

表1 ヒト(自己)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(案)

---

- 第1章 総則
  - 第1 目的
  - 第2 定義
- 第2章 製造方法
  - 第1 原材料と製造関連物質
    - 1 目的とする細胞・組織について
      - (1) 生物学的機能等の特徴と選択理由
      - (2) ドナーの感染症に対する配慮
      - (3) 細胞・組織の採取・保存・運搬について
    - 2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質
      - (1) 細胞の培養を行う場合
      - (2) 非細胞・組織成分と組み合わせる場合
      - (3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合
  - 第2 製造工程
    - 1 ロット構成の有無とロットの規定
    - 2 細胞・組織の加工方法
    - 3 加工した細胞の特性解析
    - 4 最終製品の形態, 包装等
    - 5 製造方法の妥当性と恒常性
    - 6 製造方法の変更
  - 第3 最終製品の品質管理
    - 1 総論
    - 2 最終製品の品質管理法
- 第3章 細胞・組織加工医薬品等の安定性
- 第4章 細胞・組織加工医薬品等の非臨床安全性試験
- 第5章 細胞・組織加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験
- 第6章 細胞・組織加工医薬品等の体内動態
- 第7章 臨床試験

---

見(発症メカニズム, 病態等), 現在の治療法の概略とその長所・短所及び予後, 当該製品と類似の医薬品又は医療機器, 治療法等があればその利用状況について説明し, 当該製品等の開発に至った経緯を明らかにすること。適宜, 文献等を引用して説明すること。

## 1.2 特徴及び有用性

当該製品が, 対象疾患に対し有効であるとする理論的根拠及び基礎試験成績等から見た特徴及び有用性を可能な範囲で明らかにすること。また, 対象疾患の治療においてどのような位置づけを占

めると期待されるのかを説明し, これまでに得られている情報に基づき, 当該製品に期待されるリスクとベネフィットについて考察すること。

## 1.3 外国における使用状況

当該製品の外国における申請状況及び臨床使用状況(承認, 治験及び臨床研究の別)について, 文献等を引用するなど情報の入手可能な範囲で明らかにすること。当該製品にかかる海外臨床試験がある場合には, プロトコルの概略とともにデータを示し, 中等度の有害事象, 副作用については, 症例ごとに具体的に示すこと。また, 類似の製品

表2 確認申請の記載要領

---

第1 起源又は発見の経緯及び外国等における使用状況について
1 開発の経緯
2 特徴及び有用性
3 外国における使用状況
4 国内における臨床研究の状況
第2 製造方法について
1 製造方法の概略
2 原材料及び製造関連物質
(1)目的とする細胞・組織
① 生物学的機能等の特徴と選択理由
② ドナーの感染症に対する配慮
③ 細胞・組織の採取・保存・運搬
(2)目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質
3 製造工程
(1) ロット構成の有無とロットの規定
(2) 細胞・組織の加工方法
(3) 加工した細胞の特性解析
(4) 最終製品の形態、包装等
(5) 製造方法の妥当性と恒常性
(6) 製造方法の変更
4 最終製品の品質管理
5 製造施設・設備の概要
第3 細胞・組織加工医薬品等の安定性
第4 細胞・組織加工医薬品等の非臨床安全性試験
第5 細胞・組織加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験
第6 細胞・組織加工医薬品等の体内動態
第7 臨床試験実施の妥当性
第8 臨床試験の概要

---

についての同様の情報があれば情報の入手可能な範囲で参考として示すこと。類似製品については、当該製品との違い(原材料、製造方法、適用対象、適用方法等)について説明すること。

#### 1.4 国内における臨床研究の状況

国内で類似の製品を用いた臨床研究が実施されている場合には、その状況について文献等を引用するなど情報の入手可能な範囲で明らかにすること。

#### 2. 非臨床試験等の内容の総括

非臨床試験等の内容を総括し、現在の知見で細胞・組織加工医薬品等の安全性が確保されており、品質、安定性、安全性及び予想される有効性や性能の面から臨床試験を行うことの妥当性を明らかにする必要がある。この際、既存の治療法と比べて優れていると考えられる点及び劣っていると考えられる点を踏まえ、細胞・組織加工医薬品等による治療を行うべき理由を勘案すること。特に、最終製品の感染性物質、不純物の残存性について詳細に考察すること。品質、非臨床試験結果から予測される副作用、

不具合の程度と対応策も説明すること。

### 3. 確認及び報告事項

(1) 細胞・組織加工医薬品等にかかる治験の依頼をしようとする者又は自ら治験を行おうとする者は治験計画の届出を行う前に、当該治験機器又は治験薬の安全性及び品質の確保を期するため、当該医薬品等が本指針に適合していることの確認(以下「確認」という。)を厚生労働大臣に求めること。

確認の申請は、所定の様式により行うものとする。所定の様式の記載にあたっては、確認申請の記載要領を参照のこと。なお、確認申請時点における本指針への適合性の確認の趣旨は、当該細胞・組織加工医薬品等の治験を開始するにあたって支障となる品質及び安全性上の問題が存在するか否かの確認にある。したがって確認申請の場合、申請にあたって添付すべき資料について本指針に示された要件や内容の深さをすべて満たすことを必ずしも求めている訳ではない。品質及び安全性の確保のための必要十分な資料は治験の進行とともに本指針に沿って充実整備されることを前提に、確認申請ではその趣旨に適用必要条件を満たし、合理的に作成された適切な資料を提出すること。

また、確認に必要とされる資料の範囲、程度については、当該製品の由来、対象疾患、対象患者、適用部位、適用方法、加工方法等により異なり、本指針では具体的に明らかでないことも少なくないので、個別に独立行政法人医薬品医療機器総合機構の相談を受けることが望ましい。

1) 細胞・組織加工医薬品等にかかる治験計画届を行うときは、治験計画届書の備考欄に、当該治験機器又は治験薬が細胞・組織加工医薬

品等である旨及び確認を受けた年月日を記載すること。

(3) 細胞・組織加工医薬品等の製造販売業者は、細胞・組織加工医薬品等に関する情報を収集し、感染症の発症等、自らが取り扱う細胞・組織加工医薬品等の評価に影響を及ぼす知見を発見した場合には、速やかに所定の様式により厚生労働大臣に報告しなければならない。

### おわりに

細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保の課題については、未知、未経験の要素が多い。本稿で紹介した「基本的考え方」や指針及び関連する解説の内容は、基本的、一般的に留意すべき事項であり、また、現時点での限られた知識、情報の範囲内で考えられることである。したがって、これを固定化したものとしてとらえるべきではない。個々の製品についての試験の実施や評価に関しては、細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保という目的を踏まえ、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、柔軟に対応していくことが重要であると考えられる。そのようなアプローチや事例の蓄積の中から、さらに目的に適ったコンセプトやデータも生まれ、また、新たな評価技術の開発や医療実践もなされて、この分野の進展が図られるものと期待される。

### 参考文献

- 1) 早川堯夫：遺伝子治療用医薬品及び細胞治療用医薬品の品質・安全性等の確保。低温生物工学会誌，45：18-33，1999。
- 2) 早川堯夫，内田恵理子，黒澤 努，白倉良太：トランスジェニック動物由来細胞の品質・安全性確保に関する基礎的研究。医薬品研究，31：791-817，2000。

(早川堯夫/安藤 剛)

## 概論 遺伝子治療用医薬品の品質、安全性等の確保

1990年以降、人の疾病治療を目的とする革新的な医療技術の1つとして遺伝子治療の進展への努力が続けられている。この医療技術は、人為的に加工した遺伝子を人の体内に投与し、疾病の治療を図ろうとするものである。全世界で、2007年1月までに癌で約850、血管系疾患、先天性遺伝子疾患でそれぞれ100余、感染症で80余、合計1,200余のプロトコールにより遺伝子治療が実施されている。わが国では現在までに約20のプロトコールでの遺伝子治療臨床研究が実施されている(<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>)。

遺伝子治療のヒトでの実践を医療行為の面からみれば、例えば臨床研究及び治験(臨床試験)、治療薬承認後の治療といったステージに分けられる。現行の遺伝子治療臨床試験の多くは、臨床研究のステージに相当する。その一方でこの臨床研究に使用される製品にスポットをあてると、その製品に関して将来のより広範な使用が視野におかれているような場合には、いわゆる治験薬としての側面を有している。特にメーカーが当該製品の製造や供給を業として行い、将来の実用化を目指している場合には、臨床研究は、医薬品開発における特殊な形の治験ともみなすことができる。

