

第一種使用規程承認申請書

令和 5 年 2 月 21 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 岡山大学病院
申請者 病院長 前田 嘉信
住所 岡山県岡山市鹿田町二丁目 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（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。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	ヒト REIC/Dkk-3 タンパク質を発現する非増殖性遺伝子組換え 5 型ヒトアデノウイルス (Ad5-SGE-REIC/Dkk-3)
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付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 溶液の保管と調製 (1) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 原液は、バイアルに封入したものを容器に密封した状態で、治療施設内の施設可能な冷凍庫に保管する。 (2) 凍結状態の Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 原液の融解、希釈及び分注の操作は、治療施設内の安全キャビネット内で実施する。 (3) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 原液並びに原液から所定の濃度に希釈された溶液（以下、「Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 溶液」）は、密封した容器に入れて、他の区域と明確に区別された治療室（以下、「治療室」という。）に運搬する。 患者への投与 (4) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 溶液の患者に対する投与は、治療室内において実施する。 (5) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 溶液は注入用穿刺針を用いて、腹部超音波等の監視下に肝腫瘍内（原発性及び転移性肝がん内）へ注入する。 (6) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 溶液の注入部位の周辺（経皮的に注入する場合は穿刺部位の周辺）には、滅菌された不織布を二重に敷き詰める。 (7) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 溶液の注入操作は慎重に行い、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 の漏出及びエアロゾル化を最小限に留める。 投与後の患者の管理 (8) 投与終了後、患者の創部を消毒し、滅菌ガーゼで覆う。ウイルス漏出に留意して、患者を治療室から個室に移送する。 (9) 投与終了後 24 時間まで、患者を個室で管理する。 (10) 検査等の理由で患者が一時的に個室から外に出る場合は、排泄等によるウイルス排出を最小限に留める。 感染性廃棄物の処理 (11) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 溶液は、ウイルス不活化処理を行った後、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づき医療施設で定められている医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」）に従い廃棄する。 (12) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 溶液の投与等の際に用いた注射針、注射器等の器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化処理を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。 (13) 個室における管理中の患者の排泄物等（血液、体液、尿、糞便等をいう。以下同じ。）は、必要に応じて検査を行い、ウイルス不活化処理を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。 (14) 個室における管理中の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、ウイルス不活化処理を行った後、使い捨てとするものにあつては医療廃棄物管理規程に従って廃棄し、再利用するものにあつては十分洗浄する。

遺伝子組換え 生物等の第一 種使用等の方 法	(15) (12)、(13)及び(14)のウイルス不活化処理又は検査を治療室又は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。 臨床検体の取り扱い (16) 臨床検体を用いる検査は、治療施設の規定に従って行う。 (17) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された患者の検体である旨を情報提供して行う。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。 (18) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和45年法律第137号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。 以上
---------------------------------	---

生物多様性影響評価書

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又はキャプシドタンパク質のアミノ酸配列の違いで、少なくとも57のタイプに分けられており（文献1、2、3、4）、ヒトREIC/Dkk-3タンパク質を発現する非増殖性遺伝子組換え5型ヒトアデノウイルス(Ad5-SGE-REIC/Dkk-3)は、ヒトアデノウイルス5型(Ad5)を宿主として作製された（別紙1）。

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）。ヒトアデノウイルス1、2、5、6型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5）。Ad5は、自然界では、ヒトでのみ増殖を伴う感染が起こる（文献1、2）。実験室内では、コット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： Knipe, D. M. ; Howley, P. M. ed. Fields VIROLOGY fourth edition,

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, 2265-2326.

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

文献3： Aoki, K. et al. J. Virology. 2011, 85, 5703-5704.

文献4： Walsh, M. P. et al. J. Clin. Microbiol. 2011, 49, 3482-3490.

文献5： 水田克巳など： 山形県衛生研究所報. 1997, 32, 5-7.

