

単純ヘルペスウイルス 1 型ーチミジンキナーゼ及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体を発現し、マウスアンフォトロピックウイルス 4070A の env 蛋白質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス（SFCMM-3）申請書等

第一種使用規程承認申請書	1
--------------	---

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
(2) 使用等の歴史及び現状	4
(3) 生理学・生態学的特性	5

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報	8
(2) ベクターに関する情報	12
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	12
(4) 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	14
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	14
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	15

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容	16
(2) 使用等の方法	16
(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における 情報収集の方法	18
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響 を防止するための措置	18
(5) 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の 環境での使用等の結果	18
(6) 国外における使用等により得られた情報	19

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 他の微生物を減少させる性質	20
2 病原性	20
3 有害物質の産生性	21
4 核酸を水平伝達する性質	22
5 その他の性質	23

第三 生物多様性影響の総合的評価	24
------------------	----

第一種使用規程承認申請書

平成 19 年 6 月 12 日

厚生労働大臣 柳澤 伯夫 殿
環境大臣 若林 正俊 殿

氏名 タカラバイオ株式会社
申請者 代表取締役社長 加藤 郁之進 印
住所 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号

第一種使用規程について承認を受けたいので、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第 4 条第 2 項（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	単純ヘルペスウイルス 1 型－チミジンキナーゼ及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体を発現し、マウスアンフォトロピックウイルス 4070A の env 蛋白質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス（SFCMM-3）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	(1) SFCMM-3（以下、本遺伝子組換え生物という）溶液は、容器に密封され、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の施設可能な保管室内の冷凍庫に保管する。 (2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 レベルの拡散防止措置を執ることができる細胞調製室（以下、細胞調製室という）内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。ドナーリンパ球への本遺伝子組換え生物導入操作、本遺伝子組換え生物導入細胞の培養その他の本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取扱いも同様に細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈溶液若しくはその凍結品又は本遺伝子組換え生物導入細胞を開放系区域を通して他の P2 レベル区域に運搬する場合には、密閉した容器に入れ、容器の落下や破損を防止するために当該容器を箱等に入れ運搬する。 (3) 本遺伝子組換え生物溶液（希釈液も含む）又は本遺伝子組換え生物導入細胞を廃棄する際には、滅菌処理を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。 (4) 医療廃棄物管理規程は以下の内容を含むものであり、治療施設において承認してこれを定めるものとする。 1) 治療施設は年度単位の廃棄物処理計画書を策定し、職員に周知する。廃棄物処理計画書には、廃棄物の発生状況、分別方法、治療施設内の収集及び運搬方法、治療施設内で行う滅菌及び消毒の範囲、梱包方法、保管方法、業者に処理委託する場合の手続き及び緊急時の連絡体制を含める。

	2) 治療施設は処理に関する報告書を作成し、5年間保存する。 3) 感染性廃棄物の処理は、次のとおり行う。 a) 感染性廃棄物はその他の廃棄物と分別するとともに、運搬容器に収納密閉し排出するものとする。 b) 感染性廃棄物の収集運搬及び保管は、途中で内容物が飛散することがないように容器で行うものとし、液体を含むものは、その内容物が漏洩しないよう密閉容器を使用するものとする。また、これらが腐敗し又は悪臭を発生しないような措置を執るものとする。 c) 鋭利廃棄物の収集運搬及び保管には、刺傷事故等の危険を防止するために貫通性のない堅牢な容器を使用する。 d) 感染性廃棄物の梱包物及び保管は極力短期間とし、保管場所には関係者以外の立入りができないように配慮するとともに他の廃棄物と区分して保管するものとする。また、保管場所には関係者の見やすい場所に感染性廃棄物が保管されていること及びその取扱い上の注意事項を記載し表示するものとする。 4) 感染性廃棄物を収納した運搬容器には、バイオハザードマークを貼付表示するものとする。 5) 感染性廃棄物の処理を自ら行わず業者に処理委託する場合は、廃棄物処理法に基づき都道府県知事により感染性廃棄物処理の許可を受けた業者であることを確認のうえ委託契約を行うものとする。なお、受託業者はその業務を他の業者へ再委託しないものとする。 (5) 患者に対する遺伝子導入細胞の投与は、室圧が陰圧に管理され、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「陰圧の個室」という）内において、輸注により行う。なお、投与時に本遺伝子組換え生物導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具類は使い捨てとし、使用後、陰圧の個室内で適切に消毒を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。 (6) 投与後3日まで、患者を陰圧の個室内で管理し、検査等の理由で患者が一時的に陰圧の個室外の開放区域に出る場合には、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。陰圧の個室における管理期間中の患者の血液及び体液は、その都度適切に消毒を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また患者の尿及び糞便等の排泄物は、投与翌日以降に行われる患者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法試験にて自己増殖能を獲得したレトロウイルス（以下「RCR」という）の存在が否定されるまで、陰圧の個室内で適切に消毒を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、臨床検体として使用する患者の血液、体液、排泄物等の取扱いは、本遺伝子組換え生物溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取扱いに準じる。 (7) 陰圧の個室における管理期間中、患者に対して侵襲的に使用した器具及び患者の血液、体液、排泄物等に接触した器具等は、陰圧の個室内で適切に消毒を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄するか、又は陰圧の個室内でじゅうぶんに洗浄する。 (8) 陰圧の個室における患者の管理を解除する前に、RCRが患者の
--	--

	末梢血単核球（PBMC）及び血漿において陰性であることを確認する。RCR が検出されたときは、陰圧の個室における管理を継続する。 (9) 陰圧の個室における管理解除後に患者の PBMC 又は血漿から RCR が検出された場合は、直ちに患者を陰圧の個室における管理下に移し、上記(6)から(8)までと同様の措置を執る。
--	--

生物多様性影響評価書

I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

単純ヘルペスウイルス 1 型—チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体 (Δ LINGFR) 遺伝子を含むレトロウイルスベクター SFCMM-3 (以下、本遺伝子組換え生物という) は増殖能欠損型レトロウイルスベクターである。本遺伝子組換え生物の宿主はモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus: MoMLV) である。

