

でも変化することが知られており、このようなバンドを治療方針決定のための根拠、すなわち白血病などの副作用の発現の目安として使うことは出来ないとされた。特に、遺伝子導入細胞のクローナリティー(クローン増殖)の傾向が、従来から用いられている信頼性の高い方法によっても認められた場合には、より頻繁に被験者のモニタリングを行う必要があるとの結論が出された。

臨床における副作用発現を未然に防ぐための管理方法として、遺伝子導入細胞のクローナリティーをより高感度でかつより高い信頼性をもって監視するため、複数の方法を組み合わせることが科学的に妥当であると議論で確認された。さらに、新しい検査方法がまだ開発途上にあることから、将来も必要に応じて科学的検査が行えるよう、被験者の検体などの試料の保管が推奨されている。

その後、4例目の白血病発症も確認され、現在もフォローアップがつづけられている。X-SCID 遺伝子治療による白血病発症の主要因についてはいまだ不明であるが、同様の治療を実施していまだ白血病発症が認められていないイギリスでの遺伝子治療を含め、従来のベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療はこれ以上行わないとされている(イギリスでは患児の治療が予定されたエントリー数に達したためとされている)。近いうちに、より安全性を高めたベクターを用いて X-SCID 遺伝子治療が再開される予定になっている。

#### 5. 遺伝子治療臨床試験に参加した被験者の長期フォローアップ(追跡)調査のFDAガイドラインに関する議論

FDAは、遺伝子治療を受けた被験者の長期フォローアップに関するガイダンスとして、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療薬治験に参加した被験者の増殖性ウイルス(RCV)感染の監視に特化したガイダンス「レトロウイルスベクターをもとにした遺伝子治療薬に混入する増殖性レトロウイルス試験およびレトロウイルスベクターを用いた治験の患者の追跡調査に関するガイダンス追補」を2000年9月に発出した(2006年11月改正<sup>10)</sup>。

しかしその後、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療による白血病発症という深刻な

有害事象が発生し、また、その他のベクターによる遺伝子治療の長期フォローアップに関するガイダンスも必要とされたことから、FDAは、長期フォローアップに関するガイドラインの作成を検討し、原案について2004年のGT-DGで議論を行った。

その後、FDAは2005年8月に「製薬業界へのガイダンス：遺伝子治療臨床試験-遅発性の有害事象に関する被験者の観察」案を提出した。このガイドライン案では、遺伝子治療臨床研究のうち遅発性有害事象のリスク評価により長期フォローアップが必要と判断されるものについては、① 被験者の長期フォローアップ調査を遺伝子治療実施後15年間は実施するよう計画する必要がある。② その間に収集しなければならないデータとしては、悪性腫瘍、神経疾患、リウマチ性疾患、免疫性疾患・血液疾患などの新たな臨床症状の発症の有無のほか、ベクター配列の持続性をベクターが検出されなくなるまで継続実施する必要がある。また、組み込み型ベクターによる造血幹細胞遺伝子治療の場合には、クローナリティーの評価を実施する必要がある。③ 遺伝子治療実施後5年間は最低、年に一度の健康診断・検査によるフォローアップ調査を、その後6~15年目までは調査票によるフォローアップ調査を実施しなければならない。また、これに用いる調査票の内容は、わかりやすいものにとどめておく必要があるとされている。④ このフォローアップ調査の結果は、遺伝子治療臨床試験に参加した被験者における長期リスクを評価するために、毎年とりまとめてFDAに報告することを求めている。

FDAは、2006年11月に上記ガイダンスを発出した<sup>11)</sup>。本ガイダンスは前出のレトロウイルスベクターに関するガイダンス<sup>10)</sup>を補足する内容ともなっている。

#### 6. 腫瘍溶解性ウイルス製品の品質・安全性確保と公開ワークショップ

腫瘍溶解性ウイルスとは、正常細胞では増殖できず、腫瘍細胞で選択的に増殖して細胞を溶解することが可能な制限増殖ウイルスであり、これまで十分な効果がみられてこなかった従来のがん治療遺伝子治療にかわる新たな治療法として期待されている

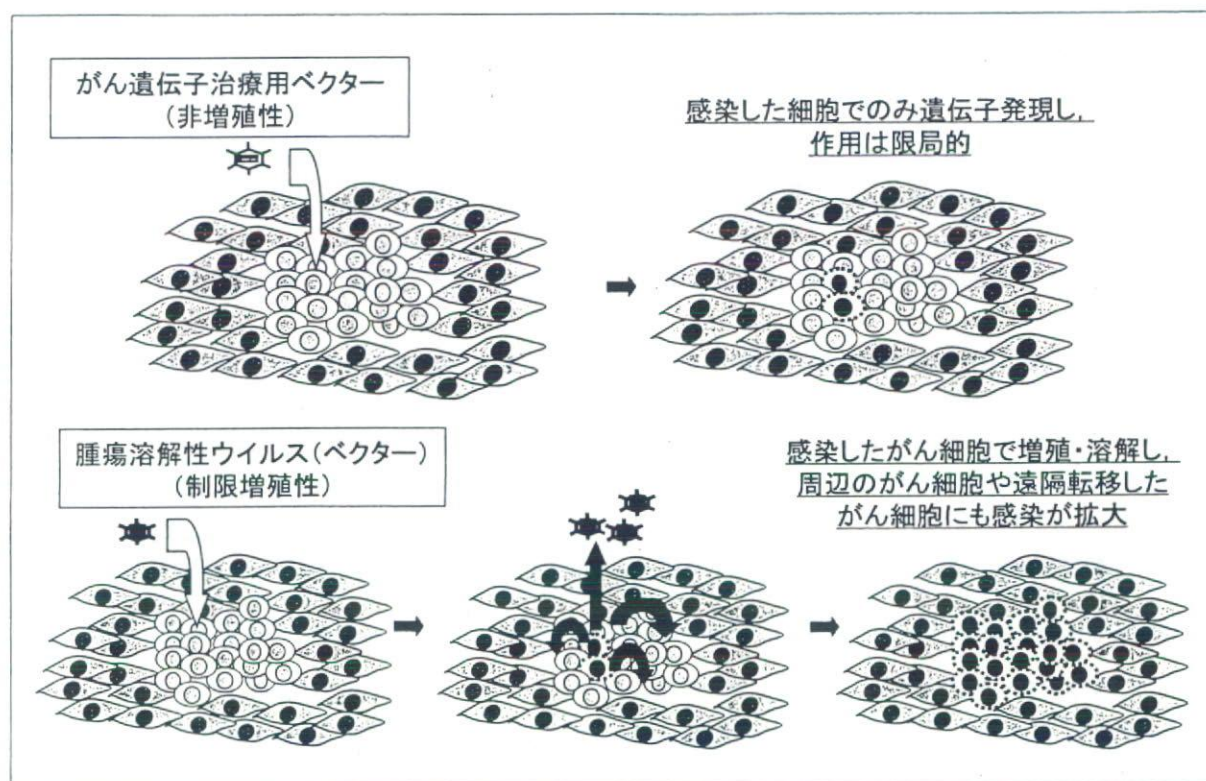


図1 遺伝子治療用ベクターと腫瘍溶解性ウイルスの違い  
腫瘍溶解性ウイルスは、正常細胞内では増殖できないが、標的とするがん細胞内で選択的に増殖可能な制限増殖型ウイルスである。

