

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ィ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) 重篤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) 伝達性海綿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」⁹⁾

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勘案しつつ、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上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」⁶⁾

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¹⁴⁾¹⁵⁾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¹⁶⁾、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)¹⁶⁾¹⁷⁾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)¹⁸⁾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」⁸⁾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」¹⁹⁾、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」¹⁶⁾¹⁷⁾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

な点として、上記「生物由来原料基準」⁴⁾および「基本的考え方」⁹⁾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²⁾²⁰⁾。

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」⁹⁾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」⁹⁾や「指針」¹⁰⁾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) 早川堯夫：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) 早川堯夫, 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) 早川堯夫, 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) 早川堯夫：臨床試験2003。東京, 薬事日報社, 157-179, 2003
- 5) 早川堯夫, 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)
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)
- 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)
- 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)

- 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 1-1 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 1-2 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/方面、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/方面、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」¹⁰⁾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症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」¹⁰⁾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)¹⁹⁾

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)¹⁰⁾¹⁷⁾

生物由来原料基準(厚生労働省, 2003)⁹⁾

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)⁹⁾

<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)²⁰⁾

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)²¹⁾

特定胚の取扱いに関する指針(文部科学省告示第173号, 2001)²²⁾

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)²³⁾

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.whoirei.mhlw.go.jp/%7Ehouri/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)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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

バイオロジクスのトランスレーショナルリサーチ (その1)

最近医薬品を含めた医療技術開発におけるトランスレーショナルリサーチ (TR) の重要性が叫ばれ、様々な学会等でトピックとして取り上げられている。我が国の医薬品開発環境の最も大きな問題点の一つは、臨床研究環境の未整備であることは衆目の一致するところであるが、取り上げられる機会が多い割には、TRの要点についての理解は必ずしも深まっていらないように思われる。そこで本稿ではバイオロジクス、特に筆者の専門とするバイオテクノロジー応用医薬品 (バイオ医薬品) の開発を目指してTRを実施する上で考慮すべき点を、規制ガイドラインを参考に、2回に分けて考えてみる。

TRの本来の意味は、「探索的臨床研究=基礎的研究成果を臨床へ導入するための臨床開発の初期段階のプロセス」であるが、今現在本来の意味のTRを行う上での条件等を定めた公的なガイドラインはない。しかしTRの対象を治験レベルまで広げると、その実施の条件、および注意点は既存の各種ガイドライン等から浮かび上がる。

バイオ医薬品の中で既に最も実用化が実現している医薬品は、遺伝子組換え技術や細胞培養技術を用いて製造されたタンパク質性医薬品 (エリスロポエチン、インスリン類、成長ホルモン、インターフェロン、ヒトモノクローナル抗体等) であるが、我が国においてこれら医薬品開発にあたってまず参照すべきガイドラインは、(1)薬審第243号通知 (昭和59年3月30日) 「組換えDNA技術応用医薬品ガイドライン」; (2)薬審第1第10号通知 (昭和63年6月6日) 「細胞培養技術応用医薬品ガイドライン」; (3)都道府県衛生主管部 (局) 業務主管課宛事務連絡 (平成元年5月) 「薬審第1第10号通知に関する質疑応答」である。しかしその後、医薬品の開発段階で考慮することが必要な技術的要件に関するICH国際調和ガイドラインが作成され、国内ガイドラインとして公表されている。これらは企業による新薬開発を対象としたものであるが、生体内タンパク質の医薬品への応用をめざしたトランスジェニックリサーチの実施の条件を考える上での参考となる。以下がこれらのガイドラインである: (1) 「遺伝子発現構成体ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第3号 平成10年1月6日)」: 主として遺伝子組換え技術を用いて医薬品製造用細胞を作製する場合の遺伝子発現構成体の設計、作製、細胞への導入、導入後の安定性チェックに関する注意点; (2) 「細胞基材ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第873号 平成12年7月14日)」: バイオ医薬品の製造に使用する細胞基材の由来、調整、特性

解析、管理に関する注意点; (3) 「安定性ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第6号 平成10年1月6日)」: タンパク質性医薬品の安定性試験に関する注意点; (4) 「ウイルス安全性ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第329号 平成12年2月22日)」: 製品のウイルス汚染に関する配慮、試験に関する注意点; (5) 「タンパク質性医薬品の特性解析・品質規格ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第571号 平成13年5月1日)」: 医薬品の特性解析および品質規格設定にあたっての注意点; (6) 「同等性・同質性ガイドライン (厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知 薬食審発第0426001号 平成17年4月26日)」: 製造工程の変更にとまなう医薬品の同等性/同質性評価にあたっての注意点; (7) 「非臨床安全性評価ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第326号 平成12年2月22日)」: 臨床試験に先立つ非臨床安全性試験に関する注意点。

これらタンパク質性医薬品を低分子化学合成医薬品と比較すると、(1)タンパク質の高次構造解析に限界があるため、構造の完全な同定、確認がしばしば困難であり、生物活性に基づく評価が重要; (2)製造の一定性を確保することが困難な細胞を利用して製造し、また翻訳後修飾等により分子多様性がある物質が多いので、物質の一定性の確保が重要; (3)常温で不安定な物質が多く、実時間での安定性の確認および保存条件の確保が重要; (4)製造に生体由来原料を使用するので、感染症に対する配慮が重要; (5)品質確保のために遺伝子発現構成体、細胞基材、宿主由来不純物など製造工程管理が重要; (6)物質としては天然のタンパク質に近いので、薬理作用および作用メカニズムの予測は容易であるが、種差により動物を用いた非臨床試験が不適切な場合もある; (7)体内動態試験は方法論に限界がある場合がある; (8)ヒトタンパク質の場合、種差、抗原性等により、げっ歯類動物を用いた非臨床安全性試験の予測性に限界がある、といった特徴がある。とりわけバイオロジクスの場合は被験物質の一定性の確保は、いかなるTRにおいてもデータの信頼性をはかる上で極めて重要であり、大学等での研究では見逃されがちな点である。(次号に続く)

(国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部)
川西 徹 Toru Kawanishi
e-mail: kawanish@nihs.go.jp

キーワード: トランスレーショナルリサーチ,
バイオロジクス, 創薬

バイオリジクスのトランスレーショナルリサーチ (TR) (その2)

前号でタンパク質性医薬品のTR実施の参考となると思われる医薬品開発関連のガイドラインを紹介したが、その他のガイドラインとして、「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期について（厚生省医薬安全局審査管理課長通知 別添 医薬審第1019号 平成10年11月13日発、医薬審第1831号 平成12年12月27日改正）」があげられる。これは主として化学合成医薬品を対象として、臨床試験実施までに非臨床安全性試験で確認しておくべき事項をまとめたものであり、タンパク質性医薬品のTR実施の条件を考える上で参考となろう。また臨床試験の実施要領に関しては、「医薬品の臨床試験の実施の基準（GCP）（厚生省令第28号 平成9年3月27日付）」があり、(1)インフォームドコンセントの徹底、(2)治験審査委員会（IRB）における臨床試験実施計画や患者説明文書の審議の必須化、(3)研究資金提供先と研究者との関係の十分な開示、(4)臨床試験で発生する有害事象・副作用に関する情報の国あるいはIRBなどへの報告の義務化、(5)第三者機関などへの臨床試験の進捗状況のモニタリング・監査の義務化、など臨床試験が備えるべき条件がまとめられている。なおGCPは、さらに医師主導型治験を可能にするための改正がなされている（厚生労働省令第106号 平成15年6月12日付）。

