

ター粒子の排出が検出されている。

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は11報中7報で報告されていた。

#### ④AAVベクター

嚢胞性線維症遺伝子治療の論文5報中4報で、吸入投与又は経鼻投与後1日目の鼻咽頭液試料と唾液中にベクターの排出が検出された。血液中への排出は認められなかった。AAVベクターの残りの2報は血友病Bの遺伝子治療で、AAVベクターを筋肉内投与した場合、唾液中には24時間後まで、血液中には48時間後まで排出がPCRにより検出された。しかし、2ヵ月後の精液中にはベクターは検出されなかった。同一のベクターを肝動脈内投与した場合、投与後1週間は尿中への排泄が用量依存的に認められた。この治療を行った患者7名中6名において、ベクターDNAが精液中に治療後16週まで検出された。うち1名では、ベクターDNAは、精液中に検出されたが運動精子中には存在していないことを確認した。このケースでは、臨床試験は生殖細胞系列への遺伝子組み込みとそれにより起こりうる結果を調べるために一時停止の措置が取られた。また、精液の長期モニタリングが諮問委員会から推奨されることとなった。

AAVベクターの報告では、ベクターゲノムが検出されても感染性があることを確認している報告はない。AAVはCPEを起さないウイルスで、その増殖がアデノウイルスに依存していることから、感染性AAV粒子の確認は実験が難しいためと考えられる。

定量的なウイルス排出試験データ又はアッセイの検出感度は7報中6報で報告されていた。

なお、AAVベクターに関して、ICHワークショップでは、投与方法、血清型、投与量に関係なく、大動物(イヌ、ネコ、非ヒト霊長類)及びヒトに対するrAAVの投与は尿への排出に関連

するという報告、ベクターDNAは全身の体液に一過性に分布し、投与量とベクターDNA濃度もしくはその持続期間に関しては明確な関連が認められなかったこと、生体内分布と排出データはマウスやネコのデータとの相関性が高いという報告もなされている[2]。

#### ⑤ボックスウイルスベクター

ボックスウイルスベクターに関する文献5報は全て、増殖性、制限増殖性、又は非増殖性のワクシニアウイルスベクターを局所投与するものであった。4報では、血液、尿、糞便、唾液、鼻咽頭試料、皮膚への排出は検出されなかった。残りの1報は、増殖性ワクシニアベクターを皮内投与後に、治療した8名の患者全てで生きたワクシニアウイルスが脱落したかさぶたから検出されたが、投与部位以外から得たスワブ中には検出されなかった。ワクシニアベクターはPCR法により確認された。同じ文献において、創傷包帯、病院の備品やベッドリネン、空気サンプルにおけるベクターの存在を検討しているが、生きたワクシニアウイルスは投与部位に用いた包帯のみで検出された。

ボックスウイルスベクターでは、全ての報告に共通して生物学的感染性粒子試験が実施されていた。

アッセイの感度は2報で報告されていた。

### C.2.2 日本の遺伝子治療臨床研究におけるウイルス/ベクター排出のリスク評価の現状

日本では、ウイルスベクターや遺伝子組換え増殖性ウイルスを臨床で患者に投与することは、「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、平成15年法律第97号)」で定められた「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。そのため、生物多様性影響評価書を作成し、使用規程を定めて、ウイルスやベクタ

一の環境中への拡散、生物多様性への影響を防止することが必要とされている。平成16年8月以降に継続中あるいは新規申請された遺伝子治療臨床研究については、第一種使用規程・生物多様性影響評価書が公開されている[21]。生物多様性影響評価書にはウイルス/ベクターの排出に関連する非臨床、臨床の情報が記載されているので、表4に生物多様性影響評価書からみた日本の遺伝子治療臨床研究におけるウイルス排出試験の現状をまとめた。第一種使用規程・生物多様性影響評価書は9機関のものが公開されており、内訳はレトロウイルスベクターの *ex vivo* 遺伝子治療が3件、非増殖性アデノウイルスベクターが4件、非伝播型センダイウイルスベクターが1件、AAVベクターが1件であった。レトロウイルスベクターの *ex vivo* 遺伝子治療では、Schenk-Braat らの報告[19]と同様、排出試験は血液試料中の増殖性レトロウイルスを対象としたもので、アッセイはPCR法又は感染性試験が用いられている。投与後長期間フォローしても増殖性レトロウイルスは検出されていない。非増殖性アデノウイルスベクターは全て前立腺癌の治療で前立腺局所に投与するものであるが、ウイルス排出試験の対象は血液、尿中のベクターであり、マウスモデルの結果を基に臨床での被験者の隔離の期間が定められている。アデノウイルスベクターは一過性に全身に分布したが、1日後から3日後には消失した。患者に投与した例でも、1-3日後にはウイルス排出は検出されず、環境中への排出も確認されなかった。センダイウイルスベクターは本件が世界で最初の臨床投与となるため、動物での体内分布がマウス、ラット、サルを用いて検討されている。血中、尿中の検出は一過性で、一週間後には検出されないことが示されており、被験者も一週間は隔離するとされている。アッセイにはPCR法と生物学的試験が併用されている。AAVベクターは、非臨床試験でラット及びサルのパーキンソン病モデル

