

(別紙様式)

生物多様性影響評価書

(区分：遺伝子治療臨床研究)

HGF の競合的アンタゴニストである NK4 を発現する非増殖性の
遺伝子組換えアデノウイルス 5 型ベクター (Ad5CMV-NK4)

目 次

I	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
1	分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
2	使用等の歴史及び現状	3
3	生理・生態学的特性	4
II	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	7
1	供与核酸に関する情報	7
2	ベクターに関する情報	11
3	遺伝子組換え生物等の調製方法	13
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	16
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	17
6	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	18
III	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	20
1	使用等の内容	20
2	使用等の方法	20
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	21
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	21
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	22
6	国外における使用等により得られた情報	23
IV	生物多様性影響評価	24
1	他の微生物を減少させる性質	24
2	病原性	24
3	有害物質の産生性	25
4	核酸を水平伝達する性質	26
5	その他の性質	26
V	総合的評価	27
別紙	NK4 遺伝子発現アデノウイルスベクターの全塩基配列	28

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NK分子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Ad5CMV-NK4はヒトアデノウイルス5型を宿主として作製された。

アデノウイルス5型は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）。子供の40-60%が中和抗体をもつ（文献2）。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 DM, Howley PM 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.

2 使用等の歴史及び現状

アデノウイルス5型そのもの人為的な利用は知られていない。ヒトアデノウイルス4型及び7型は、経口生ワクチンとして米国で30年以上にわたり、延べ約100万人の兵士に対し風邪ワクチンとして投与されてきた実績があり、重篤な副作用の報告もない。

なお、アデノウイルス5型の遺伝子治療用ベクターとしての利用は、1990年以後ウイルス複製に必須のE1領域を遺伝子組換え技術により欠失させた非増殖性のものが、国内外で汎用されている。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蛋白質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事が明らかにされた。

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性

ヒトアデノウイルスはエンベロープをもたない2本鎖DNAウイルスであり、アデノウイルス科マストアデノウイルス属に分類される。ウイルスキャプシドは直径80 nmの正二十面体である。51の血清型が知られており、ハムスターへの腫瘍原性により3つの群に分けられている。ウイルス粒子はDNAと蛋白質より成る。DNAの分子量は $20-25 \times 10^6$ ダルトン、長さ約12 μm の線状2本鎖(ゲノムサイズ:約36 kb)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

自然界において、宿主域はヒトを始めとして、サル、ネコ、イヌ、ウサギ、ラット、マウス、ハムスター、等の哺乳類及び鳥類の細胞に幅広く感染し取り込まれる。しかし、生活環を完結しウイルス粒子を産生するためには、ヒトアデノウイルスは種特異的であり、ヒト以外では、ハムスター、コットンラット等ごくわずかな種でしかウイルスの増殖は認められない。ヒトに最も近いサルですら宿主としては適当でなく、シミアンウイルス40(SV40)の共感染下にはじめてウイルス粒子が産生される。

また、ヒトアデノウイルスは広範な組織に感染可能であり、高度に分化した神経系、筋系、肝細胞から上皮細胞、線維芽細胞に至る付着系の細胞に感染することが知られている。しかしながら、細胞内での増殖の程度は組織により異なる。

(4) 繁殖又は増殖の様式

ヒトアデノウイルスの生活環は次のように考えられている。ウイルス粒子は、ファイバーを介して標的細胞の受容体と結合し、次いでペントンベースがインテグリンに結合する。ペントンベースとインテグリンの相互作用により、ウイルス粒子はエンドサイトーシスにより細胞質に取り込まれる。細胞表面に吸着したウイルス粒子の80-85%がエンドソーム中に取り込まれ、エンドソーム中のウイルス粒子の約90%がエンドソームを破壊して細胞質へ移動する。その過程で、まずペントンベースが外れ、続いて粒子構造が壊れコアが核膜内に放出される。核内でウイルスゲノムは染色体外遺伝子として存在する(epichromosomal localization)。ウイルスゲノムから細胞由来の転写因子を利用してE1A遺伝子産物がまず産生され、他の初期遺伝子群の発現を制御する。次いでE2遺伝子産物の蓄積に伴い、DNA複製反応が開始される。同時に後期遺伝子群の発現が起こり、ウイルス粒子構成蛋白質が産生される。その際、E1B遺伝子産物及びE4遺伝子産物により、感染細胞由来mRNAの細胞質

への移行が阻害されるとともに、細胞由来の 5'末端に存在するキャップ構造に結合する蛋白質 (CBP) が脱リン酸化され、細胞由来 mRNA の翻訳は著しく制御される。その結果、キャップ非依存的に翻訳されるウイルス由来 mRNA が効率的に細胞質に蓄積し、ウイルス粒子構成蛋白質の産生が促進される。過剰に産生されたウイルス粒子構成蛋白質は、ウイルスゲノムとともに核内でウイルス粒子として組み立てられる。さらに、ウイルス粒子の蓄積により、その凝集塊から成る核内封入体と呼ばれる構造体が形成される。ウイルス粒子は、感染細胞の崩壊により、細胞外に放出される。

ヒトアデノウイルスはヒトに経口感染し、急性の呼吸器疾患、角膜炎、乳幼児下痢症等を引き起こす。感染経路としては飛沫感染がある。

(5) 病原性

ヒトアデノウイルスは、急性の呼吸器疾患、角結膜炎、乳幼児下痢症などの原因ウイルスとして知られている。各疾患の発症はアデノウイルスの血清型と関連しており、Ad5CMV-NK4 の由来であるアデノウイルス 5 型は、不顕性に終わることが多いが、乳幼児における急性発熱性咽頭炎の起因ウイルスとして知られている。最近、百日咳様症候群との関連が報告されているが、アデノウイルス 5 型の単独感染が百日咳様症候群の原因であるよりむしろ、百日咳菌の感染下に潜在ウイルスの活性化が起きている可能性が指摘されている。また、肝移植患者において、免疫抑制剤服用下にアデノウイルス C 亜群由来のアデノウイルス肝炎が報告されている。アデノウイルス 5 型感染症に対する治療薬は存在しないが、免疫力の低下した患者に重症の感染症を来した場合には免疫グロブリンの投与を行う。一般的には予後良好なので、安静を保ち二次感染を防ぐことが肝要である。アデノウイルス感染に関連した疾患について表 1 に示した。

表 1. アデノウイルス感染に関連した疾患

疾患名	対象患者	関連血清型
急性発熱性咽頭炎	乳幼児	1-3、5-7
咽頭結膜性発熱	小児	3、7、1
急性呼吸疾患	新兵 (軍人)	3、4、7、14、21
肺炎	乳幼児	1-3、7
肺炎	新兵 (軍人)	4、7
流行性角結膜炎	全世代	8、11、19、37
百日咳様症候群	乳幼児	5
急性出血性膀胱炎	乳幼児	11、21
胃腸炎	乳幼児	40、41
肝炎	肝移植レシピエント (乳幼児)	1、2、5
尿管内ウイルス存続	AIDS 患者他免疫抑制状態の患者	34、35

(6) 有害物質の産生性

野生型ヒトアデノウイルスの細胞障害性の発現は、感染細胞内での蛋白質合成阻害及びウイルス構成蛋白の貯留によると考えられている。現在まで、野生型ヒトアデノウイルスにおける有害物質の産生性は同定されていない。

(7) その他の情報

野生型ヒトアデノウイルスは、他の DNA ウィルスと同様、高圧蒸気滅菌、ガス滅菌、焼灼、紫外線殺菌灯、次亜塩素酸ナトリウム (1-20 ppm) 等により不活化される。また、Ad5CMV-NK4 は、E1 領域を欠いているために非増殖性である。

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

ウイルスベクターに導入した核酸である NK4 発現カセットは、①ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター配列、②コザック配列、③NK4cDNA、④SV40 ポリアデニレーション配列から成る。各領域は、Ad5CMV-NK4 ウイルスベクター5'末端の塩基を 1 とした時の塩基番号で示した。

① 505-1332 (CMV プロモーター)

GenBank Database の CMV プロモーターの塩基配列 828bp (下記) と一致する。ヒトサイトメガロウイルスに由来するプロモーター配列。

```
TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATT
GCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTG
ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA
GTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGAC
GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA
TTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG
ATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCA
CCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCG
TGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC
ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGG
```

② 1339-1344 (Kozak 配列)

コザック配列は (6 bp: GCCACC)、細菌由来のグアニン-シトシンを多く含む DNA 配列で、遺伝子の ATG 開始コドンの周辺で見つかったもの。

③ 1345-2769 (NK4cDNA)

ヒト NK4 遺伝子はヒト HGF 遺伝子の一部分として定義される。ヒト HGF の遺伝子座は第 7 染色体長腕 (7q11.2-21) 上に位置し、18 個のエクソンから成り、728 アミノ酸残基の HGF 蛋白質をコードする。NK4cDNA は NK4 遺伝子のエクソン部分 1419 bp (下記) から成り、473 アミノ酸残基をコードする。

```
ATGTGGGTGACCAAACCTCCTGCCAGCCCTGCTGCTGCAGCATGTCCTCCTGCATCTCCTCCTGCTCCCC
ATCGCCATCCCCATGCGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAATACAATTCATGAATTCAAAAAATCAGCA
AAGACTACCCTAATCAAAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAAAACCAAAAAGTGAATACTGCAGACCAA
```

TGTGCTAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACTTCCATTCACTTGCAAGGCTTTTGTGTTTTGATAAAGCA
 AGAAAACAATGCCTCTGGTTCCCTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAGAATTTGGCCATGAA
 TTTGACCTCTATGAAAACAAAGACTACATTAGAAACTGCATCATTTGGTAAAGGACGCAGCTACAAGGGA
 ACAGTATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCCTGGAGTCCATGATACCACACGAACACAGC
 TATCGGGGTAAAGACCTACAGGAAACTACTGTGCAAAATCCTCGAGGGGAAGAAGGGGGACCCTGGTGT
 TTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGAAGTCTGTGACATTCCTCAGTGTTCAGAAGTTGAATGCATG
 ACCTGCAATGGGGAGAGTTATCGAGGTCTCATGGATCATAACAGAATCAGGCAAGATTTGTCAGCGCTGG
 GATCATCAGACACCACACCGGCACAAATTCCTTGCCTGAAAGATATCCCAGCAAGGGCTTTGATGATAAT
 TATTGCCGCAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGGTGCTATACTCTTGACCCTCACACCCGCTGGGAG
 TACTGTGCAATTAACAACATGCGCTGACAATACTATGAATGACACTGATGTTCCCTTTGGAAACAACGAA
 TGCATCCAAGGTCAAGGAGAAGGCTACAGGGGCACTGTCAATACCATTTGGAATGGAATTCATGTGAG
 CGTTGGGATTCTCAGTATCCTCACGAGCATGACATGACTCCTGAAAATTTCAAGTGCAAGGACCTACGA
 GAAAATTACTGCCGAAATCCAGATGGGTCTGAATCACCCCTGGTGTGTTTACCCTGATCCAAACATCCGA
 GTTGGCTACTGCTCCCAAATTCCAAACGTGATATGTCACATGGACAAGATTGTTATCGTGGGAATGGC
 AAAAATTATATGGGCAACTTATCCCAAACAAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAACATG
 GAAGACTTACATCGTCATATCTTCTGGGAACCAGATGCAAGTAAGCTGAATGAGAATTACTGCCGAAAT
 CCAGATGATGATGCTCATGGACCCTGGTGCTACACGGGAAATCCACTCATTCCTTGGGATTATTGCCCT
 ATTTCTCGTTGTGAAGGTGATACCACACCTACAATAGTC

④ 2776-2920 (SV40 ポリアデニレーション配列)

GenBank Database の SV40pA の塩基配列 146 bp (下記) と一致する。SV40 ポリアデニレーション配列は、SV40 に由来するポリ A 付加シグナル配列。

CGAGATCCGAACTTGTGTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACA
 AATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTC
 TAGATCT

(2) 構成要素の機能

a) NK4 蛋白質の構造

ヒト NK4cDNA より予想されるヒト NK4 蛋白質の全アミノ酸配列を下に示した (473 アミノ酸残基、下線部は分泌シグナル配列)。

MWVTKLLPALLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIKTKKVNTA
 DQCANRCTRNGLPFTCKAFVFDKARKQLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDLYENKDYIRNCIIGKGR
 SYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSYRGKDLQENYCRNPRGEEGPPWCFTSNPEVRYEVCDIPQC
 SEVECMTNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTPHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYT
 LDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDVPLETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGPCQRWDSQYPHEHDMT
 PENFKCKDLRENYCRNPDGSESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRNGNKNYMGNLSQTR
 SGLTCSMWDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTT

PTIV

ヒトNK4蛋白質(5残基欠損型)はN末端の分泌シグナル配列(31アミノ酸残基)を除く442アミノ酸残基から構成され、下記のような特徴的ドメインを有する。

細胞外分泌シグナル配列:	aa1-31
N末端ヘアピン構造:	aa39-122
第1クリングル構造:	aa126-202
第2クリングル構造:	aa203-284
第3クリングル構造:	aa297-379
第4クリングル構造:	aa383-465

HGF蛋白質は不活性型1本鎖preproHGFとして翻訳された後、細胞外分泌シグナル配列によって細胞外に分泌されプロセッシングを受けて2本鎖の活性型成熟分子となる。N末端ヘアピン構造とそれに続く第1クリングル構造は、c-Metレセプターとの結合に関与する。クリングル構造は、デンマークの菓子パンKringleの構造と似ていることから名付けられた蛋白質の構造上の特徴であり、プラスミノゲンなどの造血因子蛋白質に多く見られ蛋白質間相互作用に関与すると考えられている。各クリングル構造内には3箇所のジスルフィド結合があり立体構造を保持している。プラスミノゲンの分子内断片でクリングル構造を持つアンジオスタチンにも血管新生阻害作用が認められており、クリングル構造と血管新生阻害作用との関連が示唆されているが、詳細なメカニズムは不明である。

NK4蛋白質には下記のように3箇所の糖鎖付加部位が存在するが、グリコシダーゼ処理によって糖鎖を除去してもHGFアンタゴニスト活性及び血管新生阻害活性に影響は見られなかった。

アスパラギン(aa289):	N-結合型糖鎖
アスパラギン(aa397):	N-結合型糖鎖
スレオニン(aa471):	O-結合型糖鎖

b) NK4蛋白質の生物活性

HGFは、細胞膜を貫通するc-Metレセプターに結合することにより、増殖促進、血管新生、遊走促進、形態形成など多面的な生物活性を発揮する。c-Metレセプターには、細胞内ドメインにチロシンキナーゼと呼ばれる蛋白質のチロシン残基をリン酸化する酵素活性を持つ部分が存在する。HGFがc-Metに結合すると細胞質のチロシンキナーゼ活性が活性化され、これにより細胞内に様々なシグナルが伝達される。癌細胞の多くはこのc-Metを過剰発現しており、HGFの結合によって活性化されると、癌細胞の浸潤・転移に至る複数の事象が同時に進行する。すなわち、HGFはカドヘリンなどの細胞接着分子を介した細胞間接着をルーズにし、癌細胞が原発巣から離脱するのを促す。また、HGFは基底膜やコラーゲンなど細胞外基質を分

解する様々な蛋白質分解酵素の産生を促すとともに、癌細胞の活発な遊走を促す。同時に、癌細胞と血管内皮細胞の接着を促進するなど、これら一連の反応の同時進行により HGF は癌細胞の浸潤・転移を強力に促進する。

NK4 蛋白質は、c-Met レセプターへの結合に関与する N 末端ヘアピン構造と第 1 クリングル構造を持っているため、c-Met に結合するものの c-Met を活性化しない (図 1)。つまり、NK4 はそれ自身生物活性を発揮することなく、HGF が c-Met 受容体に結合するのを競合的に阻害するアンタゴニストとして作用することにより、HGF の関与する癌細胞の浸潤・転移を強力に抑制する。一方、NK4 は、HGF アンタゴニスト活性とは独立したメカニズムによって、HGF だけではなく VEGF や bFGF による血管新生をも抑制する。従って、NK4 は HGF アンタゴニスト活性と血管新生阻害活性を同時に有する 2 機能性分子であり、癌細胞を“凍結”、あるいは“休眠”の状態に至らしめる新規な抗癌剤の分子標的としての利用が期待される (図 2)。

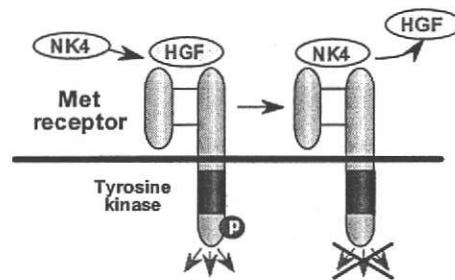


図 1. NK4 による HGF アンタゴニスト作用

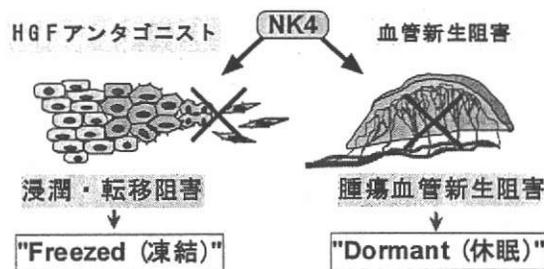


図 2. NK4 の 2 つの機能と癌の“凍結・休眠”療法

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

Ad5CMV-NK4は、NK4遺伝子発現カセットを含む pAdApt.NK4 (図3) と、アデノウイルス5型ゲノムを含むpWE.AdAfIII-rITRsp (図4) の相同組換えによって作成された(次項目)。pAdApt.NK4の由来はシャトルベクターpAdApt (Crucell社) で、一方、pWE.AdAfIII-rITRsp (Crucell社) はコスミドベクターpWE25に由来する。

(2) 特性

pAdAptは、大腸菌複製開始点ori、アンピシリン耐性遺伝子Amp、アデノウイルス5型ゲノムDNA相同部位2箇所(1-454、3511-6095)、CMVプロモーター、SV40ポリアデニレーション配列を構成要素とする。一方、pWE.AdAfIII-rITRspはコスミドベクターpWE25に由来し、アデノウイルス5型ゲノムDNA全長を含む。

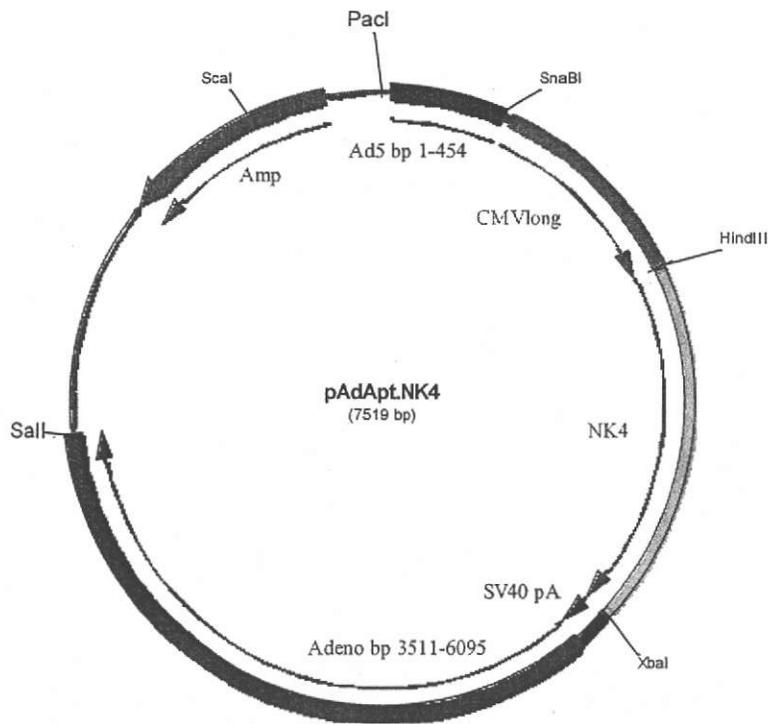
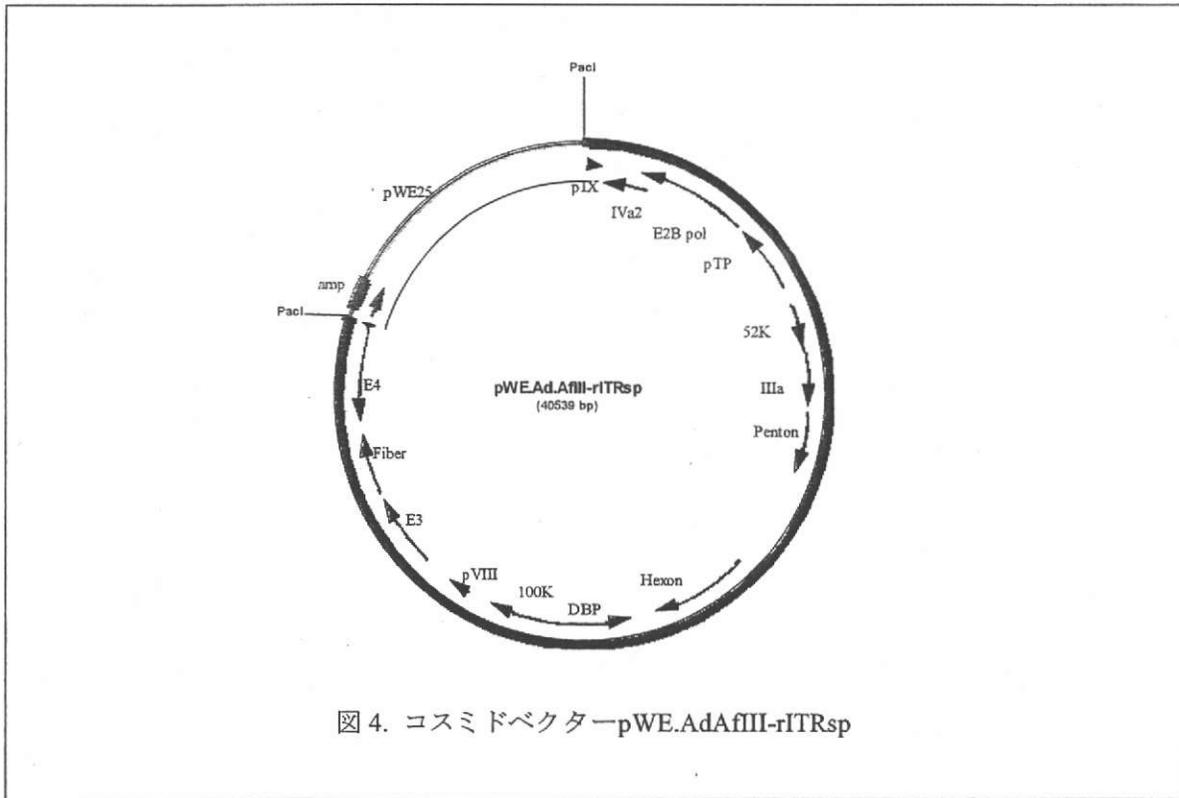


図3. プラスミドベクターpAdApt.NK4



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

アデノウイルスは全質量の13%を占めるDNAと87%を占める蛋白質を含む、直径65-80 nmの正二十面体の構造を有する。ウイルスのDNAは約36 kbの長さである。アデノウイルス蛋白質の発現は、一般的に早期と後期とに分類される。6つの蛋白質が早期(E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4)に、他の蛋白質(L1、IVa2、IX)は後期に発現する。E1AとE1BはウイルスDNAの複製に重要な役割を果たす。E2AはDNA結合タンパクをコードし、E2BはDNA polymerase及びウイルスゲノムの5'末端に見られるタンパクをコードする。E3はウイルスDNAの複製に関連しないが、ウイルスの感染に対する宿主免疫反応を引き起こすと考えられる。E4蛋白質はウイルスの構築と関連すると考えられている。本研究に用いられるAd5CMV-NK4ベクターは、E1A及びE1B部分が欠損しておりその欠損部にCMVプロモーターで転写制御されるNK4cDNAが挿入されている(図5)。

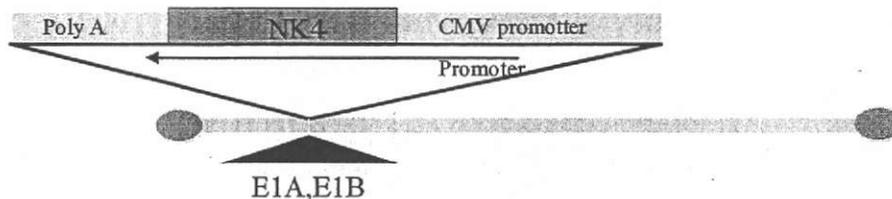


図5. Ad5CMV-NK4の模式図

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミドベクターpAdAptのHindIII及びXbaI制限酵素サイトにコザック配列(GCCACC)を付加したNK4cDNAを挿入し、プラスミドベクターpAdApt.NK4(図3)を作成した。pAdApt.NK4をPacI及びSaII制限酵素で、Ad5CMV-NK4ゲノムDNAを含むコスミドベクターpWE.AdAfl II-rITRsp(図4)をPacI制限酵素にて直鎖状にし、各DNA断片を精製した。上述の2種のDNA断片をPER.C6TMヘルパー細胞(Crucell社)にLipofectamine200CD(Invitrogen社)を用いたりポソーム法によって同時に組み込んだ。2種のDNA断片の相同組換えにより、アデノウイルス5型のE1領域がNK4発現カセットに組換えられたAd5CMV-NK4のDNA全長が形成される(Ad5CMV-NK4の全塩基配列は別紙)。PER.C6TMヘルパー細胞はアデノウイルス5型のE1領域、約4kbを内在しておりE1由来転写活性因子を産生する細胞株である。この転写活性因子がE1領域を除去したAd5CMV-NK4にトランスに働き、Ad5CMV-NK4ウイルスベクターが産生される。尚、PER.C6TM細胞は従来の293細胞と異なり、Ad5CMV-NK4の発現カセット前後との相同部位をE1遺伝子の前後に持たないので、PER.C6TM由来のE1遺伝子とAd5CMV-NK4の発現カセットとの相同組換えが理論上起こらず、Replication Competent Adenovirus(RCA)の発生も起こらないと

考えられる。なお、Ad5CMV-NK4の全シーケンスはALF Express™自動DNA解析装置（Pharmacia Biotech社）により確認済みである。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本研究に用いられるAd5CMV-NK4は、現行のGMP基準に従って、神戸バイオメディカル創造センターのBiologics Laboratoryで製造された。Biologics Laboratoryは神戸大学発ベンチャーの株式会社GMJ（旧株式会社ジーンメディスンジャパン）社によって運営管理されており、千葉大学の臨床研究実施研究者が共同研究者である神戸大学の臨床研究実施研究者と共に実施した。マスターセルバンク、マスターウイルスシードストック（マスターウイルスバンク）など原材料から製造工程、最終製品に至るまで一貫した品質管理のもとに製造され、保管されている。最終製品については、各種ウイルスやマイコプラズマの混入がなく、無菌試験、エンドトキシン試験にて下記項目が陰性であることが確認された（表2）（添付資料1-3）。

表2. ウイルスベクター最終製品の品質管理試験

試験項目	内容
力価測定	吸光度によるvirus particle、TCID ₅₀ 法
ウイルス検出試験	PCRによるHBV, HCV, HIV-1, HTLV-1, Parvovirus B19の検出
マイコプラズマ検出試験	PCRによるマイコプラズマ遺伝子検査
無菌試験	ソイビーンカゼインダイジェスト培地、液状チオグリコール酸培地にて生育可能な細菌・真菌の検討
エンドトキシン検出試験	第十五改正日本薬局方におけるエンドトキシン試験法
RCA 検出試験	A549細胞を用いたCPE検出法

