

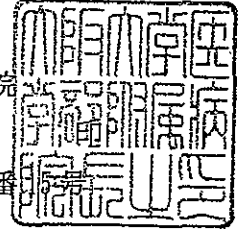


第一種使用規程承認申請書

平成23年 7 月 5 日

厚生労働大臣 細川 律夫 殿
環境大臣 江田 五月 殿

氏名 大阪大学医学部附属病院
申請者 病院長 福澤 正洋
住所 大阪府吹田市山田丘2番



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（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>HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体 α 鎖及び β 鎖を発現し、Gibbon ape 白血病ウイルスの env 蛋白をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニー Maus 白血病ウイルス (MS-bPa)</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 大阪府吹田市山田丘 2 番 15 号 治療施設の名称 大阪大学医学部附属病院</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) MS-bPa 導入細胞は、容器に密閉され、凍結状態で治療施設に運搬し、施設内の施設可能な冷凍庫に保管する。 (2) MS-bPa 導入細胞を、開放系区域を通過して運搬する場合には、密閉した容器に入れ、容器の落下や破損を防止するために当該容器を箱等に入れ運搬する。 (3) MS-bPa 導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理、0.5%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液への浸漬処理又は消毒用アルコール処理による。以下同じ。）を行った後、大阪大学医学部附属病院で定められた感染性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) 被験者に対する MS-bPa 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陽圧でない個室（以下「個室」という。）内において輸注により行う。なお、投与時に MS-bPa 導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具等は使い捨てとし、適切にウイルス不活化を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらのウイルス不活化を個室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。 (5) 投与後 3 日まで、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外の開放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。 (6) 個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、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ポリメラーゼ連鎖反応法試験にて自己増殖能を獲得したレトロウイルス（以下「RCR」という。）の存在が否定されるまで、適切に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。なお、これらのウイルス不活化を個室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。また、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、MS-bPa 導入細胞の取扱いに準ずる。 (7) 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、適切にウイルス不活化を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。なお、これらのウイルス不活化又は洗浄を個室外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて

	<p>運搬する。</p> <p>(8) 個室における被験者の管理を解除する前に、RCR が被験者の末梢血単核球（以下「PBMC」という。）及び血漿において陰性であることを確認する。RCR が検出されたときは、個室における管理を継続する。</p> <p>(9) 個室における管理解除後に被験者の PBMC 又は血漿から RCR が検出された場合は、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記（5）から（8）までと同様の措置を執る。</p>
--	---

「HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体 α 鎖及び β 鎖を発現し、Gibbon ape 白血病ウイルスの env 蛋白をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニー Maus 白血病ウイルス (MS-bPa)」

生物多様性影響評価書

大阪大学医学部附属病院

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 分類学上の位置づけ及び自然環境における分布状況

HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR) α 鎖及び β 鎖を発現し、Gibbon ape 白血病ウイルスの env 蛋白をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニー白血病ウイルス MS-bPa (以下、本遺伝子組換え生物という) は増殖能欠損型レトロウイルスベクターである。本遺伝子組換え生物の宿主はモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus: MoMLV) である。

レトロウイルス科はアルファ〜イプシロンレトロウイルス及びレンチウイルス (以上はオルソレトロウイルス亜科) 並びにスプーマウイルス (スプーマレトロウイルス亜科) の 7 つの属に分類される。マウス白血病ウイルス (Murine leukemia virus: MLV) はガンマレトロウイルス属に属する種である (文献1)。MLV は AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスとして発見された。MoMLV は、実験室内で MLV を継代することにより、病原性の高いウイルス株として Sarcoma 37 細胞から単離されたエコトロピック (同種指向性) レトロウイルスである。MoMLV は発がん遺伝子を持たず、マウスの年齢及び系統にかかわらず感染し、長期間感染したマウスのほぼすべてが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げっ歯類にのみ感染し、ヒトを含む他の動物に対する感染性や病原性の報告はない。

文献1 : ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>

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).

