

## トランスジェニック動物/クローン動物を利用して製造した医薬品の品質・安全性評価

早川堯夫\*, 豊島 聡, 山口照英, 川西 徹

## Studies on Quality and Safety Control of Drugs for Human Use from Transgenic Animals/Clone Animals

Takao Hayakawa, Satoshi Toyoshima,  
Teruhide Yamaguchi and Toru Kawanishi

Recently the pharmaceuticals, which were produced using transgenic animals, have been developed, and will be submitted for registration in nearly future in Japan as well as in USA and EU. In addition, clone animals are also thought to be useful for the productions of the pharmaceuticals. This study has been, therefore, undertaken to establish the technical requirement for registration of the pharmaceuticals. They should be evaluated from the following standpoints: 1) Transgene construct and its characterization; 2) Creation and characterization of the transgenic founder animal; 3) Establishment of a reliable and continuous source of transgenic founder animals; 4) Generation and selection of the production animals; 5) Maintenance of transgenic animals; 6) Recovery and purification of products from transgenic animals; 7) Characterization of products; 8) Process validation/evaluation and in-process test; 9) Specification of products; 10) Stability of products; 11) Preclinical safety evaluation and clinical evaluation. Cloning technology by nuclear transfer of a transformed somatic cell has been already applied to the creation of the transgenic founder animal for the production of pharmaceuticals. The pharmaceuticals produced using the clone animals could be evaluated from almost the same standpoints. However, the flexible evaluation will be also needed depending on the development of the technology.

Keywords: biotechnology-derived products, transgenic animals, clone animals, quality control, safety control

## はじめに

近年のバイオテクノロジーの飛躍的な進歩により、1985年のヒトインスリンの承認を始めとして数多くのバイオテクノロジー応用医薬品が医療現場に供されている。これらは、微生物や動物細胞の組換え体由来の組換え医薬品あるいは動物細胞を大量培養する技術を用いた細胞培養医薬品である。

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、ウシ等の動物を用いて製造した医薬品が開発され、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においては、1995年に“Points to consider in the manufacture and testing of therapeutic products for human use derived from transgenic animals.”<sup>1)</sup>、EU CPMPでも同年にガイドライン“Use of transgenic animals in the manufacture of biological medicinal products for human use.”<sup>2)</sup>を示し、トランスジェニック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明らかにしている。

このトランスジェニック技術を応用した動物あるいはクローン動物による医薬品の製造は、遺伝子組換えと細胞培養を中心とした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るとされ、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。そこで、我が国でもトランスジェニック動物/クローン動物に製造させた製品について、医薬品製造の観点から品質、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が急務となっている。

そこで、日進月歩のトランスジェニック動物/クローン動物を利用した医薬品の製造技術の現状をまとめた。さらに医薬品製造の観点から、製造に利用される動物を作出、育成、維持する上での留意事項及び製品の品質や安全性確保に必要な評価技術に関して、トランスジェニック動物/クローン動物に関連する公表論文および医薬品製造の観点からの安全性に関する情報、上記米国FDA point to consider (PTC)<sup>1)</sup>およびEU CPMPのガイドライン<sup>2)</sup>、また遺伝子組換え医薬品、細胞培養医薬品、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品の品質、有効性、安全性確保を図る過程あるいは関連する評価技術の開発研究を行う過程で蓄積されてきた経験や知見、さらにICH文書の関連部分<sup>3-14)</sup>等を参考にして考察した。

\*To whom correspondence should be addressed: Takao Hayakawa; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9064

## 1. トランスジェニック動物を用いた医薬品開発の現状

### 1.1 トランスジェニック動物とは

トランスジェニック動物とは、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。トランスジェニック動物のタイプとしては1)生殖細胞系を含め動物を構成するすべての細胞にDNAが導入され遺伝性が獲得された動物、2)生殖細胞以外の体細胞に遺伝子が導入されるが遺伝性は獲得されていない動物、の2種類が考えられるが、医薬品生産用の動物工場として考えた場合、医薬品の恒常的生産という立場から、現在までに試みられているものは、主として前者のタイプである。

### 1.2 トランスジェニック動物によって生産される医薬品

外来遺伝子をマイクロインジェクション法により前核期受精卵に導入して動物個体を形質転換することによってトランスジェニック動物を作出する方法は1980年にマウスで初めて成功し<sup>15)</sup>、さらに1985年には家畜での形質転換の成功が報告された<sup>16)</sup>。その後1988年にこの技術を用いて乳汁中に医薬品を生産するトランスジェニック動物の作出が報告された<sup>17,18)</sup>。以降、現在までに医薬品生産への応用が検討されているトランスジェニック動物由来製品の例<sup>19)</sup>をTable 1にあげた。このうちヒトアンチトロンビンIIIについては欧米で動脈血管バイパス手術時の血液凝固抑制薬として既に臨床第Ⅲ相試験がほぼ終了しており、またアルファー1プロテナーゼインヒビター(膵嚢胞性線維症治療薬)、アルファグルコシダーゼ(ボンベ病治療薬)等についても第Ⅱ相試験の段階にある。

Table 1 医薬品生産への応用が検討されているトランスジェニック動物由来製品の例

アルファグルコシダーゼ
アルファー1プロテナーゼインヒビター
アンジオテンシン
可溶性CD4HIVレセプター
グルタミン酸脱炭酸酵素
グルコセレブロシダーゼ
血液凝固第Ⅶ、第Ⅷ、第Ⅸ及び第Ⅹ因子
サイトカイン受容体
持続型組織プラスミノゲン活性化因子
囊(のう)胎性線維症トランスメンブラン制御因子
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)
ヒト血清アルブミン
ヒト成長ホルモン
ヒトフィブリノーゲン
プロインスリン
プロテインC
プロラクチン
ベータインターフェロン
ミエリン塩基性タンパク

### 1.3 トランスジェニック動物による医薬品生産の方法と利点

医薬品生産のためのトランスジェニック動物の作出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。現在医薬品の動物工場としてトランスジェニック動物の作出が試みられている動物種としては、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、マウス等があげられる。この中で、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウサギでは、乳腺特異的に発現するカゼイン等の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、これを受精卵に導入し、個体として誕生・成熟させた後、乳腺に目的物質を発現させ、乳汁中に分泌させるという方法が一般的である(Fig.1)。実際の生産では、目的タンパク質の生産量が多い動物を初代トランスジェニック動物として選別、確立し、この初代動物を交配することによって生産用トランスジェニック動物を作出し、これら生産用トランスジェニック動物の乳汁を集めて目的タンパク質を抽出、精製(さらに場合によっては加工)して医薬品とする。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。また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low、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。その他、尿、精液、血液等が動物工場を用いた医薬品製造における目的タンパク質の分泌先として検討されているが、WHOは乳汁、尿、精液、血液はプリオンに関して非感染であろうとみなしている<sup>20,21)</sup>。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しようとしているのは主にヤギ、ヒツジ、ウシ、ブタであり、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期待もある。

### 1.4 トランスジェニックマウスを用いたヒト型モノクローナル抗体の作製

トランスジェニックマウスでは、乳汁等への分泌を利用する医薬品の製造も考えられているが、生産効率は大動物に遠く及ばない。しかし、ヒト型モノクローナル抗体の生産についてはトランスジェニックマウスが唯一利用できる動物として作出に成功している<sup>22)</sup>。この場合、①マウス自身の免疫グ

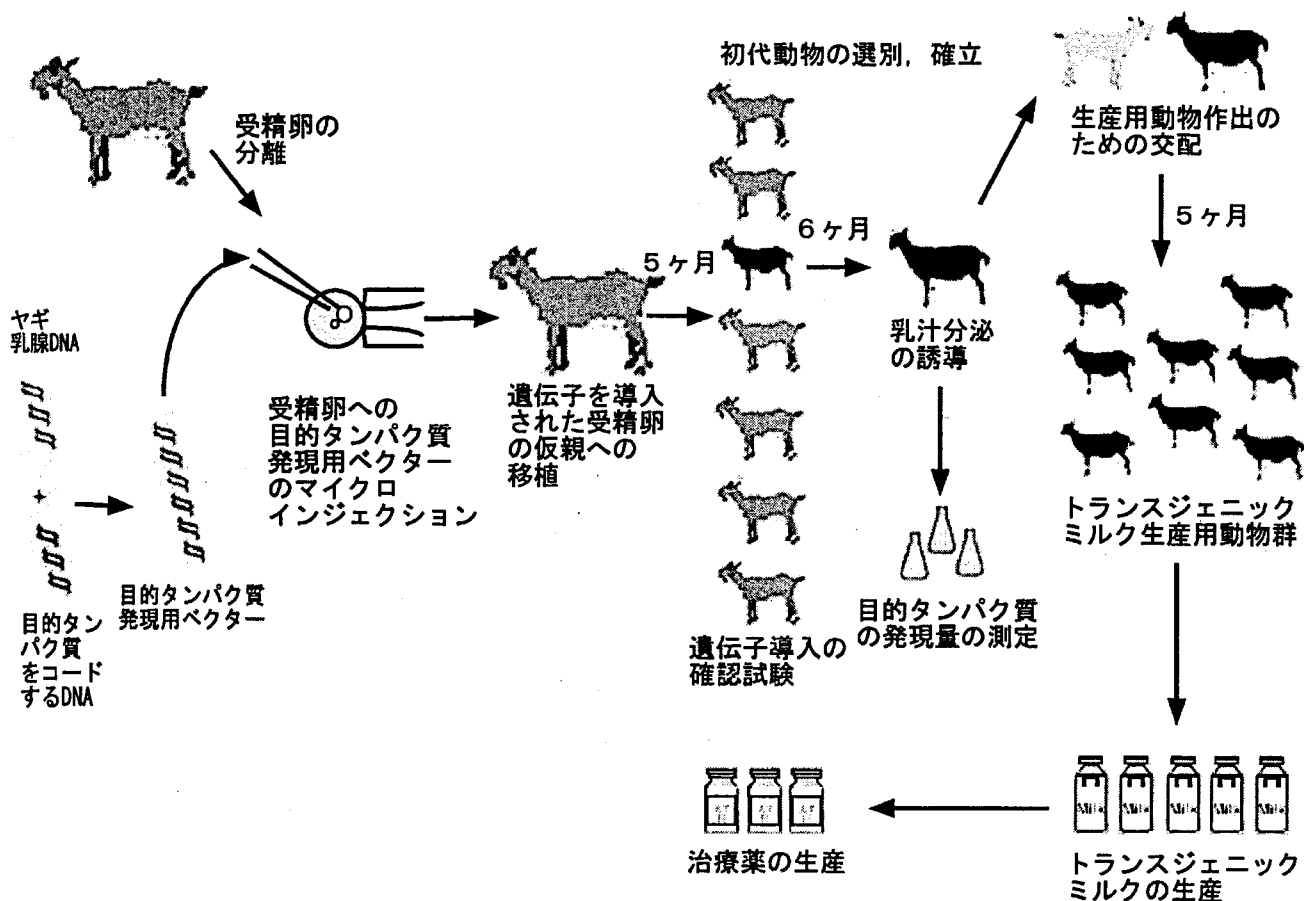


Fig. 1. トランスジェニックヤギを用いた医薬品の生産

はじめに生産する医薬品（目的タンパク質）をコードする DNA とヤギの乳腺由来タンパク質（例えばカゼイン）のプロモーター領域を結合させ、目的タンパク質を動物の乳腺で発現させ乳汁に分泌させるためのベクターを作製する。これをヤギから摘出した受精卵にマイクロインジェクションする。この遺伝子導入受精卵を仮親の子宮に移植する。生まれた子ヤギについて遺伝子導入を確認し、導入が確認された動物について乳汁分泌を誘導する。目的タンパク質の生産量が多い動物を初代動物とし、この初代動物を交配することによって生産用トランスジェニック動物を作出する。生産用トランスジェニック動物の乳汁を集め、医薬品を得る。ヒツジ、ブタ、ウシ、ウサギ、マウスなどについても同様の方法で医薬品の生産が試みられている。

ロブリン遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作出する。  
 ②他方酵母人工染色体 (YAC) のような巨大ベクターを用いてヒト免疫グロブリンのH鎖及びL鎖 (κ鎖) の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスをそれぞれ作出し、これらを交配することによりマウス型に加えヒト型の免疫グロブリンを産生するトランスジェニックマウスを作出する。  
 ③①のマウス免疫グロブリンを産生しないマウスと ②のヒト免疫グロブリンを産生するマウスを交配することによりヒトの抗体を作る (マウスの抗体は作らない) トランスジェニックマウスを完成させる。こうして得られたトランスジェニックマウスを目的抗体に対する抗原で免疫し、リンパ球を取り出して、ミエローマ細胞とのハイブリドーマを調製後、目的抗体産生ハイブリドーマを選択する。医薬品としてのモノクローナル抗体はこのハイブリドーマの大量培養により得られる。

### 1.5 医薬品生産用の動物工場としてのトランスジェニック動物の問題点

#### 1.5.1 初代トランスジェニック動物の作出効率の改善と体細胞クローン動物作出技術の利用

このようにトランスジェニック動物を利用する医薬品生産は細胞培養による生産と比べて、多くの利点を有しているが、残されている大きな技術的課題の一つに、初代トランスジェニック動物の作出効率の改善がある。

トランスジェニック動物の作出方法には、一般に用いられる ①受精卵へ直接組換え遺伝子をマイクロインジェクションする方法の他、②組換え遺伝子を導入したES細胞を用い、キメラ動物として個体発生させる方法、③レトロウイルスベクターを用いて初期発生胚に感染させる方法、などがある。マウスの場合は②のES細胞を用いてキメラ動物として個体発生させる方法も目的に応じて使われているが、動物

