

平成 24 年 7 月 13 日

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
法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性
影響評価に関する作業委員会

委員長 小澤 敬也

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（平成 15 年法律第 97 号）に基づき申請のあった下記の遺伝子組換え生物等の第一種使用規程について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙 1 のとおりとりまとめたので報告いたします。

なお、本作業委員会においては、とくにウイルスのモニタリングに関して慎重な審議が行われましたので、その概要を別紙 2 のとおり報告いたします。

記

1. ヒトアデノウイルス 5 型を基本骨格としてテロメラーゼ活性依存性に制限増殖する腫瘍融解ウイルス（Telomelysin）

申請者：岡山大学病院 病院長 槇野 博史

申請日：平成 23 年 11 月 14 日

【作業委員会の評価結果（岡山大学病院）】

1. ヒトアデノウイルス 5 型を基本骨格としてテロメラーゼ活性依存性に制限増殖する腫瘍融解ウイルス (Telomelysin)
第一種使用等の内容：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
申請者：岡山大学病院 病院長 横野 博史
(1) 生物多様性影響評価の結果について ① 他の微生物を減少させる性質 申請されている第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、Telomelysin 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極めて微量と考えられる。また、Telomelysin 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ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) と同等であり、自然界で感染する対象はヒトのみである。さらに、Telomelysin は、腫瘍細胞内にて選択的に増殖するウイルスであり、正常細胞では増殖しない。したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、Telomelysin は環境中に拡散したとしてもやがて消滅すると考えられる。 また、Telomelysin の感染する動植物等の種類は野生型 Ad5 と同等であるため、Telomelysin は微生物には感染せず、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。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
② 病原性 Telomelysin の感染する動植物等の種類は野生型 Ad5 と同等であり、自然界で感染する対象はヒトのみである。また、Telomelysin は、腫瘍細胞内にて選択的に増殖するウイルスであり、正常細胞では増殖せず、正常細胞での細胞障害性は乏しい。このため、Telomelysin 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。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
③ 有害物質の産生性 Telomelysin の有害物質の産生性は知られておらず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
④ 核酸を水平伝達する性質 第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、Telomelysin の環境中への拡散は極めて微量と考えられる上、Telomelysin 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 と同等であり、自然界で感染する対象はヒトのみである。さらに、Telomelysin は、腫瘍細胞内にて選択的に増殖するウイルスであり、正常細胞では増殖しない。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論 以上を踏まえ、Telomelysin を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生じるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

作業委員会における審議の概要
(ウイルスのモニタリングに関して)

(1) 審議の経緯

本作業委員会は、以下の会合を開催して審議を行った。

第1回：平成24年3月27日(火) 18:15～18:55

また、会合の前後においても、各委員より申請者に対して意見・照会事項を送付し、申請者よりそれに対する回答を得るなどした。

(2) 本作業委員会における意見

- 本件第一種使用規程の申請に係る遺伝子組換え生物 (Telomelysin) は、腫瘍選択的に増殖するウイルスである。

そのため、投与後腫瘍細胞内において増殖したウイルスが喀痰、尿中等に移行することにより、セカンドピーク (投与後いったん減少した喀痰、尿中等のウイルスが再び増加すること) が検出される可能性がある。

- このため、投与後の喀痰、尿中等のウイルスのモニタリングについては、セカンドピークを考慮した適切な手法 (期間、頻度) を検討する必要がある。

- もっとも、第一種使用は、遺伝子組換え生物等が環境中に拡散することを前提とし、その場合であっても生物多様性影響が生ずるおそれがないことを確認して使用するものであるから、必ずしも厳格なモニタリングを行う必要はないとも考えられる。

しかしながら、第一種使用の場合であっても遺伝子組換え生物等の環境中への拡散はなるべく低減することが望ましいこと、また、Telomelysin の腫瘍選択的な増殖性を確認する上でもウイルスの体内動態データを収集することは意味があることから、一定のデータが蓄積されるまでの間は、ウイルスの体内動態等の評価を目的とした継続的なモニタリングを行うことを検討すべきである。

- なお、上記のとおり、第一種使用は、遺伝子組換え生物等が環境中に拡散することを前提とした使用であるから、仮に上記の継続的なモニタリング中に喀痰、尿中等からウイルスが検出されたとしても、直ちに患者を個室管理に移す必要はないものと考えられる。

