

図2 ウイルスのがん細胞で選択的に増殖させる方法  
(Ries SJ et al., 2004<sup>13)</sup>, Fig 1 より改変)

果が得られるかの評価に、動物モデルが有用であることが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およ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、などから動物モデルの限界も指摘されている。

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るということについてはコンセンサスが得られている。腫瘍選択性に関しては、非腫瘍細胞培養株および腫瘍細胞培養株を用いた試験、またはヒト正常組織およびヒト腫瘍組織からの初代組織片培養を用いた試験が有用とされている。

### (3) 臨床研究

腫瘍溶解性ウイルスは、その複雑な特性から、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るとされた。

### (4) 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、局所投与およ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うるとされている。

また、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が重要な課題であるとされている。さらに、腫瘍溶解性ウイルスの体外排出に関する予防措置も大きな課題である。

### (5) 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、化学療法や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が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、免疫反応を活性化させる遺伝子などの治療

表5 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方

1. 緒言
2. 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みにおけるリスク要因
2.1 ベクター
2.2 投与量および投与経路
3. 非臨床試験
3.1 一般に考慮すべき事項
3.2 生体内分布試験
4. 患者のモニタリング

用遺伝子をウイルスゲノムに挿入する遺伝子治療との組み合わせや、腫瘍細胞へのターゲティング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および臨床試験の取り組みも行われている。

現在、GT-DG では、2008 年を目途に、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性評価に関する ICH 見解案を作成中である。

#### 7. ICH 見解：生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方

GT-DG では、2005 年から「生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方」に関する ICH 見解をまとめるための議論が開始された。本見解の最も大きな目的は、遺伝子改変された次世代をつくらないことに尽きている。遺伝子治療用ベクターが生殖細胞の染色体へ組み込まれなくとも、生殖細胞へ遺伝子導入されただけでも発生毒性など他の安全性の懸念はもちろん生じるが、発生毒性などは他のガイドラインなどで対応していくものとされた。

本見解では、非臨床試験を通じて体内分布試験の実施によって生殖組織へのベクターの分布が起こるか否か、またベクターが生殖組織で検出された場合にはその検出が持続的か一過性を明らかにすることを求めている。さらに、生殖組織で持続的に検出された場合、生殖細胞そのものに遺伝子が組み込まれているのか、白血球など周辺細胞にのみ局在するのかを明らかにすることが求められている。これらの試験を通じて、ベクターが生殖細胞内に持続的に保持されることが明らかになった場合には、ヒトへの使用に際しては規制当局と十分な議論をすること

を求めている。

非臨床試験でベクターが一過性にせよ生殖腺に局在する可能性が示された場合には、臨床試験において患者の精液にベクターが局在することがないかモニタリングを考慮すべきとされた。また、臨床試験の期間中は、非臨床生体内分布試験の結果にかかわらず避妊手段をとるべきことが推奨された。なお、対象患者が生殖不能な場合、または余命が短いことが見込まれる重篤な疾患では、精液のモニタリングは必要ないとされている。

本見解は、2006 年の ICH シカゴ会議で最終案がとりまとめられ、ICH 運営委員会によって承認された(表 5)<sup>17)</sup>。

#### GT-DG の今後の活動

ICH GT-DG の活動では、遺伝子治療をめぐって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 各極で遺伝子治療用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。今後、ベクターの排出に関する見解の作成やガイドライン化、腫瘍溶解性ウイルスに関する見解の作成など、いくつかの重要な科学的コンセプトが出されていく予定になっている。

わが国における遺伝子治療の臨床研究の数は欧米にくらべて非常に少なく、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、ここ数年はわ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、遺伝子治療薬に関する ICH 見解やガイドラインの策定が、わが国における遺伝子治療薬開発の促進につながっていくと期待される。

#### 文 献

- 1) Marshall E : Clinical trials : gene therapy death prompts review of adenovirus vector. Science 286 : 2244-2245, 1999.
- 2) Hutchins B : Development of a reference material for characterizing adenovirus vectors. BioProcessing Journal 1 : 25-28, 2002.
- 3) Hutchins B, Sajjadi N, Seaver S, Shepherd A, Bauer SR et

- al. : Working toward an adenoviral vector testing standard. *Molecular Therapy* 2 : 532-534, 2000.
- 4) Bamford KB, Wood S, Shaw RJ : Standards for gene therapy clinical trials based on pro-active risk assessment in a London NHS Teaching Hospital Trust. *Q J Med* 98 : 75-86, 2005.
  - 5) CHMP Guideline : Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors. CHMP/BWP/2458/03, 2005. (<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/245803>)
  - 6) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N et al. : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003.
  - 7) Schmidt M, Glimm H, Wissler M, Hoffmann G, Olsson K et al. : Efficient characterization of retro-, lenti-, and foamyvector-transduced cell populations by high-accuracy insertion site sequencing. *Ann N Y Acad Sci* 996 : 112-121, 2003.
  - 8) Schmidt M, Carbonaro DA, Speckmann C, Wissler M, Bohnsack J et al. : Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 9 : 463-468, 2003.
  - 9) Woods NB, Muessig A, Schmidt M, Flygare J, Olsson K et al. : Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell : risk of insertional mutagenesis. *Blood* 101 : 1284-1289, 2003.
  - 10) FDA Guidance for Industry : Supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors, November 2006. (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/retrogt1000.pdf>)
  - 11) FDA Guidance for Industry : Gene therapy clinical trials - observing subjects for delayed adverse events, November 2006. (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/gtclin.pdf>)
  - 12) European Medicines Agency (EMA) : Report from the CPMP gene therapy expert group meeting 26th-27th. EMA/CPMP/1879/04/Final 2004, February, 2004.
  - 13) Ries SJ, Brandts CH : Oncolytic viruses for the treatment of cancer : current strategies and clinical trials. *Drug Discov Today* 9 : 759-768, 2004.
  - 14) Lin E, Nemunaitis J : Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther* 11 : 643-664, 2004.
  - 15) Aghi M, Martuza RL : Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 24 : 7802-7816, 2005.
  - 16) Yamaguchi T, Uchida E : Regulatory aspects of oncolytic virus products. *Curr Cancer Drug Targets* 7 : 203-207, 2007.
  - 17) ICH Considerations : General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors, October 2006. (<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA3363.pdf>)

## 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球様症状の発症など、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、サイエンススペースの 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
- 先天性遺伝性疾患（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 コモング鎖を導入）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

遺伝子治療薬（ベクター）の直接投与

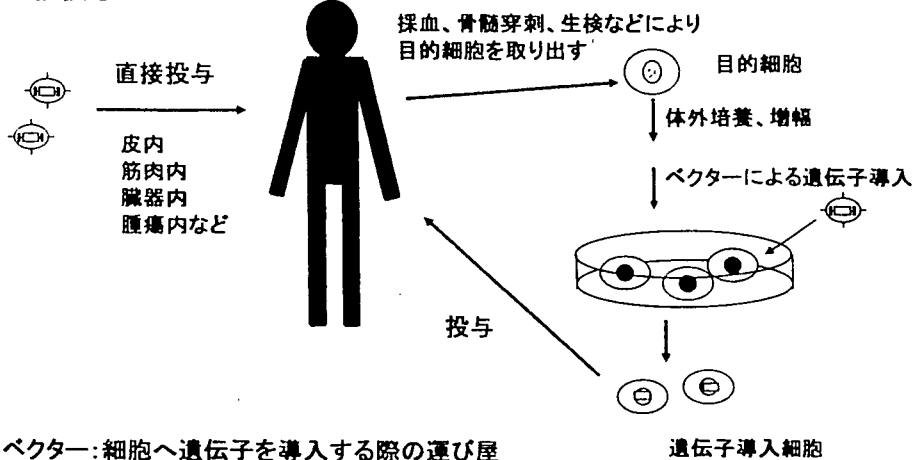


Fig. 1 遺伝子治療とは

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](http://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](http://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1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 :  $-80^{\circ}\text{C}$  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)への組み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)

