

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、その結果を別紙のとおりまとめたので報告いたします。

記

1. ヒト色素上皮由来因子（hPEDF）を発現し、ヒト水疱性口内炎ウイルス（Vesicular Stomatitis Virus : VSV）の env 蛋白質（VSV-G）をエンベロープにもつ非増殖性の遺伝子組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルス（SIVagm-hPEDF）

申請者：九州大学病院 病院長 久保 千春

申請日：平成 22 年 9 月 29 日

【作業委員会の評価結果（九州大学病院）】

1. ヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) を発現し、ヒト水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus : VSV) の env 蛋白質 (VSV-G) をエンベロープにもつ非増殖性の遺伝子組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルス (SIVagm-hPEDF)
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
申請者：九州大学病院 病院長 久保 千春
(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、SIVagm-hPEDF の環境中への拡散は極めて微量である。さらに、SIVagm-hPEDF は増殖能を失っており、環境中では増殖することではなく、また、相同組換えによって増殖性ウイルスが出現する可能性も極めて低いと考えられる。したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、環境中へ拡散したとしても、やがて消滅すると考えられる。 SIVagm-hPEDF は、ヒト水疱性口内炎ウイルス (VSV) の env 蛋白質 (VSV-G) によってシェードタイプパッケージされており、感染性は VSV と同一と考えられるので、微生物には感染せず、また、競合や有害物質の産生により他の微生物を減少させる性質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 SIVagm-hPEDF の感染性は VSV と同一と考えられるため、自然界で病原性を受ける対象はヒトの他にサル、ウシなど多くの哺乳動物が想定される。 しかしながら、まず、SIVagm-hPEDF が感染したヒトではヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) を発現する可能性があるが、これによるヒトへの病原性は知られていない。 また、SIVagm-hPEDF は、自己不活性 (SIN) 化されており、遺伝子挿入により宿主遺伝子が非特異的に活性化する可能性を最小化しているなど、遺伝子挿入によって悪性腫瘍が生じる可能性は理論的に極めて低いと考えられる。実際に、小動物 (マウス、ラット) およびサルを用いた安全性試験において、免疫不全やがんの発生を含め、重篤な有害事象を認めなかった。 さらに、SIVagm-hPEDF は増殖能を失っており、また、増殖性ウイルスが出現する可能性も極めて低いと考えられる上、万一増殖型ウイルスが出現したとしても、元来野生型ウイルスは自然宿主に対しても病原性を示さない。 したがって、SIVagm-hPEDF 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低いと考えられる。 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ず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 SIVagm-hPEDF 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ず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 SIVagm-hPEDF の感染性は VSV と同一と考えられるため、自然界で病原性を受ける対象はヒトの他にサル、ウシなど多くの哺乳動物が想定される。 SIVagm-hPEDF が感染したヒトでは PEDF 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、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、SIVagm-hPEDF の環境中への拡散は極めて微量である。さらに、SIVagm-hPEDF は増殖能を失っており、また、増殖性ウイルスが出現する可能性も極めて低く、環境中へ拡散したとしても、やがて消滅すると考えられる。 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、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ず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、SIVagm-hPEDF 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ず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。

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

【九州大学病院】

「神経栄養因子（ヒト色素上皮因子：hPEDF）遺伝子搭載第3世代組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクターの網膜下投与による網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療臨床研究」

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 堯夫	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

22. 9. 29

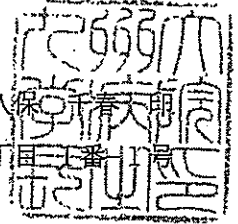
平成 年 月 日

厚生労働大臣 細川 律夫 殿

環境大臣 松本 龍 殿

氏名 九州大学病院 病院長 久保 正典

住所 福岡県福岡市東区馬出3丁目7番1号



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	ヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) を発現し、ヒト水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus: VSV) の env 蛋白質 (VSV-G) をエンベロープにもつ非増殖性の遺伝子組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルス (SIVagm-hPEDF)
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不随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	治療施設の住所地 福岡県福岡市東区馬出3丁目-1番1号 治療施設の名称 九州大学病院 (1) SIVagm-hPEDF 溶液は、容器に密閉され、凍結状態で治療施設に輸送し、凍結状態のまま施設内の施設可能な P2 レベルの保管室内の冷凍庫に保管する。 (2) 凍結状態の SIVagm-hPEDF 溶液の融解、バイアルの開封並びに SIVagm-hPEDF 溶液の希釈及び分注操作は、P2 レベルの実験室内の安全キャビネット内で行う。SIVagm-hPEDF 希釈溶液の保管は、上記保管室内の冷凍庫において行う。なお、SIVagm-hPEDF 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、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) SIVagm-hPEDF 溶液 (希釈溶液も含む。) を廃棄する際には、滅菌処理 (70%エタノール [30 分]、塩素系漂白剤 [有効塩素濃度 0.1~1.0% 次亜塩素酸ナトリウム、30 分]、もしくはオートクレーブ) を行った後、九州大学病院で定められた医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。 (4) 被験者に投与する SIVagm-hPEDF 希釈溶液は、P2 レベルの実験室内の安全キャビネット内でシリンジへ充填する。充填されたシリンジは、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、九州大学病院南棟3階手術部まで運搬する。 (5) 被験者に対する SIVagm-hPEDF の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った九州大学病院南棟3階手術部において行う。局所麻酔下に硝子体手術により硝子体を切除後、SIVagm-hPEDF 希釈溶液を網膜に注入する。 (6) ベクター投与後、被験眼はガーゼにて覆い、眼帯を着用し遮蔽してウイルスの漏出を防止する。その後、被験者を速やかに環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない遺伝子治療室 (以下「個室」という。) へ搬送する。 (7) 投与時に SIVagm-hPEDF と直接接触する注射針、シリンジ、ガーゼ、

滅菌シート等は使い捨てとし、環境中への拡散防止措置を適切に執った室内において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別室にて行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(8) 投与後1週間まで、被験者を上記室内で個室管理し、検査等の理由で被験者が一時的に個室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を義務付ける。看護師1名を常時同伴させ、開放系区域での排泄や喀痰喀出等の禁止を義務付ける。

(9) 個室管理期間中の被験者の排泄物(血液、体液、尿及び糞便)は、臨床検体として使用するものを除いては、当該室内で塩素系漂白剤(有効塩素濃度 0.1~1.0% 次亜塩素酸ナトリウム、30分)に浸漬、固形化剤を使用して固形化した後、オートクレーブバックへ回収、バイオハザードマーク付き医療廃棄物用段ボールへ梱包した後、九州大学病院で定められた医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらの滅菌処理を別室にて行う場合には、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の取扱いは、上記 SIVagm-hPEDF 溶液の取扱いに準ずる。

