

F. 研究業績

<論文発表>

1. Watanabe, K., Hyuga, S., Hyuga, M., Sekiguchi, A., Endo, M., Tsuda, T., Oikawa, T., Yamaguchi, T., and Hanawa, T., Unkeito, a traditional Kampo formula, exhibits a selective estrogen receptor modulator-like activity. - Prevention of osteoporosis in ovariectomized mice -*J. Trad. Med.*, (in press)
2. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. *Glycoscience Lab. Manual.*, Ed. Naoyuki Taniguchi, (in press)
3. Nana Mukai, Taichi Akahori, Motohiro Komaki, Toshie Kanayasu-Toyoda, Akiko, Ishii-Watabe, Akiko Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Mayumi Abe, Teruo Amagasa, Ikuo Morita: A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp. Cell Res.* (inpress)
4. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: Relative quantification of N-glycans using an isotope tagging method, *Immunology*, 2008, (in press)
5. 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究(3) 過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品の品質評価. *医薬品研究*, (印刷中)
6. 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究(4) 過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品の品質評価. *医薬品研究* (印刷中)
7. 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能解析」(Functional Glycomics) 研究成果公開発表シンポジウム「第3の生命鎖: 糖鎖の謎が今, 解る」(監修: 古川鋼一) (印刷中)
8. 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英: 糖鎖と生物薬品. *Journal Applied Glycoscience*. (印刷中)
9. 掛樋一晃, 木下充弘, 橋井則貴, 川崎ナナ, 寺尾敏光, 河合健蔵, 余田 光, 山口照英: ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究 (第3報) キャピラリー電気泳動法によるヘパリンナトリウム不純物の分析. *医薬品研究* (印刷中)
10. K. Satoh, A. Iwata-Takakura, A. Yoshikawa, Y. Gotanda, T. Tanaka, T. Yamaguchi & H. Mizoguchi, A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection, *Vox Sanguinis*, 95, 174-180, (2008)
11. Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Matsuishi-Nakajima, Y., Kawanishi T. and Yamaguchi, T.: Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 869: 20-30 (2008)
12. Satsuki Itoh, Akiko Hachisuka, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Reiko Teshima, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Glycosylation Analysis of IgLON Family Proteins in Rat Brain by Liquid Chromatography and Multiple-Stage Mass Spectrometry, *Biochemistry*, 47, 10132-10154, (2008)
13. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* 20, 97-116 (2008)
14. Takuo Suzuki, Norimasa Tamehiro, Yoji Sato, Tetsu Kobayashi, Akiko Ishii-Watabe, Youichi Shinozaki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Teruhide Yamaguchi, and Toru Kawanishi: The novel compounds that

- activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression. *J. Pharmacol. Sci.* 107(3), 285-294 (2008)
15. Mizuho Harashima, Kayo Harada, Yoshimasa Ito, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Teruhide Yamaguchi, Shingo Niimi. Annexin A3 Expression Increases in Hepatocytes and is Regulated by Hepatocyte Growth Factor in Rat Liver Regeneration, *J. Biochem.* 143, 537-545 (2008)
 16. Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T, Yamaguchi T. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem.* 144, 399-408, (2008)
 17. 山口照英, 内田恵理子: 日米 EU 医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制に於ける国際動向. *Drug Delivery System*, 22, 651-659 (2008)
 18. 山口照英, 石井明子: 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言 *PHARMASTAGE*, 7, 1-6 (2008)
 19. 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 小林 哲, 石川リカ, 高井俊紀, 古賀明子, 岡本寿美子, 山口秀人, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 窪田雅之, 掛樋一晃, 木下充弘, 鳥 圭介, 山田真希, 山口照英: 質量分析法を用いたペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試験法に関する研究. *医薬品研究* 39(10), 627-646 (2008)
 20. 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 糖鎖異常の網羅的解析. *蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性*. 53, 1690-1696 (2008)
 21. 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 薮島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 宮田一義, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 木下充弘, 掛樋一晃, 合田幸広, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究 (第1報) $^1\text{H-NMR}$ によるヘパリンナトリウム純度試験に関する研究. *医薬品研究*, 39, 651-659 (2008)
 22. 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 福原 潔, 品川麻衣, 榛葉信久, 有村雅敏, 辰巳昌史, 奥田晴宏, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究 (第2報) $^1\text{H-NMR}$ によるヘパリンカルシウム純度試験に関する研究, *医薬品研究*, 39, 660-664 (2008).
 23. 新見伸吾, 原島瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫, 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望(その1). *医薬品研究*, 39(1), 1-37 (2008)
 24. 新見伸吾, 原島瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫, 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望(その2). *医薬品研究*, 39(6), 359-387 (2008)
 25. Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, and Teruhide Yamaguchi: Glycopeptide analysis using LC/MS and LC/MS/MS, in *The Protein Protocols Handbook* (John Walker, ed.) Humana, Totowa, NJ. (2007)
 26. Uchida E, Kogi M, Oshizawa T, Furuta B, Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Yamaguchi T. Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses. *J Virol Methods*. Jul;143(1):95-103. (2007)
 27. Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi T: Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase C ϵ in Neutrophilic Differentiation Cells, *Journal of Cellular Physiology*. 211, 189-196 (2007)
 28. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Yukari Matsuishi, Masashi Toyoda, Yoko Katagiri, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akihiro Umezawa, and Teruhide Yamaguchi: Study on the quality control of cell therapy product: Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1160, 263-269 (2007)
 29. Yamaguchi, T., Uchida, E.: Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products. *CCDT Journal*, 7, 203-208 (2007)
 30. Mizuguchi H., Funakoshi N., Hosono T., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning

- of short hairpin RNA-coding DNAs. *Hum. Gene Ther.*, 18, 74-80 (2007)
31. Koizumi N., Yamaguchi T., Kawabata K., Sakurai F., Sasaki T., Watanabe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production. *J. Immunol.*, 178, 1767-1773 (2007)
 32. Ishii-Watabe, A., Kobayashi, T., Suzuki, T., Yamaguchi, T., Kawanishi, T.: Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture. *Biologicals*, 35, 247-257 (2007)
 33. Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, and Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133 positive cells. *J Biol Chem.*, 282, 33507-33514 (2007)
 34. Niimi, S., Harashima, Y., Yamaguchi, T.: Study of hepatocytes using RNA interference. *Journal of Organ Dysfunction*, 3, 164-182 (2007)
 35. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. *実験医学増刊号*, 25, 1127-1136 (2007)
 36. 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 山口照英: 細胞治療薬の品質・安全性評価における糖鎖解析の重要性と LC/MS の応用可能性. *News Letter 糖鎖フラッシュ号, Functional Glycomics*, 9, 35-41 (2007)
 37. 山口照英: Gene Therapy Discussion Group の動向について. *医薬品研究*, 38, 50-59, (2007)
 38. 内田恵理子, 石井(渡部) 明子, 山口照英: 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保. *臨床ウイルス学会誌*, 35, 278-290 (2007)
 39. 山口照英, 石井明子: 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. 『谷本学校毒性質問箱』, サイエントリスト社, 東京, 10, 1-34, (2007)
 40. 山口照英, 内田恵理子: 日米 EU 医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制に於ける国際動向. *Drug Delivery System*, 22(6), 651-659 (2007)
 41. 山口照英: ICH 遺伝子治療専門家会議-2006 シカゴ会議報告一. *医薬品研究*, 38, 277-285, (2007)
 42. 山口照英: ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について. *Bio Clinica*, 27, 67-74 (2007)
 43. 山口照英, 土屋利江: 細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価. *YAKUGAKUZASSHI*, 127, 839-840 (2007)
 44. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 抗体の LC/MS. 『抗体医薬品の最前線』, 105-115, 植田充美監修, シーエムシー, 東京(2007)
 45. 石井明子, 鈴木琢雄, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫: 植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保. *バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保*, 702-718, 早川堯夫監修, 株式会社エル・アイ・シー, 東京 (2007)
 46. Minamisawa S, Uemura N, Sato Y, Yokoyama U, Yamaguchi T, Inoue K, Nakagome M, Bai Y, Hori H, Shimizu M, Mochizuki S, Ishikawa Y.: Post-transcriptional downregulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in the atrial myocardium. *FEBS Lett*, 580, 2247-2252 (2006)
 47. Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H.: Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. *Gene Ther.*, 13, 1118-1126 (2006)
 48. 山口照英: ICH 遺伝子治療専門家会議シカゴミーティングと今後の展望. *ファルマシア*, 42(4), 357-360 (2006)
 49. 山口照英: 医薬品各条の改正点-生物薬品. *薬局*, 57, 89-95 (2006)
- <政策提言>
1. 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な考え方」平成18年10月
 2. 「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査(NAT)の実施に関するガイドライン」平成16年8月3日(薬食発第0803002号)
 3. 医薬発1314号改定「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」作成(平成20年2月8日)

4. 医薬発1314号改定「ヒト（同種）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」作成（平成20年9月12日）（薬食発第0912006号）
5. 薬食監麻発第0327027号「ヒト（自己）由来細胞・組織化更衣薬品等の製造管理・品質管理の考え方について」作成
6. 「生物由来原料基準」平成17年厚生労働省告示第262号
7. 「生物由来原料基準」平成17年厚生労働省告示第177号

<特許出願等>

1. 佐藤陽治、山口照英、長谷川哲也、細野哲司、佐藤光利 特願2006-109854「細胞の心筋細胞分化活性検出用マーカー」
2. 川崎ナナ、橋井則貴、山口照英 特願2007-322161「同位体標識法とLC/MSⁿを利用した糖鎖比較定量法」

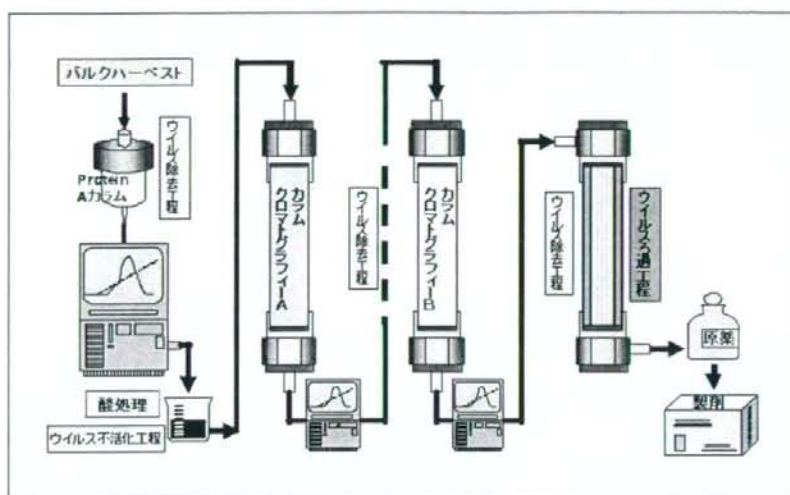


図1 代表的な抗体医薬品の精製工程とウイルスクリアランス

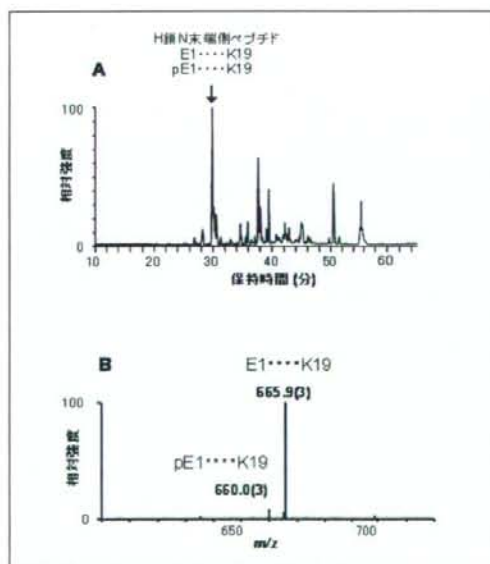


図2 N末端の不均一性

A ペプチドマップとH鎖N末端側ペプチドの保持時間

B N末端側ペプチドのマススペクトル

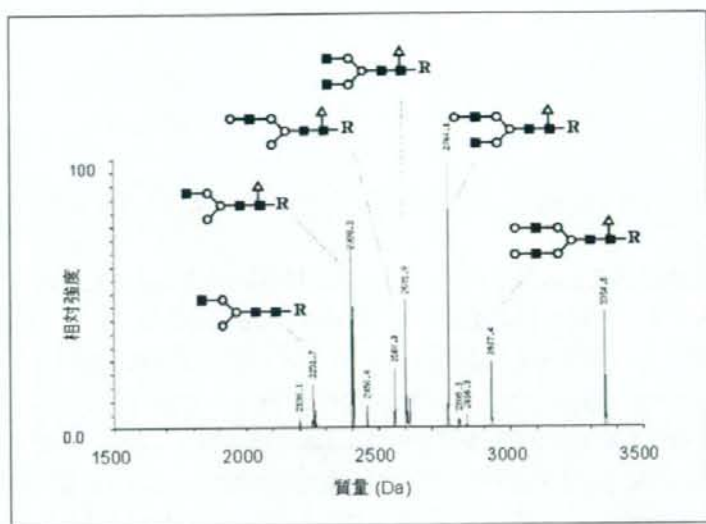


図3 糖鎖の不均一性 コンセンサス糖鎖結合ペプチドのマスペクトルと糖鎖推定構造
 ■, GlcNAc; ○, Gal; ⊕, Man; ▲, Fuc

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価に関する研究
—腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保について—

