



第一種使用規程承認申請書

平成 21 年 8 月 27 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿



申請者 氏名 岡山大学病院
病院長 森田 潔
住所 岡山市北区鹿田町二丁目 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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) 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/hREIC)</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の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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>治療施設の所在地 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 治療施設の名称 岡山大学病院</p> <p>(1) Adv/hREIC 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/hREIC 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/hREIC 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/hREIC 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/hREIC 溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（0.18%もしくは0.24%次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒薬（以下「消毒薬」という）または高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。）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) P2 実験室内の安全キャビネット内で Adv/hREIC 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整（以下「Adv/hREIC 液」という）した後、二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った治療室（以下「治療室」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。）に直ちに運搬し、専用の注入用穿刺針、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。）に充填する。</p> <p>(5) 被験者に対する Adv/hREIC 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、治療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 室内において注入用穿刺針を用いて、それぞれ</p>

Adv/hREIC 液を注入することにより行う。注入針の抜去は慎重に行い、Adv/hREIC 液の漏出及びエアロゾル化を防止する。注入部位の周辺には敷布（滅菌された不織布）を二重に敷き詰める。

(6) 被験者への Adv/hREIC 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、治療室又は 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、ウイルス不活化を行い、再利用する。これらのウイルス不活化を治療室又は 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。治療後の当該治療室は床を消毒液で掃き清掃する。なお、治療室内の空気は換気により約 5 分に 1 回（1 時間に 12 回）入れ替わる。

(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個室から外の開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留め、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、研究用検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、Adv/hREIC 溶液の取扱いに準ずる。排泄物等が床等に落下した場合は床を消毒液で掃き清掃する。

(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/hREIC が陰性であることを確認する。Adv/hREIC が確認されたときは、個室における被験者の管理を

	<p>継続する。また排泄物等の床等への落下の有無にかかわらず、個室における管理終了後は床を消毒液で掃き清掃する。</p> <p>(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 Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) 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/hREIC 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。</p>
--	---

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 Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) 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/hREIC) 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

物理的不活化法として Ad5 は 56℃、30 分の加熱で感染性を失う（文献 4）。また化学的不活化法として用いる消毒薬としては以下のものを含む：塩素系漂白剤（たとえば次亜塩素酸ナトリウム）、グルタールアルデヒドなど（文献 5）。特に次亜塩素酸ナトリウムはごく低濃度においても細菌に対して速効的な殺菌力を発揮し、またウイルスに対する効力の面でも最も信頼のおける消毒薬である。0.1%～1%の高濃度であれば結核菌を殺菌することもでき、この濃度においては高水準消毒薬に分類される（文献 6）。

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

文献 5: APIC guidelines for infection control practice

(<http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds3e-eng.php>)

文献 6: http://www.yoshida-pharm.com/text/05/5_2_3.html

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 REIC/Dkk-3 をコードする DNA (REIC/Dkk-3 遺伝子 ; 1053bp) 及び CAG プロモーターを宿主に導入した (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

CAG プロモーターは REIC/Dkk-3 遺伝子のみを転写させることになるため、REIC/Dkk-3 遺伝子が発現される。発現する REIC/Dkk-3 タンパク質は分子量約 60kDa の

糖蛋白質で、N末端に1つのシグナルペプチドとシステインドメイン、coiled-coil ドメインをそれぞれ2つずつ有する350のアミノ酸より構成される。REIC/Dkk-3はDkkファミリーと呼ばれる分泌型蛋白群の一種で、DkkファミリーにはWnt受容体を介してWntシグナル伝達を阻害する作用があることが知られている。REIC/Dkk-3は腫瘍特異的細胞アポトーシスを誘導する機能を有していると考えられており、その機序として、c-Jun-N-terminal kinase (JNK)を活性させることでの、Baxのミトコンドリアへの移行促進作用が考えられている(文献7)。また遺伝子導入により産生された蛋白によるヒト正常細胞(線維芽細胞、前立腺間質細胞、前立腺上皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、気道上皮細胞、肝細胞、腎近位尿細管細胞)への障害性は認めていない(文献7, 未発表データ)。これらの供与核酸の導入によって、Adv/hREICの感染性がAd5から変わることはないと考えられる。また、Adv/hREICにはアデノウイルスが増殖するために不可欠であるE1遺伝子及びE3遺伝子が含まれないため、Adv/hREICに増殖性は無いと考える。

文献7: Abarzua F., et al.: Cancer Research 65:9617-9622, 2005

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

Adv/hREICアデノウイルスベクターはコスミドpAxCAREICより作製される。pAxCAREICはCAGプロモーターの転写制御下にあるヒトhREIC遺伝子を発現させるプラスミドである。コスミドpAxCAREICをヒト胎児腎由来293細胞に感染させ、最終的な遺伝子組換えアデノウイルスベクターAdv/hREICが生成される(ベクターの構造は別紙2)。

(2) 特性

コスミドpAxCAREIC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/hREICのゲノム構造概略図は別紙2参照)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法(別紙2の各図を参照)

コスミドベクターpAxCAREICの作製法を以下に示す。REIC/Dkk-3遺伝子の開始コドン前にBamHIサイトをデザインしたプライマー(REIC-S; 5'-GGATCCAGAGCGGAAATGCAGCGG-3'(配列番号4の塩基番号190-206に相当する配列の5'側にBamHIサイトであるGGATCCを繋げた配列))と、終止コドンの後にEcoRIサイトをデザインしたプライマー(REIC-A: 5'-GAATTCTAAATCTCTTCCCCTCCCAG-3'

(配列番号4の塩基番号1230-1249に相当する配列のアンチセンス鎖の5'側にEcoRIサイトであるGAATTC配列を繋げた配列)) を設計した。次に、pTracer/REIC (別紙2、図1) を鋳型にして、REICのコーディング領域をPCRにより増幅した。PCR条件は、94℃ 30秒、63℃ 30秒、72℃ 1分を30サイクルで行った。約1.1kbの増幅産物をゲルから回収し、EcoRI、BamHI消化した後、pUC119にサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、アンピシリン耐性クローンから抽出したプラスミドの塩基配列の解析を行い、インサートの配列に変異が入っていないことを確認した (pUC119/REIC、図2)。pUC119/REICをEcoRI、BamHI消化し、約1.1kbのREIC断片を回収した。回収したREIC断片をDNA Blunting Kit (タカラ社製、日本) を用いて末端を平滑化し、CAGプロモーターが含まれるコスミド (pAxCAwt、図3、タカラ社製、日本) のSwal部位にサブクローニングした。得られたコスミド (pAxCAREIC、図4) をClaI消化してインサートの有無を確認した。さらに、StuI、SpeI消化してインサートの向きが5'-プロモーター、インサート、ポリAシグナルであることを確認した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

Adv/hREIC 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る。Adv/hREIC 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される予定である。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 FDA 基準に従う予定である (各バンク及び最終製品の品質管理試験の詳細は別紙として添付する予定)。凍結した状態で日本へ輸送した最終製品は、岡山大学病院遺伝子・細胞治療センター (P2 レベル) において保存され、受入れ試験が実施される (受入れ試験の詳細は別紙 3)。

具体的には、最終製品は岡山大学病院中央診療棟 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、保管される (当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙 4)。

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/hREIC 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。細胞に感染すると、Adv/hREIC のゲノムは核内の染色体外に存在し、REIC/Dkk-3 遺伝子が転写される。すなわち、REIC/Dkk-3 遺伝子の発現は一過性である。

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

Adv/hREIC は宿主の Ad5 に存在しない REIC/Dkk-3 遺伝子を含むので、REIC/Dkk-3