Bull. Natl. Health Sci., 117, 1-38 (1999)　Special report

バイオテクノロジーを応用した医薬品の特性解析，品質及び安全性確保の評価科学

－組換え医薬品，細胞培養医薬品，遺伝子治療用医薬品，細胞治療用医薬品，トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品，トランスジェニック動物由来細胞治療用医薬品－

早川堯夫

Science of Evaluating the Characteristics, Quality and Safety of Biotechnological Products: $_{R}$DNA-derived products, cell culture technology-derived products, gene therapy products, cellular therapy products, and transgenic animal-derived protein products and cellular products

Takao Hayakawa

Recent progress in biotechnology, including recombinant DNA (rDNA) technology and cell culture technology, has enabled us to produce new medically useful agents intended for human use. These agents include therapeutic peptides and proteins derived from rDNA-modified cell substrates, continuous cell lines, diploid cell lines, and hybridoma cell lines, gene therapy products, cellular therapy products, and therapeutic protein products and cellular products derived from transgenic animals. To enable these products to be of use in human therapy, it is essential that suitable measures be taken by manufacturers and regulatory authorities to assure their quality, efficacy, and safety. This article describes points based on the latest sound scientific principles to be considered when producing, testing, evaluating and controlling biotechnology products for human therapy, especially with respect to their characteristics, quality, and safety.

Keywords: Biotechnology products, Characterization, Quality control, Safety

はじめに

生物もしくはその機能単位を利用した技術による医薬品生産は，抗生物質をはじめ，アミノ酸や酵素などの生産方法としてかなり古くから行われていたが，遺伝子工学，細胞工学，細胞大量培養技術などのバイオテクノロジーの飛躍的発展により 1970 年代後半から全く新たなステージに入った．新たに登場したバイオテクノロジーとは，生物やその機能単位を単にそのまま利用するのではなく，遺伝子，細胞，生物などを人工的に操作し，その機能や性質を意図的に変え，改変された生物やその機能単位をより積極的に利用しようとするまさに革新的な技術であった．こうした技術により，遺伝子，細胞，生物などの機能や性質を変えたり，生物の種の壁や細胞の寿命をのりこえることが可能になり，これはいち早く医薬品生産技術として応用されることになった．

バイオテクノロジーが医薬品生産へ最初に応用され，そして画期的な成果を挙げたのが，生物の種の壁や細胞の寿命をのりこえて大腸菌やネズミの細胞でヒトのタンパク質を作ったり，培養細胞から有用タンパク質を大量に得ることであった[1]．こうしたアプローチにより，従来の手法，あるいは天然からの抽出や化学合成などでは入手することが困難であったヒト型のホルモンや酵素，サイトカイン，各種成長因子をはじめ，血液成分，ワクチン類，モノクローナル抗体などを大量に生産することが可能になったのである．また，タンパク質のアミノ酸配列を自在に変換して，ある特異的な活性の発現や増幅，持続性や安定性の増大，好ましくない作用の軽減などを図ることも可能になってきた．このような歴史的経緯から，現在一般に，バイオテクノロジー応用医薬品（以下バイオ医薬品）と称されているのは，組換え DNA 技術あるいは細胞培養技術を応用して生産され，組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品として臨床に使用されているタンパク質性医薬品のことである．

一方，最近，バイオテクノロジーの医薬品生産への応用はさらに大きな広がりをみせはじめている．すなわちバイオテクノロジーにより，1) 生命現象や疾病の仕組みの解明

が飛躍的に進み，それをもとにした新しい医薬品の設計が可能になってきているほか，2) 遺伝子治療用医薬品の創製，3) 細胞治療用医薬品の創製，4) トランスジェニック／クローン動物によるタンパク質性医薬品，5) トランスジェニック動物由来細胞治療用医薬品開発などが推進されてきている．

こうしたバイオテクノロジーという画期的な医薬品製造技術の応用が，医薬品に結実していくためには，品質，安全性及び有効性に関する試験方法や評価方法の開発というもう一つの要素が不可欠である．もともと，新たな医薬品の創製（創薬）は，医薬品生産技術と製品に対する適切な試験・評価といういわば車の両輪によって推進，達成される．製造技術の開発と並んで試験・評価法を開発し，あるいは評価方法に関する適切な指針を提示することは，当面の問題を解いていくためばかりではなく，将来，新たな医薬品開発を適正にかつ効率よく促進させるための先導的基盤的要素にもなる．このことが，きわめて明確な形で認識され，立証されたのは，バイオ医薬品の開発においてであった．バイオ医薬品の種類や製造方法は多様でそれぞれに特徴があり，その特性解析，品質や安全性等の評価などには，従来の医薬品とは異なる手法を用いたり，新しい観点から捉えなければならない面が多々ある．したがって，さまざまなバイオ医薬品のユニークさを加味した上で開発の各段階で適切に対応し，円滑な医薬品開発やその評価作業を進めていくためには，それぞれのケース毎に応じた適切な試験方法や評価方法をむしろ新たに創造していく必要があった．そうした認識は，バイオテクノロジーの利用が考えられた当初から，開発メーカー側や，バイオ医薬品の開発に関係するすべての国々の行政側，WHO などの関係国際機関において共通するものであった．そのような背景のもと，国内外，産官学を問わず，関係者はそれぞれの立場で，共通の目標を達成すべく注力することとなった．こうした中，1991 年に開始された ICH（International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use：日・米・EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議）では，バイオ医薬品分野も検討対象となり，その試験・評価法の開発に関する日・米・欧の国際共同作業の推進を決定的なものとした．その過程はまさにバイオ医薬品評価科学における新たな挑戦と創造の連続であり，そうした挑戦は今後もさらに絶えず続けられるものであると予測される．

本稿では，最も実用化が進んでいる組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品，すなわちタンパク質性のバイオ医薬品の特性解析，品質・安全性確保がどのようになされてきたかを中心にしながら，遺伝子治療用医薬品，細胞治療用医薬品，トランスジェニック動物（Tg 動物）由来タンパク質性医薬品，Tg 動物由来細胞治療用医薬品などの次世代バイオテクノロジー応用医薬品の品質・安全性等確保問題についても言及したい．

1. バイオテクノロジーによる各種の医薬品生産

Fig. 1 には，バイオテクノロジーを利用した各種の医薬品生産方式を模式的に示している．これらのうち，組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品といわれるタンパク質性医薬品が，最も早くから実用化されているものであり，わが国でもすでに約 50 品目の製品が臨床に使用されている．これらが現在のところ一般に,バイオ医薬品と称されている [2-3]．

組換え医薬品や細胞培養医薬品の生産のポイントは，遺伝子組換え技術，細胞工学技術，あるいは細胞分離・培養技術といったバイオテクノロジーを駆使して，目的とする有用タンパク質生産性と増殖性に優れた細胞株を医薬品素材として得ることである．例えば，ヒト成長ホルモンの遺伝子を組換え技術で作成し，大腸菌や CHO 細胞に導入して得た組換え体細胞や，細胞融合で得た特異抗体を産生するハイブリドーマなどが有用タンパク質生産・増殖性細胞に相当する．こうして得た有用細胞から目的タンパク質を大量に生産する段階では発酵あるいは細胞大量培養といった技術が大きな威力を発揮する．得られた生産物は加工・精製されて最終目的物質であるタンパク質性医薬品になる．

遺伝子治療や細胞治療は，臨床研究あるいは治験としてヒトへの応用が緒についた段階である．それに用いられる遺伝子治療用医薬品の場合，医薬品成分の本質は遺伝子である．基本となる技術は，遺伝子組換え技術であり，その核心部分は，医薬品素材としての治療用遺伝子を含むベクターを作成するところである．ベクターの大量生産技術も重要な要素である．得られたベクターを加工・精製して遺伝子治療用の医薬品を製する．

細胞治療用医薬品の場合,その成分の本質は細胞である．基本となる技術は遺伝子組換え技術や細胞工学技術，細胞分離・培養技術などである．最も核心をなすところは医薬品素材としての目的有用細胞を分離あるいは細胞株を樹立することである．目的に応じた細胞の加工（薬剤処理，生物学的特性の改変，遺伝子工学的改変など)，細胞の増殖や大量生産技術も重要な要素である．得られた細胞を加工・精製して，細胞治療用の医薬品を製する．

動物工場（トランスジェニック／クローン動物）由来医薬品の場合,その成分の本質は,タンパク質あるいは細胞・組織である．とりあえずはタンパク質製品が実用化に近い状態にある．しかし，将来的には，細胞あるいは組織も考えられている．基本となる技術は遺伝子組換え技術や細胞工学技術，細胞分離培養技術に加えて動物育種・繁殖技術が重要である．最も核心をなすのは目的とする有用タンパク質あるいは有用細胞を生産するトランスジェニック／ク

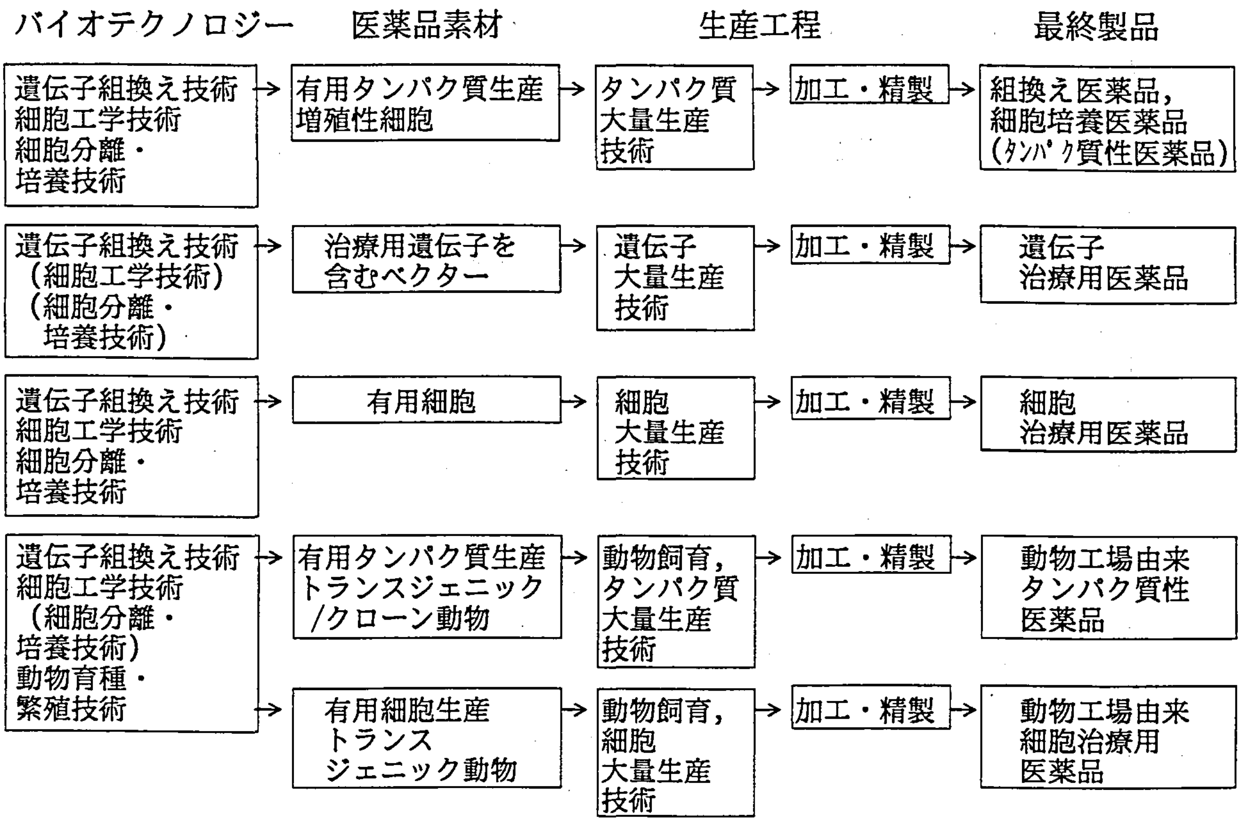

Fig.1. バイオテクノロジーによる各種の医薬品生産

ローン動物を樹立することである．この場合は，文字通り動物自体が医薬品素材である．動物は目的タンパク質や細胞の生産工場となるので，生産用動物系をいかに樹立し，繁殖，維持管理して，いかに目的物質を大量生産させるかの技術が重要になる．

2. 組換え医薬品及び細胞培養医薬品の品質，安全性等の確保

2. 1 組換え医薬品及び細胞培養医薬品の評価のあり方をめぐる草創期と国際調和への胎動

組換え DNA 技術あるいは細胞培養技術を応用して製造されるいわゆる組換え医薬品及び細胞培養医薬品（狭義のバイオ医薬品）の品質，安全性等の保証に関して，とくにどのような点に留意して試験が行われ，どのような基準で評価すればよいかについては，バイオテクノロジーによる有用物質の生産が可能になった時点から，開発メーカー，学界，行政それぞれの立場での検討が行われてきた．この問題に関する各関係国や機関の取り組み状況を歴史的にみてみると，1983 年頃から WHO[4-5]，米国 FDA[6]，EC（現 EU）医薬品委員会（Committee for Proprietary Medical Products：CPMP）[7]から公的見解や文書が次々に公表された．

わが国では 1985 年に組換え DNA 技術を応用した医薬品の実用化第 1 号として，大腸菌由来のヒトインスリンが誕生したのを手始めに，ヒト成長ホルモン，インターフェロン α-2a，α-2B，酵母由来の B 型肝炎ワクチン，また，連続継代性細胞株（リンパ芽球腫細胞：NAMALWA 細胞）を製造基質としたインターフェロン α，ヒト 2 倍体細胞を製造基質としたインターフェロン β，ウロキナーゼなどが続々と臨床の場に提供されようとしていた．この組換えヒトインスリンの実用化に先んずること 4 年前の 1981 年 4 月に，厚生省は，遺伝子組換えを利用して生産される医薬品に関する研究班を設置し，その品質，有効性，安全性を評価するためにはどのような試験データが必要かについての検討を開始した[8]．その結果は厚生省より 1984 年 3 月に「組換え DNA 技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」（昭和 59 年 3 月 30 日：薬審第 243 号）という形で公表された[9]．この薬審第 243 号の背景説明やその内容の解釈，運用などについては，さまざまな機会を通じて公表された[10-16]．薬審 243 号は組換え医薬品のうちでも大腸菌などの微生物を宿主として生産された糖鎖をもたないペプチドやタンパク質を対象とするものであった．一方，ヒトや動物細胞などを宿主とした組換え医薬品，モノクローナル抗体，その他の細胞培養医

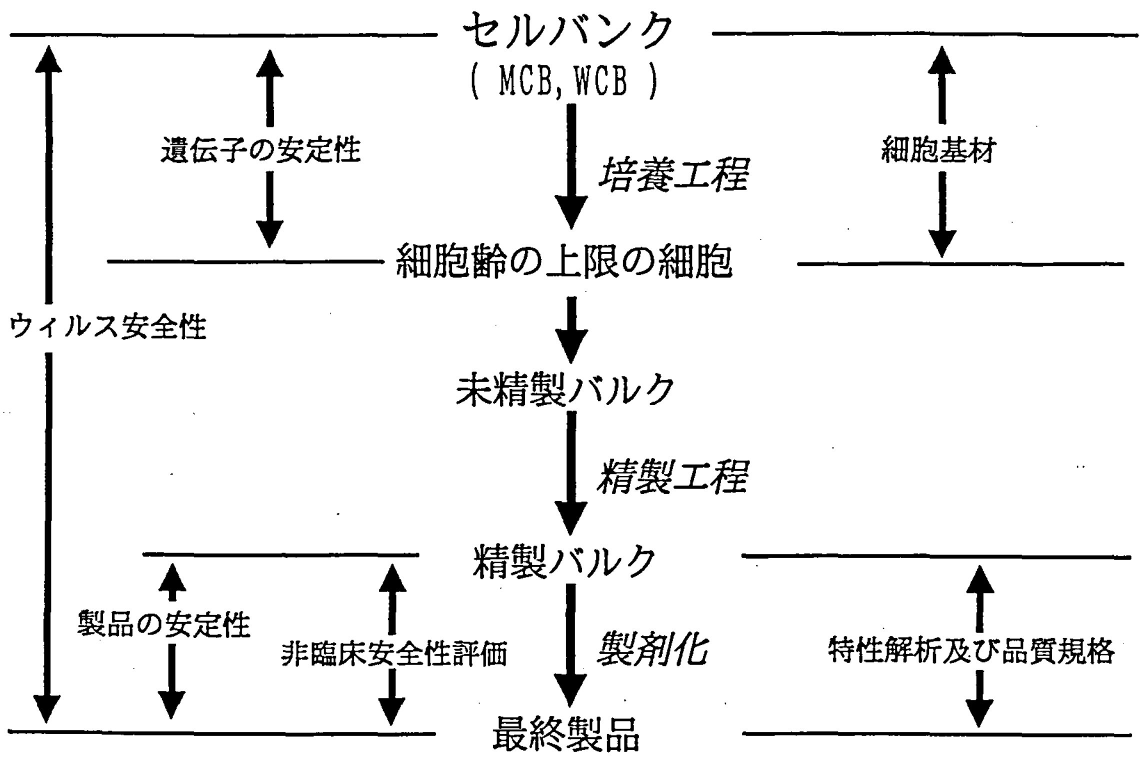

Fig.2. ICH 各トピックの位置づけ

薬品の品質，有効性，安全性を評価するためにはどのような試験データが必要かについての指針の提示は，1988 年 6 月に「細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」(昭和 63 年 6 月 6 日：薬審 1 第 10 号) として公表された[17]. 薬審 1 第 10 号の背景説明やその内容の解釈，運用などについては，さまざまな機会を通じて公表されているので [13,16,18-23]，詳細はこれらの記事を参照されたい.

一方，国際的にこうした問題点を明らかにし,その解決を目指して，産，学，官はもとより国のレベルを超えて討議しようとする国際シンポジウムなども盛んに行われた [24-25].

こうした中でいわゆる物質面からみた品質・安全性確保策については，ほぼ現在の規制の基礎となるような方向性が出されてきた[26]. しかし，最も着目すべきは，既にこの時点で日・米・欧を中心とした各国，各界関係者の意見，技術，経験等の交流がかなりの頻度と濃密さで行われており，バイオ医薬品の評価のあり方をめぐる国際調和への胎動が図らずも始まっていたということである.

なお，わが国では，1992 年に薬審第 243 号の改訂版が作製され内示された．ところが，ICH が本格的な活動を展開しようとしていたタイミングとの関係で内示段階でとどまった．しかし，本内示案は内容的にはきわめて充実したものであり，関係者の間では事実上の国内ガイドラインであり，また後年，ICH ガイドラインの基盤をなすこととなった.

2.2 バイオ医薬品の品質･安全性確保にかかわる ICH ガイドライン

ICH のバイオ医薬品 (組換え医薬品及び細胞培養医薬品) の品質・安全性分野では，6 つの課題に関するガイドラインが作成対象になった．略称でよぶと，1) 細胞基材 (生産細胞株の適格性と管理)，2) 遺伝子の安定性 (遺伝子組換え体の解析と安定性)，3) ウイルス安全性，4) 製品の安定性，5) 非臨床安全性評価，6) 製品の特性解析及び品質規格に関するガイドラインということになる．これらについては 1991 年に ICH 1 で非臨床安全性評価の問題が取り上げられて以来[27]，通算 8 年余りの作業の末に全ての課題が既に日・米・欧間で合意に達している.

Fig. 2 には，バイオ医薬品に関する ICH 各トピックが，バイオ医薬品の製造工程に沿ってみた場合，どのような製造段階の問題を取り扱っているか，すなわちバイオ医薬品製造過程における ICH 各トピックの位置づけを示した．6

つのICHガイドラインは，バイオ医薬品の製造過程の出発点である細胞基材の問題から，培養を経て製品に至り，その品質，安全性の確保に関係する主な課題をカバーしていることになる[28].

国際合意に達したICHガイドラインの内容は当然，国内におけるバイオ医薬品の試験や評価を行う際の基本となり，そこに記載されている内容については遵守する必要がある．しかし，一方でこれらICHガイドラインは，バイオ医薬品の品質・安全性確保のための試験や評価にかかわるすべての問題をカバーしているわけではない．そこで本稿では，全体として話を進めながら，話の流れの中で必要に応じて適宜，ICHガイドラインの内容を織り込むこととする．

2．3　組換え医薬品及び細胞培養医薬品の品質，安全性等確保に必要な一般的留意事項

以下には，現時点で，組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質，安全性等を確保するために必要とされている一般的留意事項の要点を示した[16,29-32].

1) 採用した製造方法について詳細なデータを示し，それが一定の目的物質を製造する上で適正なものであることを立証し，かつ，そうした製造方法を一定に保っていくことを保証する必要がある．このことは，複雑でかつ変動要因の多い人工的な製造過程を経て生産される複雑な高分子タンパク質（組換え医薬品及び細胞培養医薬品）の品質，有効性，安全性を確保する上できわめて重要な意味を持っている．

2)組換え医薬品や細胞培養医薬品は人工的シナリオで得られる人工的産物で，かつ高分子タンパク質であるので，その構造，特性や品質について物理的化学的方法，免疫学的方法あるいは生物学的方法などを駆使して徹底的に解析する必要がある．

3)最終目的物質に混入してくる可能性がある有害因子，あるいは製造工程由来不純物や目的物質由来不純物について特に注意を払う必要がある．

4) 組換え医薬品や細胞培養医薬品は，例えばヒト型のホルモンや酵素，サイトカイン，モノクローナル抗体，ワクチンなどといった，きわめて特異な化学的あるいは生物学的特徴を有するものであるから，毒性試験などの非臨床動物試験を実施するにあたって，従来の低分子の有機合成医薬品に用いられたようなアプローチをとることは必ずしも適切ではなく，その製品の特性や臨床上の使用目的を考慮しながらケース・バイ・ケースの原則で対処する必要がある．その際，目的とする製品の生化学，生理学あるいは薬理学的作用を十分に把握し，生物学的応答性に関して適切な試験動物を選択することが重要である．

5)臨床試験の目的や実施方法自体が他の医薬品の場合と変わるところはないが，組換え医薬品や細胞培養医薬品の場合は，それ自体がタンパク質であり，また，不純物の多くが高分子であるので，目的有効成分や不純物が患者になんらかの免疫応答を引き起こし，結果的にその有効性，安全性に影響を及ぼす可能性に関して特に留意する必要がある．

6)品質の恒常性を保証するための適切な規格及び試験方法を確立する必要がある．

いずれにしても，個々の組換え医薬品や細胞培養医薬品に関して，最も適切な非臨床試験及び臨床試験は，目的物質の製造方法，成分の種類・特性，臨床適用上の対象とする効能・効果，臨床用量，臨床投与経路，投与頻度，投与対象患者などに応じて実施することにある．

2．4　製造方法の明確化とその妥当性の証明，一定性に関する詳細な情報の提供により品質の恒常性を確保することの必要性

2．4．1　組換え医薬品及び細胞培養医薬品の製造工程の特徴

組換え医薬品や細胞培養医薬品の製造工程はきわめて複雑な多くのステップからなる．また，その特徴は，1) 人工的に遺伝子や生物あるいはその両者を操作し，任意にデザインされた多様なシナリオに従い，2) 不確定要素を秘める生細胞を用いて，3) 不安定な高分子タンパク質を生産し，4) 高度に精製して医薬品として利用する，ことにある．そのため目的有効成分の化学構造や生物活性に変化が生じる可能性があり，これにより医薬品の品質・安全性・有効性確保上の問題を生じる可能性がある．

2．4．1．1　多様な人工的シナリオによる医薬品製造

例えば，組換え医薬品の場合，最終的に同一目的物を目指すとしても，その戦略及び戦術は以下に述べるように非常に多様であり，いく通りものシナリオが可能である．まず，1) 目的発現タンパク質をコードする塩基配列（構造遺伝子）をどのような種類や起源の細胞から得るのか，どのような方法で作成するのかにはさまざまな選択肢がある．また，2) 構造遺伝子の直接の発現産物は，必ずしも最終目的タンパク質である必要はなく，細胞内での生化学的プロセッシングあるいは分離後の人工的プロセッシングなどを考慮して定められるので，最終的に目指す目的物は同じであってもスタートに用いる構造遺伝子部分の構造やデザインの仕方もさまざまである．しかも，3) これらの発現様式は，直接発現，あるいは雑種融合タンパク質としての発現などの違いもあり，後者では他のタンパク質の一部をコードする遺伝子と連結する形をとっている．次に，4) 発現を調節するプロモーターやエンハンサー及びその周辺の塩基配列部分の由来，選択やデザインはさらにバリエーションに富む．それ以外に複製や選択系（薬剤耐性）などにかか