ものである(図1)。腫瘍溶解性ウイルス開発は、腫瘍特異的に増殖する野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを用いた研究から、遺伝子改変技術を用いた病原性の除去や腫瘍指向性をより高めた制限増殖性ウイルスベクターを用いるものへと移行しつつある(図2)。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<sup>12-16)</sup>。しかし、腫瘍溶解性ウイルスの臨床適用は未知・未経験の要素も多い領域であり、基礎となる科学的知見も十分に集積されていないことから、GT-DGでは、品質確保の方策、安全性や有効性評価のための動物を用いた非臨床試験のあり方、さらには臨床研究における安全性・有効性評価などを議論するために、公開ワークショップを開催して議論を行い、その成果をコンセプトペーパーとして公開した。

腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性には、①腫瘍溶解性ウイルスの選択・設計(野生型・弱毒型・遺伝子組換え型)、②動物やヒトで期待される効果の

評価、③ウイルス複製の腫瘍選択性、④臨床上の安全性、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排出の測定法とデータ、などが特に重要な課題とされている。

#### (1) 腫瘍溶解性ウイルスの設計および特性解析

現在使用されている腫瘍溶解性ウイルス開発では、腫瘍細胞内で選択的に複製する非組換えウイルスを用いる場合と遺伝子組換え型ウイルスを用いる場合がある。通常の遺伝子治療では、ベクター中のRCVの検出が品質・安全性の観点から重要であるが、腫瘍溶解性ウイルスは制限複製能を持つことから、RCVの検出よりも目的ウイルスの変化体をどのように検出するかが重要とされている。また、品質の恒常性の観点から、ウイルス感染性力価ばかりでなく、力価に対する粒子数の比を規格化することが重要とされた。

#### (2) 非臨床試験

腫瘍溶解性ウイルスの安全性評価や目的とする効

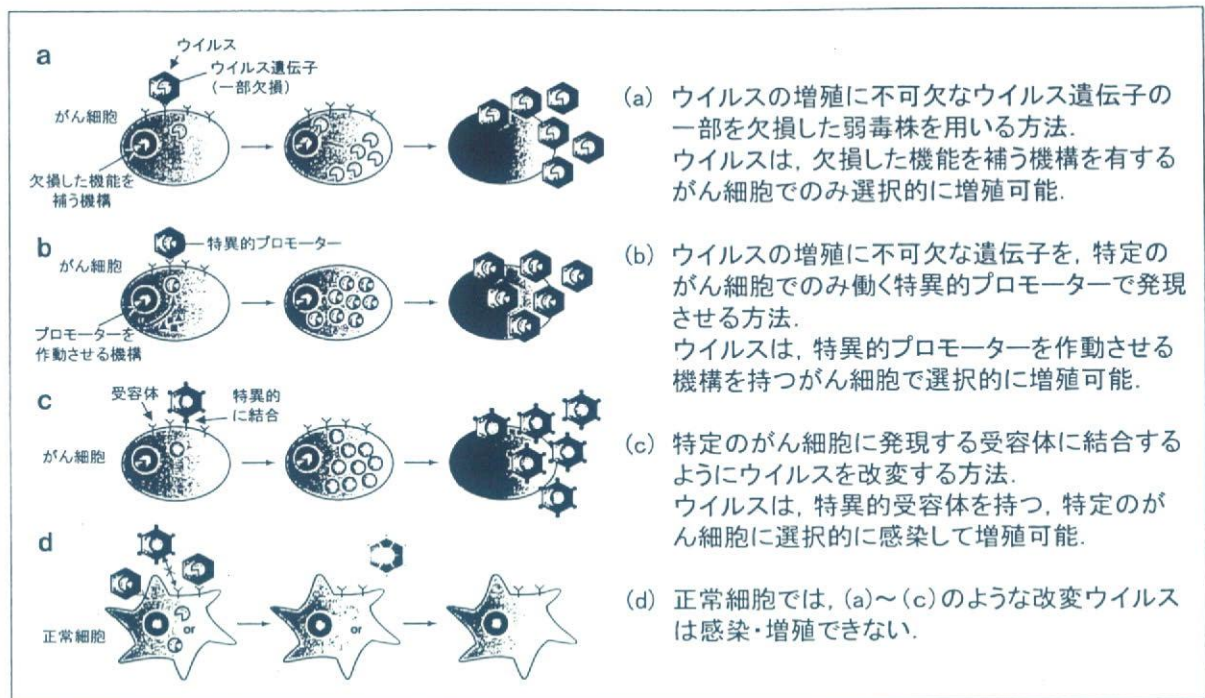


図2 ウイルスをがん細胞で選択的に増殖させる方法  
(Ries SJ et al., 2004<sup>13)</sup>, Fig 1 より改変)

果が得られるかの評価に、動物モデルが有用であることが一致した意見であった。しかし、① 腫瘍溶解性ウイルスの感染および複製能に動物種特異性があること、② 動物にヒト腫瘍細胞を移植した腫瘍モデル動物では、ウイルスがヒト体内とは異なる指向性・分布を示すこと、③ 動物での免疫反応がヒトとは異なること、などから動物モデルの限界も指摘されている。

しかし、生体内分布や安全性・毒性の評価、臨床での投与経路や用法・用量の選択などに関して、動物モデルが有用な情報を与えるということについてはコンセンサスが得られている。腫瘍選択性に関しては、非腫瘍細胞培養株および腫瘍細胞培養株を用いた試験、またはヒト正常組織およびヒト腫瘍組織からの初代組織片培養を用いた試験が有用とされている。

### (3) 臨床研究

腫瘍溶解性ウイルスは、その複雑な特性から、開発の基礎段階で十分に特性解析することが困難であり、また有用な動物モデルが必ずしも存在するわけではないことから、臨床研究の開始に当たっては多

くの検討すべき課題があるとされた。

### (4) 臨床薬物動態

臨床薬物動態の解析手法として、被験者のモニタリングにはPCR、感染力力価試験のいずれも用いられている。いくつかの腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究において、血液中に検出されるウイルス量は投与直後と4~7日目にピークが認められた。このような2相性のピークは、局所投与および静注した場合のいずれでも観察されており、ウイルスの複製をモニターする手段となりうるとされている。