を用いて臨床と同じ脳内投与を行い、ベクターが血液中に検出されないことを確認している。

全ての例において、ウイルス/ベクターの環境中への拡散、生物多様性影響を防止するため、投与後数日間は被験者を個室にて管理し、管理中は排泄物や使用した器具等の不活化処理を行うこと、個室管理を解除する前に血液や尿中への排出がないことを確認することが使用規程として定められている。遺伝子治療に用いるウイルスベクターの生物多様性影響評価、ウイルス排出の評価が適切に行われ、臨床使用において承認された使用規程が守られている限りにおいて、日本ではウイルス排出による環境影響、第三者への伝播が生ずるおそれはないと考えられる。

### C.2.3 ウイルス/ベクター排出に関するワークショップでの議論及びウイルス排出のリスク評価において考慮すべき事項に関する考察

ICH 遺伝子治療専門家会議は、第15回ヨーロッパ遺伝子細胞治療学会(ESGCT)年会との協催で2007年10月30日に、ウイルス/ベクターの排出に関するワークショップを開催した。ワークショップでは、①多様なベクター系におけるウイルス排出に関する実際のデータに関する議論、②排泄物中に排出されたベクターのアッセイ法に関する議論、③患者家族や医療従事者などの第三者への暴露や公衆衛生への影響に関する議論が行われた[20]。現在、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情報を基にウイルス/ベクター排出に関するICH見解を作成中である。ワークショップでの議論の結果とC.2.1、C.2.2に示した海外及び日本における遺伝子治療臨床試験でのウイルス排出試験の現状をもとに、ウイルスやベクターの体外排出のリスク評価のあり方、考慮すべき事項を検討した。

#### 1) ウイルス/ベクター排出に関するガイドラ



## インについて

日米EU各極において、ウイルス/ベクター排出試験に関する基準、いつどのようなステップでウイルス/ベクター排出試験を実施すべきかについて明らかにしたガイダンスは現在どの極にも存在しない。しかし、各極とも公衆衛生上の懸念、すなわち病原体の伝播の可能性から、ウイルス/ベクター排出の評価を実施するような規制の枠組みがとられている。EUでは、遺伝子組換え生物(GMO)の環境リスク評価が求められることから、ウイルス/ベクター排出データは環境リスク評価を実施する上でも必要とされる。ICH各極において、ウイルス/ベクター排出試験は段階的およびケースバイケースのアプローチが採用されている。水平伝播に関する試験はほとんど要求されていない。

各国で遺伝子治療の環境影響への規制状況が異なること、ウイルス排出の分析に関するガイドラインがないことから、現在報告されている遺伝子治療臨床試験に関する論文ではウイルス排出試験データが報告されていない例も多く、報告されていてもウイルス排出の分析のデザインは試験毎に大きく異なり、その標準化は現状では困難である。しかし、遺伝子治療臨床試験でウイルス/ベクターの排出は現実起こっていることであり、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療で共通の現象である。ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の臨床試験ではウイルス排出試験を実施すべきであること、及び試験すべき生体試料の種類、用いるアッセイ法、ウイルス排出試験の技術的要件などを示したガイドラインが必要と考えられる。ガイドラインがあれば、ウイルス排出試験の統一化が図られ、エビデンスに基づいた環境リスク評価が可能になると考えられる。現在ICH遺伝子治療専門家会議で検討されているウイルス/ベクターの排出に関するICH見解にはそのような役割を果たすことが期待される。

## 2) 非臨床試験におけるウイルス/ベクター排出試験について

非臨床試験におけるウイルス/ベクター排出試験計画に関連する議論の主な要点は以下の通りである。

### ①動物モデルの選択法と妥当性

非臨床試験において、臨床におけるウイルス排出を予測するための動物モデルを使用した試験が必要と考えられる。試験に使用される動物モデルとしては、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、非ヒト霊長類等が挙げられる。動物モデルの妥当性は議論になるところである。適切な動物モデルを使用し、臨床の投与経路を反映した投与を行うことにより、臨床のウイルス排出試験において採取すべきサンプルの種類や採取すべき時期を決定できる可能性がある。しかしながら、ウイルスの体内分布、ウイルスの感染や複製は生物種により感受性が異なること、腫瘍溶解性ウイルスの場合、癌異種移植モデルでは指向性が異なること、全ての免疫応答を動物でモデル化することはできないことなどを含めて、動物モデルには限界があると考えられる。ウイルス排出試験は動物試験だけで済むものではなく、臨床試験での実施により実態を把握することが重要と考えられる。

### ②ウイルス排出のアッセイ法

ウイルス/ベクター排出のアッセイ法には、主にウイルスゲノムの塩基配列を検出する方法であるPCR法とウイルスの感染性を調べる生物学的試験(感染性試験)が用いられている。各アッセイ法の長所および短所、試験の妥当性は議論になるところである。PCR法を用いたベクター配列の検出が最も頻繁に用いられている手法であるが、PCRでの陽性はベクターのDNA、RNAの存在を示しても、有害な感染性ウイルス粒子の存在とは必ずしも一致しない。感染性粒子の排出に関する生物学的試験データ

