

第一種使用規程承認申請書

平成30年2月21日

厚生労働大臣 加藤 勝信 殿
環境大臣 中川 雅治 殿

氏名 杏林製薬株式会社
申請者 代表取締役社長 穂川 稔
住所 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

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	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	<p>1 希釈液の調製</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物等が含まれる原液（以下「原液」という。）は、容器（バイアル）に封入し、密封した状態で、治療施設内の適切に管理されたディープフリーザーに保管する。</p> <p>(2) 原液の希釈は、治療施設の規定に従って行う。</p> <p>(3) 原液又は所定の濃度に希釈された溶液（以下「原液等」という。）は密封した状態で、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。</p> <p>2 患者への投与</p> <p>(1) 原液等の患者に対する投与は、治療室内において実施する。</p> <p>(2) 患者への投与は、患者の胸腔内又は胸膜腫瘍内へ原液等を注入することにより行う。</p> <p>(3) 原液等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。</p> <p>(4) 原液等の注入操作は、慎重に行い、本遺伝子組換え生物等の漏出及びエアロゾル化を最小限に留める。</p> <p>(5) 原液等の投与終了後、患者の創部を消毒し、滅菌ガーゼで覆い、患者からのウイルス漏出に留意する。</p> <p>(6) 原液等の投与終了後、必要に応じて治療室の床を消毒する。</p> <p>3 患者等の管理</p> <p>(1) 滅菌ガーゼによる創部の被覆は、医師の判断により必要とされる期間継続する。</p> <p>(2) 原液等の投与を受けた患者が外部医療施設で治療を受ける際は、第一種使用等の承認を受けている遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者であることが情報提供されるよう、患者に適切な指導を行う。</p> <p>4 患者検体の取扱い</p> <p>(1) 治療施設その他外部医療施設（以下「施設等」という。）で、患者から採取した検体は、施設等の規定に従って取り扱う。検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合には、検体は検査機関の規定に従って取り扱う。</p> <p>(2) 施設等から検査機関への検体の運搬は、本遺伝子組換え生物等が拡散しない構造の容器に入れて行い、胸水及び血液検体を運搬する際には、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する。</p>

5 感染性廃棄物等の処理

- (1) 原液等、1、2で用いた機器や材料等、並びに患者から採取した胸水及び血液検体は、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）の要件を満たす当該施設等及び検査機関で定められ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」という。）に従い、施設等及び検査機関内で不活化処理を行った後、医療廃棄物として廃棄するか、又は原液等並びに患者から採取した胸水及び血液検体が漏出しない、密封容器に入れ、他の医療廃棄物とは区別して保管し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和46年9月23日政令第300号）の別表第Iの4の項で定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。
- (2) 投与部位と接触したガーゼ類や、本遺伝子組換え生物等が付着した器具や材料等については、医療廃棄物管理規程に従って、施設等及び検査機関内で不活化処理を行った後、医療廃棄物として廃棄するか、又は厳重な密閉を行い、他の医療廃棄物とは区別して保管し、感染性廃棄物として廃棄する。ただし、再利用するものにあつては、不活化処理を行う。
- (3) 患者検体は、施設等及び検査機関の医療廃棄物管理規程に従って廃棄する。

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: 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）。

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蛋白質とウイルスゲノムから形成されたウイル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。

(4) 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）。

(5) 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。

(6) 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/text/05/5_2_3html

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（塩基配列は別紙3）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（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（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）。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）への障害性は認められていない（別添：  ）。

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に増殖性は無いと考える。

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. Interbational 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を作成するために、まず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DH5 α 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へBGH polyA+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) の形でSGEカセットを挿入し、構築した。pShuttle2/REIC中にクローニングし、これを大腸菌DH5 α に導入した。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)。続いてpShuttle2/REIC-SGE からREIC/Dkk-3発現カセットを組換え、REIC/Dkk-3発現pAdeno-X/REIC-SGEを構築した。上記の段階で作製したpShuttle2/REIC-SGEをPI-SceI、I-CeuIにて消化し、REIC/Dkk-3発現カセットを調整し、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、