(10) 個室管理期間中、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に接触した器具等は、環境中への拡散防止措置を適切に執った室内において 70%エタノール(30分)の噴霧もしくは塩素系漂白剤(有効塩素濃度 0.1~1.0% 次亜塩素酸ナトリウム、30分)に浸漬の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別室にて行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(11) 被験者の個室管理を解除する前に、経時的に(投与後当日、1、3、7日目)被験者の血液、尿中及び涙液中の SIVagm-hPEDF が陰性であることを RT-PCR 法にて確認する。投与後7日を越えて同遺伝子配列が検出される場合、陰転化が確認できるまで同室での個室管理を継続する。ただし、投与後14日を越えて同遺伝子配列が検出される場合は、培養細胞を用いて感染性ウイルスの存在の有無を確認する。患者より採取したサンプル中の感染性ウイルスの存在が否定された後、同室の退出を許可する。

(12) 被験者の個室管理を解除後に被験者の血液、尿中及び涙液中から SIVagm-hPEDF が検出された場合は、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(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

「ヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) 遺伝子搭載第3世代組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクター (SIVagm-hPEDF)」の基本骨格に用いられているアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルス (Simian immunodeficiency virus from African green monkeys: SIVagm) は、分類学的にはレトロウイルス科、レンチウイルス属に分類されている (文献 1)。レトロウイルスは逆転写酵素を有するRNAウイルスの総称で、レンチウイルス、ガンマレトロウイルスなど7属に分類される。レンチウイルス属には、サル免疫不全ウイルス (SIV) の他にヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus: HIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (Equine infectious anemia virus: EIAV) などが含まれ、SIVはさらにSIVsm/mac, SIVcpz, SIVagm, SIVmd, SIVsykの5種に分類される (文献 2, 3)。

SIVagm はアフリカミドリザルを主な自然宿主とするが、実験室内ではマカクザルやブタオザルにも感染することが報告されている。HIV類と異なり自然宿主に対し病原性を示さないことが知られている。また遺伝学的にも宿主に病原性を持つ HIV と大きく隔絶されている。本研究に使用される SIVagm-hPEDF は、SIVagmTYO 株を基本骨格として作成された (文献 4)。

ヒトへの SIV の感染については、これまでに報告がない。

文献 1 : Knipe DM, Howley PM: Nonhuman Lentiviruses. Fields virology fifth edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; pp.2215-2243 (2007).

文献 2 : Hirsch, V.M., Dapolito, G., Goeken, R., and Campbell, B.J. 1995. Phylogeny and natural history of the primate lentiviruses, SIV and HIV. *Curr Opin Genet Dev* 5:798-806.

文献 3 : 井戸栄治、速水正憲. サル免疫不全ウイルスの遺伝子と感染・病原性. 蛋白質核酸酵素 39(8): 1425-1437 (1994)

文献 4 : Fukasawa, M., Miura, T., Hasegawa, A., Morikawa, S., Tsujimoto, H., Miki, K., Kitamura, T., and Hayami, M. 1988. Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group. *Nature* 333:457-461.

2 使用等の歴史及び現状

レンチウイルスの中で、HIVはヒト後天性免疫不全症候群 (Acquired immune deficiency syndrome: AIDS) の原因ウイルスとして知られており、1983年に同定されて以来、その病原性を解明するために研究室での実験に多く用いられている。現在までに、その遺伝情報、感染の機序、複製と遺伝子発現の調節などについて多くの情報が明らかとなり、HIVに対する治療薬の研究が進められている (文献5, 6)。

SIVagmはサルより分離された、HIVと類縁のレンチウイルスであるが、HIVと異なり自然宿主に対して病原性を有さないことが知られている (文献7)。

近年、cDNAからレンチウイルスを回収する技術が確立され、ウイルスの改変・改良が可能となった。遺伝子組換えレンチウイルスベクターは、マウスオンコウイルス由来であるレトロウイルスベクターと異なり非分裂細胞への遺伝子導入が可能であり、一般に遺伝子導入効率も高いことから、レンチウイルスを遺伝子導入ベクターとして捉えた研究・開発が進められている (文献8-11)。

最近では、ベクターを構築するパッケージングシステムから、免疫不全症の発症に関連する修飾タンパク質などを全て取り除き、さらにベクター再構成に使用するテンプレートを複数に分割しつつ、効率よくベクター粒子を再構成する技術が開発されている。これらの方法を使用することにより、再構成中の相同組換えにより偶発的に生成される自己複製

能を獲得したレンチウイルス (replication competent lentivirus: RCL) が発生する可能性は、理論的にほとんどないと考えられている (文献12-14)。

最近、遺伝子組換えレンチウイルスベクター (HIVベクター) を用いた臨床試験成績が明らかにされた。AIDSに対する治療薬としての使用を目標とした安全性試験であったが、ベクターの使用により重篤な有害事象の発現の発現は認めなかったと報告されている (文献15)。一方、本臨床研究に使用される遺伝子組換えSIVagmベクターの人体への投与については、これまで報告はない。

- 文献 5 : Knipe DM, Howley PM: HIVs and Their Replication. Fields virology fifth edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; pp.2107-2185 (2007).
- 文献 6 : 吉仲由之、山本直樹. レトロウイルス研究の流れと展望. 蛋白質核酸酵素 52(10): 1056-1062 (2007)
- 文献 7 : Miura, T., Tsujimoto, H., Fukasawa, M., Ohta, Y., Honjo, S., and Hayami, M. 1989. Genetic analysis and infection of SIVAGM and SIVMND. *J Med Primatol* 18:255-259.
- 文献 8 : Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
- 文献 9 : Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D., and Verma, I.M. 1996. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11382-11388.
- 文献 10 : Nakajima, T., Nakamaru, K., Ido, E., Terao, K., Hayami, M., and Hasegawa, M. 2000. Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. *Hum Gene Ther* 11:1863-1874.
- 文献 11 : 埴秀樹. レンチウイルスベクターの最近の進歩. バイオテクノロジージャーナル 7(2): 158-162 (2007)
- 文献 12 : Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15:871-875.
- 文献 13 : Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72:8463-8471.
- 文献 14 : Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880.
- 文献 15 : Levine, B.L., Humeau, L.M., Boyer, J., MacGregor, R.R., Rebello, T., Lu, X., Binder, G.K., Slepishkin, V., Lemiale, F., Mascola, J.R., et al. 2006. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17372-17377.