タンパク質性医薬品以外に、近年ヒト由来細胞あるいは組織を疾病治療に用いる細胞治療が活発に試みられるようになってきている。この細胞治療に関するガイドラインとしては、細胞治療用医薬品の開発を目指して臨床研究や治験を行うにあたっての科学的および倫理的妥当性を示す上での基本的考え方、必要とされるデータや留意事項を扱った、「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（厚生労働省医薬安全局長通知 医薬発第266号 昭和13年3月28日発）」があり、製品の品質、安全性確保に関する技術的要件の他、細胞・組織採取段階における医療機関の倫理委員会での審査、ドナーに対する説明・同意、ドナーの選択基準や適格性に関する事項、また使用段階における患者に対する説明と適用についての同意、患者などに関する情報の把握、個人情報の保護に関する事項などが上げられている。また我が国ではヒト由来の細胞・組織を加工した医薬品又は医療用具に係る治験を依頼しようとする場合、厚生労働大臣にその安全性及び品質の確認を求める必要がある（確認申

請）。その際の提出資料の内容については「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（厚生労働省医薬安全局長通知 医薬発第1314号 平成12年12月26日発）」にまとめられている。

細胞治療とならんで先端的医療の代表ともいえる遺伝子治療では、治療行為として行う場合（遺伝子臨床研究）と、製薬企業等が遺伝子治療用医薬品を開発する場合（遺伝子治療用医薬品の治験）とで参照すべきガイドラインが異なる。前者では「遺伝子治療臨床研究に関する指針（13文科振第1144号科発第0327001号 平成14年3月27日）」があり、適用対象疾患の規定、治療に用いるベクター等の品質等の確認、インフォームドコンセントの明確化、実施機関の責任者の業務、審査委員会、厚生労働大臣へ意見を求める確認申請、記録の保存、秘密保護等などについて述べられている。この指針は一部改正され（16文科振第931号科発第1228003号 平成16年12月28日）、研究実施主体の責任、個人情報の取り扱いを含めた倫理面で手続き等がさらに明確化された。また後者の遺伝子治療薬の治験では「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（通知）（厚生省薬務局通知 薬発第1062号 平成7年11月15日）」、および「遺伝子治療臨床研究に関する指針（厚生省告示第23号 平成6年2月8日厚生大臣）」があり、さらにその改正版（厚生労働省通知医薬発第0329004号 平成14年3月29日）が出されている。以上の細胞治療や遺伝子治療に関するガイドラインは、バイオリジクスのTR実施の際の、特に倫理面での考え方の参考になるとと思われる。

なお、バイオリジクスは生体由来材料を製造に用いることから、特に感染症への配慮が求められる。「生体由来原料基準（厚生労働省告示210号 平成15年5月20日）」には医薬品製造に用いる生物由来原料に関する基準が定められているが、TR実施においても、検討対象とする物質の製造に用いる原料に関して参考になろう。

以上、2回にわたってバイオリジクスのTR実施に際し、参考となる我が国の医薬品開発関連ガイドラインを紹介した。以上のガイドラインについては、そのほとんどは国立医薬品食品衛生研究所のホームページ（<http://www.nihs.go.jp/index-j.html>）の厚生労働省関連情報より検索／ダウンロードが可能である。

（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 川西 徹 Toru Kawanishi）

キーワード：トランスレーショナルリサーチ、バイオリジクス、創薬 e-mail: kawanish@nihs.go.jp

品質に関わるトピックの動向***

—Q5E: バイオ医薬品のコンパラビリティ—

川西 徹*, 松木 滋**

1. 東京会議までの経過

1.1 ブリュッセル会議 (2002年2月)

ブリュッセル会議で作成されたコンセプト・ペーパーの概略を Table 1 に示します。

1. 製造工程に変更を加えたバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品のコンパラビリティに関するガイドラインを作成する。2. 適用範囲は Q6B (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の規格及び試験方法の設定について)と同じ。3. 製造工程変更後の製品の申請資料として、製造工程変更前の製品について得られたデータを用いる場合を対象とする。4. コンパラビリティを確立するために必要な、科学的な考え方に焦点を絞って議論する。5. 製品の品質と製造工程の両方の観点から議論する。6. まず品質分野のエキスパートが一次案を作成し、必要であれば安全性分野及び有効性分野のグループの参加を求め、非臨床、臨床分野の問題を議論する。7. FDA は内部事情によりドラフト作成作業に入れないので、当面ワシントン会議に向けて PhRMA が調整役、JPMA が事務局としてプレドラフト作成を行うこととされました。

1.2 ワシントン会議 (2002年9月)

前回ワシントン会議の内容を Table 2 にまとめました。後発品の取り扱いについて議論しましたが、運営委員会により後発品を適用範囲に含まないことが確認されました。ガイドラインに盛り込むアイテムを挙げた PhRMA 原案のアウトラインの各項目について JPMA の position paper 等を参考にして議論しました。また、極によってはコンセプト・ペ

ーパーの作成に関わったメンバーの交代があったこともあり、共通認識を深める目的で非公式のワークショップも開催されました。

また、EWG が正式に発足し PhRMA と JPMA 両者がラポーターとしてドラフト作成を進めることになりました。

1.3 前回ワシントン会議以降

ワシントン会議以降の経過を Table 3 に示します。まずガイドライン案の作成を本格的に進めるために、基本になるドラフトはラポーターが作成することになって、各極のガイドラインや position paper の比較表、更にガイドラインのたたき台として Draft 0 を 2002 年 11 月に示しました。続いて三極 6 団体からコメントを収集し、そのコメントを踏まえて、2003 年 2 月の東京会議で用いるガイドライン案として Draft 1 をラポーターが提示しました。

2. 東京会議の内容

東京会議での検討内容を Table 4 にまとめました。まず、三極 6 団体と Canada からそれぞれの考え方が表明されました。その後東京会議の前に提示されたガイドライン案の Draft 1 について詳細に検討しました。この検討の各段階で議論された項目の中で、今後調和に向けて議論すべき主な検討項目を特定化しました。そして、次回ブリュッセル会議に向けて Draft 作成の日程について検討しました。

2.1 三極から考え方の表明 (Table 5)