---

- 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)への組み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Draft3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)への組み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)への組み込みリスク評価における原則

- 
- 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)への組み込みリスクに影響する因子
    - ベクターの種類
    - 投与量
    - 投与方法や投与部位
  - 非臨床試験
    - 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

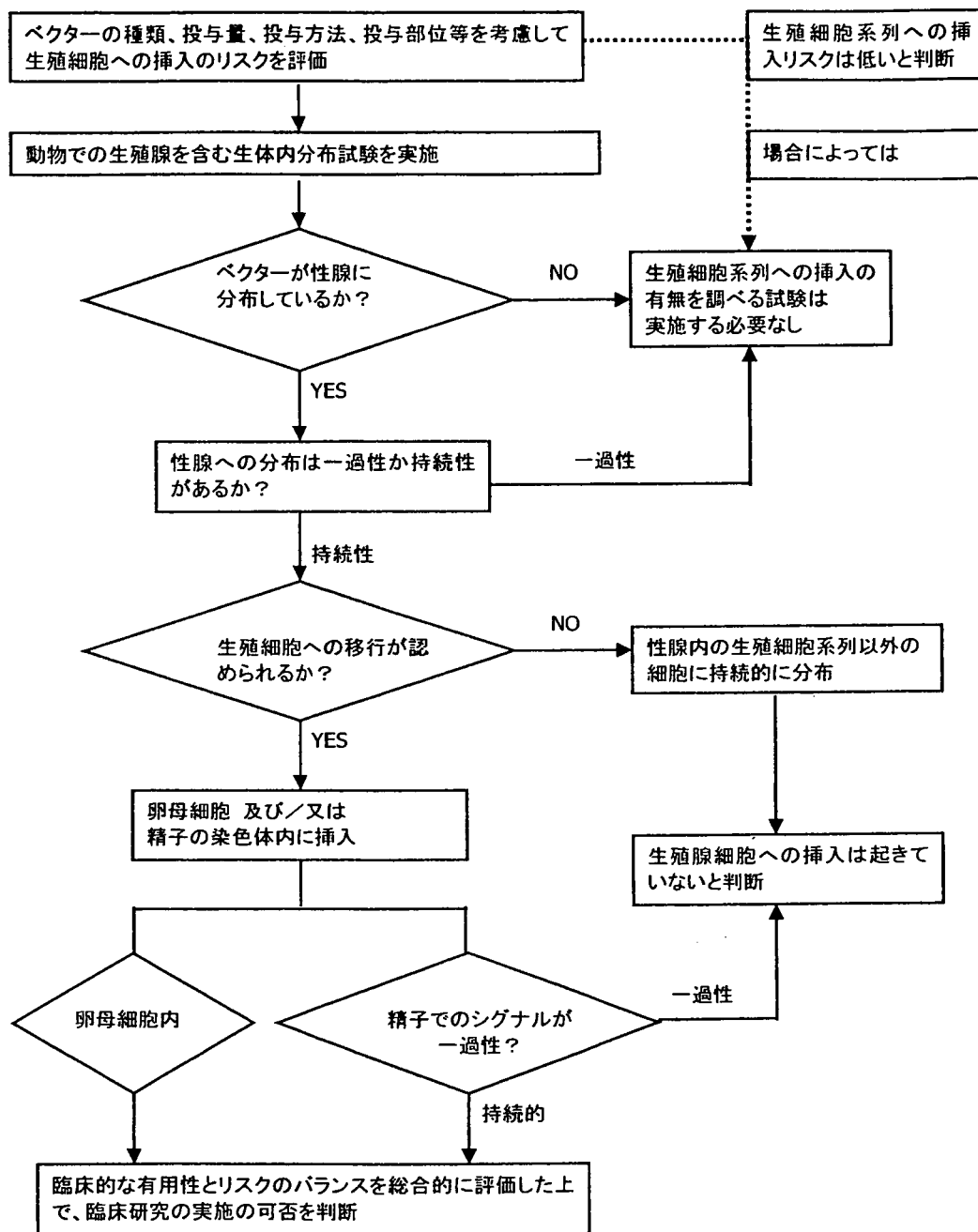


Fig. 2 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への組み込みの有無を調べるための動物試験のフロー (案)

布を試験するに当たっては、定量的 PCR 等の適切な感度を持つ試験法を用いて試験をすることが求められます。

生殖腺への分布が認められた場合、そのシグナルに持続性があるかどうかを試験し、持続性が認められれば更に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します。これをフローチャートで表

すと、Fig. 2 のようになります。

まずはベクターに応じてリスクを評価します。生殖細胞への挿入リスクが低いと判断された場合は、もともと生殖細胞の挿入リスクがないと考え、試験を実施する必要がない場合もあります。しかし生体内分布試験を実施してベクターが性腺に分布しないのであれば、それ以上の試験は必要ありません。こ

の評価を全ての製品について行わなければならないかについては、例えば対象が非常に高齢であったり、重篤な患者に限定される場合は、次世代への影響を考慮する必要がないことから、試験を実施する必要はないことが記載されています。

一方、ベクターが性腺に分布していた場合は、性腺の分布が一過性か持続性かを判断し、一過性であれば組み込みは起きていないと判断できますが、持続性であって、かつ生殖細胞に移行した場合は、精子の染色体内に行っているかどうかを試験し、精子でのシグナルが一過性であれば、生殖腺細胞への挿入は起きていないと判断できます。一過性でない場合、よほどの理由がない限り臨床試験は実施できないこととなります。ただし、先ほど述べたように次世代への影響が起るような患者を対象としていない場合は判断が変わってきます。

### 5.2.3 患者のモニタリング (Table 11)

非臨床試験において、生殖腺内に例えば一過性のベクターシグナルが認められた場合は、臨床試験において患者の精子への伝達が無いか、特に精子の成熟サイクルの期間を越えて試験をすることが推奨されます。

## 6. 遺伝子治療専門家会議の今後の活動予定 (Table 12)

ICH 見解の策定を次の二つについても行うべきではないかと議論しました。

まず、「腫瘍溶解性ウイルス」について、2005年のシカゴ会議でオープンワークショップを行った成果を基に ICH としての見解案、もう一つは、ウイルスやウイルスベクターの体外への放出の評価についても見解案を作成すればどうかといった意見が出ました。

更に、ICH7 での活動予定についても議論をしま

**Table 12** ICH 遺伝子治療専門家会議の今後の活動予定

- 
- ICH GTDG 今後の活動予定
    - ・ ICH 見解の策定
      - ・ ICH 見解「腫瘍溶解性ウイルス」
      - ・ ICH 見解「ウイルス/ベクターの体外放出評価」
    - ・ ICH7 での活動予定
- 

した。

### 6.1 腫瘍溶解性ウイルス

非増殖性のウイルスを用いたがん治療においては、腫瘍部位にベクターが入った部分のみがん細胞は死に、入っていない部分は生き残ります。ところが腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞でのみ増殖できる性質を持っており、がん細胞を破壊し、更に隣のがん細胞も破壊して増殖していくという制限増殖型ウイルスです<sup>1)</sup>。

世界的に見ると、腫瘍溶解性ウイルスはアメリカ、カナダ、ヨーロッパで多くの製品の開発が行われています。国内では遺伝子治療としてはまだ行われていませんが、野生型あるいは弱毒化されたウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究は行われています。名古屋大学で行われている例を Table 13 に示します。