臨床研究、治験、あるいは実用化後の治療いずれのステージを問わず、

- ① そこに使用される製品の品質、有効性及び安全性の確保
- ② 体内への導入に際しての安全性の確保
- ③ 治療目的の達成

については十分な科学的知見に基づき予測されるものである必要があることはいうまでもない。とりわけ遺伝子治療のような全く新しい分野では未

知、未経験の要素も多いことも含め、細心の配慮をしつつ事を進める必要がある。

しかし、研究、治験、承認後の治療では、自ずと目的や位置づけが異なるところがあり、それぞれを勘案した合理的で適正なアプローチ、対応がなされることも重要である。

例えば、きわめて限られた範囲の患者のみに限定した臨床研究を、ある定められたロットのみの製品を用いて実施しようとする場合には、そのロットの範囲内での薬剤としての品質や安全性を専ら対象として試験、評価することになる。臨床使用に至る前臨床段階での試験や評価の範囲と程度、臨床研究の実施に際してのプロトコール、薬剤の管理、*ex vivo*法における細胞の前処理等を含む管理や培養、体内への導入に際しての安全性の確保、治療の実施と評価なども特定の臨床医と特定の患者という枠組みの中での個別対応においていかに適切であるかに重点がおかれることになる。その意味では、製品の品質、安全性が厳密に確認・評価され、治療薬としての必要十分条件が充たされてから臨床研究を実施するというよりも、品質、安全性面から臨床研究を行うのに支障がないことが確認されていれば、暫定的な品質規格等を設定して臨床研究に入り、臨床研究における有効性・安全性の評価や品質との関係の解析あるいは製造を重ねていく中での品質に関する実態等の把握を踏まえて充実整備を図っていこうという方策になる。

その延長線上、あるいは当初から当該製品を繰り返し製造したり、製造のスケールアップを図ったり、あるいは供給先の拡大を前提にする場合には、品質や安全性の恒常性を保証し、将来にわたる安定供給への継続性を図る必要がある。そのた

めには製造工程の再現性、バリデーション、ロット間の品質管理、安定性などに関するさらに慎重な試験、評価が必要になってくる。前臨床試験や臨床試験でのアプローチ及び評価の仕方に関しても、個別のケースにとどまらない一般性、普遍的広がりを視野においたものである必要がある。

遺伝子治療研究について厚生労働省は、その円滑な推進、長期的な研究推進の観点から、様々な施策を講じてきた。その一環として平成6年2月及び平成14年3月に、遺伝子治療の臨床研究に関し遵守すべき事項を定め、もって遺伝子治療臨床研究の科学的妥当性及び倫理性を確保し、その適正な実施を図ることを目的とした「遺伝子治療臨床研究に関する指針」を告示した。この指針を基に、わが国で実施されるすべての遺伝子治療臨床研究はその科学的妥当性及び倫理性が厚生科学審議会で審査されることになっている。その結果、遺伝子治療臨床研究がすでに20件超実施されているのは周知のとおりである。

一方で、企業活動としてこのような遺伝子治療用医薬品開発及び製造が活発に行われ始めていることなどから、その円滑な推進、長期的な研究・技術開発の推進には、企業が遺伝子治療研究のための製品の品質及び安全性等に関し、臨床研究、治験などに先だって評価を受け、治療薬としての適切性の確認を得られる仕組みが必要とされ、そのための施策も講じられてきた。当面は遺伝子治療臨床研究に用いられる製品ではあるが、製造業者が将来的には治験を経て、医薬品としての承認を得ることを視野において当該製品を製造して供給しようとしている場合に対応するためである。従来、臨床研究に使用する製品に対する審査制度はなく、その品質は製造業者の自主管理に委ねられるというのが一般的であった。しかし、厚生省薬務局(現在の厚生労働省医薬食品局)では、遺伝子治療薬についてはその特殊性を鑑みると、製品の品質及び安全性の確保に関して事前に評価、確認する必要があるとの見解に至った。審査体制とし

ては、中央薬事審議会バイオテクノロジー特別部会(現在の薬事・食品衛生審議会生物由来技術部会)が遺伝子治療薬の製造法の妥当性や品質、安全性評価に関する審議を行うこととした。また、そのための調査会として平成7年4月に遺伝子治療用医薬品調査会を設置した(現在、当該調査会は廃止されて、指針への適合性に関する審査は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構において、外部専門委員との協議を踏まえた事前審査システムが採用され、事前審査の後、薬事・食品衛生審議会生物由来技術部会における審議等を経て大臣確認がなされることになっている)。この調査会がまず行った作業が、「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(案)」の作成であった。この指針案は、特別部会等でさらに討議された後、平成7年11月に薬務局長名で通知された。指針には、企業が臨床研究用薬剤の適合性確認を求めようとする際にどのようなデータ、情報を提出すればよいか提示されている。その後、指針の科学的内容自体には大きな変更は行われていないが、臨床試験における倫理的な配慮(H14.03.29、医薬発第0329004号)と個人情報保護(H16.12.28、薬食発第1228004号)に関する追加がなされ、より一般性及び汎用性の高い形で遺伝子治療が実施されるよう規制環境が整備されてきている。

本稿では、遺伝子治療に用いられる製品について、医薬品としての観点からどのような製造管理、特性・品質解析、有効性・安全性評価などがなされる必要があるかについて、薬務局長指針を踏まえて概説し、実用化に向けての課題等についても言及する。

## 1. 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の概要

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(以下、指針)は、製造業者からみれば、

遺伝子治療の目的に使用しようとする製品(遺伝子治療用医薬品)の品質及び安全性等に関し、臨床研究、治験などに先だって評価を受け、治療薬としての適切性の確認を求めようとする際にどのようなデータ、情報を提出すればよいかを示されたものと捉えられる。調査会(現在は医薬品医療機器総合機構)／部会からみれば、どのような項目、内容につき審査し、その適合性を判断すればよいかの目安が示されたものである。適合性の確認は最終的には厚生労働大臣によって行われる。この指針作成にあたっては、具体的事例や経験が乏しい中で当時想定され得るいろいろな事項を可能な限り網羅すべく努力が払われた。ただし、本指針の前文にも書かれているように、いろいろな将来展開の可能性を考慮すれば、その内容はあくまで1つの目安であり、個々の遺伝子治療用医薬品についての試験の実施や評価に際しては、品質及び安全性等の確保という目的を踏まえ、その時点での学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースの原則で柔軟に対応することが肝要であるとされている。

指針本体の内容は、表1のように9章から構成されている。また、別記として、より詳細な補足説明及び確認申請資料を作成する上で必要な情報や手引が10章にわたって述べられている。その内容構成を表1に示した。

以下では、これらのうちの主なポイントについて概説する。

## 2. 指針における用語の定義

指針では、「遺伝子治療」、「マスター・セル・バンク(MCB)」、「ワーキング・セル・バンク(WCB)」、「ベクター」、「ウイルスベクター」、「非ウイルスベクター」、「ヘルパー」、「パッケージング細胞」、「作業区域」などの用語の定義がなされている。このうち特に、「ベクター」の定義をめぐっては様々な

表1 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保関する指針内容概要

指針内容
1) 総則(目的, 定義)
2) 遺伝子治療用医薬品の製造方法
3) 遺伝子治療用医薬品の規格及び試験法並びに製剤設計
4) 遺伝子治療用医薬品の安定性
5) 遺伝子治療用医薬品の非臨床安全性試験
6) 遺伝子治療用医薬品の効力を裏付ける試験
7) 遺伝子治療用医薬品の体内動態等
8) 遺伝子治療用医薬品製造施設及び設備
9) その他
別記内容
1) 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況について
2) 製造方法について
3) 規格及び試験方法並びに製剤設計
4) 安定性試験
5) 非臨床安全性試験
6) 効能試験
7) 体内動態等
8) 非臨床試験結果等の総括
9) 遺伝子治療臨床試験の概要
10) 製造施設・設備

