

## 8. 安全性についての評価

### 8-1. 遺伝子導入方法の安全性

#### 8-1-1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

レトロウイルスベクターSFCMM-3 を産生するパッケージング細胞株 Am12 は共同研究者の Bordignon 博士らの H.S.Raffaele 研究所で樹立され、現在イタリアの MolMed 社がクニリカルグレードベクターとして管理・保存している。今回の遺伝子治療臨床研究に使用されるウイルスベクター上清は MolMed 社により作成された SFCMM-3 のマスターセルバンク(MCB)より供与される。培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/10% fetal calf serum が用いられる。

#### MCB の作成法

MolMed 社の細胞バンク(SFCMM-3 Primary Seed Bank)より SFCMM-3 の 1 バイアルを解凍し、培養液中で増殖させ、以下の検査を行う。

#### 1. 遺伝子発現、導入効率

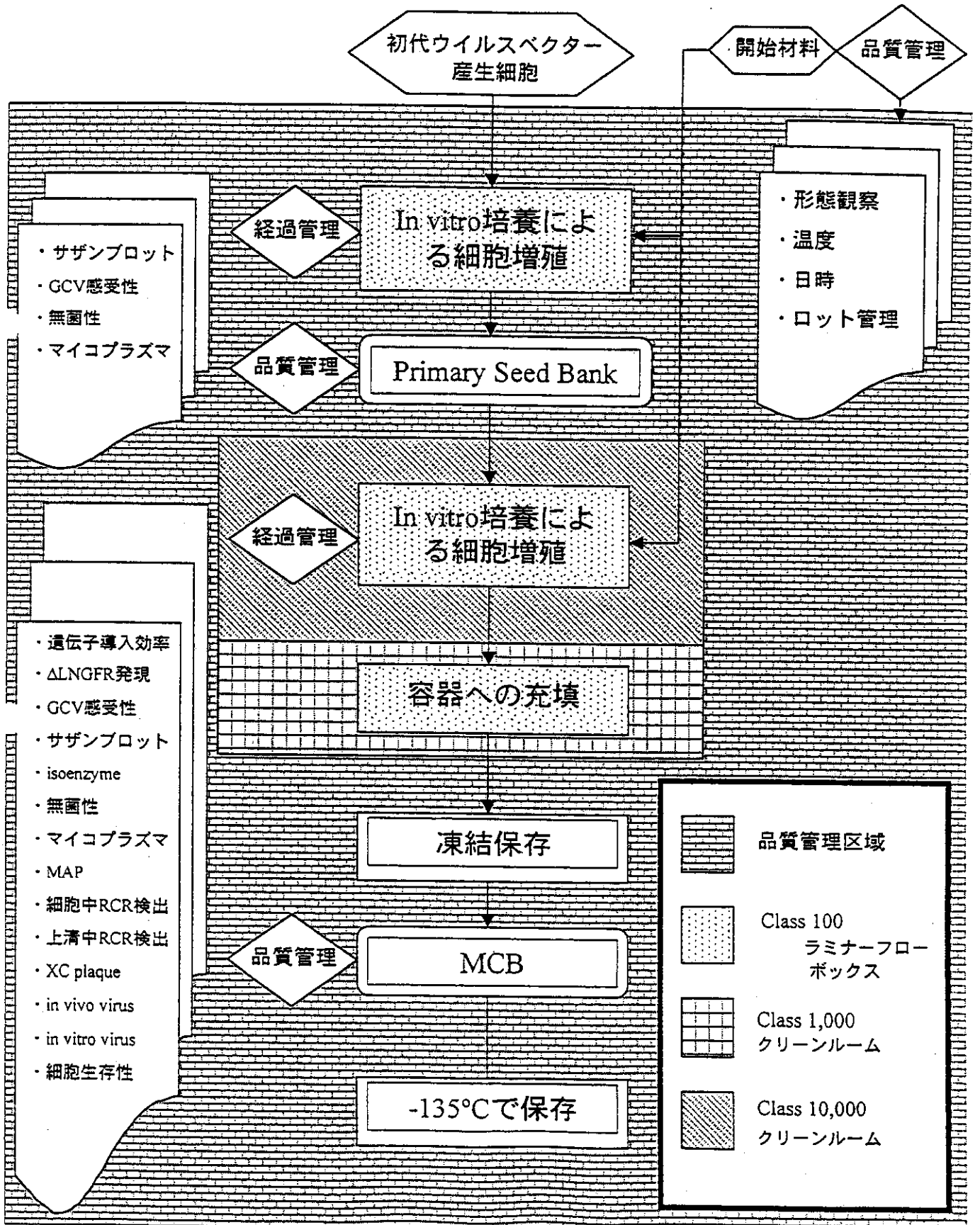
ΔLNGFR の発現、Southern Blot 法によるウイルスベクター産生細胞中のベクターゲノムの状態、NIH3T3、K562 を用いたウイルスベクター力価の測定、GCV の感受性

