

Ad vectors expressing siRNA for gene transfer studies and therapeutic applications.

Various types of promoters that are based on polymerase II as well as polymerase III have been developed to transcribe shRNA (siRNA) (Xia *et al.*, 2002; Shinagawa and Ishii, 2003). Although the present study applied the most commonly used U6 promoter for simple and efficient construction of siRNA-expressing Ad vectors, this method could easily be applied to vectors using other promoters including polymerase II-based promoters. This method can also easily be combined with various types of improved Ad vectors, such as Ad vectors containing capsid modification (Koizumi *et al.*, 2003, 2006; Mizuguchi and Hayakawa, 2004; Kurachi *et al.*, 2006) or Ad vectors belonging to different subgroups to modify tropism (Sakurai *et al.*, 2003), and Ad vectors containing a tetracycline-inducible RNAi system (Hosono *et al.*, 2004). The method developed in the present study should be a powerful tool for the application of RNAi, and might facilitate the development of an siRNA-expressing Ad vector library for functional screening.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Risako Nagahashi-Nakano and Tomomi Sasaki for technical assistance. This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

REFERENCES

- BETT, A.J., HADDARA, W., PREVEC, L., and GRAHAM, F.L. (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8802–8806.
- BODEN, D., PUSCH, O., LEE, F., TUCKER, L., SHANK, P.R., and RAMRATNAM, B. (2003). Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5033–5038.
- BRUMMELKAMP, T.R., BERNARDS, R., and AGAMI, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550–553.
- HE, T.C., ZHOU, S., DA COSTA, L.T., YU, J., KINZLER, K.W., and VOGELSTEIN, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2509–2514.
- HOSONO, T., MIZUGUCHI, H., KATAYAMA, K., XU, Z.L., SAKURAI, F., ISHII-WATABE, A., KAWABATA, K., YAMAGUCHI, T., NAKAGAWA, S., MAYUMI, T., and HAYAKAWA, T. (2004). Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.* **15**, 813–819.
- KOIZUMI, N., MIZUGUCHI, H., UTOGUCHI, N., WATANABE, Y., and HAYAKAWA, T. (2003). Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J. Gene Med.* **5**, 267–276.
- KOIZUMI, N., KAWABATA, K., SAKURAI, F., WATANABE, Y., HAYAKAWA, T., and MIZUGUCHI, H. (2006). Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, α , integrin, and heparan sulfate binding reduce *in vivo* tissue transduction and toxicity. *Hum. Gene Ther.* **17**, 264–279.
- KURACHI, S., KOIZUMI, N., SAKURAI, F., KAWABATA, K., SAKURAI, H., NAKAGAWA, S., HAYAKAWA, T. and MIZUGUCHI, H. (2006). Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther.* (in press).
- LEE, N.S., DOHJIMA, T., BAUER, G., LI, H., LI, M.J., EHSANI, A., SALVATERRA, P., and ROSSI, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 *rev* transcripts in human cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 500–505.
- MAIZEL, J.V., Jr., WHITE, D.O., and SCHARFF, M.D. (1968). The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* **36**, 115–125.
- McCONNELL, M.J., and IMPERIALE, M.J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **15**, 1022–1033.
- MIYAGISHI, M., SUMIMOTO, H., MIYOSHI, H., KAWAKAMI, Y., and TAIRA, K. (2004). Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. *J. Gene Med.* **6**, 715–723.
- MIZUGUCHI, H., and HAYAKAWA, T. (2004). Targeted adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **15**, 1034–1044.
- MIZUGUCHI, H., and KAY, M.A. (1998). Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2577–2583.
- MIZUGUCHI, H., and KAY, M.A. (1999). A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2013–2017.
- MIZUGUCHI, H., KAY, M.A., and HAYAKAWA, T. (2001). Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**, 165–176.
- PADDISON, P.J., CAUDY, A.A., BERNSTEIN, E., HANNON, G.J., and CONKLIN, D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16**, 948–958.
- PAUL, C.P., GOOD, P.D., WINER, I., and ENGELKE, D.R. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 505–508.
- SAKURAI, F., MIZUGUCHI, H., and HAYAKAWA, T. (2003). Efficient gene transfer into human CD34⁺ cells by an adenovirus type 35 vector. *Gene Ther.* **10**, 1041–1048.
- SCHERER, L.J., and ROSSI, J.J. (2003). Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1457–1465.
- SHINAGAWA, T., and ISHII, S. (2003). Generation of Ski-knockdown mice by expressing a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promoter. *Genes Dev.* **17**, 1340–1345.
- SUI, G., SOOHOO, C., AFFAR EL, B., GAY, F., SHI, Y., and FORRESTER, W.C. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 5515–5520.
- VOLPERS, C., and KOCHANSEK, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J. Gene Med.* **6**, S164–S171.
- XIA, H., MAO, Q., PAULSON, H.L., and DAVIDSON, B.L. (2002). siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1006–1010.
- YU, J.Y., DERUITER, S.L., and TURNER, D.L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6047–6052.

Address reprint requests to:

Dr. Hiroyuki Mizuguchi
National Institute of Biomedical Innovation
Asagi 7-6-8, Suito
Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

E-mail: mizuguch@nibio.go.jp

Received for publication September 3, 2006; accepted after revision November 12, 2006.

Published online: December 22, 2006.

