

岡山大学医学部・歯学部附属病院の 遺伝子治療臨床研究に係る第一種使用規程について

- 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に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P 1
(遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会)
- 遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会委員名簿・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P 3
- 第一種使用規程承認申請書・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P 4
- 生物多様性影響評価書・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P 7

平成 19 年 11 月 26 日

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
法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について

遺伝子治療臨床研究に係る
生物多様性影響評価に関する
作業委員会 委員長 吉倉 廣

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（平成 15 年法律第 97 号）に基づき申請のあった下記の遺伝子組換え生物等の第一種使用規程について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. ヒトインターロイキン-12 遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型（Adv/IL-12）
申請者：岡山大学医学部・歯学部附属病院 病院長 森田 潔
申請日：平成 18 年 7 月 18 日

【作業委員会の評価結果（岡山大学医学部・歯学部附属病院）】

1. ヒトインターロイキン-12 遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型 (Adv/IL-12)
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
申請者：岡山大学医学部・歯学部附属病院 病院長 森田 潔
(1) 生物多様性影響評価の結果について
① 他の微生物を減少させる性質 申請されている第一種使用規程に従った使用を行うかぎり Adv/IL-12 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。 さらに、Adv/IL-12 は増殖能を失っていることから、野生型アデノウイルス (Adv) との共感染がないかぎり環境中で増殖することはない。 したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり Adv/IL-12 は環境中に拡散したとしても比較的早期に消滅すると考えられる。 Adv/IL-12 及びそれに由来する増殖能を獲得したウイルス (RCA) が感染する動植物等の種類は野生型ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) と同等で、これらのウイルスが微生物に感染するとの報告はない。ヒトインターロイキン-12 (IL-12) 遺伝子を発現すること及び非増殖性であること以外は、その他の特性についても Adv/IL-12 は野生型 Ad5 と同等と考えられ、Adv/IL-12 及び RCA が競合等で他の微生物を減少させる性質はないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
② 病原性 Adv/IL-12 及び RCA が感染する動植物等の種類は野生型 Ad5 と同等で、ほ乳動物に感染するが、自然界ではヒト以外の動植物及び微生物に感染するとの報告はない。また、RCA が生じるためには野生型 Adv との共感染が必要であり、その起こり得る可能性は Adv/IL-12 を投与された被験者が野生型 Adv に感染した場合のみである。 一方、これまで Adv/IL-12 を含む非増殖性の遺伝子組換え Ad5 が国内外で使用されているが、環境への悪影響及び野生型 Ad5 を超える病原性を示したとする報告はない。また、Adv/IL-12 が感染したほ乳動物では一過性に感染細胞で IL-12 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによるヒトへの病原性は知られていない。アデノウイルスの副作用で問題となる非特異的免疫反応を引き起こす IL-6 がヒト腎臓細胞で大腸菌感染存在下では IL-12 により上昇するとの報告があるが、Adv/IL-12 投与時は大腸菌感染に特別な注意を払い、大腸菌感染存在下という環境を極力避けることにより、IL-12 によるアデノウイルス副作用の増悪の事態は十分避けられると考えられる。 したがって、Adv/IL-12、RCA いずれも野生型 Ad5 を超える病原性は示さないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
③ 有害物質の産生性 Adv/IL-12 の有害物質の産生性は知られておらず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
④ 核酸を水平伝達する性質 自然界では野生型 Ad5 がヒト以外の動植物及び微生物に感染するとの報告はない。したがって、Adv/IL-12 及び RCA の感染性は、野生型 Ad5 と同様、環境中ではヒト以外には感染しないと考えられる。Adv/IL-12 が感染したほ乳動物では一過性に感染細胞で Adv/IL-12 遺伝子を発現する可能性はあるが、これが他のほ乳動物個体へ水平伝達することは非常に考えにくい。 また、申請されている第一種使用規程に従った使用を行うかぎり Adv/IL-12 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。さらに、Adv/IL-12 は増殖能を失っていることから、野生型 Adv との共感染がないかぎり環境中で増殖することはない。したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり Adv/IL-12 は環境中に拡散したとしても比較的早期に消滅すると考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論 以上を踏まえ、Adv/IL-12 を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

