

患者が死亡した場合には、その死因を明らかにするために適切な試料を用いて組織病理学的な検死や培養での解析を行うべきである。可能であれば、血液検体や関連する組織片を採取し、保存しておくべきである。内在性レトロウイルス検査のための検体も保管しておくべきである。

病歴記録

患者の受けたスクリーニング検査結果や有害事象の記録、異種細胞治療における処置やドナー動物を含めた製品の詳細等の全ての患者情報の治療記録が作成されなければならない。適切なトラッキングシステムを確立し、実施する必要がある。有害事象が起きた場合には、必要に応じて臨床試験や検査結果に関する追加的な情報やドナー動物に関する追加的な情報を収集しなければならない。

患者の治療記録には異なるサーバーランプログラムからのデータベースから得られるものや、保管検体の検査結果等も含まれる。また、患者の治療記録には製品の製造に関連する情報とリンクされている必要がある。

患者の治療記録は以下のような事項が含まれる。

- 製品に関する情報：ドナー動物、製造施設、治療を行う医療機関、異種細胞医薬品の識別子（品質モジュールを参照）、医薬品製造承認保持者について
- 患者情報：コード番号、患者イニシャル、生年月日などの患者標識子は患者のトラッキングに際して患者関連情報としてリンクさせておく必要がある。
- 製法に関する情報：患者に投与された製品の製造日、処置を受けた医療機関や担当医師や処置方法などの患者標識子
- 病歴や治療を行う前の患者の病態
- ホローアップでの様々な医療情報：患者への投薬や医療措置、拒絶反応、感染症、注意すべき他の症状、入院歴や合併症
- 有害事象の報告書
- 有害事象の発症日、その経過、転記
- 患者ホローアップでの検査、検査日、検査内容、検体、検査結果
- 有害事象に対する処置の方法
- 患者の死亡記録

医薬品製造承認保持者はサーバーランシステムを規定しておかなければならない。さらに、製造を中止しても全ての検体や記録の保管義務を負う。検体や記録の保管や登録は、適切に実施できるような法的根拠があれば第3者に委託することも可能である。

生体試料検体の保管

アクティブなスクリーニングプログラムに加え、感染症が起きた場合やその疑いがある場合の遡及調査

における検査の為に、血液や血漿、尿などの適当な生体試料を採取し、保管するべきである。申請者は、感染症のリスクについての将来の評価ためにドナー動物由来の検体や異種細胞、さらには患者の検体を保管する義務がある。患者に密接に接する人の検体も可能であれば保管するべきである。保管された検体の保存場所等について治療記録に記載する必要があり、情報は必要に応じてデータベースにリンクされていなければならない。

生体試料検体の採取スケジュールは認可前に確立しておかなければならない。異種細胞治療を実施する前、及び実施直後やさらに適切な時期に、試料を採取しなければならない。生体試料検体は、公衆衛生上の観点からの解析や公衆衛生上の重大な問題となるような感染症の発症を適切に評価できるような条件で、採取、保管されなければならない。医薬品製造承認保持者は安全装置をつけるなど、将来、生体試料を利用できるように何十年に渡って適切に保管しなければならない。医薬品製造承認保持者は将来に渡っての感染症に関するドナー動物や製品の検査スケジュールについて考えておく必要がある。

有害事象の報告義務

重大な有害事象が起こった場合には即座に規制当局に報告しなければならない。報告書の形式は従来のものと同様で良いが、必要な全ての情報が含まれていなければならない。

次のような重大な有害事象に関しての報告することが必要である、

1. 感染症の伝播の可能性：もし患者や異種細胞治療薬を採取したドナー動物（死亡後の検査等で）になんらかの感染症伝播の可能性があることが分かった場合には、当該規制当局に連絡をしなければならない。
2. HIV、HBV、HCV、結核等の感染症や全ての人獣共通感染症を含む伝達性の疾病に患者が感染していることの実事。患者と密接に接する人に何らかの感染症が広がっていないかについても報告する義務がある。
3. 患者に新たな癌の発症が明らかになった場合
4. 移植された異種細胞の機能不全や萎縮が見られた場合
5. 異種細胞の拒絶反応が起こった場合
6. 患者の死亡
7. 異種細胞治療によって引き起こされた可能性のある臨床上のその他の有害事象

