

IX. 緊急連絡先

実施機関名： 国立成育医療センター病院

診療科名： 膠原病・感染症科、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：

Ⅲ. 資 料

3) 生物多様性評価書

ヒト cytochrome b-245, beta polypeptide (CYBB) 遺伝子を含み、マウスアンフトロピックウイルス 4070A のエンベロープタンパク質を有する増殖能欠損型モロニーマウス白血球ウイルスベクター MFGSgp91 申請書

第一種使用規程承認申請書	2
生物多様性影響評価書	
I 宿主または宿主に属する分類上の種に関する情報	4
1 分類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	4
II 遺伝子組換え生物等の調整等に関する情報	7
1 供与核酸に関する情報	7
2 ベクターに関する情報	7
3 遺伝子組換え生物等の調整法	8
4 細胞内に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	10
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	10
6 宿主または宿主に属する分類学上の種との相違	11
III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	12
1 使用等の内容	12
2 使用等の方法	12
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	13
4 生物多様性影響が生ずるおそれがある場合における生物多様性影響を防止するための処置	13
5 実験室等での使用等また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	13
6 国外における使用等により得られた情報	13
VI 項目ごとの生物多様性影響の評価	14
1 他の微生物を減少される性質	14
2 病原性	14
3 有害物質の生産性	15
4 核酸を水平伝播する性質	15
5 その他の性質	16
V 生物多様性の総合的評価	17

第一種使用規程承認申請書

平成 年 月 日

厚生労働大臣 殿

所 属
申請者
住 所
印

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に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、次の通り申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	ヒト cytochrome b-245, beta polypeptide (CYBB) 遺伝子を含み、マウスアンフォトロピックウイルス 4070A のエンベロープタンパク質を有する増殖能欠損型モロニーマウス白血病ウイルスベクター MFGSgp91
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、運搬及び廃棄なら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	<ol style="list-style-type: none"> 1. 本遺伝子組換え生物 MFGSgp91 (以下、「本遺伝子組換え生物」と記す) は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送され、施設内の施錠可能な保存室内の冷凍庫にて保管する。 2. 凍結状態の本遺伝子組換え生物の融解、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」と記す) の安全キャビネット内または細胞調製室内での閉鎖系バッグにて行う。患者由来末梢血 CD34 陽性細胞 (以下、「造血幹細胞」と記す) への本遺伝子組換え生物の導入操作、それら細胞の培養、その他、本遺伝子組換え生物の希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取り扱いもすべて同様に細胞調製室の安全キャビネット内または細胞調製室内での閉鎖系バッグにて行う。本遺伝子組換え生物の希釈液及び遺伝子導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷凍庫及び冷蔵庫または培養器にて行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈液もしくはその冷凍品または本遺伝子組換え生物を、開放系区間を通して他の P2 レベル区域に運搬する場合には、二重に密封した容器に入れて運搬する。 3. 本遺伝子組換え生物液 (希釈液を含む) または本遺伝子組換え生物導入細胞を廃棄する際には、滅菌操作を行った後、本施設で定められた感染性廃棄物処理規程 (以下、「感染性廃棄物処理規程」と記す) に従い、廃棄する。 4. 被験者に対する本遺伝子組換え生物導入細胞の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室 (以下「クリーンルーム」と記す) 内で輸注により行う。なお、投与時に本遺伝子組換え生物導入細胞に直

接接触した注射針、注射器、チューブ等の器具類は使い捨てとし、クリーンルーム内で適切に消毒を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。