10 ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について

やまぐち てるひで
山口 照英

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

山口 照英
1976年神戸大学大学院理学研究科修士課程終了。同年東京都臨床医学総合研究所炎症研究室研究員、87年国立衛生試験所生物化学部主任研究員、91年同第3室長、2002年国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部長、06年同生物薬品部長。
研究テーマはバイオ医薬品及び細胞治療薬の品質・安全性確保技術の開発。趣味は読書。

Key words :細胞治療薬, 薬事法, 細胞・組織加工医薬品, 品質と安全性

Abstract

再生医療・細胞治療の開発が急速に進んでいるが、臨床研究や高度先進医療としての開発に比較し薬事法の規制を受ける細胞治療薬の開発が遅れているといわれている。より再生医療・細胞治療を広く国民に提供して行くには、臨床研究等の成果を生かし薬事法の規制のもとに細胞組織加工医薬品等（細胞治療薬；医薬品や医療機器を含む）として開発することが望まれる。本稿では、細胞治療薬を適切に開発して行くために求められるウイルス等の感染因子に対する安全確保、製法の確立や恒常性の維持、品質管理のありかた等について概説した。

はじめに

発生学や幹細胞研究の飛躍的な進展に加え、種々の細胞への分化誘導や増幅法などの培養技術やバイオテクノロジー応用技術の進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、さまざまな疾患の治療に用いる細胞治療薬やそれを用いた医療技術の開発が進んでいる。さらに、これらの開発では治験や臨床研究といった異なるアプローチがとられており、医薬品・医療用具といった薬事法上の規制のかかる製品開発を目指す場合ばかりでなく、高度先進医療としての実用化を目指している場合もある。本稿では、特に薬事法の規制を受ける細胞

治療薬（細胞・組織加工医薬品等）の指針で求められている開発に当たっての要点を概説する。さらには各国の規制状況との比較を行い、実用化において特に注意を払うべき点について考察したい。

細胞治療薬は、極めて複雑な構造を持ち、かつ生きているというダイナミックな特性を併せ持つことから、従来の医薬品に適用されていた品質管理や、非臨床試験や臨床試験の必要事項は必ずしも適用出来るわけではない。さらに、生きた細胞を投与するために、これまでのバイオ医薬品等のように高度な精製やウイルス不活化・除去工程を適用することが困難であり、安全性に関して特別な配慮が必要とされる。厚生労働省からは、表1にあげたような細胞治療薬に関するいくつかの指針や基準が出されている。特に、平成12年に出された医薬発第1314号通知の別添1¹⁾、及び別添2²⁾は、ヒト細胞治療薬の規制の根幹をなす指針である。別添1は、細胞治療薬の製造に当たって、その採取行為から加工、製造における取り扱いや使用に当たっての基本的要件を示している。別添2は、ヒト由来細胞治療薬に焦点をあて、その品質・安全性・有効性確保のための要件をまとめたもので、承認申請のみならず治験前の確認申請で求められる資料についても明らかにされている。この確認申請の制度は、細胞治療薬については未知・未経験の要素が多いことから、その治験

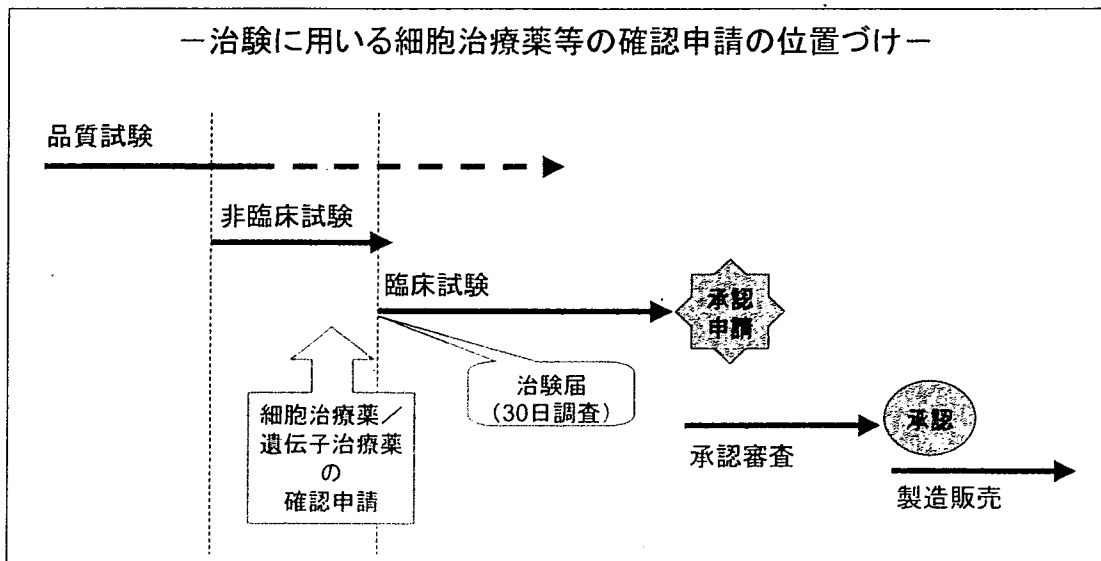


図1 薬事法に基づく先端医薬品の品質・安全性の確保

表1 我が国における細胞治療薬（再生医療）に関連する指針や通知

細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方 (医薬発第1314号 別添1)
ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (医薬発第1314号 別添2)
生物由来製品及び特定生物由来製品の指定並びに生物由来原料基準の制定等について (医薬発第052001号)
生物由来製品に関する感染症定期報告制度について (医薬発第051508号)

