



AAVベクター製品に含まれる不純物と安全性評価

山本 武範^{*1}, 櫻井 陽^{*2, ※}, 直田 みさき^{*2, ※}, 内田 恵理子^{*1}, 山下 拓真^{*1},
吉田 徳幸^{*1}, 内田 安則^{*1}, 佐々木 澄美^{*1}, 太田 哲也^{*3, *4}, 三井田 宏明^{*3, *5},
木下 潔^{*3, *6}, 奈良岡 準^{*3, *7}, 後藤 浩一^{*5}, 高木 観^{*4}, 川崎 秀吉^{*7},
佐々木 正徳^{*8}, 小野寺 雅史^{*9}, 井上 貴雄^{*1}

Impurities that could be Contained in AAV Vector Products and Safety Evaluation

Takenori YAMAMOTO^{*1}, Akira SAKURAI^{*2, ※}, Misaki NAOTA^{*2, ※},
Eriko UCHIDA^{*1}, Takuma YAMASHITA^{*1}, Tokuyuki YOSHIDA^{*1},
Yasunori UCHIDA^{*1}, Kiyomi SASAKI^{*1}, Tetsuya OHTA^{*3, *4},
Hiroaki MIIDA^{*3, *5}, Kiyoshi KINOSHITA^{*3, *6}, Hitoshi NARAOKA^{*3, *7},
Kohichi GOTO^{*5}, Kan TAKAGI^{*4}, Hideyoshi KAWASAKI^{*7},
Masanori SASAKI^{*8}, Masafumi ONODERA^{*9} and Takao INOUE^{*1}

1. はじめに

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター製品は複雑

な工程を経て製造されるため、最終製品の中に様々な不純物が残留する可能性がある。「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」¹⁾ 別

- * 1 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)
National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa 210-9501, Japan
- * 2 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関3-3-2 新霞が関ビル (〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shin-Kasumigaseki Bldg., 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan
- * 3 日本製薬工業協会 東京都中央区日本橋本町2-3-11 日本橋ライフサイエンスビルディング (〒103-0023)
Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Nihonbashi Life Science Bldg., 2-3-11 Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023, Japan
- * 4 田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 安全性研究所 神奈川県藤沢市村岡東2-26-1 湘南ヘルスイノベーションパーク (〒251-8555)
Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Shonan Health Innovation Park, 2-26-1 Muraoka-Higashi, Fujisawa-shi, Kanagawa 251-8555, Japan
- * 5 第一三共株式会社 安全性研究所 東京都江戸川区北葛西1-16-13 (〒134-8630)
Daiichi Sankyo Co., Ltd., 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan
- * 6 MSD株式会社 東京都千代田区九段北1-13-12 北の丸スクエア (〒102-8667)
MSD K. K., Kitanomaru Square, 1-13-12 Kudankita, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8667, Japan
- * 7 アステラス製薬株式会社 つくば研究センター 茨城県つくば市御幸が丘21 (〒305-8585)
Astellas Pharma Inc., Tsukuba Research Center, 21 Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585, Japan
- * 8 中外製薬株式会社 安全性バイオサイエンス研究部 中外ライフサイエンスパーク横浜 神奈川県横浜市戸塚区戸塚町216 (〒244-8602)
Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Chugai Life Science Park Yokohama, 216 Totsukacho, Totsuka-ku, Yokohama City, Kanagawa 244-8602, Japan
- * 9 国立大学法人大阪大学 大学院工学研究科 大阪府吹田市山田丘2-1 (〒565-0871)
Graduate School of Engineering, the University of Osaka, 2-1 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan
- ※ 本稿は、著者の個人的見解に基づくものであり、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の公式見解を示すものではない。

