

前立腺がん遺伝子治療臨床研究に関する同意書
(継続投与について)

岡山大学病院

病 院 長 殿

私は、前立腺がんに対する REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の継続投与について、口頭および文書により説明を受け、下記の内容を理解しました。遺伝子治療臨床研究に引き続き参加することに同意します。また、上記臨床研究を行う上で必要な処置、及び上記臨床研究において予測されない状況が発生した場合、それに対応するための緊急処置を受けることも併せて同意します。

- はじめに
- 臨床研究について
- 遺伝子治療臨床研究開始後の経過について
- 継続投与について
- 期待される治療効果について
- 安全性と副作用について
- 治療に関わる諸経費
- 同意の撤回について
- 同意撤回後の資料取り扱いについて
- 緊急連絡先およびお問い合わせ先について
- 遺伝子治療臨床研究の正式名称と実施組織体制

同意年月日 平成 年 月 日

患者氏名 (署名又は記名捺印) _____ (印)
連絡先 _____

代諾者 (署名又は記名捺印) _____ (印)
連絡先 _____

患者様との関係 _____ 生年月日: 年 月 日生

立会人 (署名又は記名捺印) _____ (印)
連絡先 _____
患者様との関係 _____

説明をした医師及び説明日

平成 年 月 日

(署名) _____ (印)

(署名) _____ (印)

前立腺がん遺伝子治療臨床研究に関する同意撤回書

岡山大学病院

病 院 長 殿

私は、前立腺がんに対する REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究について、研究協力を依頼され、同意書に署名しましたが、その同意を撤回する事を担当医師 _____ に口頭で伝え、確認のため、同意撤回書を提出します。

平成 年 月 日

患者氏名（署名又は記名捺印） _____ (印)

連絡先 _____

代諾者（署名又は記名捺印） _____ (印)

連絡先 _____

患者様との関係 _____ 生年月日： 年 月 日生

立会人（署名又は記名捺印） _____ (印)

連絡先 _____

患者様との関係 _____

厚生科学審議会科学技術部会 がん遺伝子治療臨床研究作業委員会委員名簿

氏 名	所 属
あさの 浅野 茂隆	早稲田大学理工学術院特任教授
あらと 荒戸 照世	独立行政法人医薬品医療機器総合機構生物系審査第一部審査役
おざわ 小澤 敬也	自治医科大学医学部教授
かねこ 金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系教授
かねだ 金田 安史	大阪大学大学院医学系研究科教授
さいとう 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 島田 隆	日本医科大学医学部教授
はまだ 濱田 洋文	札幌医科大学教授
はやかわ 早川 堯夫	近畿大学薬学総合研究所所長

○委員長 (五十音順 敬称略)
(平成21年6月11日現在)

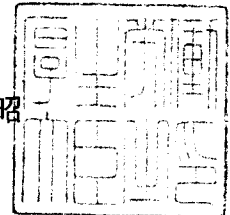


厚生労働省発科 1023 第 2 号
平成 21 年 10 月 23 日

厚生科学審議会会長

垣 添 忠 生 殿

厚生労働大臣 長 妻 昭



諮 問 書

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）第 4 条第 1 項に基づく第一種使用規程等の主務大臣承認に関し、下記の遺伝子治療臨床研究について、厚生労働省設置法（平成 11 年法律第 97 号）第 8 条第 1 項第 1 号イの規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

前立腺癌に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究

- ・ 申請者 岡山大学病院 病院長 森田 潔
- ・ 遺伝子組換え生物等の名称

Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3)
遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型
(Adv/REIC)

厚 科 審 第 21 号

平成 21 年 10 月 23 日

科学技術部会部会長

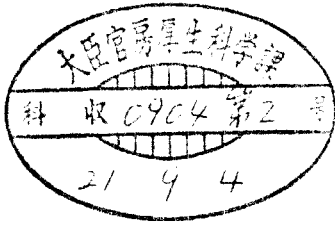
永 井 良 三 殿

厚生科学審議会会長

垣 添 忠 生

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価について（付議）

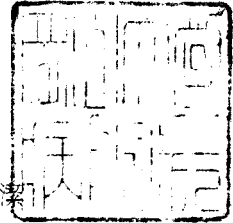
標記について、平成 21 年 10 月 23 日付け厚生労働省発科 1023 第 2 号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第 3 条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。