(3) 申請者の対応

- 上記の意見を受け、患者の個室管理について、第一種使用規程の見直しが行われた。なお、ウイルスの体内動態等の評価を目的とした継続的なモニタリングについては、すでに46日目までのモニタリングが計画されていることから、更なる期間の延長は行わないこととされた。

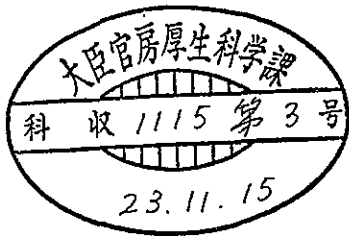
厚生科学審議会科学技術部会
 遺伝子治療臨床研究作業委員会に係る
 生物多様性影響評価に関する作業委員会 委員名簿

【岡山大学病院】

「頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルスTelomelysinを用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究」

氏 名	所 属
○ いわさき かずひろ 岩崎 一弘	(独)国立環境研究所 主任研究員
おざわ けいや 小澤 敬也	自治医科大学 医学部教授
かんだ ただひと 神田 忠仁	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
さいとう いずむ 斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
はやかわ たかお 早川 義夫	近畿大学 薬学総合研究所所長
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

○：委員長（五十音順 敬称略）



第一種使用規程承認申請書

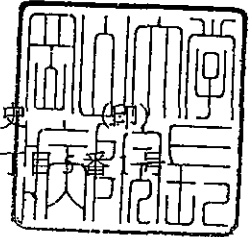
平成 23 年 11 月 14 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

申請者 氏名 岡山大学病院

病院長 榎野 博史

住所 岡山市北区鹿田町二丁目五番 五



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第4条第2項の規程により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	ヒトアデノウイルス5型を基本骨格としてテロメラーゼ活性依存性に制限増殖する腫瘍融解ウイルス (Telomelysin)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	治療施設の所在地 岡山県岡山市北区鹿田町2丁目5番1号 治療施設の名称 岡山大学病院 (1) Telomelysin 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 Telomelysin 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。Telomelysin 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、Telomelysin 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) Telomelysin 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%若しくは 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）又は高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。）を行った後、岡山大学病院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 Telomelysin 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整（以下「Telomelysin 液」という）した後、二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った治療室（以下「治療室」という。）又は放射線部コンピュータ断層撮影装置室（以下「CT 室」という。）に直ちに運搬し、専用の注入用穿刺針、注射器及びチューブからなるデバイス（以下「注入セット」という。）に充填する。 (5) 被験者に対する Telomelysin の投与は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる頭頸部・胸部悪性腫瘍症例を対象とする。各患者に対する Telomelysin 投与量は、低用量（1×10^{10} vp (viral particles)）、中用量（1×10^{11} vp）、高用量（1×10^{12} vp）の3群で、投与ウイルス液量は 1 ml とする。腫瘍内 5 か所に

注入するため、1箇所あたり0.2ml程度ずつ注入することになる。局所麻酔下、咽頭麻酔下、あるいは全身麻酔下に、細い注射針を装着した注射器、内視鏡の生検鉗子孔を通した穿刺吸引針、あるいはCTガイド下や超音波ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて、面積が 1 cm^2 <かつ 25 cm^2 >の腫瘍内5ヵ所（4分割した区域と中心部）に病変全体を3次的にカバーする様に直接注入する。Telomelysinの投与初日を第1日目とし、重篤な副作用を認めない場合は第18日目、第32日目に同じ病変に投与を行い、計3回の治療を実施する。注入針の抜去は慎重に行い、Telomelysin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Telomelysin投与終了後、被験者の創部を消毒する。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を、治療室又はCT室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室に移送する。

(7) 上記(5)及び(6)で用いた注入セット等の器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、穿刺用ガイド装置等は、ウイルス不活化を行い、再利用する。これらのウイルス不活化を治療室又はCT室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。治療後の当該治療室は床を消毒液で掃き清掃する。なお、治療室内の空気は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) 投与後48時間まで、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による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、Telomelysin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、被験者の喀痰、唾液及び尿中の Telomelysin が陰性であることを確認する。Telomelysin 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、被験者の喀痰、唾液及び尿中から Telomelysin が検出された場合には、被験者を個室における管理下に移す必要性について検討する。 なお、必要と判断された場合は、上記(8)から(11)までと同様の措置を執る。
--	---

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)、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルス(Telomelysin)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、コトンラット及びニュージーランドウサギへの経鼻接種でウイルス増殖が報告されている(文献 1)。

文献 1 : Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed.: Fields VIROLOGY fourth edition, pp.2265-2326, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)

