

な場合でも、あなたの名前などの個人情報はわからないようにし、プライバシーを守ることをお約束します。

13. 個人情報の取扱いと診療情報の開示の問い合わせの窓口

国立成育医療センターでは、個人情報の取扱いや診療情報の開示に関する問い合わせ窓口を設けております。

この研究に関する個人情報、診療情報の開示についてのご相談窓口は、次の通りです。

国立成育医療センター〇〇課（もっと具体的に担当者氏名を記載する予定）

病院1階会計横カウンター電話：03-3416-0181（代表）

また、個人情報や診療情報の開示を申請できる方は、次の方です。

- ① 臨床研究に参加したあなた自身
- ② あなた自身が申請できない場合は、法定代理人または実際にあなたの世話をしている親族かそれに準ずる方
- ③ 特例として、臨床研究に参加した方が死亡され、ご本人が意思表示をできなかった場合は、ご遺族の方

開示の申請をしたい時は、ご自分の身分証明書、②③の方は、身分証明書とあな

たとの関係を証明する書類に、開示申請書を添えて提出してください。

あなたの申請書については、国立成育医療センター病院の診療情報開示委員会で、開示できるかできないか、開示できる範囲などを話し合っ決めて決めます。

14. 臨床研究の参加に必要な費用について

臨床研究に必要な費用、たとえばレトロウイルスベクターの代金や骨髄血採取にかかる費用、入院中の病室の代金などは、研究グループが負担します。

この臨床研究に参加して起こった副作用により、何らかの健康上の被害を受けた場合は、最善を尽くして適切な治療をします。副作用に対する検査や治療にかかる医療費は、研究グループが支払います。国立成育医療センターだけでなく、他の医療機関で副作用に対する検査、治療を受けられた場合も、あなたの自己負担分は、研究グループが支払います。また、医療費以外の実費については支払われません。あなたの退院後の食費やご家族がお見舞いに来られるときの交通費や食事代などは補償されません。あなたが臨床研究に参加するために、あなたやご家族が仕事を休んだりして収入が減ったとしても、その分の補償はされません。この臨床研究の期間中でも、この研究と関係のない病気の医療費はこれまで通りあなたの負担となります。

15. 臨床研究に参加される方が未成年の場合

(1) あなたが、16歳以上20歳未満のとき

この臨床研究に参加することは、ご両親など保護者の方とよく相談して、参加するか決めてください。この臨床研究について聞いた説明を理解され、参加することを決めると、保護者の方に「同意書」という書類に署名をしていただきます。あなたも署名をしてください。

(2) あなたが16歳未満の場合

この臨床研究に参加するかどうかを決められるのは、あなたのご両親など保護者の方です。しかし、自分の病気の治療のことですから、心配になってあたりまえです。病院の医師が、あなたにわかるようにお話をしますので、よく聞いて、わからないことや心配なことがあったら、いつでもなんでも聞いてください。

16. その他

(1) カウンセリング

「はじめに」のところにも書きましたが、参加をお考えの段階からこの研究が終了するまでの間に、不安な気持ちになったり、誰かに相談をしたくなったりすることがあるかもしれません。その場合は、いつでもカウンセリングを受けることができます。

(2) 他の病気にかかったら

この臨床研究に参加している間に、他の病気にかかって、他の病院を受診したり、他の治療を受けたりする場合は、私たち研究グループにもお知らせください。

(3) 参加することが適当でないと判断されたら

あなたがこの臨床研究への参加を決めて同意書に署名した後でも、診察や検査の結果によっては、臨床研究に参加することが適当でないと「遺伝子治療臨床研究適応判定委員会」が判断するかもしれません。また、重い副作用などにより研究を続けることが難しいと判断されたときは、この研究を中止して、他の最適な治療を行います。

