

Fig.2 プラスミドDNAワクチンの使用目的
(ClinicalTrials.gov登録数)

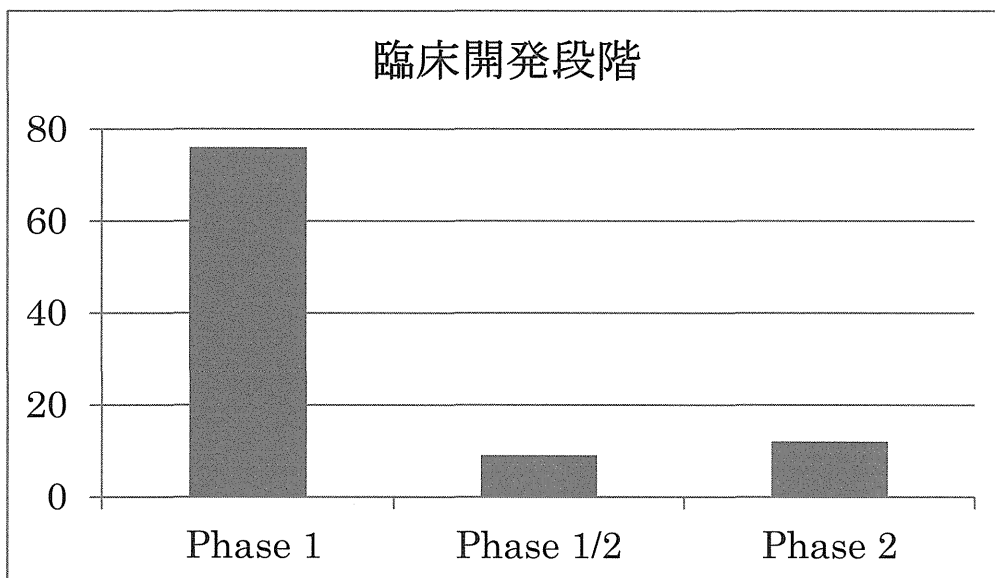


Fig.3 プラスミドDNAワクチンの臨床開発段階
(ClinicalTrials.gov登録数)

の他の感染症はいずれも5件以内だった (Fig.4)。HIVワクチンは、予防を目的とするものと治療を目的とするものの両方が含まれていた。HIV以外では、B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、ヒトパピローマウイルス (HPV) といった慢性の感染症に対する治療用ワクチンが開発されている。一方、インフルエンザやエボラなどの急性感染症には予防用ワクチンとしての開発が進められている。一方、がんの治療用ワクチンで対象とされるがん種で

は、メラノーマが6件で1/3近くを占めていた (Fig.5)。

登録されている臨床試験の実施地域を見ると、北米が2/3を占め、その大部分が米国での実施であるが、アフリカや中南米などの発展途上国でも相当数の臨床試験が行われており、先進国を中心として臨床試験が実施されている遺伝子治療とは大きな違いが見られた (Fig.6)。

プラスミドDNAワクチンに導入されている遺伝

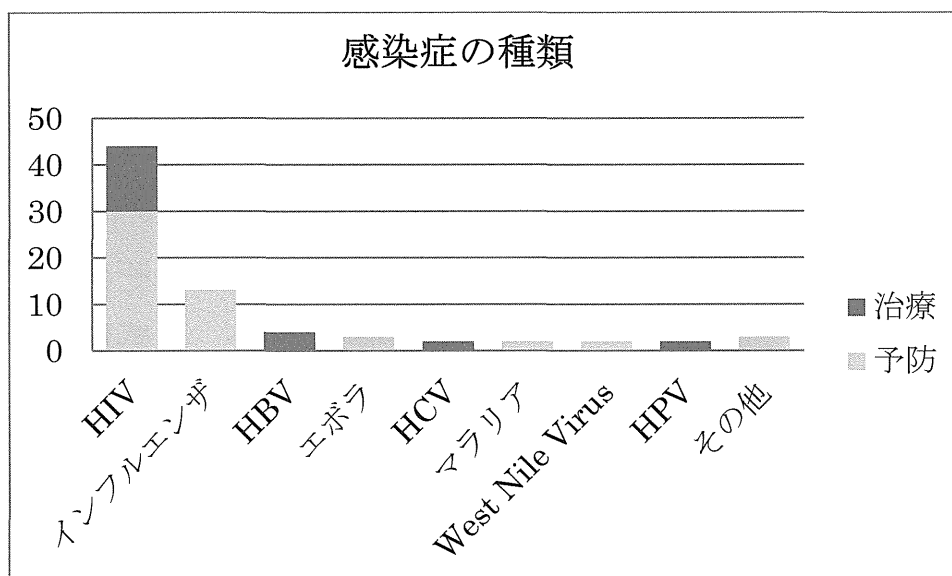


Fig.4 プラスミドDNAワクチンが対象とする感染症の種類
(ClinicalTrials.gov登録数)

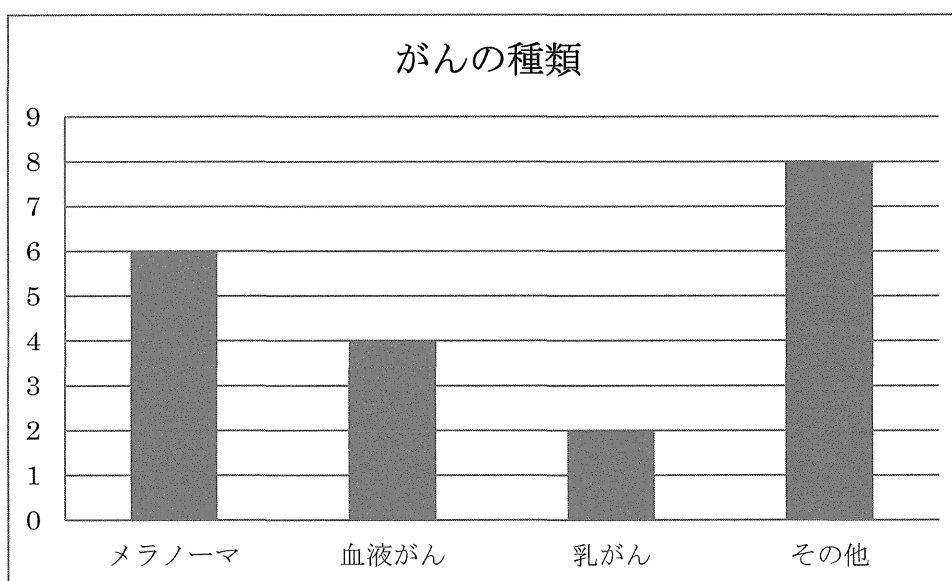


Fig.5 プラスミドDNAワクチンが対象とするがんの種類
(ClinicalTrials.gov登録数)

子や投与方法については、詳細な情報が入手できないものも多く、統計的に数値を示すことはできないが、明らかになった範囲では次のような傾向が認められた。使用される遺伝子としては、病原体の抗原タンパク質・ペプチド抗原をコードする遺伝子やがん抗原が用いられており、異なる抗原をコードした複数のプラスミドを混合した多価のワクチンとしての開発例が多い。また、がん治療用ワクチンでは、がん抗原としてヒトの遺伝子のかわりに異種の相同遺伝

子を用いる例、たとえばヒトのCD20のかわりにマウスのCD20を抗原とする例がいくつか認められた。これは、ヒトと相同の異種抗原を用いることで、CD8⁺T cellが誘導されるという治験に基づいた手法である。また、免疫を増強するためのサイトカイン遺伝子を組み込んだプラスミドを単独、もしくは他のプラスミドとの併用で用いる例もある。

生体への導入方法としては、プラスミドDNAは遺伝子導入効率が低い、筋肉内投与ではnaked DNA

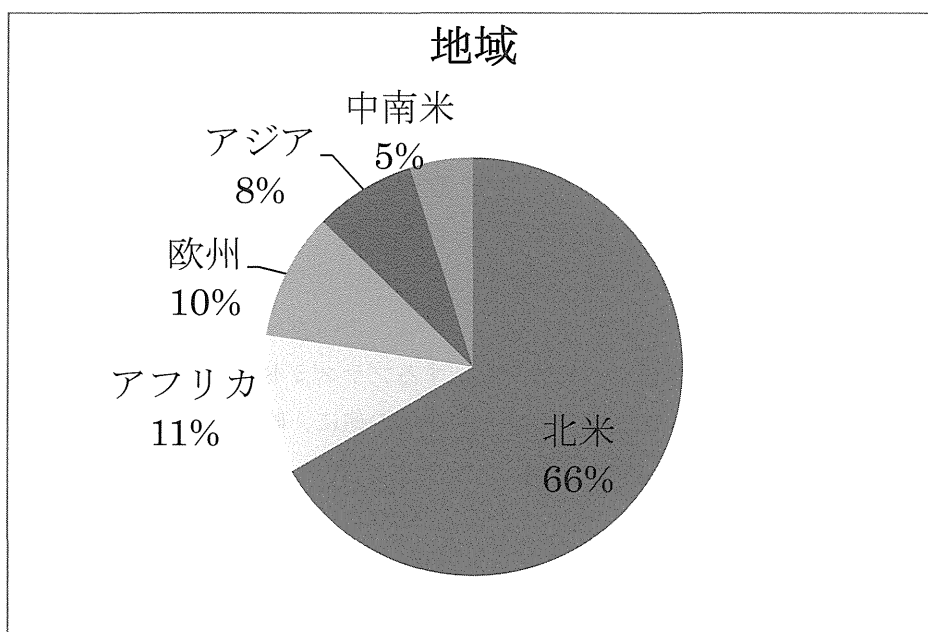


Fig.6 プラスミドDNAワクチンの臨床試験実施地域
(ClinicalTrials.gov登録数)

でも取り込まれて発現することが知られ、筋肉内の直接投与が多く用いられている。また、アジュバントを用いたり、カチオン性脂質やエレクトロポレーション、金コロイド粒子を用いたニードルフリー・インジェクション法等のドラッグデリバリーシステム (DDS) も多く利用されている。

プラスミドDNAワクチンの投与方法として、時期を変えて異なる種類のワクチンを投与することにより免疫原性の増強を行う方法であるプライム・ブースト (prime-boost) 法が用いられる例も見られた。これにはDNAワクチンとワクシニアウイルスベクターやアデノウイルスベクターなどの組み合わせが用いられている。このような使用法は遺伝子治療にはないワクチン独自の方法である。

1.3 日本の現状

「plasmid DNA vaccine」でヒットした臨床試験97件には、日本で実施されている臨床試験は含まれていなかった。しかし、実際には日本で初めてのプラスミドDNAワクチン (開発コード: ASP0113) の臨床試験が実施中である。ClinicalTrials.govで検索したところ、この臨床試験は「plasmid DNA vaccine」ではなく「vaccine」として登録されていることが確認された。ASP0113はがん患者への造血細胞移植後の

サイトメガロウイルス (CMV) の感染抑制を目的としたワクチンである。日本ではワクチンとしてではなく、遺伝子治療用医薬品としての確認申請が提出され、治験前の品質及び安全性の確認が厚生労働省により行われた。2012年6月25日の薬事・食品衛生審議会生物由来技術部会議事録およびアステラス製薬のプレスリリースによると、本品目はCMV抗原であるリンタンパク質pp65と糖タンパク質gBの2種類の遺伝子をそれぞれ組み込んだ2種類のプラスミドDNAを主成分とする2価ワクチンである。組成としては2種類のプラスミドDNAとブロック共重合体であるポロキサマー、陽イオン界面活性剤である塩化ベンザルコニウムの3者からなる複合体であり、筋肉内に投与される。投与部位において、CMV抗原タンパク質が発現し、抗原特異的な免疫を獲得・増強させることで、結果としてCMVの再活性化抑制効果や再活性化後の感染症の重症化防止の効果をもたらすことを目指したものとされる。昨年より、約500例を対象とする国際共同第Ⅲ相試験として実施されている。

