

様式第 1 (第 7 条関係)

第一種使用規程承認申請書

令和元年 6 月 28 日

厚生労働大臣 根本 匠 殿  
環境大臣 原田 義昭 殿

氏名 アステラス製薬株式会社  
申請者 代表取締役社長 安川 健司 印  
住所 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>VGF 遺伝子及び O1L 遺伝子並びに B5R の SCR ドメインを欠失し、ヒト IL-12 及びヒト IL-7 遺伝子を導入した弱毒化ワクシニアウイルス LC16mO 株 (ASP9801)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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。</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>本遺伝子組換え生物等の原液の保管 (1) 本遺伝子組換え生物等の原液の保管は、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>本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管 (2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設他の区画と明確に区別された作業室内で、エアロゾルの飛散を防止する方策を講じて行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。 (3) 希釈液は、容器に密封された状態で保管する。</p> <p>運搬 (4) 本遺伝子組換え生物等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>

(5) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、固形がん患者の腫瘍内に直接注入することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物等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

(6) 本遺伝子組換え生物等の投与後、投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう、注入部位を防水密閉ドレッシング材等で被覆する。被覆は、医師の判断により必要とされる期間継続する。

(7) 投与を受けた患者を、他の区画と明確に区別された一般個室（以下「個室」という。）に入室させ、投与後、本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまでの期間、患者からの本遺伝子組換え生物等を含む排泄物等の環境への放出を最小限に留めるとともに、伝播リスクを低減化するための管理（以下「個室管理」という。）を行う。医師の判断により必要に応じて期間を延長する。

(8) 個室管理の期間中にやむを得ず一時的に個室外に出る場合は、患者からの本遺伝子組換え生物等の排出が最小限となるよう対策を講じるとともに、第三者との不要な接触を避けるよう患者に適切な指導を行う。

(9) 個室管理の期間中、患者からの本遺伝子組換え生物等を含む排泄物等の環境への放出を最小限に留めるよう患者に適切な指導を行う。

(10) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が投与法毎に明らかになるまで、血液、尿、糞便又は唾液等に対し、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。

(11) 投与終了後、排出等の管理が不要となるまでの期間、患者からの本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限に留める対策を講じる。

(12) 投与終了後、排出等の管理が不要となるまでの期間に、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患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。

(13) 遺伝子組換え生物等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本遺伝子組換え生物等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

(14) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。

(15) 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、本遺伝子組換え生物等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。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された患者の検体である旨を情報提供して行う。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。

(16) 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

(17) 本遺伝子組換え生物等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) 本遺伝子組換え生物等の原液及び希釈液の廃棄は、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。

(19) 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、不活化処理を行った上で廃棄する。

(20) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等を廃棄する場合は、密封された状態で高圧蒸気滅菌により不活化処理を行い、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

ワクシニアウイルスはポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に属するウイルスであり、世界保健機構による世界痘瘡根絶宣言まで、種痘に用いるワクチンとして世界中で使用されてきた（文献1）。ワクシニアウイルスの起源は明らかではないが、ヒトにおいて継代されてきた牛痘ウイルス（ポックスウイルス科オルソポックスウイルス属）又はウシにおいて継代されてきた痘瘡ウイルス（ポックスウイルス科オルソポックスウイルス属）に由来すると考えられており、ワクシニアウイルスは人工的なウイルスであり、自然界に存在しない（文献2，文献3）。

LC16mO ΔSCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7（以下、「本遺伝子組換え生物等」）は Lister (Elstree) 株に由来する LC16mO 株を宿主とする（文献4）。LC16mO 株は Lister (Elstree) 株をウサギ腎臓細胞で継代培養することにより日本で単離された弱毒株であり、中枢神経病原性が Lister (Elstree) 株に比し大きく減弱している（別紙1，文献5）。また、LC16mO 株をさらに継代培養して単離された LC16m8 株は、天然痘によるバイオテロ対策のためのワクチンとして日本で備蓄されている（別紙1，文献1）。