レトロウイルス科はアルファ〜イプシロンレトロウイルス及びレンチウイルス (以上はオルソレトロウイルス亜科) 並びにスプーマウイルス (スプーマレトロウイルス亜科) の 7 つの属に分類される。マウス白血病ウイルス (Murine leukemia virus: MLV) はガンマレトロウイルス属に属する種である (文献1)。MLV は AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスとして発見された。MoMLV は、実験室内で MLV を継代することにより、病原性の高いウイルス株として Sarcoma 37 細胞から単離されたエコトロピック (同種指向性) レトロウイルスである。MoMLV は発がん遺伝子を持たず、マウスの年齢及び系統にかかわらず感染し、長期間感染したマウスのほぼすべてがリンパ性白血病を発症することが報告されている (文献2)。MoMLV はマウスやラット等のげっ歯類にのみ感染し、ヒトを含む他の動物に対する感染性や病原性の報告はない (文献3)。

文献1 : Büchen-Osmond C ed., ICTVdB – The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB Management, Columbia University, New York, USA (2004)

文献2 : Moloney JB. Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. J Natl Cancer Inst 24:933-951, 1960.

文献3 : Coffin JM, Hughes S, Varmus HE ed., Retroviruses, pp14, 478-502, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1997)

2 使用等の歴史及び現状

レトロウイルスは、医学生物学領域において遺伝子導入ベクターとしての応用が最も早く進んだウイルスであり、米国で行われた遺伝子治療の最初の臨床例もレトロウイルスベクターを用いたものであった (文献4)。遺伝子治療/遺伝子マーキングの臨床プロトコルでは、レトロウイルスベクター法を用いたものが 23.2% を占める (文献5)。レトロウイルスの中でも MoMLV は遺伝子導入用ベクターとして広く使われている。

文献4: Blaese RM, et al. T Lymphocyte-directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results after 4 Years. Science 270:475-480, 1995.

文献5: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性 (文献6)

MoMLV 粒子は直径約 100 nm の球形の C 型粒子であり、ウイルスゲノムを内包するコアとそれを取り囲むエンベロープ (外被) からなる。コアは主としてカプシド蛋白質 (CA) により構築されており、その中に 2 分子の RNA ゲノムを有する。そのほか、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、プロテアーゼ (PR)、核酸結合蛋白質 (NC) もコア内部に存在する。コアの周囲にはウイルス産生細胞の細胞膜に由来する脂質二重膜のエンベロープが存在する。エンベロープとコアの間にはマトリックス蛋白質 (MA) が存在する。エンベロープには膜貫通蛋白質 (TM) が突き刺さっており、それに表面蛋白質 (SU) が弱く結合している。SU と TM の複合体はウイルス粒子のエンベロープ上で多量体 (おそらくは三量体) を形成する。

(2) 生息又は生育可能な環境の条件

他のウイルスと同様に、MoMLV は宿主細胞に感染した場合にのみ増殖が可能である (I-3-(4)「繁殖又は増殖の様式」参照)。レトロウイルスは比較的不安定なウイルスであり、体液中、培地中等の限られた環境中でしか感染性を保持できない。なお、ショ糖とゼラチンを添加して凍結乾燥を行うと安定に保存できるとの報告がある (文献7)。

(3) 捕食性又は寄生性

MoMLV はマウス及びラットの細胞に感染し、ウイルスゲノムは逆転写により DNA に変換された後、細胞の染色体に組み込まれる (プロウイルス)。他の生物を捕食することはない。

(4) 繁殖又は増殖の様式

レトロウイルスはキャリアーである動物の血液中や体液中に存在し、他の個体がそれに接触することにより感染する。レトロウイルスが細胞に感染し増殖するときは、1) 吸着、2) 侵入、3) 逆転写、4) 宿主染色体への組み込み、5) RNA 合成、6) 蛋白質合成、7) アセンブリー・放出、8) 成熟といった各段階を経る。一方、レトロウイルスのゲノム配列が生殖系細胞の染色体中にプロウイルスとして組み込まれている場合には、動物の繁殖によって子孫に受け継がれる。

野生型 MoMLV がヒト細胞に感染することはない。ヒト細胞に感染可能なエンベロープ蛋白質 (env 蛋白質) [例えば、4070A アンフォトロピック env 蛋白質、gibbon ape leukemia

virus (GaLV) env 蛋白質] を持つ MoMLV を人為的に作製した場合にはヒトへの感染が可能である。

(5) 病原性 (文献8)

MoMLV の病原性に関して、下記のことが報告されている。

- 1) MoMLV は、マウスに悪性腫瘍を含む多様な疾患を発生させる。
マウスで起こる疾病・病態としては、白血病、リンパ腫、貧血、免疫不全、腫瘍及び神経変性が知られている。
- 2) レトロウイルスはランダムに宿主染色体に挿入されるため、細胞機能に重要な遺伝子を活性化又は不活化し、がん性の変化をもたらす危険性がある。
- 3) 内在性ウイルスとの組換えにより増殖性レトロウイルス (replication competent retrovirus: RCR) が出現する可能性がある。
- 4) MoMLV はマウスやラットにのみ感染するので、ヒトに対する感染性及び病原性はない。
- 5) 感染により宿主細胞が破壊されることはない。

(6) 有害物質の産生性

MoMLV が有害物質を産生することはない、また、MoMLV に感染したことにより細胞が有害物質の産生能を獲得するとの情報はない。

(7) その他の情報

1) MoMLV の不活化条件

MoMLV と同じレトロウイルス科に属するヒト免疫不全ウイルス (HIV) の滅菌、消毒法として、①121℃、20 分間の蒸気滅菌、②170℃、2 時間の乾熱滅菌、③20～30 分間の煮沸消毒、④有効塩素濃度 0.1～1.0%の次亜塩素酸ナトリウム、⑤70%エタノール又は 70%イソプロピルアルコール、⑥3.5～4%ホルマリン、⑦2%グルタール、が有効である (文献9)。また、10%及び 1%ポピドンヨード液 (文献10)、0.3%過酸化水素水 (文献11) で不活化が可能との報告がある。