5. 投与後3日までは被験者をクリーンルーム内の個室で管理し、検査等の理由にて被験者が一時的にクリーンルーム外の開放区内に出る場合には、マスク及びガウン等の着用にてウイルス漏出の予防措置を義務付ける。クリーンルームにおける管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に消毒し、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。また、被験者の尿及び糞便等の排泄物は、投与翌日以降に行われる被験者の血液を用いたPCRにて自己増殖能を獲得した野性型レトロウイルス（以下、「RCR」と記す）の存在が否定されるまで、クリーンルーム内で適切に消毒を行い、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物取り扱い、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り扱いに準ずる。
6. クリーンルーム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及び被験者の排泄物等に接触した器具は、クリーンルーム内で適切に消毒を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄するかまたはクリーンルーム内で十分に洗浄する。
7. クリーンルームにおける被験者の管理を解除する前に、RCRが被験者の血液細胞及び血漿において陰性であることを確認する。RCRが確認されたときは、クリーンルームにおける管理を継続する。
8. クリーンルームにおける管理解除後に被験者の血液細胞または血漿からRCRが検出された場合は、直ちに被験者をクリーンルームにおける管理下に移し、上記、(5)から(7)までと同様の措置を執る。

生物多様性影響評価書

I 宿主または宿主の属する分類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

レトロウイルスは逆転写酵素を内包する RNA ウイルスの総称で、現在、7 種に分類され、そのうち 5 種類は腫瘍形成能を有するオンコウイルス (oncovirus) で、他はレンチウイルス (lentivirus) とスプーマウイルス (spumavirus) に分けられる (文献 1)。遺伝子治療用ベクターとして広く使用されているレトロウイルスはガンマレトロウイルス属に分類するマウス白血病ウイルス (murine leukemia virus; MLV) で、AKR や C58 系マウスなどでの自然発症白血病原因ウイルスとして同定された。MLV のうち、実験室内で sarcoma 37 細胞の継代培養により分離されたウイルスが Moloney murine leukemia virus (MoMLV) で、この MoMLV は発がん遺伝子を持たず、マウスの年齢や系統にかかわらず感染し、長期間感染したマウスに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齧歯類のみに感染し、ヒトに対して感染性、病原性は有しない (文献 3)。

文献 1. Buchen-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 (1977).

2 使用等の歴史及び現状

レトロウイルスは、医学生物領域において遺伝子導入用ベクターとしての応用が最も進んだウイルスで、米国で行われた最初の遺伝子治療臨床研究においても MoMLV を宿主とした遺伝子組換え生物が用いられた (文献 4)。現在、遺伝子治療/ 遺伝子マーキングの臨床プロトコールで、このレトロウイルスを基とした遺伝子組換え生物を用いたものが全体の約 21% を占めている (文献 5)。

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 生理学的及び生態学的特性

1) 基本特性 (文献 6)

MoMLV の径はおよそ 80~100 μm で、ゲノムを内包するコアとそれを取り囲む外被 (エンベロープ) よりなる。コアは主としてカプシドタンパク (CA) により構成され、その中に 2 分子の 10kb 程度のプラス鎖 RNA ゲノムを有する。その他、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、プロテアーゼ (PR)、核酸結合タンパク質 (NC) もコア内部に存在する。外被はウイルス産生細胞由来の脂質二重膜に由来し、外被とコアの間にはマトリックスタンパク質 (MA)、外被には細胞表面において表面タンパク質 (SU) と結合する膜貫通タンパク質 (TM) が貫通している。

2) 生育または生育可能な環境の条件

MoMLV はマウス、ラットなどの齧歯類の細胞しか感染せず、また、その宿主細胞に感染した場合のみ増殖が可能である。MoMLV は比較的不安定なウイルスで、体液や培養液中などの限られた環境でしか感染性を保持しない。なお、常温においてウイルスの感染力は 2 時間程度で失活する

3) 捕食性または寄宿性

自然界では、マウス、ラットなどの齧歯類のみに感染が成立し、ウイルスゲノムは自らが持つ逆転写酵素により DNA に変換され、宿主染色体に挿入される。他の生物を捕食することはない。

4) 繁殖または増殖様式

レトロウイルスは感染した動物の血液、体液（唾液、精子、母乳）に存在し、それらに触れることで新たな感染が生ずる（水平感染）。また、ほぼ 100% のマウスが内在性レトロウイルスゲノムを染色体に有し、生殖行為により子孫へと伝播していく（垂直感染）。

増殖様式は、(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) タンパク質合成、(7) 集合・放出、(8) 成熟 といった各段階を経る。

