

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、改定：2002年9月
- ・ Ethanol (95)：2001年10月、改定：2002年9月
- ・ Carboxymethylcellulose Calcium：2001年10月（改定見込み：2003年7月）
- ・ Cellulose Acetate Phthalate：2001年10月
- ・ Croscarmellose Sodium：2001年10月
- ・ Cellulose Acetate：2001年10月、改定：2003年2月
- ・ Ethylcellulose：2002年2月
- ・ Lactose, Anhydrous：2002年9月、改定：2003年2月
- ・ Lactose, Monohydrate：2002年9月
- ・ Saccharin：2003年2月
- ・ Saccharin Calcium：2003年2月（JP：非収載）
- ・ Saccharin Sodium：2003年2月

各調和項目の進捗状況を2003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CPを、行末は調和の現Stageを示す。

C.11.5 ICH Q6A ガイドライン関連試験法の調和進捗状況

Bacterial endotoxins、Extractable volume of parenterals、Residue on ignition/Sulphated ash及びSterilityは調和合意されたが、ICH品質分科会からタスクフォース合意事項の提供を受けたDissolution/Disintegration、Uniformity of content / Uniformity of mass、及びMicrobial contamination、並びにColour/clarityについては調和が遅れている。

2003年2月のPDG会合で確認し、ICH運営委員会に報告した進捗状況は次のとおりである。

①Dissolution/Disintegration [USP], Stage 4

ICHタスクフォース合意事項に基づく調和案(Stage 4 draft)が作成され、各薬局方において検討中であり、2003年中の調和合意が期待される。

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

Dissolution/Disintegrationと同様に、調和案(Stage 4 draft)が作成され、各薬局方において検討中であるが、判定基準の調和にはICHタスクフォース合意事項の再検討が必要なため、PDGはICHに対し品質専門家との協議を要請している。

③Microbial contamination [EP], Stage 3

ICHタスクフォース合意事項に基づく調和案に

はなお問題が多かったため、2003年1月に専門家会合を開催し、調整をはかり、近くStage 4 draftが作成される見込みである。

④Bacterial 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月に施行されている。

⑤Colour/clarity [EP], Stage 3

これまでの調和過程からICHが求める調和事項に十分把握できない点があることが明らかとなったため、ICHに照会の上調和を進めることとされた。

⑥Extractable volume of parenterals [EP], Stage 6

2000年7月に合意署名された。

⑦Particulate matter [EP], Stage 6

2001年5月に合意署名された。

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

2000年11月に合意署名された。

⑨Sterility [EP], Stage 6

2002年10月に調和困難な部分(Sticking points)を除外し合意署名された。

C.11.6 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。

①Conductivity, 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、EPが提案したPharmaceutical waters調和に連動し、再度調和項目にあげられているが、CPの指定には至っていない。

②Heavy metals [USP], Stage 3

EPからのmicrowave ovenを用いる新法の提案を受け、USP draftの検討を棚上げにし、EP提案を検討することとされた。

③Organic 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ている。

C.11.7 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、薬局方に大きな違いがあり、調和の目的が立たないままの膠着状態にある。

C.11.8 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] 及び Inhalation [EP] Stage 3 である。

① Friability of tablets [USP], Stage 4

大きな問題点はなく、2003年7月の調和合意が見込まれている。

② Inhalation [EP] Stage 3

JP コメントの提出を待ち、Stage 4へ進むことが見込まれている。

C.11.9 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く、医薬品添加物の物性試験法が中心であるが、調和の進捗は緩慢である。EPはこの分野に新しい機器分析法を取り入れることに積極的であり、新規調和項目 (Thermal behavior, Gravimetric water sorption) の提案もある。

- Analytical sieving [USP], Stage 4
- 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
- Mercury intrusion porosimetry [EP] Stage 3 (JP: 調和参画辞退)
- X-ray diffraction for crystalline and non-crystalline solids [EP] Stage 3

C.11.10 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ではないが、バイオテクノロジー関連医薬品の試験法の調和が進められ、2002年9月に全ての項目の調和が完了した。

- Amino acid determination [USP], Stage 6
- Capillary electrophoresis [EP], Stage 6
- Isoelectric focusing [EP], Stage 6
- Protein determination [USP], Stage 6
- Peptide mapping [USP], Stage 6
- Polyacrylamide gel electrophoresis [EP], Stage 6

C.11.11 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除外し、各薬局方が合意しうる項目につき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 が調和合意された。その後も調和合意が進み、約40%の項目について調和した。

調和の進捗を受け、新規調和項目が検討され、2003年2月に10品目が採択された。

① 調和合意したもの (Stage 6)

「9.4 薬局方調和の現況」の項に記載した19品目が調和合意されている。

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二ナトリウム [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]
- Magnesium stearate ステアリン酸マグネシウム [USP]
- Povidone ポビドン [JP]
- 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)

- Carboxymethylcellulose sodium カルメロースナトリウム [USP]
- Cellulose, microcrystalline 結晶セルロース [USP]
- Cellulose, powdered 粉末セルロース [USP]
- 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]
- 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]
- 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]
- 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]
- 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)

- ・ Glycerol グリセリン[USP]

⑤調和第一次案作成中のもの (Stage 2)

- ・ Polysorbate 80 ポリソルベート 80 [EP]
- ・ Sucrose 精製白糖[EP]
- ・ 2003年2月にCPが指定されたもの
 - Carmellose [JP]
 - Calcium Carbonate [USP]
 - Copolyvidone [JP or EP]
 - Gelatin [EP]
 - Glucose/Dextrose [EP]
 - Glyceryl mono stearate [USP]
 - Mannitol [EP]
 - Sodium lauryl sulphate [USP]
 - Starch pregelatinized [JP]
 - Propylene Glycol [JP or EP]

D. 考察

D.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)細胞特性解析法としてのアイソザイム分析、(4)HLAの判定、に関する各種試験法について検討した。細胞の遺伝的同一性や純度に関する試験としてはG-バンド分染法やQ-バンド法、R-バンド法、M-FISH法などが有用と考えられるが、精度や感度はばかりでなく、操作性、時間的な制約等を勘案した場合、現時点では最適な試験法というものはないが、製造に要する時間等、製品ごとの制約に応じて試験法を選択すべきと考えられること、また複数の試験法を組み合わせることにより、さらに高感度・高精度の試験が可能であることが明らかになった。また、細胞の同一性の確認に関しては、STRに着目した試験法が非常に有用であると考えられる。がん化細胞の検出法に関しては、現時点で十分な感度を持ったものはなく、試験法を組み合わせたり、染色体検査等との組み合わせも考慮して試験を行う必要があることが明らかになった。HLA解析については、血清学的試験よりもPCR法などを利用した様々な有用なDNA解析法が開発されつつあることが明らかになったが、それぞれの試験法を熟知した上で細胞治療薬に適用することが必要と考えられた。

D.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—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—

ウイルスベクターに混入する増殖性ウイルスに関してFDAは、2000年に「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、試験容量等を具体的に提示しているが、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に関しては、FDAガイドライン中にCPE法を用いて検出することが適当と思われること、定量的にRCAを検出できる系であることが望ましいことなどが記載されているが、RCR検出系のような詳細な方法は示されていない。アデノウイルスベクターの安全性確保においては、主としてカプシドタンパク質に起因する免疫原性が問題となっており、RCAの危険性についての評価が未だなされていないことも背景にあると思われる。しかし、RCAはそれ自身の感染性や増殖性の懸念のみならず、ベクターに対するヘルパー機能によってベクター投与を受けたヒトでのベクター増殖を起こす懸念もあることなどから、ベクターへのRCAの混入はできる限り避けるべきである。従来のCPEによるRCA検出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、アデノウイルスベクターの安全性確保に向けて、より有効な検出法の開発が望まれている。

アデノウイルスベクターの安全性確保を目指した欧米での動きとして、Adenovirus Reference Material Working Groupが組織され、2002年に標準品が策定されたことが挙げられる。標準品の主たる役割は、ベクターの粒子数および感染力価のスタンダードとしてのものであるが、標準品は野生型アデノウイルスであるためRCA検出系におけるスタンダードとしての役割も担っている。本研究においても標準品の使用が望ましいと考えられたが、分譲開始時期が遅れ、また入手した標準品の感染力価に問題がある可能性が出てきたため標準品を用いた検討はまだ行っていない。本研究では、代替品としてATCCより購入した5型アデノウイルスをHeLa細胞で増幅し、CsClを用いた超遠心で精製後、標準品の力価測定法として公開されているStandard Operating Procedureに準じてparticle titerおよびinfectious titerを測定したものを実験に用いた。このサンプルのparticle titerとinfectious titer (NIU/ml)の比率は1:8.6で、標準品の値(1:8.28)に近いものであった。

ウイルスゲノムを高感度に検出できる方法として、ウイルススクリーニング試験にはPCRが多用されている。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PCRを定量的に実施可能となっている。今回の検討では、E1領域の配列を認識するように設計したプライマーとTaqManプローブを用いたリアルタイム定量PCRによりRCA量が $10^2 \sim 10^8$ particlesの広範囲にわたり定量可能であることが示された。さらに、nested PCRにより、 10^1 particles/sample以下という低濃度のRCAの検出も可能であった。このような低いコピー数のサンプルを試験する場合は、tubeの中のRCA溶液にRCAが含まれるか含まれないかのばらつきが生じるため、tubeにより増幅が検出される場合とされない場合が生じることから、検体数を多く取ってhit rateによってコピー数を推定する手法が用いられることもある。「PCRの検出限界に関する理論的考察(日本

赤十字血漿分画センター 鈴木亨氏 著)」には、シングルコピーのウイルスが検出できるほど PCR が最適化されていることを前提に、PCR hit rate と tube あたりの平均コピー数が示されているが、今回の検討では、10 コピーのとき hit rate が 9/10、3.16 コピーのとき 5/10、1 コピーのとき 1/10 で、理論値と比べて hit rate が若干低い傾向にあるが、実際には核酸抽出の段階でのロスや、PCR 反応の検出限界はシングルコピーより高いであろうことを考えれば妥当な結果と思われる。

PCR による測定は高感度であるという利点がある一方で、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。アデノウイルスベクターに含まれる RCA 検出においても、RCR の場合と同様、ベクターに含まれる DNA 断片の混入が問題となり、Infectivity PCR が有効な手段であると考えられたことから、RCR 検出系に則した系の確立を試みた。まず、RCR 検出系と同様に上清からの RCA 濃縮を行うことを試みたが、よい方法は見出せなかった。アデノウイルスは非エンベロープウイルスであり、凍結融解や超音波処理、超遠心などによる操作にも耐えることから、ベクター調製の際には細胞画分が材料として用いられている。この点はレトロウイルスがエンベロープウイルスであり、細胞内では完全なウイルス粒子を形成しておらず、また、超遠心、ポリエチレングリコール沈殿などでは有効なウイルス濃縮が行えないためにベクター産生細胞の培養上清をベクター溶液として用いることと異なる点である。RCR 検出系においては PEI-磁気ビーズを用いた新規ウイルス濃縮法が有効であったが、RCA 検出系においては細胞画分を用いることにより RCR 検出系での濃縮操作に替え、また、ガラスビーズによる抽出を行うことで簡便化を図った。従来の核酸抽出法とガラスビーズによる抽出の比較では、抽出効率の点では大きな差はなく、検出限界は同等であった。