厚生科学審議会科学技術部会遺伝子治療臨床研究作業委員会
遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会委員名簿

氏名	所属・役職
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	国立環境研究所生物多様性の減少機構の解明と保全プロジェクトグループ主任研究員
おざわ けいや 小澤 敬也	自治医科大学医学部教授
かんだ ただひと 神田 忠仁	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター長
ささづき たけひこ 笹月 健彦	国立国際医療センター総長
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学医学部教授
はやかわ たかお 早川 堯夫	独立行政法人医薬品医療機器総合機構顧問
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長
○ よしくら ひろし 吉倉 廣	厚生労働省医薬品食品局食品安全部企画情報課参与
わたなべ まこと 渡邊 信	筑波大学生命環境科学研究科教授

○委員長（五十音順 敬称略）

（平成19年4月1日現在）



第一種使用規程承認申請書

平成18年7月18日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

申請者 氏名 岡山大学医学部・歯学部附属病院
病院長 森田 潔
住所 岡山市鹿田町二丁目5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	ヒトインターロイキン-12 遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型 (Adv/IL-12)
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	<p>治療施設の所在地 岡山県岡山市鹿田町 2 丁目 5 番 1 号</p> <p>治療施設の名称 岡山大学医学部・歯学部附属病院</p> <p>(1) Adv/IL-12 溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。</p> <p>(2) 凍結状態の Adv/IL-12 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 実験室内の安全キャビネット内で行う。Adv/IL-12 希釈溶液の保管は、P2 実験室内の冷凍庫において行う。なお、Adv/IL-12 希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通過して他の P2 レベル区域に運搬する必要がある場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。</p> <p>(3) Adv/IL-12 溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化(0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液への 2 時間以上の浸漬による。)を行った後、本施設で定められている医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。</p> <p>(4) Adv/IL-12 希釈溶液を二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない手術部無菌室（以下「無菌室」という。）又は放射線部コンピュータ断層撮影装置室（以下「CT 室」という。）に運搬し、専用の CT ガイド下注入用穿刺針、注射器及びチューブからなるデバイス（以下「注入セット」という。）に充填し、注入用ポンプに装着する。</p> <p>(5) 被験者に対する Adv/IL-12 の投与は、内分泌療法中に再燃した前立腺がんの前立腺腫瘍内又は前立腺摘除術後の局所再発巣内については、無菌室内において超音波検査装置に装着された穿刺用ガイド装置を用いて、また、遠隔転移病巣内については、CT 室内において CT ガイド下注入用穿刺針を用いて、それぞれ Adv/IL-12 希釈溶液を注入することにより行う。</p> <p>(6) 被験者への Adv/IL-12 投与終了後、被験者の創部を消毒する。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験</p>

- 者を、無菌室又は CT 室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室（以下「個室」という。）に移送する。
- (7) 上記(5)及び(6)で用いた注入セット等の器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、穿刺用ガイド装置等は、ウイルス不活化（20w/v%グルタラル溶液による洗浄による。）を行い、再利用する。これらのウイルス不活化を無菌室又は CT 室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (8) 投与後 24 時間まで、被験者を個室で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に無菌室、CT 室又は個室から外の開放系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。
- (9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物（血液、体液、尿及び糞便等）は、ウイルス不活化（0.5%次亜塩素酸ナトリウムへの 2 時間以上の浸漬、高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。以下同じ。）を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、Adv/IL-12 溶液の取扱いに準ずる。
- (10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液及び尿中の Adv/IL-12 が陰性であることを確認する。Adv/IL-12 が確認されたときは、個室における被験者の管理を継続する。
- (12) 個室における被験者の管理の解除後に、遺伝子治療臨床研究実施計画書（前立腺癌に対する Interleukin-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究）に示す観察期間内に被験者の血液又は尿中から Adv/IL-12 が検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(8)から(11)までと同様の措置を執る。

