

「ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素
(aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) を
発現する遺伝子組換え2型アデノ随伴ウイルス
ベクター (AAV-hAADC-2)」

生物多様性影響評価書

自治医科大学附属病院

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 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

AAV-hAADC-2 (以下、本遺伝子組換え生物という) は、ヒト芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) を発現する遺伝子組換え 2 型アデノ随伴ウイルスベクターである。

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)。これまでに霊長類で分離されたウイルスは、血清型およびゲノムの違いに基づき100以上の型に分けられており (文献1、3、4)、本遺伝子組換え生物は 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、哺乳類に感染する。ヒトでは小児期に初感染が起これること、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) が、ヒトへの病原性は知られていない。

文献 1 : Kaipe DM, Howley PM. 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

AAVは約4.7 kb の線状1 本鎖DNAウイルスであり、エンベロープを持たず直径約26 nmの正二十面体構造のキャプシドを有している。

細胞膜の普遍的成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカンを認識して感染するため宿主域は広く、非分裂細胞にも導入が可能である。野生型 AAV は標的細胞に感染すると Rep が関与して第 19 染色体長腕の AAVS1 領域に組み込まれることが知られているが、プラスミド

ベクターから作成した AAV はランダムに組み込まれる傾向にあり、アクティブな遺伝子領域に挿入されやすいとの報告がある(文献 5)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染はするが、ウイルス粒子を構成するために必要な E1A、E1B、E2A、E4 及び VA 遺伝子を有さず、自律的な増殖能を欠損したウイルスである。増殖にはこれらの遺伝子を提供する「ヘルパーウイルス」(アデノウイルス又はヘルペスウイルスなど)の存在が必要である。培養細胞でも同様に、rep 及び cap を搭載した「アデノ随伴ウイルスヘルパープラスミド (AAV ヘルパープラスミド)」及び、E2A、E4 及び VA を発現する「アデノウイルスヘルパープラスミド (Ad ヘルパープラスミド)」を、E1A 及び E1B を発現するヒト胎児腎培養細胞 (293T/17 細胞) にコトランスフェクションした場合にのみ増殖が起こる。本ウイルスは物理化学的に比較的堅牢であり、常温においても比較的安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

他の生物を捕食することはない。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。ヒトの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同時に感染した場合に感染個体で増幅し、分泌物と一緒に排泄されて、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6、7)。

(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処理により完全に不活化される。

文献 5 : Nakai H, et al. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nature Genetics* 34 :297-302 (2003)

文献 6 : Chen C, et al. Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J. Virol.* 79: 14781-14792 (2005)

文献 7 : 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

AAV2 の両末端にある ITR (Inverted terminal repeat) の間の領域を供与核酸となる AAV-hAADC-2 (3,457bp) と置換した。AAV-hAADC-2 の全塩基配列を別紙1に示した。AAV-hAADC-2 は AAV2 にヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素 human aromatic L-amino acid decarboxylase (hAADC) の発現カセットを挿入したものであり、その構成成分は以下のとおりである。

- 1) サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー (CMV Pr)
塩基番号139から797の659 bp の配列である。hAADC 遺伝子を転写する。
- 2) ヒトβグロビンイントロン
塩基番号805から1,296の492 bp の配列である。cDNA からの発現レベルを増加させる。
- 3) ヒトAADC遺伝子 (hAADC)
塩基番号1,331から3,307の1,443 bp の配列であり、hAADC (EC 4.1.1.28) をコードする。発現産物のhAADCはL-dopaをドパミンに、5-HTP (5-hydroxytryptophan) をセロトニンに脱炭酸化する酵素である。アミノ酸配列を別紙2に示した。
- 4) ヒト成長ホルモンのpoly A 付加シグナル (hGH poly(A))
塩基番号2,829から3,307の479 bp の配列である。CMVプロモーターにより開始された転写が終了する。
- 5) 人工配列
塩基番号 131 から 138、798 から 1,004、1,298 から 1,330、2,774 から 2,828 及び 3,308 から 3,338 の配列である。これらは制限酵素認識サイトを含むクローニングサイト及びその周辺配列であり、131 から 138 及び 3308 から 3338 の配列には制限酵素 NotI 切断サイトを有する。

AAV-hAADC-2の構造模式図を別紙3に示した。

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調製に使用するpAAV-hAADC-2、pRC-BI-khB342-2 及びpHelper の3種類のプラスミドの構成を別紙4 に記載した。

pAAV-hAADC-2 はCMV の転写制御下にあるhAADC 遺伝子を含む。pRC-BI-khB342-2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) を含むAAVヘルパープラスミドである。pHelperは、2 型アデノウイルスのE2A、E4及びVARNA遺伝子を含むAdヘルパープラスミドである。いずれもAmpicilin 耐性遺伝子を有している。(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、CMV Pr、 β グロビンイントロン、hAADC、hGH poly(A)からなる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。pRC-BI-khB342-2 は、AAV2 のゲノムDNA からITR を削除してAAV2 のrep 遺伝子及びcap 遺伝子をクローニングし、更に、SnaBI サイトにヒトBcl-XL 遺伝子及びhsa-miR342 を発現するカセットを挿入した。なお、rep遺伝子のp5プロモーターはTATA boxを破壊し、rep、cap遺伝子のポリA配列の下流に移動させている。pHelperは、アデノウイルス2 型のE2A、E4、VARNA 遺伝子をクローニングして構築した(別紙4)。構築したpAAV-hAADC-2、pHelper 及びpRC-BI-khB342-2のそれぞれを大腸菌DH5 α に導入して形質転換し、アンピシリン耐性株のグリセロールストックを作製して、MWCBとした。各プラスミドベクター溶液は、MWCB を培養して菌体を集め、溶菌後、ゲル濾過クロマトグラフィー及び2種類のイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、更に、タンジェンシャルフロー膜濃縮にて濃縮後、0.22 μ mフィルターで濾過して作製した。得られたpAAV-hAADC-2、pHelper 及びpRC-BI-khB342-2 を共に、リン酸カルシウム法によってヒト胎児腎細胞 (293T/17 細胞) に導入し、本遺伝子組換え生物を得た (別紙5)。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本組換え生物は、293T/17生産細胞から抽出及び粗精製処理後、セシウム密度勾配超遠心により精製し、更に、タンジェンシャルフロー膜濃縮にてバッファー置換後、0.22 μ mフィルターで濾過して、クライオバイアルにて-80℃で保存した。

プラスミドの製造及び品質試験並びに本遺伝子組換え生物の製造及び品質試験は、タカラバイオ株式会社草津事業所(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において、GMP 基準に従って実施した(各バンク及び本遺伝子組換え生物の品質管理試験の詳細は別紙6及び別紙7)。本遺伝子組換え生物は、自治医科大学附属病院本館1 階臨床用細胞調製室(P2レベル)にて受け入れ、同室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)。

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8)。

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たエピソームとして存在すると考えられる(文献9、10、11)。この2 本鎖

DNA となったものからhAADC が転写される。細胞のゲノムへの組込みは稀で低頻度である。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。

本遺伝子組換え生物を293T/17 細胞で作製する過程でpRC-BI-khB342-2 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 8 : Xu R, et al. Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. Med. Sci. Monit. 11 : 305-308 (2005)

文献 9 : 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 10 : Schnepf B, et al. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. J. Virol. 77: 3495-3504 (2005)

文献 11 : 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)

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

本遺伝子組換え生物は宿主の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、定量する方法により検出される。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

宿主であるAAV2と本遺伝子組換え生物の間には以下の相違がある。

- ・本遺伝子組換え生物は発現プロモーターの下流にhAADC遺伝子を持つため、本遺伝子組換え生物が感染した細胞はhAADCを発現する。
- ・本遺伝子組換え生物はウイルスDNA の複製やAAV粒子の形成に必要なrep及びcap 遺伝子を欠失しているため、rep及びcap 遺伝子が組み込まれた又はトランスフェクションされた細胞でなければ増殖は起こらない。
- ・本遺伝子組換え生物はヘルパーウイルスを介さずにプラスミドベクターを用いて製造するが、ヒトに感染してもほとんどがエピソードとして核内に留まり、稀に、細胞のゲノム

にランダムに組み込まれる。

・本遺伝子組換え生物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11）。

本遺伝子組換え生物由来のRCA は、本遺伝子組換え生物作製時、rep及びcap 遺伝子をもつpRC-BI-khB342-2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可能性がある。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、RCAが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9、10、11）。

