

# 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

ヒトアデノウイルス 5 型 (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

ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) の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](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 CMV 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

CMV 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 の感染性がヒトアデノウイルス 5 型 (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 REIC/Dkk-3 組換え Adeno-X プラスミド DNA (pAdeno-X/REIC) より作製される。この pAdeno-X/REIC は CMV プロモーターの転写制御下にあるヒト REIC 遺伝子を発現させるプラスミドである。pAdeno-X/REIC 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

プラスミド pAdeno-X/REIC 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

ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) の E1 領域を供与核酸と置換した (Adv/hREIC の構造概略図は別紙 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)

REIC/Dkk-3発現Adeno-XプラスミドDNA (pAdeno-X/REIC) を作成するために、まず REIC/Dkk-3遺伝子をpShuttleベクター(Clontech社製)中にクローニングし、哺乳類細胞用のカセットを構築した。これを大腸菌DH5αに導入し、カナマイシ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 (pShuttle/REIC)。次に、pShuttle/REIC からREIC/Dkk-3発現カセットを組換え、REIC/Dkk-3発現Adeno-XプラスミドDNAを構築した。上記の段階で作製したpShuttle/REICをPI-SceI、I-CeuIにて消化し、REIC/Dkk-3発現カセットを調整し、PI-SceI、I-CeuIにて消化したBD Adeno-X viral DNA (Clontech社製)とライゲーションした。そのライゲーション産物をSwalで消化し、大腸菌Stable2 (Invitrogen社製)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。以上により、REIC/Dkk-3発現Adeno-XプラスミドDNA (pAdeno-X/REIC) が作成された。さらにAdv/hREICを作成するために、この構築したREIC/Dkk-3組換えAdeno-XプラスミドDNAを、ヒトHEK293細胞にトランスフェクションすることによってAdv/hREIC組換えアデノウイルスを作製した。以上の操作により、全長のヒトREIC/Dkk-3遺伝子がアデノウイルス内に移入された。

#### (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

Adv/hREIC はヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) の E1 ならびに E3 領域を欠失している。E1 領域に含まれる E1A 及び E1B 遺伝子の産物はウイルス 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。本臨床研究で用いられる Adv/hREIC の最終製品は、(株)桃太郎源社が製造委託した、米国ベイラー医科大学 細胞・遺伝子治療センター (Houston, Texas 州) で製造された製剤を使用する予定である。凍結した状態で日本へ輸送した最終製品は、岡山大学病院新医療研究開発センターの探索的医薬品開発室 (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 階新医療研究開発センターの探索的医薬品開発室のベクター保存室内のディープフリーザー内に保管される (当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙 4)。

#### 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 は宿主のヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) に存在しない REIC/Dkk-3 遺伝子を含むので、REIC/Dkk-3 遺伝子 DNA の一部を PCR で増幅、定量する方法で Adv/hREIC を検出できる。先行した Adv/HSV-tk を用いた前立腺癌遺伝子治療臨床研究 (岡山大学実施) におけるアデノウイルスベクターの血中、尿中の検出結果 (感度 100 コピー/μg) では、アデノウイルスベクター投与後血中では翌日、尿中では 2 日目に全例測定感度以下になっている (文献 8)。なお、投与前は全例測定感度以下であった (論文未発表)。Real-time PCR 法を用いた方法であり臨床応用性を含めた信頼性も実証された。さらに、現在、岡山大学で実施をされている Adv-CAG-hREIC (CAG プロモーターを含む Adv-hREIC) を用いた前立腺癌遺伝子治療臨床研究では、Adv-CAG-hREIC の腫瘍内局所投与が行われた計 20 名の患者 (平成 25 年 7 月 31 日現在) において、Adv-CAG-hREIC の投与後血中では翌日に、尿中では 3 日目に全例測定感度以下になっている (論文未発表)。悪性胸膜中皮腫の患者を対象とした本臨床研究でも、Adv/hREIC の腫瘍内局所投与を含む同様の投与手法を採用するが、類似した結果が予測される。

文献 8 : Nasu, Y, et al.: Molecular Therapy. 15: 834-840 (2007)

#### 6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

Adv/hREIC はヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) の E1 領域の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群を発現できない。E1 領域に含まれる E1A 及び E1B 遺伝子から作られる蛋白質はウイルス DNA の複製に必要なため (文献 1、2)、E1A 及び E1B 遺伝子を持続的に発現している細胞 (例えば 293 細胞) や Ad5 と共感染した細胞でなければ Adv/hREIC の増殖は起こらない。また、Adv/hREIC では外来 CMV プロモーターから転写される REIC/Dkk-3 遺伝子が発現することになる。これらの点を除くと、Adv/hREIC の感染する動植物等の種類、感染経路、伝搬様式等は野生型 Ad5 とまったく同等である。Adv/hREIC 由来の RCA は、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 Ad5 と同等であると考えられる。

### 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

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

- (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。
- (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。
- (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。
- (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、治療室である総合診療棟 IVR-CT 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。
- (5) 悪性胸膜中皮腫に罹患した被験者に対する Adv/hREIC の投与は、総合診療棟 IVR-CT 室内において、Adv/hREIC 液をあらかじめ留置している胸腔内チューブ又は CT ガイド下に注入用穿刺針を用いて、胸水貯留を認める胸腔内、あるいは評価可能な 1 病変部に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、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、穿利用ガイド装置等は、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 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 HEPA フィルターを用いた換気により約 5 分に 1 回（1 時間に 12 回）入れ替わる。

(8) Adv/hREIC 溶液の投与後 24 時間まで、被験者を個室内で管理する。また、Adv/hREIC 溶液を胸腔内に注入する際に胸腔内カテーテルチューブを挿入した場合はその抜去後 24 時間まで、又は、被験者より排出された胸水中の Adv/hREIC が陰性であることが確認できるまで、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。

(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（悪性胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-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。

### 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 Adv/hREIC 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（RCA）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、被験者を個室管理下に移して追跡する。

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

Adv/hREIC 投与後の被験者については、個室管理下、PCR 法にて血液及び尿中の遺伝子組換えウイルス (Adv/hREIC) が消失するまで追跡する。管理中は排泄物が床等に落下した場合は床を消毒液で掃き清掃する。また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。

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

Adv/hREIC と同様に非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型の構造をもち、マウスインターロイキン-12 (mIL-12) 遺伝子を発現する Adv/mIL-12 ベクターの溶液を前立腺癌マウスモデルに投与した動物実験では、マウス血清中の mIL-12 レベルは投与翌日にピークとなり (15000 pg/ml)、投与 3 日後にはベクター投与前のレベルに低下した。mIL-12 の上昇後に脾臓の重量は増加したが mIL-12 レベルの低下に伴い脾臓の重量は正常に戻った。一過性の mIL-12 上昇に伴うと考えられる死亡例はマウスには認められず、また体重減少等も認められなかった (文献 9)。Adv/mIL-12 の消長及び体外への排出については詳細が不明であるが、同じくヒトアデノウイルス 5 型の E1 領域を単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子に置換した非増殖性アデノウイルスベクターである Adv.RSV-TK を用いたマウスモデルの動物実験では、ベクター注入 1 週間後、ベクター DNA は尿、精液及び精子には認めず、血中にはマウス 40 匹中 1 匹のみに認めた。ベクターの広がりには前立腺、精囊、精巣、骨盤リンパ節、消化管及び肝において観察された (文献 10)。

岡山大学病院において、2001 年以後に前立腺癌に対する Adv.RSV-TK 及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究を行い、9 例 (2 例は同一症例) の前立腺がん患者に Adv.RSV-TK の投与を行った (文献 8)。また、2008 年以降に前立腺癌に対する Adv/IL-12 を用いた遺伝子治療臨床研究を行い、6 例の前立腺癌患者に Adv/IL-12 の投与を行った。投与後の被験者の血液、尿中の Adv.RSV-TK および Adv/IL-12 の有無を PCR 法により検査したところ、血液中へのアデノウイルスベクターの移行は低用量群においては認められず、中用量群において投与後 30 分をピークに認められたが翌日には消失した。尿中への移行は投与直後において認めたが多くの場合は 2 日目に消失した。さらに、現在、岡山大学で実施をされている Adv-CAG-hREIC (CAG プロモーターを含む Adv-hREIC) を用いた前立腺癌遺伝子治療臨床研究では、Adv-CAG-hREIC の腫瘍内局所投与が行われた計 20 名の患者 (平成 25 年 7 月 31 日現在) において、Adv-CAG-hREIC の投与後血中では翌日に、尿中では 3 日目に全例測定感度以下になっている (論文未発表)。被験者



