

- 山口照英: ヒトミエロペルオキシダーゼの部位特異的糖鎖構造解析. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 11) 片桐洋子, 佐藤 伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 鈴木佑典, 中島英規, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬: ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の多様性と endopeptidase 活性. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 12) 中村里香, 手島玲子, 佐藤里絵, 中島 紫, 川崎ナナ, 山口照英, 澤田純一, 名古屋博之 (養殖研): GM 遺伝子組換えアマゴの安全性研究—アレルゲン性について. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 13) 楽 娜, 伊原友紀, 松下及川浩子, 中村公亮, 川崎ナナ, 白川 剛, 小川温子: 膵臓 α -アミラーゼに対する内在性レセプターの同定と糖鎖結合部位の予測. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 14) Kotone Sano, Miho Asahi, Kimie Asanuma, Maiko Yanagibashi, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Zenta Yasakawa, Chihiro Sata, Ken Kitajima, Haruko Ogawa: Mechanism of tissue remodeling regulation by the change in glycosylation and biological activity if extracellular matrix glycosylation. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 15) 森田 一平, 角田 品子, 山本 修平, 鮫島健彦, 川崎 ナナ, 川寄 敏祐, 岡 昌吾: 樹状突起スパイン形成における HNK-1 糖鎖機能に関する研究 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 16) 小林 恭子, 木塚 康彦, 川崎 ナナ, 角田 品子, 岡 昌吾: マウスの腎臓における非硫酸化型 HNK-1 糖鎖を発現する新規タンパク質の同定とその機能に関する研究 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 17) 水口 惣平, 野村 和子, 出嶋 克史, 泉川友美, 江草 徳幸, 谷口 史恭, 田村 純一, 中島 紫, 伊藤 さつき, 川崎 ナナ, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 北川 裕之, 菅原 一幸, 野村 一也: モデル生物 *C. elegans* を用いたヘパラン硫酸とコンドロイチンプロテオグリカンの生体内機能解析 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 18) 村田 大輔, 野村 和子, 水口 惣平, 出嶋 克史, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 福島 慶子, 山下 克子, 中島 紫, 伊藤 さつき, 川崎 ナナ, 野村 一也: 線虫 *C. elegans* における GPI アンカーの機能解析 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 19) 野村 和子, 林 康広, 村田 大輔, 永石 貴之, 水口 惣平, 出嶋 克史, 福岡 宏史, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 中島 紫, 川崎 ナナ, 伊東 信, 平林 義雄, 野村 一也: 線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 20) 平野 真, Bruce Y. Ma, 川崎 ナナ, 川寄 伸子, 川寄 敏祐: Binding of MBP to Meprins Results in the Inhibition of the Proteolytic Activity of Meprins and the Initiation of the Complement Activation 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 21) 川寄 伸子, 井上 理抄, Kay-Hooi Khoo, 川崎 ナナ, Bruce Yong MA, 川寄 敏祐: ヒト結腸がん細胞より単離されたマンナン結合タンパク質リガンド糖タンパク質の性質 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 22) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖と医薬品. 日本応用糖質科学会平成19年度大会(2007. 8. 30)平塚
- 23) 片桐洋子, 佐藤 伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 鈴木佑典, 中島英規, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬: ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の多様性. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
- 24) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿ による目的部分糖鎖構造を持つ糖タンパク質の特異的同定. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
- 25) 佐野 琴音, 旭美穂, 浅沼公恵, 伊藤さつき, 橋井則貴, 川崎ナナ, 安川然太, 佐藤 ちひろ, 北島健, 小川温子: 組織再生に関

- わるマトリクス糖タンパク質の活性調節と修復過程における糖鎖変化. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
- 26) 楽 娜, 伊原友紀, 松下及川浩子, 中村公亮, 川崎ナナ, 小川温子: プタ腺臓 α -アミラーゼに対する十二指腸刷子縁膜糖タンパク質レセプターの探索. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
- 27) 野村和子, 林 康宏, 村田大輔, 永石貴之, 水口惣平, 出嶋克史, 福嶋宏史, 松石 紫, 川崎ナナ, 安藤恵子, 三谷昌平, 伊藤 信, 平林義雄, 野村一也: 線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
- 28) 井上理抄, Kay-Hooi Khoo, 川崎ナナ, Bruce Youg MA, 川崎敏祐, 川崎伸子: ヒト結腸ガン細胞上に発現するマンナン結合タンパク質 (MBP) の内在性糖鎖リガンド. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
- 29) 川崎ナナ, 高倉大輔, 中島 紫, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿを用いた糖鎖抗原付加タンパク質の同定. 日本プロテオーム機構第5回大会 (2007. 7. 30-31)東京
- 30) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 中島 紫, 山口照英: 細胞治療/再生医療における糖鎖解析の重要性と糖鎖を利用した細胞特性解析への挑戦. 第4回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (2006, 10, 23-24) 東京
- 31) 野村一也, 水口惣平, 野村和子, 出嶋克史, 永石貴之, 村田大輔, 安藤恵子, 三谷昌平, 瀬古 玲, 山下克子, 泉川友美, 北川裕之, 菅原一幸, 川崎ナナ, 松石 紫, 權 娟大, 成松 久: 遺伝子破壊による線虫糖鎖関連遺伝子の機能解析. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 32) 旭 美穂, 佐野琴音, 橋井則貴, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 柳橋麻衣子, 宮本泰則, 小川温子: 肝再生過程におけるラット血漿フィブロネクチンの糖鎖構造. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 33) 吉田奈央, 竹原弥生, 佐野琴音, 向山恵津子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 穠山 浩, 吉岡靖雄, 米谷民雄, 小川温子: スギヒラタケレクチンの精製とその糖鎖異性. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 34) 井上里抄, Kay-Hooi Khoo, 寺田基剛, 川崎ナナ, Ma Bruce Yong, 川崎敏祐, 川崎伸子: 血清マンナン結合タンパク質(MBP)に結合するヒト結腸ガン細胞上のリガンド糖タンパク質. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 35) 馬場亮人, Ma Bruce Yong, 松石 紫, 川崎ナナ, 平野 真, 川崎伸子, 川崎敏祐: レクチン jacalin による CD54 を介した T細胞の活性化に関する研究. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 36) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 川西 徹, 山口照英: LC/MS/MS を用いたヒト血清グライコプロテオームの解析. 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会 (2006, 7, 18-19) 東京
- 37) Kotone Sano, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yasunori Miyamoto, Haruko Ogawa: Reduced glycosylation of vitronectin modulates the tissue lytic system and stellate-cell spreading during liver regeneration. International Symposium on Extracellular Glycomatrix in Health and Disease. (2006, 6, 15-17) Awajishima
- 38) Yanyang Zhao, Jianguo Gu, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Eiji Miyoshi, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Naoyuki Taniguchi: Deletion of core fucosylation on $\alpha 3 \beta 1$ integrin down-regulates its functions. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 39) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi: Differential analysis of N-linked oligosaccharides in kidney of human systemic lupus erythematosus (SLE) model mouse by LC/MS. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 40) Kotone Sano, Kimie Asanuma, Nana Kawasaki, Fumio Arisaka, Haruko Ogawa: How Glycosylation Activates Multifunctional Extracellular Matrix Glycoprotein, Vitronectin, during Liver Regeneration. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 41) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii,