医薬品による有害事象の情報については患者にも伝えなければならない。感染症発症のリスクがかなり高い場合には、患者と密接に接する人や一般の人々に対しても情報を提供することが重要である。その場合には個人情報保護を担保しながら有効な方法を採用しなければならない。

もし伝達性の病原体に対して患者が陽性であるこ

とが判明した場合の取るべきアクションについて明確にしておかなければならない。治療後、患者が一般の生活に入っていく前に、公衆衛生に対するリスクを最小限にするための規則や対処方法が明確に記載されていなければならない。

6. 6 データベース

サーベランスシステムの一環として、EU 内での異種細胞治療に関する電子データベースを作り上げるか、既存のデータベースにネットワーク上でリンクするようにしなければならない。それらの電子データベースは EU 域内で互換性のある情報システム、ルーチンのデータ収集法、データの報告形式、一般的始動形式で作成され、あるいは修正されていなければならない。さらには全ての関連する事項のデータベースが、閲覧可能なようにしておく必要がある。こういった観点から互換性のあるデータを報告することを担保するために統一された基準が必要である。メドラ (MedDRA) のような既存システムが利用可能である。医薬品製造承認保持者は関連する適切なフォーマットに従い全てのデータと最新のデータを入力しなければならない。

データベースには次のようなリンクされている情報やリンク外の情報を含む。

- 各々の細胞バッチの標識子を含む異種細胞治療薬に関する情報
- 治療実施施設情報
- 患者情報/その標識子やコード番号、さらには治療方法に関する詳細な情報
- 有害事象に関する除法
- 最新のアクションプランに関する書類や患者ホローアップ、治療記録、検査記録に関する情報
- 可能であれば患者の剖検記録
- 生体試料の検査結果
- 感染症の発症リスクを最小にするための手法に関する詳細やその実施要領
- 製品によっては動物施設や動物の健康状態に関するアクセス方法

このようなデータベースにより、i) 想定される異種細胞由来感染症などの健康への有害事象の発症の確認、ii) 国内外での有害事象発症の検索、iii) 異種細胞治療薬の治療に伴う疫学的に重要な有害事象に関して、患者や医療機関への情報提供、iv) 生命科学あるいは臨床研究の観点からの評価、v) 長期安全性の評価などが可能になる。

加盟国、各国行政庁あるいは委員会等の規制当局がデータベースにアクセスできるようにしなければならない。

6. 7 報告義務

医薬品製造承認保持者は、患者の健康状態、有害事象、患者やドナー動物の検査結果、さらには施設に関する安全情報を一定期間毎 (承認後 2 年間は四

半期毎に、その後の 3 年間は半年に 1 回、それ以降は 1 年に一回) に規制当局に対して提出することが求められる。

医薬品製造承認保持者は、新興動物由来感染症など新たな緊急情報に関して積極的に対処する責務がある。これには、速やかに規制当局に報告しなければならないような、患者や、患者に密接に接する人や公衆に重大な影響を与えるような情報も含まれる。

治療の透明性や異種細胞治療の公衆に対してリスクが生じる可能性等の情報についても透明性が確保されなければならない。

C-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。ラポーターとして、EMA と厚生労働省が指名された。本見解案は表 2 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る、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、シュードタイプ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、可能な限りこの期間 (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限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。