三極いずれの団体からも Draft 1 の内容は Draft 0 に対して大きく改善されたことが表明されました。日本からはコンパラビリティのガイドラインに

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

** キリンビール株式会社医薬カンパニー生産本部 群馬県高崎市萩原町 100-1 (〒370-0013)

*** 当協会主催の第 8 回 ICH 即時報告会 (平成 15 年 3 月 6 日: 東京, 3 月 11 日: 大阪) における講演による。

Table 1 2002年2月コンセプト・ペーパー概略

1. 製造工程に変更を加えたバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品のコンパラビリティに関するガイドラインを作成する。
2. 適用範囲は Q6B と同じ。
3. 製造工程変更後の製品の申請資料として、変更前の製品のデータを用いる場合が対象。
4. 科学的な考え方に焦点を絞って議論する。
5. 製品の品質と製造工程の観点から議論する。
6. Quality のエキスパートが一次案を作成する。
7. ワシントン会議に向け PhRMA を調整役、JPMA を事務局としてプレドラフト作成を行う。

Table 2 2002年9月ワシントン会議討議内容

1. 運営委員会の後発品は適用範囲に含まない事が確認された。
2. PhRMA 原案の Outline を基に、JPMA position paper 等を参考にして、用語の定義、ガイドラインに入れるべき項目等について討議
3. PhRMA 主催非公開ワークショップ (トピック：(1)製造方法の変更に伴う製品の抗原性評価に関する考察；(2)製薬企業によるコンパラビリティ評価例の報告)
4. EWG が正式に発足し、PhRMA と JPMA がラポーターとなることとされた。

Table 3 前回ワシントン会議以降の経過

1. ラポーターが各極のガイドライン、あるいは Position Paper の比較表を作成、さらに、ガイドラインのたたき台として "Draft 0" (各国の主張をほぼすべて取り入れたバージョン) を提示 (2002年11月)
2. "Draft 0" について三極からコメント収集 (2002年12月～2003年1月)
3. 東京会議に用いる "Draft 1" をラポーターが提示 (2003年1月)

Table 4 東京会議の内容のまとめ

1. 三極から考え方の表明
2. ガイドライン案(Draft 1)の検討
3. 調和に向け今後の主要な検討項目の特定化
4. ブリュッセル会議への日程の検討

Table 5 三極から考え方の表明

- 日本: Draft 1 は大きく改善した。製品の品質によるコンパラビリティ評価を重視すべき。詳細な製造工程関連の記述は現行審査システムでは適用が難しい。
- 欧州: Draft 1 は大きく改善した。製造工程の記述、非臨床、臨床の取り扱いの検討を要請。
- 米国: Draft 1 は大きく改善した。リスク評価、コンパラビリティ評価手順、開発段階のコンパラビリティについて検討を要請。品質の改善を目的とした場合についても盛り込むべき。

においては基本的に製品の品質の比較による評価を重視すべきであること、更に日本の現行の審査システムにおいては詳細な製造工程関連の記述は難しいことが主張されました。

欧州からは反対に製造プロセスを詳細に盛り込むべきであると共に、非臨床及び臨床分野の取り扱いについての記述が要請されました。

米国からは製造工程を変更したときのリスク評価やコンパラビリティ評価を行う際の手順及び開発段階でのコンパラビリティ評価の検討が要請されました。更に品質の改善を目的とした製造工程の変更についても考え方を整理すべきであると要請されました。

2.2 ガイドライン案 (Draft 1) の検討 (Table 6)

今回の東京会議では多くの時間をかけてガイドライン案である Draft 1 の内容について詳細に検討しました。その結果、ガイドラインを作成する上で調和に向けて障害になるような大きな問題はないことを確認しました。

討議の結果については、現段階でガイドラインに盛り込むべきとされた項目について説明します。ただし、まだ案の段階であり、今後調和の過程において大きな変更も考えられますので、不確定なものであることをご承知おき下さい。

1 番の Introduction ではそれぞれ目的、背景、適用範囲、基本原則が述べられています。

2 番の Guidelines からコンパラビリティの検討作業にあたっての具体的な指針が述べられています。その最初にコンパラビリティを検討するため

Table 6 ガイドライン TOC 案
ICH Q5E: Comparability of Biotechnological/Biological
Products Subject to Changes in their Manufacturing Process

1	Introduction
1.1	Objectives
1.2	Background
1.3	Scope of the Guideline
1.4	General Principles
2	Guidelines
2.1	Considerations for Establishing Comparability
2.2	Key Quality Criteria
2.2.1	Analytical Techniques
2.2.2	Characterisation
2.2.3	Specifications
2.2.4	Stability
2.3	The Manufacturing Process
2.3.1	Drug Substance and Drug Product
2.3.2	Description of the Manufacturing process and controls
2.3.3	Assessing Impact of Manufacturing Changes
2.3.4	Process Evaluation / Validation: Consistency of Batches before and after manufacturing change
2.4	The Comparability exercise (Study)
2.4.1	Overall Strategy
2.4.2	Post marketing
2.4.3	Drug Substance
2.4.4	Drug Product
2.5	Development
2.6	Nonclinical and clinical data
3	Glossary

に考慮すべきポイントについての総論、次に品質関係でコンパラビリティを検討する上での要素を述べます。これには分析法の適格性、物理的・化学的、生物学的あるいは免疫学的な特性解析、製品規格、製品の安定性に関する比較が含まれます。

次に製造工程について順番に述べます。最初に原薬と製剤の製造工程、製造工程と工程管理の記述、製造工程変更によるインパクトの評価、製造工程の変更前後のロットの恒常性を確認するための工程評価/検証と続きます。後ほど述べますが、この製造工程の内容については、どのような順番・構成で記述するか今後大きな議論になると考えています。

続いてコンパラビリティ評価研究の具体的な流れについての説明です。まず全体の方策、市販後の場合、原薬・製剤の場合、開発段階でのコンパラビリティ、そして非臨床・臨床のデータという流れになり、最後に用語集となる予定です。

2.3 今後の検討課題 (Table 7)

今回の東京会議ではガイドライン案である Draft

1を詳細に検討し、その結果、調和ガイドラインの作成をめざす上で、調和を阻む大きな問題点はないことを確認しました。しかし、今後調整が必要と考えられる主要な検討課題がいくつか浮かび上がりました。

まず製造工程の記述です。これは欧州が強く主張している点ですが、このガイドラインに製造工程関係の要素を詳細に記述し、CPMPのガイドラインのような工程管理の規格値及び適否の判定基準やインプロセスコントロールもコンパラビリティ評価の重要な要素として記述しようという主張です。これには日米が反対していますから相当な議論になる

Table 7 今後の検討課題

- | |
|--------------------|
| 1. 製造工程の記述 |
| 2. コンパラビリティを評価する手順 |
| 3. 開発段階のコンパラビリティ評価 |
| 4. 試験方法の分析能力の検討 |
| 5. 非臨床及び臨床研究について |