Infectivity PCR では RCA を HeLa 細胞に 1pfu 以上感染させた場合、感染 3 日目以降で RCA の増幅が検出された。従来の CPE を指標としたアッセイでは 6 日間程度の培養期間が必要であり、確実に RCA を検出するには 1000pfu 必要であったことから、試験期間の短縮と 1000 倍ほどの高感度化が達成された。また、実際の RCA 測定を模したアデノウイルスベクター試料中にスパイクした RCA について検討を行ったところ、1pfu 以上の RCA を感染させた場合に、増幅された RCA が検出され、RCA のみの場合と同様の検出限界(1pfu/dish)で測定可能という結果が得られた。ベクターに RCA をスパイクした場合の CPE は RCA のみの場合と比較して著明に抑制されており、培養 9 日目で 10000pfu/dish のサンプルでようやく CPE の兆候が認められたことから、Infectivity PCR による高感度化は 10000 倍以上であると考えられた。レトロウイルスベクターに含まれる RCR の検出においては、従来の方法であるフォーカスアッセイと比較して Infectivity

PCR の採用により達成された高感度化は約 3-10 倍であったので、アデノウイルスベクターに含まれる RCA 検出系の方が Infectivity PCR による高感度化の度合いははるかに高いという結果となった。また RCA のほうがより早い時期から検出可能であった。これは、RCR では上清中に出てきたウイルスを濃縮しないと測定できないのに対し、RCA では細胞中のウイルスを検出可能であること、RCR 検出に用いられているフォーカスアッセイの感度が高く、RCA 検出に用いられている CPE アッセイの感度が低いことなどに起因すると思われる。今回の検討では、CPE アッセイにおいて細胞を継代せず confluent の状態で培養を続けて CPE を観察したが、従来の CPE アッセイでは途中で継代をしながら RCA を増幅することが一般的である。アデノウイルス受容体の CAR が tight junction に存在する分子であることを考えると、細胞が confluent な状態ではアデノウイルスの感染が起こりにくく、繰り返しての感染による増殖が起こりにくくなっている可能性も考えられるため、今回の実験方法では CPE アッセイの感度を過小評価している可能性もあるかもしれない。

CPE がベクターの MOI に影響を受けることは FDA ガイドライン中にも記載があり、慎重に MOI を設定することと指示されている。今回の実験ではベクターの MOI を約 30 というやや高い設定で行った。ベクターが共存することで CPE は見難くなったが、PCR による評価では RCA のみの場合と同様に 1pfu/dish のサンプルでも RCA 検出が可能であった。実際にベクター中の RCA 混入率を評価する場合には、アデノウイルスは高タイターであるため MOI を考えるとアッセイに必要な細胞数もかなり多くなる。Infectivity PCR では CPE アッセイと比較して、培養スケールの縮小も可能であると思われる。

Nested PCR によりリアルタイム定量 PCR の検出限界以下の試料でも RCA を検出できたことから、Infectivity PCR による RCA 検出のさらなる高感度化に nested PCR が有効である可能性が期待された。しかし Infectivity PCR においては nested PCR を用いることで検出限界の 1pfu/dish の試料でより確実に RCA を検出することが可能になったが、0.1pfu/dish の試料でも検出できるといった検出感度の向上にはつながらなかった。これは、低 pfu の試料では、RCA の感染、増幅が成立するか否かにハードルがあり、感染・増幅がおこったサンプルではある程度の量の RCA が含まれ、感染・増幅が起こらなかったサンプルでは全く RCA が存在しないためと推定される。このような状況を考えると、RCA 検出系は、Quantal assay (all or none での評価)であり、1pfu の標準品をコントロールとして用いながら、RCA が検出されない上限のベクター粒子数と、RCA が検出される下限のベクター粒子数を測定することで、RCA の混入率を求めることが妥当かもしれない。もちろん、感受性細胞により未知試料の RCA を増幅する際、RCA 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 RCA の量を

定量的に評価することも可能であると考えられる。

以上、Infectivity PCR 法と、ガラスビーズによる細胞からの DNA 抽出法を組み合わせることによって、従来の細胞変性効果を指標とした RCA 検出法と比較してより短時間でより高感度に RCA の定量的測定が可能であることを明らかにした。今後、標準品を用いて、これまで行われてきた CPE アッセイの検出感度を改めて評価すると共に、今回の検討で得られた結果を再評価することにより、アデノウイルスベクターの安全性確保のための RCA 検出系がより確実なものになると考えられる。

D.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

遺伝子治療が開始されてから 10 年が経過し、一部の疾患では有効性が報告されているが、同時に遺伝子治療技術の問題点も明らかになっている。今後、遺伝子治療を進展させていくためには、現在のベクターの改良だけでなく、新規の遺伝子導入技術の開発が不可欠である。本研究では新しいベクターとして期待されている HIV ベクターの応用として血管新生抑制因子遺伝子を組み込んだベクターを作製し、新生血管病モデルに対する有用性を検討した。眼内新生血管モデルマウスの硝子体内へ HIV ベクターを直接投与することで 90%以上のマウスで眼内血管新生の有意な抑制効果が認められた。失明原因のトップである糖尿病網膜症や加齢性黄斑症等の眼内血管新生病治療法の重要な選択肢になることが期待される。

今回使用した眼内新生血管モデルは相対的低酸素により急激に新生血管が生じ、新生血管が最大になるのは酸素暴露から戻して 5 日目から 7 日目である。HIV ベクター由来のアンギオスタチンが発現するのに遺伝子導入してから 2 日程度かかるので、タンパクとして存在し、実際効き始めるのは酸素投与後 3 日目から 5 日目である。もし最初からタンパクとしてアンギオスタチンが存在していればさらに血管新生は抑制されたと考えられる。臨床的に加齢性黄斑症や糖尿病網膜症を考えると今回のモデルと異なり、発症から緩徐に進行する。血管新生抑制は腫瘍の抑制において注目されているが、血管新生という観点から見ると腫瘍では新生するスピードが速く、抑制されにくい、進行に時間のかかる眼内新生血管病こそ適応の高い疾患であると考えられる。

抗新生血管作用を持つ蛋白製剤を直接投与することも考えられるが、眼内は網膜血管柵が存在し血中からの薬剤移行率は低い。また点眼薬も眼内へほとんど移行しない。眼内に蛋白製剤を頻回に投与することは現実的に感染症の問題があり不可能である。これらの問題を考えあわせると、持続的に発現可能な遺伝子治療は理想的な治療法であり、抗新生血管を狙った遺伝子治療は将来の失明防止への非常に有力な選択肢となると考えられる。

D.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 ベクターでは、血清型の違いにより極めて大きな発現レベルの相違があることが確認された。今回の検討に用いた実験系は、Epo 遺伝子の場合には同種蛋白質を産生することから、導入遺伝子産物に対する免疫反応の関与を考慮する必要がなく、血清型の違いのみに焦点を当てて比較検討することが可能であった。また、筋注法の場合、霊長類モデルでも 1 型に由来するキャプシドを利用した場合に他を大きく凌駕する効果が得られた。このことは、ヒトへの臨床応用でも、骨格筋を標的とする場合は従来の 2 型のものではなく、1 型の AAV ベクターが至適であることを示唆している。

尚、筋注した AAV ベクターのキャプシドに対する抗体が誘導されたことから、もし再投与が必要になるような場合は、何らかの対策が必要になるものと考えられる。その他、特に重篤な副作用は観察されず、安全性の高いベクターであることが裏づけられた。今後、前臨床試験としてさらに長期的な効果及び安全性の検証が課題である。

D.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—

D.5.1 欧米の動向—残された論点

米国 FDA では、同等性/同質性評価プロトコルの運用とともにその更なる整備を進めており、最近になってタンパク質性医薬品以外の医薬品 (Generic Drugs も含めた) についても同等性/同質性評価プロトコルに関するガイダンスを作成した。内容的には、生物薬品に関するガイドラインと矛盾する点はない。

一方欧州 CPMP では 2002 年 3 月に施行したバイオ医薬品の同等性/同質性評価ガイドラインの補遺ドラフトを公表し、現在意見聴取期間にある。この補遺ドラフトでは、同等性/同質性評価ガイドライン本体では明確にできなかった、(1)非臨床試験および臨床試験の必要性に関する記述、(2)免疫原性試験に関する記述、(3)先発メーカーによる先発製品と同等なものとして後発メーカーから申請された後発品の同等性/同質性評価 の 3 点を主に扱っている。非臨床試験および臨床試験については一般的な原則を記述しており、内容は妥当なものと考えられる。ただし、実際の同等性/同質性評価は連続的、階層的な評価であり、その中で臨床試験は最終段階であり、本質的にケースバイケースの対応が求められるが、どのような場合に臨床試験が要求されるかについては、未だ明確な方向が示されておらず、実際に利用しようとしても利用しにくいガイダンスという印象をもたざるをえない。

CPMP の同等性/同質性ガイドラインの補遺ドラフトでは、ヒトにおける免疫原性試験の必要性を強調している。そのこと自体は重要な視点ではあるものの、免疫原性が問題となっている事例をみても、事故の発生頻度は極めて低く、免疫原性に関する臨床試験をあらかじめ行ってみても、予測性は低いものとならざるをえない。その点、実際の同等性/同

質性評価において免疫原性試験の位置付けをどのようにとるかは今後の課題といえよう。

欧米とも、法律的には Generic Biologics (安全性および有効性については文献を参照することで申請者自身では前臨床試験および臨床試験を行うことなく申請された医薬品) はないこととなっている (欧州は法律改正作業中)。CPMP の同等性/同質性評価ガイドラインの補遺ドラフトでは先発品と同等なものとして後発メーカーが申請してきた製品の同等性/同質性評価にふれているが、同一メーカーにおける製造方法が変更された製品間の比較の原則の延長線上にあり、妥当なものと考えられる。

D.5.2 欧米における同等性/同質性評価の科学的アプローチのまとめ

米国 FDA と欧州 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、理化学的特性 (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)も行うという表現の違いはある)、(4) 必要に応じた前臨床試験、(5) 以上の試験で同等性/同質性が示されない場合はなんらかの非臨床試験および臨床試験を行う、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(5)を行わずして同質性/同等性の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。一方、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みえるが、CPMP のガイダンスノートは臨床試験による評価を重視しているながら、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たままである。また製造方法の変更の影響の重みづけを、製品規格と工程管理の規格値/適否の判定基準への影響に求めており、科学的な分類法とはいえない。また CPMP のガイダンスの補遺ドラフトでは、ヒトでの免疫原性試験の重視を打ち出しているが、一般原則として正しいことながら、どの程度の予測性が確保できるかは疑問である。CPMP のガイダンスの補遺ドラフトではさらに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/同質性評価にも触れているが、同一製造メーカー内の同質性/同等性評価の延長線上の評価ととらえられており、この扱いは妥当なものと考えられる。