2 使用等の歴史及び現状

レトロウイルスは、医学生物学領域において遺伝子導入ベクターとしての応用が最も早く進んだウイルスであり、米国で行われた遺伝子治療の最初の臨床例もレトロウイルスベクターを用いたものであった (文献3)。遺伝子治療/遺伝子マーキングの臨床プロトコールでは、レトロウイルスベクター法を用いたものが 20.7% を占める (文献4)。レトロウイルスの中でも MoMLV は遺伝子導入用ベクターとして広く使われている。

文献3: 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4: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性 (文献5)

MoMLV 粒子は直径約 100 nm の球形の C 型粒子であり、ウイルスゲノムを内包するコアとそれを取り囲むエンベロープ (外被) からなる。コアは主としてカプシド蛋白質 (CA) により構築されており、その中に 2 分子の RNA ゲノムを有する。そのほか、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、プロテアーゼ (PR)、核酸結合蛋白質 (NC) もコア内部に存在する。コアの周囲にはウイルス産生細胞の細胞膜に由来する脂質二重膜のエンベロープが存在する。エンベロープとコアの間にはマトリックス蛋白質 (MA) が存在する。エンベロープには膜貫通蛋白質 (TM) が突き刺さっており、それに表面蛋白質 (SU) が弱く結合している。SU と TM の複合体はウイルス粒子のエンベロープ上で多量体 (おそらくは三量体) を形成する。

(2) 生息又は生育可能な環境の条件

他のウイルスと同様に、MoMLV は宿主細胞に感染した場合にのみ増殖が可能である (I-3-(4)「繁殖又は増殖の様式」参照)。レトロウイルスは比較的不安定なウイルスであり、体液中、培地中等の限られた環境中でしか感染性を保持できない。なお、ショ糖とゼラチンを添加して凍結乾燥を行うと安定に保存できるとの報告がある (文献6)。

(3) 捕食性又は寄生性

MoMLV はマウス及びラットの細胞に感染し、ウイルスゲノムは逆転写により DNA に変換された後、細胞の染色体に組み込まれる (プロウイルス)。他の生物を捕食することはない。

(4) 繁殖又は増殖の様式

レトロウイルスはキャリアーである動物の血液中や体液中に存在し、他の個体がそれに接触することにより感染する。レトロウイルスが細胞に感染し増殖するときは、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) 蛋白質合成、7) アセンブリー・放出、8) 成熟といった各段階を経る。一方、レトロウイルスのゲノム配列が生殖系細胞の染色体中にプロウイルスとして組み込まれている場合には、動物の繁殖によって子孫に受け継がれる。

野生型 MoMLV がヒト細胞に感染することはない。ヒト細胞に感染可能なエンベロープ蛋白質 (env 蛋白質) [例えば、4070A アンフトロピック env 蛋白質、gibbon ape leukemia virus (GaLV) env 蛋白質] を持つ MoMLV を人為的に作製した場合にはヒトへの感染が可能である。

(5) 病原性

MoMLV の病原性に関して、下記のことが報告されている。

- 1) MoMLV は、マウスに悪性腫瘍を含む多様な疾患を発生させる。
マウスで起こる疾病・病態としては、白血病、リンパ腫、貧血、免疫不全、腫瘍及び神経変性が知られている。
- 2) レトロウイルスはランダムに宿主染色体に挿入されるため、細胞機能に重要な遺伝子を活性化又は不活化し、がん性の変化をもたらす危険性がある。
- 3) 内在性ウイルスとの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無い。
- 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 に感染したことにより細胞が有害物質の産生能を獲得するとの情報はない。

(7) その他の情報

1) MoMLV の不活化条件

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、①121°C、20 分間の高圧蒸気滅菌、②170°C、2 時間の乾熱滅菌、③20~30 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、⑤70%エタノール又は70%イソプロピルアルコール、⑥3.5~4%ホルマリン、⑦2%グルタラル、が有効である (文献7)。また、10%及び 1%ポピドンヨード液 (文献8)、0.3%過酸化水素水 (文献9) で不活化が可能との報告がある。

紫外線及び熱による液体中の MoMLV 及び HIV の不活化を比較した研究によると (文献10)、MoMLV を 1/10 まで不活化するのに必要な紫外線照射量 (D_{10}) は 2,800 erg/mm² であり、熱処理時間 (T_{10}) は 50°C では 50 秒、55°C では 20 秒、70°C では 8 秒である。したがって、55°C、2 分間又は 70°C、50 秒間の熱処理により、MoMLV の感染価を 1/10⁶ に低下させることができると考えられる。また、50°C における T_{10} が 80~90 秒であるとの報告もある (文献11)。

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ザル (文献13) の体内に侵入したときにも同様のメカニズムにより不活化される (文献14) と考えられる。