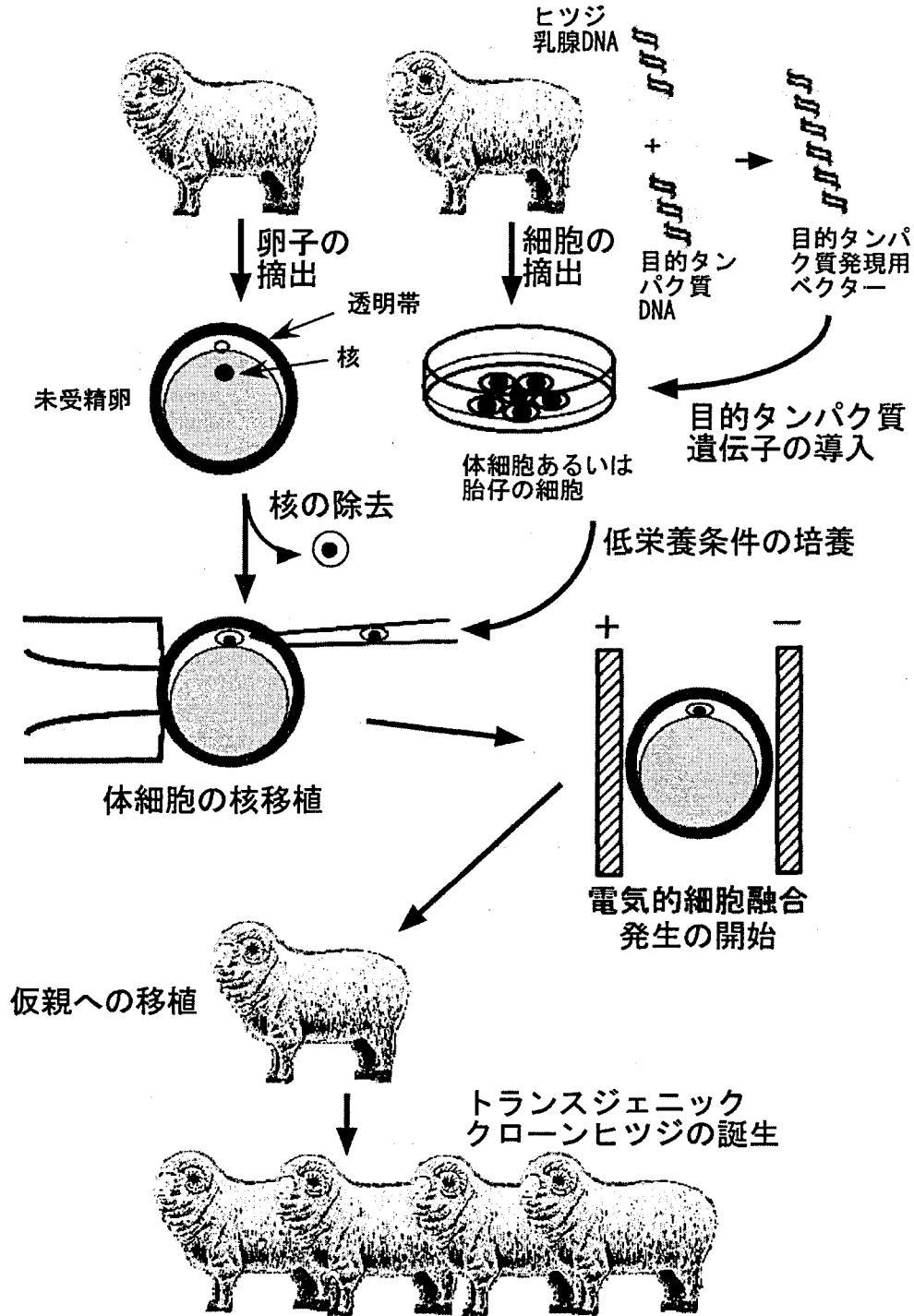


Fig.2 核移植によるトランスジェニッククローンヒツジの作出

Fig.1と同様に目的タンパク質を乳汁に分泌させるためのベクターを作製する。このベクターを用いて、ヒツジの乳腺細胞（体細胞）や胎仔の細胞に目的タンパク質遺伝子を導入し、形質転換細胞をクローン化する。次にこの形質転換クローン細胞を、ヒツジから摘出し、更に核を除去した未受精卵に移植する。この際、移植前に栄養分の濃度を下げた培養液中で細胞を培養することにより細胞周期を休止期にあわせることが重要で、この飢餓培養というステップを入れたことが体細胞クローン動物細胞の作出にWilmutら<sup>23)</sup>が初めて成功した鍵であった。核移植後の卵に電気刺激を与え、移植細胞と卵子との細胞融合を起こさせると同時に発生を開始させる。これを仮親の子宮へ移植し、トランスジェニッククローンヒツジを出産させる。

工場として主に用いられるヤギ, ヒツジ, ウシ等の家畜においてはES細胞の樹立は困難を極めている。またレトロウィルスベクターを用いる方法も動物工場としてのトランスジェニック動物の作出法としては一般化していない。一方, 現在までのところ, 最も一般的な受精卵へ組換え遺伝子をマイクロインジェクションする方法 (Fig. 1) によるトランスジェニック動物の作出効率は極めて低く (通常0.1~1%), その改善が望まれてきた。この点では, 1997年ロスリン研究所とPPL Therapeutics社の共同チームによる体細胞クローン動物の作出の成功<sup>23)</sup> (Fig. 2) は, トランスジェニック動物の作出においてブレークスルーとなる可能性があり, 注目を浴びている。彼らは乳腺由来の培養細胞を核を除去した未受精卵に核移植し, 電気刺激によって発生を開始させることによってクローン動物を得ることに成功した<sup>24)</sup>。したがって, 予めジーンターゲット法により適切な部位へ遺伝子を導入した体細胞をクローン化し, 均一な細胞を用いて核移植を行えば, 医薬品の製造に適した初代トランスジェニック動物を確立することが容易になることが予想された。事実, ロスリン研究所とPPL Therapeutics社のグループは, 続いて乳汁にヒト血液凝固第IV因子を分泌するトランスジェニッククローンヒツジの作出に成功した<sup>25)</sup>。さらにはヒトアンチトロンビンIIIを乳汁に分泌するトランスジェニッククローンヤギ<sup>26)</sup>, あるいは組織利用を目的として $\alpha 1, 3$ ガラクトース転移酵素遺伝子をノックアウトしたクローンブタ<sup>27)</sup>, あるいは $\alpha 1, 3$ ガラクトース転移酵素遺伝子やプリオン遺伝子を欠失したクローンヒツジ<sup>28)</sup>の作出といった成功例の報告が続いている。

しかしこのように体細胞トランスジェニッククローン動物の作出は次々と報告されているものの<sup>24-30)</sup>, 実際にはこれら動物の作出効率は依然として改善する方向には向かっていない。即ちクローン胚を仮親に移植した後に, そのほぼ半数は着床前後で死滅し, その後分娩にいたる様々な過程で流産死するものが少なくない。さらに出生直後には, 胎児の過大化, 胎盤の肥大化, 呼吸不全 (肺機能の未成熟), 線維芽細胞の異常増殖, 胸腺の欠失などにより, ほぼ半数が1週間以内に死亡している。したがって, 成長する個体は移植したクローン胚の数%以下が普通である。その主な原因としてはインプリンティング遺伝子のリプログラミング異常が推定されているが<sup>31, 32)</sup>, 直接的な証拠は得られていない。このように体細胞クローン動物の作出効率を改善させるまでには今後更なる技術的な改良が必要と考えられ, 医薬品生産用の初代トランスジェニック動物作出法として通常用いられているマイクロインジェクションによる遺伝子導入法に本格的に置き換わるまでには至っていない。しかしながら, 体細胞クローン動物の作出の歴史はまだ4年に過ぎず, 様々な可能性を求めてクローン動物の作出が世界各地で試みられていることからすれば, 近い将来作出効率が改善される可能性は十分考えられる。

その他初代トランスジェニック動物の作出効率を改善する試みとしては, レトロウィルスベクターを用いて卵母細胞への遺伝子導入効率を飛躍的に高めた報告<sup>33)</sup>, またマウスクローン動物の作出においては, 体細胞ではなく胚性幹細胞 (ES細胞) の核移植を成功させた報告<sup>34)</sup>もあり, 新しい遺伝子導入法に関する研究は多彩になってきており, 今後の技術革新に期待するところは大きい。

### 1.5.2 生産用トランスジェニック動物の不均一性とクローン動物の利用の可能性

トランスジェニック動物を利用した医薬品生産システムを開発する過程では, 目的物質を高収量かつ安定的に生産できる遺伝的性質をもった初代トランスジェニック動物を選別, 確立することがまず必要である。次に, これらの動物を他の動物と交配させ, 同様な遺伝的形質を有する生産用動物を作出することが必要となる。この過程においては, 通常の交配では初代トランスジェニック動物と同じ遺伝的形質を受け継ぐ動物は一定の確率以上は生まれず, また当然のことながら個体差は大きい。そこで, 今後の方向としては優良な初代トランスジェニック動物を得た後, この動物から遺伝的に同様なクローン動物を得て生産用動物として用いる方法が考えられる。しかし体細胞クローン動物においては, 1.5.1に記したように作出効率は極めて低く, 現状では経済的観点からもこの方法を採用しにくい状況にある。さらに初代動物から何世代にも渡って安定的にクローン動物の作出が可能かどうかについてもまだ未知である。例えばクローンヒツジ“ドリー”の場合には, 染色体末端のテロメア長はその元になった体細胞のそれと比べると短縮しており, クローン動物は生後直後でも生物学的にドナー細胞の年齢を引き継ぐ可能性が示唆された<sup>35)</sup>。一方, 老化したウシ体細胞を用いてクローン動物を作出した場合には, テロメア長は同等か逆に伸長していることが報告されている<sup>36, 37)</sup>。マウスでは6世代のクローンについてテロメア長の解析がなされているが, やはり伸長傾向が報告されており, 動物の寿命あるいは行動にも異常は生じていない<sup>38)</sup>。しかし同じ報告の中で, 世代を経過するにつれ, 作出効率が減少するという結果が得られており, 5世代あるいは6世代では極めて低値となっている。一方ウシでも少なくとも2世代のクローンを繰り返し作出することは可能であることが確認されているが, それ以降については検討途上にある。このように現在までに得られている情報は断片的である。特に家畜動物では複数世代にわたる遺伝的安定性の確認には長時間を要することもあり, これら体細胞クローン動物の安定性について結論が得られるまでには, 今後のデータの蓄積と解析が必要である。

個体差のない生産用動物を得る手段としては, 初代トランスジェニック動物から得た体細胞を用いて生産用トランスジェニッククローン動物を作出するという方法以外にも, 胎

仔を含めた成体から採取した体細胞に目的物質の遺伝子を導入しクローン化した細胞を用いて生産用体細胞クローン動物を作出するという方法も考えられる。この方法を用いれば、理論的にはほぼ無限数のクローン動物の作出が可能である。しかし 1.5.1に記したような作出効率の問題以外にも、現状ではクローン動物間の類似性を示す系統だったデータは得られていない。一般には、1個の受精卵を分割して得られるウシの双子について成長、肉質、乳量などを検討した結果を見ても、必ずしも同一ではないことから、個体の発生は胎児期あるいは出生後の外的環境に影響を強く受けるものと考えられている。体細胞クローン動物間では、未受精卵に細胞を移植し発生を開始させるという人工的な操作が必要であることから、同一卵子に由来する双子以上に動物間に相同性があるとは考えにくく、このクローン技術を生産用トランスジェニック動物の作出に応用したとしても、同じ動物が得られるとは考えにくい。このような体細胞クローン動物の個体差を生む要因としてはさらに以下のような原因が考えられる。

- a. 卵子と精子の受精によって開始される通常の個体の発生では、卵子あるいは精子形成の過程で月単位から年単位という長い時間をかけて遺伝子発現がプログラミングされるが、体細胞クローン動物では核移植の過程における分単位から時間単位という極めて短時間のうちにリプログラミングがなされる必要がある。そのため、このリプログラミングに狂いが生じやすいものと思われる。このことが 1.5.1に記した作出効率の低さの原因ともなるし、たとえ正常動物として成長しても個体差を生む要因となりうる。
- b. 核移植では、一般に核を取り除いた未受精卵にドナー細胞を移植後融合させるため、融合直後にはミトコンドリアはレシピエント細胞である卵子由来のものと導入されたドナー細胞由来のものが混在する。その後ドナー細胞由来のミトコンドリアは順次消失してレシピエント細胞由来のミトコンドリアに置き代わることが観察されている<sup>39)</sup>。ミトコンドリアはリボソームRNAやトランスファーRNAおよびタンパク質（呼吸酵素とATP合成酵素の一部）をコードする遺伝子を有することが知られており、この遺伝子は個体ごとに微妙に異なる。このことは、核移植によって得られたクローン動物の遺伝子すべてがドナー細胞に由来するものでないことを示しており、異なった動物から得られた卵子を用いた場合、同じドナー細胞を移植してもミトコンドリア遺伝子は異なる。医薬品生産の動物工場として考えた場合、これら動物によって生産される生理活性タンパク質の特性の変化にミトコンドリア遺伝子が直接関わるとは考えにくいものの、作出されたクローン動物において生理活性タンパク質の生産量に動物個体差を生じさせる可能性は否定できない。
- c. 核移植によるクローン動物の作出においては、核移植された卵子はインキュベータ中で一定時間培養された後

(ヒツジは体外での培養を行わない場合もある)、仮親に移植される。したがって仮親が異なれば、その後の卵子がおかれる環境が異なり、クローン動物とはいえ個体差を生じさせる要因となる。

このように生産用動物へのクローン動物の利用については潜在的には極めて大きなメリットが考えられるが、現状の体細胞クローン動物作出法では経済的メリットを含めて未解決、あるいは結論の出ていない問題が多く、医薬品生産にこの方法が導入されるまでにはさらに知識や技術の蓄積が必要と思われる。

### 1.5.3 ヒトと動物との種差による目的タンパク質の違い —翻訳後修飾—

目的タンパク質の遺伝子を動物に導入してタンパク質性医薬品を生産する場合、タンパク質の一次構造は導入遺伝子レベルで規定できる。しかし、これらタンパク質の多くは通常、動物体内で遺伝子翻訳後にプロセッシングを受け、ポリペプチドの切断、アミノ酸残基の修飾や糖付加などの各種修飾を伴いながら、機能発現に必要な高次構造を獲得(フォールディング)するといわれている。このような翻訳後修飾のプロセスには動物間の種差が報告されている。例えば、ブタで生産したヒトprotein Cは不完全なプロセッシングの結果、異なるN末端のバリエーションが生産されることが報告されている<sup>40)</sup>。またヒトprotein Cの生産においてグルタミン酸が $\gamma$ -カルボキシル化される割合はトランスジェニックマウスで生産した場合極めて低く<sup>41)</sup>、トランスジェニックブタで生産した場合でも30~60%にとどまる<sup>42)</sup>ことが報告されている。さらに動物種によってタンパク質リン酸化の効率が異なるという結果も報告されている<sup>43)</sup>。タンパク質への糖の付加については、N-結合糖鎖ではトランスジェニック動物によって生産されたタンパク質でも正常な付加が報告されているが、O-結合糖鎖においてはヒト型と異なる例が報告されている<sup>44)</sup>。このようにトランスジェニック動物において、ヒト細胞内と異なるプロセッシングが行われた場合には、目的タンパク質にヒト型とは異なった抗原性が付与される可能性がある。さらに付加された糖鎖の末端シアル酸量は生体内での半減期に深くかかわり、*in vivo*生物活性を変化させる大きな要因となる可能性もある。