を開始する前に一定の品質・安全性を担保することを目的として、厚生労働大臣にその確認を求めるとされているものである（図1）。確認申請は、治験の申請前に行われ、その段階で必要とされるデータはあくまでも安全に治験を実施するに足る品質・安全性が確保されているかを確認するためのものである。このような確認申請は、他には遺伝子治療薬にのみ適用されている制度である。

第1314号については現在見直し作業が進行中であり、指針をヒト自己由来細胞製品とヒト同種由来細胞製品に分ける予定である。それぞれの指針については、今後の議論を通じて変更される可能性があり、本稿ではこれまでの指針に

沿った概説を行うと共に、必要に応じて現時点で示されている改正案についても触れていくことにする。

1. ヒト由来細胞治療薬関連指針の概要

1) ヒト由来細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の定義

細胞治療に用いる細胞・組織加工医薬品等とは、ヒトあるいは動物由来の細胞・組織を加工した医薬品又は医療用具と定義される。本稿では前述したように、細胞・組織加工医薬品等を細胞治療薬と略す。前記した通知や指針は、細胞治療に用いる医薬品や医療用具を企業が開発しようとする場合を対象としており、細胞治療の臨床研究については対象外とされている。

2) 「指針」の対象とする範囲

「指針」等の対象とする範囲として、輸血用血液製剤、移植医療としての骨髄移植、臍帯血移植、ヒト皮膚や骨等を直接利用する医療行為は含まれていない。また細胞・組織の加工としては、*in vitro*での増殖、薬剤処理による細胞の活性化あるいは生物学的特性の改変、遺伝子工

学的改変を指し、単なる遠心操作等の細胞・組織の分離や抗生物質処理及びガンマ線等の滅菌、冷凍、解凍は含まれない。欧米では、我が国で移植医療として分類される製品についても細胞治療薬として規制がかけられており、この点が大きな違いである。日米欧の細胞治療薬(細胞治療製品)の規制の違いについては、表2を参照されたい。

3) 細胞治療薬等の品質や安全性面での問題点

「指針」の安全性面で最も重視されている点はウイルス等の感染症伝播をいかに防止するかである。細胞治療に用いる細胞は滅菌や高度な精製といった処理ができないため、原材料や製造に用いられる試薬や血清等へのウイルス等の混入を如何に防止するかが最重要課題となる。また、製品に感染因子が混入した場合、患者ばかりでなく患者の家族や医療従事者等へも感染が広がる危険性があり、公衆衛生の観点も含め十分な対策が求められる。この点は、欧米のガイドラインとも共通している点であり、細胞治療薬の基本的要件である。

しかし、ウイルス試験にも検出限界があり、また未知のウイルスの存在も考えられるため、ウイルスの潜在を前提とした対策が求められる。原材料となる細胞・組織に関する記録や最終製品の製造記録や試験及び検査記録の保存、可能であれば採取した細胞・組織の一部を保管することが求められている。これは、将来患者に当該製品が原因と推定されるような感染症が発症した場合の原因解明を可能とするための措置である。また、製品が生物由来原料基準に基づき、特定生物由来製品や生物由来製品の指定を受けた場合には、それぞれの指定に応じた上乘せの安全対策が必要となる。

2. 指針等で求められる細胞治療薬の要件

1) 基原または発見の経緯及び外国等における使用状況

細胞治療薬の開発の経緯やその特徴などにつ

いて明らかにすることが求められる。また、外国等での使用状況についても明らかにする必要がある。一方、ヒト由来細胞を用いた細胞治療薬の開発では、先行して実施された国内での臨床研究の技術移転をうけているケースも多くあり、技術移転を受けた臨床研究の実施状況についての情報も提供されなければならない。

2) 原材料となる細胞・組織の由来と選択基準

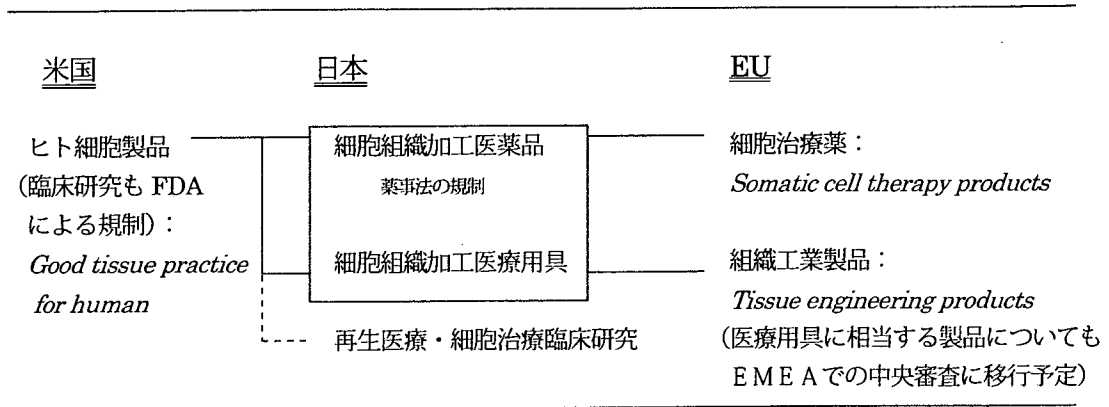
第1314号指針では、原材料として用いられる細胞・組織が自己由来であるか非自己であることを明確にすることが求められるが、改正予定の指針では自己と同種とに分けられる予定である。細胞・組織の入手方法及びその生物学的特徴について説明し、細胞・組織を選択した理由を明らかにする必要がある。原材料となる細胞・組織の特性と適格性について、形態学的特徴、増殖特性、生化学的指標、免疫学的特徴、特徴となる細胞由来産生物質等、遺伝型や表現型から適切な指標を選択して解析し、明らかにすることが求められる。

