

binding may be a more crucial determinant for Ad vector-mediated *in vivo* transduction of mice, especially in the liver, than binding to primary receptors (CAR for Ad5 and CD46 for Ad35), irrespective of Ad5 or Ad35 vectors.

Homozygous CD46TG mice, which express CD46 more abundantly than hemizygous CD46TG mice, seem to be more susceptible to Ad35 vectors than hemizygous mice (Figure 4). Our *in vitro* transduction experiments that used primary cells from CD46TG mice also demonstrated that mBM-DC and peritoneal macrophages derived from wild-type mice were refractory to Ad35 vectors, but high-level CD46 expression in cells from CD46TG mice increased the transduction efficiencies of Ad35 vectors (Figure 3). Together, these results indicate that CD46 expression levels are a crucial factor in Ad35 vector-mediated transduction. Anderson *et al.*⁴⁹ reported a similar result, in which the transduction efficiencies of the chimeric Ad5F35 vector, which is an Ad5-based vector containing an Ad35 fiber shaft and knob, increased progressively with CD46 expression density in a panel of CHO cells stably expressing CD46.⁴⁹ Together, these findings suggest that Ad35 vectors can be a potent and selective platform for transduction into tumor cells expressing high levels of CD46, because human malignant tumor cells (including primary tumor cells) express CD46 more abundantly than nontransformed human cells.^{23,24} Engineered measles viruses, which enter cells efficiently via CD46, exhibit selective oncolytic activity by exploiting the difference in CD46 expression levels between ovarian cancer cells and nontransformed cells.²³

Transduction efficiencies of intraperitoneal-administered Ad35 vectors were >10-fold higher in homozygous CD46TG mice than in wild-type mice (Figure 4). In particular, peritoneal organs, such as the liver, kidney, peritoneal wall and diaphragm, were transduced efficiently. X-gal staining experiments demonstrated that efficient transduction occurred mainly in the mesothelial cells of the liver and kidney (Figure 6). In contrast, noteworthy luciferase production after intraperitoneal administration of Ad35 vector was not detected in the lung or heart, which are distant from the peritoneal cavity. Few LacZ-positive cells were found in the interior of the liver and kidney. These results indicate that after intraperitoneal injection, a portion of the Ad35 vector dose efficiently infects the mesothelia of tissues via CD46 on the surface of the organ, leading to efficient transduction. Another fraction of the dose, which is probably exuded into the bloodstream from the peritoneal cavity, likely poorly transduces the tissues of CD46TG mice. Using quantitative real-time PCR, we confirmed that Ad35 vector DNA was present in the blood after intraperitoneal injection (data not shown).

In summary, we demonstrated that Ad35 vectors used the human CD46 expressed in CD46TG mice as an attachment receptor after *in vivo* administration. CD46TG mice are more susceptible to Ad35 vector-mediated transduction than wild-type mice, but the transduction efficiencies of Ad35 vectors in CD46TG mice were much lower than those of conventional Ad5 vectors.¹³ As a next step, evaluation of Ad35 vector-mediated transduction in non-human primates, which ubiquitously express CD46 (as do humans), is necessary to assess the validity and utility of CD46TG mice as small animal models for Ad35 vectors.

Acknowledgements

We thank Ms Tomomi Sasaki, Ms Tsukasa Nakano and Ms Kimiyo Akitomo for their technical assistance. We also thank Dr Naoki Okada (Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, Japan) for his help in the preparation of bone marrow-derived DCs. This work was supported by grants for Health and Labour Sciences Research from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan, and by Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (B).

References

- Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, van Meijer M, Germeraad WT, Grimbergen J *et al.* Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol* 2002; 76: 4612–4620.
- De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ *et al.* Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3940–3945.
- Chirmule N, Propert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Therapy* 1999; 6: 1574–1583.
- Stone D, Ni S, Li ZY, Gaggar A, DiPaolo N, Feng Q *et al.* Development and assessment of human adenovirus type 11 as a gene transfer vector. *J Virol* 2005; 79: 5090–5104.
- Smith TA, White BD, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A. Transient immunosuppression permits successful repetitive intravenous administration of an adenovirus vector. *Gene Therapy* 1996; 3: 496–502.
- Vlachaki MT, Hernandez-Garcia A, Ittmann M, Chhikara M, Aguilar LK, Zhu X *et al.* Impact of preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity in a subcutaneous mouse cancer model. *Mol Ther* 2002; 6: 342–348.
- Rebel VI, Hartnett S, Denham J, Chan M, Finberg R, Sieff CA. Maturation and lineage-specific expression of the coxsackie and adenovirus receptor in hematopoietic cells. *Stem Cells* 2000; 18: 176–182.
- Tillman BW, de Gruijl TD, Luyckx-de Bakker SA, Scheper RJ, Pinedo HM, Curiel TJ *et al.* Maturation of dendritic cells accompanies high-efficiency gene transfer by a CD40-targeted adenoviral vector. *J Immunol* 1999; 162: 6378–6383.
- Haviv YS, Blackwell JL, Kanerva A, Nagi P, Krasnykh V, Dmitriev I *et al.* Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors. *Cancer Res* 2002; 62: 4273–4281.
- Abrahamsen K, Kong HL, Mastrangeli A, Brough D, Lizonova A, Crystal RG *et al.* Construction of an adenovirus type 7a E1A- vector. *J Virol* 1997; 71: 8946–8951.
- Holterman L, Vogels R, van der Vlugt R, Sieuwerts M, Grimbergen J, Kaspers J *et al.* Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. *J Virol* 2004; 78: 13207–13215.
- Sakurai F, Mizuguchi H, Hayakawa T. Efficient gene transfer into human CD34+ cells by an adenovirus type 35 vector. *Gene Therapy* 2003; 10: 1041–1048.
- 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* 2003; 8: 813–821.
- Vogels R, Zuijdsgeest D, van Rijnsoever R, Hartkoorn E, Damen I, de Bethune MP *et al.* Replication-deficient human adenovirus

