

ムページでは、日本における遺伝子治療の状況について厚生労働省の厚生科学課の協力を得ながら英語で公開し、国際的な情報共有の場としても役立てています。

3.3 遺伝子治療専門家会議で取り上げられたトピック

過去に遺伝子治療専門家会議は専門家会議として発足して6回、合計8回の会議を開きました。その中で取り上げられたトピックをTable 7に示します。

1点目は遺伝子治療で用いるウイルスあるいはウイルスベクターの体外への放出について、患者だけでなく患者をケアする人や患者の家族も遺伝子ベクターが伝播される可能性があるため、どのように検出して防げば良いかの議論です。

2点目は、遺伝子治療のベクター作成時における増殖性の replication confident virus (RCV) の混入についての議論です。

3点目は、Viral Shedding あるいは RCV の測定には適切な参照品が必要なため、現在、アデノウイルス5型の参照品が作られています。この参照品の有用性やどのように利用すべきかについての議論です。

4点目は、生殖腺への遺伝子治療ベクターの伝達に関するリスクを最小にするための方策についての議論で、2005年に見解案としてまとめることが方針とされました。

5点目は、前述したフランスでの事例のように、染色体挿入変異による癌化などのリスクについての評価や評価法についての議論です。

6点目は、腫瘍溶解性ウイルスについて、臨床あるいは非臨床のあり方、あるいは特性解析や品質管

Table 7 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 type5)
- Minimize of the Risk of Germline transmission
- Insertional mutagenesis
- Oncolytic virus (Workshop)
- Long term follow up (FDA Guideline 案)
- Lentiviral vector (EMEA Guideline 案)

理をどのように行うべきかについての議論です。

それ以外には、FDAのLong term follow upあるいはEMEAのLentiviral vectorといった各極のガイドライン案について議論し、各極からのコメントが作成されたガイドラインに取り込まれています。

4. 横浜会議

4.1 遺伝子治療をめぐる各極の最新情報 (Table 8)

EUからは、非常に有効な成績が得られているレトロウイルスベクターを用いた慢性肉芽腫症 (CGD) の治療において、スイスとドイツで3名の患者の治療が行われ、そのうちの1名が遺伝子治療の効果が現れる前に原疾患 (感染症) により死亡したことが報告されました。EUは、これは副作用ではないと判断していますが、EFTAでは詳しい情報が得られるまでは、CGDの臨床研究は一時凍結していることが報告されました。

FDAは、臨床研究における遅発性の副作用、すなわちLong termのフォローアップに関するガイドラインを近々発出する予定で、これについていくつかのコメントを提出しました。

また、前述したアデノウイルスベクターの参照品は、遺伝子治療の品質あるいはViral Sheddingを測定するために推奨していますが、その安定性試験

Table 8 遺伝子治療を巡る各極の最新情報

- EU: レトロウイルスベクターを用いた慢性肉芽腫症 (CGD: 好中球の活性酸素生成酵素の異常により殺菌能が欠損し、重篤な感染症を繰り返す) の遺伝子治療での死亡例についての現在の見解。スイスとドイツで3名の患者に本遺伝子治療が行われたが1名の患者が死亡。十分な機能回復が得られる前の原疾患 (感染症) による死亡。副作用ではないとの判断。
- EFTA: CGDの臨床研究については詳しい情報が得られるまで一時凍結
- FDA: 臨床研究における遅発性の副作用のフォローアップに関するガイドラインを発出する予定。遺伝子治療用アデノウイルスベクターの参照品の長期安定性に関する情報: -80°C で50ヶ月の安定性を確認
- Japan: ADA-SCID 遺伝子治療のフォローアップについて報告。現在まで、ガン化等の重篤な副作用は見られていない

Table 9 ICH遺伝子治療専門家会議見解(案)「意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則」

報告担当者 (1st) : Markku Pasanen (EMEA)
同 (2nd) : Teruhide Yamaguchi (MHLW)
同 (3rd) : Dan Takefman (FDA)
<ul style="list-style-type: none"> • 2005年10月：欧州医薬品庁が第1次案を作成、各極に配付 • 2005年11月：各極から寄せられた事前コメントを基に、GTDG会議で第2次案を作成 • 2006年1月：第2次案に対する各極からのコメントを切り取り(コメントとりまとめ：MHLW)→第3次案を作成 • 2006年6月：横浜 GTDG 会議で検討→第4次案を作成 • 2006年7月：Draft4に対するコメント締め切り(予定) • 2006年9月：Draft5作成(予定) • 2006年10月：シカゴ GTDG 会議で Draft5 の検討、最終案の作成(予定)

