



想定されるケースは、

①遺伝子組換え微生物を含有する医薬品をヒトまたは動物に投与する場合(治験を含む)

②医薬品等の製造工程で使用する遺伝子組換え動植物を開放系で飼育/栽培する場合の二つであると思われる(表1参照)。特に①については、医薬品等の国際的な開発状況を考慮すると、現時点で具体的に想定されるものとして、ウイルスなどに由来する遺伝子組換え微生物を含有する遺伝子治療用医薬品、および遺伝子組換え生ワクチンの2種が挙げられるであろう。

LMOの第一種使用等を行おうとする際には、使用等の開始に先立ち、LMOの種類ごとに主務大臣に対して生物多様性影響評価書を添付して第一種使用規程承認申請を行い、承認を得ておかなければならない。また、日本にLMOを輸入して第一種使用等を行おうとする場合には、

①国内で実際に第一種使用等を行う予定の者が第一種使用規程承認申請を行うことが必要

②輸出元が直接、第一種使用規程承認申請を行うことが可能

である。この場合に輸出元は、日本において当該LMOの適正な使用等のために必要な措置を執らせるための国内管理人を選定しておく必要がある。なお、すでに承認されている第一種使用規程(承認後、官報に告示されるとともに日本版バイオセーフティクリアリングハウス(J-BCH)のホームページ(<http://www.bch.biodic.go.jp>)に掲載される)に従って当該LMOの第一種使用等を行おうとする場合には改めて第一種使用規程承認申請を行う必要はない¹⁾。

第一種使用規程承認申請書の様式および記入方法は、法律施行規則⁴⁾で定められているとおりであり、申請者の氏名および住所、用いるLMOの種類、名称並びに当該LMOの使用等の内容および方法を記入する。また、申請者が申請前に実施する当該LMOの生物多様性影響評価は、「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第三条の規定に基づく基本的事項」¹⁸⁾に示された留意事項(表7)に留意しながら、具体的には「遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領」¹⁹⁾に従って実施し(表8)、その結果を生物多様性影響評価書に記入する。なお、産業上の使用等には該当しないが、法の適用対象となる遺伝子治療薬を用いてヒトで遺伝子治療臨床研究(治験ではないもの)を行う際にも、厚生労働大臣および環境大臣への第一種使用規程承認申請が必要となる。その際の生物多様性影響評価書の様式および記入方法が厚生労働省から示されている²⁰⁾。



第4章 安全性評価の国内規制と技術

表6 ヒト用医薬品等の製造に関して、遺伝子組換え微生物の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置¹³⁾(1)

①通知¹³⁾の概略

第1章 総則	第1 目的	ヒト用の医薬品等を製造する場合の拡散防止措置及び運営上の遵守事項等について定め、遺伝子組換え微生物の拡散防止を的確に実施することを目的とする。
	第2 製造に当たって執る拡散防止措置(下表②参照)	
第2章 拡散防止措置 (下表③参照)	第1 GILSPの施設及び設備等	1. 製造 (1)施設及び設備、(2)設備管理、(3)汚染の防止 2. 保管 3. 運搬
	第2 カテゴリー1の施設及び設備等	1. 製造 (1)施設及び設備、(2)設備管理、(3)汚染の防止 2. 保管 3. 運搬
	第3 カテゴリー2及び3の施設及び設備等	1. 製造 (1)施設及び設備、(2)設備管理、(3)汚染の防止 2. 保管 3. 運搬
第3章 組織並びに運営上の遵守事項	第1 製造業者	医薬品等の製造工程において遺伝子組換え微生物を使用等する者(製造業者)の任務：(1)製造所ごとに製造管理者(医療機器、医薬部外品又は化粧品の場合には、責任技術者)及び製造安全主任者を任命すること。(2)製造上の安全性を確保するため製造業者ごとに製造安全委員会を設置し、その委員を任命すること。また、製造安全委員会に製造業務の安全確保について調査審議を求めること。(3)製造管理者が業務を遂行するに当たって支障を生じることがないようにすること。
	第2 製造管理者又は責任技術者	製造管理者又は責任技術者は、法 ¹⁾ 、省令 ²⁾ 及び本通知を熟知していること。 任務：(1)製造計画の立案及びその実施に際し、法 ¹⁾ 、省令 ²⁾ 及び本通知を十分に遵守し、製造安全主任者との緊密な連絡の下に製造作業全体の適切な管理・監督に当たること。(2)製造従事者に対して教育訓練を行うこと。(3)製造安全委員会と十分連絡を取るとともに、必要な事項について製造安全委員会に報告すること。(4)その他製造上の安全性の確保に必要な事項を実施すること。
	第3 製造安全主任者	製造安全主任者は、遺伝子組換え微生物の使用等に関し、製造管理者又は責任技術者を補佐するものであり、製造上の安全性を確保するための知識及び技術に高度に習熟した者であること。法 ¹⁾ 、省令 ²⁾ 及び本通知を熟知していること。 任務：(1)製造が法 ¹⁾ 、省令 ²⁾ 及び本通知に従って適正に遂行されていることを確認すること。(2)製造管理者又は責任技術者に対し助言、報告を行うこと。(3)その他製造上の安全性の確保に関し、必要な事項の処理に当たること。
	第4 製造従事者	製造従事者は、製造管理者又は責任技術者の行う教育訓練をあらかじめ受けた者であること。 遵守すべき事項：(1)製造作業を行うに当たって製造上の安全確保について十分に自覚し必要な配慮をすること。(2)作業区域内では、作業レベルに応じた作業衣を着用すること。
	第5 製造安全委員会	製造安全委員会は、高度に専門的な知識及び技術並びに広い視野に立った判断が要求されることを十分に考慮し、適切な分野の者により構成されること。 製造安全委員会が、製造業者の求めに応じて調査審議し、製造業者に報告する事項：(1)製造作業標準の法 ¹⁾ 、省令 ²⁾ 及び本通知に対する適合性。(2)製造従事者に対する安全訓練教育及び健康管理の状況。(3)事故発生の際の必要な処置及び改善策。(4)その他製造上の安全性の確保



第3章 組織並びに運営上の遵守事項		に関する必要な事項。 製造安全委員会は、必要に応じて製造管理者又は責任技術者あるいは製造安全主任者から報告を求めることができる。
	第6 教育訓練	製造管理者又は責任技術者は、製造作業の開始前に製造従事者に対し、法 ¹⁾ 、省令 ⁶⁾ 及び本通知を熟知させること。 教育訓練を行うべき事項：(1) 遺伝子組換え微生物の安全性に関する知識。(2) 製造に用いる遺伝子組換え微生物の安全な取扱いに関する技術。(3) 設備・装置に関する知識及び技術。(4) 製造工程の安全性に関する知識。(5) 事故発生時の措置に関する知識。
	第7 健康管理	(1) 製造業者は、製造従事者に対し、定期健康診断を行うとともに、医薬品等を取り扱うのに不適当な者を製造作業に従事させないこと。(2) 製造業者は、製造従事者がカテゴリ2及び3の製造作業に従事する場合は、あらかじめ予防及び治療の方策について検討しておくこと。(3) 製造業者は、カテゴリ2及び3の製造作業において作業区域内感染のおそれがある場合は、直ちに製造従事者に対し健康診断を行い、適切な措置を執ること。なお、カテゴリ3の製造従事者については、製造従事前に血清をあらかじめ採取し、当該製造従事者が製造に従事することを終了日から2年間はこれを保存すること。
	第8 記録及びその保存	製造管理者又は責任技術者が、帳簿を備え、記載すべき事項：(1) 遺伝子組換え微生物の名称及びその容器に付された番号。(2) 遺伝子組換え微生物の保管及び継代の状況。(3) 遺伝子組換え微生物の生物学的性状及びその試験検査の年月日。(4) 遺伝子組換え微生物の譲受けの相手方の氏名及び住所。(5) 製造従事者の氏名、所属機関、職名、製造業務に従事している期間(カテゴリ1～3の場合にかぎる)。(6) 健康診断の結果。(7) 製造安全委員会の審議記録(製造作業標準が法 ¹⁾ 、省令 ⁶⁾ 及び本通知に適合していることを確認する根拠となった資料を含む)。(8) 設備・装置の定期点検記録及び製造記録。 この帳簿は、当該医薬品等の製造終了の日から5年間保存すること。
	第9 報告	製造業者は、製造に用いる遺伝子組換え微生物に関する情報を収集するとともに、当該遺伝子組換え微生物の評価に影響を及ぼす知見を発見した場合には、速やかに厚生労働大臣に報告すること。

②使用区分を選定する際の遺伝子組換え微生物の性質などの基準

使用区分	基準
GILSP*	宿主、供与核酸及びベクター並びに遺伝子組換え微生物が以下の基準を満たすもの (1) 宿主 ・病原性がないこと ・病原性に関係のあるウイルス及びプラスミドを含まないこと ・安全に長期間利用した歴史がある、又は特殊な培養条件下では増殖するがそれ以外では増殖が制限されていること (2) 供与核酸及びベクター ・性質が十分に明らかにされており、有害と認められる塩基配列を含まないこと ・伝達性に乏しく、かつ本来耐性を獲得することが知られていない生細胞に耐性マーカーを伝達しないこと (3) 遺伝子組換え微生物 ・病原性がないこと ・宿主と比べて増殖する能力が高くないこと
カテゴリ1	遺伝子組換え微生物が病原性がある可能性が低く、かつGILSPに含まれないもの
カテゴリ2	遺伝子組換え微生物がヒトに感染性はあるが発症の可能性は少なく、予防対策及び有効な治療法があるもの
カテゴリ3	遺伝子組換え微生物がヒトに対し病原性があり、取り扱う際にかんがりの注意を必要とするが、感染・発症してもその危険度は比較的 low、予防対策及び有効な治療法があるもの