わる部位のデザインを含めると遺伝子発現構成体（発現ベクター）の構築方法も非常に多様になる．また，5）この構造遺伝子部分や発現調節塩基配列の選択，遺伝子発現構成体の構築方法は，宿主の選択とも関連する．宿主には大腸菌のような微生物から，動物細胞までさまざまな細胞が用いられる．宿主の選択は，目的物質の種類・性質，発現効率，生産効率，宿主内でのプロセシングや安定性，分離・精製効率などを考慮して行われる．さらに，6）遺伝子発現構成体を宿主細胞に入れる方法，遺伝子発現構成体を増殖する方法，クローン細胞株を選択する方法もさまざまである．動物細胞を用いた場合，同一のクローン細胞株（種細胞株）の樹立を再現することは難しいので，この点を考慮に入れた対応が必要である．次に，7）セル・バンクの調製経緯や調製法，その維持・管理，更新法もさまざまであろう．また，8）細胞の特性・品質あるいは目的タンパク質の特性や安定性，生産効率，精製効率等に応じて，培養方法，精製方法にはさまざまな設計，条件設定がなされる．さらに，9）製剤化も各製品の安定性，臨床上の用法，用量を考慮した製剤設計や適切な生産スケールが個別に選択されることになる．

非組換え体細胞，正常2倍体，ハイブリドーマなどを出発素材とする細胞培養医薬品の場合でも，種細胞株やマスター・セル・バンク（MCB）の樹立法のシナリオは多様である．それ以降の製造方法における多様性については，組換え医薬品の場合と事情は同じである．

2．4．1．2 不確定要素を秘める生細胞

目的物質を生産する細胞が人工的できわめて多様なシナリオに基づき作製される一方で，その細胞が保存中に変化したり，医薬品生産のための大量培養中に変異したり，あるいはその機能（DNA複製，転写，翻訳，プロセシング等）が目的通り発揮されない可能性など，生き物のもつ不確定性を考慮に入れる必要がある．大量培養をタンクでやるのか，動物体を経由するのかなどの培養手段も重要な関心事の一つである．

2．4．1．3 生産物からみた視点

生産物の面，すなわち物質特性や品質面からみた組換え医薬品及び細胞培養医薬品固有の特徴も考慮に入れる必要がある．製造方法と関連する生産物における問題については，採用された製造方法に応じて，二次的修飾に関連する問題を考慮する必要がある．二次的修飾には，遺伝子発現段階あるいはタンパク質への翻訳後の段階での修飾による変異体やメチオニル化体の生成，宿主内での前駆体から活性体への変換，高次構造形成，アミド化，糖鎖の付加，あるいは細胞内での分解などがある．最終目的物質を得るための必要な加工などが行われる場合もある（遺伝子発現産物が直接の最終目的物質でない場合も多い：例，インスリン，成長ホルモン）．こうした二次的修飾の有無や修飾のされ方如何では，化学構造上の問題のみならず，有効性や安全性の問題にも関連する可能性がある．

また，生産物が主に不安定な高分子のポリペプチドもしくはタンパク質であるという点も特別な注意を要することである．生産過程や精製過程での安定性についても種々問題が多く，最終的に得られる製品の同一性，均一性，純度などは，採用された生産細胞の種類や性質，培養方法あるいは精製方法などに大きく依存することになる．

さらに，これら生産の各段階で採用した目的タンパク質の構造遺伝子をめぐる遺伝情報の発現方式などのデザインのやり方，使用細胞の種類・性質，培養条件，精製方法などに密接に関連して生じてくる重要な問題として有害因子や微量混在物の問題がある．どのような有害因子や不純物が問題になるかということも，結局はどのような製造方法を採用したかにかかっている．

2．4．2 製品の品質・安全性の確保やその恒常性を図るためには

これまで述べたような問題点が組換え医薬品及び細胞培養医薬品製造の背景にあることを考慮すれば，製品の品質・安全性の確保とその恒常性を図るためには，まず，それぞれのケースごとに，1）採用された製造方法の詳細を明確にして，その科学的妥当性を示す，2）さらにその製造方法で得た製品の物性，品質，有効性，安全性に関する詳細な検討を行って，製品の面からその製法の妥当性を立証する，3）こうして得られた製品の品質，有効性，安全性の恒常性を維持，保証するために必要なロット毎の品質規格，試験法を定める，4）必要に応じて，適切な工程内管理試験を設定する，などの対応が必要である．

結局，多様性や不確定性を秘めた製造方法が特徴のバイオ医薬品にあっては，製品の品質管理試験のみならず，妥当性が検証された製造方法を一定に維持していくことや，そのための工程管理試験を厳密に行うことによって，生産物の品質・安全性を確保し，その恒常性を保証しようとする視点が不可欠である．

2．4．3 製造方法において，その詳細を明確にし，その恒常性を維持すべき主な項目

Table 1には，製造方法において，その詳細を明確にし，その恒常性を維持すべき主な項目について，要約した．これに関連する詳細な検討事項については，現在のわが国のガイドラインや日・米・欧のICH国際調和ガイドライン及び関連記事などに記載されているが[16,22,23,30,33-42]，ここでは紙数の関係で主な要点だけを述べることにする．

1）組換え医薬品の製造にあたっては，①目的発現タンパク質をコードする構造遺伝子の起源（入手方法）と構造，②遺伝子発現構成体（発現ベクター）を構成する諸要素（例

Table 1.　製造方法において，その詳細を明確にし，その恒常性を維持すべき主な項目

- 遺伝子操作の妥当性
- 生産細胞株の由来や特性の明確化と恒常性の保持
- 細胞における微生物汚染や他の細胞汚染の否定
- 生産各段階の細胞基材の管理
  - セル・バンク・システムの構築
    - 調製法・特性の明確化
    - 微生物汚染等否定・保存管理
    - 更新方法
- 細胞の保存中や大量培養中の安定性
  - 生存率・遺伝子安定性・細胞特性・生産物
- 培養法
- 精製法
  - 目的物質精製状況
  - 外来性有害因子や不純物の不活化・除去状況
- プロセスバリデーションによる工程の妥当性検証
- 工程内管理試験

えば複製開始点，抗生物質耐性遺伝子，プロモーター，エンハンサーなど）の由来と機能及び構造，③目的タンパク質の発現方法に関する記述，④遺伝子発現構成体を構築する手順と構造，⑤宿主細胞の由来や特性と選択理由，⑥遺伝子発現構成体を宿主細胞に入れる方法，⑦遺伝子発現構成体を増幅する方法，⑧クローン細胞株の選択に用いた評価基準と樹立方法，などを含む遺伝子操作の妥当性を明らかにすることが重要である．

2）非組換え体による細胞培養医薬品の製造にあっては，①細胞の起源，由来，特性，②細胞の培養歴，培養方法，③セル・バンクの元となる細胞株（種細胞株）の樹立方法，関連情報などについて明らかにすることが重要である．

3）目的細胞における微生物汚染や他の細胞混入否定に関する試験データが不可欠である．

4）生産にかかわる細胞基材の恒常性を図る基本的方策として，一般にクローン（種）細胞株を出発素材としたセル・バンク・システムが構築されるが，バンクを構成する細胞の調製法，特性，保存管理法や更新方法を明らかにし，細胞基材の恒常性を維持していくことが重要である．その具体的内容として考えられる項目には，①マスター・セル・バンク（MCB）やワーキング・セル・バンク（WCB）を初めて調製した際の調製法，調製アンプル数，細胞特性や微生物汚染等否定に係わる試験項目，試験方法，試験結果（評価基準），②両セル・バンクを更新する際の調製法，調製アンプル数，細胞特性や微生物汚染等否定に係わる試験項目，試験方法，各試験項目結果の判定基準（更新されたバンクの適否評価基準），③両バンクの保存方法，現行保存アンプル数，④保存中の細胞の安定性試験実施要領（試験の時期，項目，方法，評価基準），廃棄基準等，⑤両バンクの使用スケジュール，更新スケジュール等が挙げられる．細胞特性解析は表現型や遺伝子型などにかかわる適切な指標に関して行われる．動物細胞では，例えば形態学的解析，アイソザイム分析，染色体のバンデング解析，種特異的抗血清による解析，染色体のバンデング解析による（細胞特有の）マーカー染色体の検出，遺伝子多型を検出するための DNA 分析などが考えられるが，その他当該細胞に特有な指標も含めて，適切に指標を選択する．微生物細胞では，選択培地での増殖特性解析などが考えられる．遺伝子発現構成体が染色体に導入された組換え体細胞においては，そのコピー数，挿入と欠失，組み込み部位の数，染色体外発現系の場合は，遺伝子発現構成体を保持する細胞の割合（%）を測定しておく必要がある．また，いずれの場合も，遺伝子発現構成体中の目的タンパク質をコードする部分の塩基配列が正しいことを立証しておく必要がある．非組換え体細胞であっても目的タンパク質をコードする部分の塩基配列が解析できることもある．目的タンパク質の発現も細胞特性の指標の一つである．

5）細胞の保存中や大量培養中の安定性評価を行う必要がある．医薬品製造条件下で，細胞が安定に一定の目的物質を生産することを検証しておくことは，組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質の恒常性確保上きわめて重要である．実際には，医薬品製造のためにどこまでの期間あるいは細胞数倍加レベルまで細胞を増殖培養するのか，できるのか，すなわち，パイロットスケールあるいはフルスケールで，医薬品製造条件として提案するイン・ビトロ細胞齢まであるいはそれ以上に増殖させた製造用細胞における細胞の特性，目的物質をコードする遺伝子の塩基配列，あるいは生産タンパク質などの適切な指標について，MCB（WCB）のそれと比較したとき，変化がなく，予期される目的物質が恒常的に生産されることを立証しておく必要がある．その最も代表的な評価方法の例が，組換え体細胞における遺伝的安定性の評価である[35]．

6）培養法の一定性を保つ必要がある．さもなければ，前項で述べた医薬品製造条件下で，細胞が安定に一定の品質の目的物質を生産することの検証は意味をなさなくなる．培地の組成など培養の方法が変われば，培地由来の不純物の混入が問題になるほか，培地の変更が実際の発現の場で誘導条件に影響し，発現状況が変わる可能性や，培養方法如何では細胞の安定性や変異の確率が変わることなども懸念される．また，培地の成分による発現タンパク質の変性や修飾が安全性（免疫原性など）に影響を及ぼすことも考えられる．培地の組成に依存して，細胞中で，ある種のプロテアーゼの作用が発現して生産物を一部分解し，最終産物の品質の均一性が変動することもある．また，細胞の大量培養に動物などを経由する場合で，動物の種類，株その他の条件を変更するようなケースも考え得るが，その際は動物由来の有害因子の混入問題等について改めて評価が必要になってくる．

7) 精製法の一定性を保つ必要がある．特に，①目的物質の細胞からの分離と精製手順，②各精製段階での精製状況（例えばタンパク質収量，活性収率，比活性，電気泳動パターン等），③エンドトキシン等の有害因子や主な不純物の除去状況と除去効率，④一次産物を加工して目的物質に変換する場合はその手順と目的物質の精製手順，などについてその妥当性を証明し，その後はこの妥当性が証明された分離精製工程を一定にしておく必要がある．目的物が比較的不安定な高分子タンパク質であることから，生産細胞（とくに菌体内）からの抽出・分離法の変更も含めて精製方法を変更した際に，分離精製過程での目的物質に対する物理的，化学的あるいは生物学的作用の種類や程度が変わり，目的物の構造や性質に影響を及ぼす結果，最終製品の品質が変わることが懸念される．また，細胞の一次生産物がプロ体や雑種融合タンパク質あるいはインスリンのA鎖のような最終目的物の一部である場合には，最終産物を得るための加工の方法などが変更される可能性があるが，これも最終製品の品質に影響を及ぼすことが考えられる．細胞培養法によるインターフェロン－αに典型的にみられるように，最終産物が不均一な複数の活性成分からなる場合には，精製方法の変更は最終産物中の（活性の異なる）成分の種類や成分比の変動につながり，有効性等に影響する可能性がある．生産菌体や動物細胞由来，培地由来その他製造工程中に混入する可能性がある有害因子や不純物の不活化や除去状況が精製工程に依存して変わることもきわめて重大な問題である．その他，精製工程中で用いる試薬の混入や抗体カラムからの抗体の漏出など，採用された精製方法そのものに由来する安全性上の問題もある．

8) 製造工程全体にわたって，プロセスバリデーションによる工程の妥当性検証が不可欠である．

9) こうした製造工程の恒常性を常にモニターするために，製品のみならず，原材料の品質，機械や装置の作動状況にかかわる工程内管理試験がきちんと実施される必要がある．

このように製造方法の主要部分の一定性を保つことは非常に重要なので，もし，既存の組換え医薬品や細胞培養医薬品と同じ目的物質を目指すとしても，上に述べたようなことのいずれかが変更された場合には，その変更の程度に応じて改めてその妥当性について評価し直す必要がある．

2．5　ウイルス面からみた組換え医薬品及び細胞培養医薬品の安全性確保[33,34,41,43]

ヒトあるいは動物細胞由来の組換え医薬品や細胞培養医薬品すべてに共通の課題できわめて重要な問題の一つにウイルス汚染という安全性上の問題がある．ウイルス汚染は，出発素材である細胞系に由来して起きる可能性がある．また，製造工程中に外来性因子として導入された結果生ずる可能性もある．これらの医薬品についてウイルス面からみた安全性を確保する方策として考慮すべき事項には以下のようなものが挙げられる．1) ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような生産用細胞系及び製造関連物質（培地成分，試薬，抗体カラムなど）を選択すること，2) 出発素材である細胞基材などにつき徹底的な解析とスクリーニングを行い，ウイルス存在の有無及び存在するウイルスの種類について検討すること，3) 汚染ウイルスがどの程度ヒトへの有害性が高いかを検討・確認すること，4) 製造工程の適当な段階において製品のウイルス否定試験を実施すること，例えば，未加工／未精製バルクなどにおいて外来性ウイルスを検出するための適切な試験計画を設定すること，5) ウイルスクリアランスを最大限達成するために製造工程中にウイルスの除去・不活化に関する各種の方法を用いること，6) 周到なウイルスクリアランス試験計画をたてること，7) ウイルス不活化及び除去を評価する試験を実施し，評価すること．これらの方策は，段階的にかつ相互補完的に活用していくことが重要であると考えられている．以下には，そのさらに根幹をなす部分に焦点をあて概説する．

2．5．1　各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験の要領

ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような生産用細胞系及び製造関連物質を選択するとともに，これらにつき徹底的なスクリーニングを行うことは，ウイルス面からみた安全性を確保する上で，なによりもまず実施すべき基本的アプローチである．Table 2には，マスター・セル・バンク（MCB），ワーキング・セル・バンク（WCB），及び医薬品製造条件として提案されたインビトロ細胞齢の上限まで培養された細胞（CAL）などの各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験の実施要領を例示したものである．

2．5．2　未精製バルクにおけるウイルス試験

製造工程の適当な段階において製品のウイルス否定試験を実施することは，製品のウイルス安全性確保上の第2の基本的アプローチともいうべき必須事項である．

医薬品生産のための培養を終了し精製工程へ受け入れる段階での製品を未加工／未精製バルク（unprocessed bulk）と称している．この未加工／未精製バルクは，最終製品への外来性微生物汚染の可能性を高確率で測定することができる最も効果的なレベルの一つであること，また，各細胞レベルでの一回のウイルス試験は，細胞株適格性についてであって，それらの細胞株に外来性ウイルスが存在しないことが，次々生産されるバルク各ロットにもウイルスが存在しないことを必ずしも常に保証するものではないということから，少なくとも3ロットのデータが評価資料として

Table 2. 各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB	CAL
レトロウイルス及び内在性ウイルス試験			
感染性試験	+	−	+
電子顕微鏡観察	+	−	+
逆転写酵素活性	+*1	−	+*1
その他細胞種特異ｳｲﾙｽ試験	適宜実施	−	適宜実施
非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験			
in vitro試験	+	−*2	+
in vivo試験	+	−*2	+
抗体産生試験	+*3	−	−
その他細胞種特異ｳｲﾙｽ試験	適宜実施	−	−

*1:レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要
*2:ＣＡＬ（イン・ビトロ細胞齢の上限の細胞）で試験が実施されるときは不要
*3:例えばマウス，ラット，ハムスターでの抗体産生試験，通常，げっ歯類由来の細胞に対し適用する

必要であるとされている．この段階で外来ウイルスの迷入が検出された場合には，一般にそのバルクを製品生産用に使用すべきではないことはいうまでもなく，また汚染原因をつきとめるなど適切な対応が必要である．

2．5．3 ウイルスクリアランスに関する工程の評価及び精製バルクでのウイルス試験実施要領

MCB を含めた細胞レベル及び製造工程の適切な段階の製品レベルにおいて，それぞれに最も適切で合理的なウイルス試験を実施するという 2 つの基本的アプローチと並んで，未加工/未精製バルクからの製品の精製工程がいかにウイルスを不活化／除去できるかに関するクリアランス能力を適切に試験・評価することは，ウイルス安全性確保上もう一つの柱となるべき必須なアプローチである．

細胞レベルでのウイルス試験や未精製バルクでの試験結果により，ウイルスの存在の有無，同定の可否，存在ウイルスのヒトへの病原性の可能性が明らかになるが，これらさまざまなケースに応じて，ウイルス不活化／除去に関する工程の評価をどのように実施すべきか，あるいは精製バルクでどのように対応すべきかに関する考え方が Table 3 に要約されている．ここでは，5 つのケースを想定した上で，とるべき対応策を提示している．このなかにあって，とくに中心的な役割を果たすのがウイルスクリアランス工程評価試験と特性解析試験という 2 つの異なるウイルスクリアランス試験である．

まず，ウイルスクリアランス工程評価試験とは，存在が知られているか予測されるウイルスに関して製造工程が有する不活化／除去能力を解析することを目的に行う試験である．試験に用いるウイルスは，製造工程で使用される細胞基材，その他の試薬類や各種物質に混在することが知られているか，あるいは存在の可能性があるウイルス類と同一かあるいは同種のウイルス（“関連ウイルス”）である．精製工程や不活化工程はこれら関連ウイルスを不活化／除去する能力があることを示す必要がある．この“関連ウイルス”の入手が困難であったり，ウイルスクリアランスに関する工程評価試験にうまく適用出来ない（例えば *in vitro* で十分に高力価になるまで培養できない）場合には，代替として“特異的モデルウイルス”を用いることになる．適切な“特異的モデルウイルス”とは，存在が知られているかあるいは存在が疑われるウイルスに密接に関連しているウイルス，すなわち同一の属もしくは科のもので，検出されたウイルスあるいは存在が疑われるウイルスと類似した

Table 3. ウイルスクリアランスに関する工程の評価及び精製バルクでのウイルス試験実施要項

	ケースA	ケースB	ケースC	ケースD	ケースE
[細胞や未精製バルクでのウイルス試験結果]					
ウイルスの存在	−	−	+	+	(+) *1
ウイルス様粒子の存在	−	−	−	−	(+) *1
レトロウイルス様粒子の存在	−	+	−	−	(+) *1
ウイルスの分離同定の可否	適用外	+	+	+	−
ウイルスのヒトへの感染性	適用外	−	−	+	未知
[必要とする対応]					
ウイルスクリアランスに関する工程特性解析試験	必要*2	必要*2	必要*2	必要*2	必要*4
ウイルスクリアランスに関する工程評価試験	不要*3	必要*3	必要*3	必要*3	必要*4
精製目的産物でのウイルス否定試験	適用外	必要*5	必要*5	必要*5	必要*5

*1:未知のウイルスまたは（レトロ）ウイルス様粒子が直接あるいは間接法で検出
*2:非特異的モデルマウスを用い，当該精製工程の一般的ウイルス排除能力の特性を解析する
*3:検出されたウイルス及び存在が予測されるウイルスと同じか同種のウイルス（関連ウイルス），またはそれらと同一の属や科で物理的化学的性質が類似しているウイルス（特異的モデルウイルス）を用い，当該精製工程の特定ウイルス不活化・除去能力を評価する
*4:規制当局に相談する
*5:最低3-5ロットについて実施する必要があるが，CHO細胞におけるレトロウイルス様粒子（例： Type A, R 又は C）のようなものについては不要である

物理的，化学的性質を有するものである．

一方，それ以外のウイルスを不活化／除去する能力に関する工程の特性を評価する試験を一般に行うべきであるとされている．これは，ウイルスクリアランス工程特性解析試験と呼ばれ，その目的は，ある工程がウイルスの除去や不活化に関して一般にどの程度の能力を有するかを解析すること，すなわち工程が確実にウイルスクリアランス能力を発揮するという面での特性（robustness）を解析することである．この工程特性解析試験には，細胞などに存在が知られていないか，予測されていないウイルスで，かつ広範な生化学的・生物物理的性質を有するさまざまなウイルス（“非特異的モデルウイルス”）を用いる．この試験は特定のウイルスによるリスクに対する安全性を評価するために行うわけではない．したがって，クリアランスに関して特定の数値目標が達成される必要はない．

なお，Table 3 における 5 つのケースのうち，実用化されている組換え医薬品等で最も一般的なケースは，ケース A とケース B である．

2．6 目的物質の構造，特性，品質の検討

目的物質の製造工程の明確化，妥当性の検証と表裏一体の関係で重要なことは，最終目的物質の組成分析，構造解析，物理的化学的性質，生物学的性質，免疫化学的性質などを含む特性解析と有害因子や不純物の混入問題も含めた品質評価である．幸いなことに，生理活性タンパク質の構造解析技術や特性・品質解析法，不純物の分離検出法などが，バイオ医薬品の開発と期を一にして発達し，生産物の構造解析や特性解析，品質評価に大きな威力を発揮している．バイオ医薬品における構造解析，特性解析，品質評価の重要性は，これが本質的には人工的な技術に基づいて生産される高分子タンパク質であることを考えれば自ずと明らかである[16,30,44-48]．

2．6．1 組換え医薬品や細胞培養医薬品における成分の不均一性問題とその対応

組換え医薬品や細胞培養医薬品における構造解析，特性解析，品質評価を行うにあたって，まず留意すべきことの一つは，これら医薬品の成分を物質構造面からみるとき，不可避的な不均一性が存在する可能性があることである．不均一性は，組換え医薬品等の製造面の特徴及び成分の本質がタンパク質であるという物質面の特徴の双方に起因して生じる[30,44,46,49]．まず，組換え医薬品や細胞培養医薬品は

その生産のために，完全な人為的制御が不可能な生きた細胞による生合成過程を利用していることから，生産物であるタンパク質において分子構造的な不均一性が不可避的に発生する可能性がある．最も典型的な例は，生産物が糖タンパク質の場合である．これは，仮に単一の遺伝子から単一の発現タンパク質に翻訳されたとしても，糖鎖付加という翻訳後の修飾により，①発現タンパク質各糖鎖結合部位への糖鎖付加の有無をはじめ，②付加した糖鎖の種類の多様性，③同一糖鎖結合部位に付加した糖鎖における種類の多様性と存在量の不均一性などが生じ，結果的に生産物の構成成分が分子種としてきわめて多様な糖鎖付加体（グリコフォーム）の集合体となるケースである[30,45,47,50]．目的物質が分子としての不均一性を示す原因となる翻訳後修飾には，糖鎖付加の他に，リン酸化，アセチル化，タンパク分解プロセシング等がある．いずれの場合も，目的物質は予想される範囲内での翻訳後修飾を受けた不均一な分子種の混合物ということになる．これとは別に，細胞培養医薬品であるインターフェロンαのように，生産誘導剤により複数（10数種類）存在する遺伝子が同時発現するため，必然的に生産物が分子種の異なる複数の遺伝子発現タンパク質の混合物になるケースもある[15]．

このような，組換え医薬品や細胞培養医薬品の製造面の特徴及びタンパク質であるという物質面の特徴に起因して生じる不可避的でかつ人為的に制御不可能な不均一性については，それを前提とした科学的で合理的な対応が必要である．

一方，不均一性は，不安定な高分子タンパク質であるという物質面の特徴に起因して，原薬又は製剤の製造中あるいは保存中にも起こりうる．これについては回避するべく可能な方策がとられるとしても，完全に回避することは難しいので，それ相応の適切な対応が必要となる．