と思います。

次にコンパラビリティ評価の手順です。コンパラビリティを成立させるための評価は幾つかのステップを踏んで段階的に進めますが、その順番はケースにより異なります。そこで、基本的な考え方をどのようにガイドラインに記述するかという課題があります。

開発段階では製造工程を改良するために様々な変更が行われますが、多種多様なケースをどのようにまとめ、ガイドラインに盛り込むべきかが問題です。またコンパラビリティを成立させるために用いる試験方法の分析能力についてどのように評価して使用すれば良いのかといった課題もあります。

そして、これも大きな問題ですが、非臨床及び臨床研究についてはどのような内容を盛り込むべきかという課題があります。非臨床及び臨床研究関連の記述は、最初に述べたようにコンセプト・ペーパー (Table 1) では、まず品質分野のエキスパートが一次案を作成し、必要であれば安全性分野及び有効性分野のグループの参加を求めて前臨床及び臨床分野の問題を議論することになっていました。

今回の東京会議において、非臨床及び臨床研究の具体的な手順についてEWGの考え方をまとめました (Table 8)。その結果、まず品質分野のエキスパートが集まってガイドラインを作成し、Step 2とします。それから非臨床及び臨床分野の専門家の意見を聞き、Step 4の前にその内容を品質分野のエキスパートが検討することとしました。

2.4 ブリュッセル会議までの日程 (Table 9)

EWGでは2003年11月の大阪でのICH6でStep 2にしようとして議論を進めていますが、正式にEWGメンバーが直接顔を合わせて討論できる機会は7月に予定されているブリュッセル会議しかありません。先ほど述べた問題点を解決するには、EWG会議が

Table 8 非臨床及び臨床研究

- | |
|---|
| 1. 品質分野の専門家が討議してガイドラインを作成し、Step 2とする。 |
| 2. 非臨床及び臨床分野の専門家にはその後に意見を聞く。 |
| 3. Step 4に先立ち、非臨床及び臨床分野の専門家からのコメントについて、品質分野の専門家が検討する。 |

Table 9 ブリュッセル会議迄の日程

- | |
|---|
| 1. Draft 2(ラポーターが作成): 3月上旬 |
| 2. 各極からのコメントの収集: 4月中旬 |
| 3. 臨時EWG会議: 5月上旬
製造工程の記述等について検討する予定。 |
| 4. Draft 3作成及びコメント収集: 6月 |

大阪ICH6までに一回では、Step 2に進むのは困難ということがEWG内での共通認識でした。そこで、ブリュッセル会議までの5月上旬に臨時EWG会議の開催を提案することとしました。

2.5 臨時EWG会議 (Table 10)

臨時EWG会議では、先ほど述べた問題点の中で最も大きな問題点と思われる製造工程の記述について検討する予定です。先ほど述べたように三極の考え方が大きく異なっています。特に欧州から詳細に盛り込むべきであるとの意見が出されていますので、その記述内容については、かなり突っ込んだ話し合いをすることになりそうです。

その他の課題も検討する予定ですが、このトピックがQ5シリーズとQ6Bガイドラインを踏まえて、その応用によって成立するコンパラビリティ評価法についての調和を目指したガイドラインであることから、各課題について相当詳細かつ念入りの議論を行うことが調和のための必須要件であると思っています。

2.6 臨時EWG会議 (Table 11)

今回の東京会議で予想以上に検討が進みましたことから、11月の大阪ICH6でStep 2に到達できる可能性が出てきました。大阪でStep 2に達するためには5月の臨時会議と7月のブリュッセル会議で十分な検討を行い、確実にドラフト作成を進めるこ

Table 10 臨時EWG会議—製造工程の記述—

- | |
|--------------------------------------|
| 1. 製造工程の記述について、考え方が三極間において大きく異なっている。 |
| 2. 欧州から詳細に盛り込むべきとの意見。 |
| 3. 製造工程の記述内容について検討する。 |

Table 11 今後の予定

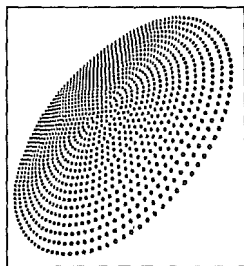
2003年5月	臨時EWG
2003年7月	ブリュッセルEWG
2003年11月	ICH 6 (Step 2?)

とが必要であると思っています。

文 献

イオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について, 医薬審発第571号, 平成13年5月1日.

- 1) 厚生労働省医薬局審査管理課長：生物薬品（バ



LC/MSを用いた グライコーム解析

川崎ナナ^{*,**} 橋井則貴^{*,**}

伊藤さつき^{*} 原園 景^{*} 川西 徹^{*}

Key words : LC/MS、グライコーム、グライコミクス、糖タンパク質、糖ペプチド、糖鎖

はじめに

細胞・組織に発現している全タンパク質(プロテオーム)を系統的・網羅的に解析することによって生命現象を解き明かそうとするプロテオミクスに高い関心が集まっている¹⁾。さらに最近では、細胞内タンパク質の主な翻訳後修飾の一つである糖鎖が、タンパク質の機能調節等を介して様々な疾患や発生・分化等に深く関わっていることが明らかになってきたことから²⁻⁸⁾、細胞・組織発現糖タンパク質やその糖鎖部分の構造・機能を解析しようとするグライコミクスへの関心も高まっている^{9,10)}。

プロテオミクスの基盤的技術である質量分析法(MS)は、グライコミクスにおいても、糖タンパク質や糖鎖の構造特性解析のための有用なツールとして期待されている^{11,12)}。しかし、糖タンパク質は複数の糖鎖結合部位に

様々な糖鎖が結合した不均一な集合体であることや、糖鎖が結合することによってMSにおけるイオン化効率が低下するなどの問題があるため、プロテオミクスの手法をそのまま利用できない場合が多い。そこで、レクチンや各種液体クロマトグラフィー(LC)など、糖鎖生物学分野で従来から利用されてきた糖鎖構造解析技術と、MSやデータベースを中心としたプロテオミクスの技術を組み合わせた様々なグライコーム解析技術の開発が進められている^{13,14)}。中でもLCとMSをオンラインで結んだLC/MSは、イオン化を妨害する物質を除去したり、不均一な糖鎖混合物を分離しながら、直接質量分析を行うことが可能な分析技術で、簡便・迅速なグライコーム解析法として優れている。本稿では、LC/MSを利用したグライコーム解析例をいくつか紹介する。