の結果が報告されました。

日本は、北海道大学で行われた ADA-SCID 遺伝子治療のフォローアップについて、現在までのところガン化等の重篤な副作用は見られていないと報告しました。

4.2 生殖細胞への挿入リスクの問題について (Table 9)

ICH GTDG 見解案は後述しますように、題名が変更されております。

「意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則」の最初の見解案は EMEA が作成、次に筆者が Draft 3 を作成し、現在は FDA に交代しています。ほぼ大きな論点はなくなっていますので、2006 年度中に最終案にする予定です。

これまでの経過は Table 9 に示すように、2005 年 10 月に EMEA が第 1 次案作成、11 月のシカゴ会議で各極から寄せられたコメントを基に第 2 次案を作成、更に第 2 次案に対する各極のコメントを基に第 3 次案を作成し、横浜会議ではそれを検討して第 4 次案を作成しました。

現在は第 4 次案のコメントを求めているところで、7 月中に締め切り、FDA に送付することとなっています。

5. 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則

5.1 構成

Table 10 に示すように最初に序論があり、次にリスクに影響する因子として、ベクターの種類、投与量、及び投与方法や投与部位について記載されています。3 番目には非臨床試験で実施すべきこととして一般的考慮事項と生体内分布試験について記載され、4 番目は何らかのリスクが想定される場合、患者に対するモニタリングをどのように行っていくべきかが記載されています。

5.2 見解案議論の主なポイント (Table 11)

この見解案のタイトルについては、最初は trans-*mission* という言葉を用いて「伝達リスク」という

Table 10 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • 序論 • 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスクに影響する因子 <ul style="list-style-type: none"> ・ベクターの種類 ・投与量 ・投与方法や投与部位 • 非臨床試験 <ul style="list-style-type: none"> ・一般的考慮事項 ・生体内分布試験 • 患者のモニタリング • 用語 |
|--|

Table 11 見解案議論の主なポイント

- 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 (Draft3)
 - ↓
 - 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞 (染色体) への組込みリスク評価における原則 (Draft4) (遺伝子改変が次世代へ及ぶことを防止するための方策に限定することを明記)
 - 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞 (染色体) への組込みリスクに影響する因子
 1. 生体内分布様式, 増殖特性, 組込み能等のベクターの性質に依存してリスクが分類できる
 2. リスクは次の順で低くなる
 - ① 搭載遺伝子を核内へ送達し, かつ染色体への組込み機能を持つベクター
 - ② 搭載遺伝子を核内へ送達するが, 染色体への組込み機能を持たないベクター (非ウイルスベクターを含む)
 - ③ 搭載遺伝子を核内へ送達せず細胞質にのみ局在
 - ④ 体外で遺伝子導入された細胞 (非増殖性ベクター)
 3. 投与量, 投与方法, 投与部位
 - 非臨床試験
 1. 非臨床試験のデザインに関しては, ICH M3 や ICH S6 などの他の GL のスコープには含まれないが, 基本原則は適用できるかもしれない。
 2. 生体内分布試験
 - 生体内分布試験では, 生殖腺への分布を試験すること
 - 生殖腺への分布の検出に当たっては, 定量的 PCR 等の適切な感度をもつ試験法を用いて試験すること
 3. 生殖腺への分布が認められたときにはそのシグナルが持続性があるかを試験すること。持続性が認められたときには, 生殖細胞へのシグナルが認められるかどうかを明らかにすること
 - 患者のモニタリング

非臨床試験において生殖腺に一過性のベクターシグナルが認められたときには, 臨床試験において患者の精子への伝達が無いかモニタリングすることが推奨される

言葉を用いていましたが, 基本的に遺伝子治療用ベクターの生殖細胞の染色体への組込みリスクにおける原則, つまり次世代へ影響が及ぶことを避けるといったことに限定することとし, 例えば卵子の染色体外にベクターが入った場合にも発生に影響が及ぶ可能性があります, それについて発生毒性あるいは他の非臨床的試験でカバーすべきであるといったことを明記しています。

5.2.1 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞 (染色体) への組込みリスクに影響する因子

染色体への組込みリスクに影響する因子として, ベクターの生体内分布様式, 増殖特性, あるいは組込み能等のベクターの性質に依存してリスクが分類できます。

リスクの分類として最も高いのは, 遺伝子を核内へ送達し, かつ染色体への組込み機能を持つベクターです。

2番目は, 核内には送達するけれども, 通常は組込み能がなく, 高濃度に存在すると組込みが行われ

る場合です。

3番目は遺伝子を核内に送達せず, 細胞質のみに局在する場合です。例えばセンダイウイルスベクターを用いた場合は, ここに該当します。

4番目は体外で遺伝子導入された細胞で治療を行い, かつ非増殖性ウイルスベクターを使う場合で, 非常にリスクは低く, 生殖細胞への組込みリスクに関する非臨床試験を行う必要はないと考えられます。その他に投与量, 投与方法及び投与部位がリスクに関与します。