紫外線及び熱による液体中の MoMLV 及び HIV の不活化を比較した研究によると (文献12)、MoMLV を 1/10 まで不活化するのに必要な紫外線照射量 (D_{10}) は $2,800 \text{ erg/mm}^2$ であり、熱処理時間 (T_{10}) は 50℃では 50 秒、55℃では 20 秒、70℃では 8 秒である。したがって、55℃、2 分間又は 70℃、50 秒間の熱処理により、MoMLV の感染価を $1/10^6$ に低下させることができると考えられる。また、50℃における T_{10} が 80～90 秒であるとの報告もある (文献13)。

マウス由来のウイルス産生細胞により産生されたレトロウイルスベクターが仮にヒト体内に侵入したとしても、ヒト血清 (補体) により速やかに不活化される (文献14)。抗

α -galactosyl 自然抗体を有する旧世界ザル（文献15）の体内に侵入したときにも同様のメカニズムにより不活化される（文献16）と考えられる。

2) MoMLV からの、増殖能欠損型レトロウイルスベクターの構築

本遺伝子組換え生物は増殖能欠損型レトロウイルスベクターである。野生型 MoMLV のゲノムから gag、pol 及び env 遺伝子を除去するとともにネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo)が挿入されたゲノムを持つ増殖能欠損型レトロウイルスベクターLXSN（文献17）が構築された。LXSN 作製に使用される pLXSN の塩基配列は、NCBI Nucleotide M28248 に登録されている。本遺伝子組換え生物は、LXSN のゲノムから neo の大半が除去され、HSV-TK 遺伝子及び Δ LNGFR 遺伝子が挿入されたゲノムを持つ。

文献6：遺伝子治療開発研究ハンドブック 第3章、第2節、1.1 レトロウイルスの増殖サイクル (p. 322)

文献7：Levy JA and Fieldsteel AH. Freeze-drying is an effective method for preserving infectious type C retroviruses. J Virol Methods 5:165-171, 1982.

文献8：遺伝子治療開発研究ハンドブック 第6章、第2節、1. ウイルスベクターの安全性 (p. 627)

文献9：日本ウイルス学会．ウイルス研究におけるバイオセーフティ指針．ウイルス 43:199-232, 1993.

文献10：加藤真吾、平石佳之、富永恵子、他．プラーク法を用いた各種消毒剤による HIV-1 不活化の検討．基礎と臨床 30:3615-3620, 1996.

文献11：Martin LS, McDougal JS, and Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. J Infect Dis 152:400-403, 1985.

文献12：Yoshikura H. Thermostability of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in a liquid matrix is far higher than of an ecotropic murine leukemia virus. Jpn J Cancer Res 80:1-5, 1989.

文献13：Yoshikura H. Ultraviolet sensitivity of helper function of murine leukemia virus. Arch Biochem Biophys 154:76-83, 1973.

文献14：Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, Okada H, Weiss RA, and Collins MK. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. J Virol 68:8001-8007, 1994.

文献15：Galili Uri, Tanemura M. Significance of α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) Epitopes and α 1,3 Galactosyltransferase in Xenotransplantation. Trends Glycosci Glycotechnol 11:317-327, 1999.

文献16：Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, et al. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti- α -galactosyl natural antibody. J Exp Med 182:1345-1355, 1995.

文献17：Miller AD and Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Biotechniques 7:980-991, 1989.

II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1 供与核酸に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

本遺伝子組換え生物のゲノムを構成する供与核酸は HSV-TK 遺伝子、Simian virus 40 (SV40) 初期プロモーター、 Δ LNGFR 遺伝子、5'-long terminal repeat (LTR)、パッケージングシグナル (Ψ) の前半、3'-LTR の R 領域、neo の断片及び制限酵素認識部位等の人工配列である。本遺伝子組換え生物のゲノムの構成と、その配列を DNA 配列に変換したものの制限酵素地図を※別紙 2 に示す。また、供与核酸の塩基配列及び蛋白質をコードするものについてはそのアミノ酸配列を※別紙 1 に示す。

※注 別紙は、企業情報が含まれるため非開示とする。

1) HSV-TK 遺伝子

HSV-TK 遺伝子は、単純ヘルペスウイルス 1 型—チミジンキナーゼの遺伝子であり、1981 年、Wagner らによりヒト単純ヘルペスウイルス 1 型の CL101 株由来の遺伝子配列が明らかにされている（文献18）。本遺伝子組換え生物のプロウイルス（但し、3'-LTR の R 領域は MoMLV 由来）である SFCMM-3 DNA 中の HSV-TK 遺伝子は単一エクソンからなり、376 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 1,128 塩基対と TAG を終止コドンとする 1,131 塩基対で構成されている。

本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において、HSV-TK 遺伝子は 5'-LTR から転写される。レトロウイルスが細胞に感染して染色体に組み込まれると、3'-LTR 由来の U3 領域と 5'-LTR 由来の R 及び U5 領域からなる LTR がプロウイルス DNA の両端に配置される。したがって、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において、MoMLV LTR 由来の U3 領域が HSV-TK 遺伝子のプロモーターとして機能する。このプロモーターは多くの種類の細胞において構成的に機能する。

2) SV40 初期プロモーター

SV40 はパポバウイルス科のポリオーマウイルス属に属するウイルスであり、ゲノムは環状 2 本鎖 DNA である。SFCMM-3 DNA 中の SV40 由来 DNA は 328 塩基対であり、上流側から順に、72 塩基対のエンハンサー配列（2 回繰り返す）、21 塩基対の 3 回繰り返す構造（6 箇所の Sp1 結合配列を含む）及び TATA ボックスからなる SV40 初期プロモーターを含んでいる。

3) Δ LNGFR 遺伝子

Δ LNGFR 遺伝子は、細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体をコードする遺伝子である（文献19、20、21）。ヒト低親和性神経成長因子受容体（LNGFR）遺伝子は、1986 年 Johnson らによってヒトメラノーマ細胞株 A875 から単離された（文献 19）。LNGFR 遺伝

子は427アミノ酸からなるポリペプチドをコードする1,281塩基対と終止コドンTAGより成り立っており、LNGFR前駆体は、N末端から順に、28アミノ酸からなるシグナルペプチド、細胞外ドメインとして6個のシステイン残基を有する40アミノ酸からなるポリペプチドの4回繰り返し配列、セリン／スレオニンリッチ領域、1回膜貫通領域、及び155アミノ酸からなる細胞内領域を有している。SFCMM-3 DNAに含まれるΔLNGFR遺伝子は、LNGFR遺伝子を制限酵素 Sst I 及び Pvu II で処理して細胞内領域をコードする塩基対を除去した940塩基対のフラグメントをpUC19のSma Iサイトにサブクローニングして終止コドンを導入したもので、開始コドンATGの上流に113塩基対の非翻訳領域(UTR)を有し、細胞外ドメイン及び細胞膜貫通領域の280アミノ酸からなるポリペプチドをコードする956塩基対の遺伝子である。

