

【民間実用化研究促進事業（平成21～23年度）研究成果の概要】

（課 題 名）遺伝子組換え犬顆粒球コロニー刺激因子製剤の実用化

（受 託 者）日生研株式会社

（統括責任者）長井 伸也（日生研株式会社取締役）

（研究代表者）山元 哲（日生研株式会社研究員）

1 試験研究の概要

（1）試験研究の目的

本研究開発事業では犬の好中球減少症を治療もしくは予防する動物用医薬品として犬 G-CSF タンパク質を安価に提供することを目標とする。

（2）試験研究の概要

犬 G-CSF を遺伝子組換え技術を利用して生産する方法については基盤が整った。商品化を目的に生産した犬 G-CSF を使用して以下の項目を実施する。

- ①長期保存試験を行い、製剤の安定性を確認する。
- ②犬やげっ歯類を用いて製剤の安全性を確認する。
- ③実製造レベルで製造し、コストを確認・低減する。
- ④犬を用いて体内での動態を追跡する。
- ⑤臨床試験を行い、用法用量を確認する。

2 成果の概要

（1）製造技術の確認

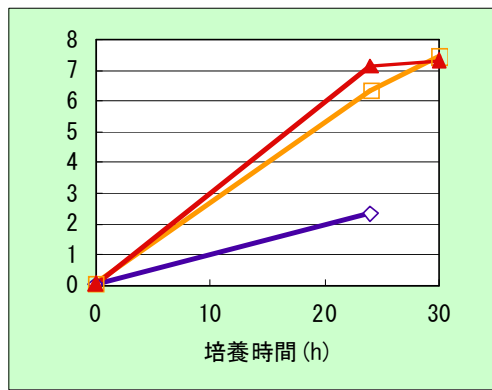
目標と概要：300L 培養規模での製造を行い、精製を行う。精製前の培養液を元にした原液の活性回収率を 5 %以上に引き上げる。前培養の段階で十分な菌量が必要と考えられたため、前培養の培養条件を検討する。

成果：・300L 培養を行ない、精製を完了した。活性回収率は 2.4%となり、目標の 5%以上に引き上げることはできなかった。回収率が低い原因は、培養上清中の G-CSF 発現量及び菌量が低かった事と考えられた。前培養(2 次培養)の培養終了時における吸光度(OD)が低かったことから、この段階の菌量を十分にすることによって、最終的に回収率が改善されると推察された。

- ・前培養の培養条件を検討し、攪拌回転数を 170rpm から 200rpm へ、通気を 0.6VVM から 0.8VVM(VVM: volume per volume per minute (1 分間に供給する培地 1L あたりの通気量)) へと変更した。この条件で OD(620nm)が 7 を超え、前培養で十分な菌量となった(下図)。

図 1. 4L 培養の時間経過に伴う OD (620nm) の変化

平成 22 年度に行った 300L 培養時の前培養(◇)と条件検討 1 回目(□)および 2 回目(▲)の OD (620nm) の変化の比較。通気量が条件検討一回目 0.7vvm、二回目 0.8vvm。



(2) 保存性の調査

目標と概要：原液および製剤の長期安定性について性状を数値データとして表す。規格値と適合するか否かで安定性を示す。また、過酷試験(凍結融解、pH 変化、光照射)、加速試験(25℃、45℃、50℃に加温、振とう)を行い、安定性や使用時のさまざまな条件下での保存の注意点を明らかにする。また、構造確認及び物理化学的性質の評価を行う。