2．6．2　バイオテクノロジーにより生産された製品における目的物質とは

前項での問題点とも関連して，バイオ医薬品における「目的物質」とは，物質面からみてどのようなものであり，目的物質といえないものはどのようなものであるかを明確に定義しておくことがまず何よりも重要である．これは，組換え医薬品や細胞培養医薬品の本質やアイデンティについて論じ，一般名称を定め，構造解析や特性解析，品質評価をする上での基本中の基本となる[46-47,49]．この問題については，ICHの特性解析・規格に関する国際調和ガイドラインを作成する際にも最もホットな議論の対象の一つとなった[51]．議論の収束に基本的な方向づけをしたのは，わが国から出されたコンセプトであった．これは，前項で述べたバイオ医薬品生産の特徴であり，生産物に不可避的に存在する分子の不均一性の問題に対してどのように対処すればよいかを含めて提示されたものであった．このコンセプトは，以下に述べるバイオ医薬品における「有効成分」，「目的物質関連物質」，「目的物質由来不純物」の定義や各物質の相互の関連づけも含めて論点を整理し，向かうべき方向を明確にするべく提起されたものであった．

論議の結果，「目的物質」とは，1）予期した構造を有するタンパク質，2）DNA塩基配列から期待されるタンパク質，3）しかるべき翻訳後修飾（グリコフォームを含む）から期待されるタンパク質，4）生物活性分子を生産するのに必要な，意図的な加工・修飾操作から期待されるタンパク質のいずれかにあてはまるものを指すと定義された．このうち，1）はモノクローナル抗体のような場合を想定している．また，3）は，前項で述べた生産物に不可避的に存在する分子の不均一性の問題への対処を考慮したもので，得られた不均一な分子集合体を総体として目的物質として取り扱うことが合理的であるとの考えに基づいて定義されたものである．

一方，明らかに翻訳後修飾以降に起こった変化によって生じたとみなされる変化体は，当然，目的物質の範疇には含めない．しかし，これら製造中あるいは保存中に生成する目的物質由来の物質は，その特性に応じてさらに2つのカテゴリーに分類して取り扱うことが合理的であるとされた．まず，目的物質から派生した物質のうち，活性があり，製品の安全性及び有効性に関して悪影響を及ぼさないもの，すなわち，目的物質に匹敵する特性を備えているものは「目的物質関連物質」と称し，不純物とは考えず，「有効成分」として扱うこととした．生物活性の面から考えると「目的物質」と「目的物質関連物質」を合わせたものを「有効成分」とすることが実際的であり合理性もあるということである．ただし，「目的物質関連物質」には当然，許容量に限界が設けられる必要がある．他方，目的物質の分子変化体（例えば，前駆体，製造中や保存時に生成するある種の分解物・変化物など）で，生物活性，有効性及び安全性の点で目的物質のそれに匹敵する性質を持たないものは「目的物質由来不純物」と称し，文字通り不純物として扱うこととなった．

2．6．3　目的物質等の組成分析，構造及び特性解析

目的物質について当初のシナリオどおり意図した化学構造を有する物質が得られたかどうかを適切な組成分析，構造解析法を駆使して確認，同定する必要がある[32,48]．糖タンパク質については，糖鎖の種類，構造及び付加状況などについて技術的に一般に可能な範囲で解析を行う必要がある．これは糖鎖が有効性，安全性にどのような影響を及ぼすのかを知るための基礎資料となる．また，目的タンパク質に期待される正しいジスルフィド架橋の形成も含めた正しい折りたたみ構造，すなわち活性高次構造を形成し，

天然型（もし同一のものあるいは類似のものがあれば）に匹敵する生物活性を有することを立証することも重要である[52]．細胞内に組み込まれた目的タンパク質に対応する構造遺伝子は特定のアミノ酸配列の作成に関する青写真ではあるが，高次構造形成に関する情報は提供しないからである．特に原核細胞を用いた組換え遺伝子産物の場合は，活性高次構造形成上の問題点が比較的多い．また仮に当初は正しい高次構造が形成されたとしても，製造過程等における化学的，物理的原因による構造変化も考えられるので，その意味でも最終産物での検討が必要である．さらに各種の理化学的，免疫化学的あるいは生物学的試験を徹底的に行って，生産物の均一性や純度あるいは目的とする生物活性を示すかどうか，その他の性状に関するデータを集める必要がある．

2．6．3．1　目的物質等のタンパク質部分の構造や組成の解析目標と解析方法[30,37,44,48,56]

目的物質等のタンパク質部分の構造や組成の解析目標としては，1）アミノ酸組成分析，2）末端アミノ酸及び末端アミノ酸配列分析，3）スルフヒドリル基とジスルフィド結合の数と位置の解析，4）ペプチド分析，5）全アミノ酸配列分析，6）高次構造解析などの項目が挙げられる．全アミノ酸配列分析は，通常，1）〜4）について可能な範囲で解析し，このデータと目的物質の遺伝子塩基配列から推定されるアミノ酸配列を照合しながら決定（推定）する．こうした目標を達成するための分析方法は，ある程度ルーチン化してきている．アミノ酸組成分析にはアミノ酸自動分析法，N-末端アミノ酸配列分析にはEdman自動分析法，C-末端アミノ酸配列にはカルボキシペプチダーゼ法が汎用される．質量分析法も用いられる．末端アミノ酸が複数の場合はその存在比を適切な方法を用いて明らかにする必要がある．ペプチド分析とは，タンパク質のある特定のペプチド結合を適当な酵素あるいは化学試薬を用いて選択的に切断し，得られたペプチド断片を高性能液体クロマトグラフ法（HPLC）などで分離し，アミノ酸組成分析，N-末端アミノ酸配列分析や質量分析（FABMS，ESIMS，MALDI-TOFMSなど）を利用して各ペプチドのアミノ酸配列を決定する方法である．各ペプチド断片の分析結果を重ね合わせていけば全アミノ酸配列の推定につながる．高次構造解析法としては，円二色性（CD），核磁気共鳴スペクトル（NMR），X線回折法などがあるが，CDから得られる情報は限られており，一方，NMR，X線回折法は必ずしも一般的ではない．

どの程度まで詳細に，徹底して解析するかは，タンパク質におけるサイズ，構造的複雑さ，目的物質を構成する分子種の多様性などの要素とその時点での分析技術の到達度など，さまざまな要素によって一様ではない．組換え医薬品の場合は，一般に全アミノ酸配列を少なくとも推定できることが望ましい．細胞融合法で生産するモノクローナル抗体の場合は少なくとも免疫グロブリンクラス，サブクラスを明らかにしておく必要がある．

目的タンパク質以外の目的物質関連タンパク質の構造解析についても上記の要素に加えて，存在量，目的物質関連物質としてのアイデンティティの確認なども考慮に入れて合理的対応をすることになる．

2．6．3．2　糖タンパク質における糖鎖の構造と機能[30,45,47-48,50]

糖タンパク質性医薬品においては糖鎖の構造と機能に着目する必要がある．糖タンパク質における糖鎖が，標的細胞におけるレセプターとの結合性を含む生物活性の発現や調節，生体内動態，輸送のための血漿タンパク質との結合性増強，免疫学的性質，物性，安定性，溶解性などに影響を与えている事例が報告されているからである．糖タンパク質の生物学的，免疫学的，物理的化学的性質は，糖鎖の種類，すなわち構造上の特徴如何で影響を受ける可能性があり，また，ポリペプチド鎖中の糖鎖結合部位数や占有率，各糖鎖結合部位での糖鎖の種類や分布状況によっても影響を受ける可能性がある．また，同種の糖タンパク質であっても，ポリペプチド鎖が一部改変されたものにあっては，もとのタンパク質と同じ糖鎖結合位置に存在する糖鎖の生物学的役割が変わってくることも知られている．

もう一つの注目すべきポイントは，バイオテクノロジーにより糖タンパク質を生産する場合，種はもとより組織や細胞種が異なると，糖鎖構造も異なってくるということである．また，糖鎖付加装置を有するもとの（宿主）細胞は同じでも，組換え体などの作製方法，挿入遺伝子，培養条件等が異なれば，生産物の糖鎖構造や糖鎖付加状況は異なってくることにも留意する必要がある．

糖鎖構造が適正でないタンパク質は，生体内動態や組織分布に関して本来のものと異なる挙動を示したり，あるいは天然型に対する拮抗剤的作用などの有害反応をひき起こしたり，あるいは長期連用投与の注射剤のような用法では抗原性が問題となってくる．

糖タンパク質の糖鎖構造の解析や特性解析は必ずしも容易なことではないが，最近の糖鎖構造解析技術の進歩やその特性解析事例をふまえて，糖鎖付加状況や糖鎖構造及びその機能等との関係を技術的に可能な範囲で把握する努力が必要である．

2．6．3．3　糖タンパク質の糖鎖の構造や組成の解析目標と解析方法

糖タンパク質の糖鎖に関しては，1）糖組成分析（中性糖，アミノ糖，シアル酸等），2）結合型解析（N-結合型やO-結合型），3）シアル酸分子種分析，4）分岐鎖型，サイズ，分布，5）糖鎖構造解析（主要糖鎖については単糖間の結合様式に至るまで解析），6）糖鎖結合位置，7）結合位置毎の

糖鎖分布，構造解析などが解析目標である．糖鎖の生物学的活性における役割等を考慮し，これらについて可能な範囲で解析することが望ましい．糖鎖部分の構造解析に必要な要素と代表的な解析方法を以下に示した．1）各種単糖分析（化学分析，ガスクロマトグラフィー，蛍光標識-HPLC，強アニオン交換 HPLC など），2）糖鎖マッピングや 2 次元又は 3 次元糖鎖マッピング（例えば，蛍光体支援糖質電気泳動法（FACE 法），キャピラリー電気泳動法（CE），ピリジルアミノ（PA）標識糖鎖の HPLC などによる），3）糖鎖構造解析：①各種修飾・分解（逐次酵素分解，メチル化，アセトリシス），②分離（GC，HPLC）と各種解析法（MS：FABMS，ESIMS，MALDI-TOFMS；NMR など）の組合せ．

現在までに汎用されている動物細胞を用いて製造した糖タンパク質の糖鎖は，数種類の基本構造をベースにしたさまざまなバリエーションであることが判明している．また，90 種類以上の PA 標識標準糖鎖も存在し，かつ適切な条件下での HPLC では糖鎖構造と溶出時間に規則性があることも判明している[53]．そのため，例えばわが国で繁用されている PA 標識糖鎖の 2 次元マッピング法を利用すれば，糖タンパク質に存在するほとんどの糖鎖構造と分布状況を推定することが可能である．結合位置毎の糖鎖分布，糖鎖構造なども，例えば，糖ペプチド断片の LC／MS で比較的短時間で分析できるようになってきている[54]．

2．6．3．4 目的物質の理化学的手法，免疫化学的手法及び生物学的手法による特性・品質解析[37,44,48,52,56]

目的物質については，各種の理化学的，免疫化学的あるいは生物学的手法による特性・品質解析を十分に行う必要がある．

1）目的物質の物理的化学的性質に関しては，①分子量・分子サイズ，②アイソフォームパターン，③比吸光度（モル吸光係数），④各種電気泳動パターン，⑤各種液体クロマトグラフィー・パターン，⑥分光学的性質（例：紫外及び可視吸収スペクトル，円二色性）などについて詳細なデータの蓄積が必要である．

理化学的手法は目的タンパク質の確認・同定，均一性や純度の検定，定量にきわめて有用である．この目的には，各種 HPLC 法（サイズ排除（SE）；逆相（RP）；イオン交換（IEX）；疎水的相互作用（HI））や電気泳動法（SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法（SDS-PAGE）；PAGE；等電点電気泳動法（IEF）；ゾーン-CE；ミセル-CE；ゲル-CE）がきわめてすぐれた威力を発揮し，かつ簡便な方法として繁用されている．例えば，HPLC 法は，カラムの充填剤や移動相などに適切な条件を選択すればポリペプチド鎖のアミノ酸 1 個の違いでも識別，分析できる．一方，電気泳動法は分子量，電荷の違いなどを識別できるほか，免疫化学的検出法（例えばウエスタンブロッティング）と組み合わせれば試験の特異性はより高いものとなる．

最終製品における分子種の均一性に関しては十分な解析を行い，その実態をきちんと把握しておき，製造ロットが変わってもその恒常性を保証することが重要である．先に述べた目的物質等における分子構造上の不均一性はそのものの品質を規定するものであるので，この不均一性の程度及びプロファイルを解析する必要があるが，その最も有力な武器になるのも HPLC 法及び電気泳動法である．目的物質等の不均一性のパターンを定義し，非臨床・臨床試験に用いたロットのパターンと一貫していることを証明し，さらに承認後の製品のロット毎に不均一性のパターンが一貫していることを保証することで製品の品質の恒常性を確認することができる．製品の不均一性のパターンの一貫性が証明されれば，個々の分子種の生物活性，有効性及び安全性（免疫原性を含む）を評価する必要は必ずしもないケースもある．なお，これら工程の変更や分解物・変化物生成により，非臨床及び臨床試験に用いた製品で認められていたものと不均一性パターンが異なってしまった場合には，その変化がもたらす影響について評価する必要がある．

2）目的物質の特性・品質解析には，理化学的手法による解析に加えて，生物学的手法あるいは免疫化学的手法による検討が不可欠である．そのアプローチ法は個々の製品の種類や特性とアッセイ系の特徴を最大限考慮した適切で合理的なものである必要がある．

免疫化学的手法の活用は，目的物質がモノクローナル抗体等の場合には免疫化学的特性を解析する手段として必須である．抗体が目的物質の場合，その免疫学的性質を徹底的に特性解析する必要がある．精製抗原と抗原の特定領域に対する抗体の結合試験を行い，可能な範囲でアフィニティー（1 価の抗原結合部位と 1 価の抗原決定基との間での結合の強さ），アビディティー（多価抗体と多価抗原との結合の強さ）及び交叉性反応を含む免疫反応性を検討するべきである．さらに，可能な範囲でエピトープに関連する標的分子及びエピトープ自身を生化学的に解析する．モノクローナル抗体以外が目的物質の場合でも，当該タンパク質上にある様々なエピトープを認識する適切な抗体（類）が入手できれば，免疫化学的方法（例えば，ELISA，ウエスタン・ブロット）は，目的物質の同定や均一性，純度あるいは含量を試験するのに有用である．抗原抗体反応ではタンパク質の高次構造もある程度反応性に影響するので目的物質の高次構造に関する情報もある程度得ることも可能である．しかし，抗原抗体反応に関わるポリペプチド鎖中の領域と生物活性に関わる領域とは必ずしも同一とは限らないので，免疫化学的試験の結果から目的物質の生物活性に言及することは慎重でなければならない．特異的中和抗体による生物活性の抑制や，レセプターなどへの結合性の阻害を検討することは同一性確認の精度を一層高めることに

なる．

目的物質の免疫化学的性質が，精製，確認試験，純度試験，定量法，体内動態試験等に利用されている場合には，目的物質と抗体に関する全ての関連情報を提供する必要がある．例えば，①イムノアッセイ，免疫電気泳動，抗体中和法等の適切な方法を用いて検討した目的物質とこれに特異な抗体との反応性，②類似物質に対する抗体又は類似物質が比較的容易に入手できる場合に，目的物質又は目的物質に対する特異抗体との反応性などが挙げられる．

3) 生物学的手法は，まず何よりも目的タンパク質を特徴づける生物学的性質や生化学的性質の解明に必須である．例えば，酵素の場合には酵素化学的性質，モノクローナル抗体の場合には標的抗原に対する特異性や組織学的結合性，ワクチンの場合には免疫原性，ホルモンの場合には目的とするホルモン活性，サイトカインの場合にも目的とするサイトカイン活性などである．一方，目的とする性質以外にも多彩な生物学的作用を有することが知られていることが多く，ケース毎に適宜，適切な検討あるいは文献からの情報の提供が必要である．生物学的手法は，生物学的機能を指標とする確認・同定法や比活性を指標とする純度検定法，力価測定のための定量法などに活用される．さらには活性高次構造形成あるいは保持の確認や，活性を指標とする安定性評価にも有用である．生物学的手法には，動物を使用する *in vivo* 法と，培養細胞での応答や生化学的反応性を指標として用いる *in vitro* 法がある．基礎研究の段階，開発段階では，両法を駆使した詳細な検討が必要である．品質管理を目的とするような試験などの場合，従来は *in vivo* 法がよく使われていたが，最近では動物愛護の問題とか，細胞生物学の発展をふまえたより簡便で正確な *in vitro* 法によるアッセイがむしろ主流になってきている．しかし，*in vivo* 法による生物活性は投与後の体内動態及び標的細胞（標的分子）との相互作用が反映されるが，*in vitro* 法で得られる生物活性は体内動態に係わる要素が反映されないため，両測定結果が相関しない場合があることに留意すべきである．その典型的な例は糖タンパク質であり，糖鎖の状態如何では，*in vivo* 法と *in vitro* 法で得られた生物活性が逆相関になることもある[55]．

4) 純度については，①目的物質の理化学的純度，②比活性を主な指標とする生物学的純度，さらに，③工程由来不純物及び混入汚染物質の観点をふまえて品質評価する．

5) ここで得られた物理的化学的，免疫化学的あるいは生物学的諸性質は，品質管理試験のほか，前臨床試験や臨床試験における有効成分の量的把握，体内動態や作用の追跡，作用機構の解析などのための基礎資料としてきわめて有用である[11]．

2．7 有害因子や不純物混入の可能性に関する検討

組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質確保，安全性の観点から特に留意する必要があるとされていることの一つが不純物の問題である．混在が予想される不純物には大別して外来性の有害因子，製造工程由来不純物と目的物質関連不純物の3種類が考えられる．

このうち外来性の代表的有害因子である微生物（細菌，真菌，マイコプラズマ，ウイルス）や発熱性物質の混在は適切な試験方法あるいはクリアランス評価試験などにより否定される必要がある[23,34,36,42]．

製造工程由来不純物と考えられる主なものには生産細胞由来のタンパク質，核酸（宿主ゲノム由来DNA，ベクター由来DNAなど），その他の細胞成分，培地由来の不純物（遺伝子発現誘導剤，抗生物質，血清，その他），目的物質の抽出，分離，加工，精製過程で用いた各種試薬，溶媒や抗体カラムなどに由来する不純物等が挙げられる[56]．細胞や培地由来のタンパク質などの混入が安全性確保の点から最も問題とされるのは，これら不純物が免疫原性物質となり得る可能性が考えられるからである．また大腸菌由来のポリペプチドのように，それ自体が免疫原性を示すというよりもアジュバントとして目的産物の免疫原性を修飾する可能性があることについても考慮しておく必要がある[57]．さらに培地に用いる抗生物質などはアレルゲンになる可能性もあるので注意が必要である．とくにラクタム系のものはそもそも使用しないよう勧告されている．これらの不純物を検出し，試験する方法としては一般に免疫化学的方法が多用される他，HPLC法や電気泳動法も必要に応じて用いられる．一方，細胞基材由来DNAは，継代培養細胞株に存在する可能性のあるオンコジーンなどが医薬品中に混入して人体に悪影響を及ぼすことを危惧する議論の中心課題として問題となってきた[5,20]．最近では，さまざまなデータの蓄積に伴い，初期ほどの危惧はなくなり，1投与あたり10 ngが限度値の目安とされているが[58]，実績としてより低い限度値が達成できている場合には，あえてレベルを下げることはない．試験法としては，一般にDNAハイブリダイゼーション法がよく用いられる．

一般に不純物として問題となる可能性があるものについては，精製工程における分離状況や除去効率を明らかにし，必要に応じて最終製品での許容限度を定め，適切な試験を行ってチェックする必要がある．実験室スケールでいわゆるスパイク試験を行って，不純物の精製工程における分離状況や除去効率が満足できることをより明確に立証したり，工程内管理試験を行うことで最終製品での混在許容限度試験を実施しないというアプローチも考・えられる．

目的物質由来不純物としては，目的物質を直接生産する過程で生じた副生成物類（切断体，S - S結合ミスマッチ体など）と，目的物質の二次的修飾の結果生じた①凝集体（二量体，多量体），②デスアミド体などの分解物，③酸化生成

物などが考えられる．

これらの不純物の混在状況については，製造方法や物質特性を考慮した上で試験対象を定め，HPLC 法，電気泳動法など適切な方法による検討を行い，その実態に関する詳細なデータを蓄積しておくことが必要である．その上で，最終製品中での許容限度を定める必要のあるものについては，その検出や混在量測定のための適切な試験を設定しておく必要がある[19,56]．

2．8 プロセス評価，工程内管理試験

組換え医薬品や細胞培養医薬品の特性・品質確保の最も基礎となるのは，前項で述べた製品の特性・品質解析結果であることはいうまでもない．この結果は，同時に製造工程全体の妥当性に関する最も重要なデータでもある．同時に，医薬品としての承認後，将来にわたって継続的に同一の特性・品質を有する医薬品を供給していくための規格及び試験方法の設定に際して最も基礎となるデータを提供する．

しかし，組換え医薬品や細胞培養医薬品が複雑な製造工程の産物であり，かつ製造工程には望ましくない有害因子が迷入する可能性があること，製品が複雑な構造や性質を有し安定性にも乏しいものであることなどを考え合わせると，開発ステージでの製品の特性・品質解析結果や規格及び試験方法のみに依存して品質の恒常性確保を望むことができないことは明らかである．そこにプロセスバリデーションの概念の導入と実施の必然性が生じてくる．いったん確立して製品の特性・品質等が評価された製造工程は，あらゆる角度から検証されること，その継続性を保証することをとおして，医薬品の品質の恒常性の確保に寄与することになる．

こうしたプロセスバリデーションの一部を形成するもので，製品の品質保証や品質の恒常性に最も直接的に関わるのが，製造・精製工程のプロセス評価である．その最大の目的は，目的産物がその生物学的特性（免疫学的特性等）を損なうことなく効率よく純化され，また，有害因子や不純物が最終産物に混入して安全性上問題となることがない製造・精製工程であることを立証し，その恒常性を確保することにある．後者の場合，当該製造・精製工程により不純物や有害因子が許容できるレベルにまで除去されているか，またその恒常性があるかを評価するのである．この恒常性を日常的にモニターするために製造工程のある段階において工程内管理試験や規格の設定が必要であるという方策もしばしば出てくる．こうして工程中で迷入の可能性がある有害因子や最終目的産物に混入が予想される不純物に関し，その除去状況又は混在状況等が示されることになる．また，それらをふまえて，最終製品（原薬や製剤）段階での規格の設定の必要性や規格値が定められることになる．

組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質確保にあたって，①プロセス評価，②製造工程の適切な段階における工程内管理試験や規格の設定，③原薬及び製剤の規格の３つのアプローチを相互補完的に合わせて，全体として目的医薬品の品質を保証するという方策は，最近国際的な合意事項として明確にされたところである[56]．この方策によれば，工程内管理試験で設定した規格・試験に関しては，最終製品での規格及び試験方法で設定する必要はなく，重複を避けることが可能となる．

2．9 規格及び試験方法(ロット毎の品質試験)[3,32,56,59]

開発研究の段階で特性・品質，有効性，安全性について詳細に検討された組換え医薬品や細胞培養医薬品は，最終的にその有用性が評価されると承認・販売され，臨床の場に供されることになる．この承認された医薬品の特性・品質，有効性，安全性は，医薬品の規格及び試験方法によって維持，保証されることになる．すなわち，製造ロット毎に，承認時に定められた方法により試験を行い，定められた規格の適合性についてチェックを行うことで品質の恒常性を図ることになる．

したがって開発段階で明らかになった組換え医薬品や細胞培養医薬品の特性・品質面での解析結果は，当然，ロット毎の品質試験にも反映させる必要がある．

そのためには少なくとも，①目的物質の同一性・構造確認に関する試験法の設定，②目的物質の均一性もしくは目的物質（有効成分）が複数の分子種からなる場合はそれらの構成比がほぼ一定であることの保証に関する試験法の設定，③目的物質のタンパク質化学的純度の保証に関する試験法の設定，④製造工程由来不純物や目的物質由来不純物にとくに配慮した純度試験の設定，⑤生物活性や生物学的純度（比活性）の保証に関わる試験法の設定，などに留意する必要がある．