D. 結論

D-1. FDA の細胞治療 IND ガイドライン案は、細胞組織加工医薬品の新薬治験申請に当たって、どのようなデータを申請者に求め、さらに審査報告書に記載すべき事項や治験開始前までに確立しておくべき事項や他の審査官との協議すべき事項など、細胞治療薬 IND を審査する審査官への手引き書の形をとっている。しかし、審査報告書への記載すべき事項としてまとめられている事項は、治験開始までに、あるいは治験最終段階までに整備されているべきデータや規格試験法の設定などが含まれており、IND 申請を行おうとする開発者にとっても有用な情報が盛り込まれている。安全性面からは、BSE を含む感染因子の混入を防ぐ方策がどのようにとられているかを明らかにすることを求め、かつ製造に用いられる各種原材料からの混入防止策について明らかにされている。また、用いる抗生物質や製造に用いた原材料の製品への混入や生細胞率の最低基準を示すことも行われている。製品の品質や安定性面から、特性解析をどのように行うべきか、安定性試験のプロコールについても明らかにされている。治験によって明らかにすべき有効性をどのように立証していくかに関連して、製品の生物活性や力価を設定についても詳細に書かれている。これらについては IND のどの段階までに最終的な答えを出すべきかについてもふれられており、本ガイドライン案は日本における細胞組織加工医薬品の IND 審査あり方に非常に参考になると考えられる。

D-2. EMA の異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための留意事項は、異種細胞治療薬の承認申請に当たって必要とされる基本事項について書かれたものである。特に、異種細胞治療薬の安全性に関する最も重要な点として、感染性因子の伝播を如何に防止、あるいは潜在的な感染を含めて検出するかに力点が置かれている。また、感染症に関する安全性は患者のみならず、患者と密接な接触を持つ人や医療従事者、さらには公衆衛生の観点からも十分な対処を求めている。感染症の伝播に関連して、治療に用いた細胞等の検体の保管、記録の保管等に加え、感染性因子の動物を用いた検査を行っている

場合に必要に応じてその試験に使用した動物の検体も保管することを推奨している。本留意事項文書では、異種細胞治療薬の基礎から前臨床開発、臨床開発、さらには市販後を含めたサーベランスの広範囲の事項について、基本的考え方が述べられており、我が国での異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための指針作成に非常に有用な情報を与えるものと考えられる。

D-3. 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. Guidance for industry: guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. March 1998. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/somgene.pdf>
2. Content and format of investigational new drug applications (INDs) for phase 1 studies of drug, including well-characterized, therapeutic, biotechnology-derived products. November 1995. <http://www.fda.gov/cder/guidance/phases1.pdf>
3. Draft guidance for industry: INDs for phase 2 and 3 studies of drugs, including specified therapeutic biotechnology-derived products, chemistry manufacturing and controls content and format. February 1999. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/indbiodft.pdf>
4. Class II special control guidance document: human dura matter; draft guidance for industry and FDA. October 22, 2002. <http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/054.html>
5. Draft guidance for industry: Preventive measures to reduce the possible risk of transmission of Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) and variant Creutzfeldt-Jacob disease (vCJD) by human cells, tissues, and cellular and tissue-based products (HCT/PS). June 2002. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/cjdvcjd0602.htm>
6. Proposed rule: suitability determination for donors of human cellular and tissue-based products. September 30, 1999. 64(FR53696). <http://www.fda.gov/cber/rules/suitdonor.pdf>
7. Point to consider in the characterization for donors of human cell lines used to produce biologicals. July 12, 1993. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptccelllines.pdf>
8. ICH guideline Q5D: derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products. July 1997. <http://www.ich.org/pdhl/ICH/q5d.pdf>
9. Guidance for industry: source animal, product, preclinical and clinical issues concerning the use of xenotransplantation products in human. April 2003. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/clinxeno.pdf>
10. PHS guideline on infectious disease issues in xenotransplantation, January 19, 2001 <http://www.fda.gov/cber/gdlns/xenophs0101.htm>
11. Point to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. February 28, 1997. http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptc_mab.pdf
12. Manual of standard operating procedures and policies: intercenter consultative/ collaborative review process. February 2003. <http://www.fda.gov/oc/ombudman/intercentersop.pdf>
13. FDA guidance concerning demonstration of comparability of human biological product, including therapeutic biotechnology-derived products. April 1996. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/comptest.pdf>
14. United states pharmacopeia (USP), Chapter<71> sterility tests, 26th revision, 2003. www.usp.org
15. ICH guideline Q5A: guidance on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. March 1997. <http://ich.org/pdf/ICH/q5a.pdf>
16. ICH topics Q3: impurities. (including guidelines on “impurities in new drug substances”, “impurities in new drug products”, and “impurities: residual solvents”) <http://www.ich.org/ich5Q.htm#Impurity>
17. Guidance on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices. 1987.
18. ICH guideline Q5C: quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products. November 1995. <http://www.ich.org/pdf/ICH/q5c.pdf>
19. ICH guideline Q1A(R): Stability testing of new drugs and products (revised guideline). November 2000. <http://www.ich.org/pdf/ICH/q1arstep4.pdf>
20. ICH Q1E: evaluation of stability data. February 2002. <http://www.ich.org/pdf/ICH/q1estep2.pdf>
21. Draft guidance for industry: Stability testing of drug substances and drug products. June 1998. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/stabdft.pdf>
22. Guidance for industry: environmental assessment of human drug and biologics applications. July 1998. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/environ.pdf>
23. Guidance on sterile drug products produced by aseptic processing. June 1987.

