

実践に基づくウイルス療法開発のガイドライン策定と人材育成

がん治療用ウイルス製造及び非臨床試験に関するガイドライン

総論編

ドラフト

東京大学医科学研究所

目次

(用語の定義)	5
1 背景・ガイドラインの対象	6
1.1 がん治療用ウイルスの選択、初期段階での確認事項	7
1.1.1 ウイルス選択の理由	7
1.1.2 腫瘍選択性	7
1.1.3 ウイルスの分子変異の確認	7
2 規格・製造	8
2.1 規格及び品質保証	8
2.1.1 ウイルスゲノム解析	9
2.1.2 感染性因子	9
2.1.3 エンドトキシン試験	10
2.1.4 外来性病原体（ウイルス）試験	10
2.1.5 ウイルス力価	10
2.1.6 その他不純物	10
2.2 製造	11
2.2.1 生物由来原材料への配慮	11
2.2.2 製造工程	11
2.3 安定性	12

2.4 同等性／製造の一貫性	13
2.5 外来遺伝子を組み込む場合	13
2.6 製剤化	14
2.7 ロット管理	14
3 非臨床試験	14
3.1 腫瘍特異性の評価	15
3.2 動物モデルの選択	15
3.2.1 動物モデルの問題点	15
3.2.2 動物モデルでの考慮	16
3.3 体内分布・薬物動態試験	16
3.4 POC (Proof of Concept) 試験・薬理学的試験	17
3.5 ウイルス排出への考慮	18
3.6 安全性試験	18
3.6.1 毒性試験のデザイン作成準備	19
3.6.2 毒性試験のデザイン策定	19
3.7 遺伝子組込み試験	21
3.8 がん原性試験	21
3.9 GLP 試験としての実施	21
3.10 外来遺伝子を組み込む場合	21

文献..... 23

(用語の定義)

1. 「がん治療用ウイルス」とは、複製する能力をもつウイルスで、腫瘍に感染させて腫瘍細胞を死滅させることを目的とする治療用ウイルスを指す。遺伝子組換えウイルス（遺伝子改変は人為的変異と自然変異の違いを問わない）、自然弱毒型ウイルス、野生型ウイルスなどあらゆるウイルスを含む。「腫瘍溶解性ウイルス」とも言われるが、本ガイドラインでは「がん治療用ウイルス」の用語を用いる。
2. 「臨床試験」とは、本ガイドラインにおいては治験及び遺伝子治療等臨床研究に関する指針に基づき実施される臨床研究を指す。
3. 「野外株」とは、通常環境中に生息し、遺伝子組換えに対してそのウイルスが本来的に備える遺伝子型を有する個体を指す。

1 背景・ガイドラインの対象

はじめに

本ガイドラインは、複製する能力を持つウイルスを腫瘍に感染させて腫瘍細胞を死滅させることを目的としたがん治療用ウイルス(oncolytic virus)を用いたウイルス療法の臨床開発にあたり、治験開始までに、品質及び安全性等の確保等のために解析しておくべき事項、製造に関する留意点及び非臨床試験を行うにあたり留意する点を示す。臨床試験に関するガイドラインは別に定める。

がん治療用ウイルスは、ウイルス感染又は生ウイルスワクチン接種により腫瘍の縮小が観察されたことにより開発されるようになった¹⁾。天然に存在する野生型ウイルスや自然弱毒型ウイルスの試験的臨床使用を経て、現在では遺伝子工学の発展を基に、腫瘍細胞で選択的に複製し、腫瘍細胞を破壊する遺伝子改変型ウイルスが用いられるようになっている。このような開発経緯を基に、がん治療用ウイルスは下記の様に分類することができる。ただし、遺伝子改変は a～e の複数を兼ね備える場合がある。

- ① 野生型（弱毒株含む）
- ② 遺伝子改変型（人為的、自然の如何を問わない）
 - a. 正常細胞でのウイルス複製に不可欠のウイルス遺伝子に変異したもの
 - b. 正常細胞の感染におけるウイルスの免疫回避に関連したウイルス遺伝子に変異したもの
 - c. 組織特異的もしくは腫瘍特異のプロモーターによりウイルス遺伝子の発現が制御されたもの
 - d. ウイルスの組織指向性(トロピズム)や細胞内への侵入過程が改変したもの
 - e. ウイルスゲノムへ特定の分子の遺伝子が組み込まれたもの

このような多様性も理由の1つとなって、がん治療用ウイルスに特化した指針は世界的に存在していない²⁾。ICH のガイドラインも「見解 “Consideration”」の段階で止まっている。本ガイドラインでは、がん治療用ウイルス全般に該当する事項を示す。本邦又は世界的に臨床開発が進んでいる単純ヘルペスウイルス（Herpes simplex virus: HSV）の製造及び非臨床試験を主な対象として留意事項は補遺①として取りまとめる。その他のウイルスについては開発状況に応じて本ガイドラインの改定として追加する。

臨床試験の実施までには、細胞株又は動物種を用いた非臨床試験による安全性の検証と、製剤としての品質の保証が必要となる。がん治療用ウイルスの非臨床試験は、動物種及び腫瘍の種類により感染効率と細胞傷害性が異なること、免疫反応による抗腫瘍効果が存在す