第一種使用規程承認申請書

平成 21 年 8 月 27 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 森田 潔
住所 岡山市北区鹿田町二丁目5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>Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) 遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型 (Adv/hREIC)</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 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</p> <p>(1) Adv/hREIC 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。</p> <p>(2) 凍結状態の Adv/hREIC 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。Adv/hREIC 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、 Adv/hREIC 希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通って他 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。</p> <p>(3) Adv/hREIC 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%もしくは 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）または高圧蒸気滅菌 処理による。以下同じ。）を行った後、本施設で定められてい 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。</p> <p>(4) P2 実験室内の安全キャビネット内で Adv/hREIC 溶液を緩衝 液で希釈し所定の投与量に調整（以下「Adv/hREIC 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。</p> <p>(5) 被験者に対する Adv/hREIC の投与は、内分泌療法中に再燃 した前立腺がんの前立腺腫瘍内又は前立腺摘除術後の局所再 発巣内については、治療室内において超音波検査装置に装着さ れた穿刺用ガイド装置を用いて、また、遠隔転移病巣内につい ては、CT 室内において注入用穿刺針を用いて、それぞれ</p>

	<p>Adv/hREIC 液を注入することにより行う。注入針の抜去は慎重に行い、Adv/hREIC 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。</p> <p>(6) 被験者への Adv/hREIC 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。</p> <p>(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、治療室内の空気は換気により約 5 分に 1 回（1 時間に 12 回）入れ替わる。</p> <p>(8) 投与後 24 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等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。</p> <p>(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、Adv/hREIC 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。</p> <p>(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。</p> <p>(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 Adv/hREIC が陰性であることを確認する。Adv/hREIC が確認されたときは、個室における被験者の管理を</p>
--	--

	<p>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。</p> <p>(12) 個室における被験者の管理の解除後に、遺伝子治療臨床研究実施計画書（前立腺癌に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究）に示す観察期間内に被験者の血液又は尿中から Adv/hREIC 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。</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

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)、ヒト Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) を発現する非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルスベクター (Adv/hREIC) 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、コッ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 に由来するウイルスベクター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たん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

ヒト REIC/Dkk-3 をコードする DNA (REIC/Dkk-3 遺伝子 ; 1053bp) 及び CAG プロモーターを宿主に導入した (供与核酸の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列などは別紙 1)。

(2) 構成要素の機能

CAG プロモーターは REIC/Dkk-3 遺伝子のみを転写させることになるため、REIC/Dkk-3 遺伝子が発現される。発現する REIC/Dkk-3 タンパク質は分子量約 60kDa の

糖蛋白質で、N末端に1つのシグナルペプチドとシステインドメイン、coiled-coil ドメインをそれぞれ2つずつ有する350のアミノ酸より構成される。REIC/Dkk-3はDkkファミリーと呼ばれる分泌型蛋白群の一種で、DkkファミリーにはWnt受容体を介してWntシグナル伝達を阻害する作用があることが知られている。REIC/Dkk-3は腫瘍特異的細胞アポトーシスを誘導する機能を有していると考えられており、その機序として、c-Jun-N-terminal kinase (JNK)を活性させることでの、Baxのミトコンドリアへの移行促進作用が考えられている(文献7)。また遺伝子導入により産生された蛋白によるヒト正常細胞(線維芽細胞、前立腺間質細胞、前立腺上皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、気道上皮細胞、肝細胞、腎近位尿細管細胞)への障害性は認めていない(文献7, 未発表データ)。これらの供与核酸の導入によって、Adv/hREICの感染性がAd5から変わることはないと考えられる。また、Adv/hREICにはアデノウイルスが増殖するために不可欠であるE1遺伝子及びE3遺伝子が含まれないため、Adv/hREICに増殖性は無いと考える。

文献7: Abarzua F., et al.: Cancer Research 65:9617-9622, 2005

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

Adv/hREICアデノウイルスベクターはコスミドpAxCAREICより作製される。pAxCAREICはCAGプロモーターの転写制御下にあるヒトhREIC遺伝子を発現させるプラスミドである。コスミドpAxCAREICをヒト胎児腎由来293細胞に感染させ、最終的な遺伝子組換えアデノウイルスベクターAdv/hREICが生成される(ベクターの構造は別紙2)。