<http://www.fda.gov/cder/guidance/old027fn.pdf>

24. Manual of standard operating procedures and policies (SOPP 8201): "Issuance of and response to clinical hold letters for investigational new drug applications. April 27, 1999.

<http://www.fda.gov/cber/regsopp/8201.htm>

25. ICH guideline Q6B: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. March 1999.

<http://www.ich.org/pdf/ICH/q6bstep4.pdf>

26. Guidance for industry: guideline on the preparation of investigational new drug products (human and animal). November 1992.

<http://www.fda.gov/cder/guidance/old042fn.pdf>

27. Guidance for industry: IND meetings for human drugs and biologics; chemistry, manufacturing and controls information. May 2001.

<http://www.fda.gov/cber/gdlns/ind052501.htm>

28. Point to consider on xenogenic cell therapy medicinal products. December 17 2003, EMEA

29. 異種移植の実施に伴う公衆衛生学的な見地からの感染症問題に関する指針 (案) 2002、厚生労働省

30. Guidance for industry: source animal, product, preclinical and clinical issues concerning the use of xenotransplantation products in human. April 2003. FDA

31. PHS guideline on infectious disease issues in xenotransplantation, January 19, 2001 FDA,

32. 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) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.* 66:133-140, (2003)

2) Iwata,A., Satoh,K.,Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi,T.; Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1065-1069 (2003)

3) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Hayakawa T: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *J Cell. Physiol.* 195:119-129, (2003)

4) Niimi, S., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 300, 770-774 (2003)

5) Iwata,A., Satoh,K., Yamaguchi,T., Tomoda,A.; Antiviral activity of 2-amino-4,4a-dihydro-4a-7-dimethyl-3H-phenoxazi-

ne-3-one on polyiovirus. *Tohoku J. Exp. Med.* 200, 161-165, (2003)

6) Oshizawa,T., Yamaguchi,T., Suzuki,K., Yamamoto,Y., Hayakawa,T.; Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-plastin in Activation of Superoxide Generating NADPH Oxidase. *J. Biochem.*, 134, 827-834 (2003)

7) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T. Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol. Ther.*, 8, 813-821 (2003).

8) Koizumi,N., Mizuguchi,H., Sakurai,F., Yamaguchi,T., Watanabe,Y., Hayakawa,T.; Reduction of natural adenovirus tropism to mice liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and v integrin-binding ablation. *J Virol.* 77, 13062-13072 (2003)

9) Satoh,K., Iwata,A., Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi,T.; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J Virol, Methods*, 114, 11-19, (2003)

10) Ishii-Watabe I., A., Uchida, E., Iwata, A., Nagata, R., Satoh, K., Fan, K., Murata, M., Mizuguchi, H., Kawasaki, N., Kawanishi, T., Yamaguchi, T., Hayakawa, T.; Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction. *Mol. Therapy*, 8, 1009-1016 (2003)