2. プラスミドDNAワクチンに関する規制・指針の国際動向

2.1 欧米の規制との比較

プラスミドDNAワクチンに関する規制・指針について調査を行った (Table 1)。プラスミドDNAワクチンは、日本では1.3で述べたように遺伝子治療製品として規制されている。プラスミドDNAワクチンに特化した指針はなく、遺伝子治療用医薬品の指針が適用される。なお、平成22年に「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン」が発出されているが、プラスミドDNAワクチンは適用外である。

一方、米国FDAは、感染症の予防・治療用DNAワクチンはワクチン(生物製剤)として規制されるが、感染症以外の治療用プラスミドDNA製剤は遺伝子治療薬として扱われており、規制的には両者は区別されている。FDAは感染症に対するプラスミドDNAワクチンに特化したガイダンス (Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications, Nov.2007) を2007年に発出している。これはFDAが1996年に発出した「Points to Consider on

Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications (感染症予防用プラスミドDNAワクチンに関する考慮事項)」について、その後のプラスミドDNAワクチンの前臨床試験成績や臨床使用実績を反映して、ガイダンスの内容を改めたものである。感染症以外の治療を目的としたプラスミドDNA製剤は、このガイダンスの対象外とされる。がんに対するプラスミドDNAについては、遺伝子治療製品の指針の他に、昨年の報告書でも取り上げた治療用がんワクチンの臨床試験に関するガイダンス (Guidance for Industry: Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines (2011)) が適用されることになる。また、EMAでも感染症に対するプラスミドDNAワクチンは遺伝子治療薬には含めないとされ、感染症に対するDNAワクチンのガイダンス作成に関するコンセプトペーパーが発出されているが、ガイダンス本体はまだ公表されていない。

そこで、FDAのガイダンスの概要を以下に紹介するとともに、これを基に、プラスミドDNAワクチンの考慮事項を検討した。

Table 1 プラスミドDNAワクチンの品質・安全性に関係する指針

対象製品	日本	米国FDA	欧州EMA
プラスミドDNA製品	遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する指針	<ul style="list-style-type: none"> Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy (1998) Guidance for FDA reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) (2008) Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products (Draft Guidance) (2012) 	<ul style="list-style-type: none"> Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Transfer Medicinal Products (2001) Non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products Non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products (2008)
プラスミドDNA ワクチン (感染症適用)	同上	<ul style="list-style-type: none"> Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications (2007) 	<ul style="list-style-type: none"> Concept paper on guidance for DNA vaccines (2012)

2.2 感染症に用いるプラスミドDNAワクチンの考慮事項 (FDA)

本ガイダンスは、感染症に対するDNAワクチンの非臨床開発および試験に関する現時点での推奨事項について説明したものであり、1996年のガイダンス文書「Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications」に優先するものである。本ガイダンスでは、DNAワクチンとは、病原体に対する免疫応答を誘導や促進する1つ以上のDNA配列を持つ精製プラスミド製剤と定義される。プラスミドは通常、細菌内での選択および複製に必要なDNA配列を持ち、ワクチン接種者における遺伝子発現を促す真核プロモーターおよびエンハンサーならびに転写終結/アデニル化配列を含んでおり、免疫調節因子を持つ場合もある。DNAワクチンは、生物製剤であり、感染症以外の治療を目的としたプラスミドDNA製剤は、本ガイダンスでは扱わない。

2.2.1 製造上の問題

INDの下で臨床試験を行う新規DNAワクチン製剤について提供すべき製造に関する情報は以下の通りである。

(1) 製剤の製造

製造工程で使用するすべての成分および最終製剤に含まれる成分を製造に関する概要に記載すべきである。使用するすべてのプラスミドの由来およびダイアグラムならびにすべての中間体となる組換えDNAのクローニング手順を含め、プラスミド構築の詳細を説明すべきである。マスターセルバンク(MCB)にあるプラスミドの全DNA配列について、予想外のものを含め、すべてのオープンリーディングフレーム(ORF)とその他の配列成分を同定して注釈をつけた配列と一緒に提示すべきである。製造工程の中間段階では、確認試験として、制限酵素マッピングやポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの様々な方法を用いることができる。しかし、バルクプラスミドワクチンでは完全塩基配の決定が望ましい。

細菌細胞の遺伝子型および由来ならびに製造に用

いるMCBとワーキングセルバンク(WCB)の構築の手順を説明すべきである。また、バクテリオファージやその他の外来性感染性物質の汚染がないことを保証するため、MCBとWCBの両方を検査する必要がある。WCBで、プラスミドDNAの遺伝的安定性を証明することが望ましい。

製造工程に関する説明は、製剤の安全性評価を行うことができるように十分に詳細なものにすべきである。非臨床安全性試験用として製造されたロットが臨床用ロットと異なる条件で製造される場合は、そのような製造上の変更点について明確に文書化すべきである。

(2) バルクプラスミド製剤の出荷試験

バルクと最終製剤が同じ場合を除き、バルクプラスミド製剤では、以下の特性について十分な特異性および感度を持つ標準的な試験法での実施が求められる。製品開発の初期段階では、このような試験には研究用の内部標準品を利用してもよいと認識されている。既知量の参照試料または添加試料を試験するか、あるいは他の適切な評価基準により試験法を評価し、試験法の性能を文書化したデータを提出すべきである。バルクおよび最終製剤の出荷試験に加え、製造の一貫性および製剤の安全性を保証するために工程内試験を実施することも推奨される。第1相臨床試験の開始に先立ち、計画された臨床試験期間中に製剤を使用できるよう、可能な限り早い段階で安定性試験を開始すべきである。

バルク出荷基準には通常、外観検査とプラスミド濃度検査を含めること。スーパーコイル構造のプラスミド画分を出荷基準に含め、スーパーコイル構造のプラスミドの含有率(80%超が望ましい)の最低基準を決めることを推奨する。免疫原性または他の意図した生物活性を予測できることを証明できるデータがあれば、出荷基準および規格として別のものを選択してもよい。

バルクプラスミド製剤について、細菌宿主細胞由来のDNA、RNA、タンパク質などの高分子不純物の有無を評価し、それぞれの最大限度値を予備的に設定する(1%未満が望ましい)。製品開発が進むにつ

れ、宿主細胞由来不純物は技術的および論理的に可能な限り減少させるべきである。発熱性物質の試験を行い、その結果を最終ロット出荷文書に添付する。リムルス試験（LAL）は、エンドトキシンの有無およびエンドトキシン汚染の有無を示す感度の高い指標である。プラスミドDNAワクチン製剤中のエンドトキシンはプラスミド1 mg中40 EUを超えるべきでない。

バルク製剤の同一性を証明するための試験を含めるべきである。例えば、制限酵素消化したプラスミドDNAのアガロースゲル電気泳動は、個々のプラスミドを同定・区別するために用いることのできる試験である。1ヵ所の製造所で複数のDNAワクチン製剤を製造する場合、確認試験は、その工場で製造された各プラスミドを区別して識別できるようにすべきである。

力価測定法を開発すべきである。初期臨床開発では、力価測定法の選択にかなりの柔軟性があると思われるが、遺伝子導入効率の*in vitro*測定法としてコードされた遺伝子の転写や翻訳をモニタリングする方法や、DNAワクチンの免疫原性に関する*in vivo*測定を含めることができる。製品開発が進むにつれ、適切な生物活性を評価できる定量的力価測定法を開発することが望ましい。可能であれば、選択した力価測定法が臨床試験で確認された免疫原性または防御活性と相関していることを示す証拠を提出すべきである。また、測定法の開発が進むにつれ、ロット間の比較を容易にするために各ロットのサンプルの保管が望まれる。

(3) 最終製剤の出荷試験

DNAワクチンの最終製剤について、力価試験、一般安全性試験、無菌性試験、純度試験、定量試験および同一性試験を実施すべきである。試験方法および規格は、バルク製剤出荷に用いたものと同じでもよい。凍結乾燥プラスミド製剤では、含湿度試験の実施を推奨する。また、最終製剤の各ロットについて、エンドトキシン試験を実施すべきである。最終製剤出荷試験に加え、製造の一貫性および製剤の安全性を保証するために工程内試験も実施すべきであ

る。判定基準および許容範囲を設定し、臨床試験用ワクチンの各ロットの結果を報告する。

2.2.2 DNAワクチンの変更

(1) 挿入遺伝子またはベクターの変更

DNAワクチンの挿入遺伝子やバックボーンベクターのDNA配列を変更する場合、その変更の性質や程度が追加の前臨床試験の実施や新規INDの提出を必要とするものか議論するため、規制当局に相談することが望ましい。その際、製造工程の変更内容および新規（変更後の）DNAワクチンの前臨床安全性評価の成績を説明すること。

(2) DNA配列解析

DNAワクチンと特に関係する製品同一性の問題として、第1相臨床試験開始前にプラスミドの配列をどの程度まで決定すべきかということがある。1996年のガイダンスでは、最低限、挿入したタンパク質コード遺伝子の配列を提出するように勧告した。しかし、プラスミドの骨格がワクチンの活性に影響を及ぼす可能性があるとのエビデンスがあり、また1996年以降の技術の進歩によりDNA配列決定が容易になってきたことから、現在は第1相臨床試験開始前にプラスミドの全塩基配列の提出が推奨される。塩基配列は完全に注釈が付けられるべきであり、予想外のORFその他の配列成分を識別すべきである。DNAワクチンによっては、それぞれ異なる抗原タンパク質をコードする遺伝子を搭載した複数のプラスミドの混合物からなるものがある。この場合、各プラスミドはそれぞれ別々に増幅させるべきである。ロット間の一貫性を確保するため、ワクチン製剤の各プラスミド成分の同一性および含量を決定するよう勧める。

2.2.3 非臨床における免疫原性試験および安全性試験

(1) 一般的考慮事項

DNAワクチンを含め、いかなる新規ワクチンでも、臨床試験で使用する前には非臨床安全性評価が必要となる。INDや生物学的製剤の承認申請などの申請

の根拠資料となる非臨床安全性試験の実施にはGLPが適用される。非臨床安全性試験は新規のDNAワクチンまたはDNAワクチン／アジュバントの新規の組み合わせごとに実施すること。また、すべての非臨床毒性試験および生体内分布／持続性試験では、臨床試験で予定される製剤処方および投与方法について評価すること。製剤処方や投与経路などに変更がある場合には、追加の安全性評価が必要になることがある。

(2) 免疫原性試験

ワクチンの免疫原性は、可能な場合には必ず適切な動物モデルを用いて評価することを推奨する。免疫原性試験には、抗原特異的抗体価の評価、血清抗体陽転率の評価、サイトカイン分泌細胞の活性化の評価、細胞性免疫応答の測定を含む。安全性試験を兼ねていない限り、非臨床免疫原性試験はGLPに従う必要はない。GLPは、被験物質の潜在的な有用性の有無を確認するための基本的な探索的試験には適用されないためである。複数の抗原をコードするDNAワクチンの場合、コードされる抗原のうち代表的な抗原に対する免疫応答を評価すべきである。

(3) サイトカイン

サイトカインをコードする遺伝子などの免疫調節遺伝子を含有するDNAワクチンの場合、コードされるヒトサイトカインに反応する動物種または動物の相同遺伝子を用いたモデルで前臨床試験を実施することが望ましい。そのような試験では、免疫系の細胞性成分または液性成分の変化により、全身性免疫抑制、慢性炎症、自己免疫その他の病態などの意図しない有害な影響が生じるかどうか評価すべきである。

(4) プライム・ブースト法

プライム・ブースト法を用いる場合、初回及び追加接種で使用される各成分の用量、スケジュールおよび投与経路の安全性および忍容性を裏付ける情報を提出すること。プライム・ブースト法で被験者に生じうるリスクの特性を明らかにする上で、既存デ

