

ない患者を対象とする場合は、それ以上の試験を行う必要はありません。

もし、性腺内にベクターのシグナルが検出された場合、当該医薬品は性腺内のどこに局在しているかを明らかにする必要があります。例えば生殖細胞系列以外の細胞にのみ持続的に分布する場合であれば次世代に影響を及ぼさないと判断することが可能です。また、ベクターに由来するシグナルが一過性であれば、組み込みが起こっていないと考えられます。しかし、持続的なシグナルが出てしまう場合は、生殖年齢、あるいは次世代に残す可能性のある患者に投与したい場合は、規制当局と相談すべきと判断されます。

4.8 患者モニタリング

患者のモニタリングについては、動物での生体内分布試験に基づいて、遺伝子治療用ベクターが一過性に生殖腺で検出された場合は、患者の精液にベクターが存在するか調べることを考慮した方が良く考えられます。ただし、上記しましたように対象患者群が生殖年齢を過ぎていたり、余命が少ないことが見込まれる重篤な患者を対象とする場合には、モニタリングをする必要はありません。もちろん、臨床試験、もしくは臨床適用においては、非臨床試験の生体内の分布の結果に関係なく、通常、試験期間中、あるいは臨床治療中は避妊手段をとることが望ましいと考えられています。

5 「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への意図しない伝達リスクを最小にするための方策」見解

まとめられた本見解は、現在、ICHのウェブページ上に掲載されており、またプレスリリースを行っています。今後、各界からのフィードバックを得るために、各極で本見解に対する意見を収集します。通常ICHガイドラインでは収集された意見に基づいてそのDraftを変更しますが、今回は少し違う目的で意見を収集しようと考えています。すなわち本見解では収集された意見に基づき、ガイドライン化の可能性について検討することとしています。

6. 腫瘍溶解性ウイルスワークショップ

今後、ICH GTDGで取り組もうとしている課題として、腫瘍溶解性ウイルスがあります。Table 1

に示すように2005年に開催されたワークショップにおいて、腫瘍溶解性ウイルスについての各専門家の意見をいろいろ集め、要約をプレスリリースしました。この成果をもとに、ICHの腫瘍溶解性ウイルスに関するICH見解(案)を作成しようとしています。

6.1 腫瘍溶解性ウイルス

通常の抗腫瘍ウイルスベクターが腫瘍に入ったとしても、に入った細胞のみが壊れ、それ以外のベクターの入っていない細胞については、崩壊は起きません。しかし、腫瘍溶解性ウイルスはそのものが腫瘍細胞内で特異的に増殖する性質を持っていますので、一つの腫瘍細胞に入り、そこから増殖したウイルスが他の腫瘍細胞に感染しますので、腫瘍細胞が限局されなくても、すなわち転移した腫瘍についても腫瘍溶解性を持つといった効果を期待したベクターです²⁾。現在、この開発が非常に急速に行われています。

我が国でも腫瘍溶解性ウイルスの開発が行われており、各種のがんに対して臨床研究や動物実験が行われています (Table 7)。

6.2 ICH見解(案)の作成 (Table 8)

腫瘍溶解性ウイルスベクターに関するICH見解(案)の作成につきましては、前述した2005年のワークショップの成果に基づき、見解(案)を作成することとなりました。最初のRapporteurはHealth Canadaで、それ以降は、性腺へのウイルスベクターの挿入のリスクに関するICH見解と同様に順次Rapporteurを交代していく予定です。

6.3 腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発に関連する問題点 (Table 9)

腫瘍溶解性ウイルスに関する課題の一つ目は、腫瘍溶解性ウイルスの設計です。二つ目は、非臨床試験での有効性・安全性の確認及び至適用法・用量の検討です。三つ目は、細胞へのターゲティング、若しくは細胞中での増殖といった腫瘍選択性です。四つ目は、臨床試験での安全性です。五つ目は、適切な動物モデルの開発であり、その安全性や有効性の評価において非常に重要な課題です。六つ目は、ワークショップでも大きな議論となりましたが、このウイルスは増殖性を持っていますので、体外への排出をどのようにモニターし、計測するのか、あるいは患者の隔離をどうすべきかについても議論する

Table 7 国内開発中の腫瘍溶解性ウイルスの例 (2005年4月現在)

<臨床研究段階>

ウイルスの種類	ウイルスの名称	ウイルスの特徴	実施施設/企業名	対象疾患	実施状況	症例数	治験
変異単純ヘルペスウイルス	HF10	弱毒型の自然変異株	名古屋大学医学部附属病院	皮膚又は皮膚に再発した乳がん	2003年に臨床研究終了	6	-
				頭頸部がん	2004年に臨床研究開始	5 (予定)	
				進行性膵臓がん	2005年に臨床研究終了	6	
				大腸がん, 乳がん	動物実験	-	

<動物実験段階>

ウイルスの種類	実施施設/企業名	対象疾患
遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス	大阪府立成人病センター	平滑筋肉腫
	愛知県がんセンター	卵巣がん
	東京大学医学部	グリオーマ, 前立腺がん
	慶應義塾大学医学部	脳腫瘍, 前立腺がん, 膀胱がん
	九州大学医学部	胆嚢がん, 胆道がん
	和歌山県立医科大学	前立腺がん, 腎がん, 卵巣がん, 乳がん
遺伝子組換えヒトアデノウイルス	岡山大学医学部/オンコリス・バイオファーマ	大腸がん, 非小細胞肺癌
	東北大学医学部	膵臓がん, 膀胱がん
		非小細胞肺癌
	筑波大学	胆嚢がん, 胆道がん
	愛媛大学医学部	卵巣がん
		グリオーマ
千葉県立がんセンター	肝がん, 肝細胞がん	
札幌医科大学	大腸がん, 肝がん	
遺伝子組換えセンダイウイルス(HVJ)	ディナベック	大腸がん, 線維肉腫
レオウイルス3型	大分大学医学部	膵がん, 同腹膜転移

(www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec1/oncltc_v/oncltc-j.html)

Table 8 腫瘍溶解性ウイルスベクター-ICH「見解」の作成

- 見解案作成のための要素について検討
- ICH GTDG held workshop Nov 7 2005
- Propose to write ICH Considerations
- 1st Rapporteur: Health Canada
- Plan for 1st draft prior to May 2007 meeting
- Rotate Rapporteurs
- Planned completion: 2008

Table 9 腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発に関連する問題点

- 腫瘍溶解性ウイルスの設計 (野生型, 弱毒型, 遺伝子組換え型)
- 非臨床試験での有効性・安全性の確認及び至適用法・用量の検討
- 腫瘍選択性
- 臨床での安全性
- 適切な動物モデル
- 体外からの排出 (測定法, 実測データ)

Table 10 ICH腫瘍溶解ウイルス「見解」
：キーエレメント

- Product design & characterization
 - Replication competent virus (RCV) & molecular variants
 - Adventitious agent testing
- Non-clinical studies
 - *In vitro* cell culture panels for selectivity
 - Animal models & virus replication *in vivo*
 - Biodistribution & shedding
- Clinical studies
 - Virus replication
 - Shedding & contact person risks