* 優良工業製造規範(Good Industrial Large-Scale Practice)の略。「GILSP遺伝子組換え微生物」は省令⁶⁾において「特殊な培養条件下以外では増殖が制限されること、病原性がないこと等のため最小限の拡散防止措置を執ることにより使用等を行うことができるものとして財務大臣、厚生労働大臣、農林水産大臣、経済産業大臣又は環境大臣が定めるもの」と定義されている。



表6 ヒト用医薬品等の製造に関して、遺伝子組換え微生物の第二種使用等のうち産業上の使用等にあって執るべき拡散防止措置¹³⁾(2)

③各使用区分における拡散防止措置

	GILSP	カテゴリー 1	カテゴリー 2 及び 3
製 造	施設 及 び 設 備	<p>GILSPにおける措置に加えて</p> <p>(1)その外の大気、水又は土壌と遺伝子組換え微生物とを物理的に分離する施設等であること</p> <p>(2)作業区域内に、製造従事者が使用する洗浄又は消毒のための設備が設けられていること</p> <p>(3)必要に応じ、作業区域内に設置された室内における空気中の遺伝子組換え微生物の数を最小限にとどめるための換気設備(遺伝子組換え微生物を捕捉できるものにかぎる)が設けられていること</p>	<p>カテゴリー 1 における措置に加えて</p> <p>(1)作業区域内を清潔に保ち、げっ歯類、昆虫類等を防除すること</p> <p>(2)別表に掲げる措置</p>
	製 造	<p>GILSPにおける措置と同</p>	<p>カテゴリー 1 における措置に加えて</p> <p>(1)製造作業中、培養又は発酵の用に供する設備及び当該設備に直接接続された設備の機能を適切な方法により確認すること</p> <p>(2)製造に用いられる設備・装置には一連の識別番号を付し、厳重な管理の下に置くこと</p>
	設 備 管 理	<p>(1)作業終了後、使用した設備・装置を十分に洗浄し、又はそれに付着した遺伝子組換え微生物を不活化すること</p> <p>(2)設置時及び定期的に、培養又は発酵の用に供する設備及び当該設備に直接接続された設備並びに除菌装置の密閉の程度又は性能の検査を行うこと</p> <p>(3)設備・装置の機能に係る部分の改造又は交換を行った場合は、その都度、当該設備・装置の密閉の程度又は性能の検査を行うこと</p> <p>(4)除菌装置については、交換時、定期検査時及び製造業務内容の変更時に、付着した遺伝子組換え微生物を不活化すること</p>	<p>GILSPにおける措置(1)及び(3)に加えて</p> <p>(1)廃液又は廃棄物は不活化すること</p> <p>(2)製造従事者は専用の作業を着用すること</p> <p>(3)遺伝子組換え微生物を培養又は発酵の用に供する設備に入れ、又はこれから取り出す場合に、遺伝子組換え微生物が施設等から漏出しないよう注意すること</p> <p>(3)遺伝子組換え微生物を含む培養液の大量流出に対する対策及び緊急時の作業手順を確立しておくこと</p>
汚 染 の 防 止	<p>(1)作業区域(遺伝子組換え微生物を使用等する区域であって、それ以外の区域と明確に区別できるもの)が設けられていること*</p> <p>(2)作業区域内に、遺伝子組換え微生物を利用して医薬品等を製造するための培養又は発酵の用に供するよく整備された装置が設けられていること*</p> <p>(3)作業区域内に、製造又は試験検査に使用する器具器械、容器等を洗浄し、又はそれらに付着した遺伝子組換え微生物を不活化するための設備が設けられていること*</p> <p>(4)遺伝子組換え微生物の生物学的性状について試験検査をするための設備が設けられていること*</p> <p>(5)遺伝子組換え微生物を他のものと区別して保管できる設備が設けられていること*</p> <p>(6)培地等を調製するための設備が設けられていること</p> <p>(7)製造従事者の更衣設備が設けられていること</p> <p>(8)作業区域内を清潔に保ち、げっ歯類、昆虫類等の駆除に努めること</p> <p>(9)作業区域及び遺伝子組換え微生物の保管設備には、その見やすいところに、遺伝子組換え微生物の作業レベルに関する必要な事項(例:「GILSP取扱い中」)を表示すること</p> <p>(10)教育訓練を受けた製造従事者以外の者の作業区域への立ち入りを作業レベルに応じ制限することとし、仮に立ち入る場合は、製造従事者の指示に従わせること</p>	<p>GILSPにおける措置(1)及び(3)に加えて</p> <p>(1)廃液又は廃棄物は不活化すること</p> <p>(2)製造従事者は専用の作業を着用すること</p> <p>(3)遺伝子組換え微生物を培養又は発酵の用に供する設備に入れ、又はこれから取り出す場合に、遺伝子組換え微生物が施設等から漏出しないよう注意すること</p> <p>(3)遺伝子組換え微生物を含む培養液の大量流出に対する対策及び緊急時の作業手順を確立しておくこと</p>	<p>カテゴリー 1 における措置(3)までに加えて</p> <p>(1)目的の物質を分離する場合であって、その物質がたん白質等のように失活しやすいものであるときは、培養液の取扱いは、その漏出を防止</p>



製造	汚染の防止		施設等から漏出しないよう取り扱うとともに、培養設備等の外面に遺伝子組換え微生物が付着した場合は直ちに不活化すること(GILSP(2)参照) (4)目的の物質を分離する場合であって、その物質がたん白質等のように失活しやすいものであるときは、培養液の取扱いは、遺伝子組換え微生物の漏出を最小限にして作業を行うことで差し支えないこと (5)設備・装置からのエアロゾルの漏出を最小限にするよう注意すること	して作業を行うことで差し支えないこと (カテゴリー1(4)参照) (2)設備・装置からのエアロゾルの漏出を防止すること(カテゴリー1(5)参照)
保管		(1) 遺伝子組換え微生物が漏出しない構造の容器に入れ、かつ当該容器の見やすい個所に遺伝子組換え微生物である旨を表示すること (2) (1)の遺伝子組換え微生物を入れた容器は、遺伝子組換え微生物以外の生物と明確に区別して保管することとし、遺伝子組換え微生物を保管している旨を当該保管設備の見やすい個所に作業レベルに応じて表示(例:「GILSP 遺伝子組換え微生物保管中」)すること (3) 製造管理者又は責任技術者は、遺伝子組換え微生物を含む保管物の明細目録を作成し、保存すること	GILSPにおける措置と同	カテゴリー1における措置に加えて (1) 作業区域内の保管設備に安全に保管すること
運搬		(1) 遺伝子組換え微生物を含む材料を作業区域外へ運搬する場合には、遺伝子組換え微生物が漏出しない構造の容器等に入れること* (2) 遺伝子組換え微生物を含む材料を入れた容器等(容器を包装する場合にあっては、当該包装)の見やすい個所に取り扱いに注意する旨を表示すること	GILSPにおける措置と同	カテゴリー1における措置に加えて (1) 遺伝子組換え微生物を含む材料を作業区域外へ運搬する場合には、容器が万一破損しても内容物が外部に漏出しないようにすること

*省令⁹⁹で定められているGILSP遺伝子組換え微生物についての拡散防止措置の内容と共通する、若しくはその内容を含むもの。

7.6 立入検査等・LMOの輸出入

法の施行に伴い、第一種使用等、第二種使用等の別を問わずLMOの使用等をしている者または過去にした者、LMOを譲渡または提供した者、国内管理人、LMOを輸出した者、その他の関係者に対して、国の機関または国の指定した独立行政法人が、立入検査を行ったり、検査に必要な量のLMOを無償で収去することができることが、新たに法律のレベルで明確に規定された¹⁾。

また、LMOを輸出する際に必要な措置(相手国への通告など)が法で定められているが、LMOを含有するヒト用医薬品の場合、それらは適用除外とされている¹⁾。



表6 ヒト用医薬品等の製造に関して、遺伝子組換え微生物の第二種使用等のうち産業上の使用等にあって執るべき拡散防止措置¹³⁾ (3)

<別表> (カテゴリー 2 及び 3 における製造「施設及び設備」に関する拡散防止措置)

	カテゴリー 2	カテゴリー 3
(1) 遺伝子組換え微生物を取り扱う工程	閉鎖系	閉鎖系
(2) 閉鎖系からの排気ガス	遺伝子組換え微生物の漏出を防止	遺伝子組換え微生物の漏出を防止
(3) サンプル、閉鎖系への物質の添加及び他の閉鎖系への遺伝子組換え微生物の移動の場合	遺伝子組換え微生物の漏出を防止	遺伝子組換え微生物の漏出を防止
(4) 培養液を閉鎖系から開放系に移す場合	遺伝子組換え微生物を不活化してから行う	遺伝子組換え微生物を不活化してから行う
(5) 閉鎖系の密閉のための設計	遺伝子組換え微生物の漏出を防止	遺伝子組換え微生物の漏出を防止
(6) 閉鎖系を設置する作業区域の条件		
a) バイオハザードの標識	必要	必要
b) 指定された製造従事者以外の立ち入り	制限	制限。製造従事者は、エアロックを経由して入ること
c) 製造従事者の着衣	専用の作業衣	専用の作業衣に完全に交換
d) 製造従事者が作業区域から退出する際のシャワー設備	場合による	必要
e) 洗浄設備及びシャワー室からの排水処理設備	場合による	必要
f) 空気の汚染を最小限にするための換気設備	場合による	必要
g) 作業区域が陰圧に保たれていること	場合による	必要
h) 作業区域において、流入・流出する空気が高性能除塵フィルターを通されていること	場合による	必要
i) 作業区域は、閉鎖系のすべての内容物が漏出してもこれを外部に漏らさないように設計されていること	場合による	必要
j) 作業区域は、燻蒸消毒ができるように設計されていること	場合による	必要

