

# 新規医薬品の開発と免疫毒性評価の課題

大沢基保

## Emerging issues in immunotoxicology evaluation of newly developed pharmaceutical products

Motoyasu OHSAWA

### はじめに

化学物質の免疫毒性試験は、免疫組織を構成する細胞を標的とする細胞毒性試験や細胞機能試験、および個体レベルの免疫能試験から構成され、そのスクリーニング方式も提唱されてきた。これは標的となる免疫細胞の正常な機能の変調(主に阻害による免疫抑制)から免疫毒性を検出する試験である。しかし、化学物質の中には、正常な機能を亢進するもの、あるいは標的細胞そのものを異常に刺激あるいは活性化する場合がある。この場合は、標的である免疫細胞の機能障害という直接的免疫毒性ではなく、その機能の制御変調による Systemic effects として免疫毒性はとらえられる。

筆者らが開発したマウスリンパ球培養の *in vitro* IgM 産生試験<sup>1)</sup>でも、水質汚染の可能性のある化学物質255種について標的リンパ球への直接的影響を調べると、細胞増殖に影響せずに抗体産生を促進するもの6種(2.4%)が検出された(一方、細胞増殖に影響せずに抗体産生を抑制するものは、29種(11.4%)であった)<sup>2)</sup>。細胞増殖と抗体産生の両方を促進する物質4種を加えると抗体産生亢進物質10種(3.9%)となり、無視しう程度とは言えない。これらは低分子化合物についての結果であり、その抗体産生亢進作用は近年増加傾向にある自己免疫疾患やアレルギー疾患などの免疫能の異常亢進の要因となる可能性が示唆される。

さらに近年、医薬品、化粧品、食品を始めとする生活物質にはタンパク質製品やナノテクノロジー製品やアジュバント成分が含まれ、直接あるいは間接に免疫系を刺激する環境条件が増えている。これらについては、共通して免疫学的な適合

性が求められる。非臨床試験による免疫毒性評価のため、低分子化合物を主対象とする医薬品については、ICH 8により免疫毒性試験ガイドライン<sup>3)</sup>が、一般の化学物質についてはWHO/IPCSにより免疫毒性評価のガイダンス<sup>4)</sup>が示されている。一方、免疫毒性評価の対象となるタンパク質や抗体などのタンパク質医薬やナノ医薬の開発は急速に進んでいる(表1)。バイオテクノロジー応用医薬の安全性評価ガイドライン<sup>5)</sup>でも、免疫系への影響評価が重視されている。しかし、タンパク質や抗体などの新規医薬品やナノ粒子に関する免疫亢進作用や免疫原性は意図した免疫制御の場合もあり、その評価は多くの課題を内包している。ここでは、タンパク質医薬とナノテク医療製品を例にとりあげ、非臨床試験での免疫毒性評価の課題を考えてみたい。

### 1. タンパク質医薬 (Protein therapeutics)

タンパク質医薬は、その医療目的により次のような機能分類が提示されている<sup>6)</sup>。①酵素活性や調節機能を有する治療用タンパク質、②特異的な標的活性を有する治療用タンパク質、③タンパク質ワクチン、④診断薬タンパク質、である(表1)。これらの人体への適用には、本来の免疫機能を攪乱しないこと、免疫原性を示さないことが必要である。

#### 1.1 治療用タンパク質

①の治療用タンパク質は、欠乏あるいは異常タンパクを補完するもの(インスリン、成長ホルモン、血液凝固因子など)や、既存能力を増強するもの(エリスロポイエチン、卵胞刺激ホルモン、インターフェロン類など)、新機能や活性を供給するもの(ボツリヌス毒素、コラゲナーゼ、アスパラギナーゼなど)があげられる。②の治療用タ

