



図4 IFN-β 1a 製剤の力価測定

遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究

研究分担者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第一室長

遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究の一環として、初年度及び次年度は、遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者の排泄物からのウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価法について検討した。ICH 見解「ウイルス/ベクターの排出に関する基本的考え方」を基に、今後、国際調和指針の作成に当たり、指針に盛り込むべき要件を検討し、ウイルスやベクターの生物学的特性と排出の分析法、非臨床試験及び臨床試験での排出試験のあり方と伝播のリスク評価の観点から考察した。また、最終年度は遺伝子治療薬のヒト初回投与試験までに実施すべき非臨床試験の要件について、EMA のガイダンスを中心に検討した。遺伝子治療薬にはプラスミド、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、遺伝子導入細胞など様々な性質の異なる種類のもが含まれるが、これら遺伝子治療薬に共通して必要とされる非臨床試験要件と、各遺伝子治療薬の種類により異なる個別の考慮事項について考察した。

A. 研究目的

遺伝子治療は、先天性遺伝子疾患やがん、心血管疾患、神経変性疾患等、現在効果的な治療法が確立されていない難病や生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患に対する革新的医療として期待されている。本邦では平成 7 年に最初の臨床研究が開始されて以来、現在までに 30 件近い臨床研究・試験が実施され、治療を受けた患者数も 180 名を超えた。平成 20 年には我が国で初めての遺伝子治療薬の承認申請が出されるなど、遺伝子治療薬の開発は急速に進展している。しかし、先天性免疫不全症やレーバー先天性黒内障などで目覚ましい成果が得られている一方で、レトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療における白血病の発症など、遺伝子治療により予想を超える重篤な副作用の発現も認められており、遺伝子治療薬の本格的な実用化・普及には克服すべき課題は未だ多い。特に重要な

課題となるのは遺伝子治療薬の品質・安全性等の確保である。遺伝子治療薬のような先端医薬品は、従来の医薬品にない概念や画期的な機能を有しているため、その品質、安全性、有効性の確保には新たな評価手法の開発が望まれている。このような技術の進歩が著しい分野においては、特に臨床開発が進んでいる海外での開発動向を踏まえ、国際的な水準からみた医薬品の評価手法や開発ステージで明らかにしておくべきデータ、あるいは承認申請において求められるデータ等の科学的妥当性について絶えず評価・検証し、評価手法や規制の国際調和を推進することが医薬品審査の迅速化には重要である。本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝子治療薬の品質・安全性確保のための評価手法や規制に関する国際調和を推進するための基盤的研究を行うものである。

本分担研究では、21 年度及び 22 年度は、遺伝子治療薬や腫瘍溶解性ウイルス製品を投与

した患者からのウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価について、今後、国際調和ガイドラインに盛り込むべき要件について検討した。23年度は遺伝子治療薬のヒト初回投与試験までに実施すべき非臨床試験の要件について検討した。

B. 研究方法

ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価については、2009年6月付けで発出された「ICH considerations: General Principles to Address Virus and Vector Shedding (ICH見解：ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方)」及び関連する論文や資料を基に検討した。また、遺伝子治療薬のヒト初回投与試験までに実施すべき非臨床試験の要件については、2008年5月にEMAから発出された「GUIDELINE ON THE NON-CLINICAL STUDIES REQUIRED BEFORE FIRST CLINICAL USE OF GENE THERAPY MEDICINAL PRODUCTS (遺伝子治療薬のヒト初回試験までに必要とされる非臨床試験に関するガイダンス)」及び関連する指針等の資料を基に検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面への配慮が必要な試料・資料は取り扱っていない。

C. 研究結果及び考察

C.1 遺伝子治療薬や腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者からのウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価

遺伝子治療薬の排出 (shedding) とは、遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルス、細菌などを投与した患者から、ベクターやウイルス、細菌が患者の分泌物や排泄物を介して拡散することと定義され、生体内分布 (患者の投与部位から全身への広がり) とは異なる概念であ

る。ウイルスやベクターの排出は患者家族や医療従事者等の第三者への伝播のリスクがあり、公衆衛生の観点から安全性確保は大きな課題である。

遺伝子治療薬や増殖性ウイルス薬は中国等では既に承認された製品があり、これらの製品が治療に用いられている。また、欧米や我が国でも遺伝子治療薬や増殖性ウイルス薬等の臨床開発は活発化しているが、非臨床試験から臨床試験においてどのような排出の評価を行うべきかについては必ずしも明確にされてこなかった。そこで、ICH 遺伝子治療専門家会議 (GTDG) は、2009年に「ICH見解：ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方」を発出し、第三者への伝播のリスクを把握するための非臨床試験や臨床試験での排出の評価に関する基本的な考え方を示した。しかし、ICH見解はガイドラインとは異なり、規制としての拘束力はない。そこで、遺伝子治療薬や増殖性ウイルス製品がグローバルに開発され、世界中で患者に投与されている現状を考慮し、ICHではICH見解をもとにウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価に関する国際調和ガイドラインの作成を検討している。ガイドラインの目的は、非臨床、臨床試験での排出試験計画、排出の検出および特性解析法に関するガイダンスを提示することである。排出の評価により排出の起こりやすさ、第三者への伝播や公衆衛生上の問題点について推定することが可能となる。ガイドラインが作成されれば、排出試験の実施に関して国際調和が推進され、不要な試験を避けることが可能となる。また、開発段階での排出に関するデータが蓄積されれば、市販後の製品の安全性監視にも役立つことが期待される。

そこで、遺伝子治療薬や腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者からのウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価に関して、今後、国際調和ガイドラインに盛り込むべき要件を

検討した。

C.1.1 ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価において考慮すべき生物学的特性

ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価において考慮すべき生物学的特性として、対象となるウイルスや遺伝子治療用ベクターが由来する野生型株の既知の生物学的特性に関する情報は、排出の試験計画を立案するための基本的要件と考えられる。野生型ウイルスの既知の感染/伝播経路や、ウイルスやベクターの一般的な生物学的特性に加えて、ウイルスやベクターの増殖能の有無は、増殖性ウイルスを使用する場合はもちろん、非増殖性のウイルスやベクターの場合でも製造工程や投与後に意図せずに増殖能を獲得することもあるため、考慮すべき重要な生物学的特性である。

癌治療用ベクターとして腫瘍溶解性生菌を用いる方法も開発されているが、ウイルスベクターだけでなく、このような細菌ベクターも排出を考慮する必要がある。細菌ベクターの場合には、ウイルスベクターの排出評価のためのガイドラインがそのままあてはまるものではないと考えられるが、その手法や一般的な考慮事項のうちの一部は適用可能と考えられる。

遺伝子治療用ベクターのうち、プラスミドベクターについては、naked DNA として排出されても第三者に伝播することはないと一般的に考えられており、ガイドラインから除外してもよいと思われる。

1) ウイルス/ウイルスベクター

遺伝子治療用ウイルスベクターと腫瘍溶解性ウイルスを以下、ウイルス/ウイルスベクターと呼ぶ。ウイルス/ウイルスベクターでは、ウイルスゲノムの遺伝子改変を行うための工程に関する情報や、組換えウイルス/ウイルスベクターの品質特性の分析は、排出のリスクを評価する上で大変有用と考えられる。排出試験

を計画するには、ウイルス/ウイルスベクターの生物学的特性として、感染指向性、増殖特性、遺伝子構造や核酸配列等の分子生物学的特性等を考慮する必要がある。野生型や天然弱毒化ウイルスでは、ウイルスの樹立と選別の経緯に関する情報が特に重要であろう。第三者への伝播のリスクを評価するには、これらの情報に加えて病原性に関わる遺伝子に関する分子解析が大変有用と考えられる。

製品の開発に当たっては、ウイルス/ウイルスベクターが由来する野生型株に関する既知の特性（感染経路、生体内分布、排出経路、潜伏感染と再活性化等）を参照すべきである。またこのような情報はウイルス/ウイルスベクターによる第三者への感染に対する防御法を確立するのにも有効と考えられる。