1. LC/MSによる細胞糖鎖の解析

疾患や発生・分化等に伴う糖鎖構造や糖鎖分布の微細な変化を見つけ出すには、糖タン

*国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

**独立行政法人科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業(CREST)

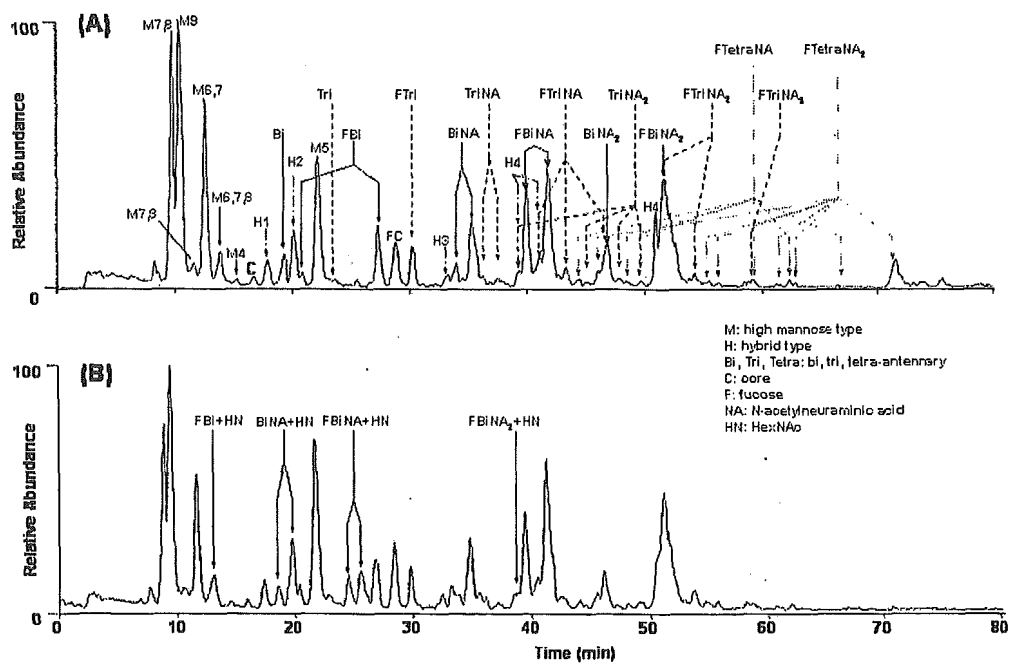


図1 (A) CHO細胞、及び(B) GnT-III遺伝子導入CHO細胞の糖鎖プロファイル

サンプル：CHO細胞(1×10^7) 膜画分からN-グリカナーゼによって切り出した糖鎖を NaBH_4 で還元した
 LC/MS：カラム，グラファイトカーボンカラム (0.2 x 150 mm)；溶離液A, 5 mM 酢酸アンモニウム/2 %
 アセトニトリル；溶離液B, 5 mM 酢酸アンモニウム/80 %アセトニトリル；グラジエント, B液 10-45 %
 (90分)；流速, $2 \mu\text{l}/\text{min}$ ；MS, TSQ-7000(サーモエレクトロン)

パク質から切り出した糖鎖をLC/MSを用いて解析する糖鎖プロファイリングが適している。構造糖鎖生物学分野ではこれまでに、糖鎖誘導体化とLCを組み合わせた様々な分離技術が開発されている¹⁵⁻¹⁷。これらをオンラインMSと組み合わせることによって、糖鎖不均一性の高い試料の解析が容易になる^{18, 19}。筆者らは、糖タンパク質からN結合型糖鎖を酵素的に切り出し、還元末端を NaBH_4 で還元した後、親水性物質に対する吸着能の高いグラファイトカーボンカラムを用いてLC/MS(GCC-LC/MS)を行う糖鎖プロファイリング法を開発している²⁰⁻²³。以下にGCC-LC/MSを用いて細胞発現糖タンパク質の糖鎖を解析した例を2つ紹介する。

1.1 糖鎖プロファイリング

図1AはCHO細胞の膜画分からN結合型糖鎖を酵素的に切り出した後、 NaBH_4 で還元し、GCC-LC/MS装置で分析して得られた結果をトータルイオンクロマトグラム(TIC)として表したもので、糖鎖の分布(プロファイ

ル)を示している。各ピークの糖鎖構造は、MSによって測定された質量を基に推定された単糖組成より、高マンノース型、及び2本鎖を中心とした複合型シアロ糖鎖であると推定された²⁴。図1Bは、CHO細胞に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細胞の糖鎖プロファイルである。GnT-IIIはトリマンノシルコアの β 1-4ManにGlcNAcを付加させる酵素である。GnT-IIIが導入された細胞には複数の新しい糖鎖が出現していることがわかる。これらは質量から、CHO細胞に結合している2本鎖糖鎖にN-アセチルヘキソサミン(HexNAc)が1分子(203Da)付加した糖鎖であることが確認され、GnT-IIIによって生じたGlcNAc付加糖鎖と推定された。このように糖鎖プロファイリングは、サンプル間の糖鎖の構造や分布を比較する方法として優れ、糖鎖生合成経路に起きた変化や、その変化に伴って生じた糖鎖の構造解析に利用できると期待される。

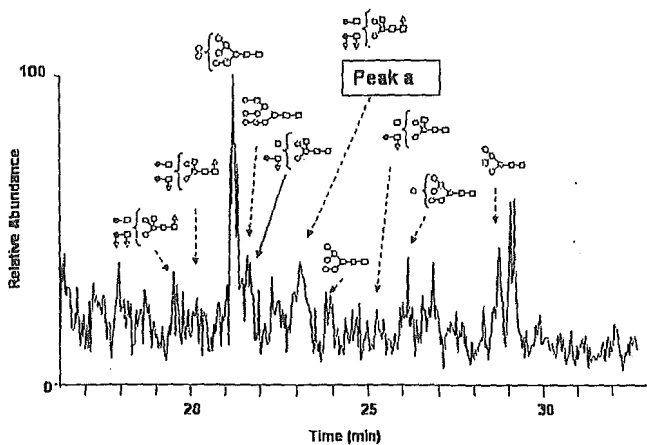


図2 マウス腎臓の糖鎖プロファイル

サンプル：腎臓(20 μ gタンパク質)の膜を含む画分からN-グリコナーゼによって切り出した糖鎖をNaBH₄で還元した

LC/MS：カラム及び溶離液，図1に準ずる；グラジエント，B液 5-45% (60分)；流速，2 μ l/min；MS，LTQ (サーモエレクトロン)

●, Gal; ○, Man; □, GalNAc; △, Fuc

1.2 糖鎖配列解析

糖鎖の配列や結合様式は、MSを繰り返す多段階MS (MSⁿ)によって、ある程度決定することができる²⁵⁻²⁷。図2は、マウス腎臓の膜画分から切り出したN結合型糖鎖を2-アミノピリジンで誘導体化し、LC/MSによる糖鎖プロファイリングを行ったものである。主な糖鎖は質量から、高マンノース型糖鎖、及び複数のフコースが結合した複合型糖鎖と推定された。各糖鎖の配列は、MSⁿにより決定した²⁸。一例として、図3にフコシル糖鎖ピーク a のMS²⁻⁴ スペクトルを示す。MS²によって[ヘキソース(Hex)-HexNAc-Fuc + Na]⁺ (m/z 534)、及び[Hex-HexNAc-Fuc₂ + Na]⁺ (m/z 680)が生じたことから、ピーク a にはルイス b (Le^b, Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc)、またはその異性体ルイス y (Le^y, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) 構造が存在することが示唆された(図3A)。そこで、m/z 534を前駆イオンとし

