

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）
分担研究報告書

ータンパク質性医薬品・核酸医薬品の安定性に関する研究ー

研究分担者：阿曾 幸男（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第二室長）

研究要旨

タンパク質性医薬品の安定性に影響を及ぼすと考えられる有効成分分子の高次構造の揺らぎを評価する手法（タンパク質の β 緩和時間等を指標にした）として、 ^{13}C -NMR緩和時間の可能性について検討し、タンパク質の安定性がカルボニル炭素の ^{13}C -NMR緩和時間によって評価できる可能性が示唆された。また、マイクロ熱量計によりタンパク質の分解に伴う熱を測定できること、熱の大きさが分解速度と関連することが示された。

A. 研究目的

革新的医薬品として注目を集めているタンパク質性医薬品の品質変化は化学的な分解とともに、分子の高次構造の変化を伴う物理的な変化によっても引き起こされ、有効性、安全性に影響を及ぼす。低分子医薬品に比べ分解メカニズムが複雑であり、医薬品添加剤が品質変化に及ぼす影響も複雑である。タンパク質性医薬品の品質確保のためには品質変化と関連する有効成分、添加剤の因子を明らかにし、その因子を評価し、コントロールする手法を開発することが不可欠である。特に、安定性を短期間に評価できる標準的な評価法があれば、安定な処方探索のための期間が短縮され、開発を促進するものと考えられる。

本研究においては近年タンパク質の安定性との関連が示唆される β 緩和時間等の分子内の局所的な運動性を指標にした評価法について検討する。局所的な運動性はタンパク質医薬品の疎水性相互作用によるタンパク質の凝集反応や酸無水物中間体を経る脱アミド反応に関連することが示唆されている。また、タンパク質の分解に伴う微少な熱を測定することによってタンパク質性医薬品の安定性評価の可能性についても検討する。抗体医薬の市販製剤に適用し、安定性評価法としての標準化をめざす。

NMR緩和時間は分子運動性の指標とされ、タンパ

ク質については動的な揺らぎの保存安定性の指標となりうることを示唆されている。これまでの検討により、タンパク質濃度が5%程度あれば ^{13}C -NMRの測定が可能であり、抗体医薬の市販製剤中のタンパク質の運動性評価に適用できることを明らかにした。本年度は4種の抗体医薬について ^{13}C -NMR緩和時間を測定するとともに、タンパク質の分解に伴う微少な熱を等温マイクロ熱量計を用いて測定する。さらに、保存した試料について、サイズ排除クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィーにより分解物を定量し、分解物の量をもとに製剤間の保存安定性の差を評価し、保存安定性と ^{13}C -NMR緩和時間によってあらわされる分子のゆらぎの大きさとの関連を検討する。

B. 研究方法

市販製剤としてヒュミラ皮下注40mgシリンジ0.8mL（アダリムマブ）、ランマーク皮下注120mg（1.7mL×バイアル、デノスマブ）、アクテムラ点滴静注用400mg（トシズマブ）、レミケード点滴静注用100mg（インフリキマブ）を用いた。レミケード点滴静注用は凍結乾燥製剤であり、10mLの水で溶解して用いた。これらの試料を25℃に保存し、サイズ排除クロマトグラフィー（カラム：Shodex KW403-4F 4.6mm×300mm、カラム温度：30℃、移動相0.3MNaClを添

加した50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)、検出：210nm) により凝集体の検出を行った。また、2種類の逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (カラム1：Inertsil WP300 C8 4.6mm×300mm、カラム2：Protonavi 4.6mm×300mm、カラム温度：60℃、検出：280nm) によりデスアミド体等の分解物の測定を行った。

タンパク質の分解に伴う微少な熱の測定は等温マイクロ熱量計 (IMC) (TAMIII、TAインストルメント) を用い、25℃で行った。製剤を高圧蒸気滅菌した専用のガラス容器に移し、熱量計にセットした。

タンパク質の局所的な運動性の評価はタンパク質のカルボニル炭素について、¹³C-NMR緩和時間 (T_1) により行った。 T_1 はInversion-recovery法によって20℃において測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は化学実験のみを行い、倫理面への配慮の必要はないと考えられる。

C. 研究結果

(1) サイズ排除クロマトグラフィーおよび逆相高速液体クロマトグラフィーによる分解物の検出

25℃で3か月保存した試料のサイズ排除クロマトグラムは非常に小さいがメインピークの前にピークが観測され、分子サイズの大きな分解物が生成していることが示された (図1)。製品によって分解物の生成量に差が見られた。タンパク濃度が高い製品においては、25℃で2週間の保存によっても分解物量の増大が観測された。一方、逆相カラムを用い、デスアミド体等の極性の変化する分解物の生成について検討したが、図2の例に示すように、いずれの製剤においても、今回検討した保存温度と時間ではクロマトグラムに大きな変化は見られなかった。

分子サイズが大きな分解物の生成速度は非常に小さく、正確な値を求めるためにはさらに長期の保存実験が必要であるが、今回得られた結果から大まかに見積もると、アクテムラ点滴静注用、レミケード点滴静注用を水に溶解したもの、ランマーク皮下注、ヒュミラ皮下注の順に生成速度が大きくなる傾向が

見られた。

(2) 等温マイクロ熱量計を用いた分解に伴う熱の測定
抗体医薬の分解に伴う熱 (Q) は、単位時間あたりに生成する分解物の量と分解熱 ΔH_d の積によってあらわされ、分解が一次反応速度式に従う場合は次式の関係が成り立つ。

$$Q = \Delta H_d \times d[D]/dt = \Delta H_d \times k[P]$$

ここでは k は分解速度定数を表し、 $[P]$ はタンパク質濃度を表す。分解の初期はタンパク質の濃度は初濃度 $[P]_0$ で近似できるので、 Q の値は一定とみなせる。

$$Q \approx \Delta H_d \times k[P]_0 = \text{一定}$$

また、今回検討した抗体において分解熱 ΔH_d が抗体の種類によらないと仮定すると、 Q を $[P]_0$ で割った値は $\Delta H_d \times k$ であり、分解速度 k の指標と考えることができる。

アクテムラ点滴静注用とレミケード点滴静注用の測定例を図3に示す。測定開始直後に比較的大きな熱が検出された後、ほぼ一定の熱が観測された。測定開始直後の熱は測定ごとに大きさや符号がランダムに変わることから、タンパク質の分解に伴う熱ではないと考えられる。本測定は試料溶液と対照として水を入れた容器を用い、それらの容器の温度差から熱を見積もっている。容器を装置にセットするときのショックや容器のシール材として使用されるゴム製のリングの緩和などが原因と考えられる。15日以降の0.1μW程度の微小な熱は100日まで測定してもほぼ一定であり、タンパク質の分解に伴う熱と考えられる。タンパク質1gあたりの熱の大きさはアクテムラ点滴静注用が約0.9μW、レミケード点滴静注用を溶解したものが約1.8μW、ランマーク皮下注が約4.6μW、ヒュミラ皮下注が約5.5μWであった。これは分子サイズが大きな分解物の生成速度と同じ順番であり、等温マイクロ熱量計による分解熱と保存安定性が関連することが示唆された。図4にサイズ排除クロマトグラフィーによって見積もられた分子サイズの大きな分解物の生成速度と等温マイクロ熱量計で観測されたタンパク1gあたりの熱の大きさの関係を示す。分解物生成速度、分解熱は十分な精度をもって測定されていないが、両者の間には相関

があるように見え、分解熱測定によりタンパク製剤の安定性を予測可能であると思われる。

(3) 抗体タンパク質の¹³C-NMR緩和時間と安定性の関係

抗体タンパク質の¹³C-NMR緩和時間は製品によって異なっており、アクテムラ点滴静注用が約3.8秒、レミケード点滴静注用を溶解したものが3.1秒、ランマーク皮下注が2.8秒、ヒュミラ皮下注が2.7秒であった。NMR緩和時間と分子運動性の関係は複雑であり、分子運動性が非常に高い場合は、運動の速度と緩和時間は比例関係がある。すなわち、緩和時間が長いほど運動速度が大きい。しかし、緩和時間はある速さの分子運動で極小値をとり、さらに運動性が低くなると運動の速度と緩和時間は反比例の関係を示す。すなわち、緩和時間が大きいほど分子運動が遅い。今回検討したタンパク質の緩和時間は分解速度が小さいタンパクほど大きいことから、運動の速度と緩和時間の間に反比例の関係が成り立つ運動速度の領域での測定と考えられる。それを確認するためには温度を変えた緩和時間の測定が必要である。図5に示すように緩和時間の逆数の値が大きいほど分解物生成速度が大きい傾向があることから、緩和時間はタンパク質の安定性の指標として用いることができると考えられる。

