乾燥システムを利用して実際にバイオ医薬を用いた製造を行い確立した製造プロセスのベリフィケーションを実施した。

このために先ず手順の標準化に必要な標準操作手順書・指図書を作成し、それに従って実際の製造を行った。次に、無菌環境レベルが高度化された充填エリアに設置した無菌分注機を用い

てガラス瓶(バイアル)への充填精度を検証した。重量法により薬液の充填精度を検証した結果、目標とする精度範囲内であることが実証された。最後に製造物の品質試験を実施し、医薬ガイドラインに準拠して設定した品質規格に適合するかどうかで、システムの適格性の評価を行った。その結果、表3 - 3 - 9 . に示すように、高度無菌凍結乾燥システムにより製造した凍結乾燥製剤 Lot . A は、全ての品質規格に適合した。このことから、確立した製造プロセスは、医薬ガイドラインに準拠したベリフィケーションに適合する事が実証された。

表3 - 3 - 9 . ロット番号Aの品質確認試験結果

試験項目	規格	ロット番号：A
性状・溶状	白色の塊又は粉末	白色の塊であった
	溶解後に微白色～白色である	微白色であった
確認試験(1)	参照品と等しい	等しかった
確認試験(2)	陽性	陽性であった
浸透圧比	規定値±一定値以内	適合した
pH	規定値±一定値以内	適合した
特有	規定値(濃度)以上	適合した
水分	規定値(%)以下	適合した
エンドトキシン	規定値未満	適合した
不溶性異物	適合する	適合した
無菌	適合する	適合した
定量	規格設定に対して一定範囲以内	適合した

クオリフィケーション：[3] 高信頼性に関する研究開発の研究項目 [3-2]

確立したシステムの信頼性高度化を実証するために、医薬ガイドラインに準拠したクオリフィケーションを実施した。クオリフィケーションとは、構造設備(設備、装置、機器、ユ・ティリティ等)について設計どおりの確である事を評価・確認して、それを文書化する事とされている。

このクオリフィケーションを実施するにあたり、先ず確立したシステムの操作手順を標準操作手順書により標準化し、実施計画書によって精度の高い検証を行った。信頼性の検証は、第15改正 日本薬局方の「培地充填試験法」に従い、高栄養な微生物増殖用培地を実際に無菌的にバイアルに充填し、培地に菌が発育するかで評価した。また、培地充填試験のバッチ3(最終回)では、作業員に対する稼働中の環境モニタリングを行った。

合計3バッチ分の培地充填試験を実施した結果、いずれの試験でも微生物汚染は認められず、試験に適合する事が実証された。また、環境モニタリングにおいても表3 - 3 - 10 . に示すように、微生物の汚染レベルは「1」か「0」であり、第15改正 日本薬局方収載の「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」にある清浄度規格に適合する事が明らかとなった。これらのことから、確立したシステムの充填エリアの無菌環境は、高い信頼性も有しており適切に管理できることがクオリフィケーションにより実証された。

表3 - 3 - 10 . 充填作業中の作業員に付着した菌数の結果(環境モニタリング)

作業員	付着菌(頭部/胸部/股部/手のひら)
A	0/0/1/0
B	0/0/0/0
C	0/0/0/0

製造スケールの評価：[4] 最適化に関する研究開発の研究項目 [4-1]

真空凍結乾燥は凍結した薬剤に下面から熱を供給し、真空表面から氷が昇華させるプロセスである。そのために重要なパラメーターは、熱供給を行うガラス瓶(バイアル)の底面積の総和と薬液の厚み(容量)である。理想的には充填本数にあわせて必要な薬液量の調製を行うこととなるが、生産量の変動を想定すると薬液の総量で調節するのは現実的ではない。そこで一定の条件で凍結乾燥を実施するには、ダミーバイアルを設置するのが最良と考えた。具体的には、生産量の変動に対して、薬剤を含まない溶解液などを充填したダミーバイアルを用意して凍結乾燥プロセスを実施するガラス瓶と溶液の総量を一定化する事で、プロセスに重要なパラメーターの一