(4) 臨床研究の期間中に亡くなられた場合

もし、臨床研究の期間中（5年間）にお亡くなりになられた場合は、ご遺族の方に解剖させていただくようお願いすることがあります。

研究グループからの説明とこのしおりをお読みになって、この臨床研究について、ご理解していただけただけでしょうか？

もし、この臨床研究に参加したいというご希望がありましたら、「臨床研究参加についての同意書」に、ご署名・捺印をお願いいたします。

心配なこと、わからないことがございましたら、どうぞ遠慮なく総括責任者か研究グループの他の研究者におたずねください。

同意書 9/14/07 Ver. 2.1

臨床研究参加についての同意書

国立成育医療センター病院長

松井 陽 殿

私は、「慢性肉芽腫症における造血幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究」に参加するにあたり、この研究の総括責任者または総括責任者の代理の医師から、「参加のしおり」をもとに、以下の項目について説明を受け、十分に理解しました。その上で、自らの自由意志により本臨床研究に参加することに同意します。

説明を受けて理解した項目（□にご自分で✓印をつけて下さい。）

- 臨床研究について
- 慢性肉芽腫症(CGD)について
- CGD の治療の現状について
- この臨床研究の目的と概要について
- 参加できる方、できない方の基準
- 骨髄血の採取について
- 造血幹細胞への遺伝子導入について
- 前処置としてブスルファンを投与することについて
- 診察や検査のスケジュールについて
- 期待される効果と予想される危険性について

- この臨床研究への参加は自由意志であること
- 参加を断ったり、中止したくなった場合について
- この臨床研究に参加された場合の診療録などの調査について
- 個人情報の保護について
- この臨床研究の結果の利用と公表について
- 診療情報の開示に関すること
- この臨床研究に関わる費用について（補償されない費用についても含めて）
- 参加者が未成年の場合の同意の仕方について

私は、この遺伝子治療臨床研究について十分理解しました。

1 ページ目の項目のすべての□に✓印を入れた上、「慢性肉芽腫症における造血幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究」に参加することに同意いたします。

同意をした日：平成 年 月 日

被験者の署名： _____ 印

被験者の代諾者の署名： _____ 印

説明をした日：平成 年 月 日

説明をした医師の署名： _____ 印

説明をした医師の職名： _____

同席した医師の署名： _____ 印

同席した医師の職名： _____

この臨床研究の責任者とその連絡先

実施機関名： 国立成育医療センター病院

診療科名： 膠原病・感染科、遺伝診療科、血液科、小児腫瘍科

電話番号：03-3416-0181（代表）（夜間休日は、03-〇〇〇〇-〇〇〇〇に連絡してください。当直医より、下記の総括責任者または分担研究者に連絡します。）

（夜間休日の対応は未決定）

総括責任者：

分担研究者：

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

レトロウイルス科 (retroviridae) のウイルスは現在、ゲノム構造の違いにより7つの属に分類されており、本研究における宿主 (SF71) は単純型レトロウイルスの一つであるガンマレトロウイルス属 (gammaretroviruses) の spleen focus forming virus (SFFV) に由来する (文献 1、2、3)。本宿主のコア粒子には Moloney murine leukemia virus (MMLV) の Gag 蛋白・Pol 蛋白、エンベロープには GALV 由来の Env 蛋白を使用しており、MMLV・GALV とともに同じくガンマレトロウイルス属に属するウイルスである (文献 1、2)。本宿主ゲノムの基本骨格は SFFV ゲノムから両端の繰り返し配列 (5'-LTR および 3'-LTR) 以外の部分を取り除き、人工レトロウイルスベクター-MSCV のリーダー配列を挿入した形で構成されている (文献 3、4)。本宿主ウイルス粒子は、パッケージング細胞 PG13 内で PG13 ゲノムに組み込まれた MMLV gag-pol および GALV env 遺伝子からの転写産物の供給を受けて産生される (文献 5)。人工的に作製されたゲノムと人工的に作出されたパッケージング細胞の組み合わせで産生されることから、本宿主は自然環境中に存在しない。

文献 1: Kaibe DM and Howley PM ed, Fields Virology 5th ed, pp1999-2069, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007

文献 2: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE ed, Retroviruses, pp11-30, Cold Spring Laboratory Press, New York, 1997

文献 3: Hildinger M et al: Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. J Virol 73:4083-4089, 1999

文献 4: Hawley RG et al: Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. Gene Ther 1:136-138, 1994