特にHBV, HCV, HIV, HTLVや、必要に応じてパルボウイルスB19, サイトメガロウイルスやEBウイルスについて血清学的試験や核酸増幅法等の検査を行う必要がある。さらに、細菌や真菌等の試験が必要となる。また、問診や病歴等も考慮した上で、ドナーとしての適格性を評価する必要がある。この場合、ヒト同種由来細胞製品のみならず、ヒト自己由来細胞製品についても、製造工程での作業従事者の安全性、他の製品に対する交差汚染防止の観点から、ウイルス等の必要な試験の実施を考慮することが求められる。ウイルス等の検査においては、PCR等を用いても検出出来ないウィンドウ期の存在があることから、適切な時期に再検査を行うことが推奨されている。

3) 採取行為及び利用の妥当性

細胞・組織採取時のドナーに対する説明及び同意の内容を明らかにし、細胞の採取部位、採取方法が科学的及び倫理的に適切であることを

表2 細胞治療製品の規制の枠組み 一日米欧比較



示す必要がある。また、ドナーに対して細胞・組織の利用目的、個人情報保護、その他採取に関する事項について理解を得るよう文書を用いて十分に説明し、自由意志に基く同意を文書によって得ることが必要である。さらに、採取施設において細胞・組織の採取の倫理及び科学的観点からの十分な審議が行える倫理委員会を設置することが求められる。

原材料となる細胞・組織について、安全性確保に必要な情報が確認できるようにドナーに関する記録が整備、保管されていることが必要である。これらの記録の保管は、製造記録とともに製品の最終有効期限より少なくとも10年間とされている。この期間については、遅発性感染症に関する新たな情報の蓄積によって今後再検討が必要とされている。また、治療の成否の検証や患者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取した細胞・組織の一部等の適当な試料を、適切な期間保存することが推奨されている。

4) 製造方法

①原材料等

細胞治療薬の製造に際しては、製品がロットを構成する場合には、原材料、最終製品、必要に応じて中間段階の製品についてロットごとに品質管理法を設定する必要がある。ロットを構

成しない場合は、各製品の使用目的や使用方法に適合する品質規格、出荷基準等を設定しなければならない。

①-1) 細胞培養方法

製造工程で細胞培養を行う場合は、培地の組成、培養条件、培養期間、収率等を具体的に記載することが求められている。使用する材料は、医薬品又は医薬品原料に匹敵する基準で品質管理されているものを用いる必要がある。全ての成分を含む培地成分に関しては、ロットごとの無菌性試験を実施するとともに、目的とする培養に適合していることを確認するための性能試験を実施することが必要である。

血清は、必須でなければ使用しないことが望ましく、使用が避けられない場合には、血清からの感染因子の混入・伝播の防止策を設ける必要がある。特にウシ血清を用いる場合には、i) 血清の由来を明確にし、ii) 牛海綿状脳症の発症地域以外の血清を用いること、iii) ウイルス等の感染因子に関して適切な否定試験を行ったものを用いること、iv) 潜在的なウイルスのリスクを避けるための放射線処理等の安全対策を実施するとともに、使用した血清の一部を保管しておくことが求められる。大学等での臨床研究では多くの場合自己血清が使用されているが、技術移転を受けて開発されてきた製品では、多くの場合ウシ血清が用いられることが多い。これは、ヒト血清では開発企

業がその製品の恒常性、一定の品質を担保することが困難であったためと推察される。もちろんウシ血清の使用は必須でなければ使用しないことが求められるが、やむを得ない場合にはその臨床上の有用性等も考慮して判断されることになる。ヨーロッパ医薬品庁 (EMEA) の細胞治療薬の指針ではヒト血清を用いる場合には自己由来血清を用いるべきとされており、またウシ血清を用いる場合には、我が国の同様の要件が求められている³⁾。

抗生物質については極力使用を避けるべきであるが、やむを得ず使用する場合には最終製品での残存性を極力低減化する使用方法を考えるべきである。他の培地成分や添加される試薬等についても、最終製品での残存性を考慮し、生体に悪影響を及ぼさないものを選択することが求められる。

フィーダー細胞として異種細胞を用いる場合には、「異種移植に関する指針」⁴⁾等を参考に安全性を確保することが必要となる。その際、セルバンクシステムを確立し、マスターセルバンク (MCB) で徹底的な安全性評価を行うと共に、条件を超えて製造された細胞についても安全性を評価し、フィーダー細胞として製造に用いる期間における、安全性やその機能の担保を行うておくことが求められる。

