

第一種使用規程承認申請書

平成 30 年 7 月 20 日

厚生労働大臣 加藤 勝信 殿
環境大臣 中川 雅治 殿

氏名 MSD 株式会社 代表取締役社長
申請者 ヨハネス・ヤクアベス・ウェストハイゼン 印
住所 東京都千代田区九段北一丁目 13 番 12 号
北の丸スクエア

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	ddFKBP 融合 <i>UL51</i> 、ddFKBP 融合 <i>UL123</i> 及び復帰型 <i>UL131</i> を有するヒトヘルペスウイルス 5 型 MAD169 株 (V160)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	ヒトの予防接種を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	原薬の保管 (1) V160を含む凍結乾燥品は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、医療施設内の施錠管理された冷蔵庫に保管される。 薬液の調製及び保管 (2) V160の薬液の調製は、医療施設内の他の区画と明確に区別された調剤室内で行い、密封した状態で保管する。 (3) 調製時は、調剤室内での V160の拡散を最小限に留める。 運搬 (4) V160を含む凍結乾燥品及び薬液の医療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

被接種者への投与

- (5) V160の投与は、医療施設内の他の区画と明確に区別された医療室内で、被接種者の筋肉内に直接注入することにより行う。投与時は、医療室内での V160の拡散を最小限に留める。

投与後の被接種者からの排出等の管理

- (6) V160の排出等の挙動が明らかになるまで、注射部位のスワブ、血液、尿、唾液検体を用いて、V160の排出等の検査を行う。

- (7) 投与後、被接種者の接種部位を滅菌ガーゼ等で覆い、接種部位から排出されるV160の環境への拡散を最小限に留める。被覆は、注入部位からのV160の拡散が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間継続する。

- (8) V160の排出等の挙動が明らかになるまで、V160の投与を受けた被接種者が当該医療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された被接種者であることが情報提供されるよう、V160の投与を受ける被接種者に適切な指導を行う。

- (9) V160の排出等の挙動が明らかになるまで、必要に応じて、被接種者からの排出物等から第三者へのV160の伝播を防止するために、V160の投与を受ける被接種者に適切な指導を行う。

被接種者検体の取扱い

- (10)被接種者から採取した検体（以下「検体」という。）は、医療施設の規定に従って取り扱う。

- (11)V160の排出等の挙動が明らかになるまで、検体の検査が外

部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、V160が拡散しない構造の容器に入れ、医療施設から検査機関へ運搬する。その際、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された被接種者の検体である旨を情報提供する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。

(12) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和45年法律第137号）に基づいて医療施設及び検査機関で定められている医療廃棄物の管理に関する規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

感染性廃棄物等の処理

(13) V160を含む凍結乾燥品及び薬液は、医療廃棄物管理規程に従い、医療施設若しくは検査機関内で不活化処理を行い医療廃棄物として廃棄するか、又はV160が漏出しないよう厳重に密閉した状態若しくは密封容器に入れ、他の医療廃棄物とは区別して保管し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和46年9月23日政令第300号）の別表第Iの4の項で定める感染性廃棄物として廃棄する。

(14) V160が付着した可能性のある機器及び器材は、医療廃棄物管理規程に従って廃棄する。再利用する機器及び器材にあつては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。

第一種使用規程承認申請書

生物多様性影響評価書

ddFKBP 融合 *UL51*、ddFKBP 融合 *UL123* 及び復帰型 *UL131*
を有するヒトヘルペスウイルス 5 型 MAD169 株 (V160)

MSD 株式会社

1. 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

本生物多様性影響評価書で評価する遺伝子組換え生物は、ddFKBP 融合 *UL51*、ddFKBP 融合 *UL123*及び復帰型 *UL131*を有するヒトヘルペスウイルス5型 MAD169株 (V160) であり、その作成に用いた親株、すなわち宿主はヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus : HCMV) MAD169株である。

MAD169株は、Elek 及び Stern によって報告された AD169株 (Elek & Stern, 1974) を Stern 博士より受領してヒト線維芽細胞 WI-38で5代継代した株であり、親ウイルスの AD169と同様の遺伝子構成及びタンパク質組成を有する。AD169株は、健康な7歳の女兒の咽頭培養から分離された HCMV を、数種のヒト線維芽細胞で53代継代し、弱毒化したものである。

MAD169株が属する分類学上の種である HCMV は、正式名称をヒトヘルペスウイルス5と称し、ヘルペスウイルス科、ベータヘルペスウイルス亜科に属するエンベロープを有する2本鎖 DNA ウイルスである。サイトメガロウイルス (CMV) は古代ウイルスであり、数百万年を超えて特定の宿主とともに進化してきた (McGeoch et al., 2006)。各動物種にはそれぞれ種特有のサイトメガロウイルスしか感染せず、「種の壁」により CMV が他の動物種に感染することはほとんどない (McGeoch et al., 2006)。CMV の「種の壁」が存在する要因として、抗アポトーシスタンパク質 (UL36、UL37)、五量体複合体 (gH/gL/UL128/UL130/UL131) 等が関係していると考えられている (Burwitz et al., 2016)。

HCMV もヒト以外のその他動物に感染しない (Burwitz et al., 2016; Schleiss, 2013)。HCMV は、唾液、尿、涙、母乳、精液及び腔分泌液等の体液中に排出され、これら体液を介してヒトに水平伝播 (経粘膜感染) する (Mocarski et al., 2013)。HCMV は、血清検査に基づくと全世界の成人集団の50%以上に広く感染しており、その罹患率は年齢とともに増加している (Mocarski et al., 2013)。日本では、最近の献血提供者を対象とした調査で、全世代の HCMV 抗体保有率は76.6%であったが、20歳代の保有率は58.8%と他の年代に比べ低くなっている (Furui et al., 2013)。また、妊婦の抗体保有率は1990年には約90%であったが、近年は70%程度に減少している (藤井, 2014)。

2. 使用等の歴史及び現状 (人用若しくは動物用医薬品としての利用の歴史又は産業的な利用の歴史及び現状を含む。)

HCMV は、その感染症予防ワクチンの開発に利用されている。過去40年以上にわたり HCMV 全粒子の改変又は個々の抗原に焦点を当てた2種類のアプローチで感染症予防ワクチン候補品が開発されてきた (Fu et al., 2014)。

