

様式第 1 (第 7 条関係)

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 4 月 1 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 国立大学法人 九州大学
九州大学病院
申請者 病院長 石橋 達朗 印
住所 福岡市東区馬出 3 丁目 1 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>ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子遺伝子を発現する F 遺伝子欠損非伝搬型遺伝子組換えセンダイウイルスベクター (rSeV/dF-hFGF2) (Z 株由来)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>(1) rSeV/dF-hFGF2 溶液は、ガラスバイアルに密封後、本剤を用いた遺伝子治療を行う治療施設 (以下単に「治療施設」という。) に凍結状態で輸送し、凍結状態のまま治療施設内のカテゴリ-1 レベルの拡散防止措置 (遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令 (平成 16 年財務省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省令第 1 号) 別表第二号に掲げる拡散防止措置をいう。以下同じ。) を執ることができる実験室における冷凍庫に保管する。</p> <p>(2) 凍結状態の rSeV/dF-hFGF2 溶液は、開放系区域を通過してカテゴリ-1 レベルの拡散防止措置を執ることができる個室の病室 (以下単に「個室」という。) に運搬する。運搬時は、取扱いに注意を要する旨を表示した二重に密閉された容器に入れて運搬する。凍結状態の rSeV/dF-hFGF2 溶液の融解、バイアルの開封及び患者に投与する rSeV/dF-hFGF2 溶液の調製は、個室で行う。</p> <p>(3) rSeV/dF-hFGF2 溶液を廃棄する際には、滅菌処理を行った後、投与が行われる施設で定められた感染性廃棄物処理規程 (以下単に「感染性廃棄物処理規程」という。) に従い廃棄する。</p> <p>(4) 患者に対する rSeV/dF-hFGF2 の投与は、個室において、rSeV/dF-hFGF2 溶液を直接筋肉内に注射することにより行う。原則として投与後 1 日は、患者を個室で管理し、その間、透析、検査等の理由で患者が一時的に個室外の開放系区域に出る場合には、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。また、注射部位の状態や患者の全身状態等から rSeV/dF-hFGF2 の漏出しリスクが高い状態が遷延する場合は、個室における管理期間を延長する。</p>

(5) 個室における管理期間中の患者の排泄物等(血液、体液、尿及び糞便をいう。以下同じ。)は、臨床検体として使用するものを除いては、当該個室で塩素系漂白剤(有効塩素濃度0.1%の次亜塩素酸ナトリウムをいう。以下同じ。)に30分間浸漬し、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に回収し、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、感染性廃棄物処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排泄物等の取扱いは、rSeV/dF-hFGF2溶液の取扱いに準ずる。

(6) rSeV/dF-hFGF2溶液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、個室において塩素系漂白剤に30分間浸漬して不活化処理を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。また、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及び患者の排泄物等に接触した器具等は、個室において70%エタノールを噴霧し、30分間静置することにより不活化処理を実施した後、使い捨てとするものにあつては感染性廃棄物処理規程に従い廃棄し、再使用するものにあつては個室において十分洗浄する。

(7) 個室における管理期間中に人工透析の実施が必要な患者については、rSeV/dF-hFGF2溶液投与時の穿刺部位を水分非透過性滅菌ドレープ等で覆い、更にインフルエンザ対策用ウイルス防御マスク(生体ウイルス遮断効率試験にて98%以上の遮断効率が確認されているもの)を着用させた上、個室の人工透析室(以下単に「透析室」という。)へ搬送する。人工透析に際し患者の血液や体液に接する穿刺針、透析器及び回路、固定テープ等は使い捨てとし、透析室内において塩素系漂白剤に30分間浸漬して不活化処理を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。人工透析終了後は、穿刺部の止血を確認した後に当該穿刺部を水分非透過性滅菌ドレープ等で覆った上、患者を個室へ搬送する。

以上

生物多様性影響評価書

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

「ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子遺伝子を発現するF遺伝子欠損非伝搬型遺伝子組換えセンダイウイルスベクター (rSeV/dF-hFGF2)」の基本骨格に用いられているセンダイウイルスは、分類学的にはパラミクソウイルス科、レスピロウイルス属に分類されている(文献 1, 2)。パラミクソウイルス科のウイルスは、ラプトウイルス科・フィロウイルス科とともにモノネガウイルススーパーファミリーを形成している(文献 3)。センダイウイルスという通称が一般的であるが、*Hemagglutinating virus of Japan* (HVJ) (文献 4) 又は1型マウスパラインフルエンザウイルス(文献1)とも呼ばれる。

センダイウイルスはマウス、ラット、ハムスター、モルモットなどの齧歯類動物を主な自然宿主とし、これら齧歯類動物に肺炎を生じる呼吸器病ウイルスであり(文献 4)、自然環境において齧歯類動物以外の動物(ヒトを含む)でのセンダイウイルスの病原性は報告されていない。通常センダイウイルスは齧歯類動物の鼻汁及び唾液から分離される。

ヒトにおけるセンダイウイルスの分布状況の血清学的な正確な把握は現時点で困難と考えられている。これは多くの小児に既感染が認められるヒトパラインフルエンザウイルス1型と免疫学的に交差性を示すことが理由と考えられている(文献 2)。

- 文献 1 : Lamb RA, Kolakofsky D: *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. In Fields virology fourth edition, Philadelphia: Lippincott-Raven; pp.1305-1340 (2001).
- 文献 2 : 大里外誉郎編, 医科ウイルス学, pp.341-354, 南江堂, 東京 (1992).
- 文献 3 : Nagai Y and Kato A. Paramyxovirus reverse genetics is coming of age, *Microbiol. Immunol.*, 43(7):613-624 (1999).
- 文献 4 : 加藤 篤、清谷 克寛、坂井(田川) 優子, センダイウイルスのエンジニアリング, *実験医学* 15: 2375-2383 (1997).

2 使用等の歴史及び現状

センダイウイルスは研究室での実験に多く用いられており、1958年にその細胞融合活性が発見されて以来、膜融合機構の解析や雑種細胞の作製など細胞生物学の領域で幅広く研究されており、雑種細胞作製による体細胞遺伝学の研究に大きく寄与してきた(文献 5 ~ 7)。また、発生工学における卵細胞同士の融合にも用いられている。センダイウイルスは増殖や取り扱いが容易であることから、パラミクソウイルスのプロトタイプとして、ウイルス遺伝学およびウイルスタンパク質の構造と機能、転写・複製機構の解析など分子生物学の研究対象として、また持続感染や呼吸器感染のモデルとして感染病理学や免疫学でも最も広く用いられるウイルスの一つである。さらに、cDNA からセンダイウイルスを調製する技術が開発され、ウイルスの改変・改良が可能となった(文献 8, 9)。我々も含め、センダイ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 10~14)。

2004年、センダイウイルス(Enders株)のヒトパラインフルエンザウイルス1型への生ワクチンとしての使用した臨床試験成績が明らかにされた(文献 15)。最大ウイルス量は 5×10^7 EID₅₀ (egg infectious dose 50)の経鼻投与であったが、有害事象の発現は認められず、投与前と比較して4.0~24倍の抗ヒトパラインフルエンザウイルス1型中和抗体が血清中に認められている。

九州大学病院では、センダイウイルスを宿主とする本遺伝子組換え生物の重症虚血肢症例に対する遺伝子治療臨床研究(オープンラベル、4段階用量漸増試験)の症例登録を2006

