



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

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、18年度は、FDAのガイダンスを基に、遺伝子治療による遅発性の有害事象に関するリスク評価法と被験者の長期フォローアップのあり方を考察した。19年度は、遺伝子治療用ウイルスベクターを投与した患者からのウイルスやベクターの体外排出試験の現状と、ウイルス排出のリスク評価において考慮すべき事項を明らかにした。20年度は、ICH見解を基に、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を明らかにした。

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。

18年度は、FDAにより発出されたガイダンスを中心に、遺伝子治療薬による遅発性有害事象のリスク評価と被験者の長期フォローアップ観察のあり方について検討した。19年度は、遺伝子治療用ウイルスベクターを投与した患者からのウイルスやベクターの体外排出(shedding)試験の現状と、ウイルス排出のリスク評価において考慮すべき事項を検討した。20年度は、腫瘍溶解性ウイルスに関するICH見解を基に、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を検討した。

B. 研究方法

18年度は、FDAから2006年11月に製薬業界に向けて発出されたガイダンス「Guidance for Industry: Gene Therapy Clinical Trials - Observing Subjects for Delayed Adverse

Events (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) [1]及び関連する各種基準やガイドライン[2-18]についても調査研究を行い、遺伝子治療薬による遅発性有害事象のリスク評価と被験者の長期フォローアップ観察の方法、わが国との違いなどを検討した。

19年度は、遺伝子治療臨床試験におけるウイルス排出試験データについてまとめた論文[19]、日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)遺伝子治療専門家会議により開催されたウイルス/ベクター排出に関するICHワークショップ(2007年10月30日)の概要資料[20]、及び日本版バイオセーフティクリアリングハウス[21]で公開されている、日本で承認された遺伝子治療用ウイルスベクターの第一種使用規程・生物多様性影響評価書を中心に、遺伝子治療用ウイルスベクターを投与した患者からのウイルスやベクターの排出試験の現状とウイルス排出のリスク評価において考慮すべき事項を検討した。

20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) [22]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

C.1 遺伝子治療による遅発性の有害事象に関するリスク評価法と被験者の長期フォローアップ観察

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、FDAは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[2])。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、2006年11月に本ガイダンスを発出した。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[2]を補足する内容ともなっている。

以下に本ガイダンスの概要を示す。

C.1.1 序

本ガイダンスは、遺伝子治療用治験薬のスポンサーに対して、遺伝子治療用治験薬を使用した被験者における遅発性の有害事象に関してのデータの収集法を含めた実験計画の勧告を提示するものである。

内容は、

- (1) 遺伝子治療用治験薬投与後に生じる遺伝子治療に関連する遅発性有害事象のリスク評価の方法
- (2) 被験者の長期フォローアップ観察で科学的に意味のある情報を得るための方法
- (3) 長期フォローアップ観察の期間と計画に関する具体的なアドバイス

本ガイダンスでは以下のトピックはカバーしない。

- ・ 生殖細胞系列への予期せぬ遺伝子導入
- ・ 感染症予防に用いるワクチン

- ・ 被験者の長期フォローアップ試験の実施が市販後又は承認時の要求事項である場合
- ・ 導入遺伝子を持たない腫瘍溶解性増殖性ウイルス
- ・ 被験者に接触した人、市民、又は環境中にベクターが排出されるリスク

遺伝子治療臨床試験が被験者に対して長期のリスクを与えるものの場合、遺伝子治療臨床試験ではそのリスクを軽減するために長期フォローアップ観察を実施しなければならない。本ガイダンスは、以下に記載する場合を除き、遺伝子導入技術を用いた臨床研究のすべての被験者に対して適用される。本ガイダンスの勧告内容は遅発性の有害事象、すなわち遺伝子治療用治療薬投与後1年以上たってから発現する有害事象に関する長期観察の実施に限定される。

C.1.2 背景

C.1.2.A 遺伝子導入技術を受けた後の遅発性有害事象のリスクの可能性

遺伝子導入技術を使用した被験者には、遺伝子や遺伝子の運搬に用いられるその他の物質の持続的な生物活性による遅発性の有害事象のリスクがある。持続的な生物活性は、製品の持続的な臨床効果を得るためには必須であるかもしれない。しかし、持続的な生物活性は正常な細胞機能に対して副作用を示す可能性があり、被験者に対して、場合によっては数ヶ月、数年も経った後で生じる可能性のある有害事象の進展のリスクを負わせるものである。

遺伝子導入技術を使用した後で起こる遅発性の有害事象のリスクを上げると考えられる要因には、ウイルスベクターの持続性、遺伝子の宿主ゲノムへの組み込み、導入遺伝子の長期的発現、宿主遺伝子の発現の変化が挙げられる。ウイルスベクターの持続性は、潜伏感染による場合もあるが、遺伝子の持続的発現やウイルス

感染の遅発性の影響を可能にする。ウイルスベクターから宿主のゲノムDNAへの遺伝物質の組み込みは、悪性形質転換のリスクをもたらす。導入遺伝子の発現の延長は無秩序な細胞増殖や悪性形質転換、自己抗原への自己免疫様反応、予測できない副作用に由来する長期リスクとも関連する可能性がある。宿主遺伝子の発現の変化は予測不可能で望ましくない生物学的事象をもたらす可能性がある。

C.1.2.B これまでのFDAの勧告

FDAは2000年9月、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療に関するガイダンスを発出した[2]。レトロウイルスは、非臨床研究においてレトロウイルスベクターで遺伝子導入した細胞を投与後に悪性腫瘍が発症したケースが報告されていたため[3]、最もリスクが高いと考えていたからであり、そのガイダンスではレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療の被験者に関する長期観察の実施に特化した勧告を行った。

FDAは当時、その他の遺伝子治療薬を投与された被験者の長期リスクに関して追加の情報を考え、Biological Response Modifiers Advisory Committee (BRMAC)の会議を2000年11月17日、2001年4月6日、2001年10月24日の3回開催してアドバイスを求めた。2001年以降、BRMACの勧告を検討し、遺伝子導入技術に関わる研究のスポンサーに対して長期フォローアップ観察の計画を提出するよう求めた。通常、スポンサーには被験者に対して遺伝子治療に関連する遅発性の有害事象の可能性を15年間観察すること、最低5年間は毎年検査を実施し、後の10年間は直接あるいは書面で毎年問い合わせを行うことを求めた。

C.1.2.C 遺伝子治療団体からの問題提起

遺伝子治療団体のメンバーは、遺伝子導入技術を用いた後の長期フォローアップに関する

問題を公開フォーラムで議論するよう求めた。そこで、2004年6月、米国遺伝子治療学会と共同で公開ワークショップが開催され[4]、以下の課題が確認された。

- 全ての遺伝子治療薬が遅発性の有害事象について同じリスクを持つわけではなく、全ての遺伝子治療薬に関する一律の長期フォローアップの勧告は製品の特性を考慮していない。
- 被験者の中には、余命が短い、健康状態が悪い、突然変異誘発物質を使用したなど、長期フォローアップが無意味な人もいる。
- 長期フォローアップの期間や計画の勧告はあまり具体的でない。

これらの問題点についてはC.1.4項、C.1.5項で述べる。

C.1.3 用語の定義と略号

- 遺伝子治療用医薬品：導入した遺伝物質の転写または翻訳を介して効果を得る製品又は核酸、ウイルス、遺伝子改変微生物として投与されたもので宿主ゲノムへの組み込みを介して効果を得る製品のこと。In vivo で使用する場合と、投与前の細胞に ex vivo で導入される場合がある。
- 遺伝子導入：遺伝物質を細胞に導入すること。
- 遺伝子導入系：ベクター、調節機構、ベクターの組成、ベクターの運搬の経路と方法を組み合わせたもの。
- 遺伝子導入技術：遺伝物質を単独で、あるいは脂質、ウイルス、その他の微生物などの適切な媒体を用いて、転写、翻訳、宿主ゲノムへの組み込み、あるいはこれらの組み合わせにより効果を得るために使用すること。遺伝子導入技術の使用は、被験者への製品の直接の投与による場合と、被験

