

20020/d/d A

厚生科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

医薬品等の品質規格に係る
国際的動向を踏まえた評価に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川 堯 夫

平成15(2003)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- 医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究 1
早川 堯夫

II. 分担研究報告

1. 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に 84
 についての国際動向の研究
 山口 照英
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に関する研究 97
 -アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスの迅速高感度検出法の開発-
 内田 恵理子
3. 遺伝子治療用レトロウイルスベクター等の開発及び有効性・安全性の評価 119
 島田 隆
4. 遺伝子治療用アデノ随伴ウイルスベクターの開発動向と安全性等評価法 122
 小澤 敬也
5. バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方 124
 -バイオ医薬品の同等性/同質性評価の欧米において残された論点-
 川西 徹
 (資料)
 ① Guidance for Industry : Comparability Protocols - Chemistry,
 Manufacturing, and Controls Information (draft, FDA CBER Feb. 2003)
 ② Note for Guidance on Comparability of Medicinal Products Containing
 Biotechnology-derived Proteins as Drug Substance : Annex on
 Non-Clinical and Clinical Considerations (CPMP Jul.2002)
6. 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討 170
 川崎 ナナ
7. 医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究 195
 新見 伸吾
8. 安定性試験における品質確保基準に関する研究 204
 吉岡 澄江
 (資料)
 ①ICH Q1E Step 4 (Draft 3) Evaluation of Stability Data
9. 医薬品の品質管理における Process Analytical Technology (PAT)の活用に関して..... 224
 小嶋 茂雄
10. 新しい品質規格を用いた製品の評価法 238
 豊島 聡

11. 医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究	245
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－	
武田 寧	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	253
IV. 研究成果の刊行物・別刷	257

医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究

主任研究者 早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所・副所長

先端技術応用医薬品を含む新医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造管理技術及び品質確保技術について、外国での進捗状況を調査すると共に、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する以下の研究を行った。

1) 細胞・組織加工医薬品等の特性解析、品質や安全性等確保のための試験法として、①細胞の同一性、純度に関する試験法、②細胞のがん化の検出に関する試験法、③細胞特性解析としてのアイソザイム分析、及び④HLA の判定、を取り上げて各試験法の国際的動向を検討し、これらの試験を細胞・組織加工医薬品に適用する際の要件について明らかにした。

2) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保のための国際的共通研究課題である、アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスの迅速高感度検出法の開発を検討し、Infectivity PCR 法とガラスビーズによる細胞からの DNA 抽出法の組み合わせにより、従来法より短時間で高感度に検出が可能であることを明らかにした。

3) 遺伝子治療用レトロウイルスベクター等の開発及び有効性・安全性の評価の一環として、HIV ベクターのプロモーターの改良や cis-element の検討を行い、より安全で導入効率の高いベクターを作製した。また、眼内新生血管病モデルの遺伝子治療において HIV ベクターの有用性を示した。

4) 遺伝子治療用アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)の開発動向と安全性等評価法研究の一環として、AAV の血清型と組織特異性の関係、及び安全性について検討し、骨格筋には 1 型、肝臓には 5 型が適していることを明らかにした。

5) バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保のための同等性/同質性評価に関する欧米の最新の動向を検討し、特に残された課題である、①同等性/同質性評価における非臨床試験、臨床試験の必要性、②同等性/同質性評価における免疫原性試験の重要性、③後発品の同等性/同質性評価、について論点を明らかにした。

6) 糖タンパク質性医薬品の特性・品質解析、品質評価、及び同等性/同質性評価における糖鎖プロファイリング法、及び糖ペプチドマッピングの有用性を甲状腺刺激ホルモンをモデルに確認した。また、キャピラリー LC/ESI-四重極型/飛行時間型質量分析計の導入は分析の微量化、高分解能スペクトル測定、及び糖配列解析を可能とし、特性・品質解析、品質評価、及び同等性/同質性評価における糖鎖プロファイリング法の有用性の向上に役立つことを明らかにした。

7) 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、肝細胞増殖因子を例に、生物学的及び免疫学的国際標準品の設定と生物学的活性測定法について検討し、他の多機能性バイオテクノロジー応用医薬品にも一般に適用できる共通の留意事項を明らかにした。

8) 複数のロットあるいは複数の含量違い製剤などから得られた安定性試験データ評価法に関する国際調和のための研究として、①分解曲線の傾きと切片の差の共分散分析法に基づく一括評価の検定法、②リテスト期間/有効期間の推定値のレンジに基づく一括評価の検定法、③一括評価に関する検定を行わない方法について比較検討し、それぞれの特徴を明らかにした。

9) Process Analytical Technology (PAT) を活用した医薬品の品質管理戦略について、FDA による PAT 推進の背景や欧米製薬企業の PAT 活用戦略を把握するとともに、医薬品の品質管理における PAT 活用の意義ならびに問題点を明らかにした。また、日本における PAT に関する研究事例を紹介し、今後の我が国における PAT 活用の方向性についても検討した。

10) 医薬品承認申請のための資料の国際共通化を目的とするガイドライン (CTD ガイドライン) 及び最近の品質に係わる ICH ガイドラインを検討し、CTD 様式による添付資料に基づく品質評価について考察した。CTD 様式の資料に基づく承認申請では、品質の適格性に加えて、適切な品質の医薬品を恒常的に生産できることを説明することが求められることを明確化した。

11) 医薬品等の品質規格に係る国際的動向の把握のため、薬局方国際調和の現状を理化学試験法、微生物試験法、生物製品試験法、医薬品添加物各条について検討し、薬局方国際調和の推進と調和結果の日本薬局方への反映のために我が国が今後の調和対応に考慮すべき事項を明らかにした。

分担研究者

小嶋 茂雄	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長
吉岡 澄江	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第2室長
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部長
川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長
新見 伸吾	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第2室長
内田恵理子	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第1室長
川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第1室長
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長
武田 寧	日本公定書協会 専務理事
小澤敬也	自治医科大学 遺伝子治療研究部教授
島田 隆	日本医科大学 第2生化学教室教授 高度先端医療技術開発センター・遺伝子治療研究部門

協力研究者

宮澤 宏	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第2室長
鈴木 孝昌	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第3室長
永田 龍二	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 主任研究官
佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 主任研究官
石井(渡部)明子	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員
太田美矢子	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官
阿曾 幸男	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 主任研究官
檜山 行雄	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第3室長
寺下敬次郎	大阪府立大学大学院 助教授
柳原 義彦	大阪府健康福祉部業務課

A. 研究目的

新医薬品等の製造については、バイオテクノロジー一等の先端技術をより高度に応用した医薬品の開発や従来製品の製造方法の技術革新など、新たな展開が我が国においても急速に進んでいる。また、これらの新医薬品等の開発や技術革新の動向をうけて、品質、安全性を確保した製品を恒常的に提供する上で不可欠な品質・安全性確保基準及び製造管理技術・品質確保技術が検討されてきている。

今後我が国において、当該医薬品の品質及び安全性確保対策を推進する上で、これらの基準や技術を学問・技術の進歩に対応したより一層適切なものとしていくためには、これら製品の開発の進展が著し

い外国での状況等を踏まえ、国際的な水準を勘案しながら、絶えず評価・検証を行う必要がある。

本研究は新医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造技術及び品質確保技術について、外国での進捗状況を調査し、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する研究を行うものである。今年度は以下の項目について研究を行った。

- 1) 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の国際的動向に関する研究
- 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ーアデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスの迅速高感度検出法の開発
- 3) 遺伝子治療用レトロウイルスベクター等の開発及び有効性・安全性の評価
- 4) 遺伝子治療用アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)の開発動向と安全性等評価法
- 5) バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方ーバイオ医薬品の同等性/同質性評価の欧米において残された論点
- 6) 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討ー糖タンパク質性医薬品の特性・品質解析、品質評価、及び同等性/同質性評価における糖鎖プロファイリング法、及び糖ペプチドマッピング法の有用性
- 7) 多機能性バイオテクノロジー応用医薬品の標準品の設定及び生物学的活性測定法
- 8) 安定性試験における品質確保基準に関する研究
- 9) 医薬品の品質管理における Process Analytical Technology (PAT) の活用に関して
- 10) 新しい品質規格を用いた製品の評価法について
- 11) 新しい品質評価基準の公定規格への反映ー薬局方国際調和

B. 研究方法

B.1 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についての国際動向の研究

細胞・組織加工医薬品の品質や安全性に関する試験法について、種々の公表論文等を中心に世界の動向を調査研究した。特に各試験法の特徴、感度、精度、操作性について詳細に調査し、細胞・加工医薬品に適応する際の問題点や今後の課題についても解析した。

B.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ーアデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスの迅速高感度検出法の開発ー

(1) ウイルス、細胞

増殖性アデノウイルス(RCA)としては、5型アデノウイルス野生株(ATCC VR-5)をHeLa細胞で感染増幅し、精製したものを用いた。培養細胞としては、HeLa細胞をRCAの増幅用及びアッセイ用に、A549細胞をRCAアッセイ用に用いた。またアデノウイルスベクターの作製およびRCAの感染タイタ

一測定には HEK293 細胞を用いた。HeLa 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 Minimum Essential Medium (MEM)、A549 細胞は 10% FCS 含有 F12-K 培地、HEK293 細胞は 10% FCS 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で継代培養を行った。

(2) アデノウイルスベクターの調製

ベクタープラスミド pAdHM10LacZ を PacI 消化により線状化して HEK293 細胞にトランスフェクションした。CPE が起こった細胞を回収し、凍結融解後、再度 293 細胞に感染させて増幅後、精製を行った。

(3) リアルタイム定量 PCR に用いるプライマー、プローブおよび反応条件

RCA の定量的検出には、RCA の E1 領域の塩基配列について設計した以下のプライマーセットとプローブを用いた。Forward プライマー (Ad5dE1-1035F) : 5' - tcc ggt cct tct aac aca cct C-3' ; Reverse プライマー (Ad5dE1-1105R) : 5' - acg gca act ggt tta atg gg-3' ; TaqMan プローブ (Ad5dE1-1058TM) : 5' -Fam-tga gat aca ccc ggt ggt ccc gc-Tamra-3' .抽出したウイルスゲノムサンプル 10 μ l は、Forward、Reverse プライマー各 0.5 μ M、TaqMan プローブ 0.16 μ M、TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems) 25 μ l と混合して 50 μ l とし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム定量 PCR を行った。反応条件は 95 $^{\circ}$ C、10 分間の熱処理後、95 $^{\circ}$ C、15 秒、60 $^{\circ}$ C、1 分の反応を 50 サイクル実施した。

(4) Nested PCR に用いるプライマーおよび反応条件

E1 領域に対応するプライマーとして、1st PCR 用に Jzp5 (Ad3473F : cgc tga gtt tgg ctc tag cga t) と Jzp6 (Ad3698R : cat cac att ctg acg cac cc)、2nd PCR 用に Jzp5-2 (Ad3483F : ggc tct agc gat gaa gat aca g) と Jzp6-2 (Ad3668R : ggg cat gcg cgt tgt caa at) を設定した。PCR は、94 $^{\circ}$ C、0.5 分、55 $^{\circ}$ C、0.5 分、72 $^{\circ}$ C、1 分の反応を 35 サイクル繰り返した後、72 $^{\circ}$ C、7 分間の反応を実施した。2nd PCR では 1st PCR の反応溶液 2 μ l を鋳型に用い、サイクル数を 25 とした。293 細胞由来 DNA を検出するため、pregnancy-specific glycoprotein 遺伝子の E1 DNA の挿入部位近傍の配列として、PSG3 (293-5281F : ctc atg cct gcc tct ttc act) と PSG4 (293-5567R : aga gcc atc cac aca atg tgc) を設定した。