(2) 特性

コスミドpAxCAREIC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

Ad5のE1領域を供与核酸と置換した(Ad5、Adv/hREICのゲノム構造概略図は別紙2参照)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法(別紙2の各図を参照)

コスミドベクターpAxCAREICの作製法を以下に示す。REIC/Dkk-3遺伝子の開始コドン前にBamHIサイトをデザインしたプライマー(REIC-S: 5'-GGATCCAGAGCGGAAATGCAGCGG-3'(配列番号4の塩基番号190-206に相当する配列の5'側にBamHIサイトであるGGATCCを繋げた配列))と、終止コドンの後にEcoRIサイトをデザインしたプライマー(REIC-A: 5'-GAATTCTAAATCTCTTCCCCTCCCAG-3'

(配列番号4の塩基番号1230-1249に相当する配列のアンチセンス鎖の5'側にEcoRIサイトであるGAATTC配列を繋げた配列)を設計した。次に、pTracer/REIC(別紙2、図1)を鋳型にして、REICのコーディング領域をPCRにより増幅した。PCR条件は、94℃ 30秒、63℃ 30秒、72℃ 1分を30サイクルで行った。約1.1kbの増幅産物をゲルから回収し、EcoRI、BamHI消化した後、pUC119にサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、アンピシリン耐性クローンから抽出したプラスミドの塩基配列の解析を行い、インサートの配列に変異が入っていないことを確認した(pUC119/REIC、図2)。pUC119/REICをEcoRI、BamHI消化し、約1.1kbのREIC断片を回収した。回収したREIC断片をDNA Blunting Kit(タカラ社製、日本)を用いて末端を平滑化し、CAGプロモーターが含まれるコスミド(pAxCAwt、図3、タカラ社製、日本)のSwaI部位にサブクローニングした。得られたコスミド(pAxCAREIC、図4)をClaI消化してインサートの有無を確認した。さらに、StuI、SpeI消化してインサートの向きが5'プロモーター、インサート、ポリAシグナルであることを確認した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

Adv/hREICはAd5ウイルスのE1領域を欠失している。E1A及びE1B遺伝子産物はウイルスDNAの複製に必要なので、これらの遺伝子を継続的に発現している293細胞を使って増殖させる。Adv/hREICの最終製品は米国Baylor医科大学細胞・遺伝子治療センターで製造される予定である。製造工程には現行の米国GMP基準に従ってセルバンクシステム及びウイルスバンクシステムを用い、各バンクの品質管理はFDA基準に従う予定である(各バンク及び最終製品の品質管理試験の詳細は別紙として添付する予定)。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、受入れ試験が実施される(受入れ試験の詳細は別紙3)。

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)。

また、マスターウイルスバンク、マスターセルバンク及びワーキングセルバンクは、すべて米国Baylor医科大学細胞・遺伝子治療センターに保管されている。

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Adv/hREIC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、Adv/hREICのゲノムは核内の染色体外に存在し、REIC/Dkk-3遺伝子が転写される。すなわち、REIC/Dkk-3遺伝子の発現は一過性である。

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

Adv/hREICは宿主のAd5に存在しないREIC/Dkk-3遺伝子を含むので、REIC/Dkk-3

遺伝子 DNA の一部を PCR で増幅、定量する方法で Adv/hREIC を検出できる。先行した Adv/HSV-tk を用いた同様の前立腺癌遺伝子治療臨床研究（岡山大学実施）におけるアデノウイルスベクターの血中、尿中の検出結果（感度 100 コピー/ μ g）では、アデノウイルスベクター投与後血中では翌日、尿中では 2 日目に全例測定感度以下になっている（文献 8）。なお、投与前は全例測定感度以下であった（論文未発表）。Real-time PCR 法を用いた方法であり臨床応用性を含めた信頼性も実証された。本臨床研究にても同様の手法を採用するが類似した結果が予測される。

文献 8 : Nasu, Y, et al.: Molecular Therapy, 15: 834-840 (2007)

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

Adv/hREIC は Ad5 の E1 領域の遺伝子を欠失しているため、これらの領域にコードされているウイルス蛋白質群を発現できない。E1A 及び E1B 遺伝子から作られる蛋白質はウイルス DNA の複製に必要なため（文献 1、2）、E1A 及び E1B 遺伝子を持続的に発現している細胞（例えば 293 細胞）や Ad5 と共感染した細胞でなければ Adv/hREIC の増殖は起こらない。また、Adv/hREIC では外来 CAG プロモーターから転写される REIC/Dkk-3 遺伝子が発現することになる。これらの点を除くと、Adv/hREIC 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。