生物多様性影響評価書

(区分：遺伝子治療臨床研究)

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

ヒトアデノウイルスはアデノウイルス科マストアデノウイルス属に分類されている (文献 1、2)。これまでに分離されたウイルスは、中和抗体を誘導する抗原性の違いで 51 の血清型に分けられており (文献 1、2)、ヒトインターロイキン-12 (IL-12) を発現する非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルスベクター (Adv/IL-12) はヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) を宿主として作製された。

Ad5 は 4 歳以下の乳幼児の多くに感染しており、咽頭及び糞便からウイルスが分離される (文献 2)。Ad1、2、5、6 に対する中和抗体保有率は 1~2 歳齢では 46.7~93.3% で、20 歳齢までに 100% に達している。 (文献 3)。自然環境において、ヒト以外の動物での増殖は報告されていない。実験室内では、コットンラット及びニュージーランドウサギへの経鼻接種でウイルス増殖が報告されている (文献 1)。

文献 1 : Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed.: Fields VIROLOGY fourth edition, pp.2265-2326, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)

文献 2 : 畑中正一編: ウイルス学, pp.198-208, 朝倉書店, 東京 (1997)

文献 3 : 水田克巳など: 山形県衛生研究所報, 32: 5-7 (1999)

2 使用等の歴史及び現状

Ad5 を生ワクチン等に使用した報告はない。Ad5 に由来するウイルスベクターが遺伝子治療で汎用されている (IV 章参照)。

3 生理・生態学的特性 (文献 1、2)

(1) 基本的特性

ウイルスキャプシドは直径 80 nm の正二十面体で、エンベロープはない。ゲノムは約 36 kb の 2 本鎖 DNA である。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染し、増殖する。培養細胞でも、ヒト由来の細胞でのみ効率よく増殖する。サル由来培養細胞で低レベルの増殖が起こる。経口感染することから推定されるように、室温で比較的安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

自然界では、ヒトでのみ増殖を伴う感染が起こる。

(4) 繁殖又は増殖の様式

Ad5 は、ヒトに経口感染し、増殖したウイルスは便と共に排泄される。

(5) 病原性

Ad5 の感染は不顕性に終わることが多いが、4 歳以下の乳幼児では急性熱性咽頭炎となる場合もある。いずれの場合も感染後に産生される中和抗体で再感染は阻止される。リンパ節に潜伏する例や小児の腸重積症に関わる可能性も指摘されている。

(6) 有害物質の産生性

Ad5 の感染で細胞内に産生されるたん白質等の毒性は報告されていない。

(7) その他の情報

Ad5 は 56℃、30 分の加熱で感染性を失う（文献 4）。

文献 4 : Bardell, D.: J. Clin. Microbiol. 4: 322-325 (1976)

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

ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (750bp)、IL-12 をコードする DNA (IL-12 遺伝子 ; p40 1080bp、p35 795bp、IRES 配列 : encephalomyocarditis virus 由来) 及び SV40 ポリ A 付加シグナルを宿主に導入した (供与核酸の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列などは別紙 1)。

(2) 構成要素の機能

CMV プロモーターは IL-12 遺伝子のみを転写させることになるため、IL-12 遺伝子が発現される。発現する IL-12 タンパク質は分子量約 70kDa (p70) の糖蛋白質で、1 個の分子内ジスルフィド結合により結ばれた分子量各 40kDa (p40) と 35kDa (p35) の互いに相同性のない 2 つのサブユニットより構成された異型二量体である。生物活性としては種々の免疫賦活能を有しており以下の活性が明らかにされている。①Natural killer (NK) 細胞、Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の誘導および細胞障害性の増強 (細胞障害性細胞への効果)、②CD4+ および CD8+ T 細胞 (リンパ系細胞) の増殖促進、③マクロファージ、NK/LAK 細胞、T 細胞からのサイトカイン (IFN- γ 、TNF- α など) 産生の促進、