このうち HCMV 全粒子を改変した生ワクチンとして4種類の候補ワクチンが開発されており、AD169株/MAD169株は、その一つである。HCMV 感染には「種の壁」が存在するため、AD169株/MAD169株を含めた全粒子候補生ワクチンの安全性及び免疫原性はヒトで評価されている (別紙1)。

3. 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

HCMV は最大のヒトヘルペスウイルスであり（直径：200～300 nm）、約165遺伝子をコードする約235 kb のゲノムを有する。ウイルス粒子は、タンパク質であるテグメントが覆う正二十面体のヌcleoカプシドにパッケージングされた二本鎖線状 DNA ゲノム、複数のウイルス糖タンパク質を含む脂質二重層のエンベロープから成る（図 1）（Crough & Khanna, 2009）。

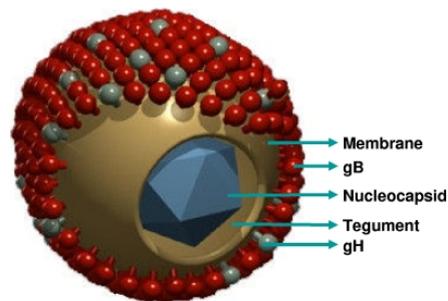


図 1 HCMV 粒子の三次元構造（Crough & Khanna, 2009）

In vitro では、HCMV は上皮細胞、内皮細胞、筋細胞及び線維芽細胞、並びに白血球及び骨髄系細胞を含む種々のヒト細胞に感染するが、ウイルスの侵入には複数の糖タンパク質複合体が必要となる。糖タンパク質 B（gB）はクラス III 融合タンパク質であり（Burke & Heldwein, 2015）、その膜融合活性は gH 及び gL を含む複合体との相互作用を介して起こる。UL128、UL130及び UL131タンパク質と結合した gH/gL からなる五量体複合体（gH/gL/UL128/UL130/UL131 タンパク質）により、HCMV が受容体介在エンドサイトーシス経路を介して上皮細胞、内皮細胞及び白血球に感染すると推定されている（Wang & Shenk, 2005; Ryckman et al., 2008）。

自然界において、野生型 HCMV は感染宿主であるヒト以外で複製及び生存することはできず、接触感染によりヒトからヒトへ伝播する。健康なヒトでは初感染により、臨床症状を伴うことはまれであるが、数週間持続するウイルス血症を引き起こし、唾液及び尿等に何ヵ月間もウイルスを排出する。

自然感染によって誘導される免疫には液性免疫と細胞性免疫があり、成人では HCMV 感染に対する防御及び妊婦から胎児へのウイルス伝播（垂直伝播）に対する防御を担う（Plotkin et al., 1989; Adler et al., 2016; Fowler et al., 2003; Lillieri et al., 2013）。

V160の宿主である MAD169株は、AD169株の継代変異株である。AD169株は、健康な7歳の女児の咽頭培養より分離された野生型 HCMV を53代継代して得られた弱毒化株である。MAD169株は AD169株をヒト線維芽細胞にてさらに5代継代したものであり、野生型 HCMV と比較して AD169株と同様のゲノム変異を有する（Bradley et al., 2009; 別紙1）。AD169株及び MAD169株で欠失し重複 RL 断片により置換されている UL/b'領域の約15 kb には、感染宿主における潜伏感染、免疫回避、ウイルス転移、又は他の病原性に関連する機能を持つと考えられているタンパク質がコードされている（Mocarski et al., 2013）。MAD169株及び AD169株はこれら変異により弱毒化されており、AD169及び MAD169を用いた臨床試験では、それぞれ良好な忍容性及び安全性が確認

され、いずれのワクチン被接種者からもウイルス排出は認められなかった (Elek & Stern, 1974; Neff et al., 1979)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

HCMV は他のウイルスと同様に細胞内病原体であり、*in vitro* ではヒト細胞を用いた適切な培養条件下でのみ増殖する。野生型 HCMV は、自然界ではヒトでのみ増殖し、感染症を引き起こす。AD169又はMAD169を用いた臨床試験ではウイルス排出は認められず、このことからAD169及びMAD169はヒトでは効率的に増殖しない。

(3) 捕食性又は寄生性

HCMV は他の生物を捕食することはない。野生型 HCMV は、自然界では、ヒトでのみ増殖し、感染症を引き起こす。AD169又はMAD169を用いた臨床試験ではウイルス排出は認められず、このことからAD169及びMAD169はヒトでは効率的に増殖しない。

(4) 繁殖又は増殖の様式

一般にヒトでは、体液に排出された野生型 HCMV が口腔や性器粘膜を介して伝播する。粘膜上皮細胞より宿主に侵入したウイルスは白血球及び内皮細胞に広がり、さらにそれらが血行性に広がることにより血管内皮細胞並びに肝臓、肺、腎臓及び唾液腺の上皮細胞等に感染する。上皮細胞、内皮細胞及び白血球へのウイルス親和性は、宿主内での最初のウイルス複製及び播種において重要な役割を果たす (Revello & Gerna, 2010)。HCMV の初感染者では、感染6~8週間後に中和抗体が産生されるが、ウイルス血症は数週間続き、尿や唾液中へのウイルス排出は6ヵ月以上続く (Zanghellini et al., 1999)。

MAD169株は上皮細胞、内皮細胞及び白血球へのウイルス親和性に関連する五量体複合体を発現しない。この複合体は野生型 HCMV で発現し、ヒトの上皮細胞、内皮細胞及び白血球への野生型 HCMV の感染を可能にしている。野生型 HCMV 分離株は、*In vitro* では繊維芽細胞で効率的に増殖することができないが、MAD169株は繊維芽細胞に適応し、効率的に増殖が可能となっている。一方、MAD169株の臨床試験ではウイルス排出は認められず、ヒト体内では効率的に増殖しない。

