

な呼吸器感染である RSV に対して行われた。ALN-RSV01 はウイルスのヌクレオカプシド (N) 遺伝子をターゲティングする siRNA である。臨床第一相試験のフォローアップで、この薬剤は噴霧器を用いた吸入により投与された。単回投与では ALN-RSV01 が 0.1 から 3 mg/kg、複数回の投与治療群では 3 日間 1 日に 1 回 0.01 から 0.6mg/kg の範囲で評価され、重度あるいは重篤な有害事象は見られなかった。なお、吸入 ALN-RAV01 のデリバリー効率は非臨床試験モデルよりもヒトのほうで顕著に高かった。臨床第二相試験では、健康な成人を野生型 RSV 株に感染させ、ALN-RSV01 がウイルス接種前 2 日間と接種後 3 日間の合計 5 日間連続で鼻腔内に投与された。その結果、ALN-RSV01 は安全で十分耐容性であり統計的に有意な抗ウイルス活性を示すことが報告された。ALN-RSV01 はさらに自然に RSV に感染した成人患者の臨床第 2 相試験で評価される予定である。

siRNA の最初の全身投与として p53 腫瘍抑制遺伝子をターゲティングする AKIi-5 が開発されている。p53 遺伝子は損傷に反応して尿細管細胞のアポトーシスを誘導することにより急性腎不全の発症に重要な役割を果たしている。AKIi-5 は化学修飾 siRNA であり、急性腎損傷において p53 を一時的に抑制することにより生体の治療能力を惹起し細胞の損傷を回復させることが期待されるため、急性腎損傷の治療にも用いられる予定である。急性腎損傷の治療の非臨床試験がラットとサルで行われた。AKIi-5 の単回ボラス投与で治療したラットは虚血/再かん流により誘導される急性腎損傷から顕著に防御された。ラット及びサルにおける薬動学、分布、毒性研究において AKIi-5 は好ましい毒性プロファイルを示し、腎臓にお

いて貯留時間は短かった。現在進行中の臨床第 1 相試験で、AKIi-5 は大規模な心臓手術を受けた患者に単回投与で静脈投与されている。

RNAi をベースにした NUCB-1000 の HBV 感染の治療の臨床第 1 相試験が全身投与で開始された。NUCB-1000 は異なった配列の HBV ゲノムをターゲティングする四つの異なった shRNA を RNA ポリメラーゼ III プロモーターの元で発現するようデザインされたプラスミド DNA であり陽性脂質デリバリー系で処方されている。

遺伝子治療と RNAi を組み合わせた HIV の治療の開発が臨床第 1 相で最近行われている。このアプローチは造血幹細胞である CD34⁺細胞を誘導後採取し、三つの HIV 関連遺伝子、trans activator of transcription/regulator of virion (tat/rev), CCR5, transactivation-response genes をそれぞれ標的とする shRNA、リボザイム、RNA デコイをレンチウイルスベクターにより CD34⁺細胞に *ex vivo* でデリバリーし、その細胞を患者に戻すものである。非臨床試験では有望な安全性及び有効性に関する結果が得られており、造血幹細胞を正常に分化できた。

TD-101 は先天性爪肥厚症の治療を目的として皮膚における標的遺伝子発現を抑制するように設計された siRNA である。先天性爪肥厚症はケラチン遺伝子の変異により引き起こされるまれなドミナントネガティブの上皮脆弱性疾患である。変異ケラチンをターゲティングする単一ヌクレオチド特異的な siRNA により *in vitro* 及び *in vivo* において凝集の表現系が逆転することが示された。臨床第 1 相試験では、未修飾の siRNA が皮膚内に投与された。

C. 1.3 克服すべき安全性及び特異性に関する

懸念

RNAiにおける有害事象は2003年に報告された。最初にヒト細胞でRNAiの有効性が示されたすぐ後に多くのグループでsiRNA処理した細胞においてIFN反応が誘導されることが報告された。さらに、siRNA及びshRNAによる標的としないmRNAの望ましくないダウンレギュレーションというoff-target効果が報告された。その後、大規模の遺伝子発現プロファイルの研究によりsiRNAとoff-target mRNAの3'非翻訳領域の間でわずか6-7ヌクレオチドの相同性があればoff-target遺伝子の抑制が誘導されることが示され、その誘導は多くの場合micro RNA(miRNA)を介した機構による起きると考えられた。また、siRNA-脂質複合体によりTLR特に形質細胞様樹状細胞においてTLR7の誘導が促進されることが報告され、この効果は細胞及び配列特異的でありsiRNAのGUリッチなdanger motifによることも明らかになった。その後、この効果はsiRNAを最適化すること及びこれら細胞を標的としない処方を用いることにより回避できることが示唆された。同様に、多くの報告はsiRNAの化学修飾によりIFN及びサイトカインの誘導を回避できることが示された。従って、このような有害事象は将来の臨床プロトコルでは完全に除去できる可能性が高いと考えられる。注目すべき点はRNAiに関連した有害免疫反応はこれまで培養細胞でしか見つかっていないということであり、*in vivo*においても起きるかどうかは不明である。さらに先天性免疫反応は動物とヒトにおいて複雑であるため、今後のsiRNAデリバリー複合体を用いる場合はその治療の指標の正確な評価が確立されるまでにさらに臨床試験が必要である。

他方、最近のマウスの研究でRNAi発現の新

規の特異的な有害事象が明らかになった。この研究では先に示したマウスの肝臓で49種類の異なるshRNAのパネルを発現する非常に効率的な二重鎖AAV-8ベクターが用いられた。その中で36種類のベクターがレベルの異なる肝臓障害を引き起こし、そのほとんど半分で動物の疾病及び致死が起きた。この原因は高いレベルでshRNAが発現することにより内在性miRNA経路のステップが飽和されることによるものであり、その候補として前駆miRNAとshRNAの細胞質への輸送を仲介する核のkaryopherin exportin-5が示唆された。なお、この*in vivo*の毒性は有効かつ安全なshRNA発現カセット及び必要最小限に有効なベクターの投与量を選択することにより軽減できることが示された。このような選択を行ったAAV/shRNAを用いるとトランスジェニックマウスでHBVが5ヶ月間ウイルスのタイターで2対数以上抑制され、各種のレポーター遺伝子も1年間強く抑制されることが示された。

同様なsiRNAの多重投与により内在性miRNAのレベルに影響を及ぼさないで顕著なターゲットとする肝臓遺伝子の抑制がマウスとハムスターにおいて得られた。このようにmiRNAのレベルが影響を受けないのは、先ほどの飽和モデルに基づくとしRNAはmiRNAよりも下流の過程でRNAi経路に入ることから、exportin-5のような上流の成分の飽和が回避されたためと思われる。しかし、この知見は例えば2種類のsiRNAをマウスに共投与すると*in vivo*でお互い競合し個々の有効性が阻害されるという初期の報告と一致しない。同様な結果が培養細胞でも報告されており、各種の標的mRNAに対する多くのshRNAあるいはsiRNAを共投与すると個々のRNAトリガーの有効性が低下した。高濃度のsiRNAで細胞

内 RNAi マシンが飽和される可能性を示す結果が得られている。それらのデータによると外から導入した siRNA を細胞内の RISC が集合させる能力は非常に限られており、RISC を化学量論的に滴定することが可能であることが示されている。このモデルにより観察された siRNA の間の競合がうまく説明可能である。したがって、複数の siRNA は細胞内の限られたプールの RISC 及び結合タンパク質とお互いに競合し、少なくとも特定の組織及び細胞では高投与量の siRNA により RNAi 経路を過剰に飽和させることが実行可能であると考えられる。このモデルと一致して、先のマウス肝臓における結果は RNAi 経路において exportin-5 のみが律速因子ではないことを示している。まだ証明されていないが他の律速タンパク質が RISC の slicer 成分である Ago-2 である可能性がある。Ago-2 は miRNA、shRNA、siRNA の作用発現に必要なタンパク質である。この RISC の飽和により先に示した siRNA の競合を示す知見が説明可能である。このモデルを支持する結果がヒト組織パネルにおける Ago-2 タンパク質の発現解析により得られた。この結果によると、Ago-2 タンパク質は特に肝臓と肺で低いことが示された。

