

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

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

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

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性 (文献7)

MoMLV は直径約 100 nm の球形ウイルスであり、ウイルスゲノムを内包するコアとそれを取り囲むエンベロープ (外被) からなる。コアは主としてカプシド蛋白質 (CA) により構築されており、その中に 2 分子の RNA ゲノムを有する。そのほか、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、プロテアーゼ (PR)、核酸結合蛋白質 (NC) もコア内部に存在する。コアの周囲にはウイルス産生細胞の細胞膜に由来する脂質二重膜のエンベロープが存在する。エンベロープとコアの間にはマトリックス蛋白質 (MA) が存在する。エンベロープには膜貫通蛋白質 (TM) が突き刺さっており、それに表面蛋白質 (SU) が弱く結合している。SU と TM の複合体はウイルス粒子のエンベロープ上で多量体を形成する。

(2) 生息又は生育可能な環境の条件

他のウイルスと同様に、MoMLV は宿主細胞に感染した場合にのみ増殖が可能である (I-3-(4) 「繁殖又は増殖の様式」参照)。レトロウイルスは比較的不安定なウイルスであり、体液中、培地中等の限られた環境中でしか感染性を保持できない。なお、ショ糖とゼラチンを添加して凍結乾燥を行うと安定に保存できるとの報告がある (文献8)。

(3) 捕食性又は寄生性

MoMLV はマウス及びラットの細胞に感染した後、そのゲノムが逆転写酵素により DNA に逆転写され、プロウイルスとして細胞の染色体に組み込まれる。宿主細胞が増殖分裂する時には、染色体の一部として同時に複製され、娘細胞へと受け継がれて行く。MoMLV は他の生物を捕食することはない。

(4) 繁殖又は増殖の様式

レトロウイルスはキャリアーである動物の血液中や体液中に存在し、他の個体がそれに接触することにより感染する。レトロウイルスが細胞に感染し増殖するときは、1) 吸着、2) 侵入、3) 逆転写、4) 宿主染色体への組み込み、5) RNA 合成、6) 蛋白質合成、7) アセンブリ、8) 出芽といった各段階を経る。一方、レトロウイルスのゲノム配列が細胞の染色体中にプロウイルスとして組み込まれている場合には、細胞分裂時に同時に複製されて娘細胞へ分配されるが、生殖系細胞に導入された場合には動物の繁殖によって子孫に受け継がれることになる。

野生型 MoMLV がヒト細胞に感染することはない。ヒト細胞に感染可能なエンベロープ蛋白質

(env 蛋白質) [例えば、4070A アンフトロピック env 蛋白質、gibbon ape leukemia virus (GaLV) env 蛋白質] を持つ MoMLV を人為的に作製した場合にはヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスター細胞への感染が可能である。

(5) 病原性 (文献 9)

MoMLV の病原性に関して、下記のことが報告されている。

- 1) MoMLV は、マウスに悪性腫瘍を含む多様な疾患を発生させる。マウスで起こる疾病・病態としては、白血病、リンパ腫、貧血、免疫不全、腫瘍及び神経変性がある。
- 2) レトロウイルスはランダムに宿主染色体に挿入されるため、細胞機能に重要な遺伝子を活性化又は不活化し、がん性の変化をもたらす危険性がある。レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 治療の遺伝子治療で、がん遺伝子である LMO-2 の近傍にレトロウイルスが組み込まれたために LMO-2 蛋白質の異常発現を招き、それが 3 年後に白血病を発症する原因の一つとなったことを示唆する報告が出されている (文献 10)。
- 3) 内在性ウイルスとの組換えにより増殖性レトロウイルス (replication competent retrovirus: RCR) が出現する可能性がある。
- 4) MoMLV はマウスやラットにのみ感染するので、ヒトに対する感染性及び病原性はない。
- 5) 感染により宿主細胞が破壊されることはない。