3 生理・生態学的特性 (文献 1)

(1) 基本的特性

SIVagmは直径約100nmの球型のエンベロープウイルスで、一本鎖のプラス鎖RNAをゲノムとして持つ。SIVagmのゲノムには、*gag*, *pol*, *env*といったすべてのレトロウイルスに共通する遺伝子、*tat*, *rev*といった調節遺伝子のほかに、*vif*, *vpx*, *nef*というアクセサリ遺伝子を有する。*gag*はウイルスの構造タンパク質をコードし、*pol*はウイルス酵素群を、*env*はエンベロープタンパク質をコードする。*tat*, *rev*は発現制御遺伝子で、*tat*は遺伝子発現の制御シグナル配列を含むTAR (transacting responsive element) に結合してさらに下流の転写を促進し、*rev*はmRNAの核外輸送に関わるRRE (rev response element) に結合する。*vif*, *vpx*, *nef*はSIVagmの複製に必ずしも必須ではなく、アクセサリ遺伝子と呼ばれる。SIVagmは細胞に吸着・侵入したのち、自らの逆転写酵素を用いてRNAゲノムを2本鎖DNAに変換する。逆転写で形成された二本鎖DNAはインテグラーゼによって宿主染色体に組み込まれる。この組み込みは一般にランダムに起こると考えられているが、一方で最近の報告では発現遺伝子近傍に取り込まれる確率が高いことが報告されており、これはレトロウイルスにも同様の傾向があることから、クロマチン構造の状態との関連が示唆されている (文献16)。宿主染色体に組み込まれたウイルス由来DNA配列 (プロウイルス) からは、宿主細胞のRNAポリメラーゼを利用して、新しいウイルスRNA分子が合成される (文献1, 3, 4)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

SIVagmはサルに血液感染、性感染または母子感染し、潜伏期を経て増殖する。SIVagmはHIVと同様にCD4分子を主要なレセプターとしており、CD4陽性Tリンパ球、マクロファージや一部の樹状細胞などに感染する。血液・性感染をすることから推定されるように、血液や精液などの体液中では比較的安定であるが、空気感染をしないことから環境中ではやがて消滅すると考えられる。SIVagmのヒトへの感染はこれまでに報告がない。

(3) 捕食性又は寄生性

報告によっても異なるが、アフリカミドリザルの10-60%にSIVagmの感染を認めることが報告されている(文献17-19)。また実験施設においては、アフリカミドリザル以外のマカクザルにも感染することが報告されている(文献20)。ヒトへの感染性に関しては、これまでに報告がない。

(4) 繁殖又は増殖の様式

SIVagmはアフリカミドリザルを自然宿主とし、血液感染、性感染または母子感染によって伝播し、潜伏期間を経て感染個体で増殖する。細胞に感染後、ウイルスのRNAゲノムは2本鎖DNAに変換され、宿主染色体へ組み込まれる。染色体に組み込まれたプロウイルスから、ウイルスRNAゲノムやウイルスタンパク質が翻訳・転写され、新たなウイルス粒子が形成・放出される。空気伝播はしない。増殖したウイルスは、HIVと同様に血液、精液、母乳などの体液に排出される(文献3-5)。

(5) 病原性

SIVagmはアフリカミドリザルを自然宿主とするが、アフリカミドリザルに対して病原性を有さないことが知られている(文献7)。実験施設においては、SIVagm90株をブタオザル(pig-tailed macaque)に感染させた場合、CD4陽性リンパ球の減少、易感染性など、後天性免疫不全症(AIDS)と類似した症状を呈することが報告されている(文献21)。しかし、今回我々の用いたSIVagm TYO株に関しては、マカクザルに感染させても特に異常を認めず、これまでに病原性は報告されていない(文献20)。ヒトへの感染に関してはこれまでに報告がなく、その病原性も報告されていない。

(6) 有害物質の産生性

SIVagmそのもの、およびその構造蛋白が有害物質を産生することは報告がなく、また感染を契機に有害物質が産生されるとする報告もない。

(7) その他の情報

物理化学的安定性に関しては、SIVagmはエンベロープを有しており、有機溶媒(グルタールアルデヒド、エタノールなど)や塩素化合物などの処理で容易に失活し、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)と同様に感染性を失う。例えば、有機溶媒としては2%グルタールアルデヒドあるいは50%エタノールで10分、70%アルコールで1分処理、塩素化合物としては有効塩素濃度0.1~1.0%の次亜塩素酸ナトリウムで処理することで容易に失活する(文献22-25)。また実験室においては、通常はオートクレーブによる滅菌処理により失活させる。保存安定性に関しては、-80℃以下では、数年間にわたり感染性がほとんど低下しない。ただし、凍結融解を繰り返すと、エンベロープが障害を受けて感染性が急激に低下する。

文献 16: Mitchell, R. S., Beitzel, B.F., Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C.C., Ecker, J.R., and Bushman, F. D. 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol.* 2:E234 (1127-1137).

文献 17: Ohta, Y., Masuda, T., Tsujimoto, H., Ishikawa, K., Kodama, T., Morikawa, S., Nakai, M., Honjo, S., and Hayami, M. 1988. Isolation of simian immunodeficiency virus from African green

- monkeys and seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates. *Int J Cancer* 41:115-122.
- 文献 18 : Hendry, R.M., Wells, M.A., Phelan, M.A., Schneider, A.L., Epstein, J.S., and Quinnan, G.V. 1986. Antibodies to simian immunodeficiency virus in African green monkeys in Africa in 1957-62. *Lancet* 2:455.
- 文献 19 : Allan, J.S., Short, M., Taylor, M.E., Su, S., Hirsch, V.M., Johnson, P.R., Shaw, G.M., and Hahn, B.H. 1991. Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *J Virol* 65:2816-2828.
- 文献 20 : Honjo, S., Narita, T., Kobayashi, R., Hiyaoka, A., Fujimoto, K., Takasaka, M., Sakakibara, I., Mukai, R., Ishikawa, K., Ohta, Y., et al. 1990. Experimental infection of African green monkeys and cynomolgus monkeys with a SIVAGM strain isolated from a healthy African green monkey. *J Med Primatol* 19:9-20.
- 文献 21 : Hirsch, V.M., Dapolito, G., Johnson, P.R., Elkins, W.R., London, W.T., Montali, R.J., Goldstein, S., and Brown, C. 1995. Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication. *J Virol* 69:955-967.
- 文献 22 : 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. 1993. ウイルス 43:199-232.
- 文献 23 : Spire, B., Barre-Sinoussi, F., Montagnier, L., and Chermann, J.C. 1984. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet* 2:899-901.
- 文献 24 : Resnick, L., Veren, K., Salahuddin, S.Z., Tondreau, S., and Markham, P.D. 1986. Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments. *Jama* 255:1887-1891.
- 文献 25 : Watanabe, Y., Miyata, H., and Sato, H. 1989. Inactivation of laboratory animal RNA-viruses by physicochemical treatment. *Jikken Dobutsu* 38:305-311.

