

## ① 薬局方調和手順

Stage 1, Identification : 薬局方調和項目選定

PDG は、薬局方国際調和項目を選定し、CP を指定する。

Stage 2, Investigation : Proposal Draft (Stage 3 draft) 作成

CP は、担当項目につき、日米欧の薬局方を比較検討の上、必要な調査・研究を実施し、国際調和第一次案である Proposal Draft (Stage 3 draft) を作成し、その設定根拠等の説明を付して他の薬局方に送付する。

Stage 3, Proposal : Official Inquiry Draft (Stage 4 Draft)作成

各薬局方は Stage 3 Draft 及びその付属文書を、CP の提案に手を加えることなく、それぞれの薬局方機関誌 (EP: Pharmeuropa、JP:日本薬局方フォーラム (JPF)、USP: Pharmacopeial Forum。以下「フォーラム」という) の直近号に掲載し、薬局方利用者にコメントを求める (コメント期間: 4~6ヶ月)。

各薬局方は、薬局方利用者のコメントを検討、集約し、コメント期間終了後2ヶ月以内に、CP に送付する。

CP は、各薬局方のコメントを検討し、第二次案である Official Inquiry Draft (Stage 4 Draft) を作成し、必要な説明を付して他の薬局方に送付する。

Stage 4, Official Inquiry : Draft Harmonized Document (Stage 5A Draft)作成

各薬局方は CP から送付された Stage 4 Draft 及びその解説を「フォーラム」直近号に掲載し、薬局方利用者にコメントを求める (コメント期間: 4~6ヶ月)。なお、Stage 4 Draft の掲載に当たっては読者の便を図るため、各薬局方独自の表記スタイルに編集して掲載することができる。

各薬局方は薬局方利用者のコメントを検討し、コメント期間終了後2ヶ月以内に、集約したコメントを CP に送付する。

CP は、各薬局方のコメントに基づき必要な修正を加えた調和文書案 Draft Harmonized Document (Stage 5A Draft) を作成し、説明を付して他の薬局方に送付する。

Stage 5, Consensus : 調和合意

Stage 5A : Consensus Document (Stage 5B document)作成

各薬局方は CP から送付された Stage 5A Draft を検討し、その受け入れ可否を4ヶ月以内に CP に報告する。この段階で3薬局方の合意に至らない場合には、CP は改定調和文書案 (Stage 5A/2 Draft) を作成し、各薬局方に送付する。各薬局方は受け入れ可否を4ヶ月以内に CP に報告する。この調和文書改定作業を3薬局方の合意が得られるまで繰り返す。

Stage 5B, Final Consensus : Consensus Document (Stage 5B document)合意

Stage 5A の合意を受け、CP は合意署名文書案となる Consensus Document (Stage 5B document) を各薬局方に送付し、最終確認を求めた後、直近の

PDG 会議において調和合意署名する。これにより PDG の作業は終結する。

Stage 6, Adoption : 各薬局方改正

各薬局方は、それぞれの所定手順により、合意文書の内容を直近の改正または追補に取り込む作業を進める。

Stage 7, Implementation : 国際調和施行

日米欧3薬局方の全てに PDG 合意内容が反映されている段階である。

## ② 調和後の改定手順

ひとたび3薬局方が調和に合意し、薬局方に反映した事項の改正は独自に(勝手に)行うことなく、PDG 所定の手順に従うべきこととされている。

改定提案を認めうるものとして次のような場合が挙げられている。

- ・ 公衆衛生または安全性に係る理由がある場合
- ・ 現行規格に適合する製品の入手が困難となった場合
- ・ 試薬の入手が不可能な場合
- ・ 新規の製造法による製品が現行規格に適合しなくなる場合
- ・ より優れた試験方法に変更する場合

調和改定の提案は、PDG に改定理由と改定内容を提案し、PDG の合意と CP の指名により、調和手順の Stage 2 (Stage 3 Document の作成) から開始することとされている。なお、緊急を要する場合には、PDG の合意により手順が簡略化できることとされている。

## ③ 薬局方調和手順の改定

1999年4月の手順文書合意以後これに従って調和を進めてきたが、その後の「全面調和」から「部分的調和」への方向変換に伴う手順変更の反映するとともに、さらなる調和の効率化をはかるために、手順書改定が進められている。主な改定点は、次のとおりである。

- ・ 部分的調和 (Harmonization by attribute) に整合した記載とする。
- ・ Public comments を求めるためのフォーラム誌上公開を、Stage 4 draft のみとする。
- ・ 合意署名文書の書式を、医薬品各条及び一般試験法について、明示する。
- ・ 合意署名文書を反映した薬局方改正時に薬局方が独自に追加した項目 (Local attribute) を PDG に報告する。

## 9.4 薬局方調和の現況

薬局方調和は、既収載項目の調和 (Retrospective harmonization) と未収載項目の調和 (Prospective harmonization) の両面にわたって進められている。前者は医薬品添加物各条及び一般試験法の調和であり、後者は生物薬品関連試験法である。バイオ医薬品各条についても一時は調和の動きもあったが、その後休眠状態となり、復活の様子もなく立ち消えと考えられる。

医薬品添加物各条の調和は、医薬品製剤の国際的流通の円滑化に資するとの考え方により薬局方調和の最優先課題として PDG が先ず採り上げたものであり、約 50 品目について調和が進められている。

一般試験法の調和は、医薬品添加剤各条の調和過程において必要性が認識され、採択されたものである。対象分野は、理化学試験、微生物関連試験、製剤試験、物性試験、生物薬品関連試験法にわたり、約 30 の試験法について調和が進められている。このうちの 5 試験法 (Dissolution, Disintegration, Microbial contamination, Uniformity of content, Uniformity of Mass) の判定基準に関する部分は ICH 品質分科会タスクフォースによる調和合意事項が PDG に提供されている。

生物薬品関連試験法は、上記の薬局方既記載項目の調和とは異なり、未記載項目の調和に該当するものである。各薬局方に記載された後の調和には既記載であるが故の種々の困難が経験されたことから、収載前に調和をはかることにより効率的な薬局方調和を期待するものである。

2002 年 2 月末までに 3 局の調和合意署名に至ったものは、署名年月を付してまとめると、下記の 5 試験法及び 14 医薬品添加物各条である。

#### 試験法：

- ・ Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) : 1999 年
- ・ Bacterial Endotoxin Test : 2000 年 1 月
- ・ Test for Extractable Volume of Parenteral Preparations : 2000 年 7 月
- ・ Test for Particulate Contamination: Sub-visible Particles : 2000 年 7 月
- ・ Residue on Ignition/Sulphated Ash Test : 2000 年 11 月

#### 医薬品添加剤各条：

- ・ Benzyl Alcohol : 2000 年 7 月
- ・ Citric Acid, Anhydrous : 2001 年 5 月
- ・ Citric Acid, Monohydrate : 2001 年 5 月
- ・ Sodium Chloride : 2001 年 5 月
- ・ Starch, Corn : 2001 年 10 月
- ・ Starch, Potato : 2001 年 10 月
- ・ Starch, Wheat : 2001 年 10 月
- ・ Ethanol, Anhydrous : 2001 年 10 月
- ・ Ethanol (95) : 2001 年 10 月
- ・ Carboxymethylcellulose Calcium : 2001 年 10 月
- ・ Cellulose Acetate Phthalate : 2001 年 10 月
- ・ Croscarmellose Sodium : 2001 年 10 月
- ・ Cellulose Acetate : 2001 年 10 月
- ・ Ethylcellulose : 2002 年 2 月

調和項目別進捗状況を 2002 年 2 月の PDG において確認された結果を元に、分野別にまとめると以下のとおりである。[ ] 内は Coordinating Pharmacopoeia を、行末は調和の現 Stage を示す。

## 9.5 ICH Q6A ガイドライン関連試験法の調和進捗状況

Bacterial endotoxins 及び Residue on ignition/Sulphated ash は調和合意されたが、ICH 品質分科会に調和協調を求めた試験法についてはタスクフォース合意事項の提供を受けたが、PDG による調和文書作成が遅れている。

### ① Dissolution/Disintegration [USP], Stage 4

ICH タスクフォース合意事項に基づく調和案が作成されているが、USP に固有の事項も含まれている等の難点指摘があり、global style の Stage 4 draft を作成中である。

### ② Uniformity of content / Uniformity of mass [USP], Stage 4

Dissolution/Disintegration と同様に、global style の Stage 4 draft を作成中である。

### ③ Microbial contamination [EP],

ICH タスクフォース合意事項に基づく調和案が、Test methods と Acceptance criteria に分けて作成されている。

Test methods, Stage 3 : 2002 年 3 月に Stage 4 draft が配付される予定である。

Acceptance criteria, Stage 3 : Stage 3 draft を公開中である。

### ④ Bacterial endotoxins [JP], Stage 7

2000 年 1 月に合意署名された。合意内容を反映した薬局方改正は、USP 及び EP は 2001 年 1 月に、JP は 2001 年 4 月に完了している。

### ⑤ Colour/clarity [EP], Stage 3

EP は、Stage 4 draft を作成中である。

### ⑥ Extractable volume of parenterals [EP], Stage 6

2000 年 7 月に 3 局合意署名された。

### ⑦ Particulate matter [EP], Stage 6

2001 年 5 月に 3 局合意署名された。

### ⑧ Residue on ignition/Sulphated ash [JP], Stage 6

2000 年 11 月に 3 局合意署名された。

### ⑨ Sterility [EP], Stage 5A

EP は、1999 年 10 月に開催された薬局方調和 3 局専門家会合における調和協議の結果を反映した調和案を作成し、2002 年 1 月に調和困難な部分 (Sticking points) を除外した調和合意文書案を作成し、2002 年 9 月の合意署名を提案している。

## 9.6 理化学試験法

ICH Q6A ガイドライン関連試験法として調和が進められている Colour/clarity [EP], Residue on ignition/Sulphated ash [JP] の外には、Conductivity, Heavy metals, Organic volatile impurities が調和項目とされている。

### ① Conductivity, Stage 1

一時は Sucrose (精製白糖) の独立示性値の試験法として 3 局合意済みとされていたが、最近の Pharmaceutical waters 調和の動きに合わせて、再

度調和項目にあげられているが、CP に指定には至っていない。

② Heavy metals [USP], Stage 3  
コメント提出が求められている。

③ Organic volatile impurities

残留溶媒試験法は既に3局に規定されており、これらの規定には若干の相違点はあるものの、判定に影響する程のものではなく、調和の現実的な必要性に乏しいとの認識により、調和項目から削除された。

### 9.7 微生物関連試験法の調和進捗状況

ICH Q6A ガイドライン関連試験法である Microbial contamination [EP], Bacterial endotoxins [JP], Sterility [EP] 以外の調和対象項目として、Preservative effectiveness (Efficacy of antimicrobial preservatives) [EP], Stage 5A がある。保存抗力試験の試験法については調和が進んだが、本試験法の適用については、これを開発段階の試験とするか、出荷試験とするかについて、薬局間で大きな違いがあり、調和の目的が立たないままの膠着状態にある。