AAV-hAADC-2 は細胞に感染するとそのゲノムの大半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) 本遺伝子組換え生物の溶液は、スクリュウキャップ付き密閉容器に封入されており、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 本遺伝子組換え生物の溶液の融解、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。本遺伝子組換え生物希釈溶液の保管は、P2 実験室内の冷凍庫において行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通過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) 本遺伝子組換え生物（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本遺伝子組換え生物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、本遺伝子組換え生物投与当日は手術室で他の手術を行わない。

(5) 被験者に対する本遺伝子組換え生物の投与は、手術室内において、両側の被殻の中に本遺伝子組換え生物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本遺伝子組換え生物希釈溶液を被殻内の2方向へ3 μ l/minの速度で注入する。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本遺伝子組換え生物希釈溶液の漏出及び抜去中の本遺伝子組換え生物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) 被験者へ本遺伝子組換え生物投与終了後、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、本遺伝子組換え生物の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本遺伝子組換え生物が陰性であることを確認する。本遺伝子組換え生物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本遺伝子組換え生物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

被験者体内におけるRCA の出現の有無については、被験者への投与後、適切な時期に血液及び尿を用いてPCR 法にて検査し、連続した2回の検査結果が陰性であることを確認する。

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が連続した2回の検査において検出されなくなるまで追跡する。

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12、13、14、15、16、17、18、19）。また、血液中でAAV-hAADC-2 は検出されていない。

文献 12: Fan DS, 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 13: 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 14: 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)

文献 15: Sanftner ML, et al. AAV2-mediated gene delivery to monkey putamen: Evaluation of an infusion device and delivery parameters. Experimental Neurology 194 476 – 483 (2005)

文献 16: Cunningham J, et al. Biodistribution of Adeno-associated Virus Type-2 in Nonhuman Primates after Convection-enhanced Delivery to Brain. Molecular Ther. 16:1267–1275 (2008)

文献 17: Daadi MM, et al. Distribution of AAV2-hAADC-transduced cells after 3 years in Parkinsonian monkeys. Neuroreport 17:201-204 (2006)

文献 18 : Fiandaca SM, et al. Real-time MR imaging of adeno-associated viral vector delivery to the primate brain. *Neuroimage* 47(Suppl 2): T27–T35 (2009)

文献 19 : Sebastian WS, et al. Safety and Tolerability of Magnetic Resonance Imaging-Guided Convection-Enhanced Delivery of AAV2-hAADC with a Novel Delivery Platform in Nonhuman Primate Striatum. *Hum. Gene Ther.* 23:210–217 (2012)

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20）。

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21）。

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。

また、本研究と同じ目的遺伝子を搭載したAAVベクターを同じ経路で投与した第I相臨床試験が米国で実施されている。2008年、カルフォルニア大学ローレンス・バークレイ国立研究所より、AAV-hAADCベクターをパーキンソン患者の両側後方被殻に注入した第I相臨床試験結果が報告された。60から67歳の男女5人に総量 9×10^{10} のベクターゲノムを投与したところ、1か月及び6か月後に、6-[18F]フルオロ-L-mチロシン(FMT)の取込みが30%向上し、ベクターに関連する有害事象は認められなかった。引き続き、総量 3×10^{11} のベクターゲノムが男女5人に注入され、FMT 取込みは75%増加したが、ベクターに関連する有害事象は認められなかった。その後、最長、4年以上にわたり脳内での遺伝子の発現が観察され、若干の運動機能悪化などの4件の有害事象が報告されたが、ベクターの異常増殖による有害事象は認められていない（文献22、23、24）。

文献 20 : Manno CS, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101: 2963–2972 (2003)

文献 21 : Manno CS, 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)

文献 22 : Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, et al. Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 70:1980–1983 (2008)

文献 23 : Christine CW, Starr PA, Larson PS, et al. Safety and tolerability of putaminal AADC

gene therapy for Parkinson disease. Neurology 73:1662-1669 (2009)

文献 24 : Mittermeyer G, Christine CW, Rosenbluth KH, et al. Long-Term Evaluation of a Phase 1 Study of AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease. Hum. Gene Ther. 23:377-381 (2012)

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本遺伝子組換え生物由来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

本遺伝子組換え生物が自然界で感染する対象は、哺乳動物である。また、たとえ本遺伝子組換え生物からRCA が生じて、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(文献1)。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物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-HTP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-HTP 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(文献10、11)、血清型が異なる遺伝子組み換えAAVが欧州で医薬品(Glybera)として承認されたが、

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、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来RCA が環境中へ拡散する可能性は低く、また、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物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、本遺伝子組換え生物由来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、本遺伝子組換え生物が効率よく感染する対象はヒトに限られるため、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来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

本遺伝子組換え生物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

本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来RCA の感染性は野生型AAV2 と同一と考えられる。自然界では、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、ヒト以外にカニクイサル、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

本遺伝子組換え生物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には知られていない。本遺伝子組換え生物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、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来RCA の環境中への拡散は極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物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、本遺伝子組換え生物由来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、本遺伝子組換え生物が効率よく感染する対象はヒトに限られることから、本遺伝子組換え生物はやがて環境中から消滅すると考えられる。

極めて微量の本遺伝子組換え生物由来の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 25 : Kay MA, 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 26 : Manno CS, 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)

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動植物等の種類は野生型AAV2 と同等で、ほ乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

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。本遺伝子組換え生物によるhAADC 遺伝子の

発現はヒトに病原性をもたないので、ヒトに対する影響はないと考えられる。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を失っているため、野生型AAV 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等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。ヒト体内の同一の細胞に本遺伝子組換え生物と野生型AAV 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等が感染する可能性は極めて低く、本遺伝子組換え生物はやがて環境中から消滅すると考えられる。極めて微量の本遺伝子組換え生物由来の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。

従って、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。

生物多様性影響評価書 別紙 目次

別紙 1: AAV-hAADC-2 の全塩基配列

別紙 2: hAADC のアミノ酸配列

別紙 3: AAV-hAADC-2 の構造

別紙 4: プラスミドの構造

別紙 5: 組換え AAV ウイルス作製の概略図

別紙 6: AAV-hAADC-2の品質管理試験

別紙 7: 293T/17細胞 (MWCB)の品質管理試験

別紙 8: 治療施設の地図及び保管場所の概略図

別紙 9: 治療施設医療廃棄物管理規程

別紙1 AAVベクター-AAV-hAAD-2の塩基配列

1	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTT	60
	left ITR 領域	
61	GGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGSCCAACTCCATCACT	120
121	AGGGGTTCCTGCGGCCGCACGCGTCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG	180
	CMV promoter	
181	TTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT	240
241	GACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC	300
301	CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG	360
361	CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT	420
421	GGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA	480
481	TCTAGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG	540
541	TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAG	600
601	TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT	660
661	GACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGT	720
721	GAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCG	780
781	GGACCGATCCAGCCTCCGCGGATTGGAATCCCGGGCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGA	840
	β-globin intron	
841	TTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACGCGCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAAATG	900
901	CTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTATTATCTTATTTCTAATACTTCCCTAATCTCTT	960
961	TCTTTTCAAGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTCACCATTTCTAAAGAATAAC	1020
1021	AGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATAT	1080
1081	AAATTGTAACGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAT	1140
1141	TCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTT	1200
1201	TTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTC	1260
1261	TGTGTGCTGGCCCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTGGAACATCGATTGAATTCCCCG	1320
1321	GGGATCCACCATGAACGCAAGTGAATTCGGAAGGAGAGGGAAGGAGATGGTGGATTACGT	1380
	ヒト AADC	
1381	GGCCAACTACATGGAAGGCATTGAGGGACGCCAGGTCTACCCTGACGTGGAGCCCGGGTA	1440
1441	CCTGCGGCCGCTGATCCCTGCCGCTGCCCTCAGGAGCCAGACACGTTTGAGGACATCAT	1500
1501	CAACGACGTTGAGAAGATAATCATGCCTGGGGTGACGCACTGGCACAGCCCCCTACTTCTT	1560