このように翻訳後修飾の種差により、トランスジェニック動物に生産させたヒト型目的タンパク質は、ヒトの体内で合成された目的タンパク質と特性・機能に違いが生じる可能性があるが、現在までに得られている情報のほとんどは事例報告にとどまっており、系統的な情報の蓄積は不十分である。したがって、現状では製品の品質・安全性等への影響を事前に予測することは困難であり、ヒト型タンパク質遺伝子を哺乳類動物へ導入して合成された医薬品であっても、組換え細胞を用いて製造された医薬品と同様に、目的タンパク質

等の構造、特性、機能の解析を十分に行う必要がある。

## 2 トランスジェニック動物を利用して生産される医薬品の品質、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

以上のように、トランスジェニック動物あるいはクローン動物を動物工場として用いた医薬品生産には、今後さらに改善が必要と思われるいくつかの課題があるものの、細胞培養系と比べてそれに勝る大きなメリットがあるため、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近い。我が国においてもトランスジェニック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するのは時間の問題といえる。しかしトランスジェニック動物を利用したタンパク質性医薬品の生産において用いられる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。

トランスジェニック動物を応用して製造した製品の医薬品としての品質、安全性等の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、トランスジェニック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。

製造面で留意すべき主な事項としては、1) 遺伝子導入構成体の構築と特性解析、2) 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析、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、4) 生産用トランスジェニック動物の作出と選別、5) トランスジェニック動物の飼育管理施設、日常的維持・管理および微生物統御、6) トランスジェニック動物から目的物質の採取、精製、製品化などが挙げられる。製品の試験、評価などで留意すべき主な事項としては、1) 製品の特性・品質解析、2) プロセス評価/検証、工程内管理試験、3) 規格の設定、4) 製品の安定性評価、5) 非臨床安全性等試験および臨床試験などが挙げられる。

### 2.1 遺伝子導入構成体の構築と特性解析

トランスジェニック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。この基本概念は、従来の遺伝子組換え技術を応用した

医薬品、細胞培養技術を応用した医薬品の場合<sup>45-47)</sup>と同じである。また、遺伝子治療用医薬品や細胞治療用医薬品の品質、安全性等の確保に関する考え方<sup>48)</sup>のスタートポイントでもある。したがって、どのような情報が必要かという点に関しては、上記のバイオテクノロジー応用医薬品に関する指針等で述べられている事項を参考に検討することが適切であると考えられる。

以下には、トランスジェニック動物を作出するために用いられた遺伝子導入構成体の構築と特性解析に関してその詳細を明確にすべき項目を挙げた。

- (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) 導入遺伝子の性質
- (4) 目的遺伝子産物の構造、生物活性及び性質
- (5) ベクターの由来、性質、入手方法を始め、遺伝子導入構成体を作製するために必要なすべての原材料、性質、手順
- (6) 遺伝子導入構成体の構造や特性
- (7) 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ィルスのバンク化、バンクの管理方法

以上の各項目の詳細な内容については組換え医薬品、細胞培養医薬品、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品等の医薬品の申請の要件に関する文書、および関連研究報告等<sup>5, 6, 49-52)</sup>を参照するとよい。

## 2.2 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析

### 2.2.1 トランスジェニック動物の作出に使われる動物

トランスジェニック動物の作出に用いられる動物は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を使用すべきである。初代トランスジェニック動物の作出に使われる配偶子あるいは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が明らかにされている必要があり、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示す。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。プリオン関連の疾病が同じ動物種で発生し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。有害感染物質に関する管理については、生産用動物と同様の要件が必要とされる。

### 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。例えば卵子の単離、インビトロ受精、マイクロインジェクション、核移植等に用いられた方法については、既存の方法、新たに開発した方法に関わらず詳細を示す必要がある。また体細胞変異を生じさせた動物についても、その方法の詳細を示す必要がある。

### 2.2.3 初代トランスジェニック動物の確認

初代トランスジェニック動物の確認法および選別法を定める必要がある。初代動物に導入された遺伝子の存在をテスト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、生成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。目的物質の収量については、季節変動、年齢差も含めて明確に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。遺伝子導入により目的物質を発現、生産するようになった組織では、もともとそのような物質は生産されていない。そのためその動物組織での翻訳後修飾の仕方は、目的物質が本来生産されている、例えばヒト組織のそれとは異なる可能性がある。その結果、天然のものと違った生成物が生産される可能性があるため、トランスジェニック動物由来製品の生物学的、免疫学的活性は適切に評価されるべきである。さらに、大量に生成された導入遺伝子生成物が生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。

マウス免疫グロブリンを産生せずヒト免疫グロブリンを産生する初代トランスジェニックマウスの作出には、マウス免疫グロブリンのH鎖及びL鎖遺伝子それぞれのノックアウトマウスに加え、ヒト免疫グロブリンのH鎖及びL鎖遺伝子それぞれについてトランスジェニックマウスの調製が必要である。従って、トランスジェニック動物の確認はそれぞれのマウスについて必要である。すなわち、ノックアウトマウスについてはターゲティングした遺伝子が発現していないことを、遺伝子導入したマウスについては目的遺伝子が発現していることを確認する必要がある。なお、作出されたヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスは、定常部がマウス型で可変部がヒト型の抗体(キメラ抗体)を産生することができるのでターゲティング遺伝子の非発現とトランスジェニック遺伝子の発現を注意深く調べる必要がある。

### 2.2.4 目的物質の生産の安定性の確認

目的物質の継続的な生産は、導入遺伝子の安定性、および導入遺伝子の発現の安定性に依存している。

#### 1) 導入遺伝子の安定性

導入された遺伝子は通常染色体の一つの部位にDNAの複数のコピーが挿入される。しかし挿入部位が複数箇所ある場合や、あるいは導入遺伝子の転移、欠失が生じる場合も考えられる。したがって動物を交配する間の遺伝子の安定性を、サザンブロット、塩基配列の解析、その他の方法でモニターする必要がある。一つの染色体に導入された遺伝子の数は、数

世代にわたり安定している必要がある。できれば初代動物において、単一部位に挿入されていることを直接的方法で確認すべきである。それが不可能な場合は、複数世代にわたってDNAを制限酵素を用いて解析することにより、導入遺伝子の単一部位での挿入を確認するという方策があり得る。同様な方法は導入遺伝子のコピー数の安定性の確認、あるいは転移や欠失の確認の際にも応用できる。

#### 2) 遺伝子発現の安定性

導入遺伝子産物の発現は、初代トランスジェニック動物の遺伝的特性と、父性遺伝あるいは母性遺伝によるインプリンティング効果との相互作用によって、様々に影響される。継代するにつれ、発現が減少することもしばしば観察される。したがって、初代トランスジェニック動物の個々、および生まれた子孫に関して、同一世代内および世代間の発現の安定性を確認する必要がある。発現の安定性は、生産に用いられる期間以上にわたって確認すべきである。遺伝子発現の安定性については、生産動物としての許容範囲を定める必要がある。また、できればノーザンブロット、RT-PCR、DNase protection assay等を用いて、転写によるRNA発現についても確認をとるべきである。目的物質の収量、さらに可能ならばその発現量を複数世代にわたってモニターし、許容最低量を定めるべきである。

### 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

動物は細胞と違って無制限に保存しておくことはできない。したがって、トランスジェニック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(ICHガイドラインQ5D<sup>6</sup>参照)。すなわちマスターセルバンク(MCB)とワーキングセルバンク(WCB)の二段階方式に類似した方法を取り、マスタートランスジェニックバンク(MTB)およびワーキングトランスジェニックバンク(WTB)からなるバンクを作ることが適切である。それぞれのバンクは十分に特性解析された限られた数のトランスジェニック動物からなる。さらに信頼性のおける方法を選択すれば、一頭(一匹)の起源動物およびその動物の直系の子供から得た凍結精子あるいは凍結胚をバンクに利用することも可能である。

ところで、トランスジェニック動物は様々な方法で繁殖させることができる。したがって、製造業者が初代トランスジェニック動物を活用して同一目的物質の生産を可能にするような方策は、上記のようなやり方以外にも考えられる。この場合、初代トランスジェニック動物については、目的物質の発現および安全性などに特に関連する特性を徹底して明らかにすることを最大の眼目とした努力を傾注しておく必要がある。そうしておけば、この一頭の有用な初代動物から次々生まれる動物は、目的物質の発現および安全性の面か



らみて初代動物と同等である、と特性づけられると期待できる。こうしたアプローチにより、目的物質の生産に用いられる動物が厳密にその特性を明らかにされた動物であることが保証されることになる。

ヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスの保存、維持については他のトランスジェニック動物と異なり、マウス免疫グロブリン遺伝子ノックアウトマウス及びヒト免疫グロブリン遺伝子導入マウスの保存、維持をも考慮する必要がある。

## 2.4 生産用トランスジェニック動物の作出

特性解析が終わった初代動物は、生産用動物の繁殖に使用される。導入された遺伝子は非トランスジェニック動物、あるいはトランスジェニック動物との交配により、次世代に受け継がれる。製造者は生産用動物として用いるトランスジェニック動物を選別するにあたっての基準を示す必要がある。医薬品生産用トランスジェニック動物個々について、起源となった初代トランスジェニック動物個体に遡れるような記録が必要である。また生産用動物個々について、出生場所、出生日、医薬品生産への使用、病気の頻度および経過、処分についての記録が必要である。

繁殖方法についての詳細な記録も必要である。人工授精、胚移入、精子の収集・貯蔵の方法について記述し、適切な基準を設ける必要がある。インビトロ受精法が用いられた場合は、精子および卵子の収集法に関する基準について明らかにする必要がある。接合体の単離および仮親への移植の経過も明らかにすべきである。トランスジェニック精子あるいは卵子と接合する相手方となる動物が健康であり、感染物質による汚染がないことを示す必要がある。さらに妊娠の確認、分娩の過程を明らかにする必要がある。

## 2.5 トランスジェニック動物の飼育管理施設、日常的維持・管理、および微生物統御

### 2.5.1 動物施設の原則

医薬品生産の対象となるトランスジェニック動物種としては、マウス、ラット、ウサギなどの実験小動物とウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ミニブタなどの家畜が考えられる。両者は、動物としての特性からトランスジェニック個体の維持・管理について区別して考えることができる。すなわち、前者は逃亡の可能性が高く、個体識別も煩雑になりやすいことから、飼育管理はより厳密に行う必要がある。一方、家畜は個体識別が容易であり、逃亡の可能性も極めて低いことから、飼育エリアをフェンスなどで外的環境と隔離することによって、トランスジェニック個体の維持は可能であろう。医薬品製造のための動物工場としてのトランスジェニック動物の利用は主に後者の家畜が用いられているので、本稿では以下に家畜用動物施設について述べる。

トランスジェニック動物の品質管理は飼育する動物施設

に依存する。したがって①初代トランスジェニック動物の作出、②生産用トランスジェニック動物の作出、維持、及び、③生産用トランスジェニック動物からの目的物質を含む生体材料の採取は、特に理由のある場合を除いて、最低限度所定の飼育管理基準を満たした施設(例えば、AAALAC International (<http://www.aaalac.org/>))のような認証システムによる認定施設相当)で行われなければならない。

これらの基準はいずれも実験動物の品質管理について有効であるが、医薬品製造のための動物においてはより一層厳しい基準も考慮すべきである。とりわけ病原体の動物施設内への侵入は厳重に防止すべきで、施設内への搬入動物はすべて同等以上のレベルの管理基準を有する施設からのものとし、搬入動物の臨床診断、及びその後の定期的な微生物モニタリングの実施とその結果の公開を義務づける。

### 2.5.2 動物の維持・管理

トランスジェニック動物の維持・管理は目的物質の品質保証のため動物個体のみでなく飼育管理方式を含め吟味する必要がある。また医薬品の製造工場として利用するため、従来の家畜以上のレベルの微生物管理が要求される。

この管理のためには動物に直接関わる環境の統御、投与される飼料、飲水、飼育装置の品質管理も要求される。また動物管理施設への新たな動物の搬入時にも十分な検疫を行う必要がある。原則的には、当該の生産コロニーへの動物の搬入は禁止すべきである。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、あるいはトランスジェニック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。

ヒトおよび搬入物品からの微生物混入にも注意を払う必要がある。関係者は動物に微生物を移すことのないような服装をすることなど現行の実験動物施設での飼育管理方法を遵守するだけでなく、管理者は関係者の健康管理を適切に行う必要がある。健康であれば特に問題とはならないような微生物も、健康を害することによりそのヒトの体内で増殖し動物に伝播させることも考えられるので、関係者の良好な労働環境を構築することも重要である。

また動物に与える飼料成分も明らかにし、特にプリオン関連疾患の危険因子を排除するため、飼料には反芻動物を原料とした肉骨粉を含んではならない。さらに飼料中に残留する農薬成分をモニタリングし、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。

衛生状態のモニタリングは、動物の健康状態を維持するためばかりでなく、製品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、トランスジェニック動物の飼育計画、および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。医薬品生産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。疾病にかかった動物は医薬品生産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。

医薬品製造に各トランスジェニック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。生産から外す理由としては病気、生産量の減少、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、生産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。

### 2.5.3 既知感染物質のスクリーニング

トランスジェニック動物種が感染されている可能性のある微生物の統御にあたって重要なものとしては、1) 従来から家畜で知られている人獣共通感染症原因微生物、2) 清浄化によっても統御が困難な微生物、および 3) 新たに発見された、あるいは今後発見される新興感染症の原因となる微生物等に分類できる。1としては炭疽、ブルセラ、サルモネラ、ブタ丹毒、結核、コクシエラブルネチー(Q熱原因菌)、トキソプラズマ、各種寄生虫などがある。これらのほとんどは食品衛生上の問題から多くの家畜では駆除されている。2としてはレトロウイルス、トキソプラズマ等が問題となる。3としてはスクレーパーなど伝達性海綿状脳症(プリオン病)の原因物質がとくに注目される。これは2にも分類すべきものであるが、その発症が地域限定であることから、正常域由来の動物を使用することで防止は可能とされる。しかし新興の感染症はその発生、病原性を特定するには時日を要する事から、関連情報の収集が最大の予防法とならざるを得ない。

以上の観点を加味しながら、トランスジェニック動物種、特にトランスジェニック動物由来医薬品製造に主に用いられるヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ等に感染している可能性のあるウイルス、とりわけ人獣共通感染ウイルス (Table 2) については、トランスジェニック動物作出に用いた動物をどのような地域から得たのか、トランスジェニック動物を飼育している地域に流行しているウイルスにはどのようなものがあるか、さらにはヒトで発病した場合の病状の重さなどを総合的に勘案してウイルス検査を行い、可能な限り感染を否定しておく必要がある。その際、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。以下に主な人獣共通感染ウイルスの特徴を記す。