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

ヒト色素上皮由来因子 (略称: hPEDF) をコードする全長の cDNA は 1257bp であり、ヒト由来培養網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) の cDNA ライブラリーをテンプレートとして、サブクローニングを行った。さらにその塩基配列が Genbank に登録されている hPEDF 遺伝子の塩基配列 (No. AF400442) と完全に同一であることを確認し、供与核酸とした。(供与核酸の全塩基配列および対応するアミノ酸配列は別紙 1)

ベクターゲノム RNA を合成する遺伝子導入ベクタープラスミドは、pBluescript KS+ベクターを基本骨格とし、 $\Delta 5'$ LTR、パッケージングシグナル (Ψ)、RRE、cPPT、CMV プロモーター、搭載遺伝子 (hPEDF)、WPPE、 $\Delta 3'$ LTR の構造を持つ。(RRE、cPPT、CMV プロモーター、WPPE の全塩基配列、塩基数、由来については別紙 2) 供与核酸の転写には、プロモーター活性の高い CMV プロモーターを用い、ベクターゲノム RNA の 5'端と 3'端にある Long terminal repeat (LTR) 配列の持つプロモーター活性は完全に除去した (文献 10, 14)。

(2) 構成要素の機能

1) ヒト PEDF 遺伝子

ヒト PEDF タンパクは 418 個のアミノ酸からなる、糖鎖修飾を受けた分子量 46,342Da の一本鎖ポリペプチドで、分泌シグナルを有し細胞外に分泌される。構造上セリンプロテアーゼ感受性ループを有するが、プロテアーゼ阻害活性はないことが報告されている (文献 26, 27)。

PEDF の代表的な生物活性は神経親和性である。これまで種々の神経細胞に対して、分化誘導、および傷害による神経アポトーシス死を抑制する作用を持つことが、培養細胞および動物個体において報告されている。その機序としては培養未熟小脳顆粒細胞を用いた検討があり、転写因子 NFkB の活性化が関与し、また抗アポトーシス遺伝子である Bcl-2, Bcl-x や、神経栄養因子である NGF、BDNF の発現を誘導することが報告されている (文献 28)。さらに近年では、PEDF は強力な血管新生抑制効果を有し、種々の血管新生モデル、腫瘍血管新生を抑制することが報告されている (文献 29)。

また PEDF はヒト胎児網膜色素上皮細胞の培養上清から分離・精製された因子であり、眼内局所において比較的豊富に存在し、眼内での過剰発現による副作用は理論的に低いと考えられる (文献 30)。実際に、発生期のマウス網膜に PEDF を高発現させた場合においても、神経系・血管系の発達に異常を認めなかったことが報告されている (文献 31)。さらに、米国において施行されている hPEDF 遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターの硝子体投与による加齢黄斑変性に対する臨床研究においても、過剰発現による毒性は報告されていない (文献 32)。

また PEDF により野生型ならびに遺伝子組換え SIV ベクターの感染性 (感染する動植物の種類や感染様式) が変化したとする報告はない。

2) RRE (Rev-response element)

この核酸は SIVagmTYO1 株由来で、Rev タンパク質との作用により転写産物 (ウイルス RNA) の細胞質への核外移行を促進する。

3) cPPT (central polypurine tract)

この核酸は SIVagmTYO1 株由来で、ウイルスゲノムの核移行や宿主染色体への組換え効率を高めて遺伝子導入効率を上昇させる。

4) CMV プロモーター

この核酸は Cytomegarovirus プロモーター配列由来で、多くの細胞において構成的に機能するプロモーターであり、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、hPEDF 遺伝子の転写を行う。

5) WRPE (woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element)

この核酸はウッドチャック肝炎ウイルス由来で、RNA 安定性を高めることにより導入遺伝子の発現効率を高める。

供与核酸は、殆どのウイルス由来の遺伝子を欠失させた非伝播型ベクターに搭載されているため、伝播性は消失しているが、これら供与核酸の導入によって SIVagm-hPEDF の感染性及び増殖性が変わることはないと考えられる。これはウイルス遺伝子の欠失に関わらず、ラット網膜に同等の効率で大腸菌 LacZ 遺伝子 (別紙 3 (1)) 及び hPEDF (別紙 3 (2)) を発現させることができることから支持されることが考えられる。

- 文献 26 : Steele, F.R., Chader, G.J., Johnson, L.V., and Tombran-Tink, J. 1993. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1526-1530.
- 文献 27 : Becerra, S.P. 1997. Structure-function studies on PEDF. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. *Adv Exp Med Biol* 425:223-237.
- 文献 28 : Yabe, T., Wilson, D., and Schwartz, J.P. 2001. NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 276:43313-43319.
- 文献 29 : Dawson, D.W., Volpert, O.V., Gillis, P., Crawford, S.E., Xu, H., Benedict, W., and Bouck, N.P. 1999. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285:245-248.
- 文献 30 : Tombran-Tink, J., Shivaram, S.M., Chader, G.J., Johnson, L.V., and Bok, D. 1995. Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* 15:4992-5003.
- 文献 31 : Wong, W.T., Rex, T.S., Auricchio, A., Maguire, A.M., Chung, D., Tang, W., and Bennett, J. 2004. Effect of over-expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) on developing retinal vasculature in the mouse. *Mol Vis* 10:837-844.
- 文献 32 : Campochiaro, P.A., Nguyen, Q.D., Shah, S.M., Klein, M.L., Holz, E., Frank, R.N., Saperstein, D.A., Gupta, A., Stout, J.T., Macko, J., et al. 2006. Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 17:167-176.

