

Table 7 固形製剤あるいは液剤容器施栓系の変更に関わる安定性データ

変更様式	変更の範囲	例	安定性データ パッケージ
容器施栓系の保護機能に影響を与えない変更	ふたの変更	内部のシールは変更されないケースにおいて、幼児が開封できない特性の追加あるいは変更あるいは金属からプラスチックスクリューキャップの変更	タイプ0
	2次包装の変更	カートンの変更	タイプ0
	直接容器及び製剤に相当しないものの除去	除去 挿入物 フィルター	タイプ0 タイプ1
	容器施栓系の形状の変更	(サイズの変更なし)	タイプ0
	容器施栓系のサイズの変更	承認のサイズの範囲内 承認のサイズの範囲外	タイプ0 タイプ2
容器施栓系の保護機能に影響を与えるおそれのある変更	同一系において保護機能を増強するための要素の変更及び追加	a. ヒートインダクション型シールの追加また変更 i 経口固形製剤 ii 経口液状製剤 b. 乾燥剤またはフィルターの追加または変更 c. うわ包装またはカートンの追加	タイプ1 タイプ2 タイプ2 タイプ2
	容器施栓系の製造業者または規定の変更（同じシステム内に限る、びん、ブリスター樹脂、キャップライナー、ラミネート、乾燥剤、フィルターが含まれる）	a. 既承認あるいは公定書記載の容器施栓系同等性プロトコルを以下に用いる場合 i 経口固形製剤 ii 経口液状製剤 b. 既承認あるいは公定書記載の容器施栓系同等性プロトコルを用いない	タイプ1 タイプ1 タイプ2
	異なる容器施栓系への変更	全ての固形あるいは液状製剤	SBI・No SBI タイプ3・4

米国のガイドライン

Guidance for submitting documentation for the stability of human drugs and biologics (February 1987)

D. Supplements to new drug applications

処方、供給業者、容器施栓系の変更

製剤処方、原薬供給業者、容器施栓系に関する変更申請のための追加資料にはこれらの変更が安定性に悪影響を与えないことを示すデータが要求される。

通常既承認製剤との同等性を示す加速試験及び安定性試験を続行する旨の標準的コミットメントで十分である。

比較的不安定であることが知られている製剤における重大な変更に関しては、通常推奨される保存条件及び加速試験条件における6ヶ月のデータが要求される。変更により製剤の安定性が変化すると信じるに足る理由が得られなかった場合には、既承認の保存期間を使用する。

ポリエチレン容器の互換性

USP の基準と試験に合致するポリエチレン容器の互換性に関して：
特に試験は要求されないが、既承認の試験法（あるいはFDAが特定した方法）により安定性試験を実施する旨のコミットメントが必要。

新製造施設

類似の装置を用い、同一の製剤の製造を新施設に変更する場合：

製剤の特性、関与する工程、既得安定性データに依存するが、3ヶ月の加速試験が

要

既承認の安定性試験プロトコールに基づき少なくとも市販開始後最初の3ロットを用いた安定性試験を実施する旨のコミットメントが要。

再加工された物質

再加工された物質の使用に認めるための変更申請資料は再加工された製品が定められた有効期間内で既承認時と同一性、力価、品質、純度が同一であることを示すデータが含まれる必要がある。標準的安定性試験実施のコミットメントが要

新規容器製造業者

素材あるいは規格の変更を行うことなく新規容器製造業者を申請する場合、申請者は既承認容器の完全な規格を有し、新規製容器製造業者に供給すべきである。

新規容器製造業者は製造情報を申請者（あるいはFDA）に提出するべきである。また、製剤製造業者に指定された樹脂や供給業者の変更について直ちに伝達すべきである。

新規容器製造業者による容器で包装された最初の3市販製剤ロットに関して安定性試験を実施するコミットメントが要。このことにより、加速試験や予備的な安定性データは不要であり、既承認の有効期間を用いることができる。

EU ガイドライン

Guidance on stability for application for variations to a marketing authorization 19 May, 2005

目的

変更申請の際に生じる安定性試験の要点を述べること。

適用範囲

原薬及び最終製剤の変更には様々な状況がある。

本ガイドラインはタイプ 1 変更並びに下記の広範なタイプ 2 変更における原薬及び最終製剤に要求される安定性試験に適用される。

- ・ 原薬の製造方法の変更
- ・ 最終製剤の組成の変更
- ・ 最終製剤の一次包装の変更

変更の際の安定性試験の範囲および計画は原薬及び製剤の既知情報及び経験に基づくべきである。下記のような情報の内可能なものを考慮する。

原薬：

- ・ 過酷試験成績を含む安定性プロファイル
- ・ 裏付けデータ
- ・ 加速及び長期保存試験

最終製剤：

- ・ 裏付けデータ
- ・ 加速及び長期保存試験

申請者は変更の際には必ず、当該変更が原薬及び最終製剤の品質特性及び安定性にインパクトを与えるか否かに関し

て調査すること。

安定性データが必要な場合は、本ガイドラインで定められた試験の条件設定は CHMP/ICH Guideline on Stability Testing of New Drug Substances and Products, CHMP/QWP Guideline on Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products 等に準拠する。

適切であれば CHMP/ICH ガイドライン (Note for Guidance on Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of Drug Substances and Drug Products) に記載されているブラケット法及びマトリックス法の適用も可能である。