— Cowpox virus (牛痘ウイルス): 主として、西ヨーロッパ、東ヨーロッパにみられる。ウシでは、乳房、乳頭に発痘。ヒトでは、指、手などに発痘。ウイルスの分離には発育鶏卵の漿尿膜接種、培養細胞への接種が用いられ、血清診断には赤血球凝集阻止反応が用いられる。

— Paravaccinia virus (偽牛痘ウイルス): 世界中に分布する。日本でも希ではない。動物では、口唇、鼻鏡、乳房、乳頭、ヒトでは、手、指などに発痘が生じる。確認は電子顕微鏡検査による。ただし発育鶏卵で増殖しない。ウイルスの分離には初代培養細胞を用いる。血清診断法は実用化されていない。

— Murray Valley encephalitis virus (マレーバレー脳炎ウイルス): 主としてオーストラリア南部のMurray-Darling川流域に多発する。感染動物は無症状である。ヒトでは日本脳炎に似た症状を示す。致死率は日本脳炎と同様といわれている。診断は血清中の抗体検査による。

— Louping-ill virus (羊跳躍病ウイルス): スコットランド、アイルランド、ウエールズ、イングランド北部にみられる。ウシでは脳脊髄炎、ヒトでは、インフルエンザ様症状がおこる。重症例では髄膜脳炎がみられる。麻痺がおきるとポリオ同様の症状を示す。ウイルスの分離には、マウス、発育鶏卵、ヒツジ培養細胞が用いられる。血清診断には、中和試験、赤血球凝集阻止反応を用いる。

— Foot-and-mouth disease virus (口蹄疫ウイルス): オセアニア、北米、スカンジナビアでみられる。ウシでは突然の発熱、流涎、舌、口、乳頭、乳房の水疱、ヒトでは、発熱頭痛、感染部位の水疱、口、手足の水疱が生じる。1-2週間で回復する。ウイルスの分離には乳のみマウス(授乳期のマウス)への接種が用いられる。血清診断にはゲル内沈降反応、中和試験などを用いる。

— Japanese encephalitis virus (日本脳炎ウイルス): アジア、東南アジアでみられる。妊娠ブタに感染すると死産を引き起こすことが多い。ヒトでは、不顕性感染が多いが、発症すると、発熱、脳炎が起こり、致死率は35%と高い。ウイルスの分離には乳のみマウスへの接種、培養細胞への接種などが用いられる。間接蛍光抗体法、ELISA法、中和試験、赤血球凝集阻止反応などによる血清反応が診断に用いられる。

— Vesicular stomatitis virus (水泡性口炎ウイルス): 主としてアメリカ大陸に分布する。動物では、発熱、口腔粘膜、蹄等の水泡、びらんが起こる。ヒトでは、インフルエンザ様の症状を呈し、口腔、喉に水泡ができることもある。

— Orf virus (オルフウイルス): 動物では、口唇、鼻鏡、乳頭、乳房などに発痘。死亡することは希である。ヒトでは、手、指などに発痘がみられる。確認は電子顕微鏡検査で行う。発育鶏卵で増殖しない。ウイルスの分離には初代培養細胞を用いる。血清診断法は実用化されていない。

— Borna disease virus (ボルナウイルス): 主として中央ヨーロッパに分布する。動物では脳炎が生じ、典型的な症状として、興奮、けいれん、麻痺などがみられる。ヒトで脳内に持続感染することが知られているが、発症については不明である。長い潜伏期間や病気の進行状態からスローウイルス感染の一つとみなされている。最近、精神病との関連が

Table 2. 各々の動物に感染することが知られている人畜共通感染ウイルス

	ウシ	ブタ	ヒツジ	ヤギ	ウマ
牛痘ウイルス (Cowpox virus)	◎				
偽牛痘ウイルス (Paravaccinia virus)	◎	◎	◎	◎	
マレーバレー脳炎ウイルス (Murphy valley encephalitis virus)	◎	◎			
羊跳躍病ウイルス (Louping-ill virus)	◎	◎	◎	◎	
口蹄疫ウイルス (Foot-and-mouth disease virus)	◎	◎			
日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus)		◎			
水疱性口炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus)		◎			
オルフウイルス (Orf virus)			◎		
ボルナ病ウイルス (Borna disease virus)			◎		◎
狂犬病ウイルス (Rabies virus)	◎	◎	◎	◎	◎
インフルエンザウイルス (Influenza virus)		◎			
ブタE型肝炎ウイルス (Porcine hepatitis E virus)		◎			
脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis virus)	◎	◎			
ロタウイルス (Rota virus)	◎				
東部ウマ脳炎ウイルス (Eastern equine encephalitis virus)					◎
西部ウマ脳炎ウイルス (Western equine encephalitis virus)					◎
ベネズエラウマ脳炎ウイルス (Venezuelan equine encephalitis virus)					◎
伝染病性胃腸炎ウイルス (Transmissible gastroenteritis virus)		◎			
ブタ呼吸器コロナウイルス (Porcine respiratory coronavirus)		◎			
ブタ流行性下痢症ウイルス (Porcine epidemic diarrhea)		◎			
血球凝集性脳髄炎ウイルス (Hemagglutinating encephalomyelitis virus)		◎			
ブタ繁殖呼吸器病候群ウイルス (Porcine respiratory and reproductive complex virus)		◎			
ブタコレラウイルス (Hog cholera virus)		◎			
パラインフルエンザ3型ウイルス (Parainfluenza 3 virus)		◎			
エンテロウイルス1型 (Talfan/Teschen disease virus)		◎			
レオウイルス (Reoviruses)		◎			
内在性レトロウイルス (Endogenous virus)		◎			
ブタアデノウイルス1-4型 (Porcine adenovirus)		◎			
ブタサーコウイルス (Porcine circovirus)		◎			
ブタパルボウイルス (Porcine parvovirus)		◎			
スイボックスウイルス (Swinpox virus)		◎			
ブタサイトメガロウイルス (Porcine cytomegalovirus)		◎			
アルファヘルペスウイルス (Pseudorabies virus)		◎			
ロシア春夏脳炎ウイルス (Russian spring summer encephalitis virus)			◎	◎	
リフトバレー熱ウイルス (Rift Valley fever virus)			◎	◎	
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus) (ナイロウイルス (Nairovirus) )			◎	◎	
トロウイルス (Torovirus)	◎				

指摘されている。ヒトや種々の動物の細胞で増殖するが細胞変性効果は無い。診断には血清中の抗体検査を行なう。PCR反応も用いる。

— Rabies virus (狂犬病ウイルス) : 中枢神経の興奮による痙攣に続いて麻痺期に入り、嚥下筋、呼吸筋などの麻痺を起こして急死する。pH 6.2, 低温でガチョウ赤血球の凝集反応を起こす。また、ニワトリ、ミドリザル、アカゲザルの赤血球の凝集も起こす。ニワトリ胚 (HEP-Flury 株)、子イヌ、ハムスター、ブタ腎の初代細胞で培養可能である。

トランスジェニック動物及び細胞、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物質の回収および精製方法に応じて規定する。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。

トランスジェニック動物の細胞、組織、臓器試料は、例えばヒト末梢血単核細胞などの適切な指標細胞との共培養などにより試験する。すなわち、無作為継代培養を行い、細胞障害性の影響や病巣形成の観察、逆転写酵素分析、電子顕微鏡検査などの適切な方法を用いて感染物質の有無を明らかにすることが必要と考えられる。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免疫学的手法、分子生物学的手法によりさらに検討する。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。予想される細菌やウイルスの検出にはPCRを適用できる。

なおトランスジェニック動物由来医薬品のウイルス安全性の確保にあたっては、局方生物薬品のウイルスに対する安全性確保のための留意事項<sup>53)</sup>やウイルス安全性にかかわるICH合意文書に基づく通知<sup>4)</sup>が適切に適用できる場合には参照するとよい。

#### 2.5.4 トランスジェニック動物の生産ラインへの供給と処分方法

現時点では、特に家畜のトランスジェニック動物の作出効率は低いために、その作出過程で遺伝子導入の有無や医薬品生産能力の異なる様々な個体ができる。実験動物とは異なり、これらの動物を維持管理することは経費的にも限られた施設の規模では困難をとまう。必要に応じて体細胞、生殖細胞 (精子・卵子) の凍結保存によってラインを維持すると同時に、不要な個体は屠殺処分する必要がある。家畜の場合は、食肉に供する可能性があるために、その方法は特に注意する必要がある。トランスジェニック家畜の食肉としての安全性が確認されていない現時点では、導入遺伝子の存在の有無に関わらず、トランスジェニック個体を作成する過程あるいは医薬品生産に供した後に廃棄処分する個体はすべて焼却処分とする必要がある。ウシの場合は、成体で1000kgを超える場合も想定され、その屠殺や解体のための施設を

必要とする。ブタ、ヤギ、ヒツジなどについては、焼却処分は可能である。いずれにしても、適当な規模の屠体焼却処理施設が必要である。

### 2.6 トランスジェニック動物からの目的物質の採取、精製、製品化

#### 2.6.1 トランスジェニック動物からの目的物質の採取

トランスジェニック動物から目的物質を採取する方法は様々ある。現状では通常乳汁、血液あるいは尿から採取するが、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、目的物質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。以下に考慮にいれるポイントを列記する。

##### 1) ホスト動物について

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。目的物質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。さらに、有害な感染性物質の除去あるいはその不活性化が保証される製造工程を採用することは極めて重要である。

##### 2) 目的物質を得るための材料について

トランスジェニック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物質を採取して用いる。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。

目的物質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、細菌、寄生虫、ウイルス等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、およ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、相補性、疑似化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組織から得た製品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、および検疫期間中や乳汁、血液、尿やその他の細胞、組織、臓器採取時に他の非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。

トランスジェニックマウスを応用してヒト型抗体を採取

するためには、まず抗原による免疫、免疫リンパ球とミエローマ細胞とのハイブリドーマの調製、目的抗体産生ハイブリドーマの選択を行う。この際、選択されたハイブリドーマが確かにヒト型抗体を産生していることを遺伝子及びタンパク質レベルで厳密に確認する必要がある。このようにして選択されたハイブリドーマが目的抗体を得るためのホスト細胞となる。これらの評価については、通常の細胞培養医薬品の生産に準じる。

## 2.6.2 トランスジェニック動物からの目的物質の精製、製品化

目的物質の精製に関しては、1) 原材料からの分離と精製手順、2) 各精製段階での精製状況、3) 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、そののち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。分離精製工程の変更は、しばしば、目的物質の品質を変えたり、また特に望ましくない有害因子や不純物を製品に混入させる原因になるからである。

トランスジェニック動物由来製品の安全性を確保する上で、精製工程あるいは不活化過程の評価はきわめて重要な意味をもっている。医薬品の製造工程中に仮になんらかの外来性微生物等が迷入したとしても、プロセスがこうした未知の思いもよらない有害因子をも除去する能力を有することを証明するとともに、こうした確信をもつための一つの目安にもなるとの意味あいがある。不純物については、原材料由来、製法由来、製品が変化したものなどが考えられる。これら不純物の除去状況については、あるステップで精製された目的物質中の含量あるいは精製工程での除去効率などより評価する。これらプロセス評価/検証をめぐる問題については後に再度述べることにする。

要約すれば望ましい分離・精製方法とは、目的物質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ることであり、また、有害因子や不純物が最終産物に混入し、安全性上問題となることがないように十分配慮された工程を巧みに組み合わせていることである。

以下には、精製法に関して特に留意すべき事項を列挙した。

- ① フローチャート等を利用して目的物質の採取（抽出）・分離、精製方法等の詳細を示すこと。
- ② 各精製段階における目的物質の精製の状況（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）を明らかにすること。
- ③ トランスジェニック動物あるいは原材料に由来する可能性のあるエンドトキシン等有害因子、主な不純タンパク質、糖質、脂質、核酸等及び分離・精製工程に由来する不純物（例えば抗体カラムにおける遊離した抗体等）並び

に製品関連不純物について、精製工程での除去効率、試験方法、検出限界等について明らかにすること。

- ④ 遺伝子発現タンパク質を適当な処理（化学処理、酵素処理等）を施して最終目的物に導く場合には、その手順と使用した試薬及び前駆体や雑種融合タンパク質から切り離れたペプチド等の最終目的物との分離方法を明らかにすること。

## 2.7 製品の構造、特性・品質解析

前項までに述べた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、最終目的物質の構造解析、物理的・化学的性質、生物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。

トランスジェニック動物由来製品にあつては、まず第一に当初のシナリオどおり、目的遺伝子構造から意図した目的タンパク質の化学構造を有する製品が得られたかどうかを確認、同定する必要がある。糖タンパク質では糖の部分の解析を詳細に行う必要がある。また、高次構造が形成され、目的とする生物活性を示すかどうかを確かめる必要がある。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その他の性質に関するデータを集める必要がある。

トランスジェニック動物由来製品における構造決定、同一性の確認、純度の検討、各種特性・品質等に関する解析の重要性は、これが本質的には人工的な技術に基づいて、しかも従来にない技術で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。製品の構造や特性・品質解析結果が、逆に当該製品の製造過程のシナリオや製造技術の妥当性を最も確実に立証することになる。

幸いなことに、タンパク質や糖鎖の構造解析技術や同定法、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、生産物の特性解析や品質評価に大きな威力を発揮しているので、実施可能でかつ適切な最新技術を駆使してトランスジェニック動物由来製品の構造、特性・品質解析を徹底的に行うべきである。

天然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、それらとの比較を行うことが望まれる。

以上のような解析を行うにあたって検討すべき項目としては、一般的には、従来の組換え医薬品、細胞培養医薬品などにおいて必要とされてきたような以下に列記する項目が考えられる。しかし、これらの項目はあくまで例示である。個々のトランスジェニック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。

### 2.7.1 構造決定・組成分析

#### 1) 構造・組成

例えば次の項目についての検討を行い、目的有効成分の構造・組成を可能な範囲で明らかにする。

#### ①アミノ酸組成

種々の加水分解と適切な分析法を用いて全アミノ酸の組成を測定し、塩基配列より推定されるアミノ酸組成との比較を行う。

#### ②末端アミノ酸及び末端域アミノ酸配列

N末端及びC末端アミノ酸の種類を明らかにすること。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こと。N末端アミノ酸配列はEdman法や質量分析法等を用い、C末端アミノ酸配列はカルボキシペプチダーゼ法や質量分析法等を用いて決定し、塩基配列より推定される末端配列との比較を行う。