研究分担者 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第一室長

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究の一環として、本年度は ICH 遺伝子治療専門家会議より発出された「ICH 見解：腫瘍溶解性ウイルス」を基に腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保のあり方を検討した。本見解は腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発のための一般的原則を示したものであり、腫瘍溶解性ウイルスの特性解析、非臨床試験、臨床試験において考慮すべき事項がまとめられている。腫瘍溶解性ウイルスの製造や特性解析は基本的には遺伝子治療薬の規制の原則に従うが、独自の項目として腫瘍細胞選択性や分子変異体の有無の確認が必要となる。外来性病原体試験は腫瘍溶解性ウイルスが増殖性を持つため技術的困難を伴うが、中和抗体を使用して実施できることが示されている。非臨床試験では、担がんモデル、非担がんモデルを適切に選択して、腫瘍選択性や生物活性の評価、安全性評価、生体内分布と感染性の評価、ウイルス排出の評価等を実施する必要がある。しかし、ウイルスの感染・複製に対する感受性の種特異性や免疫応答などの点で動物モデルには限界があり十分な安全性情報が得られない場合があるため、初期臨床試験での開始用量や投与経路の決定には特に注意が必要である。また、臨床試験では血中ウイルス量やウイルスに対する免疫反応のモニタリングが重要であり、ウイルス排出のモニタリングを含む患者以外への暴露のリスクを最小限にするためのバイオセーフティーに関する考慮も必要とされる。我が国でも腫瘍溶解性ウイルスの開発が進められているが、本見解が参照されることにより腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保が図られることが期待される。

A. 研究目的

遺伝子治療は、現在、効果的な治療法のないガンや各種遺伝性疾患等に対する画期的な先端医療として、また、高齢化社会の到来に伴い増加の一途をたどると予測される糖尿病や動脈硬化等のいわゆる成人病に対しても、既存の方法より優れた治療法となる可能性がある新しい医療技術として期待されている。一方でアデノウイルスベクターを用いた臨床研究における死亡事故やレトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症

(X-linked severe combined immunodeficiency; X-SCID) の遺伝子治療における T 細胞白血病の発症など、遺伝子治療により予想を超える重大な有害事象も生じている。このように遺伝子治療のような革新的医療技術には、未知、未経験の要素が多く、治療法として確立するためには解決すべき課題が数多く存在する。今後、遺伝子治療が一般的に実用化されるための重要課題のひとつとなるのが品質・安全性の確保である。遺伝子治療のように学問・技術が急速に進歩している分野

においては、特にこれらの医薬品の開発、臨床研究の進展が著しい外国での学問・科学の進歩を踏まえ、国際的な水準からみた安全性確保方策の科学的妥当性について絶えず評価・検証する必要がある。本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝子治療に関する国際的動向、安全性確保方策の進展を調査し、我が国の遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保に寄与する基礎的研究を行うものである。

腫瘍溶解性ウイルスとは、正常細胞内では増殖できず、標的とするがん細胞内でのみ特異的に増殖可能な制限増殖型ウイルスで、非増殖性のウイルスベクターを用いた従来のがん遺伝子治療よりも高い抗腫瘍効果が得られることが期待されている。腫瘍溶解性ウイルスの開発はここ数年で急速に進展しているが、その臨床適用は未知・未経験の要素も多く、基礎となる科学的知見も十分に集積されていない。そこで、本年度は、ICH 遺伝子治療専門家会議により2008年11月に発出された「ICH 見解：腫瘍溶解性ウイルス」を基に、腫瘍溶解性ウイルスの特性解析、非臨床試験や臨床試験で考慮すべき事項について検討した。

B. 研究方法

本年度は、2008年11月13日付けで発出された「ICH 見解：腫瘍溶解性ウイルス」(ICH considerations: Oncolytic Viruses: 参考資料)及び腫瘍溶解性ウイルスに関する論文や関連資料を基に、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保のあり方、特性解析、非臨床試験、臨床試験において考慮すべき事項について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、調査研究であり、倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

腫瘍溶解性ウイルスとは、正常細胞内では増

殖できず、標的とするがん細胞内でのみ特異的に増殖可能な制限増殖型ウイルスのことである。がん細胞に腫瘍溶解性ウイルスが感染すると、細胞内で増殖してがん細胞を破壊・死滅させるのみならず、その際放出されたウイルスは周辺のがん細胞にも感染して腫瘍全体を縮小させることから、非増殖性のウイルスベクターを用いた従来のがん遺伝子治療よりも高い抗腫瘍効果が得られることが期待されている。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、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が開発が始まった。腫瘍溶解性ウイルスの開発は、ニューカッスル病ウイルスやレオウイルスなどの腫瘍特異的増殖性を示す野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを利用したものから、ヘルペスウイルスやアデノウイルスなどを遺伝的に改変することにより、病原性を除去し、腫瘍指向性を高めた遺伝子組換え型制限増殖性ウイルスの開発に移行しつつあり、さらには治療用遺伝子を腫瘍溶解性ウイルスに搭載することによって、抗腫瘍効果をさらに高めた武装化(armed)ウイルスの開発も進められている。

腫瘍溶解性ウイルスの開発はここ数年で急速に進展し、多くの総説も書かれている。腫瘍溶解性ウイルスは中国では既に2005年に1品目が承認されている。しかし、欧米では未だ研究段階であり、臨床適用は未知・未経験の要素も多く、基礎となる科学的知見も十分に集積されていない。そこで、ICH 遺伝子治療専門家会議では、2005年に腫瘍溶解性ウイルスに関する公開ワークショップを開催して問題点を検討した。その結果、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) 腫瘍溶解性ウイルスに混入する増殖性ウイルス及び目的とする腫瘍溶解性ウイルスの分子変化体の検

出法、5) 迷入ウイルスの試験法、6) 臨床上の安全性、7) 動物試験に用いる適切な動物モデル、8) 腫瘍溶解性ウイルスの体外排出の測定法とそのリスク評価、などが腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性に関する重要な課題として挙げられた。ICH 遺伝子治療専門家会議では、このワークショップで得られた結果を基に、腫瘍溶解性ウイルスに関する ICH 見解の作成について検討が続けられ、2008 年 11 月 13 日付けで「ICH 見解：腫瘍溶解性ウイルス」が発出された。本見解の構成を表 1 に示す。本見解では、腫瘍溶解性ウイルスに関する基本的な解説の後、特性解析、非臨床試験、臨床試験で実施すべき事項や考慮すべき事項がまとめられている。具体的な内容を以下に示す。なお、本見解についてはパブコメを実施中であり、今後改訂される可能性もある。