1561	CGCCTACTTCCCCACTGCCAGCTCGTACCCGGCCATGCTTGCGGACATGCTGTGCGGGGC	1620
1621	CATTGGCTGCATCGGCTTCTCCTGGGCGGCAAGCCCAGCATGCACAGAGCTGGAGACTGT	1680
1681	GATGATGGACTGGCTCGGGAAGATGCTGGAAGTACCAAAGGCATTTTTGAATGAGAAAGC	1740
1741	TGGAGAAGGGGGAGGAGTGATCCAGGGAAGTGCCAGTGAAGCCACCCTGGTGGCCCTGCT	1800
1801	GGCCGCTCGGACCAAAGTGATCCATCGGCTGCAGGCAGCGTCCCCAGAGCTCACACAGGC	1860
1861	CGCTATCATGGAGAAGCTGGTGGCTTACTCATCCGATCAGGCACACTCCTCAGTGGAAG	1920
1921	AGCTGGGTAAATTGGTGGAGTGAAATTAAGGCCATCCCCCTCAGATGGCAACTTCGCCAT	1980
1981	GCGTGCGTCTGCCCTGCAGGAAGCCCTGGAGAGAGACAAAGCGGCTGGCCTGATTCCTTT	2040
2041	CTTTATGGTTGCCACCCTGGGGACCACAACATGCTGCTCCTTTGACAATCTCTTAGAAGT	2100
2101	CGGTCCTATCTGCAACAAGGAAGACATATGGCTGCACGTTGATGCAGCCTACGCAGGCAG	2160
2161	TGCATTATCTGCCCTGAGTTCCGGCACCTTCTGAATGGAGTGGAGTTTGCAGATTCATT	2220
2221	CAACTTTAATCCCCACAAATGGCTATTGGTGAATTTTGAAGTGTCTGCCATGTGGGTGAA	2280
2281	AAAGAGAACAGACTTAACGGGAGCCTTTAGACTGGACCCCACTTACCTGAAGCACAGCCA	2340
2341	TCAGGATTCAGGGCTTATCACTGACTACCGGCATTGGCAGATACCACTGGGCAGAAGATT	2400
2401	TCGCTCTTTGAAAATGTGGTTTGTATTTAGGATGTATGGAGTCAAAGGACTGCAGGCTTA	2460
2461	TATCCGCAAGCATGTCCAGCTGTCCCATGAGTTTGAGTCACTGGTGCGCCAGGATCCCCG	2520
2521	CTTTGAAATCTGTGTGGAAGTCATTCTGGGGCTTGTCTGCTTTCGGCTAAAGGGTTCCAA	2580
2581	CAAAGTGAATGAAGCTCTTCTGCAAAGAATAAACAGTGCCAAAAAATCCACTTGGTTCC	2640
2641	ATGTCACCTCAGGGACAAGTTTGTCTGCGCTTTGCCATCTGTTCTCGCACGGTGAATC	2700
2701	TGCCCCATGTGCAGCGGGCCTGGGAACACATCAAAGAGCTGGCGGCCGACGTGCTGCGAGC	2760
2761	AGAGAGGGAGTAGGAGTGAAGCCAGGACCTGCAGAAGCTTGCCTCGAGCAGCGCTGCTCG	2820
2821	AGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGT	2880
2881	TGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGA	2940
2941	CTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGT	3000
3001	TGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGC	3060
3061	ACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCC	3120
3121	TCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTG	3180

hGH polyA

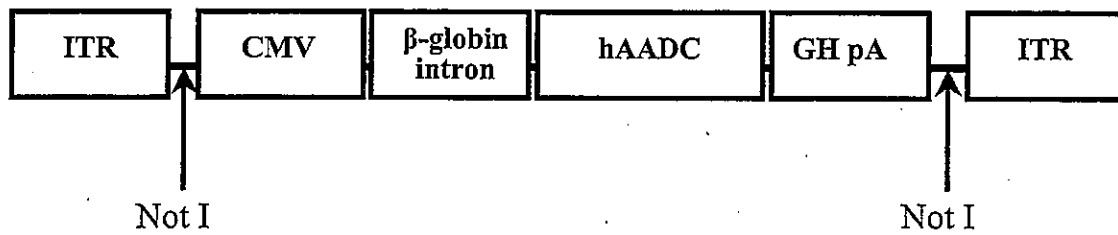
3181	GTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGAT	3240
3241	CTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCC	3300
3301	TGTCCTTCTGATTTTGTAGGTAACGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTT	3360
3361	GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCG	3420
3421	ACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG	3468

right ITR 領域

別紙2 haADC のアミノ酸配列

MNASEFRRRGKEMVDYVANYMEGIEGRQVYPDVEPGYLRPLIPAAAPQEPDTFEDIINDVE
KIIMPGVTHWHSPYFFAYFPTASSYPAMLADMLCGAIGCIGFSWAASPACTELETVMMDWL
GKMLELPKAFLNEKAGEGGGVIQGSASEATLVALLAARTKVIHRLQAASPELTQAAIMEKL
VAYSSDQAHSSVERAGLIGGVKLKAIPSDGNFAMRASALQEALERDKAAGLIPFFMVATLG
TTTCCSFDNLLEVGPICNKEDIWLHVDAAYAGSAFICPEFRHLLNGVEFADSFNPNPHKWLL
VNFDCSAMWVKKRTDLTGAFRLDPTYLKSHQDSGLITDYRHWQIPLGRRFRSLKMWFVF
RMYGVKGLQAYIRKQVLSHEFESLVRQDPRFEICVEVILGLVCFRLKGSNKVNEALLQRIN
SAKKIHLVPCHLRDKFVLRFAICSRVTESAHVQRAWHEHIKELAADVLAERE

別紙3 AAV-hAADC-2 の構造



ITR: inverted terminal repeats

CMV: cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer

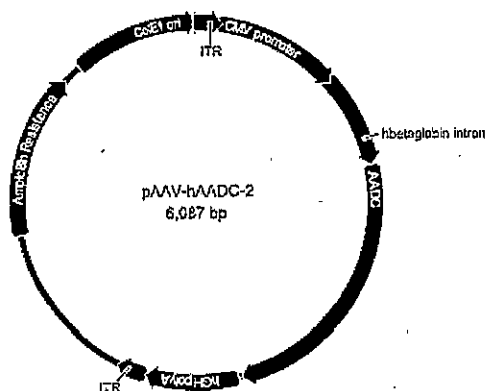
β -globin intron: human β -globin intron

hAADC: cDNA of human aromatic L-amino acid decarboxylase

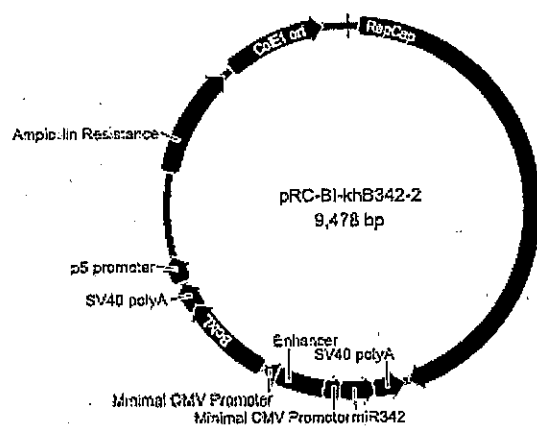
GH pA: human growth hormone polyadenylation signal