年4月より開始し、2010年9月末日までに12症例の投与及び観察期間が完了した。その結果、CRPの上昇を除き、明確にrSeV/dF-hFGF2と因果関係が推察されるあるいは可能性が示唆される有害事象は認められず、また用量依存性も見られなかった。さらに効能評価項目のうち、安静時疼痛の改善ならびに最大跛行距離/跛行出現距離において、単回投与にて再現性よく、既承認同効薬のシロスタゾールの効果を凌駕する改善傾向があることが判明した（文献16、添付1：遺伝子治療臨床研究 総括報告書）。

- 文献 5 : Kim J, Okada Y. Morphological changes in Ehrlich ascites tumor cells during the cell fusion reaction with HVJ (Sendai Virus). I. Alterations of cytoplasmic organelles and their reversion. *Exp Cell Res.* 130:191-202 (1980).
- 文献 6 : Kim J, Okada Y. Morphological changes in Ehrlich ascites tumor cells during the cell fusion reaction with HVJ (Sendai virus). II. Cluster formation of intramembrane particles in the early stage of cell fusion. *Exp Cell Res.* 132:125-136 (1981)
- 文献 7 : Kim J, Okada Y. Morphological changes in Ehrlich ascites tumor cells during the cell fusion reaction with HVJ (Sendai virus). III. Morphological characterization of HVJ glycoproteins integrated into the plasma membrane and their internalization by coated vesicles. *Exp Cell Res.* 140:127-136 (1982).
- 文献 8 : Kato A, Kiyotani K, Sakai Y, et al. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J.* 16:578-587 (1997).
- 文献 9 : Kato A, Sakai Y, Shioda T, et al. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells.* 1:569-579 (1996).
- 文献 10 : Moriya C, Shioda T, Tashiro K, et al. Large quantity production with extreme convenience of human SDF-1alpha and SDF-1beta by a Sendai virus vector. *FEBS Lett.* 425:105-111 (1998)
- 文献 11 : Hasan MK, Kato A, Shioda T, et al. Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3' proximal first locus. *J Gen Virol.* 78:2813-2820 (1997)
- 文献 12 : Li HO, Zhu YF, Asakawa M, et al. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J Virol.* 74:6564-6569 (2000)
- 文献 13 : Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S, et al. Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol.* 18:970-973 (2000)
- 文献 14 : Bitzer M, Armeanu S, Lauer UM, et al. Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J Gene Med.* 5:543-553 (2003)
- 文献 15 : Slobod KS, Shenep JL, Lujan-Zilbermann J, et al. Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine.* 22:3182-3186, 2004.
- 文献16 : Yonemitsu Y, Matsumoto T, Itoh H, Okazaki J, Uchiyama M, Yoshida K, Onimaru M, Onohara T, Inoguchi H, Kyuragi R, Shimokawa M, Ban H, Tanaka M, Inoue M, Shu T, Hasegawa M, Nakanishi Y, Maehara Y. DVC1-0101 to treat peripheral arterial disease: a Phase I/IIa open-label dose-escalation clinical trial. *Mol. Ther.* 2013 Mar;21(3):707-14.

3 生理・生態学的特性（文献 1）

（1）基本的特性

センダイウイルスは直径150-250nmのほぼ楕円形で、大きさと形状に多形性を示すエンペロープウイルスである。センダイウイルスが属するパラミクソウイルス科のウイルスは一本鎖の非分節型（-）鎖RNAをゲノムとして持つ。ゲノムRNAは、ヌクレオカプシッド（NP）タンパク質と非常に強く結合しており、この状態でのみRNA合成の鋳型活性を有す。野生型ウイルスの全長15,384塩基のゲノムRNAには主に6個の遺伝子がコードされ、3'端から順にNPタンパク質遺伝子、RNAポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化タンパク質（P）遺伝子、ウイルス粒子構造を内側から維持し、ウイルス粒子のアセンブリーと出芽に關与するマトリックスタンパク質（M）遺伝子、そして宿主細胞への侵入にかかわる膜融合タンパク質（F）遺伝子、結合に關わる赤血球凝集素ノイラミニダーゼ（HN）遺伝子、及びRNAポリメラーゼの大サブユニットである巨大（ラージ）タンパク質（L）遺伝子が直線的に並ぶ（-3：図2）。各遺伝子がコードするタンパク質のうち、NP、P及びLの3種類のタンパク質は、ウイルスのゲノムRNAとともに転写・複製の鋳型となり、自律複製可能なレプリコンであるゲノムRNA-タンパク質複合体（ribonucleoprotein complex、RNP）を形成する。それぞれの遺伝子は個々の転写制御ユニットを有し、単独のmRNAとして転写され、それぞれ1個のタンパク質が翻訳される。例外的にP遺伝子からはPタンパク質以外に、異なるタンパク質読み枠を利用して翻訳される非構造タンパク質（C）とmRNAを読み取り途中のRNAポリメラーゼが特定の場所でスリップし、グアニン塩基を1分子余計に付加する（RNA編集）ことによりPタンパク質の読み枠が変えられてできる新しいタンパク質（V）の3つが翻訳される。このような巧みな方法により、センダイウイルスゲノムRNAから総計8種類のタンパク質が産生される（文献4）。

（2）生育又は生育可能な環境の条件

実験施設内でのマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ等の齧歯類動物に空気感染もしくは接触感染しよく増殖するが、自然界での感染・増殖は認められていない（文献17）。培養細胞においては哺乳動物細胞のほとんどに存在するN-アセチルシアル酸とHNタンパク質を介して結合し、細胞内へゲノムを導入する。そのため、ほとんどの哺乳動物培養細胞に感染可能である。また、レトロウイルスなどとは異なり、静止期の細胞内においても良く生育する。しかしながら、センダイウイルスの感染性の決定に必須なFタンパク質は、非活性型の前駆タンパク質（F0）として合成され、トリプシン様プロテアーゼにより、F1とF2に開裂し活性化され、HNとの相互作用により膜融合を引き起こす。則ち、このトリプシン様プロテアーゼによりFタンパク質が活性化しなければ、生育した宿主は伝播しない。このような、Fタンパク質の解裂活性化に伴うウイルスの感染性発現という機序は、全てのエンペロープを持つウイルスに共通な現象であり、これら宿主域と病原性を規定し、トロピズムを限定する要因であることが解明されている（文献18）。空気・接触感染をすることから推定されるように、室温では比較的安定である。

（3）捕食性又は寄生性

実験施設以外での自然界での感染報告はない（文献17）。ヒトへの感染性に関しては、1952年に日本で初めて分離された当初は、新生児肺炎の原因となる新規ウイルスと思われたが、以後の検討では、マウスを用いた継代により分離されたために、マウスが保有していたウイルスを検出したことが明らかになっている。また、1956年にロシアでヒトへの感染の報告もあるが、当時はウイルスの分離法、他の類似ウイルス（Mumps, parainfluenza virus等）との抗原性による明瞭な区別もなされていなかったため、現在では根拠が乏しいと考えられている。以後ヒトへの病原性に関する報告はない。

ヒトにおける感染分布については、ほとんど報告が無く、また現時点で血清学的検査法

で正確に把握することは困難と考えられている。これはセンダイウイルスが、ヒトに多く既感染が見られるヒトパラインフルエンザウイルス1型との相同性も高く（遺伝子配列として56%以上）、免疫学的に交差反応が認められるためである。

