

自治医科大学附属病院の 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 5
- 生物多様性影響評価書P 9

(参考資料)

- 遺伝子治療臨床研究に係る第一種使用規程の承認状況一覧P23
- 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の概要等P24
- 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等（参照条文）P26
- 「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」の概要及び「遺伝子治療臨床研究に関する指針」との関係についてP30

平成 18 年 9 月 27 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. ヒトアミノ酸脱炭酸酵素遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノ随伴ウイルス 2 型（AAV-hAADC-2）
申請者：自治医科大学附属病院 病院長 島田 和幸
（申請時：布施 勝生）
申請日：平成 18 年 1 月 25 日

【作業委員会の評価結果（自治医科大学附属病院）】

1. ヒトアミノ酸脱炭酸酵素遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノ随伴ウイルス 2 型 (AAV-hAADC-2)
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：自治医科大学附属病院 病院長 島田 和幸（申請時：布施 勝生）
(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 AAV-hAADC-2 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、AAV-hAADC-2 は増殖能を失っていることから、野生型アデノ随伴ウイルス (AAV) 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルスなどとの三重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 AAV-hAADC-2 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。 AAV-hAADC-2 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アデノ随伴ウイルス 2 型 (AAV2) 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。ヒトアミノ酸脱炭酸酵素 (hAADC) 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 AAV-hAADC-2 は AAV2 と同等と考えられ、AAV-hAADC-2 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 AAV-hAADC-2 及び RCA が感染する動植物等の種類は AAV2 と同等で、ほ乳動物に感染し、自然界でそれ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 AAV2 及び AAV のヘルパーウイルスとの三重感染が必要であり、これはヒトにおいてのみ起こり得る。 さらに、AAV2 の病原性は報告されていない。AAV-hAADC-2 が感染したほ乳類で一過性に hAADC 遺伝子が発現する可能性があるが、たとえ hAADC が過剰発現してもそれにより生成するドーパミン又はセロトニンの量は生理的範囲内であると予想される。 したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり AAV-hAADC-2 及び RCA は、AAV2 と同様に、ヒトを含むほ乳類に対して病原性を示さないと考えられる。 なお、AAV2 に由来する非増殖性遺伝子組換えウイルスが米国で用いられているが、環境への悪影響及び当該ウイルスに由来する重篤な副作用に関する報告はない。 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 AAV-hAADC-2 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 AAV-hAADC-2 及び RCA の感染性は AAV2 と同等で、ほ乳動物に感染し、自然界でそれ以外の動植物及び微生物に感染するとの報告はない。AAV-hAADC-2 が感染したほ乳類で一過性に hAADC 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによる他のほ乳類個体への核酸の水平伝達は知られていない。RCA が出現したとしても核酸を水平伝達する性質は AAV2 と同等である。 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 AAV-hAADC-2 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、AAV-hAADC-2 は増殖能を失っていることから、AAV 及び 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 AAV-hAADC-2 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、AAV-hAADC-2 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18年4月1日現在）