## 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。）

ワクシニアウイルスは天然痘に対するワクチンとして世界中で普及し、1960年代において、ヨーロッパでは主に Lister 株、米国では NYBH 株、日本では池田株等が使用されていた（文献 6）。しかし、これらのワクチンは副反応が強く、特に神経合併症による種痘後脳炎が問題となったため、日本では Lister 株を改良した弱毒ワクチン株 LC16mO 株及び LC16m8 株が開発された（別紙 1, 文献 1, 文献 5）。1973 年から 1974 年にかけて種痘研究班に属する国内諸施設において、LC16mO 株は約 3,000 例、LC16m8 株は約 50,000 例の小児に対して接種が行われた実績がある（文献 7）。LC16m8 株は弱毒痘苗として国から認可を受けたが、定期接種としての種痘が事実上中止されたため、当時は実用には至らなかった（文献 1）。

現在、天然痘ウイルスは自然界から根絶されているため、一般には天然痘ワクチンとしてのワクシニアウイルスの使用実績はない（文献 8）。一方で、天然痘によるバイオテロ対策のためのワクチンとして日本では LC16m8 株が備蓄されており、2005 年から 2010 年には国連の平和維持活動に従事する陸上自衛隊員 268 人に LC16m8 株の接種が行われた（文献 9）。

近年、種々の遺伝子組換えワクシニアウイルスについて、悪性腫瘍に対するウイルス療法として利用されるべく、アジア及び欧米において複数の臨床試験が実施されている（文献 10～文献 16）。日本では遺伝子組換えワクシニアウイルスの臨床使用に関する報告はない。

## 3 生理学的及び生態学的特性

### (1) 基本的特性

ワクシニアウイルスは大きい粒子径、大きいゲノムサイズ及び複雑な構造を特徴とするエンベロープを有する DNA ウイルスである（文献 17）。ワクシニアウイルスのウイルス粒子は煉瓦状の形状を示し、その大きさは約 200～250 nm である（文献 3, 別紙 1）。ワクシニアウイルスは 2 つの感染性粒子（EEV と IMV）の形態が知られており、EEV（細胞外エンベロープビリオン）は二重膜（内膜と外膜）のエンベロープを有するのに対して、IMV（細胞内成熟ビリオン）は内膜のみを有する（文献 18）。内膜の内側にはウイルス DNA 及び核タンパク質から形成されるコアが存在する。ワクシニアウイルスのゲノムはおおよそ 200 kbp の二本鎖 DNA であり、ゲノムの両端にはタンデムに並んだいくつもの反復配列を有するヘアピンループが存在する（文献 3, 別紙 2）。

### (2) 生育又は生育可能な環境の条件

ワクシニアウイルスはヒトに感染し、増殖することができる。また、実験室内において、マウス、ウサギ等のげっ歯類、及びサル等にワクシニアウイルスを感染させることができる。培養細胞では、ヒトを含む上記の哺乳動物由来の細胞株、ニワトリ胎児初代培養細胞等でワクシニアウイルスを効率的に増殖させることができる。ワクシニアウイルスは種痘として世界中で使われていたにもかかわらず、現在自然界に存在しないことから、外界においては不安定であると考えら

れる。

### (3) 捕食性又は寄生性

捕食性は無い。ワクシニアウイルスはヒト以外に、げっ歯類，サル等の哺乳動物に感染することが知られている。

### (4) 繁殖又は増殖の様式

ワクシニアウイルスは注射，あるいは種痘と同様の接種方法により，ヒトに感染させることができる。ワクシニアウイルスの受容体は明らかにされていないが，細胞表面のグリコサミノグリカン，ラミニン等複数あると考えられている（文献 18）。ビリオンはエンドサイトーシスあるいは膜融合によって細胞内に侵入し，ウイルスのコアが細胞質内に放出される（別紙 1）。ウイルスのコアにはウイルスゲノム DNA に加えて複数の転写因子や酵素が組み込まれており，これらによってウイルスゲノムの転写と複製が行われる（文献 19，別紙 1）。ワクシニアウイルスのゲノムが感染細胞の核内に移行することはないため，ワクシニアウイルスゲノムが感染細胞のゲノムに挿入される可能性は無い（文献 20）。