#### ③スルフヒドリル基、ジスルフィド結合の数と位置

スルフヒドリル基、ジスルフィド結合の存在が塩基配列より推定される場合には、その数やその位置を適切なスルフヒドリル基検出法や加水分解と液体クロマトグラフ法を組み合わせた方法、あるいはその他適切な分析手段(例えば質量分析法)等を用い可能な範囲で決定する。

#### ④ペプチド分析

酵素的又は化学的な加水分解を用い、次いで液体クロマトグラフ法等を用いて分析すること。適切な標準物質や類似物質が入手できる場合にはそれとのペプチドマップを比較することは有用である。必要に応じて適切なペプチド断片のアミノ酸組成分析、アミノ酸配列分析をアミノ酸自動分析法、Edman法、質量分析法等を用いて行う。

#### ⑤アミノ酸配列

上記①～④項等の結果に基づいてアミノ酸配列を導き、塩基配列より推定されるアミノ酸配列との比較を行う。

#### ⑥糖鎖

トランスジェニック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。その糖鎖付加の様相は、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。糖タンパク質における糖鎖が、例えば、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、生体寿命、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、溶解性などに大きな影響を与えていることが次第に明らかになってきている。したがって、トランスジェニック動物由来糖タンパク質製品における糖鎖の分析目標としては、1)中性糖、アミノ糖、シアル酸等の糖組成分析、2)結合型解析、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、構造解析などが分析目標となる。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鎖電気泳動法(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：FAB-MS、ESI-MS、MALDI-TOF-MS；NMRなど)の組み合わせ。

### 2.7.2 物理的・化学的性質、免疫学的性質、生物学的性質について

#### 1) 物理的・化学的性質

例えば次の項目について検討する。

##### ①分光学的性質

紫外外部吸収スペクトル、可視吸収スペクトル、吸光係数等を示す。

##### ②等電点

ゲル等電点電気泳動等により測定する。

##### ③分子量

ゲルろ過クロマトグラフィー、SDS-ゲル電気泳動(還元、非還元)等により測定する。

##### ④電気泳動パターン

ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ゲル等電点電気泳動、SDS-ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動等における泳動パターン、同一性、均一性、純度等に関する情報を提供する。

##### ⑤液体クロマトグラフパターン

ゲルろ過、逆相、イオン交換、疎水性カラムクロマトグラフィー等におけるクロマトパターン、同一性、均一性、純度等に関する情報を提供する。

##### ⑥高次構造

円二色性、旋光分散、核磁気共鳴スペクトル等を適宜用いて検討する。

#### 2) 免疫化学的性質

トランスジェニック動物由来製品において、目的物質がモノクローナル抗体である場合は、特性解析手段として免疫化学的手法の活用は必須である。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、可能な限りアフィニティー(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)及び免疫反応性(交差反応性を含む)を決定する。更に関連するエピトープを有する標的分子を生化学的に明らかにし、可能な範囲でエピトープ自身も明確にする。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、ウェスタン・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がある程度得ることも可能である。しかし、抗原抗体反応に係わるポリペプチド鎖中の領域と生物活性に係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。ただし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、体内動態試験などに利用されている場合には、目的物質と抗体に関するすべ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、抗体中和法などの適切な方法を用いて検討した目的物質とこれに特異的な抗体との反応性、(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、などがあげられる。

### 3) 生物学的性質

トランスジェニック動物由来製品にあつては、まず何よりも目的タンパク質を特徴づける目的の生物学的あるいは生化学的性質を確認することが必須である。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は目的とするサイトカイン活性などである。一方、多くの場合、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おり、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。

こうして明らかになった製品の生物学的あるいは生化学的機能は、これを指標とする確認・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。

生物学的性質を検討する手法には、動物を使用する *in vivo*法と、細胞などを用いる *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。しかし、品質管理を目的とするような試験などでは、動物愛護、細胞生物学の発展をふまえたより簡便で正確な *in vitro*法の開発、あるいは生物活性との相関性が検証された理化学的試験法を適宜利用することが望ましい。

## 2.8 プロセス評価/検証、工程内管理試験

トランスジェニック動物由来製品の特性・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を設定する際に最も基礎となるデータを提供する。

しかし、トランスジェニック動物由来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・品質解析結果や承認条件として設定される製品の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。そこにプロセス評価/検証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や、その継続性を保証することを通して、医薬品の品質の恒常性の確保にさらに確実に寄与する不可欠な要素となる。

### 2.8.1 各段階でのプロセス評価/検証、工程内管理試験

わが国の現行の制度で中々考えると、プロセス評価/検証には開発段階で実施するものと、承認後に実生産スケールで実施するものがある。

組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品の場合、開発段階ではまず製造過程の主要部分、例えば目的物質に対応する構造遺伝子の入手方法、発現ベクターの構築、宿主の選択、種細胞株の樹立方法、培養方法などの妥当性を、遺伝子安定性ガイドライン<sup>6)</sup>、細胞基材ガイドライン<sup>10)</sup>などを参照しながら評価/検証する。一方トランスジェニック動物由来医薬品では目的タンパク質の合成過程は動物に委ねられる。したがって開発段階では、導入遺伝子および動物について上記2.1から2.4及び2.5の一部の要件について評価/検証することになる。次に、トランスジェニック動物から目的物質の採取、精製過程を含め設定された製法が全体として当初の意図どおりであったかどうか、妥当であったかどうかを最終的に得られた産物の特性、品質の解析結果から評価/検証する。さらに、有害因子や不純物が最終産物に迷入し、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するために製造・精製工程の評価/検証を行う。すなわち最終目的物質への混入が予想される不純物や、工程中で迷入の可能性のある有害因子が当該製造・精製工程により許容できるレベルにまで除去されているか、およびこれら物質が混入あるいは迷入しても当該工程が除去する能力を有しているかを評価/検証する。不純物などについては、適当な製造段階における製品を直接測定することにより除去状況を知り、各精製工程が持つ除去効率や除去能力などを検証することができる。なお、別途、実生産を反映しながらスケールダウンした系での添加回収実験などにより工程がもつ特定の不純物に対するクリアランス能力を評価するという方

策もある。こうした評価/検証の過程で、製品の品質確保面からみて評価/検証された工程が将来にわたって恒常性を維持するために必要なプロセスコントロールの方策を構築していくことになる。このプロセスコントロールの中には、製造工程のある段階において工程内管理試験や規格を設定するという方策もある。これらの結果やその他後に述べる規格及び試験方法の設定に際して考慮すべき諸要素をふまえて、最終製品（原薬や製剤）段階での規格及び試験方法が暫定的に定められる。この製品段階での規格及び試験方法や工程内管理試験の妥当性は、非臨床安全性試験や臨床試験に用いたロットを含む適当なロット数の製品についてのロット分析により評価される。場合によっては、規格及び試験方法を再検討する必要、ひいては製造工程の一部を再構築する必要がある。工程内管理試験及び規格及び試験方法はきわめて重要な評価対象であり、承認事項である。

一連のロット分析は言うまでもなく製造工程の妥当性、恒常性の検証をも重要な目的の一つとしている。こうして製造工程の妥当性、恒常性が製品の分析によって評価/検証されることにもなるが、以降の製品における望ましい品質やその恒常性の確保が妥当性と恒常性を評価/検証された製造工程によって保証されることにもなる。製造工程と製品とは常に双方向的に、あるいは相補的に妥当性や恒常性が評価/検証される関係にあるといえる。

このように、承認時には、①プロセス評価/検証、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原薬及び製剤における適切な規格及び試験方法設定の3つのアプローチを相互補完的に合わせて、全体として目的タンパク質性医薬品の品質を保証するという方策を示す必要があることが、ICHでも国際的合意事項として明確にされたところである<sup>11,12)</sup>。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。トランスジェニック動物由来医薬品においても、他のバイオテクノロジー応用医薬品と同様に、プロセス評価/検証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及び試験方法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ろう。

承認後には、実生産スケールで必要なプロセスバリデーションを実施し、製造工程の恒常性を検証する。また、製品レベルでの品質の恒常性の確保に関する確認は、承認された工程内管理試験や原薬及び製剤での規格及び試験方法によって行われる。

## 2.8.2 不純物および有害因子の除去のプロセス評価/検証

不純物および有害因子の除去のプロセス評価/検証はトランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性を担保する

上で、非常に重要なステップであるので、以下に詳述する。

不純物については、原材料由来、製法由来、製品が変化したものなどが考えられる。これら不純物の除去については、製造工程中のあるステップと次のステップにおける製品中の不純物含量あるいは精製工程での除去効率などより評価/検証する。精製工程中での除去効率は、実際の工程を再現できるスケールダウンしたカラム等に対象物質を添加（スパイク）し、各工程単位毎に求められた除去率を積算することにより、予測することもできる。

不純物の問題とは別に、外来性有害因子の不活化、除去という観点からプロセス評価/検証と工程内管理試験がきわめて重要であることはすでに述べたとおりである。予測できる外来性有害因子としては、各種微生物、エンドトキシンなどがまず挙げられる。無菌試験、マイコプラズマ試験、エンドトキシン試験などを工程内の適切な段階における管理試験として設定することは、製品の安全性確保上の重要なポイントである。エンドトキシンについては精製工程における除去状況をモニターすることが望ましいこともある。

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。

一般にトランスジェニック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方策としては、1)生産用動物系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)製造工程の適切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製品のいずれの段階で実施すべきかは慎重に検討する必要がある。しかし、実施を考慮する際にまず選択すべき製品段階は、トランスジェニック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ある。この未精製バルクは、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、動物レベルでの一回の試験は、動物の適格性についてであって、試験時の動物に外来性ウイルスが存在しなかったからといって、次々生産されるバルク各ロットにもウイルスがないことを必ずしも常に保証するものではないからである。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。

次に目的物質の精製プロセスにおけるウイルスクリアランス評価試験等のあり方が問題となる。

ウイルスクリアランス試験の目的は、ウイルスの不活化や除去に有効と考えられるあるプロセスについて評価すること、それらの各プロセスを併せて全体としてウイルスがどの



程度減少したかを定量的に測定することにある。

このウイルスクリアランス評価試験には2つのアプローチが考えられる。その一つは、未精製バルク等に現に存在が知られているウイルスそのもののクリアランスを評価するためのプロセス評価試験（ウイルスクリアランス評価試験）、もう一つは、ある特定のウイルスの不活化や除去目的を達成しようとするよりむしろ、そのプロセスがもつウイルスを排除する能力の特性を解析するための、プロセス特性解析試験（ウイルスクリアランス特性解析試験）である。

前者は、実際例としてはほとんど考えられないケースである。しかし、目的物質がある重篤な疾患を治療するのにきわめて有用な医薬品で、混在するウイルスあるいはウイルス様粒子がヒトに対する病原性を持たず、また精製プロセスにおいて不活化、除去できるようなケースについては、予めウイルスの混在のみを理由に製品を排除することは必ずしも合理的ではないところから考慮に入れることとした。

ウイルスクリアランスに関するプロセス評価試験あるいはプロセス特性解析試験に際して重要なことの一つは、どのようなウイルス類を実験に使用するかということである。このようなウイルス類を仮に3つのカテゴリー、すなわち“関連ウイルス”、“特異的モデルウイルス”、“非特異的モデルウイルス”に分けることとする。これはICHガイドライン<sup>3)</sup>およびその通知<sup>4)</sup>で細胞株由来のバイオテクノロジー製品について採用されている考え方である。

“関連ウイルス”とは、製造過程で使用される動物、飼料、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で、ウイルスクリアランスに関するプロセス評価に用いられるものである。これらのウイルス類は、実際に存在するものなので不活化過程あるいは精製過程がこれらを不活化・除去する能力があることを示す必要がある。

一方、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プロセス評価にうまく適用出来ないといった場合には、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物理的・化学的性質を有するものである。

これら2つのカテゴリーのウイルス類は、実際に存在するウイルスのクリアランスに関するプロセス評価に用いられるものであるが、それとは別の観点のアプローチであるプロセス特性解析試験、つまり、一般にあるプロセスがウイルスの除去や不活化に関してどの程度の能力を有するかが目的である場合、すなわちプロセスがもつウイルス排除能力の特性を解析するために用いられるのが“非特異性モデルウイルス”である。

非特異的モデルウイルスとしては、目的からしてさまざま

な異なる性質を持つものが用いられるべきである。例えば、DNAウイルスとRNAウイルス、外殻（エンベロップ）を有するウイルスと有さないもの、サイズの異なるものなどの全てが包含しているようにウイルスのあるセットを選択する必要がある。このような実験目的には、現在、少なくとも3種類以上の非特異的ウイルスを使用することが望ましいとされている。どのようなウイルスを何種類選択するかは、製造に用いた動物種や製造過程の内容とどう解析したかにもよる。この非特異的モデルウイルスを用いたプロセス特性解析試験は未精製バルク等におけるウイルスの存在の有無にかかわらず実施する必要がある。

ウイルスクリアランス手順の評価と特性解析に関連する主な事項としては、上に述べたA)ウイルスクリアランス評価試験及び特性解析試験に用いるウイルスの選択以外に、B)ウイルスクリアランス試験のデザインと実施要領、C)ウイルスクリアランス試験の解釈、D)ウイルスクリアランス試験の限界、E)統計、F)ウイルスクリアランスの再評価などがある。詳細についてはウイルス安全性評価に関するICHガイドラインQ5A<sup>3)</sup>および通知<sup>4)</sup>を参照されたい。

## 2.9 規格及び試験方法について

トランスジェニック動物由来医薬品の品質の保証及び恒常性の確保を図る直接の方策あるいはその基盤には、さまざまなものが挙げられる。開発段階においては、①製造工程の確かな設定、②製品の特性や品質の十分な特性解析、③製造工程の評価/検証、承認時においては、④適切な規格及び試験方法の設定、⑤工程内管理試験の設定、⑥安定性試験の評価、承認後においては、⑦設定された規格及び試験方法の履行、⑧設定された工程内管理試験の履行、⑨最終的に定められた製造工程の評価/検証とGMPの遵守、⑩原材料その他医薬品製造に用いられる試薬類や資材の品質管理などが挙げられる。これらの要素をすべて適正に充たすことによって医薬品の適切な品質が保証されるが、規格及び試験方法が承認後の医薬品の品質とそれを基盤とした有効性、安全性の維持、保証に中心的役割を演ずることは言うまでもない。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は品質の恒常性を図る上で基本的な方策である。

規格及び試験方法の本来の目的は、原薬や製剤の特性を徹底的に解析することではない。目的は品質の確認やその恒常性のチェックにある。試験項目、試験方法及び規格値/適否の判定基準はこのような観点をふまえて選択する。しかし、開発段階で明らかになったトランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品の品質上の特性を的確に反映した規格及び試験方法を設定し、ロット毎の品質保証試験に役立たせることはきわめて重要である。特に、医薬品の安全性及び有効性を確保するために有用な分子特性及び生物学的な特性に焦点を当てる必要がある。

トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品の特徴を考慮すると、一般的には少なくとも、①有効成分の同一性・構造確認に関する試験法の設定、②有効成分の均一性、もしくは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有効成分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製法に付随して混入が予想される不純物や目的物関連の類縁物質に特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)の保証に係わる試験法の設定、などに大きな関心が払われる必要がある。

さらに、規格及び試験方法を適切に設定するためには、1)製造の一定性を示すために使用したロットから得られたデータ、及び製造方法に依存して派生する種類や存在量が異なる目的物質関連物質、目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物について十分な考慮を払うこと、2)安定性試験データを勘案すること、3)非臨床試験及び臨床試験に使用したロットから得られたデータに基づくこと、4)データは分析法に依存する場合もあるので、参考にするデータが規格及び試験方法で設定したデータと分析法の面からみて関連していることを確認しておくこと、及び適切な分析法を設定すること、などが重要な要素である。

ここで留意すべきことは、高度に精製されたタンパク性医薬品にあつては、生物活性の保証に加え、タンパク化学的性質の保証を重要な柱にすることが必然的な流れとなつていくということである。

また、品質確保のための方策全体における原薬及び製剤の規格及び試験方法の位置づけについては既に述べたとおり、プロセス評価/検証と工程内管理試験と合わせて相互補完的に考える方向を明確に目指すべきである。

以下にトランスジェニック動物由来医薬品の原薬あるいは製剤の規格及び試験方法(ロット毎の品質試験)における主要項目とその設定上の留意点について簡単に述べておく。

- (1) 規格及び試験方法に採用する項目及び試験法の選択は、製品により異なる。また、合理的な理由がある場合は、必ずしも一律に通知<sup>12)</sup>の適用が求められている訳ではない。また、項目によってはその設定に、弾力的な考え方で対処しても差し支えないものもある。
- (2) 規格及び試験方法は全体として目的とする医薬品の品質を確認し、その恒常性を図るためのものであるから、全体のバランスを考えて項目及び試験方法を過不足なく、適切に設定することが望ましい。また、同一原理の、同一趣旨の試験をそれぞれ別の項目で重複させる必要はない。
- (3) 試験項目及び試験方法の選択理由、規格値/適否の判定基準の適合範囲の設定根拠を明らかにする必要がある。規格値/適否の判定基準は、非臨床試験や臨床試験に用いたロットから得られたデータ、製造の一定性を示すため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、並びに製品の開発段階で得られた適切なデータに基づい

て設定し、その根拠を示す必要がある。

- (4) 原薬又は製剤の段階で試験を実施するより、むしろ製造工程のある段階で試験を実施する方が適切な場合もある。これを工程内管理試験と称しているが、その試験方法及び規格値/判定基準はわが国では規制対象であり、承認事項になる。この場合、原薬又は製剤の段階で試験を重ねて実施する必要はない。
- (5) 全ての原薬に適用されると思われる規格及び試験方法の項目として、①外観・性状、②確認試験、③純度及び不純物、④力価、⑤タンパク質量などがある。また、適宜、薬局方の試験(例えば、エンドトキシンの検出)を行う。さらに個別の原薬ごとに必要な試験と規格値/判定基準が設定されることになる。一方、製剤の規格及び試験方法として全ての製剤に適用される項目には、通例、原薬のそれと同様に、①外観・性状、②確認試験、③純度及び不純物、④力価、⑤タンパク質量などが挙げられる。さらに剤形の種類に応じて薬局方上の規定が適用される。薬局方に記載されている代表的な試験法には、無菌試験、エンドトキシン、微生物限度試験、実容量試験、不溶性微粒子試験、重量偏差/含量均一性試験及び凍結乾燥製剤の含湿度があるが、これら以外の試験も適用できる。重量偏差/含量均一性試験については、工程管理試験として実施し、相応する規格値を設定するという方策でもよい。
- (6) 確認試験では、その原薬や製剤に極めて特異的である必要がある。また、分子構造上の特徴やその他の特有の性質に基づいて設定する必要がある。分子全体としての同一性の確認や、構成成分あるいは部分構造の確認が行われることになる。もし適当な標準物質があれば、HPLC法、ポリアクリルアミド電気泳動法(PAGE)、SDS-PAGE、等電点電気泳動法(IEF)などの理化学試験法が分子全体としての簡便な確認同定法になり得る。特にHPLC法では、成長ホルモンの例のように分子量2万程度のタンパク質中のアミノ酸1個の違いが識別可能な場合もある。IEFでN末端メチオニン1個の有無のみが異なる分子種を相互に識別できた例もある。免疫学的手法や生物学的手法も有力な同定手段である。これらの手法を電気泳動法などと組み合わせれば確認手段としては一層確実なものとなる。

原薬の確認試験には、2種類以上の試験(理化学試験、生物学的試験、免疫化学試験)を実施することが推奨されている。製剤の確認試験では、ほとんどの場合、1種類の試験で十分であると考えられるが、製品によっては同一性を確認するためには2種類以上の試験が必要となる場合もある。

確認試験の実施にあたって適切な標準物質がない場合でも、SDS-PAGEによる分子量、IEFによる等電点の測定などは、一つの確認手段となり得る。これらは示性値的な扱いで別項目として設定することもある。また、予めその抗原特異性が判明している抗体を用いた免疫化学的試験や

力価測定法（定量法）のそれとは異なる特異的なバイオアッセイも活用できる場合がある。

最終製品が複数の活性成分からなる場合には、その種類の確認やおおよその存在比の確認を行うことも必要かも知れない。

一方、構成成分等の確認としては、構成アミノ酸や糖含量などがあるが、これらの項目は一般に確認試験とは別の独立項目として設定されることが多い。タンパク質や糖の比色反応は意義に乏しい。ただし、脂肪などが構成成分として含まれる場合は、それらを適切に確認することは必要である。また、末端アミノ酸分析が重要な意味を持つ場合もある。

- (7) 構成アミノ酸あるいはペプチドマップは各ロットの一次構造における正当性を裏付ける上できわめて重要である。タンパク質性医薬品の場合、同一の生物活性が必ずしも同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味しない。意図の変換はもとより、意図しない変異、プロセッシングの可能性をチェックするために、目的の一次構造保持に関する試験は必要である。構成アミノ酸分析は、試験対象のタンパク質を加水分解してその構成アミノ酸比を標準アミノ酸を基に分析することになるので標準タンパク質を必ずしも必要としない。構成アミノ酸の分析精度は、被験タンパク質の分子量が数万以上であるときや、糖タンパク質の場合は低下する。分析条件により個々のアミノ酸の回収率なども変わってくるので、規格値は、実測値に則して個々に設定する方がよい。ペプチドマップは、標準物質（標準タンパク質）を必要とする。標準物質と試料とを同一条件で加水分解処理して得たペプチド断片の同一性を比較試験することになるが、分析手段としてはHPLC法が優れている。ポイントの一つは適切な加水分解条件の選択であるが、分子量の比較的高いタンパク質や糖タンパク質でも利用できる。

なお、他の試験法なども含めて、構造確認が十分可能であると判断される場合には、構成アミノ酸、ペプチドマップいずれかを省略することは差し支えないとされている。

- (8) 糖タンパク質における糖部分については、規格及び試験方法でどの程度の試験を行うべきかは、糖鎖の役割と日常的に用いられている分析法との兼ね合いで考慮する問題である。ちなみに、構造・組成の解析の項では、糖含量（中性糖、アミノ糖、シアル酸）を決定する他、糖鎖構造、オリゴ糖パターン（枝分かれ構造の全体像）及びポリペプチド鎖の糖鎖結合部位を可能な範囲で分析することとなっている。最近の糖タンパク質に関する解析法の急速な発達と知見の集積状況からすれば、例えば、質量分析法を用いれば、ポリペプチド鎖の糖鎖結合部位毎に結合している糖鎖の不均一性、すなわち、数十種類程度の糖鎖の構造程度までは、比較的簡単に分析することが可能になっている。オリゴ糖パターン程度ならさらに簡便な日常的分析法

で測定可能である。したがって、規格及び試験方法において、例えばフェノール-硫酸法といった一般的な糖の比色定量法で測定して、単にトータルとして糖が何%〜何%にあると規格化することでよいとするのは、いまや必ずしも一般に妥当であるとは思えない。特に、目的有効成分の糖部分のもつ生物活性発現への関与、体内動態への関与、免疫原性との関連などなんらかの生物学的役割が明らかにされている場合は、少なくともその背景となる糖構造を端的に反映できるような規格試験法を設定することが望ましいであろう。また、タンパク質部分の構造は基本的に同じであるが糖部分において差異があるような同種同効医薬品で、その差異により当該医薬品の有効性、安全性上の特長に独自性があると主張するような場合には、規格の設定をその主張の裏付けとなるよう連動させておく必要がある。技術開発の進み具合からすれば、単に糖の含量や個々の構成糖の組成比の規格化というレベルにとどまらず、糖鎖部分の不均一性や一定の糖鎖組成比の規格化、すなわち一種の糖鎖マッピングの設定も品質の恒常性という観点から必要になると思われる。

- (9) タンパク質性医薬品の場合、絶対的な純度を決定するのはむずかしく、また、その結果は試験方法に依存する。原薬の純度を評価する際には、一般に、各種の分析方法を組み合わせるにより行う。ところで、「原薬」は「目的物質」、「目的物質関連物質」並びに「目的物質由来不純物」及び「製造工程由来不純物」から構成される。また、緩衝液のような他の構成成分を含めた添加剤を含有する場合もある。「目的物質」とは、①予期した構造を有するタンパク質、②DNA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（グリコフォームの生成も含む）から期待されるタンパク質、及び④生物活性分子を生産するのに必要な、意図的な加工・修飾から期待されるタンパク質を指す。「目的物質関連物質」とは、製造中や保存中に生成する目的産物の分子変化体で、生物活性があり、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で、目的物質に匹敵する特性を備えており、不純物とは考えないものである。「目的物質由来不純物」とは、目的物質の分子変化体で、生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質に匹敵する特性を持たないものである。「製造工程由来不純物」とは、文字通り、製造工程に由来する不純物である。

原薬の純度を規格及び試験方法として設定しようとする場合、目的物質、目的物質関連物質及び不純物を相互に分離することに重点をおいた分析方法の選択、最適化に留意する必要がある。

「目的物質関連物質」の代表的なものとしては、インスリンやヒト成長ホルモンの脱アミド体、ヒト成長ホルモンのメチオニンスルホキシド体などがある。HPLC法でこれらの変化体が識別分析できるようになっている。目的物質関

連物質については、それぞれ個別の若しくは総量での規格値を適切に設定する必要がある。

「目的物質由来不純物」には、例えば、前駆体、製造中や保存中に生成する分解物・変化物がある。後者には、目的物質のペプチド結合が加水分解酵素や化学物質により開裂して生じた切断体、異性体、ジスルフィド結合ミスマッチ体、目的物質の二量体や多量体が含まれる。「目的物質由来不純物」を規格及び試験方法として設定しようとする場合、目的物質及び目的物質関連物質と分離分析できる方法の選択、最適化に留意する必要がある。HPLC法や電気泳動法が一般に有用である。「目的物質由来不純物」に関する規格値は、それぞれ個別に若しくは総量で適切に設定する必要がある。不純物のうち、あるものについては、効果的なプロセスコントロールにより許容できるレベル内に収まっているか、あるいは容認できるレベル以下まで効率的に除去できることを適切な検討によって実証していれば、原薬や製剤を対象とする試験は必ずしも必要ではなく、かつ規格及び試験方法に含めなくてもよい場合がある。本件に関する検討については実生産規模での確認が必要なこともある。

「製造工程由来不純物」には、動物に由来するもの、動物からの採取材料（乳汁、血液、尿、その他の組織）に由来するもの、あるいは採取以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するものがある。

採取材料に由来する不純物には、例えば、採取材料由来タンパク質、核酸などがある。採取材料由来タンパク質に対しては、広範なタンパク質性不純物を検出することができる高感度な分析法、例えばイムノアッセイが一般に用いられる。イムノアッセイの場合、試験に用いるポリクローナル抗体の調製に工夫が必要である。考えられる方法は、遺伝子を導入していない動物の採取材料を医薬品製造時と同様の分離、精製操作を行い、部分精製段階における試料を抗原として抗体を得るという方法である。採取材料由来タンパク質に対する特異抗体試料の作製方法のもう一つの工夫として、採取材料由来タンパク質の部分精製品を免疫して作製した抗血清を、部分精製品で作製したアフィニティカラムにかけて精製し、その特異性並びにタイターを高める方法などもある。採取材料由来のタンパク質などの混入が問題となるのは、それ自体がヒトに対し抗原性物質となる可能性があるからである。

採取材料由来のDNAは、（ハイブリダイゼーション法などにより）製品を直接測定することにより検出される。

採取以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来する不純物には、例えば、酵素、化学的・生化学的試薬（例えば、臭化シアン、グアニジン、酸化剤及び還元剤）、無機塩（例えば、重金属、ヒ素、非金属イオン）、溶媒、クロマトグラフ用担体、アフィニティクロマトグラフ用担体のリガンド（例えば、モノクローナル抗

体）、その他の漏出物などがある。製造工程の適切な管理により、これらの不純物は最小限にする必要がある。

精製過程で用いる試薬類などの原薬への混入の可能性等については、プロセス評価/検証で予め適切な検討がなされ、可能性が否定されていれば、ロット毎の規格項目として必ずしも設定する必要はない。しかし、これにはあくまで一度はきちんとしたプロセス評価/検証を行って、当該成分の除去状況、あるいはその除去効率などについての合理的なデータ、根拠が示されることが前提となっている。したがって、同一目的有効成分を最終産物とする場合でも、製法、精製法などが変更されれば、こうしたプロセス評価/検証に依拠した純度試験の項目の取捨選択基準が変わるので、改めてその基準の見直しをしなければならない。工程内管理試験を設定するなど適切なプロセスコントロールを行うことが示される場合には、原薬で繰り返し規格値を設定する必要はない。

製剤については、製剤化中あるいは製剤の保存中に特異的に生成する分解物・変化物があることが判明していたり、原薬に元々存在する目的物質由来不純物が量的に増加する場合には、これらの不純物のレベルを測定し、規格値を設定する必要がある。