2) MoMLV からの、増殖能欠損型レトロウイルスベクターの構築

本遺伝子組換え生物は増殖能欠損型レトロウイルスベクターである。野生型 MoMLV のゲノムから gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子の蛋白質コード領域のすべてを除去した増殖能欠

損型レトロウイルスベクターMT (文献15, 16) が構築された。MTのプロウイルス配列 (MT DNA) 中の3'-long terminal repeat (LTR) を murine stem cell virus (MSCV) 由来の配列で置換したものがMS DNAであり、gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を発現する細胞にMS DNAを導入することによりレトロウイルスベクターMSが産生される。本遺伝子組換え生物のゲノムは、HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR) β 鎖遺伝子、マウスホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子プロモーター (P_{pgk}) 及び TCR α 鎖遺伝子がMSのゲノムに挿入された構造を有する。

- 文献5：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 (p. 322)
- 文献6：Levy JA, et al. Freeze-drying is an effective method for preserving infectious type C retroviruses. *J Virol Methods* 5:165-171 (1982).
- 文献7：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8：加藤真吾、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9：Martin LS, et al. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152:400-403 (1985).
- 文献10：Yoshikura H. Thermostability of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in a liquid matrix is far higher than of an ecotropic murine leukemia virus. *Jpn J Cancer Res* 80:1-5 (1989).
- 文献11：Yoshikura H. Ultraviolet sensitivity of helper function of murine leukemia virus. *Arch Biochem Biophys* 154:76-83 (1973).
- 文献12：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).
- 文献13：Galili Uri, et al. Significance of α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) Epitopes and α 1,3 Galactosyltransferase in Xenotransplantation. *Trends Glycosci Glycotechnol* 11:317-327 (1999).
- 文献14：Rother RP, 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).
- 文献15：Yu SS, et al. High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Therapy* 7:797-804 (2000).

文献16: Lee J-T, et al. Engineering the splice acceptor for improved gene expression and viral titer in an MLV-based retroviral vector. Gene Therapy 11:94-99 (2004).

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

本遺伝子組換え生物のゲノムを構成する供与核酸はTCR β 鎖遺伝子、 P_{PGK} 、TCR α 鎖遺伝子、3'-LTRのU3領域及び制限酵素認識部位等の人工配列である。本遺伝子組換え生物のゲノムの構成と、その配列をDNA配列に変換したものの制限酵素地図を別紙1に示す。また、供与核酸の塩基配列及び蛋白質をコードするものについてはそのアミノ酸配列を別紙2に示す。

1) TCR β 鎖遺伝子

本遺伝子は、HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド特異的なヒト由来細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) クローン #2-28 (文献17) から、TCR β 鎖遺伝子に特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法により単離された cDNA である。本遺伝子は 313 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 939 塩基対と終止コドン TAG より成り立っており、コードされる蛋白質は 116 アミノ酸からなる V7-9 領域、15 アミノ酸からなる J2-5 領域及び 179 アミノ酸からなる C2 領域からなっている。TCR β 鎖遺伝子は 7 番染色体に存在し、多数の亜型から構成される。

2) P_{PGK}

P_{PGK} は 513 bp からなるマウスゲノム由来の DNA 断片に含まれる。

3) TCR α 鎖遺伝子

本遺伝子は、クローン #2-28 (文献 17) から TCR β 鎖遺伝子と同様の方法により単離された cDNA である。本遺伝子は 272 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 816 塩基対と終止コドン TGA より成り立っており、コードされる蛋白は 111 アミノ酸からなる V8-1 領域、20 アミノ酸からなる J10 領域及び 141 アミノ酸からなる C 領域からなっている。TCR α 鎖遺伝子は 14 番染色体上に存在し、多数の亜型から構成される。

4) 3'-LTR の U3 領域

本遺伝子組換え生物の 5'-LTR の全域及び 3'-LTR の R 領域は MoMLV 由来であり、3'-LTR の U3 領域は MSCV 由来である。本遺伝子組換え生物を作製するために用いた MS-bPa DNA (II-3-(2)「宿主内に移入された核酸の移入方法」参照) の 5'-LTR は MoMLV 由来、3'-LTR は MSCV 由来であるが、I-3-(7)-2「MoMLV からの、増殖能欠損型レトロウイルスベクターの構築」に記載したとおり、産生細胞から産生される本遺伝子組換え生物の 3'-LTR の U3 領域は MSCV 由来、LTR のそれ以外の領域は MoMLV 由来となる。