者への投与前に ex vivo で製品に用いた細胞や組織を用いる場合がある。

- IND：新薬臨床試験開始届
- (DNAの)組み込み：外来のDNA配列をゲノムに取り込む過程。
- 潜伏感染：ウイルスが宿主に明白な臨床症状を呈さずに存在する期間。
- 長期フォローアップ観察：通常の治験で予定される観察を継続し、延長して評価すること。長期フォローアップ観察は遺伝子治療のように遅発性の有害事象のリスクが高いと考えられる新薬試験では不可欠である。
- (非臨床での)最大投与量(MFD)：ヒト以外の動物に投与可能な最大量。限度値は動物の大きさ、投与部位、製品の特性に依存する。MFDは臨床的に意義のある投与量とは等価ではない。
- 持続性：遺伝物質の導入に関して、遺伝子導入物質を投与した宿主に遺伝子配列が継続して存在することを指す。遺伝子配列は宿主ゲノムに組み込まれる場合と遺伝子配列を持つベクターが潜伏感染する場合がある。
- 非臨床試験：ヒト以外の動物を用いたり、ヒトやその他の動物から単離した細胞、組織を用いて実施する治験薬の試験。非臨床試験は臨床試験前あるいは試験中に実施される。
- (ウイルス感染の)再活性化：潜伏感染の後で、ウイルス感染の症状あるいは無症候性ウイルス感染が再度出現すること。
- 導入遺伝子：宿主細胞に導入された外来遺伝子。
- ベクター配列：遺伝子治療用ベクターに導入されたDNAまたはRNAいずれかの特定の核酸配列。配列にはベクター骨格、導入遺伝子、調節配列の遺伝子治療用ベクターすべての構成要素が含まれる。

- ・ ウイルスベクター：遺伝物質を運ぶように
改変されたウイルス。

C.1.4 遺伝子治療の治験における遅発性リスクの評価に用いられる非臨床試験データ

C.1.4.A 遺伝子治療により起こる可能性のある遅発性のリスクの評価基準

遺伝子治療技術の使用による遅発性の有害事象のリスクが低い場合、通常、長期フォローアップ観察は求めない。製品のリスク評価には、非臨床及び臨床で得られた利用可能な証拠を用いること。遅発性の有害事象のリスク評価には、当該製品及び類似の製品について実施された試験に基づく現在までの情報を用いてもよい。データの蓄積に従い、製品のリスクを再評価することが重要であり、適合する場合は長期フォローアップ観察に関するプロトコルを修正すること。

リスク評価とは継続的なプロセスである。新たな情報により長期フォローアップ観察の必要性や現行の試験の修正が示されるかもしれない。例えば、最近の報告で当該製品や類似の製品に関する新たなリスクが判明した場合、これらのベクターの投与を受けた被験者の長期リスクを軽減するには長期フォローアップ観察が必要となる。同様に、製品が遅発性のリスクと無関係であることを示唆する十分なデータが蓄積された場合には、長期フォローアップ観察の規定は軽減あるいは削除が適切である。

当該製品または類似の製品に関して、既に得られている適切な非臨床及び臨床試験の経験は、遅発性の有害事象の評価において非常に関連がある。同じベクタークラス、同様の投与経路、同じ臨床適応の製品での経験は役に立つ情報となる。

リスクのレベルを評価するには、図1「遺伝子治療による遅発性の有害事象のリスク評価のためのフレームワーク」を参照すること。これにより遅発性の有害事象のリスクが低い場

合には、被験者のリスク軽減のための長期フォローアップ観察の計画は必要ないであろう。質問1~3の回答には非臨床試験の結果が役に立つ。当該INDをFDAに提出するときには、有害事象のリスク評価に関連するすべてのデータを示すこと。

以下の質問に回答するために図1のフレームワークを使用すること。

- ・ 質問1：当該遺伝子治療用医薬品は *ex vivo* での細胞の改変のみに使用するものか？

「いいえ」の場合質問2に、「はい」の場合質問3, 4に進む。

- ・ 質問2：非臨床試験結果によりベクター配列の持続性が認められるか？

「いいえ」の場合、遺伝子治療に関連する遅発性の有害事象のリスクは非常に低く、長期フォローアップ観察も必要ないであろう。「はい」の場合、質問3, 4にすすむこと。

ベクターの持続性が不明の場合、リスク評価には持続性と仮定するか、あるいは適切な動物種を用いてベクターの持続性を評価する非臨床試験を実施することが望ましい。非臨床試験の計画と詳細及び生体内試験におけるPCR試験の望ましい感度については、C.1.4.B.「ベクターの生体内分布と持続性を評価するための非臨床試験計画の考慮事項」を参照すること。ベクターの持続性は、ベクターの最終投与後に実施する試験において、ベクター配列がPCR試験の閾値以上の検出レベルにあり、複数の時点で下降傾向が認められないことで示される。反対に、感度の良いPCR試験でもベクター配列が検出できない場合、あるいはベクター配列の検出が時間経過に伴い下降する場合には持続性があるとはいえない。

- ・ 質問3：ベクター配列は組み込まれているか？

「いいえ」の場合、質問4に進むこと。「はい」の場合、臨床プロトコールには長期フォローアップ観察を入れることが求められる。

・質問4：ベクターは潜伏感染、再活性化能を有するか？

「いいえ」の場合、その遺伝子導入技術を受けても遺伝子治療による遅発性の有害自称が起こるリスクは低い。長期フォローアップ観察は必要ないであろう。「はい」の場合、すべての臨床プロトコールに長期フォローアップ観察を入れることが求められる。

類似の製品の投与による遅発性の有害事象のリスクが低いという研究室レベル、非臨床試験での証拠がある場合は、長期フォローアップ観察は必要ないと思われる。類似の製品のデータを提出する場合、明快な説明を提示すれば当該製品との関連性を評価することが可能である。

以下に2つの例を示す。

- ・当該製品がプラスミドで、類似の製品もプラスミドであるが、治療用遺伝子をコードする配列が異なる。類似の製品は非臨床及び臨床試験に使用されており、当該製品と同一の投与経路、同一の最終処方である。類似の製品のベクターに持続性がないことを示す論文を引用することは当該ベクターの持続性に関して適切に述べているといえる。
- ・当該製品と類似の製品とは投与経路のみ異なる。類似の製品は腫瘍内に投与する。当該製品は静脈内に投与する。腫瘍内に投与した場合にはベクターに持続性がないことが報告されている。このような場合、類似製品の試験から得られたデータは十分に関連性があるとはいえない、なぜなら当該製品の全身性投与に関するデータがないからである。したがって、被験者の長期リスクを軽減するための長期フォローアップ観察が必要ないと結論付けるには

類似性は不十分である。類似製品の試験で関連するデータがない場合、非臨床試験で当該製品を静脈内投与し、ベクターの持続性のリスク評価を行うことを推奨する。

当該ベクターはヒト宿主に持続性がなく、ベクターのDNAはヒトゲノムには組み込まれないとの結論を支持する十分な証拠が類似製品の試験で得られていると考える場合、長期フォローアップ観察を行わない臨床プロトコールを提出する判断をするかもしれない。そのような申請書をFDAが審査し、申請書の調査あるいは他の情報から判断に同意できない場合には、長期リスク軽減のために遅発性の有害事象の長期フォローアップ観察の実施が不可欠であると結論付ける。