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

ヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) を発現する第 3 世代遺伝子組換え SIVagm ベクター (SIVagm-hPEDF) は、1) ジーントランスファープラスミド (pGTV-PEDF)、2) パッケージングプラスミド (pPV 3rd)、3) rev 発現プラスミド (pCI-rev)、4) VSV-G 発現プラスミド (pVSV-G) の 4 種類のプラスミドより作製される。ベクターの構造図は別紙 4。

1) ジーントランスファープラスミド (pGTV-PEDF)

CMV プロモーターの制御下にあるヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) 遺伝子を含む。

2) パッケージングプラスミド (pPV 3rd)

パッケージングに必要な SIVagmTYO1 株由来の gag、pol を含む。

3) rev 発現プラスミド (pCI-rev)

パッケージングに必要な SIVagmTYO1 株由来の rev を含む。

4) VSV-G 発現プラスミド (pVSV-G)

ヒト水疱性口内炎ウイルス (VSV) の G 蛋白 (VSV-G) を発現する遺伝子を含む。

(2) 特性

1) ジーントランスファープラスミド (pGTV-PEDF)

ベクターゲノム RNA を合成する遺伝子導入プラスミドで、アンピシリン耐性遺伝子を有

している。

2) パッケージングプラスミド (pPV 3rd)

gag、*pol* のウイルス構成タンパク質を発現させるプラスミドで、アンピシリン耐性遺伝子を有している。

3) *rev* 発現プラスミド (pCI-*rev*)

制御タンパク質である *Rev* を発現するプラスミドで、アンピシリン耐性遺伝子を有している。

4) VSV-G 発現プラスミド (pVSV-G)

ウイルス外殻タンパク質である VSV-G を発現させるプラスミドで、アンピシリン耐性遺伝子を有している。

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

SIVagm-hPEDFベクター粒子に含まれるベクターゲノムRNAは、5'端と3'端にそれぞれLTRを持つ単鎖RNAである。前述のように5'LTRと3'LTRのU3領域は削除され、替わりに治療遺伝子の発現のためにCMVのプロモーター配列が挿入されており、*tat*非依存的なゲノムRNAの転写を可能としている。5'LTR下流にはSIVのパッケージングシグナル (ψ)、*Rev*との作用により転写産物の核外移行を亢進する*Rev*応答領域 (Rev-response element: RRE)、遺伝子の導入効率を上昇させるcentral polypurine tract (cPPT) 配列を有し、CMVプロモーターとその直下に搭載遺伝子hPEDFが挿入されている。その下流にはhPEDF mRNAの安定性を高めることにより導入遺伝子の発現効率を高めるウッドチェック肝炎ウイルスのpost-transcriptional regulatory element (WPPE) 配列が挿入されている。

野生型SIVagm及び構築された SIVagm-hPEDF のゲノム構造の概略図は別紙 5。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

レトロウイルスベクターの一般的な作製方法と同様、複数のプラスミドを培養細胞に同時に導入し、細胞上清に放出されるベクター粒子を回収し、精製・濃縮する方法を用いた。具体的には、1) ベクターゲノム RNA を合成する遺伝子導入プラスミド、2) *gag*、*pol* のウイルス構成タンパク質を発現させるパッケージングプラスミド、3) 制御タンパク質である *Rev* を発現する *Rev* 発現プラスミド、4) ウイルス外殻タンパク質を発現させる VSV-G プラスミドの 4 種のプラスミド (各プラスミド構築法は別紙 6) を、最適化された一定の比率でヒト腎臓線維芽細胞由来株 293T にトランスフェクションすることにより作成される (概略図は別紙 7)。

293T 細胞はセルバンク化し、SIVagm-PEDF の製造毎にプラスミドを導入する。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

プラスミド導入後、ウイルスベクターを含む培養上清を回収・濾過し、混入DNAを除去した後に濃縮を行う。濃縮後のベクター力価は遺伝子導入プラスミド中の遺伝子配列を標的にしたリアルタイムRT-PCRにより粒子数 (viral particle: Vp) を測定する。抗ヒトPEDF抗体を用いて免疫組織化学的検出によるfunctional titerの算出 (transduction unit: T.U.) も併せて行う。SIVagm-hPEDF の最終製品は中華人民共和国 Vector Gene Technology社にて製造される (製造工程の概略図は別紙 8)。製造工程は現行のGMP 基準に従ってセルバンクシステムを用い、品質管理は FDA 基準に従う (セルバンクの品質検査試験の詳細は別紙 9)。凍結した状態で日本へ輸送した最終製品は、九州大学病院北棟2階分子・細胞調製センター内細胞保存ユニット (P2レベル) において受け入れ、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 10)。また最終製品は、九州大学大学院医学研究院病理病態学第5研究室 (P2レベル) において受け入れ試験 (別紙 11) を実施する。

マスターセルバンクは、Vector Gene Technology 社に保管されている。

SIVagm-hPEDFは第3世代に改良されており、相同組換えにより増殖性遺伝子組み換えウイルスが出現する可能性は極めて低い（文献13）。

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 SIVagm-hPEDF の一本鎖 RNAとして存在し、保管中は極めて安定で、感染する動植物の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。

細胞に感染すると、SIVagm-hPEDF の RNA ゲノムは核内へは移行し、逆転写酵素によって2本鎖DNAに変換され、宿主染色体に組み込まれる。組み込まれたDNA（プロウイルス）からは、宿主のRNAポリメラーゼによってhPEDFが転写される。hPEDFの発現は、小動物（ラット）において少なくとも1年間、大動物（サル）においても少なくとも3年間の安定した遺伝子発現を確認している（文献33, 34）。また遺伝子組換えによりウイルスが感染する動物種や感染様式が変化したとする報告はない。

ベクターゲノムの染色体内への組み込み部位については、本ベクターをヒト網膜色素上皮細胞株に遺伝子導入し、プロウイルスの染色体挿入部位について検討を行った。747クローンを検討した結果、特定のホットスポットは検出されず、過去のHIVの報告と同様にランダムな遺伝子挿入と考えられた（文献35）。

SIVagm-hPEDF を作製する過程で、ゲノムから欠失した *gag*、*pol* タンパク質や *Rev* タンパク質を分離したプラスミドよりトランスに供給するが（第3世代に改良）、ベクターゲノムと *gag*、*pol*、*Rev* タンパク質遺伝子には、相同部分はなく、相同組換えによりRCLが出現する可能性は極めて低い（文献13）。

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

SIVagm-hPEDF の検出にはRT-PCR法を用いる。SIVagm-hPEDFは自然界に存在するSIVagm が有しないヒト由来 PEDF 遺伝子を含むが、正常ヒト組織はPEDFを高く発現しているため、この部分を標的とした場合、リアルタイムRT-PCR法ではバックグラウンドが高い。