- Akira Harazono, Yukari Nakajima, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi:
Glycosylation analysis of IgLON family glycoproteins in rat brain by LC/MSⁿ (II). 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 42) Yasuhiko Kizuka, Nobuaki Maeda, Nana Kawasaki, Toshisuke Kawasaki, Shogo Oka:
A unique type of HNK-1 carbohydrate expressed on phosphacan is biosynthesized by GlcAT-P. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 43) Makoto Baba, Bruce Y. Ma, Matsuishi Yukari, Nana Kawasaki, Makoto Hirano, Nobuko Kawasaki, Shogo Oka, Toshisuke Kawasaki: The lectin jacalin induces T lymphocyte activation through CD45 signaling. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 44) Makoto Hirano, Yong B. Ma, Nana Kawasaki, Kazumichi Okimura, Nobuko Kawasaki, Shogo Oka, Toshisuke Kawasaki:
Mannan-binding protein binding to metalloproteases meprin α and β results in the proteolytic activity inhibition and the complement activation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 45) Nobuko Kawasaki, Risa Inoue, Motoki Terada, Kay-Hooi Khoo, Nana Kawasaki, Bruce Y Ma, Toshisuke Kawasaki:
Characteristic endogenous ligands for mannan-binding protein expressed on SW1116 human colon cancer cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 46) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 山口照英, 早川堯夫, 川西徹: LC/MS を用いた血清糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析. Pharmaco-Heamtology シンポジウム (2006, 6, 30)東京
- 47) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/MSⁿ を用いた部位特異的糖鎖構造解析. 第6回日本蛋

G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

表4 ①～⑤ 記入例

| | 分類 | 記入例 | |
|---------------------------|--------------------|---|--|
| ①製造方法 | a. 抽出(天然由来/植物細胞由来) | ・ヒトリン/腫瘍で発生される ・ヒトメラノーマ腫瘍で発生される ・ヒト胎盤由来 | |
| | b. 合成 | 合成 | |
| | c. 遺伝子組み換え | 遺伝子組み換え | |
| ②由来及び型 | a. 天然型 | ・ヒトエリスロポエチンで ・ロロアーゼの多型の主要なバリエーションの一つで ・第V110位子の主要なアミノフォームで | |
| | b. 類似型 | ・ヒト成長ホルモンの誘導体で ・ヒト細胞プラスミノーゲンアクチベータの誘導体で | |
| | c. 融合型等 | ・ヒト化モノクローナル抗体で ・ヒト抗ヒトCD4モノクローナル抗体であるIgG2で ・融合タンパク質で | |
| ③糖鎖型は天然型との違い、融合型の場合は糖鎖成分等 | 糖鎖型 | a. 置換型 | ・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 |
| | | b. 削除型 | ・ヒト成長ホルモンの101～101番目のアミノ酸残基に由来する ・クリングルドドメイン及びセリンプロテアーゼドメインからなる |
| | | c. 伸縮型 | ・平均分子量のポリエチレングリコール(平均分子量4,000)が共有結合している(主な結合部位: IgM, Lys15) |
| | d. 融合型 | ・マウス抗ヒトCD4抗体の糖鎖決定部、並びにヒトIgG1のフレームワーク領域が定常部からなる ・1～13糖目はヒトCD28の糖鎖非領域、また134～356糖目はヒトIgG1のF領域からなる | |
| ④原料 | a. ペプチド・タンパク質 | 糖鎖が結合していないペプチドやタンパク質の場合は原料不詳 | |
| | b. 精ペプチド・精タンパク質 | ・チャイニーズハムスター卵巣細胞により発生される ・ムシ科により発生される ・マウスメラノーマ細胞により発生される | |
| ⑤糖鎖 | 製造条件 | a. 1本鎖 | ○糖のアミノ酸残基からなるタンパク質 ○糖のアミノ酸残基からなるA鎖及びB鎖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 |
| | 二重鎖以上 | a. 2重鎖以上(ホモ) | ○糖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糖タンパク質(分子量: 約300,000) |
| | 二重鎖以上(ヘテロ) | b. 2重鎖以上(ヘテロ) | ○糖のアミノ酸残基からなるAサブユニット2分子及びB鎖のアミノ酸残基からなるBサブユニット2分子から構成される糖タンパク質(分子量: 約300,000) |
| | | | |

表1 糖鎖の違いによって異なるINNを持つ糖タンパク質性医薬品

| 基原 | INN | 細胞/組織 |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------|
| α-Galactosidase | <i>Agalactase Alfa</i> | Human cell line |
| | <i>Agalactase Beta</i> | CHO |
| Antithrombins | <i>Antithrombin III</i> | Human source |
| | <i>Antithrombin Alfa</i> | Goat |
| Erythropoetin | <i>Epoetin Alfa</i> | CHO |
| | <i>Epoetin Beta</i> | CHO |
| | <i>Epoetin Gamma</i> | |
| | <i>Epoetin Delta</i> | Human cell line |
| | <i>Epoetin Epsilon</i> | BHK |
| | <i>Epoetin Zeta</i> | |
| | <i>Epoetin Theta</i> | |
| | <i>Epoetin Iota</i> | |
| FSH | <i>Follitropin Alfa</i> | CHO |
| | <i>Follitropin Beta</i> | CHO |
| Prourokinase | <i>Nasarupase</i> | Human cell line |
| | <i>Nasarupase Beta</i> | Murine cell line |
| Urokinase | <i>Urokinase</i> | Human source |
| | <i>Urokinase Alfa</i> | Non-human mammalian cell line |

表2 INN収載低分子量ヘパリン

| INN | 分析手法 | 平均分子量 | 試薬数/二糖 | 主成分の種類 | |
|---------------------|--------------------------------|--|-----------|--------------------------------------|---------------------|
| | | | | 非還元末端 | 還元末端 |
| Daltecparin Sodium | 薄層法 | 5,600 - 6,400 (5,000) | 2.0 - 2.5 | A | O |
| Mincifaparin Sodium | 薄層法 | 1,700 - 3,200 (3,000(21,000 - 6,000)) | 2.1 | A | O |
| Nedroparin Calcium | 薄層法 | 3,800 - 5,200 (4,300) | 2.1 | A | O |
| Aviparin Sodium | 薄層法 | 3,150 - 5,150 (4,150) | 2.1 | A | O |
| Cartroparin Sodium | 薄層法/イオン交換 | 5,000 - 7,000 (7,000(21,000以下)) | 2 - 2.5 | A | O |
| Liraparin Calcium | 薄層法 | 3,000 - 5,000 (7,000(21,000以下)) | 2 | A | 6-sulfate structure |
| Pantoparin Sodium | 薄層法/化学/第二薄層 | 4,000 - 6,000 (5,000) | 2.0 - 2.5 | A | D |
| Thromboparin Sodium | Fluorochromim Assay/免疫ヘパリンアッセイ | 5,500 - 7,500 (6,500) | 1.8 - 2.5 | B | D |
| Enoxiparin Sodium | ベンジルエーテル誘導体をアルカリ分解 | 3,500 - 5,500 (4,500) | 約2 | B | 記載なし |
| Bemiparin Sodium | 4級アンモニウム塩によるアルカリ分解 | 3,500 - 4,200 (3,800) | 約2 | 2-O-sulfate-4-amino-pyranosidic acid | D |
| Daltecparin Sodium | 金属イオン/薄層法/化学 | 2,250 - 3,850 (3,000) | 2.5 | 記載なし | 記載なし |
| Avicoparin Sodium | 薄層法/加熱 | 1,800 - 6,500 (3,000(22,000 - 15,000)) | 2.7 | 異なる種類を2つ | |