表1 免疫毒性評価の対象となる医薬品の種類

分類	例(承認品目)
タンパク質医薬	
① 酵素活性や調節機能を有する治療用タンパク質	
欠乏あるいは異常タンパクを補充/置換するもの	インスリン, 成長ホルモン, 血液凝固因子, アデノシンデアミナーゼなど
既存能力を増強するもの	エリスロポイエチン, 卵胞刺激ホルモン(FSH), インターフェロン類, 組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)など
新機能や活性を供給するもの	ボツリヌス毒素, コラゲナーゼ, アスパラギナーゼなど
② 特異的な標的活性を有する治療用タンパク質抗体医薬	
抗体医薬	
抗がん薬	リツキシマブ, トラスツズマブ, ベバシズマブ, イピリムマブ, ニボルマブ
抗リウマチ薬	インフリキシマブ, トシリズマブ, アダリムマブ
免疫抑制薬	ムロモナブ-CD3
喘息薬	オマリズマブ
受容体拮抗薬	アバタセプト, エタネルセプト, ベグミソバント
薬物-抗体薬	ゲムツマブオゾガマイシン, イブリツモマブ-チウキセタン
③ タンパク質ワクチン	B型肝炎ウイルス抗原, ヒトパピローマウイルスワクチン, インフルエンザワクチン, シプリューセル-T*
④ タンパク質診断薬	結核抗原DPPD, グルカゴン・セクレチンなどのホルモン類, インジウムベンテトレオチド( <sup>111</sup> In)
ナノ医薬品**	
① リボソーム製剤	ビスダイン, アムビゾーム, ドキシル
② 鉄ナノ粒子製剤	リゾビスト, フェジン
③ ナノ結晶製剤	イメンド, ゼプリオン
④ その他	アブラキサン

\* 日本では未承認(2016年7月現在).

\*\* ナノ医薬製剤の品目名はすべて商品名.

ンパク質には, リツキシマブを始めとする多くの抗体医薬やエタネルセプトのような融合タンパク質である受容体拮抗薬, 薬物を結合させたモノクローナル抗体を標的細胞への薬物送達手段とする薬物-抗体薬などが開発されている.

治療用タンパク質には, 免疫原性(immunogenicity)の問題がある. ヒト以外の動物種のタンパク質を用いた場合, タンパク質分子組成に種差がなければ問題はないが, 種差があるとどんなに精製しても抗原性が存在する. 抗原性が強いとヒトの側に免疫反応を引き起こす免疫原になる. これを回避するためにタンパク質医薬はヒト化されるが, 保存状態により免疫原性を有することがある. また, 最近では遺伝子組換え技術により, 動物やそれ以外の生物にヒト型タンパク質を合成させることが可能になっているが, 時々それらタンパク質の免疫原性が課題となる.

タンパク質医薬の代表である抗体医薬の中で最近特に注目されたのは, 免疫抑制機構を阻害する抗体を開発し, がんに対する免疫を増強し, 画期的な抗がん作用をもたらした免疫チェックポイント阻害薬である. その臨床適用により, 免疫異常が関与すると考えられる副作用が報告されるようになり, 免疫毒性試験のあらたな課題が生じてきた.

一方, ③のタンパク質ワクチンでは, 病原特異的なタンパク質の免疫原性を利用しているので, それに伴う免疫毒性や免疫誘導によるアレルギー反応の誘発の有無の検査が必要である. とくに, ワクチン効果を高めるためにアジュバントが併用されるが, それによる免疫異常亢進の評価が課題となる. ④の診断薬としてのタンパク質は, *in vivo* または *in vitro* での標的への選択的結合やその機能修飾を, 病原や疾病状態の指標として利用するものである. 診断のため生体に直接投与する

場合は、診断薬タンパクそのものの免疫原性を始めとする短期の免疫影響の評価が課題となる。

## 1.2 免疫原性

特異抗体と反応する物質を抗原といい、タンパク質をはじめ種々の分子が抗体に結合し抗原として認識される。しかし、すべての抗原がそれ自身で特異抗体産生などの免疫応答を誘導(適応免疫誘導)するわけではない。抗原性を有するタンパク質は、ほとんどの免疫応答に必要なT細胞を動員できるので、十分な適応免疫応答を誘導しやすい。この免疫応答を誘導できる物質の性質が免疫原性である。タンパク質以外の抗原物質でも、T細胞の反応を誘導するキャリアタンパクと複合体を形成すると免疫原性を得ることがある。

一般に強い免疫原性を有する医薬は、主に(1)分子量が10,000以上のポリペプチドまたはタンパク質と、(2)それらに共有結合して複合体を形成する分子量1,000以下の低分子化合物(ハプテン)とに分けられる。分子量5,000~10,000のポリペプチドまたはタンパク質は弱い免疫原性を発揮する場合があります。分子量1,000~5,000の物質の免疫原性は予測不能とされている。

また、タンパク質抗原には精製タンパク質では実験的に免疫応答を誘導できないものがあり、水酸化アルミニウム(アラム)などの免疫応答増強物質(アジュバント)とともに投与すると免疫原性を示すようになる。精製タンパク質抗原をワクチンとして用いる場合に、免疫原性を高めるためアジュバントを加えるのはこの例にあたる。

