

様式第 1 (第 7 条関係)

第一種使用規程承認申請書	
平成 31 年 2 月 5 日	
厚生労働大臣 根本 匠 殿 環境大臣 原田 義昭 殿	氏名 オンコリスバイオフィーマ株式会社 申請者 代表取締役社長 浦田 泰生 印 住所 東京都港区虎ノ門四丁目 1 番地 28 号 虎ノ門タワーズオフィス
第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項 (同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。) の規定により、次のとおり申請します。	
遺伝子組換え生物等の種類 の名称	ヒトテロメラーゼ遺伝子プロモーター制御下に E1A および E1B 遺伝子を同時に発現するように E1 領域が改変されたヒトアデノウイルス 5 型(OBP-301)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	ヒトの治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	<p>OBP-301 の原液の保管</p> <p>(1) OBP-301 の原液の保管は、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、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において行う。</p> <p>OBP-301 の原液の希釈液の調製及び保管</p> <p>(2) 原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行う。</p> <p>(3) 原液の希釈時は、エアロゾルの飛散を防ぐ措置を講じ、OBP-301 の拡散を最小限に留める。</p> <p>(4) 希釈液は密封した状態で保管する。</p> <p>運搬</p> <p>(5) OBP-301 の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。</p> <p>患者への投与</p> <p>(6) OBP-301 の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、内視鏡下による投与、エコーガイド及び CT ガイド下での経皮的投与、直視下での経皮的投与のいずれかの方法で、患者の腫瘍内に直接注入することにより行う。</p> <p>(7) 投与時は、治療室内での OBP-301 の拡散を最小限に留める。</p> <p>投与後の患者からの排出等の管理</p> <p>(8) 経皮的投与を受けた患者に対して、投与部位からの OBP-301 の環境への拡散を最小限とするため、密閉ドレッシング材等による被覆を行う。被覆は、注入部位からの OBP-301 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。</p> <p>(9) 患者からの排泄物等から第三者への OBP-301 の伝播を最小限に留めるため、OBP-301 の投与を受ける患者に適切な指導を行う。</p> <p>(10) OBP-301 の排出等が投与経路毎に明らかになるまで血液、尿、唾液、糞便及び密閉ドレッシング材等に対し、OBP-301 の排出等の検査を経時的に実施する。</p> <p>(11) OBP-301 の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間に、</p>

投与を受けた患者が当該治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患者であることが情報提供されるよう、OBP-301の投与を受けた患者に適切に指導する。

- (12) OBP-301の予期しない増殖又は伝播が疑われた場合には、血液、体液、分泌物又は排泄物等に対する OBP-301の有無を確認するために必要な検査を行う。

患者検体の取扱い

- (13) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。

- (14) OBP-301の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間に、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、OBP-301が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。また、施設等から検査機関への検体の運搬の際、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患者の検体である旨を情報提供した上で行う。

- (15) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

感染性廃棄物等の処理

- (16) OBP-301の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。

- (17) 原液の希釈液及び OBP-301が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。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。

- (18) 患者が自宅で用いたドレッシング材及び洗浄に用いた器材等は、厳重に密閉した状態で保管し、不活化処理した上で廃棄する。

- (19) 治療施設外で保管された OBP-301を含有する未開封のバイアルは、密封された状態で高圧蒸気滅菌による不活化処理を行い、廃棄する。

生物多様性影響評価書

I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

ヒトアデノウイルスはアデノウイルス科マストアデノウイルス属に分類されている(文献1)。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及びカプシドタンパク質のアミノ酸配列の違いで51のタイプに分けられており(文献2)、テロメラーゼ遺伝子プロモーター依存的にがん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 OBP-301 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1)。アデノウイルス1、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、ニュージーランドウサギ、及びシリアンハムスターへの経鼻接種でウイルス増殖が報告されている(文献4、5、6)。