の個室管理期間中の医療従事者や被験者の家族等面会者の健康状態からみて、Adv.RSV-TK、Adv/IL-12 および Adv-CAG-hREIC の環境中への放出及び医療従事者や面会者への感染は認められていない。

文献 9 : Nasu, Y., et al.: Gene Ther. 6: 338-349 (1999)

文献 10 : Timme, T. L., et al.: Cancer Gene Ther. 5: 74-82 (1998)

## 6 国外における使用等により得られた情報

本申請の Adv/hREIC については、国外における使用の報告はない。Adv/hREIC と同様に非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型の構造をもつ、Adv.RSV-TK 及び Adv/IL-12 については、前立腺癌における国外での使用が実施されており、以下に示す。

1996 年 8 月より、放射線治療後の局所再燃がんに対する Adv.RSV-TK 及びガンシクロビルの併用療法の第 I 相臨床試験が米国 Baylor 医科大学で実施された。当該試験において Adv.RSV-TK を前立腺巣内に局所内投与された 18 名の患者の尿を検体として、PCR 法によるアデノウイルス DNA の確認が行われた。Adv.RSV-TK 投与後、尿中にはアデノウイルス DNA が、症例により差はあるが、0~32 日間（平均 6.8 日間）検出された（文献 11）。

また、悪性胸膜中皮腫の遺伝子治療に関しては Adv/hREIC と同様に非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型の構造をもつ、Adv/TK もしくは Adv/IFN-beta の使用が実施されている。以下にその概要を示す。

- ① HSV-tk による遺伝子治療の臨床第 1 相試験は 1995 年 11 月から開始された。HSV-tk 遺伝子が組み込まれたアデノウイルスベクターを 1 回、胸腔内に直接投与し、その後ガンシクロビルの全身投与を行った。21 人の未治療の悪性中皮腫患者に対して投与するウイルス量を約 3 倍ずつ上げ、 $5.0 \times 10^{13}$  vp まで達したが、重篤な副作用は認めず、最大耐量には達しなかった[一過性リンパ球減少 (grade 4) 1 例、肝機能異常 (grade 3) 1 例、その他、軽度の一過性の発熱、低酸素血症)、低血圧)、肝機能異常、低酸素血症など]。抗腫瘍効果としては 21 例中 18 例が効果を判定するのに十分な期間を得ており、うち 3 例が 1998 年 2 月の段階で画像上腫瘍の進行を認めなかった。その後、HSV-tk 遺伝子治療はステロイドを追加した投与方法に変更し 5 名の患者に施行、また、1998 年 6 月からは単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子はそのままだウイルスの他の構造をより安全に変更したウイルスベクターを用いて (E1/E3 欠失ウイルスから E1/E4 欠失ウイルスへ変更) 8 例に治療を行った。すなわち、合計 34 名の患者に HSV-tk 遺伝子が組み込まれているアデノウイルスベクターが投与された。追加の症例においても重篤な副作用は認められなかった。この追加症例のうち 2 例において 6.5 年以上の長期生存を認めている (2005 年論文発表時)。(文献 12)

② IFN-beta を組み込んだアデノウイルスベクターによる悪性胸水例に対する遺伝子治療の臨床第1相試験が2003年8月から開始された。投与は、胸腔内投与1回であり、悪性胸膜中皮腫7例、悪性胸水を伴う非小細胞肺癌2例、卵巣癌1例に行われた。投与開始量である $9.0 \times 10^{11}$  vpでは重篤な副作用は認められなかったが、1段階投与量を上げたウイルス量の $3.0 \times 10^{12}$  vpでは4例中2例で重篤な低酸素血症 (grade 3)、肝機能障害 (grade 3) をそれぞれ認めた。低酸素血症を認めた症例は併存疾患として慢性心不全を伴う症例であり、肝機能障害を認めた症例は、以前、悪性リンパ腫のため腹部に放射線治療の既往がある症例であった。この結果、最大耐量は $9.0 \times 10^{11}$  vpと決定された。悪性胸膜中皮腫7例の治療効果に関しては、投与後60日のCTの評価において4例で腫瘍の大きさは変わらず、3例で腫瘍の増大を認めた。またPET検査では3例で不変、1例でFDGの取り込みの低下を認めた。生存に関しては研究が発表された2007年時点で、生存例は3例(34ヵ月、32ヵ月、26ヵ月)であった。(文献13)

文献 11 : Herman, J. R., et al.: Human Gene Ther. 10: 1239-1249 (1999)

文献 12 : Sterman, D.H., et al.: Clin Cancer Res 11,7444-7453(2005)

文献 13 : Sterman, D.H., et al.: Clin Cancer Res. 13,4456-4466(2007)

## 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

Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の感染性は野生型ヒトアデノウイルス 5 型(Ad5) と同一と考えられるので、微生物に感染せず、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

Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の感染性は野生型ヒトアデノウイルス 5 型(Ad5) と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである(文献 1、2)。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

Adv/hREIC が感染したヒトで一過性に REIC/Dkk-3 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによるヒトへの病原性は知られていない。Adv/hREIC 由来 RCA の病原性は、野生型 Ad5 と同等であると考えられる。

なお、Ad5 を宿主とする遺伝子治療用ウイルスベクター(遺伝子組換え生物等)は 1990 年以後、国内外で汎用されているが(文献 11)、環境への悪影響に関する報告はない。1999 年に初めて遺伝子治療薬の投与に起因する死亡例が、当該ベクターを用いた米国での遺伝子治療臨床研究において発生したが、その後の調査研究により、当該事例は、ベクター大量投与の結果、循環血中に漏れ出たベクターのウイルス蛋白により引き起こさ

れた全身的免疫反応に起因するものであることが明らかにされている。(文献 14)。

(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、Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。Adv/hREIC は増殖能を失っているため、野生型アデノウイルスとの共感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。さらに、Adv/hREIC が効率よく感染する対象はヒトに限られること(文献 1、2)を踏まえると、Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 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少ないと考えられる。実際に、現在、岡山大学で実施をされている Adv-CAG-hREIC (CAG プロモーターを含む Adv-hREIC) を用いた前立腺癌遺伝子治療臨床研究では、Adv-CAG-hREIC の腫瘍内局所投与が行われた計 20 名の患者(平成 25 年 7 月 31 日現在)において、Adv-CAG-hREIC の投与後血中では翌日に、尿中では 3 日目に全例測定感度以下になっている(論文未発表)。被験者の個室管理期間中の医療従事者や被験者の家族等面会者の健康状態からみても、Adv-CAG-hREIC 及び当該ウイルスベクター由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量であり、これらのウイルス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少ないと考えられる。

(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。

文献 14 : Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Human Gene Therapy 13:3-13 (2002)

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

Adv/hREIC 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等の特定

Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の感染性は野生型ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである (文献 1、2)。

(2) 影響の具体的内容の評価

Adv/hREIC が感染したヒトで一過性に REIC/Dkk-3 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによるヒトへの核酸の水平伝達は知られていない。

また、Adv/hREIC 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 Ad5 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、Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。Adv/hREIC は増殖能を失っているため、被験者に野生型アデノウイルスが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、Adv/hREIC が効率よく感染する対象はヒトに限られること (文献 1、2) 及びヒト体内の同一細胞に Adv/hREIC 及び野生型アデノウイルスが感染する可能性は極めて低いことも踏まえると、Adv/hREIC はやがて環境中から消滅すると考えられる。

また、Adv/hREIC 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可能性は野生型 Ad5 と同程度であると考えられる。

(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、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

なし。

## V 総合的評価

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、Adv/hREIC 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。また、これまでの動物を用いた予備的実験により、Adv/hREIC による REIC/Dkk-3 遺伝子の一過性発現がヒトに強い病原性を示す可能性は極めて小さいと考えられる。Adv/hREIC が感染する動植物等の種類は野生型ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) と同等で、ヒトにのみ感染し、自然界で他のほ乳動物、植物及び微生物には感染しないと考えられる。