(6) 有害物質の産生性

MoMLV が有害物質を産生することはない。また、MoMLV に感染したことにより細胞が有害物質の産生能を獲得するとの報告はない。

(7) その他の情報

MoMLV の不活化条件

MoMLV についての詳細な不活化条件の報告はないが、同じレトロウイルス科に属するヒト免疫不全ウイルス (HIV) の滅菌、消毒法を以下にあげる。

- ① 121℃、20 分間の蒸気滅菌
- ② 170℃、2 時間の乾熱滅菌
- ③ 20～30 分間の煮沸消毒
- ③ 有効塩素濃度 0.1～1.0%の次亜塩素酸ナトリウム
- ④ 70%エタノール又は 70%イソプロピルアルコール
- ⑤ 3.5～4%ホルマリン
- ⑥ 2%グルタラル (以上文献 11)
- ⑦ 10%及び 1%ポピドンヨード液 (文献 12)

⑧ 0.3%過酸化水素水 (文献 13)

紫外線及び熱による液体中の MoMLV 及び HIV の不活化を比較した研究によると (文献 14)、MoMLV を 1/10 まで不活化するのに必要な紫外線照射量 (D_{10}) は 2,800 erg/mm² であり、熱処理時間 (T_{10}) は 50℃では 50 秒、55℃では 20 秒、70℃では 8 秒である。したがって、55℃、2 分間又は 70℃、50 秒間の熱処理により、MoMLV の感染価を 1/10⁶ に低下させることができると考えられる。また、50℃における T_{10} が 80~90 秒であるとの報告もある (文献 15)。

マウス由来のウイルス産生細胞により産生されたレトロウイルスベクターが仮にヒト体内に侵入したとしても、ヒト血清 (補体) により速やかに不活化される (文献 16)。抗 α -galactosyl 自然抗体を有する旧世界ザル (文献 17) の体内に侵入したときにも同様のメカニズムにより不活化される (文献 18) と考えられる。

- 文献 7 : 遺伝子治療開発研究ハンドブック (1999) 第 3 章、第 2 節、1.1 レトロウイルスの増殖サイクル (p. 322)
- 文献 8 : Levy JA and Fieldsteel AH. Freeze-drying is an effective method for preserving infectious type C retroviruses. *J Virol Methods* 5:165-171, 1982.
- 文献 9 : 遺伝子治療開発研究ハンドブック (1999) 第 6 章、第 2 節、1. ウイルスベクターの安全性 (p. 627)
- 文献 10 : Hacein-Bay-Abina S, et al. LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 *Science* 302:415-419, 2003
- 文献 11 : 日本ウイルス学会. ウイルス研究におけるバイオセーフティ指針. *ウイルス* 43:199-232, 1993.
- 文献 12 : 加藤真吾、平石佳之、富永恵子、他. プラーク法を用いた各種消毒剤による HIV-1 不活化の検討. *基礎と臨床* 30:3615-3620, 1996.
- 文献 13 : Martin LS, McDougal JS, and Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152:400-403, 1985.
- 文献 14 : Yoshikura H. Thermostability of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in a liquid matrix is far higher than of an ecotropic murine leukemia virus. *Jpn J Cancer Res* 80:1-5, 1989.
- 文献 15 : Yoshikura H. Ultraviolet sensitivity of helper function of murine leukemia virus. *Arch Biochem Biophys* 154:76-83, 1973.
- 文献 16 : Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, Okada H, Weiss RA, and Collins MK. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* 68:8001-8007, 1994.
- 文献 17 : Galili Uri, Tanemura M. Significance of α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) Epitopes and α 1,3 Galactosyltransferase in Xenotransplantation. *Trends Glycosci Glycotechnol* 11:317-327, 1999.
- 文献 18 : Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, et al. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti- α -galactosyl natural antibody. *J Exp Med* 182:1345-1355, 1995.