11) Tomofumi Fujino, Yoji Sato, Mizuho Une, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, Koichi Shudo, Kazuhide Inoue, and Tomoko Nishimaki-Mogami; In vitro farnesoid X receptor ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. *J Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 87, 247-252 (2003)

12) 山口照英、内田恵理子：生物薬品のウイルス安全性を目的とした核酸増幅検査 (NAT) のフィージビリティースタディー：医薬品研究、34、763-769 (2003)

13) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Xu Z.L., Sakurai F., Ishii-Watabe A., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T. Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 15, 813-819 (2004)

14) Uchida, E., Sato, K., Iwata, A., Ishii-Watabe, A., Mizuguchi, H., Hikata, M., Murata, M., Yamaguchi, T., Hayakawa, T.: An improved method for detection of replication competent retrovirus in retrovirus vector products, *Biologicals*, 32, 139-146 (2004)

15) Kusui, K., Sasaki, H., Adachi, R., Matsui, S., Yamamoto, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Suzuki, K.; Ribosomal protein S18 identified as a cofilin-binding protein by using phage display library. *Mol. Cell. Biochem.*, 262, 187-193 (2004)

16) Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa, T., Suzuki, T., Nishimaki-Mogami, T., Sato, Y., Sawada, J., Inoue, K., Shudo, K., Ohno, Y., Yamaguchi T:

- HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance. *J. Steroid Biochem Mol.* 94, 303-309 (2005)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) 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. Cont. Release.*, 110, 202-211 (2005)
- 24) 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(5), 515-519 (2005)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 山口照英：医薬品各条の改正点－生物薬品。 *薬局*, (印刷中)

表1 異種細胞治療医薬品に関する留意事項

-
1. 序論
 1. 1 はじめに
 1. 2 異種細胞治療医薬品の範囲
 2. 原料の採取動物
 2. 1 動物の適正
 2. 2 動物の飼育
 2. 3 動物施設
 2. 4 輸送
 2. 5 細胞・組織を採取するドナー動物及び最初に樹立した動物の感染性因子検査
 2. 6 細胞や組織等の保存
 3. 製造
 3. 1 一般的留意事項
 3. 2 製造工程の設計
 3. 3 製造工程に用いられる原料の品質基準
 3. 4 有用成分の同定
 3. 5 製剤設計（製剤化）
 3. 6 医薬品原体や最終製剤製品の出荷試験と安定性
 4. 前臨床試験
 4. 1 薬理試験
 4. 2 毒性試験
 4. 3 他の毒性試験
 5. ヒトでの有効性と安全性
 5. 1 効能と患者の選択基準
 5. 2 異種細胞治療を行うスタッフと治療施設
 5. 3 エンドポイント
 5. 4 前臨床データと臨床開発
 5. 5 同種細胞治療との関係
 5. 6 治療での処置法や投与方法に関連する技術
 5. 7 薬効学
 5. 8 薬物動態学
 5. 9 投与量
 5. 10 補助的な治療
 5. 11 臨床試験の柱
 5. 12 臨床における安全性
 5. 13 インターベンショナル操作
 5. 14 免疫学的合併症
 5. 15 感染症
 6. ファーマコビジランス及び特定サーベランスシステム
 6. 1 想定されるリスク及び範囲
 6. 2 想定されるリスクについてのサーベランス
 6. 3 臨床サーベランス
 6. 4 スクリーニングプログラム
 6. 5 有害事象の報告義務
 6. 6 データベース
 6. 7 報告義務
-

表2 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

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
協力研究者 永田龍二 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部主任研究官