は価値があるが、このような情報は限られている。PCR法で陽性になった場合のみ、感染性試験により確認するという段階的解析も用いられているが、試料の種類やベクターの種類によっては感染性試験の実施が困難であるという技術的限界も認識されている。可能な限り、PCR法だけではなく感染性も調べることが望ましいと考えられることから、生体試料を用いた高感度な感染性試験の技術開発も必要である。

### ③その他

その他、非臨床の排出試験において使用される被検試料はGMPで製造されたものである必要があるかどうか、また非臨床試験はGLPレベルで実施する必要があるのかも、ワークショップでは問題点として挙げられた。

## 3) 臨床試験におけるウイルス/ベクター排出試験について

臨床試験におけるウイルス/ベクター排出試験に関する議論の要点は以下の通りである。

### ①患者のモニタリングの時期と期間

患者のモニタリングの時期と期間は、ベクターの種類、投与経路、投与量、投与スケジュールにより異なることが考えられ、現在の臨床試験の知見から結論を出すのは難しい。動物モデルでウイルス排出が認められた期間を基に、モニタリングの時期と期間を設定することが必要であろう。増殖性ウイルスの場合、ウイルス排出はin vivoでの複製後に見られることから、増殖性ウイルスでは長期間に渡り排出される可能性が示唆され、モニタリングの期間も長くなることが考えられる。

### ②解析すべき生体試料

臨床試験で採取する生体試料の例としては、尿、糞便、汗、唾液、精液、痰、口腔・咽頭スワブ、うがい液、皮膚等が挙げられる。血漿/血液、末梢血単核球などの血液関連試料は排泄

物の範疇には入らないが、血液を介した第三者への感染の可能性は高いことからウイルス排出試験の対象とされる。ウイルス/ベクターの体内分布や排出は、ベクターの種類や投与経路により異なる。臨床試験の実データ [19]を見ると、ウイルス排出陽性の試料は投与部位の近傍の排泄物から得られることが多い。例えば、吸入や経鼻吸収の場合は鼻咽頭スワブや唾液中、皮内投与では皮膚やかさぶた、前立腺癌では尿中に検出されることが多いので、このような試料の検査が必要であろう。レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターの腫瘍内投与では、一般的に血液中に排出が認められている。例外的に、アデノウイルスベクターの脳腫瘍への局所投与では排出がほとんど見られないことから、アデノウイルスベクターは脳からは排出されないと考えられる。対照的に、レトロウイルスベクターの脳腫瘍局所投与では、8報中6報でPBMCからベクターが検出されている。ベクターやベクター産生細胞の血液中への漏出や、局所で遺伝子導入したリンパ球や癌細胞の血液中への遊走が報告されている。ウイルスベクターは局所投与後に血液中に拡散する可能性が高く、臨床モニタリングや治療に携わる医療関係者及び患者に近い環境にいる人にとって、血液は汚染の原因となりうることから、血液試料の測定は必須と考えられる。

AAVベクターによる血友病Bの治療の例では、筋肉内投与の場合にはベクターは投与後2日以内に唾液や血清に現れるだけで尿中には排出されず、2ヵ月後の精液中にも検出されなかったが、肝動脈から同一ベクターを点滴投与すると、投与後1週間は尿中に排出され、7名中6名で投与16週後まで精液中に検出された。このような知見が得られているベクター・投与経路を用いる場合、陽性が報告されている試料を試験することが望ましいであろう。

なお、ワークショップでは、ウイルス/ベクター排出試験データの質を担保するためには、



生体試料の取り扱い、保存、輸送に関する手順書の作成とスタッフの全段階におけるトレーニングも重要であると報告されている [2]。

### ③生殖細胞系列へのウイルス排出

遺伝子治療の安全性上の懸案事項として、生殖腺へのベクターの拡散、生殖細胞系列への遺伝子導入リスクの問題がある。ベクターの精液中への排出は生殖腺への生体内分布を示すものである。遺伝子治療臨床研究で精液のウイルス排出試験はあまり実施されていないが、精液中に長期間ベクターが検出された例も報告されている。2006年にICHより発出された「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」[23]には、ベクターの生殖細胞系列への分布に関する非臨床試験や患者のモニタリングなどの基本的考え方が提示されている。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、臨床試験で患者の精液のモニタリングを考慮する必要があるとされ、検査期間も精子形成の1サイクルである64-74日間を超えて複数回実施することが望ましいとされている。ベクターの精液中への排出試験については、このICH見解に従って実施することが望ましい。

### ④試験対象

ウイルス排出評価の対象とされるのは、投与したベクターまたは非増殖性のウイルスベクターを投与後に出現した増殖性ウイルスである。増殖性ウイルスはベクターに混入している場合と、患者体内で野生型ウイルスとの組換えにより生じる場合が考えられる。非増殖性ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターの場合、患者の体内での増殖性ウイルスの出現が安全性上の重要な懸案事項となることから、増殖性ウイルスの排出が検討されている。レトロウイルスベクターによる *ex vivo* 遺伝子治療で