（４）繁殖又は増殖の様式

センダイウイルスは、一段増殖には12～18時間を要し、野生型ウイルスの場合、最終的には1細胞あたり約1,000個のウイルス粒子が産生されると考えられている。細胞への導入後、導入されたゲノムRNP複合体（ribonucleoprotein complex）は核へは移行せず、細胞質においてウイルスコンポーネントの転写及びウイルスゲノムの複製を行う。ウイルス由来のRNAポリメラーゼ（P及びLタンパク質の複合体）で行われるため細胞種を選ばず発現効率が高い。また、全ての生活環においてRNA相でありDNA相を経ない。核への移行がないこと、DNA相がないことから、宿主細胞の染色体と相互作用する可能性が少なく、宿主染色体への組み込みはない。これらの特徴は、同じRNAウイルスであるが、プロウイルスが宿主染色体へ挿入されるレトロウイルス（遺伝子治療臨床研究、基礎研究に汎用されている代表的ベクター）と異なる。センダイウイルスは、室温では安定であり、実験室内でマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ等に空気感染もしくは接触感染し増殖する。特に幼若マウスにおいて感受性が高く、食欲不振、元気消失、異常呼吸音などを示すが、幼若マウス以外では無症状あるいは軽度の症状しか示さずに自然治癒し、死亡例は稀である（文献19）。また、センダイウイルスはアフリカミドリザル（およびチンパンジー）の上気道および下気道において、ヒトパラインフルエンザウイルス1型（hPIV1）と同じように効率的に増殖することが確認された（文献20）。一方で、センダイウイルスはヒトに対する病原性が知られておらず、センダイウイルスをhPIV1に対するワクチンとして評価した、アフリカミドリザルでの検討（文献20）およびヒトでの臨床試験（文献15）においてもセンダイウイルスに由来する重篤な副作用は確認されなかった。

（５）病原性

センダイウイルスはラット、ハムスター、モルモット等の齧歯類動物に感染し、風邪、肺炎等の呼吸器病を起こす。実験施設内で、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等の齧歯類動物に感染し、感染個体で増殖される。伝搬に関しては、空気感染や同居による接触感染により起きるが、空気伝搬は予想されるほど強くなく、主な原因は水またはエサを介しての接触伝搬による（文献21）。増殖したウイルスは、唾液、鼻水等により排出される。なお、rSeV/dF-hFGF2の由来するセンダイウイルスZ株は、1953年に大阪大学微生物病研究所で分離され、その後実験室で継代された株で、新鮮分離株と比べ、マウスでの致死量が1,000倍以上必要であり、肺内増殖の程度も弱く、弱毒性であることが報告されている（文献22）。野生型センダイウイルスEnders株のサル（African Green Monkey）への気道内投与による実験では、鼻水の分泌が増加した他には重篤な副作用が見られない（文献23）。また、ヒトへの感染に関しては、野生型ウイルスEnders株を、ヒトパラインフルエンザウイルス1型ウイルスに対する生ワクチンとして使用した臨床試験が行われているが、その場合も重篤な副作用は検出されていない（文献15）。

（６）有害物質の産生性

センダイウイルスそのもの、およびその構造タンパク質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、センダイウイルスはエンベロープを有しており、有機溶媒（エーテル、クロロホルム、エタノールなど）、界面活性剤（SDS、Triton X-100、Tween20

など)、塩素系漂白剤或いは第4級アンモニウム 塩などの処理で容易に失活し、感染性を失う(文献 21, 23)。例えば、有機溶媒としては100%のエーテル或いはクロロホルムで10分、70%エタノールで30分処理、塩素化合物としては1000ppmの次亜塩素酸或いは第4級アンモニウム塩として0.05%の塩化ベンザルコニウムで30分処理することで容易に失活する(文献 25, 26)。界面活性剤としては、0.1% SDS, 0.1% Triton X-100 或いは 0.1% Tween20で1時間から2時間処理することで、容易にウイルスタンパク質を可溶化し、ウイルスを失活させる(文献 27, 28)。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 17 : Didcock L., Young D. F., Goodbourn S. Et al. Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes: importance for virus pathogenesis. *J. Virol.* 73(4): 3125-3133 (1999)
- 文献 18 : 永井美之, プロテアーゼ依存性ウイルストロピズム, *実験医学* 9:2185-2191(1991)
- 文献 19 : 清水悠紀臣ほか 『動物の感染症』 近代出版 2002年
- 文献 20 : Skiadopoulos MH, Surman SR et al. Sendai virus, a murine parainfluenza virus type 1, replicates to a level similar to human PIV1 in the upper and lower respiratory tract of African green monkeys and chimpanzees. *Virology*.297:153-160 (2002)
- 文献 21 : ウイルス実験学各論 : 国立予防衛生研究所学友会編. 15. パラミクソウイルス pp.331-340, 丸善, 東京 (1982)
- 文献 22 : Yamaguchi R., Iwai H., Ueda K. Variation of virulence and other properties among Sendai virus strains. *Microbiol. Immunol.* 32(2): 235-240 (1988)
- 文献 23 : Hurwitz JL, Soike KF, Sangster MY, et al. Intranasal Sendai virus vaccine protects African green monkeys from infection with human parainfluenza virus-type one. *Vaccine* 15:533-540 (1997)
- 文献 24 : ウイルス実験プロトコール : 永田恭介・小林信之編 (Medical View) 代表的消毒剤 の適用 pp358-359.
- 文献 25 : Watanabe Y, Miyata H, Sato H. Inactivation of Laboratory Animal RNA-viruses by Physicochemical Treatment. *Exp. Anim* 38 (4):305-311 (1989)
- 文献 26 : Meng ZD, Birch C, Heath R, et al. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl Environ Microbiol.* 53:727-730 (1987)
- 文献 27 : Tomas E, Samuel I, Portocala R. Interaction between ceruloplasmin and Sendai virus envelope components. Note ii. Some characteristics of Tween 20-solubilized envelope components isolated by gel-filtration. *Virologie.* 27:127-132 (1976)
- 文献 28 : Katzir Z, Gutman O, Henis YI. Application of fluorescence photobleaching recovery to assess complex formation between the two envelope proteins of Sendai virus in membranes of fused human erythrocytes. *Biochemistry.* 28:6400-6405 (1989)

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

18kDa ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (略称 hFGF2) をコードする全長の cDNA 領域 (以下、hFGF2 遺伝子) は 468bp であり、ヒト線維芽細胞 MRC-5 cDNA ライブラリーから単離された。その塩基配列は GenBank に登録されている hFGF2 遺伝子の cDNA 塩基配列 (例えば M27968.1) と完全に同一である。

一方、テンプレートプラスミド作製の pSeV/dF には、Z 株ゲノムの 3' 末端付近 (+)鎖 cDNA 上では 5' 末端付近) に遺伝子を搭載するため *NotI* 切断部位を含む 18 塩基が導入されている。hFGF2 遺伝子を pSeV/dF に挿入するため、同遺伝子を鋳型として、必要な配列が付加されたプライマーを用いて、PCR 法により hFGF2 遺伝子を含む断片 (hFGF2 遺伝子領域断片) を増幅した。hFGF2 遺伝子領域断片は、hFGF2 遺伝子の 5' 末に *NotI* 認識配列を、また 3' 末にセンダイウイルス転写終結 (E)、介在 (I)、開始 (S) シグナル及び *NotI* 認識配列を持つ。E、I、S 配列は、それぞれ 9、3、10 塩基からなる (文献 11)。供与核酸 (535 塩基) を含む配列及び、対応するアミノ酸配列を別紙 1 に示す。hFGF2 遺伝子領域断片の配列内には、目的以外のタンパク質を発現する ORF は報告されていない。

(2) 構成要素の機能

上記のごとく、遺伝子組換えセンダイウイルスにおける供与核酸の転写は、アデノウイルスなどの DNA を鋳型とする転写と異なり、プロモーター配列及び polyA シグナルを必要としない。その代わりにウイルス自身の RNA ポリメラーゼ (L タンパク) が認識する転写開始シグナル (S)、転写終結シグナル (E) が挿入されている。