REIC/Dkk-3発現pAdeno-X/REIC-SGEが作成された。さらにAd5-SGE-REIC/Dkk-3を作成するために、この構築した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

にて出荷試験が行われる。最終製品は医療施設に運搬され、ディープフリーザー内に保管される。

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の血中、尿中の検出結果 (感度100コピー/mL) 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。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) を用いた前立腺癌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患者において、Ad5-CAG-REICの

投与後、血中では翌日に、尿中では56日目に全例測定感度以下あること確認している（別紙10、表10-1）。

現在実施中である悪性胸膜中皮腫患者を対象としたAd-SGE-REICの第I/II相臨床試験（Ad-SGE-REIC-I101試験）においては、Day5（2回目投与終了翌日）以降に各患者の血液、尿、糞便、及び唾液が採取され、アデノウイルスDNA残存を検索している。Day5以降、4例に血中でアデノウイルスDNAが検出され、最長でDay32まで検出されたが、時間経過と共にDNA残存は減少傾向にあり、その他の検体では定量下限以下あるいは検出限界以下であった（別紙10、表10-2）。また、アデノウイルスDNA残存が検出された。高用量群（ 3.0×10^{12} vp）のAd5-SGE-REIC/Dkk-3を投与した患者全てにおいて、Day4（2回目投与前）以降の胸水中のアデノウイルスDNAを測定した。高用量群の患者全てにおいてアデノウイルスDNAが検出されたが、経時的に検体が採取されたREIC-I101-02-01の症例における測定結果からはDay5以降、DNA残存は減少傾向にあることが示唆された（別紙10、表10-3）。

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蛋白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の増殖は起こらない。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）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。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無いと考えられる。

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

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 希釈液の調製

- (1) 本遺伝子組換え生物等が含まれる原液（以下単に「原液」という。）は、容器（バイアル）に封入し、密封した状態で、治療施設内の適切に管理されたディープフリーザーに保管する。
- (2) 原液の希釈は、治療施設の規定に従って行う。
- (3) 原液又は所定の濃度に希釈された溶液（以下「原液等」という。）は密封した状態で、他の区域と明確に区別された治療室（以下単に「治療室」という。）に運搬する。

2 患者への投与

- (1) 原液等の患者に対する投与は、治療室内において実施する。
- (2) 患者への投与は、患者の体腔内又は腫瘍内へ原液等を注入することにより行う。
- (3) 原液等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。
- (4) 原液等の注入操作は、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。
- (5) 原液等の投与終了後、患者の創部を消毒し、滅菌ガーゼで覆い、患者からのウイルス漏出に留意する。
- (6) 原液等の投与終了後、必要に応じて治療室の床を消毒する。

3 患者等の管理

- (1) 滅菌ガーゼによる創部の被覆は、医師の判断により必要とされる期間継続する。
- (2) 原液等の投与を受けた患者がその他の外部医療施設で治療を受ける際は、第一種使用等の承認を受けている遺伝子組換え生物等の投与を受けたことが情報提供されるよう患者に適切な指導を行う。

4 患者検体の取り扱い

- (1) 治療施設及びその他の外部医療施設（以下、「施設等」という。）で、患者から採取した検体は、施設等の規定に従って取り扱う（通常診療で患者検体と同様に取扱うことを可能とする）。検体の検査が外部の受託検査機関（以下、「検査機関」という。）に委託される場合には、検体は検査機関の規定に従って取り扱う（一般の受託と同様に扱うことを可能とする）。
- (2) 施設等から検査機関への検体の運搬は、本遺伝子組換え生物等が拡散しない構造の容器に入れて行い、胸水及び血液検体については、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する。