5.2.2 非臨床試験 (Table 11)

5.2.1 で述べたようなリスクに基づいて非臨床試験をデザインします。

デザインに関しては, ICH M3 や S6 など他のガイドラインのスコープには含まれません。ただし基本原則については, 適用できる可能性もあると考えています。

遺伝子治療ベクターでは, 当然生体内分布試験が行われます。その試験においては, 必ず生殖腺への分布も試験することが求められます。生殖腺への分

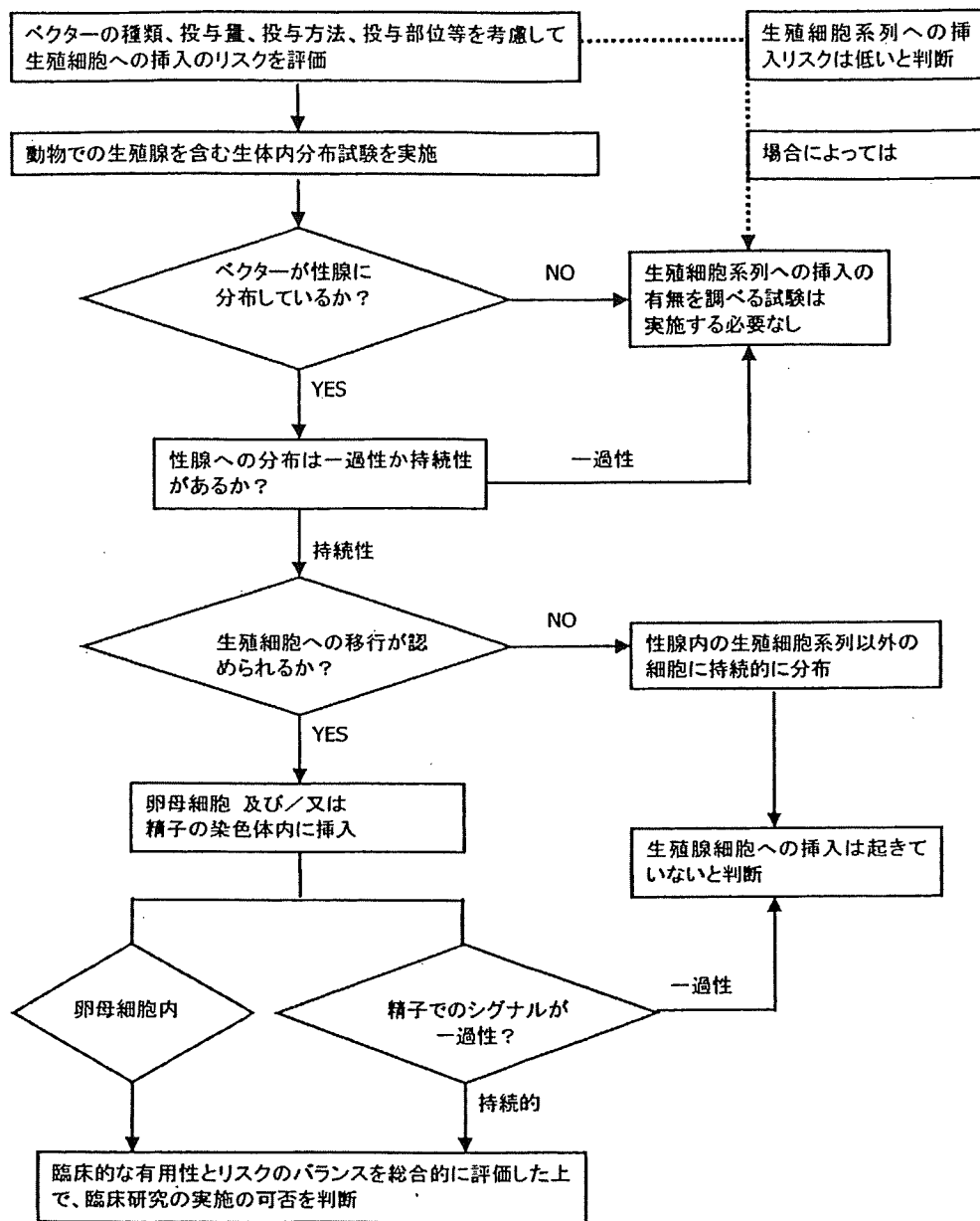


Fig. 2 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への組込みの有無を調べるための動物試験のフロー（案）

布を試験するに当たっては、定量的PCR等の適切な感度を持つ試験法を用いて試験をすることが求められます。

生殖腺への分布が認められた場合、そのシグナルに持続性があるかどうかを試験し、持続性が認められれば更に生殖細胞へのシグナルが認められるかどうかを明らかにします。これをフローチャードで表