(5) 病原性

健康なヒトへの HCMV の初感染で臨床症状が発現することは稀であり、他のヘルペスウイルスと同様に潜伏感染する。しかし、免疫系に障害がある場合、又は胎児で未発達な場合には、HCMV 感染により生命が脅かされる危険性がある。免疫系障害例として、免疫抑制下にある移植患者が挙げられる。これらの患者では HCMV 感染又は再燃により移植後に重大な病状となり、能動的モニタリングや医療管理が必要となる。HCMV 感染はPCRを用いたウイルス血症により診断され、先制治療下でもウイルス量を基に肝炎、肺炎、腸炎、網膜炎及び血管障害等の HCMV 感染症に至る可能性が高いと判断された場合には抗ウイルス剤 (ガンシクロビル、バルガンシクロビル等) で治療される (Mocarski et al., 2013)。

HCMV 感染の急性期が過ぎると、主として造血幹細胞、単球及び骨髄系細胞において潜伏感染が成立する。臓器移植、白血病や他のがんの化学療法、後天性免疫不全症候群（AIDS）等の免疫抑制状態では、HCMV 感染や再燃により脳炎、網膜炎及び肺炎等、種々の病気を引き起こす可能性がある。治療には HCMV 高力価免疫グロブリンや抗ウイルス薬（ガンシクロビル、バルガンシクロビル、ホスカルネット等）が使用されている（根来 et al., 2013）。

HCMV 感染は、先天性感染症も医学的に重要である。妊婦が HCMV に感染又は再燃が生じると、胎盤を介して胎児にウイルスが移行して先天性 HCMV 感染症を発症する可能性がある。先天性 HCMV 感染は世界で最も一般的な先天性感染であり、先進国での感染率は全出生児の0.6～0.7%と推定されている（Marsico & Kimberlin, 2017）。先天性感染で生まれた児の約10～15%は症候性感染児であり、点状出血、黄疸、肝脾腫大、小頭症や神経発達異常を伴う。症候性感染児の約30～50%及び無症候性児の8～12%は感音難聴を発現し、無症候性児においても、神経学的後遺症などの疾病の負担がある。症候性感染児の新生児期死亡率は5%未満であると推定されている（Boppana et al., 2013）。

日本では、2013～2015年のレセプトデータを基にした調査において、先天性 HCMV 感染症の発生率は2.48/10,000出生（信頼区間：1.84～3.26）であった。日本における2015年の出生数は約100万であり、184～326人の有症候・有所見の先天性 HCMV 感染症児が出生していると推定されている（藤井, 2016）。症候性児の90%及び無症候性児の10～15%が精神遅滞、運動障害、感音難聴などの障害を来すことが知られており、症候性又は症状が発現した先天性感染児に対する治療法として、適応外使用による抗ウイルス剤治療が行われている（藤井, 2014）。

健康被験者を対象に、ワクチン候補株である MAD169株及び AD169株の安全性及び免疫原性を評価した臨床試験において、PCR より以前から確立していたウイルス培養法により MAD169株又は AD169株の排出を注意深く観察したところ、ウイルスの排出は認められなかった。また、忍容性は良好であり、被接種者に病原性の症状及び徴候はなく、最も多くみられた有害事象は注射部位の有害事象であった（Elek & Stern, 1974; Neff et al., 1979）。これらは、Toledo 株のような野生型 HCMV を用いた臨床試験と異なる結果であり（Plotkin et al., 1989）、MAD169株及び AD169株がヒトでウイルス感染及びウイルス血症を引き起こさない程度に弱毒化されていることを示している。

(6) 有害物質の産生性

ウイルス粒子及びその構成タンパク質自体が有害物質を産生することはない。

(7) その他の情報（不活化条件等を含む。）

HCMV は細胞内病原体であることから、感染宿主であるヒト体内以外の自然環境下では生存し得ない。

HCMVに感染した幼児の周辺環境又は間接的に接触する部位からHCMVが回収されるかどうか、また、育児環境でのHCMVの生存期間、さらに環境中の表面でのHCMVの生存期間がウイルス量に依存するかどうかを検討されている（Faix, 1985）。集中治療室に収容されたHCMV感染幼児8例からは、尿中及び唾液中にウイルスの排出がみとめられた。各例から新鮮な尿検体を採取

し、プラーク法によりウイルス量を測定した。また、8例から採取した尿を殺菌したプレキシガラス及び綿毛布に塗布し、室内空气中で室温（25～27℃）にて、1、2、4、8、12、24及び48時間静置後、予め湿らせた無菌綿棒を用いて、検体を採取した。その結果、プレキシガラスからは、8例中1例で8時間後まで、3例で4時間後まで、HCMVの生存が確認された。また、綿毛布からは、8例中1例で2時間後まで、4例で1時間後にHCMVの生存が確認された。ウイルスの生存期間は、塗布した尿中のウイルス量と相関していた。尿中のウイルス量が 10^4 pfu/mL以下の場合、1時間後で生存ウイルスは回収されなかった。

また、HCMV は、乾燥した無生物の表面上で数時間から最大7日間（毛布では2時間、プレキシガラスでは4～8時間）生存可能であるとの報告がある（Faix, 1985）。

さらに、水中での HCMV の生存期間について、HCMV（C87及び Davis 株）を Tris 緩衝液に懸濁し、4、22（室温）、36又は50℃にて培養後、ヒト肺線維芽細胞を用いたプラーク法により感染性 HCMV を定量した。その結果、HCMV 株は22又は36℃では1～6時間、生存が維持されたが、その後生存率は低下した。4及び50℃では22℃と比較してより不安定であった（Plummer & Lewis, 1965）。屋外の環境中（河川・湖水、水道水、下水、土壌水等）での生存性を検討した報告はない（2018年5月現在）。

また、AD169を用いて手及び資材表面上の生存時間について検討されている。唾液及びリン酸緩衝生理食塩液で希釈したAD169株（ 1×10^5 個/mL）を手の表面に塗布した。その結果、塗布1分後では20掌中18例で、15分後では20掌中4例にのみ生存AD169ウイルスが回収された。また、生存期間及び移行性を検討するために、AD169株を手の表面に塗布後、プラスチック、金属板、ガラス、木材、ゴム、綿布、クラッカー及び他の手の表面に接触させた。その結果、生存時間はプラスチックで15分、クラッカーとガラスで5分、金属板で1分、綿布で1分以下であり、木材、ゴム及び手からは生存ウイルスは回収されなかった。また、手洗い方法の有効性を検討するため、AD169株を手の表面に塗布して水、単純／抗菌石鹼及び消毒剤（65%エチルアルコール）で洗浄した結果、手の表面から生存ウイルスは回収されなかった（Stowell et al., 2014）。

