

出して定量的RT-PCRでウイルスを定量した。本法を用いることにより、10日以内に1 pfu / シャーレになるように添加した増殖性レトロウイルスが検出可能であり、通常のフォーカスアッセイより迅速性もあり、感度も100倍高いことが明らかになった(図4)¹⁶⁾。

アデノウイルスベクターの場合、通常、図5に示すように目的遺伝子をアデノウイルスベクターの増幅に関与するE1領域に挿入するため、発現ベクターにはE1領域が欠損している。ベクターの製造にはE1領域をもつ細胞を用いるが、従来よりアデノウイルスベクター製造用細胞として用いられてきた293細胞では、細胞のもつE1領域とベクターの配列に一部重複があり、そのため相同組換えによりE1領域を持つ増殖性ウイルスが産生される可能性が避けられなかった。こうして産生されるベクターに混入する微量の増殖性アデノウイルスを、E1領域

を特異的に検出するプライマー、プローブのセットを用いてPCR反応により検出しようとすると、ベクター製造用細胞に由来するE1領域DNA断片がPCR反応のバックグラウンドになってしまう。そのため、アデノウイルスが増幅出来る細胞を用いて細胞変成効果(CPE)を指標として増殖性ウイルスを検出する系が用いられているが、レトロウイルスの場合と同様、何代も細胞感染を繰り返し、増殖性ウイルスを増幅する必要がある。そこで、我々はウイルスの感染性試験にPCR法の迅速性・高感度性を組み合わせることにより増殖性アデノウイルスを高感度で検出する感染性PCR法を開発した(図6)。すなわち、増殖性アデノウイルスを含む検体を、指向性細胞であるHeLa細胞に感染させ、細胞内で増幅したウイルスのDNA断片を効率よく回収し、この中に含まれるE1領域DNAを定量的PCRやnested PCRを用いて検出

する方法である。細胞内のウイルスDNA断片の効率的な回収には我々が開発したガラスビーズ吸着法を用いた。感染性PCR法では、産生細胞由来のE1領域DNA断片の混入は、HeLa細胞に感染させることにより殆ど起こらず、また、細胞へ感染させ増幅してきたウイルス由来DNAを検出するため、感染力価との相関が明確になるという長所もある。本法を用いることにより、アデノウイルスベクターにスパイクした増殖性アデノウイルスを従来法であるCPE法に比べて10,000倍以上高感度に検出できることが明らかになり、かつ迅速性にも優れていることが確認された¹⁷⁾。

一方、ウイルスベクターに混入する危険性のある増殖性アデノウイルスおよび増殖性レトロウイルスに関しては、産生細胞の選択やベクターデザインによって混入リスクが

<PG4 S+L- assay>

ffu/dish	Day 3	Day 7
100	0/5	
10	0/5	4/5
3	0/5	2/5
1	0/5	1/5
0.3	0/5	0/5
0.1	0/5	0/5
0.01	0/5	0/5

<Infectivity RT-PCR with PEI-beads>

ffu/dis h	Day 3	Day 5	Day 7	Day 10
100				
10				
3	1/5		3/5	
1	2/5	2/5	4/5	3/5
0.3	0/5	0/5	0/5	1/5
0.1	0/5	0/5	0/5	0/5
0.01	0/5	0/5	0/5	0/5

Lower number of RCR in Retrovirus vector can be detected in earlier days

図4 PEI磁気ビーズを用いた感染性PCRとS+L-アッセイによる増殖性レトロウイルス検出の比較

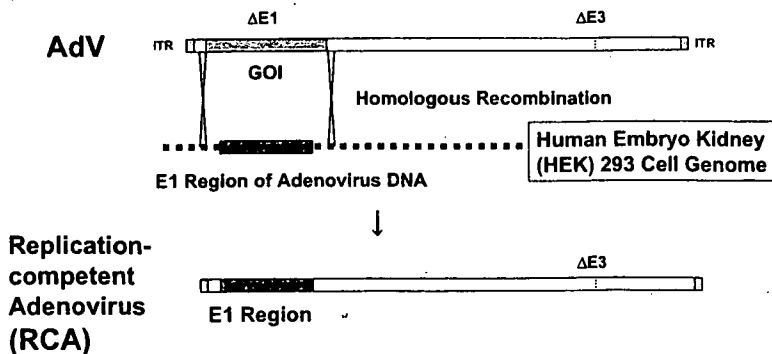
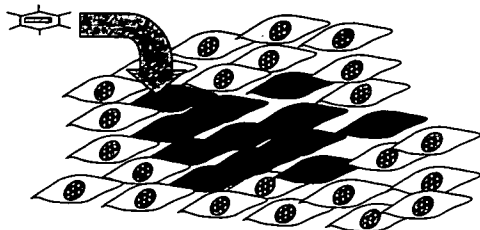
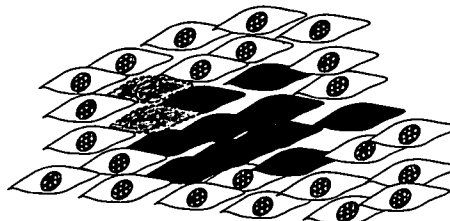


図5 アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルス (RCA)

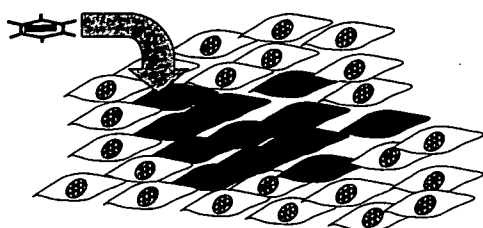
がん遺伝子治療ベクター



感染した細胞のみ溶解



腫瘍溶解性ウイルス(ベクター)



周辺のがん細胞や遠隔転移したがん細胞も溶解

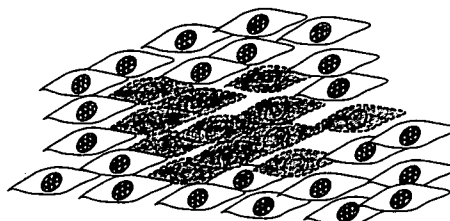


図8 腫瘍溶解性ウイルスと従来型のがん遺伝子治療ベクターの比較

がん細胞の中で特異的に増殖し、細胞を溶解して死滅させる性質を持つ特殊なウイルスあるいは遺伝子改変されたウイルスを用いてがん細胞を特異的に溶解させようとする治療法である。腫瘍溶解性ウイルスの開発は、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²¹⁻²³⁾。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)、1)動物やヒトで期待される効果の評価、2)ウイルス複製の腫瘍選択性、3)臨床上の安全性、4)動物試験に用いる適切な動物モデル、5)腫瘍溶解性ウイルスの体外放出の検出とそのリスク評価などが大きな問題となっている。

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。通常のがん遺伝子治療では、ベクターに混入する増殖性ウイルス(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増殖能をもつことから、RCV検出よりも目的ウイルスの変化体をどの様に検出するかが重要な課題である。また、

増殖性を持つために、目的ウイルスやウイルスベクター以外の迷入ウイルスの試験が通常の方法では区別ができない。このために、迷入ウイルス試験では目的ウイルスの中和抗体を用いて試験を行うことなどが行われている。一方、腫瘍溶解性ウイルスの安全性上の大きな問題として、増殖能を持つために、変異を起こした場合により重篤な副作用が出やすく、また患者以外への伝播のリスクも高いことが上げられる。従って、ウイルスの変異を適切に検出する手法の開発が非常に重要である。さらには、このようなウイルスの変異がどの程度の頻度で起こるか、あるいはそのリスクについての評価を十分に行う必要がある。

3. 細胞治療薬(再生医療)等のウイルス安全性確保について

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学・幹細胞研究の飛躍的な進展により、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の開発が急速に進んでいる。このように細胞そのものを治療薬として用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患ばかりでなく、糖尿病等の慢性疾患に対してもきわめて有効な治療法になる可能性が高い。細胞治療薬の開発は世界的レ