遅発性の有害事象に関する長期フォローアップ観察の実施を求める例を以下に示す。

- ・非臨床毒性試験で、導入遺伝子の発現が遅発性の毒性と関連性があることを示す場合。
- ・導入遺伝子が宿主の遺伝子を機能的に代替する場合。導入遺伝子産物が免疫原性を持つ可能性がある場合。
- ・非臨床試験データではベクターの持続性がないことを示すが、短期の臨床試験においてベクターの持続性を示すデータが集積された場合。

C.1.4.B ベクターの生体内分布及び持続性評価のための非臨床試験計画における考慮事項

C.1.4.Aで論じたように、ベクターの持続性は遺伝子導入技術を受けた後の遅発性の有害事象のリスクを高めるものである。実際、ベクターが長期間持続するほど、遅発性の有害事象のリスクの期間と程度は大きくなる。ベクター配列を高感度で定量的に検出可能な方法を用いて非臨床生体内分布試験を実施することを推奨する。そのような試験ではin vivoで直接投与後のベクターの非標的組織への分布と非

標的組織、標的組織両方でのベクターの持続性を調べるように計画すること。可能であり妥当な場合には、ベクターの導入又はベクターの複製が可能な動物種、目的導入遺伝子に生物学的応答を示す動物種を試験に用いることが望ましい[5]。非臨床試験の期間は、用いる動物モデルにより異なる。被験者での遅発性の有害事象の予測は、可能であれば動物での適切な長期観察のデータにより評価する。

動物での生体内分布試験は、独立試験としても毒性試験の一部として実施することも可能である。ベクターの局在と持続性を評価できるように、動物試験の計画には以下の点を考慮すること[6]。

C.1.4.B.1 動物試験の計画

- 最終処方を変更すると生体内分布が変わる可能性があるため、臨床試験で用いる最終処方の製品を用いること。
- 雌雄両方を用いること、単一の性を用いる場合はその妥当性を示すこと。
- 一群の各時点の測定に、げっ歯類の場合は雄雌各5匹以上、げっ歯類以外では雄雌各3～5匹を用いること。
- 試験計画では、動物の年齢や生理的状態など、ベクターの分布や持続性に影響する可能性のある要因を考慮すること。
- 可能であれば、ベクターの投与には臨床の投与経路を用いること。
- ベクターの生体内分布について、媒体のみのコントロール群と最大投与量（MFD）または臨床投与量に該当する量を投与した動物の群で評価すること。他の投与量での試験では用量依存的な情報が得られる。
- 同一の動物モデルを用いて実施した別の毒性試験で安全性指標が設定されていない場合、ベクターの存在・持続性と副作用との相関の可能性を評価するために、生体内分布試験に適切な安全性指標を含めること。

安全性指標には臨床観察、体重、臨床病理、臓器病理、組織病理を含めること。

- ベクターの分布と持続性の動態を調べるために、複数の時点で調べる。ベクター配列の組織からのクリアランスを評価するため、ベクター検出のピークと予想される時点と、それ以降の数点で調べるのが望ましい。

C.1.4.B.2 組織の採集と分析

- 少なくとも以下の組織パネルを収集して分析すること：血液、投与部位、生殖腺、脳、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓。ベクターの種類と導入遺伝子、投与経路によっては他の組織の評価も考慮すること（例えばリンパ節、皮下・筋肉内投与では投与と反対側の部位、骨髄、目など）。
- 他の組織試料による汚染の可能性がない組織採取法を選択すること。
- 試料のベクター配列の分析には定量的で高感度なPCR試験を用いること。選択した試験法が動物及びヒトの組織でベクター配列を特異的に検出できることを示すデータをINDに提出すること。PCR技術は絶えず変化しており、試料の分析前にアッセイ法について検討することを勧める。現時点での推奨は以下のとおりである：
 - 試験の定量限界はゲノムDNA 1 μ gあたりベクター50コピー以下であり、この限界量を95%信頼限界で検出可能であること。
 - 各組織で最低3サンプルを用いること。各組織の1サンプルには、PCR反応の妥当性を調べるために、コントロールDNAのスパイクと、既知量のベクター配列を入れること。スパイクコントロールでは当該PCR試験の感度がわかる。
 - 調べたい組織と試料のサイズを考慮して、組織あたりの繰り返し数の根拠を

示すこと。

C.1.4.B.3 その他の考慮事項

試験により生体内分布とベクターの持続性を適切に評価できるように、治験開始前にFDAと相談することを勧める。各ベクターの *in vivo* 評価には結果と解釈に影響する多数の要因がある。

C.1.4.C 遅発性の有害事象のリスクとしてのベクターの組み込み能と再活性化

現在治験に用いられている3種類の遺伝子治療用ベクター（ガンマレトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス）は遅発性の有害事象のリスクが高いと考えられる。従って、FDAはこれらのベクターを投与された被験者の長期リスクを軽減するために、臨床での長期フォローアップ観察試験が必要と考えている。ガンマレトロウイルスとレンチウイルスは組み込み能があり、ヘルペスウイルスは潜伏感染と再活性化能がある。この項では、これらのリスクとこれらの能力を持たないベクターを用いた遺伝子導入技術の相対的に低いリスクについて論じる。

遺伝子治療の治験に用いられるベクターのほとんどは宿主細胞DNAへの組み込みの性質により分類できる（表1）。表1と図1の質問3の回答に示すように、組み込み能を持つベクターはそのベクターを投与された被験者の長期リスクの軽減のために長期フォローアップ観察を行うことが必要とされる十分なリスクがある。

ヘルペスウイルスをベースにした遺伝子導入用ベクターも、遺伝子治療薬として用いる場合には、潜伏感染と再活性化能により遅発性の有害事象のリスクがある。潜伏感染の間、ウイルスとその遺伝子産物は不活化されている。再活性化は最初に投与してから数ヶ月あるいは数年も遅れて起こる。

ベクターの組み込み能は、遺伝子治療薬としての有用性を高めるために改変される場合がある。例えば、アデノウイルスベクターはそのDNAを組み込めるように改変される場合がある[6-10]。他の例として、プラスミドDNAベクターを細胞に導入する方法を、より高い組み込み頻度が得られるよう変更することもある[11]。遺伝子導入系の変更が持続性や組み込み能を変えてしまう場合、以下の行動をとること：

- ベクターの持続性を評価する適切な動物モデルを用いた非臨床試験データを提出すること。C.1.4.B.3に示すように、治験前に試験計画についてFDAと相談すること。
- ベクターに持続性がない場合、遅発性の有害事象のリスクは低いと予測される。長期フォローアップ観察は判断に任せる。
- ベクターが持続性を示す場合、ベクターの組み込みや潜伏感染・再活性化能を評価する非臨床試験を実施することが望ましい。
 - 遺伝子の組み込みや潜伏感染による持続性の証拠が認められなければ、遅発性の有害事象のリスクは低いと予測される。長期フォローアップ観察は判断に任せる。
 - 遺伝子の組み込みの証拠はないが、潜伏感染や再活性化についての結論が出ない場合や実施できない場合、潜伏感染又は再活性化の証拠が認められる場合、遅発性の有害事象のリスクの予測は確定できない。長期フォローアップ観察が求められる。
- ベクターの組み込みに関する非臨床試験ができない場合、遺伝子の組み込みが認められる場合あるいはベクターが潜伏感染して持続し再活性化されるかもしれない場合、遅発性の有害事象のリスクは高いか未知であり、被験者に対する長期フォローアップ観察は当然必要である。
- ベクターの組み込みに関する試験を実施