ワクシニアウイルスのコア形成は細胞質内で起こる。EEV はエキソサイトーシスによって細胞から放出される際に外膜を獲得し，IMV は細胞破壊の際に放出される。

### (5) 病原性

ワクシニアウイルスの発がん性は報告されていない。ワクシニアウイルスは天然痘に対する生ウイルスワクチンとして用いられ，一般に健常人では無症候性であるが，軽度の発疹及び発熱を引き起こすことがある。湿疹を有する小児に感染した場合に種痘性湿疹が起こることがあるが，致死的になるのは稀である。その他に，稀ではあるが，より重症な副反応として進行性種痘疹及び種痘後脳炎が知られており，前者は免疫に欠陥のある小児にのみ起こる（文献 17）。天然痘ワクチンの副反应对策として，現在，流通している静注グロブリンを標準量として 4～6 本投与することが理論的に有効であるとされている（文献 8）。日本において，1973 年から 1974 年にかけて約 50,000 例の小児に対して LC16m8 株の接種が行われており，問題となる副反応は認められなかったことが報告されている（文献 7）。詳細な臨床的観察が実施された 10,578 例において，種痘後 4～14 日の間の発熱率は 7.7% であり，種痘性湿疹 1 例，自己接種 9 例，種痘疹 8 例，一過性の良性熱性痙攣 3 例が認められたが，いずれも軽症であった。また，2005 年から 2010 年にかけて自衛隊員 268 例に対して LC16m8 株の接種が行われており，重篤な副反応は認められず，全身反応として，腋窩リンパ節腫脹 52 例，発熱 4 例，倦怠感 2 例，発疹 1 例等が認められたことが報告されている（文献 9）。

ワクシニアウイルス接種者から，重篤な湿疹かつ発育不全の既往歴を有する小児へ家庭内感染し，小児が種痘性湿疹を発症した例が米国において報告されている（文献 21）。また，妊娠状態にある母親にワクシニアウイルスを接種した場合，ワクシニアウイルスが胎児へ垂直感染するリ

スクが有ることが報告されている（文献 22）。妊娠状態にある母親に対するワクシニアウイルス接種と催奇形性については相関が無いことが報告されている（文献 22）。

#### (6) 有害物質の産生性

ワクシニアウイルスの粒子自体及びそのゲノムにコードされるタンパク質に、有害物質を産生する活性はない。

#### (7) その他の情報（不活化条件等を含む。）

ワクシニアウイルスはエンベロップを有するウイルスであるため、界面活性剤、アルコール等のエンベロップ脂質を溶かす消毒剤に対して感受性が高い。器械に対しては2%～3.5%グルタラルや0.55%フタラルへの30分間浸漬、0.3%過酢酸への10分間浸漬等、環境に対してはアルコール（消毒用エタノール、70v/v%イソプロパノール）や0.5%（5,000ppm）次亜塩素酸ナトリウムでの清拭により消毒することができる。また、オートクレーブ処理、80°C・10分間の熱水や蒸気による処理等が有効である（文献 23）。

## 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

ワクシニアウイルス LC16mO 株ゲノム内の vaccinia virus growth factor (VGF) 遺伝子領域に、合成ワクシニアウイルスプロモーター配列（文献 24）、及びプロモーターに作動可能に連結されたヒトインターロイキン (IL) -12 をコードする遺伝子が挿入されている。ヒト IL-12 をコードする遺伝子はヒト IL-12 サブユニット p40 をコードする遺伝子及びヒト IL-12 サブユニット  $\alpha$  をコードする遺伝子より構成され、両者は内部リボソーム導入部位 (IRES) 配列により連結されている。また、ウイルスゲノム内 O1L 遺伝子領域に、同じく合成ワクシニアウイルスプロモーター配列、及びプロモーターに作動可能に連結されたヒト IL-7 をコードする遺伝子が挿入されている。これにより VGF 及び O1L は機能欠損している。さらに、B5R をコードする遺伝子の一部が改変されており、これにより完全長の B5R に代わって改変 B5R が産生される。これら供与核酸の由来と詳細は以下のとおりであり、それぞれの塩基配列については別紙 2 及び別紙 3 に記載する。