ータで十分と判断されれば、毒性試験を追加で実施する必要はない場合もある。

(5) 自己免疫

公表されている非臨床試験によると、DNAワクチンの接種により、抗DNA自己抗体IgGを分泌する自己反応性B細胞の活性化が示されている。しかし、この応答の程度および持続期間は、正常な動物に疾患を生じさせたり、自己免疫疾患を発症しやすいマウスの発症を促進するには不十分である。非臨床試験では、全身性の自己免疫はDNAワクチンの接種では発現しにくいことが示唆されている。また、ワクチンでコードされる抗原を発現する筋細胞や樹状細胞に対する免疫応答が発現しないことから、抗原発現細胞が存在する組織に対する自己免疫応答も発現しにくいことが示唆されている。しかし、自己と交差反応する抗原（潜在抗原を含む）をコードすることにより、DNAワクチンが臓器特異的な自己免疫を特異体質的に引き起こしたり悪化させたりする可能性は残る。ワクチン接種による自己免疫疾患の発症の有無の評価のための非臨床試験の実施は推奨しないが、非臨床の免疫原性試験および毒性試験に用いる動物の健康状態全般については注意深く監視を継続することが望ましい。

自己抗原（サイトカイン、ケモカイン、表面受容体／リガンド、潜在性自己抗原など）をコードする導入遺伝子産物により免疫応答が誘導される場合、対応する内在性タンパク質との交差反応の可能性を検討すること。内在性タンパク質に対する持続的な免疫応答が検出された場合、適切な動物モデルを用いて動物の相同遺伝子について検討することにより有害作用の可能性を評価することを推奨する。さらに、臨床試験中は自己抗原に対する免疫応答が誘導されるかどうかモニタリングし、そのような免疫応答の被験者への影響を注意深く評価すること。

(6) 局所副反応および全身毒性試験

全身毒性および局所副反応を評価する試験は、同時に行ってよい。これらの試験では、臨床での予定接種回数より少なくとも1回多く接種を行うことを

推奨する。また、臨床で予定している最高用量を使用することを推奨する。非臨床試験の実施計画書に記載する評価項目としては、造血系および免疫系をはじめとする潜在的な標的器官に対する毒性を含めること。非臨床試験には、臨床病理学的評価（血液生化学的検査、血液学的検査および凝固検査）および病理組織学的評価（組織の肉眼的および顕微鏡的評価の両方を網羅）も含めること。局所副反応および全身毒性を評価するための動物モデルおよび試験デザインに関する推奨事項についてのさらなるガイダンスとして、「WHO Guidelines on Non-clinical Evaluation of Vaccines (ワクチンの非臨床評価に関するWHOガイドライン)」を参照できる。

注射部位副反応の試験については、各回のワクチン接種後の注射部位の詳細な臨床観察および生検または最終剖検検体から得た注射部位組織の病理学的評価を含めること。さらに、短期的な毒性と持続的な毒性の両方を検討すべきであり、それらの検討にあたっては、動物コホートを最終ワクチン接種後2～3日後と2～3週後に分けて検討を行うのが望ましい。

(7) 生体内分布、持続性および組み込み解析

プラスミドDNAの生体内分布、持続性および染色体組み込み試験は当初、DNAワクチンの被験者において、コードされた抗原の注射部位または異所での長期的な発現やプラスミドDNAの組み込みによりリスクが増大するかどうか検討するために推奨されていた。DNAの組み込みに関する理論上の懸念としては、染色体への挿入によりがん抑制因子の活性が低下したり、がん遺伝子の活性が上昇することによる腫瘍形成のリスクがある。さらに、DNAの組み込みにより、染色体の切断や再編成が誘導され染色体が不安定になる可能性がある。

一般的な生体内分布／持続性試験では、接種後数日～数ヶ月の複数の時点において採取した種々の組織でプラスミドDNAが検出されるかどうかを評価する。採取する組織は通常、血液、心臓、脳、肝臓、腎臓、骨髄、卵巣／精巣、肺、流入領域リンパ節、脾臓、注射部位の筋肉および注射部位の皮下組織な

どである。プラスミドの濃度の評価には通常、感度、特異性および阻害物質の不在が確認済みの定量PCRを用いる。この分析法の感度として、宿主DNA 1 μgあたり100コピー未満のプラスミドを十分に定量できることを推奨する。「非持続性」と判断するには、各部位のプラスミドDNAの量がこの定量限界を下回る必要がある。

プラスミドDNAの生体内分布／持続性試験により、共通のプラスミドベクターから調製された異なる抗原をコードするDNAワクチンは、同じような挙動を示すことが明らかになっている。プラスミドDNAを従来の筋肉内、皮下、皮内投与や粒子を用いたDDSで導入した場合、ベクターDNAが異所で長期的に持続することは極めて稀である。しかし、投与部位やその近傍の組織では、宿主DNA 1 μgあたり数千コピーのプラスミドDNAが60日以上持続することも多い。このようなDNAを調べても、プラスミドの大部分は組み込まれていないことが示されている。

以上の知見に基づき、生体内分布／染色体組み込みのプロファイルが許容できることが確認済みのプラスミドベクターに新規遺伝子を挿入して製造されるDNAワクチンでは、生体内分布試験が必要ない場合もある。しかし新規のベクターや剤形、導入方法、投与経路を用いたり、細胞への取込みや生体内分布に重大な影響を及ぼす変更を行った場合は、生体内分布試験が必要である。

プラスミドDNAの持続性および組み込みの頻度を解析した公表論文により、組み込み試験が必要となるのはどの動物のどの組織でもよいが、試験終了時まで宿主DNA 1 μgあたり30,000コピーを超える量でプラスミドの持続性が確認された場合のみと考えられる。プラスミドDNAがこの閾値を超えて持続する場合は、ワクチンを接種した動物のゲノムにDNAが組み込まれたかどうかを評価すべきである。通常の組み込み試験では、プラスミドDNAの持続性が確認されたすべての組織について評価する。少なくとも4つの独立したDNA試料を分析することを推奨する。各試料には、異なるドナー動物からプールしたDNAが含まれる場合がある。各ゲノムDNA試料に存在するプラスミドDNAを検出し、定量するには、通常、

Q-PCRが用いられる。染色体に組み込まれていないプラスミドDNAは、ゲル精製法により高分子量ゲノムDNAから分離できる。またコンカテマーは、プラスミドDNAのヘアモチーフを標的とする制限酵素消化により除去できる。ゲノムへの組込みを確認し、組込み部位を特定するには、特別に設計されたPCRプライマーが用いられる。

D. 考 察

プラスミドDNAワクチンの開発と規制について検討した。臨床開発中の製品は、感染症の予防・治療用ワクチンとがん治療用ワクチンに大別された。欧米では、感染症に用いるプラスミドDNAはワクチン、それ以外に適用されるプラスミドDNAは遺伝子治療製品として区別して規制されているが、両方とも免疫誘導を目的としたプラスミドDNAであり、両者に本質的な違いがあるわけではなく、行政的な区分によるものと考えられる。また、治療用プラスミドDNAワクチンと遺伝子治療用プラスミドDNAにも本質的な違いはない。ワクチンとして用いる場合にはアジュバントを用いたり複数のプラスミドを組み合わせたり、複数回の投与を行うことなど、ワクチン独自の適用法があるが、プラスミドDNAワクチンは遺伝子治療製品の一形態と考えることに問題はないと考えられる。

プラスミドDNAに関するガイダンスは現時点ではFDAのガイダンスのみであるが、このガイダンスは感染症に用いるプラスミドDNAワクチン以外の治療用プラスミドDNA製剤には適用されないとされる。しかし内容を確認すると、出荷試験に関する事項として、安全性・有効性に影響するプラスミドの全塩基配列の決定と配列成分の特定、MCB・WCBの作製、エンドトキシン含量、有効性に影響するスーパーコイル構造の含有率の規格など、感染症ワクチンに限らず、プラスミドDNA製品に共通する品質管理項目が示されていると考えられる。FDAの遺伝子治療製品に関するガイダンス（1998年）よりも作成時期が新しく、また遺伝子治療のガイダンスにプラスミドDNAに関する記載は少ないこともあり、プ

ラスミド製品の品質に関する考慮事項としては、この間の知見を踏まえたより詳細なものとなっている。一方、非臨床試験については、免疫原性試験、自己免疫の評価に対する考え方など、免疫誘導を目的とした製品に関する基本的な考え方が示されている。これも感染症ワクチンに限定される内容ではなく、他の治療用プラスミドDNAワクチンにも当てはまる内容である。また、生体内分布試験と持続性、組込試験は一般的なワクチンにはない遺伝子治療製品に特有の試験となるが、具体的な試験法が示されているほか、ベクターバックボーンが同一で遺伝子だけ異なる場合には生体内分布試験が必要ないことや、組込試験が必要となる条件は「宿主DNA 1 µgあたり30,000コピーを超える量で持続性が確認された場合」というこれまでのプラスミドDNA製品での経験に基づいた考え方や具体的な数値が示されているなど、FDAのガイダンスは、感染症にとどまらず、プラスミドDNAワクチンやプラスミドDNA製品の品質・安全性確保の方策を考える上でも参考になるものと考えられる。

E. 結 論

プラスミドDNAワクチンの開発と規制の国際動向を調査した。開発品目は感染症の予防・治療用ワクチンと、がんの治療用ワクチンに大別された。海外では感染症を対象とする製品はワクチンとして、その他の治療に用いる製品は遺伝子治療製品として規制されているが、免疫誘導を目的とする製品としての本質に違いはないと考えられる。FDAのガイダンスを基に、製造工程で明らかにすべき事項や製剤の出荷試験として設定すべき事項、非臨床試験の考え方など、プラスミドDNAワクチンの品質・安全性確保で考慮すべき事項を考察した。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成25年度分担研究報告書

ーバイオ医薬品の工程開発・管理並びに規格及び試験法に関する研究ー

研究分担者：川崎 ナナ（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長）
橋井 則貴（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長）
日向 昌司（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官）

研究要旨

抗体医薬品の糖鎖の品質管理基準の設定において、糖鎖の変動が血中濃度に及ぼす影響を考慮することが重要である。そこで、質量分析（MS）により、血中で安定な糖鎖構造を明らかにすることを目的として、昨年度開発した抗体親和性ペプチド固定化ゲルを充填したスピンカラムを作製し、血漿試料から抗体医薬品を回収できることを確認した。また、MSによる宿主由来タンパク質（HCP）の管理手法を開発する第一歩として、CHO細胞の培養上清及びプロテインA（PrA）カラムクロマトグラフィー工程で残留するHCPを、ショットガンプロテオミクスの手法により同定した。今後、Multiple Reaction Monitoring（MRM）による純度試験を行うためのプローブペプチドの設定を検討する予定である。

キーワード：抗体医薬品、バイオアナリシス、宿主由来タンパク質

A. 研究目的

近年、開発品目数が急増している抗体医薬品の工程開発・管理、並びに規格及び試験法に関する課題として、糖鎖不均一性及びHCPがある。

遺伝子組換え技術により製造される抗体には、主糖鎖であるフコシル化複合型二本鎖の他に、数パーセント程度の高マンノース型糖鎖が付加している。高マンノース型糖鎖をもつ抗体は、肝臓の肝類洞内皮細胞や、マクロファージに発現しているマンノースレセプターを介して消失されやすいことが知られている。また、ある種のFc融合タンパク質では、アガラクト複合型糖鎖が融合タンパク質部分に付加した分子種が、マンノースレセプターを介して、速やかに除去されることも報告されている。したがって、抗体医薬品の血中における糖鎖不均一性の変化と血中安定性の関係性を解明することは、管理すべき糖鎖の特定、及びその糖鎖の管理基準／許容範囲を設定するために重要である。

投与された抗体医薬品の糖鎖不均一性解析方法としては、血中から回収した抗体をプロテアーゼで消化した後、糖ペプチドをMSで解析するケースと、回収した抗体からPNGaseFにより糖鎖を切り出した後、誘導体化した糖鎖を液体クロマトグラフィー（LC）、MS、あるいはLC/MSにより解析するケースがある。血中の抗体医薬品の回収方法としては、抗体特異的リガンドが用いられる場合が多いが、特異性は高いものの回収率が低いことや、CDR領域に内因性のリガンドや抗薬物抗体が結合している抗体医薬品を回収できないことなどの課題が残されている。また、抗体ごとに抗体特異的リガンド結合担体を準備する必要があり、分析方法を確立するまでに長時間を要することなども課題である。もう一つの課題であるHCPは、原薬中の残留量、あるいは、精製工程で十分に除去される場合においては、工程内管理試験として中間体中の残留量の上限値が設定され管理されている。残留HCP量の測定は、主に抗HCP抗体を用