していない場合、当該ベクターが遅発性に有害事象について高リスクでないことを評価するための以下の項目を含むデータを提示すること。

- なぜベクター組み込み試験を実施しないのかの説明。
- 当該製品による遅発性の有害事象のリスク評価を支持する証拠。

プラスミド、ポックスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）をベースにしたベクターは組み込みや潜伏感染後の再活性化の性質を持たないベクターであり、それに反する証拠がないため、遺伝子治療による遅発性有害事象のリスクは低い。しかし、当該ベクターが組み込みや再活性化能が低い場合でも、非臨床試験や臨床データによりベクターの持続性が認められる場合、遅発性の有害事象のリスクの懸念が生じるため、長期フォローアップ観察が必要となる。例えば、AAVベクターは導入遺伝子の発現が持続性を示すことから、自己免疫疾患の可能性があり、遅発性の異常な免疫応答のリスクに考慮する必要がある。

一方、現在遅発性のリスクがあると考えられているベクターでも、リスクを低減するための改変が行われることもあり得る。したがって、新規ベクタータイプで遅発性有害事象のリスクが低減していることを示すデータを提示すれば、データに基づいて当該ベクター投与後の被験者の長期フォローアップ観察の必要性の再評価が可能となる。

C.1.5 長期フォローアップ観察のプロトコルに関する勧告：臨床で考慮すべき事項

本項では、長期フォローアップ観察の計画と実施に適する基本原則を勧告する。

C.1.5.A 長期フォローアップ観察の実施の決定

本項は長期フォローアップ観察が妥当なプ

ロトコルに適用される。長期フォローアップ観察は以下の場合に必要なとされる：

- ・ 図1の回答で当該製品のリスクが高い又は未知の場合。
- ・ 製品に関する情報全体をみて、長期フォローアップ観察が被験者のリスクを軽減すると考えられる場合。具体例はC.1.4.Aの最後の段落を参照すること。

通常は長期フォローアップ観察が必要とされる場合でも、状況によっては治験の対象患者群の適合性にに基づきその観察は科学的に意味がないと判断することもあり得る。長期フォローアップを実施しないと判断した場合、被験者群の観察を継続しないという判断の正当な理由をINDに提示しなければならない。以下の項では、長期フォローアップ観察の実施で得られる科学的に有益なデータの収集のための治験対象患者群のモニタリングの適切性を判断するのに用いる選択基準に関する情報を提供する。また、フォローアップ観察の期間と長期フォローアップでの観察に関する必要最低限の勧告について議論する。

C.1.5.B 治験対象患者群の長期フォローアップ観察の適切性

選択された治験対象患者の余命が短いことが予想される場合、多重疾患に罹患している場合、他の薬剤を投与した場合などでは、被験者の長期フォローアップ観察の有用性は低いかもしれない。例えば、被験者が広範囲に及ぶ疾患に罹患していたり、放射線や化学療法など遅発性の有害事象を引き起こす可能性があるものを用いた場合、長期フォローアップ観察はほとんど効果がない。反対に、限定された疾患の場合や疾患がない被験者、併存疾患でも遅発性の有害事象の可能性のある薬剤の使用が限定されている場合、長期フォローアップ観察は非常に価値がある可能性がある。遺伝子治療の実施により余命や併存疾患が変わる場合、その治

験における長期フォローアップ観察の妥当性に関する当初の評価を再検討する必要がある。

C. 1. 5. C 望ましいフォローアップ観察期間

長期フォローアップ観察は、リスクのある被験者を観察するのに十分な期間実施すべきであり、その期間は製品の特性、投与法の性質、遅発性の有害事象発現が予想される時期に依存する。2000年11月17日、2001年4月6日及び2001年10月24日のBRMACでは長期フォローアップ観察の実施期間として、15年間を含めたいくつかの異なる期間を議論した(C. 1. 2. B参照)。FDAではBRMACの助言に基づき、最低15年間はフォローアップ観察を行うことを推奨した。しかし、個別の治験では支持する証拠に基づき、より短期間の観察でも適当な場合があることが判明した。長期フォローアップ観察の期間の決定に影響する要素は以下のようなものが挙げられる：

- ・ in vivoでのベクターの持続期間
- ・ in vivoでの導入遺伝子の発現期間
- ・ 被験者群の事前、同時あるいは事後の遺伝子治療の実施
- ・ 被験者群の予想される生存率
- ・ 長期フォローアップ観察実施の可能性と科学的重要性に関連するその他の要因

C. 1. 5. D フォローアップ観察の基本原則

このフォローアップ観察に関する勧告はBRMAC会議での議論と勧告に基づいている。臨床データの蓄積に従い、長期フォローアップ観察の期間に関する勧告は変わりうる。

長期フォローアップ観察は臨床試験に参加した被験者の遺伝子治療に関連した遅発性の有害事象を見出すのに適切のように設計されていることが重要である。本文書では、試験プロトコールの一部となる長期フォローアップに関する一般的で必要最低限の基本原則の勧告を提示する。

治験責任医師は、治験薬投与群及び対照群の被験者各人について、全ての観察結果その他の治験に関連するデータを記録した適切で正確な病歴記録を作成し維持することが求められる。この記録には、製品を投与する前の全ての疾患、状態、身体的異常を記録した基準病歴が含まれる。治験のスポンサーは、治験責任医師ではない医療提供者(例えば被験者の担当医師、医師の助手、看護師など)に対して、そのような観察記録を取り治験責任医師に報告するための様式を作成することが望ましい。病歴記録には医療機関への定期的な訪問から得られた情報やベクター配列の持続性の試験結果も入れるべきである。ベクター配列の直接試験が被験者に侵襲的である場合、ベクターの持続性を示す代替試験を用いることもできる。

少なくとも最初の5年間は以下について実施することが望ましい。

- ・ 遺伝子治療に関連する遅発性の有害事象の検査の実施。
- ・ 治験責任医師は投与した発がん性物質その他の医薬品の全てに関する詳細な記録を病歴記録に残し、それらの副作用情報に容易にアクセスできるようにすること。
- ・ 各被験者について、病歴、健康診断、臨床検査など新たな知見を引き出して記録するために、最低年に一度の医療提供者への定期的訪問計画を立てること。
- ・ 以下を含む新たな臨床症状の出現を記録するための方法の確立。
 - 新たな悪性腫瘍
 - 神経疾患の新たな発症や既存の神経疾患の悪化
 - リューマチその他の自己免疫疾患の新たな発症や既存の疾患の悪化
 - 血液疾患の新たな発症
- ・ 予期せぬ疾患や入院を含めた遅発性の有害事象の報告に関して被験者と医療提供者との協力を引き出すような計画を立てる

こと。

少なくとも次の10年間は、治験責任医師に以下について確実に行わせることが望ましい。

- ・ 最低年1回は被験者に連絡すること。検査を行わない場合には、被験者が病院を受診するかわりに電話又はアンケートにより連絡をとってもよい。
- ・ これまでの試験結果を考慮して適切なフォローアップ方法を継続すること。例えば、被験者のこれまでの試験結果でベクターの持続性が示された場合、ベクター配列をモニターすることが望ましい。

全ての長期フォローアップ観察は、FDAの臨床試験に関する規制に従って実施すること。臨床の長期フォローアップ観察での有害事象に関するデータの収集と報告に関する追加の勧告は以下のとおりである。

