

## 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について

(平成10年1月6日 医薬審第3号  
各都道府県衛生主管部(局)長あて 厚生省医薬安全局審査管理課長通知)

近年、優れた新医薬品の地球的規模での研究開発の促進と、患者への迅速な提供を図るため、承認審査資料の国際的ハーモナイゼーション推進の必要性が指摘されている。

このような要請に応えるため、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)が組織され、品質、安全性及び有効性の3分野でハーモナイゼーションの促進を図るための活動が行われている。

本ガイドラインは、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について、ICHにおける三極の合意事項に基づき、その標準的と思われる方法を示したものである。

貴管下関係業者に対し周知方よろしくご配慮願いたい。

### 別紙

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

#### 1 はじめに

本文書は、真核細胞及び原核細胞で組換え DNA 技術を応用してタンパク質を生産する際の遺伝子発現構成体の解析に関する指針を示したものである。本文書の目的は、組換え DNA 技術応用タンパク質(以下、組換えタンパク質と略す)の生産に用いる遺伝子発現構成体の構造面での評価にどのような情報が有用であるかについて述べることにあり、組換え DNA 技術応用医薬品(以下、組換え医薬品と略す)の品質確保に関連する問題のすべてを網羅することを意図したものではない。

遺伝子発現構成体とは、組換えタンパク質をコードする配列を含む発現ベクターのことである。組換え医薬品の品質とその恒常性の確保を図るためには、精製後の組換えタンパク質に対する各種試験に併せて、遺伝子発現構成体のしかるべき部分を核酸分析技術を用いて解析することが必要である。この核酸レベルでの遺伝子発現構成体の解析については、あくまで組換え遺伝子のコード配列に関して評価するものであって、翻訳段階での正確さや、二次構造、三次構造あるいは翻訳後修飾といった組換えタンパク質の特性を評価するものではないことをふまえた上で、品質に関する総合的な評価の一環をなすものであると捉える必要がある。

#### 2 遺伝子発現構成体解析の必要性、妥当性及びあり方

遺伝子発現構成体の解析の目的は、宿主細胞に導入された目的産物をコードする遺伝子の塩基配列が正しいことを立証すること及びこの塩基配列が医薬品製造条件下で製造終了時まで安定に維持されていることを立証することにある。生きた細胞中では、組換えタンパク質の遺伝子配列が変異を起こし、これがタンパク質の特性を変化させ、ひいては患者にとって安全性上問題になるような事態につながる可能性がある。タンパク質にはいろいろな修飾や変化が起こりうるが、そのすべてをある単独の実験手法だけで検出するということはできない。タンパク質のアミノ酸配列を決定したり、遺伝子発現タンパク質がプロテアーゼによるプロセッシング、糖鎖の付加、リン酸化、アセチル化などのいわゆる翻訳後修飾を受けた後に示す構造的特徴を解析、評価する場合には、タンパク質に対する各種分析法が有用である。しかし、タンパク質に対する解析手段が組換えタンパク質をコードする塩基配列の変異によるタンパク質の構造変化のすべてを検出できるとは限らず、むしろ核酸分析のデータが活用できる場合もある。タンパク質分析と核酸分析のいずれが相対的により重要であるかは、対象となる目的産物毎に異なる。

核酸分析は遺伝子発現構成体のコード配列や物理的状态を解析、検証するのに用いられる。ここでの核酸分析は発現タンパク質が正しいアミノ酸配列を有するであろうことを保証する目的で実施されるのであって、塩基配列の低レベルでの変異を検出することは目的としていない。遺伝子発現構成体のコピーが複数組み込まれている生産細胞にあっては、それらのコピーすべてが必ずしも転写されるとは限らない。このような場合には、ゲノム DNA を分析するよりも mRNA あるいは cDNA の分析による転写産物そのものの試験を行う方がより適切である。分析方法としては、個々の DNA クローンを選択して分析する方法があるが、別に、クローンをプールしたものあるいはポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)で増幅して得た試料のような大多数の DNA を代表するものを対象に分析するという方策も考えられる。その他、遺伝子発現構成体中の組換えタンパク質をコードする塩基配列を確認するのに迅速で検出感度の高い方法があれば、これを利用することも考えられる。