文献 5: Miller AD et al: Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. J Virol 65:2220-2224, 1991

2. 使用等の歴史及び現状

ガンマレトロウイルスが生ワクチン等に使用された報告はない。また、ガンマレトロウイルスに由来する遺伝子組換えウイルスは、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

ガンマレトロウイルスのキャプシドは正二十面体で、これをエンベロープが包んでおり、総体として直径約 100nm である。SF71 ゲノムは約 2.3kb の 1 本鎖 RNA で、1 個のウイルス粒子内に 2 分子の RNA を含む。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染するが、構造蛋白質遺伝子を欠失しているので増殖できない (複製不能型レトロウイルス)。遺伝子組換えにより構造蛋白質遺伝子 (*gag*・*pol*・*env*) を全て獲得した場合には、複製可能型レトロウイルス (RCR) が生ずるが、その確率は非常に小さい。ヘルパーウイルスの共感染により *gag*・*pol*・*env* 遺伝子産物が供給された場合も、本宿主の増殖は起こりうるが、この場合でも自己複製不能型となる。本宿主は常温において不安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

ヒトやサルを含む様々な動物 (マウスを除く) に対し感染が起こりうる (文献 1、2)。感染後は、本宿主のゲノムが感染個体の染色体に組み込まれた形で存在する。

(4) 繁殖又は増殖の様式

本宿主の基になった野生型ガンマレトロウイルスが自然宿主間でどのように感染するかについての詳細は不明であるが、主に咬傷などから体内に侵入し、ウイルス血症の状態を経て感受性のある組織に感染すると考えられる。その後は、感染細胞の染色体にゲノムが組み込まれて安定に存在する。また、組み込まれたゲノムからの転写・翻訳を経て感染性粒子が再構成される (文献 1)。

本宿主は自己複製能を有しないので、RCR が生じない限り感染個体において増殖したり排泄されたりすることはない。また、ヒト血中では、補体の働きにより速やかに感染性を失うので、ウイルス血症をきたすことはない (文献 6)。

(5) 病原性

野生型 SF71・野生型 MMLV はマウス、野生型 GALV はサルにおいて、それぞれ長期感染後に血球増多症や白血病を起こすことが知られている (文献 2)。ヒトについては、これまで感染に伴ういかなる病原性も知られていない。

(6) 有害物質の産生性

ガンマレトロウイルスの感染に際して細胞内に産生される蛋白質性の毒素等は報告されていない。

(7) その他の情報

ガンマレトロウイルスに共通する性質として、物理化学的に不安定なエンベロープを有しており、70%エタノール処理でほぼ不活化する。通常のオートクレーブにより完全に不活化される。

文献 6 : Takeuchi Y et al: Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. J Virol 68:8001-8007, 1994

II. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

<p>1. 供与核酸に関する情報</p> <p>(1) 構成及び構成要素の由来 ヒト gp91^{phox} をコードする cDNA (文献 7 ; GenBank accession No. NM000397 ; コード領域は 1,713 bp) を宿主ゲノムに挿入した (文献 8 ; 供与核酸の全塩基配列および対応するアミノ酸配列は別紙 1、2)。</p> <p>(2) 構成要素の機能 gp91^{phox} 遺伝子が転写・翻訳されると、チトクロム <i>b</i>₅₅₈ (Cyt<i>b</i>558) の b-サブユニット (CYBB ; GenBank accession No. NP000388) が発現される。Cyt<i>b</i>558 は p47^{phox}・p67^{phox}・p40^{phox} などの細胞質因子とともに NADPH オキシダーゼを形成し、活性酸素産生に関与する (文献 7)。ガンマレトロウイルスの増殖と複製には、ウイルス固有の構造蛋白質である gag・pol 蛋白質とエンベロープ蛋白質 (ウイルス固有の env ないし同様の機能を持つ蛋白質) が必要であり、また感染の標的細胞はウイルスエンベロープによって規定される。そこで、ウイルス蛋白質コード遺伝子をもたない SF71 (ウイルスキャプシドは MMLV と同じ組成、エンベロープは GALV と同じ) は増殖性をもたず、また感染の標的細胞は野生型 GALV と同様であると考えられる (文献 1、2、5)。</p>
--