MSCV は人工的に作製されたレトロウイルスベクターであり、その LTR は PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus (PCMV) 由来である。Myeloproliferative sarcoma virus (MPSV) は、MoMLV に由来するモロニーマウス肉腫ウイルス (Moloney murine sarcoma virus: MoMSV) を実験室で継代することにより得られた変異株であり、マウス胚性がん細胞株である PCC4 細胞で MPSV を継代することにより、PCMV が得られた。

5) 制限酵素認識部位等の人工配列

MS-bPa DNA 構築の過程で挿入された制限酵素認識部位等の人工配列は別紙 2-5 に示すとおりである。

(2) 構成要素の機能

1) TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子

TCR は T 細胞及び NKT 細胞に特異的に発現する抗原認識レセプターであり、免疫系における T 細胞、NKT 細胞の抗原特異性を決定している。機能的 TCR 分子は抗原認識を行う TCR α β 鎖又は γ δ 鎖のヘテロダイマーからなり、細胞内へのシグナル伝達を担う CD3 分子群と会合し、TCR-CD3 複合体を形成している。

TCR 分子は主要組織適合抗原 (MHC) 拘束性に、標的細胞の MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識する。このことにより、T 細胞や NKT 細胞は抗原特異性を示す。抗原認識の際の結合力の強弱や補助レセプターからのシグナルの有無により、T 細胞や NKT 細胞の活性化、アナジの誘導、分化、生存、細胞死等を司る。

TCR 鎖は免疫グロブリンスーパーファミリー分子に属し、2つの Ig ドメインからなる細胞外領域、20 アミノ酸からなる膜貫通領域、数個のアミノ酸からなる細胞内領域で構成される。2つの Ig ドメインのうち、N 末端側が可変領域、C 末端側が定常領域に相当する。 α 鎖が 45-60 kDa、 β 鎖が 40-50 kDa で α 鎖と β 鎖は S-S 結合でヘテロ 2 量体を形成し、2つの Ig ドメインをもって MHC・ペプチド複合体との接合面を構成している。細胞外領域に存在する CDR1、CDR2 領域は MHC との結合に貢献し、CDR3 領域は主としてペプチドを認識するのに必要とされる。

TCR の発現とシグナル伝達には TCR と複合体を形成する 4 種類の CD3 鎖が重要である。抗原認識の際に TCR-CD3 複合体と CD4 又は CD8 が会合することにより Lck や Fyn 分子が複合体に近づき、CD3 の活性化モチーフ ITAM のチロシンをリン酸化することにより TCR のシグナルが伝達され、T 細胞や NKT 細胞の抗原特異的な生理活性が発現される。

2) P_{PGK}

ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) は解糖系の酵素であり、ほとんどの組織において構成的に発現している。マウス P_{PGK} はヒトを含む広範囲の哺乳類細胞において、細胞が増殖中であるか否かを問わずに機能するプロモーターである。本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において、TCR α 鎖遺伝子の転写を行う。

3) 3'-LTR の U3 領域

LTR 中の MoMLV 由来の他の部分とともにプロウイルスの 5'-LTR 及び 3'-LTR を形成し、これらは細胞染色体への組込みに必須である。また、MoMLV 由来の相同配列と同様に、強いプロモーター活性とエンハンサー活性を有する。MSCV LTR は MoMLV LTR に比べて、胚性幹細胞、胎児がん細胞及びその他の哺乳動物細胞において高い発現レベルを持続的に保持することが可能である。本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において、TCR β 鎖遺伝子の転写を行う。

4) 制限酵素認識部位等の人工配列

本遺伝子組換え生物の生物学的機能には影響を及ぼさないと考えられる。

5) MS-bPa DNA 中の有害配列の有無

MS-bPa DNA の全塩基配列中の有害配列（がん遺伝子、有害物質、トキシン）の有無について相同性の検索を行ったところ、有害配列は見当たらなかった。

文献17 : Miyahara Y, et al. Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. Clin Cancer Res 11(15):5581-5589 (2005).

