

## LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコム解析

川崎ナナ・橋井則貴・伊藤さつき・日向昌司・川西 徹・早川堯夫

## SUMMARY

Liquid chromatography/mass spectrometry equipped with a graphitized carbon column is useful for the simultaneous analysis of oligosaccharides. By using capillary column and nano-electrospray ion source, the method can be used for the oligosaccharide profiling of sub microgram quantities of glycoproteins. This oligosaccharide profiling is expected to be a powerful tool for the glycome analysis. We demonstrate a potential application of oligosaccharide profiling in glycomics with two examples, the structural analysis of *N*-linked oligosaccharides from a gel-separated glycoprotein, and the differential analysis of *N*-linked oligosaccharides in cells.

Key words: LC/MS, oligosaccharide profiling, 2-dimensional electrophoresis, glycomics.

## はじめに

糖タンパク質の糖鎖の構造や不均一性は、発生・加齢・疾病等に関連して変化することが知られている<sup>1)</sup>。しかし、従来のプロテオミクス的アプローチ、すなわち、2次元電気泳動(2-DE)等でタンパク質発現量を比較し、差異の認められたタンパク質を質量分析法(MS)とデータベース検索により同定するという方法<sup>2)</sup>では、糖鎖の変化によって引き起こされる生命現象を捉えることはできない。糖タンパク質の糖鎖部分に関係する様々な現象を解明するには、糖鎖の定性的・定量的解析に基づくグライコム解析技術の開発が不可欠である。

MSと液体クロマトグラフィー(LC)をオンラインで結んだLC/MSは、分子量情報だけでなく、多くの異性体が存在する糖鎖の詳細な構造や不均一性に関する情報を提供してくれることから、今後、糖鎖生物学分野においても有力なツールとなることが期待されている。我々は、極性物質の吸着能が高く、エレクトロスプレーイオン化(ESI)に適した溶媒で糖鎖を分離・溶出できるグラファイトカーボンカラム(GCC)を用いることによって、高マンノース型、複合型、混成型糖鎖や、酸性糖鎖、中性糖鎖など様々な糖鎖

を一度に分離・検出できる糖鎖プロファイリング法を開発した<sup>3,4)</sup>。この糖鎖プロファイリング法は、グライコム解析の様々なステップにおいても役立つと思われる。本稿では、グライコム解析における糖鎖プロファイリングの可能性として、2-DEで分離されたゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析に応用した例と、細胞発現糖タンパク質の糖鎖の差異解析に応用した例を紹介する。

## I. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析

## 1. 糖鎖プロファイリング法の微量化

一般に2-DEとクマシーブルー(CBB)染色によって検出可能な糖タンパク質量は1 $\mu$ g程度といわれているが、ゲルからの回収率や操作中の損失等を考慮に入れると、サブマイクログラムのタンパク質に由来する糖鎖を解析できる分析システムが必要となる。そこで、キャピラリーカラムとナノスプレーイオン源を用いて、糖鎖プロファイリングの微量化を検討した。

NS0細胞産生遺伝子組換え型ヒト肝細胞増殖因子(HGF)に*N*-グリコシダーゼF(PNGase F)を作用させて*N*結合糖鎖を切り出し、anomerの分離を避けるためNaBH<sub>4</sub>で還元した。200 ngのHGFに由来する糖鎖をGCC-LC/MSを

Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/mass spectrometry.

Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa; 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

Correspondence address: Nana Kawasaki; Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

第53回日本電気泳動学会シンポジウム

(受付2003年11月13日, 受理2003年11月20日, 刊行2004年3月15日)

用いて分析したところ、トータルイオンクロマトグラム (TIC) 上に2つの大きなピークと、複数の小さいピークが確認された (Fig. 1A). ピーク A は、マスペクトル (Fig. 1B), 及びプロダクトイオンスペクトル (Fig. 1C) から、*N*-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) 及びヘキソース (Hex)-Hex を部分構造とする複合型糖鎖であることが示唆された. 他のピークについても同様に, NeuGc 及び Hex-Hex 構造が存在することが推定された. そこで, Hex-Hex 構造を確認するため, 糖鎖を  $\alpha$ -ガラクトシダーゼで消化し, 再度 LC/MS で分析を行ったところ, Fig. 1A 上で検出されたピークが消失し, 新たに複数のピークが出現することが確認された. これらのピークの分子量は,  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ消化前の糖鎖から Gal が1または2分子消失した糖鎖の分子量に一致することから, HGF の非還元末端には1または2分子の Gal が  $\alpha$  結合していることが確認された<sup>5)</sup>. NS0 細胞産生糖タンパク質には Gal $\alpha$ 1-3Gal を含む糖鎖が結合していることが報告されており<sup>6,7)</sup>, 今回検出された Hex-Hex も Gal $\alpha$ 1-3Gal 結合であると推定された. これらのことから, ピーク A の糖鎖構造は Fig. 1C 上図のように推定され, 他のピークについても, NeuGc 及び Gal $\alpha$ 1-3Gal 結合を部分構造とする複合型糖鎖であると考えられた.

以上のように, キャピラリーカラムとナノスプレーイオ

ン源を用いることによって, サブマイクログラムの糖タンパク質の糖鎖のプロファイリングが可能となった. また, LC/MS/MS, 及びエキソグリコシダーゼ消化と LC/MS を組み合わせることによって, より詳細な構造情報が得られることが確認された.

## 2. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析

つぎに, GCC-LC/MS を用いた電気泳動ゲル内糖タンパク質の糖鎖のプロファイリングを検討した. 2  $\mu$ g のヒト黒色腫細胞産生ヒト組織プラスミノーゲンアクチベータ (tPA) を SDS-PAGE で展開し (Fig. 2A), ゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を切り出した. NaBH<sub>4</sub> 還元糖鎖を LC/MS で分析したところ Fig. 2B のような糖鎖プロファイルが得られ, ゲルから抽出された tPA の糖鎖の分離パターンは, 泳動前の分離パターンとはほぼ同様であることが確認された.

以上のように, CBB 染色される程度の糖タンパク質があれば, ゲル内タンパク質であっても, GCC-LC/MS による糖鎖プロファイリングが可能であることが確認された. ゲル内タンパク質糖鎖の解析法として, 2-aminobenzamide 誘導体化後, イオン交換や順相 LC で分離し, オフライン MALDI-TOFMS で解析する手法が報告されている<sup>8)</sup>. 我々は, GCC-LC/MS を用いた解析は誘導体化における糖鎖の分解が生じ

