

『慢性肉芽腫症』に対する遺伝子治療について

(第1版)

(独) 国立成育医療研究センター

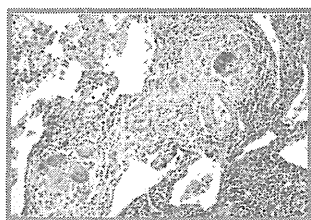
1. はじめに

国立成育医療研究センターでは、現在行っている治療だけでは症状が良ならず、また、ドナー不在などの理由により HLA 一致造血幹細胞移植も行えない X 連鎖慢性肉芽腫症の方を対象として、遺伝子治療臨床研究を実施することになりました。そこで、この遺伝子治療臨床研究について、簡単にご説明します。

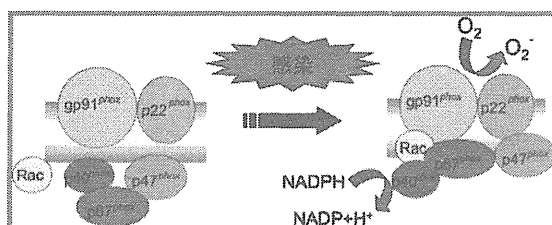
慢性肉芽腫症の方で、この臨床研究についてさらに詳しい説明を希望される方は、主治医の先生とご相談の上、国立成育医療研究センター免疫科までご連絡ください。

2. X 連鎖慢性肉芽腫症について

白血球の一つである好中球は、細菌やカビ（真菌）などの病原体を殺菌することでそれらを無害にして、身体を守っています。病原体を殺菌する活性酸素をつくるには、6つのタンパク質から成る NADPH オキシダーゼが必要です。しかし、X 連鎖慢性肉芽腫症では、CYBB 遺伝子の異常が原因で6つのタンパク質の一つである gp91^{phox} が欠けてしまい、NADPH オキシダーゼを形成することができません。このため慢性肉芽腫症では活性酸素がつくられないので、病原体を殺菌する働きが著しく低下しています。そのため、感染症を繰り返したり、腸や肝臓、肺などに肉芽腫（一種のこぶ）をつくって臓器障害を起こしたりします。



肉芽腫

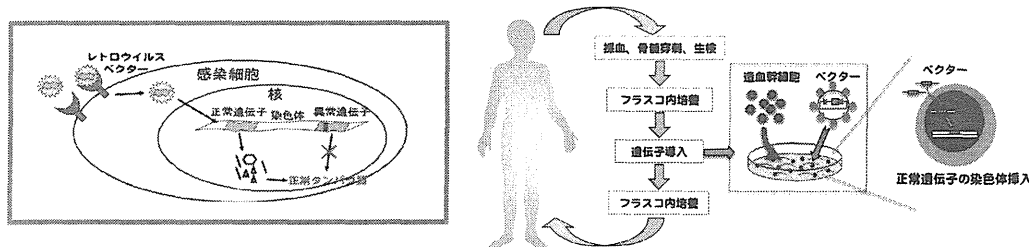


活性酸素 (O₂⁻) の産生

慢性肉芽腫症に対する治療は、予防治療、対症療法（症状を緩和するための治療）、根治療法（病気を根本から治す治療）に分けられます。現在、慢性肉芽腫症に対する根治療法は「造血幹細胞移植」しかありませんが、適切なドナーが見つからない場合もあります。そのような X 連鎖慢性肉芽腫症の方が、今回の遺伝子治療臨床研究に参加することができます。

3. 遺伝子治療とは

X 連鎖慢性肉芽腫症は、一つの遺伝子の変化が原因で起こる病気であるため、本来の遺伝子を回復することで治療できます。本来の遺伝子を入れて治療する方法を、遺伝子治療といいます。遺伝子治療では、本来の遺伝子を造血幹細胞細胞に運ぶために、「レトロウイルス」（遺伝子の運び屋）を使用します。



今回の遺伝子治療では、身体の外で本来の遺伝子を造血幹細胞に入れるため、レトロウイルスが直接身体に投与されることはありません。現在まで 82 名の原発性免疫不全症の方が、欧米などで造血幹細胞遺伝子治

(独) 国立成育医療研究センター
遺伝子治療の案内資料
研究課題名：慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究
版番号：第1版
作成年月日：2010年11月12日
療を受けました（日本では、アデノシン・デアミナーゼ欠損症2名（北海道大学））。