論議があったが、「目的遺伝子を宿主細胞に導入するときに使われる運搬体をいう」と本来の意味どおりの定義とした。ただし、「ウイルスベクター」については、野生型ウイルスゲノムの代わりに目的遺伝子を組み込んだ組換えウイルスゲノムがウイルス粒子内にパッケージされているものに対してすでに一般的に使用されている呼称なので、それに従うこととした。ウイルスベクター以外の運搬体は「非ウイルスベクター」と称することとした。

## 3. 遺伝子治療用医薬品の製造方法の明確化とその妥当性の検証, 一定性の維持

製造方法の詳細とその妥当性を明らかにするこ

と、製法の一貫性を示すことは、遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保、品質恒常性の維持にとって特に重要とされる事項の1つである。遺伝子治療用医薬品の製造方法に関しては、どのような遺伝子導入法を目指すのか、どのような投与方法によるのかによってアプローチや評価方法が異なるので、遺伝子導入法による区分と投与方法による区分にそれぞれ整理した。遺伝子導入法による区分ではさらに、

- 1) ウイルスベクターを用いる場合
- 2) 非ウイルスベクターを用いる場合
- 3) ベクターを用いずに直接導入する場合

に分け、必要な試験や情報、評価すべきデータについて例示した。表2には遺伝子導入方法の如何を問わず、製造方法に関し、それぞれのケースで共通して資料提供が必要な主な項目を示した。

投与方法による区分では、(1) *ex vivo* 法の場合と(2) *in vivo* 法の場合に分ける。

### 3.1 ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合

ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合には、表2の項目に加えて、「野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響」、「パッケージングに用いる細胞の培養方法、生物学的特徴及び人に対する影響」、「パッケージング細胞の培養方法、生物学的特徴及び人に対する影響」、「ウイルスベクター産生細胞の人に対する影響」、「ウイルスベクターの粒子構造上の特徴」、「ウイルスベ

表2 各種遺伝子導入法に共通して情報提供が求められる事項

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・当該遺伝子導入法を選択した理由及びその特徴</li> <li>・導入DNA又はRNAの作製方法、構造分析、性質</li> <li>・導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性</li> <li>・その他のDNAの作製方法、構造及び性質</li> <li>・セル・バンクシステム</li> </ul> |
|--|

クターの生物学的特徴」、「ウイルスベクターの製造方法」などに関するデータや情報の提供を必要とする。

このうち、「ウイルスベクターの生物学的特徴」として情報提供が求められている内容は、

- ① ウイルスベクターにより、どのような細胞に遺伝子導入が行えるか、種特異性・組織特異性があるか、静止期の細胞への遺伝子導入は可能かなどについて明らかにすること
- ② 遺伝子の導入効率及び導入遺伝子の発現効率について示すこと
- ③ 導入遺伝子の細胞内での存在様式、安定性について明らかにすること、染色体内に組み込まれる場合には、その位置が特定されているか不特定かを明らかにすること

などである。

また、「ウイルスベクターの製造方法」として求められている事項は、

- ① 人に導入されるDNA又はRNAの作製方法から始まりウイルスベクターの製造にいたる一連の製造過程を総括的に示すこと
- ② ウイルスベクターの精製法について示すこと
- ③ 実用化のためスケールアップ等の措置を講じた場合は、適切なバリデーションデータを示し、その内容を明らかにすること
- ④ パッケージング細胞を使用する場合には、その作製手順、選択・同定方法及び種細胞株を確立するまでの単離純化方法、MCB及びWCBの調製・保存方法、管理法、更新法、特徴及びパッケージング細胞に挿入されたDNA又はRNAの安定性についても明らかにすること
- ⑤ 培養期間中を通じて、またロット間で細胞フェノタイプ等が変化していないことの確認試験方法及び試験結果を示すこと
- ⑥ 増殖性ウイルスを含めて品質管理に必要な安全試験の試験時期、試験方法及び試験結果を示すこと

などである。

一方、共通して資料提供が必要な項目のうち「セル・バンクシステム」の項は、遺伝子治療用医薬品の製造過程のいろいろな局面で細胞の使用が予測されることと関連している。使用が予測される細胞は、例えば、

- ① ウイルスペクター(人に導入される DNA 又は RNA)、目的遺伝子、ウイルスベクターを製造するために用いたプラスミド、その他の DNA の製造、ウイルスの製造などに使用する細胞
- ② パッケージングに用いる細胞
- ③ パッケージング細胞及びウイルスベクター産生細胞

などである。その際、セル・バンクシステムを構築して、一定の品質の細胞、あるいは特定の細胞からある目的産物の供給を図り、利用することも多いと思われる。そのような場合には、セル・バンクの調製方法、保存方法、管理方法、更新法等について、各物質の製造、各細胞ごとに詳細に情報を提供する必要がある。パッケージングに用いる細胞やパッケージング細胞では凍結及び解凍手順、解凍後及び培養後の確認試験並びに凍結有効期間についても明らかにしておく必要がある。これらの概念や内容は、すでにバイオ医薬品の製造に際してセル・バンクシステムを使う場合に述べられていることと基本的には同じである。

その他、「導入 DNA 又は RNA の作製方法、構造分析、性質」、「導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性」、「その他の DNA の作製方法、構造及び性質」などについて、どの程度の、どのような内容の資料が必要であるかは、組換え DNA 技術あるいは細胞培養技術由来の医薬品について、国内のガイドラインあるいは ICH 国際ガイドラインなどで求められている内容、程度に準ずると考えればよいと思われる。

### 3.2 非ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合

非ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合に提供を必要とするデータや情報の主なものは、表 2 で挙げた共通項目に加えて、ウイルスベクターの場合とは異なりこのケースに特徴的だと思われる「非ウイルスベクターの製造方法」、「非ウイルスベクターの構造又は組成分析」、「非ウイルスベクターの生物学的特徴」などである。

非ウイルスベクターの製造方法で最も特徴的なのは、タンパク質、糖質、脂質等が構成成分になる可能性があることである。これらについては、すでに規制があるもの、例えば、バイオテクノロジー由来のタンパク質が構成成分の場合は、まずその構成成分について現行ルールでその品質や安全性の確保に対し求められていると同様のデータが必要である。また、既存のルールがないものについても、基本的な考え方は既存のものを準用しながらケース・バイ・ケースでそれらの品質や安全性確保を図っていくことになると思われる。いずれにしても、ベクターを構成するすべての成分(例えばタンパク質、糖質、脂質等)それぞれについて、由来、調製法、精製法、品質等の詳細な情報提供が必要である。生物起原由来の材料を使用する場合には、ウイルスをはじめ、感染性微生物による汚染の可能性を否定するための試験、評価を行っておくことも不可欠である。これらの各構成成分の製法に関する試験、評価を前提として、最終的には非ウイルスベクターそのものの製造手順、精製法及び管理法についての資料を提出するということになる。

非ウイルスベクターの構造又は組成分析についても考え方は同じである。まず、①ベクターを構成する成分(例えばタンパク質、糖質、脂質等)それぞれについて、ベクター製造前後の構造又は組成を明らかにしておくこと、②各構成成分につきロット更新を行う場合には、ロット間の恒常性を



明らかにすること、例えば、組換えタンパク質やモノクローナル抗体が構成成分の一部である場合には、目的タンパク質生産用の種細胞株の樹立、セル・バンクの調製方法、保存方法、管理方法、更新法、生産のための細胞培養方法、目的タンパク質の精製法、構造・組成解析、特性解析、規格及び試験方法並びに保存安定性などに関する資料の提出が必要である。また、こうした各構成成分での試験、評価、品質管理に加え、③ベクター全体としての構造又は組成分析が当然のことながらリンケージして求められている。

### 3.3 直接 DNA 又は RNA を導入する場合

直接 DNA 又は RNA を導入する場合に情報提供が必要な項目は、表 2 で挙げた共通項目に加えて、「遺伝子導入操作」や「当該導入法の生物学的特徴」などである。このケースの場合、遺伝子導入操作に導入法としての最大の特徴がある。したがって、実際の導入手順、使用する試薬、機器等について明らかにする必要性が強調される。その他の各項目についての基本的な考え方は、すでに述べたことと同様である。

### 3.4 *ex vivo* 法及び *in vivo* 法による投与を行う場合の留意事項

投与方法に言及している理由は、開発された遺伝子治療用医薬品を使用するにあたっての基本的なプロトコール、基準をあらかじめ開発者に設定、評価させ、この標準化された使用方法を守ることを通して、医薬品としての品質、安全性の確保をより一層確実なものとするためである。