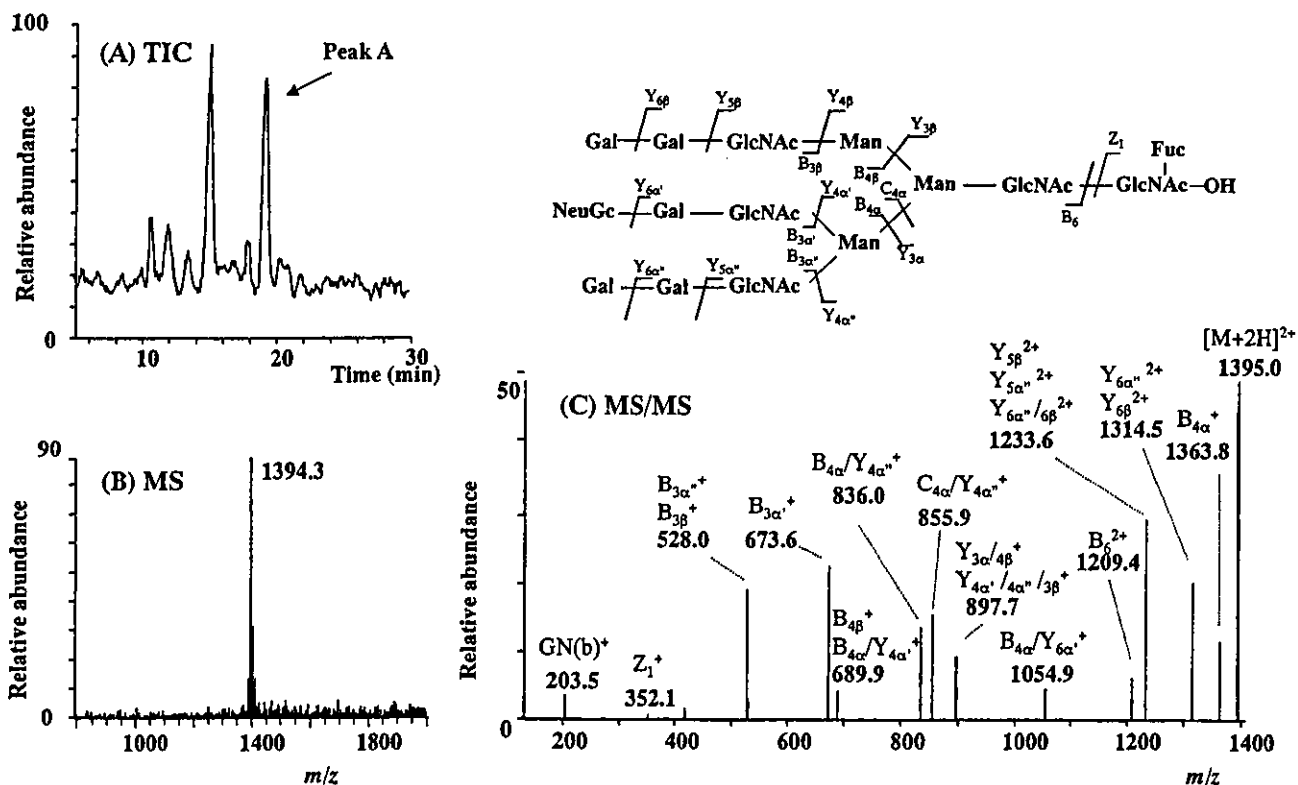


Fig. 1. (A) GCC-LC/MS によって得られた HGF の糖鎖プロファイル, (B) ピーク A のマスペクトル, (C) ピーク A のプロダクトイオンスペクトル及び推定構造

カラム, Hypercarb (0.2×150 mm); 流速, 3  $\mu$ l/min; 溶離液, 5 mM 酢酸アンモニウム/H<sub>2</sub>O-アセトニトリル; MS, TSQ-7000 (Thermoelectron)

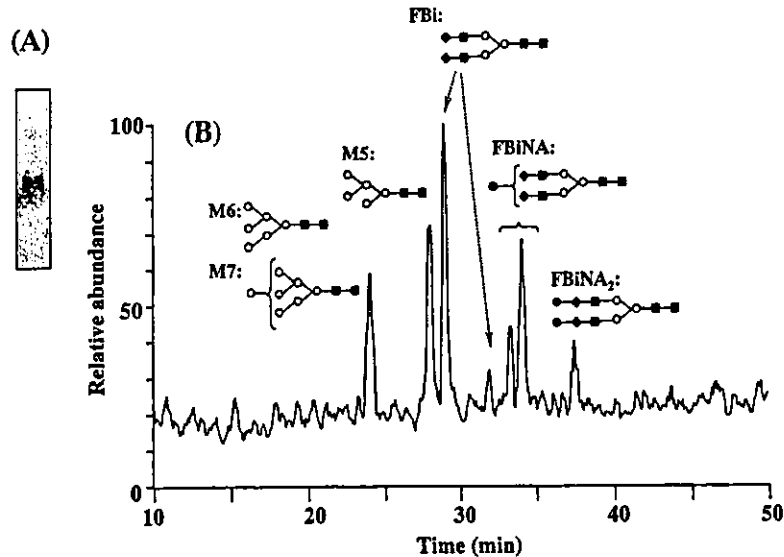


Fig. 2. (A) tPA (2  $\mu$ g) の SDS-PAGE, (B) GCC-LC/MS によるゲル内 tPA 由来糖鎖のプロファイル

ないこと、1回の LC で異性体を含む様々な糖鎖を分離できること、ESI を用いているのでシアル酸結合糖鎖や硫酸化糖鎖の解析にも応用できること、オンライン MS による簡便・迅速な分析が可能で、マイナー成分の取りこぼしがないこと等の利点があると考えている。

## II. 細胞・組織発現糖タンパク質糖鎖の差異解析

### 1. 糖鎖の差異解析

疾患組織と健常組織に発現している糖タンパク質の糖鎖の分布を直接比較し、疾患関連糖鎖遺伝子や糖タンパク質を見つけ出すことができれば、新たな診断法の開発や糖鎖と疾患の関係の解明につながるものと期待される。そこで、GCC-LC/MS を用いて、簡単な操作と実行可能なサンプル量で、サンプル間の糖鎖の差異解析を行うことを検討した。モデルとして、糖鎖遺伝子導入によって糖鎖の構造と分布が変化していることが予想される細胞を用いた。N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は、複合型 2 本鎖糖鎖に bisecting GlcNAc を付加する糖転移酵素で、細胞接着や癌転移と関係があることが報告されている<sup>9-11)</sup>。ここでは、GnT-III 遺伝子を導入した CHO 細胞を病態モデルとして、糖鎖プロファイリング法によって糖鎖の変動を捉えることができるかどうかを検証した。

$5 \times 10^6$  個程度の CHO 細胞と GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞を界面活性剤処理し、膜画分及び可溶性画分に分離した。それぞれの画分から PNGase F によって糖鎖を切り出し、 $\text{NaBH}_4$  で還元後、LC/MS によるプロファイリングを行った。Fig. 3A は CHO 細胞の膜画分の糖鎖プロファイルである。各ピークのマスペクトルから、CHO 細胞の膜タンパク質に付加している糖鎖は高マンノース型糖鎖とシアル酸が結合した複合型 2 本鎖糖鎖が中心で、さらに混成型、

トリマンノシルコア部分のみの糖鎖や、1 本鎖糖鎖などの比較的小さな糖鎖も結合していることが確認された。

Fig. 3B は、GnT-III 遺伝子導入細胞の膜画分の糖鎖プロファイルで、矢印で示す位置に CHO 細胞からは検出されない新たなイオンが検出された。GCC で糖鎖を分離した場合、bisecting GlcNAc が付加した糖鎖は付加されていない糖鎖より早く溶出される傾向がある。GnT-III 遺伝子導入によって新たに出現した糖鎖の分子量は、その後溶出された 2 本鎖糖鎖の分子量より N-アセチルヘキサミン (HexNAc) 1 分子分増加していることから、bisecting GlcNAc を有する 2 本鎖糖鎖であることが示唆された。

同様に可溶性画分についても糖鎖プロファイリングを行ったところ、膜画分とは異なるパターンが得られ、マスペクトルから、可溶性タンパク質に結合している糖鎖は主に高マンノース型であることがわかった。また、膜ほどではないが、GnT-III 遺伝子導入細胞の可溶性画分からも bisecting GlcNAc が付加していると思われる糖鎖が検出された。

Fig. 4 は CHO 細胞、及び GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞から切り出された主な糖鎖のピーク面積をアシアロ 2 本鎖糖鎖のピーク面積を 1.0 として相対的に表したもので、糖鎖分布の変化を示している。このグラフから、GnT-III の発現によって bisecting GlcNAc が付加したと思われる糖鎖は出現するものの、糖鎖全体の分布に大きな変化は生じていないことがわかる。これは、GnT-III 発現によって糖鎖構造に変化が生じたタンパク質が全体の一部であることを示唆していると考えられる。このように、GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは糖鎖の構造や分布の違いを簡単に識別できることから、健常及び病態サンプル間の糖鎖の差異解析法として有用であると思われる。