④ナイーブ T 細胞(Th0)から Th1 細胞への分化誘導

CMV プロモーターの方向と E2 及び E4 遺伝子の向きは逆方向になるため、CMV プロモーター活性が E2 及び E4 遺伝子の転写を引き起こすことはない。また、SV40 ポリ A 付加シグナルにより転写が終了する。

これらの供与核酸の導入によって、Adv/IL-12 の感染性及び増殖性が Ad5 から変わることはないと考えられる。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

Adv/IL-12 は pCA3hIL12 及び pJM17 の 2 つのプラスミドより作製される。pCA3hIL12 は CMV プロモーターの転写制御下にあるヒト IL-12 のサブユニットである p40 及び p35 を発現させるプラスミドである。pCA3hIL12 は pJM17 プラスミドとヒト胎児腎由来 293 細胞中に共感染され、最終的な遺伝子組換えアデノウイルスベクター Adv/IL-12 が生成される (ベクターの構造は別紙 2)。

(2) 特性

pCA3hIL12 はアンピシリン耐性遺伝子を有する。

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

Ad5 の E1 領域を供与核酸と置換した (Ad5、Adv/IL-12 のゲノム構造概略図は別紙 3)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法 (別紙 2)

IL-12 サブユニット (p35、p40) はホルボール 12, 13-ブチレート (PDBU) 添加ヒトリンパ球細胞株 NC-37 (ATCC CCL214) より誘導する。p35、p40 の全シーケンスをコードした cDNA は RT-PCR 法により増幅し TA クローニングベクターに挿入、シーケンスする。シーケンスされた pTAp35 クローンと pTAp40 クローンはマンチェスター大学 Frank Graham 博士により供給されたアデノウイルスシャトルベクター (pCA3) にそれぞれ挿入する。このアデノウイルスベクターは E1 部位である 342 番目の塩基から 3523 番目の塩基までが欠損しており、供与核酸及びポリリンカーと置き換わっている。IL-12 遺伝子の発現は、CMV 直接初期遺伝子プロモーター (HMV IE) により転写され、SV40 ポリ A 付加シグナル (pA) によりポリアデニル化され、終結する。

この製造法は基本的に 3 段階であり、各段階において配位位置の確認、挿入シーケンスにおける欠損や変異がないことを確認する。第 1 段階として、レトロウイルスベクター pLN ϕ - ϕ (pLXSN GenBank アクセス番号 M28248、ヘンリーフォード病院医療センター Svend O. Ferytag 博士) から脳心筋炎ウイルス IRES シーケンスを BamH I、EcoR I 制限酵素を用いて取り出し、pCA3 プラスミドに挿入、pCA3IRES プラスミドを作製する。

第2段階として、p40 遺伝子の pCA3IRES プラスミドへの組込みのため、p40 遺伝子の両端を BamH I 切断部位にするようなプライマー（5'末端側：pTA40 ベクターに既にある BamH I 切断部位より p40 遺伝子 5'側 20 塩基まで、3'末端側：新たに付設する BamH I 切断部位を含む p40 遺伝子 3'側 20 塩基まで）を使用して pTAp40 ベクターより p40 遺伝子を PCR 法にて増幅した。この p40 遺伝子を含む PCR 産物をフラグメントのまま BamH I により切断し、pCA3IRES に挿入し pCA3p40IRES とした。第3段階としては pTAp35 を Spe I と Xho I 制限酵素により切断して p35 の切出しを行い、Spe I 及び Xho I 制限酵素により切断された pCA3p40IRES と結合させた。上記のようにしてヒト IL-12 cDNA のサブユニットである p40、p35 を含むプラスミド pCA3hIL12 が作製された。全挿入遺伝子はシーケンシングし、報告されている p35（Gen Bank LOCUS AF050083）と p40（Gen Bank LOCUS HSU89323）との相違がないことを確認した。全塩基配列も確認している。このプラスミドは、pJM17 プラスミドと 293 細胞中に共感染され、最終的な組換えアデノウイルスベクター Adv/IL-12 が生成される。（作製概略図は別紙 2）。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