すと、Fig.2のようになります。

まずはベクターに応じてリスクを評価します。生殖細胞への挿入リスクが低いと判断された場合は、もともと生殖細胞の挿入リスクがないと考え、試験を実施する必要がない場合もあります。しかし生体内分布試験を実施してベクターが性腺に分布しないのであれば、それ以上の試験は必要ありません。こ

の評価を全ての製品について行わなければならないかについては、例えば対象が非常に高齢であったり、重篤な患者に限定される場合は、次世代への影響を考慮する必要がないことから、試験を実施する必要はないことが記載されています。

一方、ベクターが性腺に分布していた場合は、性腺の分布が一過性か持続性かを判断し、一過性であれば組み込みは起きていないと判断できますが、持続性であって、かつ生殖細胞に移行した場合は、精子の染色体内に行っているかどうかを試験し、精子でのシグナルが一過性であれば、生殖腺細胞への挿入は起きていないと判断できます。一過性でない場合、よほどの理由がない限り臨床試験は実施できないこととなります。ただし、先ほど述べたように次世代への影響が起るような患者を対象としていない場合は判断が変わってきます。

5.2.3 患者のモニタリング (Table 11)

非臨床試験において、生殖腺内に例えば一過性のベクターシグナルが認められた場合は、臨床試験において患者の精子への伝達が無いか、特に精子の成熟サイクルの期間を越えて試験をすることが推奨されます。

6. 遺伝子治療専門家会議の今後の活動予定 (Table 12)

ICH 見解の策定を次の二つについても行うべきではないかと議論しました。

まず、「腫瘍溶解性ウイルス」について、2005年のシカゴ会議でオープンワークショップを行った成果を基に ICH としての見解案、もう一つは、ウイルスやウイルスベクターの体外への放出の評価についても見解案を作成すればどうかといった意見が出ました。

更に、ICH7 での活動予定についても議論をしま

Table 12 ICH 遺伝子治療専門家会議の今後の活動予定

- ICH GTDG 今後の活動予定
 - ・ ICH 見解の策定
 - ・ ICH 見解「腫瘍溶解性ウイルス」
 - ・ ICH 見解「ウイルス/ベクターの体外放出評価」
 - ・ ICH7 での活動予定

した。

6.1 腫瘍溶解性ウイルス

非増殖性のウイルスを用いたがん治療においては、腫瘍部位にベクターが入った部分のみがん細胞は死に、入っていない部分は生き残ります。ところが腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞でのみ増殖できる性質を持っており、がん細胞を破壊し、更に隣のがん細胞も破壊して増殖していくという制限増殖型ウイルスです。

世界的に見ると、腫瘍溶解性ウイルスはアメリカ、カナダ、ヨーロッパで多くの製品の開発が行われています。国内では遺伝子治療としてはまだ行われていませんが、野生型あるいは弱毒化されたウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究は行われています。名古屋大学で行われている例を Table 13 に示します。

それ以外にも動物実験の段階のステージにある製品を Table 13 に示しています。これらはほとんどが遺伝子組換えのウイルスのタイプです。

6.2 ICH 腫瘍溶解性ウイルスワークショップ (Table 14)

2005年にシカゴにおいて、腫瘍溶解性ウイルスのワークショップが開催されました。その目的は、腫瘍溶解性ウイルスについて以下のような臨床開発に関連する問題点を整理し、意見交換を行うことです。

問題点の一つ目は、腫瘍溶解性ウイルスには、野生型、弱毒型、遺伝子組換え型がありますが、それぞれどのような設計に基づき腫瘍に特異的に作用するかについての検討です。

二つ目は、非臨床試験の有効性・安全性の確認及び至適用法・用量の検討です。

三つ目は、腫瘍選択性で、例えば腫瘍にのみ発現しているタンパク質や発現が抑えられているタンパク質をターゲットにしたり、若しくは腫瘍細胞に特異的に発現している抗原をターゲットにするといった選択性が検討されています。

四つ目は、臨床での安全性で、患者体内であれば生きたウイルスが存在し続けることも含めた安全性をどのように評価するかの検討です。

五つ目は、安全性、投与量、あるいはその有効性を評価するためには適切な動物モデルを策定しなければなりませんので、モデル動物の開発についてです。

Table 13 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	-	

*:天然型ウイルスのため、実施前に「遺伝子治療臨床研究指針に関する指針」に基づく厚生労働大臣の確認は不要。また、カルタヘナ法に基づく第一種使用規程承認申請も不要。

<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	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/egtp/egtp/sect/oncltc_v/onclt-j.html)

