

ット毎の糖鎖を分析し、その恒常性を確認する必要がある。

⑦ 純度試験

分離・精製工程由来の不純物や目的産物関連不純物等で許容限度を定める必要のあるものについては液体クロマトグラフ法、電気泳動法、イムノアッセイ等を用いて設定する。液体クロマトグラフ法や電気泳動法等を用いる場合は、試料の適切な添加量等を考慮する。特に電気泳動法の場合、不純物等の検出感度、定量性に優れた染色方法を選ぶ。精製工程に由来する不純物としては、例えばアフィニティ・カラムのタンパク質リガンドやその他の試薬等が考えられる。規格は用法及び用量を勘案して設定する。なお、精製工程において不純物の除去が確認された場合は、その不純物に係わる試験を省略できる。

⑧ エンドトキシン試験又は発熱性物質試験

必要に応じて適宜設定する。

⑨ 定量法

(1) 力価

in vitro、in vivo バイオアッセイ、レセプターアッセイ等の生物学的活性（力価）を求めるための試験を行うことは原薬あるいは製剤の規格の一部として重要であるが、製剤で生物学的活性試験を行い力価を求めるのであれば、原薬では理化学試験や半定量的な生物活性試験のみで評価してもよい。

(2) 質量

質量は通常アミノ酸分析、Lowry 法、Bradford 法、吸光度法又は Kjeldahl 法等によって測定されたタンパク質含量に基づくものであるが、製造者が定量的に力価を測定している場合は、質量を測定する必要はない。

(2) 製剤

例えば次の項目について、製剤の剤型及び投与経路を考慮して必要に応じ設定する。

- ① 起原又は本質（原薬を参照）
- ② 性状（原薬を参照）
- ③ 確認試験（原薬を参照）
- ④ pH
- ⑤ 浸透圧比
- ⑥ 乾燥減量試験又は水分定量法
- ⑦ 不溶性異物試験
- ⑧ 重量偏差試験又は実容量偏差試験
- ⑨ エンドトキシン試験又は発熱性物質試験（原薬を参照）

エンドトキシン試験を設定する場合は、添加回収試験等で当該製品に対するエンドトキシン試験の適用可能性を示すことを含め、同試験を採用することの妥当性に関する情報を提供する。

⑩ 無菌試験

⑪ 定量法

- (1) 力価（原薬を参照）
- (2) 質量（原薬を参照）

2. 1 0 製剤設計

当該製剤を最終的に選択することになった製剤設計に関する経緯及び関連データについて詳細に記載する。この際、製剤設計によって新たに増強あるいは新たに付加された医薬品としての機能的特徴や安定性、臨床応用にあたっての利点などについては、その理論的根拠及び実験的根拠を示して説明する。

2. 1 1 製品の安定性評価

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に依存している。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、分解等を回避するには、一般に厳密な保存条件を必要とする。

安定性評価にはさまざまな分析手段を複合的に組み合わせることが必要である。生物学的活性の測定が適用できる場合には、これを安定性試験の重要な項目とすべきである。製品の純度や特性からみて適切な物理的・化学的手法、生化学的手法及び免疫化学的手法が適用できる場合には、それらも分子レベルでの分析や分解物・変化物の定量手段として、安定性試験計画に盛り込まれるべきである。

製薬メーカは、これらのことを勘案した上で、トランスジェニック動物由来医薬品の安定性を保証する適切なデータを作成するとともに、製品の力価、純度及び品質に影響を及ぼすさまざまな外的条件がどのようなものであるかを考察する必要がある。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。なお、審査期間中に、引き続き実施して得られた長期保存試験データも提出できる。

(1) バッチの選定

(1-1) 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ヶ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ヶ月の試験データを提出する。6ヶ月未満の有効期間を予定しているものの場合、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。培養工程及び精製工程をスケールダウンして製造した原薬についてのデータ、いわゆるパイロットプラントスケールで得たバッチのデータを承認申請用として提出することは可能である。ただし、承認後実生産スケールで製造された最初の3バッチについて長期保存試験を実施する旨の約定を規制当局と交しておく必要がある。

安定性試験に使用するバッチの品質は、非臨床試験及び臨床試験で使用するものの品質や実生産スケールで製造されるものの品質を体現するものである必要がある。加えて、パイロットプラントスケールで製造された原薬は、その製造工程や保存条件が、実生産スケールに適用される製造工程及び保存条件をともに反映したものである必要がある。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現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／栓であればサイズ的に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。

(1-2) 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、ある特定の中間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中にお

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。パイロットプラントスケールでのデータも利用できるが、実生産スケールの製造工程でそうしたデータの妥当性を確立しておくべきである。

(1-3) 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。可能ならば、安定性試験に用いる製剤（最終包装製品）の各バッチは、異なる原薬バッチを使用して製造したものとする。6ヶ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ヶ月の試験データを提出する。6ヶ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審査されることになるであろう。製品の有効期間は申請に際して根拠として提出された実際の試験データに基づく。有効期間の設定は、審査用に提出された実保存期間、実保存温度における長期保存試験の成績に基づいて行われることになるので、審査期間中にその後引き続き実施した試験の成績により、当初データでの期間が更新／延長されることになる。安定性試験に用いられる最終包装製品の品質は、非臨床試験及び臨床試験に用いられる製品の品質を体現するものである必要がある。承認後、実生産スケールで製造された最初の3バッチで長期保存試験を行う旨の約定があればパイロットプラントスケールでのデータを承認申請用資料として提出することも認められる。パイロットプラントスケールで製造されたバッチを使用した安定性試験により製品の有効期間を設定したものの、実生産スケールで製造された製品が長期保存試験でその有効期間内で規格に適合しなかったり、または非臨床試験及び臨床試験で使用されたものの品質を反映したものではなく、同等とはいえない

ような事態が生じたときには、申請者は当該規制当局に連絡し、適切な指導を受ける必要がある。

(1-4) 検体の選定

製剤に一連の容量違い（例えば、1ml、2ml、10ml）、単位違い（例えば、10単位、20単位、50単位）、質量違い（例えば、1mg、2mg、5mg）のバッチがある場合には、安定性試験に供する試料は、マトリキシング法又はブラケット法により選定することもありえる。

マトリキシング法とは、安定性試験を統計学的にデザインした方式の一つで、各測定時点で採取され試験に供されるのは全試料のうちの一部であるという方式である。本方式は、試験に供された試料の安定性が全試料の安定性を代表することを確証する適切な文書が提出されたときにのみ適用されるべきである。同一製剤での試料の違いのうちには、例えば、バッチの違い、含量違い、同一の栓でサイズ違い、あるいは可能性としては、容器／栓が異なる場合などが含まれている。マトリキシング法は、例えば含量の違い、容器／栓の違いなどが安定性に影響を及ぼす可能性があるような試料で、それらの製剤が保存条件下で同じように反応することを確かめることができない場合には、適用すべきではない。