定化を行う。この方式を適応すれば理論上1本からの製造にも対応可能となる。そこで、この方式を採用して数十本から数百本の製造スケールで、製造、模擬製造を実施した結果、いずれの製造でも規格試験に適合であった(表3 - 3 - 11.)。

以上の結果から、確立した高度無菌凍結乾燥システム・プロセス(工業化システム・プロセス)は、設定目標であったスケールの異なる製造に柔軟に対応出来ることが実証された。

表3 - 3 - 11 . 製造スケールへ柔軟に対応出来るかどうかの評価結果

評価試験	本数	規格への適合
評価試験 1*	数百本	適合
評価試験 2*	数百本	適合
評価試験 3*	数百本	適合
評価試験 4	数十本	適合
評価試験 5	数十本	適合
評価試験 6*	数百本	適合

* 評価1、2、3、6は無菌性の試験(培地充填試験、無菌試験)のみを実施した結果を示す。

容器サイズの評価: [4]最適化に関する研究開発の研究項目[4-2]

容器サイズの異なる製造に対応する技術は、薬剤の容量を変えることであり、つまりは用法や用途にバリエーションを持たせることができる上、コスト削減にも繋がる。種々の容器サイズでの製造に対応するには、熱量つまり薬剤の冷却と潜熱供給が同程度にできる環境であれば、理論上は同一の品質になるはずである。研究項目 の製造スケールの評価でも述べたとおり、真空凍結乾燥では熱供給の数値が重要であるため、容器サイズの変更により凍結乾燥を実施する溶液の総量が変化しないように適切な容器サイズと充填量を設定する必要がある。

そこで、図3 - 3 - 7 . に示すように直径 22mm バイアル(底面積 3.8cm²)と直径 30mm バイアル(底面積 7.1cm²)を選択して実証試験を実施した。各サイズの容器での製造に関して、容器底面の総面積(熱供給面積)、充填総量、充填時の液面の高さをほぼ同一にする事で、同等の昇華条件を設定することができると考えられた。この考察に基づき、2種類のサイズの容器で製造を実施した規格試験データを比較した結果、両者に差は認められなかった(表3 - 3 - 15)。このことから、確立した高度無菌凍結乾燥システム・プロセスは異なる容器サイズの製造にも柔軟に対応出来る事が実証された。

図3 - 3 - 7 . サイズの異なるバイアルで凍結乾燥したバイオ医薬(直径 30mm と直径 22mm)



少人数化・時間短縮の評価: [5]操作容易性に関する研究開発の研究項目[5-1]

少人数の作業員で短時間に製造作業を完了出来るよう操作容易性を向上した。そのために、ガラス瓶(バイアル)への自動分注システム、操作グローブのデザイン(図3 - 3 - 8、蛇腹形状のデザイン)、ソフト素材の採用による操作性向上と、ディスプレイによる作業時間削減を行った。無菌エリアの構造については主にアメフレック社が実施したため、ジェノメディアではシステム内に設置した無菌分注機による製造の高速化を検討した(図3 - 3 - 9.)。実際に2名の作業員が、確立したシステムで充填作業を実施した時のガラス瓶(バイアル)の本数と作業時間は、200本あたりの製造時間に換算すると1時間3分から1時間24分であり、目標として設定した2名の作業員で2時間以内に200本の製造プロセスを完了できる事を実証した(表3 - 3 - 12.)。