必要があると考えられます。

これらの問題点はICH腫瘍溶解性ウイルス「見解」のキーエレメント (Table 10) と非常に共通点があります。

7. ICH Viral/Vector Shedding (Fig. 3)

もう一つの話題として、遺伝子治療では、ベクターやベクターに由来する増殖性のウイルスの体外への放出をどのようにモニターするか、あるいはそのリスクをどう回避するかが非常に問題となります。

ICHにおけるこの増殖ウイルス、あるいはウイルスベクターの放出に対する見解(案)の作成計画をTable 11に示します。これについては、患者の安全性だけでなく、公衆衛生の観点からも非常に重要な問題です。このために、2007年のブラッセルICH会議で議論を行うことと、ヨーロッパで開催される遺伝子治療学会に合わせてワークショップを開催し、そこで情報を収集し、そのデータに基づいて、ICHのガイドライン化も含めて考えていく予定です。

Table 11 ICH Viral/Vector Shedding「見解」作成計画

- Discussed writing ICH Considerations on Viral / Vector Shedding
- Purpose: address patient safety & public health concerns (third party exposure)
- Timing: proposal for May 2007 meeting
- Plan a workshop in conjunction with a scientific conference in Europe
- Provide update on workshop planning at May 2007 SC meeting
- Topic has potential for ICH Guideline

8. 各国のUpdate

8.1 中国における遺伝子治療

中国における遺伝子治療の状況について、中国から報告を受けて議論しました。中国では二品目が承認されており、更に10以上のプロトコールが治験中であったり、IND申請が出されたりしています。

また、タイトルだけしか分かりませんでした。日米欧と同様のガイドラインを中国語で発出されていることが報告されました。しかし、遺伝子治療の対象とされる範囲や審査システムについては、情報の提供のされ方で日本や欧米とはかなり違った面があります。しかし、遺伝子治療の範囲については日本と欧米も厳密なところで少し異なります。

中国で承認されている二つの遺伝子治療ベクター (Table 12) のうち、一つはAdv-P53を用いたがん治療用のベクターで、もう一つは腫瘍溶解性ウイルスベクターです。議論をしている中で問題となったのは、中国で遺伝子治療を受けた患者が帰国しても、その確認の方法がないこと、特に腫瘍溶解性ウイルスベクターは増殖性ウイルスベクターであるため、体外への放出が続いている可能性があることで

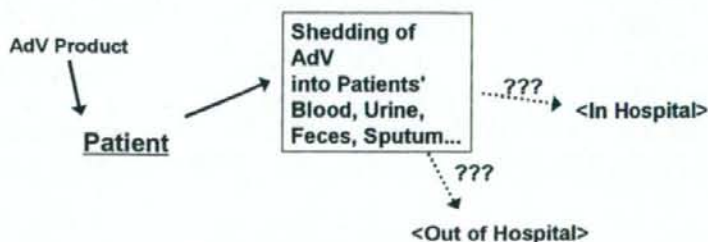


Fig. 3 Shedding of virus & vector

Table 12 Current Development of Gene Therapy in China

Adv-P53	tumor	come into the market
ONCORINE (Ad5-E1B-E3, H101)	tumor	come into the market

す。

8.2 EU 及びスイス

EU 及びスイスからは、遺伝子治療薬の環境への放出に関するガイドラインが作成中であることが報告されました³⁾。ただし、医薬品の抗生物質を服用するとその抗生物質が環境にどのような影響を及ぼすかといったことと同じような観点で、日本のカルタヘナ関連法とは異なる視点で作成されようとしています。

8.3 FDA

FDA は、遺伝子治療薬の患者への長期フォローアップのガイドラインに対していくつか意見公募を行っていましたが、近日中に公開されることが報告されました。

また、アメリカの新たな開発動向として遺伝子改変された細胞を用いた人工膀胱の開発等の紹介がありました。すなわち、ティッシュエンジニアリングと遺伝子治療との融合製品の開発が進んでおり、遺伝子治療とこのようなさまざまな融合分野についての評価がこれから重要になるとの意見が述べられました。

9. 遺伝子治療薬の品質・安全性確保における課題

遺伝子治療薬の品質・安全性確保に関わる今後の大きな課題を Table 13 に示します。上部の三つの課題に関しては、既に取り組みが始まっており、ICH 見解の作成も行われました。更にウイルスの放出や腫瘍溶解性ウイルスベクターに対する ICH 見解については、将来的にガイドライン化が必要になってくると思われます。

その他、フランスで起きた遺伝子治療における白血病の発症などのように、Insertional Mutagenesis の評価に関して、挿入部位の高感度測定法や挿

Table 13 遺伝子治療薬の品質・安全性確保における課題

- Germline-integration リスク低減化に関する見解作成完了
・2006.10.26
- Viral Shedding に関する見解案/GL 作成
・測定法の確立やリスク評価
- 腫瘍溶解性ウイルスベクターに関する見解案作成
- Insertional Mutagenesis
・挿入部位の高感度測定法開発。
・挿入部位が特定出来るより安全なベクターの開発
- 患者の長期フォローアップのあり方

Table 14 ICH 遺伝子治療WG国内メンバー

【MHLW】	【JPMA】
国立医薬品食品衛生研究所	日本製薬工業協会
山口照英	鳥海互
内田恵理子	小澤健夫
医薬品医療機器総合機構	田中宜之
荒戸照世	井上誠
前田大輔	河合睦文
	玄番岳踐
	田中舞紀

入部位が特定できるような遺伝子治療ベクターの開発が非常に重要と思われます。更に FDA が既にまとめている患者への長期フォローアップのあり方についても、今後我が国でも早期に考える必要があると考えています。

10. ICH 遺伝子治療 WG 国内メンバー

最後に今回の ICH 遺伝子治療専門家会議に出席したメンバーを Table 14 に示します。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課：ICH 見解：生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方、事務連絡、平成 19 年 4 月 6 日。
- 2) Aguilar-Cordova, E.: *Nature Biotech.*, 21, 756-757 (2003).
- 3) <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/genetherapy/20383105en.pdf>

遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

石井(渡部)明子、山口照英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

1. はじめに

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

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

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

その解決のための技術開発について概説する。

2. 遺伝子治療薬の開発とウイルス安全性

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

遺伝子治療臨床研究は、当初は、遺伝子挿入

Viral Safety of Gene therapy and Cell Therapy Products

Eriko UCHIDA, Division of Cellular and Gene Therapy Products

Akiko ISHII-WATABE, Teruhide YAMAGUCHI, Division of Biological Chemistry and Biologicals
National Institute of Health Sciences

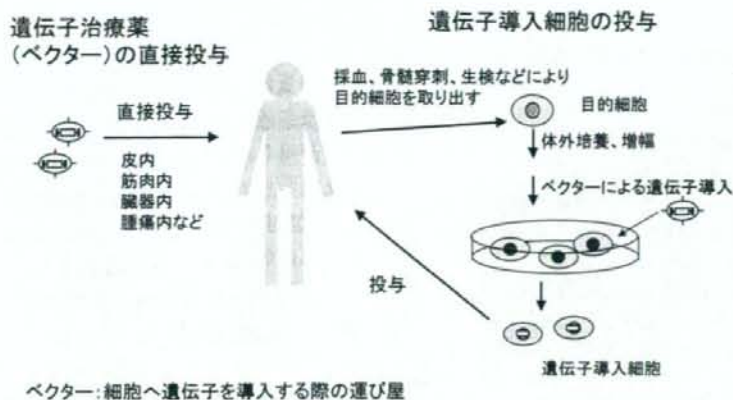


図1 遺伝子治療とは

表1 ICH 遺伝子治療専門家会議 (GTDG)

