

なことを追記した。また、増殖性レンチウイルス否定試験の感度を示すためには適切で代表的な陽性対照あるいは標準品の選択が必要であるが、全てのアクセサリー遺伝子を欠損した弱毒 HIV を陽性対照として用いることは有用であるということを追記した。

- (8) レンチウイルスベクターの特性解析と品質管理試験の項、癌原性については、ドラフトにあったプロウイルス DNA の挿入部位の同定、モニタリングを求める記載は削除し、ex vivo で遺伝子導入した細胞の一部を保存しておくことのみ考慮を求める記載に変更した。

本指針は今後遺伝子治療薬として臨床開発が期待されるレンチウイルスベクターについて基となるウイルスの性質、ベクターの特徴と欠点、安全性を確保するためのベクターの設計および製造方法、レンチウイルスベクターの特性解析と品質管理試験について、最新の知見をもとに有用な情報がまとめられたものとなっている。本指針の内容は、今後、日本におけるレンチウイルスベクターの開発と製造に関する安全性確保のあり方を考える上で非常に参考になると考えられる。

### C.6.2 レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療における重篤有害事象と安全性確保対策

レトロウイルスベクターは現在の遺伝子治療プロトコールの約 1/3 と最も広く使用されているベクターであるが、遺伝子導入効率が十分でないことなどによりこれまであまり大きな治療効果は得られていなかった。しかし、フランスのネッカー小児病院において 1999 年より実施された X 連鎖重症複合免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency; X-SCID)に対するレトロウイルスベクターを用いた幹細胞遺伝子治療では、10 例中 9 例で非常に有効な成績が得られ、遺伝子治療で初の成功例とされた。しかしながら、治療から約 3 年後の 2003 年までに、治療に成功した患者 2 名において遺伝子治療が原因となり T 細胞が異常増殖し、白血病を発症するという重篤な副作用の発現が判明し、遺伝子治療関係者に衝撃を与えた。平成 15 年度の報告書ではこの重篤な副作用の発現に関連して 2004 年 3 月までに明らかになった事項と各国の対応、今後取るべき安全性確保対策について検討した。なお、2005 年 1 月には 3 例目の症例も報告された。

#### C.6.2.1 X-SCID 遺伝子治療による副作用の発現機構

X-SCID は IL-2 受容体サブユニットのコモンガンマ鎖( $\gamma_c$ )の遺伝的な欠損が原因で T 細胞、NK 細胞への分化の初期段階がブロックされ免疫不全を生じる疾患で、通常生後 2 年以内に感染症で死亡する。今回フランスで実施された遺伝子治療は小児患者より得た CD34<sup>+</sup> 自己骨髄造血前駆細胞に対してレトロウイルスベクターを用いて ex vivo で  $\gamma_c$  遺伝子を導入後患者に戻すという治療法で、10 例中 9 例において欠損していた成熟 T 細胞の出現、免疫機能の長期にわたる改善が認められ、特別な補充療法を受けなくても日常生活を送ることができるまでに回復した。しかし治療から

約 3 年後、2 例において T 細胞の異常増殖、白血病様の症状が出現した。1 例目は 2002 年 10 月に公表されたもので、生後 1 ヶ月の時に  $9.2 \times 10^7$  個の遺伝子導入細胞を移植、30 ヶ月目までは順調に経過したが、2002 年 4 月の水痘罹患を機に T 細胞( $\gamma \delta$  T 細胞)がモノクローナルに増加、34 ヶ月目には脾腫も出現した。また 2 例目は 2003 年 1 月に公表されたもので、生後 3 ヶ月の時に  $13.3 \times 10^7$  個の遺伝子導入細胞を移植、T 細胞の回復が認められたが治療後 34 ヶ月で T 細胞( $\alpha \beta$  T 細胞)のモノクローナルな異常増加と貧血、脾腫が生じた。なお、患者は化学療法でしばらく状態が安定していたが、1 例目の患者は死亡した。

この 2 例について詳細に検討を行ったが、増殖性レトロウイルスは見いだされなかった。また、レトロウイルスの挿入部位を検討した結果、いずれも遺伝子導入直後は 50 ヶ所以上の挿入部位が LAM-PCR 法により検出されたが、T 細胞の異常増殖時には 1 クローンが増幅し、2 例とも LMO2 (LIM-domain only-2 protein) という遺伝子のプロモーター近傍にレトロウイルスベクターの挿入が認められ、LMO2 が異常発現していることが判明した。LMO2 は造血の初期に働く転写因子で、LMO2 のトランスジェニックマウスは T 細胞白血病を発症すること、また LMO2 の染色体転座による異常発現により急性リンパ性白血病(T-ALL)が発症することが知られる T 細胞の癌原遺伝子である。今回の X-SCID 遺伝子治療ではレトロウイルスベクターの挿入によりウイルス LTR のエンハンサー活性が作用して LMO2 のプロモーターが活性化され、LMO2 が異常発現したことにより T 細胞の異常増殖が引き起こされたこと、すなわち挿入変異(insertional mutagenesis)が白血病発症の主な原因と推測された。このような重篤な副作用の発生には以下のようなレトロウイルスベクターに共通の問題と、疾患、プロトコール特有の問題とが関与したと考えられる。

#### (1) 遺伝子の挿入変異のリスク

レトロウイルスベクターは遺伝子を染色体にランダムに組み込むことで遺伝子発現を行うため挿入変異のリスクは当初より想定はされていたが、これまでのレトロウイルスベクターを用いた前臨床、臨床試験の成績からはこの可能性はかなり低いものと考えられていた。しかし、X-SCID 遺伝子治療では 10 例中 2 例で LMO2 への挿入変異が認められ、さらにもう一例でも LMO2 部位への組み込みが認められたという。この結果からレトロウイルスベクターによる染色体への組み込みは従来考えられていたようにランダムに起こるものではなく、組み込み部位には選択性があり、挿入変異は予想以上の頻度で起こることが明らかとなった。

挿入変異については、マウスの実験でもレトロウイルスベクターで  $\Delta$  NGF 受容体遺伝子を導入した骨髄細胞の移植により白血病様の異常が認められ、ベクター挿入による転写因子 Ev1 (ecotropic viral integration site-1) の活性化が原因であったことが報告されている。これに関連して、最近、マウス白血病ウイルス MLV のヒト染色体への組み込みはランダムではなく、活発に転写されている遺伝子の転写開始部位付近に組み込まれ

やすいという性質があることが判明している。レトロウイルスは 10kb 離れていても遺伝子発現を増強することが可能であることから、ヒトゲノム中に 100 個以上の癌原遺伝子があるとすると、レトロウイルスによる遺伝子導入の 0.1 から 1% は癌原遺伝子の異常につながるものが推定され、レトロウイルスベクターを用いた場合の挿入変異は相当高い頻度で出現する可能性がある。

組み込み部位に関しては、今回の X-SCID の例では LMO2 がホットスポット、あるいはベクターの挿入により LMO2 が活性化された細胞は増殖性が優位であるために選択されてきたと考えられるが、それには疾患、プロトコル特有の問題と LMO2 の性質が関係していると思われる。X-SCID 患者では T 細胞の分化が阻害されているため、患者の骨髄 CD34+細胞には T 細胞前駆細胞の割合が高いと考えられる。さらに CD34+細胞を導入すると T 細胞系の増幅が優位に働き、遺伝子導入細胞の多くは T 細胞となることから T 細胞白血病を発症しやすいことが推測される。LMO2 は造血系前駆細胞すべてで発現しているが、分化に伴い低下する。LMO2 は治療対象の CD34+細胞で発現しており、T 細胞を形質転換させる能力をもつことから X-SCID では LMO2 による発癌が起りやすくなると考えられる。ヒトゲノム上の遺伝子は 30,000 個程度であり、レトロウイルスは活性化遺伝子へ挿入されやすいこと、LMO2 は CD34+で発現されていること、投与細胞数から計算すると今回の例ではどの患者でも 1-10 個、あるいは 10-100 個の細胞で LMO2 にレトロウイルスが組み込まれていたと想定され、どの細胞でも T 細胞白血病発症に至る可能性がある。しかし、LMO2 トランスジェニックマウス及び LMO2 転座の場合でも、白血病発症までには LMO2 の活性化の他に更なる変異が必要と考えられている。従って、LMO2 部位への挿入のみで白血病の発症に至るわけではなく、さらにリンパ球の異常増殖を開始、促進させるような付加的要因が関与していることが示唆される。