- type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J Virol* 2003; 77: 8263–8271.
- 15 Seshidhar Reddy P, Ganesh S, Limbach MP, Brann T, Pinkstaff A, Kaloss M et al. Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector. *Virology* 2003; 311: 384–393.
- 16 Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ, Rux JJ, Burnett RM, Alvira MR et al. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol* 2001; 75: 11603–11613.
- 17 Reddy PS, Idamakanti N, Chen Y, Whale T, Babiuk LA, Mehtali M et al. Replication-defective bovine adenovirus type 3 as an expression vector. *J Virol* 1999; 73: 9137–9144.
- 18 Nguyen T, Nery J, Joseph S, Rocha C, Carney G, Spindler K et al. Mouse adenovirus (MAV-1) expression in primary human endothelial cells and generation of a full-length infectious plasmid. *Gene Therapy* 1999; 6: 1291–1297.
- 19 Hofmann C, Loser P, Cichon G, Arnold W, Both GW, Strauss M. Ovine adenovirus vectors overcome preexisting humoral immunity against human adenoviruses *in vivo*. *J Virol* 1999; 73: 6930–6936.
- 20 Gaggar A, Shaykhetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 2003; 9: 1408–1412.
- 21 Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G, Arnberg N. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 2003; 77: 9183–9191.
- 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 Therapy* 2005; 12: 1424–1433.
- 23 Peng KW, TenEyck CJ, Galanis E, Kalli KR, Hartmann LC, Russell SJ. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res* 2002; 62: 4656–4662.
- 24 Bjorge L, Hakulinen J, Wahlstrom T, Matre R, Meri S. Complement-regulatory proteins in ovarian malignancies. *Int J Cancer* 1997; 70: 14–25.
- 25 Tsujimura A, Shida K, Kitamura M, Nomura M, Takeda J, Tanaka H et al. Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem J* 1998; 330 (Part 1): 163–168.
- 26 Johnstone RW, Loveland BE, McKenzie IF. Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal human tissues. *Immunology* 1993; 79: 341–347.
- 27 Kemper C, Leung M, Stephensen CB, Pinkert CA, Liszewski MK, Cattaneo R et al. Membrane cofactor protein (MCP; CD46) expression in transgenic mice. *Clin Exp Immunol* 2001; 124: 180–189.
- 28 Oldstone MB, Lewicki H, Thomas D, Tishon A, Dales S, Patterson J et al. Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease. *Cell* 1999; 98: 629–640.
- 29 Lemckert AA, Sumida SM, Holterman L, Vogels R, Truitt DM, Lynch DM et al. Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and Ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity. *J Virol* 2005; 79: 9694–9701.
- 30 Barouch DH, Pau MG, Custers JH, Koudstaal W, Kostense S, Havenga MJ et al. Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 immunity. *J Immunol* 2004; 172: 6290–6297.
- 31 Okada N, Masunaga Y, Okada Y, Iiyama S, Mori N, Tsuda T et al. Gene transduction efficiency and maturation status in mouse bone marrow-derived dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 421–431.
- 32 Takagi T, Kitano M, Masuda S, Tokuda H, Takakura Y, Hashida M. Augmented inhibitory effect of superoxide dismutase on superoxide anion release from macrophages by direct cationization. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1335: 91–98.
- 33 Mizuguchi H, Kay MA. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2577–2583.
- 34 Mizuguchi H, Kay MA. A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2013–2017.
- 35 Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, Cusack S. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol Cell* 2005; 17: 121–135.
- 36 Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Ishii-Watabe A, Uchida E, Utoguchi N et al. CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Therapy* 2002; 9: 769–776.
- 37 Wood M, Perrotte P, Onishi E, Harper ME, Dinney C, Pagliaro L et al. Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther* 1999; 6: 367–372.
- 38 Huard J, Lochmuller H, Acsadi G, Jani A, Massie B, Karpati G. The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Therapy* 1995; 2: 107–115.
- 39 Cattaneo R. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol* 2004; 78: 4385–4388.
- 40 Mrkic B, Pavlovic J, Rulicke T, Volpe P, Buchholz CJ, Hourcade D et al. Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *J Virol* 1998; 72: 7420–7427.
- 41 Johansson L, Rytkonen A, Bergman P, Albiger B, Kallstrom H, Hokfelt T et al. CD46 in meningococcal disease. *Science* 2003; 301: 373–375.
- 42 Maisner A, Zimmer G, Liszewski MK, Lublin DM, Atkinson JP, Herrler G. Membrane cofactor protein (CD46) is a basolateral protein that is not endocytosed. Importance of the tetrapeptide FTSL at the carboxyl terminus. *J Biol Chem* 1997; 272: 20793–20799.
- 43 Ichida S, Yuzawa Y, Okada H, Yoshioka K, Matsuo S. Localization of the complement regulatory proteins in the normal human kidney. *Kidney Int* 1994; 46: 89–96.
- 44 Sinn PL, Williams G, Vongpunsawad S, Cattaneo R, McCray Jr PB. Measles virus preferentially transduces the basolateral surface of well-differentiated human airway epithelia. *J Virol* 2002; 76: 2403–2409.
- 45 Segerman A, Arnberg N, Erikson A, Lindman K, Wadell G. There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses. *J Virol* 2003; 77: 1157–1162.
- 46 Seya T, Hara T, Iwata K, Kuriyama S, Hasegawa T, Nagase Y et al. Purification and functional properties of soluble forms of membrane cofactor protein (CD46) of complement: identification of forms increased in cancer patients' sera. *Int Immunol* 1995; 7: 727–736.
- 47 Smith TA, Idamakanti N, Rollence ML, Marshall-Neff J, Kim J, Mulgrew K et al. Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences *in vivo* gene transfer in mice. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 777–787.
- 48 Koizumi N, Mizuguchi H, Sakurai F, Yamaguchi T, Watanabe Y, Hayakawa T. Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and alphav integrin-binding ablation. *J Virol* 2003; 77: 13062–13072.
- 49 Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng KW. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* 2004; 64: 4919–4926.
- 50 Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 1995; 52: 709–720.

- 51 Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999; **284**: 1180–1183.
- 52 Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Xu ZL, Sakurai F, Ishii-Watabe A et al. Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum Gene Ther* 2004; **15**: 813–819.
- 53 Xu ZL, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Uchida E, Mayumi T, Hayakawa T. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* 2001; **272**: 149–156.
- 54 Sakai M, Nishikawa M, Thanaketspaisarn O, Yamashita F, Hashida M. Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and *in vivo* electroporation. *Gene Therapy* 2005; **12**: 607–616.
- 55 Sakurai F, Nishioka T, Saito H, Baba T, Okuda A, Matsumoto O et al. Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. *Gene Therapy* 2001; **8**: 677–686.

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

山口照英

Teruhide YAMAGUCHI

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部長

1. はじめに

ICH(日米 EU 医薬品規制調和国際会議)は医薬品の承認申請に関わる規制を調和し、申請に必要な様々なデータ等の作成における不必要な重複を避け、医薬品開発のグローバルな促進とよりよい医薬品を一刻も早く患者の元に届けることを目的として活動を行っている。2005年11月7~11日にかけてシカゴ市で開催されたICH ミーティングでは、有効性、安全性、品質、及び境界領域の17課題に関し討議が行われた。本稿では、遺伝子治療専門家会議がICH 公開ワークショップとして開催した「腫瘍溶解性ウイルスワークショップ」の成果と、「遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクの最小化に関するICH 見解(案)」作成のための議論を中心に、その活動について紹介したい。

2. 遺伝子治療専門家会議の活動

遺伝子治療専門家会議(Gene Therapy Discussion Group; GT-DG)は、2002年のワシントン D. C. 会議にて正式に発足した作業部会である。それ以前は、バイオテクノロジー医薬品専門家会議及び Ad hoc な遺伝子治療専門家会議として議論を重ねてきた。GT-DGでは、周辺技術を含め急激に進歩する遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するために、公開ワークショップの開催やICH ホームページ等を通じて得られた議論の成果を広く公開するとともに、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これまでGT-DGで取り上げた話題について表1にあげたが、非常に多岐にわたる科学的課題について議論を行ってきている。

シカゴ会議では腫瘍溶解性ウイルスの専門家を招聘し、公開ワークショップを開催した。本ワークショップでの発表及び議論に基づき、現時点での問題点の洗い出しを行った。また、「遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクの最小化に関するICH 見解(案)」作成のための議論を行った。

表1

ICH 遺伝子治療専門家会議で取り上げられた主なトピック

患者からの遺伝子治療用ベクターやウイルスの放出
遺伝子治療薬に含まれる増殖性ウイルスの検出とその手法(RCA or RCR)
遺伝子治療薬のためのウイルス参照品(Adenovirus type 5)
遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクを最小にするための方策
遺伝子治療用ベクターによる挿入変異の評価
腫瘍溶解性ウイルス(ワークショップ)
遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップ(FDA ガイドライン案)
遺伝子治療用レンチウイルスベクター(EMEA ガイドライン案)

3. 腫瘍溶解性ウイルス公開ワークショップ

腫瘍溶解性ウイルスの発見は非常に古く、悪性腫瘍患者がウイルス感染又は生ワクチンを接種された際に、腫瘍の縮小や寛解が認められたことから開発が始まった。腫瘍溶解性ウイルス開発は、腫瘍特異的に増殖する野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを用いた研究から、遺伝子改変技術を用いた病原性の除去や腫瘍指向性をより高めた制限増殖性ウイルスベクターを用いるものへと移行しつつある。腫瘍溶解性ウイルスの開発はここ数年急速に進展しており、多くの総説も書かれている。しかし、腫瘍溶解性ウイルスの臨床適用は未知・未経験の要素も多い領域であり、基礎となる科学的知見も十分に集積されていないことから、品質確保の方策、安全性や有効性評価のための動物を用いた非臨床試験のあり方、さらには臨床研究における安全性・有効性評価等を議論するために、この分野の専門家を招き今回の公開ワークショップを開催することになった。

本ワークショップでは、①腫瘍溶解性ウイルスの選択・設計(野生型・弱毒型・遺伝子組換え型)、②動物やヒト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放出の測定法と実データについて議論が行われた。

非臨床試験

現在使用されている腫瘍溶解性ウイルス開発では、腫瘍細胞内で選択的に複製する非組換えウイルスを用いる場合と遺伝子組換え型ウイルスを用いる場合がある。通常の遺伝子治療では、ベクター中の増殖性ウイルス(RCV)の検出が品質・安全性の観点から重要であるが、腫瘍溶解性ウイルスは制限複製能を持つことから、RCV検出よりも目的ウイルスの変化体をどのように検出するかについて議論が行われた。また品質の恒常性の観点から、ウイルス感染力力価ばかりでなく力価に対する粒子数の比を規格化することの必要性について、その重要度を含めた活発な議論が行われた。