RNAi 治療薬を最適で安全なものとして開発する必要条件として内在性の RNAi 経路をより理解することも必要である。重要なステップは治療の標的となる組織あるいは細胞における各種の RNAi に関与する特定の因子の特性及び発現プロファイルの比較である。それにより多くのウイルスが感染細胞において RNAi 成分と相互作用しその機能を抑制するという知見に基づき RNAi 経路とヒトウイルスの自然に起こる相互作用をさらに解明することの助けになる。例えば、アデノウイルスは

そのウイルス RNA により exportin-5 の機能を消失させ飽和する。これはベクターによりコードされる shRNA を高いレベルで発現する細胞において起きるものと似ており、ウイルス-RNAi 相互作用を更に研究することにより治療用 RNAi を最適化する機構及び概念が明らかになると思われる。同様に、*in vivo* における siRNA レベルを定量して比較する方法を考案するだけでなく、異なった RNAi トリガーをデリバリーし複数の利用可能なベクターを用いることが重要である。

同じ観点から多くの研究者により調節可能で組織特異的な RNA 発現を可能にする RNA ポリメラーゼ II をベースにした新規の RNAi プロモーターの開発が行われている。その最終目標はこれらのプロモーターの使用により内在性の miRNA 系特に exportin-5 及び RISC の過剰飽和のリスクを避けながら、核における shRNA の発現を十分高いレベルで厳密に調節し、強力で持続した RNAi を起こすことである。現在、可逆的あるいは永続的な変異体を含め様々な異なった遺伝子発現ベクター系の改変が行われている。内在性の miRNA は通常 RNA ポリメラーゼ II から発現するため多くの場合ヘアピン RNA が天然の miRNA 構造に組み込まれるということが障害となる。この戦略ではヘアピン RNA の最も効率的な発現とプロセッシングは保障されるが、ハイブリッド shRNA/miRNA 転写物の切断には核における Drosha が必要とされる。従って、他の細胞内 RNAi 成分が飽和されるリスクも同時に増加する。一般的に治療用 RNAi に適したベクターの最終のゴールはこのような最適なプロモーター系を最適なデリバリーベヒクルと結合させることである。このようなオプションはベクターをベースにした RNAi 発現系に限定され

ており、siRNA をベースにした戦略では適用できない。この組み合わせにより最終的に転写 RNAi の特異的なターゲティングだけでなく最大限の厳密な遺伝子導入が可能になることが期待される。このように、off-target 細胞における有害事象を除去することにより、最大の患者の安全性だけでなく最も高い有効性を保障することが可能となる。

C. 1. 4 新規の RNAi を基にした治療戦略

最も明白で直接的な臨床における RNAi 適用はヒトの疾患に関連した遺伝子あるいは mRNA を直接ターゲティングすることである。この概念の妥当性を検証している論文は急激に増加している。

C. 1. 4. 1 組み合わせ RNAi

病原性のウイルスを標的として治療用 RNAi を用いる際の懸念は、過去において他の単独治療において直面した障害と同じである。最も大きな障害は高いウイルス変異率により急速に生じるウイルスのカプシドミュータントを調節することである。これは特に HCV および HIV のような RNA ウイルスに当てはまる。HCV の場合 1 年間にウイルスヌクレオチド当たり 103 の変異を取り込む。また、HIV は全ての生物で急速に進化し発達している。不幸な事に、これらのケースでは RNAi の優れた特異性が欠点となる。なぜなら siRNA/shRNA とウイルス標的 mRNA の間の単一ヌクレオチドミスマッチにより認識と抑制を無効になるからである。ウイルスの変動の問題をうまく解決する方法は、siRNA のカクテルあるいは多くの shRNA を発現するベクターを用いてそのゲノムをターゲティングすることである。通常これら RNAi トリガーはウイルスゲノム内の

異なった部位及び理想的にはウイルスファミリーの全てのメンバーの中で高度に保存されている配列を同時にターゲティングする。この考えに基づくとこれら RNAi トリガーによりエスケープミュータントの形成が効果的に阻止できるはずである。実際多くの研究によりこの組み合わせ RNAi のアプローチの妥当性が評価されており、わずかに 3 種類あるいは 4 種類の siRNA/shRNA の組み合わせにより HIV のような非常に変異するウイルスでも十分調節できることが示唆されている。抗ウイルス組み合わせ RNAi のさらに可能性のある修飾はウイルスにハイジャックされる細胞の受容体や細胞質あるいは核タンパク質のような病原体の感染に寄与する細胞内タンパク質をコードする細胞内 mRNA のようなウイルス標的を混合することである。

組み合わせ RNAi 戦略はがんを含む他のヒトの疾患の治療にも有望であることである。その例は BRAF 及び SKP2 の共抑制であり、結果的に単独治療よりも抗腫瘍効率は優っている。なお、これらの遺伝子はメラノーマ細胞でアップレギュレーション及び変異が起こる頻度が高い。改良型のがん特異的な組み合わせ RNAi は通常のがん治療薬の有効性を増強させることを目的とした化学療法あるいは放射線に対する抵抗性に寄与するがん遺伝子及び遺伝子の相乗的な共抑制である。その例として MDR1 によりコードされる P-glycoprotein がある。結腸癌細胞において P-glycoprotein のレトロウイルス/shRNA を介したサイレンシングにより細胞毒性薬剤に対する感受性が増強する。他の研究では、アデノウイルスベクターを介した shRNA の発現が HIF-1 α の抑制に用いられた。なお、HIF-1 α は低酸素条件下で急速に成長する腫瘍でアップレギュレートされ

る。この抑制によりマウスにおける腫瘍の成長が遅れるだけでなく、成長の遅れは同時に放射線を投与することにより相乗的に促進された。このようにがんの治療におけるベクターを介した RNAi の組み合わせの概念が有効であることが示されている。その他の RNAi 組み合わせの修飾はリボザイム、アンチセンス、トランスドミナントタンパク質のような他の遺伝子発現の阻害剤のいずれかと組み合わせることである。注目すべき候補は HIV 感染を撃退するためにデザインされたレンチウイルスベクターであり最近臨床試験に入っている。このトリプルベクターは抗 HIV shRNA、細胞内 HIV CC 5 receptor に対するリボザイム、ウイルス TAT タンパク質を隔離するための HIV-TAR デコイを共発現する。それに代わる将来の世代のベクターはレポーターあるいはマーカーとして用いるタンパク質あるいは相乗効果を有するタンパク質を共発現できる。最初の例は γ グロビン cDNA と共にヒト鎌状 B-グロビンに対する shRNA を共発現するレンチウイルスである。鎌状細胞貧血患者からの分化する CD34⁺細胞でこのベクターは B α を特異的に低下させるが γ -グロブリンを発現し、幹細胞治療との関連で相乗的な遺伝子のサイレンシング/発現の戦略の可能性が提供された。

このように有望な成功例が示されているが、RNAi 組み合わせとベクターについてはさらに最適化が必要である。現時点における主な不明の点は複数の遺伝子を運ぶヘアピン RNA および関連するプロモーターの遺伝的安定性に関する懸念である。少なくとも DNA プラスミドに関しては、一つのプロモーターでも最大 10 個の shRNA コピーを連結させることは妥当と思われるが、ヘアピン RNA の数が 3 個を

超えると不安定になるとの報告もある。これらのパラメーターには、一つあるいは数個のプロモーターにおける多数のヘアピンの位置および個々の shRNA を分離する配列の長さおよび構造のような他の因子も含めて徹底的な試験による最適化が必要とされる。最終的には、特定の疾患のターゲティングに多数の配列を用いる場合、RISC への個々の siRNA の取り込みにおいて有害な競合を避けることが重要であり、競合により特異的な siRNA の効果が制限され、RNAi の組み合わせ治療の最初概念が無効になる。