### 9.8 製剤試験法の調和進捗状況

ICH Q6A ガイドライン関連試験法である Dissolution [USP], Disintegration [USP], Uniformity of content [USP], Uniformity of mass [USP], Extractable volume of parenterals [EP], Particulate matter [EP] 以外の調和対象項目は、Friability of tablets [USP], Stage 4 及び Inhalation [EP], Stage 3 であり、いずれもコメント提出が求められている。

### 9.9 物性試験法の調和進捗状況

ICH Q6A ガイドライン関連試験法はない。調和の進捗は緩慢であるが、EP はこの分野に積極的な面があり、2001年に3試験法が新規調和項目に採択された。

- Analytical sieving [USP], Stage 3
- Bulk density/Tapped density [EP], Stage 3
- Density of solids [EP], Stage 3
- Flowability [USP], Stage 4
- Optical microscopy [USP], Stage 4
- Powder fineness [USP], Stage 4
- Specific surface area [EP], Stage 3
- Light diffraction measurement of particle size [EP] Stage 3 : 新規追加
- Mercury intrusion porosimetry [EP] Stage 3 : 新規追加 (JP は調和参画辞退)
- X-ray diffraction for crystalline and non-crystalline solids [EP] Stage 3 : 新規追加

### 9.10 生物薬品関連試験法の調和進捗状況

ICH Q6A ガイドライン関連試験法として調和が進められているものはない。試験法の科学的な内容に関しては調和上の大きな障害となる点はほとんどないが、CP : USP の項目については global style draft 作成についての調整に手間取っている。

- Amino acid determination [USP], Stage 4
- Capillary electrophoresis [EP], Stage 3: Stage 4 をスキップすることが合意されている。
- Isoelectric focusing [EP], Stage 4
- Protein determination [USP], Stage 4
- Peptide mapping [USP], Stage 4
- Polyacrylamide gel electrophoresis [EP], Stage 6

### 9.11 医薬品添加剤各条の調和進捗状況

国際的に汎用されている 50 品目に近い医薬品添加剤について 1990 年以来調和作業を進めている。当初は各条の全試験項目を3局共通にすることを目指して進められてきたが、少数の調和困難な項目 (sticking points) を残して調和が停滞するものが少なくないため、現実的な対応として調和困難な部分を一時的に棚上げにし、各薬局方が合意する項目を抽出し、その試験方法と規格値を明示的に調和すること (Harmonization by attributes) となり、2000年8月に Benzyl alcohol が調和合意され、その後も合意署名が進んでいる。

#### ① 調和合意したもの (Stage 6/7)

- Alcohol エタノール
- Ethanol, anhydrous [EP] : 2001年10月
- Ethanol (95) [EP] : 2001年10月
- Benzyl alcohol ベンジルアルコール [EP] : 2000年7月
- Carboxymethylcellulose calcium カルメロースカルシウム [USP] : 2001年10月
- Carboxymethylcellulose sodium, cross-linked クロスカルメロースナトリウム [USP] : 2001年10月
- Cellulose acetate 酢酸セルロース [USP] : 2001年10月 (JP : 調和参加辞退)
- Cellulose acetate phthalate 酢酸フタル酸セルロース [USP] : 2001年10月
- Citric acid, anhydrous 無水クエン酸 [EP] : 2001年5月
- Citric acid, monohydrate クエン酸 [EP] : 2001年5月
- Ethylcellulose エチルセルロース [EP] : 2002年2月
- Sodium chloride 塩化ナトリウム [EP] : 2001年5月
- Starch, maize トウモロコシデンプン [USP] : 2001年10月
- Starch, potato バレイショデンプン [EP] : 2001年10月
- Starch, wheat コムギデンプン [EP] : 2001年10月

#### ② 調和の最終段階にあるもの (Stage 5)

- Calcium disodium edetate エデト酸カルシウムナトリウム [JP]
- Calcium phosphate, dibasic リン酸水素カルシウム [JP]

- Calcium phosphate, dibasic, anhydrous 無水リン酸水素カルシウム[JP]
- Cellulose, microcrystalline 結晶セルロース[USP]
- Cellulose, powdered 粉末セルロース[USP]
- Hydroxypropylmethylcellulose phthalate ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート[USP]
- Lactose, anhydrous 無水乳糖[USP]
- Lactose monohydrate 乳糖[USP]
- Magnesium stearate ステアリン酸マグネシウム[USP]
- Povidone ポビドン[JP]
- Saccharin, free サッカリン[USP]
- Saccharin calcium サッカリンカルシウム[USP] (JP:調和参加辞退)
- Saccharin sodium サッカリンナトリウム[USP]
- Sodium starch glycolate カルボキシメチルスターチナトリウム[USP]
- Talc タルク[EP]
- Titanium dioxide 酸化チタン[JP]
- ③ 調和第二次案公開中のもの (Stage 4)
  - Crospovidone クロスポビドン[EP]
  - Hydroxyethylcellulose ヒドロキシエチルセルロース[EP]
  - Hydroxypropylcellulose ヒドロキシプロピルセルロース[USP]
  - Hydroxypropylcellulose, low-substituted 低置換度ヒドロキシプロピルセルロース[USP]
  - Hydroxypropylmethylcellulose ヒドロキシプロピルメチルセルロース[JP]
  - Methylcellulose メチルセルロース [JP]
  - Methyl parahydroxybenzoate パラオキシ安息香酸メチル[EP]
  - Petrolatum 黄色ワセリン[USP]
  - Petrolatum, white 白色ワセリン[USP]
  - Polyethylene glycols マクロゴール[USP]
  - Polysorbate 80 ポリソルベート 80 [EP]
  - Silicon dioxide 二酸化ケイ素[JP]
  - Silicon dioxide, colloidal コロイド二酸化ケイ素[JP]
  - Starch, rice コメデンプン[EP]
  - Stearic acid ステアリン酸[EP]
  - Sucrose 精製白糖[EP]
  - Ethyl parahydroxybenzoate パラオキシ安息香酸エチル[EP]
  - Propyl parahydroxybenzoate パラオキシ安息香酸プロピル[EP]
  - Butyl parahydroxybenzoate パラオキシ安息香酸ブチル[EP]
- ④ 調和第一次案公開中のもの (Stage 3)
  - Carboxymethylcellulose sodium カルメロースナトリウム[USP]
- ⑤ 調和第一次案作成中のもの (Stage 2)
  - Glycerol グリセリン[USP]

## D. 考察

### 1. 細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向

細胞・組織加工医薬品の品質や安全性確保のための試験法や基準の規制のあり方の国際的動向について、欧米のガイドライン等を含めて調査研究の対象とした。今年度は特に EU の「ヒト細胞治療医薬品の品質管理における留意事項」や専門家からの情報を中心に研究した。その結果、EU では、(1)ウイルス等の感染症の伝達の防止、(2) 品質の確保を担保するような製品の品質基準の設定、(3)製品の一定性を担保する製造方法の恒常性等を最も重視していることが明らかになった。また、細胞・組織加工医薬品を自己由来か非自己の細胞を用いるかによって、その品質や安全性確保の方策を分けて考えるとしている点等については、日本における規制と極めて共通していた。しかし、ドナー適合性として検査すべきウイルスの例示等で幾つかの違いが明らかになった。このような差異が、どのような科学的根拠に基づくものかさらに検討することが、国際的整合性を図りつつ細胞・組織加工医薬品等の品質や安全性を確保する上で重要と思われる。

### 2. 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向—レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルス検出法の検討—

現在、遺伝子治療に汎用されているレトロウイルスベクターはウイルスに由来する製品であることから安全性確保には特別な配慮が必要となる。レトロウイルスベクターとして通常は増殖性(自律複製能)を失わせた欠損ウイルスを用いるが、ウイルスベクターの品質管理、安全性確保上、最も重視されるのが増殖性レトロウイルス(RCR)の混入及び遺伝子組換えによる RCR の出現である。RCR の混入を防ぐことが重要である理由は、高タイターの RCR に汚染されたレトロウイルスベクターを用いて *ex vivo* で遺伝子導入した骨髄前駆細胞を重症免疫不全アカゲザル 10 頭に投与したところ、3 頭がリンパ腫を発症し、200 日以内に死亡したという報告があり、このサルのリンパ腫からマウス RCR が検出されたこと、抗レトロウイルス抗体の応答の欠損とレトロウイルスの長期化、疾患との相関が認められたことによる。またプロウイルスの染色体組込みによる癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化の危険性も RCR の混入により高くなると考えられる。FDA は 2000 年に遺伝子治療ガイダンスの追補として「レトロウイルスベクターを用いる遺伝子治療用医薬品の増殖性レトロウイルス試験及びレトロウイルスベクターを用いた臨床試験における患者の追跡調査に関するガイダンス」を公表し、RCR 試験の実施時期、対象、容量等を具体的に提示している。RCR 暴露の危険性に関しては限られた知見しかないこと、RCR が製造段階のどの時点でも生じる可能性があることから製造の複数の段階で試験することを求めている。このうち、ベクター培養上清の RCR 試験について

は、ウイルス感受性細胞 (Mus dunni 細胞など) により最低 5 継代培養増幅後、適切な指標細胞試験 (PG4S+L-フォーカスアッセイなど) により検出することを推奨している。しかし、このような従来の試験方法は非常に時間がかかること、指標細胞での測定は熟練を要することなどの問題があり、より有効な検出法の開発が望まれる。

本研究では RCR をウイルス感受性細胞により増幅後、PEI-磁気ビーズを用いた新規ウイルス濃縮法とリアルタイム定量 RT-PCR を組み合わせて実施することにより、従来よりも短時間で高感度に RCR の定量が可能かどうかを検討した。(RT-) PCR はわずかに数コピーのウイルスゲノムを高感度に検出することが可能であるため、ウイルススクリーニング試験に多用されている。さらに最近開発されたリアルタイム定量(RT)PCR 法を用いることにより、従来は半定量的測定しか行えなかった (RT-) PCR を定量的に実施可能となっている。今回の検討では、AMLV 4070A env の配列を認識するように設計した TaqMan プライマー、プローブを用いたリアルタイム定量 RT-PCR により RCR 量が  $10^6$  ffu $\sim$ 0.1 ffu の広範囲にわたり定量可能であることが示された。

しかし、(RT)PCR による測定では必ずしも感染性を持つ増殖性ウイルスだけでなく、ウイルスゲノムの破片でも検出してしまうという欠点が指摘されている。実際、今回検討した LEGFP1 ベクター上清にはパッケージング細胞に組み込んである AMLV env 遺伝子配列を含む DNA が混入していることが判明し、ベクター上清にスパイクした RCR を直接 RT-PCR により定量測定することは不可能であった。また、PEI-磁気ビーズ処理を行い RCR 及びレトロウイルスベクターを回収してもやはり混入 DNA が検出された。これは DNA そのものが PEI に吸着性を示すためと考えられる。したがって、RCR の定量には何らかの方法で増殖性を示す RCR のみを分離することが必要となる。