Table 14 ICH腫瘍溶解性ウイルスワークショップ2005年シカゴ

- 目的
腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発に関連する以下のような問題点を整理し、フローも含めて積極的に意見交換を行う。
 - ・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）

六つ目は、先ほど述べたように長期にわたる体外からの排出をどのように測定し、評価するかについての検討です。

ワークショップでは、世界各国から約10人の演者が講演し、それぞれの発表についての議論を取りまとめ、そのアウトプットとして見解案を作成しようと考えています。

6.3 Viral Shedding (Table 15)

2002年に開催された第1回遺伝子治療ワークショップにおいて、viral sheddingについての議論を行いました。

アデノウイルスベクターの体外への放出について

Table 15 Viral Shedding

- 第1回遺伝子治療ワークショップで viral shedding についても議論 (2002年)
 - ・ アデノウイルスベクターの体外への排出 (Shedding)
 - ・ 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現在までのところ確認されていない
 - ・ アデノウイルス5型国際標準品
 - ・ アデノウイルス5型国際標準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及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る。これにより、用量依存的な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すること、及び遺伝子治療用アデノウイルスベクターの製品中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であろう。
- 2008年 (?) ICH7 で virus/vector shedding について総合的に議論 (予定)

Table 16 ICH遺伝子治療専門家会議の将来的課題

- Viral Shedding
 - ・ 測定法の確立、安全性評価。
- ウイルスベクター標準品
 - ・ レンチウイルス (?)
- 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。
- 腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性・有効性評価

は、安全性上の問題は今までのところ確認されていません。しかし、正確な評価をするためには参照品が必要ですので、アデノウイルス5型の国際標準品を使用することによって、異なる施設、若しくは研究で測定されたウイルス粒子数及び力価のデータを科学的に比較することが可能になること等について議論しました。

更に今のところ決定されているわけではないのですが、2008年にICH7が開催される場合に Viral/Vector Shedding に関する議論を再度行い、それに

Table 17 ICH GTDG国内メンバー (於横浜会議)

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	• 井上誠
• 荒戸照世	• 竹迫一任
• 前田大輔	• 玄番岳踐
	• 田中舞紀

基づいて見解案を策定することをステアリングコミッティに申請しました。

7. GTGDの将来的課題 (Table 16)

遺伝子治療専門家会議の将来的課題の一つ目は、先ほど述べた Viral Shedding について、測定法が十分確立されていませんので、今後検討していく必要があります。

二つ目は、ウイルスベクター標準品について、レンチウイルス、AAV (アデノ随伴ウイルス)、又はそれ以外のウイルスについて標準品が必要かどうかを検討し、必要であればどのように作成して、どのように利用するかを検討する必要があります。

三つ目は、Insertional Mutagenesis を評価するために挿入部位についての高感度測定法の開発があげられます。現在のところ専門家会議の議論でも確定的な方法はなく、複数の方法を取り合わせることによって推論するしかないとされており、より適切な方法を開発したり、あるいは挿入部が特定できるような安全なベクターの開発が望まれています。

四つ目は、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性・有効性評価に関しては、見解を取りまとめる中で明らかにしたいと考えています。

最後に ICH 横浜会議に参加した MHLW, JPMA のメンバーを Table 17 に示し、謝意を表したいと思います。

文 献

- 1) Estaurdo Aguilar-Cordova: *Nature Biotech.*, 21, 756-757 (2003).

臨床とウイルス別刷
第35巻第4号
2007年10月10日 発行
日本臨床ウイルス学会

遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

石井(渡部)明子、山口 照 英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

1. はじめに

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

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

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

その解決のための技術開発について概説する。

2. 遺伝子治療薬の開発とウイルス安全性

1990年に世界で最初のアデノシンデアミナーゼ欠損症（ADA-SCID）の遺伝子治療が開始され、患者の細胞を遺伝子改変して治療を行うというまったく新しい治療法が世に出された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