表7 遺伝子組換え生物等の第一種使用等に関して生物多様性影響評価書を作成する際の留意事項¹³⁾

- ① 生物多様性影響の評価に際して着目すべき点は、LMOの特性によって様々であることから、植物、動物及び微生物ごとに評価の項目を定めること
- ② 生物多様性影響の評価に必要とされる情報は、最新の科学的知見によることとし、当該LMOの宿主又は当該宿主の属する分類学上の種に関する情報、LMOの調製等に関する情報及びLMOの使用等に関する情報とすること
- ③ 生物多様性影響の評価は、影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、影響の具体的内容の評価、影響の生じやすさの評価、生物多様性影響が生じるおそれの有無等の判断の手順によること(表8参照)
- ④ ②のLMOの使用等に関する情報には、必要に応じ、承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集、生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置、実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等(原則としてLMOの生活環又は世代時間に相応する適当な期間行われるもの)の結果などを含むこと



表8 遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領¹⁹⁾の概略(1)

<p>I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 (注:「宿主」とは、遺伝子組換え技術の利用により得られた核酸が移入される生物をいう)</p>	<p>① 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 ② 使用等の歴史及び現状 ③ 生理学的及び生態学的特性 (1)基本的特性、(2)生息又は生育可能な環境の条件、(3)捕食性又は寄生性、(4)繁殖又は増殖の様式、(5)病原性、(6)有害物質の産生性、(7)その他の情報</p>
<p>II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報</p>	<p>① 供与核酸に関する情報(注:「供与核酸」とは、遺伝子組換え技術の利用により得られた核酸のうち、移入された宿主内でその全部又は一部を複製させるもの(以下、「ベクター」という)以外のものをいう) (1)構成及び構成要素の由来、(2)構成要素の機能 ② ベクターに関する情報 (1)名称及び由来、(2)特性 ③ 遺伝子組換え生物等の調製方法 (1)宿主内に移入された核酸全体の構成、(2)宿主内に移入された核酸の移入方法、(3)遺伝子組換え生物等の育成の経過 ④ 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性 ⑤ 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性 ⑥ 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違</p>
<p>III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報</p>	<p>① 使用等の内容(注:第一種使用規程承認申請書の記載と同) ② 使用等の方法(同上) ③ 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法 ④ 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置 ⑤ 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果(注:原則として遺伝子組換え生物等の生活環又は世代時間に相応する適当な期間行われるもの) ⑥ 国外における使用等に関する情報</p>
<p>IV 項目ごとの生物多様性影響の評価</p>	<p>申請したLMOが植物(注:きのこ類も含む)の場合 ① 競合における優位性(注:野生植物と栄養分、日照、生育場所などの資源を巡って競合し、それらの生育に支障を及ぼす性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定(注:分類学上の種その他の属性により特定。多数に上る場合は適切なものを選定。なお、その宿主又は宿主の属する種についてわが国での長期使用などの経験のある遺伝子組換え生物等に関しては、IV章に記載する性質のすべてについて当該遺伝子組換え生物等と宿主又は宿主の属する分類学上の種との間で異なるところがない場合には、影響を受ける可能性のある野生動植物などを特定しなくてもよい。以下同) (2)影響の具体的内容の評価(注:(1)で特定又は選定された野生動植物などが遺伝子組換え生物等から受ける影響の具体的内容について評価。以下同) (3)影響の生じやすさの評価(注:申請している第一種使用規程に従って第一種使用等を行った場合に、(1)で特定又は選定された野生動植物などが遺伝子組換え生物等から受ける影響の生じやすさについて評価。以下同) (4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断(注:(1)で特定又は選定された野生動植物などの種又は個体群の維持に支障を及ぼすおそれがあるか否かを判断。なお、その宿主又は宿主の属する種についてわが国での長期使用などの経験のある遺伝子組換え生物等に関しては、当該宿主又は宿主の属する種と比較して影響の程度が高まっているか否かにより判断してよい) ② 有害物質の産生性(注:野生動植物または微生物の生息または生育に支障を及ぼす物質を産生する性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 ③ 交雑性(注:近縁の野生植物と交雑し、遺伝子組換え技術により移入された核酸をそれらに伝達する性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p>



表8 遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領¹⁹⁾の概略(2)

	<p>④ その他の性質 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>申請したLMOが動物の場合</p> <p>① 競合における優位性(注：野生動物と食物、営巣場所、生息場所等の資源を巡って競合し、それらの生育に支障を及ぼす性質) (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>② 捕食性又は寄生性(注：野生動植物又は微生物を捕食し、あるいは野生動植物に寄生することにより野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質) (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>③ 有害物質の産生性(注：野生動植物又は微生物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質) (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>④ 交雑性(注：近縁の野生動物と交雑し、遺伝子組換え技術により移入された核酸をそれらに伝達する性質) (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>⑤ その他の性質 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>申請されたLMOが微生物(注：きのこ類以外の菌界に属する生物、原生動物界に属する生物、原核生物界に属する生物、ウイルス及びウイロイド)の場合</p> <p>① 他の微生物を減少させる性質(注：競合、有害物質の産生等により他の微生物を減少させる性質) (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>② 病原性(注：野生動植物に感染し、それらの野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質) (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>③ 有害物質の産生性(注：野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質) (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>④ 核酸を水平伝達する性質(注：遺伝子組換え技術により移入された核酸を野生動植物または他の微生物に伝達する性質) (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>⑤ その他の性質 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2) 影響の具体的内容の評価、(3) 影響の生じやすさの評価、(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p>
<p>V 生物多様性影響の総合的評価 (注：IVの項目ごとの評価結果の概要及びこれらの評価結果を踏まえた総合的な判断の結果)</p>	

注：それぞれ記載の根拠となる情報の出典や判断の根拠を明示する。



7.7 おわりに

以上、医薬品等分野における生物多様性影響評価にかかる規制や拡散防止措置等について概説した。法施行後、まだ日が浅いこともあって、現時点ではこれらの規制の運用について若干試行錯誤しているという面があることは否めないものの、今後、法および関連政省令を遵守しつつ事例や経験の蓄積が進むに従って、よりの確でスムーズな運用が行われると期待される。

<引用・参考文献>

- 1) 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、平成15年法律第97号(2003).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 2) 生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書、平成15年条約第7号および外務省告示第444号(2003).
(http://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/treaty/treaty156_6.html)
- 3) 早川堯夫、永田龍二：バイオロジクスの品質と安全性評価。長尾拓編：医薬品の安全性、南山堂、pp. 33-51(2004).
- 4) 財務省、文部科学省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：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施行規則、平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第1号(2003).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 5) 文部科学省、環境省：研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令、平成16年文部科学・環境省令第1号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 6) 文部科学省：研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令の規定に基づき認定宿主ベクター系等を定める件、平成16年文部科学省告示第7号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 7) 文部科学省：「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」の解説資料(平成16年3月8日版)(2004).
(http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/04030901.htm)
- 8) 財務省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令、平成16年財務・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第1号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 9) 財務省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：「遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令(産業上の使用等)(案)」に対する意見の概要と対応方針について(2004).



- (<http://www.env.go.jp/info/iken/result/h151225a.pdf>)
- 10) 厚生労働省：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の施行について、平成16年厚生労働省医薬食品局長通知薬食発第0219008号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/tuchi1.html>)
 - 11) 厚生労働省：遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令別表第一号に基づき厚生労働大臣が定めるGILSP遺伝子組換え微生物、平成16年厚生労働省告示第27号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
 - 12) 厚生省：組換えDNA技術応用医薬品等の製造のための指針、昭和61年厚生省薬務局長通知薬発第1051号(1986). [以後、廃止に至るまで複数回の改正が行われている]
 - 13) 厚生労働省：遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について、平成16年厚生労働省医薬食品局長通知薬食発第0219011号(2004).
(<http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/index.html>の「通知検索」から検索)
 - 14) 社団法人農林水産先端技術産業振興センターホームページ.
(http://www.biotech-house.jp/glossary/glos_27.html)
 - 15) 厚生労働省：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の施行に伴う事務取扱い等について、平成16年厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知薬食審査発第0319001号(2004).
 - 16) 厚生省：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、平成7年厚生省薬務局長通知薬発第1062号(1995).
厚生労働省：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、平成14年厚生労働省医薬局長通知医薬発第0329004号(2002).
(<http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/guidline/index.html>)
 - 17) 厚生労働省：遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が定められていない場合の拡散防止措置の確認に関する申請書の記載例について、平成16年7月30日厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡(2004).
(<http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/index.html>の「通知検索」から検索)
 - 18) 財務省、文部科学省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：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第三条の規定に基づく基本的事項、平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省告示第1号(2003).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
 - 19) 財務省、文部科学省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領、平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省告示第2号(2003).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
 - 20) 厚生労働省：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の手続等について、平成16年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.bch.biodic.go.jp/tuchi1.html>)

＜早川 堯夫/永田 龍二＞



Regulatory perspectives from Japan — Comparability of biopharmaceuticals[☆]

Toru Kawanishi*

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Accepted 22 August 2005

Abstract

In Japan there is no official guideline about comparability assessment of biotechnological products at present. However, there is some notifications which should be referred to, when the manufacturer changes the manufacturing process. Here, regulatory perspectives from Japan on the comparability assessment are presented. When establishing the comparability of biotechnological products derived from different manufacturing processes and the validity of modified manufacturing process, rational step-by-step approaches based on both product and process aspects would be useful. At first, relevant physicochemical and biological properties of products including purity, impurity profiles and stability should be compared before and after the manufacturing change, depending on the type and nature of the desired products. It is also necessary to examine the capacities of the new manufacturing process for ensuring the consistent production of the active protein product as well as the anticipated elimination of potential impurities and contaminants. Further relevant assessment of preclinical and clinical comparability of product may be necessary in some cases.