動物試験

安全性評価や腫瘍溶解性ウイルスが目的とする効果が得られるか否かの評価に、動物モデルが有用であることは、多くの講演者の一致した意見であった。しかし、①腫瘍溶解性ウイルスの感染及び複製能に動物種特異性があること、②動物にヒト腫瘍(細胞)を移植した腫瘍モデル動物ではウイルスがヒト体内とは異なる指向性/分布を示すこと、③動物での免疫反応がヒトとは異なること等から、動物モデルの限界も指摘された。しかし、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、コンセンサスが得られた。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試験又はヒト健康組織及びヒト腫瘍組織からの初代組織片培養を用いた試験の有用性について報告された。

臨床研究

腫瘍溶解性ウイルスの複雑な性質から、開発の基礎段階で十分に特性解析することが困難であり、また有用な動物モデルが必ずしも存在するわけではないことから、臨床研究の開始に当たっては多くの検討すべき課題があげられた。

今回のワークショップで取り上げられた臨床研究では、主に中等度以下(グレード1・2)の有害事象が観察されたことが報告された。また、その多くはインフルエンザ様症状であり、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。しかしこれらの有害事象が、

腫瘍溶解性ウイルス特有の有害事象と捉えるべきではないとの意見も出された。

臨床薬物動態

臨床薬物動態の解析手法として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直後と4～7日目にピークが認められた。このような2相性のピークは局所投与及び静注した場合のいずれでも観察されており、ウイルスの複製をモニターする手段となり得ることが指摘された。

用法・用量設定の必要性、腫瘍溶解性ウイルスに対する患者の中和抗体の影響などについて活発な議論が行われた。さらに、腫瘍溶解性ウイルスの体外放出に関する予防措置についても議論が行われた。

腫瘍溶解性ウイルス開発の今後の展望

腫瘍溶解性ウイルスの開発の新たな流れとして、化学療法又は放射線療法と腫瘍溶解性ウイルス療法を組み合わせる併用療法の有用性が示唆されており、今後このような併用療法の開発も進むものと考えられる。腫瘍溶解性ウイルスの設計改良のアプローチとしては、免疫反応を活性化する遺伝子のウイルスゲノムへの挿入や、腫瘍細胞へのウイルスの感染能の増強などが行われている。また、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り組みも行われている。特に、様々な腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究で具体的な進歩がみられていることは特筆すべき点である。

4. 遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクを最小にするための方策に関するICH「見解(第2次案)」

今回のGT-DGでは、「遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクを最小にするための方策に関するICH見解(第2次案)」の議論が行われた。本見解案は、EMAが1stラポーターとして第2次案までの取りまとめを行い、今回はこの第2次案について討議した。本見解案は、遺伝子治療薬の生殖細胞への伝達リスクを評価するための非臨床試験の実施スキームの提示を目的としている。図1は、どのような試験を行う必要があるのかを示したフロー図である。本見解案作成の2ndラポーターとして日本(筆者)が指名され、第3次案に反映すべき意見があれば、2006年1月までに2ndラポーターに送付することとされた。送付された意見に基づいて第3次案を作成し、2006年6月の横浜会議で詳細な議論を行い、遅くとも2007年初めに最終案を取りまとめICH運営委員会に報告する方針が確認された。また本見解案は、科学的な情報が十分に集積された段階でガイドライン作成につなげていくことも確認された。

5. GT-DGの今後の活動について

ICH GT-DG活動では、遺伝子治療をめぐる取り組むべき課題がより明確になりつつあることや、ここに来てICH各極で遺伝子治療医薬品の規制当局への承認申請が出されていることへの早急な対応もあり、ICH「見解」の作成やガイドライン策定を見据えた議論も行われるようになってきている。また、EMAの「遺伝子治療用レンチウイルスベクター」ガイドライン案やFDAの「遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップ」ガイドライン案についても、GT-DGの場で活発な議論が行われてきており、これらの案の策定に当たっては、我々日本を含めた他極の意見が多く取り入れられている。我が国における遺伝子治療の臨床研究の数は欧米に比べて非常に少なく、臨床研究での情報は多くが海外に依存している現況であることは否めない。しかし、ここ数年は我が国においても遺伝子治療薬の開発が急速に進んでおり、

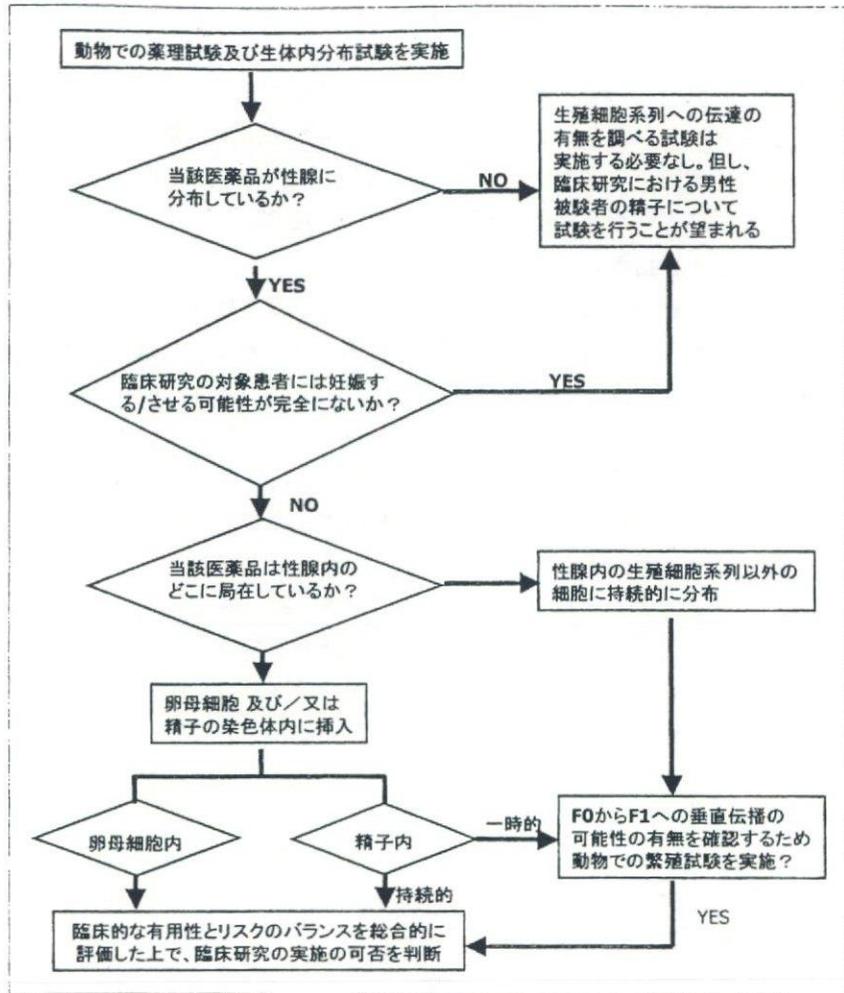


図1 遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達の有無を調べるための動物試験のフロー(案)

遺伝子治療薬に関するICH見解やガイドラインの策定が、我が国の遺伝子治療薬の開発の促進につながっていくと期待される。



▶ 医薬品各条の改正点

生物薬品

山口 照英

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部長

生物薬品の各条新規収載品目 および改正品目

生物薬品委員会の医薬品各条関係では、たん白質性/ペプチド性および高分子多糖性の新規収載品目の審議および既収載品目についての改正作業を行ってきた。

第十四改正日本薬局方(十四局)第一追補, 第二追補を経て, 第十五改正日本薬局方(十五局)に至るまで, 新規収載品目は8品目, 改正は9品目であった(表1)。これらのうち, 第十四改正日本薬局方第一追補(十四局第一追補)にはリゾチーム塩酸塩(十四局第一追補では塩化リゾチームとして収載)が新規収載された。第十四局改正日本薬局方第二追補(十四局第二追補)では, オキシトシン, セラペプターゼの新規収載が行われるとともに, オキシトシン注射液, カリジノゲナーゼ, パンプレシン注射液, ヘパリンナトリウム, ヘパリ

ンナトリウム注射液, 血清性性腺刺激ホルモン, 注射用血清性性腺刺激ホルモン, 絨毛性性腺刺激ホルモン(十四局第二追補では胎盤性性腺刺激ホルモンとして収載), 注射用絨毛性性腺刺激ホルモン(十四局第二追補では注射用胎盤性性腺刺激ホルモンとして収載)の改正が行われた。