それ以外にも動物実験の段階のステージにある製品を Table 13 に示しています。これらはほとんどが遺伝子組換えのウイルスのタイプです。

### 6.2 ICH 腫瘍溶解性ウイルスワークショップ (Table 14)

2005年にシカゴにおいて、腫瘍溶解性ウイルスのワークショップが開催されました。その目的は、腫瘍溶解性ウイルスについて以下のような臨床開発に関連する問題点を整理し、意見交換を行うことです。

問題点の一つ目は、腫瘍溶解性ウイルスには、野生型、弱毒型、遺伝子組換え型がありますが、それぞれどのような設計に基づき腫瘍に特異的に作用するかについての検討です。

二つ目は、非臨床試験の有効性・安全性の確認及び至適用法・用量の検討です。

三つ目は、腫瘍選択性で、例えば腫瘍にのみ発現しているタンパク質や発現が抑えられているタンパク質をターゲットにしたり、若しくは腫瘍細胞に特異的に発現している抗原をターゲットにするといった選択性が検討されています。

四つ目は、臨床での安全性で、患者体内であれば生きたウイルスが存在し続けることも含めた安全性をどのように評価するかの検討です。

五つ目は、安全性、投与量、あるいはその有効性を評価するためには適切な動物モデルを策定しなければなりませんので、モデル動物の開発についてです。

Table 13 国内開発中の腫瘍溶解性ウイルスの例（2005年4月現在）

## &lt;臨床研究段階&gt;

ウイルスの種類	ウイルスの名称	ウイルスの特徴	実施施設/企業名	対象疾患	実施状況	症例数	治験
変異単純ヘルペスウイルス	HF10	弱毒型の自然変異株*	名古屋大学医学部附属病院	皮膚又は皮膚に再発した乳がん	2003年に臨床研究終了	6	—
				頭頸部がん	2004年に臨床研究開始	5 (予定)	
				進行性膵臓がん	2005年に臨床研究終了	6	
				大腸がん, 乳がん	動物実験	—	

\*:天然型ウイルスのため、実施前に「遺伝子治療臨床研究指針に関する指針」に基づく厚生労働大臣の確認は不要。また、カルタヘナ法に基づく第一種使用規程承認申請も不要。

## &lt;動物実験段階&gt;

ウイルスの種類	実施施設/企業名	対象疾患
遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス	大阪府立成人病センター	平滑筋肉腫
	愛知県がんセンター	卵巣がん
	東京大学医学部	グリオーマ, 前立腺がん
	慶應義塾大学医学部	脳腫瘍, 前立腺がん, 膀胱がん
	九州大学医学部	胆嚢がん, 胆道がん
	和歌山県立医科大学	前立腺がん, 腎がん, 卵巣がん, 乳がん
遺伝子組換えヒトアデノウイルス	岡山大学医学部/オンコリス・バイオフィーマ	大腸がん, 非小細胞肺癌
	東北大学医学部	膵臓がん, 膀胱がん
		非小細胞肺癌
	筑波大学	胆嚢がん, 胆道がん
	愛媛大学医学部	卵巣がん
		グリオーマ
	千葉県立がんセンター	肝がん, 肝細胞がん
札幌医科大学	大腸がん, 肝がん	
遺伝子組換えセンダイウイルス	ディナベック	大腸がん, 線維肉腫
レオウイルス3型	大分大学医学部	膵がん, 同腹膜転移

(www.nih.go.jp/cgtp/cgtp/sect/oncltc\_v/onclt-j.html)

Table 14 ICH腫瘍溶解性ウイルスワークショップ2005年シカゴ

## ● 目的

腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発に関連する以下のような問題点を整理し、フロアーも含めて積極的に意見交換を行う。

- ・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）
- ・非臨床試験での有効性・安全性の確認及び至適用法・用量の検討
- ・腫瘍選択性
- ・臨床での安全性
- ・適切な動物モデル
- ・体外からの排出（測定法, 実測データ）

六つ目は、先ほど述べたように長期にわたる体外からの排出をどのように測定し、評価するかについての検討です。

ワークショップでは、世界各国から約10人の演者が講演し、それぞれの発表についての議論を取りまとめ、そのアウトプットとして見解案を作成しようと考えています。

## 6.3 Viral Shedding (Table 15)

2002年に開催された第1回遺伝子治療ワークショップにおいて、viral sheddingについての議論を行いました。

アデノウイルスベクターの体外への放出について

Table 15 Viral Shedding

- 第1回遺伝子治療ワークショップで viral shedding についても議論 (2002年)
  - ・ アデノウイルスベクターの体外への排出 (Shedding)
  - ・ ウイルスベクターの体外への排出に伴う安全性上の問題は現在までのところ確認されていない
  - ・ アデノウイルス5型国際標準品
  - ・ アデノウイルス5型国際標準品を使用することによって、異なる施設/研究で測定されたウイルス粒子数及び力価のデータ同士を科学的に比較することが可能となる。これにより、用量依存的な毒性のような安全性に関する情報の相関関係を明らかにすること、及び遺伝子治療用アデノウイルスベクターの製品中に含まれる増殖性アデノウイルス (RCA) の真の定量値を求めることが可能となるであろう。
- 2008年(?) ICH7で virus/vector shedding について総合的に議論 (予定)

Table 16 ICH遺伝子治療専門家会議の将来的課題

- Viral Shedding
  - ・ 測定法の確立・安全性評価。
- ウイルスベクター標準品
  - ・ レンチウイルス(?)
- Insertional Mutagenesis
  - ・ 挿入部位の高感度測定法開発。挿入部位が特定出来るより安全なベクターの開発。
- 腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性・有効性評価

は、安全性上の問題は今までのところ確認されていません。しかし、正確な評価をするためには参照品が必要ですので、アデノウイルス5型の国際標準品を使用することによって、異なる施設、若しくは研究で測定されたウイルス粒子数及び力価のデータを科学的に比較することが可能になること等について議論しました。

更に今のところ決定されているわけではないのですが、2008年にICH7が開催される場合に Viral/Vector Shedding に関する議論を再度行い、それに

Table 17 ICH GTDG国内メンバー (於横浜会議)

MHLW	JPMA
国立医薬品食品衛生研究所	日本製薬工業協会
● 山口照英	● 鳥海互
● 内田恵理子	● 小澤健夫
医薬品医療機器総合機構	● 井上誠
● 荒戸照世	● 竹迫一任
● 前田大輔	● 玄番岳踐
	● 田中舞紀

基づいて見解案を策定することをステアリングコミッティに申請しました。

### 7. GTGDの将来的課題 (Table 16)

遺伝子治療専門家会議の将来的課題の一つ目は、先ほど述べた Viral Shedding について、測定法が十分確立されていませんので、今後検討していく必要があります。

二つ目は、ウイルスベクター標準品について、レンチウイルス、AAV (アデノ随伴ウイルス)、又はそれ以外のウイルスについて標準品が必要かどうかを検討し、必要であればどのように作成して、どのように利用するかを検討する必要があります。

三つ目は、Insertional Mutagenesis を評価するために挿入部位についての高感度測定法の開発があげられます。現在のところ専門家会議の議論でも確定的な方法はなく、複数の方法を取り合わせることによって推論するしかないと言われており、より適切な方法を開発したり、あるいは挿入部が特定できるような安全なベクターの開発が望まれています。

四つ目は、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性・有効性評価に関しては、見解を取りまとめる中で明らかにしたいと考えています。

最後に ICH 横浜会議に参加した MHLW, JPMA のメンバーを Table 17 に示し、謝意を表したいと思います。

### 文 献

- 1) Estaurdo Aguilar-Cordova: *Nature Biotech.*, 21, 756-757 (2003).