※小澤委員について、自治医科大学附属病院からの申請に係る審議には不参加

第一種使用規程承認申請書

平成 18 年 1 月 25 日

厚生労働大臣 川崎 二郎 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

申請者 氏名 自治医科大学附属病院
病院長 布施 勝生
住所 栃木県下野市薬師寺 3311-1

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	ヒトアミノ酸脱炭酸酵素遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノ随伴ウイルス 2 型 (AAV-hAADC-2)
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	治療施設の所在地：栃木県下野市薬師寺 3311 番地 1 治療施設の名称：自治医科大学附属病院 (1) AAV-hAADC-2 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 AAV-hAADC-2 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の安全キャビネット内で行う。AAV-hAADC-2 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、AAV-hAADC-2 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) AAV-hAADC-2 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。）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 実験室内の安全キャビネット内で AAV-hAADC-2 希釈溶液を専用のシリンジ、チューブ及びカニューレからなるデバイスに充填し、それを専用のシリンジポンプに装着したもの（以下「注入セット」という。）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室（以下「手術室」という。）に運搬する。なお、手術室は手術室区域の端に位置し、AAV-hAADC-2 投与当日は手術室で他の手術を行わない。 (5) 被験者に対する AAV-hAADC-2 の投与は、手術室内において、両側の被殻の中に AAV-hAADC-2 希釈溶液を定位脳手術により注入することで行う。 注入セットを定位脳手術装置に慎重に装着した後、被験者の頭蓋骨に開けた直径約 12mm の骨孔からカニューレを刺入して、シリンジポンプにより AAV-hAADC-2 希釈溶液を被殻内の 2 方向へ遅い速度で注入する。注入終了後は、カニューレをそのままの位置で約 3 分間保持した後、遅い速度で抜去する。特に、脳表からの抜去は、毎分約 3mm の速度で慎重に行う。先端を先細り構造にしたカニューレを用いることにより、カニューレ先端からの AAV-hAADC-2 希釈溶液の漏出及び抜去中の AAV-hAADC-2 希釈溶液のエアゾール化を防止する。カニューレ抜去後、被験者の創部を速やかに一時的に閉創す

	る。もう一方の被殻への注入も、これと同様に行う。なお、頭部の周辺には布を二重に敷き詰める。 (6) 被験者への AAV-hAADC-2 投与終了後、被験者の創部を消毒し、真皮に至る創傷用の皮膚欠損用創傷被覆材を貼付して密閉してから、さらに三角巾で覆う。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手術室から、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及び布、ガーゼ類は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却）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。なお、当該手術室は、術後 12 時間は閉鎖する。その後、床を紫外線照射し、さらに 4 級アンモニウム塩配合洗剤で液拭きして滅菌する。 (8) 投与後 72 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手術室及び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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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、AAV-hAADC-2 溶液の取扱いに準じる。 (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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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、被験者の血液及び尿中の AAV-hAADC-2 が陰性であることを確認する。AAV-hAADC-2 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液又は尿中から AAV-hAADC-2 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

アデノ随伴ウイルス (AAV) はパルボウイルス科デペンド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、抗原性の違いに基づき 11 の血清型に分けられており (文献 1、3、4)、AAV-hAADC-2 は AAV 2 型 (AAV2) を宿主として作製された。

AAV2 は自然界に広く分布しており、ヒトでは小児期に初感染が起こること、成人の約半数が中和抗体を有することが知られている (文献 1)。自然環境及び実験室内において、ヒト以外の動物での増殖は報告されていない。

- 文献 1 : Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed., Fields VIROLOGY 4th edition, pp.2327-2379, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)
- 文献 2 : Tijssen, P. ed., Handbook of Parvoviruses, Volume I, pp.11-30, CRC press, Boca Raton, FL (1990)
- 文献 3 : Gao, G., et al., Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J. Virol. 78: 6381-6387 (2004)
- 文献 4 : Mori, S., et al., Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudo-typing characterization of capsid protein. Virology 330: 375-383 (2004)

2 使用等の歴史及び現状

AAV2 を含めいかなる血清型も生ワクチン等に使用した報告はない。また、AAV2 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

ウイルスキャプシドは直径約 26 nm の正二十面体で、エンベロープはない。ゲノムは約 4.7 kb の 1 本鎖 DNA である。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染するが、増殖にはアデノウイルス又はヘルペスウイルスなど（いわゆる「ヘルパーウイルス」）の存在が必要である。培養細胞でも同様にヘルパーウイルスの感染が成立する場合にのみ増殖が起こる。本ウイルスは常温において安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

自然界では、ヒト以外で増殖を伴う感染が起こるかどうかは明らかでない。正常フローラにおける存在については明らかにされていないが、急性感染時には便中に排泄されることがあり得るとされる（文献 1）。