また、用法・用量設定の必要性、腫瘍溶解性ウイルスに対する患者の中和抗体の影響が重要な課題であるとされている。さらに、腫瘍溶解性ウイルスの体外排出に関する予防措置も大きな課題である。

### (5) 腫瘍溶解性ウイルス開発の今後の展望

腫瘍溶解性ウイルスの開発の新たな流れとして、化学療法や放射線療法と腫瘍溶解性ウイルス療法を組み合わせる併用療法の有用性が示唆されており、今後このような併用療法の開発が進むものと考えられる。腫瘍溶解性ウイルスの設計改良のアプローチとしては、免疫反応を活性化する遺伝子などの治療

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

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

用遺伝子をウイルスゲノムに挿入する遺伝子治療との組み合わせや、腫瘍細胞へのターゲティング能の増強などが行われている。また、殺腫瘍効果の作用機序を解明できるデータを得るための非臨床試験および臨床試験の取り組みも行われている。

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

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

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

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

を求めている。

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

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

#### GT-DGの今後の活動

ICH GT-DGの活動では、遺伝子治療をめぐって取り組むべき課題がより明確になりつつあることや、ここに来てICH各極で遺伝子治療用医薬品の規制当局への承認申請が出されていることへの早急な対応もあり、ICH見解の作成やガイドライン策定を見据えた議論も行われるようになってきている。今後、ベクターの排出に関する見解の作成やガイドライン化、腫瘍溶解性ウイルスに関する見解の作成など、いくつかの重要な科学的コンセプトが出されていく予定になっている。

わが国における遺伝子治療の臨床研究の数は欧米にくらべて非常に少なく、臨床研究での情報は多くが海外に依存している現状であることは否めない。しかし、ここ数年はわが国においても遺伝子治療薬の開発が急速に進んでおり、遺伝子治療薬に関するICH見解やガイドラインの策定が、わが国における遺伝子治療薬開発の促進につながっていくと期待される。

#### 文 献

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

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



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

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

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

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

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

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

Available online 25 May 2007

## Abstract

*N*-Glycolylneuraminic acid (NeuGc), an acidic nine-carbon sugar, is produced in several animals, such as cattle and mice. Since human cells cannot synthesize NeuGc, it is considered to be immunogenic in humans. Recently, NeuGc contamination was reported in human embryonic stem cells cultured with xenogeneic serum and cells, suggesting that possibly NeuGc may harm the efficacy and safety of cell therapy products. Sialic acids have been determined by derivatization with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) followed by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS); however, the limited availability of cell therapy products requires more sensitive and specific methods for the quality test. Here we studied the use of nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron resonance mass spectrometry (nanoLC/FTMS) and nanoLC/MS/MS for NeuGc-specific determination at a low femtomole level. Using our method, we found NeuGc contamination of the human cell line (HL-60RG cells) cultured with human serum. Our method needs only  $2.5 \times 10^3$  cells for one injection and would be applicable to the determination of NeuGc in cell therapy products.  
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

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

## 1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

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

### 2.2. Cell culture

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

### 2.3. Fractionation of the membrane fraction

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

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

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

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

### 2.5. nanoLC/FTMS

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

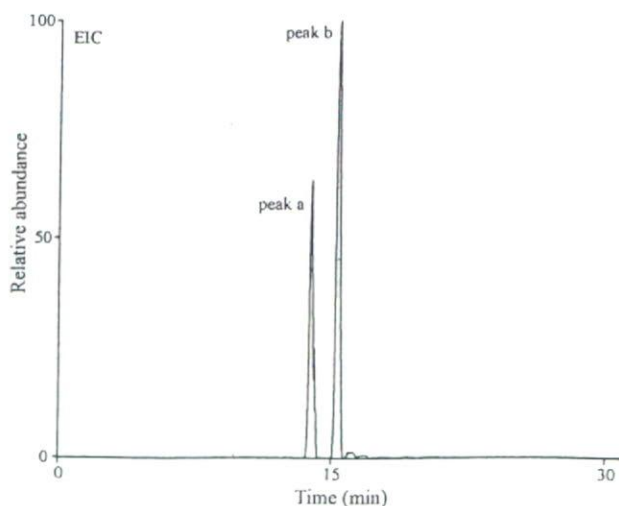


Fig. 1. EIC at  $m/z$  426.13–426.17 and  $m/z$  442.12–442.16 obtained by SIM ( $m/z$  400–450) of DMB-NeuGc and DMB-NeuAc in the positive ion mode.