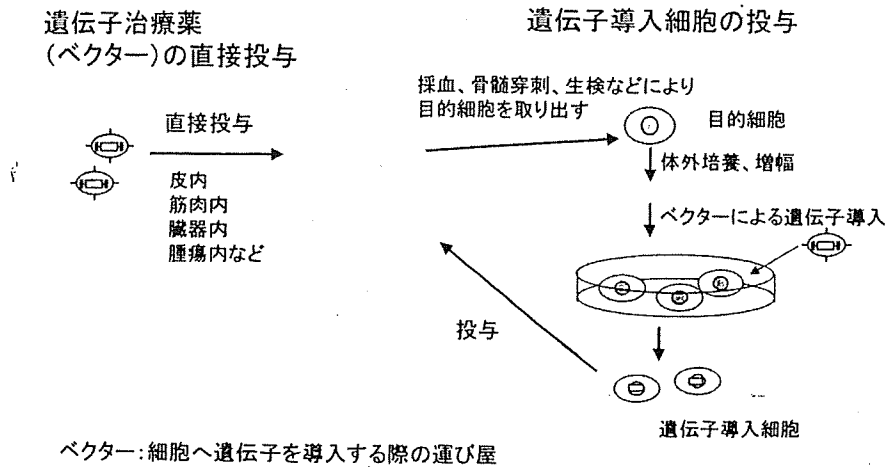


図1 遺伝子治療とは

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、力点が有効性に移るようになった。特に、多くのケースで目的とする臨床効果が得られないのは、用いた遺伝子治療用ベクターがコードする目的遺伝子からの発現が十分でなく、発現産物が少ないためと考えられるようになり、いかにして目的遺伝子を高発現するベクターを開発するかが重要なポイントと考えられるようになった。しかし、1999年に米国ペンシルベニア大学でのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、遺伝子治療薬の投与が原因で患者が急死するという初めての事故が発生し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ている。

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、普通の学校生活を送れるようになってきている。すなわち遺伝子治療で患者が治癒出来る時代に到達したといえる。しかし、上記の

表3 遺伝子治療の光と影

成功例

- ・ X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞遺伝子治療 (レトロウイルスベクターで IL-2R コモン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

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いだしており^{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

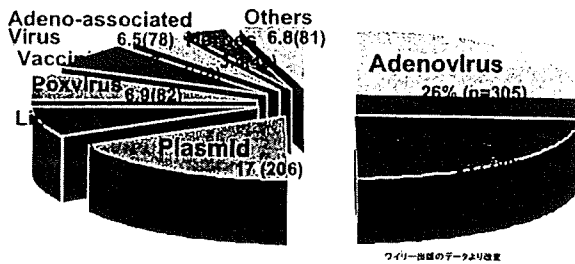
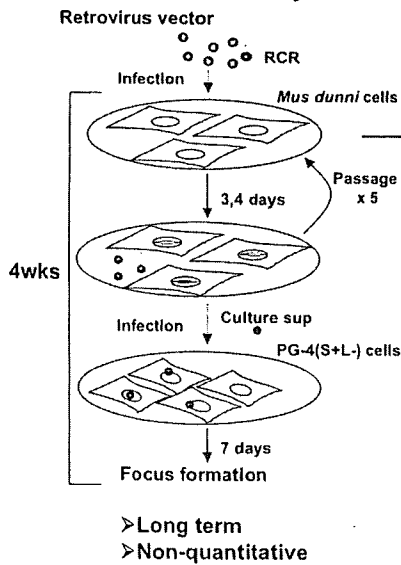