そこで Infectivity (RT)PCR、すなわち、ウイルス感受性細胞に感染させることにより、感染性を有するウイルスのみを増幅後、(RT)PCR で定量する方法の利用を検討した。感受性細胞による RCR の増幅は RCR 検出の感度を増加させる方法としても広く用いられているが、RCR 増幅後、指標細胞によるアッセイを行う代わりに RT-PCR を実施することにより、従来よりも短時間で RCR を検出可能であり、また感受性細胞により未知試料の RCR を増幅する際、RCR 標準品の増幅も並行して行うことにより、未知試料に含まれる RCR の量を定量測定することが可能と考えられる。ここでさらに、増幅された RCR を含む大量の培養上清の一部を直接 RT-PCR にかけるかわりに培養上清中に微量に増幅された RCR を濃縮して RCR 全量を測定にかけることが可能であればより高感度定量が可能と考えられる。レトロウイルスの場合、超遠心、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿などでは有効なウイルス濃縮が行えず、また超遠心は時間がかかること、PEG は PCR による測定が阻害されるなど、今回の目的には

そぐわない。本研究では PEI-磁気ビーズを用いた新規ウイルス濃縮法が RCR にも適応可能であり、RCR 希釈液 10ml からの濃縮では検出感度が約 100 倍となることを見出した。

そこで、実際に Mus dunni 細胞に感染後得られた培養上清を PEI-磁気ビーズ濃縮し、リアルタイム定量 RT-PCR を行ったところ、培地で希釈した RCR を Mus dunni 細胞に 10ffu 以上感染させた場合、感染 2 日目以降で RCR の直線的な増幅が検出され、1ffu, 0.1ffu でも 4 日目以降では増幅が検出される場合が認められた。従来の RCR アッセイでは 7 日間程度の培養期間が必要であり、RCR を 100% 検出するには 100ffu 必要であることから、従来よりも短時間での RCR 検出、および 10 倍以上の高感度化が達成された。1ffu/ml, 0.1ffu/ml という低濃度の RCR の場合、感染させた RCR 溶液に RCR が含まれるか含まれないかのばらつきが生じるため、dish により増幅が検出される場合とされない場合が生じるものと思われる。また、実際の RCR 測定を模してレトロウイルスベクターに RCR をスパイクして検討を行ったところ、感染 5 日後では 1ffu 以上で増幅が検出され、10 日間培養すると 0.3ffu でも検出可能という結果が得られた。したがって、Infectivity RT-PCR と PEI-磁気ビーズ濃縮を組み合わせることによって、従来よりも短時間で高感度に増殖性ウイルスを定量可能であることが明らかとなった。しかし、Mus dunni 細胞で増幅した培養上清中の RCR の PEI-磁気ビーズ濃縮は、RCR を培地で希釈した溶液から濃縮した場合と比較して検出感度の増加があまり認められなかった。この理由として、Mus dunni 細胞で一つの感染性ウイルスが感染して増幅されるのに必要なウイルス量は一定であるため、それ以降の段階で検出感度を高めようとしても限度があることが考えられる。また、培養上清中に RCR 以外にも PEI-磁気ビーズに結合する DNA やその他の物質が含まれているため、RCR の濃縮が完全には行えない可能性も考えられる。アッセイ全体の検出感度をさらに高感度化するには別の RCR 検出法の開発が必要と思われる。

レトロウイルスベクターの臨床での使用法は in vivo 投与よりも ex vivo で遺伝子を導入した細胞を投与する場合がほとんどと考えられる。今回はレトロウイルスベクターによる遺伝子導入細胞の RCR に関する検討は行わなかったが、遺伝子導入細胞が RCR に感染しているかどうかについては、その培養上清に対して PEI-磁気ビーズ濃縮、リアルタイム定量 RT-PCR を実施することで、従来法より感度よく検出することができると考えられる。また、今回の方法では 4070A AMLV env を含む RCR の検出を目的としたものであるが、目的とする RCR が PEI-磁気ビーズに吸着濃縮される場合、目的 RCR が検出されるような PCR プライマー、TaqMan プローブを設計すればどのような種類の RCR にも応用できる方法と考えられる。さらに、予備的検討の結果、増殖性アデノウイルスも PEI-磁気ビーズにより濃縮が可能であったことから、増殖性アデノウイルス

の検出にも応用可能であることが期待される。

### 3. バイオテクノロジー医薬品の製造法変更時の品質確保、同等性/同質性(Comparability)評価

我が国、米国 FDA、欧州 CPMP の同等性/同質性評価の科学的アプローチには大きな差異はない。即ち、(1)製造方法の変更の前後の製品間についての、物理的・化学的特性（不純物を含めた）および生物学的特性の比較、(2)新しい工程の工程内管理試験、および変更したプロセスの検証、(3)動物モデルを用いた体内動態等の試験（米国、日本では(1)、(2)によって同等性/同質性が確保された場合、(3)は必ずしも必要とされないのに対し、欧州では(3)も行うとされているという違いはある）、(4)以上の試験で同等性/同質性が証明されない場合はなんらかの臨床試験、というステップバイステップ、ケースバイケースの評価法である。ただし、米国 FDA は(4)を行わずして同質性/同等性を示すための方策を明確にすることをガイダンス作成の目的としているのに対し、欧州は科学的立場から評価法をまとめることを目的としているように見える。この点については、我が国の立場は、米国に近い。科学的にみると(4)のステップの必要性の判断が最も難しく、CPMP のガイダンスノートは製造方法の変更を申請する企業にとって、恐らく最も重要である臨床試験の必要の有無に関する決定方法が曖昧にされている。また工程内管理試験を同等性/同質性の品質クライテリアとして極めて重視している点は、我が国の審査システムからするとそのまま採用することには困難が伴う。CPMP のガイダンスノートは、既に市販されている製品と同等であるとして後発メーカーが後発品を申請する場合（いわゆる Generic Biologics）の同等性/同質性評価も対象にしており、我が国の立場と同様である。しかし必要とされる臨床試験の程度が明確にされていないので、ガイダンスとしては不十分なものとなっている。これらの問題点については欧州では引き続き検討が行われているようであり、今後その議論の成果を注視すべきものと思われる。

一方、米国および欧州の同等性/同質性ガイドラインに共通して欠けているものとして、同等性/同質性評価において第一段階でもあり、またその後のステップバイステップの評価の方向を決定する最も重要な段階である、製品の特性解析のストラテジーが欠けている点があげられる。したがって、申請者あるいは審査当局が実際に製品の同等性/同質性評価を行う場合、あるいはその評価の妥当性を評価する場合、役立つ可能性がある。その点を補強した同等性/同質性評価法案を、我が国の立場として、3.4 に提示した。

ICH においては、2002 年 2 月に、我が国の上記考え方を取り入れた「製造方法の変更時のバイオ医薬品の同等性/同質性評価ガイドライン」のコンセプトペーパーがまとめられ、非公式ながらガイドライン本体の作成作業が開始された。今後本研究の成果を、順次ガイドライン作成に生かしてゆく所存である。

### 4. バイオテクノロジー応用医薬品の同等性、同質性評価法としての LC/MS を用いた糖鎖マッピング法及び糖ペプチドマッピング法の有用性評価

平成 12 年度の本「医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた研究」報告書でも考察されているように、培養方法や精製方法等の製造方法の変更によって生じる構造の非常に類似したバイオテクノロジー応用医薬品の同等性/同質性の評価が国際的な問題となっている。とりわけ、糖タンパク質性医薬品は、同一ポリペプチド鎖に様々な糖鎖が結合した構造の類似した不均一な集団であり、この不均一性は、培養方法や分離方法の変更によって変動することが想定されること、また、糖鎖部分は、生物活性や体内動態に影響することが多くの研究によって明らかにされていることから、製法変更後、糖鎖の不均一性をいかに評価するかが重要な課題となっている。

これまで、グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS による糖鎖マッピングを開発し(Kawasaki, N., et al., 1999, *Anal. Biochem.*)、単糖組成、分岐構造、及び結合様式の違いによる糖鎖の不均一性を分析できることを示してきた(Kawasaki, N., et al., 2000, *Anal. Biochem.*)。本糖鎖マッピングは、エキソグリコシダーゼ消化法や NMR と組み合わせることによって、新規糖鎖の構造解析に応用することも可能であった(Kawasaki, N., et al., 2002, *Glycobiology*)。また、ODS カラムを用いた LC/MS によるペプチドマッピングにおいて、移動相として酢酸アンモニウムを用いることによって、糖ペプチドのみが選択的に溶出され、さらにグリコフォームが分離される糖ペプチドマッピングを開発し、EPO の部位特異的糖鎖の不均一性解析に有用であることを示してきた(Ohta, M., et al., 2001, *J. Chromatogr. A*)。

本年度は、バイオテクノロジー応用医薬品、特に、糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価における糖鎖マッピング、及び糖ペプチドマッピングの有用性を探るため、起源の異なる 3 種類の EPO(EPO-A, -B, 及び-C)を構造の非常に類似した糖タンパク質のモデルとして選び、両分析法が、これらの糖タンパク質の糖鎖構造の違いをどこまで詳細に識別できるかを評価した。

まず、糖鎖マッピングでは、一度の分析で糖鎖構造とその分布の違いを明確にできること、すなわち、3つの EPO のシアル化、アセチル化、及び硫酸化の違いを識別できることを確認した。また、エキソグリコシダーゼ消化法を併用することによって、差異の原因となっている糖鎖の詳細な構造を解析できることを実証した。これらの結果は、製法変更に伴う新旧糖タンパク質の識別が可能であること、また、製法変更によって糖鎖構造が変化したとき、どのような変化が生じているのかを簡単に解析できることを示唆している。