5 感染性廃棄物等の処理

- (1) 原液等、1、2 で用いた機器や材料等、及び患者から採取した胸水及び血液検体は、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）の要件を満たす当該施設等及び検査機関で定められ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」という。）に従い、施設等検査機関内で不活化処理を行った後、医療廃棄物として廃棄するか、又は原液等患者から採取した胸水検体及び血液検体が漏出しない、密封容器に入れ、他の医療廃棄物とは区別して保管し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和46年9月23日政令第300号）の別表第Iの4の項で定める感染性廃棄物（以下単に「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。
- (2) 投与部位や、本遺伝子組換え生物等が付着した器具や材料等については医療廃棄物管理規程に従い、施設等及び検査機関内で不活化処理を行った後、医療廃棄物として廃棄するか、又は厳重な密閉を行い、他の医療廃棄物とは区別して保管し、感染性廃棄物として廃棄する。ただし、再利用するものにあつては、不活化処理を行う。
- (3) 患者検体を用いる臨床検査は施設等及び検査機関の規定に従って行い（通常業務で扱う患者検体と同様に取扱うことを可能とする）、当該患者検体は、医療廃棄物管理規程に従って廃棄する。

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

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、患者の唾液、血液、尿中あるいは糞便を用いて、必要に応じて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

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3投与後の胸水、血液が床等に落下した場合は、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。

①Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 を用いた雄性ラット前立腺内単回投与毒性試験（GLP）

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 (Day 1) 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 8)。その結果、投与翌日 (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、経時的に減少を示し、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、いずれも投与翌日 (Day 1) に比較してわずかであった。よって、各種臓器には分布を示すが、顕著な残存傾向

は認められなかった。

②Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 を用いたラット胸腔内投与毒性試験 (GLP)

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 を用いた胸腔内投与 (Day 0 及び Day 3) 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 4、Day 17、Day 31、Day 59) に測定を行い、消失傾向を確認した (別紙 9 表 9-1)。その結果、Day 4 で高値を示したのは胸腔内組織 (肺、心臓、胸腺、大動脈、投与部位) であり、その他の臓器 (肝臓、脾臓、血液、副腎、精巣上体、顎下及び腸間膜リンパ節、腎臓、精巣、卵巣) にも分布が認められたが、胸腔内組織と比較して低く、脳では分布が認められなかった。その後、経時的に減少を示し、Day 31 及び Day 59 では胸腔内組織 (肺、心臓、胸腺、大動脈、投与部位) のみで分布が認められたが、いずれも Day 4 に比較してわずかであった。よって、投与部位である胸腔内組織を中心とした分布を示すが、顕著な残存傾向は認められなかった。

③Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 を用いたラット静脈内投与毒性試験 (GLP)

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 を用いた静脈内単回投与による 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、投与翌日及び投与後 28 日 (Day 1、Day 28) に測定を行い、消失傾向を確認した (別紙 9 表 9-2)。その結果、投与翌日 (Day 1) で高値を示したのは、投与部位、脾臓及び血液であった。その後、経時的に減少を示し、投与後 28 日 (Day 28) では脾臓と肝臓で分布が認められたが、投与翌日 (Day 1) に比較して 95%以上が消失し、顕著な残存傾向は認められなかった。

④Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 を用いたラット 13 週反復胸腔内投与毒性試験 (GLP)

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 を用いた胸腔内投与 (Day 0, 3, 17, 31, 45, 59, 73 及び 87) 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、経時的 (Day 4, 18, 32 及び 88) に測定を行い、消失傾向を確認した (別紙 9 表 9-3)。投与 4 日 (Day 4) において、胸腔内臓器及び器官 (投与部位、食道、肺、心臓、胸部大動脈及び胸腺) に高い分布が見られた。2 例の動物の投与部位で定量下限を下回ったのを除き、最終投与の翌日である投与 88 日にも微量のアデノウイルスベクターが検出された。各組織中のアデノウイルスベクター量は、投与期間の経過とともに投与初期に比して減少し、反復投与による蓄積性は認められなかった。

⑤Ad5-CAG-REIC/Dkk-3 を用いたマウス静脈内投与毒性試験 (非 GLP)

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3 とはプロモーター領域が異なる前世代の 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測定を実施し、各臓器への分布とともに、投与翌日 (Day 1) 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、投与翌日 (Day 1) では、肝臓、脾臓、結腸及び血液で分布が認められたが、投与後 7 日 (Day 7) の測定時には全て消失した。