文献 7 : Roos D et al: Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. Blood 87:1663-1681, 1996

文献 8 : Ott MG et al: Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of *MDS-EVI1*, *PRDM16* or *SETBP1*. Nat Med 12:401-409, 2006

<p>2. ベクターに関する情報</p> <p>(1) 名称及び由来 SF71gp91phox は pSF71gp91phox プラスミドと PG13 パッケージング細胞より作製される。pSF71gp91phox は SFFV 5' -LTR の転写制御下にあるヒト gp91-<i>phox</i> 遺伝子を含む。PG13 は、NIH3T3 マウス繊維芽細胞に、MMLV の蛋白質である Gag (キャプシドを形成する) および pol (ゲノムの逆転写と染色体への組み込みに関与する) をコードする遺伝子と、GALV の蛋白質である env (エンベロープに含まれ感染域を決定する) 遺伝子が組み込まれたパッケー</p>
--

ジグ細胞である。
ベクターの構造は別紙3に記載した。

(2) 特性
pSF71gp91phox はアンピシリン耐性遺伝子を有している。

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
SF71 のリーダー配列と 3'-LTR の間に挿入された供与核酸は、ヒト CYBB のコード領域 cDNA のみである。(別紙1、2、3)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法
pSF71gp91phox は、pSF71 のリーダー配列の3'側に、ヒト CYBB cDNA を制限酵素 *Bam*I と *Hind* III を使用して挿入し作製した(別紙3)。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過
pSF71gp91phox を、PG13 パッケージ細胞にトランスフェクトし、SF71gp91phox ウイルス産生細胞株を得た(別紙4)。ウイルス産生細胞株の培養上清を濾過滅菌し、SF71gp91phox の最終製品はドイツ EUFETS 社で製造した。製造工程は現行のドイツ 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 ZEKB ガイダンスに従った(各バンク及び最終製品の品質管理試験の詳細は別紙6)。凍結した状態で日本へ輸送した最終製品は、国立成育医療センター病院3階臨床用細胞プロセッシング室(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7)。最終製品は国立成育医療センター病院3階臨床用細胞プロセッシング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8)。ウイルスの調製に用いる宿主細胞は PG13 クローン XX を用い、マスターセルバンクはドイツ EUFETS 社(Lot No. XXXXX)に、ワーキングセルバンクはドイツ EUFETS 社(Lot No. XXXXX)に保管されている(別紙6)。また、マスターウイルスバンクはドイツ EUFETS 社に保管されている。

コメント: 実際のクローニング法は?

コメント: 実際の受入、保管体制に照らし合わせて要修正。

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 SF71gp91phox の1本鎖 RNA ゲノムの一部として SFFV の LTR に挟まれて存在し、凍結保管中は安定で、感染する動植物等の種類および感染様式が保管中に変化することはない。

細胞に感染すると SF71gp91phox のゲノムは細胞室内で逆転写および相補鎖合成をうけて2本鎖 DNA に変換され、LTR の配列を介して染色体に組み込まれ、細胞分裂によって失われることはない(文献1)。染色体に組み込まれたウイルスゲノム(プロウイルスと呼ぶ)から gp91^{phox} が転写される。プロウイルスからの gp91^{phox} 発現は、メチル化などエピジ

エネティックな変化により転写の不活性化が起こらない限り継続するものと考えられる。

SF71gp91phox を PG13 細胞で作製する過程で pSF71gp91phox と *gag-pol* 遺伝子・*env* 遺伝子が組換えを起こして増殖能を獲得したウイルス (replication-competent retrovirus : RCR) を生ずる可能性は否定できない。しかし *gag-pol* 遺伝子・*env* 遺伝子は別個のプラスミドを用いて段階的に導入されたものであり、RCR の発生に至るには少なくとも 3 回の組換えが必要となるため、その確率は極めて小さい。そもそも、SF71 ベクターゲノムからは *gag-pol*・*env* 遺伝子の配列が全て除かれており、リーダー配列も MSCV 由来で MMLV との相同性が低いいため、ベクターと *gag-pol*・*env* 遺伝子の組換え自体が極めて起こりにくくなっている。たとえ RCR が発生したとしても、GALV エンベロープをもつウイルスはマウスの細胞に感染できないため、培養中にウイルス産生細胞間で RCR が伝播・増幅されにくい。