C. 1. 4. 2 治療標的としての miRNA

最近の考えによると、哺乳類およびヒトにおける RNAi 経路の主な機能は内在的にコードされる miRNA の産生及びプロセッシングである。miRNA は、通常は 3'UTR にある部分的に相補性のある mRNA へ結合し阻害することによりおそらくは数千の遺伝子発現を転写後で調節する。これには明らかにオーバーラップするプロセスがあり、正確な機構は十分には解明されていないが、大部分は mRNA の分解よりもむしろ転写の阻害を介して起こる可能性が高い。この結果、miRNA が分化、形質転換、あるいはウイルス感染のような多数の多様性のある良性あるいは悪性の細胞プロセスの重要なレギュレーターになる。したがって miRNA は疾患の治療戦略について幅広い可能性を提供する。最近の報告によると、一過性のあるいは安定な表現型の機能を消失させることを目的として、特異的かつ効率的に miRNA の機能を阻害する新規の方法論が導入された。その方法では、任意の miRNA あるいは全体の miRNA ファミリーの多くの 3'UTR に対する最大 7 個の直列の結合部位を有する強力なボ

リメラーゼ II (例えば CMV) あるいは III (例えば U6) から転写産物が発現される。導入した細胞で、miRNA スポンジと呼ぶこれらコンストラクトは相補的な 7 個の配列を有する miRNA と結合し選択的に阻害できた。その効果は標準的な条件で用いた場合、antagomir 及び locked nucleic acid (LNA) アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む過去に最も多く報告されている miRNA の阻害剤と少なくとも同等であった。重要なことは、スポンジも通常 miRNA により調節されている内在性標的を抑制できることから、ターゲティングの妥当性評価において非常に可能性のある手段であることが示唆される。実際、少なくとも一過性に導入した細胞におけるスポンジのコピー数は細胞当たり数千倍でありおそらくほとんどの miRNA を抑制するのに十分であると推定された。

治療用 RNAi の観点から、この新しい方法論はウイルスの治療用ベクターから発現されるトリガーを用いて miRNA の機能を抑制する多くのオプションを提供できるため非常に興味深い。適用が可能と考えられる例として腫瘍形成における miRNA の機能の評価、最終的には動物モデルおよび患者においてがんを引き起こす miRNA の抑制が含まれる。別の興味あるオプションは肝細胞で高発現し 5'UTR に対する結合により HCV の複製に必要である miRNA-122 (miR-122) の遮蔽に用いることである。これにより新規なウイルス肝細胞感染の抑制法が提供されるだけでなく、他の RNAi の組み合わせの例として他の抗 HCVshRNA およびその阻害剤を容易に組み合わせることができる。

しかしこの場合も、この系の多くのパラメーターを十分に特性解析し最適化する必要がある。

例えば、理想的な miRNA 結合部位の数、スポンジ内におけるお互いの配置は不明である。これらの問題は今後動物実験で評価する必要がある。また、この新規方法論には安全性についてリスクがある。懸念の一つは特に一個の miRNA がおそらく数百あるいは数千の標的を調節するという事実から内在性 miRNA を完全かほぼ完全に遮蔽することにより細胞が有害な効果を受ける可能性があるということである。膨大な大部分の miRNA ファミリーの機能は不明であるので、多数の miRNA の同時抑制が細胞および生物体に耐容でない可能性は否定できない。

C. 1. 4. 3 導入遺伝子の組織選択的な発現

先ほどの戦略と別に、強い新抗原である GFP のコーディング配列の 3'UTR に miRNA (mir-142-3p) の結合部位を挿入する戦略も取られている。この特異的な miRNA は血液系統の細胞に選択的に発現する。この考えは肝臓にベクターを全身的にデリバリーさせながら、過失により導入された血液細胞からの発現を選択的に消滅させるというものである。実際、免疫不全マウスにレンチウイルスでデリバリーさせると、GFP は造血系統ではなく非血液細胞、特に肝細胞および内皮細胞にのみ発現する。その結果、GFP は抗原提示細胞で発現しないためマウスは抗 GFP 免疫反応を起こさず、ベクターの発現は維持される。ごく最近のフォローアップ研究で、同じ原理が造血細胞における組換え clotting human factor IX (hFIX) の off-target 発現を抑制するために用いられた。これは抗原提示細胞における hFIX の発現を阻止し、通常マウスにおいて長期間の hFIX の導入を障害する抗 hFIX 特異的適応免疫反応の誘導を抑制する。実際、hFIX-mir-142-3p 融合

ベクターで処理した免疫応答性血友病 B マウスは治療効果を有する hFIX 活性が 9 ヶ月持続した。過去における導入遺伝子の組織選択的な発現は例えば肝臓特異的なプロモーターのように転写のコントロールを介して主に行われた。従って、新規の RNAi を介した転写後の調節が加われればベクターを介した組織特異的な遺伝子発現戦略の見通しが明るくなる。

これらの研究では異なる種の間で導入遺伝子が用いられたので、ヒトには同様に当てはまらないように思われる。従って、shRNA 発現カセットを含む他の導入遺伝子とベクターの組み合わせでこのアプローチの可能性を確認する必要がある。実際、shRNA 配列と miRNA 結合部位を融合させることにより、理想的には全身的な RNAi ベクターの投与からでも望ましい標的細胞にのみ RNAi トリガーの選択的および特異的に発現を起こすことが理論上は可能である。このアプローチにより有効性と選択性を最大限に得るために、例えば細胞あるいは組織特異的なベクター及びプロモーターを用いて翻訳及び転写ターゲティング戦略を組み合わせたことが可能である。他方、組織選択的な発現の方法論には例えば miRNA の結合部位の理想的な数及び位置の同定など miRNA スポンジとしての同様な最適化がさらに必要である。

RNAi をベースにした発現系の中で注目すべき点は調節領域の遺伝子配列に対する小さな dsRNA が転写レベルでその発現を停止させるという報告である。そのようなプロセスが哺乳細胞で実際に起こるなら、核においてこのような dsRNA を短時間で一過性に発現させることにより遺伝子発現を止めることができるかもしれない。これを上記の miRNA を基にした系だけでなく通常の RNAi 戦略と組み合わせ

ることにより、疾患に関連した遺伝子の発現を調節する新規の治療アプローチを提供できる可能性がある。この戦略については現在 siRNA を核に効率よくデリバリーする技術はないのでウイルスベクターを用いることにより可能になるかもしれない。

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 ガイドラインにおける QbD のインプリメンテーションおよび Q11 ガイドラインドラフト

ICH 品質分野においては、Q8-10 ガイドラインの国際合意をうけて、さらに各局における国内への取り込み（インプリメンテーション）が図られている。また Q11 原薬ガイドラインについては、ドラフトゼロの作成が開始された。インプリメンテーションについては、デザインスペースの設定例、リアルタイムリリースの実現にむけた例、リアルタイムリリーステストの例、PAT への応用可能な各種分析手法の検討、デザインスペースの各局規制制度への取り込み方法の検討など、様々な活動が開始されている。

一方 Q11 の議論はブラッセルでの EWG で本格的に開始されたが、Q8 ガイドラインおよび Q8Annex 作成時にされた、Basement approach についての再検討が提案されており、QbD Approach に集中していた Q8, Q8Annex の議論に揺り戻しが生じている。これは新たにバイオテク応用医薬品の専門家がドラフト作成に加わった影響が大きいと考えられる。バイオテク応用医薬品においては、昨年報告にも記したように、製造方法の解析を通じて得られた情報を基に、工程管理によって品質の一定性をはかるという品質管理戦略はもともと馴染

みの深いものであった。ただし、バイオテク応用医薬品の場合、デザインスペースを広く適用するには困難が伴うと思われる。即ち、

- (1) 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ーを特定する上で配慮すべき要素はバイオテク応用医薬品の場合多様であり、工程パラメーターと品質特性パラメーターの関係の解析が困難なものも少なくない；
- (2) 上記パラメーター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；
- (3) 有効性・安全性へ悪影響を及ぼさない（即ち同等・同質といえる）品質特性の変動幅を、臨床データなしに求めることはバイオテク応用医薬品では困難なことが多い等の理由により、デザインスペースの定義にあたって、判定基準となる CQA（Critical Quality Attributes）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、論理的に設定できるデザインスペースは限定的なものになるものと予想される。

したがって、製造方法に関するガイドラインは定義可能な範囲が不明確なデザインスペースに重きをおく QbD アプローチに焦点をさぼるより、現状ではほとんどの製品の開発の際にとられている Basement アプローチも取り上げるべきという考えをもつバイオテク応用医薬品の専門家がいることが、Q11 の議論の揺り戻しの原因と思われる。