ベルで急速に広がっており、欧米ではすでに複数の製品（細胞組織利用医薬品等）が承認されている。

厚生労働省では、薬事法上の規制を受ける細胞組織利用医薬品等の安全性および品質の確保のために必要な基本的要件を明らかにするために、平成13年に、「細胞組織利用医薬品等の取扱いおよび使用に関する基本的考え方」²⁴⁾、および「ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質および安全性確保に関する指針」(以下「ヒト細胞指針」と略す)²⁵⁾の策定を行った。これらの指針は、ヒト由来の細胞・組織を加工した製品について、治験前の品質・安全性確認や承認申請のために製造者が厚生労働省に提出しなければならない資料の内容について明らかにしたものである。さらに、厚生労働省では薬事法上の規制を受けない細胞治療臨床研究に用いる細胞の品質や安全性確保のために、平成18年に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の施行等についてヒト幹細胞を用いる臨床研究（以下「ヒト幹細胞臨床研究」）²⁶⁾を策定した。この「ヒ

ト幹細胞臨床研究」では、品質・安全性確保のための方策については上述した「ヒト細胞指針」を準用するように求めており、薬事法上の規制を受けない臨床研究においても同等の安全性を担保することが大きな特徴である。

本総説では、これらの通知や指針に記載されている、細胞治療に用いる細胞組織利用医薬品等のウイルス安全性の確保について概説するとともに、我々のデータも紹介する。

1) 細胞組織利用医薬品等の開発動向

細胞組織利用医薬品の開発は日米欧の先進国のみならず、ASEAN 諸国や他の地域でも活発に行われている。日本で承認された細胞組織利用医薬品はまだ無いが、欧米では既に培養皮膚や培養軟骨などのいくつかの製品が上市されている。複数の製品が確認申請を受け治験に入っており、臨床研究を含めると200を超える細胞治療（再生医療）開発が行われている。表4には、国内での治験や高度先進医療として実施されている事例を挙げた。血管、心筋、角膜、軟骨、骨、培養皮膚と多岐にわたっており、また

表4 日本で臨床応用が実施された／実施中の再生医療の例 2005年7月現在

分類	再生組織	適用細胞	疾患名	実施施設	備考
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	大阪市立大学医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	岡山大学医学部附属病院	高度先進医療
角膜・角膜上皮	羊膜	難治性眼疾患	結膜上皮内過形成や結膜腫瘍等	金沢大学医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	関西医科大学附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	京都府立医大附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	久留米大学病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	群大医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	国立循環器病センター	高度先進医療
血管・心臓	血管	末梢血幹細胞	慢性閉塞性動脈硬化症、パージャール病	札幌北楡病院	高度先進医療
骨・軟骨	軟骨	軟骨	膝関節、離断性骨軟骨炎、変形性関節症	東京医科歯科大学医学部附属病院	治験
皮膚	表皮	皮膚	重症熱傷	東京女子医科大学病院	治験
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	奈良県立医大附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	自治医科大学附属病院	高度先進医療
骨・軟骨	軟骨	軟骨	外傷性軟骨欠損症、離断性骨軟骨炎等	島根大学医学部附属病院	治験
皮膚	表皮	皮膚	重症熱傷	社会保険中京病院	治験
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	昭和大学病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	信大医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	末梢血単核球	慢性閉塞性動脈硬化症、パージャール病	千葉大学附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	新潟大学医歯学総合病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病等	日本医科大学附属病院	高度先進医療
骨・軟骨	軟骨	軟骨	膝関節、肘関節の外傷性軟骨欠損症等	広島大学病院	治験
骨・軟骨	軟骨	軟骨	膝関節、肘関節の外傷性軟骨欠損症等	北海道大学病院	治験
骨・軟骨	軟骨	軟骨	膝関節、肘関節の外傷性軟骨欠損症等	三菱名古屋病院	治験

樹状細胞や活性化リンパ球を用いた癌治療の開発も実施されている。表4には自家細胞を用いた研究の代表例をあげたが、同種他家細胞を用いた製品の開発も急速に進んでいる(表5)。また、図9にEUでの開発状況をまとめたが、癌免疫療法の臨床研究が最も多く、ついで心血管系治療が多くなっており、我が国の趨勢と異なる点があることが分かる。

このような細胞治療薬の急速な開発状況に対応するために、欧米でも既にいくつかの指針等が作成されている^{3,5,27-29)}。これらの指針等で最も重要視されている安全性上の課題は、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、ウイルス等の感染因子が混入した場合に患者ばかりでなく患者の家族等へ感染が広がる危険性がある。すなわち個の安全性ばかりでなく公衆衛生の観点からも、製品の安全性を担保することが最も重視されている。

また、不適切な製造による不良品の製造、不適切な製品の取扱いや使用による問題の発生を防止することが目的とされている。これらの問題への対処を定めることにより、高品質で安全性の高い細胞組織利用医薬品等の開発を推進することができると思われる。

2) 原材料となる細胞・組織の由来とウイルス安全性

細胞組織利用医薬品では、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かを明確にし、細胞・組織の入手方法およ

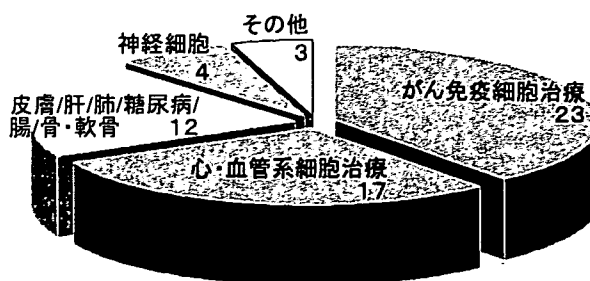


図9 EUにおける体細胞治療臨床研究申請件数 (2004.8 ~ 2006.10)

びその生物学的特徴について説明し、当該細胞・組織を選択した理由を明らかにすることが必要である。特にウイルス安全性に関しては、原材料となる細胞・組織の適格性について、HBV, HCV, HIV, HTLV, ヒトパルボウイルス B19, さらに必要に応じて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³⁰⁾。さらに、ウイルス等の検査においては、ウインドウ期の存在を念頭において、適切な時期に再検査を行うことが推奨されている。

ただし、自己由来の細胞・組織を用いる場合は、感染因子に関して必ずしもドナースクリーニングを行う必要はないとの考え方もある。しかし、自己由来の細胞・組織を用いる場合においても、製造従事者への安全性や製造工程へウイルス陽性原料を持ち込む可能性について十分な配慮が必要であり、必要に応じて上記したウイルス否定試験や迷入ウイルス試験の実施や、培養工程で特定のウイルス増幅が起きないことを確認することが必要となる。

表5 同種細胞治療等の開発状況

細胞	供給源	対象疾患	方法
培養皮膚(真皮)	割礼組織	難治性潰瘍, 重症熱傷	ヒト線維芽細胞を培養
造血幹細胞	臍帯血	白血病治療	臍帯血造血幹細胞の増幅
リンパ球輸注	同種	移植片対宿主病(GVDH)抑制	同種造血幹細胞移植後にドナーリンパ球輸注
神経幹細胞	ヒト胎児脳細胞	セルロイド・リボフスチン症	ヒト胎児脳細胞増殖
神経幹細胞	ヒト胎児脳細胞	脳卒中	ヒト胎児神経幹細胞培養
間葉系幹細胞	ヒト骨髄由来	造血幹細胞移植 GVDH 抑制	ヒト間葉系幹細胞増幅
ヒト造血幹細胞	臍帯血	造血幹細胞移植	臍帯血造血幹細胞増幅

原材料となる細胞・組織について、安全性確保上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、今後、遅発性感染症の情報によっては再検討が必要とされている。また同様の観点から、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。

採取した細胞・組織について、細胞の採取収率、生存率や細胞・組織の特性解析と平行して、微生物汚染がないことを示す検査を行う必要がある。

3) 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。使用する原材料は、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。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。血清を使用する場合には、混入が想定されるウイルスについて否定試験を行ったものを使用する必要がある、さらに可能な限りγ線照射等の処理を実施し、潜在するウイルスの低減化・不活化を行う必要がある。

