

療法において有望な増殖因子」の項で述べたように、VEGF あるいは FGF-2 のような血管新生促進因子と周皮細胞の強制動員を促進する Ang-1、PDGF-BB のような成熟促進因子を組み合わせて用いることである。壁細胞（周皮細胞）は過透過性を抑制するだけでなく、未成熟な血管を安定化させる。機能がお互いに効率よく補える増殖因子の組み合わせとして、Ang-1 と VEGF-A そして PDGF-BB と FGF-2 が考えられる。

一方、増殖因子の組み合わせると、治療戦略がより複雑になる。例えば、各因子の相対的な投与量、各因子の投与スケジュール、各因子のデリバリー方法などが問題点となり、これらを全て満たす治療戦略を設定することは必ずしも容易ではない。

#### (4) 他の増殖因子をアップレギュレートする因子を用いる

最近、インビボにおいてアデノウイルスベクターを用いて Hif1- $\alpha$  を過剰発現すると、血管新生増殖因子が多数アップレギュレートされることが示されている。増殖因子の作用は動物の種類により異なる場合があるので、ヒトへ適用する前に複数の動物種で試験する必要がある。これに関連し、内在性 Hif1- $\alpha$  の不活性化を阻害すると、虚血四肢における血管新生が促進される。このように、他の増殖因子をアップレギュレートできる因子を用いた戦略も有効かもしれない。

#### (5) 共通の経路を標的とする

増殖因子のシグナル伝達における共通の経路のなかで、NO の産生は治療の非常に有力な標的である。主に *in vitro* の知見から、VEGF、FGF、TGF- $\beta$  による血管新生促進効果において NO の関与が示唆されている。しかしながら、NOS 阻害剤、あるいは eNOS および iNOS ノックアウトマウスにおけるインビボの知見では、NO の関与について以下のように統一した結論が出ていない。最も説得力のある *in vivo* の知見は以下の Murohara らによる研究である。ウサギ虚血後肢モデルにおいて NO 産生促進因子である L-arginine を食事に加えて与えると、血管新生が促進された。また、マウスの虚血後肢モデルにおいて eNOS 欠損マウスでは野生型のマウスに比べ、血管新生は阻害された。対照的に血管新生の非外科的腸間膜ウインドーモデルで、NO 合成の阻害剤である L-NAME を与えると bFGF による血管新生が促進された。L-NAME を与えた野生型のマウスおよび eNOS および iNOS 欠損マウスを用いた、*in vivo* マトリゲルペレットモデルの結果では、NO は FGF-2 および VEGF-A による血管新生誘導に関与していないことが示されている。同様に、血管新生の腫瘍モデル、*in vivo* のマトリゲルモデルにおいて、NO を放出する NO ドナーである SNAP および SNAG を投与すると、FGF2 による血管新生の誘導が阻害された。これらの知見は、VEGF、FGF、Ang-1 を含む様々な増殖因子により誘導される血管新生において、NO がメ

ディエーターとして作用することを示す数々の報告と対照的である。従って、血管新生および動脈新生における NO の役割について、統一的な見解は得られておらず、NO ドナーあるいは NO 合成酵素阻害剤がそれぞれ血管新生を促進あるいは抑制するかどうかについては、臨床的に試験されていないというのが現状である。

#### (6) 持続的なデリバリーが可能な方法を用いてタンパク質を投与する

血管新生療法を効果的に行なううえにおいて、デリバリーの持続時間が重要な点である。血管新生促進因子のほとんどは内皮細胞の生存因子としても作用する。したがって、標的細胞における初期のアポトーシスを抑制するためには、単一増殖因子のデリバリーでは持続する必要があると考えられる。増殖因子を組み合わせた最近の研究では、血管新生の初期に血管の安定性が決定されることから、このような治療ではデリバリーは短期間のほうがよいことが示唆された。

一方、増殖因子を長時間デリバリーするために、各種のマトリックスが設計されている。PDGF-BB のデリバリーにセファロースヘパリンビーズを用いた場合、10 日間にわたり一次速度式に基づいた良好な放出が起こり、その結果、虚血心筋の流量および機能が改善した。さらに scaffold として poly(lactide-co-glycolide) を用いると、VEGF<sub>165</sub> と PDGF-BB が異なったキネティクスで効率よく同時にデリバリーされる。生体適合性があり放出が緩やかなポリマーをうまくステントの上にコートできれば、この領域は急速に進歩する可能性が高い。タンパク質のデリバリーを持続させる他の手段は、プラスミド、複製欠損アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスを用いた遺伝子治療である。持続的にデリバリーするため、タンパク質あるいは遺伝子治療のどちらを用いるかは、薬物動態、安全性、コストに基づいて最終的に決定することになる。

#### (7) タンパク質を標的部位に対して効率よくデリバリーする

これに関しては、主として FGF-2 の生体における分布について、多くの研究が行なわれた。その結果、FGF-2 を静脈内あるいは冠動脈内に投与すると、心筋内、末梢動脈障害の場合は筋肉そして心膜内へ選択的にデリバリーされた。虚血領域に対して FGF-2 を心筋内投与した場合、局所における濃度は特に高かった。デリバリーは虚血ゾーン、境界ゾーン、流域に対して行なう必要があると考えられるが、効力を比較した研究はほとんどない。多くの虚血後肢の研究から示されているように、理想的なデリバリーとしては、持続的な動脈内デリバリーが優れているように思われる。しかし、このデリバリーは冠状動脈系では技術的に困難である。他のデリバリー法として、冠状静脈内への逆投与がある。この技術は、FGF-2 の単回投与では成功しているが、

最終的な実現可能性および効果は、臨床試験の結果を待たなければ判断できない。

#### (8) 増殖因子を遺伝子導入した細胞および増殖因子によりプライミングを行なった細胞を用いる

骨髄由来幹細胞は虚血組織における血管新生へ寄与する。多能性造血幹細胞は、血管新生のプロセスに関与する内皮細胞に分化できる。C.3.5 血管新生療法において有望な増殖因子の項に述べたように、幹細胞から内皮細胞への分化は、様々な増殖因子により調節される。したがって、骨髄由来幹細胞を移植前にこれら増殖因子でプライミングを行なうことにより内皮細胞への分化がより促進される可能性がある。これに関連し、移植された筋細胞の心筋梗塞組織への生着を、HGF が促進することを示唆する知見もある。このように、細胞と血管新生促進因子を組み合わせた治療法は有効な治療法として将来用いられる可能性を秘めている。また、移植する細胞は、デリバーが必要な標的遺伝子のキャリアーとしても用いることができる。

#### (9) 内在性前駆細胞を強制動員する

分離した幹細胞を投与する代わりに、血管新生を促進する、骨髄および他の組織からの内在性前駆細胞を強制動員することは非常に魅力的な治療アプローチと思われる。C.3.5 血管新生療法においても若干ふれたが、以下にその可能性を支持する実験結果の詳細について述べる。サイトカイン (G-CSF、Ang-1、PlGF) およびケモカイン (SDF-1) は骨髄から EPC の動員およびその後の末梢循環における増加を促進する。なお、EPC、SDF-1 そして VEGF<sub>165</sub> のレベルの上昇において、どの動員因子が最も強い作用を示すかについては明らかではない。動物モデルでアデノウイルスベクターを用いて SDF-1 および VEGF の遺伝子を静脈内に投与すると、造血前駆細胞および循環 EPC の強制動員が速やかに誘導された。一方、Ang-1 による前駆細胞の強制動員の誘導は、遅延性であり顕著でない。しかしながら、VEGF と Ang を組み合わせるとその効果は相乗的であり、循環中に前駆細胞がより長期にわたる上昇した。さらに、それに関連し骨髄における毛細血管の増殖の増大、結果的に脾臓の巨大化の原因となる脾臓への前駆細胞のホーミングがおきた。患者における VEGF 遺伝子導入により安全な条件において循環 EPC が増加した。

他の候補としては G-CSF と GM-CSF があげられる。げっ歯類および人間以外の霊長類における急性心筋梗塞モデルにおいて、心筋梗塞後、G-CSF を投与すると、心臓の機能の改善、毛細血管密度の増加、心筋細胞死の低下が起きたしかしながら、心筋梗塞の患者において冠動脈ステントの存在で G-CSF を投与すると、ステント再狭窄が顕著に増加したため、処置は中止された。GM-CSF を組換え体として毎日投与すると、ウサギおよびマウス角膜モデルにおいて EPC が動員され、虚血後肢の新血管形成が促進された。ロムルチド (200  $\mu$ g/kg/

日) により GM-CSF を誘導すると、梗塞ラットにおいて梗塞からの回復が遅延し、梗塞が拡大した。心筋梗塞の初期段階に GM-CSF を誘導すると、単核球の動員が促進され、梗塞部位における不適切なコラーゲン生成がおきた。したがって、GM-CSF 投与の場合、悪い時期に悪い細胞が誘導されるという事態を避ける必要がある。GM-CSF 治療の安全性についてはいくつかの研究で評価されている。冠動脈疾患の患者における小規模無作為、二重盲検、プラセボコントロールの冠動脈内 GM-CSF 投与の研究では安全性および冠動脈側副血流の改善が示された。

赤血球分化因子として知られる Epo (Erythropoietin) は EPC の動員を促進する。Epo で処置したマウスでは骨髄および末梢血液における EPC の数、側副の拡大が促進され、後肢虚血の場合には血流が改善された。冠動脈心臓病の患者において、Epo の血清レベルは循環 EPC あるいは骨髄前駆細胞の数と相関した。

HMG-CoA 還元酵素の阻害剤であるスタチンはマウスおよび安定冠動脈疾患の患者において EPC の動員およびその機能的を促進する。スタチンによる EPC の分化の誘導は PI3-kinase/Akt を介している。その他の可能性として、EPC の増殖促進および老化を低下させるサイクリンのアップレギュレーション等、細胞周期に関わる遺伝子発現の調節が考えられる。同様にエストロジェンは EPC のアポトーシスを抑制し、骨髄由来 EPC の強制動員および増殖を促進した。エストロジェンの効果は eNOS<sup>-/-</sup>マウスにおいて完全に消失したことから、eNOS 依存性の機構が考えられる。VEGF による EPC の強制動員の誘導も eNOS 欠損マウスでは低下することから、eNOS は骨髄由来 EPC の強制動員において必須の役割を果たしていると考えられる。

#### (10) 本来生体に備わっている抗血管新生機構を阻害する

血管新生のリスクファクターが有無の虚血動物モデルあるいはヒト疾患組織において、増殖因子および増殖因子受容体の発現に関するデータが少ないことを考えると、欠乏していると推測される因子を補充する治療戦略は必ずしも合理的ではないようにも考えられる。また、生体において増殖因子の発現が増加している状態で、それ以上あるいはそれよりもはるかに多い量の増殖因子を外から投与した場合、血管新生は促進されるのかという疑問も残る。多くの前臨床試験では、実際 VEGF および FGF を適切に投与すれば、血管新生が促進されることが示されている。しかし、正常をはるかに超えるレベルで増殖因子を投与すると、例えば、VEGF および FGF の場合、病的な血管形成が起きる可能性があり、治療濃度域は狭いと考えられる。

したがって、本来生体に備わっている抗血管新生機構を阻害することに焦点をおいた治療も考える必要がある。例えば、睡眠により誘導される角膜の

低酸素刺激では、血管新生が起きない。これは角膜組織のいたる所に発現している HIF-1 $\alpha$  のドミナントネガティブミュータントによると考えられる。興味深いことに、このミュータントは低酸素症によっても調節される。HIF-1 $\alpha$  ミュータントのアンタゴニストにより、角膜の低酸素刺激による血管新生反応の誘導が回復する。他の生体由来の血管新生の阻害剤、例えばエンドスタチン、トロンボスポンジンは組織虚血の間アップレギュレートされる。興味深いことに、最近の知見によると、ヒト平滑筋肉腫セルライン、SK-LMS-1 細胞の担ガンモデルにおいて、HGF は部分的ではあるがトロンボスポンジン-1 のダウンレギュレーションを介して腫瘍における血管新生を誘導する。このように、抗血管新生因子の作用を弱めることにより治療効果が改善する可能性がある。

#### (11) 遺伝子治療において、遺伝子をどこにデリバリーするか

遺伝子治療における望ましい遺伝子のデリバリー部位は治療の最終目標および増殖因子の性質により変わりうる。毛細血管の成長を意図する場合は梗塞先端部位が望ましい。健康な組織において側副は、開冠動脈血管から冬眠心筋へと成長する。導入する部位の微小環境および産生される増殖因子の標的細胞も考慮に入れる必要がある。増殖因子は標的細胞において発現する受容体を介して機能を発揮する。治療効果を得るにはリガンドと受容体の相互作用が必須である。ベクターあるいは産生されたタンパク質は正常な基底膜をうまく貫通できない。多数の平滑筋層で覆われた大きな内径の血管の場合はなおさらである。従って、動脈内皮に作用することを意図して増殖因子を用いる場合は、血管の管腔で作用できるようにする必要がある。血管系を囲む組織の構成細胞である壁細胞に増殖因子を作用させる場合も同様である。増殖因子の可溶性によっても、リガンドのバイオアベイラビリティが調節される。細胞表面のヘパリンプロテオグリカンに結合しやすい増殖因子は、産生細胞の周辺にとどまる。一方、可溶性増殖因子は拡散し、広範囲の組織をカバーする。病的状態の微小環境では、増殖因子のデリバリーの効率が悪い。一方、増殖因子をあまりにも広範囲に過剰発現した場合は重大な副作用がおきる。発現は適切なデリバリー方法を用いて的確な組織のコンパートメントに対し行なう必要がある。しかしながら、局所的に遺伝子導入する場合、導入されたコンパートメントの位置について詳細に調べることは事実上困難である。また、特定の細胞のみに発現させることも困難である。最近、遺伝子デリバリーベクターを組織あるいは細胞に対して特異的にターゲティングする技術が発達しており、遺伝子導入の心筋特異性が改善している。