まず、*ex vivo* 法の場合、次の項目を中心に詳細な検討と評価が求められている。

- 1) 標的細胞の由来や特性、選択理由を明らかにすることによるその適格性
- 2) 感染性微生物汚染の可能性、免疫適合性、健

康状態などの面での評価を含めた細胞供与者の選択基準と適格性

- 3) 細胞採取から始まり、遺伝子導入、導入遺伝子の安定性、培地、培養期間、微生物汚染対策も含めた細胞培養方法関連事項
- 4) 微生物汚染の否定、試薬等の残留量測定などを含む遺伝子導入細胞の適格性試験
- 5) 遺伝子導入細胞の患者への投与方法など。

*In vivo* 法の場合には、標的細胞の生物学的特徴、当該細胞を標的細胞として選択した理由、投与方法(遺伝子導入の方法、投与量、投与回数、間隔等)、標的細胞以外(特に生殖細胞系列)への遺伝子導入の可能性に関する検討・考察などが重要なポイントである。

### 4. 規格及び試験方法並びに製剤設計

遺伝子治療用医薬品の品質を確保し、その恒定性を図るためには、医薬品本体の特性や不純物の種類、存在量などについて十分な解析を行い、その特性・品質プロファイルを明確にした後、それらを適切に反映した規格及び試験方法を設定し、ロット間の製品管理をすることがなによりも重要である。また、細菌・真菌、迷入ウイルス、マイコプラズマ等による汚染の可能性について否定することも必須である。さらに、予測される混入物やウイルス混入の可能性に関するプロセスバリデーションを製造及び精製過程でどのように行ったのか、あるいは次項で述べる安定性試験の結果も品質確保、規格及び試験方法の設定上の重要な参考事項となる。なお、特別の製剤処方がある場合には、その合理的説明と必要に応じて製剤機能試験を設定することが必要である。

## 5. 遺伝子治療用医薬品の安定性

安定性については、原体及び製剤について、流通使用期間を考慮し、適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定する必要がある。また、貯法以外又は有効期限を超える保存について、試験を実施し、安定性の限界を確認することや、各試験において用いたロットの数の妥当性を合理的に説明することなどが重要である。

## 6. 遺伝子治療用医薬品の非臨床安全性試験

遺伝子治療用医薬品の非臨床安全性試験に関しては、製品の安全性について、技術的に可能な範囲で適当な動物を用いた試験及び *in vitro* における試験を適切に実施することが必要である。この安全性試験は、人における製品の投与経路を反映している必要がある。安全性を確認するにあたっては、特に、

- 1) 増殖ウイルス出現の可能性
- 2) 細胞又は組織に傷害を与える可能性
- 3) 導入遺伝子が生体に及ぼす影響
- 4) 発現産物の異常発現に起因する安全性
- 5) 癌原性
- 6) 免疫原性
- 7) 試験実施が技術的に可能であれば一般毒性などに着目すること

が必要とされている。しかし、すべての項目について試験の実施を求めている訳ではない。ケース・バイ・ケースで科学的に意味がある試験項目と試験方法を選択し、結果を臨床適応との関連性などを踏まえて評価、考察する必要がある。また、試験の選択や結果の解析等の妥当性に関して、合理的な説明がなされることが肝要である。

## 7. 遺伝子治療用医薬品の効力を裏付ける試験、体内動態等

遺伝子治療用医薬品の効力を裏付ける試験としては、

- 1) 適切に設計された培養細胞及び実験動物を用いた試験により、遺伝子の導入効率、導入遺伝子の構造及び安定性、導入遺伝子からの目的産物の発現効率及びその持続性、発現産物の生物活性、細胞、組織及び個体への期待される効果等を検討すること
  - 2) 適当な疾病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
- などが期待されている。

遺伝子治療用医薬品の体内動態に関しては、

- 1) 遺伝子治療用医薬品又は遺伝子導入細胞の実験動物での吸収、分布等の体内動態に関する試験等により、人における遺伝子導入細胞の生存期間等を推測し、目的とする効果が十分得られることを説明すること
  - 2) 特に、遺伝子治療用医薬品又は遺伝子導入細胞が特定の部位(組織等)に到達する必要がある場合には、その局在性を十分に説明すること
- が必要である。

## 8. 非臨床試験結果等の総括及び遺伝子治療臨床試験

非臨床試験結果等の総括として、以上述べてきたような製造方法から体内動態までのデータを総括し、現在の知見で遺伝子治療用医薬品の安全性が適切に確保されており、品質、安全性及び予想される有効性の面から臨床試験を行うことの正当性を記載し、臨床試験の開始が十分な基礎データに裏付けられたものであることを示す必要がある。

なお、参考事項として、予定されている遺伝子治療臨床試験の概要に関し、次のような項目についての情報提供が必要である。

- 1) 適応症として選択した疾患に関して、現在得られている知見
- 2) すべての検査、治療内容等の臨床試験計画
- 3) どのような機序で治療効果が得られるのかを明らかにすること。また、既存の治療法と比較して遺伝子治療を行うべき理由及び妥当性
- 4) 遺伝子治療臨床試験実施施設・体制の適正性
- 5) 被験者の選択基準及び除外基準
- 6) 被験者の同意の取得方法
- 7) 必要とする症例数及び実施期間並びにその根拠
- 8) 遺伝子治療臨床試験の具体的な実施方法
- 9) 患者(被験者)のフォロー観察予定
- 10) 患者以外への遺伝子導入の可能性
- 11) 患者のQOLを含む効果判定基準  
(臨床試験の実施にあたり倫理的配慮がなされていること、個人情報保護の観点から適切な対応がなされていることを示す必要がある旨の指針の一部改正がなされている(H14.03.29, 医薬発第0329004号, H16.12.28, 薬食発第1228004号))。

## 9. 遺伝子治療用医薬品製造施設及び設備

遺伝子治療用医薬品製造施設及び設備については、表3に示すような基準が求められている。内容的には従来の指針を踏襲したものである。

## 10. その他：指針の製造業者にとっての利用の仕方、遺伝子治療用医薬品の品質、安全性確保を図る上での報告義務

以下には、いままで述べてきた本指針の製造業

表3 遺伝子治療用医薬品製造施設及び設備

- |  |
|--|
| (1)作業区域を有すること  |
| (2)作業区域は、次の基準を満たすものであること。<br>①他の区域と区分されていること<br>②よく整備された培養装置を有すること。                                      |
| (3)取り扱う組換え体及び遺伝子治療用医薬品の理化学的、生物学的及び免疫化学的性状を試験検査するための設備を有すること。   |
| (4)次に掲げる設備を有すること。<br>①組換え体の保管設備<br>②培地を調製するための設備<br>③製造又は試験検査に使用する器具器械、容器等を洗浄し、滅菌するための設備<br>④製造従事者の更衣設備。 |
| (5)その他必要と認められる設備・装置を有すること。   |

者にとっての利用の仕方、遺伝子治療用医薬品の品質、安全性確保を図る上での報告義務が述べられている。すなわち、

- 1) 遺伝子治療用医薬品の製造業者又は輸入業者は、遺伝子治療用医薬品の安全性及び品質の確保を期するため、当該医薬品が本指針に適合していることの確認を厚生労働大臣に求めなければならない(「求めることができる」から、「求めなければならない」に変更された(H14.03.29, 医薬発第0329004号))
- 2) 遺伝子治療用医薬品の製造業者又は輸入業者は、遺伝子治療に関する情報を収集し、自らが取り扱う遺伝子治療用医薬品の評価に影響を及ぼす知見を発見した場合には、速やかに厚生労働大臣に報告しなければならないということである。