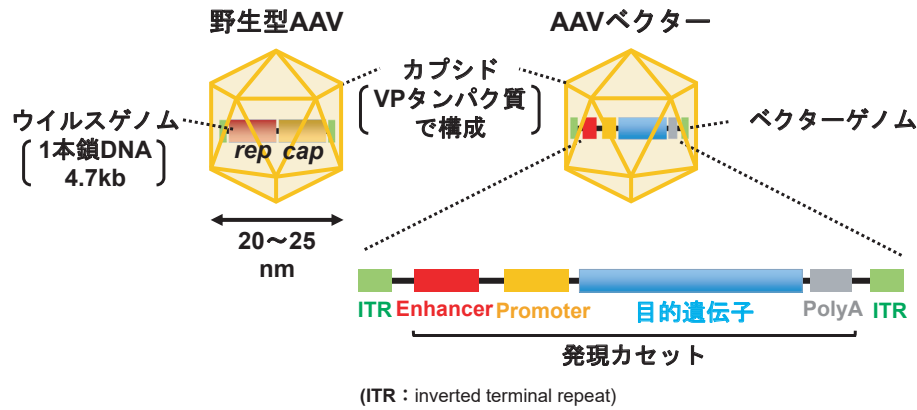


Fig. 1 野生型AAV及びAAVベクターの構造

添「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(指針)の中では、「最終製品に混入する可能性のある製造工程由来不純物に対しては、最終製品への残存量を求め、ヒトに投与された際の曝露量では、ヒトでの安全性上の懸念が生じないことを明らかにすること」とされており、安全性の観点から懸念される不純物について評価を行うことが求められている。しかしながら、個々の不純物に対する具体的な安全性評価の考え方や、製法変更などによって不純物プロファイルが大きく変動した場合の対応については、指針内で十分に示されていないのが現状である。これを踏まえ、2024年12月に開催された第20回核酸・遺伝子医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム「AAVベクター製品の安全性評価の考え方」²⁾では、パネルディスカッションにおいて、AAVベクター製品に含まれる不純物に関する種々の疑問について、安全性確保の観点から議論が行われた。

本稿では、まずAAVベクターの一般的な製造工程、各工程で生じる不純物、及び指針に記載されている不純物に関する事項について概説する。次に、これらを踏まえて、安全性の観点から懸念されるAAVベクター製品の不純物に関して、パネルディスカッションで議論された内容を紹介する。

2. 野生型AAV及びAAVベクターの構造

野生型AAVは1本鎖ゲノムがカプシド(外殻)で包まれた構造を有している(Fig. 1)。ウイルスゲノ

ムには*rep*遺伝子と*cap*遺伝子が存在し、*rep*遺伝子はゲノム複製等に関与する非構造タンパク質をコードしており、*cap*遺伝子はカプシドを構成する構造タンパク質(VP1, VP2, VP3)をコードしている。また、ゲノムの両端には逆位末端反復配列(Inverted Terminal Repeat: ITR)と呼ばれるゲノムの複製及びカプシドへのゲノムの内包に寄与する配列が存在している。現在、ヒト及び非ヒト霊長類においてはAAV1~13型をはじめとする血清型が知られている³⁾。これらAAV血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸配列はそれぞれ異なっており、この違いによって感染性や組織移行性などの性質に多様性が生じると考えられている。

AAVベクターは、AAVのウイルスゲノムの*rep*遺伝子と*cap*遺伝子を含む90%以上の領域を目的遺伝子の発現カセットに組み換えた遺伝子組換えウイルスである。

3. AAVベクターの製造工程由来と想定される不純物

AAVベクター製品の製造工程は、近年非常に多様化している。AAVベクター製品に混入する不純物は、製造工程の違いにより質・量が異なると予想されることから、不純物の安全性について考察する際には、用いた製造工程に応じた対応が求められると考えられる。