1. 有害事象の発見: 遅発性の有害事象の発見を促すため、プロトコルには適切な医療専門家を特定し、その人による観察を被験者の有害事象発現の評価に用いることを推奨する。適切な医療専門家としては、治験に関与していない医者、助手、看護師も含まれる。そのような特定の個人に、有害事象の報告を治験担当医師に迅速に提供するように周知するように手配すること。

被験者の協力と収集データの質を高めるために、被験者に対して自己の観察と有害事象の報告を奨励すること。被験者が治験担当医師への報告に用いることができる道具としては、被験者の健康に関する日記やパンフレット、治験担当医師の連絡先を記載したラミネートされた財布サイズのカードなどがある。

IND安全性レポート: 製品の使用による有害事象については報告要件に従う必要がある。長期フォローアップ観察の進展に従って得られた、遺伝子治療薬の使用による重篤なものや予期しないものを含めた有害事象

の経験、新しい知見や発見を、治験に参加した各医師に対して周知させる必要がある。各IND安全性レポート（治験医及びFDAに提出が求められている）では、これまでファイルされた同様の有害事象経験に関する報告書の全て特定し、有害事象の重大性をこれまでの同様の報告を踏まえて分析しなければならない。受け取った安全性情報の全てを迅速に調査すること。有害事象と遺伝子治療薬との関係が不確かであれば、追加の調査を行うこと、及び被験者全てに有害事象のリスクを告知するためのインフォームドコンセント文書とパンフレットの修正を行うことが望ましい。治験担当医師は以前治験に参加した被験者に連絡を取り、新たなリスクに関する情報を報告することが求められる。

2. INDへの年一度の報告/情報の要約: INDが開始され、長期フォローアップ観察が終了するまでの期間、年報をファイルしなければならない。この報告書には前年の臨床、非臨床試験で得られた知見、過去に報告したIND安全性報告、最も高頻度の有害事象、最も重篤な有害事象に関して要約あるいは表にして提出する。
3. 臨床プロトコルの修正: 臨床データにより製品が遅発性のリスクと関係ないことが示唆された場合、被験者の長期フォローアップ観察に関する臨床プロトコルの変更を望むかもしれない。しかしこの場合、変更前にFDAに対してINDプロトコルの修正を届け出なければならない。
4. 定期検査: 長期フォローアップ観察では、当該プロトコルのリスク評価によりもっと頻繁な検査が必要な場合を除いて、最初の5年間は少なくとも年に一度は医療専門家による定期検査を実施することを推奨する。例えば、当該製品または類似の製品を投与した被験者が急激に進展する

可逆性の遅発性の有害事象を発症し、その症状が製品によるものと考えられる場合には、年に2回もしくは4回の頻度で観察を実施するのが望ましい。このような定期的な評価には、簡単な病歴記録と、臨床的重大な有害事象の発現の兆候が見られるかどうかにより焦点を当てた検査を行う必要がある。定期検査には、血液学的検査などの適切な検査を行うこと。長期フォローアップ観察は研究目的のみで行うものであり、製品の使用に関連しない健康上の問題の評価や治療のために実施するのではない。

6. **ベクター配列**：長期フォローアップの間、被験者のベクター配列の持続性の試験を、ベクターが検出されなくなるまで少なくとも年に一度は継続実施することが望ましい。その試験法は、ベクター配列を検出するのに十分高感度である必要がある。過度に侵襲的ではない方法で遺伝子導入細胞集団をサンプリングすることが望ましい。(造血幹細胞での存在を検査する場合、末梢血は骨髄の生検よりもサンプルとして望ましい。) 遺伝子導入細胞を得るのに侵襲的な手段が必要な場合、ベクターの持続性を測定する別の方法(例えば、導入遺伝子産物の発現量、臨床効果など)を考慮すること。ベクターが検出されないことを示すデータはINDの修正となる長期フォローアップ計画を改定する根拠を与えうる。このようなプロトコルの修正には、当該製品のリスク評価、及びベクターの持続性の低下がリスクに与える影響の評価を含めること。

C.1.5.E 長期フォローアップ観察が必要な治験でのインフォームド・コンセント

インフォームド・コンセントの文書には研究の目的、被験者の参加期間、従うべき手続きに

ついて記載する必要がある。従って、インフォームド・コンセントでは、長期フォローアップ観察の目的と期間、被験者に求められる定期検査の受診場所と受診の時間間隔、あるいは他の手段による連絡法等を説明する必要がある。

レトロウイルスベクターのインフォームド・コンセントに関する補足の勧告に関してはC.1.5.F.3に記載する。

C.1.5.F 組み込み型ベクターに関する特別の考慮事項

本項は、組み込み型のベクターの被験者、すなわちレトロウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターにより体外で遺伝子改変を行った細胞を導入した被験者にのみ適用される勧告である。マウスで実施した非臨床試験のうち少なくとも2件で、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子をマウス細胞DNAに組み込むことにより悪性形質転換が起こったことが報告されている[12,13]。さらに、臨床試験の1件で、レトロウイルスベクターを用いて、*ex vivo*で改変した造血幹細胞を投与されたX-SCID患者11名のうち3名で急性のT細胞クローン増殖を発症し[14,15]、うち1名は死亡した[15]。これらの白血病は被験者の細胞DNAにレトロウイルスベクター由来のDNAが組み込まれた結果生じたものである。X-SCIDの患児がレトロウイルスベクターを用いた後で悪性腫瘍を発症したという結果[14]は、現時点ではガンマレトロウイルス、レンチウイルス由来製品を含むレトロウイルスベクターのような組み込み型のベクターを被験者に用いた場合のデータ収集に関して追加の勧告を促した。

C.1.5.F.1 データの収集

関連する代用細胞を用いて、ベクターの組み込み部位のパターン(ベクター配列が組み込まれた細胞がベクター組み込みのパターンの観点で見たときにポリクローナルか、オリゴクロー

一ナルか、モノクローナルか)を評価する試験を実施することを推奨する。FDAは、組み込み型のベクターを用いた治験の被験者で、(1)標的細胞が高い複製能を有し、長期間生存する細胞であることが知られている場合、(2)適切な代用細胞が試験しやすい場合、ベクター組み込みパターンの評価を考慮する。例えば、造血幹細胞は高い複製能を有し、長期間生存する。造血幹細胞が遺伝子治療の標的細胞の場合、末梢血をベクターの持続性試験の代用細胞として用いることができる。試験が適当と判断された場合、末梢血が代用細胞の場合、純化した造血細胞サブセット(例えばリンパ球と顆粒球)の分析を実施することになる。一方、組み込み型ベクターをin vivoで肝細胞に用いた場合、最終分化した肝細胞は通常環境では分裂せず、またベクターの持続性を非侵襲的に試験可能な妥当な代用細胞は存在しないため、組み込み部位の分析を実施する必要はない。これらの分析の実施方法と実施計画については以下を参照すること。

- (a) ベクター組み込み部位のパターンを評価する方法の選択は、適切な陽性対照、陰性対照を用いて得たデータに基づいて行うこと(すなわち、ベクターコピーの組み込まれた部位と数が既知の標的細胞と、ベクターの組み込みのない標的細胞)。試験ではアッセイの感度、特異性、再現性を示すこと。
- (b) PCR試験の結果、少なくとも1%の代用細胞でベクター配列が陽性の場合、ベクター組み込み部位のパターンを調べることが望ましい。代替法として、ベクター組み込み部位のクローナリティーを分析するかどうかの決定を、クローナリティー検出に用いるアッセイ系の感度の評価に基づいて行っても良い。
- (c) 被験者から最初の5年間は6ヶ月以内の間隔で、次の10年間もしくは試料からベクタ