(4) 繁殖又は増殖の様式

AAV2 は、ヒトに主に経気道ないし経口感染し、ヘルパーウイルスと共に増殖したウイルスは分泌物と一緒に排泄される。ヘルパーウイルスと同時に感染した場合、感染個体で増幅し、ヘルパーウイルスと共に次の生物に感染する。ヘルパーウイルスが存在しない場合、AAV2 ゲノムは、扁桃・肺・脾臓などの組織において、2 本鎖環状 DNA として存在し、まれに染色体に組み込まれる（文献 5、6）。

(5) 病原性

AAV2 の感染は不顕性に終わると考えられており、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

AAV2 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

パルボウイルスに共通する性質として物理化学的に安定なキャプシドを有していることから、不活化には 85℃で数分の加熱処理が必要とされている（文献 1）。通常のオートクレーブにより完全に不活化される。

文献 5： Chen, C., et al., Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. J. Virol. 79: 14781-14792 (2005)

文献 6： Schnepf, B., et al., Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. J. Virol. 79: 14793-14803 (2005)

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プロモーター（略称 CMV）、ヒト β グロビンイントロン、ヒト芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 human aromatic L-amino acid decarboxylase (hAADC) (1,443 bp) をコードする DNA、及びヒト成長ホルモンの poly A 付加シグナル（略称 GH pA）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は別紙 1、2）。

(2) 構成要素の機能

CMV は hAADC 遺伝子のみを転写し hAADC (EC 4.1.1.28) が発現される。また、GHpA により転写が終了する。

AAV2 の増殖と複製には、ゲノム両端に存在する反復配列 ITR とウイルス固有の非構造蛋白質である Rep 蛋白質（及びヘルパーウイルスの働き）が必要であり、また感染の標的細胞はウイルスキャプシドによって規定される。そこで、ウイルスゲノム両端の ITR の間のウイルス蛋白質コード領域を上記供与核酸に置き換えた AAV-hAADC-2（ウイルスキャプシドは野生型 AAV2 と同じ組成）については、ヘルパーウイルス存在下でも増殖性をもたず、また感染の標的細胞は野生型 AAV2 と同様であると考えられる（文献 7、8、9）。

文献 7： Yan, Z., et al., Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. J. Virol. 79: 364-379 (2005)

文献 8： Schnepf, B., et al, Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. J. Virol. 77: 3495-3504 (2005)

文献 9： Grimm, D., et al. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. J Virol 80: 426-439 (2006)

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

AAV-hAADC-2 は pAAV-hAADC-2、pHLP19 及び pladeno5 の 3 種類のプラスミドより作製される。pAAV-hAADC-2 は CMV の転写制御下にある hAADC 遺伝子を含む。pHLP19 は AAV2 ゲノムのうち、ウイルス固有の蛋白質である Rep（複製と増殖に関与する）及び VP（キャプシドを形成する）をコードする領域（4,229 bp）と、AAV2 の固有のプロモーターである p5 プロモーター領域（181 bp）を含むヘルパープラスミドである。pladeno5 は、2 型アデノウイルスゲノムの一部（E2A、E4、VA-RNA）を含むヘルパープラスミドである。

ベクターの構造は別紙 3 に記載した。

(2) 特性

pAAV-hAADC-2、pHLP19 及び pladeno5 は Ampicilin 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

AAV2 の両末端にある ITR 以外の領域を供与核酸と置換した。AAV2 由来の塩基配列は両端に存在する ITR 領域を除き、サイトメガロウイルスのプロモーター (CMV)、ヒトβグロビンイントロン、hAADC 遺伝子 (hAADC)、ヒト成長ホルモンのポリ A 配列 (GH pA) によって置換されている (別紙 1、5)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

pAAV-hAADC-2 は、AAV2 の末端反復配列 ITR 配列の間に、hAADC 遺伝子の発現カセットを制限酵素 Not I を使用して挿入し作製した (別紙 3)。また、アデノウイルス 2 型のゲノム DNA から E2A、E4、VA-RNA の各々をプロモーター領域と共に切り出してプラスミド pBluescript II に組み込み、アデノウイルス由来ヘルパープラスミド pladeno5 を構築した (別紙 3)。同様に、AAV2 のゲノム DNA から ITR を削除した、Rep 及び VP 蛋白質発現カセットを pBluescript II に組み込み、AAV 由来ヘルパープラスミド pHLP19 を構築した (別紙 3)。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