## (2) 導入遺伝子の発現によるリスク

導入遺伝子が白血病発症の要因の一つである可能性も指摘されている。X-SCID の場合、導入遺伝子の  $\gamma c$  は T 細胞増殖因子として作用する IL-2, -4, -7, -9, -15, -21 (すべて単独あるいは他の因子と共同で T 細胞の増殖因子として作用するサイトカイン) の受容体の共通サブユニットであるが、これらのサイトカイン受容体は白血病発症とも関与しており、例えば、IL7 受容体はほとんどの T-ALL で発現されており、白血病 T 細胞の DNA 合成、セルサイクル促進、アポトシス抑制に働くという。また、マウス血液癌のレトロウイルス挿入部位のデータベース(mouse retroviral tagged cancer gene database)をサーチした結果、T 細胞白血病細胞で LMO2、 $\gamma c$  の両方に挿入されている例が見いだされている。この例では LMO2 の発現が上昇し、X-SCID 患者の白血病細胞と同様の所見であったことから LMO2 と  $\gamma c$  との共同作用による発癌が遺伝的に示唆される。X-SCID 患者の白血病細胞では  $\gamma c$  の過剰発現は認められていないが、 $\gamma c$  が遺伝子導入細胞の増殖や分化に作用することでオンコジェニックに働いた可能性は

考えられる。

## (3) その他のリスク要因

さらに 2 例の患者における T 細胞の選択的増殖、白血病発症には以下の要因が関与した可能性が考えられる。

① 2 例とも患者に戻した CD34+細胞の数が他の患者と比較して最も多かった ( $1.8 \times 10^7$ 細胞及び  $2.0 \times 10^7$ 細胞/kg、治療の平均値は  $4.3 \times 10^6$ 細胞/kg)。このため挿入変異の起こった細胞が投与されるリスクが高まった。

② 発症した 2 例は治療時の年齢が最も低かった(生後 1ヶ月と3ヶ月、その他の患者は6ヶ月以上)。患者の年齢が低い場合には幹細胞のサブセットが異なり、挿入変異のリスクが高い T 細胞前駆細胞の比率が高く、また細胞の増幅能も高いため異常増幅が起りやすい可能性がある。

③ 発症した 1 人の患者は腫瘍多発家系で染色体の転座も認められており、また水痘罹患がきっかけとなって T 細胞の選択的増幅が起こった。もう 1 人の患者は他の T 細胞オンコジーン TAL1, SCL に変異が認められている。これらの要因が LMO2 部位への挿入に加えて白血病の促進に関与した可能性がある。

## C.6.2.2 各国の対応

1 例目の報告(2002 年 10 月 3 日公表)を受けてすぐに英国を除く各国で X-SCID 遺伝子治療、あるいは国によってはレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療全てが一時的に中止・凍結とされた。米国では FDA/CBER/BRMAC が 2002 年 10 月 10 日、レトロウイルスによる X-SCID 遺伝子治療の安全性に関わる公聴会を開催して発症の原因や代替法との比較などの検討により対応を協議した。SCID-X1 の治療法は HLA 適合ドナーがあれば骨髄移植が第 1 選択であるが、完全に適合した場合で生存率が 84%、半一致では 60%であり、また SCID 患者では骨髄移植でも 1-5% にリンパ性増殖性疾患が発生する。これまで得られた知見と治療のリスク・ベネフィットを考慮して、レトロウイルスベクターを用いた SCID に対する幹細胞遺伝子治療は全面的な凍結、中止とはせず、治療プロトコルの見直し、患者のモニタリング体制の強化及び白血病が発症した事実も含めて発癌のリスクを患者に説明し、治療中の患者を含めてインフォームドコンセントを取り直すことを条件として治療を再開するという方針が示された。

しかし、2003 年 1 月に公表された 2 例目の白血病発症の報告を受けて、FDA はレトロウイルスベクターを造血幹細胞に導入する全ての遺伝子治療臨床試験の一時中止を発表するとともにレトロウイルスベクターを用いた過去の遺伝子治療の副作用についても再調査を行った。2003 年 2 月には FDA/CBER/BRMAC の会議で遺伝子治療の再開に向けて議論し、諮問委員会は X-SCID に  $\gamma c$  遺伝子をレトロウイルスベクターで導入する治療法については他に有効な治療法がない場合に限り認めるべきであること、またレトロウイルスベクターを用いたその他の幹細胞遺伝子治療については治療のリスク・ベネフィット、適切なインフォームドコンセント、代替法のリスク・ベネフィットについてケースバ

イケースでレビューした後に一時停止を解除すべきであるという勧告を出した。

その他の国の現在の対応状況は以下のとおり。

英国: SCID 遺伝子治療はケースバイケースで評価し、継続実施されている。

フランス: 一時的な中断の後、2004年1月からX-SCID 遺伝子治療の再開が認められた。

イタリア: 2003年12月まではレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が全て中止された。新しいルールが現在待たれている。

ドイツ: レトロウイルスを用いた遺伝子治療が全て一時中断されたが、2003年2月に再開された。

ヨーロッパ: 統一された規制はない。幹細胞遺伝子治療については生命を脅かす疾患の場合リスク・ベネフィットを注意深く評価した後で認められるべきとされた。

### C.6.2.3 日本における対応

我が国では東北大でネッカー小児病院との共同研究として計画されたX-SCID 遺伝子治療が遺伝子治療臨床研究作業委員会で承認され患者の選定作業中であつたが、1例目の報告を受けて実施は保留とされた。さらに2例目の報告を受けた2003年1月の遺伝子治療臨床研究作業委員会では、(1)東北大におけるX-SCID に対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療は保留のまま据え置くこと、(2)北大で計画されたADA欠損症(ADA-SCID)に対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療は研究計画を再検討すること、(3)癌研での乳がんに対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療の今後の実施を当面差し控えることと既に実施したものについては経過観察を続けること、(4)その他のレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究について、既に実施したものについては慎重に経過観察を続けることと今後実施するものについては有用性と有害事象との関係において慎重に取り扱う必要があることが示された。その後、2004年10月の厚生科学審議会科学技術部会においてレトロウイルスベクターを用いた2種類の遺伝子治療(北大のADA欠損症における血液幹細胞を標的とする遺伝子治療および筑波大学付属病院で計画された同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルスチミジンキナーゼ導入ドナーTリンパ球輸注療法)が審議され、遺伝子治療のリスク・ベネフィットを考慮し、フランスでの有害事象を受けて予想される副作用と危険性についてのインフォームドコンセントへの追記及び患者のモニタリングを強化した実施計画の変更が承認され再開が認められた。

### C.6.2.4 今後の安全性確保対策と課題

遺伝子治療の実施にあたってはリスク・ベネフィットの考慮が非常に重要となる。X-SCID 遺伝子治療はベネフィットは非常に大きい、フランスで実施されたレトロウイルスベクターで $\gamma c$  遺伝子を導入した骨髓幹細胞を患者に戻す治療法は現在の段階では白血病発症のリスクが相当高いことから、その実施、再開にあたっては米国のBRMACの勧告にもあるように他に有効な治

療法がない場合に限って認められるべきであり、さらにプロトコルの見直しや患者の血液細胞のクローナリティのモニタリング、あるいは後で解析を行うための患者試料保存の実施が必要と思われる。

2002年12月4-6日に行われた米国組換えDNA審議会(RAC)ではX-SCID 遺伝子治療患者のモニタリングとその評価に関するプロトコルの試案が出された。その内容は以下のとおりである。

- (1) 末梢血サンプルについて6ヶ月ごとにLAM-PCRを行いクローナリティを調べる。
- (2) LAM-PCRで異なる2つの時点(90日以内)のサンプル間で遺伝子導入細胞の20%以上のクローンが2倍以上の増加を認めた場合はオリゴクローナル、モノクローナル増加とみなし、次の検査を行う。
  - (i) リンパ球増加による臨床的評価
  - (ii) 血清学的検査
  - (iii) 末梢血検査—リンパ球増加、白血球増加、骨髓浸潤(血液減少)
- (3) 末梢血の免疫学的検査により異常クローンを含む細胞群の免疫学的表現系を同定する。モノクローナルな細胞群が検出されたら挿入部位の同定を行い、ベクター挿入と遺伝子発現異常との因果関係を検討する。
- (4) オリゴクローナル、モノクローナルな細胞集団が認められた場合、より頻繁にフォローを行う。少なくとも2年間の間LAM-PCRを90日ごとに実施し、白血病発症の有無を追跡調査する。
- (5) 一生涯にわたり定期的にモニタリングを実施。