別紙4 プラスミドの構造

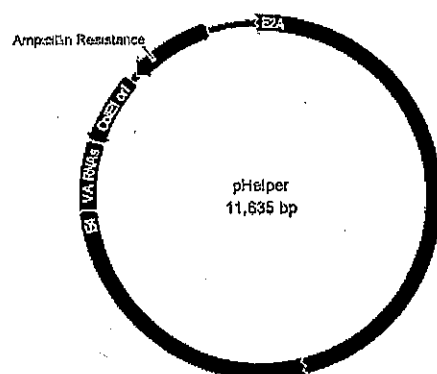
pAAV-hAADC-2



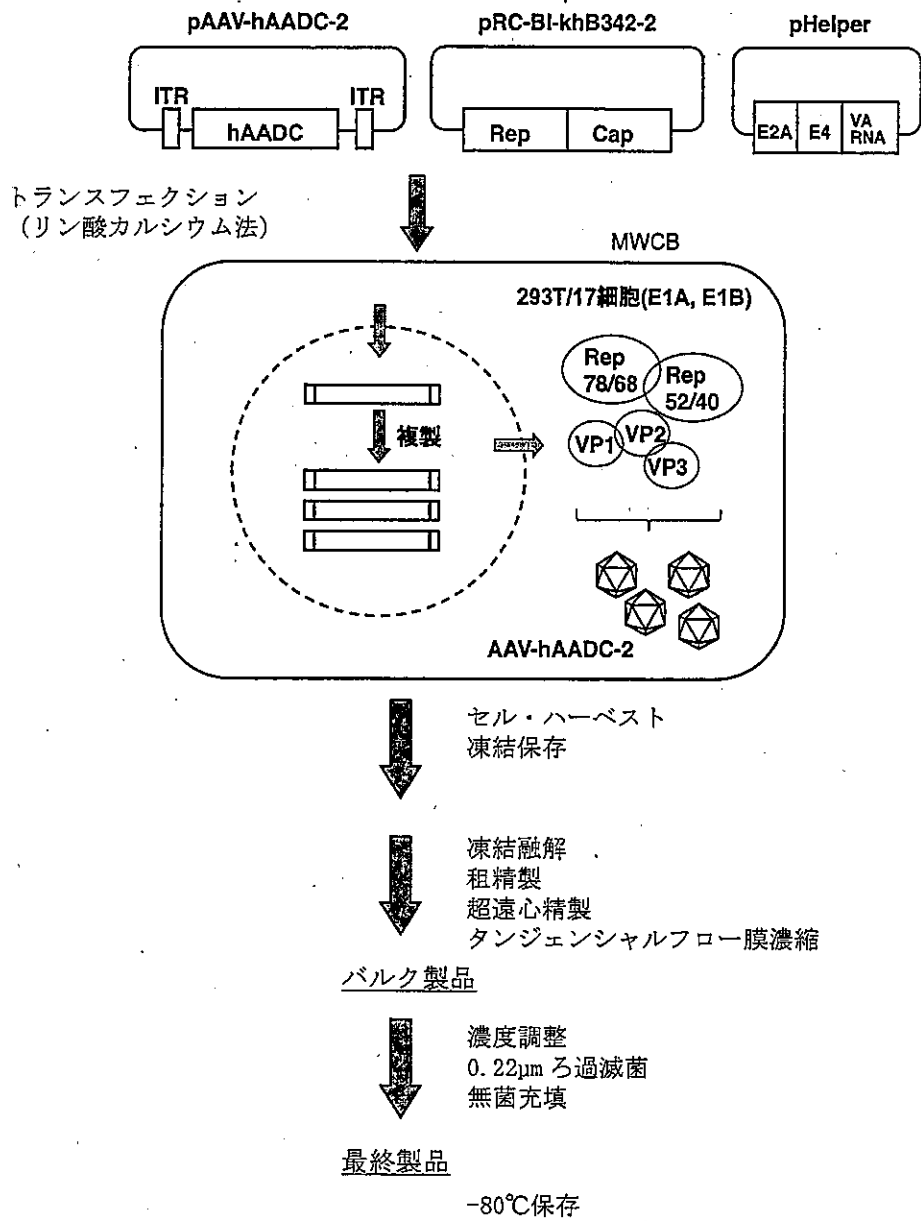
pRC-BI-khB342-2



pHelper



別紙5 組換え AAV ウイルス作製の概略図



別紙6 AAV-hAADC-2の品質試験

I. AAV-hAADC-2の品質試験

AAV-hAADC-2の最終製品の品質試験の試験結果と規格、並びに AAV-hAADC-2の工程内（セル・ハーベスト）品質試験及び AAV-hAADC-2のバルク製品の品質試験の試験結果と規格を、表1、表2及び表3に示す。

表1 AAV-hAADC-2の最終製品の品質試験

試験項目	規格	結果 (Lot.)
ベクターゲノム濃度試験	未定	
エンドトキシン試験	≤ 10 EU/mL	
純度試験	標準品と同等	
導入効率試験	結果の報告	
感染力価試験	結果の報告	
性状試験	無色澄明～半透明の溶液	
pH試験	未定	
浸透圧試験	未定	
無菌試験	適合	
ウイルスベクター純度試験（電子顕微鏡）	規格なし	
塩基配列試験	適合	
oriDNA 配列定量試験（Q-PCR 法）	結果の報告	
rcAAV 否定試験	$< 10^3$ AAV genomes/unit	
セシウム残留試験	≤ 1.4 μ g/unit	
キャプシド率試験	規格なし	
ヒトゲノム DNA 残留試験	規格なし	
ベンゾナーゼ残留試験	≤ 1.0 ng/mL	

表2 AAV-hAADC-2の工程内（セル・ハーベスト）品質試験項目と規格

試験項目	規格	結果 (Lot.)
In vitro ウイルス試験	陰性	
マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）	陰性	

表3 AAV-hAADC-2のバルク製品の品質試験項目と規格

試験項目	規格	結果 (Lot.)
ベクターゲノム濃度試験	未定	

II. 試験方法の概要

上記試験方法の概要を以下に示す。

1. 無菌試験

製造数が、100 容器以下であるとき、各培地に対して 10%、また 101 容器以上 500 容器以下であるとき、各培地に対して 10 容器を検体とする。検体を液状チオグリコール酸培地（TGC 培地）またはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（SCD 培地）に接種し、TGC 培地は 30～35℃で、SCD 培地は 20～25℃で 14 日間培養し、菌の発育の有無を確認する。培養最終日に検体によって培地が混濁し判定が困難な場合、培養液を新しい培地に接種して、元の培地と共に 4 日間以上培養し、菌の発育の有無を確認する。

2. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）

1) 培養法：

- ①マイコプラズマが増殖可能な寒天培地に WCB 破碎液を接種し、微好氣的条件で 35～37℃において 14 日間以上培養する。
- ②マイコプラズマが増殖可能な液体培地に試料溶液を接種し、密栓して 35～37℃において 21 日間培養する。
- ③試料溶液を接種した液体培地より、接種後 3±1 日目、7±1 日目、14±1 日目及び 20±1 日目に寒天培地上にその培地を接種し、これらを微好氣的条件下 35～37℃で 14 日間（但し 20±1 日目に接種したものは 7 日間）以上培養する。
- ①から③について、マイコプラズマの生育の有無を調べる。

2) DNA 染色法：

WCB 破碎液を Vero 細胞に接種し、3 日間培養する。スライド付の培養容器に継代後、3-5 日間培養する。培養後、スライド上の培養細胞を固定して DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡にてマイコプラズマの存在を検鏡する。

3. In vitro ウイルス試験

検体を各指標細胞（MRC-5、Vero、NIH3T3）に接種後、36±2℃、5%炭酸ガス条件下で 28 日間培養し（期間中、必要に応じて継代を行う）、ウイルス特異的な細胞変性効果（CPE）出現の有無を観察する。

培養 28 日目の細胞について、ヒト O 型、モルモット及びニワトリの混合赤血球に対する吸着反応の有無を試験する。

また、培養 28 日目の培養上清を用いて、ニワトリ、モルモット及びアカゲザルの各赤血球に対する凝集反応の有無を試験する。

4. ベクターゲノム濃度試験

ウイルスベクターゲノム DNA に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、Ct 値を測定する。測定した Ct を元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線からベクターゲノム濃度を換算する。

5. oriDNA 配列定量試験 (Q-PCR 法)

プラスミド DNA 配列に含まれる oriDNA 配列に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、Ct 値を測定する。測定した Ct を元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線から検体中に含まれる oriDNA 配列の濃度を換算する。

6. rcAAV 否定試験

検体を、E1/E3 欠損型アデノウイルスとともに、293 細胞に共感染させる。共感染後の細胞を継代して、ウイルス増幅を起こした後、PCR により、AAV 配列の増幅の有無を検出する。

7. セシウム残留試験

GC-MS 法により、セシウム濃度を測定する。

8. キャプシド率試験

微量分光光度計を用いて、紫外線吸光度 (260 nm 及び 280 nm) を測定する。280 nm 測定値に対する 260 nm 測定値の比率をキャプシド率の指標とする。

9. ヒトゲノム DNA 残留試験

ヒトゲノム DNA に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、Ct 値を測定する。測定した Ct を元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線からヒトゲノム DNA 濃度を換算する。

10. エンドトキシン試験

日本薬局方 一般試験法 エンドトキシン試験 カイネティック比濁法の項により、エンドトキシン濃度を測定する。

11. 純度試験

電気泳動法 (SDS-PAGE 法) により、タンパクを分子サイズで分離した後、銀染色を行う。標準品と比較した純度を測定する。

12. 導入効率試験

検体を、HeLaRC32 細胞に共感染させる。共感染後の細胞の細胞膜を融解した後、抗 hAADC-2 抗体を用いた ELISA 法により、導入遺伝子の発現の有無を測定する。

13. 感染力価試験

検体を、野生型アデノウイルスとともに、HeLaRC32 細胞に共感染させる。共感染後の細胞から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて、増殖の有無を定性的に測定する。
測定値をグラフ化し、TCID₅₀ とする。