# Study on the quality control of cell therapy products Determination of *N*-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry

Noritaka Hashii<sup>a,b</sup>, Nana Kawasaki<sup>a,b,\*</sup>, Yukari Nakajima<sup>a,b</sup>, Masashi Toyoda<sup>c</sup>,  
Yoko Katagiri<sup>c</sup>, Satsuki Itoh<sup>a</sup>, Akira Harazono<sup>a</sup>,  
Akihiro Umezawa<sup>c</sup>, Teruhide Yamaguchi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup> Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of Japan Science and Technology Agency (JST),  
4-1-8 Hon-cho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

<sup>c</sup> National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan

Received 6 February 2007; received in revised form 16 May 2007; accepted 21 May 2007

Available online 25 May 2007

## Abstract

*N*-Glycolylneuraminic acid (NeuGc), an acidic nine-carbon sugar, is produced in several animals, such as cattle and mice. Since human cells cannot synthesize NeuGc, it is considered to be immunogenic in humans. Recently, NeuGc contamination was reported in human embryonic stem cells cultured with xenogeneic serum and cells, suggesting that possibly NeuGc may harm the efficacy and safety of cell therapy products. Sialic acids have been determined by derivatization with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) followed by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS); however, the limited availability of cell therapy products requires more sensitive and specific methods for the quality test. Here we studied the use of nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron resonance mass spectrometry (nanoLC/FTMS) and nanoLC/MS/MS for NeuGc-specific determination at a low femtomole level. Using our method, we found NeuGc contamination of the human cell line (HL-60RG cells) cultured with human serum. Our method needs only  $2.5 \times 10^3$  cells for one injection and would be applicable to the determination of NeuGc in cell therapy products.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *N*-Glycolylneuraminic acid; Nano-flow liquid chromatography; Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry; Cell therapy products

## 1. Introduction

Sialic acids are a family of acidic nine-carbon sugars found in the non-reducing terminal of *N*-linked and *O*-linked oligosaccharides of glycoproteins and glycolipids [1,2]. There are more than 30 members with different substitutions on the amino group at carbon 5 and on hydroxyl groups at carbons 4, 7, 8 and 9 [2–8]. *N*-Glycolylneuraminic acid (NeuGc), a 5-*N*-glycolylated sialic acid, is produced in several animals, such as cattle, horses, mice and rats [9]. Since human cells cannot

synthesize NeuGc due to mutation of the cytidine monophospho (*CMP*)-*N*-acetylneuraminic acid (NeuAc) hydroxylase gene [10,11], NeuGc is considered to be antigenic and to induce immunoreaction in humans [4,12,13].

Advances in biotechnology and cell culture techniques make it possible to administer human and animal cells directly to patients as cell therapy products. In cell therapy and tissue engineering, human embryonic stem (ES) cells are expected to be useful for the treatment of many diseases. Recently, it was reported that NeuGc is incorporated into ES cells from human and mouse feeder cells and cultivation media containing xenogeneic serum, such as fetal calf serum (FCS) [14,15]. Since NeuGc is a foreign component in humans, it is feared that NeuGc may harm the efficacy and safety of cell therapy products. To

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9074; fax: +81 3 3700 9084.  
E-mail address: [nana@nihs.go.jp](mailto:nana@nihs.go.jp) (N. Kawasaki).

assess the adverse effects of NeuGc, it is necessary to quantify NeuGc in cell therapy products.

Sialic acids have been determined by labeling with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) followed by conventional high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescent detection [16–20]. The femtomole level of sialic acid can be determined by fluorescent detection [19]. The use of liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) has more advantage in the identification of sialic acid species [18,20–22]. The derivatization of sialic acids with DMB has advantages of good separation of NeuGc from NeuAc in chromatography and enhancement of ionization efficiency in MS. However, more sensitive and specific methods are desired for the quality control of cell therapy products, since in many case only a low number of cell products, approximately  $1 \times 10^6$  to  $1 \times 10^8$ , should be available for quality tests.

In this study, we studied the use of nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron resonance mass spectrometry (nanoLC/FTMS) and LC/MS/MS to achieve the sensitive and specific determination of NeuGc. The potential of the method for quality testing of cell therapy products was evaluated using substrain of human promyelocytic leukemia HL-60 cells (HL-60RG cells) as model cells. Using this method, we determined NeuGc in membrane fractions from HL-60RG cells cultured with FCS, human serum and serum-free medium.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

NeuGc and NeuAc were purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). FCS and normal human serum were purchased from Dainippon Sumitomo Pharma (Osaka, Japan). RPMI1640 medium and ASF104 medium were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Ajinomoto (Tokyo, Japan), respectively.

### 2.2. Cell culture

Substrain of human promyelocytic leukemia HL-60 cells (HL-60RG cells, JCRB Cellbank, Osaka, Japan) was cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10% FCS, 100 unit/ml of penicillin and 100  $\mu$ g/ml of streptomycin under a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. HL-60RG cells were replaced at  $2 \times 10^5$  cells/100 mm dish in RPMI1640 medium supplemented with 10% FCS or 10% normal human serum, and in serum-free ASF104 medium. The media were replaced four times, and semi-confluent growth cells were harvested.

### 2.3. Fractionation of the membrane fraction

The cells were washed in phosphate buffer saline (PBS) supplemented with protease inhibitors (protease inhibitor mix

solution, Wako, Tokyo, Japan) three times. The washed cells ( $1 \times 10^6$ ) were suspended in 100  $\mu$ l of 0.25 M sucrose/10 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4) containing protease inhibitors, and sonicated at 4 °C for 30 s, two times (40W, Bioruptor UCW-201, Tosyoudenki, Kanagawa, Japan). After the nuclei were removed by centrifugation at 4 °C,  $450 \times g$  for 10 min, the mitochondria and lysosome fractions were removed by re-centrifugation at 4 °C,  $20,000 \times g$  for 10 min. The membrane fractions were precipitated by ultracentrifugation at 4 °C,  $100,000 \times g$  for 60 min. The membrane fractions were washed in 100  $\mu$ l of 150 mM ammonium acetate buffer (pH 7.4) and recovered by re-ultracentrifugation.

### 2.4. Derivatization of NeuGc and NeuAc with DMB reagent

The membrane fractions were sonicated in 250  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O and then incubated with 250  $\mu$ l of 4 M acetic acid (final concentration, 2 M) at 80 °C for 3 h. The released sialic acids were passed through a solid-phase extraction cartridge (SepPak C-18, Waters, Milford, MA, USA) with 2 ml of H<sub>2</sub>O, dried under vacuum, and resolved in 50  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O. The solution was incubated with DMB according to the manufacturer's instruction (Takara, Tokyo, Japan), and the reaction mixture was applied on a solid-phase extraction cartridge (Envi-Carb C, Supelco, Bellefonte, PA, USA). After washing the cartridge with 2.5 ml of 5 mM ammonium acetate (pH 9.6) for desalting, the DMB-labeled sialic acids were eluted with 3 ml of 45% acetonitrile/5 mM ammonium acetate (pH 9.6). The collected fraction was freeze dried.