規格及び試験方法に採用する試験方法の選択は，製品により異なるが，選択した試験方法の妥当性や規格値の適合範囲を設定するために用いた根拠を明らかにする必要がある．規格値は，非臨床・臨床試験に用いたロットから得られたデータ，製造の一貫性の証明に用いたロットから得られたデータ，及び安定性試験データ，並びに関連する開発上のデータに基づいて設定し，根拠を示す必要がある．複数の同種同効医薬品を生物学的方法で測定し，力価で表示する場合には，医療現場の混乱を避け，相対比較ができるように，可能な限り生物活性単位表示の統一と力価測定法の標準化に努めるべきである．標準的試験法の簡便，高精度化も目指すべき方向である[60-62]．わが国では，組織プラスミノーゲン活性化因子（t-PA），トロンボモヂュリン，エリスロポエチン等の標準的試験法が開発された[61,63]．

その一方で留意すべきことは，組換え医薬品等の場合，

生物活性の保証を主な柱とする従来の方式からタンパク化学的性質の保証をもう一つの柱にすえることが必然的な流れとなってきたということである．技術面でも，組換え医薬品や細胞培養医薬品の開発に呼応してタンパク質に関する分析手段が急速に発展してきたので，こうした対応が現実的に可能になってきた．こうした背景のもとで，同一性の確認や純度検定に際しては，しばしば高分子タンパク質中のアミノ酸1個が置換した誘導体が識別あるいは検出すべき対象となり，また，安定性試験においても，タンパク分子中のわずかな変化，例えば，ある特定のアミノ酸残基の脱アミノ化反応や酸化反応などですら試験対象となってきている[44,48]．タンパク質性医薬品の品質確保や評価のあり方も，物性面ではまさに有機化学薬品に近いような精密度を要求されるという新たな局面が生まれてきているといってよい．この延長線上に，生物学的試験法から理化学的試験法へ切り替えることが試みられている．

2．10 品質管理における生物学的試験法から理化学試験法への切り替え

ヒト成長ホルモンやインスリンの品質管理における定量法は，従来，生物学的試験法で行われていたが，生物活性成分のみを分離，測定できるHPLC法が開発され，近い将来これに切り替えられる予定であり，もはや生物活性試験を行う必要がなくなった．品質管理における生物学的試験法から理化学試験法への切り替えへの要件と戦略としては，1）開発段階での徹底的な生物学的特性解析の実施，2）製造方法の明確化と一定性の確保，3）生物活性を保持する目的有効成分を選択的に識別し，定量することが可能な試験系の確立が挙げられる．このうち，3）に関する実証的研究においては，①各ロットにおいて生物活性（力価）と理化学試験測定値（タンパク質量量）が相関することの証明，②一たん理化学試験法に切り替えると，以降は，その測定結果（タンパク質量）が同時に生物活性（力価）を反映したものでなければならないことの確認，すなわち理化学試験測定値（タンパク質量）の中に生物活性のないものは含まれず，生物活性のあるものは理化学試験測定値に含まれることの確認，③具体的には，製造過程，保存中にどのような事態が生じても，生物活性のあるもののみを選択的に識別し，定量可能な理化学試験法の確立が必要である．ヒト成長ホルモンやインスリンの場合もこのような考えに基づいて検討が行われた．その結果，前者については，適切な条件下でのサイズ排除（SE）-HPLCのhGHに相当するピークから分取した試料は，実験誤差の範囲内でいずれもヒト成長ホルモン有効成分として満足できる活性を有することが確認され，後者についても，適切な条件下でのRP-HPLC法は，生物活性を有するインスリンのみを選択的に識別，定量できることが判明した[61,64]．

2．11 標準品，標準物質

組換え医薬品や細胞培養医薬品の特性・品質評価の基準となる物質の設定に関して最も理想的なのは国際標準品あるいは国内の統一標準品が制定されているケースである．しかし，組換え医薬品等の開発テンポは早いので，開発時にこうした公的標準品が制定されていることはまれである．また，複数のメーカーにより，それぞれ異なるソース（種細胞）から開発された同種，同効製品に対して公的標準品を制定しようとする場合，最も大きな問題となるのは，標準物質と対象となる製品との化学的及び生物学的同一性である．複数の同種製品が相互に，化学構造的に同一ではなく，目的とする理化学的試験に不適切な場合は，共通の標準品を制定することはできない．相互の化学的構造上の微妙な差異が各種の生物学的作用に影響を及ぼさないのであれば，アッセイ系の標準化や力価表示法の統一も含めれば共通の力価測定用標準品を制定できる可能性があるが，化学的構造上の差異が各種生物学的作用の差異として現れるようなケースでは共通の標準品はできない．

公的標準品が存在しない場合，医薬品開発者としてはとりあえず，自家標準物質を確立する必要がある．その場合のアプローチはおよそ次のようなものであろう[47,56,59]．

1）開発ステージにおける目的物質の解析で構造，組成，諸性質などについて徹底的に吟味されたロットのものをリザーブして第1次標準物質とする．これは，非臨床試験，臨床試験で使用されたロットの品質と同等もしくはそれ以上のものでもあることが望ましい．

2）それが困難な場合，あるいはストック切れで更新を必要とする場合は，1）の手順と基準で得られたものとその物性，純度などにおいて同一，同等であることを客観的に立証できる試験を行うよう適正なルールを定め，これに適合したものを第1次標準物質とする．なお，標準物質の力価に関しては，範囲で定めることはしない．

3）第1次標準物質から試験目的に則した評価法で常用標準品を確立する．

4）標準物質とは，あくまで試験目的に則した形でその規格，基準などが定められるべきものである．例えば力価測定用の標準物質の場合には，その標準物質について，同一性と正確な力価が定まっていることが重要で，厳密なHPLC的純度は必ずしも要求されない．一方，HPLC用の標準物質の場合には，厳密なHPLC的純度が要求される．

5）組換え医薬品や細胞培養医薬品はタンパク質製剤であるのでその安定性に問題があるが，標準物質はその保存期間中なんらの変化もしないことが絶対の前提条件である．

6）標準物質は通常，バイアルの内容物を所定量の適当な溶媒に溶解すれば所定の力価（質量）を示すよう製造する．表示値は，バイアルに分注・充填後に力価検定（質量定量分析）を行い，一定値を定める．範囲では定めない．この

場合，再溶解したとき，容器の材質や溶媒の性質によって標準タンパク質が容器に吸着して表示通りの力価（質量）を示さない可能性がある．また，溶解後の安定性に問題はなくとも，経時的に容器への吸着が増す場合もある．標準物質製造時には，凍結処理や製剤化がどのような影響を起こすかという問題とともに，容器の材質や標準物質溶解液の種類，あるいは溶解後の取り扱い方について十分な吟味が必要である．

2．12　組換え医薬品や細胞培養医薬品の安定性試験[38,40-41,65-66]

組換え医薬品や細胞培養医薬品の安定性試験の目的は，1）品質保証可能な保存条件，保存期間の設定，2）医薬品が経時的にどのような変化をうける可能性があるかについて検討していくことにある．

試験の実施計画や評価に際して第一義的に重要な点は，実保存期間，実保存条件での安定性試験データが，貯法を決める場合はもとより，分解物の確認やその後の処置などのことを考える際にも，基本になるということである．換言すると，申請しようとする精密な範囲の保存温度と保存条件で長期安定性試験のプロトコールをつくり，データを評価すべきであるということである．有効期間が化学薬品に比較して短期間というケースも考えられるが，それに応じて経時変化をモニターするための試験間隔を短くする必要がある．

試験の実施にあたっては，対象となる製品の同一性，純度，生物活性における変化を検出／測定できる検証された適切な理化学的試験方法（各種電気泳動法，高分解能クロマトグラフィ，ペプチドマッピングなど），生化学的方法，免疫化学的方法，生物学的方法を駆使してデータを集積する必要がある．分解物・変化物に関しては，長期保存試験で有意に生成するような分解物等がある場合にその特性解析や定量，安全性上の問題について考慮する必要がある．その許容量は，前臨床や臨床試験で用いた試料でのレベルを勘案して設定し，その根拠を明らかにする必要がある．

2．13　組換え医薬品や細胞培養医薬品の非臨床生物試験におけるポイントと問題点

一般に動物等を用いた非臨床生物試験の目的は，まず臨床試験の開始に先立って，当該医薬品の効果の発現，その作用持続時間，作用機序等の予測，あるいは副作用の発現の推定に関する多大な情報を与えることにある．また，臨床試験により得られた観察結果の解釈を裏付けるための試験やデータを要に応じて追加蓄積し，臨床上の有効性，安全性の適正な評価に資することのできる必要な情報を提供することも非臨床試験の重要な目的の一つである．したがって，一般に非臨床試験の実施は新医薬品の開発研究上不可欠なものである．バイオ医薬品の場合もこの点では例外ではない．

しかし，バイオ医薬品の物性面あるいは作用面での特性などから，従来の医薬品，特に化学薬品に対する非臨床試験の種類・項目及び試験方法をそのまま適用することは必ずしも妥当ではないさまざまな特徴を有するので，従来の一般の医薬品の場合とは異なる観点や方法で非臨床試験を実施すべき点が多い．

現時点ではあらゆる組換え医薬品や細胞培養医薬品に対応できるよう試験の実施基準，実施方法について一律に定める事は合理的ではなく，ケース・バイ・ケースで柔軟に対応していくのを基本姿勢とするのがよいというのが世界的共通認識となっている[24,67-69]．

もちろん，このケース・バイ・ケースでの対処の基本精神は，当該医薬品の臨床上の有効性や安全性の適正な評価に役立てるということをあくまで目的として，その時点で最も科学的に適切な試験がなされ，データが蓄積される事を一般原則とするところにあることはいうまでもない．その上で，個々の医薬品についての試験の内容及び範囲に関しては，いま，対象としている医薬品の特性，臨床適用法などを配慮して合理的に考えようということである．従って，試験の種類・項目及び試験方法の取捨選択に関しては，その合理的根拠について十分説明できることが必要とされている．さらに積極的には，個別の申請資料の作成という観点からだけではなく，社会的な意義，責務も考えて，この方面のデータの蓄積を増やし，この方面の進歩を図るということも望まれている．さらに詳細な技術的留意事項についてはICHガイドラインに記述されている[68]．

2．14　臨床試験について

臨床試験の実施にあたっては第1相，第2相及び第3相と段階的に慎重に行い，有効性及び安全性について，精密かつ客観的な考察を行う．これに加えて，組換え医薬品や細胞培養医薬品の特殊性を勘案して，特に，タンパク質性の有効成分あるいは宿主等に由来する抗原に対する抗体産生やアレルギーの発現など患者における免疫応答状況，産生した抗体との相互作用による薬物動態の変化及び有効性に対する影響，投与部位の局所反応，あるいは発熱性などについての詳細な検討が必要である．かってヒト型のタンパク質にはヒトに対して抗原性を持たないであろうとの期待が寄せられていたが，ヒト型といえども医薬品として投与したときには抗原性を賦与されているケースも多いので，この点に関する留意が必要である[70]．有効成分の物性，品質と密接に関連している可能性も高いのでそうした観点からの詳細な解析，考察が今後とも重要であると思われる．

3. 遺伝子治療用医薬品の品質，安全性等の確保[71)]

最近，人の疾病治療を目的とする革新的な医療技術として遺伝子治療が注目されている．この医療技術は，人為的に加工した遺伝子を人の体内に投与し，疾病の治療を図ろうとするものである．米国では，1998年までにガンで約150，エイズで20余，先天性遺伝子疾患で30余，血管，リューマチ病で約10の合計210余のプロトコールで約3000名の患者に遺伝子治療が実施されている．わが国では現在までに4つのプロトコールでの遺伝子治療臨床研究が実施されている．

遺伝子治療は，全く新たな医療実践であるところから，わが国では「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（平成6年2月告示）を基に，臨床研究が科学的妥当性及び倫理性を確保しながら適正に実施されるよう厚生科学審議会で審査するなど必要な施策を講じている．一方で，企業活動としてこのような治療用遺伝子開発及び製造が活発に行われ始めていることなどから，その円滑な推進，長期的な研究・技術開発の推進には，企業が遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性等に関し，臨床研究，治験などに先だって評価を受け，治療薬としての適切性の確認を得られる仕組みが必要とされ，そのための施策も講じられている．すなわち，「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針（平成7年11月薬務局長発）」により，企業が臨床研究用薬剤の適合性確認を求めようとする際にどのようなデータ，情報を提出すればよいかが提示されている．審査体制としては，中央薬事審議会バイオテクノロジー特別部会／遺伝子治療用医薬品調査会が遺伝子治療薬の製造法の妥当性や品質，安全性評価に関する審議を行っている．

遺伝子治療に用いられる薬剤は，①その品質，有効性及び安全性の確保，②体内への導入に際しての安全性の確保，③治療目的の達成，について十分な科学的知見に基づき予測，確認されたものでなければならない．この確認はその時点の科学的水準をもとに適切になされたものである必要がある．とくに，企業活動として治療用遺伝子の開発及び製造を行う場合には，これを従来にはないさまざまな特徴や留意点を有する一種の医薬品と考えた上で，医薬品としての一般性，普遍的広がりを視野におき，その適格性を示す必要がある．

遺伝子治療に用いられる製品について，未だ具体的事例や経験は乏しいものの，医薬品としての観点からどのような製造管理，特性・品質解析，有効性・安全性評価などがなされる必要があるかについて，薬務局長指針をふまえて概説する．

Table 4. 各種遺伝子導入法に共通して情報提供が求められる事項

- 当該遺伝子導入法を選択した理由及びその特徴
- 導入ＤＮＡ又はＲＮＡの作製方法，構造分析，性質
- 導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性
- その他のＤＮＡの作製方法，構造及び性質
- セルバンクシステム

3. 1 遺伝子治療用医薬品の製造方法の明確化とその妥当性の検証，一定性の維持

製造方法の詳細とその妥当性を明らかにすること，製法の一貫性を示すことは，遺伝子治療用医薬品の品質，安全性の確保，品質恒常性の維持にとって特に重要とされる事項の一つである．遺伝子治療用医薬品の製造方法に関しては，どのような遺伝子導入法を目指すのか，どのような投与方法によるのかによってアプローチや評価方法が異なるので，遺伝子導入法による区分と投与方法による区分にそれぞれ整理した．遺伝子導入法による区分ではさらに，1) ウイルスベクターを用いる場合，2) 非ウイルスベクターを用いる場合，3) ベクターを用いずに直接導入する場合に分け，必要な試験や情報，評価すべきデータについて例示した．Table 4 には遺伝子導入方法の如何を問わず，製造方法に関し，それぞれのケースで共通して資料提供が必要な主な項目を示した．

投与方法による区分では，(1) *ex vivo* 法の場合と (2) *in vivo* 法の場合に分ける．

3. 1. 1 ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合

ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合には，Table 4 の項目に加えて，「野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響」，「パッケージングに用いる細胞の培養方法，生物学的特徴及び人に対する影響」，「パッケージング細胞の培養方法，生物学的特徴及び人に対する影響」，「ウイルスベクター産生細胞の人に対する影響」，「ウイルスベクターの粒子構造上の特徴」，「ウイルスベクターの生物学的特徴」，「ウイルスベクターの製造方法」などに関するデータや情報の提供を必要とする．

このうち，「ウイルスベクターの生物学的特徴」として情報提供が求められている内容は，①ウイルスベクターにより，どのような細胞に遺伝子導入が行えるか，種特異性・組織特異性があるか，静止期の細胞への遺伝子導入は可能かなどについて明らかにすること，②遺伝子の導入効率及び導入遺伝子の発現効率について示すこと，③導入遺伝子の細胞内での存在様式，安定性について明らかにすること，染色体内に組み込まれる場合には，その位置が特定されて

いるか不特定かを明らかにすることなどである．また，「ウイルスベクターの製造方法」として求められている事項は，①人に導入されるDNA又はRNAの作製方法から始まりウイルスベクターの製造にいたる一連の製造過程を総括的に示すこと，②ウイルスベクターの精製法について示すこと，③実用化のためスケールアップ等の措置を講じた場合は，適切なバリデーションデータを示し，その内容を明らかにすること，④パッケージング細胞を使用する場合は，その作製手順，選択・同定方法及び種細胞株を確立するまでの単離純化方法，MCB及びWCBの調製・保存方法，管理法，更新法，特徴及びパッケージング細胞に挿入されたDNA又はRNAの安定性についても明らかにすること，⑤培養期間中を通じて，またロット間で細胞フェノタイプ等が変化していないことの確認試験方法及び試験結果を示すこと，⑥増殖性ウイルスを含めて品質管理に必要な安全試験の時期，方法及び結果を示すことなどである．

一方，共通して資料提供が必要な項目のうち「セルバンクシステム」の項は，遺伝子治療用医薬品の製造過程のいろいろな局面で細胞の使用が予測されることと関連している．使用が予測される細胞は，例えば，①ウイルスベクター（人に導入されるDNA又はRNA），目的遺伝子，ウイルスベクターを製造するために用いたプラスミド，その他のDNAの製造，ウイルスの製造などに使用する細胞，②パッケージングに用いる細胞，③パッケージング細胞及びウイルスベクター産生細胞などである．その際，セルバンクシステムを構築して，一定の品質の細胞，あるいは特定の細胞からある目的産物の供給を図り，利用することも多いと思われる．そのような場合には，セルバンクの調製方法，保存方法，管理方法，更新法等について，各物質の製造，各細胞毎に詳細に情報を提供する必要がある．パッケージングに用いる細胞やパッケージング細胞では凍結及び解凍手順，解凍後及び培養後の確認試験並びに凍結有効期間についても明らかにしておく必要がある．これらの概念や内容は，すでにバイオ医薬品の製造に際してセルバンクシステムを使う場合に述べられていることと基本的には同じである．その他，「導入DNA又はRNAの作製方法，構造分析，性質」，「導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性」，「その他のDNAの作製方法，構造及び性質」などについて，どの程度の，どのような内容の資料が必要であるかは，組換えDNA技術あるいは細胞培養技術由来の医薬品について，国内のガイドラインあるいはICH国際ガイドラインなどで求められている内容，程度に準ずると考えれば良いと思われる．

3．1．2 非ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合

非ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合に提供を必要とするデータや情報の主なものは，Table 4で挙げた共通項目に加えて，ウイルスベクターの場合とは異なりこのケースに特徴的だと思われる「非ウイルスベクターの製造方法」，「非ウイルスベクターの構造又は組成分析」，「非ウイルスベクターの生物学的特徴」などである．

非ウイルスベクターの製造方法で最も特徴的なのは，タンパク質，糖質，脂質等が構成成分になる可能性があることである．これらについては，すでに規制があるもの，例えば，バイオテクノロジー由来のタンパク質が構成成分の場合は，まずその構成成分について現行ルールでその品質や安全性の確保に対し求められているのと同様のデータが必要である．また，既存のルールがないものについても，基本的な考え方は既存のものを準用しながらケース・バイ・ケースでそれらの品質や安全性確保を図っていくことになると思われる．いずれにしても，ベクターを構成するすべての成分（例えばタンパク質，糖質，脂質等）それぞれについて，由来，調製法，精製法，品質等の詳細な情報提供が必要である．生物起原由来の材料を使用する場合には，ウイルスをはじめ，感染性微生物による汚染の可能性を否定するための試験，評価を行っておくことも不可欠である．これらの各構成成分の製法に関する試験，評価を前提として，最終的には非ウイルスベクターそのものの製造手順，精製法及び管理法についての資料を提出するということになる．

非ウイルスベクターの構造又は組成分析についても考え方は同じである．まず，①ベクターを構成する成分（例えばタンパク質，糖質，脂質等）それぞれについて，ベクター製造前後の構造又は組成を明らかにしておくこと，②各構成成分のロット更新を行う場合には，ロット間の恒常性を明らかにすること，例えば，組換えタンパク質やモノクローナル抗体が構成成分の一部である場合には，目的タンパク質生産用の種細胞株の樹立，セルバンクの調製方法，保存方法，管理方法，更新法，生産のための細胞培養方法，目的タンパク質の精製法，構造・組成解析，特性解析，規格及び試験方法並びに保存安定性などに関する資料の提出が必要である．また，こうした各構成成分での試験，評価，品質管理に加え，③ベクター全体としての構造又は組成分析が当然のことながらリンケージして求められている．

3．1．3 直接DNA又はRNAを導入する場合

直接DNA又はRNAを導入する場合に情報提供が必要な項目は，Table 4で挙げた共通項目に加えて，「遺伝子導入操作」や「当該導入法の生物学的特徴」などである．このケースの場合，遺伝子導入操作に導入法としての最大の特徴がある．したがって，実際の導入手順，使用する試薬，機器等について明確にする必要性がある．その他の各項目についての基本的な考え方は，すでに述べたことと同様である．

3．1．4　*Ex vivo* 法及び *in vivo* 法による投与を行う場合の留意事項

投与方法に言及している理由は，開発された遺伝子治療用医薬品を使用するにあたっての基本的なプロトコール，基準をあらかじめ開発者に設定，評価させ，この標準化された使用法を守ることを通して，医薬品としての品質，安全性の確保をより一層確実なものとするためである．

まず，*ex vivo* 法の場合，次の項目を中心に詳細な検討と評価が求められている．1）標的細胞の由来や特性，選択理由を明らかにすることによるその適格性，2）感染性微生物汚染の可能性，免疫適合性，健康状態などの面での評価を含めた細胞供与者の選択基準と適格性，3）細胞採取から始まり，遺伝子導入，導入遺伝子の安定性，培地，培養期間，微生物汚染対策も含めた細胞培養方法関連事項，4）微生物汚染の否定，試薬等の残留量測定などを含む遺伝子導入細胞の適格性試験，5）遺伝子導入細胞の患者への投与方法など．

in vivo 法の場合には，標的細胞の生物学的特徴，当該細胞を標的細胞として選択した理由，投与方法（遺伝子導入の方法，投与量，投与回数，間隔等），標的細胞以外（特に生殖細胞系列）への遺伝子導入の可能性に関する検討・考察などが重要なポイントである．

3．2　規格及び試験方法並びに製剤設計

遺伝子治療用医薬品の品質を確保し，その恒常性を図るためには，医薬品本体の特性や不純物の種類，存在量などについて十分な解析を行い，その特性・品質プロフィルを明確にした後，それらを適切に反映した規格及び試験方法を設定し，ロット間の製品管理をすることがなによりも重要である．また，細菌，迷入ウイルス，マイコプラズマ，真菌等による汚染の可能性について否定することも必須である．さらに，予測される混入物やウイルス混入の可能性に関するプロセスバリデーションを製造及び精製過程でどのように行ったのか，あるいは次項で述べる安定性試験の結果も品質確保，規格及び試験方法の設定上の重要な参考事項となる．なお，特別の製剤処方がある場合には，その合理的説明と必要に応じて製剤機能試験を設定することが必要である．

3．3　遺伝子治療用医薬品の安定性

安定性については，原体及び製剤について，流通使用期間を考慮し，適切な安定性試験を実施し，貯法及び有効期限を設定する必要がある．また，貯法以外又は有効期限を超える保存について，試験を実施し，安定性の限界を確認することや，各試験において用いたロットの数の妥当性を合理的に説明することなどが重要である．

3．4　遺伝子治療用医薬品の非臨床安全性試験

遺伝子治療用医薬品の非臨床安全性試験に関しては，製品の安全性について，適当な動物を用いた試験及び *in vitro* における試験を適切に実施することが必要である．この安全性試験は，人における製品の投与経路を反映している必要がある．安全性を確認するにあたっては，特に，1）増殖ウイルス出現の可能性，2）細胞又は組織に傷害を与える可能性，3）導入遺伝子が生体に及ぼす影響，4）発現産物の異常発現に起因する安全性，5）がん原性，6）免疫原性，7）試験実施が技術的に可能であれば一般毒性などに着目することが必要とされている．しかし，すべての項目について試験の実施を求めている訳ではない．ケース・バイ・ケースで対応し，かつ，合理的な説明がなされることが肝要である．

3．5　遺伝子治療用医薬品の効力を裏付ける試験，体内動態等

遺伝子治療用医薬品の効力を裏付ける試験としては，1）適切に設計された培養細胞及び実験動物を用いた試験により，遺伝子の導入効率，導入遺伝子の構造及び安定性，導入遺伝子からの目的産物の発現効率及びその持続性，発現産物の生物活性，細胞，組織及び個体への期待される効果等を検討すること，2）適当な疾病モデル動物がある場合には，それを用いて治療効果を検討すること，などが期待されている．

遺伝子治療用医薬品の体内動態に関しては，1）遺伝子治療用医薬品又は遺伝子導入細胞の実験動物での吸収，分布等の体内動態に関する試験等により，人における遺伝子導入細胞の生存期間等を推測し，目的とする効果が十分得られることを説明すること，2）特に，遺伝子治療用医薬品又は遺伝子導入細胞が特定の部位（組織等）に到達する必要がある場合には，その局在性を十分に説明すること，などが必要である．