Adv/IL-12 は Ad5 ウイルスの E1 領域を欠失している。E1A 及び E1B 遺伝子産物はウイルス DNA の複製に必要なので、これらの遺伝子を継続的に発現している 293 細胞を使って増殖させた。Adv/IL-12 の最終製品は米国 Baylor 医科大学細胞・遺伝子治療センターで製造した。製造工程には現行の米国 GMP 基準に従ってセルバンクシステム及びウイルスバンクシステムを用い、各バンクの品質管理は Food and Drug Administration (FDA) 基準に従った（各バンク及び最終製品の品質管理試験の詳細は別紙 4）。凍結した状態で日本へ輸送した最終製品は、岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子・細胞治療センター（P2 レベル）において受入れ試験を実施する（受入れ試験の詳細は別紙 5）。

最終製品は岡山大学医学部・歯学部附属病院中央診療棟 5 階遺伝子・細胞治療センターのベクター保存室内のディープフリーザーに施錠の上、保管する（当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙 6）。

また、マスターウイルスバンク、マスターセルバンク及びワーキングセルバンクは、すべて米国 Baylor 医科大学細胞・遺伝子治療センターに保管されている。

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 Adv/IL-12 の 2 本鎖 DNA ゲノムの一部として存在し、保管中は極めて安定で、感染する動植物等の種類及び感染様式が保管中に変化することはない（文献 5）。細胞に感染すると、Adv/IL-12 のゲノムは核内の染色体外に存在し、IL-12 遺伝子が転写される。IL-12 遺伝子の発現は一過性である（文献 5）。

Adv/IL-12 を 293 細胞で増殖させる過程で、293 細胞染色体に組み込まれている E1 遺伝子と Adv/IL-12 ゲノムの間で相同組換えが起こり、増殖能を獲得したウイルス（RCA）が生じる可能性がある。しかしその RCA はパッケージできるサイズを考慮すれば、ほぼ全ての供与核酸を失っていると考えられる。

文献 5 : Nasu, Y., et al.: Gene Ther. 6: 338-349 (1999)

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

Adv/IL-12 は宿主の Ad5 に存在しない IL-12 遺伝子を含むので、IL-12 遺伝子 DNA の一部を PCR で増幅、定量する方法で Adv/IL-12 を検出できる。先行した Adv/HSV-tk を用いた同様の前立腺癌遺伝子治療臨床研究（岡山大学実施）におけるアデノウイルスベクターの血中、尿中の検出結果（感度 100 コピー/ μ g）では、アデノウイルスベクター投与後血中では翌日、尿中では 2 日目に全例測定感度以下になっている（文献 6）。なお、投与前は全例測定感度以下であった（論文未発表）。Real-time PCR 法を用いた方法であり臨床応用性を含めた信頼性も実証された。本臨床研究にても同様の手法を採用するが類似した結果が予測される。

Adv/IL-12 由来の RCA はアデノウイルスに感受性をもつ細胞（ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞）を用いたバイオアッセイが一般的に行われており、この方法の検出感度及び信頼性は高く、FDA もこの検出方法を推奨している。

文献 6 : Nasu, Y, et al.: Molecular Therapy. 15: 834-840 (2007)

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

Adv/IL-12 は Ad5 の E1 領域の遺伝子を欠失しているため、これらの領域にコードされているウイルスタンパク質群を発現できない。E1A 及び E1B 遺伝子から作られるタンパク質はウイルス DNA の複製に必要なため（文献 1、2）、E1A 及び E1B 遺伝子を持続的に発現している細胞（例えば 293 細胞）や Ad5 と共感染した細胞でなければ Adv/IL-12 の増殖は起こらない。また、Adv/IL-12 では外来 CMV プロモーターから転写される IL-12 遺伝子が発現することになる（文献 5）。これらの点を除くと、Adv/IL-12 の感染する動物等の種類、感染経路、伝搬様式等は野生型 Ad5 とまったく同等である。