① 増殖能

ウイルス/ウイルスベクターの増殖能は排出評価にあたって考慮すべき重要な特性である。増殖性ウイルス/ウイルスベクターは患者体内に長期間存続する恐れがあり、患者体内でその量が増える可能性があるからである。このことは排出の可能性を高め、排出期間を増加させ、結果的に伝播の可能性を高めることになる。増殖性ウイルス/ウイルスベクターでは、排出に影響を与える可能性があるため、分子変異体の分析も重要である。

非増殖性ウイルス/ウイルスベクターの場合、製品が排出されたとしても、投与後にその量が増えることはなく、排出は増殖性ウイルス/ウイルスベクターと比べるとはるかに短期間になることが見込まれる。しかしながら、非増殖性ウイルス/ウイルスベクターであっても、製造工程で増殖性ウイルスが生じる可能性がある。従って、製造工程で生じる可能性のある分子変異体の解析を行うことは、製品の品質の観点からも、また排出の考察を行うに当たっても重要である。

遺伝的改変により増殖能を低下させたウイルス/ウイルスベクターでは、その増殖能が復帰したり変異する可能性も考慮する必要がある。非増殖性ウイルス/ウイルスベクターは、患者の体内において、他のウイルスとの組換えや細胞の遺伝子により相補されたり、あるいは細胞の遺伝子との再配列により増殖性を再獲得する可能性がある。

② 持続性と潜伏感染

ウイルス/ウイルスベクターの持続性や潜伏感染は排出速度と排出量に影響する。持続性の高いウイルス/ウイルスベクターでは、排出はより長期間に及ぶ可能性がある。潜伏感染/再活性化の可能性があるウイルス/ウイルスベクター（ヘルペスウイルスなど）では、潜伏感染したウイルスが再活性化する可能性を考慮して、より長期間のモニタリングが必要になると考えられる。

③ 感染指向性と投与/感染経路

ウイルス/ウイルスベクターの感染指向性と投与経路はウイルス/ウイルスベクターを細胞標的に運ぶための重要な要素であり、排出プロファイル及び伝播の可能性に影響を与える可能性がある。

前述の通り、ベクターが由来する野生型株の感染指向性と投与経路に関する情報は排出を考慮する上で必須である。ウイルス/ウイルスベクターの感染指向性が野生型と同じである場合、排出と伝播の経路は野生型のそれを基に推定することができる。例えば、野生型ウイルスが皮膚、血液、体液等との接触によって感染する場合、血液、体液等によるウイルス/ウイルスベクターの排出を考慮すべきと考えられる。また、野生型ウイルスが空気感染または飛沫感染により非接触感染性を示す場合、ウイルスベクターも同様の経路で感染する可能性がある。非接触感染は伝播の可能性を高めると考

えられる。

野生型とは異なる細胞/組織特異性を持つように遺伝子改変されたウイルス/ウイルスベクターの場合、排出プロファイルは改変された標的特異性に依存する。

しかし、ウイルス/ウイルスベクターの感染と増殖を許容する細胞、組織、臓器へのターゲティングは、投与したウイルス/ウイルスベクターの感染指向性に加えて、ウイルス/ウイルスベクターと細胞、組織、臓器の接触の程度とも密接に関係する。従って、ウイルス/ウイルスベクターの排出は投与部位及び投与経路に依存し、野生型とは異なる排出プロファイルを示すことが考えられる。例えば、呼吸器系組織に感染指向性を持つ野生型ウイルスに由来するウイルス/ウイルスベクターは、野生型と同様に呼吸器系組織に感染指向性を示すと考えられるが、排出プロファイルは投与経路に依存し、呼吸器内投与、腫瘍内投与、全身性投与では排出プロファイルが異なると考えられる。

非増殖性ウイルスベクターを用いて *ex-vivo* で遺伝子導入した細胞を患者に投与する場合は、通常、感染性ウイルスが遺伝子導入細胞から遊離することは考えにくいので、排出のリスクは極めて低いと考えられる。

④ ウイルス不活化及び治療法

非病原性株に由来するウイルス/ウイルスベクターは病原性株に由来するものよりも排出時の懸念は低いと考えられるが、これはウイルス/ウイルスベクターのその他の生物学的特性、すなわち増殖性や弱毒化の程度に依存する。

ウイルス/ウイルスベクターの生物学的特性として、物理的・化学的な不活化に対する感受性に関する情報は、排出されたウイルスの伝播のリスクを評価するうえで重要である。また、野生型ウイルスに対する有効な不活化法、感染患者の有効な治療法に関する情報を幅広く集めておくことは、感染のリスクとその影響をコ

ントロールする手段として利用できる可能性がある。

2) 非ウイルスベクター

プラスミドベクターは、通常は患者体内で増幅したり、第三者に伝播可能な形で排出されるということはないので、プラスミドの排出と伝播のリスクは比較的low、排出試験で考慮すべき事項は限定的なものになると考えられる。しかし、例えばフラーレンからなる安定なナノ粒子のような、特殊なドラッグデリバリーシステムを利用してプラスミドを投与する場合、そのまま修飾を受けない形で排出される可能性がある。また、ウイルスゲノムの一部を持つプラスミドや、動物細胞の自己複製系を持つプラスミドでは、ウイルス粒子やプラスミドの増幅が生じる可能性がある。このような場合には、特別な注意が必要になると考えられる。

細菌性ベクターや治療用細菌は、一般的に増殖性あるいは制限増殖性であり、この点が最も考慮すべき事項である。しかし、これに加えて休眠性/持続性と抗生物質耐性についても考慮する必要がある。

① 増殖能

ウイルスベクターの増殖能について記載したC.1.1①の関連する部分は、細菌性ベクターや治療用細菌にも一般的に適用できると考えられる。

② 休眠状態と持続性

細菌性ベクターや治療用細菌の排出の経路と期間を推定するには、細菌性ベクターの増殖を許容する細胞の種類と、細菌性ベクターが持続感染する、あるいは休眠状態で生存する組織、臓器の特性を考慮することが重要と考えられる。ネズミチフス菌、リステリア・モノサイトジェネス、結核菌など、ある種の細菌は細胞内で増殖（細胞内感染）することが可能である。

このような細胞内で増殖性を示す細菌性ベクターの排出は、より長期間に及ぶ可能性がある。

③ 抗生物質感受性/耐性

抗生物質感受性は細菌性ベクターの除去や、感染した第三者への治療計画を考える上で重要な要素である。抗生物質耐性遺伝子を細菌性ベクターに組み込むことは、細菌感染の治療において利用可能な抗生物質を制限することになるため、耐性遺伝子を持たないベクターの利用が望ましい。

3) 免疫系と導入遺伝子

① 免疫系の影響

ウイルスやベクターに対する免疫応答は排出プロファイルを変える可能性がある。患者の免疫応答が強力な場合、投与されたウイルスやベクターのクリアランスが早まり、その結果、ウイルスやベクターの排出期間はより短期間になる可能性がある。遺伝子改変を行ったウイルスやベクターに対する免疫応答は、改変された遺伝子の影響で、野生型株に対する免疫応答とは異なっている可能性がある。

第三者への伝播のリスクを考慮する場合、一般の人々が野生型ウイルスまたは親株に対して既存免疫を獲得しているかどうかに関する情報が有用と考えられる。大部分の人々が当該ウイルス種に対して既に免疫を獲得している場合、ウイルスは効果的にクリアランスされるため、ウイルスやベクターの排出が生じててもウイルスやベクターの伝播のリスクは一般的に低いと考えられ、ほとんどの状況で安全であると見なされる。しかし、高齢者や乳幼児など、免疫能が低い人ではクリアランス機構が有効に働かない可能性があり、感染が起こると重大な結果になる可能性がある。免疫能が低下した人と患者が接触する可能性については、常に気を付ける必要がある。