pAAV-hAADC-2 を、アデノウイルス由来ヘルパープラスミド pladeno5 及び AAV 由来ヘルパープラスミド pHLP19 と共に、リン酸カルシウム法によってヒト胎児腎細胞 (293 細胞) に導入し、遺伝子組換え AAV である AAV-hAADC-2 を得た (別紙 4)。AAV-hAADC-2 の最終製品は米国 AVIGEN 社で製造した。製造工程は現行の米国 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 FDA 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、自治医科大学附属病院本館 1 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)。

最終製品は自治医科大学附属病院本館 2 階遺伝子治療研究部実験室 (W2-321) 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 293X2 Clone 42 を用い、マスターセルバンクは米国 BioReliance 社 (Lot No. 2003-0076) に、ワーキングセルバンクは BioReliance 社 (Lot No. 3006-101303) 及び米国 GENZYME 社 (Lot No. 6069-0101、6069-0102) 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米国 GENZYME 社に保管されている。

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 AAV-hAADC-2 の 1 本鎖 DNA ゲノムの一部として AAV の ITR に挟まれて存在し、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 10）。

細胞に感染すると AAV-hAADC-2 のゲノムは核内に移行して 2 本鎖 DNA となり、多くは染色体とは独立して存在すると考えられる（文献 7、8、9）。この 2 本鎖 DNA となったものから hAADC が転写される。hAADC の発現は発現する細胞の遺伝子に変化が起こらないかぎり、また細胞が分裂しないかぎり継続するものと考えられる。一般に神経細胞は非分裂細胞であるので長期的な発現が期待される。

AAV-hAADC-2 を 293 細胞で作製する過程で pHLP19 と pAAV-hAADC-2 が非相同組換えを起こして増殖能を獲得したウイルス（replication-competent AAV、以下 RCA とする）を生ずる可能性は否定できない。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。さらにこの RCA も野生型の AAV と同様に AAV のヘルパーウイルスであるアデノウイルスや単純ヘルペスウイルス等がないかぎり実際には増殖することは不可能である。

文献 10： Xu, R., et al., Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. Med. Sci. Monit. 11: 305-308 (2005)

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

AAV-hAADC-2 は宿主の AAV2 に存在しない hAADC 遺伝子を含むので、hAADC 遺伝子 DNA の一部を PCR で増幅、定量する方法で AAV-hAADC-2 を検出できる。このときに用いる PCR 反応では試料 1 µl 中に 12 コピーの AAV-hAADC-2 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。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

AAV-hAADC-2 は rep、cap 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。rep、cap 遺伝子はそれぞれウイルス DNA の複製、AAV 粒子の形成に必要であるため、rep、cap 遺伝子が組み込まれた細胞又は pHLP19 がトランスフェクションされた細胞でなければ AAV-hAADC-2 の増殖は起こらない。AAV-hAADC-2 の感染する動植物の種類、感染経路、伝播様式等は野生型 AAV と同等と考えられる（文献 9）。

AAV-hAADC-2 由来の RCA は、AAV-hAADC-2 作製時、rep、cap 遺伝子をもつ pHLP19 と hAADC 遺伝子をもつ pAAV-hAADC-2 の間での遺伝子組換えにより生じると考えられ

るが、ウイルスゲノムの複製に必須な ITR と Rep、及び細胞向性（cell tropism）を規定するキャプシドは野生型と同一であるので、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、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 AAV 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 RCA 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 AAV 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（文献 7、8、9）。