##### ① ヒト IL-12 をコードする遺伝子

合成ワクシニアウイルスプロモーターの下流に、人工合成されたヒト IL-12 サブユニット p40 遺伝子の open reading frame (ORF) が連結されている。その直下に、人工合成された IRES 配列が連結され、さらにその直下に、人工合成されたヒト IL-12 サブユニット  $\alpha$  遺伝子の ORF が連結されている（別紙 2）。

##### ② IRES 配列

上述のとおり、ヒト IL-12 サブユニット p40 遺伝子の ORF とヒト IL-12 サブユニット  $\alpha$  遺伝子の ORF を連結する（別紙 2）。脳心筋炎ウイルスの 5'末端側の非コード領域に存在する配列であり、遺伝子工学において汎用される。

③ ヒト IL-7 をコードする遺伝子

合成ワクシニアウイルスプロモーターの下流に、人工合成したヒト IL-7 遺伝子の ORF が連結されている（別紙 2）。

④ 改変 B5R をコードする遺伝子

ウイルスゲノム上の B5R 遺伝子が直接改変されており、SCR ドメインと呼ばれる領域をコードする遺伝子配列が欠失している（別紙 2）。

なお、以下の遺伝子は宿主と比較し欠失している。

VGF をコードする遺伝子の機能欠損

VGF をコードする遺伝子の ORF がヒト IL-12 をコードする遺伝子の挿入により分断されており、機能欠損している（別紙 3）。

O1L をコードする遺伝子の機能欠損

O1L をコードする遺伝子の ORF がヒト IL-7 をコードする遺伝子の挿入により分断されており、機能欠損している（別紙 3）。

(2) **構成要素の機能**

① ヒト IL-12

ヒト IL-12 サブユニット p40 及びヒト IL-12 サブユニット  $\alpha$  によって構成されるヘテロダイマーとして機能する。IL-12 は T 細胞やナチュラルキラー（NK）細胞を活性化、分化誘導する機能を有する（文献 25）。

② IRES 配列

IRES 配列の直下に連結された遺伝子は、IRES 配列の上流に連結された遺伝子を作動するプロモーターによって作動される。本遺伝子組換え生物等においては、IRES 配列の直下に連結されたヒト IL-12 サブユニット  $\alpha$  遺伝子が、IRES 配列の上流に連結されたヒト IL-12 サブユニット p40 遺伝子を作動する合成ワクシニアウイルスプロモーターによって作動される。IRES 配列に病原性は関与しない。

③ ヒト IL-7

IL-7 は T 細胞や B 細胞の生存、増殖及び分化に寄与する（文献 26）。また、IL-7 が IL-12 と協働して T 細胞を活性化することが知られている（文献 27）。

④ 改変 B5R

ワクシニアウイルス粒子の一形態である EEV の表面には、SCR ドメインを欠失した改変 B5R タンパクが EEV の脂質二重膜を貫通する形で存在する。SCR ドメインは本来 EEV の外側に露出し、抗ワクシニアウイルス抗体が認識するエピトープを含むため、SCR ドメインを欠失した改変 B5R タンパクを有する EEV は抗ワクシニアウイルス抗体に対して耐性が高い（文



献 28)。

なお、以下の遺伝子は宿主と比較し欠失している。

#### VGF (機能欠損)

ウイルスが感染した細胞において分泌され、上皮増殖因子受容体に結合して細胞分裂を促進する (文献 29, 文献 30)。正常細胞において、VGF を欠損させた変異株のウイルス複製能は著しく低下することが報告されている (文献 31)。

#### O1L (機能欠損)

ウイルス感染細胞の細胞分裂に寄与する (文献 32)。正常細胞において、VGF 遺伝子及び O1L 遺伝子の両方を欠損させた変異株は、VGF 欠損変異株と比較してさらに複製能力が低下することが知られている (文献 33)。

ヒト IL-12 サブユニット p40, ヒト IL-12 サブユニット  $\alpha$ , ヒト IL-7 及び改変 B5R のアミノ酸配列については別紙 2 に記載する。これらの供与核酸の移入の結果、本遺伝子組換え生物等の感染性が LC16mO 株から変わることはないと考えられる。VGF 及び O1L の本来の機能及び機能欠損の意義の詳細については、「6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違」の項に記載した。

