

れた。薬剤を臨床開発する前に標的に対する薬物動態を十分理解することが重要である。これは患者のために最も成功しやすい開発戦略を選択する手助けとなる。

C. 2 医薬品の製造方法の評価に関する国際動向研究

C. 2.1 ICH-Q8 ガイドライン作成の背景

ICH 品質分野において、新しい品質システム構築が提唱された背景としては、FDA の新しい戦略があるものと思われる。

米国 FDA は、ゲノム創薬等新しい医薬品開発手法が生まれ、医薬品開発が活発化しているにもかかわらず、近年、承認される医薬品数が減少傾向にあることに危機感を表明するとともに、2004 年に“Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products”（平成 18 年度分担研究報告書資料 1）という文書を発表し、医薬品開発および承認審査を妨げる要因を解析し、これを克服するための戦略を打ち出した。これとほぼ時を同じくして、医薬品の品質管理においても新しい考え方を打ち出し、“Pharmaceutical CGMPs for the 21st century: A risk-based approach”（平成 18 年度分担研究報告書資料 2）として公表し、品質リスク管理に基づくアプローチによる、新しい総合的品質システム構築を提唱した。その後、後者の品質管理システム構築の提案は、前者の総合的な医薬品開発促進策の提案の一部に組み込まれ、“Critical Path Initiatives”という国家計画として FDA によって再編成されている（“Critical Path Opportunities Initiated During 2006”（2006）（平成 18 年度分担研究報告書資料 3））。

FDA の医薬品品質管理についての危機意識は以下のようなものである。医薬品はヒトに投

与される商品であり、特に健康にかかわるがゆえに、歴史的に極めて厳しい規制体制が確立されてきた。このことが要因の一つとなり、医薬品の開発製造コストが高騰し、承認までの時間が延長し、医薬品開発は困難になってきている。また一度開発、承認されても、品質の向上あるいは製造コストの改善等を目指した製法変更は、規制当局による承認あるいは届出が必要なため、実施までに時間、経費がかかる。そのため製造工程の変更を避ける傾向にあり、工業製品の中でも製造管理は旧態依然のシステムで行われていることが少なくない。一方規制側からみると、製法変更に関する承認審査のために大きなリソースが必要とされるため、規制コストの増大を招いている。このような問題を解決するために、医薬品の品質管理に製造科学と品質リスク管理の考えを導入した新しい開発アプローチを導入し、品質管理システムを近代化させる必要がある。

FDA はこの新しいアプローチを“Quality by Design (QbyD)”的アプローチと称しているが、その意味するところは、環境要因、工程上の要因、原材料、品質特性といった工程上の重要な要素を確認し、これら要素が医薬品の性能や品質へ及ぼす影響を解析、それに基づき品質管理システムを構築するアプローチである。このアプローチをとる目的は、製造工程を科学的に解析することにより、生産される製品の品質を評価あるいは改善する能力を高め、最終製品の規格試験に頼らずに品質確保を行うことを可能とする新しい製造管理手法を構築することにあるとされる。その際、製品の品質特性を近赤外やラマン分光あるいはイメージングによってリアルタイムにモニタリングする手法（Process Analytical Technology (PAT)）は、品質を保証する上で重要な製造段階をモニタ

一するための分析手法となり、これらの手法を活用すれば、最終製品のロット試験なしにリアルタイムの出荷が可能となる。したがって、PATはQbDアプローチを実現させるために極めて有力な技術と位置づけられる。

ICHのQ8以降のガイドラインがテーマとして取り上げられていることについては、以上のFDAの新たな戦略が背景にあると考えられ、このような方向は、医薬品の世界同時開発を目指す医薬品開発企業の向かう方向にも合致したため、これら新しいICH品質ガイドライン作成が推進されているものと考えられる。

C. 2. 2 ICH Q8 ガイドラインについて

C. 2. 2. 1 Q8 製剤開発ガイドライン

ICHQ8「製剤開発ガイドライン」は、CTDに示された承認申請時に必要とされる添付資料の中で、3.2.P.2「製剤開発の経緯」の項において推奨されるべき記載内容に関するハイレベルな指針として作成された。

製剤開発研究の目的は、第一に適正な品質を有する医薬品を設計することであり、第二に意図した機能を有する医薬品を一貫して供給できる製造工程を設計することである。この目的を達成する過程においては、科学的手法と品質リスク管理の適用が推奨される。製剤開発研究や製造経験を通して得られた情報の理解により、製造管理法、及び規格が確立されるが、製造工程の理解が深まるにつれ、最終製品の規格試験による品質保証は、製剤設計及び工程の設計による品質保証に置き換えることが可能となる。さらに製造方法に関する科学的理解が深まり、製造管理においてその範囲では品質の一定性が保証されるデザインスペースを確立することができれば、その範囲での運用は規制上の製法変更とはみなされず、承認事項一部変更

のための規制手続きの必要がなくなり、製法変更の運用の弾力的な運用が可能となる。

このようにQ8ガイドラインは「製剤開発の経緯」の項の記載方法のガイドラインであるばかりでなく、医薬品製剤の品質管理における科学的手法と品質リスク管理の本格的導入を推奨する先進的/先導的ガイドラインである。これは、化成品規格および試験法ガイドライン(Q6A)においてスキップテストあるいはパラメトリックリリースとして萌芽的に導入された、最終製品規格試験に代わる工程管理による品質管理手法を、さらに品質管理法として様々な工程で導入することを推奨するガイドラインといえる。その際、デザインスペースという概念を導入し、製法変更の弾力的運用を可能にする方法の導入を図ったガイドラインでもある。

C. 2. 2. 2 Q8(R1) 製剤開発 Q8 付属書

Q8ガイドラインは、新しい製造工程開発・品質管理手法を提案する先進的/先導的ガイドラインであるが、それを現すための象徴的言葉であり、Q8ガイドライン作成の過程の議論において汎用されていた「QbDアプローチ」という用語そのものはQ8文書中では用いられておらず（文書中では”to design a quality product”, “quality should be built by design”と表現されている）、その定義についても文書化されないままにあった。また、規制上に柔軟性をもたらすための「design space デザインスペース」の概念についても、用語集の中で「品質を確保することが立証されている入力変数（原料の性質など）と工程パラメータの多元的な組み合わせと相互作用；このデザインスペース内で運用することは変更とみなされない；デザインスペース外への移動は変更とみなされ、

通常は承認事項一部変更のための規制手続きが開始されることになる；デザインスペースは申請者が提案し、規制当局がその評価を行って承認する」と説明されているものの、その具体例、設定方法、さらには規制への具体的な取り込み等について、必ずしも統一的な理解がされていないままに合意に至ったと思われる。

そこで、次のステップとして、経口固形製剤、注射剤、経口服液剤を例に、具体例や設定方法について明確にし、さらには従来行われてきた製造工程開発の手法（この文書では「最小限アプローチ」あるいは「基本となるアプローチ」と称せられる）とリスク管理手法を導入して製造科学に基づいて行う「体系的アプローチ（QbD アプローチ）」を比較検討、まとめるという方向でQ8を補足する複数の付属書の作成が開始された。しかしこの付属書を作成する過程で、QbD アプローチの中でも、規制上の弾力性を持たせるうえで要となる概念である「デザインスペース」の定義、具体例、設定方法へ議論の中心が移り、ステップ2ガイドラインは製剤別の具体例あるいは設定方法の例示というより、デザインスペースの概念の明確化、設定の考え方、CTD フォーマットにおける記載法に議論の中心が移り、ステップ2文書においても、記述の相当部分がこの点に割かれることとなった。

さらに、製剤毎に具体例を検討するとされていた、注射剤あるいは経口服液剤については、付属書作成は立ち消えとなってしまった。さらに当初「QbD アプローチ」とともにまとめられていた「最小限アプローチ」についても最小限の記述にとどめられ、「QbD アプローチ」と対比した表一つに概念がまとめられたのみとなった。

