

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
平成10年度報告書

トランスジェニック動物／クローン動物を利用して  
製造した医薬品の安全性評価に関する研究

主任研究者：早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所  
分担研究者：真弓忠範 大阪大学大学院薬学研究科  
黒澤 努 大阪大学医学部附属実験動物  
豊島 聰 星薬科大学  
山口照英 国立医薬品食品衛生研究所  
川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)

平成10年度報告書

トランスジェニック動物／クローン動物を利用して  
製造した医薬品の安全性評価に関する研究

主任研究者： 早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究者：

真弓忠範	大阪大学大学院薬学研究科
黒澤 努	大阪大学医学部附属実験動物
豊島 聰	星薬科大学
山口照英	国立医薬品食品衛生研究所
川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所

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  
安全性評価に関する研究

主任研究者 早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部部長

**研究要旨** トランスジェニック動物を応用して製造した医薬品の品質、安全性等確保に必要な諸要素を明らかにし、その評価技術の開発を目的とする基礎的研究を行った。トランスジェニック動物由来医薬品の試験や評価にあたって考慮すべき要件を、(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製と選別、(5) トランスジェニック動物の維持管理、(6) トランスジェニック動物から目的産物の採取、精製、製品化、(7) 製品の特性・品質解析、(8) プロセス評価、工程内管理試験、(9) 医薬品規格及び試験方法の設定、(10) 製剤設計、(11) 製品の安定性試験、(12) 非臨床安全性等試験、(13) 臨床試験、に分類し、各要件について評価方法および評価基準に関して検討・考察した。

**分担研究者**

真弓忠範 大阪大学大学院薬学研究科教授  
黒澤 努 大阪大学医学部附属実験動物施設  
助教授  
豊島 聡 星薬科大学教授  
山口照英 国立医薬品食品衛生研究所室長  
川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所室長

**A. 研究目的**

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.”、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.”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、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、我が国においてもいくつかの会社が設立されている。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。

このような状況に鑑み、本研究の初年度では、今後、開発が進展すると思われるトランスジェニック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や安全性確保に必要な評価技術に関する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た。

## B. 研究方法

トランスジェニック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、米国FDAのPoint to consider (PTC)、EU CPMPのガイドライン、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文書の関連部分等を参考に、トランスジェニック動物を応用して製造した医薬品の品質及び安全性確保に必要な諸要素を明らかにし、その評価方法について検討した。

## C. 研究結果及び考察

### 1 トランスジェニック動物を用いた医薬品開発の現状

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。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トランスジェニック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、囊(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、欧米では現在phase IIを終了したと伝えられている。

医薬品生産のためのトランスジェニック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、乳線に目的産物を発現させ、乳中に分泌させるというものである。それによると通常の

細胞培養系による培養液中の発現量（100～200 mg/L）や高度に至適化した細胞培養条件の発現量（1～2 g/L）に比べ、乳中での発現量は10 g/L以上と液量あたり10～100倍というデータが示されており、細胞培養系とくらべて目的産物の効率的生産が可能な系として注目されている。また、乳汁に含まれている本来のタンパク質は、メスの泌乳期に乳腺にのみ発現されるタンパク質で主にカゼイン類と乳漿タンパク質類であることがわかっている。これらの遺伝子の大部分はすでにクローニングされており、その発現やタイミングを調節する要素（塩基配列）も解明されているので、発現調節因子として活用しやすい。しかもこれらの調節塩基配列は種を超えてヒトタンパク質をコードする遺伝子発現を引き起こすことができる。こうした内因性の調節塩基配列を用いることや、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注目されている。目的タンパク質側から考えても、乳汁は目的とする生物活性を保持しつつタンパク発現を可能にする格好のメディウムであり、また、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。さらに、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ことは、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いことを意味しており、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。ちなみに、乳汁は一般に食用に供されているものである。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。すなわち、プリオンは乳腺中では生産されないし、入ってきたとしても持続して存続し得ないと報告されている。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。