4. 慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療

慢性肉芽腫症の根治療法は、造血幹細胞移植です。しかし欧米を中心に、適合するドナーが見つからない方には、造血幹細胞遺伝子治療が行われています。今回の遺伝子治療では、身体の外で本来の遺伝子を入られた造血幹細胞は、点滴によって身体へ戻されます。このとき、造血幹細胞が効率よく生着するためには、骨髓に生着するための十分な「場所」を用意する必要があります。この「場所」をつくるために、ブスルファンという薬を使用します。これまで、慢性肉芽腫症の13名の方が造血幹細胞遺伝子治療を受けました。その結果、肝膿瘍や肺膿瘍など、従来の治療では軽快しなかった感染症が、11名中8名で改善しました（遺伝子治療前に感染症がなかった2名を除く（韓国））。

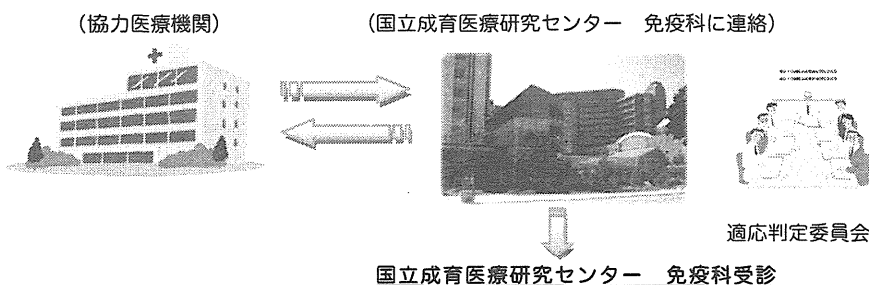
しかし、ドイツとスイスで遺伝子治療を受けた3名の方に、レトロウイルスが原因で骨髓異形成という重い造血異常が occurred。この副作用によって1名が死亡し、2名が造血幹細胞移植を受けて生存しています。ただ、今回の遺伝子治療で使用するレトロウイルスは、既にアメリカで用いられていますが、今のところ治療を受けた方に白血病や骨髓異形成などの造血異常は発生していません。

5. 遺伝子治療により発生した重い副作用（白血病、骨髓異形成の発生）

遺伝子治療で使用するレトロウイルスは、「がん遺伝子」（「がん」の原因となる遺伝子）や「がん抑制遺伝子」（「がん」の発生を抑える遺伝子）の近くに入りやすいため、血液の「がん」（白血病）が発生する危険があります。実際、他の免疫不全症や慢性肉芽腫症の方で遺伝子治療を受けた後、白血病や骨髓異形成をおこした方がいます。今のところ、一つの「がん遺伝子」や「がん抑制遺伝子」がレトロウイルスの影響を受けただけで「がん」がおこるとは考えられませんが、遺伝子治療に伴い「がん」のおこる危険性はあります。そのため、レトロウイルスを用いた遺伝子治療は、遺伝子治療が与える利益（治療効果）が危険性（主に白血病などのがんが起こる危険性）を大きく上回ると判断される方に対してのみ行われます。

6. 国立成育医療研究センターにおける遺伝子治療を希望する方へ

現在、診療を受けている担当医の先生から遺伝子治療に関する簡単な説明を受けて、この臨床研究に参加して治療を希望される方は、国立成育医療研究センター病院「免疫科」を受診してください。その際、担当医の先生から、当免疫科に紹介していただくこととなります。当免疫科では、あなたの病状を協力医療機関の医師と共に検討し、今回の臨床研究に適していると判断した場合は、当センターの「適応判定委員会」に実施に関する審査を申請します。そこで「実施可能」と判断された場合は、当免疫科の医師があなたに今回の臨床研究に関する詳細な説明を行い、同意の有無を確認します。