D. 考 察

本年度の検討により、タンパク質の分子サイズの大きな分解物の生成速度と等温マイクロ熱量計による分解熱やタンパク質のカルボニル炭素の¹³C-NMR緩和時間との間に関連があることを示唆する結果が得られた。今回使用した¹³Cの共鳴周波数100MHzの装置を用いた場合、¹³C-NMR緩和時間は数日の測定時間を要する。また、十分なs/n比を得るためにはさらに長い測定時間が必要となる。等温マイクロ熱量計による分解熱の測定には定常状態になるまでに1ヶ月を要することから、測定時間の観点からは¹³C-NMR

緩和時間が有利であると考えられる。しかし、¹³C-NMR緩和時間と分子運動性の関係は運動の速度によって比例関係が成り立つ場合と反比例の関係が成り立つ場合があり、緩和時間の温度依存性を検討することなどによりタンパク質の運動性と緩和時間の関係を詳細に検討する必要があると考えられる。

NMR緩和時間や分解に伴う微少な熱が保存安定性と関連することが示唆されたことから、実時間で保存に比べ、短時間で安定性評価が可能になり、革新的なタンパク質医薬の実用化促進につながるものと考えられる。

E. 結 論

タンパク質の高次構造の揺らぎを¹³C-NMRによって評価する方法について市販モノクロナル抗体製剤を用いて検討した。動的な揺らぎの指標である¹³C-NMR緩和時間はサイズ排除クロマトグラフィーで検出される大きなサイズの分解物の生成速度と関連することが示唆され¹³C-NMR緩和時間は製剤中のタンパク質の保存安定性の評価に有用であることが示唆された。また、分解に伴う熱を等温マイクロ熱量計で観測でき、熱の大きさと分解速度が関連することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

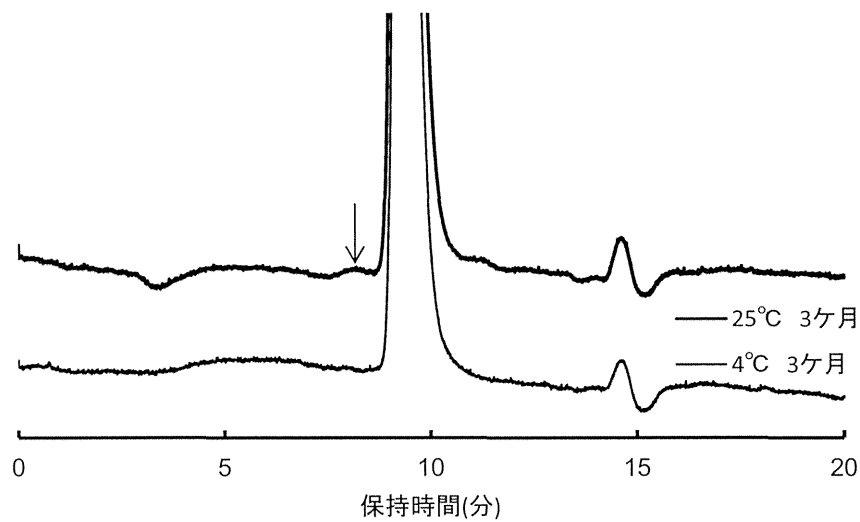


図1 サイズ排除クロマトグラフィーの測定例

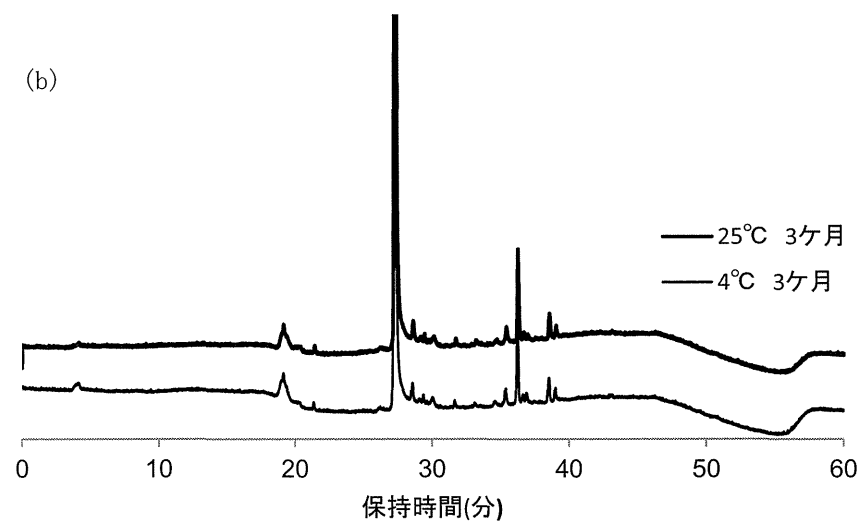
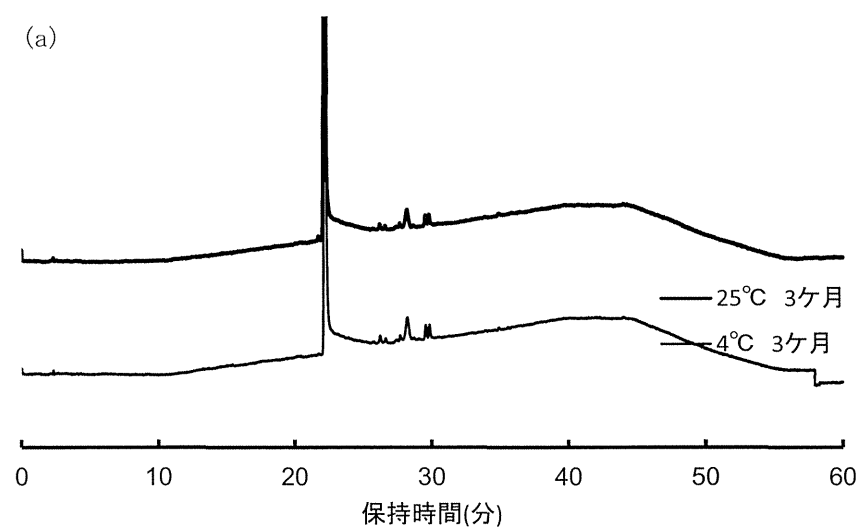