成果：・長期安定性：原液、製剤ともに最大 30 ヶ月間安定であることを確認した。

- ・凍結融解：未処理のサンプルと比較して、Western blot 解析で G-CSF のバンドに変化はみられず、生物活性も低下しなかったため、5 回までの凍結融解でも安定と考えられた。
- ・pH 変化：pH 2, 7, 12 に変化させて 1 日あるいは、1 週間 4℃で保存した。原液の pH を 12 に上昇させたときに Western blot 解析において、高分子量のバンドが検出された。pH 12 では G-CSF の一部が変性すると考えられた。
- ・温度 25℃、照度 2000 lx にて曝光し、総照度 30 万 lx・h (約 6 日)、60 万 lx・h (約 13 日)、90 万 lx・h (約 19 日)、120 万 lx・h (約 25 日) の各光照射量でバイアルを回収し、性状の変化を調べた。Western blot 解析したところ、原液に関しては高分子量のバンドが検出され、生物活性に低下がみられたため、遮光保存が必要であると考えられた。
- ・原液は 20 分、製剤は 1, 8, 16, 24 時間振とうした。原液は生物活性が約 20%低下した。製剤はバイアル縦向きの場合で約 20%、バイアル横向きの場合で約 50%の生物活性の減少がみられた。Western blot 解析において、未処理のサンプルと比較して、G-CSF のバンドに変化はみられなかったことより、G-CSF に変性は起こっていないと考えられた。生物活性の低下はブチルゴム栓等への吸着が原因と考えられた。
- ・原液及び製剤を 25℃、45℃、50℃に加温し、一定期間経過後にバイアルを回収して性状の変化を調べた。Western blot 解析を行い、生物活性の変化を調べたところ、25℃では G-CSF のバンドに変化はみられず、生物活性に変化はみられなかった。45℃では日数の経過により G-CSF のバンドに変化が生じて高分子量のバンドが検出され、生物活性も低下した。50℃では時間経過により高分子量のバンドが検出され、生物活性も低下した。
- ・ペプチドマッピング：犬 G-CSF を Glu-C によって酵素消化し、HPLC 分離を行った。特異的なペプチドピークパターンを決定したところ、ピークは G-CSF 由来であることを確認した。
- ・プロテインマッピング：犬 G-CSF を 3 種類の酵素で消化した。生成したペプチド断片のシークエンスは予想配列の 98%をカバーした。

(3) 安全性試験

目標と概要：長期反復投与を行い、剖検および組織切片の所見を検索して異常の有無を調査し、安全性を調査する。新規医薬品であるため、未知の無毒性量を算定する。妊娠したウサギへの反復投与を実施し、剖検および組織切片の所見を検索して異常の有無を調査する。新規医薬品であるため、影響量を算定する。また、変異原性について調査する。

- ・ 3 週間反復投与試験：ラットを用いて 3 週間の反復投与。
- ・ 13 週間投与試験：ラットを用いて 13 週間の反復投与。
- ・ 催奇形性試験：妊娠したウサギへの反復投与。
- ・ 変異原性試験：サルモネラ菌の突然変異復帰試験、培養細胞の染色体異常試験。

成果：・ 3 週間反復投与試験：250 $\mu\text{g/kg}$ 及び 25 $\mu\text{g/kg}$ の用量では、脾臓重量の有意な増加および脾臓の腫大が認められ、毒性変化と考えられた。0 $\mu\text{g/kg}$ (対照)、2.5 $\mu\text{g/kg}$ の用量ではこの変化は認められなかった。血液学的検査及び血液生化学的検査で認められた変化は、いずれも被験物質の薬理作用に関連した変化と考えられ、休薬によって回復性を示す可逆的な変化であった。無毒性量は 2.5 $\mu\text{g/kg}$ と考えられた。

- ・ 13 週間投与試験：250 $\mu\text{g/kg}$ 群および 25 $\mu\text{g/kg}$ 群の雌雄の脾臓の腫大が観察され、250 $\mu\text{g/kg}$ 群の雌および 25 $\mu\text{g/kg}$ 群の雄の発生率は有意な高値であった。0 $\mu\text{g/kg}$ (対照)、2.5 $\mu\text{g/kg}$ の用量ではこの変化は認められなかった。血液学的検査及び血液生化学的検査で認められた変化は、いずれも被験物質の薬理作用に関連した変化と考えられ、休薬によって回復性を示す可逆的な変化であった。無毒性量は 2.5 $\mu\text{g/kg}$ と考えられた。
- ・ 催奇形性試験：交尾を認めた雌ウサギの妊娠 6 日から 18 日まで皮下投与した。胎児に対する無影響量は 25 $\mu\text{g/kg}$ で、催奇形性は陰性であった。
- ・ 変異原性試験：犬 G-CSF の変異原性は陰性であった。