5) 病原性（文献 7）

MoMLV の病原性に関しては、以下のことが知られている。

- (1) MoMLV は、マウスに悪性腫瘍を含む多様な疾患を発症させる。マウスに起こる疾患・病態としては、白血病、リンパ腫、貧血、免疫不全、腫瘍及び神経変性等がある。
- (2) レトロウイルスはランダムに宿主染色体に挿入するため、細胞機能に重要な遺伝子を活性化したり、不活性化したりし、がん化の変化をもたらす危険性がある
- (3) 内在性レトロウイルスとの遺伝子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 に感染したことで細胞が有害物質を産生することもない。

7) その他の情報

MoMLV の不活化の条件としては、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、(1) 121°C、20 分間の蒸気滅菌、(2) 170°C、2 時間の乾熱滅菌、(3) 20～30 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、5) 70% エタノールまたは 70% イソプロピルアルコール、6) 3.5～4.0% ホルマリン、7) 2% グルタラール、が上げられている（文献 8）。また、10% 及び 1% ポピドンヨード液（文献 9）、0.3% 過酸化水素水（文献 10）で不活化が可能との報告もある。

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 12）。抗 α -galactosyl 自然抗体を有する旧世界サル（文献 13）の体内に侵入したときにも同様の機構にて不活化される（文献 14）。

- 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 (p322)
- 文献 7: 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 (p627)
- 文献 8: 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 9: 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 10: Martin LS, MaDougal JS, and Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphocyte virus type III/ Lymphadenopathy-associated virus. J Infect Dis 152: 400-403, 1985.
- 文献 11: Yoshikura H. Thermostability of human immunodeficiency virus (HIV-1) in a liquid matrix is far higher than that of an ectropic murine leukemia virus. Jpn J Cancer Res 80: 1-5, 1989.
- 文献 12: Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, Okada H, Weiss RA, Collins MK. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer clone. J Virol 68: 8001-8007, 1994.
- 文献 13: Galili Uri, Tanemura M. Significance of α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) Epitopes and α 1, 3 Galactosyltransferase of Xenotransplantation. Trend Glycosci Glycotechnol 11: 317-327, 1999.
- 文献 14: Rother RP, Fedor 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.

II 遺伝子組換え生物等の調整等に関する情報

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を構成するゲノムのうち供与核酸は、ヒト由来 cytochrome b-245, beta polypeptide (CYBB) と制限酵素認識部位等の人工配列である。

(1) CYBB は、1986 年、Orkin 博士らによってヒト白血病細胞株より単離された 4353 塩基対の糖タンパク質 gp91^{phox} をコードする遺伝子で、X 染色体短腕 (Xp21.1) 上にある全長 33.5kb の遺伝子である (GenBank NM_000397 文献 15)。転写産物は、翻訳開始コドン (ATG) の上流に 61bp の非翻訳領域を有し、570 アミノ酸をコードする 1710bp と終止コドン (TTA) よりなる 1713bp である。CYBB の塩基配列及びタンパク質をコードするものはそのアミノ酸配列を別紙 1 に示す。

(2) MFGSgp91 DNA 構築過程で挿入された制限酵素認識配列部位等の人工配列を別紙 2 に示す。

2) 構成要素の機能

(1) ヒト CYBB 遺伝子により発現される gp91^{phox} は、363 個のアミノ酸からなる分子量約 40kDa の細胞質内タンパク質で、p22^{phox} と会合することで膜タンパク質のシトクロム b558 を構成する。このシトクロム b558 は菌体成分等の刺激により細胞質内タンパク質の p47^{phox}、p67^{phox}、p40^{phox}、rac と会合し、superoxide anion の産生に関わる酵素 NADPH oxidase を生成する。一般に休止状態では、シトクロム b558 は細胞質因子と乖離しているため NADPH の活性は起こらないが、刺激により細胞質因子が細胞膜に移行し、シトクロム b558 と会合することで活性型 NADPH oxidase が生成される。本酵素は分子酸素を直接還元することで superoxide anion (O₂⁻) を生成し、食細胞へと放出して、さらに強力な活性酸素種 (H₂O₂, HClO⁻) を生成し、強力な殺菌作用を発揮する。

(2) 制限酵素認識部位等は人工的な配列であり、生物学的には影響を及ぼさないと考えられる。

文献 15: Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, et al. Cloning the gene for an inherited human disorder - chronic granulomatous disease - on the basis of its chromosomal location. Nature 322: 32-38, 1986.

