

平成 25 年 3 月 29 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

委員長代理 島田 隆

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とりまとめたので
報告いたします。

記

1. ヒト レシチン:コレステロールアシルトランスフェラーゼ (hLCAT) 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 (CGT_hLCAT RV)
申請者: 千葉大学医学部附属病院 病院長 宮崎 勝
申請日: 平成 22 年 4 月 9 日

【作業委員会の評価結果（千葉大学医学部附属病院）】

1. ヒト レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（hLCAT）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（CGT_hLCAT RV）

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：千葉大学医学部附属病院 病院長 宮崎 勝

(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、本遺伝子組換え生物（CGT_hLCAT RV）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、本遺伝子組換え生物は、マウス、ラット等のげっ歯類に加え、ヒト、サル、イヌ等の幅広い動物種に感染しうるが、増殖能を失っているため、gag、pol 及び env 遺伝子を発現する細胞に感染した場合等を除いて増殖することはない。したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、本遺伝子組換え生物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、本遺伝子組換え生物及び RCR 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

本遺伝子組換え生物及び RCR は、幅広い動物種に感染し、挿入変異によってはがん化を引き起こす可能性がある。しかし、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、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微量であると考えられる。また、マウス由来の産生細胞により産生された本遺伝子組換え生物は、ヒト血清により速やかに不活化されるとともに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しており、通常の細胞に感染してもウイルス粒子を産生することはないと考えられる。さらに、RCR 出現の可能性が極めて低い第三世代のパッケージング細胞を使用して製造されていること等から、患者体内に RCR が侵入する可能性も極めて低く、RCR が万一患者体内に侵入したとしても、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、RCR が環境中に放出される可能性は極めて低い。

導入遺伝子である LCAT は、遊離型コレステロールをコレステロールエステルに変換する酵素として機能するが、ヒトでの LCAT 過剰症にともなう有害な臨床症状はなく、本遺伝子が発現することにより本遺伝子組換え生物がヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。

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、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

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、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

本遺伝子組換え生物及び RCR が患者体外に排出された場合には、幅広い動物種に感染し、その核酸がゲノム中に組み込まれる可能性がある。しかし、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、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微量と考えられ、野生動物に核酸が伝達される可能性は非常に低い。RCR が多量に出現した場合には、血液、体液等を通じてその核酸が伝達される可能性はあるが、RCR 出現の可能性は極めて低い。

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、本遺伝子組換え生物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

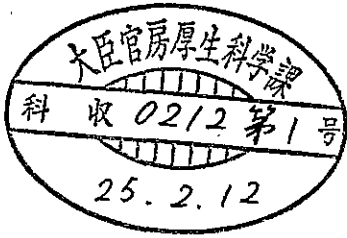
【 千葉大学医学部附属病院 】

「家族性LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症
 を対象としたLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」

氏名	所属
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	内閣府 政策統括官付参事官
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

○

○：委員長代理（五十音順 敬称略）



第一種使用規程承認申請書

平成22年4月9日

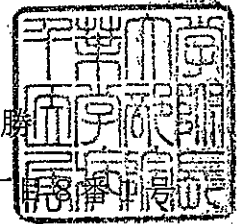
一部修正 平成25年2月7日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

申請者 千葉大学医学部附属病院長

宮崎 勝

千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目



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>ヒト レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（hLCAT）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（CGT_hLCAT RV）</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</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 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 治療施設の名称 千葉大学医学部附属病院</p> <p>(1) CGT_hLCAT RV溶液は、容器に密閉後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内のP2レベルの拡散防止措置を執ることのできる細胞調製室（以下「細胞調製室」という。）の施錠可能な前室に設置した冷凍庫に保管する。</p> <p>(2) 凍結状態のCGT_hLCAT RV溶液の溶解、希釈及び分注操作は、細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。被験者の前脂肪細胞へのCGT_hLCAT RV導入操作、CGT_hLCAT RV導入細胞の培養その他のCGT_hLCAT RV希釈溶液及びCGT_hLCAT RV導入細胞の取扱いも同様に細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。CGT_hLCAT RV希釈溶液及びCGT_hLCAT RV導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、CGT_hLCAT RV希釈溶液若しくはその凍結品又はCGT_hLCAT RV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、二重に密閉した容器に入れて運搬する。</p> <p>(3) CGT_hLCAT RV溶液（希釈溶液を含む。以下同じ。）又はCGT_hLCAT RV導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活化を行った後、千葉大学医学部附属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。</p> <p>(4) 細胞調製室内の安全キャビネット内でCGT_hLCAT RV導入細胞懸濁液を注射器に充填し、それを二重に密閉した後、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）に運搬する。</p> <p>(5) 被験者に対するCGT_hLCAT RV導入細胞の投与は、個室において、被験者の皮下脂肪組織内に注射移植する。</p> <p>(6) 上記(5)で用いた、CGT_hLCAT RV導入細胞に直接接触する</p>