文献1：畑中正一編：ウイルス学，pp.198-208，朝倉書店，東京，1997

文献2：Russell et al. *J Gen Virol.* 90(Pt 1):1-20, 2009

文献3：水田克巳など：山形県衛生研究所報，32: 5-7, 1999

文献4：Hjorth et al. *Arch Virol.* 100(3): 279-283, 1988

文献5：Gordon et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 33(3):574-80, 1992

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

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）

Ad5に由来する組換えアデノウイルスが遺伝子治療で汎用されている（IV章参照）。

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

ウイルスカプシドは直径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

Ad5 は、ヒトやコットンラット等でのみ増殖を伴う感染が起こる。

(4) 繁殖又は増殖の様式

ヒトアデノウイルスは、感染細胞の細胞質に侵入し、核内で染色体外遺伝子として存在する。ウイルスゲノムの複製開始には E1A 及び E1B 遺伝子の発現が必要とされ、ウイルス粒子構成タンパク質とウイルスゲノムから形成されたウイルス粒子は核内封入体となり、感染細胞の崩壊によりウイルス粒子が細胞外に排出される。

(5) 病原性

Ad5 のヒトに対する病原性としては、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。

また、Ad5 の動物に対する病原性としては、コットンラットに経鼻摂取した際に肺の組織病変が認められている（文献 6）。また、ハムスターに経鼻摂取した場合にも、肺及び気管支に病変が認められている（文献 4）。

(6) 有害物質の産生性

Ad5 の感染で細胞内に産生されるタンパク質等の毒性は報告されていない。

(7) その他の情報

物理的不活化法として Ad5 は 56℃、30 分の加熱で感染性を失う（文献 7）。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）やヨウ素剤等のハロゲン系消毒剤、アセトアルデヒドやフタラール等のホルマリン系消毒剤、アルコールに有機酸と亜鉛化合物を添加した消毒剤及び過酢酸等である（文献 8、9、10）。

未開封の OBP-301 バイアルを廃棄する際には、121℃、2 気圧、20 分の高圧蒸気滅菌（文献 7）または、0.1%以上の濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液をバイアルに入れ、30 分以上放置し、不活化した後に廃棄する（文献 9）。

文献 7 : Bardell, D. *J. Clin. Microbiol.* 4: 322-325, 1976

文献 8 : APIC guidelines for infection control practice,

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

文献 9 : 厚生労働省 HP 「各種微生物に対する消毒剤の用法」

https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/jinshikkan_a_0008.pdf

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

OBP-301 では、内因性の E1A プロモーターの代わりにヒトテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに [REDACTED] が挿入されている。

(2) 構成要素の機能

OBP-301 は、テロメラーゼ活性と発現が相関する hTERT 遺伝子のプロモーターに結合する転写因子に依存して増殖し、がん細胞を選択的に破壊する。テロメラーゼは多くのがん細胞でその活性の上昇が認められているため、多くのがん細胞では hTERT プロモーターを活性化する転写因子のレベルが上昇しているものと考えられる。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 (別紙 1) が、また内因性の E1B プロモーターの代わりに [REDACTED] が挿入されている。[REDACTED] にリボソームが結合し、[REDACTED] 下流にコードされるタンパク質の合成が開始する。[REDACTED] E1A タンパク質は、ウイルスの複製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 55 kDa 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

OBP-301 の作製には Mizuguchi らが作製した [REDACTED] (文献 11) が用いられた。従って、OBP-301 の Ad5 配列は [REDACTED] に由来する (別紙 3)。

(2) 特性

[REDACTED] は、両端の逆方向反復配列 (ITR) に挟まれる Ad5 ゲノム全長を有するプラスミドで、Ad5 の E1 遺伝子領域は除かれている。OBP-301 の作製に当たっては、[REDACTED] の [REDACTED] 部位の間に、hTERT 遺伝子プロモーター、E1A 遺伝子、[REDACTED]、E1B 遺伝子より構成される目的配列 ([REDACTED]) が挿入されたプラスミドが作製された。ウイルス粒子は、プラスミドを [REDACTED] 処理した断片を [REDACTED] に導入することで作製された。作製された OBP-301 は [REDACTED] によるクローニング及び遺伝子配列の確認