図2 世界の遺伝子治療臨床研究で用いられているベクターの種類

<Classical extended S+L- assay method>



<Infectivity qRT-PCR with RCR concentration>

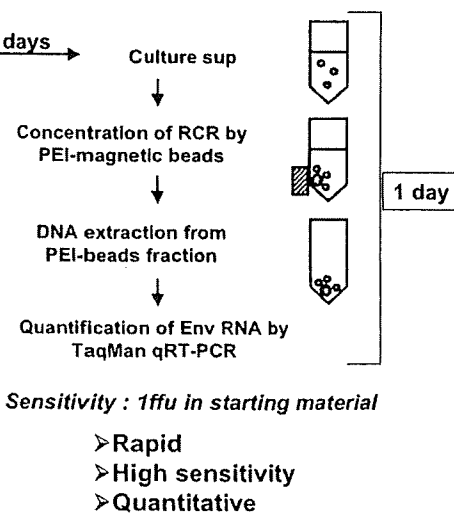


図3 感染性PCR法とS+L-アッセイ法の比較

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

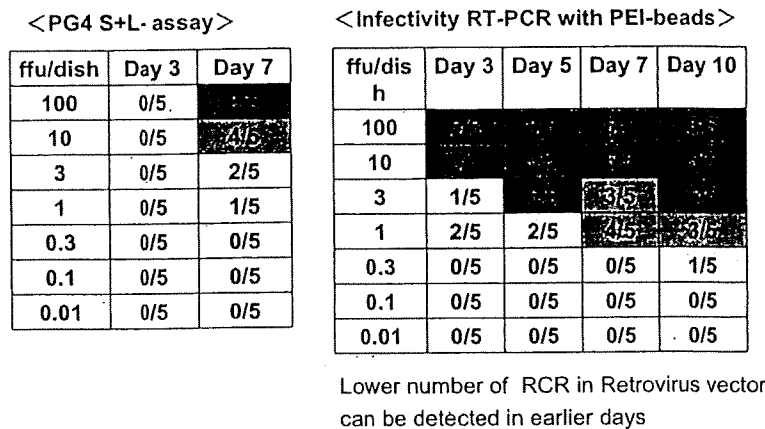


図4 PEI磁気ビーズを用いた感染性PCRとS+L-アッセイによる増殖性レトロウイルス検出の比較

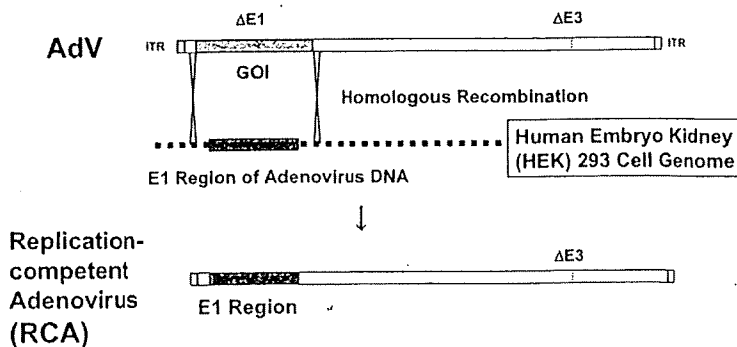


図5 アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルス (RCA)

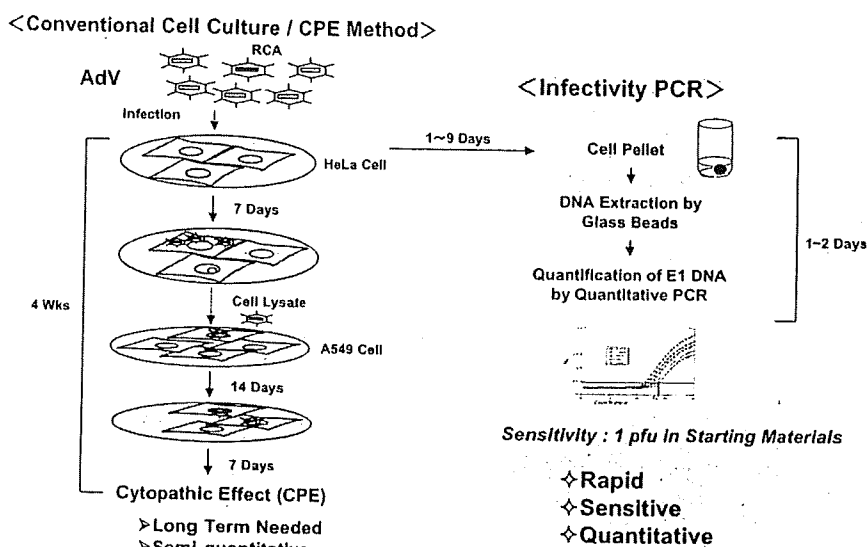


図6 増殖性アデノウイルス検出法：CPE法と感染性PCR法

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

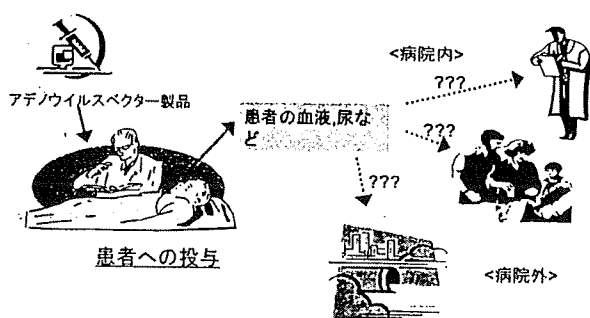


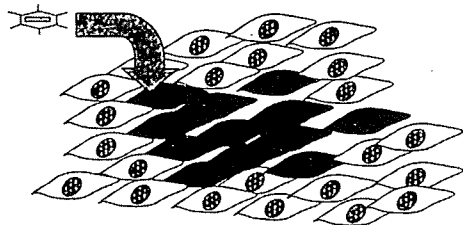
図7 患者からのベクターやウイルスの放出の影響

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。

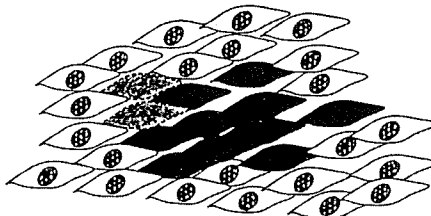
4) 腫瘍溶解性ウイルスのウイルス安全性

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が開発が始まった(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

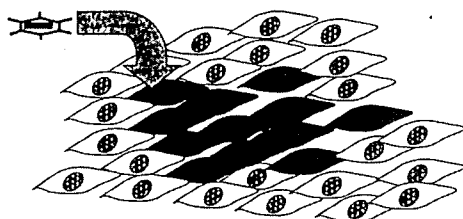
がん遺伝子治療ベクター



感染した細胞のみ溶解



腫瘍溶解性ウイルス(ベクター)