注射針、注射器及びチューブ等の器具等並びに布及びガーゼ類等は使い捨てとし、使用后、ウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルスの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。

(7) 投与後3日まで、被験者を個室で管理し、検査等の理由で被験者が一時的に個室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。

(8) 個室における管理期間中の被験者の排泄物は、投与翌日以降に行われる患者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）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、ウイルスの不活化を行った後、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患者の血液及び尿の取扱いは、CGT_hLCAT RV溶液及びCGT_hLCAT RV導入細胞の取扱いに準じる。

(9) 個室における管理期間中、患者に対して侵襲的に使用した器具等並びに患者の血液、体液及び排泄物等に接触した器具等は、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。これらのウイルスの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。

(10) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血清においてRCRが陰性であることを確認する。RCRが確認されたときは、個室における管理を継続する。

(11) 個室における管理解除後に被験者の血清からRCRが検出された場合は、直ちに被験者を上記個室における管理下に移し、上記(7)から(10)までと同様の措置を執る。

(別紙様式)

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

本遺伝子治療に用いる遺伝子組換え生物（以下、「CGT_hLCAT RV」という。）のもとになったウイルスはモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus: MoMLV) である。

レトロウイルスは逆転写酵素を持ち一本鎖RNAを遺伝子として持つRNAウイルスの総称であるが、MoMLVはそのレトロウイルス科のガンマレトロウイルス属 (C-タイプウイルス) に所属するマウス白血病ウイルスであり、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クトロピック (同種指向性) レトロウイルスである (文献1、2)。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。

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 : 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2 : ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>

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、遺伝子治療用の遺伝子導入ベクターとしてもっとも早くから開発改良が加えられてきており、現在までに試みられた遺伝子治療臨床プロトコルのうちの21.3 % (336/1579 プロトコル; 2009年12月現在) でレトロウイルスベクターが使用されている (文献4)。その中でも、MoMLVは遺伝子導入ベクターとして広く用いられており、わが国で最初に行われた遺伝子治療でもMoMLV由来のベクターが使用された (文献5)。米国では、2000年から2009年 (11月23日現在) の間にレトロウイルスを用いた87のプロトコルがRecombinant Advisory Committeeに申請されたが、僅かな例外を除き、すべてが*ex vivo*での遺伝子導入の系である。血球系細胞への導入プロトコルが多くを占めるが、非血球系細胞への導入手法としても用いられている (文献6)。

文献4 : <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

文献5 : Otsu, M., et al.: American Society of Gene Therapy, 8th Annual Meeting (2005)

文献6 : Human Gene Transfer Protocols (Last updated: 11-23-09)

http://oba.od.nih.gov/rdna/adverse_event_oba.html

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性 (文献7)

MoMLV は直径約 100 nm の球形ウイルスであり、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8)。

(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た後、そのゲノムが逆転写酵素により DNA に逆転写され、プロウイルスとして細胞の染色体に組み込まれる。宿主細胞が増殖分裂する時には、染色体の一部として同時に複製され、娘細胞へと受け継がれて行く。MoMLV は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) 宿主染色体への組み込み、5) RNA 合成、6) 蛋白質合成、7) アセンブリ、8) 出芽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、細胞分裂時に同時に複製されて娘細胞へ分配されるが、生殖系細胞に導入された場合には動物の繁殖によって子孫に受け継がれることになる。

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、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスター細胞への感染が可能である。

(5) 病原性 (文献 9)

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ある。
- 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。レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 治療の遺伝子治療で、がん遺伝子である LMO-2 の近傍にレトロウイルスが組み込まれたために LMO-2 蛋白質の異常発現を招き、それが 3 年後に白血病を発症する原因の一つとなったことを示唆する報告が出されている (文献 10)。
- 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報告はない。

(7) その他の情報

MoMLV の不活化条件

MoMLV についての詳細な不活化条件の報告はないが、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、消毒法を以下にあげる。

- ① 121°C、20 分間の蒸気滅菌
- ② 170°C、2 時間の乾熱滅菌
- ③ 20~30 分間の煮沸消毒
- ③ 有効塩素濃度 0.1~1.0% の次亜塩素酸ナトリウム
- ④ 70% エタノール又は 70% イソプロピルアルコール
- ⑤ 3.5~4% ホルマリン
- ⑥ 2% グルタラル (以上文献 11)

⑦ 10%及び1%ポピドンヨード液 (文献12)

⑧ 0.3%過酸化水素水 (文献13)

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14)、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 $2,800 \text{ erg/mm}^2$ 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 $1/10^6$ 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15)。

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16)。抗 α -galactosyl 自然抗体を有する旧世界ザル (文献17) 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18) と考えられる。