なお、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齧歯類細胞に比べ、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。作製法の概略は以下の通りである。はじめにマウス免疫グロブリンのH鎖及びL鎖（ $\kappa$ 鎖と $\lambda$ 鎖の2種類）の遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製し、これらを交配することにより免疫グロブリンを産生しないノックアウトマウスを調製する。次に、ヒト免疫グロブリンのH鎖及びL鎖（ $\kappa$ 鎖）の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、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調製する。最後に免疫グロブリンを産生しないマウスと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が完成する。

このようにトランスジェニック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してくるのは時間の問題といえる。上記に述べたように、トランスジェニック動物を利用したタンパク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。

## 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

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製と選別、5) トランスジェニック動物の維持管理、6) トランスジェニック動物から目的産物の採取、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、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、最終目的産物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、安全性等確保に関する考え方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や研究報告書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。とくに、遺伝子治療法で用いられるような手法でトランスジェニック動物を作出しようとする場合には、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おいて記載された事項がそのまま適用されることになる。

以下には、「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）」、「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）」、「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）」、「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書）」、「組換えDNA技術を応用し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（ICH文書：医薬安全局審査管理課通知、平成10年1月）」等を参考にしながら、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主な項目を挙げた。なお、遺伝子治療法で用いられるような手法で体細胞や動物個体に遺伝子を導入してトランスジェニック動物を作出しようとするケースはむしろ少ないと考えられるが、可能性が皆無ではないところから、そうしたケースも包含できるように必要な項目を挙げた。

- (1) トランスジェニック動物に導入された遺伝物質の構成成分(目的遺伝子、プロモーター、エンハンサー等の調節塩基配列、複製単位、選択遺伝子、プラスミド及びその他の構成体を形成する塩基配列部分)すべてについて、その由来(起原及び入手方法)を明らかにする。目的遺伝子については、構築手順、増幅法及び精製法を詳細に記載する。その他の核酸塩基配列で、その構築、増幅及び精製について特記することがあれば明らかにする。塩基配列、構築や精製を含む調製法の妥当性、適格性についても明らかにする。目的遺伝子が合成遺伝子の場合も、対応する遺伝子がある場合は、その由来について同様に記載する。天然には存在しない合成遺伝子が導入される場合は、その塩基配列の意味について記載する。トランスジェニック動物に導入されるDNA又はRNA及び目的遺伝子の製造にセルバンクシステムを使用する場合には、その調製方法、保存方法、管理方法、更新法等についても詳細に記載する。
- (2) トランスジェニック動物に導入されたDNA又はRNAの塩基配列を明らかにする。目的遺伝子及びフランキング領域(目的産物をコードする翻訳配列の5'及び3'両端に隣接する非翻訳領域であり、翻訳配列の転写、翻訳及び安定性に重要な影響を及ぼす領域を示す。これらの領域には、プロモーター、エンハンサー、スプライシング配列等を含むが、複製開始点及び抗生物質耐性遺伝子は含まない)については配列分析を行う。その他

の塩基配列のうち、既知のものについては文献等を引用して情報提供する。未知のものについては配列分析を行う。配列分析はバリデーションされた方法により行い、その方法も記載する。制限酵素切断地図及び構成成分(目的遺伝子、調節塩基配列、複製単位、選択遺伝子、その他のコンストラクトを形成する塩基配列部分等)の配置図を記載する。酵母人工染色体(YAC)のような巨大ベクターを用いた場合など、塩基配列がすべて明らかになっていない時は、大きなDNAセグメントについて詳細な制限酵素地図を示すべきである。さらにcDNAの塩基配列を明らかにする必要がある。

- (3) 目的遺伝子と自然界に存在する遺伝子との構造及び塩基配列の比較(cDNAか染色体DNAか、置換、付加、欠失等の変異の有無、相同性等)を記載する。
- (4) トランスジェニック動物に導入されるDNA又はRNAに含まれるすべての翻訳可能領域を明らかにする。また、生理活性を持つ可能性のある塩基配列についても記載する。
- (5) 導入遺伝子の発現機構について記載する。遺伝子の発現が何らかの調節を受けるように設計されている場合には、その調節機構及びその実験的根拠を記載する。
- (6) トランスジェニック動物に導入されたDNA又はRNAは染色体に組み込まれるか、またはエピソームとして存在するか、前者の場合には、部位特異的か非特異的か、後者の場合には染色体外複製を伴うのかについて記載する。
- (7) 導入遺伝子の発現は一過性のものか、持続性のものかを、理論的又は実験的根拠に基づいて記載する。
- (8) 導入遺伝子からの全発現産物の構造及び生物活性について記載する。特に、ヒトに対

