

第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 6 月 9 日

厚生労働大臣 舛添 要一 殿
環境大臣 鴨下 一郎 殿

氏名 国立がんセンター
申請者 総長 廣橋 説雄
住所 東京都中央区築地五丁目一番五番



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>単純ヘルペスウイルス 1 型ーチミジンキナーゼ及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体を発現し、マウスアンフォトロピックウイルス 4070A の env 蛋白質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マウス白血病ウイルス (SFCMM-3)</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 東京都中央区築地五丁目 1 番 1 号 治療施設の名称 国立がんセンター中央病院</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) SFCMM-3 溶液は、容器に密封され、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 SFCMM-3 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又は P2 実験室内で閉鎖系にて行う。ドナーリンパ球への SFCMM-3 導入操作、SFCMM-3 導入細胞の培養その他の SFCMM-3 希釈溶液及び SFCMM-3 導入細胞の取扱いも同様に P2 実験室内の安全キャビネット内又は P2 実験室内で閉鎖系にて行う。SFCMM-3 希釈溶液及び SFCMM-3 導入細胞の保管は、P2 実験室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、SFCMM-3 希釈溶液若しくはその凍結品又は SFCMM-3 導入細胞を開放系区域を通して他の P2 レベル区域に運搬する場合には、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) SFCMM-3 溶液（希釈溶液を含む。）又は SFCMM-3 導入細胞を廃棄する際には、滅菌処理（121℃、20 分間以上の高圧蒸気滅菌処理又は 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液への 2 時間以上の浸漬処理による。以下同じ。）を行った後、国立がんセンター中央病院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) 被験者に対する遺伝子導入細胞の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「クリーンルーム」という。）内において、輸注により行う。なお、投与時に SFCMM-3 導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具類は使い捨てとし、適切に滅菌処理を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらの滅菌処理をクリーンルーム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、被験者をクリーンルーム内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的にクリーンルーム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) クリーンルーム内における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に滅菌処理を行い、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、適切に滅菌処理を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらの滅菌処理をクリーンルーム外の区域で行う場合には、二重に密閉

	<p>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、SFCMM-3 溶液及び SFCMM-3 導入細胞の取扱いに準ずる。</p> <p>(7) クリーンルーム内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、適切に滅菌処理を実施した後、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、これらの滅菌処理をクリーンルーム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。</p> <p>(8) クリーンルーム内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、クリーンルーム内における管理を継続する。</p> <p>(9) クリーンルーム内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、直ちに被験者をクリーンルーム内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>
--	--

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

単純ヘルペスウイルス 1 型—チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体 (Δ LNGFR) 遺伝子を含むレトロウイルスベクター-SFCMM-3 (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3)。

文献1 : Büchen-Osmond C ed., ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB Management, Columbia University, New York, USA (2004)

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)

文献3 : Coffin JM, Hughes S, Varmus HE ed., Retroviruses, pp14, 478-502, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1997)

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4)。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 23.2% を占める (文献5)。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4 : 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5 : <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性 (文献6)

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は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7)。

(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 アンフォトロピック 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 (文献8)

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ない。
- 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9)。また、10%及び 1%ポピドンヨード液 (文献10)、0.3%過酸化水素水 (文献11) 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12)、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13)。

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14)。抗

α -galactosyl 自然抗体を有する旧世界ザル（文献15）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16）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（別紙1）

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 及び env 遺伝子を除去するとともにネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（neo）が挿入されたゲノムを持つ増殖能欠損型レトロウイルスベクター-N2 が作製された。N2 のプロウイルス DNA をもとに、パッケージングシグナル（ Ψ ）とオーバーラップする gag 構造たん白質（Pr65 gag）遺伝子の発現を防止するために開始コドン（TAG）に改変するとともに、グリコシル化 gag（gPr85 gag）の発現を防止するために 5'-long terminal repeat（LTR）と Ψ の前半を含む 5' 側の非翻訳領域をモロニー Maus 肉腫ウイルス（MoMSV）の相同配列で置き換えることにより、LNL6 DNA が作製された。LNL6 DNA に含まれる env 遺伝子の断片と neo の 3' 非コード領域の一部を除去することにより、LN DNA が作製された。これにマルチプルクロニングサイト（MCS）及び Simian virus 40（SV40）初期プロモーター配列を挿入することにより LXSN DNA が構築された。増殖能欠損型レトロウイルスベクター-LXSN（文献17）は、LXSN DNA をパッケージング細胞に導入することにより作成可能である。LXSN DNA を含むプラスミドである pLXSN の塩基配列は、NCBI Nucleotide M28248 に登録されている。本遺伝子組換え生物は、LXSN のゲノムから neo の大半が除去され、HSV-TK 遺伝子及び Δ LNGFR 遺伝子が挿入されたゲノムを持つ。

文献6：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7：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8：遺伝子治療開発研究ハンドブック 第6章、第2節、1. ウイルスベクターの安全性（p. 627）

文献9：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10：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11：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12：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13：Yoshikura H. Ultraviolet sensitivity of helper function of murine leukemia virus. Arch Biochem Biophys 154:76-83 (1973)