② 導入遺伝子の影響

ウイルスやベクターが導入遺伝子を持つように改変されたものでは、その排出は導入遺伝子により影響を受ける可能性がある。例えば、免疫系を刺激する導入遺伝子の発現により、ウイルス/ベクターのクリアランスが促進される可能性や、ウイルスの増殖機構に影響を与える可能性のある因子を導入する場合などである。

ウイルスやベクターが自殺遺伝子をコードしている場合、特殊な条件下では宿主の細胞死が誘導される可能性がある。そのような導入遺伝子は、ウイルスやベクターが宿主細胞から遊離する引き金となり、排出のタイミングに影響を与える可能性があると考えられる。

C.1.2 ウイルスやベクターの排出の分析法

排出試験の実施には、適格な分析法を用いることが大変重要である。伝播の可能性を定量的に評価することが可能な定量的な分析法を用いることが望ましい。排出されたウイルスやベクターの検出には、通常、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等の核酸増幅検査 (NAT) と感染性試験の2つの方法が用いられる。これらの方法はいずれも利点と欠点がある。NATに基づく分析法は感度が高いが、排出されたウイルスやベクターが感染性を有するインタクトなウイルスやベクターなのか、非感染性の分解物なのかを区別できない。一方、感染性試験は感染性のあるウイルスやベクターのみを検出可能であるが、NATよりも感度が低い。従って、適切なアッセイ系を選択することが重要であるが、ウイルスやベクターの遺伝子配列を検出する定量的NATに基づく方法を含めることが望ましいと考えられる。どのような試験法を選択するにしても、その妥当性を明らかにすることが必要である。

1) 分析法の確立における注意点

分析する検体はインタクトなウイルス/ベク

ター又はウイルス/ベクターの断片や分子変異体である。排出の検出に用いる分析法は、特異性があり、十分な感度を持ち、再現性のある方法で、何が排出されたのかを十分に区別できるものである必要がある。分析法は定量的方法か定性的方法のいずれかを用いる。

何が排出されたのか、「排出物」を明らかにするために、複数の分析法を組み合わせることが望ましい。例えば、single-site NATを用いた場合、短いウイルス断片も検出してしまうため、排出を過剰評価してしまう可能性がある。妥当性が示されていれば、multi-targetあるいはmultiplex NATを行うことにより、ウイルスやベクターの配列全体を決定することが可能であり、排出されたウイルスやベクターがインタクトか否かに関する有用な情報を得ることが可能と考えられる。

定量的分析法の感度を考慮し、用いた方法の検出限界を明らかにすることが重要である。定量限界、特に定量下限が重要である。ウイルス等の標準参照物質が利用可能であれば、定量的分析法を改良するのに役立つと考えられる。

排出の分析系は標的となる検体のプロファイルに依存して確立する必要がある。血液、唾液、尿などの体液中の「排出物」の量は単位容積当たりで表すことが望ましいが、生体内分布試験のPCRデータでは、ゲノムDNA 1 μ g当たりの量として表すことが一般的である。検体が糞便の場合には、単位重量当たりで表すことになる。

分析用試料中に含まれる試験の阻害物質となる不純物を除去するステップを入れる必要がある。また、分析データの解釈において、分析系が妨害を受けている可能性を考慮することが重要である。生体試料マトリクスによる測定妨害の評価が重要である。過度の妨害を避けるには、分析前に試料を希釈することが必要となるが、試料を希釈しても試料マトリクスの阻害作用を避けられない場合には、代替試験を開

発する必要がある。

排出の適切な分析法は製品開発の初期の段階から確立する必要があるが、分析法の完全なバリデーションは承認申請までに行えば良いと考えられる。分析法の妥当性の検証には、ICH Q2 及び Q7 ガイドラインに記載されている原則が適用可能である。

2) 分析法

①核酸増幅検査(NAT)に基づく分析法

NAT に基づく分析法は1コピーから数コピーのDNA断片を増幅することによりウイルスやベクターの遺伝子配列を検出することができる。

NAT の利点は、非常に高感度で再現性があり、迅速な方法ということである。NAT の主な欠点は、インタクトなウイルス/ベクターと、感染性のないウイルス/ベクターの分解物とを区別できないことである。試料分析の第一選択としては、まず NAT によりウイルス/ベクターに特異的な核酸断片を定量的に検出することが望ましいと考えられる。

NAT 技術は常に進歩しているので、現時点で望ましいと考えられる事項は以下の通りである。

- 測定対象に特異的で、適切な精度を持つ分析法を確立すること。定量が必要な場合、定量限界と適切な測定範囲を決定すること。
- 既知の量のウイルス/ベクター配列を含むスパイクコントロールサンプルを用いて抽出法の妥当性を示すこと。
- 検出に用いる増幅領域、プライマーとプローブの選択の根拠を示すこと。
- 分析には複数の繰り返し試料を用いること。NAT の妥当性を評価するため、各組織からの試料ひとつに対して、既知の量のウイルス/ベクター配列を持つコントロール DNA のスパイクを含めること。

- 試験の繰り返し数の根拠を提示すること。

②感染性試験

感染性試験には、「排出物」を増殖許容性細胞株と *in vitro* で培養した後、高感度なエンドポイント検出（細胞内で増幅したウイルス/ベクターの高感度検出）により測定する方法が含まれる。非増殖性ウイルス/ベクターの場合、感染性試験には *in vitro* 培養系での形質導入と導入遺伝子の検出が含まれる。

試料中のウイルス/ベクターの感染価を測定する方法としては、プラークアッセイが広く用いられている。50%組織培養感染量(TCID50)試験も用いられる。感染性試験の利点は、インタクトで感染性のあるウイルス/ベクターのみを検出可能なことである。感染性試験は増殖能を再獲得したウイルスベクターや分子変異体も検出することができる。感染性試験の主な欠点は、NAT に基づく分析法と比べて本質的に感度が低いことである。

感染性試験は、適切な感度と再現性を示すことが必要であり、統計的な妥当性を明らかにできるように、十分な繰り返し数を用いて実施する必要がある。検出感度を明らかにするには、適切な参照ウイルスを用いる必要がある。また、用いた細胞株の選択の合理性を示す必要がある。

しかしながら、感染性試験には一定の限界がある。例えば、ヒトは広範なウイルスに感染するということから生じる問題がある。臨床試料の測定には、用いる標的細胞は投与したウイルス/ベクターに特異的な感受性を持つことが必要とされるが、そのために方法の開発が困難な場合がある。感染性試験はまた、生物学的試験法の全てに共通する、値の変動が問題となる。

このような測定の難しさと定量的分析法の重要性を考慮すると、感染性試験は NAT のような定量的分析法と組み合わせて用いることが望ましいと考えられる。

しかしながら、「排出物」による伝播の可能性を正確に評価するには感染性試験を用いることが重要と考えられる。感染性試験は、「排出物」の性質、すなわちインタクトなウイルス/ベクターなのかウイルス/ベクターの断片なのかを正確に評価することが可能だからである。感染性試験は排出された増殖性ウイルス/ベクターを検出する基本的な試験として通例用いられる。また、非増殖性ウイルス/ベクターを投与した場合、「排出物」が非増殖性のウイルス/ベクターなのか、増殖性を有する組換え体なのかを確定するのに感染性試験は有益と考えられる。このような場合、感染性試験においてウイルス増殖を相補する遺伝子を持つ細胞株と持たない細胞株を用いることで実施できる。例えば、アデノウイルスベクターの場合、アデノウイルスベクターの増殖を相補する E1a 領域を持たない A549 細胞と、同領域を持つ HEK293 細胞を用いることで「排出物」の特性解析が可能である。

③ その他の分析法

その他の分析法として、いくつかの方法が特殊なケースや特定のウイルス/ベクターの検出に用いられる。

- イムノアッセイやサザンブロットをウイルス/ベクターの検出に用いることができる。これらの方法の主な欠点は、インタクトのウイルス/ベクターと、感染性を持たないウイルス/ベクターの分解物とを区別できない点である。
- 細菌性ベクターの場合、NATに加えて、特殊な条件下でのコロニー形成試験が通常用いられる。
- RNAベクターの場合、特殊な分析法を考慮する必要があるかもしれない。