#### 2. 安全性

無菌性(細菌、真菌)、マイコプラズマ、細胞の RCR テスト(*Mus dunni*細胞との共培養後の PG-4 S<sup>+</sup>L<sup>-</sup>テスト)、上清中の RCR テスト(*Mus dunni*細胞への感染後の PG-4 S<sup>+</sup>L<sup>-</sup>テスト)、マウス抗体産生(MAP)、XC プラークアッセイ、エンドトキシン(LAL)

上記の検査にてウイルスベクター力価、安全性等が確認された細胞はさらに培養を続け、最終的に 1 バイアルあたり  $10 \times 10^6$  個のウイルスベクター産生細胞を含む 100 バイアルが用意され、使用時まで  $-135^{\circ}\text{C}$  以下にて保存される。培養は P3 レベルの実験室(GMP production に関する EC ガイドラインに基づく class 100,000)内の laminar flow hood (class 100)で行われ、最終的なバイアルへの保存は class 10,000 の実験室内の laminar flow (LF) hood(class 100)で行われる。以下に SFCMM-3 マスターセルバンク作成のためのフローチャートを示す。

SFCMM-3作製システムーフローチャート  
 マスターセルバンク(Master Cell Bank: MCB)の作製



## ウイルスベクター上清の大量生産

ウイルスベクター上清の大量生産においては上記の MCB より 1 バイアルが解凍され、13 日間培養することで細胞を増殖させる。この段階で  $4 \times 10^9$  個程度の細胞が得られるが、その後 3 日間(培養 14、15、16 日)細胞を  $1 \times 10^6$  個/mL で培養することで各々 4L のウイルスベクター上清を回収する。一工程で 12L のウイルス上清が得られるが、4L ずつ別々に 0.22 $\mu$ m のミリポアフィルターで濾過滅菌した後、使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存する。回収された各々のウイルスベクター上清の一部に対して以下の検査が行われ、ウイルスベクター上清の安全性が確かめられる。

### 1. 遺伝子発現、導入効率

$\Delta$ LNGFR の発現、Southern Blot 法によるウイルスベクター産生細胞中のベクターの状態、NIH3T3、K562 を用いたウイルスベクター力価の測定、GCV への感受性