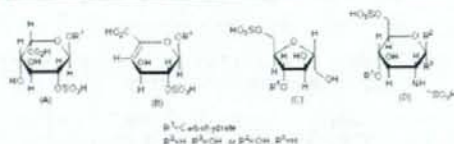


表3 各低分子量ヘパリンのHPAEC-PADプロファイル中に観測されたいくつかのピークのウロン酸1 mmol当たりのピーク面積(n=3)

| 低分子量ヘパリン | バルナパリン | | バルナパリン | | ダルテパリン | | ダルテパリン | | レヒパリン | | エノキサパリン | |
|---|----------------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | Peak Area (nD X min) | | | | | | | | | | | |
| | Average | % RSD | Average | % RSD | Average | % RSD | Average | % RSD | Average | % RSD | Average | % RSD |
| Peak1 | | | | | | | | | | | 134 | 0.9 |
| 2,5-dihydroxy-2,5-dimethyltetrahydrofuran-3-one | | | | | 286 | 2.7 | 303 | 3.8 | 523 | 2.2 | | |
| GalN | 55 | 1.8 | 192 | 0.3 | 34 | 2.5 | 47 | 5.1 | 14 | 9.5 | 5 | 44.5 |
| ManN | 95 | 1.9 | 13 | 3.1 | | | | | 5 | 7.5 | 207 | 2.8 |
| GalS | 306 | 3.9 | 2579 | 3.7 | 2152 | 4.9 | 2188 | 5.1 | 2187 | 3.5 | 2403 | 1.0 |
| Gal | 21 | 2.8 | 40 | 3.8 | 27 | 3.2 | 35 | 5.0 | 32 | 7.5 | 82 | 8.7 |
| Peak4 | | | | | 114 | 5.0 | 117 | 5.2 | 208 | 1.7 | | |
| Peak5 | | | | | 110 | 2.3 | 95 | 3.5 | 157 | 1.3 | | |
| Peak6 | 277 | 5.1 | 175 | 4.8 | 161 | 5.1 | 164 | 7.2 | 145 | 5.7 | 144 | 3.9 |
| Peak7 | 202 | 5.3 | 204 | 2.7 | 146 | 4.2 | 156 | 5.4 | 189 | 5.0 | 258 | 1.0 |
| Peak8 | 303 | 3.4 | 281 | 3.1 | 212 | 4.8 | 213 | 5.4 | 205 | 2.8 | 402 | 0.5 |
| Peak9 | 2195 | 1.0 | 1931 | 0.4 | 2180 | 2.5 | 2188 | 4.0 | 2023 | 1.2 | 1647 | 0.3 |
| GalA | 55 | 4.5 | 95 | 0.5 | 75 | 3.1 | 92 | 5.1 | 98 | 5.0 | 91 | 5.5 |
| IdoA | 145 | 7.5 | 174 | 7.9 | 119 | 20.5 | 125 | 19.7 | 248 | 5.3 | 44 | 27.9 |

※ 各ピークは図2を参照する。

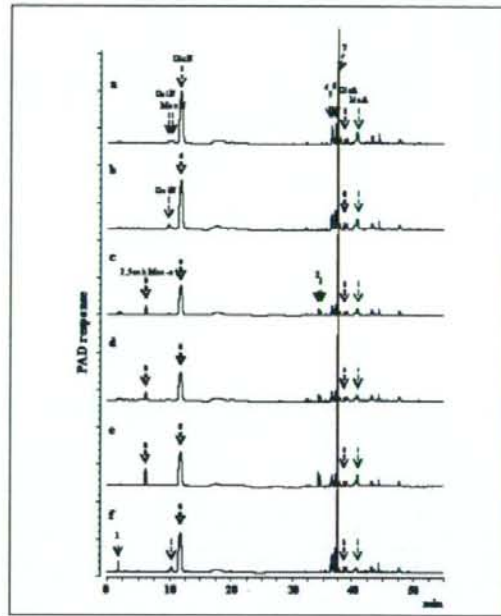


図6 各種低分子量ヘパリンの2 N TFA存在下、100°C、12時間加水分解したときのHPAEC-PADプロファイル

(a) パルナバリン1, (b) パルナバリン2, (c) ダルテバリン1, (d) ダルテバリン2, (e) レビバリン, (f) エノキサバリン

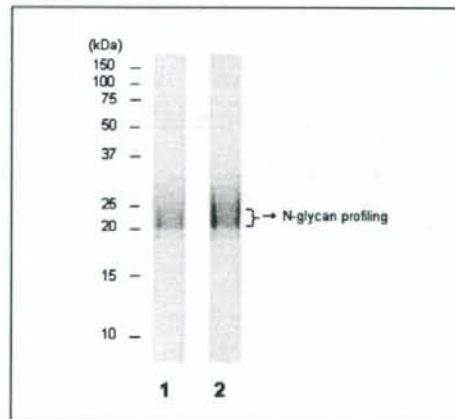


図7 *Follitropin* のSDS-PAGE
Lane 1: *Follitropin Alfa* (Gonal-f)
Lane 2: *Follitropin Beta* (Follistim)

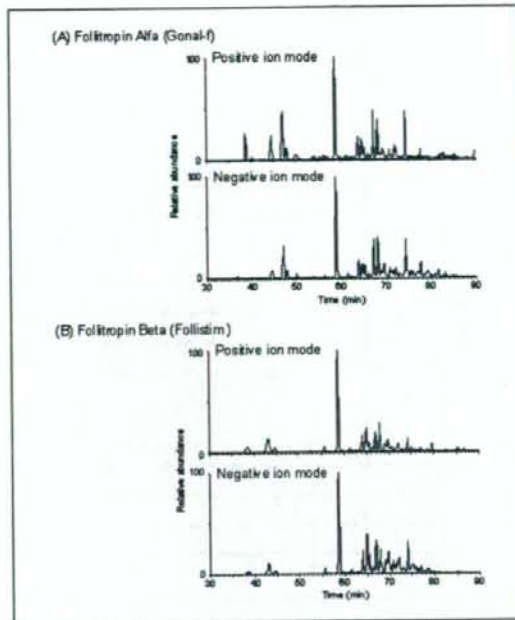


図2 *Follitropin Alfa* 及び *Beta* の糖鎖プロファイル
 (A) *Follitropin Alfa* (Gonal-f), (B) *Follitropin Beta* (Follistim)