1. タイプ I 変更

EC 1084/2003 1085/2003 に示されたタイプ I に関する条件を満たし、安定性データを要求される場合、提出すべき最小限の安定性データは、タイプ IA および IB に関する通知に文書要求事項として示されているものである。安定性試験は、加速試験あるいは長期保存試験条件を用い、上記ガイドラインで定められた試験期間を満たすものし、その試験の結果を変更前の原薬または最終製剤の結果と比較し、当該変更が安定性プロファイルに悪影響を与えないことを保証する；即ち、原薬あるいは最終製剤の規格限度値が提案されているリテスト期間あるいは有効期間中適合することを示すべきである。変更前のデータに関しては過去に取得されたデータを用いることができ、必ずしも変更後の製品との組み合わせ

としてデータを収集する必要はない。

2. タイプII変更

EC 1084/2003 1085/2003 はマイナーな変更とはみなされない変更あるいは販売承認事項の拡大に相当する以外の変更をタイプII変更としている。

Annex 1 および 2 に記載されている変更がタイプII変更として取り扱われる。タイプIのリストに記載されている変更であっても、Annex の条件に適合しない場合はタイプIB としては取り扱われず、タイプII変更となる。

2.1 原薬の製造方法の変更

原薬の製造方法の変更の場合、下記の取り扱いが可能である。

原薬の品質特性が安定性を損なう様な方向で変化する場合は変更前後の原薬を用いた比較試験成績が加速試験及び長期保存試験に関して必要である

- ・ 原薬が安定であることが知られている場合はパイロットスケールで1ロットについて3ヶ月の試験成績 (Annex1 の安定な原薬の定義を参照)
- ・ 原薬が不安定であることが知られている場合はパイロットスケールで3ロットについて6ヶ月の試験成績

原薬の品質の変化が最終製剤の安定性の変化に影響を与える場合は、更に製剤の加速試験及び長期保存試験に関して、パイロットスケールで2ロットについて3ヶ月の試験成績が求められる。

2.2 最終製剤の組成の変更

最終製剤の組成変更の場合下記の取り扱

いが可能である。

Conventional release の製剤 (Conventional release な固形製剤あるいは液剤) でかつ原薬が安定な場合、2パイロットスケールロットでの比較試験 (長期保存試験及び加速試験、6ヶ月) が必要である。

危険性の高い製剤 (溶出調節型の製剤) の場合、及び原薬が不安定であることが知られている場合は3パイロットスケールロットでの比較試験 (長期保存試験及び加速試験、6ヶ月) が必要である。

2.3 最終製剤の直接容器の変更

最終製剤の直接容器が変更の場合下記の取り扱いが可能である。

保護機能が低下する容器の場合及び相互作用のリスクがある製剤 (半固形あるいは液状製剤) 3パイロットスケールロットでの比較試験 (長期保存試験及び加速試験、6ヶ月) が必要である

3 コミットメントバッチ

最終製剤の安定性試験を伴う Type1B 変更の場合、コミットメントバッチの適切なフォローアップ試験が必要である

最終製剤の安定性試験を伴うタイプII変更の場合は、少なくとも実製造スケールの最初の製品に関して、上記安定性試験と同一条件かで長期保存試験が必要。安定性試験の結果は求めに応じて示されるとともに、安定性試験結果に問題が認められた場合は規制当局に通告のことである。

D. 結論

欧米においては医薬品の特性及び製造方法等の変更の程度に応じた安定性の事前評価、と事後の安定性評価のコミットメントが求められている。我が国の製法変更に伴い事後安定性評価を実施する方が品質維持に有効と考えられる。

E 健康危険情報

なし

F. 研究業績

1. 論文発表

- 奥田晴宏、承認申請書記載例解説の概要： 考え方、記載事項の設定等、大阪医薬品協会会報、680, 100-123 (2005).
- CTD-Q 申請における品質保証と承認審査の機能(第 6 章)、奥田晴宏、CTD 申請－各分野における留意点と申請時の必需事項－pp.149-160 (株) 情報機構 (2005).

2. 学会発表

- 奥田晴宏：承認申請書記載例解説の概要：考え方、記載項目の設定等、改正薬事法に基づく承認申請書記載に関する説明会（東薬工・大薬協）(2005.6)
- 奥田晴宏：法改正と設計領域、第 4 回医薬品品質フォーラム (2005.7)
- 奥田晴宏：品質保証の新展開－ICH ガイドライン Q8「製剤開発」と薬事法改正、第 15 回固形製剤処方研究会シンポジウム (2005.11)
- 奥田晴宏：品質に関するトピックの動向－Q8－、第 13 回 ICH 即時報告会 (2005.12)
- 奥田晴宏：品質保証の国際動向と改正薬事法の運用、第 5 回医薬品添加剤セミナー (2006.2)
- 奥田晴宏：ICH－Q8（製剤開発）について 東薬工 (2006.3)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