2001年5月 ICH SC

「遺伝子治療用医薬品など急速に進展している領域においては、特にその種の製品の規制に重大な影響を及ぼす可能性のある新しい科学的知見に関連する情報について、ICH 各極間での情報の交換/共有を積極的に継続して行う必要がある」



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

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

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

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

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

表2 ICH 遺伝子治療専門家会議で取り上げられたトピック

- ・ Viral Shedding from patients
- ・ Detection of RCV (RCA or RCR)
- ・ Reference Materials (Adenovirus type 5)
- ・ Minimize of the Risk of Germline transmission
- ・ Insertional mutagenesis
- ・ Oncolytic virus (Workshop)
- ・ Long term follow up (FDA Guideline 案)
- ・ Lentiviral vector (EMA Guideline 案)

1) 遺伝子治療の光と影

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

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

注) その後4例目の白血病患者が出たとの報告があった。

このようなフランスでの X-SCID 遺伝子治療による重篤な副作用発現は、遺伝子導入効率の非常に高い遺伝子治療用ベクターや導入条件が開発されたためともいえる。表3に示すように、X-SCID や ADA-SCID¹⁾、さらには慢性肉芽腫症 (CGD) 遺伝子治療¹³⁾ で非常にめざましい治療効果が認められるようになり、無菌室でしか生活出来なかった患児が室外で生活出来るようになり、普通の学校生活が送れるようになってきている。すなわち遺伝子治療で患者が治療出来る時代に到達したといえる。しかし、上記の

表3 遺伝子治療の光と影

成功例

- ・ X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞遺伝子治療 (レトロウイルスベクターで IL-2R コモンγ鎖を導入) により10人中9人に著効
- ・ アデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA-SCID) に有効
- ・ 慢性肉芽腫症 (CGD) の遺伝子治療で極めて有望な結果

重篤な副作用の発現

- ・ アデノウイルスベクターの投与による異常免疫反応により死亡 (米・ペンシルベニア大)
- ・ レトロウイルスベクターによる X-SCID 遺伝子治療で遺伝子の染色体挿入が原因となり3名に T 細胞白血病様症状発症 (仏・ネッカー病院)

遺伝子治療はまだ医療として十分に確立しておらず、有効性、安全性を慎重に検討する必要がある

ように安全性面からも遺伝子治療はまだ医療として十分に確立しておらず、有効性、安全性を慎重に検討する必要がある。

2) 遺伝子治療用ベクターに含まれる増殖性ウイルス検出

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

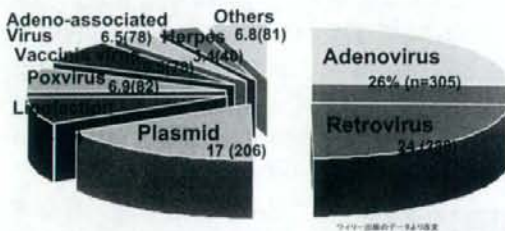


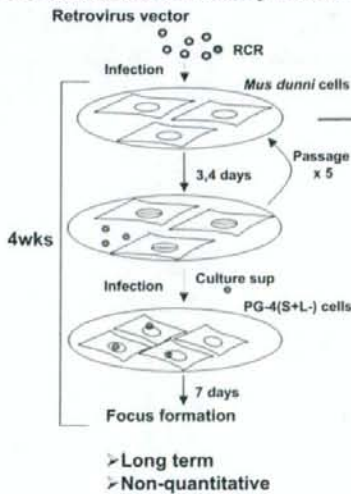
図2 世界の遺伝子治療臨床研究で用いられているベクターの種類

が必要とされている。

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

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

<Classical extended S+L- assay method>



<Infectivity qRT-PCR with RCR concentration>

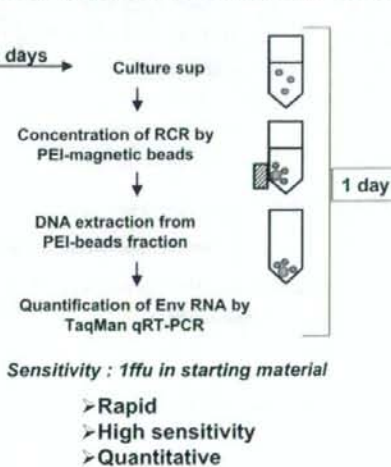


図3 感染性PCR法とS+L-アッセイ法の比較

出して定量的RT-PCRでウイルスを定量した。本法を用いることにより、10日以内に1 pfu/シャーレになるように添加した増殖性レトロウイルスが検出可能であり、通常のフォーカスアッセイより迅速性もあり、感度も100倍高いことが明らかになった(図4)¹⁶⁾。

アデノウイルスベクターの場合、通常、図5に示すように目的遺伝子をアデノウイルスベクターの増幅に関与するE1領域に挿入するため、発現ベクターにはE1領域が欠損している。ベクターの製造にはE1領域をもつ細胞を用いるが、従来よりアデノウイルスベクター製造用細胞として用いられてきた293細胞では、細胞のもつE1領域とベクターの配列に一部重複があり、そのため相同組換えによりE1領域を持つ増殖性ウイルスが産生される可能性が避けられなかった。こうして産生されるベクターに混入する微量の増殖性アデノウイルスを、E1領域

を特異的に検出するプライマー、プローブのセットを用いてPCR反応により検出しようとすると、ベクター製造用細胞に由来するE1領域DNA断片がPCR反応のバックグラウンドになってしまう。そのため、アデノウイルスが増幅出来る細胞を用いて細胞変成効果(CPE)を指標として増殖性ウイルスを検出する系が用いられているが、レトロウイルスの場合と同様、何代も細胞感染を繰り返し、増殖性ウイルスを増幅する必要がある。そこで、我々はウイルスの感染性試験にPCR法の迅速性・高感度性を組み合わせることにより増殖性アデノウイルスを高感度で検出する感染性PCR法を開発した(図6)。すなわち、増殖性アデノウイルスを含む検体を、指向性細胞であるHeLa細胞に感染させ、細胞内で増幅したウイルスのDNA断片を効率よく回収し、この中に含まれるE1領域DNAを定量的PCRやnested PCRを用いて検出

する方法である。細胞内のウイルスDNA断片の効率的な回収には我々が開発したガラスビーズ吸着法を用いた。感染性PCR法では、産生細胞由来のE1領域DNA断片の混入は、HeLa細胞に感染させることにより殆ど起こらず、また、細胞へ感染させ増幅してきたウイルス由来DNAを検出するため、感染力価との相関が明確になるという長所もある。本法を用いることにより、アデノウイルスベクターにスパイクした増殖性アデノウイルスを従来法であるCPE法に比べて10,000倍以上高感度に検出できることが明らかになり、かつ迅速性にも優れていることが確認された¹⁷⁾。