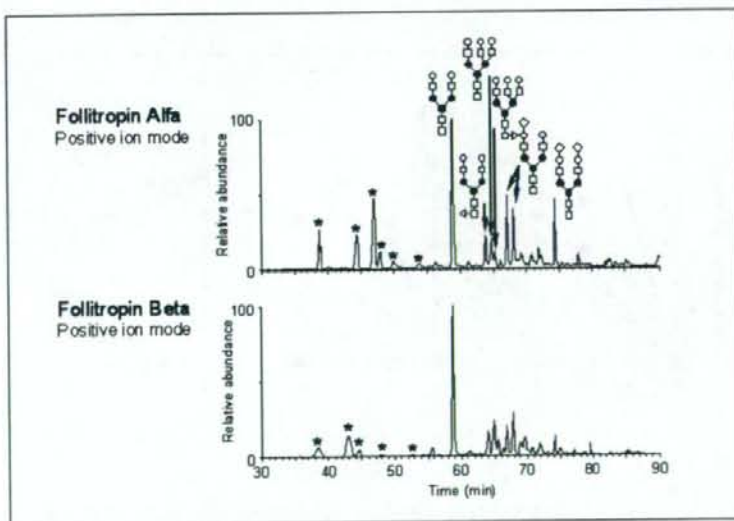


図3 *Follitropin Alfa* 及び *Beta* の主な糖鎖の構造

*: non-glycan peak

○: Man, ●: Gal, □: GlcNAc, △: Fuc

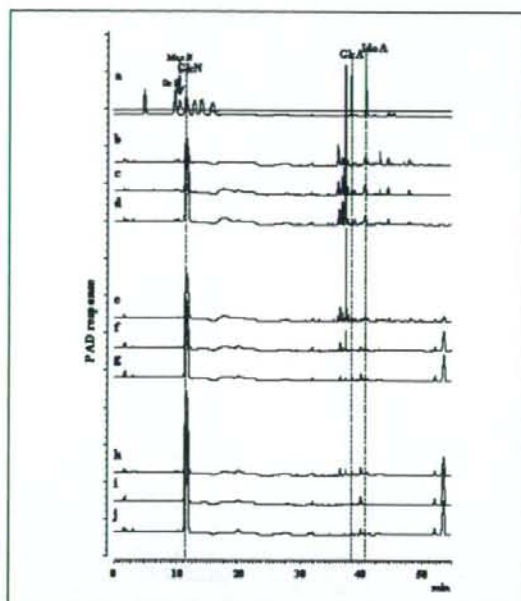


図4 各種条件下で酸加水分解したときの低分子量ヘパリン(パルナパリン製品1)のHPAEC-PADプロファイル
 (a) 単糖標準物質(上段 ManN, 下段 Fuc, GalN, GlcN, Gal, Glc, Xyl, GlcA及びIdoA) ,
 (b-d) パルナパリン製品1を2 N TFA存在下, 100°Cで4時間, 8時間及び12時間加熱,
 (e-g) 2 N HCl存在下, 100°Cで4時間, 8時間及び12時間加熱,
 (h-j) 4 N HCl存在下, 100°Cで4時間, 8時間 及び12時間加熱.

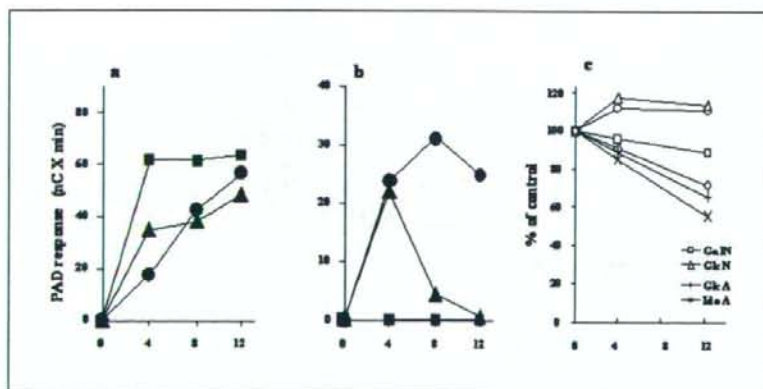


図5 ピーク面積の経時変化

パルナパリンを2 N TFA(●), 2 N HCl(▲)又は4 N HCl(■)存在下, 100°Cで加熱したときのGlcNのピーク(a)及び37.5分のピーク(b)のピーク面積の経時変化。(c)各単糖を2 N TFA存在下, 100°Cで加熱したときのそれぞれのピーク面積の経時変化.

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

研究分担者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長
研究協力者 多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員
研究協力者 鈴木琢雄 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官

トランスジェニック植物を用いて製造される組換えタンパク質性医薬品について、製品開発の現状と規制環境整備の国際的動向を調査し、品質・安全性のための課題を検討した。

- 1) 海外では、ウキクサで生産されたインターフェロンなどがフェーズⅡ臨床試験に進んでおり、医薬品としての有用性が認められているタンパク質を有効成分とする医薬品の生産宿主としてトランスジェニック植物の利用が進んでいる。
- 2) 米国では2002年にガイダンス案が、EUでは2006年のガイドライン案に続いて2008年にガイドライン最終版が公表された。米国のガイダンス案では、安定発現系の他に一過性発現系も適用対象とされ、可食植物を利用した製品も含めて、留意事項が記載されている。EUのガイドラインでは、適用対象が安定的に遺伝子導入された高等植物に限定され、非経口投与される有効成分の品質・安全性確保に関する留意事項が記載されている。
- 3) トランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質性医薬品の生産では、生産期間を通じて適格な出発原料が供給されるよう、栽培条件の変動があっても目的物質の発現量や特性に影響が生じにくい優れた生産用植物株を樹立してトランスジェニック・バンクを作製すると共に、栽培・収穫・初期加工からなる製造の第1フェーズの管理手法を確立することが重要である。
- 4) 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品質特性解析においては、目的タンパク質の翻訳後修飾、製造工程由来不純物、および混入汚染物質に関する評価が重要である。

トランスジェニック植物により生産される組換えタンパク質性医薬品は、トランスジェニック動物により生産される組換えタンパク質性医薬品と並び、新世代バイオ医薬品に位置付けられる。我が国においても、これらの製品の実用化に備え、品質・安全性確保に求められる要件を明らかにしていく必要がある。

A. 研究目的

近年、タンパク質性医薬品の製造方法をめぐって、安全性のさらなる向上と製造コスト削減を求める動きが強くなり、これらの要件を満足しうる方法として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が注目されている。トランスジェニック植物を用いたタンパク質生産では、血清等の動物由来原料を用いる際の安全性上の重要課題である感染性物質混入に関する対策を軽減することができることとされている。また、高価な培地成分や特殊な動物細胞培養設備に代わり、比較的安価な植物栽培による生産が可能であるため、製造コストを大幅に削減することができるとも言われている。海外ではトランスジェニック植物を用いて製造されたタンパク質の中に、既にフェーズⅡ臨床試験の段階にまで開発が進んだものがあり、医薬品としての実用化も遠くないと思われるが、これまでにヒトの医薬品として承認された実績がないため、製造されたタンパク質の品質・安全性確保が今後の課題である。