生物薬品委員会の局方収載に おける各条審議のポイントと 基本方針

生物薬品委員会の局方収載における各条審議は, 表2にあげた基本方針に沿って行った。これらの基本方針は, 十四局収載における基本方針に準じている。

① 合理性に基づく規格および試験方法の設定

生物薬品の各条における試験項目や規格値の設定においては, ①品質の恒常性維持, ②科学の進歩に即応した品質確保, 品質管理, ③後続品に対する品質基準の規範となる規格・試験法の設定, ④同一原理の試験項目を重複させないなど, 設定する各条ごとに合理性に基づく試験項目の設定, ⑤簡便で精度の高い試験法への変更, ⑥実測値に基づいた規格値の設定などの観点から審議を行うこととした。

表1 生物薬品の各条新規収載品目および改正品目

新規収載品目	改正品目
リゾチーム塩酸塩	カリジノゲナーゼ
ゴナドレリン酢酸塩	オキシトシン注射液
セラペプターゼ	血清性性腺刺激ホルモン
バルナパリンナトリウム	注射用血清性性腺刺激ホルモン
オキシトシン	絨毛性性腺刺激ホルモン
セルモロイキン	注射用絨毛性性腺刺激ホルモン
テセロイキン	パンプレシン注射液
注射用テセロイキン	ヘパリンナトリウム
	ヘパリンナトリウム注射液

にあたっては、保険医療上重要な医薬品としてオーファンドラッグの指定を受けた医薬品や市場で広く使用されている医薬品、さらには米国薬局方(USP)や欧州薬局方(EP)に掲載されているなど国際的にも広く使用されている医薬品から、候補とすべき品目を選定した。さらに、標準品の策定が可能な医薬品を候補品目とすることにし、20品目を新規収載候補品目とした。十五局では、このうちパルナパリンナトリウム、セルモロイキン、テセロイキンが収載されることになった。

収載品目別の概説と審議の経緯の要点

① リゾチーム塩酸塩

リゾチームはムコ多糖分解作用をもつ酵素であり、溶菌活性を示す。リゾチーム塩酸塩の本質はニワトリ卵白より精製される塩基性ポリペプチドである。消炎酵素剤として用いられ、単味あるいは感冒薬に配合して用いられている。さらに、歯科領域などの小手術の止血時、点眼剤として慢性結膜炎、外用剤として皮膚科医用などにも幅広く臨床使用されている。

リゾチーム塩酸塩は医療用、一般用として広く使用され、品目数としても多数に上っている。日本薬局方外医薬品規格(局外規)に収載されていた品目であり、第十四局第一追補に収載された。

基原、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、強熱残分、定量法を規定した。性状についてはエーテルへの溶解性の情報は意義が乏しいことから、水およびエタノールへの溶解性を記載することとした。確認試験では、ニンヒドリンによる呈色反応および参照スペクトルとの一致を規定した。純度試験として、局外規では、溶状、重金属、ヒ素、および窒

素を規定していたが、製造工程からヒ素を規定する意義は乏しいとして、原案ではヒ素の規定を除くことが提案された。審議の結果、ヒ素を規定する必要はないとされた。一方、窒素については示性値として設定すべきとして、純度試験から独立した示性値として規定することとし、幅をもつ規格値とした。定量法としては、迅速分析法の記載に従い *Micrococcus luteus* を基質として、その溶菌活性で規定することとした。局外規では、同様に溶菌活性を指標とする定量法を採用していたが、反応停止法が規定されていなかった。そこで、定量法として反応停止を含めて規定することにより、より精度の高い試験法を採用することとした。保存条件としては、気密容器で保存可能であり、冷所などの温度規定は必要とされた。

② ゴナドレリン酢酸塩

ゴナドレリン酢酸塩は、ゴナドトロピン(LH, FSH)分泌促進作用をもつペプチドで、視床下部性腺機能低下症、ゴナドトロピン分泌不全を伴う下垂体性小人症、視床下部器質性障害、ゴナドトロピン単独欠損症の治療や下垂体性LH分泌機能検査薬として用いられる。

基原、性状、確認試験、施光度、pH、構成アミノ酸、純度試験、水分、定量法を規定した。性状について、水、メタノール、酢酸、エタノールに対する溶解性を規定した。確認試験として、紫外可視吸収スペクトルと赤外吸収スペクトルを採用し、参照スペクトルとの同等性を確認することとした。また、本品は酢酸塩であることから、酢酸を含むことを確認することとした。液体クロマトグラフィー法を用いた構成アミノ酸分析法を採用し、アルギニンに対する各構成アミノ酸の比を規定した。純度試験として、溶状を紫外可

表2 生物薬品委員会の各条審議の基本方針

- 1) 各条全体としての合理性に基づく規格および試験方法の設定
- 2) 範囲のある含量規格の設定
- 3) 性状の溶解性試験の見直し
- 4) 試験動物の使用削減の観点からみた合理的試験法の設定
 - ① バイオアッセイ法から理化学的試験法や免疫化学的方法への移行
 - ② ヒスタミンおよびヒスタミン様物質、異常毒性否定試験などの設定の意義および必要性の見直し
 - ③ 毒性試験の設定の意義および必要性の見直し
 - ④ 発熱性物質試験のエンドトキシン試験への切り替え
- 5) 比活性の独立示性値としての設定
- 6) 純度試験などに液体クロマトグラフィー法の積極的活用、電気泳動法で試験を実施する際の検出感度の保証
- 7) 血液凝固性物質、血液型物質などの設定の意義および必要性の見直し
- 8) 同種同効医薬品の収載にあたっての調和

② 範囲のある含量規格の設定

酵素製剤などの原薬については、単位質量当たりの活性について、上限値と下限値を設定する。このことにより、品質の恒常性の確保を目指す。

③ 性状の溶解性試験の見直し

たん白質やペプチド医薬品の特性から、有機溶媒などへの溶解性に関して、意義の乏しいものは削除することとし、合理的な性状を規定する。

④ 試験動物の使用削減の観点からの合理的試験法の設定

動物福祉やより合理的な試験法の採用を行うとの観点から、*in vivo*アッセイ法から*in vitro*アッセイ法や理化学的試験法などへの移行を図る。ヒスタミンやヒスタミン様物質試験や異常毒性否定試験などは、設定の意義や必要性を見直すこととした。発熱性物質試験からエンドトキシン試験への切り替えを進める。

⑤ 比活性の独立示性値としての設定

比活性は製品の特性を示す値であることから、純度試験として設定するのではなく、独立した示性値として設定することにした。

⑥ 純度試験などに液体クロマトグラフィー法の積極的活用、電気泳動法で試験を実施する際の検出感度の保証

液体クロマトグラフィー法などの技術進歩が著しいことから、純度試験などに積極的に活用していくこととした。その際、検出感度を設定し、保証していくことにした。

⑦ 血液凝固性物質、血液型物質などの設定の意義および必要性の見直し

血液凝固物質や血液型物質の混入に関する試験項目については、起源からみて混入の可能性のないものについては見直すこととした。

⑧ 同種同効医薬品の収載にあたっての調和

インスリンや成長ホルモンなどの同種同効医薬品の収載にあたっては、試験項目や規格値について、合理的な場合に調和を図ることとした。

新規収載候補品目の策定

上記の十五局の収載方針の策定と並行して、継続審議中の各条審議に加えて、新規収載候補品目の策定を行った。候補品目の策定

視吸光度測定法を用いた350nmにおける吸光度を限度値として規定した。また、液体クロマトグラフィー法を用いた類縁物質の限度値を規格した。定量法として、生物活性試験に替えて、液体クロマトグラフィー法を採用し、ゴナドレリン酢酸塩標準品を基準としてゴナドレリン量を求めることとした。ゴナドレリン酢酸塩は、吸湿性があり、また光感受性もあるため遮光して、冷所、密封容器に保存することとされた。

一方、ゴナドレリン酢酸塩は現在のところ、製造しているのは1社のみであり、供給できる標準品が非常にわずかしくなく、受け入れ試験として吸湿性のある本品の水分含量の測定や他の項目を十分に試験するだけの量の確保が困難との報告があった。生物薬品では、各条に記載される製品で1社のみが製造しているものが増加してくることが予想され、標準品の策定においても特別な配慮が必要と考えられた。このため、標準品の試験として必ずしも必要と考えられない試験項目については、設定しないこととした。また使用量などが必要以上に多い項目については適切な量を用いるように変更することとした。確認試験として、質量分析法を用いた分子量の規定、およびゴナドレリン酢酸塩のペプチド配列を確認できるMS/MS分析(質量分析)を行うこととした。さらに、標準品の配布制限も行うこととした。