は、ウイルス排出の分析はもっぱら増殖性レトロウイルスを対象とし、ベクターの検出は行われていない。遺伝子導入細胞でフリーのベクター粒子が存在しないことは品質規格で設定されており、ベクターの排出は考慮しなくて良いと考えられる。なお、これまでの臨床試験の報告では、レトロウイルスベクターを用いた445名、アデノウイルスベクターを用いた201名について増殖性ウイルスが調べられているが、患者で検出された例はない。

### ⑤患者の隔離に関する見解

各極の規制状況で大きく異なるものに、患者の隔離に関する見解がある。日本ではカルタヘナ法に基づき、遺伝子組換え生物等に該当するウイルスベクターや増殖性ウイルスを臨床で患者に投与する場合、遺伝子組換え生物等の第一種使用となる。この場合、使用規程を定めた上で、環境中への拡散、生物多様性への影響を防止するために、患者を一定期間個室に隔離し、ウイルス/ベクターの排出がないことを確認した後に隔離を解除するという措置が執られている。しかし、海外ではこのような患者の隔離は行われていないという。ウイルス排出の実態に関するデータの蓄積により、ウイルス排出のリスク評価が適切に行われるようになれば、過剰な隔離は必要なくなることも考えられる。

### ⑥ウイルス排出試験のインパクト

患者から排出された感染性ウイルスベクターに暴露した場合の影響は、ベクターの増殖能と遺伝子挿入能、治療用遺伝子に依存すると考えられる。例えば、自殺遺伝子をコードした非増殖性ベクターの排出が環境に与える影響は、プロドラッグがなければ何も影響がないため、細胞毒性遺伝子を搭載した増殖性ベクターの排出と比較すると影響はずっと低いであろう。患者の排泄物を介して環境中に排出されたウイルスベクター粒子が実際に第3者に感染す

ることが可能かどうか、相互汚染を起こすリスクに関しては、現時点では不明である。アデノウイルスでは、 $10^3$  pfu のウイルスを吸入すると十分に気道の感染が認められるというが、このようなデータをウイルス排出のリスク評価として人の汚染に外挿することは難しい。ウイルス/ベクターのウイルス排出による伝播のリスクを正しく評価するためには、ウイルス排出試験データの質、量を向上させ、相互比較の出来るデータを蓄積し、汎用性のあるデータを得ることが必要であろう。そのためにも、ウイルス/ベクター排出に関する ICH 見解の作成が期待される。

### C.3 腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保

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の開発が始まった。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」[22]が発出された。本見解の構成を表 5 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。

#### C.3.1 ICH 見解：腫瘍溶解性ウイルス

##### C.3.1.1 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)、ポックスウイルス、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。

### C. 3. 1. 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。

#### C. 3. 1. 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* アッセイを実施するべきである。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。

#### C. 3. 1. 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。

#### C. 3. 1. 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。

### C. 3. 1. 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。

#### C. 3. 1. 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 (C. 3. 1. 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 (C. 3. 1. 3. 3-3. 6 参照)。

#### C. 3. 1. 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 (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、担がん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。遺伝子産物は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。

動物種を選択においては、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。

#### C. 3. 1. 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。

#### C. 3. 1. 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るべきである。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は明らかになるであろう。

#### C. 3. 1. 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。

#### C. 3. 1. 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るべきである。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。

#### C. 3. 1. 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。

#### C. 3. 1. 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る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。

#### C. 3. 1. 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。



#### C.3.1.4.2 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っ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。

#### C.3.1.4.3 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、臨床プロトコールの中で、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、患者と接触するその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。

#### C.3.2 腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性確保に関する考察

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日文部科学省・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種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則

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*の外来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とは限らないため、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、その有効性及び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) に関する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。

#### D. 結論

(1) 遺伝子治療による遅発性の有害事象に関する被験者の長期フォローアップ観察についてFDAのガイダンスを基に検討した。遺伝子治療薬による遅発性有害事象のリスクの評価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において考慮すべき点などを明らかにした。

(2) 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/ベクター排出試験の現状と、ウイルス排出のリスク評価について検討した。ベクターの種類や投与経路、投与量、投与計画により体内分布やウイルス排出は大きく異なること、ウイルス排出のアッセイ法はPCR法が頻用されているが、リスク評価には感染性粒子の排出データが重要であることを

含め、ウイルス排出試験に関する非臨床試験計画や、臨床試験計画で考慮すべき事項及び問題点を明らかにした。

(3) 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

- [1] FDA Guidance for Industry: Gene Therapy Clinical Trials – Observing Subjects for Delayed Adverse Events, November 2006  
(<http://www.fda.gov/cber/gdlns/gtclin.pdf>)
- [2] 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>).
- [3] Donahue, R.E., et al., Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *Journal of Experimental Medicine* 1992; 176:1125-1135.
- [4] Nyberg, K., et al., Workshop on long-term follow-up of participants in