(5) ZnCl₂ によるウイルス濃縮法

ウイルス液に必要な量の 1M ZnCl₂ を添加し、vortex した後、室温で 10 分間静置した。液量が 1ml の場合は 12000rpm で 5 分、10ml の場合は 3000rpm で 15 分遠心し、沈殿と上清に分離した。沈殿を EGTA 溶液で溶解後、スマイテスト EX-R&D 核酸抽出キッ

トを用いて沈殿画分に含まれる核酸を抽出した。

(6) 細胞からの核酸抽出

・スマイテスト EX-R&D:細胞をセルスクレイパーで回収し、PBS(-)で洗浄、再懸濁後凍結し、-70 $^{\circ}$ Cで保存した。凍結融解を 5 回繰り返して細胞を破碎した後、10mg/ml DNase I を 2 μ l、10mg/ml RNase A を 2 μ l、1M MgCl₂ を 1 μ l 添加して、37 $^{\circ}$ C、30 分反応させ、細胞由来の核酸を消化した。反応終了後、スマイテスト EX-R&D により核酸抽出を行った。
・ガラスビーズ法：細胞をセルスクレイパーで回収し、PBS(-)で洗浄後、-30 $^{\circ}$ Cで保存した。細胞ペレットに、ガラスビーズ 1 個、界面活性剤を含む溶液 (L1) 125 μ l、プロテナーゼ K を含む酵素溶液 (L2) 125 μ l を添加し、10 秒程度 vortex した。65 $^{\circ}$ Cで 10 分インキュベーションした後、10 秒程度 vortex して、再度 65 $^{\circ}$ Cで 10 分インキュベーションした。抽出液 2ml を添加して室温で 1 分攪拌した。上清を除き、洗浄液 2ml を用いてビーズを 2 回洗浄後、室温で 5 分風乾した。ビーズに DNA 溶解液 50 μ l を加え、30 秒 vortex、65 $^{\circ}$ C、5 分インキュベーションを 2 回繰り返し、さらに 30 秒 vortex した後、上清を採取し、20 μ l を定量的 PCR 反応に用いた。

(7) 培養細胞による RCA の増幅

HeLa 細胞(1 x 10⁶ 個)を 100mm dish に播種して一晩培養後、培地を除去し、1% FCS 含有培地に希釈した RCA 液 1ml を加えて 37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養した。(スパイク実験の場合は細胞数を 1.5 x 10⁶ 個とし、RCA 感染時にアデノウイルスベクターも同時に添加した。)感染後、培地を除去し、10% FCS 含有培地 10ml を加えて培養し、Day1、3、6、9 に細胞および上清を回収した。細胞はセルスクレイパーではがし、2000rpm で 10 分遠心後、上清を別のチューブに移して、PBS(-)3ml に懸濁した。細胞懸濁液は分注して遠心し、上清を除去後、ウイルスゲノムの抽出まで-30 $^{\circ}$ Cで保存した。

(8) Cytopathic effect (CPE)アッセイ

RCA のウイルス学的検出法である CPE アッセイは、RCA 感受性細胞である HeLa 細胞または A549 細胞を指標細胞に用いた。(7)の方法による RCA の感染実験の際に、顕微鏡下で CPE の有無を観察した。

B.3 遺伝子治療用レトロウイルスベクター等の開発及び有効性・安全性の評価

増殖性 HIV ベクターが出現する可能性を取り除くため、パッケージングプラスミドから可能な限り、アクセサリ遺伝子を取り除き、発現単位ごとに分割した。また、組み込まれたベクターの LTR が機能しないような self inactivation(SIN)ベクターの形のベクタープラスミドを作製した。これらをアデノウイルスベクターに組み込み、アデノウイルスベクターを発現ベクターとして使う新しいパッケージング法の開発を検討した。さらに限外濾過、カラムなど

によりベクターの濃縮法を検討した。

PCR クローニングにより調製したアングリオスタチン遺伝子を組み込んだ HIV ベクター(HIV-Ang)を作製した。HIV-Ang の *in vitro* での血管新生抑制作用をヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)と線維芽細胞との共培養により検討した。C57BL/6J マウスを生後7日目(P7)からP12まで75%酸素下においた後、通常酸素濃度に戻し未熟児網膜症モデルを作製した。HIV-ang またはコントロールとして HIV-GFP を左眼硝子体内に、PBS を右眼硝子体内に注入した。P19 に網膜新生血管を Smith の方法 (Smith, L. E. IOVS, 1994, 35, 101-11) により硝子体内の血管内皮細胞の核数を平均化し、評価した。

B.4 遺伝子治療用アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)の開発動向と安全性等評価法

1 型から 5 型までの計 5 種類の血清型を用いて AAV ベクターを作製するシステムを準備し、これらを用いて LacZ 遺伝子あるいはマウスエリスロポエチン (Epo) 遺伝子を搭載するベクターを作製した。ベクターの血清型に関する評価については、マウスの系で、筋肉注射及び経門脈投与における遺伝子発現効率を比較検討した。骨格筋を標的とする場合は CMV プロモーター、門脈ルートでは CAG プロモーターを用いた。次に、カニクイザルでは、1 型・2 型・5 型の血清型につき、ヒト凝固第 IX 因子遺伝子を搭載したベクターを用いて、筋注の実験を行った。サルの実験では、さらに免疫反応に関して、各血清型のキャプシドに対する抗体を、ELISA 法を用いて検討した。副作用に関しては、病理組織学的検討を行った。

B.5 バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方—バイオ医薬品の同等性/同質性評価の欧米において残された論点—

バイオテクノロジー医薬品の製造方法の変更が医薬品の品質に及ぼす影響の評価に関連する公表論文、米国 FDA の関連文書、EU CPMP の関連文書、米国製薬工業協会 (PhRMA) の関連文書、インターネットによる検索によって得られる米国、および欧州の関連情報、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、製造方法の変更が医薬品の品質に及ぼす影響の評価、とりわけ製造工程の変更内容からどのような評価法が適切かについて調査した。

B.6 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

(1) 試料

ヒト脳下垂体由来甲状腺刺激ホルモン(pTSH)、遺伝子組換え甲状腺刺激ホルモン (rTSH) 及びトリプシンはシグマ社より購入した。N-グリコシダーゼ F (PNGase F) は Roche Diagnostic GmbH 社

製を用いた。

(2) 糖鎖の調製

TSH (100 μ g) を 8 M グアニジン塩酸塩、5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl、pH 8.6 (360 μ l) に溶解し、2-メルカプトエタノール 2.6 μ l を加え、室温で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 7.56 mg を試料溶解溶液 60 μ l に溶かして試料溶液に加え、遮光下、室温にて 2 時間放置した。PD-10 カラムを用いて脱試薬し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。還元カルボキシメチル化 TSH を 100 μ l のリン酸緩衝液 (pH 6.4) に溶解し、2 単位の PNGaseF と 37 $^{\circ}$ C で 72 時間反応させて糖鎖を切り出した。70%冷エタノールを加えてタンパク質を沈殿させ、上清を SpeedVac で減圧乾固した。糖鎖を 50 μ l の水に溶解し、0.5 M NaBH₄ (50 μ l) と反応させて糖アルコールとした。カーボンカートリッジ ENVI-Carb (Supelco) を用いて脱塩し、減圧乾固後、100ml の水に溶解して試料溶液とした。

(3) TSH のペプチド/糖ペプチドの調製

還元カルボキシメチル化した TSH (100 μ g) を 100 mM 酢酸アンモニウム (pH 8.0) 100 μ l に溶かし、トリプシン (2 μ g) を 2 μ l の塩酸溶液 (pH 3.0) に溶解させたものに加えて、37 $^{\circ}$ C で 4 または 8 時間消化した。

(4) 糖鎖プロファイリング

① HPLC :

装置 : Ultra-PlusII (Micro-Tech Scientific Inc.)
カラム : Hypercarb (Michrom BioResource 社製、0.2 \times 150 mm)
溶離液 A : 2% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 8.5)
溶離液 B : 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 8.5)
グラジエントプログラム : B 液 2~40% (0~60 分)
流速 : 3 μ l/分

② ESI-TOFMS, ESI-Q/TOFMS :

装置 : QSTAR (Applied Biosystems)
測定モード : ポジティブイオンモード
Ion source gas: 20
Curtain gas: 25
Ionspray voltage: 5500
Declustering potential: 50
Focusing potential: 275
Declustering potential 2: 15
Collision energy: 25
Collision gas: 5
スキャン範囲: *m/z* 800-2000

(5) 糖ペプチドマッピング

① HPLC

HPLC 装置 : Finnigan spectrasystem (p4000 pump, UV2000, Finnigan 社)

分離カラム：Vydac C18 (2.1 x 250 mm, Vydac 社)

流速：0.2 ml/min

検出波長：206 nm

a) トリフルオロ酢酸 (TFA) 系溶離液

移動相 A：0.05 % TFA

移動相 B：0.05 % TFA を含むアセトニトリル
グラジエント：移動相 B を 90 分間で 1-40 % に上
昇させた。

b) 酢酸アンモニウム系溶離液

移動相 A：1 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B：1 mM 酢酸アンモニウムを含む 80 % ア
セトニトリル

グラジエント：移動相 B を 60 分間で 1-25 % に上
昇させた後、60-90 分で 25-50 % に上
昇させた。

② ESI-MS:

装置：ESI-トリプルステージ四重極型 MS/MS シ
ステム TSQ-7000 (Finnigan 社)

測定モード：ポジティブイオンモード

シースガス：70 psi

オグジュラリーガス：10 unit

キャピラリー温度：225 °C

マルチプライヤー：1200 V

ESI 電圧：4500V

スキャン範囲： m/z 400-2400

スキャン速度：1 スキャン/4 秒

B.7 多機能性バイオテクノロジー応用医薬品の標
準品の設定及び生物学的活性測定法に関する検討

組換え HGF 国際標準品が設定されるに至った経
緯についてその詳細を検討した。また、組換え HGF
の各種疾患治療効果に関する知見並びに治療効果に
関連する細胞レベルにおける生物学的な作用について
検討した。

B.8 安定性試験における品質確保基準に関する研
究

「新原薬及び新製剤の安定性試験」に関する ICH
ガイドライン(吉岡、資料1)では、リテスト期間又
は有効期間を推定するために定量的な安定性データ
を解析するための方法として回帰分析が認められて
おり、全ロットを一括して評価できるか否かに関す
る統計的検定を有意水準 0.25 で実施することが推
奨されているが、その詳細は記載されていない。

すなわち、単一のロットから得られたデータに基
づいてリテストないし有効期間を決める際には、通
常、定量的な項目が時間に対して直線的な関係にあ
ると仮定し、平均値の 95% 両側信頼限界を求め、片
側下限が規格の下限と交差する点をリテスト期間な
いし有効期間として設定することができるが、複数
のロットあるいは複数の含量違いの製剤などから得
られたデータがある場合には、それらをまとめて一
括して解析してよいかどうかを評価しなければなら
ない。そのための方法としては、以前から FDA の