周辺のがん細胞や遠隔転移したがん細胞も溶解

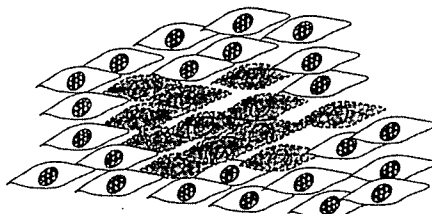


図8 腫瘍溶解性ウイルスと従来型のがん遺伝子治療ベクターの比較

がん細胞の中で特異的に増殖し、細胞を溶解して死滅させる性質を持つ特殊なウイルスあるいは遺伝子改変されたウイルスを用いてがん細胞を特異的に溶解させようとする治療法である。腫瘍溶解性ウイルスの開発は、腫瘍特異的に増殖する野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを用いた研究から、遺伝子改変技術を用いた病原性の除去や腫瘍指向性をより高めた制限増殖性ウイルスを用いるものへと移行しつつある。腫瘍溶解性ウイルスの開発はここ数年急速に進展しており、多くの総説も書かれている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な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	群大医学部附属病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	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	札幌北楡病院	高度先進医療
骨・軟骨	軟骨	軟骨	膝関節、離断性骨軟骨炎、変形性関節症	東京医科歯科大学医学部附属病院	治験
皮膚	表皮	皮膚	重症熱傷	東京女子医科大学病院	治験
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病	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	新潟大学医歯学総合病院	高度先進医療
血管・心臓	血管	骨髄単核球	閉塞性動脈硬化症、パージャール病等	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思われる。

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

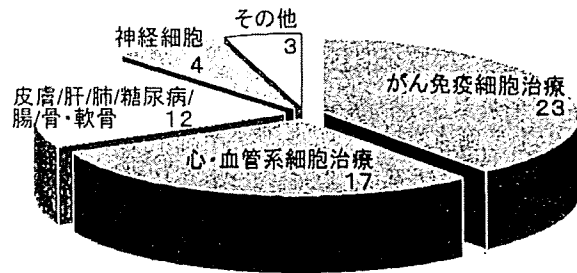


図9 EUにおける体細胞治療臨床研究申請件数 (2004.8～2006.10)

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	ヒト骨髓由来	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、遅発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り、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-

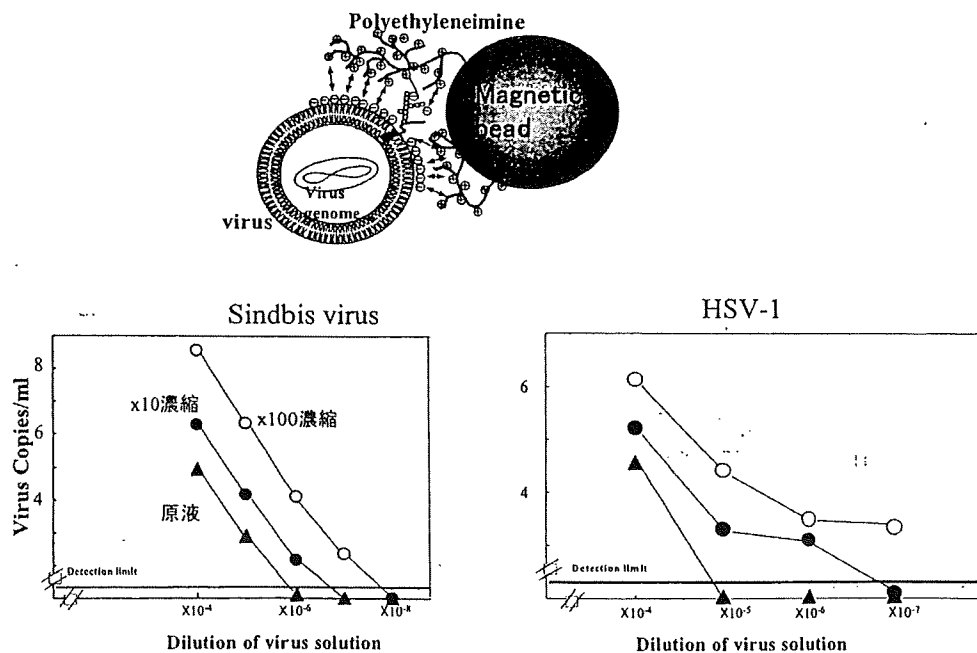


図10 PEI磁気ビーズを用いたウイルス濃縮

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	+
ブタパルボウイルス (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, Nusbaum 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, Schwarzwaelder 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-EVI1, 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