- human gene transfer research. *Molecular Therapy* 2004; 10(6):976-980.
- [5] FDA Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy, March 1998 (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/somgene.pdf>).
- [6] Bauer, S., Current FDA approach for preclinical vector biodistribution studies, March 12, 1999: Recombinant DNA Advisory Committee Meeting (<http://www4.od.nih.gov/oba/rac/minute/s/3-99RAC.htm#IX>).
- [7] Shayakhmetov, D.M., et al., A high-capacity, capsid-modified hybrid adenovirus/adenovirus-associated virus vector for stable transduction of human hematopoietic cells. *Journal of Virology* 2002; 76(3):1135-1143.
- [8] Goncalves, M.A., et al., Stable transduction of large DNA by high-capacity adeno-associated virus/adenovirus hybrid vectors. *Virology* 2004; 321(2):287-96.
- [9] Picard-Maureau, M., et al., Foamy virus—adenovirus hybrid vectors. *Gene Therapy* 2004; 11(8):722-28.
- [10] Yant, S.R., et al., Transposition from a gutless adeno-transposon vector stabilizes transgene expression *in vivo*. *Nature Biotechnology* 2002; 20(10):999-1005.
- [11] Wang, Z., et al., Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Therapy* 2004; 11(8):711-21.
- [12] Li, Z., et al., Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002; 296:497.
- [13] Modlich, U., et al., Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* 2005; 105(11):4235.
- [14] Hacein-Bey-Abina, S., et al., *LMO2*-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302(5644): 415-9.
- [15] Couzin, J., Kaiser, J., As Gelsinger Case Ends, Gene Therapy Suffers Another Blow. *Science* 2005; 307:1028.
- [16] Ott M.G., et al., Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nature Medicine* 2006; 12(4):401-9.
- [17] Schmidt M., et al., Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nature Medicine* 2003; 9(4):463-68.
- [18] Guidance for FDA review staff and sponsors: Content and review of chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs), draft guidance, Nov. 2004
- [19] Schenk-Braat, EAM et al: An inventory of shedding data from clinical gene therapy trials, *J. Gene Med.*, 9, 910-921 (2007)
- [20] ICH GTDG: Communication Paper, Gene Therapy Discussion Group Meeting, Rotterdam, Oct 30-Nov 1



(2007)

<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4360.pdf>

[21] バイオセーフティクリアリングハウス (J-BCH) ホームページ

<http://www.bch.biodic.go.jp/>

[22] ICH Considerations : General Principles to Address the Risk of Inadvertent Germline Integration of Gene Therapy Vectors (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), 25 October (2006)

<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4363.pdf>;

[http://www.pmda.go.jp/ich/w/gtdg\\_07\\_04\\_06.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/w/gtdg_07_04_06.pdf)

[23] considerations: Oncolytic Viruses:

<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4929.pdf>

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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5回、*Pharm Tech Japan*, 22 (13), 91-99 (2006)
- 2) Teruhide Yamaguchi, Eriko Uchida: Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products, *Current Cancer Drug Targets*, 7, 203-208 (2007)
- 3) Eriko Uchida, Mieko Kogi, Tadashi Oshizawa, Koei Satoh, Akiko Iwata, Mitsuhiro Murata, Mikio Hikata, Teruhide Yamaguchi: 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, *Journal of Virological Methods*, 143, 95-103 (2007)
- 4) Toshie Kanayasu-Toyoda, Takayoshi Suzuki, Tadashi Oshizawa, Eriko Uchida, Takao Hayakawa, AND Teruhide Yamaguchi: Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase C $\alpha$  in Neutrophilic Differentiation Cells, *Journal of Cellular Physiology*, 211, 189-196 (2007)
- 5) 内田 恵理子: 遺伝子治療薬開発の現状と品質・安全性確保における国際的動向、*Pharmstage*, 7(9), 1-5 (2007)
- 6) 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おける国際動向、*Drug Delivery System*, 22-6, 651-659 (2007)
- 7) 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、臨床とウイルス、35(4), 278-290 (2007)
- 8) 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7回、*Pharm Tech Japan*, 23 (2), 81-87 (2007)
- 9) 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9回、*Pharm Tech Japan*, 23 (4), 101-109 (2007)
- 10) 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12回、*Pharm Tech Japan*, 23 (8), 85-93 (2007)
- 11) 内田恵理子、川崎ナナ、宮田直樹: 薬の