する影響が知られている場合には詳細な資料を添付する。

- (9) ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合には、①当該遺伝子導入法を選択した理由及びその特徴、②野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響、③上記(1)項に準じた導入DNA又はRNA(ウイルス粒子内にパッケージされているDNA又はRNA)の作製方法や上記(2)項に準じた導入DNA又はRNAの構造分析の詳細、④ウイルスベクターを作製するために用いるプラスミドの由来(起原及び入手方法)、構成成分、構築手段、増幅法及び精製法、⑤ウイルスベクターを作製するために用いるプラスミドを含めて、ウイルスベクターの構築手順、増幅法及び精製法、⑥パッケージング細胞を用いる場合には、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、⑦ヘルパー及びウイルスベクターを作製するために用いたプラスミド以外で遺伝子導入構成体の製造過程において使用するDNAがある場合には、その由来、作製方法、構造、性質等、⑧パッケージングに用いる細胞の培養方法、生物学的特徴及び動物に対する影響並びに細胞の培養方法、⑨パッケージング細胞の培養方法、生物学的特徴及び動物に対する影響、⑩特にウイルスベクター産生細胞を動物に移植する場合であって、人に対する病原性又は細胞傷害性が知られている場合の情報、⑪ウイルスベクターの粒子構造上の特徴、⑫ウイルスベクターの生物学的特徴などについて詳細に記載する。
- (10) ウイルスベクターの製造方法について上記各項における記述をもとに包括的に記載する。また、その精製法について記載する。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、その内容を記載する。パッケージング細胞を使用する

場合には、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記載する。さらに、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記載する。また、増殖性ウイルスを含めて品質管理に必要な安全試験の試験時期、試験方法及び試験結果を記載する。

- (11) ウイルスベクター、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、ウイルスの製造、パッケージングに用いる細胞、パッケージング細胞及びウイルスベクター産生細胞にセルバンクシステムを使用する場合には、その調製方法、保存方法、管理方法、更新法等について、各物質の製造、各細胞の項で詳細に記載する。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記載する。
- (12) 非ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合には、当該遺伝子導入法の理論的根拠及び実験的根拠について記載する。この際、非ウイルスベクターの構造上の特徴を含めて説明する。
- (13) 非ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合で、トランスジェニック動物に導入されるDNA又はRNA以外で遺伝子導入構成体またはベクターの製造過程において使用するDNAがあるときは、その由来、作製方法、構造、性質等について記載する。DNAの製造にセルバンクシステムを使用する場合には、その調製方法、保存方法、管理方法、更新法等について詳細に記載する。
- (14) 非ウイルスベクターの製造手順、精製



法及び管理法について記載する。ベクターのすべての各構成成分（タンパク質、糖質、脂質等）について、由来、調製法、精製法、品質等を詳細に記載する。タンパク質、糖質、脂質等生物起原由来の材料を使用する場合には、感染性微生物による汚染の可能性を否定しておく必要がある。

- (15) 非ウイルスベクターの構造又は組成分析について記載する。ベクターの各構成成分（タンパク質、糖質、脂質等）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。各構成成分につき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。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に関する資料が必要である。ベクターの各構成成分について医薬品としての使用実績があれば記載する。
- (16) 非ウイルスベクターの生物学的特徴について、当該ベクターにより、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記載する。遺伝子の導入効率及び導入遺伝子の発現効率について記載する。導入遺伝子の細胞内での存在様式、安定性について記載する。なお、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。
- (17) 直接DNA又はRNAを導入する場合には、当該遺伝子導入法の理論的根拠について記載する。
- (18) 直接遺伝子導入操作における実際の導入手順、使用する試薬、機器等について記載