Adv/hREIC 由来の RCA は、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 Ad5 と同等であると考えられる。

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 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) Adv/hREIC 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 Adv/hREIC 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。Adv/hREIC 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、Adv/hREIC 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) Adv/hREIC 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%もしくは 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）または高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。）を行った後、本施設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 Adv/hREIC 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整（以下「Adv/hREIC 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 Adv/hREIC の投与は、内分泌療法中に再燃した前立腺がんの前立腺腫瘍内又は前立腺摘除術後の局所再発巣内については、治療室内において超音波検査装置に装着された穿刺用ガイド装置を用いて、また、遠隔転移病巣内については、CT 室内において注入用穿刺針を用いて、それぞれ Adv/hREIC 液を注入することにより行う。注入針の抜去は慎重に行い、Adv/hREIC 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 Adv/hREIC 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 24 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（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、Adv/hREIC 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、被験者の血液及び尿中の Adv/hREIC が陰性であることを確認する。Adv/hREIC 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、遺伝子治療臨床研究実施計画書（前立腺癌に対する **Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3)** 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究) に示す観察期間内に被験者の血液又は尿中から Adv/hREIC 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
被験者への Adv/hREIC 投与後、被験者体内で増殖能を獲得した遺伝子組換えウイルス (RCA) の有無については、血液及び尿を用いて PCR 法にて検査し、検出された場合は消失するまで、被験者を個室管理下に移して追跡する。

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

Adv/hREIC 投与後の被験者については、個室管理下、PCR 法にて血液及び尿中の遺伝子組換えウイルス (Adv/hREIC) が消失するまで追跡する。管理中は排泄物が床等に落下した場合は床を消毒液で掃き清掃する。また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。

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

Adv/hREIC と同様に非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型の構造をもち、マウスインターロイキン-12 (mIL-12) 遺伝子を発現する Adv/mIL-12 ベクターの溶液をマウスモデルに投与した動物実験では、マウス血清中の mIL-12 レベルは投与翌日にピークとなり (15000pg/ml)、投与 3 日後にはベクター投与前のレベルに低下した。mIL-12 の上昇後に脾臓の重量は増加したが mIL-12 レベルの低下に伴い脾臓の重量は正常に戻った。一過性の mIL-12 上昇に伴うと考えられる死亡例はマウスには認められず、また体重減少等も認められなかった (文献 9)。Adv/mIL-12 の消長及び体外への排出については詳細が不明であるが、同じくヒトアデノウイルス 5 型の E1 領域を単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子に置換した非増殖性アデノウイルスベクターである Adv.RSV-TK を用いたマウスモデルの動物実験では、ベクター注入 1 週間後、ベクター DNA は尿、精液及び精子には認めず、血中にはマウス 40 匹中 1 匹のみに認めた。ベクターの広がりには前立腺、精囊、精巣、骨盤リンパ節、消化管及び肝において観察された (文献 10)。

岡山大学病院において、前立腺癌患者に対する Adv/hREIC の投与はまだ行っていないが、2001 年以後に前立腺癌に対する Adv.RSV-TK 及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究を行い、9 例（2 例は同一症例）の前立腺がん患者に Adv.RSV-TK の投与を行った（文献 8）。また、2008 年以降に前立腺癌に対する Adv/IL-12 を用いた遺伝子治療臨床研究を行い、6 例の前立腺癌患者に Adv/IL-12 の投与を行った。投与後の被験者の血液、尿中の Adv.RSV-TK および Adv /IL-12 の有無を PCR 法により検査したところ、血液中へのアデノウイルスベクターの移行は低用量群においては認められず、中用量群において投与後 30 分をピークに認められたが翌日には消失した。尿中への移行は投与直後において認めたが多くの場合は 2 日目に消失した。被験者の個室管理期間中の医療従事者や被験者の家族等面会者の健康状態からみて、Adv.RSV-TK および Adv/IL-12 の環境中への放出及び医療従事者や面会者への感染は認められていない。

文献 9 : Nasu, Y., et al.: Gene Ther. 6: 338-349 (1999)

文献 10 : Timme, T. L., et al.: Cancer Gene Ther. 5: 74-82 (1998)