図2 逆相高速液体グラフィーの測定例
(a) : C4カラム、(b) : C8カラム

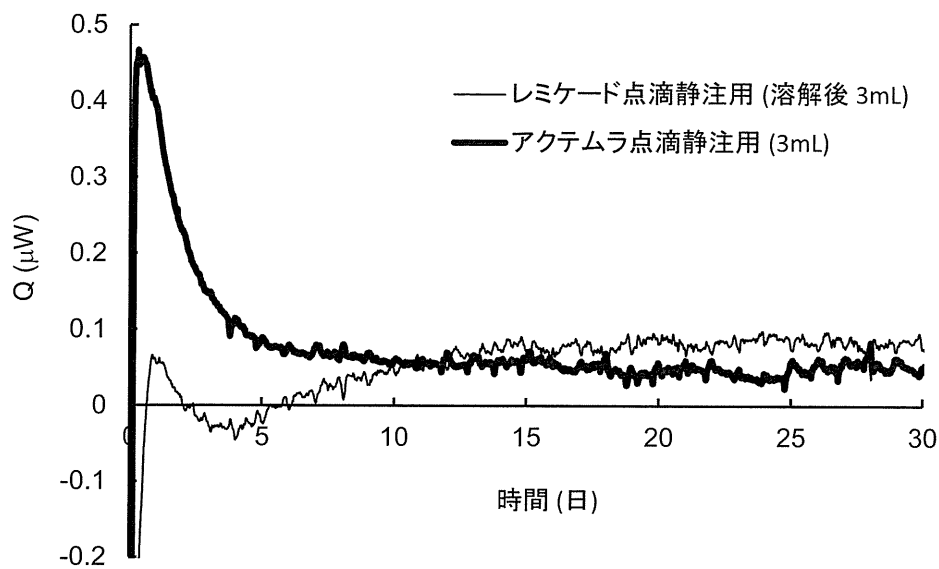


図3 等温マイクロ熱量計による抗体医薬剤の分解熱の測定例

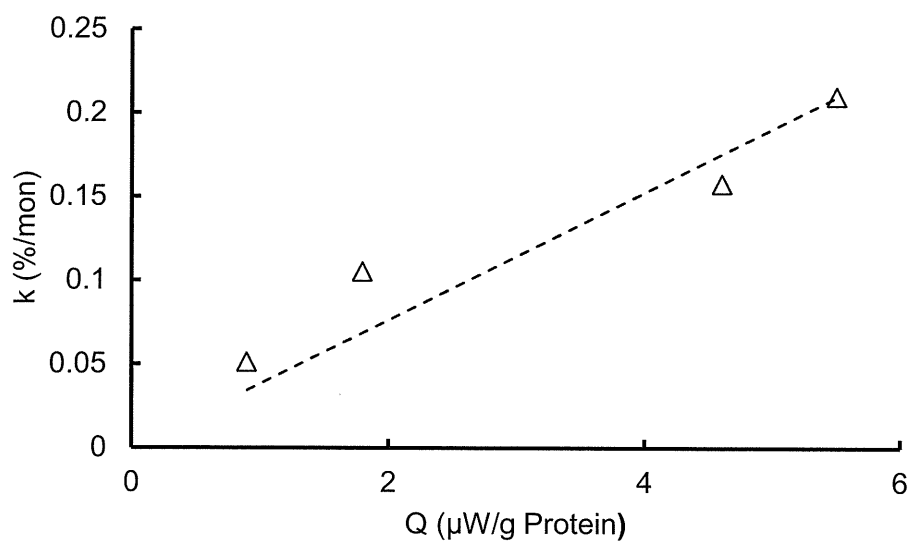


図4 ミクロ熱量計によって測定される分解熱 (Q) と分解物生成速度 (k) の関係

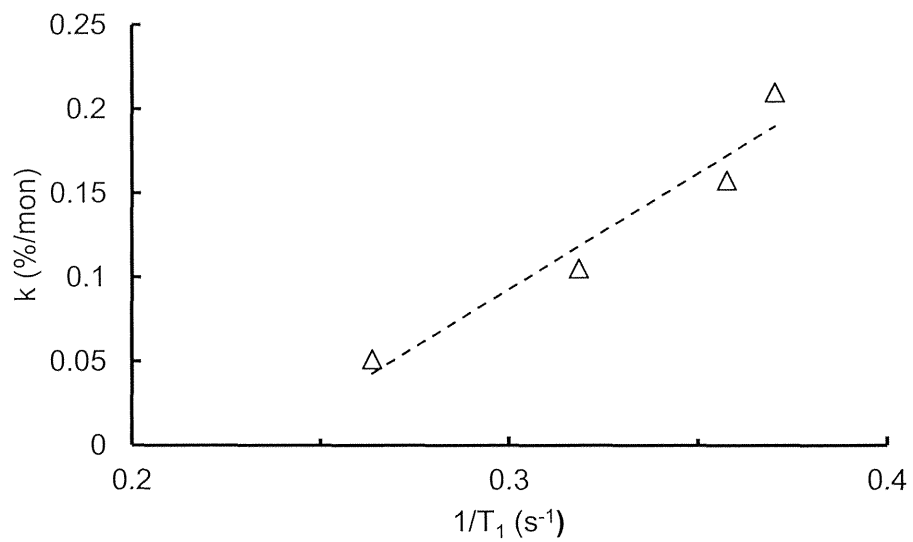


図5 ¹³C-NMR緩和時間 (T_1) と分解物生成速度 (k) との関係

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）
分担研究報告書

－遺伝子治療用医薬品の評価に関するレギュラトリーサイエンス研究－

研究分担者：内田 恵理子（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第一室長）

研究協力者：五十嵐 友香（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 協力研究員）

研究要旨

遺伝子治療用医薬品（遺伝子治療用製品）の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究の一環として、1）迅速に巨大な遺伝情報を解析可能な次世代シーケンサーを用いたベクター解析技術の有用性についてレトロウイルスベクターを取り上げその品質評価への適用を検討した。2）遺伝子治療ベクターの設計変更や製造変更における要件について検討した。1）製造方法の異なる2種類のレトロウイルスベクターについて従来のキャピラリーシーケンサーによる解析と次世代シーケンサーによる解析を行った。その結果、ベクター産生細胞を用いて製造したベクターは次世代シーケンサーによって十分なカバレッジでの全塩基配列解析が可能であり、配列に変異が生じた場合でも検出可能であるが、一過性のトランスフェクションで製造したベクターは塩基配列情報のカバレッジが十分ではないとの結果が得られ、生産細胞系によりベクターの品質の一定性が異なることが示された。2）遺伝子治療用製品の開発途中での設計変更時の考え方について、EMAのリフレクションペーパーを基に検討した。臨床開発の途中で良く行われるベクターコンストラクトの設計変更例として、プラスミドベクターの抗生物質耐性選択マーカーの変更やAAVベクターの血清型の変更、レトロウイルスベクターの自己不活化型ベクターへの変更などの例を取り上げ、導入した変更に伴い必要となる追加の非臨床試験の範囲、使用する非臨床モデルの適用、及び臨床試験開始前までに新規の製品設計とのブリッジングをサポートする追加の非臨床データの必要性など、変更時にどの程度のデータを収集すれば良いかについて考え方をまとめた。今回の検討を基に、遺伝子治療の個別課題として設計変更や製造変更時の考え方を提示する予定である。

A. 研究目的

本研究は、革新的医薬品としての遺伝子治療用医薬品（遺伝子治療用製品と）の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究として、遺伝子治療用製品において整備が求められるガイダンスの検討や素案作成のための研究及び遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価手法に関する研究を行うことを目的としている。

24年度は、国内外の遺伝子治療用製品の開発動向の包括的調査及び規制ガイドラインの整備状況を調

査するとともに、遺伝子治療用ベクターとして、最近、特に開発が進んでいるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター製品の開発と品質、安全性確保に関する要件を検討した。また、遺伝子治療用ベクターの品質評価法として、デジタルPCRの活用に関する検討を開始した。25年度は、染色体組込型ベクターの開発動向と安全性確保の課題として挿入変異のリスクについて検討した。また前年度に引き続いて、遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価の一環として、デジタルPCRを活用した比活性の評価及び遺

伝子導入細胞でのベクターの残存性の評価への適用を検討した。26年度は次世代シーケンサーによるウイルスベクターの品質評価について製法の異なるレトロウイルスベクターを取り上げ、次世代シーケンサーによりベクターの遺伝子配列の確認にどの程度適用可能か検討するとともに、遺伝子治療用製品の開発途中での設計、製法変更時の考え方について検討した。

B. 研究方法

1) 次世代シーケンサーを用いたレトロウイルスベクターの品質評価

(1) Stable cell lineによるレトロウイルスベクターの産生

MFGSgp91phox レトロウイルスベクター：gp91phox遺伝子発現レトロウイルスベクター (env：4070A) は、ベクターをstableに産生するHEK293SPA cell lineを10%FBS含有DMEMで培養し、80%コンフルエントの状態に培地交換を行い、24時間後にレトロウイルスベクターを含む培養上清を回収して試料とした。HEK293SPA cell lineに導入されたMFGSgp91phoxレトロウイルスベクタープラスミドの構造をFig.1に示す。得られたウイルス上清はPEG沈殿法により100倍に濃縮した。

(2) 一過性のトランスフェクション法によるレトロウイルスベクターの産生

一過性のトランスフェクション法によるレトロウイルスベクターは、HEK293gp cell line (レトロウイルスのgag-polをstableに発現する細胞) に対してリン酸カルシウム法を用いてMFGSgp91phoxレトロウイルスベクタープラスミド および10A1エンベローププラスミド をトランスフェクションし、16時間目に初回培地交換を行った後、培地交換から24-72後にウイルス上清として回収した。

(3) キャピラリーシーケンサーによるウイルスゲノムの塩基配列分析

stable cell line由来ウイルス上清または一過性のトランスフェクション法により作成したウイルス上清

から、スマイテストEX-R&D (Medical and Biological Laboratories) またはNucleoSpin RNA virus (Takara bio) を用いてウイルスRNAを抽出した。また、Superscript III First Strand synthesis system (Life Technologies) を用いてcDNAを合成した。さらに、キャピラリーシーケンサーでは700bp前後しか解析できないため、解析配列をベクタープラスミド配列内に組み込まれた目的遺伝子であるgp91phox (約1800bp) に絞るために、gp91phoxの配列の全長をPCRにて増幅しゲル抽出法により精製したものを鋳型サンプルとした。このPCR産物をもとに、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いてsequence PCRを行いエタノール沈殿による精製後、ABI 3500xl Genetic Analyzerを用いて解析を行った。キャピラリーシーケンサーでリードできたデータの塩基配列と元のベクタープラスミドの配列をアSEMBLしたときの塩基の一致率を、stable cell lineより産生したレトロウイルスベクターと一過性トランスフェクション法で産生したベクターとで比較した。