これまで、糖鎖の構造には、構成単糖の種類、分

岐構造、結合位置、結合様式、及び修飾の違いによる多様性が存在することから、糖鎖の不均一性を詳細に解析するには多大な労力と時間が必要とされてきた。そこで、品質評価・品質管理には、全糖鎖の構造を解析することよりも、活性に関与することが明らかな構造の違いに基づき分析方法の利用、例えば、シアロ糖鎖の分布が活性に関与している場合は、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法などの電荷の相違に基づく分析法の利用が提唱されてきた。今回、モデルとして用いた EPO も、シアル酸結合数が生物活性に影響することが知られている糖タンパク質であり、等電点電気泳動法やキャピラリー電気泳動法の他、FACE、HPAEC-PAD、及びシアル酸定量法などの利用が検討されてきた。しかし、今回の分析の結果、EPO の糖鎖には、硫酸基、及びアセチル基が結合していること、また、結合の程度は EPO によって異なることが明らかになった。硫酸基、及びアセチル基そのものの活性等に及ぼす影響はまだ明らかにされていないが、硫酸基の結合は、電荷に基づくシアロ糖鎖の分析に影響を与え、アセチル基の付加はサイズや疎水性の違いに基づく分析に影響を及ぼすことが考えられる。さらに、アセチル NeuAc は、シアル酸定量に影響を与えることが知られている。従って、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、FACE、HPAEC-PAD、及びシアル酸定量法だけでは、製法変更に伴う糖鎖構造の変化を正確に把握することはできないと予想される。これに対して、糖鎖マッピングは一度の分析で糖鎖構造の僅かな違いを捉え、迅速かつ簡単にその構造を明らかにすることができることから、製造方法等変更後の同等性/同質性評価において、優れた能力を発揮できるものと思われる。例えば、N グリコリルノイラミン酸や、Gal $\beta$ 1-3Gal のような糖鎖抗原などの出現にも迅速に対応できることが期待される。

糖タンパク質性医薬品には、組織プラスミノゲンアクチベータのように、分子内に複数の糖鎖が結合しており、それぞれの糖鎖が異なった役割を担っているものも少なくない。また、各糖鎖が高次構造や安定性に寄与しているという研究結果も報告されており、部位ごとの糖鎖の不均一性を明らかにすることはより重要であると思われる。従来から糖鎖結合部位ごとの糖鎖構造解析に、オンライン、またはオフラインによる MS とペプチド/糖ペプチドマッピングの組み合わせが用いられてきた。従来法では、トリフルオロ酢酸などの酸溶媒により、ペプチド及び糖ペプチドを溶出させてペプチド/糖ペプチドマップを作成し、結合している主な糖鎖の構造は、糖ペプチドのマスペクトルから解析された。しかし、この方法では主成分のイオン強度が大きいため、マイナー成分や修飾糖鎖などのイオンピークが検出され難く、詳細な糖鎖構造に関する情報を得ることは難しかった。これに対して、我々が見出した糖ペプチドマッピングは、ペプチドと糖ペプチド混合物から、糖ペプチドが優先的に溶出され、さらに各糖ペプチドは、結合している糖鎖の違いによって細かく分離されるため、糖鎖結合部位ごとの糖鎖の不均一

性をより詳細に解析することが可能である。

実際、糖ペプチドマッピングでは、EPO の 4 つの糖鎖結合部位ごとの糖鎖の不均一性の違いを明らかにできることを確認した。すなわち、1)糖鎖マッピングで見出された EPO-A のジシアロ及びトリシアロ 4 本鎖糖鎖は Asn24 に結合していること、2)EPO-B 及び C のアセチル化はすべての部位で起きているが、EPO-B は Asn83 で、また、EPO-C は Asn24 で顕著であること、3)EPO-C の硫酸化は Asn38 及び Asn83 で起きていること、が明らかになった。

以上のように、本研究では、我々が開発した糖鎖マッピングと糖ペプチドマッピングの、製造法変更等によって得られる新旧糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価法としての有用性を評価し、糖鎖マッピングは、糖鎖の構造と分布の違いに基づく糖タンパク質の差異を識別できること、さらに、エキソグリコシダーゼ消化法を併用することによって、差異の原因となっている糖鎖の構造を解析できること、また、糖ペプチドマッピングを行うことによって、その糖鎖が結合している部位を明らかにできることを確認した。従って、糖鎖マッピング及び糖ペプチドマッピングは、糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価法として有用であると思われる。

## 5. 生物薬品の統一力価試験法設定と標準物質の確立に関する検討

本研究では、医薬品の品質確保技術の国際調和を目指した研究の一環として、生物薬品の統一力価試験法と標準物質の確立方策について検討した。具体例として、現在抗凝固薬としての申請が予定されている h-TM を取り上げた。確立した h-TM の共通力価測定法は Fig.19 に示すように、良好な基質切断反応時間依存性を示した。また、Fig.20, 21 に示すように、両 h-TM において良好な濃度依存性を示した。Table 12, 13 に示すように、異なったロットの h-トロンピンと h-プロテイン C を用いて uh-TM の活性を共通力価測定法により測定した結果、ロット間分散係数はそれぞれ 2.90%、6.57%と低かった。この結果から共通力価測定法により測定された h-TM の活性は h-トロンピン及び h-プロテイン C のロット間の違いによりほとんど影響を受けないことが示された。Table 15 に示すように、共通力価測定法により同時、日間、施設間再現性を検討した結果、それらの分散係数 5.02%以下と低かった。この結果から共通力価測定法が再現性のある方法であることが示された。以上の結果から本研究で確立された共通力価測定法は h-TM の活性測定法として妥当であることが示された。

本研究ではまた TJRS1 と名付けた h-TM 初回国内標準物質の力価を測定し、1 アンプル当たり 205JRS 単位と定めた。Fig.23 に示したアレニウス式から予想されるように、h-TM 初回国内標準物質は-20℃で 100 年間力価を低下させることなく保存可能であることが示された。

このような共通力価測定法の確立とh-TM初回国内標準品を対照に用いた各h-TMの活性測定によりrh-TMとuh-TMの品質と臨床上の有効性を比較することが可能になった。さらに、このような共通力価測定法とh-TM初回国内標準品を用いた力価の比較はこれらh-TMに近い将来臨床的に治療薬として用いられた際、臨床適用にあたって無用の混乱を避けるうえで非常に有用と考えられる。

以上、生物薬品の統一力価試験法の設定と標準物質の確立方策について具体例として現在抗凝固薬としての申請が予定されているヒトトロンボモジュリン(h-TM)について検討し、以下のような一般的な留意事項を明らかにした。

#### ①既存の試験法の評価

A法及びB法の長所及び短所の検証

#### ②自家力価の評価

A法及びB法において設定された力価の妥当性に関する評価

#### ③共通力価測定法の確立

既存の試験法の評価に基づくより有用な共通力価測定法の設定

適切な基質切断時間の設定

各h-TM社内標準物質を用いた濃度依存性に関する検討

#### ④共通力価の定義

共通力価測定法に基づく妥当な共通力価の定義の設定

既存の試験法における自家力価の評価に基づくより妥当な共通力価の設定

各h-TMにおける自家力価と共通力価の関係に対する検討

#### ⑤共通力価測定法の妥当性の評価

同時、日間、施設間再現性の試験と評価

#### ⑥標準物質の確立

標準物質候補品の共通力価測定法を用いた共同検定による1アンプル当たりの力価の決定

#### ⑦標準物質の保存安定性の評価

様々な温度及び期間で保存した標準物質の力価測定結果のアレニウスプロット解析に基づく安定性の評価

以上、今回示した各種試験に基づく具体的な留意事項は共通性が高いことから、今後他の生物薬品あるいは生物医薬品候補品について統一力価試験法と標準物質を確立する際に有用と考えられる。

### 6. 安定性試験における品質確保基準に関する研究

ANCOVA法は回帰曲線の平均の傾きからの偏差の総和に基づいてロット間の傾きの差を検定するのに対して、本研究で開発したレンジに基づく方法は、有効期間の推定値の最大値と最高値から計算した単一の値に基づいて有効期間の推定値の差を検定するため、推定される有効期間の変動は考慮されない。したがって、レンジに基づく方法の感度は試験に用

いるロットの数に大きく影響される。この問題を避けるためには、推定値の変動を考慮して有効期間の推定値の差を検定する方法を確立することが必要であり、そのための基礎検討が必要と考えられる。

また、本研究において、レンジに基づく方法で用いられた15%の基準値は前年度までに報告されたように、 $\beta$ 誤差が20%を超えないように設定したものである。この基準値の妥当性を判断するためには、 $\beta$ 誤差に加えて、ロット間で安定性の差がない場合に差があると判断してしまう $\alpha$ 誤差を考察することが必要である。本研究ではANCOVA法とレンジに基づく方法を $\beta$ 誤差に基づいて比較したが、さらに $\alpha$ 誤差に基づいて両方法を比較することが必要であり、今後の検討課題であると考えられる。

### 7. 不純物の安全性確認に関するQ&A作成

原薬および製剤の不純物ガイドライン(Q3AおよびQ3B)の解釈および運用方法を巡る混乱を解決することを目的として、日本製薬工業協会(製薬協)と国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研)の間で、不純物の安全性確認に関するQ&Aの作成に関して研究を行った。製薬協において、品質および安全性の専門家からなるプロジェクトチームを編成し、製薬協各社に対するアンケート調査などを通じて問題点を把握して、これを基に不純物の安全性確認に関するQ&A原案を作成した。このQ&A原案について、国立衛研の品質および安全性の専門家ならびに国立衛研医薬品医療機器審査センターの品質および安全性の担当者が検討し、修正案を作成した。この後、製薬協と国立衛研の間で意見の交換を行った結果、2001年9月に最終案が完成した。

このように、この不純物の安全性確認に関するQ&Aは、官民の関係者の間で意見の摺り合わせを行って作成されたものであり、当初の目的とされた不純物ガイドラインの解釈および運用方法を巡る混乱を解決するのに役立つものと考えられる。

Q3AおよびQ3Bについては、現在改定作業が行われており、Q3Aは2002年2月のブリュッセルでの会議で最終合意に達したが、Q3Bはまだステップ2の段階にある。なお、Q3Aの改正では、不純物の安全性確保に関する記載に関しては、従来、どのような場合に用いるべきかが必ずしも明確でなかった「8. 新たな不純物」の項が「7. 不純物の安全性確認」の項に統合されるなどの変更が加えられた。したがって、本Q&Aについても今後多少の手直しが必要と思われるが、基本的な点についてはこのままでよいと考えられる。

### 8. 新しい品質規格を用いた製品の評価法

ICHにおいてCTD(コモンテクニカルドキュメント-医薬品承認申請のための国際共通化資料)が一昨年秋合意に達し、本邦においても昨年6月に通知された。平成15年7月からCTD様式による申請が義務化される。CTD様式では後述するように添付



資料の構成が異なるが、本分担研究においては、従来の通知（平成 11 年 4 月 8 日医薬発 481 号 医薬品の承認申請について）に従って申請書等を作成する時の規制当局に提出すべき事項に関して取扱った。

CTD は提出すべき資料の配列を定めているものであり、従来から必要とされていたことと本質的な変更はない。しかし、品質について添付資料に記載すべき項目として、製造方法及びプロセスコントロール、原材料の管理、重要工程及び重要中間体の管理、プロセスバリデーション等が CTD 様式による申請では設定された。生物薬品に関しては、現在の添付資料においても製造に関する記載は化成品のそれに比べてはるかに詳細に求められているが、今後、これらの項目が明確化された事に伴い、パイロットスケールのデータではあっても、製造に関するより詳細なデータの提出が必要となろう。