とはいえ、本報告は、以下バイオテク応用医薬品の製法開発における QbD アプローチの議論を取り上げることとする。

C. 2. 2 バイオテク応用医薬品の開発における欧米で行われているデザインスペースの議論

QbD アプローチはまず標的製品プロファイル（製剤の望ましい品質、ひいては安全性及び有効性を保証するために理論的に到達すべき製剤の品質特性についての先を見越した要約）の考察に始まる。次に望ましい品質、安全性、有効性に影響を及ぼす品質特性からなる重要品質特性（CQA）の特定に進む。CQA の特定には、Q9 で用意されているような各種リスク評価法を用いることとなる。その際、研究室レベルでのデータ、関連物質に関して得られている文献データ、非臨床試験の経験、臨床試験の経験が重要となる。特定した CQA については、さらに開発過程でも品質上、非臨床データ、臨床データ等をもとに、CQA を精査してゆく（Q8Annex では示されていないが、ここで最終的に確認された CQA を Product Design Space と称する論文もある）。

続いて、(1) CQA に影響を及ぼす原料特性及び工程パラメーターをリスクアセスメントで特定する；(2) デザインスペースの理解・定義に役立つようなデータをとるために実験計画法（design of experiments (DOE)）を利用して、研究をデザインする；(3) 研究が実行され、デザインスペースの定義および重要性が決定される。(3) においては、故障モードとその影響の解析（Failure mode and effects analysis (FMEA)）の手法がしばしば解析に用いられる。（資料 1）

デザインスペースの解析例としては、(1) 培養工程の原料特性、培養液のパラメーター、操作パラメーターに関する解析、(2) 精製工程、特にカラムクロマトグラフィーへの、遊離液のグラジエント条件、pH、流出速度、温度、ベッドサイズ等のパラメーターの解析、などがあげられる。

C. 2. 3 バイオテック応用製品における QbD アプローチ研究の新しい流れ

もう一つの新しい流れとしては、FDA の QbD に対する積極的な取り組みに対応するものとして、業界側が抗体医薬を特定した QbD アプローチ研究が開始されたことである。これは、7つの製薬大手企業 (Amgen, Genentech, Abbotto Bio Mediimmune (AstraZeneca), GlaxoSmithKline Bio, Eli Lilly Bio そして Pfizer Bio) が参加してコンソーシアムを立ち上げ、ICH Q8-10 に示された考えを反映させた、架空ではあるが現実的なモノクローナル抗体の製造工程プログラムを検討するというものである (資料 2)。

近年に市販され、今後も開発されるであろう抗体医薬の多くは遺伝子組換え技術を利用して開発したキメラ抗体、ヒト化抗体、あるいはヒト抗体であり、またその多くは IgG である。したがって相補性決定領域 (CDR) 以外は構造上極めて類似している。そのため、製造工程は共通性の高いものであり、標準的製造工程を考える際の材料として最適である。

昨年暮れに公表された、EMA の「モノクローナル抗体およびその関連製品の開発、製造、特性解析、および規格に関するガイドライン」(資料 3) においても、「Platform manufacturing」という概念であらわされた考えが打ち出されており、モノクローナル抗体の製造工程のように、製品間で共通性の高い製造工程については、バリデーションデータなどは共有化可能な場合があることが示されている。

上記の活動を反映した学術集会も企画、開催されつつある (資料 4)。

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 結果

C. 3. 1. 1 低分子ヘパリンの酸加水分解条件の検討

予め標準物質を用いて、HPAEC-PAD により GalN、ManN、GlcN、GlcA 及び IdoA はそれぞれ約 9.5、10.5 分、11.5 分、38.5 分及び 41 分に溶出されることを確認した (図 1a)。つぎに、バルナバリン製品 1 を用いて、低分子ヘパリンの加水分解条件を検討した。図 1b-d、図 1e-g 及び図 1h-j は、それぞれバルナバリン製品 1 を 2 N TFA、2 N HCl 及び 4 N HCl に溶解し、4、8、及び 12 時間 100°C で加熱して得られた分解物の HPAEC-PAD パターンである。いずれの加水分解条件でも GlcN に相当するピークは強く観測されたが、GlcA 及び IdoA に相当するピークはわずかしか観測されなかった。2 N TFA による加水分解では、加熱時間が長いほど GlcN のピークは大きくなる傾向があった (図 2a)。また、36 分から 38 分に GlcN、GlcA 及び IdoA 以外の複数のピークが観測され、もっとも目立つ 37.5 分のピークは、8 時間前後で最大になることがわかった (図 2b)。2 N HCl を用いた酸加水分解でも、GlcN のピーク面積は時間の経過とともに増加すること (図 2a)、また、36~38 分のピークは、8 時間以降減少することが確認された。4 N HCl を用いた場合は、GlcN のピーク面積は 4 時間で最大になり、12 時間加熱しても変化がないこと、また、36~38 分に目立ったピークは検出されないことが確認された。さらに、2 N 及び 4 N HCl を用いた場合には、約 54 分頃に TNF を用いた場合には検出されないピークが溶出されることが分かった。

以上のように、2 N TFA を用いた場合、HCl を用いた場合と比べて多くのピークが比較的強く観測されること、及び 8~12 時間の加水

分解により 37.5 分のピークが最大となることから、以後、低分子量ヘパリンを 2 N TFA に溶解し、100°C で 12 時間加熱する条件を用いることにした。別に単糖を 2 N TFA 中 100°C で 12 時間加熱しても、GalN 及び GlcN は分解しないこと、また、GlcA 及び IdoA の残存率はそれぞれ約 65% 及び 55% であることを確認した (図 2c)。

C. 3. 1. 2 各種低分子量ヘパリン酸加水分解物の HPAEC-PAD パターン

各種低分子量ヘパリンを 2N TFA 中 100°C で 12 時間加熱して得られた分解物の HPAEC-PAD パターンを図 3 に示す。各低分子量ヘパリンとも、GlcN に相当するピーク及び 37.5 分のピークが強く観測された。

バルナバリン製品 1 及び 2 のパターンは類似していたが、わずかな違いが認められた。即ち、バルナバリン製品 1 には、ManN の溶出位置 (10.5 分) に小さなピークが認められたが、製剤 2 ではほとんど認められなかった。また、バルナバリン製剤 2 では GalN に相当するピークが強く観測され、そのピーク面積はバルナバリン製剤 1 の約 3.7 倍であった。ManN は原料であるヘパリンナトリウムを製造する過程で、還元末端の GlcNAC が異性化したもの、また、GalN は、ヘパリンナトリウムの製造工程で製造工程由来不純物として混入したデルマタン硫酸エステルに由来するものと考えられた。

ダルテバリン 2 製品はほぼ同一のパターンを示した。また、6 分、32.5 分前後及び 34 分前後に、バルナバリン及びエノキサバリンからは検出されないピークが検出された。6 分のピークは 2,5-anhMan-ol の溶出位置に相当していたことから (データ非表示)、還元末端の

2,5-anhMan-ol と推定された。34 分前後のピークは、2,5-anhMan-ol にウロン酸が結合した二糖と推定された (未確認)。

レビバリンからも、ダルテバリンと同様に 6 分、34 分前後及び 41 分に、それぞれ還元末端の 2,5-anhMan-ol、2,5-anhMan-ol にウロン酸が結合した二糖 (推定) 及び idoA に相当するピークが検出された。これら 3 つのピークのピーク面積の GlcN のピーク面積に対する割合をダルテバリンと比較すると、いずれもダルテバリンよりも大きくなっていることが確認された。レビバリンにおいて末端由来の糖と考えられた 6 分、34 分前後及び 41 分のピークの比率が高くなっていたことは、レビバリンの平均分子量が (約 4,000) がダルテバリンの平均分子量 (約 5,000) よりも小さいことを反映していると考えられた。