②-2) 非細胞成分と組み合わせる場合

細胞成分とともに最終製品の一部として用いられる原材料 (シートやマトリックス、医療材料等) に関しては、品質・安全性に関する適切な情報を提供することが求められる。必要な試験については、「医療用具の製造 (輸入) 承認申請に必要な生物学的試験の基本的考え方について」 (医薬審発第 0213001 号)⁵⁾等を参照し、試験結果を示すと共に当該原材料を使用することの妥当性を示すことが必要となる。妥当性の提示に当たっては、文献からの知見、情報を合理的に活用することが可能である。

また目的とする細胞との相互作用について明らかにすることが求められる。特に、基材との相互作用により、臨床適応に必要な細胞の機能や増殖性、安定性に悪影響を及ぼすことがない

かを明らかにしておく必要がある。

③-3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合

細胞に遺伝子工学的改変を加える場合は、①目的遺伝子の由来、②入手方法、③クローニング法、④細胞バンク作成法や管理法、更新法、⑤目的遺伝子の構造、⑥導入遺伝子の性質、⑦目的遺伝子産物の構造、⑧遺伝子構成体の作製手順、原材料、性質、⑨遺伝子構成体の構造や特性、⑩ベクターや遺伝子構成体を作製するための細胞やウイルスのバンク化、バンクの管理法について明らかにすることが求められる。

②製造工程

原材料の細胞・組織等の受け入れから最終製品製造における加工の方法 (製造工程) の概要を示すと共に、各工程での処理の内容、工程管理、品質管理について詳細な説明が求められる。

細胞の加工

細胞・組織の受け入れのために必要な試験を実施するとともに、受け入れ基準を設定しておく必要がある。採取した細胞塊や組織等について、必要且つ可能であればポビドンヨード液等を用いた除菌・不活化を実施することが求められる。当然このような操作は採取した細胞塊や組織の表面に付着した細菌や真菌、ウイルス等の不活化、除去の処理にのみ適用可能である。

細胞の培養を行う場合には培地の組成、培養条件、培養期間、収率等を明らかにする必要がある。

細胞のバンク化を行う場合には、医薬品製造に用いられる細胞基材に関する ICH Q5D ガイドライン⁶⁾を参照することが求められる。

さらに採取した細胞の取り違い防止策やクロスコンタミネーションの防止策を明らかにし、その妥当性を説明することが求められる。患者に感染症が発症した場合の原因究明の一助にするために、採取した細胞・組織の一部を適切な期間保存しておくことを考慮すべきである。

③加工した細胞の特性解析

工程評価の一環として、加工した細胞の変化を調べておくことが求められる。このために、形態学的特徴、増殖特性、生化学的指標、免疫

学的指標、細胞の特性に関連する細胞由来産生物質などの指標から、適切なものを選び解析することが必要である。また培養期間中に望ましくない特性の変化が起きていないことを確認するために、規定された培養期間を超えて培養された細胞について試験を行い、目的としない望ましくない細胞の変化が起きないことを確認しておくことが必要となる。

培養期間や加工の程度に応じて、細胞の形質転換の可能性について評価しておくことが必要となる。しかし非常に短期間の培養であれば核型分析の必要性は低いと考えられる。また、細胞治療薬の大きな懸念として造腫瘍性があるが、そのリスクが高い場合には、ヌードマウスを用いた造腫瘍性試験等の実施も考慮すべきである。しかし、増殖能の変化、サイトカインや増殖因子に対する応答性等、その他の適切な試験も考慮し、科学的に合理的な試験を実施することが望ましい。例えば、FDAも一律に細胞治療薬について造腫瘍性試験を求めてはならず、そのリスクの高い場合にのみヌードマウスを用いた試験が必要になるとされている。

④製造方法の恒常性

細胞治療薬の製造方法の恒常性を示すために、製造工程を通じて、加工した製品の細胞生存率や製品の有効性や安全性の面から求められる表現型や遺伝型の適切な指標、機能特性、目的とする細胞の含有率等が本質的に損なわれないことを評価しておくことが必要である。このために、複数の検体（ロット）を用いた試験を実施することが必要である。どの程度のロットを用いるのかは、培養工程等、どのような加工を行うか、あるいは確認申請のステージか承認申請かどうかによっても異なる。

5) 最終製品の品質管理

細胞治療薬の品質管理には、①最終製品等の規格及び試験方法の設定、②適用ロット毎の原材料の品質管理、③製造工程の妥当性の検証と一定性の維持、④各工程の中間製品の品質管理を適正に行い、品質管理全体からみたその妥当

性を明らかにする必要がある。

最終製品については、表3に示したような品質管理項目及び試験を参考として、適切な規格・試験方法を設定することが必要となるが、ロットを構成しない場合には、個別製品が品質管理の対象となる。ロットを構成する場合には、個別の製品ではなく各ロットが品質管理の対象となる。例えば、自己由来細胞製品であっても、製造後、複数のアンプルに分注して凍結し、繰り返し投与する製品では、凍結した全アンプルが一つのロットを構成することになる。

確認試験では、目的とする細胞の生化学的特徴、免疫学的特徴、目的細胞の産生する物質などの指標から、適切なものを選択して設定することが必要となる。

細胞の純度試験としては、目的細胞以外の異常増殖細胞の出現、形質転換細胞の有無や混入細胞の有無等の細胞の純度について試験を行い規格を設定することが求められる。

製造工程由来不純物試験として、原材料に存在するか、又は製造過程で非細胞・組織成分、培地成分、資材、試薬などに由来し、製品中に混入物、残留物、あるいは新たな生成物、分解物等として存在する可能性があるもので、かつ品質、安全性面からみて望ましくない物質等について、適切な試験を実施し、規格を設定することが必要となる。例えば、ウシ胎児血清由来タンパク質、増殖因子、あるいは抗生物質など、必要に応じて最終製品への存在許容量を設定しておく必要がある。