いたサンドイッチELISAなど、免疫学的手法が用いられている。

免疫学的手法は、タンパク質の測定技術の中で簡便かつ最も高感度であることから、残留量を管理する限度試験として優れた手法であるが、適切な抗体を準備する必要がある。HCPは、複数種類のタンパク質の集合体であるため、すべてのHCPを漏れなく測定しうる抗体を準備することが望ましいが、それは容易でない。また、どのような種類のタンパク質が残留しているのか、質的な情報も得られないことも問題である。例えば、製法変更において、量的な同等性あるいは優位性が確認できた場合であっても、質的に変動している可能性は排除できない。混入するHCPが、どの程度の有害事象を引き起こすのかについては、量的な評価だけでは不十分であるため、臨床試験での有害事象の発生等の結果を合わせて判断する必要がある。したがって、量的だけでなく、質的な変動を測定しうる評価手法を開発することで、リスクの低減に寄与するものと期待される。

このような背景を踏まえ、本年度は、血中抗体医薬品の糖鎖不均一性解析技術を開発する一環として、昨年度開発した抗体親和性ペプチドを固定化させたゲルを用いて、操作が簡便なスピнкаラムを作製し、血漿試料から抗体医薬品を回収するためのカラムとしての応用可能性を検証した。また、本カラムの抗TNF- α 抗体以外の抗体への選択性についても検証した。さらに、質的量的な解析を可能にするMSの手法としてMRMに着目し、定量に適したプローブペプチドのリストを作成するため、ショットガンプロテオミクスの手法により、残留性HCPを同定した。

B. 研究方法

B.1 血中抗体医薬品の糖鎖不均一性解析を目的とした抗体回収方法の検討

B.1.1 抗体及びヒト血漿

抗体として、muromonab-CD3 (Johnson & Johnson)、palivizumab (MedImmune)、omalizumab (Genentech)、daclizumab (Roche)、cetuximab (ImClone)、trastuzumab (Genentech)、adalimumab (Abbott)、infliximab (Johnson & Johnson)、及び golimumab (Johnson &

Johnson) を使用した。ヒト血漿は、KAC corporation (Kyoto, Japan) より購入した。

B.1.2 抗体親和性ペプチド固定化スピнкаラムの作製

抗体親和性ペプチドとして、昨年度報告した抗TNF- α 抗体に親和性を示すペプチドを使用した (図1 (A))。そのペプチドの化学合成品 (アミノ酸配列: CGSGSGSIAVSYQTK) を東レリサーチセンターから購入した。抗体親和性ペプチドを0.5Mリン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解して、ペプチド溶液 (1.0mg/mL) を調製した。そのペプチド溶液 (100 μ L) を10mgの抗体固定化用ゲル (TSKgel Tressyl-5PW、Tosoh) に加え、室温で一晩振とうさせた。200 μ Lの0.5M NaClでゲルを洗浄した後、100 μ Lの0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) を加えて、室温で30分間のインキュベーションにより、未反応の活性基をブロッキングした。得られた抗体親和性ペプチド固相化ゲルをUltrafree-MC (0.5mL、0.22mm filter、Millipore) に移して、抗体を回収するための簡易スピнкаラムを作製した。

B.1.3 ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

電気泳動ゲルは、グラジュエントゲル (e-PAGEL、18ウェル、厚さ1.0mm、グラジュエント5%–20%; ATTO) を用いた。

ローディングバッファー及び泳動バッファーの組成は以下の通りであった。

ローディングバッファー:

- 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) 1.25mL
- SDS (Wako) 0.2g
- グリセロール (Wako) 2 mL
- プロモフェノールブルー (Wako) 少量
- 精製水: 6.75mL

泳動バッファー:

- Tris (Sigma Aldrich) 3 g
- グリシン (Wako) 14.4 g
- SDS (Wako) 1 g
- 精製水 1 L

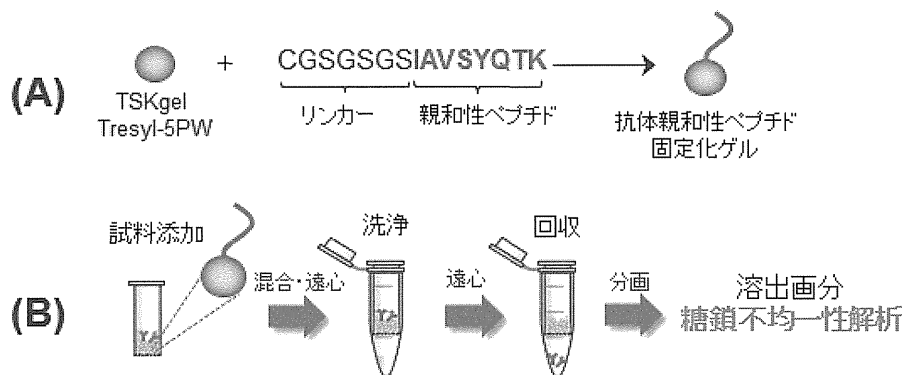


図1 (A) 抗体親和性ペプチド固定化ゲルの作製, (B) 抗体親和性ペプチド固定化ゲルを充填した簡易カラムによる抗体の回収・濃縮方法

10 μ Lのローディングバッファーに10 μ Lのサンプル溶液を添加、混合して、試料溶液とし、その13.5 μ Lをゲルに注入した。ゲル染色は、SYPRO Rudy Protein Gel Stain (Life Technologies) で行い、Typhoon 9400 (GE Healthcare) でバンドを確認した。

B. 1.4 ヒト血漿中からのgolimumab回収

10 μ Lのgolimumab水溶液 (1.0 μ g/ μ L) に90 μ Lのヒト血漿を加えて調製したサンプル溶液を、抗体親和性ペプチド固定化ゲルに添加した。転倒操作により、十分にゲルと溶液を混合した後、遠心分離 (5000 \times g) を行い、未吸着画分を回収した。次に、300 μ Lの洗浄バッファーの添加、混合、及び遠心分離操作を3回繰り返すことにより、ゲルを洗浄した。ペプチドに吸着したgolimumabは、300 μ Lの溶出バッファー (0.1%*n*-octylglucoside添加PBS、pH 7.4) の添加、混合及び遠心分離操作を3回繰り返すことにより吸着画分を回収した (図1 (B))。

B. 2 MSによるHCPの定量法の開発に関する研究

B. 2.1 ヌル細胞の培養上清の調製

本研究では、遺伝子を導入していないCHO-DG44細胞株 (ヌル細胞) を用い、昨年度モデルとして開発したトラスツマブ生産システムと同様の工程により調製した。0.1%Pluronic F-68を添加したDG44培地 (GE Healthcare) に、 2.0×10^5 cells/mLとなるようにヌル細胞を播種し、7日間、巡回培養 (125rpm、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂気流下) した。馴化培地 (CM) を回収し、3000rpm、20分間の遠心分離後、上清をろ過フィルター (0.22 μ m) で清澄化した。限外ろ過 (Pellicon XL 10kDa、Millipore) で、約1/50量と

なるまで濃縮し、CM濃縮液とした。CM濃縮液のHCP (CM-HCP) 濃度は、Protein Assay kit (Bio-rad) を用いて測定した。

B. 2.2 PrAカラムに吸着して残留するHCP量の評価

CM濃縮液 5 mLをPrAカラム (HiTrap MabSelect、GE Healthcare) に流速 1 mL/minでアプライし、15分間、洗浄液 (50mM Tris-HCl pH 7.5、0.5M NaCl) で洗浄した。溶出バッファー (0.1M Gly-HCl pH 3.0) で溶出した後、中和バッファー (2 M Tris-HCl pH 8.5) でpH 7.5に調整した。PrA溶出液のHCP (PrA-HCP) 濃度は、ELISA Kit (Cygnus Technologies) を用いて測定した。

B. 2.3 PrAカラムに吸着して残留するHCP量の2次元電気泳動による評価

CM濃縮液及びPrA溶出液について、2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) を用いて脱塩処理を行い、2% IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare) を含んだDeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) に再懸濁し2次元電気泳動のサンプルとした。Immobiline Dry Strip (pH 3-10、GE Healthcare) にアプライし、500Vで1時間、1000Vで1時間、8000Vで2時間泳動した。平衡化バッファーで、30分間平衡化した後、SDS-PAGEを行った。ゲルはSYPRO Rubyで染色した。

B. 2.4 ショットガンプロテオミクスの手法によるHCPの同定

CM-HCP及びPrA-HCPについて、約1 μ gを含む溶液を各々凍結乾燥した後、7 M guanidine-HCl pH 8.6、0.5M Tris-HCl、5 mM EDTAに再溶解した。DTT溶液

を添加し、65° Cで30分間インキュベートした後、ヨード酢酸溶液を添加し、室温で40分間反応させた。脱塩カラム (PD MiniTrap G-25、GE Healthcare) で脱塩し、凍結乾燥した。消化バッファー (50mM Tris-HCl pH 8.5) に再溶解し、トリプシン (Mass Spec Grade、Promega) を添加した後、37° Cで16時間インキュベートした。遠心乾燥させた後、0.1%ギ酸で溶解し、20 ng相当量を解析に供した。

LCは、Paradigm MS4 (Michrom BioResources) に逆相カラム (L-Column、0.075mm×150mm、粒子径 3 μm、化学物質評価研究機構) を接続して用いた。MS装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AB/MDS Sciex) を接続したQq-TOF-MS装置 (Qstar Elite、AB/MDS Sciex) を使用し、ポジティブイオンモードでデータを取得した。LC及びMSの測定条件は以下の通りである。

A溶媒：0.1%ギ酸、2%アセトニトリル水溶液

B溶媒：0.1%ギ酸、90%アセトニトリル水溶液

グラジエント：5-65%B溶媒、リニアグラジエント、
120分間

流速：0.3μL/min

スキャン範囲：*m/z* 400-2,000

スプレー電圧：4.0 ekV

検出されたMSスペクトル、MS/MSスペクトルについて、検索エンジンSEQUEST (Proteome Discoverer、Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質データベース (CHO refseq protein Fasta及びSwiss-Prot-Human) に対して検索を行った。

C. 結果と考察

C.1 血中抗体医薬品の糖鎖不均一性解析を目的とした抗体回収方法の検討

C.1.1 洗浄条件の検討

(1) 洗浄バッファーの種類及び塩濃度の検討

抗体親和性ペプチド固定化ゲルを充填したカラムで使用する洗浄バッファーを決めるために、25mM 酢酸アンモニウム (AcONH₄) (pH 7.0)、150mM AcONH₄ (pH 7.0)、及びPBS (pH 7.4) を洗浄バッファーとして使用したときの抗体回収率を比較した。モデル抗体として、抗TNF-α抗体のgolimumabを使用した。10μLのgolimumab水溶液 (1.0μg/μL) に90μLの洗浄バッファーを加えて試料溶液とした。未吸着画分、洗浄画分、及び吸着画分の回収方法は、B.1.4に記述した方法に従った。未吸着画分、洗浄画分、及び溶出画分の一部を分取して、B.1.3に記述した方法に従い、SDS-PAGEを行った。図2 (A)は、洗浄バ