ること、生体内でウイルスは複製することから投与量よりも多くのウイルスが生体内に存在する可能性があること、等の特徴があり、また、適切なモデルの作製が困難であり、その限界を認識して実施する必要がある。製剤の品質を保証するためには、規格、製造、品質検証作業等におけるがん治療用ウイルスの特徴に留意しなければならない。例えば、培養細胞から抽出・精製という化学合成とは異なる概念での配慮が必要となる。

1.1 がん治療用ウイルスの選択、初期段階での確認事項

開発対象とするウイルスにより、自然宿主、感染経路、感染組織・細胞、抗ウイルス薬の存在（臨床応用時の安全性の配慮）、宿主細胞の DNA への組み込み、免疫原性が異なる。これにより、非臨床試験及び臨床試験での配慮又は開発の障壁が大きく異なるので、開発にあたり十分に検討する必要がある。選択するウイルスの野外株の生物学的特徴とヒトに対する影響の詳細な検討は、安全性と有効性の検討の基礎情報となるので詳細に行う。

1.1.1 ウイルス選択の理由

使用するウイルスの名称、入手経路、宿主領域、構造、物理化学的安定性、病原性、腫瘍選択性、腫瘍又は正常細胞への傷害性を含め、ウイルスを選択した理論的根拠を示す必要がある。今までにヒトに投与されたことのない種類のウイルスを用いる場合には、ヒトにおける感染性、病原性及び細胞傷害性について詳細に検討する。

1.1.2 腫瘍選択性

がん治療用ウイルスは、感染もしくはウイルス複製について、細胞特異性及び腫瘍選択性を示すことが多く、非臨床試験開始前に十分な文献学的考察又は予備的試験をして実施可能性を確認しておく必要がある。

1.1.3 ウイルスの分子変異の確認

野外株であっても分子変異を有し、がん治療用ウイルスとして臨床試験が実施されている例もある。ウイルスの由来、選択方法及び基準を示す事はがん治療用ウイルスとしてのプロファイルを明らかにするためにも必要である。また、あらかじめ対象ウイルスの分子変異の有無を確認しておく必要がある。

① 全ゲノム解析は有用であるが、繰り返し配列等の理由により全ゲノム配列を明らかに

することは困難な場合がある。また標準となる全ゲノム情報が存在しない場合も多く、標準配列とどの程度までの塩基配列の違いが許容されるのかが現時点では明らかでない。その場合、野生型についてはウイルスの複製、感染の選択性に係わる分子変異の有無、遺伝子改変型については遺伝子改変箇所の配列を最低限、確認する必要がある。

- ② 分子変異を有していた場合、関連する領域及び塩基配列と、腫瘍選択性、細胞傷害性の強さ、又は安全性との関連を検討する。その際、有効性及び安全性への影響について十分考察する。
- ③ 分子変異を有していた場合、開発用に確保したウイルス全体における分子変異を有するウイルスの割合を確認する。

2 規格・製造

がん治療用ウイルスの製造は、試験製造における特性解析やそれまでの開発の過程で得られた知識に基づき、製造管理、品質管理方法及び規格を定めた上で、行われることが一般的である。その過程においては細胞の使用、生物由来原料の使用、細胞成分の除去等多くの課題が存在する。それぞれの問題点を明らかにし、対応方法を検討することが重要である。品質を確保するためには、最終製品としての規格・試験方法の決定、原材料の品質管理、及び製造工程における重要ステップでの工程内管理、が重要である。そして、最終製品における規格の実測値と評価結果を示した上で、最終製品の妥当性を示す必要がある。以下の項目は、野生型と遺伝子改変型の区別なく、また自然変異と人為的変異の区別なく、がん治療用ウイルスに一般的に適用される。

2.1 規格及び品質保証

臨床試験に使用する製剤の暫定規格は、製造方法の開発過程で得られた知識、ロット分析結果及び非臨床試験の結果を踏まえて検討する。非臨床安全性試験は、臨床試験に使用する製剤と同じ製造方法で製造した製剤で実施することが望ましいが、開発過程における製造方法や製造場所の変更が考えられることから、開発初期においては様々な特性解析試験を実施しておき、非臨床安全性試験実施後に製造方法等を変更した場合にも、変更前後の製造の一貫性を説明できるようなデータを取得しておくことが重要である。また、規格設定にあたっては、ウイルスそのものの性質と、最終製剤(剤型)の両方の点から考える必要がある。

品質を保証するための試験は、製造工程の複数の段階で実施する。その試験項目は、その段階とその後の過程に及ぼす影響を考慮して決定する。試験はバリデートされた機器・手法によって行われなければならない、外部機関に委託する場合には、その信頼性を検討しておく