## 11. 遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けての課題

「遺伝子治療臨床研究に関する指針」による審査及び「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」に基づく確認申請が開始されてからそれぞれ13年余、12年余が経過したが実用化という点ではまだ途遠しという感である。これまで後者の指針を踏まえて厚生(労働)大臣により確認がなされた品目は、HIV発症の遅延又は防止を目的としたHIV-1のenv遺伝子等を搭載したレトロウイルスベクター(平成9年)、非小細胞肺癌又は進行食道癌の治療を目的としたヒト正常型p53遺伝子を搭載したアデノウイルスベクター(平成10年)、閉塞性動脈硬化症又はビュルガー病に対するヒト肝細胞増殖因子遺伝子を搭載したプラスミドベクター(平成15年)の3品目にすぎない。このうち、最初の1品目については治験開始前に中止となっており、国内で治験として実施された品目は2品目である。治験に先駆けて実施されている臨床研究を含めても20余品目に留まっている。欧米においても本分野の進展が著しい訳でもないが、欧米に比べて日本がさらに遅れていることは否めない。

今後、遺伝子治療用医薬品の実用化を促進するためには、規制面及び科学面双方での一層の進展が必要である。

規制面では、とりあえずは現行の指針を前提としつつ、例えば臨床研究や確認審査の申請者によるデータ作成や資料整備及び規制側の審査それぞれがいかに合理的、効率的に行えるかがポイントである。そのためには従来にも増して関係者間での積極的な情報交換や対話が必要であろう。また将来に向けて国際レベルで、医薬品開発を安全にかつ迅速に進めていくためには、各国の開発側と規制側が社会に開かれた形でコンセンサスを形成していくことが重要であると考え。現在、そのような場として、ICHの遺伝子治療専門家会議(Gene Therapy Discussion Group; GTDG)がある。ICH-GTDGは、遺伝子治療医薬品等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等について、情報交換、調査及び検討することを目的に年に数回開かれているものである。2007

年4月には「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」という見解書が取りまとめられており、国内でパブリックコメントも実施されている。このような見解書は今後も作成されていくことが予定されており、当面、ガイドラインとして規制を求めるものではないが、未だ経験に乏しいこの分野にあつて、その時点で考えられる合理的な開発スタンスを示すものであるものであると考えられるため、注目していくべきであると考え。

科学面においても、本邦では臨床試験に到達しているものは少数で、経験や知見の蓄積はきわめて乏しい状況である。しかし、海外における経験や知見の蓄積の収集や、それらに関する情報交換もなされており、遺伝子治療の実用化に向けての研究・開発はその初期段階を経て、今後に向けての問題点が明らかになってきている。

遺伝子治療の分野に限らず、先端的医療において安全性に関する関心は高く、最も着目しておくべき要素である。遺伝子治療用医薬品において、安全性面からみた重大な歴史的出来事は、米国のアデノウイルスベクターを用いたオルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)遺伝子欠損症に対する遺伝子治療における死亡例(1999年)と、フランスのレトロウイルスベクターを用いたX連鎖免疫不全症(X-SCID)に対する遺伝子治療における白血病発症例(～2007年)である。また、2007年7月末に、米国において、アデノ随伴ウイルスベクターを用いたリウマチに対する遺伝子治療で死亡例が報告されたが、現在のところ詳細な原因は発表されていない。前2者の症例の詳細な分析結果については専門書に譲ることにするが、アデノウイルスベクターについては高用量のアデノウイルス粒子を血管内投与したことで、患者における肝機能の低下などから全身性の炎症反応が起こったことが原因と考えられている。レトロウイルスベクターの場合についてはプロオンコジーン近傍への挿入変異による白血病細胞化の可能性が示唆されている。

しかし、発生機序としてはいろいろな要素があり、それらが複合的に絡まり合って臨床症状を引き起こしていると推測される。詳細な発生機序の解明は将来の発展に向けての礎になると考えられる。

現行の遺伝子導入技術、中でも根幹をなすアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、制限増殖型ウイルス、膜融合リポソームやHVJ-エンベロープベクターを含む非ウイルスベクターなどの遺伝子導入ベクター(遺伝子治療用医薬品)には、それぞれ機能面あるいは安全性面での一長一短があり、いずれをとってみても治療技術として普遍化できるだけの満足すべき結果が得られていない。万能のベクターが存在しない以上、当面は、それぞれのベクターとしての特長を活かしつつ、問題点を克服するというアプローチで改良を重ね、最も効果的に活用できる臨床目的ごとに使い分けていくという方策がとられることになるであろう。適用法の工夫や目的遺伝子に活路を期待する部分も少なくない。しかしながら、長期的にみれば、より普遍的な遺伝子導入技術、具体的には、より改良された遺伝子導入ベクター(遺伝子治療用医薬品)の開発が望まれることはいうまでもない。

将来の遺伝子治療用医薬品に求められる機能と安全性要件あるいは生産性等を考察してみると、主なものとして以下のような事項が挙げられる。すなわち、

- ① ヒトに対する非病原性
- ② 低細胞毒性
- ③ 非抗原性
- ④ 導入遺伝子の数やサイズに関する許容性
- ⑤ 標的細胞特異性
- ⑥ 遺伝子導入効率
- ⑦ 安定性
- ⑧ 導入遺伝子の高発現や安定発現、発現調節
- ⑨ 遺伝子毒性(染色体への導入遺伝子の組み込みによる発癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝

子の不活化の可能性等)の回避

⑩ ベクター作製法の簡便さや大量調製の容易さなどの諸要件である。遺伝子導入ベクターにおけるこれらの要件の達成度が医薬品としての品質・安全性・有効性に関する評価に耐え、治療の成否を決める鍵にもなり、実用化への道を拡大するということである。

上記①～⑩の大半の条件を充たすには、例えば、ウイルスベクターを限りなく改良していくか、非ウイルス化したもの、あるいは、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの長所を最大限活かし、かつ短所を最小限にした非ウイルスベクターの開発研究が必要である。ベクターのうち、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、制限増殖型ウイルス、非ウイルスベクターにおける技術的進歩についての詳細は、本章第2、第3、第4、第5及び第6節をそれぞれ参照されたい。

①については、製品中の増殖性ウイルス(野生型)の存在が最重要課題の1つである。非増殖性ウイルスベクター中の増殖性ウイルス(replication competent virus: RCV, レトロウイルスではRCR, アデノウイルスではRCA, レンチウイルスではRCLという)を完全になくすことは困難であるが、ベクターやパッケージング細胞の改良によりその出現量を低減化させたり、アッセイ法を改善、適正化することで増殖性ウイルス量を定量的に測定し、許容限度以上の増殖性ウイルスが存在する製品を排除するという方策での対応が進んできている。アデノ随伴ウイルスの場合はそれ自体に増殖能がなく、非病原性であることからRCVの問題は他に比しそれほど深刻に捉えられていない。また、第3世代のレンチウイルスベクターでは、RCLの出現量はRCRに比し、格段に低減化されており、検出限界以下である。

③に関して、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどウイルスベクターを用いた場合には、投与されたベクター自身のカプシドタン

パク質に対して、非ウイルスベクターの場合には大腸菌由来プラスミドを用いることから非メチル化 CpG DNA に対して自然免疫応答を生じることになるが、現時点ではこれらの免疫応答を制御するのは困難であり、今後の最重要研究課題の1つである。アデノウイルスベクターの場合、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域以外のすべてのウイルス遺伝子を欠損させたベクター (Gutted アデノウイルスベクター) の開発を進めることにより、問題解決が期待される(ただし、Gutted アデノウイルスベクターを用いても、投与されたベクター自身のカプシドタンパク質に対する免疫応答を克服することはできない)。なお、Gutted アデノウイルスベクターでは、最大約 36 kb までの外来遺伝子を挿入でき、④の問題も解決可能である。ちなみに、レトロウイルスベクターでは約 8 kb まで、アデノ随伴ウイルスでは、通常約 4.6 kb まで、発現ユニットを分ける工夫で約 9 kb までがそれぞれ搭載可能限度とされている。

⑤については、レトロウイルスベクターの場合、細胞受容体との相互作用に関与する Env を操作して宿主域や導入効率を変えようとする試みがいろいろ行われている。また、種々のリガンドや抗体を組み込んだキメラエンベロープによる特定の細胞へのターゲティングも試みられている。しかしこれらは遺伝子導入効率の低さを克服する必要がある。アデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターにおいても、ウイルス表面のタンパク質に外来ペプチドを発現させることによりベクターの標的細胞選択制の自在な制御を目指すベクターの開発が進んできている。また、従来(アデノウイルスの場合ヒト 5 型、アデノ随伴ウイルスの場合ヒト 2 型)とは異なった血清型や種に属するアデノウイルスやアデノ随伴ウイルスなどが異なる受容体指向性を有することを基盤として、標的細胞特異性が異なるベクターの開発が目指されている。ベクターの血清型と組織特異性に関する知見が蓄積されていけば、標的組織の種類、特徴に応じて

