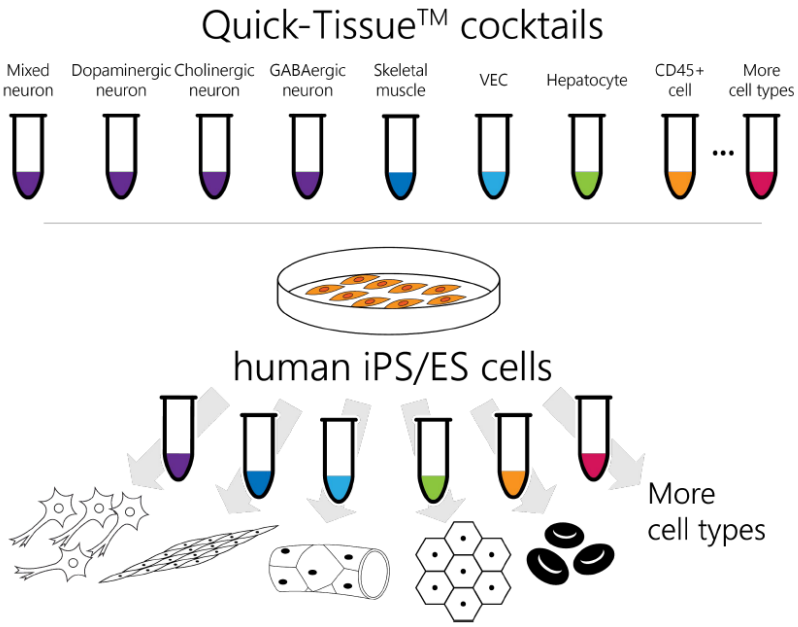
資料２

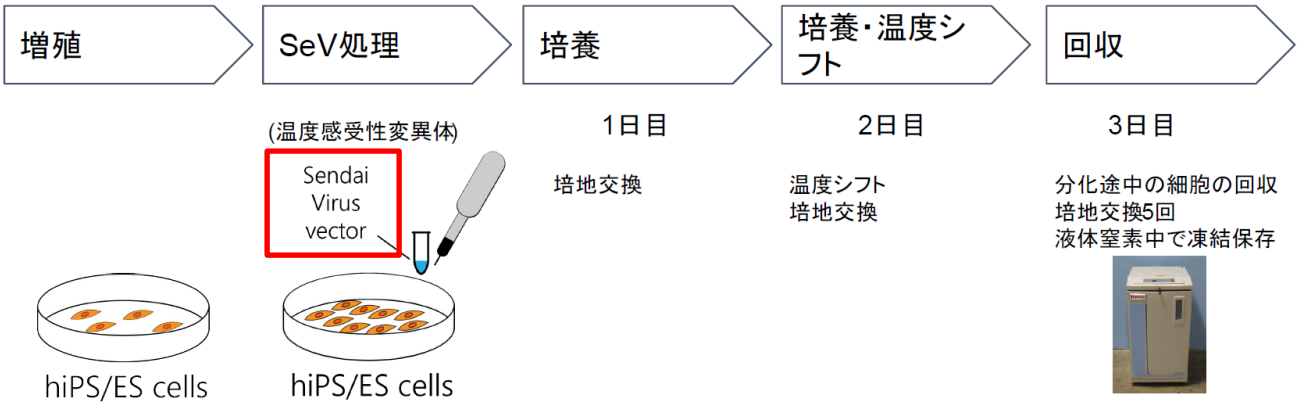
分化誘導等に使用した遺伝子組換えウイルスの
細胞製品（研究・検査用試薬）中の残存如何の判断について
（案）

1. 照会案件概要

- エリクサジェン・サイエンティフィック社では、ID ファーマ社が製造した遺伝子組換えセンダイウイルス（ベクター）を利用し、ヒト多能性幹細胞（iPS/ES 細胞）から分化誘導した研究・検査用神経細胞試薬を製品化予定。



- 分化誘導においては、分化誘導因子発現遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えセンダイウイルスを iPS/ES 細胞に感染させる。当該分化誘導因子が iPS/ES 細胞内で発現することで、iPS/ES 細胞から目的の神経細胞への分化誘導が行われる。