ICH 見解：腫瘍溶解性ウイルス

1. 緒言

腫瘍溶解性ウイルスは、悪性腫瘍患者の初期臨床研究においてウイルス感染又は生ウイルスワクチン接種に伴い悪性腫瘍の退縮が認められたことにより初めて見出された。これらの初期の報告以来、腫瘍溶解性ウイルスの研究は、個別のウイルス感染の経験や意図的に感染させた事例から、がん治療のために特別に選択したウイルスや遺伝子改変を施したウイルスを使用するものへと進歩している。腫瘍溶解性ウイルスは、正常組織に過度の損傷を与えることなく腫瘍組織内で選択的に増殖、拡散し、腫瘍組織を破壊することを目的としている。

腫瘍溶解性ウイルスには、がん細胞で選択的に複製しこれを溶解させる特有の性質を持つ野生型ウイルスや弱毒化ウイルスがある。加えて、がん細胞で選択的に複製し、細胞を溶解させるよう遺伝子改変されたウイルスもある。ウイルスの改変には、1) 正常

細胞でのウイルス複製に不可欠のウイルス遺伝子の変異、2) 腫瘍特異的プロモーターの使用による初期遺伝子発現の制御、3) ウイルスの組織指向性(トロピズム)や細胞内への侵入過程の改変、4) ウイルスゲノムへの目的遺伝子の組み込みなどがある。腫瘍溶解性ウイルスには、アデノウイルス、麻疹ウイルス、水胞性口内炎ウイルス(VSV)、レオウイルス、ニューキャッスル病ウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、ボックスウイルス、センダイウイルスなどがある。

ICHに参加している規制当局は、腫瘍溶解性ウイルスの治療上の有用性と複製能を有するウイルスを使用することによるリスクとのバランスが重要である、ということで合意している。本文書では、各極における規制上の分類に関わらず、腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発のための一般的原則を示す。

2. 腫瘍溶解性ウイルスの特性解析

腫瘍溶解性ウイルスの製造及び特性解析は、各極のガイドラインでカバーされている生物薬品等、より具体的には遺伝子治療薬に対する現行の規制の原則に従う。ただし、腫瘍溶解性ウイルスは複製能を有するため、外来性病原体試験や特性解析の実施においては、特有の技術的な困難さを伴っている。

2.1 選択性

腫瘍選択性に関して分子レベルで十分に理解することが重要である。臨床試験前に腫瘍細胞への選択性を示すために、腫瘍溶解性ウイルスの細胞傷害性/細胞溶解性や複製に関して増殖許容性(permissive)の腫瘍細胞株及び非許容性の正常細胞株を用いた *in vitro* アッセイを実施すべきである。ヒト正常組織由来及びヒト腫瘍組織由来の初代移植片培養(初代細胞培養)も使用することができる。

腫瘍細胞に対する選択性は、腫瘍溶解性ウイ

ルスの力価の直接的な指標ではない。力価の出荷試験では、腫瘍溶解性ウイルスの生物活性（腫瘍細胞の溶解性など）を直接測定するか、それと相関するような指標を測定するべきである。

2.2 分子変異体

腫瘍溶解性ウイルスの特性解析には、目的とするウイルスの分子変異体の存在の有無の確認を含める。複製における選択性又は腫瘍溶解性プロファイルが変化している可能性のある変異体に焦点を当てた試験を実施すべきである。分子変異体の試験法は、変異体の特性と存在量の両方を反映しうるものである必要がある。腫瘍溶解性ウイルスの由来や起源、選別の方法を記載しておくことは、遺伝的な安定性を証明し、評価することの助けとなる。

2.3 外来性病原体試験

腫瘍溶解性ウイルスは、外来性病原体試験で常用される培養系において複製可能であり偽陽性の結果を示すことがあるため、外来性病原体試験は特に技術的な困難さを伴うことがある。これを克服する一つの方策としては、*in vivo* 及び *in vitro* 外来性病原体試験を実施する際に腫瘍溶解性ウイルスに対する中和抗体を使用することが挙げられる。もし中和抗体が利用できない場合、ウイルスを接種することなく、ウイルスの生産培養と同時並行的に培養した細胞を検体として外来性病原体試験を実施することでも許容できる場合があり、これは生ウイルスワクチンの試験で実施されている手法と同様の手法である。

3. 非臨床試験

非臨床試験は臨床試験に用いる腫瘍溶解性ウイルス構成体を用いて実施するべきである。非臨床試験を開始する前に、開発中の腫瘍溶解性ウイルスに類似したウイルスを用いて実施

された試験結果を参考にすることは有用と考えられる。

3.1 選択性の評価

動物モデルを使用する前に、正常細胞及び腫瘍細胞における選択性を解析する *in vitro* 試験によって、選択的な遺伝子発現、細胞傷害性及びウイルス複製について検討するべきである (Section 2.1 参照)。

適用可能であれば、*in vivo* モデルにおいてもウイルス複製の選択性について検討するべきである (Section 3.3-3.6 参照)。

3.2 動物モデルの選択とその限界

動物モデルの選択においては、試験の目的に加えて、腫瘍溶解性ウイルスのトロピズム、感染性、複製能、細胞障害活性、及び抗腫瘍効果を考慮する必要がある。非担がん動物及び異種移植又は同種移植担がん動物モデルのいずれも非臨床試験で有用であるが、ウイルスの感染及び複製に対する種の感受性の差異や免疫応答のすべての面を備えたモデルになり得ないなどの限界がある。

腫瘍溶解性ウイルスの親ウイルスに対する動物種の増殖許容性を考慮する必要がある。非臨床試験において通常用いられる標準的な動物種は適切でない可能性があることから、別の動物種を考慮する必要があるであろう (例: コットンラット、シリアンハムスター)。使用する動物種は、理想的には、ウイルス感染に感受性があり、腫瘍溶解性ウイルスによって引き起こされる感染が病理学的に類似した結果を示すことが望ましい。遺伝子改変又は細胞/組織移植によってヒトの標的受容体を発現する「ヒト化」げっ歯動物が使用できる場合がある。

担がんモデルは、ブルーフ・オブ・コンセプト (POC)、薬物動態学、薬力学、ウイルス排出及び安全性を調べるために用いることができる。理想的には、異種移植又は同種移植モデル

は、動物モデルで観察された治療効果を臨床における有効性の指標として外挿しうる程度に、対象患者集団の腫瘍の生物学的及び病理学的側面を反映していることが望ましい。モデル動物の選択に当たっては、担がんモデル動物でのウイルスの生体内分布や持続性は非担がん動物のそれとは著しく異なるため、腫瘍溶解性ウイルスの安全性を評価するときにも腫瘍の生物学的及び病理学的側面を考慮すべきである。