成分組成において同一でかつ容器は全く同じタイプのものを使用しているが充填量においては異なる3種以上の製剤の場合、製造業者は容器サイズの最も小さいものと最も大きいもの（充填量の最も小さいものと最も大きいもの）のみを安定性試験の試料とすることができる。これがブラケット法である。ブラケット法をとり入れたプロトコルのデザインでは、中間的な充填量の試料の安定性は両極の充填量の試料の安定性により代表されるとの仮定に基づいている。場合によっては、両極の充填量の試料で集められたデータが全試料の安定性を適正に表

わしていることを示すデータを提出する必要があるかも知れない。

(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をそれだけで明らかにすることができるような安定性評価試験法あるいはパラメーターはない。したがって、製造業者は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指針を考案し、提示する必要がある。

この安定性評価指針に含まれる試験方法は申請者により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。以下の各項に示されている項目は、医薬品の安定性を適切に示そうとする際に、通常、資料作りが必要であろう代表的な特性項目を例示したものであり、全てを包含しているものではない。

(2-1) 安定性試験実施計画書/結果報告書

承認申請資料には、原薬及び製剤について、申請する貯法及び有効期間の妥当性を示す詳細な安定性試験実施計画書/結果報告書を添付する必要がある。この実施計画書/結果報告書には、適切に定められた規格や試験実施間隔等を含め、承認を得ようとする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ために必要な情報がすべて記載されている必要がある。統計学的手法は安定性に関する3極調和ガイドラインに記載されている方法を用いること。

(2-2) 力価

製品の臨床効果と、定義可能でかつ測定可能な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。本文書に述べられている製品の安定性試験において力価とは、目的とする効果を発揮するための特殊な能力のことをさす。力価は、製品のある特性を測定することを基盤としており、適切な定量性のある方法により検定される。一般に、異なる試験室において測定されたトランスジェニック動物由来医薬品の力価は、適当な標準物質の力価に関係づけて表わされる場合のみ、意味あるものとして比較することができる。その目的のために、国内標準品又は国際標準品に対して直接的又は間接的に検定された標準物質を力価測定に用いるべきである。

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。

(2-3) 純度及び分子特性の解析

製品の安定性試験において、純度とは相対的な用語である。トランスジェニック動物由来医薬品には、糖鎖付加、脱アミド化、あるいはその他の不均一性などがあるため、その絶対的な純度を決定することは極めて困難である。したがって、トランスジェニック動物由来医薬品の純度は、一般的に複数の方法により評価されるべきである。得られる純度は試験方法に依存したものになる。安定性試験の目的をふまえると、その純度試験は分解物・変化物を測定することに焦点を合わせるべきである。

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報告し、説明資料を作成する必要がある。分解物・変化物の許容限界量は、非臨床およ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、凝集又は断片化等による物質変化を的確に検出することが可能となる。これに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、ウエスタンブロット、等電点電気泳動法等）、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、イオン交換、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。

通常の方法では適切に特性解析ができない物質又はルーチンに用いられる分析手法では正確な純度の測定が不可能な製品の場合、申請者は代替試験法を設定し、その妥当性の根拠を示す必要がある。

(2-4) その他の製品特性

トランスジェニック動物由来医薬品に特に限られた項目ではないが、下記の製品特性について最終包装形態でモニターし、報告する必要がある。

製剤の外観（溶液／懸濁液の色及び濁度、粉末の色、形状及び溶解時間）；溶液のものはそのままの状態、粉末及び凍結乾燥品を溶解剤で溶解するものについては溶解後に、肉眼で観察される微粒子の有無；pH；粉末及び凍結乾燥品の含湿度。

無菌試験またはそれに代わる試験（例えば、容器／栓の完全性試験）は少なくとも試験開始時及び申請する有効期間の最終時に実施すること。

添加剤（例えば安定剤、保存剤、賦形剤等）が製剤の保存中に変化・分解する可能性もある。予備安定性試験において、これらの添加剤における化学反応や分解が製剤の品質に悪影響を与える徴候がみられた場合には、安定性試験においてこれらの項目をモニターすべきであろう。

容器／栓は、製品に悪影響を及ぼす可能性があるため、注意深く評価する必要がある。（3.5参照）。

(3) 保存条件

(3-1) 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。

(3-2) 湿度

トランスジェニック動物由来医薬品は、通常、防湿性の容器に入れられ、流通される。したがって、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。

(3-3) 加速及び苛酷条件

前述したように、有効期間は実保存温度、実保存期間で実施された試験成績に基づいて設定されるべきである。しかし、原薬及び製剤について加速及び苛酷条件下での試験も実施することが強く望まれる。

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、スケールアップ等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。安定性に関する3極調和ガイドライン中に加速及び苛酷試験の条件についての記載があるが、これらはトランスジェニック動物由来医薬品には適切でない場合があることに留意すべきである。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。

(3-4) 光

申請者は試験の方針を決めるに際して、ケースバイケースで当該規制当局に相談すること。

(3-5) 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。

(3-6) 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。

(4) 試験頻度/期間

トランスジェニック動物由来医薬品の有効期間は、何日という単位から数年と幅が広いので、すべての製品に一律にあてはまる安定性試験の期間や試験頻度を定めることは難しい。しかし、少数の例外を除き、現存の製品あるいは将来開発される可能性がある製品の有効期間は半年から5年の範囲と考えられる。そこで本文書では、この範囲に有効期間が想定されるものとして以下のような指針を定めた。これにはトランスジェニック動物由来医薬品における変化・分解というものが、長期保存期間中の時間経過の中の各時間間隔において、経過した時間としては同じであっても、時点が異なれば必ずしも同じ内容/程度の変化にならない場合が多いことなどを考慮している。すなわち、1年以下の有効期間を申請する場合は、長期保存試験は最初の3カ月は1カ月毎、その後は3カ月毎に試験する。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カ月毎、2年目は6カ月毎、それ以降は1年毎に試験することとする。

上記の試験間隔は承認前や許可前の段階において妥当であろうとされているものである。しかし、製品の承認/許可後であって、すでに製品の安定性に関して適切なデータがあり、問題がないことが示された場合には、試験の一部を省略しても差し支えないであろう。製品の安定性が損なわれないことを示すデータがある場合には、申請者が、承認/許可後の長期保存試験の計画書としてある特定の時点での試験（例えば9カ月の試験）の省略を裏付けるような試験計画書を積極的に提出することが望まれる。

(5) 規格

トランスジェニック動物由来医薬品では、保存中に活性の有意な低下、物理的・化学的な変化又は分解が起こる可能性があるが、出荷規格と有効期間の終了時点での規格（有効期間内規格）については、各国の基準や国際的な基準の

中ではほとんどふれられていない。申請有効期間中の活性低下の最大許容範囲や物理的・化学的変化（分解）の限度については、トランスジェニック動物由来医薬品の個々のタイプやグループごとの勧告はなされておらず、ケースバイケースで考えられている。それぞれの製品は、その有効期間を通して安全性、純度、力価などにおいて定められた限度値内に規格が維持されている必要がある。この規格や限度値は、適切な統計学的手法を利用した情報に基づいて定められる必要がある。もし異なった出荷規格と有効期間内規格を用いようとする場合には、安定性に関する3極調和ガイドラインで述べられているように臨床効果に影響しないことを示す十分なデータによる裏付けが必要である。