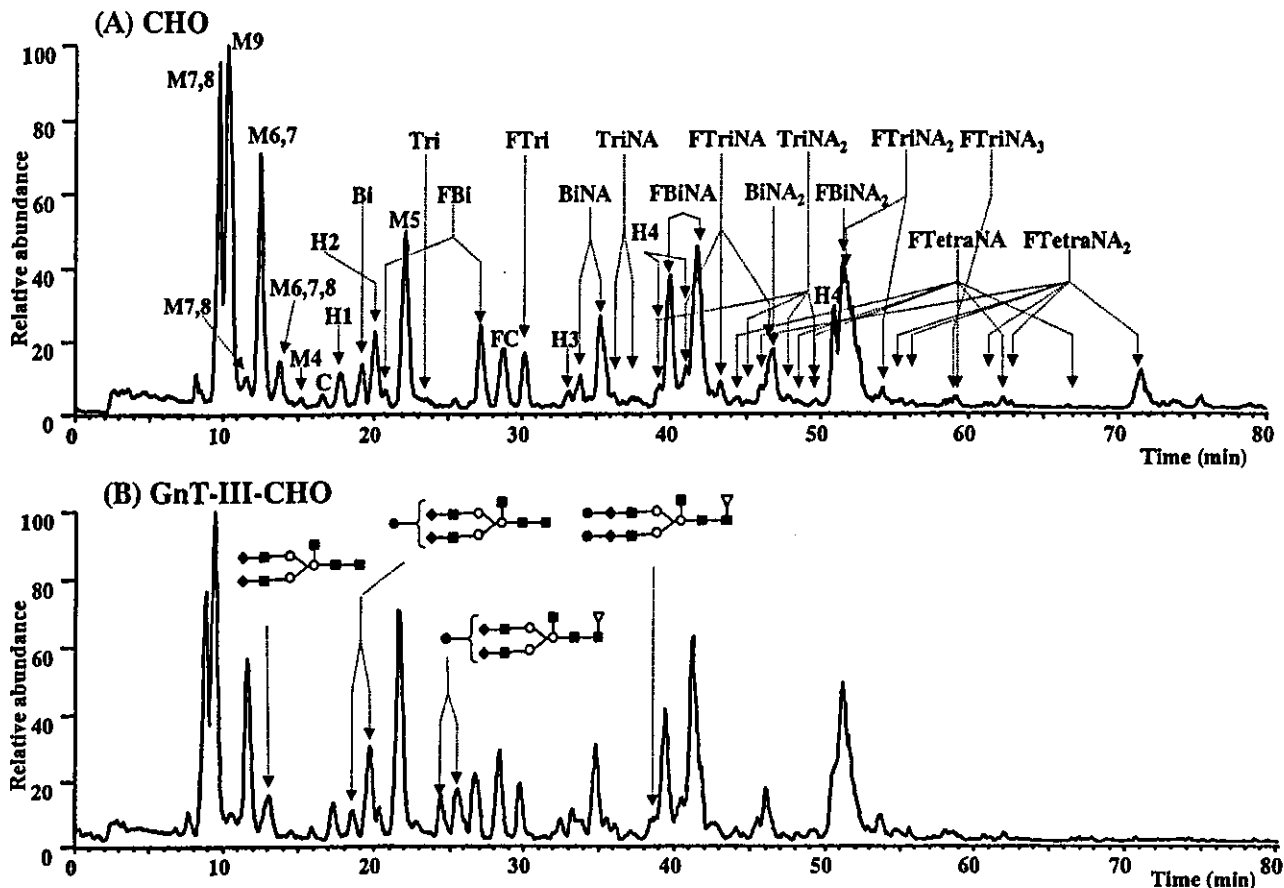


Fig. 3. (A) CHO 細胞膜画分の糖鎖プロファイル, (B) GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞の糖鎖プロファイル  
 M, Man; H, hybrid; C, trimannosylcore; F, Fuc; NA, NeuAc; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary

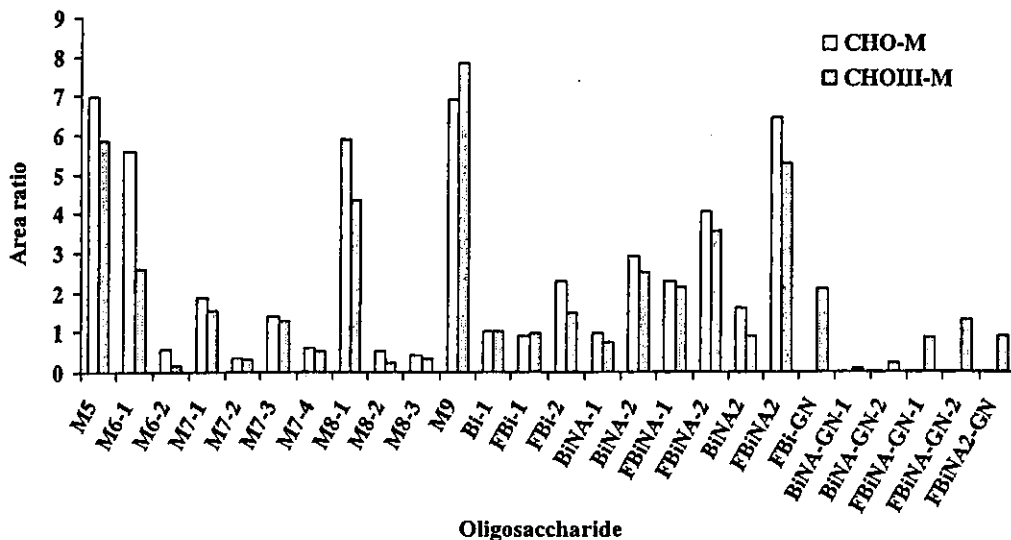


Fig. 4. CHO 細胞膜画分 (CHO-M) 及び GnT-III 遺伝子導入細胞由来膜画分 (CHOIII-M) 由来糖鎖の分布

アシアロ 2 本鎖糖鎖を 1.0 とする

## 2. 糖タンパク質の同定と特性解析

糖鎖差異解析によって疾患関連糖鎖を見出すことができれば、プロテオミクス的手法を用いて、その糖鎖が付加しているタンパク質の同定と特性解析を行うことになる。可

溶性タンパク質であれば、レクチンカラムや免疫沈降法などで得られた画分を SDS-PAGE 等で展開して目的糖タンパク質を得ることができるが、不溶性膜タンパク質の場合、レクチン等による分画が難しいケースが多く、2-DE 後、レ

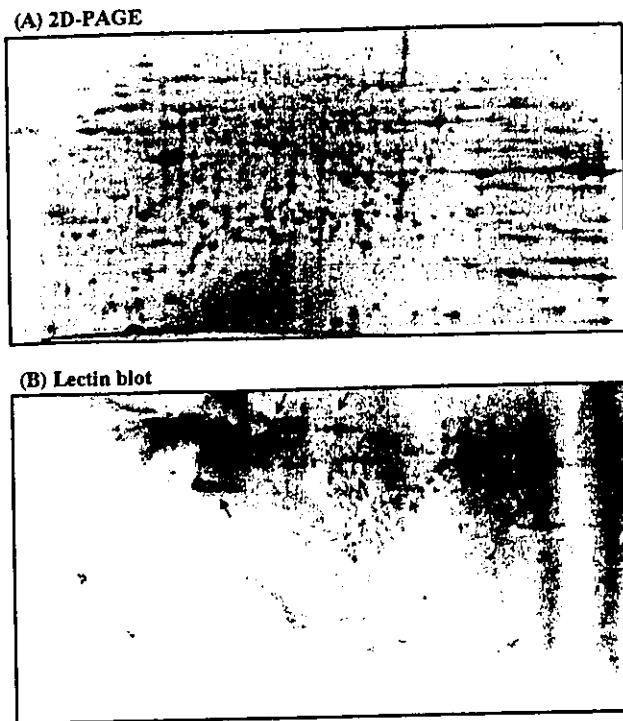


Fig. 5. GnT-III 遺伝子導入細胞膜画分の 2-DE

(A) Sypro Orange 染色, (B) PHA-E<sub>4</sub> プロット  
IEF, pH 3-10, 18 cm, 33,500 Vhr; SDS-PAGE, 12.5% gel  
(24×11 cm), 20 mA-0.5 hr, 50 mA-1.2 hr

クチンプロットなどにより糖タンパク質の位置を特定することになる<sup>12)</sup>。しかし後者の場合、泳動ゲルとレクチンプロット膜のマッチング、及び特定されたゲル上タンパク質に目的糖鎖が付加していることの検証が必要となってくる。

Fig. 5 は、GnT-III 遺伝子導入細胞の膜画分を 2 枚のゲルで展開し、Sypro Orange で全タンパク質を染色した結果 (A)、及び bisecting GlcNAc を認識する PHA-E<sub>4</sub> レクチンを用いてレクチンプロットを行った結果 (B) を示している。レクチンプロットによって、酸性側の 70-80 kDa 周辺に、糖タンパク質に特徴的な train 状のスポットが複数組検出され、一部のタンパク質の糖鎖に bisecting GlcNAc が付加されていることが確認された。我々は、レクチンプロット上のスポットの位置から特定された泳動ゲル上の糖タンパク質の糖鎖の解析にも糖鎖プロファイリングが役立つと考えている。現在、bisecting GlcNAc が付加していると推定されたスポットについて、ゲル内トリプシン消化に先立ち PNGase F 消化を行って糖鎖を切り出し、GCC-LC/MS を用いた bisecting GlcNAc の有無の確認と糖鎖構造解析を行っているところである。

#### おわりに

GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは、糖タンパク質性医薬品の特徴・品質解析を目的として開発されたものである。この糖鎖プロファイリングが、2-DE 等のプロ

テオミクスの手法と組み合わせることによって、医薬品開発型研究のグライコミクスにも応用できる可能がでてきた。電気泳動ゲル上の全タンパク質の中から糖タンパク質を検出する方法は報告されているが<sup>13,14)</sup>、特定の糖鎖を付加している糖タンパク質のみを検出・抽出する方法は確立されておらず、それらを効率的に検出する方法の確立が今後の課題であろう。