一方、ウイルスベクターに混入する危険性のある増殖性アデノウイルスおよび増殖性レトロウイルスに関しては、産生細胞の選択やベクターデザインによって混入リスクが

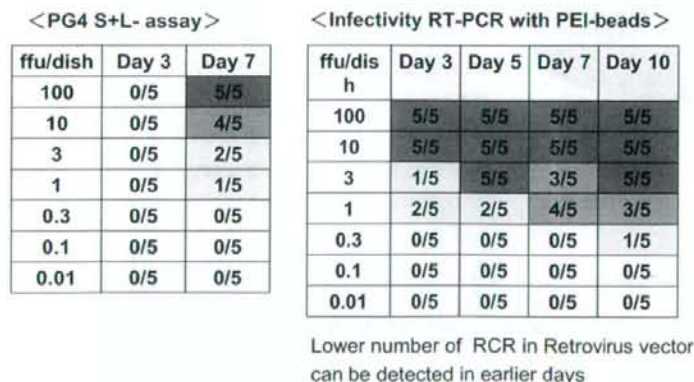


図4 PEI磁気ビーズを用いた感染性PCRとS+L-アッセイによる増殖性レトロウイルス検出の比較

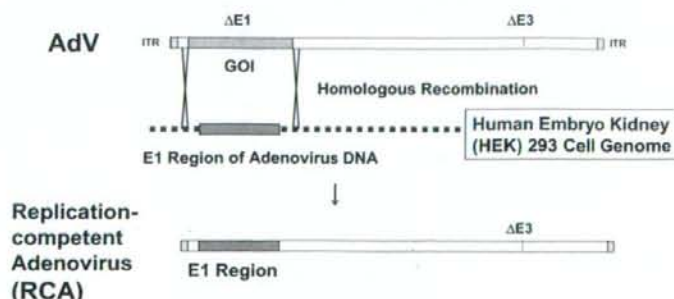


図5 アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルス (RCA)

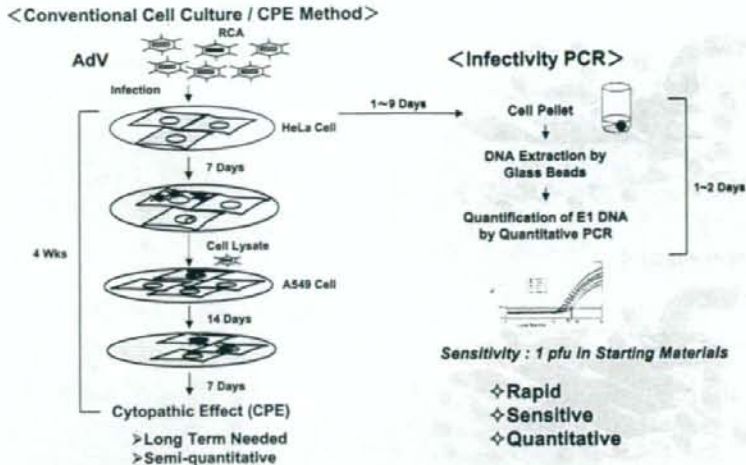


図6 増殖性アデノウイルス検出法：CPE法と感染性PCR法

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

3) 患者からの遺伝子治療用ベクターやウイルスの放出

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



図7 患者からのベクターやウイルスの放出の影響

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

4) 腫瘍溶解性ウイルスのウイルス安全性

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

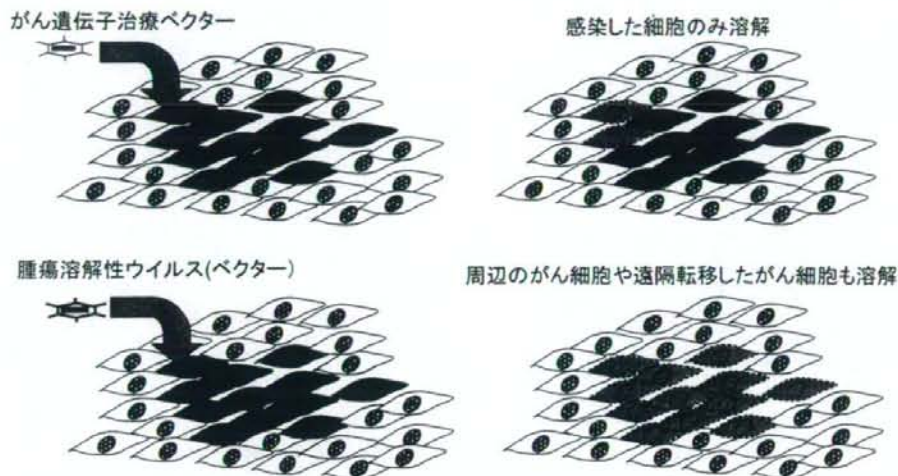


図8 腫瘍溶解性ウイルスと従来型のがん遺伝子治療ベクターの比較

がん細胞の中で特異的に増殖し、細胞を溶解して死滅させる性質を持つ特殊なウイルスあるいは遺伝子改変されたウイルスを用いてがん細胞を特異的に溶解させようとする治療法である。腫瘍溶解性ウイルスの開発は、腫瘍特異的に増殖する野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを用いた研究から、遺伝子改変技術を用いた病原性の除去や腫瘍指向性をより高めた制限増殖性ウイルスを用いるものへと移行しつつある。腫瘍溶解性ウイルスの開発はここ数年急速に進展しており、多くの総説も書かれている²¹⁻²³。腫瘍溶解性ウイルスの選択・設計（野生型・弱毒型・遺伝子組換え型）、1)動物やヒトで期待される効果の評価、2)ウイルス複製の腫瘍選択性、3)臨床上の安全性、4)動物試験に用いる適切な動物モデル、5)腫瘍溶解性ウイルスの体外放出の検出とそのリスク評価などが大きな問題となっている。

現在使用されている腫瘍溶解性ウイルス開発では、腫瘍細胞内で選択的に複製する非組換えウイルスを用いる場合と遺伝子組換え型ウイルスを用いる場合がある。通常の遺伝子治療では、ベクターに混入する増殖性ウイルス（RCV）の検出が品質・安全性の観点から重要であるが、腫瘍溶解性ウイルスは制限増殖能をもつことから、RCV検出よりも目的ウイルスの変化体をどの様に検出するかが重要な課題である。また、

増殖性を持つために、目的ウイルスやウイルスベクター以外の迷入ウイルスの試験が通常の方法では区別ができない。このために、迷入ウイルス試験では目的ウイルスの中和抗体を用いて試験を行うことなどが行われている。一方、腫瘍溶解性ウイルスの安全性上の大きな問題として、増殖能を持つために、変異を起こした場合により重篤な副作用が出やすく、また患者以外への伝播のリスクも高いことが上げられる。従って、ウイルスの変異を適切に検出する手法の開発が非常に重要である。さらには、このようなウイルスの変異がどの程度の頻度で起こるか、あるいはそのリスクについての評価を十分に行う必要がある。

3. 細胞治療薬（再生医療）等のウイルス安全性確保について

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学・幹細胞研究の飛躍的な進展により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、さまざまな疾患の治療に用いる細胞治療薬の開発が急速に進んでいる。このように細胞そのものを治療薬として用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患ばかりでなく、糖尿病等の慢性疾患に対してもきわめて有効な治療法になる可能性が高い。細胞治療薬の開発は世界的レ

