

Table1 日米EUで承認されている改変型タンパク質医薬品

| 分類        | 一般名                   |       | 承認年  | 適応疾患      | 改変目的  | 改変部位                                | 付加された主な機能                |
|-----------|-----------------------|-------|------|-----------|-------|-------------------------------------|--------------------------|
|           | 米国                    | EU 日本 |      |           |       |                                     |                          |
| アミノ酸配列改変型 | Insulin Lispro        |       | 1996 | 糖尿病       | PK    | B28Pro→Lys, B29Lys→Pro              | 速効性(多量体形成抑制、血中移行促進)      |
|           | Insulin Aspart        |       | 2000 | 糖尿病       | PK    | B28Pro→Asp                          | 速効性(多量体形成抑制、血中移行促進)      |
|           | insulin Glulisine     |       | 2004 | 糖尿病       | PK    | B3Asn→Lys, B29Lys→Glu               | 速効性(多量体形成抑制、血中移行促進)      |
|           | Insulin Glargine      |       | 2000 | 糖尿病       | PK    | A鎖のC末端のAsn→Gly, B鎖のC末端にArg2個付加      | 持続性(中性pHでの溶解性低下による徐放化)   |
|           | insulin Detemir       |       | 2005 | 糖尿病       | PK    | B30Thr欠損, B29LysにC14脂肪酸結合           | 持続性(アルブミンとの結合による)        |
| t-PA      | Reteplase             |       | 1996 | 急性心筋梗塞    | PK    | Fドメイン, EGFFドメイン, K1ドメイン欠損, 糖鎖なし     | 血中半減期延長(3分→90分)、血栓溶解速度上昇 |
| t-PA      | Tenecteplase          |       | 2000 | 急性心筋梗塞    | PK    | PドメインとK1ドメインの37アミノ酸置換               | ファイブリン結合特異性上昇、PAI-1拮抗性上昇 |
| t-PA      | Pamiteplase           |       | -    | 急性心筋梗塞    | PK    | K1ドメイン欠損, Arg275→Glu                | 血中半減期延長                  |
| インターフェロンα | Interferon alfacon-1  |       | 1997 | C型肝炎      | PD    | 各サブタイプで出現頻度の高いアミノ酸に置換               | 比活性上昇                    |
| G-CSF     | Nartograstim          |       | -    | 好中球減少症    | PD    | N末端付近5アミノ酸置換                        | 比活性上昇                    |
| 糖鎖改変型     | Imiglucerase          |       | 1994 | ゴーシェ病     | PK    | シアル酸を酵素的に除去し、糖鎖末端をマンノースに            | 標的細胞(マクロファージ)への取り込み促進    |
|           | Darbepoetin alfa      |       | 2001 | 貧血        | PK    | アミノ酸置換によりN型糖鎖付加部位を2箇所追加             | 血中半減期延長                  |
| PEG結合型    | Peginterferon alfa-2a |       | 2002 | C型肝炎      | PK    | PEG修飾(40kDaの分岐型PEG, 1箇所, Lys)       | 血中半減期延長                  |
|           | Peginterferon alfa-2b |       | 2001 | C型肝炎      | PK    | PEG修飾(12kDaのPEG, 1箇所, Lys他)         | 血中半減期延長                  |
|           | Pegfilgrastim         |       | 2002 | 好中球減少症    | PK    | PEG修飾(20kDaのPEG, 1箇所, N末端)          | 血中半減期延長                  |
|           | Pegvisomant           |       | 2003 | 先端巨大症     | PD+PK | 9アミノ酸置換+PEG修飾(5kDaのPEG, 4-6箇所, Lys) | GHアンタゴニストとしての作用+血中半減期延長  |
| 融合タンパク質   | Denileukin Difitox    |       | 1999 | 皮膚T細胞リンパ腫 | PD+PK | IL2 + Diphtheria toxin              | IL2受容体に結合                |
|           | Etanercept            |       | 1998 | 関節リウマチ    | PD+PK | TNFR + Fc                           | TNFに結合+血中濃度持続            |
|           | Alefacept             |       | 2003 | 尋常性乾癬     | PD+PK | LFA3 + Fc                           | CD2に結合+血中濃度持続            |
|           | Abatacept             |       | 2005 | 関節リウマチ    | PD+PK | CTLA4 + Fc                          | CD80/CD86に結合+血中濃度持続      |