しかし、担がんモデルは対象とする患者集団における腫瘍の生物学的及び病理学的側面の一部しか反映していない。例えば、異種移植担がんモデルを用いた場合、マウス組織ではアデノウイルスは増殖することができないため、ウイルス増殖を評価するには限界がある。さらに、がん組織の移植に汎用されるマウスの系統は免疫不全であり、そのため、腫瘍溶解性ウイルスに対する免疫応答を調べることは適していない。その他、担癌モデルを用いることの不利益点として、腫瘍増殖によって動物の生存期間が短いことがある。従って、長期安全性を調べるには適していないであろう。

非担がんの生物学的に感受性のある動物種は、担がんモデルから得られた情報を補完するものとして腫瘍溶解性ウイルスの安全性を評価するために用いることができる。

腫瘍溶解性ウイルスに目的遺伝子が組み込まれている場合、発現されるタンパク質に対して動物種が薬理的に反応性を有していることが重要である。遺伝子産物とその動物種で活性がない場合(例えば、ヒト GM-CSF はマウスにおいて活性がない)、種特異的な相同遺伝子を発現するように腫瘍溶解性ウイルスを設計し、それを非臨床試験において活性及び安全性の両方を評価するために使用することができる。このような場合、臨床使用を目指す腫瘍溶解性ウイルスとの同等性(例えば目的遺伝子の発現レベル)を適切に評価するために、動物に投与された腫瘍溶解性ウイルスの特性解析の実施

を考慮するべきである。

動物種の選択においては、腫瘍溶解性ウイルスの臨床での投与方法を考慮することが重要である。もし投与経路が肝動脈注射のように標準的なものでない場合、大動物種が必要になることがある。

3.3 薬理学/ POC

POC や予測される作用機序などの生物学的活性は、*in vitro* 及び *in vivo* の両方のモデルを使用して示すことができる。腫瘍溶解性ウイルスが生体内で目的とする生物学的効果をもたらす能力があることを示すためには、腫瘍溶解性ウイルスの生物活性及び薬理学的プロファイルを調べるのが重要である。これらの試験は、ウイルス複製の選択性や抗腫瘍活性を含め、標的となるがん腫瘍溶解性ウイルスが生物学的に有効な作用を示すかを調べることで、特定の対象患者集団に腫瘍溶解性ウイルスを投与することの科学的妥当性の確立に寄与するはずである。さらに非臨床試験は、1) 薬理的活性を示す用量範囲の決定と至適投与量や最小有効投与量の確立、2) 最適な投与経路の決定、3) 初期臨床試験のための投与スケジュールの決定に役立つ。

3.4 生体内分布

動物での生体内分布試験は、標的及び非標的臓器における腫瘍溶解性ウイルスの分布を調べるための試験である。腫瘍溶解性ウイルスの分布や推移はウイルスゲノムを検出することにより測定することができる。動物の臓器又は組織における腫瘍溶解性ウイルスの配列の存在を調べるには、定量的 PCR のような高感度分析法を少なくとも一種類用いることが望ましい。

腫瘍溶解性ウイルスの生体内分布プロファイルの評価と平行して、腫瘍溶解性ウイルスの感染性を評価するべきである。腫瘍溶解性ウイ

ルスは複製能があり、正常組織において感染及び増殖する可能性があるため、ウイルス力価及びウイルス核酸の量を測定すべきである。非標的組織でウイルスのゲノム配列又は目的遺伝子の発現が明らかに認められた場合は、組織/体液のさらなる分析を実施すべきである。これらのデータと毒性試験における臨床病理学的及び病理組織学的検査成績とあわせて考察することにより、ウイルスの存在や遺伝子発現が動物における副作用の所見と相関しているかどうか明らかになるであろう。

3.5 ウイルス排出に関する考慮事項

本 ICH 見解において、ウイルス排出とは患者の排泄物を介した腫瘍溶解性ウイルスの伝播と定義される。

腫瘍溶解性ウイルスを用いるにあたっての懸念のひとつは患者以外への暴露の可能性である。動物を用いたウイルス排出の評価は、臨床モニタリング計画のデザインに役立つと考えられる。腫瘍溶解性ウイルスの排出に関する情報は、非臨床及び臨床試験における長期有害事象のモニタリングに有用である。

3.6 毒性試験及び安全性試験

毒性試験における観察期間及び剖検の間隔は、腫瘍溶解性ウイルスの生体内分布及び持続性のプロファイル、並びに目的遺伝子を保持している場合はその発現プロファイルから設定されることが多い。腫瘍溶解性ウイルスの毒性評価では、投与後に起こりうる局所及び全身性の毒性の識別、解析、定量化ができるような幅広い検討を行うべきである。POC 試験で確立された動物種、投与経路及び投与手順、想定される治療上の用量域及び投与スケジュールから、毒性試験をデザインすべきである。腫瘍溶解性ウイルスの毒性は投与経路に依存することから、投与経路及び投与スケジュールは想定している臨床試験を出来るかぎり忠実に反映す

べきである。評価結果には、急性及び慢性毒性、毒性の可逆性、遅発性毒性及び用量反応性を含める。ICH S6 ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」の科学的原則には適用可能な部分もあるが、毒性試験は、正常細胞/組織におけるウイルス複製及び感染の可能性、並びにウイルスや発現した目的遺伝子への望ましくない免疫反応などを含む腫瘍溶解性ウイルスの生物学的特性を反映する必要があるだろう。

3.7 医薬品安全性試験実施基準 (GLP) 試験

安全性の評価指標は、担がん動物を使用して実施された試験によって収集されることがあり、動物の管理においても特別な配慮が必要となる可能性がある。したがって、各極の法律で要求されている GLP の全面遵守は、困難を伴うことがある。バイオセーフティーの要件も、GLP に適合した腫瘍溶解性ウイルスの非臨床試験の実施可能性に影響を与えることがある。そのため、非 GLP 試験であっても、当該試験があらかじめデザインされた試験計画に従って実施され、そのデータが提案された臨床試験をサポートするのに十分な質と完全性 (整合性) を備えている限り、受け入れることは可能であろう。

4. 臨床試験

腫瘍溶解性ウイルスの複雑性及び動物モデルの有用性に限界があることにより、初期臨床試験で明らかにすべき多くの課題が残されている。このため、初期の投与レジメン及び投与経路に関して注意が必要となるであろう。動物での投与情報からは十分な安全性情報が取得できていない場合があることから、安全な開始用量を決定するためには、がん患者における用量設定試験を実施する必要がある。適切な投与経路を決定する際には、腫瘍内投与から始め、部分又は局所投与、そして全身投与へと段階的に実施する手法がしばしば用いられる。選