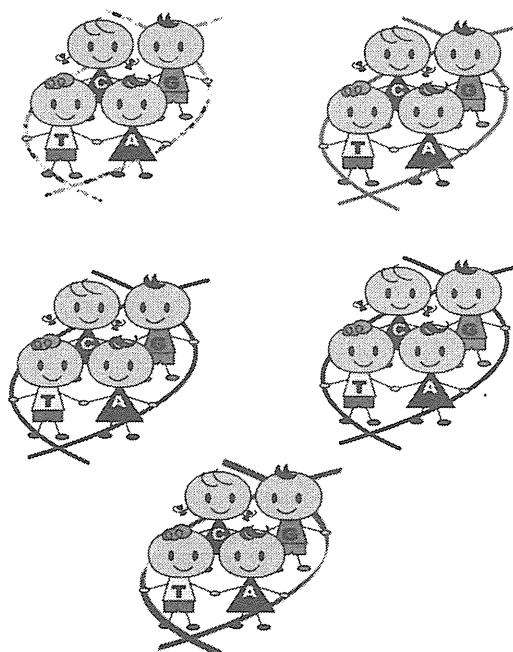


そして、今回の遺伝子治療臨床研究の詳細な説明を聞き、参加に同意（同意書に署名）された方は、臨床研究に参加することができます。

「慢性肉芽腫症」の患者さまへ

～遺伝子治療臨床研究～

入院のしおり

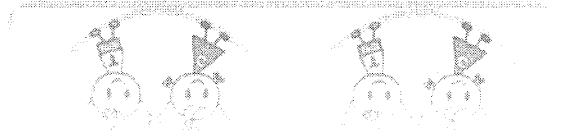
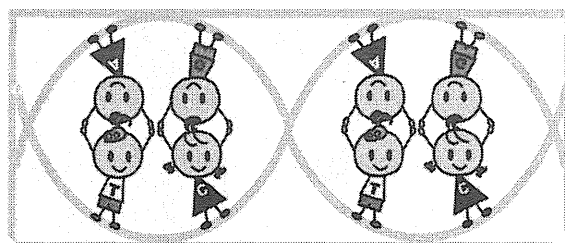
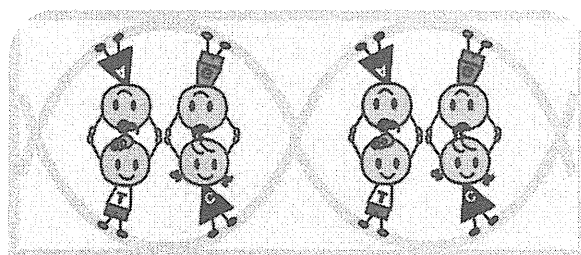


独立行政法人
国立成育医療研究センター

作成年月日：2012年10月23日

目次

1. スケジュール	3
2. 入院	5
A) 準備するもの	5
B) 個室での過ごし方	6
C) 面会の方へ	7



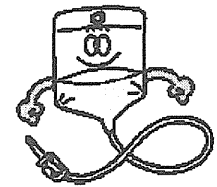
1. スケジュール

慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究のスケジュールは、以下の流れで行います。
詳しくは、別紙スケジュール表をご参照ください。

① 慢性肉芽腫症の患者さんに行います「遺伝治療臨床研究」の説明を聞き、参加に同意されましたら、登録時の検査を行います。

② 造血幹細胞の採取を行います。(G-CSF の注射を行います。)

- 造血幹細胞を増やす薬 (G-CSF) を皮下に注射します。毎日 1 回、4 日間行い、5 日目に静脈より造血幹細胞を含む血液細胞を採取します。
- 造血幹細胞の採取には、約 3~4 時間かかります。(入院して行う場合もあります。)



③ 遺伝子治療のために入院します。(2. 入院を参照)

④ 前治療を行います。(ブスフアンの点滴を行います。)

- ブスルフアンの点滴は、体重にあった量を 1 日 4 回、2 時間くらいかけて 3 日間、静脈から点滴を行います。
- ブスルフアンの点滴により、あなたの免疫力が落ちて感染症にかかる可能性が高くなりますので、日常生活に注意する事があります。不便なことがありますが、医師・看護師の指示にしたがい生活してください。

⑤ 遺伝子 (CYBB) の入った造血幹細胞を点滴します。

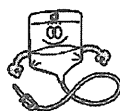
- ブスルフアンの点滴を行ってから 24~36 時間後に、遺伝子を入れた細胞をゆっくりと (10 分以上かけて) 静脈から点滴を行います。
- 遺伝子を入れた点滴をおこなう前後で安全確認のために、体温・呼吸数・脈拍・血圧などの全身状態を観察します。
- 遺伝子導入は、ウイルスを使用して点滴にて行いますので、遺伝子導入に使用したウイルスが体の外に出ているか血液検査を行います。