必要がある。

- ① 規格項目には、ゲノム構造、生物学的特徴、導入因子の cDNA 配列と発現状況（例：当該遺伝子が規定する物質の産生量や活性）を含める。又、野外株との差異について詳細に記載する。
- ② 改変領域又は遺伝子導入領域について塩基配列の解析を行う。解析可能であり標準となる全ゲノム配列情報が存在すれば、全ゲノム解析を行うことは有用であるが、必須ではない。
- ③ ウイルスゲノムに合成遺伝子や外来遺伝子、特定の機能をもつ RNA (shRNA 等)などが組み込まれている場合は、塩基配列から予想される作用について説明する。
- ④ どのような投与方法を用いるかにより、準拠すべき規格を決定する。例えば、注射剤の場合には、規格の決定にあたっては日本薬局方 製剤総則「3.1 注射剤」に準拠し、pH と、不溶性異物を規格に入れることを考慮する。エンベロープを有するウイルスについては、不溶性微粒子を規格に含む必要はない。日本薬局方は、必ずしもウイルス療法製剤の規格に適合しないため、準拠できない場合には、代替の規格を設定し、その根拠を示す。
- ⑤ 効力に関連する重要な因子は感染能力を有するウイルスの濃度、すなわち感染力価である。そのため、原則として、力価/mL を規格項目に含める。ウイルス粒子数を持って力価の代替とする場合には、力価試験を設定しない理由を説明すると共に、ウイルス粒子数に占める感染性ウイルスの数の割合を示す。
- ⑥ 製剤の純度については、比活性（力価/タンパク質含量）などで示して規格項目に含める。また、工程由来不純物についての規格項目を設定する。
- ⑦ 各規格試験は、分析バリデーションのガイドライン^{5),6)}を参考に、試験法の原理を踏まえ、特異性、真度、精度等の試験性能を理解し、実施・考察を行う。

2.1.1 ウイルスゲノム解析

改変部位、遺伝子組込み部位等の遺伝子の塩基配列の解析を行う。少なくとも制限酵素を用いた解析を行い、意図した遺伝子改変以外に明らかな変異がないことを確認する。

2.1.2 感染性因子

- ① あらかじめ、マスターセルバンク、マスターウイルスバンク、中間工程、最終製剤を含め、どの段階で感染性因子に関するどのような検査を行うか定めておく。

- ② 無菌試験（細菌及び真菌の否定試験）は、日本薬局方の無菌試験法（4.06）に準じて行う。何らかの理由により日本薬局方の適用が困難な場合には、その理由を明らかにし、なるべく準拠するように試験方法を設定して実施する。
- ③ マイコプラズマ否定試験は、日本薬局方参考情報のマイコプラズマ否定試験に準拠して実施する。何らかの理由により適応が困難な場合には、その理由を明らかにし、なるべく準拠するように試験方法を設定して実施する。
- ④ 最終製剤では、無菌性試験とマイコプラズマ試験は実施する。

2.1.3 エンドトキシン試験

エンドトキシン試験は、日本薬局方エンドトキシン試験法（4.01）に準拠して実施する。何らかの理由により適応が困難な場合には、その理由を明らかにし、なるべく準拠するように試験方法を設定して実施する。エンドトキシンは、用いる細胞、原材料、基剤からも検出される場合があるため、添付文書等によりエンドトキシン検査結果を確認しておく。エンドトキシンについて不明な場合には、個々にエンドトキシン試験を実施することを検討する。

2.1.4 外来性病原体（ウイルス）試験

外来性病原体としてのウイルス試験は、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」を参考に実施する⁷⁾。がん治療用ウイルスは、外来性病原体試験での培養条件で複製し、偽陽性となる場合がある。

2.1.5 ウイルスカ価

ウイルスカ価の測定方法及び規格について試験方法の確立及び規格の設定を行う必要がある。規格は、ウイルス粒子あたりの感染価（例えば、カ価/mL、カ価/タンパク質）等により設定する。

2.1.6 その他不純物

培養に用いた細胞及び血清を含む培地成分、製造工程で用いられた原材料について、製造工程での汚染及び混入について検討する。また、当該細胞由来のDNAとタンパク質の混入についても検討する。製品に残留する可能性があり、局所投与した場合に周辺組織に

影響があると考えられる物質（例：ベンゾナーゼの酵素活性）、又は特定の臓器若しくは全身に影響を与える物質について、検出手法、ヒトに製品を投与した場合の影響又は混入の可能性もしくは量を軽減する方法について検討する。

2.2 製造

がん治療用ウイルスの製造は、細胞に感染・複製させたのち回収、精製、バイアル充填する段階に大きく分けることができる。段階に応じて、生物由来原材料が用いられる。

2.2.1 生物由来原材料への配慮

- ① 生物由来原材料を使用する場合、使用する細胞、原料について生物由来原材料を抽出し、生物由来原料基準への適合性を確認する必要がある。安全性について資料を取り揃え、安全性についての考察を行う。その際、混入する可能性のある他のウイルスや病原体の不活性化の方法と、国内外の文献等の情報を交える必要がある。
- ② 使用する原材料（例：サイトカインや増殖因子）が動物（ほ乳類、鳥類、は虫類、又は両生類）又はヒト由来の細胞を用いて製造されたものであるか否かを明らかにし、生物由来原料基準において該当する基準に準拠する。
- ③ 使用する原材料は、成分及び分量、生物由来原材料が使用されている場合にはその情報を製造元から入手する必要がある。マスターファイル登録されているものについては、生物由来原材料や重金属等の安全性に関する情報を製造元から入手できるようにしておく。
- ④ 生物由来製品又は特定生物由来製品を原材料として使用している場合は、「生物由来原料基準」（平成15年厚生労働省告示第210号最終改正：平成26年9月26日厚生労働省告示第375号）への適合性を明らかにする^{8)・9)}。また、感染性因子に関する試験についてもデータを用いてその適合性を示す。