製造方法の変更に伴う生物薬品の品質変化に関する研究
— 生物薬品の承認申請書における軽微届出変更の導入 —

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長

要 旨

昨年度まとめた承認申請書へ記載すべき範囲・事項案をもとに、ICH-Q6B ガイドラインの適用対象である組換え医薬品を例に、申請時における製造方法の記載例を検討した。その際、（１）重要工程、重要中間体に関する製造工程の記載は、原則として一変対象とする、（２）しかし、重要工程、あるいは重要中間体に関する製造工程の変更であっても、製品の品質の一定性を確保する上で合理的といえるようなプロセス・パラメータおよびスケール、仕込量等の変更については、製法変更時の評価が適格になされる条件が整っていれば、軽微変更扱いも可とする、（３）重要工程、重要中間体以外の製造工程の記載においては、軽微変更を活用する、という原則を基本とした。ただし、軽微変更時の評価法の適格性について、現実の審査制度の中でどのように評価するかについての継続的検討が必要であり、現段階ではあくまで研究者の試案である。

A. 研究目的

平成 17 年に施行される改正薬事法により製造方法の管理等が許可から承認事項となり、さらに平成 15 年より施行のコモンテクニカルドキュメント(CTD)様式では製造方法等の管理方法が添付資料として提出されることが義務づけられた。それらに伴い、改正薬事法では承認申請書の記載事項のうち、軽微とされる承認事項の変更は一部変更承認を必要とせず、届出のみでよいとされた。しかしながら、「軽微届出変更」の内容は明確にされていないことから、医薬品の品質・安全性・有効性に影響を与えない製造方法等の軽微届出変更の範囲を明らかにし、承認申請への記載方法を明らかにする必要性が生じた。

本研究は、生物薬品について製造方法等の変更

が品質に及ぼす影響について考察し、「軽微な変更」の範囲を具体的に明らかにすることにより、改正薬事法の施行を円滑にすることを目的として行った。昨年度は、生物薬品の承認申請書へ製造方法について記載すべき範囲・事項について整理するとともに、軽微届出変更の範囲について整理した。今年度は、昨年度の結果をうけて、記載例の作成を目指した検討を行った。

B. 研究方法

バイオテクノロジー応用医薬品を主とした生物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、米国食品医薬品局(FDA)の関連文書、欧州医薬品委員会(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、改正薬事法の施行される中で、生物薬品について承認申請書に記載すべき項目の整理を行うとともに、「軽微届出変更」の導入について考察した。本報告において「軽微届出変更」は「最終製品の品質・有効性・安全性に対して悪影響を及ぼさないことが予想、検証され、変更にあたって規制当局に届出のみで実施することが許される変更」の意味で用いる。

C. 研究結果および考察

1. 記載例の対象

昨年度本研究によって文書化した生物薬品の承認申請書に製造方法として記載すべき範囲・項目を基に、その記載例を作成するにおいては、生物薬品には物質的にも極めて広い範囲の医薬品が含まれる点について考慮する必要がある。例えば、生体から抽出・精製されたタンパク質性医薬品の中には、純度が低い物もあり、不純物を含めると、理化学的特性でさえ、明確にされていないものもある一方、近年のバイオテクノロジー応用医薬品には純度が95%以上のものも少なくない。したがって、それら製品と近年開発が盛んなバイオテクノロジー応用医薬品とを同列にまとめることは不可能と考えられる。そこで、記載例を作成するにあたって想定した医薬品は、生物薬品の新薬の多くが含まれる、ICH-Q6Bの適用対象となるような製品とした。すなわち、タンパク質、ポリペプチド、それらの誘導體、及びそれらを構成成分とする医薬品（例えば、抱合体）であり、タンパク質及びポリペプチドとしては、組換え体細胞又は非組換え体細胞のタンパク質発現系から培養により産生され、高度に精製され、一連の適

切な分析方法により特性解析できるものである。

さらに、2002年7月に公表されたICH-CTD-Qの記載例である「CTD-品質に関する概括資料第2部（モジュール2）原薬／製剤のモックアップ（記載例）」の生物薬品に関する記載例をその原型にして、検討した。この記載例は、「ヒト胎児肝細胞に由来する HS 増殖因子の遺伝子の発現によりチャイニーズハムスター卵母細胞で産生される 354 個、353 個及び 352 個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質：バイオグラスチム」の製造方法である。

資料1がその記載例である。

2. 記載例の補足説明

新薬として生物薬品を承認申請する場合、ICH-CTDガイドラインに示された添付書類を添えて、承認申請書を規制当局に申請することになる。その際、製造方法関係では、製法の記載とともに、プロセス・バリデーション／プロセス評価や製造工程の開発の経緯についても記載が必要である。承認申請書への製造方法の記載内容については、これらの記載によって変わる。また、軽微変更対象と見なせるか否かについては、特にプロセス・バリデーション／プロセス評価の内容と結果によって大きく左右される。また、製造管理の方策全体からすると、工程内管理は製品の「規格及び試験方法」と相互補完的な関係にあり、「規格および試験方法」をも設定しない限り、工程内管理が必要かつ十分にされているかを評価することもできない。したがって、仮定の製品について、承認段階の記載例を作成することは、不可能である。

そこで、資料1は以下の条件のもとに作成した。

1. 資料1は、あくまで申請者が承認申請時に、承認申請書の製造方法として記載が望まれると考えられる例として作成した。
2. 重要工程、重要中間体に関する製造工程の記載は、原則として一変対象とする。