4) 高感度ウイルス検出法

輸血でのウイルス感染に関しては、数コピーから数十コピーのウイルスで感染が起きることが知られており、細胞治療薬のようにウイルスの不活化・除去工程が実質できない製品の場合には、可能な限り高感度なウイルス否定試験の開発が望まれている。現在最も高感度なウイルス検出法としては、PCRなどの核酸増幅検査（NAT）があげられるが、NATを用いても、ウイルス感染初期のウインドウ期や低濃度キャリアーではウイルスゲノムの検出が不可能な場合があることが知られている。従って、ウイルス濃縮法等を利用することによるウイルス検出の高感度化ができれば、細胞治療薬のウイルス安全性に大きく貢献することが期待出来る。我々は、新規ウイルス濃縮法としてポリエチレンイミン磁気ビーズ（PEI 磁気ビーズ）を用いた手法を開発し¹⁵⁾（図10）、PEI 磁気ビ

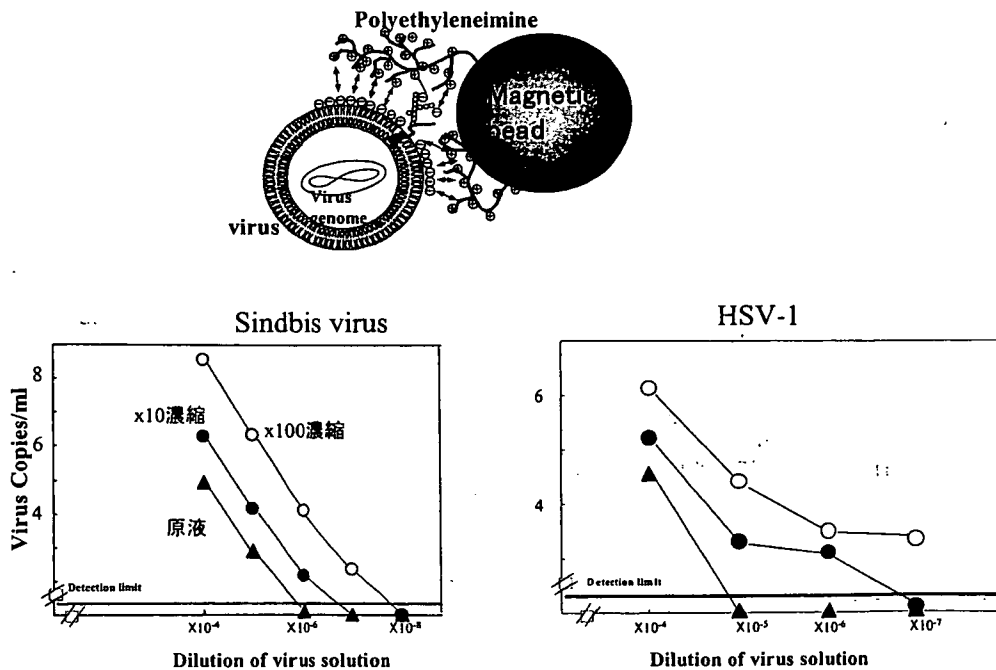


図10 PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮

表6 PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮結果

ウイルス	宿主	ウイルスゲノム	脂質膜	サイズ (nm)	PEI- 磁気ビーズ濃縮
モデルウイルス					
サイトメガロウイルス	サル	DNA	+	180-200	+
ヘルペスウイルス I 型	ヒト	DNA	+	150-200	+
水疱性口内炎ウイルス	ウシ	RNA	+	70-150	+
同種指向性マウス白血病ウイルス	マウス	RNA	+	80-110	+
Sindbis ウイルス	ヒト	RNA	+	60-70	+
アデノウイルス 5 型 (Ad-5)	ヒト	DNA	-	70-90	+
SV-40ウイルス (SV-40)	サル	DNA	-	40-50	+
ブタバルボウイルス (PPV)	ブタ	DNA	-	18-24	+*
ポリオウイルス Sabin 1 型	ヒト	RNA	-	25-30	+**
ヒト感染性ウイルス					
ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	ヒト	RNA	+	80-100	+
B 型肝炎ウイルス (HBV)	ヒト	DNA	+	40-45	+
C 型肝炎ウイルス (HCV)	ヒト	RNA	+	40-50	+
A 型肝炎ウイルス (HAV)	ヒト	RNA	-	25-30	+*

* : 条件により濃縮されない場合もある

** : PEI 磁気ビーズのみでは濃縮されないが, IgM 抗体や抗体と補体の添加により濃縮可能

ズを用いることにより, C 型肝炎ウイルスや B 型肝炎ウイルスをはじめとして多くのウイルスが濃縮可能であることを報告している(表 6).

4. 遺伝子治療薬や細胞治療薬のウイルス安全性確保を目指した将来的な課題

遺伝子治療薬や細胞治療薬などの先端技術医薬品のウイルス等の安全性確保に関しては, 多くの検討すべき課題が残されている。また, これらの先端技術医薬品の開発はその周辺技術も含めて急速に進展しており, さらに腫瘍溶解性ウイルスベクターのようにこれまでの概念にない画期的な製品の開発も続いており, このような革新的技術を用いた製品については, その安全性を確保しつつ合理的な規制を行うことが, よりよい医療をできるだけ早く国民に届けることになる。このためにも, 高感度・高精度のウイルス安全性検出技術等の基盤技術の開発を進めると共に, 適切なりスク評価に基づいた行政施策の立案に資する研究が望まれている。

謝 辞

本研究の一部は, 厚生労働科学研究費, 政策創薬総合研究事業, 文部科学省研究費の支援を受けて行われた。

参考文献

- 1) Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF : T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID : initial trial results after 4 years. Science 270 : 475-480, 1995
- 2) 厚生省薬務局長通知 : 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針。薬発第1062号, 医薬発第329004号, 薬食発第1228004号, 平成 7 年11月15日 (平成14年 3 月29日, 平成16年12月28日一部改正)
- 3) FDA/CBER : Guidance for industry : Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy.

- 1998.3
- 4) EMEA : Note for guidance on the quality, pre-clinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products. CPMP/BWP/3088/99, 2001.4
 - 5) FDA : Guidance for reviewers : Instructions and template for chemistry, manufacturing, and control (CMC) reviewers of human somatic cell therapy investigational new drug applications (IND). 2003.8
 - 6) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知 : ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価. 医薬審第329号, 平成12年2月22日
 - 7) Marshall E : Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286 : 2244-2245, 1999
 - 8) Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML : Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80 : 148-158, 2003
 - 9) Hutchins B : Development of a reference material for characterizing adenovirus vectors. *BioProcessing Journal* 1 : 25-28, 2002
 - 10) Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M : Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346 : 1185-1193, 2002
 - 11) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A : Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288 : 669-672, 2000
 - 12) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003
 - 13) Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kuhlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pitz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Luthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M : Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVII, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12 : 401-409, 2006
 - 14) FDA/CBER : 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. 2000.10
 - 15) Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Hayakawa T, Yamaguchi T : Virus concentration using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads for improving the sensitivity of nucleic acid amplification tests. *J Virol Methods* 114 : 11-19, 2003
 - 16) Uchida E, Sato K, Iwata A, Ishii-Watabe A, Mizuguchi H, Hikata M, Murata M, Yamaguchi T, Hayakawa T : An improved method for detection of replication-competent retrovirus in retrovirus vector products. *Biologicals* 32 : 139-146, 2004
 - 17) Ishii-Watabe A, Uchida E, Iwata A, Nagata R, Satoh K, Fan K, Murata M, Mizuguchi H, Kawasaki N, Kawanishi T, Yamaguchi T, Hayakawa T : Detection of replication-competent adenoviruses spiked into recombinant adenovirus vector products by infectivity PCR. *Mol Ther* 8 : 1009-1016, 2003
 - 18) Farson D, Tao L, Ko D, Li Q, Brignetti D, Segawa K, Mittelstaedt D, Harding T, Yu DC, Li Y : Development of novel E1-complementary cells for adenoviral production free of replication-competent adenovirus. *Mol Ther* 14 : 305-311, 2006
 - 19) Murakami P, Pungor E, Files J, Do L, van Rijnsoever R, Vogels R, Bout A, McCaman M : A single short

- stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles. Hum Gene Ther 13 : 909-920, 2002
- 20) Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC : New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. Hum Gene Ther 9 : 1909-1917, 1998
- 21) Aghi M, Martuza RL : Oncolytic viral therapies - the clinical experience. Oncogene 24 : 7802-7816, 2005
- 22) Lin E, Nemunaitis J : Oncolytic viral therapies. Cancer Gene Ther 11 : 643-664, 2004
- 23) Ries SJ, Brandts CH : Oncolytic viruses for the treatment of cancer : current strategies and clinical trials. Drug Discov Today 9 : 759-768, 2004
- 24) 厚生労働省医薬局長通知：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266号，平成13年3月28日
- 25) 厚生労働省医薬局長通知：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，平成12年12月26日
- 26) 厚生労働省医薬局長通知：ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の施行等についてヒト幹細胞を用いる臨床研究。健発第0703003号，平成18年7月3日
- 27) EMEA : Point to consider on xenogenic cell therapy medicinal products. 2003.12.17
- 28) EMEA : Point-to-consider on the manufacture and quality control of human somatic cell therapy medicinal products. CPMP/BWP/41450/98, 2001.5.31
- 29) FDA/CBER : Suitability determination for donors of human cellular and tissue-based products. 97N-484S, 1999.9.30
- 30) 厚生労働省医薬局長通知：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，平成15年5月20日

〈特集1〉次世代バイオ医薬品の開発ノウハウ～TGN1412、その後

1. 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について — TGN1412 事故が医薬品開発に与えたインパクト —

山口 照英 石井 明子

国立医薬品食品衛生研究所

要旨

作用の種特異性が高く、動物モデルでの評価が困難なバイオ医薬品では、非臨床試験の結果をもとに臨床適用における有効性・安全性について十分な評価を行うことが困難な場合も多い。ヒト CD28 に対するアゴニスト抗体 TGN1412 の臨床試験では、非臨床試験結果に基づいて行われた用量設定が適切でなかった可能性が指摘されている。従来のバイオ医薬品では不足あるいは欠損している生体内成分の補充療法に用いられるものが主流であったが、最近では、疾患との関連が解明された生体機能分子を標的とする新たなコンセプトに基づいて、生体には存在しない構造を持つ非天然型のタンパク質を医薬品とする研究開発が精力的に進められている。天然型のバイオ医薬品が臨床、生理的な濃度範囲となるような用量で投与される場合には、いくつかの非臨床試験については必ずしも要求されるわけではないが、非天然型のタンパク質性医薬品では有効性・安全性のプロファイルは未知であるため、非臨床・臨床試験でそれらを明らかにしていかなければならず、開発過程での課題は多い。TGN1412 のように生理的なりガンド以上に強力に T 細胞を活性化し得るような抗体医薬品は特殊な例ではあるものの、今後、疾患関連遺伝子・タンパク質のさらなる解明に伴い、これまでにないコンセプトに基づく分子標的医薬品として、新規な標的を持つ抗体医薬

品や改変型の抗体を含め各種の改変型タンパク質性医薬品など、ヒトに特異的に作用する医薬品が益々多く開発されてくると予想されることから、その安全性や有効性の評価には新たな視点も必要になるであろう。

臨床試験の実施においては被験者の安全性確保が最優先であることは言うまでもないが、患者のもとに可能な限り速やかに医薬品を届けるためには、科学的に妥当と考えられる非臨床試験を実施し、安全性を十分に検証した上で、適切なタイミングで臨床試験に移行することが重要であると考えられる。非臨床試験の有用性と限界を見極めつつ、安全性に最大限の配慮をしながら有用な医薬品の開発を推進するため、我が国においても、医薬品の開発側、規制側、さらには、アカデミアを交えた議論がより一層深められることが望まれる。

1.1. はじめに

抗体医薬品は、標的分子と特異的に、高い親和性をもって結合する。このことが薬効を発揮する上では重要であるが、ヒトタンパク質を標的とする抗体医薬品の場合、非臨床試験で用いられる動物に存在する相同分子との構造上の違い等から標的分子との結合が弱い、あるいは検出されない場合があり、安全性を評価するための非臨床試験系の有用性がしばしば問題となる。標的分子に対する高い特異性は、タンパク質性医薬品（バイオ医薬品：注1）に共通した

特徴であるが、インスリンや成長ホルモンのように補充療法に用いられる古典的なバイオ医薬品は、生体内タンパク質と同一あるいは同等の構造を持つタンパク質として製造されたものであるため、その有効性・安全性のプロファイルは天然のタンパク質の特性をもとに、ほぼ明らかであると考えることができた。しかし、近年開発がさかんなキメラ型抗体、ヒト化抗体、各種の融合タンパク質や改変タンパク質などの天然に存在しない構造を持つタンパク質性医薬品では、有効性・安全性プロファイルが未知であるため、非臨床試験さらには臨床試験を通じて明らかにしていくことが求められる。

バイオ医薬品の非臨床試験における安全性評価では、目的タンパク質の構造の多様性や不均一性、作用発現の動物種特異性、免疫原性など、バイオ医薬品の物性面や作用面での特徴・特殊性からみて、従来の医薬品（特に化学合成医薬品）において実施される定型的な非臨床安全性試験の種類・項目および試験方法をそのまま機械的に適用することは妥当ではなく、従来とは異なる観点や方法で試験を実施すべき場合が多い¹⁾。バイオ医薬品の非臨床試験をどのように行い、ヒトへの投与にあたって安全性を担保していくかについては、これまでも議論が重ねられ、一般原則を記載した国際調和ガイドラインも作成されている²⁾。しかし、過去に例のない惨事となったTGN1412の事故は、作用の種特異性が高いアゴニスト抗体医薬品の評価の難しさを、世界中に強烈に印象づけることとなった。

一般に、化学薬品では、濃度によっては標的分子以外へ作用を示すものも多いことから、有害反応の主な原因が off-target 効果であることが少なくないのに対して、抗体医薬品などのバイオ医薬品では、標的分子との結合特異性が非常に高いため、有害反応の主な原因は on-target 効果であるとされている³⁾。すなわち、バイオ医薬品の安全性を考える際には、その生物学的性質や薬理作用に関する十分な理解が必須である。TGN1412の例においても、有害反応の原因

はTGN1412の生物学的な作用にあるとされ、標的分子を介した反応がサイトカイン放出症候群につながったと考えられている⁴⁾。しかし、重篤な例は稀であるが、サイトカイン放出症候群はこれまでに他の抗体医薬品でも生じている^{5,6)}。TGN1412の開発にあたって、過去の知見に基づいてサイトカイン放出症候群の危険はどのように考えられていたであろうか。また、他の抗体医薬品で報告されているサイトカイン放出症候群とはどのような違いがあったのか。

TGN1412の臨床試験に関してはすでに多くの専門家から解説がなされているが、本稿では、バイオ医薬品の特性と品質・安全性確保に関心を寄せている立場から、TGN1412の特性と他の抗体医薬品との比較に基づき、改めてTGN1412の事故を振り返ると共に、TGN1412による有害事象発生の原因検証とその後の議論をもとに欧州医薬品庁から公表された“ヒト初回投与試験におけるリスク要因の同定およびリスク低減のための方策に関するガイドライン”を紹介し、この事故を教訓にした今後の非臨床・臨床試験のあり方を考察する。

1.2. 抗体医薬品とサイトカイン放出症候群

TGN1412に関する各種の資料から、TGN1412の臨床試験で生じたサイトカイン放出症候群は、次のようなものであったと考えられる。

(1) TGN1412の開発では、過去の知見に基づき、サイトカイン放出症候群発生のリスクに関する配慮はなされていたものの、動物とヒトでの標的分子との親和性の差や反応性の相違が十分考慮されず、CD28の占有率が90%にもなる用量が投与された結果、生理的に制御が可能な範囲を超えてT細胞やエフェクター細胞が活性化され、重度のサイトカイン放出症候群が生じたと推察される。(後述 1.2.1.~1.2.6.参照)

(2) 臨床試験後に、TGN1412をプレートへ固定化することにより *in vitro* でTGN1412の生物活性を検出できる試験系が確立された。確立された試験法を用いた検討により、ヒトとカニク