そのため、SIVagm-hPEDF、野生型SIVagm及び相同組換えにより増殖能を獲得する組換えウイルスの全てを検出し得るパッケージングシグナル (ψ) 領域を標的とした検出方法を確立した。このパッケージングシグナル (ψ) 領域の RNA を RT 法で DNA に逆転写後、PCR法を用いて 増幅、定量する方法で SIVagm-hPEDF を検出できる。細胞から抽出したバックグラウンドRNA 0.1mgに10コピーのSIVagm-hPEDFがあれば検出することができる。

RCL (replication competent lentivirus) 検出について：

米国 Recombinant DNA Advisory Committee において議論されているように（2006年3月および6月開催）（文献36, 37）、レンチウイルスベクターにおけるRCLの検出法として再現性が高く安定した方法は確立していないことが報告されている。第3世代の製造方法によって生産された HIV 由来レンチウイルスベクターについて、最も経験のある2施設（Inder Verma 博士の研究室ならびに National Gene Vector Laboratories）において繰り返し実施された、1）遺伝子導入標的細胞における capsid 蛋白 (p24) 検出法、2）vector mobilization assay、3）*gag*, *pol* 遺伝子を対象としたPCR法、のいずれにおいてもRCLの出現は検出できなかったことから、広汎なRCL検出試験を実施する必要性はないのではないか、とされている。従って本臨床研究において実施するRCL検出試験は、基本的にVIRxSYS社が公表している方法と同様に、最終生産物ならびに最終生産に使用した293T細胞に対する継代培養増幅法（10継代）により増幅し、SIVagm *gag* に対するDNA/RNA RT-PCRにより、Vector Gene Technology社においてGMP生産物最終検定の一貫として検定する。本法では、1検体あたり10コピーの検出感度が得られている。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

野生型レンチウイルスの場合、ウイルスゲノムに自身の複製に必要な遺伝子群がコードされており、宿主の染色体に組み込まれた後、ウイルスタンパク質が合成され、新たなウイルス粒子が形成される。ウイルスゲノムの両端には、転写活性を有するLTRが存在し、この部位より転写が開始される。またウイルス粒子はCD4分子を主要なレセプターとするため、感染性はCD4陽性Tリンパ球、マクロファージや一部の樹状細胞などに限定される。

一方、SIVagmゲノム領域における野生型との違いは、1) 修飾タンパク質であるvif、vpx、nef、LTRの転写修飾因子であるtat、エンベロープタンパク質であるenvを全て取り除いていること、2) パッケージングに必要なgag、pol、revは分離したプラスミドに搭載され、ベクター再構成時には2つのプラスミドより独立して供給されること、3) 5'LTRならびに3'LTRのU3、U5領域の一部が欠失されており、その転写活性が取り除かれていること (self-inactivation: SIN化)、の3点である。その結果、塩基配列としてウイルスゲノムの80%以上が取り除かれている。本ベクターによって導入される遺伝子はhPEDFのみである。そのため、遺伝子導入後に新たなウイルス粒子は形成されず、非伝播性となっている。またhPEDFの転写にはCMVプロモーターを用い、LTRの転写活性部位は削除している。そのため、本ベクターの遺伝子導入によってhPEDFタンパクが遺伝子導入細胞で発現されるが、hPEDF以外の遺伝子が非特異的に活性化される可能性は理論的に低い。

本ベクターは、その製造過程において、パッケージングに必要なgag、pol、revタンパクをトランスに供給して生産し、エンベロープタンパク質としてVSV-Gを用いているため、ヒトの他にサル、ウシなど多くの哺乳動物の幅広い細胞への感染が可能である。網膜下投与によって、網膜色素上皮細胞へ選択性の高い遺伝子導入を確認している。

- 文献 33 : Ikeda, Y., Goto, Y., Yonemitsu, Y., Miyazaki, M., Sakamoto, T., Ishibashi, T., Tabata, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Tobimatsu, S., et al. 2003. Simian immunodeficiency virus-based lentivirus vector for retinal gene transfer: a preclinical safety study in adult rats. *Gene Ther* 10:1161-1169.
- 文献 34 : Miyazaki, M., Ikeda, Y., Yonemitsu, Y., Goto, Y., Sakamoto, T., Tabata, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Tobimatsu, S., Ishibashi, T., et al. 2003. Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. *Gene Ther* 10:1503-1511.
- 文献 35 : Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521-529.
- 文献 36 : Minutes of March 2006 RAC Meeting. Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors (http://oba.od.nih.gov/rdna/rdna_resources.html)
- 文献 37 : Minutes of June 2006 RAC Meeting. Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors (http://oba.od.nih.gov/rdna/rdna_resources.html)

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投与及び保管、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：福岡県福岡市東区馬出3丁目1番1号

治療施設の名称：九州大学病院

(1) 輸送・保管方法：

SIVagm-hPEDF 溶液は、容器に密閉され、凍結状態で治療施設に輸送し、凍結状態のまま施設内の施錠可能な P2 レベルの保管室内の冷凍庫に保管する。

(2) 投与用試料の調製等：

凍結状態の SIVagm-hPEDF 溶液の融解、バイアルの開封並びに SIVagm-hPEDF 溶液の希釈及び分注操作は、P2 レベルの実験室内の安全キャビネット内で行う。SIVagm-hPEDF 希釈溶液の保管は、上記保管室内の冷凍庫において行う。なお、SIVagm-hPEDF 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、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) 滅菌処理・廃棄方法：

SIVagm-hPEDF 溶液（希釈溶液も含む。）を廃棄する際には、滅菌処理（塩素系漂白剤〔有効塩素濃度 0.1～1.0% 次亜塩素酸ナトリウム、30 分〕、もしくはオートクレーブ）を行った後、九州大学病院で定められた医療廃棄物管理規程（別紙 12）に従い、廃棄する。

(4) 投与時の試料運搬等：

被験者に投与する SIVagm-hPEDF 希釈溶液は、P2 レベルの実験室内の安全キャビネット内でシリンジへ充填する。充填されたシリンジは、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、九州大学病院南棟 3 階手術部まで運搬する。

(5) 投与法：

被験者に対する SIVagm-hPEDF の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った九州大学病院南棟 3 階手術部において行う。局所麻酔下に硝子体手術により硝子体を切除後、SIVagm-hPEDF 希釈溶液を網膜に注入する。