### 2.5. nanoLC/FTMS

DMB-labeled sialic acids were separated by HPLC using Paradigm MS4 (Michrom BioResource, Auburn, CA, USA) equipped with a reversed-phase C18 column (Magic C18, 50 mm  $\times$  0.1 mm, 3  $\mu$ m, Michrom BioResource, Auburn, CA, USA). Elution was achieved using 0.1% formic acid/2% ace-

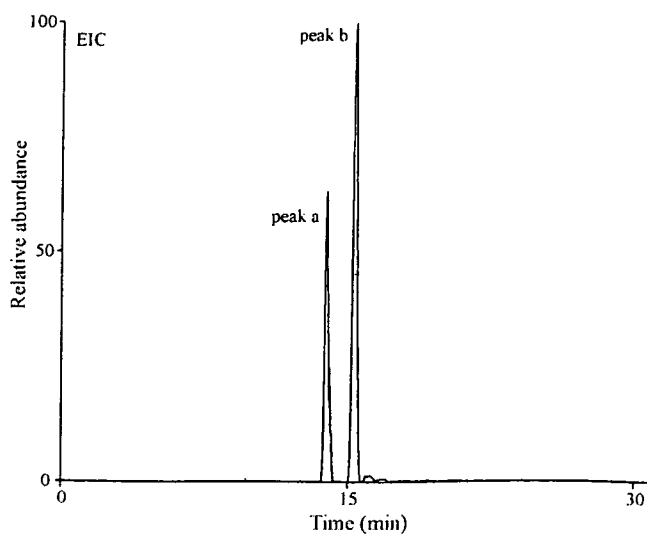


Fig. 1. EIC at  $m/z$  426.13–426.17 and  $m/z$  442.12–442.16 obtained by SIM ( $m/z$  400–450) of DMB-NeuGc and DMB-NeuAc in the positive ion mode.

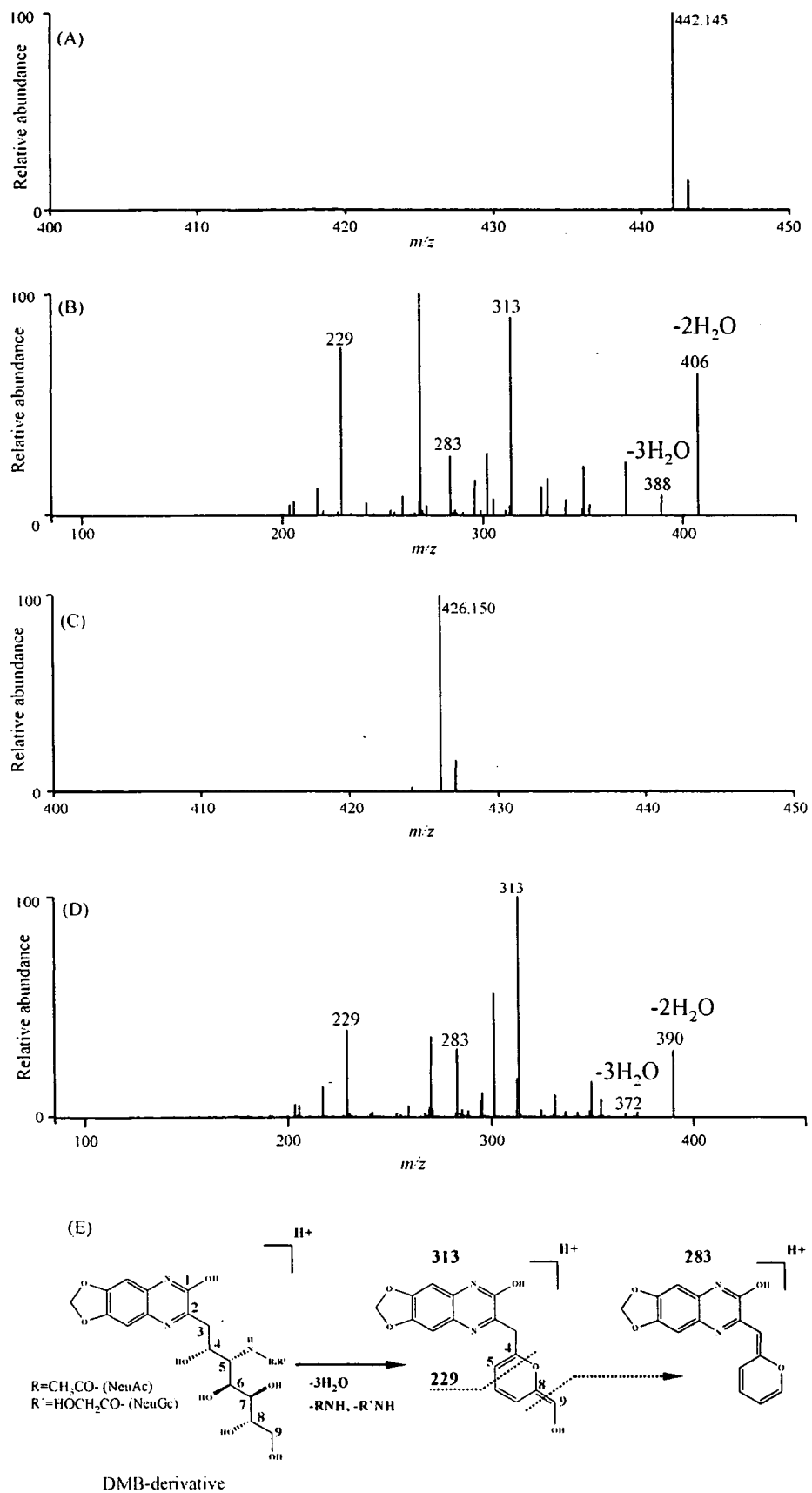


Fig. 2. (A) Typical MS spectrum of peak a. (B) MS/MS spectrum of  $[M + H]^+$  ( $m/z$  442.145) acquired from around peak a. (C) Typical MS spectrum of peak b. (D) MS/MS spectrum of  $[M + H]^+$  ( $m/z$  426.150) acquired from around peak b. (E) Fragmentation of DMB-NeuGc and DMB-NeuAc.



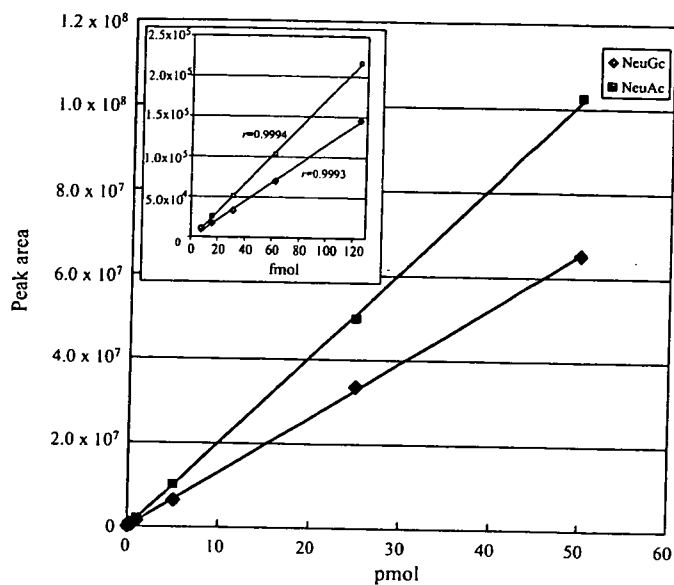


Fig. 3. Calibration curves of DMB-NeuGc ( $r=0.9998$ ) and DMB-NeuAc ( $r=0.9995$ ).

tonitrile (pump A) and 0.1% formic acid/80% acetonitrile (pump B) with a linear gradient of 10–90% of B in 30 min at a flow rate of 750 nl/min. On-line MS and MS/MS were performed using an Fourier transformation ion cyclotron resonance (FT)/ion trap (IT) type mass spectrometer (LTQ-FT, Thermo-Electron, San Jose, CA, USA) equipped with a nano-electrospray ion source (AMR, Tokyo, Japan). DMB-NeuAc and DMB-NeuGc were determined by selected ion monitoring (SIM) in the positive ion mode. The analytical conditions were set to 200 °C for capillary temperature, 1800 eV spray voltage,  $m/z$  400–450 scan range, and 35% collision energy. The automatic gain control (AGC) value, which is adjusted for the amount of imported ions for FTMS, was set to  $5 \times 10^4$ . Maximum injection times, which are the adjusted times of imported ions, for ITMS and FTMS, were set to 50 and 1250 ms, respectively.