イザルのリンパ球ではTGN1412への反応性に相違があり、カニクイザルのリンパ球ではTGN1412単独の刺激では細胞増殖やサイトカイン産生が起こらないことが示された。また、ヒトリンパ球では、TGN1412の薬理作用である細胞増殖と、有害作用である炎症性サイトカイン放出がほぼ同じ濃度領域で検出された。これらのことから、非臨床試験の段階でTGN1412の生物活性について、ヒトやサルをを用いた適切な試験系による解析が行われていれば、臨床試験での有害事象発生を予測できた可能性もあると考えられる。(後述1.2.7.参照)

これらの考察に基づき、T細胞を活性化作用を持つ抗体医薬品、あるいは、Fcγ受容体を介してエフェクター細胞を活性化作用を持つ抗体医薬品では、今後もサイトカイン放出症候群に対する慎重な対応が必要であると考えられる。また、バイオ医薬品の安全性を考える上では、医薬品の生物活性や薬理作用に対する理解を深めることが重要であり、臨床での薬効や毒性を予測するためには、ヒト細胞や組織を用いた試験系の利用・開発が有効であると考えられる。

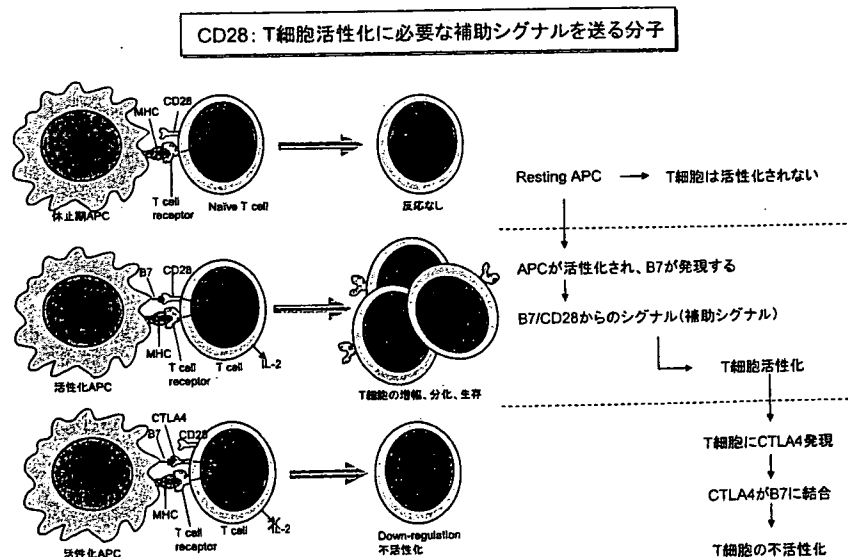
以下に、これらの考察の根拠となる知見を紹介する。

介する。

1.2.1. TGN1412の特性

TGN1412は、ヒト化抗ヒトCD28抗体(注2)で、T細胞表面分子CD28に結合する。サブクラスはIgG4(注3)。T細胞が抗原提示細胞(APC)から抗原提示を受けて活性化されるには、T細胞受容体(TCR)が抗原を認識すると共に、抗原提示細胞上のB7(CD80, CD86)とT細胞上のCD28が結合し、CD28を介した補助シグナルが惹起されることが必要である(図1, 2)⁷⁾。TGN1412は、アゴニスト活性を持つことが大きな特徴であり、生理的なT細胞活性化経路とは異なり、単独でCD28を介してT細胞を活性化することができるとされている^{8,9)}。

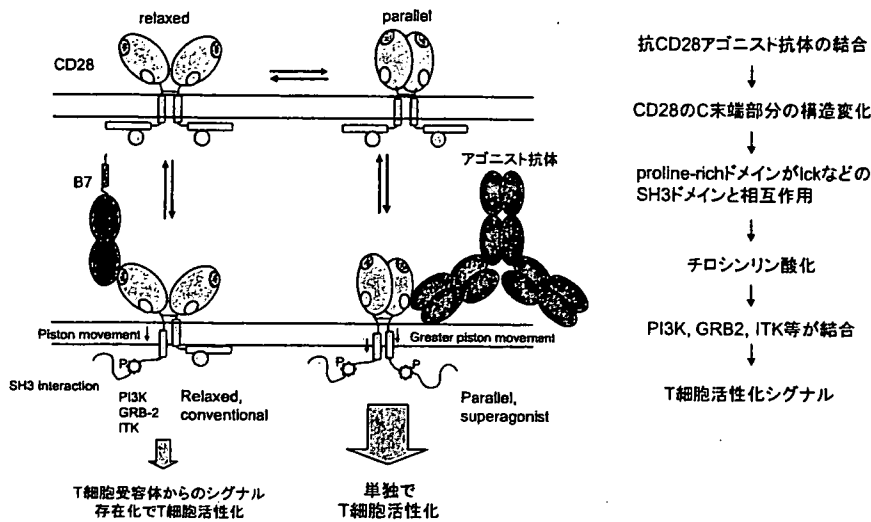
TGN1412の適応疾患としては、B細胞性慢性リンパ性白血病(B-CLL)と関節リウマチが考えられていた¹⁰⁾。T細胞の数と機能が低下しているB-CLLにおいては、TGN1412によるT細胞の増殖と活性化の促進、および、CD40/CD40L経路を介して間接的にB7の発現を増強することにより、B細胞リンパ腫の抗原提示能を改善し、腫瘍特異的T細胞の誘導を促すことよって奏功するとされていた。一方、関節リウマチで



<Arlene Het al. New Eng. J. Med. 355, 973, 2006より改変>

図1

TGN1412によるCD28活性化機構



<Margulies DH J. Exp. Med. 197, 949, 2003より改変>

図2

CD28 を介した T 細胞活性化のシグナルとしては、生理的リガンドである B7 の結合により CD28 の細胞内ドメインの構造が変化してプロリンリッチドメインが露出し、SH3 ドメインを持つ Lck などの kinase によって CD28 のチロシン残基のリン酸化が起こること、これにより PI3K、Grb-2、Itk などが CD28 に結合可能となり、続いて、それぞれの基質のリン酸化やアダプタータンパクとの結合によりシグナルが伝達され、NF- κ B、NFAT、AP-1 などの転写因子の活性化が起こることが知られている (Sharpe AH and Freeman GJ, *Nat. Rev. Immunol.* 2, 116, 2002)。TGN1412 は、B7 と異なり、CD28 の細胞膜貫通部位近傍の C-D ループに結合し、CD28 をクロスリンクすることにより CD28 を活性化することができるとされている (Beyersdorf N. et al. *Ann. Rheum. Dis.*, 64, iv91, 2005)。このときにおこる CD28 の細胞内ドメインの構造変化が B7 が結合したときよりも大きく、Lck 以外の kinase が働くなど、より多くの情報伝達関連タンパク質のアクセスが可能となることにより、TCR からのシグナルがなくても T 細胞を活性化することができると考えられている (Margulies DH, *J. Exp. Med.* 197, 949, 2003)。

は、IL-4、IL-10 などの抗炎症性サイトカインの誘導と、自己反応性 T 細胞をコントロールし得る調節性 T 細胞の増殖により奏功するとされていた。これら、CD28 の活性化により疾患を治療するというコンセプトは新規なものであり、臨床試験を経て、その有用性が示されていくはずであった。

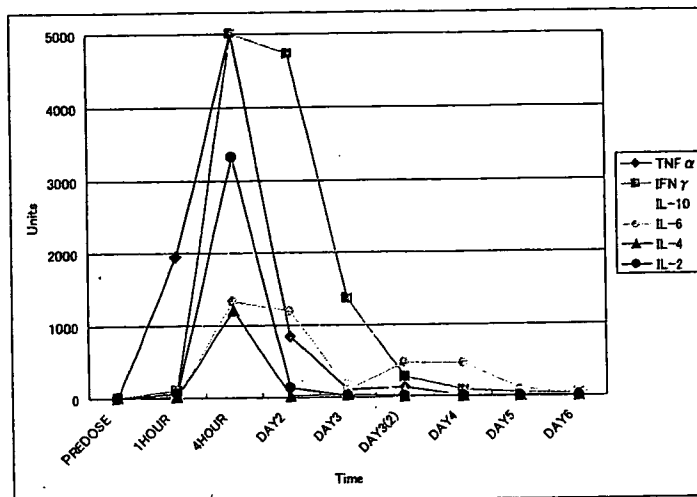
1.2.2. TGN1412 の臨床試験

健康人を対象とした TGN1412 の初回臨床試験は、2006 年 3 月 13 日、ロンドンの Northwick Park 病院で行われた。0.1 mg/kg の TGN1412 を静脈内投与された被験者 6 人全員に重度のサイトカイン放出症候群が生じ、多臓器不全に陥った。症状は極めて重篤であったが、主とし