D.6 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

糖タンパク質の糖鎖部分の構造解析の重要性は先に述べた通りであるが、糖鎖構造は複雑な上、多様性に富んでいることから、その解析方法は複雑である。いかに簡便・迅速に、わずかの試料で多くの情報を得るかが国際的な課題とされている。そこで近

年、進展が目覚ましい質量分析法を取り入れた新しい分析法が、国内外で数多く開発されるようになってきた。現在、糖鎖分析に用いられるイオン化法の主流は MALDI 法と ESI 法の 2 つである。それぞれに一長一短があるが、我々は、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の解析には ESI 法が適していると考えている。その第一の理由は、糖鎖の検出感度の違いにある。MALDI 法における糖鎖の感度はペプチドに比較して著しく低い。多くの場合、糖鎖を揮発性物質に誘導体化することで解決が試みられているが、誘導体化における煩雑さ、糖鎖の修飾、定量的には回収できないなどの点を考慮すると、この過程を省略しても糖鎖を検出できる ESI 法の方が糖鎖含有タンパク質性医薬品の解析に適していると考えられる。第二の理由として、ESI 法は LC とオンラインで結ぶことができるという点があげられる。糖鎖には糖配列、分岐構造、及び結合様式の差異に基づく多くの異性体が存在するが、質量分析法単独ではこれらを識別することはできない。構造の違いに基づいて LC 部分で糖鎖を分離し、MS/MS 分析することによって、詳細構造に関する情報を得ることができると思われる。また、LC における各糖鎖の溶出時間からもその構造を推定することができる。以上の観点から我々は LC/ESI-MS を用いた独自の糖鎖プロファイリング法及び糖ペプチドマッピング法を開発し、様々な糖タンパク質の構造解析に応用してきた。

昨年度は、独自の糖鎖プロファイリング法と糖ペプチドマッピング法を、糖鎖含有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/同質性評価に役立てることができるかどうかを検討し、起源の異なる 3 種類の EPO をモデルとして用いて糖鎖プロファイリング、及び糖ペプチドマッピングを行い、糖鎖構造や部位特異的糖鎖の不均一性を識別できることを確認し、特性・品質解析、品質評価はもちろんのこと、同等性/同質性評価法としても有用であることを明らかにした。

本年度は、本分析法の有用性の拡大を目指し、まず、モデル糖タンパク質として、生物活性における糖鎖の重要性が知られ、現在、国内外で甲状腺癌の診断薬として高く期待されている TSH を選択した。検討の結果、糖鎖プロファイリング及び糖ペプチドマッピングは EPO とは異なる糖鎖を多く結合している TSH においても有用であることが確認された。さらに、医薬品の研究開発段階において、特性解析に使用できる糖タンパク質の量は限られていることから、分析の微量化と、より多くの情報を得ることの重要性を考え、CapLC/ESI-Q/TOFMS の導入を検討した。その結果、CapLC はセミマイクロ LC/MS の 20 分の 1 のサンプル量で十分な糖鎖プロファイルを与えることが確認された。また、TOFMS 分析による高分解能スペクトル測定は、四重極 MS では困難であった [Fuc]₂ と [NeuAc] の識別は勿論のこと、[Man]₃ と SO₃[HexNAc]₂ も識別できることが確認された。さらに、これまでは MS と MS/MS をそれぞれ別途分析する必要があったが、Q/TOFMS を用いることによって、一度の分析で両方のデータを得

ることが可能となり、サンプルと分析時間を節約できることが確認された。今後、CapLC/ESI-Q/TOFMSを糖ペプチドマッピングにも応用していくことによって、糖鎖プロファイリングと糖ペプチドマッピングの組み合わせは、特性・品質解析、品質評価、及び同等性/同質性評価において益々威力を発揮するものと期待される。

D.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

医薬品審査の国際調和を目指した研究の一環として、現在肝疾患、腎不全、血管機能障害に対する治療薬としての応用が期待されている肝細胞増殖因子(HGF)の生物学的及び免疫化学的国際標準品の設定、及び各種疾患の治療薬として用いる場合、各治療効果に関連した品質を保証するうえにおいて適切な細胞を用いた生物学的活性測定法について検討した。

国際標準品に関してはWHOにより提供された不活性型の1本鎖及び活性型の2本鎖組換えHGF標準品候補合計3種類について共同検定に参画した施設により各種細胞を用いた生物学的アッセイ及びELISAを用いた免疫化学的アッセイにより測定が行われ、最終的に1本鎖及び2本鎖組換えHGFの生物学的及び免疫学的標準品が設定されたが、その設定にあたって数々の問題点が明らかになった。各自家標準品を基にして得られた生物学的アッセイの値は、特に1本鎖において実際の充填量に比べて低く算出され、すべての標準品候補において測定におけるばらつきが高かった。アッセイ系における1本鎖と2本鎖の活性の違い、特に対照として用いた各施設における自家標準品の比活性の違いによると思われる充填量と測定結果のずれ及び測定結果のばらつきが大きさが問題となった。一方、免疫学的アッセイにおいても、その値は特に1本鎖において実際の充填量に比べて低く算出されたが、すべての標準品候補における測定のはらつきは生物学的アッセイに比べると低かった。各標準品候補の免疫化学的アッセイの値を2本鎖標準品候補に関しては2本鎖自家標準品で、また1本鎖標準品候補に関しては1本鎖自家標準品で計算し直すと充填量とよく一致し、測定のはらつきは小さかった。免疫学的標準品に関しては恐らく産生細胞における糖鎖の違いによると思われる抗体の反応性の違いが問題となった。このように、いろいろな面で複雑なタンパク性生理活性物質の標準化にあたってはどのような対照品を基準とするかが重要であることが明らかになった。

また、HGFの各種疾患の治療効果に関連した細胞レベルの生物学的活性については、多数の生物学的活性が明らかになった。組換えHGFを肝疾患の治療薬として用いる場合、その生物学的試験法として初代培養肝細胞に対するDNA合成促進作用等が有用であることが示された。同様に腎不全の治療薬として用いる場合、その生物学的試験法として腎臓近位細管細胞に対する増殖促進作用、ウシ尿管上皮細胞

の管腔形成促進作用などが有用であることが示された。また、血管機能障害の治療薬として用いる場合、各種血管内皮細胞に対するDNA合成促進作用、アポトーシス及びネクローシス抑制作用などが有用であることが示された。今後、各生物活性について再現性、濃度依存性、反応性、操作性などの種々の観点からその規格試験法への応用について検討する必要がある。

以上HGFを例にとり示した多機能性バイオテクノロジー応用医薬品に関する具体的な標準品の設定及びバイオアッセイに関する知見は共通性が高いことから、今後他の多機能性バイオテクノロジー応用医薬品候補について標準品及び適切なバイオアッセイを設定する上で有用と考えられる。

D.8 安定性試験における品質確保基準に関する研究

ロット間あるいは要因間の差を検定し、データを一括できるかどうか判断する方法としては、回帰曲線の傾きおよび切片について共分散分析を行う方法が最も一般的であると考えられる。しかし、この方法の検出力は定量誤差の大きさによって大きく影響され、定量誤差が大きくなるほど検出力は著しく低下する。その結果、大きい定量誤差を含むデータほど、ロット間あるいは要因間の安定性の差を見逃す傾向が大きくなり、安定性の差を検定するには問題があることも分かっている。

有効期間の推定値の同等性を推定値のレンジに基づいて検定する方法は、共分散分析法に比較して、検出力が定量誤差の大きさによって受ける影響が著しく小さい利点を持つ。しかし、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ため、レンジに基づく方法の検出力は試験に用いるロットや要因の数に大きく影響されるという欠点を持つ。推定値の変動を考慮して平均有効期間の同等性を検定する方法を確立することが必要であると考えられる。

一括評価に関する検定を行わずに、各要因の有効期間を提示する値と比較し、その結果に基づいて有効期間の設定する方法は、詳細な統計解析を必要としない簡便な方法であるが、ロット間あるいは要因間に差があるのかどうかを最終的に判断することはできないため、見かけ上、適切と思われる有効期間の保証にとどまり、安定性の実態の解析は不可能である。

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

D.9.1 PATの意義について

PATは、最近の科学技術の発展により種々の特性をリアルタイムあるいはそれに近い形で測定できる分析手段が開発されてきたことを背景に、医薬品の製造プロセスを効率的なものに改善したいという二

ーズに後押しされて、欧米で提唱され始めた分析技術をベースとした品質保証の方法論ともいうべきものであり、“医薬品製造における工程分析の科学的手法、工程管理と制御のフィードバックの方法、情報管理ツール、製品の品質や工程の最適化の方法”などの技術を、製造プロセスを持続的に検証し、品質保証の基盤を提供するのに最善の形で応用しようとする戦略的な狙いをもつものである。

PATの活用により、製造プロセスの進行に伴う特性の変化を測定して解析することによって、製造プロセスに対する理解を深め、品質担保のキーとなる要因を把握して、製造工程にフィードバックして、その要因を適切なレベルにコントロールできるように改善することができれば、医薬品の品質保証のレベルを高めることができる。さらに、キーとなる要因をリアルタイムでモニターできれば、そのデータを品質担保の指標にすることができる。

このように、医薬品の製造プロセスにおいて品質担保のキーとなる要因をコントロールすることで品質の確かな医薬品〔“造り込まれた”品質をもつ医薬品〕が製造されるようになって、品質規格には必ず適合するようになると、品質保証のスタイルが変わってくることになる。すなわち、PATは、品質保証のスタイルを、現在の品質試験への適否を中心に据えた「品質試験を行って文書化して残す」スタイルから、「“造り込まれた”（あるいは“設計された”）品質を保証する」スタイルに移行する機会を与えるものである。

PAT活用を巡る最近の動きは、製薬企業各社に、規制でしぼられているからという消極的な動機からではなく、自ら“Good Practice（良き実践規範）”を積極的に実践して、恒常的に品質の維持向上に取り組む方向に進むことを求めているように思われる。

D.9.2 欧米製薬企業のPAT活用戦略

同じPATの活用を標榜していても、企業によって目指す方向にかなりの違いが見られる。

その1つは、前項で述べたように、種々の分析手段を活用して製造プロセスを解析することによって、製造プロセスに対する理解を深め、品質担保のキーとなる要因を把握して、製造工程にフィードバックして、その要因を適切なレベルにコントロールできるように改善することができれば、医薬品の品質保証のレベルを高めることができるという方向である。この立場に立つ人は、製造プロセスの解析が進み、品質保証のレベルアップが達成できた結果として「品質試験の省力化」ができることはあるかも知れないが、それをPAT活用の目的とはしないとしている。