#### 文 献

- 1) Durand G, Seta N. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem* 2000;46:795-805.
- 2) Fenselau C. MALDI MS and strategies for protein analysis. *Anal Chem* 1997;69:661A-665A.
- 3) Kawasaki N, Ohta M, Hyuga S, Hashimoto O, Hayakawa T. Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999;269:297-303.
- 4) Itoh S, Kawasaki N, Ohta M, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T. Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr* 2002;168:89-100.
- 5) Kawasaki N, Itoh S, Ohta M, Hayakawa T. Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003;316:15-22.
- 6) Baker KN, Rendall MH, Hills AE, Hoare M, Freedman RB, James DC. Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 2001;73:188-202.
- 7) Sheeley DM, Merrill BM, Taylor LC. Characterization of monoclonal antibody glycosylation: comparison of expression systems and identification of terminal alpha-linked galactose. *Anal Biochem* 1997;247:102-110.
- 8) Rudd PM, Colominas C, Royle L, Murphy N, Hart E, Merry, AH, Hebestreit HF, Dwek RA. A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of N-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. *Proteomics* 2001;1:285-294.
- 9) Sheng Y, Yoshimura M, Inoue S, Oritani K, Nishiura T, Yoshida H, Ogawa M, Okajima Y, Matsuzawa Y, Taniguchi N. Remodeling of glycoconjugates on CD44 enhances cell adhesion to hyaluronate, tumor growth and metastasis in B16 melanoma cells expressing beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III. *Int J Cancer* 1997;73:850-858.
- 10) Yoshimura M, Nishikawa A, Ihara Y, Taniguchi S, Taniguchi N. Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8754-8758.

- 11) Yoshimura M, Ihara Y, Matsuzawa Y, Taniguchi N. Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis. *J Biol Chem* 1996;271:13811-13815.
- 12) Ekuni A, Miyoshi E, Ko JH, Noda K, Kitada T, Ihara S, Endo T, Hino A, Honke K, Taniguchi N. A glycomic approach to hepatic tumors in N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) transgenic mice induced by diethylnitrosamine (DEN): identification of haptoglobin as a target molecule of GnT-III. *Free Radic Res* 2002;36:827-833.
- 13) Wilson NL, Schulz BL, Karlsson NG, Packer NH. Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *J Proteome Res* 2002;1:521-529.
- 14) Schulenberg B, Beechem JM, Patton WF. Mapping glycosylation changes related to cancer using the Multiplexed Proteomics technology: a protein differential display approach. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;793:127-139.

## 再生医療分野における指針・ガイドライン： 再生医療の適正かつ効果的な推進を目指して

*Guidelines on Regenerative Medicine in Japan: Approaches for Appropriate and  
Effective Promotion of Regenerative Medicine*

### Keywords

再生医療  
細胞組織医薬品等→用語解説 106頁  
品質・安全性  
指針・ガイドライン

早川 堯夫<sup>1)</sup> 永田 龍二<sup>2)</sup>

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所  
2) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

### Summary

There are many approaches for producing and evaluating novel biologicals, including cell/tissue-based products used in regenerative medicine. To have such products contribute more significantly to human health care, it is essential that suitable measures based on sound scientific principles and approaches should be taken by physicians, manufacturers and control authorities to assure the quality, safety, and efficacy of these products. In addition to this, relevant aspects with respect to emerging technologies, public concerns, as well as the protection of individual rights are essential elements that must be taken into account.

In this article, Japanese guidelines on the quality and safety of cell/tissue-based products, as well as on ethics in regenerative medicine are described.

### はじめに

生命科学や関連技術の進歩の延長線上に人々が期待する大きな成果に、画期的な医薬品・医療機器や医療技術の開発がある。その成果が優れていれるほど、保健衛生面で人類に恩恵をもたらす共通の資産としての価値が高くなる。これらの医薬品・医療機器や医療技術は、科学的には、生命科学や関連技術の進歩を集学的に統合化して得られる結晶であるが、その過程において、いかに個々の科学的要素を充実させ、最も効率かつ最大限に活用できるか、また、最終目標である品質・有効性・安全性においていかに望ましいものとするかが、必須の課題である。一方、社会的な存在としての医薬品・医療機器や医療技術という視点でみると、特に先端的製品や技術であればあるほど、その開発や適用に当たって、倫理的妥当性、社会的理解や認知、経

Hayakawa, Takao<sup>1)</sup> / Nagata, Ryuji<sup>2)</sup>

1) National Institute of Health Sciences

2) Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

E-mail : rnagata@nihs.go.jp

経済的妥当性などの課題にいかん適正に対処し、クリアするか、その結果、人類の資産である優良な医薬品・医療機器や医療技術を、いかに速やかに誕生させ、医療の場に提供し、いかに適正使用するかが、重要課題である。トータルとして、基礎研究・基盤技術研究から臨床応用・実用化に至るまでの過程をいかにスムーズに効率よく行うかというポイントは、図に示したような各要素をそれぞれの連携・調整を取りつつ満たすことにかかっており、規制環境の整備も含め、最終目標を目指した統合的アプローチが必要となる<sup>1)</sup>。このためには、研究開発、評価、使用の各局面において、再生医療の推進を目指す企業、学界、公的研究機関、規制当局のいずれもが密接な連携、情報共有を図り、それぞれの立場において

それぞれの機能を最大限に発揮しながら、最も望ましい形の共通の目的実現を目指した科学的思考やアプローチを実践すること、すなわち情報や認識の共有化がキーポイントになる。

これらのさまざまな局面で、各種指針・ガイドラインや品質・有効性・安全性にかかわる評価科学の適切な適用が重要な役割を演ずることになる。再生医療に限らず、指針・ガイドラインは本来、科学技術の所産を最も望ましい形で、かつ迅速、効率的に臨床の場にもたらすために、望ましい考え方やアプローチ法、適切な試験項目や試験、作成すべきデータを示すものである。再生医療分野は医療技術的にも新しく、経済的妥当性、社会的理解・認知、倫理的妥当性の面でも現時点では確たる答えがすべて用意されているとは限

らない分野である。このような分野では、健康被害や倫理問題などが発生することのないよう特に慎重に配慮する一方で、先端科学技術の「より望ましい形で国民生活への還元」ということの意義を踏まえ、これを推進することは極めて重要であるとの認識をもつ必要がある。指針・ガイドライン類は、新たな医療技術を1日でも早く国民のもとに提供するための流れをより適正、円滑に推進するためのものであって、結果的にブレーキをかけるためのものとして利用してはならない。このため、公的な指針・ガイドラインの作成・運用に際しては、その時点での科学的かつ合理的な根拠に基づいて、社会的な合意を得つつ行われる必要がある。不確実な要素を多く含む技術のおよび行政的諸課題に対しては、学際的に可能なアプローチを含む統合的アプローチや国際的動向も加味した上で、社会的に最適な選択肢を決定し、歩を進めることが肝要である。

以下に再生医療に関係すると思われる既存の指針・ガイドラインについて概説するが、これらは必要なすべてを包含したものではなく、また、科学技術などの進歩や社会情勢の変化に対応して、適宜、見直しの対象ともなるべきものである。

### 品質・安全性面における指針・ガイドライン

再生医療に用いられる細胞組織製品に特徴的な最重要課題は、①ウイルスなどの感染性物質の伝播を可能なかぎ

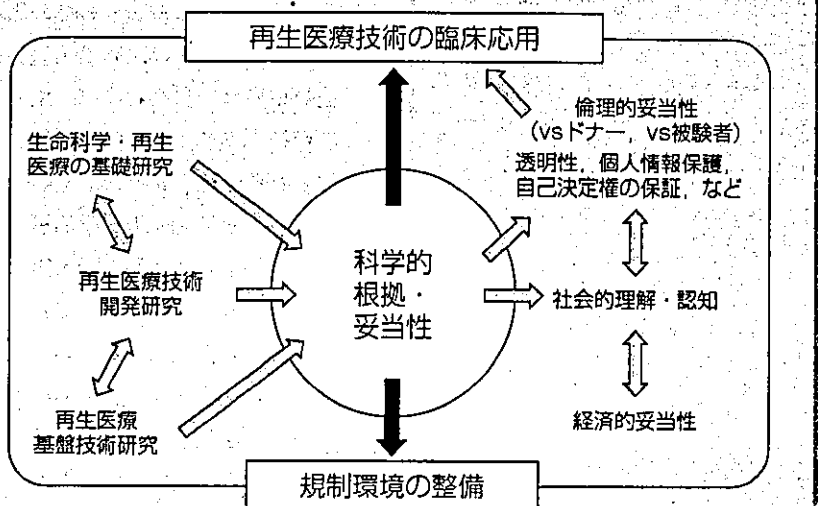


図 再生医療の実現化に向けて統合的アプローチが有用となるさまざまな局面<sup>1)</sup>



り防止すべきであること、および、②製品ごとにその特質を個別に考慮した品質・安全性確保のための適切な方策をケースバイケースで採用すべきであること、の二点である<sup>21)5)</sup>。