AAV-hAADC-2 は細胞に感染するとそのゲノムは染色体に組み込まれず、主に核内の染色体外に存在する。

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：栃木県下野市薬師寺 3311 番地 1

治療施設の名称：自治医科大学附属病院

- (1) AAV-hAADC-2 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 AAV-hAADC-2 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の安全キャビネット内で行う。AAV-hAADC-2 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、AAV-hAADC-2 希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通して他の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) AAV-hAADC-2 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。）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 実験室内の安全キャビネット内で AAV-hAADC-2 希釈溶液を専用のシリンジ、チューブ及びカニューレからなるデバイスに充填し、それを専用のシリンジポンプに装着したもの（以下「注入セット」という。）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室（以下「手術室」という。）に運搬する。なお、手術室

- は手術室区域の端に位置し、AAV-hAADC-2 投与当日は手術室で他の手術を行わない。
- (5) 被験者に対する AAV-hAADC-2 の投与は、手術室内において、両側の被殻の中に AAV-hAADC-2 希釈溶液を定位脳手術により注入することで行う。
- 注入セットを定位脳手術装置に慎重に装着した後、被験者の頭蓋骨に開けた直径約 12mm の骨孔からカニューレを刺入して、シリンジポンプにより AAV-hAADC-2 希釈溶液を被殻内の 2 方向へ遅い速度で注入する。注入終了後は、カニューレをそのままの位置で約 3 分間保持した後、遅い速度で抜去する。特に、脳表からの抜去は、毎分約 3mm の速度で慎重に行う。先端を先細り構造にしたカニューレを用いることにより、カニューレ先端からの AAV-hAADC-2 希釈溶液の漏出及び抜去中の AAV-hAADC-2 希釈溶液のエアゾール化を防止する。カニューレ抜去後、被験者の創部を速やかに一時的に閉創する。もう一方の被殻への注入も、これと同様に行う。なお、頭部の周辺には布を二重に敷き詰める。
- (6) 被験者への AAV-hAADC-2 投与終了後、被験者の創部を消毒し、真皮に至る創傷用の皮膚欠損用創傷被覆材を貼付して密閉してから、さらに三角巾で覆う。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手術室から、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及び布、ガーゼ類は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却）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。なお、当該手術室は、術後 12 時間は閉鎖する。その後、床を紫外線照射し、さらに 4 級アンモニウム塩配合洗剤で液拭きして滅菌する。
- (8) 投与後 72 時間まで、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手術室及び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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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、AAV-hAADC-2 溶液の取扱いに準じる。
- (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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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、被験者の血液及び尿中の AAV-hAADC-2 が陰性であることを確認する。AAV-hAADC-2 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液又は尿中から AAV-hAADC-2 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 RCA の出現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、尿中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

ラット及びサルのパークンソン病モデルに対して脳内へ AAV-hAADC-2 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 11、12、13）。また、血液中で AAV-hAADC-2 は検出されていない。

文献 11： Fan, D. S., et al., Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and atomatic L-amino acid decarboxylase genes using two separete adeno-associated virus vectors. Hum. Gene Ther. 9: 2527-2535 (1998)

文献 12： Shen, Y., et al., Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase I for gene therapy of Parkinson's disease. Hum. Gene Ther. 11: 1509-1519 (2000)

文献 13： Muramatsu, S., et al., Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. Hum. Gene Ther. 13: 345-354 (2002)

6 国外における使用等により得られた情報

1999 年に承認され、米国ペンシルバニア大学で実施された第 I 相臨床試験（血友病 B に対するヒト凝固第 IX 因子を搭載する組換え遺伝子 AAV の骨格筋内投与による治療）において 8 名の患者に AAV に由来する遺伝子組換えウイルスを骨格筋に投与した結果、尿中への遺伝子組換えウイルスの排出は注入後 2 日目以降では検出されなかった（文献 14）。一方、ヒト凝固第 IX 因子を搭載する遺伝子組換え AAV を肝動脈に注入した臨床試験では、