- 文献7 : 遺伝子治療開発研究ハンドブック (1999) 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8 : Levy JA and Fieldsteel AH. Freeze-drying is an effective method for preserving infectious type C retroviruses. *J Virol Methods* 5:165-171, 1982.
- 文献9 : 遺伝子治療開発研究ハンドブック (1999) 第6章、第2節、1. ウイルスベクターの安全性 (p.627)
- 文献10 : Hacein-Bay-Abina S, et al. LM02-associated clonal T cell roliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 *Science* 302:415-419, 2003
- 文献11 : 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12 : 加藤真吾、平石佳之、富永恵子、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13 : Martin LS, McDougal JS, and Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152:400-403, 1985.
- 文献14 : Yoshikura H. Thermostability of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) ina liquid matrix is far higher than of an ecotropic murine leukemia virus. *Jpn J Cancer Res* 80:1-5, 1989.
- 文献15 : Yoshikura H. Ultraviolet sensivity of helper function of murine leukemia virus. *Arch Biochem Biophys* 154:76-83, 1973.
- 文献16 : Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, Okada H, Weiss RA, and Collins MK. 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17 : Galili Uri, Tanemura M. Significance of α -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18 : Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, 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.

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

CGT_hLCAT RV を構成するおもな供与核酸は、hLCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase) 遺伝子、パッケージングシグナル(Ψ)、5'-long terminal repeat (5' LTR)、3' LTR である。以下にその構造概略図を示す。元となった野生型ウイルス、MoMLV と異なるところは、ウイルスの自立増殖に必要な遺伝子、*gag*、*pol* 及び *env* がすべて除かれ、その部分に hLCAT 遺伝子が挿入されたことである。CGT_hLCAT RV の全塩基配列及び蛋白質をコードする部分についてはそのアミノ酸配列を※別紙 1 及び 2 に示す。

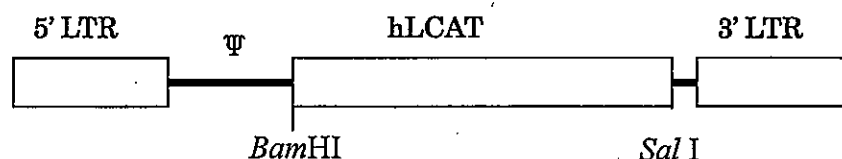


図 1. CGT_hLCAT RV 遺伝子の構造概略図

1) hLCAT 遺伝子

hLCAT 遺伝子はヒト型 LCAT をコードする遺伝子であり、hLCAT は 1986 年に、Mclean らによりクローニングされた。N 末端に 24 アミノ酸のシグナルペプチドを持つ、全長 440 アミノ酸よりなる分泌型蛋白質をコードしている。

ここでは hLCAT 遺伝子をヒト肝がん細胞株 HepG2 の cDNA ライブラリーより、PCR 法によってクローニングした。hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列) には、C 末端のグルタミン酸とストップコドンに重なった形でポリ A 付加シグナル (AATAAA) がコードされているため、ストップコドンを TAA より TGA に改変して導入遺伝子内のポリ A 付加シグナルを除き、また、蛋白質合成の効率を上げるために開始コドン上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入したものを用いている。

2) パッケージングシグナル (Ψ)

マウス MoMLV 由来のレトロウイルスパッケージングのための配列である。

3) 5' LTR 及び 3' LTR

マウス MoMLV 由来のエンハンサー・プロモーター配列である。

(2) 構成要素の機能

1) hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列)

hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列) は上流の 5' LTR のエンハンサー・プロモーター機能により転写されて LCAT を発現する。LCAT は翻訳後に糖鎖が付加され、シグナルペプチドが切断された後、416 アミノ酸からなる分子量約 63,000 の糖蛋白質として細胞外へ分泌される。LCAT は遊離コレステロールにレシチンの脂肪酸を転移してコレステロールエステルを生成するコレステロールエステル化酵素であり、血中の HDL (High Density Lipoprotein) 上で作用し、コレステロールの逆転送 (各組織より肝臓へ) を亢進させる。被験者脂肪組織より調製した前脂肪細胞に遺伝子導入後、同じ被験者の脂肪組織に自家移植して発現させることで、血中正常値の 10% の LCAT 活性を維持することを目標としている。

2) パッケージングシグナル (Ψ)

パッケージング細胞 (GP+envAM-12) において、CGT_hLCAT RV を製造する際にウイルスゲノム RNA がウイルス粒子にパッケージングされるのに必要である。

3) 5' LTR 及び 3' LTR

5' LTR は hLCAT 発現に必要な強力な転写活性をもつエンハンサー・プロモーターである。また、5' LTR 及び 3' LTR とともに、ウイルスゲノムの細胞染色体への組み込みに必須である。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

レトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) の構築には、MoMLV 由来のレトロウイルスベクターである MFG ベクターを改良した pDON-AI (タカラバイオ株式会社) を使用した (図 2)。pCGThLCAT は以下の構築過程 (※別紙 3) を通じて得られた。