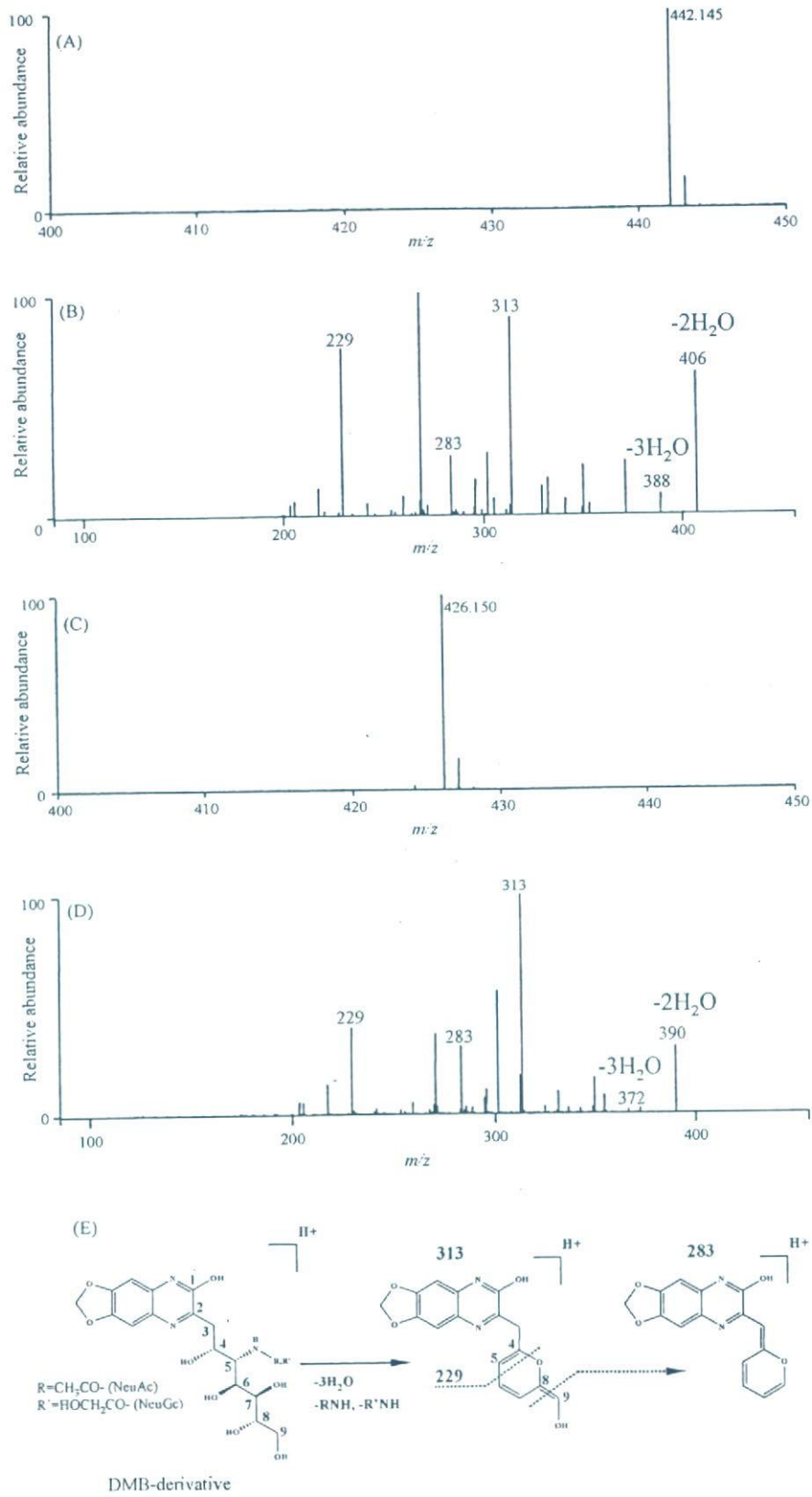


Fig. 2. (A) Typical MS spectrum of peak a. (B) MS/MS spectrum of  $[M+H]^+$  ( $m/z$  442.145) acquired from around peak a. (C) Typical MS spectrum of peak b. (D) MS/MS spectrum of  $[M+H]^+$  ( $m/z$  426.150) acquired from around peak b. (E) Fragmentation of DMB-NeuGc and DMB-NeuAc.



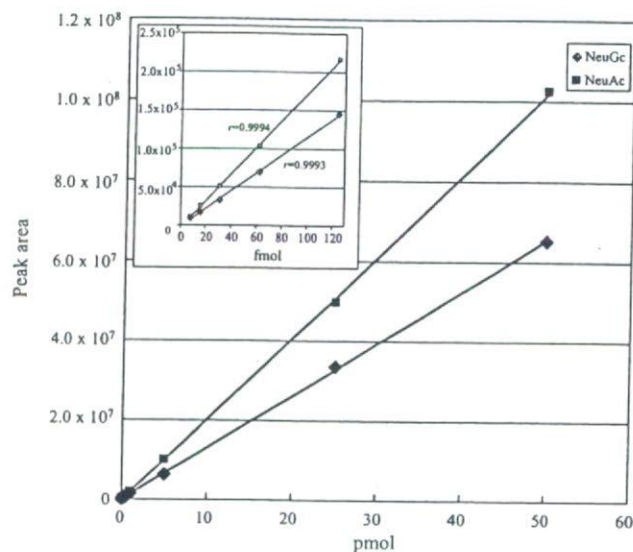


Fig. 3. Calibration curves of DMB-NeuGc ( $r=0.9998$ ) and DMB-NeuAc ( $r=0.9995$ ).

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

## 2.6. Method validation

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

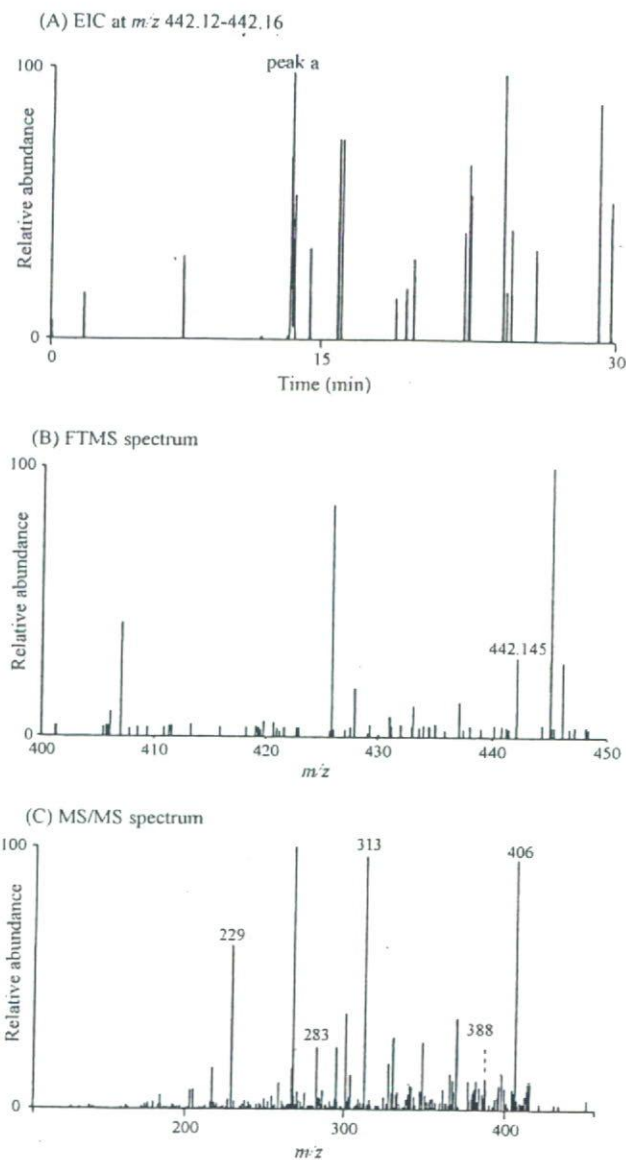


Fig. 4. Detection of DMB-NeuGc in the membrane fractions of HL-60RG cells ( $2.5 \times 10^3$ ) cultured with 10% FCS. (A) EIC at  $m/z$  442.12–442.16 obtained by SIM. (B) Typical MS spectrum of peak a. (C) MS/MS spectrum of  $[M+H]^+$  ( $m/z$  442.145) acquired from around peak a.