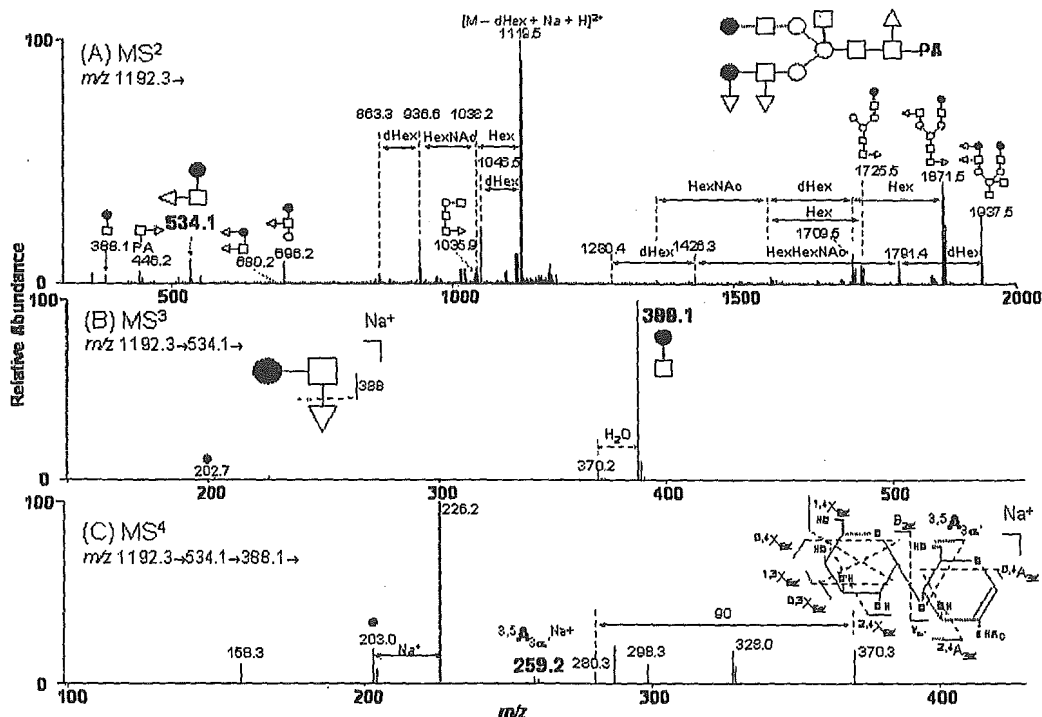


図3 図2中のピークaの (A) MS² (前駆イオン：m/z 1192.3)、(B) MS³ (前駆イオン：m/z 534)、及び (C) MS⁴ (前駆イオン：m/z 388) スペクトル

て MS³ を行ったところ、フコースが開裂した [Hex-HexNAc + Na]⁺ (*m/z* 388) が検出された (図3B)。つぎに *m/z* 388 を前駆イオンとして MS⁴ を行ったところ、環開裂した GlcNAc の 4 位炭素原子に Gal が結合したイオン (*m/z* 259) が検出されたことから、この部分構造は Le^x と決定された (図3C)。さらに、他の糖鎖のプロダクトイオンを解析した結果、マウス腎臓に結合しているフコシル糖鎖は Le^x 及び Le^y 糖鎖であることが明らかとなった。Le^x は SSEA-1 糖鎖としても知られる糖鎖エトープで、マウス ES 細胞に多く発現していることが知られ、ES 細胞の分化状態のモニタリングに利用されている糖鎖である²⁹⁾。また、シアル酸が結合したシアリル Le^x はヒト腫瘍マーカーとして利用されており³⁰⁾、マウス腎臓の主な糖鎖が Le^x 糖鎖であったことは興味深い。

2. LC/MSによる糖ペプチド解析

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、細胞・組織中の任意の糖タンパク質糖鎖の構造特性解析は糖鎖を切り離さずに行う。膜糖タンパク質などは不溶性または高分子量タンパク質であることが多いので、還元アルキル化した後、トリプシン、Lys-C、Glu-C、または Asp-N 等で消化してから分析するのが一般的である。MS において、ペプチドに比べて糖ペプチドのイオン化効率が悪いために、ペプチドが混在すると糖ペプチドのマススペクトルが得られにくいという問題があるが、LC/MS によってペプチドを除きながら質量測定を行えば、良好な糖ペプチドのマススペクトルを得ることができる³¹⁻³³⁾。糖タンパク質消化物の LC/MS では複雑なクロマトグラムが得られることが多いが、MSⁿ やインソースフラグメンテーションによって生じた糖鎖に特徴的なイオン、例えば、HexNAc⁺ (*m/z* 204) や Hex-HexNAc⁺ (*m/z* 366) などを利用することによって、糖ペプチドの MS² スペクトルを選び出すことができる

^{32, 34)}。選び出した糖ペプチドの MS² スペクトルには、ペプチドやペプチドに GlcNAc が結合したイオンが検出されている場合が多く、これらのイオンを基にペプチドと糖鎖部分の構造を決定する^{32, 33)}。

2.1 糖タンパク質の網羅的解析

図4A は、アルブミンをある程度除去したヒト血清のトリプシン消化物 0.02 μ l 相当を、C18カラムを用いた LC/MS² 装置で分析して得られた MS¹ の TIC である。血清は様々なタンパク質の混合物であるので、非常に多くのペプチドが検出されているが、MS² によって生じた HexNAc⁺ (*m/z* 204) を指標として、糖ペプチドの MS² スペクトルを選び出した (図4B)。選び出した糖ペプチドのペプチド配列と糖鎖構造は、MS² スペクトルを基に決定した。一例として図5 にピーク b の MS² スペクトルを示す。*m/z* 1442 に検出されている [ペプチド + GlcNAc + 2H]²⁺、及びペプチド由来のフラグメント (b, yイオン) から、この糖ペプチドはハ