2 使用等の歴史及び現状

ヒトアデノウイルス5型(Ad5)を生ワクチン等に使用した報告はない。Ad5に由来する遺伝子組換えアデノウイルスが遺伝子治療で汎用されている（IV章参照）。

3 生理学的及び生態学的特性（文献1、2及び別紙1）

1) 基本的特性

ヒトアデノウイルス5型(Ad5)のウイルスキャプシドは直径80nmの正二十面体で、エンベロープはない。ゲノムは約36kbの2本鎖である。

2) 生育又は生育可能な環境の条件

Ad5は、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

Ad5は、自然界ではヒトでのみ増殖を伴う感染が起こる（文献1、2）。

4) 繁殖又は増殖の様式

ヒトアデノウイルスは、感染細胞の細胞質に取り込まれ、核内で染色体外遺伝子として存在する。E1AおよびE2遺伝子が発現した後、ウイルスゲノムのDNA複製が開始される。過剰生産されたウイルス粒子構成タンパク質とウイルスゲノムから形成されたウイルス粒子は核内封入体となり、感染細胞の崩壊によりウイルス粒子が細胞外に放出される。

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防止される。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。

Ad5の動物に対する感染性として、コットンラットでは経鼻接種した際に、肺胞内細胞浸潤、肺胞上皮傷害、細気管支周囲細胞浸潤及び血管周囲細胞浸潤の組織学的変化を特徴とする肺の組織病変が認められている（文献6）。また、幼若及び成熟ハムスターに経鼻接種した場合にも肺に組織学的変化が見られ、気管支肺炎、間質性肺炎及び多発性の肺胞虚脱とともに、幼若ハムスターでは気管支及び肺胞上皮細胞において好塩基性の核内封入体が認められている（文献7）。

6) 有害物質の産生性

Ad5の感染で細胞内に産生されるタンパク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8）。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（例えば次亜塩素酸ナトリウム）、グルタールアルデヒド（文献9）。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10）。

文献 6： Prince, G.A. et al. J. Virol. 1993, 67, 101-111.

文献 7： Hjorth, R. N. et al. Arch. Virol. 1988, 100, 279-283.

文献 8： Bardell, D. J. Clin. Microbiol. 1976, 4, 322-325.

文献 9： APIC guidelines for infection control practice

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

文献 10： http://www.yoshida-pharm.com/2012/text05_02_03/#anc_07

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

- ・ CMVプロモーター：Cytomegalovirus
 - ・ ヒトREIC/Dkk-3タンパク質をコードするDNA（REIC/Dkk-3遺伝子；1053bp）：ヒト
 - ・ bovine growth hormone polyA：ウシ
 - ・ hTERTエンハンサー：ヒト
 - ・ SV40エンハンサー：Simian virus
 - ・ CMVエンハンサー：Cytomegalovirus
- 詳細を別紙2に記載する。

2) 構成要素の機能

CMV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タンパク質が発現される。分泌されるREIC/Dkk-3タンパク質は分子量約60kDaの糖タンパク質で、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（構造の模式図を別紙2に記載した）。REIC/Dkk-3タンパク質はDkkファミリーと呼ばれる分泌型タンパク群の一種で、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（ファミリーの構造比較及びREICとWntシグナルとの関係模式図を別紙2に記載した）。

REIC/Dkk-3タンパク質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）の活性化による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11）。さらに、REIC/Dkk-3タンパク質は、サイトカイン様の作用を有し、ヒト単球に作用して、IL-4とGM-CSFによって誘導される未成熟な樹状細胞に類似した細胞を誘導する（文献12）。また、REIC/Dkk-3タンパク質を腫瘍内投与することにより、腫瘍部位へ樹状細胞及びキラーT細胞の集積、脾細胞の抗腫瘍活性の増加を伴って腫瘍が退縮することが認められている（概念図を別紙2に記載した）。

さらに、遺伝子導入により産生されたタンパク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、腎近位尿管細胞）への障害性は認められていない。

これらの供与核酸の導入によって、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3の感染性がヒトアデノウイルス5型（Ad5）から変わることはないと考えられる。また、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3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、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3に増殖性はないと考える。

BGH polyA配列は、REIC遺伝子を発現するためのpolyA配列として挿入されている。また、挿入された 3つのエンハンサー（hTERTエンハンサー、SV40エンハンサー及びCMVエンハンサー）により、REIC/Dkk-3遺伝子を高発現させることが可能である(文献13、14)。特に下流にがん細胞特異的エンハンサーであるhTERTを組み込むことにより、腫瘍選択的なREIC/Dkk-3タンパク質の発現亢進を可能としている（文献15）。

文献 11： Abarzua, F. et al. Cancer Research. 2005, 65, 9617-9622.