## 2 ベクターに関する情報

### (1) 名称及び由来

該当なし

### (2) 特性

該当なし

## 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

LC16mO 株の VGF 遺伝子領域にヒト IL-12 をコードする遺伝子が挿入され、O1L 遺伝子領域にヒト IL-7 をコードする遺伝子が挿入されている。さらに、B5R 遺伝子が改変されている。宿主に移入された各供与核酸の塩基配列は別紙 2 に記載した。

### (2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

#### 遺伝子組換えワクシニアウイルス LC16mO VGF-SP-LucGFP/O1L-p7.5-DsRed の調製

宿主 LC16mO 株から遺伝子組換えウイルス LC16mO VGF-SP-LucGFP/O1L-p7.5-DsRed を作製した (文献 33)。本ウイルスの全ゲノム配列は別紙 3 に記載した。このウイルスは VGF 及び O1L の機能を欠損し、VGF 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結された LucGFP 遺伝子が挿入され、O1L 遺伝子領域には p7.5k プロモーターに連結された DsRed 遺伝子

が挿入されている。

#### 本遺伝子組換え生物等の構築に用いたプラスミド

本遺伝子組換え生物等の構築を目的として以下のプラスミドを用いた（文献4，別紙3）。

- ① pUC19-O1L  
ワクシニアウイルス O1L 遺伝子を含有する pUC19 プラスミド
- ② pUC19-VGF  
ワクシニアウイルス VGF 遺伝子を含有する pUC19 プラスミド
- ③ pTN-O1L-SP-BFP  
pUC19-O1L の XbaI 制限酵素サイトに，合成ワクシニアウイルスプロモーターとそれに連結された BFP 遺伝子が挿入されたプラスミド
- ④ pB5R  
ワクシニアウイルス B4R， B5R 及び B6R 遺伝子を含有する pCRII プラスミド
- ⑤ pTN-DsRed(B5R-)  
pB5R プラスミドの B5R 遺伝子が DsRed 遺伝子に置き換わったプラスミド
- ⑥ pTN-B5R $\Delta$ 1-4  
pB5R プラスミドの B5R 遺伝子に代わり，SCR ドメインを欠失する改変 B5R をコードする遺伝子が挿入されたプラスミド
- ⑦ pTN-VGF-P-DsRed  
pUC19-VGF プラスミドの AccI 制限酵素サイトに，p7.5k プロモーターとそれに連結された DsRed 遺伝子が挿入されたプラスミド
- ⑧ pTN-VGF-SP-IL12  
pUC19-VGF プラスミドの AccI 制限酵素サイトに，合成ワクシニアウイルスプロモーター及びそれに連結されたヒト IL-12 遺伝子が挿入されたプラスミド
- ⑨ pTN-O1L-SP-IL7  
pUC19-O1L の XbaI 制限酵素サイトに，合成ワクシニアウイルスプロモーター及びそれに連結されたヒト IL-7 遺伝子が挿入されたプラスミド

#### 本遺伝子組換え生物等の構築過程

LC16mO VGF-SP-LucGFP/O1L-p7.5-DsRed 及び pTN-O1L-SP-BFP プラスミドとの RK13 細胞における相同組換えにより，LC16mO VGF-SP-LucGFP/O1L-SP-BFP を得た。このウイルスは VGF 及び O1L の機能を欠損し，VGF 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結された LucGFP 遺伝子が挿入され，O1L 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結された BFP 遺伝子が挿入されている。

LC16mO VGF-SP-LucGFP/O1L- SP-BFP 及び pTN-DsRed(B5R-)プラスミドとの RK13 細胞における相同組換えにより，LC16mO  $\Delta$ -DsRed VGF-SP-LucGFP/O1L-SP-BFP を得た。このウイルスは VGF 及び O1L の機能を欠損し，VGF 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結され

た LucGFP 遺伝子が挿入され、O1L 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結された BFP 遺伝子が挿入されている。さらに B5R 遺伝子が DsRed 遺伝子に置き換わっている。