⑥その他のアデノウイルスベクターを用いたマウスにおける生体内分布測定

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 の溶液を前立腺癌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 (15000 pg/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、Ad. 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）の前立腺癌患者にAdv. RSV-TKの投与を行った（文献13）。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られたが多くの場合は2日目に消失した。

（3） Adv-CAG-REICを用いた臨床研究

岡山大学病院においてAd5-CAG-REIC（CAGプロモーターを含むAd5-REIC）を用いた前立腺癌に対する遺伝子治療臨床研究が行われた（文献19）。Ad5-CAG-REIC/Dkk-3をDay0及びDay14の2週間隔で2回、腫瘍内投与を行い、その後検出されるアデノウイルスDNAは血中ではほぼ認められず、最大用量 3.0×10^{12} vp投与群の一部で少量認められたものの、明らかに消失又は減少していることが確認された。尿中でも排泄されるアデノウイルスDNAは最大でも 3.7×10^4 copy/mLであり、時間と共に消失又は減少傾向であった（別紙10、表10-1）。なお、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。

（4） Ad5CMV-p53を用いた臨床研究

岡山大学附属病院を中心に1999年3月から非小細胞癌に対するAd5CMV-p53を用いた第I相臨床試験が行われ、患者からの血液、尿、便、リンパ節などでのAd5CMV-p53の有無をPCR法で検出したところ、血液中には3日目まで検出され、咽頭うがい液からは13日後にも検出されたが、尿中には投与後に検出されず、環境への拡散の危険について報告は無い。また、千葉大学医学部附属病院で実施された食道癌に対するAd5CMV-p53を用いた第I/II相臨床研究では、食道癌患者10名に対しAd5CMV-p53投与から一週間後に患者の血液、尿、糞便中のAd5CMV-p53検出試験を46回行い、45回は陰性、1回のみ糞便に陽性で、この患者は隔離解除を延期し12日目に陰性となった。なお、医療従事者への感染は当該従事者の健康状態からみてないものと考えられ、環境中への拡散の可能性はないと考えられることが報告されている。（平成25年7月12日付、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）

(5) Ad5-SGE-REIC/Dkk-3を用いた国内臨床試験

悪性胸膜中皮腫患者を対象としたAd-SGE-REIC の第I/II 相臨床試験(Ad-SGE-REIC-I101 試験)が2015年より実施されており、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3を 3.0×10^{11} vp から 3.0×10^{12} vpの投与が終了している(本試験は現在も進行中)。本試験では、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3をDay1、4に胸腔内投与し、安全性や有効性評価に加え、アデノウイルス排出の有無を検討している。Day5(2回目投与終了翌日)以降に各患者の血液、尿、糞便、及び唾液が採取され、アデノウイルスDNA残存を検索している。4例にDay5以降も血中でアデノウイルスDNAが検出され、最長でDay32まで検出されたが、時間経過と共にDNA残存は減少傾向にあった。尿、糞便及び唾液の検体では定量下限以下あるいは検出限界以下であった(別紙10、表10-2)。また、高用量群(3.0×10^{12} vp)のAd5-SGE-REIC/Dkk-3を投与した患者において、Day4(2回目投与前)以降の胸水中のアデノウイルスDNA残存を測定した。高用量群の患者全てにおいてアデノウイルスDNAが検出されたが、経時的に検体が採取されたREIC-I101-02-01の症例における測定結果からはDay5以降、DNA残存は減少傾向にあることが示唆された(別紙10、表10-3)。

文献17: Hull, G.W. et al. Clin. Cancer Res. 2000, 6, 4101-4109.

文献18: Timme, T. L. et al. Cancer Gene Ther. 1998, 5, 74-82.

文献19: Kumon, H. et al. Cancer Gene Ther. 2016, 23, 400-409.