文献 12： Watanabe, M. et al. International J. Oncology. 2009, 34, 657-663.

文献 13： Watanabe, M. et al. Oncology Report. 2014, 31, 1089-1095.

文献 14： Sakaguchi, M. et al. Mol. Biotechnol. 2014, 14.

文献 15： Takakura, M. et al. Cancer Research. 1999, 59, 551-557.

2 ベクターに関する情報

1) 名称及び由来

本遺伝子組換えウイルス調製用のプラスミドpAdeno-X/REIC-SGEの作製には、pAdeno-Xを用いた。

2) 特性

pAdeno-X はE1およびE3遺伝子を欠失させたAd5ゲノムの全長から成るプラスミドベクターである。逆方向反復塩基配列末端(ITR)は、アデノウイルスDNAの複製に必要不可欠で、E1/E3を欠損したAd5ゲノムを挟んでいる。pAdeno-X/REIC-SGE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

ヒトアデノウイルス5型(Ad5)のE1領域を供与核酸と置換した(Ad5-SGE-REIC/Dkk-3)の構造概略図及びアデノウイルスベクターの全塩基配列は別紙3参照)。

2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3を作製するため、REIC/Dkk-3遺伝子をpShuttle 2 (Clontech社製)中にクローニングし、哺乳類細胞用のカセットを構築した。これを大腸菌DH5αに導入し、カナマイシ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(pShuttle2/REIC)。次に、pShuttle2/REICにBGH polyAと3つのエンハンサー(hTERTエンハンサー、SV40エンハンサー及びCMVエンハンサー)からなるSGEカセットを挿入し、pShuttle2/REIC-SGEを構築した。これを大腸菌DH5αに導入、カナマイシ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(pShuttle2/REIC-SGE)。

上記の段階で作製したpShuttle2/REIC-SGEをPI-*SceI*、I-*CeuI*にて消化してREIC/Dkk-3発現カセットとSGEカセットを調製し、PI-*SceI*、I-*CeuI*にて消化したAdeno-X viral DNA（Clontech社製）とライゲーションした。そのライゲーション産物を*SwaI*で消化し、大腸菌Stable2 (Invitrogen社製)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。以上により、pAdeno-X/REIC-SGEが作製された。

さらに、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3を作製するため、pAdeno-X/REIC-SGEを、HEK293細胞にトランスフェクションすることによってAd5-SGE-REIC/Dkk-3を作製した。以上の操作により、全長のヒトREIC/Dkk-3遺伝子、並びにSGEカセットがアデノウイルス内に移入された。

3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3は、ヒトアデノウイルス5型（Ad5）のE1ならびにE3領域を欠失している。E1領域に含まれるE1A及びE1B遺伝子の産物はウイルス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HEK293細胞を使って増殖させる。本臨床試験で用いられるAd5-SGE-REIC/Dkk-3の最終製品の製造には、HEK293細胞のマスターセルバンク及びAd5-SGE-REIC/Dkk-3のマスターウイルスバンクが用いられる。本臨床試験では、タカラバイオ株式会社で製造された製剤を使用する予定である（治験薬の製造方法の詳細及び製剤化するまでの工程は別紙4）。

タカラバイオ株式会社で製造された最終製品は、同社にて出荷試験が行われる。最終製品では、増殖性アデノウイルス（RCA）が陰性であることが確認される。

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Ad5-SGE-REIC/Dkk-3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、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3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

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3は、宿主のヒトアデノウイルス5型（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Ad5-SGE-REIC/Dkk-3を検出できる。