- 名前 ステムを知らば薬がわかる 第 15 回、*Pharm Tech Japan*, 23 (11), 93-100 (2007)
- 12) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知らば薬がわかる 第 18 回、*Pharm Tech Japan*, 24(1), 101-105 (2008)
- 13) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知らば薬がわかる 第 21 回、*Pharm Tech Japan*, 24(4), 101-106 (2008)
- 14) 内田恵理子、川崎ナナ、宮田直樹：薬の名前 ステムを知らば薬がわかる 第 24 回、*Pharm Tech Japan*, 24(8), 103-109 (2008)
- 15) 蜂須賀暁子、川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知らば薬がわかる 第 28 回、*Pharm Tech Japan*, 24(12), 105-113 (2008)
2. 学会発表
- 1) 内田恵理子、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：パーフルオロオクタン酸(PFOA)による新規ウイルス不活化法の開発；第 54 回日本ウイルス学会学術集会；2006 年 11 月 19 日、名古屋
- 2) 内田恵理子、山口照英：バイオ医薬品／生物薬品のウイルス安全性に関する国際動向；第 6 回日本医薬品等ウイルス安全性シンポジウム；2006 年 12 月 1 日、東京
- 3) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：放射照射による Op9 細胞の造血支持能の誘導；第 6 回日本再生医療学会総会、2007 年 3 月 13 日、横浜
- 4) 内田恵理子、小木美恵子、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：生物薬品のウイルス安全性確保：生物薬品のウイルス除去のためのポリエチレンイミン結合カラムの開発、2007 年 3 月 28 日、富山
- 5) 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 細胞の好中球分化において増殖・分化に重要な働きをする、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007 年 12 月 12 日、横浜
- 6) 伊藤さつき、川崎ナナ、橋井則貴、原園 景、中島 紫、高倉大輔、内田恵理子、押澤 正、山口照英：ヒト ミエロペルオキシダーゼの部位特異的糖鎖構造解析、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007 年 12 月 12 日、横浜
- 7) 内田恵理子、小木美恵子、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、鈴木和博、山口照英：ポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いた C 型肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007 年 12 月 14 日、横浜
- 8) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：放射照射による Op9 細胞の造血支持能の増強に関する分子の探索、第 7 回日本再生医療学会総会、2008 年 3 月 13 日、名古屋
- 9) 内田恵理子、小木美恵子、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、鈴木和博、山口照英：医薬品のウイルス安全性確保のためのヒト肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法の開発、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 27 日、横浜
- 10) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を担うストローマ細胞膜タンパク質の探索、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 27 日、横浜
- 11) 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) 11<sup>th</sup> annual meeting, Boston, May28-June 1, 2008

- 12) 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 日、東京
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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 治験に現在一般的に用いられている遺伝子治療用ベクターの組み込み特性  
(参考資料1より)

| ベクターの種類                | 組み込みの傾向 <sup>1</sup> | 長期フォローアップ観察の<br>必要性 <sup>2</sup> |
|------------------------|----------------------|----------------------------------|
| プラスミド                  | なし                   | なし                               |
| ボクスイルス                 | なし                   | なし                               |
| アデノウイルス                | なし                   | なし                               |
| アデノ随伴ウイルス <sup>3</sup> | なし                   | なし                               |
| ヘルペスウイルス               | なし<br>潜伏感染/再活性化の可能性  | あり                               |
| ガンマレトロウイルス             | あり                   | あり                               |
| レンチウイルス                | あり                   | あり                               |

<sup>1</sup>ベクターの設計(すなわち、組み込みを促進するような機構を持たない)及び非臨床、臨床での証拠の量に基づくと、ベクターは組み込みがおこらないか、おこっても極めて低頻度である。

<sup>2</sup>組み込みがなくても導入遺伝子の持続発現が認められる特殊な条件では、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長期フォローアップ観察が必要との結論になる可能性がある。これは発現する導入遺伝子や臨床適応など、本文に記載されている追加の基準に依存する。

<sup>3</sup>Rep欠損ベクターに限定

表2 遺伝子治療臨床試験においてウイルス排出分析に用いられたアッセイの種類と数  
(参考資料19より)

| アッセイ法          | 非増殖性<br>レトロウイルスベクター<br>(n=27) | 非増殖性<br>アデノウイルスベクター<br>(n=52) | 制限増殖性<br>アデノウイルス<br>(n=11) | AAV<br>(n=7) | ボクスイルスベクター<br>(n=5) |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------|---------------------|
| <b>アッセイの種類</b> |                               |                               |                            |              |                     |
| PCR法           | 23 (85%)                      | 31 (60%)                      | 11 (100%)                  | 5            | 3                   |
| ・定量PCR         | 3                             | 6                             | 5                          | 0            | 0                   |
| ・非定量PCR        | 14                            | 13                            | 5                          | 5            | 0                   |
| ・詳細不明          | 6                             | 12                            | 1                          | 0            | 3                   |
| 生物学的試験         | 7 (26%)*                      | 35 (67%)                      | 5 (31%)                    | 5            | 5                   |
| ELISA          | 0 (0%)                        | 9 (17%)                       | 0 (0%)                     | 0            | 0                   |
| 詳細不明           | 2 (7%)                        | 2 (4%)                        | 0 (0%)                     | 0            | 0                   |
| <b>使用アッセイ数</b> |                               |                               |                            |              |                     |
| ・1アッセイ         | 18 (74%)                      | 28 (54%)                      | 6 (55%)                    | 4            | 2                   |
| ・2アッセイ         | 5 (19%)                       | 21 (40%)                      | 5 (45%)                    | 3            | 3                   |
| ・2アッセイ以上       | 0 (0%)                        | 1 (2%)                        | 0 (0%)                     | 0            | 0                   |
| ・不明            | 2 (7%)                        | 2 (4%)                        | 0 (0%)                     | 0            | 0                   |