2 ベクターに関する情報

1) 名称及び由来

本遺伝子組換え生物 (レトロウイルスベクター) は MFGSgp91 であり、米国国立衛生研究所 (NIH) の Harry L. Malech 博士らにより作製されたが (文献 16)、以下にその作製法について記載する。

(1) MFG の DNA 配列

MFGSgp91 の基となるベクターは MFG であり (文献 17)、この MFG は、MoMLV ゲノムの 5' LTR から 1038 塩基対 (bp) 番目の *NarI* 部位までの DNA 配列 (ただし、*NarI* 配列は MFG では *NdeI* 配列に変換されている)、5401bp 番目の *NdeI* 配列番目から 5674bp 番目の *XbaI* 配列の DNA 配列、合成 DNA 配列 CTAGACTTGCCATGGCGGATC (二重鎖) 及び 7672bp 番目の *ClaI* (*BamHI* 配列に変換) から 3' LTR までの DNA 配列まで含んでいる。

(2) MFG の転写単位

MFG が宿主染色体に挿入された後、プロウイルス (宿主染色体に挿入された MFG) は 5' LTR から 396bp 番目の転写開始点より転写が開始され、3' LTR から 696bp 番目まで転写される。MFG では、gag、pol、env のウイルスゲノムはほぼ全て欠失しているが、gag の一部 (5' 側) の約

400bp、env 5' 側のスプライスアクセプター領域の約 400bp、env の一部 (3' 側) の約 90bp は残されている。

(3) MFG の特徴

MFG のパッケージングシグナル Ψ は gag の一部まで及んでおり、この gag 配列の一部を含むパッケージングシグナルを拡張パッケージングシグナル (Ψ') とよび、ウイルスゲノムのパッケージング効率を著しく向上させている。また、MFG は MoMLV 由来の splice donor/ acceptor 配列を有し、さらに導入遺伝子の開始コドンに MoMLV の env 開始コドンに合わせることで、導入遺伝子の転写効率を高めている。MFG は薬剤選択マーカー遺伝子を有してはいない。

(4) MFGS の特徴

3) で述べたように、MFG の Ψ' は gag の一部を有している。この部分はウイルス粒子膜表面や粒子内にある 2 つの重複した Gag-Pol ポリペプチドのアミノ酸末端側をコードするもので、これがパッケージング細胞株が持つ gag-pol と遺伝子相同組換えを起こし、複製可能なレトロウイルス (replication competent virus; RCR) を産生する危険性がある。同時に、このポリペプチドがウイルス由来のタンパク質であるため、宿主の免疫反応を惹起する可能性もあり、MFG の gag 配列に以下のような変異を挿入し、遺伝子組換え率の低下と免疫原性の軽減を図ったものが MFGS である。

(1) 5' LTR より 1256bp 番目の A を T に、1478bp 番目の C を T に変換することで、Gag-Pol の重複翻訳フレームを 84bp と 15bp に短縮させた。

(2) 5' LTR より 1273bp 番目の T を A に変換することで、重複翻訳フレームには影響を与えず、パッケージング機能のためのステムループの形成能力を保持させた。

以上の変異により、導入遺伝子の発現は低下させず、p15Gag の発現は消失した。

尚、pMFGS の全配列を、別紙 3 に示す。

2) 特性

MFGS はアンピシリン (Amp) 耐性の pBR322 系プラスミドベクターに組込まれている。MFGS は、複製に必要な gag、pol、env を欠いているため、パッケージング細胞株以外で複製・増殖することはない。

文献 16: Brenner S, Whiting-Theobald NL, Linton GF, et al. Concentrated RD114-pseudotyped MFGS-gp91phox vector achieves high levels of functional correction of the chronic granulomatous disease oxidase defect in NOD/SCID/beta-microglobulin-/- repopulating mobilized human peripheral blood CD34+ cells. Blood 102: 2789-2797, 2003.