Ad5/HSV-tkを用いた前立腺がん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の血中、尿中の検出結果（感度100コピー/μL）では、アデノウイルス投与後、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16）。なお、投与前は全例測定感度以下であった。本測定は、Real-timePCR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。また、岡山大学で実施中のAd5-CAG-REIC (CAGプロモーターを含むAd5-REIC) を用いた前立腺がん遺伝子治療臨床研究では、Ad5-CAG-REICの腫瘍内局所投与が行われた26名の患者(平成27年2月現在)において、Ad5-CAG-REICの投与後、血中では翌日に、尿中では3日目に全例測定感度以下あること確認している(データ未公開)。現在実施中である悪性胸膜中皮腫患者を対象とした本遺伝子治療薬開発においても、同様の検出方法が採用されている。

文献 16 : Nasu, Y. et al. Molecular Therapy. 2007, 15, 834-840.

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3はヒトアデノウイルス5型(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タンパク質群を発現できない。E1領域に含まれるE1A及びE1B遺伝子から作られるタンパク質はウイルス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HEK293細胞)やAd5と共感染した細胞でなければAd5-SGE-REIC/Dkk-3の増殖は起らない。また、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3では外来CMV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、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3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。Ad5-SGE-REIC/Dkk-3由来の増殖性ウイルス(RCA)についても、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。また、当該遺伝子組換えアデノウイルスではE3領域が欠損しており、E3領域がコードするタンパク質群が発現しないが、そのことにより野生型Ad5の生物学的性質との間に著明な相違が生じることはないと考えられる。

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

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3溶液の保管と調製

- (1) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3原液は、バイアルに封入したものを容器に密封した状態で、治療施設内の施設可能な冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態のAd5-SGE-REIC/Dkk-3原液の融解、希釈及び分注の操作は、治療施設内の安全キャビネット内で実施する。
- (3) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3原液ならびに原液から所定の濃度に希釈された溶液（以下「Ad5-SGE-REIC/Dkk-3溶液」という。）は、二重に密封した容器に入れて、他の区域と明確に区別された治療室（以下「治療室」という。）に運搬する。

患者への投与

- (4) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3溶液の患者に対する投与は、治療室内において実施する。
- (5) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3溶液は注入用穿刺針を用いて、腹部超音波等の監視下に肝腫瘍内（原発性及び転移性肝がん内）へ注入する。
- (6) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3溶液の注入部位の周辺には、滅菌された不織布を二重に敷き詰める。
- (7) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3溶液の注入操作は慎重に行い、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3の漏出及びエアロゾル化を最小限に留める。

投与後の患者の管理

- (8) 投与終了後、患者の創部を消毒し、滅菌ガーゼで覆う。患者は、ウイルス漏出に留意して、治療室から個室に移送する。
- (9) 患者は、投与終了後24時間まで、個室で管理する。
- (10) 検査等の理由で患者が一時的に個室から外に出る場合は、排泄等によるウイルス排出を最小限に留める。

感染性廃棄物の処理

- (11) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3溶液は、ウイルス不活化処理を行った後、廃棄物の処理及

び清掃に関する法律（昭和45年法律第137号）に基づき医療施設で定められている医療廃棄物の管理に係る規程(以下、医療廃棄物管理規程)に従い廃棄する。

- (12) (5)、(6) 及び(8)において、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3溶液の投与等の際に用いた注射針、注射器等の器具、並びに布 及びガーゼ類は、ウイルス不活化処理を行った後、医療廃棄物管理規程等に従い廃棄する。
- (13) 個室における管理中の患者の排泄物等（血液、体液、尿、糞便等をいう。以下同じ。）は、必要に応じて検査を行い、ウイルス不活化処理を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。
- (14) 個室における管理中の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、ウイルス不活化処理を行った後、使い捨てとするものにあつては医療廃棄物管理規程に従って廃棄し、再利用するものにあつては十分洗浄する。
- (15) (12)、(13) 及び(14)のウイルス不活化処理又は検査を治療室又は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。

臨床検体の取り扱い

- (16) 臨床検体を用いる検査は、治療施設の規定に従って行う。
- (17) 遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された患者の検体である旨を情報提供して行う。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (18) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和45年法律第137号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