ガイドランスの中に記載されている分解曲線の傾きと
切片の差を共分散分析法で検定する方法がある。ま
た、リテストないし有効期間の推定値のレンジ、す
なわち範囲に基づいて有効期間の差を直接評価する
方法もある。さらに、統計的取扱いをより簡単に行
う評価法も考案されている。これらの各方法の特徴
や差異を比較検討した。

B.9 医薬品の品質管理における Process Analytical
Technology (PAT) の活用に関して

FDA のホームページから PAT を巡る FDA の動き
を調査・分析するとともに、欧米製薬企業の品質担
当者と PAT の活用に関してディスカッションを行
った。これらの活動を通じて、FDA による PAT 推
進の背景や欧米製薬企業の PAT 活用戦略を把握す
るとともに、医薬品の品質管理における PAT 活用の
意義ならびに問題点を考察した。

また、本研究の研究協力者である大阪府立大学寺
下助教授の PAT に関する研究を紹介するとともに、
今後の我が国における PAT 活用の方向性について
も考察した。

B.10 新しい品質規格を用いた製品の評価法

従前の承認申請資料に関する通知、平成 11 年 4
月 8 日医薬発第 481 号「医薬品の承認申請について」
ならびに同日付け医薬審発第 666 号「医薬品の承認
申請に際し留意すべき事項」と品質に関する CTD
ガイドラインを比較検討した。

B.11 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—

薬局方国際調和の最近の動向を理化学試験法、微
生物試験法、生物薬品試験法、医薬品添加物各条に
ついて検討した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は、動物倫理面(動物愛
護上の配慮など)を含めて自治医大および日本医大
動物実験指針規定に沿って行った。厚生省霊長類共
同利用施設で実施したサルの実験は、国立感染症研
究所「動物実験ガイドライン」および筑波霊長類セ
ンター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行っ
た。

C. 研究結果

C.1 細胞・組織加工医薬品の品質や安全性確保のた
めの試験法や基準についての国際動向の研究

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や幹細
胞研究・再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは
動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治
療に直接投与する医療(細胞治療)の開発が急速に
進展している。このような細胞や組織から構成され
る医薬品や医療用具(細胞・組織加工医薬品等と呼
ぶ)を医療に用いることができれば、ガン、筋ジス
トロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死
的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう

症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。我が国においても、様々な形での細胞・組織加工医薬品等の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。特に、感染性物質の混入やガン等の望ましくない細胞の出現あるいは染色体異常の惹起等を的確に検出するためにどのような試験を行うべきか、またその規制はどうあるべきか検討すべき課題は多い。

本年度は、細胞・組織加工医薬品等の品質、安全性等確保のための試験法についての最新の技術等を検討するとともに、細胞・組織加工医薬品に適用する際の要件について解析した。

C.1.1 細胞・組織加工医薬品等の遺伝的同一性、純度試験

細胞の遺伝的同一性、純度試験としては主として染色体解析が行われており、製造を通じて染色体に変化がないが、あるいは細胞集団中に染色体異常を起こした細胞が出現していないことの確認が行われることになる。細胞の染色体解析では、染色体数の計数（分布とモード数）および分染法（G/Q-band法）等による核型分析が行われている。種々の染色体解析について検討した。

(1) G-バンド分染法¹⁾

現在最も一般的に用いられている分染法は G-バンド分染法（GTG法：G-bands by trypsin using Giemsa）である。細胞をコルセミド等を用いて分裂中期で停止させ、酢酸・アルコール固定（カルノア固定）、風乾、そして蛋白分解酵素、塩、熱、洗浄剤、あるいは尿素により緩和に染色体を変性させた後、最後にギムザ染色を施す。得られるバンドパターンは基本的には後述する Q-バンド法のパターンとほとんど同様であるが、G-バンド染色法は光学顕微鏡で観察でき、ギムザ液による染色のため染色後乾燥してもその分染パターンが維持でき濃淡が明瞭であり、より高解像度の染色体バンドが得られる。用いられる蛋白分解酵素としてはトリプシンが一般的である。しかし、染色後のエイジングに長時間を要することやトリプシン濃度、処理温度により、得られる分染パターンに大きな差ができ、また手技者の経験等により大きな差がでるとされている。対象となる細胞は、一般組織・血液・羊水細胞・絨毛細胞・骨髄由来細胞などである。得られた標本を光学顕微鏡で観察するとともに、各染色体バンドの並べ替えもコンピュータ処理により自動化されてきている。染色体解析では、分裂中期の細胞を染色することから、分裂可能な細胞にのみ適用可能であり、分裂していない細胞あるいはほとんど増殖しない細胞は適用外あるいは適用が困難となる。以上のような点から、現時点では細胞・組織加工医薬品等の遺伝的同一性、純度試験としては G-バンド分染法が最初に選択されることが多い。ただし、判定に時間を要することから、短時間での培養工程を経て製造される細胞・組織加工医薬品では、出荷前の判定が難しく、他の

短時間で判定可能な手法の採用も考慮すべきであろう。

(2) Q-バンド解析²⁾

DNA と結合する蛍光色素を用いて、細胞を染色すると、各染色体特有に染色体長軸に沿った蛍光の強弱のバンドが見られる。このとき染め出される蛍光バンドを Q-バンドという。蛍光色素はアクリジン系の蛍光色素であるキナクリンマスタードやキナクリン2 塩化水素あるいはヘキスト 33258 などが用いられる。Q-バンド解析では、G-バンド分染法と同様に、コルセミド等の存在下で培養後、細胞をカルノア固定し、その後適当な蛍光染色を行うことにより観察が可能であり、非常に短時間に解析ができる。Q-バンド解析では、蛍光色素により A-T 対を多く含む DNA 領域が強い蛍光を発することが知られている。Q-バンド解析は、他の分染法と違い、染色前に熱、薬剤など経験を要する前処理が必要ないため、手技者の技能に依存しないで安定した標本ができる。また、Q-バンドの特徴として染色体の特定の部位に特に強い蛍光がみられる。このような強い蛍光が認められる部位は、異型性を示すことが知られている。異型性とは、疾患とは関連がない個人の変異であり、染色のされ方の差異により親子鑑定や、過剰染色体の起源の同定マーカーとして利用できるため、細胞・組織加工医薬品等の同一性の判定に利用できると考えられる。異型性は、Y 染色体長腕端部、3 番 4 番染色体の着糸点付近、端部着糸点型染色体の短腕と付随体部位で見られる。G-バンド分染法は手技者の経験、天候（梅雨時や乾燥期）によってもその標本のできは左右され、また時にエイジングに 1 週間から 10 日間要し、結果が出るまでに時間がかかりすぎる欠点がある。これに対し、Q-バンド分染法はエイジングがいらず、標本作成後、直ちにキナクリンマスタード染色をすれば観察が可能であるという簡便さから、以前は、かなり一般的に Q-バンド分染法が染色体異常の検査に用いられていた。しかし、解像度は G-バンド分染法より劣るため、通常の染色体検査としては現在は G-バンド分染法に取って代わられている。しかし、短時間で判定を行う必要がある場合には、現在も Q-バンド分染法も選択肢の一つと考えられる。

(3) R-バンド法³⁾

染色体標本を塩類溶液中で加熱後、ギムザ染色すると G-バンドにおける濃淡が、ちょうど反転した形のバンドとして検出される。特に、DNA 合成後期に BrdU 処理した後、コルセミド処理をし、ヘキスト 33258 染色後、UV 照射により BrdU 取り込み部分を破壊する方法は再現性のよい R-バンドが得られる。R-バンド法では、fluorescence in-situ hybridization (FISH)法と組み合わせた遺伝子のマッピングではアクリジンオレンジのような蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡下で目的遺伝子と同時に観察することも行われているが、核型分析としての染色は G-バンド分染法と同様にギムザ染色も行われてい

る。ギムザ染色を用いた R-バンド法は、観察は通常の光学顕微鏡で観察でき、また、標本の長期間保存が可能である。最近では R-バンド分染を行った試料を対象とした画像解析ソフトも開発中である。特に G-バンドと濃淡のパターンが逆になるので、G-バンドで確定できなかった切断点に対して有用であり、また、染色体の端部が濃染されることにより、G-バンドに比べて個々の染色体の大きさの違いをつかみ易いという利点がある。G-バンドでは 21 番・22 番染色体は小さく、時に判別が困難な場合があるが、R-バンドでは比較的容易に判別することができる。従って、細胞・組織加工医薬品等の同一性の判定に、前述の G-バンド分染法と R-バンド法を組み合わせることで、より詳細な細胞遺伝学的同一性の確認が可能と考えられる。

(4) SKY 法と M-FISH 法^{4,8)}

様々な蛍光染色試薬の開発や画像解析技術の進歩に基づいてヒト染色体の 24 種類 (22n+XY) を同時に染め分ける SKY 法 (Spectral karyotyping) や M-FISH 法 (Multicolor-FISH) が開発されている。これらの方法は由来不明の染色体断片やマーカー染色体の同定などに汎用されている。両者はいずれも、5 種類の波長の異なる蛍光色素を利用して各染色体に特異的なプローブを作製する際に、5 種類の蛍光色素を組み合わせることにより 24 種類の染色体を分別できるようにすることが特徴である。種々のプローブが市販されており、蛍光色素を組み合わせるというコンセプトは同じであるが、そのパターンの識別の方法や検出法は全く異なっている。

SKY 法では、各々の染色体からの蛍光は、トリプルバンドパスフィルター及び干渉計を通過後、干渉波として CCD カメラに受光され、デジタル化されて取り込まれる。デジタル化された干渉波の情報は、フーリエ変換され、縦軸に強度、横軸に波長をとった 2 次元上に展開することにより、各染色体由来の蛍光スペクトルがスペクトルイメージを描くことになる。このイメージの違いによって 24 種類の染色体を識別している。

M-FISH 法では、各々の染色体からの蛍光は、5 種類の蛍光色素と対比染色の DAPI を加えた 6 種類の蛍光色素を別々に区別できるフィルターを通過後、それぞれ別々にコンピュータに取り込み、さらにそれぞれの蛍光ごとに染色体像を重ね合わせ再構築し、再構築された色素の組み合わせパターンから染色体を識別している。以上の両方法とも由来不明のマーカー染色体の確定や、転座相手の簡便な確定に大変有効な手段であるが、同一染色体内の欠失や重複は検出できないという欠点がある。サブテロメア付近の転座も全てが検出できるわけではない。従ってこのような点を改良した手法の開発が望まれている。

以上のように、染色体解析法としては、Q-バンド解析、G-バンド分染法、R-バンド法等、染色体の部位特異的な染色パターンから転座、欠失、逆位等を検出する様々な手法が開発されてきている。これら

の手法の、解像度に関する欠点や高度な技術を要する点を克服するために、SKY 法や M-FISH 法といったより簡便に染色体の解析を行う方法が開発されてきている。しかし、SKY 法や M-FISH 法により操作の簡便性、迅速性は格段に向上しつつあるが、これらの手法も十分な解像度や精度を持っているわけではなく、より高精度かつ簡便な手法の開発が望まれている。また、細胞・組織加工医薬品等への適応に際しては、各種法の特徴を熟知し、適切な手法の選択が必要と考えられる。