#### (12) 遺伝子治療において、遺伝子をどのようにデリバリーするか

心筋における治療的血管新生において多種多様

なデリバリーの方法が導入されている。例えば、増殖因子をマウスの尾静脈を介してデリバリーする方法、大動物モデルにおいて最先端の高度な技術を用いて局所にデリバリーする方法などがある。多くのモデルでは開胸術のような侵襲的な手法が必要とされるが、それ自体で若く健康な動物において損傷を与えることになり、その結果、修復過程が始まり内在性の増殖因子が誘導される。さらに重要な点は、別の治療を最も緊急に必要とする重病の患者には、非常に侵襲的でストレスの多い遺伝子導入方法は適していないということである。遺伝子導入ベクターは標準サイズの血管造影用カテーテルを用いて冠動脈に導入できる。冠動脈内投与のアプローチは比較的単純で、特別な器具や医師に特別な訓練は必要なく、血管造影術と組み合わせると侵襲的な手法は必要ではない。通常、冠動脈内投与は内皮細胞へ遺伝子を導入する目的で用いられる。動物モデルで良好な治療効果が報告されているが、これまでの報告によるとヒトでは臨床効果は低い。静脈内および動脈内のアプローチでは特別な器具は必要としない。組換え FGF-2 を用いた検討では静脈内投与は有効ではないが、冠動脈投与は有効であることが示されている。内皮はタンパク質およびウイルス粒子の障壁である。bFGF の組織分布を動脈内あるいは静脈内投与で調べると、<sup>125</sup>I 標識した bFGF のそれぞれ 0.88% および 0.26% が心筋に見つかっている。

治療薬は血管周囲の組織にもデリバリーできる。心膜内のアプローチではベクターは心臓周囲の心膜内にデリバリーされる。心内膜および心外膜に対する導入効率は良好であるが、側副へのかん流では治療効果はみられていない。高濃度の治療用タンパク質が心嚢液で産生されるが、心筋を貫通することができず、成長している側副血管に到達できない。注射針付きのカテーテルを用いることにより効率よく局所にデリバリーできる。血管周囲で局所的にタンパク質濃度が高くなっても血管新生反応が起こるのは主として血管の外膜であり、血管壁を貫通できない。

心筋内遺伝子導入では標的部位にベクターを直接デリバリーできる。心筋内への直接投与は従来の外科的処置と組み合わせる。侵襲的な外科的処置および増殖因子の局所的なデリバリーができないような障害の程度が高い患者には、NOGA およびスチレットの注入カテーテルのような経皮的な技法を用いた心筋内への直接投与が適している。さらに、臨床試験において不可欠である治療効果および副作用の可能性は、大動物モデルで容易に評価できる。ヒトの治療用に開発された技術は大動物モデルにおいても適用でき、その結果に基づき臨床試験に使用される段階に移行する。

#### (13) 遺伝子治療においてどのような遺伝子導入ベクターを選択するか

遺伝子治療において遺伝子導入に用いるベクターの選択も重要なポイントである。急性心筋梗塞後

の治療と慢性心筋虚血とでは遺伝子発現のタイムコースを変える必要がある。同様に、慢性虚血において閉塞性動脈疾患の進行が緩やかで、その際酸素圧の低下がみられるような比較的健康な心筋と梗塞後に障害を受けた心筋とでは形成される微小環境は異なる。増殖因子をコードする遺伝子は非ウイルスプラスミド構成体あるいはウイルスベクターを用いてデリバリーできる。プラスミドは安全であり作成も容易ではあるが、心筋における導入効率は非常に低いのが欠点である。なお、リポソームを用いることによりその導入効率が顕著に改善できるという報告もある。

遺伝子治療を目的とした新しいウイルスが開発され、既存のベクターも改良により改善されていることから、ウイルスベクターが多く用いられるようになってきている。遺伝子治療における理想的なウイルスベクターとは導入効率が高い、毒性が低い、免疫原性が無い、長い遺伝子が挿入できる、標的とする細胞だけに遺伝子が発現できる、遺伝子発現が調節できるといった特徴を有している必要があるが、このような特徴の全てを有するベクターはまだ開発されていない。遺伝子導入のベクターを臨床適用する場合、品質が最も重要な選択基準となる。心筋梗塞後において局所組織かん流のサルベージが起きるには、短時間高い効率で導入する必要がある。アデノウイルスは利用頻度が最も多く研究も進んでいる遺伝子導入ベクターの一つである。アデノウイルスの長所は導入効率が高い、導入遺伝子の発現能が比較的高い、高いタイターで産生できるという点である。正常の免疫系を有する大動物における導入遺伝子の発現は一過性で2-3週間続き、その期間内で毛細血管ネットワークの形成、組織かん流の増加は十分起きる。

側副血管の成長および新生血管の動脈形成には数週間から数ヶ月までとより長い発現が必要である。このような長期間の発現にはエピソードベクターあるいは宿主細胞染色体に組み込む可能なベクターを用いる。AAV (Adeno-associated vector) アデノ随伴ウイルスはアデノウイルスより導入効率は低い、筋肉組織に対して指向性を有し、遺伝子発現は導入後1年間持続する。AAVに導入できるDNAの長さは最大5 kbであり、ほとんどの増殖因子の遺伝子は導入可能である。しかしながら、場合によってはそれ以上の長さの遺伝子を導入することから、この導入能力の低さが開発の妨げとなっている。レンチウイルスはもっと長い遺伝子が導入可能であり、静止期および増殖期の細胞に導入できる。宿主染色体へ組み込まれるため安全性が懸念されるが、その解決法として数々の発現調節系が開発されている。また、心臓血管へのアプローチにおける欠点は導入効率の低さとウイルス標品のタイターの低さである。

#### (14) 遺伝子治療において治療薬をどれだけデリバリーするか

遺伝子治療のアプローチに限った話ではないが、

この場合も治療濃度域がある。治療濃度域とは、最大限の治療効果と最小限の副作用の両方が得られる濃度域を指す。増殖因子を同じ量投与しても患者により作用発現の強さは変動するが、遺伝子治療の場合はそれに加えて導入効率およびタンパク質産生レベルも患者によりかなり変動する。したがって、ウイルスデリバリーのアプローチでは最適量の増殖因子が産生されるウイルスの濃度および投与した組織環境下において増殖因子が標的とする組織にうまく分布できるかどうかのポイントとなる。

従来の薬理学的アプローチでは、薬は通常様々な組織に分布される。遺伝子治療は治療タンパク質を局所にデリバリーできるという利点があるが、それは逆に正確な投与量の算定、さらにデリバリー自体も難しくなるという欠点にもなる。血流における薬の濃度は決めるのは容易であるが、大動物において局所タンパク質濃度が最適になるようなウイルス投与量を正確に決めるには、通常よりはるかに多くの前臨床試験が必要である。治療効果は標的組織におけるウイルス溶液の拡散、導入効率、導入細胞によるタンパク質の発現レベルおよび増殖因子の溶解性など様々な因子により総合的に決定される。

大部分の前臨床遺伝子治療実験はマウスモデルで行われている。マウスモデルは遺伝子導入および遺伝子ノックアウト実験、増殖因子の作用の検討では非常に有用であるが、小動物で得られた実験結果を基にしてヒトの治療を行おうとする場合は十分注意する必要がある。マウスにおけるウイルスの投与量、タンパク質濃度の実験結果はヒトへそのまま外挿できない場合がある。例えば、マウス尾静脈への投与においてウイルス粒子として  $1.0 \times 10^{11}$  個および容量として 3ml 用いる場合、その値をそのままヒトに外挿すると、それぞれ  $1.0 \times 10^{14}$  個および 7L になる。また、小さな組織では増殖因子の効力および正確な投与量を決定は困難である。マウスでは数回の投与で心筋の全体をカバーするのは容易だが、マウスより数百倍大きい豚の心臓をカバーすることははるかに難しい。筋肉内注入により起こる注射針の痕跡のようなことでもマウスではヒトと全体的に占める割合が異なる。例えば、28-G の注射針では筋肉組織で約  $500 \mu\text{m}$  の幅の壊死した痕跡が起きる。そのような状態では筋肉の炎症性細胞および障害筋細胞が自ら増殖因子を供給するようになる。その注射針の痕跡の大きさはマウスでは左心室筋肉の 1/8 であるが、ヒトでは左心室筋肉のわずかに 1/200 にしかすぎない。

#### (15) 血管新生増殖因子タンパク質を用いた治療におけるリスクと何か

VEGF による透過性の増加のような特異的な有害作用と、腫瘍の成長、糖尿病性網膜症の悪化、アテローム性動脈硬化のような血管新生に直接関連した有害作用は区別できる。VEGF/VPF (血管透過性因子) の血管透過性を促進する活性は、ヒスタミンに比べて 50000 倍以上高い。他の可能性も除外できないが、この効果は内皮開窓の誘導によると

考えられる。

腫瘍成長と糖尿病性網膜症は血管新生と血管新生促進因子に依存することが多くの研究で示されている。しかし、投与した増殖因子により腫瘍成長および網膜症の悪化が実際に促進されるという知見はほとんどない。顕性腫瘍および糖尿病性網膜症の患者は臨床試験において除外されているが、現在、血管新生促進因子のタンパク質あるいは遺伝子治療を受けている 1000 人以上の患者において、この二つの疾患の合併症の患者は見つかっていない。特に VEGF の動脈硬化促進作用がアテローム性動脈硬化の前臨床モデルで試験されている。VEGF を投与すると、プラークの形成が促進されるが、flt-1 をブロックすると動脈硬化の形成が低下した。これと一致して、TNP40 あるいは Ang のような一般的な血管新生阻害剤により実験的アテローム性動脈硬化症が低下する。しかし、VEGF 遺伝子治療の臨床試験では VEGF の動脈硬化の形成促進作用を裏づけることができなかった。同様に、アテローム性動脈硬化症の大動物モデルで、FGF-2 を冠動脈ステント移植しても、作用が示されなかった。このような統一的な見解が得られない状況において、限られた数の試験において示された、血管新生促進作用を有する増殖因子による動脈の形成促進作用と臨床との関連の有無については判断できない。したがって、将来の臨床試験では、アテローム性動脈硬化症の進行を第一に注意する必要がある。

#### (16) 遺伝子治療におけるリスクとは何か

遺伝子治療の副作用はデリバリーのプロセス、ベクターあるいは遺伝子産物そのものにより起き得る。遺伝子治療の最終目標の一つは選択枝のない患者に適した治療法を提供することである。遺伝子治療ベクターのデリバリー自体可能な限り非侵襲的でリスクが低い必要がある。したがって、外科的アプローチおよび長期間にわたるかん流の繰り返しは、心筋の血管新生において临床上適切なデリバリー戦略とは言いがたい。インビボにおいてウイルスおよび非ウイルスを用いた遺伝子デリバリーにより、有害効果が起き得る。高投与量の裸の DNA は壊死と炎症を起こすとの報告もある。ほとんどのウイルスは免疫反応を惹起し、その結果、一過性の体温上昇から敗血症ショックまで一連の臨床症状が起きる。宿主染色体へベクターが組み込まれる場合はガン遺伝子の活性化、正常な遺伝子発現の妨害、宿主染色体の変異促進が起きる可能性がある。

小動物を用いた侵襲的なアプローチでは心臓において血管新生分子に特異的な有害作用は表に出てこない。したがって、大動物およびヒトにおける有害作用の立証は不十分である。また、小動物を用いた研究ではその後のフォローアップの期間は非常に短い。血管新生遺伝子治療では導入組織における過剰血管成長、いわゆる血管腫あるいは糸球体硬化形成が懸念される。しかしながら、そのような構造は通常血流により再構成され、血管は正常に構築される。遺伝子治療により増殖因子を標的組織以外

にも発現させた場合、他の組織に対して腫瘍の成長促進、網膜症、関節炎のような有害な副作用が起きるかも可能性がある。このような有害作用は組織特異的なプロモーターあるいは低酸素状態の条件下で発現が促進されるようなベクターを用いることにより克服できるかもしれない。VEGF の副作用は血管透過性の亢進と浮腫であるが、心臓におけるそのような兆候、すなわち心膜液貯留という副作用は用量が多すぎる場合に起きることが最近になって示された。このように、可能性のある副作用について総合的に評価するためには、大動物において、最適投与量及びベクターと遺伝子のそれぞれに組み合わせにおいてデリバリーの戦略を決める必要がある。