文献 2 : 畑中正一編: ウイルス学, pp.198-208, 朝倉書店, 東京 (1997)

文献 3 : 水田克巳など: 山形県衛生研究所報, 32: 5-7 (1999)

2 使用等の歴史及び現状

Ad5 を生ワクチン等に使用した報告はない。Ad5 に由来する組換えアデノウイルスが遺伝子治療で汎用されている(IV 章参照)。

3 生理・生態学的特性(文献 1、2)

(1) 基本的特性

ウイルスキャプシドは直径 80 nm の正二十面体で、エンベロープはない。ゲノムは約 36 kb の 2 本鎖 DNA である。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染し、増殖する。培養細胞でも、ヒト由来の細胞でのみ効率よく増殖する。サル由来培養細胞で低レベルの増殖が起こる。経口感染することから推定されるように、室温で比較的安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

自然界では、ヒトやコットンラット等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蛋白質等の毒性は報告されていない。

(7) その他の情報

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

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

文献 5: APIC guidelines for infection control practice

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

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

II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1 供与核酸に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

Telomelysin (OBP-301)では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されており、hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現される。

(2) 構成要素の機能

Telomelysin は、テロメラーゼ活性と非常によく相関する hTERT (human telomerase reverse

transcriptase) 遺伝子のプロモーター活性に依存して増殖し、癌細胞を選択的に破壊する。テロメラーゼは多くの癌細胞でその活性の上昇が認められているため、癌細胞では hTERT 遺伝子の発現制御を行っている hTERT プロモーターのスイッチがオンになると考えられる。Telomelysin では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーター（別紙 1）が、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されており、hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現される。E1A タンパク質は、感染可能なウイルス産生に必要な遺伝子群の転写を活性化し、E1B タンパク質は、宿主細胞のタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの複製を促進する。また、E1B の 55kDa タンパク質は、放射線による DNA 傷害の修復を阻害することで放射線感受性を増強することが明らかになっている。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

Telomelysin (OBP-301)組換えアデノウイルスは pGL3-Basic vector の hTERT-promoter を用いて作製される。pGL3-Basic vector から hTERT promoter を MluI+BglII により切り出し (455bp)、E1A-IRES-E1B の E1A 上流にある XhoI site に順方向に挿入、hTERT promoter-E1A-IRES-E1B(hAIB)を作成する。最終的に、Adeno-X Viral DNA に pSh-hAIB を組み込み、組み換えアデノウイルスを作成した。（別紙 3）

(2) 特性

Adeno-X Viral DNA 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

Telomelysin (OBP-301)では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されている。（別紙 2）。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法（別紙 3 の各図を参照）

pSh-hAIB の作製法を以下に示す。

① E1A遺伝子を、RT-PCRにて増幅した。プライマーは、

E1A-S ; aca ccg gga ctg aaa atg ag、E1A-AS ; cag agg ttt ac acct tat ggcを用いた。また、E1B遺伝子を、ゲノムDNAのPCRにて増幅した。プライマーは、E1B-S ; ctg acc tca tgg agg ctt gg、E1B-AS ; gcc cag aca ttt cag tac ctcを用いた。それぞれ、PCR productのTA cloning (TA Cloning Kit Dual Promoter ; Invitrogen) (Fig1) を使い、シークエンスを確認した後、EcoRIによりそれぞれ911bp、1836bpのfragmentを切り出した。

- ② E1AをpIRES(CLONTEC)(Fig.2)のMCS-AのMluI siteに順方向に挿入した (blunt end ligation)。
- ③ E1BをE1A-IRESのMCS-BのSalI siteに順方向に挿入した (blunt end ligation)。
- ④ hTERT promoter(Fig.3)をMluI+BglIIにより切り出し (455bp)、E1A-IRES-E1BのE1A上流にあるXhoI siteに順方向に挿入した (blunt end ligation)。
- ⑤ hTERT promoter-E1A-IRES-E1B(hAIB)をNheI+NotIにより切り出し (3828bp)、MfeI+NheI digestionによりCMV promoterを除去したpShuttle vector(Fig.4a)に順方向に挿入した(pSh-hAIB) (Fig.4b)。
- ⑥ I-CeuI+P1-SceIにより4381bpのpSh-hAIB断片を切り出し、Adeno-X Viral DNA(Fig.5)に挿入した (AdenoX-hAIB)。
- ⑦ Adeno-X Expression System(CLONTECH)(Fig.6)のマニュアルに従って、hAIBを持つ組み換えアデノウイルスを作製した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