ヒト FGF2 タンパク質は 155 アミノ酸からなる等電点 9.6、分子量 18 kDa の一本鎖ポリペプチドからなる単純タンパク質で、ヘパリンへの結合能がある (文献 29)。いわゆる古典的分泌シグナルを有していないが、種々の細胞で実際に分泌されていることが確認されている。

FGF2 は種々の間葉系細胞の増殖を促進するが、その中でも最も特徴的な作用は、血管内皮細胞の増殖促進・管腔形成の促進作用 (血管新生促進作用) である。これらの作用は培養細胞のみならず、動物個体局所での作用も確認されている。同様の作用を持つものに血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 及び肝細胞増殖因子 (HGF) など複数のものが知られているが、FGF2 は VEGF 及び HGF の発現を誘導し、より効果的に機能的な血管新生を促進することが明らかになっている (文献 30)。

過剰発現による副作用的観点からすると、FGF2 は、上述のように種々の間葉系細胞・血管内皮細胞などの増殖を促進することが知られているものの、トランスジェニックマウスを用いた成績においても悪性新生物が発生したとする報告はない (文献 31)。FGF2 の高発現時における生体への毒性は十分に明らかではないが、ヒト冠状動脈内への大量のタンパク質投与の結果によると、一時的なタンパク尿、わずかな血圧低下以外に重篤な副作用は認められていない (文献 32)。また、FGF2 のトランスジェニックマウスでは、特に血管系の異常は報告されておらず、主な形態の変化は頭蓋肥大 (又は大頭症、macrocephaly) と軟骨異形成 (chondrodysplasia) のみであった (文献 31)。さらに現在、FGF2 のタンパク質製剤はフィブラスプレーとして科研製薬より発売されており、国内においてもヒトへの投与に関する十分な実績がある。

文献 29: 塩川光一郎、浅野美咲、塩崎千織, サイトカイン・サイトカイン受容体系の分子生物学: 線維芽細胞増殖因子, 日本臨床 50:1893-1901 (1992)

文献 30: 藤井孝明、米満吉和, FGF-2 による血管新生因子群の階層的発現制御機構 - 機

- 能を持つ血管の再生システム．実験医学 22（増刊）:1123-1129 (2004)
- 文献 31： Coffin JD, Florkiewicz RZ, Neumann J, et al. Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol Biol Cell*. 6:1861-1873 (1995)
- 文献 32： Laham RJ, Chronos NA, Pike M, et al. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol*. 36:2132-2139 (2000)

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

名称：pSeV/dF

由来：ベクターゲノムの由来する Z 株は、1953 年大阪大学、微生物病研究所で分離されたもので、センダイウイルスの標準株の一つとされており、ゲノム遺伝子の全塩基配列も決定されている（GenBank: M30202.1：登録配列と99.7%同一。全塩基配列は、別紙 2を参照）。

pSeV/dFは、以下の手順により構築した。

センダイウイルス全長ゲノム cDNA（pSeV18+b(+)）の構築（文献 9, 11）

センダイウイルス転写ユニットを作製するために、T7 プロモーター、(+)鎖 RNA が転写されるように設計されたセンダイウイルス cDNA、リボザイム遺伝子をこの順に保持する DNA を、pUC18 プラスミドに挿入し、センダイウイルスゲノム (+)鎖の cDNA を含むプラスミド pSeV (+)を構築した（文献 9）。pSeV (+)をベースに外来目的遺伝子の発現が出来るように、pSeV (+)の SeV リーダー配列と NP 構造遺伝子の間に *Not* I 制限酵素認識部位を含む 18 塩基のクロニングサイトを挿入した SeV ゲノム cDNA プラスミド pSeV18⁺b(+) を作製した（文献 11）。

F 欠失型 SeV ゲノム cDNA（pSeV/dF）の構築（文献 12, 35）

センダイウイルス（SeV）全長ゲノムcDNA、pSeV18+b(+)（文献11）から、さらに PCR 法を用いて pSeV18⁺b(+)よりF遺伝子のORF（ATG-TGA=1,698bp）を除いて連結し、F欠失型SeVゲノムcDNA（pSeV/dF）を構築した（文献 12, 35）。pSeV/dFのプラスミド構築スキームおよび構造図を図1に示す。