3) 解釈

NAT で検出された「排出物」の量が感染性

試験の検出限界以下の場合、試験感度の制約から、感染性試験による「排出物」の更なる分析を実施しない、という選択も考えられる。このように、NAT のみを実施し、感染性試験を実施しない場合、NAT により検出された「排出物」は感染性があるものと見なすべきである。また、高感度アッセイにより複数の連続した排出サンプルが陰性となるまで、感染の可能性があると見なす必要があると考えられる。

C.1.3 非臨床での排出試験

非臨床での排出試験はウイルスやベクターの分泌・排泄プロファイルを明らかにすることを目的とするもので、実施が望ましいが、当該ベクター/ウイルス系に関して十分な経験がある場合には、その価値は限定的と考えられる。非臨床での排出試験データは、臨床での排出の可能性と程度を推定し排出試験を計画するのに役立つが、臨床の排出試験を代替するものではない。また非臨床の排出試験は独立した試験として実施する必要はなく、他の非臨床試験に組み込むことが可能である。同じウイルス株や同じウイルス/ベクターでマーカー遺伝子を発現するものなど、同様の性質を示すウイルス/ベクター製品を用いた試験結果を排出プロファイルの推定に用いることができると考えられるが、非臨床での排出試験を実施しない場合は、その妥当性を示す必要がある。排出は生体内分布とは異なるが、非臨床での生体内分布試験データは排出試験を計画するのに役立つと考えられる。

1) 非臨床の排出試験で用いる製品

非臨床での排出試験に用いる製品は、臨床試験で用いる製品と同等のもの、特に分子的・遺伝的に同一で、ウイルスのタイター/活性、処方も同等であることが必要である。臨床用の製品と可能な限り同様の製造が必要とされるが、臨床用より小スケールでの製造でよく、試験もすべて実施する必要はないと考えられる。排出

試験に用いる非臨床製品の品質に関する適切な評価、及び非臨床用と臨床用の品質特性の詳細な比較については、臨床試験の開始までにしておく必要がある。

2) 動物種

ウイルス/ベクター製品の多くの動物種の感染性については、由来する親株の性質に依存し、ヒト以外の動物種では容易に感染しない場合が多いため、非臨床での排出試験を実施する前に、選択した試験動物への感染性を確認することが重要である。さらに、動物によっては、ウイルス受容体の発現と分布が宿主への取り込みと排出プロファイルに影響する可能性があり、ウイルス/ベクターの細胞・組織分布は種により異なる可能性がある。排出試験での生物学的に妥当な種の実験の原則は、人と同じウイルス/ベクター感染性、増殖性を示す非病態動物である。ウイルス/ベクターの生物活性や毒性、生体内分布が疾患の状態により異なる可能性があるため、疾患モデル動物を使用することが望ましい。動物種/モデルの実験の妥当性を示すため、正常な種と病態モデルでの排出の比較を示す必要がある。一つの方法としては選択した動物種・モデルの実験の妥当性を示すデータを含む非臨床 POC、毒性・生体内分布試験での知見を基に、ウイルス排出の実験を計画するという方法がある。疾患の状態が排出プロファイルに影響することが予想される場合、疾患状態を模倣した動物モデルを実験に用いるべきである。例えば、腫瘍溶解性ウイルスでは、ウイルスを増殖させるため担癌モデルの使用が適している。また担癌状態はウイルス/ベクターに対する免疫能に影響する可能性があり、ウイルス/ベクターの拡散とクリアランス速度、ひいては排出に影響する可能性がある。

疾患モデル動物を用いた排出試験は動物の作製やケアに特殊な技術を持つラボで実施する必要があるが、GLP の遵守は困難である。

この場合、各試験の詳細なプロトコルをあらかじめ設計しておく必要があり、プロトコルに従って実施すべきである。データの整合性を確保すべきであり、プロトコルの逸脱については記録しておく必要がある。

3) 投与量と投与経路

非臨床での排出試験における投与量と投与経路は、可能な限り臨床で予定されている投与量、投与経路を反映すべきであり、1) 臨床での投与経路の使用、2) 少なくとも臨床での投与量増大試験での最大投与量の投与、2) 単回投与か繰り返し投与かを含む臨床で予定される投与計画、での実施が求められる。さらに、臨床投与量の範囲内でウイルス/ベクター排出の投与量依存性の影響を評価することを考慮するのもよい。臨床での投与経路に加え、全身性投与における排出プロファイルを調べるために静脈内 (IV) 投与を行うことも考えられるが、静脈内投与は暴露に関して最悪のケースとは限らない。例えば、頭蓋内投与でウイルスの感染・増殖が局所でおこる場合、局所での活性が排出プロファイルに影響する可能性があるが、これは静脈内投与では反映されない。従って、静脈内投与を排出の評価の規定値として用いる場合には、その妥当性を示す必要がある。

4) サンプルングの頻度と試験期間

ウイルス/ベクター投与後のサンプルング頻度の決定に、野生型株の既知の生物学的特性を利用することができる。一般に、投与後最初の数日間は、一過性の排出プロファイルを検出するために、より高い頻度でサンプルを採取することが適切である。排泄物・分泌物の量が限られることから、サンプルの数と頻度は現実性を考慮して決定すべきである。単回投与後の排出プロファイルをまず調べ、そのデータを複数回投与でのサンプルング頻度の決定に用いることができる。

体内分布試験の結果はウイルス/ベクターの組織中での持続性評価に有用と考えられる。ウイルス/ベクターが腎臓、肺、血中など特定の組織で長期間持続する場合、排出の分析期間は数値の低下が認められる同様のタイムコースで実施することが望ましい。生体内分布期間より長く排出が持続する場合、排出を検出する適切な期間での試験の実施が必要である。増殖性ウイルス/ベクターの場合、増殖を示唆する第2のピークの検出に十分な試験期間をとることが重要である。複数の連続する試料が陰性となれば、排出試験を終了してよいと考えられる。排出試験には感度の高い定量的アッセイ法を用いること、またアッセイ効率は低濃度のウイルス/ベクターを十分正確に測定できることが重要である。

潜伏感染、再活性化するウイルス/ベクター製品（細菌を含む）では、動物モデルで人と同様に潜伏感染や再活性化を見ることは難しい。

また、免疫応答はウイルス/ベクターを血中から除去し排出の期間を短縮化する可能性があるため、データの解釈で考慮する必要がある。

現在実施されている細菌療法には、各治療サイクルの後で抗生物質投与により細菌感染のクリアランスが行われるというものがある。これは非臨床試験で評価すべきであり、短期間（2,3ヶ月まで）の効果は動物モデルで容易に評価可能と考えられる。抗生物質治療を繰り返すことによる選択圧力は、投与した細菌の「遺伝的ドリフト」を誘導し、生物学的特性や排出パターンの変化を導く可能性があると考えられる。

5) サンプルの採取

採取するサンプルは、ウイルス/ベクターの特性、投与経路及び動物種、生体内分布プロファイルを考慮して決定すべきである。最も一般的に採取されるサンプルの例は尿と糞便であるが、ほかに口腔スワブ（ぬぐい液）、鼻腔スワブ、唾液、気管支洗浄液などのサンプルを含

めることもできる。

定量的で適格性が確認された分析試験を実施するためには、採取するサンプルの種類と採取量を考慮することが重要である。尿のように、分泌物・排泄物の種類によっては十分量のサンプルを採取することが困難な場合、十分なサンプル量を得るために同一量を同時に投与された複数の動物から得られるサンプルをプールすることが選択肢のひとつと考えられる。投与群あたりで必要となるサンプルと採取の間隔、サンプル数は、分析の一貫性、信頼性が得られるに十分なものであることが必要である。また、適切なサンプルの取扱と保存も重要である。