(6) ラベル表示

ほとんどのトランスジェニック動物由来医薬品の原薬、製剤には正確に定められた保存温度が推奨される。とりわけ凍結させてはならない原薬、製剤については、特別な勧告を記載する必要がある。これらの条件のほか、必要ならば光や湿度から保護すべき旨の勧告なども容器、包装及び添付文書などに記載する必要がある。この表示法は各国/地域の基準に準拠することとなっている。

2. 1 2 非臨床安全性等試験

トランスジェニック動物由来医薬品では不純物や混入物質の混在により、安全性に関わる問題が発生する可能性がある。しかしこれらについては非臨床試験計画を設定するより、精製過程で極力不純物や混入物を除去する方向をめざすか、適正な理化学試験法で分析し許容限界を定める方向が望ましい。いずれの場合においても、非臨床試験計画を実施しようとする場合には、当該トランスジェニック動物由来医薬品の特性・品質が明らかにされている必要がある。

トランスジェニック動物由来医薬品は、宿主細胞成分の混入に起因するリスクを伴う可能性がある。このような宿主細胞成分の混在によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起されることがある。核酸汚染に関連する有害作用については、理論上で考えられていることであるが、可能性は除外できない。更にウイルス感染の危険性もある。

一般に、最終的な薬効薬理試験および毒性試験には臨床試験で使用する予定の製品と同等のものを使用する必要がある。また、実際に承認を得ようとする製品の品質と同等である必要がある。しかし、開発の過程においては製品の品質と収量を向上させるため製造工程に変更を加えることがある。開発計画の進行中に新規または改良された製造工程を採用した場合や、製品あるいは製剤に有意な変更を加えた場合には、開発期間中の被験物質とを比較し、同等性あるいは優位性を示さなければならない。これは理化学的、生化学的及び生物学的特性(同一性、純度、安定性および力価)に基づいて検討する。場合によっては追加試験(薬物動態試験、薬動力学試験ないしは安全性試験)が必要となることもある。その際、用いる研究方法の科学的根拠について明らかにする必要がある。

2. 1 2. 1 毒性試験について

トランスジェニック動物を利用して製造される医薬品の毒性評価については、従来の製法のバイオテクノロジー応用医薬品と同様に、試験の実施基準、実施方法について一律に定めることは合理的ではない。したがって、当該医薬品の臨床上の安全性の適正な評価に資することを目的として、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ことを一般原則とした上で、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、当該医薬品の特性、臨床適用法などを配慮しつつ、ケース・バイ・

ケースで柔軟に対処することとすべきである。ただし、試験の種類・項目及び試験方法の取捨選択に際しては、その合理的根拠について十分説明できることが必要である。なお、その際には、例えば以下の留意点を考慮する。

(1) 一般原則

安全性に関する非臨床試験の目的は、医薬品の薬理作用および毒性作用について、ヒト試験を開始する前だけでなく、臨床開発段階を通じて明らかにすることである。*In vitro* および *in vivo* の両方の試験を実施することで、これらの特性が明らかとなる。既に臨床使用され、広い使用経験のある医薬品と構造的あるいは薬理的に類似するトランスジェニック動物由来医薬品の場合、毒性試験を簡略化してもよい場合がある。

非臨床安全性試験の設定については、1)適切な動物種の選択、2)年齢、3)生理学的状態、4)投与量、投与経路、処置方法を含む投与様式、5)使用条件下での被験物質の安定性について考慮しなければならない。

毒性試験は、「医薬品の安全性試験の実施に関する基準 (GLP)」に準拠して実施されることが求められている。しかし、トランスジェニック動物由来医薬品において必要とされることの多い特殊な試験系の中には、完全に GLP 対応で実施することができない場合がある。このような場合には、GLP に対応していない部分を明確にし、安全性評価全体に対するその相対的重要性について検討しなければならない。GLP に完全に対応していない試験であっても、そこから得られたデータを臨床試験の実施や製造承認を得るための支持データとして使用することができる。

トランスジェニック動物由来医薬品ではその特徴的かつ多様な構造や、種特異性、免疫原性、予期しない多彩な生物活性といった生物学的性質のため、医薬品の従来の毒性試験方法が適切

でない場合がある。

(2) 生物学的活性/薬力学

製品のどの作用が臨床活性と関連しているか調べるため、*in vitro* 定量法により生物学的活性を測定することを試みる。細胞の表現型や増殖に及ぼす直接効果について検討するためには、樹立細胞系あるいは初代培養細胞を使用することが有用である。多くのトランスジェニック動物由来医薬品の作用には種特異性があるため、毒性試験では適切な動物種を選択して用いることが重要である。*In vivo* 活性における特定の作用について予測したり、複数の動物種(ヒトを含む)の感受性を量的に比較するために *in vitro* の哺乳類細胞の細胞系を利用することもある。例えば、受容体占有率、受容体親和性、あるいは薬理効果などについて評価したり、更に *in vivo* の薬理試験や毒性試験を行う上で適切な動物種を選択することを目的に、*in vitro* 試験系を用いる。これらの *in vitro* および *in vivo* の試験結果を組み合わせることは、そこで得られた知見をヒトに外挿する上で有用である。作用機序を明らかにすることを含めた薬理活性評価のための *in vivo* 試験は、臨床試験における被験物質の適用法の理論的根拠を示す目的で用いられることも多い。

(3) 動物種/モデルの選択

多くのトランスジェニック動物由来医薬品では、その薬理活性と種・組織特異性があいまって、汎用される動物種(例えば、ラット、イヌ)を使用した標準的毒性試験は意味をなさないことがしばしばある。安全性評価試験では適切な動物種が用いられるべきである。適切な動物種とはその動物種に受容体または抗原決定基(被験物質が抗体の場合)が発現し、被験物質の薬理的活性が示されるものである。種々の方法(例えば、免疫化学的または機能的試験)を用い

て適切な動物種を確定することができる。受容体や抗原決定基の分布を知ることにより、*in vivo* で発現する可能性のある毒性を更に明確にできる。

安全性評価には、通常二種類の動物種を使用する必要がある。しかし、正当な理由が示されていれば、適切な一種類の動物のみで十分である(例えば、適切な動物種が一種類のみ確認されている場合や当該トランスジェニック動物由来医薬品の生物学的活性が十分に理解されている場合)。さらに、短期試験で毒性を特定するのに二種類の動物種が必要である場合でも、引き続き行われる長期試験は一種類の動物種でもよい場合がある(例えば、短期試験で使用した二種類の動物種の毒性像が同等であった場合)。

適切でない動物種を用いた毒性試験からは誤った結論が導かれることがあるため、推奨できない。適切な動物種がない場合、ヒト型受容体を発現させたトランスジェニック動物や、その動物にとっての相同タンパク質などを使った方法が考慮の対象になるが、その合理性については十分な説明が必要である。