③ セラペプターゼ

セラチア属菌から製造されたたん白質分解活性を有する酵素であり、抗炎症作用を有する。手術後や外傷時の抗炎症作用、副鼻腔炎や気管支炎の消炎、喀痰喀出不全に対する治療を目的として内服で用いる。

基原、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、強熱残分、定量法を規定した。SDSポリ

アクリルアミド電気泳動や免疫化学的手法を用いた確認試験の設定を要望したところ、金属プロテアーゼの特性を利用した方法が原案作成者より提案された。検討の結果、提案は適切であるとされ、定量法を準用した方法を規定することとした。原案では、重金属およびヒ素に対して独立した試験が規定されていたが、これらは純度試験として規定すべきとされた。とくに重金属に関しては実測値に基づき、より適切な規格(50ppmから20ppm)にすることとされた。定量法として、乳性カゼインの分解活性をトリクロロ酢酸可溶性画分のチロジン残基の増加を指標とする試験法により設定した。貯法としては気密容器とした。

④ バルナバリンナトリウム

ブタ腸粘膜由来のヘパリンを化学的に分解して得たヘパリンのナトリウム塩であり、血液中のアンチトロンビンⅢ(ATⅢ)を活性化することにより血液凝固阻止作用を発現する。血液透析や血液ろ過などの血液体外循環時の灌流血液の凝固防止を目的として使用されている。

基原、性状、確認試験、pH、純度試験、乾燥減量、分子量、分子量分布、硫酸エステル化の度合、総窒素、抗第Ⅱa因子活性、抗第Ⅹa因子活性・抗第Ⅱa因子活性比、定量法を規定した。基原に関して、ダルテパリンナトリウムの整合を図り、参考情報の「日本薬局方の通則等に規定する動物由来医薬品起源としての動物に求められる要件」との対応から、原料を得る動物の表記に「健康な動物」と記載することとされた。原案では試験溶媒として用いていない、エタノール(95)およびエーテルへの溶解性について記載されていたが、意義は低いとして削除することとされ、エタノール(99.5)への溶解性を追加することとし

た。確認試験として、トルイジンブルーOの反応を用いた多糖類染色試験を設定するとともに、ナトリウム塩の定性反応を規定した。パルナパリンナトリウムは多くの分子量の異なるヘパリンナトリウムの集合体であることから、規格項目として分子量と分子量分布を設定し、分子量の項では平均分子量を規定することとした。分子量測定には「分子量測定用低分子量ヘパリン標準品」を用いることとした。ヘパリンナトリウムは、注射剤としても使用されることから「溶状」を設定した。硫酸エステル化は電位差滴定法を用いる試験法を採用した。原料のヘパリンナトリウムでは総窒素を規定していることから、総窒素の項を設定することとした。定量法は、標準品として低分子量ヘパリンを用い抗第Xa因子活性を指標とする試験法を採用し、1mg中の低分子ヘパリン単位を求めることとした。また、別に抗IIa因子活性の比活性を求め、抗第Xa因子活性・抗IIa因子活性の比を幅で規定することとした。貯法は密封容器とした。

⑤ オキシトシン

下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンで、化学合成により製造され、子宮収縮作用がある。子宮収縮の誘発、促進ならびに子宮出血の治療を目的とし、分娩誘発、微弱陣痛、弛緩出血などの治療に点滴静注あるいは、筋注により用いられる。オキシトシン注射液は既収載であったが、その原薬の新規収載を行った。

基原、性状、確認試験、構成アミノ酸、純度試験、水分、定量法を規定した。性状について、規格・試験法で使用する溶媒について調査し、水、エタノール(99.5)、および塩酸試液への溶解性を規定した。確認試験として、吸収スペクトル法を採用し、参照スペクトルとの同等性を確認することとした。構成アミ

ノ酸を設定したが、血圧上昇成分であるバソプレシン様ペプチドが存在しないことを担保するために、オキシトシンに含まれないほかのアミノ酸の限度値を規定した。純度試験では、酢酸を幅規格で設定するとともに、類縁物質について規格値を設定した。定量法は、オキシトシン注射液で動物を用いた生物活性試験が規定されていたが、高速液クロマトグラフィー(HPLC)法に変更することとした。このために、オキシトシンの強制分解溶液を用いて、生物活性試験とHPLC法を比較し、両試験法に良好な相関関係が認められたことから、HPLC法の採用が妥当とされた。貯法温度は2~8℃とし、吸湿性をもつことから気密容器とした。

⑥ セルモロイキン

セルモロイキンの本質は組換えDNA技術によって作られるインターロイキン(IL)-2であり、進行腎細胞がん、悪性黒色腫、血管肉腫に点滴静注ないしは皮下投与される。

基原、性状、確認試験、pH、純度試験、酢酸アンモニウム、エンドトキシン、無菌、定量法が設定された。確認試験では、フォリン試薬を用いたたん白質としての反応性の確認、アミノ酸分析による構成アミノ酸、SDSポリアクリルアミド電気泳動を用いた分子量、ペプチドマップ試験、IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞の増殖活性の抗IL抗体による阻害を指標とする試験を設定した。アミノ酸分析の試験法は、第十四局第二追補参考情報アミノ酸分析法に準じた設定を行った。ペプチドマップ試験法の規格として、ピーク位置の同等性のみならず量的な同等性を確認するために溶出ピークの高さの同等性についても確認することとした。純度試験として、酵素免疫手法による大腸菌由来たん白質、SDSポリアクリルアミド電気泳動を用いた重

合体、液体クロマトグラフィー法を用いた類縁物質のそれぞれの試験を設定した。重合体以外にSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離可能な不純物としては、大腸菌たん白質やメチオニル化体などのセルモロイキン類縁物質が考えられるが、これらは製造工程でSDSポリアクリルアミド電気泳動の検出限度以下となるとのデータが示された。したがって、重合体の試験法としてSDSポリアクリルアミド電気泳動を採用した。緩衝液成分として、酢酸アンモニウムを用いていることから、幅をもった規格として酢酸アンモニウム量を規定した。原案では発熱性物質が規定されていたが、エンドトキシンへ変更することとした。定量法として、IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞のセルモロイキン依存的な増殖活性を指標として、IL-2標準品を用いて定量する方法を採用した。また、別にたん白質量を測定し、比活性を求めることとした。貯法温度は、 -20°C 以下とし、滅菌した気密容器を用いることとした。

⑦ テセロイキン

テセロイキンの本質は組換えDNA技術によって作られるメチオニル化IL-2であり、進行腎細胞がん、悪性黒色腫、血管肉腫などに点滴静注ないしは皮下投与される。

基原、性状、確認試験、pH、純度試験、エンドトキシン、比活性、定量法が設定された。確認試験として、IL-2中和抗体を用いた生物活性抑制の確認試験、構成アミノ酸分析法、SDSポリアクリルアミド電気泳動による分子量、等電点電気泳動法を採用した。中和抗体を用いた生物活性抑制試験では、定量法を準用し、生物活性の中和率を規格として採用した。分子量および等電点の規格は、標準品を用いるのではなく標準物質から算出した分子量や等電点の値を規格として設定するこ

ととした。純度試験として、大腸菌由来たん白質、テトラサイクリン塩酸塩、デスメチオニル体、二量体、その他の異種たん白質、酢酸を設定した。大腸菌由来たん白質は、当初イムノラジオメトリックアッセイ法を採用していたがイムノエンザイモメトリック法に変更した。

テセロイキンは、メチオニル化体であるために、メチオニンがはずれたデスメチオニル化体の量を液体クロマトグラフィー法を用いて求めることにした。二量体およびその他の異種たん白質に関して、それぞれ液体クロマトグラフィー法を用いる試験法を採用した。定量法として、IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞を用いた増殖能促進作用を指標とする生物活性試験を採用し、IL-2標準品を用いて力価を求めることとした。また、別にたん白質量定量試験より、テセロイキンのたん白質量を求め、比活性を規格として採用した。貯法温度として -10°C 以下とし、密封容器に保存することとした。