数字は論文数(カッコ内はベクターの種類別の比率)を示す

\*PCR測定のみ使用



表3 遺伝子治療臨床試験においてウイルス排出分析に用いられた生体試料  
(参考資料19より)

| ベクター                                 | 投与経路   | 生体試料の種類   |
|--------------------------------------|--|---|
| レトロウイルスベクター (n=27)<br>In vivo (n=16) | ip (2), it (13), iv (1)  | 血液関連試料(18), 糞便(1), 唾液(1), 精液(1), 皮膚(1), 尿(2)              |
| Ex vivo (n=11)                       | id (2), it (1), iv (8)   | 血液関連試料(11)  |
| 非増殖性アデノウイルスベクター (n=50)               | ic (2), im (2), inh/in (9), ip (3), it (26), ivi (2), その他* (6) | 血液関連試料(35), 糞便(23), 鼻咽頭液(26), 唾液(15), 精液(2), 皮膚(1), 尿(44) |
| 制限増殖性アデノウイルス (n=11)                  | ip (1), it (8), it+iv (1), it/ip (1)                           | 血液関連試料(9), 皮膚(1), 尿(3)                                    |
| AAV (n=7)                            | is (1), im (1), inh/in (5)                                     | 血液関連試料(5), 糞便(4), 鼻咽頭液(3), 唾液(4), 精液(2), 尿(5)             |
| ポックスウイルスベクター (n=5)                   | id (2), im (2), it (1)   | 血液関連試料(3), 糞便(1), 鼻咽頭液(2), 唾液(1), 皮膚(2), 尿(3)             |

カッコ内は論文数を示す  
血液関連試料は血液、血漿、末梢血単核球等、鼻咽頭液は鼻腔スワブ、咽頭スワブ、気管支洗浄液等を含む  
\*： 腹腔内、it： 鼻内、iv： 静脈内、ic： 冠動脈内、im： 筋肉内、inh/in： 吸入/鼻腔内、ivi： 硝子体内  
\*その他は動脈内(1)、皮下内(1)、心筋内(1)、胸膜内(2)、静脈内(1)を含む

表4 日本の遺伝子治療臨床研究におけるウイルス排出試験の現状  
(参考資料生物多様性影響評価書より)