以下に、AAVベクターの製造工程の一例と各工程で混入しうる不純物について概説する。

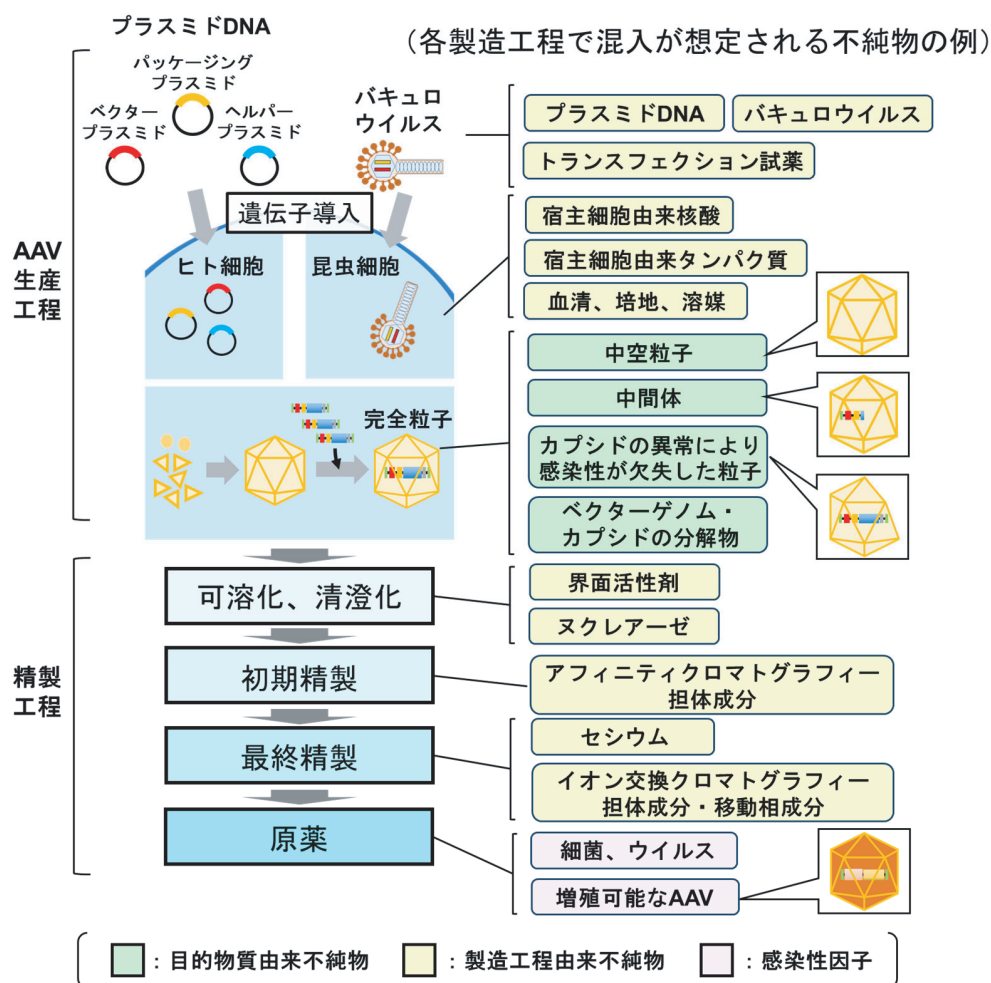


Fig. 2 AAVベクターの製造工程と混入が想定される不純物の例

3.1 AAVベクターの製造工程

AAVベクターの製造工程は、上流のAAVベクターの産生工程と下流の精製工程に分けられる (Fig. 2). 現状で一般的に用いられるAAVベクターの製造方法は、ヒトの細胞に必要なプラスミドDNAをトランスフェクションする方法と、AAVベクターの遺伝子を有する遺伝子組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させる方法に分類される。

ヒト細胞を用いた産生工程においては、まず「野生型AAVの*rep*、*cap*遺伝子を目的遺伝子に置き換えた塩基配列を含むプラスミドDNA (ベクタープラスミド)」、*rep*遺伝子と*cap*遺伝子を搭載したパッケージングプラスミド、並びに「アデノウイルス等に由来しAAVの複製とパッケージングに補助的な働きを担う遺伝子を搭載したヘルパープラスミド」の3種類のプラスミドDNAを、HEK293細胞等の宿主細胞にトランスフェクションすることにより、

細胞内でAAVベクターを産生させる。

一方で、昆虫細胞とバキュロウイルスを用いた製造法においては、AAVベクターの骨格を有する遺伝子組換えバキュロウイルスと*rep*遺伝子や*cap*遺伝子を搭載した別のバキュロウイルスをSf9細胞等の昆虫細胞に感染させ、AAVベクターを産生させる。バキュロウイルスを用いた製法はヒト細胞を用いる製法と比較して大量生産に適しているため、ここ2～3年の間に米国で承認された中で、Roctavian[®]⁴⁾やHemgenix[®]⁵⁾がバキュロウイルスを用いた製法で製造されている。

AAVベクターの製造において、目的とする完全長のベクターゲノムを内包したカプシド粒子 (完全粒子) のみが産生されることが理想であるが、実際にはベクターゲノムを含まない空のカプシド粒子 (中空粒子)、不完全なゲノム断片などの目的外核酸が封入されているカプシド粒子 (中間体)、カプシド