もう1つは、製造過程で何が起きているかを必ずしも明らかにしなくても、NIRなどリアルタイムでモニターできる機器を活用して、その機器から得られる情報と品質規格の項目との間に相関関係が認められ、機器からの情報がある範囲に達すれば、品質規格の限度値をクリアできることが示されれば、機器からの情報を指標として出荷を行っても良いの

ではないかとするいわばパラメトリックリリースの拡張版とでもいうべき考え方を推し進めようとする方向である。その機器からの情報が一体何を意味するのかという点については必ずしも明らかでなくてもよい、また、得られた情報を製造工程にフィードバックして工程の改善を目指すことは必ずしも要しないという点で、明らかに前者とは異なる立場であり、出荷段階での「品質試験の省力化」を優先した考え方である。

規制側の立場に立ってこの2つの方向を眺めて見ると、どうみても前者の考え方が妥当と思われる。前者のように、PATによって医薬品製造工程で何が起きているかが明らかにされているのであれば、“キーとなる要因（パラメーター）をきちんと監視していれば、品質は担保できる”といった説明を受けたとき、そんなに抵抗感はない。しかしながら、後者のように、機器の情報が一体何を意味するのか明らかにされない（ブラックボックスのまま）では、いろいろな要因が変動したときに品質規格との相関関係が成り立たなくなるのではないかと不安は拭えず、かなりの抵抗感を覚えるのではないと思われる。

D.9.3 PAT活用の問題点

《 技術的側面から見たときの問題点 》

- 1) C.9.4項の例のように、従来からの分析機器を用いて製造プロセスの解析を行うことは可能であるが、“一定時間ごとに製造プロセスを止めて、解析を行う”必要があるため、測定と解析に時間がかかり、忙しい製造現場での活用には実用的とは言えない。従来、製造現場でプロセスの解析が十分行われてこなかった原因には、プロセスの解析に適した分析機器があまりなかったことがあるのではないか？
- 2) したがって、医薬品の製造装置に目的に適った測定が可能な分析手段を組み込んだ解析用の装置（例えば、C.9.3項で紹介した On-line NIR bin blender）を必要に応じて開発する必要があるが、こうした解析用の装置を開発できるのは、そのためにリソースを振り向ける余裕のある大手の企業に限られるのではないか？また、開発された装置が市販されるようになるかどうか、市販されるとしても非常に高価なものになってしまうのではないか（大手の企業以外では、なかなか活用の機会が得られないのではないか）？
- 3) 解析用の装置が入手できたとしても、自社製品の製造プロセスの解析に当たっては各社の製品の組成や製造方法に見合った解析方法やデータベースを独自に作成して適用する必要があるのではないか（どこまで標準化が可能であろうか）？

《 規制面から見たときの問題点 》

- 1) 品質保証のスタイルが、PATの活用によって、現在の品質規格への適否を中心に据えたスタイルから、“造り込まれた”品質を保証するスタイルに移行するのにどのように対応するのか？

D.9.4 我が国における方向性

我が国では、PAT の概念がまだ広く知られておらず、欧米における PAT 活用の動き（特に、FDA の cGMP 改定に関連した動き）に注目している人が、PAT について解説を始めた段階にある。しかしながら、欧米での活発な動きを見ていると、このような我が国の状況のままでは、規制側、企業側ともに国際的な場で日本としての見解を問われて答えに窮する場面が出てくるおそれがある。したがって、我が国においても、できるだけ早くこの PAT への理解を深めて、どう対応するかを考えておく必要がある。

上述のように、PAT 活用の主体は企業側であり、我が国の製薬企業も PAT を活用した製造プロセスの解析に基づいたアカウンタビリティのある品質保証が求められる時代の到来に備えておく必要がある。

我が国の GMP 関係者には、米国以上に規格試験に基づいて適否の判定を行って出荷することにこだわる人が多いと思われるが、ファルマシア 3 月号掲載の「医薬品規制の国際基準化と品質担保のあり方」(論文発表 22)で小嶋が述べているように、“国際化の波の中で生き抜くには、医薬品の開発や承認申請資料の作成にあたる企業側の者であろうと、承認審査や査察にあたる規制側の者であろうと、科学的な論拠に基づいて柔軟な判断を行い得るだけの力をつける必要がある。”

“規制側の者の言ったことを金科玉条にして、その枠を守っていれば良いとする考え方は、こうした国際化の時代においてはもう通用しないと考えるべきである。誰かからやれと言われるからというのではなく、自分でよく考えて、審査する者を納得させるような説明を論拠となるデータを使ってきちんと展開するようにして欲しいものである。ミニマムで良い、他と同じで良いとするのではなく、それを超えて一歩踏み出す気構えが必要と思われる。企業側がこのようなアカウンタビリティのある説明を行ってこそ、医薬品の品質保証は、開発段階での十分な特性解析、それをベースとした適切な規格の設定とそれに基づく品質試験、ならびに GMP に基づく安定した製造工程での製品の生産という 3 本の柱がうまくリンクしつつ行われることが重要であり、そうした状況の下では品質保証を柔軟な形で行うことが可能となる。”という ICH-Q6A ガイドラインの基本精神が規制側にも実際に納得できるものとなるのではないと思われる。”

下線部分は、PAT の目指す方向と一致しているように思われる。

D.9.5 PAT に関するディスカッションを

“アカウンタビリティのある形で常に対処するように心がけ、それに基づいたやりとりを規制側と企業側の間で積み重ねていくことが、こうした国際化の時代において我が国の品質保証のあり方をレベルアップしていく道ではないかと思われる。

そうした状態にしていくためには、もちろん関係者一人一人の努力が大切なことは言うまでもないが、

それをバックアップするためにも規制側の者と企業側の者がフランクにディスカッションできるような場をできるだけ多く設けて、種々の問題について議論を積み重ねていくことも必要であろう。最近日本薬学会に設けられたレギュラトリーサイエンス部会が中心となって種々の課題に関するシンポジウムを開催して、そうした議論の場を提供してくれることを期待したい。”

PAT に関しても多くの方が関心をもち、データに基づいてディスカッションが行えるようになることを期待したい。

D.10 新しい品質規格を用いた製品の評価法

CTD ガイドライン（品質）は提出すべき資料の配列を定めたものであり、従来から必要とされていた資料と本質的な変更はない。しかし、従来では、申請者が自社で保管していた例えば治験薬の品質に係わるデータを、CTD 様式の申請では承認申請の段階で規制当局に提示することとなる。このことは、CTD 様式の申請では、適切な品質の医薬品が実生産に移行したときに恒常的に製造できるかということを示す必要があるということの意味する。従って、規制当局は、従来は申請された医薬品が保健衛生上適切な品質か否かを中心に審査していたが、今後はそのことに加えて、当該医薬品が恒常的に生産可能か否かの審査も実施する必要が生じる。

平成 14 年 7 月に公布された改正薬事法で大幅な薬事制度の見直しが行われ、製造承認と販売許可に分かれていた承認・許可制度が、製造販売業者による承認取得（元売承認取得）へと一元化された。最終的に上市する企業が、販売される医薬品の全責任を負うべきであるとする企業の安全対策責任の明確化と国際的整合化を図ることが改正の目的である。欧米の販売承認制度との整合を図り、併せて全製造工程の委受託を可能にすることにより、現在の企業形態の多様化に速やかに対応できる様にするねらいがある。

この改正薬事法では、承認後に実施されていた製造工程の評価も元売り承認の対象となる。従って、CTD ガイドライン（品質）で新たに求められる製造に関する事項は、改正薬事法の元での承認審査では必須の事項となろう。また、パイロットレベルで製造された製品の品質に係わるデータで承認申請がなされた場合には、最終的な実生産レベルの品質との同等・同質性に係わる説明をより一層求められることになろう。

D.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－

薬局方国際調和とその成果の各薬局方への反映により、薬局方国際調和の成果を各域の薬事規制調和に活用する環境が整いつつあり、薬局方国際調和の「公定規格に反映される新しい品質評価基準」への寄与が期待される。しかし現状は未だ路半ばの状態であり、現状維持ではこれまでの積み重ねが無駄に帰することにもなりかねない。また、今後の対応に

適切を欠くと日本薬局方の薬局方国際調和への姿勢を問われかねない。

「日本薬局方作成基本方針」の5本柱の一つである「薬局方国際調和の推進」に向けて日本薬局方関係者が認識すべき事項を整理し、考察する。

D.11.1 PDG 動向への対応について

PDG が初期の混沌状態を脱し、定常的に調和成果を挙げ得る状態に成長したことは明らかである。また、薬局方国際調和方針及び調和手順をこれまでの経験を生かして見直し、透明性を保ちつつより迅速に調和を達成することができるように改定したことにより、従来不足がちであった各地域間の調和従事者及び薬局方利用者の共通理解形成も進んでいる。

今後の展開として予測される方向としては、当初設定した調和課題の合意が進んでいることを受け、新たな調和課題が検討され始めているが、調和対象を標準品等のこれまで手をつけかねていた困難な調和課題への取り組みが求められることも考えられ、また、PDG がその機能を十分に発揮するためには各薬局方の協力体制を維持強化が必要であるため現状では一部に偏在しがちな負担の均等化が求められることが考えられる。

日本薬局方が今後の PDG の展開に適切な対処を欠くと、PDG の構成員としての資質を問われることにもなりかねないので、これらの動向にも的確に対応できるように日本薬局方の薬局方国際調和への対応体制の整備充実をはかることが必要である。

D.11.2 調和項目への対応について

これまで、日本薬局方の薬局方国際調和への対応には、日本薬局方事務局の関与が乏しく、日本薬局方委員会関係者の個人的奉仕への依存度がきわめて高いことに加えて、日本薬局方委員会としての組織的な対応に欠ける傾向が強いことから、その改善が不可欠であることを繰り返し提言してきた。医薬品機構による日本薬局方事務局支援強化及び PDG 関連調整会議の設置等の対応がとられて来たことは評価すべきものである。

医薬品機構による日本薬局方事務局支援強化により、これまで事務局が対処できていなかった調和課題毎の進捗状況の把握が可能になり、適切な対応をとる上に必要な情報は確保されたものの、日本薬局方事務局がその情報を活用し、日本薬局方委員会の運営に十分生かすまでには至っていないため、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状態が十分に解消されたとはいえない。

また、調和案の審議を担当する委員会間の薬局方国際調和に関する認識の相違により日本薬局方の薬局方国際調和への取り組みに一貫性を欠くことなどへの対応として、委員会間の共通理解形成を目的とした PDG 関連調整会議が設置された。これにより薬局方国際調和に関する委員会横断的事項について連絡調整する場が確保され、委員会間の調整のみならず、調和方針等への日本薬局方見解のとりまとめ

などにも一定の効果を上げている。PDG 関連調整会議の活用により、日本薬局方の PDG 対応が改善されるとの期待もあったが、これまでのところ著しい成果をあげるには至っていない。

日本薬局方の薬局方国際調和への対応体制は整いつつあるが、これを十分に活用し、組織的な対応ができない状態にあることの一因は、日本薬局方事務局による日本薬局方委員会運営にあると考えられる。事務局が当事者意識をもって主体的に取り組むことが、薬局方国際調和への日本薬局方の対応に飛躍的な改善をもたらす上に、必要不可欠である。