Step 1 : 1-(1)-1) に記載されている通り、ヒト肝がん細胞株の cDNA ライブラリーから hLCAT 遺伝子 (1.3kb) を調製した。

Step 2 : pDON-AI DNA ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の *Bam* HI 切断部位と *Sa*I I 切断部位の間に、当該制限酵素配列を含むプライマーにより増幅させた hLCAT 遺伝子を挿入した。次に、蛋白質合成効率の向上のために開始コドン ATG 上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入した。また、hLCAT 遺伝子ストップコドン近傍に存在するポリ A 付加配列の AATAAA (TAA がストップコドン) を別のストップコドン TGA に改変

した。

Step 3 : 目的以外の不要な遺伝子の発現を避けるために、*Sal* I 切断部位から *Xho* I 切断部位までを切り出して、Minimal SV40 promoter 配列及び *Neo*^R (ネオマイシン耐性遺伝子配列) を除去した。

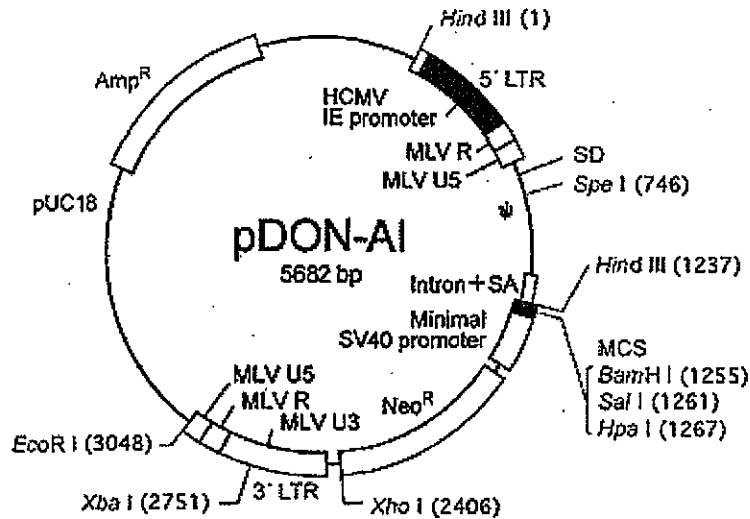


図 2 pDON-AI DNA ベクターの構造

(2) 特性

このレトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) は、基本的性質をベクター pDON-AI から受け継いでおり、LTR とパッケージングシグナル (Ψ 配列) 以外の MoMLV 由来遺伝子 (*gag*, *pol*, *env*) を含まず、かつ 5' LTR の U3 領域がより強力なサイトメガロウイルス由来のプロモーターに置換されている (文献 19、20)。従って、このベクターの特徴は MoMLV の構造遺伝子を完全に除くことによって、パッケージング細胞中での相同的組換えによる増殖性ウイルスの出現を抑え、かつ導入遺伝子の発現効率を上げていることにある。

文献 19 : Yu SS, Kim J-M, and Kim S: High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Therapy* 7:797-804, 2000

文献 20 : Kim SH, Yu SS, Park JS, Robbins PD, An CS, and Kim S: Construction of Retroviral Vectors with Improved Safety, Gene Expression, and Versatility. *J Virology* 72:994-1004, 1998

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

CGT_hLCAT RV のゲノムは 1 本鎖 RNA であるが、DNA 配列に変換したプロウイルス配列を示す。1-(1) で示したとおり、ゲノムの構成成分は hLCAT cDNA 配列のほかは、パッケージングシグナル (Ψ) と 5' LTR 及び 3' LTR である。

注) マスターセルバンクを作製する際に GP+envAM-12 細胞にウイルスを感染させてアンフォトロピック hLCAT 発現レトロウイルスを構築する過程で、宿主染色体に組み込まれる時に、逆転写酵素によりウイルスゲノム上の 3' LTR 配列が 5' LTR 領域へとコピー・置換されるため、5' LTR 領域塩基配列はオリジナルベクターの 3' LTR 配列へと再変換され、レトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) の配列とは異なっている。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

MoMLV の *gag-pol* 遺伝子とエコトロピックエンベロープ遺伝子を発現するパッケージング細胞である GP+E-86 細胞に、レトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) をハイグロマイシン耐性遺伝子と同時にトランスフェクションした。トランスフェクションには Lipofectamine 2000CD (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いた。Hygromycin B 選択により薬剤耐性細胞プールを獲得し、この細胞の培養上清から hLCAT 発現エコトロピックレトロウイルスベクターを回収した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

1) パッケージング細胞株

CGT_hLCAT RV の産生細胞株の作製に使用したパッケージング細胞株は GP+envAM-12 (文献 21、22) である。パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミド (*gag-pol*、及び *env*) により別々に導入した細胞株であるので、相同的組換えによる野生型・増殖性ウイルス (RCR) 出現のリスクは極めて少ないと考えられている。