(5) STR マーカーを用いた細胞の同一性試験⁹⁾

細胞の同一性を確認する手法として近年多用されているのが Short Tandem Repeat (STR) の多型に注目した個別識別技術である (Multiplex PCR method using Short Tandem Repeat [STR])。ヒト細胞に適応する場合には、多型が顕著に見られる複数のローカスを選び、その領域を増幅する PCR プライマーを利用して該当する領域を増幅し、ローカスごとに増幅された 1 ないし 2 本のバンドの長さに基づき同一性の判定を行う。通常、プライマーセットによって PCR で増幅される DNA の分子長が重ならないようにデザインされており、かつ各プライマーセットが異なる蛍光色によってラベルされているため増幅産物を混合したままで DNA シーケンサーを用いたフラグメント解析を行い、増幅した各バンドの長さの組み合わせから同一性を判定することが可能となる。本法を用いることにより、細胞の同一性を精度良く判定することが可能であり、また、他の細胞の混入があった場合にも検出が可能である。通常、9 つのローカスに対するプライマーセットでの PCR 増幅産物を組み合わせることで解析することにより同一性や混入の判定を行うが、さらにターゲットとするローカスを増やすことで、より詳細な解析が可能となると期待される。

C.1.2 がん化予測(あるいはがん細胞検出)試験¹⁰⁻¹⁸⁾

細胞ががん化すると、正常の細胞にない特性を示すようになる。このような異常細胞の特性を解析することにより、細胞のがん化あるいは形質転換を試験する方法として、①無限増殖能の獲得についての試験、②トランスフォーム・フォーカス試験、③軟寒天培養試験、④造腫瘍試験が挙げられる。正常細胞は一定の期間しか培養できないが、がん細胞及びトランスフォーム (形質転換) 細胞は一般に無限増殖能を持っている。いわば細胞が不死化しているというが、細胞・組織加工医薬品等の試験に適応するには非常に時間を要するために、あまり適切な試験法とは言えない。

(1) トランスフォーム・フォーカス試験

正常細胞は一般に細胞同士が接触すると、コンタクトインヒビションと言われる増殖阻害現象が認められるが、トランスフォーム・フォーカス試験は、細胞ががん化あるいはトランスフォームするとこのような接触阻害現象が認められなくなることを原理

としている。通常培養を続けて confluent になると正常細胞は一層の細胞シートとなって増殖が停止するが、培養した細胞集団にトランスフォームした細胞が存在すると、接触阻害が起こらずその部位だけ細胞が層状に増えてくるとともに、形態も変化する。このような細胞をギムザ染色すると、がん化あるいはトランスフォームした細胞が存在する部分だけがフォーカスを形成して見える。このフォーカスの形成を指標として、細胞のがん化、トランスフォームを評価するのがトランスフォーム・フォーカス試験である。接触阻止現象は、繊維芽細胞の研究から生まれたものであり、必ずしも上皮系の細胞には当てはまらないことを留意しておく必要がある。

(2) 軟寒天内コロニー形成試験

軟寒天内コロニー形成能は、繊維芽細胞と上皮細胞に共通してトランスフォームした細胞に認められる現象と考えられている。基質に接着して増殖する多くの細胞は、軟寒天内では足場がないために増殖できない。細胞のがん化やトランスフォームに伴う現象として、この軟寒天内での増殖能の獲得がある。このような現象を足場非依存性 (Anchorage-independent growth) という。本法はコロニー形成をさせるまで長期の培養を必要とするために、短期間での培養しか行わないような細胞・組織加工医薬品では適応が難しいこともある。また、軟寒天内コロニーの形成能と、(3)のヌードマウスでの造腫瘍性とは相関しないことも多く、軟寒天内コロニー形成能を持たないからといってヌードマウスでの造腫瘍性がないとは言えないこともある¹⁹⁾。造腫瘍性を正確に判定するには、他の手法との併用を行うなどの考慮が望ましいと考えられる。

(3) ヌードマウス腫瘍形成試験

軟寒天内コロニー形成試験より、より正確にがん化の判定を行うのがヌードマウスでの腫瘍形成を見る試験である¹⁴⁾。この方法は、ヌードマウスに移植した際に腫瘍を作るかどうかにより絶対的な判定をすることができるが、結果が出るまで時間がかかること、特にがん化した細胞が非常にわずかなポピュレーションしか含まれない場合には正確な判定が下せないという問題もある。

(4) がん遺伝子異常検出試験

がん特異遺伝子の発現を指標とする試験法としては、白血病原因遺伝子としてよく知られているフィラデルフィア染色体¹⁵⁾やその他のがん遺伝子を検出する手法が適応できる場合もあるかもしれない。フィラデルフィア染色体など特定の染色体転座が起こっていれば、FISH(クロモソームペインティング)または転座産物特異的 RT-PCR 法にて比較的簡便に検出できる。RT-PCR 法では、細胞集団にごくわずかながん細胞の混入がある場合にも比較的感度良く検出できる利点がある。これらの検出法は、あらかじめ限られた遺伝子変異が想定される場合のみ適応可能である。また、p53、Ras などの癌遺伝子、癌

抑制遺伝子など、がん関連遺伝子¹⁶⁻¹⁸⁾の変異を解析することにより、造腫瘍性を予測できる場合もあるかもしれない。p53 遺伝子の場合、酵母を用いたアッセイや、抗体を使った検出も可能である(変異型 p53 蛋白は安定化され蓄積する)。SSCP 法や変異アレル特異的 PCR 法なども、このようながん関連遺伝子の変異の検出に有効であるが、適応範囲が制限される。また、すべてのがん関連遺伝子の変異を調べることは現実的ではないと思われる。染色体異常をとらえる場合には、G-バンド解析や M-FISH (SKY) 法が有用であるが、染色体異常が起こっていることが必ずしもがん化を意味しているわけではないことを念頭においておく必要がある。

細胞集団全体ががん化しているようなケースでは、それぞれの手法の簡便性や迅速性等に問題があるものの、がん化をかなりの確率に判定することが可能であるが、細胞・組織加工医薬品等の中にわずかにがん化した細胞が出現することを想定した場合、このようながん化細胞を高感度に検出する手法としては、現時点で十分な精度・感度を持った手法は確立されているとは考えられない。従って、現時点では細胞の染色体変異等も含めた解析を行うことが望ましいと考えられる。

C.1.3 アイソザイム分析¹⁹⁻²⁰⁾

アイソザイム分析は主として由来動物種の同定手法として用いられる方法であり、他細胞の混入および取り違えの有無を確認するために行われる分析法である。同一種内の個別の個体由来の細胞を区別したいときは STR による多型解析法他の手法を用いる必要がある。一般的に G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)、LDH (lactate dehydrogenase)、NP (nucleotide phosphorylase) などの複数の酵素を選び、非変性電気泳動とゲル内酵素反応による染色パターンから動物種の特定が行われている。解析に際して、細胞から酵素を失活させないように低温で抽出し、さらに非変性条件下でゲル電気泳動を行いアイソザイムを分離する。泳動したゲルを用いて発色性の基質を用いてゲル内酵素反応を行うことにより、目的とするバンドの位置を染色して確認する。反応に用いる基質液やゲル等についてはキット化されたものが用いられており、簡便、短時間に細胞の由来動物種を同定することが可能である。ただし特定の細胞株において特異的に発現していることが既知のアイソザイムに関しては、その細胞株の同一動物種由来細胞への混入をアイソザイム分析によって判定することが可能であるが、このようなケースは非常にまれであり、通常の細胞・組織加工医薬品等の製造ではあまり想定されないと考えられる。

C.1.4 HLA タイピング²¹⁻³⁷⁾

HLA 抗原は免疫機構によって自己・非自己を識別するための、細胞の持つ標識の主な構成要素である。従って、輸血および移植時のドナーとレシピエントの組織適合性を検討する場合には HLA 抗原のタイ

ピングを行い、HLA の一致したドナー・レシピエント間で移植が行われている。細胞組織加工医薬品等を用いた治療においても、同種由来からの製品を体内に投与し生着を目指す場合には、HLA の判定が原則的に必要になると考えられる。生着を目的としない皮膚移植等においては HLA の一致は必要としないとされている。また、角膜上皮幹細胞を増幅させた角膜移植治療などにおいては、兄弟間での移植も可能とされていることから、厳密な HLA の一致は必要がない場合もあると考えられている。さらに、臍帯血由来の造血幹細胞の移植治療では、大人の造血幹細胞と異なり HLA の一致はそれほど厳密でなくても移植が成立することもあるとされており、HLA をどの程度一致させればいいのか重要な要素となる。しかし、一般に HLA 抗原の適合度が高いほど移植成績は良好である。成人での骨髄移植等の造血幹細胞移植の場合は、HLA が完全に一致する必要があるため厳密なタイピングが求められる。特に、成人造血幹細胞移植の際、レシピエントの HLA 抗原の片方をドナーがホモ接合体で有している場合、レシピエントはドナー細胞を排除できないが、ドナー細胞はレシピエント組織を非自己と認識し、いわゆる GVHD (Graft versus host disease) が発症するケースが多い。重篤な GVHD は致死的な疾患であり、GVHD の発症を防ぐことが成人での造血幹細胞移植の成否を決定する重要なポイントである。

HLA タイピングの方法としては、大きく分けて従来からの血清学的タイピングと遺伝子解析に基づいた DNA タイピングとがある。血清学的タイピングは生きたリンパ球が必要であり、また解析が煩雑である等の理由から、近年は DNA タイピングが主流となってきている。DNA タイピングでは PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)、PCR-SSO (sequence-specific oligonucleotide)、PCR-SSP (sequence-specific primers) のように塩基配列のみに依存した方法が使用されてきたが、多数のアレルが存在する上に non-classical な HLA 遺伝子の存在および偽遺伝子の障害もあり、プライマーの選択が容易ではなく、比較的解析度の低いものとされてきた。近年は塩基配列のみならず核酸のコンフォメーションも指標にした方法やハイスループットな装置による直接塩基配列決定法 (direct sequencing) といった高い解析度のものが開発され、その精度が向上してきている。

(1) 血清学的タイピング

従来からの HLA のタイピング法として用いられてきたのは、リンパ球を分離後、各 HLA 特異的な血清 (抗体) および補体の添加による細胞溶解反応を指標とする血清学的手法である。細胞障害活性を指標とするために、生存率の高いリンパ球を分離することが重要である。リンパ球の分離法としては、比重の違いによりリンパ球を分離する Ficoll-Conray 比重遠心法²¹⁾や、抗体を結合させた磁気ビーズを用いてリンパ球を分離する方法も良く用いられている²²⁾。後者は比較的簡単な操作で短時

間にリンパ球を分離できることから近年よく用いられている方法である。また、B リンパ球がナイロンカラムに特異的に吸着することを利用するナイロンカラム法も用いられている²³⁻²⁴⁾。