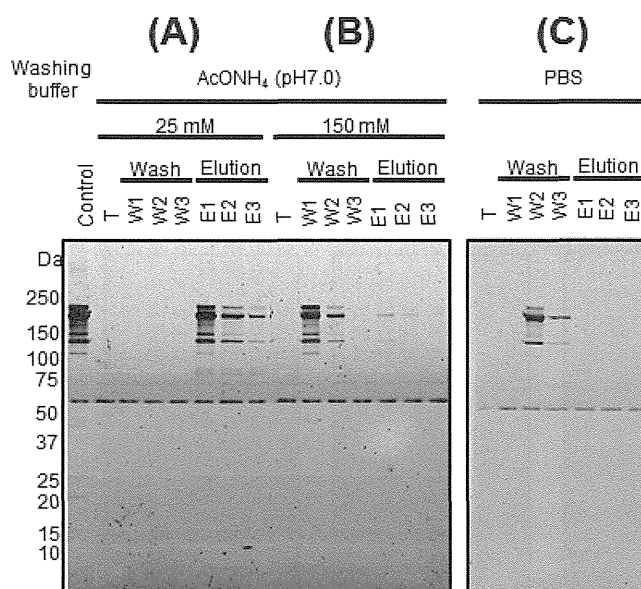


図2 洗浄条件の検討(1). 洗浄バッファー：(A), 25mM AcONH₄ (pH 7.0) ; (B), 150mM AcONH₄ (pH 7.0) ; (C), PBS. サンプル, golimumab 10μg ; 溶出バッファー, 0.1% (w/v) *n*-オクチルグルコシド添加PBS ; T, 未吸着画分 ; W1-W3, 洗浄画分 ; E, 吸着画分. 各フラクションは、300μlずつ分取した。

ッファーとして、25mM AcONH₄ (pH 7.0) を用いたときのSDS-PAGEの結果である。未吸着画分、及び洗浄画分ではgolimumab由来のバンドは検出されず、吸着画分のみバンドが検出された(回収率、100%)。一方、図2(B)及び2(C)に示したように、150mM AcONH₄ (pH 7.0)、及びPBSを用いたときは、いずれもgolimumabは洗浄画分に分画され、回収は困難であった(回収率、0%)。これらの結果から、親和性ペプチドに結合したgolimumabは、150mM程度の塩を含む洗浄バッファーを用いると回収は困難であるが、25mM AcONH₄ (pH 7.0) をバッファーとして用いることで回収できることが示唆された。

(2) 洗浄バッファーpHの検討

pH 5.0、8.0、9.0及び10.0の25mM AcONH₄を洗浄バッファーとして、本カラムによるgolimumabの回収率を検証した(図3)。洗浄バッファーとして、pH 5.0及び8.0の25mM AcONH₄を用いたとき、pH 7.0のときと同様に回収率は100%であった。一方、25mM AcONH₄ (pH 9.0) を使用したとき、golimumabの一部は洗浄画分に分画され、回収率は、40%程度であった。さらに25mM AcONH₄ (pH 10.0) では、すべて洗浄画分に分画された。以上のことから、洗浄バッファー(25mM AcONH₄)のpHを5~8に調節することで、golimumabを回収することができることが明らかとなった。

C. 1.2 抗体親和性ペプチド固定化カラムによるその他の抗体医薬品の回収

本カラムのGolimumab以外の抗体医薬品(muromonab-CD3、palivizumab、omalizumab、daclizumab、cetuximab、trastuzumab、adalimumab、及びinfiximab)への適用可能性を検証した(図4)。10μLの各抗体医薬品の水溶液(1.0μg/μL)に90μLの洗浄バッファーを加えて調製した試料溶液をカラムに注入後、未吸着画分、洗浄画分、及び吸着画分を回収した後、SDS-PAGEにより回収率を検証した。25mM AcONH₄ (pH 7.0) を洗浄バッファーとして用いたとき、daclizumab [図4(D)、4(I)]は、高い回収率(97%)を示したが、その他の抗体医薬品の回収率は、ばらつきがみられるものの、いずれも低値(72%~0%)であった。一方、25mM AcONH₄ (pH 5.0) を洗浄バッファーとして用いたとき、マウスIgG2a抗体であるmuromonab-CD3の回収率は低値(56%)であったが[図4(A)、4(I)]、その他の抗体医薬品の回収率は、いずれも85%以上と向上した。以上の結果から、洗浄バッファーのpHを最適化することで、様々な抗体医薬品を回収できる可能性が示唆された。

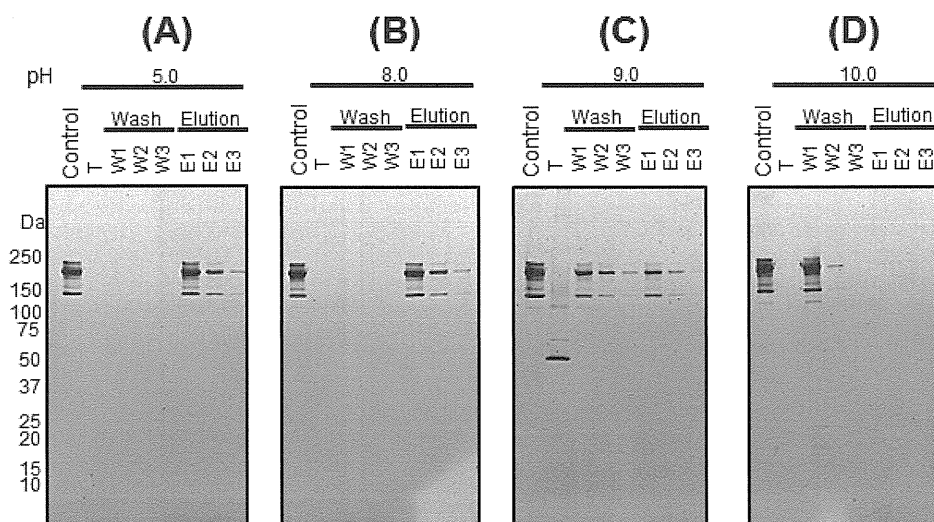


図3 洗浄条件の検討(2). 洗浄バッファー: 25mM AcONH₄ pH 5.0(A); pH 8.0(B); pH 9.0(C); pH 10.0(D). サンプル, golimumab 100μg; 溶出バッファー, 0.1% (w/v) *n*-オクチルグルコシド添加PBS; T, 未吸着画分; W1-W3, 洗浄画分; E, 吸着画分. 各フラクションは, 300μlずつ分取した.

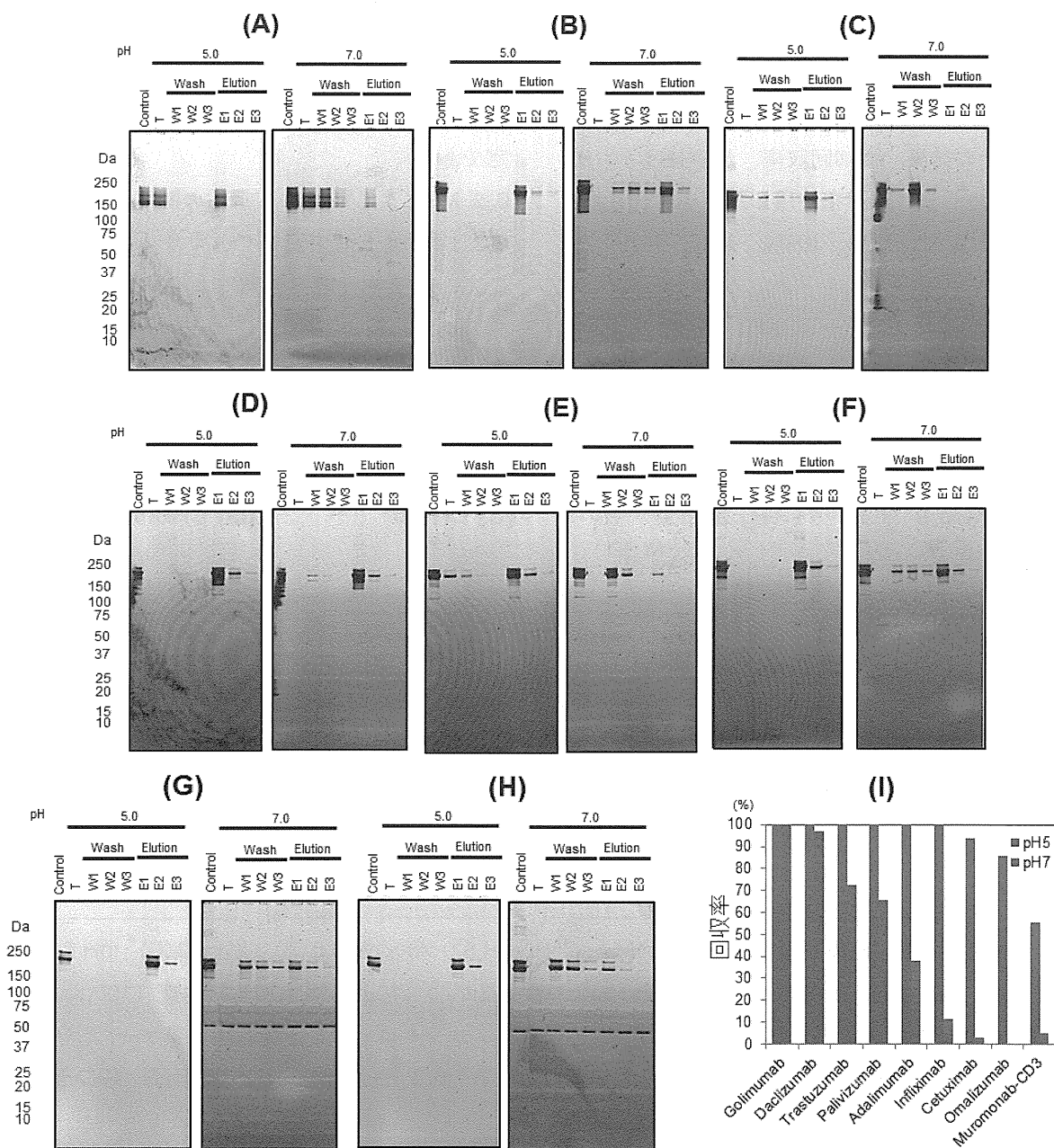


図4 抗体親和性カラムを用いた抗体医薬品の回収. 洗浄バッファーとして, 25mM AcONH₄ pH 5.0, 及び pH 7.0を使用した. サンプル (100µg) : (A), muromonab-CD3 ; (B), palivizumab ; (C), omalizumab ; (D), daclizumab ; (E), cetuximab ; (F), trastuzumab ; (G), adalimumab ; (H), infliximab. (I), 回収率の要約. 溶出バッファー, 0.1% (w/v) *n*-オクチルグルコシド添加PBS ; T, 未吸着画分 ; W1-W3, 洗浄画分 ; E, 吸着画分. 各フラクションは, 300µlずつ分取した. 回収率は, 未吸着画分, 洗浄画分, 及び溶出画分のバンドの総体積に対する溶出画分のバンドの体積の比率 (%) として算出した.