このような挿入部位のモニタリングはクローナリティの変化を調べることはできるが、患者の発癌のリスクを予測、診断するものではないので他の臨床検査、血液学的検査も同時に行う必要がある。また治療施設にとっては負担が大きく、むしろ幹細胞遺伝子治療を実施した患者から定期的に採取した骨髓、血液サンプルを保存し、いつでもレトロスペクティブな分析が可能な状態にすることの方が大事ではないかという意見もある。

レトロウイルスベクターは染色体に遺伝子が組み込まれてはじめて遺伝子を発現して作用するものであることから、挿入変異はベクターの本質的な問題であるが、遺伝子治療の安全性を確保するためには挿入変異のリスクを可能な限り減らすことが重要である。挿入変異のリスクはベクターの用量、治療に用いる細胞数、細胞の種類、ベクターの種類、発現遺伝子、対象疾患に依存する。挿入変異による副作用発現のリスクを減らすには次のような方法が挙げられる。

①細胞あたりの遺伝子導入数の低減と患者に戻す遺伝子導入細胞の数の低減。

MOIが高いと望ましくない部位への挿入リスクが高まり、細胞数が多いと望ましくない部位に挿入された細胞が患者に投与される確率が高まる。しかし、これらの低減により治療効果が低下する可能性がある。

②安全性を高めた改良型ベクターの開発。

レトロウイルスベクターの3'LTRのエンハンサー活性が問題となることからエンハンサーを除去したSINベク

ターの開発や、挿入変異が生じた場合にベクターを除去できるような機構を取り入れたベクターの開発。

これらはすぐにでも実現が可能と思われる。

### ③安全な細胞だけを戻す方法の開発。

少量の幹細胞に遺伝子導入を行い、患者に戻す前に遺伝的解析を行い、あらかじめ問題のない部位に挿入された細胞だけを患者に戻すことができれば望ましい。しかし、現在の挿入部位を検出する方法では細胞が破壊されてしまうため、移植前に挿入部位を特定することは技術的に不可能である。

### ④ベクターの挿入機構の解明と望ましくない部位への挿入を回避できるベクターの開発。

### ⑤安全な挿入部位を明らかにし、これらの部位を標的としたベクターの開発。

これらを実現するには十分な基礎研究が必要である。また、あわせて前臨床段階でリスクを評価できる非臨床安全性試験法の開発、癌原遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化を高感度に測定する方法の開発が望まれる。ベクターの挿入部位の解析法は患者の細胞の挿入部位、クローナリティのモニタリングやベクターがどこに入りやすいかを検討するためにも重要な手段である。現在は LAM-PCR 法がよく用いられている。この方法はレトロウイルスとゲノムの融合部位の配列を調べることが可能な方法で、PCR のバンドの数を解析することによりおよそそのクローナリティを知ることができるため、レトロウイルスベクターの挿入部位を検出するにはすぐれた方法であるが、かなり複雑なステップを含むため汎用性にかげ、ベクターの導入効率の低い場合などには定量性にも欠けるという問題も指摘されている。挿入変異に関しては HIV-1 や AAV でもヒトゲノムへの組込みはランダムではなく活性化遺伝子に入りやすくホットスポットがあることが報告されており、遺伝子を染色体に挿入することで機能するレンチウイルスベクター、AAV ベクターもレトロウイルスベクターと同様に挿入変異のリスクがあると考えられる。

## C.6.2.5 平成 15 年度の報告書以降の進展

①2004 年の ICH での遺伝子治療専門家会議では、SCID の遺伝子治療における一般的リスク要因について議論を行い、以下の点が一般的リスク要因であるという点で合意された。

- 患者の年齢
- 細胞に組み込まれた遺伝子治療用ベクターのコピー数/染色体挿入頻度が、細胞あたり平均 1 を超えること
- 投与量(患者に投与した遺伝子導入細胞の総数)
- 遺伝子導入細胞の種類に応じた相対的リスクは以下のとおりである(リスクの高い順に)
  - 選択的優位性をもつと予想される幹細胞(すなわち、他の幹細胞に比べて増殖能が高い幹細胞)
  - 幹細胞
  - T 細胞又は他の既に分化した細胞

また、染色体へのベクター挿入による発がんのリスクを評価するための新しい技術については、まだバリデ

ートはされていないものの、遺伝子治療臨床研究においても有用である。現在、LAM-PCR 法が広く用いられているが、LAM-PCR 法はまだバリデートされていない技術であることから、複数の試験による確認が必要となる可能性がある。LAM-PCR 法において検出される主要なバンドは疾患の過程でも変化するので、このようなバンドを治療方針決定のための根拠、すなわち白血病等副作用の発現の目安として使うことはできない。遺伝子導入細胞のクローナリティの傾向が、従来から用いられている信頼性の高い方法によっても認められた場合には、より頻繁に被験者のモニタリングを行う必要がある。臨床における副作用発現を未然に防ぐための管理方法として、遺伝子導入細胞のクローナリティをより高感度でかつより高い信頼性をもって監視するために複数の方法を組み合わせることは、科学的に適切である。加えて、新しい検査方法がまだ開発途上にあることから、将来も必要に応じて科学的検査が行えるよう被験者検体等の試料を保管しておくことも意義がある、と報告されている。

②2005 年 1 月に 3 例目の発症が明らかになった。3 例目では、ベクターは 1,2 例目と同様の LMO2 遺伝子近傍の他に 3 つのがん遺伝子近傍に挿入されているという。3 例目の発症により、フランスでの当該臨床研究はベクターのデザインを変更してより高い安全性が確保されるまで保留とされた。日本でも東北大で計画されていた臨床研究はフランスの臨床研究と同じベクター、プロトコルのため、施設側で保留されているが、同様の変更が必要と考えられる。3 例目の発症後に開催された 2005 年 5 月の ICH 遺伝子治療専門家会議ではレトロウイルスの染色体挿入変異による発がんのリスクに関して議論したが、現時点では決定的な結論を導くだけの情報が十分に揃っていないことが確認され、挿入変異による発がんリスクにベクターの構造が及ぼす影響の評価を目的とした研究プログラム開始の意義について議論された。

遺伝子治療の臨床研究については各極でリスク・ベネフィットの再評価が行われており、SCID に対する遺伝子治療では 1 プロトコルで白血病の発症が認められたが、臨床研究の有用性が確認されており、他にも移植片対宿主病 (GVHD) や慢性肉芽腫性疾患 (CGD) の臨床研究で将来有望な予備的結果が得られている。遺伝子治療のリスク・ベネフィットを見極め、疾患と治療遺伝子に対する理解を深め、各ベクターおよび導入遺伝子に固有のリスク要因を明らかにした上でベクターの改良や新たなベクターの開発を行うことが今後の遺伝子治療の安全性確保には重要であると思われる。

## C.6.3 腫瘍溶解性ウイルス (oncolytic virus) を用いた癌治療について

腫瘍溶解性ウイルス療法とは、正常細胞では増殖できないが、標的とする癌細胞で特異的に増殖可能な制限増殖型ウイルス (conditionally replicative virus, replication-selective virus) を癌細胞に感染させ、ウイルス増殖による直接の殺細胞効果により癌を治療する

方法で、癌ウイルス療法(cancer virotherapy)とも呼ばれる。非増殖性ウイルスベクターを用いる遺伝子治療と異なり、腫瘍溶解性ウイルス療法では、最初にウイルスが感染した癌細胞を破壊、死滅させるだけでなく、増殖したウイルスが周辺の細胞に拡散し、さらに癌組織全体に感染が広がることで治療効果が高まることが期待される。また、ウイルスの感染により腫瘍細胞に特異的な抗腫瘍免疫が誘導される場合は、免疫系による抗腫瘍効果の増強も期待される。用いられる腫瘍溶解性ウイルスは、変異株を含めた天然に存在する遺伝的改変を行っていないウイルスと、遺伝的改変によって癌細胞での選択的自己複製能を持たせた弱毒ウイルスとに分類される。このうち、天然のウイルスを用いた場合は遺伝子治療の範疇には属しないと考えられるが、組換えウイルスを用いた場合は広義の遺伝子治療と考えられる。さらに腫瘍溶解性ウイルス療法に従来の遺伝子治療を組合わせたものとして、治療用遺伝子を搭載した武装化腫瘍溶解性ウイルス(armed oncolytic virus)も研究開発が進められている。腫瘍溶解性ウイルスは10年程前から研究が開始され、活発な研究が展開されている。現在10種類以上の腫瘍溶解性ウイルスが臨床試験初期段階にあり、前臨床レベルのものを含めると膨大な報告が出されている。平成16年度の分担研究では代表的なウイルスを中心に、癌細胞への標的化の方法と用いられるウイルスの特徴、臨床研究を中心とした具体例、日本における研究開発の現状、問題点と今後の課題について詳細に報告した(内容は平成16年度研究報告書参照)。腫瘍溶解性ウイルスに関しては、その後、2005年11月に日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)でワークショップが開催された。本ワークショップは腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発に関する問題点を洗い出して意見交換を行うことを目的としたものである。内容についてはICHの遺伝子治療専門家グループ(GTDG)から声明が出されており、以下にその概要を紹介する。