## 1.3 タンパク質の凝集と免疫原性

遺伝子組換えによるヒト型のタンパク質医薬は、ヒトの内在タンパク質と同等であるため、免疫原性は低いと考えられていた。しかし、患者に臨床適用すると免疫原性が示され、抗薬物抗体(Anti-drug antibody: ADA)が生じることが知られてきた<sup>7)</sup>。ADAの出現は、交差反応する内在性タンパク質因子の中和による有害影響や、薬物自体の中和による効果の減少を生じる可能性がある。抗体医薬をはじめタンパク質医薬にADAを生じさせる主な要因に、タンパク質組成の変異とタンパク質の凝集がある。これらはともにタンパク質医薬の物性と品質管理に関係する事項で、抗原エピトープの質と量に影響する。

微生物や動物細胞、あるいは生物個体を用いて生産されるタンパク質医薬は、アミノ酸組成に変異を生じやすい。アミノ酸組成の変異は新抗原の出現を含め抗原エピトープの抗原性を強める質的变化を生じる可能性がある。一方、タンパク質は物性として、種々の要因により凝集しやすい性質を持つ。疎水結合を生じやすい疎水性アミノ酸を多く含む組成や、pH、媒体、濃度や添加物などの保存環境条件がこの要因になりうる<sup>8)</sup>。凝集体の形成はタンパク質の免疫原性を増すことが多い。この理由として、タンパク質が凝集すると抗原エピトープの密度が増加し、抗原提示細胞やB細胞を活性化しやすくなること、あるいは、直接B細胞に働き自己タンパク質に対する寛容機構を解除しやすくなることなどが想定されている<sup>9)</sup>。

バイオ医薬のタンパク質凝集により、これら機構を介してADAが出現すると、その医薬の安全性と薬効に影響する。そのため、治療用タンパク質の凝集形成のスクリーニングやそれによる免疫原性の試験はタンパク質医薬開発の重要な要素であり、詳細に論じられている<sup>9)</sup>。凝集体形成の分析は、ゲルろ過クロマトグラフィーやSDS-ポリアクリルアミド電気泳動などの生化学的手法で行われる。一方、免疫原性の評価はADAの測定による。ADAの測定のための動物試験モデルは、ICH S6ガイドライン(2011)<sup>5)</sup>によると、治療用タンパク質の標的分子が発現している動物種を用いることが必要である。ヒトタンパク質医薬は、非ヒト霊長類にくらべ齧歯類では種差による免疫原性を生じやすいため、評価に用いるには限界がある。しかし、非ヒト霊長類動物での試験は、実験倫理の面と設備、コストの面で制約がある。そのため、ヒトタンパク質に免疫学的に寛容なトランスジェニックマウス<sup>10)</sup>を用い、タンパク質凝集の免疫原性を予測するモデル開発も試みられている<sup>11-13)</sup>。In vivoモデルでは、トランスジェニックマウスに治療用ヒトタンパク質を腹腔内に反復投与し、抗体(結合抗体と中和抗体)産生量を測定する<sup>11)</sup>。High-throughput化するために種々のin vitro試験系の開発も試みられている<sup>12,14)</sup>。トランスジェニックマウスのin vivoモデルは実用面での可能性を有しているが、今のところいずれの試験系も安全性評価の面では限定的である。

#### 1.4 免疫チェックポイント阻害薬

抗体医薬の中で、免疫チェックポイント阻害薬は安全性評価の面で新たな問題を提起している。抗がん治療の免疫チェックポイント阻害薬として開発されたイピリムマブ(Ipilimumab: ヤーボイ<sup>®</sup>)、ニボルマブ(Nivolumab: オプジーボ<sup>®</sup>)、ペムブロリズマブ(Pembrolizumab: Keytruda<sup>®</sup>)などは、代表的なヒト型モノクローナル抗体である。進行がんの治療で、抗体医薬の免疫チェックポイント阻害薬はその薬効面で注目されているが、副作用として自己免疫性疾患を生じることが知られてきた。