RCR の有無については、ウイルス産生細胞や培養上清の全ロットについて厳重な検査を行っている。万一検査をすり抜けた RCR が感染した細胞が被験者に注射された場合でも、マウス由来のパッケージング細胞で作られたウイルスは、ヒト血中の補体で速やかに不活化される。従って、RCR が被験者の体内で増殖したり、環境中に散布されたりする可能性はほとんどない。

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

SF71gp91phox は宿主 SF71 が由来する SFFV に存在しない CYBB 遺伝子を含むので、SFFV LTR と CYBB 遺伝子 DNA の接合部を PCR で増幅、定量する方法で SF71gp91phox を検出できる。このときに用いる PCR 反応では試料 1 μ l 中に XX コピーの SF71gp91phox があれば検出することができる。本検出法の信頼性については、同様の定量的 PCR 法を用いたウイルス検出法が既に臨床応用されていることから、十分に確立しているものと考えられる。

コメント：実際の検出法は確立しているか？

6. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

SF71gp91phox は *gag-pol*・*env* 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蛋白質を発現できない。これらの遺伝子はレトロウイルス粒子の形成に必要であるため、パッケージング細胞または *gag-pol*・*env* 遺伝子をもつ DNA が同時にトランスフェクトされた細胞でなければ、SF71gp91phox の増殖は起こらない。SF71gp91phox の感染する動植物の種類や感染経路などは野生型 GALV と同等と考えられる (文献 5)。ただし、SF71gp91phox は複製不能型ウイルスなので、感染動物から他の動物に伝播することはない。

SF71gp91phox 由来の RCR は、SF71gp91phox 作製時、*gag-pol*・*env* 遺伝子が組み込まれた PG13 細胞染色体と pSF71gp91phox との間の遺伝子組換えにより生じると考えられ、細胞向性 (cell tropism) を規定するエンベロープは野生型 GALV に由来する。また、キャプシドや逆転写酵素などは GALV と同じガンマレトロウイルス属の MMLV に由来し、両者が感染細胞に与える生物学的影響はほぼ同等と考えられる。従って、細胞内遺伝子組換え生物に該当するものも含め、ヒトや動植物等への感染性や感染様式、病原性など、生物多様性に影響を与える性質は野生型 GALV と同等であると考えられる。また供与核酸の一部を保持し

た RCR が生じる可能性は否定できないが、供与核酸がベクター内の野生型 GALV 由来の生物多様性に影響を与える因子に関与する可能性は低い。

SF71gp91phox が細胞に感染するとそのゲノムは染色体に組み込まれ、染色体 DNA の一部として複製・分配される。

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

実施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。

コメント：これ以降は自治の AAV パーキンソン GT の評価書を改変しただけ。
内容は実際のプロトコールに合わせて要修正。

2. 使用等の方法

実施施設の所在地：東京都世田谷区大蔵 2-10-1

実施施設の名称：国立成育医療センター病院および研究所

- (1) SF71gp91phox 溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の実験室内の冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態の SF71gp91phox 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 レベルの細胞プロセッシング室（以下「P2 細胞プロセッシング室」という。）内の安全キャビネット内で行う。SF71gp91phox 希釈溶液の保管は、P2 細胞プロセッシング室の冷凍庫において行う。なお、SF71gp91phox 希釈溶液又はその凍結品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、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (3) SF71gp91phox 溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。以下同じ。）を行った後、本施設で定められた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) P2 細胞プロセッシング室内の安全キャビネット内で SF71gp91phox 希釈溶液を専用の閉鎖系細胞培養バッグに充填し、被験者より採取した骨髄 CD34 陽性細胞浮游液と混合して P2 細胞プロセッシング室内のインキュベータで培養する。培養後はバッグより細胞を回収後、洗浄して当該施設造血幹細胞移植ユニットに運搬する。し、被験者の静脈内に注入する。
- (5) 被験者に対する SF71gp91phox 感染細胞の投与は、造血幹細胞移植ユニット内において、ウイルス漏出予防のために、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）被験者の静脈内に注入することで行う。
- (6) 被験者への SF71gp91phox 感染細胞投与終了後も、引き続きウイルス漏出予防のために、被験者を個室個室内で管理する。
- (7) 上記(5)及び(6)で用いた注入用シリンジなどの器具及び布、ガーゼ類は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルス不活化を他の区域