#### C. 4 改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究

組換えタンパク質医薬品は、高度な生物活性を持つ医薬品として現代の医療に欠かせない存在となっている。組換えタンパク質医薬品の魅力の一つは、アミノ酸配列や修飾構造の改変によって、望ましい薬効/体内動態プロファイルを目指して、合理的アプローチによる改良を進められるところにある。これまでにインスリンやインターフェロン等で改変型医薬品が開発され、患者の quality of life の向上にも大きく貢献してきているが、今後は、疾患関連タンパク質の同定や、分子進化法などによる人工タンパク質作製技術の開発、医薬品としての有効性・安全性を向上させるためのタンパク質体内動態制御技術の進歩等を背景に、改変型タンパク質性医薬品の創出がこれまで以上に加速されると予想される。

従来、タンパク質性医薬品は、生体由来試料から精製されて用いられていた血液凝固因子や、組換え医薬品として最初に承認されたインスリンのように、生体が本来発現しているものを補うためのものであった。天然に存在するタンパク質と同等のものとして製造されたタンパク質医薬品では、その作用プロファイルはほぼ明らかであり、一定の品質が確保されていれば、生体内に存在する濃度における一定の安全性も確保できると期待される。これに対して、天然のものとは異なる構造を持つ改変型タンパク質性医薬品では、改変の目的とした機能以外の特性にも変化がおよび、安全性への影響が生じる可能性も考えられることから、品質および安全性の確保においては、特段の配慮が必要になると考えられる。本研究では、改変型タンパク質医薬品の品質・安全性確保における課題を考察するため、開発の国際的動向として、日米 EU 三極における改変型タンパク質医薬品承認の動向と、それぞれの品目の特性に関する調査を行った。

ところで、遺伝子組換え技術を応用して製造されるタンパク質が天然のものと比較して完全に同じ構造を持つということは、糖鎖を持たない単純タンパク質においてのみ考えることである。医薬品として用いられているタンパク質の多くは糖タンパ

ク質であるが、糖タンパク質の場合は、タンパク質を発現する細胞の種類によって付加される糖鎖の構造が異なる上に、糖鎖の構造に著しい不均一性が存在するため、生体由来タンパク質と組換えタンパク質で、糖鎖を含めた構造が完全に一致することは現実的には有り得ないことと考えられる。しかしながら、このように、組換えタンパク質において機能的差異を目的とせず生じる天然のタンパク質との差異は、本研究では改変として取り扱わないこととする。本来は糖タンパク質であるものを、機能的差異が生じないという根拠に基づいて糖鎖非修飾体として製造して用いる場合も、改変体としては取り扱わないこととする。また、天然のものと同等の活性を期待する場合でも、特許対策や技術的理由によりいくつかのアミノ酸残基が置換あるいは付加されている場合もあるが、そのような場合も機能的改変を意図していないと考えられることから、改変体としては取り扱わないこととする。つまり、本研究では、改変型タンパク質として、機能的改変を意図してアミノ酸あるいは修飾構造を変化させたタンパク質を取り扱うこととしたい。また、改変型タンパク質の代表例の1つであるヒト化モノクローナル抗体やその修飾体については、現状と問題点に関して、本研究班の平成15年度報告書で詳細な内容が報告されているため割愛した。

#### C.4.1 改変型タンパク質開発の国際的動向

これまでに、米国、EU、あるいは日本で承認された改変タンパク質医薬品を、アミノ酸置換型、糖鎖改変型、ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol: PEG) 結合型、融合タンパク質に分類し、それぞれの名称、各極で承認された時期、改変部位の特徴、改変の目的、適応疾患などについて Table 7にまとめた。

Table 7あげた20種類のうち、米国では17種類、EUでは15種類、日本では10種類が承認されている。我が国でのみ承認されているものとして、改変型t-PAのパミテプラーゼ、改変型G-CSFのナルトグラスチムの2種類があるが、欧米でのみ使用されていて我が国では未承認のものは10種類であった。欧米で承認され、その後我が国でも承認された8品目について、欧米での承認後に我が国での承認までに要した年数は平均3.75年であった。

タンパク質に改変が施される場合、目的は大きく2つあると考えられる。1つは、**pharmacodynamics**に関わる改変、すなわち、標的分子との親和性や特異性の上昇、特定の機能の分離など、薬効に関わる機能そのものの改良。もう1つは、**pharmacokinetics**に関わる改変、すなわち、血中滞留性の改善や、標的指向性の付与など体内動態の改良である。これまでに承認された改変型タンパク質医薬品では、後者の体内動態制御に関わる改変が施されている例が多く、融合タンパク質を含めた20種類のうち18種類では、体内動態の制御に関する機能が付与されていた。タンパク質の体内動態を制御することにより有効性・安全性の向上を期待する試みが、

これまでのタンパク質改変の主要な目的であったことが推察される。

実際の例として、アミノ酸配列を改変した速効型あるいは持続型のインスリン、PEG結合型インターフェロンなどは、ドラッグデリバリーシステムの改良を加えることで患者のQOL向上やコンプライアンスの改善に大きく貢献している。糖鎖構造を改変したイミグルセラーゼは、改変によって初めて標的細胞内へのタンパク質の送達が可能になり、医薬品として応用された例である。新たなタンパク質医薬品として設計された融合タンパク質においても、標的細胞へのターゲティングや血中濃度維持のためのタンパク質ドメインが用いられており、これらもDDS的な機能付与が改変型タンパク質医薬品の新規開発において重要であることの表れであると考えられる。

以下、それぞれの改変型タンパク質医薬品の特性について述べる。

#### C.4.2 アミノ酸改変体

##### C.4.2.1 改変型インスリン 〈速効型インスリン〉

インスリンは、生理的濃度 ( $10^{-10}$ M) では単量体で存在しているが、製剤中の濃度 ( $10^{-3}$ M) では主として二量体あるいは六量体となっている。皮下あるいは筋肉に投与されたインスリンが血中に移行するには、多量体から解離して単量体になる必要があるため、患者は食事の30分以上前にインスリンを打つことを余儀なくされていた。食事時間を常に事前に確定させることは社会生活を送る上では困難な場合も多く、また、投与後に予定どおり食事がとれない場合は低血糖に陥る危険などがあるため、食事の直前或いは直後に投与可能な速効型インスリンの開発が望まれていた。

インスリン分子同士の間合に関わる部分はB鎖のC末端付近であるため、この領域のアミノ酸を改変することで、投与後速やかに血中に移行することのできる速効型のインスリンが開発できると考えられた。しかし、この領域のアミノ酸を置換する当初の試みは成功せず、**insulin like growth factor-1 (IGF-1)**の構造にヒントを得て、最初の改変インスリンが生まれている。IGF-1はその名のとおりインスリンに類似した構造を持ち、IGF-1のA鎖B鎖に存在するアミノ酸の50%は対応する位置のインスリンのアミノ酸に一致している。しかし、IGF-1はインスリンのように分子間で会合体を形成しない。そこで、インスリンB鎖の28番目のProと29番目のLysがIGF-1では逆になっている点に着目し、B28ProとB29Lysを逆にしたインスリン (B28Lys, B29Pro) が作製されたところ、速効性の血糖降下作用を示すことが分かった。こうしてできたのが、最初の改変型インスリン **Insulin lispro** である。

##### Insulin lispro インスリン リスプロ

改変部位: B鎖28番目Pro→Lys, B鎖29番目Lys



→Pro

製造用宿主：大腸菌

特徴：食事の直前に投与される速効型インスリン。多量体形成が抑制される結果、投与後に速やかに血中に以降する。多量体形成の抑制は、プロリン残基を移動させることにより、分子間の疎水結合形成が減ったためと考えられる。

**Insulin Aspart インスリン アスパルト**

改変部位：B鎖28番目Pro→Asp

製造用宿主：酵母

特徴：食事の直前に投与される速効型インスリン。インスリンリスプロと同様、B鎖28番目のProを置換することにより分子間の疎水的相互作用が抑制され、多量体形成が抑制される結果、速やかな血中への移行を実現した改変体。

**Insulin Glulisine**

改変部位：B鎖3番目Asn→Lys, B鎖29番目Lys→Glu

製造用宿主：大腸菌

特徴：多量体形成の抑制により、血中への速やかな移行が可能な速効型インスリン。

### <持続型インスリン>

健常人では、インスリンは血糖値の上昇に応じて分泌されるのみでなく、定常的に低濃度のインスリンが分泌されている。従って、糖尿病の治療においては、健常人でみられるベースラインレベルのインスリンを維持するために、速効型と持続型のインスリンの併用が行われる。インスリンの持続性を増すためには、製剤に亜鉛やプロタミンを添加する手法が用いられてきたが、血中インスリンレベルの推移が一定でなくピークが存在することや、患者間での吸収のばらつきが大きいといった問題があった。これらの問題を解決すべく、等電点の変化による投与部位からの徐放、あるいはアルブミン結合性の付与により投与部位からの徐放と血中濃度の持続を実現した改変体が開発されている。

**Insulin Glargin インスリン グラルギン**

改変部位：B鎖のC末端にArg2個付加、A鎖のC末端のAsp→Gly

製造用宿主：大腸菌

特徴：アミノ酸置換により等電点がインスリンのpH 5.4より中性側(pH 6.7)にシフトしている。製剤のpHが4.0であるため製剤中ではInsulin Glarginは完全に溶解しているが、皮下投与されるとpHが7.0まで上昇するために投与部位にインスリンの微細な沈澱が生じる。個々のインスリン分子は、その沈澱からゆっくりと再溶解されて循環血中に入るため、血中にインスリンを持続的に供給することが可能となっている。

**Insulin Detemir インスリン デテミル**

改変部位：B鎖30番目Thr欠損、B鎖29番目(C

末端)Lysのεアミノ基にC14脂肪酸(ミリスチン酸)が結合

製造方法：酵母で生産されたタンパク質に、化学修飾によりミリスチン酸を結合

特徴：分子間会合による多量体形成とアルブミンへの結合のために投与部位から血中に徐放される。また、アルブミンとの結合のために、血中滞留性が向上している。比活性はインスリンの1/4。

### C.4.2.2 改変型 tissue-plasminogen activator (t-PA)

天然のt-PAは、血管内皮細胞から産生されるセリンプロテアーゼであり、限定分解によりplasminogenを活性化して、fibrin分解活性を持つplasminを生成させることにより血栓溶解反応を開始させる。t-PAは、Fingerドメイン(フィブリンへの高親和性結合に関与)、Proteaseドメイン(プラスミノゲンの特異的な切断に関与)、EGFドメイン(肝臓にある受容体との結合とそれによる血中からの消失に関与)、Kring1ドメイン(肝臓への結合に関与)、Kring2ドメイン(フィブリンに促進されるプロテアーゼ活性に関与)の5つの機能ドメインを有している。天然型t-PAの血中半減期は約3分と非常に短いため、点滴による持続投与が必要であるのに対して、血中半減期の長い改変体では、単回投与が可能となっている。天然のt-PAは糖鎖修飾されており、糖鎖は肝臓への取り込み、血中からの消失に関わっている。

### Reteplase

改変部位：t-PAのドメインのうち、Pドメイン(プロテアーゼドメイン)とK2ドメイン(Kring2ドメイン)の2つのドメインのみからなる。

製造用宿主：大腸菌

特徴：糖鎖がないこと、および、EGFドメイン、K1ドメインがないことにより、血中半減期が90分以上と延長されており、単回の静脈内投与が可能となっている。また、F1ドメインの欠損によりフィブリン親和性が減少する結果、本薬が血栓の奥まで浸透できるようになり、血栓の速やかな溶解が可能となった。

### Tenecteplase

改変部位：PドメインとK1ドメインに3箇所のアミノ酸置換

製造用宿主：CHO細胞

特徴：血中半減期の長い改変型t-PA。フィブリン親和性および、t-PAの阻害因子plasminogen activator inhibitor-1への抵抗性が上昇している。

### Pamiteplase パミテプラゼ

改変部位：K1ドメインを欠損させ、天然型t-PAでN末端から275番目のArgをGluに置換

製造用宿主：CHO細胞

特徴：フィブリンに対する高い親和性を有し、プラスミノゲン活性化作用はフィブリンにより顕著

に増強される。天然型 t-PA と比較して血中半減期が延長されている。

#### C. 4. 2. 3 改変型インターフェロン

Interferon alfacon-1 インターフェロン アルファコン-1

改変部位：ヒトインターフェロンアルファの 12 種類のサブタイプのアミノ酸配列において、各位置の出現頻度が最も高いアミノ酸に置換。

製造用宿主：大腸菌

特徴：インターフェロンアルファに比較して高い抗ウイルス活性、NK 細胞およびマクロファージ活性化などの免疫賦活作用、腫瘍細胞の増殖抑制作用を示す。

#### C. 4. 2. 4 改変型顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)

Nartograstim ナルトグラスチム

改変部位：N 末端側から 1、3、4、5、17 番目のアミノ酸が Ala, Thr, Tyr, Arg, Ser に置換されている。

製造用宿主：大腸菌

特徴：非改変型の G-CSF と比較して、約 3 倍の比活性を示す。また、In vitro 試験により、血漿中での安定性が天然型 hG-CSF (糖鎖非結合) と比較して高いことが示されており、N 末端の置換により立体構造が安定化した結果、プロテアーゼに対して耐性になったものと考えられている。