種々の血清型ベクターを使い分けるアプローチも一層重要になってくると考えられる。特定の細胞でのみ働くプロモーターを利用することも1つの方策である。制限増殖型ウイルスは癌細胞のみで選択的に増殖し、腫瘍を破壊すべく設計されたもので、Oncolytic Virus とも称される。アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのウイルス遺伝子に特定の変異あるいは欠失を加えることにより、癌細胞の生物学的な特殊性に基づいた制限増殖性を期待する方法、腫瘍特異的及び臓器特異的なプロモーターを導入することによってウイルス初期遺伝子の転写を制御して、癌細胞に特異的な制限増殖性を付加する方法である。一方、遺伝子組換え技術によらず、ウイルス自体の性質として正常細胞への細胞傷害性が低く、発癌遺伝子の異常発現によりウイルス複製が行われ癌細胞特異性を示す特定の野生型や弱毒化自然変異株を利用する方策も試みられている。

⑥に関連して、従来はアデノ随伴ウイルス(AAV)においてゲノムが一本鎖 DNA であるため発現効率が必ずしもよくないことが問題であったが、self-complementary AAV という標的細胞内で直ちに二本鎖の状態になるベクターの開発で高い遺伝子発現効率が得られるようになった。ただし、搭載できるゲノムサイズが従来法の半分になる。

⑧のうち、導入遺伝子発現調節については、例えばテトラサイクリンの遺伝子発現制御系を搭載したベクターの作製により、単一のアデノウイルスベクターなどで目的遺伝子の発現制御が可能となってきている。安定発現については、Gutted アデノウイルスベクターをベースにして、例えば EB ウイルス等の複製能を利用し、アデノ-EB ハイブリッドベクターのような染色体外で複製能を有したエピゾーマルベクターとして存在させることや、Sleeping Beauty 等のトランスポゾンを利用して目的遺伝子を染色体に組み込ませる活性をアデノウイルスベクターに付与することが考えられる。また、Gutted アデノウイルス-アデノ随伴

ウイルスからなるハイブリッドベクターを複製し、アデノ随伴ウイルスの染色体への部位特異的組み込み能(第19染色体の長腕部への組み込み)を利用することも考えられる。

⑨については、レトロウイルスベクターや非分裂細胞にも遺伝子導入できるレンチウイルスベクターの場合、挿入変異をいかに回避するかが課題である。挿入変異による発癌の可能性は、理論的には考えられても多くの実施例からきわめて低いであろうとされてきた。しかし、既述のようにX-SCIDの患者4人に白血病の発症が報告された。X-SCIDの場合は様々な要因が複合的に重なって癌が発症した特異な例とされているが、挿入変異の回避のためのより安全なベクターへの改良や安全性評価技術の開発は最重要な研究課題である。SIN(self inactivating)ベクターを基本として組織特異的プロモーターやクロマチンインシュレーター等を使用する、標的とする細胞の数や挿入されるベクターのコピー数を可能な限り少なくするようコントロールする、自殺遺伝子を組み込むといった方策が考えられている。

非ウイルスベクターの場合、その最大の課題はいかに遺伝子導入効率を高めるかである。その解決策で有望なのはウイルス的要素の付加である。ウイルスの構成要素を利用した非ウイルスベクターの場合、①から④や⑩の要件は、例えば、「安全で品質管理が容易な素材から大量に調製でき、封入できる物質の種類やサイズに関する許容性が非常に高く、また標的細胞との膜融合によりきわめて短時間で直接細胞質内に高効率で物質を導入することができ、細胞毒性も示さないという特徴を持つ膜融合リポソームやHVJ-エンベロープベクター」のようなものの開発研究を進めることで充たされる可能性がある。しかし、所期の目的に叶うかどうかは適正に評価、検証していく必

要がある。次に、⑤の標的細胞特異性を付与しようとするれば、例えば、標的細胞表面に特異的に存在する受容体その他の分子を認識する分子をベクターに付与するか、遺伝子導入構成体に細胞特異的プロモーターを装着することなどが考えられる。また、⑥の遺伝子導入効率を高めるための方策としては、目的導入遺伝子に核移行シグナルを持たせるなどで核への遺伝子送達能を高めるか、核移行を伴わず細胞質内で高効率で目的遺伝子を発現する方法を開発する必要がある。

さらに、⑦安定性、⑧導入遺伝子の高発現や安定発現、発現調節、⑨遺伝子毒性の回避などを図ろうとするれば、目的導入遺伝子が細胞核内の宿主染色体外で安定に存在することができるような要素(例えばウイルスが核内独立レプリコンとして存在しうるための要素やテロメアなど)及び細胞種特異的プロモーター並びに核移行に必要な要素を装備した遺伝子導入構成体として「ミニ人工染色体」の開発を目指すか、あるいは宿主染色体の特定位置(例えば第19染色体の長腕部)に選択的に目的遺伝子を挿入するなどの技術開発が必要である。

このようなそれぞれ新たな技術開発を行った場合、その妥当性を適正に評価する必要があることはいうまでもない。逆に、新たな技術開発をする場合に評価のポイントを常に念頭に置いて研究を行えば、効率的な開発が可能となる。安全性評価のポイントを念頭において、あるベクター開発の企画・設計の段階から安全性設計を十二分に盛り込んだものとするれば、安全性設計なしに開発を進めた場合と比較して、安全性評価において実体としても、時間や労力においても明らかに合理的に事を運ぶことが可能であろう。この企画・設計段階から問題点を克服したものを創るという思想はきわめて重要であることを強調しておきたい。

(早川堯夫/前田大輔/水口裕之)

## 第1節 アデノウイルスベクター

### はじめに

本稿では、遺伝子治療用ベクターとしてのアデノウイルスベクターの諸性質、現状を紹介しながら、本ベクターの品質・安全性上の課題、および従来型アデノウイルスベクターの欠点を克服し、安全で遺伝子導入効率のよい次世代アデノウイルスベクターの開発状況について解説する。

### 1. アデノウイルスの性質と構造

1953年、小児の扁桃腺やアデノイド組織培養液中から分離されたアデノウイルスは、現在までにヒト・トリ・ウシ・サル・イヌ・マウス・ブタを宿主とする80以上の血清型の存在が明らかにされている。ヒト型ではこれまでに51種類の血清型が発見されており、遺伝子治療のベクターとして用いられているのは、遺伝子の構造解析が最も進んでいる2型と5型(sub-group Cに属する)である。臨床的には小児期に急性気道炎、角結膜炎、膀胱炎などを起こすウイルスである。米国では、約30年以上もの間、約100万人の兵士に対しワクチンとしてアデノウイルスが投与され、重篤な副作用を示さなかったという特徴を持つ。

アデノウイルスは、エンベロープを持たず、252個のカプソメアよりなる正20面体構造をしている。そのうち頂点にある突起構造を持った12個はペントン(ペントンベースとファイバーからなる)と呼ばれ、他の240個はヘキソンと呼ばれる。ウイルスの細胞内への侵入は、ファイバー

がアデノウイルス受容体(coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR); 2型や5型における受容体)に結合し<sup>1)</sup>、その後ペントンベースのRGD(Arg-Gly-Asp)モチーフが細胞表面上のインテグリン( $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ )に結合することによって起こる<sup>2)</sup>。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシドタンパク質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内に侵入する。細胞質内に導入されたウイルスゲノムの核への移行は効率よく起こり、細胞に感染したウイルスの50-80%は60分以内に核に到達する<sup>3), 4)</sup>。核内に導入されたウイルスゲノムは、ゲノム両端のITR(inverted terminal repeat)領域に結合するアデノウイルスDNAポリメラーゼと末端タンパク質前駆体(pre-terminal protein)、宿主由来のタンパク質などとの複合体を介して環状化し、核マトリックスに結合した状態で存在する。