2003年5月に告示された「生物由来原料基準」<sup>6)</sup>は、医薬品、医薬部外品、化粧品および医療機器(以下、医薬品等)に使用されるヒト、その他の生物(植物を除く)に由来する原料または材料(添加剤、培地などとして製造工程において使用されるものを含む)について、製造に使用される際に講ずべき必要な措置に関する基準を定めることにより、医薬品等の品質、有効性および安全性を確保することを目的としたものである。ヒトまたは動物の細胞や組織に由来する再生医療用の医薬品等は、「生物由来原料基準」<sup>6)</sup>においては「人細胞組織製品」もしくは「動物細胞組織製品」として分類されており、それぞれ「人細胞組織製品原料基準」(表1)および「動物細胞組織製品原料基準」の中で、ドナーの適格性、原材料の採取の方法、記録の保管などについて規定されている。「生物由来原料基準」<sup>6)</sup>は、厳密には薬事法上の医薬品等のみを直接の規制対象としていることから、医師/医療機関の責任により実施される臨床研究(薬事法上の承認申請の意志をもたずに実施される研究。その研究結果報告書を承認申請資料として用いることは原則不可)に用いられる細胞組織製品は規制対象に該当しないと考えられるものの<sup>7)</sup>、薬事法上の医薬品等では「生物

由来原料基準」<sup>6)</sup>の遵守が義務付けられていること、および「ヘルシンキ宣言」(「11. ヒトを対象とする医学研究は、一般的に受け入れられた科学的原則に従い、科学的文献の十分な知識、他の関連した情報源及び十分な実験並びに適切な場合には動物実験に基づかなければならない」)<sup>8)</sup>を踏まえると、再生医療の臨床研究を実施するに当たっても、この「生物由来原料基準」<sup>6)</sup>に可能なかぎり準拠することは当然であると期待される。

同様に、直接的には薬事法上の医薬品等を適用対象としているものの、その開発段階も含めた細胞組織製品の品質および安全性の確保を目的として、2000年に厚生省から「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」という通知<sup>9)10)</sup>が出されており、その別添1として「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」(以下、「基本的考え方」)<sup>9)</sup>、別添2として「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(以下、「指針」)<sup>10)</sup>が示されている。このうち、「基本的考え方」<sup>9)</sup>は、製品の由来がヒトか動物かを問わず、細胞組織製品全般に共通して品質・安全性を確保するために必要な基本的考え方を示したものである。「基本的考え方」<sup>9)</sup>には、「生物由来原料基準」<sup>6)</sup>で規定されている内容に加えて、製造工程に関するGMP(Good Manufacturing Practice)の概念など、重要な考え方が明記されており(表2

下線部)、「生物由来原料基準」<sup>6)</sup>と併せて日本版cGTP(current Good Tissue Practice)と捉えることができるであろう。

一方、「指針」<sup>10)</sup>は、ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安全性確保のための基本的な要件を定めたものである(表3)。この「指針」<sup>10)</sup>においては、当該医薬品等の臨床試験(薬事法上の承認申請の意志をもって実施される治験)をわが国で実施するに当たり、臨床試験依頼者は事前に厚生労働大臣に対して本指針に適合することの確認を求めるとされているが、その際の実験申請資料に記載すべき内容を具体的に明らかにしたものである。本文書の適用対象は、ヒト由来の細胞・組織加工医薬品等に限定されているものの(ここでいう「加工」の定義は表4を参照)、当該医薬品等の臨床研究を実施する場合および他の細胞組織製品を用いて臨床研究/臨床試験を実施する場合でも、その内容は十分活用できるであろう。臨床研究/臨床試験に用いられる細胞組織製品の品質および安全性の確保のためには、上記「生物由来原料基準」<sup>6)</sup>および「基本的考え方」<sup>9)</sup>を踏まえながら、「指針」<sup>10)</sup>で具体的にあげられている事項について十分理解・考慮しなければならないのである。

なお、細胞組織製品の製造過程で人為的に遺伝子操作を行うケースでは、その導入遺伝子から発現する蛋白質に何らかの作用を期待する場合、厚生労働省や文部科学省の指針<sup>11)12)</sup>の適用対

1. 人細胞組織製品[人に由来する原料又は材料(血液及び血液から製造される成分を除く。)から構成される医薬品又は医療用具をいう。以下同じ。]の原料又は材料として用いる細胞及び組織については、採取するために必要な衛生管理を行うのに十分な人員及び設備を有する施設で採取されたものでなければならない。
2. 人細胞組織製品の原材料として用いる細胞又は組織を採取するに当たっては、次に掲げる措置が講じられていなければならない。
  - ア) 当該細胞又は組織を採取する過程における病原微生物その他疾病の原因となるものによる汚染を防止するために必要な措置が講じられていること。
  - イ) 採取された細胞又は組織について、必要に応じて感染症に関する最新の知見に照らして適切な検査が行われ、病原微生物その他疾病の原因となるものに汚染されていない旨が確認されていること。
3. ドナーは、次のいずれにも該当し、人細胞組織製品の原材料として用いる細胞又は組織を提供するにつき十分な適格性を有するものでなければならない。なお、人細胞組織製品の使用の対象者とドナーが同一の者である場合は必ずしもドナースクリーニングを必要としない。
  - ア) 当該細胞又は組織を採取するに当たって、それらの利用の目的に応じ、問診、検診、検査等により、細菌、真菌、ウイルス等の感染が否定されていること。
  - イ) ア)の検査項目及び検査方法が感染症等に関する最新の知見に照らして適切なものであること。
  - ウ) ア)の検査項目、検査方法等に応じた再検査がウインドウピリオドを勘案して適切な時期に行われていること。
4. 上記のほか次に掲げる疾病等について、問診、検診、検査等を行うとともに、輸血又は移植医療を受けた経験の有無等を勘案して、ドナーとしての適格性があると判断されていなければならない。
  - ア) 梅毒トレポネーマ、クラミジア、淋菌、結核菌等の細菌による感染症
  - イ) 敗血症及びその疑い
  - ウ) 悪性腫瘍
  - エ) 重要な代謝及び内分泌疾患
  - オ) 膠原病及び血液疾患
  - カ) 肝疾患
  - キ) 伝達性海绵状脳症及びその疑い並びにその他の痴呆症
5. 細胞又は組織の採取を行う者が、ドナーとなる者に対して、ドナースクリーニングの実施前に細胞及び組織の利用目的、個人情報保護、その他採取に関する事項について当該者の理解を得るよう、文書を用いて十分に説明し、自由な意思による同意を文書により得たものでなければならない。なお、説明に当たっては、同意の拒否及び撤回の権利があり、拒否又は撤回することにより当該者が不利益を受けないことが明らかにされていなければならない。
6. ドナー本人が説明を受け同意を与えることが困難な場合又は単独で完全な同意を与える能力を欠いている場合において、下記の要件を満たす場合に限り、代諾者(本人に対して親権を行う者、配偶者及び後見人その他これらに準じる者であって、本人に代わって説明を受け、本人に代わって同意をする権限を有するものをいう。以下同じ。)の同意により細胞又は組織の採取を行うことができる。
  - ア) 当該ドナーからの細胞又は組織の採取が人細胞組織製品の品質、有効性及び安全性の確保の観点等から必要とされる合理的理由があること。
  - イ) 代諾者がドナーの意思及び利益を最もよく代弁できると判断される者であり、かつ、代諾者の同意に際しては、ドナーと代諾者の関係についての記録が作成され、同意書とともに保存されていること。
  - ウ) 細胞又は組織を採取する者は可能な限りドナーにその理解力に応じた説明を行うとともに、ドナー本人からも同意を得るように努めること。
  - エ) 採取を行う施設の倫理委員会等において、当該ドナーからの細胞又は組織の採取の科学的及び倫理的妥当性が審査され、了承されていること。