⑧ 注射用テセロイキン

テセロイキン注射液として、基原、製法、性状、確認試験、pH、純度試験、乾燥減量、エンドトキシン、製剤均一性、不溶性異物、不溶性微粒子、無菌、定量法を規定した。確認試験として、テセロイキンの確認試験を準用し、IL-2中和抗体を用いた生物活性抑制の確認試験、およびSDSポリアクリルアミド電気泳動による分子量の試験を規定した。定量法としては、同様に、テセロイキン定量法のIL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞を用いた増殖能促進作用を指標とする生物活性試験を準用することとした。貯法温度は、凍結を避けた 10°C 以下とし、凍結乾燥品であることから、密封容器に保存することとした。

生物薬品各条審議のポイントと 生物薬品改正の基本方針と その対応

生物薬品改正の基本方針については最初に述べたが、この基本方針に沿った各条審議での対応については以下のとおりである。

ゴナドレリン酢酸塩およびオキシトシンでは当初、生物活性試験が規定されていたが、収載にあたって物理的定量法へ変更を行った。セラペプターゼの酵素製剤の原薬について、単位質量当たりの範囲のある含量規格の

設定を行うこととした。発熱性物質を規定していたセルモロイキンでは、エンドトキシンに替えることになった。また、リゾチーム塩酸塩では、試験法の見直しを行い、より精度の高い方法を採用した。また、全般的に規格値の見直しを求め、安定性を考慮した実測値に基づいた規格値を設定した。

今回の収載品目ではセルモロイキンとテセロイキンの同種同効医薬品を収載した。これらの審議にあたっては、共通の標準品を用いるものであり、各条の構成などの調和を図った。



杵の動き

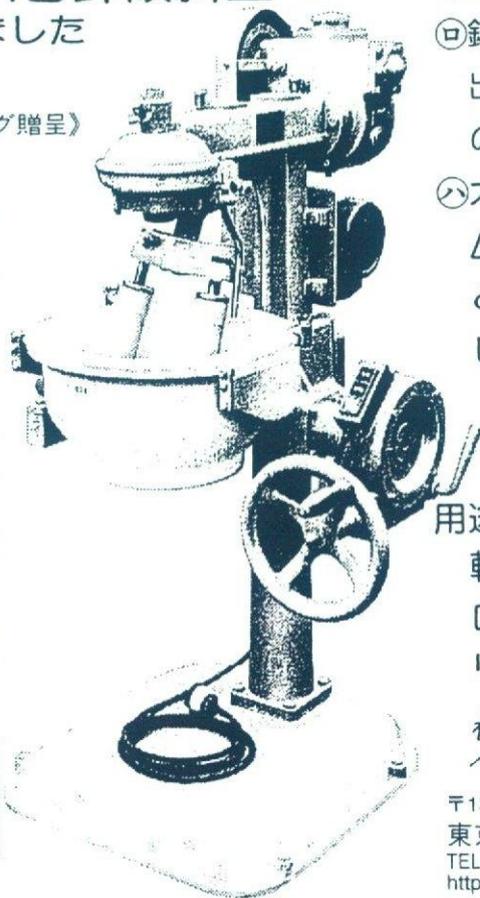
新しい小型機械 “第24号鉢傾斜型”が 出来ました

《カタログ贈呈》

攪拌・混合・ねり合せ作業を精密に組み合わせ、貴重な薬剤をムラなく安定して製造する機械として、大学医学部、病院、薬局にて長年ご愛用頂いています。小型石川式攪拌搗潰機にウォーム機構の第24号型が開発され、ご好評を頂いております。

**AGA型用に
高純度アルミナ鉢・杵
新発売!!**

加熱型・冷却型もあります



標準第24号機に比べ

- ①ずっと静かな運転
- ②鉢をハンドルで傾斜出来ますので鉢・杵の着脱が容易
- ③大型機と同じウォーム機構ですから一段と安定した作業を致します

用途

軟膏・散薬・顆粒・
ローション・パップ剤・
リニメント剤

株式会社 石川工場

〒135-0053
東京都江東区辰巳1-1-8
TEL 03-3522-1018 / FAX 03-3522-1017
<http://www.ishikawakojo.jp>

Gene Therapy Discussion Groupの動向について**

山口 照 英*

1. 横浜会議とこれまでの経緯 (Table 1)

遺伝子治療薬は、まだ製品が世の中に出ておらず、ICHにおいても他のEWGと異なる取組みをしています。

本稿では、これまで遺伝子治療専門家会議で行われてきた活動について概説すると共に、横浜会議で取り上げた三つのテーマについて説明します。

一点目は、各極の遺伝子治療に関する最近の進展について、横浜会議で報告し、議論したことがあげられます。

二点目は、この遺伝子治療専門家会議で議論が続いています見解案 (Considerations) についてです。横浜会議ではこの「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列の意図しない伝達リスクを最小にするための方策」見解案のDraft 3の議論を行いました。

三点目は、遺伝子治療の専門家会議で今後取り上げるべき課題についてです。横浜会議で今後の課題について議論し、ステアリングコミッティにいくつかの課題を提案し、了承を得ました。

2. 遺伝子治療について

遺伝子治療とは、様々な遺伝子的疾患あるいは重篤な疾患に対し、目的遺伝子を患者の体内にあるいは体外で患者の細胞に導入して行う治療です (Fig. 1)。

遺伝子治療専門家会議では、例えば新聞で報道されたフランスでの白血病様症状の発症など、有害事象が起きた場合、どのように対処するかも含め、その時点でのサイエンティフィックな到達点に基づき、サイエンスベースのrecommendationを出すといった取組みを行っています。

2.1 遺伝子治療の対象疾患

遺伝子治療の対象疾患は、Table 2に示すように重篤な遺伝性疾患、がん、血管の疾患あるいは神経病などがあげられます。

2.2 遺伝子治療の光と影 (Table 3)

遺伝子治療は、当初なかなか治療効果は得られませんでした。最近になっていくつかの画期的な成果が得られるようになってきました。

例えば、フランスで行われた重度の免疫不全症であるX連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞の遺伝子治療において、10人中9人に著効が得られました。この結果、今まで無菌室でしか生活できなかった子供が室外に出られるようになった画期的な治療成果です。その他同じような重度免疫不全症であるアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症でも有効な治療成績が得られています。更に、最近では白血球による殺菌機能が欠損している慢性肉芽腫症 (CGD) という遺伝子疾患についても、遺伝子治療で極めて有望な結果が得られています。

上記三例は先天性遺伝子疾患ですが、これらは導入効率の上昇等の進歩により、非常に著効が得られるようになった事例です。

一方、影の部分として重篤な副作用の発現があります。例えば、アメリカのペンシルベニア大学では1999年に遺伝子治療においてアデノウイルスベクターを所定以上に大量に投与したために死亡した例があり、これを受けて、アデノウイルスベクターの投与量あるいはベクター粒子数の上限が設定されるようになりました。

また、2002年から、フランスのネッカー病院で、レトロウイルスベクターを用いたX-SCID遺伝子

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

** 当協会主催の第14回ICH即時報告会 (平成18年7月26日) における講演による。

Table 1 遺伝子治療専門家会議横浜会議とこれまでの経緯

- 遺伝子治療専門家会議のこれまでの活動
- 横浜会議で取り上げられたテーマ
 - 各極の遺伝子治療に関する進展
 - ICH 見解案「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への意図しない伝達リスクを最小にするための方策」Draft3の議論
 - 今後取り上げるべき課題

Table 2 遺伝子治療の対象疾患

- 重篤な遺伝性疾患、がんその他の生命を脅かす疾患又は身体の機能を著しく損なう疾患
- 先天性遺伝子疾患（単一遺伝子疾患）：ADA欠損症、X-SCID、血友病、筋ジストロフィーなど
 - ガン：肺ガン、腎ガン、前立腺ガン、食道ガン、脳腫瘍、黒色腫など
 - 末梢性血管疾患：閉塞性動脈硬化症など
 - 虚血性心疾患：狭心症、心筋梗塞など
 - 神経変性疾患：アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）など
 - ウイルス感染症：HIV、B型、C型肝炎ウイルスなど
 - 生活習慣病、慢性疾患：糖尿病、関節リウマチなど