C. 2.3 Q8 および Q8(R1)ガイドラインにおける QbD アプローチ のバイオテク応用医薬品原薬の製法開発への適用

Q8(R1)付属書では、製剤開発における旧来のアプローチ：最小限アプローチ において必要な要素は、以下のようにまとめられている。

- (1)投与経路、剤形、生物学的利用能、用量、安定性などを考慮した、品質、安全性、有効性に関連する標的製品プロファイルの定義
- (2)当該製剤の重要品質特性(CQA)の特定；この特定により品質に影響を及ぼす製剤特性の研究や管理が可能となる
- (3)原薬、添加剤などの品質特性の特定及び望ましい品質を製剤に付与する添加剤の種類と量の選択
- (4)適切な製造工程の選択
- (5)管理戦略の決定

QbD アプローチでは、以上の要素に加えて下記の要素が必要とされている。

- (6)製剤処方及び製造工程の体系的な評価、理解、洗練；これには以下に挙げるような作業が含まれる
 - ・従前の知識、実験、リスクアセスメントなどを通じ、製剤のCQAに影響を及ぼす原料特性及び工程パラメータの特定
 - ・原料特性及び工程パラメータと製剤のCQAを関連づける機能的関係の特定
- (7)適切な管理戦略を確率するための、品質リスクアセスメントと組み合わせた深い工程理解の活用；これにはたとえばデザインスペース及び/又はリアルタイムリリースについての提案が含まれる。

以上の要素が満足されるような開発アプローチがとられることによって、製品ライフサイ

クルの全期間を通じた継続的な改善およびイノベーションが実現する、とされている。

これを原薬に移し替えると、QbD アプローチをとる際、標的製品プロファイルの設定、あるいは CQA を特定するにあたっては、(1)有効成分の特定（定義）が可能な特性、(2)不純物（有効成分に由来する不純物、および工程由来不純物）の特性、(3) 混入物質の特性、(4)安定性を考える必要がある。これらの点について、バイオテクノロジー応用医薬品原薬の場合、化成品原薬とは以下のような違いがある。

(1)有効成分として特定が可能な特性： 化成品原薬においては、NMR あるいは赤外スペクトルといった構造解析によって有効成分を特定（定義）できる。しかしバイオテクノロジー医薬品では、構造解析からの定義、構造解析以外の物理化学的特性からの定義、そして生物学的特性からの定義を併用することになる。即ち、多くのバイオテクノロジー応用医薬品においては、高次構造解析手法の限界により構造解析データのみから有効成分を特定することは困難である。したがって有効成分を定義する上で、構造解析+物理化学的特性の分析に加えて、生物活性値を合わせて物質を定義せざるを得ない製品がほとんどである。ここで生物活性試験と臨床効果との関係が明瞭な物質の場合は、生物活性から有効性（あるいは安全性）へのインパクトを予測することは可能と考えられるが、生物活性と臨床効果の関係が明瞭でない物質の場合は、有効性・安全性に悪影響を及ぼすことのない変動幅を設定することは必ずしも容易でないが、バイオテクノロジー応用医薬品の中には、このように生物活性と臨床効果の関係が明瞭でないものが少なくない。

さらにペプチドの N-末、C-末における翻訳後

修飾に由来する分子多様性、あるいは糖タンパク質に代表されるような複合タンパク質のもつ分子多様性ゆえに、有効成分を定義（特定）するために構造の特性をパターンとして表現せざるを得ない。ただし、このパターンは赤外スペクトルのように同一性が明確に判定できるものではなく、同等性/同質性を判定する上での判定基準が明確に設定しにくいパターンである。

また有効成分には、目的物質と同様の生物活性を示す目的物質関連物質も含まれることから、有効成分一つをとってみても、有効性、安全性へ悪影響を及ぼさない品質特性の範囲について境界を明確化することは困難である。

(2)不純物の特性： 化成品不純物の多くは、液クロ、ガスクロでの定量的な解析が比較的容易であり、不純物混入の安全性へのインパクトについては、ICH 不純物ガイドラインで設定されている基準量から整理することができよう。さらに、毒性を確認する必要があるほどの量の不純物が含まれている場合でも、動物実験によって安全性へのインパクトを予測することは比較的容易である。一方、多くのバイオテクノロジー応用医薬品の場合、含有される可能性のある目的物質由来不純物については、開発中に行うロット分析によって特定し、CQA の絞り込みも可能かもしれないが、不純物個々の生物作用は種特異的である場合が多いので、動物実験でヒトに対する有効性・安全性へのインパクトを定量性を含めて予測するには限界がある。さらに特にヒトに対する抗原性を示す可能性は、極低レベルでもあるので、安全性へのインパクト予測は困難であり、化成品 ICH 不純物ガイドラインを適用することはできない。したがって例え不純物に関する CQA と工程パラメータとの関係は求められても、その変動の

安全性へのインパクトを量的に求めることは困難である。

(3)混入物質の特性： 無菌性の評価については、化成品でもバイオテクノロジー応用製品でも、同様と考えられる。しかし、デザインスペースを設定する際に必要な、種々条件を変えての検討を、ウィルスあるいはプリオンに関する製造工程の除去能について行うことは、コスト的にも定量的評価の困難さを考えても現実的ではない。したがって、ウィルスあるいはプリオン除去に関係するような工程パラメータについてのデザインスペースの設定は困難かと思われる。

(4)安定性： 化成品原薬の実時間、実保存条件での安定性については、加速試験結果からの外挿が可能な場合が多く、安定性という要素をデザインスペースの設定に加味することは比較的容易と考えられる。一方、タンパク質性医薬品の場合、加速試験条件の安定性データからの実時間安定性の予測性は特定のタンパク質製品を除いて十分とはいえない。したがって、実時間、実保存条件での安定性データが基本である。そのため、原料特性および工程パラメータと安定性との関係の解析は、化成品と比べて格段に制限されると考えられる。

C. 2. 4 バイオテクノロジー応用医薬品のデザインスペース設定の可能性

以上のように、有効成分、不純物、混入物質、安定性 という品質特性パラメータを特定する上で配慮すべき要素に関して、バイオテクノロジー応用医薬品の場合、多様であり、工程パラメータと品質特性パラメータの関係の解析が困難なものも少なくないと思われる。さらにパラメータ間の相互作用についても、科学的な解析が可能なものは必ずしも多くないことが

予想される。

また有効性・安全性へ悪影響を及ぼさない品質特性の変動幅を、臨床データなしに求めることは、多くのバイオテクノロジー応用医薬品では困難である。したがって、デザインスペースの設定の検討において、判定基準となる CQA は、第三相臨床試験に用いたロットの品質特性に縛られることとなり、設定できてもデザインスペースは限定的なものになるものと思われる。

ただし、例えば、生産培養工程のように、細胞個々がおかれる物理的、化学的環境要因について、要因（温度、攪拌条件、スケール、溶液中の物質濃度等）間の相互作用を数式で表現できるような製造工程においては、例えばスケールアップ時の温度あるいは攪拌条件等の工程パラメータに関するデザインスペースを、リスク管理手法を応用して求めることは可能と考えられる。

また同様に精製工程のカラムクロマトグラフィなどについても、物理的、化学的解析から、パラメータ間の相互作用の関係を数式で表現できるケースがあり、そのような場合は、工程パラメータに関するデザインスペースの設定は可能と考えられる。

C. 2. 5 バイオテクノロジー応用医薬品の製造工程における PAT について

QbD アプローチのメリットとして、リアルタイムモニタリング手法を導入して、製品ロット試験を行わずして、リアルタイム出荷を実現することが挙げられている。このポイントについては、化成品とバイオテク応用医薬品の間に相違はない。ただし、原薬は、最終製剤からみると、中間体の一つとみなせ、リアルタイム出荷は、製剤におけるほどの実質的なインパクト