ベルで急速に広がっており、欧米ではすでに複数の製品（細胞組織利用医薬品等）が承認されている。

厚生労働省では、薬事法上の規制を受ける細胞組織利用医薬品等の安全性および品質の確保のために必要な基本的要件を明らかにするために、平成13年に、「細胞組織利用医薬品等の取扱いおよび使用に関する基本的考え方」²⁴⁾、および「ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質および安全性確保に関する指針」(以下「ヒト細胞指針」と略す)²⁵⁾の策定を行った。これらの指針は、ヒト由来の細胞・組織を加工した製品について、治験前の品質・安全性確認や承認申請のために製造者が厚生労働省に提出しなければならない資料の内容について明らかにしたものである。さらに、厚生労働省では薬事法上の規制を受けない細胞治療臨床研究に用いる細胞の品質や安全性確保のために、平成18年に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の施行等についてヒト幹細胞を用いる臨床研究(以下「ヒト幹細胞臨床研究」)²⁶⁾を策定した。この「ヒ

ト幹細胞臨床研究」では、品質・安全性確保のための方策については上述した「ヒト細胞指針」を準用するように求めており、薬事法上の規制を受けない臨床研究においても同等の安全性を担保することが大きな特徴である。

本総説では、これらの通知や指針に記載されている、細胞治療に用いる細胞組織利用医薬品等のウイルス安全性の確保について概説するとともに、我々のデータも紹介する。

1) 細胞組織利用医薬品等の開発動向

細胞組織利用医薬品の開発は日米欧の先進国のみならず、ASEAN 諸国や他の地域でも活発に行われている。日本で承認された細胞組織利用医薬品はまだ無いが、欧米では既に培養皮膚や培養軟骨などのいくつかの製品が上市されている。複数の製品が確認申請を受け治験に入っており、臨床研究を含めると200を超える細胞治療（再生医療）開発が行われている。表4には、国内での治験や高度先進医療として実施されている事例を挙げた。血管、心筋、角膜、軟骨、骨、培養皮膚と多岐にわたっており、また

表4 日本で臨床応用が実施された／実施中の再生医療の例 2005年7月現在

分類	再生組織	適用細胞	疾患名	実施施設	備考
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	大阪市立大学医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	岡山大学医学部附属病院	高度先進医療
角膜・角膜上皮	羊膜	難治性眼疾患	結膜上皮内過形成や結膜腫瘍等	金沢大学医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	関西医科大学附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	京都府立医大附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	久留米大学病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	群馬大学医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	国立循環器病センター	高度先進医療
血管・心臓	血管	末梢血幹細胞	慢性閉塞性動脈硬化症、パージャール病	札幌北病院	高度先進医療
骨・軟骨	軟骨	軟骨	膝関節、離断性骨軟骨炎、変形性関節症	東京医科歯科大学医学部附属病院	治験
皮膚	表皮	皮膚	重症熱傷	東京女子医科大学病院	治験
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	奈良県立医大附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	自治医科大学附属病院	高度先進医療
骨・軟骨	軟骨	軟骨	外傷性軟骨欠損症、離断性骨軟骨炎等	島根大学医学部附属病院	治験
皮膚	表皮	皮膚	重症熱傷	社会保険中京病院	治験
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	昭和大学病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	信大医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	末梢血単核球	慢性閉塞性動脈硬化症、パージャール病	千葉大学附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	新潟大学医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病等	日本医科大学附属病院	高度先進医療
骨・軟骨	軟骨	軟骨	膝関節、肘関節の外傷性軟骨欠損症等	広島大学病院	治験
骨・軟骨	軟骨	軟骨	膝関節、肘関節の外傷性軟骨欠損症等	北海道大学病院	治験
骨・軟骨	軟骨	軟骨	膝関節、肘関節の外傷性軟骨欠損症等	三菱名古屋病院	治験

樹状細胞や活性化リンパ球を用いた癌治療の開発も実施されている。表4には自家細胞を用いた研究の代表例をあげたが、同種他家細胞を用いた製品の開発も急速に進んでいる(表5)。また、図9にEUでの開発状況をまとめたが、癌免疫療法の臨床研究が最も多く、ついで心血管系治療が多くなっており、我が国の趨勢と異なる点があることが分かる。

このような細胞治療薬の急速な開発状況に対応するために、欧米でも既にいくつかの指針等が作成されている^{3),5),27-29)}。これらの指針等で最も重要視されている安全性上の課題は、ウイルス等の感染症伝播をいかに防止するかである。細胞治療に用いる細胞は滅菌や高度な精製といった処理ができないため、ウイルス等の感染因子が混入した場合に患者ばかりでなく患者の家族等へ感染が広がる危険性がある。すなわち個の安全性ばかりでなく公衆衛生の観点からも、製品の安全性を担保することが最も重視されている。

また、不適切な製造による不良品の製造、不適切な製品の取扱いや使用による問題の発生を防止することが目的とされている。これらの問題への対処を定めることにより、高品質で安全性の高い細胞組織利用医薬品等の開発を推進することができると考えられる。

2) 原材料となる細胞・組織の由来とウイルス安全性

細胞組織利用医薬品では、原材料として用いられる細胞・組織が自己由来であるか非自己であるかを明確にし、細胞・組織の入手方法およ

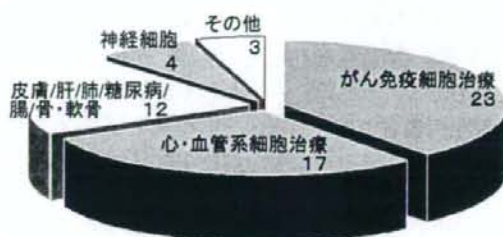


図9 EUにおける体細胞治療臨床研究申請件数 (2004.8 ~ 2006.10)

びその生物学的特徴について説明し、当該細胞・組織を選択した理由を明らかにすることが必要である。特にウイルス安全性に関しては、原材料となる細胞・組織の適格性について、HBV, HCV, HIV, HTLV, ヒトパルボウイルス B19、さらに必要に応じてサイトメガロウイルスやEBウイルスについて、血清学的試験や核酸増幅法等の検査を行う必要がある³⁰⁾。さらに、ウイルス等の検査においては、ウインドウ期の存在を念頭において、適切な時期に再検査を行うことが推奨されている。

ただし、自己由来の細胞・組織を用いる場合は、感染因子に関して必ずしもドナースクリーニングを行う必要はないとの考え方もある。しかし、自己由来の細胞・組織を用いる場合においても、製造従事者への安全性や製造工程へウイルス陽性原料を持ち込む可能性について十分な配慮が必要であり、必要に応じて上記したウイルス否定試験や迷入ウイルス試験の実施や、培養工程で特定のウイルス増幅が起きないことを確認することが必要となる。

表5 同種細胞治療等の開発状況

細胞	供給源	対象疾患	方 法
培養皮膚(真皮)	割礼組織	難治性潰瘍, 重症熱傷	ヒト線維芽細胞を培養
造血幹細胞	臍帯血	白血病治療	臍帯血造血幹細胞の増幅
リンパ球輸注	同種	移植片対宿主病(GVDH)抑制	同種造血幹細胞移植後にドナーリンパ球輸注
神経幹細胞	ヒト胎児脳細胞	セルロイド・リボフスチン症	ヒト胎児脳細胞増殖
神経幹細胞	ヒト胎児脳細胞	脳卒中	ヒト胎児神経幹細胞培養
間葉系幹細胞	ヒト骨髄由来	造血幹細胞移植 GVDH 抑制	ヒト間葉系幹細胞増幅
ヒト造血幹細胞	臍帯血	造血幹細胞移植	臍帯血造血幹細胞増幅