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
増殖性の遺伝子組換えアデノウイルスの排出がないことを確認するために、個室管理とは独立して、患者の血液、尿中あるいは糞便を用いて、必要に応じたモニタリングと検討を行う。

4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

管理中は排泄物が床等に落下した場合は床を消毒薬で掃き清掃する。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薬で掃き清掃する。

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

1) 動物を用いた非臨床試験の結果

体内分布測定をラット及びマウスを用いて実施した。ラットに関しては、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 を用いた前立腺内単回投与による GLP 毒性試験において体内分布測定を実施し、投与部位及び各臓器への分布とともに、投与翌日から経時的 (Day 1、Day 14、Day 28、Day 56/57) に測定を行い、消失傾向を確認した (別紙 5)。

その結果、Day 1 で最も高値を示したのは投与部位の前立腺であり、次いで肝臓であった。その他の臓器にも分布が認められたが、脳、背髄、骨髄及び顎下リンパ節には分布が認められなかった。その後、経時的に減少し、最終測定時点では、前立腺、肝臓、脾臓及び膵臓で認められたが、いずれも Day1 に比較してわずかであった。よって、各種臓器に分布するが、顕著な残存傾向は認められなかった。マウスに関しては、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 とはプロモーター領域が異なる Ad5-CAG-REIC/Dkk-3 を用いた静脈内単回投与試験において体内分布を測定し、各臓器への分布とともに、投与翌日から経時的 (Day 1、Day 7、Day 28) に測定を行い、消失傾向を確認した。その結果、Day 1 では、肝臓、脾臓、結腸及び血液で分布が認められたが、Day 7 の測定時には全て消失した。

同様に Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 を用いたラット静脈内単回投与試験を実施し、体内分布測定を、Day 1、Day 28 に実施した。ベクターは、Day 1 で投与部位、脾臓及び血液に高濃度で認め、低用量と高用量で同様の分布を示していた (別紙 5)。高用量の脾臓及び肝臓で、Day 28 まで、投与量に比して微量のベクターが検出されたが、血液中のベクターは、Day 28 で定量下限未満となった。本試験で、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 の 5.0×10^{10} vp の投与は死亡例がなく、一般状態、体重、摂餌量、尿検査及び剖検時の肉眼的観察にも影響が見られなかった。Day 1 の臨床病理学的検査で、赤血球数が軽度増加し、炎症に対する反応として、好中球、単球、APTT、血小板、フィブリノーゲンの軽微な変動が見られた。また、ビリルビン、AST 及び ALT の変動から、肝胆汁系へ影響が示唆された。全ての臨床病理学的パラメーターの変化は、Day 28 で軽度若しくは消失していた。これら所見は、腹腔内の臓器での病理組織学的所見と相関が見られたことから、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 投与に起因した変化と考えられた。また、Day 1 で、肝臓及び脾臓重量が変化し、同器官に関連する病理組織学的所見が見られたが、Day 28 で所見の発現頻度が低下し、回復傾向が示唆された。上記の全ての所見については、いずれも毒性学的意義のない変化と判断した。一方、 5.0×10^{10} vp を投与した雌の一匹で、投与後 1 日に毒性学的な変化として脾臓に出血が見られた。

肝臓内投与での体内分布測定試験は施行していないが、肝臓腫瘍内投与において漏れた製剤は、静脈内に溢流すると考えられ、上述の静脈内投与試験で代用しうると判断し

た。

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3と類似して、非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルス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の溶液を前立腺がん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 (15,000pg/ml)、投与3日後にはAdv/mIL-12投与前のレベルに低下した。mIL-12の上昇後に脾臓の重量が増加したが、mIL-12レベルの低下に伴い脾臓の重量は正常に復した。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17)。

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であるAdv.RSV-TKを用いたマウスモデルの実験では、Adv.RSV-TK注入1週間後、当該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。Adv.RSV-TKの広がりには前立腺、精嚢、精巣、骨盤リンパ節、消化管及び肝臓において観察された (文献18)。