## 2.6. Method validation

The linearity of the signal intensity peak area of DMB-NeuAc and DMB-NeuGc was assessed by injections of 0.0078–500 pmol DMB derivatives. Correlation coefficients were calibrated using a least-squares linear regression model. The detection limit (DL) and the quantification limit (QL) were calculated using the formulas  $DL = 3.3 \times \sigma / \text{slope}$  ( $\sigma$ : average of noise on chromatograph) and  $QL = 10 \times \sigma / \text{slope}$ , respectively. Accuracy and precision were determined by measuring three samples, where NeuGc spiked at the concentration of 50 fmol to the membrane fraction of cells cultured in serum-free medium which contains no NeuGc before the derivatization of NeuGc with DMB. Accuracy was calculated by comparison of the mean peak area and the calibration curve. Precision was estimated by relative standard deviation (RSD) from three samples.

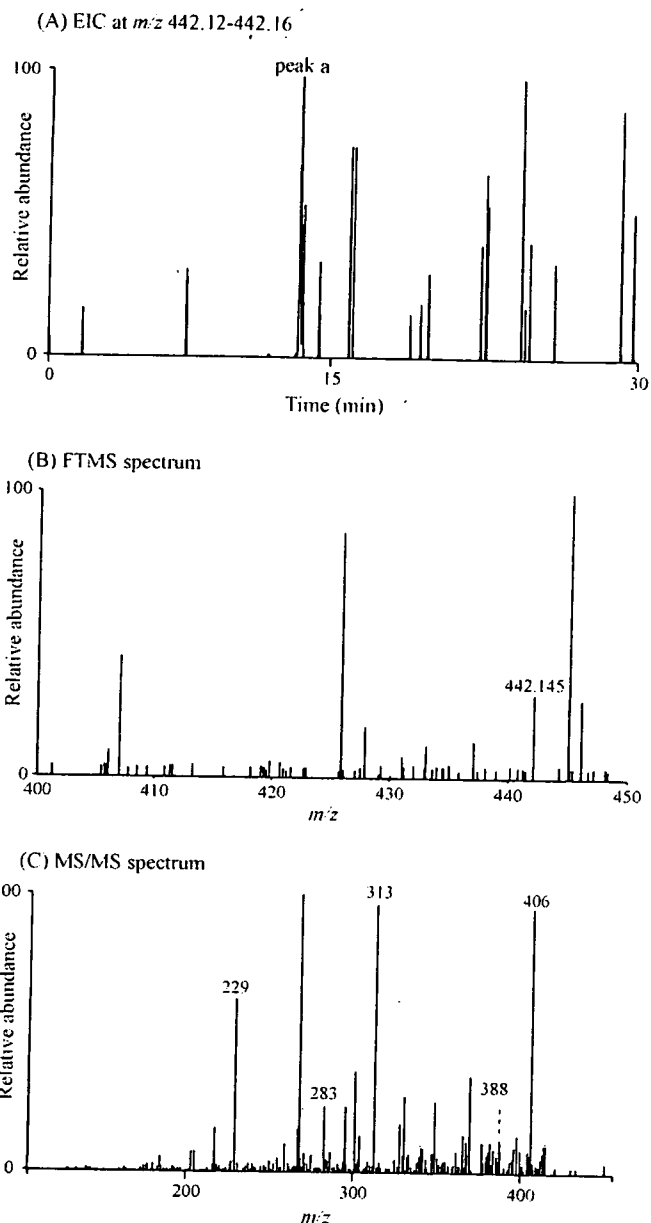


Fig. 4. Detection of DMB-NeuGc in the membrane fractions of HL-60RG cells ( $2.5 \times 10^3$ ) cultured with 10% FCS. (A) EIC at  $m/z$  442.12–442.16 obtained by SIM. (B) Typical MS spectrum of peak a. (C) MS/MS spectrum of  $[M+H]^+$  ( $m/z$  442.145) acquired from around peak a.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Analysis of NeuGc and NeuAc by nanoLC/FTMS

It was reported that DMB-NeuGc yielded its dehydrated ion ( $m/z$  424) together with molecular ion ( $m/z$  442) by MS in the positive ion mode [18,21]. To control the dehydration of molecular ion in the ion trap device, AGC value, which regulates the amount of ions trapped into ion trap device, was set to  $5 \times 10^4$  (default value,  $5 \times 10^5$ ). This value was also useful for the detection of molecular ion of DMB-NeuAc.

Using the AGC value at  $5 \times 10^4$ , SIM ( $m/z$  400–450) was carried out in the positive ion mode. When a mix-

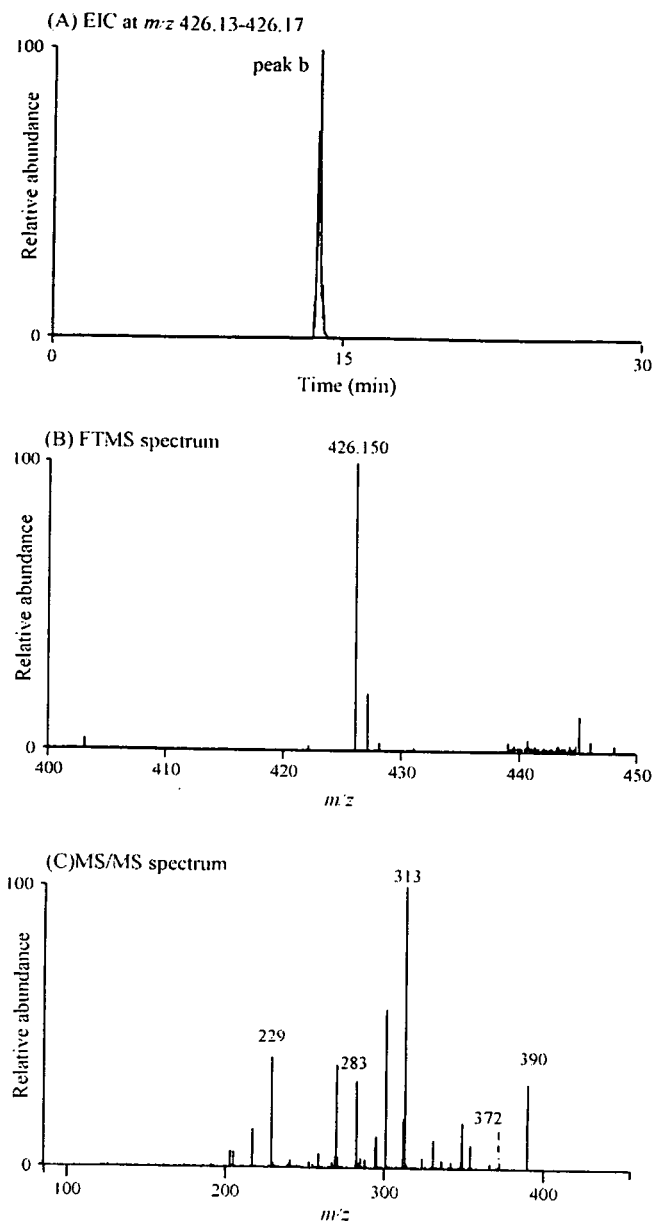


Fig. 5. Detection of DMB-NeuAc in the membrane fractions of HL-60RG cells ( $2.5 \times 10^3$ ) cultured with 10% FCS. (A) EIC at  $m/z$  426.13–426.17 obtained by SIM. (B) Typical MS spectrum of peak b. (C) MS/MS spectrum of  $[M+H]^+$  ( $m/z$  426.150) acquired from around peak b.

ture of DMB-NeuGc and DMB-NeuAc (2 pmol each) was subjected to nanoLC/MS, two peaks appeared at 14 min (peak a) and 15 min (peak b) on the extracted ion chromatogram (EIC) at  $m/z$  426.13–426.17 and  $m/z$  442.12–442.16 (Fig. 1).