## 3. Results and discussion

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

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

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

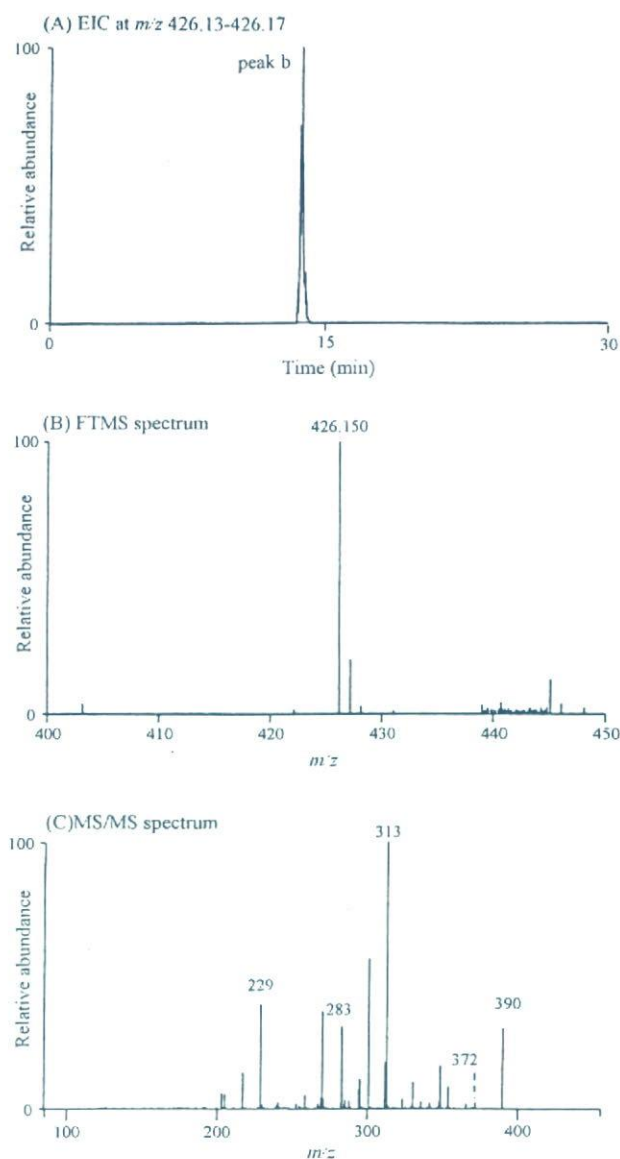


Fig. 5. Detection of DMB-NeuAc in the membrane fractions of HL-60RG cells ( $2.5 \times 10^3$ ) cultured with 10% FCS. (A) EIC at  $m/z$  426.13–426.17 obtained by SIM. (B) Typical MS spectrum of peak b. (C) MS/MS spectrum of  $[M+H]^+$  ( $m/z$  426.150) acquired from around peak b.

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

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

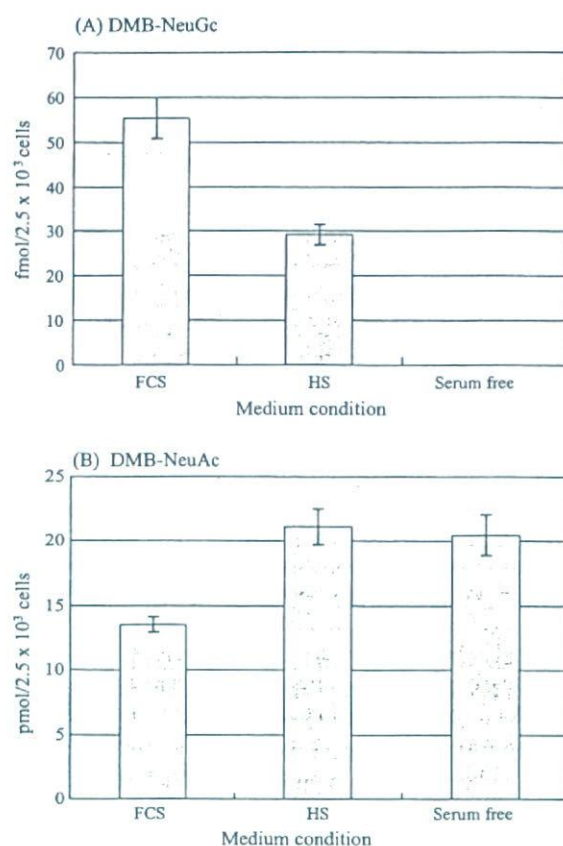


Fig. 6. Levels of (A) NeuGc and (B) NeuAc in the membrane fraction of HL-60RG cells ( $2.5 \times 10^3$ ) cultured with 10% FCS, 10% human serum (HS) and serum-free medium. Values are the means  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

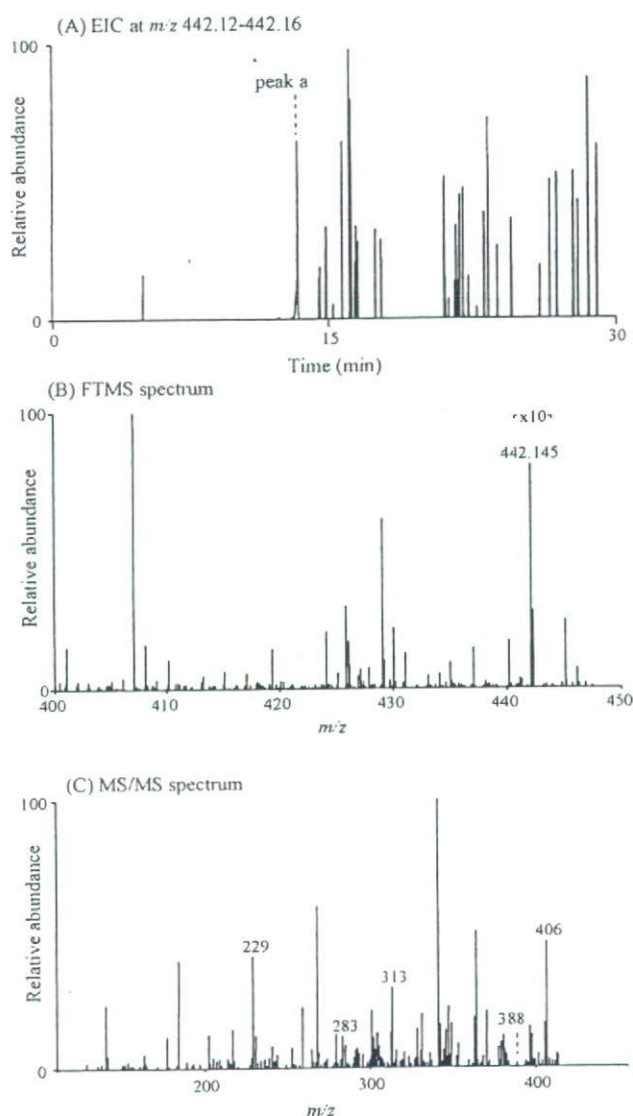


Fig. 7. Detection of DMB-NeuGc in the membrane fractions of HL-60RG cells ( $2.5 \times 10^3$ ) cultured with 10% human serum. (A) EIC at  $m/z$  442.12–442.16 obtained by SIM. (B) Typical MS spectrum of peak a. (C) MS/MS spectrum of  $[M + H]^+$  ( $m/z$  442.145) acquired from around peak a.