文献 17: Ohashi T, Bomst S, Robinson P, et al. Efficient transfer and sustained high expression of the human glucocerebrosidase gene in mice and their functional macrophage following transplantation of bone marrow transduced by a retroviral vector. Proc Nat Acad Sci USA 89: 11332-11336, 1992.

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造

本遺伝子組換え生物のゲノム構造と制限地図を別紙 2 にて示す。ただし、本遺伝子組換え生物のゲノムは一本鎖 RNA であるため、別表に示す制限地図は DNA 配列に変換されたときのものである。ゲノム配列は、5' 末端側より、5' LTR、拡張パッケージングシグナル (Ψ')、ヒト由来 CYBB 遺伝子及び 3' LTR である。

2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

MFGSgp91 は、MFGS 内の *NcoI*-*Bam*HI の配列とその両端に相当する配列を有するヒト由来 CYBB 遺伝子を挿入して作製された。

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

MFGSgp91 はウイルス粒子形成に必須の遺伝子 *gag*、*pol*、*env* を有していないため、これ自体では完全なウイルス粒子を形成することはない。このため、MFGSgp91 に相当する遺伝子組換え生物を作製するためには、パッケージング細胞株が必要となる。

本遺伝子組換え生物の作製に使用されるパッケージング細胞株は 293-SPA であるが、これは、
a) ヒト由来胎児腎細胞 293 細胞 (ATCC CRL 1573) に MoMLV ゲノム DNA よりパッケージングシグナル、*env* 及び 3' LTR のゲノム配列を取り除いた 5' LTR と *gag-pol* 配列を含む pCRIPenv-ベクターと SV40 early promoter より大腸菌由来 *gpt* 遺伝子を発現する pSV2gpt ベクターをリポフェクション法にて導入し、薬剤 (mycophenolic acid) にて Gag-Pol 発現する細胞を選択し、
b) これら Gag-Pol 発現細胞に、マウスアンフォトロピックウイルス由来 4070A *env* を発現する pCRIPAMgag-と大腸菌由来 *hyg* 遺伝子を発現する pSV2hyg を導入し、薬剤 (hygromycin) にて Env 発現細胞を選択し、
c) 最終的に、Gag-Pol 及び Env を高発現し、レトロウイルスベクターを導入することで高力価のウイルスを産生する細胞株をパッケージング細胞株 293-SPA として樹立した。

この 293-SPA はパッケージングシグナルを有していないため、パッケージングシグナルを有するレトロウイルスベクターを導入しない限り、遺伝子組換え生物 (レトロウイルス) は生じない。

(2) ウイルス産生細胞株

MFGSgp91 ウイルス産生細胞株は、上記、293-SPA に pMFGgp91 をリポフェクション法にて導入し、そのうちで最もウイルス力価の高いものをウイルス産生細胞株として樹立した。

(3) 遺伝子治療臨床研究に使用されるウイルス産生細胞株の Master Cell Bank (MCB)

遺伝子治療臨床研究で使用される MFGgp91 産生細胞株 293-SPA-gp91-155 は、NIH の Harry L. Malech 博士らによって樹立され、同博士が所属する National Institute of Allergy and Infectious Diseases との契約に基づき、米国 Magenta 社 (Rockville, MD) が臨床用ベクター (GMP) として管理・保管されている。今回の遺伝子治療臨床研究において、Magenta 社が製造した 293-SPA-gp91-155 のマスターセルバンク (Master Cell Bank) より作製した MFGSgp91 のウイルス上清が使用される (別紙 4)。

(4) 本遺伝子組換え生物の最終製品の製造・輸送

全ての製造は Magenta 社の管理された製造エリアにて、GMP 準拠の下、行われる。MCB または Working Cell Bank を融解し、拡大培養及び生産培養を行うことで本遺伝子組換え生物を含む培養上清を得、これを無菌濾過して小分けに分注し、凍結することで本遺伝子組換え生物を有効成分とする製材を得る (別紙 5)。