原材料となる細胞・組織について、安全性確保に必要な情報が確認できるように、ドナーに関する記録が整備、保管されていることが必要である。これらの記録の保管は、製造記録とともに製品の最終有効期限より少なくとも10年間とされている。この期間については、今後、運送性感染症の情報によっては再検討が必要とされている。また同様の観点から、治療の成否の検証や患者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取した細胞・組織の一部等の適当な試料を、適切な期間保存することが推奨されている。

採取した細胞・組織について、細胞の採取収率、生存率や細胞・組織の特性解析と平行して、微生物汚染がないことを示す検査を行う必要がある。

3) 細胞培養方法

製造工程で細胞培養を行う場合は、培地の組成、培養条件、培養期間、収率等を具体的に記載することが求められている。使用する原材料は、医薬品又は医薬品原料に匹敵する基準で品質管理されているものを用いる必要がある。血清は、必須でなければ使用しないことが望ましく、使用が避けられない場合には、血清からの

感染因子の混入・伝播の防止策を設ける必要がある。血清を使用する場合には、混入が想定されるウイルスについて否定試験を行ったものを使用する必要がある。さらに可能な限りγ線照射等の処理を実施し、潜在するウイルスの低減化・不活化を行う必要がある。

4) 高感度ウイルス検出法

輸血でのウイルス感染に関しては、数コピーから数十コピーのウイルスで感染が起きることが知られており、細胞治療薬のようにウイルスの不活化・除去工程が実質できない製品の場合には、可能な限り高感度なウイルス否定試験の開発が望まれている。現在最も高感度なウイルス検出法としては、PCRなどの核酸増幅検査(NAT)があげられるが、NATを用いても、ウイルス感染初期のウィンドウ期や低濃度キャリアーではウイルスゲノムの検出が不可能な場合があることが知られている。従って、ウイルス濃縮法等を利用することによるウイルス検出の高感度化ができれば、細胞治療薬のウイルス安全性に大きく貢献することが期待出来る。我々は、新規ウイルス濃縮法としてポリエチレンイミン磁気ビーズ(PEI磁気ビーズ)を用いた手法を開発し¹⁵⁾(図10)、PEI磁気ビ

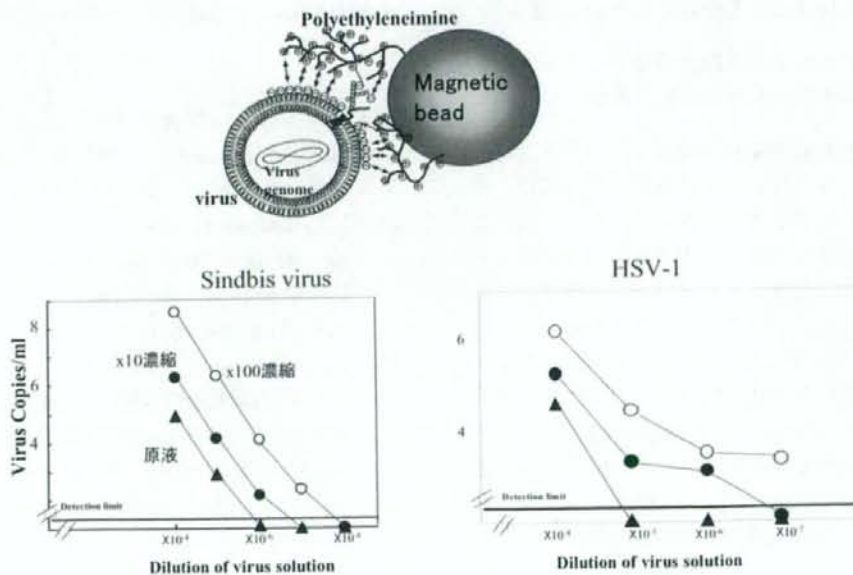


図10 PEI磁気ビーズを用いたウイルス濃縮

表6 PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮結果

ウイルス	宿主	ウイルスゲノム	脂質膜	サイズ (nm)	PEI-磁気ビーズ濃縮
モデルウイルス					
サイトメガロウイルス	サル	DNA	+	180-200	+
ヘルペスウイルス I 型	ヒト	DNA	+	150-200	+
水疱性口内炎ウイルス	ウシ	RNA	+	70-150	+
同種指向性マウス白血病ウイルス	マウス	RNA	+	80-110	+
Sindbis ウイルス	ヒト	RNA	+	60-70	+
アデノウイルス 5 型 (Ad-5)	ヒト	DNA	-	70-90	+
SV-40ウイルス (SV-40)	サル	DNA	-	40-50	+
ブタバルボウイルス (PPV)	ブタ	DNA	-	18-24	+*
ポリオウイルス Sabin 1 型	ヒト	RNA	-	25-30	+**
ヒト感染性ウイルス					
ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	ヒト	RNA	+	80-100	+
B 型肝炎ウイルス (HBV)	ヒト	DNA	+	40-45	+
C 型肝炎ウイルス (HCV)	ヒト	RNA	+	40-50	+
A 型肝炎ウイルス (HAV)	ヒト	RNA	-	25-30	+*

*: 条件により濃縮されない場合もある

** : PEI 磁気ビーズのみでは濃縮されないが, IgM 抗体や抗体と補体の添加により濃縮可能

ズを用いることにより, C型肝炎ウイルスやB型肝炎ウイルスをはじめとして多くのウイルスが濃縮可能であることを報告している(表6).

4. 遺伝子治療薬や細胞治療薬のウイルス安全性確保を目指した将来的な課題

遺伝子治療薬や細胞治療薬などの先端技術医薬品のウイルス等の安全性確保に関しては, 多くの検討すべき課題が残されている。また, これらの先端技術医薬品の開発はその周辺技術も含めて急速に進展しており, さらに腫瘍溶解性ウイルスベクターのようにこれまでの概念にない画期的な製品の開発も続いており, このような革新的技術を用いた製品については, その安全性を確保しつつ合理的な規制を行うことが, よりよい医療をできるだけ早く国民に届けることになる。このためにも, 高感度・高精度のウイルス安全性検出技術等の基盤技術の開発を進めると共に, 適切なりリスク評価に基づいた行政施策の立案に資する研究が望まれている。

謝 辞

本研究の一部は, 厚生労働科学研究費, 政策創薬総合研究事業, 文部科学省研究費の支援を受けて行われた。

参考文献

- 1) Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF: T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475-480, 1995
- 2) 厚生省薬務局長通知: 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。薬発第1062号, 医薬発第329004号, 薬食発第1228004号, 平成7年11月15日(平成14年3月29日, 平成16年12月28日一部改正)
- 3) FDA/CBER: Guidance for industry: Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy.