択された投与経路の妥当性を示すべきであり、非標的部位におけるウイルス複製の可能性も考慮すべきである。

可能であれば、腫瘍溶解性ウイルス又は分子変異体の望ましくない複製に対処するための抗ウイルス療法を考慮すべきである。一例として、ガンシクロビルは、腫瘍溶解性 HSV の複製の制御に有用である。

4.1 薬物動態、薬力学及び生物活性

腫瘍溶解性ウイルス量のモニタリングには、PCR 及び感染性試験の両者が使用されている。感染組織でのウイルス複製を反映したウイルスの第二ピークを十分に検出することが可能な頻度と期間にわたり、血中モニタリングを実施すべきである。腫瘍溶解性ウイルスのモニターには、ウイルス遺伝子の指標又は目的遺伝子の発現レベルを調べるなどの別の手法を用いることもできる。

腫瘍内における腫瘍溶解性ウイルスの存在と分布を測定することは困難であると予想されるが、腫瘍の切除又は生検が可能であれば腫瘍病理学の観点から有用な情報が得られる可能性がある。

4.2 免疫及び免疫反応

ウイルスに対する既存の免疫(体液性免疫や細胞性免疫)は、投与経路、投与レジメン及び連続投与の効果に影響を及ぼす場合がある。腫瘍溶解性ウイルス(及び存在する場合は目的遺伝子産物)に対する免疫反応をモニタリングすることは重要である。

しかし、抗ウイルス抗体の中和作用が有効性に及ぼす影響は現時点では明らかではない。この免疫応答は、過度のウイルス血症に対する防御機構となる可能性がある一方で、ウイルスの遠隔がん組織への拡散という目的を妨げてしまう可能性もある。

目的とするがん細胞の溶解に伴う炎症反応

の影響も考慮すべきである。

4.3 バイオセーフティー

腫瘍溶解性ウイルスを投与する際、感染性物質やバイオセーフティーに関する予防措置、バイオセーフティーやそれに関連するガイドラインに従うことが重要である。各医療施設、国、州、地域の規制を遵守すべきである。一般にすべての規制当局は、臨床プロトコルの中で、基本的な予防措置として臨床試験期間中の物理的な避妊を求めている。

非臨床におけるウイルス排出試験結果は、臨床試験の計画や検出方法の評価にも有用である。排出ウイルスのモニタリングを臨床開発計画に組み込むことが望ましい。

腫瘍溶解性ウイルスの伝播が及ぼす影響は十分に解明されておらず、医療従事者、家族、患者と接触する他の人への暴露を最小限にするために予防措置を講ずるべきである。免疫抑制又は免疫低下患者、同様に免疫機能の低い集団(乳児や高齢者等)への暴露を最小限にするための配慮も必要である。

患者及びその家族に対して、外来投与後の公共移動や日常生活における第三者への暴露を最小限にするための方法を指導することが適切であろう。これには特定の衛生管理に関する助言も含まれる。これらの考慮事項の多くは環境への放出/リスクとして取り扱う事項であり、詳細については各規制当局に相談するべきである。

D. 考察

今回検討した「ICH見解:腫瘍溶解性ウイルス」は、腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発のための一般的原則を示したものであり、腫瘍溶解性ウイルスの特性解析、非臨床試験、臨床試験において考慮すべき事項がまとめられている。

腫瘍溶解性ウイルス開発は、腫瘍細胞内で選択的に複製する性質を持つ野生型・弱毒化非組

換えウイルスを用いる場合と、選択増殖性を持つように人為的に改変した遺伝子組換え型ウイルスを用いる場合に大きく分類される。日本では、遺伝子組換え型の腫瘍溶解性ウイルスは「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」で定められた「遺伝子組換え生物等」であり、これを臨床で使用する場合には「遺伝子組換え生物等の第一種使用等(環境中への拡散を防止しないで行う使用等)」に該当するため、第一種使用規程の大臣承認が必要とされる。そのため、遺伝子組換え型の腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究は、同じく「遺伝子組換え生物等」に該当する遺伝子治療用ウイルスベクターに準じて「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成14年3月27日文科科学省・厚生労働省告示第1号、平成16年12月28日全部改正)に従い実施する必要がある。一方、非組換え型の腫瘍溶解性ウイルスはカルタヘナ法の対象外であり、規制上別枠とされている。しかし、本見解には、腫瘍溶解性ウイルスが各極でどのような規制上の分類に該当するかにはかかわらず、腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発のための一般的原则が示されている。今後、我が国でも、遺伝子組換え型、非組換え型を問わず本見解を参照することが望まれる。

1) 特性解析

本見解では、腫瘍溶解性ウイルスの製造や特性解析は、遺伝子治療薬に対する規制の原則に従うとされている。腫瘍溶解性ウイルスは遺伝子治療用ウイルスベクターとは異なるが、特に遺伝子組換え型ウイルスでは遺伝子治療用ウイルスベクターと共通のウイルスが使用されたり、共通の遺伝子改変技術が利用されるなど、その品質、安全性確保の考え方には共通する部分が多いためと考えられる。一方、腫瘍溶解性ウイルス独自の項目として、腫瘍選択性と分子変異体が挙げられている。腫瘍選択性は腫瘍溶

解性ウイルスの特徴であり、有効性、安全性の両面で重要な項目であることから、*in vitro*, *in vivo*での評価が必要とされる。

また、従来の遺伝子治療に用いられる非増殖性ウイルスベクターの特性解析では、ベクター製造中に組換えにより生じ、ベクターに混入する可能性のある増殖性ウイルス(RCV)の検出が重要である。しかし、腫瘍溶解性ウイルスは目的ウイルスが選択増殖性を持つため、変異を起こした場合により重篤な副作用が出やすく、患者以外への伝播のリスクも高い。従って、腫瘍溶解性ウイルスでは腫瘍溶解性や選択増殖性の変異した分子変異体の検出が非常に重要な課題とされる。遺伝子組換え型ウイルスの場合、目的ウイルスの遺伝子配列は単一であり、分子変異体を特定することが可能である。しかし、野生型・弱毒化ウイルスは単一クローンではなく目的ウイルスに分子変異体が存在する。この場合、腫瘍溶解性ウイルスの由来や起源、どのように選別したかの履歴を明確にして、遺伝的安定性を証明することが重要と考えられる。