PD=pharmacodynamics: 薬効に関わる機能を改変  
PK=pharmacokinetics: 体内動態を改変

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない伝達リスクを最小にするための方策に関する研究

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

遺伝子治療薬の生殖細胞への挿入リスクは、染色体への挿入変異リスクと並び遺伝子治療薬の安全性に関する非常に重要な課題である。本年度は ICH 遺伝子治療専門家会議において検討が続けられている「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない伝達リスクを最小にするための方策」案を中心に調査・研究した。本文書は、ICH の「見解」として 2007 年までに公表される予定であり、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スキームを含めた非臨床試験の方法、非臨床試験の結果から臨床試験の実施をどの様な判断するか、また臨床試験の実施に当たっての対応等が含まれる予定である。特に、非臨床試験に当たって実施すべき試験を選択していくためのフローチャートが提案されており、遺伝子治療薬のリスクに応じた実施すべき試験の選択法が示されようとしている。今後、我が国においてもアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた遺伝子治療や制限増殖能をもつウイルスベクター製品の開発も進んでいることから、本見解案が遺伝子治療薬開発における安全性評価に非常に有用であると考えられる。

### A. 研究目的

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伝達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伝達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伝達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

## B. 方法

本年度は、ICH 見解案の「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞 への意図しない伝達リスクを最小にするための方策」を中心に調査研究を行った。また、関連する指針としてヨーロッパ医薬品庁(EMEA)のコンセプ

トペーパー(1)についても調査研究を行い、我が国や FDA との規制の違いや、共通する重要事項などを明らかにした。

## C. 結果及び考察

「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞 への意図しない伝達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。ラポーターして、EMEA と厚生労働省が指名された。本見解案は表 1 に示す様な構成からなり、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、どの様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。

\*\*\*\*\*

### 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伝達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。

## 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伝達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伝達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伝達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伝達を引き起こす重大な懸念が生じる。

## 3. 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない伝達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 が生殖細胞に伝達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伝達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。

### 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。

### 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、生殖細胞への伝達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伝

達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伝達に関して再度試験／検討を行う必要がある。

### 3) ベクター

各ベクターの生殖細胞への伝達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伝達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、組込み能のないベクターとは、組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。

#### 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伝達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。

#### 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、生殖細胞への伝達リスクが高まる可能性がある。

#### 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伝達リスクの評価

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 との間で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。

#### 5. 精子への伝達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、被験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。

#### 6. 卵子への伝達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伝達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伝達され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伝達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伝達リスクが上昇する。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

当該医薬品の伝達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様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ます。



る。さらに、生体内分布試験に用いる動物種等について、EMEA 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ていくことになる。

#### D. 結論

本年度は ICH 遺伝子治療専門家会議において検討されている「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない伝達リスクを最小にするための方策」案について調査・研究した。本見解案では、非臨床試験に当たって実施すべき試験を選択していくためのフローチャートが提案されており、遺伝子治療薬のリスクに応じて実施すべき試験の選択を示すことが目的とされている。今後、我が国においても AAV ベクターを用いた遺伝子治療や制限増殖能をもつウイルスベクター製品の開発も進んでいることから、本見解案が遺伝子治療薬開発における安全性評価に非常に有用であると考えられる。

#### E. 参考文献

1. EMEA/CHMP/SWP/110180/2004:  
idConcept paper on the development of a committee for medicinal products for human use (CHMP) guideline on non clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors.

#### F. 業績

##### 1. 論文発表

- 1) Iwata,A. Sato,K., Yamaguchi,T., Yoshiake,N., Tomoda,A.: Suppression of proliferation of poliovirus and porcine parvovirus by novel phenoxazine, 2-amino-4,4a-dihydro-

- 4a-7-dimethyl-3H-phenoxazine and 3-amino-1,4a-dihydro-4a-8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 905-907 (2005)
- 2) Hosono,T, Mizuguchi H, Katayama K, Koizumi,N, Kawabata,K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Watanabe Y, Mayumi T, Hayakawa T.; RNA interference of PPARgamma using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene.* 348, 157-165. (2005)
- 3) Xu ZL, Mizuguchi H, Sakurai F, Koizumi N, Hosono T, Kawabata K, Watanabe Y, Yamaguchi T, Hayakawa T.; Approaches to improving the kinetics of adenovirus-delivered genes and gene products. *Adv Drug Deliv Rev.* 57, 781-802. (2005)
- 4) Yamamoto,Y., Akita,Y., Tai,S., Fukasaku,S., Yamaguchi,T., Oshizawa, T., Yamaoka,K., Shimamura,M., Hazato,T.; Two-dimensional electrophoresis of disease-associated proteins in human cerebrospinal fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J. Electrophoresis.* 49, 23-27 (2005)
- 5) Kawabata K., Sakurai F., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol. Therapy.* 12, 547-554 (2005)
- 6) Mizuguchi H., Xu Z-L., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Efficient regulation of gene expression using self-contained fiber-modified adenovirus vectors containing the tet-off system. *J. Control. Release.*, 110, 202-211 (2005)
- 7) Yoji Sato, Ryo Nakamura, Mitsutoshi Satoh, Kayoko Fujishita, Satoko Mori, Helen Kiriazis Seiichi Ishida, Teruhide Yamaguchi, Kazuhide Inoue, Taku Nagao and Yasuo Ohno: Thyroid Hormone Targets Matrix Gla Protein Gene Associated with Vascular Smooth Muscle Calcification. *Circulation Res.* 97, 550-557 (2005)