免疫の程度と質は、抗原認識後の共刺激シグナルと抑制シグナルのバランスによって調節される<sup>15)</sup>。免疫チェックポイントとは、このシグナル調節に関わる分子機構のことである。がん細胞に対する免疫では、がん抗原が自己抗原に類似しているため免疫反応を抑制したり、がん細胞上のリガンドが免疫細胞の受容体に結合して免疫応答を封じるなど、抑制的なチェックポイント機構が働きやすい。この免疫抑制に関わるチェックポイント分子の働きを阻害すると、がん細胞に対する免疫が活性化され、新しいがん免疫療法となった。免疫抑制に関わるチェックポイント分子としては、抗原提示細胞上のPDL1/PDL2, B7-H3, B7-H4, CD80/86やT細胞上のPD1, CTLA4, LAG3などが知られている<sup>15)</sup>。イピリムマブはCTLA4の抗体医薬であり、ニボルマブとペムブロリズマブはPD1の抗体医薬である。

これらヒトモノクローナル抗体医薬の安全性評価には、ヒトタンパク質としての評価に加えて、薬効の標的が免疫調節分子であることから免疫活性化による二次的影響への評価が必須となる。従来の安全性評価は、バイオテクノロジー応用医薬品の評価に関するガイドラインICH S6(R1)<sup>5)</sup>に沿って行われている。その事例を、イピリムマブについて紹介する。

抗体医薬イピリムマブ<sup>16)</sup>は、薬効薬理の結合特性試験では、サル以外の動物種(齧歯類, ウサギ)のCTLA4およびそれを強制発現させたマウス細胞株には結合しない。また、種々組織を用いた交差反応性試験でも、ヒトとサルの組織にのみ反応があり、組織特異性もリンパ球での交差性は認められるが、リンパ球の非特異的活性化はないこと

が確かめられていた。そのため、その非臨床試験である有効性に関する薬理試験と安全性を評価する各種の毒性試験はカニクイザルで実施され、必要なデータが集められた。免疫チェックポイント阻害に伴う可能性のある自己免疫反応は検出されなかったので、標的特異性は高いと判断された。このように標的特性に種差のある抗体医薬の安全性評価は、まず各医薬について標的の種間交差反応性と組織特異性、および薬物体内動態が必要な基本情報となる。イピリムマブの事例では、サルとの種間交差反応性があったので、サルを用いれば従来の非臨床の安全性評価が有効であった。ニボルマブの場合も、同様の抗体特性からカニクイザルにて非臨床の安全性評価がなされている<sup>17)</sup>。他のヒト抗体医薬もサルを用いて非臨床の安全性評価が行われているようであるが、治療用ヒトタンパク質に共通してサルでの試験を標準とするのは、実験の倫理面からも難しくなっている。抗悪性腫瘍薬のガイドラインICH S9<sup>18)</sup>では、バイオ医薬の用途に応じて(A fit-for-purpose strategy)、種差特性に応じた一定の前提のもとで、従来の齧歯類等による非臨床試験を適用しうるとするcase by case approach<sup>19)</sup>の方針が提示されている。しかし、適用できるケースはかなり限られてこよう。標的特性がさらに限定される個別医療としてのバイオ医薬や細胞医薬が出現すれば、非臨床の安全性評価は従来のガイドラインでは対応できない状況になる。免疫寛容動物やヒト化動物(免疫不全動物やヒト標的分子を発現させたトランスジェニック動物)の開発使用や、ヒト細胞や組織を用いた*in vitro*試験の併用も試みられているが、個別の試験方法だけでの評価には種々の限界があり、当面は医薬の用途に応じたこれらの併用が必要である。

次に、種差とは別の安全性評価上の問題が現れてきた。免疫チェックポイント阻害薬については、臨床応用が進むにつれ、自己免疫性疾患の副作用の発現が知られてきた。2016年7月の時点で治療患者の約10%に、間質性肺炎、甲状腺機能異常、劇症I型糖尿病、自己免疫性腸炎、重症筋無力症などの疾患の発症がみられ<sup>20)</sup>、自己免疫機序の関与が疑われている。イピリムマブは、サルでの1ヵ月間静脈内投与試験では非特異的免疫増強効

果や自己免疫作用を示さなかったとされる<sup>16)</sup>。医薬品として承認された細胞表面抗原を標的とする15種のモノクローナル抗体医薬と受容体拮抗薬について、非臨床動物試験と臨床試験での薬効薬理と安全性のデータの比較が試みられている<sup>21)</sup>。それによると、非臨床動物試験(マウスタンパク代用物を投与したマウス試験とヒト医薬を投与したサル試験)と臨床試験の結果は、薬効薬理ではよい一致を示したが、有害影響についての一致は乏しいとされた。さらに、サルの試験が特に優れている証拠も得られていない。有害影響についてはサル試験と臨床試験の結果の一致が乏しいとすれば、上述の免疫チェックポイント阻害薬副作用の自己免疫性疾患の検出には、サル試験でも不十分である可能性が指摘される。