する。

- (19) 直接遺伝子導入法の生物学的特徴に関連して、当該導入法により、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記載する。遺伝子の導入効率及び導入遺伝子の発現効率について記載する。導入遺伝子の細胞内での存在様式、安定性について記載する。なお、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。

## 2.2 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析

- (1) トランスジェニック動物の作製に使われる動物

トランスジェニック動物作製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。プリオン関連の疾病が同じ動物種で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。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) 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な記述が必要である。例えば卵子の単離、インビトロ受精、ES細胞のマイクロインジ

クション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な記述が必要である。また体細胞変異を生じさせた動物についても、その方法の詳細な記述が必要である。

### (3) 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およびその後の各世代のトランスジェニック動物の確認方法を定め、報告する必要がある。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。

初代動物が目的産物を生産していることを確認する方法を詳細に記述する必要がある。目的産物の収量については、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。遺伝子導入により目的産物を発現、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、目的産物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。そのため、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。

### (4) 目的産物の生産の安定性

目的産物の継続的な生産は、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

導入遺伝子生成物の発現は様々な要因によって影響される。継代するにつれ、発現が減少することはしばしば観察される。したがって、初代動物の個々について、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しておく必要がある。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。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 法を用いて、転写による RNA 発現についても確認をとるべきである。目的産物の収量、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 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な特性解析がなされた限られた数のトランスジェニック動物からなる。さらに適切な方法があれば、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られた凍結精子あるいは胚をバンクとして利用することができるだろう。

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、製造業者が初代のトランスジェニック動物を活用して同一目的産物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、目的産物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。

## 2.4 生産用トランスジェニック動物の作製

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述も必要である。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記す必要がある。接合体の単離および仮親への移植の経過も報告すべきである。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、分娩の過程を記述する必要がある。

## 2.5 トランスジェニック動物の維持・管理

### (1) 動物の維持・管理

トランスジェニック動物は感染物質への暴露の可能性が非常に小さ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。

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。

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、飼料には動物の脂肪を精製した物質が含まれないようにすることも必要と思われる。また飼料中に残留する農薬成分もモニタリングし、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。

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) 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もの等に分類できる。1としては炭素、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、等が問題となろう。3としてはスクレーピー、プリオン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（補遺参照）。

以上の観点から、トランスジェニック動物種に感染している可能性のあるウイルスに関して可能な限り明らかにしておく必要がある。特に、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。

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産物の回収および精製方法に応じて規定する。トランスジェニック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は特に重要と考えられる。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。予想される細菌の検出にはPCRを適用できる。

## 2.6 トランスジェニック動物から目的産物の採取、精製、製品化

### 2.6.1 トランスジェニック動物から目的

## 産物の採取

トランスジェニック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。以下に考慮に入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。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) 目的産物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、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。

## 2.6.2 トランスジェニック動物から目的産物の精製、製品化

目的産物の精製に関しては、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産物に変換する場合はその手順と、目的産物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、目的産物の品質を変えたり、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ということが証明できる、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産物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をめぐる問題については後に再度述べることとする。

要約すれば望ましい分離・精製方法とは、目的産物とその生物学的特性（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、精製法に関して医薬品申請資料として記載が必要と思われる事項を列挙した。

- ① フローチャート等を利用して目的産物の採取（抽出）・分離、精製方法等を詳細に記載すること。
- ② 各精製段階における目的産物の精製の状況（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記載すること。
- ④ 遺伝子発現タンパク質を適切な処理（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産物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、最終目的産物の構造解析、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っては、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、しかも従来には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ため、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こと。

#### 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こと。

#### 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こと。

#### 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こと。

#### ⑤ アミノ酸配列

上記①～⑤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、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しだい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) ノイラミン酸分子種分析、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。

なお、単糖分析法には、化学分析、GC、蛍光標識-HPLC、強アニオン交換 HPLC などがある。糖鎖マッピング（二次元、三次元）による糖鎖構造推定には、PA 化等蛍光標識糖鎖の HPLC、糖鎖自動解析法、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 法）等がある。また、より詳細な糖鎖構造は、各種修飾・分解・分離・検出法の組合せ（逐次酵素分解、メシル化分析、アセトリス、メシル化と GLC/MS、LC/MS、FAB/MS、NMR）、FAB/MS、・ES/MS、NMR などにより解析される。