D.11.3 PDG 合意事項の日本薬局方への取り込みについて

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合意事項への取り込みは、それぞれの薬局方の責任とされている。PDG による調和合意は、薬局方調和の実効発揮への中段階に過ぎず、日本薬局方への合意事項への取り込みなしには、日本薬局方の国際調和はあり得ない。ところが、日本薬局方への取り込みが早くても合意の4年半後になるものもあり、日本薬局方への調和合意事項の取り込みには遅れが著しく、内外の非難を浴びかねない。欧米とは異なり翻訳が必要であるなどの事情もあるが、合意前の調和案の段階における日本薬局方改正を念頭に置いた審議が不十分であったことや、合意後の日本薬局方改正審議への移行に円滑を欠いたことなどの反省点も少なくない。PDG 合意事項の日本薬局方への可及的速やかな取り込みに求められるものは、日本薬局方事務局の主体性のある委員会運営と、担当委員会の当事者意識にほかならない。

また、合意事項の薬局方改正への取り込み時点で、合意内容の不備に気付いた場合には、速やかに合意案の修正整備を PDG に提案することを考慮すべきであり、不備をそのまま放置するようなことは避けるべきである。

D.11.4 日本薬局方の国際化に向けて

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に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日本薬局方委員会の現状対応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どころか、薬局方国際調和の障害との誹りを受けることにならないとも限らないとの危惧さえ感じられる。

「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む、事務局機能の強化を図るとともに、日本薬局方委員会が、薬局方国際調和は日本薬局方改正と一体のものであるとの認識の下に、効率的に審議を進めることが必要不可欠である。これには、事務局

や日本薬局方委員会を構成する個人の資質向上もさることながら、事務局・委員会の効率的な運営を可能とする体制の確立が強く求められる。

薬事法改正を受けた新組織の設立の動きがあり、日本薬局方事務局もその対象に含まれるとされているので、国際的に評価される日本薬局方に脱皮しうる日本薬局方体制の整備が期待される。

本研究の成果が、現実を踏まえた、本質的な日本薬局方体制の改善、整備に生かされることを期待したい。

E. 結論

E.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確保に関する試験法の国際的動向を検討した。細胞の遺伝的な同一性、純度に関する試験としては G-バンド分染法や Q-バンド法、R-バンド法、M-FISH 法などが有用であるが、精度、感度、操作性、時間等全ての面で最適な試験法はなく、製造に要する時間等、製品ごとの制約に応じて試験法を選択すべきであり、また複数の試験法を組み合わせることでさらに高感度・高精度の試験が可能であることが明らかになった。細胞の同一性の確認に関しては、STR に着目した試験法が非常に有用である。がん化細胞の検出法に関しては、現時点で十分な感度を持つものはなく、試験法を組み合わせたり、染色体検査等との組み合わせも考慮して試験を行う必要があることが明らかになった。HLA 解析については、血清学的試験よりも PCR 法などを利用した様々な有用な DNA 解析法が開発されつつあり、各試験法を熟知した上で細胞治療薬に適用することが必要と考えられた。

E.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—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—

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 (RCA) の検出法について検討を行った。アデノウイルスベクター試料をウイルス感受性細胞に感染増幅後、E1 遺伝子配列に対するプライマー、プローブを用いたリアルタイム定量 PCR で RCA の検出を行う Infectivity PCR 法と、ガラスビーズを用いた細胞からの DNA 抽出法を組み合わせることにより、従来の指標細胞を用いた RCA 検出法と比較して、より短時間でより高感度に混入 RCA の定量的測定が可能であることを明らかにした。

E.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。HIV ベクターの応用として血管新生抑制因子アンギオスタチンを発現する HIV

ベクターを作製し、眼内新生血管病モデルマウスへの遺伝子治療において HIV ベクターの有用性を示した。

E.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 ベクターによる遺伝子導入法に関して、血清型と組織特異性の関係を検討した。筋肉には 1 型 AAV ベクター、肝臓には 5 型 AAV ベクターが適していることを確認した。安全性については、AAV ベクターのキャプシドに対する抗体の出現を認めたが、特に問題となる副作用は観察されなかった。AAV ベクターは、遺伝子治療用ベクターとして有用と思われる。

E.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—

米国 FDA は同等性/同質性評価プロトコールの運用およびそのさらなる整備を継続しており、最近、タンパク質医薬品は適用外であるが、Generics Drugs をも適用対象とする同等性/同質性評価プロトコール作成のガイダンスドラフトを公表した。内容的にはタンパク質医薬品を対象とした 1996 年の同等性/同質性評価ガイドラインと矛盾する部分はない。一方欧州では、2002 年 3 月に施行されたバイオテクノロジー医薬品の同等性/同質性評価に関する CPMP ガイダンスの補遺ドラフトが公表され、(1)同等性/同質性評価における非臨床試験および臨床試験の必要性、(2)同等性/同質性評価における免疫原性試験の重要性、(3)先発品と同等なものとして後発メーカーから申請された後発品の同等性/同質性評価、の 3 点が扱われている。非臨床試験及び臨床試験については、内容は妥当であるがどのような場合に非臨床試験及び臨床試験まで必要かの場合分けが明瞭ではない。またヒトにおける免疫原性試験の必要性を示しているが、実際の評価において免疫原性の予測に有用であるかは疑問である。一方、後発品の同等性評価の扱いは、同一メーカー内での製造方法の変更時の同等性評価の延長線上にある妥当なものであり、わが国にも導入できる方策といえる。

E.6 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

生物薬品の特性・品質解析、品質評価法、及び同等性/同質性評価において、液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化・質量分析法 (LC/ESI-MS) を用いた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を、モデル糖タンパク質として遺伝子組換え型及びヒト脳下垂体由来ヒト甲状腺刺激ホルモン (rTSH, pTSH) を用いて検討した。その結果、糖鎖プロファイリング及び糖ペプチドマッピングを組み合わせることによって、rTSH 及び pTSH の一次構造と糖鎖構造の違いを明らかにできること、また、糖鎖構造の詳細や部位特異的糖鎖の不均一性を解析できることを確認した。

さらに、糖鎖プロファイリングにおいて、キャピラリーLC/ESI-四重極型/飛行時間型質量分析計(CapLC/ESI-Q/TOFMS)の導入は、分析の微量化、高分解能スペクトル測定、及びMS/MS自動測定による糖配列解析を可能とすることから、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/同質性評価法としての有用性の向上に役立つことが確認された。

E.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

医薬品審査の国際調和を目指した研究の一環として、現在肝疾患、腎不全、血管機能障害に対する治療薬としての応用が期待されている肝細胞増殖因子(HGF)の生物学的及び免疫化学的国際標準品の設定と、各種疾患の治療薬として用いる場合、各治療効果に関連した品質を保証するうえにおいて適切な細胞を用いた生物学的活性測定法について検討した。

国際標準品として最終的に1本鎖及び2本鎖組換えHGFの生物学的及び免疫学的標準品が設定されたが、生物学的標準品の設定にあたっては1本鎖と2本鎖の活性の違い、対照として用いた各施設の自家標準品の比活性の違いによる思われる充填量と測定結果のずれ、測定結果のばらつきが大きさが問題となった。免疫学的標準品に関しては恐らく産生細胞における糖鎖の違いによる抗体の反応性の違いが問題となった。このように、いろいろな面で複雑なタンパク質性生理活性物質の標準化にあたってはどのような対照品を基準とするかが重要であることが明らかになった。

HGFの各種疾患の治療効果に関連した細胞レベルの生物学的活性については多数の生物学的活性が明らかになった。今後、各生物活性について再現性、濃度依存性、反応性、操作性などの種々の観点からその規格試験法への応用について検討する必要がある。

以上HGFを例にとり示した多機能性バイオテクノロジー応用医薬品に関する具体的な標準品の設定及びバイオアッセイに関する知見は共通性が高いことから、今後他の多機能性バイオテクノロジー応用医薬品候補について標準品及び適切なバイオアッセイを設定する上で有用と考えられる。

E.8 安定性試験における品質確保基準に関する研究

安定性試験データ評価法の国際調和を目指した研究として、複数のロットあるいは複数の含量違いなどから得られたデータがある場合の安定性試験データ解析法を検討した。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、あるいはリテストないし有効期間の推定値のレンジに基づいて有効期間の同等性を評価する方法によって、異なるロットあるいは要因からのデータを一括して解析してよいかどうかを判断するか、あるいは、一括評価に関する検定を行わずに、各

要因の有効期間を提示する値と比較し、その結果に基づいて有効期間を設定するか、の3通りの方法について比較検討した結果、それぞれの特徴を明らかにした。

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

米国FDAによるProcess Analytical Technology (PAT)を活用した医薬品の品質管理戦略の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、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考察した。PATの活用により、製造プロセスの進行に伴う特性の変化を測定して解析することで、製造プロセスに対する理解を深め、品質担保のキーとなる要因を把握して、その要因を適切なレベルにコントロールできるように製造工程を改善することができれば、医薬品の品質保証のレベルを高めることができる。さらに、キーとなる要因をリアルタイムでモニターできれば、そのデータを品質担保の指標にすることができる。医薬品の製造プロセスにおいて品質担保のキーとなる要因をコントロールすることで品質の確かな医薬品が製造されるようになると、品質保証のスタイルが変わってくる。すなわち、PATは、品質保証のスタイルを、現在の品質試験への適否を中心に据えたスタイルから、“造り込まれた”品質を保証するスタイルに移行する機会を与えるものである。我が国においても、できるだけ早くこのPATへの理解を深めて、どう対応するかを考えておく必要がある。PAT活用の主体は企業側であり、我が国の製薬企業もPATを活用した製造プロセスの解析に基づいたアカウンタビリティのある品質保証が求められる時代の到来に備えておく必要がある。

E.10 新しい品質規格を用いた製品の評価法

ICHにおいて合意された承認申請資料の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、平成15年7月から義務化されるCTD様式による添付資料に基づく品質評価について考察を加えた。本ガイドラインでは、記載内容の深さ・程度は各極の方針に依存するとされたことから、我が国の現状の承認・許可制度との整合を図り、本邦ではパイロットスケールで生産された製品の品質に係わるデータで申請することが可能であるとされた。CTD様式に基づく承認申請では、製造に関する多数の事項を規制当局に説明することが必要となり、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。

E.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。医薬品等の品質規格に係る国際的動向の把握のために、近年成果をあげている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調査した。

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ので、我が国の今後の調和対応に考慮を要する事項を整理し、考察した。