を行った後、[REDACTED]で増殖させた。

文献 11 : Mizuguchi and Kay, *Hum. Gene Ther.*, 9, 2577-2583, 1998

3 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

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 [REDACTED] が導入されているが、実際の OBP-301 作製の過程では [REDACTED] の E1 遺伝子欠失領域に、hTERT 遺伝子プロモーター、E1A 遺伝子、[REDACTED]、E1B 遺伝子より構成される目的配列 ([REDACTED]) が挿入された。別紙 2 に構成の概要と全塩基配列を示した。

(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)

① [REDACTED] の作製

E1A 及び E1B 遺伝子を PCR で増幅後 TA cloning (TA Cloning Kit Dual Promoter ; Invitrogen) を行い、シーケンスを確認した。TA クローニングベクターから E1A、E1B を、[REDACTED] より hTERT プロモーターをそれぞれ切り出し、[REDACTED] を作製した。[REDACTED]

② OBP-301 の作製

プラスミド [REDACTED] から [REDACTED] 断片を切り出し、[REDACTED] に挿入した [REDACTED]。プラスミド [REDACTED] を増幅した後、精製した。精製した [REDACTED] を直鎖化した後、[REDACTED] に導入し、感染性のある組換えアデノウイルス OBP-301 を作製した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

OBP-301 は、岡山大学で開発された国産の腫瘍溶解性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。治験に用いられる OBP-301 は、米国 [REDACTED] において米国 CGMP 下で製造・管理される。

① セルバンク :

OBP-301 のパッケージング及びウイルス製造は [REDACTED] を用いて [REDACTED] の製造施設において実施する。

[REDACTED] は [REDACTED] を培養、馴化させたものである。この [REDACTED] をさらに CD293 培地で培養・増殖させ、リサーチセルバンク (RCB) を作製した。さらに RCB を CGMP 下で CD293 培地を用いて増殖させ、マスターセルバンク (MCB) を作製した。

②ウイルスバンク：

初回はRCBの[]を用いてリサーチウイルスバンク（RVB）を、初回以降はMCBの[]を用いてマスターウイルスバンク（MVB）を、[]の製造施設においてGMP下で製造した。

③米国における品質管理（別紙4）：

RVB及びMVBについて、別紙4に記載した品質管理試験が行われている。RVBの品質管理試験の1つとしてE1領域に挿入した「発現カセットの塩基配列解析」を実施しており、発現カセットの安定性が確認されている。

バルク原薬、最終製剤については、別紙4のII及びIIIに示された品質管理試験が行われている。

凍結した状態で輸入された最終製品は治療施設に運搬され、ディープフリーザーにて冷凍保管される。[]あるいは保管倉庫より治療施設に輸送し、治療施設の管理下で保管される。

4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸はOBP-301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、OBP-301のゲノムは核内の染色体外に存在し、テロメラーゼ活性と発現が相関するhTERT遺伝子のプロモーター活性に依存して増殖する。

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

OBP-301は、IRES及びE1A配列に対する2種類のプライマーを用いた定量的PCR法により、特異的に検出可能である。ヒトの唾液（検出感度： 5×10^4 VP/mL）、喀痰（検出感度： 3×10^5 VP/mL）、血液（検出感度： 2×10^4 VP/mL）、尿（検出感度： 5×10^4 VP/mL）及び糞便（検出感度： 5×10^7 VP/mL）中のOBP-301を検出できることが確認されている（文献12-15）。投与部位を被覆する密閉ドレッシング材のスワブ検体に対しても、IRES及びE1Aに対する2種類のプライマーを用いた定量的PCR法によりOBP-301を検出する。適格性評価結果から、検出感度は 1×10^2 VP/sampleである（文献16）。

PCR法による検出の信頼性については、すでに定量的PCR法を用いたウイルス検出法がOBP-301及びその他の腫瘍溶解性ウイルスの臨床試験で用いられており、信頼性が確立している。

文献12：Validation Report「The Analytic Method for Determining Concentration of Telomelysin (OBP-301) in Human Plasma and Urine by Quantitative Polymerase Chain Reaction」
（社内資料）