14. 性状試験

性状を目視確認する。

15. pH 試験

pH 計を用いて、日本薬局方 pH 試験を実施する。

16. 浸透圧試験

浸透圧計を用いて、日本薬局方 浸透圧試験を実施する。

17. ウイルスベクター純度試験（電子顕微鏡）

ウイルス粒子とウイルスパーティクルのみの割合を電子顕微鏡法により確認する。

18. 塩基配列試験

塩基配列決定用シーケンスプライマーを用いて、シーケンス反応を行った後、反応産物を精製し、DNA シーケンサーで解析する。

19. ベンゾナーゼ残留試験

製造に使用したベンゾナーゼの残留量を、抗 Benzonase 抗体を用いた ELISA 法により測定する。

別紙 7 293T/17 細胞セルバンクの品質試験

I. 293T/17 MCB 及び WCB の品質試験の結果

表 1 に MCB 及び WCB の品質試験の結果を示す。

表 1 293T/17 MCB の品質試験の試験結果

試験項目	規格	結果 (Lot. LV201208)
細胞生存率試験 (トリパンプルー法)	>50%	79.3%
アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定	ヒト	ヒト
マイコプラズマ否定試験 (欧州薬局方)	陰性	陰性
無菌試験	適合	適合
In vitro ウイルス試験	陰性	陰性
In vivo ウイルス試験	陰性	陰性
形質転換試験	規格なし	コロニー形成を認める。
レトロウイルス粒子試験	ウイルス様粒子なし	ウイルス様粒子なし
In vitro レトロウイルス試験 (培養法)	活性なし	活性なし
In vitro レトロウイルス試験	活性なし	活性なし
PCV/BCV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HIV-1/2 ウイルス否定試験	陰性	陰性
HTLV-1/2 ウイルス否定試験	陰性	陰性
HAV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HBV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HCV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HHV-6/7/8 ウイルス否定試験	陰性	陰性
hCMV ウイルス否定試験	陰性	陰性
EBV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HPV B-19 ウイルス否定試験	陰性	陰性
SV40 ウイルス否定試験	陰性	陰性
AAV ウイルス否定試験	陰性	陰性

表 2 293T/17 WCB の品質試験の試験結果

試験項目	規格	結果 (Lot. LV201307)
細胞生存率試験（トリパンプルー法）	>50%	78.7%
アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定	ヒト	ヒト
マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）	陰性	
無菌試験	適合	
In vitro ウイルス試験	陰性	
In vivo ウイルス試験	陰性	

II. 試験方法の概要

1. 細胞生存率試験（トリパンプルー法）

MCBを融解後、トリパンプルー溶液で1区画の細胞数が30～100個となるように希釈し、血球計数盤を用いて上下の計算室の生細胞（トリパンプルーで染まらない細胞）及び死細胞（トリパンプルーで青く染まった細胞）を計測し、以下の式で生細胞濃度、細胞生存率を求める。

生細胞濃度 (cells/mL) = 生細胞の総平均値 × 10,000 × 希釈倍率

総細胞濃度 (cells/mL) = 総細胞の総平均値 × 10,000 × 希釈倍率

細胞生存率 (%) = 生細胞濃度 ÷ 総細胞濃度 × 100

2. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定

MCBを拡大培養し生細胞を検体とする。細胞抽出液を調製し、アガロースゲル電気泳動を実施する。アガロースゲル上に分離された細胞抽出液中の各種の酵素について活性染色を行なう。各種酵素の電気泳動での移動距離を標準移動距離と比較して、そのパターンが最も一致する生物を、その細胞の由来生物と判定する。

3. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）

1) 培養法：

① マイコプラズマが増殖可能な寒天培地に MCB 破砕液を接種し、微好氣的条件下で 35～37℃において 14 日間以上培養する。

② マイコプラズマが増殖可能な液体培地に試料溶液を接種し、密栓して 35～37℃において 21 日間培養する。

③ 試料溶液を接種した液体培地より、接種後 3±1 日目、7±1 日目、14±1 日目及び 20±1 日目に寒天培地上にその培地を接種し、これらを微好氣的条件下 35～37℃で

14 日間（但し 20±1 日目に接種したものは 7 日間）以上培養する。

①から③について、マイコプラズマの生育の有無を調べる。

2) DNA 染色法：

MCB 破砕液を Vero 細胞に接種し、3 日間培養する。スライド付の培養容器に継代後、3-5 日間培養する。培養後、スライド上の培養細胞を固定して DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡にてマイコプラズマの存在を検鏡する。

4. 無菌試験（欧州薬局方）

MCB 製造量の 2%分を検体とする。検体を液状チオグリコール酸培地（TGC 培地）またはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（SCD 培地）に接種し、TGC 培地は 30～35℃で、SCD 培地は 20～25℃で 14 日間培養し、菌の発育の有無を確認する。培養最終日に検体によって培地が混濁し判定が困難な場合、培養液を新しい培地に接種して、元の培地と共に 4 日間以上培養し、菌の発育の有無を確認する。

5. In vitro ウイルス試験

検体を各指標細胞（MRC-5、Vero、NIH3T3）に接種後、36±2℃、5%炭酸ガス条件下で 28 日間培養し（期間中、必要に応じて継代を行う）、ウイルス特異的な細胞変性効果（CPE）出現の有無を観察する。

培養 28 日目の細胞について、ヒト O 型、モルモット及びニワトリの混合赤血球に対する吸着反応の有無を試験する。

また、培養 28 日目の培養上清を用いて、ニワトリ、モルモット及びアカゲザルの各赤血球に対する凝集反応の有無を試験する。

6. In vivo ウイルス試験

検体を、モルモット、成熟マウス、乳のみマウス、及び発育鶏卵に接種し、病原体による感染の有無を確認する。

モルモットと成熟マウスは 28 日間、乳のみマウスは 14 日間観察する。また乳のみマウスは 14 日目に安楽死後、破砕して新たな乳のみマウスに接種し、14 日間観察する。

発育鶏卵の尿膜接種群では、接種後 1 日目と 3 日目に開卵し観察する。開卵後の尿膜液を再度接種し、接種後 1 日目と 3 日目に開卵し観察する。卵黄嚢接種群は接種後 1 日目と 9～12 日目に開卵し観察する。開卵後の卵黄嚢を破砕し、再度接種し、接種後 1 日目と 9～12 日目に開卵し観察する。

モルモットと発育鶏卵の尿膜接種群ではヒト O 型、モルモット、及びニワトリの各赤血球に対する凝集試験を行う。

7. In vitro ウシウイルス／ブタウイルス試験

検体を各指標細胞（ST, BT, Vero）に接種後、 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、5%炭酸ガス条件下で 21 日間以上培養し（期間中、継代を行う）、ウイルス特異的な細胞変性効果（CPE）出現の有無を観察する。

さらに、培養終了後の細胞について、ウイルス特異的抗体を用いた蛍光免疫染色により、蛍光の有無を試験する。

8. 形質転換試験

軟寒天コロニー法により、形質転換の有無を測定する。各細胞の培養培地より終濃度 0.5%Agar の軟寒天を調製する。軟寒天内に細胞を（コロニー形成の判定が容易な）適切な濃度で播種し、 37°C 5% CO_2 の条件で 14 日間培養する。培養後の軟寒天内のコロニー形成の有無を判定する。

9. レトロウイルス粒子試験

固定化した後薄切した細胞を電子染色し、透過電子顕微鏡により観察し、ウイルス粒子の有無を測定する。

10. In vitro レトロウイルス試験（培養法）

検体を 293 細胞に感染し、ウイルスの増幅工程を経た上で、RTase の活性測定（FPERT assay : Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase）を行なう。活性がないとき陰性と判定する。

11. In vitro レトロウイルス試験

検体を直接 RTase の活性測定（FPERT assay : Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase）を行なう。活性がないとき陰性と判定する。

12. PCV/BCV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA（CrMV DNA）をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を PCV/BCV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA（CrMV DNA）特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の PCV/BCV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

13. HIV-1/2 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA（CrMV DNA）を

スパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HIV-1/2 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HIV-1/2 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

14. HTLV-1/2 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HTLV-1/2 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HTLV-1/2 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

15. HAV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) をスパイクした検体より、RNA を抽出する。抽出した RNA を HAV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム RT-PCR 反応を行い、検体中の HAV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

16. HBV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HBV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HBV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

17. HCV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) をスパイクした検体より、RNA を抽出する。抽出した RNA を HCV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム RT-PCR 反応を行い、検体中の HCV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照に

についても同時に実施する。

18. HHV-6/7/8 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HHV-6/7/8 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HHV-6/7/8 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

19. hCMV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を hCMV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の hCMV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

20. EBV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を EBV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の EBV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

21. HPV B-19 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HPV B-19 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HPV B-19 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

22. SV40 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) を

スパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を SV40 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の SV40 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

23. AAV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を AAV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の AAV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