参考文献等

- (1) Wang, HC.: Banding in human chromosomes treated with typsin. *Nature New Biol*, 235, 1972
- (2) Caspersson, T., et al.: The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes distinguishing characters and variability. *Hereditas*, 67: 89-102, 1971
- (3) Sahar, E., Latt, S.A.: Enhancement of banding patterns in human metaphase chromosomes by energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5650-5654, 1978
- (4) Speicher MR, Ballard SG, Ward DC.: Karyotyping human chromosomes by combinational multi-fluor FISH. *Nature Genet*, 12, 368-375, 1996
- (5) Eils R, Uhrig S, Saracoglu K, Satzler K, Bolzer A, Peterson I, Chasery JM, Gancer M, Speicher MR.: An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosome rearrangements by Multiplex-FISH(M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* 82: 160-171, 1998
- (6) Schrock E et al.: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273, 494-497, 1996
- (7) Seabright M.: A rapid technique for human chromosomes. *Lancet* 2, 971-972, 1971
- (8) Schröck, E. et al.: Multicolor spectral karyotyping of human chromosome. *Science* 273, 494-497 (1996)
- (9) Tanabe, H., Takada, Y., Minegishi, D., Kurematsu, M., Masui, T., and Mizusawa, H.: Cell line individualization by STR multiplex system in the cell bank found cross contamination between. *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 18: 329-338, 1999.
- (10) Transformation assay of established cell lines: mechanisms and application. Proceedings of a workshop organized by IARC in collaboration with the US National Cancer Institute and the US Environmental Protection Agency. Lyon, 15-17 February 1984.
- (11) *IARC Sci Publ.* 1985, 67: 1-225.
- (12) Klein JC. How selective are agar cultures for malignant transformation? *Arch Geschwulstforsch.* 1981, 51: 58-62.
- (13) Kuroki, T.: *Method in Cell Biology*, vol. IX., Academic Press Inc., 157-178 (1975)
- (14) Smith GJ, Bell WN, Grisham JW. Clonal analysis of the expression of multiple transformation phenotypes and tumorigenicity by morphologically transformed 10T1/2 cells. *Cancer Res.* 1993, 53: 500-8.
- (15) Barnes DJ, Melo JV.: Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol.* 2002, 108: 180-202.
- (16) Pearson PL, Van der Luit RB.: The genetic analysis of cancer. *J Intern Med.* 1998, 243: 413-7.
- (17) Ishioka C, Frebourg T, Yan YX, Vidal M, Friend SH, Schmidt S, Iggo R.: Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat Genet.* 1993, 5: 124-129.
- (18) Hammel P, Leroy-Viard K, Chaumette MT, Villaudy J, Falzone MC, Rouillard D, Hamelin R, Boissier B, Remvikos Y.: Correlations between p53-protein accumulation, serum antibodies and gene mutation in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 1999, 81: 712-8.
- (19) O'Brien SJ, Shannon JE, Gail MH. : A molecular approach to the identification and individualization of human and animal cells in culture: isozyme and allozyme genetic signatures. *In Vitro.* 1980 16, 119-135.
- (20) Nelson-Rees WA, Daniels DW, Flandermeyer RR.: Cross-contamination of cells in culture. *Science.* 1981 212, 446-452. .
- (21) Clouse K, Adams P, Sheridan J, Orosz C. : Rapid method for purification of human T lymphocytes for further functional studies. *J Immunol Methods.* 1987 Dec 24:105 (2):253-62.
- (22) Vartdal F, Gaudernack G, Funderud S, Bratlie A, Lea T, Ugelstad J, Thorsby E. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation--a fast and reliable technique. *Tissue Antigens.* 1986 Nov;28(5):301-12.
- (23) Eisen SA, Wedner HJ, Parker CW. : Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunol Commun.* 1972;1(6):571-7. .
- (24) Lowry RP, Person AE, Goguen JE, Carpenter CB, Garovoy MR. : Technical modifications for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity versus separated T and B lymphocytes: T and B-cell separation by nylon wool columns. *Transplant Proc.* 1978 Dec;10(4):833-7.
- (25) Dyer PA, Martin S. : Techniques used to define human MHC antigens: serology. *Immunol Lett.* 1991 Jul;29(1-2):15-21. .
- (26) Nomura N, Inoko H, Kato S, Arimori S, Ota

- M, Tsuji K. : PCR-RFLP: a new HLA-DNA typing method tested in bone marrow transplantation. *Transplant Proc.* 1991 23:431-433. .
- (27) Olerup O, Zetterquist H. : DR "low-resolution" PCR-SSP typing--a correction and an up-date. *Tissue Antigens.* 1993 41:55-56. .
- (28) Olerup O, Zetterquist H. : HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens.* 1992 39:225-235.
- (29) Wordsworth P.: PCR-SSO typing in HLA-disease association studies. *Eur J Immunogenet.* 1991 18:139-46.
- (30) Clay TM, Howard MR, Bidwell JL, Bidwell EA, Raymond PA, Evans JE, Bradley BA. : PCR-SSO typing for DR4-Dw subtypes: application to unrelated bone marrow transplant donor selection. *Eur J Immunogenet.* 1991 18:97-104.
- (31) Howell WM, Sage DA, Haegert DG, Evans PR, Smith JL.: PCR-SSO typing for HLA-DPB alleles. *Eur J Immunogenet.* 1991 18:81-95. .
- (32) Vaughan RW. : PCR-SSO typing for HLA-DRB alleles. *Eur J Immunogenet.* 1991 18:69-80.
- (33) Doherty DG, Donaldson PT.: HLA-DRB and DQB typing by a combination of serology, restriction fragment length polymorphism analysis and oligonucleotide probing. *Eur J Immunogenet.* 1991 18:111-24.
- (34) Hoshino S, Kimura A, Fukuda Y, Dohi K, Sasazuki T.: Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: a simple, economical, and rapid method for histocompatibility testing. *Hum Immunol.* 1992 33:98-107.
- (35) Ramon DS, Arguello JR, Cox ST, McWhinnie A, Little AM, Marsh SG, Madrigal JA. : Application of RSCA for the typing of HLA-DPB1. *Hum Immunol.* 1998 59(11):734-47.
- (36) Arguello JR, Little AM, Bohan E, Gallardo D, O'Shea J, Dodi IA, Goldman JM, Madrigal JA. : A high resolution HLA class I and class II matching method for bone marrow donor selection. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Sep;22(6):527-34.
- (37) Arguello JR, Little AM, Bohan E, Goldman JM, Marsh SG, Madrigal JA. : High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA). *Tissue Antigens.* 1998 Jul;52(1):57-66.
- (38) Wilke M, Pool J, den Haan JM, Goulmy E. Genomic identification of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus by allele-specific PCR. *Tissue Antigens.* 1998 52:312-7.
- (39) den Haan JM, Meadows LM, Wang W, Pool J, Blokland E, Bishop TL, Reinhardus C, Shabanowitz J, Offringa R, Hunt DF, Engelhard VH, Goulmy E. The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science.* 1998 279:1054-1057.
- (40) Tseng LH, Lin MT, Martin PJ, Pei J, Smith AG, Hansen JA.: Definition of the gene encoding the minor histocompatibility antigen HA-1 and typing for HA-1 from genomic DNA. *Tissue Antigens.* 1998 52:305-11.
- (41) <http://www.fda.gov/cder/OPS/PAT.htm>.
- (42) 水田泰一、西山昌慶、プロセス・アナリティカル・テクノロジーの解説、ファームテックジャパン、18, 1771-1780(2002).
- (43) <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/10.11>.
- (44) <http://www.fda.gov/oc/guidance/gmp.html>.
- (45) <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/slides/3841s1.html>.
- (46) http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/slides/3841s1_02_hammond.ppt.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. Virol. Method.* (in press)
- 2) Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA, Eriko Uchida and Takao HAYAKAWA: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells, *Biochem. Pharm.* (in press)
- 3) Kawasaki, N., Itoh, S., Ohta, M., and Hayakawa, T.: Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (in press)
- 4) 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, *J Cell Physiol.*, 195, 119-129 (2003)
- 5) Igarashi, T., Miyake, K., Kato, K., Watanabe, A., Ishizaki, M., Ohara, K., and Shimada, T.:

- Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neo-vascularization in a murine proliferative retinopathy model. *Gene Ther.* 10:219-226 (2003)
- 6) Niimi S, Oshizawa T, Yamaguchi T, Harashima M, Seki T, Ariga T, Kawanishi T, Hayakawa T, Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 770-774 (2003)
 - 7) Takao HAYAKAWA: Perspective on assessing comparability of biotechnology products- a view from Japan- Biologics 2000 Brown F, Lubiniecki A, Murano G (eds), *Dev Biol Stand.*, Basel, Karger, 109, 27-40 (2002)
 - 8) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Kogi M, Uchida E, Hayakawa T.: Role of the p70 S6 kinase cascade in neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells-a study of transferrin receptor-positive and -negative cells obtained from dimethyl sulfoxide- or retinoic acid-treated HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys.* 405, 21-31 (2002)
 - 9) Eriko UCHIDA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE and Takao HAYAKAWA: Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 891-897 (2002)
 - 10) 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*, 81, 155-163 (2002).
 - 11) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: CAR- or αv 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*, 9, 769-776 (2002).
 - 12) Igarashi, T., Miyake, K., Suzuki, N., Kato, K., Takahashi, H., Ohara, K., and Shimada, T. : New strategy for in vivo transgene expression in corneal epithelial progenitor cells. *Current Eye Res.* 24:46-50 (2002)
 - 13) Okada T, Nomoto T, Shimazaki K, Lijun W, Lu Y, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Hanazono Y, Kume A, Muramatsu S, Nakano I, Ozawa K. Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain. *Methods* 28, 237-247 (2002)
 - 14) Okada T, Shimazaki K, Nomoto T, Mizukami H, Monahan J, Ozawa K and Kawai N. AAV mediated gene transfer for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Method Enzymol* 346, 378-393 (2002)
 - 15) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Usefulness of sugar-mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, 30, 113-123 (2002)
 - 16) Ohta, M., Kawasaki, N., Itoh, S., and Hayakawa, T.: Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessment of glycoprotein products. *Biologicals*, 30, 235-244 (2002)
 - 17) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 968, 89-100 (2002)
 - 18) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., and Hayakawa, T.: Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to recombinant human thrombomodulin. *J. Chromatogr. A*, 978, 141-152 (2002)
 - 19) Niimi S, Hyuga M, Kazama H, Inagawa M, Seki T, Ariga T, Kobayashi T, Hayakawa T, Activins A, AB and B inhibit hepatocyte growth factor synthesis by MRC-5 human lung fibroblasts *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1405-1408 (2002)
 - 20) S.Yoshioka, Y.Aso, S.Kojima, N.F.Cappuccino: A Comparison of the ANCOVA and range-based approaches for assessing batch-to-batch variability of the stability of pharmaceutical products. *Chem. Pharm. Bull.*, 50:881-883 (2002).
 - 21) 早川堯夫 : バイオテクノロジー応用医薬品、臨床試験、内藤周幸編、(印刷中)、薬事日報社、東京
 - 22) 小嶋茂雄、医薬品規制の国際基準化と品質担保のあり方、*ファルマシア*、39, 199-203(2003).
 - 23) 内田恵理子 : 遺伝子治療薬開発を巡る規制。 *Cancer Frontier* 4, 137-143 (2002/2003)
 - 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、石井(渡部)明子 : 先端的バイオロジクス開発の現状と新たなバイオ創薬に向けての課題、*医薬品研究*、33, 693-729 (2002)
 - 26) 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*、33、275-284 (2002)
 - 27) 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一、医薬品研究 33、210-230 (2002)