2 ベクターに関する情報

(空欄)

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

本遺伝子組換え生物のゲノムの構成と制限酵素地図を別紙 1 に示す。本遺伝子組換え生物のゲノムは 1 本鎖 RNA であるが、別紙 1 の制限酵素認識部位は DNA 配列に変換したときのものである。本遺伝子組換え生物のゲノムの構成成分は、5' 末端側から順に、5'-LTR、 Ψ 、TCR β 鎖遺伝子、 P_{PGK} 、TCR α 鎖遺伝子及び 3'-LTR である（詳細は II-1-(1)「構成及び構成要素の由来」及び II-1-(2)「構成要素の機能」を参照）。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

本遺伝子組換え生物は、MS-bPa 産生細胞から産生される。この産生細胞は、本遺伝子組換え生物のプロウイルス配列をパッケージング細胞の染色体に挿入することにより作製された。本遺伝子組換え生物のプロウイルス DNA（但し、5'-LTR は MoMLV 由来、3'-LTR は MSCV 由来；MS-bPa DNA と呼ぶ）を挿入したプラスミドである pMS-bPa は、標準的な遺伝子工学的手法を用いて構築された。以下にその概要を、別紙 3 に詳細及びフローチャートを示す。

MT ベクターは MoMLV プロウイルスの 5'-LTR 及び 3'-LTR を含み、ウイルス蛋白質をコ

ードする配列を全く含まないレトロウイルスベクターである(文献 15, 16)。pMT は MT ベクターのプロウイルス配列を含むプラスミドであり、pMT の 3' -LTR を MSCV プロウイルスの 3' -LTR で置換したものが pMS である。pMS の 3' -LTR の上流に、TCR β 鎖 cDNA のコード域、マウス P_{gk} 及び TCR α 鎖 cDNA のコード域を組み込んだものが pMS-bPa である。

(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

pMS-bPa は、ウイルス粒子形成に必須な gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を欠いているため、この DNA を通常の細胞に導入してもウイルス粒子を産生することはない。したがって、ウイルス粒子の産生にはパッケージング細胞が必要となる。本遺伝子組換え生物の産生に使用するパッケージング細胞株は、PG13 (ATCC CRL-10686) (文献18)で、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミド (1 つは gag-pol 遺伝子、もう 1 つは env 遺伝子) で別々に導入した細胞株である。古い世代のパッケージング細胞株と比較して、この第 3 世代のパッケージング細胞を使用した場合には RCR 出現のリスクが極めて少ないことが知られている。

2) ウイルス産生細胞株の作製

gag-pol 遺伝子発現プラスミドである pGP、エコトロピック env 遺伝子発現プラスミドである pE-eco 及び MS-bPa DNA ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクトした。培養上清中には、マウス由来のパッケージング細胞である PG13 に効率よく感染するエコトロピックレトロウイルスベクター MS-bPa が一過性に産生される。この培養上清を PG13 細胞に感染させ、限界希釈法により細胞をクローニングした。こうして得られたクローンから産生されるレトロウイルスベクター MS-bPa の力価をリアルタイム RT-PCR により測定し、高力価なウイルスを産生するクローン MS-bPa #20 を得た。これをマスターセルバンク (MCB) 用シードセルとして樹立し、これを培養して MCB を作製した。MCB の作製のフローチャートを別紙 4 に、MCB の品質試験項目と結果を別紙 5 に示す。

3) 本遺伝子組換え生物の最終製品の製造

本遺伝子組換え生物の製造は、本遺伝子治療臨床研究の共同実施施設である三重大学医学部の研究者が製造管理責任者となり、タカラバイオ株式会社草津センター (滋賀県草津市野路東七丁目 2 番 62 号) の細胞・遺伝子治療センターの製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。

MCB を解凍後、拡大培養及び生産培養を行うことにより本遺伝子組換え生物を含む培養上清を得る。これを無菌ろ過した後、小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。本遺伝子組換え生物の製造方法のフローチャートを別紙 6 に示す。こうして製造された本遺伝子組換え生物の最終製品の各ロットについて品質試験を行う (別紙 7)。

文献18: Miller AD, et al. Construction and properties of retrovirus packaging cells

based on gibbon ape leukemia virus. J Virol 65:2220-2224 (1991).