エノキサバリンのクロマトグラムでは、他の低分子量ヘパリンの酸加水分解物に認められる 41 分の idoA に相当するピークは僅かしか認められなかった。これは、エノキサバリンの非還元末端の主要な構造が 4 位に二重結合が入った構造 (α -threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸 ($\Delta 4$ 不飽和ウロン酸)) であること、及びヘパリン鎖内部の IdoA はほとんど遊離されないか、されても分解されてしまうことを示唆していると思われる (α -threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸の溶出位置は未確認)。また、10.5 分に ManN に相当するピークや、ほぼボイド容量の約 2 分に他の低分子量ヘパリンには観測されていないピークが認められた。エノキサバリンには、還元末端に ManNAc や 1,6-アンヒドロ環構造を持つ分子が含まれていることが報告されており、これらのピークは、1,6-アンヒドロ環構造をもつ GlcN や ManN である可能性が示唆された。

カルバゾール硫酸法にて、グルクロン酸を標準として各低分子量ヘパリンのウロン酸を定量したところ、バルナバリン製品 1 及び 2、ダルテバリン製品 1 及び 2、レビバリン及びエノキサバリンの 1 IU 当たりのウロン酸の量は、それぞれ 4.7 μg 、5.0 μg 、3.5 μg 、3.5 μg 、4.3 μg 及び 4.5 μg であった。つぎに、酸加水分解後 HPAEC-PAD により得られた 2,5-anhMan-ol, GalN, ManN, GlcN, Gal, GlcA 及び IdoA 並びに、比較的強く観測された peak1-7 (図 3) のウロン酸 1 nmol 当たりのピーク面積比を求めたところ表 1 に示す値が得られた。相対標準偏差は、一部の強度の低いピークや分離が不十分なピーク (IdoA 等) を除き、10% 以内であった ($n=3$)。バルナバリン製品 2 の GlcN のピーク比は、バルナバリン製品 1 よりも若干小さくなったが、これは GalN が混入していたからと考えられた。また、Peak7 のピーク面積は、バルナバリン製品 1 及び 2、ダルテバリン製品 1 及び 2 並びにレビバリンではほぼ同程度であり、還元末端の構造とは関係しないことが示唆された。

さらに、加水分解効率を調べる目的で、ピーク面積より GlcN を定量したところ、バルナバリン製品 1 及び 2、ダルテバリン製品 1 及び 2、レビバリン及びエノキサバリンのウロン酸 1 nmol 当たりの遊離 GlcN は、それぞれ 119、105、86、84、86 及び 94 pmol であった (データ非表示)。ウロン酸と GlcN が 1:1 で含まれていると仮定した場合、本酸加水分解条件により、全体の約 10% 程度の GlcN が遊離してきたことが分かった。

C. 3. 2 考察

低分子量ヘパリンは、硫酸エステル化の位置と程度、あるいはウロン酸の種類などが異なる

分子の混合物であり、直接構造を明らかにすることは困難である。従って、低分子量ヘパリンを後続品/後発品として開発するにあたって、先行品との構造特性の類似性を評価することが重要となる。本研究では、低分子量ヘパリンを酸加水分解産物とし、HPAEC-PAD によって得られたクロマトグラムのパターンを比較することにより、JAN の異なる低分子量ヘパリンの識別、及び同一 JAN を持つ低分子量ヘパリンの構造特性の類似性評価が可能かどうかを検討した。

糖鎖の加水分解法として一般的に用いられる TFA 及び HCl を用いた条件を検討したところ、いずれの酸加水分解条件でも、GlcN のピークは観測されたが、ウロン酸 (GlcA 及び IdoA) のピークはわずかししか観測されなかった。これは、ヘパリン類のウロン酸は、負電荷と (脱硫酸化又は脱アセチル化後の) グルコサミンの正電荷の相互作用により酸加水分解に対して安定化されること、及び酸性溶液中で脱炭酸を起こしたり、ラクトン環を形成したりすることが原因と考えられた。それでも、2 N TFA 中 100°C で 8~12 時間加水分解する条件によって、ある程度の単糖やオリゴ糖を検出することができたこと、また、比較的多くのピークが得られたことから、本研究では、TFA による酸加水分解を選択した。

バルナバリン、ダルテバリン、レビバリン及びエノキサバリンの酸加水物の HPAEC-PAD パターンを比較したところ、それぞれ末端構造や平均分子量に応じた特徴的なパターンを示すことが明らかになった。また、同一 JAN を持つ低分子量ヘパリンの HPAEC-PAD パターンは類似していることも確認された。HPAEC-PAD は、酸加水分解で得た糖を誘導体化することなく高感度で検出できること、ま

た、操作が簡便であることから、先行品と後続品/後発品の類似性評価に利用可能と思われる。

低分子量ヘパリンの原料であるヘパリンは、ブタ小腸より精製されるが、製造工程由来不純物として、デルマタン硫酸エステルが混入することが知られている。また、2007年秋～2008年春、主に米国において、ヘパリンナトリウムを使用した患者に、ヘパリンナトリウムに混入された高度に硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステル(OSCS)による有害事象が発生した際、低分子量ヘパリン製剤にもOSCSが混入されていることが明らかとなり、国際的な問題となった。デルマタン硫酸エステルもOSCSも、ヘパリンには含まれないGalNAcを構成成分とすることから、日局を含む各国関係機関では、ヘパリン純度試験法としての単糖分析に高い関心を持っている。本研究で得られた結果は、単糖分析がヘパリンや低分子量ヘパリンの純度試験法として利用できることを示唆するものであり、加水分解条件検討の結果等は、今後の日局各条ヘパリンナトリウム等の純度試験法整備に応用できるものと期待される。

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 結果

C. 4. 1. 1 トランスジェニック植物を用いて生産される組換えタンパク質性医薬品の開発動向

トランスジェニック植物を用いて生産された組換えタンパク質性医薬品の開発動向を表2に示す。ベニバナ種子で生産されたインスリンの臨床試験が開始されるなど、新たな開発の動きがある一方で、開発企業が倒産したという情報がある製品（非ホジキンリンパ腫ワクチ

ン）や、開発企業のホームページが閉鎖され開発が中断された可能性が高い製品（胃リパーゼ、ラクトフェリン）がある。

現在フェーズⅡ以降の臨床試験が進められているのは、抗*S. mutans*抗体とインターフェロンアルファ-2bである。抗*S. mutans*抗体は糖タンパク質であるが、植物に特有の糖鎖構造などが大きな問題にならないと考えられる口腔内投与製剤としての開発が行われている。インターフェロンアルファ-2bやフェーズⅠ/Ⅱ臨床試験が行われているインスリンは注射剤であるが、糖鎖を持たないタンパク質である。注射剤では、これまでに医薬品として有効性が確認され、臨床応用されているタンパク質を有効成分とする製品での開発が先行していると言える。トランスジェニック植物で製造される組換えタンパク質性医薬品に特有の投与形態である可食植物で生産されたワクチン類については最近の動向に関する情報がなく、開発が進んでいない様子である。以下に、開発が進んでいる品目に関する概要を記載する。

C. 4. 1. 1. 1 抗*S. mutans*抗体 [1]

抗*S. mutans*抗体CaroRx™は、抗原結合部位がIgG由来であるが、その他の部分は分泌型IgAの構造を持つ分泌型IgA/Gキメラ分子であり、H鎖がIgG由来のC_γ1、C_γ2とIgA由来のCa2、Ca3からなるIgA/Gキメラ2分子とJ鎖およびsecretory componentから構成される。遺伝子組換えと交配により作製された組換えタバコを用いて生産され、破碎と凍結融解により調製した葉の抽出物から精製される。CaroRx™は、う蝕関連菌*S. mutans*の表面にある接着タンパク質に結合するため、*S. mutans*の歯への接着を防ぐ働きを持つ。用法としては、クロルヘキシジンによる口腔内の殺

菌を行った後、2～3 週間の間に CaroRx™ を口腔内に数回適用する。これにより、6 ヶ月から 1 年の間、口腔内での *S. mutans* 繁殖を防ぐことができるとされている。分泌型 IgA/G と IgG の比較では、分泌型 IgA/G の方が口腔内への滞留性が高く、抗原への結合も強いとされている。