3．6　非臨床試験結果等の総括及び遺伝子治療臨床試験

非臨床試験結果等の総括として，以上述べてきたような製造方法から体内動態までのデータを総括し，現在の知見で遺伝子治療用医薬品の安全性が適切に確保されており，品質，安全性及び予想される有効性の面から臨床試験を行うことの正当性を記載し，臨床試験の開始が十分な基礎データに裏付けられたものであることを示す必要がある．

なお，参考事項として，予定されている遺伝子治療臨床試験の概要に関し，次のような項目についての情報提供が必要である．1）適応症として選択した疾患に関して，現在得られている知見，2）すべての検査，治療内容等の臨床試験計画，3）どのような機序で治療効果が得られるのかを明

らかにすること．また，既存の治療法と比較して遺伝子治療を行うべき理由および妥当性，4）遺伝子治療臨床試験実施施設・体制の適正性，5）被験者の選択基準および除外基準，6）被験者の同意の取得方法，7）必要とする症例数および実施期間ならびにその根拠，8）細胞治療臨床試験の具体的な実施方法，9）患者（被験者）のフォローー観察予定，10）患者以外への遺伝子導入の可能性，11）患者の QOL を含む効果判定基準．

3．7 遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けての課題

遺伝子治療の実用化に向けての研究はその初期段階を経て，今後に向けての問題点が明らかになってきた．現行の遺伝子導入技術，中でも根幹をなすレトロウイルスベクター，アデノウイルスベクター，アデノ随伴ウイルスベクター，リポソームなどの遺伝子導入ベクター（遺伝子治療用医薬品）には，それぞれ機能面あるいは安全性面での一長一短があり，いずれをとってみても治療技術として普遍化できるだけの満足すべき結果が得られていない[72]．

これらのデータをふまえ，評価科学の観点から将来の遺伝子治療用医薬品に求められる機能と安全性要件を考察してみると，主なものとして以下のような事項が挙げられる．すなわち，①ヒトに対する非病原性，②低細胞毒性，③非抗原性，④導入遺伝子の数やサイズに関する許容性，⑤標的細胞特異性，⑥遺伝子導入効率，⑦安定性，⑧導入遺伝子の高発現や安定発現，発現調節，⑨遺伝子毒性の回避などの諸要件である．遺伝子導入ベクターにおけるこれらの要件の達成度が医薬品としての品質・安全性・有効性に関する評価に耐え，治療の成否を決める鍵になるということである．

これらの評価科学からみた課題は，とりもなおさず遺伝子治療の現状を切り拓き，将来の進展を図るための開発基盤研究の目標でもある．そしてそれぞれの要件の目標達成に向けての開発基盤研究が適正に進展するためには，さらに細部にわたる評価科学が必要になる．例えば，上記①〜⑨の大半の条件を充たすには，ウイルスベクターを限りなく非ウイルス化したもの[73]，あるいは，ウイルスベクターと非ウイルスベクターの長所を最大限活かし，かつ短所を最小限にしたいわばハイブリッド型ベクターの開発研究が必要である[74-75]．後者の場合，①から④の要件は，例えば，「安全で品質管理が容易な素材から大量に調製でき，封入できる物質の種類やサイズに関する許容性が非常に高く，また標的細胞との膜融合によりきわめて短時間で直接細胞質内に高効率で物質を導入することができ，細胞毒性も示さないという特徴を持つ膜融合リポソーム[75-78]」のようなものの開発研究を進めることで充たされる可能性があるが，所期の目的に叶うかどうかは適正に評価，検証する必要がある．次に，⑤の標的細胞特異性を付与しようとすれば，例えば，標的細胞表面に特異的に存在する受容体その他の分子を認識する分子をベクターに付与するか，導入遺伝子構成体に細胞特異的プロモータを装着する必要がある[72c]．また，⑥の遺伝子導入効率を高めるための方策としては，目的導入遺伝子に核移行シグナルを持たせるなどで核への遺伝子送達能を高めるか，T7 プロモータ／T7RNA ポリメラーゼ系などを利用して核移行を伴わず細胞質内で高効率で目的遺伝子を発現する方法[75,79]を開発する必要がある．さらに，⑦安定性，⑧導入遺伝子の高発現や安定発現，発現調節，⑨遺伝子毒性の回避などを図ろうとすれば，目的導入遺伝子が細胞核内の宿主染色体外で安定に存在することができるような要素（例えばウイルスが核内独立レプリコンとして存在しうるための要素やテロメアなど）及び細胞種特異的プロモータ並びに核移行に必要な要素を装備した遺伝子導入構成体として「ミニ人工染色体」の開発を目指すか[74-76]，あるいは宿主染色体の安全な特定位置（例えば第 19 染色体の長腕部）に選択的に目的遺伝子を挿入するなどの技術開発が必要である．

このようなそれぞれ新たな技術開発を行った場合，その妥当性を適正に評価する必要があることは言うまでもない．その際，これら先端的技術開発の渦中で自らも研究に従事するか，あるいは周辺領域に位置し，技術開発の成果が理解，把握できる状態にあって問題点を明らかにし，解決策を探っていく中ではじめて，より適切な評価や評価技術開発が可能になると考えられる．逆に，新たな技術開発をする場合に評価のポイントを常に念頭に置いて研究を行えば，効率的な開発が可能となる．安全性評価のポイントを念頭において，あるベクター開発の企画・設計の段階から安全性設計を十二分に盛り込んだものとすれば，安全性設計なしに開発を進めた場合と比較して，安全性評価において実体としても，時間や労力においても明らかに合理的に事を運ぶことが可能であろう．

このように，先端技術応用医薬品分野にあっては，評価科学研究の対象は，次々と新たに展開していく開発研究の成果に他ならない．逆に，技術開発研究は評価科学に動機づけられ，またそれを羅針盤としながら進めることになる．評価科学研究と技術開発研究は相互に触発・啓発し合い，あるいは補完的な役割を果たしながら進展していくことになるので，評価科学研究は，開発型研究と背中合わせの関係にあることが望ましい．その際，双方からみて，企画・設計段階から問題点を克服したものを創るという思想はきわめて重要であることを再度強調しておきたい．

4. 細胞治療用医薬品の品質及び安全性の確保

近年のバイオテクノロジーの発展によって，ヒトや動物の細胞を大量に培養増殖させることや，細胞に各種の加工を行うことにより，その細胞の性質や機能を改変することが可能になってきた．これらの細胞を患者に投与することによりガンや糖尿病の治療を行うことが試みられている．このようないわゆる細胞治療の試みは，従来は臨床現場において医師の裁量による治療研究として実施されてきたが，最近，米国を中心に，企業活動として治療用細胞の開発や製造が活発に行われ始めており，わが国においても同様の動きがみられるようになってきている．細胞治療用医薬品の製造管理や品質・安全性確保には従来の医薬品にはないさまざまな特徴や留意点があり，また，細胞の由来，製造方法，特性，用法などによる特徴や留意点のバリエーションも多岐にわたるが，少なくとも具体化が想定されるものについては，これらに対応し，どのような製造管理法，品質・有効性・安全性評価法，品質管理法が必要であるかがあらかじめ明らかにされていることが望まれる．筆者らは，評価科学の観点から，細胞治療用医薬品の品質，安全性確保に必要と考えられる主な事項について検討を行ってきたので[71)]，その概略を紹介する．ただし，最近，厚生省医薬安全局が細胞・組織利用医薬品・医療用具等の品質・安全性確保についての指針を作成するための作業を開始したので，近い将来にはより充実適正化された公的指針が提示され，活用できるものと期待される．

4. 1 細胞治療及び細胞治療用医薬品とは

本稿では，細胞治療及び細胞治療用医薬品について仮に次のように定義した．「細胞治療」とは，ヒト疾患の治療を目的として，自己（Autologus），同種（Allogenic）あるいは異種（Xenogenic）の細胞を，生体外（*ex vivo*）で選別し，加工（薬剤処理，生物学的特性の改変もしくは遺伝子工学的改変）し，あるいは増殖した後にヒトに投与する治療をいう．なお，骨髄移植，角膜移植あるいは腎臓移植，肝臓移植のようなすでに一般に組織移植や臓器移植として知られている治療技術，血液の成分輸血等，最小限の操作を加えた，あるいは選別を行った従来の骨髄移植は細胞治療には含まれない．

「細胞治療用医薬品」とは，「細胞治療」を目的として，自己，同種あるいは異種の細胞を，生体外で選別し，加工し，あるいは増殖した後にヒトに投与する医薬品をいう．

例えば，ヒトの骨髄，末梢血，胎盤または臍帯血中に含まれる全血球細胞への分化能を保持した増殖性細胞，これを純化した細胞群，またはこれを骨髄造血系の再構築を目的として加工したもの；抗ガン作用や抗ウイルス作用などを目的としたリンホカイン活性化キラー細胞（LAK）や腫瘍浸潤リンパ球（TIL），*ex vivo* で遺伝子導入した細胞；複雑な生体機能を発揮させるための肝細胞，筋肉細胞や心筋細胞，膵臓細胞，神経細胞；酵素，サイトカイン，凝固因子といった分子の供給源としての細胞などがヒト疾患の治療を目的として業として製造され，臨床研究，治験，臨床治療に使用される場合の製品が考えられる．

4. 2 製造方法の明確化とその妥当性の検証及び一定性の保持

細胞治療用医薬品の製造方法について，その詳細と妥当性を明らかにすること，製法の一定性を示すことは，品質，安全性の確保，品質恒常性の維持にとって特に重要とされる事項の一つである．以下には，製造方法の中でとくに情報やデータ提供が必要と思われる事項を示した．

4. 2. 1 原材料となる細胞

原材料となる細胞については，1）細胞の起源・由来，選択理由，2）細胞の特性と適格性，3）細胞の採取・保存・運搬，などについて明らかにしておく必要がある．

ヒト細胞の場合，特性解析には，表現型，機能解析，HLAタイピングによる解析などを含めることが必要である．また，細胞供与者の選択基準，適格性（病歴，健康状態，感染性微生物汚染チェック，免疫適合性など）を定め，その妥当性を明らかにしておく必要がある．原材料細胞のトレーサビリティの保証手段などに留意する必要がある．異種細胞やバンク化細胞を用いる場合は，その特性，適格性，管理方法，更新方法などを明らかにしておく必要がある．

細胞の採取に関しては，①作業者の適格性，②採取行為及び利用の倫理的妥当性，③インフォームドコンセント，プライバシー保護，④ドナーの安全性確保のための試験検査，対処法，⑤採取状況（採取環境，用具，採取方法の妥当性を含む），⑥採取した細胞の試験検査（採取収率，生存率，細胞特性解析，微生物試験等）などについて明らかにし，その妥当性を示す必要がある．また，治療用細胞の製造や治療の前に保存あるいは運搬する場合には，保存方法（保存条件，保存期間，取り違えを避けるための手順等）や運搬方法（運搬容器，運搬手順など）の妥当性を明らかにする必要がある．採取した細胞は，その一部を適当な保存方法を用いて治療用細胞の製造や治療の成果を判定するのに必要な期間保存することが必要である．さらに，細胞はドナーに関する試験検査，細胞の安全性に関する試験検査等の記録と照合可能なラベルが添付された用具に採取され，保存されるべきである．

細胞は生存率や表現型，遺伝形質及び特有の機能その他の特性・品質に影響を及ぼさない範囲で感染物質を不活化・除去する処理を行う必要がある．細胞の投与時まで培養液中で保存される細胞については，ウイルス及びマイコ

プラズマの検査を含む適切なスクリーニング及び病理組織学的検査により感染物質の存在を否定する必要がある．これらの方法は手順として文書化され，責任の所在を明らかにしておくことが必要である．

4．2．2 原材料となる遺伝子，ベクター，ウイルスなど

細胞に遺伝子を導入して目的細胞を得ようとする場合には，1）目的遺伝子の由来，入手方法，クローニング方法，セルバンク情報，2）目的遺伝子の構造，3）目的遺伝子産物の構造，生物活性，性質，4）ベクターの由来，性質，入手方法をはじめ，遺伝子導入構成体を作製するために必要な全ての原材料，性質，手順に関する情報，5）遺伝子導入構成体の構造や特性，6）ベクターや遺伝子導入構成体を作製するための細胞やウイルスのバンク化，バンク管理法に関する詳細な情報を示す必要がある．

4．2．3 細胞や遺伝子以外の原材料

細胞とともに最終製品の一部を構成する原材料がある場合には，その品質・安全性に関する知見及び当該原材料と細胞との相互作用等が細胞に及ぼす影響について明らかにする必要がある．

4．2．4 治療用細胞の製造工程

治療用細胞の製造に際してもその基本は言うまでもなく製造方法の明確化，妥当性の検証，一定性の保持を図ることにある．そのためには，1）細胞の分離，洗浄方法，2）細胞の加工（薬剤処理，生物学的特性の改変もしくは遺伝子工学的改変）方法，3）細胞の培養方法（培地の組成，培養条件，培養期間など），4）細胞の製剤化方法（製剤設計や製剤処方を含む）などの詳細及び各工程の諸条件を定めるに至った根拠を明らかにして，各工程の妥当性を検証する必要がある．臨床上の使用目的，用法や製剤設計の最適化等の理由により医療用具と治療用細胞とを組み合わせた場合には，その内容と根拠について明らかにすること．これらいずれかの過程で細胞をバンク化する場合は，その理由，細胞バンクの作製方法及び細胞バンクの特性解析，保存・維持・管理法，更新方法その他の各作業工程や試験に関する手順などについて詳細を明らかにし，妥当性を示す必要がある．また，5）製造施設及び設備の適格性，6）要員の適格性，7）製造工程で用いる培地成分，試薬・試液・器具等の適格性や品質保証，品質管理法についても詳細を明らかにして妥当性を示す必要がある．さらに治療用細胞の製造工程で，細胞の品質，安全性確保と製造の一定性をモニターするための工程内試験を設定する場合には，その規格及び試験方法内容と設定根拠及び妥当性を明らかにする必要がある．

これらのデータをもとに製造標準書／標準作業手順書を作成し，以降その一定性を維持する必要がある．製造のための細胞にはロット番号を付し，細胞ロット毎に全作業工程についての製造記録を作製する．その際，原材料並びに作業に用いられた器具，試薬，培地の構成成分，また，製品を入れる容器についても，必要事項を記録する．手順書等を改変する場合は，細胞の純度，回収率，細胞機能の保持，および安全性等を十分評価した上で実行する必要がある．さらに，培養ロット間での細胞のクロスコンタミネーションや取り違えを防ぐ工程管理法や品質管理法を整備し，実施すべきである．新規な装置を導入あるいは使用する場合には，治療用細胞製造用装置としての安全性，有用性と妥当性を明らかにする必要がある．

治療用細胞の製造工程は個々の細胞や治療目的などによって非常に多様であろうと予測される．しかし，あらゆる場合や局面において常に基本とすべきは，目的細胞の生存率や本質的な特徴（表現型，遺伝形質，機能特性，細胞活性等）が損なわれないことである．また，細菌，酵母，真菌，マイコプラズマ，迷入ウイルスはもとよりその他の汚染物質により汚染されないことである．製造工程の適切な段階における病原体や感染微生物の検査方法，汚染防止のための管理体制及び採用した不活化・除去方法並びに工程評価について明らかにする必要がある．

4．2．5 製造方法等の変更

細胞の採取から細胞治療用の最終製剤の製造にいたる過程で製造方法，作業手順，工程内管理試験などを変更した場合には，その内容の詳細を示し，適切なデータに基づいてその妥当性を明らかにする必要がある．

4．3 細胞の品質管理

細胞治療用医薬品の品質確保には，最終製品の規格及び試験方法を設定する他，投与ロット毎の原材料の品質管理，製造工程の妥当性の検証と一定性の維持，各工程の中間製品の品質管理を適正に行うことが必要である．最終製品（原体／製剤）の規格及び試験方法並びにその設定根拠を，原材料の品質管理，製造工程の妥当性の検証と一定性の維持，各工程の中間製品の品質管理のあり方を考慮に入れて示す必要がある．なお，ロットを構成しない個人単回使用を意図して調製された治療用細胞は，各治験の目的やプロトコールに適合する適切な品質基準，出荷基準により管理する．ロット毎の品質管理項目例としては，（1）回収率並びに生存率，（2）同一性の確認，（3）細胞由来の各種活性因子に関する考慮，（4）無菌試験（真菌，細菌，マイコプラズマ等），（5）エンドトキシン試験，（6）製造工程由来不純物試験，（7）細胞由来目的外生理活性物質試験，（8）細胞の純度試験，（9）効能試験，（10）輸送や凍結・解凍に伴う細胞

変化に関するチェック項目，(11) HBV，HCV，HIV 等のヒト由来病原体による感染の可能性に関する否定試験などが挙げられる．細胞の無菌性については，細胞を患者に注入する以前に試験により示すべきである．しかし，最終製品における無菌試験に関しては，その結果がレシピエントへの投与後にしか得られない場合も想定され，このような場合は，直近で得られているデータを参考とする．ただし，最終製品の無菌試験は必ず実施すること．また，投与後に無菌性が否定された場合の対処方法をあらかじめ設定しておく必要がある．一方，細胞凍結保存や細胞加工に伴う細胞培養の期間が長期に及ぶ場合においては，ある一定期間ごとに無菌試験を実施することが望ましい．また，無菌試験での微生物の培養はレシピエントに細胞を注入する直前に実施すべきである．数日以上維持された培養についてはマイコプラズマを検査することが望ましい．

4．4　安定性試験

製品となる細胞あるいは重要な中間体である細胞について，流通使用期間や使用形態を充分考慮して，例えば，細胞の生存率・力価等に基づく適切な安定性試験を実施し，貯法及び有効期限を設定することが必要である．また，標準的な製造期間を超える場合や標準的な保存期間を超える長期保存についても検討し，安定性の限界を確認することが望ましい．各試験において用いたロット数の妥当性を合理的に説明する必要がある．輸送や凍結・解凍等が必要な場合には，それらの操作が細胞の安定性や規格に影響を及ぼさないことを確認することが必要である．

4．5　細胞治療用医薬品の非臨床安全性試験

最終製品の安全性について，適切な動物を用いた試験及び *in vitro* での試験を代表的なロットで適切に実施する必要がある．適宜，文献的知見等より考察，説明してもよい．安全性試験は，ヒトにおける製品の投与経路を考慮して設定すべきである．例えば，次の項目について，安全性を確認又は考察することが望ましいと考えられる．①検出可能な微生物汚染の可能性（細菌，真菌，マイコプラズマ，HBV，HIV 等），②細胞の性質の変化の解析（表現型，染色体検査等），③細胞が産生する各種サイトカイン，成長因子等の生体内への影響，④正常な細胞または組織に影響を与える可能性，⑤望ましくない免疫反応が生じる可能性，⑥外来遺伝子を導入して治療用細胞を調製した場合は，増殖性ウイルス，導入遺伝子並びにその産物についての安全性評価，増殖性の変化，腫瘍形成及びがん化の可能性，⑦最終製品が大量に得られる場合の一般毒性試験．

4．6　細胞治療用医薬品の効力を裏付ける試験，体内動態等

実験動物や細胞等を用い適切に設計された試験により，治療用細胞の機能発現や作用持続性，医薬品として期待される効果等に関する裏付けデータを得る必要がある．遺伝子導入細胞にあっては，導入遺伝子からの目的産物の発現効率，発現の持続性，導入遺伝子の発現産物の生物活性，医薬品として期待される効果等を検討するべきである．適当な疾患モデル動物がある場合には，それを用いて治療効果を検討するのが望ましい．適宜，他の治療法との比較も行う．

製品を構成する細胞及び導入遺伝子の発現産物の実験動物での吸収，分布等の体内動態に関する試験等により，人における移植細胞の生存期間及び導入遺伝子の発現産物の持続期間を推測し，目的とする効果が得られることを説明する必要がある．特に，移植細胞が特定の部位（組織等）に到達して作用する場合には，その局在性を十分に説明するべきである．

4．7　非臨床試験等の内容の総括及び臨床試験

非臨床試験の内容を総括し，現在の時点で細胞治療用医薬品の安全性が確保されており，品質，安定性，安全性および予想される有効性の面から臨床試験を行うことの妥当性を示す必要がある．最終製品の病原体及び感染性物質による感染の危険性の否定に関しては特に留意すること．細胞治療用医薬品の臨床試験の実施に際して情報提供が必要と思われる項目は，基本的には遺伝子治療用医薬品の項（3．6項）で示したような項目と同様な趣旨のものである．

4．8　試料の保管，記録，市販後調査報告事項等

細胞治療については経験によらないと分からないことも多いと考えられるため，細胞ドナー（細胞の起源）の記録の保存，試料の保存および患者の追跡記録はその後の安全性評価にきわめて重要と考えられる．したがって細胞を臨床使用した場合には，倫理的，技術的に可能な範囲で細胞を採取したドナーの血清，血漿試料，治療に用いた細胞以外の細胞試料を保存すべきである．細菌，真菌，ウイルスによる汚染の発生の有無を必ず追跡し，感染が生じた場合はその原因を追及し，明らかにするよう努めることが重要である．

細胞治療用医薬品の製造業者又は輸入業者は，細胞治療に関する情報を収集し，自らが取り扱う細胞治療用医薬品の評価に影響を及ぼす知見を発見した場合には，速やかに規制当局に報告する必要がある．

5.　トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保

最近，欧米を中心にトランスジェニック技術を応用したヤギ，ウシ等の動物に製造させた製品が開発され，最も進んだものについては臨床試験が始まるなど，動物を医薬品工場として利用する技術が実用化段階に入ってきている．さらにはクローン動物の医薬品生産への利用の可能性も検討され始めている．こうした動向をうけて米国 FDA，EU（CPMP）では Tg 動物を利用して製造した医薬品の製造及び試験における留意事項をガイダンスとして示している．

このトランスジェニック技術を応用した動物による医薬品の製造は，従来のバイオ技術による医薬品の製造よりはるかに効率的であり，我が国においても近い将来，当該技術を利用した医薬品が臨床に供されることが予想される．このような状況に鑑み，筆者らは，今後，開発が進展すると思われるトランスジェニック（Tg）動物／クローン動物を応用した製品の製造技術の状況を把握し，医薬品製造の観点から，製造に利用される動物を作製，育成，維持する上での留意事項及び製品の品質，有効性，安全性を確保するために必要な試験方法や評価方法の検討を行うとともに，ガイドライン等を作成するための基礎的研究を行っているのでその概略を紹介する．

5.1　トランスジェニック動物を用いた医薬品開発の現状

Tg 動物とは，人為的に組換え DNA を導入され形質が変化した動物と仮に定義される．タイプとしては，胚系に DNA が導入され遺伝性が獲得された動物と生殖細胞以外の体細胞に遺伝子が導入され遺伝性は獲得されていない動物の 2 種類が考えられる．

医薬品生産への応用が検討されている Tg 動物由来製品としては，ヒトアンチトロンビンⅢ，ヒト型モノクローナル抗体（MAb）類（MAb-融合タンパク質，MAb-腫瘍マーカー，抗ルイス Y 抗原 MAb，抗ヒトトランスフェリンレセプターMAb，抗ヒトトランスフェリンレセプター1 本鎖 MAb），アルファー1 プロテナーゼインヒビター，アンギオテンシン，ベータインターフェロン，嚢（のう）胞性繊維症トランスメンブラン制御因子，血液凝固第Ⅸ及び第Ⅹ因子，グルタミン酸脱炭酸酵素，グルコセレブロシダーゼ，ヒト成長ホルモン，ヒト血清アルブミン，持続型組織プラスミノーゲン活性化因子，ミエリン塩基性タンパク，プロインスリン，プロラクチン，可溶性 CD4HIV レセプター，プロテイン C，ヒトフィブリノーゲン，サイトカイン受容体，医療用ペプチド，ヒトアルブミン等の発現が報告されている．このうちヒトアンチトロンビンⅢについては，米国では現在臨床第 2 相試験を終了したと伝えられている．