(4) 動態試験

目標と概要：抗体を用いた高感度 ELISA システムを作製する。血清中で 10pg/mL の G-CSF 測定を目標とする。健常犬に犬 G-CSF を 20 $\mu\text{g/kg}$ で皮下投与し、高感度 ELISA を用いて測定した血中動態をもとに動態パラメータを算出する。また、投与後の臓器への分布量あるいは排泄物への排泄量を算出する。もしくは検出限界以下であることを明らかにする。

成果：・ 高感度サンドイッチ ELISA を構築し、犬 G-CSF 製剤を犬血漿で希釈して測定したところ、発光強度は犬 G-CSF 濃度が 40ng/mL～2.5pg/mL の範囲で直線性を示した。

- ・ 血中動態パラメータ

最高血漿中濃度 (Cmax)	最高血漿中到達時間 (Tmax)	半減期(T1/2)
11.04 – 36.92 ng/mL	2 – 3 時間	5.09 時間

- ・ 肝臓、脾臓磨砕液中の G-CSF 濃度は検出限界以下であったが、4 頭全頭で心臓、3 頭で腎臓、2 頭で肺に僅かに G-CSF が検出された。
- ・ 尿中の G-CSF 濃度は検出限界以下であり、また、糞便中の G-CSF は反応が阻害され測定不能であった。

(5) 臨床試験

目標と概要：臨床現場においてがん罹患した犬、100 症例以上に投与する。25 例ほどの非投与対

照を設定する。また、有害事象、副作用の発生があった場合、必要があれば一般薬理試験等を行う。重篤な副作用ではないことを明らかにする。

<一般薬理試験>

①抗原性に関する調査

- ・抗原性に関して人の G-CSF と比較試験を行った。
- ・2 日間連続投与/週で用量 2.5 μ g/kg の人 G-CSF(グラン；協和発酵キリン)または犬 G-CSF 製剤(ロット 100621)を初回投与日を試験 1 日とし、試験 59 日まで投与した。
- ・定期的に血清を採取し、好中球数の測定と抗体検出の ELISA を行った。

②炎症に対する影響の調査

- ・調査にはコラーゲン誘導性関節炎モデル(CIA モデル)を使用した。
- ・関節炎はウシ関節軟骨由来 II 型コラーゲン を免疫することにより誘導した。
- ・関節炎誘導と同時に、犬 G-CSF を投与(臨床適用量、100 倍用量、600 倍用量)して関節炎への影響を調査した。
- ・関節炎は目視により測定し、スコア化した。

成果：治験実施計画書、症例記録票の見本、被験薬概要書を作成し、動物医薬品検査所への治験計画に関する届出を行い、その後、臨床試験を開始した。平成 24 年 3 月 19 日現在、適用症例があったのは 16 施設中 8 施設であり、投与群 32 症例・非投与群 9 症例である。症例数の集まりが悪く、年度内に目標は達成できなかった。今後、実施施設数を増やることにより、早期に臨床試験を終了する予定である。

<一般薬理試験>

①抗原性に関する調査

犬 G-CSF は健常犬への長期間の投与により抗体が産生される可能性が人の G-CSF より低く、抗体が産生された場合も G-CSF の効果が消失するリスクが低いと考えられた。

②炎症に対する影響の調査

- ・600 倍用量投与群の関節炎のスコアが上昇したが、その他の用量では陰性対照群と有意差が認められなかった。
- ・犬 G-CSF は炎症(関節炎など)の症状を悪化させる可能性がある。しかし、臨床適用量である 2.5 μ g/kg ではその作用は弱いと考えられた。

3 成果を踏まえた今後の事業化の見通しについて

弊社は製造販売業の許可を取得しており、自社の製造設備を用いて製造するため、事業化において設備の問題はない。現時点では製造販売承認を得ること自体が本製剤の事業化にとって必須である。本委託事業の成果により、平成 22 年度までに製造販売承認申請書の作成に必要な試験がほぼ終了していることから、事業化に向けて順調に進展していると考ええる。臨床試験終了後、速やかに製造販売承認申請書を提出する予定である。

4 問い合わせ先

日生研株式会社 製品開発部 山元 哲

TEL：0428-33-1045、FAX：0428-32-0670

e-mail address：yamagen@nibs.or.jp