© 2005 The International Association for Biologicals. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Biotechnological product; Comparability; Japan; ICH-guideline; Regulatory perspectives; Harmonization

1. Introduction

Biotechnological products were developed and produced based on many innovative technologies, which are always advancing by themselves. The products are, therefore, often subject to change in the manufacturing process for improvement of the product quality and production economy, increase in production yield, and so on. It is not reasonable that the manufacturers are required to submit the same full data to obtain the authorization of the manufacturing change as to obtain the new drug authorization. USA-FDA and EU-CPMA have already set each guideline for comparability assessment of biotechnological/biological products. We had also started the discussion about the comparability guideline in Japan. However, we stopped developing it, because comparability

assessment of biotechnological products was nominated as a candidate of the new topic in the ICH-Quality. Drafting of the harmonized guideline has just started in the ICH-EWG. Here, I would like to give the regulatory perspectives about the comparability assessment of biopharmaceuticals from Japan.

2. Present official notifications relating with comparability assessment of biotechnological products before and after manufacturing changes in Japan

In Japan, we do not have any official guideline for the comparability assessment of biotechnological/biological products whose manufacturing processes are changed, yet. However, there is a notification, which should be referred to, when the manufacturer changes the manufacturing process of biotechnology-derived drugs which have already been approved. That is the Notification No. 243 from the Pharmaceutical Affairs Bureau, MHW of 1984. However, nearly 20 years have already passed since the Notification was made and some parts

[☆] The perspectives are before the discussion in the ICH-EWG.

* Tel./fax: +81 3 3700 9064.

E-mail address: kawanishi@nihs.go.jp

of the requirement are assumed to be too strict. At present we usually treat each case as summarized below.

The following recombinant drugs would be treated as “not new drugs”, which are categorized as “1-(8) other drugs” in the Pharmaceutical Affairs Bureau Notification No. 698: the first is the product which contains identical active ingredient although the culture method is different from the approved drug; the second is that which contains identical active ingredient although the purification process is different from the approved drug; and the third is the other drug in which difference is not specified. The followings are also usually treated as “not new drugs” but decided on a case-by-case basis: the product which contains identical active ingredient but its structure gene is identified by different process; and the product which contains identical active ingredient but host cell/vector system is different from the approved drug. In the case of the category 1-(8) other drugs as “not new drug”, the data on specification and test methods, stability, and bioequivalence are required to be submitted for the registration as the pharmaceuticals, and a list of literature references concerning toxicity, pharmacological action, absorption, distribution, metabolism and excretion, and clinical trials for active ingredients concerned, as well as an outline of the list contents and the results of evaluation test are also required. In addition, in the case of the biotechnology-derived drugs, the following data are also needed on a case-by-case basis:

- data on the manufacturing process, physicochemical analysis, specifications and test methods, stability;
- data on single dose administration toxicity in one species of animals;
- data on bioequivalency study;
- data on clinical study for safety, etc.

The present notifications relating with the comparability of the products between before and after the changes in the manufacturing process in Japan are very simple, as summarized above. However, we have discussed much how to assess comparability of biotechnological products to draft the guideline, within Japanese experts. The following is the perspectives obtained from the discussion.

3. Regulatory perspectives from Japan: “how should we assess comparability of biotechnological products before and after the manufacturing change?”

To date, various topics related to the characterization and quality assessment as well as the manufacturing process for biotechnological products have been the subject of ICH harmonized guidelines and have proven very useful, in allowing manufacturers to develop a global approach to these issues. However, there is no specific international guideline on comparability of biotechnological products subject to changes in the manufacturing process. The subject we are facing is how to develop and establish rational concepts and approaches for establishing comparability of protein products derived from different biopharmaceutical manufacturing processes.

3.1. When is comparability assessment needed?

A comparability assessment is needed when a manufacturer wants to claim that the product of new manufacturing process Y is comparable to the already existing product of manufacturing process X with respect to quality, safety and efficacy (Fig. 1). The new process Y would be employed by either the same manufacturer, innovator or by different subsequent-entry manufacturer(s). The existing product from process X may be either an already licensed one or one under development for new drug application for approval. In case where there is an already licensed drug, subsequent-entry product(s) from different manufacturer(s) will be dealt with as a so-called generic product(s). On the other hand, the application from the innovator will be handled as a partial variation from already licensed conditions for the drug with respect to the manufacturing process. In the case of manufacturing variation of the product under development, the issue becomes the verification of such change within a single manufacturer at various stages of product development from early stage research to pre-approval. Here, the followings should be mentioned: it has been already decided that the generic products are excluded from the scope of the ICH-Q5E comparability guideline, but in Japan we still think that the comparability of the generic products could be evaluated following the same scientific approach.

3.2. General principles of comparability assessment

When establishing the comparability of biotechnological products derived from different manufacturing processes and the validity of modified manufacturing process, rational step-by-step approaches based on both product and process aspects would be useful. In this approach, the following parameters should be considered as key points:

- (1) physicochemical and biological characterizations;
- (2) impurities profile and the presence of potential contaminants;
- (3) batch analysis;
- (4) product stability;
- (5) manufacturing process evaluation/validation studies; and in wider perspective
- (6) preclinical and clinical studies.

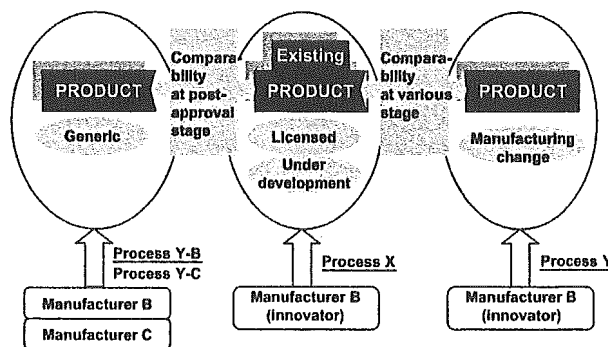


Fig. 1. Various cases of comparability assessment.

3.3. Strategies for comparability assessment

From the viewpoint of product aspects, the essential and critical first step is to establish whether the new candidate product in question is comparable to the existing product in terms of molecular and quality attributes. This is because whatever changes (minor or major) in the manufacturing process are made, if the new candidate product in question is not comparable to the existing product in terms of molecular and quality attributes, the new one will rather be regarded as a novel molecular entity for new drug application, but not as a qualified candidate for further comparability studies. The candidate product should be, therefore, the subject of extensive identification and characterization, as well as quality assessments including tests on impurities profile and the presence of potential contaminants. If these attributes of the candidate product and process are found to be comparable to those of the previous ones, further assessment of preclinical and clinical comparability would be performed, where necessary and appropriate.

3.4. Comparability from product aspects

Before going into some details about the need for further assessment of preclinical and clinical comparability, however, one should ask the following key question: “what is the identity or comparability of the biosynthetic protein product which possesses the inherent degree of structural heterogeneity?” In other words, what kind of criteria should be applied for establishing the identity or comparability of the candidate product(s) compared to the previous product with respect to molecular and quality attributes?

To answer this question, we should remind new concepts in the ICH-Q6B document. In the document we have introduced the concept, which has defined the desired product and variants, so that an inherent degree of structural and quality heterogeneity can be dealt within a relevant way. Desired product is defined as: (1) the protein which has the expected structure, or (2) the protein which is expected from the DNA sequence and anticipated post-translational modification (including glyco-forms), and from the intended downstream modification to produce an active biological molecule. When molecular variants of the desired product are formed during manufacture and/or storage and have properties comparable to the desired product, they are considered to be product-related substances and incorporated into active ingredient. When molecular variants of the desired product do not have properties comparable to those of the desired product, they are considered to be product-related impurities. In the concept, active ingredient may be composed of the desired product and multiple product-related substances; the desired product can be a mixture of several molecular entities derived from anticipated post-translational modification. Impurities may be either process-related or product-related (Fig. 2).

Various cases are considered for minimum qualification for further comparability assessments depending on each following specific type of desired product (A–D):

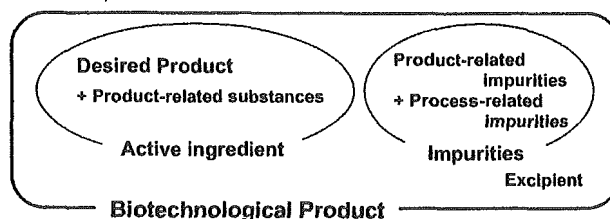


Fig. 2. New concept about biotechnological product in the ICH-Q6B.

- (A) the protein which has the expected structure (e.g., monoclonal antibodies);
- (B) the protein which is expected from the DNA sequence (simple protein);
- (C) the protein which is expected from the DNA sequence and anticipated post-translational modification; and
- (D) the protein which is expected from the intended downstream modification to produce an active biological molecule.

In the case of the “Desired product” being defined as the protein which has the expected structure, like monoclonal antibodies, minimum qualification for a candidate product for further comparability assessments should be that the product is derived from the same initial cell clone as a previous one and has comparable molecular and quality attributes compared to a previous one with respect to: (1) structural features, (2) physicochemical, (3) immunological properties, and (4) impurities profile. Variation of carbohydrate heterogeneity due to changes in culture conditions should be considered on a case-by-case basis.

In the case of the “Desired product” being defined as the protein which is expected from the DNA sequence, like recombinant insulin, minimum qualification for a candidate (product) for further comparability assessments should be that the product is the same as an already existing one with respect to protein structure, physicochemical and biological properties, as well as comparable impurities profiles.