作製した Telomescan は Adeno-X Expression System(CLONTECH)(Fig.6)のマニュアルに従い、293 細胞を使って増殖させた。Telomelysin は、岡山大学で開発された国産の抗がんウイルス製剤であり、岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ (株)によって臨床開発が進められている。本臨床研究では、米国で行われた各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験のために、オンコリスバイオファーマ (株)が Introgen Therapeutics 社にて製造した Telomelysin の臨床ロットを輸入して使用する。凍結した状態で日本へ輸送した最終製品は、岡山大学病院遺伝子・細胞治療センター (P2 レベル) において保存される。

具体的には、最終製品は岡山大学病院中央診療棟 5 階遺伝子・細胞治療センターのベクター保存室内のディープフリーザーに施設の上、保管される (当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙 4)。

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 Telomelysin 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、Telomelysin のゲノムは核内の染色体外に存在し、テロメラーゼ活性と非常によく相関する hTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子のプロモーター活性に依存して増殖する。

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

Telomelysin の検出は、定期的に唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する E1A あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定

量的 PCR を行う。これらのプライマーにより、血漿中の Telomelysin を定量可能であることが確認されており、検出感度はそれぞれ 1×10^2 PFU/ml、 1×10^3 PFU/ml であった（文献 7）。また、米国での臨床試験において、唾液、喀痰、血液、尿中の Telomelysin 検出にも使用可能であることを確認しており（文献 8）、これらのプライマーを用いた定量的 PCR は十分信頼できるといえる。

文献 7: Hashimoto, Y. *et al.*: Cancer Science, pp.385-390, WILEY-BLACKWELL, Malden (2008)

文献 8: Nemunaitis, J. *et al.*: Molecular Therapy, pp.429-434, Nature Publishing Group, New York (2010)

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

Telomelysin は特別な治療遺伝子を持たず、外来性の塩基配列として hTERT プロモーターが挿入されている点が野生型アデノウイルスの配列との大きな違いである。Telomelysin では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されている。癌細胞では hTERT 遺伝子の発現制御を行っている hTERT プロモーターのスイッチがオンになると考えられる。hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現され、ウイルスが増殖する。これらの点を除くと、Telomelysin 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。

本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用の組換えアデノウイルスと異なり、本来 E1A および E1B 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus, RCA) であるため、RCA 量を制限する評価基準の適応とはならない。

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) Telomelysin 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 Telomelysin 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。Telomelysin 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、Telomelysin 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) Telomelysin 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%若しくは 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）又は高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。）を行った後、岡山大学病院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 Telomelysin 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整（以下「Telomelysin 液」という）した後、二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った治療室（以下「治療室」という。）又は放射線部コンピュータ断層撮影装置室（以下「CT 室」という。）に直ちに運搬し、専用の注入用穿刺針、注射器及びチューブからなるデバイス（以下「注入セット」という。）に充填する。
- (5) 被験者に対する Telomelysin の投与は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる頭頸部・胸部悪性腫瘍症例を対象とする。各患者に対する Telomelysin 投与量は、低用量（ 1×10^{10} vp）、中用量（ 1×10^{11} vp）、高用量（ 1×10^{12} vp）の 3 群で、投与ウイルス液量は 1 ml とする。腫瘍内 5 カ所に注入するため、1 箇所あたり 0.2ml 程度ずつ注入することになる。局所麻酔下、咽頭麻酔下、あるいは全身麻酔下に、細い注射針を装着した注射器、内視鏡の生検鉗子孔を通した穿刺吸引針、あるいは CT ガイド下や超音波ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて、面積が 1 cm^2 <かつ 25 cm^2 > の腫瘍内 5 カ所（4 分割した区域と中心部）に病変全体を 3 次元的にカバーする様に直接注入する。Telomelysin の投与初日を第 1 日目とし、重篤な副作用を認めない場合は第 18 日目、第 32 日目に同じ病変に投与を行い、計 3 回の治療を実施する。注入針の抜去は慎重に行い、Telomelysin 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 Telomelysin 投与終了後、被験者の創部を消毒する。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を、治療室又は CT 室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室（以下「個室」という。）に移送する。
- (7) 上記(5)及び(6)で用いた注入セット等の器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、穿刺用ガイド装置等は、ウイルス不活化を行い、再利用する。これらのウイルス不活化を治療室又は CT 室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。治療後の当該治療室は床を消毒液で掃き清掃する。なお、治療室内の空気は 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) 投与後 48 時間まで、被験者を個室で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に個室から外の開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留め、マスク及びガウン着用による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、Telomelysin 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、被験者の喀痰、唾液及び尿中の Telomelysin が陰性であることを確認する。Telomelysin 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、被験者の喀痰、唾液及び尿中から Telomelysin が検出された場合には、被験者を個室における管理下に移す必要性について検討する。