- 1998.3
- 4) EMEA : Note for guidance on the quality, pre-clinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products. CPMP/BWP/3088/99, 2001.4
 - 5) FDA : Guidance for reviewers : Instructions and template for chemistry, manufacturing, and control (CMC) reviewers of human somatic cell therapy investigational new drug applications (IND). 2003.8
 - 6) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知 : ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価. 医薬審第329号, 平成12年2月22日
 - 7) Marshall E : Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286 : 2244-2245, 1999
 - 8) Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML : Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80 : 148-158, 2003
 - 9) Hutchins B : Development of a reference material for characterizing adenovirus vectors. *BioProcessing Journal* 1 : 25-28, 2002
 - 10) Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M : Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346 : 1185-1193, 2002
 - 11) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nussbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A : Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288 : 669-672, 2000
 - 12) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003
 - 13) Ott MG, Schmidt M, Schwarzmaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kuhlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Luthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M : Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12 : 401-409, 2006
 - 14) FDA/CBER : 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. 2000.10
 - 15) Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Hayakawa T, Yamaguchi T : Virus concentration using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads for improving the sensitivity of nucleic acid amplification tests. *J Virol Methods* 114 : 11-19, 2003
 - 16) Uchida E, Sato K, Iwata A, Ishii-Watabe A, Mizuguchi H, Hikata M, Murata M, Yamaguchi T, Hayakawa T : An improved method for detection of replication-competent retrovirus in retrovirus vector products. *Biologicals* 32 : 139-146, 2004
 - 17) Ishii-Watabe A, Uchida E, Iwata A, Nagata R, Satoh K, Fan K, Murata M, Mizuguchi H, Kawasaki N, Kawanishi T, Yamaguchi T, Hayakawa T : Detection of replication-competent adenoviruses spiked into recombinant adenovirus vector products by infectivity PCR. *Mol Ther* 8 : 1009-1016, 2003
 - 18) Farson D, Tao L, Ko D, Li Q, Brignetti D, Segawa K, Mittelstaedt D, Harding T, Yu DC, Li Y : Development of novel E1-complementary cells for adenoviral production free of replication-competent adenovirus. *Mol Ther* 14 : 305-311, 2006
 - 19) Murakami P, Pungor E, Files J, Do L, van Rijnsvoever R, Vogels R, Bout A, McCaman M : A single short

stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles. Hum Gene Ther 13 : 909-920, 2002

- 20) Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC : New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. Hum Gene Ther 9 : 1909-1917, 1998
- 21) Aghi M, Martuza RL : Oncolytic viral therapies - the clinical experience. Oncogene 24 : 7802-7816, 2005
- 22) Lin E, Nemunaitis J : Oncolytic viral therapies. Cancer Gene Ther 11 : 643-664, 2004
- 23) Ries SJ, Brandts CH : Oncolytic viruses for the treatment of cancer : current strategies and clinical trials. Drug Discov Today 9 : 759-768, 2004
- 24) 厚生労働省医薬局長通知 : 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方。医薬発第266号, 平成13年3月28日
- 25) 厚生労働省医薬局長通知 : ヒト由来細胞・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。医薬発 第1314号, 平成12年12月26日
- 26) 厚生労働省医薬局長通知 : ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の施行等について ヒト幹細胞を用いる臨床研究。健発第0703003号, 平成18年7月3日
- 27) EMEA : Point to consider on xenogenic cell therapy medicinal products. 2003.12.17
- 28) EMEA : Point-to-consider on the manufacture and quality control of human somatic cell therapy medicinal products. CPMP/BWP/41450/98, 2001.5.31
- 29) FDA/CBER : Suitability determination for donors of human cellular and tissue-based products. 97N-484S, 1999.9.30
- 30) 厚生労働省医薬局長通知 : 生物由来製品及び特定生物由来製品の指定並びに生物由来原料基準の制定等について。医薬発第052001号, 平成15年5月20日

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 遺伝子治療専門家グループの活動と 遺伝子治療薬の規制における国際動向

特集 臨床応用が迫る遺伝子治療の動向と国産技術の開発

山口照英*¹⁾, 内田恵理子*²⁾

Quality control and safety of human cell therapy products

ICH gene therapy discussion group has been expected to exchange information with the following objectives: monitoring emerging scientific issues, developing new ways of communication to ensure that the outcomes of ICH are well understood and widely disseminated, proactively setting out principles that may have a beneficial impact on harmonizing regulation of gene therapy products. The group has been discussing and published the concept papers about reference materials for gene therapy vectors, virus/vector shedding, evaluation of risk of X-SCID gene therapy, oncolytic virus products, and risk of germline integration of gene therapy products.

ICH 遺伝子治療専門家グループは、遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するため、専門家グループ会議や公開ワークショップなどを通じて得られた議論の成果を広く公開するとともに、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これまで議論が行われてきた国際標準品、ウイルスベクターの排出、X-SCID 遺伝子治療における白血球発症とリスク評価、腫瘍溶解性ウイルス製品の品質・安全性確保、“生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方” などについて紹介する。

Teruhide Yamaguchi*¹⁾, Eriko Uchida*²⁾

key words: gene therapy, ICH, oncolytic virus, viral shedding, insertional mutagenesis

日米 EU 医薬品規制調和国際会議(ICH)は、日米 EU 間の医薬品の承認申請に関わる規制を調和し、申請に必要なさまざまなデータなどの作成における不必要な重複を避け、グローバルな医薬品開発の促進と、よりよい医薬品を一刻も早く患者のもとに届けることを目的として活動を行っている。ICH は、1990年4月、日本・アメリカ・ヨーロッパの各医薬品規制当局と業界団体の6極により発足した。それ以来、ICH 運営委員会(ICH-SC)は毎年2~3回の会合をつづけており、さらにICH 国際会議も2~3年に1回程度の頻度で開催されている。

この間、ICH 発足以来、50を超えるガイドラインが合意(調和)され、調和ガイドラインが各地域で

施行されてきている(http://www.pmda.go.jp/ich/ich_index.html)。新医薬品の品質・有効性・安全性の評価に関わる技術的なガイドラインだけでなく、承認申請資料の形式、市販後安全体制などについても議論がされてきている。また、カナダ、スイス、WHO などの他の機関もオブザーバーとして議論に参加するようになってきている。

遺伝子治療専門家会議(Gene Therapy Discussion Group: GT-DG)は、2002年のICH ワシントン会議にて正式に発足した作業部会である。それ以前は、バイオテクノロジー-医薬品専門家会議および Ad hoc な GT-DG として議論を重ねてきた。GT-DG では、周辺技術を含め急激に進歩する遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するために、公開ワークショップの開催や ICH ホームページなどを通じて得られた議論の成果を広く公開するとともに、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これ

*¹⁾ Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

*²⁾ Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞薬品部

表1 ICH 遺伝子治療専門家会議で採り上げられた主なトピック

- ・患者からの遺伝子治療用ベクターやウイルスの体外排出
- ・遺伝子治療薬に含まれる増殖性ウイルスの検出とその手法 (RCA or RCR)
- ・遺伝子治療薬のためのウイルス参照品(アデノウイルス5型)
- ・生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方
- ・遺伝子治療用ベクターによる挿入変異の評価
- ・腫瘍溶解性ウイルス(ワークショップ)
- ・遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップ(FDAガイドライン案)
- ・遺伝子治療用レンチウイルスベクター(EMEAガイドライン案)

表2 ICH 遺伝子治療公開ワークショップ(2002年)のテーマ

- ・アデノウイルス5型国際参照品(EU2)の確立状況
- ・他のベクター用の国際標準品の開発および有用性
- ・アデノウイルスベクターの体外排出
- ・レンチウイルスベクター