In cases where the *in vivo* biological activity is closely related to the intended clinical effectiveness, further preclinical and clinical assessments with respect to efficacy may be omitted.

In the case of the “Desired product” being defined as the protein which is expected from the DNA sequence structure and anticipated post-translational modification, typically like glycoproteins, minimum qualification for a candidate product for further comparability assessments should be that the product is derived from the same initial cell clone as a previous product and has the same protein structure, comparable physicochemical properties, comparable carbohydrate patterns compared to a previous product with respect to the types of sialic acids and their contents, and antennary profile. Here, comparable biological properties, especially ensuring higher-order structure, *in vivo* activity and representing the clinical effectiveness, if any, is a critical factor for the qualification.

In the case of the protein which is expected from the intended downstream modification to produce an active

Mass Spectrometry of Glycoproteins

糖タンパク質の質量分析

Kawasaki, Nana^{*1,2}; Itoh, Satsuki¹; Harazono, Akira¹; Hashii, Noritaka^{1,2}; Matsuishi, Yukari^{1,2}
Hayakawa, Takao³; and Kawanishi, Toru¹¹Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Science,
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan²Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of Japan Science and Technology Agency (JST),
Kawaguchi Center Building, 4-1-8, Hon-cho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan³Pharmaceutical and Medical Devices Agency, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo, 100-0013, Japan^{*}Correspondence to: Nana Kawasaki, National Institute of Health Sciences,
Division of Biological Chemistry and Biologicals, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan
FAX: 81-3-3700-9084, E-mail: nana@nihs.go.jp**Key Words:** MS, MS/MS, MSⁿ, glycoprotein, oligosaccharide, glycopeptide**Abstract**

This review presents mass spectrometric methods for glycoprotein identification; determination of glycosylation sites, structural elucidation of carbohydrates, and their applications to glycomics and proteomics.

要 約

本レビューでは、質量分析を用いた糖タンパク質同定、糖鎖結合位置の決定、糖鎖構造解析、及びグライコミクス・プロテオミクスへの応用について紹介する。

A. Introduction

Mass spectrometry (MS) has become a powerful tool for glycoprotein identification, and the determination of glycosylation sites, and structural features of carbohydrates, such as sequence, linkage and branching at each glycosylation site. Generally, the mass spectrometric characterization of glycoprotein involves the following steps: 1) fractionation of enzymatically or chemically liberated glycans followed by MS, and 2) fractionation of glycopeptides from proteolytic digests followed by MS. Here we present the MS of glycan and glycopeptides using the latest applications.

B. MS of Liberated Glycans

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) (1), and electrospray ionization (ESI) (2), which are soft ionization techniques, are often used for glycan molecular mass determination. MALDI has been used by preference for rapid microanalyses, however, it generates metastable ions and the consequent various fragmentations, including the depletion of terminal sialic acids (known as post-source decay, PSD) (3). Although ESI used to have a problem with sensitivity, the introduction of nanospray technology allows us to use ESI to analyze femtomole levels of glycans (4). To measure all types of glycans, including neutral glycans and sulfated or sialylated acidic glycans, we suggest mass spectrometric glycan analysis in both positive and negative ion modes.

MALDI and ESI are combined with several types of

A. 緒 言

質量分析 (MS) は、糖タンパク質の同定、糖鎖結合位置の決定、並びに各結合位置における糖鎖の配列、結合位置、及び分岐等を含む構造特性解析の有用な手段として利用されている。現在、MS を用いた糖鎖解析のアプローチとしては、1) 酵素的または化学的に切り出された糖鎖の分画と MS、及び 2) 糖タンパク質酵素消化物からの糖ペプチドの分画と MS、が一般的である。そこで、ここでは、遊離糖鎖と糖ペプチドの MS について、最近の分析例を取り上げながら解説する。

B. 遊離糖鎖の MS

糖鎖分子の分析に適したソフトイオン化法として、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) (1)、及びエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) (2) がよく利用されている。MALDI は迅速分析及び微量分析に適しているが、準安定イオンが生成し、MS¹ スペクトル上にはシアル酸が脱離したイオンをはじめとする様々なフラグメントが検出される (ポストソース分解, PSD) (3)。ESI は感度上の問題が指摘されてきたが、現在ではナノスプレーの開発によって、フェムトモルレベルの糖鎖分析が可能となっている (4)。糖鎖には中性糖鎖だけでなく、シアル酸や硫酸基などが結合した酸性糖鎖が存在するので、未知試料を分析する際には、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードで測定するのが望ましい。

MALDI や ESI は様々なアナライザー (分析計) と組み合

analyzer, such as quadrupole (Q) (5), quadrupole ion trap (IT) (6), time-of-flight (TOF) (7), and Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) (8). Tandem mass spectrometers with various combinations of these analyzers have recently become available. Tandem mass spectrometry (MS/MS) is widely recognized as an effective means of structural elucidation, including molecular mass measurement by MS¹ and oligosaccharide sequencing by collision-induced dissociation (CID)-MS/MS (9-11). In particular, ITMS instruments are becoming popular for multistage tandem mass spectrometry (MSⁿ), which offers multiple precursor selections and CID experiments (12, 13).

Fig. 1A shows types of carbohydrate fragmentation by CID-MS/MS (14). In the positive ion mode the most common fragmentation involves cleavage of the glycosidic bond with retention of the glycosidic oxygen atom by species formed from the reducing end (Fig. 1B). Fragment ions generated by this cleavage are represented as B-ion (non-reducing end) and Y-ion (reducing end). The cleavage of carbon-carbon bonds of the sugar ring yields A-ion and X-ion. These cross ring fragments are often used as decisive ions in linkage determination (15, 16).

Fig. 2 shows the positive ion ESI-MS/MS and MS³ spectra of pyridylaminated agalacto-triantennary oligosaccharide (I) (Figs. 2A, A') and bisected agalacto-biantennary oligosaccharide (II) (Figs. 2B, B'). These are positional isomers whose one GlcNAc is attached to either α 1-3/6 Man or β 1-4Man in the trimannosyl core and cannot

わせて利用されている。アナライザーには四重極型 (Q) (5)、イオントラップ型 (IT) (6)、飛行時間型 (TOF) (7)、及びフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (FTICR) (8) MS 装置などが用いられている。現在では、これらの分析装置を様々に組み合わせたタンデム質量分析装置の利用が可能である。タンデム質量分析 (MS/MS) は、MS¹ による糖鎖の質量測定と、衝突誘起解離 (CID)-MS/MS による糖鎖の配列解析を同時に行うことができる (9-11)。特に ITMS 装置は、前駆イオンの選択と CID-MS/MS を繰り返す多段階 MS/MS (MSⁿ) が可能であることから、近年、糖鎖解析用装置としての人気が高い (12, 13)。

図 1A は、CID-MS/MS における糖鎖の開裂を示したものである (14)。ポジティブイオンモードで測定した糖鎖の CID-MS/MS では主に、グリコシド結合の酸素原子を還元末端側糖鎖に残した開裂が生じる (図 1B)。そのとき生じた非還元末端側イオンは B イオン、還元末端側イオンは Y イオンと呼ばれ、糖鎖の配列解析に利用される。ピラノース環の炭素-炭素間の結合が開裂して生じたイオンは A、及び X イオンと呼ばれ、糖鎖結合位置の決め手となることがある (15, 16)。

図 2 は、ピリジルアミノ化されたアガラクト 3 本鎖糖鎖 (I) 及びアガラクトバイセクト 2 本鎖糖鎖 (II) のポジティブイオン MS/MS (図 2A, B)、及び MS³ (図 2A', B') スペクトルである。これらの糖鎖は GlcNAc 1 分子がトリマンノシルコアの α 1-3/6Man または β 1-4Man に結合した位置異性体で、MS¹ による分子量測定では区別することはできない。しかし、MSⁿ によっ

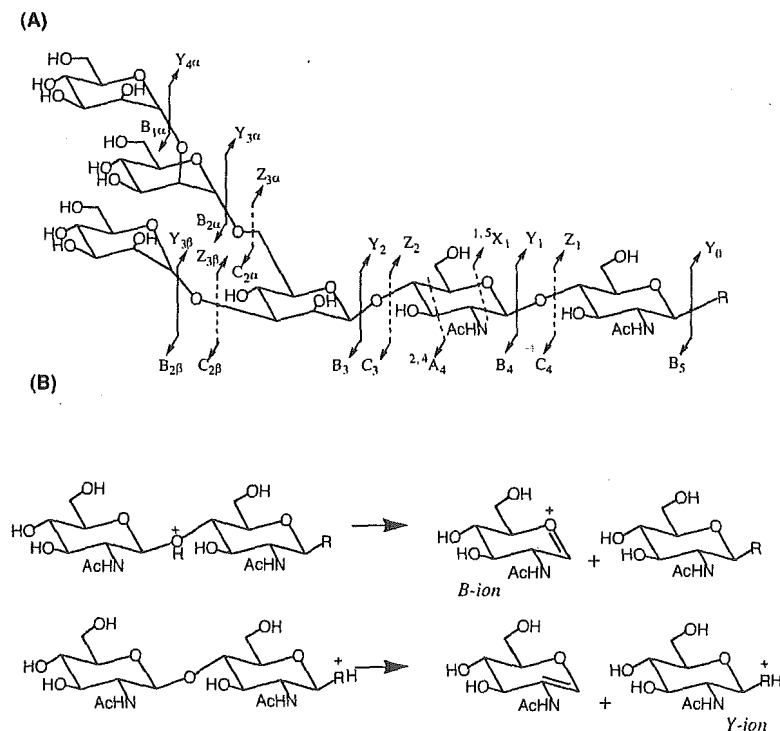


Fig. 1. (A) Types of carbohydrate fragmentation. (B) Production of B- and Y-ions in the positive ion mode.