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 の一部として存在する。凍結保管中は安定である。感染する動植物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、移入した核酸を含むウイルスゲノム RNA は逆転写され、プロウイルスとして細胞染色体に組み込まれる。プロウイルスは細胞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かぎり安定に保持される。

TCR β 鎖遺伝子は MSCV 由来 LTR の U3 領域により、TCR α 鎖遺伝子は P_{PK} により転写される。これらのプロモーターは持続的に機能するので、両遺伝子の発現は構成的である。

本遺伝子組換え生物を製造する際に、ウイルス産生細胞の細胞内で本遺伝子組換え生物のゲノム、gag-pol 遺伝子断片及び env 遺伝子断片が相同組換えを起こし、RCR が出現する可能性がある。RCR の出現機構から、その大部分は gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を持ち、TCR α 鎖遺伝子及び β 鎖遺伝子を持たないものである。しかし、TCR α 鎖遺伝子又は β 鎖遺伝子を持つ RCR の出現する可能性は否定できない。なお、これらの RCR は遺伝子組換え生物等に該当する。

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) MS-bPa の検出方法

本遺伝子組換え生物は、宿主である MoMLV にはない TCR α 鎖遺伝子及び β 鎖遺伝子を持つので、これらの遺伝子のいずれかを RT-PCR 法で増幅することにより本遺伝子組換え生物の検出が可能である。

2) MS-bPa により遺伝子導入された細胞の検出方法

細胞から調製したゲノム DNA を鋳型に、パッケージングシグナルに相当する配列をリアルタイム PCR で定量することにより検出可能である。

3) RCR の検出方法

・ 293 細胞増幅法

293 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。100 mL あたり 1 RCR が含まれる検体から 300 mL の被検試料をサンプリングして接種した場合、95% の確率で被検試料中に RCR が含まれ、検出される。

・ RT-PCR 法

被検試料から RNA を調製し、GaLV env 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物を検出する。本試験の感度は、パッケージング細胞の末梢血リンパ球中の希釈率として 10^{-4} ~ 10^{-5} であることを確認している。

6 宿主又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の間には以下の相違点がある。

・本遺伝子組換え生物は gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を欠損しているため、本遺伝子組換え生物が感染した通常の細胞はウイルス粒子形成に必要な蛋白質を合成できない。したがって、本遺伝子組換え生物は gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を発現する細胞においてのみ増殖できる。

・本遺伝子組換え生物は TCR α 鎖遺伝子及び β 鎖遺伝子を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物が感染した細胞は TCR α 鎖及び β 鎖を発現する。

・MoMLV がマウス、ラット等のげっ歯類にだけ感染しうるのに対して、GaLV はラット、ハムスター、ウサギ、ミンク、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒト及びニワトリの細胞に感染するとの報告がある (文献19)。本遺伝子組換え生物はウイルス粒子表面に GaLV env 蛋白質を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物はヒト、サル、イヌ等、幅広い動物種の細胞に本遺伝子組換え生物の核酸を伝達しうる。

本遺伝子組換え生物が自立的増殖能を欠損している点を除いて、I-3「生理・生態学的特性」に記載した性質は同等である。

本遺伝子組換え生物由来の RCR が感染可能な生物種は宿主である MoMLV のそれと異なっているものの、感染様式、病原性及び挿入変異の可能性などの、生物多様性に影響を及ぼす程度に大きな違いはないと考えられる。

文献19 : Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 93:11407-11413 (1996).

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 大阪府吹田市山田丘 2 番 15 号

治療施設の名称 大阪大学医学部附属病院

- (1) MS-bPa 導入細胞は、容器に密閉され、凍結状態で治療施設に運搬し、施設内の施錠可能な冷凍庫に保管する。
- (2) MS-bPa 導入細胞を、開放系区域を通過して運搬する場合には、密閉した容器に入れ、容器の落下や破損を防止するために当該容器を箱等に入れ運搬する。
- (3) MS-bPa 導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理、0.5%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液への浸漬処理又は消毒用アルコール処理による。以下同じ。）を行った後、大阪大学医学部附属病院で定められた感染性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) 被験者に対する MS-bPa 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陽圧でない個室（以下「個室」という。）内において輸注により行う。なお、投与時に MS-bPa 導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具等は使い捨てとし、適切にウイルス不活化を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらのウイルス不活化を個室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。
- (5) 投与後3日まで、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外の開放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。
- (6) 個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、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ポリメラーゼ連鎖反応法試験にて自己増殖能を獲得したレトロウイルス（以下「RCR」という。）の存在が否定されるまで、適切に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。なお、これらのウイルス不活化を個室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。また、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、MS-bPa 導入細胞の取扱いに準ずる。
- (7) 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、適切にウイルス不活化を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。なお、これらのウイルス不活化又は洗浄を個室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。
- (8) 個室における被験者の管理を解除する前に、RCR が被験者の末梢血単核球（以下「PBMC」という。）及び血漿において陰性であることを確認する。RCR が検出されたときは、個室における管理を継続する。
- (9) 個室における管理解除後に被験者の PBMC 又は血漿から RCR が検出された場合直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記（5）から（8）までと同様の