⑥ 白血球が増えて感染症にかかる危険性がなくなり、医師が一般病棟へ移動でき

ると判断したら一般病棟に移ります。

- ⑦ 状態が安定し日常生活が送れるようになりましたら退院し、外来で診察・検査などを行います。



2. 入院

A) 準備するもの

入室までに準備していただく物品	チェック欄
パジャマ・衣類・下着（前開きのものでゆとりのあるサイズの綿製品を用意してください。*洗濯後はよく乾燥させてください。） *汚染した衣類やタオル類は、消毒液につけて頂きますので、漂白される可能性があります。	
タオル・バスタオル（シャワーまたは体拭きに使用します。 *洗濯後はよく乾燥させてください。）	
プラスチックコップ（うがい用、飲水用）	
内履き（ウエットティッシュでふけるような素材のもの。）	
おもちゃ（必要最低限としてください。洗浄、水ぶきできるもの。ベッドしたに落ちやすい細かいものはお勧めできません。また、DVD・CDはレンタル品の使用も可能ですが、その場合は患者さん本人が触れないように操作をお願いします。）	
ビニール袋（洗濯ものをいれるもの）	

以下の物品は未開封の物を準備して下さい。	チェック欄
お尻ふき（おむつを使用しない場合でも必要です。）	
コットン	
ティッシュペーパー	
歯ブラシ	
綿棒	
ボディソープ、シャンプー（泡タイプを推奨しています）	
口腔ケア用ジェル・うがい薬	
内服の水・お茶（内服に水・お茶を希望される場合はペットボトルの製品をご持参ください。使用される場合はコップに移し開封後は24時間を期限とし新しい物に交換します。）	

※持ち込みが不可なもの

- ぬいぐるみやクッション（ほこりや雑菌がつきやすい）
- 生花・ドライフラワー（微生物・雑菌・カビがつきやすい）
- 古本（雑菌・カビのついている可能性があります）
- シール（ほこりや雑菌がつきやすい）

※本や紙製品を持ち込む場合は、新しく購入したものをご用意ください。

（図書館など不特定多数の方が触れたものは持ち込みできません。）

※室内は清潔を保つため必要最低限のものを持参し、常に必要とされないものはお持ち帰りください。

B) 個室での過ごし方

【入室】

- ① ディスポマスクをつけます。
- ② 肘まで十分に手洗い後、ペーパータオルで水分を拭き取ります。
(腕時計や指輪ははずすか、ずらして十分に手を洗い乾燥させてください。)

【清潔】

- ① 皮膚の清潔に保ち、感染を防ぐために毎日清潔ケアを行います。
- ② 状態に応じてシャワーか清拭を行います。
- ③ 清潔ケア時に着替えをしますので衣類は、ゆとりのある吸着性により綿製品、前開きのものをご用意してください。
- ④ 着替え使用するタオル類は、ご家庭で洗濯しよく乾燥したものを用意してください。
- ⑤ 清潔ケアは看護師が行います。ご家族のご協力をえることもありますのでご了承ください。
- ⑥ ケア時は適宜皮膚状態を観察します。ご家族、ご自身が何か気付いたことがありましたらお知らせください。
- ⑦ 遺伝子治療後数日間は、専用のディスポタオルを使用します。
- ⑧ 遺伝子治療後の数日間使用した衣類やタオルは、指示があるまでビニール袋に入れて保管します。ウイルス拡散の危険性がなくなった時に自宅に持ち帰っていただきますので、洗濯をお願いいたします。
- ⑨ 汚染した衣類は、家庭用漂白剤につけてから洗濯をしてください。

【食事】

- ① 食事は造血幹細胞移植ガイドラインに沿った基準で調理され、ラップがかけられて出されます。看護師がラップをはずしてお渡しします。
- ② 必要時飲水量も計測しますので食事についてくるお茶は飲む前に量を計測してください。
- ③ 食事は患者さんにとって感染源となりえるため、基本的に病院で出された食事をお召し上がりください。持ち込みは原則禁止としております。
- ④ ご希望があれば事前に栄養士と相談し、患者さんの好みのメニューや飲み物を取り入れる事ができる場合もあります。

【口腔ケア】

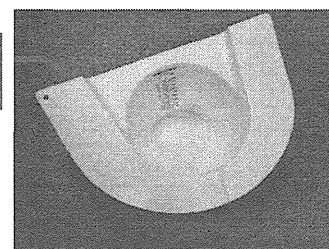
- ① 口腔内の感染を減らすために、食後は歯磨きまたは嗽を行ってください。
- ② 遺伝子治療後、ウイルス拡散の危険性がある期間（1日～3日）
 - 歯磨きやうがいを行うときは、導入したウイルスの拡散を防止するためにガーグルベースンにビニール袋をかぶせて使用します。