文献13：Final Report「The Analytic Method for Determining Concentration of Telomelysin (OBP-

301) in Human Sputum by Quantitative Polymerase Chain Reaction」 (社内資料)

文献 14: Final Report 「The Analytic Method for Determining Concentration of Telomelysin (OBP-301) in Human Saliva by Quantitative Polymerase Chain Reaction」 (社内資料)

文献 15: Validation Report 「The Analytic Method for Determining Concentration of Telomelysin (OBP-301) in Human Stool by Quantitative Polymerase Chain Reaction」 (社内資料)

文献 16: 試験報告書「ドレッシング材からの OBP-301 ウイルス DNA 検出・定量(qPCR)」 (社内資料)

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

OBP-301 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 プロモーター及び IRES 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。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。正常細胞では hTERT 遺伝子の発現は限られている一方で、がん細胞ではその発現が高くなっていることから、hTERT 遺伝子の発現制御を行っている hTERT プロモーターが活性化されていると考えられる。OBP-301 は、hTERT プロモーターを活性化する転写因子に依存して 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、OBP-301 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 と同等である。

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

ヒトの治療を目的とした投与、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

OBP-301 の原液の保管

(1) OBP-301 の原液の保管は、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、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において行う。

OBP-301 の原液の希釈液の調製及び保管

- (2) 原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行う。
- (3) 原液の希釈時は、エアロゾルの飛散を防ぐ措置を講じ、OBP-301 の拡散を最小限に留める。
- (4) 希釈液は密封した状態で保管する。

運搬

(5) OBP-301 の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

患者への投与

- (6) OBP-301 の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、内視鏡下による投与、エコーガイド及び CT ガイド下での経皮的投与、直視下での経皮的投与のいずれかの方法で、患者の腫瘍内に直接注入することにより行う。
- (7) 投与時は、治療室内での OBP-301 の拡散を最小限に留める。

投与後の患者からの排出等の管理

- (8) 経皮的投与を受けた患者に対して、投与部位からの OBP-301 の環境への拡散を最小限とするため、密閉ドレッシング材等による被覆を行う。被覆は、注入部位からの OBP-301 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。
- (9) 患者からの排泄物等から第三者への OBP-301 の伝播を最小限に留めるため、OBP-301 の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (10) OBP-301 の排出等が投与経路毎に明らかになるまで血液、尿、唾液、糞便及び密閉ドレッシング材等に対し、OBP-301 の排出等の検査を経時的に実施する。
- (11) OBP-301 の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間に、投与を受けた患者が当該治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患者であることが情報提供されるよう、OBP-301 の投与を受けた患者に適切に指導する。
- (12) OBP-301 の予期しない増殖又は伝播が疑われた場合には、血液、体液、分泌物又は排泄物等に対する OBP-301 の有無を確認するために必要な検査を行う。

患者検体の取扱い

- (13) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (14) OBP-301 の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間に、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、OBP-301 が漏出ししない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。また、施設等から検査機関への検体の運搬の際、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患者の検体である旨を情報提供した上で行う。
- (15) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

感染性廃棄物等の処理

- (16) OBP-301 の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。

- (17) 原液の希釈液及び OBP-301 が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。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。
- (18) 患者が自宅で用いたドレッシング材及び洗浄に用いた器材等は、厳重に密閉した状態で保管し、不活化処理した上で廃棄する。
- (19) 治療施設外で保管された OBP-301 を含有する未開封のバイアルは、密封された状態で高圧蒸気滅菌による不活化処理を行い、廃棄する。

3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

OBP-301 の排出の有無は、必要に応じて喀痰、唾液、尿、糞便、投与部位を被覆する密閉ドレッシング材より得られるウイルス DNA について II-5 項に記載の定量的 PCR 法により検査する。OBP-301 の体内動態及び排出が明らかになるまでは、体内動態及び排出の経時変化をモニタリングし、排出されるウイルス DNA が検出限界以下になる時期を確認する。