#### C. 4. 3 修飾構造改変タンパク質

アミノ酸置換による改変の他、いわゆる Post-translational engineering も盛んに試みられている。タンパク質に化学修飾を行うもの、糖鎖部分の構造を改変したもの、アミノ酸置換により糖鎖修飾部位を増やした改変体などが開発されている。PEG 化や糖鎖修飾部位の増加により血中半減期が延長された改変型タンパク質では、改変を加えないものと比較して投与回数を減らすことができ、患者の負担軽減やコンプライアンス改善に貢献している。

#### C. 4. 3. 1 糖鎖構造改変型

##### (1) 糖鎖改変型グルコセレブロシダーゼ

Imiglucerase イミグルセラゼ

改変部位：グルコセレブロシダーゼの糖鎖末端のシアル酸を除去

製造方法：CHO 細胞で生産された組換えタンパク質をエキソグリコシダーゼで処理

特徴：ゴーシェ病は、糖脂質分解に関わるリソソーム酵素グルコセレブロシダーゼ活性の遺伝的な欠損によるものであり、組織性マクロファージに変化が最も顕著に現われる。グルコセレブロシダーゼをエキソグリコシダーゼで処理することにより、糖鎖末端のシアル酸を除去し、マンノース残基を露出させる結果、マクロファージ表面に存在するマンノース受容体を介してマクロファージに取り込まれ、細胞内に薬が送達される。改変していないグルコセレブロシダーゼを投与した場合は、肝臓に取り込まれ、

血中から速やかに消失する。

##### (2) 糖鎖改変型エリスロポエチン

Darbepoetin alfa ダルベポエチン アルファ

改変部位：アミノ酸置換により、ヒト erythropoietin (EPO) に N 型糖鎖結合部位を新たに 2 つ導入した改変体。

製造用宿主：CHO 細胞

特徴：非改変型の EPO と比較して N 型糖鎖結合部位が 2 箇所多く、5 本の N 結合型糖鎖と 1 本の O 結合型糖鎖が結合している。糖鎖が増えることにより血中半減期が延長され、週 1 回の投与が可能となった。

#### C. 4. 3. 2 PEG 結合型

##### (1) PEG 結合型インターフェロン

インターフェロンの血中半減期は 3~5 時間程度である。インターフェロン療法では週 2 回の投与が必要であったが、PEG 化により血中半減期が 24 時間程度にまで延長され、週 1 回の投与が可能になった。

Peginterferon alfa-2a ペグインターフェロン アルファ-2a

構造：インターフェロンアルファ-2a のリジン残基 (主な部位：第 31 位、第 121 位、第 131 位、第 134 位) の 1 箇所に、1 分子の分枝ポリエチレングリコール (分子量約 40kDa、2 つの約 20kDa のモノメトキシポリエチレングリコール鎖がカルボキシリジンに結合したもの) が、アミド結合を介して共有結合している修飾タンパク質 (分子量：約 60K)。製造方法：組換えタンパク質を化学修飾  
特徴：血中半減期が非 PEG 修飾型インターフェロンの約 10 倍に延長され、投与頻度を減らすことが可能となった。

Peginterferon alfa-2b ペグインターフェロン アルファ-2b

構造：インターフェロンアルファ-2b のアミノ酸残基 (Cys<sup>1</sup>, His<sup>7</sup>, Lys<sup>31</sup>, His<sup>34</sup>, Lys<sup>49</sup>, Lys<sup>83</sup>, Lys<sup>112</sup>, Lys<sup>121</sup>, Tyr<sup>129</sup>, Lys<sup>131</sup>, Lys<sup>133</sup>, Lys<sup>134</sup>, Ser<sup>163</sup> 及び Lys<sup>164</sup>) の 1 箇所に 1 分子のメトキシポリエチレングリコール (平均分子量：約 12K) がカルボニル基を介して共有結合している修飾タンパク質 (分子量：約 32K)。

製造方法：大腸菌で生産された組換えタンパク質を化学修飾

特徴：PEG 修飾により高分子化されることによって、主として腎からの排泄が抑制され、生体内での保持時間が長くなることにより持続的な体内動態を示す。非 PEG 修飾型インターフェロン製剤と比べて投与回数を減らすことが可能。

##### (2) PEG 結合型 G-CSF

Pegfilgrastim

構造：フィルグラスチムの N 末端アミノ酸に、



20kDa のメトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドが 1 分子結合。

製造方法: 大腸菌で生産されたタンパク質を化学修飾

特徴: PEG 化によってフィルグラスチムの腎クリアランスを減少させることにより、持続性とした改変体。

### (3) PEG 結合型成長ホルモン誘導体

Pegvisomant ペグビソマント

構造: Human growth hormone (hGH) のアミノ酸配列を 9 箇所置換し、アミノ酸残基 (Phe<sup>1</sup>, Lys<sup>38</sup>, Lys<sup>41</sup>, Lys<sup>70</sup>, Lys<sup>115</sup>, Lys<sup>120</sup>, Lys<sup>140</sup>, Lys<sup>145</sup>, Lys<sup>158</sup>) に hGH 誘導体 1 分子あたり、4~6 個の PEG (分子量 5K) が結合している。

製造方法: 大腸菌で生産されたタンパク質を化学修飾

特徴: Human growth hormone (hGH) のアミノ酸配列を 9 箇所置換し、hGH 受容体への結合能を有するものの細胞内応答は惹起しない誘導体に PEG 化を施した改変体。内因性 hGH の受容体への結合を阻害する。hGH 誘導体 1 分子あたり、4~6 個の PEG (分子量 5K) が Lys 残基に結合しており、PEG 化により血中半減期の延長が図られている。hGH の過剰分泌が原因でおこる内分泌疾患である先端巨大症に用いられる。

#### C.4.4 融合タンパク質

複数のタンパク質ドメインを融合させた人工タンパク質は、新しい作用機構を有する医薬品として、いわゆる rational approach により創出された医薬品と言える。これまでに 4 種類が医薬品として承認されているが、いずれも、2 種類のタンパク質ドメインのうち、1 つのドメインが薬効を担い、もう 1 つのドメインが主に体内動態制御に関わっている。

#### Denileukin Diftitox

構造: Interleukin2 (IL-2) の一部 (2-133 アミノ酸) と diphtheria toxin の一部 (細胞傷害性ドメインと細胞内移行ドメイン 1-386, 484-485 アミノ酸) の融合タンパク質。分子量 58K。

製造用宿主: 大腸菌

特徴: IL2 由来ドメインにより標的細胞 (IL2 受容体発現リンパ腫細胞) へのターゲティングが行われ、細胞に結合した後、受容体リガンド複合体として細胞内に取り込まれる。ジフテリアトキシンによるタンパク合成阻害によって、細胞死が誘導される。

IL-2 受容体として機能する CD25 が発現している非ホジキン型リンパ腫の一種である皮膚 T 細胞リンパ腫に用いられる。副作用として、IL2 受容体を発現している活性化 B 細胞や T 細胞、マクロファージにも作用してしまうため、感染症が起こる場合がある。

#### Etanercept エタネルセプト

構造: ヒト Tumor necrosis factor (TNF) 受容体 p75

の細胞外のリガンド結合ドメインとヒト IgG の Fc 部分の融合タンパク質。分子量 150K。

製造用宿主: CHO 細胞

特徴: 細胞表面の TNF 受容体への TNF の結合を拮抗的に阻害することにより、炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  の阻害剤として働く。薬効を担うのは、TNF $\alpha$  への結合性を有する TNF 受容体由来ドメインで、Fc 部分は血中半減期延長の役割を持つ。関節リウマチに用いられる。

#### Alefacept

構造: ヒト leukocyte function antigen 3 (LFA-3) の細胞外領域である CD2 結合ドメインとヒト IgG1 の Fc ドメインの融合タンパク質。分子量 91.4K。

製造用宿主: CHO 細胞

特徴: CD2 抗原を表面に発現している T リンパ球に結合し、リンパ球の活性化を阻害する。T リンパ球の細胞数減少も認められるが、その機構としては、Alefacept の Fc 部分が NK (Natural Killer) 細胞など Fc 受容体を有する細胞傷害性の細胞と T 細胞を架橋するためと考えられている。中程度から重症の乾癬に用いられる。

#### Abatacept

構造: ヒト CTLA-4 の細胞外ドメインと IgG1 の Fc ドメインの融合タンパク質。分子量 92K。

特徴: 抗原提示細胞上に存在する CD80/CD86 分子に結合することにより、CD28 分子を介した T 細胞の活性化が阻害される。T 細胞の機能抑制効果を有する新しいタイプのリウマチ治療薬であり、2005 年 12 月に米国で承認された。TNF $\alpha$  阻害剤などこれまでの治療薬が効かない症例での効果が期待されている。

#### C.4.5 考察

##### C.4.5.1 改変型医薬品の品質・安全性確保

タンパク質医薬品の品質・安全性確保における改変型タンパク質に特有の課題として、化学修飾工程を有する場合の特性解析、および、生物学的性質と免疫原性の評価の重要性を取り上げ、以下に考察する。

##### (1) 化学修飾工程を有する場合

タンパク質医薬品の品質・安全性は製造方法の影響を大きく受ける。従って、遺伝子組換え、細胞培養、タンパク質精製からなる通常の組換えタンパク質の製造工程に加えて、PEG 化、脂質修飾などの化学修飾工程が加わる場合は、修飾に関連する項目についての評価が品質・安全性確保のポイントとなると思われる。ここでは PEG 化を例に、化学修飾工程を有する場合の品質・安全性確保について考察する。

PEG 化反応はタンパク質の部位特異的なものではなく、1 種類あるいは数種類のアミノ酸に PEG が導入されるものである。従って、PEG 化反応後

のタンパク質は PEG 化された部位、導入された PEG 分子数のいずれにおいても異なる構造を持つ分子種の混合物となり、分子量などを指標に精製された画分についても、PEG 修飾位置異性体の混合物となる。従って、物理的・化学的性質として、分子量、PEG 結合分子数、PEG 結合部位、PEG 修飾位置異性体の構成比などを解析し、目的物質や目的物質関連物質の構造を明確にすることが重要になると思われる。生物学的性質の点では、PEG 修飾位置異性体ごとの生物活性や体内動態、PEG 非修飾体との比活性の比較も、明らかにすべき特性である。不純物については、製造工程由来不純物として、PEG 化反応の工程で用いられる試薬を評価項目に加え、目的物質由来不純物としては、PEG 非結合型となった遊離のタンパク質や、生物活性の異なる PEG 修飾位置異性体を評価すべきであると思われる。修飾反応条件が、修飾部位異性体の構成比に大きく影響し、原薬の生物活性にも影響を与えると予想されることから、製品の品質の一定性を確保するためには、PEG 化反応の条件、精製工程などが厳密に管理されなければならないと考えられる。また、工程管理の中では、PEG 化反応に用いられる各種試薬の品質管理なども必要であろう。

## (2) 生物学的性質等

改変型タンパク質医薬品が単純タンパク質あるいは糖タンパク質であり、特別な加工工程を経ない場合、その物理的・化学的性質については、通常の組換えタンパク質と同様の特性解析を行うことで評価が可能であると考えられる。しかし、改変型タンパク質医薬品の生物学的性質に関しては、改変目的とされた機能以外も変化している可能性が十分あり、安全性に影響がおよぶ場合もあると考えられるため、生物活性、体内動態、がん原性などについて、できる限り詳細な解析が必要であると考えられる。

一例を挙げると、持続型のインスリン改変体であるインスリン グラルギンでは、インスリン受容体との親和性はインスリンと差異がないものの、インスリン様成長因子 IGF-1 受容体との結合親和性がインスリンの 6~8 倍であると報告されている[12]。げっ歯類を用いた 24 ヶ月間反復投与の発がん性試験により、インスリン グラルギンは発がん性を有しないと判断されており[13]、IGF-1 受容体への高親和性結合と安全性との関連は明らかでないが、このような特性をもつタンパク質の場合は、市販後調査等により長期投与の安全性について検証する必要があると思われる。

一方、医薬品ではないが、B 鎖 10 番目の His を Asp に置換し、インスリン受容体との親和性が亢進した改変インスリンでは、ラットで乳腺腫瘍の発生が報告されている[14,15]。1 アミノ酸の置換により発がん性が生じることを示す例であり、改変による生物学的性質の変化が安全性に大きく影響する場合があることを認識する必要があると思われる。生物活性の評価は、評価項目ごとに試験の設定が必要であるが、想定外の変化がある場合も予想されるこ

とから、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析などの網羅的解析手法を用いた評価も有用と考えられる。

## (3) 免疫原性

アミノ酸置換などにより改変を加えた場合に必ず懸念されるのが、免疫原性の問題である。しかし、タンパク質医薬品の免疫原性は、タンパク質の一次構造のみで決定されるわけではなく、製剤中の目的物質の凝集体や製造工程由来不純物、添加物、投与経路、投与量なども影響する[16]。また、癌患者のように免疫機能の低下した患者では抗体が出現しにくく、免疫機能の亢進した患者では抗体が産生されやすい、血友病患者のように遺伝子に欠損のある場合は対応するタンパク質の抗体が産生されやすい、といった患者側の要因も変動要素として加わる。さらに、ヒトに対する免疫原性は動物実験で評価することができず、臨床試験に入ってから評価となる、といった事情により、タンパク質医薬品の免疫原性は予測が難しく、医薬品開発の早い段階での評価が困難になっている。しかし、天然型の組換えタンパク質医薬品においても免疫原性が問題になる例もあり[17]、天然にはない構造を持つ改変型のタンパク質医薬品では、免疫原性に十分な注意を払う必要があると考えられる。これまでの事例で特に目立った免疫原性が報告されているのは、菌体由来タンパク質であるジフテリアトキシンのドメインを持つ Denileukin Diftitox で、3 回目の投与後には 97% の患者で抗体が検出され、抗体の影響により当該タンパク質のクリアランスが亢進していると報告されている。