はない。しかし、リアルタイムモニタリング手法の採用は、原薬の品質向上に役立つと考えられる。

例えば生産培養工程において、細胞の生育状態、培養液中の成分濃度、あるいは目的タンパク質の生合成量、目的物質関連物質や不純物量等をリアルタイムモニタリングし、フィードバック的に培養時間、培養条件等を適宜調節すれば、生産効率の向上、不純物量の低下、原薬の一定性確保という視点から、より合理的な生産管理が可能と考えられる。したがって、培養工程における各種リアルタイムモニタリング手法、精製工程における不純物、混入物質等のリアルタイムモニタリング手法の開発・導入は、製品の一定性確保および品質向上に資するところ甚だ大と思われる。

同様のことは、クロマトグラフィーによる精製工程においても当てはまることであり、流出物のリアルタイムモニタリングを行い、フィードバック的に流出条件を調節するようなシステムにすることで、製品の品質向上も期待できる。

C.3 生物薬品の特性・品質評価解析、品質評価法の開発に関する研究

C.3.1 本質記載

(1) 本文には、由来及び構造情報を記載し、製造方法の詳細や遺伝子情報の記載は最小限に留める。

本文には、ペプチド/タンパク質等の由来や構造情報を記載し、有効性・安全性等に特に影響がない限り、製造方法や遺伝子情報に関する記載は最小限に留めてよいと考える。例えば、最終産物に含まれないシグナルペプチドや、mRNA の由来組織は本質記載に記す必要はない。また、DNA の種類（例えば合成 DNA、ゲノ

ム DNA、または cDNA 等）に関する記載は今後省略してよいだろう。

(2) 本文は、「●は、・・・」で始める。ここで●は、該当品目の JAN を意味する

これまで JAN の本質は、「ヒト肝細胞の mRNA に由来するヒト xxxxx cDNA の発現により、チャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される一個のアミノ酸残基 (C H N O S ;分子量:...,...) からなる糖たん白質 (分子量:約...,000)」のように、「・・・からなるたん白質」や「・・・からなるペプチド」で終わる 1 文で記載するのが一般的であった。しかし、最近では、改変型、断片型、修飾型、融合型、もしくはそれらを組み合わせた複雑な構造特性を有するバイオ医薬品が開発されるようになり、従来の記載方法で構造特性を表現することが難しくなっている。一方、第 16 改正日局原案作成要領において基原の書きだしは「本品は・・・」とするとされており、基原、構造、活性、及び含量等を含む多くの情報を複数の文に分けて記載することが可能になっている。そこで、JAN の本質記載においても、日局の基原の記載方法に準じ、「●は、・・・(●は、該当品目の JAN を意味する)」で書きだすこととし、必要に応じて本質記載を複数の文に分けてもよいこととするのが適切と考えられる。以下に、具体的な記載方法を示す。

(3) 本文には、1) 基原 ①製造方法 (抽出、合成、又は遺伝子組換え等)、②由来、及び型 (天然型、類縁型、又は融合型等)、③改変、断片、修飾、及び/又は融合等の内容; 2) 基材 (産生細胞); 3) 構造 (アミノ酸残基数、サブユニット数、及び分子量 (不均一性が高い場合)) を記す

1) 基原

① 製造方法

従来通り、申請/届出品目が天然から抽出したもの、合成品、もしくは遺伝子組換え技術によって製造したものであることを明らかにする。細胞・組織から抽出した場合は、「ヒトリンパ芽球で産生される」あるいは「ヒト尿に由来する」のように細胞の種類や由来組織等が明確になるように記載する。合成型、及び遺伝子組換え型の場合は、それぞれ「合成」及び「遺伝子組換え」と記載し、さらに②及び③に示すような構造情報を記載する。表1の①に製造方法の記載例を示す。

② 由来、及び型

合成または遺伝子組換え型の場合は、ペプチド/タンパク質等の由来と型を明らかにする。ここで型とは、天然型、類縁型、及び融合型を意味する。天然型とは、天然に存在するペプチド/タンパク質等と同一のアミノ酸配列を有し、改変や修飾が施されていないものを指す。類縁型とは、ある一つのペプチド/タンパク質のアミノ酸配列の一部を改変したもの、断片に相当するもの、あるいは修飾したものを指す。融合型とは、2つ以上のペプチド・タンパク質の全体もしくは一部分から構成されているものを指す。表1の②に由来及び型の記載例を示す。

a. 天然型

天然型の場合は、「ヒト成長ホルモンで」、または「組織プラスミノゲンアクチベータで」のようにペプチド/タンパク質等の由来を明らかにする。多型が知られている場合は、「□の多型の主要なバリエーションの一つで」のように記載する。また、第VIII因子やインターフェロ

ンアルファのように複数のアイソフォームが存在する場合は、「△の主要なアイソフォームで」、あるいは「△のアイソフォームの一つで」のように記載するのが望ましい。

b. 類縁型

類縁型の場合は、「ヒト成長ホルモンの類縁体で」、または「ヒト組織プラスミノゲンアクチベータの類縁体で」のように、何の類縁体であるかを明らかにする。さらに下の③に示すように、改変・修飾あるいは断片化等の内容について説明する。

c. 融合型

融合型の場合は、「ヒトIgG1のFcドメインとヒト α 受容体からなる融合タンパク質」のように、構成している成分を明確にする。モノクローナル抗体の場合は、抗体の型がわかるように「ヒト化モノクローナル抗体」や「キメラモノクローナル抗体」のように記載する。

③ 置換、断片、修飾、及び/又は構成成分等の説明

類縁型の場合は、以下のa~cに示すように、置換したアミノ酸、相当するアミノ酸の位置、あるいは修飾方法等について説明する。また、融合タンパク質の場合は、以下のdに示すように、構成ペプチド/タンパク質について説明する。尚、一部の分子にのみ生じた意図しない修飾で、有効性・安全性等に特に影響しない場合は、本質記載に記載する必要はない(2. アミノ酸配列、糖鎖構造、及びその他の修飾等を参照)。(例 N末端のピログルタミン酸形成、C末端のプロセシング)。表1の③に置換、断片、修飾、及び/又は融合に関する説明の例を示す。

a. 置換

アミノ酸残基の一部が置換されたペプチド/タンパク質の場合は、置換された位置と置換後のアミノ酸残基がわかるように、「A鎖の5番目のAsnがSerに、B鎖の8番目のThrがProに置換されている」もしくは「Fcドメインの300、305及び310番目のアミノ酸残基がSerに置換されている」のように記載する。

b. 断片

あるペプチドやタンパク質の一部分からなるペプチド/タンパク質の場合は、「ヒト成長ホルモンの101～191番目のアミノ酸残基に相当する」、「組織プラスミノゲンアクチベータのクリングル2ドメイン及びセリンプロテアーゼドメインからなる」、もしくは「〇〇抗体のFab断片からなる」のように、そのペプチド・タンパク質が元のペプチド/タンパク質のどの部分に相当するかを記載する。

c. 修飾

脂質、合成化合物、PEG、あるいは改変糖鎖等が共有結合しているペプチド/タンパク質の場合は、修飾物質の種類（化学名、分子式及び分子量等）、結合数、主な結合位置、並びに結合方法等を記載する。例えば、「平均2本のメトキシポリエチレングリコール(平均分子量5,000)が共有結合している（主な結合部位：Lys5、Lys15）」、「20番目のLysにパルミチン酸が結合している」、もしくは「H鎖のAsn305にフコース非結合糖鎖が結合している」のように記載する。

d. 融合

2つ以上のペプチド/タンパク質の全体もしくは一部が融合した形で構成されるペプチド/

タンパク質の場合は、各ペプチド/タンパク質の由来と、それぞれが最終産物のどの部分に相当するかを説明する。例えば、ヒト化モノクローナル抗体、及びFcドメインと受容体の一部からなる融合タンパク質の場合は、それぞれ「マウス抗ヒトCD▲抗体の相補性決定部、並びに□鎖を含むヒトIgG1のフレームワーク部及び定常部からなる」、及び「1～133番目はヒトCD28の細胞外領域、また134～356番目はヒトIgG1のFc領域からなる」のように記載する。