組換え医薬品生産系の開発段階及びバリデーション段階で遺伝子発現構成体の解析に関して具体的にどのようなデータの提出が必要かという点については、次項より順次述べるが、用いられる分析方法は、配列の確認という目的に合うものであることが検証されている必要がある。その検証結果を記載した提出資料には、少な

くとも変異配列の検出限界に関するデータが含まれている必要がある。これは、核酸の配列分析法あるいはタンパク質の配列分析法のいずれかで実施しておく必要がある。なお、今後の技術革新や新たな科学情報を取り入れ活用していくため、本文書で示されている遺伝子発現構成体の解析をめぐる基本的考え方や勧告は、定期的に見直していく必要がある。

### 3 遺伝子発現系の解析

#### 3 .A . 遺伝子発現構成体及びマスター・セル・バンクの出発素材としてのクローン細胞

まず、目的タンパク質をコードする塩基配列の起源を明らかにする必要がある。これには、当該塩基配列をどのような種類や起源の細胞から得たのか、また目的タンパク質をコードする DNA をどのような方法で作成したかなどに関する情報が含まれる必要がある。

次に、遺伝子発現構成体を構築する手順の詳細が明かにされる必要がある。これには、遺伝子発現構成体の要素である例えば、複製開始点、抗生物質耐性遺伝子、プロモーター、エンハンサーなどの由来と機能や、目的タンパク質を融合タンパク質として発現させるか否かなどに関する記述が含まれるべきである。

また、(遺伝子発現構成体である)プラスミドに含まれる各種要素に関する詳細なマップ及びプラスミドの全塩基配列を示す必要がある。その際、プラスミド構築中に配列分析した領域と、配列に関する情報を文献上から得た領域とを明らかにしておく。プラスミドに目的タンパク質以外のタンパク質発現に係わるコードがある場合にはその旨を記載する必要がある。ベクターに挿入された目的タンパク質をコードする領域及びそのフランキング領域の塩基配列については、挿入のための連結部位を含め、遺伝子発現構成体を対象とした DNA 配列分析により決定する必要がある。

また、遺伝子発現構成体を宿主細胞に入れる方法を示す必要がある。さらに、遺伝子発現構成体を増幅する方法や、医薬品生産の素材となるクローン細胞株の選択に用いた評価基準について詳細を明らかにする必要がある。

#### 3 .B . セル・バンク・システム

組換えタンパク質の生産は、特定のマスター・セル・バンク(MCB)及びワーキング・セル・バンク(WCB)を基盤とする必要がある。セル・バンクとは、単一の細胞プールから分注された細胞を均質に含む複数のアンプルをまとめて一定の条件下で保存したものである。MCB は、通常、遺伝子発現構成体を含む、選択されたクローン細胞株から調製する。WCB は一本もしくはそれ以上の MCB アンプルから細胞を増殖させ調製する。当該細胞株の起源や由来、セル・バンクの調製経緯や調製法については、細胞の培養方法、培養に用いた試薬類、イン・ビトロ細胞齢、保存条件などを含め、詳細を明らかにする必要がある。また、セル・バンクすべてについて、表現型と遺伝子型にかかわる適切な指標をもとに特性が明らかにされている必要がある。組換えタンパク質の発現や遺伝子発現構成体の存在もこうした指標にあたる。

MCB 中の遺伝子発現構成体については以下に述べるような解析を行う必要がある。MCB での解析がなんらかの理由で不可能なときは、WCB での検討がなされることになるが、この場合には、WCB 作成毎に試験を実施する必要がある。

遺伝子発現構成体のコピー数、挿入と欠失、組み込み部位の数については、制限酵素マップその他の適切な方法を用いて解析する必要がある。また、染色体外発現系の場合には、遺伝子発現構成体を保持する細胞の割合(%)を測定しておく必要がある。