ヒトアデノウイルスは約36 kbの線状二本鎖DNAをゲノムとして持ち、その遺伝子は初期遺伝子のE1・E2・E3・E4と、後期遺伝子のL1・L2・L3・L4・L5に大別される(図1A)。初期遺伝子は主にウイルスDNAの複製に、後期遺伝子は主にカプシドなどの構造タンパク質の合成に関与する。遺伝子治療用ベクターとして用いられているアデノウイルスベクターは、70以上にも及ぶウイルスタンパク質の合成を誘導する初期遺伝子であるE1領域(E1領域はE1AとE1Bに分けられ、E1Aにより全てのアデノウイルスのプロモーターが活性化される)を外来遺伝子に置き換え、E1タンパク質をトランスに供給できる細胞株である293細胞(ヒト胎児由来腎細胞をアデノウイルスでトランスフォームして作製された細胞株で



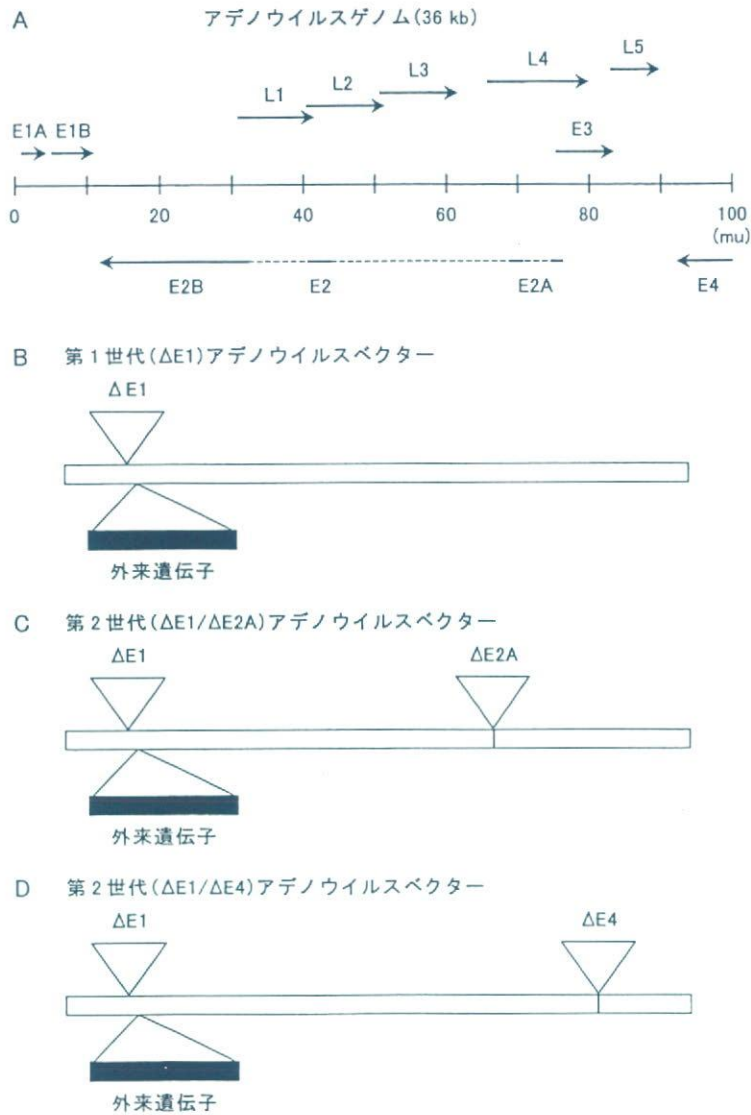


図1 アデノウイルスの遺伝子構造と第1世代・第2世代アデノウイルスベクター

A. アデノウイルスの遺伝子構造

初期遺伝子領域の E1, E2, E3, E4 と後期遺伝子領域の L1, L2, L3, L4, L5 の転写単位を示した。ウイルス DNA を 0-100 のマップ単位 (mu) で表した。

B. 第1世代 (E1 欠損型) アデノウイルスベクター

C. 第2世代 (E1 欠損/E2A 欠損型) アデノウイルスベクター

D. 第2世代 (E1 欠損/E4 欠損型) アデノウイルスベクター

注) 第1・第2世代のベクターとも、E3 領域も除かれることが多い。

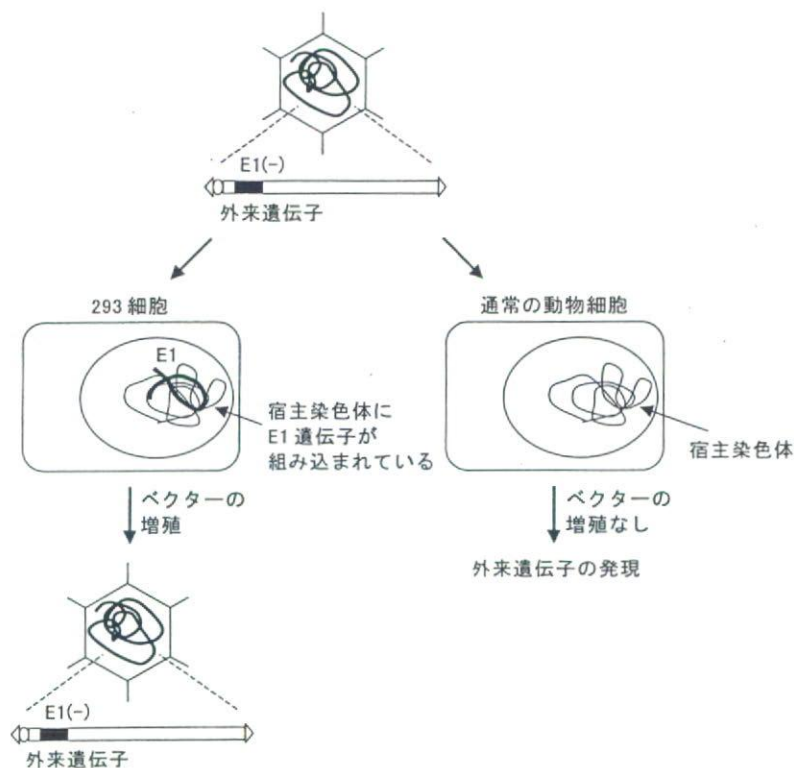


図2 非増殖型アデノウイルス

あり、E1 遺伝子を含むアデノウイルス DNA の一部を持っている)などで増殖させる。したがって、E1 領域を欠損したベクターは、理論上 E1 遺伝子産物を発現していない通常の細胞では増殖できず、増殖不能ウイルスとなる(図2)。また、E3 領域はウイルスの増殖には必須ではないため、外来遺伝子の挿入サイズの上昇を目的に除かれることが多い。アデノウイルスは野生型ゲノムサイズの105%までのゲノムをカプシド内にパッケージングすることができるため、E1 および E3 領域を欠損することにより、最大約 8.1 kb までの外来遺伝子を挿入できるベクターが開発されている<sup>5), 6)</sup>。

## 2. アデノウイルスベクターの特徴

アデノウイルスベクターの特徴としては以下のようことが挙げられる。1)種を問わず多くの種類の細胞に遺伝子導入でき、既存のベクターの中では最も遺伝子導入効率のよいものの1つである。培養細胞に感染させた場合には、初代培養細胞を含めてほとんどの細胞で100%の効率で外来遺伝子を発現させることができる。2)増殖停止期の細胞に対しても効率よく遺伝子導入できる。3) *in vivo* の組織への直接の遺伝子導入にも適している。例えば、本ベクターをマウスやラットに静脈内投与すると90%以上のベクターが肝臓に移行し、100%の肝細胞で外来遺伝子の発現がみられる。また、脳や腫瘍、筋肉などの組織に直接投与する

と、局所での効率のよい外来遺伝子の発現が得られる。4)高タイター( $10^{11}$  PFU/mL以上)のウイルスが比較的容易に得られる。5)物理化学的に安定であり遠心により濃縮が可能である。6)比較的大きな外来遺伝子(最大約8.1 kb)を挿入できる。7)ウイルスゲノムは核内では染色体外DNAとして存在し、宿主の染色体に組み込まれる頻度は低い。そのため、遺伝子毒性(外来遺伝子が宿主染色体に組み込まれることによる細胞の癌化など)を引き起こす可能性が極めて低い。これは逆に、分裂が盛んな細胞においては導入コピー数は分裂ごとに希釈されることを意味する。一方、分裂停止期の細胞においては数週間から数ヶ月間の持続した遺伝子発現がみられる。したがって、一般的にはアデノウイルスベクターは“持続性の長い一過性の発現ベクター”と考えられている。