2) 基材

従来通り、糖タンパク質の場合は、「チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される」、「△酵母により産生される」、「マウスミエローマ(NSO)細胞により産生される」のように細胞の種類を記載する。尚、産生細胞のサブラインは記載する必要はない。また、ペプチドやタンパク質の場合は原則として細胞を記載しない。Table 1の④に記載例を示す。

3) 構造

構造情報として、従来通り、アミノ酸残基数及びサブユニットの数を記載する。モノマーの場合は、「…個のアミノ酸残基からなるタンパク質」、ホモダイマーの場合は、「…個のアミノ酸残基からなるサブユニット2分子から構成されるタンパク質」、また、ヘテロダイマーの場合は、「…個のアミノ酸残基からなるA鎖及び…個のアミノ酸残基からなるB鎖から構成されるタンパク質」のように記載する。抗体の場合は、「…個のアミノ酸残基からなるL鎖2分子及び…個のアミノ酸残基からなるH鎖2分子から構成される糖タンパク質」と記載する。分子量が均一なペプチド、タンパク質（修飾

ペプチド、修飾タンパク質、糖ペプチド、及び糖タンパク質を含む)の分子式及び分子量は、分子式及び分子量欄に記載し、本質記載には記載しないこととする(3. 分子式及び分子量参照)。分子量が不均一なペプチド、タンパク質(例:糖ペプチド、糖タンパク質、修飾ペプチド、及び修飾タンパク質等)の場合は、分子全体の分子量を適正に反映する方法、例えば、理化学分析(質量分析法、超遠心分析法、電気泳動法、サイズ排除クロマトグラフィー等)による測定値、あるいは、アミノ酸部分の理論分子量に修飾部分の化学分析等による分子量測定値を加えた値を、“約 35,000”のように記載すればよい(百位以下の桁は四捨五入)。分子量の根拠は、理化学的研究に関する資料の中で説明する。尚、測定値と理論的な値に大きな差があるときは、測定方法を記載することが望ましい。表1の⑤に記載例を示す。

C. 3. 2 アミノ酸配列、糖鎖構造、及びその他の修飾等

(1) アミノ酸配列及び翻訳後修飾の位置

第16改正日局原案作成要領に準じ、概ね20アミノ酸残基以下のペプチドは3文字で表記する。また、概ね21アミノ酸残基を超えるペプチド・糖ペプチドは1文字で表記し、50残基で改行する。

意図せず生じた翻訳後修飾等は、本質記載ではなく、脚注に翻訳後修飾されているアミノ酸残基と翻訳後修飾の種類を記載することとする。対象となる主な翻訳後修飾として、N末のアセチル化やピログルタミン酸形成、C末のプロセシング、糖鎖付加などが挙げられる。また、一部の分子にのみ生じた修飾は「Gln1:ピログルタミン酸形成(部分的)」や「N100:糖鎖付加(部分的)」のように記載する。

(2) ジスルフィド結合

ポリペプチド鎖内ジスルフィド結合は、システイン残基を「C-C」を用いてなるべく線同士が交差しないように結ぶ。ポリペプチド鎖間ジスルフィド結合は、「A鎖 Cys10-B鎖 Cys15」や「C300:ポリペプチド鎖間ジスルフィド結合」のように記載する。

(3) 糖鎖構造

糖鎖は、代表的な数個の糖鎖の構造を結合位置ごとに記載するのが望ましい。糖鎖の有無や糖鎖構造が活性等に影響しない場合は、結合の割合が多い数個の糖鎖を記載すればよい。また、糖鎖の構造が活性等に影響する場合は、結合数の多い糖鎖を数個と活性等に寄与する代表的糖鎖構造を数個記載する。部位ごとの糖鎖構造が明らかでない場合はまとめて記載してよいものとする。

(4) その他の翻訳後修飾

脂質、合成化合物、またはPEG等が結合している場合は、その構造及びペプチド/タンパク質への結合方法がわかるように記載する。

C. 3. 3 分子式及び分子量

(1) 対象

1) 均一なペプチド/タンパク質

分子量及び分子式が均一なペプチド及びタンパク質の場合は、分子式及び分子量欄に分子式及び分子量を記載する。修飾ペプチド、修飾タンパク質、糖ペプチド、もしくは糖タンパク質等で、修飾の種類及び結合数が均一な場合は、修飾もしくは糖鎖付加された分子の分子式及び分子量を記載する(例 N末のアセチル化、C末のアミド化、アシル基付加など)。意図せ

ず生じた部分的修飾は、修飾されていないものとして計算する(例 N末の部分的ピログルタミン酸形成、C末の部分的プロセシングなど)。

2) 不均一なペプチド/タンパク質

糖ペプチド、糖タンパク質、修飾ペプチド、あるいは修飾タンパク質(例 PEG化タンパク質)等で、分子式及び分子量が不均一な場合は、日局に準じ、ペプチドもしくはタンパク質部分の分子式及び分子量を記載する。

単純タンパク質であっても、分子式及び分子量が不均一な場合は、分子式及び分子量記載欄に分子式及び分子量を記載する必要はない(例 インターフェロンアルファ、第 VIII 因子等)。

(2) 計算方法

分子量は、最新の原子量表を使って分子式から理論分子量を計算した後、小数点以下3桁目で四捨五入して計算する。

N末端、C末端、及び側鎖は非解離状態で計算する。

分子全体の分子式は、ジスルフィド結合を S-S として計算する。サブユニットの分子式は、ポリペプチド鎖内ジスルフィド結合を S-S として計算し、ポリペプチド鎖間ジスルフィド結合を SH(還元型)として計算する。

C. 3.4 記載例

以下にモデルペプチドあるいはタンパク質を用いて、本質、アミノ酸配列等、並びに分子式及び分子量の記載方法を示す。

(1) 置換型合成ペプチドの例 (表1における分類: ①b、②b、③a、④a、⑤a)

オキシトシンの8番目の Leu 残基が Lys に置換された合成ペプチドの場合、本質記載は以

下ようになる。アミノ酸配列は3文字で表記し、C末端のアミド結合とジスルフィド結合を記載する。分子量及び分子式はアミド結合及びジスルフィド結合したものとして計算する。

本質記載:

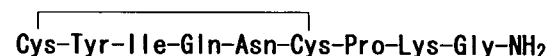
[英名]

● is a synthetic human oxytocin analog in which Leu at position 8 is substituted by Lys. ● is a peptide consisting of 9 amino acid residues.

[日本名]

●は、合成ヒトオキシトシン類縁体で、8番目の Leu が Lys に置換されている。●は、9個のアミノ酸残基からなるペプチドである。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合:



分子式及び分子量:

C₄₃H₆₇N₁₃O₁₃S₂: 1,038.20

(2) 断片型遺伝子組換えペプチドの例 (①c、②b、③b、④a、⑤a)

ヒト成長ホルモンの101番目から191番目のアミノ酸配列と同じ配列をもつ遺伝子組換えペプチドの場合、本質記載及びアミノ酸配列は以下の通りとなる。アミノ酸配列は1文字で表記する。

本質記載:

[英名]

● is a recombinant human growth hormone analog which corresponds to

amino acids 101 – 191 of human growth hormone. ● is a peptide consisting of 91 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒト成長ホルモンの類縁体で、ヒト成長ホルモンの101～191番目のアミノ酸に相当する。●は、91個のアミノ酸残基からなるペプチドである。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合：

LVYGASDSNV YDLLKDLLEEG IQTLMGRLLED GSPRTGQIFK QTYSKFDNTS
 HNDDALLKNY GLLYCFRKDM DKVETFLRIV QCRSVEGSCG F

分子式及び分子量：

$C_{455}H_{708}N_{122}O_{145}S_5$: 10,367.55

(3)断片型・置換型・修飾型遺伝子組換えタンパク質(均一)の例 (①c、②b、③a、b及びc、④a、⑤a)