図3 - 3 - 8 . 操作グローブボックスのデザイン案(修正前) 詳細はアメフレック社が記載

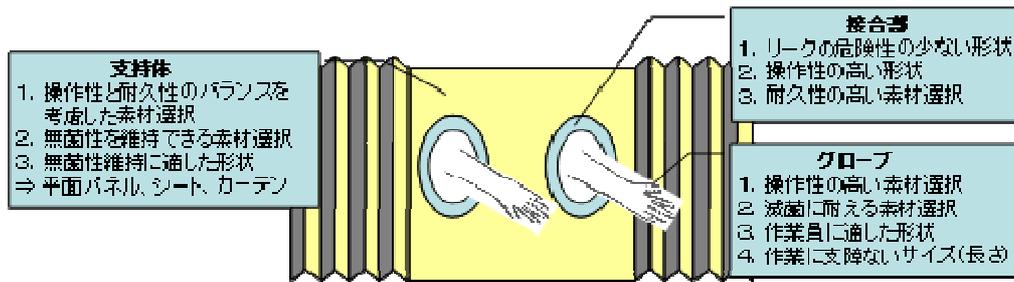


図3 - 3 - 9 . 高度無菌化凍結乾燥システムに組み込んだミリポア社無菌分注機



右側に見えるシルバーの装置が分注装置、左側の白い装置が送液装置である。分注装置に付いているノズルから薬液を吐出しバイアルに受ける。薬液は精密電子天秤により吐出量を監視している。

表3 - 3 - 12 . 製造に用いた充填本数と作業時間

	作業1	作業2	作業3	作業4	平均
バイアル本数	400 本以上	200 本以上	400 本以上	400 本以上	
200 本あたりの作業時間	1 時間 12 分	1 時間 24 分	1 時間 06 分	1 時間 03 分	1 時間 11 分

低コスト化の評価: [5] 操作容易性に関する研究開発の研究項目 [5-2]

低コスト化についてはアメフレック社の研究員と協力して研究開発を実施した。図3 - 3 - 9 .、図3 - 3 - 10 . に示すように、使い捨てグローブの採用、グローブ周りの構造の改良による素材コストの低減、安価なステンレスパネル素材の採用、安価かつ安全な全面パンチングテーブルの開発などにより、目標としていた数百万円レベルでのシステム構築を達成した。

図3 - 3 - 9 . 充填エリア作業面



図3 - 3 - 10 . 全面エアタイト脱着式パネル



3 - 4 . 考察

本事業では、新規の技術開発によりテーラーメイド的バイオ医薬の製造に適した高度無菌化凍結乾燥システムと凍結乾燥プロセスを確立し、その性能を医薬ガイドラインに

準拠して実証した。また、確立直後の性能が恒常的に維持できることをベリフィケーション、クオリフィケーションという、信頼性(再現性)を検証する方法で実証した。更に、中小のバイオ企業の少量・多品種製造のために普及させることが出来るよう、少人数での操作性、幅広い製造スケール・容器サイズに柔軟に対応可能であることを実証した。これらの性能面の高度化と並行して、中小企業向け設備として設備投資額を低減できるようにするため、低コスト化についても技術開発を実施し、数百万レベルという従来のアイソレーター(数千万レベル)よりも低価格で提供できることを実証した。医薬製造においては規制が厳しく、製造用設備、プロセスの実績が特に重要視される傾向にある。そこで、今後確立した新規システム・プロセスを活用し、自社で開発しているバイオ医薬を初めとして、種々のバイオ医薬の製造実績を蓄積し、技術の普及に貢献する予定である。

3 - 5 . 当該研究開発の連絡窓口

ジェノメディア株式会社 代表取締役社長 中島 俊洋

住所:大阪府池田市緑丘1 - 8 - 31 Tel:072-751-1143 Fax:072-751-1176

4 . 大阪大学大学院医学系研究科の研究成果

4 - 1 . 研究担当項目

本事業では から の10項目の研究開発を実施した。そのうちで大阪大学大学院医学系研究科が研究を担当したのは、 性能の実証に関する研究、 である。

4 - 2 . 研究目的及び目標

大阪大学においては、製造物の有効性を実証するための試験を実施した。本事業においてモデルとして選択したバイオ医薬(HVJ-E、GEN0101/TSD-0014)は、多彩な抗腫瘍効果を有する治療薬であり、シーズの発明者である大阪大学の金田研究室では、種々の有効性評価法が確立されている。そのため、他の研究機関とは異なる方法で製造物の有効性実証試験を実施した。