治療で、遺伝子の染色体挿入が原因となり3名にT細胞白血病様症状が発症しました。

このような重篤な有害事象が起こることもあり、遺伝子治療はまだ医療として十分に確立していないといえます。このため、有効性、安全性を慎重に検

Table 3 遺伝子治療の光と影

成功例

- X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）に対する造血幹細胞遺伝子治療（レトロウイルスベクターでIL-2R コモンγ鎖を導入）により10人中9人に著効
- アデノシンデアミナーゼ欠損症（ADA-SCID）に有効
- 慢性肉芽腫症（CGD）の遺伝子治療で極めて有望な結果

重篤な副作用の発現

- 1999年 アデノウイルスベクターの投与による異常免疫反応により死亡（米・ペンシルベニア大）
- 2002年 レトロウイルスベクターによるX-SCID 遺伝子治療で遺伝子の染色体挿入が原因となり3名にT細胞白血病様症状発症（仏・ネッカー病院）
- 遺伝子治療はまだ医療として十分に確立しておらず、有効性、安全性を慎重に検討する必要がある

討する必要があるとの姿勢で遺伝子治療専門家会議は行われています。

3. ICH 遺伝子治療専門家会議（GTDG）

2001年5月のICHのステアリングコミッティにおいて、遺伝子治療薬などの製品の規制に重大な影響を及ぼす可能性がある新しい科学的知見に関する情報について、ICH各極間での情報の交換及び共有を積極的に継続して行う必要があるとの認識の

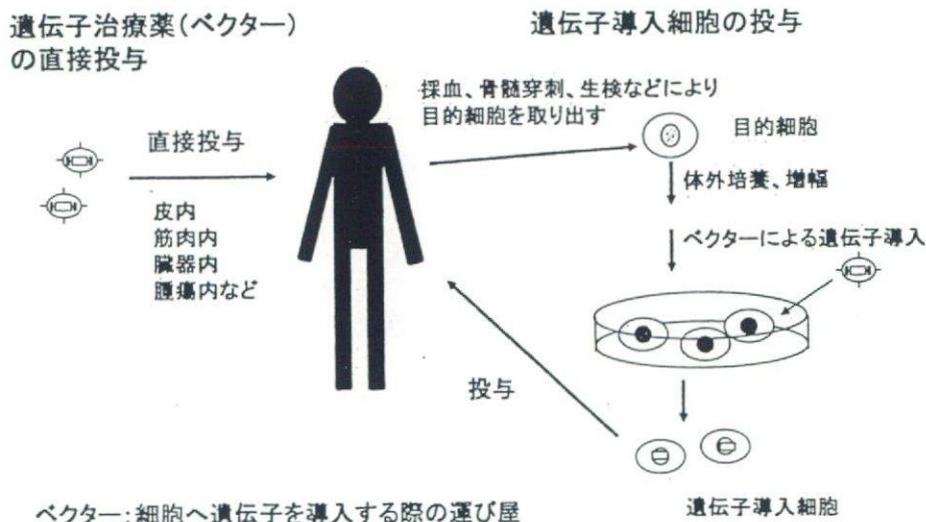


Fig. 1 遺伝子治療とは

と、遺伝子治療専門家会議 (Gene Therapy Discussion Group; GTDG) が ad hoc に新設されました。他の専門家作業グループのように EWG ではない理由は、EWG はガイドラインを作る時に立ち上げる専門家作業グループですが、現時点ではガイドラインに取り上げる取組みをしていないため、遺伝子治療専門家会議となりました。現時点での参加メンバー (Table 4) には、ICH 3 極 6 グループに EFTA とカナダが加わっています。

3.1 遺伝子治療専門家会議の活動 (Table 5)

1997 年及び 2001 年の ICH 会議のバイオテクノロジー専門家会議において遺伝子治療の問題が取り上げられ、2002 年に初めて遺伝子治療専門家会議が正式に発足しました。その後 2003 年は大阪での ICH6、2004 年はワシントン、2005 年はブリュッセルとシカゴで遺伝子治療専門家会議が開催されました。

3.2 遺伝子治療専門家会議の目的 (Table 6)

遺伝子治療専門家会議の目的の一つは、遺伝子治療分野は非常に急速に進展しているため、その科学的事項について調査・検討することです。

二つ目は、遺伝子治療用医薬品に関する規制の国

Table 4 ICH 遺伝子治療専門家会議参加メンバー

Klaus Cichutek (EMEA), Stephanie Simek (FDA), Teruhide Yamaguchi (MHLW), Christine-Lise Julou (EFPIA), Wataru Toriumi (JPMA), Alex Kuta (PhRMA), EFTA, Canada

Table 5 ICH 遺伝子治療専門家会議の活動

1997 年ブラッセル：
バイオテクノロジー専門家会議
2001 年 東京・舞浜：
バイオテクノロジー専門家会議
2002 年ワシントン：
遺伝子治療専門家会議として正式に発足
2003 年大阪 (ICH6)：遺伝子治療専門家会議
2004 年ワシントン：遺伝子治療専門家会議
2005 年ブラッセル：遺伝子治療専門家会議
2005 年シカゴ：遺伝子治療専門家会議

際調和に有益な影響をもたらす可能性のある一般的原則をあらかじめ公表することです。

三つ目は、ICH における議論の成果が社会に広く浸透し、十分理解されることを保証するための社会に向けた新しいコミュニケーション手段として、インターネット等を利用して公開することです。

例えば 2002 年、2003 年及び 2005 年に公開ワークショップを開催しています。2005 年は、後述する腫瘍溶解性ウイルスに関する公開ワークショップを開催しています。

また、ICH のステアリングコミッティで遺伝子治療専門家会議の公式声明を発表し、その時点での到達点を公開します。更に誰でもアクセス可能な ICH 遺伝子治療のホームページを開設し、これを ICH 事務局のホームページ内に開設する了解を得て公開しています。国立医薬品食品衛生研究所 (衛研) の遺伝子細胞医薬部のホームページでは、これを日本語に仮訳して掲載しています。更にこの衛研のホー

Table 6 ICH 遺伝子治療専門家会議の目的

- 研究が進められている科学的事項について調査・検討
- 遺伝子治療用医薬品に関する規制の国際調和に有益な影響をもたらす可能性のある一般的原則を予め積極的に提示
- ICH における議論の成果が社会に広く浸透し、十分理解されることを保証するための、社会に向けた新しいコミュニケーション手段を開発
 - 例：ICH 遺伝子治療公開ワークショップの開催
 - 2002 年 9 月、2003 年 11 月、2005 年 11 月に開催
 - ICH SC を介しての ICH GTDG 公的声明の発表
 - 誰でもアクセス可能な ICH 遺伝子治療ホームページの開設
 - ICH 事務局ホームページ内 (英語)：
www.ich.org/cache/html/1386-272-1.html
 - 国立衛研 遺伝子細胞医薬部ホームページ内 (日本語)：
www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec1/index1-j.html

ムページでは、日本における遺伝子治療の状況について厚生労働省の厚生科学課の協力を得ながら英語で公開し、国際的な情報共有の場としても役立てています。

3.3 遺伝子治療専門家会議で取り上げられたトピック

過去に遺伝子治療専門家会議は専門家会議として発足して6回、合計8回の会議を開きました。その中で取り上げられたトピックをTable 7に示します。

1点目は遺伝子治療で用いるウイルスあるいはウイルスベクターの体外への放出について、患者だけでなく患者をケアする人や患者の家族も遺伝子ベクターが伝播される可能性があるため、どのように検出して防げば良いかの議論です。

2点目は、遺伝子治療のベクター作成時における増殖性の replication confident virus (RCV) の混入についての議論です。

3点目は、Viral SheddingあるいはRCVの測定には適切な参照品が必要なため、現在、アデノウイルス5型の参照品が作られています。この参照品の有用性やどのように利用すべきかについての議論です。

4点目は、生殖腺への遺伝子治療ベクターの伝達に関するリスクを最小にするための方策についての議論で、2005年に見解案としてまとめることが方針とされました。

5点目は、前述したフランスでの事例のように、染色体挿入変異による癌化などのリスクについての評価や評価法についての議論です。

6点目は、腫瘍溶解性ウイルスについて、臨床あるいは非臨床のあり方、あるいは特性解析や品質管

Table 7 ICH 遺伝子治療専門家会議で取り上げられたトピック

- Viral Shedding from patients
- Detection of RCV (RCA or RCR)
- Reference Materials (Adenovirus type5)
- Minimize of the Risk of Germline transmission
- Insertional mutagenesis
- Oncolytic virus (Workshop)
- Long term follow up (FDA Guideline 案)
- Lentiviral vector (EMEA Guideline 案)