ヒト成長ホルモンの51～191番目のアミノ酸配列と同じ配列を持つ遺伝子組換えタンパク質で、N末端側から90番目のアミノ酸残基がSerに置換され、20番目のLys残基にミリスチン酸が結合している場合、本質記載は以下のようなになる。アミノ酸配列等には、一次構造及びジスルフィド結合に加えて、ミリスチン酸の結合位置及び構造を記載する。この類縁体の分子式及び分子量は均一なので、分子式及び分子式はミリスチン酸が結合しているものとして計算する。

本質記載：

[英名]

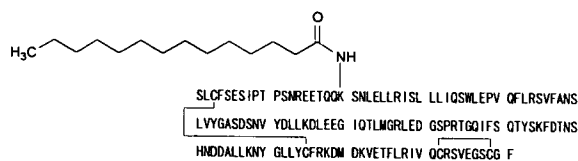
● is a recombinant human growth hormone analog corresponding to amino acids 51-191 of human growth hormone,

whose Lys at position 90 is substituted by Ser, and whose Lys at position 20 is myristoylated. ● is a modified protein consisting of 141 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒト成長ホルモンの類縁体で、ヒト成長ホルモンの51～191番目のアミノ酸に相当し、90番目のLys残基がSerに置換され、20番目のLys残基がミリスチン酸化されている。●は、141個のアミノ酸残基からなる修飾タンパク質である

アミノ酸配列、ジスルフィド結合、及び修飾



分子式及び分子量：

$C_{723}H_{1135}N_{189}O_{225}S_6$: 16,267.27

(1) 改変型・修飾(PEG化)型遺伝子組換えヘテロダイマー型ペプチド(不均一)の例 (①c、②b、③a及びc、④a、⑤c)

インスリンをモデルに、PEG化されたペプチド/タンパク質の記載方法を考える。インスリンはA鎖及びB鎖からなるヘテロダイマーペプチドである。モデルペプチドのA鎖10番目及びB鎖15番目のアミノ酸残基はLysに置換され、平均2～3個のPEGが共有結合している。PEG化予想部位はA鎖のN末端Glyと10番目のLys、並びにB鎖のN末端のPheと15及び29番目のLysである。このPEG化インスリンの本質記載は以下のようなになる。この分子は不均一であるので、本質記載に分子量を約〇〇と記載する。また、分子量に幅がある

場合は、○～○のように幅記載してもよいものとする。分子式及び分子量欄には、ペプチド部分全体、及びA鎖とB鎖のペプチド部分の分子式及び分子量を記載する。A鎖の分子式及び分子量は、サブユニット内ジスルフィド結合はS-Sとして、またサブユニット間ジスルフィド結合は還元型(SH)として計算する。ペプチド部分全体は、すべてジスルフィド結合しているものとして計算する。アミノ酸配列、PEG化部位及びPEGの構造を記載する。

本質記載：

[英名]

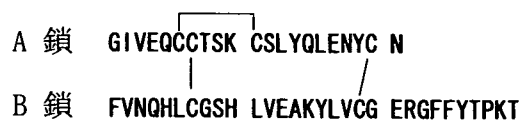
● is a recombinant human insulin analog in which Ile10 in the A-chain and Leu15 in the B-chain are substituted by Lys, and to which an average of 2 to 3 polyethylene glycol polymers (molecular weight: ca. 5,000) are covalently bound (probable attachment sites: A-chain: Gly1, Lys10; B-chain: Phe1, Lys15, Lys29). ● is a pegylated peptide (molecular weight: ca. 15,000 – 20,000) whose peptide moiety is composed of a A-chain consisting of 21 amino acid residues and a B-chain consisting of 30 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒトインスリンの類縁体で、A鎖Ile10及びB鎖Leu15がLysに置換され、平均して2～3個のポリエチレングリコール(平均分子量：約5,000)が結合している(主な結合位置:A鎖Gly1、Lys10; B鎖Phe1、Lys15、Lys29)。●は、21個のアミノ酸残基からなるA鎖及び30個のアミノ酸残基からなるB鎖から

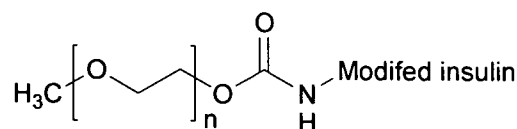
構成されるPEG化ペプチド(分子量：約15,000～20,000)である。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合



A鎖G1、A鎖K10、B鎖F1、B鎖K15、
B鎖K29：PEG化部位

PEG結合



分子式及び分子量：

C₂₅₇H₃₈₅N₆₇O₇₇S₆：5,837.60 (ペプチド部分)

A鎖 C₉₉H₁₅₄N₂₆O₃₅S₄：2,396.70

B鎖 C₁₅₈H₂₃₅N₄₁O₄₂S₂：3,444.94

(5) 遺伝子組換え糖タンパク質の例 (①c、②a、④b、⑤a)

インターフェロンガンマの2箇所を高マンノース型糖鎖と複合型糖鎖が結合している場合、本質記載には産生細胞と分子量を記載する。分子量及び分子式欄には、ペプチド部分の分子式及び分子量を記載する。また、一次構造の脚注に糖鎖結合部位を示し、別に部位毎の主な糖鎖構造を示す。

本質記載：

[英名]

● is a recombinant human interferon gamma, which is produced in Chinese hamster ovary cells. ● is a glycoprotein (molecular weight: ca.21,000) consisting

of 146 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒトインターフェロンガンマで、チャイニーズハムスター卵巣細胞から産生される。●は、146個のアミノ酸からなる糖タンパク質(分子量：約21,000)である。

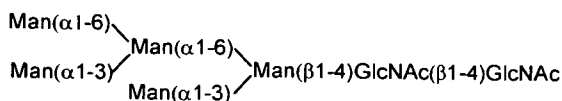
アミノ酸配列：

CYQDPPYVKE AENLKKYFNA GHSDVADNGT LFLGILKNWK EESDRKIMQS
QIVSFYFKLF KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM NVKFFNSNKK KRDDFEKLTN
YSVTDLNVQR KAIHELIVQM AELSPAAKTG KRKRSQMLFR GRRASQ

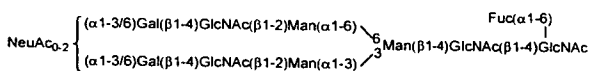
N28、 N100：糖鎖結合部位

主な糖鎖の推定構造：

N28



N100



分子量及び分子式：

C₇₆₁H₁₂₀₆N₂₁₄O₂₂₅S₆：17,145.41(タンパク質部分)

(6) 遺伝子組換えヒト化抗体の例 (①c、②c、③d、④b、⑤c)

ヒト化抗体の場合、本質記載には以下のように、相補性決定部の由来とフレームワーク及び定常部の由来をサブクラス(IgG1~4)及びL鎖(κ鎖またはλ鎖)を含めて記載する。キメラ型の場合は、可変部の由来と定常部の由来を

サブクラス(IgG1~4)及びL鎖(κ鎖またはλ鎖)を含めて記載する。N末端のピログルタミン酸形成やC末端のプロセシングのように意図しない修飾が一部の分子に生じている場合は、本質記載ではなく、一次構造の脚注にK459：プロセシング(部分的)のように記載する。分子式及び分子量は、修飾されていないものとして計算する。

本質記載：

[英名]

● is a recombinant humanized monoclonal antibody composed of complementarity-determining regions derived from mouse anti-human O monoclonal antibody and framework regions and constant regions derived from human IgG1. ● is produced in Chinese hamster ovary cells. ● is a glycoprotein (molecular weight: ca.155,000 - 160,000) composed of 2 H-chain (γ-chain) molecules consisting of 459 amino acid residues each and 2 L-chain (κ-chain) molecules consisting of 214 amino acid residues each.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体であり、マウス抗ヒト抗体の相補性決定部、並びにヒトIgG1のフレームワーク及び定常部からなる。●は、CHO細胞により産生される。●は、459個のアミノ酸残基からなるH鎖(γ1鎖)2分子及び214個のアミノ酸残基からなるL鎖(κ鎖)2分子で構成される糖タンパク質(分子量：約155,000~160,000)である。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合：