表 1-1 「人細胞組織製品原料基準」<sup>9)</sup>

7. 死体から細胞又は組織の提供を受ける場合には、遺族に対して5.に従って説明し同意を得たものでなければならない。細胞又は組織の採取は、当該ドナーが細胞又は組織の提供を生前に拒否していない場合に限る。また、ドナーに対する礼意の保持に留意したものでなければならない。
8. 手術等で摘出された細胞又は組織を利用する場合においても、5.及び6.に従って同意を得たものでなければならない。なお、この場合にあつては、当該手術等が細胞又は組織の採取の目的を優先して行われたものであってはならない。
9. ドナーからの細胞又は組織の採取が無対価で行われたものでなければならない。ただし、細胞又は組織の提供により生じるドナーの負担につき、交通費等実際にかかった費用を助産しつつ、倫理委員会等の了承を得た上で、適切な補填がなされることは、この限りではない。
10. 細胞組織製品の原材料となる人の細胞又は組織についての、品質及び安全性の確保に必要な情報が確認できるよう、次に掲げる事項が記録され、保存されていなければならない。
  - ア) 当該細胞又は組織を採取した施設
  - イ) 当該細胞又は組織を採取した年月日
  - ウ) ドナースクリーニングのための問診、検診、検査等による診断の結果及び状況
  - エ) 当該細胞又は組織を採取する作業の経過
  - オ) 倫理委員会等の審議結果
  - カ) 同意説明文書及び同意文書
  - キ) ドナーに関する識別番号
  - ク) ア)からキ)に掲げるもののほか、人細胞組織製品の品質及び安全性の確保に関し必要な事項

表 1-2 「人細胞組織製品原料基準」<sup>6)</sup>

象にもなり、臨床研究/臨床試験の実施前には確認申請が必要となる。動物培養細胞をフィーダー細胞として利用する場合も含めて、製造過程で動物由来の細胞・組織を用いる際には、厚生労働科学研究費補助金 厚生労働科学研究事業によりまとめられた感染性物質に関する指針<sup>10)15)</sup>も参考になるであろう。また、2002年の薬事法改正に伴い、企業の依頼により実施される従来型の臨床試験(治験)に加えて、2003年7月からは新たに医師/医療機関主導型の臨床試験(治験)が認められているが<sup>16)</sup>、このような臨床試験においても、「医薬品の臨床試験の実施の基準」(Good Clinical Practice : GCP)<sup>16)17)</sup>を遵守することはもちろん

のこと、「治験薬の製造管理及び品質管理基準並びに治験薬の製造施設の構造設備基準」(治験薬GMP)<sup>18)</sup>への準拠も求められる。

### 倫理面における指針・ガイドライン

一般に、臨床研究/臨床試験を実施する際の国際的な倫理的規範として「ヘルシンキ宣言」<sup>9)</sup>が存在し、さらに臨床研究に関しては2003年7月に告示された「臨床研究に関する倫理指針」<sup>19)</sup>、臨床試験(治験)に関しては「医薬品の臨床試験の実施の基準」<sup>16)17)</sup>を遵守することとされている。これらは被験者に対する倫理面での配慮を定めたものであるが、再生医療に特徴的

なことから、上記「生物由来原料基準」<sup>6)</sup>および「基本的考え方」<sup>9)</sup>にも明記されているとおり、被験者への倫理的配慮に加えてドナーに対する倫理的配慮も忘れてはならない。

特定の技術および原材料に関して、わが国が策定した医学・生命科学研究全体に係る倫理指針類として、クローン技術、特定胚およびヒトES細胞に関する指針などがすでに公表されており、さらに現在、専門の委員会を設けて審議中のものもある(表5)。また、この他にも関係学会などで独自に作成された指針類もあるので、再生医療研究を実施する際には十分留意されたい<sup>2)20)</sup>。

1. 本文書の目的、基本原則、定義

細胞組織製品は、細胞・組織に由来する感染症の伝播などの危険性を完全には排除し得ないおそれがあることから、他の治療薬や治療法と比較して有用性が同程度以上と判断されるときにのみ使用

2. 細胞・組織採取について

- ・適切な衛生管理。知識・技術をもった人員の確保
- ・倫理委員会での事前調査・審議
- ・ドナーからのインフォームドコンセントの取得。無対価での提供
- ・ドナーおよびドナー動物の選択基準および適格性
- ・感染性物質による汚染を防ぐために必要な措置・検査の実施記録

3. 製造段階における安全性確保対策

- ・独立した作業区域の設置。複数のドナーからの細胞・組織を同一室内で同時期に取り扱うことや、交叉汚染を引き起こす可能性のある保管方法の禁止
- ・標準操作手順書の作成および遵守。製造工程に関する記録
- ・採取した細胞・組織および試薬などの受け入れ試験・検査。製品の試験・検査。感染性物質による汚染の危険性の排除
- ・最新技術の反映

4. 職員および組織ならびに管理体制(職員の教育訓練、健康管理)など

5. 使用段階における安全性確保対策

- ・ドナーや最終製品の試験・検査結果の医療機関に対する提供
- ・患者からのインフォームドコンセントの取得
- ・患者などの試料の保存。患者などに関する情報の把握

6. 個人情報の保護

7. 見直し

※生物由来原料基準では明記されていない内容に下線を付した。

表2 「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」<sup>9)</sup>の概略

おわりに

再生医療の臨床研究/臨床試験を実施するに当たって、たとえば細胞組織製品の品質・安全性に関する「基本的考え方」<sup>9)</sup>や「指針」<sup>10)</sup>をはじめ、本稿で紹介した指針・ガイドライン類はそれぞれの作成時点での知識や情報に基づくものであることから、これらを

未来永劫固定化された規制と捉えることは不適切である。基礎研究・基盤技術研究や非臨床試験も含めて、個々の細胞組織製品について実施される試験の内容やその成績の評価に際しては、品質および安全性の確保、そして国民に対する先端科学技術の迅速な還元という最終目的を常に意識しながら、倫理面への配慮も含めた統合的アプローチにより柔軟かつ合理的に対応してい

くことが重要である。このようなアプローチおよび種々の事例の蓄積から、再生医療のさらなる進展が図られるものと期待される。

●文献

- 1) 早川 勉夫：バイオ創薬におけるレギュラトリーサイエンスの新展開。国立医薬品食品衛生研究所報告 121：128-143, 2003
- 2) 早川 勉夫, 山崎 修道, 延原 正弘 編：バイオ医薬品の品質・安全性評価。東京, エル・アイ・シー, 2001
- 3) 早川 勉夫, 石井 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
- 4) 早川 勉夫：臨床試験 2003。東京, 薬事日報社, 157-179, 2003
- 5) 早川 勉夫, 永田 龍二：細胞・組織加工医薬品・医療機器の品質管理。Clin Neurosci 21：1195-1197, 2003
- 6) 生物由来原料基準。厚生労働省告示 第 210号, 2003 ([http://www.hourei.mhlw.go.jp/%7Ehourei/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=hourei&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=513](http://www.hourei.mhlw.go.jp/%7Ehourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=hourei&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=513))  
一部改正：厚生労働省告示 第 157号, 2004 ([http://www.piis.pref.mie.jp/ipp/ta/index\\_a1-2.asp?PARAM1=10001434](http://www.piis.pref.mie.jp/ipp/ta/index_a1-2.asp?PARAM1=10001434))
- 7) 臨床研究機関への医薬品, 医療機器等の提供について。薬事法及び採血及び供血あつせん業取締法の一部を改正する法律 参考資料, 2002 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/2002/09/dl/tp0910-2f26.pdf>)
- 8) 世界医師会(日本医師会 訳)：ヘルシンキ宣言—ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則, 2002 ([http://www.med.or.jp/wma/helsinki02\\_j.html](http://www.med.or.jp/wma/helsinki02_j.html))
- 9) ヒト又は動物由来成分を原料として製

造される医薬品等の品質及び安全性確保について、厚生省医薬安全局長通知 医薬発第 1314 号, 2000 (<http://www.nihs.go.jp/mhlw/tuuchi/2000/001226-1314/001226-1314.pdf>)

細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方、同通知別添 1, 2000 (<http://www.nihs.go.jp/mhlw/jouhou/cell/cell-a.pdf>)

- 10) ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について、厚生省医薬安全局長通知 医薬発第 1314 号, 2000 (<http://www.nihs.go.jp/mhlw/tuuchi/2000/001226-1314/001226-1314.pdf>)

ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針、同通知別添 2, 2000 (<http://www.nihs.go.jp/mhlw/jouhou/cell/cell-b.pdf>)

- 11) 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について、厚生省薬務局長通知 薬発第 1062 号, 1995 (<http://dgm1pc13.nihs.go.jp/www/cgtp/guidline/951115.pdf>)

一部改正：遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について、厚生労働省医薬局長通知 医薬発第 0329004 号, 2002 (<http://dgm1pc13.nihs.go.jp/www/cgtp/guidline/020329.pdf>)