の異常により感染性が失われた粒子等が高い割合で生じており、これらを下流の精製工程で除去することが必要となる。

精製工程 (Fig. 2の下部) については、ヒト細胞を用いた場合であってもバキュロウイルスを用いた方法であっても本質的な差はない。まず細胞内で産生されたAAVベクターを回収するため、界面活性剤を用いて細胞を可溶化する。カプシドの血清型によっては細胞外に分泌されるため、培養上清からも回収する。次に、ベンゾナーゼ等の核酸分解酵素を用いて、プラスミドDNA及び宿主細胞由来核酸を消化後、ろ過等により清澄化する。続いて、カプシドタンパク質に対する特異的抗体を用いたアフィニティー精製カラム等により初期精製を行う。この工程で特異的抗体に結合できない不純物の多くを除去する。一方、上記の初期精製では、完全粒子と同じカプシドを持つ中空粒子や中間体等は除去できないため、これらを分離・除去するために、塩化セシウム密度勾配超遠心や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて最終精製を行う。最後に、混在しているセシウム等の小分子をタンジェンシャルフローろ過により除去することにより、最終産物を得る。

3.2 AAVベクター製品の目的物質由来不純物

上述したAAVベクターの製造工程から想定される目的物質由来不純物 (Fig. 2, 緑色で示した項目) としては、中空粒子、中間体、カプシドの異常により感染性が欠失した粒子、ベクターゲノムやカプシドの分解物等が挙げられる。これらの目的物質由来不純物の中で、中空粒子や中間体のように、密度や電荷などの物理化学的な性質が完全粒子と類似している粒子は、一般的な精製工程において厳密に分離・除去することが現状では難しいため、最終産物にも残留すると考えられる。

3.3 製造工程由来不純物

製造工程由来不純物 (Fig. 2, 黄色で示した項目) としては、AAVベクター産生工程では、プラスミドDNA、ポリエチレンイミン等のトランスフェクション試薬、宿主細胞に由来する核酸及びタンパク質、バキュロウイルス及びバキュロウイルスに由来する核酸及びタンパク質、宿主細胞の培養に用いる

血清、培地成分等が挙げられる。また、下流の精製工程では、細胞の可溶化に用いる界面活性剤、プラスミドDNAや宿主細胞由来核酸を分解するために添加される核酸分解酵素のほか、アフィニティークロマトグラフィーが初期精製として実施される場合には、クロマトグラフィーの担体成分である樹脂や解離した抗体等の混入が考えられる。

最終精製では、塩化セシウム密度勾配超遠心を用いる場合には塩化セシウムの混入が、HPLCを用いる場合にはクロマトグラフィーの分離用担体や移動相成分の混入が想定される。

3.4 感染性因子

AAVベクターの製造においては、製造に用いる宿主細胞のセルバンクの作製工程をはじめ、全製造工程を通して、細菌、ウイルス等の感染性因子 (Fig. 2, 桃色で示した項目) が混入する可能性が考えられる。また、3種のプラスミドDNAをトランスフェクションしたヒト細胞内において、*rep/cap* 遺伝子を含むパッケージングプラスミドと目的遺伝子を含むベクタープラスミドの組み換えにより、*rep* 遺伝子及び*cap* 遺伝子がベクタープラスミドに挿入され、意図せず増殖可能なAAV (replication competent AAV:rcAAV) が産生されることがある。

4. 指針に記載されているウイルスベクター製品に関する純度試験

指針¹⁾には使用するベクター等の品質について明らかにすべき事項、非臨床評価の考え方、治験で考慮すべき事項、参照すべき公定書等が提示されている。指針中に記載されているウイルスベクターを用いた遺伝子治療用製品に関係する品質評価項目をTable 1にまとめた。

指針では、遺伝子治療用製品の品質管理において適切な純度試験の設定が求められる項目として、ベクターの製造に用いるDNA、タンパク質、ペプチド、培地添加物、溶媒、血清等が挙げられており、ウイルスベクターの場合、具体的には、製造に用いた核酸分解酵素、プラスミドDNA、ヘルパーウイルス、ベクター産生細胞に由来するタンパク質及びDNA、中空粒子等の不完全粒子 (指針に示される「非感染性粒子」に含まれる) 等の残留量に対する純

Table 1 「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」に記載されている品質に関する試験と評価項目