2) ウイルス産生細胞株 (MCB) の作製

hLCAT 発現エコトロピックレトロウイルスベクターを、RetroNectin (タカラバイオ株式会社) を用いて、MoMLV の *gag-pol* 遺伝子及びマウスウイルス 4070A 由来アンフォトロピックエンベロープ遺伝子を発現する GP+envAM-12 細胞 (マウス由来細胞) に感染させることで、ヒト細胞にも感染可能なアンフォトロピックレトロウイルスベクターを構築した。

感染させた GP+envAM-12 細胞を 96 穴プレート 50 枚に限界希釈して播種し、ウイルス産生細胞のスクリーニングを行った。シングルクローンと考えられる 201 ウェルについてその上清をリアルタイム RT-PCR で分析し、陽性クローン 9 個を得た。この中か

ら最も高タイターのウイルス産生株を1ライン (GP+envAM-12/CGThLCAT A_17_4) 選択し、hLCAT 発現アンフォトロピックレトロウイルスベクター産生細胞としてプレマスターセルバンク (pre-MCB) を作製した。pre-MCB より継代を3回実施し、マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) の作製を行った。

マスターセルバンクは、タカラバイオ株式会社においてGMP製造されたものである。1バイアルにウイルスベクター産生細胞を 4×10^6 個/mL含み、液体窒素タンクにて保存されている。

以上のウイルスベクター調製からマスターセルバンク作製までの構築スキームを※別紙4に示す。

3) CGT_hLCAT RV の最終製品の製造・輸送

遺伝子導入に使用するCGT_hLCAT RVは、上記マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) より、タカラバイオ株式会社においてGMP製造された。

マスターセルバンクからのCGT_hLCAT RV (Lot. CRV07-2) の製造は次の方法にて行った。

- ① MCB (CGT_hLMC Lot. CM06-1) より7本を融解して培養を開始した。
- ② 2回の継代培養後、セルスタック (10チャンバー6個および5チャンバー1個) でセミコンフルエントまで培養した。
- ③ 培養後、ウイルスハーベスト培地に交換し、24時間後に培地上清を回収した。
- ④ 回収後新たなウイルスハーベスト培地に交換し、次の24時間培養後に培地上清を回収し、同じ操作をさらにもう一度行い3回ウイルス液の回収をおこなった。
- ⑤ 回収した3回分のウイルス液をプールした後、無菌ろ過を行ってフローズバック (100 mL用、50 mL用) 及びクライオバイアル (4 mL用) に分注して -80°C にて凍結保存した。

凍結保存されたCGT_hLCAT RVは、品質試験の後、適切な拡散防止措置を執ってドライアイス詰めで、千葉大学医学部附属病院細胞調製室へ送られ、施錠可能な製剤保管室に設置した超低温フリーザーに保管される。

CGT_hLCAT RVの品質試験項目・暫定規格及び参考実測値を※別紙5に示す。また、当該治療施設、細胞調製施設及び保管場所の地図ならびに細胞調製室の概略図を※別紙6、7及び8に示す。

文献 21 : Markowitz D, Goff S, and Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167:400-406, 1988.

文献 22 : Markowitz D, Goff S, and Bank A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes

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 CGT_hLCAT RV のゲノム RNA の一部として存在する。凍結保管中は安定であり、CGT_hLCAT RV の生物学的性質が変化することはない。

CGT_hLCAT RV が細胞に感染すると、移入した核酸を含むウイルスゲノム RNA は逆転写され、プロウイルスとして細胞染色体に組み込まれる。プロウイルスは細胞染色体の複製に伴って複製されるので、移入された核酸は細胞が生きているかぎり安定に保持される。

LCAT 遺伝子は MoMLV の LTR により転写される。これらのプロモーターは持続的に機能するので、両遺伝子の発現は構成的である。

CGT_hLCAT RV を製造する際に、パッケージング細胞内で CGT_hLCAT RV のゲノムが細胞の *gag-pol* 及び *env* と相同組換えをおこして RCR が出現する可能性は否定できない。しかしながら、GP+envAM-12 細胞では *gag-pol* と *env* が独立して存在していることから、野生型の増殖性レトロウイルス (RCR) が出現するには複数回の組換えが同時に必要であること、また、CGT_hLCAT RV のゲノムは *gag*、*pol*、*env* が完全に欠落しているため、相同的組換えに必要な元のウイルス由来配列はより少なくなっていることから、RCR 出現の確率は極めて低いと考えられる。

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

(1) CGT_hLCAT RV の検出方法

CGT_hLCAT RV は野生型ウイルス MoMLV にはない hLCAT 遺伝子の cDNA 配列を持つので、LCAT 遺伝子のイントロン部分を挟む塩基配列をプライマーにして RT-PCR 法による CGT_hLCAT RV の特異的検出が可能である。また検体中の含量も同様のプライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法により定量できる。