不活化条件について：

HCMV ウイルスは、56℃、30分で不活化される。消毒用エタノール、70 v/v%イソプロパノール液等のアルコール系消毒剤、クロロホルム、フロロカーボン等の脂質溶剤によっても容易に不活化される（厚生労働省健康局結核感染症課長，平成16年；吉田製薬，2003）。また、陽イオン・両性界面活性剤系、ビッグアナイド系、アルデヒド系及びハロゲン系消毒剤、並びに次亜塩素酸ナトリウムもエンベロープを有するウイルスに対して有効である（野田 et al., 2000；吉田製薬，2004）。野生型 HCMV の播種は、飲み物及び食べ物を共有しないこと、手洗いの励行、特に体液に接触した際の手洗い等の基本的な衛生習慣により防止できる（Ross et al., 2006）。なお、MAD169は HCMV 由来であることから、HCMV と同様の条件で不活化されると考えられる。

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

以下に、各供与核酸の構成及び構成要素の由来を記載する。

- ddFKBP : ddFKBP は FK506結合タンパク質の不安定化ドメインであり、V160に用いられている ddFKBP 配列は既知の ddFKBP のアミノ酸配列に基づき合成した。
- ddFKBP 融合 *UL51* : ddFKBP 融合 *UL51*は、ヒト ddFKBP 配列を、MAD169のウイルスターミナーゼサブユニット *UL51*の N 末端に融合させたものである。
- ddFKBP 融合 *UL123* : ddFKBP 融合 *UL123*は、ヒト ddFKBP 配列を、IE1をコードするウイルス遺伝子 *UL123*の5'末端にインフレームでクローニングしたものである。*UL122*は最初の3つのエクソンを *UL123*と共有し、IE2をコードする。IE1及びIE2は共に調節タンパク質であり、*UL123*及び *UL122*の転写物は、第3エクソン後に異なるスプライシングを受けるものの単一の前駆体 RNA から産生するため、IE1及びIE2の N 末端は同じアミノ酸配列を共有する。ddFKBP 配列を *UL123*の5'末端にクローニングすることにより、IE1及びIE2は共に ddFKBP 融合タンパク質として発現する。ddFKBP の由来については上記参照のこと。
- 復帰型 *UL131* : AD169/MAD169では、*UL131*の第1エクソンにおけるフレームシフト変異により翻訳の中途終止が起きていた。V160では、この変異を修復して復帰型 *UL131*とした。これにより V160では、gH 五量体複合体が発現可能となり、上皮及び内皮細胞指向性が復帰した。
- LoxP 配列 : LoxP 配列 (別紙2) は、Yu らの報告 (Yu et al., 2002) に基づいて合成したものである。LoxP はポリペプチドをコードしない。

(2) 構成要素の機能

各供与核酸の機能について、以下に記載する。

- ddFKBP : ddFKBP は分解されやすい性質があるため、ddFKBP と融合した非構造ウイルスタンパク質も発現とともに分解される (Banaszynski et al., 2006)。しかしながら、ddFKBP に対するリガンドとして特異的にデザインされた低分子化合物 Shield-1 (Clackson et al., 1998、化合物名は別紙2参照) が供給されると、ddFKBP 融合タンパク質の分解は妨げられる。Shield-1は、ddFKBP に結合して効果的に安定化させる。これにより、ddFKBP 融合タンパク質は分解から防御され、製造時には、V160のウイルス複製が可能となる。
- ddFKBP 融合 *UL51* : *UL51*タンパク質 (*UL51*) は、複製中のウイルス DNA コンカテマーを切断し各ウイルスゲノムをウイルスカプシドにパッケージする役割を担うウイルスターミナーゼ複合体を構成する必須構成要素である。ddFKBP 融合 *UL51*は V160ワクチン粒子には取り込まれない。上述のように、ddFKBP 融合 *UL51*は (ddFKBP 融合 *UL123*とともに)、V160ワクチン株に、ddFKBP/Shield-1機構による条件的複製欠損性を付与する。
- ddFKBP 融合 *UL123* : IE1及びIE2は、*UL123*に完全に (IE1) 又は部分的に (IE2) コードさ

れる発現産物である。IE1及びIE2はいずれも、主にウイルス転写の活性化を担う重要な調節タンパク質であり、ウイルス複製に不可欠なタンパク質である。ddFKBP 融合 *UL123* から産生されるタンパク質は、V160には取り込まれない。上述のように、ddFKBP 融合 *UL123* は ddFKBP 融合 *UL51* とともに、V160 ワクチン株に、ddFKBP/Shield-1 機構による条件的複製欠損性を付与する。

- 復帰型 *UL131* : *UL131* の発現産物は gH/gL/UL128/UL130/UL131 からなる gH 五量体複合体を構成するタンパク質である。この複合体により、HCMV は内皮細胞及び外皮細胞に感染することが可能となる。AD169/MAD169 は線維芽細胞で継代したため、内皮細胞及び外皮細胞への感染能を失っているが、この指向性の欠如は、*UL131* のフレームシフト変異により gH 五量体複合体の発現が阻害されるためであることが示されている。さらに重要なことに、gH 五量体複合体は、HCMV 自然感染後に生成する中和抗体の主な標的となる。V160 の中和抗体への反応性を AD169/MAD169 に比べて改善させるため、V160 では *UL131* のフレームシフト変異を修復した。この改善効果は非臨床試験により確認されている (Wang et al., 2016)。
- LoxP 配列 : BAC 組換え技術を使って MAD169 から V160 を調製する遺伝子組換えの過程で、1 コピーの LoxP 配列が残存した。LoxP はポリペプチドをコードしない。すなわち、V160 ワクチン株を確認するための遺伝マーカーとしての機能を提供するが、これ以上の機能はない。

なお、V160 においては、ddFKBP 融合タンパク質の発現は、天然の HCMV プロモーターにより、予想される遺伝子発現動態で制御される。非ヒト霊長類における試験では、V160 の接種による ddFKBP 融合タンパク質の発現 (及び続いて起こる分解) は、FKBP に対するいかなる免疫応答も誘発しなかった (Wang et al., 2016)。