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研究の一環として、平成 15 年度は EU-CPMP から提出されたレンチウイルスベクターの開発と製造に関するポジションステートメント案を基にレンチウイルスベクターの品質・安全性確保において考慮すべき点を明らかにした。また、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療の副作用としての白血病発症の機構と安全性確保のための方策について明らかにした。平成 16 年度は腫瘍溶解性ウイルス(oncolytic virus)を用いた癌治療の現状、臨床開発状況に関する国際的動向と国内の開発状況及び今後の課題について明らかにした。平成 17 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」を基に、遺伝子治療薬の新薬治験申請段階で品質、安全性確保において考慮すべき事項を明らかにした。

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。平成 15 年度は EU CPMP のレンチウイルスベクターの開発と製造に関するポジションステートメント案を基に、レンチウイルスベクターの品質・安全性確保において考慮すべき点を検討した。また、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療の副作用としての白血病発症の機構と安全性確保のための方策について検討した。平成 16 年度は腫瘍溶解性ウイルス(oncolytic virus)を用いた癌治療について、その現状と臨床開発状況に関する国際的動向と国内の開発状況及び今後の課題を検討した。平成 17 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

平成 15 年度は、EU CPMP が 2003 年に作成した「レンチウイルスベクターの開発と製造に関するポジションステートメント案」(Position statement on development and manufacture of lentiviral vectors; 現在は Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors [1])及び関連する論文等を基にレンチウイルスベクターの品質、安全性確保に重要な要件を検討した。また、フランスでの X 連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)に対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療による白血病発症事例に関連する論文、報告書等を基に、遺伝子治療の副作用としての白血病発症の機構と安全性確保のための方策について検討した。平成 16 年度は腫瘍溶解性ウイルスに関する総説を中心に、論文、学会発表資料、ウェブ公開資料等を調査し、腫瘍溶解性ウイルスに関する研究の現状と問題点について検討した。平成 17 年度は 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[24]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

C.1 レンチウイルスベクターの品質、安全性確保

マウス白血病ウイルスなどを基にしたレトロウイルスベクターは、現在の遺伝子治療臨床研究で最も広く用いられているベクターであるが、増殖性の細胞にしか遺伝子導入できず、導入効率も低い。一方、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)を代表とするレンチウイルスは同じくレトロウイルス科に属するが、非分裂細胞にも感染し、遺伝子を染色体中に効率よく導入することから、レトロウイルスの長所を持ち、in vivo で体細胞にも遺伝子導入可能なベクターとしての開発が注目されているが、安全性上

考慮すべき点も多い。レンチウイルスベクターの製造と臨床使用における主な懸念としては、①レンチウイルスベクター製造過程における増殖性レンチウイルス(RCL)の出現の可能性、②レンチウイルスの遺伝子との *in vivo* での組換えの可能性、③プロウイルス DNA が活性遺伝子内や遺伝子の近傍に挿入されることにより、発癌をイニシエーションあるいはプロモーションする可能性があげられる。2003年9月、EU CPMPよりレンチウイルスベクターの品質、安全性に関する要件をまとめた「レンチウイルスベクターの開発と製造に関するポジションステートメント」(案)が公表された。その概要と問題点について平成15年度の報告書に詳細に報告した(内容は平成15年度の報告書を参照)。その後、EUは日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)遺伝子治療専門家会議における議論を受けて一部修正した内容を2004年4月にポジションステートメントとして、さらに2005年5月には「レンチウイルスベクターの開発と製造に関する指針」[1]として公表した。