3. しかし、重要工程、あるいは重要中間体に関する製造工程の変更であっても、実際の製造において、製品の品質の一定性を確保する上で合理的といえるようなプロセス・パラメータおよびスケール、仕込量等の変更においては、製法変更時の評価が適格になされる条件が整っていれば、軽微変更扱いも可とする。
4. 重要工程、重要中間体以外の製造工程の記載においては、軽微変更を活用する。
5. ただし、軽微変更対象について個別の判断は、プロセス・バリデーション/プロセス評価の内容および結果、規格および試験方法の内容 によって変わりうる。
6. 注⑩において、「軽微変更として申請する場合は、新たなロットを使用する場合に行う不純物除去能を含めたバリデーションを計画し、これを承認書に添付する必要がある。また、その計画に関する根拠が審査段階で評価される。」としているが、この部分については、審査体制との整合性をとる必要があり、本報告書の段階ではこのような方策がとれるかどうかは不明である。
7. 規制当局および業界の専門家との討議を経て作成されたものではあるものの、すべてにおいて関係者の合意が得られているわけではないこと。したがって現段階では、あくまで報告者の見解である。

D. まとめ

昨年度、改正薬事法の施行に伴い、生物薬品の製造方法に関する承認申請書への記載事項案を作成した。今年度は、記載事項案をもとに、ICH-Q6B の適用対象となるような製品を例として、承認申請書への生物薬品の製造方法の記載例を作成した。

謝辞： 本研究は、医薬品医療機器総合機構生物系審査部のメンバー、および(財)ヒューマンサイエンス振興財団 ICH CTD ワーキンググループのメンバーとの度重なる討論を通じて行われたものであります。本報告の内容に関しての全責任は分担研究者にありますが、本報告書をまとめるにあたって、ご支援、ご協力、アイデア提供をいただいた上記メンバーに、心より感謝申し上げます。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shingo NIIMI, Mizuho HARASHIMNA, Masaru GAMOU, Masashi HYUGA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Expression of Annexin A# in Primary Cultured Parenchymal Rat Hepatocytes and Inhibition of DNA Synthesis by Suppression of Annexin A# Expression Using RNA Interference, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 4242-428 (2005)
- 2) Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Glycobiology.* **15**, 447-462 (2005)
- 3) Hiroshi. Kawai, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Haruna Sakurai, Hisayuki Ohata, Kazuo Honda, Kazutaka Momose, I Namekata, Hikaru Tanaka, Koki Shigenobu, Ryu. Nakamura, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi; Simultaneous real-time detection of initiator- and effector-caspase activation by double FRET analysis. *J. Pharmacol.Sci.* **97**: 361-368 (2005)
- 4) J. Yuan, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: Isotope tag

- method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1067**, 145-152 (2005)
- 5) Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T. and Hayakawa, T: Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells, *J Biochem (Tokyo)*, **137**, 579-586 (2005)
 - 6) 新見伸吾、原島瑞、川西徹、早川堯夫、抗体医薬の現状と展望 医薬品研究 **36**, 163-193 (2005)
 - 7) Takuo Suzuki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Hiroshi Kawai, Tetsu Kobayashi, Youichi Shinozaki, Yoji Sato, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi: Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using GFP derivatives, *Phytomedicine* (in press)
 - 8) Akira Harazono, Nana Kawanishi, Satsuki Itoh, Noritake Hashii, Akiko Ishii-watabe, Toru KAWANISHI, and Takao Hayakawa: Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **348**, 259-268 (2005)
 - 9) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Noritake Hashii, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multiple tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Chromatogr A*, **1094**, 105-117 (2005)
 - 10) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritake Hashii, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes, *J. Chromatogr A*, **1103**, 296-305 (2006)
 - 11) Noritake Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 3315-3321 (2005)
 - 12) Noritake Hashii, Nana Kawasaki Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Glycomic/glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structure alteration in the cells. *Proteomics*, **5**, 4665-4672 (2005)
 - 13) 川西 徹: バイオロジクスのトランスレーショナルリサーチ(1) 日薬理誌 **126**, 427 (2005)
 - 14) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Noritake HASHII, Yukari MATSUISHI, Takao HAYAKAWA, and Toru KAWANISHI: Mass spectrometry of glycoprotein, Trends in Glyco sci. Glycotech. 2005, in press
 - 15) 川崎ナナ、橋井則貴、伊藤さつき、原園 景、川西 徹: LC/MS を用いたグライコーム解析、臨床化学, **34**, 309-318 (2005)
 - 16) 川西 徹: バイオロジクスのトランスレーショナルリサーチ(2) 日薬理誌 **127** (in press)
 - 17) Kawanishi, T., Regulatory perspectives from Japan - Comparability of biopharmaceuticals, *Biologicals*, **34**, 65-68 (2006)

2. 学会発表

- 1) 川西 徹: バイオ医薬品の開発動向およびその品質評価の課題、薬剤学懇談会 (2005年9月29日)