また、アデノウイルスベクターの調製に使用する PER.C6™細胞のマスターセルバンク、ワーキングセルバンク及び Ad5CMV-NK4 マスターウイルスシードストックに対しても品質管理試験が施行され、各項目における安全性が確認されている。マスターセルバンク等及びマスターウイルスシードストックの試験項目は下記のとおりである。

<マスターセル・ワーキングセルバンク>

- ・チオグリコレートブイヨン・トリプケースイブイヨンによる無菌試験
- ・エンドトキシン否定試験
- ・マイコプラズマ否定試験
- ・HTLV-I 否定試験（PCR法）
- ・HCV, HBV 否定試験（PCR法）

- ・ HIV-1 否定試験 (PCR 法)
- ・ サイトメガロウイルス否定試験 (PCR 法)
- ・ EB ウイルス否定試験 (PCR 法)
- ・ Parvovirus B19 DNA 否定試験 (PCR 法)
- ・ アデノウイルス検出試験 (抗アデノウイルス抗体による蛍光染色)
- ・ ウイルス分離試験 (HEL ヒト胎児肺由来細胞、HeLa, Vero, RD ヒト横紋筋由来細胞、MDCK イヌ腎臓由来細胞, A549 細胞を用いた CPE 検出試験)

<マスターウイルスシードストック>

- ・ チオグリコレートブイヨン・トリプケースイブイヨンによる無菌試験
- ・ エンドトキシン否定試験
- ・ マイコプラズマ否定試験
- ・ HTLV-I 否定試験 (PCR 法)
- ・ HCV, HBV 否定試験 (PCR 法)
- ・ HIV-1 否定試験 (PCR 法)
- ・ サイトメガロウイルス否定試験 (PCR 法)
- ・ EB ウイルス否定試験 (PCR 法)
- ・ Parvovirus B19 DNA 否定試験 (PCR 法)

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、Ad5CMV-NK4のゲノムは核内の染色体外に存在し、NK4遺伝子が転写されるが、その発現は一過性である。Ad5CMV-NK4はPER.C6TM細胞を使用して増殖させているため、相同組換えを起こしてRCAが産生されるとは極めて考えにくい、万一そのような場合は供与核酸のほぼ大半は消失していると考えられる。

またAd5CMV-NK4投与によるNK4蛋白質の生体内発現については以下のとおりである。当該実験には6-7週齢のC57BL/6マウス(雄)を用いた。Ad5CMV-NK4 (1×10^9 pfu)を生理食塩水で希釈し、マウスの尾静脈から投与した。投与後、経時的に解剖し、採取した臓器及び血漿中のNK4蛋白質濃度をELISAにて分析した。

NK4の血漿中濃度はAd5CMV-NK4投与後1週間をピークとしており、ピーク時における血中濃度は約150 ng/mlで、その後血漿中濃度は低下したが1箇月後でも約10 ng/mlと、血中HGFを阻害するのにじゅうぶんな濃度のNK4蛋白質レベルが維持された(図6)。また肝臓・肺・腎臓においても投与後1-2週間をピークに持続的なNK4蛋白質の産生が認められた。Ad5CMV-NK4は各種臓器において発現されるが、とりわけ、肝臓におけるNK4のレベルは最も高い発現が認められた。したがって、1回のAd5CMV-NK4投与によって1箇月間のNK4蛋白質の発現・産生が維持できることが明らかになった。さらに、この期間中、マウスにおいて外見的な異常はなく、大きな副作用はほとんど認められなかった。

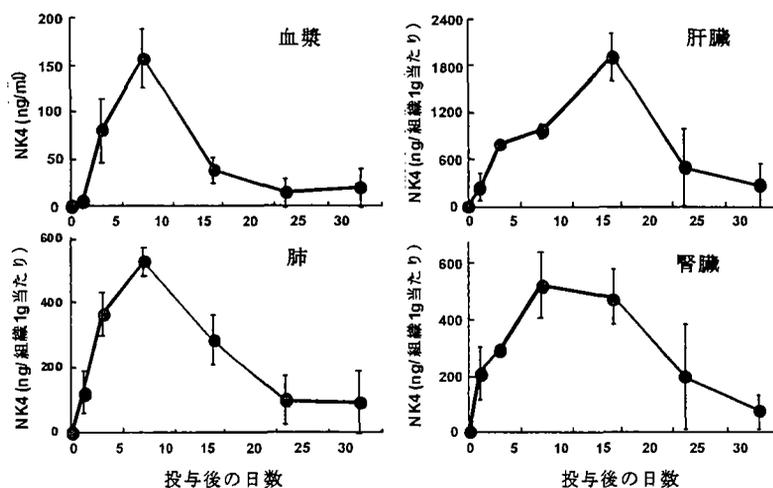


図6. Ad5CMV-NK4を投与したマウス血漿中並びに臓器中のNK4蛋白質の発現変化

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

PCR 法にて Ad5CMV-NK4 を検出することができる。PCR 法では、野生型アデノウイルスの遺伝子には存在しない Ad5CMV-NK4 特有の遺伝子配列(イントロンを挟む NK4cDNA 配列)をプライマーとして使用することで、Ad5CMV-NK4 の存在を特異的に検出できる。検体中の 1 コピーを検出することが可能であり、本検出法の信頼性については、同様の定量的 PCR 法を用いたウイルス検出法が既に臨床検査等でされていることから、十分に確立しているものと考えられる。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

(1) Ad5CMV-NK4 ウイルスベクターの生物学的特徴

Ad5CMV-NK4 ウイルスベクターは、アデノウイルスの増殖に必須の蛋白質(E1A および E1B) がコードされている E1 領域が欠損しているために、恒常的に当該蛋白質が発現している細胞(例えば 293 細胞) 以外では増殖性を有しない。しかし、CMV プロモーターから転写される NK4 蛋白質を産生する。ウイルスの基本構造がタイプ 5 型由来であり、感染性については同野生型ウイルスと同様である。野生型アデノウイルスと同様、染色体に組み込まれることはなく、染色体外遺伝子として存在し、感染細胞の細胞分裂によって NK4 遺伝子の発現は減少していく。したがって NK 蛋白質の発現も一過性のものとなる。

(2) 増殖性ウイルス出現の可能性

①増殖性アデノウイルス (RCA) 出現の機序

Ad5CMV-NK4 ウイルスベクターはウイルス複製に必要な E1 領域が除かれ、当該部分が NK 遺伝子に置き換えられている。したがって、293 細胞のように E1 領域遺伝子を発現する細胞が、当該遺伝子をトランスに発現しなければ、複製増殖することができない。この胎児性腎細胞由来の 293 細胞は、ヒト 5 型アデノウイルスの E1A 及び E1B 遺伝子を包括する nt 1-4137 の領域を含んでおり、この領域はアデノウイルスゲノムの左腕の 12%に相当する。一方非増殖性の Ad5CMV-NK4 のような組換え型アデノウイルスは通常 nt 400-3500 領域を欠失しているが、293 細胞中の E1 領域とは相同部位が存在しており、その結果、組換え型アデノウイルスの作製にあたって相同組換えが生じ、RCA が発生する可能性がある。一般的に、293 細胞への 1 粒子の組換え型アデノウイルスの感染は 10,000 粒子以上の子孫アデノウイルスを生じうる。同時に、組換え型アデノウイルスと 293 細胞間の一回の相同組換えが起こる頻度は最低で 10^6 回の組換えに対して 1 回程度であると予想されている。

②PER.C6TM細胞使用による RCA 出現リスクの低減

RCA 出現の原因となる相同部位の除去のため、PER.C6TM細胞がオランダ Crucell 社によって開発された。PER.C6TM細胞はヒト胎児性網膜芽細胞に、E1A 及び E1B 領域 (Ad5 nt 459-3510) を導入したものである。この配列には E1 プロモーター及びポリ A シグナルは含まれておらず、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ PGK プロモーター及び B 型肝炎ウイルスのポリ A シークエンスが組み込まれている。また同時に Ad5 の E1 領域 (Ad5 nt 455-3510) を欠失させた組換え型アデノウイルスを作製するための pAdApt シャトルベクターも同時に開発された。これらの PER.C6TM細胞により作製された組換え型アデノウイルスでは、RCA の出現は極めて低いと考えられる。

③RCA の検出方法

Ad5CMV-NK4 と RCA との違いは E1 領域にあるため、E1A あるいは E1B 遺伝子に関する PCR

を行うことによって両者を区別することが可能である。ウイルスが含まれた検査すべき検体を、E1 領域を含まない A549 細胞あるいは HeLa 細胞の培養液に入れてウイルスを感染させ、RCA を増殖させた後に、当該細胞より DNA を抽出し、E1A あるいは E1B のウイルス遺伝子内に設定したプライマーを使用した RCR を行うことによって、Ad5CMV-NK4 と RCA の区別をつけることが可能で、RCA 有無の検出ができる。本手法により検体中 1 コピーの RCA を検出することが可能である。

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臨床研究を目的とした投与、保管、運搬、廃棄及び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) Ad5CMV-NK4 溶液は、ガラスバイアルに密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、凍結状態のまま施設内のベクター調製室内の冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態の Ad5CMV-NK4 溶液の融解、バイアルの開封並びに Ad5CMV-NK4 溶液の希釈及び分注は、上記ベクター調製室内の P2 レベル設備内の安全キャビネット内で行う。なお、この希釈溶液を、解放系区域を通過して他の P2 レベル相当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) Ad5CMV-NK4 溶液（希釈液も含む）を廃棄する際には、本施設で定められた感染性廃棄物処理規程により行う。
- (4) 被験者に対する Ad5CMV-NK4 の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った室内において Ad5CMV-NK4 希釈溶液を胸腔内投与することにより行う。投与後 48 時間まで、被験者に心電図モニターを装着して管理する。
- (5) 個室管理期間中の被験者の排泄物（唾液、血液、及び尿）は、臨床検体として使用する物を除き、投与後 7 日間、あるいはウイルスが陰性化するまでバイオハザードマークを明示して感染性廃棄物として取り扱う。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物の取扱いは、上記 Ad5CMV-NK4 溶液の取扱いに準じる。
- (6) 個室管理期間中、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に接触した器具等は、環境中への拡散防止措置を適切に執った室内で高圧蒸気滅菌処理ないしは次亜塩素酸処理を実施した後、本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か、もしくは環境中への拡散防止措置を適切に執った室内で十分洗浄する。

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

※ 主務大臣が必要と認める場合にのみ記載し、それ以外の場合は空欄とすること。

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

※ 主務大臣が必要と認める場合にのみ記載し、それ以外の場合は空欄とすること。

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) Ad5CMV-p53を用いた臨床研究の結果

岡山大学付属病院を中心に米国と同様のプロトコールにより1999年3月から非小細胞肺癌に対する Ad5CMV-p53 を用いた第 I 相臨床試験が行われ、被験者からの血液、尿、便、リンパ節などでの Ad5CMV-p53 の検出検査 (PCR 法) では、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、尿中には投与後ずっと検出されず、環境への拡散の危険についての報告は無い。また、本施設 (千葉大学医学部附属病院) で実施中の食道癌に対する Ad5CMV-p53 を用いた第 I - II 相臨床研究 (文献3) では、食道癌患者10名に対し Ad5CMV-p53 投与から一週間後に被験者の血液、尿、糞便中の Ad5CMV-p53 検出試験を計46回行い、45回は陰性、1回のみ糞便に陽性で、この被験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と考えられ、環境中への拡散の可能性はない。

(2) マウスを用いた Ad5CMV-NK4 の安全性試験

Crlj:CD-1 (ICR) 系雄性マウスを用いて Ad5CMV-NK4 の単回静脈内投与による安全性試験を実施した。Ad5CMV-NK4 の投与量は、高用量 (1.25×10^8 pfu /animal) 及び低用量 (1.25×10^6 pfu /animal) の2用量 (n=6) とし、対照群のマウスにはリン酸緩衝液 (-) を静脈内投与した (n=6)。投与後1、3及び14日後に採血し血清を採取した。また、採血終了後、脳、肺、肝臓、腎臓及び精巣を摘出し重量測定後、肺、腎臓及び精巣については左側を、脳については正中線で2分割した左側を、肝臓については最も大きい葉 (左葉) を液体窒素で凍結し保存した。他方はホルマリン固定後に、常法に従って病理組織検査を実施した。投与1日後に低用量群の1例が死亡した。投与2及び3日後に高用量群の2例に、自発運動減少、脱毛、後肢浮腫及び痂皮形成がみられ、低用量群の2例に脱毛及び自発運動減少がみられた。投与3日後に低用量群の1例に自発運動減少、失調歩行、脱毛及び体温低下がみられた。各臓器の病理組織検査では、高用量群、低用量群とも対照群と同様の組織像を呈しており、Ad5CMV-NK4 の正常組織への病理組織学的影響は認められなかった。

組織より抽出したDNAを用いてウイルスベクター投与後の各臓器中に存在するアデノウイルス量を検討した結果では、高用量投与群において、投与14日後でも肝組織中にアデノウイルスDNAの存在が確認され、肺には投与1日後のみアデノウイルスDNAの存在が確認されたが、低用量投与群においては、いずれの臓器においても、アデノウイルスDNAの存在は確認されなかった。一方、組織より抽出したRNAを用いて各臓器中でのNK4mRNA発現を確認した結果においては、高用量投与群の投与1日後の肺・肝・精巣組織、また、投与3日後の肝組織に対照群と比して高いレベルでNK4の発現を認めたが、それ以外では対照群と同程度のレベルのNK4mRNAの発現状況であった。

6 国外における使用等により得られた情報

Ad5CMV-NK4を用いた臨床試験は、実施例がないためこれまでに得られた情報はない。搭載cDNAが異なるAd5CMVベクターの使用経験は2つの臨床研究で報告されているので、その結果を記載する。

- ① 本臨床研究の対象と同じ悪性胸膜中皮腫を対象とした、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子発現型アデノウイルスベクターの第I相臨床試験（胸腔内投与）が米国のペンシルバニア大学において実施された（文献4）。投与量は 5×10^{10} viral particles (vp)から 5×10^{13} vpまで胸腔内投与が行われた。その結果、最高投与量まで増量されたが、最大耐量は確認できず 5×10^{13} vp以上と判断された。主な副作用は注入部位疼痛、発熱などで、腎毒性等の化学療法に良く見られる重篤な毒性は報告されておらず忍容性は良好であった。なお、環境中への拡散について報告はない。
- ② 悪性胸膜中皮腫を対象とした、インターフェロン β 遺伝子発現型アデノウイルスベクターの第I相臨床試験（胸腔内投与）が米国のペンシルバニア大学において実施された（文献5）。投与量は 9×10^{11} vpと 3×10^{12} vpの2用量で胸腔内投与が行われた。その結果、 3×10^{12} vp投与4症例において一過性の低酸素症が1例（原疾患に心不全を有していた症例で、利尿剤にて改善）と肝機能障害が1例（生化学的検査によるもので臨床的症状は認められず）が認められた。一方 9×10^{11} vp投与の場合、6例中6例でグレード1ないし2の有害事象が観察され、当該研究における最大耐量は 9×10^{11} vpと判断された。主な副作用は注入部位疼痛、発熱などで、腎毒性等の化学療法に良く見られる重篤な毒性は報告されておらず忍容性は良好であった。また、上記10症例のなかで4例の患者から、アデノウイルス投与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。

文献3： Shimada H, Matsubara H, Shiratori T, et al. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2006; 97: 554-561.

文献4： Serman DH, Recio A, Vachani A, et al. Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 7444-7453.

文献5： Serman DH, Recio A, Carroll RG, et al. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN- β gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions. high rate of antitumor immune responses. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 4456-4466.

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

Ad5CMV-NK4の感染性は、感染の種特異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タイプ5型Adと同一であり、微生物に感染することはなく、また有害物質等の産生により他の微生物を減少させることないと考えられる。したがって、このために影響を受ける可能性のある野生動植物はない。これは野生型アデノウイルスとなっても同じである。

(2) 影響の具体的内容の評価

他の微生物を減少させることはないため、当該ウイルスに関して該当事項はない。

(3) 影響の生じやすさの評価

他の微生物を減少させることはないため、当該ウイルスに関して該当事項はない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質について生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

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

Ad5CMV-NK4の感染性はアデノウイルス5型と同じであり、当該遺伝子組換えウイルスが感染しうる対象はヒトを含む一部のほ乳類及び鳥類である。しかし、自己増殖能を失っていることから、他の野生動植物に対して病原性を呈するおそれはないと考えられる。また、欠損しているE1領域について、Ad5CMV-NK4がこれを取り込み、野生型アデノウイルスとなることを、現実問題として自然界で起こることは想定し難いが、万一野生型となったとしても、結局はアデノウイルス5型と同一の感染性と病原性を有するにすぎず、すでに自然界に広く分布しているアデノウイルス5型以上の感染性と病原性を獲得するものではない。

(2) 影響の具体的内容の評価

Ad5CMV-NK4がヒトに感染した場合、一過性にNK4蛋白質の発現が見られるが、これによるヒトへの病原性は知られていない。また Ad5CMV-NK4由来のRCAおよび、万一野生型アデノウイルスとなった場合においても、その感染性と病原性はすでに自然界に分布するアデノウイルスと同等であり、その病原性については、I「宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報」の3「生理・生態学的特性」(5)病原性に記載されているものと同一である。Ad5を用いた遺伝子治療用ベクターについては1990年以降、米国・欧州・中国あるい

は本邦においても使用されているが、環境中への悪影響に関する報告はない。またAd5による遺伝子治療ベクターによる死亡例は、I「宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報」の2「使用等の歴史及び現状」に記載されたとおりである。

(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、Ad5CMV-NK4および、万一生じると仮定した野生型アデノウイルスの環境中への拡散は極めて微量である。実際問題としてAd5CMV-NK4が感染しうるのはヒトのみあり、当該ウイルスは自己増殖能を失っていることから環境中で増殖することはない。Ad5CMV-NK4由来の野生型アデノウイルスが、環境中に大量に放出されることは考えられず、万一そのようなことが生じても、その病原性は広く自然界に分布するアデノウイルスと同等である。したがって、Ad5CMV-NK4の投与によって、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

当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

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

Ad5CMV-NK4の有害物質の産生性は知られておらず、また安全性試験の結果等において、当該遺伝子組換えウイルスの野生動物に対する有害物質の産生性は認められていない。また植物に対して有害物質産生もないことから、他の野生動植物等に対する有害物質を産生するおそれはないと考えられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

有害物質の産生はないことから特記すべきことはない。

(3) 影響の生じやすさの評価

有害物質の産生はないことから特記すべきことはない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

有害物質の産生性について、当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

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

Ad5CMV-NK4の感染性はアデノウイルス5型と同じであり、実際問題として感染しうるのは自然宿主のヒトであり、また当該遺伝子組換えウイルスは自己増殖能を失っていることから、他の野生動植物に対して核酸を水平伝達するおそれはないと考えられる。万一野生型のアデノウイルスが生じて、その感染性はアデノウイルス5型を越えるものではない点から、核酸の水平伝達によって影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

Ad5CMV-NK4が感染したヒトにおいて一過性にNK4遺伝子が発現しうるが、これによってヒトを含む他の哺乳類等への水平伝達は知られていない。また野生型アデノウイルスが万一生じて、核酸水平伝達の性質は自然界に広く分布するアデノウイルス5型と同様である。

(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、Ad5CMV-NK4より派生するRCAの環境中への拡散は極めて微量である。Ad5CMV-NK4は自己増殖能を失っており、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。アデノウイルスが自然界において感染し増殖するのはヒトにほぼ限られており、野生型アデノウイルスが同一個体の同一細胞に共感染する可能性は、ヒトのアデノウイルスに対する免疫応答を考えれば極めて低い。Ad5CMV-NK4より派生するRCAの核酸水平伝達の性質は自然界に広く分布するアデノウイルス5型と同様である。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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考えられる。

5 その他の性質

なし。

V 総合的評価

Ad5CMV-NK4 の感染性は、感染の種特異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タイプ 5 型 Ad と同一であり、自然界では微生物、植物に感染することはないと考えられる。また有害物質等の産生により他の微生物等を減少させることないと考えられる。また Ad5CMV-NK4 の動物への感染性はヒトを含む一部のほ乳類及び鳥類であるが、自己増殖能を失っていることから、他の野生動物に対して病原性を呈するおそれはないと考えられる。また、欠損している E1 領域について、Ad5CMV-NK4 がこの遺伝子を取り込み、野生型アデノウイルスとなることは現実には自然界で起こることは想定し難いが、万一野生型となったとしても、結局はアデノウイルス 5 型と同一の感染性と病原性を有するにすぎず、すでに自然界に広く分布しているアデノウイルス 5 型以上の感染性と病原性を獲得するものではない。さらに、Ad5CMV-NK4 による有害物質の産生性は認められていないことから、他の野生動植物等に対する有害物質を産生するおそれはないと考えられる。したがって、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響、病原性に関して生物多様性影響、水平伝達によるヒトや他の哺乳類に対し生物多様性影響を生じるおそれはないと考えられる。

また、使用等を行う場所としては主として P2 レベル相当の個室に限っており、被験者の排泄物等については不活化する等の措置を講じることとしている。

以上のことから、当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、Ad5CMV-NK4 の第一種使用等により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 NK4 遺伝子発現アデノウイルスベクターの全塩基配列

- CMV プロモータ : 482-1309
- コザック配列 : 1316-1321
- **NK4 遺伝子 : 1322-2740**
 TGATAA : 終止コドン
- SV40 polyA : 2753-2897

```

CATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGCGGGGGCGTGGGAAC
GGGGCGGGTACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAGTACAG
TTTTTGGTGTGCGCGGGTATACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGTTTAGGGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCGAGT
AAGATTTGGCCATTTTCGCGGGAAACTGAATAAGAGGAAGTGAATCTGAATAATTTGTGTACTCATAGCGCGTAATATTTGTGTC
TAGGGCCGCGGGGACTTTGACCGTTTTACGTGGAGACTCGCCAGGTGTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCGGGGTCAAAGTTGGC
GTTTTATTATTATAGTACGTACGTACCAGTGCCTAGGTGGTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTTCATTGGTTATATAG
CATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATAGCTTGTATCCATATCAATAATGTCATTTTATATTGGCTCATGTCCAACATTAC
CGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCG
TTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG
TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATA
TGCCAAGTACGCCCCATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA
CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTG
ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTC
GTAACAACCTCCGCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCTATATAAGCAGAGCTGTTTAGTGAACCGTC
AGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACGGGACCGATCCAGCCTCCGCGCGGGGACCGGTGCA
TTGGAAGCTTGGCACCATTGGGTGACCAAACCTCGCCAGCCCTGCTGTGAGCATGTCCTCTGCATCTCCTCTGCTGCCCAT
CGCCATCCCTTATGACAGGGGACAAAGGAAAAGAGAAATACAATTCATGAATTCAAAATCAGCAAGACTACCCTAATCAAAT
AGATCCAGCACTGAAGATAAAAACCAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACTTCCATT
CACTGCAAGGCTTTTGTTTTGGATAAAGCAAGAAAACAATGCTCTGGTTCCTTCAATAGCATGTCAAAGTGGAGTGAAAAAAGA
ATTTGGCCATGAATTTGACCTCTATGAAAACAAAGACTACATTAGAAAATGCATCATTTGGTAAAGGACCGCAGCTACAAGGGAACAGT
ATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTGACGCCCTGGAGTCCATGATACACACGACACAGCTATCGGGTAAAGACTTACAGGA
AAACTACTGTCCAAATCCTCGAGGGGAGAAGGGGACCCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGAAGTCTGTGACAT
TCCTCAGTGTTCAGAAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGGAGAGTTATCGAGGTCATGGAATCATAAGAAATCAGGCAAGATTTG
TCAGCGCTGGGATCATCAGACACCACCCGGCACAAATCTTCCTGAAAAGATATCCGACAAAGGCTTTTCATGATAAATATTECCG
CAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGGTGTACTACTCTTGACCCTCACACCCGCTGGGAGTACTGTGCAATTAACAATGCGCTGA
CAATACTATGAATGACACTGATGTTCCTTTGGAAACAATGAATGCATCAAGGTCAGGAGAAGGCTACAGGGGCATGTCATATAC
CATTTGGAATGGAATTCATGTCAGCGTTGGGATTTCTCAGTATCCTCACGAGCATGACATGACTCCTGAAAATTTCAAGTGCAGGA
CCTACGAGAAAATTAAGTCCGAAATCCAGATGGGTGATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATG
CTCCCAAATTCCAAATCTGTGATATGTCACATGGACAAGATTGTTATCGTGGGAATGGCAAAAATATATGGGCAACTTATCCCAAAC
AAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAATGGAAGACTTACATCGTCAATCTCTCGGGAACCAGATGCAAGTAAGCT
GAATGAGAATTAAGTCCGAAATCCAGATGATGATGCTCATGGACCTGGTGTGCTACACGGGAAATCCACTCATTCCTTGGGATTTATG
CCCTATTTCTCGTGTGAAAGGTGATACACACCTACAATAGTCTGATAATCTAGACGAGATCCGAACTTGTTTATTGACAGCTTATAA
TGTTTACAAAATAAGCAATAGCATCACAAATTTCCAAAATAAAGCATTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT
CAATGTATCTTATCTAGATCTGTACTGAAATGTGTGGCGTGGCTTAAAGGTTGGGAAAGAATATATAAGGTGGGGGTCTTAT
GTAGTTTTGTATCTGTTTTGCAGCAGCCCGCCGCCATGAGCACCACCTGTTTGTGGAAGCATGTTGAGCTCATATTTGACAAC
GCGCATGCCCCATGGGCGGGGTGCGTCAGAATGTGATGGGCTCCAGCATGATGTTGCGCCCGCTGCCCCGAAACTCTACTAC
CTTGACCTACGAGACCGTGTCTGGAACGCCGTTGGAGACTGCAGCCTCCGCGCCGCTTCAGCCGCTGCAGCCACCGCCGCGGGAT
TGTGACTGACTTTGCTTTCTGAGCCCGTTGCAAGCAGTGCAGCTTCCGTTTCATCCGCCCGCATGACAAGTTGACGGCTCTTTT
GGCACAAATGGATTTTGTACCCGGGAATTAATGTCGTTTTCTCAGCAGCTGTTGGATCTGCGCCAGCAGGTTTCTGCCCTGAAGGC
TTCTCCCTCCCAATGCGGTTTAAACATAAATAAAAAACCAGACTCTGTTTGGATTTGGATCAAGCAAGTGTCTTGCTGTCTTTA
TTTAGGGTTTTTGCAGCGCGGTAGGCCGGGACAGCGGCTCGGTCGTTGAGGGTCTGTGTATTTTTCCAGGACGTTGGTAAAG
GTGACTCTGGATGTTAGATACATGGGCATAAGCCGCTCTGCGGGTGGAGGTAGCACCAGTGCAGAGCTTCAAGTGTGCGGGGTGGT
GTTGTAGATGATCCAGTGTAGCAGGAGCGCTGGGCGTGGTGCCTAAAATGTCTTTCAGTAGCAAGCTGATTGCCAGGGGACAGCC
CTTGGTGAAGTGTTTACAAAGCGGTTAAGCTGGGATGGGTGCATACGTGGGATATGAGATGCATCTTGGACTGTATTTTTAGGTT
GGCTATGTTCCAGCCATATCCCTCCGGGATTCATGTTGTGCAGAACCACAGCAGTGTATCCGGTGCATTTGGGAAATTTGTC
ATGTAGCTTAGAAGGAAATGCGTGGAAAGAACTGGAGACGCCCTGTGACCTCCAAGATTTTCCATGCAATTCCTCATATGATGGC
AATGGGCCACGGGCGGGCCTGGGCGAAGATATTTCTGGGATCACTAAGCTCATAGTTGTGTTCCAGGATGAGATCGTCATAGGC
CATTTTTACAAAGCGGGGAGGTTGCCAGACTGCGGTATAAATGGTTCCATCCGCGCCAGGGGCTAGTTACCTCACAGATTTG
CATTTCCACGCTTTGAGTTGAGTTGAGTTGGGGATCTGTCTACTCGGGGCGATGAAGAAAACGGTTTCCGGGTAGGGGAGATCAG
CTGGGAAGAAAGCAGGTTCTGAGCAGCTGCGACTTACCGCAGCCGGTGGGCCGTAATCACACCTATTACCGGCTGCAACTGGTA
GTTAAGAGAGCTGCAGCTGCCGTCTATCCCTGAGCAGGGGGCCACTCGTTAAGCATGTCCTGACTCGCATGTTTCCCTGACCAA
ATCCGCCAGAAGCGCTCGCCGCCAGCGATAGCAGTTCTTGAAGGAAGCAAAGTTTTTCAACGGTTTGGAGACCGTCCGCCGTAGG
CATGCTTTTGGCGTTTGACCAAGCAGTTCCAGGCGGTCCACAGCTCGGTCACTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCATATCTCC

```

TCGTTTTCGCGGGTTGGGGCGGCTTTTCGCTGTACGGCAGTAGTCGGTGCCTCGTCCAGACGGGCCAGGGTCATGTCTTTCCACGGGGCGC
 AGGGTCTCGTCAGCGTAGTCTGGGTACGGTGAAGGGGTGCGCTCCGGGTCGCGCTGGCCAGGGTGCCTTGGAGGCTGGTCTCG
 CTGGTGTGAAGCGCTGCCGCTTTCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCATTTGACCATGGTGTTCATAGTCCAGCCCTCCGCGGGC
 TGGCCCTTGGCGCGCAGCTTGCCTTGGAGGAGGGCCGCGCACGAGGGGCAGTGCAGACTTTTGGGGCGTAGAGCTTGGGCGGAGA
 AATACCGATTCCGGGGAGTAGGCATCCGCGCCGACGGCCCGCAGACGGTCTCGCATTCACAGCCAGGTGAGCTCTGGCCGTTCCG
 GGGTCAAAAACAGGTTCCCCCATGCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTCTGGTTTTCCATGAGCCGGTGTCCACGCTCGGTGACGAAA
 AGGTGTCCGTGTCCCCGTATACAGACTTGAGAGGCTGTCTCGAGCGGTGTCCGCGTCTCTCGTATAGAACTCGGACCAC
 TCTGAGACAAGGCTCGCTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCTAAGTGGAGGGGTAGCGGTGCTGTCCACTAGGGGGTCCACTCGC
 TCCAGGGTGTGAAGACACATGTGCCCTCTTCGGCATCAAGGAAGGTGATTGGTTGTAGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGTTCCT
 GAAGGGGGCTATAAAAAGGGGGTGGGGGGCGTTCGCTCTACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTGGGGTGG
 TACTCCCTCGAAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTACCTGGCCCGCG
 GTGATGCCTTTGGGGTGGCCGCATCCATCTGGTCAAGAAAGACAATCTTTTGTGTCAAGCTTGGTGGCAAACGACCCGTAGAGG
 GCGTTGGACAGCAACTTGGCGATGGAGCGCAGGGTTTGGTTTTGTGCGGATCGGCGCTCCTTGGCCGGATGTTTAGCTGCACG
 TATTGCGCGCAACGCCACCCCATTCGGGAAAGACGGTGTGCGCTCGTGGGACCAGGTGCACGCGCAACCCGGTGTGTCAGG
 GTGACAAGGTCAACGCTGGTGGCTACTCTCCGCGTAGGGCTCGTGGTCCAGCAGAGGGCGCCCGCTTGGCGGAGCAGATGGC
 GGTAGGGGGTCTAGCTCGCTCTCGTCCGGGGGTCTGCGTCCACGGTAAAGACCCCGGGCAGGAGCGCGCTCGAAGTAGTCTATC
 TTGCATCTTGAAGTCTAGCGCTGCTGCCATGCGGGGGCGCAAGCGCGCTCGTATGGGTGTAGTGGGGGACCCCATGGCATG
 GGGTGGGTGAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAATGTCGTAACGTAGAGGGGCTCTCTGAGTATTCCAAGATATGTAGGGTAGCAT
 CTTCCACCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAATCGTATAGTTCGTGCGAGGGAGCGAGGAGGTGGGACCGAGGTGTCTACGGGGGGC
 TGCTCTGCTCGGAAGACTATCTGCCGTAAGATGGCATGTGAGTTGGATGATATGGTTGGACGCTGGAAGACGTTGAAGTGGCGTCT
 GTGAGACTTACCGCGTACGCACGAAGGAGGCGTAGGAGTCCGCGCAGCTTGTGACAGCTCGCGGGTACTGACGCTTAGGGCG
 CAGTAGTCCAGGGTTTCTTGTGATGATGCTACTATCTCTGTCCCTTTTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGG
 TCTTTCCACTACTCTGGAACCCGCTCGGCTCCGCAACGTAAGGAGGCTAGCATGTAGAACTGGTTGACGGGAGCTGTTAGGGC
 CAGCATCCCTTTTCTACGGGTAGCGCTATGCTGCGCGGCTTCCGGAGCGAGGTGTGGGTGAGCGCAAAGGTGTCCCTGACCATG
 ACTTTGAGGTACTGGTATTTGAAGTCAAGTGTGCTGCGCATCCGCCCTGCTCCAGAGCAAAAAGTCCGTGCGCTTTTTTGAACCGGGA
 TTTGGCAGGGCGAAGGTGACATCGTTGAAGAGTATCTTTCCGCGCGAGGCATAAAGTTGCGTGTGATGCGGAAGGGTCCCGGACC
 TCGGAACGGTGTAAATACCTGGGCGGCGAGCAGCATCTGCAAGCCGTTGATGTTGTGGCCACAATGTAAAGTCCAAGAAG
 CGCGGGATGCCCTTGTGAGAGGCAATTTTTTAAGTCCCTGCTAGGTGAGCTCTTCAAGGGAGCTGAGCCCGTCTCTGAAAGGGCC
 CAGTCTGCAAGATGAGGGTTGGAAGCGACGAATGAGCTCCACAGGTACGGGCCATTAGCATTTGACAGGTGGTGCAGAAAGGTCTTA
 AACTGGCGACTATGGCCATTTTTTCTGGGGTGTGACAGTAGAAGGTAAGCGGGTCTTGTCCAGCGGTCCCATCCAAGGTTCCGG
 GCTAGGCTCTCGCGGGCAGTCACTAGAGGCTCATCTCCGCCAAGTTCATGACCAGCATGAAGGGCACGAGCTGCTTCCCAAAGGCC
 CCCATCCAAGTATAGTCTCTACATCGTAGGTGACAAAGACGCTCGGTGCGAGGATCCGAGCCGATCCGGGAAGAGACTGGATCTCC
 CGCCACCAATTGGAGGATGGCTATTGATGTGGTGAAGTAGAAGTCCGCTGCGACGGCCGAACACTCGTGTGGCTTTGTAAAAA
 CGTGGCAGTACTGGCAGCGGTGACGGGCTGTACATCTGACAGAGGTGACCTGACGACCGCGCACAGGAAGCAGAGTGGGAAT
 TTGAGCCCTCGCCTGGCGGGTTTTGGCTGGTGGTCTTCTACTTCCGGTGTCTGTCTTACCGTCTGGCTGCTCGAGGGGAGTTACG
 GTGGATCGGACACCACCGCGCGGAGCCCAAAGTCCAGATGTCGCGCGCGGGCGGTGGAGCTTGTGACAACATCGCGCAGATGG
 GAGCTGTCCAGGCTTGGAGCTCCGCGCGGTGAGGCTCAGGTGAGGCGGAGCTCTGCGAGGTTTACTCGCAGGATCCGCGCGGCGG
 GCTAGATCCAGGTGATACCTAATTTCCAGGGGCTGGTGGTGGCGCGTTCGATGGCTTGCAGAGGGCCGATCCCGCGGCGGACT
 ACGGTACCGCGCGGGCGGGGGTGGCCCGGGGGTGTCTTGGATGATGCATCTAAAAGCGGTGACCGGGCGGAGCCCGGGAGGTA
 GGGGGGGTCCGGACCCGCGGGGAGAGGGGGCAGGGGCAGCTCGGCCCGCGCGGGGCGAGGAGCTGGTCTGCGCGGTAGGTTCC
 TGGCGAACCGCACGCGCGGGTGTGATCTCTGAAATCTGGCGCTCTCGGTGAAGACGACGGGCGGGTGGAGCTTGAACCTGAAAG
 AGAGTTCCAGAGAATCAATTTTCGTTGCTGTTGACGGCGGCTGGCGCAAACTCTCTGACGCTCTCTGAAAGGTGCTGTGATAGGCGA
 TCTCGGCCATGAACTGCTGATCTCTTCTCTGAGATCTCCGCGTCCGGCTCGCTCCACGGTGGCGGGCAGGTCGTTGGAATGC
 GGGCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTGAGGCTCCCTCGTTCCAGACGGGCTGTAGACCACGCCCCCTTCCGCATCGGGGCGCGCA
 TGACCACCTGCGCGAGATTGAGCTCCACGTGCCGGGCGAAGACGGCGTAGTTTTCCAGGGCGTGAAGAGGTAGTTGAGGGTGGTGC
 CGGTGTCTTGCACGAAGAAGTACATAAACCAGCGTCCGCAACGTTGATTCGTTGATATCCCCAAGGCCCTCAAGGCGCTCCATGG
 CCTCGTAGAAGTCCACGGCAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGGGAGTGGGCGCCGACACGGTAACTCTTCCAGAAAGACGGATGGCTCG
 CGACAGTGTGCGCACCTCGCGCTCAAAGGCTACAGGGGCTCTTCTTCTTCTCAATCTCTCTTCCATAAGGGCTCCCTTCTT
 CTCTTCTGGCGGGTGGGGGAGGGGGACACGGCGGCGACGACGGCGCACCGGGAGGGGTCGACAAAAGCGCTCGATCATCTCCC
 CGCGGGCAGCGCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGGCGCTTCTCGCGGGGGCGCAGTTGGAAGACGCGCCCGTCTATGTCCCGGTTAT
 GGGTTGGCGGGGGTGCATCGCGGACGGGATACGGCGCTAACGATGCATCTCAACAATTGTGTGATAGTACTCCGCCCGCGAGGG
 ACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGGAAAGGGCGTCTAACAGTCAAGTCCAGGTTAGGCTGAGCACCG
 TGGCGGGCGCAGCGGGCGGGTGGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAGTAGGCGGTCTTGGACGGC
 GGATGGTGCAGAGAAGCACCATGTCTTGGGTCCGGCTGCTGAATGCGCAGGGCGTGGCCATGCCCCAGGCTTGGTTTTGACATC
 GGCGCAGGCTTTGTAGTAGTCTTGATGAGCTTTTACCGGCATCTTCTTCTTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
 TCGCTGGCGGGCGGGGAGTTGGCCGTAGGTGGCGCCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
 GGGCTAGGTGAGCGACAACGCGCTCCGCTAATATGGCTCTGACCTGCGTGAAGGGTAGACTGGAAGTCAATCCATGTCCACAAAGC
 GGTGGTATGCGCCGTTGATGGTGAAGTGCAGTTGGCCATAACGGACAGTTAACGGTCTGGTGACCCGGTGGCAGAGCTCGG
 TGTACCTGAGACCGAGTAAGCCCTCGAGTCAATACGTAGTCTGCAAGTCCGACACAGGTAAGTGGTATCCACCAAAGTGGC
 GCGGGGCTGGCGGTAGAGGGGCCAGCGTAGGGTGGCCGGGGCTCCGGGGCGAGATCTTCCAACATAAGGGCATGATATCCGTAGA
 TGTACTGGACATCCAGGTGATCCGGCGGGCGGTGGTGGAGGGCGCGGAAAGTCCGCGACCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCA
 AAAAGTGTCCATCGGTGGGAGCGCTGCGCGGTGAGGCGCGCAATCTGACGCTCTAGACCTGCAAAAAGGAGGAGCCTGTAAG
 CGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAATTCGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTCCGAGCCCGTATCCGGCGCTCCGC
 CGTATCCATGCGGTTACCGCCCGGTGTGCAACCCAGGTGTGCGACGTGACACACGGGGAGTGTCTCTTTGGCTTCTTCCAG
 GCGCGGGCTGCTCGCTAGCTTTTTTGGCCACTGGCCGCGCGCAGCGTAAGCGGTAGGCTGGAAGCGGAAAGCATTAAGTGGCT
 CGTCCCTGTAGCCGGAGGGTTATTTTCCAAGGGTGTAGTCCGGGACCCCGGTTCCAGTCTCGGACCGGGCGACTGCGCGGAAC
 GGGGGTTTGCATCCCGCTCATGCAAGACCCGCTTGAATACTCTCGGAAACAGGGACGAGCCCTTTTGTCTTTCCAGATGC
 ATCCGGTGTGCGGCAGATGCGCCCCCTCTCAGCAGCGGCAAGAGCAAGAGCAGCGGCAGACATGCAGGGCACCTCCCTCTCT

CTACCGCGTCAGGAGGGGCGACATCCGCGGTTGACGCGGCAGCAGATGGTGATTACGAACCCCGCGGGCGCCGGCCGGCGACTACC
TGGACTTGGAGGAGGGCGAGGGCCTGGCGCGGCTAGGAGCGCCCTCCTGAGCGGCACCCAAGGGTGCAGCTGAAGCGTGATACGC
GTGAGGCGTACGTGCCCGGCAGAACCTGTTTCGCGACCGCGAGGGAGAGGCCCGAGGAGATGCGGGATCGAAAGTTCCACGCAG
GGCGCGAGCTGCCGCATGGCTGAATCGCGAGCGGTTGCTGCGCGAGGAGGACTTTGAGCCCGACCGCGCAACCGGGATTAGTCCCG
CGCGCGCACACGTGGCGGCGCCGACCTGGTAACCGCATACGAGCAGACGGTGAACCAGGAGATTAACCTTCAAAAAAGCTTTAACA
ACCACGTGCGTACGCTTGTGGCGCGCGAGGAGGTGGCTATAGGACTGATGCATCTGTGGGACTTTGTAAGCGCGCTGGAGCAAAAC
CAAATAGCAAGCCGCTCATGGCGCAGCTGTTCTTATAGTGCAGCACAGCAGGGACAACGAGGCATTAGGGATGCGCTGCTAAACA
TAGTAGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTGCTCGATTTGATAAACATCCTGCAGAGCATAGTGGTGCAGGAGCGCAGCTTGAGCCTGGCTG
ACAAGGTGGCCGCCATCAACTATTCCATGCTTAGCCTGGGCAAGTTTTACGCCGCAAGATATACCATACCCCTACGTTCCCATAG
ACAAGGAGGTAAGATCGAGGGGTTCTACATGCGCATGGCGTGAAGGTGCTTACCTTGAGCGACGACCTGGGCGTTTATCGCAACG
AGCGCATCCACAAGGCGCTGAGCGTGAGCCGGCGCGGAGCTCAGCGACCCGAGCTGATGCACAGCCTGCAAAGGGCCCTGGCTG
GCACGGCGAGCGCGATAGAGAGGCGGAGTCTACTTTGACGCGGGCGCTGACCTGCGCTGGGCCCAAGCCGACGCGCCCTGGAGG
CAGCTGGGGCCGACCTGGGCTGGCGGTGGCACCCGCGCGCTGGCAACGTGGCGGCGTGGAGGAATATGACGAGGACGATGAGT
ACGAGCCAGAGGACGCGGAGTACTAAGCGGTGATGTTCTGATCAGATGATGCAAGACCGAACGGACCCGGCGTGGCGGGCGCTG
GCAGAGCCAGCCGTCGGCCCTAACTCCACGGACGACTGGCGCCAGGTGATGGACCGCATCATGTCGCTGACTGCGCGCAATCCTGA
CGAGTCCGGCAGCAGCCGAGGCCAACCGGCTCTCCGCAATCTGGAAGCGGTGGTCCGGCGCGCGCAAACCCACGCAGGAGAA
GGTGTGTCGATCGTAAACCGCTGGCCGAAAACAGGGCCATCCGGCCGACGAGGCGCGCTGGTCTACGACGCGCTGCTTACGCG
CGTGGCTCGTTACAACAGCGGCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGGCTGGTGGGGATGTGCGCGAGGCCGTCGCGCAGCGTGA
CGCGCAGCAGCAGGGCAACCTGGGCTCCATGGTTGCACTAAACCGCTTCTGAGTACACAGCCCGCAACGTGCCGCGGGGACAGGA
GGACTACACCAACTTTGTGAGCGCACTGCGGCTAATGGTGAAGTGCAGACCCGAAAGTGAAGTGTACCACTGGGCGAGACTATT
TTCCAGACAGTAGACAAGGCTGCAGACCGTAAACCTGAGCGAGCTTTCAAAAACCTGAGGGGCTGTGGGGGTGGCGGCTCC
CACAGGCGACCGCGGACCGTGTCTAGCTTGTGACGCCAACTCGCGCTGTTGCTGCTGCTAATAGCGCCCTTACGGACAGTGG
CAGCGTGTCCCGGACACATACTTAGGTCACTTGTGACACTGTACCGCGAGGCCATAGGTGAGGCGCATGTGGACGAGCATACTTT
CCAGGAGATTACAAGTGTACGCCGCGCGCTGGGGCAGGAGGACAGGGCAGCTGGAGGCAACCTAAACTACCTGCTGACCAACCG
GCGGCAGAAGATCCCTCGTTGCACAGTTAAACAGCGAGGAGGAGCGCATTTTGGCTACGTGCAGCAGAGCGTGAGCCTTAACT
GATGCGCGCAGGCTAACCGCTGAGCGTGGCGTGGCATGACCGCGCAACATGGAACCGGCGATGATGCTCAAAACCGCGCTT
TATCAACCGCTAATGACTACTTGCATCGCGCGGCGCGTGAACCCGAGTATTTACCAATGCCATCTGAACCCGCACTGGCT
ACCGCCCTGTTTCTACACGGGGGATTCGAGGTGCCGAGGTAACGATGGATTCTCTGGGACGACATAGACGACAGCGTGTT
TTCCCGCAACCCGAGACCTGCTAGAGTTGCAACAGCGCGAGGAGGACAGGCGCGCTGCGAAAGGAAAGCTTCCCGAGGCCAAG
CAGCTTGTCCGATAGGCGCTGCGGCCCGCGGTGAGTACTAGTACCCATTTCAAGCTTGATAGGGTCTTACCAGCATACTG
CACCACCCCGCGCGCTGCTGGGCGAGGAGGATCTAAACAACTCGCTGCTGACGCGCGCGGCAAAAACCTGCTCCGCG
ATTTCCCAACAACGGGATAGAGAGCCTAGTGGACAAGATGAGTAGATGGAAGACGTACGCGCAGGAGCACAGGGACGTGCCAGGCC
GCGCCCGCCACCGCTGCTCAAAGGCACGACCGTACGCGGGGTCTGGTGTGGGAGGACGATGACTCGGCAGACGACAGCAGCGTCT
GGATTTGGGAGGAGTGGCAACCCGTTTGGCGACCTTCGCCCGGTTGGGAGAGATGTTTTAAAAAAGCAATGATGCAAAA
ATAAAAACTACCAAGGCAATGGCAATGGCACGAGCTTGTGTTTACCATAAAGTTTAAAGCGCGGGTGTGCTGCGGCTTGCCTAA
GGACAATCAGGTGGAGCTGAAATACGAGTGGGTGGAGTTACCGTGCAGGAGGCAACTACTCCGAGACCATGACCATAGACTTAT
GAACAACCGCATCGTGGAGCACTACTTGAAGTGGGCGAGACAGAAGCGGGTCTGGAAAGCGACATCGGGGTAAAGTTGACACCCG
CAACTTCAGACTGGGGTTGACCCCGTCACTGGTCTTGTGATGCTGGGGTATATACAAACGAAGCCTTCCATCCAGACATATTTT
GCTGCCAGGATGCGGGGTGGACTTACCCACAGCCGCTGAGCAACTTGTGGGCATCCGCAAGCGGCAACCTTCCAGGAGGGCTT
TAGGATCACTACGATGATGCTGGAGGTTGATACATTTCCCGACTTACCTGCGGCTCGGAGCAGGTCTACTGGTCTGCGAGCATGAT
CGAACAGGGCGGGGTGGCGCAGGCGGCGAGCAACAGCAGTGGCAGCGGCGGGAAGAGAAGTCCAACCGCGCAGCCGCGCAATGCA
GCCGTTGGAGGACATGAACGATCATGCCATTCGCGGCGACACCTTTGCCACACGGGCTGAGGAGAAGCGCGCTGAGGCCGAAGCAGC
GGCCGAAGCTGCCGCCCGCTGCGCAACCCGAGGTGAGAGAAGCCTCAGAAGAAACCGGTGATCAAAACCCCTGACAGAGGACAGCAA
GAAACGCAAGTACAACCTAATAAGCAATGACAGCACCTTACCCAGTACCGCAGCTGGTACCTTGCATACAACCTACGGCGACCCCTCA
GACCGGAATCCGCTCATGGACCTGCTTTGCACTCCTGACGTAACCTGCGGCTCGGAGCAGGTCTACTGGTCTGCGAGCATGAT
GCAAGACCCCGTACCTTCCGCTCCACGCGCCAGATCAGCAACTTTCGGTGGTGGGCGCGGAGCTGTGCCCCGCTGCACTCCAAGAG
CTTCTACAACGACAGGCGGCTACTCCCACTCATCCGCCAGTTTACCTCTCGACCCAGTGTCAATCGCTTTCGAGAACCA
GATTTTGGCGCGCCCGCAGCCCCACCATCACCCGCTCAGTGAACAGTCTCTGCTCTCACAGATCACGGGACGCTACCGCTGCG
CAACAGCATCGGAGGATCCAGCGAGTGACCATTACTGACGCCAGACCGCCACTGCCCCTACGTTTACAAGGCCCTGGGCATAGT
CTCGCCCGCGCTCCTATCGAGCCGACTTTTTGAGCAAGCATGTCCATCCTTATATCGCCAGCAATAACAGGCGGCTGGGCGCTGCG
CTTCCCAAGCAAGATGTTTGGCGGGCCAAAGAAGCGCTCCGACCAACACCCAGTGGCGGTGCGGGGCACTACCGCGCCCTGGGG
CGCGCACAACGCGGCCGCACTGGGCGCACACCGTGCATGACGCCATCGACGCGGTGGTGGAGGAGCGCGCAACTACACGCCAC
GCCGCCACAGTGTCCACAGTGGACGCGGCCATTAGACCGTGGTGGCGGAGCCCGGCGCTATGCTAAAATGAAGAGACGGCGGAG
GCGGCTAGCAGCTCGCCACCGCCGACCCGGCATTGCCGCCAACCGCCGCGCGGCGGCGGCTTAAACCGCGCAGCTCGCACCG
CCGACGCGCGGCTCAGGGCGCTCGAAGGCTGGCCGCGGTTGTCAGCTGTGCCCCAGGTAACAGGCGAGCGCGCCGCGC
AGCAGCCGCGGCCATTAGTGTACTCAGGGTTCGAGGGGCAACGTGATTTGGGTGCGGACTCGGTTAGCGGCTGCGGTGTC
CGTGGCACCCGCCCCCGCGCAACTAGATTGCAAGAAAAAAGTACTTAGACTCGTACTGTTGATGATPCCAGGCGCGCGCGG
CAACGAAGCTATGTCAAGCGCAAAATCAAGAAGAGATGCTCCAGGTGATCGCGCCGAGATCTATGGCCCCGGAAGAAGGAAGA
GCAGGATTACAAGCCCCGAAGCTAAGCGGGTCAAAAAGAAAAAGAAAGATGATGATGATGAACCTGACGACGAGGTGGAAGTGT
GCACGCTACCGCGCCAGGCGAGCGGTACAGTGGAAAGGTGACCGCTGAAACCGTGTGTTTGGCAGCCGACCCAGCTTACTTAC
GCCGGTGGAGCGCTCCACCCGCACTACAAGCGGTGATGATGAGGTGTACGGCAGCAGGACCTGCTTGGCAGGCCAACGAGCG
CCTCGGGGAGTTTGCCTACGGAAGCGGCATAAGGACATGCTGGGTTGCCGTTGGACGAGGGCAACCAACACCTAGCCTAAGCC
CGTAACACTGCAGAGGTGCTGCCCGCTTGCACCTCCGAAGAAAAGCGCGGCTAAAGCGGAGTCTGGTGAAGTGGACCCAC