As shown in Fig. 2A, the  $m/z$  values of molecular ions around 14 min ( $m/z$  442.145) suggest the elution of DMB-NeuGc in peak a. The structure of the DMB derivative at peak a was confirmed by the product ion spectra acquired from  $[M+H]^+$  ( $m/z$  442.145) as a precursor ion (Fig. 2B). Product ions missing two and three molecules of  $H_2O$  were found at  $m/z$  406 and 388 in MS/MS spectra. Ions losing three  $H_2O$  and glycolyl groups ( $m/z$  313), cross-ring fragment ion ( $m/z$  229) and fragment ion yielded by loss of formaldehyde ( $m/z$  283) were also formed by

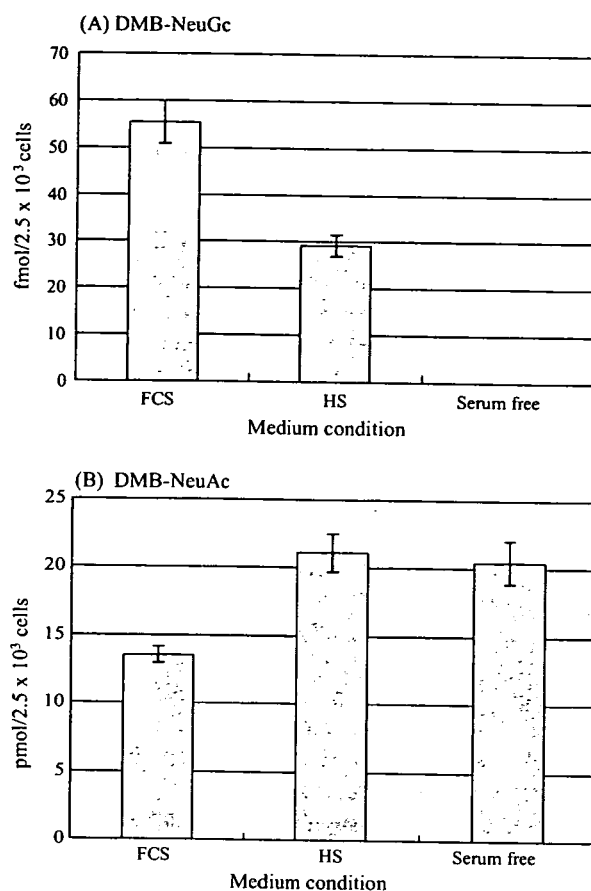


Fig. 6. Levels of (A) NeuGc and (B) NeuAc in the membrane fraction of HL-60RG cells ( $2.5 \times 10^3$ ) cultured with 10% FCS, 10% human serum (HS) and serum-free medium. Values are the means  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

MS/MS (Fig. 2E). The fragment pattern of the MS/MS spectrum from  $[M+H]^+$  ( $m/z$  442.145) was consistent with that of DMB-NeuGc in the previous report [21]. Fragments at  $m/z$  406 and 388 are DMB-NeuGc characteristic ions, which could be used for specific determination of DMB-NeuGc. Likewise, peak b was identified as DMB-NeuAc by molecular ions ( $m/z$  426.150) and their product ions ( $m/z$  390, 372, 313, 283 and 229) formed by MS/MS of  $[M+H]^+$  ( $m/z$  426.150) as a precursor ion (Fig. 2C and D).

Calibration curves were prepared by the injection of DMB-NeuGc and DMB-NeuAc from 0.0078 to 500 pmol. The linearity of DMB-NeuGc and DMB-NeuAc was confirmed in the range of 0.0078–50 pmol with the regression equations of  $Y=1.31 \times 10^6 X - 9028.5$  ( $r=0.9998$ ) and  $Y=2.03 \times 10^6 X - 21548.0$  ( $r=0.9995$ ), respectively (Fig. 3). DL and QL of DMB-NeuGc were 8.6 and 26.3 fmol, and those of DMB-NeuAc were 5.6 and 16.9 fmol, respectively. The use of FT/MS gave an accuracy of 92.4% by eliminating contaminants by using accurate  $m/z$  values. The precision of this method for NeuGc was 7.3%. Compared to the former method, in which a micro or semi-micro column and the quadrupole mass spectrometer were used for the detection of picomole levels of DMB derivatives, SIM by using nanoLC/FTMS achieved the specific detection of DMB-derivatized sialic acids at a lower level. The method using nanoLC/FTMS and nanoLC/MS/MS allows not

only the determination of DMB-derivatives with similar sensitivity as the fluorescence detection but also the identification of sialic acid species.

### 3.2. Quantification of NeuAc and NeuGc in membrane fraction of HL-60RG cells

Using HL-60RG cells as model cells, the potential of this method for the quantification of NeuGc on the cell membrane was evaluated. The membrane fraction from cells ( $1 \times 10^6$ ) cultured with 10% FCS was prepared by ultracentrifugation. Sialic acids were released by treatment with 2 M acetic acid at 80 °C for 3 h and derivatized with DMB. DMB derivatives ( $2.5 \times 10^3$  cells) were subjected to nanoLC/MS and nanoLC/MS/MS in SIM mode. As shown in Fig. 4A, some peaks appeared in EIC at  $m/z$  442.12–442.16. Based on the retention time as well as the  $m/z$  value of molecular ion ( $m/z$  442.145), peak a that appeared at 14 min was assigned to be a peak of NeuGc (Fig. 4B). Fig. 4C shows the MS/MS spectrum acquired from  $[M + H]^+$  ( $m/z$  442.145) as precursor. The NeuGc-characteristic ions at  $m/z$  406 and 388 together with other product ions at  $m/z$  313, 283 and 229 clearly indicate the presence of NeuGc in the membrane fraction of HL-60RG cells. In the EIC at  $m/z$  426.13–426.17, the single peak was observed at 15 min (Fig. 5A). The molecular ion at  $m/z$  426.150, and product ions at  $m/z$  390, 372, 313, 283 and 229 acquired at 15.13 min suggest that DMB-NeuAc is eluted in peak b (Fig. 5B and C). The levels of NeuGc and NeuAc in the membrane fraction from HL-60RG cells ( $2.5 \times 10^3$  cells) cultured with 10% FCS were  $55.4 \pm 4.6$  fmol and  $13.5 \pm 0.6$  pmol, respectively (Fig. 6)

After the cultivation of HL-60RG cells with human serum for 10 days (medium was changed four times), NeuGc and NeuAc were determined by the proposed method. Fig. 7A shows the EIC at  $m/z$  442.12–442.16 obtained by nanoLC/MS. In spite of cultivation in human serum, an obvious peak still appeared at 14 min. Molecular ion ( $m/z$  442.145) and NeuGc-characteristic product ions found in the MS/MS spectrum acquired from the molecular ion clearly indicate the presence of NeuGc in the membrane fraction (Fig. 7B and C). The levels of NeuGc and NeuAc in cells ( $2.5 \times 10^3$ ) cultured in 10% human serum were  $29.2 \pm 2.4$  fmol and  $21.0 \pm 1.4$  pmol, respectively (Fig. 6).

In contrast, no significant peaks appeared in EIC at  $m/z$  442.12–442.16 when HL-60RG cells were cultured in serum-free medium for 14 days (medium was changed four times). The level of NeuAc in cells cultured in serum-free medium was  $20.5 \pm 1.6$  pmol (Fig. 6).