Magenta 社において製造された製材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、国立成育医療センターにて受け入れ試験を実施する (別紙 6)。適切と判断された製材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。

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 の一部として存在し、凍結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。

本遺伝子組換え生物が細胞に感染すると、移入された核酸を含むウイルスゲノム RNA は逆転写酵素により DNA に変換され、プロウイルスとして宿主染色体に組込まれる。プロウイルスは宿主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限り安定して保存される。

本遺伝子組換え生物を製造する過程で、ウイルス産生細胞株内で本遺伝子組換え生物のゲノムの gag-pol 断片及び env 断片が相同組換えを起こし、増殖能を獲得したウイルス (RCR) が生じる可能性がある。生ずる可能性のある RCR の大部分は、供与核酸を失った MFGSgp91 あるいは MoMLV そのもの (これらは遺伝子組換え生物には該当しない) と考えられるが、供与核酸の一部を保持した RCR (遺伝子組換え生物に該当) が生ず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 に存在しないヒト由来 CYBB 遺伝子を含むので、CYBB 遺伝子をリアルタイム PCR 法にて定量することで本遺伝子組換え生物を検出することが可能である。

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

細胞から調製されたゲノム DNA を鋳型に、CYBB 遺伝子をリアルタイム PCR にて定量することで検出可能である。この方法により定量下限は、遺伝子導入細胞を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。同様に、遺伝子導入細胞膜表面上に発現される CYBB 遺伝子の遺伝子産物 gp91^{phox} を抗ヒト gp91^{phox} 抗体 (7AD) にて染色し、flow-cytometry (FACS) にて検出できる。この検出感度は、 10^{-4} から 10^{-5} ($1/10^4 \sim 10^5$) と考えられる。

3) RCR の検出法

(1) S+L-アッセイ

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。100ml あたり 1 RCR が含まれている検体から 300ml の被検試材をサンプリングして接種した場合、95%の確率で被検試材中に RCR が含まれ、検出される。

(2) PCR 法

被検試材から DNA を調製し、4070A 特異的プライマーを用いて PCR を行い、env の増幅を図る。本試験の感度は、パッケージング細胞株を用いた系で希釈率として $10^{-4} \sim 10^{-5}$ であることが確認されている。

6 宿主また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との相違は以下の点である。

- ・ 本遺伝子組換え生物は gag、pol 及び env を欠失しているため、これら領域にコードされているウイルス粒子形成に必要なウイルスタンパク質は発現しない。したがって、Gag-Pol 及び Env を持続的に発現している細胞株においてのみ、増殖が可能である。
- ・ 本遺伝子組換え生物はヒト由来 CYBB 遺伝子を発現する。
- ・ MoMLV がマウス、ラット等の齧歯類の細胞にのみ感染するのに対し、アンフォトロピック 4070A を Env として有するウイルスはヒト、サルなどの細胞にも感染する。したがって、本遺伝子組換え生物は MoMLV とは異なり、ヒト、サルなどの細胞にも核酸を伝播する。

上記、3 点を除き、本遺伝子組換え生物の性質は宿主である MoMLV と同等である。また、本遺伝子組換え生物由来の RCR に関しても、感染可能な生物種は異なるものの、感染様式、病原性など生物多様性に影響を与える性質に関しては野性型 MoMLV と大差がないものと考えられる。