性能の実証に関する研究

動物モデルを用いた有効性実証試験(信頼性基準レベル)で統計的有意差

4 - 3 . 研究開発の背景

HVJ(Hemagglutinating virus of Japan; Sendai virus) はパラミキソウイルス科のパラミキソウイルス属の1つで、平均直径300 nmのウイルス粒子であり、その内部には約15kBのminus-strand RNAを含むマウスのウイルスで高い細胞融合能をもつ。我々は、紫外線などでHVJを不活化し、その粒子を精製後、治療遺伝子と混合し低濃度の界面活性剤処理と遠心力によって不活化HVJ粒子内に遺伝子を封入し、強い融合活性を保ったまま培養細胞へも生体組織へも遺伝子導入が可能なHVJ envelope vector (HVJ-E)を完成した。plasmid DNAは約20%の効率で封入される。HVJ-Eは細胞融合活性を有しており、10秒以内に細胞膜での融合を起こし、封入物を直接細胞質内に導入できる。この能力を利用して、HVJ-E vectorは多くの培養細胞ばかりでなく生体組織への遺伝子導入にも優いることが明らかになった。

このHVJ-Eを用いた治療実験を行ううちに治療分子を含まないHVJ-E自体に抗腫瘍効果があることが見出された。マウスの結腸がんや腎臓がんの腫瘍塊に繰り返し投与すると、腫瘍が高率に消失するが、それは抗腫瘍免疫の活性化によることが明らかになった。

一方、ヒトの癌細胞に対してはHVJ-E自身が腫瘍細胞死を誘導できることが判明した。特にホルモン抵抗性の前立腺がんはHVJのレセプターが強発現しているために、HVJ-Eに極めて感受性が高くアポトーシスが誘導される。正所性癌モデルでの有効性も確認された。すでに臨床用製剤も開発され、動物を用いた安全性試験を終え、大阪大学医学部附属病院ではメラノーマ患者への臨床応用が昨年末よりはじめられた。今後医薬品としての応用事例が増えることが期待されている。

4 - 4 . 研究目的及び目標

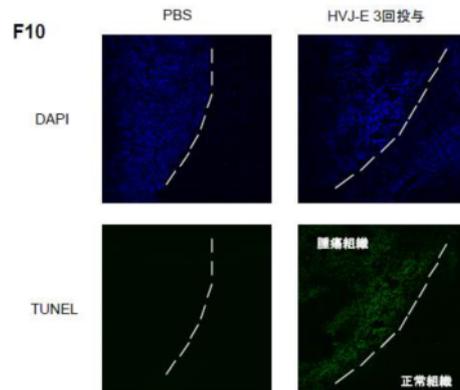
本事業でテーラーメイド型バイオ医薬の少量・多品種製造に適した高度無菌凍結乾燥システム・プ

ロセスが開発された。そこで、今後医薬ガイドラインに準拠したレベルで製造された場合に、医薬品として多くの癌患者に応用されるレベルの有効性を保持していることを、動物モデルで検証する。

4 - 5 . 研究の成果

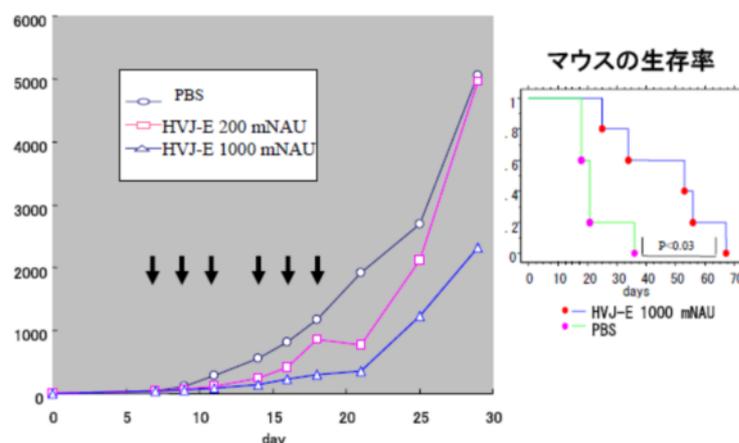
- 1) マウスがん細胞を同系マウスの皮内に移植し、腫瘍径が約 5mm になった時点で、本事業においてバイオ医薬のモデルとして選択した HVJ-E (GEN0101) 製剤とコントロールとして PBS100 μ l をそれぞれ腫瘍内に注入した。投与は 2 日おきに 3 回行った。最終投与後 48 時間で腫瘍内に浸潤してくる免疫細胞の定量を、それぞれの細胞マーカーの RT-PCR により行った。その結果、細胞傷害性 T 細胞、樹状細胞、Natural Killer 細胞のそれぞれのマーカーの発現が、PBS 投与群と比較して 6~28 倍の上昇しており、抗腫瘍免疫に必要な細胞の著明な浸潤が起きていることが明らかになった事から、抗腫瘍効果に関連する作用が保持されていることが示唆された。
- 2) そこで、1)と同様の条件でバイオ医薬の投与を行った担癌マウスから脾臓細胞を分離し、ELISPOT assay で腫瘍細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性を評価した結果、無処理群に対して HVJ-E 投与群では有意な CTL の上昇が認められた。
- 3) 1)と同様の条件で HVJ-E や PBS を投与したメラノーマ腫瘍塊の細胞死が起きているかどうかを検討した結果、図 4 - 5 - 1 . に示すように腫瘍組織特異的に TUNEL 陽性の細胞群が検出され、著明なアポトーシス誘導が起きていることが確認された。