- 28) 山口照英：ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保について。ファルマシア、38、523-525 (2002)
- 29) 水口裕之、早川堯夫：in vitro ライゲーションを利用したアデノウイルスベクターの作製・増殖法、実験医学、20、1799-1804 (2002)
- 30) 太田美矢子、川崎ナナ、伊藤さつき、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 (IV) エリスロポエチン製剤 その 4. 衛研報告、120、89-97 (2002)
- 31) 吉岡澄江：安定性試験へのブラケットティング法およびマトリキシング法の適用に関するガイドライン。医薬品研究、33:561-567 (2002)

2. 学会発表

- 1) Igarashi T., Miyake K., Kato K., Kato M., Kurai K., Ishizaki M., Takahashi H., Ohara K., Shimada T.: Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. European society of gene therapy. Antibes, France, 2002.10
- 2) Toru KAWANISHI: Japanese Perspective, in PDA/IABs Conference "Scientific Considerations for Comparability of Biopharmaceuticals" in Prague, 2003.2
- 3) 豊田淑江、山口照英、押澤正、早川堯夫：AC133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析第 1 回日本再生医療学会、京都、平成 14 年 4 月
- 4) 豊田淑江、山口照英、押澤正、早川堯夫：ヒト末梢血における AC133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析。第 23 回日本炎症・再生医学会。東京、平成 14 年 7 月
- 5) Igarashi T., Miyake K., Kato M., Kato K., Suzuki N., Ishizaki M., Takahashi H., Ohara K., Shimada T.: Inhibition of Neovascularization in a Murine Proliferative Retinopathy Model by Lentivirus Mediated Expression of Angiostatin. 日本遺伝子治療学会。東京、平成 14 年 7 月
- 6) 豊田淑江、押澤正、内田恵理子、早川堯夫、山口照英：G-CSF による HL-60 細胞中球分化亢進と増殖促進における PKC δ の役割。第 75 回日本生化学大会。京都、平成 14 年 10 月
- 7) 押澤正、山口照英、豊田淑江、内田恵理子、早川堯夫：HL-60 細胞の好中球様細胞への分化に関与するタンパク質の解析。第 75 回日本生化学大会。京都、平成 14 年 10 月
- 8) 内田恵理子、日方幹男、村田充弘、佐藤功栄、岩田明子、石井（渡部）明子、山口照英、早川堯夫：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の高感度検出法の開発。第 75 回日本生化学会、京都、平成 14 年 10 月
- 9) 川崎ナナ、伊藤さつき、袁 進、太田美矢子、石井明子、川西 徹、早川堯夫：nanospray LC/ESI-MS による糖タンパク質糖鎖の微量分析法の開発。第 75 回日本生化学会大会、京都、平成 14 年 10 月
- 10) 伊藤さつき、川崎ナナ、太田美矢子、川西 徹、早川堯夫：nanospray LC/ESI-MS/MS を用いた微量糖タンパク質の構造解析。第 75 回日本生化学会大会、京都、平成 14 年 10 月
- 11) 蜂須賀暁子、中島 治、川崎ナナ、伊藤さつき、手島玲子、早川堯夫、澤田純一：OBCAM (オピオイド結合性タンパク) の精製と糖鎖構造解析。第 75 回日本生化学会大会、京都、平成 14 年 10 月
- 12) 原島 瑞、新見伸吾、長岡陽子、関 泰一郎、有賀豊彦、早川堯夫：初代培養肝細胞においてプロテアソーム特異的阻害剤であるラクタシステンはグルコシルコリド依存的なチロシニアミノトランスフェラーゼの誘導を阻害する 第 75 回日本生化学会大会、京都、平成 14 年 10 月
- 13) 豊田淑江、押澤正、鈴木孝昌、早川堯夫、山口照英：臍帯血における AC133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析、第 2 回再生医療学会、神戸、平成 15 年 3 月
- 14) 川崎ナナ、伊藤さつき、太田美矢子、袁 進、川西 徹、早川堯夫：LC/MS/MS を用いた N 結合糖鎖のプロファイリング及び糖配列解析。日本薬学会第 123 年会、長崎、平成 15 年 3 月
- 15) 伊藤さつき、川崎ナナ、蜂須賀暁子、太田美矢子、袁 進、手島玲子、澤田純一、川西 徹、早川堯夫：Capillary LC/MS による電気泳動法で分離された糖タンパク質の N 結合型糖鎖解析。日本薬学会第 123 年会、長崎、平成 15 年 3 月
- 16) 嶋澤るみ子、荒戸照世、小笠原弘道、奥田晴宏、鹿野真弓、豊島聡、永井尚美、長岡寛明、永田龍二、中村高敏、星隆弘、本田二葉、前田大輔、山田博章：医薬品承認審査上の規格・安定性分野について—審査報告書の事例を踏まえ—、日本薬学会第 123 年会、長崎、平成 15 年 3 月
- 17) 荒戸照世、永田龍二、小笠原弘道、奥田晴宏、鹿野真弓、嶋澤るみ子、豊島聡、永井尚美、長岡寛明、中村高敏、星隆弘、本田二葉、前田大輔、山田博章：生物薬品承認審査上の規格・安定性分野について—審査報告書の事例を踏まえ—、日本薬学会第 123 年会、長崎、平成 15 年 3 月

G. 知的所有権の取得状況

なし

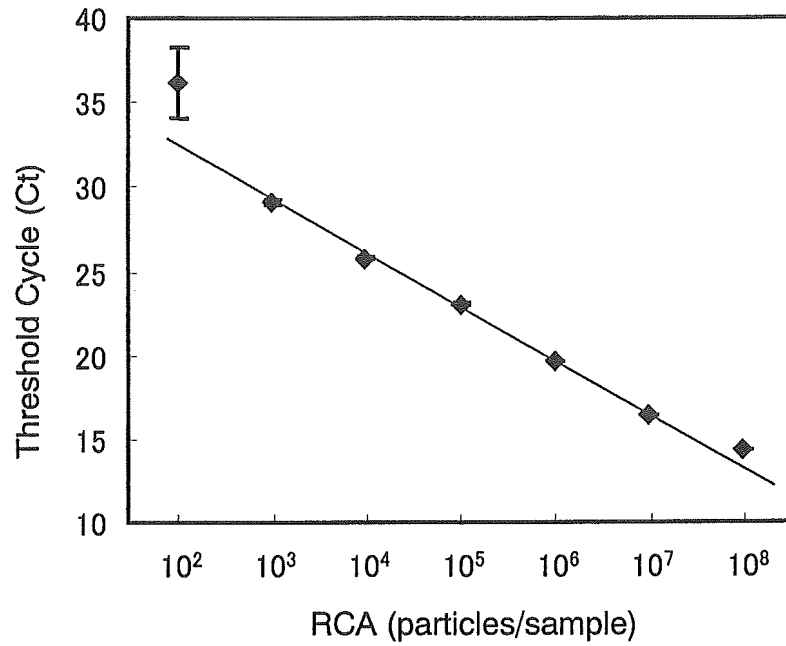


Fig. 1 Standard curve for the determination of RCA quantity generated from amplification plot of real-time quantitative PCR.

Viral genome DNA were extracted from serial log dilution of RCA, and amplification of each sample were performed by real-time quantitative PCR. Data were the mean \pm S.D. of triplicate amplification.

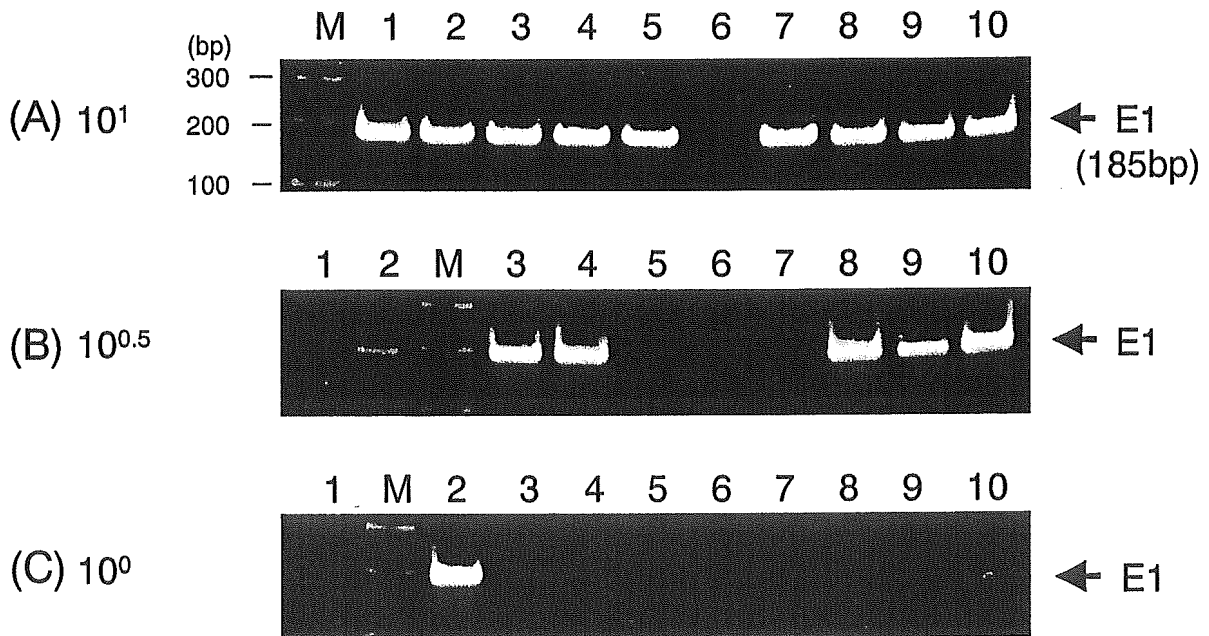


Fig. 2 Detection of low copy number of RCA by nested PCR.