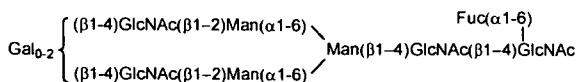
ELGMTQSPSS VSASVGRVT ITCRASHSIS TYLNWYQOKP GKAPKLLIYA
 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FSLTINSLOP EDFATYYCOO TFSPSGTFGO
 GTKVELKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWVK
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYKHK LYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK

EVLVESGGG LVOPGGSLRL SCAASGFTFT SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN
 IKQEGSEKTY VDATKGRFTI TRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVVYCAREF
 ESTMTSVNAD YYYFYMDVWG KGTITVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG
 TAALGCLVKD YFPEPVTWSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSVVTV
 PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVKPK SCDKHTCPP CPAPPELLGGP
 SVFLFPPKPK DTLMISRTE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNK
 TKPREEOYNS TYRVVSVLTV LHODWLNKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 NNYKTTTPVL DSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

H 鎖 E1：部分的ピログルタミン酸；H 鎖 N309：糖鎖結合；H 鎖 K459：部分的プロセシング；

L 鎖 C214 - H 鎖 C232、H 鎖 C238 - H 鎖 C238、H 鎖 C241 - H 鎖 C241：ジスルフィド結合

主な糖鎖の推定構造：



分子量及び分子式：

C₆₅₃₆H₁₀₀₉₆N₁₇₃₆O₂₀₅₄S₄₈：147,395.62 (タンパク質部分、4 量体)

H 鎖 C₂₂₅₁H₃₄₇₂N₅₉₄O₆₉₃S₁₈：50,520.39

L 鎖 C₁₀₁₇H₁₅₈₀N₂₇₄O₃₃₄S₆：23,181.45

(7) 遺伝子組換え改変型融合型二量体(ホモ)糖

タンパク質の例 (①c、②c、③a 及び d、④b、⑤b)

N 末端側は受容体タンパク質の細胞外領域に由来し、C 末端側は Fc ドメインに由来する融合タンパク質で、N 末端側から 147 番目のアミノ酸が Ser 置換されている場合、本質記載は以下のようになる。この融合タンパク質の 6 箇所に糖鎖が結合しており、その内シアル酸結合糖鎖は活性に影響するものとする。アミノ酸配列とは別に糖鎖結合部位毎に代表的な糖鎖の推定構造を記載し、シアル糖鎖が結合している 3 箇所については、シアル酸が結合していることがわかるように記載する。分子式及び分子量は単量体及び二量体について記載する。

本質記載：

[日本名]

●は、遺伝子組換え融合糖タンパク質であり、1～133 番目はヒト CD28 の細胞外領域、また 134～356 番目は改変型ヒト IgG1 の Fc ドメインからなり、147 番目のアミノ酸残基が Ser に置換されている。●は、マウスミエローマ(NS0)細胞から産生される。●は、356 個のアミノ酸残基からなるポリペプチド 2 分子から構成される糖タンパク質 (分子量：約 90,000) である。

[英名]

● is a recombinant fusion glycoprotein composed of an extracellular domain of human CD28 in positions 1 - 133 and modified Fc domain of human IgG1 at positions 134 - 356, and whose amino acid residue at position 147 is substituted by Ser. ● is produced in mouse myeloma (NS0) cells. ● is a

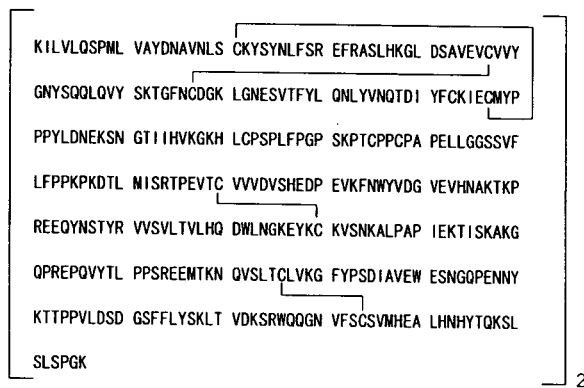
glycoprotein (molecular weight: ca. 90,000) composed of 2 polypeptide molecules consisting of 356 amino acid residues each.

分子量及び分子式:

$C_{3604}H_{5534}N_{934}O_{1070}S_{34}$: 80,156.33 (タンパク質部分、2量体)

単量体 $C_{1802}H_{2769}N_{467}O_{535}S_{17}$: 40,080.18

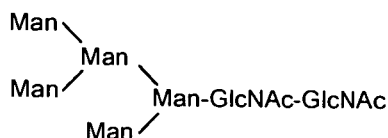
アミノ酸配列及びジスルフィド結合:



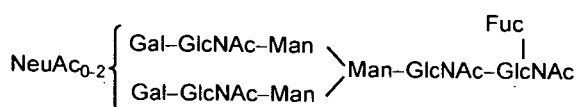
N18、N52、N73、N86、N110、N206:
 糖鎖結合; K356:部分的プロセッシング; C135、
 C138:分子間ジスルフィド結合

主な糖鎖及び活性に寄与する主な糖鎖の推定構造:

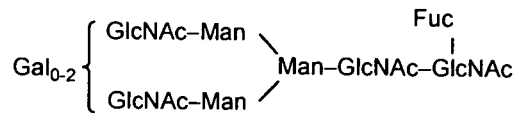
N18, N86



N52, N73, N110



N206



C. 4 トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質評価等に関する研究

C. 4. 1 組換えタンパク質医薬品の製造に用いられる宿主細胞に関する動向

1980年代以降バイオテクノロジーの進展を背景に実用化された組換えタンパク質医薬品は、低分子化合物医薬品では成し得ない高度な生物活性を持つことから、現代医療には欠かせない存在となっている。組換えタンパク質医薬品の生産には、大腸菌、酵母、あるいはCHO、SP2/0、NS0などの動物細胞が用いられ、例は少ないがヒト由来細胞株が用いられることもある。Fig.1に我が国でこれまでに承認された組換えタンパク質医薬品の承認年を生産宿主別に示した。大腸菌や酵母で生産される製品の開発が一定数であるのに対して、特に最近、動物細胞で生産される製品の増加が顕著である。組換え医薬品の製造では、生産コストや動物由来原料の不利用の点で大腸菌や酵母の利用に利点があるが、医薬品として有用なタンパク質には構造が複雑なものが多く、また生体内安定性や活性保持に糖鎖が必要なものが多いために、動物細胞あるいはヒト細胞を用いて生産される製品が増えてきていると考えられる。動物細胞を用いた組換えタンパク質医薬品では生産コストが高く、薬価も高額となる。また、血清等の動物由来原料を使用するため、それに伴う安全性面での懸念も少なからずある。近年多くの製品が上市されている抗体医薬品では投与量が高く、1回の投与量が数十mg~数百mgにもなるため、生産設備への投資も膨大な

ものとなっている。

一方、トランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質生産には、糖鎖修飾を含め複雑な構造を持つタンパク質の生産が可能であること、動物由来原料の使用を避けられること、栽培による場合は生産規模の拡大縮小が容易であること、生産コストが低いこと、といった利点がある。そのため、大腸菌、酵母、動物細胞、ヒト細胞に続く新たな生産宿主として、植物の利用に期待が持たれているところである。

C. 4. 2 植物における組換えタンパク質生産と製品開発への応用

これまでにトランスジェニック植物で発現されたタンパク質の例を Table 2 に示す。酵素、ホルモン、サイトカイン、抗体など、様々なタンパク質の発現が試みられている。植物を用いて組換えヒトタンパク質を生産した最初の例は、1986年に組換えタバコで発現された成長ホルモン(ノパリン合成酵素との融合タンパク質として)である³⁾。ヒトタンパク質と同じ配列を持つタンパク質としての第一号は、1990年に組換えタバコと組換えジャガイモで作られた血清アルブミンで、シグナルペプチドを植物タンパク質由来のものに置換することにより、タンパク質の細胞外分泌と正しいN末端プロセッシングに成功したことが報告されている⁴⁾。また、1989年には、組換えタバコを用いたマウスIgGの発現が報告された⁵⁾。IgGの発現系では、H鎖あるいはL鎖の遺伝子を導入した組換えタバコを別々に作製し、その交配によってH鎖とL鎖を発現する組換えタバコを作製することに成功している。これにより、H鎖とL鎖の会合、S-S結合形成など、抗体分子の成熟に必要なシステムが植物にも存在することが明らかとなり、トランスジェニック植