2.2.2 製造工程

ウイルスの製造は、下記の事項について実施方法を詳細に規定・記載し、行う。実施のための組織、手順書、バリデーションや是正措置の方法等は適用となる法規・ガイドラインを特定しそれらに準拠する。準拠できない場合には、その理由を明確にする。

- a. 原材料となる細胞の起源、由来、選択理由
- b. ウイルスの培養・増殖のための細胞（マスターセルバンク、ワーキングセルバンク）：樹立方法、管理方法、特性

- c. 細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質：添加剤（懸濁液）、培地、試薬を含む
 - d. 感染させるウイルスの作製方法：ウイルスゲノムの作製方法、感染ウイルスの作製方法を含む
 - e. ウイルスの製造方法：マスターウイルスバンク、ワーキングウイルスバンクの管理、製造工程の概要、各製造工程のフローチャートを含む
 - f. 加工または使用した細胞の特性解析
 - g. 工程内管理試験
 - h. 最終製品の形態、包装
 - i. 製造方法の恒常性及び妥当性
-
- ① 製造にあたっては製造するウイルスの標準品（マスターウイルスシードストック（MVSS）を含む）を作成し、適切に保管する。保管に際しては、保管の条件、安定性、標準品の更新方法を検討しておく。
 - ② 製造に用いた全ての構成成分を示し、日本薬局方適合、マスターファイル登録、又は原材料として適切であることの資料を入手し、規格、組成等の一覧を作成する。
 - ③ ウイルスの培養・複製のための細胞については、名称、由来、入手経路、ヒトにおける病原性、増殖性、培養方法、成長因子依存性、フェノタイプ、腫瘍形成能、安定性等について考察し、選択した理由を明らかにする。
 - ④ ウイルスの培養・複製のための細胞については、試験項目を決め、品質検査を行う。ウイルス試験の実施に際しては、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」を参考にする⁷⁾。
 - ⑤ ウイルスの培養・複製のために今までに使用されていない細胞を用いる場合には、ICH-Q5D ガイドライン「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」に準拠して、試験を実施する¹⁰⁾。
 - ⑥ 細胞のウイルス安全性に関する試験データや試験の充足性について詳細なデータを明らかにすること。
 - ⑦ 工程内管理試験として、精製前のウイルス、精製後のウイルス、又はバイアル充填後のウイルスの品質試験等、製造工程中の重要な段階で試験方法、規格を設定して実施する。

2.3 安定性

製造したウイルスの保管温度等の条件及び保存期間、又はヒトへの投与のため、直前に調製を行う場合には、調製から投与までの許容時間を設定し、当該期間中の安定性を評価しておく必要がある。

- ① 製造したウイルス製剤の安定性については、一義的には、ウイルス力価の安定性の評価を実施する。長期的に保管する温度、短期的に保管する温度、施設内移動や投与前の温度などを想定し、それぞれの温度におけるがん治療用ウイルスのウイルス力価の経時的变化を調査する。臨床試験に用いる製剤と同じ製造方法で製造した製剤を用いて評価することが望ましい。
- ② 品質の安定性を検証するために、必要な時点において、設定されている規格に準じた試験を実施する。がん治療用ウイルスを保管する容器（ウイルスを充填したバイアルなど）の適格性について、製造元より情報を入手し、もしくは試験を行って、検討する。
- ③ 製造施設と、投与医療機関が同一敷地でない場合には、移送のための適切な保存条件と保存期間を設定する必要がある。

2.4 同等性／製造の一貫性

開発初期段階では必ずしも求められないが、非臨床試験用製剤の小規模製造から治験用製剤の製造、又は承認販売後のように規模を拡大して製造する際には、製造施設の変更、又はスケールアップによる使用機器・機材の変更と製造工程の変更が想定される。また、製造施設の更新又は主要機器の変更も想定される。このような場合に、同等性（又は製造の一貫性）を証明することのできる項目をあらかじめ検討しておくことが推奨される。

スケールアップ等の製法変更を行った場合には、あらかじめ設定した規格に関するデータを呈示して同等性を示し、製法変更の妥当性を証明する。同等性が示せない場合には、新たな製法の製剤について、以前の製剤で実施した試験項目を再試行する必要性が生じる可能性がある。

2.5 外来遺伝子を組み込む場合

がん治療用ウイルスの作用機序には特異的抗がん免疫の誘導が含まれると考えられているが、抗がん免疫を増強させることを目的として特定のサイトカイン等の外来遺伝子を組み込む改変が試みられている。

- ① 外来遺伝子を組み込む目的とその妥当性を明らかにする。特に対象とする疾患における役割と妥当性を明らかにする。そして、外来遺伝子の由来、作用機序、塩基配列、発現場所（全細胞又は腫瘍特異的）、遺伝子の導入効率及び発現効率とその持続性を明らかにする。遺伝子を改変している場合には、塩基配列とその目的を明らかにする。
- ② 外来遺伝子の発現産物がタンパク質である場合には、臨床上の役割や有効性及び安全性のデータ、その生物活性について明らかにする。
- ③ 天然には存在しない遺伝子が導入される場合は、生物活性や安全性及び有効性の根拠を明らかにする。