6) 非臨床データの解釈と伝播試験

非臨床の排出試験で得られたデータは、特に臨床での排出試験で採取すべきサンプルの種類やサンプリング頻度、試験期間の設定に有用である。もしも非臨床試験で排出が検出され、感染性試験で増殖能が確認された場合、伝播の可能性が動物実験により示される可能性がある。臨床試験でのヒトからヒトへの伝播の可能性を予測する上で、同居感染試験の実施が有用なこともあるが、人と動物では排出されたウイルス/ベクターの伝播の経路が異なることに注意すべきである。一度排出が確認されたら、伝播に関する適切な結論を得るために、臨床での伝播の可能性を臨床で綿密にモニターすることが必要であろう。

C.1.4 臨床における排出試験

臨床での排出試験を実施するには、試験の実施時期、試験計画、ウイルス/ベクターの生物特性とウイルス/ベクターの伝播の可能性と結果など、考慮すべき原則が多々ある。

現在使用されているウイルス/ベクターのほとんどは非増殖性あるいは制限増殖性であり、由来する野生型ウイルスの感染によっておこ

るウイルス血症と比較して、排出は短期間と考えられ、また、投与経路によっては、野生型とは異なる排出プロファイルを示すことが予測される。野生型株について知られている感染経路に関する情報が、排出試験のデータの解釈と伝播の可能性の推定に役立つと考えられる。

前述の非臨床での考慮事項、すなわち投与経路、観察された排出の期間、採取すべきサンプルの種類と頻度などは、臨床での排出試験を計画するうえでも当てはまる。臨床での排出試験を計画する際に考慮すべき主要な要素としては、親ウイルス/ベクターの既知の生物学的特性、製品の増殖能、投与量、投与経路及び患者集団が挙げられる。

ウイルス/ベクターの投与経路と投与量は排出パターンに影響する。例えば、静脈内投与は同じウイルス/ベクター製品の局所投与と比べて、より広範囲に拡散し、排出の可能性も高まる。採取すべきサンプルの種類にも影響する可能性がある。ウイルス/ベクターの高用量の投与も組織・臓器での分布や排出のタイミングに影響する可能性がある。臨床試験に登録される患者集団とその免疫状態も、ウイルス/ベクターの排出期間を決定する際に考慮すべきであろう。

ウイルス/ベクターの排出試験は可能であればより早い時期に実施すべきであろう。伝播のリスクが高く、公衆衛生に影響する可能性のあるウイルス/ベクターの場合、排出試験は初期の臨床試験で実施すべきである。公衆衛生上の懸念が低い場合には、臨床投与量が確定した後（用量増加試験終了後）に排出試験を開始するのでも良い場合もあるかもしれない。

排出に関する十分なデータが第一相試験において得られた場合、第二相試験での排出試験の省略が妥当な場合もある。第二相試験で排出試験を追加実施する必要性に影響する要素としては、投与経路や投与計画が同じかどうか、収集したデータの質と一貫性、収集したデータ

が患者の排出パターンを予測しうる信頼性があるかどうかなどが考えられる。代表的な排出プロファイルが得られるように適切な患者数での試験を計画することが必要である。排出試験は独立して実施する必要はなく、本来の臨床研究プロトコールに入れることができる。考慮すべき重要な点として、患者のサンプルの採取と試験における品質管理プログラムがある。例えば、患者のサンプルは汚染が最小限となるように採取し、サンプルの分解が最小となるよう一定の期間内にアッセイするか、試験を後で実施する場合にはサンプルを即座に凍結保存することが必要である。

1) サンプリングの採取頻度と期間

非臨床及び類似の臨床試験から得られたデータは、サンプリングの期間と頻度を定めるのに役立つ。採取頻度は試験が良く管理され、データが一定である限り、非臨床試験をベースに考えればよいであろう。サンプリング頻度は非臨床と同様、一過性の排出を検出するには、投与直後の数日はより高頻度のサンプル採取を行う必要がある。採取頻度の一例として、1日目、3日目、7日目、以後28-30日目までは週に一度、さらにその後はより低頻度で収集するという方法がある。サンプリング頻度はウイルス/ベクターの増殖能にも依存し、増殖性の場合、サンプルの採取期間は投与後に起こりうる2回目の排出ピークの検出を考慮する必要がある。

サンプリングの期間と頻度は患者集団や臨床適用、併用する治療法、患者の免疫状態にも影響を受ける可能性がある。ウイルス/ベクターに対する免疫応答は排出プロファイルを変え、強力な免疫応答はウイルス/ベクターのクリアランスを早め、結果的にウイルス/ベクターの排出期間および排出量を減らす可能性がある。遺伝的に改変されたウイルス/ベクターに対する免疫応答は、野生型とは異なる可能性

があることに注意が必要である。

増殖性ウイルスの場合、免疫不全患者は免疫機能が保たれている患者とはウイルスクリアランスパターンが異なり、2回目の感染ピークが免疫力のある患者よりも顕著になることが考えられるので、サンプリングのタイミングと排出期間の再評価が必要であろう。免疫不全患者や免疫抑制剤の使用がウイルス/ベクターの排出に与える影響についても考慮すべきである。腫瘍溶解性ウイルスの多くは、排出を長期化させる可能性がある免疫抑制効果を持つ化学療法剤と共に投与されている。

サンプリングは連続する3回のデータがアッセイの検出限界 (LOD) 以下になるまで継続すべきであろう。ウイルス/ベクターの量が検出限界以下にならない場合でも、継続して低下傾向を示す場合には、少なくとも連続する3回のデータポイントでプラトーであることを示すまで採取を継続すべきであろう。

ウイルス/ベクターの複数回投与が必要な臨床試験では、サンプル採取の時期は単回投与よりも長期間となる。同じウイルス/ベクターの単回投与により得られた排出データが複数回投与でのサンプル採取の目安となる。

ウイルス/ベクターの種類によっては、排出試験の終了後に再活性化を示す臨床的兆候が認められたり、長期間にわたり低レベルの排出が持続することもありうる。このような場合、被験者のサンプリングの再開を考慮すべきである。一例として、がん治療における細菌の投与では、患者で細菌の再活性化または低レベル排出が認められる可能性がある。他の例として、腫瘍溶解性ヘルペスウイルスは、再活性化されるまで潜伏感染する生物学的特性を持つウイルスをベースにしたものである。

2) サンプルの採取

非臨床試験で収集されたデータは臨床で採取すべきサンプルの決定に役立つであろう。上

述のように、最も一般的に採取されるサンプルは尿、糞便、唾液であるが、ウイルス/ベクターの特性と臨床試験での投与経路に依存し、追加のサンプルを含めることができる。例えば、頭頸部がんの腫瘍内投与では、鼻咽頭洗浄液・ぬぐい液の採取も考慮する必要があるかもしれない。また、ウイルス/ベクターを皮内又は皮下に投与する場合、投与部位を拭ったものを排出の確認用サンプルとして採取することもある。ウイルスの既知の感染経路が鼻エアロゾルを介する場合、鼻腔スワブをサンプルとして採取することが必要であろう。

腫瘍溶解性ウイルスの多くは、主な投与経路は腫瘍内であり、その後、腫瘍切除を行う。ウイルス投与後に外科手術を行う場合、ウイルスの増殖と周辺組織への拡散の有無をバイオプシーにより確認することが有用である。バイオプシーの結果から、患者でのウイルスの拡散と感染のリスクおよび第三者への伝播の可能性に関する有用な情報を得られる可能性がある。

適切な分析試験を実施するためには十分量の試料を採取すべきであり、可能であれば必要に応じて再試験を実施できるだけの量を得る必要がある。サンプルの質としては、交差汚染がなく、試験期間中安定なことが必要であろう。

血液サンプルの qPCR による分析は、血液中にウイルス/ベクターが存在する可能性（例えば、手術時や開放創があるとき）を評価したいときに有用な情報が得られると考えられる。

3) 臨床での排出試験データの解釈

臨床での排出試験データの評価と排出されたウイルス/ベクターの伝播のリスク評価に際して考慮すべき重要な要素のひとつは、排出物の同定と特性解析である。特に、インタクトなウイルス/ベクターと、分解あるいは非感染性のものを区別できない分析法を用いた場合、得られたデータからは伝播のリスクはわからないため、定量 PCR などの分析法は感染性試験と