医薬品生産のための Tg 動物の作製とその利用法に関してはさまざまな戦略や技術があり得る．その中で，現在最も検討が進んでいる方法は，乳腺特異的に発現する乳タンパク質のプロモーター配列に目的遺伝子をコードする領域を連結させ，受精卵にマイクロインジェクションし，個体として誕生・成熟させた後，乳線に目的物質を発現させ，乳中に分泌させるというものである．この方法は，細胞培養系とくらべて目的物質の効率的生産が可能な系として注目されている．また，乳タンパク質の発現やタイミングを調節する要素（塩基配列）もよく解明されており，目的タンパク質が外分泌されるという点も含めて，挿入された外来遺伝子発現が動物の健康に及ぼすリスクも低いという利点もある．さらに，目的タンパク質がきわめて高濃度に発現し，しかも共存するタンパク質類等が明らかであるところから精製法に関する戦略も立てやすい．乳腺という天然のフィルターを通過して生産物が得られるという過程を経るので，生産動物由来のウイルス等微生物汚染の可能性が比較的低く，安全性に関する対策を立てやすいという利点も考えられる．乳汁は，いわゆるプリオンに関しても比較的安全性の高い医薬品出発物質であると考えられている．WHO も乳汁と精液はプリオンに関して非感染であろうとみなしている．

ここで生産しようとするタンパク質の多くは糖タンパク質であるが，生産動物として利用されようとしているのはヤギやウシであり，従来の細胞培養系による糖タンパク質生産に一般的に利用されているげっ歯類細胞に比べ，系統発生学的にヒトにより近い動物系であるところから，付加される糖鎖もヒト型に近くなるのではないかとの期待もある．

一方，マウスの自己抗体の発現をブロックしてヒトの抗体遺伝子を導入し，ヒト型抗体をつくらせるトランスジェニックマウスの開発も報告されている．

このように Tg 動物を利用したタンパク質生産系は，細胞培養系と比べて優れた特長を有するタンパク質性医薬品の新しい生産方法として，研究が盛んに行われているばかりでなく，欧米ではすでに医薬品としての承認申請もなされている．我が国においても Tg 動物を利用して生産される製品が医薬品候補として出現してくるのは時間の問題といえる．上記に述べたように，Tg 動物を利用したタンパク質性医薬品の生産には，多くの利点が期待されるものの，製造方法は従来にない全く新しいものであり，生産物の品質，安全性，有効性評価に関しても未知，未経験の要素があることは否めない．したがって，この新たな創薬技術による医薬品創製を推進する立場を基本としながらも，製品の医薬品としての品質，安全性，有効性を確保するためにどのような試験とデータが必要であり，どのような評価方法が適正であるかについて慎重に検討する必要がある．

5. 2 トランスジェニック動物を利用して生産されるタンパク質性医薬品の品質，安全性等確保に必要な諸要素及び評価にあたって考慮すべき要件

Tg動物を応用して製造した製品の医薬品としての品質，安全性等確保を図るためには，特徴ある製造方法の詳細を明確にし，その妥当性と恒常性の検証を行う必要がある．また，併せて製品における適切な試験を実施する必要がある．そこで，Tg動物由来医薬品の製造及び試験においてどのような事項が一般的に留意されるべきかについて検討した．また，その評価に際してポイントとなる事項について考察した．

5. 2. 1 遺伝子導入構成体の構築と特性解析

Tg動物を作出するために動物に導入された組換え遺伝子（遺伝子導入構成体）に関する情報は，最終目的物質の構造や特性が期待されたものであり，安全であることを立証するための最も基本になる情報として重要である．どのようなデータ，情報が必要かという点に関しては，従来の組換え医薬品や遺伝子治療用医薬品の場合に述べられている事項を参考に考慮することが適切であると考えられる．

5. 2. 2 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析

5. 2. 2. 1 Tg動物の作製に使われる動物

Tg動物の作製に用いられる動物に関しては，以下の点に留意すべきである．①動物は，系列系譜が証明され，閉鎖系で繁殖・飼育されたものを使用すべきである．②血清学的によく解明された動物で，その動物種およびヒトに感染する物質を可能な限り排除した閉鎖集団またはコロニーから入手したものを使用すべきである．③一定の管理された閉鎖系で飼育されてはいるが，自由に動きまわることが可能であり，節足動物や他の動物と接触する機会があるため偶発的に感染物質を取り込む可能性があるような環境下で飼育された動物は，代替動物が存在しないなど合理的な理由がない限り使用を避ける．こうした動物をやむなく使用する場合は，感染物質に関してより徹底したスクリーニングが必要である．④捕獲した野生動物は使用しない．⑤輸入動物や輸入後の第1世代の動物は，わが国では入手できない種又は系統の動物でない限り，使用しない．万一，使用の是非につき検討することがあるとしても，その特性が文書で明らかにされ，妥当性が検証され，かつ承認を得た場合に限る．⑥プリオンにより伝達される疾病（例えば伝達性海綿状脳症）が報告されている動物種を使用する際には，発症例がなく，飼料管理も適切である閉鎖集団から入手すること．同じ動物種でプリオンにより伝達される疾病が生じていることが報告されている国から輸入した動物の使用は避けるべきである．ちなみにウシについては動物個体はもとより，ウシ由来製品に至るまで輸入禁止である．⑦農場や市場から集められた動物は，他の動物と接触する機会も多く，一般に過去の健康状態に関する記録も整備されていないので使用は避けるべきである．

初代Tg動物の作製に使われる配偶子あるいは胚性幹細胞（ES細胞）を取り出す動物，および仮親となる動物の履歴については詳細に記述される必要があり，例えば種，系統，起源となる国，健康状態，その他血統に関する情報を記述する．種特有の疾病あるいは血液関連の疾病などに関する獣医学的検査結果も示すべきである．有害感染物質に関する管理については，5. 2. 5項を参照のこと．

5. 2. 2. 2 遺伝子の導入方法

組換えDNAを動物に導入する方法について詳細を明らかにする必要がある．

5. 2. 2. 3 Tg動物の確認

初代Tg動物及びその後の各世代のTg動物の確認法とその妥当性を示す必要がある．初代動物に導入された遺伝子の存在を試験する方法の感度も明確にする必要がある．外来遺伝子を取り込んでいるにもかかわらず，目的遺伝子発現産物を発現していない動物と，外来遺伝子を取り込んでいない動物との区別も明確にすべきである．初代動物が目的物質を生産していることを確認する方法の詳細を明らかにする必要がある．目的遺伝子産物の発現量については，季節変動，年齢差も含めて報告されるべきであろう．導入遺伝子が，予定された臓器で，適切なタイミングで発現しているか確認しておく必要がある．また，当該組織において，その他の機能が正常に働いていることも確認する必要がある．さらに，導入遺伝子産物が動物個体に悪影響を及ぼしたり，内在性物質の発現レベルに影響する恐れがあるので，注意する必要がある．

5. 2. 2. 4 目的物質の生産の安定性

目的物質の継続的な生産は，導入遺伝子の安定性，及び導入遺伝子の発現の安定性に依存しているので各安定性の確認方法，基準及びそれらの妥当性について明らかにしておく必要がある．

5. 2. 3 トランスジェニック動物系の保存，継続的維持・供給体制の確立

Tg動物による医薬品生産を継続的に可能にしてゆくためのシステムを確立する必要がある．そのための方法としては，細胞バンクの概念が役立つものと思われる．

5. 2. 4 生産用トランスジェニック動物の作製

生産用動物として用いるTg動物の作製法及び選別評価基準，生産用Tg動物個々についてのトレーサビリティの保証手段などについての詳細を明らかにする必要がある．

5．2．5 トランスジェニック動物の維持管理

Tg動物の繁殖・飼育法及び施設・環境，衛生状態のモニタリング方法，誕生から死亡までの記録（特に投薬や疾病記録），飼料成分及びその品質管理法，飼育期間中に与えた飼料の内容および摂取量，医薬品製造に各Tg動物を用いることを一時的，あるいは恒久的に止める詳細な基準などを明らかにしてそれらの妥当性を示す必要がある．

Tg動物の微生物学的統御は，医薬品生産動物の品質維持，個体維持のためにきわめて重要であるが，困難な課題でもある．まず，Tg動物作製用の動物の微生物学的品質は，現行の実験動物に適用されるSPF以上とする．また，微生物統御は動物作製，維持管理方法と密接に関連することから，動物施設自体が基準に適合したものが要求される．また，これらを管理するために実験動物医学認定医や有資格の実験動物技術者が必要である．一方，当該Tg動物種に感染する可能性のある病原体に関して可能な限り情報を収集し，対策を講ずることができるようにしておく必要がある．特に，新興の感染症や，宿主に感染後，発症まで長期間かかるレトロウイルスやウイルスの組換えの可能性については注意が必要である．人獣共通感染症の観点から，Tg動物に存在する異種親和性の内因性ウイルス，持続性ウイルスのヒトへの感染性や疾病との関連性について明らかにしておくことや，既知の人獣共通感染症原因微生物について注目しておくことは特に重要と考えられる．後者については，もとになる動物の適切な選択，清浄化とその後の厳格な微生物統御によって問題点を可能な限りクリアする方策がとられるべきである．Tg動物及び細胞，組織，臓器に対する既知感染物質のスクリーニングは，目的産物の回収法及び精製方法をも加味して適切に実施する．なお，スクリーニングに用いる検査法は特異性，感受性，有効性が示されているものでなければならない．また，当該分野の学問・科学技術の進歩や，感染疾患に関する知識の進歩にあわせて適宜更新されるべきである．

5．2．6 トランスジェニック動物から目的産物の採取

Tg動物から目的産物を採取する方法は様々ある．現状では乳中，血中あるいは尿中からの採取がほとんどであるが，摘出した組織からの抽出も考えられる．採取方法については一般的には，目的産物の力価や生物学的純度を保つことなど，品質や安全性に留意しながら無菌的に行う必要があるが，動物種や材料などによってそれぞれ注意すべき点は異なる．以下に留意事項を列記する．

1）用いる動物種によって，混入する可能性のある有害物質あるいは微生物は異なる．目的産物の採取および精製の段階におけるこれら汚染物質のモニタリングにおいては，それぞれの物質に応じた適切な測定法を選択する必要がある．

2）Tg動物を応用して医薬品を生産する場合，通常，乳汁，血液，尿へ分泌される目的産物を採取して用いる．これら製造材料への分泌量は変動しやすく，有害物質による汚染の程度も一定とはいえない．したがって，このようなばらつきがあっても安全かつ安定に製品が得られるような製法を選ぶ必要がある．目的産物を得るために動物から材料を採取するにあたって，個々の動物の適格性の判定は品種，系列系譜，ワクチン接種歴等を含む健康記録に基づいて行う．動物については使用前に隔離し，使用する個々の動物ごとに適切な血清学的検査，培養，血球数測定，末梢血スメアの検査，糞中の寄生虫検査等を行い，感染物質（細菌，寄生虫，ウイルス）の有無を検査することが必要である．特に動物に存在することが予想されるウイルスに着目した検討を行い，合理的理由がある場合を除きその存在を否定することが必要である．ヒト，及びヒト以外の霊長類に感染することが証明されているウイルス又はウイルス様物質の検査は慎重に行うべきである．また組換え，相補，擬型の可能性のあるウイルスには注意が必要である．ヒトに病原性を示す可能性のあるウイルスが存在する動物由来細胞・組織は原則として使用すべきではない．スクリーニング，適格性の判定は材料採取の直前に実施すべきであり，判定から時間が経った場合，検疫期間中や細胞，組織，臓器採取時に他の被検疫動物と接触した場合は再度スクリーニングを行うことが必要である．

5．2．7 トランスジェニック動物から目的産物の精製，製品化

目的物質の精製に関しては，2．4．3の第7項に記述したことが参考になる．

5．2．8 製品の構造，特性・品質解析

精製を終了したTg動物由来タンパク質製品の構造，特性・品質解析にあたっては，従来の組換え医薬品や細胞培養医薬品などにおけるアプローチや留意点（本稿2．6．3項及び2．7項）が参考になる．しかし，これらはあくまで一般的事項や例示であり，個々のTg動物由来製品の製造工程や個別製品の特徴を加味した科学的合理性に基づく試験の省略あるいは試験の追加がなされることがむしろ望ましいと考えられる．例えば，Tg動物由来糖タンパク質製品における糖鎖がいかなるものであるかは構造，特性面からみて重大な関心事である．従来の組換え医薬品や細胞培養医薬品のそれとは異なることが予測され，また糖鎖構造がヒトにより近いとの期待もあるからである．天然由来の物質あるいは遺伝子組換え細胞や培養細胞系等で製造した同一あるいは非常に類似した物質を入手できる場合には，それらとの比較も行うことが望まれる．

5. 2. 9　プロセス評価，工程内管理試験

Tg動物由来医薬品においても，他のバイオ医薬品と同様に（2. 8 項参照），プロセス評価や工程内での管理試験と規格のような上流の製造工程での品質管理と，原薬及び製剤レベルでの規格を合わせて考えるという，科学的にも，経済的にも合理的なアプローチの導入が図られるべきである．今後，関係者がこうした新たな考え方に柔軟に対応し，個々のケース毎に最も合理的で適切な具体策を講ずることが期待される．

有害因子や不純物については，2. 7項における記述が参考になる．

安全性確保の観点から最も大きな関心が払われるべきはウイルス汚染及びウイルスの不活化，除去に関するプロセス評価である．一般に Tg 動物由来製品におけるウイルス汚染の可能性を制御するには，1）生産用動物系，飼料，その他の試薬類をはじめとする製造関連物質の選択と試験，2）製造過程がどの程度ウイルス除去，不活化能力を有するかに関する評価（試験），3）製造工程の適当な段階における製品のウイルス否定試験の3つのアプローチを採用し，相互補完的に活用，実施する必要がある．迷入ウイルス否定試験を Tg 動物から目的物質を採取し，精製工程へ受け入れる段階で実施することはきわめて重要である．どのような頻度で，どの程度のウイルス試験を実施するかは，ケース・バイ・ケースであるが，いずれにしても製造者が各製造バッチ中の外来性ウイルスの存在の有無を継続的に評価するための計画を作成することが望ましい．また，目的物質の精製工程におけるウイルスクリアランス評価試験を適切に行う必要がある．さらに詳細については2. 5. 2項及び2. 5. 3項の記述が参考になる．

5. 2. 10　規格及び試験方法，安定性評価

Tg動物由来医薬品の規格及び試験方法は，他のバイオ医薬品同様，製造方法，特性解析・品質評価結果，製品の安定性，非臨床安全性試験や臨床試験，分析法，プロセス評価と工程内管理試験などの要素を考慮しながら設定すべきである．

安定性評価については，2. 12項の記述，及びICHガイドライン[65]が参考になる．

5. 2. 11　非臨床安全性等試験，臨床試験

組換え医薬品等に対するアプローチに準じて考えるが，人獣共通感染症が発生する可能性について絶えず高い関心を払い，適切なデータや情報の収集に努める必要がある．

6.　トランスジェニック動物由来細胞の品質・安全性等の確保

Tg動物由来の細胞・組織・臓器を治療に用いる異種移植（Xenotransplantation）については，臓器移植でしか治療できない患者の慢性的臓器不足を解決する有望な治療法として，またヒトからの臓器や細胞の移植が不可能な疾病に対する新たな治療法として欧米を中心に研究開発が進められており，Tg動物由来の細胞・臓器を生体応用を目的とした製品として供給するための幾つかの会社が設立されている．一方で，細胞を大量に培養，増殖させることや各種加工を行い細胞の性質や機能を改変することが可能となり，これらの細胞を患者に投与することにより治療を行ういわゆる細胞治療も，米国を中心に細胞の開発や製造が行われ始めている．Tg動物由来の細胞を治療に用いた例はまだ報告がないが，今後の開発の進展により，わが国においても将来，このような製品が臨床に供される事が予想される．しかし，その品質・安全性等の確保に関してはガイドラインはなく，個別企業に任されているなど必ずしも十分な対策がなされていないのが現状である．

本項では，今後開発が進展すると思われる Tg 動物由来細胞をそのまま，あるいは加工や増殖して，ヒト疾患の治療を目的とした製品として利用する場合の品質及び安全性確保を図るために必要な諸要素と，その評価方法について検討した結果の概略を述べる．なお，最近，厚生省医薬安全局が細胞・組織利用医薬品・医療用具等の品質・安全性確保についての指針を作成するための作業を開始したので，近い将来にはより充実適正化された公的指針が提示されるものと期待される．

6. 1　異種細胞治療・異種移植研究開発の現状と安全性等確保上の問題点

本項で論ずるのは，Tg動物由来の異種細胞を用いた細胞治療である．異種細胞のヒトへの投与は異種移植の一種とも考えられる．異種移植とは，ヒトに移植，又はインプラントされたり，*ex vivo* 灌流に用いられるヒト以外の動物由来の生存細胞・組織・臓器の使用に関わる全ての手法を対象とした用語である．Tg動物由来細胞を用いた治療の安全性確保については，免疫学的な面，生理学的な面，感染症の観点から考える必要がある．

6. 1. 1　異種細胞治療における免疫学的問題点

細胞・組織や臓器の移植では拒絶反応が一番の問題となる．特に，異種移植では，ヒトに存在する自然抗体と異種抗原との抗原抗体反応による補体活性化により血管内皮で超急性拒絶反応が引き起こされることが問題である．そこでトランスジェニック技術を応用して動物をヒト型に改変

することにより，異種移植の際の拒絶反応を抑制し，免疫適合性を確保して生着を延長させる研究が進められている．現在までに，(1) 超急性免疫拒絶反応を引き起こす補体系を制御する試みとして，ヒト補体制御因子（CD46（MCP），CD55（DAF），CD59（Protectin）など）の遺伝子を導入した Tg 動物，(2) ドナー臓器の抗原性を低下させる試みとして，異種移植抗原である Gal α1→3Gal を生成する糖転移酵素（α1, 3 Galactosyltransferase）の遺伝子を破壊したノックアウト動物，または Gal α1→3Gal を修飾する酵素（α1,2 Fucosyltransferase, α1,2 Sialyltransferase など）の遺伝子を導入した Tg 動物，などの開発が行われている．

異種移植に用いる動物としてはブタがヒトへの移植治療に用いる最も有力な候補として考えられている．DAF 遺伝子を導入した Tg ブタのヒト型心臓やヒト型腎臓，ヒト型肝臓において超急性拒絶反応が回避できる可能性がサルやヒヒのレベルで示されている．

Tg 動物由来の細胞を用いたヒトへの臨床試験は現在まだ行われていないが，Tg ブタのドパミン産生ニューロンのパーキンソンモデルラットへの移植で拒絶反応回避の可能性が示されている．異種細胞の移植としては，ブタ胎児神経細胞を用いたパーキンソン病治療の臨床第 1 相試験が既に開始されており，症状の改善が認められること，移植後 7 ヶ月でブタのニューロンとグリア細胞が患者脳内で生着，成長していることが確認され，有望な治療法となりうることが報告されている[80]．その他，難治性疼痛患者にカプセル化ウシ副腎細胞，糖尿病患者にカプセル化ブタランゲルハンス島細胞，肝不全患者にブタ肝臓細胞，AIDS 患者にヒヒの骨髄細胞などの移植治療が臨床試験されており，また脳腫瘍の臨床治療研究として自殺遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター産生マウス培養細胞の移植も報告されている[81]．動物実験レベルではクローン培養したウシの副腎皮質細胞を副腎摘出免疫不全マウスに移植すると，副腎機能が代行できることも報告されている[82]．今後，Tg 動物開発の進展にともなって，Tg 動物由来細胞を用いた治療も進展することが予想される．

しかし，Tg 動物由来の細胞・組織を用いた治療は，現在のところ未だ基礎研究段階にあり，十分な安全性に関する保証がなされていない．免疫拒絶反応については，遺伝子組換えにより超急性拒絶反応が回避されたとしても，それに引き続く拒絶反応として血管内皮細胞の活性化による Delayed xenograft rejection（DXR）が障壁として想定され，さらにその後には同種移植にも見られる T 細胞／MHC 系を介した細胞性拒絶反応を克服する必要がある[83]．DXR については内皮細胞活性化によるサイトカイン産生，炎症反応惹起に働く転写因子 Nuclear factor κB (NFκB) を阻害する IκB 遺伝子の導入や，アンチトロンビン III，トロンボモジュリンなど抗凝固因子遺伝子の導入，アポトーシス抑制のための遺伝子導入なども検討されているが，有効性，安全性に関してはこれからの研究を待たねばならない．細胞移植の場合には，臓器移植と比べて超急性拒絶反応を被る度合いは低いと考えられるが，細胞性免疫拒絶反応の克服は必要となる．

6．1．2 異種細胞治療における生理学的問題

同種細胞にない異種移植固有の問題点として，異種細胞がヒトの体内で細胞間のクロストークあるいは生体ネットワーク内での制御などに関して種特異性を超えて正常に機能するかどうかが挙げられる．正常に機能しなければ有効性の面からみても問題が生ずる可能性があるが，さらに宿主の正常な代謝や生理的機能を妨げたり，ネットワークによる制御を含む恒常性維持機構をかき乱すようなことがあれば，安全性の面から大きな問題となる．

6．1．3 異種細胞治療における感染症問題

遺伝子組換え動物由来細胞をヒトへの治療に用いる際の安全性確保において極めて重要な問題は，感染症の危険性をいかに回避するかである．異種細胞治療では異種細胞と体内で直接接触することになるため，ズーノシス感染物質として知られているものや動物に内在する正常な微生物叢あるいは共生生物のような微生物など，通常は感染しない動物の病原体がヒトに感染する危険性がある．さらに移植時には大部分の患者において免疫抑制剤を使用することにより通常の生理的及び免疫学的防御が抑制されているため，既知あるいは未知の感染物質が移植細胞を通して容易にヒトに感染する危険性が高まる．さらに感染物質の性質や危険性がさまざまであり，これらへの対応を一律にすることが難しい点も問題である．例えば，レトロウイルスやプリオンのようなある種の病原体は，宿主に侵入した後，長期間を経て始めて臨床的に識別可能な疾患を発病させる．また，現在の診断技術では組織試料中で容易に検出又は識別できない感染物質もある．ヒト由来の細胞，臓器の場合には，伝染する感染物質の種類は非常に良く特定されているが，異種由来の細胞によって伝染する可能性のある感染物質については未知の面が多い．動物ではごく軽度の症状のみを引き起こす感染物質であってもヒトに感染した場合に重篤な症状を引き起こしたり，死亡の原因となる可能性も考えられる．また異種動物からの感染は，特に自然宿主ではないヒトを通過することにより病原性が変化する恐れがある．レトロウイルスがヒトレトロウイルスと組換えを起こして新たに危険なレトロウイルスになる可能性もある．しかも，一度移植用細胞を通じて動物からヒトに水平感染が成立すると，その患者から他の一般の人々へ病気が広がり，HIV／AIDS，エボラウイルス，新型 CJD のようにヒトに新種の疫病を蔓延させる懸念も否定できない．

ズーノシス（人獣共通感染症）とは，動物との日常的な接触や動物の摂取によって動物からヒトに伝播する疾患である．既にズーノシスの原因となる多くの物質の特徴が明らかにされ，特定されている．しかし，典型的なズーノシスとして認識されていない異種間感染物質が，異種細胞からレシピエントへ，さらにレシピエントから他の人々に伝播する可能性は公衆衛生上大きな問題である．患者への異種細胞の移植，それに関連した解剖学的バリアの崩壊及び患者における免疫抑制状態は，ヒトと動物との通常の接触に比べて異種間感染物質をさらに容易に伝播させる可能性がある．したがって，異種動物の細胞を人間に移植するには感染症の可能性，公衆衛生上の危険性に対する安全性確保がきわめて慎重に行われる必要がある．

現在はブタがヒトへの移植治療の有望な候補と考えられ，遺伝子組換えブタが開発されている．しかし，ブタにおいては，1）既知の人獣感染症病原体のほか，最近，2）ヒトの細胞株に感染性を示すレトロウイルス類（ブタの腎臓細胞株 PK15から産生されるC型レトロウイルス）の存在[84]や，多くのブタ組織から新たに2種類の内在性プロウイルス（PVRV-A, PVRV-B）の同定[85]，3）新興感染症病原体（E型肝炎ウイルス，メナングルウイルス）[86]，4）導入遺伝子産物（CD55，CD46等）がウイルスレセプターとして働く可能性[87]，5）遺伝子導入によりウイルスの種の壁が取り除かれる可能性[84]，などが報告され，Tgブタの細胞等を移植に用いることによる感染症の新たな危険性も浮上してきている．

6. 2 異種細胞治療による感染症発生防止のため一般的に考慮すべき事項

既知ズーノシスや異種間感染物質による疾患が異種細胞治療を通して一般大衆においても発現する危険性を最小限にとどめるためには基本的には以下の項目が一般的に考慮すべき事項と考えられる[88]．