無菌試験及びマイコプラズマ否定試験については、適切な検体を用いてあらかじめ試験を行い、全例において無菌性を確認しておくことが必要である。また、無菌性試験の結果が患者への投与後になる場合も無菌性試験を実施し、万が一投与後に無菌性が否定された場合の対処法について設定しておくことが必要である。エンドトキシン試験では、規格値は必ずしも実測値によらず、日本薬局方で示されている最終製品の1回投与量をもとにした安全域を考慮して設定すればよい。製造工程中で使用する生物由来

原料などを考慮して、最終製品等について必要なウイルスの試験を実施する必要がある場合もある。また、製造工程中、潜在しているウイルスが増幅する可能性がある場合には、中間製品、最終製品等でウイルスの存在を試験する必要もある。

それぞれ臨床使用目的に応じた細胞の効能試験を実施する必要がある場合もある。例えば、幹細胞等を用いて特定の細胞への機能分化を期待する場合には、その分化能を試験し、規格を設定する必要があると考えられる。また、遺伝子改変細胞であれば改変によってもたらされた特定タンパク質の発現について規格を設定することが求められる。

細胞から分泌される特性の生理活性物質がその効能である場合には、力価試験としてその生理活性物質の発現量に関する規格・試験法を設定することが必要となる。

確認申請の段階では、全ての規格が設定出来ることはまれであり、その後の臨床開発を通じて適切な規格が設定されていくものと考えられる。従って、いくつかの試験項目については少数の検体で得られた試験結果に基づいて暫定基準を設けておくことで対応可能な場合がある。

6) 安定性

製剤化した細胞治療薬や重要な中間工程製品について、保存や流通期間を考慮した安定性試験を実施する必要がある。試験では、細胞の生存率、力価等の適切な項目を選び、試験を実施することが求められる。その結果に基づいて、貯法や有効期間を設定することが必要である。また凍結保存を行う場合には、凍結操作による、生存率や増殖能、力価等への影響を確認することが必要となる。

7) 細胞治療薬の非臨床安全性試験

細胞治療薬の非臨床安全性試験として、可能であれば、科学的合理性のある範囲で動物を用いた試験、あるいは *in vitro* での試験を実施することが求められる。

ヒト由来細胞治療薬の試験用検体は貴重で限りがあり、又、異種細胞であるヒト細胞を動物に投与して得られる結果の有用性については限りと考えられることから、動物細胞を用いた製品モデルを作製し適切な実験動物に適用する試験系が、科学的合理性がある場合も考えられる。またこのような試験によって、より有用な知見が得られると考えられる場合には、試験の実施を考慮することが望ましい。場合によっては動物細胞を用いる試験系も考慮し、以上のようなアプローチにより試験を行なった際には、その妥当性を明らかにすることが必要である。

8) 細胞治療薬の効能または性能を裏付ける試験

一般的に種の壁があるため、動物を用いてヒト由来細胞治療薬の効能や性能を裏付ける試験を実施することにはその解釈も含めて困難が伴う。このために、モデル動物の相同細胞を用いた評価系やヌードマウスに当該ヒト細胞を投与するなどの様々な工夫が試みられている。しかし、モデル動物での反応性がヒトと同じであるとは限らず、モデル動物を用いた試験が必ずしも適切な評価系とは言えないことも多い。従って、技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、実験動物、細胞等を用いて、適切に設計された試験により、細胞治療薬の機能発現、作用持続性、医薬品・医療機器として期待される効果を検討することが望ましい。また、既に確立された適当な動物由来細胞・組織製品モデルや疾患モデル動物がある場合には、それを用いて治療効果を検討することが必要となる。また、必要に応じて、文献や知見等により合理的に細胞治療薬の効力又は性能が他の治療法に比較して勝れていることが期待できる場合には、臨床開発の初期段階として詳細な動物実験等は必要とされない可能性もある。

特に開発に当たって参照可能な臨床研究の成果があり、効能または性能を裏付ける情報が得られる場合には、モデル動物を用いた試験の必

表3 最終製品の品質管理項目及び試験

1) 回収率並びに生存率
2) 確認試験
3) 細胞の純度試験
4) 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験
5) 製造工程由来不純物試験
6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験
7) エンドトキシン試験
8) ウイルス等の試験
9) 効能試験
10) 力価試験
11) 力学的適合性試験

要性はより低くなると考えられる。この場合にも、臨床研究の成果を参照することの妥当性を説明することが必要となる。

9) 臨床試験

試験に当たっては、①対象疾患、②対象とする被験者及び被験者から除外すべき患者の考え方、③細胞・組織加工医薬品等の適用を含め、被験者に対して行われる治療内容、④既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性、⑤現在得られている情報から想定されるリスクやベネフィットを含め、被験者への説明事項等を明確にしておくことが求められる。