なお、不純物とは別のカテゴリーとして「混入汚染物質」がある。医薬品中の「混入汚染物質」とは、製造工程には本来存在しないはずのもので、外来性の化学物質や生化学的な物質（例えば、微生物由来プロテアーゼ）あるいは微生物類のようなものすべてを指す。汚染物質の混入は厳に避けるべきであり、適切な工程内管理試験の規格値/適否の判定基準や処置基準値あるいは原薬及び製剤の規格及び試験方法により適正に管理する必要がある。製造工程に迷入する可能性のあるウイルスについては、製造工程のウイルス除去/不活化の能力を示す必要がある。その方策については 2.8.2 項及び「ヒト又は動物起源細胞株を用いたバイオテクノロジー応用製品のウイルス安全性評価」<sup>4)</sup>を参照されたい。

- (10) トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品の原薬の規格及び試験方法には、適切な、バリデーションされた力価試験が必要である。しかし、適切な力価試験を製剤について設定していれば、原薬の段階での定量的な評価には、代替試験法（理化学的試験法や生物学的試験法）でも十分な場合がある。また、比活性の測定により、更に有用な情報が得られる場合もある。一方、製剤の場合、適切な力価試験を原薬について設定していれば、製剤の段階での定量的な評価には、代替試験法（理化学的試験法や生物学的試験法）でも十分な場合がある。ただし、そのような設定を行う場合には、製剤化の過程で生物活性の低下は生じないなど、その妥当性を示す必要がある。

生物学的試験は、タンパク質性医薬品が目的とする活性高次構造を形成し、特徴的な生物活性を保持していること

を立証する上で重要な試験である。また、臨床上の効果を直接反映する場合も多い。しかし、臨床上の効果を直接反映するような試験は一般に動物を用いた *in vivo* 試験であり、動物愛護の観点からはできることなら回避したい。また、煩雑で多大の労力と時間がかかる割にはきわめてばらつきの多い結果しかもたらさないこともしばしばある。その結果として、有効成分自体はきわめて純度も高く、均質であるにもかかわらず、実態とかけ離れた非常に広い規格巾を設定せざるを得ないという不合理に遭遇することも少なくない。そこで、臨床上の効果とは必ずしも相関しないが、より高精度で簡便な *in vitro* 試験法で定量するという方策も考えられる。この場合、*in vivo* 試験を半定量的な試験法として別に設定するのか、あるいは原薬、製剤いずれかで設定するのか、あるいはルーチンの試験方法としては設定しないのか、いろいろなケースが考えられる。いずれにしても、設定された方策の妥当性が示される必要がある。ちなみに、エリスロポエチンの例にみられるように、*in vivo* 活性に必須な糖鎖構造が *in vitro* 活性には制御的に機能し、糖鎖構造如何では、*in vivo* 活性と *in vitro* 活性が逆相関の関係になる場合もある<sup>54)</sup>ので慎重なアプローチが必要である。エリスロポエチンの場合は、現状で *in vitro* 試験のみでコントロールすることの合理性を見出すのは難しい。同種同効の有効成分でありながら、わずかに構造の異なるさまざまな分子種が生産されているのがタンパク質性医薬品の特徴の一つであるが、これらは採用されたパイオアッセイ系それぞれに依存して互いに相関しない力価を示す例も多い。しかし、一般的な解決策はなく、一つ一つ吟味しながら合理的な規格及び試験方法の設定を模索していくしかない。

トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品では、なによりも有効成分が物質的にほとんど純粋なものとして得られることを考慮し、適切で目的にかなうならば、理化学的試験法を定量法とすることは、差し支えない。ただし、これらの方法によるときは、その特異性において、生物活性との相関が確認されている必要がある。すなわち、HPLC法を採用するとしても、定量しようとするピークに帰属される物質は、少なくとも完全に生物活性のあるもの、すなわち目的物質か目的物質関連物質であり、不純物はもとより、活性構造の変化などで活性を失ったもの、あるいは本来のものと同等の活性を示さなくなったものは、当該ピークとは分離されたピークとして現れること、ピーク面積（高さ）と活性との関係が予め明らかにされていることなどの前提条件が必要である。また、十分に確立された製造実績が必要である。ただし、現時点では、一般に生物学的試験による定量によらないでHPLC法で試験することの妥当性が立証されているのは、インスリンとヒト成長ホルモンのみである。理化学的試験法を物質量からの観測の定量法とし、信頼区間が比較的広い生物学的試験を別

に設定するという組み合わせもあるかも知れない。

- (II) 新たなトランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品を承認申請する際に、国際標準品又は国内標準品が利用できる場合はほとんどない。したがって一般には承認申請時まで、製造業者は自ら、代表的な製造ロットでかつ臨床試験に用いた検体を代表するロットから調製し適切に特性解析した「自家一次標準物質」を確立しておく必要がある。一般的にはさらに、一次標準物質を基に検定した「自家常用標準物質」を設定する。自家常用標準物質は、自家一次標準物質と同様に調製され、ある特定の製品特性について、各生産ロットを評価、管理するために、確立されたものである。

国際標準品又は国内標準品が利用でき、かつ適切であれば、これを基に標準物質を検定する必要がある。生物学的試験及び理化学試験の両方に同一の標準物質を使用することが望ましいが、別々の標準物質が必要な場合もある。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の純度は必ずしも要求されない。標準物質の力価に関しては、範囲で定めることはしない。一方、ペプチドマップ用やHPLC用の標準物質の場合には、目的に応じた構造、組成、諸性質などについての徹底的な解析結果と厳密な純度が要求される。また、目的物質関連物質、目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物に対して、それぞれの標準物質を個別に確立する必要がある場合もある。適宜、承認申請書中に、標準物質の調製や精製に関する記述を入れておく必要がある。標準物質の特性解析、保存条件、及び安定化のための製剤設計についても、資料を作成し、提出する必要がある。

なお、パイオ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。

## 2.10 安定性試験

一般に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することにある。

トランスジェニック動物由来医薬品においてもこの目的そのものは変わらない。しかし、その本質が通常の化学物質とは異なる特性を有しているため、これらの医薬品が安定に維持できる保存条件及び期間を定めるために行われる安定性試験の実施要領は、その特性に十分配慮したものである必要がある。トランスジェニック動物由来医薬品の場合、その有効成分は、一般にはタンパク質やポリペプチドであり、分子の高次構造（コンホメーション）の維持や、それを基盤とする生物学的活性の維持には、共有結合はもとより非共有結

合が関与している。また、温度変化、酸化、光、イオン強度、せん断のような環境因子に特に敏感である。生物学的活性を維持し、分解などを回避するには、一般に厳密な保存条件が必要とする。

原薬又は製剤のいずれの貯法を申請する際にも、その根拠となる第一義的なデータは、実保存期間、実保存条件での長期保存試験により得られるデータである。したがって、適切な長期保存試験計画の立案は、製品開発の成否にきわめて重要である。

### 2.10.1 バッチの選定

#### 1) 原薬 (バルク)

原薬が製造後、製剤化工程又は最終工程の前の段階で保存される場合には、実生産スケールを反映する3バッチ以上の試料について安定性試験成績を提出する必要がある。6カ月以上の有効期間を予定しているものについては承認申請時に最低6カ月の試験データを提出する。6カ月未満の有効期間を予定しているもの場合、当初の申請に最低限どの程度のデータが必要かについてはケースバイケースで決定されるであろう。

原薬の安定性試験に使用する容器は、実生産の製造工程で実際に用いられる容器を適切に体现できるものを用いる必要がある。実際の製造に通常使用されるものと同じ材質及び同じタイプの容器/栓であればサイズの小さな容器を用いて安定性試験を実施しても差し支えない。

#### 2) 中間製品

トランスジェニック動物由来医薬品の製造において、ある特定の間接製品の品質とその管理が最終製品の製造に重要となる場合がある。その場合、製造業者は開発された製造工程において、該当する中間製品を定め、自家試験データを取得し、その安定性を保証する工程管理限度値を設定することが一般的に求められる。

#### 3) 製剤 (最終包装製品)

実生産スケールを反映する3バッチ以上の製剤(最終包装製品)について安定性試験成績を提出する。安定性試験に用いる製剤(最終包装製品)の各バッチは、可能な範囲で異なる原薬バッチを使用して製造したものとする。予定される有効期間と提出すべき実験データの関係は原薬の場合と同様である。

### 2.10.2 安定性評価

一般的に、トランスジェニック動物由来医薬品の安定性面での特性は、数種類の安定性評価試験法あるいはいろいろなパラメーターを組み合わせることで評価できる。したがって、当該医薬品の同一性、純度及び力価の変化を捉えることができる総合的な安定性評価法を考案する必要がある。

この安定性評価法に含まれる試験方法はバリデートされたものであって、これに関する資料は申請時点において提出

できる状態にしておくべきである。どのような試験項目を採用するかは製品の特徴に応じて定められる。以下に、安定性評価に関連する事項のうち主なものを示す。

#### 1) 安定性試験実施計画書/結果報告書

原薬及び製剤について、貯法及び有効期間の妥当性を示す試験実施間隔などを含め、有効期間中をとおしてトランスジェニック動物由来医薬品が安定であることを示す情報がすべて記載された安定性試験実施計画書/結果報告書を作成する必要がある。統計学的手法は安定性に関するICHガイドラインに記載されている方法を用いる。

#### 2) 力価

製品の臨床効果と生物学的活性とが関連性を有している場合には、力価試験は安定性評価の一部であるべきである。

力価の経時的変化に関する検討は、安定性試験実施計画書にしたがって適切な間隔で実施される必要がある。またその結果は、可能な限り、国内又は国際的に認定された標準品を基準として検定された生物学的活性単位で報告される必要がある。国内標準品又は国際標準品がない場合、試験結果を、適切な特性解析がなされた自家標準物質を用いて得られた自家単位でのデータにより報告してもよい。

トランスジェニック動物由来医薬品の中には、力価が有効成分と第二の成分とのコンジュゲーションあるいはアジュバントとの結合に依存しているものがある。コンジュゲートあるいはアジュバントとして用いられたキャリアーからの有効成分の離脱については、流通過程で遭遇する条件も含め、実保存期間、実保存温度で検討する必要がある。この種の製品にあつては、*in vitro*の生物学的活性試験や物理的・化学的特性分析が実施不可能かあるいは正確性に欠く結果を与えるため、安定性評価が困難な場合がある。このような*in vitro*試験における不十分さを補完するために、適切な方策(例えば、コンジュゲーションや結合前の製品についての試験、第二成分から有効成分の離脱の評価、*in vivo*による力価試験)を考えたり、又は適切な代替試験の活用を考慮する必要がある。

#### 3) 純度及び分子特性の解析

安定性試験に供されたトランスジェニック動物由来医薬品に関しては、純度はもとより、その分解物・変化物について、個々の量及び総量を可能な限り測定する必要がある。分解物・変化物の許容限界量は、非臨床及び臨床試験に用いた原薬及び製剤の分析結果に基づくべきである。

適切な理化学的分析手法、生化学的手法及び免疫化学的分析手法を用いれば、原薬及び(又は)製剤について広範囲な特性解析(例えば、分子量、荷電、親水性)を行うことができ、保存中の脱アミド化、酸化、スルホキシド化、凝集又は断片化などによる物質変化を的確に検出することが可能となる。有用な分析方法の例としては、電気泳動法(SDS-PAGE)、免疫電気泳動法、ウェスタンブロット、等電点電気泳動法など、高分離能クロマトグラフ法(例えば逆相クロマトグラ

フ法, ゲル濾過クロマトグラフ法, イオン交換クロマトグラフ法, アフィニティクロマトグラフ法) 及びペプチドマッピングがある。

長期保存試験, 加速試験及び(又は)苛酷試験において, 分解物・変化物の生成を示す有意な質的又は量的変化が検出された場合には, 計画に沿って実施された長期保存試験中に生成する分解物・変化物が安全性上問題となる可能性につき検討・考察する必要がある。また, それらの特性解析と定量的把握が必要かどうかにつき検討・考察するべきである。許容限度値については, 非臨床及び臨床試験に用いた原薬及び(又は)製剤で検出された水準を勘案して設定し, その妥当性の根拠を示す必要がある。

### 2.10.3 保存条件

#### 1) 温度

トランスジェニック動物由来医薬品の多くは保存温度を厳密に限定する必要があるため, 実保存温度, 実保存期間で実施される安定性試験の保存条件は, 通常, 申請する保存温度に限定される。

#### 2) 湿度

申請しようとする容器(及び申請しようとする保存条件)が, 高湿度及び低湿度に対して十分な防湿効果を有することを証明できる場合, 各種の相対湿度条件下での安定性試験は一般に省略することができる。防湿性の容器を使用しない場合には, 適切な安定性のデータを提出する。

#### 3) 加速及び苛酷条件

加速試験は, ①有効期間の設定上有用な補足情報を提供する; ②将来の製品開発(例えば, 製剤処方変更, スケールアップなどのような製法変更を申請する際の予備的評価)に資する当該物質の安定性面での情報を提供する; ③安定性試験に用いられる分析方法のバリデーションを行う際に役立つ; ④原薬又は製剤の変化の様相(分解特性)の解明に役立つ情報をもたらす, などの可能性がある。

苛酷試験は, ①製品が申請する保存条件以外の条件に偶発的に曝された場合(例えば, 輸送中), 製品に悪影響があるかどうかを判断する; ②どのような特異的試験パラメーターが製品の安定性指標として最適かを評価する, ことなどに有用である可能性がある。また, ③極端な条件下に原薬又は製剤を曝すことで, 変化・分解のパターンを明らかにするのに役立つ可能性がある。仮に変化・分解のパターンが明らかとなるのであれば, 同様な変化が申請しようとしている保存条件下で起きるかどうかをモニターする必要がある。条件については個々のトランスジェニック製品の特性を考え, ケースバイケースで慎重に選択する必要がある。

#### 4) 容器/栓

トランスジェニック動物由来医薬品において, 製剤と容器や栓との相互作用によって製品の品質変化が起こる可能性がある。アンプル製品以外の液体の製品で, 使用される容器

や栓との相互作用が明らかになっていない場合については, 正立の状態だけでなく容器を倒立又は横倒しさせた状態も含めた(すなわち栓と接触した状態で)安定性試験を実施し, 栓が製品の品質に影響を及ぼさないか検討する必要がある。市販予定のすべての容器/栓の組み合わせについてのデータが必要である。

また, 通常の単回使用バイアルに必要な標準的なデータに加えて, 注射針などを何度も栓から入れて繰り返し抜き取り使用するマルチプルドーズバイアルの場合は, 容器, 包装, 添付文書などに記載する使用手引に規定された最長使用期間中, 栓がそうした条件に耐え, 製品の力価, 純度, 品質が保持されていることを示す必要がある。