## 9. 新しい品質評価基準の公定規格への反映—薬局方国際調和—

薬局方国際調和の進展とその成果の日本薬局方への反映は、医薬品品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価の推進に資するところが少なくないと考えられるが、それらが円滑に進んでいるとは言い難い状況も認められるので、「薬局方国際調和の推進」と「薬局方国際調和の成果の日本薬局方への反映促進」について、現状の問題点を考察する。

### 9.1 薬局方国際調和の推進について

#### ① PDG の課題

PDG は、薬局方利用者からの薬局方国際調和の目に見える成果が上がらないとの評価を受けとめ、2000 年に現実的な対応に転換することにより、調和合意が進んでいるが、未だに PDG の方針の理解度に差があることは否めない。特に、各薬局方の改正と調和合意の切り分けについての理解を共有しているとはいえないのが現状であるが、PDG によるこの認識の下に効率的な改正案審議を進める薬局方国際調和の方針の見直しが予定されているので、その議論を通して共通理解が形成されることが期待される。

#### ② 日本薬局方の問題

日本薬局方の薬局方国際調和への対応は、個人奉仕への依存度が高く、組織的な対応に欠ける傾向が強く、日本薬局方事務局の主体的な関与に乏しいのが実態である。事務局における調和進捗状況の把握が十分ではないため、委員会における PDG 調和案審議が PDG の申し合わせ期間内に行われないことも珍しいことではなく、また委員会の審議結果の欧米薬局方への伝達に著しい遅れを生じることも少なくない。また、日本薬局方の国際調和への対応方針が明確にされていないため、場当たりの対応にならざるを得ず、日本薬局方の PDG 対応に不整合を生じることもある。

このような状況が、PDG 調和合意が更に加速すると思われる今後も継続することは、欧米薬局方の日本薬局方に対する信頼の喪失につながることを憂慮される。とはいえ、日本薬局方事務局及び局方委員

会が、PDG 調和に的確に対応しうる状況にあるとはいえないのは、国際調和外の日本薬局方改正に手一杯である現状の結果にはかならないとも考えられ、抜本的な方策を講ずることなしには本質的な改善は望むべくもないものと思われる。

### 9.2 薬局方国際調和の成果の日本薬局方への反映促進について

薬局方国際調和は、PDG による調和文書の合意署名をもって PDG としての手順を終結し、その後の各薬局方における施行は、それぞれの薬局方の責任であるとされている。PDG による調和合意署名は、薬局方調和の実効を伴わない中間段階に過ぎず、合意内容の日本薬局方への反映なしには、日本薬局方の国際調和はあり得ない。ところが、合意署名後 2 年を経ても日本薬局方改正案の審議に至らないものさえある状態であり、日本薬局方の国際調和への姿勢が問われかねない。

日本薬局方への反映遅延は、事務局の国際調和対応についての理解が十分とはいえないこと、及び薬局方委員会における調和案の審議に日本薬局方への反映に関する考慮が乏しいことの結果とも考えられるが、その背景である事務局及び局方委員会の慢性的な過負荷状態の軽減なしに改善を期待することは無理な相談ともいえよう。

### 9.3 日本薬局方の充実に向けて

日本薬局方を国際的動向を踏まえた公定規格とするためには、PDG の成果である日米欧調和事項を的確に反映したものとなるような日本薬局方改正を推進することが必須である。しかし日本薬局方事務局と局方委員会の実態を考えると、現状を改善することなしには、薬局方国際調和に日本薬局方の存在を示すことが出来ないに止まらず、薬局方国際調和の障害にならないとも限らないと思われる。

「国際調和の推進」は日本薬局方改正の 5 本柱のひとつとしても掲げられているものでもあるので、日本薬局方を作成する立場にある厚生労働省が当事者として、これらの問題の改善、解消に主体的に取り組み、事務局機能の強化を図るとともに、薬局方委員会が薬局方国際調和は日本薬局方と一体のものとして効率的に対応ができる環境を整備することが必要不可欠である。

日本薬局方の本質を見極め、それに沿って日本薬局方利用者のニーズに着実に対応することにより、欧米からも高く評価され得る、日本薬局方の国際化が確実に進むことを期待したい。

## E. 結論

### 1. 細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向

細胞・組織加工医薬品の品質や安全性確保のための試験法や基準の設定、さらには規制のあり方についての国際動向を調査研究した。特に、EU の最新情報を基に検討し、ヒト由来細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質や安全性確保のための規制の

あり方について、我が国や FDA のあり方と比較し検討した。その結果、EU は(1)ウイルス等の感染症の伝達の防止、(2)品質の確保を担保するような製品の品質基準の設定、(3)製品の一定性を担保する製造方法の恒常性等をもっとも重視していることが明らかになった。また、細胞・組織加工医薬品を自己由来か非自己の細胞を用いるかによって、その品質や安全性確保の方策を分けて考えるとしている点は各国共通の認識であることが明らかになった。さらに、ウイルスのスクリーニング試験法のあり方等、多くの点で共通することが多いが、いくつか異なる点もあきらかになった。このような差異が、どのような科学的根拠に基くもののかさらに検討することが、国際的整合性を図りつつ細胞・組織加工医薬品等の品質や安全性を確保する上で重要と思われる。

## 2. 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向—レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルス検出法の検討—

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向を踏まえた研究として、レトロウイルスベクターの安全性確保上最も重視される、ベクターに混入する増殖性レトロウイルス(RCR)の検出法について検討を行った。RCRに存在するがレトロウイルスベクターでは欠損しているエンベロップ(env)遺伝子配列に対するプライマー、プローブを用いてリアルタイム定量RT-PCRを行うことによりRCRを定量的に測定可能であることを確認した。またポリエチレンイミン(PEI)結合磁気ビーズを用いた新規ウイルス濃縮法によりRCRを濃縮可能であることを見だし、大量の試料に微量に含まれるRCRをPEI-磁気ビーズにより濃縮後にリアルタイム定量RT-PCRで検出することにより感度よく検出できる可能性を示した。さらに、ウイルス感受性細胞に一度感染させることで増殖性を有するRCRのみを増幅し、リアルタイム定量RT-PCRで検出を行うInfectivity RT-PCRという方法と、PEI-磁気ビーズ濃縮とを組み合わせることによって、env遺伝子配列を含む増殖性のない核酸がレトロウイルスベクター試料中に混入している場合でも、従来の指標細胞を用いたRCR検出法と比較してより短時間でより高感度にRCRの定量的測定が可能であることを明らかにした。

## 3. バイオテクノロジー医薬品の製造法変更時の品質確保、同等性/同質性(Comparability)評価

欧州では、近年米国と同様に製造方法が変更された場合のバイオテクノロジー医薬品の同等性/同質性評価の議論がなされてきた。最近バイオテクノロジー医薬品の同等性/同質性に関するガイダンスノートが公表され、2002年3月に施行された。FDAのガイダンスと科学的立場は共通しているものの、臨床試験を繰り返さずに同等性/同質性を明らかにする手続きに重きをおくFDAガイダンスと異なり、同等性/同質性評価の科学的方策を総合的にまとめる方向にあるが、(1)物理的・化学的特性試験や生物学

的特性試験等で差異が出た場合に必要とされる臨床試験との関係、および(2)既に市販されている製品と同様であるとして後発メーカーから申請された製品(いわゆるGeneric Biologicals)の同等性/同質性試験の内容、の2点では必ずしも明確な考え方が提示されていない。EU内ではこの問題についての議論が継続して行われているようであり、その経過については、我が国における同等性/同質性の評価法を確立する上で注目してゆくべきと考えられる。

## 4. バイオテクノロジー応用医薬品の同等性、同質性評価法としてのLC/MSを用いた糖鎖マッピング法及び糖ペプチドマッピング法の有用性評価

国際的な重要課題となっているバイオテクノロジー応用医薬品の同等性/同質性評価法としての、糖鎖マッピング及び糖ペプチドマッピングの有用性を評価した。類似糖タンパク質のモデルとして、起源の異なる3種類の遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチン(EPO)を用い、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)を用いた糖鎖マッピング、及び糖ペプチドマッピングが、類似糖タンパク質の構造の違いをどれだけ識別できるかを調べた。その結果、糖鎖マッピングは、糖鎖の構造と分布の違いに基づく糖タンパク質の差異を明確にできること、また、エキソグリコシダーゼ消化法を併用することによって、差異の原因となっている糖鎖の構造を解析できること、さらに、糖ペプチドマッピングを行うことによって、その糖鎖が結合している部位を明らかにできることを確認した。以上のことから、LC/MSによる糖鎖マッピング及び糖ペプチドマッピングは、製造方法変更等によって生じる新旧糖タンパク質の同等性/同質性評価法として有用であることが確認された。

糖鎖マッピング及び糖ペプチドマッピングは、糖鎖の構造とその分布の違いに基づく糖タンパク質の差異の識別、差異の原因となる糖鎖構造の解析、及びその糖鎖の結合部位を明らかにできることから、糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価法として有用であることが確認された。

## 5. 生物薬品の統一力価試験法設定と標準物質の確立に関する検討

医薬品の品質確保技術の国際調和を目指した研究の一環として、生物薬品の統一力価試験法の設定と標準物質の確立方策について検討した。具体例として現在抗凝固薬としての申請が予定されているヒトトロポモジュリン(h-TM)の統一力価試験法の確立、統一力価試験法を用いた単位の定義、及びh-TM日本初回標準物質の設定を行った。その結果、①既存の試験法の評価、②自家力価の評価、③共通力価測定法の確立、④共通力価の定義、⑤共通力価測定法の妥当性の評価、⑥標準物質の確立、⑦標準物質の保存安定性の評価、などが統一力価試験法設定と標準物質の確立に

において共通性の高い一般的な留意事項であることを明らかにした。これらの留意事項は、今後、他の生物薬品や生物薬品候補について統一力価試験法と標準物質を確立する際に有用と考えられる。

## 6. 安定性試験における品質確保基準に関する研究

安定性試験データの解析におけるロット間変動の検定法として、FDAが推奨するANCOVA法と新たに開発したレンジに基づく方法の有用性を比較検討した。モンテカルロ法によって発生させた安定性試験データを用いて、両方法によってロット間変動の検定を行い、ロット間変動に対する検出力を比較した結果、0.5%以下の誤差の分析法を用いて安定性データが得られた場合に、レンジに基づく方法はANCOVA法と同等の確率でロット間の分解曲線の傾きの差を検出できることが明らかになり、ANCOVA法に代わる方法として活用できる可能性が示された。

## 7. 不純物の安全性確認に関する Q&A 作成

原薬および製剤の不純物ガイドライン (Q3A および Q3B) の解釈および運用方法を巡る混乱を解決することを目的として、日本製薬工業協会 (製薬協) と国立医薬品食品衛生研究所 (国立衛研) の間で、不純物の安全性確認に関する Q&A の作成に関して研究を行い、2001 年 9 月に最終案が完成した。この不純物の安全性確認に関する Q&A は当初の目的とされた不純物ガイドラインの解釈および運用方法を巡る混乱を解決するのに役立つものと考えられる。