当該医薬品とそれに対応するヒト型受容体の相互作用およびその後の細胞や組織応答が、ヒトで予期される生理学的な一連の反応と同様である場合、ヒト型受容体を発現したトランスジェニック動物モデルを使用して得られた情報は効果的である。相同タンパク質を利用しても有益な情報が得られるかもしれないが、この時注意しなければならないのは、相同タンパク質と実際に臨床で使用される製品とでは、製造工程、不純物や混入物質の程度、薬物動態および厳密な意味での薬理作用機序などが異なっている可能性があることである。トランスジェニック動物モデルや相同タンパク質を使用できない場合でも、重要な機能に関する項目(例えば、心血管系、呼吸器系)の評価を含めた、一種類の動物種を用いたしかるべき毒性試験(例えば、14日間

以内の反復投与毒性試験)が、依然として意義があるかもしれない。

近年、ヒト疾患と類似していると考えられる実験動物モデルの開発がめざましい。これらの動物モデルには、自然発症性疾患モデル、遺伝子ノックアウトモデル、およびトランスジェニック動物などが含まれる。これらのモデルは、製品の薬理作用、薬物動態、吸収量などを測定する際に、有用な情報を提供する可能性を持つばかりでなく、安全性(例えば、疾患進行を促進させる有害作用)を評価する上でも有益である可能性がある。場合によっては、正常な動物での毒性試験の代わりに病態動物モデルを使った試験を実施することも考慮されてよい(注1)。このような病態動物モデルを使用して安全性を評価する場合には、その科学的妥当性が明確に示される必要がある。

(4) 動物数/性別

各用量毎に使用される動物数は毒性検出力に直接関係してくる。例数が少ないと毒性の重症度が無視され、その発現頻度のみが観察されることがとなり、その結果毒性事象の観察を誤ることがある。サンプル数に起因するこうした限界は、しばしば霊長類を使った試験で発生するが、モニタリングの頻度を増やしたり、観察期間を延長することで部分的に補うことができる。一般的には雌雄両方を用いるべきであるが、一方を省略する場合には、その妥当性について説明する必要がある。

(5) 用法/用量の設定

投与経路および投与回数は予想される臨床適用に近い形にすべきである。また使用する動物種における当該医薬品の薬物動態、生物学的利用率を考慮にいれながら、動物に安全かつ苦痛なく投与しうる容量であるよう注意すべきである。例えば、有効成分の消失速度が速い場合や、

溶解度が小さい場合、これを補うために実験動物では臨床試験での予定投与計画と比較して投与頻度を増やさなければならないかもしれない。このような場合には、臨床での投与量に対する実験動物での相対的な投与量について明示しなければならない。また、投与量、濃度、剤形および投与部位などの影響も考慮しなければならない。投与方法や動物の大きさ、あるいは生理学的理由により生物学的利用率に限界があり、投与経路を変更しなければならないような場合、臨床で予定されている投与経路以外の経路で投与することは差し支えない。

投与用量の段階は用量-反応関係、毒性用量、無毒性用量(NOEL)などに関する情報が得られるように設定しなければならない。毒性がほとんどないか、全くない医薬品では、明確な最大用量を求めることができない。このような場合は、その用量設定について、およびヒト適用時に予定される用量の何倍量を投与量とするかについての明確な科学的根拠が求められる。高用量の設定には、予想される薬理的・生理学的効果、被検物質の入手の可能性、および意図する臨床用途などに基づいて判断する必要がある。選択された動物の細胞に対する医薬品の親和性や薬理効果がヒト細胞と比較して低い場合には、高用量で試験することも重要である。十分な安全幅を確保するためにヒトと比較して何倍の用量を試験すべきかについては、各トランスジェニック動物由来医薬品の分類とその臨床適応により異なる。

(6) 免疫原性

ヒトへの適用が期待されるトランスジェニック動物由来医薬品の多くは、動物で免疫原性を示す。そのため、この種の医薬品の反復投与毒性試験を行う際に、投与にตอบสนองして産生された抗体を測定することは、これらの試験結果を解釈する上で役に立つ。抗体反応については、そ

の特性（例えば、力価、応答した動物数、中和または非中和）を明らかにし、またその発現の薬理的あるいは毒性学的変化との関連性について検討しなければならない。特にデータを解釈する際には、抗体の産生が薬物動態/薬動学的特性、副作用の発現率・重症度、補体の活性化、新しい毒性作用の発現にどう影響するかについても考慮すべきである。また、免疫複合体の形成や沈着に関連して起こりうる病理学的変化についても注意を払うことが必要である。

抗体が検出された場合であっても、実験動物の大部分で免疫応答によってトランスジェニック動物由来医薬品の薬理作用あるいは毒性作用が中和されない限り、非臨床安全性試験を中止したり、試験期間を変更したりすべきではない。多くの場合、トランスジェニック動物由来医薬品に対する免疫応答は、ヒトの場合と同様変動しやすい。このような問題のため、安全性試験のデータを正当に解釈することができない場合、特に重要な所見については抗体反応に起因するものと結論してはならない。

動物で抗体が産生されたからといって、ヒトにおいても同様に抗体産生の可能性があるとは予測できない。ヒトではヒト型タンパク質に対しても血清抗体が産生されることがあるが、抗体が存在しても治療効果が持続することはよくある。ヒトでは遺伝子組換えタンパク質に対して重篤なアナフィラキシー反応が起こることは稀である。したがって、タンパク質製剤は、通常モルモットのアナフィラキシー試験では陽性の結果が得られるが、ヒトでも同様の反応が起こると予測することはできない。従って、このようなタンパク質製剤をモルモットのアナフィラキシー試験で画一的に評価することはほとんど意味がないと考えられる。

（7）個別別留意事項

（7-1）安全性薬理試験

適切な動物モデルを用いて有害な薬理活性が認められるかどうかを検討することは重要であり、また、必要に応じて毒性試験ないし臨床試験に有害な薬理活性のモニタリング試験を組み込むことは有意義である。安全性薬理試験は潜在的な毒性を予測するうえで、有用な指標を提供する。これらの指標は、独立した試験、もしくは毒性試験に組み込まれた形で検討してもよい。安全性薬理試験の目的は、主要な生理的機能（例えば、循環器系、呼吸器系、中枢神経・自律神経系、腎臓系）に及ぼす影響を検討することにある。この検討には、通常の動物を使用する代わりに、単離臓器やその他の実験系による *in vitro* 試験が含まれてもよい。このような試験によって、特異的臓器毒性について作用機序に基づいた説明が可能になる可能性があり、ヒトでの臨床使用および適用法を考えるうえでも、十分に検討がなされるべきである。

（7-2）単回投与毒性試験

単回投与毒性試験からは、全身あるいは局所毒性と用量との相関性を明らかにする有益なデータが得られる可能性がある。これらのデータは反復投与毒性試験での投与量設定に利用できる。用量-反応関係の情報は、薬理試験または動物モデルでの薬効試験の一部と同様に、単回投与毒性試験を通して収集される。