試験 ¹⁾	評価項目
特性解析	・目的遺伝子配列, フランキング領域配列, プロモーターやエンハンサーの配列, 場合によっては全塩基配列又は制限酵素切断マップ ・標的細胞における目的とする遺伝子の発現及び持続性 ・必要に応じて標的細胞以外での発現
確認試験	塩基配列等
純度試験	ベクター産生細胞由来： ・DNA ・タンパク質, ペプチド, 培地添加物, 溶媒, 血清等 ベクターの製造や精製工程由来： ・スクレアーゼ ・プラスミドDNA ・ヘルパーウイルス ・非感染性粒子の残存量
感染性因子に関する試験	無菌試験 マイコプラズマ否定試験 迷入ウイルス試験 増殖性ウイルス試験 エンドトキシン試験
生物活性又は力価	目的とする臨床効果と密接に関連する生物活性 感染性粒子/非感染性粒子の比率及びウイルス力価 ウイルス粒子あたりの感染価
含量	ウイルス粒子数 ウイルス力価
その他の製品の特性に応じて実施する試験	粒子径分布

1) その他に外観・性状, 一般試験 (浸透圧, pH, 採取容量, 不溶性微粒子, 不溶性異物等) に関しては設定が求められている。

度試験の設定が求められている。これに加え, 感染性因子に関する試験として, 無菌試験, マイコプラズマ否定試験, 迷入ウイルス試験, 増殖性ウイルス試験, エンドトキシン試験が求められている。

5. AAVベクター製品に含まれうる不純物に関する安全性評価

指針¹⁾では, 「最終製品に混入する可能性のある製造工程由来不純物に対しては, 最終製品への残留量を求め, ヒトに投与された際の曝露量では, ヒトでの安全性上の懸念が生じないことを明らかにすること」とされている。

冒頭に記載したシンポジウムのパネルディスカッションでは, 安全性確保の観点から特にどのような不純物に注目すべきかを議論した上で, 個々の不純物の安全性評価の考え方について議論した。

5.1 安全性確保の観点から特に注目すべき不純物について

疑問：AAVベクターの製造工程を考慮すると種々の不純物が最終製品に混入しうると考えられる (Fig. 2)。また, 指針¹⁾においてもウイルスベクター製品に対する複数の純度試験の設定が求められている (Table 1)。これらの不純物の中で, 安全性確保の観点から特に注目すべき不純物はどれか, という疑問が生じた。

議論：安全性確保の観点から特に注目すべき不純物として, 不完全粒子, 核酸不純物, タンパク質不純物の三つが挙げられ, 以下の議論が行われた。

不完全粒子：

AAVベクター製品に混入しうる種々の不純物の中でも, 不完全粒子は自然免疫系の活性化のリスクを増大させるなどの理由から, 特に注意すべき不純物と考えられる。不完全粒子には, 中空粒子, 不完

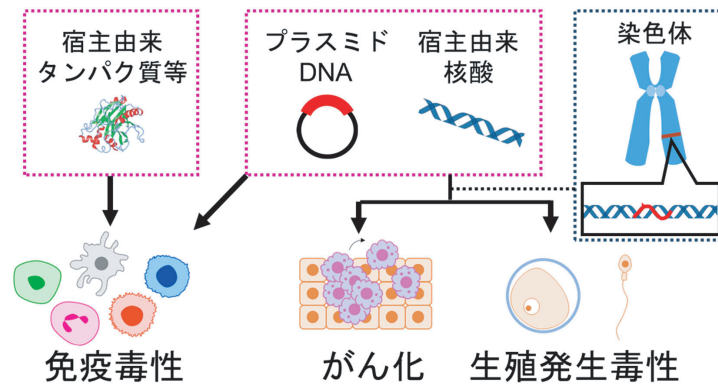


Fig. 3 AAVベクター製品に含まれる不純物から生じる可能性がある毒性の例

全なゲノム断片などが封入された粒子(中間体), カプシド構造の異常により感染能を欠失した粒子等, 多様な粒子が含まれる。近年では中空粒子の中にも核酸不純物が内包されているという報告もなされている⁶⁾。AAVベクター製品の投与量はベクターゲノムのコピー数に基づき決定されるため, 不完全粒子の割合が高い製品の場合, 体内に導入されるカプシドタンパク質の量はベクターゲノムのコピー数から想定される量よりも多くなり, 自然免疫系の活性化を介した免疫毒性のリスクが増大することとなる。また, 不完全粒子に内包された目的外核酸が自然免疫系を活性化する可能性のほか, 目的外核酸が染色体に挿入されてがん化や生殖発生毒性を引き起こしたりする可能性も考えられる⁷⁻⁹⁾。