CGTGCAGCTGATGGTACCCAAGCGCCAGCGACTGGAAGATGTCTTGAAAAAATGACCGTGGAACTGGGCTGGAGCCCGAGGTCCG
CGTGGCCGCAATCAAGCAGGTGGCGCCGGGACTGGGCGTGCAGACCGTGGACGTTTCAGATACCCACTACCAGTAGCACCAGTATTGC
CACCGCCACAGAGGGCATGGAGACACAACCGTCCCGGTTGCCAGCGTGGCGGATGCCCGGTCAGCCGGTCCGTCGGCGCCG
GTCCAAGACCTCTACGGAGGTGCAAACGGACCCGTTGGATGTTTCGCGTTTTAGCCCCCGCGCCCGCGCCGTTTCAGGGAAGTACGG
CGCGCCAGCGCGCTACTGCCGAATATGCCCTACATCCTTCCATTGCGCTACCCCGGCTATCGTGGCTACACCTACCGCCCCAG
AAGACGAGCACTACCCGACGCCGAACCACCACTGGAACCCGCGCCCGCGTGCAGCCGTCGCCAGCCCGTGGTGGCCCGATTTCCGT
GCGCAGGGTGGCTCGCGAAGGAGGCGAGGACCTGGTGTGCCAACAGCGCGCTACCACCCAGCATCGTTTTAAAGCCGGTCTTTGT
GGTTCTTGACATATGGCCCTCACCTGCCCGCTCGTTTTCCGGTGCAGCCGTTCCAGGAAGAATGACCCAGTAGGAGGGCATGGC
CGGCCACGGCTGACGGGGCATGCGTGTGCGCACACCCGCGCGCGCGTGCACCGTGCATGCGCGCGGTATCCTGCC
CCTCCTTATTCCTACTGATCGCCGCGGATTTGGCGCGTGCCTGGAATTGCATCCGTGGCCTTGACAGGCGCAGACACTGATTTAA
AACAAAGTTGCATGTGGAAAAATCAAAATAAAAAGTCTGGACTCTCACGCTCGCTTGGTCTGTAACTATTTTGTAGAATGGAAGACA
TCAACTTTGCGTCTCTGGCCCCGACACCGGCTCGCGCCCGTTTATGGGAACTGGCAAGATATCGGCACCAGCAATATGAGCGGTG
GCGCCTTTCAGCTGGGGCTCGTGTGGAGCGGCATTAATAATTTCCGTTCCACCGTTAAGAAGTATGGCAGCAAGCCCTGGAACAGCA
GCACAGGCCAGATGCTGAGGGATAAGTTGAAAGAGCAAAATTTCCAACAAAAGGTGGTAGATGGCCTGGCCTTGGCATTAGCGGGG
TGGTGGACCTGGCCAACAGGCGAGTGCAAAATAAGATTAACAGTAAGCTTGTATCCCGCCCTCCCGTAGAGGAGCCTCCACCGGCCG
TGAGACAGTGTCTCCAGAGGGCGTGGCGAAAAGCGTCCGCGCCCCGACAGGGAAGAACTCTGGTGCAGCAAAATAGACGAGCCTC
CCTCGTACGAGGAGGCACTAAAGCAAGGCTGCCACCACCCGTCATCGCGCCCATGGCTACCGGAGTGTGGGCCAGCACACAC
CCGTAAACGCTGGACTGCCCTCCCGCGCACCCAGCAGAAACCTGTGCTGCCAGGCCGACCGCCGTTGTTGTAACCCGTCCCTA
GCCGCGCTCCCTGCGCCCGCGCCAGCGTCCCGATCGTTGCGGCCGTAGCCAGTGGCACTGGCAAAGCAGACTGCAACAGCA
TCGTGGGTCTGGGGTGCATCCCTGAAGCGCCGACGATGCTTCTGATAGCTAACGTGTGCTATGTGTGTCATGTATGCGTCCATGT
CGCCGCCAGAGGAGCTGCTGAGCCGCGCGCGCCGCTTTCCAAGATGGCTACCCCTTCGATGATGCCGAGTGGTCTTACATGCAC
ATCTCGGGCCAGGACCGCTCGGAGTACCTGAGCCCCGGGCTGGTGCAGTTGCGCGGCCACCGAGACGCTTTCAGCTGAATAAC
AAGTTTAGAACCACCCAGCTGGCGCTACGCACGCGTACCCAGCAGAACCTGCTGCCAGCGTCCAGCGTTTGCAGCTTTCAGTAACTG
CGTAGGATACTGCGTACTCGTACAAGCGCGGTTTCACTAGCTGTGGGTGATAACCGTGTGCTGGACATGGCTTCCAGTACTTTT
GACATCCGCGCGTGTGACAGGGGCCCTACTTTAAGCCCTACTCTGGCACTGCCTACACGCCCTGGCTCCCAAGGTTGCCCA
AATCCTTGCAGATGGGATGAAGCTGCTACTGCTCTGAAATAAACCTAGAAGAAGAGGACGATGACAACGAAGACGAAGTAGACGAG
CAAGCTGAGCAGCAAAAACTCACGTATTTGGCGAGGCGCTTATCTGGTATAAATATTACAAGGAGGGTATTCAAAATAGGTGTC
GAAGGTCAAACACTAAATATGCCGATAAAACATTTCAACCTGAACCTCAAATAGGAGAATCTAGTGGTACGAAACAGAAATTAAT
CATGCAGCTGGGAGAGTCTAAAAAGACTACCCCAATGAAACCATGTTACGGTTCATATGCAAAACCACAAATGAAATGGAGGG
CAAGGCATTCTTGTAAAGCAACAAAATGGAAAGCTAGAAAGTCAAGTGGAAATGCAATTTTCTCACTACTGAGGCAGCCGAGGC
AATGGTGATAACTTGACTCCTAAAGTGGTATTGTACAGTGAAGATGTAGATATAGAAACCCAGACACTCATATTTCTTACATGCC
ACTATTAAGGAAGGTAACCTACGAGAACTAATGGGCAACAATCTATGCCAACAGGCTAATTACATGGCTTTTAGGGACAATTTT
ATTGGTCTAATGTATTACAACAGCACGGGTAATATGGGTGTCTGGCGGCCAAGCATCGCAGTTGAATGCTGTTGTAGATTTGCAA
GACAGAAACACAGAGCTTTCATACCAGCTTTTGTCTGATTCCATTGGTGATAGAACCAGGTACTTTTCTATGTGGAATCAGGCTGTT
GACAGCTATGATCCAGATGTTAGAATATTGAAATCATGGAACGAAAGATGAACCTCAAATFACTGCTTTCCTACTGGGAGGTGTG
ATTAATACAGAGCTTTACCAAGGTAACAACTAAAACAGGTCAGGAAATGGATGGGAAAAGATGTACAGAATTTTCAGATAAA
AATGAAATAAGAGTGGAAATAATTTGCCATGAAATCAATTAATGCAACCTGTGGAGAAATTTCTGTACTCCAACATAGCC
CTGTATTTGCCCGACAAGCTAAAGTACAGTCTTTCAACGTAAAAAATTTCTGATAACCCAAACACTCAGCTACATGCAACAGCGA
GTGGTGGCTCCCGGGCTAGTGGACTGCTACATTAACCTTGGAGCAGCTGGTCCCTTGACTATATGGACAACGTCAACCCATTTAAC
CACCACCGCAATGCTGGCTGCGCTACCGCTCAATGTTGCTGGGCAATGGTGCCTATGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCTCAGAAG
TTCTTTGCCATTAACAACTCCTTCTCTGCGGGCTCATACACTACGAGTGGAACTTCAGGAAGGATGTTAACTGGTCTGCAG
AGCTCCCTAGGAAATGACCTAAGGGTTGACGGAGCGAGCTTAAGTTTATAGCATTGCGCTTTCGCCACCTTCTTCCCATGGCC
CACAACACCGCCTCCACGCTTGAGGCCATGCTTAGAAACGACACCAACGACCAGTCTTTAACGACTATCTTCCGCGCCAACATG
CTTACCCATACCCGCCAACGCTACCAACGTGCCATATCCATCCCTCCCGCACTGGGCGGCTTTCGCGGCTGGGCTTCCAG
CGCCTTAAGACTAAGGAACCCCATCACTGGGCTCGGGCTACGACCCTTATACCTACTCTGGCTCTATACCCTACCTAGATGGA
ACCTTTACTCAACCACACTTTAAGAAGGTGGCCATTACCTTTGACTCTTCTGTGCTAGCTGGCTGGCAATGACCGCTGCTTACC
CCCAAGACTTTGAAATTAAGCGCTCAGTTGACGGGAGGTTTACAAGCTTGGCATTGCCCAGTGTAACTGACCAAGACTGGTTCCTGGTA
CAAATGCTAGCTAACTATAACATTGGCTACCAGGGCTTCTATATCCAGAGAGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTTAGAAAC
TTCCAGCCATGAGCCGTCAGGTGGTGGATGATACTAAATACAAGGACTACCAACAGGTGGGCATCTACACCAACACAACACTCT
GGATTTGTTGGCTACCTTGGCCCCACCATGCGGAAGGACAGGCTACCTGCTAACTTCCCTATCCGCTTATAGGCAAGACCGCA
GTTGACAGCATTACCCAGAAAAGTTCTTTGCGATGCGACCCTTGGCGCATCCCATTTCCAGTAACTTTATGTCCATGGGCGCA
CTCAGAGACTGGGCCAAAACCTTCTACGCCAACCCTCCCGCCAGCGGTAGACATGACTTTTGGGTGGATCCCATGGACGAGCCC
ACCCTTCTTTATGTTTTGTTGAAGTCTTTGACGTGGTCCGTGTGCACCAGCCGACCGCGGGCTCATCGAAACCGTGTACTGCGC
ACGCCCTTCTCGGCCGCAACGCCACAACATAAAGAAGCAAGCAACATCAACAACAGCTGCCGCCATGGGCTCCAGTGAGCAGGAAC
TGAAAGCCATGTCAAAGATCTTGGTGTGGGCCATATTTTTGGGCACCTATGACAAGCGCTTCCAGGCTTTGTTTTCCACACA
AGCTCGCCTGCGCCATAGTCAATACGGCCGCTCGCGAGACTGGGGCGGTACACTGGATGGCCTTTGCCTGGAACCCGCACTCAAAA
CATGCTACTCTTTGAGCCCTTTGGCTTTTCTGACCAGCGACTCAAGCAGGTTTACCAGTTTGTAGTACAGTACTCCTGCGCCGTA
GCGCCATTGCTTCTTCCCGGACCGCTGTATAACGCTGGAAGTCCACCCAAAGCGTACAGGGGCCAACTCGGCCGCTGTGGAC
TATTCTGCTGATGTTTCTCCACGCTTTGCCAACTGGCCCCAACTCCCATGGATACAACCCACCATGAACCTTATTACGGGG
TACCAACTCCATGCTCAACAGTCCCGAGGTACAGCCACCTGCGTGCACACCAGGAACAGCTTACAGCTTCCCTGGAGCGCCACT
CGCCCTACTTCCGAGCCACAGTGGCGAGATTAGGAGCGCCACTTCTTTTGTACCTTGAATAACATGTAATAAATAATGTACTAAG
ACACTTTCAATAAAGGCAAAATGCTTTTATTGTACTCTCGGGTATTATTTACCACCCCTTGCCTTCGCGCCGTTTAAAAAT
CAAAGGGGTTCTGCGCGCATCGCTATGCCACTGGCAGGGACAGTTGCGATACTGGTGTTTAGTGTCCACTTAACTCAGGCA
CAACCATCCGCGGACGCTCGGTGAAGTTTTACTCCACAGGCTGCGCACCATCAACACCGCTTAGCAGGTCGGGCGCGGATATCT
TGAAGTCGAGTTGGGGCTCCGCGCTGCGCGCGGAGTTGCGATACACAGGTTGCGACTGGAACACTATCAGCGCCGGTGGT
GCACGCTGGCCAGCAGCTCTGTGCGAGATCAGATCCGCTCCAGGCTCCGCGTGTCTCAGGGCGAACGGAGTCAACTTTGGTA
GCTGCCTTCCCAAAAAGGGCGCTGCCAGGCTTTGAGTTGCATCGCACCTGAGTGGCATCAAAGGTGACCGTCCCGGCTTGGG
CGTTAGGATACAGCCCTGCATAAAAAGCTTTGATCTGCTTAAAAGCCACTGAGCCTTTGCGCTTACAGAGAAGACATGCCGCAAG

ACTTGGCCGAAAACGATTGGCCGGACAGGCCGCGTCTGTCACGAGCACCTTGGCGTGGTGGAGATCTGCACCACATTTCCGGC
CCCACCGTTTCTTACGATCTTGGCCTTGCTAGACTGCTCCTTACGCGCGCGTGGCCGTTTTCCGCTCGTCACATCCATTTCAATCA
CGTGCTCCTTATTTATCATAATGCTTCCGTGTAGACTTAAAGCTCGCCTTCGATCTCAGCGCAGCGGTGCAGCCACAACGCCGAGC
CCGTGGGCTCGTGATGCTTGTAGGTCACTCTGCAACGACTGCAGGTACGGCTGCAGGAATCGCCCCATCATCGTCAAAAGGTCT
TGTGCTGGTGAAGGTGAGCTGCAACCCGCGGTGCTCCTCGTTCAGCCAGGTCTTGCATACGGCCGCCAGAGCTCCACTTGGTCAG
GCAGTAGTTTTGAAGTTCCGCTTAGATCGTTATCCACGTGGTACTTGTCCATCAGCGCGCGCAGCCTCCATGCCCTTCTCCACG
CAGACAGATCGGCACACTCAGCGGGTTCATCACCCTAATTTCACTTTCGGCTTCGCTGGGCTCTTCTTCTTCCCTTGGCTCCGCA
TACCACGCGCCACTGGGTCGTTTCACTCAGCCGCGCCTGTGCGCTTACCTCCTTTGCCATGCTTATTAGCACCAGGTGGGTTGC
TGAAACCCACCATTGTAGCGCCACATCTTCTTCTTCTCCTCGCTGTCCAGATTACCTCTGGTGTAGCGGGCGCTCGGGCTTGG
GAGAAGGGCGCTTCTTTTTTCTTCTTGGGCGCAATGGCCAAATCCGCGCGGAGGTGATGGCCGCGGGCTGGGTGTGCGCGCACC
GCGGCTCTTGTGATGAGTCTTCTCGTCTCGGACTCGATACGCCGCTCATCCGCTTTTTTGGGGCGCCCGGGGAGGGCGCGCG
ACGGGGACGGGACGACACGCTCTCCATGGTTGGGGGACGTGCGCGCCACCGCTCCGCGCTCGGGGGTGGTTTCGCGCTGCTCCT
CTTCCCGACTGGCCATTTCTTCTCCTATAGGCAGAAAAGATCATGGAGTCACTGAGAAGAAGGACAGCCTAACCGCCCCCTTG
AGTTCGCCACCACCGCCTCCACCGATGCGGCCAACGCGCTACCACCTTCCCGCTCGAGGCACCCCCGCTTGAGGAGGAGGAAGTGA
TTATCGAGCAGGACCAGGTTTTGTAAGCGAAGACGACGAGGACCGCTCAGTACCAACAGAGGATAAAAAGCAAGACCAGGACAACG
CAGAGGCAACAGGAGCAAGTCCGGCGGGGGGACGAAAGGCATGGCGACTACCTAGATGTGGGAGACGACGTGCTTGTGAAGCATC
TGCAGCGCCAGTGCCTATTTCTGCGACGCGTTGCAAGAGCGCAGCGATGTGCCCTCGCCATAGCGGATGTGAGCCTTGCTTACG
AACGCCACCTATTTCACTCAGCGCGTACCCCCAACGCCAAGAAAACGGCACATGCGAGCCCAACCGCGCCTCAACTTCTACCCG
TATTTGCCGTGCCAGAGGTGCTTGCACCTATCACATCTTTTTCCAAAACGCAAGATACCCCTATCCTGCCGTGCCAACCGCAGCC
GAGCGGACAAGCAGCTGGCCTTGGCGCAGGGCGCTGTCACTGATATCGCTCGCTCAACGAAGTGCACAAAATCTTTGAGGGTC
TTGGACGCGACGAGAAGCGCGCCAAACGCTCTGCAACAGGAAAACAGCGAAAATGAAAGTCACTCGGAGTGTGGTGGAACTCG
AGGTGACACAGCGCGCCTAGCCGTAATAACGACGATCGAGGTCACTTTCGCTACCGGCACTTAACCTACCCCCAAGG
TCATGAGCACAGTCATGAGTGAAGTGTGCTGCGCGTGGCAGCCCTGGAGAGGGATGCAAAATTTGCAAGAACAACAGAGGAGG
GCCTACCCGACGTTGGCGACGAGCAGCTAGCGCGCTGGCTTCAAACGCGCGAGCCTGCCGACTTGGAGGAGCGACGCAAACTAATGA
TGGCCGACGTCGCTGTACCGTGGAGCTTGAAGTGCATGCAGCGGTTCTTTGCTGACCCGAGATGCAAGCAGCTAGAGGAACAT
TGCATACACTTTTCGACAGGCTACGTCAGCCAGGCTTCAACGCTGCAAGATCTTCAAACGTTGGAGCTGCAACTTCTACCTTGGAA
TTTTGCACGAAAACCGCCTTGGGCAAAACGTTGCTTCACTCAGCGTCAAGGGCGAGGCGCGCGACTACGTCGCGACTGCGTTTT
ACTTATTTCTATGCTACACTGGCAGACGGCCATGGCGGTTTGGCAGCAGTGTGGAGGAGTGAACCTCAAGGAGTGCAGAAAC
TGCTAAAGCAAAACTTGAAGGACCTATGGACGGCCTTCAAACGAGCGCTCCGTGGCCGCGCACCTGGCGGACATCATTTCCCCGAAC
GCCTGCTTAAACCCCTGCAACAGGGTCTGCCAGACTTCAACGATCAAGCATGTTCGAGAACTTTAGGAACCTTATCTTAGAGCCT
CAGGAATCTTGGCCGCCACCTGCTGTGCACTTCTAGCGACTTTGTGCCATTAAGTACCGCAATGCCATCCCGCCTTGGGGCC
ACTGCTACCTTCTGACGCTAGCCAACTACCTTGCCTACCCTCTGACATAATGGAAGACGTGAGCGGTGACGGTCTACTGGAGTGT
ACTGTGCTGCAACCTATGCACCCCGCACCGCTCCCTGGTTTGCATTCGACGCTGCTTAACGAAAGTCAAATTTACGGTACCTTTG
AGCTGACAGGGTCCCTCGCTGACGAAAAGTCCGGGGCTCCGGGGTTGAAACTCACTCCGGGGCTGTGGAGCTGGCTTACCTTCGCA
AAATTTGACTCTGAGGACTACCCAGCCAGAGATTAGTTCTACGAAAGCAATCCCGCCGCTAATGCGGGAGCTTACCGCTCGG
TCAATACCCAGGGCCACATTTGGCCATTTGCAAGCCATCAACAAAGCCCGCAAGAGTTCTGCTACGAAAGGGACGGGGGTTT
ACTTGGACCCCCAGTCCGGCGAGGAGCTCAACCCAATCCCCCGCGCGCAGCCCTATCAGCAGCAGCCGGGGCCCTTGTTC
AGGATGGCACCCAAAAGAAGCTGCAGCTGCCGCCGCCACCACGGACGAGGAGGAATACTGGGACAGTCAAGGACAGGAGGTTTTG
GACGAGGAGGAGGAGGACATGATGGAAGACTGGGAGAGCTTAGACGAGGAAGCTTCCGAGGTGCAAGAGGTGTGAGGCAAAACCCG
TCACCTCGGTGCTATTCCTCGCCGGGCCCCAGAAACTGGCAACCGGTTCCAGCATGGCTACAACCTCCGCTCCTCAGGCGCG
CCGGCACTGCGGTTTCGCGGACCCAACCGTAGATGGGACACCCTGGAACAGGGCCGGTAAAGTCCAAGCAGCCGCGCGCTTAGCC
CAAGAGCAACAACAGCGCCAAGGCTACCGCTCATGGCGGGGCAAGAACGCCATAGTTGCTTGTGCAAGACTGTGGGGGCAAC
ATCTCCTTCCCGCGCGCTTTCTTCTTACCATCACGGCGTGGCCTTCCCCGTAACATCCTGCATTACTACCGTCATCTCTACAG
CCACTGTCACCGCGCGCAGCGGACGCAACAGCAGCGGCCACACAGAAGCAAGGCGACCGGATAGCAAGACTTGACAAAGCCCAA
GAAATCCACAGCGCGGCGAGCAGCAGGAGGAGGAGCGCTGGCTTCCGCGCCACAGCAACCCGATCATCAGCCCGGACTTGAACAG
GATTTTTCCCACTCTGTATGCTATATTTCAACAGAGCAGGGGCCAAGAACAAGAGCTGAAAATAAAAAACAGGTCTCTGCGATCCCT
CACCCGAGCTGCCGTATCACAAAAGCGAAGATCAGCTTCCGGCGAGCTGGAAGACCGGAGGCTCTTTCAGTAAATACTGCGC
GCTGACTCTTAAGGACTAGTTTCGCGCCCTTTCTCAAATTTAAGCGGAAAACACTGCTATCTCCAGCGGCCACACCCGGCGCAGC
ACCTGTTGTGACGCGCATTATGAGCAAGGAAATCCACGCCCTACATGTGGAGTTACCAGCCACAATGGGACTTGGCGCTGGAGC
TGCCCAAGACTACTCAACCCGAATAAACTACATGAGCGCGGACCCACATGATATCCCGGTCAACGGAAATACGCGCCACCGAAA
CCGAATCTCCTGGAACAGGCGGCTATTACCACACACCTCGTAATAACCTTAATCCCGTAGTTGGCCGCTGCCCTGGTGTACCA
GGAAAGTCCCGCTCCACACTGTGGTACTTCCCAGAGACGCCAGGCCAAGTTCAGATGACTAACTCAGGGGCGAGCTTGCGGG
CGGCTTTCGTACAGGGTGGGTCGCGCGGGCAGGGTATAACTCACCTGACAATCAGAGGGCGAGGTATTACGTCACACGACGAGTC
GGTGAAGTCTCGCTTGGTCTCCGTCCGGACGGGACATTTAGATCGCGCGCGCGCGGCTCTTCACTACGCCCTCGTCAGGCAAT
CCTAACCTGACAGACCTCGTCTTGTAGCGCGCTCTGGAGCATTGGAACCTGCAATTTATGAGGAGTTTGTGCCATCGGTCTA
CTTTAACCCCTTCTCGGGACCTCCCGGCACTATCCGGATCAATTTATCTTAACCTTTGACGCGGTAAGGACTCGGGCGACGGCTA
CGACTGAATGTTAAGTGGAGAGGAGGCAAGTGCAGCTGAAACACCTGGTCCACTGTGCGCGCCACAAGTGTCTTGGCCGCGACTC
CGGTGAGTTTTGTACTTTGAATGCGCGAGGATCATATCGAGGGCCCGCGCACGGCGTCCGGCTTACCGCCAGGGAGAGCTTGC
CCGTAGCCTGATTCGGGAGTTTACCAGCGCCCTGTAGTTGAGCGGACAGGGGACCTGTGTTCTCACTGTGATTTGCAACTG
TCTAACCTTGATTAACAGTACTTTTGTGCTTCCATCTGTGCTGCTGATAATAATAACAGAAAATAAAATATCTGTCTGTGATTC
TTTATCTTATACTAACGCTTCTTGCCTAAGGCTCGCCGCTGCTGTGTGCACATTTGCATTTATTGTGACGTTTTTAACGCTGG
GGTCGCCACCAAGATGATTAGGTACATAATCCTAGGTTTACTCACCTTGGCTCAGCCAGGTTACCACCAAAAGGTGGATTTA
AGGAGCCAGCCTGTAATGTTACATTCGAGCTGAAGCTAATGAGTGCACCCTTATAAAATGCACCACAGAATGAAAAGCTGC

TTATTGCGCCACAAAACAAAATTGGCAAGTATGCTGTTTTATGCTATTTGGCAGCCAGGTGACACTACAGAGTATAATGTTACAGTTT
 TCCAGGGTAAAAGTCATAAAAACTTTTATGTATACTTTTCCATTTTATGAAATGTGCGACATTACCATTAGTACATGAGCAAAACAGTATA
 AGTTGTGGCCCCACAAAATTGTGTGGAAAACACTGGCATTCTGTGCACTGCTATGCTAAATACAGTGTGCTGTTGGTCTGTA
 CCCTACTCTATATATAACAAAAGCAGACGCAGCTTTATTTAGGAAAAGAAAATGCCTTAATTTACTAAGTTACAAAAGCTAATGTC
 ACCACTAAGTCTTTACTCGCTGCTTGCAAAACAAATTCAAAAGTTAGCATTATAATTAGAAATAGGATTTAAACCCCCGGTCATT
 TCCTGCTCAATACCATTCCOCTGAACAATTGACTCTATGTGGGATATGCTCCAGCGCTACAACCTTGAAGTCAGGCTTCCTGGATGT
 CAGCATCTGACTTTGGCCAGCACCTGTCCCGCGGATTTGTTCCAGTCCAACCTACAGCGACCCACCTAACAGAGATGACCAACCAA
 CCAACGCGCGCCGGCTACAGGCTTACATCTACCACAATAACCCCAAGTTTCTGCCTTTGTCAATAACTGGGATAACTTGGGCA
 TGTGGTGGTTCTCCATAGCGCTTATGTTTGTATGCCTTATTTATGTGGCTCATCTGCTGCC TAAAGCGCAAACGCGCCCGACCA
 CCATCTATAGTCCCATCATTGTGCTACACCCAAAACAATGATGGAATCCATAGATTGGACGGACTGAAACACATGTTCTTTTCTCTTA
 CAGTATGATTAATGAGACATGATTCCTCGAGTTTTTATATTAAGTACCCTTGTGCGCTTTTGTGCGGTGCTCCACATTGGCTG
 CGGTTTCTCACATCGAAGTAGACTGCATTCAGCCTTCACAGTCTATTTGCTTTACGGATTTGTCACCCTCACGCTCATCTGCAGCC
 TCATCACTGTGGTTCATCGCCTTTTATCCAGTGCATTGACTGGGTCTGTGTGCGCTTTGCATATCTCAGACACCATCCCCAGTACAGGG
 ACAGGACTATAGTGTAGCTTCTTAGAATCTTTAATTATGAAATTTACTGTGACTTTTCTGCTGATTATTGCAACCTATCTGCGTT
 TTGTTCCCGACCTCCAAGCCTCAAAGACATATATCATGCAGATTCACTCGTATATGGAATATCCAAGTTGCTACAATGAAAAAAG
 CGATCTTTCCGAAGCCTGGTTATATGCAATCATCTCTGTATGGTGTCTGCAAGTACCCTTACGCCCTAGCTATATATCCCTACCT
 TGACATTTGGCTGGAACGAATAGATGCCATGAACACCCCACTTTCCCGCGCCCGCTATGCTTCCACTGCAACAAGTTGTGCGCG
 CGGCTTTGCTCCAGCAATCAGCCTCGCCACCTTCTCCACCCCACTGAAATCAGCTACTTTAATCTAACAGGAGGAGATGACTG
 ACACCCCTAGATCTAGAATGGACGGGAATTATACAGAGCAGCGCCTGCTAGAAAGACGCAAGGCGCCGCAAGCAGCGCATGA
 ATCAAGAGCTCCAAGACATGGTTAACTTGCACCAGTGCAAAAGGGGTATCTTTTGTCTGGTAAAGCAGGCCAAAGTCACCTACGACA
 GTAATACACCGGACACCGCCTTAGCTACAAGTGCCAACCAAGCGTCAGAAAATGGTGGTTCATGGTGGGAGAAAAGCCATTACCA
 TAACTCAGCACTCGGTAGAAAACGAAGGCTGCATTCACCTACCTTTGTCAAGGACCTGAGGATCTCTGCACCCTTATTAAGACCCCTGT
 GCGGCTCAAAGATCTTATTCCCTTAACTAATAAAAAAATAAATTAAGCACTACTTACTTAAATATAGCTTAGCAAAATTTCTGCC
 AGTTTTATTCAGCAGCACTCTTGCCTCCTCCAGCTCTGGTATTGACAGTTCCTCCTGGCTGCAAACCTTCTCCACAATCTAAAT
 GGAATGTCAGTTTCTCCTGTCTCCATCCGACCCACTATCTTCATGTTGTTGCAGATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGAT
 ACCTTCAACCCCGTGTATCCATATGACACGGAAACCGGTCTCCAACGTGCTGCTTTTCTACTCCTCCCTTGTATCCCCAATGGG
 TTTCAAGAGAGTCCCCCTGGGGTACTCTCTTTGCGCTTCCGAACCTCTAGTTACCTCCAATGGCATGCTTGGCTCAAATGGGC
 AACCGCCTCTCTCTGGACAGGCGGCAACCTTACCTCCAAAATGTAACACTGTGAGCCACCTCAAATAAAACCAAGTCAAAC
 AATAACCTGGAAATATCTGCACCCCTCACAGTTACCTCAGAAGCCCTAACTGTGGCTGCCGCCACCTCTAATGGTCGCGGGCAAC
 ACACTCACCATGCAATCACAGGCCCGCTAACCGTGCAGACTCCAAACTTAGCATTGCCACCAAGGACCCCTCACAGTGTGAGAA
 GGAAAGCTAGCCCTGAAAACATCAGGCCCCCTCACACCACCGATAGCAGTACCCTTACTATCACTGCCCTCACCCCTCTAAGTACT
 GCCACTGGTAGCTTGGGCATTGACTTGAAGAGCCCAATTTATACAAAAATGGAAAACCTAGGACTAAAGTACGGGGCTCCTTTGCAT
 GTAACAGACGACTAAACACTTTGACCGTAGCAACTGGTCCAGGTGTGACTATTAAATAACTTCTTGCAAAACCTAAAGTACTTGA
 GCCTTGGGTTTTGATTACAAGGCAATATGCAACTTAATGTAGCAGGAGGACTAAGGATTGATTTCTAAAAACAGACGCCCTTATACTT
 GATGTTAGTTATCCGTTTGTATGCTCAAACCAACTAAATCTAAGACTAGGACAGGGCCCTCTTTTATAAACTCAGCCACAACITG
 GATATTAATAACAAGGCCTTACTTGTTTACAGCTTCAAACAATTTCAAAGGCTTGAAGTTAACCTAAGCACTGCCAAGGGG
 TTGATGTTTACGCTACAGCCATTAATGCAAGGATGGGCTTGAATTTGGTTACCTAATGCACCAACACAATCCCTC
 AAAACAAAATTTGGCATGGCCTAGAATTTGATTCAAACAAGGCTTGGTTCTTAACTAGGAACCTAGGCTTTGACAGACA
 GGTGCCATFACAGTAGGAAACAAAATAATGATAAGCTAACTTTGTGGACCACACCAGCTCCAATCTCCTAACTGTAGACTAAATGCA
 GAGAAAGATGCTAAACTCACTTTGGTCTTAAACAAAATGTGGCAGTCAAAATCTGCTACAGTTTCAGTTTTGGCTGTAAAGGAGT
 TTGGCTCAAATATCTGGAACAGTTCAAAGTGTCTATCTTATTATAAGATTGACGAAAATGGAGTGTACTAAACAATTTCTTCTGT
 GACCCAGAAATTTGAACTCACAGAACCCTAGTATTCACTGAAGGCACAGCTATACAAAACGCTGTGGATTATGCTAACCTATCA
 GCTTATCCAAAATCTCACGGTAAAACCTGCCAAAAGTAACATTGTGAGTCAAGTTTACTTAAACGGAGACAAAACCTAAACCTGTAA
 CTAACCATFACACTAAACGGTACACAGGAACAGGAGACACAACCTCAAAGTGCATACTCTATGTCATTTTTCATGGGACTGGTCTGGC
 CACAACFACATTAATGAAATATTTGCCACATCTCTTACACTTTTTTATACATTTGCCCAAAGATAAAGAAATCGTTTTGTGTATGTT
 CAACGTGTTTTTTTTCAATFAGCAGAAAATTTCAAGTCAATTTTTCATTCAGTATAGCCCCACACCACATAGCTTATACAGATC
 ACCCTACCTTAATCAAACCTCACAGAACCCTAGTATTCACTGAAAGGCACAGCTCCTCCCAACACACAGAGTACACAGCTCTTTCTCCCG
 GCTGGCCTTAAAAAGCATCATATCATGGGTAACAGACATATTCTTAGGTGTTATATTCCACACGGTTTTCTGTGAGCCAAACGCTC
 ATCAGTATATTAATAAACTCCCGGGCAGCTCACTTAAGTTCATGTGCTGTCCAGCTGTGAGCCACAGGCTGCTGTCCAACCTG
 CGGTTGCTTAACGGCGCGGAAGGAGAAGTCCACGCCTCATGGGGTAGAGTCATAATCGTGCATCAGGATAGGGCGGTGGTGTCTG
 CAGCAGCGCGGAATAAACTGCTGCCCGCGCGCTCCGTCTGCAGGAATACAACATGGCAGTGGTCTCCTCAGCGATGATTCCGCAC
 CGCCCGCAGCATAAAGCGCCTTGTCTCCGGGCACAGCAGCGCACCTGATCTCACTTAAATCAGCACAGTAACTGAGCACAGCAC
 CACAATATTGTTCAAATCCACAGTGAAGGCGCTGTATCCAAGCTCATGGCGGGGACCACAGAACCACAGTGGCCATCATACCA
 CAAGCGCAGGTAGATTAAGTGGCGACCCCTCATAAACACGCTGGACATAAACATTACCTCTTTTGGCATGTTGTAATTCACCACCTC
 CCGGTACCATATAAACCCTCTGATTAAACATGGCGCCATCCACCACCTCCTAAACAGCTGGCCAAAACCTGCCCGCGGCTATAACA
 CTGCAGGGAACCGGGACTGGAACAATGACAGTGGAGAGCCAGGACTCGTAACCATGGATCATCATGCTCGTTCATGATCAATGTT
 GGCACAACACAGGCACAGTGCATCACTTCTCAGGATTACAAGCTCCTCCCGGTTAGAACCATATCCAGGGAACAACCCATTC
 CTGAATCAGCGTAAATCCACACTGCAGGGAAGACCTCGCACGTAACCTACGTTGTGCATTGTCAAAGTGTACATTCCGGGCAGCAG
 CGGATGATCCTCCAGTATGGTAGCGGGTTTTCTGTCTCAAAGGAGGTAGACGATCCCTACTGTACGGAGTGGCCGAGACAACCG
 AGATCGTGTGGTCTAGTGTCTGCAAAATGGAACGCGGACGTAATTCCTGAAAGCAAAACAGGTGCGGGCGTACAAA
 CAGATCTGCGTCTCCGGCTTCGCGCTTAGATCGCTGTGTAGTGTAGTATATCCACTCTCTCAAAGCATCCAGGCGCCCTCC
 TGGCTTCGGGTTCTATGTAACCTCTTCATGCGCCGCTGCTTCAACATACAACCTACCACCGAGAATAAGCCACACAGCCACCTA
 CACATTCGTTCTGCGAGTACACACGGGAGGAGCGGAAGAGCTGGAAGAACCATGTTTTTTTTTTTTTAAAGATAATCCAAA
 ACCTCAAATGAAGATCTATTAAGTGAACGCGCTCCCTCCGGTGGCGTGGTCAAACCTCTACAGCCAAAGAACAGATAATGGCATT
 GTAAGATGTTGCACATGGCTTCAAAGGCAAACGGCCCTCACGTCGAAGTGGACGTAAGGCTAAACCCCTCAGGTTGAATCTCC
 TCTATAAACATTCAGCACTTCAACCATGCCAAAATATCTCATCTCGCCACCTTCTCAATATATCTTAAGCAAATCCCGAATA
 TTAAGTCCGGCCATGTAAGAACTGTCTCAGAGCGCCCTCCAACTCAGCCTCAGCAGGGAATCATGATTGCAAAAATTCAGGTT
 CCTCACAGACCTGTATAAGATTCAAAGCGGAACATTACAACAAAATACCCGATCCCTCAGGTCCTTCGACGGCCAGTGAACAT