C. 1.3 抗体親和性ペプチド固定化カラムにより回収したgolimumabの添加回収率、及び純度の確認

Golimumab (100µg/mL) を添加した血漿、及び血漿のみを試料として、それぞれの吸着画分を回収した後、golimumab、及び血漿のコントロールとともに

にSDS-PAGEを行った。図5 (A)～5 (D)は、pHを5.0、6.0、7.0、及び8.0に調製した洗浄バッファー (25mM AcONH₄) を使用したときの結果である。低pHの洗浄バッファーを用いる程、吸着画分の血漿由来タンパク質量に増加する傾向がみられ、逆に、高pHのバッファーで洗浄すると、血漿由来タンパク質の吸着

量を低減できることが示唆された。次に、150～170kDa付近に検出されたバンドをgolimumabの主バンドと仮定して、添加回収率、及び純度を算出した（図6）。その結果、添加回収率、及び純度ともに、pH 8.0の洗浄バッファーを使用したときに、良好な値を示した（添加回収率、103%；純度、73%）。以上の結果から、血漿から特異的にgolimumabを回収するための洗浄バッファーとして、25mM AcONH₄（pH 8.0）が適していることが明らかとなった。今後、純度の向上を目指して、親和性ペプチドの改変

について検討する予定である。また、血液試料中からgolimumab以外の抗体医薬品を高収率で回収するためのカラムの洗浄条件についても、最適化する予定である。

C.2 MSによるHCPの定量法の開発に関する研究

C.2.1 培養上清中及びPrAカラムに残留するHCPの2次元電気泳動による解析

原薬に残留するHCPは、目的物質と類似した物理化学的性質を有するか、あるいは、精製基材に結合しやすい性質を有すると考えられてきた。このよう

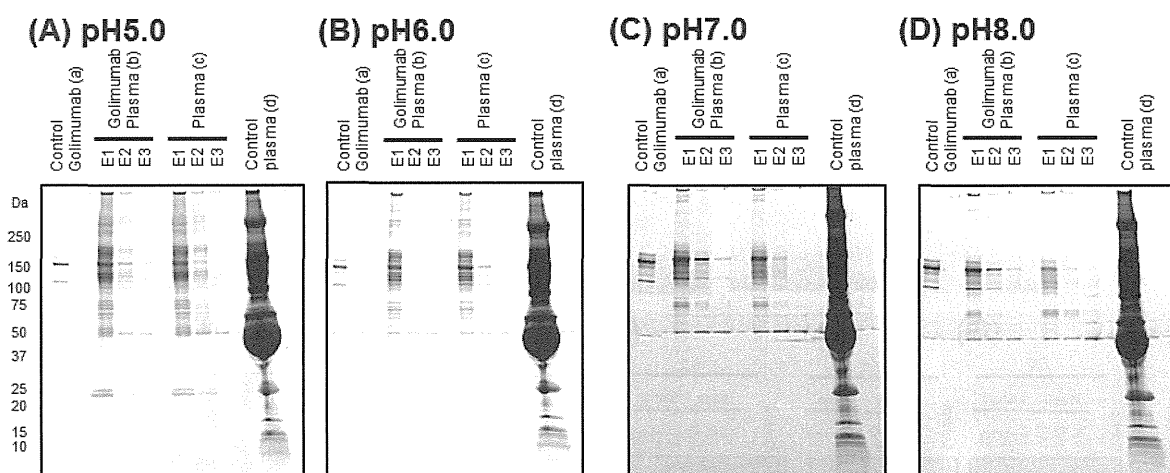


図5 特異性の確認. 洗浄バッファー：25mM AcONH₄ pH 5.0(A)；pH 6.0(B)；pH 7.0(C)；pH 8(D). サンプル：(a), golimumab（コントロール）；(b), golimumab（10μg）を添加した血漿（100μl）の溶出画分；(c), 血漿のみ（100μl）の溶出画分；(d)血漿（コントロール）. 溶出バッファー, 0.1%（w/v）*n*-オクチルグルコシド添加PBS；T, 未吸着画分；W1-W3, 洗浄画分；E, 吸着画分. 各フラクションは, 300μlずつ分取した.

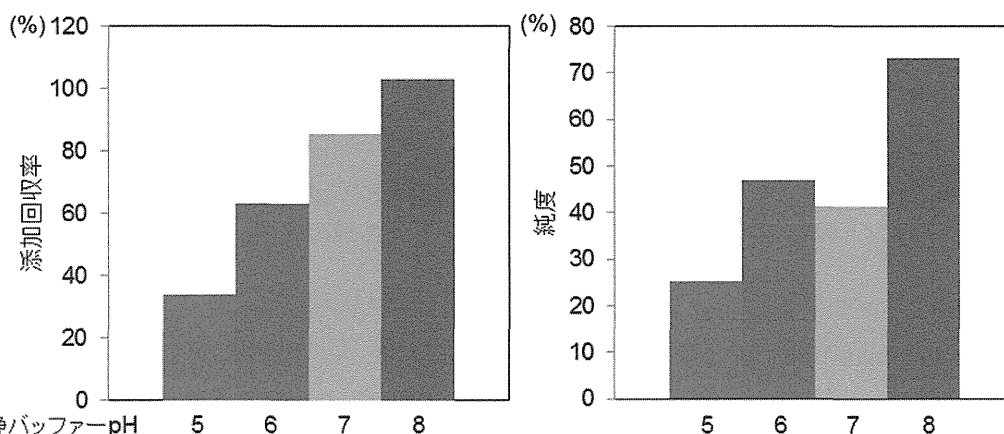


図6 golimumabを血漿に添加したとき（100μg/ml, 100μl）の添加回収率及び純度. (A) 添加回収率 [(b)抗体バンド体積 - (c)抗体バンド体積] / (a)バンド体積 (%), 及び(B) 純度 [(b)抗体バンド体積 - (c)抗体バンド体積] / (b)バンド体積 (%) は, 図5のSDS-PAGEの結果に基づき算出した.

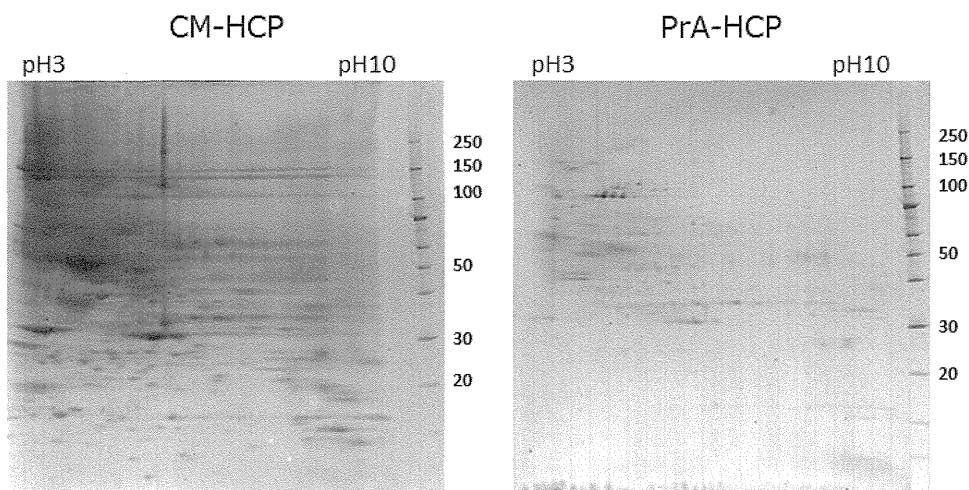


図7 2次元電気泳動によるHCPの比較.

培養上清のHCP (CM-HCP, 300 μ g) とプロテインAカラムクロマトグラフィーの残留性HCP (PrA-HCP, 10 μ g) について2次元電気泳動で分離し, SYPRO Rubyで検出した.

な考えから、欧州薬局方では、モック細胞の培養上清を部分精製して残留するHCPを免疫学的検出のための抗体作製の抗原として用いることを推奨している。しかし、残留するHCPが、どのようなタンパク質であるかについては、これまで十分な検討がなされていなかった。

本研究では、ショットガンプロテオミクスの手法による解析に先立ち、残留性HCPが、培養上清と質的に異なるのかを検証するために、抗体医薬品の初期の精製工程に多用されているPrAカラムクロマトグラフィー工程に着目し、残留性HCP (PrA-HCP) を回収し、培養上清のHCPとの差異を2次元電気泳動で検証した。その結果、培養上清のHCP (CM-HCP) とPrA-HCPの泳動パターンは明らかに異なっていることが明らかとなり、特定のHCP種が残留していることが示唆された (図7)。

C. 2.2 培養上清中及びPrAカラムに残留するHCPの2次元電気泳動による解析

CM-HCP (40ng相当) とPrA-HCP (20ng相当) について、ショットガンプロテオミクスの手法による

解析を行った。各サンプルについて、LC-MS/MSでMSスペクトル、MS/MSスペクトルの測定を3回実施した。得られたMSスペクトルデータについて、CHO細胞のゲノム情報を基に構築されたタンパク質データベース (CHO refseq protein Fasta) に対して検索した結果、CM-HCPから1612個、PrA-HCPから322個のペプチドが同定された。これらのペプチドをコードするタンパク質のうち、1回の解析において、2個以上のペプチドが同定されたタンパク質については、当該タンパク質が同定されたものとした。その結果、CM-HCPから237個、PrA-HCPから50個のタンパク質が同定され、PrA-HCPからのみ同定されたタンパク質は、25個であった。また、半定量ではあるが、主要なペプチドのピーク面積から推定した相対的なタンパク質含量を比較した結果、CM-HCPとPrA-HCPの両方から検出された25個のタンパク質の量比 (PrA-HCP/CM-HCP) は、タンパク質ごとに異なることが明らかとなり、HCP種ごとに残留しやすさが異なることが示唆された (表1)。

表 1 同定されたタンパク質のリスト (1/4)