### 2. 安全性

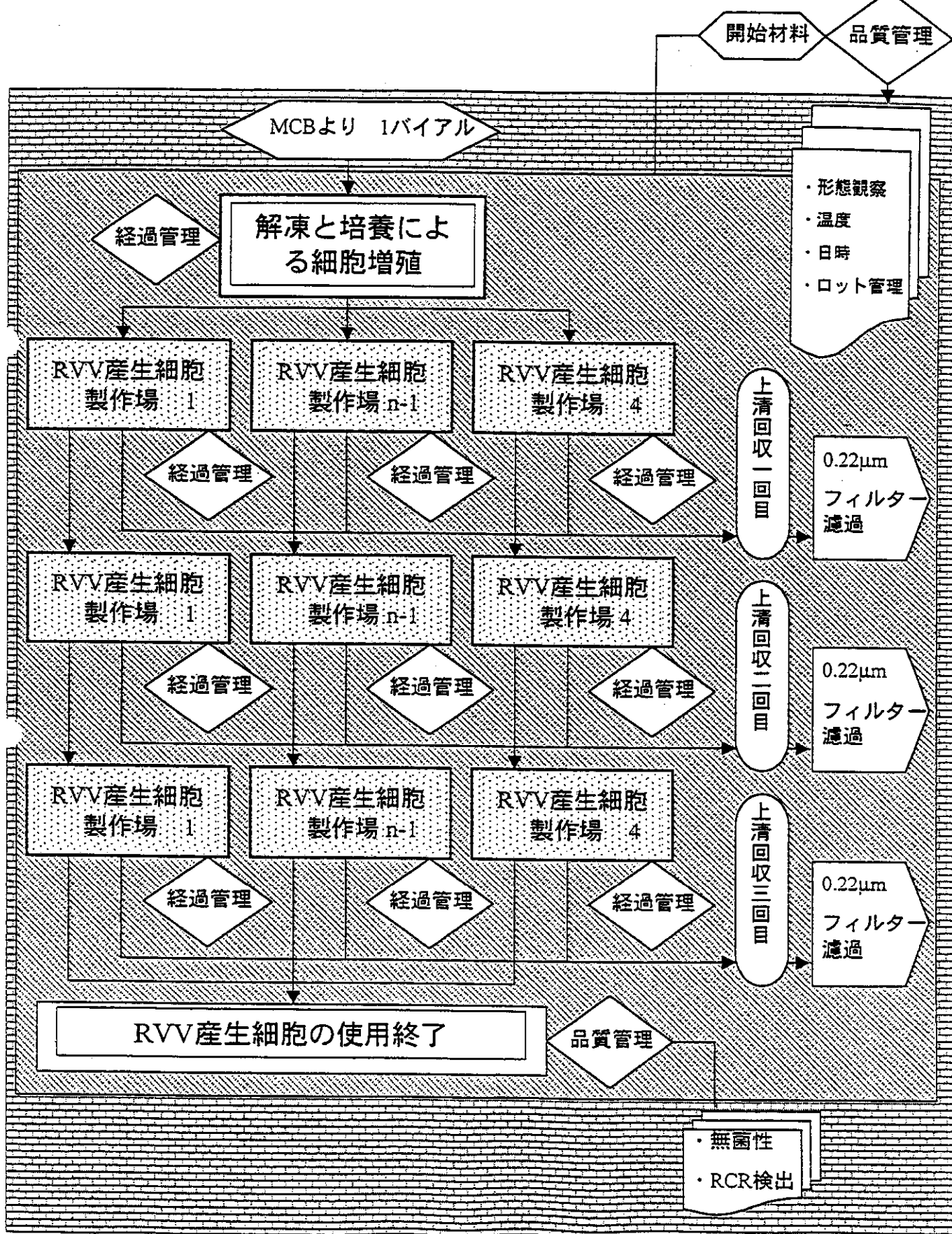
無菌性(細菌、真菌)、マイコプラズマ、細胞の RCR テスト(*Mus dunni* 細胞との共培養後の PG-4 S<sup>+</sup>L<sup>-</sup>テスト)、上清中の RCR テスト(*Mus dunni* 細胞への感染後の PG-4 S<sup>+</sup>L<sup>-</sup>テスト)、マウス感染性ウイルスの確認(MAP)、XC プラークアッセイ、エンドトキシン(LAL)