(4) 次世代シーケンサー用RNAサンプルの調製

stable cell line由来ウイルス上清からのウイルスRNAの抽出は、スマイテストEX-R&Dを用いて50 μ lのウイルス上清から調製した。

得られたRNAサンプルの濃度と質をAgilent RNA 6000 pico kitを用いてBioanalyzer (Agilent 2100) で評価し、Illumina TruSeq RNA sample preparation kitを用いて次世代シーケンサー用のRNAサンプル調製をおこなった。手順は全てキットのマニュアルに従った。

一方、一過性のトランスフェクション法によるウイルスベクター上清からのウイルス RNAの抽出はNucleoSpin RNA virusを用いた。RNA sampleはAgilent RNA 6000 pico kitを用いてBioanalyzerで濃度と質を評価した。次世代シーケンサー用のサンプル調製はSMARTer Ultra Low Input RNA kit for sequenceとLow Input Library Prep kitを用いてキットのマニュアルに従って行った。

(5) RNA濃度の測定

Bioanalyzerによりサンプルの質を確認後、qPCR (Kapa Library Quantification kit: KAPA Biosystems) により濃度を測定した。

(6) 次世代シーケンサーによる塩基配列解析

2種類のレトロウイルスベクターから抽出したRNAサンプルの次世代シーケンサーIllumina HiSeq 2000を用いた塩基配列解析は、成育医療研究センターの中林先生に委託した。

2) 遺伝子治療用製品の製法や設計変更時の考え方に関する研究

遺伝子治療用製品の製法変更時の考え方については欧州医薬品庁 (EMA) が2011年12月に発出したリフレクションペーパー (Reflection paper on design modifications of gene therapy medicinal products during development) 及び関連する論文を中心に検討した。

(倫理面への配慮)

ウイルスベクターを用いた実験は、成育医療研究センター及び国立医薬品食品衛生研究所の遺伝子組換え実験安全管理規則に基づき適正な審査により承認されたものであり、規則を遵守して適切に実施された。

C. 研究結果

C.1 次世代シーケンサーを用いたウイルスベクターの品質評価法

遺伝子治療用ウイルスベクターではベクター中の塩基配列が有効性、安全性上非常に重要であり、現在作成している「遺伝子治療製品の品質・安全性確保に関する指針」の改正案でも、ベクターの特性解析として、可能な限り、ベクターの全塩基配列を確認することを求めている。しかし、従来のキャピラリーシーケンサーでは、ウイルスのサイズが大きい場合など全塩基配列の確認が困難な場合もあり、そのような場合には目的遺伝子とフランキング領域について調べることでしている。しかし、迅速に巨大な遺伝情報を解析可能な次世代シーケンサーの

発展により、ウイルスベクターゲノムの全塩基配列解析も比較的容易に行うことが可能となりつつあり、ベクター産生細胞の継代培養等によりウイルスベクターゲノムに変異が生じた場合にも検出できる可能性がある。そこで、遺伝子治療用製品の品質・安全性評価の一環として、次世代シーケンサーを用いたウイルスベクターの品質評価について、キャピラリーシーケンサーと比較検討を行った。

1) キャピラリーシーケンサーによるレトロウイルスベクターの塩基配列解析

ウイルスベクターゲノムの塩基配列解析として、従来のキャピラリーシーケンサーでどの程度のデータが得られるのかを検討した。試料としては、ベクタープラスミドのトランスフェクションにより得られる一過性に産生されたレトロウイルスベクターおよびトランスフェクション後の細胞をクローニングして得られたウイルスベクター産生細胞 stable cell lineの培養上清として得られるレトロウイルスベクターについて、目的とする配列をきちんと含んでいるウイルスであるかの評価を行った。すなわち、用いたレトロウイルスベクタープラスミドの配列と、回収したウイルス粒子内の配列が一致するかどうかを目的遺伝子配列を対象として検討した。その結果、stable cell line由来のレトロウイルスベクターでは、目的遺伝子であるgp91phoxの配列はstable cell lineに導入されたレトロウイルスベクタープラスミドの配列と99%一致していることが確認された (Fig.2)。一方、一過性のトランスフェクションにより産生されたレトロウイルスベクターから得られたデータの例をFig.3に示す。一過性のトランスフェクションにより産生されたベクターでは、多くの場合、解析できないデータであったり、解析できてもFig.3上段に示すようにもとのプラスミドとgp91の配列に全く一致が認められなかったり、Fig.3中段および下段に示すように配列の一部だけが一致しているという結果が得られた。宿主細胞由来と思われるヒト遺伝子配列が検出される場合も認められた。なお、stable cell lineから調製したレトロウイルスベクターと一過性発現で調製したレトロウイルスベクターについ

て、キャピラリーシークエンサーによりリードできたデータの配列と元のベクタープラスミドの配列をアッセムブリしたときの塩基の一致率をTable1に示した。Stable cell lineから調製したベクターは3回とも90%以上の一致が認められたが、一過性トランスフェクションで得たベクターでは、ベクタープラスミドとベクターゲノムRNAの配列の一致する割合が、複数回の調製で0-99%と非常にばらついていた。

2) 次世代シークエンサーによるレトロウイルスベクターの塩基配列解析

キャピラリーシークエンサーにより解読できる塩基は長くても700bp程度であり、ウイルスベクターの全長を一度に解析することは困難である。一方、次世代シークエンサーでは一度に全長が解析可能であることから、次世代シークエンサー法による解析を試みた。試料としては、キャピラリーシークエンサーで分析したものと同様の方法で調製した（同一試料ではない）stable cell line由来のレトロウイルスベクターと一過性に産生されたレトロウイルスベクターを用いて、次世代シークエンサー測定用の前処理を行い、Illumina HiSeq 2000を用いて解析した。

stable cell lineから得られたレトロウイルスベクターを次世代シークエンサーで解析した結果の一部をFig.4に示す。stable cell line由来のウイルスベクターでは、ベクター配列の全てに均一かつ十分な量のリードが得られ、十分なカバレッジでの全塩基配列解析が可能であった。Fig.4の右側付近の赤色が続く領域は、細胞に導入したウイルスベクタープラスミドとウイルスベクターゲノムとで一致しない部分であるが、このようにもととなるベクタープラスミドと異なる領域を容易に判定することができた。この領域は目的遺伝子領域ではなく、ウイルス産生に重要な領域でもないが、この領域に変異が生じている可能性が示唆された。

一方、一過性のトランスフェクション法により得られたウイルス粒子由来RNAについて同様に次世代シークエンサーで解析を行ったところ、参照配列に一致するリード数が極めて少なく、解析に値する

カバレッジを得る事ができなかった (Fig.5)。数回サンプル調製をやり直して解析を試みたが、同様に解析はできなかった。以上の結果より、生産細胞系によりベクターの品質の一定性が異なることが示唆された。

C.2 遺伝子治療用製品の製法や設計変更時の考え方について

通常のバイオ医薬品では、有効成分そのものを変更する場合には新薬となる可能性が高い。また開発途中で一次構造を変更したりPEG化したりすれば、変更前のデータは基本的に使えない。しかし、遺伝子治療用製品となるウイルスベクターに関しては、開発途中で対象疾患の変更や、より高い遺伝子発現能を求めてベクター構造の変更が行われることがよくある。例えばプロモーターの変更や薬剤選択マーカーの変更など、遺伝子発現構成体の制御に関わるエレメントの変更が行われることも多い。また発現制御に関わるこれらのエレメントがオンコジーンである場合などには、遺伝子のノックダウンが行われることもある。

一方、ベクターの製造方法についても、一過性のプラスミドのトランスフェクションによるウイルスベクターの製造法から、ベクター産生細胞株を樹立して製造する方法に変更したり、プラスミドベクターからバキュロウイルスを利用してウイルスベクターを製造するなどの製法変更が行われることもある。

このようなベクターそのものの設計の変更や製法の変更が行われることにより、新たにデータを取得する必要がある場合もあると想定されるが、全ての非臨床試験を再実施しなければいけないかという点、必ずしもその必要はないと考えられる。また臨床開発中であれば、初期の安全性データについてもどの程度利用可能か、検討が必要となる。

遺伝子治療用製品の臨床開発中の設計変更時の考え方については、EMAが2011年にリフレクションペーパー (Reflection paper on design modifications of gene therapy medicinal products during development) を発出している。このリフレクションペーパーでは、臨床開発中の6つの変更例を取り上げて、製法変更