ドラフトから指針への主な修正点は以下のとおりである。

- (1) レンチウイルスの性質とレンチウイルスベクター開発への影響の項で、「他の霊長類や非霊長類のレンチウイルスはその種にとっては悪性の病原体であるが、現在の知見ではヒトには感染性あるいは病原性がないと考えられている」との記載を削除し、病原性は未知であると修正された。
- (2) レンチウイルスベクターの設計の項で、ベクター産生に3つのプラスミドを用いる方法以外も追記された。
- (3) レンチウイルスベクターの設計の項で、ドラフトではトランスファーベクターに関してベクターDNAの可動性と野生型HIVとの組換えを抑制するためにSIN (self inactivating) 修飾を推奨していたが、指針ではSIN修飾は1例でありSINベクターのプロモーターで癌遺伝子の活性化の可能性もあるとの注意書きが記載された。安全性を向上させるためのその他の修飾についてもより詳しい記載が追加された。
- (4) レンチウイルスベクターの製造方法の項で、「ベクター産生細胞株にパッケージングコンストラクトとトランスファーベクターコンストラクトを一過性に共導入することがSINベクターを含む最新のコンストラクトの組合せを使える唯一の方法である」との記載を削除した。
- (5) 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、遺伝子導入活性について、「遺伝子導入活性は粒子数、逆転写酵素活性、Gagとエンベロープ蛋白との比率など、すべての関連するLVの性質と関連する必要がある」にGagタンパク質との関連も追加した。
- (6) 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、ベクターの粒子数測定についてはドラフトに比べてその重要性が強調され、またその測定法としてネガティブ染色電子顕微鏡法以外にウイルスエンベロープあるいはカプシド蛋白を免疫染色して共焦点顕微鏡で可視化し、既知の濃度の蛍光粒子との関連を調べることで全粒子数を測定が可能であ

ること、Gagタンパク質は過剰発現したり、遺伝子導入能を欠損したLV粒子が産生されたりもするが、Gagと遺伝子導入能との関連のデータを得ることが重要であることがドラフトよりも整理して記載された。また、NAT試験に関して、DNAの混入についての記載が追記された。

- (7) 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、増殖性レンチウイルス否定試験については、レンチウイルスのgag/pol配列の染色体DNAへの挿入を検出する方法以外に、ベクターエンベロープタンパクの発現、例えばVSV-GのイムノアッセイやVSV-GのDNA,RNAの検出により測定可能なことを追記した。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.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な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[2,3]。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。

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(γc)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⁺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 γc 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[4]。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 9.2×10^7 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 13.3×10^7 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[4]。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 (この患者では今のところ白血病の発症は認められていない) [5]。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 Δ 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 Evi1 (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 [6]。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 [7]。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 [8]、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、プロトコール特有の問題と 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 による発癌が起こりやすくなると考えられる [9]。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 [4]、あるいは 10-100 個 [9] 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 [9]。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 γc 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[9]。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、 γc の両方に挿入されている例が見いだされている[10]。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 γc 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 γc の過剰発現は認められていないが、 γc 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 (1.8×10^7 細胞及び 2.0×10^7 細胞/kg、治療の平均値は 4.3×10^6 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こりやすい可能性がある[11]。

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 細胞オンコジンの 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[12]。

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[13]。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[14]。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[15]、諮問委員会は X-SCID に γc 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って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参考資料[16]によると以下のとおりである。

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。

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承認され患者の選定作業中であったが、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

バクテリウム輸注療法)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。

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 γ_c 遺伝子を導入した骨髄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[17]。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, 骨髄浸潤(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、患者の発症のリスクを予測、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髄、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[16]。

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[12]。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[12,18]。

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。

これらはすぐにも実現が可能と思われる。

③安全な細胞だけに戻す方法の開発。

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化を高感度に測定する方法の開発が望まれる[12]。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った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[7,19,20]、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。

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[21]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、まだバリデーション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 法はまだバリデーション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[22]ではレトロウイルスの染色体挿入変異による発ガン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、挿入変異による発ガン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.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み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[23]が出されており、以下にその概要を紹介する。

C.3.6 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) 臨床上の安全性、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)を行えるかどうかは、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・受容体結合たん白質の改変・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繁に用いられる技術、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も、*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て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)たん白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たん白質量測定用の臨床検査試験法を用いてCEAたん白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、いくつかの種類で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。

4. 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行われ、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させ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.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 のガイダンス案[24]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」[25] 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」[26] 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」[27] 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」[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ワイツフェルトヤコブ病及び変異型クワ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」[29]、「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」[30]及び「ヒト細胞組織利用医薬品のドナーの判定」[31]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」[32]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」[33]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」[34]及び「異種移植における感染症問題に関する PHS 指針」[35]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