(6) 被験者への試料の投与時における被験者からの環境中への拡散防止措置：

ベクター投与後、被験眼はガーゼにて覆い、眼帯を着用し遮蔽してウイルス漏出防止する。その後、被験者を速やかに遺伝子治療室（北棟 11 階遺伝子治療室: 1181 号室および 1182 号室）（以下「個室」という。）へ搬送する。

(7) 被験者への試料の投与時、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の滅菌処理・廃棄方法：

投与時に SIVagm-hPEDF と直接接触する注射針、シリンジ、ガーゼ、滅菌シート等は使い捨てとし、環境中への拡散防止措置を適切に執った室内（九州大学病院南棟 3 階手術部）において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別室にて行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(8) 個室管理期間における被験者からの環境中への拡散防止措置：

投与後 1 週間まで、被験者を上記室内で個室管理し、検査等の理由で被験者が一時的に個室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を義務付ける。看護師 1 名を常時同伴させ、開放系区域での排泄や喀痰喀出等の禁止を義務付ける。

(9) 個室管理期間における被験者の排泄物等の滅菌処理・廃棄方法

個室管理期間中の被験者の排泄物（血液、体液、尿及び糞便）は、臨床検体として使用するものを除いては、当該室内で塩素系漂白剤（有効塩素濃度 0.1～1.0% 次亜塩素酸ナトリウム、30 分）に浸漬、固化剤を使用して固化した後、オートクレーブバックへ回収、バイオハザードマーク付き医療廃棄物用段ボールへ梱包した後、九州大学病院で定められた医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらの滅菌処理を別室にて行う場合には、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の取扱いは、上記 SIVagm-hPEDF 溶液の取扱いに準ずる。

(10) 個室管理期間中、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の滅菌処理・廃棄方法：

個室管理期間中、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に接触した器具等は、環境中への拡散防止措置を適切に執った室内において 70%エタノール（30 分）の噴霧もしくは塩素系漂白剤（有効塩素濃度 0.1～1.0% 次亜塩素酸ナトリウム、30 分）に浸漬の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別室にて行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(11) 被験者の個室管理を解除する前の遺伝子組換えウイルスの陰性確認等：

被験者の個室管理を解除する前に、経時的に（投与後当日、1、3、7 日目）被験者の血液、尿中及び涙液中の SIVagm-hPEDF が陰性であることを RT-PCR 法にて確認する。投与後 7 日を越えて同遺伝子配列が検出される場合、陰転化が確認できるまで同室での個室管理を継続する。ただし、投与後 14 日を越えて同遺伝子配列が検出される場合は、培養細胞を用いて感染性ウイルスの存在の有無を確認する。患者より採取したサンプル中の感染性ウイルスの存在が否定された後、同室の退出を許可する。

(12) 被験者の個室管理を解除後に遺伝子組換えウイルスが検出された場合の措置：

被験者の個室管理を解除後に被験者の血液、尿中及び涙液中から SIVagm-hPEDF が検出された場合は、直ちに被験者を個室における管理かに移し、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

被験者への投与後、被験者の血液及び尿中の SIVagm-hPEDF を含む SIV 由来パッケージ

ングシグナル (ψ) 配列を、経時的 (投与後当日、1、3、7日目) にRT-PCRで検出する。同時に血中の炎症性サイトカイン (IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、TNF- α 、INF- γ) の経時的変化をELISA法でモニターする。サルを用いた安全性試験結果では、投与直後から投与後3ヶ月の経過全てにおいて、血液ならびに尿中にベクターの遺伝子配列は検出されていないため、一週間の管理期間で十分であると考えられる。投与後7日を越えて同遺伝子配列が検出される場合、陰転化が確認できるまで同室での個室管理とする。ただし、投与後14日を越えて同遺伝子配列が検出される場合は、培養細胞を用いて感染性ウイルスの存在の有無を確認する。患者より採取したサンプル中の感染性ウイルスの存在が否定された後、同室の退出を許可する。

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

被験者に対する SIVagm-hPEDF の投与後 1 週間まで、環境中への拡散防止措置を適切に執った室内での個室管理を行う。

検査等の理由で被験者が一時的に個室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を義務付ける。看護師 1 名を常時同伴させ、開放系区域での排泄や喀痰喀出等の禁止を義務付ける。個室管理期間中の被験者の排泄物 (血液、体液、尿及び糞便) は、臨床検体として使用するものを除いては、当該室内で塩素系漂白剤 (有効塩素濃度 0.1~1.0% 次亜塩素酸ナトリウム、30 分) に浸漬、固形化剤を使用して固形化した後、オートクレーブバックへ回収、バイオハザードマーク付き医療廃棄物用段ボールへ梱包した後、九州大学病院で定められた医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物の取扱いは、2 項 SIVagm-hPEDF 溶液の取扱いに準ずる。

SIVagm-hPEDF 投与時に用いた注射針、シリンジ、ガーゼ、滅菌シート等は使い捨てとし、環境中への拡散防止措置を適切に執った室内において塩素系漂白剤 (有効塩素濃度 0.1~1.0% 次亜塩素酸ナトリウム、30 分) にて不活化処理を実施した後、廃棄する。また、個室管理期間中、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に接触した器具等は、環境中への拡散防止措置を適切に執った室内において 70%エタノール噴霧後 30 分の不活化処理を実施した後、廃棄又は上記室内で十分洗浄する。

被験者の個室管理を解除する前に、被験者の血液、尿中及び涙液中の SIVagm-hPEDF が陰性であることを RT-PCR 法にて確認する。投与後 7 日を越えて同遺伝子配列が検出される場合、陰転化が確認できるまで同室での個室管理を継続する。ただし、投与後 14 日を越えて同遺伝子配列が検出される場合は、培養細胞を用いて感染性ウイルスの存在の有無を確認する。患者より採取したサンプル中の感染性ウイルスの存在が否定された後、同室の退出を許可する。

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

カニクイザルを用いた水平感染に関する検討において、SIVagm-hPEDF を網膜下投与したカニクイザルと非感染カニクイザルを同一飼育室内で飼育した場合の水平感染の有無について、非感染カニクイザルの VSV-G タンパク (SIVagm-hPEDF のエンベロープ) に対する抗体価の上昇は認められていない。

6 国外における使用等により得られた情報

増殖型、非伝播型を問わず、遺伝子組換え SIVagm の投与実績は国内外に無い。

遺伝子組換え HIV ベクターを AIDS に対する治療薬として使用した臨床試験が米国で実施されており (文献14)、この報告では重篤な副作用は検出されていない。また本報告では環境中への拡散に関する記載は無い。

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

SIVagm-hPEDFはVSV-Gによってシュードタイプパッケージされており、感染性はVSVと同一と考えられるので、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。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