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

高濃度の OBP-301 を含む溶液の取扱いは、必要とされる拡散防止措置を執って行い、高濃度の OBP-301 を含む可能性のある廃液等は不活化処理の後に廃棄される。

臨床試験における OBP-301 の投与経路別のウイルス排出に対する対策及びウイルス排出モニタリング計画は別紙 5 に示す。

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) OBP-301 の癌細胞選択性

OBP-301 の前臨床研究

OBP-301 を正常細胞及び癌細胞に感染させると、正常細胞では E1A タンパク質の発現が抑制されているのに対し、癌細胞では高い発現が認められた。OBP-301 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 に抑えられることを確認した (別紙 6A)。また、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膀胱癌、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 OBP-301 の用量依存性の抗腫瘍活性を測定し、 ID_{50} (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、OBP-301 は広範な抗腫瘍活性を有していた (別紙 6B)。

OBP-301 の正常細胞での細胞傷害性

ヒト正常線維芽細胞に対しては、OBP-301 は明らかな細胞傷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傷害活性を示した（別紙 6B）。

(2) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本試験では OBP-301 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 OBP-301 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細胞内に OBP-301 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 日目に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 OBP-301 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。

(3) OBP-301 ウイルスの生体内での増殖や体内分布

OBP-301 ウイルスの生体内での増殖や体内分布は、以下の 2 試験において検討された。OBP-301 ウイルス由来の DNA 塩基配列の体内分布及びウイルス残存量は、定量的 PCR 法により評価した。

① ヒト腫瘍細胞皮下移植担癌ヌードマウスへの OBP-301 腫瘍内単回毒性試験

OBP-301 を腫瘍内投与した場合、投与 28 日後及び 70 日後ともに、最も高い濃度のウイルス DNA が検出されたのは、OBP-301 投与部位であった。次いで、血中、腋窩リンパ節、脳、心臓で OBP-301 のウイルス DNA が検出可能であった。一部のマウスで肺、卵巣、子宮、腎臓、膀胱、大腸においてウイルス DNA が検出されたが、ほとんどのマウスでは検出限界以下であった。

② コットンラットへの OBP-301 筋肉内単回投与毒性試験

コットンラットに筋肉内投与した場合、投与部位で最も高い濃度のウイルス DNA 分布が認められ、OBP-301 投与 5 日後に定量範囲を超える濃度

(>5,000,000 VP/μg DNA) が検出されたが、投与 85 日後の測定までに急速に低下した (29,167±21,904 VP/μg DNA)。投与部位以外では、投与後 5 日目に 1000 VP/μg DNA 以上のウイルス DNA が大腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、脾臓、骨髄で検出されたが、その後時間の経過とともに低下し、たとえば大腸、肝臓、肺、リンパ節、脾臓などでは投与後 14 日で 5-10 分の 1 程度に減少した。脳及び膀胱では最も低い濃度であった。血中においてもウイルス DNA は、投与 5、14 ならびに 28 日後に検出されたが組織で検出された量以下であり、時間経過とともに減少し、85 日後には検出限界以下となった（別紙 7）。投与 85 日後までウイルス DNA が残存した組織検体を用いて OBP-301 の増殖を検討するため、免疫染色により E1A の発現を解析したところ、投与 5 日後の投与部位及び肝臓のみで陽性を示したが、投与 85 日後では、すべての臓器で陽性反応は認められなかった。

以上の所見から、OBP-301 を腫瘍内に局所投与した場合、低用量でも腫瘍内での薬物濃度は長期間保持される。一方、血中へ漏出し、非腫瘍組織に分布した場合、増殖はみられず、時間とともに減衰し全身的なウイルス暴露は少ないことが示唆された。

(4) 岡山大学における臨床試験でのウイルス排出試験結果（別紙 7）

岡山大学にて実施中の「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」において、[]までに []例の患者が臨床研究に登録、OBP-301 を投与された。本臨床研究では、本品を腫瘍内に []回投与 []し、 []から []の放射線照射の施行後、さらに []の放射線を追加照射して []とする治療レジメンが採用されている。