また、遺伝子発現構成体中の目的組換えタンパク質をコードする部分の塩基配列が正しいことを立証しておく必要がある。染色体外発現系の場合には、遺伝子発現構成体を単離後、再クローニングしないで目的タンパク質をコードする部分の塩基配列の妥当性を立証すべきである。目的タンパク質をコードする部分が染色体に組み込まれたものは、当該部分を再クローニングしたのち配列分析を行うことで妥当性を立証すればよいが、cDNA クローンをプールしたものや PCR で増幅して得た試料について配列分析し、評価するという方法も考えられる。これらの試験により解析された目的タンパク質をコードする塩基配列は、分析法の検出限度内で当初構築した遺伝子発現構成体中の塩基配列(3 A 項参照)と同一であり、かつ目的タンパク質のアミノ酸配列に対応したものである必要がある。

#### 3 .C . 医薬品製造のためのイン・ビトロ細胞齢の上限

医薬品製造のためのイン・ビトロ細胞齢の上限は、パイロットプラントスケールあるいは実生産スケールで、医薬品製造条件として提案されたイン・ビトロ細胞齢まで、あるいはそれ以上に増殖させた製造用細胞から得られたデータに基づいて決定される必要がある。この製造用細胞は一般的には WCB から増殖されるが、適切な理由がある場合は MCB から増殖させた細胞を用いてもよい。

上記のイン・ビトロ細胞齢の上限レベルでの製造用細胞の遺伝子発現構成体の解析は、MCB に対して 1 度だけ実施すればよい。その解析の実施内容は、3 B 項で述べた MCB に対する試験と同様のものとする。ただし、遺伝子発現構成体中の目的タンパク質をコードする部分の配列分析に関しては、核酸分析の手法によってもよいし、最終的に得たタンパク質製品を対象とする分析によってもよい。医薬品製造のためのイン・ビト

口細胞齢の上限を増加させたい場合は、新たな上限とするイン・ビトロ細胞齢と同じかそれ以上のイン・ビトロ細胞齢にまで増殖させた細胞から得られたデータに基づき、その妥当性を立証する必要がある。

#### 4 結論

組換え DNA 応用医薬品の生産の恒常性を図るには、遺伝子発現構成体と最終精製タンパク質の解析いずれもが重要である。これまで述べてきたように、核酸分析データと最終精製タンパク質の解析データの両方を組換えタンパク質医薬品の品質を確保する上での評価資料とすべきであると考えられる。

#### 5 用語集（あいうえお順）

##### 遺伝子発現構成体

組換えタンパク質をコードする配列及びその発現に必要な要素をコードする配列を含む発現ベクター

##### イン・ビトロ細胞齢

MCB アンプルの融解時より、製造容器から培養細胞（又は培養液）を収穫する時までの時間的尺度で、培養期間、細胞数倍加レベル(PDL)、または培養細胞液を一定の倍数で希釈して継代する場合の細胞継代数で示される。

##### 組み込み部位

1 コピーまたはそれ以上のコピー数の遺伝子発現構成体が組み込まれている宿主細胞のゲノム中の部位

##### パイロットプラントスケール

商業生産時のフルスケールでの製造を十分に反映し、シュミレートした、より小スケールでの組換えタンパク質の製造。細胞の増殖、収穫及び目的産物の精製方法は、スケールを除き同一である必要がある。

##### 表現型と遺伝子型にかかわる適切な指標

細胞株の確認・同定を可能にする指標であり、これには組換えタンパク質の発現あるいは遺伝子発現構成体の存在などが含まれる。

##### フランキング領域

目的産物をコードする塩基配列の 5' 及び 3' 両末端に隣接する非コード配列領域で、コード配列の転写、翻訳、安定性に影響を及ぼす重要な要素を含む領域を示す。これらの領域には、プロモーター、エンハンサーやスプライシング配列などを含むが、複製開始点や抗生物質耐性遺伝子は含まない。

##### マスター・セル・バンク(MCB)

単一の細胞プールからの分注液で、一般的には、選択されたクローン細胞株から一定の方法で調製され、複数の容器（アンプル）に分注され、一定の条件下で保存される。MCB は WCB を調製するのに用いられる。新たに調製された MCB（前回用いたクローン細胞株、MCB または WCB から調製される）について実施される試験は、特に正当な理由がない限り元の MCB について実施された試験と同じである必要がある。

##### ワーキング・セル・バンク(WCB)

WCB は、MCB から一定の条件で培養して得られる均一な細胞懸濁液を分注して調製される。

英文ガイドライン 略（薬業時報社刊：ICH 関係通知集 98追補参照）