Viral genome DNA were extracted from serial log dilution of RCA, and amplification of each sample were performed by nested PCR (n=10). Particle number in each sample was (A) 10^1 , (B) $10^{0.5}$, (C) 10^0 . M: molecular weight marker

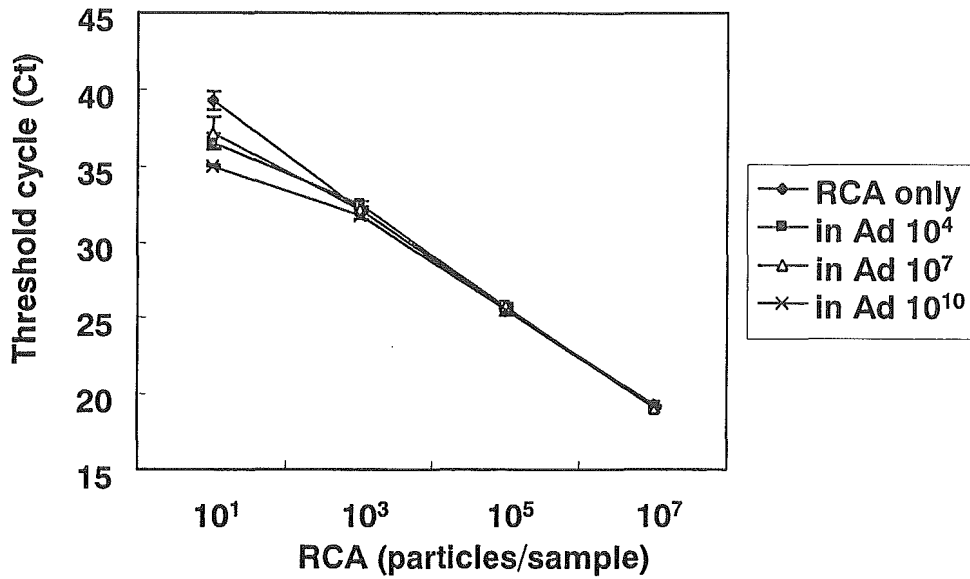


Fig. 3 Detection of RCA spiked in Ad vectors by real-time quantitative PCR
 10¹, 10³, 10⁵ or 10⁷ particles of RCA were spiked in 0, 10⁴, 10⁷ or 10¹⁰ particles of Adenovirus vectors (AdHM4LacZ). Viral DNA were extracted from each sample, and E1 DNA were detected by real-time quantitative PCR.
 Data were the mean \pm S.D. of triplicate amplification.

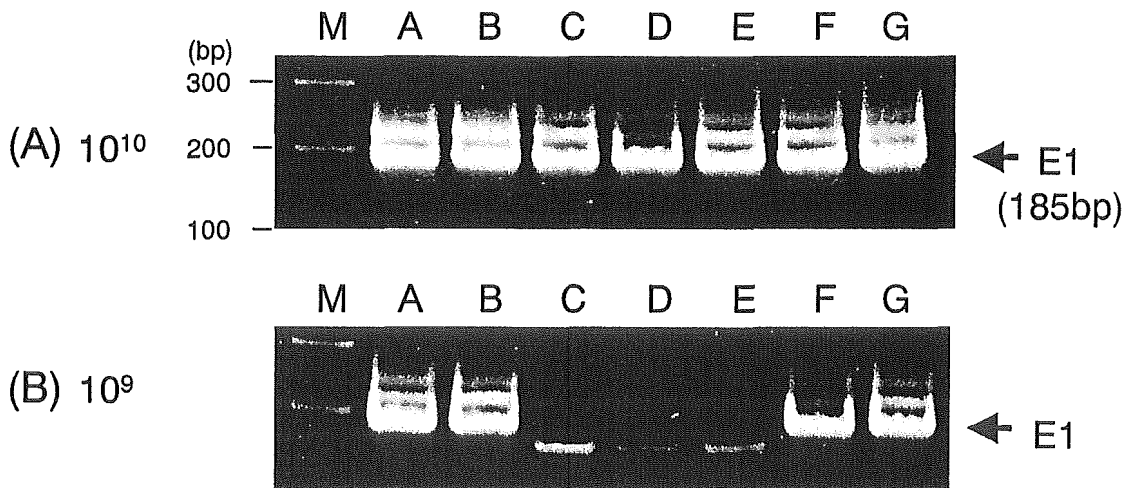


Fig. 4 Detection of E1 DNA in Ad vectors by Nested PCR

Viral DNA were extracted from 10¹⁰ (A) or 10⁹ (B) particles of Adenovirus vectors, and E1 DNA were detected by nested PCR. Lane A~G: Ad vectors constructing with in vitro ligation method and purified by CsCl density-gradient centrifugation. Lane A : AdHM4LacZ (Lot 0516), Lane B : AdHM10LacZ-2 (Lot 0529), Lane C : AdHM10LacZ-3 (Lot 0529), Lane D : AdHM10LacZ-4 (Lot 0529), Lane E : AdHM10LacZ-5 (Lot 0529), Lane F : AdHM10LacZ-3 (Lot 0613), Lane G : AdHM10LacZ-4 (Lot 0613), Lane M: Molecular weight marker.

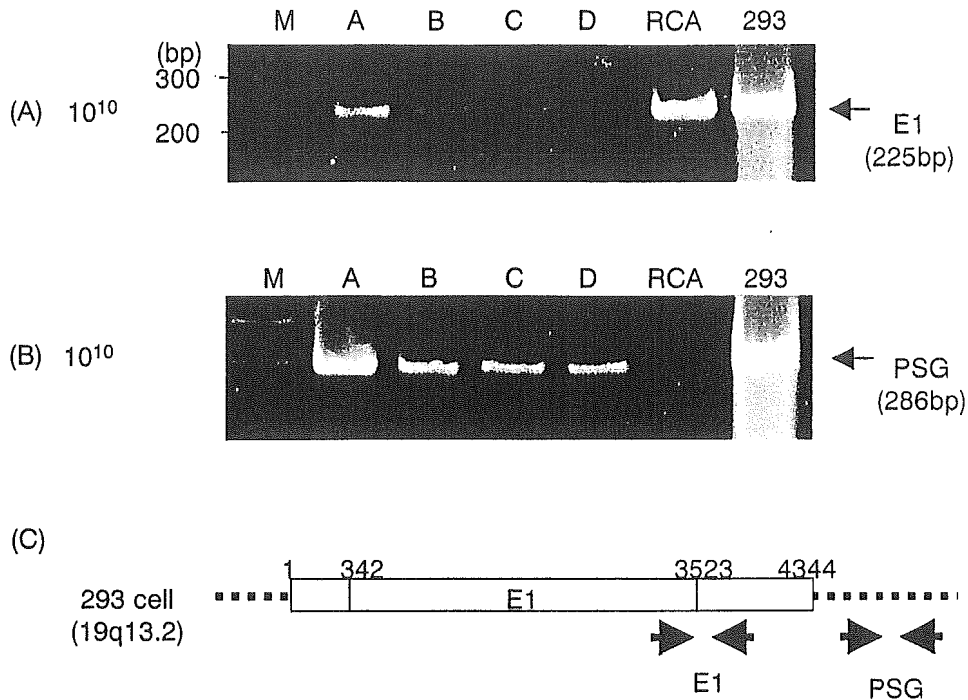


Fig. 5 Detection of E1 or pregnancy specific glycoprotein (PSG) DNA in Ad vectors by PCR

Viral DNA were extracted from 10^{10} particles of Adenovirus vectors, and then (A) E1 DNA or (B) 293 cell-derived pregnancy specific glycoprotein DNA were detected by PCR.

DNA from 293 cells were used as positive control for PSG DNA.

Lane A~G: Ad vectors constructing with in vitro ligation method and purified by CsCl density-gradient centrifugation. Lane A : AdHM4LacZ (Lot 0516), Lane B : AdHM10LacZ-3 (Lot 0529), Lane C : AdHM10LacZ-4 (Lot 0529), Lane D : AdHM10LacZ-5 (Lot 0529), Lane RCA: Replication competent adenoviruses, Lane 293 : genomic DNA extracted from 293 cells. Lane M: Molecular weight marker.

(C) E1 DNA inserted in chromosome of 293 cells and positions of PCR primers used were shown.

Table 1 Quantitative analysis of RCA concentration by Zn^{2+} .

ZnCl ₂	FCS	volume	RCA in precipitate(%)
1mM	0%	1ml	161.0
	1%	1ml	15.9
	10%	1ml	0.6
	0%	10ml	14.7
10mM	0%	1ml	102.0
	1%	1ml	113.0
	10%	1ml	116.0
	0%	10ml	0.0

1×10^6 particles of RCA in 0, 1 or 10 % FCS-containing medium were precipitated with 1mM or 10mM of ZnCl₂. Quantity of RCA in each precipitate was determined by real-time quantitative PCR.

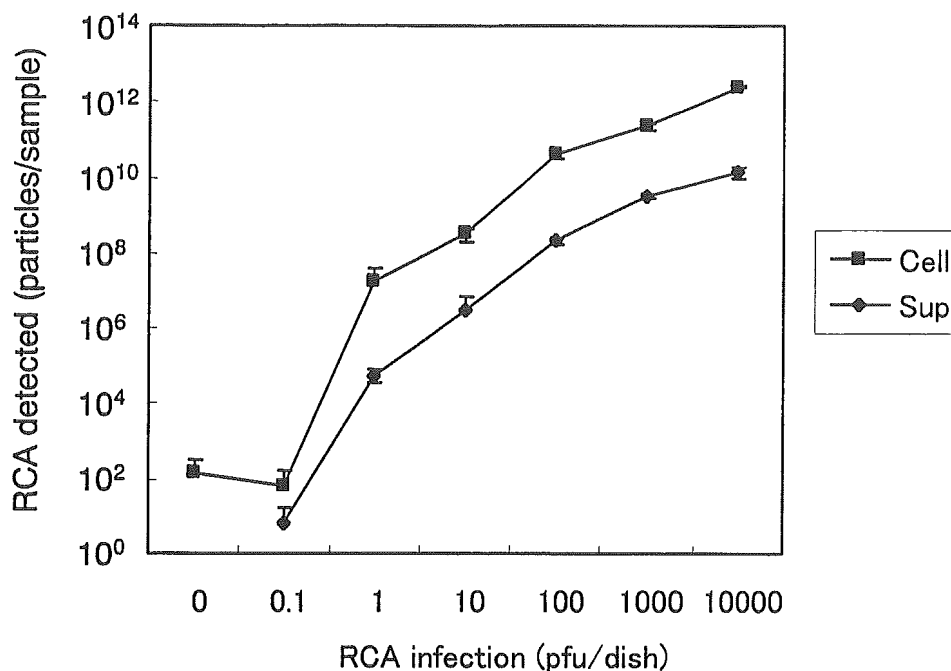


Fig. 6 Comparison of particle number of RCA in cell fraction and culture supernatant grown in HeLa cells.

Serial dilution of RCA were infected into HeLa cells.

Viral DNA from supernatant (100 μ l) or cells (one third of each dish) were extracted nine days after infection, and then quantity of RCA in each sample was determined by real-time quantitative PCR.

Data were the mean \pm S.D. (n=3).

Table 2 Comparison of DNA extraction method from RCA-infected HeLa cells

EX R&D	Gene Ball	Glass Beads
8.9 x 10 ⁸	8.6 x 10 ⁸	4.5 x 10 ⁸
3.4 x 10 ⁸	3.7x 10 ⁸	4.9 x 10 ⁸

10⁵ particles of RCA were infected into HeLa cells, two days later DNA were extracted by EX R&D reagent, Gene Ball, or Glass Beads method.

Quantity of E1 DNA in each sample was determined by real-time quantitative PCR.