表3 ヒトアデノウイルス5型国際参照品(ATCC, VR-1516)

- ・アデノウイルス粒子数: 5.8×10^{11} particles/mL
- ・感染価: 7×10^{10} NAS Infectious units/mL
- ・宿主細胞 HEK 293 由来 DNA 量: $< 3 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ of total DNA
- ・宿主細胞 HEK 293 由来蛋白質量: 18ng/mL
- ・残存 BSA 量: $< 0.5 \text{ng/mL}$
- ・遊離ヘキソン: $1.16 \mu\text{g}/\text{mL}$, $2.0 \mu\text{g}/10^{11}$ viral particles
- ・エンドトキシン: $< 0.15 \text{EU/mL}$
- ・A 260nm/A 280nm 比(0.1% (w/v) SDS 存在下): 1.37

までGT-DGで採り上げられた話題について表1にあげたが、遺伝子治療薬の品質や安全性などに関する非常に多岐にわたる科学的課題について議論を行ってきた。

本稿では、ICH GT-DGで議論された遺伝子治療薬の品質・安全性などに関するいくつかの課題を採り上げ、それぞれの議論でのポイントを紹介するとともに、議論を通じて明らかにされた規制当局としての最新のスタンスについて紹介する。また、EU医薬品庁(EMEA)から出されたレンチウイルスベクターに関するガイドラインや、遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップに関する米国食品医薬品局(FDA)のガイドラインについても議論を行ってきており、ICHで議論を行ったこれらの各極ガイドラインについても概説する。

ICH GT-DG の活動

2001年5月の東京でのICH-SCにおいて、急速に進展している遺伝子治療用医薬品の品質・安全性の確保に関しては、これらの製品の規制に重大な影響を及ぼす可能性のある新しい科学的知見に関連する情報について、ICH各極間での情報の交換・共有を積極的に継続して行う必要があることが明記された。

ICH-SCでの議論を受け、GT-DGの正式なスタートを飾るものとしてICH後援の第1回遺伝子治療ワークショップが2002年にワシントンで開催された。本公開ワークショップで扱ったトピックは表2のとおりであり、遺伝子治療に関する最新の話題が採り上げられた。その後、ICH会議やICH本会議に合わせて会合を持つとともに、e-mailなどを通じて常に情報交換を行い、遺伝子治療薬の安全性や品質などに関する最新の問題点について議論を継続してきている。これらの成果については、ICHホームページや国立医薬品食品衛生研究所のホームページに掲載している。

ICH GT-DGでの各課題ごとの議論についてそれぞれ概略を述べる。

1. 国際参照品

アメリカでオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症患者が、アデノウイルスベクターの大量投与による異常免疫反応により死亡¹⁾したことを受け、その安全性を確保するためには正確な投与量を測定することが重要であり、異なる施設での臨床研究に用いるアデノウイルスベクターのウイルス粒子数、プラーク形成単位、感染単位の相互比較を可能にするための参照品や標準品の設定が必要とされた。

そこで、アデノウイルス参照品作製のための国際委員会が発足し、2002年8月にアデノウイルス5型国際参照品が確立され、ATCCより公開された(ATCC, VR-1516, 表3)。本参照品を使用することによって、異なる施設・研究で測定されたウイルス粒子数および力価のデータ同士を科学的に比較することが可能となった^{2,3)}。

これまで、多施設間で出されている毒性データな

どに関しては、用いられているベクターの投与量・コピー数などの基準がないため、相互に比較できなかった。しかし、本参照品を用いることにより得られたデータをまとめて再検討することによって、用量依存性の毒性のような安全性に関する情報の相関関係を明らかに出来るようになり、また遺伝子治療用アデノウイルスベクターの製品に含まれる増殖性アデノウイルス(RCA)の真の定量値を求めることが可能となると期待されている。現在、アデノウイルスを用いた多くの製品の品質やRCAの評価に本参照品が用いられている。

ICH GT-DGでは、このアデノウイルス参照品の品質や安定性などに関する議論を行い、上記目的に有用であること、また長期にわたる安定性についても問題がないことなどを確認した。

2. ウイルスベクターの体内からの排出

2002年の遺伝子治療公開ワークショップでは、アデノウイルスベクターを投与した患者からのベクターの体外排出について、測定法を含め、安全性の観点から議論が行われた。現在までのところ、ウイルスベクターの体外への排出に伴う安全性上の問題は確認されていないとされている。しかし、より高い感染価を持つベクターの開発や指向性の改良など、今後もアデノウイルスベクターの開発は進むと想定され、環境への影響や広く公衆衛生の観点からその安全性を評価しておくことは重要と考えられる。このために、アデノウイルスベクターの体内からの排出をモニターする期間、タイミングについても十分に考慮する必要があること、特に投与量・投与経路を考慮して試験の間隔を設定する必要があることが示された。

アデノウイルスベクターのみならず、体外排出のリスクが想定されるベクターがつつぎと開発中であり、患者家族や医療従事者などへの伝播のリスクや公衆衛生の観点からの安全性確保が大きな課題とされている⁴⁾。そこでGT-DGでは、排出リスクの高いベクターやウイルスの体内からの排出に関して、2007年10月にヨーロッパ遺伝子治療学会との共催でICHワークショップを開催することになっている。今後、このワークショップでの議論を踏ま

えて、遺伝子治療用ベクターやウイルスの排出に関するICH見解の作成や、ガイドライン化についても検討を行っていくことになっている。

なお、ICH見解とは、ガイドラインのように各規制当局への拘束力はないものの、現時点の科学的な見解をICHとしてまとめたものである。遺伝子治療用ベクターやウイルスの排出に関するICH見解の作成に当たっては、特に治療用ベクターなどが患者以外の第三者に暴露される危険性について言及する予定となっている。

3. レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に代表されるレンチウイルスを改変してつくられるベクターである。他のレトロウイルスベクター、特にガンマレトロウイルスに由来するベクターと異なり、レンチウイルスベクターは非分裂細胞、たとえば幹細胞、リンパ球、樹状細胞、神経細胞などに遺伝子導入可能である。したがって、*ex vivo* 遺伝子導入に加えて *in vivo* での遺伝子導入にも有用であるとされている。さらに、レンチウイルスベクターは、他のレトロウイルスベクターにくらべて遺伝子サイレンシングの頻度が低いため長期間遺伝子発現が期待され、慢性疾患に対する *in vivo* 臨床管理の手段としても用いることが可能と考えられる。

レンチウイルスベクターに関する特別のリスクはまだ知られていないものの、レンチウイルスベクターは、特にその開発の主な焦点の一つがヒトの重篤な病原体であるHIVに由来するものであることから、ガンマレトロウイルスベクターと比較して、より一層、品質・有効性・安全性の問題が重要視されている。

2002年に開催されたワークショップでは、レンチウイルスベクターの安全性や品質に関する議論が行われた。特に、① レンチウイルスベクター中に含まれる増殖性レンチウイルス(RCL)に対する試験・検査の実施法、② 挿入変異の可能性・検出法、③ 生殖細胞への挿入の可能性、について議論された。レンチウイルスベクター中のRCLの検出においては、適切な陽性対照を置いて実施すべきで