LC16mO Δ-DsRed VGF-SP-LucGFP/O1L-SP-BFP 及び pTN-B5RΔ1-4 プラスミドとの RK13 細胞における相同組換えにより、LC16mO ΔSCR VGF-SP-LucGFP/O1L-SP-BFP を得た。このウイルスは VGF 及び O1L の機能を欠損し、VGF 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結された LucGFP 遺伝子が挿入され、O1L 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結された BFP 遺伝子が挿入され、さらに B5R 遺伝子が改変 B5R 遺伝子に置き換わっている。

LC16mO ΔSCR VGF-SP-LucGFP/O1L-SP-BFP 及び pTN-VGF-P-DsRed プラスミドとの RK13 細胞における相同組換えにより、LC16mO ΔSCR VGF-p7.5-DsRed/O1L-SP-BFP を得た。このウイルスは VGF 及び O1L の機能を欠損し、VGF 遺伝子領域には p7.5k プロモーターに連結された DsRed 遺伝子が挿入され、O1L 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結された BFP 遺伝子が挿入され、さらに B5R 遺伝子が改変 B5R 遺伝子に置き換わっている。

LC16mO ΔSCR VGF-p7.5-DsRed/O1L-SP-BFP 及び pTN-VGF-SP-IL12 プラスミドとの RK13 細胞における相同組換えにより、LC16mO ΔSCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-BFP を得た。このウイルスは VGF 及び O1L の機能を欠損し、VGF 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結されたヒト IL-12 遺伝子が挿入され、O1L 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結された BFP 遺伝子が挿入され、さらに B5R 遺伝子が改変 B5R 遺伝子に置き換わっている。

LC16mO ΔSCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-BFP 及び pTN-O1L-SP-IL7 プラスミドとの CV-1 細胞における相同組換え、及び BS-C-1 細胞におけるプラーク純化を経て LC16mO ΔSCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7 (本遺伝子組換え生物等) を得た。上記の構築過程について別紙 4 に図示した。このウイルスは VGF 及び O1L の機能を欠損し、VGF 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結されたヒト IL-12 遺伝子が挿入され、O1L 遺伝子領域には合成ワクシニアウイルスプロモーターに連結されたヒト IL-7 遺伝子が挿入され、さらに B5R 遺伝子が改変 B5R 遺伝子に置き換わっている (文献 4)。

### (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

宿主細胞を拡張培養し、マスターセルバンクを製造する。マスターセルバンクを拡張培養し、本遺伝子組換え生物を感染させ、増殖して産生された本遺伝子組換え生物をマスターウイルスバンクとする。マスターウイルスバンクに対して別紙 5 表 (1) に記載の品質試験を実施する。

マスターセルバンクを解凍し、培養して増殖させる。十分な細胞数が得られたら、細胞をマスターウイルスバンクに感染させる。感染させた細胞中でウイルスを増殖させる。感染させた細胞から細胞内のウイルスを採取する。その後、採取したウイルス液を清澄化する。当該清澄化バルクを精製する。精製バルクをボトルに充てんし、凍結する (別紙 5)。その後、精製バルクを融解し必要濃度まで無菌的に希釈しバイアル等の密封容器に充填する。品質管理の詳細は別紙 5 に示した。

本遺伝子組換え生物等は、ゲノムの互いに離れた 3 カ所 (VGF 遺伝子領域、O1L 遺伝子領域及

び B5R 遺伝子領域) に遺伝子組換え操作が加えられていること、及び製造において遺伝子組換えにより欠損した機能を補うためのヘルパープラスミド等を用いる必要がないことから、製造過程において組換えが起こり、宿主に復する、あるいは新たな遺伝子組換えウイルスが生じる可能性はない。

#### 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

本遺伝子組換え生物等に移入及び欠失させた核酸はワクシニアウイルスの二本鎖 DNA ゲノムの一部として存在し、凍結保管下において安定に保存される。本遺伝子組換え生物等が感染する動物種及び感染様式が凍結保管中に変化することは無い。

本遺伝子組換え生物等が細胞に感染すると、本遺伝子組換え生物等のゲノムは細胞質内に放出され、ウイルスコアに組み込まれている転写因子や酵素によって転写が開始され、ウイルスの複製が起こり、並行して感染細胞内にヒト IL-7、ヒト IL-12 及び改変 B5R が発現する。ワクシニアウイルスの複製は感染した細胞の細胞質内で起こり、ワクシニアウイルスゲノムが感染細胞の核内に移行することは無いため、ワクシニアウイルスゲノムが感染細胞のゲノムに挿入される可能性は無い。