ー配列が検出されなくなるまでは1年以内の間隔で、試料を採取してベクター配列をPCRで試験すること。

- (d) 被験者の代用細胞の分析により優勢なクローンが認められる(例えば、ベクター組み込み部位のパターンがオリゴクローナル)、あるいはモノクローナルであることが示唆される場合には、ベクター組み込み部位の分析を実施すること。さらに、優勢な組み込み部位が検出された場合、3ヶ月以内にクローナリティーの分析を実施して持続性を調べること。
- (e) ベクター組み込み部位付近の核酸配列が決定されている場合、同定された配列がヒトの癌との関連性が知られているかどうかを調べるために、同定された組み込み部位の配列をヒトゲノムデータベースや他の癌遺伝子のデータベースにある既知のヒトの配列と比較すること。
- (f) オリゴクローナルまたはモノクローナルであってもそれ自体が原因で悪性腫瘍になるのではないと認識しているが[16, 17]、一方、このような変化が悪性腫瘍のリスクを高めることも認識している。従って、以下のいずれかの状況が認められた場合、被験者の悪性腫瘍の兆候を注意深く監視するための計画を策定すること。
- ・モノクローナリティーの持続
 - ・クローンの増幅(例えば、特定のベクター挿入部位の細胞の割合が、複数の時点で増加を示す場合)
 - ・ベクター組み込み部位が癌遺伝子活性を持つローカスの近傍または内部
- (g) 特定の疾患の実体をスクリーニングするには、確立された方法を用いるか、被験者が晒された可能性のある医療上のリスクに関するスクリーニングの専門家からアドバイスをもらうこと。

C.1.5.F.2 データの報告

オリゴクローナル又はモノクローナルの証拠が認められない場合、ベクター組み込み部位のパターンに関する全ての分析の要点を記述的または表の形でINDの年報の中で報告すること。オリゴクローナル又はモノクローナルの証拠が観察された場合、この本質的な情報をIND修正情報として提出すること。この修正は30日以内に提出すること。

C.1.5.F.3 レトロウイルスベクターを用いる治験のインフォームド・コンセント

治験の被験者各人に対して、治験に参加することにより予期されるリスクに関する説明文を提示しなければならない。治験責任医師は、インフォームド・コンセントの文書について施設内審査委員会の承認を受ける必要がある。被験者にレトロウイルスベクターを投与する臨床試験では、全てのインフォームド・コンセントの文書に、X-SCIDの患児での白血病の発症についての完全で正確な情報を、素人にわかりやすい言葉で記載することが必要である。該当する場合には、以下の情報を被験者にわかりやすい用語で試験対象医薬品のリスクに関連する部分に記載すること。

- 試験対象医薬品の説明—試験にはレトロウイルスベクターで改変した細胞の人への投与が含まれる。レトロウイルスベクターは遺伝物質を細胞に挿入することのできるウイルスである。
- レトロウイルスベクターの作用機構—レトロウイルスベクターが体内の正常細胞に入ると、ベクターは自身のDNAを細胞の正常なDNAに挿入する。この過程をDNA組み込みと呼ぶ。
- DNA組み込みの影響—ほとんどのDNA組み込みは細胞や患者に対して害はないと期待される。しかし、DNAの組み込みが他の遺伝子に異常な作用を及ぼす可能性もある。

る。ほとんどの場合、この影響は健康状態には影響しない。

- 動物実験での発癌に関する考察—正常な遺伝子に対する異常な作用が、場合によっては、細胞に対して時には癌に至るような制御できない増殖を引き起こすこともある。マウスとサルを用いた動物実験で、レトロウイルスベクターDNAの組み込みが原因となって癌が引き起こされたと考えられる事象が発生している。
- 遅発性の有害事象、臨床試験において発症した白血病様悪性腫瘍に関する考察—あなたは別の遺伝子治療臨床試験で発生した癌について知ることが重要である。この試験は、フランスで実施された、X連鎖重症複合免疫不全症 (SCID) と呼ばれる疾患に対するものである。レトロウイルスベクターを用いて改変した細胞を投与して数年後に、この少人数の試験でかなりの数の患児が白血病様の悪性疾患(癌)を発症した。少なくとも一人の子供が癌で死亡した。この分野の専門家グループは患児の血液細胞について実施した試験結果を検討し、白血病様の悪性腫瘍はレトロウイルスベクターDNAにより引き起こされたと結論した。しかしながら、実験的遺伝子治療を受けたX-SCIDの患児の多くは現時点では白血病様の疾患は認められていない。彼らは健康に見えるが、彼らも悪性の増殖が生じかどうかはまだ不明である。
- 本試験での悪性腫瘍のリスク—本プロトコルで用いるレトロウイルスベクターが新たに悪性腫瘍を引き起こすかどうかは不明である。しかしながら、レトロウイルスベクターに含まれるDNAはあなたのDNAに組み込まれ、このことは状況によっては数ヵ月後、数年後に悪性の(癌性の)増殖を引き起こすことが知られていることについて認識するべきである。

C.1.6 遺伝子治療による遅発性の有害事象に関するリスク評価法と被験者の長期フォローアップ観察に関する考察

今回検討したFDAのガイダンスは、遺伝子治療薬のスポンサーに対して、遺伝子治療用治療薬による遅発性有害事象のリスク評価の方法と被験者の長期フォローアップ観察実施の判断、長期フォローアップ観察の実施期間と方法について、具体例を詳細に挙げて示したものである。

本ガイダンスで、遅発性有害事象のリスク評価において重要な点はベクターの持続性である。ベクターが染色体に組み込まれたり、潜伏感染/再活性化の可能性がある場合には、ベクターが持続性であるため高リスクで長期フォローアップ観察が必要とされる。一方、ベクターの持続性が認められなければリスクは低く、長期フォローアップ観察は必要ないとされる。リスク評価にあたってはフレームワークがわかりやすく図示されている。また、ベクターの持続性の判断に必要なベクターの生体内分布と持続性評価のための非臨床試験の実施に関しても、動物実験計画や組織の採集と分析の具体的な方法がガイダンスには記載されている。なお、生体内分布と持続性試験に用いるPCRの定量限界はゲノムDNA 1 μ gあたりベクター50コピー以下とされ、2004年11月に出された「遺伝子治療薬の新薬治験申請（IND）に必要な科学、製造及び品質管理（CMC）情報」ガイダンス案[18]よりもさらに高感度での定量が求められている。なお、本ガイダンスは2008年4月に正式に発出されており、そこでの定量限界はゲノムDNA 1 μ gあたりベクター50コピー以下に修正されている。

ベクターの持続性が高リスクであることから、現在治療に用いられている遺伝子治療用ベクターでは組み込み型ベクターのガンマレトロウイルスとレンチウイルス、潜伏感染/再活

性が知られているヘルペスウイルスが高リスクで長期フォローアップ観察が必要と分類されている。一方、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルス、プラスミドは低リスクに分類されている。しかし、これら低リスクのベクターでも非臨床試験により持続性が認められる場合には長期フォローアップ観察が必要と判断される。

また、非臨床試験でベクターに持続性が認められない製品の場合でも、非臨床毒性試験により導入遺伝子の発現が遅発性の毒性と関連性が認められる場合、導入遺伝子が宿主の遺伝子を機能的に代替する場合、導入遺伝子産物が免疫原性を持つ可能性がある場合、短期の臨床試験でベクターの持続性を示すデータが集積された場合などは長期フォローアップ観察が必要とされる。

リスク評価と製品の特性により長期フォローアップ観察が必要とされた場合、その妥当性を判断する必要がある。被験者が余命短い場合や、放射線や化学療法など遺伝子治療の他に遅発性の有害事象に影響する治療を受けた場合など、長期フォローアップ観察が科学的な意味を持たない場合には実施しないことも可能とされる。