増殖性ウイルス (RCA) を含む遺伝子組換えアデノウイルスのウイルス増殖能に関して、臨床使用経験に基づいた知見を整理した見解・声明が、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ; ICH) および、Gene Therapy Discussion Group

(ICH-GTDG) により communication paper として公開されている (別紙5)。すなわち、2004 年 6 月 10 日の ICH-GTDG 会議において、多量の RCA を含有する非増殖性アデノウイルスベクターを高用量投与された症例に関するデータが米国研究製薬工業協会 (PhRMA) によりとりまとめられ、報告されている。それによると

- ・ がん患者において、種々の投与経路 (腫瘍内、肝臓内、腹膜内) によって投与を受けた場合でも、RCA に起因する重篤な副作用はみられなかった。
- ・ 環境へのリスクという点に関して、現在用いることのできる最も感度の高い RCA 検出法であるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によっても RCA の体外への排出は認められなかったことが、データから示唆された。

ゆえに、RCA が製剤中に仮に多量に含まれていたとしても、ウイルスが生体で増殖し副作用を引き起こすこと、および、ウイルスが体外に排出されることが考えにくく、その増殖型ウイルスの当該環境中での増殖能が極めて低いことが示唆される。今回我々が使用する Adv/hREIC における RCA ウイルス出現の頻度については、その製造元である米国ベイラー医科大学 細胞・遺伝子治療センター (Houston, Texas 州) の品質検査において、 $3 \times 10^{10}$  virus particle に 1 個未満であることが、2012 年 6 月 6 日に確定をされている。この  $3 \times 10^{10}$  virus particle に 1 個未満という数値は、前述の ICH-GTDG 会議で報告された臨床研究の RCA 含有量をはるかに下回るものであり、かつ FDA の推奨する RCA 量の許容基準でもある。すなわち、今回の Adv/hREIC 使用において、増殖型ウイルスが仮に申請使用において出現した場合でも、その環境中 (患者生体内および排出後のその周囲の環境) でウイルス増殖することはほぼ不可能であり、その環境下での増殖能は限りなく低いものと考えられる。結論として、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、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、Adv/hREIC 使用により生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

別紙 1 : REIC/Dkk-3 遺伝子の構造、REIC/Dkk-3 遺伝子のアミノ酸配列

別紙 2 : REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の作製方法、  
REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の構造

別紙 3 : 受け入れ試験の詳細

別紙 4 : 治療施設の地図及び保管場所の概略図

別紙 5 : Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting, June 10, 2004  
日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) 遺伝子治療専門家グループ (GTDG)  
「見解」

## 別紙 1

### 1) REIC/Dkk-3 遺伝子の構造

ヒト REIC/Dkk-3 蛋白コード領域の塩基配列 (1053 base pair) を以下に示す。

```
1 atgcagcggc ttggggccac cctgctgtgc ctgctgctgg cggcggcggt ccccacggcc
61 cccgcgcccc ctccgacggc gacctcggct ccagtaagc ccggccccgc tctcagctac
121 ccgcaggagg aggccaccct caatgagatg ttccgagagg ttgaggaact gatggaggac
181 acgcagcaca aattgcgag cgcggtggaa gagatggagg cagaagaagc tgctgctaaa
241 gcatcatcag aagtgaacct ggcaactta cctcccagct atcacaatga gaccaacaca
301 gacacgaagg ttgaaataa taccatccat gtcaccgag aaattcaca gataaccaac
361 aaccagactg gacaaatggt ctttcagag acagttatca catctgtggg agacgaagaa
421 ggcaagaagga gccacgagtg catcatcgac gaggactgtg ggcccagcat gtactgccag
481 tttgccagct tccagtacac ctgccagcca tgccggggcc agaggatgct ctgcaccggg
541 gacagtgagt gctgtggaga ccagctgtgt gtctggggtc actgcaccaa aatggccacc
601 aggggcagca atgggacat ctgtgacaac cagagggact gccagccggg gctgtgctgt
661 gccttcaga gaggcctgct gttccctgtg tgcacacccc tgcccgtgga gggcgagctt
721 tgccatgacc ccgccagccg gcttctggac ctcatcacct gggagctaga gcctgatgga
781 gccttgacc gatgcccttg tgccagtggc ctctctgcc agccccacag ccacagcctg
841 gtgtatgtgt gcaagccgac cttcgtgggg agccgtgacc aagatgggga gatcctgctg
901 cccagagagg tccccgatga gtatgaagtt ggcagcttca tggaggaggt gcgccaggag
961 ctggaggacc tggagaggag cctgactgaa gagatggcgc tgggggagcc tgcggctgcc

1021 gccgctgcac tgctgggagg ggaagagatt tag
```

### 2) REIC/Dkk-3 遺伝子のアミノ酸配列

以下に上記遺伝子により発現されたヒト REIC/Dkk-3 タンパクのアミノ酸配列を示す。

```
MQRLGATLLCLLLAAAVPTAPAPAPTATSAPVKPGPALSYPQEEATLNEMFREVEELVE
DTQHKLRSAVEEMEAEEAAAKASSEVNLANLPPSYHNETNTDTKVGNNTIHVHREIHK
ITNNQARQMVFSETVITSVGDEEGRRSHECIIDEDCGPSMYCQFASFQYTCQPCRGQRM
LCTRDSECCGDQLCVWGHCTKMATRGSNGTICDNQRDCQPGLCCAFQRGLLFPVCIPL
PVEGELCHDPASRLLDLITWELEPDGALDRPCASGLLCQPHSHSLVYVCKPTFVGSRD
QDGEILLPREVPDEYEVGSFMEEVRQELEDLERSLTEEMALGEPAAAAAALLGEEI
```



## 別紙 2

### REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の作製方法

Adv/hREICの製造法は基本的に3段階であり、各段階の動作において配位位置の確認、挿入シーケンスにおける欠損や変異のなきを確認する。

第1段階として、REIC/Dkk-3遺伝子をpShuttleベクター(Clontech社製)中にクローニングし、哺乳類細胞用のカセットを構築した。具体的には、REIC/Dkk-3遺伝子の開始コドン前に XbaI サイトをデザインしたプライマー (XbaI-REIC-F: 5'-GCTCTAGAGCACCATGCAGCGGCTTGGGGCCACCTGC-3')と、終止コドンの後にKpnIサイトをデザインしたプライマー (KpnI-REIC-R: 5'-GGGGTACCCCCTAAATCTCTCCCCTCCCAGCAGT-3')を設計した。次に、pTracer/REIC (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℃ 1分、62℃ 30秒、68℃ 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、XbaI、KpnI消化した後、pShuttleベクターへクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、カナマイシ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 (pShuttle/REIC、図2)。

第2段階として、REIC/Dkk-3 発現カセットを組換え、REIC/Dkk-3 発現 Adeno-X プラスミド DNA を構築した。第1段階で作製した pShuttle/REIC (10μg) を PI-SceI, I-CeuI にて消化し、REIC/Dkk-3 発現カセットを調整し、PI-SceI, I-CeuI にて消化した BD Adeno-X viral DNA (図3、Clontech社製)とライゲーションした。そのライゲーション産物を SwaI で消化し、大腸菌 Stable2 (Invitrogen社製)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 (pAdeno-X/REIC、図4)。

第3段階として、この構築した REIC/Dkk-3 組換え Adeno-X プラスミド DNA を、ヒト HEK293 細胞にトランスフェクションすることによって組換えアデノウイルスを作製した。REIC/Dkk-3 組換え Adeno-X プラスミドを Pac-I 消化し、線状化した後、Profection® Mammalian Transfection Kit を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。37℃、5% CO2 条件下で 12~16 時間培養した後、アガロース培地に細胞を播種し、7~10 日間培養を続け、出現したプラークを 6~8 個分離し、-80℃にて保存した。次にプラーク溶液を凍結融解 3 回後、1000rpm、2 分遠心した上清を HEK293 細胞に感染させ、細胞の変性を確認後、細胞を回収した。細胞ペレットを 1mL の 50mM Tris-HCl (pH8.0)にて均一に懸濁し、その一部を用いてアデノウイルスを調整後、DNA を抽出し、挿入配列を確認した。残りの溶液は-80℃保存し、正しい挿入配列をもつクローンを選択後に拡大培養を開始した。凍結融解 3 回後、HEK293 細胞に感染させ、細胞の変性を確認後、1500rpm、20 分遠心して細胞を回収した。細胞ペレットは 50mM Tris-HCl (pH8.0)にて均一に懸濁し、1 次アデノウイルス感染細胞培養液として-80℃保存した。次にその培養液を用いて、同様の操作でスケールアップを行い、Tris-HCl (pH8.0)にて均一に懸濁した溶液を 2 次アデノウイルス感染細胞培養液として-80℃保存した。その培養液を凍結融解 3 回後、1500rpm、20 分遠心した上清を塩化セシウム密度勾配遠心により精製し、ウイルス液として-80℃凍結保存した。この Ad-CMV-human REIC より、臨床研究において用いられる最終的な組換えアデノウイルスベクター (Adv/hREIC) が作製される。