文献14：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15 : Galili Uri, et al. Significance of a-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16 : 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17 : Miller AD, et al. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Biotechniques 7:980-991 (1989)

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 HSV-TK 遺伝子、SV40 初期プロモーター、 Δ LNGFR 遺伝子、5'-LTR、 Ψ の前半、3'-LTR の R 領域、neo の断片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 2 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 3 に示す。

1) HSV-TK 遺伝子

HSV-TK 遺伝子は、単純ヘルペスウイルス 1 型—チミジンキナーゼの遺伝子であり、1981 年、Wagner らによりヒト単純ヘルペスウイルス 1 型の CL101 株由来の遺伝子配列が明らかにされている（文献18）。本遺伝子組換え生物のプロウイルス（但し、3'-LTR の R 領域は MoMLV 由来）である SFCMM-3 DNA 中の HSV-TK 遺伝子は単一エクソンからなり、376 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 1,128 塩基対と TAG を終止コドンとする 1,131 塩基対で構成されている。

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、HSV-TK 遺伝子は 5'-LTR から転写される。レトロウイルスが細胞に感染して染色体に組み込まれると、3'-LTR 由来の U3 領域と 5'-LTR 由来の R 及び U5 領域からなる LTR がプロウイルス DNA の両端に配置される。したがって、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、MoMLV LTR 由来の U3 領域が HSV-TK 遺伝子のプロモーターとして機能する。このプロモーターは多くの種類の細胞において構成的に機能する。

2) SV40 初期プロモーター

SV40 はポリオーマウイルス科ポリオーマウイルス属に属するウイルスであり、ゲノムは環状 2 本鎖 DNA である。SFCMM-3 DNA 中の SV40 由来 DNA は 328 塩基対であり、上流側から順に、72 塩基対のエンハンサー配列（2 回繰り返す）、21 塩基対の 3 回繰り返す構造（6 箇所の Sp1 結合配列を含む）及び TATA ボックスからなる SV40 初期プロモーターを含んでいる。

3) Δ LNGFR 遺伝子

Δ LNGFR 遺伝子は、細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体をコードする遺伝子である（文献19、20、21）。ヒト低親和性神経成長因子受容体（LNGFR）遺伝子は、1986 年 Johnson らによってヒトメラノーマ細胞株 A875 から単離された（文献 19）。LNGFR 遺伝子は 427 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 1,281 塩基対と終止コドン TAG より

成り立っており、LNGFR 前駆体は、N 末端から順に、28 アミノ酸からなるシグナルペプチド、細胞外ドメインとして 6 個のシステイン残基を有する 40 アミノ酸からなるポリペプチドの 4 回繰り返し配列、セリン/スレオニンリッチ領域、1 回膜貫通領域、及び 155 アミノ酸からなる細胞内領域を有している。SFCMM-3 DNA に含まれる Δ LNGFR 遺伝子は、LNGFR 遺伝子を制限酵素 Sst I 及び Pvu II で処理して細胞内領域をコードする塩基対を除去した 940 塩基対のフラグメントを pUC19 の Sma I サイトにサブクローニングして終止コドンを導入したもので、開始コドン ATG の上流に 113 塩基対の非翻訳領域 (UTR) を有し、細胞外ドメイン及び細胞膜貫通領域の 280 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 956 塩基対の遺伝子である。

4) 5'-LTR、 Ψ の前半及び 3'-LTR の R 領域

これらは MoMSV 由来である。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、SFCMM-3 DNA では 5'-LTR から Ψ の前半にかけての部分が MoMSV 由来の配列で置換されており、その結果、産生細胞により産生される本遺伝子組換え生物のゲノムの 5'-LTR、 Ψ の前半及び 3'-LTR の R 領域が MoMSV 由来となる。5'-LTR 及び 3'-LTR はプロウイルスの細胞染色体への組み込みに必須である。プロウイルスの 5'-LTR は、本遺伝子組換え生物の産生細胞においてウイルスゲノムの転写を行うとともに、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 HSV-TK 遺伝子の転写を行う。 Ψ は、産生細胞において本遺伝子組換え生物のゲノムがウイルス粒子にパッケージングされる際に必須である。なお、これらの部分を MoMSV 由来の配列で置換してもウイルスタイターやパッケージング効率は影響を受けないことが報告されている (文献22)。

5) neo の断片

大腸菌 Tn5 由来の neo は 264 アミノ酸からなる蛋白質をコードし、ネオマイシン耐性遺伝子として機能する。本遺伝子組換え生物のゲノムには neo のうち C 末端部分の 53 アミノ酸をコードする 161 塩基の配列、終止コドン及び 17 塩基からなる 3'-UTR が含まれる。

6) 制限酵素認識部位等の人工配列

SFCMM-3 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 3-6 に示すとおりであり、本遺伝子組換え生物のゲノム中での位置を別紙 2 に示す。

(2) 構成要素の機能

1) HSV-TK 遺伝子

HSV-TK 遺伝子は、ウイルス特有のチミジンキナーゼであり、376 アミノ酸からなる HSV-TK をコードしている。HSV-TK の基質特異性はヒト細胞が有するチミジンキナーゼとは異なっており、グアノシンの類似物質であるアシクロビル (ACV) やガンシクロビル (GCV)