ガイダンスでは、長期フォローアップ観察が妥当な場合、基本的には最低15年間は被験者のフォローアップ観察を行い、そのうち当初5年間は最低年に一度は定期検査による被験者の健康状態の観察と治療の記録をとること、その後の10年間も最低年に一度は連絡をとることなどが求められる。

長期フォローアップ観察の具体的な方法がガイダンスには記載されているが、定期検査にはベクターの持続性試験が必要とされる。最低年に一度のベクター配列試験もしくはベクターの持続性を調べる試験をベクターが検出されなくなるまで実施が求められる。フォローアップ観察の期間はベクターや導入遺伝子の in

vivo での持続期間により変わり得る。また、定期検査の頻度は有害事象の兆候が認められればより短期間での検査が求められる。

組み込み型のベクターについては、レトロウイルスベクターが原因で遅発性の白血病が発症した事例があることから極めて高リスクであるため、特別な長期フォローアップ観察が必要とされる。特に、高い複製能をもつ造血幹細胞に組み込み型ベクターで遺伝子導入を行った場合には、最初の5年間は最低半年に一度、次の10年間もしくはベクター配列が検出されなくなるまでは最低年一度、末梢血のベクター配列をPCRで試験し、1%以上の細胞で陽性であればベクターの組み込み部位のクローナリティを分析する。オリゴクローナル、モノクローナルが認められた場合はベクター組み込み部位を調べるとともに3ヶ月以内の再検査で持続性を調べ、モノクローナリティの持続やクローン増幅、ベクターの組み込み部位が癌遺伝子付近である場合はより注意深い監視が必要とされる。また、レトロウイルスベクターを用いた治験でインフォームド・コンセントに記載すべき内容もガイダンスには示されている。

わが国には遺伝子治療薬の品質、安全性確保について「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ついて」(薬発第1062号、平成7年11月15日；平成14年3月29日医薬発第0329004号で改正)が発出されており、その中の「別記IX.遺伝子治療臨床試験の概要(9)患者フォロー予定」において、「患者に投与されたベクター、遺伝子又は遺伝子が導入された細胞の生体内分布、遺伝子及び細胞の生存・機能発現期間、増殖性ウイルスや投与による随伴症状等の、場合によっては生涯にわたる観察予定を記載する。」と記載されているが、患者のフォローに関する具体的な方法や期間、遺伝子治療薬ごとのリスク評価のあり方などについては提示されていない。FDAのガイダンスに従うと、日本で現在までに多く実施さ

れているアデノウイルスベクターを用いた癌遺伝子治療やプラスミドによる遺伝子治療ではベクターの持続性が認められなければ長期フォローアップ観察の必要はない。一方、造血幹細胞遺伝子治療は、場合によっては一生涯の長期フォローアップ観察が求められることになる。これは医師にとっても被験者にとっても相当負担の大きいものである。FDAの勧告は、今後の臨床データの蓄積により変わり得るものであり、また日本にそのまま適用されるべきものではないが、遺伝子治療薬による遅発性有害事象のリスクの評価と長期フォローアップ観察のあり方、被験者の安全性確保のあり方を考える上で非常に参考になるものである。

C.2 遺伝子治療用ウイルスベクターの体外排出のリスク評価について

C.2.1 遺伝子治療臨床試験におけるウイルス/ベクター排出のリスク評価の現状

ウイルス排出(Viral shedding)とは、遺伝子治療薬や増殖性ウイルス等のウイルスをベースとする医薬品を臨床で使用する場合、患者に投与されたウイルスやベクターが患者の排泄物や体液等を介して排出されることを指す。ウイルス/ベクターの排出は環境中への拡散による環境汚染や患者家族や医療従事者等への伝播のリスクがあり、公衆衛生の観点からの安全性確保は大きな課題である。

ウイルス排出のリスクを評価するためには、遺伝子治療臨床試験におけるウイルス排出の現状把握が必要である。Schenk-Braatら[19]は、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、制限増殖性アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、ポックスウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床試験に関する文献260報を収集し、ウイルス排出に関する記載がある102報(39%)から1619名の患者のウイルス排出に関するデータを抽出・解析することにより臨床試験におけるウイルス排出

試験の現状を報告している。本論文では臨床試験の報告の90%をカバーしており、関連論文の代表例を解析していると考えられる。本論文の内容は遺伝子治療臨床プロトコルでのエビデンスに基づいたリスク評価法の確立、ウイルス排出のリスク評価に関するガイドラインの作成に有用と考えられることから、以下にその概要を紹介する。

1) ウイルス排出のアッセイ法

遺伝子治療臨床試験で使用されたウイルス/ベクター排出のアッセイ法をまとめたのが表2である。アッセイには主にベクターゲノム配列に基づいた方法である定量PCR法または非定量PCR法と、感染性ウイルス粒子を検出する生物学的試験(感染性試験)が用いられている。PCR法では、主にベクターに特異的なプライマーを用いてベクターDNAを検出している。レトロウイルスベクターのex vivo投与では、全ての文献でウイルス排出試験の対象は増殖性レトロウイルスであり、アッセイ法にはPCR法又は生物学的試験が用いられている。レトロウイルスベクターのin vivo投与の場合には、ベクターの排出は全てPCR法で検査されており、感染性試験であるマーカーレスキューアッセイやPG4S+L-アッセイはRCRの測定に用いられている。

非増殖性アデノウイルスベクターの場合、PCR法のかわりにアデノウイルスタンパク質のELISAによる検出が用いられた例もある。アデノウイルスベクターの文献のうち40%は、PCR法と生物学的試験の組み合わせで排出が検討されており、2種類の方法を用いることにより、陽性であることの確認がなされている。感染性のあるウイルスベクターを増幅可能な293細胞と、ベクターの増幅はできないA549細胞の組み合わせで試験する方法が用いられる場合もある。生物学的試験としてフローサイトメトリーを用いた方法も報告されている。増

殖性アデノウイルスはA549細胞などのベクターが増殖しない細胞を用いてアッセイされている。

制限増殖性アデノウイルスの場合、11報全てにおいてPCR法が用いられており、うち5報ではウイルス培養が併用されている。

AAVベクターでは、ウイルス排出はPCR法又は生物学的試験でアッセイされている。生物学的試験の場合、試料はAAVのRepタンパク質を発現しているアデノウイルス感染細胞を用いてAAVベクターを増幅させた後、細胞からAAVゲノムを抽出してPCRを行うという方法が用いられている。3報で、PCR法または感染性試験が別々に用いられている。アッセイ法の選択は試料の種類により異なり、PCR法は血液試料の場合に用いられ、その他の排泄物には生物学的試験が用いられている。

ボックスウイルスベクターでは、ウイルス排出はVero細胞等を用いた感染性試験でアッセイが行われている。このうち3報では確認のためにPCR法と感染性試験の2種類の試験が併用されている。

2) ウイルス排出試験で採取する生体試料

遺伝子治療臨床試験において、ウイルス排出試験で採取された生体試料をまとめたものが表3である。どのベクターの場合でも、もっとも一般的に採取されている試料は尿や血液関連試料である。その他の生体試料の選択はベクターの投与経路に依存している。例えば、皮内投与では皮膚試料、吸入/鼻腔内投与の場合には鼻咽頭スワブが採取されている。非増殖性アデノウイルスベクターの排出は、ベクターを局所投与した場合でも、血液関連試料、尿、糞便、咽頭スワブ等、より広範な生体試料についてウイルス排出が調べられている。これとは対照的に、制限増殖性アデノウイルスでは、主に血液関連試料が対象とされている。また、レトロウイルスベクターによるex vivo遺伝子治療の場