6 国外における使用等により得られた情報

国外では現在、前立腺がん患者を対象とした臨床試験(NCT01931046試験)が実施中である。Ad5-SGE-REIC/Dkk-3を 3.0×10^{11} vpから最大 3.0×10^{12} vpの用量まで6週間隔で4回腫瘍内に投与し、本品と因果関係が否定できない有害事象はいずれも軽度又は中等度のものであり、重篤な有害事象は発現していないと考えられる(文献20)。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、前立腺癌における国外での使用が実施されている。1996年8月より、放射線治療後の局所再燃前立腺癌に対するAdv. RSV-TK及びガンシクロピルの併用療法の第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21)。

また、悪性胸膜中皮腫の遺伝子治療に関しては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/TK及びCMVプロモーターを有するAdv/IFN-beta及びAdv/IFN-alphaの使用が実施されている。以下にその概要を示す。

- ① 1995年よりAdv. RSV-TKによる遺伝子治療第I相臨床試験が実施され、26名の悪性中皮腫患者に対してHSV-tk遺伝子が組み込まれたAdv/TKを胸腔内へ直接に単回投与し、その後、ガンシクロピル5mg/kgを全身投与した。Adv/TKの投与量を 5×10^{10} vpから 5×10^{13} vpまで約3倍ずつ増量し、一部の症例でステロイドの追加投与を行っているが、安全性に問題なく忍容性が高いことが確認されている[一過性リンパ球減少 (grade4) 1例、肝機能異常 (grade3) 1例、そ

の他の事象などが発現]。その後1998年6月からは、E1/E3欠失からE1/E4欠失ウイルスへ変更したAdv. RSV-TKにて8例への単回投与（ガンシクロビル5mg/kg追加投与5例、ガンシクロビル7.5mg/kg追加投与3例）が行われたが、重篤な有害事象は発生せず、安全性に問題なく忍容性が高いことが確認され、最大耐量に満たないことが確認されている（文献22）。

- ② IFN-beta遺伝子が組み込まれたAdv/IFN-betaによる遺伝子治療第I相臨床試験が2003年4月から開始された。悪性胸膜中皮腫患者7例、悪性胸水を伴う非小細胞肺癌患者2例、卵巣癌患者1例に対して胸腔内への直接単回投与が行われ、投与開始量である 9.0×10^{11} vpでは重篤な副作用は認められなかったが、1段階投与量を増やした 3.0×10^{12} vpでは4例中2例で重篤な低酸素血症（grade3）、肝機能障害（grade3）がそれぞれ独立して認められ、最大耐量は 9.0×10^{11} vpとされた。なお、低酸素血症を認めた症例は併存疾患として慢性心不全を伴っており、肝機能障害を認めた症例は以前、悪性リンパ腫のため腹部に放射線治療の既往が存在していた（文献23）。上記10症例の中で3例の患者から、Adv/IFN-beta投与4日後まで血清中よりPCRによって当該アデノウイルスが検出された。

また、Adv/IFN-betaの2回投与による遺伝子治療第I相試験が2006年3月から開始された。悪性胸膜中皮腫患者10例を含む計17例の患者に対して 3×10^{11} vp、 1×10^{12} vp及び 3×10^{12} vpの3用量での胸腔内への投与が行われ、結果的に最大耐量に満たないことが確認されている（14例は投与間隔を2週間、3例は投与間隔を1週間とされている）。重篤な副作用は1例発現しているが、 3×10^{12} vpを投与した高齢の男性の胸膜転移性肺腺がん患者1例において予期しない重篤な副作用として、呼吸困難、嘔吐及び心タンポナーデが認められた。なお、心膜穿刺術により取り除いた心膜液中にはアデノウイルスベクター及びIFN-betaは検出されず、アデノウイルスの反復投与の際に起こる炎症反応によるものと考察されている。予期せぬ副作用として部分トロンボプラスチン時間値が上昇した症例が確認されたが、長期の経過観察中、出血、凝固異常も含めとくに付随する症状は発現しなかった（文献24）。

- ③ IFN-alpha遺伝子が組み込まれたAdv/IFN-alphaによる遺伝子治療第I相試験が2009年2月から実施された。悪性胸膜中皮腫患者計9例に対して、3例は 1×10^{12} vp、6例は 3×10^{11} vpの2用量での胸腔内への投与が行われており、アデノウイルスベクター投与に関しての忍容性は高いと考えられるが、予期せぬ事象として、IFN-alphaの発現レベル上昇によるインフルエンザ様症状、及びカテーテル留置による感染が確認されている（文献25）。