2.6 製剤化

製造したウイルスは最終製品として添加物が加えられ最終製品の形態となり、分注し保管、出庫される。

- ① 最終的に投与する溶液等の最終組成を示す。各成分についてその必要性及び妥当性を明らかにする。その際、各成分の安全性や使用実績等を明らかにする。新添加物にならないか、当該の成分又は使用量から検討を行う。
- ② ウイルスの力価を測定し、基準値であることを確認する。
- ③ 製品の無菌性、マイコプラズマ否定試験及び純度を測定する方法とその基準値を設定する。
- ④ 混入物及び分解物として検査する物質、検査する理由、試験方法、基準値と試験結果を明らかにする。
- ⑤ 使用する容器・包装は、容器・包装材料試験法に適合する容器等を選択する。また、出庫し他施設に運搬する際に用いる容器や方法についても明らかにする。

2.7 ロット管理

ロット単位ごとに、各ロットが規格を満たしていることを確認する必要がある。

セルバンクの管理及び製造過程を含めたロット管理の方法をあらかじめ検討・実施する。管理方法には、品質検査とその基準が含まれる。

3 非臨床試験

臨床試験でヒトに投与する前に、細胞又は動物モデル等を使用した非臨床試験にて有効性と安全性についての検討を行う必要がある。しかし、がん治療用ウイルスの場合、感染の種特異性、免疫によるウイルス排除の検証の困難、誘導すると考えられる免疫反応を検証する動物モデルの設定の困難、他動物への感染を防止することのできる施設で実施する必要性（GLP 準拠施設への委託することが困難）など、多くの問題が存在する。これらの問題を認識し、個々のがん治療用ウイルスでその特性に基づいて非臨床試験を立案、実施し、考察する必要がある。

- ① 非臨床試験を立案する際には、それぞれの試験目的を明確にする。
- ② 非臨床試験は特に毒性試験においては、臨床試験で使用する規格のウイルスを使用することが望ましい。ただし、予備的検討では類似したがん治療用ウイルスを使用して検討することはできる。
- ③ 動物を用いた非臨床試験で、がん治療用ウイルスの特性により実施できず、類似製剤で

代替せざるをえない場合には、類似製剤で代替せざるを得ない根拠及び類似製剤で代替できる根拠及びその限界について検討する。

- ④ 非臨床試験は、臨床試験開始前に終了すべき項目だけではなく、必要に応じて臨床試験実施中に実施する項目もある。
- ⑤ ウイルスの分布や体内動態等を客観的に評価する系を用いる必要がある。

3.1 腫瘍特異性の評価

がん治療用ウイルスは、感染性又はウイルス複製能において腫瘍特異性を示すことが多い。細胞株、担がん動物モデルがどの程度利用できるかによって対象となるがんの種類が決定されるが、今後の臨床開発の方向性を左右するので十分な検討が必要である。

- ① 腫瘍選択性を確認するためには、各種腫瘍由来細胞株又はコントロールとしての正常株を用いた *in vitro* 試験、及び腫瘍由来又は正常組織由来初代移植細胞を用いた *in vivo* 試験を行う。この際、細胞傷害性、ウイルスの複製、外来遺伝子を組み込んだ場合には当該遺伝子による産生物を確認し、宿主特異性又は細胞選択性を改変している場合には、どのような細胞に感染するのか詳細な研究を行う。
- ② 野生型ウイルス及び開発対象のウイルスの細胞への感染・侵入メカニズムと腫瘍の特性等を分子レベルで解析することが勧められる。

3.2 動物モデルの選択

がん治療用ウイルスに感染する動物種が存在していないか、または限られている場合があったり、がん治療用ウイルスが誘導する抗がん免疫や抗ウイルス免疫を、動物モデルでは適切に評価できなかつたりする問題点が存在する。このような限界を考慮しながら、動物モデルを選択し、非臨床における有効性及び安全性の検証を進める必要がある。選択した動物モデルに関しては、その妥当性を根拠とともに示す必要がある。

3.2.1 動物モデルの問題点

- ① 動物モデルでは、ヒトにおける腫瘍の生物学的及び病理学的特性の一部しか反映せず、動物種による変動が大きい。
- ② 感染性、細胞・組織傷害性が動物種により大きく異なる。
- ③ 文献学的データ含め、動物モデルとしての情報が乏しい。
- ④ 免疫不全動物を用いた担がん動物モデルでは、がん治療用ウイルスによって引き起こされる免疫反応、又は感染から殺細胞にいたる過程への免疫反応を反映しない。
- ⑤ 当該ウイルスに感受性のある動物種が存在したとしても、免疫が正常な動物における

担がんモデルが限られている。更に、がん治療用ウイルスの治療効果や排除、分布には宿主免疫が大きく関与するが、実験動物（特にマウスなどの小動物）とヒトでは免疫の働くしくみが異なっている。

- ⑥ 担がん動物の特性（免疫不全）又は寿命より長期安全性試験には適さない。
- ⑦ 発現遺伝子を組み込んだ場合、動物種によってはその遺伝子産物に反応しない場合がある。