これらに試験を計画するにあたっては、安全性薬理の試験項目をも組み入れることを考慮すべきである。

（7-3）反復投与毒性試験

反復投与毒性試験に使用する動物種を選択する際に考慮すべき点については、（3）動物種/モデルの選択を参照すること。投与経路および投与方法（例えば、連日投与あるいは間欠投与）は、予定されている臨床での投与形態を反映したものであること。可能であれば、これらの

試験にトキシコキネティクスを組み込むべきである。

薬理作用および毒性作用の可逆性や増悪作用の有無、更に遅延毒性の有無などを明らかにするため、通常、試験計画の中に回復期間を設けなければならない。長期間にわたって薬理/毒性作用を示すトランスジェニック動物由来医薬品の場合には、回復観察群動物の症状に回復が認められるまで観察しなければならない。反復投与毒性試験の試験期間は、予定されている臨床での投与期間および適応症に基づいて設定されなければならない。一般に、動物への投与期間はほとんどのバイオ医薬品の場合、1~3ヶ月であった。短期使用（例えば、7日以内）あるいは急性の致死性疾患に対する適応が検討されているトランスジェニック動物由来医薬品の場合には、臨床試験の実施および製造承認を得るために、2週間の反復投与試験を実施すれば十分であると考えられる。これに対し、慢性疾患に対する適応が検討されているトランスジェニック動物由来医薬品の場合には、製造承認を得るために6ヶ月未満あるいはそれ以上の試験を実施すべき場合もあるが、一般には6ヶ月の試験期間が妥当である。臨床で長期使用を意図するトランスジェニック動物由来医薬品の場合には、長期毒性試験の期間の設定について科学的根拠を明確にしておく必要がある。

(7-4) 免疫毒性試験

免疫毒性評価には、免疫原性に関する検討も含まれる（(6) 免疫原性を参照）。多くのバイオ医薬品は意図的に免疫系を亢進させたり、抑制させたりするため、体液性免疫だけでなく細胞性免疫にも影響を与えることがある。注射部位での炎症反応は、刺激反応が起こっていることを示唆するものである。しかし、単純な注射による外傷や賦形剤により誘発された特異的毒性作用が、注射部位での毒性変化とされる可

能性のあることを認識しておく必要がある。更に、標的細胞上の表面抗原の発現が変化する場合、自己免疫反応が生じる可能性が示唆される。このような問題を明らかにするために、スクリーニング試験に続く機序究明のための免疫毒性試験を実施する必要があるかもしれない。しかし、通常の段階的試験方法あるいは標準的な検査方法はトランスジェニック動物由来医薬品の場合には推奨されない。

(7-5) 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験の必要性は、製品、臨床適応および予想される対象疾患患者の背景などにより左右される（注2）。個別の試験デザインならびに投与計画は、種特異性、免疫原性、生物学的活性ないし長期消失半減期などの観点から修正しても差し支えない。潜在的発生免疫毒性に関する事項は、新生児の免疫機能を評価するよう修正された試験デザインで取り扱うことができる。

(7-6) 遺伝毒性試験

従来の医薬品についてルーチンで実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、トランスジェニック動物由来医薬品に対しては適用できないため不要である。また、大量のペプチドもしくはタンパク質を投与した場合、説明不能な結果が起こる可能性がある。もとより、ペプチド・タンパク質はDNAや他の染色体成分と直接相互に作用するとは考えられない（注3）。

遺伝毒性について懸念のあるトランスジェニック動物由来医薬品（例えば、複合タンパク製剤内に有機性の結合分子が存在する場合）では、新しく開発された方法なども含めて、実施可能かつ適切な試験系で試験を行わなければならない。製造過程の混入物の遺伝毒性を検討する目的で標準的な遺伝毒性試験を採用することは適切でない。それでもこの目的で遺伝毒性試験

を実施する場合にはその根拠を示すこと。

(7-7) がん原性試験

標準的ながん原性試験は一般にトランスジェニック動物由来医薬品には適切でない。しかし、臨床での投与期間、対象疾患の患者人口、その製品の生物学的活性（例えば、増殖因子、免疫抑制剤）などによっては、製品に特異的ながん原性の評価が必要なこともある。がん原性に対する懸念がある場合は、その危険性を調べるため、種々の研究方法を検討すべきである。

形質転換細胞の増殖や、新生物(形成)につながるクローン性増殖を誘発もしくは保持することが懸念されるトランスジェニック動物由来医薬品については、臨床試験の対象となる患者構成にできる限り対応した種々のヒト悪性細胞および正常細胞における受容体の発現について調べる必要がある。受容体を発現している正常細胞もしくは悪性腫瘍細胞の増殖を促進する能力について明らかにしなければならない。*In vitro* データにおいて発がん性の疑いが示された場合には、適切な動物モデルを用いた試験で、更に検討を進める必要がある。細胞増殖について感受性の高い指標を組み入れた長期反復投与毒性試験から有益な情報が得られよう。

げっ歯類に対して生物学的活性を有し、免疫原性がなく、かつ他の試験においてがん原性の評価を行うのに十分な情報が得られなかった場合には、一種類のげっ歯類の使用を検討すること。用量の設定は慎重に行なわなければならない。適切な用量を設定するには、薬物動態評価項目と薬動学的評価項目を組み合わせ、受容体特性の比較や予定されているヒトでの暴露量を勘案するのが最も科学的根拠に基づいた検討方法といえる。用量設定の理論的根拠について明らかにする必要がある。

(7-8) 局所刺激性試験

局所刺激性について検討しなければならない。予定される市販剤形で試験することが望ましい。しかし、正当な理由のある場合には、類似の剤形を使用した試験でも受け入れ可能となる。また、医薬品の有害作用の有無に関する試験を単回または反復投与毒性試験に組み込んで評価できる場合もあり、この場合は独立した局所刺激性試験を実施する必要はない。

(注1)

病態動物モデルの使用は、毒性評価項目の明確化、臨床適応症の選択および適正な剤形ならびに投与経路/投与方法の決定において有益である。しかしこれらの病態モデルに関しては、試験結果を評価する際の参考として利用できる既存データが不足していることが多いということに留意する必要がある。このため試験計画を最適化するために、同時対照データやベースラインデータを収集することが重要である。

(注2)

適切な動物種が霊長類に限定される場合、特定の分類の化合物（例えば、インターフェロン）では生殖発生毒性について多数の公開情報が入手可能であるかもしれない。このような場合、作用機序試験において新しいが関連のある分子によって同様の作用が惹起される可能性が高いことを示すことによって、通常の生殖発生毒性試験を省略できることがある。生殖発生毒性に対する影響を評価する手段については、それぞれの場合について、その科学的根拠を明らかにすること。

(注3)

ある種のトランスジェニック動物由来医薬品では自然発生の突然変異細胞が蓄積（例えば、選択的な増殖優位性が与えられることにより）し、その結果、がん原性が生じることが懸念される。標準的な一連の毒性試験はこのような条件を検出する