1）適切な専門技術を用い，十分なデータ管理，組織の保存及び監視過程が確立されるような異種細胞治療チームの構成及び機能．

2）異種細胞治療による感染に関する公衆衛生上の問題に関連した臨床試験プロトコール，試験施設及びインフォームドコンセント．

3）厳重に微生物管理できる動物飼育施設による動物の維持管理．

4）既知及び未知のズーノシス物質の種を超えた伝播の可能性を最少にとどめるための細胞移植前の動物のスクリーニング体制に関する規定．

5）予想されない，または過去に認知されていない感染物質が患者及び医療従事者に伝播する可能性を追跡調査するための異種細胞治療後の監視体制．

6）異種間感染物質の病院内伝播の危険性を少なくするための院内感染防止．

7）異種細胞治療により生じ，公衆衛生に影響を及ぼすと考えられる感染症について研究するためのドナー動物及び患者より得られた生物学的試料（血清，血漿，白血球及び組織を含む）の保管．

8）集中型データベース作成．公衆衛生に関する研究を行うために必要な長期にわたる安全性データの必要性．

6. 3 トランスジェニック動物由来細胞の品質・安全性等確保に必要な諸要素及び評価にあたって考慮すべき要件

Tg動物由来細胞治療用医薬品の品質・安全性等の確保にあたって，留意すべき主な事項及び評価に際してポイントとなる事項には次のようなものが挙げられる．(1) 遺伝子導入構成体の構築と特性解析，(2) 初代Tg動物の作出と特性解析，(3) Tg動物系の保存，継続的維持・供給体制の確立，(4) 細胞採取用Tg動物の作製，(5) Tg動物の維持管理，(6) 既知感染物質のスクリーニング，(7) 動物集団／コロニーの健康維持及び管理，(8) 個々のドナー動物のスクリーニング及び適格性の判定，(9) 移植用細胞の採取及びスクリーニング，(10) ドナー動物の医学的記録及び標本の保管，(11) 細胞の採取及び治療用細胞の製造，(12) 細胞の品質管理，(13) 前臨床試験，(14) 臨床試験，(15) 試料の保管及び記録．

なお，Tg動物由来の細胞を直接細胞治療に用いるのではなく，最終目的細胞を得るための原料にするという可能性もある．すなわち，①まずヒト型に改変することにより異種移植の際の拒絶反応を抑制し，免疫適合性を確保して生着を延長させるよう工夫した組換え動物由来の細胞を，②生体外（*ex vivo*）で選別し，加工（薬剤処理，生物学的特性の改変もしくは遺伝子工学的改変）し，あるいは増殖した後にヒト疾患の治療を目的としてヒトに投与することもありうる．ここで異種細胞に新たに遺伝子導入を図り，目的の細胞を得ようとする場合には，用いる「遺伝子導入構成体」について，その構築と特性解析に関する詳細なデータが提示される必要がある．

6. 3. 1 遺伝子導入構成体の構築と特性解析

Tg動物を作出するために動物に導入された組換え遺伝子（遺伝子導入構成体）や組換え動物由来の細胞をさらに形質転換するために細胞に導入された組換え遺伝子（遺伝子導入構成体）に関する情報は，最終製品である細胞の特性が期待されたものであり，安全であることを立証するための最も基本になる情報として重要である．この基本概念は，本稿で述べてきた遺伝子組換え技術を応用した医薬品の場合と同じである．

6. 3. 2 トランスジェニック動物の作出，特性解析，保存，継続的維持・供給体制の確立，細胞採取用 Tg 動物の作製

細胞の供給源である Tg 動物の作製に至るまでの主な項目には，1) Tg 動物の作製に用いられる動物，遺伝子の導入方法，初代 Tg 動物の作製，Tg 動物の特性解析，導入遺伝子の安定性及び導入遺伝子発現の安定性評価，2) Tg 動物系の保存，継続的維持・供給体制の確立，3) 細胞採取用 Tg 動物の作製，などが含まれる．これらに関して留意すべき主な点は，5. 2. 2～5. 2. 4 項に述べたことが基本になる．しかし，6. 1. 3 項や 6. 2 項でも述べたように，Tg 動物由来の細胞治療の安全性確保における最大の関心事の 1 つは，異種細胞移植による感染性物質からの危険性の回避であるところから，細胞採取用 Tg 動物の作製に至る過程においても，動物の微生物汚染を防止し，点検するための可能なあらゆる方策を講ずることが必要である．

一般に生物由来医薬品の微生物安全性確保策としては，①出発材料の吟味，②製品製造に関係するあらゆる過程や操作での微生物迷入の防止策と適切な微生物クリアランス過程の設置，③製品製造に関係する適切な段階での試験，検査などを相互補完的に組み合わせ，二重三重の安全策を講ずることが必要であると考えられる．Tg 動物由来細胞治療の場合は製品が細胞であることから，①細胞採取から最終製品に至る工程での微生物クリアランスにおいて，Tg 動物由来のタンパク質性医薬品の精製工程でのクリアランスほどの高い達成度は期待できない，②ヒトに投与する段階の治療用細胞でスクリーニングを広範囲に行い，安全性を保証しようとする方策には自ずと限界がある，と考えられる．従って，出発原料である動物の段階から，問題となるような感染物質に関する懸念を可能な限り取り除き，かつ予期せぬ汚染を未然に防止するために，厳密な方策を講ずることがきわめて重要である．考慮すべき要素には，①Tg 動物の作製に用いられる動物，飼料，導入遺伝子を含む各種試薬，器具などの微生物学的純度に関する品質の厳密な確保，②適正な動物飼育施設，設備及び専門家のもとでの厳密な動物の取り扱いと管理，③Tg 動物を外部へ輸送，移動することを含む外部環境との接触を極力排除することなどがある．以降の Tg 動物を取り扱う過程でも基本的な考え方は同じである．なお，Tg 動物から採取した細胞をバンク化し，その段階で徹底的にスクリーニングができるようなアプローチがとれれば，安全性の確保に関する信頼度はきわめて高くなる．細胞バンクの試験については，組換え医薬品等における細胞バンクの微生物試験実施要領（2. 4. 3 項の 4）及び 2. 5 項）や ICH 文書[36] が参考になる．

6. 3. 3 トランスジェニック動物の維持管理

動物の品質管理は飼育する動物施設や要員の適格性に決定的に依存する．したがって動物の飼育管理は，すべて所定の飼育管理基準を満たした認定施設において，実験動物医学専門医や実験動物技術師のような有資格者による施設運営と監督がなされる必要がある．Tg 動物の維持管理に関しては，5. 2. 5 項に記述された事項も併せて参考にする．

6. 3. 3. 1 施設

異種移植に用いる Tg 動物は感染物質への暴露の可能性が非常に少ない厳密に管理された施設で繁殖・飼育される必要がある．複数種の動物を一つの施設で飼育する場合は，他種の動物からの汚染の可能性に配慮しなければならない．また外部からの動物の侵入，あるいは Tg 動物が逃亡して繁殖することがないように細心の注意が必要である．少なくともこれらの施設は，遺伝子組換え動物の取り扱い及び使用に関する指針の認定基準を満たしている必要がある．動物施設には，定期的に動物集団の健康状態を証明し監視するシステムが構築されている必要がある．

6. 3. 3. 2 施設に関する標準作業手順

動物施設の標準作業手順には，以下の事項を詳細に記載する．

(1) 動物の受け入れ基準，(2) 疾病監視プログラム，(3) 罹患動物の隔離及び排除に関する基準，(4) 施設内立入者の健康診断及び健康調査に関する基準，(5) 施設内の清掃，(6) 飼料，水及び備品の入手先及び調達手順，(7) 節足動物及び他の動物の排除手段，(8) 動物の移送，(9) 死亡動物の処分．

動物，動物管理職員及び他の関係者の出入りを管理し，伝染性感染物質による環境汚染や不注意による暴露を最小にとどめる必要がある．

施設に関する標準作業手順には，閉鎖施設内の動物の移動に関する規定を設けなければならない．出産による場合を除いて，動物は全て明確に規定された検疫及び検査を経た後，使用目的に応じた動物コロニーに加える．動物を繁殖及び成育しようとする場合，人工受精，胚移植，医学的早期離乳（MEW），クローニングあるいは子宮切開/子宮摘出のような方法を用いたり人工哺育することによって，感染物質に対する安全性を高め，コロニー化を繰り返し行う必要性を最小限に抑えることができる．

6. 3. 3. 3 動物の施設内移動

個々のドナー動物の最終スクリーニングと適格性の判断を行い，また細胞採取中に感染物質が伝播する可能性を最小限にとどめるには，選択したドナー動物（一匹以上）を，当該作業中，閉鎖集団又はコロニーから隔離する方法を採り入れるとよい．この同一バッチの全動物に対する作業が完了し，動物を移動させた後，隔離場所及び細胞採取作業所を洗浄及び消毒してから次のバッチの動物を入室させるようにする．

6．3．3．4 飼料成分

医薬品やその他の添加物を含め，飼料成分については，少なくとも細胞提供動物の一世代前まで明らかにされ，記録文書が残されていなければならない．特に飼料中に再利用又は動物の脂肪を精製した物質が含まれていないことを明らかにしておく必要がある．このような物質が含まれないことは，顕在化が遅く，適切な検出方法がないプリオン関連疾患及びスローウイルス型感染，あるいはその他の感染物質による伝播を防止する方策として重要である．また飼料中に残留する農薬成分についてもモニタリングし，飼育期間中に与えた飼料の内容および摂取量を記録する必要がある．

6．3．3．5 ドナー動物健康記録システム

異種細胞治療に用いる動物を維持，供給する施設は，全ての動物，臓器，組織又は移植に用いる細胞の種類及び供給先の移植施設について明記したドナー動物記録システムを装備する必要がある．衛生状態のモニタリングは，動物の健康状態の維持のためばかりでなく，製品としての細胞を動物薬等による汚染から防ぐ意味でも重要である．したがって，Tg動物の飼育計画，動物および飼育施設の衛生状態をモニタリングする方法を詳細に述べる必要がある．細胞治療に用いられるすべての動物について，投与された動物薬やワクチンを含めて，誕生から死亡までの記録を行い，疾病記録はできる限り詳細に残す．施設はドナー動物の生涯にわたる健康記録，動物集団の健康調査記録及び動物入手施設の標準作業手順などの記録を保管する必要がある．これらの各種記録に含まれる情報を容易に，正確にかつ迅速に照合させるために，動物の背番号制その他の識別システムを活用するべきである．

6．3．3．6 動物が疾病等に罹ったときの処理

疾病にかかった動物は細胞治療用ドナー動物から外すべきである．バリアー動物施設で飼育できない動物の場合は，感染についてより詳細に試験を行う必要がある．

細胞治療に各Tg動物を用いることを一時的，あるいは恒久的に中止する詳細な基準を設ける必要がある．細胞採取用動物から外す理由としては病気，感染物質の発見等があげられる．もし病気が一時的なものであれば，細胞採取用動物から外して治療期間中に施された治療法とその結果を記す．

6．3．3．7 Tg動物施設が操業を停止する場合

Tg動物施設が操業を停止する場合は，全動物の健康記録及び標本を該当する臨床試験実施施設に移管するか，あるいは新しい保管場所を当該臨床施設に通知する必要がある．

6．3．4 既知感染物質のスクリーニング

動物集団，コロニー，Tg動物，細胞ドナーとなる動物及び細胞における既知感染物質の検出やスクリーニングをどのように実施するかは，それぞれの管理目的，動物の種や臨床適用に応じて異なる．個々のケースについて最も適切な試験の実施計画を立て，その科学的合理性について説明できることが必要である．試験結果及びその解釈や説明は，目的細胞を臨床に用いてもよいかどうかの適格性を判定する上のきわめて重要な要素となる．その他の一般的留意事項は5．2．5項及び5．2．6項に記述した．

その中での重要事項として挙げられているヒトに感染を引き起こす可能性がある異種親和性内在性レトロウイルス及び他の異種由来ウイルスの増殖及び検出を容易にするために，Tg動物由来の細胞試料は，ヒト末梢血単核細胞を含む適切な指標細胞のパネルを用いた共培養検定などにより試験する必要がある．共培養パネルにおける指標細胞は，細胞治療の臨床適用に応じて選択するべきである．例えば，ヒトの中枢神経系に関わる細胞治療では，神経親和性ウイルスを検出するためにヒトのニューロン細胞と共に治療用細胞試料を共培養する．感染物質の有無を明らかにするには，無作為継代培養を行い，細胞傷害性やフォーカス形成の観察，逆転写酵素試験，電子顕微鏡検査などを行うことが適切であると考えられる．培養によりウイルスまたはウイルス様物質の存在が示唆された場合は，さらに検討する．潜伏性ウイルスは化学的方法や照射法により誘発・活性化させることで検出が容易となる．予想される細菌の検出にはPCRを適用できる．

6．3．5 動物集団/コロニーの健康維持及び管理

動物集団又はコロニーが異種移植に用いる動物の供給源として適格であることを証明するための主要な条件は，(1) 閉鎖集団又はコロニーであること，(2) 感染物質に対する適切な監視プログラムがあることである．特定の使用に関連した動物集団又はコロニーの健康維持及び管理計画については，動物施設の標準作業手順に明記する必要がある．動物集団又はコロニー及び特定の個々のドナー動物に関する医学的記録は，動物施設で無期限に保管すべきである．

1) 動物施設においては，動物種に関する標準獣医学的管理（例えば寄生虫駆除対策）などをはじめ，動物集団又はコロニーの健康管理策を履行し，記録する必要がある．動物集団又はコロニーの健康に影響を及ぼすと考えられる事象はすべて記録する（例えば，安全施設の環境維持装置の故障，疾患の突発的発生，動物の突然死）．ワクチン接種及びスクリーニング計画についても詳細に記録する．ワクチンを使用した場合は記録し，安全性評価の際に考慮する必要がある．

2) 標準的な医学的管理に加えて，臨床所見的には必ずしも顕在化しない感染物質が動物集団/コロニーに侵入しないか監視する必要がある．感染物質検出のための身体的検

査及び臨床検査の種類及びスケジュールを含むこの管理プログラムについては標準作業手順に記載する必要がある．

(1)管理プログラムの一環として，無作為に選択した集団又はコロニーの代表動物から定期的に血清試料を採取する．これらの試料について当該動物種で問題となる感染物質や疫学的暴露について検査する．集団やコロニーあるいは個々のドナー動物，又は異種移植患者やその接触者において予想されない疾患が発症した場合の検査に備えて，血清試料を無期限に保管しなければならない．

(2)胎児死産や流産を含む死因が不明又は不確実な全動物について完全な剖検を実施し，感染原因を検討して記録する．

(3)動物を生涯にわたって監視し，検査するためのサブセット群を設ける旨を標準作業手順で規定することが望まれる．これらの動物を生涯にわたって監視することにより，プリオンによる疾患のような無症状の潜伏性又は遅発性疾患が検出できる機会が増えることになる．

6．3．6 個々のドナー動物のスクリーニング及び適格性の判定

個々のドナー動物の適格性の判定は，品種及び系列系譜，何らかの弱毒性生ワクチン使用に関する記録，ワクチン接種歴などを含む通常の健康記録に基づいて行う．急性感染を引き起こす病原体については，①個々のドナー動物の臨床検査及び治療，②当該病原体の培養期間を上回る適切な隔離期間を個別に設定すること，③ドナー動物が選抜される集団における感染の有無を明らかにするための集団監視，などによって制御することが可能である．検疫期間中，臨床適用において問題となる感染物質をドナー動物ごとにスクリーニングする．

1) 各ドナー動物を移植用細胞の採取前の一定期間（最低3週間）隔離する．動物集団又はコロニーから移される直前に感染した急性疾患はこの期間に臨床所見として顕在化すると考えられる．検疫期間中の検査等は，5．2．6項や6．3．4項に準ずる．

2) 臨床使用のために採取した細胞については，可能な限り感染物質の存在が否定されなければならない．潜伏性ウイルスを含む感染物質が検出された動物の使用は可能な限り避けなければならない．例えば消化管のような特定の解剖学的部位で感染性物質が検出された場合は，そのものが移植用細胞に存在しないことが証明された場合に限り，ドナー動物としての使用が認められる．

3)ドナー候補動物の選択並びに移植用細胞の採取前に，動物集団及び個々の動物の供給元，関連する飼育記録及び全てのワクチン接種の記録を含む生涯にわたる健康関連の記録について検討し，適格性を判定する．これらの記録はレトロスペクティブな研究のために無期限に保管されるべきである．移植用細胞にはドナー動物の個別記録のコピーを添付し，異種移植レシピエントの永久的医学記録の一部として保管しなければならない．

4)移植用細胞の採取後にドナー動物又は動物集団に感染性物質が検出された場合，動物施設側は臨床試験実施施設に通知する必要がある（例えば，監視動物でプリオンによる遅発性疾患が確認された場合）．

6．3．7 移植用細胞の採取及びスクリーニング

1) 移植用細胞の採取及び処理は，適切な施設で無菌条件下で実施する必要がある．

2)移植用細胞の完全性及び機能に影響を及ぼすことなく，病原体を不活化又は除去する手法を可能な限り採用すること．

3)移植時まで培養液中で保存されている移植用の細胞について，ウイルス及びマイコプラズマの検査を含む定期的な検査を行い，無菌状態が維持されていることを確認する必要がある．このための指針としては，ICH ガイドラインやわが国の関連文書を参照すること．

4)移植用細胞の採取及びスクリーニング過程における品質管理の再現性を保証するために，患者において移植が行われるまでの移植用細胞の採取に関わる全ての手順を明確にし，その一定性を維持するよう文書化すること．この間生じた事象について詳細に記録し報告すること．

5)移植用細胞の採取のために動物を安楽死させる場合は，肉眼的検査，病理組織学的検査及び微生物学的検査を含む完全な剖検を実施すること．ドナー動物を安楽死させずに移植用細胞を採取する場合は，生涯にわたり健康状態を監視すること．これらの動物が死亡又は安楽死した場合，移植用細胞の採取から死亡に至るまでの時間の経過にかかわらず完全な剖検を行うこと．これら剖検結果の記録は無期限に保管する．剖検所見により，異種移植レシピエントの健康に影響を及ぼす感染が示唆された場合（例えばプリオンによる疾患の確認），ドナー動物の細胞が提供された全ての臨床試験実施施設にその旨報告すること．

6．3．8 ドナー動物の医学的記録及び標本の保管

異種移植レシピエントと個々のドナー動物の記録及び生物学的標本を速やかに正確に照合させることができるように，ドナー動物の生物学的試料及び記録を系統的に保管することは，公衆衛生上の検討及び異種間感染を防ぐために重要である．

1)組織及び記録の保管管理及びその取り扱いに関する責任について，研究及び臨床プロトコールに明確に規定すること．

2) ドナー動物の集団又はコロニーの健康記録，個々のドナー動物の健康記録及び移植用細胞のスクリーニングに関

する記録は，無期限に保管しなければならない．ドナー動物の個別の健康記録及び移植用細胞のスクリーニング及び適格性の判定に関する記録の要約は，異種移植レシピエントの医学的記録の一部として臨床試験実施施設でファイリングし，保管すること．

3）レトロスペクティブな公衆衛生上の検討のために，移植用細胞の採取時にドナー動物の生物学的標本を保管し，公衆衛生に資するようにすること．公衆衛生上の必要が生じた場合にレトロスペクティブな分析が行えるように全ての標本を無期限に保管する．ドナー動物の生物学的標本は，取り扱い並びにドナー動物とレシピエントの健康記録の照合が容易にできるように保管すること．

4）可能な限り，各ドナー動物の血清及び血漿試料を0.5ml ずつ 5 検体以上保管することが望まれる．検査可能な量（1x10^7個）の白血球を 3 検体以上低温保存する．できれば白血球より DNA 及び RNA を抽出して分割保存すること．仮に移植用細胞を採取する際にドナー動物を安楽死させたような場合には，その主要臓器（例えば，脾臓，肝臓，骨髄，中枢神経系）より代表的な組織を採取し，パラフィン包埋，ホルマリン固定及び低温保存すること．

6．4 治療用細胞の製造方法の明確化とその妥当性の検証及び一定性の維持

異種細胞移植のための治療用細胞の製造方法の明確化とその妥当性の検証及び一定性の維持については，4．2項で述べた趣旨にしたがって実施する必要がある．具体的には，1）原材料となる細胞の由来，特性，適格性，2）細胞の採取・保存・運搬，3）原材料となる遺伝子，ベクターなど，4）細胞以外の原材料，5）細胞のバンク化や製剤設計を含む治療用細胞の製造工程，6）製造施設，設備及び器材の適格性，7）要員の適格性，8）培地液成分及び資材・試薬の適格性と品質管理，などについて詳細を明らかにし，妥当性を示す必要がある．特に Tg 動物種に存在が予想されるウイルスに着目した検討を行い，合理的理由がある場合を除き，その存在を否定すべきである．医療用具と治療用細胞とを組み合わせた場合には，その内容と根拠について明らかにしておく．製造方法等の変更にあたっては，その内容の詳細を示し，適切なデータに基づいてその妥当性を明らかにする必要がある．

6．5 細胞の品質管理及び安定性試験

Tg 動物由来細胞治療用医薬品の品質を確保するための品質管理や安定性試験のあり方に関する一般的留意事項については，4．3項及び4．4項の記述を参考にすること．

6．6 その他

異種細胞治療用医薬品の非臨床安全性試験，効力を裏付ける試験，体内動態に関する試験，臨床試験，試料の保管と記録等については 4．5 項～4．8 項を参照すること．なお，異種 Tg 動物細胞を用いた細胞治療は，未経験であることに加えて未知の要素もきわめて多いので慎重の上にも慎重なアプローチをとる必要がある．中でも，動物からヒトへの有害因子の感染の危険性に対する安全性確保策については特に留意する必要がある．

おわりに

最近15年間で数多くのバイオ医薬品（組換え医薬品，細胞培養医薬品）が誕生した背景にあるのは，単に有用物質の生産にかかわる革新的技術が発展したということのみではない．創薬のもう一つの必須要素である評価科学の進展があったことを改めて認識する必要がある．バイオ医薬品の製造方法，特性解析，品質及び有効性，安全性に係わる評価をいかに客観的，合理的かつ科学的に行うかという概念や方法論，具体的技術などが生産技術としてのバイオテクノロジーの応用と期を一にして発展することで画期的な新規医薬品が臨床の場に提供されることとなったのである．医薬品に関する評価科学は，新たに開発された製品の評価を適正にして，安全で優良な医薬品を待つ医療現場の期待に応えるという役割を果たす．それにとどまらず，開発途上の医薬品がいかに試験・評価されるべきかの指針を示す役割や，将来の開発研究を合理的にかつ効率的に進める上で必要不可欠な役割を果たす．評価科学の成果の典型的な結晶は，ガイドラインである．その国際的な集大成はICHガイドラインである．注目すべきは，組換え医薬品や細胞培養医薬品に関係するICHガイドラインの基本部分及び新しく創り出された評価の概念や方法論のかなりな部分はわが国からのデータ，提案や発想によるということである．これはバイオ医薬品開発の草創期から，産・学の協力のもとで研究，蓄積してきたわが国の評価科学の成果の賜物である．バイオ医薬品の品質・安全性確保に関する問題を国際性との関係で捉える必要性はますます高まっている．それぞれの国や地域がもつ優れた科学や考え方が国際社会に集められ，その中で活用され，あるいは新たな創造を生み，整合される方向が明確に目指されている．ここで，いかに国際社会との整合性を高め，必要な国際貢献をし得るかは，優れた科学性と，そして国際社会との交流の継続性に負うところが大きいと思われる．優良な医薬品は人類共通の資産といえるので，わが国の評価科学の成果が国際社会に敬意を持って受け入れられ，新医薬品開発のために活用されている状況は，最も平和的で意義ある国際貢献の一翼をわが国が担っていることを意味する．今後も，このような状態が継続，発展していくことを願っている．