Adv/IL-12 由来の RCA は、ヒトや動物等への感染性、感染様式、病原性など、生物多様性に影響を与える性質は野生型 Ad5 と同等であると考えられる。

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

治療施設の所在地：岡山県岡山市鹿田町2丁目5番1号

治療施設の名称：岡山大学医学部・歯学部附属病院

- (1) Adv/IL-12 溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態の Adv/IL-12 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 実験室内の安全キャビネット内で行う。Adv/IL-12 希釈溶液の保管は、P2 実験室内の冷凍庫において行う。なお、Adv/IL-12 希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通過して他の P2 レベル区域に運搬する必要がある場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (3) Adv/IL-12 溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液への2時間以上の浸漬による。）を行った後、本施設で定められている医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。
- (4) Adv/IL-12 希釈溶液を二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない手術部無菌室（以下「無菌室」という。）又は放射線部コンピュータ断層撮影装置室（以下「CT 室」という。）に運搬し、専用の CT ガイド下注入用穿刺針、注射器及びチューブからなるデバイス（以下「注入セット」という。）に充填し、注入用ポンプに装着する。
- (5) 被験者に対する Adv/IL-12 の投与は、内分泌療法中に再燃した前立腺がんの前立腺腫瘍内又は前立腺摘除術後の局所再発巣内については、無菌室内において超音波検査装置に装着された穿刺用ガイド装置を用いて、また、遠隔転移病巣内については、CT 室内において CT ガイド下注入用穿刺針を用いて、それぞれ Adv/IL-12 希釈溶液を注入することにより行う。
- (6) 被験者への Adv/IL-12 投与終了後、被験者の創部を消毒する。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を、無菌室又は CT 室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室（以下「個室」という。）に移送する。
- (7) 上記(5)及び(6)で用いた注入セット等の器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、穿刺用ガイド装置等は、ウイルス不活化（20w/v%グルタラル溶液による洗浄による。）を行い、再利用する。これらのウイルス不活化を無菌室又は CT 室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (8) 投与後 24 時間まで、被験者を個室で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に無菌室、CT 室又は個室から外の開放系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。
- (9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物（血液、体液、尿及び糞便等）は、ウイルス不活化（0.5%次亜塩素酸ナトリウムへの2時間以上の浸漬、高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。以下同じ。）を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、Adv/IL-12 溶液の取扱いに準ずる。

(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液及び尿中の Adv/IL-12 が陰性であることを確認する。Adv/IL-12 が確認されたときは、個室における被験者の管理を継続する。

(12) 個室における被験者の管理の解除後に、遺伝子治療臨床研究実施計画書（前立腺癌に対する Interleukin-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究）に示す観察期間内に被験者の血液又は尿中から Adv/IL-12 が検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(8)から(11)までと同様の措置を執る。

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

被験者への Adv/IL-12 投与後、被験者体内で増殖能を獲得した遺伝子組換えウイルス（RCA）の有無については、血液及び尿を用いて PCR 法にて検査し、検出された場合は消失するまで、被験者を個室管理下に移して追跡する。

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

Adv/IL-12 投与後の被験者については、個室管理下、PCR 法にて血液及び尿中の遺伝子組換えウイルス（Adv/IL-12）が消失するまで追跡する。

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

Adv/IL-12 と同様の構造をもち、マウスインターロイキン-12 (mIL-12) 遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型 (Adv/mIL-12) 溶液をマウスモデルに投与した動物実験では、マウス血清中の mIL-12 レベルは投与翌日にピークとなり (15000pg/ml)、投与 3 日後にはベクター投与前のレベルに低下した。mIL-12 の上昇後に脾臓の重量は増加したが mIL-12 レベルの低下に伴い脾臓の重量は正常に戻った。一過性の mIL-12 上昇に伴うと考えられる死亡例はマウスには認められず、また体重減少等も認められなかった (文献 5)。Adv/mIL-12 の消長及び体外への排出については詳細が不明であるが、同じくヒトアデノウイルス 5 型の E1 領域を単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子に置換した非増殖性アデノウイルスベクターである Adv.RSV-TK を