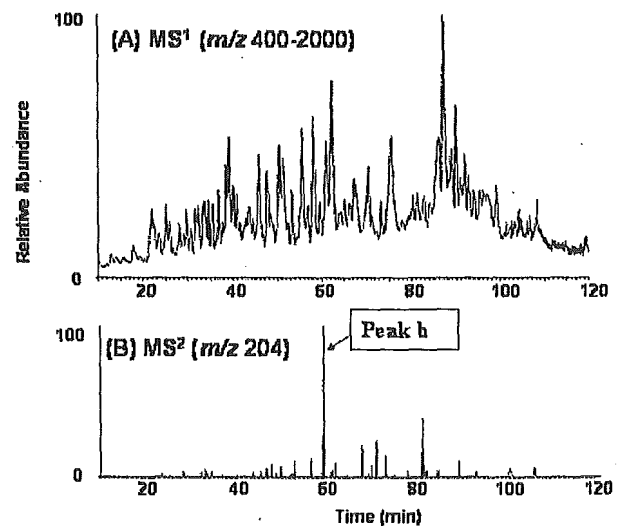


図4 (A) アルブミン除去ヒト血清トリプシン消化物の LC/MS によって得られた TIC、(B) LC/MS/MS によって生じた *m/z* 204 イオンのマスクロマトグラム
LC/MS: カラム, C18 (0.2 x 50 mm); 溶離液 A, 0.1 % ギ酸-2 % アセトニトリル; 溶離液 B, 0.1 % ギ酸-90 % アセトニトリル; グラジエント, B 液 5-50% (120 分); 流速, 2 μ l/min; MS, QSTAR (アプライドバイオシステムズ)

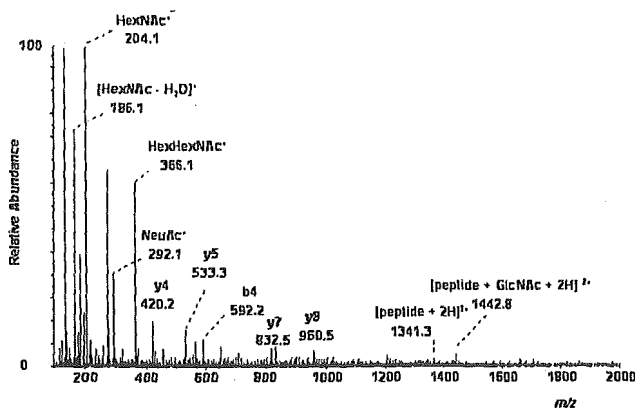


図5 図4B中のピークbのMS²スペクトル

プトグロビンの Met120-Lys143 と推定された。また、糖鎖構造は、糖ペプチドの分子量とペプチド部分の分子量の差からジシアロ2本鎖糖鎖と推定された。この方法により、ハプトグロビンの他、血清中のトランスフェリン由来糖ペプチドなども解析することができた。

2.2 糖鎖構造選択的糖タンパク質解析

ペプチド混合物の中からすべての糖ペプチドを選び出す場合は、糖鎖にほぼ共通して存在するHexNAc⁺を利用するが、任意の糖鎖を有する糖ペプチドのみを選び出す場合は、その構造に特徴的なイオンを利用する。例えば、マウス腎臓から前述したLe^x結合ペプチドを見つけた場合は、Le^xに相当するHex-(Fuc)HexNAc⁺ (*m/z* 512) 及びHex-HexNAc⁺ (*m/z* 366) を指標とすればよい。図6は、マウス腎臓膜画分をトリプシン消化し、フコースを認識するAALレクチンアフィニティークロマトグラフィーによりフコシル糖ペプチドを回収した後、C18カラムを用いてLC/MS^{2,3}を行った結果である。MS¹では複雑なクロマトグラムが得られたが(図6A)、MS²によってGalβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc⁺を生じ(図6B)、さらにMS³によってGalβ1-4GlcNAc⁺を生じたペプチドをLe^x結合糖ペプチドとして選別した(図6C)。選び出した糖ペプチドの糖鎖構造は、別途、強度の高いイオンを前駆イオンとして自動的にMSⁿを行うデータ依存的MSⁿ

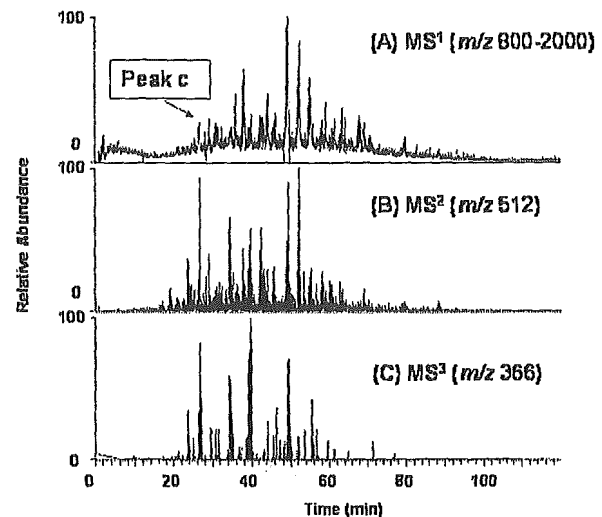


図6 (A)マウス腎臓トリプシン消化物由来フコシル糖ペプチドのTIC、(B)データ依存的MS²によって生じた*m/z* 512イオンのマスクロマトグラム、(C)MS³ (前駆イオン：*m/z* 512)によって生じた*m/z* 366イオンのマスクロマトグラム

サンプル：マウス腎臓膜画分トリプシン消化物のAALアフィニティークロマトグラフィー吸着画分LC/MS：カラム及び溶離液、図4に準ずる；MS、LTQ

によって解析した。図7はピークcに溶出されたLe^x結合糖ペプチドのデータ依存的MS²及びMS³スペクトルである。フラグメントパターンからこの糖ペプチドは、図7に示すようなLe^x部分構造を2分子有する糖鎖であることが明らかになった。さらに、MS²で生じた[peptide + GlcNAc + 2H]²⁺ (*m/z* 906)を前駆イオンとしてMS³を行った後、プロテオミクスで利用されているデータベース検索を行ったところ、この糖ペプチドはガンマグルタミルトランスフェラーゼのLHNQLLPN*TTTVEK (*糖鎖結合位置)と推定された。マウスガンマグルタミルトランスフェラーゼにLe^x糖鎖が結合していることは、木幡らによって報告されている³⁵⁾。このように、これまでは糖タンパク質を特定してから糖鎖を解析するのが一般的であったが、LC/MSⁿとタンパク質データベース検索を利用することによって、任意の糖鎖構造からタンパク質を特定することが可能となってきた。