本遺伝子組換え生物等は感受性を有する増殖中の培養細胞やヒト体内の腫瘍細胞において選択的に複製される(「6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違」の項に詳述)。

本遺伝子組換え生物等はワクシニアウイルスゲノムの互いに離れた 3 カ所 (VGF 遺伝子領域、O1L 遺伝子領域及び B5R 遺伝子領域) に遺伝子組換え操作が加えられているため、組換えにより自然に宿主のワクシニアウイルスに復する可能性は極めて低い。

#### 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

ワクシニアウイルスの表面上に存在する [REDACTED] である [REDACTED] をコードする DNA の一部を認識するプライマー及び蛍光標識プローブを用いた定量的 PCR にて定量する方法で本遺伝子組換え生物等を検出する。前述のとおりワクシニアウイルスは自然界には存在しないと考えられており、また、ワクシニアウイルスゲノムが感染細胞のゲノムに挿入される可能性は無いため(文献 20)、本検出法により本遺伝子組換え生物等を特異的に検出することができる。ヒトにおける検出方法の詳細を別紙 6 に示した。 [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] から DNA 抽出キットを用いて抽出した DNA 溶液を測定することにより [REDACTED] の DNA あたり [REDACTED] のワクシニアウイルスを検出することができる。

#### 6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

本遺伝子組換え生物等と宿主である LC16mO との間には以下の相違点がある。

##### (1) VGF 遺伝子及び O1L 遺伝子の有無による相違

本遺伝子組換え生物等は LC16mO 株とは異なり、感染細胞において VGF 遺伝子及び O1L 遺伝

子にコードされているタンパク質を発現することができない。VGF は上皮増殖因子 (EGF) と高いアミノ酸配列相同性を有するタンパク質であり、EGF と同様に上皮増殖因子受容体に結合し、Raf, MAPK, ERK と続く細胞内シグナルカスケードの活性化を引き起こし、細胞分裂を促進する (文献 29, 文献 30)。VGF は正常細胞におけるワクシニアウイルスの複製に重要な分子であり、これを欠損させた変異株のウイルス複製能は著しく低下することが報告されている (文献 31)。O1L は ERK の活性化を維持し (文献 32)、VGF とともに細胞の分裂に寄与する分子である。VGF 遺伝子及び O1L 遺伝子の両方を欠損させた変異株は、LC16mO 株又は VGF 欠損変異株と比較してさらに複製能力が低下することが知られている (文献 33)。一方、腫瘍細胞では、正常細胞とは異なり、普遍的に細胞増殖シグナルが活性化状態にあるため、VGF 遺伝子及び O1L 遺伝子の両方を欠損したワクシニアウイルスでも複製可能となると考えられている。したがって、VGF 遺伝子及び O1L 遺伝子を欠損したワクシニアウイルス株 MD-RVV は腫瘍細胞において選択的に複製が可能となる (文献 33)。この性質は本遺伝子組換え生物等においても保持されており、*in vitro* において、本遺伝子組換え生物等はヒト正常細胞に比べて、ヒトがん細胞において著しく増殖する (別紙 7)。

## (2) B5R の SCR ドメインの有無による相違

本遺伝子組換え生物等の EEV は、LC16mO 株とは異なり、SCR ドメインを欠失した B5R タンパクを表面に提示する。SCR ドメインが提示されないという点は、B5R タンパクが欠失した LC16m8 株と同じである。ワクシニアウイルス接種経験者が保持する抗ワクシニアウイルス既存抗体は SCR ドメインを主たるエピトープとして EEV を認識することが知られているため (文献 28)、本遺伝子組換え生物等の EEV は LC16mO 株の EEV と比べて既存抗体に対する免疫回避能が向上し、既存抗体を有する患者に投与した場合に、EEV による薬効が抗体により減弱するのを回避できることが期待される。B5R が正常な EEV に比べて SCR ドメインを欠失した B5R を有する EEV は、抗ワクシニアウイルス抗体存在下において免疫不全マウスの生体内での維持が長いことが示されている (文献 34)。既存抗体を有さない生体においては、SCR ドメイン欠失 EEV と B5R 正常 EEV との間に体内動態の差は無い (文献 34)。また、本遺伝子組換え生物等の EEV の病原性、抗原性、体内動態は LC16m8 株の EEV と同様と想定される。