II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1 供与核酸に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

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

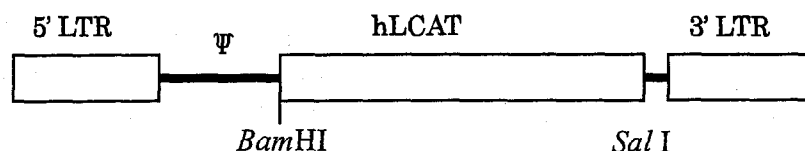


図 1. CGT_hLCAT RV 遺伝子の構造概略図

1) hLCAT 遺伝子

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

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

2) パッケージングシグナル (Ψ)

マウス MoMLV 由来のレトロウイルスパッケージングのための配列である。

3) 5' LTR 及び 3' LTR

マウス MoMLV 由来のエンハンサー・プロモーター配列である。

(2) 構成要素の機能

1) hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列)

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

2) パッケージングシグナル (Ψ)

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

3) 5' LTR 及び 3' LTR

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

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

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

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

Step 2 : pDON-AI DNA ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の *Bam* HI 切断部位と

Sal I 切断部位の間に、当該制限酵素配列を含むプライマーにより増幅させた hLCAT 遺伝子を挿入した。次に、蛋白質合成効率の向上のために開始コドン ATG 上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入した。また、hLCAT 遺伝子ストップコドン近傍に存在する ポリ A 付加配列の AATAAA (TAA がストップコドン) を別のストップコドン TGA に改変した。

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

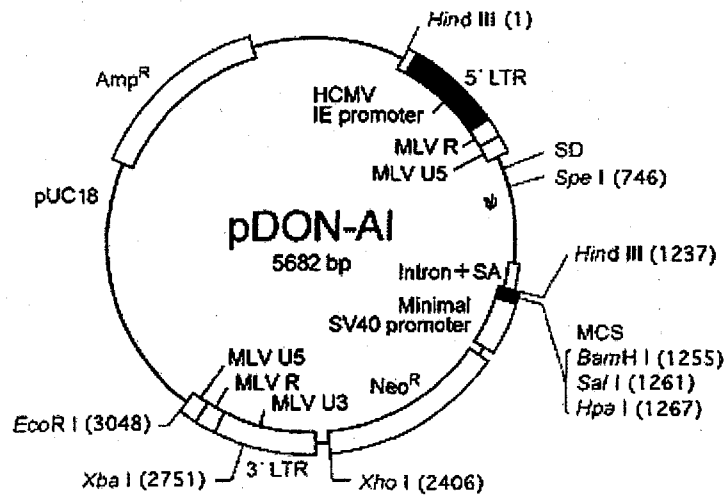


図 2 pDON-AI DNA ベクターの構造

(2) 特性

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

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

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

3 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

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

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

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

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

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

1) パッケージング細胞株

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

2) ウイルス産生細胞株 (MCB) の作製

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

感染させた GP+envAM-12 細胞を 96 穴プレート 50 枚に限界希釈して播種し、ウイルス産生細胞のスクリーニングを行った。シングルクローンと考えられる 201 ウェルにつ

いてその上清をリアルタイム RT-PCR で分析し、陽性クローン 9 個を得た。この中から最も高タイターのウイルス産生株を 1 ライン (GP+envAM-12/CGThLCAT A_17_4) 選択し、hLCAT 発現アンフォトロピックレトロウイルスベクター産生細胞としてプレマスターセルバンク (pre-MCB) を作製した。pre-MCB より継代を 3 回実施し、マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) の作製を行った。

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

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

3) 本遺伝子組換え生物の最終製品の製造・輸送

遺伝子導入に使用する本遺伝子組換え生物 (レトロウイルスベクター) は、上記マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) より、タカラバイオ株式会社において GMP 製造された。

マスターセルバンクからの本遺伝子組換え生物 (Lot. CRV07-2) の製造は次の方法にて行った。

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

凍結保存された本遺伝子組換え生物は、品質試験の後、適切な拡散防止措置を執ってドライアイス詰め、千葉大学医学部附属病院細胞調製室へ送られ、細胞調製室の前室 (施錠可能) に設置した超低温フリーザに保管される。

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

cell line. Virology 167:400-406, 1988.