(2) CGT_hLCAT RV により遺伝子導入された細胞の検出方法

細胞または組織から調製したゲノム DNA を鋳型に、上記 hLCAT 遺伝子のイントロン部分を挟む塩基配列をプライマーとして用いた PCR 法により、CGT_hLCAT RV により遺伝子導入された細胞の特異的検出が可能である。ヒト細胞が本来持つ LCAT 遺伝子はイントロンを含むため、この cDNA 配列特異的検出法では検出されない。前項同様リアルタイム PCR による定量も可能である。

(3) RCR の検出方法

- ・ *Mus dunni* を用いた増幅法

Mus dunni 細胞に検体を添加し、5回の継代培養を行う。この培養上清を PG-4 細胞に接種し、S+L-アッセイを行う。この方法は増殖能を持つレトロウイルスを検出する方法であり、本遺伝子組換え生物に由来する RCR を特異的に検出するものではない。検出感度は 1RCR/assay であることを確認している。100 mL あたり 1 RCR が含まれる検体から 300 mL の被検試料をサンプリングして接種した場合、95%の確率で被検試料中に RCR が検出される。

・ RT-PCR 法

被検試料から RNA を調製し、4070A *env* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物を検出する。本試験では、被検細胞 10^{-4} ~ 10^{-5} あたり 1 個の感染細胞の検出が可能である。

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 MoMLV と CGT_hLCAT RV の間には以下の相違点がある。

- (1) CGT_hLCAT RV は *gag*、*pol* 及び *env* を欠損しているため、CGT_hLCAT RV が感染した通常の細胞はウイルス粒子形成に必要な蛋白質を合成できない。したがって、CGT_hLCAT RV は *gag*、*pol* 及び *env* を発現する細胞においてのみ増殖できる。
- (2) CGT_hLCAT RV は LCAT 遺伝子を持つため、感染した細胞は LCAT を発現する。
- (3) MoMLV がマウス、ラット等のげっ歯類にだけ感染しうるのに対して、アンフォトロピック MLV 4070A はこれらのほか、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターの細胞にも感染すると報告されている（文献 23）。したがって、ウイルス粒子表面に 4070A 由来 *env* 蛋白質を持つ CGT_hLCAT RV はマウス、ラット等に加えてヒト、サル、イヌ等、幅広い動物種の細胞に CGT_hLCAT RV の核酸を伝達しうる。

CGT_hLCAT RV が自立的増殖能を欠いており、ヘルパー機能をもつ特殊な細胞においてしか増殖できない点と感染可能な生物種の範囲が異なる点を除いて、I-3「生理・生態学的特性」に記載した、宿主である MoMLV と本遺伝子組換え生物の分類学上の基本性質は同等であると考えられる。

- (4) 生物多様性に影響を及ぼす程度としては、CGT_hLCAT RV はより広い生物種に感染可能になるが、増殖能を持たないことから、たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはなく、野生型ウイルスよりも影響は小さいと考えられる。ただし、CGT_hLCAT RV が相同的組換えにより自立的増殖能を獲得することがあれば、何らかの影響がでることも考えられる。

文献 23 : Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 93:11407-11413, 1996.

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

2 使用等の方法

治療施設の所在地 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号

治療施設の名称 千葉大学医学部附属病院

(1) CGT_hLCAT RV溶液は、容器に密閉後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内のP2レベルの拡散防止措置を執ることのできる細胞調製室（以下「細胞調製室」という。）の施錠可能な前室に設置した冷凍庫に保管する。

(2) 凍結状態のCGT_hLCAT RV溶液の溶解、希釈及び分注操作は、細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。被験者の前脂肪細胞へのCGT_hLCAT RV導入操作、CGT_hLCAT RV導入細胞の培養その他のCGT_hLCAT RV希釈溶液及びCGT_hLCAT RV導入細胞の取扱いも同様に細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。CGT_hLCAT RV希釈溶液及びCGT_hLCAT RV導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。

なお、CGT_hLCAT RV希釈溶液若しくはその凍結品又はCGT_hLCAT RV導入細胞を開放系区域を通過して他のP2レベル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) CGT_hLCAT RV溶液（希釈溶液を含む。以下同じ。）又はCGT_hLCAT RV導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活化を行った後、千葉大学医学部附属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) 細胞調製室内の安全キャビネット内でCGT_hLCAT RV導入細胞懸濁液を注射器に充填し、それを二重に密閉した後、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）に運搬する。

(5) 被験者に対するCGT_hLCAT RV導入細胞の投与は、個室において、被験者の皮下脂肪組織内に注射移植する。

(6) 上記(5)で用いた、CGT_hLCAT RV導入細胞に直接接触する注射針、注射器及びチューブ等の器具等並びに布及びガーゼ類等は使い捨てとし、使用后、ウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルスの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。

(7) 投与後3日まで、被験者を個室で管理し、検査等の理由で被験者が一時的に個室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。