4) 5'-LTR、Ψの前半及び3'-LTRのR領域

これらはモロニー Maus 肉腫ウイルス (MoMSV) 由来である。I-3-(7)-2「MoMLVからの、増殖能欠損型レトロウイルスベクターの構築」に記載したとおり、SFCMM-3 DNAではN2 DNAの5'-LTRからΨの前半にかけての部分がMoMSV由来の配列で置換されており、その結果、産生細胞により産生される本遺伝子組換え生物のゲノムの5'-LTR、Ψの前半及び3'-LTRのR領域がMoMSV由来となる。これらの機能はI-3-(4)「繁殖又は増殖の様式」に記載したとおりである。なお、これらの部分をMoMSV由来の配列で置換してもウイルスタイターやパッケージング効率は影響を受けないことが報告されている(文献22)。

5) neoの断片

大腸菌 Tn5 由来の neo は264アミノ酸からなる蛋白質をコードし、ネオマイシン耐性遺伝子として機能する。本遺伝子組換え生物のゲノムには neo のうちC末端部分の53アミノ酸をコードする161塩基の配列、終止コドン及び17塩基からなる3'-UTRが含まれる。

6) 制限酵素認識部位等の人工配列

SFCMM-3 DNA 構築の過程で挿入された制限酵素認識部位等の人工配列は※別紙1-6に示すとおりであり、本遺伝子組換え生物のゲノム中での位置を※別紙2に示す。

(2) 構成要素の機能

1) HSV-TK 遺伝子

HSV-TK 遺伝子は、ウイルス特有のチミジンキナーゼであり、376アミノ酸からなるHSV-TKをコードしている。HSV-TKの基質特異性はヒト細胞が有するチミジンキナーゼとは異なり、グアノシンの類似物質であるアシクロビル(ACV)やガンシクロビル(GCV)をリン酸化する活性を有する(文献23、24)。ACVやGCVは生物活性が低いプロドラッグ(prodrug)と呼ばれ、これらを基質とするキナーゼを発現していない細胞に対しては毒

性を示さないが、ウイルス感染や HSV-TK 遺伝子導入等により HSV-TK が発現している細胞では ACV や GCV がリン酸化され（一リン酸化物）、さらには内在性のグアニル酸キナーゼとチミジンキナーゼにより二、三リン酸化物へと変換される。この最終産物である三リン酸化物が DNA ポリメラーゼ阻害や DNA 伸長障害を引き起こすことで細胞に強い障害を与え、最終的に細胞を死に至らせる。このように HSV-TK は ACV や GCV との組み合わせにより生物活性を示す特異的な酵素であり、HSV-TK 遺伝子は自殺遺伝子と呼ばれる。HSV-TK はウイルス由来の蛋白質であるためヒトに対して免疫原性を有しており、本遺伝子組換え生物又はこれと類似のレトロウイルスベクター SFCMM-2 (HSV-TK/neo 融合蛋白質の遺伝子を持つ) による遺伝子導入 T リンパ球が白血病患者に輸注された結果、8 例中 3 例 (SFCMM-2) 又は 15 例中 4 例 (本遺伝子組換え生物) において、HSV-TK に特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導が確認されている (文献25)。

2) SV40 初期プロモーター

多くの細胞において構成的に機能するプロモーターであり、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入した細胞においては Δ LNGFR 遺伝子の転写を行う。

SV40 初期プロモーター配列中には、23 アミノ酸から成る early leader protein (SELP) をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれる。SV40 を感染させた培養細胞において SELP と同等の分子量を有する蛋白質の発現が確認されており (文献26)、類縁のウイルスにも保存されていることから重要な機能を有することが示唆されるが、その機能についてはほとんど知られていない (文献27)。なお、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入した細胞における SELP の発現の有無に関しては不明である。

3) Δ LNGFR 遺伝子

LNGFR は神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) に対する受容体であり、膜貫通型の蛋白質である。LNGFR は主に神経系細胞において発現しており、このほかに筋肉、精巣で発現しているが、ほとんどの造血系細胞では発現していない (文献28)。Tropomyosin related kinase (Trk) と結合することで高親和性の神経成長因子受容体を形成すると報告されており、LNGFR 単独では NGF の刺激を細胞内に伝達することはない (文献29)。SFCMM-3 DNA がコードする Δ LNGFR は LNGFR の細胞内領域を欠損させたものであり、 Δ LNGFR を発現する細胞に抗 LNGFR 抗体を加えても細胞内に刺激が伝達されることはない。

4) 5'-LTR、 Ψ の前半及び 3'-LTR の R 領域

これらの供与核酸は MoMSV 由来であるが、MoMLV の相同配列と同等の機能を有していると考えられる。5'-LTR 及び 3'-LTR はウイルスゲノムの細胞染色体への組込みに必須である。また、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において、プロウイルスの 5'-LTR は HSV-TK 遺伝子の転写を行う。 Ψ は、産生細胞において本遺伝子組換え生物のゲ

ノム RNA がウイルス粒子にパッケージングされる際に必須である。

5) neo の断片

本遺伝子組換え生物のゲノムにおいて、neo の断片の上流には同じ読み枠に終止コドンが存在するので、翻訳されることはないと考えられる。また、仮に翻訳されたとしても、野生型 neo が 264 アミノ酸からなる蛋白質をコードしているのに対して、本断片は 53 アミノ酸をコードするだけなので、機能を有する蛋白質を発現する可能性は非常に低いと考えられる。