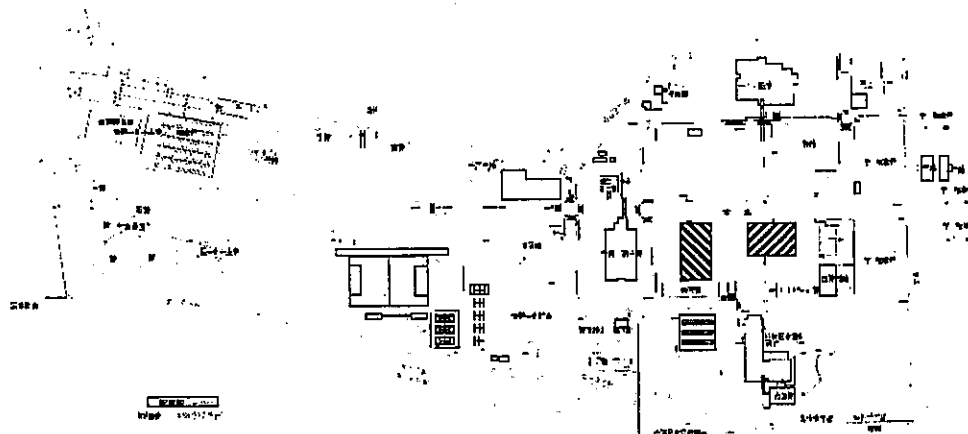
I 自治医科大学医学部附属病院の周辺地図

自治医科大学付属病院を黒線枠、自治医科大学とちぎ子ども医療センターを赤線枠で示した。

II 自治医科大学の平面図

自治医科大学医学部附属病院及び自治医科大学医学部とちぎ子ども医療センター周辺の平面図を以下に示す。

本遺伝子組換え生物の保管は自治医科大学医学部附属病院本館、投与は自治医科大学医学部附属病院新館にて実施し、投与後の患者は自治医科大学医学部附属病院とちぎ子ども医療センター病棟にて管理する。

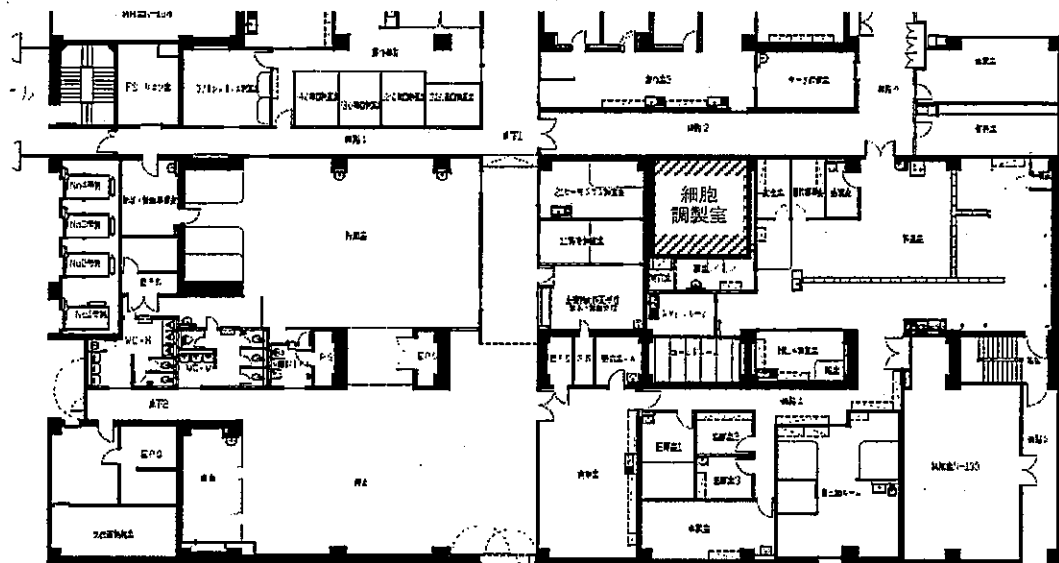


図．自治医科大学構内敷地図

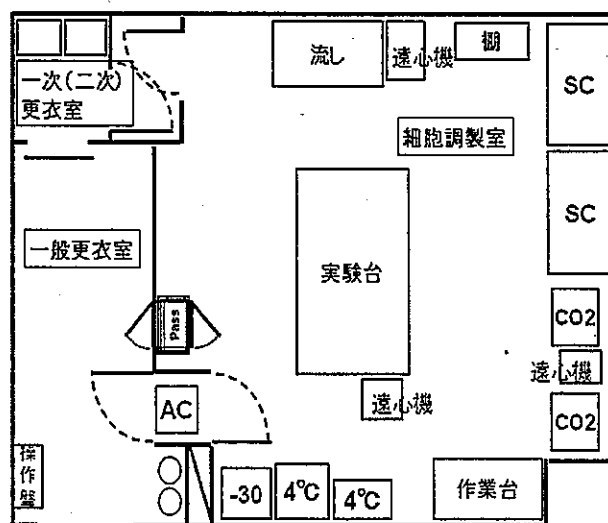
本遺伝子組換え生物の保管は自治医科大学医学部附属病院本館 1 階の無菌細胞調製室（右上がり斜線枠内）にて、患者への投与は自治医科大学附属病院新館（右下がり斜線枠内）3 階手術室にて、投与後の患者の管理は自治医科大学とちぎ子ども医療センター病棟（横線枠内）3 階 PICU、4 階又は 2 階個室病室にて実施する。自治医科大学とちぎ子ども医療センター病棟と自治医科大学附属病院新館は渡り廊下で接続されている。

Ⅲ 本遺伝子組換え生物を保管する施設の平面図

本遺伝子組換え生物の保管はP2レベルの実験室である自治医科大学付属病院本館1階輸血細胞移植部細胞調製室に設置した超低温フリーザー内に保管する。



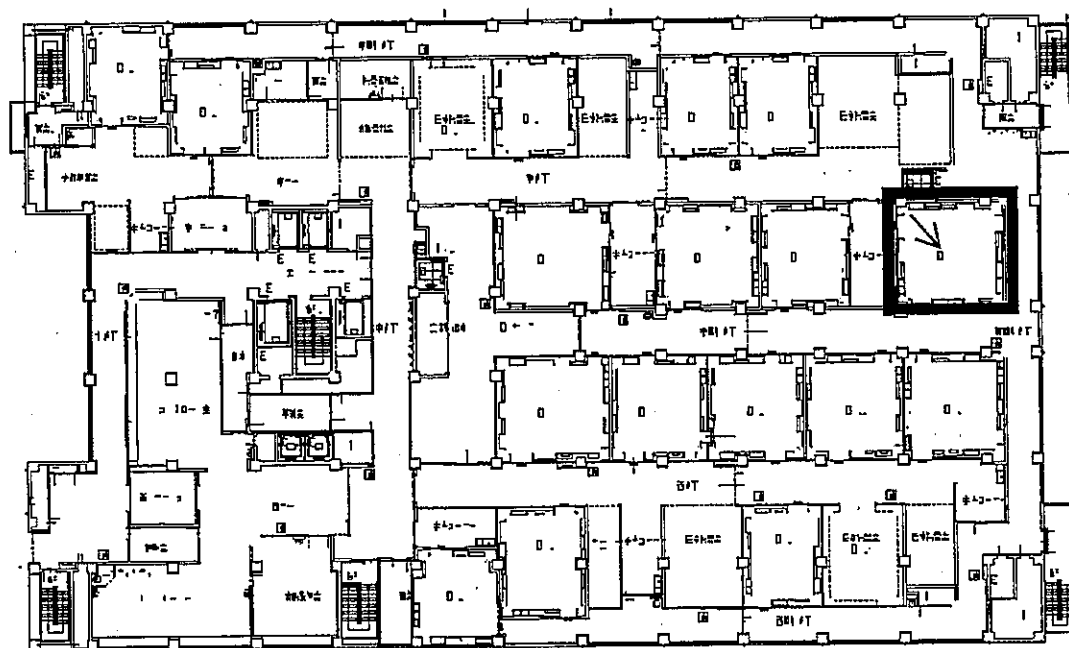
図．自治医科大学付属病院輸血細胞移植部細胞調製室周辺の見取り図



図．細胞調製室の見取り図

IV 遺伝子治療を行う施設の見取り図

本組換え生物の投与は、自治医科大学医学部附属病院新館 3 階の手術室にて行う。投与終了後、被験者の創部を皮膚欠損用創傷被覆材により密閉し、さらに三角巾で覆う。マスク及びガウンを着用した被験者を、自治医科大学子ども医療センター病棟 3 階 PICU 個室、自治医科大学子ども医療センター病棟 4 階又は 2 階の環境中への拡散防止措置を適切に執った個室病室にて管理する。