- 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) 投与後約2週間は、被験者を個室内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に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等（血液、体液、尿及び糞便等）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する。これらのウイルス不活化を他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、SF71gp91phox 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。これらのウイルス不活化を他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、被験者の血漿および尿中の SF71gp91phox が陰性であることを確認する。SF71gp91phox が確認されたときは、個室における管理を継続する。
 - (12) 個室における管理解除後に被験者の血漿又は尿中から SF71gp91phox 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
- 被験者への投与後、被験者体内における RCR の出現の有無については血液を用いて、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
- 遺伝子組換えウイルス投与後の被験者については PCR 法にて血液の遺伝子組換えウイルスを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
- マウスの X-CGD モデルに対して類似の組換えレトロウイルス感染細胞の注入を行った前臨床試験では、明らかな毒性は認められていない（文献 9）。また、血漿中で該当ウイルスは検出されていない。

文献 9: Sadat MA et al: Long-term high-level reconstitution of NADPH oxidase activity in murine X-linked chronic granulomatous disease using a

bicistronic vector expressing gp91phox and a D LNGFR cell surface marker.
Hum Gene Ther 14:651-666, 2003

6. 国内外における使用等により得られた情報

組換えガンマレトロウイルスベクターを用いて体外で遺伝子導入した細胞を被験者に再輸注する形の遺伝子治療臨床試験は、国内外で多数行われている。これまでに RCR が検出された例は報告されておらず、治療後に被験者から感染性をもつ組換え生物が検出された事例もない。

PG13 細胞でパッケージングされた (GALV エンベロープをもつ) 組換えレトロウイルスベクターが臨床に供されるようになったのは比較的新しいが、すでに幾つかの報告があり、RCR や感染性組換え生物などの問題は起こっていない (文献 10、11)。ことに文献 11 で使用されたベクターは、本臨床研究で用いる SF71gp91phox と同じ SFFV 由来のゲノム骨格をもち、しかも臨床グレードのベクター作製と管理は、同じくドイツの EUFETS 社が行っている。同社は、RCR の発生予防や検査についても十分な経験を蓄積しており、環境に及ぼす影響を最小限にできると考えられる。一方国内においても、GALV エンベロープをもつ組換えレトロウイルスについて、北海道大学のアデノシンデアミナーゼ欠損症患者 2 例と、筑波大学の白血病患者十数例の使用経験がある。これまで RCR や感染性組換え生物は検出されておらず、注意深い観察が続けられている。

被験者に直接組換え生物 (ウイルスベクター) を投与する *in vivo* 遺伝子治療 (体内法) に比べ、本研究のように体外で遺伝子導入を行った後に感染細胞を輸注する *ex vivo* 遺伝子治療 (体外法) は、特に専用バッグなどを用いたクローズド・システムの場合、遺伝子組換えウイルスの環境への排出は桁違いに少ないものと考えられる。実用上、RCR の発生がなければ、組換えウイルスの排出はほぼ皆無と言える。

文献 10: Gaspar HB et al: Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. Lancet 364:2181-2189, 2004

文献 11: Gaspar HB et al: Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. Mol Ther 14:505-513, 2006