C. 4. 1. 1. 2 インターフェロン アルファ・2b [2]

ウキクサで生産されたインターフェロン アルファ・2b (Locteron®) では、生分解性ポリマーを用いた徐放性製剤としての開発が進められており、長時間作用型のインターフェロン製剤である PEG 化インターフェロン (PEG イントロン®) あるいはアルブミンとインターフェロンの融合タンパク質 (Albuferon®) を対照とした試験が行われている。Locteron® にはインターフェロンあるいは PEG 化インターフェロンにみられる投与後の血中濃度の急激な上昇がなく、副作用を回避できる可能性がある他、血中濃度の持続性が高く、ペグイントロンでは週 1 回の投与が必要であるのに対して、2 週間に 1 回の投与でよいとされている。有効成分である インターフェロン アルファ・2b (BLX-833) については、イントロンを対照薬としたフェーズ I が実施済みとなっている。ウキクサを用いた生産系では、目的タンパク質が根から分泌されることから、植物組織を破碎する必要がなく、溶液の状態でも目的タンパク質を含む画分を得られることが利点であろう。ウキクサは閉鎖系での栽培が可能であり、製造施設は GMP に適合しているとされている。

これまで、組換えタンパク質性医薬品の薬物動態 (PK) プロファイル改良は、ヒトインスリン製剤の他は主として、アミノ酸配列の改変

や PEG 修飾、あるいは IgG の Fc ドメインとの融合タンパク質作製などのように、目的タンパク質の構造改変/修飾により行われてきた。Locteron® の開発は、組換えタンパク質の生産にトランスジェニック植物を用いることに加えて、新規な DDS 技術を応用して PK プロファイル改良を図るという点でも、新しいタイプの組換えタンパク質性医薬品であると言える。

C. 4. 1. 1. 3 インスリン [3]

ベニバナで生産されるインスリンの第 I/II 相臨床試験は、2008 年 12 月に英国で開始された。試験は既承認のインスリン 2 製剤を対照薬とした生物学的同等性評価試験として行われており、バイオシミラー製品としての承認申請を念頭に開発が進められている可能性が考えられる。ベニバナ種子の発現系では、目的タンパク質を oleosin との融合タンパク質として種子中の oil body に局在させることにより、目的タンパク質の前駆体である融合タンパク質を植物組織から容易に抽出できるよう工夫がなされている。さらに、oleosin と目的タンパク質の間に組み込まれた配列を認識するプロテアーゼ等で融合タンパク質を処理することにより、目的タンパク質を切断して水相に移行させることができるデザインになっており、夾雑タンパク質が少ない状態で目的タンパク質を含む画分を得ることができるとされている。生産用のベニバナの栽培は屋外の圃場で行われるようであり、field GMP production の標準業務手順書を作成中であるとされている。

C. 4. 1. 1. 4 改変型グルコセレブロシダーゼ [4]

トランスジェニック植物ではなく培養細胞を利用したものであるが、組換えニンジン細胞

を用いて生産されているグルコセレブロシダーゼでは、フェーズⅢ臨床試験が開始されている。植物細胞を用いて生産された組換えタンパク質性医薬品で上市されたものはこれまでになく、新しい生産系である。組換えニンジン細胞で作られているグルコセレブロシダーゼ (plant-derived glucocerebrosidase: pdGCD) は、産生されたタンパク質が液胞に貯留されるよう、植物に特異的な液胞貯留シグナル配列 DLLVDTM を C 末端に付加したタンパク質として生産されている。既承認のグルコセレブロシダーゼ (セレザイム®) は、CHO 細胞で産生させたヒト β-グルコセレブロシダーゼを、シアリダーゼ、β-ガラクトシダーゼ及びヘキシサミニダーゼで処理することにより糖鎖末端がマンノースになるよう糖鎖をトリミングして作製されている。糖鎖末端をマンノースにすることは、酵素がマクロファージのマンノース受容体に結合して、薬効発現部位である細胞内のリソソームに取り込まれるために必須である。pdGCD では、液胞に存在する酵素の作用により糖鎖末端がマンノースとなるため、発現された目的タンパク質に糖鎖のトリミング処理を施す必要がない。既承認のグルコセレブロシダーゼとは一次構造が異なる別のタンパク質であるが、文献では、酵素活性や高次構造はセレザイムと同様であり、安全性に関する問題はないとされている [5]。植物の特色を活かした組換えタンパク質の製造方法であると言える。生産コストの点で利点があるものと思われる。

C. 4. 1. 2 トランスジェニック植物由来タンパク質医薬品の品質に関するガイドラインの整備状況

トランスジェニック植物で生産される組換えタンパク質性医薬品の品質に関するガイド

ラインとしては、2002 年に FDA から公表されたガイダンス案“Guidance for industry: Drugs, biologics, and medical devices derived from bioengineered plants for use in humans and animals” [6] と、2008 年に EMEA から公表されたガイドライン“Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants” (資料 6) がある。我が国には、トランスジェニック植物由来タンパク質医薬品の品質に特化したガイドラインはなく、今後検討する必要があると思われる。

EMEA ガイドラインでは、適用対象が安定的に遺伝子導入された高等植物 (種子植物) に限定されているが、植物を用いた組換えタンパク質発現系では、コケや緑藻等の植物が用いられる他、一過性発現系が用いられることもある。EMEA ガイドラインはおそらく、単細胞あるいはそれに近い植物では、従来の微生物や動物細胞の培養系における品質確保の方策を応用して考えやすいこと、一過性発現系では品質・安全性確保のための方策として、別途考慮すべき事項が生じること等から、それらをガイドラインの適用対象外とすることによって、焦点を絞って議論を進めたものと思われる。

2008 年 7 月に公表された EMEA ガイドラインに関しては、2006 年にガイドライン案 (DRAFT) が公表されており、ガイドライン案では、下記の 4 点について特にコメントが求められていた [7]。

- ・トランスジェニック植物関連の用語
- ・バンキングシステム
- ・一般的な製造の戦略
- ・栽培、収穫、初期加工へのガイダンス

それぞれの問いかけに対して寄せられたコメントと、回答およびガイドラインへの反映の

概要を表 3 に記す [8]。コメントはいずれも Pharma-Planta (欧州および南アフリカの産学連携団体) からのものであり、バンキングに関する記載は概略に止めることや、初期の製造工程を GACP (Good Agricultural Collection System) に適合することでよいとする意見が出されている。これらの意見に対しては、農作物の栽培と医薬品生産では求められる要件が異なることを理由に、全ては受け入れられない旨、回答されている。

ガイドライン案では、製造関連事項について、「一般的な製造方法」、「栽培、収穫、初期加工」、「下流加工」と項立てされていたが、最終版では、「栽培、収穫、初期加工」が「製造の第 1 フェーズ: First production phase」に、「下流加工」が「製造の第 2 フェーズ (下流加工): Second production phase (downstream processing)」に変更された。EMA ガイドラインに示されているように、栽培、収穫、初期加工からなる製造の第 1 フェーズでは、GMP に対応することが難しい場合もあり、独自の管理システムの構築が必要である。これに対して、出発原料調製以降の製造の第 2 フェーズでは、細胞培養により製造される組換えタンパク質性医薬品における品質管理システムと同様の考え方が可能である。

以下に、EMA ガイドラインの概要を示す。

Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (EMA / CHMP / BWP / 48316 / 2006) 24 July, 2008

安定的に遺伝子導入された高等植物を用いて製造される生物学的有効成分の品質に関するガイドライン

目次

1. 緒言
2. 適用対象
3. 関連法規と留意事項
4. ガイドライン
 - 4.1 遺伝子組換え体の作製
 - 4.1.1 宿主植物
 - 4.1.2 導入遺伝子および遺伝子発現構成体
 - 4.1.3 最初の形質転換体の作出
 - 4.1.4 最終的な形質転換体の樹立
 - 4.1.5 遺伝子組換え体のバンキングシステム
 - 4.1.6 遺伝的安定性
 - 4.2 製造工程関連事項
 - 4.2.1 一般的な製造方法
 - 4.2.2 製造の第 1 フェーズ
 - 4.2.3 製造の第 2 フェーズ (下流加工)
 - 4.3 有効成分の品質管理
 - 4.3.1 特性解析
 - 4.3.2 規格及び試験方法
 - 4.4 感染性物質による汚染の防止
 - 4.4.1 非ウイルス性感染性物質
 - 4.4.2 ウイルスおよびウイルス様感染性物質
 - 4.4.3 伝達性海綿状脳症 (TSE) 関連事項