### C.6.3.1 腫瘍溶解性ウイルスに関するICHワークショップ

腫瘍溶解性ウイルスは、初期の臨床研究において悪性腫瘍患者でウイルス感染又は生ワクチン接種の時期に関係して寛解(腫瘍の縮小)が認められたことから初めて見出された。腫瘍溶解性ウイルスに関する研究は、野生型ウイルスの偶発的又は人為的な感染によるものから、がん治療に適するよう遺伝子改変された遺伝子組換えウイルスを用いるものへと推移しつつある。この領域における画期的な治療薬を開発するための基礎となる科学的知識はまだ集積段階にあることから、今回の公開ワークショップが開催された。目的は、様々ながんに対する治療用腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発に関連する問題点を洗い出して意見交換を行うことであった。対象とした腫瘍溶解性ウイルスの種類は、アデノウイルス・単純ヘルペスウイルス・レオウイルス・ニューキャッスル病ウイルス・ワクチニアウイルス・麻疹ウイルス・センダイウイルス等である。

本ワークショップでは、1)腫瘍溶解性ウイルスの設計(野生型・弱毒型・遺伝子組換え型)、2)動物や人で

期待される効果の評価、3)ウイルス複製の腫瘍選択性、4)临床上の安全性、5)動物試験に用いる適切な動物モデル、6)腫瘍溶解性ウイルスの体外への排出の測定法及び実データについて議論が行われた。

### 1. 腫瘍溶解性ウイルスの設計及び特性解析

現在使用されている腫瘍溶解性ウイルスには、腫瘍細胞内で選択的に複製する野生型・弱毒型ウイルスと遺伝子組換え型のウイルスがある。腫瘍細胞内でウイルスが選択的複製(条件複製)を行えるどうかは、それぞれのウイルスに固有の性質であるが、特定領域の欠失・受容体結合タンパク質の改変・転写制御や翻訳制御の変更などの遺伝子組換え技術を用いることによって、選択的に腫瘍細胞内で複製を行うようウイルスを分子改変することが可能である。遺伝子治療の戦略として頻りに用いられる技術、すなわち組織特異的プロモーターをウイルスに挿入することによっても、遺伝子組換え型ウイルスの腫瘍特異的な転写を制御することが可能である。

腫瘍溶解性ウイルスの製造及び特性解析における留意点は、生物起源由来医薬品について現在広く認められている原則と同一である。特に、迷入感染性因子(ウイルス)試験及び製品の特性解析試験については、新しい手法の開発が具体的に進んでいる。

#### (1) 腫瘍溶解性ウイルス中の増殖性ウイルス(RCV)、及び目的とする腫瘍溶解性ウイルスの分子変化体

非増殖性のウイルス性医薬品においては、目的物質(非増殖性ウイルス)に関連する増殖性ウイルス(RCV)を検出するための試験が実施される。一方、腫瘍溶解性ウイルスのように目的物質が複製能をもつ場合には、目的物質(増殖性ウイルス)に関連するウイルス、すなわち分子変化体の有無を調べる試験が特性解析の一環として実施された。適切なRCV試験系の確立に向けた新しい試みとして、生物活性に基づく生物学的試験(バイオアッセイ)あるいは混入が知られている若しくは予想される分子変化体をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により確認/同定して検出するという手法もある。

#### (2) 迷入感染性因子(ウイルス)試験

迷入感染性因子試験の適切な試験系を確立する際には、特に困難を伴うことがある。方法のひとつとして、迷入感染性因子試験をin vitro 又はin vivo で実施する前に腫瘍溶解性ウイルスの特異的抗体を試料に添加して目的の腫瘍溶解性ウイルスをあらかじめ中和しておくという手法がある。これは製品の擬陽性を避けるための手法として採用されている。

#### (3) 製品の出荷時規格

製品のロット間での品質の恒常性を確認する目的で、1つのin vitro 試験によって腫瘍細胞培養株に対する殺細胞能を測定することに加えて、例えばウイルスの感染性力価や力価に対する粒子数の比を求めるための他の生物学的な規格試験を相補的に実施する必要性について議論された。

## 2. 非臨床試験

非臨床試験は、①設計した腫瘍溶解性ウイルスについて予想どおりの結果が非臨床において得られるかどうか評価し、②非臨床での安全性評価を行い、かつ③臨床適用される際の用法・用量を事前に決定する目的で実施される。

### ● 動物モデル

非臨床レベルでの安全性及び予想どおりの結果が得られるかどうかを評価するに当たって動物モデルが有用であることは、今回の講演者から広く指摘された。しかし動物モデルには限界も存在する。それは例えば、腫瘍溶解性ウイルスの感染及び複製に動物種特異性があること、動物に移植したヒト腫瘍(細胞)がヒト体内とは異なる指向性/分布を示すこと、免疫反応が完全にはヒトと共通していないこと等である。生体内分布や安全性/毒性の評価、臨床での投与経路や用法・用量の選択などに関して動物モデルが有用な情報を与え得るということについては、会場の意見は一致した。また、ウイルス複製の腫瘍選択性に関して、*in vitro*での試験のみならず *in vivo* モデルを用いた検討が可能ながざり行われている。非臨床試験の成績から有用な情報を最大限かつ効率よく引き出すため、ウイルスの種類別に実施すべき動物試験の範囲や選択すべき動物モデルの種類に関して、参加者間で活発な意見交換が行われた。

設計した腫瘍溶解性ウイルスが予想どおりの結果を示すかどうかの評価あるいは作用機序解明に関する検討のような、*in vitro* 試験及び *in vivo* モデル試験の両方を用いて実施される生物活性に係る評価/検討においては、ケースバイケースで種々の方策を選択し得ることが強調された。腫瘍選択性に関しては、非腫瘍細胞培養株及び腫瘍細胞培養株を用いた又はヒトの健康な組織及びヒト腫瘍組織からの初代組織片培養を用いた *in vitro* 試験により検討された。

## 3. 臨床研究

製品の特性及びそれに伴う評価/開発のアプローチが複雑であること、及び動物モデルが有用となる局面が限定されているという理由から、臨床研究の初期の段階では検討すべき課題が多数残されている。本ワークショップでも、臨床上の安全性・用量決定及び臨床開発戦略に対して特に焦点が当てられた。

### (1) 有害事象

今回発表されたすべての臨床研究において、主に中等度以下(グレード1・2)の有害事象が観察されており、その多くはインフルエンザ様症状であったことが報告された。また、一過性の臨床検査値異常及び投与部位の局所反応も報告された。今回臨床研究で用いられたウイルスの忍容性はいずれも高かったことから、多くのケースでヒトでの最大忍容量は確立されていない。

ニューキャッスル病ウイルスを用いた複数の臨床研究では、高用量を投与可能とするための忍容性の改善を目的として、①低い静注速度、又は②最初は低用

量を投与し徐々に用量を高めてゆくという脱感作の手法が採用された。これらの臨床研究の成績を基に、上記①・②のアプローチを同時に組み合わせる実施する投与プログラムが開発された。

### (2) 臨床薬物動態

臨床薬物動態を検討するための手法及びその結果が報告された。被験者のモニタリングにはPCR・感染性力価試験のいずれも用いられている。いくつかの腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究において、血液中に検出されるウイルス量は投与後およそ4~7日目にも新たなピークを示した。これは、ウイルスの感染した組織においてウイルスが複製していることを示している。ウイルスを腫瘍内局所投与した場合及び静注した場合のいずれでも、この現象はみられている。