資料 1

製造方法

1. 細胞基材

1) 調製方法

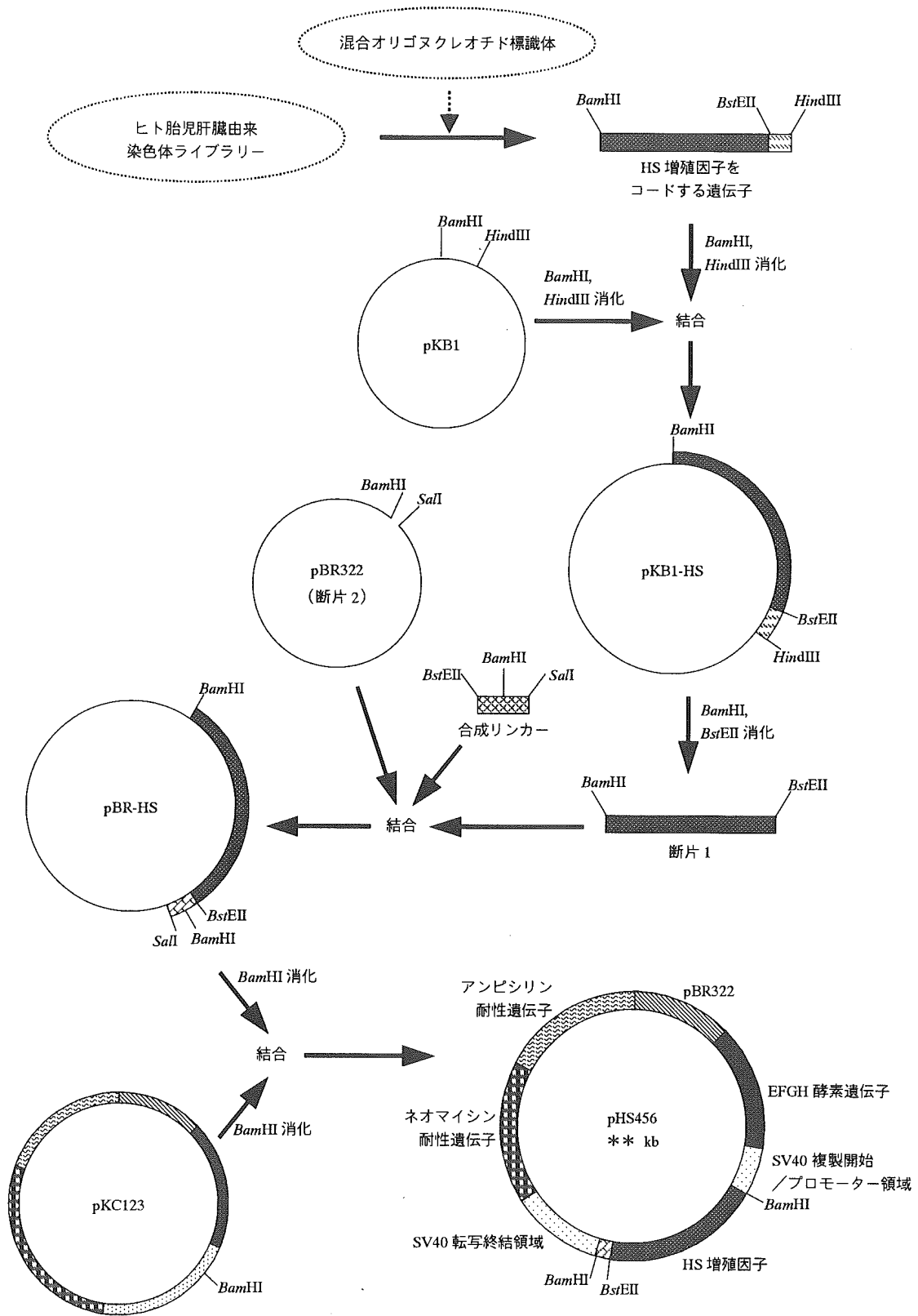
(1) 遺伝子発現構成体

注① :本項は、遺伝子の入手方法や作製の歴史を記載するものであり、記載した内容を再度繰返して実施することを必ずしも想定していない。原則として過去の経緯を記述する。なお、本項は適宜、図表を用いること。本例示では、目的構造遺伝子の入手から遺伝子発現構成体の作製までをまとめて記載したが、項目を分けて示すことも考えられ、医薬品毎に申請者が検討することが望まれる。

(改定案)

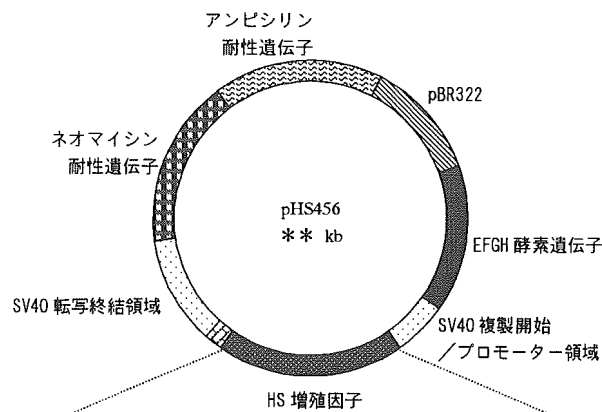
ヒト胎児肝臓由来の染色体ライブラリーから得られた HS 増殖因子をコードする遺伝子 (*Bam*HI~*Hind*III) を、*Bam*HI 及び *Hind*III で切断した pKB1 に接続し、pKB1-HS を作製する。次に pKB1-HS を制限酵素 *Bam*HI、*Bst*EII で切断し、HS 増殖因子をコードする遺伝子を含む DNA 断片 (断片 1) を得る。この断片 1 と、制限酵素 *Sal*I 及び *Bam*HI で切断した pBR322 DNA 断片 (断片 2) とを結合するために、*Sal*I、*Bam*HI 及び *Bst*EII 制限酵素切断部位配列からなる合成リンカー (*Sal*I-*Bam*HI-*Bst*EII) を作製し、*Bst*EII 末端で断片 1 と、*Sal*I 末端で断片 2 とそれぞれ結合させる。更に、断片 1 と断片 2 を *Bam*HI 末端で結合し、ベクター pBR-HS を作製する。この pBR-HS を *Bam*HI で切断して得られた HS 増殖因子をコードする遺伝子を含む DNA 断片を、pBR322 遺伝子断片、EFGH 酵素遺伝子、SV40 DNA の複製開始点とプロモーター領域及び転写終結領域並びに選択マーカ領域 (ネオマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子) から構成されるベクター pKC123 の *Bam*HI 部位に挿入し、遺伝子発現構成体 pHS456 を作製する。