(8) 個室における管理期間中の被験者の排泄物は、投与翌日以降に行われる患者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）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、ウイルスの不活化を行った後、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患者の血液及び尿の取扱いは、CGT_hLCAT RV溶液及びCGT_hLCAT RV導入細胞の取扱いに準じる。

(9) 個室における管理期間中、患者に対して侵襲的に使用した器具等並びに患者の血液、体液及び排泄物等に接触した器具等は、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。これらのウイルスの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。

(10) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血清においてRCRが陰性であることを確認する。RCRが確認されたときは、個室における管理を継続する。

(11) 個室における管理解除後に被験者の血清からRCRが検出された場合は、直ちに被験者を上記個室における管理下に移し、上記(7)から(10)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CGT_hLCAT RV導入細胞の投与後、別途規程のスケジュール（※別紙9）に従い被験者の血清を試料として、4070A *env* 遺伝子に対するPCR法又は血清の培養法による検査を実施する。また、RCR発現の有無につき被験者の臨床症状を観察する。

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

CGT_hLCAT RVを用いた遺伝子導入細胞は、細胞調製室において、第一種使用規程に従い調製される。CGT_hLCAT RVが細胞調製室の床等に漏出した場合には、直ちにペーパータオル、布等で拭き取る。拭き取った後は、消毒用エタノールを当該箇所が完全に覆われるまで噴霧して1分以上放置し、ペーパータオル、布等で拭き取ることによりCGT_hLCAT RVを不活化する。当該ペーパータオル、布等は121℃、20分間以上で高圧蒸気滅菌処理した後、廃棄する。以上により、CGT_hLCAT RVが環境中に漏出して生物多様性影響が生じることはないと考えられる。

個室における管理解除後の被験者の血清のPCR法又は血清の培養法においてRCRが検出された場合には、第一種使用規程に従い被験者を直ちに個室における管理下に移すとともに、排泄物のウイルス不活化等、第一種使用規程に定められた措置を執る。

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

マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC Lot. CM06-1) 及びそれらから作製された CGT_hLCAT RV (Lot. CRV07-1 及び CRV07-2) について Mus dunni 細胞を用いた増幅法による RCR 試験を実施した。その結果、すべて RCR 陰性であった (※別紙5)。CGT_hLCAT RV 導入細胞を用いた以下の非臨床試験ではがん化は認められず、また毒性は極めて低いことが示唆された。

カニクイザルに、CGT_hLCAT RV 導入サル前脂肪細胞を自家移植した非臨床試験において、全症例で自家移植 2ヵ月後の一般状態、体重、摂餌量、また行動観察、心電図、呼吸数等の薬理的異常所見、また剖検後の各臓器重量、血液学的変化、各臓器、組織の肉眼所見においても、異常は観察されなかった。

C57BL6Jマウスに、CGT_hLCAT RV 導入マウス前脂肪細胞を同系マウス皮下に移植しそのがん化を検討したところ、一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診、また移植後約 7ヵ月及び1年後の剖検における臓器重量、血液学的検査、各臓器、組織の肉眼所見のいずれにも異常はなくがん化は認められなかった。また、遺伝子導入していないマウス前脂肪細胞投与マウスでもがん化は認められなかった。

健康成人から得たヒト前脂肪細胞に CGT_hLCAT RV を導入し、6ヵ月間の継代培養後、軟寒天培地におけるコロニー形成能を検討した。CGT_hLCAT RV 非導入ヒト前脂肪細胞を対照群、また HeLa 細胞を陽性対照群とした。HeLa 細胞ではコロニー形成を検出したが、CGT_hLCAT RV 導入ならびに非導入ヒト前脂肪細胞のいずれも、コロニー形成能を獲得した細胞は観察されなかった。

CGT_hLCAT RV 導入ヒト前脂肪細胞を Nude マウス皮下に移植しがん化を検討した。マウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は確認されなかった。移植後約3ヵ月の剖検では、臓器重量、各臓器、組織の肉眼所見について、異常は認められなかった。

CGT_hLCAT RV 導入細胞及び CGT_hLCAT RV を用いた臨床使用経験は現在までのところない。

6 国外における使用等により得られた情報

CGT_hLCAT RV 導入細胞及び CGT_hLCAT RV を用いた使用経験は現在までのところない。

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

CGT_hLCAT RV及びRCRはアンフォトロピックenv蛋白質を持つので、広範囲の動物に感染しうるが、微生物への感染性は知られていない。したがって、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

CGT_hLCAT RV及びRCRはアンフォトロピックenv蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピックMoMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 4070Aと同様に、マウス、ラットのみならずヒト、サル等を含む広範囲の動物に感染しうる。したがってこれらの生物種はCGT_hLCAT RVの核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