6) 制限酵素認識部位等の人工配列

本遺伝子組換え生物の生物学的機能には影響を及ぼさないと考えられる。

7) SFCMM-3 DNA 中の有害配列の有無

SFCMM-3 DNA の全塩基配列中の有害配列（がん遺伝子、有害物質、トキシン）の有無について相同性の検索を行ったところ、有害配列は見当たらなかった。

- 文献18 : Wagner MJ, Sharp JA, and Summers WC. Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1441-1445, 1981.
- 文献19 : Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgel A, Morgan C, Mercer E, Bothwel M, and Chao M. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47:545-554, 1986.
- 文献20 : Hempstead BL, Patil N, Thiel B, and Chao MV. Deletion of cytoplasmic sequences of the nerve growth factor receptor leads to loss of high affinity ligand binding. *J Biol Chem* 265:9595-9598, 1990.
- 文献21 : Mavilio F, Ferrari G, Rossini S, Nobili M, Bonini C, Casorati G, Traversari C, and Bordignon C. Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood* 83:1988-1997, 1994.
- 文献22 : Bender MA, Palmer TD, Gelinas RE, and Miller AD. Evidence that the packaging signal of Moloney Murine Leukemia Virus extends into the gag region. *J Virol* 61:1639-1646, 1987.
- 文献23 : Moolten FW and Wells JM. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 46:5276-5281, 1986.
- 文献24 : Reardon JE. Herpes simplex virus type 1 and human DNA polymerase interactions with 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate analogues: kinetics of incorporation into DNA and induction of inhibition. *J Biol Chem* 264:19039-19044, 1989.
- 文献25 : Bonini C, Grez M, Traversari C, et al. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med* 9:367-369, 2003.
- 文献26 : Khalili K, Brady J, Khoury G. Translational regulation of SV40 early mRNA

defines a new viral protein. Cell 48:639-645, 1987.

文献27 : Khalili K, White MK, Sawa H, et al. The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. J Cell Physiol 204:1-7, 2005.

文献28 : Casaccia-Bonofil P, Gu C, and Chao MV. Neurotrophins in cell survival/death decisions. Adv Exp Med Biol 468:275-282, 1999.

文献29 : Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, and Barbacid M. The trk protooncogene encodes a receptor for nerve growth factor. Cell 65:189-197, 1991.

2 ベクターに関する情報

(空欄)

3 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

本遺伝子組換え生物のゲノムの構成と制限酵素地図を※別紙2に示す。本遺伝子組換え生物のゲノムは1本鎖RNAであるが、※別紙2の制限酵素認識部位はDNA配列に変換したときのものである。本遺伝子組換え生物のゲノムの構成成分は、5'末端側から順に、5'-LTR、 Ψ 、HSV-TK 遺伝子、SV40 初期プロモーター、 Δ LNGFR 遺伝子、neo の断片及び3'-LTR である（詳細はII-1-(1)「構成及び構成要素の由来」及びII-1-(2)「構成要素の機能」を参照）。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

SFCMM-3 DNA はサンラファエル研究所（イタリア、ミラノ）において構築された。SFCMM-3 DNA 構築にあたっては、pLXSN [I-3-(7)-2]「MoMLV からの、増殖能欠損型レトロウイルスベクターの構築」参照（文献17）のHpa I 部位（MCS 内）にHSV-TK 遺伝子が、Hind III（SV40 初期プロモーターの下流）-Nae I（neo の内部）部位に Δ LNGFR 遺伝子が組み込まれた。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

1) パッケージング細胞株

SFCMM-3 DNA は、ウイルス粒子形成に必要な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、このDNAを通常の細胞に導入してもウイルス粒子を産生することはない。したがって、ウイルス粒子の産生にはパッケージング細胞が必要となる。本遺伝子組換え生物の産生細胞株の作製に使用したパッケージング細胞株は GP+envAm12（文献30）で、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を2種類のプラスミド（一方は gag と pol、他方は env 遺伝子）により別々に導入した細胞株である。古い世代のパッケージング細胞株と比較して、

このパッケージング細胞を使用した場合には RCR 出現のリスクが極めて少ないことが知られている。

2) ウイルス産生細胞株の作製

エコトロピックパッケージング細胞 GP+E-86 (文献31) に SFCMM-3 DNA をトランスフェクションし、培養上清を回収した。この培養上清をアンフォピックパッケージング細胞 GP+envAm12 に感染させることにより、レトロウイルスベクターSFCMM-3 産生細胞を作製した。本遺伝子組換え生物の産生性が高いクローンを選択し、シードセルとした。パッケージング細胞株である GP+envAm12 及び GP+E-86 の作製に用いられたパッケージングプラスミド中の、gag、pol、env 遺伝子の塩基配列及びコードする蛋白質のアミノ酸配列並びにこれらの遺伝子産物からプロセッシングにより生ずるウイルス構成蛋白質を※別紙 1 に示す。

シードセルからマスターセルバンク (MCB) を作製し、MCB からワーキングセルバンク (WCB) を作製した。MCB 及び WCB はモルメド社 (イタリア、ミラノ) において作製され、同社内の液体窒素保存容器において保管されている (品質試験の詳細を※別紙 3 に、MCB 及び WCB の監視計画を※別紙 4 に記載)。

3) 本遺伝子組換え生物の最終製品の製造・輸送

すべての製造はモルメド社の管理された製造エリアにて、GMP 遵守下で行われた。MCB 又は WCB を融解し、拡大培養及び生産培養を行うことにより本遺伝子組換え生物を含む培養上清を得、これを無菌ろ過して小分け分注することにより、本遺伝子組換え生物を有効成分とする TBI-0301 製剤を製造した。TBI-0301 製剤の各ロットについて、品質試験を実施する (※別紙 5)。

モルメド社において製造された TBI-0301 製剤は適切な拡散防止措置を執り、ドライアイス詰めで日本まで空輸し、タカラバイオ (株) 細胞・遺伝子治療センター (滋賀県草津市) において受入れ試験を実施する (※別紙 5)。合格した TBI-0301 製剤は同センター管理区域内の超低温フリーザーにて凍結保管する。

TBI-0301 製剤はタカラバイオ (株) から国立がんセンター中央病院 (以下、中央病院) に、適切な拡散防止措置を執り、ドライアイス詰めで輸送する。中央病院 12 階の施設可能な製剤保管室に設置した超低温フリーザーに保管する (当該治療施設の地図及び保管場所の概略図を※別紙 6 に示す)。

文献30 : Markowitz D, Goff S, and Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. Virology 167:400-406, 1988.