- 使用後は、消毒液を入れてから室内のトイレに破棄します。
- 使用したビニール袋は、その都度破棄します。

【排泄】

- ① トイレを使用できる方は室内のトイレを使用し、排泄後は丁寧に手洗いを行ってください。
- ② 排泄物は、尿器またはユーリパン（トイレに設置）で計測します。
- ③ 遺伝子治療後の数日間は、トイレにビニール袋のかかったユーリパンをおきますので、そこに排泄してください。排泄後は量を測ります。

ユーリパン



C) 面会の方へ

- ① 入室時は、手洗いを十分に行ってください。
- ② 清潔な衣類を着用してください。（洋服の素材は、ほこりのつきにくい物で毛皮や羊毛などの洗濯のしにくいものは避けてください。）
室外から感染を防ぐために割烹着またはエプロンなどを準備し、1日1回は交換してください。
- ③ 患者さんが面会の方に首・顔・紙などに触れないようにしてください。髪の毛は後ろでまとめてください。
- ④ 患者さんのベッドで添い寝や座ることはできません。
- ⑤ 患者さんが触れるものはマイペット（洗剤）で拭いてください。
- ⑥ 荷物は最小限にしてください。ベッドサイドには面会者の荷物を持ち込まないでください。
- ⑦ 面会は両親・祖父母までとしてください。
- ⑧ 処置時には一時ご退室いただく場合があります。
- ⑨ 個室の入口のドアは常に閉めておいてください。
- ⑩ 室内にはモニターが設置されており、ナースステーションのテレビ画面に室内の様子が映されます。十分な観察を行うとともに緊急時に対応するためですのでご了承ください。
- ⑪ 面会の方自身の健康にも注意し、十分に休息・睡眠をとってください。
 - 発熱・咳・のどの痛み・嘔吐・下痢・発疹などの症状がある場合は、面会をご遠慮ください。
 - 感染症（インフルエンザ・水痘・おたふくかぜ・麻疹・風疹など）に罹った人と接触した可能性がある場合は申し出てください。
- ⑫ 基本的に付き添いはできません。

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 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 23 年 9 月 29 日

(一部修正) 平成 24 年 2 月 6 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

所 属 国立成育医療研究センター
申請者 加藤 達夫 印
住 所 東京都世田谷区大蔵 2-10-1

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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>ヒト cytochrome b-245, beta polypeptide (CYBB) 遺伝子を含み、マウスアノプオ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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p> <p>遺伝子治療臨床研究実施施設の名称及びその所在地 国立成育医療研究センター病院及び研究所 〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<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

	<p>従い、廃棄する。</p> <ol style="list-style-type: none"> 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「細胞治療室」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した注射針、注射器、チューブ等の器具類は使い捨てとし、細胞治療室内で適切に滅菌操作を実施した後、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、被験者を細胞治療室内の個室で管理し、検査等の理由で被験者が一時的に細胞治療室外の開放区内に出る場合には、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。また、投与後3日目の被験者細胞治療室管理解除は、被験者血液細胞ならびに血漿中の RCR が陰性であることを確認してから行う。なお、RCR が確認されたときは細胞治療室における管理を継続する。 6. 細胞治療室における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に滅菌操作し、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、細胞治療室内で適切に滅菌操作を行い、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 7. 細胞治療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及び被験者の排泄物等に接触した器具は、細胞治療室内で適切に滅菌操作を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄するかまたは細胞治療室内で十分に洗浄する。 8. 細胞治療室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、直ちに被験者を細胞治療室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: 933-947, 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 μ m 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、滅菌操作法として、(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% グルタルール、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遺伝子組換え生物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 a-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: J. Virological methods 5: 165-171, 1982.
- 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 a-Gal (Gal a1-3Gal b1-4GlcNAc-R) Epitopes and a 1, 3 Galactosyltransferase of Xenotransplantation. Trend Glycosci Glycotechnol 11: 317-327, 1999.
- 文献 14: Rother RP, Fedor WI, Springhorn JP, et al. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-a-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 CTAGACTTGCCATGGCGCGATC (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を 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-BamHI* 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する。次に、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 発現細胞を選択する。最終的に、c) 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 (WCB) 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。

なお、BioReliance 社が行った今回の遺伝子組換え生物の品質検査結果を別紙 7 に示す。

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活着し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。

ただ、今回使用するパッケージング細胞株 293-SPA において MoMLV 由来 gag-pol および env 遺伝子は個別のベクターによってその発現が誘導されるため、RCR が出現するための遺伝子組換えは二度必要となる。よって、遺伝子組換えによる RCR 出現の可能性は極めて低いと考えられる。

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 法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 (7D5) にて染色し、flow-cytometry (FACS) 法にて検出できる。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須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。