#### 5) 凍結乾燥品の溶解後の安定性

凍結乾燥品の溶解後の安定性については, 容器, 包装, 添付文書などに記載された条件及び最長保存期間での安定性を検討する必要がある。

### 2.10.4 試験頻度/期間

1年以下の有効期間を申請する場合には, 長期保存試験は最初の3カ月は1カ月ごと, その後は3カ月ごとに試験する。1年を超える有効期間を申請する場合は, 最初の1年目は3カ月ごと, 2年目は6カ月ごと, それ以降は1年ごとに試験することとする。

### 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(ICH S6 国際調和ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の前臨床安全性評価」<sup>13,14)</sup>に準じ, ヒトで起こりうる安全性, 有効性上の問題を, 適切に評価できる非臨床試験によって十分検討し, その危険性と有益性の科学的妥当性を考察する。

妥当性が認められた場合には第I相, 第II相及び第III相と臨床試験を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。その際動物由来微生物の迷入による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。

特に次の項目について, 詳細に検討する。

- 1 局所的及び全身のアレルギー
- 2 抗体産生(有効成分に対する抗体など)
- 3 投与部位の局所反応
- 4 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
- 5 発熱性

なお, 既に生体由来等の同一有効成分のものが市販されている場合には, 当該同一有効成分医薬品を用いている患者とトランスジェニック動物を利用して製造される医薬品を用いている患者について, 抗体の推移, 作用の変動などを観察し, 比較考察するほか, 予測される治療期間, 患者数などを

考慮し、必要に応じて精密かつ客観的な比較試験を行う。

## 2.1.2 クローン動物を利用して生産される医薬品の品質、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

1.5 に記したように、動物工場としてのトランスジェニック動物の問題点を改善するために、体細胞クローン動物作出技術は二つの視点から動物工場の作出に利用が可能と考えられる。即ち初代トランスジェニック動物の作出効率を改善する手段としての利用、もう一つは均一な生産用動物を作出する手段としての利用である。現時点では、体細胞クローン動物の作出効率は依然として低く、さらに作出した動物の安定性、動物の均一性とも確認されていないため、生産用動物の作出への応用への具体的な動きはみられない。一方初代トランスジェニック動物作出のための利用についても、体細胞クローン動物作出効率はまだ低いため、マイクロマニピュレーション法から本格的にシフトするには至っていない。しかし、ターゲット特異的な遺伝子導入が可能である特性を生かし、今後応用例が増えてゆくものと考えられる。

そこで以下に体細胞クローン動物を利用して生産された医薬品の品質・安全性の確保の方策についても考察を加える。

即ち、初代トランスジェニッククローン動物を作出する場合、核移植されるドナー細胞に目的遺伝子を導入しクローン化するまでの過程は、生物薬品製造のための細胞基材に関するガイドライン<sup>9)</sup>を適用して評価することができる。体細胞やES細胞を含んだドナー細胞の核移植、および移植後の細胞の融合法については、その方法の詳細と妥当性を明らかにする。次のステップである仮親への卵子の移植、および妊娠、さらには初代トランスジェニッククローン動物の作出とその特性解析については、基本的には通常の「初代トランスジェニック動物の作出と特性解析」と同様のアプローチが適用できる。ただし、クローン動物の生物学的特性については未だ解明されていない問題も多く、今後の科学的知見の集積に応じた対応が必要とされるであろう。

生産用動物の作出に体細胞クローン動物を利用する場合においては、初代トランスジェニック動物からの細胞の分離、さらには核移植から生産用クローン動物の作出に至る操作の詳細と妥当性を明らかにする必要がある。また通常の交配による生産用動物の作出同様に、生産用クローン動物の選別の方法およびその基準を定める必要がある。一方、クローン化した形質転換細胞から核移植によって直接生産用トランスジェニッククローン動物を作出するケースにおいては、上記初代トランスジェニッククローン動物の作出の場合と同様のアプローチが適用できる。体細胞クローン動物の特性についてはまだ未知な部分が少なくないので、生産用トランスジェニッククローン動物の評価においては、特に同一性と安定性について、遺伝子レベル、目的タンパク質の構造、特

性、機能、生産量等、多方面からの慎重な検討が望まれる。その他の留意事項は、通常のトランスジェニック動物の作出、および動物の維持・管理と同様の原則を適用することができる。また、体細胞クローン動物からの目的物質の採取以降の工程については、今後クローン動物作出上の特別な技術が開発されない限り、従来のトランスジェニック動物を利用した医薬品の製造と同様の原則をあてはめることが可能と考えられる。

## おわりに

以上、本稿では医薬品としての申請が間近に迫っているトランスジェニック動物を用いて製造された医薬品の現状をまとめるとともに、その品質・安全性等の評価法について考察した。トランスジェニック動物を動物工場として用いるこの製造方法は、従来の組換え細胞による医薬品の生産と比較して生産コストの大きな引き下げが可能という大きなメリットゆえに、急速な普及が予想された時期があった。しかし、当初の予想に比較すると、今現在、動物工場による医薬品製造への急速なシフトは生じていない。その主な理由としては、医薬品生産動物の効率的作出と実用への応用が十分でなかったことが挙げられる。しかし、20世紀中には困難と思われていた核移植による体細胞クローン動物の作出が1997年に成功し、動物工場による医薬品生産は、生産コスト、製品の品質の一定性の確保という点でメリットが増す可能性も考えられるようになった。また、医薬品製造技術として、トランスジェニック動物やクローン動物作出技術に秀でたベンチャー企業と医薬品開発に長けた製薬企業との協力体制が次第に整いつつある。さらに発牛工学は日進月歩の状況にあり、現在問題となっているトランスジェニック動物/クローン動物の動物作出効率の低さ、あるいは動物の均一性、遺伝的安定性という点でも改良が重ねられるものと思われる。したがって、21世紀において、動物工場による医薬品生産は、バイオテクノロジー応用医薬品の製造方法として、重要な位置を占める可能性が高い。その時のためにも、我が国において、これら医薬品の品質・安全性等の評価のためのガイドライン作成を急ぐ必要がある。そのための基礎資料として本稿が役立つことができれば幸いである。

## 謝 辞

本稿の内容は、大阪大学大学院薬学系研究科 真弓忠範教授、大阪大学医学部附属動物実験施設 黒澤努助教授、京都大学大学院農学系研究科 今井裕教授、米国FDA-CBER Steven R. Bauer 博士、Genzyme Transgenics社 Michael W. Young 氏、Frederick D. Reinhart博士、Merry L. Harvey 氏、Timothy J. Maines 氏、PPL Therapeutics社 Ron James 博士、Fraser J. Leslie 氏、Marilyn Moore 氏との討議、あ



るいは情報提供の結果得られたものである。ここに心よりの感謝の意を表す。また、本稿は「医薬品研究」に掲載された論文<sup>59)</sup>を加筆、再構成したものである。同論文の内容の一部の転載をご許可くださいました寺尾允男日本公定書協会会長に心よりの感謝の意を表す。なお、本研究の一部は厚生科学研究費補助金医薬安全総合研究事業 (H10- 医薬-042) として実施されたものである。

## 文 献

- 1) US Food and Drug Administration: Center for Biologicals Evaluation and Research: Points to consider in the manufacture and testing of therapeutic products for human use derived from transgenic animals. (1995)
- 2) EU CPMP: Use of transgenic animals in the manufacture of biological medicinal products for human use. Ad hoc working party on biotechnology/pharmacy, Directorate-general III/3612/93 Final (1995)
- 3) ICH Harmonized Tripartite Guideline: "Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin" (1997)
- 4) ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について (厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第329号 平成12年2月22日)
- 5) ICH Harmonized Tripartite Guideline: "Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of r-DNA Derived Protein Products" (1995)
- 6) 組換えDNA技術を用いたタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析について (厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第3号 平成10年1月6日)
- 7) ICH Harmonized Tripartite Guideline: "Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products" (1995)
- 8) 生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の安定性試験について (厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第6号 平成10年1月6日)
- 9) ICH Harmonized Tripartite Guideline: "Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products" (1997)
- 10) 生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基材の由来, 調製及び特性解析について (厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第873号 平成12年7月14日)
- 11) ICH Harmonized Tripartite guideline: "Specifications: Test Procedure and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products" (1999)
- 12) 生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の規格及び試験方法の設定について (厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第571号 平成13年5月1日)
- 13) ICH Harmonized Tripartite guideline: "Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals" (1997)
- 14) バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価について (厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第326号 平成12年2月22日)
- 15) Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H.: *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 7380-7384 (1980)
- 16) Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Jr., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R. D., and Brinster, R.L.: *Nature* **315**, 680-683 (1985)
- 17) Simons, J.P., Wilmut, I., Clark, A.J., Archibald, A.L., Bishop, J.O., and Lathe, R.: *Bio/Technology* **6**, 179-183 (1988)
- 18) Wilmut, I., Archibald, A.L., McClenaghan, M., Simons, J.P., Whitelaw, C.B., and Clark, A.J.: *Experientia* **47**, 905-912 (1991)
- 19) 上田正次: "トランスジェニック動物を用いた医薬品の品質・安全性の確保" バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, エル・アイ・シー, 東京, pp. 443-452 (2001)
- 20) World Health Organization (WHO): Report of WHO Consultation on Public Health Issues related to Human and Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies, WHO, Geneva (1996)
- 21) World Health Organization (WHO): Infection Control Guidelines for Transmissible Spongiform Encephalopathies, Report on a WHO Consultation, WHO, Geneva (1999)
- 22) 西義介: ヒトの抗体をつくるトランスジェニックマウス, 日経サイエンス, **25**, 40-50 (1995)
- 23) Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K.H.: *Nature* **385**, 810-813 (1997)
- 24) Wilmut, I.: *Sci Am* **279**, 58-63 (1998)
- 25) Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., and Campbell, K.H.: *Science* **278**, 2130-2133 (1997)
- 26) Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destremes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W., and Echelard, Y.: *Nat Biotechnol* **17**, 456-461 (1999)
- 27) Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins,

- J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A., and Campbell, K. H.: *Nature* **407**, 86-90 (2000)
- 28) Denning, C., Burl, S., Ainslie, A., Bracken, J., Dinnyes, A., Fletcher, J., King, T., Ritchie, M., Ritchie, W.A., Rollo, M., de Sousa, P., Travers, A., Wilmut, I., and Clark, A.J.: *Nat Biotechnol* **19**, 559-562 (2001)
- 29) Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., and Tsunoda, Y.: *Science* **282**, 2095-2098 (1998)
- 30) Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., and Perry, A. C.: *Science* **289**, 1188-1190 (2000)
- 31) Young, L. E., Fernandes, K., McEvoy, T. G., Butterwith, S. C., Gutierrez, C. G., Carolan, C., Broadbent, P. J., Robinson, J. J., Wilmut, I., and Sinclair, K. D.: *Nat Genet* **27**, 153-154 (2001)
- 32) Ohgane, J., Wakayama, T., Kogo, Y., Senda, S., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R., and Shiota, K.: *Genesis* **30**, 45-50 (2001)
- 33) Chan, A. W., Homan, E. J., Ballou, L. U., Burns, J. C., and Bremel, R. D.: *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14028-14033 (1998)
- 34) Wakayama, T., Rodriguez, I., Perry, A. C., Yanagimachi, R., and Mombaerts, P.: *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14984-14989 (1999)
- 35) Shiels, P. G., Kind, A. J., Campbell, K. H., Waddington, D., Wilmut, I., Colman, A., and Schnieke, A. E.: *Nature* **399**, 316-317 (1999)
- 36) Tian, X. C., Xu, J., and Yang, X.: *Nat Genet* **26**, 272-273 (2000)
- 37) Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Blackwell, C., Cristofalo, V. J., Francis, M. K., Baerlocher, G. M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E. A., Sawyer, N., Lansdorp, P. M., and West, M. D.: *Science* **288**, 665-669 (2000)
- 38) Wakayama, T., Shinkai, Y., Tamashiro, K. L., Niida, H., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Ogura, A., Tanemura, K., Tachibana, M., Perry, A. C., Colgan, D. F., Mombaerts, P., and Yanagimachi, R.: *Nature* **407**, 318-319 (2000)
- 39) Evans, M. J., Gurer, C., Loike, J. D., Wilmut, I., Schnieke, A. E., and Schon, E. A.: *Nat Genet* **23**, 90-93 (1999)
- 40) Lee, T. K., Drohan, W. N., and Lubon, H.: *J Biochem (Tokyo)* **118**, 81-87 (1995)
- 41) Droham, W., Zhang, D.W., Paleyanda, R., Chang, R., Wrobe, M., Velander, W., and Lubon, H.: *Transgenic Res.*, **3**, 355-364 (1994)
- 42) Valender, W.H., Johnson, J.L., Page, R.L., Russel, C.G., Subramanian, A., Wilkins, T.D., Gwazdauskas, F.C. Pittius, C., and Drohan, W.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 12003-12007 (1992)
- 43) McKee, C., Gibson, A., Dalrymple, M., Emslie, L., Garner, I., and Cottingham, I.: *Nat Biotechnol* **16**, 647-651. (1998)
- 44) Korhonen, V. P., Tolvanen, M., Hyttinen, J. M., Uusi-Oukari, M., Sinervirta, R., Alhonen, L., Jauhiainen, M., Janne, O. A., and Janne, J.: *Eur J Biochem* **245**, 482-489 (1997)
- 45) 早川堯夫: 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医薬品, トランスジェニック動物由来細胞治療用医薬品 — 衛研報告 **117**, 1-38 (1999)
- 46) 早川堯夫: 細胞培養医薬品生産に用いられる動物細胞及び生産工程の管理方法 (その1), 細胞の特性試験, 管理方法, 安定性評価, 培養について, 医薬品研究, **23**, 137-148 (1992)
- 47) 早川堯夫: 細胞培養医薬品生産に用いられる動物細胞及び生産工程の管理方法 (その2), 細胞の無菌試験, ウイルス試験, 目的産物の分離・精製方法について, 医薬品研究, **23**, 519-532 (1992)
- 48) 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**, 18-33 (1999)
- 49) 組換えDNA技術を応用し, 微生物を用い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 (薬審第243号改訂案, 平成4年8月内示)
- 50) 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)
- 51) 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について (薬務局長通知 薬発第1062号, 平成7年11月15日)
- 52) 細胞治療の安全性評価に関する研究 (早川堯夫: 平成8年度厚生科学研究報告)
- 53) 早川堯夫: 日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究 ウィルス安全性確保の基本要件 医薬品研究 **30**, 602-617 (1999)
- 54) Morimoto, K., Tsuda, E., Said, A.A., Uchida, E., Hatakeyama, S., Ueda, M., Hayakawa, T.: *Glycoconjugate, J.*, **13**, 1013-1020 (1996)
- 55) 早川堯夫, 真弓忠範, 黒澤努, 豊島聰, 山口照英, 川西徹: トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保に関する基礎的検討 医薬品研究 **32**, 223-246 (2001)