トランスジェニック植物を用いて製造されたタンパク質における医薬品としての品質・安全性確保のための基本的な考え方は、微生物や動物細胞を用いて製造された従来の組換えタンパク質性医薬品と変わらない。しかし、植物では、タンパク質の翻訳後修飾がヒトや動物と異なること、微生物や動物にはない成分が含まれること、環境から混入する可能性のある混入汚染物質の種類が異なることなどから、植物に特有の問題に注意して評価を行う必要がある。すなわち、トランスジェニック植物を用いて製造されたタンパク質性医薬品の品質特性解析においては、目的タンパク質の翻訳後修飾、製造工程由来不純物、および混入汚染物質に関する評価が特に重要であると考えられる。また、トランスジェニック植物を用いた生産系で課題となる事項としては、バンキングシステムの

確立と植物から出発原料（医薬品製造基材）調製に至る工程の管理手法の確立があげられる。

本研究では、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について、開発状況を調査するとともに、品質・安全性の評価に関する規制環境整備の国際的動向を明らかにするため、FDA および EMEA から公表されたガイドラインに関する検討を行った。さらに、品質・安全性確保のための課題として、適格な出発原料の恒常的な供給のために求められる要件、および、植物に特有の糖鎖の免疫原性に関連する課題について考察した。

B. 研究方法

製品開発状況に関しては、学術雑誌に掲載された論文¹⁾、およびトランスジェニック植物で製造した組換えタンパク質性医薬品を開発している企業からの公開情報を参考に調査を行った。また、FDA/USDA 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”²⁾、および 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 (EMA/CHMP/BWP/48316/2006; 24 July 2008)”³⁾をもとに、規制環境の整備に関する国際動向を検討した。バイオ医薬品の製造に関連する ICH ガイドライン (Q5A, Q5B, Q5D) も適宜参考にした。

C. 結果と考察

C.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 Table 1 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.1.1 抗 *S. mutans* 抗体⁴⁾

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 γ 1, C γ 2 と IgA 由来の C α 2, C α 3 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、クロロ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。

C.1.2 インターフェロン アルファ・2b⁵⁾

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、PEG 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。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、溶液の状態での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。

C.1.3 インスリン⁶⁾

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.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”²⁾と、2008年にEMA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”³⁾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。

FDAのガイダンス案は、米国農務省USDAと共同で作成され、安定発現系および一過性発現系を用いて組換え植物により生産された医薬品、生物製品、医療用具、動物薬を対象に、宿主および原材料植物の特性について明らかにすべき事項、環境に関する留意事項、製造方法関連の留意事項、前臨床試験における留意事項等について記載されている。USDAと共同で策定されているため、圃場栽培に関する規制、

封じ込め、食料あるいは飼料用作物への混入防止に関することが詳しく記載されている。

本分担報告書では、FDAガイダンス文書にある“drugs”は“医薬品”、“biologics”は“生物製品”と訳したが、drugsとbiologicsの意味するところは、製品の特性ではなく、FDAのCDERの規制対象製品としてのdrugs、CBERの規制対象製品としてのbiologicsであると思われる。ガイダンスドラフトが公表された2002年には、CBERが組換えタンパク質性医薬品を取り扱っていたが、2003年に制度が変更され、現在ではCDERが組換えタンパク質性医薬品を取り扱っている。

2008年に公表されたEMAのガイドラインでは、一過性発現系については対象外とされ、安定発現系を用いて組換え植物により生産された有効成分の品質・安全性関連事項を対象に、組換え体作製について明らかにすべき事項、製造方法関連の留意事項、有効成分の品質管理、感染性物質による汚染の防止等について記載されている。宿主植物の種類としては、高等植物に限定されており、また、有効成分の投与経路としては、非経口投与されるものが適用対象とされている。

EMA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。

- ・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Table 2に記す。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、回答された。

上記のように、EMEA と FDA のガイドラインの主な相違点は二つある。第一に、EMEA ガイドラインでは、適用対象となる生産宿主を安定的に遺伝子導入された高等植物に限定しているのに対して、FDA ガイダンスでは、安定発現系の他に一過性発現系についても適用対象としている点である。また、FDA ガイダンスでは、植物種については特に規定していない。第二に、トランスジェニック植物を利用して製造される医薬品に独特の形態である可食植物を利用したいわゆる食べるワクチン(未加工の野菜や果実を経口投与するもの)について、有効成分の品質に関するガイドラインである EMEA ガイドラインでは全く記載がないのに対して、FDA ガイダンスでは、製法と工程に関連する留意事項などについて記載している点である。

これらの観点で、我が国におけるガイドライン策定を想定して適用範囲を考察すると、発現系に関しては、一過性発現系はウイルスベクターの使用に関連した安全性確保や製品の品質管理が極めて難しいと考えられるため、安定発現系に限定することが現実的であると思われる。生産宿主となる植物種に関しては、コケや緑藻など、医薬品生産に適した特色を持つ種子植物以外の植物も開発されてきており、将来的には、生産宿主が高等植物に限定されるものではないと予想されるため、高等植物に限定しない形でもよいと思われる。可食植物を利用した製品を考慮した内容にすべきかについては、我が国では、粘膜免疫に関して優れた基礎研究が

行われており、抗原タンパク質のデザインなど、製品開発につながる有用な基礎的知見が得られてくる可能性があることに加えて、花粉症対策のイネなどの食べるワクチンの研究開発も行われているため、ガイドラインあるいはその補遺の適用対象とすることが望まれるであろう。すなわち、今後、“安定的に遺伝子導入された組換え植物株に由来する製品の品質・安全性”に関するガイドラインを考えていくことが望ましいと思われる。

以下に、FDA ガイダンス案の概要を示す。

Guidance for Industry: Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals (DRAFT GUIDANCE) Sep 2002

遺伝子組換え植物に由来するヒトまたは動物用の医薬品、生物製品、医療機器に関する企業向けガイダンス

目次

- I. 緒言
 - A. 目的および適用対象
 - B. 規制当局の責任範囲
- II. 宿主および原材料植物の特性解析
 - A. 一般的留意事項
 - B. 宿主植物
 - C. 遺伝子導入された原材料植物
- III. 環境に関する留意事項
 - A. 一般的留意事項
 - B. 国家環境政策法 (NEPA)
 - C. 封じ込め法
- IV. 製法と工程に関連する留意事項

- A. 一般的留意事項
 - B. 未加工の果実あるいは野菜からなる製品に関する特別な留意事項
 - C. FDA および USDA の関連法規
 - D. 製造方法
 - E. 製品の特性解析
 - F. 製品の安定性
- V. ヒトに用いられる医薬品生産用組換え植物由来製品の臨床段階での留意事項
- A. 一般的留意事項
 - B. 不純物の評価
 - C. アレルゲン性
 - D. 免疫原性
- VI. FDA 規制対象製品の臨床試験、および、USDA 規制対象製品の承認前試験

I. 緒言

I-A. 目的および適用対象

本文書は、FDA あるいは USDA による規制を受ける中間体、タンパク質性医薬品、医療用具、新規な動物薬、家畜用生物製品を含む生物起源由来医薬品（以下、規制対象製品“regulated products”と記載）の製造における組換え植物または組換え植物由来原料の利用に関して、米国医薬食品局（FDA）と米国農務省（USDA）が共同で策定したものである。本文書では、ヒトに用いられる非タンパク質性の医薬品、生薬、アレルゲン（21CFR680.1）は取り扱い対象としない。しかし、医薬品用の組換え植物が非タンパク質性製剤の製造に用いられる場合、宿主あるいは原材料植物の特性解析や環境への配慮に関しては、本文書に記載されている内容を応用できる。組換え植物を用いてヒト用の非タンパク質性医薬品を製造することを計画している場合は、医薬品開発の早