分離したリンパ球を HLA に対する各種特異的抗血清 (抗体) および補体を用いて処理し、補体の細胞傷害性をエオジン染色もしくは蛍光染色により評価する (リンパ球細胞障害試験²⁵⁾)。リンパ球の細胞障害を引き起こした HLA 特異的抗体の種類からタイピングを行う。リンパ球分離によく用いられる磁気ビーズ法では、分離したリンパ球に巨大な磁気ビーズをつけているためにエオジン法による光学顕微鏡での判定が行えない。磁気ビーズで分離したリンパ球を用いる場合には蛍光法を用いる。HLA-A、B、C 型の判定には T リンパ球、HLA-DR、DP、DQ 型の判定には B リンパ球を用いる。HLA-D 型はドナーのリンパ球とレシピエントのリンパ球を混合培養したのちに決められるため、リンパ球混合反応 (mixed lymphocyte reaction) ともいう。混合培養して抗原反応でリンパ球が増殖する場合は HLA-D が異なるとする。以上のように、HLA の血清学的手法による操作は非常に煩雑であり、また多量の血液を必要とするなどの理由から、適応が可能である場合には後述する DNA タイピングが望ましいと考えられる。

(2) DNA タイピング

DNA シーケンシングが迅速に行えるようになったことや多様な PCR 関連技術の開発により、近年、DNA 配列に基づいた迅速な解析法が用いられるようになってきている。特に、良質な抗血清を入手することが困難な class II 抗原に関しては DNA 配列でタイピングを行うことが多い。

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法²⁶⁾は、特定の HLA サブタイプにおいて特定の制限酵素が認識する固有の遺伝子変異部位が存在する場合、その変異部位をはさむようにプライマーを設計し、増幅した PCR 産物を変異配列を認識する制限酵素で消化し、電気泳動により得られる切断パターンから HLA サブタイプを判定しようとする方法である。変異部位を持たない他の HLA サブタイプ由来の PCR 産物は切断されないため、DNA の長さを比較することにより目的とする HLA を持つかどうかを簡単に判定できる。ヘテロ接合体では、切断された断片と切断されない断片が観察されることになる。HLA サブタイプごとに異なる制限酵素認識部位が存在する場合は、複数の酵素を用いて切断を行い、HLA サブタイプの判定を行う。

PCR-SSP (sequence specific primers) 法²⁷⁻²⁸⁾は、HLA のサブタイプごとに異なる配列を選択し、各サブタイプ特異的なプライマーを用いて PCR 法で増幅する方法である。PCR による増幅の有無によって HLA サブタイプを確認することができる。プライマーの設計に当たっては、プライマーの 3'末端部位に HLA サブタイプ固有の配列がくるようにする。これにより、3'末端が鋳型と相溶性のあるプライマーに

については PCR 増幅が行われるが、3'末端と鋳型の相同性がない場合には PCR が進行しないようにする。何れのプライマーで増幅されたかをゲル電気泳動で検出することで簡単にタイプが判定できる利点があるが、PCR 産物のサイズのみでの判定では非特異的 PCR 産物による誤判定の可能性も否定できないという欠点がある。厳密な解析を行うには増幅産物のシーケンス等が必要になる場合も考えられる。

PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide)法²⁹⁻³³⁾は HLA サブタイプ特異的な塩基配列に対する合成プローブ (oligonucleotide probe) をフィルターもしくはマイクロプレートにドットプロットされた PCR 産物とハイブリダイズさせ、プローブと PCR 産物との結合を指標に HLA サブタイプを検出する方法である。また、逆にプローブをドットプロットして、PCR 産物をハイブリダイズするリバースドットプロット (reverse dot blot) 法もある。従来この方法の検出は、放射性同位元素を使用することが欠点であったが、最近では化学発光や発色などによって検出することも可能になってきている。

PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism)法³⁴⁾では、PCR 産物の 2 本鎖 DNA を熱やアルカリで処理して変性させた後、得られた 1 本鎖 DNA を変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、泳動度の違いにより HLA の判定を行う手法である。1 本鎖 DNA は分子内相互作用によって折り畳まれた立体構造を形成し、その構造の特異性に依存してゲル電気泳動の移動度が変化することを原理としている。エチジウムブロマイドは、2 本鎖 DNA を染色するが、1 本鎖 DNA をほとんど染色しないため、泳動バンドの検出には銀染色が使用される。蛍光色素でプライマーを標識しておく、DNA 自動シーケンサーが利用できるためハイスループットな解析が可能といわれている。ただし正確な立体構造を解析するには一本鎖 DNA の塩基数が 200~300 でなくてはならない点、電気泳動中の正確な温度制御が必要な点、および同一条件下でも一本鎖 DNA は複数のコンフォメーションを取ることがあり、泳動パターンが複雑になる可能性がある点などが欠点として挙げられる。

PCR-RSCA (reference strand conformation analysis)³⁵⁻³⁷⁾は SSCP 法に類似した方法で、HLA の各ローカス特異的なプライマーを用いて PCR により増幅した産物を加熱変性させ、Cy5 などで蛍光標識したリファレンス DNA プローブとアニールさせることにより、リファレンス DNA プローブとの相同性の高さによって電気泳動での移動度が異なることを原理としている。PCR 産物とリファレンス DNA との相同性が高いほどアニリングの効率がよいが、ミスマッチ塩基対が存在する場合には 2 本鎖 DNA のコンフォメーションが変化する。コンフォメーション変化はミスマッチ塩基対の数と位置によって決定される。リファレンス DNA とアニールした状態の PCR 産物を、非変性条件下、DNA 自動シーケンサーを用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離する。電気泳動において 2 本鎖 DNA

はコンフォメーションの差によって特有の移動度を示すため、DNA 自動シーケンサーの蛍光検出により測定された移動度により PCR 産物とリファレンス DNA の塩基配列の差異を判定する。PCR-SSCP 等における泳動パターンが非常に複雑になるという欠点があるが、本法を用いることによりその問題を軽減することができる。

PCR-RFLP 法や PCR-SSP 法は非常に短時間にかつサーマルサイクラー程度の機器があれば解析可能であるが、得られた PCR 増幅産物あるいはその酵素切断断片の大きさでのみ判定するため、非特異的なバンドの出現を排除できないと言った欠点がある。Nested PCR あるいは他の特異性を高める手法を組み合わせることにより、より精度の高い手法となる可能性がある。一方、他の手法はプローブを用いることなどにより特異性を高める工夫がされているが、かなり手法が煩雑と言った欠点がある。従って、細胞・組織加工医薬品に適応する際には、対象とする細胞等での非特異反応の有無をあらかじめ検討し、試験法を選択することが望ましいと考えられる。

(3) マイナー抗原³⁸⁻⁴⁰⁾

マイナー抗原は HLA 同様に同種多様性をもち、HLA 分子上に多型抗原ペプチドとして提示される。マイナー抗原の機能は HLA 拘束性を持ち (通常は HLA class I 拘束性)、その発現は臓器または組織特異性を示す。マイナー抗原は数十から数百個あると想定されているが、現時点では数個程度しか確認されていない。このため、マイナー抗原を含めて完全に一致したドナー細胞を探すことは不可能と考えられる。しかし、マイナー抗原の一種、HA-1 のミスマッチは HLA が適合したドナーからの骨髄移植においても T 細胞レセプターにより認識され、GVHD を引き起こす要因として知られている。したがって、増幅した造血幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の適応において HA-1 のタイピングを行うことがその安全性を高めるために必要かもしれない。

C.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ーアデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスの迅速高感度検出法の開発ー

疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与する遺伝子治療は、バイオテクノロジーやゲノム科学の進歩を基礎にした革新的な医療技術として期待されている。遺伝子治療は先天性の遺伝性疾患や悪性腫瘍など、現在有効な治療法が確立されていない疾患に対して画期的な治療法となることが期待されるばかりでなく、いわゆる成人病などのより一般的な疾患に対しても応用が検討されている。しかし、遺伝子治療はまだ治療法として確立されていない実験的医療の段階である。遺伝子治療に用いられる遺伝子治療用医薬品は従来の医薬品にはない画期的な作用機序による治療効果が期待される一方で、新技術の利用に起因する安全性に関する危険性も否定できない。遺伝子治療の実

用化を推進するためには遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保、使用段階での安全性の確保が重要となる。遺伝子治療のように学問・技術が急速に進歩している分野においては、特にこれらの医薬品の開発、臨床研究の進展が著しい外国での学問・科学の進歩を踏まえ、国際的な水準からみた安全性確保方策の科学的妥当性について絶えず評価・検証する必要がある。

本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝子治療に関する国際的動向、安全性確保方策の進展を調査し、我が国の遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保に寄与する基礎的研究を行うものである。本年度はアデノウイルスベクターの品質管理、安全性確保上重視される、ベクターに混入する増殖性アデノウイルス (Replication-competent adenovirus; RCR) の迅速高感度検出法の開発について検討した。

C.2.1 リアルタイム定量 PCR による RCA 測定の定量性

まず、リアルタイム定量 PCR による RCA 定量の検討を行った。RCA の 10 倍希釈系列を MEM 培地を用いて調製し、各 100 μ l より EX R&D を用いてウイルスゲノム DNA を抽出し、20 μ l の水に溶解した。このうちの 10 μ l を用いてリアルタイム定量 PCR を行った。用いたプライマーおよび TaqMan プロブは RCA ゲノムに含まれるがアデノウイルスベクターには含まれない E1 領域の配列を認識するように設計されたものである。リアルタイム定量 PCR 増幅プロットにおいて TaqMan プロブの蛍光シグナルが一定の閾値を越えたサイクル数 (threshold cycle; Ct) とウイルス希釈列 100 μ l に含まれる RCA 量より得られた検量線を Fig. 1 に示す。標準曲線はウイルス希釈列 100 μ l 中に含まれる RCA が 10^8 particles \sim 10^2 particles の広範囲にわたって良好な直線性を示した。RCA 量が 10^2 particles 以下ではリアルタイム定量 PCR で正確な増幅プロットが得られなかったことから、この方法による RCA 定量の検出限界は 10^2 particles であることがわかった。

次に、リアルタイム定量 PCR の検出限界以下のサンプルについて、nested PCR による検出を試みた。Nested PCR は、定量性はないものの非常に低いコピー数の DNA も検出できることが知られている。E1 領域に設定したプライマーにより 10^1 、 $10^{0.5}$ 、 10^0 particles/tube のサンプル各 10 本について nested PCR を行ったところ、 10^1 particles/tube では 10 本のうち 9 本、 $10^{0.5}$ particles/tube では 10 本のうち 5 本、 10^0 particle/tube は 10 本のうち 1 本で目的のバンドが検出された。このことから、nested PCR では、リアルタイム定量 PCR の検出限界以下のサンプルでも検出可能であり、十分なサンプル数をとれば、その検出限界は 10^1 コピー以下であることが分かった (Fig. 2)。

C.2.2 ウイルスベクターに混入する RCA の測定

RCA の実際の測定においては高濃度のアデノウ

イルスベクターに微量に混入する RCA を定量的に検出する必要がある。そこで、アデノウイルスベクター試料に RCA を微量スパイクした場合にもリアルタイム定量 PCR による RCA 定量が可能かどうかを検討した。アデノウイルスベクター試料としては AdHM4LacZ (Lot. 0516) を用いた。0、 10^1 、 10^4 、 10^7 particles/sample の Ad ベクターに 10^1 、 10^3 、 10^5 、 10^7 particles/sample の RCA をスパイクし、各画分より抽出した核酸試料を用いてリアルタイム定量 PCR による RCA 定量を行った。その結果、RCA が 10^3 particles/sample 以上ではベクターの影響を受けることなく RCA の定量が可能であった (Fig. 3)。一方、RCA が 10^3 particles/sample 以下の場合には、ベクターの存在によりその量に応じて Ct 値が低下する傾向が認められた。このことから、ベクター中に RCA が存在する場合でも、ベクターの影響を受けることなく定量が可能であるが、この実験に用いたベクターには微量の RCA が混入している可能性があると考えられた。他のロットのベクターについてリアルタイム定量 PCR あるいは nested PCR を用いて検討したところ、 10^9 particles のベクターではロットによって E1 DNA が検出されるものとされないものがあったが、 10^{10} particles のベクターでは全てのロットで E1 DNA が検出されることが分かった。Fig. 4 には nested PCR の結果を示す。