このような安全性上の懸念から, AAVベクター製品の製造工程において不完全粒子を完全に除去することが望ましいが, 不完全粒子の物理化学的特性は目的物質である完全粒子と類似していることから, 現在の製造技術水準で不完全粒子を完全に除去することは困難であり, 最終製品中に一定量残留することが避けられないのが現状である。このため, 最終製品に残留する不完全粒子の特性・種類を可能な限り明らかにすることが重要であり, また, 技術開発が進んでいる中空粒子の混入率を指標とした評価法を用いて品質管理を行うことが望ましいと考える(5.3項を参照)。

核酸不純物：

プラスミドDNA, 製造時に用いる細胞由来のDNA及びRNAなどの核酸不純物についても, 自然免疫活性化による免疫毒性や染色体組込みによるが

ん化及び生殖発生毒性の発現が理論的に考えられる(Fig. 3)。また, 製造に用いた*rep*及び*cap*等のウイルス関連遺伝子が体内に導入されると意図しないウイルスタンパク質の発現が引き起こされる可能性がある。これらの核酸不純物は, 多くの製造プロセスで核酸分解酵素処理により分解・除去が行われるものの, 残留量を評価・管理することが重要である。

タンパク質不純物：

宿主細胞由来のタンパク質や製造工程で使用される核酸分解酵素などの酵素が含まれる。特に, バキュロウイルスを用いた場合には, 残留した昆虫由来タンパク質による免疫毒性が懸念されるため, 精製工程により残留量をできるだけ低減させるとともに, 残留量を評価・管理することが必要である。

また, 最終製品に混入しうる不純物のうち, rcAAVと血清由来不純物等について以下の議論がなされた。

rcAAV：

「3.4. 感染性因子」の項に記載したように, AAVベクター製品の製造工程において自己複製能力を持つrcAAVが生成・混入する可能性がある。しかし, rcAAVは野生型のAAVと同様に, アデノウイルス等のヘルパーウイルスが存在しない場合には体内で増殖できないため, 管理の必要はあるものの, リスク対応の優先順位は相対的に低いと考えられる。

血清由来不純物等：

製造に用いる宿主細胞の培養等に血清やトリプシン等の生物由来原料を用いた場合には, 細菌, 真菌, ウイルス等の感染性因子による汚染が考えられるため, 他の生物由来製品と同じく, 生物由来原料

基準¹⁰⁾に準じた対応が必要になる。

結論：免疫毒性等のリスクがある一方で、十分な除去が難しい不完全粒子が安全性確保の観点から特に注目すべき不純物である。また、不完全粒子と比較して効率的な除去は可能であるものの、同様の毒性のリスクがある核酸不純物及びタンパク質不純物についても留意が必要である。

5.2 製法変更に伴い新たな不純物や規格値を超える不純物が生じた場合の対応

疑問：臨床用製剤を製造するため、非臨床用製剤の製造工程をスケールアップするための製法変更が行われる場合がある。このような製法変更に伴う純度試験において、製法変更前に設定した規格値を超える不純物や新たな不純物が生じることがありうる。

この場合、新たな毒性試験の実施が必要か、という疑問が生じた。

議論：複雑な構造を有するAAVベクター製品は、従来のバイオ医薬品以上に製法変更前後における不純物の変動が大きく、同等性の担保が難しい場合が多い。特に、製造に用いる宿主細胞の変更のように原材料の組成が大幅に変化する場合には、新たな不純物が生じる可能性があり、毒性試験を追加で実施する必要がある。ただし、製法変更前から残留していた不純物について、製法変更後にその量が製法変更前の規格値を超えた場合であっても、その混入量が製法変更前に実施した毒性試験から問題がないと判断される場合は、安全性は評価済みと見なすことができる。

このように、一般に品質の規格値は厳しく設定される場合が多いため、製法変更により規格値以上の不純物が生じた場合でも、毒性試験で確認された許容範囲に収まることが多い。追加での毒性試験が必要になるのは、この許容範囲を超え、逸脱の度合いが大きい場合に限られると考えて差し支えないと思われる。

結論：製法変更により新たな不純物が生じた場合は、毒性試験を実施する必要がある。ただし、非臨床用製剤に元々含まれていた不純物が製法変更により規格値を上回った場合でも、製法変更前に実施済みの毒性試験でその不純物の含量が評価されていれば、当該不純物の安全性は評価済みとし、新た