被験者体内のウイルス量をモニターする方法として、様々な手法が試みられている。卵巣がんの治療を目的とした麻疹ウイルスの臨床研究では、当該ウイルスがヒトがん胎児性抗原(CEA)タンパク質を発現するよう遺伝子組換えされており、既に広く使われている血清CEAタンパク質量測定用の臨床検査試験法を用いてCEAタンパク質を測定することにより被験者体内のウイルス量の指標を得ている。

### (3) 腫瘍溶解性ウイルスが臨床的にも生物活性を示していることの根拠

腫瘍溶解性ウイルスを偶発的又は人為的に感染させた臨床研究において、標的腫瘍内に当該ウイルスが存在することないしは当該ウイルスの活性があることが実際に確認されている。腫瘍体積の縮小も複数の臨床研究で認められた。

### (4) 作用機序

本ワークショップでの意見交換の際、臨床的に観察された生物活性を説明できる可能性のある作用機序がいくつか提示された。例えば、直接的な腫瘍溶解効果や免疫系を介して発揮される間接的な効果などである。

### (5) 用法・用量

腫瘍溶解性ウイルスが自律複製能をもつからといって、有効用量を決定するための臨床研究を実施する必要がないことにはならないという点に注意すべきである。有効濃度の腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍全体にくまなく分布させることは、困難な場合が少なくない。

### (6) 臨床開発戦略

臨床研究に関する複数の発表において、腫瘍内投与から開始し、次に腫瘍内以外への局所投与、最後に全身投与を実施するといった段階的に投与方法を拡大していくアプローチが報告された。標的腫瘍へのウイルス送達効率の向上を目的として、あるいはウイルス複製の指標を測定するために被験者から検体を採取する際、市販の医療機器(例えば、卵巣がん患者の腹腔内に埋植する機器)の活用についても報告された。腫瘍溶解性ウイルス単独で治療した場合と化学療法や

放射線療法などの他の治療法と組み合わせた場合の腫瘍溶解効果を比較した成績も示された。その結果、いくつかの種類の進行した腫瘍に対しては併用療法の方がより効果的であるという可能性が指摘された。

#### (7) 中和抗体

いくつかの臨床研究において、腫瘍溶解性ウイルスの投与後に抗ウイルス中和抗体の力価の増加が認められた。しかしながら、抗ウイルス中和抗体の存在が再投与に影響を与えることは必ずしもなかった。抗ウイルス中和抗体が臨床的有効性に及ぼす影響については、現在までのところ十分には解明されていない。

#### (8) 腫瘍溶解性ウイルスの体外への排出及び被験者に接する人々にとってのリスク

腫瘍溶解性ウイルスの体外への排出に関する非臨床試験が実施され、その成績が報告された。また、いくつかの臨床研究でも被験者からの体外へのウイルス排出の有無がモニターされており、それらの成績について意見交換が行われた。しかしながら、これらのウイルス排出に関するデータは限られたものであることから、病院関係者・被験者の家族・その他被験者に接する人々がウイルスにさらされるリスクを減少させるための予防措置が講演者から紹介された。

#### C.6.3.2 腫瘍溶解性ウイルスの今後の展望

現在開発中の腫瘍溶解性ウイルスについて今後も引き続き臨床開発を継続するという計画をもつ研究グループがある一方、化学療法又は放射線療法に腫瘍溶解性ウイルス療法を組み合わせることによって付加的又は協同的な効果が得られることが非臨床試験で示唆されたことから、臨床開発をこのような組合せ療法で進めようとして計画している研究グループもある。腫瘍溶解性ウイルスの種類によっては臨床研究が既に実施され、その成績が公表されているが、その公表データを利用しながら腫瘍溶解性ウイルスの設計改良及び試験評価を実施するという反復的アプローチをとる研究グループもある。例えば、患者の免疫反応を活性化する遺伝子をウイルスゲノムに組み込んだり、あるいは腫瘍細胞へのウイルスの感染能を高めたりすることによって、腫瘍溶解性ウイルスの殺腫瘍効果を高める方策を探索している。腫瘍溶解性ウイルスの複製の腫瘍選択性及びその殺腫瘍効果の作用機序を解明できるデータを得るための非臨床試験及び臨床研究の取組が行われている。

本ワークショップでは、腫瘍溶解性ウイルス開発の関係者による意見交換が公開で行われ、当該分野の現状に関する有用な情報が提供された。腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発において様々な種類のウイルスで具体的な進歩がみられていることは特に重要である。

#### C.6.4 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

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「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」ガイダンス案は、遺伝子治療薬の新薬治験申請において、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.6.4.1 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」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」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」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.6.4.1.1 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」[28]、「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ーイツフェルトヤコブ病及び変異型クロー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」、「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」及び「ヒト細胞組織利用医薬品のドナーの判定」を発売している。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「生物製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」及び ICH の Q5D 文書「生物製品(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」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、ドーパミンの分泌、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」及び「異種移植における感染症問題に関するPHS指針」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(サザンプ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(サザンプロットなど)

## (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。

- ⑥ 試薬の使用時の濃度
- ⑦ 試薬供給業者/製造者
- ⑧ 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。
- ⑨ 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」[36]を参考にすること。)
- ⑩ 「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.6.4.1.2 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證するデータがあるかについて記載すること。

#### C.6.4.2 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」[37]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.6.4.2.1 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[38]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[38]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、最終ハーベットの 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」等を参照すること。

### 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。製造にげっ歯類細胞株を用いる場合は、げっ歯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試験を実施することが望ましい。ヒトウイルスはPCR反応を用いた試験を用いることができる。

遺伝子治療用製品をヒト由来の細胞で産生する場合、例えばアデノウイルスベクターを293細胞で産生する場合、前述のウイルスに加えてアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)などの他のヒトウイルスについても試験を行い、INDに記載すること。

#### ②レトロウイルス

MCB、MVBをレトロウイルスベクター以外のベクター産生に用いる場合、MCB、MVBについてレトロウイルスの混入の有無を逆転写酵素試験(RT)や電子顕微鏡により試験し、試験結果をINDに記載すること。レトロウイルスベクターの製造においては、MVB、WVB、ベクター培養上清、製造終了後の細胞、ex vivo遺伝子改変細胞を含め、ベクター製造の複数の段階で増殖性レトロウイルス(RCR)試験を実施することが望ましい。増殖性レトロウイルス試験の詳細は「レトロウイルスベクターを利用した遺伝子治療薬及びレトロウイルスベクターを用いた臨床試験の患者の追跡調査における増殖性レトロウイルス試験に関する指針追補」を参照のこと。

アンフォトロピックマウス白血病ウイルスのエンベロープを有するベクターを産生する細胞の場合、*Mus dunni*などの感受性細胞を用いてRCR試験を実施し、INDに試験結果を記載すること。エトロピックパッケージング細胞株をレトロウイルスベクターの産生に用いる場合には、MCBに低濃度に混入する可能性のあるエトロピックレトロウイルスを検出する試験を実施して記載すること。マウスエトロピックウイルスの混入はXCあるいはD56プラークアッセイ法により検出可能である。

ベクター培養上清の試験法を記載すること。ベクター上清ロットの適切な試験は、*Mus dunni*細胞などの感受性細胞で増幅後、PG-4 S+L-細胞などの指標細胞を用いて検出する方法であろう。製造終了後の細胞プールの適切な試験は、アンフォトロピックウイルスの場合は*Mus dunni*細胞などの感受性細胞との共培養を行い、増幅されたウイルスについて適切な指標細胞試験を行うことである。Ex vivo遺伝子改変細胞の場合、細胞を4日以上培養する場合にはRCR試験を実施すべきである。治療に用いる前にRCR試験の結果を得ることが困難な場合は、培養試験を開始しながら一方で代替試験(PCRなど)を出荷試験として実施することが望ましい。

### ③アデノウイルス

アデノウイルスベクターを用いる場合、増殖性アデノウイルス(RCA)の試験をMVBおよび最終ベクター製品について実施することが望ましい。RCA混入の最大限度値は $3 \times 10^{10}$ ウイルス粒子あたり1未満、またアデノウイルスの粒子数と感染単位(iu)の比は30:1以下であることが望ましい。

#### C.6.4.2.2 確認試験

申請者は、MCB や最終製品が目的とする製品であること、また同一製造施設で製造されている他の製品と明確に区別できるような確認試験を設定することが望ましい。最終製品の場合、確認試験はパイアルの中身が正しく表示されているかどうかを確認するのに重要である。表示に関する詳細な情報は以下の V 項 2)を参照のこと。