時のデータの収集に関する考え方を示している。リフレクションペーパーで取り上げられている変更例とその考え方について以下に概要を示すとともに、今後、わが国で遺伝子治療用製品の製法変更時の考え方をリフレクションペーパーにまとめるために取り上げるべき内容について検討した。

1) スプライドナー／アクセプター配列の改変

ベクターによっては、治療用遺伝子に隠れたスプライド部位が含まれ、これを使用した場合に製品が不活化される可能性が臨床開発中に判明し、第Ⅲ相臨床試験の前に治療用遺伝子をコードする塩基配列にサイレント変異を導入して、隠れたスプライド部位を不活化することにより、活性タンパク質のみが翻訳されるようにする場合がある。

このような場合、有効成分の特性が変化することが考えられ、改変前後でのベクターの同等性について第Ⅲ相試験の前に考察する必要がある。

当該ベクターがex vivo遺伝子導入用のレトロウイルスベクターで、stableなパッケージング細胞株を用いて製造する場合、新たなパッケージング細胞株の産生が必要となる。この場合は同等性評価を実施し、ウイルスベクターの品質及びベクターによる遺伝子導入効率のみならず、製品の変更前後でのex vivo遺伝子導入細胞の品質／同等性を検討し、製品の変更が第Ⅰ／Ⅱ相試験と第Ⅲ相試験の間で患者に輸注したex vivo遺伝子導入細胞の安全性や有効性に有害な影響を及ぼさないことを確認する必要がある。工程内管理及び出荷試験（ウイルスハーベスト、原薬及び製剤）から得られた同等性データも必要となる。また、免疫表現型試験（イムノフェノタイピング）、特異的シーケンス、生存率、エンドトキシン、ベクターの完全性、コピー数、増殖性レトロウイルス（RCR）、導入遺伝子の発現レベル及び発現産物の安定性、外来性ウイルス、マイコプラズマ、特定のスプライシング型、及び無菌性に関する最終製品のデータの同等性を示すことも必要である。

製品特性は変化するが、品質レベルでの比較を実施すれば、製品の変更はベクターの安全性や有効性プロファイルに影響を及ぼさないと結論付けること

が可能と考えられる。したがって、当初のベクターと改良されたベクターを用いて得られた安全性パッケージのブリッジングのための追加の非臨床試験は要求されない可能性がある。

この原則は、一過性のトランスフェクションによるレトロウイルスベクター製造方法にも応用できると考えられる。

2) キメラ型非ヒトアデノウイルスベクターにおけるE4の変更

遺伝子治療に用いられるアデノウイルスベクターは、多くの場合ヒトアデノウイルスをベースとしている。ヒトアデノウイルスに対する中和抗体は、ヒトへの通常のアデノウイルス感染により一般に高い比率で存在する。このため、ヒトアデノウイルスをベースとする遺伝子治療ベクターの有効性が失われることがある。この問題を克服するため、中和抗体が存在する可能性が低い、ヒトに感染しないアデノウイルスをベースとするベクターの開発が行われている。この場合、非ヒトアデノウイルスベクターに対する既存の免疫応答がないため、ヒトアデノウイルスベクターと比べて有効性及び安全性プロファイルの改善が期待される。しかし、血清学的に異なるアデノウイルスベクターの開発では、十分な高力価のベクターを増幅可能な相補的パッケージング細胞株を樹立する必要がある。これを解決するにはキメラ型アデノウイルスベクターの開発が可能である。

E1領域欠損非ヒトアデノウイルスベクターの増幅には、ヒトアデノウイルス5型のE1タンパク質を恒常的に発現するヒトパッケージング細胞株が使用できる。非ヒトアデノウイルスベクターの生産性は、E4領域のopen reading frame（ORF）3及び4をヒトのE4変異体に交換することでさらに改善が可能であることが示唆されている。

ベクターの収量を改善するために、臨床開発途中でベクター中の非ヒトアデノウイルスのE4 ORFをヒトE4 ORFに置換する場合、2種類のベクターコンストラクトを比較するには広範囲の試験が必要となる。2種類のアデノウイルスベクターロットについて、同一性、純度、培養細胞での力価及びin vivo力

価の観点で同等性評価がおこなわれることになる。しかし、品質特性についてこのような試験を実施しても、(i) アデノウイルスベクターそのものの免疫原性プロファイルや、(ii) 導入遺伝子の発現カスケード及びその結果としての免疫学的事象に関する構造変化の影響を検討することはできない。したがって、新規ベクターを用いて臨床試験を繰り返さないためには、変更前のベクターと新規ベクターをブリッジングする非臨床データが重要になると考えられる。

非臨床ブリッジング試験は製剤の安全性と有効性から構成され、当初のベクターに対する改良型ベクターの*in vivo*での免疫学的力価を評価する。さらに、薬物動態、生体内分布及び反復投与毒性を含む非臨床試験が必要と考えられる。

ベクターは非増殖性であっても、相補的な野生型アデノウイルスの存在下で*in vivo*複製が生じる可能性がある点にも注意が必要である。相補的な野生型アデノウイルスは患者には存在する可能性があるが、非臨床試験で使用する動物には存在しない。したがって、非臨床試験で相補的複製のリスクに対処する必要はないと考えられるが、臨床試験を実施する際はこの点を考慮に入れるべきである。さらに、非臨床試験によく用いられる動物モデルと患者とでは、アデノウイルス受容体の特性、局在及び発現レベルが異なる。このような宿主に依存する側面が薬物動態や生体内分布に影響を及ぼすことがある。したがって、非臨床のブリッジング試験結果の予測値を評価する際には慎重な取り組みが必要であり、「ヒト化ベクター」を用いる臨床試験を反復する必要性は、選択した動物モデルを臨床と比較したときの予測可能性に依存すると考えられる。

3) プラスミドベクターの選択マーカーの変更

プラスミドベクターに組み込まれた抗生物質耐性選択マーカーの使用は、標的 patient 集団の治療に有害な影響を及ぼすおそれがあるため、可能な限り回避すべきである。しかし、抗生物質耐性遺伝子が必要な場合は、医療現場で使用されていない抗生物質に対する耐性遺伝子を用いることが望ましい。このた

め、プラスミドベクターの設計や構築で最初に使用したアンピシリン耐性選択マーカーは、初めてヒトに投与するまでに変更しなければならない可能性がある。

このような設計の変更では、製品の分子特性が変化する可能性がある。目的の製品の本質的な特徴をみると、選択マーカーの変更前後でヒト細胞での発現レベルが同等の場合、変更前の選択遺伝子を保有するプラスミドDNAを用いて実施した動物実験（薬力学試験など）の大半は、反復の必要がないと考えられる。しかし、新たに導入したマーカー遺伝子がDNAの染色体への組込みに影響を及ぼす可能性があるため、塩基配列解析などの情報から染色体への組込みが起こらないことが裏付けられない限り、染色体組込試験を考慮する必要があると考えられる。

4) カプセル化遺伝子導入細胞でのプロモーターの変更

半透膜のカプセルに遺伝子導入細胞を入れると、細胞を外来の環境から絶縁する機能が得られ、これにより、細胞の免疫拒絶や移動のリスクは回避されるが、治療用タンパク質は遺伝子導入細胞から分泌され、カプセル膜を通過して、標的組織に影響を及ぼすことが可能である。

治療用タンパク質の発現を増加させるため、導入遺伝子のプロモーターやエンハンサーを製品開発中に変更したり、細胞の生存率や寿命を改善するため、カプセルマトリクスを変更することが考えられる。有効成分は治療用の目的タンパク質をコードする発現カセットが安定的に導入されたクローン化細胞であるため、新規のマスターセルバンクが作製されることになる。

このような場合、治療用タンパク質の分泌レベルが向上しても製品特性は変化しないことを立証するには、全ての毒性試験が必要となる。

新規のカプセルマトリクスで細胞の生存率が向上することを考慮すると、分泌されるタンパク質に対する標的組織の曝露期間が旧製品と比べて延長される可能性がある点についても、毒性試験において検討が必要である。

2つのマスターセルバンク間で不純物プロファイルに差が生じることも予測されるが、物理化学的手法や生物学的手法での評価は困難であり、毒性試験により検討する必要があると思われる。

カプセル化した遺伝子導入細胞で新たな生体内分布試験を実施する必要はないと考えられるが、カプセルマトリクスの完全性(細胞封じ込め能力を含む)と互換性は、関連する細胞株を用いて立証する必要があると考えられる。

5) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの血清型の変更

これまでAAVベクターを用いた臨床試験では、ほとんどの場合2型のAAVが使用されていた。しかし、現在では他の血清型が前臨床試験で評価されており、複数の製品が臨床試験に入っている。

AAVベクターの重要な問題として、AAVカプシドの組織特異性と免疫原性が挙げられる。既知の血清型はいずれも、多様な組織由来の細胞に感染可能であり、標的組織に特異的にAAVベクターを感染させることが目的の場合、これが重要な課題となる可能性があり、製品の安全性と有効性をともに損なうおそれがある。AAV製品の開発においてAAVカプシドの免疫原性、特にAAV2型については別の重要な問題となる。多くの試験によりAAVは血清型が異なると組織指向性が異なることが示唆されており、8型は肝臓への指向性が高く、1型、6型、7型は骨格筋に対する感染性が高いこと、また1型と2型のハイブリッドは2型より免疫原性が低いことなどが示されている。したがって、組織や細胞へのターゲティング能を改善し、安全性や有効性プロファイルを改善するため、開発途中でAAVの血清型を変更することは妥当である。実際、血友病B治療用AAVは2型から2/8型に、嚢胞性線維症治療用AAVは2型から6型に、筋ジストロフィー治療用AAVは2型から2/5型に変更されている。血清型の変更はベクターの遺伝子導入効率に望ましい影響をもたらす、免疫関連疾患のリスクを減少させる可能性がある。

一方、ベクターカプシドの血清型の変更は、製品の遺伝的特性や品質特性の部分的な変化、製造工程

の大幅な変化、組織指向性や生体内分布、免疫原性などの安全性の大きな変化(改善)、及び薬理/力価の若干の変化(向上)をもたらす可能性がある。従って、品質データはフルパッケージが必要となり、また変更した血清型での増殖性ウイルス(RCV)産生のリスク評価やRCVを検出するための適切なアッセイも必要と考えられる。生体内分布や免疫原性反応(該当する場合)についても、新規血清型ベクターを用いた完全な非臨床評価が必要となる。生体内分布試験の結果に基づいて、毒性試験は製品の免疫原性と免疫毒性に焦点を当て、簡略化した薬理学的データパッケージとブリッジングデータがあれば十分と考えられる。

6) 単一遺伝子疾患におけるレトロウイルスベクターから自己不活化型レトロウイルスベクターへの変更

単一遺伝子疾患における遺伝子治療では、治療用遺伝子をヒト体細胞の染色体に組み込むことが可能なレトロウイルスベクターが用いられ、造血幹細胞への遺伝子導入にはマウス白血病ウイルス(MLV)に由来する非増殖性レトロウイルスベクターがよく用いられている。重症免疫不全症に対するMLV由来ベクターを用いた遺伝子治療では、有効性の持続が確認されている一方で、一部の患者で治療後に白血病が発症し、遺伝子治療用製品による予期せぬ重篤な副作用とみなされている。詳細な解析の結果、ベクターは既知のプロトオンコジーン近傍又は内部に挿入されて遺伝子を活性化し、悪性形質転換及び遺伝的に異常な細胞増殖をもたらしたことが判明している。MLVベクターの染色体組込みにより、MLVベクターの5'末端反復配列(LTR)内にある強力なプロモーター/エンハンサーが隣接する遺伝子の調節解除を誘発し、プロトオンコジーンの過剰発現に至ったと考えられている。

このような挿入変異の影響を最小限にするための方法の一つは、MLVベクターの設計を変更し、ウイルス由来の強力なプロモーター/エンハンサーを除去して自己不活化型(self-inactivating; SIN) LTRとすることである。ウイルスのプロモーター/エンハ

ンサーは、治療用遺伝子の転写のための、より弱い内部プロモーター／エンハンサーにより置換される。

このような変更を導入する場合は以下の点を考慮することが必要と考えられる。

- ① 再設計したMLV-SINベクター等によるヒト造血幹細胞への*in vitro*遺伝子導入と遺伝子導入後の治療用タンパク質の発現量の同等性を検討すること。再設計したベクターはほとんどの場合転写活性が異なる。
- ② SINベクターは挿入変異を誘発する傾向が低いという仮説を実験的に検証すること。挿入変異を*in vitro*モデルのみで評価しても、挿入発癌の真のリスクを適切に検討することはできない。現在、挿入変異リスクを予測できることが立証された動物モデルはないが、がん化傾向のある動物モデルは挿入変異に対する感受性が示されている。このような動物は同一の導入遺伝子を搭載したMLVベクターとMLV-SINベクターでの挿入変異リスクの比較に有用と考えられる。挿入変異発生率の低減を示唆するデータが多く得られれば、異なるベクターでの挿入変異率を比較するプラットフォーム試験によって、再設計したSINレトロウイルスベクターの使用を十分にサポートできると考えられる。
- ③ 再設計したMLV-SINベクターでも作用機序や疾患の改善に違いはないことを、適切な動物モデルや関連する*in vitro*モデルを用いた非臨床試験により証明すること。
- ④ 可能であれば、非臨床試験での細胞への遺伝子導入量（細胞あたりのベクターコピー数）は、予想される最悪のシナリオでのベクターの安全性リスクを評価するため、臨床で予測される遺伝子導入量を上回ることが必要である。

再設計したレトロウイルスベクターの特性解析と品質特性は、ICH-Q5Eの一般原則に従い、ベクタータイター、不純物プロファイル、遺伝子導入効率、細胞あたりのコピー数及び遺伝子導入細胞中のベクター粒子の力価の観点で、旧ベクターとの同等性が立証されることが望ましい。

D. 考察

D.1 次世代シークエンサーを用いたウイルスベクターの品質評価法

製造法の異なる2種類のレトロウイルスベクター、stable cell line由来と一過性のトランスフェクション由来のベクターについて、キャピラリーシークエンサーと次世代シークエンサーを用いてゲノム配列解析を行った結果、stable cell lineからは一定の配列のベクターが常に得られるが、一過性発現で製造するウイルスベクターはロット間で大きく品質が異なる可能性が明らかになった。キャピラリーシークエンサーにより一回に解読できる塩基は長くても700bp程度であり、ウイルスベクターの全長を解析することは困難であることから、解析対象をウイルスベクター中の目的遺伝子領域のみのおよそ1800bp程度について解析を行ったが、目的遺伝子の領域だけでも両者において大きな品質の差が見られたことから、ウイルスベクター全体では相当の差が生じているものと考えられる。この原因のひとつとして、トランスフェクションに用いたプラスミドの純度が影響している可能性が考えられるが、今回はそこまでの検討ができなかったため、今後、ウイルスベクターに混入するプラスミドの影響も含めて検討が必要と考えている。

また今回、残念ながら一過性のトランスフェクションで作製したベクターの配列は次世代シークエンサーを用いて十分なカバレッジが得られず解析することができなかった。次世代シークエンサーは大量のデータを読むことが可能なことから、複数の異なるベクター配列が混入していても同時に解析できることを期待したが、測定は容易ではないことが判明した。ウイルスベクターの全塩基配列と、混入する可能性のある変異ウイルスの解析には、次世代シークエンサー用の試料調製を始め、様々な条件検討を行うことが必要となる可能性がある。また、今回の解析ではキャピラリーシークエンサーで分析したサンプルと同一サンプルを解析することが出来ず両者の直接の相関性を示すことはできないが、今後は同じRNAサンプルについて両シークエンサーにより解析し、これらの結果の相関性について評価する必

要があると思われる。

遺伝子治療に用いるレトロウイルスベクターは、通常、ベクタープラスミドをパッケージング細胞にトランスフェクション後、ベクターを高発現するベクター産生細胞をクローニングしてstable cell lineを樹立し、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクを作製して産生する。一方、レンチウイルスベクターやAAVベクターではstable cell lineの樹立が難しく、プラスミドのトランスフェクションによりウイルスベクターを製造するが多い。今後、レンチウイルスベクターやAAVベクターを用いて同様の検討を行い、今回レトロウイルスベクターで認められたようにトランスフェクションの度にベクターゲノムの品質が異なるのかどうか確認する必要があるが、トランスフェクション法で作製するベクターでは、品質評価として塩基配列解析が必要になることが考えられる。

また、今回の次世代シーケンサー解析よりstableなウイルスベクター産生細胞から得られたウイルス粒子のRNAを解析可能であることが示唆され、元のベクタープラスミドの配列との相違を評価することができた。なお、今回不一致が確認された領域は、ウイルスベクターの機能や目的遺伝子の発現には問題にならない領域と判断されたが、今後、このような解析データを蓄積することにより、ウイルスベクターで変異が起りやすいホットスポットなどが明らかになることが期待される。

