

遺伝子導入細胞作製に用いられた自立的な増殖力のない遺伝子組換えウイルスを 非存在として取り扱える標準操作に関する合意について

2015年3月20日

日本製薬工業協会研究開発委員会
委員長 竹内誠

細胞への遺伝子導入に、種々の増殖力等欠損型ウイルスが広く利用され、作製した細胞の機関間での授受も行われている。本文章は、作製した遺伝子導入細胞がカルタヘナ法の対象であるか否かについて判断するにあたり、その細胞へのウイルス残存について、業界共通の基準を示すものである。

自立的な増殖力のない遺伝子組換えウイルス「レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、センダイウイルス（非伝播型）」を感染させた細胞における、これらウイルスの残存なしと確認している各社の運用ルールを基に、共通の基準の策定を検討した。その結果、これら自立的な増殖力のない遺伝子組換えウイルスは、感染させた細胞について洗浄操作の伴う**継代培養を3代以上**（ウイルス残存ゼロの証明は不可能であるので、事実上残存しなくなる段階としての継代数）行うことで実質的に非存在として取り扱うことができる結論した。

継代数の根拠は東京大学医科学研究所斎藤泉先生の論文¹⁾を基にしている。すなわち、本論文では、現在用いられているウイルスベクターの中で最も感染力が強いアデノウイルスでも、酵素化学的処理により3代以上の継代培養を経たものからウイルスは検出されないことを報告している。また、酵素化学的処理を行わない継代については、下記に示したウイルス粒子の半減期に基づく考察(a)および(b)により実質的に非存在として取り扱えるとした。さらに、継代時の培地交換により残存するウイルス量は、さらに低下すると考えることが可能である。

*半減期に基づく考察²⁾

(a) レトロウイルス：感染に用いる遺伝子組換えウイルス量を 1×10^9 particle/ml \times 3mL、レトロウイルスの半減期を 4.5 時間と仮定した場合、2 週間後に残存する遺伝子組換えウイルス量は 1×10^{-13} particle と計算できる。

(b) レンチウイルス：感染に用いる遺伝子組換えウイルス量を 1×10^9 particle/ml \times 3mL、レンチウイルスの半減期を 10.4 時間と仮定した場合、2 週間後に残存する遺伝子組換えウイルス量は 0.6 particle と算出される。この場合、2 週間で少なくとも 3 代継代（細胞洗浄と培地交換で 1×10^{-3} のウイルスの減少を達成し得る希釈洗浄を

行う) を実施した場合、2 週間後に残存する遺伝子組換えウイルス量は、 0.6×10^{-9} particle と考えられる。

(a)(b)いずれにおいても遺伝子組換えウイルスの残存量は、ゼロに近く、存在する蓋然性はなく、SAL (Sterility Assurance Level) で示されている滅菌保証レベル(10^{-6})を達成している。

補足事項；継代と半減期について

- ① 酵素化学的処理を伴う継代とは、接着細胞での洗浄、トリプシン処理等酵素処理、洗浄遠心を伴う操作を指す。
- ② 酵素化学的処理を行わない継代とは、浮遊細胞での希釈、洗浄遠心による培地交換を伴う操作を指す。
- ③ 各ウイルスの半減期による考察は、標準的な 3 代継代に必要な培養に要するのべ時間を基にしている。実測値に基づく運用を行うことがより望ましい。

- 1) Saito, Izumu *et al.* Efficient Sequential Gene Regulation via FLP- and Cre-Recombinase Using Adenovirus Vector in Mammalian Cells Including Mouse ES Cells, *Microbiol. Immunol.*, **50**(10), 831-843 (2006)
- 2) Higashikawa, F., Chang, L –J. Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors: *Virology*, **280**(1), 124-131 (2001)

文章活用にあたっての留意事項

- ① 各機関において、追加で、若しくは独自の基準に基づいて、上記以外の手順（例；PCR による確認操作等）を定めることを妨げるものではない。
- ② 文章内容が正しく反映されるように、各操作条件を機関の安全主任者（委員会）にて確認すること。
- ③ 将来、新しいウイルスベクターが開発されると予測されるが、ここでは本文章を作成した 2015 年 1 月時点における、文章中に記載した増殖力等欠損型ウイルスに対してのみ適用できるものとする。また、増殖力等欠損型ウイルスとは、「研究開発二種省令別表第一第一号へに該当しないウイルス及びウイロイドに係る考え方」（平成 19 年 5 月 14 日文部科学省研究振興局ライフサイエンス課生命倫理・安全対策室）に基づくものとする。

以上