概要

組換えタンパク質の製造方法として長年にわたって確立されてきた原核生物、酵母、動物細胞培養を補完し得る方法として、トランスジェニック植物を用いる技術が台頭してきた。本文書では、この新しい技術を用いて生産される有効成分の品質確保に必要な方策に関するガイダンスを提示する。

1. 緒言

本ガイドラインの主な目的は、既存の他の生産システムにおける品質ガイダンスの内容を、トランスジェニック高等植物を用いたシステ

ムに特有の課題に適合させることである。

バイオテクノロジーを応用して生産された他の有効成分の場合と同様、製造工程とその管理は、トランスジェニック植物により生産された有効成分の品質プロファイルに大きく影響する。さらに、トランスジェニック植物を用いた生産の経験は限られているため、開発研究の実施にあたって慎重な対応が求められる。

安定的に遺伝子導入する方法としては、パーティクルガン法、マイクロインジェクション、アグロバクテリウム法(核内遺伝子への遺伝子導入)、および、クラミドモナス法(葉緑体遺伝子への遺伝子導入)等がある。土壌や水生環境で生育すること、強固な細胞壁が存在すること、翻訳後修飾パターン(糖鎖修飾を含む)が他の真核生物と異なること等が、植物の特徴である。これらの特徴が有効成分の品質・安全性・有効性プロファイルに影響することは明らかである。

2. 適用対象

本ガイドラインの適用対象は、高等植物の核または色素体ゲノムに安定的に導入された1つあるいは複数の遺伝子から発現される生物学的有効成分の品質(感染性物質の安全性評価を含む)に関する事項である。本文書では、高等植物とは、種子植物(裸子植物および被子植物)に属するものを指す。一過性に遺伝子が導入された植物を用いた生産や植物細胞の培養による生産は、本ガイドラインの適用対象外とする。

本ガイドラインは主として、トランスジェニック植物を用いて生産され、非経口投与されるものに適用する。経口的に投与されるものについては、本ガイドラインの全てが当てはまる訳ではないが、同様の基本的な原則は適用される。

3. 関連法規と留意事項

本ガイドラインは、理事会指令 Directive 2001/83/EC の緒言と一般的原則(4)、補足 I の第 1 部第 3 節、さらに該当する EMEA CHMP ガイドラインを参考にして読むこと。EMEA Herbal Medicinal Products Committee (HMPC)のガイドラインは、本ガイドラインとは異なる形で植物の利用に言及したものであるが、参考にできるところもある。

遺伝子導入された高等植物を用いて製造された生物学的有効成分を含む医薬品は、Regulation (EC) No 726/2004 の補遺の適用対象に入り、その規制に定められたような中央認可方式によって市販許可が与えられている場合は、EU 域内でのみ市販されることになる。

トランスジェニック植物を用いた製造システムで用いられる封じ込め方法は、環境からトランスジェニック植物を守ることによる医薬品の品質確保と、トランスジェニック植物から環境を守ることによる環境保護のそれぞれの領域において機能すると考えられる。EU 内で導入遺伝子を持つ植物組織の栽培あるいは加工に責任を持つ製造業者は、地域の GMO と他の環境規制、特に Directive 2001/18/EC に従わなければならない。封じ込めのための方策は、トランスジェニック植物の直接の消費あるいは食物連鎖への意図しない放出により、ヒトや動物が意図的あるいは事故によりトランスジェニック植物を摂取することを防ぐものでなければならない。

4. ガイドライン

4.1 遺伝子組換え体の作製

4.1.1 宿主植物

申請者は、宿主植物の表現型/遺伝子型の種類と安定性、管理可能な環境下での日常的な栽培への適合性、外来因子(例:植物ウイルス/ウイロイド、カビ)の感染に対する感受性/耐

性、タンパク質の翻訳後修飾パターン等の事項を考慮して、遺伝子導入に用いた宿主植物の選択に関してその妥当性を記載する必要がある。

選択した植物については、分類学に関する文献を引用して、科、属、種、亜種、栽培品種、一般的な名称を明示する。植物の糖鎖修飾パターンや成長特性、耐性の改変のように、宿主植物自身の特性が改変されることもある。そのような場合は、改変された宿主植物の樹立について詳細に記載し、用いられた方法も説明すること。

宿主植物が、二次代謝産物（例えば、薬理活性を持つアルカロイドや配糖体）のようにヒトに有害な可能性のある成分を産生することが知られている場合は、適切な精製法を開発し、リスクアセスメントを提示すること。

4.1.2 導入遺伝子および遺伝子発現構成体

製造業者は、タンパク質をコードする塩基配列の起源を記載する必要がある。DNA配列の改変は全て明らかにして記載すること。

最初の形質転換体を得るために用いられた遺伝子導入法が適切であることを示し、遺伝子発現構成体の構築についても詳細に記載すること。アグロバクテリウムのような微生物による遺伝子導入法を用いた場合は、用いたシステムの起源、履歴、生物学的特性に関する完全な文書を提示すること。遺伝子発現構成体に関しては、複製起点、選択マーカー、レポーター遺伝子、プロモーター、エンハンサー、リーダー／ターゲット配列などの各要素の起源と機能を記載すること。プラスミドの構成要素の詳細なマップと注釈付きの全長配列を、構築の段階で配列を解析した領域と文献から引用した領域が分かるような形で示すこと。目的遺伝子のコーディング領域とベクターに挿入されているコーディング領域近傍の塩基配列について、

ベクターとの境界部位より上流を含めて決定すること。プラスミドにコードされる他の発現タンパク質についても記載すること。宿主植物の特性を制御あるいは改変するために導入あるいは改変される目的遺伝子以外の遺伝子（例えば、糖転移酵素の発現や阻害に影響する因子、播種性に影響する因子）について、情報を記載し、説明すること。

4.1.3 最初の形質転換体の作出

形質転換の方法と用いた試薬・機器を記載すること。最初の、あるいは、最終的に得られた形質転換体について、導入または修飾された遺伝子の状態を適切に記載すること。これには、少なくとも、目的の配列、挿入された部位および数、単純反復配列、逆方向反復配列、インサート配列、インサート近傍領域、挿入の連結部位、形質転換の工程での残存物に関する情報（例：アグロバクテリウムの感染後の運命）を含むこと。

4.1.4 最終的な形質転換体の樹立

形質転換により作出された最初の形質転換体は通常、最終的なあるいは生産用の形質転換体を得るために何世代かにわたって栽培される。販売承認申請においてこれらは、最初の形質転換体を T₀、続く世代については T₁、T₂、T₃ 等、製造用の形質転換体を T_p とするが、適宜、他の命名法も使用可能であろう。これらの工程については、全ての操作、用いた試薬と培地に関する情報を含めて、詳細に記載すること。

形質の優れた植物株 (elite line) を製造工程で用いる場合は、その正当性を示し、主な組換え株に関して詳細に記載すること。交配操作に関して詳細に記載すると共に、作出した植物株の性質に交配操作が与える影響を明らかにして記載すること。

4.1.5 遺伝子組換え体のバンキングシステム

他に正当と判断されるものがなく、可能であれば、バッチ間の一定性を確保するための戦略にバンキングシステムを含むこと。製造の戦略に応じて、生産株と elite line の双方のバンクが必要であろう。医薬品製造基材のバンキングシステムやバイオ医薬品の生産に用いられる材料に関する基本原則は CHMP ガイドラインに記載されているので、トランスジェニック植物由来有効成分の生産システムを考える際に考慮すること。

したがって製造業者は、長期の保管が可能で、多くの回数の製造に対して一定の品質を保った十分量の出発原料を供給可能なマスターおよびワーキング・トランスジェニック・バンクを、最終的な形質転換体から作製する必要がある。これらのバンクは、長期にわたる供給を確保するために十分な規模で作製すること。

マスターおよびワーキング・トランスジェニック・バンクを作製・樹立・維持した過程は、明確に記載すること。マスター・トランスジェニック・バンクおよびワーキング・トランスジェニック・バンクの特性解析と品質試験に適用される方法には、評価対象となっている特定のトランスジェニック植物の事情に応じ、CHMP が採用したガイドラインに定められた原則を考慮すること。マスター・トランスジェニック・バンク作製に用いられる植物材料は、遺伝子型と表現型が十分に解析されている必要がある。導入遺伝子に起因するジーンサイレンシング活性や多形質発現効果のように、生産用作物に影響し、結果として有効成分の品質や安全性に影響するような全ての特性を明らかにするために、マスター・トランスジェニック・バンク作製に用いられる材料の特性解析は、植物学、園芸学、農学、および、植物化学的な