As shown in Figs. 4A and 7A, there are many different molecules detected at  $m/z$  442.14–442.16 in the cells, which makes it difficult to determine a small amount of NeuGc in the membrane fraction by the low-resolution mass spectrometry. The DMB-NeuGc-specific detection was achieved by acquisition of both the accurate mass by FTMS and the characteristic product ions arisen from DMB-NeuGc by MS/MS.

Our method needs only  $2.5 \times 10^3$  cells for one injection and is applicable to the determination of NeuGc in cell therapy products. The incorporation of dietary NeuGc into human

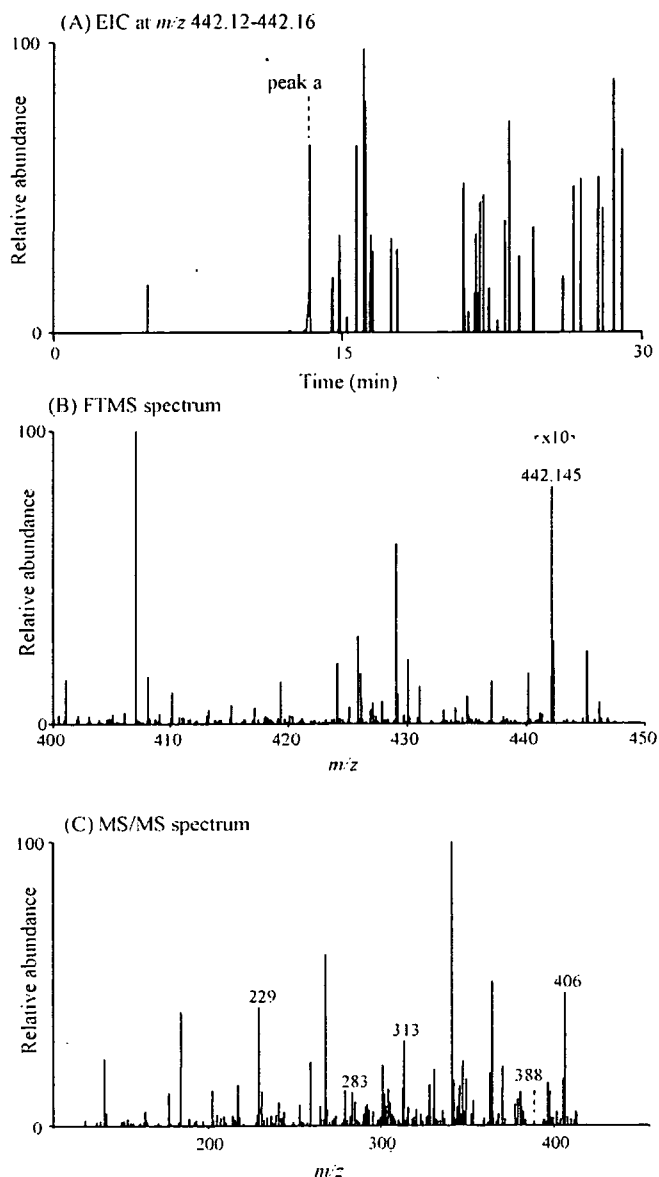


Fig. 7. Detection of DMB-NeuGc in the membrane fractions of HL-60RG cells ( $2.5 \times 10^3$ ) cultured with 10% human serum. (A) EIC at  $m/z$  442.12–442.16 obtained by SIM. (B) Typical MS spectrum of peak a. (C) MS/MS spectrum of  $[M + H]^+$  ( $m/z$  442.145) acquired from around peak a.

serum has been reported by Tangvoranuntalul et al. [23], which has raised concerns about NeuGc contamination of cell therapy products through cultivation with human serum. Although using our method, we demonstrated the existence of NeuGc in human cells cultured with human serum, NeuGc could not be detected in human cells cultured in serum-free medium in which no NeuGc exists. These results suggest the difficulty of avoiding NeuGc contamination of cell therapy products during the manufacturing process. Further study to assess the immunogenicity of incorporated NeuGc is necessary to ensure the safety and efficacy of cell therapy products, and our method is useful for the sensitive and quantitative analysis of NeuGc in cell therapy products.

## Acknowledgements

This study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health Labor and Welfare, and Core Research for the Evolutional Science and Technology Program, Japan Science and Technology Corp.

## References

- [1] C. Traving, R. Schauer, *Cell Mol. Life Sci.* 54 (1998) 1330.
- [2] T. Angata, A. Varki, *Chem. Rev.* 102 (2002) 439.
- [3] A. Varki, *Glycobiology* 2 (1992) 25.
- [4] R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40 (1982) 131.
- [5] S. Kitazume, K. Kitajima, S. Inoue, S.M. Haslam, H.R. Morris, A. Dell, W.J. Lennarz, Y. Inoue, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6694.
- [6] R. Schauer, J. Haverkamp, M. Wember, J.P. Kamerling, J.F. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.* 62 (1976) 237.
- [7] N. Kawasaki, S. Itoh, M. Ohta, T. Hayakawa, *Anal. Biochem.* 316 (2003) 15.
- [8] M. Nakano, K. Kakehi, M.H. Tsai, Y.C. Lee, *Glycobiology* 14 (2004) 431.
- [9] E.A. Muchmore, S. Diaz, A. Varki, *Am. J. Phys. Anthropol.* 107 (1998) 187.
- [10] A. Irie, S. Koyama, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, A. Suzuki, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 15866.
- [11] H.H. Chou, H. Takematsu, S. Diaz, J. Iber, E. Nickerson, K.L. Wright, E.A. Muchmore, D.L. Nelson, S.T. Warren, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 11751.
- [12] H. Higashi, M. Naiki, S. Matuo, K. Okouchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79 (1977) 388.
- [13] J.M. Merrick, K. Zadarlik, F. Milgrom, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 57 (1978) 477.
- [14] M.J. Martin, A. Muotri, F. Gage, A. Varki, *Nat. Med.* 11 (2005) 228.
- [15] A. Heiskanen, T. Satomaa, S. Tiitinen, A. Laitinen, S. Mannelin, U. Impola, M. Mikkola, C. Olsson, H. Miller-Podraza, M. Blomqvist, A. Olonen, H. Salo, P. Lehenkari, T. Tuuri, T. Otonkoski, J. Natunen, J. Saarinen, J. Laine, *Stem Cells* 25 (2007) 197.
- [16] A.E. Manzi, S. Diaz, A. Varki, *Anal. Biochem.* 188 (1990) 20.
- [17] S. Hara, M. Yamaguchi, Y. Takemori, K. Furuhata, H. Ogura, M. Nakamura, *Anal. Biochem.* 179 (1989) 162.
- [18] M. Bardor, D.H. Nguyen, S. Diaz, A. Varki, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 4228.
- [19] M. Ito, K. Ikeda, Y. Suzuki, K. Tanaka, M. Saito, *Anal. Biochem.* 300 (2002) 260.
- [20] F.N. Lamari, N.K. Karamanos, *J. Chromatogr. B* 781 (2002) 3.
- [21] A. Klein, S. Diaz, I. Ferreira, G. Lamblin, P. Roussel, A.E. Manzi, *Glycobiology* 7 (1997) 421.
- [22] H.H. Chou, T. Hayakawa, S. Diaz, M. Krings, E. Indriati, M. Leakey, S. Paabo, Y. Satta, N. Takahata, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 11736.
- [23] P. Tangvoranuntakul, P. Gagneux, S. Diaz, M. Bardor, N. Varki, A. Varki, E. Muchmore, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 12045.