图 1

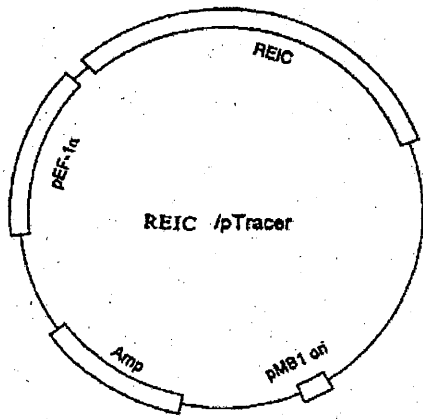


图 2

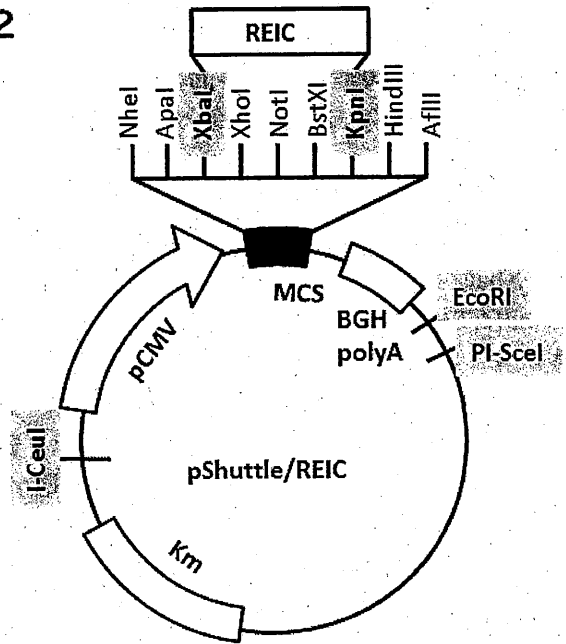


图 3

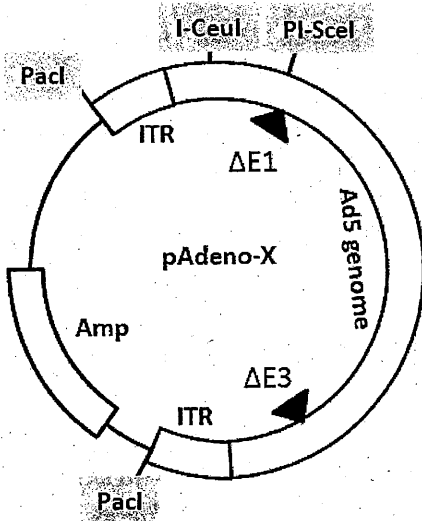
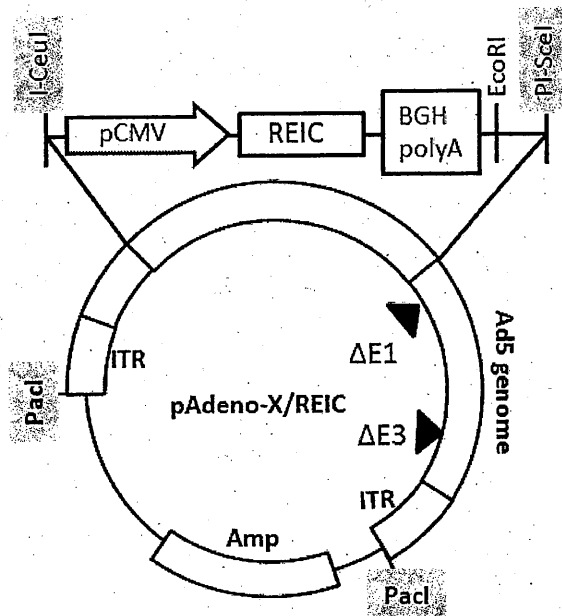
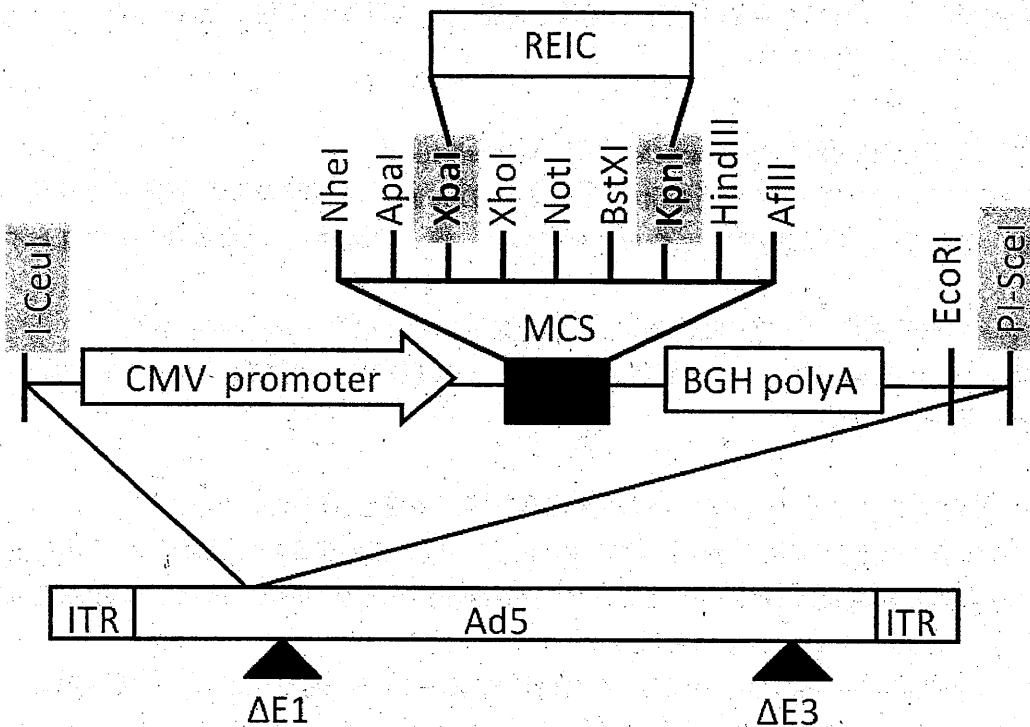


图 4



また、以下に、ヒト REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の構造を示した。



ヒト REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターは、ヒト REIC/Dkk-3 遺伝子全長を pAdeno-X ベクターに挿入した pAdeno-X-REIC を、HEK293 細胞に感染させることにより作成された。すなわち本遺伝子治療臨床研究で用いられるベクターは、上図に示すような E1 および E3 欠損型の非増殖性アデノウイルスベクターである。逆方向反復塩基配列末端 (ITR) は、アデノウイルス DNA の複製に必要不可欠で、E1/E3 を欠損した Ad5 ゲノムを挟んでいる。REIC/Dkk-3 の cDNA は、CMV プロモーター及び BGH ポリ A シグナルとともに組み込まれている。このウイルスベクターは細胞内に侵入し、ウイルスゲノムは核内へと注入されるが、発現すべき E1 遺伝子が欠損しているため、このタンパク質により転写活性化を受ける他のすべてのアデノウイルスプロモーターは駆動することができず、ウイルスの生活環はここで停止する。そして、外来 CMV プロモーターから転写される REIC/Dkk-3 遺伝子のみが発現することになる。