2. ベクターに関する情報

- (1) 名称及び由来
- (2) 特性

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

V160 ゲノムは、MAD169 におけるフレームシフト変異を修復した完全長 *UL131* をコードする。また、V160 ゲノムは、IE1/2 (同じ N 末端を共有) 及び *UL51* の N 末端に ddFKBP をそれぞれ融合させたタンパク質をコードする。V160 の作製には自己切断性 BAC クローンを用いたが、その名

残として1コピーの LoxP 配列が V160ゲノム中に残存している。

なお、AD169で報告されている *RL5A*、*RL13*及び *UL36*の変異及び UL/b'の欠失 (Bradley et al., 2009) は、V160の配列においても確認されている。

追加の詳細情報は別紙3に記載する。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

供与核酸の宿主内への移入方法を以下に示す。詳細は、別紙3に記載する。

A) bMAD-GFP (GFP を発現する BAC 由来 MAD169) の調製 :

BAC エlement、GFP 発現カセット及びこれらに隣接する2つの LoxP 部位を含む DNA 断片を MAD169ゲノム中の *US28*と *UL29* の両 ORF 間に相同組換えして導入することにより、感染性 BAC クローン bMAD-GFP を得た。

B) beMAD-GFP (GFP を発現する BAC 由来上皮指向性 MAD) の調製 : bMAD-GFP の *UL131* の第1エクソンから1つのアデニンを除去して *UL131*のフレームシフト変異を修復することにより、感染性 BAC クローン beMAD-GFP を作製した。

C) beMAD (BAC 由来上皮指向性 MAD) の調製 : beMAD-GFP 中の GFP ORF を *Cre* リコンビナーゼ ORF と置換し、自己切断性 BAC クローン beMAD を作製した。

D) V160の調製 :

自己切断性 BAC クローン beMAD を使用し、ddFKBP を2種のウイルス必須タンパク質 IE1/2 及び *UL51*と融合した。組換え後の BAC クローンから DNA を抽出し、これを ARPE-19細胞へエレクトロポレーションした後、Shield-1を含む培地で培養し、感染性ウイルスを得た。子孫ウイルス粒子をプラーク精製し、ddFKBP 配列が挿入されていることを配列解析により確認した。また、V160が上皮細胞で増殖できることにより、*UL131*のフレームシフト変異が修復され gH 五量体複合体の発現が回復したことを機能的に確認した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

V160のセルバンク、ウイルスシード、原薬ロット及び製剤ロットは、XXXXXXXXXX米国XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXの施設において GMP 管理下で製造され、保管される。すべてのセルバンク及びウイルスシードバンクは、米国食品医薬品局 (FDA)、欧州薬局方 (EP) 及び世界保健機関 (WHO) のガイドラインを考慮して開発された分析計画に従って特性解析が実施され、出荷される。セルバンク及びウイルスシードバンクは、液体窒素の気相中で保管される。育成の経過に関する追加情報は別紙3に示す。

V160は、親株である AD169と同様、UL/b'領域に15 kb の欠失を有する。製造中に15 kb もの欠失が回復するようなメカニズムは考えられず、製造工程において V160が野生型に復帰するリスクはないと考えられる。

V160では、いずれもウイルス産生に必須なタンパク質である *UL51*及び *IE1/2*の N 末端に、ddFKBP 配列が融合している。ddFKBP 配列でフレームシフト変異が起きた場合であっても、同時に、融合したタンパク質の発現が阻害されるため、ウイルス産生も阻害される。また、ddFKBP 配列は、

ウイルス複製に不可欠な2つのウイルスタンパク質が制御可能となるように、ウイルスゲノム中の2箇所挿入されている。さらに、Shield-1存在下では、V160は親株のウイルスと同程度に効率的に複製するため (Wang et al., 2016)、Shield-1存在下の培地中では、V160製造中に変異株が生成する選択圧はない。V160は二本鎖 DNA ウイルスであり、そのウイルスポリメラーゼは3'エクソヌクレアーゼ活性を持ち、DNA 合成時にエラーを修正してゲノムフィデリティを維持することに寄与する。

以上より、製造工程において、V160から野生型ウイルスが生じる可能性は極めて低く、その試験は必要無いと考えられる。

4. 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

ワクチン接種後、V160ゲノムは注射部位の細胞に送達され、設計どおりにいくつかのウイルス遺伝子が発現する。ddFKBP 融合タンパク質の発現は、野生型ウイルス由来のプロモーターにより誘導され、通常のウイルス複製でのウイルス遺伝子発現の流れに従って発現する (Mocarski et al., 2013)。ddFKBP は2つの必須ウイルスタンパク質 (IE1/2及びUL51) のN末端に直接融合した分解ドメイン (dd) であり、それら融合タンパク質を安定化させ、分解を阻止する Shield-1が存在しないため、V160ウイルスはワクチン被接種者の体内で複製しない。

V160は Shield-1非存在下では子孫ウイルスを産生しない条件的複製欠損性ウイルスである。V160は発現ベクターではないため、細胞内へのウイルスの侵入後のウイルスゲノムの安定性については、直接検討していない。

接種を受けた被験者の体内で野生型 HCMV の共感染により、新たな遺伝子組換え生物等が生じる可能性は極めて低い (別紙3)。

UL/b'領域の約15 kb の欠損により V160株は潜伏感染することが出来ず、遅延した増幅も起こらないと考えられる (別紙3)。

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

血漿、唾液及び尿検体中の野生型 HCMV 及び V160株の両方のウイルスについて評価できるリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を開発した。HCMV の qPCR (Generic CMV-qPCR) は、野生型 HCMV 及び V160株を含むすべての HCMV に保存されている特定のゲノム領域を検出する。Generic CMV-qPCR 陽性検体はさらに V160株特異的 qPCR を行い、野生型 HCMV と V160株を識別するために V160株固有の領域を含めたいくつかのウイルスゲノム領域について、多重測定法で検査する。qPCR の感度及び特異性は確認されており、V160株と野生型 HCMV 及び実験室株等の他の HCMV を識別することが可能である。