AATCGTGCAGGTCTGCACGGACCAGCGCGGCCACTTCCCGCCAGGAACCATGACAAAAGAACCCACACTGATTATGACACGCATAC
TCGGAGCTATGCTAACCAGCGTAGCCCCGATGTAAGCTTGTTGCATGGGCGGCATATAAAATGCAGGTGCTGCTCAAAAAATCAG
GCAAAGCCTCGCGCAAAAAAGAAAGCACATCGTAGTCATGCTCATGCAGATAAAGGCAGGTAAGCTCCGGAACCCACAGAAAAAG
ACACCATTTTTCTCTCAAACATGTCTGCGGGTTCTGCATAAACACAAAATAAAATAACAAAAAACATTTAAACATTAGAAGCCTG
TCTTACAACAGGAAAAACAACCCTTATAAGCATAAGACGGACTACGGCCATGCCGGCGTGACCGTAAAAAACTGGTCACCGTGATT
AAAAAGCACCACCGACAGCTCCTCGGTTCATGTCCGGAGTCATAATGTAAGACTCGGTAAACACATCAGGTTGATTCATCGGTGAGTG
CTAAAAGCGACCGAAATAGCCCGGGGAATACATACCCGCAGGCGTAGAGACAACATTACAGCCCCCATAGGAGGTATAACAAAAT
TAATAGGAGAGAAAAACATAAACACCTGAAAAACCTCCTGCCTAGGCAAAATAGCACCCCTCCCGCTCCAGAACACATACAGCG
CTTCCACAGCGGCAGCCATAACAGTCAGCCTTACCAGTAAAAAGAAAACCTATTAAAAAACACCACTCGACACGGCACCAGCTC
AATCAGTCACAGTGTA AAAAAGGGCCAAGTGCAGAGCGAGTATATATAGGACTAAAAAATGACGTAACGGTTAAAGTCCACAAAAA
CACCCAGAAAACCGCACGCGAACCTACGCCAGAAACGAAAGCCAAAAACCCACAACCTCCTCAAATCGTCACTCCGTTTTCCCA
CGTTACGTCACTTCCCATTTAAGAAAACACAATTCCCAACACATAAAGTTACTCCGCCCTAAACCTACGTACCCGCCCGTT
CCCACGCCCGCCACGTCACAACTCCACCCCTCATTATCATATTGGCTTCAATCCAAAATAAGGTATATTATTGATGATG

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

【 千葉大学医学部附属病院 】

「切除不能悪性胸膜中皮腫を対象としたNK4遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究」

○

氏名	所属
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	(独)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	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
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 生物薬品部研究員

○：委員長（五十音順 敬称略）

遺伝子治療臨床研究実施計画の申請及び
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申請について

【 岡山大学病院 】

課題名 : 頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルス
Telomelysin を用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究

遺伝子治療臨床研究実施計画の申請

- 諮問 及び付議 P. 1
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書 及び概要書 . . . P. 3
- 同意説明文書 P. 17

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申請

- 諮問 及び付議 P. 37
- 第一種使用規程承認申請書 P. 41
- 生物多様性影響評価書 P. 45
- 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 名簿 P. 57

厚 科 審 第 1 号

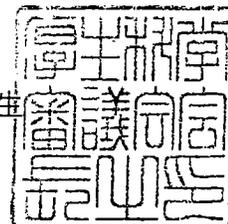
平成 24 年 1 月 4 日

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実施計画について（付議）

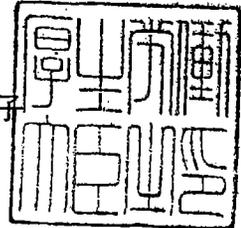
標記について、平成 24 年 1 月 4 日付厚生労働省発科 0104 第 1 号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第 3 条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

厚生労働省発科 0104 第 1 号
平成 24 年 1 月 4 日

厚生科学審議会会長

垣添 忠生 殿

厚生労働大臣 小宮山 洋子



諮 問 書

下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、その医療上の有用性及び倫理性に関し、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 号イ及び遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）の規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

1. 申請日 平成 23 年 10 月 27 日

申請者 千葉大学医学部附属病院 病院長 宮崎 勝

遺伝子治療臨床研究の名称

切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究

2. 申請日 平成 23 年 11 月 14 日

申請者 岡山大学病院 病院長 榎野 博史

遺伝子治療臨床研究の名称

頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin を用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究



別紙様式第 1

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 23 年 11 月 14 日

厚生労働大臣 殿

実施施設	所在地	岡山県岡山市北区鹿田町 2 丁目 5 番 1 号 (郵便番号 700-8558)
	名称	岡山大学病院 (電話番号 086-223-7151) (Fax 番号 086-223-7636)
	代表者 役職名・氏名	岡山大学病院長 横野 博史 (印)

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添のとおり実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin を用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授・藤原 俊義

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成23年 11月 14日

研究の名称	頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin を用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究
研究実施期間	厚生労働大臣による了承の日より3年間

総括責任者	所属部局の所在地	岡山市北区鹿田町 2-5-1 (郵便番号 700-8558)	
	所属機関・部局・職	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器外科学・教授	
	氏名	藤原 俊義	 印
実施施設	所在地	岡山市北区鹿田町 2-5-1 (郵便番号 700-8558)	
	名称	岡山大学病院	
	連絡先	岡山市北区鹿田町 2-5-1 (電話番号 086-235-7257) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器外科学	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	那須 保友	岡山大学病院・新医療研究開発センター・教授	遺伝子治療臨床研究実施の総合判断及び研究全体の監督
	金澤 右	岡山大学病院・放射線科・科長	放射線治療の施行、画像診断、臨床観察、効果判定
	佐々木 朗	岡山大学病院・口腔外科・科長	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定
	山本 和秀	岡山大学病院・消化器内科・科長	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定
	谷本 光音	岡山大学病院・呼吸器・アレルギー内科・科長	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定
	白川 靖博	岡山大学病院・消化管外科・講師	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定
	香川 俊輔	岡山大学病院・消化管外科・講師	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ウイルスの投与、臨床観察、効果判定
	宇野 太	岡山大学病院・新医療研究開発センター・助教	ウイルスの投与、臨床観察、効果判定
田澤 大	岡山大学病院・新医療研究開発センター・助教	ウイルスの管理・調製、ウイルスの投与、臨床観察、効果判定、標本管理・処理、分子生物学的解析	

	<p>野間 和広</p> <p>浦田 泰生</p>	<p>岡山大学・医療教育統合開発センター・助教</p> <p>オンコリスバイオファーマ（株） 代表取締役社長</p>	<p>ウイルスの投与、臨床観察、効果判定、標本の管理・処理</p> <p>ウイルスの提供、輸入手続、受け入れ試験の実施</p>				
<p>審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由</p>	<p>別紙のとおり（添付資料 7.1 参照）</p> <table border="1" data-bbox="718 568 1422 790"> <thead> <tr> <th data-bbox="718 568 1069 629">審査委員会の長の職名</th> <th data-bbox="1069 568 1422 629">氏 名</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="718 629 1069 790"> 岡山大学病院 遺伝子治療臨床研究 審査委員会委員長 </td> <td data-bbox="1069 629 1422 790"> 伊達 勲  </td> </tr> </tbody> </table>			審査委員会の長の職名	氏 名	岡山大学病院 遺伝子治療臨床研究 審査委員会委員長	伊達 勲 
審査委員会の長の職名	氏 名						
岡山大学病院 遺伝子治療臨床研究 審査委員会委員長	伊達 勲 						

研究の区分	○遺伝子治療臨床研究	遺伝子治療標識研究
研究の目的	<p>Telomelysin (OBP-301)は、ヒトアデノウイルス5型を基本骨格とし、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルス (Oncolytic Virus)である。80-85%以上のヒト悪性腫瘍でテロメラーゼ活性の上昇が認められるため、Telomelysin は多くの癌細胞で増殖し、極めて広範な抗腫瘍活性を有する。一方、一般的にテロメラーゼ活性の低い正常組織ではその増殖が抑えられ、細胞死は誘導されず、安全性が確保される。また、前臨床研究により、Telomelysin の腫瘍内投与と局所放射線治療の明らかな併用効果が確認されている。</p> <p>本研究では、頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、肺癌）を対象に、Telomelysin を腫瘍内局所投与し、同時に局所放射線治療を行った場合の安全性の検討（最大耐量の推定）（主要エンドポイント）と評価可能症例における治療効果の観察（副次エンドポイント）を目的とする。まず、放射線照射量を一定としてTelomelysin 投与量の段階的増量を行い、併用治療の質的・量的安全性を確認する。また、局所の治療効果の判定を行うとともに、奏効の持続期間、腫瘍進行までの期間、生存期間、癌に伴う病的状態の改善効果（quality of life ; QOL、嚥下機能、呼吸機能、疼痛軽減、Performance Status、など）について評価する。さらに、腫瘍退縮や転移抑制、生存期間の延長などを期待する際の根拠となる分子生物学的効果や病理組織学的変化について解析する。</p> <p>Telomelysin は、岡山大学で開発された国産の抗がんウイルス製剤であり、岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ（株）によって臨床開発が進められている。本臨床研究では、米国で行われた各種進行固形癌を対象としたTelomelysin の第I相臨床試験のために、オンコリスバイオファーマ（株）がIntrogen Therapeutics社にて製造したTelomelysin の臨床ロットを輸入して使用する。本臨床研究は、岡山大学病院とオンコリスバイオファーマ（株）の共同研究であり、現時点では製造販売承認を目的とした治験ではない。</p>	
対象患者及びその選定理由	<p>1) 対象疾患</p> <p>本研究は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した頭頸部・胸部悪性腫瘍症例、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる症例を対象とする。具体的には、遠隔転移を認めないが周辺リンパ節転移や隣接臓器への直接浸潤により治癒切除が不可能な症例、また遠隔転移が認められても転移巣より原発巣の浸潤などの局所症状により生命予後が期待できない、あるいは著しく生活の質（QOL）を損なうような症例から選別される。疾患としては、頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌を対象とする。</p> <p>2) 対象疾患の選定理由</p> <p>頭頸部癌、食道癌、肺癌が局所性に存在する場合は外科的切除が最も確実な治療法であるが、診断時に周辺リンパ節や隣接臓器への浸潤のため根治切除不能となる進行癌も多く、また初期治療後の再発症例では高率に外科的切除不可能である。腫瘍が小さくても、機能温存のために外科的切除ができない症例も多く、その場合は放射線治療や化学療法、あるいはその併用が試みられる。放射線化学療法の進歩により徐々に進行症例の予後も改善されつつあるが、化学療法の副作用により治療が完遂できない場合も多くみられ、特に高齢者などではその傾向が顕著に認められる。したがって、安全性の高い、より優れた集学的治療法の開発が望まれている。</p> <p>a) 頭頸部癌</p> <p>頭頸部癌とは、口唇・口腔、咽頭、喉頭、上顎洞、唾液腺、甲状腺から発生する悪性腫瘍の総称であり、組織型は多彩であるが、扁平上皮癌が圧倒的に多い。男性では喉頭癌が最も多く、次いで口腔癌、咽頭癌と続くが、女性では甲状腺癌が最も多く、次いで口腔癌、咽頭癌、喉頭癌の順である。頭頸部領域は発声、呼吸、嚥下などの機能に重要であり、また視覚、嗅覚、味覚、聴覚、平衡覚といった感覚器が存在するため、その部位や亜部位により診断や治療方針、治療成績などが異なってくる。上顎洞癌、口腔癌、喉頭癌の領域では、手術、放射線治療、化学療法を組み</p>	

入れた集学的治療が主体となった治療法の進歩により生存率は向上してきたが、現行の治療法ではさらなる生存率の改善は難しく、術後の機能障害が問題となる患者も多く存在する。咽頭のうち中ならびに下咽頭に発生する癌は、初期には症状の自覚が乏しいため進行癌が多く、標準的に外科的切除と放射線・化学療法が行われているが、生存率が低いこと、手術による機能障害がみられること、死因として局所再発と遠隔転移いずれもが認められることなどが問題であり、治療成績の向上には、やはり新たな有効な治療薬剤の開発が必要である。

b) 食道癌

本邦では毎年 10,000 人以上が食道癌に罹患する。その頻度は加齢とともに急激に増加し、高齢者が多いのが特徴である。切除不能例に関してはその予後は極めて不良であり、全身状態が良好であれば放射線、抗癌剤を併用したものが行われるが、高齢や心・肺・肝機能異常などの理由により至適量の抗がん剤投与や放射線照射が困難な患者も多くみられる。さらに、副作用による QOL の低下などの点からも標準的治療と呼べるものはまだ確立されていない。最近では、抗体医薬品や分子標的薬剤など、従来の抗癌剤とは作用機序の異なる新規抗癌医薬品がすでに市場に出ているが、食道癌に対しては未だ開発が進んでいないのが現状である。したがって、局所進行食道癌に対する安全性と有効性を兼ね備えた新たな治療戦略の確立が望まれている。

c) 肺癌（非小細胞肺癌）

近年、本邦における肺癌患者の発生率は全年齢層において増加を続けており、肺癌は胃癌を抜いて本邦における男性癌死亡の第 1 位を占めるに至っている。原発性肺癌はその病理組織型により、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌を一括した非小細胞肺癌と小細胞肺癌に分類される。小細胞肺癌は一般に化学療法に対して高感受性の癌であり、生存期間の延長が認められるため化学療法が第一選択の治療となっているが、原発性肺癌の 80% 以上を占めている非小細胞肺癌は多くが診断時に切除不能の進行癌であり、治療成績は極めて不良である。外科療法、化学療法、放射線療法などを併用する集学的治療により、奏効率の向上や一定の腫瘍縮小効果は得られるようになってきたが、依然として発見時切除不能例が多く、副作用による QOL の低下や延命効果などの点でまだまだ満足すべき成績を達成できていないのが現状である。最近、特定のシグナル伝達経路を阻害する分子標的薬剤の感受性が特異的な遺伝子変異の有無に大きく関わっており、喫煙歴のない日本人女性の腺癌患者で有効であることが明らかになってきた。しかし、喫煙歴のある男性の扁平上皮癌患者ではその効果は期待できず、やはり新たな治療法の開発が必要と考えられる。

3) 当該臨床研究の概要

ウイルスは、本来ヒトの細胞に感染、増殖し、その細胞を様々な機序により破壊する。このウイルスの増殖機能に選択性を付加することにより、ウイルスを癌細胞のみを傷害する治療用製剤として用いることができる。本研究では、頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、肺癌）患者に、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルスである Telomelysin (OBP-301) を投与し、同時に局所放射線治療を行い、その治療効果と生物学的反応、及び安全性を検討する。Telomelysin は癌細胞に感染して細胞内で複製・増殖し、細胞破壊を引き起こすことで放出され、さらに周辺の癌細胞へと感染を広げて行く。ウイルスが癌組織内に拡散して行くとともに、連鎖的に細胞死を誘導し、広い範囲の癌組織が崩壊していくと期待される。放射線治療を併用することで Telomelysin の感染効率が増強し、Telomelysin は放射線による DNA 傷害の修復を阻害することで放射感受性を増強する。また、放射線による細胞破壊はウイルス拡散を促進すると考えられる。しかし、正常組織に到達した時点で、テロメラーゼ活性がないためにウイルス増殖は止まり、正常細胞への影響は最小限に抑えられる。すなわち、頭頸部癌、食道癌、肺癌などのテロメラーゼ活性を有するヒト固形癌ではウイルスが増殖し、効率良く細胞死を誘導することが可能である。さらに、局所放射線療法を併用することで、より強力な抗腫瘍活性が発揮されると期待される。

<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>本研究では、テロメラーゼ活性依存性に hTERT (human telomerase reverse transcriptase) プロモーターにより増殖し、癌細胞を選択的に破壊する腫瘍融解ウイルスである Telomelysin (OBP-301) を用いる。hTERT はテロメラーゼの構成成分の一つであり、テロメラーゼは多くの癌細胞でその活性の上昇が認められているため、癌細胞では hTERT 遺伝子の発現制御を行っている hTERT プロモーターのスイッチがオンになると考えられる。</p> <p>Telomelysin は特別な治療遺伝子を持たず、外来性の塩基配列として hTERT プロモーターが挿入されている点が野生型アデノウイルスの配列との大きな違いである。hTERT プロモーターでは、転写開始部位より上流 181-bp が hTERT 活性化に必要なプロモーターのコア領域であり、本研究ではこの領域を含む 378-bp 断片を hTERT プロモーターとして用いた。Telomelysin では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されており、hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現される。E1A タンパク質は、感染可能なウイルス産生に必要な遺伝子群の転写を活性化し、E1B タンパク質は、宿主細胞のタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの複製を促進する。また、E1B の 55kDa タンパク質は、放射線による DNA 傷害の修復を阻害することで放射線感受性を増強することが明らかになっている。</p> <p>本研究に用いられる Telomelysin は、米国テキサス州ヒューストンの Introgen Therapeutics 社において the current Good Manufacturing Practice (cGMP) に従った製造工程で製造された。Master Cell Bank (MCB) 由来の HeLa 細胞を Wave 200 パイオリアクターにて大量培養し、Master Virus Bank (MVB) 由来の Telomelysin ウイルスを感染させた後、カラムにて精製、各種品質試験を終えた後にバイアルに分注し保管されている。</p>
<p>これまでの研究成果</p>	<p>1) Telomelysin の前臨床研究</p> <p>Telomelysin を癌細胞に感染させると、E1A、E1B mRNA、および E1A タンパク質の発現がみられたが、正常細胞ではそれらの発現は抑制されていた。また、Telomelysin は、癌細胞では 3 日以内に 10^5-10^6 倍に増殖したが、正常細胞では 100-1000 倍にとどまり、正常細胞では癌細胞に比べてその増殖が 10^3-10^4 分の 1 に抑えられることが明らかになった。肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膵癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、など様々な臓器由来のヒト悪性腫瘍細胞株を用いて Telomelysin の用量依存性の抗腫瘍活性を測定し、ID50 (50%の標的癌細胞を殺すことのできるウイルス濃度) を算出したところ、ほとんどの細胞株で 20 MOI (PFU/cell) 以下であり、Telomelysin は広範な抗腫瘍活性を有していた。</p> <p>2) Telomelysin と放射線治療の併用に関する研究成果</p> <p>次に、ヒト肺癌細胞、食道癌細胞で Telomelysin と放射線治療の併用効果を検証したところ、明らかな相乗効果が確認された。これは、放射線照射が標的細胞のコクサッキー・アデノウイルス受容体の発現を増強することで Telomelysin の感染効率が上がったこと、および Telomelysin の感染が放射線による DNA 傷害の修復を阻害することで放射線感受性を増強したことによると考えられる。</p> <p>ヌードマウスの背部皮下にヒト肺癌細胞、食道癌細胞を移植し、腫瘍部位に放射線照射を行い、直後に Telomelysin を腫瘍内に注入した。この治療を 3 回繰り返したところ、放射線単独群、Telomelysin 単独群でも無治療群に比べて有意な抗腫瘍活性が認められたが、併用群では腫瘍の部分的な退縮がみられ、他のいずれの群よりも有意に強い抗腫瘍効果が観察された。</p> <p>3) Telomelysin の第 I 相臨床試験</p> <p>有望な前臨床研究の成果に基づき、2006 年 3 月、岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ (株) により、米国食品医薬品局 (US FDA) に治験申請 (IND application) がなされた。慎重な議論の後、8 月に承認を受け、10 月より米国テキサス州ダラスの Mary Crowley Medical Research Center (MCMRC) にて、各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験「A Phase I Dose-Escalation Study of Intratumoral Injection with Telomerase-Specific Replication-Competent Oncolytic</p>

	<p>Adenovirus, Telomelysin (OBP-301) for Various Solid Tumors」が開始された。さらに、米国モンタナ州ビリングスの Billings Clinic を追加して多施設共同臨床試験体制とし、単回投与 16 例、複数回投与（1 回/週、5 回投与）7 例、計 23 例が登録され、単回投与 16 例、複数回投与 6 例、計 22 例に治療が行われた。腫瘍内単回投与を受けた 16 例の進行固形癌患者（悪性黒色種、唾液腺癌、舌癌、平滑筋肉腫、神経内分泌腫瘍、非小細胞肺癌、口腔底癌、基底細胞癌、胆嚢癌、乳癌、など）では、初期 3 例は 10^{10} virus particle (vp)、次の 3 例目は 10^{11} vp が投与され、最高容量 10^{12} vp は 10 例に投与されている。投与部位の疼痛や硬結などの局所反応と発熱などの全身症状はみられたが、重篤な有害事象はなく、安全に投与可能であった。Telomelysin のウイルス DNA は 16 例中 13 例で一過性に血中に検出されたが、うち 3 例では 7 日後あるいは 14 日後に再度血中でウイルス DNA が認められ、腫瘍内でのウイルス増殖を示唆する結果と考えられる。投与後 28 日目の RECIST 判定では、評価可能であった 12 例中 11 例が SD、1 例が PD であり、56 日目には評価可能であった 9 例すべてが SD であった。悪性黒色腫患者 1 例では、28 日目で 33%、56 日目で 56.7% の腫瘍縮小がみられた。また、28 日目で SD であった患者のうち 4 例で生検が行われたが、組織学的に腫瘍壊死が観察された。複数回投与の症例については、現在、解析中である。これらの結果から、Telomelysin の単独投与は安全であり、ウイルス増殖が確認された症例では抗腫瘍効果が期待できると言える。</p> <p>4) 腫瘍融解ウイルス(Oncolytic virus)に関する一般的な研究状況</p> <p>遺伝子改変技術を応用することで、ウイルスを癌細胞のみを傷害する治療用製剤として用いることが可能である。最もよく研究されているのがアデノウイルスとヘルペスウイルスであり、米国を中心に前立腺がんの特異的な PSA プロモーターを用いた制限増殖型アデノウイルスや p53 遺伝子機能を欠失したがん細胞でのみ増殖可能な ONYX-015 (E1B 55kD 欠損アデノウイルス)、改変型ヘルペスウイルスである G207 や NV1020、治療遺伝子を持つ OncoVEX GM-CSF などの臨床試験が進められてきた。また、本邦でも名古屋大学などで、細胞増殖が活発にみられる癌細胞でのみ増殖可能であるヘルペスウイルスの自然変異株 HF10 の臨床応用も試みられた。さらに最近、東京大学から申請されていた進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47Δ を用いたウイルス療法の実施が承認されている。</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p>1) Telomelysin の純度</p> <p>本研究に用いられる Telomelysin は、現行の cGMP 基準に従って、Master Cell Bank (MCB)、Master Virus Bank (MVB) など原材料から製造工程、最終製品に至るまで一貫した品質管理のもとに米国テキサス州ヒューストンの Introgen Therapeutics 社において生産されている。最終製品については、純度、確認試験、無菌試験、異常毒性否定試験、及びエンドトキシン試験等の安全性項目のすべてが確認されている。</p> <p>2) 増殖性ウイルス出現の可能性</p> <p>本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用のアデノウイルスベクターと異なり、本来 E1A および E1B 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus, RCA) であるため、RCA 量を制限する評価基準の適応とはならない。しかし、293 細胞を用いた製造過程では、Telomelysin の hTERT プロモーター領域と 293 細胞が持つ内因性の E1A あるいは E1B プロモーターが相同組換えを生じる可能性は否定できない。</p> <p>そこで、野生型アデノウイルス出現を防ぐ対策として、Introgen Therapeutics 社において子宮癌由来のヒト癌細胞 HeLa を用いた製造システムが開発された。Telomelysin は本来 E1 遺伝子を有しているため、E1 欠損アデノウイルスベクターのようにヘルパー細胞による E1 機能の補完は必要なく、hTERT プロモーターが活性化される細胞環境があれば複製・増殖することが可能である。アデノウイルスに感受性をもち、かつ無血清培地で浮遊状態での大量培養が可能であることから HeLa 細胞が選定された。HeLa 細胞にはプロモーター配列を含めて E1 遺伝子領域が内在せず、Telomelysin との相同部位が全く存在しないため、野生型アデノウイルスの出</p>