- 12) 医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について、厚生労働省医薬局審査管理課長通知 医薬審発第 0213001 号, 2003 ([http://dmd.nihs.go.jp/iso-tc194/guide\\_kihon.pdf](http://dmd.nihs.go.jp/iso-tc194/guide_kihon.pdf))

- 13) 遺伝子治療臨床研究に関する指針、文部科学省・厚生労働省告示 第 1 号, 2002 (<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/index.html>)

<参考> 遺伝子治療臨床研究に関する「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく第一種使用規程承認申請

1. 本文書の目的、定義

2. 利用目的、製造方法および安定性

①原材料となる細胞・組織および製造方法について

- ・原材料となる細胞・組織の特性と適格性の確認。採取した細胞・組織の一部保管。感染性物質の不活化/除去。加工した細胞の特性解析
- ・培地や細胞・組織の処理に用いる試薬などの全成分について、感染性物質の否定も含めて適格性を明らかにし、必要な品質規格を設定。培養・加工時の血清の使用は可能なかぎり避ける。これが避けられない場合、血清由来感染性物質の混入・伝播の防止および使用血清の一部を保管
- ・細胞・組織に人為的に遺伝子を外部から導入する場合における詳細は文献 11 も参照

②細胞・組織以外の原材料について

- ・細胞・組織以外に最終製品の一部を構成する原材料がある場合、当該原材料の品質および安全性ならびに細胞に及ぼす影響を検討。当該原材料の特性に応じて文献 12 を参考に必要な規格を設定
- ・細胞・組織と患者の適用部位を隔離する目的で非細胞・組織成分を用いる場合、次の項目を参考に効果・安全性を確認：免疫隔離の程度、栄養成分および排泄・分泌物の拡散、細胞・組織由来の生理活性物質の膜透過キネティクスと薬理効果、患者由来の生理活性物質の細胞・組織への有害作用

③細胞・組織の同一性および均一性の確認、品質管理、製品の安定性の確認

- ・次に示す一般的な品質管理試験項目を参考に必要な規格を設定：細胞の回収率・生存率、同一性の確認、細胞・組織由来の目的生理活性物質の量/力価、無菌性およびマイコプラズマ、エンドトキシン、製造工程由来不純物、細胞の純度、細胞・組織由来の目的外生理活性物質の種類および量/力価、力学的適合性、感染性物質

3. 非臨床安全性試験、効力/性能を裏付ける試験、体内動態

- ・特に次の項目について必要に応じて動物および *in vitro* での試験を実施し、安全性を確認：加工細胞の性質の変化、細胞・組織が産生する各種生理活性物質の定量および患者への影響、患者の正常細胞・組織に対する製品の影響、望ましくない免疫反応が生じる可能性、（最終製品が大量に生産される場合には）一般毒性試験

4. 臨床試験（外国における開発状況も含める）

①治験計画の概要

- ・製品適用後の有効性/安全性評価期間・項目は十分検討して決定。免疫学的事項も含める

5. 確認および報告

表 3 「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」<sup>10)</sup>の概略

の手続等について、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知 科発第 0219001 号, 2004 (<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/index.html>)

- 14) 異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染性問題に関する指針について、厚生労働省医政局研究開発振興課長通知 医政研発第 0709001 号, 2002 (<http://www.>)

1. 細胞・組織の人為的な増殖

例) ドナーから採取した細胞・組織を体外で培養・増殖させた後、それを患者に適用する場合。

2. 細胞・組織の活性化などを目的とした処理

①薬剤処理

例) ドナーから採取した未分化の細胞の体外での培養に際し、分化誘導物質を添加して目的とするステージの細胞に分化させた後、それを患者に適用する場合。

②生物学的特性の改変

例) 採取した細胞を体外で培養する際に、サイトカインや抗原で人為的に刺激することによって細胞の生物学的特性を目的のものに改変した後、それを患者に適用する場合。

③細胞・組織の遺伝子工学的改変

例) 採取した細胞・組織に体外で遺伝子導入を行った後、それを患者に適用する場合(このような場合は「遺伝子治療」の範疇にも属することに注意)。

3. 非細胞・組織とのハイブリッド化

例) 採取した細胞・組織の体外での培養に際し、特定の効果を期待して人為的に添加された非細胞・組織成分が、最終製品においても含有されている場合。一例としては、採取した細胞を培養用マトリクス上で培養し、それにより得られた増殖細胞の貼りついたマトリクス全体を患者に適用する場合。

4. カプセル化

例) 細胞・組織加工医薬品・医療機器の本質である細胞・組織が適用患者などに直接的に接触しないよう、非細胞・組織成分を用いて当該細胞・組織が隔離されるような剤型として最終製品が製造されている場合。一例としては、目的のペプチド・蛋白を産生・分泌する動物細胞を患者に適用する際に、そのまま適用したのでは免疫反応の惹起や人獣共通感染症病原体の混入が懸念されるため、目的のペプチド・蛋白が透過するような材質のカプセルで当該細胞をくるみ、それを患者に適用する場合。

5. その他

注：上記の区分は各々独立したものではなく、品目ごとに複数の区分に該当する場合もある。

表4 「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等」<sup>10)</sup>における「加工」の具体例

<臨床研究>

- ・ 臨床研究に関する倫理指針(厚生労働省, 2003)<sup>19)</sup>
- ・ ヒト幹細胞を用いた臨床研究の在り方(厚生労働省 厚生科学審議会 科学技術部会 ヒト幹細胞を用いた臨床研究の在り方に関する専門委員会, 審議中)

<臨床試験>

- ・ 医薬品の臨床試験の実施の基準(厚生労働省, 1997, 2003)<sup>10)17)</sup>
- ・ 生物由来原料基準(厚生労働省, 2003)<sup>10)</sup>
- ・ 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方(厚生省, 2000)<sup>20)</sup>

<研究全般>

- ・ ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律(法律第146号, 2000)<sup>20)</sup>
- ・ ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針(文部科学省告示第155号, 2001)<sup>21)</sup>
- ・ 特定胚の取扱いに関する指針(文部科学省告示第173号, 2001)<sup>22)</sup>
- ・ ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方(中間報告書)(総合科学技術会議 生命倫理専門調査会, 2003)<sup>23)</sup>

mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/index.html)

- 15) 再生医療分野における「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく3T3J2株及び3T3NIH株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針(案), 第19回 厚生科学審議会 科学技術部会 資料, 2004 (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2004/04/dl/s0414-3f.pdf>)
- 16) 医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令, 厚生労働省令第106号, 2003
- 17) 医薬品の臨床試験の実施の基準, 厚生省令第28号, 1997(文献16により一部改正) ([http://www.hourei.mhlw.go.jp/%7Ehourei/cgi-bin/t\\_docframe](http://www.hourei.mhlw.go.jp/%7Ehourei/cgi-bin/t_docframe)).

表5 再生医療に関するわが国の倫理指針類

- cgi?MODE=hourei&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=462)
- 18) 治験薬の製造管理及び品質管理基準並びに治験薬の製造施設の構造設備基準，厚生省薬務局長通知 薬発第480号，1997 ([http://www.hourei.mhlw.go.jp/%7Ehourei/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3213](http://www.hourei.mhlw.go.jp/%7Ehourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3213))
- 19) 臨床研究に関する倫理指針，厚生労働省告示 第255号，2003 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/2003/07/dl/tp0730-2b.pdf>)
- 20) ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律，法律 第146号，2000 ([http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/main.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/main.htm))
- 21) ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針，文部科学省告示 第155号，2001 ([http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/main.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/main.htm))
- 22) 特定胚の取扱いに関する指針，文部科学省告示 第173号，2001 ([http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/main.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/main.htm))
- 23) 総合科学技術会議 生命倫理専門調査会：ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方(中間報告書)，2003 (<http://www.8.cao.go.jp/cstp/tyousakai/life/pubcom/chukan.pdf>)
- 24) 丸山英二：わが国の医学・生命科学に関する政府指針，ジュリスト 1247：37-48，2003

# OPINION

DDS 19 卷 2 号, 平成 16 年

## バイオ創薬の新たな展開と 効果的な推進に向けて

早川 堯夫

現在は創薬史上に類のない時機である。ゲノム解読後のゲノム科学をベースにした創薬、幹細胞学の発展などをベースにした細胞治療や再生医療用の製品開発、その他の生命科学や先端技術の進展を背景にした創薬など、いずれも熾烈な国際的競争が展開されている。医薬品などが疾病の予防、診断、治療を通して保健衛生の向上に寄与するものであり、それゆえに人類に恩恵をもたらす共通の資産であるという本質を考えれば、創薬が国際競争により推進されることは、当然望ましいことである。わが国としては、科学技術立国を目指すということも含めて、米・欧に伍して、産・官・学あげてこの課題に取り組む必要がある。