これらの性質により、アデノウイルスベクターは単に遺伝子治療のための有望なベクターというだけでなく、動物個体の組織で目的遺伝子を直接発現させてその機能を解析したり、ヒトゲノム配列解読後の各遺伝子の機能解析を目的とした研究において最も重要なツールとしても注目されている。

一方欠点としては、血球系の細胞などアデノウイルス受容体であるCARの発現が乏しい細胞への遺伝子導入効率が低いこと、高濃度のベクターを作用させると細胞毒性を示すことがあること、免疫反応を引き起こすことなどが挙げられる(これらの欠点を克服するための方法については後述する)。

### 3. アデノウイルスベクターの作製法

従来、アデノウイルスベクターは293細胞内での相同組換えを利用して作製されていた<sup>5), 7)</sup>。すなわち、目的遺伝子の発現単位をE1領域の上流と下流のゲノムDNAの一部の間に組み込んだプラスミド(あるいはコスミド)と、E1領域を除く

ウイルスゲノム全長(あるいはE1領域を除くウイルスゲノム全長を有するプラスミド)を293細胞にコ・トランスフェクションし、E1領域前後の相同な遺伝子配列領域間での相同組換えを期待し、E1領域を外来遺伝子に置き換えるというものである。しかしながら、動物細胞内での相同組換えの効率がよくないことや、煩雑な作業を必要とすること、293細胞の染色体に組み込まれているE1遺伝子とも相同組換えを起こし、高頻度に野生型のウイルスからなるクローンも生成するといった問題点があり、ベクターの作製はそれほど容易なものではなかった。これはアデノウイルスのゲノムサイズが約36 kbと巨大なため単一の制限酵素切断部位を得ることが困難であり、プラスミド構築に基づいて簡単にE1領域を外来遺伝子に置き換えるような方法が開発されていなかったことに起因している。

著者らは、これまであまり用いられることのなかったI-CeuIとPI-SceI(これらの酵素はアデノウイルスゲノムを切断しない)という少なくともそれぞれ9-10, 11 bpを認識する制限酵素に着目し、これらの酵素の認識配列をE1欠損領域に組み込むことによって、簡便な1ステップの*in vitro*ライゲーションに基づいたプラスミド構築で外来遺伝子をE1欠損領域に挿入する方法を開発した<sup>6), 8), 9)</sup>(図3)。作製した組換えプラスミドをゲノム両端に存在する制限酵素PacIで処理することにより線状にし、293細胞にトランスフェクションすると、組換えアデノウイルスが生じる。本法は、1)簡便なプラスミド構築に基づいているため、特別な試薬・テクニックを必要とせず、だれでも簡単にウイルスDNAに相当するプラスミドの作製が可能であり、2)相同組換えを必要としないため効率がよい、3)均一なウイルスDNA(に相当するプラスミド)を293細胞へ導入することによりウイルスを作製するので、野生型ウイルスからなるクローンを生成する可能性は極めて低く(4.1項で述べるように、ベクター増殖中に野生型ウイル

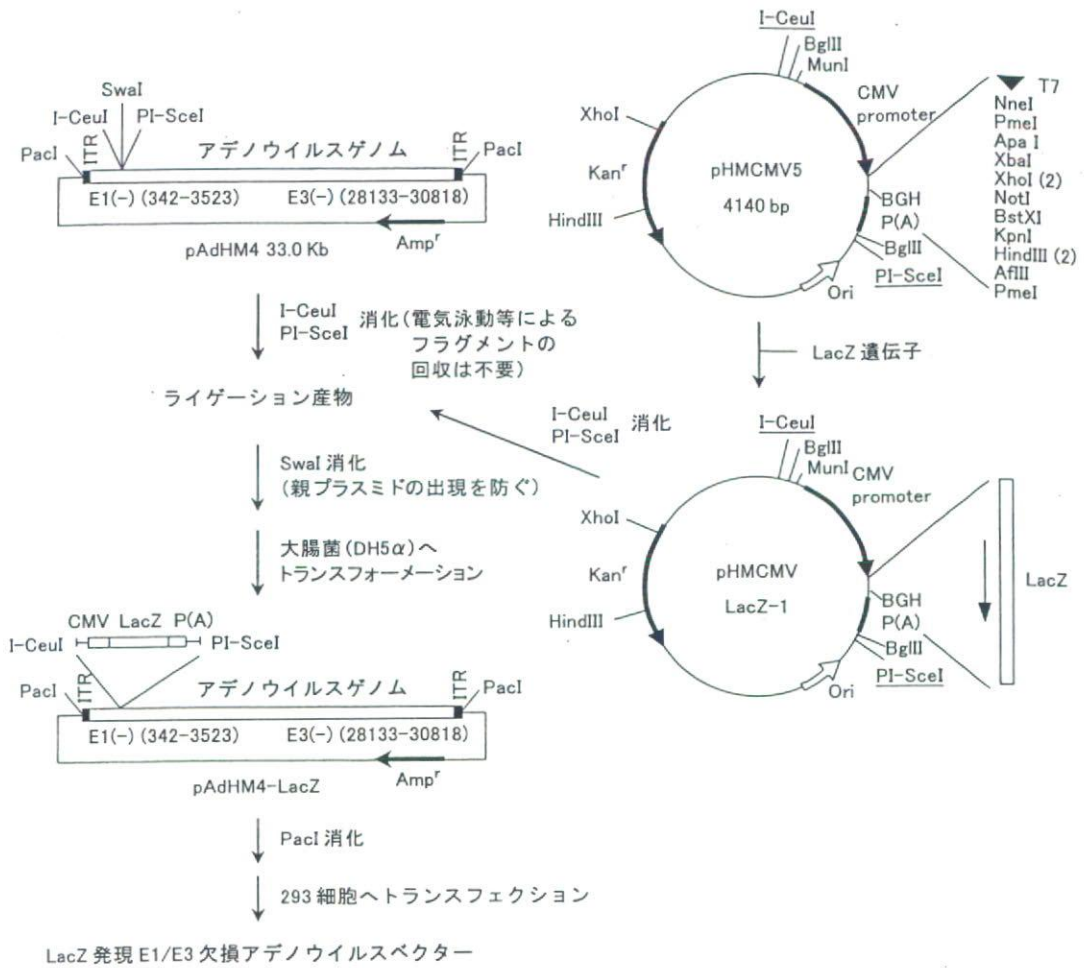


図3 βガラクトシダーゼ(LacZ)発現E1/E3欠損アデノウイルスベクターの作製例

I-CeuI と P1-SceI 配列を有したシャトルプラスミド pHMCMV5(カナマイシン耐性遺伝子を持っている)に LacZ の遺伝子を組み込んだプラスミドと、E1 欠損領域にユニークな制限酵素部位の I-CeuI, SwaI, P1-SceI 認識配列を持ち E1/E3 領域を除去したアデノウイルス全ゲノムを有したベクタープラスミド pAdHM4 を、I-CeuI と P1-SceI で切断し、両者を直接ライゲーションする。ライゲーション産物を SwaI 消化(組換えプラスミドは SwaI 部位を消失しているが親プラスミドは SwaI 部位を持っているため、SwaI 消化することで親プラスミドは大腸菌に導入しても生育しない)し、大腸菌にトランスフォーメーション、アンピシリンプレートに播種すると、LacZ 発現単位を E1 欠損領域に有した目的の組換えプラスミドのみが選択できる。生じたプラスミドをゲノム両端に存在する制限酵素 PacI 部位で切断することにより線状にし、293 細胞にトランスフェクションすると、組換えアデノウイルスベクターができる。なお、本システムでは、第 1 世代のベクターである E1(あるいは E1/E3) 欠損型のベクター作製が可能なベクタープラスミド pAdHM3, -4, -10, 第 2 世代の E1/E3/E4 欠損型のベクター作製が可能な pAdHM12(E4 発現 293 細胞が必要)、プロモーターカセットを有していないシャトルプラスミド、CMV あるいは RSV のプロモーターカセットを既に有しているシャトルプラスミドなど様々なベクターシステムが用意されており、研究目的に合わせて使い分けることができるようになってきている。