図 4 - 5 - 1 . マウスがんモデルにおけるがん細胞死の誘導活性



- 4) ヒトがん細胞株を免疫不全マウスの皮内に移植し、腫瘍径が約 5mm になった時点でモデルとして選択したバイオ医薬を無投与 (PBS)、低用量、高用量の 3 つの条件で腫瘍内に注入し、腫瘍径を測定した結果、用量依存性に腫瘍増殖の抑制が認められた。また、生存期間についても高用量投与群では有意 ($p < 0.03$) な延長が認められた。それらの結果を図 4 - 5 - 2 . に示す。

図 4 - 5 - 2 . ヒトがんのマウスモデルにおける有効性の実証



4 - 6 . 考察

今回ジェノメディアから供給された HVJ-E は抗腫瘍免疫の活性化、腫瘍細胞に対する細胞死誘導効

果の両方において、過去に見出された抗腫瘍効果に劣らない十分な治療効果を有していることが実証された。

4 - 7. 当該研究開発の連絡窓口

金田安史(大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学 教授

住所:大阪府吹田市山田丘2 - 2 TEL:06 - 6879 - 3900

5. 産業技術総合研究所・関西センターの研究成果

5 - 1. 研究担当項目

本事業では から の10項目の研究開発を実施した。そのうちで産総研・関西センターが研究を担当したのは以下の項目である。

高品質化の実証(品質管理試験)

安定性の実証に関する研究開発

5 - 2. 研究目的及び目標

テーラーメイド的バイオ医薬の普及のために必要となる、少量多品種の製造に柔軟に対応でき、かつ医薬ガイドラインに準拠したレベルの無菌性を持つ凍結乾燥システムとそれを利用したプロセスの開発を行う。各研究項目の数値目標は以下の通りである。

高品質化の実証(品質管理試験)

確立した工業化プロセスで製造した製造物が品質試験に適合

安定性の実証に関する研究開発

医薬ガイドラインに従ってデザインされた安定性試験で長期安定性を実証

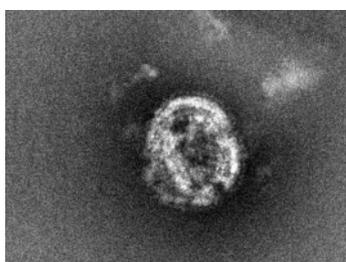
5 - 3. 研究成果

高品質化の実証(品質管理試験)