	<p>現は起こらないと理論的には考えられる。</p> <p>実際に、Nested PCR 法を用いて野生型アデノウイルスの有無を確認したところ、293 細胞で製造した Telomelysin のロットには 10ng のウイルス中に 1pg (0.01%) の野生型アデノウイルスが検出可能であったが、HeLa 細胞で製造したロットでは検出限界以下であり、野生型アデノウイルスの混入はないものと考えられた。</p> <p>3) Telomelysin の正常細胞での細胞障害性 ヒト正常線維芽細胞に対しては、Telomelysin は明らかな細胞障害活性を認めなかった。また、ヒト正常肝細胞、ヒト正常腎上皮細胞、ヒト正常気道上皮細胞では、野生型アデノウイルスに比べて低い細胞障害活性を示した。</p> <p>4) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性 本研究のプロトコールでは Telomelysin は病巣に直接局所注入されるが、コトントンラットでの定量的 PCR による Telomelysin の体内分布解析において、筋肉内投与あるいは静脈内投与後 8 日目において血液中ならびに測定した組織中で検出可能であった。また、ヌードマウスの背部皮下に移植したヒト腫瘍内に Telomelysin を投与すると、投与部位でのウイルス DNA は極めて高値であったが、投与後 70 日目のその他の組織でもウイルス DNA は検出可能であった。すなわち、投与部位で増殖した Telomelysin が全身循環に入ったものと推測されるが、抗 E1A 抗体を用いた各組織の免疫組織染色では投与部位以外の正常組織は染色されず、投与部位以外の正常組織ではウイルス増殖は認められないことが確認された。</p> <p>5) 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性 Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低いが、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。</p> <p>6) 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験 米国にて各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験が行われ、腫瘍内単回投与を受けた 16 例の進行固形癌患者では、初期 3 例は 10^{10} vp、次の 3 例目は 10^{11} vp が投与され、最高容量 10^{12} vp は 10 例に投与されている。投与部位の疼痛や硬結などの局所反応と発熱などの全身症状はみられたが、重篤な有害事象はなく、安全に投与可能であった。</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p>岡山大学病院では、1996 年 1 月、学内に遺伝子治療臨床研究審査委員会を設置し、21 世紀型医療において重要な位置を占めるであろうと期待される遺伝子治療研究を推進してきた。肺癌および前立腺癌に対する遺伝子治療プロトコールは同審査委員会の了承を得て、文部省の学術審議会特定研究領域推進分科会バイオサイエンス部会専門委員会および厚生省の厚生科学審議会先端医療技術評価部会において審議され、それぞれ 1998 年、2000 年に文部大臣・厚生大臣からその実施が了承されている。</p> <p>1999 年 3 月には他施設に先駆け、本邦ではじめての肺癌遺伝子治療を開始した。この臨床研究は、遺伝子治療では本邦ではじめての多施設共同研究に進み、岡山大学を中心に東京医大、東京慈恵会医大、東北大学が参画し、2005 年無事に臨床試験を終了している。また、2001 年 3 月には本邦初の前立腺癌遺伝子治療が実施され、2005 年に終了している。また、2008 年 2 月に厚生労働大臣から実施の承認を得た前立腺癌に対する Interleukin-12 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は、現在も臨床研究を継続中である。したがって、ウイルス製剤の取り扱い場所、患者の研究を実際に行う施設(病棟、手術室、CT 室)およびそれらの運用を含めて、すでに整備され経験豊富なスタッフを擁しており、病院側の受け入</p>

	<p>れ体制は整備されている。さらに、審査体制を含めた学内の体制も充分確立され有機的に機能している。また、2003年にはトランスレーショナル・リサーチの推進を目的として岡山大学病院内に遺伝子・細胞治療センターが設置され、2008年には生物製剤などを用いた治療を行うための先端治療室、及びリサーチナースが治療後の患者をケアする患者回復室などが拡充整備されている。本研究も同センターの活動の一環として実施される予定である。</p> <p>本研究で用いる Telomelysin は、岡山大学で開発された国産の抗がんウイルス製剤であり、遺伝子・細胞治療センターを中心として <i>in vitro</i> から <i>in vivo</i> までの様々な前臨床研究が行われてきた。その研究成果をもとに、2004年3月に Telomelysin をコア技術として岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ(株)が設立された。米国での第I相臨床試験はすでに終了しており、単回投与16例、複数回投与7例が登録され、安全性・忍容性、体内動態、臨床効果などに関する解析結果はFDAに報告されている。</p> <p>以上より、致命的疾患である頭頸部・胸部悪性腫瘍を対象として、Telomelysin と放射線を併用してその安全性と抗腫瘍活性を検証する本研究は、岡山大学病院で実施することは十分可能であると判断した。</p>
<p>実 施 計 画</p>	<p>1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画</p> <p>本研究は、進行再発頭頸部・胸部悪性腫瘍(頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌)症例における腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin の局所投与と放射線併用の安全性および抗腫瘍効果、生物学的反応の検討を目的とした第I/II相臨床研究である。治療前検査にて後述する選択基準に合致、さらに除外基準に抵触しないことが明らかになった場合、治療前検査データをもとに院内の遺伝子治療臨床研究審査委員会の下に設置された安全・効果評価・適応判定部会にて適応を評価する。部会で本研究の適応と判断された場合、文書によるインフォームド・コンセントを行い、同意が得られた場合に限り、以下の方法によって本研究を実施する。</p> <p>被験者は、Telomelysin の投与を行う21日以上前にすべての治療(化学療法、放射線療法、免疫療法、etc.)を中止する。Telomelysin の局所投与と放射線併用による副作用の評価、治療効果、および Telomelysin の最大耐量(定義:最大の効果を認めかつ最小の副作用を示す用量)を推定するために、投与量を 1.0×10^{10} vp (viral particles) から開始して10倍ずつ増量し 1.0×10^{11} vp、1.0×10^{12} vp に至る3レベルの治療群を設定する。放射線治療は、対象疾患に応じて照射野を設定し、治療計画に従って60Gyの治療を行う。Telmelysin の各用量レベルでそれぞれ3人の被験者を評価し、有害事象が発生しなければ逐次用量レベルの上昇を行う。ただし、有害事象が発生した場合はその重篤度を評価し、プロトコルに従って症例数を追加し同一用量で検討するか、試験を中止するかを判断する。最大耐量(Maximum Tolerated Dose, MTD)では3人に投与して問題なければさらに3人、計6人の被験者で評価する。つまり、各用量レベルでの安全性の検討(最大耐量の推定)を行った後、治療効果の観察も行うことを目的とする第I/II相臨床研究として計画した。遺伝子治療終了後、評価基準に従って安全性ならびに治療効果を評価する。</p> <p>2) 選定基準及び除外基準 【選定基準】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 20歳以上の成人。 2) 組織学的あるいは細胞診によって証明された頭頸部・胸部悪性腫瘍(頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌)症例で、外科的切除により根治不能な局所的に進行した症例、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる症例。具体的には、遠隔転移を認めないが周辺リンパ節転移や隣接臓器への直接浸潤により治癒切除が不可能な症例、また遠隔転移が認められても転移巣より原発巣の浸潤などの局所症状により生命予後が期待できない、あるいは著しく生活の質(QOL)を損なうような症例。また、外科療法、化学療法、放射線療法などの従来の治療法が何らかの理由(低肺機能や腎機能障害など)で受けられない症例で、被験者の希望がある場合は対象となりうる。 3) 被験者の腫瘍は、ウイルス液の局所的注入が可能であること。

- 4) 被験者の腫瘍は、測定可能、評価可能であること。
- 5) 被験者のウイルスが投与される腫瘍の面積が $1\text{ cm}^2 <$ 、 $25\text{ cm}^2 >$ であること。
- 6) 被験者は、12週間以上の生存が期待でき、Performance Status (PS)が2以下。
- 7) 文書を用いた説明により文書による同意が得られた症例。
- 8) 妊娠・授乳をしていない、またはコンドームなどの体液の交換を伴わない適切な避妊を行っていること。
- 9) 骨髄機能と肝機能及び、腎機能が適切であること。

【除外基準】

- 1) コントロール不可能な活動性感染症等、重篤な併発疾患がある場合。
- 2) 3週間以内（ニトロソウレアもしくはマイトマイシンCを使用の場合は6週間以内）に化学療法、レーザー照射、ステント挿入が行われていた場合。
- 3) 非局所的副腎皮質ステロイドが併用されている場合。
- 4) 試験登録前4週間以内に未承認試験薬の臨床試験に参加していた場合。
- 5) 試験対象悪性腫瘍以外の同時性、異時性悪性腫瘍がある場合。ただし根治しており、無病期間が2年以上に達している場合はこの限りでない。
- 6) 試験計画書の遵守及び試験でのフォローアップが不可能である場合（精神的、家族的、社会的、地理的等の理由による）。
- 7) 自家もしくは同種臓器、組織移植歴がある場合。
- 8) 血清検査により、HIV 1、HIV 2、HBV、HCVが陽性の場合。
- 9) その他担当医が不適当と認めた場合。

3) 実施期間及び目標症例数

実施期間は了承が得られた時点から3年間とする。目標症例数は原則として12例とするが、各用量レベルでの副作用の出現の有無によって最大24例とする。

4) Telomelysinの投与方法

各患者に対するTeloemelysin投与量は、低用量 (1×10^{10} vp)、中用量 (1×10^{11} vp)、高用量 (1×10^{12} vp) の3群で、投与ウイルス液量は1 mlとする。腫瘍内5カ所に注入するため、1箇所あたり0.2ml程度ずつ注入することになる。局所麻酔下、咽頭麻酔下、あるいは全身麻酔下に、細い注射針を装着した注射器、内視鏡の生検鉗子孔を通した穿刺吸引針、あるいはCTガイド下や超音波ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて、面積が $1\text{ cm}^2 <$ かつ $25\text{ cm}^2 >$ の腫瘍内5カ所（4分割した区域と中心部）に病変全体を3次的にカバーする様に直接注入する。Telomelysinの投与初日を第1日目とし、重篤な副作用を認めない場合は第18日目、第32日目に同じ病変に投与を行い、計3回の治療を実施する。

5) 放射線治療の併用

すべての被験者は、第1日目にTelomelysinの投与を受けた後、有害事象がみられなければ、第4日目から2Gy/日、5回/週で、総線量60Gyの放射線治療を施行される。リンパ節領域を含む広範な照射野に5週間で50Gy照射し、さらに照射野を絞って1週間10Gyを追加する予定である。しかし、個々の患者の年齢、一般状態(PS)、原発巣、病期、病理組織型、病巣の進展範囲、リスク臓器の位置などを考慮して適切な放射線治療計画をたてる。

6) 臨床検査項目及び観察項目

【治療開始前評価】

- 1) 初回の治療を開始する前に、被験者の病歴（並存疾患、アレルギー歴、手術歴、既往歴、常用薬、喫煙歴）及び現症について記録する。
- 2) 臨床検査データとしては、白血球分画、血小板数を含むCBC、PT、APTT、電解質、ビリルビン、クレアチニン、トランスアミナーゼなどを含む生化学検査一般、及び尿検査、胸部X線写真、心電図、腫瘍マーカーなどを記録する。
- 3) 治療開始以前に施行された抗癌療法の影響が認められる場合は、有害事象の評価指標に従ってその重篤度を判定し記録する。

- 4) 治療開始前の臨床病期を肉眼的観察、触診、画像診断、及び内視鏡診断により評価する。肉眼的あるいは内視鏡的に腫瘍が直視可能であれば一定の距離から写真撮影を行い、その位置と大きさ（できれば長径と短径）を記録する。また、X線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PETなどで抽出可能であれば、やはりその位置と大きさ（長径と短径）、周辺組織への浸潤程度、及び癌細胞の活動性を記録する。さらに、臨床病期は各種癌取扱規約に基づいて決定する。
- 5) 臨床的に必要と判断されれば、治療前に動脈血ガス分析、O₂ 飽和度、FEV_{1.0}を含む呼吸機能検査を施行する。
- 6) 唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。
- 7) 血液サンプルから血清を分離し、ELISA 法にてサイトカイン（Interleukin 6 ; IL-6、IL-10、Interferon- γ ; IFN- γ ）を測定する。また、アデノウイルス中和抗体価を測定する。さらに、血液中リンパ球サブセット（CD4、CD8、NK）を測定する。

【治療中評価】

- 1) 治療中定期的に被験者の病状及び PS や体重を含む現症を記録する。
- 2) 被験者の CBC、血小板数、PT、APTT、電解質、生化学検査一般などの検査は、治療中定期的に行い記録する。
- 3) 腫瘍が肉眼的あるいは内視鏡的に直視可能であれば、治療中定期的に写真撮影し、その大きさ（できれば長径と短径）を記録する。また、X線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PETなどで抽出可能であれば、定期的にその大きさ（長径と短径）、周辺組織への浸潤程度、及び癌細胞の活動性を記録する。さらに、臨床病期も定期的に再評価する。
- 4) 定期的に唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。
- 5) 定期的に採取した血液サンプルから血清を分離し、ELISA 法にてサイトカイン（Interleukin 6 ; IL-6、IL-10、Interferon- γ ; IFN- γ ）を測定する。また、血液中リンパ球サブセット（CD4、CD8、NK）を測定する。
- 6) 被験者が死亡した場合は剖検を依頼し、癌組織及び正常組織を採取し、同様に組織学的・分子生物学的検討を行う。
- 7) すべての被験者は、定期的に臨床効果及び毒性・副作用について評価される。

【治療後評価】

治療を終了した一ヶ月（28日）後、及び三ヶ月後に治療後評価を行う。

- 1) 被験者の病状及び PS や体重を含む現症を記録する。
- 2) 被験者の CBC、血小板数、PT、APTT、電解質、生化学検査一般などの検査を行い記録する。
- 3) 腫瘍が肉眼的あるいは内視鏡的に直視可能であれば、写真撮影し、その大きさ（できれば長径と短径）を記録する。また、X線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PETなどで抽出可能であれば、その大きさ（長径と短径）、周辺組織への浸潤程度、及び癌細胞の活動性を記録する。さらに、臨床病期も再評価する。
- 4) 生検にて癌組織を採取し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて病変範囲、治療による細胞死の有無、腫瘍の消失などを初回生検組織と比較検討する。また、症例によっては抗 EIA 抗体あるいは抗ヘキソン抗体を用いて免疫組織学的染色を行い、Telomelysin の遺残を検討する。
- 5) 血液を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。
- 6) アデノウイルス中和抗体価を測定する。
- 7) 臨床効果及び毒性・副作用について評価する。

7) 副作用の判定基準

治療中及び治療後に見られるすべての有害事象のうち、治療に関する毒性・副作用は、「副作用の評価指標」に基づいて grade 0-4 で評価する。この「副作用の評価指標」は、NCI (National Cancer Institute) の common toxicity criteria 日本語版 (有害事象共通用語基準 v3.0) に基づいて作成されたものである。副作用の認められた期間及びそれに対する治療についても記録する。致死的な副作用が生じた場合は、実施施設の長である岡山大学病院長を通じて厚生労働大臣に報告する。

Telomelysin の各濃度につき、それぞれ3人ずつの被験者に投与する。3人の内1人に grade 3 以上 (血液系では grade 4) の副作用が認められた場合、さらに3人の被験者にその濃度の Telomelysin を投与する。6人中2人以上の被験者で grade 3 以上 (血液系では grade 4) の副作用が見られた時点で、その濃度より1段階低くそれらの副作用を生じない濃度を最大耐量 (MTD) とする。MTD の副作用が認められた被験者では、1段階低い濃度で治療を継続する。

8) 治療効果の評価方法及び評価基準

【臨床的効果】

評価は The Response Evaluation Criteria in Solid Tumor Group (RECIST Group) の評価基準を用いて、Telomelysin 投与病変および非投与病変について評価する。測定可能病変 (1 臓器 5 個、全体で 10 個まで) の最大長の和をもって効果を評価する。以下に RECIST 評価基準 (version 1.1) を示す。

- Complete Response (CR): すべての測定可能病変の消失、病的リンパ節の短径の 10 mm 未満への縮小
- Partial Response (PR): 少なくとも治療前の直径の和と比して 30% 減少
- Progression (PD): 少なくとも治療前の最短径の和と比して 20% 増加、および少なくとも 5 mm の増加、あるいは新病変の出現
- Stable Disease (SD): PR とするには腫瘍の縮小が不十分で、かつ PD とするには腫瘍の増大が不十分な場合

【病理組織学的検討】

腫瘍から生検にて採取した癌組織を用いて、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて組織学的に検討する。症例によっては、抗 E1A 抗体あるいは抗ヘキソン抗体を用いて免疫組織学的染色を行い、Telomelysin の感染と拡散を確認する。

【総合効果】

各被験者の治療効果に関しては、以下の基準に従って総合的に評価する。

総合効果評価基準

投与病変	非投与病変	新病変	総合効果
CR	CR	なし	CR
CR	PR/SD	なし	PR
PR	PD を除く全て	なし	PR
SD	PD を除く全て	なし	SD
PD	全て	全て	PD
全て	PD	全て	PD
全て	全て	あり	PD

【腫瘍進行までの期間及び生存期間】

被験者の腫瘍進行までの期間は、Telomelysin 初回投与から腫瘍進行までの期間とし、生存期間は Telomelysin 初回投与日から死亡日までとする。

備 考	<p>被験者の同意取得について：被験者は本臨床研究について、文書に基づいて説明を受け、その内容と期待される治療効果及び危険性を十分に理解し、自主的に同意をした上で、同意書に署名するものとする。なお、同意後も被験者からの申し出により同意を撤回し、本臨床研究への参加をいつでも中止することができるものである。</p> <p>個人情報については、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」、「国立大学法人岡山大学医学部・歯学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理のための措置に関する規程」に沿って適切な取り扱いを行うものとする。</p>
-----	--

添付資料 3

頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルス
Telomelysin を用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究

説明と同意書

平成 21 年 3 月 6 日初版
平成 21 年 7 月 23 日第 2 版
平成 22 年 7 月 8 日第 3 版
平成 23 年 2 月 8 日第 4 版
平成 23 年 10 月 22 日第 5 版

遺伝子治療臨床研究に参加をご希望の患者さんへの説明と同意書

説 明

1. はじめに

最近の遺伝子工学の進歩により、ウイルスなどの微生物の遺伝子を操作してがん治療薬を開発することが可能になってきつつあります。これらの進歩に支えられて、岡山大学病院では、頭頸部がん、食道がん、肺がんの新しい治療として、がん細胞の中だけで増えてがん細胞を殺すウイルス療法と放射線治療を併用する遺伝子治療臨床研究（以下「臨床研究」と略します）を計画いたしました。

これから、この臨床研究で行われるウイルス療法の仕組み、期待される効果、安全性、予想される副作用などについてご説明いたしますので、この臨床研究に被験者（患者）として参加してこの治療を受けられるかどうかをご検討ください。

もちろん、実際にはこの文書に基づいて担当の医師が詳しくお話いたしますし、わからない点があれば何度でも説明いたします。

このような臨床研究に参加される方の人権を守るため、あなたが臨床研究に参加することは、あくまでもあなたの自主性に基づいた自由意思によるものであることを前提として以下のことを約束します。

- a) 臨床研究に参加することを私たちがお勧めして、あなたが拒否された場合も、今後の治療には不利益を受けることは一切ないこと。
- b) 臨床研究に参加することに同意した場合でも、あなたが健康に不安を感じたり、あなたにとって何らかの不都合が生じたりした場合は、いつでも研究参加の同意を撤回することが出来ること。

2. 臨床研究について

臨床研究（あるいは臨床試験）とは、新しく考え出された治療方法や薬物を患者さんのご協力を受けて投与することにより、実施の診療・治療の場で安全性や治療効果を検討することを言います。このような新しい治療法を一般的に実施し、広く患者さんが恩恵を受けることができるようにするためには、臨床研究を行い、安全性に問題がないか、そして治療効果があるかについて科学的な評価を受けなければなりません。

一般的に臨床研究は治療あるいは薬剤の副作用を確認し、安全であるかどうかを調べる段階(第Ⅰ相試験)、第Ⅰ相試験で定められた方法で治療を行って効果を調べる段階(第Ⅱ相試験)、現在一般的に使われている治療や薬剤と比較する段階(第Ⅲ相試験)に分けられます。これらの臨床試験を経て、十分な効果があることが科学的に証明され、かつ安全性に大きな問題がないと判断されたものが医薬品として認められます。

ウイルス療法に関する臨床研究は、まだ研究段階の治療です。患者さんにとって、本当に効果があるかどうか、安全に行えるかどうか、わからないところもたくさんあります。今回、患者さんに紹介する臨床研究は、治療の安全性を調べることを主たる目的(主要エンドポイントと呼びます)とし、同時に治療の効果も調べることを目的としており(副次エンドポイントと呼びます)、第Ⅰ/Ⅱ相試験に相当します。

ただ、この試験は、製薬会社などが新薬の厚生労働省の承認を得るために行う臨床試験、いわゆる治験ではありません。

3. あなたのご病気について

あなたのがん(頭頸部がん、食道がん、肺がんのいずれか)は、手術で完全に切除することが難しい状態にあります。このまま病気が進行しますと、がんによって咽頭や食道、気管・気管支といった食物や空気の通り道が閉塞されたり、がんが大きくなって痛みの原因になったりすることが予測されます。

このような時、一般的には抗がん剤治療、放射線治療、あるいはその併用治療が行われますが、確実に効果が得られる決定的な治療法の組み合わせが定まっていないのが現状です。抗がん剤治療は新しい薬剤が次々に承認され、いろいろな薬剤を組み合わせる治療が試みられていますが、多くの副作用がみられています。

そこで、私たちは、より副作用の少ないと期待されるウイルス療法と放射線治療を併用することで、がんの増殖を抑えたり縮小させたりしようと考えています。

4. この臨床研究の概要

一般的に、ウイルスは細胞に感染すると細胞の中で増殖して、その細胞を殺すことで他の細胞へと感染を拡げていきます。したがって、ウイルスをがん細胞に感染させると、がん細胞を殺すことができますが、野生のウイルスの場合、正常な細胞にも感染して増殖するので、正常な細胞も殺してしまうこととなります。

そこで私たちは、遺伝子組み換え技術を用いて、がん細胞に感染したときだけ増殖するウイルス製剤、テロメライシン(Telomelysin)を開発しました。テロメライシンは、

がん細胞に感染すると増殖してがん細胞を殺しますが、正常な細胞では増殖が抑えられるため、細胞は生き続けることができます。したがって、テロメライシンはがん細胞を選択的に殺傷する抗がん剤として用いることができます。また基礎研究において、テロメライシンは放射線ががん細胞を殺す機能を増強する効果があることが明らかになっています。

この臨床研究では、テロメライシンの投与と放射線治療を同時に行うことで、より強力な抗腫瘍効果を期待しています。

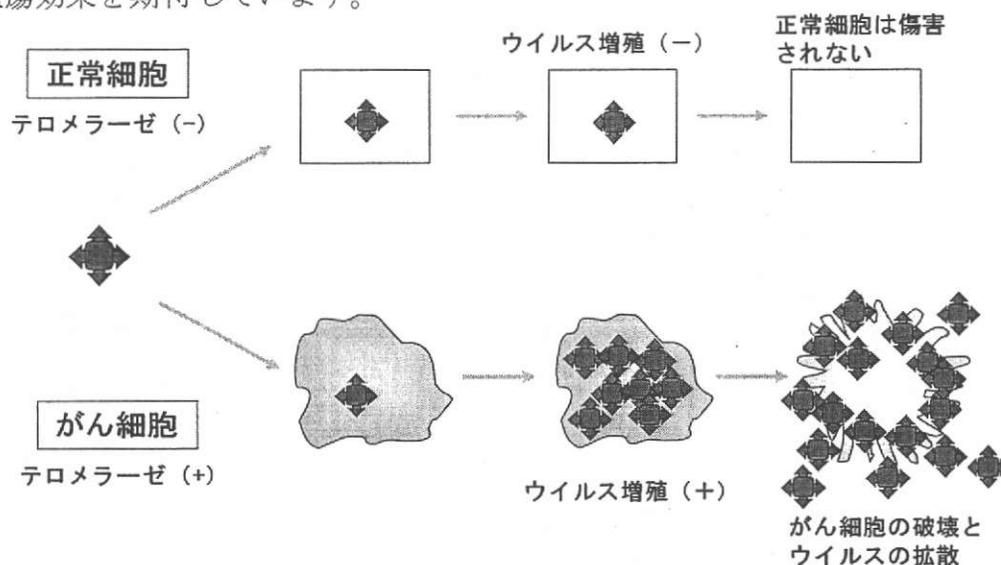


図1 テロメライシンの作用機序

5. この臨床研究の目的

この臨床研究の主な目的は、テロメライシンをがんの中に投与し、同時に放射線治療を行うことで、重い副作用なく頭頸部がん、食道がん、あるいは肺がんの増殖を抑制したり、縮小させたりすることができるか否かを検討することです。テロメライシンの安全性はすでに米国での第I相臨床試験で確かめられていますが、放射線治療と同時に使われた経験はまだありません。そこで、低い容量のテロメライシンから開始して段階的に使用する量を増やし、第I/II相試験として安全性および身体での反応、有効性を検討する予定です。

私たちは、がんの増殖が止まったり、がんが小さくなったりすることで、痛みが和らいだり、症状がよくなることを期待しています。しかし、テロメライシンと放射線を併用する臨床研究は初めての試みであり、はっきりとした臨床効果を期待するのはこれからのことなのです。治療の効果がなく症状が強くなる場合も考えられます。そのような

場合、症状緩和のための手段を尽くします。多くの人のデータを集め、良い結果と悪い結果の両方をよく検討して次の段階の治療に貢献するよう進めますのでご理解下さい。

6. テロメライシンについて

テロメライシンは、遺伝子組み換え技術を用いてアデノウイルス 5 型をもとに作成されました。アデノウイルスの型によっては結膜炎や胃腸炎、重症肺炎などを起こす場合もありますが、アデノウイルス 5 型は幼児の「かぜ」を起こすウイルスの一つと考えられています。テロメライシンは、テロメラーゼという細胞を不死化する酵素を持つ細胞に感染した時に増殖することができます。ヒトの 80% 以上のがんではテロメラーゼの活性が認められることから、ほとんどのがん細胞でテロメライシンは増殖して、そのがん細胞を殺すことができると考えられます。米国では、さまざまな固形がんの患者さんを対象に、テロメライシンの投与量を段階的に増やして安全性を確認するための第 I 相臨床試験が行われ、テロメライシン単独での腫瘍内投与の安全性が確認されています。