ようにはデザインされていない。この問題に取り組むためには、既存のものに代わる *in vitro* あるいは *in vivo* モデルを開発し、検討する必要がある。

2. 1 2. 2 薬効薬理試験について

一般の新医薬品と同様に、薬理作用、その他薬効の裏付け、及び作用機序に関する試験を実施し、検討する。ただし、トランスジェニック動物を利用して製造される医薬品の有効成分が生体由来等既存の成分のものと全く同一であることが証明され、かつ、その成分が既に薬理的に研究されているものであれば、次の試験を除き省略することは差し支えない。

- 1 生体由来等既存の同一成分医薬品との比較を含めた基本的な効力薬理試験
- 2 必要な場合には、生体由来等既存の同一成分医薬品との高次構造の同等性の証明を含めて、例えば次の性質を確認する試験を行う。
 - ① レセプターとの結合性、結合状態及び結合親和力
 - ② 各標的細胞がある場合には、それに及ぼす生物効果
 - ③ ワクチンの場合には、免疫原性及び抗体との反応特性

毒性試験の項でも触れたように、ヒト型受容体を発現したトランスジェニック動物モデルは、薬効薬理試験における実験動物としても有益である。例えば、ヒトインターロイキン-6 を過剰発現する C57BL/6 マウス由来の hIL-6 トランスジェニックマウス hIL-6 Tgm (MHC haplotype: H2b) を用いてヒトインターロイキン-6 抗体の作用を検討することが可能である。即ち、hIL-6 Tgm は加齢に伴い IgG1 プラズマサイトーシスおよびメサングウム細胞増殖性糸球体腎炎を発症し、15 週齢程度で死亡するが、hIL-6 を中和する抗

体はこれらの病態を抑制する。したがってこの抑制作用を指標に、種々の条件での hIL-6 抗体の *in vivo* 作用を調べることができる。

2. 1 2. 3 薬物動態試験について

トランスジェニック動物由来医薬品の場合、薬物動態試験について一律のガイドラインを作成することは困難である。適切な動物種における単回および反復投与時の薬物動態試験、トキシコキネティクスおよび組織分布試験は有用である。しかし、マスバランス（物質収支）を評価する定型的な試験は有用とはいえない。動物の種差に起因する薬物動態の差は動物試験による予測や毒性試験における用量-反応関係の評価に大きく影響することがある。免疫系が関与したクリアランスメカニズムにより薬物反応速度論的特性が変化すると、薬物動態および毒性データの解釈に影響を及ぼすことがある。医薬品の中（例えば、サイトカイン）には、薬物動態に相関して薬力学的作用発現が著明に遅れたり、または血漿中濃度に比例して薬力学的作用を持続させる性質のものがあるかもしれない。

薬物動態試験ではできる限り毒性試験および臨床上使用される製品を用い、臨床適用経路で実施するべきである。吸収は投与剤形、濃度、投与部位あるいは投与容量により影響を受けることがある。毒性試験期間中、可能な限り全身暴露について測定しておくべきである。

放射性標識タンパク質を使用する場合は、その放射性標識物と元の非標識化合物の活性および生物学的性質が同等に保持されていることを証明しておくことが重要である。標識タンパク質を使って得られた放射能濃度およびオートラジオグラフィーのデータの解釈は、*in vivo* での代謝が速いことや放射標識結合が不安定なことから困難なこともある。また、特定のアミノ酸骨格を放射性同位元素で置換したトレーサーを用いた試験結果を解釈する際には、この放射性

標識アミノ酸が薬物以外のタンパク質やペプチドに取り込まれることがあることに、特に留意する必要がある。

臨床試験での薬物投与に基づく安全域を予測するために、臨床試験に先だって適切な動物モデルを用いた試験を実施し、吸収、血中濃度およびクリアランスに関する情報がある程度得られていることが必要である。また、原則としてヒトでの動態に関するデータも必要である。

一種類または複数の分析方法を採用するかどうかはケースバイケースで対応すべきである。例えば、放射性同位元素標識タンパク質を投与した場合、TCA沈殿物の放射能を測定することによってある程度の情報が得られるが、被験物質を特異的に分析できる方法を用いることがより望ましい。理想としては、動物とヒトで同一の分析方法を用いることが望ましい。また、血漿/血清中の薬物結合タンパク質あるいは抗体が分析結果に影響を及ぼすかどうかを明らかにしておくことも重要である。

トランスジェニック動物由来医薬品の代謝は小ペプチドとアミノ酸といった単純な物質への分解であり、その代謝経路もよくわかっている。従って、一般の医薬品で実施される従来の生体内代謝の詳細を調べる試験は必要ない。

生物学的マトリックス(例えば、血漿、血清、脳脊髄液)中のトランスジェニック動物由来医薬品の動態およびこの動態への結合タンパク質の影響を検討することは、その薬力学的作用を考察する上で重要である。

同一有効成分・剤型・投与法の医薬品が承認されているトランスジェニック動物を利用して製造される医薬品の場合で、すでに十分な吸排データが蓄積されているならば、従来品と比して同等であるとのデータがあればよい。しかし、この場合でもただちにヒトによる試験をすることはせず、適当な動物試験により、まず動物についての同等性を確かめておく必要がある。

2. 1 3 臨床試験について

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及び倫理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。

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及び宿主の抗原と反応するような抗体)
- 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。

D. 結論

トランスジェニック動物を応用して製造した医薬品の出現は時間の問題であり、我が国においてもそれらの品質、安全性等確保に必要な諸要素をまとめ、評価法を明らかにするとともに、ガイドライン作成を急ぐ必要がある。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、(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 に分類できた。検討・考察の結果、(1)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)については、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、細胞治療用医薬品等に対する試験や評価と同様の方法が用いられると考えられ、特に ICH のバイオテクノロジー応用医薬品に関するガイドラインに盛り込まれた考え方が参考になると結論できた。一方(2)、(3)、(4)、(5)、(6)については獣医学領域の配慮、とりわけ動物管理や人畜共通感染物質による汚染についてのチェックに関する新たな評価手法の開発が重要と思われた。

E. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Hayakawa, T., "Overview of the international endeavor toward harmonization of technical requirements for the control of new medicines from biotechnology", *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (eds. Ryuzo SASAKI, Koji IKURA, Masaya NAGAO, and Seiji MASUDA), Kluwer Academic Publisher b.v., The Netherlands, (in press)
- 2) Hayakawa, T., "New Medicines from Biotechnology: Overview: International Endeavor Toward Harmonization of Technical Requirements in Biotechnology.", *The 4th International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of*

- Pharmaceuticals for Human Use*, Brussels 1997, ed, P.F. D'Arcy and A.W.G. Harron, Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp153-155 (1998)
- 3) Kawanishi, T. : "New medicines from Biotechnology: Cell Substrate", *The Fourth International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Brussels 1997, ed, P.F. D'Arcy and D.W.G.Harron, Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp162-167 (1998)
 - 4) 早川堯夫、内田恵理子：局方を介した生物薬品の品質確保の国際調和に関する基礎的研究—マイコプラズマ否定試験法について—、*医薬品研究*、29、895-903 (1998)
 - 5) 早川堯夫：バイオテクノロジー医薬品分野におけるICHの進展、*ファルマシア*、34、992-994 (1998)