出所：いずれもエリクサジェン・サイエンティフィック社資料（一部編集）

- 分化誘導に遺伝子組換えウイルスを使用していることから、最終製品中に当該ウイルスが残存しているか否かを評価・判断する必要がある。（遺伝子組換えウイルスが残存している場合には、当該製品はカルタヘナ法規制の対象となり、使用の際は基本的に第二種規制（拡散防止措置を執って研究開発等を行う）の対象となり、保管・運搬の際にも拡散防止措置（専用の容器等）が必要、譲渡等の際は情報提供が必要がとなる。）

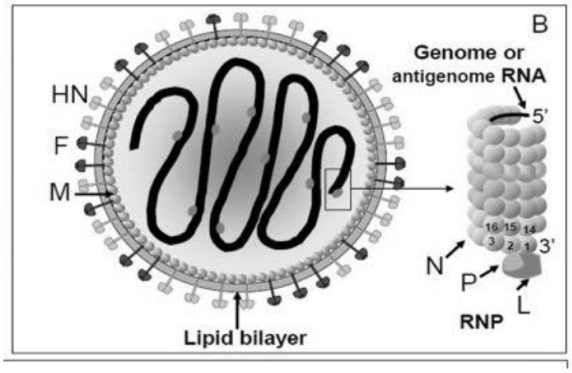
2. 判断について（案）

- 以下により、今回照会の事案については、カルタヘナ法規制の対象となる遺伝子組換えウイルスが残存していないことを確認する。

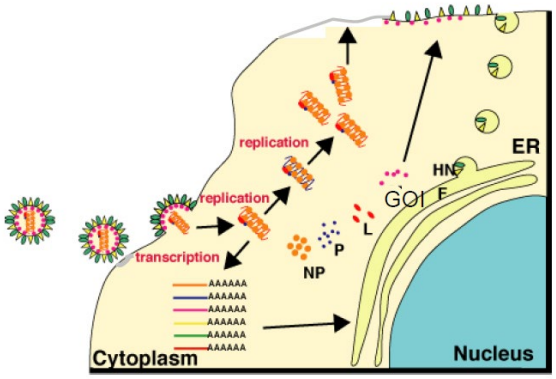
（１）分化誘導に使用される遺伝子組換えウイルスについて（前提情報）

- 使用される遺伝子組換えセンダイウイルスは、**ウイルスが感染能を持つために必要な F タンパク（ウイルスが細胞に侵入する際に必要な膜融合を担う）を発現する遺伝子を欠失**させている。
- また、温度感受性の変異が加えられており（核酸の複製に関与する P 遺伝子及び L 遺伝子を改変）、37℃で培養した後は核酸の複製が行われない。培養開始後 2 日目から 3 日目に 37℃で培養が行われることから、それ以降に複製が行われることはない。