て免疫抑制を目的とした投薬 (hydrocortisone、methylprednisolone、抗 IL-2 受容体抗体 daclizumab 等) と、血液透析、血漿交換などの処置により救命された¹³⁾。

血液検査の結果では、すべての患者で投与 4 時間後までに、TNF α の急激な増加と、それに続く IL-2、IL-6、IL-10、IFN γ 等の増加が認められている (図 3)⁴⁾。サイトカイン放出は、hydrocortisone や methylprednisolone 等の投与により改善され、ほぼ 3 日以内に低値になっている。また、TGN1412 投与直後から重度の血小板減少、リンパ球減少、単球減少が認められており、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 細胞は、投与 24 時間後まで測定限界以下となっている¹³⁾。

TGN1412を投与された被験者の血中サイトカイン濃度



<Expert Scientific Group Final Report (P.36)をもとに作成>

図 3

表 1

臨床試験後に実施されたTGN1412の品質評価

開発企業により定められた規格試験

- 紫外吸光度測定
- エンドキシン試験 (LALゲル化法)
- SDS-ポリアクリルアミド電気泳動
- 等電点電気泳動
- サイズ排除高速液体クロマトグラフィー
- 細胞結合性試験 (BIAcore)
- 生菌数試験
- 無菌試験

規格試験以外の試験

- ウサギ発熱性物質試験
- 異常毒性試験 (英国薬局方)
- Toxicity Screen (FDA's Forensic Chemistry Centre)

<Expert Scientific Group Final Report (P.40)をもとに作成>

1.2.3. TGN1412 臨床試験の問題

TGN1412の臨床試験後、目的の構造や生物活性を持つタンパク質が作られていたか、汚染物質の混入はなかったか等について、あらためて治験薬の品質を確かめる試験が行われた(注4)(表1)。その結果、試験結果に問題はなく、エンドトキシン、発熱性物質、微生物その他の混

入は認められなかったとされ、事故の原因は、品質特性解析や非臨床試験では予測されなかったTGN1412の生物学的な作用にあったとされた⁴⁾。

非臨床試験結果から予測されなかった有害事象がヒト初回投与試験で生じた原因としては、用量と投与方法が適切でなかった可能性が指摘されている^{12, 13)}。TGN1412の初回臨床投与量は、FDAガイダンス案“Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers”を参考に、最大無毒性量(No Observed Adverse Effect Level: NOAEL)を基準に決定された¹⁰⁾。すなわち、カニクイザルを用いた28日間反復投与実験の高用量群に投与された50 mg/kgをNOAELとし、allometric correction factorとして3.1を用いてhuman equivalent dose (HED)を16 mg/kg、safety factorとして160を用いて、0.1 mg/kgと算出されている。しかし、TGN1412を投与されたカニクイザルでは低用量群、高用量群ともに、炎症性サイトカインIL6の濃度上昇がみられているため(表2)、これが薬理作用でなく有害作用であると考え、NOAELを50 mg/kgとしたことが適切でなかった可能性も考えられ

表 2

TGN1412を投与されたカニクイザルの血中サイトカイン濃度

Cytokine	Inflammatory type	Mean peak cytokine concentration (range) in pg/ml		
		Control	Low dose (5mg/kg)	High dose (50mg/kg)
IL-2	Pro-inflammatory	37 (20-60)	25 (0-84)	100 (25-211)
IL-4	Anti-inflammatory	12 (0-18)	13 (8-18)	17 (0-40)
IL-5	Anti-inflammatory	6 (3-7)	49 (6-139)	107 (11-458)
IL-6	Pro-inflammatory	7 (0-22)	68 (32-101)	128 (24-390)
TNF α	Pro-inflammatory	20 (11-26)	20 (15-27)	22 (19-26)
IFN γ	Pro-inflammatory	18 (0-35)	23 (19-32)	33 (17-93)

<治験薬概要書(P.46) , Kenter MJH and Cohen AF *Lancet* 368, 1387, 2006 をもとに作成>

る¹²⁾。さらに、公開された治験薬概要書などにヒトとカニクイザルにおけるTGN1412とCD28の親和性や反応性の差異に関する記載がないことから、用量設定のための試験系や結果の解釈が妥当でなかった可能性は否定できないであろう。

投与方法に関して、治験計画では、short-term infusionによりTGN1412を投与するとされており、2 mg/mlに希釈した製剤を1~5 ml/minで投与することとされているため、0.1 mg/kgを体重70 kgのヒトに投与する場合は、0.7~3.5分で投与するプロトコールとなっていた¹⁰⁾。一方、カニクイザルを用いた実験では、1時間以上をかけて点滴静注するプロトコールとなっている¹⁰⁾。非臨床試験と臨床試験で異なる投与方法が採用された理由は不明であるが、抗体医薬品によるサイトカイン放出症候群は、注入速度に依存して起こりやすいことが知られているため¹⁴⁾、投与速度が高すぎたことがサイトカイン放出症候群が起こった原因の一つである可能性も考えられる。

1.2.4. 抗体医薬品の有害反応としてのサイトカイン放出症候群

サイトカイン放出症候群は、抗体医薬品によ

る有害反応の一つとして認識されていたリスクであるが、通常は軽度~中程度であり、抗炎症薬や解熱薬の投与、あるいは、投与量の漸増、投与速度の制限などによりコントロールされている^{5,6)}(注5)。しかし、稀に重度のサイトカイン症候群が生じることがあり、抗CD3抗体Muromonab-CD3、抗CD20抗体Rituximab、抗CD52抗体Alemtuzumabでは、サイトカイン放出症候群による死亡例が報告されている^{5,6)}。

抗CD3抗体Muromonab-CD3により生じるサイトカイン放出症候群には、
 -CD3およびFc γ 受容体との結合を介したT細胞の活性化
 -Fc γ 受容体との結合を介したエフェクター細胞の活性化
 の2つの機構が関与していると考えられている¹⁵⁻¹⁸⁾。

Muromonab-CD3は、T細胞受容体複合体の構成要素であるCD3に結合し、T細胞受容体をインターナリゼーションさせることによりT細胞の活性化を抑制するが、CD3に結合した際、一時的にT細胞を活性化し、サイトカイン放出を起こすことが知られている¹⁷⁾。すなわち、Muromonab-CD3は目的外の作用としてアゴニスト活性を併せ持つ抗体であると言える。

Muromonab-CD3はFc部分を介してFc γ 受容体とも結合する。Fc γ 受容体との結合は、CD3のクロスリンクによるT細胞活性化に関与すると共に、Fc γ 受容体を発現しているエフェクター細胞の活性化も引き起こす。活性化されたエフェクター細胞からもサイトカインが放出されるため、T細胞とエフェクター細胞から放出されたサイトカインにより、サイトカイン放出症候群が生じると考えられている。Muromonab-CD3の初回～第3回の投与時には、ほとんど全ての患者でインフルエンザ様症状を示す軽度のサイトカイン放出症候群が起こるとされている。腎移植の急性拒絶反応の臨床試験においては、Muromonab-CD3投与後、サイトカイン放出が関与すると考えられる致死的な肺浮腫が生じた割合は、2%以下であった¹⁹⁾。Muromonab-CD3は臓器移植の際の免疫抑制に用いられるため、他の免疫抑制薬が併用される場合が多いが、methylprednisoloneの前投与を受けなかった患者で、TNF α の上昇がより顕著となる傾向がある²⁰⁾。