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

## Acknowledgements

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

## References

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

## 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

石井(渡部)明子, 山口 照 英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

### 1. はじめに

ゲノムプロジェクトの成果やバイオテクノロジー、発生学、幹細胞学などの科学・技術の飛躍的な発展を受けて、遺伝子治療薬や細胞治療薬（再生医療）の開発が大きく進んでいる。遺伝子治療では、ベクターや遺伝子導入方法、周辺技術の改良や知識の集積などによって、一部の先天性遺伝子疾患に関してはめざましい治療効果が見られるようになってきている。また、ガン細胞で特異的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する腫瘍溶解性ウイルスなど、これまでの遺伝子治療用ベクターとは全く発想の異なる技術開発も行われるようになってきている。さらには、siRNA や miRNA による遺伝子発現制御の発見を受け、タンパク質発現を目的としない RNA 転写のみを目的とするベクターの開発も進んでいる。

一方、細胞治療（再生医療）の開発研究では、国内では200を超える臨床研究や治療薬の開発が進んでおり、国際的にも多様な治療薬の開発が先進国のみならず、ASEAN 諸国を始め様々な国で開発研究が進められている。EU では加盟国独自の規制から欧州医薬品庁での中央審査に移行する動きが始まっており、規制状況も大きく変わろうとしている。

本総説では、遺伝子治療薬や細胞治療薬などの先端技術医薬品の開発動向を含め、このような先端医薬品のウイルス安全性確保の問題点や

その解決のための技術開発について概説する。

### 2. 遺伝子治療薬の開発とウイルス安全性

1990年に世界で最初のアデノシンデアミナーゼ欠損症（ADA-SCID）の遺伝子治療が開始され、患者の細胞を遺伝子改変して治療を行うというまったく新しい治療法が世に出された<sup>1)</sup>。それ以降、世界中で非常に多種多様な遺伝子治療臨床研究が実施されてきている（図1）。このような遺伝子治療薬の開発動向を受け、欧米や日本でも遺伝子治療薬の品質・安全性・有効性を確保するための指針が制定された<sup>2-5)</sup>。これらの指針の中で、遺伝子治療薬のウイルス安全性確保に関しては、*in vitro* 及び *in vivo* ウイルス迷入試験やヒト由来細胞を用いる場合の各種ヒトウイルス否定試験、製造（培養）に用いる血清や動物由来因子の安全性試験などについて言及している。さらに、ベクター製造に用いられるセルバンクシステムに関しては日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）で策定された ICH-Q5A ガイドライン「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」<sup>6)</sup> に基づいた評価が求められる。本稿では、遺伝子治療薬のウイルス安全性に関する基本的事項に関しては各ガイドラインを参考にされるものとして、現在 ICH 等で議論されている遺伝子治療薬のウイルス安全性に絞って概説することとする。

遺伝子治療臨床研究は、当初は、遺伝子挿入

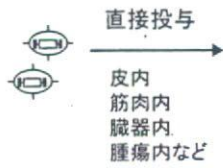
Viral Safety of Gene therapy and Cell Therapy Products

Eriko UCHIDA, Division of Cellular and Gene Therapy Products

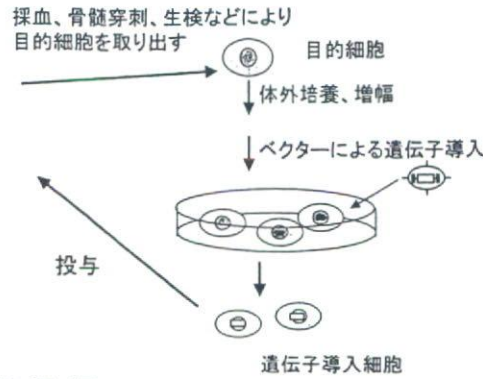
Akiko ISHII-WATABE, Teruhide YAMAGUCHI, Division of Biological Chemistry and Biologicals

National Institute of Health Sciences

遺伝子治療薬  
(ベクター)の直接投与



遺伝子導入細胞の投与



ベクター：細胞へ遺伝子を導入する際の運び屋

図1 遺伝子治療とは

表1 ICH 遺伝子治療専門家会議 (GTDG)

2001年5月 ICH SC

「遺伝子治療用医薬品など急速に進展している領域においては、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/共有を積極的に継続して行う必要がある」



ICH 内に、遺伝子治療専門家会議 (Gene Therapy Discussion Group ; GTDG) を新設

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

変異等の安全性に関するさまざまな懸念から、有効性よりも安全性に重点を置いて実施されてきた。しかし、実際に多くの遺伝子治療臨床研究が開始されると、当初危惧された挿入変異やさまざまな安全性に関連する有害事象はほとんど認められず、力点が有効性に移るようになった。特に、多くのケースで目的とする臨床効果が得られないのは、用いた遺伝子治療用ベクターがコードする目的遺伝子からの発現が十分でなく、発現産物が少ないためと考えられるようになり、いかにして目的遺伝子を高発現するベクターを開発するかが重要なポイントと考えられるようになった。しかし、1999年に米国ペンシルベニア大学でのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、遺伝子治療薬の投与が原因で患者が急死するという初めての事故が発生し<sup>7)</sup>、遺伝子治療薬の品質や遺伝子治療の安全性確保が再度クローズアップされることとなった。

以上のような背景から、2002年に ICH の中に遺伝子治療薬の品質・安全性・有効性に関する様々な問題を科学的に討議するために遺伝子治療専門家会議 (Gene Therapy Discussion Group : GT-DG) が発足した (表1)。ICH における GT-DG の活動としては、周辺技術を含め急激に進歩する遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するために、公開ワークショップの開催や ICH ホームページ等を通じて得られた議論の成果を広く公開すると共に、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これまで GT-DG で取り上げた話題について表2にあげたが、非常に多岐に渡る科学的課題について議論を行ってきた。

本稿では、特に ICH の GT-DG での議論を中心に、遺伝子治療薬を巡る最近の動向とウイルス安全性について概説するとともに、我々のデータについても紹介する。

表2 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 type 5)
- ・ Minimize of the Risk of Germline transmission
- ・ Insertional mutagenesis
- ・ Oncolytic virus (Workshop)
- ・ Long term follow up (FDA Guideline 案)
- ・ Lentiviral vector (EMA Guideline 案)