組み合わせることが望ましい。定量PCRで検出された排出物の量が感染性試験の検出限界以下の場合、試験の感度の制約から、感染性試験を行わないかもしれないが、インタクトなウイルス/ベクターと非感染性あるいは分解物を区別できない試験のみを実施する場合、排出物は感染性があると見なすべきであろう。

伝播のリスクを評価するうえで、ウイルス/ベクターがどのように排出されるのかを明らかにすべきであり、野生型株の自然感染の経路を考慮する必要がある。例えば、エアロゾルを介して飛散するウイルスでは、唾液や鼻咽頭ぬぐい液中に排出が認められた場合、他の経路（尿中等）からの排出と比較して、伝播の可能性はより高いと考えられる。また、排出量と期間も考慮すべきであり、増殖性ウイルス/ベクターは、患者体内に長期間持続し、量も増えて結果的に伝播の可能性が高まる。

非病原性株に由来するウイルス/ベクターは病原性株に由来するものと比べて排出時の懸念は低いかもしれないが、増殖性や弱毒化の程度などの他の生物学的特性にも依存する。ウイルス/ベクターに導入遺伝子が組み込まれている場合には、発現される導入遺伝子産物の安全性プロファイルや導入遺伝子がウイルス/ベクターの表現型の特徴に及ぼす影響も考慮すべきである。

非増殖性ウイルスは第三者への伝播のリスクは増殖性ウイルスより低いが、製造工程で組換えが起こり、わずかな量の増殖性ウイルス(RCV)が生じる可能性があり、このようにして出現したRCVは、野生型親株と同様の健康への懸念、伝播の可能性がある。最終的には、安全性情報は臨床試験から得ることが必要となる。

C.1.5 伝播

投与後、患者から排出が観察されたとしても、直ちに伝播が起こることを意味するものではないので、臨床プロトコールには伝播の評価を

含めるべきである。データにより導かれた伝播の可能性とその結果に関するリスク評価が理論的であり入手可能な場合、第三者への有害事象の有無にかかわらず、実施すべきである。これらの知見に基づいて、企業は臨床試験及び製造承認後の伝播の評価の必要性や評価の省略を正当化できると考えられる。

1) ウイルス/ベクターの伝播の評価の原則

以下、ウイルス/ベクターの伝播の可能性の評価と、伝播が起こったときの第三者への結果の評価で考慮すべき要素について述べる。

感染性のあるウイルス/ベクターの排出量と排出期間を評価すべきである。この情報は、伝播の可能性がウイルス/ベクターの由来する親株の感染に必要な既知の感染価と相関する可能性があるもので有用である。また、伝播が最も起こりやすい時期、たとえば投与直後（医療従事者への伝播）なのかあるいは投与から遅れて出るのか（家族や病院内の他の患者、一般人への伝播）ということを検討すべきである。この評価は臨床での排出ピークと相関し、ウイルス/ベクターの増殖性にも依存すると考えられる。

ウイルス/ベクターの生物学的特性も考慮すべきであり、最も重要なのは排出物の増殖性である。排出物が感染性であっても、必ずしも第三者で増殖することを意味するものではなく、増殖しない場合でも伝播の可能性はある。第三者への伝播リスクを考慮すると、一般市民での野生型・親株に対する既存の免疫力に関する情報が有用であり、その株に対する免疫が広範に認められれば伝播リスクは一般に低くなり、製品は排出状況に関わらず安全と見なされる可能性がある。一方、患者が免疫力を持たない、あるいは免疫力が低下した人と接触する可能性について常に注意すべきであろう。

2) 臨床における伝播の評価

臨床試験に参加した患者で排出が観察され、

排出の量と期間から第三者への伝播とその結果が起り得る可能性がある場合、リスクアセスメントを実施すべき、あるいは伝播が公衆衛生に与える影響に関する研究を実施すべきである。これは既存の臨床プロトコルの枠内で実施できるかもしれないが、市販後の場合、臨床試験の枠組みで医薬品による伝播の可能性に関する全体像を描くことはできないと考えられるので、リスク管理計画の一環としてモニタリングの継続が不可欠であろう。

ウイルス/ベクターが増殖性の場合や患者の排出データが第三者への伝播に著しい懸念を示すような場合、伝播のリスクが最大となる医療従事者、ホームケア提供者、家族などのモニタリングが必要であろう。伝播による感染の兆候を明らかにすることが重要であり、これは野生型の親ウイルス/ベクターの感染の兆候や治療用遺伝子からの発現産物の生物活性とも関連する可能性がある。

伝播を示唆する何らかの兆候が見られた場合、モニタリングは健康状態に関する問診などの非侵襲的な方法でも行えるが、適切な調査を実施すべきである。このようなモニタリングは、ワクシニアの伝播・増殖による皮膚病変のように、伝播による感染で明らかな臨床症状が期待される場合に最も有効であるが、多くの場合、モニタリングにはウイルスに対する抗体反応や、治療用タンパク質やバイレミアの証拠を調べるための血液のサンプリングを含めるべきである。また、ウイルス/ベクターの排出を評価するサンプルの採取も考慮すべきである。この場合、望ましいサンプルは、本来の臨床試験での排出に関する知見に依存し、ウイルス/細菌/ベクターの検出に適したアッセイ（qPCR や感染性試験）を実施すべきである。

3) 伝播のリスクと結果の解釈

伝播の程度を評価できる利用可能な臨床データ、伝播の可能性に関する理論的リスク評価

及び公衆衛生に関する想定される影響に基づいて、以下の点について結論を出すべきである。

- a) 投与後、ウイルス/ベクターの大量の排出が観察されるか
- b) ウイルス/ベクターは容易に第三者に感染するか
- c) 感染により第三者に健康影響が生じるか
- d) 製品の投与により公衆衛生上のリスクが生じるか（第三者への伝播）

評価する患者数や密接な接触者の数が少ない場合、伝播が起こらないことを確実に示すことは困難かもしれない。この場合、販売承認時に、製品のファーマコビジランスとリスク管理プログラム（安全性監視市販後調査）の一部として、伝播に関するリスク評価計画を取り込むことが必要であろう。伝播は観察されても健康影響が最小限という場合も、上記と同様のアプローチ、すなわち伝播に関する市販後の評価が必要であろう。さらに、患者への情報文書には、投与後の伝播を最小限に抑えるためにとるべき手段の詳細に関するアドバイスを入れるべきである。

C.1.6 ガイドライン作成のその後の状況

本研究では、ICH で作成が予定されていたウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価に関する国際調和ガイドライン（ICH M6）に盛り込むべき要件について検討を行った。しかし、ICH における遺伝子治療作業委員会および ICH M6 ミーティングは、2010 年秋の会議がキャンセルされ、以降中断しており、ガイドライン作成に関する検討は進んでいない。遺伝子治療薬の排出と伝播のリスク評価は重要なテーマであり、今後の検討再開が待たれるところである。

C.2 遺伝子治療薬のヒト初回投与試験までに実施すべき非臨床試験の要件について

我が国では、遺伝子治療薬のヒトへの投与は

臨床研究として実施される場合と治験として実施される場合がある。臨床研究として実施される場合は、安全性確保のため「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（文部科学省・厚生労働省告示 第2号 平成16年12月28日、平成20年12月1日一部改正）に従い、国による審査が行われているが、遺伝子治療薬をヒトに対して初めて投与するまでにどのような試験を実施しておく必要があるのかについては指針には全く触れられていない。また、遺伝子治療薬の投与を治験として実施する場合には、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性確保に関する指針」（薬発第1062号平成7年11月15日厚生省薬務局長通知、平成14年3月29日改正、平成16年12月28日一部改正）に従い、品質等に関して確認申請を行う必要がある。この指針には確認申請に必要とされる非臨床安全性試験についても触れられているが、平成7年に発出された指針が基になっており、その後の遺伝子治療薬分野をはじめとする科学技術の進歩に十分対応するものとはなっていない。