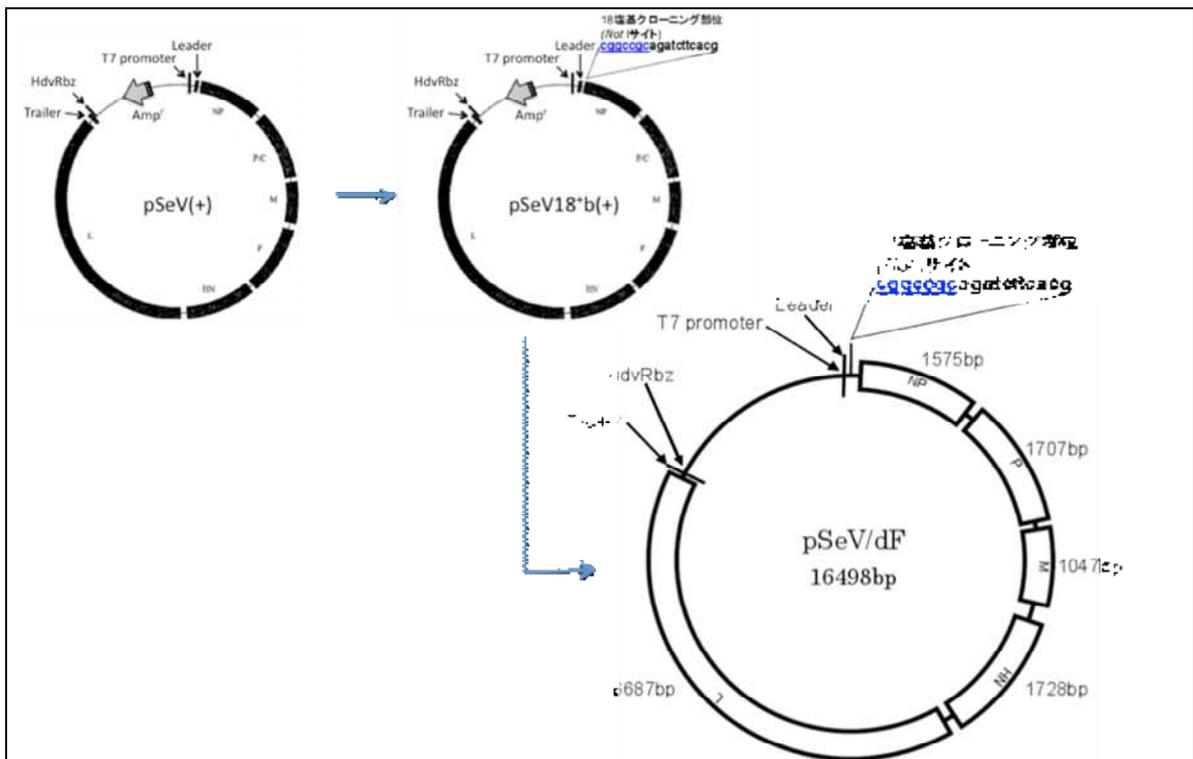


図1. pSeV/dF構造図

(2) 特性

pSeV/dFは大腸菌内で複製可能な pUC18ベクターを基本骨格とし、T7 RNAポリメラーゼプロモーター、アンピシリン耐性マーカー、18塩基クローニング部位 (cgggccgagatctcaag)、SeV-F遺伝子を欠失させた Z 株のゲノムRNA由来の配列 (NP, P, M, HN, L遺伝子)、D型肝炎ウイルス (Hepatitis delta virus : HDV)由来リボザイム (self-cleaving ribozyme(Rbz)) 等よりなる。NPはウイルスゲノムに結合するヌcleoカプシドタンパク質 (Nucleocapsid Protein)、PはRNAポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化タンパク質 (Phosphoprotein)、Mはウイルス粒子構造を内側から維持するマトリクスタンパク質 (Matrix protein)、HNは標的細胞との結合にかかわる赤血球凝集素/ノイラミニダーゼ (Hemagglutinin-Neuraminidase)、LはRNAポリメラーゼの大サブユニットである巨大タンパク質 (Large protein) である。また pSeV/dFから除去されたFは標的細胞への侵入にかかわる膜融合タンパク質 (Fusion protein) である。Rbzは正しい3'末端をもつRNA、すなわちウイルスゲノムの正確なコピーとするために、cDNAの3'末端に、RNAゲノム末端領域の自己切断のためにD型肝炎ウイルス由来リボザイムを付加している (塩基配列は文献33, 34)。

セウダイウイルスゲノム領域における野生型との違いは 1) F 遺伝子領域が欠失している、2) 18塩基クローニング部位 (スペーサー配列) が挿入されている、の2点である。

pSeV/dFの18塩基クローニング部位に供与核酸 (hFGF2遺伝子) を挿入し、ウイルスベクターのテンプレートである pSeV18+hFGF2/ F を作製した (文献 35)。

文献 33 : Ferre-D'Amare et al., Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. Nature 395:567 (1998)
 文献 34 : Sharmeen et al., Antigenomic RNA of Human Hepatitis Delta Virus Can Undergo Self-Cleavage (Jouranal of Virology 62:2674 (1988)
 文献 35 : Hirata T , Iida A, Shiraki-Iida T. et al., An improved method for recovery of

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

pSeV/dF の SeV リーダー配列 (後述) と NP 構造遺伝子の間にある *NotI* 切断部位に *hFGF2* 遺伝子領域断片を挿入し、テンプレートプラスミド pSeV18+hFGF2/ΔF を作製した。pSeV18+hFGF2/ΔF の構造と制限酵素切断地図を図 2 に示す。リーダー配列からトレーラー配列 (後述) までのセンダイウイルス遺伝子及び *hFGF2* 遺伝子 (紫色で表示) を含む範囲が rSeV/dF-hFGF2 のゲノムテンプレートである。

リーダーおよびトレーラーはセンダイウイルスの RNA-dependent RNA polymerase (P 及び L 遺伝子産物から成る) が結合するプロモーター領域であり、(+鎖)ゲノムの複製および転写 (mRNA 合成) の時にはこの酵素はリーダーに結合して複製および転写を開始する。一方(-鎖)ゲノムの複製の時には、この酵素が(+鎖)ゲノムのトレーラーの相補鎖部分に結合し、複製を開始する。

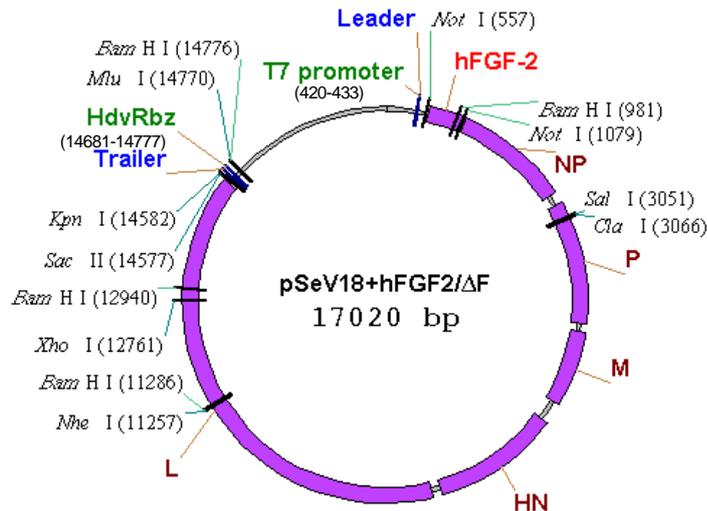


図 2 . pSeV18+hFGF2/ΔF の構造及び制限酵素地図

pSeV18+hFGF2/ΔF から、リバーシジェネティクス法 (次項を参照) を用いて rSeV/dF-hFGF2 を構築した。野生型センダイウイルス及び構築された rSeV/dF-hFGF2 のゲノム構造の概略図は図 3 に示す。また、別紙 2 に rSeV/dF-hFGF2 ゲノムの全塩基配列を示す。rSeV/dF-hFGF2 は、野生型センダイウイルスと同じく 1 本鎖 RNA (-) 鎖をゲノムとする。

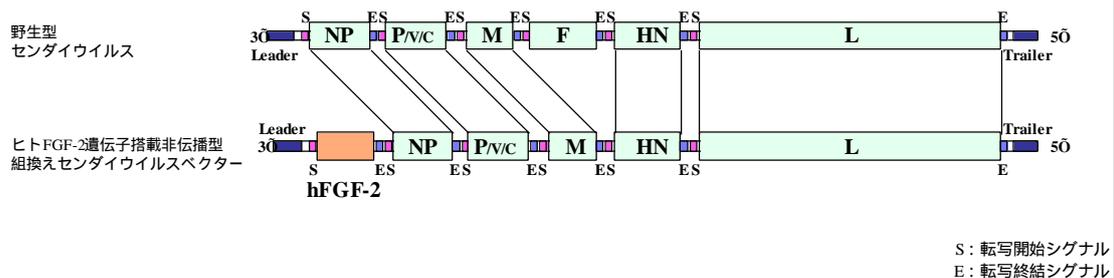


図 3 . 野生型センダイウイルス及び rSeV/dF-hFGF2 のゲノム構造

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

pSeV18+hFGF2/ΔFからrSeV/dF-hFGF2を構築する過程として(-)鎖RNAウイルスをcDNAより作製させるためにリバースジェネティクス法を用いた(文献 35) 具体的にはT7ポリメラーゼを発現する組換えワクチニアウイルス(vTF7-3)をサル腎臓由来LLC-MK2細胞に感染後、pSeV18+hFGF2/ΔFとT7プロモータ支配下でNP, P, L,及びFタンパク質を発現する4つのプラスミドを同時にLLC-MK2細胞にトランスフェクションすることにより、rSeV/dF-hFGF2のベクターシードを調製し、後述するLLC-MK2/F/Ad細胞を用いてベクターを増幅しF欠失型ベクターであるrSeV/dF-hFGF2を作製した(図4)。このベクターはPre-MVSS (pre-master virus seed stock)である。Pre-MVSSの段階で全塩基配列の確認を行った。尚、作製に用いた組換えワクチニアウイルスは、Pre-MVSSの段階で検出限界以下であることが確認されている。