## 8. 新しい品質規格を用いた製品の評価法

本邦においては、新医薬品の承認申請に際して、承認事項を記載した承認申請書とともに、添付資料及び添付資料概要を提出し、規制当局に当該医薬品の品質、有効性及び安全性を示さなければならない。生物薬品の品質は①十分な特性解析とロット分析②適切に設定された規格及び試験方法③評価された製造工程による製造、によって初めて恒常的に確保されることから、これらの事項を規制当局に適切に示し、評価を受けなければならない。本研究では各種の生物薬品に関する ICH ガイドラインを検討し、品質について添付資料に記載すべき事項に関して検討を行った。また承認申請書、添付資料概要に記載する事項に関するも考察した。なお、本研究結果は平成 14 年 1 月 28 日厚生労働省医薬局審査管理課から事務連絡「新医薬品の承認申請資料などに関する留意事項」の「3. バイオテクノロジー応用医薬品/生物由来医薬品 (主として組換え DNA 技術を応用して製造されるペプチド/たんぱく性製剤) に特有な事項」に反映された。

## 9. 新しい品質評価基準の公定規格への反映—薬局方国際調和—

薬局方は、欧米諸国においても我が国と同様に、

医薬品の品質評価基準の基本とされている公定規格である。薬局方国際調和は 10 年に余る試行錯誤を経て、その成果をあげ始めているので、薬局方国際調和の現状を理化学試験法、微生物試験法、生物薬品試験法、医薬品添加物各条について研究した。薬局方調和により国際調和された新しい品質評価基準の日本薬局方への反映は、国際的動向を踏まえた品質評価に欠くことの出来ないものであるが、我が国の現状は必ずしも満足すべきものとはいえないので、その問題点を考察した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) S.Yoshioka, Y.Aso, S.Kojima: A Comparison of the ANCOVA and range-based approaches for assessing batch-to-batch variability of the stability of pharmaceutical products. *Chem. Pharm. Bull.*, Submitted.
- 2) K. SATOH, A.IWATA, M. MURATA, M. HIKATA, T.HAYAKAWA, T.YAMAGUCHI; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Clin. Microbiol.*, submitted.
- 3) Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA and Takao HAYAKAWA: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *British J. Hematol.*, submitted.
- 4) Takao HAYAKAWA: Perspective on assessing comparability of biotechnology products—a view from Japan. *Dev Biol Stand.*, Basel, Karger, in press.
- 5) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: The usefulness of sugar-mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, in press.
- 6) Zhi-Li XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA: Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *Journal of Controlled Release*, in press (2002).
- 7) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: CAR- or  $\alpha v$  integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Therapy*, in press (2002).
- 8) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., and

- Hayakawa, T.: Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Methods Molecular Biology*, in press.
- 9) Nagano, M., Nakamura, T., Niimi, S., Fujino, S., Nishimura, T., Murayama, N., Ishida, S., Ozawa, S., Saitou, Y., Sawada, J.: Substitution of arginine for cysteine 643 of the glucocorticoid receptor reduces its steroid-binding affinity and transcriptional activity. *Cancer Lett.*, in press (2002).
  - 10) Niimi, S., Horikawa, M., Seki, T., Ariga, T., Kobayashi, T., Hayakawa, T.: Effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes Effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, in press (2002).
  - 11) Niimi, S., Oshizawa, T., Naotsuka, M., Ohba, S., Yokozawa, A., Murata, T., Hayakawa, T.: Establishment of a standard assay for human thrombomodulin and determination of the activity of the Japanese reference standard. *Biologicals* 30, 69-76 (2002).
  - 12) Sachiko Matsui, Sachiko Matsumoto, Reiko Adachi, Kaoru Kusui, Akiko Hirayama, Hidemi Watanabe, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Teruhide Yamaguchi, Tadashi Kasahara, and Kazuhiro Suzuki :LIM Kinase 1 Modulates Opsonized Zymosan-triggered Activation of Macrophage-like U937 Cells. POSSIBLE INVOLVEMENT OF PHOSPHORYLATION OF COFILIN AND REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON. *J. Biol. Chem.*, 277, 544-549 (2002).
  - 13) Takao HAYAKAWA: Specifications For Biotechnological Substances, Proceedings of the Fifth International Conference on Harmonization San Diego 2000, Ed. By M. Cone, Regulatory Affairs Journals LTD, pp. 121-128 (2001).
  - 14) Takao HAYAKAWA: Biotech Process Evaluation, Proceedings of the Fifth International Conference on Harmonization San Diego 2000, Ed. By M. Cone, Regulatory Affairs Journals LTD, pp. 73-77 (2001).
  - 15) Kawasaki, N., Haishima, Y., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology*, 11, 1043-1049 (2001).
  - 16) Zhi-Li Xu, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA: Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, 272, 149-156 (2001).
  - 17) Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: Efficient gene transfer by fiber mutant adenoviral vectors containing RGD peptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1568, 13-20 (2001).
  - 18) Kawasaki, N.: Analysis of interactions between carbohydrates and proteins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 13, supplement GT-C04E (2001).
  - 19) Ohta, M., Kawasaki, N., Hyuga, S., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 910, 1-11 (2001).
  - 20) Sachiko MATSUI, Reiko ADACHI, Kaoru KUSUI, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi KASAHARA, Takao HAYAKAWA and Kazuhiro SUZUKI: U73122 inhibits the dephosphorylation and translocation of cofilin in activated macrophage-like U937 cells, *Cell. Signalling*, 13, 17-22 (2001).
  - 21) 早川堯夫、山口照英、石井（渡部）明子、押澤正：核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリティスタディ。医薬品研究、（印刷中）。
  - 22) 早川堯夫、山口照英、押澤正：日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究 ―ウイルス安全性確保の基本要件―。医薬品研究、33(3), 210-230 (2002)。
  - 23) 小嶋茂雄、島田弘康、橋本正晴、苗代一郎、中島芳文、門田利人、三宅幸雄、森田健、若田明裕、竹内正紀、酒井喜代志、鈴木専二、松澤利明、奥田秀毅、井上達、林真、長谷川隆一、奥田晴宏、高田幸一、原薬及び製剤中の不純物の安全性確認に関する Q&A。医薬品研究、33, 17-27 (2002)。
  - 24) 早川堯夫、石井（渡部）明子：生物薬品の開発の現状とトランスレーショナルリサーチへの条件。医学のあゆみ、200, 539-543 (2002)。
  - 25) 早川堯夫：バイオ医薬品の規格及び試験方法、安定性試験。PHARMSTAGE, 1(3), 9-17 (2001)。
  - 26) 水口裕之、早川堯夫：プラスミド構築に基づいた組み換えアデノウイルスベクター作製技術。BIO INDUSTRY, 18(7), 5-14 (2001)。
  - 27) 早川堯夫：バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験。日本薬局方技術情報 (JPTI) 2001、JPTI 編集委員会編、pp.278-284 (2001)、じほう、東京。
  - 28) 早川堯夫：バイオテクノロジー製剤の特徴と品質上のポイント。医薬品開発評価の基礎と臨床、医薬品開発評価の基礎と臨床研究会編、

- pp.411-442 (2001)、デジタルプレス、東京。
- 29) 早川堯夫：バイオテクノロジーを応用した医薬品の品質および安全性確保の評価科学。PDA *Journal of GMP and Validation in Japan*, 3, 57-64 (2001).
  - 30) 早川堯夫, 水口裕之：遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて一次世代アデノウイルスベクターの開発。医薬ジャーナル, 37(5), 1514-1546 (2001).
  - 31) 豊田淑江, 山口照英, 内田恵理子, 押澤 正, 早川堯夫：好中球機能分化と増殖の制御。炎症, 12巻, 101-109 (2001)。
  - 32) 早川堯夫, 真弓忠範, 黒澤 努, 豊島 聡, 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).
  - 33) 早川堯夫, 豊島 聡, 山口照英, 川西 徹：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。衛研報告, 119, 1-26 (2001).
  - 34) 早川堯夫, 谷本 剛, 山口照英, 川西 徹, 酒井喜代志：医薬品各条の改正点 生物薬品。薬局, 52, 1609-1615 (2001).
  - 35) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫：糖鎖含有タンパク質製剤の品質評価試験法に関する研究(III)。衛研報告, 119, 65-69 (2001).

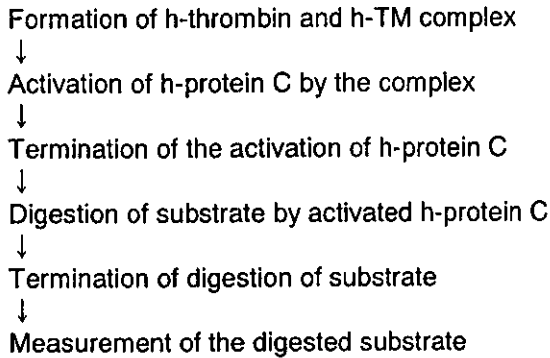
## 2. 学会発表

- 1) Eriko UCHIDA: "Quality and Safety of Gene Therapy Products in Japan." Meeting on Biotech and Gene Therapy Products, ICH Tokyo meeting 2001 (2001.5)
- 2) 新見伸吾, 堀川麻衣, 関泰一郎, 有賀豊彦, 小林 哲, 早川堯夫：初代培養ラット肝細胞におけるEGFによるDNA合成促進に対するアクチビン AB,B の作用。第8回肝細胞研究会 (2001.6)
- 3) Kobayashi, T., Niimi, S., Hyuga, M., Hayakawa, T.: Left lobe-specific increase of HGF and follistatin mRNA in relation to the rat liver regeneration. 14th International Congress of Developmental Biology (2001.7)
- 4) 沢井 勇, 斎藤芳郎, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫, 高橋和彦：ヒト selenoprotein P の糖鎖構造解析。第38回日本生化学会北海道支部例会 (2001.7)
- 5) 豊田淑江, 山口照英, 押澤正, 内田恵理子, 早川堯夫：HL-60細胞の好中球への分化・増殖における p70S6 キナーゼ (p70S6K) カスケードの役割についての研究。第22回日本炎症・再生医学会、東京 (2001.7)
- 6) 早川堯夫：生物薬品の開発の現状。癌分子標的治療研究会ワークショップ、ニセコ (2001.8)
- 7) 豊田淑江, 山口照英, 押澤正, 内田恵理子, 早川堯夫：HL-60細胞の好中球への分化・増殖の