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

所在地： 東京都世田谷区大蔵 2-10-1

名称： 国立成育医療センター（治療実施場所・保管場所は別紙 7）

- 1) 本遺伝子組換え生物 MFGSgp91（以下、「本遺伝子組換え生物」と記す）は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送され、施設内の施錠可能な保存室内の冷凍庫にて保管する。
- 2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物の融解、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」と記す）の安全キャビネット内または細胞調製室内での閉鎖系バッグにて行う。患者由来末梢血 CD34 陽性細胞（以下、「造血幹細胞」と記す）への本遺伝子組換え生物の導入操作、それら細胞の培養、その他、本遺伝子組換え生物の希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取り扱いもすべて同様に細胞調製室の安全キャビネット内または細胞調製室内での閉鎖系バッグにて行う。本遺伝子組換え生物の希釈液及び遺伝子導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷凍庫及び冷蔵庫または培養器にて行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈液もしくはその冷凍品または本遺伝子組換え生物を開放系区間を通して他の P2 レベル区域に運搬する場合には、二重に密封した容器に入れて運搬する。
- 3) 本遺伝子組換え生物液（希釈液を含む）または本遺伝子組換え生物導入細胞を廃棄する際には、滅菌操作を行った後、本施設で定められた感染性廃棄物処理規程（以下、「感染性廃棄物処理規程」と記す、別紙 8）に従い、廃棄する。
- 4) 被験者に対する本遺伝子組換え生物導入細胞の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「クリーンルーム」と記す）内にて輸注により行う。なお、投与時に本遺伝子組換え生物導入細胞に直接接触した注射針、注射器、チューブ等の器具類は使い捨てとし、クリーンルーム内で適切に消毒を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。
- 5) 投与後 3 日まで、被験者をクリーンルーム内の個室で管理し、検査等の理由で被験者が一時的にクリーンルーム外の開放区内に出る場合には、マウス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。クリーンルームにおける管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に消毒し、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。また、被験者の尿及び糞便等の排泄物は、投与翌日以降に行われる被験者の血液を用いた PCR にて自己増殖能を獲得した野性型レトロウイルス（以下、「RCR」と記す）の存在が否定されるまで、クリーンルーム内で適切に消毒を行い、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物取扱いは、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り扱いに準ずる。

6) クリーンルーム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は、クリーンルーム内で適切に消毒を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄するかまたはクリーンルーム内で十分に洗浄する。

7) クリーンルームにおける被験者の管理を解除する前に、RCR が被験者の血液細胞及び血漿において陰性であることを確認する。RCR が確認されたときは、クリーンルームにおける管理を継続する。

8) クリーンルームにおける管理解除後に被験者の血液細胞または血漿から RCR が検出された場合は、直ちに被験者をクリーンルームにおける管理下に移し、上記、(5)から(7)までと同様の措置を執る。

3 承認をう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、被験者体内で増殖能を獲得した遺伝子組換えウイルス (RCR) の有無は、投与後 1、3 週目、それ以降は半年までは月に 1 回、それ以降は年に 1 回の 4070A env を標的とした PCR にて確認する。RCR 出現の際には、患者を入院管理とし、リンパ腫等の発症を注意深く観察する。

4 生物多様性影響が生ずるおそれが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でき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該当箇所が完全に覆われるまで噴霧し、1 分以上放置する。使用したペーパータオルや布等は 121℃、20 分間以上のオートクレーブにより滅菌した後に廃棄する。

クリーンルームにおける管理解除後の被験者血液に RCR が検出された場合には、第一種使用規程に従い、被験者を直ちにクリーンルーム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 実験室等での使用または第一種使用が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

当センターでは、前臨床研究として 1 回、MFGSgp91 遺伝子導入細胞及びその培養上清の RCR 試験を行った。その結果、すべての検体において RCR は陰性であった (別紙 9)。また、これら遺伝子導入細胞を免疫不全マウスに投与しても発がん性並びに毒性所見を認めていない。当該遺伝子治療臨床研究では、患者からの造血幹細胞の採取から投与までを全ての細胞操作を閉鎖系システムで行っており、外部へウイルスが漏出することはない。また、これまでのところ遺伝子導入細胞において残存する MFGSgp91 の活性を検出したこともない。

6 国外における使用等により得られた情報

現在まで Malech 博士らが同一のウイルスベクターを使用しているが、現時点で RCR の検出はない。また、治療を受けた患者において MFGSgp91 の活性を認めた症例もない。

IV 生物多様性影響評価

1 他の微生物を減少される性質

1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR の感染性は、ウイルスがアンフォトロピック Env を持つので、ヒト細胞を含む広範囲の動物種の細胞に感染するが、微生物には感染しない。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ていない。