性質に関する非形質転換体との比較を含めて実施される必要がある。

この解析には、導入遺伝子（例えば、配列、完全性、挿入部位、コピー数、マーカー配列の運命）、遺伝子発現（組織／器官特異性、調節、発現量）、植物のジーンサイレンシング効果、他のタンパク質の過剰発現、倍数性、核型の分析を含むこと。

バンク化されたものの安定性を検証し、結果に基づいて以下のことを明らかにすること。

- ・ 容器と包装の規格および試験方法
- ・ 貯法
- ・ 有効期限

4.1.6 遺伝的安定性

最初の形質転換体の段階から収穫時点まで、生産システムの遺伝的安定性を明らかにすること。安定性は、継代された作物のデータを含めて決定すること。定められた栽培条件での植物齢の限界を規定すること。遺伝的安定性試験は、栽培期間中の工程管理から得られる補足的なデータと、有効成分のバッチの品質試験結果によって補完する必要がある。販売承認申請書の中でこれらの事項を相互に関連付けることが重要である。

4.2 製造工程関連事項

4.2.1 一般的な製造方法

全て生物学的有効成分において、生産システムとその管理は、生産の一定性と生産される製品の品質を決める要因の一つである。遺伝子組換え高等植物を用いた有効成分の生産において、この原則を実行するための明確な方策を提示し、流れ図を用いて図示すること。

Good production practice

マスター・トランスジェニック・バンクとワーキング・トランスジェニック・バンクは通常、GMP 環境下で樹立し、維持されるべきである。

有効成分の各バッチの製造工程とは、ワーキング・トランスジェニック・バンクの一部を取り出したところから、バッチの試験および出荷までとすること。

トランスジェニック植物を用いた製造工程は二つの異なるフェーズに分けられる。

製造の第一フェーズは、トランスジェニック植物を用いる生産技術に特異的であり、栽培、収穫、収穫物の一次加工（例えば、スクリーニング、洗浄、選別、膨潤、輸送、貯蔵）がこれに含まれる。このフェーズの要素に従来のGMPの原理を適用するのが現実的でない場合、適切な品質システムを開発して実施すること。

品質システムの記載に用いられる項目には、少なくとも、人材（適格性とトレーニングを含む）、トレーサビリティを含む記録作成、監査と視察の手はず、そのシステムがいずれかの公的機関で承認されているかどうかの情報を含むこと。システムの開発においては、HMPCの“植物由来出発原料の Good Agricultural and Collection Practice (GACP) に関するガイドライン”に書かれている基本原理が出发点として用いられるであろう。ただし、GACPガイドラインは、別の用途での植物の利用を目的としたものであるため、その順守の確認のみではトランスジェニック植物を用いた生産の管理が適切だと見なされない。

すなわち、GMPあるいは決定された品質システムのいずれに準じて作業がなされる場合でも、製造工程の初期のステップが適切な工程内管理の適用によって十分に管理されると共に、GMP条件下での次の工程に適した十分に特性解析された出発原料が供給され、さらに、工程が十分に記録される必要がある。査察の際には、操作手順と記録を閲覧できるようにしておくこと。

一次加工の下流（製造の第2フェーズ）における有効成分の製造操作は通常、GMPに従って実施される。製品の分離、精製、製剤化などを含む第2フェーズは、全てのバイオテクノロジー応用医薬品に共通であり、一般的な要件は該当するCHMPやGMPガイドラインに記載されている。

4.2.2 製造の第1フェーズ

製造場所の記載

- ・ 明確な境界線を設けた地理的な位置
- ・ 生育支持体（典型的には土、水溶液、水性懸濁液）の品質と性質、水の供給、その他の原料（肥料や殺虫剤を含む）を規定し、適宜、規格および試験方法を設定すること。
- ・ 季節性や通常起こり得る変化を含め、主な気象条件について記載すること。その場所での最も極端な条件についても言及すること。
- ・ 栽培場所の監視
- ・ 地域の植物相および動物相
- ・ 周辺地域での他の遺伝子改変植物の栽培
- ・ 製造場所での作業に関する品質管理システム

栽培方法

- ・ 繁殖の手順と技術。栽培方法に応じて、製造工程での遺伝的安定性の資料を参照しながら、各段階での世代数を明らかにすること。
- ・ 目的外の植物や花粉などの外来の遺伝的物質の侵入を検出し、除去するための方法
- ・ 害虫を検出し、除去する方法
- ・ 植物の健康状態をモニタリングする方法、および病害への対策
- ・ 生産の一定性に関する工程内モニタリング。
以下の例のように、栽培に関する重要な指標を決め、その指標が正当であることを示

す：

- ・ 季節性や近隣の植物相の性質を含む環境条件を考慮した栽培技術および場所
- ・ 土壌の性質（放射活性がある可能性を含む）
- ・ 植物ホルモンおよび肥料の使用
- ・ 化学的あるいは生物学的な試薬を用いた殺虫剤
- ・ 交配による遺伝型の多様化の可能性

収穫および収穫後の初期加工

- ・ 収穫開始の基準
- ・ げっ歯類、鳥、死骸の混入を防ぐ技術を含む収穫方法
- ・ 輸送や貯蔵の方法を含む収穫直後の産物の取り扱い方法とその妥当性、および、施される機械的、物理的、化学的、あるいは生物学的な処理
- ・ 分離された一次加工品の貯蔵条件と期間

収穫物、有効成分、最終製品のバッチの定義を明確にし、各バッチについて、ワーキング・トランスジェニック・バンクまで遡ることのできるトレーサビリティの確保について記載すること。収穫物あるいは他の中間体をプールする計画を明確にし、適宜、規格および試験方法を設定すること。

4.2.3 製造の第2フェーズ（下流加工）

一般のバイオテクノロジー応用医薬品の場合と同様に、製品の精製に用いられる方法とその工程内管理について規格および試験方法を含めて詳細に記載し、その正当性を検証すること。植物栽培に固有の特殊性を考慮し、工程の頑健性を示すことに特に注意を払うこと。

植物や製造工程に由来する不純物や混入汚染物質となり得るもの（例えば、宿主細胞由来タンパク質、DNA、植物代謝産物、除草剤、肥料、カビ毒）について評価すること。目的物質と類似した宿主由来タンパク質、目的物質と

共に精製されてくる汚染物質、過敏反応など安全性上の懸念となる可能性のある全ての要素について、記録を取るよう留意すること。

不純物や汚染物質に関する精製工程の除去能力について示し、精製の各段階での不純物除去率と全体での除去率を明らかにすること。必要であれば、不純物/混入汚染物質の濃度を通常の製造工程で予想されるよりも高く（スパイク）して、その除去工程の頑健性を示すこと。さらに、現実的な条件と最悪の条件を想定して、投与量あたりの不純物/混入汚染物質の残存量の定量的評価を行うこと。

4.3 有効成分の品質管理

4.3.1 特性解析

トランスジェニック植物由来の有効成分の特性解析は、関連するガイドライン（特に、規格および試験方法に関する ICH Q6B ガイドライン）、薬局方、その他の要件を考慮して、適切な方法により実施すること。可能かつ妥当であれば、特性解析において、有効成分と天然に存在するカウンターパートとの比較も行うこと。見出された違いの影響について注意深く考察し、安全性と有効性の観点からよく議論すること。

物理化学的性質、生物学的性質、免疫化学的性質、純度、不純物を含む有効成分の詳細な品質プロファイルを、適切な分析技術を用いて明らかにすること。翻訳後修飾等により構造上の不均一性がある場合は、不均一性のパターンを明らかにすること。さらに、バッチ間での一定性を確保するための適切な工程管理と規格および試験方法を確立する基礎として、栽培、収穫、収穫後の加工、貯蔵が有効成分の多様性のパターンに与える影響を適切に明らかにすること。

糖鎖付加を含む植物タンパク質の翻訳後修