図．自治医科大学医学部附属病院新館 3 階手術室の見取り図
手術室を赤線枠で示す。

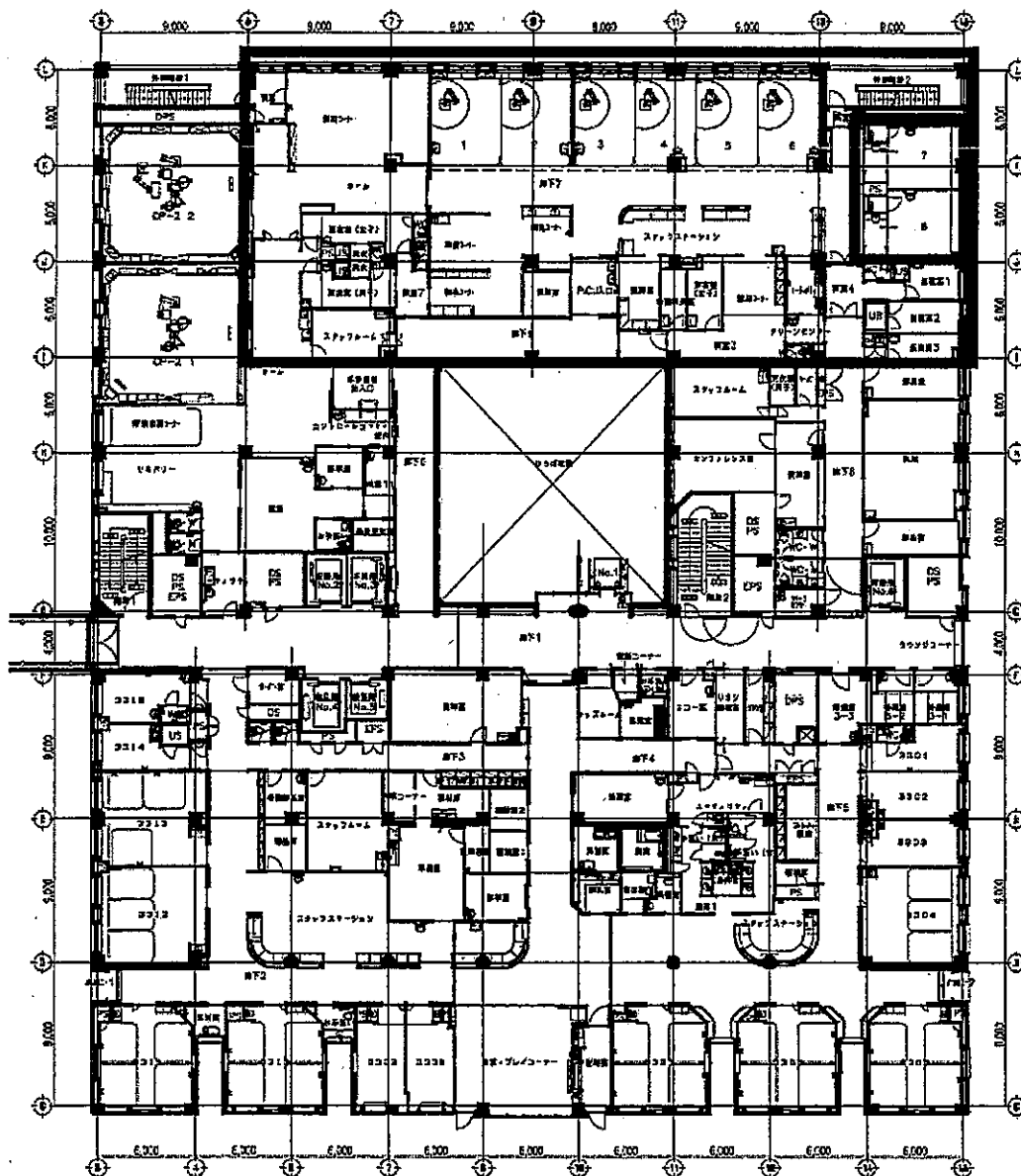


図. 自治医科大学医学部附属病院とちぎ子ども医療センター病棟3階PICU
及びPICU個室の見取り図

PICUを青線枠で、使用するPICU個室を赤線枠で示す。PICU個室は赤線枠内のどちらかを使用する。図面中央左は自治医科大学付属病院新館3階への渡り廊下を示す。

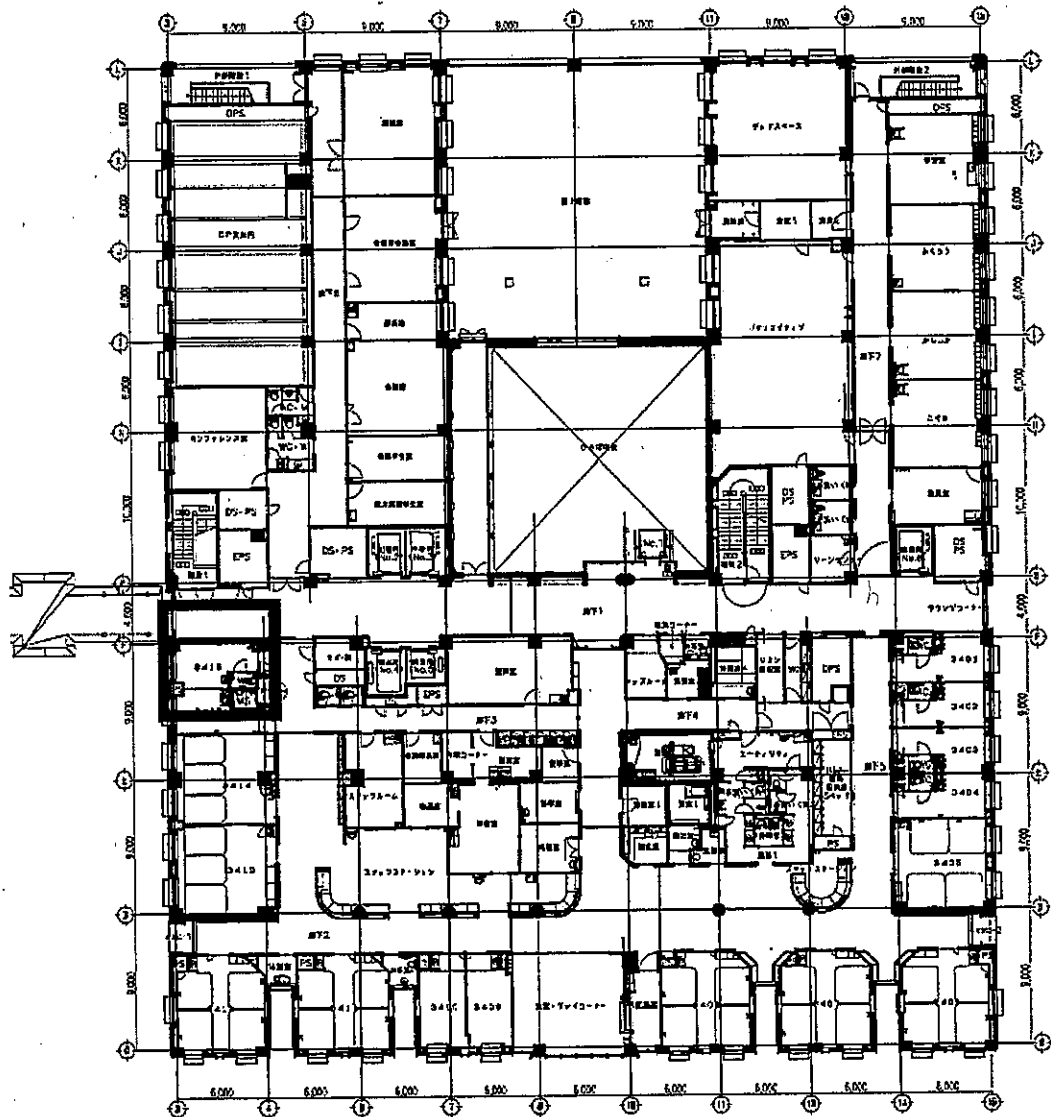


図. 自治医科大学医学部附属病院とちぎ子ども医療センター病棟 4 階及び
病室の見取り図

使用する陰圧個室を赤線枠で示す。陰圧個室は赤線枠内のどちらかを使用する。

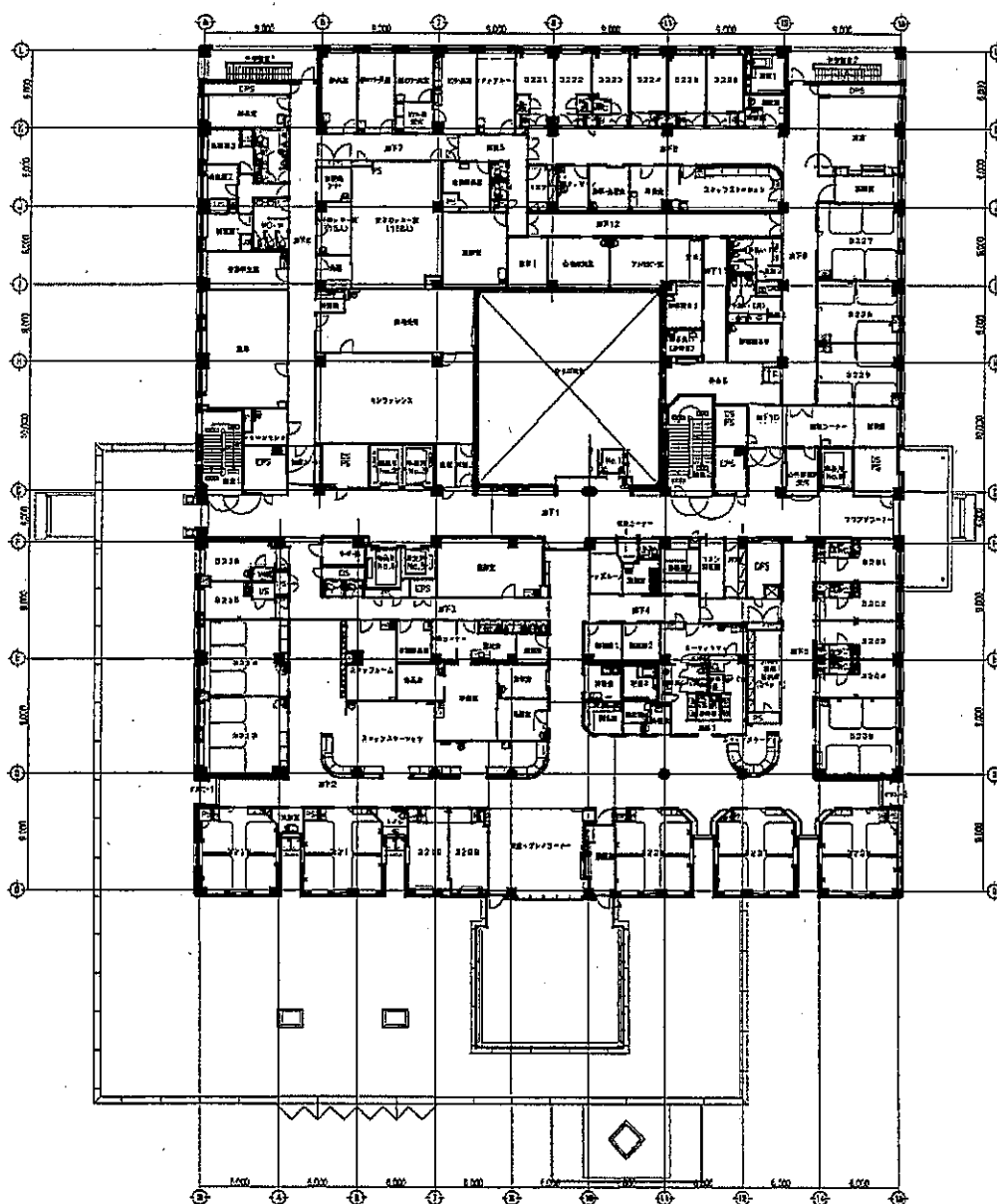


図. 自治医科大学医学部附属病院とちぎ子ども医療センター病棟 2 階及び
病室の見取り図

(目的)

第1条 この規程は、自治医科大学及び自治医科大学附属病院(以下「病院等」という。)から排出される医療廃棄物のうち感染症を生ずる恐れがある廃棄物(以下「感染性廃棄物」という。)について、廃棄物の処理及び清掃に関する法律(昭和45年法律第137号。以下「廃棄物処理法」という。)及び医療廃棄物処理ガイドライン(以下「ガイドライン」という。)に沿って、適性に処理するために必要な具体的手順等を定めることを目的とする。

(定義)

第2条 この規程の用語の定義は、当該各号に定めるところによる。

- (1) 医療廃棄物とは、病院等における医療行為等に伴って発生する廃棄物をいう。
- (2) 感染性廃棄物とは、医療廃棄物のうち感染症を生ずるおそれのある廃棄物をいう。
- (3) 非感染性廃棄物とは、医療行為等に伴って発生する廃棄物のうち感染性廃棄物以外の廃棄物をいう。

(感染性廃棄物の範囲)

第3条 感染性廃棄物とは、次の各号に掲げるものをいう。

- (1) 血液、血清、血漿及び体液(以下「血液等」という。)並びに血液製剤(全血製剤、血液成分製剤)
- (2) 手術等により排出される病理廃棄物
- (3) 血液等が付着した鋭利な物
- (4) 病原微生物に関連した試験・検査等に用いられた試験器具、培地及び透析器具
- (5) その他血液等が付着した廃棄物

(感染性廃棄物の管理者)

第4条 病院等より排出される感染性廃棄物を適正に処理するため、管理責任者を置く。

- 2 管理責任者は、病院長をもって充てる。
- 3 管理責任者は、感染性廃棄物分別、収集、運搬、処理及び処分の状況を把握し、医師、看護師及び清掃作業員を指導する。

(分別及び排出方法)

第5条 病院等で発生する医療廃棄物は、次の各号に掲げる分別排出をする。

- (1) 感染性廃棄物
 - (2) 非感染性廃棄物