措置を執る。

別紙 8：治療施設の地図及び見取り図

別紙 9：大阪大学医学部附属病院医療廃棄物管理規程

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

遺伝子導入細胞を患者に投与した後、患者の PBMC 及び血漿を試料として、GalV env 遺伝子に対する RT-PCR 法により RCR のモニタリングを実施する。RCR のモニタリングは、個室における管理解除前、投与 35±3 日後及び 63±3 日後並びに生存中にわたり実施する。

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

本遺伝子組換え生物を用いた遺伝子導入細胞は、本遺伝子治療臨床研究の共同実施施設である三重大学医学部において調製され、適切な拡散防止措置を執って大阪大学医学部附属病院（以下、当院という）に運搬される。当該遺伝子導入細胞は、当院内の適切に拡散防止措置を執った冷凍庫に保管され、第一種使用規程に従って患者に投与される。

個室における管理解除後の患者の PBMC 又は血漿において RCR が検出された場合には、第一種使用規程に従い患者を直ちに個室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

(1) 本遺伝子組換え生物の産生細胞及び最終製品の RCR 試験

本遺伝子組換え生物産生細胞の MCB、本遺伝子組換え生物最終製品及び end of production cell (EPC) について品質試験を実施した。その結果、いずれも RCR 陰性であった（別紙 5、別紙 7）。

(2) 遺伝子導入リンパ球の RCR 試験

本遺伝子組換え生物を用いて健常人由来 PBMC に遺伝子導入を行い、7 日間培養後の遺伝子導入細胞について品質試験を実施した。その結果、RCR 陰性であった（別紙 10）。

(3) 遺伝子導入リンパ球の毒性

本遺伝子組換え生物及び健常人由来 PBMC を用いて調製した遺伝子導入リンパ球 (GMC) 又は遺伝子導入を行わずに GMC と同様に培養したリンパ球 (NGMC) を免疫不全マウスである NOD/SCID/ γ c^{null} (NOG) マウスに静脈内投与した。GMC 群と NGMC 群の間で、投与後 7 日目及び 14 日目における生存率、体重及び一般症状、剖検時の臓器重量並びに肝臓、腎臓、脾臓及び肺の病理組織学的所見に差は認められなかった（別紙 11）。

(4) 本遺伝子組換え生物がヒトに投与され、感染する可能性

遺伝子治療用の遺伝子導入細胞を調製する際には、本遺伝子組換え生物を固相化したバッグ内でPBMCに遺伝子導入を行い、培養後に細胞を濃縮・洗浄する。このため、細胞調製に使用される本遺伝子組換え生物のほとんどは患者に投与される細胞懸濁液から除去されるが、最大0.7個程度の本遺伝子組換え生物が患者に投与されると推定できる。しかし、マウス由来の産生細胞により製造された本遺伝子組換え生物は、ヒト血清（補体）により速やかに不活化され、患者体内で遺伝子導入が起きる可能性は低いと考えられる。

6 国外における使用等により得られた情報

米国国立衛生研究所のRosenbergらのグループは、レトロウイルスベクターを用いて腫瘍抗原MART-1 特異的TCR 遺伝子を患者自己リンパ球に導入し、悪性黒色腫患者に輸注する臨床試験を実施した（文献20）。この試験は、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球を用いた臨床研究として現在まで唯一の論文報告である。17名の患者に対して遺伝子導入細胞が輸注され、いずれの患者にも遺伝子導入細胞輸注による毒性はみられなかった。しかし、その後行われたMART-1 抗原に対する反応性がより強いTCR 遺伝子を使用した臨床試験では、正常色素細胞への傷害性が報告された（文献21）。なお、国外において、ヒトに対する本遺伝子組換え生物の使用経験はない。

文献20: Morgan RA, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-129 (2006).

文献21: Johnson LA, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114(3):535-546 (2009).