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の判断

よって、他の微生物を減少される性質について、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性の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の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR の感染性は、ウイルスがアンフォトロピック Env を持つので、ヒト、サル、イヌ、ネコ等の広範囲の動物種の細胞に感染する。したがって、これら生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝播されることにより影響を受ける可能性はある。

2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物はヒト、サル、イヌ、ネコ等の細胞に感染し、染色体への挿入変異により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ヒト由来 CYBB は、NADPH oxidase の構成タンパク質であり、この遺伝子が発現することでの病原性は極めて低いと考えられる。

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された遺伝子組換え生物等の第一種使用等にしがって用いられる限り、本遺伝子組換え生物が施設外に放出される可能性は極めて低い。たとえ、放出されたとしてもその量はごく微量である。また、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠いているので、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過程で出現した RCR が被験者細胞に混入して、被験者に投与された場合、被験者体内で 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 の出現の可能性が極めて低いパッケージング細胞株を使用して製造されており、さらに使用に関しては、事前検査にて RCR が検出されないウイルス上清を使用するので、被験者体内に RCR が侵入する可能性は極めて低い。

4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

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された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性の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は特定されていない。

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された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性の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の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR の感染性は、ウイルスがアンフォトロピック Env を持つので、ヒト、サル、イヌ、ネコ等の広範囲の動物種の細胞に感染する。したがって、これら生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝播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または本遺伝子組換え生物に該当する RCR によって、これら遺伝子組換え生物の核酸が野生生物のゲノム中に組込まれる可能性ある。

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された遺伝子組換え生物等の第一種使用等にしたがって用いられる限り、本遺伝子組換え生物が施設外に放出される可能性は極めて低い。たとえ、放出されたとしてもその量はごく微量である。このため、ごく微量の本遺伝子組換え生物によって野生生物に核酸が伝播する可能性は極めて低い。

遺伝子組換え生物に該当する 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、その核酸が伝播される可能性は否定できないが、RCR の出現の可能性が極めて小さいので、その可能性も極めて小さい。

4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

よって、核酸の水平伝播する性質について、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限り、生物多様性の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

核酸を垂直伝播する性質

本遺伝子組換え生物が感染可能な野生生物の生殖系細胞のゲノム中に組み込まれて、核酸垂直伝播する可能性は完全に否定できない。しかし、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、本遺伝子組換え生物によりその核酸が野生生物に伝播される可能性は極めて低く、さらに RCR が出現しない限り、本遺伝子組換え生物の核酸が伝播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のみに限られているため、その細胞が生殖細胞である確率は極めて低い。また、RCR が出現する可能性は極めて低いため、本遺伝子組換え生物または RCR の核酸が生殖細胞に伝播される可能性は極めて低い。よって、核酸を垂直伝播する性質について、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限り、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

V 生物多様性の総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動植物の種類は 4070A アンフトロピック Env によつて規定されるため、齧歯類及びヒトを含む霊長類に感染するが、自然界で植物及び微生物には感染しない。

第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、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、たとえ拡散したとしても、その量は検出レベル以下であると推定される。本遺伝子組換え生物によるヒト由来 CYBB 遺伝子の発現はヒトには病原性はなく、ヒトに対する影響もない。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠いているため、MLV が増殖しているマウスに感染させれば、MLV が助けとなって増殖する可能性がある。しかし、その場合でも、MLV は血液を介してのみ感染し、同居等による水平感染はないので、さらなる感染が広がる可能性はほとんどない。本遺伝子組換え生物が MLV と同等に増殖するとは考えられず、やがて環境から消滅すると思われる。

環境中でマウスに感染し、MLV ゲノムとの相同組換えによつて RCR が出現する可能性や当該第一種使用によつて極めて微量の本遺伝子組換え生物由来 RCR の環境中への放出も完全に否定できないが、RCR の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝播する性質は野生型アンフトロピック・マウス白血病ウイルスと同等である。ヒトに MLV が感染しても病原性は報告されておらず、たとえ、ウイルスがヒト体内に侵入しても、血清補体により急速に失活すると考えられ、ヒト及び他の哺乳類、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された遺伝子組換え生物等の第一種使用等による限り、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がないと判断される。