 - (3) 上記以外の廃棄物(紙くず類)
- 2 前項の区分による廃棄物の分別及び排出方法は、別に定める廃棄物取扱ガイドによる。

(収集・運搬)

第6条 収集・運搬(以下「運搬等」という。)は、運搬途中で内容物が飛散、流出するおそれのない容器及び車両で行うものとする。

- 2 感染性廃棄物と他の廃棄物は混載しないものとする。ただし、すべてのものを感染性廃棄物として取扱う場合は、この限りでない。

(梱包)

第7条 一時保管又は運搬等の目的で梱包する場合は、次の各号に掲げる容器又は材料を、廃棄物の性状に応じて適切なものを選択するものとする。

- (1) 鋭利な物(注射針、メス等)については、耐貫通性のある堅牢な容器
- (2) 固形状のもの(血液の付着したガーゼ等)については、丈夫なプラスチック容器等
- (3) 液状又はでい状のもの(血液等)については、漏洩しない密閉容器

(容器の管理)

第8条 分別排出及び運搬等に用いる容器は、定期的に次の各号に定める点検等を行う。

- (1) 割れ等の異常の点検
- (2) 洗浄及び消毒

(表示)

第9条 感染性廃棄物を梱包した容器及びこれを収納する容器には、感染性廃棄物及び感染性として取り扱う廃棄物である旨を表示する。

(保管)

第10条 保管は、極力短期間とする。

- 2 腐敗性のある感染性廃棄物をやむを得ず長期間保管する場合は、冷蔵庫で保管する。
- 3 保管場所は関係者以外の立入りを禁止するとともに、見やすい箇所に、感染性廃棄物の存在と取扱い注意事項を表示する。

(委託契約)

第11条 収集、運搬、処理及び処分の業務を業者に委託する場合は、廃棄物処理法及びガイドラインに定める委託基準に基づき、事前に委託契約を締結する。

- 2 委託業者は、廃棄物処理法に基づく資格、認可を得た業者の中から、信頼度の高い業者を選定する。

- 3 受託業者には、原則として再委託を禁止させる。

(委託の実施)

第12条 管理責任者は、受託者の適切な業務の遂行に協力するために、次の各号に定める事項を遵守する。

- (1) 廃棄物の種類、性状、取扱い方法等を告知する。
 - (2) 可能な限り安全な形で排出するように努める。
- 2 感染性廃棄物の処分等を院外で行うため、これらの業務を委託しようとする場合は、受託業者に対しマニフェスト(積荷目録)を交付し、適正に処理を行う。この場合において、マニフェストの保管は5年間とする。

附 則

この規程は、平成3年4月1日から施行する。

附 則(平成14年規程第8号)

この規程は、平成14年4月1日から施行する。

附 則(平成15年規程第12号)

この規程は、平成15年3月17日から施行し、平成14年12月1日から適用する。

附 則(平成21年規程第33号)

この規程は、平成21年4月1日から施行する。