い段階で FDA の生物製品評価研究センター（CBER）に相談することを勧める。本文書の目的として、“医薬品生産用組換え植物 bioengineered pharmaceutical plant”とは、生物学的製品または医薬品をコードする遺伝子を発現するように組換え DNA 技術を用いて操作された植物を意味する。

本文書では、“you”は、スポンサー、製造業者、認可を受けた人、および、申請者を指し、“we”は、FDA あるいは USDA/動植物検疫局（APHIS）/獣医生物学センター（CVB）を指す。

本文書では、新しい動物薬の研究、および、FDA に提出する研究新薬（IND）申請、研究医療機器（IDE）、バイオロジクス許可申請書（BLA）、新薬承認申請（NDA）、動物用新薬申請書（NADA）、市販前承認申請（PMA）、510（k）、あるいは、USDA に提出する米国の家畜用生物学的製剤承認申請（VBPLA）の作成の際に、言及すべき重要な科学的問題と情報について概説する。本文書では、ヒトまたは動物での使用、あるいは、臨床における診断システムの構成要素としての利用のために組換え植物を用いて製造された製品の安全性と有効性を示すために考慮すべきことを述べる。

さらに、本文書では、医薬品生産用組換え植物、あるいは、規制対象製品の発現のための遺伝子を含む組換えベクターを感染させた植物で生産される全ての医薬品製造工程に必須の、環境への配慮と封じ込め方法について述べる。

さらに、本文書は、FDA あるいは USDA による規制を受ける製品の製造のための原材料として医薬品生産用組換え植物を利用する場合に特異的なことについて言及している。したがって、他の発現系と共通である多くの事項に

については焦点をあてていない。製品が複雑で多様であるため、一つの文書で全ての事項に事前に対処することはできない。製品に関するその他の特定の課題については、FDA あるいは USDA の他の文書を参照すること。

APHIS にあるバイオテクノロジー規制課 (BRS) が、医薬品生産用組換え植物および感染性を有する植物用バクテリアの輸入と州間の移動、ならびに、それらの環境 (例: グリーンハウス、実験室、発酵槽のような封じ込め施設の外) への放出について、監督していることを知っておく必要がある。監督の対象となる活動をする場合は、APHIS/BRS から事前に許可を得なければならない (7CFR340)。許可申請のためのガイダンスは、USDA/APHIS の web サイト <http://www.aphis.usda.gov/biotech>、あるいは、USDA/APHIS/BRS への文書での照会により得られる。本文書は、植物の認可プロセスについては記載しない。

I-B. 規制当局の責任範囲

FDA は、治療、予防、診断を目的として医薬品生産用組換え植物を用いて製造されるヒト用の生物製品、ヒトあるいは動物用の医薬品に関する規制を行う。ヒトに投与される生物起源由来医薬品および医薬品は、公衆保健サービス法 (PHS Act) (42 U.S.C.262 参照)、連邦食品医薬品化粧品法 (FD&C Act) (21 U.S.C.301 参照) の元、生物学的医薬品評価研究センター-CBER と CDER により規制される。FDA は、動物の診断、治療、鎮静、手当て、疾病予防、動物の骨格や機能を変えようことを目的に、医薬品生産用組換え植物を用いて製造される動物薬についても規制を行う。新しい動物薬や新しい動物薬を含む飼料は、FDC 法の元、動物用医薬品センター (CVM) により規制される。FDA による規制は、米国連邦規則 21 条 (21CFR) に記載されている。

USDA は、ウイルス-血清-毒素法 (21.U.S.C.151 参照) の元、APHIS にある獣医生物学センター (CVB) を介して家畜用生物製品の規制を行う。USDA による規制は、米国連邦規則 9 条 (9CFR) Parts 101-124 に記載されている。

前述のように、APHIS/BRS は、植物保護法 (7U.S.C.7701-7772) のもと、全ての医薬品生産用組換え植物の輸入、州間の輸送、環境への放出 (例: 圃場試験) について規制を行う。APHIS/BRS による規制は、米国連邦規則第 7 条 (7CFR)、特に、7CFR340 に記載されている。

Appendix A に関連機関の連絡先が記載されている。

重複を避けるため、医薬品生産用組換え植物の圃場栽培に伴って生じる国家環境政策法 (NEPA) アセスメントを含む環境面での安全性の問題の報告については、主として APHIS/BRS が対応する。医薬品生産用組換え植物は APHIS の許可を得て栽培され、圃場栽培の許可は製品の申請書を提出する前に得ることになるため、APHIS/BRS はそのような植物の圃場栽培により生じる環境への影響を明らかにし、評価することになる。規制対象となる製品の使用により生じる環境面での問題は、製品の審査と認可を行う担当機関での NEPA 分析において取り扱われる。これらの機関による NEPA 分析では、APHIS/BRS の環境面での報告が考慮される。第 III 章 B の国家環境政策法も参照すること。

II. 宿主および原材料植物の特性解析

II-A. 一般的留意事項

開発段階では、目的物質の原料として用いる

植物種について慎重に考慮する必要がある。考慮すべき事項としては、植物がアレルゲンや毒性物質を発現する可能性、植物の繁殖方法と封じ込めを確実にする方策、さらに、食用植物が非食用物質の生産に用いられる場合は、非食用（非飼料用）植物が食物や飼料に混入しないための方策等がある。食用あるいは飼料用植物への混入が認められた製品は、FDC 法のもと、製法が法定基準に合っていないと見なされる。

最新の規制に対応するための要件を知るためには、適切なガイダンス文書や法規を参照し、開発のできるだけ早い段階で関係機関に相談することが推奨される。

II-B. 宿主植物

申請書には、可能な限り狭い細かい分類で植物を同定するために必要な情報（例：属、種、亜種、変種または園芸品種、系統）を含む宿主植物の生物学的特性を全て記載すること。

目的物質の製造の一定性が選択された植物によって確保されるかを関係機関が評価するために、改変されていない宿主植物の繁殖特性と、生産の実施に関して以下の点を記載して提出すること。

- ・ 一年性、多年性、あるいは、二年性としての生育環境
- ・ 繁殖能力の獲得時期と開花期間
- ・ 種子の生産と収穫
- ・ 貯蔵される種子の純度を維持するための方法
- ・ 生育条件
- ・ 収穫時期
- ・ 収穫法
- ・ 収穫物の輸送、保存、分類法

さらに、その植物種において産生されることが知られている全ての毒物、栄養阻害物質、ア

レルゲンの含有量、および、重金属の蓄積に関する知見について記載すること。その植物種が、生あるいは加工された形で、食物や飼料として利用される種であるかについても述べる。

II-C. 遺伝子導入された原材料植物

1. 一般的留意事項

宿主植物は、内在性遺伝子産物の発現を上げるような改変、あるいは、異種の遺伝子産物を発現するような操作を受ける。改変のための遺伝子は一過性に植物に加えられるか、安定的に挿入される。遺伝子発現の方法によらず、植物株のバンク化およびベクターを含む製造工程における生育と発現の段階の履歴を保存していく必要がある。最も重要なことは、原材料植物により生産される製品の一定性を示すデータを申請書に記載することである。