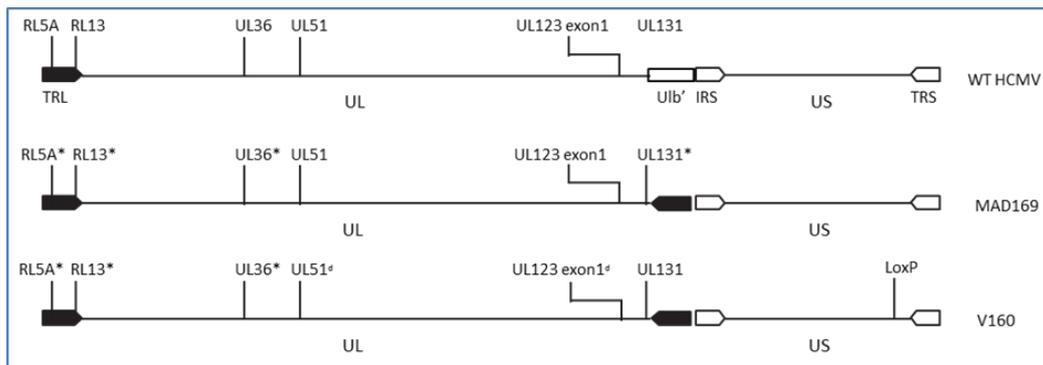
また、今後この Generic CMV-qPCR を接種部位スワブ検体用にも Qualification し、接種部位における V160株の検出に用いる予定である。接種部位はアルコール等による消毒を接種前に行うため、接種後のスワブ検体から陽性結果が出た場合は、V160株が検出されたものとする。

め、接種部位のスワブ検体を用いて、野生型 HCMV と V160株を識別する追加の検査は実施しない予定である。

詳細については、別紙3に示す。

6. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

野生型 HCMV 及び MAD169と比較した V160のゲノム構造を図 2に示す。



Symbols: * mutation, ^d ddFKBP

図 2 野生型 HCMV 及び MAD169 と比較した V160 のゲノム構造

V160は、自然免疫のための重要なウイルス抗原を保持しているという点で、生化学的には野生型 HCMV に類似している (Freed et al., 2013) が、遺伝的には以下の点で野生型 HCMV 及び／又は宿主である MAD169と相違している。

V160は、AD169/MAD169株に見られるのと同様の主要な遺伝子変異 (*RL5A*、*RL13*及び *UL36* の変異並びに *UL/b'*領域中の約15 kb の欠失) を持つ。*RL5A* 及び *UL36*を除き、同様の変異は Towne 株のような他の弱毒化 HCMV ウイルスでも認められ、これらの変異は野生型 HCMV と比較した際の弱毒化マーカーと考えられている。また、V160は、*UL51*及び *UL123*の5'末端に融合した ddFKBP 配列を有している。ddFKBP 配列は、化学物質によるウイルス複製制御に重要な役割を持ち、野生型 HCMV 及び MAD169にはないものである。さらに、V160ゲノムには、遺伝子組換えの過程で用いた LoxP 配列が1つ残存している。この LoxP 配列は、ポリペプチドをコードせず、AD169/MAD169を含む他の HCMV 実験室株及び野生型 HCMV から V160を識別する際の遺伝子マーカーとなる。AD169/MAD169では、*UL131*においてフレームシフト変異による翻訳の中途終止が起きていたが、V160では、このフレームシフト変異を修復して復帰型 *UL131*とした。

V160では、ddFKBP/Shield-1機構によりウイルス複製は厳密に制御され、この機構により、V160は条件的複製欠損型ウイルスとなる。ヒトにおいては、野生型 HCMV は複製可能であるが、Shield-1が存在しないため V160は複製できない。In vitro においては、宿主である MAD169は Shield-1非存

在下であってもヒト線維芽細胞中で複製可能であるのに対し、V160は Shield-1非存在下では複製されないことが種々の細胞で示されている (Wang et al., 2016)。

本遺伝子組換え生物等の増殖能は低いが、増殖を伴わない感染能 (細胞内へ侵入する能力) は野生型 HCMV と同様である。V160は野生型 HCMV と同様のウイルスの侵入機序、たとえば五量体 gH 複合体である gH/gL/gO、gB 及び gM/gN 複合体を有しており、Shield-1非存在下では野生型 HCMV と同じスペクトラムの各種ヒト細胞に対する感染能を有する。一方、HCMV では種特異性が厳格であることが知られており、V160も他の動物種の細胞には感染しないと考えられる。

III. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1. 使用等の内容

ヒトの予防接種を目的とした使用、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

原薬の保管

- (1) V160を含む凍結乾燥品は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、医療施設内の施錠管理された冷蔵庫に保管される。

薬液の調製及び保管

- (2) V160の薬液の調製は、医療施設内の他の区画と明確に区別された調剤室内で行い、密封した状態で保管する。
(3) 調製時は、調剤室内での V160の拡散を最小限に留める。

運搬

- (4) V160を含む凍結乾燥品及び薬液の医療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

被接種者への投与

- (5) V160の投与は、医療施設内の他の区画と明確に区別された医療室内で、被接種者の筋肉内に直接注入することにより行う。投与時は、医療室内での V160の拡散を最小限に留める。

投与後の被接種者からの排出等の管理

- (6) V160の排出等の挙動が明らかになるまで、注射部位のスワブ、血液、尿、唾液検体を用いて、V160の排出等の検査を行う。
(7) 投与後、被接種者の接種部位を滅菌ガーゼ等で覆い、接種部位から排出される V160の環境への拡散を最小限に留める。被覆は、注入部位からの V160の拡散が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間継続する。
(8) V160の排出等の挙動が明らかになるまで、V160の投与を受けた被接種者が当該医療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された被接種者であることが情報提供されるよう、V160の投与を受ける被接種者に適切な指導を行う。
(9) V160の排出等の挙動が明らかになるまで、必要に応じて、被接種者の排出物等から第三者への伝播を防止するための適切な指導を行う。

被接種者検体の取扱い

- (10)被接種者から採取した検体（以下「検体」という。）は、医療施設の規定に従って取り扱う。

- (11)V160の排出等の挙動が明らかになるまで、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、V160が拡散しない構造の容器に入れ、医療施設から検査機関へ運搬する。その際、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された被接種者の検体である旨を情報提供する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (12)検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和45年法律第137号）に基づいて医療施設及び検査機関で定められている医療廃棄物の管理に関する規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