IV. 生物多様性影響評価

<p>1 他の微生物を減少させる性質</p> <p>(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 SF71gp91phox 由来 RCR の感染性は野生型 GALV と同一と考えられ、微生物に感染するとの報告はない。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。</p> <p>(2) 影響の具体的内容の評価 (該当せず。)</p> <p>(3) 影響の生じやすさの評価 (該当せず。)</p> <p>(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。</p>
<p>2. 病原性</p> <p>(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 SF71gp91phox が自然界で感染する対象は、マウスを除く哺乳動物である。また、RCR が生じないかぎり感染した細胞で複製は起こらない。また、たとえ SF71gp91phox から RCR が生じて、GALV エンベロープをもつ同組換えウイルスは、ヒト血中補体により失活する(文献6)。</p> <p>(2) 影響の具体的内容の評価 SF71gp91phox が感染した動物で <i>CYBB</i> 遺伝子が発現する可能性はあるが、gp91^{phox} は p22^{phox} なしには安定に存在できず、さらに p47^{phox} や p67^{phox} がないと機能的 NADPH オキシダーゼを構成できない。生体においてこれら NADPH オキシダーゼのサブユニットが発現しているのは分化した血液食細胞だけであり、他の細胞系で gp91^{phox} が単独で構成的に発現しても、細胞の生存や機能に影響を与えないと考えられる。血液食細胞で gp91^{phox} が過剰発現したとしても、その存在量はヘテロダイマーを形成する相手の p22^{phox} により上限が決定されるので、生理的範囲にとどまる SF71gp91phox 由来 RCR は、野生型 SF71gp91phox と同様に病原性をもたないと考えられる。 なお、GALV エンベロープをもつ遺伝子組換えウイルスは、アメリカ・ヨーロッパ・韓国・日本で使用されているが、環境への悪影響に関する報告はない。また、これまで当該ウイ</p>

ルスを投与されたヒトにおいて当該ウイルスに由来する重篤な副作用は報告されていない。

(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、SF71gp91phox および SF71gp91phox 由来 RCR の環境中への拡散は極めて微量である。また、SF71gp91phox はヘルパーウイルスの存在なしに増殖することはなく、SF71gp91phox 由来 RCR も、常温で不安定である。従って、SF71gp91phox および SF71gp91phox 由来 RCR 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小さいと考えられる。

(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。

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

SF71gp91phox 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

SF71gp91phox および SF71gp91phox 由来 RCR の感染性は野生型 GALV と同一と考えられる。野生型 GALV はサルを自然宿主とし、サル以外で増殖を伴う感染が成立するかどうかは明らかではない。GALV エンベロープをもつ遺伝子組換えレトロウイルスを使用した実験結果から、ヒト以外にサル、ウシ、イヌ、ネコ、ラット、などの哺乳動物に感染することが報告されている。

(2) 影響の具体的内容の評価

SF71gp91phox が感染したヒトまたはヒト以外の哺乳類で一過性に CYBB 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによる他の哺乳類個体への核酸の水平伝達は知られていない。

SF71gp91phox 由来の遺伝子組換え生物に該当する RCR が出現したとしても、核酸を水平伝達する性質は野生型 GALV 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、SF71gp91phox および SF71gp91phox 由来 RCR の環境中への拡散は極めて微量である。また、SF71gp91phox 自体はヘルパーウイルスの存在なしに増殖する能力はなく、SF71gp91phox 由来 RCR も常温で不安定なため、環境中で増殖しにくい。従って、SF71gp91phox 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 SF71gp91phox 由来の RCR の環境中への放出も完全には否定できないが、レトロウイルス粒子へパッケージングできる RNA のサイズに上限があるため、RCR は野生型 SFFV と同じになるか、あるいは外来遺伝子を含んでも野生型 SFFV に近い構造になると考えられる。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野生型ガンマレトロウイルスと同等であり、ヒトおよび他の哺乳動物、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。

(4) 生物多様性が生ずるおそれの有無等の判断

よって、拡散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

SF71gp91phox が感染する動植物等の種類は野生型 GALV と同等で、マウス以外の哺乳動物に感染する。自然界で植物および微生物に感染するとの報告はない。

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、SF71gp91phox 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。SF71gp91phox による CYBB 遺伝子の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、SF71gp91phox は増殖能を失っているため、野生型レトロウイルスなどヘルパーウイルスとの重感染がな