Accession	Description	XCoverage	Z#PSMs	Maximum Area		Ratio	CM-HCP			PrA-HCP				
				CM-HCP	PrA-HCP		Identified#	Identified#	1	2	3	1	2	3
354500555	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 6A [Cricetulus griseus]	18.03	106				0	9	0	0	0	9	7	8
354502621	PREDICTED: nuclease-sensitive element-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	19.58	65				0	4	0	0	0	4	4	4
354479720	PREDICTED: desmoplakin [Cricetulus griseus]	5.02	56				0	8	0	0	0	7	7	8
354498558	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 42 [Cricetulus griseus]	14.16	49				0	6	0	0	0	6	6	5
354500381	PREDICTED: serine protease HTRA1-like [Cricetulus griseus]	14.47	38				1	2	1	1	1	2	2	2
354504022	PREDICTED: myosin-9 [Cricetulus griseus]	6.70	31				0	7	0	0	0	3	3	7
354471168	PREDICTED: lysyl oxidase homolog 4 [Cricetulus griseus]	20.05	16				0	5	0	0	0	5	2	3
354480050	PREDICTED: histone H1.2-like [Cricetulus griseus]	11.79	16				0	3	0	0	0	3	1	3
354477991	PREDICTED: charged multivesicular body protein 4b-like [Cricetulus griseus]	16.81	15				0	3	0	0	0	3	3	3
354485076	PREDICTED: junction plakoglobin [Cricetulus griseus]	9.32	15				0	3	0	0	0	3	2	3
354488183	PREDICTED: matrix metalloproteinase-19 [Cricetulus griseus]	11.24	9				1	2	1	1	1	2	1	2
354472325	PREDICTED: tubulointerstitial nephritis antigen [Cricetulus griseus]	11.18	9				0	3	0	0	0	1	1	3
354469338	PREDICTED: EMILIN-1 [Cricetulus griseus]	5.41	6				0	2	0	0	0	1	2	2
354498145	PREDICTED: lysyl oxidase homolog 3 [Cricetulus griseus]	8.39	6				0	2	0	0	0	2	2	1
354503090	PREDICTED: myosin-9-like, partial [Cricetulus griseus]	15.60	4				0	2	0	0	0	0	2	1
354500563	PREDICTED: hypothetical protein LOC100752858 [Cricetulus griseus]	9.10	87				1	7	1	0	1	7	5	5
354508182	PREDICTED: hypothetical protein LOC100767830, partial [Cricetulus griseus]	13.93	31				0	2	0	0	0	2	2	2
354503072	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 10-like, partial [Cricetulus griseus]	17.27	33				0	5	0	0	0	4	5	4
354498554	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 14-like [Cricetulus griseus]	22.57	119				0	9	0	0	0	9	9	9
354498556	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 16-like [Cricetulus griseus]	24.47	101				0	9	0	0	0	7	9	8
354499560	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 17 [Cricetulus griseus]	15.28	63				0	7	0	0	0	7	6	5
354505985	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 2 oral-like isoform 2 [Cricetulus griseus]	7.87	51				0	4	0	0	0	4	3	3
354500571	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 5-like [Cricetulus griseus]	33.00	142				0	16	0	0	0	14	16	15
354500573	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 71 [Cricetulus griseus]	3.91	12				0	2	0	0	0	2	1	1
354504783	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 75-like [Cricetulus griseus]	10.22	54				0	7	0	0	0	7	5	6
354484753	PREDICTED: granulins isoform 2 [Cricetulus griseus]	55.74	307	9.536E6	8.772E7	9.20	12	5	12	11	12	5	4	5
354483018	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein [Cricetulus griseus]	20.17	207	6.025E5	3.404E6	5.65	4	32	3	2	4	32	24	27
354468511	PREDICTED: high mobility group protein B1-like [Cricetulus griseus]	31.82	118	2.699E6	1.077E7	3.99	6	6	6	6	6	6	6	5
354484377	PREDICTED: high mobility group protein B2-like [Cricetulus griseus]	18.56	36	4.767E5	1.207E6	2.53	3	5	1	2	3	5	3	5
354505689	PREDICTED: lactadherin-like, partial [Cricetulus griseus]	18.06	28	1.428E6	3.111E6	2.18	2	2	2	2	2	2	2	1
354494385	PREDICTED: fibronectin isoform 3 [Cricetulus griseus]	25.29	245	1.541E6	3.343E6	2.17	10	25	7	10	10	25	21	24
354495632	PREDICTED: nidogen-1-like, partial [Cricetulus griseus]	63.03	287	3.840E6	7.072E6	1.84	16	20	16	16	15	19	20	19
354488129	PREDICTED: nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like [Cricetulus griseus]	41.86	54	1.668E6	2.976E6	1.78	5	3	5	5	5	3	3	3
354473313	PREDICTED: metalloproteinase inhibitor 2-like [Cricetulus griseus]	44.76	108	2.701E6	4.228E6	1.57	5	4	5	4	4	4	4	4
354501005	PREDICTED: lactadherin-like, partial [Cricetulus griseus]	30.46	27	4.421E5	6.710E5	1.52	4	2	3	4	3	2	1	2
354490982	PREDICTED: nidogen-1-like, partial [Cricetulus griseus]	44.42	212	8.808E6	1.032E7	1.17	13	10	13	13	9	10	7	5
354502803	PREDICTED: nucleolin [Cricetulus griseus]	20.60	119	4.336E6	4.815E6	1.11	10	7	8	9	10	6	7	5
354482553	PREDICTED: thrombospondin-1 [Cricetulus griseus]	11.20	58	1.305E6	8.015E5	0.61	6	3	4	5	6	3	2	2
354478507	PREDICTED: peroxidasin homolog [Cricetulus griseus]	13.29	50	2.192E6	1.108E6	0.51	5	6	3	5	4	6	5	4
354477555	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: plasminogen activator inhibitor 1-like [Cricetulus griseus]	25.37	34	2.347E6	6.224E5	0.27	5	2	4	3	5	2	1	2
354472939	PREDICTED: extracellular matrix protein 1-like [Cricetulus griseus]	29.48	77	2.823E6	6.864E5	0.24	10	2	9	10	10	2	2	2
354497139	PREDICTED: procollagen C-andopeptidase enhancer 1 [Cricetulus griseus]	35.47	72	4.143E6	1.001E6	0.24	8	2	8	8	8	2	1	2
354501828	PREDICTED: protein CYR61 [Cricetulus griseus]	31.22	27	1.850E6	4.465E5	0.24	4	2	3	3	4	0	1	2
354497282	PREDICTED: actin, cytoplasmic 2-like, partial [Cricetulus griseus]	52.30	159	8.941E6	1.657E6	0.19	12	5	12	12	10	5	5	4
354473282	PREDICTED: galectin-3-binding protein-like [Cricetulus griseus]	34.84	82	4.442E6	6.700E5	0.15	9	2	9	9	9	1	1	2
354499945	PREDICTED: alpha-enolase [Cricetulus griseus]	51.52	228	2.804E7	2.945E6	0.11	14	2	13	14	14	2	2	2
349501082	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Cricetulus griseus]	62.76	202	2.406E7	2.237E6	0.09	10	6	9	10	8	6	4	4
354486063	PREDICTED: clusterin-like [Cricetulus griseus]	34.16	240	3.900E7	2.444E6	0.06	11	7	10	10	11	7	6	6
354473496	PREDICTED: pyruvate kinase isozymes M1/M2-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	62.34	320	2.493E7	1.277E6	0.05	23	5	23	23	23	5	4	3
354494438	PREDICTED: sulfated glycoprotein 1 [Cricetulus griseus]	52.68	298	2.239E7	5.906E5	0.03	23	2	18	23	22	2	2	2
354471469	PREDICTED: chondroitin sulfate proteoglycan 4 [Cricetulus griseus]	36.89	478				46	0	46	44	45	0	0	0
350539823	heat shock cognate 71 kDa protein [Cricetulus griseus]	59.44	322				25	1	24	23	25	0	1	1
354494109	PREDICTED: legumain [Cricetulus griseus]	44.98	303				13	0	11	13	13	0	0	0
346227155	elongation factor 2 [Cricetulus griseus]	51.17	281				28	1	25	28	25	1	1	1
354468711	PREDICTED: cathepsin 2 [Cricetulus griseus]	61.11	242				13	0	13	13	13	0	0	0
346986399	elongation factor 1-alpha 1 [Cricetulus griseus]	47.40	203				12	1	11	11	12	1	1	1
350540646	phosphoglycerate kinase 1 [Cricetulus griseus]	55.40	157				14	0	11	14	14	0	0	0
350540064	heat shock protein HSP 90-alpha [Cricetulus griseus]	36.15	155				16	1	16	16	16	0	0	1
354496071	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase A isoform 1 [Cricetulus griseus]	62.91	147				12	0	11	12	12	0	0	0
354476740	PREDICTED: lysosomal protective protein isoform 2 [Cricetulus griseus]	34.66	141				12	0	10	12	11	0	0	0
354467411	PREDICTED: transketolase-like [Cricetulus griseus]	43.98	139				13	0	9	13	13	0	0	0
354481801	PREDICTED: N(4)-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	58.38	137				9	0	9	9	8	0	0	0
354474198	PREDICTED: glypican-1-like [Cricetulus griseus]	27.86	123				13	0	12	13	13	0	0	0
354479029	PREDICTED: heat shock protein HSP 90-beta-like [Cricetulus griseus]	36.60	120				15	1	14	14	15	0	0	1
346227178	L-lactate dehydrogenase A chain [Cricetulus griseus]	62.05	118				12	0	12	11	12	0	0	0

* ヒト由来のkeratinと判断されたタンパク質については、グレーで示した。

表1 同定されたタンパク質のリスト (2/4)

354503280	PREDICTED: annexin A2-like, partial [Cricetulus griseus]	66.08	113							12	1	11	12	12	0	0	0	1
354474409	PREDICTED: SPARC-like [Cricetulus griseus]	44.63	108							12	0	10	12	10	0	0	0	0
354507493	PREDICTED: cathepsin L1-like [Cricetulus griseus]	31.53	108							9	0	9	9	9	0	0	0	0
354500481	PREDICTED: filamin-A [Cricetulus griseus]	17.30	98							9	0	16	17	19	0	0	0	0
354485253	PREDICTED: adipocyte enhancer-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	20.96	98							13	0	13	10	13	0	0	0	0
350537423	78 kDa glucose-regulated protein [Cricetulus griseus]	30.28	95							12	1	11	12	12	0	1	1	1
354496912	PREDICTED: annexin A1-like [Cricetulus griseus]	46.24	94							12	0	11	11	12	0	0	0	0
354500404	PREDICTED: metalloproteinase inhibitor 1-like [Cricetulus griseus]	49.75	93							8	0	8	7	8	0	0	0	0
354485381	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: amyloid beta A4 protein [Cricetulus griseus]	30.77	92							14	0	11	12	14	0	0	0	0
354487462	PREDICTED: thioredoxin reductase 1, cytoplasmic [Cricetulus griseus]	30.77	92							11	0	10	11	11	0	0	0	0
354496408	PREDICTED: galectin-1-like [Cricetulus griseus]	64.44	92							6	0	6	6	5	0	0	0	0
354477852	PREDICTED: follistatin-related protein 1-like [Cricetulus griseus]	46.08	91							11	0	9	10	11	0	0	0	0
350537945	peroxiredoxin-1 [Cricetulus griseus]	63.82	89							8	0	5	8	8	0	0	0	0
354482483	PREDICTED: vimentin [Cricetulus griseus]	30.26	88							14	0	11	12	14	0	0	0	0
354476371	PREDICTED: dystroglycan [Cricetulus griseus]	15.20	87							7	0	7	7	7	0	0	0	0
354486886	PREDICTED: suprabasin-like [Cricetulus griseus]	39.04	86							15	0	15	12	12	0	0	0	0
354480699	PREDICTED: latent-transforming growth factor beta-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	16.20	86							13	0	13	11	11	0	0	0	0
354467379	PREDICTED: complement C1r-A subcomponent [Cricetulus griseus]	24.69	78							10	0	8	10	9	0	0	0	0
354496841	PREDICTED: insulin-like growth factor-binding protein 4-like [Cricetulus griseus]	50.39	77							7	0	6	7	7	0	0	0	0
354481556	PREDICTED: prelamins A/C-like isoform 2 [Cricetulus griseus]	30.66	75							14	0	11	14	14	0	0	0	0
354472141	PREDICTED: alpha-actinin-1 [Cricetulus griseus]	23.95	70							14	0	13	14	12	0	0	0	0
354467325	PREDICTED: calcium-dependent serine proteinase-like [Cricetulus griseus]	20.58	69							7	0	7	7	7	0	0	0	0
354502765	PREDICTED: nucleobindin-2-like [Cricetulus griseus]	39.05	68							10	0	7	10	9	0	0	0	0
354472688	PREDICTED: neural cell adhesion molecule 1 [Cricetulus griseus]	20.75	66							12	0	10	12	9	0	0	0	0
354471594	PREDICTED: cathepsin B-like [Cricetulus griseus]	34.22	66							9	0	7	8	9	0	0	0	0
346421364	calreticulin [Cricetulus griseus]	28.30	66							6	0	5	6	6	0	0	0	0
354507428	PREDICTED: dipeptidyl peptidase 2-like [Cricetulus griseus]	24.51	64							8	0	7	8	7	0	0	0	0
354483044	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like [Cricetulus griseus]	50.00	63							7	0	7	7	7	0	0	0	0
354479921	PREDICTED: elongation factor 1-beta-like [Cricetulus griseus]	29.78	63							6	0	6	6	6	0	0	0	0
354466994	PREDICTED: phosphatidylethanolamine-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	51.87	61							6	0	5	5	6	0	0	0	0
354468863	PREDICTED: actin, alpha skeletal muscle-like [Cricetulus griseus]	16.98	61							5	1	5	5	4	1	1	1	1
354478924	PREDICTED: tropomyosin alpha-3 chain-like isoform 3 [Cricetulus griseus]	33.06	60							9	0	7	9	7	0	0	0	0
354496917	PREDICTED: calmodulin-like [Cricetulus griseus]	24.91	59							5	0	4	5	5	0	0	0	0
354465044	PREDICTED: rab GDP dissociation inhibitor beta-like [Cricetulus griseus]	45.62	58							10	0	9	10	10	0	0	0	0
354469007	PREDICTED: rho GDP-dissociation inhibitor 1-like [Cricetulus griseus]	42.16	56							7	0	7	5	6	0	0	0	0
354469184	PREDICTED: lysosomal alpha-glucosidase-like [Cricetulus griseus]	20.97	55							10	0	8	7	10	0	0	0	0
350537543	glutathione S-transferase P 1 [Cricetulus griseus]	44.29	53							7	0	6	7	7	0	0	0	0
354500373	PREDICTED: nucleophosmin-like [Cricetulus griseus]	32.92	53							6	1	6	5	5	1	1	1	1
354498951	PREDICTED: epididymal secretory protein E1-like [Cricetulus griseus]	24.83	53							3	1	3	3	3	0	1	1	1
354473830	PREDICTED: tropomyosin alpha-1 chain-like [Cricetulus griseus]	28.52	52							9	0	9	8	7	0	0	0	0
354471198	PREDICTED: phosphoglycerate mutase 1-like [Cricetulus griseus]	26.50	52							7	0	5	5	7	0	0	0	0
354475571	PREDICTED: NSFL1 cofactor p47-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	29.84	51							7	0	7	7	7	0	0	0	0
354495391	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P2-like [Cricetulus griseus]	81.74	50							5	0	5	5	4	0	0	0	0
354484889	PREDICTED: 14-3-3 protein beta/alpha-like [Cricetulus griseus]	38.21	49							7	0	7	6	7	0	0	0	0
354506568	PREDICTED: calyntenin-1 [Cricetulus griseus]	18.45	48							8	0	8	7	7	0	0	0	0
354501786	PREDICTED: cofilin-1-like [Cricetulus griseus]	40.36	48							5	0	5	5	4	0	0	0	0
354465012	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5-like [Cricetulus griseus]	12.07	47							8	0	6	8	8	0	0	0	0
354495983	PREDICTED: ribonuclease T2-like [Cricetulus griseus]	32.05	43							4	0	4	4	4	0	0	0	0
354490988	PREDICTED: dickkopf-related protein 3-like [Cricetulus griseus]	35.92	42							8	0	8	8	6	0	0	0	0
354505868	PREDICTED: glutathione S-transferase Y1-like [Cricetulus griseus]	35.32	42							7	0	6	5	7	0	0	0	0
354496335	PREDICTED: cathepsin D [Cricetulus griseus]	22.79	42							5	0	5	5	5	0	0	0	0
354497474	PREDICTED: endoplasmic [Cricetulus griseus]	10.59	39							6	0	5	6	6	0	0	0	0
354478439	PREDICTED: nucleoside diphosphate kinase B-like [Cricetulus griseus]	34.21	39							4	0	4	4	4	0	0	0	0
354482082	PREDICTED: aldose reductase-like [Cricetulus griseus]	26.27	38							5	0	5	4	3	0	0	0	0
354478441	PREDICTED: nucleoside diphosphate kinase A-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	69.74	36							8	0	6	8	7	0	0	0	0
354504887	PREDICTED: corniflin-A-like [Cricetulus griseus]	47.79	36							3	0	2	3	2	0	0	0	0
354499529	PREDICTED: tyrosine-protein kinase receptor UFO [Cricetulus griseus]	11.23	35							5	0	4	5	4	0	0	0	0
354502651	PREDICTED: 14-3-3 protein theta-like [Cricetulus griseus]	34.29	34							6	0	5	6	6	0	0	0	0
354489742	PREDICTED: thioredoxin-like [Cricetulus griseus]	61.45	34							4	0	4	4	4	0	0	0	0
354475521	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: lipoprotein lipase [Cricetulus griseus]	24.95	33							7	0	6	5	7	0	0	0	0
354474350	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like [Cricetulus griseus]	39.35	32							6	0	6	6	5	0	0	0	0
354501655	PREDICTED: tripeptidyl-peptidase 1-like [Cricetulus griseus]	23.27	32							6	0	4	6	3	0	0	0	0
354499497	PREDICTED: protein SET-like [Cricetulus griseus]	31.29	31							5	0	4	4	5	0	0	0	0
354498717	PREDICTED: N-acetylglucosamine-6-sulfatase [Cricetulus griseus]	26.82	30							6	0	5	6	6	0	0	0	0
354466320	PREDICTED: superoxide dismutase [Cu-Zn]-like [Cricetulus griseus]	14.88	30							2	0	2	2	2	0	0	0	0
350539695	protein disulfide-isomerase [Cricetulus griseus]	17.68	29							6	0	3	5	6	0	0	0	0
354508126	PREDICTED: 14-3-3 protein epsilon-like, partial [Cricetulus griseus]	60.00	29							5	0	2	5	4	0	0	0	0