本臨床研究はコホート 1 []、コホート 2 []及びコホート 3 []による用量漸増試験であり、コホート 1 には []例、コホート 2 には []例、コホート 3 には []例が登録され、全例が食道癌であった。

これらの患者に対し以下の測定時点において OBP-301 投与後の []のウイルス DNA の検出を行った。

[]
[]
[]
投与後、コホート 1 [] 7 症例中 3 症例において定量限界以下の []ウイルス DNA が検出されたが、1 回目、2 回目の投与どちらの場合も、 []までに全例で消失した。コホート 2 []及びコホート 3 []症例中すべての症例において投与 []では []にウイルス DNA が検出されたが、 []にはすべての症例で検出限界以下となっていた。一方、 []ではウイルス DNA はコホート 1 からコホート 3 のすべての症例で検出されなかった。 []ではコホート 1 の []例で []に定量限界以下のウイルス DNA が検出された。

以上の所見から、OBP-301 を腫瘍内に局所投与した場合、一部 []に漏出するが、 []にウイルス DNA の排出が認められないことから、全身的なウイルス暴露が起きていないことが示された。 []にウイルス DNA が検出された患者は []が起きていた。このことから、投与時に []可能性がある場合には、注意深く観察する必要があると考えられるが、より高用量投与群であるコホート 2 及び 3 のすべての患者で検出されなかったことから、 []排出される可能性は低いと考えられる。以上より、OBP-301 を腫瘍内に局所投与した場合、環境中へ拡散する可能性は低いと考えられる。

(5) 食道癌を対象とした第 I 相臨床試験でのウイルス排出試験結果（別紙 7）

現在実施中の「標準的な治療の適用が困難な食道癌患者を対象とした OBP-301・放射

線併用療法による第 I 相臨床試験」において、[redacted]までに計 [redacted]例の患者が本臨床試験に登録、OBP-301 を投与された。本臨床試験では、岡山大学で実施中の試験と同様のレジメンを採用している。

本臨床試験はコホート 1 [redacted]及びコホート 2 [redacted]からなる用量漸増試験であり、コホート 1 には [redacted]例、コホート 2 には [redacted]例が登録され、現在コホート 2 を実施中である。採取検体及びその採取日は以下の通りである。

コホート 1

[redacted]
[redacted]
[redacted]

コホート 2

[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]

現在、コホート 1 の [redacted]例及びコホート 2 の [redacted]例について解析が終了している。[redacted]では、すべての症例で投与 [redacted]にウイルス DNA が検出されたが、投与 [redacted]には検出限界以下となっていた。[redacted]に関しては、すべての症例でウイルス DNA は検出されなかった。[redacted]に関しては、[redacted]で投与後初回の検体でウイルス DNA が検出された。

以上の所見から、食道癌に対して OBP-301 を局所投与した場合、[redacted]にウイルスは [redacted]より消失していたこと及び [redacted]からウイルス DNA が検出されなかったことから全身的なウイルス暴露が起きていないことが示された。[redacted]に検出されたウイルス DNA については、OBP-301 投与時に漏出したものと考えられ、不活化など適切な処理を行うことで環境中への拡散を抑制することができると考えられる。

6 国外における使用等により得られた情報

(1) 米国での OBP-301 の第 I 相臨床試験 (別紙 7)

米国にて各種進行固形癌を対象とした OBP-301 の第 I 相臨床試験が行われ、OBP-301 投与後の [redacted]のウイルス DNA の検出を行った。各サンプルの測定点は以下のとおりである。

[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]

[redacted]の OBP-301 を投与した場合、血中ウイルス DNA は投与後速やかに上昇した [redacted]に減少し、投

与後 までに全例で消失した。 にはウイルスは検出されておらず、 には少数例で微量なウイルスが検出されたのみであった。また、単回投与と反復投与でのウイルス排出にも大きな変化はない。

(2) 肝細胞癌を対象とした第 I 相臨床試験でのウイルス排出試験結果 (別紙 7)