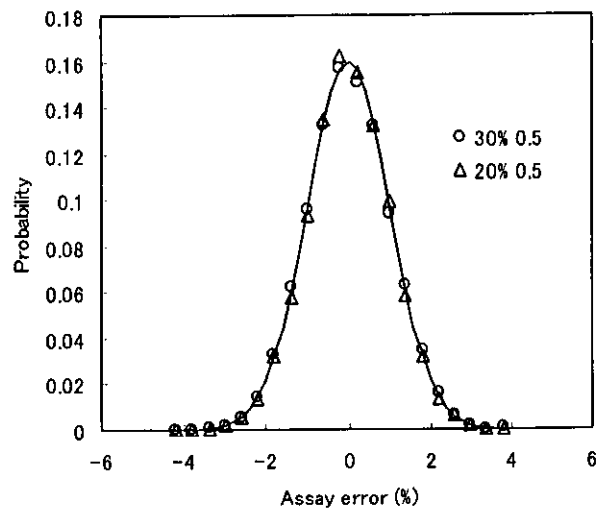
- コミットメントにおけるPI3k-PKC-p70S6キナーゼ (p70S6K) カスケードの役割。第74回日本生化学会大会 (2001.10)
- 8) 新見伸吾, 風間宏美, 稲川雅美, 関泰一郎, 有賀豊彦, 日向昌司, 早川堯夫：MRC-5細胞におけるTPA依存的なHGF産生促進に対するアクチビンの作用。第74回日本生化学会大会 (2001.10)
  - 9) 川崎ナナ, 配島由二, 太田美矢子, 伊藤さつき, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫：LC/MS及びNMRを用いたエリスロポエチンの硫酸化糖鎖の構造解析。第74回日本生化学会大会 (2001.10)
  - 10) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 日向昌司, 太田美矢子, 日向須美子, 早川堯夫：LC/MS及びLC/MS/MSを用いた組換え型ヒトフォリスタチンの糖鎖構造解析。第74回日本生化学会大会 (2001.10)
  - 11) 沢井 勇, 斎藤芳郎, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫, 高橋和彦：ヒト selenoprotein P の糖鎖構造解析。第74回日本生化学会大会 (2001.10)
  - 12) 山口照英, 早川堯夫：バイオテクノロジーを応用した医薬品の品質及び安全性確保の評価科学。PDA 第9回年会及び併催シンポジウム、東京 (2001.11)
  - 13) 早川堯夫：CTD/Q:全体説明とポイント。東西合同技術研究講演会 (2001.12)
  - 14) 早川堯夫：Q6B:全体説明とポイント。東西合同技術研究講演会 (2001.12)
  - 15) 山口照英：細胞・組織利用医薬品・医療用具の品質管理手法について。第6回関西バイオコンファレンス、神戸 (2002.3)
  - 16) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫：キャピラリーLC/MSによる微量糖タンパク質糖鎖の構造解析。日本薬学会第122年会 (2002.3)
  - 17) 太田美矢子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫：LC/MSを用いた糖ペプチドマッピング法による甲状腺刺激ホルモンの部位特異的な糖鎖の不均一性の解析。日本薬学会第122年会 (2002.3)
  - 18) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫：LC/MSを用いたタイプの異なるN-結合型糖鎖の一斉分析。日本薬学会第122年会 (2002.3)

## G.知的所有権の取得状況

なし



**Fig.1** Fundamental protocol of the standard assay method for h-TM.



**Fig. 2** Distributions of assay errors used for generating the data of 30% stability difference among batches and 0.5% assay error (○), and the data of 20% stability difference and 0.5% assay error (△). Solid line represents theoretical normal distribution.

**Table 1** 不純物の安全性確認に関するQ&Aの作成の経緯

1999.11	製薬協に不純物の安全性確認に関するQ&A作成のプロジェクト設置
1999.12～2000.01	問題点の抽出、整理
2000.02	製薬協各社に対する対応状況の調査(アンケート調査の実施)
2000.03～05	アンケート調査のまとめ、Q&A原案(Ver.1)の作成
2000.06	製薬協側→国立衛研側 Q&A原案の送付
2000.11～12	国立衛研側→製薬協側 Q&A修正案(Ver.2) 提示
2001.02	製薬協側→国立衛研側 Q&A修正案(Ver.3) 提示
2001.04	国立衛研側→製薬協側 Q&A修正案(Ver.4) 提示
2001.05	製薬協側→国立衛研側 Q&A修正案(Ver.5) 提示
2001.07	国立衛研側→製薬協側 Q&A修正案(Ver.6) 提示
2001.09	官民関係者のミーティングでQ&A最終案(Ver.7)に合意

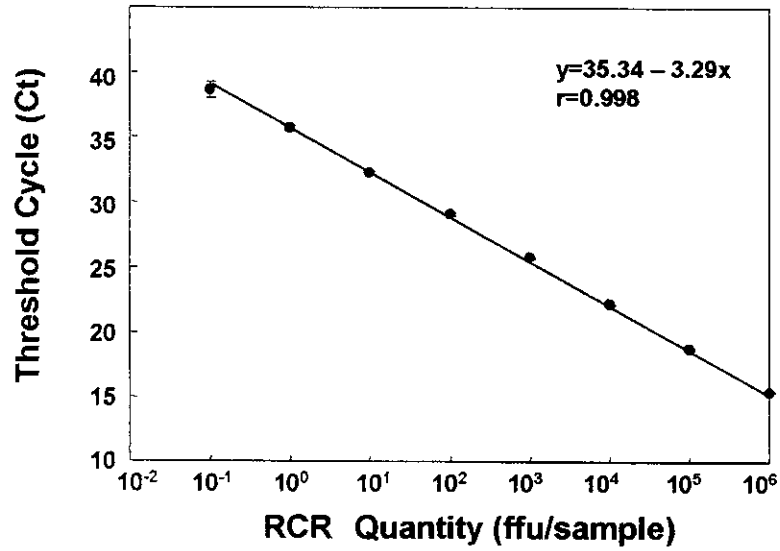
Table 2 ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の各国の規制の比較（1）

	日 本	EU	米 国
細胞治療用医薬品の定義	生物由来医薬品又は生物由来医療用具のうち、ヒト又は動物の細胞・組織から構成されたもの。	自己あるいは同種の細胞から構成されるヒト体細胞	ヒトに投与する自己、同種あるいは異種動物由来の生殖系列以外の生きている体細胞。細胞・組織を利用した医薬品、医療用具の他に、自己由来軟骨細胞、血液幹細胞、精液を含む生殖細胞、腱、骨、心臓弁や角膜等の移植用組織も対象
除外	輸血用血液製剤、血液製剤、骨髄移植、臍帯血移植、移植医療としてのヒトの皮膚や骨、心臓弁等	輸血用血液製剤	輸血用血液製剤、
細胞治療用医薬品等の規制ガイドラインにおけるキーポイント	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染性因子の伝達防止、</li> <li>● 細胞治療薬の品質及び安全性の確保</li> <li>● 細胞・組織の取扱いに関する科学的、倫理的妥当性の確保</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 細胞治療薬にどのような品質基準を適用するか</li> <li>● 感染因子の混入防止</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染因子の混入防止</li> <li>● プロセスコントロール</li> <li>● 臨床上の安全性と有効性を担保するか</li> </ul>

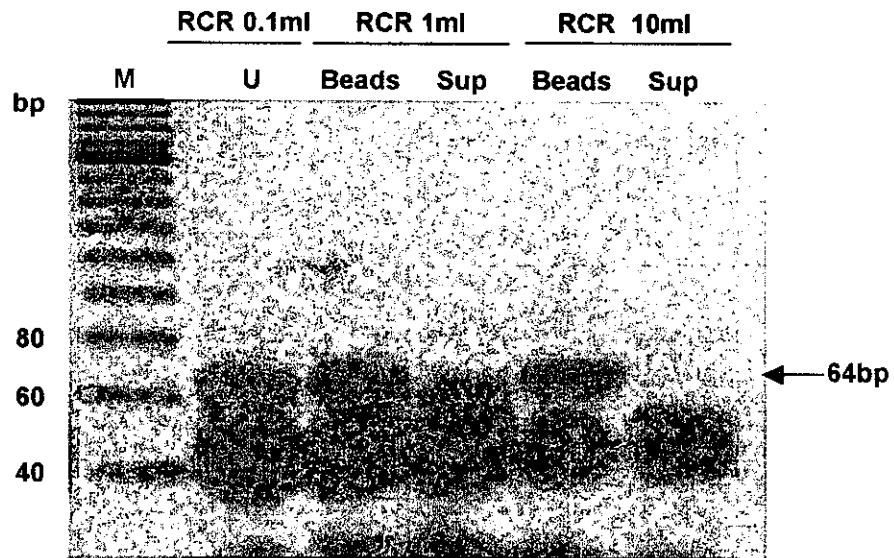
**Table 3** ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の各国の規制の比較（2）

	日 本	EU	米 国
ドナースクリーニング 試験			
試験項目	HIV-1, HIV-2, HBV, HCV, HTLV-1, 2, パルボ ウイルス B19、	HIV-1, HIV-2, HBV, HCV	HIV-1, HIV-2, HBV, HCV, トリポネーマ
必要に応じて	サイトメガロウイル ス、EB ウイルス、		HTLV-1, 2, サイトメガ ロウイルス
問診等の含めた適格性	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 梅毒トレポネー マ、クラミジア、 淋菌、結核菌等の 細菌による感染症</li> <li>● 敗血症及びその疑 い</li> <li>● 悪性腫瘍</li> <li>● 重篤な代謝、内分 泌疾患</li> <li>● 膠原病、血液疾患</li> <li>● 肝疾患</li> <li>● 痴呆症（伝達性海 綿状脳症及びその 疑いのあるもの）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 年齢、性別、</li> <li>● 病歴、最近の健康状 態</li> <li>● 遺伝的疾患に関す るすべての家族歴</li> <li>● マイコバクテリア</li> <li>● 海綿状脳症の危険 性</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 年齢、性別</li> <li>● 血液ドナーの基準 に適合すること</li> <li>● 病歴データ</li> <li>● 臓器・組織ドナーに 関する勧告事項を 参照すること</li> </ul>
特記事項		複数のドナーからの細 胞を混合する場合 <ul style="list-style-type: none"> <li>● 免疫寛容</li> <li>● 予期せぬ細胞相互 作用</li> <li>● 望ましくない免疫 反応等</li> <li>● 細胞の産生する因 子の変化</li> <li>● 感染の危険性はよ り増加</li> </ul> ついて配慮すること	複数のドナーからの細 胞を混合する場合 <ul style="list-style-type: none"> <li>● 免疫応答による細 胞間相互作用の可 能性</li> <li>● 細胞の能力を変え る可能性</li> <li>● 複数のドナー細胞 を混合したときの特 性解析の困難性</li> </ul> ついて配慮すること





**Fig.3** Standard curve for the determination of RCR quantity generated from amplification plot of real-time quantitative RT-PCR. Viral genome RNA were extracted from serial log dilution of RCR standard, and amplification of each sample were performed by real-time quantitative RT-PCR. Data were the mean  $\pm$  S.D. of triplicate amplification.