一方、抗CD20抗体Rituximabおよび抗CD52抗体Alemtuzumabにより生じるサイトカイン放出症候群には、

– Fc γ 受容体との結合を介したエフェクター細胞の活性化

が関与しているとされている^{21, 22)}。すなわち、活性化されたエフェクター細胞から放出されるサイトカインにより、サイトカイン放出症候群が生じると考えられている。注5に記載したように、これらの医薬品ではサイトカイン放出症候群はinfusion reactionの一因としての位置づけとなっており、infusion reactionが生じた例のうち、どの程度がサイトカイン放出が関与するものかは不明であるが、Rituximabでは発熱等のinfusion reactionが生じる頻度は約90%²³⁾となっている。重篤な例は一部に限られ、Rituximabが米国で上市された1年後の1998年12月に出されたDoctor Letterによると、Rituximabを投与された患者12,000～14,000人のうち、重篤

な (serious) infusion-related eventsが70例で生じ、死亡した8例中7例では初回投与時に重篤な症状が生じたと報告されている。Alemtuzumabでは発熱等のinfusion reactionが生じる頻度は83%²⁴⁾とされ、149人のB細胞慢性白血病患者を対象とした治験では、Grade3～4の有害事象が生じた割合は、発熱については19%、硬直については16%、低血圧については5%とされている。

1.2.5. TGN1412の開発過程で、サイトカイン放出症候群に対する配慮がなされていたか

上記の知見から考えると、

- T細胞を活性化しない
- Fc γ 受容体と結合しない (エフェクター細胞を活性化しない)

ことが、抗体医薬品投与に伴うサイトカイン放出症候群の回避につながると思われる。

TGN1412の薬効発現においてはT細胞を活性化することが重要であるため、T細胞の活性化作用をなくすことはできない。しかし、Muromonab-CD3を投与されたチンパンジーでTNF α とIFN γ を含めた炎症性サイトカインの放出が起ったことが報告されている²⁵⁾のに対して、TGN1412を投与されたカニクイザルではTNF α およびIFN γ の放出が検出されなかったことを根拠として、TGN1412の開発過程では、TGN1412のT細胞活性化作用はサイトカイン放出症候群につながらないと判断されていた¹⁰⁾。

TGN1412の薬効発現においてエフェクター細胞の活性化は不要であるので、Fc γ 受容体との結合はなくてもよいはずである。すなわち、血中半減期が短くなるという問題は生じるが、Fcドメインを持たないF(ab)²として開発することも一案であったと思われる。しかし、Investigational Medicinal Product Dossierには、TGN1412の生物活性発現には、Fc/Fc受容体を介したCD28のクロスリンクが必要であり、Fc部分を除いたF(ab)²ではT細胞の増殖が起

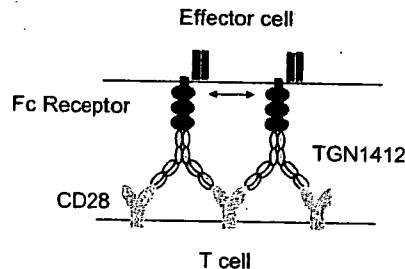
こらなかつたと記載されている (図4)²⁶⁾。

TGN1412の場合、Fcドメインが必須であるとしても、エフェクター細胞の活性化作用は極力ないことが望ましい。この点について、IgGのサブクラスとして、エフェクター活性の低いIgG4を選択している点では、配慮はされていたと考えられる。治験薬概要書には、TGN1412のIgG1バリエーションであるTGN1112とTGN1412について、エフェクター活性を比較した結果が記載されている (図5)。この試験では、サイ

トカイン放出症候群を起こすことが知られているAlemtuzumabをポジティブコントロールとして用いて両抗体のADCC活性とCDC活性が検討されており、TGN1412はADCC活性、CDC活性を示さず、TGN1112はADCC活性を示したと記載されている。一方、薬理活性はTGN1112の方が高かったと記載されている。したがって、目的外の作用であるADCC活性を持たないことを重視して、あえて薬理活性の低いTGN1412を選択したと考えることができる。

TGN1412の生物活性発現におけるFc領域の必要性

Since F(ab)₂ fragments of agonistic anti-CD28 antibodies were not capable to induce a proliferative T cell response, an intact Fc-region appears to be required for TGN1412 biological activity. Experiments with highly purified T cells and Fc-receptor binding studies underlined the notion that cross-linking via Fc-receptor(s) is required for efficient TGN1412-mediated triggering of T cells.



<Investigational Medicinal Product Dossier (P.111)をもとに作成>

図4

TGN1412 (IgG4)とTGN1112 (IgG1)の活性比較

	標的	サブクラス	CDC hPBMC	ADCC Jurkat CD28+, CD52+	ADCC Jurkat CD28-, CD52-
Alemtuzumab	CD52	IgG1	+	+	-
TGN1112	CD28	IgG1	-	+	+
TGN1412	CD28	IgG4	-	-	-

CDC: 補体依存性細胞障害
ADCC: 抗体依存性細胞障害

アカゲザル リンパ球の活性化 (ex vivo): TGN1112 > TGN1412

<治験薬概要書 (P.30, 36)をもとに作成>

図5

以上のことから考えると、TGN1412の開発過程では、過去の知見に基づいてサイトカイン放出症候群への配慮はなされたものと思われる。ただ、治験薬概要書にある「5 mg/kgのTGN1412を投与されたカニクイザルでのサイトカイン上昇がわずかであったため、第I相臨床試験において、0.1～5.0 mg/kgの用量でサイトカイン放出症候群が起こるとは想定されない。」との記載からは、サルとヒトでTGN1412への応答性に違いがある可能性に関する配慮が感じられず、リスクに対する認識が十分ではなかった可能性が伺われる。また、TGN1412の作用にFc部分が必要であることや、TGN1412を投与された被験者で血中TNF α 濃度が非常に急激な増加を示したことから、サイトカイン放出にはT細胞以外の細胞(エフェクター細胞)も関与していた可能性が考えられる²⁷⁾。

蛇足ながら、Muromonab-CD3、Rituximab、あるいはAlemtuzumabではサイトカイン放出症候群を回避することができるかどうかであるが、Muromonab-CD3の場合は構造改変による回避が可能、Rituximab、Alemtuzumabに関しては回避が難しいと考えられる。Muromonab-CD3の作用においては、CD3およびFc γ 受容体との結合を介したT細胞の活性化やFc γ 受容体との結合を介したエフェクター細胞の活性化は不要であるため、Fc γ 受容体との結合活性を減じた改変体が開発されており、臨床試験でサイトカイン放出症候群の発生頻度を低下させることができたと報告されている¹⁸⁾。一方、RituximabやAlemtuzumabでは、標的細胞を障害することが薬効発現において重要であるため、サイトカイン放出を伴うエフェクター細胞の活性化は薬理作用の一部である。したがって、これらの場合は、抗炎症薬や解熱薬の前投与などにより、放出されたサイトカインの全身への影響を少なくする等の工夫をすることで、対処せざるを得ない。RituximabやAlemtuzumabに限らず、開発中のものを含めて、腫瘍細胞等を標的とする抗体医薬品ではエフェクター細胞の

活性化が重要であることが多いため、そのような抗体医薬品では常にサイトカイン放出症候群に対する注意が必要であると思われる。

1.2.6. TGN1412により生じたサイトカイン放出症候群の特徴

TGN1412で生じたサイトカイン放出症候群で特に際立った特徴は、早期の肺障害と著明なリンパ球減少であるとされている。すべての患者でみられた早い段階からの肺の障害は異常で、肺に特異的な免疫反応が起こった可能性もあり、TGN1412の肺への直接作用とサイトカインの作用があいまって、このような早期の肺障害が起こった可能性も考えられている。また、リンパ球減少は他の抗体医薬品で生じたサイトカイン放出症候群でも見られているが、TGN1412の場合は特に顕著であるとされている。TNF α などのサイトカイン放出がおこる敗血症では、数日にわたってリンパ球が減少する場面があるが、B細胞とCD4⁺T細胞に特異的であるのに対して、TGN1412投与後は、8時間以内という早い段階でリンパ球減少がおこっていること、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、単球のいずれもが減っていることから、サイトカインの影響のみでなく、TGN1412そのものの作用によって、リンパ球の死滅あるいは他の組織への移行などのために、リンパ球減少が生じた可能性も考えられている¹¹⁾。