アデノウイルスベクターは、293 細胞で増幅した後、cell lysate を DNase で処理してから CsCl を用いた超遠心で精製しているため、293 細胞由来の DNA の混入は多くないと考えられるが、ベクター中に検出される E1 DNA が 293 細胞での相同組み換えによって生じた RCA の混入によるものなのか 293 細胞由来の DNA 断片であるのかを、293 細胞の E1 挿入領域近傍に存在する pregnancy specific glycoprotein の配列を検出する PCR によって検討した。その結果、調べた全てのロットにおいて、 10^{10} particles では 293 細胞由来の DNA を検出するプライマーによって強いバンドが検出されたことから、ベクター標品には 293 細胞由来の DNA 断片が混入していると考えられた (Fig. 5)。従って、293 細胞で増幅し精製したアデノウイルスベクター試料を、直接リアルタイム定量 PCR による RCA 測定の試料として用いることができないことが明らかとなり、ベクターに混入する RCA を測定するには RCA と 293 細胞由来 E1 DNA との分離操作を行う必要があることが分かった。そこで、ウイルス感受性細胞に RCA をスパイクしたアデノウイルスベクター試料を感染させ、感染性、増殖性を有する RCA のみを増幅させた後に PCR を実施することにより、ベクターに混入する E1 DNA の影響を抑えて RCA を測定できる可能性について検討した。ウイルス感受性細胞でウイルスを増幅後 PCR を行う Infectivity PCR 法は、昨年度確立されたレトロウイルスベクターに混入する RCR の検出系においても有効であった方法である。

C.2.3 RCA の濃縮法の検討

Infectivity PCR を行う際に、試料中にごく微量に存在する RCA を定量する場合、RCA の濃縮が可能であれば検出感度を上げられることが予想される。増殖性レトロウイルス等のエンベロープ型ウイルスの場合、ポリエチレンイミン(PEI)結合磁気ビーズが有効であること、また PEI-磁気ビーズに捕捉されないウイルスでもスルホン化磁気ビーズに 2 価イオンを組み合わせることにより捕捉可能な場合があることが明らかにされているが、アデノウイルスの場合、PEI-磁気ビーズ、スルホン化磁気ビーズともに濃縮効率は最大 50% 程度に過ぎなかった(data not shown)。

一方、ウイルスは Zn^{2+} などの 2 価イオンによって沈殿画分に回収できることが知られている。そこで、 $ZnCl_2$ による RCA 濃縮についても検討した。ウイルス液に $ZnCl_2$ を添加して沈殿画分を得、そこから DNA を抽出してリアルタイム定量 PCR による RCA 測定を行ったところ、沈殿画分に RCA をほぼ 100% の効率で回収できることが分かった (Table 1)。血清の添加により Zn^{2+} イオンの濃縮効果は低下したが、 $ZnCl_2$ 濃度を上げると血清が存在していても RCA を沈殿させ濃縮することができた。しかし、濃縮するウイルス液の量を 1ml から 10ml に増やしたところ、沈殿 (おそらく Zn^{2+} やタンパク等) の量が増え、核酸抽出により回収したサンプルでは PCR 反応が阻害され、RCA の検出ができなかった。リアルタイム定量 PCR による DNA 増幅反応に及ぼす $ZnCl_2$ の影響を検討したところ、0.1mM 以下の $ZnCl_2$ では影響は認められなかったが、反応系に 1 mM $ZnCl_2$ が存在すると全く反応が進まなかった (data not shown)。沈殿からの核酸抽出の過程にフェノールクロロホルム処理を加えることや、反応系に EGTA を加えることで、 Zn 沈殿画分中の RCA の測定が可能になることが分かったが、100% 定量可能な条件を設定するには至らなかった。

C.2.4 細胞画分および培養上清に含まれる RCA 量の比較

アデノウイルスベクターの作製工程では一般に 293 細胞にベクターを感染させて増殖させた後、培養上清を使わずに細胞画分からウイルスを調製する。そこで、細胞画分を用いることで培養上清よりも感度よく RCA を検出できるのではないかと考えた。通常、大量の細胞からの核酸回収は、ゲノム DNA の共存のために粘性などの問題が生じることが多いが、RCA 検出においてはウイルス DNA がカプシドタンパクにコートされているためにヌクレアーゼ耐性であることを利用して、回収した細胞を凍結融解した後、DNase および RNase で処理して細胞由来の核酸を消化することによりサンプルの粘性を下げる工夫をした。この処理を行えば、 1×10^6 個を超える量の細胞からでも問題なく DNA を抽出することが可能であった。

HeLa 細胞に RCA を感染させ、上清および細胞から DNA を調製し、E1 DNA をリアルタイム定量 PCR で測定した結果を Fig. 6 に示す。培養上清 100

μ l から抽出した DNA と、培養 dish 1/3 枚分に相当する細胞から抽出した DNA を用いて RCA 量を比較すると、細胞画分では上清の 100 倍以上の E1 DNA を検出することができた。Dish あたりでは、培養上清全体に含まれる 5~10 倍量の RCA が細胞画分に含まれることが分かった。従って、培養上清中の RCA を 100% の効率で濃縮することができても、細胞画分を利用する方がそれ以上に効率よく RCA を検出できることが分かった。そこで、Infectivity PCR による RCA の検出では細胞画分を用いることとした。

一方、細胞からの DNA 抽出の際に、凍結融解・ヌクレアーゼ処理の操作を経ずに簡便に DNA を抽出する方法として、ガラスビーズを用いた抽出法を検討した。この方法は、細胞のゲノム DNA の抽出を目的として開発されたものであるが、ウイルス DNA の抽出にも有効であることが検討されてきている。RCA を感染させた細胞を用いてガラスビーズによる DNA 抽出を行ったところ、従来の方法と同等の効率で、より簡便にウイルス DNA を回収できることが明らかとなり、ガラスビーズを用いることでアッセイ系の迅速化・簡便化を計ることが可能となった (Table 2)。また、ガラスビーズの他に、抽出操作の自動化のためにビーズ中に鉄球を入れたポリスチレン製のビーズ (Gene Ball; JSR Co.) についても検討したが、ガラスビーズとほぼ同等の抽出効率であった (Table 2)。

C.2.5 RCA のウイルス感受性細胞による増幅と定量

RCA を 1% FCS 含有 MEM 培地で希釈したウイルス希釈系列各 1ml (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 pfu/ml) を HeLa 細胞に感染させた後、経日的に細胞を回収し、ガラスビーズを用いて DNA を抽出してリアルタイム定量 PCR を行い、RCA 増幅の容量反応性を検討した。その結果、HeLa 細胞に感染させた RCA 量が 1 pfu/dish 以上の場合、各濃度 3 枚の dish 全てにおいて感染 3 日目から RCA の増幅が検出された。0.1 pfu/dish では RCA の増幅は検出されなかった (Fig. 7, Table 3B)。したがって感染 3 日目以降に測定することで 1pfu/dish 以上の RCA が検出可能と考えられた。同時に顕微鏡観察を行い、従来の RCA 検出法である CPE アッセイによる評価を行ったところ、Day6 の段階で、10000 pfu/dish でははっきりと CPE が認められ、1000 pfu/dish のサンプルでわずかに CPE が認められたが、100pfu/dish 以下では CPE が認められなかった (Table 3A)。Day9 では、1000 pfu/dish、10000 pfu/dish でははっきりと CPE が認められ、100 pfu/dish でもわずかに CPE が認められたが、10pfu/dish 以下では認められなかった。したがって Infectivity PCR により検出感度は 100 倍以上、場合によっては 1000 倍以上に高めることが可能なこと、CPE アッセイよりも短時間で RCA が検出可能なことが判明した。HeLa 細胞のかわりに A549 細胞を用いた場合、Day 6 までは HeLa 細胞と同様に CPE の観察をすることができたが、それ以降は細胞の劣

化が著しく、Day9 では CPE を判定することが不可能であった。また、リアルタイム定量 PCR により増幅された RCA を定量した結果、HeLa 細胞と比較して A549 細胞では RCA 量がやや少ない傾向が認められた (data not shown)。A549 細胞は、FDA のガイドラインにおいて使用可能な指標細胞の例として挙げられているが、今回用いた実験系では HeLa 細胞の方が適していると考えられた。

C.2.6 アデノウイルスベクターにスパイクした RCA のウイルス感受性細胞による増幅と定量

次に、RCA をウイルスベクターにスパイクした希釈した試料についても RCA のみの場合と同様に、Infectivity PCR による測定ができるかどうかを検討した (Fig. 8, Table 4)。10cm dish に HeLa 細胞を 1.5×10^6 個播種し、翌日、dish あたり 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 pfu の RCA をそれぞれ 10^9 particles の アデノウイルスベクター AdHM10-LacZ3 と共に細胞に感染させた。この条件では、ベクターの MOI は約 30 である。1, 3, 6 及び 9 日目に細胞を回収し、ガラスビーズで DNA を抽出して RCA の測定を行ったところ、感染 1 日目以降、1pfu 以上で RCA の増幅が濃度依存的に検出された。0.1 pfu/dish では検出されなかった。従って、この実験での検出限界は 1pfu/dish であり、RCA 単独の場合と同等と考えられたが、RCA の定量値は RCA 単独の場合と比較して低かった。同時に顕微鏡観察により CPE アッセイを行ったが、Day9 において 10000pfu/dish のサンプルで 1dish にわずかに CPE の兆候が認められたのみであり、RCA 単独の場合と比較して CPE は起こりにくくなっていた (Table 4)。この結果から、RCA をベクターにスパイクした場合の方が Infectivity PCR による高感度化の程度は大きく、10000 倍の差があると考えられた。したがって、ウイルスベクター中の RCA の検出についても Infectivity PCR によって、従来の RCA 検出法よりも短時間で高感度に RCA を検出可能なことが明らかとなった。

C.3 遺伝子治療用レトロウイルスベクター等の開発及び有効性・安全性の評価

HIV ベクターはエイズの遺伝子治療のためのベクターとして開発されたレトロウイルスベクターの一種であり、CD4⁺ヘルパーリンパ球に特異的に感染するという特徴を持っている。最近、HIV ベクターが非分裂細胞に遺伝子導入できることが明らかになり、エイズ以外の疾患に対する応用も検討されている。リンパ球以外の細胞種に対する遺伝子導入法は、組織特異性のない VSV ウイルスの外殻蛋白(VSVG)を用いる方法と、CD4 発現ベクターとの二段階遺伝子導入法により可能になっている。これまでに開発されたベクターの中で非分裂細胞の染色体へ組み込まれるのは HIV ベクターのみであり様々な疾患への応用が期待される。