おわりに

近年、非常に多岐にわたる細胞治療薬の開発が進められているが、未だ承認に至った製品はない。平成19年に「ヒト培養表皮」が医療機器・体外診断薬部会で承認され、近いうちに我が国初の細胞治療薬が市場に出されることになると考えられる。しかし、現状では次々に製品が市場に提供されるという状況ではなく、現在の開発スピードから類推して、多くの細胞治療薬が市場に出てくるのはもう少し先になるのではと推察される。このような状況を受け、細胞

治療薬の適正な開発を推進するという立場から、現在第1314号の改定が進められて評価基準がよりわかりやすく、かつ臨床開発初期、すなわち確認申請の段階で必要な要素等が明確にされる予定である。そのヒト自己由来細胞に関する指針案は既に公開されている。

参考文献

- 1) 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方：厚生労働省医薬局長通知医薬発第266号、平成13年3月28日
- 2) ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針：厚生労働省医薬局長通知医薬発第1314号、平成12年12月26日
- 3) GUIDELINE ON HUMAN CELL-BASED MEDICINAL PRODUCTS； EMEA/CHMP/410869/2006, 11 January 2007
- 4) “異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針”に基づく3T3J2株及び3T3NIH株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針について：医政局研究開発振興課長通知、医政研発第0702001号、平成16年7月7日
- 5) 医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的試験の基本的考え方について：医薬局審査管理課長通知、医薬審発第0213001号、平成15年2月13日
- 6) 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）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析：医薬審第873号、平成12年7月14日

<BIO Information>

第17回日本耳科学会

日本耳科学会は下記日程で
学術総会を開催します。

- 会 期：2007年10月18日(水)～20日(土)
会 場：福岡市・福岡国際会議場
会 長：小宗 静男 (九州大学大学院医学
研究院 耳鼻咽喉科学分野)

連絡先：九州大学：TEL (092) 642-5668
／FAX (092) 642-5685

※バックナンバーを会場で販売予定です。
お立ち寄り下さい。

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を続けています見解案 (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、様々な遺伝子の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も

遺伝子治療薬（ベクター）の直接投与

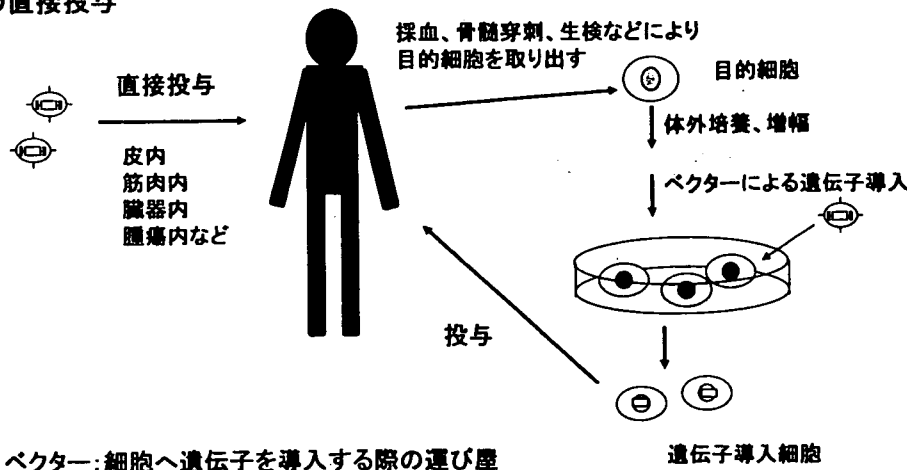


Fig. 1 遺伝子治療とは

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则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则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 (EMA 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 EMA 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°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)

- 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(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月中旬に締め切り、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

-
- 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
 - 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かが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