8×10^{10} vg/kg 2 名、 4×10^{11} vg/kg 3 名、 2×10^{12} vg/kg 2 名の合計 7 名において、術後 2 日目以降にも血清中にベクターゲノムが検出され、そのうち 2×10^{12} vg/kg を投与した 1 名では 14 週まで陽性であった。また、 4×10^{11} vg/kg 投与群の 1 名では、16 週まで精液中に検出され、別の 1 名では 20 週まで末梢血単核細胞中で検出された（文献 15）。

本研究で用いるウイルス量は血友病の場合に比べておよそ 100 分の 1 以下であり、しかも脳内への投与であるため遺伝子組換えウイルスの環境への排出はより少ないものと考えられる。

文献 14： Manno, C. S., et al., AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. Blood 101: 2963–2972 (2003)

文献 15： Manno, C. S., et al., Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response. Nat. Med. 12: 342–347 (2006)

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

AAV-hAADC-2 及び AAV-hAADC-2 由来 RCA の感染性は野生型 AAV2 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。

(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

AAV-hAADC-2 が自然界で感染する対象は、ほ乳動物である。また、RCA 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 AAV-hAADC-2 から RCA が生じても、AAV-hAADC-2 と同様にヘルパーウイルスが同時に感染しないかぎり複製は起こらない。このような事象が起こりうるのはヒトにおいてのみである（文献 1）。

(2) 影響の具体的内容の評価

AAV-hAADC-2 が感染した動物で一過性に hAADC 遺伝子が発現する可能性はあるが、hAADC の基質となる L-dopa 又は 5-hydroxytryptophan (5-HT) が供給されないかぎり、ドパミン又はセロトニンが産生されることはない。動物体内にある L-dopa 又は 5-HT は少量であり、また自然界においてこれらの基質が外来性に供給されることはないため、たとえ hAADC が過剰発現しても生成するドパミン又はセロトニンの量は生理的範囲内であると予想される。

AAV-hAADC-2 由来 RCA は、野生型 AAV-hAADC-2 と同様に病原性をもたないと考え

られる。

なお、AAV2 に由来する遺伝子組換えウイルスは 1999 年以後、米国で使用されているが（文献 8、9）、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、AAV-hAADC-2 及び AAV-hAADC-2 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。また、AAV-hAADC-2 自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはない、AAV-hAADC-2 由来 RCA も、ヘルパーウイルスであるアデノウイルス等と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、AAV-hAADC-2 が効率よく感染する対象はヒトに限られるため、AAV-hAADC-2 及び AAV-hAADC-2 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

AAV-hAADC-2 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が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

AAV-hAADC-2 及び AAV-hAADC-2 由来 RCA の感染性は野生型 AAV2 と同一と考えられる。野生型 AAV2 はヒトを自然宿主とし、ヒト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。遺伝子組換え AAV2 を使用した実験結果から、ヒト以外にカンクイサル、アカゲサル、イヌ、ラット、マウスなどのほ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

AAV-hAADC-2 が感染したヒト又はヒト以外のほ乳類で一過性に hAADC 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによる他のほ乳類個体への核酸の水平伝達は知られていない。

AAV-hAADC-2 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 AAV2 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、AAV-hAADC-2 及び AAV-hAADC-2 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。また、AAV-hAADC-2 自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖する能力はなく、AAV-hAADC-2 由来 RCA も、ヘルパーウイルスであるアデノウイルス等と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、AAV-hAADC-2 が効率よく感染する対象はヒトに限られることから、AAV-hAADC-2 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 AAV-hAADC-2 由来の RCA の環境中への放出も完全には否定できないが、AAV 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 AAV2 と同じになるか、あるいは短い外来遺伝子を含んでいても野生型 AAV2 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 AAV2 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。

(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。

文献 16 : Kay, M. A., et al., Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. Nat. Genet. 24: 257-261 (2000)

文献 17 : High, K., et al., Human immune responses to AAV-2 capsid may limit duration of expression in liver-directed gene transfer in humans with hemophilia B. Blood 104: 121a (2004)