また、テロメライシンが感染したがん細胞では、放射線により傷ついた DNA が修復されるのが抑えられるため、放射線治療の効果がより強力にみられることが明らかになっています。逆に、放射線が照射されたがん細胞はテロメライシンがよく感染することもわかっています。すなわち、それぞれの効果を増強することで、テロメライシンと放射線治療は相乗効果を発揮することができるのです。この有望な基礎研究成果に基づいて、いよいよ実際の患者さんについてその効果と安全性を確かめる段階となりました。

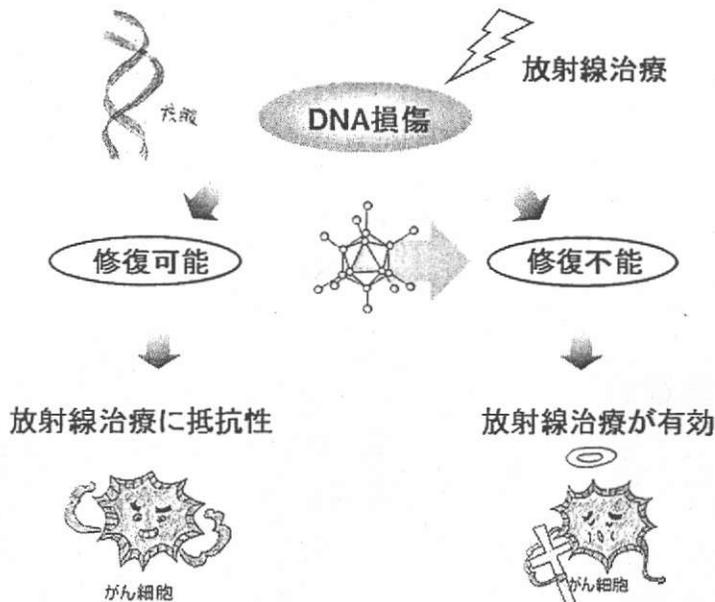


図 2 テロメライシンによる放射線治療の効果増強

テロメライシンが DNA 修復を阻害して放射線治療の効果を増強する。

7. この臨床研究に参加できる患者さんの条件

がんの治療法は多数ありますが、がんの種類や進行の状況を診断して、もっともよいと思われる治療法を選ばなければなりません。

この臨床研究の対象となるのは、頭頸部がん、食道がん、あるいは肺がん（非小細胞肺がん）の患者さんで、全身状態あるいはがんの状況から外科的な手術によりがんを完全に取り除くのは難しいと判断された方、あるいは手術のあとがんが再発された方です。外科的な切除にともなう危険性の高い方も対象となります。肺がんの中で、非小細胞肺がんとは扁平上皮がん、腺がん、大細胞がんの総称で、抗がん剤の比較的良好に効く小細胞肺がんはこの治療の対象とはなりません。

担当医師によりこの臨床研究の適応症例に該当すると判断された場合、あなたの病歴、全身状態を含めた検査結果は岡山大学病院の本臨床研究審査委員会の中にある安全・効果評価・適応判定部会に提出されます。この部会にてあなたが遺伝子治療を受けるに適切であると判断され、そしてあなたが同意書に自署又は捺印をして遺伝子治療を受けることに同意されますと、治療が開始されることとなります。

研究に参加いただける患者さんの医学的な主な条件は以下の通りです。

- 1) 年齢は20歳以上で上限はないが、医学的に本臨床研究を行うために十分な身体的機能を有すると判断されること。
- 2) 手術により切除できない頭頸部がん、食道がん、非小細胞肺がん（扁平上皮がん、腺がん、大細胞がん）を有していること。
- 3) ウイルス液のがんへの局所的注入が可能であること。
- 4) がんの面積が 1 cm^2 <、 25 cm^2 > であること。
- 5) 無症状であるか、あるいは症状があっても歩行可能か、ベッド上にいるのが1日の半分以下であること。
- 6) 骨髄機能、肝機能、腎機能、心機能、肺機能に重い障害がないこと。

8. この臨床研究の進め方

この臨床研究では、テロメライシンを投与し、同時に放射線治療を行った場合の人体での安全性と治療効果を調べるために、投与量を段階的に増やしながら進めます。

まず、ある濃度のウイルス投与と放射線治療を3人の患者さんに行い、副作用とがんに対する効果の有無を調べます。この治療で重い副作用が認められなければ、続く別の3人の患者さんでは、10倍増量したウイルス投与と放射線治療を行い、同じように副作

用と治療効果を観察します。この段階で重い副作用が認められない場合には、10倍増量した最大投与量のウイルス投与と放射線治療による安全性と効果を確認するために、さらに6人の患者さんの治療を行います。なお、ウイルスを増量した場合も、放射線治療は標準的に使われている照射量に保ち、増やすことはありません。計画通りに進めば合計12人の患者さんでこの臨床研究が終了することとなります。ただし、この臨床研究の途中で重い副作用が認められたときは直ちに投与を中止し、副作用に対する治療に努めることとなります。その場合、安全に投与できる最大投与量を決定するために、そのレベルでの患者さんの数を増やして検討することとなります。

このように安全性を確認しながら一つ一つの段階を進みますので、あなたがこの臨床研究に参加された場合、その時の臨床研究の進行状況によってあなたに用いるウイルスの投与量が決まっています。この臨床研究は、安全性を確認するためのデータの収集を目的としており、治療の途中であなたに投与するウイルスの量を増やしたりすることはできません。

これは重い副作用がおこるのを未然に防ぐなど、安全に臨床研究を進めるために必要なことなのです。この臨床研究の進め方と現在の進行状況について十分に説明を受けて、納得されたうえで同意するか否かの判断をして下さい。

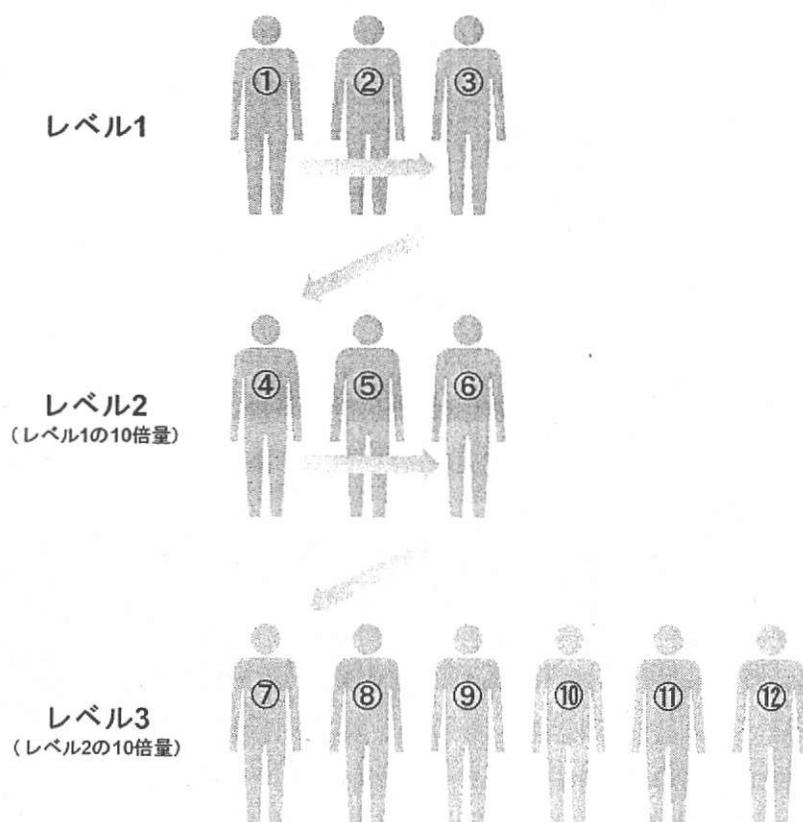
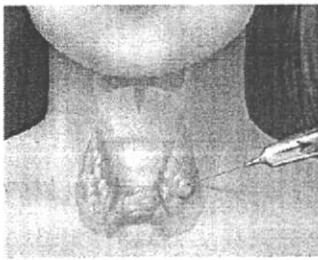


図3 臨床研究の進め方

9. この臨床研究での治療の実際

1) テロメラシンの投与

テロメラシンのウイルス液の投与は、局所麻酔、咽頭麻酔、あるいは全身麻酔のもとで、直接がんを見ながら、あるいは内視鏡（消化管内視鏡あるいは気管支内視鏡）を用いて注射を行います。また、コンピューター断層撮影（CT）というレントゲンの透視下や超音波エコーでがん病巣を確認しながら、体の外から針を刺して投与することもあります。注射は細い針を使って、原則としてがんの中5ヶ所に行います。この治療は、問題となる副作用が認められない限り、投与初日を第1日目として、第18日目、第32日目に同じ場所のがんに行い、計3回の投与を行う予定です。



1) 体の表面のがんに直接注射
(頭頸部がん)



2) 内視鏡を用いて注射
(頭頸部がん、食道がん、肺がん)



3) CTを見ながら体の表面から注射
(食道がん、肺がん)

図4 テロメラシンの投与方法

2) 放射線治療

第1日目にテロメラシンの投与を受けた後、問題となる副作用が認められなければ、すべての患者さんは第4日目から原則として週5回（平日5日）、6週間の放射線治療を受けていただきます。

準備として、治療開始前に放射線治療計画用CTを行い、照射すべきがん病変とその周辺の画像を撮影し、局所への照射範囲を決めます。その後、放射線治療担当医師が医学物理の専門家や放射線技師とともに、一番よい照射方法をコンピュータープログラムを用いて決めます。その決められた方法に従って、放射線治療担当医師と技師が放射線治療を行います。

原則として1日1回、月曜日から金曜日までの週5回で、一回の照射時間は数分程度です。照射中の患者さんには苦痛はありません。第18日目、第32日目に行うテロメラシンの投与は、同日の放射線治療の後に行います。

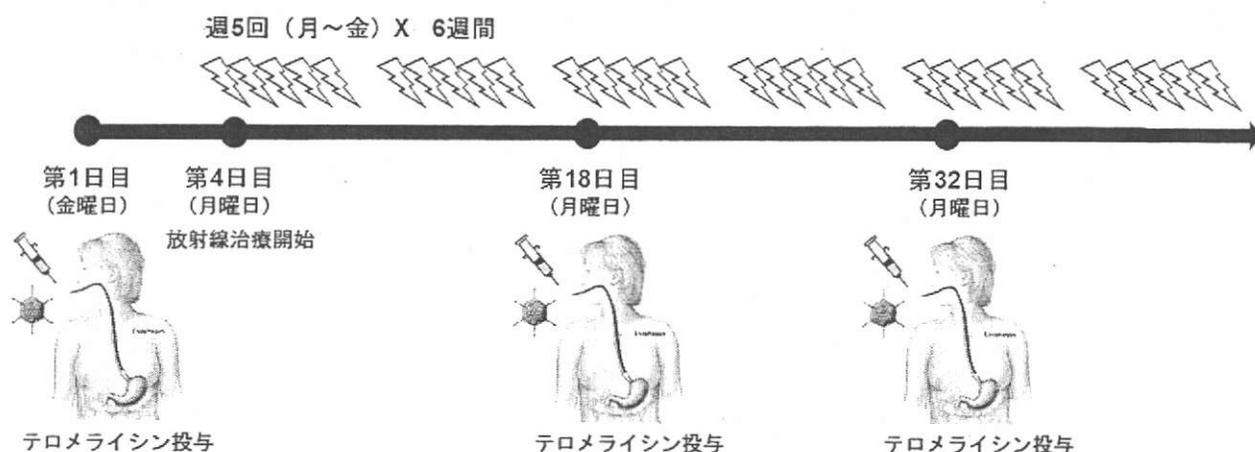


図5 治療のスケジュール (食道がんの場合)

3) 治療中および治療後の検査

テロメライシンの投与後、定期的に採血やレントゲン撮影などを行い、副作用とがんの進行や治療の効果を確かめます。ウイルス投与後 48 時間は個室にとどまっていたいただき、個室外に出る自由が制限されます。専用の着衣の着用が義務づけられ、排泄物、着衣や病室内も消毒等が実施されます。これらは、遺伝子組み換えウイルスであるテロメライシンが環境中に散らばって、自然界の生物および微生物に影響を与える可能性を最小限に抑えるためのものですので、ご協力をお願いいたします。

入院期間はあなたの健康状態により異なりますが、放射線治療終了から数日間経過を観察して、担当医師が問題ないと判断しましたら退院していただきます。その後、約一ヵ月後、三ヵ月後に採血や CT、あるいは核磁気共鳴画像診断 (MRI)、陽電子放射断層撮影 (PET) で、副作用と治療効果判定を行います。また、治療後三ヶ月の時点では、テロメライシンを投与したのと同じ方法でがんの一部を取り、顕微鏡で治療効果があるかどうかを確認します。

10. 期待される治療効果について

テロメライシンの注射と放射線治療の併用によって、具体的な効果としてはがんの増殖が停止したり、縮小したりすること、あるいはがんによる痛みが和らぐことなど、進行したがんによる症状が改善されることを期待しています。進行したがんが治癒することまでは期待できません (延命効果については不明です) が、がんによる症状が軽減し、生活しやすくなり、その状態が長く続けば治療として有用であると考えます。

に軽快しますが、まれに出血が多いことがあります。そのような場合には緊急に適切な処置をいたします。

CT を用いて体の外から直接がんを穿刺して治療する場合には、肺から空気が漏れて気胸となり肺がしぼむことがあります。自然に軽快することがほとんどです。膨らみが悪い場合は、肺を膨らますための処置をいたします。

3) 放射線治療による副作用

放射線治療による副作用としては、頭頸部がんの場合、口腔、咽頭の粘膜炎（口内炎）、皮膚炎、唾液分泌障害、味覚障害、嚥下障害など、食道がん、肺がんの場合は、色素沈着、皮膚炎、食道炎、食道潰瘍、食道穿孔、食道出血、肺臓炎などが予測されます。また、骨髄機能が低下すれば、感染や出血しやすくなります。これらは通常の放射線治療でも見られる副作用であります。

以上が予測される副作用ですが、テロメラインシンの投与と放射線治療を同時に行うことは、まだ人では試みられておりません。何らかの予測できない副作用が生じる可能性はありますので、すべての患者さんは厳重に経過観察を受け、副作用が生じれば速やかに対処されます。

また、あなたの病状については、本臨床研究の担当医師以外に、先に述べました安全・効果評価・適応判定部会の複数の委員が監視する仕組みとなっています。もちろん予測されなかった事態が生じた時には、私たちは全力でそれに対処しますが、治療を中止する場合もあることを、予めご理解いただきたいと思っております。その際は、事前あるいは事後に十分に説明させていただきます。

12. この臨床研究に関わる有害事象が生じた場合について

臨床研究の期間中及び終了後にあなたが身体の異常に気づかれたときは、担当医師や看護師にすぐに申し出て下さい。専門の医師が直ちに適切な処置を行います。

このような自覚症状がなくても、治療による何らかの有害事象が発見された場合には、まずあなたにお知らせし、その上で適切な治療を行います。

岡山大学病院は、本臨床研究による治療が原因で生じたいかなる身体的障害に対しても十分な医療的処置を提供します。ただし、金銭的な補償はいたしません。また、この臨床研究で対象とした病気以外によるものや、明らかに臨床研究用薬に関連して起きた症状（いわゆる副作用）と考えられないものについては、通常の治療及び支払い方法（例

えば健康保険など) となります。

通院や入院、社会的問題などによる臨床研究期間中の減収や不快感などの精神的または肉体的な不利益に対する補償をすることは出来ませんので、了解した上で、本臨床研究に参加して下さい。

13. 外国での状況について

テロメライシンの第 I 相臨床試験「各種固形がん患者を対象としたテロメラーゼ特異的に増殖する腫瘍溶解性アデノウイルス、テロメライシン (OBP-301) の第 I 相単回投与試験」は、米国食品医薬品局 (FDA) の承認のもと、2006 年 10 月から開始されました。テキサス州ダラスのマリー・クローリー医学研究センター、モンタナ州ビリングスのビリングスクリニックで 16 例の患者さんに投与され、安全性や治療効果に関する情報が集められています。また、2008 年 6 月からは、週 1 回、5 週間、計 5 回のテロメライシン投与を行う反復投与試験が、さらに 6 例の患者さんに追加で行われました。

テロメライシンを 1 回のみ投与された初めの 16 例の患者さんについての報告によりますと、多くみられた副作用は発熱、寒気 (37.5%、6/16)、倦怠感 (56.3%、9/16)、投与部位の疼痛 (37.5%、6/16) などでしたが、いずれも軽いもので軽快しています。治療後もなく病気の進展によって何らかの症状が発生したり、亡くなられたりした方もありますが、テロメライシンの投与と明らかに関係した高率に発生する重大な副作用は認められていません。

治療効果に関しては、テロメライシン投与後 28 日目の時点で評価可能であった 12 例中 1 例でがんの 20%以上の増大がみられましたが、11 例の患者さんでは増大は認められず、56 日でも評価可能であった 9 例すべてでがんの進行はみられませんでした。悪性黒色腫の患者さん 1 例では、28 日目で 33%、56 日目で 56.7%のがんの縮小が認められています。また、28 日目でがんの増大がみられなかった患者さんのうち 4 例で組織が調べられましたが、がんの壊死が観察されたということです。

今回、私たちが計画している臨床研究では、この第 I 相臨床試験と同じテロメライシンを用いて治療を行う予定です。

外国で行われた他の遺伝子治療の情報についてもお伝えしておきます。

がんに対する遺伝子治療ではありませんが、1999 年 9 月に酵素欠損症の 18 歳の青年に酵素の遺伝子を持つアデノウイルスを投与したところ、直後に急性の心肺肝不全で死亡する事故が報告されています。ただ、規定量以上のアデノウイルスを投与したことに

よる事故であり、遺伝子治療自体の安全性に問題があるわけではないと考えられています。また、免疫不全症の患児にレトロウイルスによって遺伝子を導入した幹細胞を投与する臨床研究では、患児の一部に白血病が発症する問題が生じましたが、テロメライシンは染色体に組み込まれないアデノウイルスであるため、このような副作用は理論的には発生しません。

14. 臨床研究に参加される患者さんの権利と義務ならびに注意点について

人権にかかる重要なことがらは最初に説明しましたが、念のためにもう一度以下のことを申し上げますので確認して下さい。

あなたがこの臨床研究に参加されるかどうかは、あなたの自由意思によって決められるもので、決して強制されるものではありません。担当医師から紹介された臨床研究なので参加を断わりにくいなど考えることはありません。疑問があればどんどん質問して下さい。もしも満足する答えが得られない場合は、参加しないことを考えてもよいでしょう。その場合には、他の新しい抗がん剤の治療や抗がん剤と放射線治療を併用する方法などを選ぶことが考えられますし、症状を緩和することに重きをおいた緩和医療を選ぶのも良いと思います。臨床研究に参加することを断られても、あるいは一度同意した後、その同意を撤回して治療中止の申し出をされても、その後の治療であなたが何ら不利益を受けないことを保証いたします。臨床研究の参加に同意されても、医療訴訟を提起する権利や人権が制約されることはありません。

臨床研究に参加されましたら、治療がひとまず終わっても経過観察の必要がありますので、岡山大学病院、あるいはそれと密接な関連を持つ医療施設（担当医師からお知らせします）を定期的に受診されることをお勧めします。このことは何よりも、あなたにとって不利益となる副作用を監視し、それを防止するためであり、さらに治療の効果を明らかにするためです。なお、不幸にして何らかの原因でお亡くなりになった場合には、治療の効果を確認するために病理解剖にご協力下さいますようお願いいたします。

また注意していただきたい点として、本臨床研究実施中に他院・他科の診察を受ける場合には本臨床研究を受けている旨を必ず他院・他科の担当医に報告し、本臨床研究の担当医にも必ず報告してください。また他院・他科で処方された薬や、あなた自身が薬局で購入した薬がある場合、可能な限り服用前に本臨床研究担当医に相談するとともに、服用後は必ず本臨床研究担当医に報告してください。

15. 治療に関わる諸経費について

あなたは、この臨床研究のために発生する健康保険で賄うことが出来ない費用（検査・画像診断や治療のための投薬・注射にかかわる費用、入院費用など）については、岡山大学が負担いたしますので支払う必要はありません。ただし、健康保険で賄われる費用の自己負担分は支払って頂く必要があります。もし、費用などのことで心配やわからないことがあれば、いつでも臨床研究担当医師に相談して下さい。

16. 遺伝子治療臨床研究実施に必要な手続きについて

日本国内で遺伝子治療臨床研究を実施する場合には、国が定めた「遺伝子治療臨床研究に関する指針」の規定に従って、岡山大学病院の遺伝子治療臨床研究審査委員会、厚生科学審議会科学技術部会ならびにがん遺伝子治療臨床研究作業委員会にて、研究の安全性、予測される効果、倫理的な諸問題などについて慎重に審議し、臨床研究の実施に問題がないことを確認します。すべての審議で了承されて、初めて臨床研究を開始することが許されています。

今回、あなたに提案した遺伝子治療臨床研究はこのような手続きを経て承認された臨床研究です。

17. 同意の撤回について

臨床研究に参加することをいったん同意した後や臨床研究が開始されてからでも、いつでもあなたの希望に従い研究参加の同意を撤回することができます。同意を撤回された場合、その後の治療についてあなたが何ら不利益を受けないことを保証いたします。同意の撤回に際しては、撤回することを担当医師に口頭で伝え、その後、確認のために所定の同意撤回書を提出していただきます。

18. 同意撤回後の資料取り扱いについて

同意を撤回される以前のあなたの臨床経過や検査結果ならびに保管されている臨床検体については、貴重な資料となりますので、遺伝子治療臨床研究の資料として使用させていただきますことをご了承下さい。

19. 個人情報の保護について

1) あなたの診療記録および同意書など、この遺伝子治療臨床研究に伴う診療記録や臨床データは、以下の法律等の規定に基づき、岡山大学病院医事課で保管し秘密を厳守し

ます。得られた臨床データはこの臨床研究に利用する他、この研究の結果を医学雑誌や学会、厚生労働省およびその審議会に報告することがありますが、あなたの個人情報保護されます。なお、利用目的に変更が生じた場合には、改めてご連絡させていただきます。

① 個人情報の保護に関する法律（平成 15 年 5 月 30 日法律第 57 号、平成 21 年法 49 号で一部改正）

② 遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 16 年 12 月 28 日全面改訂 文部科学省・厚生労働省告示）

③ 国立大学法人岡山大学医学部・歯学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理のための措置に関する規程（平成 17 年 3 月 24 日施行）

2) あなたは、この臨床研究により得られた、あなた自身が識別できる個人情報の開示を求めることができます。その際には、上記の指針・規定および「国立大学法人岡山大学の情報公開に関する規定」に照らし、開示の妥当性を判断します。患者さんが個人情報の開示を請求する場合は、無料といたします。ただし、実施にかかる手数料については、当院が定めた料金規程により納めていただきます。

3) あなたは、この臨床研究により得られた「あなた自身が識別できる個人情報の内容が事実ではないと判断した場合」には、訂正・追加または削除を求めることができます。訂正・追加または削除できない場合には、必要に応じてその旨を説明します。

4) あなたは、この臨床研究により得られた「あなた自身が識別できる個人情報の内容が事実ではないと判断した場合、本臨床研究の目的達成に必要な範囲を超えて利用されていると判断した場合あるいは不正の手段により個人情報が取得されたものと判断した場合」には利用の停止または消去を求めることができます。その際には、総括責任医師が内容を調査し、違反が判明した場合には必要な措置を講じるとともに、必要に応じてその旨を説明します。なお、利用の停止または消去ができない場合にも、必要に応じてその旨を説明します。

5) 個人情報に関してあなたのご理解を深めていただくため、個人情報の保護に関する法律及び当病院の個人情報に関する院内規定を当病院のホームページ上に掲載しております (<http://www.uro.jp/okayama/index.html>)。また、個人情報の開示等に関する詳細な

内容の照会や疑問等については、下記担当係にお問い合わせ願います。

担当係： 岡山大学病院医事課患者支援係
(電話 086-235-7205)

20. 緊急連絡先および質問の問い合わせ先について

この臨床研究への参加者としてのあなたの権利や、研究に関連した障害などについて、何らかの問題や質問が生じたときには、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科学 (TEL 086-235-7257、FAX 086-221-8775)、または岡山大学病院総務課 (TEL 086-235-7507) にご連絡下さい。

21. 遺伝子治療臨床研究の正式名称と実施組織体制

1) 研究の名称

頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin を用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究

2) 実施施設

岡山大学病院

連絡先：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学

TEL 086-235-7257

FAX 086-221-8775

3) 総括責任医師

藤原 俊義 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学・教授)

4) 研究担当医師

白川 靖博 (岡山大学病院 消化管外科 講師)

香川 俊輔 (岡山大学病院 消化管外科 講師)

宇野 太 (岡山大学病院 新医療研究開発センター 助教)

田澤 大 (岡山大学病院 新医療研究開発センター 助教)

野間 和広 (岡山大学 医療教育統合開発センター 助教)

遺伝子治療臨床研究に関する同意書

岡山大学病院

病 院 長 殿

私は、腫瘍選択的融解ウイルス テロメライシンを用いた放射線併用ウイルス療法について、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。臨床研究に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
- あなたの病気について
- この臨床研究の概要
- この臨床研究の目的
- テロメライシンについて
- この臨床研究に参加できる患者さんの条件
- この臨床研究の進め方
- この臨床研究での治療の実際
- 期待される治療効果について
- 安全性と副作用について
- この臨床研究に関わる有害事象が生じた場合について
- 外国での状況について
- 臨床研究に参加される患者さんの権利と義務ならびに注意点について
- 治療に関わる諸経費について
- 遺伝子治療臨床研究実施に必要な手続きについて
- 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
- 個人情報の保護について
- 緊急連絡先および質問の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

以上の内容を証明するため、ここに署名、または記名捺印いたします。

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 _____

生年月日 年 月 日

代諾者 (患者の) 後見人、配偶者、子 (未成年を除く)、父母、兄弟姉妹の順に。(該当部分をまるで囲んでください)

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

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)

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、腫瘍選択的融解ウイルス テロメライシンを用いた放射線併用ウイルス療法について、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 _____

生年月日 年 月 日

代諾者（患者の）後見人、配偶者、子（未成年を除く）、父母、兄弟姉妹の順に。（該当部分をまるで囲んでください）

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

立会人（署名又は記名捺印） _____ (印)

連絡先 _____

患者様との関係 _____

厚 科 審 第 2 号

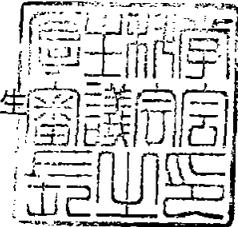
平成 24 年 1 月 4 日

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）

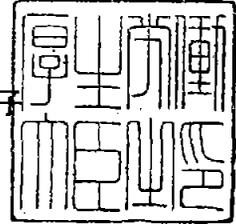
標記について、平成 24 年 1 月 4 日付厚生労働省発科 0104 第 2 号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第 3 条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

厚生労働省発科 0104 第 2 号
平成 24 年 1 月 4 日

厚生科学審議会会長

垣添 忠生 殿

厚生労働大臣 小宮山 洋子



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

1. 申請日 平成 23 年 10 月 27 日

申請者 千葉大学医学部附属病院 病院長 宮崎 勝

遺伝子治療臨床研究の名称

切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究

遺伝子組換え生物等の名称

HGF の競合的アンタゴニストである NK4 を発現する非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルス 5 型ベクター（Ad5CMV-NK4）