6 国外における使用等により得られた情報

本申請の Adv/hREIC については、国外における使用の報告はない。Adv/hREIC と同様に非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型の構造をもつ、Adv.RSV-TK 及び Adv/IL-12 については、前立腺癌における国外での使用が実施されており、以下に示す。

1996 年 8 月より、放射線治療後の局所再燃がんに対する Adv.RSV-TK 及びガンシクロビルの併用療法の第 I 相臨床試験が米国 Baylor 医科大学で実施された。当該試験において Adv.RSV-TK を前立腺巣内に局所内投与された 18 名の患者の尿を検体として、PCR 法によるアデノウイルス DNA の確認が行われた。Adv.RSV-TK 投与後、尿中にはアデノウイルス DNA が、症例により差はあるが、0~32 日間（平均 6.8 日間）検出された（文献 11）。

また、2004 年 5 月から米国 Baylor 医科大学において第 1 例目の前立腺癌に対する Adv/IL-12 を用いた遺伝子治療が施行された。（主任研究者の転出に伴い研究は中断されたため、詳細なデータは公表されていない。）

文献 11 : Herman, J. R., et al.: Human Gene Ther. 10: 1239-1249 (1999)

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

Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA 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

Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA 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

Adv/hREIC が感染したヒトで一過性に REIC/Dkk-3 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによるヒトへの病原性は知られていない。Adv/hREIC 由来 RCA の病原性は、野生型 Ad5 と同等であると考えられる。

なお、Ad5 を宿主とする遺伝子治療用ウイルスベクター（遺伝子組換え生物等）は 1990 年以後、国内外で汎用されているが（文献 11）、環境への悪影響に関する報告はない。1999 年に初めて遺伝子治療薬の投与に起因する死亡例が、当該ベクターを用いた米国での遺伝子治療臨床研究において発生したが、その後の調査研究により、当該事例は、ベクター大量投与の結果、循環血中に漏れ出たベクターのウイルスたん白により引き起こされた全身的免疫反応に起因するものであることが明らかにされている（文献 12）。

(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、Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。さらに、Adv/hREIC は増殖能を失っているため、野生型アデノウイルスとの共感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。さらに、Adv/hREIC 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）を踏まえると、Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 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。

文献 12 : Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Human Gene Therapy 13:3-13 (2002)

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

Adv/hREIC 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

Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA 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

Adv/hREIC が感染したヒトで一過性に REIC/Dkk-3 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。

Adv/hREIC 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 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、Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。Adv/hREIC は増殖能を失っているため、被験者に野生型アデノウイルスが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、Adv/hREIC 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) 及びヒト体内の同一細胞に Adv/hREIC 及び野生型

アデノウイルスが感染する可能性は極めて低いことも踏まえると、Adv/hREIC はやがて環境中から消滅すると考えられる。

Adv/hREIC 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可能性は野生型 Ad5 と同程度であると考えられる。

(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

Adv/hREIC が感染する動植物等の種類は野生型 Ad5 と同等で、ヒトにのみ感染し、自然界で他のほ乳動物、植物及び微生物には感染しないと考えられる。

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、Adv/hREIC 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。これまでの動物を用いた予備的実験により、Adv/hREIC による REIC/Dkk-3 遺伝子の一過性発現がヒトに強い病原性を示す可能性は極めて小さいと考えられ、ヒトに対する影響はほとんどないと考えられる。さらに、Adv/hREIC は増殖能を失っているため、野生型アデノウイルスとの共感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。ヒト体内の同一の細胞に Adv/hREIC と野生型アデノウイルスが感染する可能性は極めて低く、Adv/hREIC 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 Adv/hREIC 由来 RCA の環境中への放出も完全には否定できないが、アデノウイルス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 Ad5 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 Ad5 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 Ad5 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、Adv/hREIC 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。

別紙 1 : REIC/Dkk-3 遺伝子の構造、REIC/Dkk-3 遺伝子のアミノ酸配列

別紙 2 : REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製方法、REIC/Dkk-3 遺

伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の作製図、REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の構造

別紙 3 : 受け入れ試験の詳細

別紙 4 : 治療施設の地図及び保管場所の概略図

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
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

氏名	所属
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	独立行政法人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	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター長
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長
わたなべ まこと 渡邊 信	筑波大学生命環境科学研究科教授

○委員長 (五十音順 敬称略)
(平成21年6月11日現在)