な毒性試験は不要である。

疑問：不純物の毒性試験が必要になった場合、その不純物がDNA成分の場合（製造工程由来のプラスミドDNA等）、あるいは、DNA成分以外の場合（中空粒子、宿主細胞由来タンパク質等）で、それぞれどのような期間で評価可能か、という疑問が生じた。

議論：DNA成分の不純物の場合には、まずWHOが定めるバイオ医薬品の残留DNA量の基準値（限度値）である10 ng/dose¹¹⁾を下回るかどうかが目安となる。この基準を上回った場合には、まずは低減が求められ、低減に限界がある場合は毒性試験が必要となる可能性がある。毒性試験を実施する場合、例えば宿主細胞由来DNAのような核酸不純物の場合は、生体反応が早い自然免疫系の活性化が主たる毒性と考えられるため、長期の観察までは必要ないと考えられる。

DNA成分以外の不純物の場合にも、不純物の特性に合わせた評価期間の設定が重要である。通常のAAVベクター製品は単回投与による毒性試験により評価されるが、この場合に長期観察では病変が生じていても観察期間中に回復してしまうことも想定されるため、短期での観察が適切と考えられる。一方で、中空粒子は完全粒子の感染性に影響を与えることが指摘されているため¹²⁾、中空粒子の含量が大きく変わる場合には、AAVベクターからの発現産物量が変化する可能性があり、安全性のみならず有効性評価の観点からも、長期観察が必要となるかもしれない。

結論：毒性の評価期間は、評価すべき不純物の特性に合わせて決めるべきと考えられる。

5.3 中空粒子の混入率の基準に関する考え方について

現在、AAVベクター製品の投与量は、ベクターゲノムのコピー数により規定された含量を基に決定されている。このため、中空粒子の混入は、生体内に投与されるカプシドタンパク質及び中空粒子内に封入されている目的外核酸の量を増大させ、これに伴う自然免疫応答の増強等による毒性を引き起こすことが考えられる。このため、安全性の観点から、中空粒子の混入量を低減させることが望ましい。また、有効性の観点からも、中空粒子は完全粒子の細

胞への感染性を低下させることから¹²⁾、中空粒子の混入量を低減させることが望ましい。しかし、中空粒子の混入率をどの程度まで低減させれば良いかという点（閾値）に関しては、国内外ともに共通した認識は存在しない。

疑問：中空粒子の評価法に関するガイダンス案¹³⁾が米国食品医薬品局（FDA）に提案されている^{注1)}。この文書では、「中空粒子の混入率は最大30%以下に設定することを推奨する（製品の70%以上が完全粒子で構成されるべきである）。中空粒子の混入率がこの基準を上回る場合、中空粒子の存在が患者の安全性に悪影響を及ぼさないこと、及び治療効果を損なわないことを示すデータを提出する必要がある」との記載がある。この「製品の70%以上は完全粒子で構成されるべき」との基準の妥当性をどう考えるべきか、という疑問が生じた。

議論：中空粒子の混入率は、AAVベクターの製造方法（ヒト細胞かバキュロウイルスか）や中空粒子を除くための精製法（超遠心精製か、HPLC精製か）等によって大きく異なると考えられるため、現時点ではその混入率の閾値を一律に決めることは難しい。中空粒子の混入率の大小に関わらず、有効性と安全性を評価した治験製品と最終製品の同等/同質性が説明できることが重要になる。

基本的な考え方としては、上述した安全性・有効性の観点から、中空粒子の混入量を開発の進展に伴い低減させていくことが望ましい。一方で、中空粒子が完全粒子の感染性を低下させる場合があることを考慮すると¹²⁾、製法変更等による中空粒子の急激な低減は完全粒子の感染性を過度に増強させる可能性も考えられる。例えば、血友病治療用のAAVベクター製品（例えば、血液凝固因子の遺伝子を搭載したAAVベクター）において、完全粒子の感染性の増強が生じた場合、血液凝固因子の過剰な発現による血栓の形成に繋がる可能性も考えられる。このような目的遺伝子の過剰発現が安全性に影響を及ぼす懸念がある場合には、製法変更による中空粒子の急激な低減はむしろ避けるべきと考えられ、製法変更前後で中空粒子の混入率をある程度一定に保つことが望ましいと評価される可能性がある。

結論：現段階では、中空粒子の混入率の限度値を決めることは難しい。有効性及び安全性を評価した製剤と最終製剤との間に同等性/同等性が担保されていることが重要と考えられる。