遺伝子発現構成体作製のフロー



注②：本項では，DNA 塩基配列として第 2 部記載例に相関させ，遺伝子発現構成体の作製経緯より，シグナルペプチド領域や活性化ペプチド領域も含めて示してある。

遺伝子発現構成体の構造



<HS 増殖因子をコードする遺伝子の DNA 塩基配列>

ATG CTT TAT ATT
シグナルペプチド領域 ←

CTT GTT GCA TTC ATT GTT TCT GGT TTC CTT GCA ATT TTC GAT GGT TAT GGT CTT CCA GCA TTC GGT GCA
 TCT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT AAT GAG TCT
 GGT GCA GCA TCT GCA CTT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT
 TTC GGT AAT GCA CTT GGT CTT GGT AAG CAC AAT TAT GGT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT
 GCA CAC GTT CTT AAG AAT CGA CGA CTT ACC GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT
 TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT CAG TTC GAT ATT AAG GGT GGT CTT TTC GCA GAG GGT AAT TCT GAT GCA
 TAT TTC GGT AAT ATT TTC GCA AAG CAC CGA CGA TCT CCA GGT GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT
 AAT GAG GGT AAT TCT GAT GGT TAT TTC GGT AAT GCA TTC CAG GAG CGA TTC CCA CCA CAC CAC GAG GGT
 AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GTT GTT CCA GGT GAG GAG GAG CAG AAG TTC GAG GGT AAT TCT GAT
 GCA TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT GGT TAT TTC GGT AAT GCA CTT CTT CAG CTT AAG TCT GAT
 TCT TCT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT ACC GTT TGC CTT CCA CCA GCA GAT CTT CAG GAG
 GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT TTC TAT TCT GAG
 CGA CTT AAG GAG GCA CAC GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT TCT CAG CAC CTT CTT AAT CGA
 ACC GTT ACC GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT AAT
 GCA GCA CAG GGT GAT TCT GGT GGT CCA CTT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GTT GGT ATT
 ATT TCT TGG GGT CTT GGT GCA GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT GGT
 TAT TTC GGT AAT GAT AAT ATG CGA CCA GAT CAC GCA TCT ACC CCA GGT TAT CTT GGT TTC GTT GAG TCT
 GAG ACC CTT CAG GTT CCA CGA GAT ACC CTT GGT GCA CAG ATT GCA ACC CCA GCA TAT AAG GGT AGA
 活性化ペプチド領域 ▶

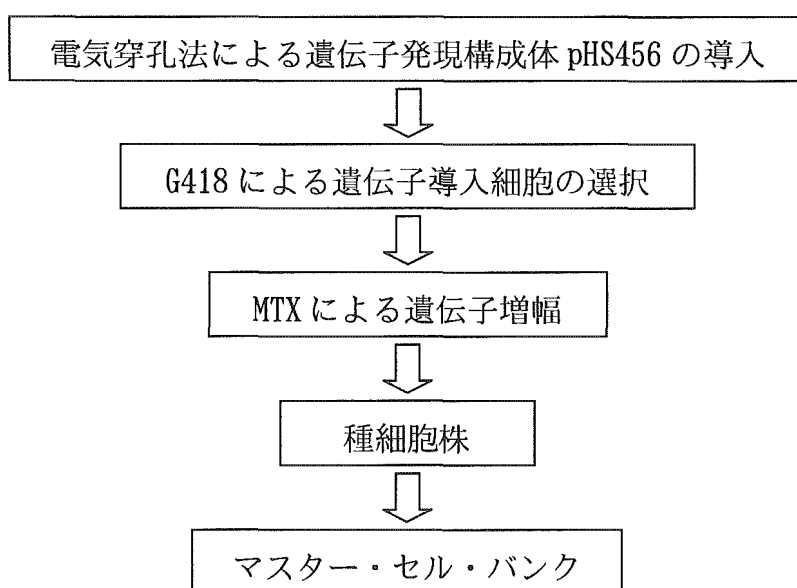
(2) マスター・セル・バンクの調製

注③：本項では、原則として宿主と遺伝子発現構成体を用いて実施されたマスター・セル・バンク調製の過去の経緯を出来るだけ詳細に記述する。
作製にあたって特殊な方法を用いる場合には、その方法に関しても記載すること。

チャイニーズハムスター卵巣切片由来の細胞株(CHO-X1)に ABCD 要求性を付与し、EFGH 酵素を欠失させた細胞株に、電気穿孔法等の適切な方法により遺伝子発現構成体 pHS456 を導入する。その後、G418 を含む培地を用いて培養して遺伝子導入細胞を選択する。次に、メトトレキサート (MTX) を含む培地を用いて遺伝子増幅後、クローニングし、種細胞株とする。