文献31 : Markowitz D, Goff S, and Bank A. A safe packaging line for gene transfer:

separating viral genes on two different plasmids. J Virol 62:1120-1124, 1988.

4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸は本遺伝子組換え生物のゲノム RNA の一部として存在する。凍結保管中は安定である。感染する動植物の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。

本遺伝子組換え生物が細胞に感染すると、移入した核酸を含むウイルスゲノム RNA は逆転写され、プロウイルスとして細胞染色体に組み込まれる。プロウイルスは細胞染色体の複製に伴って複製されるので、移入された核酸は細胞が生きているかぎり安定に保持される。

HSV-TK 遺伝子は MoMLV の LTR により、 Δ LNGFR 遺伝子は SV40 初期プロモーターにより転写される。これらのプロモーターは持続的に機能するので、両遺伝子の発現は構成的である。

本遺伝子組換え生物を製造する際に、ウイルス産生細胞の細胞内で本遺伝子組換え生物のゲノム、gag-pol 遺伝子断片及び env 遺伝子断片が相同組換えを起こし、RCR が出現する可能性がある。RCR の出現機構から、その大部分は gag、pol 及び env 遺伝子を持ち、HSV-TK 遺伝子及び Δ LNGFR 遺伝子を持たないものである（env 遺伝子は MLV 4070A 由来、LTR の一部は MoMSV 由来であり、これらは MLV の変異体と考えられるので遺伝子組換え生物等に該当しない）。しかし、HSV-TK 遺伝子又は Δ LNGFR 遺伝子を持つ RCR（遺伝子組換え生物等に該当）の出現する可能性は否定できない。

5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

1) 本遺伝子組換え生物の検出方法

本遺伝子組換え生物は宿主である MoMLV にはない HSV-TK 遺伝子を持つので、HSV-TK 遺伝子をリアルタイム RT-PCR 法で定量することにより本遺伝子組換え生物の検出が可能である。

2) 本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞の検出方法

細胞から調製したゲノム DNA を鋳型に、HSV-TK 遺伝子をリアルタイム PCR で定量することにより検出可能である。この方法による定量の下限は、遺伝子導入細胞の非導入細胞中の希釈率として 10^{-3} であることを確認している。

3) RCR の検出方法

- Mus dunni を用いた増幅法

Mus dunni 細胞に検体を添加し、5 回の継代培養を行う。この培養上清を PG-4 細胞に接

種し、S+L-アッセイを行う。この方法は増殖能を持つレトロウイルスを検出する方法であり、本遺伝子組換え生物に由来する RCR を特異的に検出するものではない。検出感度は 1 RCR/接種物であることを確認している。100 mL あたり 1 RCR が含まれる検体から 300 mL の被検試料をサンプリングして接種した場合、95%の確率で被検試料中に RCR が含まれ、検出される。

- RT-PCR 法

被検試料から RNA を調製し、4070A env 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物を検出する。本試験の感度は、パッケージング細胞の末梢血リンパ球中の希釈率として $10^{-4} \sim 10^{-5}$ であることを確認している。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

宿主である MoMLV と本遺伝子組換え生物の間には以下の相違点がある。

- 本遺伝子組換え生物は gag、pol 及び env 遺伝子を欠損しているため、本遺伝子組換え生物が感染した通常の細胞はウイルス粒子形成に必要な蛋白質を合成できない。したがって、本遺伝子組換え生物は gag、pol 及び env 遺伝子を発現する細胞においてのみ増殖できる。
- 本遺伝子組換え生物は HSV-TK 遺伝子及び SV40 初期プロモーターの支配下にある Δ LNGFR 遺伝子を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物が感染した細胞は HSV-TK と Δ LNGFR を発現する。
- MoMLV がマウス、ラット等のげっ歯類にだけ感染しうるのに対して、アンフォトロピック MLV 4070A はこれらのほか、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターの細胞にも感染するとの報告がある（文献32）。本遺伝子組換え生物はウイルス粒子表面に 4070A アンフォトロピック env 蛋白質を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物はマウス、ラット等に加えてヒト、サル、イヌ等、幅広い動物種の細胞に本遺伝子組換え生物の核酸を伝達しうる。

本遺伝子組換え生物が自立的増殖能を欠損している点を除いて、I-3「生理・生態学的特性」に記載した性質は同等であると考えられる。

遺伝子組換え生物等に該当するものを含めて、本遺伝子組換え生物由来の RCR が感染可能な生物種は宿主である MoMLV のそれと異なっているものの、感染様式、病原性及び挿入変異の可能性などの、生物多様性に影響を及ぼす程度に大きな違いはないと考えられる。

文献32 : Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene

transfer. Proc Natl Acad Sci USA 93:11407-11413, 1996.

III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1 使用等の内容

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

2 使用等の方法

- (1) 本遺伝子組換え生物溶液は、容器に密封され、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の施錠可能な保管室内の冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 レベルの拡散防止措置を執ることができる細胞調製室（以下、細胞調製室という）内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。ドナーリンパ球への本遺伝子組換え生物導入操作、本遺伝子組換え生物導入細胞の培養その他の本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取扱いも同様に細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈溶液若しくはその凍結品又は本遺伝子組換え生物導入細胞を開放系区域を通して他の P2 レベル区域に運搬する場合には、密閉した容器に入れ、容器の落下や破損を防止するために当該容器を箱等に入れ運搬する。
- (3) 本遺伝子組換え生物溶液（希釈液も含む）又は本遺伝子組換え生物導入細胞を廃棄する際には、滅菌処理を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。
- (4) 医療廃棄物管理規程は以下の内容を含むものであり、治療施設において承認してこれを定めるものとする。
- 6) 治療施設は年度単位の廃棄物処理計画書を策定し、職員に周知する。廃棄物処理計画書には、廃棄物の発生状況、分別方法、治療施設内の収集及び運搬方法、治療施設内で行う滅菌及び消毒の範囲、梱包方法、保管方法、業者に処理委託する場合の手続き及び緊急時の連絡体制を含める。
- 7) 治療施設は処理に関する報告書を作成し、5 年間保存する。
- 8) 感染性廃棄物の処理は、次のとおり行う。
 - e) 感染性廃棄物はその他の廃棄物と分別するとともに、運搬容器に収納密閉し排出するものとする。
 - f) 感染性廃棄物の収集運搬及び保管は、途中で内容物が飛散することがないように容器で行うものとし、液体を含むものは、その内容物が漏洩しないよう密閉容器を使用