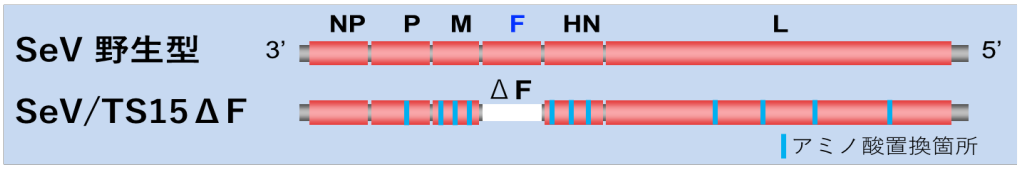
［センダイウイルスの粒子構造］



［センダイウイルスの感染メカニズム］

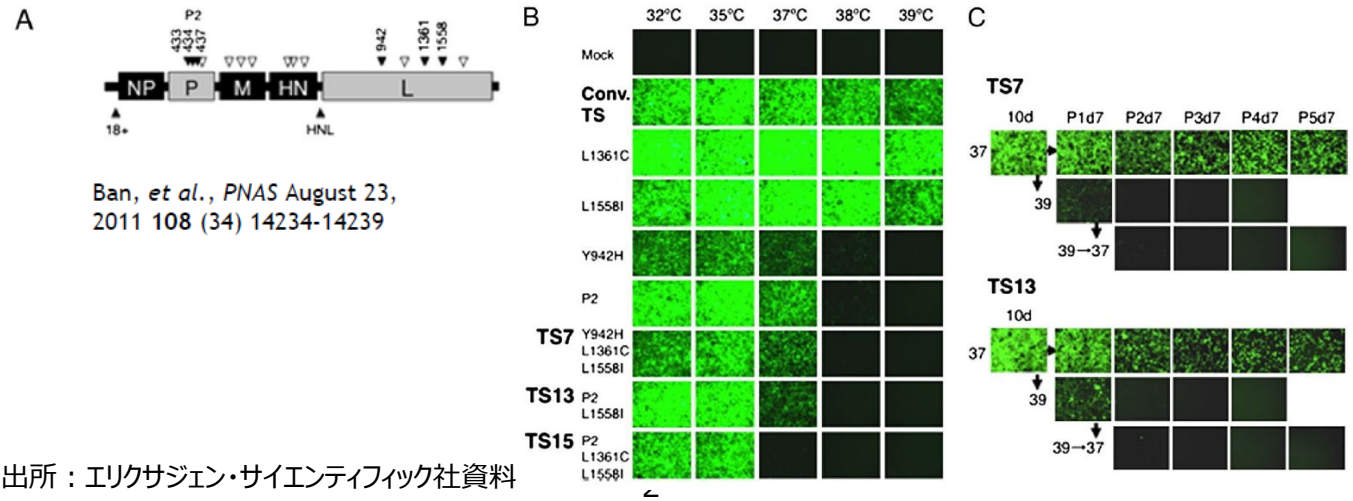


［センダイウイルスのゲノム構成］



出所：以上 ID ファーマ社資料

［温度感受性の確認］



出所：エリクサジェン・サイエンティフィック社資料

（２）残存の評価

- 以下、①感染細胞外の状況、②同細胞内のウイルス粒子の状況に分けて整理する。

①感染細胞外

➢ 細胞に感染させる際、培地・上清中に遺伝子組換えウイルスが残存する。しかし、**培地交換及び洗浄を計８回**行うとしており、仮に毎回５％程度の培地が残ると仮定しても残存ウイルス粒子数は0.000469CIU となり、残存の可能性は極めて低いと考えられる。また、感染性試験でネガティブとの評価が得られ、残存していないことが裏付けられている（資料２別添参照）。

［細胞洗浄の方法・機能とその効果］

Day 0
1. Plate iPSCs in differentiation medium (3 x 10^6 cells in 6 ml)
2. Immediately add SeV (MOI 4.0: 12 x 10^6 CIU)
3. Rotate the dish
4. Incubate the culture at 33° C for 18 - 24 hours

Day 1
1. Change medium (old 6 ml medium with SeV was replaced with fresh 6 ml medium without SeV; no additional wash during the medium change)
2. Incubate at 33°C for 18 - 24 hours

Day 2
1. Change medium
2. Shift incubation temperature to 37°C to inactivate SeV

SeV Cell Infectious Units (CIU)	12	millions
Medium change	8	times

Medium leftover after each wash	Expected remaining CIU
1%	0.000000001
3%	0.00000787
5%	0.000469
10%	0.12

Day 3
1. Wash with 2 ml PBS
2. Treat with 1.8 ml dissociation enzyme
3. Incubate 5-30 min
4. Wash with 2 ml PBS
5. Suspend in 2 ml PBS + iRock
6. Centrifuge at 300 xg for 4 minutes
7. Aspirate the supernatant and resuspend the pellet in 0.5 ml cryo medium/ 2 x 10^6 cells
8. After thawing before plating, 2 x 10^6 cells/ 0.5 ml were diluted into 5 ml for an additional wash.

出所：エリクサジェン・サイエンティフィック社資料

②感染細胞内

➢ **感染細胞の中に存在するのは、遺伝子組換えセンダイウイルスの核酸及び一部タンパク質であって、カルタヘナ法規制の対象である「生物」の定義（法第２条）には該当しない。**また、同様に**感染細胞そのものも法規制の対象となる生物の定義には該当しない。**

➢ なお、細胞への感染後 37 度へと温度シフトするまでの間に、F タンパクを有さない非感染性粒子が出芽する。これは、感染しないことから核酸の複製・移転を行わないが、いずせにせよ、出芽後の洗浄により、当該粒子が残存している可能性も極めて低いと考えられる。

（３）生物多様性影響の評価

- （２）で述べたように、①感染細胞外に遺伝子組換えセンダイウイルスが残存している可能性は極めて低いと考えられ、②感染細胞内にはカルタヘナ法の規制対象となる生物に該当するものは存在しないと考えられる。仮に、万一、遺伝子組換えセンダイウイルスが極微量、残存するとしても、**F 遺伝子を欠失していることから、増殖して他に感染していくことはないため、生物多様性等に影響を及ぼすことはない**と考えられる（更に、37℃で培養を行った段階で遺伝子の複製・発現が起こらないようにされている）。