以上より、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じ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

SIVagm-hPEDFはVSV-Gによってシュードタイプパッケージされており、感染性はVSVと同一と考えられる。そのため、自然界で病原性を受ける対象はヒトの他にサル、ウシなど多くの哺乳動物が想定される。

(2) 影響の具体的内容の評価

SIVagm-hPEDFが感染したヒトではhPEDFを発現する可能性があるが、これによるヒトへの病原性は知られていない。米国において、PEDF遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターを硝子体内へ投与する臨床研究が行われているが、PEDFの過剰発現による病原性は報告されていない(文献32)。

レンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどを宿主としたベクターでは、ウイルスゲノムが宿主染色体へ組み込まれるため、長期間の安定した遺伝子発現が得られる。一方で、マウス白血病ウイルス(MLV)を基本骨格としたレトロウイルスベクターが、造血幹細胞において特定のがん遺伝子領域(LMO2)を活性化したように、悪性腫瘍の発生に関する危険性を完全には否定できない(文献38)。遺伝子挿入による悪性腫瘍発生の機序としては、1)がん遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域への挿入による転写活性化、2)がん抑制遺伝子のエクソン領域あるいはプロモーター、エンハンサー領域への挿入による発現阻害、の2つが考えられるが、本ベクターは前述のようにSIN化されており、1)の機序によって非特異的にがん遺伝子を活性化させる可能性は理論的にない(文献14)。SIVagm-hPEDFを網膜色素上皮細胞株に感染させ、遺伝子挿入部位について検討したところ、747ヶ所の組み込み部位で特定のホットスポットを認めなかった。またがん抑制遺伝子の発現に影響を与える可能性のある部位への挿入は1ヶ所(0.13%)のみであった。がん抑制遺伝子の発現阻害によるがん化には、遺伝子対の両方の発現阻害が必要であることから、本ベクターによるがん化の可能性は計算上約60万分の1以下(0.0013²)である上、さらに一つの細胞に複数のベクターが感染する必要が

あり、その可能性は理論的には非常に低いと考えられる。近年、白血病発症マウスモデルにおいて、MLVを基本骨格としたレトロウイルスベクターが有意にがん化を促進したのに対し、SIN化されたレンチウイルスベクターはがん化に関与しなかったとの報告があり（文献39）、SIN化されたレンチウイルスベクターはレトロウイルスベクターに比し安全性が高いと考察されている。実際に、小動物（マウス、ラット）およびサルを用いて本ベクターの安全性を確認したが、全経過において免疫不全やがんの発生を含め、重篤な有害事象を認めなかった。

なおSIVagmベクターは、2000年に最初の構築の成功が報告されて以来（文献10）、まだ限られた施設でしか使用されていないために、環境への影響に関する既存の知見が不足している。但し、野生型のSIVagmTYO株は発見以来20年を経過し、多くの研究機関において使用されてきたが、環境に対する影響はこれまで報告されていない。従ってその危険性は理論的に低いものと判断される。

（３）影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、SIVagm-hPEDFの環境中への拡散は極めて微量である。さらにSIVagm-hPEDFは増殖能を失っており、環境中では増殖することはない。また野生型HIVと共存した場合においても、SIVagm-hPEDFは第3世代に改良されていること、HIVと相同性の高い配列が削除されていることから相同組換えにより増殖型ウイルスが出現する可能性は極めて低いと考えられる。さらに万一増殖型ウイルスが出現した場合にも、元来SIVagmTYO株は自然宿主に対しても病原性を示さないことが知られている（文献3, 6）。

従って、SIVagm-hPEDF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低いと考えられる。

（４）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、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 38 : Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419.

文献 39 : Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., et al. 2006. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* 24:687-696.

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

SIVagm-hPEDF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

以上より、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

SIVagm-hPEDFはVSV-Gによってシュードタイプパッケージされており、感染性はVSVと同一と考えられる。そのため、自然界で病原性を受ける対象はヒトの他にサル、ウシなど多くの哺乳動物が想定される。

(2) 影響の具体的内容の評価

SIVagm-hPEDFが感染したヒトではPEDF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。

(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限り、SIVagm-hPEDFの環境中への拡散は極めて微量である。さらにSIVagm-hPEDFは増殖能を失っており、環境中では増殖することはない。また上述のように相同組換えによって増殖性ウイルスが出現する可能性は極めて低いと考えられる。従って、仮に微量なSIVagm-hPEDFが環境中へ拡散しても、やがて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

以上より、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

SIVagm-hPEDFはVSV-Gによってシュードタイプパッケージされているため、ヒトを含め幅広い哺乳動物への感染性を有する。しかしSIVagm-hPEDFによって導入される遺伝子はhPEDFのみであること、SIVagm-hPEDFの基本骨格となるSIVagmTYO株は自然宿主においても病原性を有さないことから、感染が成立しても病原性は低いと考えられる。また野生型SIVならびにSIVagm-hPEDFは植物および微生物には感染することは報告されていない。

申請している管理方法を用いる限り、SIVagm-hPEDF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。さらに、SIVagm-hPEDFはウイルス由来のゲノムシーケンスの殆どが排除（第3世代化）されており、2次感染粒子の放出がなく、また仮に野生型HIVと共感染しても、相同部分が殆どないため増殖性ウイルスを生じる可能性は極めて低いと考えられる。従って、SIVagm-hPEDFはやがて環境中から消滅するものと考えられる。

SIVagm-hPEDFによるhPEDF遺伝子発現は、被験者の網膜色素上皮細胞に限定される。またhPEDFは元来眼内局所において比較的豊富に存在するため、眼内での過剰発現によるヒトに対する影響はないと考えられる。SIVagm-hPEDFは、5'LTRならびに3'LTRの転写活性を取り除いており（SIN化）、遺伝子挿入により宿主遺伝子が非特異的に活性化する可能性を最小化している。また遺伝子挿入部位に特定の偏りを認めず、遺伝子挿入によって悪性腫瘍が生じる可能性は理論的に極めて低いと考えられる。実際に、小動物（マウス、ラット）およびサルを用いた安全性試験において、重篤な有害事象を認めなかった。

SIVagm-hPEDF由来の増殖性レンチウイルスの出現の可能性は理論的にはないと考えられるが、仮に出現し環境中へ拡散したとしても、元来野生型ウイルスに自然宿主への病原性がなく、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。

従って、第一種使用規程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、SIVagm-hPEDFによる生物多様性が生ずるおそれはないと判断される。