## 別紙 3

### Adv/hREIC 製剤の受入れ試験の詳細

#### 1. 変性の有無を確認する外観試験

融解後ベクター液の混濁の有無を肉眼で確認する。混濁が存在した場合は、当該ベクターを使用せず破棄する。

#### 2. ウイルスの力価の測定 Viral particle (VP) concentration

Sample を 2 倍希釈し分光光度計で吸光度 (OD<sub>260</sub> 値: 溶解液のみの吸光度で補正した値) を計測し、下記の数式より VP を求める。尚、吸光度は 6 回計測の平均値とする。

$$VP = \text{平均吸光度 (平均 OD}_{260} \text{ 値)} \times 2 \text{ (希釈率)} \times 1.1 \times 10^{12} \text{ viral particle/ml}$$

製造者により測定された既知の VP 濃度から 25% 以内に維持されていることを使用適格の条件とする。

#### 3. REIC 発現アデノウイルスベクターの生物学的活性を確かめるための試験

培養細胞への遺伝子導入時における REIC タンパク質の産生能や細胞死 (アポトーシスを含む) 誘導能を検定するため、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞である 211H 細胞を用いた *in vitro* functionality assay を行う。

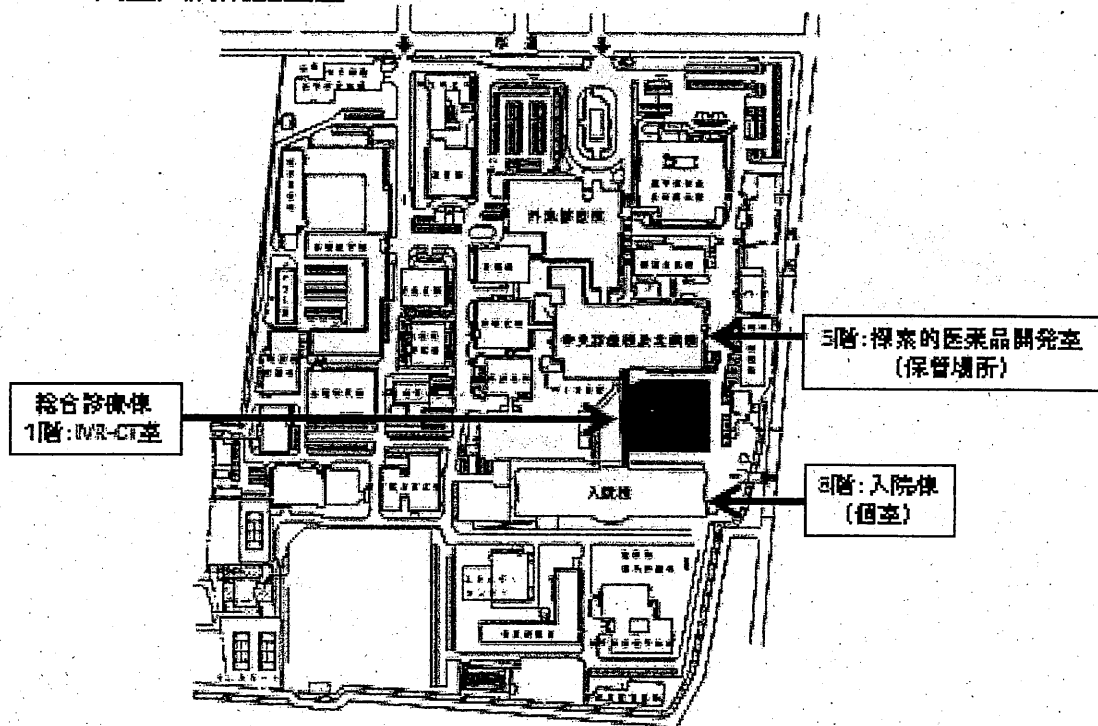
3-a. Adv/hREIC 感染 (100 MOI) 後、24 時間後に 211H 細胞を回収し、細胞内における REIC タンパク質の発現をウェスタンブロット法により確認する。

3-b. Adv/hREIC 感染 (500 MOI) 後 72 時間後に、211H 細胞の細胞死誘導率をヘキスト 33342 による細胞核の染色により測定する。岡山大学において GMP (Good Manufacturing Practice) 基準を満たす Adv/hREIC のウイルスベクターを用いた functionality assay では、感染後の細胞死誘導率は 88.6% であった。受け入れ時に実施した場合の細胞死誘導率が、上記の岡山大学における結果 (細胞死誘導率: 88.6%) から 25% 以内に維持されていることを条件とする。