（４）その他（当該細胞試薬を他の生物に移入する場合）

- 当該細胞試薬は、研究利用の目的で他の生物（人以外）に移植することも想定される。
- 分化誘導した細胞の遺伝子が組換えられている場合であって、当該分化細胞が移植した生物個体に生着（機能している状態）する場合には、当該生物は細胞外で加工した核酸を有することになり、遺伝子組換え生物に該当すると考えられる。
- しかし、今回照会を受けている事案については、当該細胞の遺伝子を組換えてはおらず、仮に移植した生物個体に生着したとしても細胞外で加工した核酸を有することにはならない為、当該生物は遺伝子組換え生物には該当しない。

3．類似案件の判断基準について（案）

◆ 今後、遺伝子組換えウイルスを使用して分化誘導を行った研究・検査用細胞試薬中の遺伝子組換えウイルスの残存如何の判断については、以下が確保されている場合には、残存していないと使用者自身で判断して差し支えないこととする。（申請マニュアル中の Q&A に掲載する。使用者が判断に困る場合には、NITE が相談を受け付ける。そこでも判断が困難な場合には審議会での審査の対象とする。）

- 分化誘導に使用する遺伝子組換えウイルスには生物多様性及び人の健康に影響を及ぼす遺伝子が組み込まれていないこと（分化誘導を目的とする挿入遺伝子はこれに該当しない）。
- 当該細胞が、法第 2 条に規定する「生物」に該当しないこと。
- ウイルス粒子が残存していないことや検出限界以下となっていることが、合理的な根拠により推察・判断できる複数回の洗浄が行われていること。
- 非増殖性であること（増殖能を喪失する遺伝子改変がなされていること。また、当該細胞への感染後感染性ウイルス粒子が出現しないことが合理的に説明可能であること）。
- 感染性試験を実施して、残存していないことを確認することが望ましい（上記工程を経た上で、更に過去の同種の細胞試薬の生産等から得られた知見・経験の蓄積により残存していないと判断できる場合には、必ずしも感染性試験まで実施する必要はない）。
- 研究・検査用試薬としての使用に限られること（Ex Vivo 遺伝子治療等医療目的で使用するものについては厚生労働省が示す考え方に従うこと）。
- 求められた場合には適切に説明できるよう、根拠資料等を管理・保管しておくこと。
- 染色体の遺伝子組換えを行った当該細胞試薬を法第 2 条に規定する生物に移植し、当該生物内で生着する場合、当該生物は細胞外で加工した核酸を有することになり、カルタヘナ法規制の対象である遺伝子組換え生物に該当すると考えられる。この為、当該細胞試薬がそのような形で使用される可能性がある場合には、譲渡の際に、移植後の生物は遺伝子組換え生物に該当し、カルタヘナ法の規定に従って適切に使用する必要がある旨情報提供すること。