なお、必要と判断された場合は、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

対外へのウイルス排出の有無は、唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いての PCR で検出を行う。血液によるウイルス DNA 検査は投与後 1、4、11、18、32 日目、退院時、退院 1 カ月後に行う。唾液、喀痰、尿によるウイルス DNA 検査は投与後 1 日目と退院時に行う。

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

本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用の組換えアデノウイルスと異なり、本来 EIA および EIB 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus, RCA) であるため、RCA 量を制限する評価基準の適応とはならない。

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低い、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。Telomelysin を低用量あるいは中用量投与された被験者は、投与後 48 時間まで個室管理される。高用量投与された被験者は、投与後喀痰中のウイルス DNA の陰性が確認されるまで個室管理される。喀痰検査は投与後 1 日目に行い、ウイルス DNA が検出された場合はさらに 48 時間おきに再検査を行い、陰性を確認する。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。

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) Telomelysin の前臨床研究

Telomelysin を癌細胞に感染させると、E1A、E1B mRNA、および E1A タンパク質の発現がみられたが、正常細胞ではそれらの発現は抑制されていた。また、Telomelysin は、癌細胞では 3 日以内に 10^5 - 10^6 倍に増殖したが、正常細胞では 100-1000 倍にとどまり、正常細胞では癌細胞に比べてその増殖が 10^3 - 10^4 分の 1 に抑えられることが明らかになった。肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膵癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、など様々な臓器由来のヒト悪性腫瘍細胞株を用いて Telomelysin の容量依存性の抗腫瘍活性を測定し、ID50 (50%の標的癌細胞を殺すことのできるウイルス濃度) を算出したところ、ほとんどの細胞株で 20 MOI (PFU/cell) 以下であり、Telomelysin は広範な抗腫瘍活性を有していた。

2) Telomelysin の正常細胞での細胞障害性

ヒト正常線維芽細胞に対しては、Telomelysin は明らかな細胞障害活性を認めなかった。また、ヒト正常肝細胞、ヒト正常腎上皮細胞、ヒト正常気道上皮細胞では、野生型アデノウイルスに比べて低い細胞障害活性を示した。

3) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本研究のプロトコールでは Telomelysin は病巣に直接局所注入されるが、コットラットでの定量的 PCR による Telomelysin の体内分布解析において、筋肉内投与あるいは静脈内投与後 8 日目において血液中ならび測定した組織中で検出可能であった。また、ヌードマウスの背部皮下に移植したヒト腫瘍内に Telomelysin を投与すると、投与部位でのウイルス DNA は極めて高値であったが、投与後 70 日目のその他の組織でもウイルス DNA は検出可能であった。すなわち、投与部位で増殖した Telomelysin が全身循環に入ったものと推測されるが、抗 E1A 抗体を用いた各組織の免疫組織染色では投与部位以外の正常組織は染色されず、投与部位以外の正常組織ではウイルス増殖は認められないことが確認された。

4) 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低い、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。

5) 動物実験でのウイルスの体内での増殖や体内分布、排出について

Telomelysin ウイルスの体内での増殖や体内分布は、ヒト腫瘍細胞を皮下移植した担

癌ヌードマウスに Telomelysin を腫瘍内投与する単回投与毒性試験（試験番号：FXT00022）と、アデノウイルスに感受性のあるコottonラットに Telomelysin を筋肉内投与する単回投与毒性試験（試験番号：FXT00014）において正常細胞・組織でのウイルス DNA 分布と拡散を検討した。Telomelysin ウイルス由来の DNA 塩基配列の体内分布及びウイルス残存量は、qPCR 解析により評価した。