外来性病原体試験は製品の品質・安全性評価に不可欠の項目であるが、腫瘍溶解性ウイルスの場合、外来性病原体試験で自身が増殖性を示すために試験系の確立が技術的に難しいという問題がある。これを解決する方法のひとつとして、本見解には中和抗体を用いて目的ウイルスを中和後に*in vivo*, *in vitro*の外來性病原体試験を実施する方法が示されている。しかし、ウイルスによっては中和抗体が利用できるには限らないため、生ウイルスワクチンの試験に用いられている方法として、ウイルスの生産培養と並行培養したものの細胞を検体とする方法も許容されるとしている。

2) 非臨床試験

非臨床試験では、動物モデルの選択が重要である。臨床適用を反映する担がんモデル動物を

用いて、腫瘍選択性や生物活性の評価、安全性評価、生体内分布と感染性の評価、ウイルス排出の評価等を行うことが必要とされる。

しかし、ウイルスの感染・複製に対する感受性に種特異性があることや免疫応答などの点で動物モデルには限界がある。免疫応答に関しては、宿主の免疫応答による中和抗体の出現がウイルスの抗腫瘍効果や転移病巣での効果を減弱する可能性もあるが、逆に腫瘍から血液中に漏出したウイルスを中和して安全性を高める可能性もある。しかし、非臨床試験では、担がんモデルに免疫不全動物が使用されるためその評価は困難である。また担がんモデルでは癌により長期安全性を調べることは困難であるため、非担がんモデルを補完的に使用して総合的に評価することが必要とされる。

3) 臨床試験

非臨床試験では動物モデルに限界があり、十分な安全性情報が得られない場合があるため、初期臨床試験での開始用量や投与経路の決定には特に注意が必要である。臨床試験では、血中ウイルス量のモニタリングやウイルスに対する免疫反応のモニタリング、ウイルス排出のモニタリングが必要とされる。

免疫反応に関しては、前述の通り非臨床試験で用いる動物モデルに限界があるため、臨床試験で免疫応答をモニタリングし、その有効性や安全性に及ぼす影響を評価することが重要となる。

また、腫瘍溶解性ウイルスは増殖性を持つウイルスであることから、体外に排出された場合、患者以外に伝播する可能性が懸念される。そのため、臨床試験では患者以外への暴露のリスクを最小限にするためのバイオセーフティーに関する考慮も必要となる。非臨床試験によりウイルス排出の評価を行い、その結果を基に、臨床試験で実施するウイルス排出のモニタリングの時期や期間、採取する検体の選択をする必

要がある。ICH遺伝子治療専門家会議では、ウイルス/ベクターの排出 (virus/vector shedding) に関して、ICH見解の作成が進められている。今後発出が予定されるウイルス/ベクターの排出に関するICH見解を本見解と併せて参照することが望まれる。

E. 結論

腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保についてICH見解を基に検討した。特性解析では腫瘍細胞選択性や分子変異体の有無の確認が重要であること、非臨床試験では選択性、生物活性、安全性評価、生体内分布と感染性の評価、ウイルス排出の評価等が必要であり、臨床試験では血中ウイルス量やウイルスに対する免疫反応のモニタリング、ウイルス排出のモニタリングを含む患者以外への暴露のリスクを最小限にするためのバイオセーフティーに関する考慮が必要であること等、腫瘍溶解性ウイルスの特性解析、非臨床試験、臨床試験で考慮すべき事項及び問題点を明らかにした。

参考資料

ICH considerations: Oncolytic Viruses;
<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4929.pdf>

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第21回、*Pharm Tech Japan*, 24(4), 101-106 (2008)
- 2) 内田恵理子、川崎ナナ、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第24回、*Pharm Tech Japan*, 24(8), 103-109 (2008)
- 3) 蜂須賀暁子、川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわか

る 第 28 回、*Pharm Tech Japan*, 24(12),
105-113 (2008)

2. 学会発表

- 1) Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Hiroaki Segawa, Birei Furuta, Eriko Uchida, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, Mahito Nakanishi: Characterization of Novel Defective Sendai Virus Vectors Capable of Persistent Expression of Therapeutic Genes, ASGT (American Society of Gene Therapy) 11th annual meeting, Boston, May28-June 1, 2008
- 2) 山口 照英, 内田 恵理子: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26~28 日、東京
- 3) 西村健、大高真奈美、瀬川宏知、内田恵理子、古田美玲、豊田淑江、山口照英、中西真人: 細胞質持続発現型 RNA ベクターの性質検討と医療応用に向けた研究、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、2008 年 12 月 9-12 日、京都
- 4) 押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英: カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、2008 年 12 月 9-12 日、京都
- 5) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英: 造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質のプロテオーム解析、第 8 回日本再生医療学会総会、2008 年 3 月 5-6 日、東京
- 6) 内田 恵理子: 医薬品のウイルス安全性確保: NAT による C 型肝炎ウイルス検出の

評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発、日本薬学会第 129 年会シンポジウム、2009 年 3 月 26-28 日、京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 「ICH見解：腫瘍溶解性ウイルス」の構成

-
1. 緒言
 2. 腫瘍溶解性ウイルスの特性解析
 - 2.1 選択性
 - 2.2 分子変異体
 - 2.3 外来性病原体試験
 3. 非臨床試験
 - 3.1 選択性の評価
 - 3.2 動物モデルの選択とその限界
 - 3.3 薬理学/ POC
 - 3.4 生体内分布
 - 3.5 ウイルス排出に関する考慮事項
 - 3.6 毒性試験及び安全性試験
 - 3.7 医薬品安全性試験実施基準 (GLP) 試験
 4. 臨床試験
 - 4.1 薬物動態、薬力学及び生物活性
 - 4.2 免疫及び免疫反応
 - 4.3 バイオセーフティー
-

ICH Considerations

**Oncolytic Viruses
November 13, 2008**

1. Introduction

Oncolytic viruses (OV) were first observed in early clinical studies in patients with malignancies where tumour regressions were observed to coincide with viral infections or with live virus vaccinations. Since these early reports, studies using OV have progressed from anecdotal and controlled infections to specifically selecting or genetically modifying viruses for cancer treatment. OV are intended to propagate selectively in tumour tissue and spread, destroying the tissue without causing excessive damage to normal tissues.

OV can be wild type or naturally attenuated strains of viruses that possess an inherent property of selective replication and lysis of cancer cells. Additionally, viruses can be genetically modified to selectively replicate and lyse cancer cells. These modifications can include 1) the mutation of the viral coding genes that are critical for viral replication in normal cells, 2) the control of early gene expression by using tumour-specific promoters, 3) a change in the viral tissue tropism and/or cell entry process, and 4) the incorporation of transgenes into the viral genome. Examples of OV include adenovirus, measles virus, vesicular stomatitis virus (VSV), reovirus, Newcastle disease virus, herpes simplex (HSV), poxvirus, Sendai virus, and others.