別紙 4

治療施設の地図及び保管場所の概略図

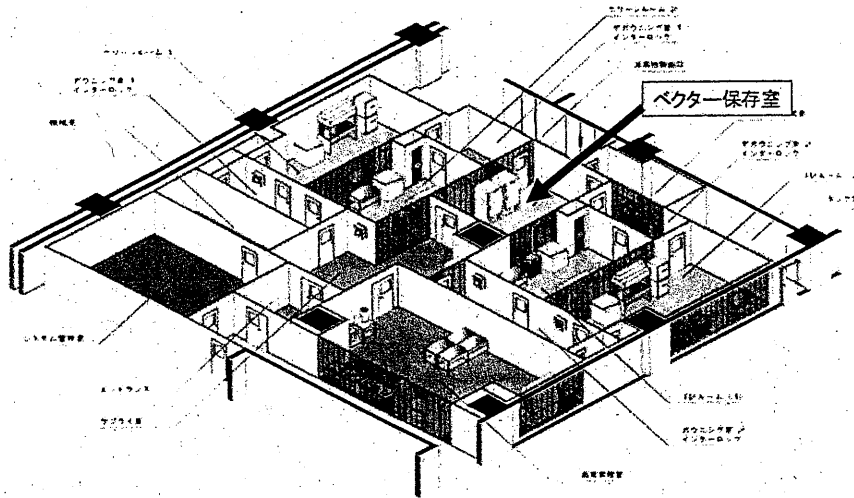
岡山大病院配置図



# アデノウイルスベクターの保管・調剤の場所

岡山大学病院中央診療棟 5階 新医療研究開発センター（探索的医薬品開発室）

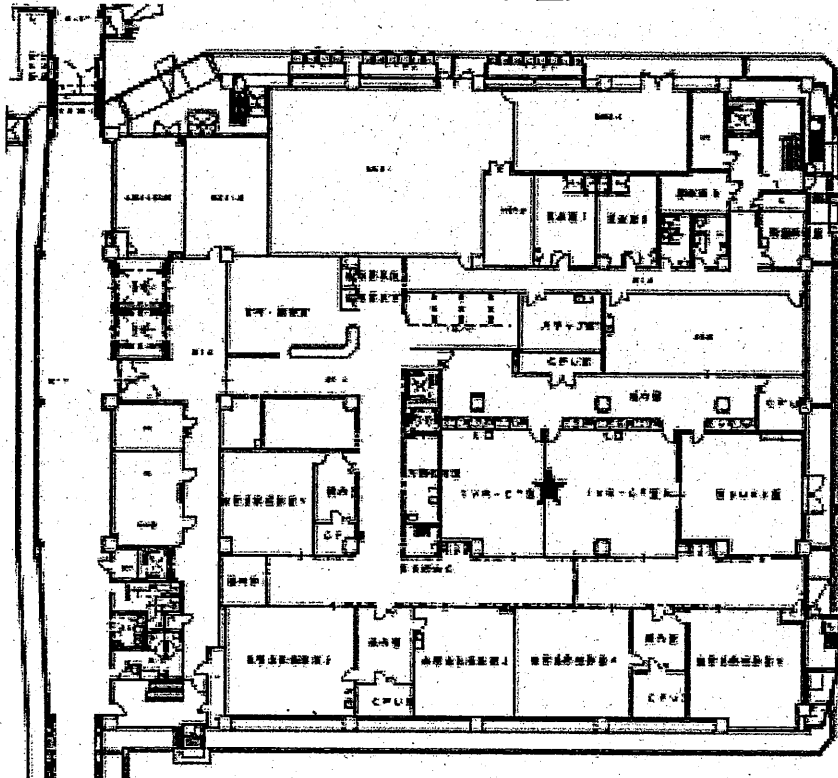
岡山大学病院 新医療研究開発センター（探索的医薬品開発室）



アデノウイルスベクター注入場所

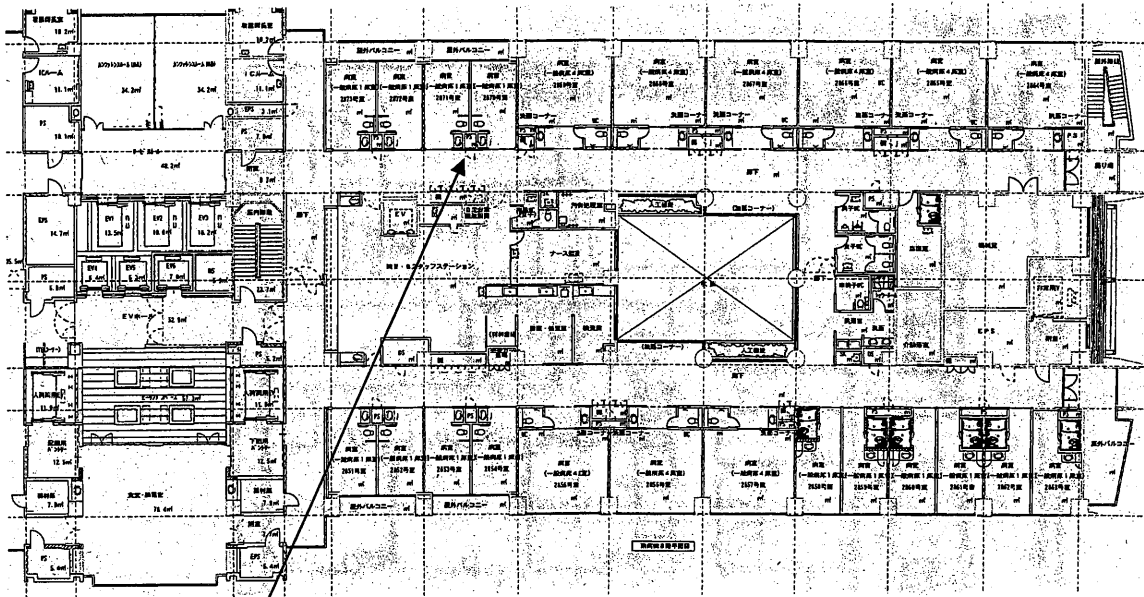
1) 岡山大学病院 総合診療棟 IVR-CT 室

総合診療棟1階 (CT室)

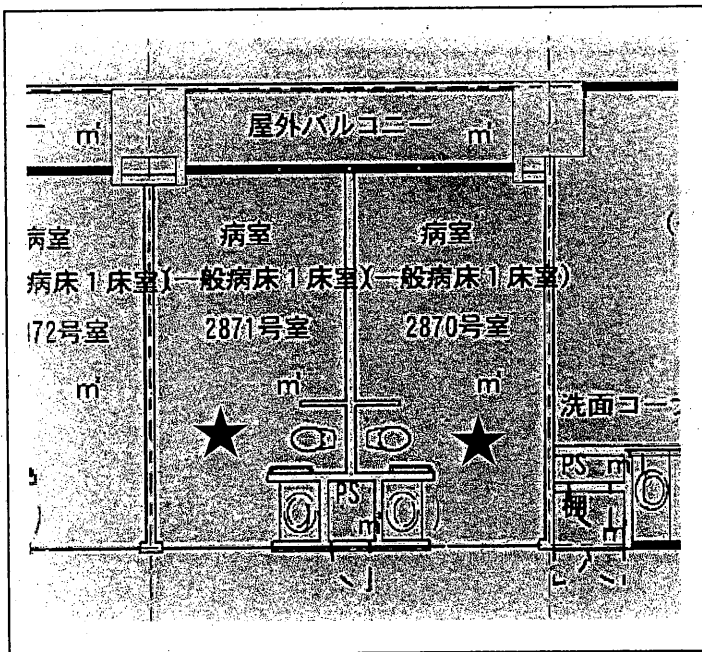


患者の管理場所 (個室)

入院棟 東 8 階 外科病棟 重症個室 2870 号、2871 号室



患者の管理場所





別紙 5 :

Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting. June 10, 2004

**Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting  
June 10, 2004  
(Revised in February 2005\*)**

The scope of the meeting included an update on new gene therapy developments in the regions and an exchange of information on the main topics agreed upon during the 2003 meeting of the ICH GT discussion group (GTDG). The group also discussed organisational matters relevant to future activities in 2005 and 2006. Representatives from the three ICH regions (including experts from regulatory authorities and industry), Health Canada and EFTA participated.

***Update on SCID gene therapy***

Updates on the experience in the regions were provided. Some documented clinical benefits are now available, such as those seen in the XI-SCID and ADA/SCID clinical trials. Encouraging preliminary results are being generated in clinical trials in Graft Versus Host Disease (GVHD) as well.

The group discussed and agreed on general risk factors:

- Subject age
- Copy number/integration events per cell >1 (on average)
- Dose (total number of transduced cells)
- Relative risk associated with transduced cell populations (most to least):
  - Stem cells with expected selective advantage
  - Stem cells
  - T cells or other differentiated cells

New technologies to assess the risks of insertional oncogenesis are being developed and appear to be useful for clinical research purposes but have not yet been validated. LAM PCR is widely used but since it is not yet validated the use of more than one test could be called for. Dominant bands vary during the disease and do not provide the basis for therapeutic decision-making. If cell clonality trend is detected with a combination of reliable traditional methods, patients should be monitored more often.

The GTDG considered scientifically justified using a combination of methods to improve surveillance for cell clonality as a tool of clinical management. The group also considered valuable the sample archiving for further scientific purposes, as new methods are still in development.

***Long-term follow-up (LTFU) of participants in gene therapy clinical trials***

FDA presented their current recommendations and background on long-term follow-up of participants in GT clinical trials. All GT trials should have a plan for LTFU for up to 15 years. Data collection should include

- De novo* cancer
- Neurologic disorders\*
- Rheumatologic disorders
- Immunological/haematological disorders

\* **Considerations** : In order to avoid confusion with the M2 ESTRI Recommendations that follow the step-wise ICH process, the ICH Steering Committee requested that the outcome of GTDG discussions should now be called "Considerations", rather than "Recommendations".

Physical examinations should be carried out for the first 5 years, followed by a questionnaire for the years 6 to 15 (questionnaire should be kept simple)

This observational information should be collected and submitted annually with the purpose of assessing long term risks for patients involved in GT clinical trials.

The group considers that GT LTFU should be included in the ICH GTDG program in view of the specific features of Gene Therapy that would complement ICH E1 and other Pharmacovigilance documents under development.

#### ***HIV vaccination in healthy volunteers: possible risks***

The GTDG discussed a number of issues related to the exposure of healthy volunteers to HIV vaccines based on gene therapy products:

- Potential risks related to the manufacturing strategy of vaccinia-derived vectors (e.g., production in primary chicken embryo fibroblasts which could be a source of retroviral sequences)
- Production in non-diploid cell lines of a number of gene therapy vectors used therapeutically or in a preventive mode
- Risks posed by functional HIV genes included in the vector (such as *env*, *nef*, *tat*)
- Long-term monitoring of healthy volunteers
- Risk-benefit balance for healthy volunteers

In the USA, gene-based vaccines used as preventive medicines are not regulated as gene therapy products. In Japan, such vaccines are not regulated as gene therapy products. In the EU, gene-based vaccines are considered to be gene therapy products as defined by Annex I to Directive 2001/83/EC as amended by Directive 2003/63/EC; the EU therefore will continue to explore these aspects and will report to the GTDG on matters which might be relevant.

#### ***Replication competent adenovirus (RCA) in replication deficient adenoviral vectors***

The level of RCA depends on the production strategy and the particular cells lines used. The amount detected is higher in batches produced in conventional cell lines (e.g., 293 cells) compared to that found in batches produced in recently engineered cell lines (e.g., PER.C6 cells).

PhRMA presented data obtained in conjunction with the administration of high doses of replication deficient adenovirus vectors containing high quantities of RCA

- No serious adverse events related to the RCA were observed using various routes of administration (intratumoral, intrahepatic, intraperitoneal) in cancer patients.
- With respect to environmental risk the presented data suggest that shedding of RCA has not been detected by PCR, which is the most sensitive currently available assay.