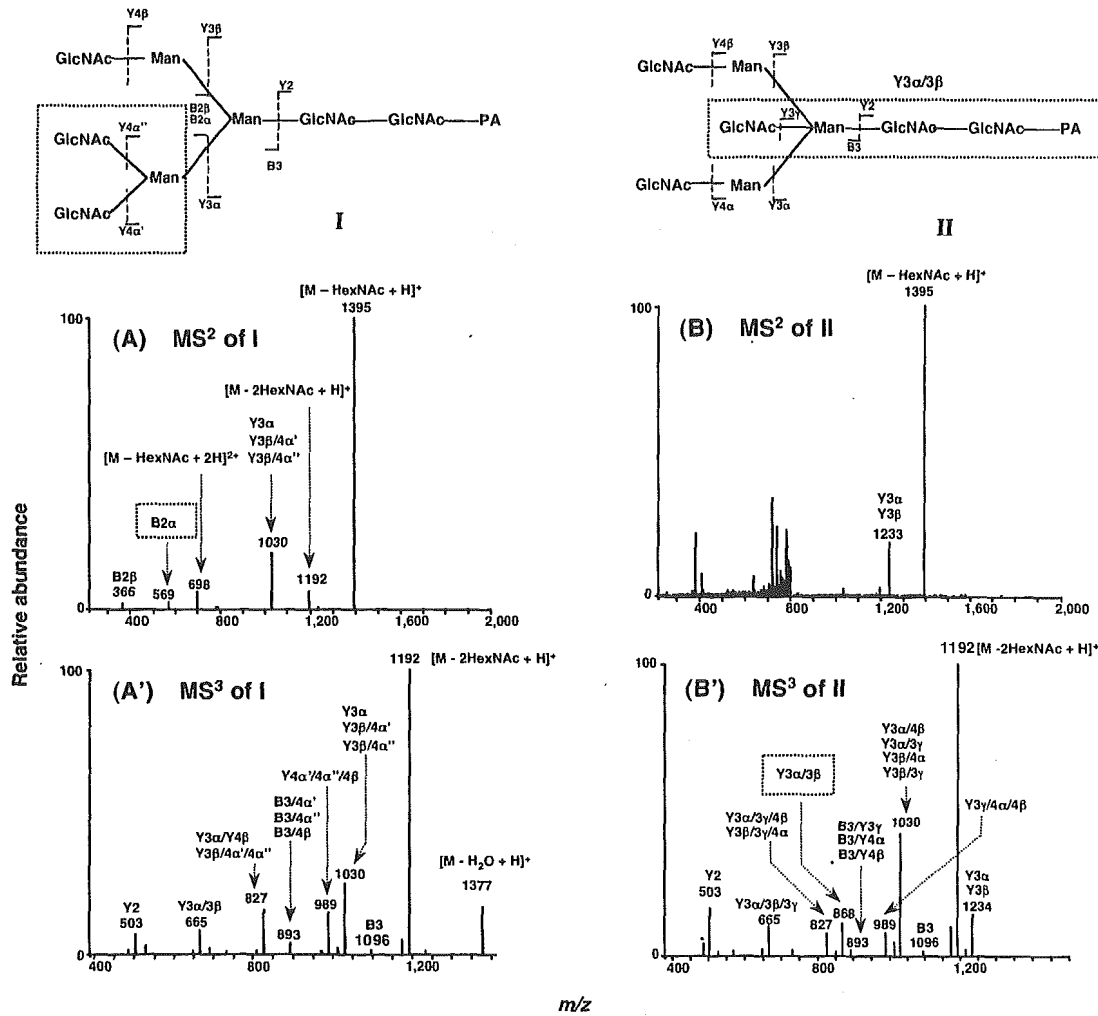


Fig. 2. MSⁿ spectra of oligosaccharides. (A) MS/MS spectrum of oligosaccharide I (precursor ion: *m/z* 800.8). (A') MS³ spectrum of oligosaccharide I (precursor ion: *m/z* 1,395.4). (B) MS/MS spectrum of oligosaccharide II (precursor ion: *m/z* 800.5). (B') MS³ spectrum of oligosaccharide II (precursor ion: *m/z* 1,395.4). MS: LTQ (Thermo Electron).

be discriminated by MS¹ (molecular mass determination). In contrast, MSⁿ spectra clearly show structural differences between two glycans. B-ion corresponding to GlcNAc₂Man⁺ is observed at *m/z* 569 in the MS/MS spectrum of glycan I (Fig. 2A), while Y-ion at *m/z* 868 corresponding to [GlcNAc-Man-GlcNAc-GlcNAc-PA + H]⁺ is detected in MS³ spectrum of glycan II (Fig. 2B'). In particular, glycan II can be determined as bisected oligosaccharides on the basis of a bisected *N*-glycan diagnostic ion at *m/z* 868.

The MSⁿ spectra of some glycans exhibit characteristic fragment patterns. Hence, even if no diagnostic ion, such as a bisected glycan-specific fragment, is detected, the glycan structure can be sometimes deduced from ion intensity ratios obtained by MSⁿ (17,18). For instance, structures of branched arms were deduced from mass spectrometric patterns obtained by MS/MS which causes a cleavage of α1-3 linkage more than α1-6 linkage (19-21). However, complete structural

て両者の構造の違いを明確にすることができる。例えば、糖鎖IのMS/MSスペクトルには *m/z* 569に GlcNAc₂Man⁺に相当するBイオンが検出され(図2A)、糖鎖IIのMS³スペクトル(前駆イオン: *m/z* 1395 [M-HexNAc + H]⁺)には [GlcNAc-Man-GlcNAc-GlcNAc-PA + H]⁺に相当するイオンが *m/z* 868に検出されている(図2B')。特に、[GlcNAc-Man-GlcNAc-GlcNAc-PA + H]⁺ (*m/z* 868)はバイセクト糖鎖に特異的なフラグメントであり、糖鎖IIがバイセクト糖鎖であることを決定づけている。

糖鎖のMSⁿは特徴的なスペクトルパターンを示すことが多いので、構造特異的イオンが検出されない場合でも、MSⁿスペクトルのパターンより糖鎖構造を推定できる場合がある(17,18)。例えば、トリマンノシルコアのα1-3結合がα1-6結合よりも開裂しやすいことを利用して、分岐構造を解析した例が報告されている(19-21)。しかし、MS単独で糖鎖構造を完

elucidation by MS alone is still a great challenge, and additional experiments are required, such as exoglycosidase digestion (22), lectin affinity chromatography (23), and sugar mapping (17,24,25).

C. Glycan Profiling by LC/MS

Many different oligosaccharides are attached to a glycoprotein. The development of derivatization and separation techniques for glycans has been an important part of structural glycobiology (26-34). The derivatization of glycan with a hydrophobic molecule improves the ionization efficiency of hydrophilic glycans and offers higher sensitivity (31,35). A combination of various HPLC techniques with off-line MALDI-MS or on-line ESI-MS has been successful in oligosaccharide profiling as well as the elucidation of structural details (36-39). As an example, we present the mass spectrometric *N*-glycan profiling of CHO cells and cells transfected with *N*-acetylglucosaminyltransferase III, which catalyzes the addition of GlcNAc to β 1-4Man in the trimannosyl core (Fig. 3) (40). Mass spectrometric analysis reveals the difference in glycosylation between two samples and the appearance of peaks with additional HexNAc (203 Da) in the transfected cells.

We recently demonstrated quantitative oligosaccharide

全に同定することが困難である場合が多く、MSはエキソグリコシダーゼによる段階的消化法(22)、レクチンアフィニティークロマトグラフィー(23)、及び糖鎖マッピング(17,24,25)などと組み合わせて用いられることが多い。

C. LC/MSを用いた糖鎖プロファイリング

糖タンパク質には様々な糖鎖が結合しているので、糖鎖の標識法と分離技術の開発は、構造糖鎖生物学において重要な位置を占めている(26-34)。糖鎖を分離・検出するために開発された疎水性物質による誘導体化は、親水性の高い糖鎖のイオン化効率を向上させるので、MSにおける高感度化においても有用である(31,35)。さらに、様々なHPLCによる分離法とオフラインMALDI-MS、あるいはオンラインESI-MSを組み合わせた分析方法は、糖鎖プロファイリングと糖鎖構造解析を兼ね備えた方法として利用され、多くの成果を上げている(36-39)。一例として図3にCHO細胞、及びトリマンノシルコアの β 1-4ManにGlcNAcを付加させる*N*-アセチルグルコサミン転移酵素III(GnT-III)遺伝子を導入したCHO細胞のMSを用いた糖鎖プロファイリングの結果を示す(40)。MSを利用することによって、GnT-III導入細胞で新たに出現した糖鎖は、HexNAc1分子(203Da)増加した糖鎖であることが確認できる。