### 1) 遺伝子治療の光と影

ペンシルベニア大学でのアデノウイルスベクターを用いた先天性代謝疾患 (OTC 欠損症) の遺伝子治療で発生した死亡事故は、その事故原因について徹底的な解析が行われた結果、アデノウイルスベクターの動脈内への過剰投与による異常免疫反応が原因と結論された<sup>8)</sup>。この教訓から、アデノウイルス参照品を用いて治療に用いるアデノウイルスベクターの特性・品質管理を行うことが提案され、FDA および欧米の産官学で構成されるアデノウイルス参照品作業委員会 (Adenovirus reference material working group) により2002年にアデノウイルス5型参照品 (国際標準品) が策定された<sup>9)</sup>。この参照品を用いてアデノウイルスベクター製品の粒子数や感染力価を測定することにより、異なる施設/研究で測定されたウイルス粒子数および力価のデータ同士を科学的に比較することが可能である。

一方、1999年からフランスのネッカー病院で実施されたレトロウイルスベクターによるX連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する遺伝子治療では、10例中9例で非常に有効な成績が得られ、遺伝子治療で初の成功例と報告された<sup>10,11)</sup>。しかし治療から約3年後、遺伝子の染色体挿入が原因となり、2名の患児にT細胞白血病様症状が発症するという重篤な副作用の発現が判明した<sup>12)</sup>。その後1名は白血病で死亡し、また3例目の発症も報告された。このような重篤な副作用の原因として、癌遺伝子であるLMO2領域への挿入変異が起きたことが一つの要因とされているが、イギリスで実施されている同様の遺伝子治療では、現在までこのような副作用は認められていない。しかし、現時点でもフォローアップが続いており、これらの原因の究明はかなり先にならざるを得ない<sup>13)</sup>。

注) その後4例目の白血病患者が出たとの報告があった。

このようなフランスでのX-SCID 遺伝子治療による重篤な副作用発現は、遺伝子導入効率の非常に高い遺伝子治療用ベクターや導入条件が開発されたためともいえる。表3に示すように、X-SCID や ADA-SCID<sup>11)</sup>、さらには慢性肉芽腫症 (CGD) 遺伝子治療<sup>13)</sup> で非常にめざましい治療効果が認められるようになり、無菌室でしか生活出来なかった患児が室外で生活出来るようになり、普通の学校生活が送れるようになってきている。すなわち遺伝子治療で患者が治癒出来る時代に到達したといえる。しかし、上記の

表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

- ・ 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)
- ・ 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

ように安全性面からも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。

2) 遺伝子治療用ベクターに含まれる増殖性ウイルス検出

図2は世界で実施された遺伝子治療臨床研究の件数をベクターごとに分類したものである(ワイリー出版のデータ (<http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical/>)) を改変)。用いられるベクターとしては、アデノウイルスやレトロウイルスが約半数を占めている。これらのウイルスベクターの作製においては、生産細胞内において相同組換えにより増殖能を持ったウイルスが出現する可能性がある。従って、遺伝子治療用ベクターの製造では増殖性ウイルスの試験

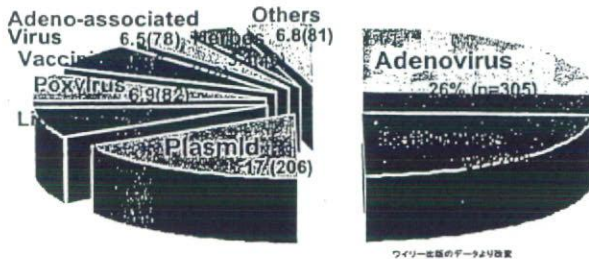


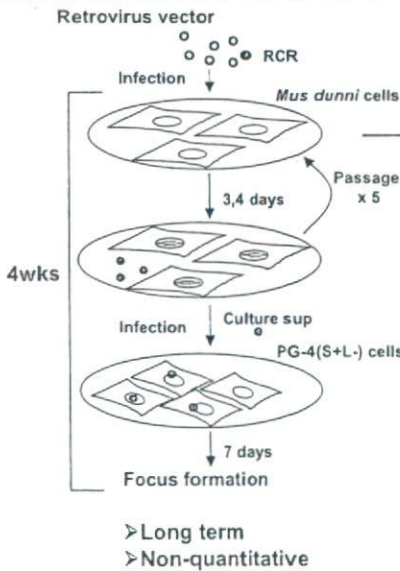
図2 世界の遺伝子治療臨床研究で用いられているベクターの種類

が必要とされている。

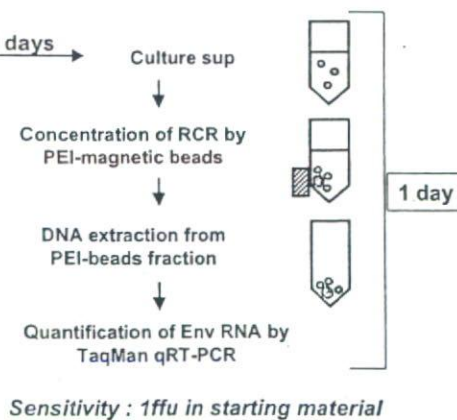
一方、このような治療用ベクターに存在する増殖性ウイルスの検出では、共存するベクターによって検出しようとする増殖性ウイルスの感染性試験が妨害されることが知られており、この点に充分配慮した試験を行う必要がある。

そこで、大量に存在するレトロウイルスベクターに混入する微量の増殖性レトロウイルスを検出するために、FDAのガイドライン<sup>14)</sup>ではMus dunni細胞へ感染を繰り返し(通常5回継代を繰り返す)、ついで指標細胞であるPG-4(S+L-)細胞へ感染させ、フォーカス形成を指標として検出する方法が示されている。しかし、この方法は結果が出るまで一ヶ月近くを要するため、我々はMus dunni細胞に感染後、培養上清に産生されてくるレトロウイルスを濃縮して定量的RT-PCR法にて検出する方法(感染性PCR法)を開発した(図3)。ウイルスの濃縮には、ポリエチレンイミン磁気ビーズ(PEIビーズ)を用いることにより多くのモデルウイルスを吸着・濃縮出来ることを見いだしており<sup>15,16)</sup>、本法でもPEIビーズを用いた系を確立した。すなわち、レトロウイルスが含まれるMus dunni細胞の上清にPEIビーズを添加し、PEIビーズ吸着画分からレトロウイルスゲノムを抽

<Classical extended S+L- assay method>



<Infectivity qRT-PCR with RCR concentration>



- >Rapid
- >High sensitivity
- >Quantitative

図3 感染性PCR法とS+L-アッセイ法の比較



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)<sup>16)</sup>。

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<sup>17)</sup>。

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	4/5
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	5/5	5/5	5/5	7/5
10	3/5	4/5	6/5	4/5
3	1/5	1/5	3/5	1/5
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