表1 同定されたタンパク質のリスト (3/4)

354506076	PREDICTED: glutathione S-transferase omega-1-like isoform 2 [Cricetulus griseus]	27.92	28				5	0	5	4	5	0	0	0
354506128	PREDICTED: osteopontin-like [Cricetulus griseus]	29.00	28				5	0	5	4	5	0	0	0
354479537	PREDICTED: deoxyribonuclease-2-alpha-like [Cricetulus griseus]	19.68	27				5	0	5	5	4	0	0	0
354485875	PREDICTED: adenyl cyclase-associated protein 1-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	21.94	27				5	0	4	5	4	0	0	0
354496607	PREDICTED: annexin A5-like [Cricetulus griseus]	29.91	27				4	0	4	4	4	0	0	0
354496734	PREDICTED: elongation factor 1-delta-like isoform 1 [Cricetulus griseus]	27.40	27				4	0	4	4	4	0	0	0
354473981	PREDICTED: gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase-like [Cricetulus griseus]	23.58	27				3	0	3	2	3	0	0	0
354487034	PREDICTED: macrophage-capping protein-like [Cricetulus griseus]	33.24	26				6	0	6	6	4	0	0	0
354478131	PREDICTED: transgelin-2-like [Cricetulus griseus]	34.67	26				5	0	5	4	4	0	0	0
354484391	PREDICTED: 14-3-3 protein zeta/delta-like [Cricetulus griseus]	24.90	26				4	0	3	4	3	0	0	0
354483990	PREDICTED: 14-3-3 protein eta-like [Cricetulus griseus]	33.86	25				6	0	6	4	4	0	0	0
354490697	PREDICTED: transmembrane glycoprotein NMB-like [Cricetulus griseus]	12.95	25				5	0	4	4	5	0	0	0
354475919	PREDICTED: sulfhydryl oxidase 1 [Cricetulus griseus]	9.13	25				4	0	3	4	4	0	0	0
354491066	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: plectin [Cricetulus griseus]	4.29	24				6	0	5	6	5	0	0	0
354488159	PREDICTED: proliferation-associated protein 2G4-like [Cricetulus griseus]	19.04	24				5	0	4	5	4	0	0	0
354495466	PREDICTED: G-protein coupled receptor 56 [Cricetulus griseus]	11.77	24				5	0	5	3	3	0	0	0
354505958	PREDICTED: phosphoserine aminotransferase isoform 2 [Cricetulus griseus]	17.07	24				4	0	4	3	3	0	0	0
3545038125	protein disulfide-isomerase A3 [Cricetulus griseus]	17.43	23				4	0	4	4	4	0	0	0
354492431	PREDICTED: nuclear migration protein nudC-like [Cricetulus griseus]	27.83	22				6	0	3	5	6	0	0	0
354494567	PREDICTED: laminin subunit beta-1 [Cricetulus griseus]	11.21	22				5	0	4	5	4	0	0	0
354496448	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like [Cricetulus griseus]	35.06	22				5	0	2	5	2	0	0	0
354508098	PREDICTED: WNT1-inducible-signaling pathway protein 1-like [Cricetulus griseus]	46.88	22				4	1	4	3	3	1	0	0
354502560	PREDICTED: protein DJ-1-like [Cricetulus griseus]	29.10	22				3	0	3	3	3	0	0	0
354504493	PREDICTED: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating-like [Cricetulus griseus]	12.01	22				3	0	3	3	3	0	0	0
354472995	PREDICTED: proteasome subunit beta type-4-like [Cricetulus griseus]	23.48	22				3	0	1	3	3	0	0	0
354472764	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1-like [Cricetulus griseus]	14.29	21				4	0	4	4	4	0	0	0
354507825	PREDICTED: WNT1-inducible-signaling pathway protein 1-like, partial [Cricetulus griseus]	28.57	21				3	0	2	2	3	0	0	0
354472673	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-like [Cricetulus griseus]	17.70	21				3	0	3	3	2	0	0	0
354493316	PREDICTED: elongation factor 1-gamma [Cricetulus griseus]	12.13	21				3	0	3	3	2	0	0	0
354504055	PREDICTED: arylsulfatase A [Cricetulus griseus]	15.44	21				3	0	3	2	2	0	0	0
354507007	PREDICTED: alcohol dehydrogenase class-3-like [Cricetulus griseus]	25.94	20				4	0	3	4	4	0	0	0
354502310	PREDICTED: ferritin heavy chain, partial [Cricetulus griseus]	23.41	20				4	0	4	2	2	0	0	0
350539641	stress-induced-phosphoprotein 1 [Cricetulus griseus]	9.02	20				3	0	3	3	3	0	0	0
354488731	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-7-like [Cricetulus griseus]	13.09	20				3	0	3	3	3	0	0	0
354493494	PREDICTED: S-methyl-S'-thioadenosine phosphorylase-like [Cricetulus griseus]	19.08	20				3	0	3	2	3	0	0	0
354482849	PREDICTED: cellular nucleic acid-binding protein isoform 2 [Cricetulus griseus]	36.47	19				5	0	4	5	4	0	0	0
354474405	PREDICTED: ganglioside GM2 activator-like [Cricetulus griseus]	21.47	19				2	0	2	1	1	0	0	0
350538257	peroxiredoxin-2 [Cricetulus griseus]	45.96	18				5	0	3	5	2	0	0	0
354484895	PREDICTED: WNT1-inducible-signaling pathway protein 2-like [Cricetulus griseus]	33.20	18				4	1	4	3	4	1	1	0
350539727	heterochromatin protein 1 gamma [Cricetulus griseus]	16.39	18				3	0	3	2	2	0	0	0
354490016	PREDICTED: protein S100-A11-like [Cricetulus griseus]	27.00	18				2	0	2	2	2	0	0	0
354483485	PREDICTED: decorin-like [Cricetulus griseus]	20.44	17				4	0	2	4	3	0	0	0
354467339	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4-like [Cricetulus griseus]	16.98	17				4	0	4	3	3	0	0	0
354475591	PREDICTED: cystatin-C-like [Cricetulus griseus]	22.86	17				2	0	2	2	2	0	0	0
354488751	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P1-like [Cricetulus griseus]	32.35	17				2	0	2	2	2	0	0	0
354488951	PREDICTED: thimet oligopeptidase-like [Cricetulus griseus]	9.88	16				4	0	4	3	2	0	0	0
354470990	PREDICTED: peroxiredoxin-6-like, partial [Cricetulus griseus]	21.00	16				3	0	2	3	3	0	0	0
354480148	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-7-like isoform 3 [Cricetulus griseus]	16.98	16				2	0	2	2	2	0	0	0
354481584	PREDICTED: hepatoma-derived growth factor-like [Cricetulus griseus]	20.35	16				2	0	1	2	2	0	0	0
354481833	PREDICTED: acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic-like [Cricetulus griseus]	14.36	16				2	0	1	2	2	0	0	0
354481232	PREDICTED: radixin [Cricetulus griseus]	10.12	15				4	0	3	4	2	0	0	0
354497025	PREDICTED: prostaglandin reductase 1-like [Cricetulus griseus]	22.80	15				3	0	3	2	3	0	0	0
354470665	PREDICTED: calumenin [Cricetulus griseus]	15.24	15				3	0	2	2	3	0	0	0
354497793	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein DC-like [Cricetulus griseus]	15.03	15				3	0	3	3	2	0	0	0
354500485	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit S1 [Cricetulus griseus]	7.71	15				2	0	2	2	2	0	0	0
354501814	PREDICTED: protein FAM3C-like [Cricetulus griseus]	15.42	15				2	0	2	2	2	0	0	0
354471447	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-4-like [Cricetulus griseus]	15.33	15				2	0	2	1	2	0	0	0
354491739	PREDICTED: poly(rC)-binding protein 1-like [Cricetulus griseus]	28.37	14				5	0	2	3	5	0	0	0
354465636	PREDICTED: importin-5-like [Cricetulus griseus]	8.42	14				5	0	5	2	3	0	0	0
354492323	PREDICTED: moesin [Cricetulus griseus]	12.90	14				4	0	2	4	4	0	0	0
354494273	PREDICTED: purine nucleoside phosphorylase-like [Cricetulus griseus]	30.81	14				4	0	4	2	3	0	0	0
354504153	PREDICTED: GTP-binding nuclear protein Ran-like [Cricetulus griseus]	14.81	14				3	0	2	3	3	0	0	0
354467010	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P0-like isoform 2 [Cricetulus griseus]	16.56	14				3	0	3	2	2	0	0	0
354490165	PREDICTED: 60S ribosomal protein L12-like [Cricetulus griseus]	15.38	14				2	0	2	2	2	0	0	0
345842428	tubulin alpha-1C chain [Cricetulus griseus]	11.14	13				3	0	2	2	3	0	0	0
354507964	PREDICTED: 14-3-3 protein gamma-like, partial [Cricetulus griseus]	15.76	13				2	0	2	2	2	0	0	0
354484911	PREDICTED: syndecan-4-like [Cricetulus griseus]	28.22	12				4	0	2	2	4	0	0	0