2. 口頭発表

- 1) HAYAKAWA, T., "Overview of the international endeavor toward harmonization of technical requirements for the control of new medicines from biotechnology", *The Joint International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology and European Society for Animal Cell Technology (JAACT/ESACT '98)*, *Animal Cell Technology, Challenges for the 21st Century*, Kyoto (1998.7).
- 2) 早川堯夫：バイオテクノロジー応用医薬品に関するICHガイドライン、*PDA Symposium on Virus and Prion Clearance from Biopharmaceutical Products*, 東京(1998.10)

補遺 人獣共通感染症原因微生物

ヒトに感染するとともに、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシなどのトランスジェニック動物作製に用いられる動物に感染する可能性が知られているウイルスとしては表1の様なもの知られている。これらのウイルスの検査にあたっては、トランスジェニック動物作製に用いた動物が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はどのようなものか、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行うべきである。

— Cowpox virus (牛痘ウイルス) 主として、西ヨーロッパ。東ヨーロッパにも。ウシでは、乳頭、乳房に発痘。ヒトでは、指、手などに発痘。発育鶏卵の漿尿膜接種、培養細胞、血清反応として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。日本でも希ではない。動物では、口唇、鼻鏡、乳房、乳頭に発痘。ヒトでは、手、指などに発痘。電子顕微鏡検査、発育鶏卵で増殖せず。ウイルスの分離には初代培養細胞を用いる。血清反応は実用化されておらず。

— 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。ヒトでは、日本脳炎に似た症状。致死率も日本脳炎と同様といわれている。血清を用いた抗体検査。

— 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。ウシでは脳脊髄炎。ヒトでは、インフルエンザ様症状。重症例では髄膜脳炎。麻痺がおきるとポリオと同じ症状。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。血清反応では、中和試験、赤血球凝集阻止反応が用いられる。

— 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。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。1、2週間で回復。乳のみマウスへの接種。血清診断にはゲル内沈降反応。中和試験。

— Japanese encephalitis virus (日本脳炎ウイルス) アジア、東南アジア。妊娠ブタに感染すると死産が多い。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。ウイルスの分離は乳のみマウス、培養細胞などが用いられる。血清反応としては、間接蛍光抗体法、ELISA法、中和試験、赤血球凝集阻止反応などがある。

— Vesicular stomatitis virus (水疱性口炎ウイルス) 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。電子顕微鏡検査、発育鶏卵で増殖せず。ウイルスの分離には初代培養細胞を用いる。血清反応は実用化されておらず。

— Borna disease virus (ボルナウイルス) 主として中央ヨーロッパ。動物の典型的な症状は、脳炎であり、興奮、無動、けいれん、麻痺など。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。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見なされている。最近、精神病との関連が指摘されている。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。血清学的には抗体の検出で行う。PCR反応。

— 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、嚙

下筋、呼吸筋などの麻痺を起こして急速に死亡する。pH6.2、低温でのガチヨウ赤血球の凝集反応。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。

動物医薬品の製造に用いられる動物は、その

動物が健康であることが明らかにされている必要がある。さらには、飼育されている群が適切に管理された飼育条件にあって全く異常な個体が発生していないことも必要である。また、ヒトに感染性や病原性をもたらすことが知られている表1にあげた各々の動物特有のウイルスの存在を血清学的あるいは核酸増幅法等を用いて否定しておくべきである。

表1. 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
Cowpox virus	○			
Paravaccinia virus	○	○	○	○
Murray valley encephalitis virus	○	○		
Louping-ill virus	○	○	○	○
Foot-and-mouth disease virus	○	○		
Japanese encephalitis virus		○		
Vesicular stomatitis virus		○		
Orf virus			○	
Borna disease virus			○	
Rabies virus	○	○	○	○

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 安全性評価に関する研究

遺伝子導入構成体の構築と特性解析 —遺伝子導入構成体の医薬品としての応用とその解析—

所属 大阪大学薬学研究科
分担研究者 真弓忠範

APAマイクロカプセルなどの高分子担体に封入した機能性細胞（遺伝子導入構成体）を生体内に投与することにより、生理活性物質の長期 *in vivo* デリバリーが達成でき得ることを明らかとし、新規DDS製剤としての細胞性製剤の概念および方法論を提示した。

A. 研究目的

近年の分子生物学の目覚ましい進歩に伴い、生命体の恒常性維持機構、すなわち生体がホルモンをはじめとする生理活性物質を、必要ときに、必要な量だけ、必要な場所でいかに機能させているか等の巧妙な仕組みが次第に明らかとなってきた。これら一連の生命現象の中で驚嘆すべきことは、生体内での様々な連関、制御のもとに、細胞がいかにタイミングよく生理活性物質を細胞内で生合成し、細胞外に徐放しているかである。この細胞に本来的に備わった生理活性物質の生合成機能、徐放機能、センサー機能などの制御機構は、まさしく薬物治療の最適化を目指したDDS (Drug Delivery System) を具現化したものであり、機能面からいえば細胞に勝る製剤はない。しかしながら、生理活性物質のデリバリーを目的として非自己の細胞を直接生体内へ投与すると、ホストの免疫反応により、投与された細胞は忽ち拒絶されてしまう。即ち、いかにして細胞をホストの免疫系から隔離し、生体内で長期間生存させ、その機能を維持させるかが、細胞療法の鍵を握っている。我々は地球上で最もインテリジェントな粒子である細胞を、いかに疾病治療に応用するかという視点から、細胞を半透性の高分子物質で封入することで細胞を製剤として利用する、「細胞性製剤」(cytomedicine) とも言うべき新規投与剤形に関する検討を行ってきた。

本研究では細胞を封入する高分子担体としてアルギン酸とポリ(L)リジン (PLL) のイオンコンプレックスにより形成されたアルギン酸-PLL-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルを適用した。APA膜は細胞の生存に不可欠な酸素、栄養物などの低分子物質は自由に透過するが、封入細胞の侵出あるいは免疫担当細胞の侵入は阻止することが可能

である。そのためAPAマイクロカプセル内に封入された細胞は、生体に投与すると免疫系から隔離され、自身の分泌する生理活性物質を長期間デリバリーすることが可能となると考えられる。本年度研究では、まずAPAマイクロカプセルを用いた細胞性製剤の開発に当り、カプセルの強度、物質透過性、生体適合性を *in vitro* および *in vivo* で評価し、APAマイクロカプセル作製の最適化を行った。次に抗ヒトインターロイキン6 (hIL-6) モノクローナル抗体 (SK2抗体) を分泌するSK2細胞 (遺伝子導入構成体) を封入したAPAマイクロカプセル (APA-SK2細胞) を作製し、培養系において封入細胞の *viability* に関する検討を行った。さらにはhIL-6を過剰発現するhIL-6トランスジェニックマウス (hIL-6 Tgm) を病態モデル動物として使用し、APA-SK2細胞の細胞性製剤としての有効性を検討した。