これらの疾患は、宿主の自己免疫素因の発現によるものか否か、また抗体薬の直接的あるいは間接的な関与によるものなのかは、現段階では不明である。しかし、免疫チェックポイントによる免疫抑制の阻害は、がん抗原のみならず、生体に本来備わっている自己抗原に対する免疫抑制をも阻害する可能性を示唆するもので、このリスクを予測する試験系の開発が免疫毒性試験に必須であることが明らかになった。

低分子物質の場合は動物実験での反復投与により自己抗体の誘導を検出したり、自己免疫遺伝素因を有するモデル動物で抗核抗体のような自己抗体産生の促進効果を調べる試験系が用いられる。治療用ヒトタンパク質医薬では、医薬に対する反応の種差の問題に加えて、自己免疫素因の種差も課題になる。また、ヒト全血に抗体医薬を添加して短期間のインキュベーションの後、サイトカイン産生への影響から、自己免疫やサイトカイン放出症候群(Cytokine release syndrome)に繋がる免疫亢進を推測する方法等も試みられている<sup>17,22)</sup>。しかし、全血では反応の感度が低いことが指摘され<sup>22)</sup>、方法は確立途上の段階である。

## 2. ナノ医療製品 (Nanomedicinal products)

### 2.1 ナノ粒子の特徴

1~100 nmの粒子状あるいは構造体の物質であるナノ材料には、自然に生成するものと人工的に生成または合成されたものがある。燃

焼や混合、飛散などによって自然に生成したナノ材料には、大気中の微小粒子やオイルの懸濁物中の微粒子、アスベスト繊維、アジュバント粒子などがある。一方、ポリマー粒子やリポソーム粒子、金属粒子や、カーボンナノファイバーなどのナノ構造化合物は人工的ナノ材料として使用されている。その形状や化学組成、表面荷電状態等により異なる性質を有するが、ここでは主に医薬として用いられるナノ粒子について取り上げる。ナノ粒子の医療応用は、ワクチンのアジュバントとしての利用と医薬の担体としての利用が主に注目されている。

ナノ粒子の体内挙動と免疫学的性質について、次のように考えられている<sup>23)</sup>。血中に到達したナノ粒子は、哺乳類細胞にファゴサイトーシス、マクロピノサイトーシスあるいはエンドサイトーシスによって取り込まれる。各経路は、従来の0.5 μm以上の粒子状物質の取り込み機構であるファゴサイトーシスと異なり、ナノ粒子のタイプに応じた一連の受容体によって媒介される。スカベンジャー受容体を介する場合を除き、ナノ粒子を取り込んだ抗原提示細胞を始めとする食細胞は活性化され、各ナノ粒子の抗原性、アジュバント性(Adjuvanticity)あるいは炎症反応誘導性に応じて免疫反応や炎症反応を生じやすい。

### 2.2 免疫原性、アジュバント活性

ナノ粒子素材自体の抗原性に関する研究は少なく、C<sup>60</sup>-フラーレンに対する抗体生成が報告されているが、今のところ確立された知見ではない。したがって、ナノ粒子自体の抗原性による抗体産生はかなり限定的と考えられ、抗体が生じたとしてもナノ粒子の効能に影響するだけとされる。しかし、ナノ粒子が体内でタンパク質や薬物を附着し担体として働いた場合、あるいは薬物担体として人工的に薬物やタンパク質医薬との複合体を形成させた場合は、免疫原性を得てADAを始めとする抗体を産生しやすくなる。ナノ粒子は、表面の高荷電密度や疎水性により体液中のタンパク質を吸着しやすい<sup>24)</sup>。このため、タンパク質がナノ粒子に吸着されると、抗原提示細胞に取り込まれやすくなるとともに、抗原性の弱いタンパク質も抗原密度が高くなり免疫原性を示しやすくなる。この抗原提示の促進効果は、いわゆるアジュバント