3.2.2 動物モデルでの考慮

- ① 上記「動物モデルの問題点」で示したように、選択した動物モデルが適切でないことがある。非臨床試験を開始する前の検討、又は、より適切な情報を得るための方法について検討を行う。
- ② 非臨床試験で通常用いられている動物種は適当でないことが多く、用いるウイルスの種類に応じて動物種を検討する必要がある。
- ③ ヒトで予定する投与経路を動物モデルで実施できるか考慮する。同じ投与経路を用いることができない場合には、代替で用いる投与経路とその妥当性及び臨床導入する際の注意を考察する。
- ④ 臨床試験で対象とする疾患の病態生理学的、薬理的、及び毒性のモデルとしての再現性の限界を考察する。
- ⑤ がん治療用ウイルスの体内動態がヒトと類似していることが望ましい。
- ⑥ ウイルスの感染機序が判明している場合には、ヒトにおける標的受容体を発現しているヒト化げっ歯類を使用することを考慮する。
- ⑦ ヒトと生理学的及び解剖学的に比較できることが望ましい
- ⑧ 担がんモデル動物でのウイルスの生体内分布や持続性は非担がん動物とは著しく異なることが多い。そのため、がん治療用ウイルスの安全性評価時には腫瘍の生物学的及び病理学的側面を考慮する。

3.3 体内分布・薬物動態試験

ウイルス療法の非臨床試験においては、通常のADME（吸収: absorption、分布: distribution、代謝: metabolism、排泄: excretion）の概念は当てはまらない。しかし、標的の腫瘍又はその他の臓器・組織での分布を調べ、また、標的としない臓器・組織、また必要に応じて生殖臓器への分布を明らかにすることにより、ヒトでの有効性及び安全性にどのように影響を与えるかを調べる必要がある。また、ウイルスがどのように減少していくかを調べることは、動物モデルにおける臓器・組織の検討をどの時点で行うべきなのかを検討する根拠になり

得る。

- ① 生体内分布試験を実施できない場合には、その理由を明らかにする。また、生体内分布試験の結果がなくても臨床試験を実施することができる根拠を明らかにする。
- ② 生体内分布データは、動物モデルで毒性が出現した場合に、その原因の解明に役立つ。その際、動物モデルで出現した臨床的及び病理学的所見と合わせて検討する。
- ③ 体内分布を検討する前に、ウイルスの検出方法を明らかにしておく必要がある。測定としては、腫瘍又はその他の臓器・組織でのウイルス力価・ウイルス核酸量・ウイルスのコピー数の測定、又は免疫組織化学的評価が用いられる。発現遺伝子を組み込んだ場合には、その遺伝子のコピー数又は遺伝子産物の発現の検出を用いることができる可能性がある。

3.4 POC (Proof of Concept) 試験・薬理学的試験

非臨床試験の段階で、開発しているがん治療用ウイルスがヒトにおいて有効性を示すであろうという根拠(Proof of Concept)を *in vitro* 試験や *in vivo* 試験によって得ることは、ヒトにおいて臨床試験の実施可能性を示す上で重要である。これにはがん治療用ウイルスの生物活性及び薬理学的プロファイルを明らかにすることが含まれるが、同時に下記を明らかにすることにより、臨床試験のデザインを決めるうえで重要な情報を得ることができる。

- a. 薬理学的活性を示す用量範囲を決定する。これには至適投与量及び最小有効投与量の決定が含まれる。
 - b. 最適な投与経路を決定する。これには投与経路の最適化、がん治療用ウイルスが標的部位・組織・細胞に到達することの確認が含まれる。
 - c. 投与スケジュールの最適化
 - d. 想定していた **mechanism of action** と生物学的活性が示されているか。
- ① 通常、*in vitro* 試験のみで必要なデータを得ることは困難であり、*in vivo* 試験の実施を考慮する。但し、ヒトと動物ではウイルス感受性と免疫反応が異なることを考慮する必要がある。
 - ② 動物モデルの選択が、得られるデータの質及び量に関係するので、十分に検討を行ったうえで実施する。
 - ③ 抗がん免疫の誘導能等を評価する場合には、動物モデルにおける評価に限界があるものの、腫瘍反応性 T 細胞刺激によるインターフェロン γ の分泌を測定する等の手法を考慮する。

3.5 ウイルス排出への考慮

がん治療用ウイルスの生体内における複製と排除、分布及び排出は、ウイルスに対する感受性に加え、宿主の免疫反応に大きく左右されるため、ウイルス排出について動物を用いた非臨床試験で評価することは極めて困難である。従って、ウイルス排出については、原則として、ヒトで評価せざるを得ない。しかしながら、投与経路によって、特有のウイルス排出が予想されるような場合には、動物を用いたウイルス排出の評価が、臨床試験におけるウイルス排出のモニタリング計画のデザインに役立つ場合がある。非臨床試験におけるウイルス排出の検討は、臨床でのウイルス排出評価を代替するものではない。