最終製品が複数の細胞株から構成されている場合には、用いられた複数の細胞株を区別可能な確認試験あるいは品質管理法を確立し、その方法について説明すること。試験法としては細胞表面マーカーや遺伝的多型性などを含めること。

#### C.6.4.2.3 純度試験

製品の純度とは、製造工程における不可避的なものを除いて異物の混入がないことと規定される。純度試験には、発熱性物質試験/エンドトキシン試験(下記参照)、細胞の活性化や加工に用いたタンパク質やペプチドの残存、製造に用いたサイトカイン、成長因子、抗体、血清などの試薬や成分、さらには目的外の形質を持つ細胞も含まれる。

##### (1) 残存している混入成分

製品の製造や精製工程に用いるペプチド、タンパク質、DNA、RNA、溶媒、製造に用いる成長因子、抗体、血清などの試薬の残存に関して適切な純度試験を設定すること。製品がex vivo遺伝子改変細胞の場合には、目的外の形質を持つ細胞や細胞残査を測定する試験も純度試験に入れること。詳細はICH Q3ガイドライン「医薬品の不純物について」を参照のこと。申請者は実施した純度試験と出荷規格をINDに記載すること。

#### (2) 発熱性物質/エンドトキシン

リムルス試験によるエンドトキシン試験は、治験の早い段階及び市販製品で実施される代表的な発熱性物質(エンドトキシン)試験である。申請者がリムルスエンドトキシン試験を採用する場合には、「生物学的製剤基準、純度」に記載されている発熱性物質試験を用いて、製造工程によるエンドトキシン以外の内在性発熱性物質の産生を評価することも必要である。髄腔内投与される医薬品を除く全ての静注薬(非経口製剤)において、エンドトキシン上限値は1回の投与で体重1kgあたり5EU以下とすることが推奨されている。髄腔内投与される医薬品では、1回の投与で体重1kgあたり0.2EU以下が望ましい。しかしながら、実際の規格値は実際のデータに基づいて決めるべきである。詳細は、「ヒト及び動物静注医薬品、生物薬品、医療用具の最終製品でのエンドトキシン検出のためのリムルス試験の評価」ガイドラインを参照のこと。企業は実施した発熱性物質試験/エンドトキシン試験と出荷規格についてINDに記載すること。

#### C.6.4.2.4 力価試験

申請者は、製品の力価測定に用いた全ての試験を記載し、その妥当性を示すこと。これらの力価試験法は定量性を持つ必要があるが、定性的な生物試験の側面を持つ場合もある。治験第1/2相試験では、遺伝子治療用ベクター産物の発現量を定量することが望ましい。第3相試験では、in vivo及びin vitroにおいて適切な生物活性を測定可能な力価試験を実施すること。製品の承認までに力価試験の正当性を明らかにすること。

#### C.6.4.2.5 その他

##### (1) 一般安全性試験

「一般安全性試験」で除外されている場合を除き、全ての遺伝子治療用医薬品の承認には一般安全性試験が求められている。一般安全性試験はヒトに投与する生物薬品について実施し、個別の試験は21 CFR 610.11に記載されている。申請者は製品の開発段階で一般安全性試験を実施したかどうかを報告すること。

##### (2) 生存率

製品に細胞が含まれる場合、申請者は細胞生存率の下限値の出荷規格を確立する必要がある。遺伝子改変体細胞治療薬の場合、一般的に生存率の規格値の下限として許容できるのは70%である。もし、こ

の値の設定が難しい場合、低い生存率規格値で死細胞や細胞の破片等を投与しても医薬品の安全性や治療効果に影響しないことを示すデータを提出すること。詳細は「ヒト細胞治療及び遺伝子治療に関するガイドライン」を参照のこと。

### (3) 細胞数／投与量

製品の試験及び出荷基準の一部として、生細胞数及び目的機能を持つ細胞数の下限の規格値を設定すること。また投与される細胞数の上限値が設定されているかどうか、設定されている場合にはどのような根拠に基づくのかを報告すること。遺伝子治療用ベクターを投与する場合には、投与量をプラスミド DNA の濃度、ウイルス粒子数もしくはウイルスタイターとして示すこと。

#### C.6.4.3 最終製品の出荷規格試験

最終製品とは患者に投与するために製剤化された製品と規定される。遺伝子治療用製品の場合、例えばバイアルに充填されたベクターや ex vivo 遺伝子改変細胞が相当する。最終製品の出荷規格試験は製造された製品のロット毎に実施する必要がある。製造工程により、投薬一回分がひとつのロットとみなされる場合もありうる。最終製品の出荷規格試験の結果は患者に投与する前に得られなければならない。試験結果を出荷前に得ることができない場合には、申請者はそのことを IND 及び規格に明確に記載するとともに、もし結果が受け入れ基準に適合しなかった場合の報告の手順の詳細を添付すること。最終製品の規格案の全て (I 項に記載されている安全性試験、純度試験、力価試験、確認試験についての各試験法と受け入れ基準) について、試験の感度と特異性を含めて一覧表の形で提出すること。(製品が承認されるまでに、これらのパラメータの妥当性を明らかにすること)。

#### C.6.4.4 製品の安定性

製品が治験実施に必要な期間にわたりその品質が保たれていることを保証するために、治験の早い段階から安定性試験を実施すること(「INDの内容と書式」)。製品の承認には最終処方と保存期間を支持するデータが必要である。申請者は試験を支持するのに用いる安定性試験法について記載する必要がある。詳細は、ICH Q5Cガイドライン「生物薬品(バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品)の安定性試験について」、Q1A(R)ガイドライン「安定性試験法ガイドラインについて」(改訂版)、Q1Eガイドライン「安定性試験データの評価に関するガイドラインについて」、及びガイドライン案「医薬品、医用材料の安定性試験について」の最終版を参照すること。

##### (1) 安定性試験

「INDの内容と書式」に示されているように、申請者は、安定性試験を治験の全ての相において実施し、申請者が提案する臨床試験の実施期間中、製品が科学的、物理的に受け入れ可能なものであることを示す必要がある。非常に短期間の臨床試験を予定している場合、

提出される安定性データはそれに応じて限定されたものとなる。安定性試験プロトコールと試験データは製造中間製品及び最終の遺伝子治療用製品の両者について提出することが望ましい。安定性試験プロトコールには製品の無菌性、同一性、純度、品質及び力価の試験が含まれるべきである。実施した各試験法に関して試験方法や検体のサンプリングのタイミング(試験開始前の検体も含めること)、試験実施温度、さらにはこれらのパラメータを臨床プロトコールで要求される保存期間について測定し、製品の安定性を十分立証できる試験となっているかを示すなど、その他の適切な情報についても記載すること。

##### (1) 中間工程製品の安定性試験

細胞を凍結保存する場合、凍結保存期間の製品の安定性確認に用いた安定性試験プロトコールについて、上述のパラメータを測定し、記載すること。凍結前と凍結保存解凍後の検体の比較試験がよく用いられる。また細胞の凍結保存やベクターのハーベスト間での一時保存、バルク製品の保存のように製造工程を一時止めるようなステップが存在する場合に実施する安定性試験について記載すること。

##### (2) 最終製品の安定性試験

最終製品に関して有効期限を確立するため、製品の製剤化や患者への投与までの期間の安定性を示すデータを提出すること。安定性試験は適切な温度で、また想定される保存期間にわたり適切な時点で試験を行うことが望ましい。製品が製造場所から医療機関まで輸送される場合には輸送時間や輸送条件(梱包方法、温度等)を記載すること。安定性試験プロトコールは、提案されている輸送条件で製品の品質、無菌性、力価等が維持されることを十分に保証するものである必要がある。さらに、過酷条件下でのバリデーション試験は治験第3相までに開始し、生物薬品としての承認申請を提出するまでに完了すること。

#### C.6.4.5 その他

##### (1) 製品の追跡(トラッキング)

自己由来製品及び患者特異的製品の場合、申請者は製品の追跡及び他の製品との隔離が可能なシステムを確立すること。適切な追跡システムとは、治療用製品をその採取から投与まで追跡可能であり、製品をインキュベータ内、フード内、凍結保存設備内で他の製品から隔離するような手順を含むものである。

##### (2) 表示

複数の医療機関で製品を使用する場合には、製品の製造の全工程を通じた表示と、製品を適切な医療機関に確実に届けるために用いる表示について記載すること。製品の表示には少なくとも製品の製造時期、保存条件、有効期限と使用時期、製品名及び患者を特定できる2種類の識別表示等が含まれることが望ましい。「治験薬の表示」基準に従い治験用製品に次のような記載を表示すること:「注意:新薬一連邦法に基づき治験にのみ使用すること」。自己あるいは自己以外のヒト