感染性廃棄物等の処理

- (13)V160を含む凍結乾燥品及び薬液は、医療廃棄物管理規程に従い、医療施設若しくは検査機関内で不活化処理を行い医療廃棄物として廃棄するか、又はV160が漏出しないよう厳重に密閉した状態若しくは密封容器に入れ、他の医療廃棄物とは区別して保管し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和46年9月23日政令第300号）の別表第Iの4の項で定める感染性廃棄物として廃棄する。
- (14)V160が付着した可能性のある機器及び器材は、医療廃棄物管理規程に従って廃棄する。再利用する機器及び器材にあつては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。

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

V160の排出等が明らかになるまで、第一種使用等の開始後に実施する国内治験において、治験実施計画書に従いV160の排出等に関する情報を安全性情報と共に収集する。

4. 生物多様性影響が生ず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 該当せず。

5. 実験室等での使用等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V160はマウス、ウサギ及びアカゲザルを用いた動物実験で実験用ワクチンとして評価されている（Wang et al., 2016）。これらの動物種においてHCMVは増殖しないことが予想されており、これら非臨床試験でV160のウイルス排出は検討していないが、ラットを用いた非臨床試験が現在進行中であり、本邦での第I相臨床試験開始前に完了する予定である。

ウイルス排出はHCMVが腎臓や唾液腺のような臓器に播種した結果として引き起こされ、これら臓器でウイルスが増殖することで、それぞれ尿及び唾液へのウイルス排出が起こる。実験的には、インタクトなUL/b'領域を持つ野生型のHCMVのみが、ヒト胎児の肝臓と胸腺をSCIDマウスに移植したHCMVの*in vivo*感染動物モデルにおいて増殖することができ、UL/b'領域が欠損したTowne株及びAD169rev株[V160と同様にAD169の上皮指向性を回復させた株（Fu et al., 2012）]の増殖は認められなかった（Dulal et al., 2016）。このように、UL/b'領域はSCIDマウスに移植されたヒト胎児の肝臓と胸腺組織内での増殖に重要であることが示されている。V160はAD169及びMAD169と同様にUL/b'領域を欠損しており、AD169及びMAD169の臨床試験では尿

及び唾液中へのウイルス排出は認められなかった (Elek & Stern,1974; Neff et al., 1979)。

また、HCMV の他のワクチン候補株である Towne では接種後の血中への分布が被接種者から採取した血液から抽出したリンパ球をヒト線維芽細胞に接種する系により評価され (Plotkin et al, 1989)、Towne/Toledo (キメラ株) ではウイルス血症が検討された (Heineman et al., 2006) が、これらの臨床試験で血中にウイルスは検出されなかったことが報告されている。

なお、ウイルス粒子の構成及び構造に基づき、V160は親ウイルスである AD169と同様の生存性を示すと考えられる。V160の親ウイルスである AD169又は HCMV の環境中での生存性について、第 I 章3. (7) 項に示した。

6. 国外における使用等により得られた情報

第 I 相臨床試験として、米国で「健康成人におけるヒトサイトメガロウイルスワクチン (V160) の安全性、忍容性及び免疫原性試験 (V160-001)」を、GCP を遵守して2013年12月～2017年3月に実施した (ClinicalTrials.gov. [Internet])。この試験は、2パート、first-in-human、二重盲検、無作為化、プラセボ対照、用量漸増、多施設共同試験であり、18歳以上の健康成人を対象として、様々な用量、製剤、投与経路での安全性、忍容性及び免疫原性を評価した。本試験において V160の安全性プロファイルは良好であり、V160の接種を受けた被験者から V160株の排出は認められなかった。本試験の詳細については別紙4に示した。

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微生物の特定

V160の感染宿主は野生型 HCMV と同様と考えられ、他の微生物に感染するとの報告はなく、有害物質の産生を通じて、他の微生物へ影響を与える可能性も極めて低い。従って、影響を受ける可能性のある微生物は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当せず。

(3) 影響の生じやすさの評価

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

影響を受ける可能性のある微生物は特定されず、他の微生物を減少させる性質について、生物多様性に関する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

V160の感染宿主は野生型 HCMV と同様と考えられる。影響を受ける可能性のある動植物等としては、ヒトが考えられる。「種の壁」のため、影響を受ける可能性のあるヒト以外の野生動植物等は存在しないと考えられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

米国第 I 相試験の結果から、V160のヒトへの接種における忍容性は良好であり、目的とする免疫原性及びワクチン接種による一般的な副反応以外の影響は認められていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

V160の増殖は、自然界及びヒト体内には存在しない Shield-1に厳密に依存し、米国第 I 相試験の結果でもウイルス排出は認められていないことから水平感染の可能性は非常に低く、V160の影響は被接種者に限定され、免疫機能の低いヒトも含め、第三者に影響は生じないと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

病原性について、当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、生物多様性に悪影響を及ぼす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

V160の接種による、野生型 HCMV を超える有害物質の産生は知られていないため、影響を受ける可能性のある野生動植物等はいない。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当せず。

(3) 影響の生じやすさの評価

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

影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性について、生物多様性影響に悪影響が生ずるおそれはないと判断される。

4. 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物又は他の微生物の特定

影響を受ける可能性のある生物はヒトのみである。

(2) 影響の具体的内容の評価

V160はヒト体内で増殖しないため、他の動植物等に水平感染し、次いで、核酸を水平伝達する可能性は非常に低く、具体的な影響は想定されない。

(3) 影響の生じやすさの評価

V160の体外への排出は認められないため、影響が生じる可能性は非常に低い。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

影響を受ける可能性のある野生動植物又は他の微生物は特定されず、核酸を水平伝達する性質について、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従えば、V160ウイルスの環境中の拡散は次の理由から抑えられると考えられる。① V160ウイルスの複製は厳密に Shield-1に依存しているため Shield-1非存在下では増殖できないこと、② 現在の HCMV に関する知見に基づくと、V160ウイルスがヒト以外の動物種に感染できないこと、さらに、③ 米国での臨床試験において、V160ウイルス株の排出は検出されず、V160の接種を受けた被験者の安全性及び忍容性が確認されていることから、V160がヒト、野生動植物又は微生物等に影響を及ぼす可能性はないと考えられる。