3.6 安全性試験

がん治療用ウイルスは、腫瘍内で複製するため、健常動物だけではなく、担がん動物モデルを使用するかどうかを検討する必要がある。また、動物種により正常細胞への感染性が異なるため、どの動物モデルを選択するかは安全性試験の実施において大きな課題である。非臨床試験は、ヒトにおいて想定される毒性を、臓器別又はウイルスの特性と合わせて検討し、投与スケジュール又は投与量により毒性のプロファイルが変化するかを確かめることも含まれる。安全性試験を計画、実施、評価する上でがん治療用ウイルスに特徴的な事項としては下記があり、検討する必要がある。

- a. 最終製剤に含まれる添加物等により毒性が示されることがある。
- b. 投与経路により毒性が異なる。
- c. 非標的細胞・組織への感染、集積がないか確認する必要がある。
- d. 標的組織・細胞又は非標的により、ウイルスの濃度と持続性、複製能が異なると考えられること。
- e. 抗がん免疫の活性化又はトレランス誘導による抑制により有効性に影響を与える可能性があること。
- f. ウイルスに対する自然免疫又は獲得免疫応答により排除される可能性があること。
- g. 担がんモデルの腫瘍の感染性、ウイルス複製能、細胞傷害性により毒性が異なる可能性があること。
- h. がん治療用ウイルスの野生型復帰、染色体への組み込み、腫瘍形成の危険性を考慮する必要があること。
- i. ウイルスの排出により、当該ウイルスの動物の他臓器への伝播、又は他の動物への伝播の可能性があること。

3.6.1 毒性試験のデザイン作成準備

毒性試験のデザインを作成する場合には、下記の事項を検討して策定する必要がある。

- ① 臨床応用する対象のがんの種類・治療の状態を検討する。生存期間を延長する、又は QOL を向上する標準治療のなくなった段階の悪性腫瘍の患者が、最初の臨床試験の対象となることが多い。このため、正常な免疫を有する動物に加え、免疫不全動物を用いた毒性試験、抗がん剤との併用を検討している場合には当該抗がん剤との併用による毒性の増加などを考慮する。
- ② 開発対象のがん治療用ウイルス又は類似した製剤に関する非臨床試験及び臨床での安全性、POC 試験を含む薬理学的特性の情報を収集する。
- ③ 動物モデルのがん治療用ウイルスに対する生物学的応答性、解剖学的特性の情報を収集する。
- ④ 推定する mechanism of action を明らかにする。

3.6.2 毒性試験のデザイン策定

がん治療用ウイルスの投与量の設定にあたっては、用量反応性と、ウイルスの導入効率、ウイルス複製能、用いる動物モデルによる特性（投与経路による投与のしやすさ、感受性）等を考慮する必要があり、適切な対照群を選択した上で、用量依存性を確認するために複数の投与群を設定する。毒性試験においては、可能であれば、無毒性量(NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)、最大耐用量(MTD: Maximum Tolerated Dose)、投与可能な最大用量(MFD: Maximum Feasible Dose)等の適切なパラメータを考慮する。ただし、正常細胞での細胞傷害性を認めない場合には、最大耐用量に達しないことに留意する。これらのパラメータ等を含めて、臨床試験における一回あたりの初回投与量、想定する一回投与量、投与経路、投与回数、投与間隔などの設定、標的臓器の留意点の特定、及び中止基準などを設定するのに役立つ。

一般毒性試験の試験デザインは、「医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」の別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」を参照し、開発対象のがん治療用ウイルスの特性を踏まえて毒性試験の試験デザインを設定する必要がある¹¹⁾。また、ICH S6ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」の科学的原則において参照可能部分を特定しておく¹²⁾。

- ① 投与後に起こりうる局所及び全身性の毒性の識別、解析、定量化ができるような幅広い検討が必要である。
- ② POC試験で用いられた動物種を用いることを検討する。
- ③ 観察期間・投与から剖検までの間隔は、がん治療用ウイルスの生体内分布及び持続性のプロファイルから設定する。発現遺伝子を有する場合はその遺伝子産物が生体内で機

能する時間を考慮する。

- ④ 毒性試験には、急性及び慢性毒性、毒性の可逆性（必須ではないが、臨床試験での投与スケジュール又は毒性軽減手段の検討には有用なことがある）、遅発性毒性及び用量反応性を検討できるように試験を設定する。但し、ヒトと同じウイルス感受性と免疫反応性を示す動物が存在しないため、遅発性毒性の検討は可能でないこともある。
- ⑤ 毒性の可逆性（回復性）は、毒性試験で重篤な所見が認められ、臨床において安全性に懸念が生じる場合には、回復性試験又は科学的評価に基づいて、毒性の回復性を評価する。
- ⑥ 他の医薬品の毒性試験のように 2 種類の動物種では実施できない場合がある。適切な動物種が 1 種類しか確認されない場合には 1 種類の動物種で評価することの妥当性を示す。
- ⑦ 臨床試験での投与経路を動物が小型であるために用いることができない場合には、全身への影響については代替投与経路で評価することを検討し、その妥当性を示す。その場合、投与部位（例：腫瘍内投与）への影響は大型の動物モデルを用いることを検討し、その妥当性を示す。また、非臨床試験で使用される最高投与量は、動物種の大きさ、投与経路によって制限される可能性がある。この場合、選択した投与量が妥当性であること、又は限界があることを示す。
- ⑧ 正常な動物種を用いることができない場合には、遺伝子改変動物を用いる可能性を検討する。しかし、正常動物と臓器能、免疫応答性、病理学的特性等が異なることがあり、用いる事の妥当性と限界を示す必要がある。
- ⑨ 毒性試験で観察する項目としては、死因を含めた死亡又は瀕死状況、一般状態、体重、摂餌量、飲水量、臨床検査値（血液生化学的検査、血液検査、尿検査）、剖検所見、病理組織学的検査等がある。病理組織学的検査においては、臓器重量、生体内分布試験想定される組織・臓器を含めた主要臓器（脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓等）、必要であれば生殖器（精巣、卵巣）及び投与部位を病理学的又はウイルス量と関連させて評価する必要がある。また、発現遺伝子産物の特性、免疫応答等の特性により項目を追加することを考慮する。
- ⑩ がん治療用ウイルスは、腫瘍内投与を投与経路とする場合も多い。局所投与を行う場合には、局所刺激性を周囲の組織・臓器との関連を考慮しながら検討する。