EU requires replication deficient adenoviral vectors containing a specified level of RCA to be demonstrated in pre-clinical and clinical studies as safe; at present EU does not recommend specific limits, although generally reduction of RCA presence in

vector lots is recommended. The current FDA recommendation is  $<1$  RCA in  $3 \times 10^{10}$  virus particles. Japan evaluates the risks associated with the level of RCA on a case-by-case basis and refers to the FDA recommendations. Health Canada reported that most sponsors have submitted data showing no shedding. Currently Health Canada refers to the FDA RCA limit for their evaluations, but allows some exceptions if not all batches meet the limit.

Consensus was reached that the ICH regions are discouraging high levels of RCA in adenoviral vector batches.

#### ***Germline transmission studies***

EU presented the discussion held at the CHMP Gene Therapy Expert Group (GTEG) meetings with the goal of developing an addendum to the current GT guideline to assist sponsors and member states. The GTEG wrote a scientific report on a risk assessment approach taking into account a number of factors such as:

- persistence of vector DNA presence
- association with germline cells or other cells (stromal, leukocytes)
- chromosomal integration in germline cells

EU submissions are expected to provide pre-clinical data to show no evidence for risk of inadvertent germline transmission via bio-distribution studies, using good analytical methods.

The regions agreed that bio-distribution studies are important and should be submitted as a part of the clinical development package. The timing for submitting such studies varies by region.

The GTDG considered that it is necessary to continue the discussion with the aim of identifying common principles to minimize the risk of germline transmission.

#### ***Future Activities***

The next ICH Gene Therapy public workshop will be held in conjunction with the ICH meeting in fall 2005 in USA.

The objectives of the workshops will be to acquire information on the approaches currently being developed with Oncolytic viruses. Issues relevant both to the development of the field and public health will be identified and discussed. The workshop may cover emerging issues including models to study selectivity, attenuation modes, shedding, clinical safety.

The program of the workshop will be further elaborated at the next meeting of the GTDG scheduled to take place in spring 2005.

## 日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) 遺伝子治療専門家グループ (GTDG) 「見解」

この日本語訳は、国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部が参考までに仮訳したものですので、必ず英語原文をご参照ください。

### 日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) 遺伝子治療専門家グループ (GTDG) 「見解」 [仮訳]

ICH GTDG 会議  
2004 年 6 月 10 日  
(2005 年 2 月改正<sup>1</sup>)

今回の会議では、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) 各極 (日本、アメリカ合衆国 (米国)、ヨーロッパ連合 (EU)) における遺伝子治療に関する最新情報の紹介、及び 2003 年の ICH 遺伝子治療専門家グループ (GTDG) で合意された主要議題に関する情報交換などが行われた。さらに、今後 2005 年及び 2006 年の活動に関連する体制についても議論された。ICH 3 極の各代表者 (規制当局及び産業界の遺伝子治療専門家を含む) 並びにカナダ保健省及び欧州自由貿易連合 (EFTA)<sup>2</sup>の各代表者が参加した。

#### 重症複合免疫不全症 (SCID) の遺伝子治療に関する最新情報

今回の会議では、SCID の遺伝子治療に関する各極の最新情報が報告された。

X1 連鎖重症複合免疫不全症 (X1-SCID) 及びアデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA/SCID) の遺伝子治療臨床研究でも実際に示されているように、SCID に対する遺伝子治療の臨床的有用性は既に確認されている。同様に移植片対宿主病 (GVHD) の遺伝子治療臨床研究においても、将来有望な予備的結果が報告されている。

GTDG は SCID の遺伝子治療における一般的リスク要因について議論を行い、以下の点が一般的リスク要因であるという点で合意した。

- ・ 患者の年齢
- ・ 細胞に組み込まれた遺伝子治療用ベクターのコピー数/染色体挿入頻度が、細胞あたり平均 1 を超えること
- ・ 投与量 (患者に投与した遺伝子導入細胞の総数)
- ・ 遺伝子導入細胞の種類に応じた相対的リスクは以下のとおりである (リスクの高い順に)
  - 選択的優位性をもつと予想される幹細胞 (すなわち、他の幹細胞に比べて増殖能が高い幹細胞)
  - 幹細胞
  - T 細胞又は他の既に分化した細胞

染色体へのベクター挿入による発がんのリスクを評価するための新しい技術が開発中である。このような技術は、まだバリデーションはされていないものの、遺伝子治療臨床研究においても有用であるように思われる。現在、LAM PCR (linear-amplification-mediated

<sup>1</sup> 「見解」 ("Considerations")

GTDG 会議での結論は、ICH 内での段階的な手続きを経て定められた M2 ESTR1 (規制情報の電子的伝送の標準) 専門家作業グループの「勧告」 ("Recommendations") との用語の混乱を避けるために、現時点では「勧告」ではなく「見解」と称するよう ICH 運営委員会から求められた。

<sup>2</sup> 訳注: 現在、ノルウェー王国、スイス連邦、アイスランド共和国及びリヒテンシュタイン公国の 4 カ国が加盟。

この日本語訳は、国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部が参考までに仮訳したものですので、必ず英語原文をご参照ください。

PCR; 片方向増幅を介するポリメラーゼ連鎖反応) 法が広く用いられている。しかし、LAM-PCR 法はまだバリデートされていない技術であることから、複数の試験による確認が必要となる可能性がある。LAM PCR 法において検出される主要なバンドは疾患の過程でも変化するので、このようなバンドを治療方針決定のための根拠、すなわち白血病等副作用の発現の目安として使うことはできない。遺伝子導入細胞のクローナリティー (クローン<sup>1</sup>増殖) の傾向が、従来から用いられている信頼性の高い方法によっても認められた場合には、より頻りに被験者のモニタリングを行う必要がある。

臨床における副作用発現を未然に防ぐための管理方法として、遺伝子導入細胞のクローナリティーをより高感度でかつより高い信頼性をもって監視するために複数の方法を組み合わせることは、科学的に適切であると GTDG では考えている。加えて、新しい検査方法がまだ開発途上にあることから、将来も必要に応じて科学的検査が行えるよう被験者検体等の試料を保管しておくことも意義があると GTDG では考えている。

#### 遺伝子治療臨床研究に参加した被験者の長期フォローアップ (追跡) 調査

米国食品医薬品局 (FDA) は、遺伝子治療臨床研究に参加した被験者の長期フォローアップ調査について、現在 FDA が推奨している内容及びその背景を説明した。すなわち米国では、①すべての遺伝子治療臨床研究において、被験者の長期フォローアップ調査を遺伝子治療実施後 15 年間は実施するよう計画する必要がある。②その間に収集しなければならないデータとしては、以下の項目が含まれる。

*De novo* 由来がん<sup>2</sup>の発症の有無

神経疾患の発症の有無

リウマチ性疾患の発症の有無

免疫性疾患/血液疾患の発症の有無

③遺伝子治療実施後 5 年間は健康診断・検査によるフォローアップ調査を、その後 6 年目から 15 年目までは調査票によるフォローアップ調査を実施しなければならない。また、これに用いる調査票の内容は、わかりやすいものに留めておく必要がある。④このフォローアップ調査の結果は、遺伝子治療臨床研究に参加した被験者における長期リスクの評価のために、毎年とりまとめて FDA に報告しなければならない。

遺伝子治療臨床研究の長期フォローアップ調査に際しては、ICH E1 ガイドライン「致命的でない疾患に対し長期間の投与が想定される新医薬品の治験段階において安全性を評価するために必要な症例数と投与期間について」<sup>3</sup>及び現在作成中<sup>4</sup>の医薬品安全性監視 (ファーマコビジランス) に関連する ICH ガイドライン<sup>5</sup>の内容に加えて、遺伝子治療に特有の事項も考慮する必要があることから、本件については今後 ICH GTDG 内で正式な議題として議論する必要があると GTDG では考えている。

#### 健康な被験者 (ボランティア) への HIV ワクチン投与一可能性のあるリスク

遺伝子治療用ベクターを利用した HIV ワクチンを健康なボランティアに投与することに

<sup>1</sup> 訳注: 単一細胞に由来する細胞集団。

<sup>2</sup> 訳注: 前がん状態 (ポリープ) を経ないで発生するがん。

<sup>3</sup> 訳注: <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/efficacy/ela/e01a.html>。

<sup>4</sup> 訳注: 2004 年 11 月に ICH 3 種合意文書 (英文) が完成。

<sup>5</sup> 訳注: [http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@\\_ID=1195&@\\_MODE=GLB](http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID=1195&@_MODE=GLB)。