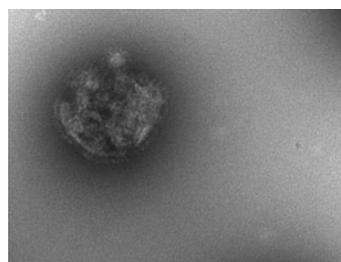
より微細な有効性の評価を行うために、産業技術総合研究所において電子顕微鏡を用いた凍結乾燥製剤の評価を行った。モデルとして選択したバイオ医薬を用いて無菌凍結乾燥プロセス前後での構想の評価を実施した。凍結乾燥前後の溶液と製剤をそれぞれ用いて構造変化を評価する目的で、走査型電子顕微鏡を用いた。生物系の試料の場合は特に観察面の処理や乾燥、導電性の付加にそれに適した処理が必要であるが、条件設定により図5 - 3 - 1.のような像を得ることができ、凍結乾燥の前後で薬効成分である粒子の大きさや形状に差はなく工業化プロセスがバイオ医薬の構造破壊を起こすことのない適切な工程である事が実証された。

図5 - 3 - 1. 電子顕微鏡撮影による高次構造の評価

凍結乾燥プロセス前



凍結乾燥による安定化プロセス後



100 μm

安定性の実証に関する研究開発

さらに、製造物の活性が保持されていることを実証するためにマウスのがん細胞を用いて、膜融合活性の有無を検証することとした。モデルとして選択したバイオ医薬は、脂質2重膜から構成される外膜を有するナノサイズの微粒子であり、標的となるがん細胞に付着して外膜と細胞膜との間で膜融合を起こすことが明らかとなっている。細胞の内部の微細構造をより高い解像度でみるために、透過型電子顕微鏡を用いて観察を実施した結果、図5 - 3 - 2. に示すように、細胞に添加して5分後は粒子状の構造、膜融合像、膜融合後に細胞内へ粒子内に含有さ

れていた核酸成分が注入された像がそれぞれ確認された。一方、添加60分後は、図5 - 3 - 3 . に示すように既に反応が進んだ状態であり、遊離粒子や膜融合像は観察できず、細胞内へ粒子内に含有されていた核酸成分が注入された像だけが確認された。これらの結果から、バイオ医薬の膜融合活性は無菌凍結乾燥プロセス後も保持されており、細胞添加後経時的に細胞への付着 膜融合 粒子内部の核酸成分の細胞内への注入が進む事が実証された。

5 - 4 . 考察

製造物の透過型電子顕微鏡による直接的な観察の結果から、無菌凍結乾燥プロセス後もバイオ医薬の高次構造が保持されている事、それに加えてバイオ医薬としての作用である膜融合活性や内部に含有している核酸成分の注入活性についても保持されていることが明らかとなった。こんご、更に多くの製造ロットで確立した高度無菌凍結乾燥システム・プロセスによるバイオ医薬の製造で、高次構造や活性が保持されていることを示すデータを取得し、再現性の実証を進める予定である。

5 - 5 . 当該研究開発の連絡窓口

産業技術総合研究所・関西センター バイオインターフェース研究グループ長 小島 正己
住所:大阪府池田市緑丘1 - 8 - 31 TEL:072-751-9521

図5 - 3 - 2 . 電子顕微鏡撮影による観察 (細胞への添加 5 分後)

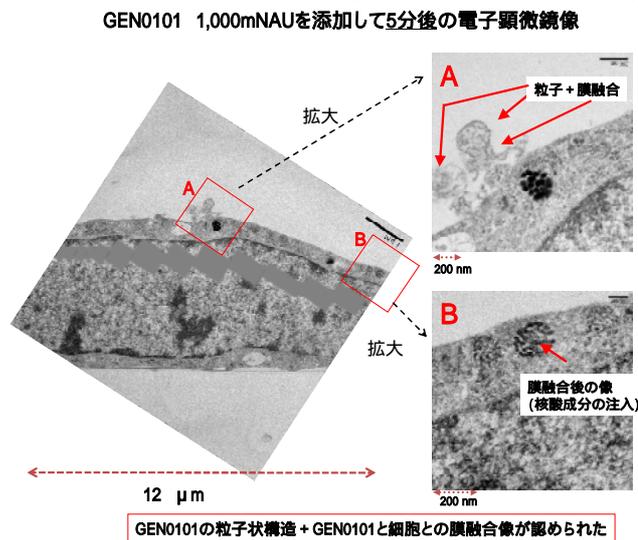


図5 - 3 - 3 . 電子顕微鏡撮影による観察 (細胞への添加 60 分後)