筆者らは最近、安定同位体標識化2-アミノピリジン(AP)を用いた標識法とLC/MSを組み合わせた定量的糖鎖プロファ

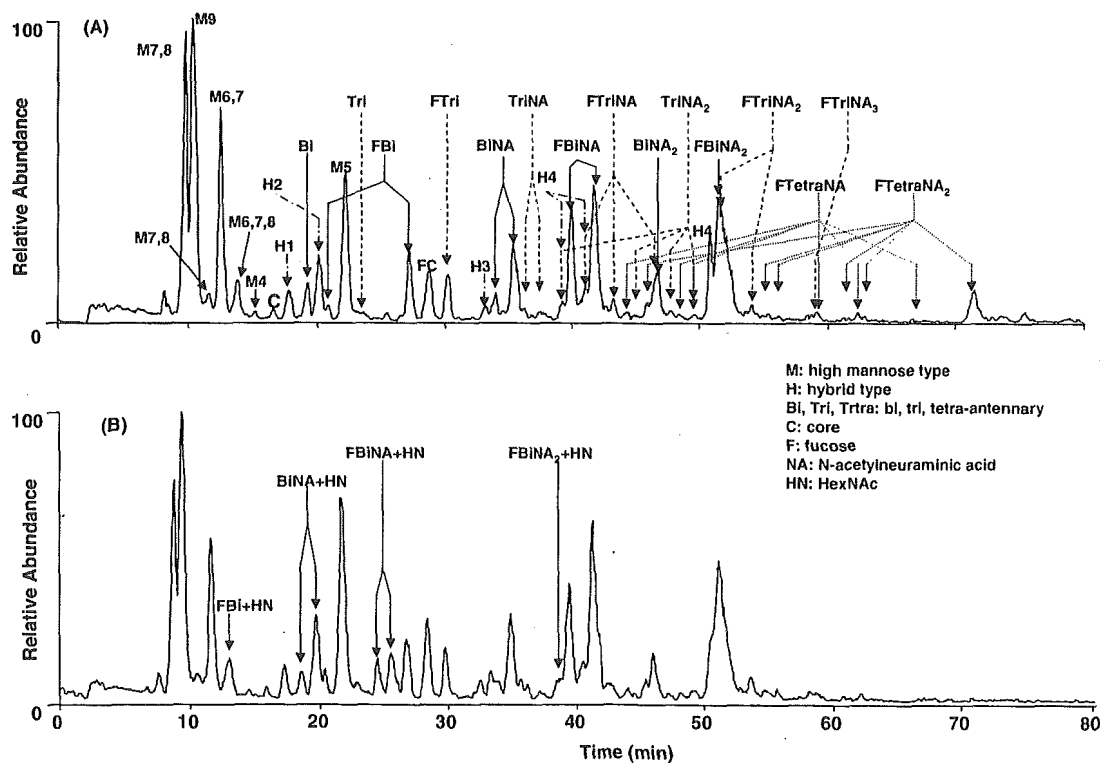


Fig. 3. TICs of *N*-linked oligosaccharides released from the insoluble fractions. (A) CHO cells. (B) *N*-acetylglucosaminyltransferase III-transfected CHO cells. Column: Hypercarb (0.2 × 150 mm, Thermo Electron), LC: Magic 2002 (Michrome BioResources), MS: TSQ-7000 (Thermo Electron), Eluent: 5 mM ammonium acetate containing acetonitrile.

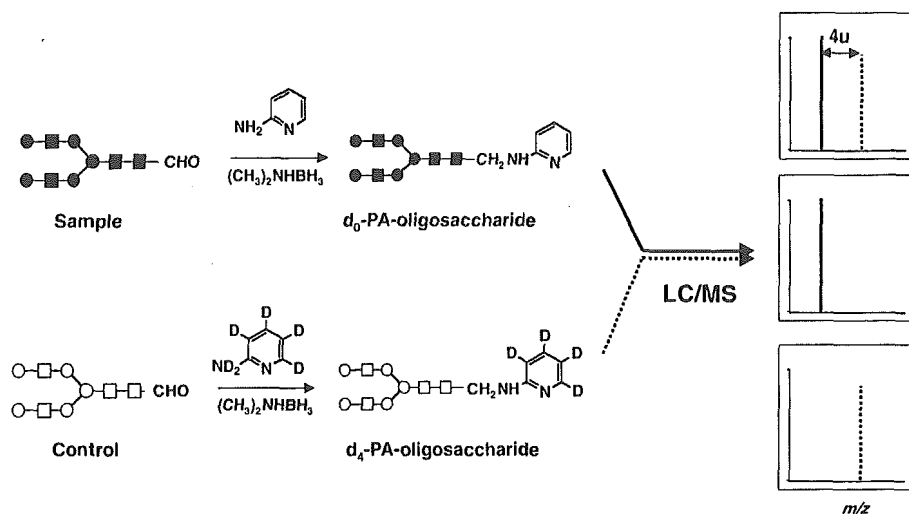


Fig. 4. Quantitative oligosaccharide profiling using LC/MS and an isotope tagging method.

profiling using isotope-labeled 2-aminopyridine (AP) and LC/MS (Fig. 4) (41). In this procedure, oligosaccharides released from an analyte and standard glycoprotein are tagged with d_0 -AP and d_4 -AP, respectively, and an equal amount of d_0 -PA and d_4 -PA oligosaccharides is analyzed by LC/MS. Oligosaccharides existing in either the analyte or standard glycoprotein appear as single ions, and oligosaccharides that exist in both analyte and standard glycoprotein are detected as paired ions with a difference of 4 u. The relative amount of analyte oligosaccharides can be determined on the basis of the analyte/ internal standard ion pair intensity ratio. This method can improve the precision of the mass spectrometric quantification and be used for glycan differential analysis among multiple samples.

D. MS of Glycopeptides

When glycans are released from protein, all information about their attachment to the protein is lost. Protein identification, determination of glycosylation sites and site-specific glycosylation analyses are generally achieved by the mass spectrometric analysis of glycopeptides. ESI and MALDI coupled with several analyzers are employed for glycopeptide analysis. ESI allows the accurate mass measurement of relatively large glycopeptide/protein because of the generation of multiple charged ions, whereas ions of large glycopeptide molecule ions are sometimes missed by MALDI-MS due to PSD and their poor ionization efficiency (42).

Fig. 5 illustrates three possible cleavages of the peptide backbone. The most common C-terminal and N-terminal fragment ions are b-ion and y-ion, respectively (37). In many cases, CID induces glycosidic bond cleavages rather than peptide backbones. Electron capture dissociation with FT-ICRMS is reported as a means for preferential cleavage of the

イリングを開発した(図4)(41)。この方法は、標準糖タンパク質及び検体糖タンパク質から切り出した糖鎖をそれぞれ6重水素置換AP(d_6 -AP)、及び未置換AP(d_0 -AP)で標識し、得られた d_4 -PA糖鎖及び d_0 -PA糖鎖を1対1の混合物としてLC/MSで分析するものである。標準糖タンパク質または検体糖タンパク質のどちらか一方にしか結合していない糖鎖は、 d_4 -PA糖鎖または d_0 -PA糖鎖どちらかの単独イオンとして検出される。標準糖タンパク質及び検体糖タンパク質に共通して存在する糖鎖は4u異なる1対のイオンとして検出され、 d_4 -PA糖鎖及び d_0 -PA糖鎖のイオン強度比から相対糖鎖結合量を求めることができる。同位体標識糖鎖を内部標準物質として用いることによって、MSを用いた定量解析における再現性が改良されるので、定量的糖鎖プロファイリングは、複数のサンプル間の糖鎖の差異を質的量的に比較する場合に有用である。

D. 糖ペプチドのMS

タンパク質から糖鎖を切り離すと、糖鎖とタンパク質間の結合に関する情報が失われてしまうので、糖鎖含有タンパク質の同定、糖鎖結合位置の決定、及び部位特異的糖鎖不均一性の解析などには糖ペプチドのMSが適している。糖ペプチドの分析においても、ESIあるいはMALDIに様々なアナライザーを組み合わせた装置が利用されている。MALDI-MSでは、ほぼ一価イオンが生成するが、ESI-MSでは多価イオンが生成するため比較的高分子量の糖ペプチドの質量を正確に測定することが可能である。また、MALDI-MSを用いて糖鎖の割合が高い糖ペプチドを分析する場合、イオン化の抑制やPSDによって、分子関連イオンが測定されにくいとする報告がある(42)。

図5はペプチド骨格の開裂を示している。ペプチド結合の開裂によって生じたN末端側はbイオン、C末端側はyイオンと呼ばれる(43)。通常、糖ペプチドのCID-MS/MSでは、ペプチドよりも糖鎖の開裂が優先される。ペプチド部分が優先的に開裂する方法としてFT-ICRMS装置を用いた電子捕獲解

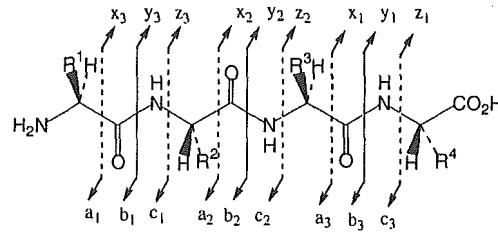


Fig. 5. Types of peptide fragmentation.

peptide backbone (44,45).