文献 22 : Markowitz D, Goff S, and Bank A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. J Virol 62:1120-1124, 1988.

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

移入した核酸は本遺伝子組換え生物のゲノム RNA の一部として存在する。凍結保管中は安定であり、本遺伝子組換え生物（レトロウイルス）の生物学的性質が変化することはない。

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

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

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

5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

(1) 本遺伝子組換え生物の検出方法

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

(2) 本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞の検出方法

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

(3) RCR の検出方法

・ Mus dunni を用いた増幅法

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

・ RT-PCR 法

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

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

宿主である MoMLV と本遺伝子組換え生物の間には以下の相違点がある。

- (1) 本遺伝子組換え生物は *gag*、*pol* 及び *env* を欠損しているため、本遺伝子組換え生物が感染した通常の細胞はウイルス粒子形成に必要な蛋白質を合成できない。したがって、本遺伝子組換え生物は *gag*、*pol* 及び *env* を発現する細胞においてのみ増殖できる。
- (2) 本遺伝子組換え生物は hLCAT 遺伝子を持つため、感染した細胞は LCAT を発現する。
- (3) MoMLV がマウス、ラット等のげっ歯類にだけ感染しうるのに対して、アンフォトロピック MLV 4070A はこれらのほか、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターの細胞にも感染すると報告されている（文献 23）。したがって、ウイルス粒子表面に 4070A 由来 env 蛋白質を持つ本遺伝子組換え生物はマウス、ラット等に加えてヒト、サル、イヌ等、幅広い動物種の細胞に本遺伝子組換え生物の核酸を伝達しうる。
本遺伝子組換え生物が自立的増殖能を欠いており、ヘルパー機能をもつ特殊な細胞においてしか増殖できない点と感染可能な生物種の範囲が異なる点を除いて、I-3「生理・生態学的特性」に記載した、宿主である MoMLV と本遺伝子組換え生物の分類学上の基本性質は同等であると考えられる。
- (4) 生物多様性に影響を及ぼす程度としては、本遺伝子組換え生物はより広い生物種に感染可能になるが、増殖能を持たないことから、たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはなく、野生型ウイルスよりも影響は小さいと考えられる。ただし、本遺伝子組換え生物が相同的組換えにより自立的増殖能を獲得する

ことがあれば、何らかの影響がでることも考えられる。

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

Ⅲ 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1 使用等の内容

治療施設におけるヒト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：千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号

治療施設の名称：千葉大学医学部附属病院

(1) 本遺伝子組換え生物溶液は、容器に密閉後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の細胞調製室内の冷凍庫に保管する。

(2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物溶液の溶解、希釈及び分注操作は、細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。被験者の前脂肪細胞への本遺伝子組換え生物導入操作、本遺伝子組換え生物導入細胞の培養その他の本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取扱いも同様に細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の保管は、細胞調製室前室に設置の冷蔵庫、冷凍庫、もしくは細胞調製室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈溶液若しくはその凍結品又は本遺伝子組換え生物導入細胞を開放系区域を通して他のP2レベル区域に運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(3) 本遺伝子組換え生物溶液（希釈溶液も含む）又は本遺伝子組換え生物導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活性化を行った後、本施設で定められた医療廃棄物処理規程（以下「医療廃棄物処理規程」という。）に従い廃棄する。

(4) 細胞調製室内の安全キャビネット内で本遺伝子組換え生物導入細胞懸濁液を注射器に充填し、それを二重に密閉した後、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）に運搬する。

(5) 被験者に対する本遺伝子組換え生物導入細胞の投与は、個室において、被験者の皮下脂肪組織内に注射移植する。

(6) 上記(5)で用いた、本遺伝子組換え生物導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具、布、ガーゼ類等は使い捨てとし、使用后、ウイルスの不活性化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルスの不活性化を他の区域で行う場合には、二重に密閉し