Regulatory authorities represented at the ICH agree that the therapeutic potential of OV will need to be balanced against the risks associated with the use of virus that is replication competent. This document identifies general principles for the clinical development of OV regardless of the classification of such products in each region.

2. Product Characterization of Oncolytic Viruses

Manufacturing and characterization of OV follow the currently recognized principles for biologicals and, more specifically, for gene therapy products, as covered by regional guidelines. However, since the product is replication competent, there are specific technical challenges for adventitious agent testing and product characterization.

2.1 Selectivity

A clear understanding of the molecular basis for tumor selectivity is important. To demonstrate selectivity in tumour cells prior to use in human clinical studies, OV should be assayed *in vitro* for cytotoxicity/lysis and/or replication on permissive (tumour) and non-permissive (normal) cell lines. Primary explant cultures of normal and tumour-derived human tissues can also be used.

Tumour cell selectivity is not considered to be a direct measure of potency for this class of products. Release testing for potency should utilize assay(s) that measure or correlate with the biological activity of the OV, e.g., tumor cell lysis.

2.2 Molecular variants

For OV products, characterization includes testing the product for the presence of molecular variants of the intended oncolytic virus. A focus for testing should be potential variants that might have an altered replication selectivity or oncolytic profile. The testing strategy for

molecular variants may need to reflect both the nature and amount of the variant(s). Describing the history and selection procedures of OV can help in the demonstration and evaluation of genetic stability.

2.3 Adventitious agent testing

Adventitious agent testing can be particularly challenging for OV because these products can replicate in commonly used test systems, generating false positive results. One possible strategy to overcome this challenge is based on the use of specific antibodies to neutralize the OV prior to performing *in vivo* and *in vitro* adventitious agent testing. If a neutralizing antibody is not available then it might be appropriate to conduct adventitious agent testing on materials from parallel production cultures performed without the viral product, an approach similar to that used for testing live viral vaccines.

3. Non-clinical studies

Non-clinical studies should be conducted with the OV construct intended for use in clinical trials. It may be helpful to consider the results of studies conducted with viruses similar to the OV under investigation prior to initiating non-clinical studies.

3.1 Evaluation of Selectivity

Prior to using animal models, studies conducted *in vitro* to characterize selectivity in normal and tumour cells should address selective gene expression, cytotoxicity and viral replication (see Section 2.1).

When possible, selectivity of virus replication should also be studied using *in vivo* models (see Sections 3.3 – 3.6).

3.2 Selection and limitations of animal models

Selection of the animal model should take into consideration the purpose of the study as well as the viral tropism, infectivity, replication ability, cytopathic potential, and anti-tumour effect of the OV. Both non-tumour-bearing animal species and tumour-bearing xenograft or syngeneic animal models are useful for non-clinical testing, but the limiting factors include: species susceptibility to the viral infection and replication, and the inability to model all aspects of the immune response.

The permissiveness of the animal species to the parental virus of the OV needs to be considered. Standard animal species routinely used for non-clinical testing might not be appropriate; therefore, other animal species may need to be considered (e.g., cotton rats, Syrian hamsters). The species used should ideally be sensitive not just to infection by the virus, but also to the pathological consequences of infection that can be induced by the OV. In some cases, 'humanized' rodents can be used that express the human target receptor(s) either by genetic modification or cell / tissue transplantation.

Tumour-bearing models can be used to assess proof of concept (POC), pharmacokinetics, pharmacodynamics, viral shedding, and safety. Ideally, a xenograft or syngeneic model should represent the tumour biology and pathology of the target clinical population to the extent that therapeutic effectiveness observed in the animal model will be an indication of clinical outcome. This desired effect should be considered when evaluating the safety of the OV, as the level of viral presence and the extent of persistence in various biological samples of a tumour-bearing model can be significantly different than in a non-tumour-bearing animal.

However tumour-bearing models reflect only certain aspects of the tumour biology and pathology of the target clinical population. The limiting factors include, for example, when using a tumour xenograft model, the inability of an adenovirus to replicate in murine tissues;

this will limit the assessment of the replication effects of the virus. In addition the mouse host strains often used are immune deficient; therefore assessment of immune response to the OV will also be limited. One other potential disadvantage with the use of tumour-bearing models is that they have a reduced life span due to tumour growth. Therefore, the ability to assess long-term safety might be limited.

Non-tumour-bearing, biologically sensitive, animal species can be used to evaluate the safety of the OV to complement the information obtained from tumour-bearing models.

When the OV contains a transgene, it is important that the animal species be pharmacologically responsive to the expressed protein. If the expressed transgene is inactive in the animal species (e.g., human GM-CSF is inactive in mice), OV can be engineered to express the analogous species-specific transgene and used in non-clinical studies to assess both activity and safety. In these instances, characterization of the OV administered to animals should be performed to assess the extent of comparability to the intended clinical OV, e.g., level of transgene expression.

It is important to consider the intended clinical administration procedure for the OV when selecting the animal species. If the route is non-standard, such as intrahepatic arterial injection, a large animal species may be needed.

3.3 Pharmacology / POC

Aspects of biological activity such as POC and potential mechanism of action can be demonstrated using both *in vitro* and *in vivo* models. It is important to assess the bioactivity and pharmacologic profile of the OV to understand the ability of the OV to induce the desired biological effect(s) *in vivo*. Studies should contribute to establishment of the scientific justification for administration of the OV in a specified target population by addressing the biological feasibility of the use of the OV in the target cancer, including selectivity of replication and anti-tumor activity. In addition, non-clinical studies help to: 1) define a pharmacologically active dose range, with establishment of an optimal biological dose and a minimally effective dose, 2) determine a potentially optimal route for product administration, and 3) define a dosing schedule for early phase clinical trials.

3.4 Biodistribution

Biodistribution studies in animals address OV dissemination to target and non-target organs. OV dissemination can be detected using an assay for nucleic acid sequences. It is also recommended that testing for the presence of OV sequences in animal organs and tissues be done by at least one sensitive assay such as quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR).

In parallel with determining the biodistribution profile of the viral genome is understanding the infectious potential of the administered OV. Viral titers and viral nucleic acid levels should be quantitated because OV are replication-competent and may have the potential to infect and replicate in normal tissues. The presence of viral genome sequences or transgene expression in non-target tissues at significant levels should trigger further analysis of the tissue/biological fluid. These data, coupled with toxicology study results, such as clinical pathology and histopathology evaluation, will determine whether virus presence and/or gene expression correlates with adverse safety signals in animals.

3.5 Viral Shedding Considerations

For the purposes of this ICH Considerations document, viral shedding is defined as the dissemination of the OV through excreta of the patient.