効果に他ならない。そのため、ナノ粒子のワクチンアジュバントとしての活用が注目されている。

従来アジュバントとして多用されてきたアルミニウムアジュバント(Aluminum-based adjuvants: 通称として当初に開発された「アラム」の名が用いられることが多いが、種々のアルミニウム塩が使われており、厳密には同義ではない)は、水中で1~10  $\mu\text{m}$ 程度の凝集体を形成する<sup>25)</sup>。アルミニウムアジュバントは細胞毒性を示し炎症反応を生じることからそのアジュバント効果は、アルミニウムゲルの細胞毒性により死細胞から放出された宿主DNAを介しているとする説が提示されている<sup>26)</sup>。すなわち、自然免疫機構が放出宿主DNAを傷害関連分子パターン(damage-associated molecular patterns)として認識して活性化され、ワクチン抗原接種部位の免疫応答を増強することになる。これがアルミニウムアジュバントの効果の主要機序とすると、接種抗原に関係しない免疫反応も同時に亢進する可能性を排除できない。ナノ粒子は、この傷害関連分子パターンによらず、より強い効果を示すアジュバントとして期待されている。例えば、マウスへのHIVワクチン接種では、アジュバントをポリメチルメタクリレート(Nano)のナノ粒子を用いると、アルミニウムアジュバントの場合より100倍ほど高い抗体価が生じている<sup>27)</sup>。

### 2.3 ナノ医療製品の免疫毒性試験の課題

ワクチンの使用は、今日では感染症予防のほかがんなどの疾病治療にも試みられている。このワクチンの効果を高める新規アジュバントへの需要は高い。WHOが示したワクチンアジュバントの非臨床安全性評価に関するガイドライン<sup>28)</sup>によると、アジュバント単独とアジュバントワクチン製剤による毒性評価が求められている。無機あるいは有機化合物などの抗原性のないアジュバントの場合、アジュバント単独の毒性試験は一般の医薬品の安全性試験に準じて実施する。しかし、それらのアジュバントワクチン製剤あるいはタンパク質や菌体によるアジュバントの場合は、タンパク質医薬の場合と同じく免疫原性や免疫反応についての種差の課題が生じる。

これに加えて、ナノ粒子に吸着結合した内因性のタンパク質が抗原性を有している場合は、抗原密度が増し、免疫原性を示す可能性がある。一方、

免疫細胞はナノ粒子の表面状態や組成によって炎症反応を起こすことがある。カチオン型ナノリポソームのようなカチオン荷電粒子は炎症反応を生じやすく、ヒト白血球から炎症性サイトカインの遊離を引き起こしたり、樹状細胞に細胞表面マーカーCD80/CD86を発現させる<sup>23)</sup>。医療目的でナノ粒子を薬物担体として抗体などのタンパク質やプラスミドDNAを結合したナノ医療では、より炎症反応が生じやすくなるが、これが有益な免疫増強につながるのか、特異性の低い免疫亢進となり、自己免疫やアレルギーの誘因となる有害な免疫毒性になるかについては明らかではない。抗体などのタンパク質医薬をナノ粒子担体に結合させたナノ医療では、たんぱく質医薬の場合と同じ免疫毒性評価の課題を有するとともに、ナノ粒子担体によるアジュバント活性の影響も評価する必要がある。また、銀ナノ粒子のラットへの28日間反復静注投与による免疫毒性試験では、脾臓の重量や脾細胞数は増加したが、胸腺重量は減少しT細胞依存性抗体産生反応は抑制された<sup>29)</sup>。すなわち、ナノ粒子による特異性の低い免疫亢進は、特異的な防御免疫機能とは異なる免疫機能に関連すると考えられ、特異的な適応免疫の抑制に加えて、非特異的な免疫刺激による自然免疫の異常亢進にも注目する必要がある。

これらを踏まえてナノ粒子医薬の免疫毒性試験について、ICH 8の免疫毒性試験ガイドラインの適用についての評価がなされている<sup>30)</sup>。それによると、補体活性化関連偽アレルギー(例: リポソーム製剤に血漿成分が反応すると補体系が活性化されて起こる)、骨髄抑制、インフラマソーム活性化、過敏症のようなナノ粒子に関連する免疫毒性効果は、ICH 8の免疫毒性試験ガイドラインでは検出しにくいことが指摘され、試験項目の拡張が要望されている。このことは、医薬以外の医療器材、食品、化粧品などにナノ粒子の用途が広がった場合の、安全性試験と評価にも留意事項とすべきであろう。