CGT_hLCAT RVはヒト、サル等の細胞への挿入変異によってがん化を誘発する可能性がある。マウス、ラットに対する病原性は宿主と同等であると考えられる。

CGT_hLCAT RVからの発現産物であるLCATは、遊離型コレステロールをコレステロールエステルに変換する酵素として機能する。本反応は、末梢組織から肝臓へコレステロールを転送・異化排泄するコレステロール逆転送系の最初の段階を支配する。ヒトでのLCAT過剰症にともなう有害な臨床症状はなく、本遺伝子が発現することにより、CGT_hLCAT RVがヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。

(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、CGT_hLCAT RVが前脂肪細胞とともに被験者に投与されることによって、当該施設外に出る可能性は極めて低く、出たとしてもごく微量である。また、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15）。さらに、*gag*、*pol*、*env* 遺伝子を完全に欠如したCGT_hLCAT RVは増殖能を欠損しているため、通常の細胞に感染してもウイルス粒子を産生することはなく、たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはない。

一方、CGT_hLCAT RVの製造工程中に出現したRCRが前脂肪細胞に混入して被験者に移植された場合には被験者体内でRCRが産生される可能性がある。しかし、CGT_hLCAT RVはRCR出現の可能性が極めて低い第3世代のパッケージング細胞（GP+envAM-12細胞）を使用して製造されているうえに、CGT_hLCAT RV及びCGT_hLCAT RV導入細胞のRCR陰性を確認してから使用するため、被験者体内にRCRが侵入する可能性は極めて低い。また、RCR試験で検出されなかったRCRが万一被験者体内に侵入したとしても、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、RCRが環境中に放出される可能性は極めて低い。

(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

CGT_hLCAT RV及びRCRの有害物質の産生性は知られていない。したがって、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

CGT_hLCAT RV及びRCRはアンフォトロピックenv蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピックMoMLV4070Aと同様に、マウス、ラットのみならずヒト、サル等を含む広範囲の動物に感染しうる。したがってこれらの生物種はCGT_hLCAT RVの核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

CGT_hLCAT RV又は遺伝子組換え生物等に該当するRCRによってこれらの遺伝子組換え生物の核酸が野生生物のゲノム中に組込まれる可能性がある。

(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、CGT_hLCAT RVが前脂肪細胞とともに被験者に投与されることによって当該施設外に出たとしてもごく微量である。ごく微量の本遺伝子組換え生物によって野生動物に核酸が伝達される可能性は非常に低い。さらに、増殖能を持たないことから、たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはない。

遺伝子組換え生物等に該当するRCRが多量に出現した場合には、血液、体液等を通じて他の個体にRCRが感染し、その核酸が伝達される可能性は否定できないが、RCR出現の可能性は極めて低い。

(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

核酸を垂直伝達する性質

CGT_hLCAT RVが感染可能な野生動物等の生殖系細胞のゲノム中に組込まれて、核酸を垂直伝達する可能性は完全には否定できない。しかし、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、CGT_hLCAT RVによりその核酸が野生動物に伝達さ

れる可能性は非常に低い。RCRが出現しないかぎり、CGT_hLCAT RVの核酸が伝達される細胞はCGT_hLCAT RVが最初に感染した細胞とその娘細胞に限られ、その細胞が生殖系細胞である確率は低い。また、RCRが出現する可能性は極めて低い。以上から、CGT_hLCAT RV又はRCRの核酸が生殖細胞に伝達される可能性は極めて低い。よって、核酸を垂直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。

V 総合的評価

CGT_hLCAT RVが感染する動物種は4070Aアンフトロピックenv蛋白質によって規定されるため、げっ歯類及びヒトを含む広範囲の動物であり、野生型アンフトロピックMoMLV4070Aと同じである。自然界で植物及び微生物に感染す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、CGT_hLCAT RV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。CGT_hLCAT RVにより導入されたhLCAT遺伝子が発現することにより、ヒトに病原性を示す可能性は非常に小さい。さらに、CGT_hLCAT RVは増殖能を欠如しているため、MoMLVの感染等により*gag*、*pol* 及び*env* 遺伝子を発現している細胞に感染した場合を除いて増殖することはない。MoMLVに感染しているマウスにCGT_hLCAT RVが感染すれば、MoMLVがヘルパーとなって増殖する可能性がある。しかしその場合でも、MoMLV は血液や体液を介してのみ感染するので、CGT_hLCAT RVの感染が他個体に広がる可能性はほとんどない。ヘルパーを必要とするCGT_hLCAT RVが野生型 MoMLV と同等に増殖することはないので、やがて環境中から消滅すると思われる。

環境中でマウスに感染し、MoMLVゲノムとの相同組換えによってRCRが出現する可能性や、当該第一種使用によって極めて微量のCGT_hLCAT RV由来RCRが環境中に放出される可能性は完全には否定できないが、RCRの感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質はMoMLVと同等である。ヒトにMoMLVが感染しても病原性は報告されておらず、RCRがヒト体内に侵入しても、血清中の補体により急速に失活することを考慮すると、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。

したがって、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、CGT_hLCAT RV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。