創薬は、シーズ探索・発見と、およびそれをもとにした医薬品候補の探索・選択・最適化、製法の検討、品質・有効性・安全性評価という二つのステージに大別される。

ゲノム科学をベースにした創薬の場合、第1のステージは、疾患や薬物の作用、生体の恒常性維持に関係する新規遺伝子や蛋白質の探索とその機能解明である。このためには、各種ゲノミクス、プロテオミクス、バイオインフォマティクスなどの包括的・網羅的なアプローチや、これらにより絞り込み、推定された遺伝子や蛋白質機能の実証的な解析・確認が必要とされる。しかし、キーとなる“機能の実証的解析・確認”は、

適切な技術基盤が必ずしも十分に開発、整備されておらず律速段階となっている。したがって、この点をブレイクスルーすれば、米・欧に匹敵する“新規日の丸遺伝子や蛋白質”を見いだすことも可能であり、わが国独自の技術開発や研究の進展に期待したい。

第2のステージは、明らかにした遺伝子や蛋白質の機能に基づく創薬である。その際、機能が明らかにされた新たな遺伝子、蛋白質、関連機能分子自体が医薬品候補(有効成分)となるケースや、新たに機能解明された遺伝子や蛋白質を分子標的としてこれらを制御できるもの、たとえば、アンチセンスや siRNA などの核酸、抗体類、分子標的的化学合成品、

テーラーメイド型製品などが医薬品候補となるケースが考えられる。第2ステージで最も重要なことは、有効性・安全性確保の観点から最終的にあるべき薬剤の姿を想定しながら開発を進めることであり、そこで DDS 研究の果たす役割は大きい。

医薬品は有効成分によって第1の特性を与えられるが、DDS 技術によって第2の特性を与えられる。それは、臨床目的に応じた薬物治療の最適化、究極的には、必要な場で、必要な時間、必要な濃度で有効成分が作用するという特性の賦与である。蛋白質性医薬品、核酸医薬品、遺伝子治療薬、分子標的薬などは有効成分において画期的なものであるとともに、DDS 研究による適切な特性の賦与により最も有効に活用される先端的医薬品となるものが多い。また、細胞をベースにした製品のあるものは、適用された生体側とのコミュニケーションにより効能効果を示すという理想的な薬剤を目指すものである。最適な DDS は集学的に統合化して達成されるが、わが国には充実した研究基盤があり、世界をリードできる潜在力がある。

新規遺伝子・蛋白質機能解明や再生医学・細胞治療に有用な細胞の開発と、DDS 研究の推進・統合により、わが国のバイオ創薬が効果的に推進され、国益に適うとともに、平和的で素晴らしい国際貢献にもなることを心から期待したい。



はやかわ たかお  
国立医薬品食品衛生研究所副所長



---

# 医薬品の 安全性

---

国立医薬品食品衛生研究所所長 長尾 拓 編

南山堂

# バイオリジクスの品質と安全性評価

## I. バイオリジクス概論

バイオリジクスとは、起源・製造方法面からみれば、「生物由来の医薬品・医療機器または生物機能を利用して製造した医薬品・医療機器」となる。機能面からみれば、「生体内機能分子としての作用を発現させようとするもの」、「生体内機能分子の作用を促進または制御するもの」、「生体細胞・組織などの再生・修復または代替に資するもの」といえる。物質面からみれば、「ペプチド・タンパク質、核酸、糖質、細胞・組織、あるいは臓器抽出物など」ということになる。古典的なバイオリジクスとしては、組織・臓器や体液等由来のホルモン、酵素、血液凝固因子類のようなペプチド・タンパク質性の医薬品およびそれを利用した医療機器のほかに、ワクチン・抗毒素類、全血製剤や赤血球・血小板製剤があり、また広い意味ではヘパリンやコンドロイチン硫酸のような糖質なども含まれ得る。微生物の生産する抗生物質や抗腫瘍薬なども生物由来の医薬品ととらえることが可能であるが、本章の対象としては取り扱わない。

1980年代以後、生命科学の進歩および遺伝子組換え技術、細胞工学技術、あるいは細胞分離・培養技術、動物育種・繁殖技術、核酸分析・合成技術などのバイオテクノロジーを中心とする先端技術の飛躍的な発展を背景に、遺伝子組換え技術を用いて改変された大腸菌や動物細胞など、および有用物質生産細胞株として選抜あるいは加工された培養細胞によるヒトタンパク質などの恒常的な大量生産が可能となった。その結果、ヒトインスリンやヒト成長ホルモンなど、従来の方法では生体から高純度の医薬品として安定供給できる量を得ることが困難であったホルモン・酵素類が大量に供給されるようになり、さらに、血液を原材料とする限りにおいてはウイルスなどの感染性病原因子の混入が理論上完全には否定し得なかったヒト血液凝固因子類などがバイオテクノロジーを応用して生産できるようになった。また、インターフェロンをはじめとするサイトカイン類、エリスロポエチン、コロニー形成刺激因子などの分化・増

殖・成長因子が臨床の場に提供され、さらに最近では細胞膜上のタンパク質などを標的とした抗体類なども新たに医薬品として開発・実用化されている。また、バイオテクノロジーの応用により元の構造の一部を改変し、例えば生体内での血中半減期の延長や作用特異性の向上など、新たな機能を人為的に付加した改変型ペプチド・タンパク質性医薬品も開発されている。

上記のような細胞基材から生産されるタンパク質性医薬品以外にも、新しいタイプのバイオテクノロジー応用医薬品として、「遺伝子治療用医薬品」、アンチセンスやリボザイムなどの「核酸医薬品」、細胞や組織そのものを医薬品として応用した「細胞・組織利用医薬品」、トランスジェニック動物（人為的に外来遺伝子を導入した動物）やクローン動物（遺伝子レベルでみてまったく同一の動物個体群）またはトランスジェニック植物に生産させたタンパク質や細胞などを有効成分とした「動物工場/植物工場由来医薬品」が注目を浴びている。このうち遺伝子治療用医薬品は、一般にベクター（目的遺伝子の担い手、本来の病原性を消失させてヒト細胞への感染性のみを保持したウイルス由来のものやプラスミドなど）に目的とするタンパク質の遺伝子を組み込み、これをヒトに投与することにより生体内での目的タンパク質の発現を期待するものである。アンチセンス医薬品は、標的とするタンパク質の遺伝子またはmRNAに相補的な配列をもつ核酸を有効成分とし、これをヒトに投与することにより標的タンパク質の発現抑制を期待するものである。またリボザイム医薬品は、特定の配列のRNA鎖を認識して切断するなどの酵素活性をもつRNA分子を有効成分とする医薬品で、アンチセンス医薬品と同様に標的タンパク質の発現抑制を期待するものである。バイオロジクスの分類を表3-1に示す。

表3-1 バイオロジクス（医薬品）の分類

<古典的バイオロジクス>

- 組織・臓器や尿などから抽出したペプチド・タンパク質性医薬品
- 血液製剤（全血製剤、赤血球・血小板製剤、血漿分画製剤）
- ワクチン・抗毒素類

<バイオテクノロジーなどを用いて生産される先端的バイオロジクス>

- 細胞基材より生産されるペプチド・タンパク質性医薬品（遺伝子組換え技術応用医薬品、細胞培養技術応用医薬品）
- 遺伝子治療用医薬品
- 細胞・組織利用医薬品（細胞・組織加工医薬品も含む）
- 動物工場/植物工場由来医薬品（ペプチド・タンパク質性医薬品や細胞・組織利用医薬品）
- 核酸医薬品（アンチセンス、リボザイムなど）

注) この分類はあくまで便宜的なものである。また、上記の区分は必ずしも各々独立しておらず、製品によっては複数の区分にまたがる場合もある。

## II. バイオロジクスの品質・安全性確保

バイオロジクスは有効成分および最終製品の構造、組成、特性、品質、安定性、毒性、薬理および体内動態のあらゆる面において化学合成医薬品とは異なる際立った特徴をもつ。すなわちバイオロジクスは、細胞基材由来ペプチド・タンパク質性医薬品、遺伝子治療用医薬品、細胞・組織利用医薬品などのように医薬品製造用基材や製造方法、そして有効成分の本質や不純物、外来性有害因子の種類や混在の可能性の有無などが異なるいくつかのカテゴリーに分類さ

図3-1 代表的な先端的バイオロジクス（医薬品）の製造方法の概略