### おわりに

新規のタンパク質医薬やナノ医療製品の開発により、それらの免疫原性試験と免疫毒性試験は非臨床安全性評価の必須項目となってきた。免疫原

性と免疫毒性は従来安全性評価の面で、前者は被験物質の特性、後者は生体の応答特性として別個に捉えられがちであった。しかし、標的器官と毒性発現の観点からすれば、共に免疫系を標的とし、相互に関連する機序により発現することが明らかなることから、これらを別個のこととして捉えることは合理的でない。免疫原性は免疫系に固有の応答を生じさせるが、免疫攪乱を生じさせる特性として、広義の免疫毒性の範囲に含めて論議されるべきであろう。

近年の免疫毒性の分野では、これまで述べてきたように免疫原性と、自己免疫あるいは過敏症の誘発などの異常免疫亢進の評価のニーズが高まっている。これは、免疫毒性は、当初環境汚染物質の影響評価を重視して、感染や発がんに対する免疫への影響が注目され、免疫抑制が重視された。今日では、医薬品や食品などの生活物質を通じて免疫能を活性化し、疾病治療や健康増進に活用する試みが増えた。その結果、医薬品の分野では、医薬の免疫原性をはじめ意図せぬ非特異的な免疫亢進が生じ、これら免疫刺激あるいは免疫亢進の評価が、免疫毒性試験の重要なテーマになっている。この非特異的な免疫亢進は、適応免疫能とは別に自然免疫能への影響に由来している可能性が高い。前述のナノ銀粒子の投与実験では、適応免疫能の抑制が見られた一方、脾細胞数の増加などの免疫亢進に繋がる現象もみられ、相反する方向の影響が生じている。脾細胞数の増加は、適応免疫能の亢進に寄与していないことから、炎症反応による自然免疫能の亢進が生じている可能性がある。このような、適応免疫能の抑制と自然免疫能の亢進を示唆する現象が並行して生じる事例は、これまでも多くみられる。免疫原性の獲得を含めて免疫亢進としてみられる免疫毒性発現の解釈とその試験法の確立が免疫毒性評価の当面する課題である。

軽度の炎症反応の持続は、免疫系を持続的に刺激し、免疫亢進に至る可能性がある。炎症反応は細胞傷害に伴って発生する。細胞傷害による細胞死の過程は、ネクローシス、アポトーシス、ネクローシス、オートファジー細胞死、パイロトーシスなどに分類されつつある。細胞死により放出された宿主DNAが、抗原提示細胞を含む食細胞

を活性化し、免疫反応を亢進すると考える説を考慮すると、細胞死の過程により、免疫亢進の内容が異なるかもしれない。また、ループス型の自己免疫疾患の遺伝素因を有する動物個体では、このような死細胞の抗原とアジュバント作用を示す環境物質(環境アジュバント)が共存すると、自己免疫疾患の発症やその時期が早まる<sup>31,32)</sup>ことから、新規物質の炎症誘発性とアジュバント作用は、免疫亢進物質の免疫毒性試験項目に追加されるべきであろう。しかし、従来の免疫毒性試験の項目を拡張するだけでは、評価をより難しくしかねない。新規物質の用途に応じて、適応免疫と自然免疫への影響を見直して、試験項目を整理すべき段階にあると言える。

#### 文献

- 1) Takahashi K, Ohsawa M, Utsumi H: A simple bioassay for evaluating immunotoxic properties of chemicals by use of *in vitro* antibody production system. *J Health Sci.* 2002; **48**: 161-167
- 2) Ohsawa M, Takahashi K, Tokunaga H: 6.4 *In vitro* IgM production test (In: Utsumi H, Nakamuro K eds: "Bioassay and Bio-informatics" Tokyo: Kougaku-Tosho Pub Ltd, 2011. 139-145
- 3) ICH Harmonized Tripartite Guideline: Immunotoxicological Studies for Human Pharmaceuticals S8. 2005. 1-11(厚生労働省医薬食品局審査管理課, 薬食審査発0418001号:「ICH S8: 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」2006. 1-12)
- 4) WHO/IPCS: Guidance for Immunotoxicity Risk Assessment for Chemicals. IPCS harmonization project document No.10. Geneva: World Health Organization. 2012
- 5) ICH Harmonized Tripartite Guideline: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals S6 (R1), 2011. 1-19 (厚生労働省医薬食品局審査管理課, 薬食審査発0323第1号:「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価(新ガイドライン)」2012. 1-23)
- 6) Leader B, Baca QJ, Golan DE: Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; **7**: 21-39
- 7) Sauerborn M, Brinks V, Jiskoot W, et al.: Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2010; **31**: 53-59