- 8) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities. *Gene Ther.*, 12, 1424-1433 (2005)
- 9) 水沢左衛子、岡田義昭、堀内善信、田中建志、佐藤功栄、金子健二、佐々木祐子、田中利明、伴野丞計、友水健雄、速水照一、土方美奈子、平子一郎、真弓忠、三上貢一、三代俊治、宮本誠二、牟田健吾、Thomas Weimer、Todd Gierman、小室勝利、山口照英：C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製。輸血学会雑誌51, 515-519 (2005)
- 10) Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Naoya Koizumi, Naokazu Inoue, Masaru Okabe, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa, and Hiroyuki Mizuguchi: Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. *Gene Therapy*. in press (2006)
- 11) 山口照英：ICH 遺伝子治療専門家会議 シカゴミーティングと今後の展望。ファルマシア、(印刷中)
- 12) 山口照英：医薬品各条の改正点－生物薬品。薬局、(印刷中)

解析について。第5回日本再生医療学会総会。(2006. 3. 8. 岡山)

## 2. 学会発表

- 1) 豊田淑江、押澤正、鈴木孝昌、藤野智史、最上知子、井上和秀、澤田純一、山口照英：表面プラズモン共鳴を用いた9-シスレチノイン酸のレチノイドX受容体との結合解析とHX531のアンタゴニスト効果について。第78回日本生化学大会(2005. 10. 14、神戸)
- 2) 山口照英：遺伝子治療用ベクターの安全性に関する最近の動向(ICH 専門家会議)。第5回日本医薬品等ウイルス安全性研究会シンポジウム(2005、12、16、東京)
- 3) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を持つフィーダー細胞の

表1 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない伝達リスクを最小にするための方策

- 
1. 緒言
  2. 一般的原則
  3. 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない伝達リスクを最小にするために考慮すべき事項
    - 1) 生体内分布試験
    - 2) 対象患者層
    - 3) ベクター
      - ・ 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
    - 4) 投与量
    - 5) 投与経路
  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伝達リスクの評価
  5. 精子への伝達に影響を与える要素
  6. 卵子への伝達に影響を与える要素
-

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向に関する研究  
— 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 —

分担研究者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第一室長

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向を踏まえた評価に関する研究の一環として、本年度は米国 FDA の「遺伝子治療薬の新薬治験申請 (IND) に必要な化学、製造及び品質管理(CMC)情報に関するガイダンス案」について検討した。本ガイダンス案は、遺伝子治療用医薬品の新薬治験申請にあたり、申請者が CMC に関してどのような情報を提出する必要があるのか、また、審査官はどのような点に注意して審査報告書を作成すべきかをまとめたものである。遺伝子治療薬の品質、安全性面で考慮すべき点、試験を行うべき内容などが具体的かつ詳細に提示されており、治験のどの段階までにどのようなデータを揃えるべきかも示されている。フォーマットが示され、それに従って書類を作成することにより遺伝子治療薬の新薬治験申請および審査を効率的に行うことが可能である。本ガイドライン案はわが国における遺伝子治療薬の新薬治験申請における品質、安全性確保のあり方にも非常に参考になるものである。

## A. 研究目的

遺伝子治療は、現在、効果的な治療法のないガンや各種遺伝性疾患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糖尿病や動脈硬化等のいわゆる成人病に対しても、既存の方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。一方でアデノウイルスベクターを用いた臨床研究における死亡事故やレトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency; X-SCID) の遺伝子治療における T 細胞白血病の発症など、遺伝子治療により予想を超える重篤な副作用も生じている。このように遺伝子治療のような革新的医療技術には、未知、未経験の要素が多く、治療法として確立するためには解決すべき課題

が数多く存在する。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、以上のような現状を踏まえ、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。

## B. 研究方法

FDA が 2004 年 11 月に FDA 審査官および申請者に向けて発出した「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」ガイダンス案[1]を中心に、関連する各種基準やガイドラインについても調査研究を行い、遺伝子治療薬の品質、安全性確保において考慮すべき点やわが国との規制の違いなどを検討した。

## C. 研究結果及び考察

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。

### I. 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」[2] 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」[3] 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」[4] 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。

#### 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」[5]、「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」[6]、「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」[7]及び「ヒト細胞組織利用医薬品のドナーの判定」[8]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」[9]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」[10]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。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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）
- 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、保存したとバイアル数、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」 [11] 及び「異種移植における感染症問題に関する PHS 指針」 [12] 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、試薬等が生物薬品、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」[13]を参考にすること。）
- ⑤ 「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で 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。

## 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。細胞の選別法（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充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。

## II. 製品試験

製造工程が管理されていないければ、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」[14]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。

## 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[15]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[15]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、培養期間を超えて培養したり、細胞の活性化や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