RCAを含む遺伝子組換えアデノウイルスの増殖能に関して、臨床使用経験に基づいた知見を整理した見解・声明が、日米EU医薬品規制調和国際会議（The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use；ICH）及び、Gene Therapy Discussion Group（ICH-GTD）によりcommunication paperとして公開されている（別紙7）。すなわち、2004年6月10日のICH-GTDG会議において、多量の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米国研究製薬工業協会（PhRMA）によりとりまとめられ、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、現在用いることのできる最も感度の高いRCA検出法があるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によってRCAの体外への排出は認められなかったことが、データから示唆された。
- ゆえに、RCAが製剤中に仮に多量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ことが考えにくく、その増殖型ウイルスの当該環境中での増殖能が低いことが示唆される。

文献 20 : Study of a Recombinant Adenovirus to Treat Localized Prostate Cancer (NCT01931046 試験) , Safety Report (November 22, 2015)

文献 21 : Herman, J. R. et al. Human Gene Ther. 1999, 10, 1239-1249.

文献 22 : Sterman, D.H. et al. Clin. Cancer Res. 2005, 11, 7444-7453.

文献 23 : Sterman, D.H. et al. Clin. Cancer Res. 2007, 13, 4456-4466.

文献 24 : Sterman, D.H. et al. Molecular Therapy. 2010, 18, 852-860.

文献 25 : Sterman, D.H. et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2011, 184, 1395-1399.

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、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。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。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、Biooutsource Limited、1 Technology Terrace Todd Campus (Glasgow, G20 0XA) の品質検査において、 3×10^{10} virus particleに1個未満であることが確認されている。この 3×10^{10} virus particle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。すなわち使用するAd5-SGE-REIC/Dkk-3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（患者生体内および排出後のその周囲の環境）でウイルス増殖することはほぼ不可能であり、その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

(1)～(3)より、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書及び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

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 26)。

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21)、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27)。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

Ad5-SGE-REIC/Dkk-3の感染する生物種の種類、感染経路、伝搬様式等は、野生型 Ad5 と同様であるとされる。前立腺癌患者を対象としたアデノウイルスベクターの腫瘍内投与及び悪性胸膜中皮腫患者を対象としたAd5-SGE-REIC/Dkk-3の胸腔内投与では、採取された検体中のアデノウイルスDNAは、投与後の時間経過に伴い消失又は減少傾向を示しており、環境中での増殖は認められていない。従って、第一種使用規程承認申請書及びⅢ章に記載した遺伝子組み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ないか、あったとしても極めて微量である。また、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3は増殖能を有さず、RCAウイルス出現の頻度は、 3×10^{10} virus particleに1個未満であることが確認されており、増殖型ウイルスが申請使用において出現した場合でも、その環境中で増殖することはほぼ不可能である。これらを踏まえるとAd5-SGE-REIC/Dkk-3が被験者以外の人に病原性を示す可能性は、ほぼ無いと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

(1)～(3)より、第一種使用規程承認申請書及び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、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 26 : 社内資料、 A SINGLE DOSE INTRA-PROSTATE TOXICITY AND BIODISTRIBUTION STUDY IN RATS WITH AD5-SGE-REICDKK3 (GLP)

文献 27 : 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

(1)～(3)より、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書及び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

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

第一種使用規程承認申請書及び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

(1)～(3)より、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書及び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

第一種使用規程承認申請書及び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、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こと、及び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低いことが考えられる。また、Ad5-SGE-REIC/Dkk-3の臨床での使用経験において、悪性胸膜中皮腫又は前立腺がん患者に胸腔内又は腫瘍内投与を実施しており、一部の症例で僅かにアデノウイルスDNAの血中への蓄積性が確認されたが、投与後早期に消失又は経時的に減少傾向にあった。また、胸水中においては、投与後アデノウイルスDNAの残存が確認されているが経時的に減少傾向にあり、増殖性が示唆されないことからRCAの懸念は生じていないと考えられる。

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、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。