2. 申請日 平成 23 年 11 月 14 日

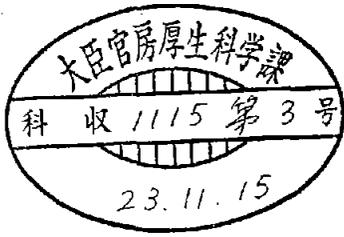
申請者 岡山大学病院 病院長 榎野 博史

遺伝子治療臨床研究の名称

頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin
を用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究

遺伝子組換え生物等の名称

ヒトアデノウイルス5型を基本骨格としてテロメラーゼ活性依存性に
制限増殖する腫瘍融解ウイルス (Telomelysin)



第一種使用規程承認申請書

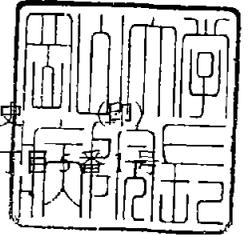
平成 23 年 11 月 14 日

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 榎野 博史 (印)

住所 岡山市北区鹿田町二丁目五番一号



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第 4 条第 2 項の規程により、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>ヒトアデノウイルス5型を基本骨格としてテロメラゼ活性依存性に制限増殖する腫瘍融解ウイルス (Telomelysin)</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2丁目5番1号 治療施設の名称 岡山大学病院</p> <p>(1) Telomelysin 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 Telomelysin 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。Telomelysin 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、Telomelysin 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。</p> <p>(3) Telomelysin 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%若しくは 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) 又は高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。) を行った後、岡山大学病院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 Telomelysin 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整 (以下「Telomelysin 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 Telomelysin の投与は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる頭頸部・胸部悪性腫瘍症例を対象とする。各患者に対する Telomelysin 投与量は、低用量 (1×10^{10} vp (viral particles))、中用量 (1×10^{11} vp)、高用量 (1×10^{12} vp) の3群で、投与ウイルス液量は 1 ml とする。腫瘍内 5 カ所に</p>

注入するため、1箇所あたり0.2ml程度ずつ注入することになる。局所麻酔下、咽頭麻酔下、あるいは全身麻酔下に、細い注射針を装着した注射器、内視鏡の生検鉗子孔を通した穿刺吸引針、あるいはCTガイド下や超音波ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて、面積が 1 cm^2 <かつ 25 cm^2 >の腫瘍内5カ所（4分割した区域と中心部）に病変全体を3次的にカバーする様に直接注入する。Telomelysinの投与初日を第1日目とし、重篤な副作用を認めない場合は第18日目、第32日目に同じ病変に投与を行い、計3回の治療を実施する。注入針の抜去は慎重に行い、Telomelysin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Telomelysin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HEPAフィルターを用いた換気により約5分に1回（1時間に12回）入れ替わる。

(8) Telomelysinの患者以外の人への感染の可能性は極めて低い。が、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。現在、米国で実施されているTelomelysinの臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。

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)、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルス(Telomelysin)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蛋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

Telomelysin (OBP-301)では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されており、hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現される。

(2) 構成要素の機能

Telomelysin は、テロメラーゼ活性依存性に hTERT (human telomerase reverse transcriptase)

プロモーターにより増殖し、癌細胞を選択的に破壊する。テロメラーゼは多くの癌細胞でその活性の上昇が認められているため、癌細胞ではhTERT遺伝子の発現制御を行っているhTERTプロモーターのスイッチがオンになると考えられる。Telomelysinでは、内因性のE1Aプロモーターの代わりにhTERTプロモーター（別紙1）が、また内因性のE1Bプロモーターの代わりにIRES配列が挿入されており、hTERTプロモーター依存性にE1A及びE1B遺伝子が発現される。E1Aタンパク質は、感染可能なウイルス産生に必要な遺伝子群の転写を活性化し、E1Bタンパク質は、宿主細胞のタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの複製を促進する。また、E1Bの55kDaタンパク質は、放射線によるDNA傷害の修復を阻害することで放射線感受性を増強することが明らかになっている。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

Telomelysin (OBP-301)アデノウイルスベクターはpGL3-Basic vectorのhTERT-promoterを用いて作製される。pGL3-Basic vectorからhTERT promoterをMluI+BglIIにより切り出し(455bp)、E1A-IRES-E1BのE1A上流にあるXhoI siteに順方向に挿入、hTERT promoter-E1A-IRES-E1B(hAIB)を作成する。最終的に、Adeno-X Viral DNAにpSh-hAIBを組み込み、組換えアデノウイルスを作成した。(別紙3)

(2) 特性

Adeno-X Viral DNA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

Telomelysin (OBP-301)では、内因性のE1Aプロモーターの代わりにhTERTプロモーターが、また内因性のE1Bプロモーターの代わりにIRES配列が挿入されている。

(別紙2)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法 (別紙3の各図を参照)

pSh-hAIBの作製法を以下に示す。

① E1A遺伝子を、RT-PCRにて増幅した。プライマーは、

E1A-S ; aca ccg gga ctg aaa atg ag、E1A-AS ; cag agg ttt ac acct tat ggcを用いた。また、

E1B遺伝子を、ゲノムDNAのPCRにて増幅した。プライマーは、E1B-S ; ctg acc tca tgg agg ctt gg、E1B-AS ; gcc cag aca ttt cag tac ctcを用いた。それぞれ、PCR productのTA

cloning (TA Cloning Kit Dual Promoter ; Invitrogen) (Fig1) を用い、シークエンスを確認した後、EcoRIによりそれぞれ911bp、1836bpのfragmentを切り出した。

② E1AをpIRES(CLONTEC)(Fig.2)のMCS-AのMluI siteに順方向に挿入した (blunt end ligation)。

③ E1BをE1A-IRESのMCS-BのSall siteに順方向に挿入した (blunt end ligation)。

④ hTERT promoter(Fig.3)をMluI+BglIIにより切り出し (455bp)、E1A-IRES-E1BのE1A上流にあるXhoI siteに順方向に挿入した (blunt end ligation)。

⑤ hTERT promoter-E1A-IRES-E1B(hAIB)をNheI+NotIにより切り出し (3828bp)、MfeI+NheI digestionによりCMV promoterを除去したpShuttle vector(Fig.4a)に順方向に挿入した(pSh-hAIB) (Fig.4b)。

⑥ I-CeuI+PI-SceIにより4381bpのpSh-hAIB断片を切り出し、Adeno-X Viral DNA(Fig.5)に挿入した (AdenoX-hAIB)。

⑦ Adeno-X Expression System(CLONTECH)(Fig.6)のマニュアルに従って、hAIBを持つ組換えアデノウイルスを作製した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

作製した Telomescan は Adeno-X Expression System(CLONTECH)(Fig.6)のマニュアルに従い、293 細胞を使って増殖させた。Telomelysin は、岡山大学で開発された国産の抗がんウイルス製剤であり、岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ (株) によって臨床開発が進められている。本臨床研究では、米国で行われた各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験のために、オンコリスバイオファーマ (株) が Introgen Therapeutics 社にて製造した Telomelysin の臨床ロットを輸入して使用する。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) において保存される。

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錠の上、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)。

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 Telomelysin 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、Telomelysin のゲノムは核内の染色体外に存在し、テロメラーゼ活性依存性に hTERT (human telomerase reverse transcriptase) プロモーターにより増殖する。

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

Telomelysin は唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異

的に検出する E1A あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

Telomelysin は特別な治療遺伝子を持たず、外来性の塩基配列として hTERT プロモーターが挿入されている点が野生型アデノウイルスの配列との大きな違いである。Telomelysin では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されている。癌細胞では hTERT 遺伝子の発現制御を行っている hTERT プロモーターのスイッチがオンになると考えられる。hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現され、ウイルスが増殖する。これらの点を除くと、Telomelysin 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。

本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用のアデノウイルスベクターと異なり、本来 E1A および E1B 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus、RCA) であるため、RCA 量を制限する評価基準の適応とはならない。

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) Telomelysin 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 Telomelysin 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。Telomelysin 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、Telomelysin 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) Telomelysin 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%若しくは 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) 又は高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。) を行った後、岡山大学病院で定められている

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 Telomelysin 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整（以下「Telomelysin 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 Telomelysin の投与は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる頭頸部・胸部悪性腫瘍症例を対象とする。各患者に対する Telomelysin 投与量は、低用量（ 1×10^{10} vp）、中用量（ 1×10^{11} vp）、高用量（ 1×10^{12} vp）の3群で、投与ウイルス液量は 1 ml とする。腫瘍内 5 ヶ所に注入するため、1 箇所あたり 0.2ml 程度ずつ注入することになる。局所麻酔下、咽頭麻酔下、あるいは全身麻酔下に、細い注射針を装着した注射器、内視鏡の生検鉗子孔を通した穿刺吸引針、あるいは CT ガイド下や超音波ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて、面積が 1 cm^2 未満かつ 25 cm^2 の腫瘍内 5 ヶ所（4 分割した区域と中心部）に病変全体を 3 次元的にカバーする様に直接注入する。Telomelysin の投与初日を第 1 日目とし、重篤な副作用を認めない場合は第 18 日目、第 32 日目に同じ病変に投与を行い、計 3 回の治療を実施する。注入針の抜去は慎重に行い、Telomelysin 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 Telomelysin 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 HEPA フィルターを用いた換気により約 5 分に 1 回（1 時間に 12 回）入れ替わる。
- (8) Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低いが、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。

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

対外へのウイルス排出の有無は、唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルよ

り Telomelysin を特異的に検出する E1A あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いての PCR で可能である。

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

本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用のアデノウイルスベクターと異なり、本来 E1A および E1B 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus, RCA) であるため、RCA 量を制限する評価基準の適応とはならない。

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低い、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。

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) Telomelysin の前臨床研究

Telomelysin を癌細胞に感染させると、E1A、E1B mRNA、および E1A タンパク質の発現がみられたが、正常細胞ではそれらの発現は抑制されていた。また、Telomelysin は、癌細胞では 3 日以内に 10^5 - 10^6 倍に増殖したが、正常細胞では 100-1000 倍にとどまり、正常細胞では癌細胞に比べてその増殖が 10^3 - 10^4 分の 1 に抑えられることが明らかになった。肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膵癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、など様々な臓器由来のヒト悪性腫瘍細胞株を用いて Telomelysin の容量依存性の抗腫瘍活性を測定し、IDS₅₀ (50%の標的癌細胞を殺すことのできるウイルス濃度) を算出したところ、ほとんどの細胞株で 20 MOI (PFU/cell) 以下であり、Telomelysin は広範な抗腫瘍活性を有していた。

2) Telomelysin の正常細胞での細胞障害性

ヒト正常線維芽細胞に対しては、Telomelysin は明らかな細胞障害活性を認めなかった。また、ヒト正常肝細胞、ヒト正常腎上皮細胞、ヒト正常気道上皮細胞では、野生型アデノウイルスに比べて低い細胞障害活性を示した。

3) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本研究のプロトコールでは Telomelysin は病巣に直接局所注入されるが、コットンラットでの定量的 PCR による Telomelysin の体内分布解析において、筋肉内投与あるいは静脈内投与後 8 日目において血液中ならび測定した組織中で検出可能であった。ま

た、ヌードマウスの背部皮下に移植したヒト腫瘍内に Telomelysin を投与すると、投与部位でのウイルス DNA は極めて高値であったが、投与後 70 日目のその他の組織でもウイルス DNA は検出可能であった。すなわち、投与部位で増殖した Telomelysin が全身循環に入ったものと推測されるが、抗 EIA 抗体を用いた各組織の免疫組織染色では投与部位以外の正常組織は染色されず、投与部位以外の正常組織ではウイルス増殖は認められないことが確認された。

4) 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低いが、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。

6 国外における使用等により得られた情報

5) 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験

米国にて各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験が行われ、腫瘍内単回投与を受けた 16 例の進行固形癌患者では、初期 3 例は 10^{10} vp、次の 3 例目は 10^{11} vp が投与され、最高容量 10^{12} vp は 10 例に投与されている。投与部位の疼痛や硬結などの局所反応と発熱などの全身症状はみられたが、重篤な有害事象はなく、安全に投与可能であった。

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

Telomelysin 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

Telomelysin 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

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低い。

- (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、Telomelysin の環境中への拡散は極めて微量である。Telomelysin 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。さらに、Telomelysin 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）Telomelysin の正常細胞での細胞障害性は乏しいことを踏まえると、Telomelysin 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。

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

Telomelysin 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

Telomelysin 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

Telomelysin の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、Telomelysin の環境中への拡散は極めて微量である。Telomelysin 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）及び正常細胞内での増殖能は乏しいことも踏まえると、Telomelysin 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

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

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、Telomelysin 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。Telomelysin 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、自然界でヒトを除く哺乳類、鳥類、両生類、

爬虫類、魚類、昆虫など、他の動植物には感染しないと考えられる。

本研究に用いるTelomelysinは、遺伝子治療用のアデノウイルスベクターと異なり、本来E1AおよびE1B遺伝子を含んだ増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus, RCA) であるが、増殖性ウイルス (RCA) を含む遺伝子組換えアデノウイルスのウイルス増殖能に関して、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) および、Gene Therapy Discussion Group (ICH-GTDG) によりcommunication paper として公開されている (別紙5)。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ベクター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、腹腔内) 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検出法であるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によっても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。

今回我々が使用するTelomelysinは、腫瘍細胞内にて選択的に増殖するウイルスであり、正常細胞ではTelomelysin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。すなわち、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、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、Telomelysin使用により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 : hTERT promoter の構造

別紙 2 : Telomelysin (OBP-301)アデノウイルスベクター

別紙 3 : Telomelysin (OBP-301)の作成方法

別紙 4 : 治療施設の地図及び保管場所の概略図

別紙 5 : Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting. June 10, 2004

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) 遺伝子治療専門家グループ (GTDG)

「見解」

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

【 岡山大学病院 】

「頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルスTelomelysinを用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究」

○

氏名	所属
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	(独)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	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
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 生物薬品部研究員

○：委員長（五十音順 敬称略）

第68回科学技術部会	資料4-1
平成24年1月25日	

ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会について

- 新たな委員の任命について
(生物統計専門家の審査委員会委員への追加)

新たな委員の任命について

提 案

生物統計専門家の審査委員会委員への追加

背 景

- 臨床研究計画に引用されている非臨床研究の妥当性について、生物統計に根差して議論をする必要がある。
- 他の委員会（高度医療評価会議）との整合性を図り、連携を取りやすくする。
- 臨床研究計画の安全性評価について生物統計学的見地からの検討が求められる。

第68回科学技術部会	資料4-2
平成24年1月25日	

ヒト幹細胞臨床研究に関する実施施設からの報告について

【報告書】

- 先端医療振興財団 先端医療センター 2件
慢性重症下肢虚血患者に対するG-CSF動員自家末梢血単核球移植による
下肢血管再生治療

ヒト幹細胞臨床研究重大事態等報告書

平成 23 年 11 月 30 日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	神戸市中央区港島南町 2-2
	名称	(財) 先端医療振興財団 先端医療センター
	研究機関の長 役職名・氏名	センター長 鍋島 陽 

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり重大な事態を報告致します。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
慢性重症下肢虚血患者に対する G-CSF 動員自家末梢血単核球移植 による下肢血管再生治療	先端医療センター病院 診療部再生治療ユニット長 兼 血管再生科部長 川本 篤彦 

ヒト幹細胞臨床研究 重大な事態報告書

平成23年11月30日

厚生労働大臣 殿

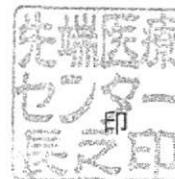
研究機関の長

職名・氏名 先端医療センター長 鍋島 陽一

研究責任者

所属 先端医療センター病院

職名・氏名 診療部再生治療ユニット長 兼 血管再生科部長 川本 篤彦



臨床研究の名称	慢性重症下肢虚血患者に対するG-CSF動員自家末梢血単核球移植による下肢血管再生治療		
被験者識別コード	※ IBRI-GM-5	年齢	※ 72歳
性別	※ 男 <input checked="" type="radio"/> 女 <input type="radio"/>	診療区分	※ <input checked="" type="radio"/> 入院 <input type="radio"/> 外来

※ 臨床研究計画そのものと関連する場合は記載不要

重大な事態と判断した理由	<input checked="" type="checkbox"/> 死亡 <input type="checkbox"/> 死亡につながるおそれがある <input type="checkbox"/> 入院または入院期間の延長 <input type="checkbox"/> 障害 <input type="checkbox"/> 障害につながるおそれがある <input type="checkbox"/> 後世代における先天性の疾病又は異常 <input type="checkbox"/> ヒト幹細胞臨床研究の実施に影響を及ぼすおそれがある <input type="checkbox"/> その他()
--------------	---

重大な事態の概要

年月日	状況・症状・処置・場所などの具体的な経過や、関連する治療歴・検査データ等
2011年7月中～下旬	全身倦怠感、食欲不振を自覚していたが、放置していた。
2011年8月16日	意識混濁が出現し、自宅近くの救急病院へ搬送された。急性腎不全(BUN 165, Cr 7.43, K 8.2)を指摘され、緊急透析を要すると判断されたため、同日、他院(総合病院)へ搬送された。入院時Hb 9.8, WBC 16380, Plt 23.6万, CRP 14.3。膀胱が緊満状態であり、尿道カテーテル挿入により濃尿を認めたことから尿閉に起因する尿路感染症による敗血症(動脈血よりKlebsiella pneumoniaeが検出)および急性腎不全と診断され、緊急透析と抗生剤投与が行われた。
2011年8月18日	自尿が得られ、WBC 12490, CRP 13.3, BUN 99, Cr 4.46, K 5.0と軽度改善傾向を示した。
2011年8月19日	ショック状態に陥り、同時に、新鮮血の大量の吐血を認めた。この際、Hb 7.5, Plt 10.8万と著明に低下。出血性ショックと診断され、輸血を行うも反応せず、心肺停止に至り、蘇生を行うも回復せず、19:46死亡が確認された。
2011年8月22日	9:57患者の夫より電話で研究担当医師に患者本人が死亡したとの連絡があった。同日午後、入院先の病院へ研究担当医師が出向いて、主治医から直接、当患者の臨床経過について説明を受けた。

倫理審査委員会 (研究機関内)の意見	本臨床試験の継続を承認する(研究責任者及び独立データモニタリング委員会の判断/方針に問題はないと判断する)。 (注)独立データモニタリング委員会からの提言は下記の通り。 1) 本有害事象と試験治療との因果関係はないと考えられる。 2) 本臨床試験を継続し、各症例の経過を慎重に観察するべきである。
-----------------------	---

原因の分析	消化管出血による出血性ショックが死因であるとの死亡時の主治医からの診断に医学上の矛盾はない。消化管出血の原因については、臨床経過および血小板数23.6→10.8万と低下していることから、敗血症による播種性血管内凝固症候群の可能性はある。単核球移植に関連して上記の有害事象が発症したとする過去の報告はない。また、本症例では試験治療後1ヶ月まで経過良好であることが確認されており、治療後2か月以上経過して病状が急変しているという経過も考慮すると、今回の臨床試験との関連性はないと判断している。ただし、ショック状態であったため、内視鏡が施行不可能の状態での出血源は未確認であり、また、遺族の同意が得られず剖検も施行できなかったため、上記以上の詳細は不明である。
-------	---

研究機関長の指示	<input type="checkbox"/> 臨床研究を中止を命じた <input type="checkbox"/> 臨床研究の休止を命じた <input type="checkbox"/> その他の必要な措置を講じた ()
----------	---

備考1 各用紙の大きさは、日本工業規格A4とすること。

備考2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙〇参照」と記載すること。

添付書類(添付した書類にチェックを入れること)

- 実施計画書の写し
- 研究責任者から研究機関の長への報告書の写し(様式自由)
- 研究機関の長から研究機関における倫理審査委員会への諮問の写し(様式自由)
- 研究機関における倫理審査委員会から研究機関の長への意見の写し(様式自由)
- インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同意文書様式(様式自由)
- その他(資料内容:重大な事態報告書 別紙(詳細報告))

ヒト幹細胞臨床研究 重大な事態報告書 別紙(詳細報告)

臨床研究の名称	慢性重症下肢虚血患者に対するG-CSF動員自家末梢血単核球移植による下肢血管再生治療		
被験者識別コード	IBRI-GM-5	登録番号	GM-4
性別	男 ^d ・女	年齢	72歳
傷病名	閉塞性動脈硬化症(右第5足趾潰瘍、左下腿切断後)		
合併症	脳梗塞後遺症(左不全麻痺、呂律障害) 糖尿病(糖尿病性腎症) 高血圧 高脂血症 右足部・爪部白癬		
既往症	30歳時 髄膜炎 60歳時 脳梗塞 61歳時 左下腿(膝下)切断		
現病歴	閉塞性動脈硬化症、糖尿病、高血圧等のため、近医に通院中であったが、2011年2月に転倒し、右踵部の疼痛を主訴に同院皮膚科を受診した。同科で右第5足趾の潰瘍病変を指摘され、下肢生理学的検査・造影CT検査で閉塞性動脈硬化症による慢性重症下肢虚血と診断された。2011年4月7日、某大学付属病院放射線科に紹介され入院した。4月12日の下肢血管造影検査で、右浅大腿動脈は口径不整で膝上部で途絶、下腿3分枝は腓骨動脈が深大腿動脈からの側副血行路により描出されるが、前・後脛骨動脈は描出されなかった。4月19日に右浅大腿動脈閉塞に対する血管内治療を試みられたが、ガイドワイヤーの通過困難により断念。外科的バイパス手術も適応外と判断され、以降、フットケアおよび血管拡張剤の点滴を行ったが、潰瘍病変の治療は遷延した。下肢血管再生治療の適応について検討するため、2011年5月9日当センターを紹介され受診した。		
経過			
2011年5月9日	臨床試験「慢性重症下肢虚血患者に対するG-CSF動員自家末梢血単核球移植による下肢血管再生治療」への参加に文書で同意した。		
2011年5月25日	症例検討会で同臨床試験への参加について適格と判断された。		
2011年5月27日	当センターに入院。同臨床試験への参加登録を行った。		
2011年5月29日～6月1日	G-CSF製剤(フィルグラスチム)皮下注(5 μ g/kg/日、4日間)		
2011年6月1日	アフレスシス施行(処理血液量5L、採取単核球数 8×10^9 個) 全身麻酔下にて、右下肢74カ所(大腿部30カ所、腓腹部30カ所、足背部4カ所、趾間部4カ所、足底部6カ所)の筋肉内へ計 6.4×10^9 個の単核球を移植。		
2011年6月2日～6月13日	単核球移植後、特記する合併症なく経過し、右第5足趾潰瘍は縮小傾向を認め、同部の疼痛も軽減した。 (注)当センター入院5カ月前より、左下肢義足の不具合のため、ほとんど義足を装着せず過ごしていた。このため、当センター入院後、すぐに義足を新調した。単核球移植後、下肢疼痛が軽減したところで新しい義足を装着して、歩行を試みたが、長期間装着していなかったために筋力が低下しており、再度、歩行リハビリテーションが必要な状況であることが判明した。したがって自宅への退院は困難であり、患者本人と夫に相談の上、これまでのかかりつけであること、自宅近所であるという理由から、近医にリハビリテーション目的で転院できるよう手配した。		
2011年6月14日	近医へ転院。		
2011年7月4日	単核球移植後4週目のため当センターを定期受診(まだ、近医に入院中)。右第5足趾の潰瘍は消失していた。全身状態も良好であり、眼底検査でも異常所見なし。血液学的検査、血液生化学検査では、Hb 10.9, WBC 4590, CRP 0.1, Cr 1.8, Hb A1c 4.9等であり、著変を認めなかった。		
2011年7月12日	歩行リハビリテーションを終了し、訪問看護・訪問リハビリを導入され、近医を退院。一般の内科診療は、同院へ定期通院の予定とした。		

2011年7月19日	2011年7月15日に意識低下のため、某病院(脳神経外科)へ救急搬送され、結果は低血糖発作であったと、家人(夫)から電話連絡を受けた。同院で、血糖降下薬(メグルコ)の内服中止を指示され、帰宅されたとのこと。食思不振もあるとのことで、処方変更の検討が必要である旨を伝え、指示を仰ぐため、早めにかかりつけの近医を受診するように伝えた。
2011年7月29日	夫より、2011年8月1日予定の当センター外来受診が難しいとの電話連絡を受けた。理由を質問すると、最近、全身倦怠感が強く、ベッド上で起き上がるのが困難であるとのことであった。当センターあるいは研究協力機関の総合病院への受診を勧めたが、遠方であるとの理由で、受診を拒否した。また、症状が重いのなら、救急要請するように伝えたが、それほど事態ではないとの回答であった。それなら、訪問看護師を介して、近医へ急ぎ受診するように伝えたところ、そのようにするとの返事があった。当センターへの再診については、いつでも連絡していただければ予約を取る旨を伝え、了解された。
2011年8月15日	2011年7月29日以降、当センターへ再診予約等の連絡がなかったため、試験分担医師から患者自宅へ電話連絡した。夫によると、患者本人が近医への受診を拒否するため受診できていないが、状態は7月29日から著変ないとのこと。しかし、今日(2011年8月15日)、訪問看護師を通じて、近医へ受診手続きを行うことにしているとの返答があった。
(注)以下、2011年8月16日～19日の経過は入院先の総合病院主治医から聴取	
2011年8月16日	意識混濁が出現し、自宅より某救急病院へ搬送された。急性腎不全(BUN 165, Cr 7.43, K 8.2)を指摘され、緊急透析を要すると判断されたため、同日、他院(総合病院)へ搬送された。入院時Hb 9.8, WBC 16380, Plt 23.6万, CRP 14.3。膀胱が緊満状態であり、尿道カテーテル挿入により膿尿を認めたことから尿閉に起因する尿路感染症による敗血症(動脈血よりKlebsiella pneumoniaeを検出)および急性腎不全と診断され、緊急透析と抗生剤投与が行われた。
2011年8月18日	自尿が得られ、WBC 12490, CRP 13.3, BUN 99, Cr 4.46, K 5.0と軽度改善傾向を示した。
2011年8月19日	ショック状態に陥り、同時に、新鮮血の大量の吐下血を認めた。この際、Hb 7.5, Plt 10.8万と著明に低下。出血性ショックと診断され、輸血を行うも反応せず、心肺停止に至り、蘇生を行うも回復せず、19:46 死亡を確認した。死因は(1)出血性ショック (2)敗血症と主治医から診断された。剖検は、遺族からの同意が得られなかったため、施行されていない。
2011年8月22日	9:57AMに夫より当センターに電話連絡があり、2011年8月19日に患者が死亡したとの報告を受けた。同日午後、詳細を確認するため、研究分担医師が他院(総合病院)へ赴き、腎臓内科主治医と直接面会し、入院経過の詳細を聴取した。
2011年8月23日	研究責任者が重大な事態と判断し、「重篤な有害事象に関する報告書(第1報)」を当センター長および病院長へ提出。
2011年8月25日	「ヒト幹細胞臨床研究 重大な事態報告書」(第1報)を厚生労働大臣へ提出。
2011年9月8日	独立データモニタリング委員会から、下記の研究責任者の医学的判断に問題はないとの提言を受けた。 1) 本有害事象と試験治療との関連はない。 2) 本臨床試験は既に全症例への治療を終えており、現時点で試験を中止することなく、各症例の経過を慎重に観察するべきである。
2011年9月16日	再生医療審査委員会(施設内倫理委員会)から、迅速審査により本研究の継続実施が承認された。
2011年10月18日	「ヒト幹細胞臨床研究 重大な事態報告書」(第2報)を厚生労働大臣へ提出。
2011年11月16日	再生医療審査委員会(施設内倫理委員会)が開催され、本研究の継続実施が承認された。
2011年11月30日	「ヒト幹細胞臨床研究 重大な事態報告書」(最終報)を厚生労働大臣へ提出。