この種細胞株をウシ胎児血清を含む培地にて培養の後、ジメチルスルフォキシドを含む凍結用培地に分散させ、分注し、 -150°C 以下で保存する。

マスター・セル・バンク調製のフローチャート



(3) ワーキング・セル・バンクの調製

マスター・セル・バンクを《5%》のウシ胎児血清を含む DMEM 培地を用いて《37°C》で、『3L』まで培養した後、『10%』のジメチルスルフォキシドを含む凍結用培地に分散させ、『200本』のワーキング・セル・バンクを分注調製し、 -150°C 以下で保存する。

2) 管理方法

マスター・セル・バンク及びワーキング・セル・バンクは、次に示す試験を実施し、各々の基準に適合することを確認する。

(1) マスター・セル・バンクの試験

①特性解析試験

試験項目	試験方法	基準
DNA コピー数	〇〇法にて、挿入された DNA コピー数を測定する。	細胞あたり約〇〇コピーの挿入が確認される。
挿入 DNA パターンの解析	サザンブロット法にて、ゲノム DNA の制限酵素 (<i>Bam</i> HI, <i>Bst</i> II) 消化パターンを解析する。	HS 増殖因子遺伝子が〇〇のように挿入されている様子が確認される。
DNA 塩基配列	核酸増幅物について、HS 増殖因子遺伝子の DNA 塩基配列を解析する。	期待される HS 増殖因子遺伝子の DNA 塩基配列と一致する。
発現たん白質の解析	ウエスタンブロット法にて、培養液中の発現たん白質について解析する。	HS 増殖因子が発現していることが確認される。
アイソザイム解析	4 種類の酵素 (A, B, C, D) のアイソザイムパターンを評価する。	CHO 細胞のパターンと一致する。
ABCD 要求性	ABCD を含まない培地中での細胞の生育状況を調べる。	生育に ABCD を要求する。

②純度試験

試験項目	試験方法	基準	
異種微生物混入	無菌試験法（日本薬局方）に従って実施する。	陰性	
マイコプラズマ	マイコプラズマ否定試験法（日本薬局方 参考情報）に従って実施する。	陰性	
ウイルス試験	感染性試験	感受性細胞を用いて、レトロウイルスの感染性について調べる。	感染性は認められない。
	電子顕微鏡観察	電子顕微鏡によりレトロウイルス及びレトロウイルス様粒子の存在について調べる。	CHO 細胞で存在の知られたレトロウイルス様粒子以外のウイルス及びウイルス様粒子は検出されない。
	逆転写酵素活性	逆転写酵素の活性について調べる。	逆転写酵素活性は認められない。
	<i>In vitro</i> 試験	指示細胞（MRC-5, VERO, CHO）に接種し、それぞれ細胞変性及び血球凝集について観察する。	ウイルス混入を示す結果は認められない。
	<i>In vivo</i> 試験	動物（成熟マウス、乳のみマウス）及び発育鶏卵に接種し、それぞれ健康状態を観察する。	ウイルス混入を示す結果は認められない。
抗体産生試験	ウイルスフリーのハムスターに接種し飼育後、血清中のウイルス（LCM, PVM, Reo3, Sendai Virus, SV5）に対する抗体産生の有無を調べる。	ウイルス混入を示す結果は認められない。	

(2) マスター・セル・バンクの更新

マスターセルバンクは、種細胞株又はマスター・セル・バンクから、1)-(2)に従い調製し、2)-(1)の試験を実施して、基準に適合すること。

(3) ワーキング・セル・バンクの試験

①特性解析試験

試験項目	試験方法	基準
ABCD 要求性	ABCD を含まない培地中での細胞の生育状況を調べる。	生育に ABCD を要求する。
発現たん白質の解析	ウエスタンブロット法にて、培養液中の発現たん白質について解析する。	HS 増殖因子が発現していることが確認される。

②純度試験

試験項目	試験方法	基準	
異種微生物混入	無菌試験法（日本薬局方）に従って実施する。	陰性	
マイコプラズマ	マイコプラズマ否定試験法（日本薬局方 参考情報）に従って実施する。	陰性	
ウイルス試験	<i>In vitro</i> 試験	指示細胞（CHO）に接種し、細胞変性及び血球凝集について観察する。	ウイルス混入を示す結果は認められない。
	<i>In vivo</i> 試験	動物（成熟マウス）に接種し、健康状態を観察する。	ウイルス混入を示す結果は認められない。

(4) ワーキング・セル・バンクの更新

ワーキング・セル・バンクは、マスター・セル・バンクから、1)-(3)に従い調製し、下記の試験を実施して、基準に適合すること。

①特性解析試験

試験項目	試験方法	基準
ABCD 要求性	ABCD を含まない培地中での細胞の生育状況を調べる。	生育に ABCD を要求する。
発現たん白質の解析	ウエスタンブロット法にて、培養液中の発現たん白質について解析する。	HS 増殖因子が発現していることが確認される。