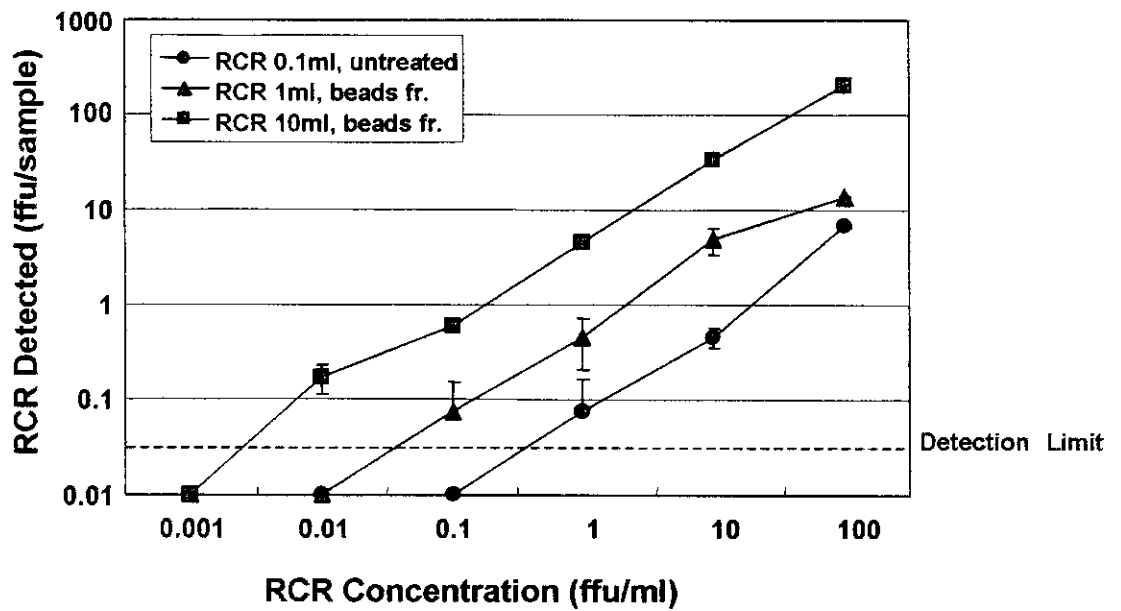
**Fig.4** Adsorption of RCR by PEI-magnetic beads. RCR ( $10^{-5}$  dilution) were fractionated with PEI-magnetic beads. Viral genome RNA extracted from beads and beads-treated supernatant fraction were amplified with RT-PCR and analyzed by 5% agarose gel. M: 20bp DNA ladder; U: untreated RCR solution; Beads: beads-adsorbed fraction; Sup: beads-treated supernatant fraction.

**Table 4** Quantitative analysis of RCR concentration by PEI-magnetic beads

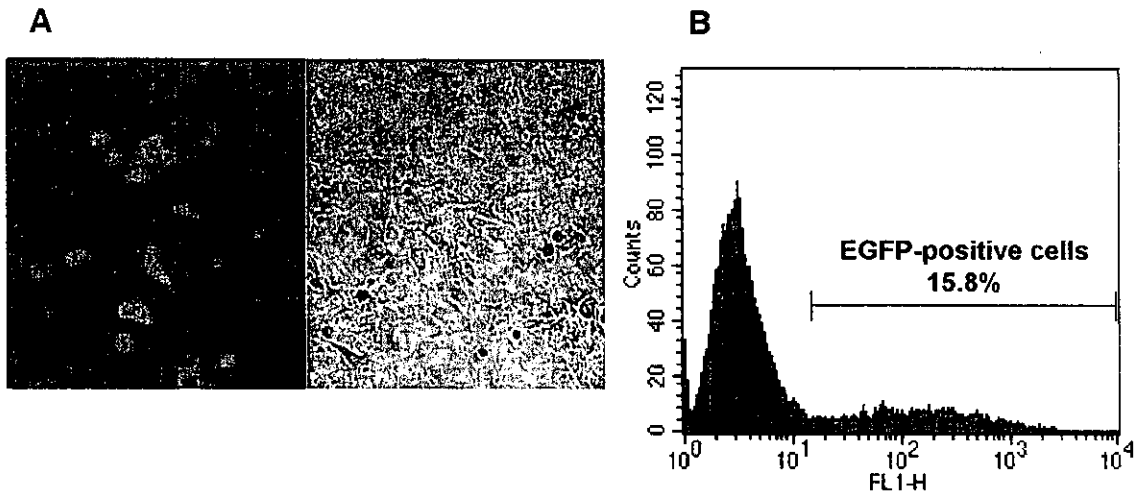
RCR Dilution	RCR Quantity (ffu/sample)				
	RCR 0.1ml Untreated	RCR 1ml		RCR 10ml	
		Beads fraction	Beads-treated sup (0.1ml)	Beads fraction	Beads-treated sup (0.1ml)
$10^{-1}$	$2.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$4.9 \times 10^1$	$6.3 \times 10^6$	$6.3 \times 10^7$
$10^{-2}$	$9.6 \times 10^4$	$1.4 \times 10^6$	-	$3.8 \times 10^6$	$4.4 \times 10^3$
$10^{-3}$	$3.7 \times 10^3$	$3.4 \times 10^4$	-	$7.2 \times 10^5$	$1.5 \times 10^0$
$10^{-4}$	$4.8 \times 10^2$	$3.3 \times 10^3$	-	$6.6 \times 10^4$	-
$10^{-5}$	$2.4 \times 10^1$	$1.2 \times 10^2$	-	$2.6 \times 10^3$	-
$10^{-6}$	$2.1 \times 10^0$	$6.9 \times 10^0$	-	$1.2 \times 10^2$	-
$10^{-7}$	- *	$3.8 \times 10^{-1}$	-	$1.0 \times 10^1$	-
$10^{-8}$	-	-	-	$5.0 \times 10^{-1}$	-
$10^{-9}$	-	-	-	-	-

Serial dilutions of RCR standard were fractionated with PEI-magnetic beads, and quantity of RCR in each fraction were determined by real-time quantitative RT-PCR.

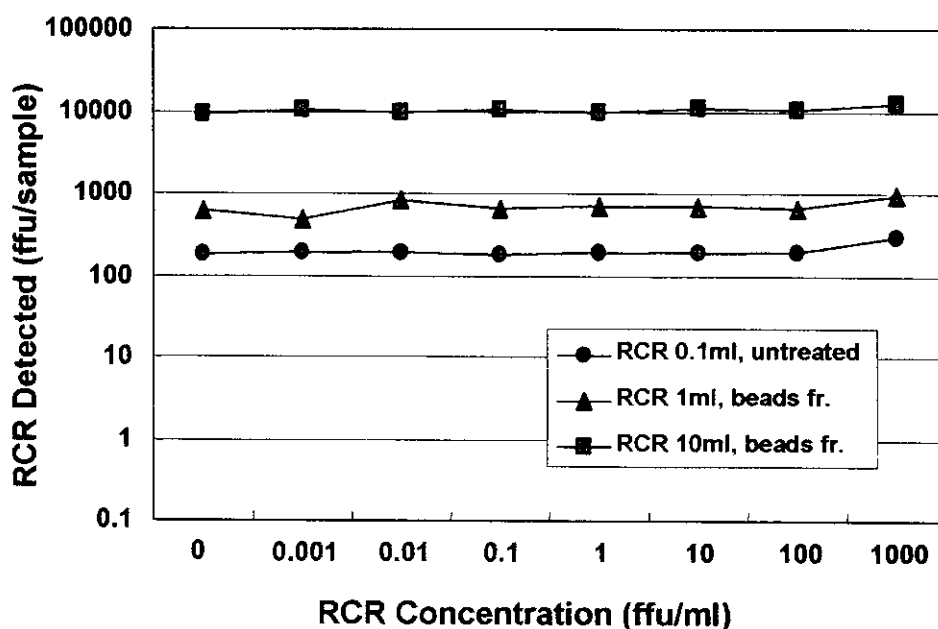
\* : under detection limit



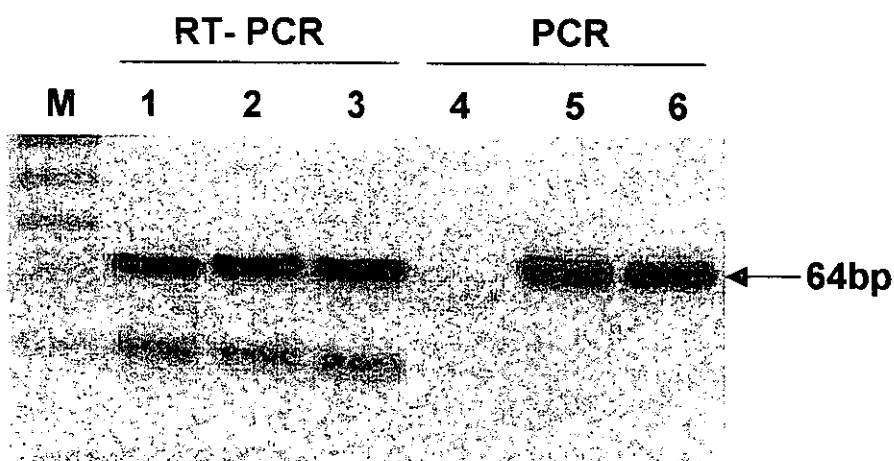
**Fig. 5** Concentration of RCR by PEI-magnetic beads. One milliliter or 10ml of serial dilution of RCR solution were incubated with PEI-magnetic beads. Viral genome RNA were extracted from beads-adsorbed fraction and untreated RCR solution. Amount of RCR were determined by real-time quantitative RT-PCR.



**Fig.6** Expression of EGFP by LEGFP1 retrovirus vector. Mus dunni cells were infected with LEGFP1 retrovirus vector. Three days after infection, EGFP expression were analyzed.  
 A. Confocal laser-scanning detection of EGFP expression. Left:EGFP expression; Right: DIC  
 B.Flow cytometric analysis of vector titer by evaluation of EGFP expression.



**Fig.7** Concentration of RCR in retrovirus vector sample by PEI-magnetic beads. One milliliter or 10ml of RCR solution diluted with LEGFP1 retroviral vector sample were incubated with PEI-magnetic beads. Viral genome RNA were extracted from beads-adsorbed fraction and untreated RCR solution. Amount of RCR were determined by real-time quantitative RT-PCR.



**Fig.8** Detection of 4070A AMLV env DNA in retroviral vector sample. Nucleic acids were extracted from RCR 100ffu (lane 1, 4),  $\Psi$  CRIP-LEGFP1 retrovirus producer cell culture supernatant (lane 2, 5), and  $\Psi$  CRIP-P131 retrovirus packaging cell culture supernatant (lane 3, 6). RT-PCR and PCR were performed using the same primer set for the detection of AMLV env sequence. M: 20bp DNA ladder.