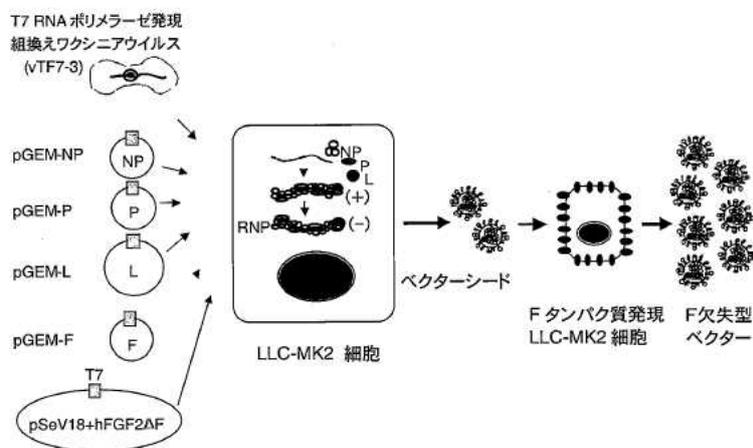


図4 . rSeV/ dF-hFGF2の作製法概略図

(3) LLC-MK₂/F/Ad細胞の作製

rSeV/dF-hFGF2はウイルスのF遺伝子を欠失しているが、F遺伝子産物はウイルス感染に必須であるため、SeV-Fタンパク質を継続的に発現しベクターにトランスに供給するパッケージング細胞(LLC-MK₂/F/Ad)を作出した。LLC-MK₂/F/Adの作出には、SeVの増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株、LLC-MK₂細胞を利用した。LLC-MK₂細胞にCre DNAリコンビナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミド(pCALNdLw/F)を、リン酸カルシウム法により導入した。G418存在下で14日間培養して回収し、それらの細胞株にCre発現非増殖型組換えアデノウイルスベクターを感染させ、SeV-Fタンパク質の発現を誘導した後に、ウエスタンブロット法によるSeV-Fタンパク質の半定量的な発現解析、フローサイトメトリーによる細胞表面への発現、トリプシン添加によるSeV-Fタンパクの解裂(活性化)及びHN遺伝子導入細胞の赤血球吸着により活性確認を行い、パッケージング用の細胞株(LLC-MK₂/F/Ad)を選択し、Pre-MCB (pre-master cell bank)を作製した。

パッケージング用細胞株の作製に利用したCre発現非増殖型組換えアデノウイルスベクターはE1遺伝子を欠失しており、LLC-MK₂/F/Ad細胞内ではウイルスが増殖することは出来ない。マスターセルバンクの作製までに10継代以上を経過しており、Cre発現非増殖型組換えアデノウイルスベクターは分解され消失するため、最終製品に混入する可能性はないと考えられる。

(4) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

マスターセルバンクおよびマスターウイルスバンクの樹立方法と規格試験

rSeV/dF-hFGF2 は、治験薬 GMP 基準に従い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て製造される。図 4 に示す F タンパク発現 LLC-MK2 細胞 (LLC-MK2/F/Ad:Pre-MCB) 及び F 欠失型ベクターである rSeV/dF-hFGF2 (Pre-MVSS) から調製し、それぞれマスターセルバンク (MCB)、マスターウイルスバンク (MVSS) として保管された。各バンクは、英国 Bio Reliance 社にて樹立され、品質管理試験が実施された。別紙 3 にマスターセルバンク及びウイルスバンクの規格試験の結果を示した。また、Pre-MVSS の段階で全塩基配列の確認が行われた。その後、品質試験が実施された両バンクは、タカラバイオ社に移管されている。

製剤の製造及び品質管理

マスターセルバンクより拡大培養された LLC-MK2/F/Ad 細胞に、マスターウイルスバンクの rSeV/dF-hFGF2 を感染させ、本遺伝子組換えウイルスの生産培養を行い、回収された培養上清をフィルターろ過する。さらに、アフィニティクロマトグラフィー、限外ろ過、ゲルろ過等により精製され、濃度調整の後バイアルに充填し、凍結保存されたものを製剤とする。また、製造工程、原薬、製剤に関して、必要とされる品質管理試験が行われる。rSeV/dF-hFGF2 の製造工程の詳細は別紙 5 に示す。工程内、原薬及び製剤各試験の品質規格を別紙 4 に示す。凍結した状態で治療施設へ輸送した最終製品は、カテゴリ 1 レベルに管理された実験室において受け入れ、ディープフリーザーに施錠の上保管する。

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

供与核酸は rSeV/dF-hFGF2 の一本鎖 RNA もしくは複製中の二本鎖 RNA の一部として存在する。レポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子を供与核酸としたセンダイウイルスベクターが、長期の反復継代においても安定に外来遺伝子を発現することから遺伝子組換えセンダイウイルスのゲノムは一般に安定であると考えられる (文献 11)。

細胞に感染すると、rSeV/dF-hFGF2 の ゲノム RNP は核へは移行せず、細胞質においてセンダイウイルス由来の RNA ポリメラーゼ (P, L) で hFGF2 遺伝子が転写される (文献 1, 3, 4, 12~14, 21)。FGF-2 タンパク質 の発現は感染する動物内で一過性で、約 2 週間で消失する (文献 13, 36~38)。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。

rSeV/dF-hFGF2 を増殖させる過程で、ゲノムから欠失した F タンパク質を細胞からトランスに供給するが (文献 35)、rSeV/dF-hFGF2 のゲノムと細胞のゲノムに導入した F タンパク質遺伝子には、相同部分はなく、相同組換えにより伝搬性を有する野生型センダイウイルス、則ち増殖性ウイルスが出現する可能性は理論的にはない。英国 Bio Reliance 社において、テストランサンプル (3 ロット) 及び最終生産品 (1 ロット) に対し有精鶏卵による 3 段階連続希釈継代による増殖性ウイルス (野生型、及び遺伝子組換え増殖型双方を検出する) の検出を行った。本方法は 10 感染粒子を検出する感度であるが、上記 4 ロットについて結果は全て陰性であった。

文献 36 : Yamashita A, Yonemitsu Y, Okano S, et al. Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. J Immunol. 168:450-457 (2002).

文献 37 : Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, et al. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. Circ Res. 90:966-973 (2002).

文献 38 : Shoji T, Yonemitsu Y, Komori K, et al. Intramuscular gene transfer of FGF-2 attenuates endothelial dysfunction and inhibits intimal hyperplasia of vein grafts in poor-runoff limbs of rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:H173-182 (2003)

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

rSeV/dF-hFGF2 の検出にはリアルタイムRT-PCR法を用いる。rSeV/dF-hFGF2は宿主のセンダイウイルス に存在しないヒト由来 *hFGF2* 遺伝子を含むが、正常ヒト組織は低レベルながらFGF2を発現しているため、この部分を標的とした場合、バックグラウンドとして *FGF2* が検出される。従って、プライマーを *FGF2*とNP領域を跨る配列が増幅するよう設計し、宿主のセンダイウイルスではなく、また正常ヒト組織に発現する低レベルの *FGF2* でもない、rSeV/dF-hFGF2 特異的に検出するリアルタイム RT-PCR 法を確立した。この方法では、細胞から抽出したバックグラウンドRNA 0.1 µgに10コピーのrSeV/dF-hFGF2があれば検出することができる。信頼性は 20 コピーから 10⁵ コピーまでの検出が可能である（試験方法の詳細を別紙6に示す）。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

野生型センダイウイルスの場合、ウイルス感染に F タンパク質が必須である。F タンパク質は、非活性型の前駆タンパク質 (F0) として合成され、トリプシン様プロテアーゼにより、F1 と F2 に開裂し活性化され、HN との相互作用により膜融合を引き起こす。則ち、この活性化に必要なトリプシン様宿主プロテアーゼの存在の有無がトロピズムを限定する要因となり、例えば齧歯類における気道上皮細胞及び発育鶏卵におけるしょう尿膜でのみ、感染性ウイルスを介して細胞間で感染を広げて伝搬することができる。rSeV/dF-hFGF2はSeVリーダー配列と NP 構造遺伝子の間に*hFGF2*遺伝子が挿入されており、感染細胞内でヒトFGF2を生産する。非伝搬性以外の性質においては、rSeV/dF-hFGF2 の感染する動植物等の種類、感染経路は野生型センダイウイルスと全く同じである。図5に示す通り、F遺伝子の欠失に関わらずマウス骨格筋に同等の効率でマウスFGF2あるいはヒトFGF2を発現できることから、rSeV/dF-hFGF2は、野生株と同等の効率で感染できると考えられる。