ところで，バイオテクノロジーによる医薬品開発は今再

び新たなステージに入ろうとしている．新たなテクノロジーは新たな評価科学を必要とする．遺伝子治療用医薬品，細胞治療用医薬品，動物工場由来タンパク質性医薬品や細胞治療用医薬品に関する評価科学のあり方として，まずは，従来，組換え医薬品や細胞培養医薬品で蓄積されてきた知識や経験を基盤にして多面的，重層的に構築していくアプローチが考えられる．本稿では随所でこのことを示唆した．しかし，新たなコンセプトやアプローチを創出し，今後の発展を期すべきところも多い．これらの次世代バイオ医薬品については，その開発自体が試行錯誤的で途上にあり，先端技術の粋を尽くしたさまざまな展開を見せようとしている．こうした分野の評価科学が目指す方向の一つは，具体的課題を前にして，日進月歩の科学的成果を迅速にキャッチし，洞察力と判断力を駆使して，その時点で最も科学的に適切な試験並びに評価を行うことである．さらにその際蓄積されたさまざまなデータや経験から新たな地平を切り拓くよう努めることである．もう一つの方向は，先端的研究の渦中に身を置き，当該分野の進歩を視野に収めながら，品質，安全性上の未解決問題を見出し，評価科学の側からブレークスルーポイントを指し示すことである．出来上がった製品について品質・安全性等の適正な評価をすることは評価科学の重要な使命である．しかし，将来に向けての品質・安全性確保の要諦は，医薬品創製の戦略や企画を立てる際，安全性思想や設計を可能な限り盛り込んだシナリオとするところにより重きをおくことにあると思われる．その際，開発メーカー，学界，行政関係者を問わず，国や地域を問わず，各方面，各分野の専門家からの積極的な問題提起やコメントが出され，建設的な論議が重ねられていく中で，より合理的な品質・安全性確保のためのシナリオが描かれ，適切な試験法や評価法が確立されていくことが期待される．各関係者間の建設的なコミュニケーションこそが，こうした新しい分野を発展させていく決定的な要因とも推進力ともなると思われる．

個々の製品についての試験の実施や評価に関しては，本稿で述べてきたような事項が参考となる場合が多ければ幸いである．しかし，最終的には個々の特性，臨床適用法などに応じ，かつ医薬品の品質及び安全性の確保という目的をふまえ，その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき，柔軟に対応していくことがより重要であろうと思われる．バイオ医薬品のような急速に進展する分野にあっては，事例から学びつつも，その評価の科学的根拠の合理性を絶えず洗い直すという柔軟な姿勢が，開発メーカー側にも行政側にも特に求められていると思われる．そのようなアプローチや事例の蓄積の中から，さらに目的に叶ったコンセプトやデータも生まれ，また，新たな評価技術の開発もなされて，この分野の進展が図られるのではないかと期待している．

参考文献

1) a) Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heynecker, H.L., Bolivar, F. and Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056-1063 (1977) ; b) "Insulins, Growth Hormone, and Recombinant DNA Technology", eds. by Gueriguian, J.L., Miller, H.L., Schaffenburug, C., Gregoire, A.T. and Sobel, S., Raven Press, New York, (1982) ; c) 早川堯夫，川村次良：医薬品研究，**14**, 171-191(1983) ; d)日本薬学会編 "薬とバイオテクノロジー", ファルマシアレビュー No.15, 日本薬学会，東京 (1984):宮田篤郎，水野健作，松尾壽之，同誌，pp.37-51 ; e) 野本明男，同誌，pp.69-76 ; f) 中里紘，田中正治，東 直樹，同誌，pp.77-87 ; g) 丸山博巳，同誌，pp.135-145 ; h) 川村次良，早川堯夫，同誌，pp.147-153 (1984)

2) a) 早川堯夫：月刊薬事，**34**, 23-29 (1992) ; b) 早川堯夫：総合臨床，**42**, 3198-3203 (1993)

3) 早川堯夫：薬局，**48**, 105-112 (1997)

4) a) World Health Organization(WHO): Quality Control of Biologicals Produced by Recombinant DNA Techniques. Bull. WHO 61:897 (1983); Bangham, D.R. & Bristow, A.F. Discussion paper on Standardization and Control of Biological Hormones Made by Recombinant DNA Methods, WHO/BS/82.1371 (1982); b) WHO Report: Interferon Therapy: Report of a WHO Scientific Group, WHO Technical Report Series No.676 (1982); WHO: Proposed Requirements for the Production of Human Interferon Preparations from Lymphoblastoid Cells (Requirements for Biological Substances No.42), WHO/BS/87.1546 (1987); c) WHO: Proposed Requirements for the Hepatitis B Vaccines Made by Recombinant DNA techniques (Requirements for Biological Substances No.39), WHO/BS/85.1478 (1985); d) WHO Report: WHO Expert Committee on Biological Standardization, 36th report. WHO Technical Report Series No.745, Annex 3, Requirements for Continuous Cell Lines Used for Biological Production (Requirements for Biological Substances No.37) pp.93-107 (1987)

5) WHO Report: WHO Study Group on Biologicals. Acceptability of Cell Substrates for Production of Biologicals. WHO Technical Report Series No.747 (1987)

6) a) Esber, E.C.: "Therapeutic Peptides and Proteins: Assessing the New Technology", Banbury Report Vol.29, eds. by Marshak, D.R. and Liu, D.T., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.265-274 (1988); b) Liu, D.T.: *ibid.*, pp.317-330 (1988); c) Office of Biologics Research and Review, Center for Drugs and Biologics, FDA; Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced By Recombinant DNA Technology. April 10 (1985); d) Idem.,: Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Production for Human Use. June 1 (1987); e) Idem.,: Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals. November 18 (1987)

7) a) Sauer, F. and Hankin, R.: *J. Clin. Pharmacol.*, **27**, 639-646 (1987); b) Commission of the European Communities: Notes to Applicants for Marketing Authorizations on the Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology. Rev. 8(Final), June 1987: III/860/87-EN (1987); c) Idem.,: Notes to

Applicants for Marketing Authorizations on the Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies of Murine Origin Intended for Use in Man. Rev. 7(Final), June 1987: III/859/87-EN (1987); d) Idem.,: Notes to Applicants for Marketing Authorizations on the Pre-clinical Biological Safety Testing of Medicinal Products Derived from Biotechnology (and Comparable Products Derived from Chemical Synthesis). Rev. 3, April 1987: III/407/87-EN (1987)
8) 野島庄七，川村次良，小池克郎，清水直容，寺尾允男，名取俊二，山崎修道，早川堯夫：医薬品研究，**15**，492-496 (1984)
9) 厚生省薬務局審査課長，生物製剤課長：（昭和 59 年 3 月 30 日）薬審第 243 号通知「組換え DNA 技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」，(1984)
10) a) 平山一男：組換え DNA 技術を応用して製造される医薬品に関する添付資料の説明会（昭和 59 年 8 月，大阪）記録，日本製薬団体連合会編，pp.3-9 (1984)；b) 早川堯夫：同誌，pp.10-36 (1984)；c)早川堯夫：臨床医，**11**，735-737 (1985)；d) 早川堯夫：「組換え DNA 技術医薬品の製造承認について」，医薬品先端技術振興協会研修会講演録，昭和 61 年度 HS レポート No.2，（財）ヒューマンサイエンス振興財団編，(1986)
11) a) 早川堯夫：PHARM TECH JAPAN，**2**，685-691 (1986)；b) *ibid*., **2**, 799-804 (1986)；c) *ibid*., 2, 1211-1217 (1986)；d) *ibid*., **3**, 127-137 (1987)
12) a) Hayakawa, T.: "Preclinical Safety of Biotechnology Products Intended for Human Use", Progress in Clinical and Biological Research. Vol. **235**, ed. by Graham, C.E., Alan. R. Liss Inc., New York, pp.15-29 (1987); b) Hayakawa, T.: "Therapeutic Peptides and Proteins: Assessing the New Technology", Banbury Report Vol.**29**, eds. by Marshak, D.R. and Liu, D.T., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.309-316 (1988)
13) Hayakawa, T.: "Biotechnologically Derived Medical Agents: The Scientific Basis of their Regulation", eds. by Gueriguian, J.L., Fattorusso, V. and Poggiolini, D., Raven Press, New York, pp.152-156 (1988)
14) a) 早川堯夫：ホルモンと臨床，**34**，483-488 (1986)；b) 新薬承認審査質疑応答集 1987 年度版：厚生省薬務局審査第一課監修，薬業時報社，東京，pp.75-131 (1987)；c) 早川堯夫：化学と薬学の教室，バイオテクノロジー特集号，pp.65-71 (1988)；野口　浩：同特集号，pp.93-100 (1988)
15) 早川堯夫：Clinical Neuroscience，**6**，1049 (1988)
16) 早川堯夫："遺伝子工学と医薬品開発（医薬品の開発 **6**）"，池原森男編，広川書店，東京，pp.223-262 (1989)
17) 厚生省薬務局審査第一課長，審査第二課長，生物製剤課長：（昭和 63 年 6 月 6 日）薬審 1 第 10 号課長通知「細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」，(1988)
18) 山崎修道：PHARM TECH JAPAN，**2**，875-881 (1986)
19) 早川堯夫：トキシコロジーフォーラム，**11**，9-19 (1988)
20) a) 小池克郎：PHARM TECH JAPAN，**3**，795-797 (1987)；b) 小池克郎：トキシコロジーフォーラム，**11**，27-31 (1988)
21) a) 松橋　直：トキシコロジーフォーラム，**11**，20-26 (1988)；b) 山田正篤：同誌，**11**，32-40 (1988)
22) 早川堯夫：医薬品研究，**23**，137-148 (1992)
23) 早川堯夫：医薬品研究，**23**，519-532 (1992)
24) " Preclinical Safety of Biotechnology Products Intended for Human Use： Progress in Clinical and Biological Research Vol. 235", ed. by Graham, C.E., Alan. R. Liss Inc., New York, (1987)
25) a) "Therapeutic Peptides and Proteins: Assessing the New Technology: Banbury Report Vol.29", eds. by Marshak, D.R. and Liu, D.T., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1988); b) "Biotechnologically Derived Medical Agents: The Scientific Basis of Their Regulation", eds. by Gueriguian, J.L., Fattorusso, V. and Poggiolini, D., Raven Press, New York, (1988); c) "Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Deliverly, and Targeting: Current Communications in Molecular Biology", eds. by Marshak, D.R. and Liu, D.T. in 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)
26) a) 早川堯夫：PHARM TECH JAPAN，**3**，553-559 (1987)；b) *ibid*., **4**, 367-374 (1988)；c) *ibid*., **4**, 523-530 (1988)；d) *ibid*., **4**, 789-794(1988)；e) *ibid*., **4**, 943-946 (1988)；f) *ibid*., **4**, 1205-1210 (1988)；g) Hayakawa, T.: "Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Delivery, and Targeting", eds. by Marshak, D. and Liu, D.T., Current Communication in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.195-200 (1989); h) 早川堯夫：医薬品研究，**20**，580-583 (1989)
27) a) Hayakawa, T.: "The First International Conference on Harmonisation Brussels 1991", eds. by Darcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.295-301 (1992); b) 早川堯夫："第 1 回 ICH，21 世紀への扉"，厚生省薬務局新医薬品課監修，薬業時報，東京，58-66 (1991); c) 林　裕造，早川堯夫，大野泰雄，五十嵐俊一，高山　敏：月刊薬事，**34**，395-398 (1992)
28) a) Hayakawa, T.: "The Fourth International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Brussels 1997,", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.153-156 (1998); b) 早川堯夫：ファルマシア，**34**，992-994 (1998); c) Hayakawa, T.: "Current Opinion in Biotechnology 1999", Vol.10, ed. by Omenn, G., Current Biology Publications, Elsevier Science Ltd., London, UK, pp.307-311(1999); d) Hayakawa, T.: "Animal Cell Technology: Challenges for the 21st Century", eds. by Ikura, K., Nagao, M., Masuda, S. and Sasaki, R., Kluwer Academic Publishers, pp.215-219(1999)
29) 早川堯夫：臨床薬理，**20**，347-352(1989)
30) Hayakawa, T.: "Scientific and Regulators Aspects of Drug Biotechnology", eds. by Chiu, Y.Y. and Gueriguian, J.L., Marcel Dekker Inc., New York, pp.468-498 (1990)
31) Hayakawa, T.: *Pharmeuropa*, *Special Edition* (Proceedings of the conference and workshops), pp.65-72 (1993)
32) Hayakawa, T.: *Dev. Biol. Stand.*, **91**, 15-23 (1997)
33) a) Hayakawa, T.: "The Second International Conference on Harmonisation, Orlando 1993", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.150-157(1994); b) Hayakawa, T.: "The Third International Conference on Harmonisation, Yokohama 1995", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.167-174 (1996)

34) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin", (1997)
35) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of R-DNA Derived Protein Products", (1995)
36) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products", (1997)
37) 早川堯夫："バイオ医薬品および産生細胞の品質・安全性評価法", 小林茂保, 早川堯夫, 山崎修道編, エル・アイ・シー，東京，pp.385-407 (1992)
38) 早川堯夫："ICH-3 横浜に向けて", (財)公定書協会編, (株)ミクス，東京，82-112 (1995)
39) 早川堯夫：バイオサイエンスとインダストリー，**53**, 16-20 (1995)
40) 早川堯夫：月刊薬事，**38**, 955-959 (1996)
41) 早川堯夫："ICH-3 横浜の成果と今後の展望", (財)公定書協会編, (株) ミクス，東京，72-95 (1996)
42) 早川堯夫, 内田恵理子：医薬品研究, **29**, 895-903 (1998)
43) a) Hayakawa, T.: "Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, vol.6", eds. by Kobayashi, T., Kitagawa, Y. and Okumura, K., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp.1-8 (1994); b) 早川堯夫：医薬品研究, **24**, 1279-1281 (1993); c) Hayakawa, T.: *IYAKUHIN KENKYU*, **24**, 1282-1292 (1993); d) Hayakawa, T.: *ibid.*, **25**, 15-24 (1994); 早川堯夫：医薬品研究，**25**, 12-14 (1994); e) Hayakawa, T.: *Dev. Biol. Stand.*, **88**, 15-18 (1996); f) Hayakawa, T.: *ibid.*, **88**, 331-332 (1996)
44) 早川堯夫，山口照英，新見伸吾，内田恵理子，押沢正：医薬品研究，**20**, 281-308 (1989)
45) 早川堯夫，山口照英，新見伸吾，内田恵理子，押沢正：医薬品研究，**20**, 735-759 (1989)
46) 早川堯夫：医薬品研究，**21**, 531-546 (1990)
47) 早川堯夫：医薬品研究，**21**, 964-972 (1990)
48) 早川堯夫："バイオ医薬品および産生細胞の品質・安全性評価法", 小林茂保, 早川堯夫, 山崎修道編, エル・アイ・シー，東京，pp.253-263 (1992)
49) Hayakawa, T.: "The Terminology of Biotechnology: A Multidisciplinary Problem", ed. by Loening, K.L., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, pp.115-123 (1990)
50) a) 森本和滋，内田恵理子，川崎ナナ，アハメド・アブド・サイード，徳永裕司，春日井　勲，早川堯夫：医薬品研究，**25**, 405-425 (1994)；b) 森本和滋，内田恵理子，川崎ナナ，アハメド・アブド・サイード，徳永裕司，春日井　勲，早川堯夫：同誌，**25**, 501-523 (1994)
51) 早川堯夫："厚生科学研究　医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究　平成十年度研究業績報告書", 東京，26-37 (1999)
52) 早川堯夫："バイオ医薬品および産生細胞の品質・安全性評価法", 小林茂保, 早川堯夫, 山崎修道編, エル・アイ・シー，東京，pp.376-382 (1992)
53) Yanagida, K., Ogawa, H., Omichi, K. and Hase, S.: *J. Chromatogr. A.*, **800**, 187-198 (1998)
54) a) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hashimoto, O. and Hayakawa, T.: *Anal. Biochem.*, **269**, 297-303 (1999); b)Kawasaki, N., Ohta, M. and Hayakawa, T.: *ibid.*,(In preparation)
55) Morimoto, K., Tsuda, E., Said, A.A., Uchida, E., Hatakeyama, S., Ueda, M. and Hayakawa, T.: *Glycoconjugate J.*, **13**, 1013-1020 (1996)
56) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological / Biological Products" (1999)
57) a) 鎮目和夫：臨床医，**11**, 661-664(1985)；b) Fryklund, L., Brandt, J., Hagerman, M., Pavlu, B., Skoog, B. and Wichman, A.: "Human Growth Hormone", eds. by Raiti, S. and Tolman, R. A., Plenum Co., New York, pp.257-266 (1986)
58) WHO Requirements for the Use of Animal Cells as *in vitro* Substrates for the Production of Biologicals. (Requirements for Biological Substances No 50), Geneva, WHO (1998)
59) 早川堯夫："バイオテクノロジー関連医薬品", 医薬品の品質管理及び試験法 (医薬品の開発 14), 鈴木郁生編, 広川書店，東京，pp.42-54 (1990)
60) Hayakawa, T., Niimi, S. and Uchida, E.: *Pharmeuropa*, **Special Edition** (Human Growth Hormone), 33-40 (1991)
61) Hayakawa, T.: "Pharmacopoeias and Quality Control of Drugs, 19 (Proceedings of 3rd International Conference on Pharmacopoeias and Quality Control of Drugs)", eds. Italian Pharmacopoeia Commission General Secretariat and Istituto Superiore di Sanita, Editrice Compositori, Bologna, pp.207-212 (1993)
62) a) 内田恵理子，森本和滋，川崎ナナ，早川堯夫：医薬品研究，**25**, 348-353 (1994)；b)新見伸吾，押澤　正，横田椅江，早川堯夫：同誌，**28**, 863-873 (1997)
63) a) Hayakawa, T., Wada, M., Mizuno, K., Abe, S., Miyashita, M. and Ueda, M.: *Biologicals*, **20**, 243-251 (1992); b) Hayakawa, T., Wada, M., Mizuno, K., Abe, S., Miyashita, M. and Ueda, M.: *ibid.*, **20**, 253-257 (1992); c) Niimi, S., Oshizawa, T. and Hayakawa, T.: *IYAKUHIN KENKYU*, **28**, 337-342 (1997); d) 新見伸吾，横田椅江，押澤　正，溝田雅洋，小山定利，横沢　彰，村田智代，早川堯夫：医薬品研究，(1999,印刷中)；e) 田中　彰，早川堯夫，関沢　文，林　紘，里　忠，石浜　洋，大森照夫，村山敬一，大橋　彰："昭和 63 年度ヒューマンサイエンス基礎科学研究事業，官民共同プロジェクト研究報告（第一分野）"，ヒューマンサイエンス振興財団，pp.218-225 (1989)
64) a) 早川堯夫，森本和滋，内田恵理子，川崎ナナ，徳永裕司，山口照英，新見伸吾，押澤　正：医薬品研究，**25**, 339-347 (1994)；b) 森本和滋，日高哲郎，本広繁徳，七里寛江，奥田秀毅，坂口慶貴，高橋　尊，江島伸一，長南義勝，早川堯夫：同誌，**26**, 404-412 (1995)
65) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products", (1995)
66) Hayakawa, T.: "The Second International Conference on Harmonisation, Orlando 1993", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.133-135 (1994)
67) a) 早川堯夫，高橋道人，田中　悟，松本清司，戸部満寿夫：医薬品研究，**22(1)**, 28-40 (1991); b) 早川堯夫："バイオ医薬品および産生細胞の品質·安全性評価法", 小林茂保，早川堯夫，山崎修道編，エル・アイ・シー，東京，pp.413-424 (1992)

68) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals", (1997)
69) a) Cavagnaro, J.A.: "The Fourth International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Brussels 1997", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.204-209 (1998); b) Inoue., T.:*ibid*., pp.209-219 (1998)
70) a) Velcovsky, H.G. and Federlin, K.F.: *Diabetes Care*, **5(Suppl. 2)**, 126-128 (1982); b) Galloway, J.A., Peck, F.B.JR., Fineberg, S.E., Spradlin, C.T., Marsden, J.H., Allemenos, D. and Ingulli-Fattic, J.: *ibid*., 135-139 (1982); c) Fireman, P., Fineberg, S.E. and Galloway, J.A.: *ibid*., 119-125 (1982); d) Fineberg, S.E.: *Diabetologia*, **25**, 465-469 (1983); e) Hintz, R.L., Rosenfeld, R.G., Wilson, D.M., Bennett, A., Finno, J. and McMlellan, B.: *Lancet*, **1**, 1276-1279 (1982); f) Kaplan, S.L., Underwood, L.E., August, G.P., Bell, J.J., Blethen, S.L., Brown, D.R., Foley, T.P., Hintz, R.L., Hopwood, N.J., Johanson, A.J., Kirkland, L.P. and Plotnick, L.P.: "Human Growth Hormone", eds. by Raiti, S. and Tolman, R. A., Plenum Co., New York, pp.267-277 (1986); g) Bierich, J.R.: "Human Growth Hormone", eds. by Raiti, S. and Tolman, R.A., Plenum Co., New York, pp.287-300 (1986)
71) 早川堯夫：遺伝子治療用医薬品及び細胞治療用医薬品の品質・安全性等の確保，低温生物工学会誌，**45(1)**，18-33 (1999)
72) a)衛藤義勝：「遺伝子治療開発研究ハンドブック」，日本遺伝子治療学会編，エヌ・ティー・エス，東京，pp.3-6 (1999)；b) 香川靖雄，遠藤仁司，浜本敏郎，：同誌，pp.265-282；c) 小澤敬也：同誌，pp.283-290；d) 金田安史：同誌，pp.291-301；e) 島田 隆：同誌，pp.302-309
73) 水口裕之，早川堯夫：蛋白質核酸酵素，**44**，1405-1414 (1999)
74) 中西真人，真弓忠範，早川堯夫：治療学，**31**，11-14 (1997)
75) 早川堯夫："平成10年度厚生科学研究費補助金 ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業研究報告書，遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究 (H10-ゲノム-033)"
76) Nakanishi, M., Mizuguchi, H., Ashihara, K., Senda, T., Akuta, T., Okabe, J., Nagoshi, E., Masago, A., Eguchi, A., Suzuki, Y., Inokuchi, H., Watabe, A., Ueda, S., Hayakawa, T. and Mayumi, T.: *J. Controlled Release*, **54**, 61-68 (1998)
77) Nakanishi, M., Mizuguchi, H., Ashihara, K., Senda, T., Eguchi, A., Watabe, A., Nakanishi, T., Kondo, M., Nakagawa, T., Masago, A., Okabe, J., Ueda, S., Mayumi, T. and Hayakawa, T.: *Molecular Membrane Biology*, **16**, 123-127 (1999)
78) Watabe, A., Mizuguchi, H., Kawanishi, T., Yamaguchi, T., Uchida, E., Mayumi, T., Nakanishi, M. and Hayakawa, T.: *Biochem. Biophys. Acta*, **1416**, 339-348 (1999)
79) a) Mizuguchi, H., Nakagawa, T., Morioka, Y., Imazu, S., Nakanishi, M., Kondo, T., Hayakawa, T. and Mayumi, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 15-18 (1997); b) Suzuki, R., Nakagawa, T., Mizuguchi, H., Imazu, S., Nakanishi, T., Nakagawa, S., Nakanishi, M., Hayakawa, T. and Mayumi,T.: *Drug Delivery System*, **13(2)**, 87-93 (1998)
80) Deacon T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer P., Kott, S., Edge, A., Penny, D., Kassissieh, S., Dempsey, P. and Isacson, O.: *Nature Medicine*, **3**, 350-353 (1997)
81) Oldfield E.H., Ram, Z., Culver, K.W., Blaese, R.M., DeVroom H.L. and Anderson, W.F.: *Hum. Gene Ther.*, **4**, 39-69 (1993)
82) Thomas, M., Robert Northrup, S. and Hornsby P.J.: *Nature Medicine*, **3**, 978-983 (1997)
83) Bach, F.H., Ferran, C., Soares, M., Wrighton, C.J., Anrather, J., Winkler, H., Robson, S.C. and Hancock, W.W.: *Nature Medicine*, **3**, 944-948 (1997)
84) Patience, C., Takeuchi, Y. and Weiss, R.A.: *Nature Medicine*, **3**, 282-312 (1997)
85) a) LeTissier, P., Stoye, J.P., Takeuchi, Y. and Weiss, R.A.: *Nature*, Vol.**386**, 681-682 (1997)；b) Martin U., Kiessig V., Blusch J.H., Haverich A., von der Helm K. Herden T., Steinhoff G.: *The Lancet*, **352**, 692-694, (1998)
86) news in brief, *Nature*, **392**, 10, (1998)
87) Weiss R.A.: *Nature*, **391**, 327-328, (1998)
88) "Draft Public Health Service Guideline on Infectious Disease Issues in Xenotransplanation" (Notice. Federal Resister, Dept. Health and Human Services, Public Health Service: **61(185)**, 49920-49932, Sept. 23, 1996)