合、血液関連試料を用いたウイルス排出試験が RCR 測定のために実施されている。AAV ベクターやボックスウイルスベクターは論文数が少ないが、ウイルス排出試験は血液試料には限定されていない。AAV の場合、7 報中 5 報が嚢胞性線維症に対して吸入/経鼻投与で遺伝子治療を実施したものであるが、これらの臨床試験では、投与部位に由来する唾液や鼻咽頭スワブについてウイルス排出試験が実施されている。精液について調べているのは 100 報中 5 報のみであった。

3) ウイルス排出試験の実施時期

文献によりばらつきが大きいのが、一般的に、レトロウイルスベクターでは投与 1 ヶ月以内にベクター配列のアッセイが実施されている。一方、増殖性レトロウイルスについては治療 1 年後又はそれ以上まで調べている。

非増殖性アデノウイルスベクター及び制限増殖性アデノウイルスでは、ウイルス排出試験は投与 1 ヶ月以内に実施されている。AAV ベクターでは、投与 1 週間以内に実施されているが、投与 4 ヶ月後まで実施している例もある。ボックスウイルスベクターでは、投与後 2 週間以内がほとんどで、21 日後が最長であった。

4) ウイルス排出試験データの実例

合計 1619 名の患者のウイルス排出試験データが収集・解析された。臨床試験によっては患者の一部を対象として排出試験データを解析しているのが、遺伝子治療を受けた患者実数はこれよりも多い。ウイルス排出試験データとして定量的解析が行われ、検出感度が記載されているものも多いが、その定量値は文献により様々な単位、例えば、PCR 法の結果はコピー数、ウイルス粒子数、プラーク形成単位 (pfu)、陽性細胞数で表され、その値もゲノム DNA 量あたりが最も多いが、細胞数あたり、サンプル量あたりで表されることもあり、異なる文献の値の

相互比較は困難である。そのため、ベクターの排出量に関して一般的な結論を出すことは困難であるが、ベクター毎の概要は以下のとおりである。

①レトロウイルスベクター

レトロウイルスベクターの文献全 27 報中、*ex vivo* 遺伝子治療の報告は 11 報で、その排出試験データはいずれも血液関連試料を対象として増殖性レトロウイルスの出現に焦点をあてたものであった。対象となる 103 名の患者でいずれも PCR 法により増殖性レトロウイルスは検出されなかった。レトロウイルスベクターの *ex vivo* 遺伝子治療では感染性レトロウイルス粒子やベクターゲノムの排出を調べた例はないが、これはベクターの排出は無視できると考えられているからであろう。

一方、レトロウイルスベクターの *in vivo* 遺伝子治療に関する論文は 16 報あり、342 名の患者について増殖性レトロウイルスが検査され、いずれも検出されなかった。ベクターの排出については、脳腫瘍、メラノーマ、乳癌に対する *in vivo* 腫瘍内投与、及び卵巣癌に対する腹腔内投与において、16 報中 10 報で血液中、主に末梢血単核球 (PBMC) にベクターの存在が確認された。特に、脳腫瘍への腫瘍内投与では、8 報中 6 報でベクター配列が PBMC で検出された。*In vivo* 遺伝子治療では感染性レトロウイルス粒子が排出される可能性がありうるが、いずれも感染性ウイルス粒子の確認試験は実施されていない。ベクター排出の期間は、投与後 1 日から 28 日までと大きな幅が見られた。血友病 A の遺伝子治療の例では、静脈内投与後 53 週目まで、患者 13 名の精液中のベクター配列の存在を定期的に測定した結果が報告されている。この例では、1 名の患者で投与後 9 週目に陽性シグナルが認められたが、それ以前及びそれ以降の精液試料では陰性であったので、運動性精子が陽性であったわけではないと

考えられている。

全 27 報中、10 報で定量的な排出試験データまたはアッセイの検出感度が報告されていた。

②非増殖性アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターに関する文献 50 報中、腫瘍内、吸入/鼻腔内、心筋内、冠動脈内、硝子体内、動脈内、胸膜内、筋肉内投与後にベクターの排出が検出されなかったのは 21 報 (42%) であった。硝子体内投与の例では RCA のみが検査されており、陰性であったと報告されている。腫瘍内投与後に血中、尿その他の排泄物へのベクターの排出が認められなかった 9 報中、5 報は脳腫瘍の遺伝子治療の例であった。しかし、同じ脳腫瘍の例で 7 名の患者のうち 2 名で血漿中に一時期ベクターの排出が検出されたという報告もある。

50 報中、ベクター DNA または感染性粒子の排出が報告されているのは 29 報 (58%) であった。測定された生体試料はベクターの投与経路、投与部位および解析時期により異なる。例えば、ベクターの鼻腔内投与や吸入の場合には、唾液や鼻咽頭液中にベクターが検出されている。腫瘍内投与の場合、26 報中 17 報において主に血液関連試料で排出が検出されている。一般的に、血中への排出の継続は短期間であり、投与 1 時間後にピークとなり、投与 2, 3 日後には消失している。しかし、ベクターを前立腺癌局所に投与した例では、治療を受けた患者のほとんどで投与 32 日後まで尿中にベクター配列が検出されたという報告もある。ウイルス排出がもっとも長く検出された例は、嚢胞性線維症に対して吸入投与した例と、肺癌に対して気管支内投与した例、腫瘍内投与した例であった。ベクターを一回投与後、気管支肺胞洗浄液、鼻腔スワブ、咽頭スワブ、唾液などの鼻咽頭液において、ベクター配列がそれぞれ 21 日後、30 日後、90 日後まで検出された。精液については、冠動脈内投与 8 週後の狭心症の患者 12 名、及び前立

腺癌で前立腺腫瘍内投与 14 日後の患者 1 名について報告されており、後者ではベクター配列が陽性であった。

ウイルス排出陽性を検証している例は多くないが、PCR での陽性シグナルが感染性のあるアデノウイルスベクター粒子かどうかを確認しているものが 8 報あった。そのうち 7 報で感染性粒子が確認されており、感染性のあるアデノウイルスベクターの排出が実際に起こっていることが示されている。また、50 報中 11 報で増殖性アデノウイルスの排出を調べているが、対象となる 201 名の患者で増殖性アデノウイルスはいずれも検出されなかった。

定量的なウイルス排出試験データまたはアッセイの検出感度が報告されていたのは 50 報中 18 報であった。

ウイルス排出の定義を考えると、患者の周辺でベクターが検出されるかどうかは重要である。患者に近くで接触した医療関係者の血液、糞便、咽頭スワブについてウイルス排出を調べている報告が 4 報あった。興味深いことに、対象者 (ある報告では 54 名にのぼる) のいずれからもベクターや RCA は検出されなかった。

③制限増殖性アデノウイルス

腫瘍内投与又は腹腔内投与後の血液、尿、皮膚へのベクターの排出が陰性であったのは、11 報中 3 報であった。残りの 8 報では、腫瘍内投与後に血液中にベクター DNA の存在が PCR 法で検出されている。血液中への排出の持続期間は、投与後数時間から 76 日後までと幅が見られた。うち 2 報では、血液中のウイルスゲノムの検出が 2 つのピークとなったことから、ウイルスが体内で複製していることが確認された。また別の 2 報では、血液中にベクター DNA が存在すれば感染性ウイルス粒子の排出と結びついているとしている。血液中には感染性ウイルス粒子は検出されなかった。対照的に、前立腺癌腫瘍内投与の例では、8 日目まで尿中に感染性ベク