物が抗体の生産に応用可能であることが示された。さらに、1995年には、抗体分子の中でも、2分子のIgAとJ鎖およびsecretory componentからなる複雑な分泌型IgAの構造を持つ分子sIgA/Gについても、遺伝子組換えと交配の組み合わせにより組換えタバコで生産が可能なが示された⁶⁾。これらの他、現在までに、エリスロポエチン、インターフェロンアルファ、インターロイキン類などのヒトタンパク質や、各種の抗体関連分子、ワクチン用の抗原を発現させた例が多数報告されており、医薬品として有用な種々の組換えタンパク質を植物で作ることが可能であると考えられる^{7, 8)}。

トランスジェニック植物を利用して製造された組換えタンパク質医薬品の中で、臨床試験が行われている例を Table 3 に示す。その中には、

- ・抗*S.mutans*抗体のように、これまでにない有効成分を持つ医薬品を開発しようとするもの
- ・胃リパーゼや内因子のように、これまで動物由来原材料から精製されて用いられていたタンパク質性医薬品を組換えタンパク質医薬品として開発しようとするもの
- ・インターフェロンアルファのように、既に臨床で使用されている組換え医薬品と同等/同質あるいは同種同効の製品として開発しようとしているもの

があり、バイオ医薬品開発の様々な局面でトランスジェニック植物の利用が試みられていると言える。抗*S.mutans*抗体、胃リパーゼ、内因子、ラクトフェリンは糖タンパク質であるが、いずれも口腔内、経口、あるいは点眼、といった方法で投与されるものであり、有効成分がそのままの形で血中に入ることは考えにくい投

与方法となっている。

ウキクサで生産されているインターフェロンアルファについては、サブクラスなどの詳細が明らかでないが、対照薬としてインターフェロンアルファ-2b (イントロン®) を用いた臨床試験が行われていることから考えると、イントロン®と同等/同質のバイオ後続品を目指した開発が行われているとも考えられる。(イントロン®の生産宿主は大腸菌。) ただし、持続性製剤としては、イントロン®では PEG 化したペグイントロン®が上市されているが、ウキクサで生産したインターフェロンアルファでは生分解性ポリマー PolyActive™ を利用した製剤の開発が行われている。

C. 4.3 植物由来糖タンパク質糖鎖の特徴

ヒトの糖タンパク質を植物で発現させると、ヒトや動物細胞の場合と同じ位置に N 結合型糖鎖が付加されるが、付加される糖鎖の構造が異なる⁹⁾。そのため、植物を用いて生産された糖タンパク質では、免疫原性、生物活性、体内動態等の点でヒトの糖タンパク質とは異なる可能性がある。ヒト糖タンパク質糖鎖と異なる植物由来糖タンパク質糖鎖の構造上の主な特徴は、

- ・ コアマンノースに β1-2 結合したキシロースが存在する
- ・還元末端 N-アセチルグルコサミンに α1-3 結合したフコースが存在する
- ・ シアル酸が付加されない

ことである (Fig. 2)。N 結合型糖鎖における β1-2 キシロース、α1-3 フコースの付加は、これまでに組換えタンパク質発現に用いられた全ての植物種において起こり得るとされており⁹⁾、植物で発現された組換えタンパク質の糖鎖解析でもその存在が報告されている^{10, 11)}。

植物で生産された組換え糖タンパク質の O 結合型糖鎖を解析した例は少ないが、組換えトウモロコシで発現したヒト IgA では、ヒト血清由来 IgA とは異なり、セリンへの糖鎖付加が起こらず、その近傍のプロリンの水酸化と水酸化プロリンへのアラビノースの付加が起こっていることが報告されている¹²⁾。ヒト血清 IgA のヒンジ領域に付加された O 結合型糖鎖は IgA のプロテアーゼによる分解を抑制する働きを持つとされているが、糖鎖構造の違いが IgA の特性にどのような違いをもたらすかは不明である。また、水酸化プロリンを持つ植物由来糖タンパク質 (Hyp-rich glycoproteins: HGRPs) には免疫原性を示すものがあることが知られているため⁹⁾、医薬品としての安全性の点では注意が必要であろう。

C. 4.4 ヒト血中に存在する植物糖鎖に対する抗体

ヒトに対してアレルギー性を示す植物由来成分には、各種のアレルゲンに共通するエピートプ Cross-reactive Carbohydrate Determinants (CCD) があることが知られており、CCD と IgE の結合では、CCD を構成する糖鎖構造のうち β1-2 キシロースと α1-3 フコースが重要であるとされている¹³⁻¹⁶⁾。従って、植物糖鎖がヒトに対して抗原性を示し得ることは、アレルギー等に関するこれまでの研究結果から明らかと言える。

CCD に対するヒト血中の抗体とアレルギーの関係に関してはよく研究されており、植物由来成分にアレルギー反応を示すヒトの約 20% では血中に CCD に対する IgE が検出されると報告されている^{14, 17)}。しかし、血中 IgE の存在とアレルギーの臨床症状には相関が少ないとされており、その理由として、抗 CCD IgE

陽性の患者では抗 CCD IgG が共存している場合が多く、IgE とアレルゲンの結合を IgG が阻害するために、IgE を介したアレルギー反応が起こらないこと等が考えられている¹⁸⁾。IgE と共存する IgG のサブクラスについては IgG4 が多いとする報告があり、IgM からのアイソタイプスイッチが起こる際に、Th2 が優位であると IgE と IgG4 が産生されることを反映していると思われる。また、報告は限られているが、トランスジェニック植物で生産した組換えヒト糖タンパク質に対してアレルギー患者血清 IgE が結合性を示し、そのエピトープは糖鎖部分であることが示されている¹⁹⁾。

一方、健常人でも約 50%では B1-2 キシロースに対する抗体が検出され、約 25%では α 1-3 フコースに対する抗体が検出されたと報告されている²⁰⁾。検出されている抗体のアイソタイプは IgM と IgG である。ヒトは食物として異種タンパク質である植物由来成分を日常的に摂取し、花粉などの植物由来物質にも日常的に曝露されている状況にある。食物として摂取された植物由来糖タンパク質は消化管で分解されて吸収されるが、一部は免疫原となり得る形で吸収され、抗体産生を惹起しているものと考えられる。また、たとえ免疫原となる形で吸収されたとしても、ホストにアレルギー傾向がなければ IgE は産生されず、植物成分に対して臨床的に症状は見られないものと思われる。

C. 4. 5 植物糖鎖を持つ組換えタンパク質医薬品の安全性

植物糖鎖の免疫原性が組換えタンパク質医薬品の安全性に与える影響は、(1) 投与以前から患者に抗体が存在する場合、(2) 繰り返し投与に伴って抗体が産生される場合、に分けて考えることができる。

C. 4. 5. 1 植物糖鎖に対する抗体を持つヒトにトランスジェニック植物由来組換えタンパク質医薬品を投与する際の安全性上の懸念

植物糖鎖に対する IgE を有するヒトに植物糖鎖を持つ組換えタンパク質を投与した場合、IgE と組換えタンパク質との結合により FcεR が活性化され、アレルギー反応が起こることが懸念される。血中 IgE レベルはアレルギーの臨床症状との相関が少ないとされているが、特に医薬品が非経口的に投与された場合は、それまでに患者が曝露されていた抗原とは存在様式が濃度や部位の点で異なるため、日常生活での曝露で問題がなくても IgE を介した有害作用がおこる可能性は否定できないであろう。組換えタンパク質の糖鎖結合部位が複数ある場合や、目的物質由来不純物として凝集体がある場合には、抗原と IgE による FcεR の架橋が起こりやすく、アレルギー反応が生じやすいと考えられることから、特に注意が必要と思われる。したがって、非経口投与する糖タンパク質医薬品の場合は、植物特有の糖鎖を付加しないよう改良した系がなければ、他の生産宿主を選択することが妥当であろう。植物糖鎖を持つ組換えタンパク質をヒトに非経口的に投与するのであれば、事前の IgE のスクリーニングが必須であると考えられる。