由来細胞を用いた治療で、患者が感染性因子のスクリーニングや試験を行っていない場合、あるいは細胞治療用製品で感染性因子の試験を実施していない場合、「警告:感染性因子については試験未実施」との警告を表示することが望ましい。

### (3) 容器/蓋

どのような容器や蓋が用いられているのか、用いられる容器や蓋が製品の特性に合ったものであるかを記載すること。

### (4) 環境への影響

「生物製剤基準」に従い環境影響評価書を提出するか、「例外規定」に従い問題ないことを明らかにすること。環境に重大な影響を引き起こす可能性のある例外的な場合を除き、通常はこの例外規定が適用される。例外的な状況とは、環境に対して非常に有害な事象を引き起こす可能性がある場合や、種や種の重要な習性に悪影響を及ぼし、危機的な状態や絶滅の恐れを招き、特殊な防衛が必要な場合などである。詳しくは「ヒト医薬品や生物医薬品の投与における環境への影響評価」ガイドラインを参照のこと。

### (5) 製造工程の適格性

遺伝子治療用製品の製造工程には複数の異なる原材料や試薬を用いる必要があり、ウイルス等の感染性因子の混入の危険性が増加する。試薬や原材料の品質管理、及び製造の一定性のモニタリングや製品の品質確保のための適切な精度管理を行うことは、製品を使用する患者の安全や治療の恒常性、有効性の確保された製品提供において重要な要素である。治験薬ロットの製造前、臨床試験の開始前に適切な製造管理が行えるようになることが必要である。これには品質管理プログラム(QC)や責任者の指名と役割の指定も含まれる。

製品の完全性や機能に問題を生じたり、感染性因子の伝播をもたらす可能性のある製品の欠陥を予防・検出・修正するために実施する、製品の製造品質保証(QA)及び品質管理(QC)プログラムについて記載すること。QAやQCプログラムの責任者を同定し、責任者の役割をリストに示すこと。製造工程に関する最終のQA、QCの監査の日付及び製造者、販売業者その他の関連業者の契約書も含めること。

さらに、同じ施設で保存、製造される異なる遺伝子治療用ベクター間での相互汚染、あるいは異なる患者の細胞間、他の製品との間で取り違えが起こらないための製造の切り替えの方法について記載すること。相互汚染したベクターの塩基配列を調べるために用いるPCR試験法、作業エリアの清浄方法、洗浄や消毒にどのような試薬を用いるのか、作業の隔離と無菌加工工程の品質管理についても記載すること。遺伝子治療用製品は、ほとんどの場合、患者に投与する最終製品への滅菌ろ過工程の導入が困難なため無菌条件で製造する必要がある。製造工程の無菌性の恒常性を担保するために、培地を充填して調べる方法は適切である。詳細は「無菌工程で製造される無菌製品に関する指

針」]を参照のこと。製品の承認前に製品の製造に用いる施設及び全製造工程について妥当性を検証し、製造及び試験に用いる全ての設備が適格であることを示すこと。

### (6) 生物統計学

治験計画や治験データの解析計画の妥当性を保証するため、化学、製造及び品質管理の項の関連する箇所については生物統計学部門と相談審査を行う。試験法のバリデーションや規格設定、製品の力価の評価、製品の安定性の評価等においては、試験の計画や解析法に多くの重要な問題が存在する。適切な統計デザインの立て方や治験結果の解析は、製品の品質、安全性、有効性を保証するための基本的要件である。

#### C.6.4.6 前臨床試験

##### (1) 概念研究の要旨

審査官は申請者から提出された治験計画の科学的妥当性を支持するための前臨床試験の情報を報告書に記載すること。この項には、製品の活性や有効性を評価するための動物試験や *in vitro* 試験から得られた前臨床試験の要約を記載する。遺伝子治療に特有の事項としては、ベクターの局在や輸送、遺伝子発現の程度及び持続性が挙げられる。

##### (2) 生殖腺への分布

遺伝子治療ベクターを直接 *in vivo* 投与で用いる場合、ベクターがどの程度投与部位の外に広まり生殖腺に分布する可能性があるのかを示すデータについて、審査官は薬理・毒性審査官に相談審査する。ほとんどの場合、この情報は治験第1相開始時には得られていないが、製品の開発過程で利用可能となるはずである。通常このようなデータはPCR試験により得られる。新規のベクター、投与経路、適応、ベクターの運搬系が提案されている場合、ベクターの分布を評価する前臨床試験を治験第1相の前に実施することが適切であろう。審査報告書には試験の感度(細胞 DNA1  $\mu\text{g}$  あたりのベクターの量)を試験対照(陽性対照、陰性対照、スパイクコントロール)とともに記載すること。PCR試験の感度は細胞 DNA1  $\mu\text{g}$  あたりベクターゲノム 100 コピー以下であること。

#### C.6.4.7 臨床試験

審査官は審査報告書に以下の概要を記載すること。

- 治験タイトル
- 登録患者数
- 投与経路
- 投与量

投薬計画や投与量増量試験があるかについても記載すること。増量する場合は増量幅や各投与量でどれだけ患者を登録するのかについても記載すること。また、一人の患者で増量試験を行うのか、あるいは患者間で増量試験を行うのか、また投与量を増量する時間的間隔及びデータの評価をどのように設定するのかについても記載すること。

### (1) 頻度

一回の治療サイクルあたりの投与回数および治療サイクル数を示すこと。

### (2) 遺伝学的試験、生化学的試験及び免疫学的試験

審査官は臨床試験担当審査官と共同で、患者に実施するすべての遺伝学的検査や製品に特有の生化学的試験および免疫学的試験が適切かどうか、また臨床試験段階に向けて試験が適切に開発され、バリデートされたかどうかを判断すること。生物活性を示すのに用いる試験法(たとえば免疫学的試験やPCR)の感度や特異性を評価し、その結果を審査報告書に記載すること。レトロウイルスを用いた遺伝子治療プロトコルの患者の血清は治療後3,6,12ヶ月でRCRの有無を分析していることを、臨床審査官と共同で確認し記載すること。治療後の試験が最初の1年間すべて陰性の場合、患者の試料は年に一度保存することが望ましい。

### (3) インフォームドコンセント

インフォームドコンセントの文書が審査に提出されている場合、製品が正確かつ完全に記載されているかどうかを確認すること。

### (4) RAC(組換えDNA委員会)の審査

申請者または申請者の機関、あるいは治験を行う医療機関のどこかがNIHの組換えDNA研究費を受領している場合、NIHはNIH組換えDNAガイドラインに従い、RACの審査まで治験プロトコルの開始を許可しないことを申請者に知らせること。申請者が組換えDNA諮問委員会の審査にプロトコルを提出しているか確認すること。

#### C.6.4.8 勧告

審査官は治験申請の審査上不足している、あるいは不完全な情報、追加の説明が必要な事項について記載すること。また、「化学、製造及び品質管理」の観点から治験を進めてもよいか、あるいは臨床試験を保留するかの総合的な評価をすること。

#### C.6.4.9 申請者へのコメント

審査官は、審査過程で未解決の事項について以下に示すように、(1)審査終了後、治験開始前に答えを出すまで治験の保留とすべき事項であるか、または(2)製品開発を進めて良い(治験の保留を行う必要がない)事項であるかのコメント案を作成すること。「新薬治験申請における治験の一時的停止に関する通知」を参考にすること。

##### (1) 臨床試験の保留

臨床試験の保留のコメントを出した場合、申請者は治験を開始する前に治験の保留を設定した事項について満足できる回答を提出しなければならない。このコメントは「新薬治験申請における保留に関する事項」にあげられる基準に合致していなければならない。

##### (2) 臨床試験の保留なし

製品の開発を進めながら回答を出してもよいコメントもある。申請者が製造上の特有の問題について、治験のある時点、例えば第3相の開始までに答えを提出する必要があるというような場合も想定される。どのような点がこのような分類に相当するのかを申請者に伝えておくこと。