| 実施機関                    | ベクター・<br>搭載遺伝子<br>(略称)                         | 投与部位                            | 試験者の職<br>業  | 試験試料・<br>検査・<br>アッセイ法                    | 関連データ   |
|-------------------------|--|---------------------------------|-------------|--|---|
| 北海道大学病<br>院             | 非増殖性147-18.249<br>3→ADA (GDSepM-ADA)           | 遺伝子導入<br>CD34陽性細胞<br>の輸注        | 投与後30日      | 末梢血単核球、血<br>漿・<br>ROR・<br>PCR法           | 患者に遺伝子導入CD34陽性細胞を移植し、7.5ヶ月、9ヶ月後にRORの存在は認められず、第3者への感染も確認されていない。海外でも最多3年間の観察期間中、患者4名の末梢血単核球及び血清中でRORは認められなかった。  |
| 産科総合病<br>院              | 非増殖性147-18.249<br>3→HCR1<br>G-HCR1             | 遺伝子導入<br>CD34陽性細胞<br>の輸注        | 投与後14日      | 末梢血、骨髄・<br>ROR・<br>PCR法(感度の検査<br>5+L-試験) | 遺伝子治療を受けた患者について入院中は月1回、退院後は2から4ヶ月に1回末梢血のRORを検査しているが、RORを検出したことはない。ウイルスベクターは遺伝子導入後に洗浄除去され、洗浄後の細胞からベクターが検出されたことはない。   |
| 京大大学附属<br>病院            | 非増殖性147-18.249<br>3→HEV-TK-ΔLMPK1<br>(SFORM-3) | 遺伝子導入下<br>アザノパ様の<br>輸注          | 投与後30日      | 末梢血単核球、血<br>漿・<br>ROR・<br>PCR法、5+L-試験    | 海外で再発白血病に対する遺伝子治療15例、HLA-B*801同型遺伝子移植試験結果に対する遺伝子治療1例に、同一SFORM-3を用いて遺伝子導入したが「アザノパ」を用いたアザノパ移植療法が行われた。投与後、患者は骨髄、ならびに血清を用いた検出可能な検量(5+L-アッセイ、Eov-PCR)においてもRORは検出されず、治療を受けた患者においてSFORM-3の活性も認められなかった。 |
| 岡山大学医学<br>部・歯学部附属<br>病院 | 非増殖性271-18.249<br>3→H5V-TK<br>(AdRSV-TK)       | 前立腺癌腫内<br>投与                    | 投与後24時<br>間 | 血清、尿・<br>ベクター、ROA・<br>PCR法               | 患者7例に投与後、血清、尿及び尿中のベクターは投与24時間後に消失した。医療従事者や家族等への感染、環境中への放出は認められなかった。   |
| 北里大学病院                  | 非増殖性271-18.249<br>3→H5V-TK<br>(AdRSV-TK)       | 前立腺癌腫内<br>投与                    | 投与後24時<br>間 | 血清、尿・<br>ベクター、ROA・<br>PCR法               | マウスモデルに投与後1週間では尿、精液、精子にベクターは検出されず、血中では40%の患者のみ検出された。ベクターの分布は前立腺、精液、精巣、骨髄、リンパ節、消化管、肝臓で一過性に観察された。<br>海外では、11名の患者に投与後、原則により尿中から尿中に20~30日間(平均8.8日間)検出された(ROR)。                                      |
| 神戸大学医学<br>部附属病院         | 非増殖性271-18.249<br>3→H5V-TK<br>(Ad-OC-TK)       | 前立腺癌の骨<br>転移巣又は腸<br>胃がん腫内投<br>与 | 投与後30日      | 血清、尿・<br>ベクター、ROA・<br>200細胞感度試験          | マウスモデルに前立腺癌腫内に感染させた場合、72時間以内に動物体内及び排泄物中から消失した。<br>4名の患者に投与72時間後の血清、尿及び尿中のベクター、ROAは検出されなかった。試験者の尿中の尿水PCR法で検出された結果及び医療従事者や家族等の感染状態から、環境中への放出は認められなかった。  |
| 岡山大学医学<br>部・歯学部附属<br>病院 | 非増殖性271-18.249<br>3→IL-12<br>(Adv/IL-12)       | 前立腺癌腫内、腸<br>胃がん腫内投<br>与         | 投与後24時<br>間 | 血清、尿・<br>ベクター、ROA・<br>PCR法               | マウスモデルで同一ベクター、同一投与経路の検討はしていない。AdRSV-TKの尿を記載。<br>AdRSV-TKを患者9例の前立腺癌腫内に投与後、血清中への移行は常用量では認められず、中間量で投与後30分モーターに20%消失した。尿中への移行は投与後後に認められたが24日目に消失した。   |
| 九州大学病院                  | 非増殖性271-18.249<br>3→FGF2<br>G+V/3→FGF2         | 下顎舌根腫内<br>投与                    | 投与後1週間      | 血清、尿・<br>ベクター・<br>PCR法及びトリプル<br>免疫反応     | マウス、ラット、サルにG+V/3→FGF2を投与した場合、血中、尿中の検出は一過性であり1週間後にほぼ消失した。<br>カニイザルに増殖性遺伝子ウイルスを接種しても同一ゲージ内の水牛感染は認められなかった。   |
| 自治医科大学<br>附属病院          | 非増殖性271-18.249<br>3→AAO<br>(AAV-AAO-3)         | 脳内投与                            | 投与後72時<br>間 | 血清、尿・<br>ベクター・<br>PCR法                   | ラット及びサルのパーキンソン病モデルに対して脳内へAAV-AAO-3の注入を行った動物実験では、血清中でAAV-AAO-3は検出されていない。   |

表5 「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 外來性病原体試験
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

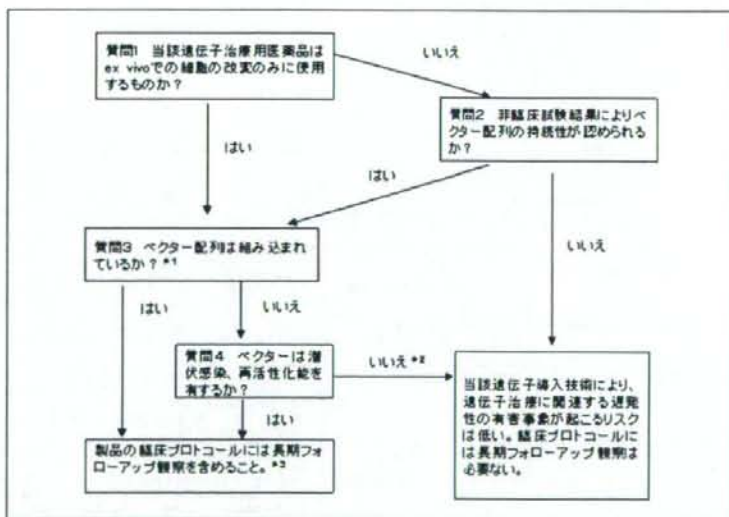


図1 遺伝子治療による遺伝性の有害事象のリスク評価のためのフレームワーク (参考資料1より)

\*1ベクターの組み込みの可能性を示唆する証拠がある場合、あるいは組み込みを促進するように設計したベクターである場合(表1参照)、答えは「はい」である。組み込みに関する証拠がない場合、製品の開発計画でこの質問に対応するための非臨床試験を実施することが望ましい。  
 \*2プロトコルが承認された後で報告された情報に基づき、持続的な遺伝子発現あるいは当該製品の投与により遺伝性の有害事象のリスクの上昇を認めた場合、ここでの質問の回答が「はい」であっても長期フォローアップ観察の実施を計画すべきである。  
 \*3長期フォローアップ観察の実施方法については、本文書Vを参照すること。