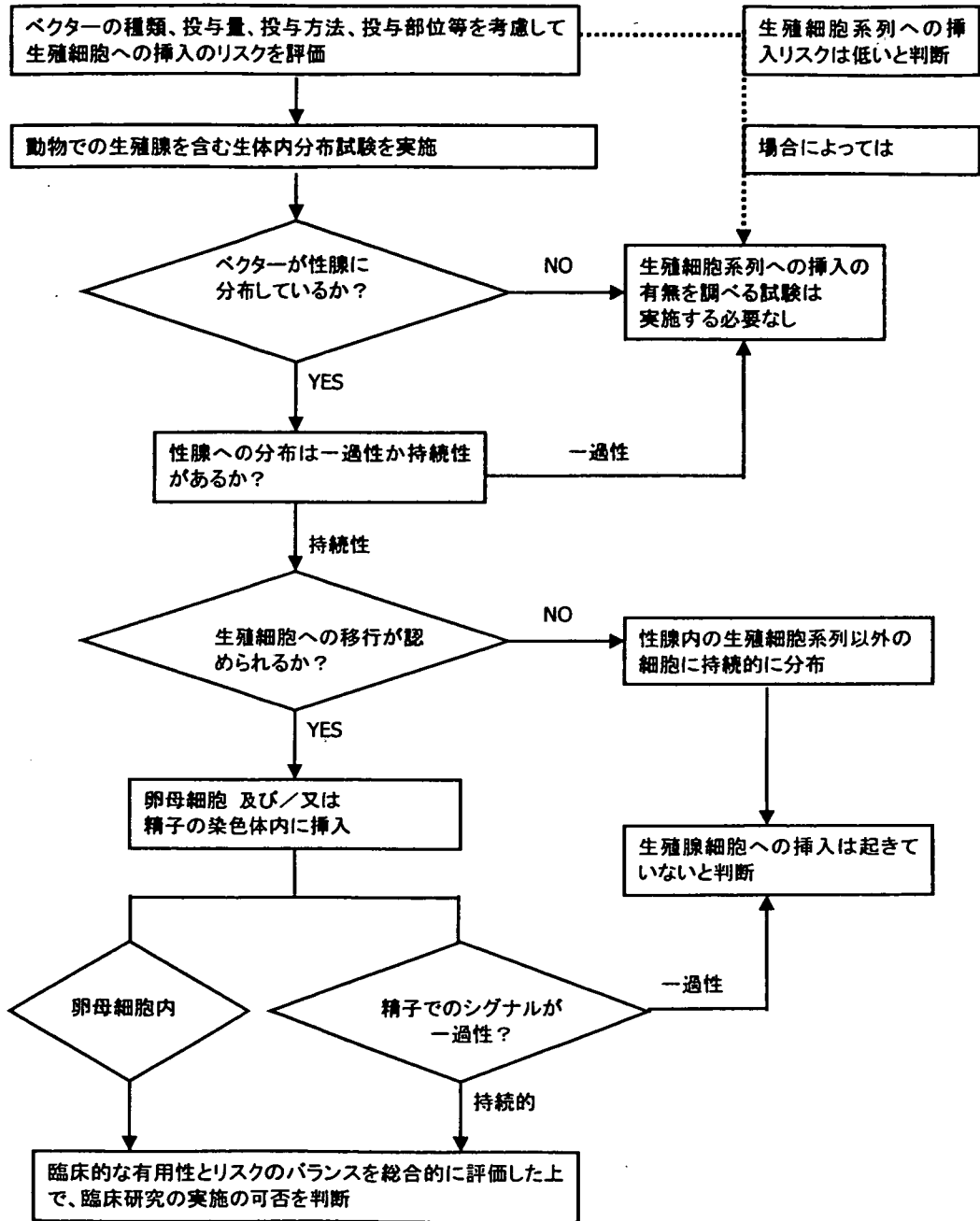


Fig. 2 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への組み込みの有無を調べるための動物試験のフロー (案)

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¹⁾。

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を検討です。

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）

<臨床研究段階>

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.

<動物実験段階>

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・バイオファーマ	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/secl/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	● 島海互
● 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で推論するしかないとされており、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).

ICH 遺伝子治療専門家会議 —2006 シカゴ会議報告—**

山口 照 英*

1. 遺伝子治療とは (Fig. 1)

遺伝子治療とは、ヒトの遺伝性疾患やがんなどの治療のため、遺伝子を持つベクターあるいはプラスミドを患者に直接投与したり、体外で患者の細胞に遺伝子を導入し再び体内に戻すといった *ex vivo* 治療などが含まれます。このような遺伝子治療は、一般的に、増殖性を持たないウイルスベクター等を用いて治療を行います。用いるベクターに増殖性を持つウイルスが存在しないかを検出する試験が行われています。最近では増殖性を持ったウイルスベクターを用いた治療も行われるようになり、多様な遺伝子治療薬の開発が行われています。

2. ICH 遺伝子治療専門家会議 (GTDG)

2.1 遺伝子治療専門家会議の経緯

遺伝子治療専門家会議は ICH の中に設置されていますが、ガイドライン作成のための専門会議 (Expert Working Group, EWG) とは異なり、Gene Therapy Discussion Group (GTDG), すなわち討議グループといった意味で位置づけられています。

2001年5月に Steering Committee (SC) において「遺伝子治療用医薬品などの急速に進展する領域においては、特にその種の製品の規制に重大な影響を及ぼす可能性のある新しい科学的知見に関連する情報について、ICH 各極間での情報の交換や共有を積極的に継続して行う必要がある」との理由で GTDG が新設されました。参加パーティーは6極及び Health Canada, EFTA です (Table 1)。

2.2 遺伝子治療専門家会議の目的

GTDG の目的は、Table 1 に示すように一つ目

は、特に遺伝子治療で研究が進められている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あらかじめ積極的に提示することです。遺伝子治療用医薬品については、非常に科学的進歩が激しいため、毎年のようにローリングアップをするといった up-to-date な改訂が必要と考えられています。三つ目は、ICH における議論の成果を広く一般に知らせて十分理解してもらうために新しいコミュニケーション手段を講じる必要があるとの理由により、ICH のホームページ上で Discussion Group での成果の公開や公開ワークショップの開催といった活動を行っています。更に国立医薬品食品衛生研究所の遺伝子細胞医薬部のホームページ内に上記の内容についての仮訳を適宜掲載しています。

2.3 遺伝子治療専門家会議の活動 (Table 2)

GTDG は、1997年から2000年頃はバイオテクノロジーグループの中の専門家会議で議論されました。その後2002年のワシントン会議において Ad hoc な専門家会議として発足し、その後現在の形ですと継続した活動を行っています。

3. 2006年 ICH シカゴ会議 (Table 3)

3.1 シカゴ会議の成果

ICH シカゴ会議では、世界初の遺伝子治療薬を承認した中国の専門家を招き、中国の現況についての情報を得ると共に意見交換を行いました。また、今までの指針とは異なる規制的ではない「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」についての

* 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15回 ICH 即時報告会 (平成18年12月21日) における講演による。