タンパク質医薬品の免疫原性の問題が難しい原因の一つは、先に述べたような免疫原性を決定する要因の複雑さにあるが、無視できないのが評価系の問題である[18]。抗体の存在は RIA (Radioimmunoassay) や ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) のような免疫学的測定法や、目的タンパク質に対する中和活性を評価するバイオアッセイを用いて評価されるが、抗体陽性患者の割合に関するデータは、アッセイ系の感度と特異性に依存する。また、血中に残存する医薬品タンパク質や、サンプリングの時期、サンプルのハンドリングなどにも影響を受けるため、異なるラボや異なる臨床試験の結果を相互比較することは容易ではない。独立して行われた試験で明らかにされた抗体出現率を比較して、タンパク質ごとの免疫原性の強弱を論じることも難しいと考えられる。

投与したタンパク質医薬品に対して抗体が産生された場合、中和抗体は目的タンパク質の効果を減弱させ、その他の抗体は目的タンパク質の体内動態に影響する。改変型タンパク質ではなく、エリスロポエチンやトロンボポエチンの例であるが、産生された抗体が、投与されたタンパク質と同様の構造を持つ生体内タンパク質の作用や体内動態にも影響を与えて深刻な副作用を起こす事例が報告されており[19]、免疫原性の問題はやはり重要であると思

われる。ヒトでの免疫原性の予測についての方法論の確立、抗体出現を適切に評価するための方法の標準化や標準物質の策定などが望まれる。文献からは、米国で抗体検出法の標準化に向けた検討が行われている様子が伺われるが[20]、古くて新しい問題と言われるタンパク質の免疫原性について、評価方法の開発・標準化に関する国際的動向を今後もフォローしていきたい。

#### C. 4. 5. 2 今後の開発動向

これまでに承認されている改変型タンパク質では、点突然変異導入法により天然に存在するタンパク質のアミノ酸配列を一部置換したものや、タンパク質の大きなドメインを用いたものであった。今後は、今までの方向の延長での開発が進められる他、分子進化法などを用いて、より人工的なタンパク質も創製されてくると予想される。

アミノ酸改変体では、特定部位のアミノ酸配列を個別に置換していく従来の手法とは異なり、ファージディスプレイ法、リボゾームディスプレイ法などの分子進化法により、特定の結合特異性を示す分子をスクリーニングすることによって、新たな機能性人工タンパク質を創製しようとする試みが進められている。ファージディスプレイ法を用いてスクリーニングされた改変型 TNF では、部位特異的 PEG 修飾を可能とする Lys 欠損型改変体や、高比活性を示す改変体が創出されている[21]。リボゾームディスプレイ法では、アンキリンリピートを基本とした人工タンパク質分子の作製に成功した例が報告されており[22,23]、より人工的な構造を持つタンパク質医薬品が開発されていく可能性が感じられる。

近年は糖タンパク質糖鎖の構造・機能解析研究の進展が著しく、糖鎖含有タンパク質医薬品の有効性・安全性の向上を目指して、タンパク質の糖鎖を改変する試みが進んでいる。抗体に結合している N 結合型糖鎖のフコース含量と抗体の細胞傷害活性 (Antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC 活性) に逆相関があることが明らかになり、フコース低減により ADCC 活性を増強した糖鎖改変型抗体の開発が進められている[24-26]。また、糖鎖合成関連遺伝子を組み換えた酵母を用いて、高い ADCC 活性を持つ抗体の生産に成功した例も報告されており[27]、糖タンパク質生産の新技術という側面とも合わせて興味深い。

新たな医薬品タンパク質のデザインとしては、Fc ドメインを融合させたタンパク質が既に 3 品目承認されており、Fc ドメインをタンパク質の血中濃度維持のために利用する方法の有用性が確立されつつある。これを改良して、2 種類のサイトカイン受容体と Fc ドメインを融合させることにより、サイトカインとの高親和性結合を実現したサイトカインの阻害タンパク質 (サイトカイントラップ) も報告されている[28]。

Fc 含有タンパク質の血中半減期が他のタンパク質と比べて長い理由は、Fc 受容体 FcRn を介したリサイクリング機構にあるとされているが、FcRn

は IgG (Fc 含有タンパク質) の血中濃度維持の他、局所でのタンパク質輸送にも関わっていることが報告されている[29]。これを利用して、Fc 融合タンパク質の経肺投与が可能であることが報告されており[30,31]、注射以外での投与が可能なタンパク質として注目される。

タンパク質医薬品はこれまでの実績の上でバイオ医薬品の中核となるものであり、今後もその位置付けには変わりがないと思われる。それを裏付けるように、米国研究製薬工業協会 (The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America; PhRMA) に加盟している企業が開発中のバイオ医薬品 324 品目のうち、11 品目が遺伝子治療薬、14 品目が核酸医薬品で、その他、すなわち開発品目全体の 9 割はタンパク質性医薬品であると報告されている[32]。ゲノミクス、プロテオミクス、グライコミクス等の進展を背景に、機能的改変を施したタンパク質医薬品は、今後さらに増加することが予想される。タンパク質の持つ力に人の知恵を加えた改変型タンパク質医薬品が、多くの患者への福音となり、健康的な生活が実現するよう、品質・安全性確保に関連する行政支援研究の課題を今後も考えていきたい。

#### C. 5 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクを最小にするための方策に関する研究

遺伝子治療薬は、現在効果的な治療法のない重度免疫不全症などの各種遺伝性疾患、再生不良性貧血やガン等に対する画期的な先端医療として、また、高齢化社会の到来に伴い増加の一途をたどると予測される動脈硬化等のいわゆる成人病についても既存の治療法より優れた治療法となる可能性がある新しい医療技術として期待されている。我が国の遺伝子治療薬開発は、欧米に比べて大きく遅れていたが、ここ数年単なるベクターの供給を受けた臨床研究ばかりでなく、独自に開発されたベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の実施が承認され、また申請されようとしており、新たな実用化の時代に入ってきている。

一方、遺伝子治療では、フィラデルフィアでのアデノウイルスベクターを用いた臨床研究での死亡事故やフランスでのレトロウイルスベクターを用いた X-SCID 治療における白血病の発症など重大な副作用の発症も報告されている。これらは、ウイルスベクターの適切な投与量の設定に問題があるケースやウイルスベクターそのものに内包される挿入変異に関する有害事象である。さらに、遺伝子治療においては相同組換えによる増殖性ウイルスの混入や、腫瘍溶解性ウイルスベクターのように増殖性を持つ製品の開発が進められており、このような増殖性ウイルスベクターの体外への放出の防止と、そのための検査手法の開発やリスク評価法のあり方など克服すべき点も多い。

ICH 遺伝子治療専門家グループでは、遺伝子治療薬の安全性確保の一環として、「遺伝子治療薬の

生殖細胞への移行リスクを最小にするための方策に関する ICH 見解」案に関する議論が行われている。本見解案は、遺伝子治療薬の生殖細胞への移行リスクを評価するための非臨床試験の実施スキームを提示することを目的としている。本見解案は遅くとも 2007 年はじめに最終案を取りまとめ ICH 運営委員会に報告する方針が確認されており、さらに科学的な情報が十分に集積された段階でガイドライン作成につなげていくことも確認されている。

我が国においても AAV ベクター等の新たな発現ベクターの開発が行われており、本見解案の重要性について十分検討することが必要と思われる。我が国における将来の動向を見据え、さまざまなタイプの遺伝子治療薬の開発が行われてくることが予想され、申請されてくる遺伝子治療薬の生殖細胞への挿入リスクをどの様に評価すべきかを明確に示すことも求められている。本研究では、「遺伝子治療薬の生殖細胞への移行リスクを最小にするための方策に関する ICH 見解」案について詳細な解析を行った。

「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞 への意図しない移行リスクを最小にするための方策」案は、遺伝子治療薬の安全性確保の一環として、ICH 遺伝子治療専門家会議で 2004 年から検討が開始されてきた。ラポーターとして、EMEA と厚生労働省が指名された。本見解案の構成を Table 8 に示すが、基本的事項について触れた後、安全性試験の一環として行われる生体内分布試験の結果に基づいて、どのようなスキームで非臨床試験を行っていくかがまとめられている。具体的な構成は以下のとおりである。

\*\*\*\*\*

### C.5.1 緒言

一般的には、遺伝子治療は疾患の治療、予防、診断のために遺伝子ないしは遺伝物質を患者の細胞内に導入して疾患を治療する医療と定義できる。遺伝子疾患の治療において長期間にわたる効果的な遺伝子発現が求められるケースなどでは、標的細胞のゲノムへの目的遺伝子の組み込みが治療の最終目的となることもある。

遺伝子治療は対象疾患、ベクターの構成、用いられる手法といったさまざまな観点から急速に進歩している分野である。従って、本文書に記載されている研究内容や用いられる手法は最新の科学的進歩を常に反映するよう改訂されていく必要があり、GMP、GLP 及び GCP の基準に準拠する必要がある。

生殖細胞に遺伝子を直接組み込むことを目的とする遺伝子治療は、現時点では ICH 各極でそれぞれ倫理的にも法的にも禁止されている。このような各極独自の規制について、そこに共通する科学的原則を ICH の場において確認することは非常に有用であり、各極及び ICH レベルでの規制の国際調和にも貢献すると考えられる。

本文書の目的は、遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクを最小にするための科

学的原則に関する ICH 各極の現時点での見解を明らかにすることである。

### C.5.2 一般的原則

医薬品は動物及びヒトでの安全性に関する情報の評価を含めた段階的なプロセスを経て開発される。一連の非臨床試験には、薬理、薬物動態、急性毒性や反復投与毒性、生殖発生毒性、安全性薬理、さらにはがん原性（長期安全性）に関する試験が含まれる。

非臨床試験は臨床試験における安全性や有効性を確立するための基盤となるものである。従来の医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品において必須とされる非臨床試験は、可能なかぎり M3 ガイドライン「医薬品の臨床試験実施のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」、S6 ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」などの ICH ガイドラインに従って実施することが求められている。しかし、遺伝子治療用医薬品のような革新的治療薬の非臨床試験の場合には、安全性に関する新たな視点を導入する必要がある。例えば、遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクについて検討し、それを最小にするための方策は、従来の ICH ガイドラインの範囲ではカバーできないものである。

本文書は、遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクに関する非臨床試験の試験方法やリスク評価の基本原則を明らかにするとともに、臨床試験において投与される遺伝子治療用医薬品の被験者の生殖細胞へ意図しない移行リスクを最小にするための有用な方策について示す。

生殖腺組織が遺伝子治療用医薬品に暴露される可能性があるということは、その製品の DNA が目的としない垂直伝播を引き起こす可能性を意味しており、安全性上の問題となる。特に、現在までに使用経験のない高力価の遺伝子治療用医薬品を用いたり、これまでないタイプのベクターや体内 (in vivo) での新たな遺伝子導入方法を用いる遺伝子治療においては、遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行を引き起こす重大な懸念が生じる。

### C.5.3 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクを最小にするために考慮すべき事項

遺伝子治療用医薬品由来の DNA の生体内分布に関連して、当該 DNA が生殖細胞に移行する可能性の検討においては、ベクターのタイプ、投与量、投与方法、治療の目的など多くの要素を考慮したリスク評価の結果に基づいて決定する必要がある。遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への移行リスクには複数の要素が影響を及ぼすので、それについての最終的なリスク評価に際しては、ケースバイケースの対応が必要となる。

#### C.5.3.1 生体内分布試験

生殖細胞に対する安全性評価のためには、適切な生体内分布試験を実施することが重要なポイントとなる。生体内分布試験は、臨床試験に用いる予定の製品（ベクター及び目的遺伝子の両方を含むもの。但し、生産スケールやロットは臨床試験用ロットと必ずしも同一である必要はない）を使って実施することが求められる。

一般的に生体内分布試験では、精巣や卵巣といった生殖腺を含む組織／器官を対象とする必要がある。また、動物の組織／器官内に遺伝子治療用医薬品に含まれる核酸の塩基配列が存在することを検出するに当たっては、その時点での最新の感度をもつ（場合によっては複数の）検出法を用いて実施することが望ましい。

動物を用いた試験において生殖腺に陽性の反応が認められた場合には、申請者は得られた陽性反応がどの程度の持続性をもつかを明らかにする必要がある。このためには、動物を用いてのより長期にわたる試験／観察が通常必要となり、また、遺伝子治療用医薬品の生殖細胞のゲノムへの組み込み及びそれを介した次世代への伝達の可能性に関する詳細な試験／検討も通常求められる。