用いたマウスモデルの動物実験では、ベクター注入 1 週間後、ベクターDNA は尿、精液及び精子には認めず、血中にはマウス 40 匹中 1 匹のみに認めた。ベクターの広がりには前立腺、精嚢、精巣、骨盤リンパ節、消化管及び肝臓において観察された（文献 7）。

岡山大学医学部・歯学部附属病院において、前立腺がん患者に対する Adv/IL-12 の投与はまだ行っていないが、2001 年以後に前立腺がんに対する Adv.RSV-TK 及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究を行い、9 例（2 例は同一症例）の前立腺がん患者に Adv.RSV-TK の投与を行った。投与後の被験者の血液及び尿中の Adv.RSV-TK の有無を PCR 法により検査したところ、血液中へのアデノウイルスベクターの移行は低用量群においては認められず、中用量群において投与後 30 分をピークに認められたが翌日には消失した。尿中への移行は投与直後において認めたが多くの場合は 2 日目に消失した。被験者の個室管理期間中の医療従事者や被験者の家族等面会者の健康状態からみて、Adv.RSV-TK の環境中への放出及び医療従事者や面会者への感染は認められていない。

文献 7 : Timme, T. L., et al.: Cancer Gene Ther. 5: 74-82 (1998)

6 国外における使用等により得られた情報

1996 年 8 月より、放射線治療後の局所再燃がんに対する Adv.RSV-TK 及びガンシクロビルの併用療法の第 I 相臨床試験が米国 Baylor 医科大学で実施された。当該試験において Adv.RSV-TK を前立腺巣内に局所内投与された 18 名の患者の尿を検体として、PCR 法によるアデノウイルス DNA の確認が行われた。Adv.RSV-TK 投与後、尿中にはアデノウイルス DNA が、症例により差はあるが、0~32 日間（平均 6.8 日間）検出された（文献 8）。

また、2004 年 5 月から米国 Baylor 医科大学において第 1 例目の前立腺がんに対する Adv/IL-12 を用いた遺伝子治療が施行された。

文献 8 : Herman, J. R., et al.: Human Gene Ther. 10: 1239-1249 (1999)

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

Adv/IL-12 及び Adv/IL-12 由来 RCA の感染性は野生型 Ad5 と同一と考えられるので、微生物に感染せず、また、競合、有害物質の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。よって、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

Adv/IL-12 及び Adv/IL-12 由来 RCA の感染性は野生型 Ad5 と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである（文献 1、2）。

(2) 影響の具体的内容の評価

Adv/IL-12 が感染したヒトで一過性に IL-12 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによるヒトへの病原性は知られていない（文献 5）。

Adv/IL-12 由来 RCA の病原性は、野生型 Ad5 と同等である。

なお、Ad5 を宿主とする遺伝子治療用ウイルスベクター（遺伝子組換え生物等）は 1990 年以後、国内外で汎用されているが（文献 8）、環境への悪影響に関する報告はない。1999 年に初めて遺伝子治療薬の投与に起因する死亡例が、当該ベクターを用いた米国での遺伝子治療臨床研究において発生したが、その後の調査研究により、当該事例は、ベクター大量投与の結果、循環血中に漏れ出たベクターのウイルスたん白により引き起こされた全身的免疫反応に起因するものであることが明らかにされている（文献 9）。

アデノウイルスの副作用で問題となる非特異的免疫反応を引き起こす IL6 や IL8 に対する IL12 の相互作用に関しては、A498（ヒト腎臓細胞）を用いた実験報告があり、大腸菌感染非存在下では IL-12 が IL6 や IL8 の分泌を増加させる事はないものの、大腸菌感染存在下では IL-12 により IL6 が上昇するとの報告がある。実際の Adv/IL-12 投与時は大腸菌感染に特別な注意を払い、感染の可能性が出れば直ちに当該大腸菌に抗菌力を持つ抗生剤を投与し治療するので、前述の如き大腸菌感染存在下という環境を極力避ける事が出来ると考える。したがってこの治療による「IL-12 によるアデノウイルス副作用の増悪」の事態は十分避けられると考える。（文献 10）