現在実施中の「A Phase I Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Telomelysin (OBP-301) in Patients with Hepatocellular Carcinoma」において、 までに計 例の患者に OBP-301 が投与されている。本試験は用量漸増試験であり、コホート 1 、コホート 2 、コホート 3 、コホート 4 が腫瘍内に単回投与された。また、コホート 5 が腫瘍内へ 回投与され、現在も試験が継続中である。

これらの患者に対し、OBP-301 投与前、

のウイルス DNA の検出を行った。現在までに、コホート 1 からコホート 5 の計 例についてウイルス DNA の検出試験が完了している。

すべての症例で OBP-301 投与後の にウイルス DNA は検出されなかったことから、 からのウイルス排出の可能性は低いと考えられた。一方、 にはウイルス DNA が検出され、腫瘍内単回投与 (コホート 1~コホート 4) では、投与量依存性に ウイルス DNA 量の増加が認められた。ウイルス DNA 量は投与 30 分後にピークを示したが、投与 までに血中のウイルス DNA は検出限界以下となった。腫瘍内複数回投与 (コホート 5) では、投与 に ウイルス DNA 量がピークとなり、投与 までに消失したことから、OBP-301 は投与後に血中に移行するが、速やかにクリアランスされることが明らかとなった。

(3) 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性

OBP-301 の患者以外のヒトへの感染の可能性は極めて低いですが、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクの着用など注意を払う。米国にて実施した OBP-301 の臨床試験において、OBP-301 を投与された患者は帰宅することが可能であった。これは、高濃度の OBP-301 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を取ることで、第三者への感染がおこる可能性は極めて低いと考えられているからである。これまで米国において病院の外来で OBP-301 の投与がなされた場合に、第三者への感染が確認されたとの報告はない。

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

OBP-301 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

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限り、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

OBP-301 の感染宿主域は野生型 Ad5 と同等と考えられるので、ヒト及び一部の動物が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

OBP-301 の患者以外のヒト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限り、OBP-301 の環境中への拡散は極めて微量である。OBP-301 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 と同等である。さらに、OBP-301 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）、OBP-301 の正常細胞での細胞傷害性は乏しいことを踏まえると、OBP-301 が患者以外のヒト又は野生動植物等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

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限り、病原性に起因する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

OBP-301 の新たな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

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限り、新たな有害物質の産生性に起因する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又は微生物の特定

OBP-301 の感染宿主域は野生型 Ad5 と同等と考えられるので、ヒト及び一部の動物が影響を受ける可能性が考えられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

OBP-301 の核酸を水平伝達する性質は野生型 Ad5 と同等である。OBP-301 が第三者に水平感染する可能性は完全には否定できないが、既に行われた臨床試験ではそのような報告はなされておらず、ヒトから動物に水平感染する可能性は更に低い。Ad5 等の野生型アデノウイルスと OBP-301 が共感染した際に、新たな遺伝子組換えウイルスが出現する可能性があるが、その影響は野生型 Ad5 と同等と考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規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限り、OBP-301 の環境中への拡散は極めて微量である。OBP-301 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、OBP-301 はやがて環境中から消滅すると考えられ、水平感染及び核酸の水平伝達の可能性は極めて低いと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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限り、核酸を水平伝達する性質に起因する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

OBP-301 は、ある限られた条件下で増殖するウイルスであるが、その感染宿主域、感染経路、増殖様式は野生型 Ad5 と同等であり、新たな有害物質の産生能はない。病原性も低く、ヒト及び一部の動物を除いては、動植物に影響を与えることはない。また OBP-301 は、評価した範囲では癌細胞選択的に増殖する。

第一種使用規定に従って使用等を行う限り、OBP-301 の環境中への拡散は極力抑えられており、たとえ拡散してもその量は極めて少なく、第三者さらには動物への水平感染の可能性は低いと考えられる。従って、OBP-301 又はその核酸の一部が他の生物に伝達される可能性も極めて低い。

以上より、第一種規定に従った使用等を行う限り、他の微生物を減少させる性質、病原性、有害物質の産生性、核酸を水平伝達する性質等に基づいて、生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断される。