するものとする。また、これらが腐敗し又は悪臭を発しないような措置を執るものとする。

g) 鋭利廃棄物の収集運搬及び保管には、刺傷事故等の危険を防止するために貫通性のない堅牢な容器を使用する。

h) 感染性廃棄物の梱包物及び保管は極力短期間とし、保管場所には関係者以外の立入りができないように配慮するとともに他の廃棄物と区分して保管するものとする。また、保管場所には関係者の見やすい場所に感染性廃棄物が保管されていること及びその取扱い上の注意事項を記載し表示するものとする。

9) 感染性廃棄物を収納した運搬容器には、バイオハザードマークを貼付表示するものとする。

10) 感染性廃棄物の処理を自ら行わず業者に処理委託する場合は、廃棄物処理法に基づき都道府県知事により感染性廃棄物処理の許可を受けた業者であることを確認のうえ委託契約を行うものとする。なお、受託業者はその業務を他の業者へ再委託しないものとする。

(5) 患者に対する遺伝子導入細胞の投与は、室圧が陰圧に管理され、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「陰圧の個室」という）内において、輸注により行う。なお、投与時に本遺伝子組換え生物導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具は使い捨てとし、使用後、陰圧の個室内で適切に消毒を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。

(6) 投与後 3 日まで、患者を陰圧の個室内で管理し、検査等の理由で患者が一時的に陰圧の個室外の開放区域に出る場合には、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。陰圧の個室における管理期間中の患者の血液及び体液は、その都度適切に消毒を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また患者の尿及び糞便等の排泄物は、投与翌日以降に行われる患者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法試験にて自己増殖能を獲得したレトロウイルス（以下「RCR」という）の存在が否定されるまで、陰圧の個室内で適切に消毒を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、臨床検体として使用する患者の血液、体液、排泄物等の取扱いは、本遺伝子組換え生物溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取扱いに準じる。

(7) 陰圧の個室における管理期間中、患者に対して侵襲的に使用した器具及び患者の血液、体液、排泄物等に接触した器具等は、陰圧の個室内で適切に消毒を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄するか、又は陰圧の個室内でじゅうぶんに洗浄する。

(8) 陰圧の個室における患者の管理を解除する前に、RCR が患者の末梢血単核球 (PBMC) 及び血漿において陰性であることを確認する。RCR が検出されたときは、陰圧の個室における管理を継続する。

(9) 陰圧の個室における管理解除後に患者の PBMC 又は血漿から RCR が検出された場合は、直ちに患者を陰圧の個室における管理下に移し、上記(6)から(8)までと同様の措置を執る。

※別紙 7：本遺伝子組換え生物を取り扱う区域の平面図

※別紙 8：国立がんセンター中央病院医療廃棄物管理規程

※別紙 9：医療廃棄物適正管理処理マニュアル

3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

遺伝子導入細胞を患者に投与した後、患者の末梢血単核球 (PBMC) 及び血漿を試料として、4070A env 遺伝子に対する RT-PCR 法により RCR のモニタリングを実施する。RCR のモニタリングは、陰圧の個室における管理解除前、投与 14 日後、28 日後、56 日後及び 84 日後並びに生存中にわたり 1 年ごとに実施する。

4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

本遺伝子組換え生物を用いた遺伝子導入細胞は、P2 レベルの拡散防止措置を執ることが出来る細胞調製室において、第一種使用規程に従い調製される。本遺伝子組換え生物が細胞調製室の床等に漏出した場合には、ただちにペーパータオル、布等で拭き取る。拭き取った後は、消毒用エタノールを当該箇所が完全に覆われるまで噴霧して 1 分以上放置し、ペーパータオル、布等で拭き取ることにより本遺伝子組換え生物を不活化する。当該ペーパータオル、布等は 121℃、20 分間以上オートクレーブにより滅菌した後、廃棄する。以上により、本遺伝子組換え生物が環境中に漏出して生物多様性影響が生じることはないと考えられる。

陰圧の個室における管理解除後の患者の PBMC 又は血漿において RCR が検出された場合には、第一種使用規程に従い患者を直ちに陰圧の個室における管理下に移すとともに、血液及び体液の消毒等、第一種使用規程に定められた措置を執る。

5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

TBI-0301 製剤を用いて、国立がんセンター中央病院において前臨床研究として 5 回の遺伝子導入を行った。RT-PCR 法による RCR 試験を 5 回すべての遺伝子導入細胞最終産物について、また、Mus dunni 細胞を用いた増幅法による RCR 試験をそのうち 2 回の遺伝子導入細胞最終産物及びその培養上清について行った。その結果、すべて RCR 陰性であった。

このようにして調製した遺伝子導入細胞を免疫不全マウス（NOG マウス）に投与したところ、毒性は極めて少ないことが示唆された。

筑波大学附属病院において、本遺伝子組換え生物を用いた同様の遺伝子治療臨床研究が実施されている。5 例の患者に遺伝子導入細胞が投与されたが、RCR の発生は報告されていない。また、当該臨床研究においては、挿入変異によるがん化等、本遺伝子組換え生物による核酸の伝達が原因と考えられる有害事象は報告されていない。

6 国外における使用等により得られた情報

モルメド社において、現在 TBI-0301 製剤の製造に使用されている MCB の 1%細胞及び 5%上清について、Mus dunni 細胞を用いた増幅法による RCR 試験を含む品質試験が行われた。この結果、いずれも品質規格を満たし、RCR 陰性であった。

モルメド社において、TBI-0301 製剤と同様の方法により、治験薬としての生産スケールで独立に製造された 3 ロットの本遺伝子組換え生物製剤及びそれらの生産培養終了時点の細胞（EPC）について、Mus dunni 細胞を用いた増幅法による RCR 試験を含む品質試験が行われた。この結果、すべてのロットは品質規格を満たし、RCR 陰性であった。