<体内分布について>

担癌ヌードマウスに Telomelysin を腫瘍内投与した場合、投与 28 日後および投与 70 日後ともに、最も高い濃度のウイルス DNA が検出されたのは、Telomelysin 投与部位であった。次いで、血中、腋窩リンパ節、脳、心臓で Telomelysin のウイルス DNA が検出可能であった。一部のマウスで肺、卵巣、子宮、腎臓、膀胱、大腸への分布が検出されたが、ほとんどのマウスが検出限界以下であった。一方、コottonラットに筋肉内投与した場合、最も高いウイルス DNA 分布が認められたのは、投与部位で、Telomelysin 投与 5 日後に検出上限を超える濃度 ($> 5,000,000 \text{ VP}/\mu\text{g}$) が検出されたが、投与 85 日後の測定まで急速に低下した ($29,167 \pm 21,904 \text{ VP}/\mu\text{g}$)。投与部位以外では、投与後 5 日目に $1000 \text{ VP}/\mu\text{g}$ 以上のウイルス DNA が大腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、脾臓、骨髄で検出されたが、その後時間の経過とともに低下し、たとえば大腸、肝臓、肺、リンパ節、脾臓などでは投与後 14 日で 5-10 分の 1 程度に減少した。脳および膀胱では最も低い濃度であった。血中においてもウイルス DNA は、投与 5、14 ならびに 28 日後に検出されたが、 $1000 \text{ VP}/\mu\text{g}$ 以下であり、また時間経過とともに減少し、85 日後には、検出限界以下となった。投与 85 日後までウイルス DNA が残存した組織検体での Telomelysin の増殖が起きていたかを検討するため、免疫染色により EIA 発現を分析したところ、投与 5 日後の投与部位及び肝臓のみで陽性を示し、85 日後では、陽性検体は認められなかった。

以上の所見から、テロメラインを腫瘍内に局所投与した場合、低用量でも腫瘍内での薬物濃度は長期間保持され、一方、血中へ漏出して他の非腫瘍組織に分布されても増殖はみられず、時間とともに減衰し全身的なウイルス暴露は少ないことが示唆された。

6 国外における使用等により得られた情報

5) 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験

米国にて各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験が行われ、腫瘍内単回投与を受けた 16 例の進行固形癌患者では、初期 3 例は 10^{10} vp 、次の 3 例目は 10^{11} vp が投与され、最高容量 10^{12} vp は 10 例に投与されている。投与部位の疼痛や硬結などの局所反応と発熱などの全身症状はみられたが、重篤な有害事象はなく、安全に投与可能であった。

Telomelysin 投与後の血液、唾液、喀痰、尿中のウイルス DNA の検出を行った際に、低用量 (10^{10} VP) 投与した場合、投与後 24 時間以内に血中のウイルス DNA を検出した。中用量 (10^{11} VP) あるいは高用量 (10^{12} VP) 投与した場合、投与後 24 時間以内と、投与後 7 日目から 28 日目までに血中のウイルス DNA を検出した。喀痰でのウイルス DNA

は高用量のみで検出され、唾液や尿中でのウイルス DNA は検出されなかった。

Telomelysin を高容量で投与した場合、単回投与 10 例中 3 例 (30%) と複数回投与 6 例中 2 例 (33%) と同程度に投与後 24 時間以内と 7 日目以降に血中のウイルス DNA を検出したことから、単回投与と複数回投与でのウイルス排出に大きな変化はないと思われる。

放射線治療を併用した場合、腫瘍細胞の細胞死が増強し、腫瘍細胞内に存在する Telomelysin が血液中に多く漏出する可能性がある。しかし、血中に多く存在する抗アデノウイルス抗体によって中和される可能性が高く、複数回投与の場合と同様にウイルス排出に大きな変化はないと思われる。

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

Telomelysin の感染性は野生型 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

Telomelysin の感染性は野生型 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

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低い。

(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、Telomelysin の環境中への拡散は極めて微量である。Telomelysin 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。さらに、Telomelysin 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）Telomelysin の正常細胞での細胞障害性は乏しいことを踏まえると、Telomelysin 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。

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

Telomelysin 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

Telomelysin の感染性は野生型 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

Telomelysin の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、Telomelysin の環境中への拡散は極めて微量である。Telomelysin 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）及び正常細胞内での増殖能は乏しいことも踏まえると、Telomelysin はやがて環境中から消滅すると考えられる。

(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

本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用の組換えアデノウイルスと異なり、本来 E1A および E1B 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス（Replication competent adenovirus, RCA）である。Telomelysin は、腫瘍細胞内にて選択的に増殖するウイルスであり、正常細胞では増殖しないウイルスである。Telomelysin 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。すなわち、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。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、Telomelysin 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。Telomelysin 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：hTERT promoter の構造

別紙 2：Telomelysin (OBP-301)組換えアデノウイルス

別紙 3：Telomelysin (OBP-301)の作成方法

別紙 4：治療施設の地図及び保管場所の概略図