

遺伝子導入細胞の製造に用いられた非増殖性遺伝子組換えウイルスの残存に関する考え方について

平成 25 年 12 月 16 日

遺伝子治療においては、疾病の治療等を目的として、生体内から細胞や組織を取り出し、それらに体外 (*ex vivo*) で遺伝子組換えウイルスにより遺伝子導入を施して患者に投与する、いわゆる *ex vivo* 遺伝子治療がある。この場合、ヒトの細胞や組織そのものは、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（以下「カルタヘナ法」という。）第 2 条に規定する生物には該当しないが、遺伝子導入に利用する遺伝子組換えウイルスは、通常、同条に規定される生物に該当する。したがって、治験等の実施に際して、製造された遺伝子導入細胞に当該ウイルスが残存している場合には、カルタヘナ法に基づく第一種使用等に係る主務大臣の承認を受ける必要があるが、残存に関する考え方については明確にされていなかった。

上記を踏まえ、以下に掲げるいずれの要件も満たす場合は、当該遺伝子導入細胞に遺伝子組換えウイルスは残存していないものとする。

1 遺伝子組換えウイルスについて

- ① レトロウイルス科ウイルス（ガンマレトロウイルス属、レンチウイルス属など）であること
- ② 非増殖性のコンストラクトになっており、製造において増殖性ウイルス（以下「RCV」という。）が容易に出現しないようにデザインされた遺伝子改変がなされていること
- ③ 製造された遺伝子組換えウイルスについて、RCV が検出限界以下であること

2 遺伝子導入細胞の製造方法について

以下のような方法により、細胞外液中の遺伝子組換えウイルスが適切に失活／希釈除去されていることが見込まれること。

- ・ 遺伝子導入以降に、当該ウイルスの感染能の半減期に比して十分に長く培養されること
- ・ 遺伝子導入工程以降で複数回の洗浄操作がなされていること

3 遺伝子導入細胞について

適切にバリデートされ、又は試験法の妥当性が広く支持されている検出系に

より、用いた遺伝子組換えウイルス及び RCV が検出限界以下であることを確認していること。なお、遺伝子導入細胞の複数ロット（ロットを形成しないものにおいては、個別に調製した由来の異なる複数の検体）において確認することが望ましい。

4 同一製品又は類似製品での知見について

同一製品又は同種のウイルスを用いて製造された類似製品について、海外臨床試験や国内遺伝子治療臨床研究等で臨床使用実績がある場合には、それらの試験等において遺伝子組換えウイルスの残存や顕在化を疑わせるような知見が得られていないこと。

【補足説明】

本考え方は、増殖性又は制限増殖性の遺伝子組換えウイルスには適用されない。また、レトロウイルス科ウイルス以外の遺伝子組換えウイルスを用いた遺伝子導入細胞について適用すべき要件は、改めて検討が必要である。なお、遺伝子導入細胞の中に移入され、又はその染色体 DNA に組み込まれた遺伝子組換えウイルス由来の核酸は、カルタヘナ法の対象にはならない。

1の①について

基本骨格はレトロウイルス科ウイルスであるが、ヒト細胞に感染可能とするために、エンベロープタンパク質がレトロウイルス等に由来しない遺伝子組換えウイルスが作製されることもある（水疱性口内炎ウイルスエンベロープ（VSV-G）の使用など）。これらについては、天然のレトロウイルス科ウイルスと物理的・化学的処理に対する感受性が同等であれば、レトロウイルス等として本整理の範囲内と考えて差し支えない。

1の②について

「RCV が容易に出現しないようにデザインされた」とは、例えば、遺伝子組換えレンチウイルスの製造においては、*gag-pol*、*env* 等のウイルス遺伝子及び導入遺伝子が4種又はそれ以上（遺伝子組換えマウス白血病レトロウイルスを製造する場合には3種又はそれ以上）の独立したプラスミド等に分割されて導入されたパッケージング細胞を用いることなどが考えられる。また、自己不活性化型（self inactivating; SIN）の構造にすることによって、RCVに関する安全性をより高めることができる。

1の③について

一律に限度値を設定することは困難であるが、当該遺伝子組換えウイルスの元となったウイルスに感受性の高い細胞を用いた感染性試験を実施し、検出されないことを確認することなどが考えられる。また、濃度既知の増殖性ウイルスを用いて検出限界等を確認することができる。

2について

適切な失活／希釈除去の基準を一律に示すことは困難であるものの、使用する遺伝子組換えウイルス量と、培養期間から推測される減衰値及び製造工程から推測される希釈率の積を用いることなどにより、感染能の低減化に係る適切性を説明することが考えられる。また、製造工程において、当該ウイルスを不活化するような効果が知られている試薬等が使われている場合には、その影響も考慮に入れることができる。なお、37℃で培養した場合のレトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクターの感染能の半減期については、文献による報告がある（F. Higashikawa and L.J. Chang (2001) *Virology*, **280**, 124-131, S.T. Andreadis, et

al. (1997) *J. Virol.*, **71**, 7541-7548 等)。

3について

非増殖性のウイルスについては、細胞に感染させても増幅は見込めないことに留意する必要がある。

試験法としては、遺伝子導入細胞の培養液上清を用いて、感受性のある指標細胞を用いた感染性試験を行い、指標細胞における逆転写産物、プロウイルス、又は導入遺伝子からの産物が検出されないことを確認することなどが考えられる。この際、濃度既知のウイルス溶液を添加する検討を行うことにより、検出限界等を確認することができる。感度向上を図るため、必要に応じて遺伝子導入補助剤の使用を考慮することなども考えられる。検出法として核酸増幅検査を用いる場合には、適切に精度管理を行う必要がある。

また、感染性試験以外の方法として、ウイルスゲノム量を適切なプライマーを用いた核酸増幅検査により直接測定することも考えられるが、遺伝子組換えウイルスの感染性粒子数とウイルスゲノム量が必ずしも一致しないこと、プロウイルスの影響等があること等に留意する必要がある。