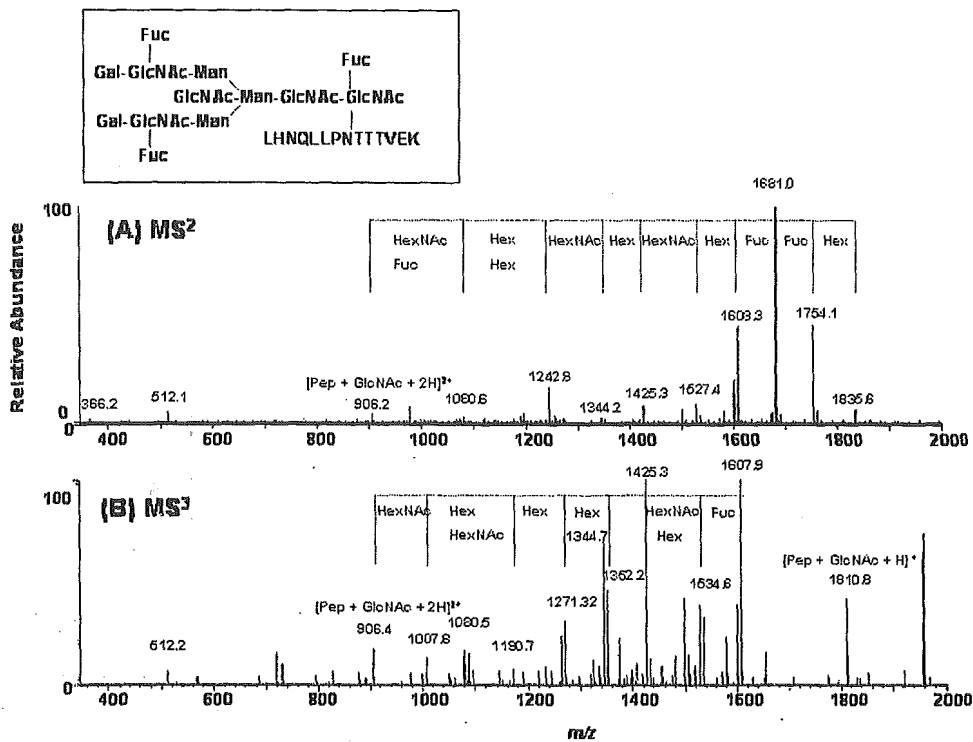


図7 図6中のピークcの位置に溶出された糖ペプチドの (A) データ依存的MS²、及び (B) データ依存的MS³スペクトル

3. 電気泳動法とLC/MSを用いた糖タンパク質の構造特性解析

細胞内糖タンパク質をインタクトのまま扱える場合は、不溶性糖タンパク質や、複雑な混合物中の糖タンパク質の分離に優れた電気泳動を利用するのが効果的である^{36, 37}。電気泳動を利用したグライコム解析例を2つ示す。

3.1 レクチンブロットとLC/MSによる糖タンパク質の同定

はじめに2次元電気泳動とレクチンを利用することによって、任意の糖鎖構造を持つコアタンパク質を特定した例を示す。図8Aは、前述のGnT-III遺伝子導入CHO細胞の2次元電気泳動図である。PHA-E₄レクチン染色を行い、GnT-IIIによってGlcNAcが付加されたタンパク質の位置を特定した(図8B)。別に展開した泳動ゲルからレクチンで染まった位置に相当するスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化、ペプチド抽出、LC/MS、及びタンパク質データベース検索を行った結果、こ

のタンパク質はインテグリン α 3と同定された²⁴。GnT-IIIは癌細胞転移抑制に関与していることが知られている酵素で³⁸⁻⁴⁰、そのターゲットタンパク質として細胞接着に関与しているインテグリンが同定されたのは興味深い⁴¹。

3.2 LC/MSⁿによるゲル内糖タンパク質の構造特性解析

つぎに、LC/MSを利用してゲル内糖タンパク質の同定、及び部位特異的糖鎖解析を行った例を示す。図9Aはマウス脳の膜面分から調製したGPIアンカー型タンパク質群をSDS-PAGEで展開し、クーマシー染色したものである。20-23kDaに表れているタンパク質は、SDSによる抽出、トリプシン消化、LC/MSⁿ(図9B)、及びデータベース検索の結果、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するThy-1と同定された。図9Cはインソースフラグメンテーションによって生じたm/z 204のイオンのマスクロマトグラムで、糖ペプチドの溶出位置を示している。各糖ペプチドの糖鎖と

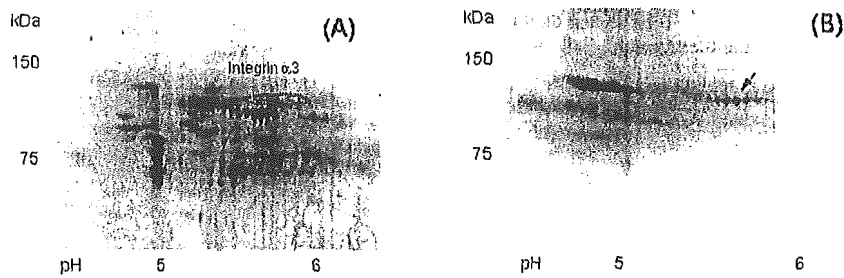


図8 GnT-III 遺伝子導入CHO 細胞の膜を含む画分の2次元電気泳動図
(A)CYPRO Orange 染色、(B)PHA-E₄レクチン染色

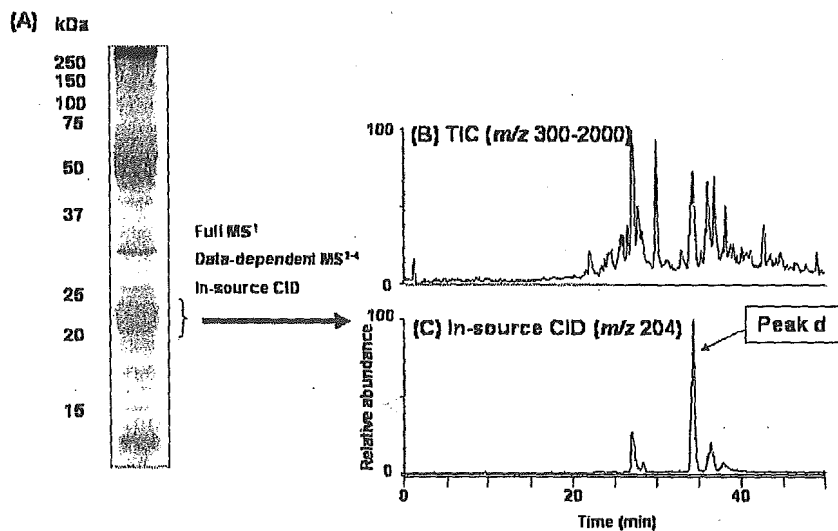


図9 (A) マウス脳由来GPIアンカー型タンパク質のSDS-PAGE、(B) 20-23kDaタンパク質トリプシン消化物のLC/MS、及び(C) インソースフラグメンテーションによって生じた m/z 204イオンのマスクロマトグラム

サンプル：20-23kDaに泳動されたタンパク質を1% SDSで抽出しトリプシン消化した
LC/MS：図6に準ずる

ペプチドは MS² 及び MS³ により決定した。一例として図10 に、図9C のピークd のデータ依存的 MS² 及び MS³ スペクトルを示す。フラグメントパターンからそれぞれ糖鎖配列、及びペプチド配列を図のように推定することができた。同様にすべての糖ペプチドの MS^{2,3}

スペクトルを解析することによって、Thy-1 の Asn23, 74, 及び 94 に結合しているN結合型糖鎖の構造を明らかにすることができた³³⁾。現在では、クーマシー染色される程度の糖タンパク質から、かなりの糖鎖構造情報を得ることが可能となってきた。