2) Adv.RSV-TK及びガンシクロビルを用いた臨床研究

岡山大学病院において、2001年以後に前立腺がんに対する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16)。投与後の患者の血液、尿中のAdv.RSV-TK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。

3) Adv-CAG-REICを用いた臨床研究

岡山大学病院で2011-2015年に実施されたAdv-CAG-REIC (CAGプロモーターを含むAd5-REIC) を用いた前立腺がんに対する遺伝子治療臨床研究では、Ad5-CAG-REICの腫瘍内局所投与が行われた26名の患者において、Ad5-CAG-REICの投与後の血中では翌日までに、尿中では2例を除き、3日目までに測定感度以下になっている。なお、初回投与の3日後にPCR法でAdv-CAG-REICが検出された2例においても、初回投与の2週間後の2回目の投与の3日目には検出されなかった。環境中への放出及び医療従事者や面会者への感染についての事例も報告されていない (データ未公開)。さらに、すでにAd5-CMV-REICを用いた悪性胸膜中皮腫に対する岡山大学での遺伝子治療臨床研究、並びにAd5-SGE-REICを用いた悪性胸膜中皮腫の臨床治験 (杏林製薬により、岡山大学、兵庫医科大学、国立がんセンターで実施中) において、「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く第一種使用規定」についての承認を取得済みであり、現在、臨床試験が実施されている。

6 国外における使用等により得られた情報

本申請のAd5-SGE-REIC/Dkk-3については、米国において、前立腺がんを対象に第I相臨床試験が2014年5月より12例に実施され、一過性の発熱以外に問題となる副作用は認められなかった。米国ではカルタヘナ法が適用されていないこと、アデノウイルスベクターを使用する遺伝子治療が多数実施された経験があることから、最近ではアデノウイルスベクターの血液、尿中等で消長についてPCR法による検査は実施されていない。

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3と類似して、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、米国での初期の前立腺がんを対象とした臨床試験において検査が実施されている。すなわち、1996年8月より、放射線治療後の局所再燃前立腺がんに対する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、当該試験においてAdv.RSV-TKを前立腺巣内に局所投与された18名の患者の尿をPCR法にて検査したところ、1例のみ32日後まで検出され、それ以外の患者においては検出されなかった、あるいは1日後～14日後までの間で検出されている（文献19）。

また、肝臓がんの遺伝子治療に関してはAd5-SGE-REIC/Dkk-3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-TK及びAdv-p53を使用した臨床試験が実施されている。以下にその概要を示す。

①スペインにおいて進行肝がんヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ 遺伝子をアデノウイルスベクターで投与した後にガンシクロビルを投与する第I相試験が行われている(文献 20)。肝がん細胞内に発現したチミジンキナーゼの作用によりガンシクロビルが DNA 合成阻害活性を有する毒性物質に変化して抗腫瘍作用を発揮することを期待する治療である。本試験においては、最高 $2 \times 10^{12} \text{vp}$ のアデノウイルス製剤が投与された。アデノウイルスによると思われる一過性の発熱は認められたが、その他特に重篤な副作用は認められなかった。

②中国においてアデノウイルスベクターを用いたがん抑制遺伝子 p53 を導入する製剤 Gendicine が開発されている。肝がんに対しても試験的に投与され、肝がんを経皮的に総量 $3 \times 10^{12} \text{vp}$ を投与した後に、肝がんの通常治療である肝動脈化学塞栓療法が行われた（文献 21,22）。本試験投与においても、特に重篤な副作用は認められていない。更に同薬剤は、20 例の肝がんに対して放射線療法との組み合わせで試験が行われ $1-3 \times 10^{12} \text{vp}$ の製剤が投与されたが、特に重篤な副作用を認めていない（文献 23）。

上述の肝臓腫瘍に対するアデノウイルスベクター投与①②においてもRCA出現の報告はない。非増殖性アデノウイルスに含まれるRCAに関しては、臨床使用経験に基づいた知見を整理した見解が、日米EU医薬品規制調和国際会議のGene Therapy