HIV ベクターをヒトの治療に使ううえで最も大きな課題は安全性を如何に確保するかという点であ

る。試験管内の実験や動物実験では病原性ウイルスが出現した例はないが、なお一層の改良が必要である。更に、効率のよいパッケージング系が無いことも欠点となっている。パッケージングに必要な HIV タンパク質に細胞毒性があるため通常のレトロウイルスで使われているパッケージング細胞は樹立できていない。

このような現状を踏まえ、本研究では安全で効率の高い HIV ベクター産生系の確立と、動物モデルを使った HIV ベクターの応用技術の開発を行った。

C.3.1 HIV ベクター産生系の改良

発現単位ごとに分割したパッケージングプラスミドとベクタープラスミドにより組み換えウイルスベクターの産生が可能であり、これらをアデノウイルスベクターに組み込むことで、プラスミドをトランスフェクションした時よりも gag, pol, env, ベクター共に高い発現が得られた。これらのアデノウイルスを使用するベクター産生法により、従来の方法より 10 倍以上力価の高い HIV ベクターが得られる。また、さらに高力価なベクターを得るため、限外濾過、カラムなどの濃縮法の開発を行い、ベクターを 1000 倍濃縮することに成功した。

HIV ベクターのプロモーターを組み込まれたベクターの LTR が機能しないような self inactivation (SIN)ベクターに改良した。また、発現効率、遺伝子導入効率をさらに高めるため、WPRE (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)や cPPT-CTS (central polypurine tract and central termination sequence) などの cis-elements の付加を行い、従来より 10 倍高い力価のベクター作製が可能となり、より安全で導入効率の高いベクターを作製した。

C.3.2 HIV ベクターを使った眼内新生血管病の治療

RNA およびタンパクレベルにおいて HIV-ang によるアンジオスタチンの発現を確認した。in vitro の実験において HUVEC により形成される血管構造の面積及び長さは HIV-ang により有意に抑制された。PBS を注入した核数に比べ、HIV-angiostatin を注入した核数は平均 68%減少し、90 % (9/10; $p=0.025$) のモデル動物において減少していた。HIV-EGFP を注入した場合は減少を認めなかった。また検鏡的に明らかな炎症反応を認めなかった。動物モデルにおける HIV-ang の遺伝子発現は RT-PCR により陽性であったが、脳、肺、心臓、肝臓、骨髄では陰性であった。硝子体内の VEGF は HIV-angiostatin を投与した群で減少していた。

C.4 遺伝子治療用アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の開発動向と安全性等評価法

AAV ベクターを遺伝子治療用ベクターとして用いた臨床研究は比較的最近スタートしたところであり、今後の発展が期待されている。基礎研究面では、AAV ベクターの血清型と組織特異性の関係が注目されるようになってきている。そこで本研究では、

代表的な 1~5 型の AAV ベクターを作製し、マウス・サルの系で、骨格筋への注射、門脈内投与の検討を行った。さらに、ベクターに対する免疫反応やその他の副作用の有無についても検討を行った。

マウス骨格筋における遺伝子発現の比較検討では、1 型 AAV ベクターが最も良好であり、5 型がこれに次ぎ、それ以外は 2 型とほぼ同じレベルであった。また、いずれの血清型を用いた場合にも発現は長期にわたって持続した。マウス肝臓においては、5 型 AAV ベクターを用いた場合に最も良好な発現が見られ、その他の型を用いた場合には 2 型において得られた結果とほぼ同等であった。

カニクイザルを用いた筋注法の検討では、1 型 AAV ベクターでやはり最も良好な結果が得られた。また、AAV ベクターに対する抗体価の検討では、注入した血清型に対する抗体価が投与後 2 週から 4 週にかけて急上昇しており、中和活性を有していることが判明した。

C.5 パイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方—パイオ医薬品の同等性/同質性評価の欧米において残された論点—

パイオテクノロジー医薬品は開発に通常 10 年単位の時間を必要とする。一方、分子生物学、生化学、たん白質化学、分析化学、細胞生物学領域の技術革新は目覚しく、パイオテクノロジー医薬品の製造技術においても医薬品開発期間中に様々な新技術が開発、導入される。したがって一度設定した製造方法についても、規制当局から承認を受け市販された後、(あるいは開発期間中においても) 製造方法の変更が望まれることが少なくない。しかしながら、製造承認、あるいは輸入承認は、当初の製造方法によって製造された製品に関して得られたデータに基づいて評価した結果であり、製造方法の変更後の医薬品の有効性および安全性について保証するものではなく、新しい製法による製品の有効性、安全性を保証する検討が必要と考えられる。とはいえ、製造方法の変更を行った製品の有効性および安全性を評価するために、新薬と同様のデータを求めることは、優れた薬の安定的供給を図る意味からも、また社会的な資源の節約という意味からも合理的とはいえない。また、製造方法の変更はしばしば医薬品の品質の改善に結びつき、安全性の観点からも好ましいケースが少なくないが、変更の際し、その影響を評価する上で重要でないデータを求めることは、好ましい製造方法の変更を妨げる要因にもなりうる。そこで現在、これらの医薬品の製造方法の変更時の評価法について検討が求められている。

パイオテクノロジー医薬品のほとんどは有効成分である目的物質において本質的に分子多様性 heterogeneity があり、同一性の定義は難しい。また製造技術が多様であるため、それに応じた不純物、混入物の解析が必要となる。したがって、製造工程の変更が医薬品の安全性、有効性に及ぼす影響を評価するためには、上記の視点から合理的に評価する必要がある。

本研究は以上のような現状を踏まえ、この分野の国際動向を調査し、我が国におけるバイオテクノロジー医薬品の製造方法の変更の評価法を定めるための基礎資料を提供するために行った。初年度は過去数年でこの分野の評価法を整備しつつある米国に焦点をあて、調査を行った。次年度は欧州についてどのような取り組みが行われているかまとめた。本年度は、さらに欧米の動向について調査し、考察した。

C.5.1 米国における Comparability の議論の経過

米国 FDA はパイオ医薬品の製造方法の変更に伴う同等性/同質性評価については、初年度報告したように 2 つのガイダンスドキュメントを公表している。一つは 1996 年 4 月に公表された「FDA Guidance Concerning Demonstration of Comparability of Human Biologic Products, Including Therapeutic Biotechnology-derived Products (治療用バイオテクノロジー応用医薬品を含む生物医薬品の同等性/同質性を提示するための FDA ガイダンス)」であるが、この文書で「製造方法の変更が行なわれた後でも医薬品が安全で、純度が高く、有効であることを同等性/同質性評価試験データが示すのなら、追加の臨床試験を行わなくとも製造法の変更を行うことができる」という米国におけるパイオテクノロジー応用医薬品の製造方法の変更に関する同等性/同質性評価の基本的考えを明らかにした。この文書で FDA は同等性/同質性評価の概念を提示するとともに、製造業者は同等性/同質性評価試験の計画にあたって、事前に FDA と十分に協議し、FDA との合意の元に同等性/同質性評価プロトコルを定めた後、実際の試験を行なうよう求めた。

2 つめのガイダンスは 1997 年 7 月に公表されたが、(Guidance for Industry : Change to an Approved Application for Specific Biotechnology and Specified Synthetic Biological Products (製薬業界へのガイダンス : パイオテクノロジー医薬品および合成生物医薬品の既承認の申請内容の変更について))、これは先のガイドラインで概念が提示された同等性/同質性評価プロトコルの内容、および製造方法の変更についての FDA への報告のルールの手引きとして作成されたものである。

さらに最近になって、同等性/同質性評価プロトコルの作成と実行に関するガイダンス「Guidance for Industry : Comparability Protocols - Chemistry, Manufacturing, and Controls Information (製薬業界へのガイダンス 同等性/同質性評価プロトコル - 化学、製造および管理情報)」のドラフト(川西、資料 1) が新たに公表され(2003 年 2 月 20 日 FDA-CBER のホームページ)、現在 3 ヶ月の意見聴取期間にある。このガイドラインは、承認をうけた後の製造方法の変更の際に必要な同等性/同質性評価試験のプロトコルを、新薬申請(NDAs)、略式新薬申請(ANDAs)、動物薬申請(NADAs)、略式動物薬申請(ANADAs)として FDA に提出する際に参照すべき解説書であ

る。またこの内容は、医薬品マスターファイル (DMF) あるいは動物薬マスターファイル (VMF) として提出される同等性/同質性評価プロトコルの作成にあたっては適用可能とされている。ただしタンパク質製品は適用対象とされていない。したがって、現在作成作業が開始されている ICH 国際調和ガイドライン (生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来製品) を対象とする) とは適用対象が異なる。

その内容は以下のとおりである。

1. 緒言
2. 背景
 - A. 同等性/同質性評価プロトコルとは
 - B. 同等性/同質性評価プロトコルを使用するメリット
 - C. 同等性/同質性評価プロトコルガイドランスを作成する理由
 - D. 承認後の変更および同等性の証明に関する情報の在り処
3. 同等性/同質性評価プロトコルを計画、作成するにあたって考慮するポイント
 - A. 同等性/同質性評価プロトコルの化学、製造、管理 (CMC) の変更の報告への影響
 - B. 同等性/同質性評価プロトコルが CMC の変更役に立つ時期
 - C. 同等性/同質性評価プロトコルが適当ではない時期
4. 同等性/同質性評価プロトコルの手順 (どのようにプロトコルを作成し、申請するかの説明)
 - A. 同等性/同質性評価プロトコルの提出方法
 - B. 同等性/同質性評価プロトコル後に提出される変更と研究の承認のされ方
 - D. 承認された同等性/同質性評価プロトコルのクライテリアに検討結果があわない場合は?
 - E. 同等性/同質性評価プロトコルが不要な場合
 - F. 承認された同等性/同質性プロトコルの変更方法
5. 同等性/同質性評価プロトコルの内容
 - A. 同等性/同質性評価プロトコルの基本要素
 - B. 同等性/同質性評価プロトコルにおいて言及すべき製造工程の変更について FDA は特別に関心をもっているか?
 - C. 同等性/同質性評価プロトコルにおいて言及すべき解析手順の変更について FDA は特別に関心をもっているか?
 - D. 同等性/同質性評価プロトコルにおいて言及すべき製造設備の変更について FDA は特別に関心をもっているか?
 - E. 同等性/同質性評価プロトコルにおいて言及すべき製造施設の変更について FDA は特別に関心をもっているか?

- F. 同等性/同質性評価プロトコルは包装の変更を用いることができるか?
- G. 同等性/同質性評価プロトコルは工程評価技術 (Process Analytical technology: PAT) に言及できるか?
- H. 同等性/同質性評価プロトコルは医薬品マスターファイル (DMF) および動物薬マスターファイル (VMF) を相互参照できるか?
- I. 同等性/同質性評価プロトコルは DMF および VMF に含むことができるか?