関する以下の諸問題について、GTDG では議論を行った。

- ・ ワクチニアウイルス由来ベクターについて、ベクターの製造方法に関連して生じ得るリスク（例えば、初代ニワトリ胚線維芽細胞を使用して製造を行うことにより、当該細胞からレトロウイルスの塩基配列が混入する可能性がある）
- ・ 治療目的又は予防目的で用いられる遺伝子治療用ベクター<sup>1</sup>の製造に非二倍体細胞株を使用することによるリスク
- ・ ベクター（HIV ワクチン）に存在している何らかの機能を有する HIV 遺伝子（例えば *env*、*nef*、*tat*）によってもたらされるリスク
- ・ 健康なボランティアに対する長期のモニタリング
- ・ 健康なボランティアにとってのリスクベネフィットのバランス

米国では、遺伝子をベースとするワクチンは、それが予防目的で使用される限り、遺伝子治療用医薬品としての規制は受けない。日本においても、そのようなワクチンは遺伝子治療用医薬品としての規制は受けない。一方、EU においては、遺伝子をベースとするワクチンは、欧州議会及び理事会指令 2001/83/EC<sup>2</sup>別添 1 における定義（欧州理事会指令 2003/63/EC<sup>3</sup>により改訂）に基づき、遺伝子治療用医薬品と扱われる。したがって、EU では、健康なボランティアへの HIV ワクチン投与に関するリスクについて調査を継続し、関連する可能性のある問題が発生した際には GTDG に報告することとする。

#### 非増殖性アデノウイルスベクター中の増殖性アデノウイルス（RCA）

非増殖性アデノウイルスベクター中の増殖性アデノウイルス（RCA）の混入量は、ベクターの製造方法及び製造に用いた細胞株の種類に依存する。非増殖性アデノウイルスベクター中に検出される RCA の量は、従来から使用されている細胞株（例えば 293 細胞）によって製造する場合に比べて、遺伝子組換え技術を使って最近開発された細胞株（例えば PER.C6 細胞）によって製造する場合の方が少ない。

多量の RCA を含有する非増殖性アデノウイルスベクターを高用量投与された症例に関するデータが米国研究製薬工業協会（PhRMA）によりとりまとめられ、今回発表された。それによると

- ・ がん患者において、種々の投与経路（腫瘍内、肝臓内、腹膜内）によって投与を受けた場合でも、RCA に起因する重篤な副作用はみられなかった。
- ・ 環境へのリスクという点に関して、現在用いることのできる最も感度の高い RCA 検出法であるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によっても RCA の体外への排出は認められなかったことが、今回のデータから示唆された。

非増殖性アデノウイルスベクターに混入する RCA 量の許容限度値に関して、EU では、非臨床試験及び臨床試験において安全性が実際に確認されている RCA 量以下であることを求めている。一般的にはベクターに混入する RCA は可能な限り少ないことが望ましいものの、EU では現在のところ公的な許容限度値として特定の数値は示していない。一方、FDA では、RCA 量の許容限度として、現在「 $3 \times 10^{10}$  ウイルス粒子あたり 1 未満」を推奨している。日本では、FDA の推奨値を参考としながら、RCA が混入している場合に想定

<sup>1</sup> 訳注：遺伝子治療用ベクターとして分類される HIV ワクチンも含む。

<sup>2</sup> 訳注：[http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-1/DIR\\_2001\\_83/DIR\\_2001\\_83\\_EN.pdf](http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-1/DIR_2001_83/DIR_2001_83_EN.pdf)。

<sup>3</sup> 訳注：[http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-1/DIR\\_2003\\_63/DIR\\_2003\\_63\\_EN.pdf](http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-1/DIR_2003_63/DIR_2003_63_EN.pdf)。

この日本語訳は、国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部が参考までに仮訳したものですので、必ず英語原文をご参照ください。

されるリスクをケースバイケースの原則で評価した上で、個別に許容限度値を設定している。カナダ保健省は、製薬企業から提出された大部分のデータにおいて RCA の体外への排出は起きていないと報告した。現在のところカナダ保健省では FDA の推奨する RCA 量の許容限度値を基準として考えているが、実際に製造した一部のロットがそれに適合していなかった場合には、FDA の推奨値を超えた許容限度値を認める場合もあるとのことである。

アデノウイルスベクター製品の各ロットに RCA が高レベルで混入することは認めないという点について、ICH 各極は合意に至った。

#### 生殖細胞系列への遺伝子治療用ベクターの伝達に関する研究

EU 域内で試験を実施する者及び EU 加盟国に参考となるような現行の遺伝子治療ガイドライン<sup>1</sup>の補遺を作成することを目的として開催された医薬品委員会 (CHMP) 遺伝子治療専門家グループ (GTEG) の会議の内容が EU から発表された。遺伝子治療におけるリスク評価のアプローチ法に関して、GTEG は以下のような点を考慮に入れた科学的な見地からの報告書<sup>2</sup>を作成した。

- ・ 体内に存在するベクターDNAの持続性
- ・ 生殖細胞系列や他の細胞 (間質細胞、白血球) との関連
- ・ 生殖細胞系列の染色体へのベクターの挿入 (伝達)

この EU の提案では、適切な分析法を用いた前臨床での動物体内分布試験によって、生殖細胞系列への予期しないベクター伝達のリスクがみられないことを示すことが望ましいとされている。

ICH 各極は、体内分布試験は重要であり、臨床開発の過程で検討されたヒトにおけるベクターの体内分布に関する成績を規制当局に提出する必要がある、という点では合意した。しかしながら、そのような成績を提出すべきタイミングは ICH 各極ごとに異なる。

GTDC は、生殖細胞系列へのベクターの伝達のリスクを最小にするための一般的方策を見出すために、この件について今後も議論を継続することが必要であると考ええる。

#### 今後の活動予定

- 2005 年秋に米国で開催される ICH 会議に併せて、次回の ICH 遺伝子治療公開ワークショップを開催する予定である。このワークショップの目的は、世界各国で開発が進められている腫瘍溶解性ウイルスについての現状に関する情報を得ることである。ワークショップでは、腫瘍溶解性ウイルス開発の進展状況及び臨床/公衆衛生上の問題の双方に関連するトピックを抽出し、それについて討論を行う予定である。また、腫瘍溶解性ウイルスの標的細胞選択性を調べるための試験系、弱毒化の様式、体内からの排出、臨床的安全性についてなど、新たに生じたトピックもワークショップで扱う予定である。ワークショップのプログラムの詳細は、2005 年の春に開催が予定されている次回の GTDC 会議において協議される予定である。

<sup>1</sup> 訳注: <http://www.emea.eu.int/hums/human/itf/itfguide.htm>.

<sup>2</sup> 訳注: <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/genetherapy/187904en.pdf>.

#### 参考文献リスト

- 1) Kaibe, D. M., Howley, P. M. ed.: Fields VIROLOGY fourth edition, pp.2265-2326, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)
- 2) 畑中正一編: ウイルス学, pp. 198-208, 朝倉書店, 東京 (1997)
- 3) 水田克巳など: 山形県衛生研究所報, 32: 5-7 (1999)
- 4) Bardell, D.: J. Clin. Microbiol. 4: 322-325 (1976)
- 5) APIC guidelines for infection control practice (<http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds3e-eng.php>)
- 6) [http://www.yoshida-pharm.com/text/05/5\\_2\\_3.html](http://www.yoshida-pharm.com/text/05/5_2_3.html)
- 7) Abarzua F., et al.: Cancer Research 65:9617-9622(2005)
- 8) Nasu, Y, et al.: Molecular Therapy. 15: 834-840 (2007)
- 9) Nasu, Y., et al.: Gene Ther. 6: 338-349 (1999)
- 10) Timme, T. L., et al.: Cancer Gene Ther. 5: 74-82 (1998)
- 11) Herman, J. R., et al.: Human Gene Ther. 10: 1239-1249 (1999)
- 12) Sterman, D.H., et al.: Clin Cancer Res 11,7444-7453(2005)
- 13) Sterman, D.H., et al.: Clin Cancer Res. 13,4456-4466(2007)
- 14) Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Human Gene Therapy 13:3-13 (2002)