ヒトでの臨床試験を行うための非臨床安全性試験に関するガイダンスとしては、平成22年2月に「ICH M3：医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（薬食審査発0219第4号、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知）が、また、医薬品開発における非臨床から初期臨床試験への移行を支援するため、ヒト初回投与試験実施までに必要とされる試験に関するガイダンス案として平成23年5月に「治験対象医薬品ヒト初回投与試験の安全性に関するガイダンス（案）」が発出されている。しかし、遺伝子治療薬は従来の医薬品とは性質が異なる点が多く、ICH M3で求められる非臨床安全性試験は遺伝子治療薬には必ずしも適切ではない。また「治験対象医薬品ヒト初回投与試験の安全性に関するガイダンス（案）」は、化学薬品やバイオ医薬品を対象としているが、遺

伝子治療薬は適用対象外とされている。

一方、欧州医薬品庁（EMA）からは、遺伝子治療薬のヒト初回投与試験までに必要とされる非臨床安全性試験に特化したガイドラインとして、2008年5月に「GUIDELINE ON THE NON-CLINICAL STUDIES REQUIRED BEFORE FIRST CLINICAL USE OF GENE THERAPY MEDICINAL PRODUCTS」が発出されている。本ガイドラインは遺伝子治療薬のヒト初回投与試験までに実施すべき非臨床試験の要件に関する国際調和ガイダンスや、我が国における関連指針の作成に非常に参考になると考えられる。そこで、EMAのガイドラインを基に、非臨床試験の要件について検討した。

C.2.1 一般原則

遺伝子治療薬には、プラスミドDNA、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、遺伝子改変ウイルス、遺伝子改変細胞などが含まれる。

遺伝子治療薬による生物学的影響の多くは、ベクター粒子やウイルスなどの運搬系によるもの、あるいは導入遺伝子/発現ベクター及び遺伝子発現産物による。必要とされる非臨床試験は、ベクター粒子などの運搬系に対するもの及び遺伝子治療薬に含まれる治療用遺伝子に対するものの両者の試験が含まれる。

類似製品から得られたデータは、補助的に用いることは可能であるが、目的とする製品のヒト初回試験の安全性を保証するには一般的に十分ではない。類似製品でこれまでに得られた非臨床及び臨床レベルでの経験は、目的とする製品について適切な試験計画を立てるためのガイドとなる。遺伝子治療薬はいずれも固有の性質を持つため、初めて人に投与する前の非臨床試験計画とその妥当性は最終的には個別の事例に応じて決定する必要がある。

動物モデルは、発現遺伝子の薬理作用や治療効果を検討するモデルを考慮に入れてその妥当性を示す必要がある。選択した動物モデルは、

可能な限りヒトでの薬理学的効果を評価できるものでなければならない。

非臨床試験は、以下の点を明らかにするために計画・実施する必要がある。

- 1) 非臨床モデルを用いた薬力学的試験
- 2) 生体内分布
- 3) 初回臨床投与時の投与量と投与量増加のスキーム
- 4) 毒性が発現する可能性のある臓器の特定
- 5) 生物活性が認められる可能性のある標的臓器の特定
- 6) 臨床試験でモニターすべき指標の特定
- 7) 被験者の適格性基準の特定

C.2.2 ヒト初回投与試験までに実施すべき非臨床試験の要件

遺伝子治療薬の前臨床データの評価は、適切なリスク評価を行うのに十分な情報を得ることが主目的であり、単独試験として実施しても別の試験と兼用してもよいと考えられる。

1) 非臨床モデルを用いた薬力学的試験

期待される臨床効果、あるいは臨床効果と関連する生物学的効果・作用の分子機構の科学的妥当性をサポートするエビデンスが得られる試験として、*in vivo*試験、あるいは*in vivo*疾患モデルが得られない場合には *in vitro*試験を実施する必要がある。特に、期待される臨床効果の検討にはヒトに相同性を示す動物モデルの使用が望ましい。目的臓器での正しい導入遺伝子産物の発現や、目的によっては遺伝子発現・産生の特異的制御を示す必要がある。遺伝子治療薬の品質データから異常遺伝子産物の発現が予見される場合、異常遺伝子産物により生じる生物学的影響を評価する必要がある。

2) 生体内分布試験

生体内分布データは、標的臓器であるか否かにかかわらず、すべての臓器について調べるこ

とが望ましい。また、遺伝子治療薬の持続性、可動性、排出も調べる必要がある。生体内分布を調べるには、一般的に、導入遺伝子/発現ベクターの分布を調べればよい。観察期間はシグナルの持続期間（導入遺伝子が発現し、活性を示す期間）をカバーするものとし、可能であればシグナルが検出されなくなる時点まで測定する。投与量は臨床投与量に適切な安全係数を含める。

3) 投与量設定のための試験

ヒトへの初回投与量は、

- ・ 遺伝子治療薬のヒトへの投与の論理的根拠: 遺伝子導入が欠損遺伝子を永続的に置換するなどの疾患パスウェイを変更する、あるいは感染予防に働くとの仮定の妥当性
- ・ 論理的根拠を確認するための動物試験で、最初に生物学的効果が認められた投与量と投与スケジュール

を基に決定するのが望ましい。投与量は毒性試験の結果に基づき再検討する。

遺伝子治療薬による毒性発現の可能性は、いくつかの要因に影響される。患者に投与されるベクターの粒子数、ウイルスカプシドタンパク質などの構成要素が毒性発現に寄与する可能性がある。また、導入遺伝子の発現や遺伝子の染色体挿入によっても生じる。従って、投与量決定には、投与量と相関する標的細胞に導入された遺伝子量の推定を考慮に入れることが必要となる。投与量は全ウイルス粒子数と遺伝子導入可能な感染性ウイルス粒子数との比率に基づいて決定する必要がある。

4) 毒性試験

毒性試験は、妥当な理由がない限り、臨床プロトコールでの投与方法、投与経路で実施すべきである。遺伝子治療薬への暴露は遺伝子治療薬の種類と予定される臨床投与量から適切な量

を検討する。投薬方法は臨床での用法を再現し、適切な安全係数をとる。毒性試験に動物を1種類しか用いない場合は、これまで得られた生物学的・薬理的データから予想される毒性発現が最もヒトと相関性を示す動物種を選択するとともに、その科学的妥当性を明らかにする必要がある。非臨床試験の期間と動物の性別はICH M3に準じるべきであろう。単回投与毒性試験で、導入遺伝子の発現がICH M3で示される期間よりも長いことが予測される、あるいは知られている場合、少なくとも遺伝子発現期間を反映する観察期間をとる必要がある。また、臨床で予見される場合、併用薬との相互作用についても調べる必要がある。

毒性試験には剖検、病理組織学的観察、毒性発現期間とその可逆性などの評価項目を含め、遺伝子治療薬が関与する可能性のある評価項目に焦点を当てる必要がある。

臨床試験で遺伝子治療薬を単回投与する場合は、単回投与毒性試験を実施する。動物への投与回数は、妥当な理由がない限り、臨床での投与回数以上とすべきである。アデノウイルスベクターを全身性投与する場合、肝毒性、腎毒性、炎症反応によるサイトカインストームの発現を評価項目に入れる。遺伝子の持続発現の影響を再現するなど、臨床の状況を再現するために複数回の投与が必要になることもあると考えられる。臨床で遺伝子治療薬を複数回投与予定の場合、反復投与毒性試験が必要とされる。

申請者は動物モデルでの毒性発現を予測できる適切なバイオマーカーを見出すことが望ましい。

毒性試験では遺伝子治療薬のコンストラクト全体(ウイルスその他の微生物あるいはベクター粒子などを含むデリバリーシステム+遺伝子発現カセットを含む発現ベクター+導入遺伝子)について評価し、細胞内での存在部位(ミトコンドリアや核染色体への組み込み部位など)や発現ベクター/導入遺伝子のコピー数