尚、RCR 検出方法はウイルスベクター上清の最終回収分の 5%を用いて行う。

以下に SFCMM-3 マスターセルバンクからのウイルスベクター上清の大量生産過程をフローチャートで示す。

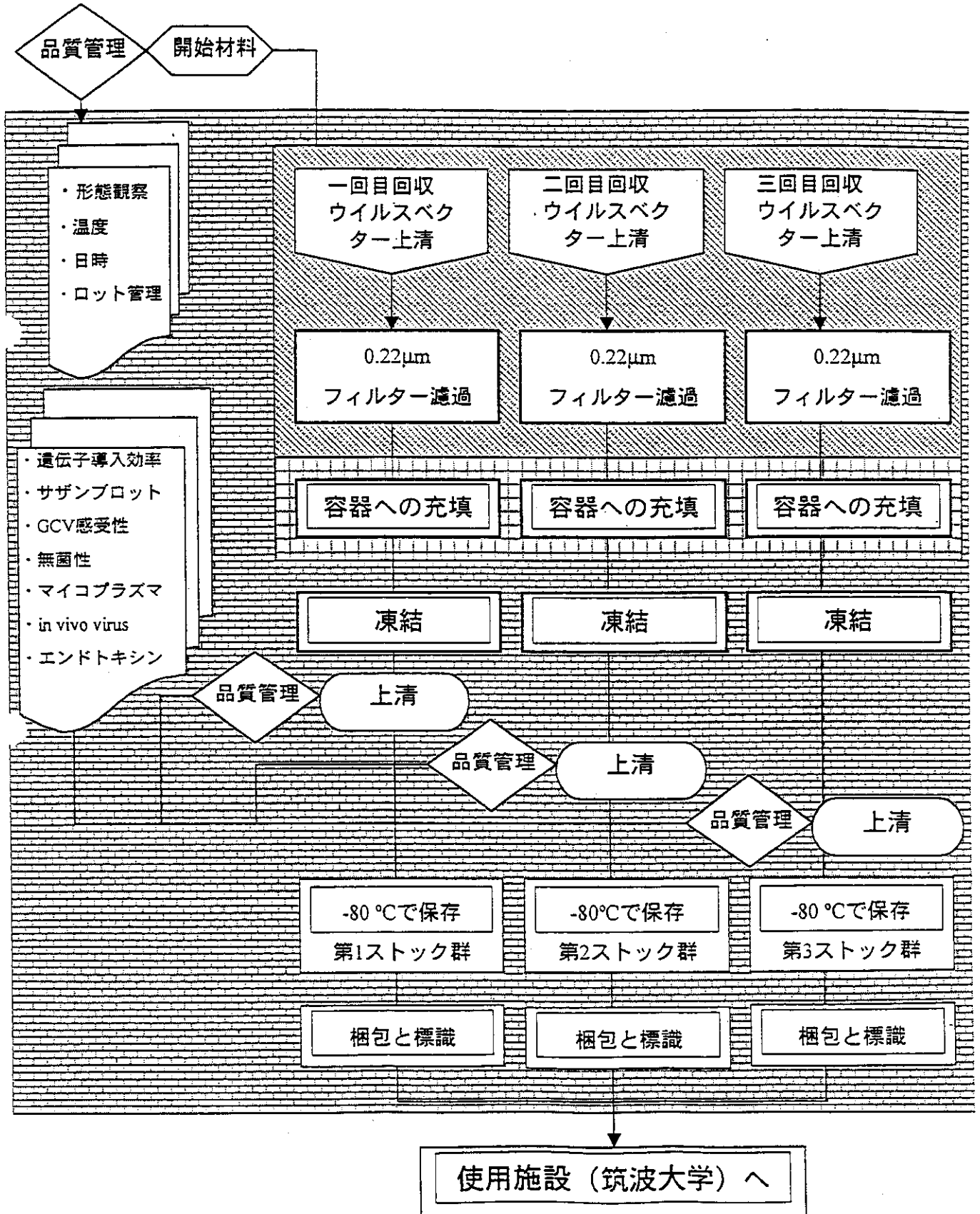
# SFCMM-3作製システムーフローチャート

## レトロウイルスベクター(RVV)上清作製工程 (3回分の場合) -1/2



# SFCMM-3作製システムーフローチャート

## レトロウイルスベクター(RVV)上清作製工程 (3回分の場合) - 2/2



以下にウイルス産生過程におけるウイルス産生細胞、およびウイルス上清の検査項目を列挙する。

### レトロウイルスベクター産生細胞の品質検査項目

試験内容	方法	結果
核型検索	アインザイムアッセイ	アインザイムのパターンがマウスのパターンと一致
細胞状態	トリパンブルー染色	> 60%
ΔLNGFR の発現 (細胞解凍時、および8週目)	FACS 解析	> 95%
GCV 感受性 (細胞解凍時、および8週目)	In vitro における異なった GCV 濃度下での細胞増殖の測定	細胞の死滅
ウイルス産生細胞におけるウイルスベクターDNAの状態	Southern Blot 解析	予想されたバンドと一致
ウイルス産生細胞におけるウイルスベクターDNAのコピー数	Southern Blot 解析	予想されたバンドと一致
遺伝子導入率 (細胞解凍時、および8週目)	NIH3T3 を用いた力価測定	1/10 希釈でのウイルス上清で >45% ΔLNGFR 陽性細胞の遺伝子導入率
細菌・真菌 (無菌性)	ヨーロッパ薬局方	検出感度以下
マイコプラズマ (直接・間接法)	ヨーロッパ薬局方	検出感度以下
細胞での RCR の確認	Mus Dunni 細胞との共培養・ Mus Dunni 細胞での RCR の増幅・ PG4 S' L-アッセイ	検出感度以下

ウイルス上清での RCR の確認	Mus Dunning 細胞への感染・ Mus Dunning 細胞での RCR の 増幅・ PG4 SL-アッセイ	検出感度以下