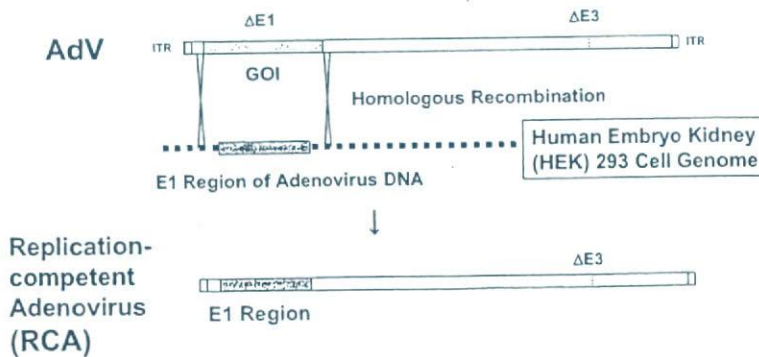


図5 アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルス (RCA)

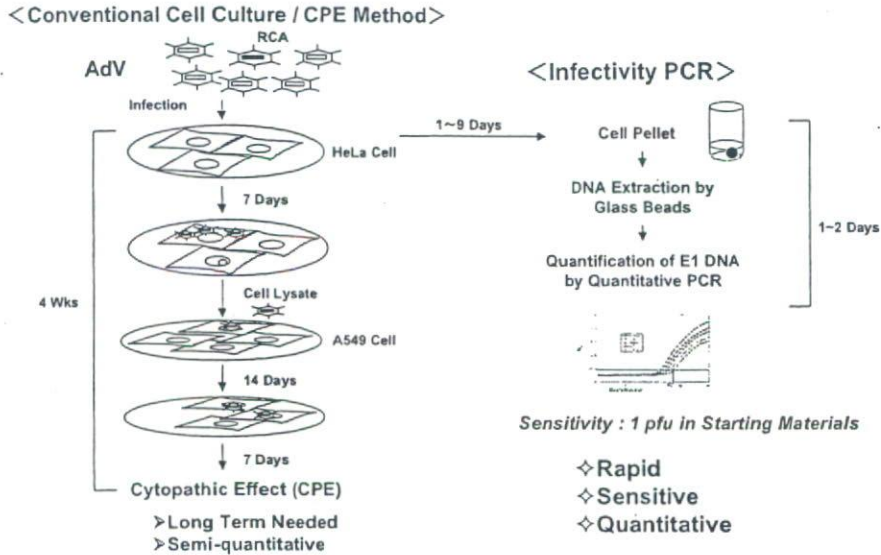


図6 増殖性アデノウイルス検出法：CPE法と感染性PCR法

非常に低減化される可能性が高い。最近アデノウイルスベクター製造用に開発されたPER.C6細胞やC139細胞では、ベクターと産生細胞の配列に重複がないため、相同組換えが抑制され、増殖性アデノウイルスの産生が起こらないことが報告されている<sup>18-20)</sup>。ベクターに混入する可能性のある増殖性ウイルスに関しては増殖性ウイルスを産生しないようなベクター製造方法の開発も非常に重要である。

3) 患者からの遺伝子治療用ベクターやウイルスの放出

遺伝子治療薬の臨床適用に当たって、ベクターやベクターに混入する可能性のある増殖性ウイルスの患者からの放出が非常に大きな問題となる(図7)。患者から放出されたベクターや増殖性ウイルスが患者の家族や医療従事者等に伝播するのを防止するために、遺伝子治療薬投与後、患者からのベクターやウイルスの放出

をモニタリングし、さらに必要に応じて隔離等の措置を行う場合がある。このために、患者の血中、喀痰、尿等に含まれるベクターや増殖性ウイルスを検査する必要がある。臨床検体中のベクターや増殖性ウイルスの高感度検出法としてはPCR等の核酸増幅検査が用いられることが多いが、この場合、伝達性のないベクターや増殖性ウイルスの遺伝子断片であっても検出してしまう可能性が高い。しかし、血清や体液試料を用いて細胞での*in vitro*感染性・伝達性試験を行う場合は、夾雑タンパク質等による阻害のために希釈等の操作が必要となり、十分な感度が得られないことが多い。従って、遺伝子治療用ベクターや増殖性ウイルスの放出について、その感染性を指標として検出する高感度な手法の開発が急がれる。あるいは、PCR等の手法を用いてゲノムレベルでの検出を行う際に、ベクターやウイルス断片と、機能を持った粒子とを区別可能な手法を開発することができれば、高感度性を持った新たな検出手法となりえる。

4) 腫瘍溶解性ウイルスのウイルス安全性

腫瘍溶解性ウイルスの発見は非常に古く、悪性腫瘍患者にウイルス感染が起こったときや生ワクチンを接種された際に、腫瘍の縮小や寛解が認められたことからウイルスを用いた治療法の開発が始まった(図8)。腫瘍溶解性ウイルス療法とは、がん細胞の異常増殖性を利用して

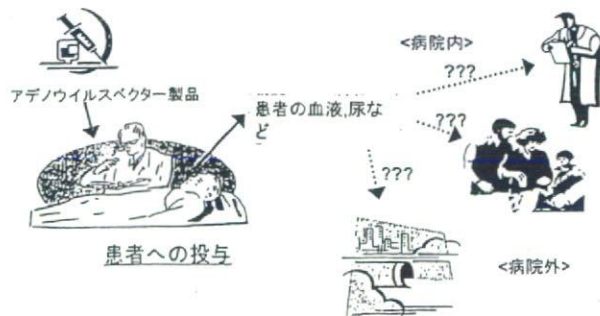


図7 患者からのベクターやウイルスの放出の影響

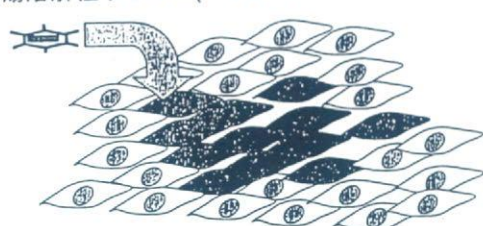
がん遺伝子治療ベクター



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

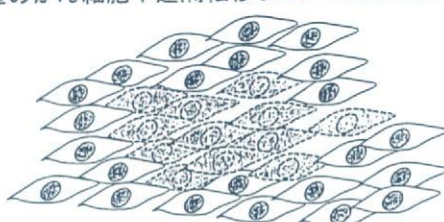


図8 腫瘍溶解性ウイルスと従来型のがん遺伝子治療ベクターの比較

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<sup>21-23)</sup>。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」<sup>24)</sup>、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)<sup>25)</sup>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」）<sup>26)</sup>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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病	信大医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	末梢血幹細胞	慢性閉塞性動脈硬化症、パージャーカー病	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、パージャーカー病	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、パージャーカー病等	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