(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、Adv/IL-12 及び Adv/IL-12 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。さらに、Adv/IL-12 は増殖能を失っているため、野生型アデノウイルスとの共感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。さらに、Adv/IL-12 が効率よく感染する対象

はヒトに限られること（文献 1、2）を踏まえると、Adv/IL-12 及び Adv/IL-12 由来 RCA が被験者以外のヒトに対して病原性を示す可能性は極めて少ないと考えられる。

(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、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。

文献 9 : Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Human Gene Therapy 13:3-13 (2002)

文献 10 : Immunoregulatory cytokines modify Escherichia Coli induced uroepithelial cell IL-6 and IL-8 responses. Cytokine.8:686-697,1996.

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

Adv/IL-12 の有害物質の産生性は知られておらず、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

Adv/IL-12 及び Adv/IL-12 由来 RCA の感染性は野生型 Ad5 と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである（文献 1、2）。

(2) 影響の具体的内容の評価

Adv/IL-12 が感染したヒトで一過性に IL-12 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによるヒトへの核酸の水平伝達は知られていない（文献 5）。

Adv/IL-12 由来の遺伝子組換え生物に該当する RCA が出現したとしても、核酸を水平伝達する性質は野生型 Ad5 と同等である。

(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、Adv/IL-12 及び Adv/IL-12 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。Adv/IL-12 は増殖能を失っているため、被験者に野生型アデノウイルスが共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。さらに、Adv/IL-12 が効率よく感染する対象はヒトに限られること（文献 1、2）及びヒト体内の同一細胞に Adv/IL-12 及び野生型アデノウイルスが感染する可能性は極めて低いことも踏まえると、Adv/IL-12 はやがて環境中から消滅すると考えられる。

Adv/IL-12 由来の遺伝子組換え生物に該当する RCA が出現したとしても、核酸を水平伝達する可能性は野生型 Ad5 と同程度である。

(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、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

なし。

V 総合的評価

Adv/IL-12 が感染する動植物等の種類は野生型 Ad5 と同等で、ヒトにのみ感染し、自然界で他のほ乳動物、植物及び微生物には感染しないと考えられる。

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、Adv/IL-12 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。Adv/IL-12 による IL-12 遺伝子の一過性発現はヒトに病原性をもたないので、ヒトに対する影響はないと考えられる。さらに、Adv/IL-12 は増殖能を失っているため、野生型アデノウイルスとの共感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。ヒト体内の同一の細胞に Adv/IL-12 と野生型アデノウイルスが感染する可能性は極めて低く、Adv/IL-12 はやがて環境中から消滅すると考えられる。

極めて微量の Adv/IL-12 由来 RCA の環境中への放出も完全には否定できないが、アデノウイルス粒子へパッケージングできる DNA のサイズに上限があるため、RCA は野生型 Ad5 と同じになるか、あるいは短い外来遺伝子を含んでも野生型 Ad5 に極めて近い構造になると考えられる。RCA の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は野生型 Ad5 と同等であり、ヒト及び他のほ乳動物、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。

従って、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、Adv/IL-12 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。

別紙 1 : IL-12 遺伝子の構造ならびにアデノウイルスベクターの構造、IL-12 遺伝子のアミノ酸配列、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) 直接初期遺伝子プロモーター (HMV IE) の塩基配列、SV40 polyA signal の塩基配列

別紙 2 : IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製方法、トランスファーベクター pCA3IL-12 の作製図、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/IL-12) の作製図

別紙 3 : IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/IL-12) の構造

別紙 4 : 各バンク及び最終製品の品質管理試験の詳細

別紙 5 : 受入れ試験の詳細

別紙 6 : 治療施設の地図及び保管場所の概略図