#### C.5.3.2 対象患者層

生体内分布試験で被検動物モデルの生殖腺に遺伝子治療用医薬品が分布しなかった場合において、臨床試験の対象患者層の全員において妊娠する／させる可能性が一切ないことが明白である場合には、生殖細胞への移行に関して追加の試験／検討を行う必要はない。しかし、このような場合でも、臨床試験において男性被験者の精子への移行の有無を確認することが推奨される。なお、上記のとおり、対象疾患を変更したり対象患者層を拡大して臨床試験を改めて実施する場合には、生殖細胞への遺伝子治療用医薬品の移行に関して再度試験／検討を行う必要がある。

#### C.5.3.3 ベクター

各ベクターの生殖細胞への移行に関する相対的なリスクは、基本的にはその生体内分布プロフィール、細胞内でのベクターの増幅能及びゲノムへの組み込み効率、さらには患者ゲノムに潜在化したベクターが再活性化する可能性がどの程度あるのかに依存する。遺伝子治療用医薬品の開発のどの段階で当該医薬品の生殖細胞への移行に関する試験を実施すべきであるかについては、同じタイプのベクターについて既に得られている知見を参考にできる場合もある。

ベクターは、標的細胞のゲノムへの組み込み能をもつものともたないものの2つに大きく分類される。組み込み能をもつベクターでは、それ自身が宿主細胞のゲノムDNAに組み込まれるようベクター上に組み込み機構（例えば、インテグラーゼや同様のウイルス機能を利用したもの）が設計されている。一方、組み込み能のないベクターとは、組み込み機構を含めないように設計されたものである。ベクターの挿入変

異を引き起こす可能性は、ベクターのタイプごとに異なる複数の機構によることに注意しなければならない。ゲノム染色体への組み込みの際に染色体の再配列や欠失を引き起こす可能性の高いウイルスが複数知られている。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターはゲノムの特定の遺伝子座のみに組み込まれるようであり、また、レトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクターは活性化遺伝子の内部に組み込まれることが多いといわれている。

臨床適用を目指して現在開発中の遺伝子治療用医薬品に使われているベクターには、次のようなものがある。

- レトロウイルスベクター
- レンチウイルスベクター
- アデノウイルスベクター
- アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター
- 単純ヘルペスウイルス（HSV-1）ベクター
- ポックスウイルスベクター
- パラミクソウイルスベクター

これらのベクターの中でレトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクターは組み込み能をもつことが文献的に知られている。ヘルペスウイルスはゲノム中に潜在化し、再活性化する可能性のあることが既に示されている。したがって、これらのベクターを臨床使用する際には、遅発性の副作用が発現するリスクあることに注意する必要がある。上に挙げたウイルスベクター以外に、プラスミドDNAなど裸のDNA及び非ウイルスベクターも臨床試験／臨床研究にしばしば用いられている。

#### C.5.3.4 投与量

非臨床試験成績に基づいて決定される投与量は、当該遺伝子治療用医薬品の生殖腺への分布及び生殖細胞への移行の程度に多大な影響を及ぼす可能性がある。遺伝子治療用医薬品又はその構成成分の生殖腺への分布のリスクが、高用量の投与によって統計的により高まることは、直感的に理解可能なおりである。

#### C.5.3.5 投与経路

投与経路は重要な要因である。遺伝子治療用医薬品を非経口的に投与する場合には、当該医薬品が生殖腺に分布する可能性が生じる。しかし、生殖腺での分布の持続性は、当該医薬品に固有の細胞指向性にも大きく影響される。

非増殖性プラスミドDNA又は非増殖性ウイルスベクターを体外（ex vivo）で細胞に導入してから体内に移入する場合のリスクは相対的に低いと考えられる。一方、DNA組み込み能をもつ増殖性ウイルスベクターを高用量で経静脈投与する場合のリスクは相対的に高いと考えられる。さらに、シュードタイピングのようなウイルスベクターの改変を行うことによってウイルスベクターの本来の細胞指向性が変化して、生殖細胞への移行リスクが高まる可能性がある。

#### C.5.4 生体内分布試験で遺伝子治療用医薬品の生殖腺への分布が認められた場合における生殖細胞への移行リスクの評価

生殖腺を対象として遺伝子治療用医薬品由来の塩基配列の存在／発現に関する試験を動物で実施し、陽性の結果が得られた場合でも、それだけで生殖細胞が遺伝子改変されているとは判断できない。従って、生殖腺で陽性の結果が得られた場合には、さらに試験／検討を行って詳細な情報を得る必要がある。精子及び卵子を対象とした試験を必ず実施し、また、生殖細胞と生殖腺内の補助細胞との間の分布の違いについても明らかにする必要がある。生殖細胞以外のセルトリ細胞やライディヒ細胞あるいは白血球など生殖腺に存在する他の細胞で持続的な陽性反応が認められた場合には、遺伝子治療用医薬品の当該世代 (F0) から次世代 (F1) への垂直伝播の可能性を確認するための動物繁殖試験の実施を検討する必要がある。

被検動物の精子に陽性反応が認められた場合には、精原細胞／精母細胞への導入の有無を確認するために、精子形成の1サイクルに要する期間を踏まえ、1サイクルの複数の時点での動物の精子を経時的に採取し、陽性反応が継続するかどうかを確認する必要がある。その結果、精子への分布が一時的なものであれば、F0 から F1 への垂直伝播の可能性を確認するための動物繁殖試験の実施を検討する必要があるし、持続的な精子への分布が確認されれば (精子ゲノムへの組み込みも含む)、精原細胞／精母細胞への導入があったと判断し、臨床試験を実施する前に、当該遺伝子治療用医薬品を用いることによる臨床的な有用性とリスクのバランスを総合的に評価する必要がある。一方、卵子への分布が確認された場合には、たとえそれが一時的なものであっても、当該遺伝子治療用医薬品を用いることによる臨床的な有用性とリスクのバランスを総合的に評価する必要がある。

動物試験において生殖腺への分布が認められ、かつリスク／ベネフィットの観点から当該遺伝子治療用医薬品を臨床に使用することが是認される場合には、すべての男性被験者に対して、当該医薬品に由来する塩基配列の精子中での存在を試験すべきである。少なくとも精子形成の1サイクルを超えるだけの期間にわたって複数回採取した検体について試験を実施することが望ましい。この精子への分布に関する試験は、試験結果が3回連続して陰性になるまで継続して行うべきであろう。

#### C.5.5 精子への移行に影響を与える要素

AAV、レンチウイルス及びアデノウイルスベクターには、細胞への導入が細胞分裂期にかぎらず可能であることから、成熟した精子に導入される理論的な可能性が存在する。一方、レトロウイルスは細胞分裂期の細胞にのみ導入されるため、成熟した精子に導入される可能性はないものと考えられる。しかしながら、血流を循環するレトロウイルスベクター

は、盛んに分裂している精原細胞に導入される可能性が理論的に存在する。投与後全身を循環する遺伝子治療用医薬品が雄性生殖細胞に到達するまでの物理的なバリアーの有無を考慮すると、精原細胞は、バリアーとして働くセルトリ細胞に保護されておらず、血流に直接接する基底膜に存在するため、精母細胞や精子と比べて当該医薬品の導入が起こりやすいと想定される。雄性生殖細胞への導入が精子形成段階の早期に起きれば起きるほど、それに伴い、雄性生殖系列細胞の遺伝子導入が持続するリスクが大きくなり、遺伝子導入細胞の占める割合も大きくなる。

ヒトにおける精子形成のサイクルはおおよそ 64 ~74 日であるため、精原細胞又は精母細胞に遺伝子治療用医薬品が導入された場合に、遺伝子導入された精子が出現するタイミングは予測可能である。遺伝子治療臨床試験の実実施計画書を作成する際には、この点を考慮すべきである。また、動物を用いて雄性生殖細胞への遺伝子導入の持続性を確認する非臨床試験を設計する際にも、同様なアプローチ、すなわち、精子形成1サイクルに要する期間を踏まえて、精原細胞又は精母細胞に遺伝子治療用医薬品が導入された場合に遺伝子導入された精子が出現し得るタイミングについて考慮すべきである。この非臨床試験は、被検動物の精子形成に要する時間の3倍以上の期間にわたって実施し、精子形成1サイクルごとに検体の採取を行うことが望ましい。

#### C.5.6 卵子への移行に影響を与える要素

遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への移行リスクの評価方法に関して、男性におけるリスクと女性におけるリスクとで大きく異なることは明白である。生体内分布に関する動物での非臨床試験において卵子を含めた雌性生殖細胞のいずれかで陽性の結果が認められた場合には、現在の科学的レベルに基づいた解釈としては、すべての雌性生殖細胞に当該医薬品が移行しているとみなすべきである。現時点では、当該医薬品のヒト女性生殖腺への移行の有無について非侵襲的にモニターする方法がないことから、リスク評価は非臨床試験におけるデータに基づかざるを得ない。今後、この分野における適切な動物モデルや試験系が開発され、その有用性が評価されることが望まれる。

子宮内 (in utero) に遺伝子治療用医薬品を投与する遺伝子治療では、他の投与経路による遺伝子治療と比較して卵巣への移行リスクが上昇する。胎児における始原生殖細胞の生殖腺内への移動はヒトでは妊娠7週目に完了するため、それ以前の始原生殖細胞では、遺伝子治療用医薬品に直接接触し得ること、及び盛んに細胞分裂していることの2点から、胎児の始原生殖細胞への当該医薬品の移行が高頻度で起こり得ると想定される。子宮内遺伝子治療を実施する際には、母体及び胎児への生殖腺への伝播のリスクを最小にするために、この点を十分に考慮して、可能なかぎりこの期間 (妊娠時から妊娠7週



目まで)を避けて遺伝子治療を実施するべきである。さらに、子宮内投与遺伝子治療におけるこのリスクは、妊娠可能な女性を対象とする他の投与経路による遺伝子治療においても十分に考慮する必要がある。臨床試験の実施前には必ず、以上の様々な要素を踏まえつつ、かつ対象疾患や治療実施計画等、臨床の状況を可能なかぎり反映するような非臨床試験を適切に計画・実施して、リスク評価を行わなければならない。

動物を用いた生体内分布に関する試験成績にかかわらず、妊娠する／させることが現在可能な被験者やそれより若年の被験者を対象とする臨床試験においては、治療終了後1年あるいはそれ以上の期間にわたって被験者に避妊させることが望ましい。

以上の様に、本見解案は遺伝子治療薬の生殖細胞への挿入リスクを評価するための非臨床試験をどのように実施していくべきかについてICH 遺伝子治療専門家会議の見解としてまとめられる予定のものである。本見解案では、リスクに応じて臨床試験の際に考慮あるいは実施すべき試験についても触れられている。また、挿入リスクの高いと想定される製品に関しては育種試験の実施についても触れられているが、この点は専門家会議の中でも意見の分かれているところである。また、非臨床試験で実施すべき動物種の数についても意見が分かれている。さらに、生体内分布試験に用いる動物種等について、EMA のコンセプトペーパーとは異なる意見も出されている。今後これらの点について議論されることになる。

## C. 6 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究—遺伝子治療薬の新薬治験申請に必要な化学、製造、品質管理に関する情報について—

C. 5でも述べたように、今後、遺伝子治療が一般的に実用化されるための極めて重要な課題のひとつとなるのが安全性の確保である。遺伝子治療のように学問・技術が急速に進歩している分野においては、特にこれらの医薬品の開発、臨床研究の進展が著しい外国での学問・科学の進歩を踏まえ、国際的な水準からみた安全性確保方策の科学的妥当性について絶えず評価・検証する必要がある。本研究は、遺伝子治療に関する国際的動向、安全性確保方策の進展を調査し、我が国の遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保に寄与する基礎的研究を行うものである。

本年度はFDAより発出された「遺伝子治療薬の新薬治験申請(IND)における化学、製造及び品質管理(CMC)に関する情報の内容と審査」に関するガイダンス案を基に、遺伝子治療薬の品質、安全性確保において考慮すべき点を検討した。

安全で有効な遺伝子治療薬を供給するためには克服すべき多くの製造上の難問がある。最終製品の組成が複雑で多様であり、細胞の起源、感染性因子の混入の可能性や無菌性工程の必要性、最終産物を

滅菌できないなどの性質を有する。また細胞を用いた製品が多く、使用期限が短いため、製品の出荷試験が十分行われる前に患者に投与されることもある。

FDA のガイダンス案は、遺伝子治療薬の新薬治験薬申請において、申請企業に対して「化学、製造及び品質管理(CMC)」に関してどのような情報を提出する必要があるのかを示すとともに、FDA のCMC 審査官に対してIND 審査でどこを記録し、評価するかを示したものである。IND 審査の第一の目的は、治験対象者の安全性と権利の保証であり、治験薬の安全性、有効性の科学的評価の妥当性を保証することである。本ガイダンス案は、治験の段階で、製品が適切な同一性、品質、純度、力価を持つことを保証するための十分な情報が提供されているかどうかを、申請者と審査官が評価するのに役立つものである。本ガイダンスではCMC 審査官への指示と審査テンプレートが記載され、どのように審査するかが記載されている。また、製品の安全性、品質をFDA 審査官が適切に評価可能なIND 申請書を作成するために、申請者(企業)がCMC 原本として提出すべき情報に関する勧告が示されている。