以上より、遺伝子組換え HCMV 生ワクチンである V160を第一種使用規程申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法に従って使用することにより、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断される。

- Adler SP, Manganello AM, Lee R, et al. A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimera vaccines in cytomegalovirus-seronegative men. *J Infect Dis.* 2016; 214: 1341-8.
- Banaszynski LA, Chen LC, Maynard-Smith LA, et al. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell.* 2006; 126: 995-1004.
- Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2013; 57: S178-81.
- Bradley AJ1, Lurain NS, Ghazal P, et al. High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *J Gen Virol.* 2009; 90: 2375-80.
- Burke HG, Heldwein EE. Crystal structure of the human cytomegalovirus glycoprotein B. *PLoS Pathog.* 2015; 11: e1005227.
- Burwitz BJ, Malouli D, Bimber BN, et al. Cross-species rhesus cytomegalovirus infection of cynomolgus macaques. *PLoS Pathog.* 2016; 12: e1006014.
- Clackson T, Yang W, Rozamus LW, et al. Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 10437-42.
- ClinicalTrials.gov. Safety, Tolerability, and Immunogenicity of the Human Cytomegalo-virus Vaccine (V160) in Healthy Adults (V160-001). Available at URL (2018.6.); <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01986010>. 2017.
- Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22: 76-98.
- Dulal K, Cheng T, Yang L, et al. Functional analysis of human cytomegalovirus UL/b' region using SCID-hu mouse model. *J Med Virol.* 2016; 88: 1417-26.
- Elek SD, Stern H. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet.* 1974; 1: 1-5.
- Faix RG. Survival of cytomegalovirus on environmental surfaces. *J Pediatr.* 1985; 106: 649-52.
- Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA.* 2003; 289: 1008-11.
- Freed DC, Tang Q, Tang A, et al. Pentameric complex of viral glycoprotein H is the primary target for potent neutralization by a human cytomegalovirus vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110: E4997-5005.
- Fu TM, An Z, Wang D. Progress on pursuit of human cytomegalovirus vaccines for prevention of congenital infection and disease. *Vaccine.* 2014; 32: 2525-33.
- Fu TM, Wang D, Freed DC, et al. Restoration of viral epithelial tropism improves immunogenicity in rabbits and rhesus macaques for a whole virion vaccine of human cytomegalovirus. *Vaccine.* 2012; 30: 7469-74.
- Furui Y, Satake M, Hoshi Y, et al. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion.* 2013; 53:

2190-7.

- Heineman TC, Schleiss M, Bernstein DI, et al. A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J Infect Dis.* 2006; 193: 1350-60.
- Lilleri D, Kabanova A, Revello MG, et al. Fetal human cytomegalovirus transmission correlates with delayed maternal antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 complex during primary infection. *PLoS One.* 2013; 8: e59863.
- Marsico C, Kimberlin DW. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr.* 2017; 43: 38.
- McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 2006; 117: 90-104.
- Mocarski ES Jr, Shenk T, Griffiths PD, et al. Cytomegaloviruses. In Knipe DM, Howley PM, editors *Fields Virology*. 6th ed. vol 2. Philadelphia; PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p1960-2014.
- Neff BJ, Weibel RE, Buynak EB, et al. Clinical and laboratory studies of live cytomegalovirus vaccine Ad-169. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1979; 160: 32-7.
- Plotkin SA, Starr SE, Friedman HM, et al. Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J Infect Dis.* 1989; 159: 860-5.
- Plummer G, Lewis B. Thermo-inactivation of herpes simplex virus and cytomegalovirus. *J Bacteriol.* 1965; 89: 671-4.
- Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev Med Virol.* 2010; 20: 136-55.
- Ross DS, Jones JL, Lynch MF. Toxoplasmosis, cytomegalovirus, listeriosis, and preconception care. *Matern Child Health J.* 2006; 10: S187-91.
- Ryckman BJ, Chase MC, Johnson DC. HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008; 105: 14118-23.
- Schleiss MR. Developing a vaccine against congenital cytomegalovirus (CMV) infection: What have we learned from animal models? Where should we go next? *Future Virol.* 2013; 8: 1161-1182.
- Stowell JD, Forlin-Passoni D, Radford K, et al. Cytomegalovirus survival and transferability and the effectiveness of common hand-washing agents against cytomegalovirus on live human hands. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 455-61.
- Wang D, Freed DC, He X, et al. A replication-defective human cytomegalovirus vaccine for prevention of congenital infection. *Sci Transl Med.* 2016; 8: 362ra145.
- Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 18153-8.
- Yu D, Smith GA, Enquist LW, et al. Construction of a self-excisable bacterial artificial chromosome containing the human cytomegalovirus genome and mutagenesis of the diploid TRL/IRL13 gene. *J*

Viol. 2002; 76: 2316-28.

- Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, et al. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. J Infect Dis. 1999; 180: 702-7.
- 厚生労働省健康局結核感染症課長. 感染症法に基づく消毒・滅菌の手引きについて. 健感発第0130001号. 平成16年1月30日.
- 根来孝治, 若林仁美, 村山純一郎ら. サイトメガロウイルス感染症の薬物治療. 昭和学会誌. 2013; 73: 163-70.
- 野田雅博, 松田俊二, 小林正夫. 消毒剤の殺ウイルス効果に関する検討—殺ウイルス効果に及ぼす血清蛋白の影響. 感染症学雑誌. 2000; 74: 664-9.
- 藤井知行 (研究代表者). サイトメガロウイルス妊娠管理マニュアル. 母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究班 (平成25~27年度). Available at URL (2018.6.); <http://www.med.kobe-u.ac.jp/cmvp/pdf/pnf3.pdf>. 2014.
- 藤井知行 (研究代表者). 母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究. 平成25~27年度総括研究報告書 (別紙2). 2016.
- 吉田製薬. アルコール系消毒薬について. Y's Letter. 16. 2003.
- 吉田製薬. ヘルペスウイルスについて. Y's Letter. 31. 2004.