B. 研究方法

(1) APAマイクロカプセルの作製

APAマイクロカプセルはSunらの方法を若干改変して作製した。air jet syringe pump droplet generatorを用いて1.8 wt%アルギン酸溶液 (Kelton LVCR®, Kelco Division of Merck & Co.) を1.5% (w/v) 塩化カルシウム溶液中へ滴下した。得られたアルギン酸カルシウムゲルのマイクロビーズを様々な分子量のPLL (平均分子量: 9,000、22,400、56,000、95,100、243,000、375,500; Sigma Chemical Co.) の0.1%溶液中で10分間穏やかに攪拌し、続いて0.03%アルギン酸溶液中で4分間穏やかに攪拌した。作製したAPAマイクロビーズを55 mMクエン酸溶液中で5分間穏やかに攪拌し、内部のアルギン酸

カルシウムゲルを溶解することでAPAマイクロカプセルとした。尚、各溶液による処理の間では生理食塩水による洗浄を3回行った。また、APA膜をより厚くする目的で、クエン酸溶液処理前に再度0.1%PLL溶液および0.03%アルギン酸溶液による処理を繰り返したAPAマイクロカプセルも併せて調製した。以後、0.1%PLL溶液処理および0.03%アルギン酸溶液処理を1回行ったカプセルについてはPLL1回処理、2回行ったカプセルについてはPLL2回処理と略記する。

(2)APAマイクロカプセルの特性評価

強度：カプセル20個を含んだ生理食塩水を超音波処理し、経時的に破壊されたカプセル数を測定した。

粒子径：位相差顕微鏡下でアルギン酸マイクロビーズおよびAPAマイクロカプセルの直径を測定した。
物質透過性：取り扱いを簡便にする目的で、直径約2 mmのアルギン酸ビーズから、上記の方法でサイズの大きなAPAマイクロカプセルを作製した。カプセル2個を5 mg/mlの各タンパク質（シトクロムC：分子量13,000、ウシ血清アルブミン：分子量67,000、ウシγグロブリン：分子量>150,000）溶液に懸濁し、50 times/minで振盪した。24時間後にカプセルを回収し、洗浄後、生理食塩水250 μl中でカプセルを破壊した。上清中のシトクロムC濃度は波長415 nmの吸光度から、他の2種のタンパク濃度はBio-Rad protein assay kitで定量した。

生体適合性：2 mlのAPAマイクロカプセルをddYマウス（清水実験材料）の腹腔内に移植し、1、2、3ヶ月後にintactなカプセルの回収量を測定した。併せてカプセル膜表面への宿主炎症性細胞の接着も観察した。

(3)APA-SK2細胞の増殖の評価

SK2細胞を 5×10^6 cells/mlで1.8%アルギン酸溶液に懸濁し、上記の方法でSK2細胞を封入したAPAマイクロカプセルを作製した。APA-SK2細胞は10% FCS含有RPMI 1640培地（日水製薬）にて37℃、5% CO2条件下で静置培養した。このカプセル300μlを破壊し、カプセル内の生細胞数と全細胞数をトリパンブルー色素排除法により経日的に計測した。

(4)細胞性製剤としてのAPA-SK2細胞の有効性の評価

病態モデル動物として、C57BL/6マウス由来のhIL-6 Tgm（MHC haplotype：H-2b）を用いた。hIL-6 TgmはhIL-6を過剰発現しているため、加齢に伴いIgG1プラズマサイトーシスおよびメサングウム細胞増殖性糸球体腎炎を発症し、15週齢程度で死亡することが報告されている。また、hIL-6を中和するSK2抗体の長期連続投与によりこれらの病態を抑制し、顕著な延命効果を示すことが明らかとなっている。細胞性製剤として3 mlのAPA-SK2細胞（MHC haplotype：H-2d、 1.5×10^7 cells/mouse）を7週齢のhIL-6 Tgmに腹腔内投与した。カプセルに封入していないSK2細胞（ 3.75×10^7 cells/mouse、

i.p.）投与群を病態改善の比較のために作製した。病態改善効果の評価は14週齢のhIL-6 Tgmから回収した肝臓、腎臓、脾臓、鼠径部リンパ節の病理組織像を観察することで行った。

C. 研究成果と考察

(1)APAマイクロカプセルの特性

機能性細胞を封入したカプセル内を生体に投与した後に、カプセルが破壊された場合は、細胞がシンジェニックでないかぎりホストの免疫系により機能を失ってしまうばかりか、cell lineなどを用いた場合にはその腫瘍原性が問題となる。そのためカプセルの強度は細胞を製剤化する上で非常に重要であり、物理的安定性の高いものを使用する必要がある。そこでまず始めに、APAマイクロカプセルの強度と、用いるPLLの分子量の関係について検討を行った。PLL1回処理のAPAマイクロカプセルでは、分子量9,000のPLLで作製したAPAマイクロカプセルが最も弱く2分間の超音波処理で20個すべてのカプセルが破壊された。一方、分子量22,400のPLLを用いたAPAマイクロカプセルの強度が最も高く、分子量が増大するにしたがって強度は低下する傾向が観察された。しかし最も高い強度が得られた分子量22,400のPLLを用いて作製したカプセルでも、60分間の超音波処理後には半数以上が破壊されることが判明した。そこでさらなるカプセル強度の増大を目的に、0.1%PLL（分子量22,400）溶液、0.03%アルギン酸溶液を再度反応させ、PLL2回処理のAPAマイクロカプセルの強度を検討した。その結果、カプセルの強度はさらに増大し、60分間の超音波処理後も破壊されたカプセルは2~3個程度であった。以上の結果より、カプセルの強度の面からするとPLL（分子量22,400）2回処理のAPAマイクロカプセルが、細胞性製剤に十分なAPAマイクロカプセルと考えられた。このPLL2回処理で作製したAPAマイクロカプセルを走査型電子顕微鏡により観察した結果、膜表面は滑らかであり、膜厚は約14μmであることを確認した。さらに膜表面を強拡大すると、膜の網目構造が観察された。尚、PLL1回処理を行ったカプセルの膜厚は約2 μmであり、PLL2回処理によって厚い強固な膜を有したAPAマイクロカプセルが作製されていることが視覚的にも証明された。またカプセル内部は空洞となっており十分な細胞増殖スペースの存在が確認された。

そこで次にPLLの分子量とAPAマイクロカプセルの粒子径との関係について検討を行った。直径約400 μmのアルギン酸マイクロビーズに様々な分子量のPLLを作用させ、APAマイクロカプセルを作製したところ、すべてのカプセルにおいて粒子径の増大が観察された。PLL1回処理のAPAマイクロカプセルでは、分子量56,000のPLLを用いた場合が最も小さなカプセルとなり、それ以上分子量が増大し