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

本遺伝子組換え生物及びRCRはGaLV env 蛋白質を持つので、広範囲の動物に感染しうるが、微生物への感染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

本遺伝子組換え生物及び RCR は GaLV env 蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型 GaLV と同様、ラット、ハムスター、ウサギ、ミンク、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒト及びニワトリを含む広範囲の動物に感染しうる。したがって、これらの生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝達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はヒト、イヌ、サル等の細胞への挿入変異によって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であると考えられる。

本遺伝子組換え生物からの発現産物である TCR α 鎖及び β 鎖が T リンパ球において発現した場合、この T リンパ球は HLA-A2402 拘束性に MAGE-A4 発現細胞特異的な細胞傷害活性を獲得する。この T リンパ球の影響を受ける可能性のある生物は HLA-A2402 陽性のヒトに限られ、MAGE-A4 を発現する正常組織である精巣において HLA は発現していないので、導入遺伝子が発現することにより、本遺伝子組換え生物がヒトに病原性を示す可能性は非常に低いと考えられる。

本遺伝子組換え生物が有害物質を産生することはなく、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞が有害物質の産生能を獲得するとの情報もない。したがって、有害物質の産生により病原性を示すことはないと考えられる。

(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、本遺伝子組換え生物が患者 T リンパ球とともに患者に投与されることによって当該施設外に出る可能性は極めて低く、出たとしてもごく微量である。また、I-3-(7) 「その他の情報」に記載したように、マウス由来の産生細胞により産生された本遺伝子組換え生物はヒト血清により速やかに不活化される (文献 12)。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しているため、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工程中に出現した RCR が患者 T リンパ球に混入して患

者に輸注された場合には患者体内で 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 出現の可能性が極めて低い第3世代のパッケージング細胞を使用して製造されているうえに、本遺伝子組換え生物の最終製品及び遺伝子導入細胞の RCR 陰性を確認してから使用するので、患者体内に RCR が侵入する可能性は極めて低い。また、RCR 試験で検出されなかった RCR が万一患者体内に侵入したとしても、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、RCR が環境中に放出される可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずる可能性の有無等の判断

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

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) 生物多様性影響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の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR は GaLV env 蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型 GaLV と同様、ラット、ハムスター、ウサギ、ミンク、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒト及びニワトリを含む広範囲の動物に感染しうる。したがって、これらの生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝達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又は RCR によってこれらの遺伝子組換え生物の核酸が野生動物のゲノム中に組み込まれる可能性がある。

(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、本遺伝子組換え生物が患者 T リンパ球とともに患者に投与されることによって当該施設外に出たとしてもごく微量である。ごく微量の本遺伝子組換え生物によって野生動物に核酸が伝達される可能性は非常に低い。

遺伝子組換え生物等に該当する 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、その核酸が伝達される可能性が否定できないが、RCR 出現の可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずる可能性の有無

よって、核酸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

核酸を垂直伝達する性質

本遺伝子組換え生物が感染可能な野生動物等の生殖系細胞のゲノム中に組み込まれて、核酸を垂直伝達する可能性は完全には否定できない。しかし、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、本遺伝子組換え生物によりその核酸が野生動物に伝達される可能性は非常に低い。RCR が出現しないかぎり、本遺伝子組換え生物の核酸が伝達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に限られ、その細胞が生殖系細胞である確率は低いと考えられる。また、RCR が出現する可能性は極めて低い。以上から、本遺伝子組換え生物又は RCR の核酸が生殖系細胞に伝達される可能性は極めて低い。よって、核酸を垂直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。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動物種は GaLV env 蛋白質によって規定されるため、げっ歯類及びヒトを含む広範囲の動物であり、野生型 GaLV と同じである。自然界で植物及び微生物に感染することはないと考えられる。

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、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、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。導入された TCR α 鎖遺伝子及び β 鎖遺伝子が発現することにより、本遺伝子組換え生物がヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しているため、MLV の感染等により gag、pol 及び env 遺伝子を発現している細胞に感染した場合を除いて増殖することはない。MLV に感染しているマウスに本遺伝子組換え生物が感染すれば、MLV がヘルパーとなって増殖する可能性がある。しかしその場合でも、MoMLV は血液を介してのみ感染するので、本遺伝子組換え生物の感染が他個体に広がる可能性はほとんどない。ヘルパーを必要とする本遺伝子組換え生物が野生型 MoMLV と同等に増殖することはないので、やがて環境中から消滅すると考えられる。

環境中でマウスに感染し、MLV ゲノムとの相同組換えによって RCR が出現する可能性や、当該第一種使用によって極めて微量の本遺伝子組換え生物由来 RCR が環境中に放出される可能性は完全には否定できないが、RCR の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は MLV 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、RCR がヒト体内に侵入しても、血清中の補体により急速に失活することを考慮すると、ヒト及び他の哺乳動物、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。

したがって、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、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はないと判断される。