先に触れたようにこのガイダンスは主として低分子医薬品を対象とするため、安全性、有効性への影響を確認するための非臨床、臨床試験への言及は極めて少ない。また同等性/同質性評価プロトコルという、米国固有の手続きについての解説を目的としており、内容においても、1997年のバイオ医薬品における同等性/同質性評価プロトコルの解説のためのガイドラインと矛盾する点はない。

以上のように米国においては、過去5年間、生物薬品関係で実施されてきた同等性/同質性評価プロトコルについて、さらにその他の医薬品にまで対象を広げたガイダンスの整備を行い、手続き上の整備を継続している。

C.5.2 欧州における同等性/同質性評価に関する議論のその後

昨年度の報告書に記したように、欧州では製造方法の変更時のバイオテクノロジー応用医薬品の同等性/同質性評価ガイドライン「原薬としてバイオテクノロジー由来タンパク質を含んだ医薬品の同等性/同質性に関するガイダンスノート」Note for Guidance on Comparability of Medicinal Products Containing Biotechnology-derived Proteins as Drug Products」を2002年3月に施行した。しかしこのガイダンスノートには、いくつかの曖昧な点が残っていた。即ち、(1) 理化学的特性および生物学的特性解析の結果、製造方法の変更の前後の製品間に違いが見出された後のアプローチをどうするか、(2) 抗原性試験の具体的内容、(3) 既に市販されている製品と同様であるとして別の申請者から申請された製品 (いわゆる Generic Biologicals) に関する同等性/同質性の検討作業の具体的方法の3点である。

以上の点に答える意味で、EUでは2002年3月に施行したガイダンスノートを補うものとして、「原薬としてバイオテクノロジー由来タンパク質を含んだ医薬品の同等性/同質性評価に関するガイダンスノート—非臨床および臨床試験に関する補遺—」のドラフトを2002年7月に公表し、2003年1月を期限に意見聴取が行われている (川西、資料2)。このドラフトでは、今日バイオ医薬品の同等性/同質性評価を行う上で課題として取り上げられる点について中心的に扱われている。

以下にそのガイドラインの要点を示す。

原薬としてのバイオテクノロジー由来タンパク質を含んだ医薬品の同等性/同質性評価に関するガイダンスノート

—非臨床試験および臨床試験に関する補遺—

1. 緒言

この文書は「原薬としてバイオテクノロジー由来タンパク質を含んだ医薬品の同等性/同質性評価に関するガイダンスノート (CPMP/BWP/3201/00)」を補う補遺として作成したものである。この文書はその他の生物薬品は対象としない。Directive 2001/83/EC の補遺の第3部、そして以下にあげる現行のガイドラインおよび将来完成されるであろうガイドラインも併せて参照すべきである。

- ICH トピック E10—臨床試験における対照群の選択に関するガイダンスノート (CPMP/ICH/364/96)
- ICH トピック S6 — バイオテクノロジー応用医薬品の前臨床安全性評価に関するガイダンスノート (CPMP/ICH/302/95)
- 糖尿病の治療における医薬品の臨床試験に関するガイダンスノート (CPMP/EWP/1080/00)
- 組換え第8因子および第9因子の臨床試験に関するガイダンスノート (CPMP/BPWG/1561/99)

2. 背景

原薬としてバイオテクノロジー由来タンパク質を含有する医薬品の同等性/同質性評価に関するガイダンスノートにおいては、以下の2つのケースにおいて同等性/同質性評価が問題となる。

- 当該製品の製造工程において変更が行われる時
- 既に市販されている製品と同等であると主張した製品が申請される時

いずれの場合でも、製造業者は製造方法の変更後の製品と変更前の対照製品が、品質、安全性、有効性という観点からみて同等のプロファイルをもつことを証明するとともに、証明の方法が妥当であることを示すことが要求される。この過程は、まず(部分的あるいは総合的な)品質の検討にはじまり、必要に応じて非臨床試験および/あるいはブリッジング臨床試験を行い同等性/同質性を明らかにするといった連続的なプロセスである。

この文書は、同等性/同質性評価を行う場合に、必要とされる非臨床および臨床データを検討することを目的としている。必要とされるデータおよびそれらのデータを提出するタイミングはケースバイケースで判断されるものであり、以下の条件によって左右される。

- 製品の特性解析の程度
- 旧製品と比較した場合の新製品の変化の性質

- 変更の前後の製品間で見出だされたり、あるいはあると想定される違い
- 関連製品群の臨床経験

3. 当該製品の製造工程の変更

原薬としてバイオテクノロジー由来タンパク質を含有する医薬品の同等性/同質性評価に関するガイダンスノートは、当該製品の製造工程の変更により、有効性/安全性への影響が予測され、あるいは影響する可能性が否定できないケースについてまとめている(原薬としてバイオテクノロジー応用タンパク質を含む医薬品の同等性/同質性評価に関するガイダンスノートのパラグラフ 2.2 参照)。製品の理化学的性質、およびインビトロ/インビボ生物活性は、各種分析法を用いて十分な特性解析が可能としても、提案されている製造工程の変更に関する経験の不足と相俟って、これらのデータからは、製造方法の変更が臨床の有効性および安全性に影響する可能性を除外することはできないと考えられる場合がある。

この文書は主にこのようなケースにおいて必要とされる非臨床データおよびヒト臨床データに焦点をあてる。しかし、あらゆる場合において、製造業者は製造工程の変更が製品の有効性/安全性に影響しないこと、そしてその結論を支持するデータが妥当な方法で得られていることを示すべきである。

もし同等性/同質性評価の過程において差異が検出された場合、明らかにしなければならない品質上の問題である可能性、あるいはその結論を下すにはさらに追加の非臨床/臨床データが必要である可能性が考えられる。

変更後の製品に関する経験の不足、およびこの文書が一般的な指針であることを考慮に入れると、それぞれの製品に必要なとされる要件はケースバイケースに判断すべきである。

製造条件の変更によって、不純物、目的物質関連不純物、そして目的物質関連物質のプロファイルに変化が生じる可能性がある。そのような場合、ヒトへの当該製品の投与に先立って、これらの変化の生物学的影響を考慮に入れるべきである。

3.1 一般的考察

この節では、製造工程の変更後の製品の有効性/安全性を検討するための検討方法を策定し、その妥当性を示す際に考慮すべきポイントについて述べる。製品の種類、および予測される変化により、必要なデータはインビトロデータ、動物実験データあるいはヒト臨床データ、あるいはその組み合わせと変わるかもしれない。このようなデータの選択の妥当性について示すべきである。

3.1.1 非臨床試験に関する考察

製造方法の変更後の製品が変更前の製品に比べて生物学的性質において臨床効果の違いを生じる可能性を考察する上で、非臨床データは有用である。場合によっては非臨床試験はほとんど、あるいは全く行う必要がないかもしれない。しかしより詳細な検

討が評価の助けとなる場合もある。安全性の問題を検討する上で、適格な研究プロトコルをデザインするためには製品の特性に関して十分に理解することが重要である。適格な非臨床試験をデザインし評価するとともに、製品の特性解析に関しては、さまざまな点において情報が関連しており、品質に関連する事項と非臨床安全性に関する事項においては重複する部分がある。とるべきアプローチが適格であることを明らかにするためには、非臨床試験に関する十分な情報を得、あるいは品質に関連する情報とを相互に参照すべきである。

臨床における安全性評価を行う上で、特に免疫原性試験のような種特異的現象を検出するためには、非臨床試験には限界があると一般に認識されている。しかし、製造方法の変更前の製品と変更後の製品の違いを検出するという目的では、非臨床試験は、臨床試験と同等であろうし、有用と考えられる。この種の検討は、開発段階において安全性に関して事前評価するために有用であろうし、必要に応じて行う追加的な確認臨床試験にも参考になるであろう。製品に応じてケースバイケースにアプローチが設定されるべきものであるが、その例として以下のようなものがあげられる。

インビトロ試験：受容体結合試験の多くは品質関連バイオアッセイ試験として既に用いられているが、反応性における変化の可能性を評価し、さらにその原因を明らかにしたい時に、組み合わせ試験として設定することができる。

インビボ試験：安全性について懸念がある場合は、一種以上の動物モデルによる適切なインビボ試験を実施するとよい。当該製品のヒトへの作用を調べるのに適していることが製造方法の変更前の製品において示されている動物種を用いたインビボ試験を行うことによって、より信頼性の高い結果が得られるであろう。得られる情報を最大限に生かし、最終剤形の形で変更前の製品と変更後の製品を比較するためにデザインされた動物実験を行うべきである。一般的に、そして動物モデルが許す限りにおいて、以下のようなエンドポイントをモニターできるように試験を考えるべきである：

- a) ファーマコキネティクス、例えばクリアランスの変化
- b) 免疫反応、例えば抗体価、中和活性、交差反応
- c) 特に関心が寄せられるポイント、例えば呼吸、腎臓、あるいは循環器のパラメーター
- d) 標準的な毒性所見（生存時、および死後の検査において）

新しい試験技術の応用も考えるべきである。エピソード・マッピング、およびリアルタイム結合試験あるいは免疫原性試験が有益と思われる。薬理学的活性物質に対する生物反応の小さな変化を比較する目的に、プロテオミクス関連科学を応用し、体液中のタンパク質プロファイルにおける量的、質的变化

をモニタリングする方法も想定される。このような研究結果の解釈は、それ自身が日々革新をとげつつある科学であるが、しかし同等性/同質性評価のためにも有用な情報を提供するものと思われる。

3.1.2 免疫原性

他の手段によって可能性を除外できる場合を除いて（5. 免疫原性を参照）、臨床データをもとに、免疫原性について常に注意を払う必要がある。

3.1.3 臨床試験に関する考慮

確認および比較のために有効性/安全性試験データが必要とされる場合、原則として、臨床的な有効性及び安全性（免疫原性以外）に関するデータの必要性を考えるべきである。この基本的な考えから乖離する場合は、その妥当性を明らかにすべきである。臨床プログラムをデザインしその妥当性を示す時に考慮に入れるべき重要なポイントとしては、変更前の製品についての以下の点に関する臨床経験があげられる。

- ・ 用量/曝露量と有効性/安全性との関係
- ・ 临床上の有効性/安全性の代行マーカーとして、薬力学マーカーを受け入れることができるかどうか
- ・ 用量/曝露量と上記代行マーカーとの関係
- ・ 薬物/受容体相互作用
- ・ 疾病特異的な作用機構
- ・ 活性に関係する標的臓器
- ・ 投与形態
- ・ 薬物動態学的特性（生物学的関門を含む）

3.1.3.1. 代行マーカー

通常、臨床試験において有効性は臨床上的エンドポイントによって定義される。しかし時によっては代行マーカーが用いられることもある。もしも治療によって薬力学的マーカーが大きく変動し、臨床的な結果の変化を説明できるならば、当該薬力学的マーカーは有効性を示す上での代行マーカーとみなせる。

代行マーカーは通常活性変化に対してより感受性が高く、臨床的なエンドポイントより短時間で評価が可能である。それゆえ、臨床データ上での同等性/同質性を検討する際に、有用なパラメーターとなるかもしれない。しかし、同等性/同質性試験の最終目的は製品の同等性/同質性を示すことにあるので、通常は有効性という視点にたつて同等性/同質性の範囲を定義し、かつその妥当性を示すためには、代行マーカーと臨床的エンドポイントとの間の量的な関係を示すデータが必要である。

代行マーカーについて完全に検証することは簡単ではないと考えられるが、エンドポイントを代行するマーカーに関する研究は推奨される。

代行マーカーの検証の際の基準が明瞭でない場合もある。例えば、好中球の絶対数と G-CSF、あるいは慢性 C 型肝炎ウイルス価の減少と α インターフェロンの関係がその例である。対象となるマーカーと