For the cleavages of both glycosidic and peptide bonds CID-MS/MS is carried out with relatively high energy (approx. 50V/1000 u) (46-51). Hence, it allows both peptide sequencing and estimation of the carbohydrate structure on the basis of b/y-ions and B/Y-ions. Fig. 6A presents the CID-MS/MS spectrum of a glycopeptide derived from human α -fetoprotein using the ESI-QqTOFMS instrument. Carbohydrate-specific B-ions, such as HexNAc⁺ and NeuAc⁺ are observed at *m/z* 204, 292 as well as y-series ions. Based on the y-series ions and peptide ion, this peptide is identified

離法が報告されている (44,45)。

糖鎖とペプチド部分を同時に開裂させるためには比較的高いエネルギー(約50V/1000 u)を与えてCID-MS/MSを行う(46-51)。生成したb、yイオン、及びB、Yイオンから、ペプチド部分のアミノ酸配列や、糖鎖構造を解析することができる。図6Aは、ESI-四重極飛行時間型MSを用いたCID-MS/MSによって得られたヒトアルファフェトプロテイン由来糖ペプチドのMS/MSスペクトルである。糖鎖Bイオンである *m/z* 204 (HexNAc⁺)、及び292 (NeuAc⁺)等と一緒に、ペプチドに由来する一連のyイオンが検出されていることがわかる。これら一

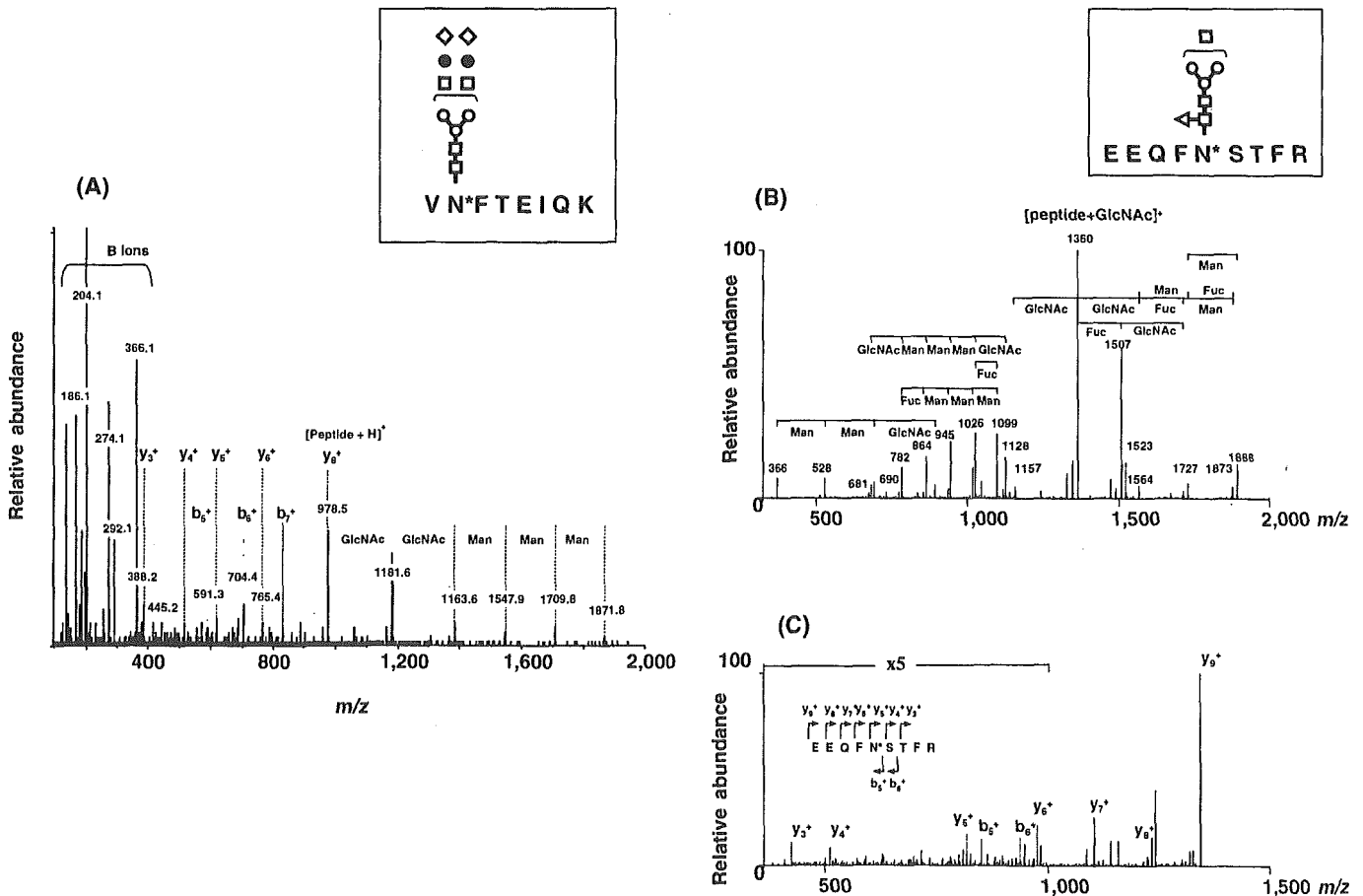


Fig. 6. CID-MSⁿ spectra of glycopeptides. (A) CID-MS/MS with relatively high energy (precursor ion, *m/z* 1,061.8), Sample: glycopeptide from human alpha-fetoprotein, MS: QSTAR (Applied Biosystems). (B) Low-energy CID-MS/MS (precursor ion, *m/z* 1,200). (C) Low-energy CID-MS³ (precursor ion, *m/z* 1,360), Sample: glycopeptide from mouse IgG1, MS: LTQ (Thermo Electron).

as VNFTEIQK. The oligosaccharide structure can be deduced as disialylated biantennary from the molecular mass of the carbohydrate moiety together with B-ions in the MS/MS spectrum.

B- and Y-series ions are produced by the low-energy CID-MS/MS of glycopeptides (12, 52-55). Fig. 6B shows the low energy (approx. 5-20V/1000 u) CID-MS/MS spectrum of glycopeptide derived from mouse IgG1. Based on the carbohydrate related-ions, the carbohydrate structure could be determined as fucosylated biantennary. When using an ITMS instrument, MS³ is automatically carried out for intense ions. In this experiment, [peptide +HexNAc +H]⁺, which is generally detected as intense ion, was subjected to further product ion scan, and b- and y-series ions appeared in the MS³ spectrum (Fig. 6C). Peptides can be identified by comparing experimental fragment ions with predictable fragment ions derived from proteins in a database. Moreover, the database analysis with the possibility of glycosylation at Asn and Ser/Thr with HexNAc, Hex, and dHex allows the identification of glycopeptides and glycosylation sites (56). For instance, this peptide was identified as EEQFN*STFR glycosylated with HexNAc at N*. This method would enable the glycosylation analysis of unknown glycoproteins and a mixture of glycoproteins.

E. Site-Specific Glycosylation Analysis of Glycoproteins

Fig. 7 illustrates the strategy for the site-specific glycosylation analysis of glycoproteins. First, a glycoprotein is digested with an appropriate proteinase, which provides

連の y イオン、及びペプチドイオンの質量から、このペプチド部分は VNFTEIQK と同定することができる。また、糖鎖構造は、糖鎖部分の分子量と B イオンからジシアロ 2 本鎖糖鎖と推定される。

低エネルギー CID-MS/MS では、グリコシド結合が優先して開裂し、B、及び Y イオンが検出される (12,52-55)。図 6B はマウス IgG1 から得られた糖ペプチドの低エネルギー CID-MS/MS (約 5-20V/1000 u) スペクトルで、糖鎖関連イオンから、糖鎖構造を推定することができる。糖ペプチドの MS/MS では一般に、[ペプチド + HexNAc + H]⁺ が比較的強く検出される。そこで、ITMS 装置を用いて [ペプチド + HexNAc + H]⁺ を前駆イオンとして選択し、さらにプロダクトイオンスキャンを行うと、MS³ スペクトル上に b 及び y イオンが検出される (図 6C)。これらの b 及び y イオンの実測値をタンパク質データベースに登録されているタンパク質の予測プロダクトイオンの理論質量と比較することによって、ペプチドを同定することができる。さらに、Asn や Ser/Thr に HexNAc、Hex、あるいは dHex 等による糖鎖修飾の可能性を追加してデータベース検索をすることによって、糖鎖結合位置を決定できる場合がある (56)。例えば、ここで分析された糖ペプチドはデータベース検索エンジンを用いて、EEQFN*STFR (N* は HexNAc 修飾 Asn) と同定された。この方法を利用することによって、混合物中の糖タンパク質や、未知の糖タンパク質の部位特異的な糖鎖解析が可能となるものと期待される。

E. 糖タンパク質の部位特異的な糖鎖解析

糖タンパク質の部位特異的な糖鎖解析の流れを図 7 にまと

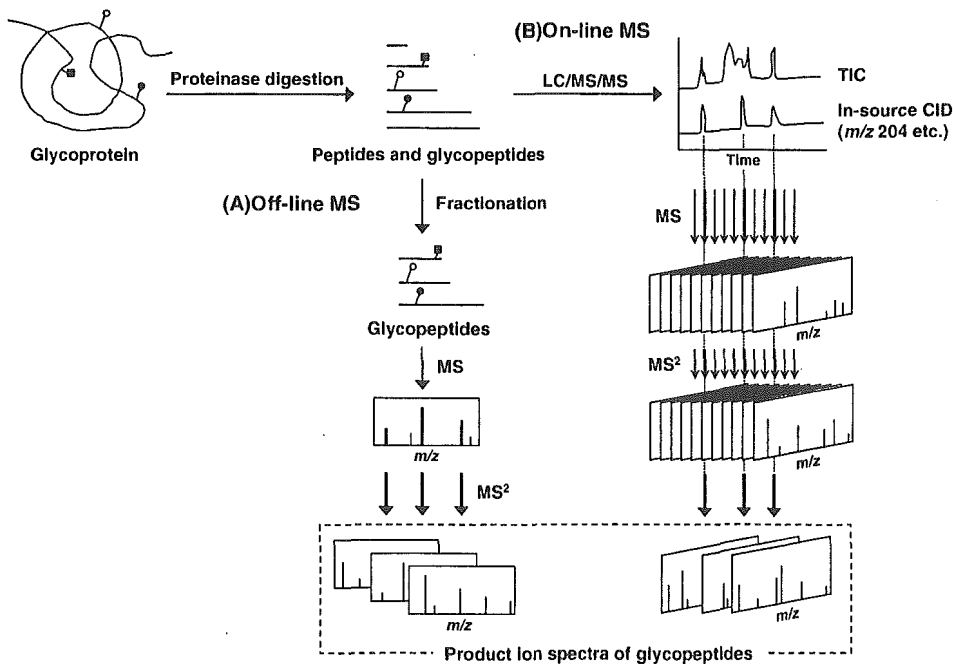


Fig. 7. Strategy for site-specific glycosylation analysis by LC off-line MS (A) and on-line LC/MS (B).