D.2 遺伝子治療製品の変更時の考え方について

EMAのリフレクションペーパーは、臨床開発の途中で遺伝子治療製品を変更する際に考慮すべき事項について、プラスミドベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、AAVベクター、遺伝子導入細胞のそれぞれの具体例を挙げて説明している。このような、遺伝子治療用製品の開発中に製品設計に大きな改良を加えることは実際に行われているが、規制上の問題としては、導入した変更に伴い必要となる追加の非臨床試験の範囲、使用する非臨床モデルの適用、及び臨床試験開始前までに新規の製品設計とのブリッジングをサポートする追加

の非臨床データの必要性などが挙げられる。今後作成を予定しているリフレクションペーパーでは、上記以外の例を含め、ベクターの変更や製法変更に際して考慮すべき事項を明らかにし、旧ベクターや旧製法で得られたデータを利用する場合にどのような解析を行っておくべきかについて言及する予定である。以下に取り上げるべき項目について検討した。

1) 適用範囲

遺伝子治療用製品の製法開発に伴う変更や製法の変更に際する対応として、遺伝子発現構成体の変更、製造細胞の変更、ベクター製造方法の変更等を行った場合に、既に得られている非臨床データや生物活性データ、生体内分布データを再度取得する必要がある場合と、旧ベクターや旧製法によって製造したベクターで得られたデータを変更後の新ベクターの安全性やPOCのデータとして使用できる場合の考え方を整理する。

どのような変更が想定されるかについては、プロモーターやエンハンサーの変更、より強力なプロモーターに変更する場合や特定の細胞のみで発現するプロモーターへの変更などが挙げられる。また、プロモーターの配列の変更や目的遺伝子をヒト細胞で発現しやすくするためのコドンの最適化、薬剤耐性マーカーの変更や削除、さらにはインターフェロン産生を低減化するためのベクター配列の変更も考えられる。

一方でICH-Q5Eのように製法そのものを変更した場合も適用できるかを考慮する必要がある。

2) 現状の問題点及び課題

ベクターを変更しても、細胞・組織指向性や発現量等が変わらなければ、生物活性や安全性にほとんど影響しない可能性もあるが、発現量が大きく変動したり、細胞指向性が変化した場合には、安全性データや有効性を示唆するデータを再度取得する必要があると考えられる。その場合でもすべてのデータを再取得すべきか、変更前のベクターで得られたデータを用いることができる可能性がないかの検討が必要である。

選択マーカを変更する、あるいは欠失させる変更を行う場合や、目的遺伝子の発現量は変わらないが、より安全性の高いプロモーターやターミネーターに変更する場合、さらには目的タンパク質の一次構造は変更しないが、コドンの最適化を行う場合などでは、旧製品で得られた安全性データや有効性を示唆するデータを用いることが可能な場合もあると考えられる。

一方、培養条件や精製法等の製法変更の場合は、例えば培養スケールの変更であってもベクターそのものの特性に影響を与えたり、不純物の内容が変化することもある。どのような特性解析データの比較をすれば、旧製法と新製法の製品を同等とみなすことができるかについて整理する必要がある。具体的には、以下のような内容について整理する予定である。

(1) 設計の変更

- ① プロモーター／エンハンサーの変更（目的遺伝子の発現量の増強や特定の細胞での発現）
- ② VSVやRGDなど細胞指向性の変更
- ③ コドンの最適化
- ④ 遺伝子構成体への変異の挿入
- ⑤ インターフェロン等の特定遺伝子の活性化能の変更

(2) 製法の変更

- ① ウイルスベクター製造のための手法の変更（プラスミド、バキュロウイルスetc）
- ② 生産細胞の変更（RCAの低減化など）
- ③ 血清の有無などの培養条件の変更

E. 結論

エンベロープタンパク質の安定発現生産株を用いて製造したベクターは品質の一定性が確認され、特に次世代シーケンサーによる全塩基配列解析で十分なカバレッジを持って配列を確認でき、配列に変異が生じた場合でも高い確度で検出可能である。一方、一過性のトランスフェクションで製造したベクターは品質の一定性を確認することが難しく、塩基配列解析でも十分なカバレッジでの評価が困難であった。また、遺伝子治療用製品の開発途中の製法や

設計変更時にどの程度のデータを収集すれば良いかについて考え方をまとめた。

これを基に、遺伝子治療製品の製法や設計変更時の考え方に関するリフレクションペーパーを作成する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山口照英、内田恵理子：遺伝子治療の開発に関する我が国の規制と海外動向、Pharma Medica（印刷中）
- 2) 内田恵理子、五十嵐友香、佐藤陽治：遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発促進のためのレギュラトリーサイエンス共同研究、衛研報告 132, 10-12（2014）

2. 学会発表

- 1) Eriko Uchida : Current situation of advanced therapy regulation in the world, 第20回日本遺伝子治療学会学術集会（2014.8）（東京）
- 2) Eriko Uchida, Yuka Igarashi, Yoji Sato, Masafumi Onodera, Teruhide Yamaguchi : Study on the biosafety of ex vivo transduced cells with retroviral vectors and Cartagena protocol domestic law, 第20回日本遺伝子治療学会学術集会（2014.8）（東京）
- 3) Yuka Igarashi, Eriko Uchida, Masafumi Onodera: Quality control for the supernatants of retroviral vectors using a next-generation DNA sequencer, 第20回日本遺伝子治療学会学術集会（2014.8）（東京）
- 4) 山口照英、内田恵理子、小野寺雅史：遺伝子治療製品の品質/安全性確保のための指針改定と国際調和、IMSUT-CGCTキックオフシンポジウム2014,（2014.11）（東京）
- 5) 内田恵理子：遺伝子治療用製品指針改定の取り組みー品質及び安全性の確保と遺伝子治療製品の開発促進のために、第5回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム（2015.1）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