②純度試験

試験項目	試験方法	基準	
異種微生物混入	無菌試験法（日本薬局方）に従って実施する。	陰性	
マイコプラズマ	マイコプラズマ否定試験法（日本薬局方 参考情報）に従って実施する。	陰性	
ウイルス試験	<i>In vitro</i> 試験	指示細胞（CHO）に接種し、細胞変性及び血球凝集について観察する。	ウイルス混入を示す結果は認められない。
	<i>In vivo</i> 試験	動物（成熟マウス）に接種し、健康状態を観察する。	ウイルス混入を示す結果は認められない。

(5) 保存中の安定性

マスター・セル・バンク及びワーキング・セル・バンクは、解凍時及び少なくとも 10 年に 1 回の頻度で生存率を測定する。

2. 製造方法

1) 細胞培養

ワーキング・セル・バンクのバイアルを融解し、ウシ血清培地（培地1）を用いて1Lまでの培養を行い^{注④}、次いで無血清培地（培地2）を用い $\ll 37^{\circ}\text{C} \gg$ で培養をした後、『50L以上』の無血清培地（培地2）で培養装置（“容量0.15m³”）を用いて $\ll 37^{\circ}\text{C} \gg$ で種培養を行う。

注④種培養工程は通常重要工程ではないので、容量は軽微変更として設定できるが、ウシ血清の残留を規定する必要があるような場合は一変記載になる。ここでは血清培地の使用容量に関する記載なので一変記載とした。

種培養液を『1200L』^{注⑤}の無血清培地（培地2）を有する連続培養装置（容量1.5m³）に播種し $\ll 37^{\circ}\text{C} \gg$ で培養する。総細胞濃度 $\ll 10 \times 10^5$ 細胞/mL以上 \gg になった時点で、培養液約『1000L』を抜き取る。生産培地（培地3）を同量添加し $\ll 37^{\circ}\text{C} \gg$ で培養を継続する。

この培地交換の操作を必要量に応じて、“3～9回”^{注⑥}繰り返す行う。

本工程終了時の最大細胞倍加数は26以下とする。

最終ハーベスト生産培養液について、別紙（2）規格及び試験方法 工程内規格試験 マイコプラズマ否定試験を行う。

“また、工程内管理（生菌数試験、生存率試験）を実施する。”^{注⑦}

“生菌数試験：日局 微生物限度試験法生菌数試験：処置基準値 100cfu/mL 未滿”

注⑤培養容器の容量が一変記載であることから、標準仕込み量の大幅な変更はないとみなせる。また、製造実績により培養容量の変更は軽微変更としてよい場合があるので、軽微変更とした。

注⑥PDLを超えてハーベストする場合は、一変対応となる。本例示は、ロットスケールから設定されたPDL内のハーベスト回数であり、その変更手続きにおいては、変更理由、追加の品質検査（例えば比活性や純度）を届出時に提出する必要がある。

注⑦この工程内管理試験は、社内工程内管理試験として位置づけられる場合もあるが、重要度が高いと考えられるため、軽微変更可の工程内管理試験として記載した。

培養工程で得られた生産培養液を“連続遠心機”^{注⑧}を用い培養上清を分離し，“限外ろ過膜（『分画分子量 30,000 以下』^{注⑨}）”を用いて濃縮する。使用時まで、 $\ll 5^{\circ}\text{C} \gg$ で保存する。保存期限 3 ヶ月。

注⑧ 本例示では，細胞と培養上清の分離を目的としており，同様な目的の他の方法（例えば，膜分離等）への変更の場合は，軽微変更扱いが可と考えられる。一方，本操作に精製等の目的が含まれる場合には，一変対象として記載すべきである。

注⑨ 本例示の工程の目的は，培養上清の濃縮のみであり，他の目的（例えば，ウイルス除去，分画等）を有する場合は一変対象となる。

2) 精製

得られた濃縮液『90L』に AB プロテアーゼを $\ll 0.1\text{mg/mL} \gg$ になるように添加し， $\ll \text{pH} 9.0 \sim 10.0 \gg$ ，反応温度 $\ll 37^{\circ}\text{C} \gg$ で $\ll 24 \text{ 時間} \gg$ 反応させ，活性型に変換する。
注⑩

この反応液を $\ll 50^{\circ}\text{C} \gg$ で $\ll 6 \text{ 時間} \gg$ 加温しウイルス不活化を行う。

注⑩ このような活性化操作において，後段の精製工程に影響を及ぼす不純物等の大幅な生成がみられる場合は，本工程でその含量を規定する必要がある。

“ウイルス不活化液をプレカラム（QAE 系アクリル系樹脂）に通液する。^{注⑪}”

これを『4L』^{注⑫}のイムノアフィニティクロマトカラム“基材：アクリル系樹脂”に展開し，非吸着たん白質を洗浄除去後，『0.5mol/L』^{注⑬}の塩化ナトリウムを含む $\ll 0.01\text{mol/L} \gg$ リン酸緩衝液（ $\ll \text{pH} 7.0 \gg$ ）で溶出する。

溶出液について別紙（2）規格及び試験方法 工程内管理試験（宿主細胞由来たん白質（ELISA））を実施する。

工程内管理試験：宿主細胞由来たん白質（ELISA）：10ppm 以下

注⑪ 本例示は，後段の精製工程のカラム保護のための前処理であり，精製を目的としていない。そのため，軽微変更可能として記載した。一方，精製能がある場合は重要な工程となるので，一変対象とすべきである。

注⑫ 通常スケールの情報として記載することから，軽微な変更記載と