◆ なお、新たな科学的知見等が得られた場合、必要に応じて見直しを行う。

／以上

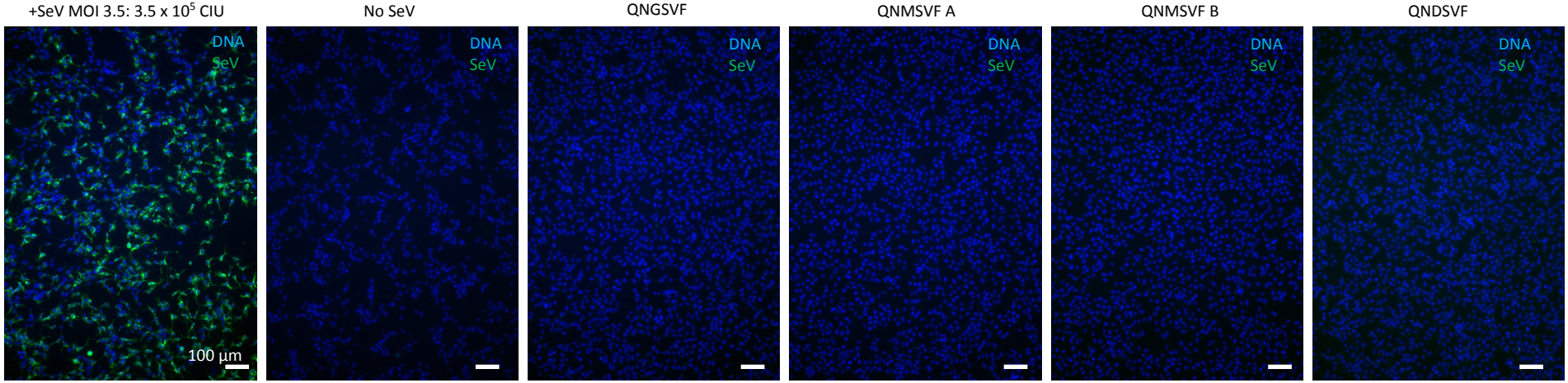
当該製品中の残存遺伝子組換えウイルスの評価例

資料２　（別添）

elixirgen scientific

QNGSVF-CW50065-20190228T
QNMSVF-CW50065-20190301TA
QNMSVF-CW50065-20190301TB
QNDSVF-CW50065-20190118T

当該製品4ロットそれぞれの1x10^{5}細胞相当の破砕物をヒトiPS細胞の培養に添加（MOI 3.5に相当）。16時間後に残存ウイルスの有無を抗センダイウイルス抗体により評価した。



QNGSVF-CW50065-20190228T, 0.45 x 10^6 細胞、破砕物
QNMSVF-CW50065-20190301TA, 0.05 x 10^6 細胞、破砕物
QNMSVF-CW50065-20190301TB, 0.28 x 10^6 細胞、破砕物
QNDSVF-CW50065-20190118T, 0.64 x 10^6 細胞、破砕物

The post-thaw cell suspension was made in 300 µl Medium iN and homogenized for 4 minutes. After centrifugation at 300 g 4 min, the cleared homogenate equivalent of 1 x 10^5 cells was mixed with Medium iN (a total of 286 µl) and applied to each well. Then, 1 x 10^5 iPSCs (CW50065 p21p12) in 13.8 µl were added to each well.
For a positive control, cell suspension was made in 300 µl Medium iN and then 2.92 µl QN-SeV was added: MOI 3.5, once thawed and frozen again.
16 hours after plating, cultures were fixed with 100% MeOH at -20°C for 40 min and subsequently treated with 2% skimmed milk in PBS (PBSM) at RT for 1 hr after three PBS washes. These were then incubated with anti-SeV Pab (1:500) in PBSM at RT for 1.75 hr. After three PBS washes, they were incubated with 488-donkey anti-rabbit IgG (1:250) in PBSM at RT for 2 hr. After three PBS washes, nuclei were stained with Hoechst33258. For nuclei, 717 msec gain 1; for green, 1862 msec gain 4.

© Elixirgen Scientific, Inc. – Visit ElixirgenScientific.com

資料２（参考）

【参照条文】

カルタヘナ法

（定義）

第二条　この法律において「生物」とは、一の細胞（細胞群を構成しているものを除く。）又は細胞群であって核酸を移転し又は複製する能力を有するものとして主務省令で定めるもの、ウイルス及びウイロイドをいう。

２　この法律において「遺伝子組換え生物等」とは、次に掲げる技術の利用により得られた核酸又はその複製物を有する生物をいう。

一　細胞外において核酸を加工する技術であって主務省令で定めるもの

二　異なる分類学上の科に属する生物の細胞を融合する技術であって主務省令で定めるもの

カルタヘナ法施行規則

（生物の定義）

第一条　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「法」という。）第二条第一項の主務省令で定める一の細胞（細胞群を構成しているものを除く。）又は細胞群（以下「細胞等」という。）は、次に掲げるもの以外のものとする。

一　ヒトの細胞等

二　分化する能力を有する、又は分化した細胞等（個体及び配偶子を除く。）であって、自然条件において個体に成育しないもの

（遺伝子組換え生物等を得るために利用される技術）

第二条　法第二条第二項第一号の主務省令で定める技術は核酸を加工する技術であって、次に掲げるもの以外のものとする。

一　細胞に移入する核酸として、次に掲げるもののみを用いて加工する技術

イ　当該細胞が由来する生物と同一の分類学上の種に属する生物の核酸

ロ　自然条件において当該細胞が由来する生物の属する分類学上の種との間で核酸を交換する種に属する生物の核酸

二　ウイルス又はウイロイドに移入する核酸として、自然条件において当該ウイルス又はウイロイドとの間で核酸を交換するウイルス又はウイロイドの核酸のみを用いて加工する技術