医薬品生産用組換え植物が食料や飼料に用いられる種である場合、医薬品生産用組換え植物と食料あるいは飼料に利用される植物体との混入が起こらないための方策を講じる必要がある。食用あるいは飼料用植物への混入が認められた製品は、FDC 法（21U.S.C.342）のもと、製法が法定基準に合っていないと見なされる。生の農作物の状態で、導入遺伝子および生産されたタンパク質の存在を検出できる方法を整備しておくことが強く求められる。

2. 組換え DNA の特性解析

申請書では、以下の項目を含め、遺伝子導入に用いられる組換え DNA 構成体あるいはウイルスベクターの特性を全て明らかにする必要がある。

- ・ コーディング領域、抗生物質あるいは除草剤耐性遺伝子、複製起点、プロモーター、エンハンサーを含む遺伝子発現構成体全体の部分に関する起源と機能
- ・ それぞれの機能的要素の位置を示した遺

伝子発現構成体のマップ

- ・ プラスミドの増幅方法
- ・ 菌体での発現に必要なプラスミド中の全ての配列
- ・ 5'および 3'境界領域を含む導入遺伝子の塩基配列
- ・ 植物のコドン使用頻度に合わせたコドンの変更

本文書では、コーディング領域とは、医薬品生産用組換え植物で発現することを設計あるいは期待されているか否かにかかわらず、全長あるいは一部削除されたセンス方向の遺伝子発現構成体、アンチセンス遺伝子発現構成体、リボザイムを含む遺伝子発現構成体、を指す。

ヒト用の生物製品のために構築される組換え DNA 構造体の分析の詳細については、日・米・EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議 (ICH) ガイドライン Q5B: 組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析を参照すること。

3. 安定発現系

マスター・シードあるいはマスター・シード・バンク (MSB) とワーキング・シードあるいはワーキング・シード・バンクを作製する前に、適切な組換え体を確立することが推奨される。安定遺伝子導入の系では、遺伝子導入法を詳細に記載し、適宜、対応する参考文献を引用すること。挿入された遺伝子のコピー数及び挿入部位数を決定し、植物ゲノムに挿入されたものが完全長であるか部分配列であるかを示すための解析を行うこと。挿入された DNA が完全で元のものとは一致していることを確認するため、安定的に遺伝子導入された植物の DNA または mRNA から、挿入部分の塩基配列を決定すること。発現するようにデザインさ

れたコーディング領域のフラグメントが検出されれば、融合タンパク質が産生される可能性と、その発現組織を明らかにすること。

遺伝子導入のために病原体あるいは病原体に由来する塩基配列を利用する場合は、病原体、その系統、含まれる遺伝子について記載する必要がある。遺伝子導入の前に病原性を規定する DNA 配列を除去あるいは改変した場合は、その改変について詳細に記載すること。遺伝子導入に用いられる全てのヘルパープラスミドあるいはそれに類似するプラスミドに関して記載すること。例えば、アグロバクテリウムによる遺伝子導入では、遺伝子導入の際に用いたアグロバクテリウムの系統名、Ti プラスミド由来のベクターをどのように非病原性化したか、遺伝子導入された組織からアグロバクテリウムを除去したかを示すこと。

最終的な遺伝子導入体を得るための選別方法を含め、工程の全てを詳細に記載する必要がある。遺伝子導入される組織あるいは細胞の起源と調製法について、組織あるいは細胞を培養または前処理した場合は、使用した全ての試薬、培地の組成について記載すること。直接遺伝子導入法では、導入される DNA の量および濃度、キャリア DNA の性質、起源、濃度、キャリア粒子の組成と起源、他の添加物の起源と濃度を含めた導入遺伝子の調製法を記載すること。さらに、遺伝子導入工程を評価するために用いた全ての試験法について詳細に記載し、結果を示すこと。

4. 一過性発現系

ウイルスを利用した一過性遺伝子導入系は、最も簡単な形としては、組換えウイルスベクターと宿主植物の 2 つ要素から構成される。宿主植物の特性については、前述の第 II 章 B に概説されている情報を含む必要がある。組換えウ

イルスペクターについて必要な情報は次のとおり。

- ・ ウイルスの分類学上の名前（科、属、系統の名称。全ての別名を含む。）
- ・ ウイルスに含まれる核酸の種類（DNA または RNA）
- ・ サテライトあるいはヘルパーウイルスを伴うか
- ・ ウイルスの自然宿主域
- ・ ウイルスの伝播形式
- ・ ウイルスがベクターによって伝播する場合は、伝播の形態（例：持続的あるいは非持続的）を含めたベクターの本質
- ・ ベクター伝播に含まれることが知られていれば、ウイルス遺伝子の本質
- ・ 圃場の条件下での他のウイルスとの相乗作用やトランスキャプシデーションが文献的に報告されているか
- ・ ウイルスの精製方法
- ・ 組換えウイルスのクローニング方法
- ・ マスター・プラスミド・バンク（MPB）を用いる場合は、その調製方法
- ・ 保存条件および MPB の安定性を示すデータ
- ・ プラスミドからの感染性核酸の調製法
- ・ 親株のゲノムとの同一性の点から感染性核酸の特性解析を行ったデータ

上記の情報に対して、適宜、対応する文献を引用すること。

5. 遺伝子安定性：シード・バンクと植物の繁殖

一過性発現系と安定発現系のいずれを用いる場合でも、植物の生育と製品の発現のロット間での一定性を確保するため、MSB と WSB を作製する必要がある。申請書における MSB に関する記載には、確認試験、製造方法、特性解析試験の結果、バンクのサイズ、保存条件、

多様性を評価したデータ、生育微生物（混入汚染物質の種類を含む）、遺伝子含量の均一性、安定性を含むこと。

安定的形質転換により樹立された医薬品生産用組換え植物株において、表現型と遺伝子型の両方が安定であることを示すデータを提出する必要がある。遺伝子の安定性を示すためには、特性の分離解析、挿入遺伝子の分子生物学的解析（例：サザン解析）、目的産物の発現解析のデータを提示すること。

繁殖可能な植物の場合は、遺伝の形式と安定性、および、規制対象製品の製造に用いられる世代数を越えて安定性を確認するのに十分な世代数においても、導入した形質が発現していることを示すデータを提出する必要がある。

繁殖不可あるいは種子形成が困難な植物（無性繁殖する雄性不稔ジャガイモのようなもの）の場合は、作物にとって適切なサイクル数を越えた無性繁殖の間に、形質が安定的に維持され、発現されることを示すデータを提出する必要がある。

6. 発現産物の組織分布

挿入された全てのコーディング領域について、発現を誘導する調節配列に従って期待される組織で意図されたようにタンパク質が発現されるか否かを示すデータ（試験方法と検出限界を示す）を提出する必要がある（例：遺伝子が誘導発現されるものであれば、誘導条件下で期待される組織で発現することを示す）。植物の主要な組織（例：葉、根、茎、種子）における生産物の分布を解析した定量的なデータを示すこと。