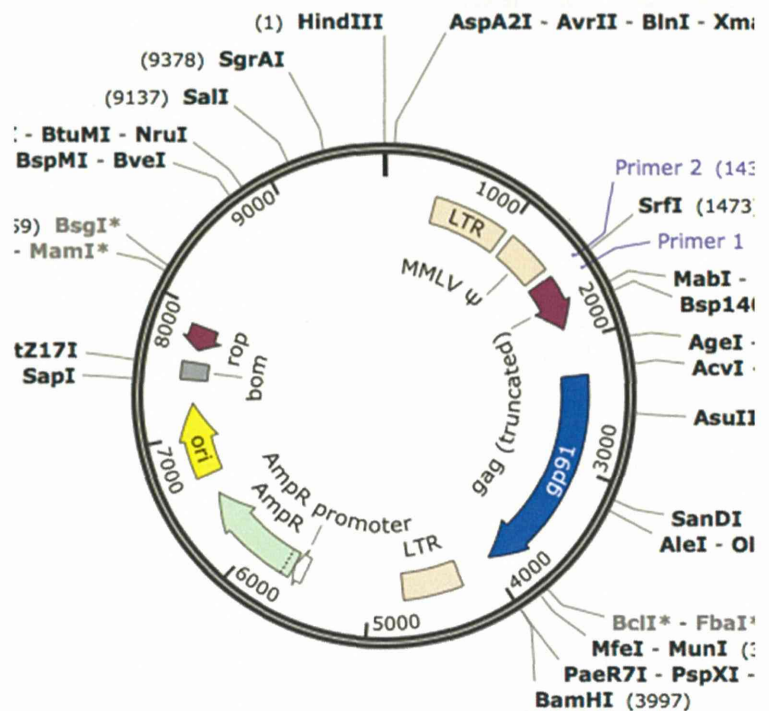


Fig.1 gp91phox発現レトロウイルスベクタープラスミドの構造

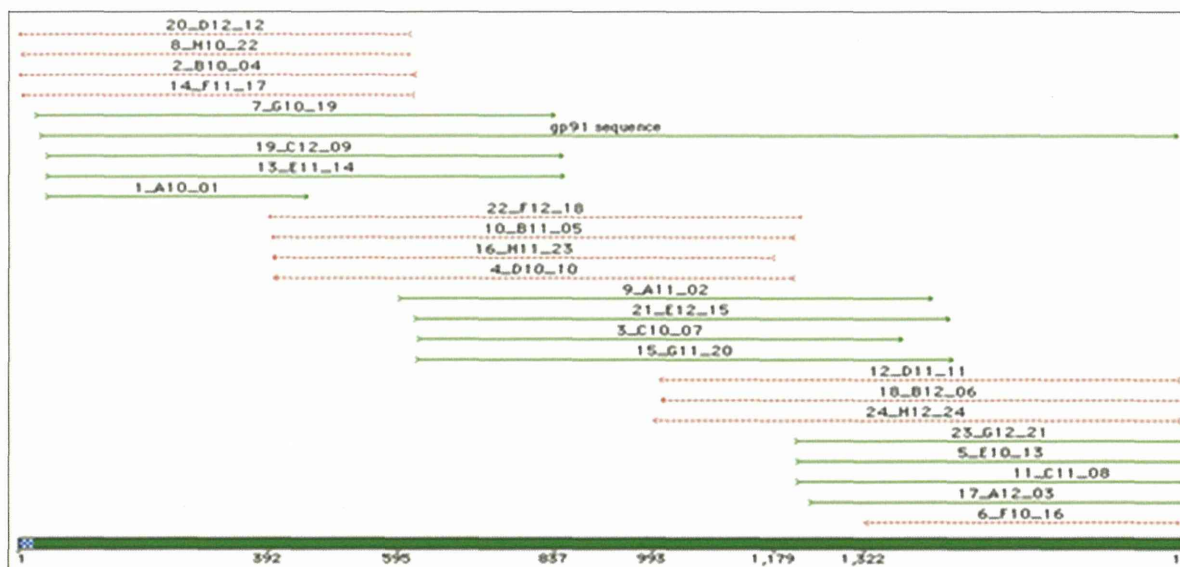


Fig.2 Stable cell line由来gp91phox発現レトロウイルスベクターのABI3500xl Genetic Analyzerによる塩基配列解析

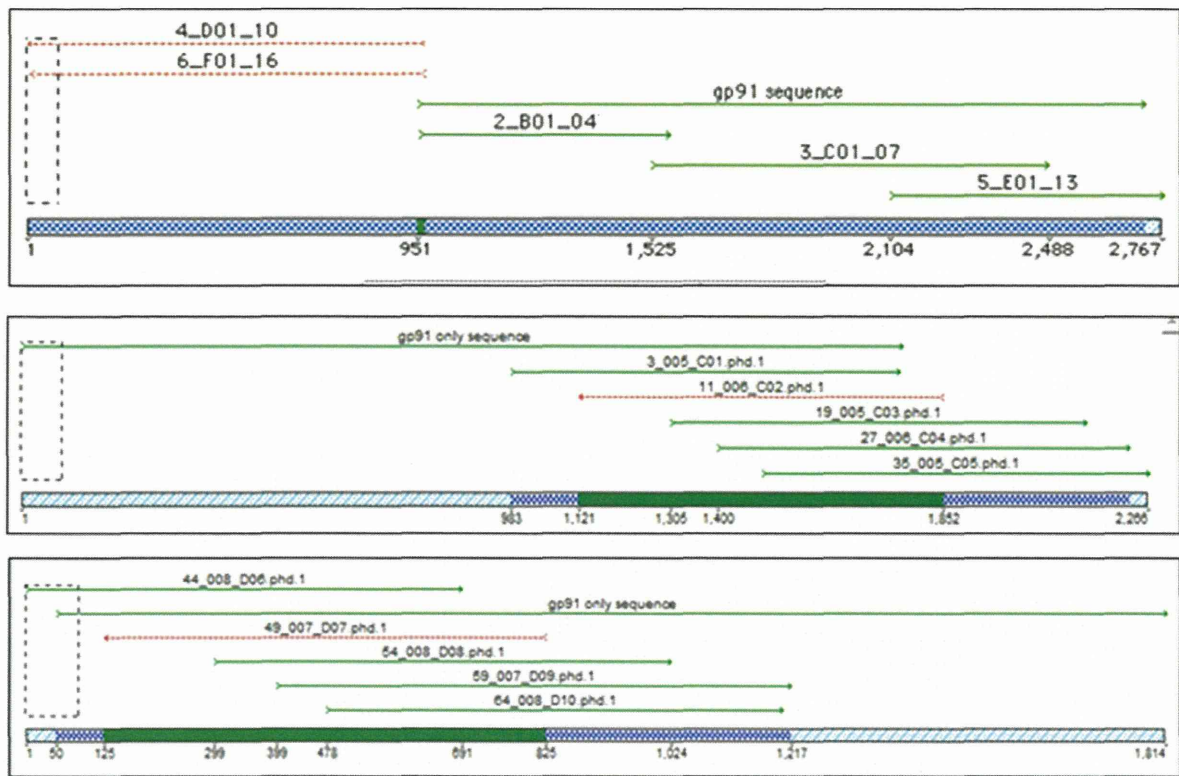


Fig.3 プラスミドの一過性トランスフェクション法により調製したgp91phox発現レトロウイルスベクターのABI3500xlGenetic Analyzerによる塩基配列解析例

Table 1 キャピラリーシーケンサーABI3500xlGenetic Analyzerによるレトロウイルスベクターのゲノム配列と元のウイルスベクタープラスミドの塩基配列との一致率

sample	concordance rate	comments
(SPA sup) stable-1	>90%	non cloning
(SPA sup) stable-2	>90%	non cloning
(SPA sup) stable-3	>90%	non cloning
Transfection (Transient) -1	<50%	non cloning
Transfection (Transient) -2	<10%	non cloning
Transfection (Transient) -3	<1%	TA-cloning
Transfection (Transient) -4	<1%	
Transfection (Transient) -5	>90%	
Transfection (Transient) -6	>90%	
Transfection (Transient) -7	>80%	non cloning

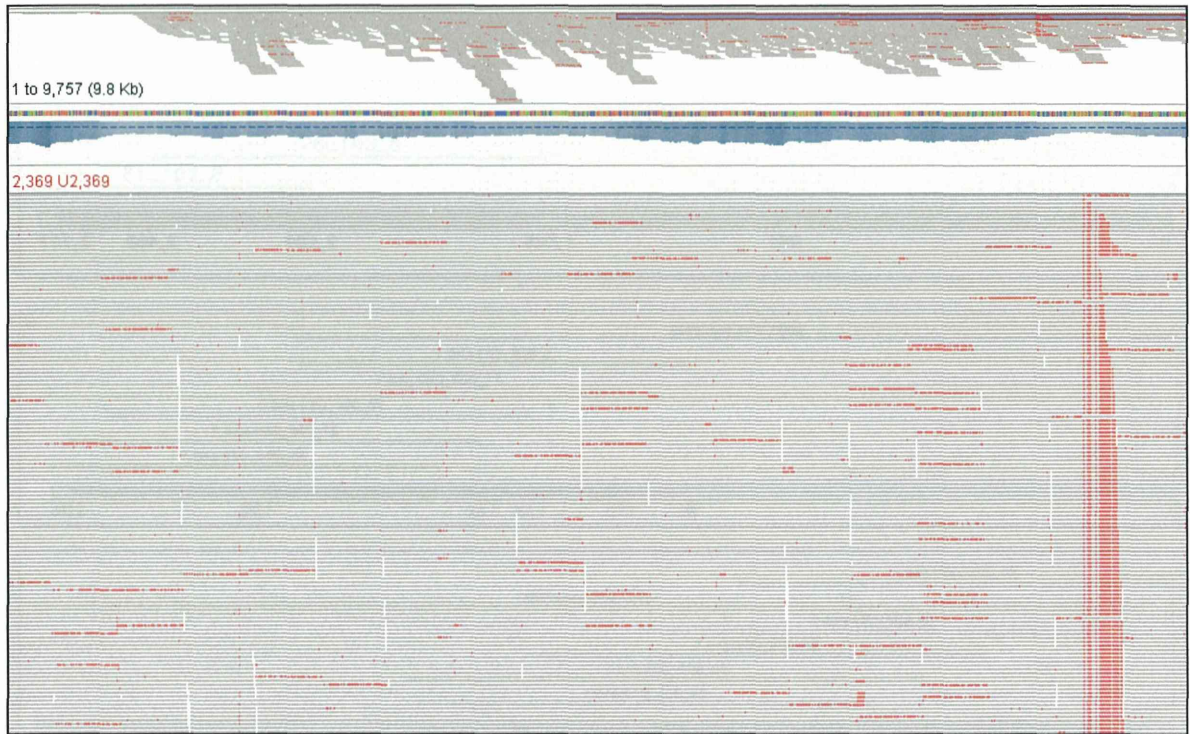


Fig.4 ベクター産生細胞由来gp91phox発現レトロウイルスベクターの
Illumina Hiseq 2000による塩基配列解析



Fig.5 プラスミドの一過性トランスフェクション法により調製したgp91phox発現
レトロウイルスベクターのIllumina Hiseq 2000による塩基配列解析例