(挿入による癌化の観点など)等を考慮する。また、導入遺伝子発現産物の毒性についても、過剰発現や免疫原性、望まない薬理作用などがあるか否かを検討する必要がある。

薬物の純度も考慮する。遺伝子治療薬の品質データから異常遺伝子発現産物の産生が予見される場合、毒性学的影響を評価すべきである。

プラスミドに含まれる抗生物質耐性遺伝子や、ウイルスベクターコンストラクトから発現されるウイルスタンパク質など、発現ベクターから発現される治療用タンパク質以外のタンパク質の*in vivo*での影響についても調べることが求められる。

5) 遺伝子組み込み試験

臨床での使用用途が生命を脅かす疾患ではない場合や小児への使用などの場合、遺伝子組み込み試験が要求される。遺伝子組み込みが起こらないと考えられる分子機構の遺伝子治療薬の場合、組み込みを検出可能な*in vivo*や*in vitro*での試験データが必要である。ベクター組み込みのおこりやすさと組み込みにより起こりうる結果を評価し、起こりうるリスクを制御する手段について記載するとともにその妥当性を示すことが求められる。

6) 生殖細胞への遺伝子導入

遺伝子治療用ベクターの生殖細胞への意図しない組み込みについては、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(2006年10月)」を参考にすることが望ましい。

7) 標的組織選択性

遺伝子治療薬が選択的なターゲティングや選択的発現(トロピズム)をするようにデザインされている場合、生体内分布データに加えて、標的組織での遺伝子発現の特異性及び遺伝子・活性発現の期間を確認する試験を実施すべ

きである。

8) 免疫原性と免疫毒性

体液性免疫、細胞性免疫を機能的評価項目とする免疫原性試験および免疫毒性試験は、一般的に増殖因子、サイトカイン等の免疫系に影響する高分子をコードする遺伝子を搭載した遺伝子治療薬の場合に必要な。

遺伝子治療薬の品質データにより、異常遺伝子産物あるいは天然型と異なる構造のタンパク質の発現が示唆される場合、導入遺伝子産物の免疫原性を調べる必要がある。導入遺伝子産物に対する既存の免疫の影響を調べる。また、ウイルスベクターを反復投与後のベクターに対する免疫について調べることが求められる。

ある種の遺伝子治療薬は、動物モデルでは臨床を再現することができないので、説明可能な免疫毒性データは得られないかもしれない。このような特殊なケースでは、相同性を示す動物モデルを使用することが奨励される。このような場合、非臨床での免疫原性試験に加えて、臨床レベルでの適格性基準と免疫原性試験を注意深く計画する必要がある。

9) デリバリー装置と添加剤

これまで臨床で遺伝子治療薬とともに使用することが承認されていないデリバリー装置や添加剤を用いる場合、遺伝子治療薬の活性や生体内分布においてこれらデリバリー装置や添加剤に期待される効果を評価する試験が求められる。他の遺伝子治療薬との臨床使用が既に承認されている場合、既存のデータを補完する試験を立案すること。試験対象の遺伝子治療薬との臨床使用が承認されている場合でも、新たに提案されている臨床設定が大きく異なる場合、申請者はこれまでの臨床経験に基づき、非臨床試験が必要ないことの妥当性を示す必要がある。

10) 生殖発生毒性試験

開発のこの段階では、生体内分布試験や生殖細胞への組み込み試験により、すでに生殖発生へのリスクの可能性は明らかにされていると考えられる。ICHM3に示されている標準的生殖発生毒性試験は、遺伝子治療薬の生物学的特徴や適応症、患者集団の特性により生殖組織・生殖機能へのリスクが示唆される場合を除き、ヒト初回試験の前に実施する必要はないと考えられる。

11) 遺伝毒性試験

標準的遺伝毒性試験は、遺伝子治療薬では通常必要ないと考えられる。

12) がん原性/腫瘍原性/造腫瘍性試験

標準的な長期げっ歯類がん原性試験は通常必要ないが、遺伝子治療薬の性質により他の試験が必要になると考えられる。遺伝子治療薬やその遺伝子発現産物は発がん活性を持つ可能性がある。遺伝子治療薬の発がん性の有無、たとえば発がんタンパク質の配列や遺伝子治療薬のゲノムでの作用機構などについてはin silicoで評価すべきである。発がん活性が既に検出されている場合、適切なin vivo/ in vitroモデルを用いて、増殖能の分析や外来性刺激依存性、アポトシス刺激やゲノム変異への応答などにより腫瘍原性を評価する必要がある。

13) 排出試験

排出に関する試験については、ICH見解「ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方（2009年6月）」を参照することが望ましい。

C.2.3 遺伝子治療薬・ベクターの種類別の非臨床試験要件

遺伝子治療薬に共通して適用される考慮事項に加えて、ベクターの種類毎に、それぞれ以

下に示す特別な考慮事項が必要と考えられる。

1) プラスミド

プラスミドやnaked DNAでは、目的とする臨床使用法(生命を脅かす疾患でない場合や小児への使用、予防のための使用など)や投与方法(*in vivo*エレクトロポレーションなど)によっては、遺伝子組込み試験が必要であろう。プラスミドが*in vivo*で非致死性疾患の患者や小児に用いられる場合には実施することが望ましい。

抗生物質耐性遺伝子をベクターの選択マーカーとして使用することは推奨されない。やむを得ない場合は、ヒト初回投与試験を実施する前にヒトの体細胞での耐性遺伝子の偶発的な発現について調べるべきである。

DNAワクチンのようにアジュバント配列がある場合、免疫毒性学的安全性を調べる。さらなるアジュバント物質が最終処方に含まれる場合、製品全体の免疫毒性学的安全性について調べるのが求められる。

トランスポゾンを搭載したプラスミドのようにプラスミドが組込み能を持つように設計されている場合、生殖細胞への伝達と組込みに関する試験を実施すべきである。

プラスミドが非増殖性ウイルスベクターや増殖性ウイルスを規定するように設計されている場合、プラスミドそのものの特性に加えて、導入されるウイルス/ウイルスベクター粒子の特性も十分に解析する必要がある。

2) ウイルスベクター

①増殖性

遺伝子改変したウイルスやウイルスベクターは増殖しないように設計されているか、逆に増殖性または制限増殖性を持つように設計されている。

増殖性を持たないように設計されたウイルスベクターでは、野生型ウイルスの相補性によ

り意図しない増殖性を獲得する可能性を調べる。組換えにより増殖性ウイルスが生じる場合、そのような組換え体の病原性を非臨床において調べる必要がある。

増殖性ウイルスまたは制限増殖性ベクターの場合、標的及び非標的を含む異なる種類の組織、細胞で、これらのベクターが期待通りの増殖性を示すかどうかを調べる。併用療法の影響についても考慮すべきであろう。このような試験はベクターと宿主の特異性により妨げられる可能性がある。

②染色体組込み

ベクターが組込み能を持つ場合、あるいは親ウイルスが組込み能を有し、遺伝子組換えにより復帰変異する可能性がある場合、生殖細胞への遺伝子導入と発がん性について試験することが求められる。

③潜伏感染/再活性化

ヘルペスウイルスのように親ウイルスが潜伏感染能を持つ場合、ベクターも潜伏感染するかどうかを調べる必要がある。潜伏感染能を持つ場合、あるいはベクターが潜伏感染するようにデザインされている場合、潜伏が特定の組織に限定されているか、またベクターは再活性化能を持つかどうかについて調べる。潜伏期間でのベクター遺伝子の発現能と発言が特性の組織に限定されているかどうかを調べる。また、検査方法の妥当性を明らかにすることが必要である。このような試験はベクターと宿主の特異性により妨げられる可能性がある。

④免疫原性

著しい免疫応答を生じるベクターでは効果的に再投与することは難しい。患者への再投与が必要で、免疫応答が認められる場合、再投与した遺伝子治療薬に対する免疫応答の影響について調べる。このような試験はベクターと宿