III. 環境に関する留意事項

III-A. 一般的留意事項

動物またはヒトに用いられる規制対象製品を生産する医薬品生産用組換え植物を用いる場合、医薬品生産用組換え植物の拡散を管理し、食料あるいは飼料供給から隔離するための封じ込め方法を含めて、環境面で配慮すべき多くの留意事項が生じる。最新の規制で必要とされる要件を知るために、開発段階のできるだけ早い時期に関係機関に相談することが推奨される。例えば、圃場栽培や輸送を行う場合は、規制に関する詳しい情報を求めて APHIS/BRIS にコンタクトをとる必要がある。ガイダンス (7.CFR340) にあるように、植物の州間の移動、輸入、圃場栽培を行う場合は、APHIS/BRIS の認可が必要となる。これらの植物の最初の実験と商業利用には、USDA/APHIS/BRIS の認可が必要であろう。APHIS のホームページ <http://www.aphis.usda.gov/biotech> にある USDA 規制 (7.CFR340) を参照すること。

温室のように閉鎖された建物内でのみ栽培される医薬品生産用組換え植物は一般的に、施設からの花粉や種子の拡散を防止する対策が講じられていれば、生育期間を通じて封じ込めされていると考えて差し支えないであろう。そのような閉鎖された施設で栽培されている場合は、USDA/APHIS/BRIS の認可を必要としないが、医薬品生産用組換え植物の輸入や州間の移動には許可が必要となる (7.CFR340.4)。

III-B. 国家環境政策法 (NEPA)

FDA (21CFR part25) および USDA (7CFR part 372) に対する NEPA の要求事項について承知しておく必要がある。種子や植物の輸送、植付け、栽培、収穫、加工、精製、梱包、保存、廃棄を含む全ての製造工程の局面で起こりうる環境への影響について配慮すること。申請者の活動が、環境アセスメントの提出を求めた 7CFR372.(C), 21CFR25.31, 25.33 から除外されるものであると考える場合は、申請書にその

旨を記載すること。利用可能なガイダンス文書を参照し、NEPA の要件について、USDA 及び FDA と直接相談することが推奨される。環境アセスメント (21CFR25.15, 25.40) あるいは規制対象外 (21CFR25.31, 25.33, 25CFR372.5(c)) であることの申し立てにより許可を得た APHIS/BRIS からの文書のコピーを、規制対象製品の申請の際に提出すること。FDA と CVB における NEPA アセスメントでは、APHIS/BRIS の評価と決定が考慮される。

III-C. 封じ込め法

1. 一般的留意事項

医薬品生産用組換え植物が申請者自身によって栽培および加工されるか、契約に基づき他者によって栽培および加工されるかによらず、製造の管理は申請者の責任であり、適宜、標準業務手順書 (SOP)、製造の概要、あるいは他の記録に明確に記載する必要がある (第 IV 章 C, FDA および USDA の関連法規を参照)。FDA の規制対象製品では、21CFR200.10, part 210, 211, 514.1, 820.50、および、Draft Guidance for Industry: Cooperative Manufacturing Arrangement for Licensed Biologics を参照。

医薬品生産用組換え植物の開発では、植物株の利用目的が規制対象製品の原材料に限定されるよう、対策を講じる必要がある。7CFR340.4, 340.7, 340.8 に記載されているように、医薬品生産用組換え植物やその種子の州間の移動には USDA/APHIS/BRIS の許可が必要であり、取り扱いと輸送の記録を保存しなければならない。家畜用生物製品用の医薬品生産用組換え植物の輸送には、USDA/APHIS/BRIS の許可が必要である。家畜用生物製品を輸送する場合は、製造のどのような段階でも CVB の認可が必要であり、9CFR103.3 による規制対象となる。このように原材料の輸送を管理する

ことで、組換え植物が意図しない用途に転用されることを防ぐ。

食料あるいは飼料に用いられる植物に遺伝子導入して規制対象製品を生産する場合は、医薬品生産用組換え植物と食料用あるいは飼料用の非組換え体を容易に見分けられる方法を考える必要がある。方法としては、植物の外観を変えるマーカー遺伝子の利用（例：新しい色や葉の形）や、植物が生育条件の改変（栄養要求性のマーカー遺伝子の利用）などがある。特異的な植物組織に産物の発現を限定する（例：組織特異的プロモーターの利用）、あるいは、産物が発現する条件を限定する（例：誘導発現型プロモーターの利用）などにより、意図せずに規制対象製品に暴露される可能性を減らすための方策を考える必要がある。異系交配する植物では、その食用／飼料用のカウンターパートが非常に少ないか、ない地域で生育させることを考えるとよいであろう。

医薬品生産用組換え植物と食料あるいは飼料用植物との混同を防止するための（食料あるいは飼料用の種子との混同も含む）手段を講じる必要がある。農場から製品までの全て段階の製造方法を開発する際に、意図しない混同が起りうる工程を明らかにし、管理する方法を確立する必要がある。生の農作物の状態で、導入遺伝子および発現されたタンパク質の存在を検出できる方法を整備しておくことが強く求められる。食用あるいは飼料用植物への混入が認められた組換え植物は、FDC法（21U.S.C.342）のもと、製法が法定基準に合っていないと見なされる。組換え体の食料あるいは飼料への混入に関する法的な対応について、FDAの食品安全性・栄養研究センター（CFSAN）あるいはCVMに相談するとよいであろう。

1. 保存種子の管理

組換え体の種子が食料あるいは飼料の生産に用いられることのないよう、生育可能な種子の在庫目録と廃棄の管理を徹底する必要がある。種子のストックを作製する際には、種子の総量（例：重さや容量）を計測しておくこと。種子のストックは、使用と廃棄を合理的に正しく計測できるように、小分けして保存すること。種子バンクから使用した量と廃棄について記録すること（7CFR340.4(b)(12)）。種子のストックには、組換え種子の圃場栽培や州間の輸送のためにAPHIS/BRSから発行された許可書のとおり、はっきりとラベルをつけること（7CFR340.7）。

2. 圃場栽培される植物

医薬品生産用組換え植物を圃場で栽培するためには、APHIS/BRSから許可を得、種蒔きから収穫までの栽培工程、残った作物あるいは作物の残渣の廃棄の管理をしなければならず、使用した圃場が次の時期に食料あるいは飼料の栽培、あるいは、牧草地として利用される場合は、圃場の次の使用に関しても管理しなければならない。製品の圃場での栽培に関わる人員は全て、責任を持つべき義務を果たすように適切に訓練される必要がある。シード・バンクから種蒔きあるいは記録用に移した種子の数についても管理すること。医薬品生産用組換え植物が生育する全ての場所の広さと位置、花粉の拡散の管理、および、次期の圃場の使用と次の生育期に自生する植物の駆除に関する資料を保持し、適宜、FDAとCVBに提出すること。圃場の位置は、全地球航行測位衛星（GPS）マーカーなどを用いて、はっきりと示すこと。野生生物や逃げた家畜が侵入しないように、境界に囲いを設置することを推奨する。医薬品生産用組換え植物の栽培に用いられる圃場は、USDA（7CFR340.4;9CFR101.108）またはFDA（42U.S.C.262; 21U.S.C.374）の査察を