Discussion Group (ICH-GTD) により公開されている（文献24）。すなわち、2004年6月10日のICH-GTDG会議において、RCAを含有する非増殖性アデノウイルスを高用量投与された症例に関するデータが報告されている。それによると、

- ・がん患者において、種々の投与経路（腫瘍内、肝臓内、腹膜内）によって投与を受けた場合でも、RCAに起因する重篤な副作用はみられなかった。
- ・環境へのリスクという点に関して、RCAが検出可能なポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて検討した結果、RCAの体外への排出は認められなかったことが示された。

故に、RCAが製剤中に仮に含まれていたとしても、ウイルスが生体で増殖し副作用を引き起こすこと、及びウイルスが体外に排出される可能性は低いことが示唆される。

文献 19 : Herman, J. R. et al. Human Gene Ther. 1999, 10, 1239-1249.

文献 20 : Sangro, B. et al. Cancer Gene Therapy 2010, 17, 837-843

文献 21 : Guan, YS. et al. World J Gastroenterol 2005, 11, 3803-3805.

文献 22 : Guan, YS. et al. World J Gastroenterol 2011, 17, 2143-2149.

文献 23 : Zhi-xiang, Y. et al. J Cancer Res Clin Oncol 2010, 136, 625-630.

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微生物の特定

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3の感染性は野生型ヒトアデノウイルス5型(Ad5)と同一と考えられるので、微生物に感染せず、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。また、5型及び5型以外の野生型アデノウイルスと本遺伝子組換え生物が共感染した場合に、野生型アデノウイルスのE1遺伝子がREIC遺伝子発現部位の遺伝子と置き換わったような遺伝子組換え生物が出現する可能性は否定できないが、その確率はきわめて低いと考えられる。仮に、遺伝子組換えウイルスが新たに生じたとしても、その感染性は野生型ウイルスと同等またはそれ以下であり、他の類縁ウイルスに対する影響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い。

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

使用する任意のAd5-SGE-REIC/Dkk-3におけるRCAウイルス出現の頻度については、 3×10^{10} virus particle (vp) に1個未満であることが確認されている。この 3×10^{10} vpに1個未満という数値は前述のICH-GTDG会議で報告された臨床研究のRCA含有量をはるかに下回るものであり、かつFDAの推奨するRCA量の許容基準でもある。すなわち、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3の使用条件において、増殖型ウイルスが仮に出現した場合でも、環境中（患者生体内および排出後の周囲の環境）で増殖することはほぼ不可能であり、当該環境下での増殖能は限りなく低いものと考えられる。

4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

上記1~3) 項より、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規定承認申請書及びⅢ章に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等によるかぎり、生物多様性への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

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3の感染性は野生型ヒトアデノウイルス5型(Ad5)と同一と考えられるので、自然界では、ヒト及び一部の動物が影響を受ける可能性がある(文献1、2)。

2) 影響の具体的内容の評価

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 感染したヒトでの発現は一過性であるが、これまでの動物を用いた試験及び REIC/Dkk-3 遺伝子を発現する類似の Ad5 を用いた臨床研究において病原性は認められていない(文献 24)。

なお、Ad5を宿主とする遺伝子治療用ウイルス(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19)、環境への悪影響に関する報告はない。当該アデノウイルスを用いた米国での遺伝子治療臨床研究において、1999年に初めて遺伝子治療薬の投与に起因する死亡例が発生したが、その後の調査研究により、当該事例は、アデノウイルス大量投与の結果、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25)。製造過程においてRCAが製剤中に混入する可能性が完全には否定できないが、混入したRCAの病原性は野生型Ad5と同等と考えられる。

3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規定承認申請書及びⅢ章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、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3の環境中への拡散は極めて微量である。Ad5-SGE-REIC/Dkk-3は増殖能を失っているので、環境中で増殖することはない。使用するAd5-SGE-REIC/Dkk-3におけるRCAウイルス出現の頻度については、 3×10^{10} vpに1個未満であることが確認されている。この数値はFDAの推奨するRCA量の許容基準でもある。すなわちAd5-SGE-REIC/Dkk-3の使用において、増殖型ウイルスが仮に申請使用において出現した場合でも、その環境中でウイルス増殖することはほぼ不可能であり、増殖能は限りなく低いものと考えられる。