TGN1412投与後の症状と、他の抗体医薬品の投与で生じた症状を比較すると、急激なTNF α 濃度の上昇、続くIFN γ 、IL-6の上昇、その後の心血管系の症状と播種性血管内凝固は、他の抗体医薬品で生じたサイトカイン放出症候群と共通である一方で、早期の肺障害の他、広汎性の紅斑と後の表皮落屑、神経系の後遺症、回復後の筋肉痛は、TGN1412に特有であるとされている¹¹⁾。

通常、抗体は血液脳関門を透過しないため、神経系の後遺症との関連は不明であるが、治験薬概要書には、TGN1412の交差反応性を調べ

た結果、ヒトとカニクイザルの脳、脊髄、および下垂体のアストロサイトが染色されたと記されている。この交差反応性の TGN1412 の安全性への影響については、カニクイザルへの反復投与試験で中枢神経系に関する所見が認められなかったことを根拠に、問題はないとされていた。また、この他に、カニクイザルの子宮頸部（上皮細胞）、ヒトの胎盤（栄養膜細胞層）が TGN1412 によって免疫染色されたと記されているが、これらはいずれも結合部位は細胞内であるとされ、*in vivo* では標的とならず、安全性上の懸念事項にはならないとされていた。これまでに得られた情報からは、これらの判断が適切であったか否かは明らかではないが、ヒトの組織・細胞パネルを用いた抗体医薬品の交差反応性の検証は、安全性に関する重要な情報を与え得るため、非臨床試験の一つとして推奨されるものであると考えられる。

1.2.7. 臨床試験後に実施されたヒト細胞を用いた TGN1412 の生物活性評価

初回臨床試験での有害事象発生後、TGN1412 の生物活性について、ヒトおよびカニクイザルのリンパ球を用いた *in vitro* 実験による検証が National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) により行われ、その途中経過が TGN1412 の事故原因の検証にあたった専門家グループ (Expert Scientific Group) の報告書に記載されると共に⁴⁾、最近、最終結果が論文としても報告された²⁸⁾。NIBSC の検討で明らかになった主な点は、(1) TGN1412 の作用を *in vitro* で検出するには、TeGenero 社で実施されていた方法とは異なり TGN1412 を固定化することが必要で、TGN1412 を固定化した条件下ではヒトリンパ球からのサイトカイン放出とリンパ球の増殖を検出できる、(2) TGN1412 の用量反応曲線はベルシェイプであり、有害事象が生じた臨床試験における血中濃度は、TGN1412 のリンパ球への作用の至適濃度領域であった、(3) カニクイザルのリンパ球では

TGN1412 による細胞増殖やサイトカイン産生が起こらない、ことである。

(1) TGN1412 の固定化

NIBSC の検討では、ヒト末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC) 懸濁液あるいは希釈したヒト全血に液相の状態では TGN1412 を添加してもサイトカイン放出が認められないものの、①ドライコーティングにより TGN1412 をプレートに固定化、あるいは、②ドライコーティングにより抗 Fc 抗体を固定化したプレートに TGN1412 を添加、または、③血管内皮細胞を播種したプレートに TGN1412 を添加することにより TGN1412 を固定化した条件下では、ヒト PBMC の増殖およびサイトカイン放出が検出され、*in vivo* での反応性を反映した結果が得られている。TeGenero 社では液相の状態では TGN1412 を添加してヒトリンパ球の反応性を調べる試験が行われていたため、その試験法では TGN1412 の生物活性を検出できていなかったと指摘された。リンパ球活性化のために抗体を固定化して使用することが有効であることは、抗 CD3 抗体でも知られている^{29,30)}。

ただし、治験薬概要書には soluble TGN1412 により T 細胞の増殖と活性化がおけると記載されており、両者の記載には相違がみられる。TGN1412 の生物活性については、実験施設間で一定した結果が得られ難く、評価が難しいものである可能性も考えられる。専門家グループの報告書には、ドライコーティングによりクロスリンクの効率がよくなることで反応が検出されやすくなることや、血管内皮細胞等に結合した TGN1412 のみが活性型として作用し、非結合型の TGN1412 が阻害的に働くことが高濃度の TGN1412 で効果が小さいことの理由であろうとする仮説が述べられており、NIBSC の検討結果は TGN1412 の性質を理解する上で無理がないものと思われる⁴⁾。

(2) TGN1412 の用量反応曲線

ヒトリンパ球の増殖と IL-2 産生に関する

TGN1412の用量依存性は、至適濃度が2~10 µg/ml (0.4~2 µg/well) で、用量反応曲線はベルシェイプとなっている。2 µg/ml (0.4 µg/well) という濃度は、臨床試験での血中濃度に対応することから、実施された臨床試験では、TGN1412の反応が最も起こりやすい用量が投与されたと考えられる。また、血管内皮細胞とリンパ球の共培養系では、TNFα、IL-8など炎症性サイトカインの放出が0.1~10 µg/wellの濃度のTGN1412で検出されており、TGN1412の薬理作用であるリンパ球増殖やIL-2産生と、有害作用である炎症性サイトカインの放出がほぼ同じ濃度領域で生じている。つまり、TGN1412の治療用量域と毒性用量域は重なっていると解釈できる。

(3) カニクイザルとヒトの反応性の相違

カニクイザルのリンパ球では、ヒトリンパ球の反応性がみられる条件、すなわちTGN1412を固定化した条件下においても、細胞増殖やIL-2産生が検出されず、カニクイザルのリンパ球に対してTGN1412は十分な作用を持たないことが示された。つまり、カニクイザルはTGN1412の安全性を評価する上で、適切な動物種ではなかったと言えよう。ただし、カニクイザルのリンパ球でもTGN1412によるIL-2受容体の発現増加がみられているため、カニクイザルにおいてもCD28へのTGN1412の結合とCD28からの情報伝達系の活性化は起こっていると考えられている。ヒトとサルでの反応性の差の原因としては、Siglecなどの抑制性分子の有無³²⁾が関与している可能性等が考えられている。

以上のように、NIBSCで確立されたヒト細胞を用いたTGN1412の*in vitro*評価系では、TGN1412の薬理作用のみならず有害作用も検出することが可能であった。臨床試験が実施される前にこのような試験が行われていれば、ヒトでの有害反応を予測できた可能性も考えられる。今後に向けた考え方として、TGN1412と類似した作用機構を持つ抗体医薬品では、このような抗体のドライコーティングや血管内皮細胞

との共培養系を用いてヒトリンパ球の反応を解析することにより、ヒトでの反応の予測に有用な知見が得られる可能性が考えられる。また、TGN1412とは異なる作用機構を持つ医薬品においても、ヒト細胞/組織を用いた評価系は、ヒトにおける安全性を考える上で、極めて有用な情報を提供し得ると考えられる。

1.2.8. 抗CD28アゴニスト抗体を治療に用いることの妥当性：Abataceptとの比較

生体におけるCD28の役割は複雑である。B7/CD28経路は、病原体に対する免疫応答や自己免疫疾患、移植片の拒絶などにおいて中心的な役割を果たす一方で、免疫応答の制御や末梢でのトレランスの維持にも関わっており、免疫応答において逆の結果につながる補助シグナルと制御性シグナルの両方に関与していることが知られている³²⁾。

TGN1412の適応疾患の一つは関節リウマチであったが、TGN1412とは対照的にCD28経路の阻害作用を持つタンパク質性医薬品Abataceptが2005年に米国で関節リウマチを適用疾患として承認されている。AbataceptはCTLA4-Igとも呼ばれ、T細胞表面に発現するタンパク質CTLA4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen) の細胞外ドメインと抗体のFc部分を融合させた人工タンパク質(改変型タンパク質)である³³⁾。CTLA4は活性化T細胞表面に発現し、CD28より高い親和性でそのリガンドであるB7に結合することにより、B7/CD28を介したシグナルをとめ、T細胞の活性化を抑制する働きを持つ(図6)。CTLA4とFcの融合タンパク質であるAbataceptは、CTLA4と同様にB7に結合することによりB7/CD28を介したシグナルを阻害し、T細胞の活性化を抑制する。これにより、抗原に対してT細胞が不応答となるため、自己免疫疾患の治療に有効と考えられている。CD28を介したシグナルをONにするのがTGN1412、OFFにするのがAbataceptと考えると両者の働きは逆