## 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、吸光係数等を示すこと。

#### ② 等電点

ゲル等電点電気泳動等により測定すること。

#### 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）等により測定すること。

#### 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こと。

#### 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こと。

#### 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こと。

### (2) 免疫化学的性質

同一性、均一性や純度の検定、定量等に目的産物の免疫化学的性質が利用される場合には、それに関連する情報を提供する。例えば、次の項目についての検討を行い、目的産物の免疫化学的性質を可能な範囲で明らかにする。

① 目的産物とこれに特異な抗体との反応性をイムノアッセイ、免疫電気泳動、抗体中和法等の適切な方法を用いて検討する

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、目的産物又は目的産物に対する特異抗体との反応性を比較検討することは、しばしば目的産物の同一性や均一性等を試験するのに有益な情報を与える。

③ 精製、確認試験、純度試験、定量法、体内動態試験等に用いた抗体については、目的産物との反応性や調製法をその用途別にまとめて示す。

### (4) 生物学的性質

トランスジェニック動物由来製品にあっては、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も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、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。

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保証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、目的産物とその生物学的特性（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、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。すなわち当該製造・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。併せて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を設定するという方策も一般的に取り入れられることになる。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。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医薬品と同様に、

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。

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産物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。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ということである。

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産物を採取し、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。

次に目的産物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、目的産物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、予めこれ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の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す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、動物や製造過程の質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 を参照すること。

## 2. 9 規格及び試験方法について

特性解析及び品質評価等が行われ、目的どりの製品が得られることが確認されると、この品質の一定性を保証、管理していくための製品レベルでの規格及び試験方法を設定することになる。

その際、開発研究の段階で詳細に検討されたトランスジェニック動物由来医薬品の品質面での特性は、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有効成分の同一性・構造確認、②有効成分の均一性、③有効成分のタンパク質化学的純度の保証、④不純物や目的物関連の類縁物質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、などに大きな関心が払われる必要がある。

ここで留意すべきことは、高度に精製されたタンパク質医薬品にあっては、生物活性の保証に加え、タンパク質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っているということである。

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。さらに、この点も含めて、原薬及び製剤の規格及び試験方法の設定は、製造方法、製品の安定性、非臨床安全性試験や臨床試験、分析法と密接に関連しており、これらの要素を考慮しながら設定すべきであると考えられる。

以下には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）において一般的に設定される必要がある項目を例示した。

原薬

例えば次の項目について、トランスジェニック動物を応用して製造した医薬品の特質を的確にとらえた規格及び試験方法を設定する。

### ① 起原又は本質

トランスジェニック動物を利用して製造された医薬品であることを明示する。

### ② 性状

外観（色、澄明性等）等

### ③ 確認試験

理化学的試験、生物学的試験又は免疫化学的試験等を目的に応じて用いる。一つ以上の試験が確認には用いられる。

### ④ 構成アミノ酸

適切な方法を用いて検出可能なアミノ酸組成を測定すること。各アミノ酸の規格は、アミノ酸残基の種類、測定誤差等を考慮し、実測値に基づいて設定すること。測定が困難なアミノ酸に関しては規格を必ずしも設定する必要はない。なお、ペプチドマップ等により構造の同一性が確認できる場合には省略することができる。

### ⑤ ペプチドマップ

適切な方法を用いてペプチドマップを行うこと。規格は例えば標準物質と同様のパターンを示すことで規定する。構造の同一性が他の試験方法（例えば構成アミノ酸、液体クロマトグラフ法）で十分に確認できる場合には省略することができる。

### ⑥ 糖組成／糖鎖分析

糖タンパク質の場合には中性糖、アミノ糖、シアル酸等の糖含量を測定すること。規格は測定誤差を考慮し、実測値に基づいて設定する。糖鎖が生物活性の発現やターゲティング等の医薬品としての特性にきわめて重要な役割を有している（可能性がある）場合には、糖鎖マッピング法などルーチンに利用可能な方法を用いて、製品各口