本ガイダンス案は、FDA における遺伝子治療薬の治験申請にあたっての、製造方法を含めた安全対策、品質確保のための施策を理解し、さらにわが国におけるあり方を考えるのに非常に有用なものである。以下にガイドライン案の概要を示す。なお、審査官への指示については一部省略した。

### C. 6.1 製品の製造及び特性に関する情報

申請者はどこでどのように遺伝子治療薬を製造したかを詳細に提示すること。ベクター、細胞、細胞バンクシステム、試薬、賦形剤を含め、遺伝子治療薬の製造に用いた全ての構成成分を示すこと。さらに、製造工程の全ての手順を示すこと。手順の例としては、ベクターの製造と精製、ex vivo で遺伝子導入した細胞の調製、製品の最終的な処方などが挙げられる。これらの情報により製品の同一性、品質、純度、力価の評価が可能になる。詳細は「製薬業界へのガイダンス：ヒト体細胞治療及び遺伝子治療に関する指針」[35]及び「製薬業界へのガイダンス：新薬の第1相治験申請の内容とその書式」[36]を参照のこと。さらに関連するFDAの他のガイドラインや「審査官へのガイダンス案：細胞治療薬の新薬治験申請の審査方針及び審査報告書フォーマット」[37]の最終版も参考になる。

なお、審査官は審査報告書を製品審査書式(省略)と以下の項目のフォーマットに従い構成すること。

#### C. 6.1.1 製品の製造工程—構成成分

以下の項目では申請者がINDとして提出し、CMC 審査官が記録し評価すべき製造上の構成成分(原料や試薬等)に関する情報の詳細を示す。

##### (1) ベクター

申請者はベクターについて以下の情報を提供する

こと。

#### a. 遺伝子治療用ベクターコンストラクト

ベクターの履歴と由来について、以下を含めて記述する。

- 関連する制限酵素切断位置を含む遺伝子地図、及び最終ベクターの産生に用いたベクターコンストラクトとその由来
- 挿入遺伝子
- プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどの調節因子
- 選択マーカー

#### b. ベクターの模式図

ベクターの模式図には挿入遺伝子と調節領域、関連する制限酵素切断部位その他の構成要素を示す。

#### c. 塩基配列解析

- ベクターが 40kb 以下の場合：申請者は全てのベクターの全塩基配列を解析し、どのような方法で塩基配列を解析したかを記載すること。全てのオープンリーディングフレーム(予想されていたものと予期しないもの)、ベクターにコードされた遺伝子について塩基配列の注釈を要約すること。ベクターと最新のデータベースサーチにより得られる配列が整合するかどうかを示すこと。
- ベクターが 40kb 以上の場合：申請者は制限酵素切断により実施した試験を含めて、塩基配列解析の実施の程度と結果を要約すること。挿入遺伝子と隣接する領域、ベクターの改変した領域に関しては塩基配列解析を実施すること。

## (2) 細胞

### a. 同種及び自己細胞の構成

申請者は以下の情報を IND に記載すること。

- 細胞の由来：組織や細胞の種類（例えば、結腸細胞、血液細胞、神経細胞、T細胞など）。
- 細胞誘導の方法：*in vivo* でドナー細胞を誘導したり、活性化するような方法を用いているかどうか。
- 細胞の採取方法：細胞の採取方法（手術を行うのか白血球分取などの方法を用いるのか（可能であれば用いる機器についても））及び採取を行う施設の名前と所在地。
- ドナースクリーニングの方法：ドナースクリーニング法の十分な安全性を担保できるか評価するとともに、その試験方法について記載すること。FDA ではこれに関連して、「クラス II 特別規制ガイダンス文書：ヒト硬膜」[38]、「製薬業界へのガイダンス案：ヒト細胞組織由来製品におけるクロイツフェルトヤコブ病及び変異型クロイツフェルトヤコブ病のリスク低減化のための防御手段」[39]、「製薬業界へのガイダンス案：ヒト細胞組織利用医薬品のドナー適正」[40]及び「ヒト細胞組織利用医薬品のド

ナーの判定」[41]を発出している。ドナーの神経細胞や組織を用いる場合、IND に記載されているドナー適格性基準が規制側の要求に適合しているかどうかを評価するためこれらのガイドライン類を参照すること。

#### ① 自己細胞を用いる場合

ドナーが特定の病原体（例えばヒト免疫不全ウイルス（HIV）、サイトメガロウイルス（CMV）など）を有するかどうかを説明し、製品の製造に用いる培養工程により病原体が増殖しないかどうかを評価すること。ドナーが特定の病原体に陽性の場合やドナースクリーニングを実施していない場合は、ウイルスその他の感染性因子が治療を受ける患者以外の人に拡散するのを防止するための注意を記載すること。

#### ② 同種細胞を用いる場合

HIV-1、HIV-2、HBV（表面抗原及びコア抗原）、HCV、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型及び 2 型（HTLV-1、HTLV-2）、CMV、EBV、その他必要に応じて実施したウイルス等の感染性因子に関するドナー試験を記載すること。これらの試験においては、FDA が承認あるいは許可した試験試薬キットの使用を推奨する。またドナーに関する血清学的あるいは診断履歴、医療履歴（病歴）等についても報告書に記載すべきである。必要に応じて遺伝的多型性や主要組織適応抗原の一致についてデータを求めることも考慮すること。臍帯血や他の分娩由来原料を用いる場合はドナーの母親での試験を行うこと。

### b. 細胞バンクシステム

申請者は製品の製造に用いた MCB、MVB、WVB に関して以下に示すような適切な情報を示すこと。パッケージング細胞、ベクター産生細胞（微生物あるいは動物細胞）、フィーダー細胞についても説明すること。製造に用いる各細胞バンク、ウイルスバンクについてその履歴、どのような細胞から得たのか、特性解析結果、試験実施の頻度について示すこと。詳細は「生物薬品の製造に用いる細胞株の特性解析に当たって考慮すべき事項」[42]及び ICH の Q5D 文書「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」[43]を参照のこと。

#### ① マスターセルバンク（MCB）/パッケージング細胞（注1,2）

申請者は、MCBの特性に関するIND情報を、細胞の安全性、同一性、純度、安定性を適切に確立する試験を含めて説明することが望ましい。この項では以下について示す。

- 1) 製品の微生物学的特性：無菌性試験、マイコプラズマ否定試験、*in vivo*および*in vitro*の迷入ウイルス試験及び必要な場合は増殖性ウイ

ルス (RCV) 試験が含まれる。

- 2) 特定病原体の否定試験：ヒト由来細胞の場合、CMV, HIV-1, 2, HTLV-1, 2, EBV, HBV, HCV, パルボB19などについて必要に応じて試験を実施する。ウシやブタ由来の添加因子（血清や血清由来成分、トリプシンなど）を用いた細胞の場合、ウシやブタ由来の感染性因子に汚染されていないか試験を行い、試験結果に基づいて評価する。
- 3) 細胞（及び可能であればベクター）の確認試験：特定の細胞を細胞株の物理的、化学的特性（表現型、遺伝型、DNA配列その他のマーカーなど）で区別可能な試験を含む。微生物細胞バンクの場合、菌株の同定、選択耐性の試験を含め、バクテリオファージの試験を考慮すること。
- 4) バンク細胞の純度：これには混入している目的外細胞の同定や混入比率も含まれる。
- 5) 細胞の活性（活性化リンパ球、ドパミンの分泌、インスリン産生など）
- 6) 製品の安全性上重要な工程：これには、次のような項目が含まれる。
  - 培養条件：これには製造に用いる全ての培地や試薬・添加剤について、試薬等の保証書のコピーとともに記録する。
  - ベクター産生細胞を樹立するために用いたベクターの MCB/親細胞への導入方法（トランスフェクション、トランスダクション、感染）
  - 産生細胞クローンの分析法と選択法
  - MCB の凍結方法、保存方法、解凍方法。細胞濃度、保存したバイアル数、保存温度、細胞バンクを保存している施設の所在、凍結保存後の継代数を重ねた時の MCB の遺伝的あるいは表現形質の安定性や細胞の生存率など、関連する情報を含む。FDA は IND の実施中、製造終了後の細胞(EOP)の安定性の評価を一回限りの試験として実施することを推奨する。この試験は通常は製品開発の後の段階で実施されるもので、承認申請に求められる。

注1. エコトピック細胞株をレトロウイルス産生細胞として用いる場合、申請者はエコトピックレトロウイルス試験（製品試験の項を参照）を実施することが望ましい。

注2. 動物由来のフィーダー細胞をヒト細胞の増幅に用いる場合（ヒトとヒト以外の動物細胞を共培養する場合）、最終製品は異種細胞移植製品に定義される。「製薬業界へのガイダンス：ヒトへの異種細胞移植製品の使用における由来動物、製品、前臨床、臨床に関する問題」 [44] 及び「異種移植における感染症問題に関するPHS指針」 [45]を参照。

## ②マスターウイルスバンク (MVB)

申請者はMVBの詳細と安全性、純度、同一性を

確認するために実施した試験について提示すること。以下の点について示すこと。

- MVBの履歴と由来
- 培養のスケールアップに用いた培養方法
- 製造に用いた培地や試薬類の試験と保証書
- 製品の微生物学的試験：無菌性試験、マイコプラズマ否定試験、in vivo, in vitroでの感染性因子試験
- 特定病原体の否定試験、例えば、ヒト由来細胞の場合はヒトウイルスなど、製造に用いた細胞株（マウス、霊長類など；MCBを参照）に由来する病原体の否定試験
- 増殖性ウイルスの否定試験
- 遺伝子治療用ベクターと治療用遺伝子が存在することの確認試験（サザンブロットなどの方法による）
- MVBの凍結保存に関する情報を保存条件や保存場所も含めて示す。

## ③ワーキングセルバンク (WCB) /ワーキングウイルスバンク (WVB)

WCB/WVB はひとつあるいは複数の MCB/MVBのバイアルに由来するものである。WCB/WVBの特性を示すのに必要な情報量は MCB/MVBに必要なものよりも通常は少なくてすむ。2層構造の細胞バンクシステムがある場合、WCB/WVBについて以下の試験を行うことが望ましい。

- in vitro迷入ウイルス試験
- 増殖性ウイルス
- 細菌、カビの無菌性
- マイコプラズマ
- 確認試験の一部（サザンブロットなど）

## (3) 試薬類

申請者は製造に用いる全ての試薬をリストアップし記載しておくことが望ましい。試薬とは、細胞の増幅、分化、選択、精製、さらには他の重要な製造工程において必須であるが、最終製品には含まれないものであり、例えば、牛胎児血清、トリプシン、成長因子、サイトカイン、モノクローナル抗体、抗生物質、細胞分離装置、培地、培地成分などがあげられる。これらの試薬は、特に感染性因子の迷入により、最終製品の安全性、力価、純度に影響する。

### a. 製造に用いる試薬の一覧

申請者は IND 中に培養液に添加するものを含めて製品の製造中に用いる全ての試薬をリストアップすることが望ましい。各試薬について以下の点を明らかにしておく必要がある。

- ① 試薬の使用時の濃度
- ② 試薬供給業者／製造者
- ③ 試薬の原料：用いる試薬の原料がヒト由来である場合には、製品の製造や調製に用いる全てのロットの安全性が保証できるような適切な方策がとられているかを明らかにすること。ブタ由来試

薬を用いる場合は、試薬にブタパルボウイルスの混入がないことを保証書あるいは他の文書で示すこと。反芻動物由来原料を用いる場合は、原産国を示し、BSE 発生国あるいは BSE リスクの高い国由来のものでないことを明らかにすること。

④試薬の品質：申請者は可能な限り FDA が承認したものであるか、あるいは臨床グレードの試薬を用いること。

(審査官は、試薬等が生物製品、医薬品あるいは医療用具として規制を受けるものである場合、専門の審査官との相談審査を考慮すること。期待される情報の例としては「ヒト治療用モノクローナル抗体の製造と試験法におけるの考慮事項」[46]を参考にすること。)

④「保証書」あるいは「相互参照文書」：もし、申請者が製造工程の一部で、FDA で承認されていない研究用レベルの試薬を使用している場合は、その試薬の使用に当たってその原材料の起源、品質や安全性を立証する情報を提出すること。試薬の販売業者が試薬製造業者規制ファイルを FDA に提出されている場合には、申請者からの「相互参照文書」を治験申請資料として提出することも可能である。試薬製造業者から得た保証書 (COA) を用いる場合、行われた試験が妥当かどうかを評価し (下記の品質管理プログラムを参照)、その情報を IND に添付すること。

#### b. 品質管理プログラム

用いる試薬が FDA の承認を得ていない場合、試薬の安全性や品質確保のための追加試験が必要となる。安全性試験 (無菌性、エンドトキシン、マイコプラズマ、迷入ウイルス等)、機能解析、純度試験、有害物質の否定試験 (残存溶媒試験など) を含む品質管理プログラムを確立すること。どの程度の試験を行うべきかについては対象となる試薬を製造工程でどのように使用するかに依存する。

#### c. 最終製品からの試薬の除去の確認

製造に用いた試薬等のうち毒性が既知あるいは毒性を持つ可能性のあるものについては、最終製品における残存量を試験し、残存量を調べた試験方法を記載すること。治験の開始前に、品質管理試験が用いた試薬の除去を十分に説明するものであるかどうか、またロット出荷試験が適切であるかどうかを明らかにすること。