4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

上記1~3) 項より、第一種使用規定承認申請書及びⅢ章に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用法等の方法によるかぎり、病原性に起因した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 24 : 桃太郎源株式会社社内資料、 A SINGLE DOSE INTRA-PROSTATE TOXICITY AND BIODISTRIBUTION STUDY IN RATS WITH AD5-SGE-REICDKK3(GLP)

文献 25 : Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Human Gene Therapy. 2002, 13, 3-13.

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

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3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

上記1~3) 項より、有害物質の産生性について、第一種使用規定承認申請書及びⅢ章に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等によるかぎり、生物多様性への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又は他の微生物の特定

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3の感染性は野生型ヒトアデノウイルス5型（Ad5）と同一と考えられるので、自然界では、ヒト及び一部の動物が影響を受ける可能性がある（文献1、2）。

2) 影響の具体的内容の評価

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3が感染したヒトや動物で一過性にREIC/Dkk-3遺伝子を発現する可能性はあるが、これによる第三者や他の動物への水平伝達は知られていない。

また、5型及び 5 型以外の野生型アデノウイルスと本遺伝子組換え生物が共感染した場合には、本遺伝子組換え生物が増殖する可能性、すなわち自己増殖可能なRCAが出現する可能性は完全には否定できない。その場合に想像されるこれらウイルス間の相同組換えにより生じうる変異体としては、例えばAd5-SGE-REIC/Dkk-3のREIC遺伝子発現部位の遺伝子が5型及び 5 型以外の野生型アデノウイルス由来のE1遺伝子に置き換わったような遺伝子組換え生物が出現する可能性は否定できないが、その確率はきわめて低いと考えられる。また、仮に、遺伝子組換えウイルスが新たに生じたとしても、その遺伝子組換え生物の生物学的な性質については、元々のAd5-SGE-REIC/Dkk-3アデノウイルスが感染性（水平伝達に関連する感染性を含む）・病原性を司る遺伝子に改変を加えていないことから、野生型の5型アデノウイルスと同等であると考えられる。また、アデノウイルスゲノムは動植物ゲノムに組み込まれないことから、他の類縁ウイルスに挿入された REIC/Dkk-3 遺伝子が、野生動植物に水平伝達される可能性は極めて低いと考えられる。

3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規定承認申請書及びⅢ章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、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3及びAd5-SGE-REIC/Dkk-3由来RCAの環境中への拡散は極めて微量である。Ad5-SGE-REIC/Dkk-3は増殖能を失っているため、患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、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3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Ad5-SGE-REIC/Dkk-3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、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3はやがて環境中から消滅すると考えられる。

4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本稿1~3)より、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規定承認申請書及びⅢ章に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等によるかぎり、生物多様性への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

第一種使用規定承認申請書及びⅢ章に記載した遺伝子組換え生物の第一種使用等の方法によるかぎり、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3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。また、これまでの動物を用いた予備的実験により、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3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る。対象は前立腺がんではあるが、すでにAd-CAG-REICを用いた遺伝子治療が実施されており、平成27年2月までに計26症例で治療が実施され、主要評価項目であるAd-CAG-REICを用いた遺伝子治療臨床研究の安全性については、確認されている（文献26、27）。同様に、前立腺がんを対象にAd5-SGE-REIC/Dkk-3を使用する第1相臨床試験が米国で実施され、安全性は確認されている。なお、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3が感染する動植物等の種類は野生型ヒトアデノウイルス5型（Ad5）と同等で、自然界で感染する対象はヒトのみである。

結論として、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、第一種使用規定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、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3使用により「他の微生物を減少させる性質」、「病原性」、「有害物質の産生性」及び「核酸を水平伝達する性質」のいずれかに起因した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26 : Kumon, H. et al.: Clin Med Insights Oncol. 2015, 9, 31-38.

文献27 : Kumon, H. et al.: Clin Transl Sci. 2015, 8, 837-40.