同種指向性ウイルス(エントロピックウイルス)の確認	XC プラークアッセイ	検出感度以下
偶発的ウイルスの確認	鳥幼虫形成卵での検査	検出感度以下
偶発的ウイルスの確認	3種の検出細胞を用いた 検査	検出感度以下
偶発的ウイルスの確認	成体マウス・乳飲みマウス・テ ンジクネズミを用いた in vivo 検査	検出感度以下
マウス細胞感染性 ウイルスの 確認	マウス抗体産生 (mouse antibody production: MAP)	検出感度以下

### レトロウイルスベクター上清の品質検査項目

(各ウイルス産生行程において、同一細胞から 3 バッチを選択し、以下の検査を行う)

試験内容	方法	結果
GCV 感受性	異なった GCV 濃度における感染した細胞の GCV 感受性の測定	細胞の死滅
ウイルスベクターの状態	ウイルス上清を用いて感染した細胞の Southern blot 解析	予想されたバンドと一致
遺伝子導入率	NIH3T3 を用いた力価測定	1/10 希釈でのウイルス上清で >45% ΔLNGFR 陽性細胞の遺伝子導入率
細菌・真菌 (無菌性)	ヨーロッパ薬局方	検出感度以下
マイコプラズマ (直接・間接法)	ヨーロッパ薬局方	検出感度以下
偶発的ウイルスの確認	3 種の検出細胞を用いた検査	検出感度以下
エンドトキシン	LAL テスト	< 0.250 EU/ml



### レトロウイルスベクター上清の追加品質検査項目

(各ウイルス産生行程において、同一細胞から最終バッチに対して以下の検査を行う)

試験内容	方法	結果
RCR 検出	Mus Dunni 細胞との共培養・Mus Dunni 細胞での RCR の増幅・PG4 S <sup>+</sup> L <sup>-</sup> アッセイ	検出感度以下

### 最終レトロウイルスベクター産生細胞の追加品質検査項目

試験内容	方法	結果
細菌・真菌 (無菌性)	ヨーロッパ薬局方	検出感度以下
RCR 検出	Mus Dunni 細胞との共培養・Mus Dunni 細胞での RCR の増幅・PG4 S <sup>+</sup> L <sup>-</sup> アッセイ	検出感度以下