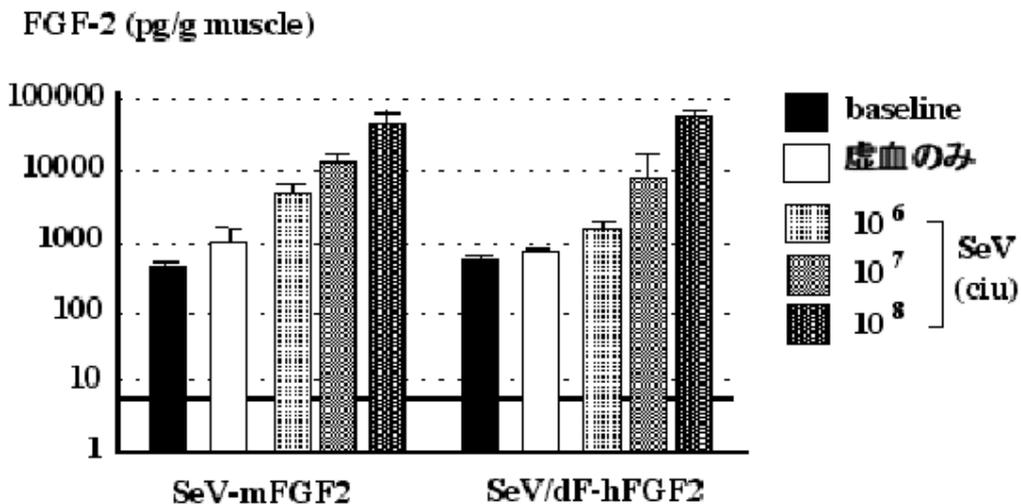


図5. マウス急性虚血後肢骨格筋に対する濃度依存性血管新生因子遺伝子発現効率
(付加型増殖伝播型ベクターおよびF遺伝子欠損非伝播型ベクターを用いた検討)
各群 n=6、平均±S.D.

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

(1) 輸送・保管方法：

rSeV/dF-hFGF2 製剤は、ガラスバイアルに密封後、本剤を用いた遺伝子治療を行う治療施設（以下、治療施設）に凍結状態で輸送され、凍結状態のまま治療施設内の産業利用二種省令（註）別表に定めるカテゴリー1 遺伝子組換え微生物の使用等に当たって執るべき拡散防止措置を執ることができる（以下、カテゴリー1 レベルの）実験室内の冷凍庫に保管される。

（註）遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成 16 年財務・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第 1 号：平成 18 年 6 月 6 日一部改正）

(2) 投与用注射液の調製等：

凍結状態の rSeV/dF-hFGF2 溶液は、開放系区域を通過してカテゴリー1 レベルの個室の病室（以下、個室）に運搬する。運搬時は、取扱いに注意を要する旨を表示した二重に密閉された容器に入れて運搬する。凍結状態の rSeV/dF-hFGF2 溶液の融解、バイアルの開封並びに rSeV/dF-hFGF2 溶液の調製は、上記個室で行う。

(3) 滅菌処理・廃棄方法：

rSeV/dF-hFGF2 製剤を廃棄する際には、滅菌処理を行った後、投与が行われる施設で定められた感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。

(4) 投与時及び個室管理期間における患者からの環境中への拡散防止措置：

患者に対する rSeV/dF-hFGF2 の投与は、上記個室において、rSeV/dF-hFGF2 溶液を直接筋肉内に注射することにより行う。原則として投与後 1 日は、患者を個室で管理し、その間、透析、検査等の理由で患者が一時的に個室外の開放系区域に出る場合には、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。また、注射部位の状態や患者の全身状態などから rSeV/dF-hFGF2 の漏出リスクが高い状態が遷延する場合は、個室管理期間を延長する。万が一、開放区域内での排出が生じた場合は、下記(5)に記載の個室での排泄物等の滅菌処理・廃棄方法と同様に処理する。硬い面にこぼれた血液や体液は、遺伝子組換え生物が存在する可能性がある場合は、ペーパータオル等で直ちに拭き取り、当該エリアを消毒薬で洗浄する。清掃に用いた物品はバイオハザードバッグに入れ塩素系漂白剤又は 70%エタノールを噴霧し除染した後密封し、バイオハザードラベルを貼付し、各治療施設の感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。

(5) 個室管理期間における患者の排泄物等の滅菌処理・廃棄方法

個室管理期間中の患者の排泄物（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（次亜塩素酸 1,000 ppm、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、各治療施設で定められた感染性廃棄物処理

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排泄物の取扱いは、上記 rSeV/dF-hFGF2 製剤の取扱いに準ずる。

(6) 患者への製剤の投与時及び個室管理期間中、患者に対して侵襲的に使用した器具等、及び患者の排泄物等に接触した器具等の滅菌処理・廃棄方法

rSeV/dF-hFGF2 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、カテゴリ-1 レベルの個室の病室内において塩素系漂白剤(次亜塩素酸 1,000 ppm、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、患者に対して侵襲的に使用した器具等及び患者の排泄物に接触した器具等は、個室において 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。

(7) 慢性人工透析を受けている患者の透析室への搬送、及び慢性人工透析時に侵襲的に使用した器具ならびに人工透析室における患者の排泄物等に接触した器具等の滅菌処理・廃棄方法：

個室管理期間中に慢性人工透析が必要な患者は、rSeV/dF-hFGF2 投与時の穿刺部位を水分非透過性滅菌ドレープ等で覆い、またインフルエンザ対策用ウイルス防御マスク(生体ウイルス遮断効率試験にて 98%以上の遮断効率が確認されているもの)を着用の上、個室の人工透析室(以下、透析室)へ搬送する。人工透析に必要な患者の血液や体液に接する穿刺針、ダイヤライザー及び回路、ならびに固定テープ等は使い捨てとし、透析室内において塩素系漂白剤(次亜塩素酸 1,000 ppm、30 分)にて不活化処理を実施した後、各治療施設で定められた感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。人工透析終了後は、穿刺部の止血を確認した後に水分非透過性滅菌ドレープ等で覆い、個室へ搬送する。

現時点で予定している医師主導治験の対象は閉塞性動脈硬化症で、高度間歇性跛行(Fontaine IIbおよびIII)を呈する患者であり、完了した臨床研究の投与量に準じた 1×10^9 ciu/肢もしくは 5×10^9 ciu/肢を被験者に投与する(参照として治験概要を別紙12に示す)。透析室の一例として、九州大学病院南棟4階の平面図を別紙7に示す。

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

第一種使用等の開始後は、患者の血液のrSeV/dF-hFGF2とセンダイウイルス由来NP遺伝子配列を跨る領域をリアルタイムRT-PCRで検出する。患者にrSeV/dF-hFGF2との因果関係が疑われる有害事象が確認された場合など、必要と判断された場合は、感染性を有するrSeV/dF-hFGF2の有無をトリ血球凝集反応で検出するか、もしくは血中の炎症性サイトカイン(IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、TNF-、IFN-)をELISA法でモニターする。

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

治療施設に輸送されたrSeV/dF-hFGF2製剤は、施錠つきディープフリーザー内に保管する。保管場所の一例として、九州大学病院 分子細胞調製センターの平面図を別紙8に示す。