#### C.6.4.10 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の考察

FDAは2003年8月に細胞治療薬の新薬治験申請に関する審査官向けのガイダンス案を発出している。細胞治療薬のガイダンス案に関しては平成15年度の当研究班報告書で分担研究者山口により詳細が報告されているが、細胞治療薬の新薬治験申請にあたり、審査官が申請者に対してどのようなデータを求めるか、また審査報告書に記載すべき事項や治験開始までに確立しておくべき事項、他の審査官と協議すべき事項などをまとめた審査官への手引書である。今回検討した遺伝子治療薬の新薬治験申請に関するガイダンス案は、この細胞治療薬のガイダンス案を基にして、ベクター、ウイルスバンク、パッケージング細胞、ex vivoでの遺伝子改変、増殖性ウイルス試験、ベクターの生殖腺への分布などの遺伝子治療薬の独自の項目を追加し、さらに審査官へのガイダンスというだけでなく、申請者に対してどのような資料、データを揃えるべきか、どのような試験を実施すべきか、また試験や規格値をいつまでに確立するべきかが具体的に提示されている。

本ガイダンス案の内容について、米国で1998年に発出された「ヒト体細胞治療及び遺伝子治療に関する指針」と比較すると、申請書類が作成しやすく整理されており、製品試験については製造工程管理の重要性が述べられ、全体により詳細に記載されている。また、指針では安定性試験の記載はなかったが、ガイダンス案では安定性試験実施の考え方、タイミング、試験項目が示されている。別添で審査報告書のテンプレートが示されており、本文もテンプレートに従いこの順番で書類を作成することで必要な情報を漏れなく提示し、評価することが可能である。また、同じく別添で最終製品の出荷基準の規格と安定性プロトコルの開発において考慮すべき事項が明らかにされ、治験の各段階及び承認申請段階でそれぞれどのようなデータに基づいて受け入れ基準の設定、分析法の開発、安定性試験プロトコルの開発を行えばよいのかが示されている。

品質、安全性確保の面で特記すべき点としては、

- 細胞を用いる場合には、ドナースクリーニングによる安全性の担保を求め、注意すべき病原体を記載していること
- 製造管理試験では各細胞・ウイルスバンクで実施すべき試験が具体的に例示されていること
- 製品試験の項目が詳細に示され、特に微生物試験について試験項目や対象となる感染性因子、試験法や試験時期などについて具体的かつ詳細に例示されていること
- 増殖性ウイルスの検出について試験対象や試験法が記載され、増殖性アデノウイルスは混入限度



( $3 \times 10^{10}$  ウイルス粒子あたり 1 未満) が数値で示されていること

- ・ アデノウイルスの粒子数と感染単位の比率は 1998 年の指針では 100:1 とされていたが本ガイダンス案では 30:1 以下に変更されたこと
  - ・ エンドトキシンの混入上限値が示されていること
  - ・ 細胞生存率の下限値 (70%) が示されていること
  - ・ 前臨床試験では、生殖腺への分布に関して特記し、分布を測定するための PCR 試験の感度も数値で示されていること (細胞 DNA1  $\mu$ g あたりベクターゲノム 100 コピー以下)
  - ・ 臨床試験では、レトロウイルス遺伝子治療の場合に患者の血清を治療後保存し、増殖性レトロウイルス (RCR) の試験を求めており、治療後 1 年間陰性でも年に一度は患者の試料を保存することを求めていること
- などが挙げられる。

遺伝子治療薬や細胞治療薬は従来の製品にはない複雑性を有し、品質、安全性上考慮すべき事項も多岐にわたり、治験申請書の作成も審査も前例が少なく、また判断が難しい点が多い。また、遺伝子治療薬や細胞治療薬の開発企業は従来からある製薬企業だけでなく、新たに参入した企業も多く、医薬品開発に必要とされるデータが十分に理解されていないこともある。本ガイダンス案は遺伝子治療薬の開発に当たり、治験開始までに、あるいは治験の最終段階、承認申請までに整備されるべきデータや規格試験法の設定等が示され、申請者にとって有用な情報が網羅されている。わが国でも「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」(薬発第 1062 号、平成 7 年 11 月 15 日;平成 14 年 3 月 29 日医薬発第 0329004 号で改正)により、遺伝子治療薬の確認申請に必要な資料の内容が示されているが、本ガイダンス案はわが国における遺伝子治療薬の IND 審査のあり方や CMC 情報のあり方、新薬治験申請段階での品質、安全性確保上考慮すべき事項を考える上でも非常に参考になると思われる。

### C.6.5 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案に関する研究

「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、EMA と厚生労働省が指名された。本見解案は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。

\*\*\*\*\*

#### C.6.5.1 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に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.6.5.2 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.6.5.3 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。

#### (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移行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。

#### (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。

#### (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.6.5.4 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。

#### C.6.5.5 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男性生殖細胞に到達するまでの物理的なバリアの有無を考慮すると、精原細胞は、バリアとして働くセ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。男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、男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、この点を考慮するべきである。また、動物を用いて男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るべきである。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.6.5.6 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ていくことになる。

## C. 7 わが国におけるマスターファイル制度のあり方に関する考察

我が国においても医薬品の承認申請資料はコモンテクニカルドキュメント(CTD)に基づいて作成されるようになりつつある。しかしながら、現行の医薬品の承認・許可制度の下でCTDを運用した場合、我が国と欧米との間の制度の違い(日本:製造承認、欧米:販売承認)が原因となって、欧米企業との間で種々の軋轢が生じることも予想された。こうしたことから、ICHによる医薬品規制の国際調和が実質的な成果を挙げるためには、我が国の承認・許可制度を欧米と共通のベースを持つものに改める必要があるとの声が高まり、非加熱血液製剤によるエイズ感染や乾燥ヒト硬膜の移植によるヤコブ病感染のような薬害が新たに発生するのを防止するために、生物由来医薬品や医療機器に対する安全対策の強化が求められていたこともあって、平成15年7月に薬事法の改正が行われた。

この改正では、我が国の医薬品の承認・許可制度が欧米と同様の販売承認をベースとしたものに抜本的に改められ、元売業者(ライセンスホルダー)が医

薬品を市場に供給するに当たっての最終責任を負うこととされるとともに、全面的な委託製造の実現、原薬等登録原簿[マスターファイル(MF)]制度の導入、GMPの承認要件化などが図られている。

このうち、マスターファイル制度の導入に関しては、改正薬事法が平成17年4月に施行されるのに向けて、現在、マスターファイル検討会(厚生労働省医薬食品局審査管理課)において、その具体的な内容の検討作業が進められている。

本研究では、原薬などの製造業者が、製造方法などに関するノウハウを含む情報を、製剤の承認申請者に開示することなく、規制当局の審査に提供できるようにするというマスターファイル制度の狙いを実現するには、わが国の制度をどのようなものとするべきかについて検討した。

## C.7.1 日本と欧米の医薬品承認・許可制度の比較

### C.7.1.1 医薬品の承認・許可対象

現行のわが国の制度(製造承認)は製造行為に着目したものであり、原薬も製剤も承認の対象とされている。一方、欧米の制度(販売承認)においては、市場に出回って患者に医薬品として投与されるのは製剤であることから、製剤が承認の対象とされており、原薬は製剤を構成する重要な成分として、詳細な資料の提出が求められている。

わが国においても、改正された承認・許可制度の下では、欧米と同様に、製剤だけが承認(販売承認)の対象となり、原薬は独立した審査対象ではなくなり、製剤の一部として審査されることになる。

### C.7.1.2 医薬品の承認事項

わが国では、承認の対象は医薬品承認書である。一方、欧米では、承認裁定書(承認状)、資料概要、試験報告書、添付文書、表示内容などが承認の対象となっており、わが国に比べて対象とされている範囲がかなり広い(Table 18)。

わが国においても、改正薬事法の下では、医薬品承認申請書にその製造方法を詳細に記載することなどが求められるようになる。製造方法の詳細な記載を義務づけるには、その裏付けとして原薬等の製造業者の知的財産権(ノウハウ)を保護する必要があり、そのための制度として原薬等登録原簿[マスターファイル(MF)]制度の導入が図られたものである。

## C.7.2 欧米のドラッグマスターファイル(DMF)制度

DMF 制度は、製剤の承認申請者と原薬の製造業者が異なっており、原薬の製造業者が製造方法などに関するノウハウを含む情報を承認申請者に開示したくない場合に、当該情報を DMF として登録しておく制度である。

製剤の承認申請者が承認申請資料において関連するDMFを引用することによって、規制当局は、DMFに記載された原薬に関する情報を承認申請資料の一部として審査できるようになる。DMFが単独で承認の対象となることはないが、承認取得後には、DMFは他の承認申請資料とともに承認事項の一部