6. 終わりに

本稿では、AAVベクター製品の非臨床安全性評価のうち、「AAVベクター製品に含まれる不純物と安全性評価」を扱った。

パネルディスカッションでの議論を通して、AAVベクター製品の不純物について、安全性の観点から特に注目すべき不純物、また製法変更時に不純物の種類や量変動した場合における追加の毒性試験の必要性や評価期間に関する考え方を整理した。また、中空粒子の混入率については、現時点でどの程度まで混入率を低減させるべきかを決めることは難しく、開発初期から上市まで、品質の一貫性を保ちながら安全性を担保していくことが妥当と考えられた。製品開発においては、上記の点を参考にしながら、安全性を確保するための品質管理戦略を構築することが望まれる。

なお、パネルディスカッションで得られた結論は、シンポジウムで議論した時点でのものであり、今後得られる知見や科学の進歩によって変わりうることに留意が必要である。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長。遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について。薬生機審発0709第2号（一部改正、医薬機審発1023第2号、令和5年10月23日）。
- 2) 第20回核酸・遺伝子医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム。国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部ホームページ。http://www.nihs.go.jp/mtgt/section2/kakusanRSsymp20.pdf (accessed 2025-06-23)。
- 3) Pipe, S.; Leebeek, F. W. G.; Ferreira, V.; Sawyer, E. K.; Pasi, J. Clinical considerations for capsid choice in the development of liver-targeted AAV-based gene transfer. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019, 15, p.170-178.
- 4) European Medicines Agency: Roctavian Assessment

注1) AAVベクターを用いた臨床開発品目における重篤有害事象の発生に伴い、Dark Horse Consulting GroupからFDAに提案型ガイダンス草案として提出された。

- report https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/roctavian-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 2025-7-10).
- 5) European Medicines Agency: Hemgenix Product information, Annex I, Summary of product characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemgenix-epar-product-information_en.pdf (accessed 2025-07-18).
- 6) Tran, N. T.; Lecomte, E.; Saleun, S.; Namkung, S.; Robin, C.; Weber, K.; Devine, E.; Blouin, V.; Adjali, O.; Ayuso, E.; Gao, G.; Penaud-Budloo, M.; Tai, P. W. L. Human and insect cell-produced recombinant adeno-associated viruses show differences in genome heterogeneity. *Hum Gene Ther.* 2022, **33**(7-8), p.371-388.
- 7) 山下拓真, 山本武範, 内田恵理子, 井上貴雄. ファームテックジャパン. 2021, **37**(15), p.2645-2651.
- 8) Cao, D.; Byrne, B. J.; de Jong, Y. P.; Terhorst, C.; Duan, D.; Herzog, R. W.; Kumar, S. R. P. Innate immune sensing of adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther.* 2024, **35**(13-14), p.451-463.
- 9) Jarvi, N.; Hofman, K.; Venkatesh, A.; Gorecki, E.; Balu-Iyer, S. V. Immunogenicity risk assessment of empty capsids present in adeno-associated viral vectors using predictive innate immune responses. *J Pharm Sci.* 2024, **113**(12), p.3457-3469.
- 10) 厚生労働省. 生物由来原料基準, 告示第37号. 平成30年2月28日. <https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000827727.pdf> (accessed 2025-07-18).
- 11) World Health Organization: Meeting Report. WHO Study Group on Cell Substrates for Production of Biologicals. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/cell-substrates/cells.final.mtgrep.ik.26_sep_07.pdf?sfvrsn=3db7d37a_3&download=true (accessed 2025-07-18).
- 12) Gao, K.; Li, M.; Zhong, L.; Su, Q.; Li, J.; Li, S.; He, R.; Zhang, Y.; Hendricks, G.; Wang, J.; Gao, G. Empty virions in AAV8 vector preparations reduce transduction efficiency and may cause total viral particle dose-limiting side-effects. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2014, **1**(9), 20139.
- 13) U. S. Food and Drug Administration: Proposed DRAFT Guidance for FDA Consideration: Testing of Adeno Associated Viral (AAV) Vector-Based Human Gene Therapy Products for Empty Capsids During Product Manufacture. https://uploads-ssl.webflow.com/6414e4e38bc16c7a84b0da2c/649cc2686e4845fa67d14fc8_DHC_Proposed-DRAFT-Guidance-for-FDA-Consideration.pdf (accessed 2025-07-10).