モルメド社において、TBI-0301 製剤と同様の方法で製造された本遺伝子組換え生物製剤による遺伝子導入細胞調製のバリデーションの目的で、4 バッチの遺伝子導入細胞が試験製造され、RT-PCR 法による RCR 試験を含む品質試験が行われた。その結果、すべてのバッチは品質規格を満たし、RCR 陰性であった。また、遺伝子治療臨床試験のために 3 バッチの遺伝子導入細胞が調製され、RT-PCR 法による RCR 試験を含む品質試験が行われた。その結果、すべてのバッチは品質規格を満たし、RCR 陰性であった。

本遺伝子組換え生物を用いた遺伝子治療の臨床研究及び治験がイタリア、イギリス及びイスラエルで実施され、合計 40 例の患者に遺伝子導入細胞が投与されたが、RCR の発生は報告されていない。また、挿入変異によるがん化等、本遺伝子組換え生物による核酸の伝達が原因と考えられる有害事象は報告されていない。

IV 生物多様性影響評価

1 他の微生物を減少させる性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR はアンフォトロピック env 蛋白質を持つので、広範囲の動物に感染しうるが、微生物への感染性は知られていない。したがって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当せず。

(3) 影響の生じやすさの評価

該当せず。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

2 病原性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR はアンフォトロピック env 蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピック MLV 4070A と同様、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターを含む広範囲の動物に感染しうる。したがって、これらの生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物はヒト、イヌ、サル等の細胞への挿入変異によってがん化を引き起こす可能性がある。マウス、ラットに対する病原性は宿主と同等であると考えられる。

本遺伝子組換え生物からの発現産物である HSV-TK は、GCV や ACV 等のプロドラッグが存在するときのみ感染した細胞で自殺装置として機能する。これらのプロドラッグは自然界に存在しないので、HSV-TK 遺伝子が自然界で自殺機能を示すことはない。また、発現産物である ΔLNGFR は細胞内領域を欠損しているので NGF のシグナルを細胞内に伝達することはなく、ΔLNGFR 遺伝子を導入したリンパ球の増殖に NGF は影響を及ぼさなかった。

との報告がある(文献 25)。したがって、これらの導入遺伝子が発現することにより、本遺伝子組換え生物がヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。

本遺伝子組換え生物が有害物質を産生することはなく、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞が有害物質の産生能を獲得するとの情報もない。したがって、有害物質の産生により病原性を示すことはないと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物がドナーリンパ球とともに患者に投与されることによって当該施設外に出る可能性は極めて低く、出たとしてもごく微量である。また、I-3-(7)「その他の情報」に記載したように、マウス由来の産生細胞により産生された本遺伝子組換え生物はヒト血清により速やかに不活化される(文献 14)。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しているので、通常の細胞に感染してもウイルス粒子を産生することはない。

一方、本遺伝子組換え生物の製造工程中に出現した RCR がドナーリンパ球に混入して患者に輸注された場合には患者体内で RCR が産生される可能性がある。しかし、本遺伝子組換え生物は RCR 出現の可能性が極めて低い第3世代のパッケージング細胞を使用して製造されているうえに、TBI-0301 製剤及び遺伝子導入細胞の RCR 陰性を確認してから使用するので、患者体内に RCR が侵入する可能性は極めて低い。また、RCR 試験で検出されなかった RCR が万一患者体内に侵入したとしても、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、RCR が環境中に放出される可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずる可能性の有無等の判断

よって、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR の有害物質の産生性は知られていない。したがって、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当せず。

(3) 影響の生じやすさの評価

該当せず。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

4 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及びRCRはアンフォトロピック env 蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピック MLV 4070A と同様、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターを含む広範囲の動物に感染しうる。したがって、これらの生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物又は遺伝子組換え生物等に該当する RCR によってこれらの遺伝子組換え生物の核酸が野生動物のゲノム中に組み込まれる可能性がある。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物がドナーリンパ球とともに患者に投与されることによって当該施設外に出たとしてもごく微量である。ごく微量の本遺伝子組換え生物によって野生動物に核酸が伝達される可能性は非常に低い。

遺伝子組換え生物等に該当する RCR が多量に出現した場合には、血液、体液等を通じて他の個体に RCR が感染し、その核酸が伝達される可能性が否定できないが、RCR 出現の可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずる可能性の有無等の判断

よって、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

5 その他の性質

核酸を垂直伝達する性質

本遺伝子組換え生物が感染可能な野生動物等の生殖系細胞のゲノム中に組み込まれて、核酸を垂直伝達する可能性は完全には否定できない。しかし、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物によりその核酸が野生動物に伝達される可能性は非常に低い。RCR が出現しないかぎり、本遺伝子組換え生物の核酸が伝達される細胞は本遺伝子組換え生物が最初に感染した細胞に限られ、その細胞が生殖系細胞である確率は低い。また、RCR が出現する可能性は極めて低い。以上から、本遺伝子組換え生物又は RCR の核酸が生殖系細胞に伝達される可能性は極めて低い。よって、核酸を垂直伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動物種は4070Aアンフォトロピック env 蛋白質によって規定されるため、げっ歯類及びヒトを含む広範囲の動物であり、野生型アンフォトロピック MLV 4070A と同じである。自然界で植物及び微生物に感染することはないと考えられる。

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしても、その量は検出レベル以下であると推定される。導入された HSV-TK 遺伝子及び Δ LNgFR 遺伝子が発現することにより、本遺伝子組換え生物がヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しているため、MLV の感染等により gag、pol 及び env 遺伝子を発現している細胞に感染した場合を除いて増殖することはない。MLV に感染しているマウスに本遺伝子組換え生物が感染すれば、MLV がヘルパーとなって増殖する可能性がある。しかしその場合でも、MoMLV は血液を介してのみ感染するので、本遺伝子組換え生物の感染が他個体に広がる可能性はほとんどない。ヘルパーを必要とする本遺伝子組換え生物が野生型 MoMLV と同等に増殖することはないので、やがて環境中から消滅すると考えられる。

環境中でマウスに感染し、MLV ゲノムとの相同組換えによって RCR が出現する可能性や、当該第一種使用によって極めて微量の本遺伝子組換え生物由来 RCR が環境中に放出される可能性は完全には否定できないが、RCR の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は MLV と同等である。ヒトに MLV が感染しても病原性は報告されておらず、RCR がヒト体内に侵入しても、血清中の補体により急速に失活することを考慮すると、ヒト及び他の哺乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

したがって、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物による生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。