#### d. その他の問題点

ペニシリン感受性の患者もいるため、申請者はベータラクタム系の抗生物質を治療薬の製造に用いないことが望ましい。ベータラクタム系の抗生物質を用いる場合は、過敏性反応を回避するための注意を払うこと。(ベータラクタム系の抗生物質が製造に用いられている場合、審査官は適切な除去基準の設定や投与する患者への適切なインフォームドコンセントも含めて、臨床審査官と相談すること。また申請者に抗生物質の使用の中止や他の抗生物質への変更を求めること。)

#### (4) その他

##### a. 複合製品

本指針が適応される複合製品とは、CBERの所管するものであり、ヒト遺伝子治療用医薬品と医薬品あるいは医療用具が組み合わされた最終製品を指す。組み合わせる医薬品や医療用具はFDAの市販の承認を受けたもの (例えば新薬承認申請 (NDA)、市販前承認申請 (PMA)、あるいは一定の要件を満たした医療用具の市販の届けなど)、あるいは治験中のものも含まれる。

複合製品の医薬品成分や医療用具に関する情報が既に FDA に提出されている場合 (例えば他の IND 治験申請、IDE 医療用具治験届けあるいはマスターファイルとして)、申請者は以前提出した FDA でオーソライズされた相互参照ファイルを提出することができる。

##### b. 協議審査

複合製品の医療用具の審査、医薬品成分の審査では CMC 審査官と他の審査官との相談審査、共同審査を行う必要がある。この項ではその手順を示しているが、詳細は省略する。

#### C. 6. 1. 2 製品の製造—製造工程

申請者は、遺伝子治療用製品の製造と精製の全ての工程について詳細な情報を示さなければならない。製造及び精製工程や製造工程管理試験、最終製品での試験に関する概略図の添付は非常に有用である。

##### (1) ベクターの産生・精製

申請者は遺伝子治療用ベクターの産生方法について以下の点を説明すること。

- 細胞の培養方法及び細胞増殖に用いた血清、成長因子、抗生物質等の培地の組成
- ベクター産生を行う際のおよその細胞継代数と細胞播種の密度
- 遠心、カラム精製、密度勾配遠心などの精製のための全ての工程

##### (2) Ex vivo で遺伝子改変した自己細胞あるいは同種 (非自己ヒト由来) 細胞の調製

自己細胞あるいは同種 (非自己ヒト由来) 細胞はウイルスベクターまたはプラスミドベクターで改変することができる。申請者は以下の方法について説明すること。

##### a. 細胞の採取/加工方法及び培養条件

採取した細胞浮遊液の量及び細胞数を記載すること。細胞採取に機械的処理あるいは酵素処理を行う場合、細胞の選択や分離に用いる機器、密度勾配や磁気ビーズの使用、蛍光励起細胞分離装置 (FACS) の使用などを記載する。培養系の説明 (フラスコ、バッグ培養など) 及び閉鎖系か開放系かについても述べる。全ての工程管理試験について説明するこ

と。

#### b. Ex vivoでの遺伝子改変

遺伝子の導入方法の詳細（トランスダクション、トランスフェクション、感染など）を説明すること。細胞の選択法（方法、使用機器、試薬など）及び放射線照射などのその他の細胞改変ステップについても詳細に説明すること。遺伝的改変後に細胞を培養する場合は、培養条件と培養時間を記載すること。

#### c. 放射線照射

自己あるいは非自己ヒト由来細胞を患者に投与する前に放射線照射する場合、細胞の増殖能は喪失しているが、放射線照射後も細胞の治療目的となる機能が維持されていることを示すデータを提出すること。細胞放射線照射装置の照射線量の校正に関する情報も必要である。

#### d. 工程スケジュールと中間製品での保管

細胞の採取からハーベストまでの各ステップで必要な時間経過を報告すること。製造の各段階でどのような試験をいつまでに行われなければならないかを明らかにすることが重要である。また人に投与するまでの間、凍結保存する場合は、そのことを安定性試験のデータとともに記載すること。細胞の採取からハーベストまでの間の細胞保存の時期と保存条件も記載する。

（審査官は、保存の間のバルクハーベストの安定性を担保するために十分な方策がとられているかどうかを評価すること。）

### (3) 最終ハーベスト

申請者は最終製品に関する詳細を提示すること。最終細胞ハーベストは最終製剤化の前に遠心操作を行うのかどうか、遠心を行う場合は遠心操作による細胞の洗浄条件や用いる培地についても記載すること。細胞を製剤化後に凍結保存するのか、すぐに患者に投与するのかを明らかにすること。最終ハーベストを保存する場合、保存条件と保存期間を記載すること。

### (4) 最終処方

最終製品の処方の詳細について記載すること。製剤にどのような成長因子やヒト血清アルブミン等の添加剤が含まれ、またそれらをどのような原料から得たのかについても明らかにすること。これら添加剤の製造供給業者及び使用濃度を明らかにすること。さらに最終製品における細胞密度、細胞濃度、ベクターの濃度を示すこと。最終製品を医療機関まで凍結して輸送する場合は、どのような条件で輸送するのか、一定の解凍条件を保証するデータがあるかについて記載すること。

## C. 6. 2 製品試験

製造工程が管理されていなければ、ロット間で一定の製品を製造することは困難であり、目的とする

臨床効果に必要な重要なパラメータを明らかにすることも困難である。詳細は「バイオテクノロジー医薬品を含むヒト生物由来製品の同一性、同質性を立証するためのFDA指針」[47]を参照のこと。

遺伝子治療薬の適切な製品試験には、安全性確保の観点で行う微生物試験（無菌試験、マイコプラズマ否定試験、迷入ウイルス試験など）や、製品の特性を評価するための確認試験、純度試験（エンドトキシンを含む）、生存率試験（ex vivo 遺伝子改変製品の場合）、力価等の試験が含まれるがこれらに限られるものではない。申請者は、セルバンク、ウイルスバンクの作製や製造工程そのものの評価、さらには各製品のロットごとの品質や製品の一定性を確保するために、製造工程を通じて適切な試験を実施することが望ましい。

製造工程が適切にコントロールできていない場合には、ロットごとの製品の恒常性を担保することは困難である。このような場合は、目的とする臨床効果を得るための製造における重要なパラメータを設定することも困難になるとされている。

中間製品の受け入れ基準や最終製品の出荷基準に用いられる規格を明記することが望ましい。規格とは製品や製品の製造に用いる原料の品質を確保するための品質基準（すなわち試験法、工程管理、受け入れ基準）である。受け入れ基準は、試験の限度値やその幅、あるいは他の規格値が含まれる。規格は製品開発段階で適切なものにすべきである。なぜならば、出荷基準は製品の承認に向けた製品の開発過程で絞り込み、確立していく必要があるためである。出荷試験、特性解析試験、ワーキングセルバンク、マスターウイルスバンク、ワーキングウイルスバンク試験について、ロット番号もしくは識別番号、製造日、試験名、試験方法、試験の感度と特異性、出荷基準、試験結果を入れた表の形で提出すること。

### C. 6. 2. 1 微生物試験

申請者は微生物試験を細胞バンク、ウイルスバンク、中間工程、最終製品の各段階で適切に実施することが望ましい。

#### (1) 無菌試験（細菌及びカビの試験）

##### a. 試験方法

適切な試験法としてはFDAの生物製剤基準21CFR610.12に記載の方法や米国薬局方<71>無菌試験法[48]に記載の方法がある。その他の方法を採用する場合は、その妥当性を示すこと。「試験や工程の同等性」に関する生物学的製剤基準21CFR610.9に示すように、製品の承認の前に、その他の方法の同等性が前述の方法と同等かより優れていることを示す必要がある。

製造に抗生物質を用いている場合には無菌試験に先立って抗生物質が除去されていることを示す文書を提出すること。抗生物質の除去が不可能な場合には米国薬局方<71>無菌試験[48]に記載の静菌試験や静カビ試験を用いて無菌試験の妥当性を評

価する。このような評価により、製品の中に含まれる残存抗生物質が無菌試験の結果に及ぼす妨害作用がないことを担保することができる。

## b. 試験のタイミング

申請者は、培養期間を超えた培養や細胞の活性化、他の加工を施すなどの製造の重要な段階で工程管理としての無菌試験を実施することが多い。申請者は、製造工程のどの段階でどのような方法で工程管理試験としての無菌試験を行うのかを明らかにすること。どのような工程管理無菌試験を採用するかについては申請者の責任において判断してよい。最終製品を使用前に凍結する場合には、患者に投与する前に結果が得られるように、申請者は凍結前に無菌試験を行うことが望ましい。しかし、解凍後に洗浄や培養などの閉鎖系でない操作を行う場合には解凍後に無菌試験を繰り返すことが必要であろう。工程管理無菌試験の結果は最終製品の必須の規格として設定することが望ましい。

細胞を 14 日間の無菌試験(生物学的製剤基準又は米国薬局方無菌試験)の結果が出る前に患者に投与する必要がある場合、最終製剤化された製品のグラム染色試験と最終製品の 14 日間の完全な無菌試験を実施し、グラム染色試験の陰性の結果に基づいて製品の出荷を行うことが望ましい。最終製品が遺伝的に改変した細胞治療薬で、14 日間の無菌試験の結果が出る前に患者に投与する場合、最終ハーベストの 48-72 時間前に試料を採取するか、培養の最終培地交換の後に試験を行い、製品の出荷の前に結果を得ておくことが望ましい。48-72 時間の無菌試験で菌の増殖が見られないこと、およびグラム染色陰性を出荷基準として用いることができる。この場合、患者に投与された後であっても 14 日間の無菌試験を実施することが望ましい。14 日間の無菌試験の結果が患者に投与する前に得られない場合には、治療開始後に製品に菌の混入が見いだされた場合の対処方法を明らかにすること。菌が混入した医薬品が患者に投与されると重大なリスクが発生する可能性が高いことより、重大な副作用発生の報告基準に従って FDA 及び治験に参加している全ての研究者に情報を提供する手続きも含む必要がある。

## (2) マイコプラズマ

マイコプラズマの混入にはいくつかの汚染源が考えられる。なかでも 2 つの主要汚染源として、培養に用いた動物の血清由来製品と培養設備の環境、特に開放系(非閉鎖系)での培養があげられる。申請者は、最も汚染の検出に適した時点、すなわち培養した細胞を集めて洗浄する前等の時点でマイコプラズマ否定試験を行うことが望ましい。試験は細胞と培養上清の両方について実施すべきである。細胞製品の多くは寿命が限られているため、出荷試験として一般的に推奨されている培養法[42]を採用することが困難な場合が多い。このような場合、製剤の開発段階では、PCR 法によるマイコプラズマの検出やその他の迅速な検出法を採用することが望

ましい。製品の承認申請においては、代替法が十分な感度と特異性を持っていることを証明するデータを提出する必要がある。

## (3) 迷入感染性因子(ウイルス)試験

申請者は、以下に示す迷入ウイルス試験を実施し、INDに記載することが望ましい。迷入感染性因子(ウイルス)の規制に関する情報は、ICH-Q5Aガイドライン「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」[49]及び参考資料[42]を参照すること。

### a. in vitro ウイルス試験

株化された細胞を用いる場合、その細胞株について説明し、in vitro ウイルス試験について説明することが望ましい。In vitro ウイルス試験は MCB、WCB、MVB、WVB、及び製造に用いた培養を終了した細胞(EOP)、ベクター製品について実施すること。試験では試験検体(MCB, MVB, etc.)をヒト細胞の MCR-5、サル由来の Vero 細胞などの種々の感受性のある指標細胞に添加して行う。細胞の選択は、製品をどのような原材料から得たかによる。製品の製造に用いた原材料と同じ種や組織から得た単層培養細胞を用いる試験系が必要である。ヒトウイルスを検出する場合にはヒトやヒト以外の霊長類から得た細胞を用いるべきである。また、細胞傷害性ウイルス及び血球凝集性ウイルスの両方を検出できるような試験法を採用することが必要である。

### b. in vivo ウイルス試験

株化された細胞を用いる場合、検体(MCB, MVB など)を成熟マウス及び乳飲みマウス、発育鶏卵などへの接種により in vivo ウイルス試験を実施することが望ましい。モルモット、ウサギ、猿など他の動物を用いた試験も必要に応じて追加すること。これらの試験では被検動物に何らかの病的異常が認められることで評価する。追加の試験が必要な場合、用いた動物が適切であることを説明すること。

### c. 選択した迷入ウイルスの種特異的試験

MCB, MVBについて適切な種特異的ウイルスに関する試験を実施することが望ましい。以下に示すように、実施した試験とその方法、試験を実施した製造段階(細胞バンク、ウイルスバンク、最終製品など)を明らかにすること。

#### ①種特異的ウイルス

MCB, MVBにおいて実施した全ての種特異的ウイルス試験について説明すること。製造にげつ菌類細胞株を用いる場合は、げつ菌類特異的ウイルスについて実施する必要がある。これらのウイルスは通常、抗体産生試験、マウス抗体産生(MAP)、ラット抗体産生(RAP)、ハムスター抗体産生(HAP)により検出する。製品にヒト由来細胞株を用いる場合、ヒトの病原体(CMV, HIV-1,2, HTLV-1,2, EBV, HCV, B19,その他のヒトウイルス)について必要に応じて