理をどのように行うべきかについての議論です。

それ以外には、FDAのLong term follow upあるいはEMEAのLentiviral vectorといった各極のガイドライン案について議論し、各極からのコメントが作成されたガイドラインに取り込まれています。

4. 横浜会議

4.1 遺伝子治療をめぐる各極の最新情報 (Table 8)

EUからは、非常に有効な成績が得られているレトロウイルスベクターを用いた慢性肉芽腫症 (CGD) の治療において、スイスとドイツで3名の患者の治療が行われ、そのうちの1名が遺伝子治療の効果が現れる前に原疾患 (感染症) により死亡したことが報告されました。EUは、これは副作用ではないと判断していますが、EFTAでは詳しい情報が得られるまでは、CGDの臨床研究は一時凍結していることが報告されました。

FDAは、臨床研究における遅発性の副作用、すなわちLong termのフォローアップに関するガイドラインを近々発出する予定で、これについていくつかのコメントを提出しました。

また、前述したアデノウイルスベクターの参照品は、遺伝子治療の品質あるいはViral Sheddingを測定するために推奨していますが、その安定性試験

Table 8 遺伝子治療を巡る各極の最新情報

- EU: レトロウイルスベクターを用いた慢性肉芽腫症 (CGD: 好中球の活性酸素生成酵素の異常により殺菌能が欠損し、重篤な感染症を繰り返す) の遺伝子治療での死亡例についての現在の見解. スイスとドイツで3名の患者に本遺伝子治療が行われたが一名の患者が死亡. 十分な機能回復が得られる前の原疾患 (感染症) による死亡. 副作用ではないとの判断.
- EFTA: CGDの臨床研究については詳しい情報が得られるまで一時凍結
- FDA: 臨床研究における遅発性の副作用のフォローアップに関するガイドラインを発出する予定. 遺伝子治療用アデノウイルスベクターの参照品の長期安定性に関する情報: -80°Cで50ヶ月の安定性を確認
- Japan: ADA-SCID 遺伝子治療のフォローアップについて報告. 現在まで、ガン化等の重篤な副作用は見られていない

Table 9 ICH遺伝子治療専門家会議見解(案)「意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則」

報告担当者(1st) : Markku Pasanen (EMEA)
同 (2nd) : Teruhide Yamaguchi (MHLW)
同 (3rd) : Dan Takefman (FDA)
<ul style="list-style-type: none"> ● 2005年10月: 欧州医薬品庁が第1次案を作成. 各極に配付 ● 2005年11月: 各極から寄せられた事前コメントを基に, GTDG会議で第2次案を作成 ● 2006年1月: 第2次案に対する各極からのコメントを切り取り(コメントとりまとめ: MHLW) → 第3次案を作成 ● 2006年6月: 横浜 GTDG会議で検討 → 第4次案を作成 ● 2006年7月: Draft4に対するコメント締め切り(予定) ● 2006年9月: Draft5作成(予定) ● 2006年10月: シカゴ GTDG会議で Draft5の検討. 最終案の作成(予定)

の結果が報告されました。

日本は、北海道大学で行われた ADA-SCID 遺伝子治療のフォローアップについて、現在までのところガン化等の重篤な副作用は見られていないと報告しました。

4.2 生殖細胞への挿入リスクの問題について (Table 9)

ICH GTDG 見解案は後述しますように、題名が変更されております。

「意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則」の最初の見解案は EMEA が作成、次に筆者が Draft 3 を作成し、現在は FDA に交代しています。ほぼ大きな論点はなくなっていますので、2006 年度中に最終案にする予定です。

これまでの経過は Table 9 に示すように、2005 年 10 月に EMEA が第 1 次案作成、11 月のシカゴ会議で各極から寄せられたコメントを基に第 2 次案を作成、更に第 2 次案に対する各極のコメントを基に第 3 次案を作成し、横浜会議ではそれを検討して第 4 次案を作成しました。

現在は第 4 次案のコメントを求めているところで、7 月中に締め切り、FDA に送付することとなっています。

5. 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則

5.1 構成

Table 10 に示すように最初に序論があり、次にリスクに影響する因子として、ベクターの種類、投与量、及び投与方法や投与部位について記載されています。3 番目には非臨床試験で実施すべきこととして一般的考慮事項と生体内分布試験について記載され、4 番目は何らかのリスクが想定される場合、患者に対するモニタリングをどのように行っていくべきかが記載されています。

5.2 見解案議論の主なポイント (Table 11)

この見解案のタイトルについては、最初は transmission という言葉を用いて「伝達リスク」という

Table 10 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ● 序論 ● 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスクに影響する因子 <ul style="list-style-type: none"> - ベクターの種類 - 投与量 - 投与方法や投与部位 ● 非臨床試験 <ul style="list-style-type: none"> - 一般的考慮事項 - 生体内分布試験 ● 患者のモニタリング ● 用語 |
|---|

Table 11 見解案議論の主なポイント

- 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への意図しない伝達リスクを最小にするための方策 (Draft3)
 - ↓
 - 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞 (染色体) への組込みリスク評価における原則 (Draft4) (遺伝子改変が次世代へ及ぶことを防止するための方策に限定することを明記)
 - 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞 (染色体) への組込みリスクに影響する因子
 1. 生体内分布様式, 増殖特性, 組込み能等のベクターの性質に依存してリスクが分類できる
 2. リスクは次の順で低くなる
 - ① 搭載遺伝子を核内へ送達し, かつ染色体への組込み機能を持つベクター
 - ② 搭載遺伝子を核内へ送達するが, 染色体への組込み機能を持たないベクター (非ウイルスベクターを含む)
 - ③ 搭載遺伝子を核内へ送達せず細胞質にのみ局在
 - ④ 体外で遺伝子導入された細胞 (非増殖性ベクター)
 3. 投与量, 投与方法, 投与部位
 - 非臨床試験
 1. 非臨床試験のデザインに関しては, ICH M3 や ICH S6 などの他の GL のスコープには含まれないが, 基本原則は適用できるかもしれない。
 2. 生体内分布試験
 - ・ 生体内分布試験では, 生殖腺への分布を試験すること
 - ・ 生殖腺への分布の検出に当たっては, 定量的 PCR 等の適切な感度をもつ試験法を用いて試験すること
 3. 生殖腺への分布が認められたときにはそのシグナルが持続性があるかを試験すること。持続性が認められたときには, 生殖細胞へのシグナルが認められるかどうかを明らかにすること
 - 患者のモニタリング
 非臨床試験において生殖腺に一過性のベクターシグナルが認められたときには, 臨床試験において患者の精子への伝達が無いモニタリングすることが推奨される

言葉を用いていましたが, 基本的に遺伝子治療用ベクターの生殖細胞の染色体への組込みリスクにおける原則, つまり次世代へ影響が及ぶことを避けることといったことに限定することとし, 例えば卵子の染色体外にベクターが入った場合にも発生に影響が及ぶ可能性があります, それについて発生毒性あるいは他の非臨床的試験でカバーすべきであるといったことを明記しています。

5.2.1 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞 (染色体) への組込みリスクに影響する因子

染色体への組込みリスクに影響する因子として, ベクターの生体内分布様式, 増殖特性, あるいは組込み能等のベクターの性質に依存してリスクが分類できます。

リスクの分類として最も高いのは, 遺伝子を核内へ送達し, かつ染色体への組込み機能を持つベクターです。

2番目は, 核内には送達するけれども, 通常は組込み能がなく, 高濃度に存在すると組込みが行われ

る場合です。

3番目は遺伝子を核内に送達せず, 細胞質のみに局在する場合です。例えばセンダイウイルスベクターを用いた場合は, ここに該当します。

4番目は体外で遺伝子導入された細胞で治療を行い, かつ非増殖性ウイルスベクターを使う場合で, 非常にリスクは低く, 生殖細胞への組込みリスクに関する非臨床試験を行う必要はないと考えられます。その他に投与量, 投与方法及び投与部位がリスクに関与します。

5.2.2 非臨床試験 (Table 11)

5.2.1 で述べたようなリスクに基づいて非臨床試験をデザインします。

デザインに関しては, ICH M3 や S6 など他のガイドラインのスコープには含まれません。ただし基本原則については, 適用できる可能性もあると考えています。

遺伝子治療ベクターでは, 当然生体内分布試験が行われます。その試験においては, 必ず生殖腺への分布も試験することが求められます。生殖腺への分