- 8) Obrezanova O, Arnell A, de la Cuesta RG, et al.: Aggregation risk prediction for antibodies and its application to biotherapeutic development. *mAbs*. 2015; 7: 352-363
- 9) Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, et al.: Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J Immunotoxicol*. 2014; 11: 99-109
- 10) Hermeling S, Jiskoot W, Crommelin D, et al.: Development of a transgenic mouse model immune tolerant for human interferon beta. *Pharm Res*. 2010; 22: 847-51
- 11) van Beers MM, Sauerborn M, Gilli F, et al.: Aggregated recombinant human interferon beta induces antibodies but no memory in immune-tolerant transgenic mice. *Pharm Res*. 2010; 27: 1812-1824
- 12) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司ら: 治療用タンパク質の免疫原性 その 2. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2010; 41: 390-400
- 13) 新見伸吾: バイオ医薬品の凝集体の免疫原性予測方法と免疫原性. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2014; 45: 471-477
- 14) Gaitonde P, Balulyer SV: In vitro immunogenicity risk-assessment of therapeutic proteins in preclinical setting. *Methods Mol Biol*. 2011; 716: 267-280
- 15) Pardoll DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 2012; 12: 252-264
- 16) 医薬品インタビューフォーム: ヤーボイ® 点滴静注液 50 mg 第4版, 2016. 66-70
- 17) 医薬品インタビューフォーム: オプジーボ® 点滴静注液 20 mg, 100 mg 第11版, 2016. 79-81
- 18) Kloks C, Berger C, Cortez P, et al.: A fit-for-purpose strategy for the risk-based immunogenicity testing of biotherapeutics: a European industry perspective. *J Immunol Methods*. 2015; 417: 1-9
- 19) ICH Harmonized Tripartite Guideline: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals S9. 2009. 1-9 (厚生労働省医薬食品局審査管理課, 薬食審査発0604第1号:「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」2010. 1-10)
- 20) (公社)日本臨床腫瘍学会: <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/dl/160713-01.pdf>(2016年7月13日現在)
- 21) Bugelski PJ, Martin PL: Concordance of preclinical and clinical pharmacology and toxicology of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins: cell surface targets. *Br J Pharmacol*. 2012; 166: 823-846
- 22) Vessillier S, Eastwood D, Fox B, et al.: Cytokine release assays for the prediction of therapeutic mAb safety in first-in man trials – Whole blood cytokine release assays are poorly predictive for TGN1412 cytokine storm. *J Immunol Methods*. 2015; 424: 43-53
- 23) Dobrovolskaia MA, McNeil SE: Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol*. 2007; 2: 469-478
- 24) Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, et al.: Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Delivery Rev*. 2009; 61: 428-437
- 25) Clausi AI, Morin A, Carpenter JF, et al.: Influence of protein conformation and adjuvant aggregation on the effectiveness of aluminum hydroxide adjuvant in a model alkaline phosphatase vaccine. *J Pharm Sci*. 2009; 98: 114-121
- 26) Marichal T, Ohata K, Bedoret D, et al.: DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Med*. 2011; 17: 996-1002
- 27) Stieneker F, Kreuter J, Löwer J: High antibody titres in mice with polymethylmethacrylate nanoparticles as adjuvant for HIV vaccines. *AIDS*. 1991; 5: 431-435
- 28) WHO guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. Adopted in 64th meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva: World Health Organization, 2013. 1-55
- 29) Vandebriel RJ, Tonk EC, de la Fonteyne-Blankestijn LJ, et al.: Immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28-day repeated-dose toxicity study in rats. *Part Fibre Toxicol*. 2014; 11: 21 (doi:10.1186/1743-8977-11-21)
- 30) Giannakou C, Park MV, de Jong WH, et al.: A comparison of immunotoxic effects of nanomedicinal products with regulatory immunotoxicity testing requirements. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11: 2935-2952



- 31) Bondanza A, Zimmermann VS, Dell' Antonio G, et al.: Requirement of dying cells and environmental adjuvants for the induction of autoimmunity. *Arthritis Rheum.* 2004; **50**: 1549-1560
- 32) 大沢基保: 重金属による免疫毒性とその発現機序. *YAKUGAKU ZASSHI*, 2009; **129**: 305-319