

20000804

厚生科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

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

平成12年度 総括・分担報告書

主任研究者 早川堯夫

平成13(2001)年 4月

厚生科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

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

平成12年度 総括・分担報告書

主任研究者 早川堯夫

平成13(2001)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
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	1
早川堯夫	
II. 分担研究報告	
1. 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 (トランスジェニック小動物の実験動物施設)	70
真弓忠範	
2. 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 (トランスジェニック動物作製・維持・管理評価技術)	73
黒澤 努	
3. 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 (クローン動物作製・維持・管理評価技術)	79
今井 裕	
4. 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 (トランスジェニックマウスを用いたヒト型抗体の作製)	85
豊島 聰	
5. 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 (ウィルス汚染の評価技術)	89
山口照英	
6. 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 (医薬品製造施設 他)	106
川西 徹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	123
IV. 研究成果の刊行物・別刷	126

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长

研究要旨 トランスジェニック動物／クローン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出と選別、（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をまとめた。クローン動物作出技術は、作出トランスジェニック動物を作出する新しい手法として既に利用されているが、クローン動物を用いて生産される医薬品評価の基本原則はトランスジェニック動物の場合と同様と考えられた。しかしこれら動物作出技術は日進月歩であり、今後技術的進展に応じた対応が必要と考えられた。

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
今井 裕 京都大学大学院農学研究科教授
豊島 聡 国立医薬品食品衛生研究所
医薬品医療機器審査センター
センター長
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、ウシ等の動物から製造した製

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、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、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製品の製造技術の進展を調査した。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/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、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/クローン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、およびその評価方法を検討した。

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

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)胚系に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

現在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)、アルファー1プロテナーゼインヒビター、アンギオテンシン、ベータイン

ターフェロン，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 VII，第 VIII，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，グルコシダーゼ，ヒト成長ホルモン，ヒト血清アルブミン，持続型組織プラスミノーゲン活性化因子，ミエリン塩基性タンパク，プロインスリン，プロラクチン，可溶性 CD4HIV レセプター，プロテイン C，ヒトフィブリノーゲン，サイトカイン受容体，医療用ペプチド，ヒトアルブミン等の発現が報告されている。このうち欧米ではヒトアンチトロンピン III について既に臨床第 3 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，グルコシダーゼ等については第 2 相試験の段階にある。

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，これを卵子に導入し，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(図 1)。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。WHO も乳汁と精液はプリオンに関して非感染であろうとみなしている。ここで生産しようとするタンパク質の多くは糖タンパク質であるが，生産動物として利用されようとしているのは主にヤギ，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の期待もある。

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及ばない。しかし，ヒト型抗体を生産するためのトランスジェニックマウスの作出に成功している(日経サイエンス，25(6)，40-50(1995))。この場合，まずマウス自身の免疫グ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。次に酵母人工染色体(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調製する。最後にマウス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 医薬品生産用のトランスジェニック動物の課題

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、トランスジェニック動物の作出効率の改善がある。

一般にトランスジェニック動物の作出方法には、

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、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. レトロウィ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が広く行われているが、動物工場として主に用いられるであろうヤギ、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おらず、通常は受精卵への遺伝子のマイクロインジェクション（図1）によって遺伝子の導入が行われている。しかし、この方法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、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（*Nature* 385, 810-813 (1997)）（図2）は、トランスジェニック動物の作出においてブレイク

スルーとなる可能性がある。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（*日経サイエンス*, 29(3), 36-43(1999)）。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、均一な細胞につ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4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（*Science* 278, 2130-2133 (1997)）。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（*Nature Biotech.* 17, 456-461 (1999)）、 α 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といった成功例の報告も続いている。現時点では、この方法を用いても動物の作出効率はそれほど高くない（数%程度）が、体細胞クローン動物の作出の試みは、現在各地で行われており、今後技術的な面での改良が急速に進むことが予想される。これら以外にも、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（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14028-14033 (1998)）、マウスにおける胚性幹細胞（ES細胞）の核移植の成功の報告（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14984-14989 (1999)）等、新しい遺伝子導入法に関する研究が行われており、今後も作出効率の改善の試みが行なわれてゆくものと思われる。

さらにもう一つの課題として、作出される動物の個体差の問題があげられる。トランスジェニック動物、とりわけヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ等のトランスジェニック動物の作出では、マイクロインジェクションや核移植といった人間の

手による各個体別の操作，および使用する仮親の違い，レシピエント卵子の違いといった個体差を生む要因が少なくない。したがって目的物質の恒常的生産という立場からは，安定的なトランスジェニック動物の作出技術が確立されてゆくことが望ましい。この点では，今後の方向としては生産用動物として優良な初代トランスジェニック動物からクローン動物を作出する方法も試みられてゆくものと考えられる（補遺1参照）。

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

このような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してく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) 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。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。

- (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、マスターセルバンク(MCB)およびワーキングセルバンク(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性試験の試験時期、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、精製方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出に使われる動物

トランスジェニック動物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、インピトロ受精、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法および選別法を定め、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。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鎖遺伝子それぞれの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これらのマウスについても必要である。すなわち、ノックアウトマウスについてはターゲッ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)を産生することがあるのでターゲッティング遺伝子の非発現とトランジーン遺伝子の発現は注意深く調べる必要がある(補遺2参照)。

(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。

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。なおマウス、ラット等の実験用小動物のための施設については補遺3を参照のこと。

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) 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産物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。

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。

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。

(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4参照)。

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。予想される細菌やウイルスの検出には PCR を適用できる（補遺 4 参照）。

(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なう。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ろう。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、末梢血スミアの検査、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。

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來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応用医薬品製造法がバイオ医薬品の新しい製造技術として受け入れられるためには、生産される蛋白質が遺伝子翻訳後にプロセッシングを受け、アミノ酸残基の修飾や糖付加などの各種修飾がなされた後にサブユニットなどの高次構造の形成が正確になされて活性体が生産されなければならない。天然体と異なるプロセッシングが行われた場合、タンパク質は新たな抗原性を示す可能性がある。また付加された糖鎖の末端シアル酸量は生体内での半減期を変化させ、*in vivo* 生物活性を変化させる可能性が考えられる。例えば、ブタで生産した 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。また生産するタンパク質の種類の違いによってグルタミン酸のγカルボキシル化が異なることも報告されており、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。さらに、タンパク質への糖の付加は、CHO 細胞で生産した場合や天然物と家畜種とは異なるという報告もある。したがって、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。さらに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、しかも従来になく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。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のがむしろ望ましい。

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み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) ノイラミニン酸分子種分析、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、メチル化分析、アセリシ、メチル化と 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的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。