植物糖鎖に対する IgE 以外の抗体 (IgG 等) を有するヒトに植物糖鎖を持つ組換えタンパク質を投与した場合、組換えタンパク質の血中半減期短縮等が起こり得ると考えられる。しかし、従来の組換えタンパク質医薬品で知られているように組換えタンパク質医薬品に対する抗体が生じている場合でも抗体が内因性タンパク質の中和活性を持つ場合以外は影響がそれほど大きくないことや、ヒトにはないシアル

酸である N グリコリルノイラミン酸の例などを考えると、植物糖鎖に対する IgG の存在は、あまり大きな問題とならない可能性もある。

N グリコリルノイラミン酸は、ヒト以外の動物に存在する非ヒト型のシアル酸として知られ、N グリコリルノイラミン酸に対する抗体は異種成分に対する拒絶反応の原因になり得るとされている²¹⁾。一方で、ヒトは食物として動物由来成分を摂取するため、日常的に N グリコリルノイラミン酸に曝露されている状態にある。また、ほとんどの健常人で N グリコリルノイラミン酸に対する抗体が検出されると報告されている (抗体陽性率 IgA : 16/18、IgM : 14/18、IgG : 17/18)²²⁾。組換えタンパク質医薬品の生産に用いられる細胞の多くは動物細胞であり、動物細胞で生産された糖タンパク質医薬品の糖鎖の一部には N グリコリルノイラミン酸が結合しているとされている²³⁾。動物細胞で生産された組換えタンパク質医薬品には非常に多くの使用例があるが、これまで N グリコリルノイラミン酸の存在に関連する有害作用は報告されていない²³⁾。

ヒトは N グリコリルノイラミン酸の合成に必要な CMP-NeuAc 水酸化酵素を遺伝的に欠損し、N グリコリルノイラミン酸を合成することができないが、N グリコリルノイラミン酸を細胞に取り込んで糖鎖に付加することはできるため、ヒト細胞・組織にも微量ながら N グリコリルノイラミン酸が検出されている^{22, 24, 25)}。キシロースやフコースはヒト糖鎖にも含まれる糖であるが、結合部位や結合様式がヒトと植物では異なる。この点は、動物特異的な N グリコリルノイラミン酸と、植物特異的な β 1-2 キシロース、 α 1-3 フコースでの相違点である。糖鎖の免疫原性が医薬品の安全性に与える影響は、動物特有の糖鎖である N グリコリルノ

イラミン酸よりも、植物特有の糖鎖の方が大きいかもしれない。

C. 4. 5. 2 トランスジェニック植物由来組換えタンパク質医薬品に対して新たに抗体が産生される可能性

植物糖鎖に対する抗体を持たないヒトの場合、急性のアレルギー反応等が起こる懸念は少ないと思われる。しかし、植物由来であるか否かに関わらず、投与された組換えタンパク質に対して新たに抗体が産生される可能性はある。

バイオ医薬品の使用に関するこれまでの経験から、組換えタンパク質医薬品ではアミノ酸配列がヒトタンパク質と同じであっても、ヒトに対して免疫原性を示すことがしばしばあり、単純タンパク質においても糖タンパク質においても、医薬品として投与された組換えタンパク質に対して抗体が産生されることが知られている (Table 4)。組換えタンパク質医薬品では、存在する濃度や部位、時間が生体内タンパク質とは異なることに加えて、製造工程由来不純物や目的物質関連物質、目的物質由来不純物 (特に凝集体) などが共存すること等が免疫原性を示す原因となっていると考えられる。さらに、抗体の出現には患者側の要素も関わり、その原因は極めて複雑である (Fig. 3)。

組換えタンパク質医薬品に非ヒト型の植物糖鎖が結合していれば、従来の組換えタンパク質医薬品より抗体が産生される可能性は高いかもしれない。但し、タンパク質部分がヒト由来である分、植物アレルゲンに比べて免疫原性は小さいと推測される。

抗原に対する抗体産生においては、初期にはコンフォメーションエピトープに対する IgM が産生され、抗原提示細胞からの抗原提示を受けた Th 細胞由来のサイトカインにより IgE や

IgG へのアイソタイプスイッチが行われる。糖鎖のみでは抗原提示細胞で MHC 分子との複合体として抗原提示されず、抗体が産生されてもアイソタイプは IgM のままであるが、糖鎖がタンパク質に結合している場合は抗原提示細胞内で分解されて糖ペプチドとして抗原提示される。植物の糖タンパク質糖鎖に対する抗体には IgM のみでなく IgE や IgG があることから、抗原提示細胞と T 細胞を介する反応を経て産生されていると考えられ、植物糖鎖の免疫原性は糖鎖のみの構造によるのではなく、植物タンパク質の構造によるところも大きいと考えられる。植物由来アレルゲンの場合はタンパク質部分も異種のものであるため強い免疫原性を示すと考えられるが、タンパク質がヒト由来の配列を持つ場合は植物由来アレルゲンと比較して免疫反応が生じにくい可能性も考えられる。

ヒトタンパク質に植物糖鎖が結合した医薬品を投与した場合に、抗体がどの程度生じるのかは推測の域を出ないが、先に述べたように、これまでの組換え医薬品で知られているよりは高くなるかもしれない。抗体が産生された場合は、血中半減期の短縮などの影響が考えられるが、植物糖鎖がアジュバントとして作用してタンパク質部分を認識する抗体が生じ、生じた抗体が内因性のタンパク質を中和してしまうと重篤な臨床症状が生じる危険があるため、注意が必要である。患者がアレルギー傾向にある場合、組換えタンパク質に結合した植物糖鎖に対して IgE が生じ、組換えタンパク質に反応して、あるいは、他の植物由来の天然の糖タンパク質に交差反応してアレルギー反応がおこるようなことがあれば、安全性上重要な問題となる。

ヒトに対する免疫原性は動物を用いた非臨

床試験で評価することができないが、動物実験の結果は安全性を考える際の情報としては参考になるものである。実験動物と同種のタンパク質に植物糖鎖が結合している場合の免疫原性を調べた報告、すなわちタバコで発現したマウス IgG をマウスに投与した報告では、抗体が産生されなかったとされている²⁶⁾。しかし、この報告で用いられた動物 BALB/c マウスはもともと免疫反応が起こりにくい系統であるため、試験系の妥当性を問う報告もある²⁰⁾。タバコで発現したヒト IgG をウサギに投与した実験では、抗体 (IgG) が産生され、産生された抗体が植物糖鎖を認識することが報告されている¹⁹⁾。この文献では CHO 細胞で発現したヒト IgG との比較を行っており、CHO 細胞由来ヒト IgG と比較してタバコ由来ヒト IgG による抗体産生が高いことが示されており、CHO で発現されたヒト IgG と比較してタバコで発現させたヒト IgG の方が免疫原性が高いと解釈できる。

C. 4. 6 ヒト型糖鎖を持つ組換えタンパク質発現系の開発

これまでの知見から、植物で製造した組換えタンパク質には植物特有の糖鎖が存在しないことが望ましいと考えられる。植物特有の糖鎖構造を持たず、ヒト型の糖鎖を持つ組換えタンパク質の生産系開発に向けた研究が進んでおり、主に、(1)組換えタンパク質の小胞体への局在化による植物特異的糖鎖付加の回避、(2)植物特異的糖鎖を付加する酵素の欠損、(3)ヒト型の糖鎖合成に関わる酵素等の発現、の 3 種類の試みが行われている。

C. 4. 6. 1 組換えタンパク質の小胞体への局在化による植物特異的糖転移反応の回避