患者に対する rSeV/dF-hFGF2 の原則として投与後 1 日まで、個室で管理を行う。マウス、ラット、サルにおける安全性試験結果では、センダイウイルス由来遺伝子配列が血中あるいは尿中に検出されても臨床的に特記すべき変化は認められず、血液中のサイトカインにも有意な変化は見られないことから(別紙9)、第一種使用等の開始後においては原則的に投与後 1 日まで環境中への拡散防止措置を適切に執った室内での経過観察とする。ただし必要に応じて医学的判断に基づき個室管理期間を延長する。個室管理の

例として、九州大学病院 遺伝子治療室の平面図を別紙 10 に示す。

検査等の理由で患者が一時的に個室外の開放系区域に出る場合には、看護師 1 名を常時同伴させ、開放系区域での排泄や喀痰咯出等の禁止を義務付ける。万が一、開放区域内での排出が生じた場合は、下記に記載の個室内での排泄物等の滅菌処理・廃棄方法と同様に処理する。硬い面にこぼれた血液や体液は、遺伝子組換え生物が存在する可能性がある場合は、ペーパータオル等で直ちに拭き取り、当該エリアを消毒薬で洗浄する。清掃に用いた物品はバイオハザードバッグに入れ塩素系漂白剤又は 70%エタノールを噴霧し除染した後密封し、バイオハザードラベルを貼付し、各治療施設の感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。

個室管理期間中の患者の排泄物（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（次亜塩素酸 1,000 ppm、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、各治療施設で定められた感染性廃棄物処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排泄物の取扱いは、2 項 rSeV/dF-hFGF2 製剤の取扱いに準ずる。

rSeV/dF-hFGF2 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、個室において塩素系漂白剤（次亜塩素酸 1,000 ppm、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、患者に対して侵襲的に使用した器具等及び患者の排泄物に接触した器具等は、個室において 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。

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

厚生労働省吉川班によるカニクイザルを用いた水平感染に関する検討において、増殖伝搬型遺伝子組換えセンダイウイルスを使用し、同一ケージ内で飼育した場合、非感染カニクイザルへの水平感染は認められなかった（文献 39）。

また、マウスを用いた実験においても、増殖伝搬型遺伝子組換えセンダイウイルスを用いた検討において、 10^8 CIU/head という致死的な量を投与した場合、初回投与のマウスは一週間以内で全例が死亡ないし瀕死期殺処分されたが、同一アイソレーター内で飼育されたセンダイウイルス未投与群のマウスにおいては生存し、抗体価の上昇も見られなかった。F 遺伝子欠損非伝搬型遺伝子組換えセンダイウイルスを用いて同様のマウスを用いた実験を行ったが、初回投与群でも死亡例は見られず、同ウイルス未投与群のマウスにおいては抗体価の上昇は見られなかった（別紙 11：未公表データ）。

九州大学病院では、センダイウイルスを宿主とする本遺伝子組換え生物の重症虚血肢症例に対する遺伝子治療臨床研究（オープンラベル、4 段階用量漸増試験）の症例登録を 2006 年 4 月より開始し、2010 年 9 月末日現在までに 12 症例の投与および観察期間が完了した（結果詳細は文献 16、添付 1）。

文献 39：吉川泰弘他 霊長類を用いた遺伝子治療法の評価システム開発研究。

厚生科学研究費補助金 総合的プロジェクト研究分野 ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業 平成 11 年度 研究報告書（厚生労働科学研究成果データベース）

6 国外における使用等により得られた情報

国外においてrSeV/dF-hFGF2の使用実績はない。

野生型センダイウイルス（Enders株）をヒトパラインフルエンザウイルス1型ウイルスへの生ワクチンとして使用した臨床試験が米国で実施されており（文献15）、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。

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

rSeV/dF-hFGF2の感染性は野生型センダイウイルスZ株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

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

rSeV/dF-hFGF2の感染性は野生型センダイウイルスZ株と同一と考えられるので、自然界で病原性を受ける対象はマウス、ラット、ハムスター、モルモットなどの齧歯類動物のみである。ヒトを含むその他の動物では感染が成立する可能性は考えられるが、野生型センダイウイルスと同様、遺伝子組換えウイルスによる病原性は低いと考えられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

rSeV/dF-hFGF2が感染したヒトではhFGF2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(組換えヒトFGF2タンパク質製剤は医薬品として市販されている)。

なお野生型センダイウイルスZ株を宿主とする遺伝子治療用非伝搬型ウイルスベクター(F遺伝子を欠失した遺伝子組換え生物等)は、2000年に最初の構築の成功が報告されて以来(文献12)、まだ限られた施設でしか使用されていないために、環境への悪影響は不明である。但し、野生型センダイウイルスZ株は発見以来50年を経過し、多くの研究機関において細胞融合実験やモノクローナル抗体作成などに汎用されて来たウイルスであるが、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、rSeV/dF-hFGF2の環境中への拡散は極めて微量である。さらにrSeV/dF-hFGF2は増殖能を失っており、さらに野生型センダイウイルスと共存しても相同組換えは起こさない(文献40)。さらに野生型センダイウイルスそのもののヒトへの経鼻投与により、重篤な副作用がなかったことが臨床試験で明らかにされている(文献15)。従って、rSeV/dF-hFGF2が患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

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 40：中西真人、芦原賢一、千田隆夫、他．膜融合リポソームを使った細胞への高効率遺伝子導入．実験医学 12:328-332 (1994)

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

rSeV/dF-hFGF2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

rSeV/dF-hFGF2の感染性は野生型センダイウイルスZ株と同一と考えられるので、自然界で病原性を受ける対象はマウス、ラット、ハムスター、モルモットなどの齧歯類動物のみである。ヒトを含むその他の動物では感染が成立する可能性は考えられるが、野生型センダイウイルスと同様、遺伝子組換えウイルスによる病原性は低いと考えられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

rSeV/dF-hFGF2が感染したヒトではhFGF2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。

カニクイザルを用いた水平感染に関する検討において、増殖伝搬型遺伝子組換えセンダイウイルスを使用し同一ケージ内で飼育した場合、非感染カニクイザルへの水平感染は認められなかった(文献39)。

(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、rSeV/dF-hFGF2の環境中への拡散は極めて微量である。さらにrSeV/dF-hFGF2は増殖能を失っており、さらに野生型センダイウイルスと共存しても相同組換えは起こさない(文献40)。従って、仮に微量なrSeV/dF-hFGF2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

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。

総合的評価

rSeV/dF-hFGF2が感染し病原性を示す動植物等の種類は、野生型センダイウイルスと同等で齧歯類動物に限定され、また植物及び微生物には感染しない。但しヒトを含めた他の哺乳動物への感染の成立の可能性はある。

申請している管理方法を用いるかぎり、rSeV/dF-hFGF2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、rSeV/dF-hFGF2はF遺伝子を欠損しているため2次感染粒子の放出がなく、また仮に野生型センダイウイルスと共感染しても相同組換えを起こさないため環境中で増殖することはない。従って、rSeV/dF-hFGF2はやがて環境中から消滅するものと考えられる。

rSeV/dF-hFGF2による*hFGF2*遺伝子発現は患者の下肢骨格筋細胞に限定され、しかも*hFGF2*遺伝子の一過性発現は病原性を持たないので、ヒトに対する影響はないと考えられる。

rSeV/dF-hFGF2由来の増殖性ウイルスの出現については理論的で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、その感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は野生型センダイウイルスと同等であり、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、rSeV/dF-hFGF2により生物多様性を損なうおそれはないと判断される。

以上