3.7 遺伝子組込み試験

ウイルスが、部位特異的又は非特異的に染色体に組み込まれるかは、元のウイルスの性状により大きく異なるが、細胞内で宿主の遺伝子機構を利用して複製するので、そのリスクについて、根拠を示して考察を行う必要がある。がん治療用ウイルスとして用いられているウ

ウイルスは、一般に、染色体への組込みの機構を持たないウイルスである（例：アデノウイルス、HSV）。

- ① 染色体への組込みの機序を有するウイルスを用いる場合には、特定の部位への組込みの可能性、又は1細胞あたりに組み込まれるコピー数を評価する必要がある。特定の部位に組み込まれる場合には、それによる発がん性又は、重要な遺伝子発現への影響を検討する必要がある。
- ② 生殖細胞への組み込みが認められる場合には、生殖細胞の染色体への組込みについて詳細な検討を行う。

3.8 がん原性試験

「3.7 遺伝子組込み試験」の結果、染色体への組込みが認められた場合、又は元の野生型ウイルスに染色体への組込み機構が存在する場合には、腫瘍原性試験を実施することを考慮する。ただし、どの段階でどの程度実施するかについては、対象とする癌腫によって考慮する。染色体への組み込みを有さない場合には、悪性腫瘍の患者が投与の対象であるのがん原性試験は、特別の理由が無い限り実施する必要はない。

3.9 GLP 試験としての実施

非臨床試験の安全性試験を始め GLP 準拠で実施すべき項目が医薬品では規定されている。しかし、がん治療用ウイルスでは、被験物質の GLP 上の取扱いや他動物への感染性等の問題から1つの安全性試験の全ての工程、又は全ての安全性試験を GLP 適合試験で実施することは困難であることが多い。そのため、非 GLP 試験として実施せざるをえない場合には、その理由、代替として実施する非臨床試験の計画、実施する施設・組織、データの質を保証するシステム、及び動物愛護等について記載又は資料を用意し、その妥当性又は GLP 準拠試験に準じたデータの保証を行うことができるかを明らかにする。

3.10 外来遺伝子を組み込む場合

生理的活性を有する物質の外来遺伝子を導入する場合には、導入遺伝子及び産生物質の安全性を考慮する必要がある。

- ① ウイルスを局所投与する場合には、投与局所と全身での発現性及び有効性と安全性を検討する。
- ② 導入遺伝子の発現レベルと持続期間及び急性又は慢性の有効性と安全性を検証する。
- ③ 産生物質の濃度、持続時間及び急性又は慢性の有効性と安全性を検証する。これには

免疫応答が含まれる。

文献

1. Dock G, The influence of complicating diseases upon leukaemia. *Am J Med Sci* 127:563-592, 1904.
2. ICH Considerations. *Oncolytic Viruses* (November 13, 2008). (日本語) ICH 見解 腫瘍溶解性ウイルス (事務連絡 平成 27 年 6 月 23 日)
3. Martuza RL. Conditional Ireplicating herpes vectors for cancer therapy. *J Clin Inves* 105:841-846, 2000.
4. Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy for malignant brain tumors. *Brain Nerve* 61:815-22, 2009.
5. 分析方法バリデーションに関するテキスト (実施項目) について (薬審第 756 号 平成 7 年 7 月 20 日、医薬審第 338 号 一部改正 平成 9 年 10 月 28 日) (ICH Q2A)
6. 分析法バリデーションに関するテキスト (実施方法) について (医薬審第 338 号 平成 9 年 10 月 28 日) (ICH Q2B)
7. 「ヒト又は動物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」について (医薬審第 329 号 平成 12 年 2 月 22 日) (ICH Q5A)
8. 「生物由来原料基準」(平成 26 年 9 月 26 日 厚生労働省告示第 375 号)
9. ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性の確保について (医薬発第 1314 号 平成 12 年 12 月 26 日)
10. 「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」について (医薬審第 873 号 平成 12 年 7 月 14 日) (ICH Q5D)
11. 医薬品の製造 (輸入) 承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて (薬審 1 第 24 号 平成元年 9 月 11 日)
12. 「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について (薬食審査 発 0323 第 1 号 平成 24 年 3 月 23 日) (ICH S6(R1))