一方で、B5R は EEV に特異的なタンパクであり IMV には存在しないため (文献 28)、SCR ドメインの欠損は IMV の病原性や抗原性には影響しない。感染性ウイルス粒子の大部分は IMV であって EEV は 1%程度であることが知られており (文献 35)、SCR ドメイン欠失は感染性ウイルス粒子全体としての感染細胞におけるがん細胞傷害能に影響しない (文献 34)。また、IMV と EEV の数的バランスから抗ワクシニアウイルス抗体には IMV に対する抗体も多く含まれると考察され、SCR ドメイン欠失ウイルスの IMV が B5R 正常ウイルスの IMV と同程度に抗ワクシニアウイルス抗体によって中和されることも報告されている (文献 34)。このことから、SCR ドメインの欠損は IMV の体内動態にも影響しないと考えられる。

## (3) ヒト IL-12 遺伝子及びヒト IL-7 遺伝子の有無による相違

本遺伝子組換え生物等は LC16mO 株とは異なり、感染細胞においてヒト IL-12 タンパク及びヒ

ト IL-7 タンパクを産生する。本遺伝子組換え生物等は腫瘍細胞においてこれらのサイトカイン産生を介して抗腫瘍免疫を亢進し、抗腫瘍効果に寄与する（文献 4）。

### 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

##### 本遺伝子組換え生物等の原液の保管

- (1) 本遺伝子組換え生物等の原液の保管は、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。

##### 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管

- (2) 本遺伝子組換え生物等の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、エアロゾルの飛散を防止する方策を講じて行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。
- (3) 希釈液は、容器に密封された状態で保管する。

##### 運搬

- (4) 本遺伝子組換え生物等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

- (5) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、固形がん患者の腫瘍内に直接注入することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物等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

- (6) 本遺伝子組換え生物等の投与後、投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう、注入部位を防水密閉ドレッシング材等で被覆する。被覆は、医師の判断により必要とされる期間継続する。
- (7) 投与を受けた患者を、他の区画と明確に区別された一般個室（以下「個室」という。）に入室させ、投与後、本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまでの期間、患者からの本遺伝子組換え生物等を含む排泄物等の環境への放出を最小限に留めるとともに、伝播リスクを低減化するための管理（以下「個室管理」という。）を行う。医師の判断により必要に

応じて期間を延長する。

- (8) 個室管理の期間中にやむを得ず一時的に個室外に出る場合は、患者からの本遺伝子組換え生物等の排出が最小限となるよう対策を講じるとともに、第三者との不要な接触を避けるよう患者に適切な指導を行う。
- (9) 個室管理の期間中、患者からの本遺伝子組換え生物等を含む排泄物等の環境への放出を最小限に留めるよう患者に適切な指導を行う。
- (10) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が投与法毎に明らかになるまで、血液、尿、糞便又は唾液等に対し、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。
- (11) 投与終了後、排出等の管理が不要となるまでの期間、患者からの本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限に留める対策を講じる。
- (12) 投与終了後、排出等の管理が不要となるまでの期間に、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患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (13) 遺伝子組換え生物等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本遺伝子組換え生物等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

- (14) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (15) 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、本遺伝子組換え生物等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。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された患者の検体である旨を情報提供して行う。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (16) 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

- (17) 本遺伝子組換え生物等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) 本遺伝子組換え生物等の原液及び希釈液の廃棄は、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。
- (19) 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、不活化処理を行った上で廃棄する。
- (20) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等を廃棄する場合は、密封された状態

で高圧蒸気滅菌により不活化処理を行い、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

患者への投与後、患者の血液及び唾液（又は口腔粘膜）等を採取する。これら検体を対象に、ワクシニアウイルスの表面上に存在する[ ]である[ ]をコードする DNA の一部を認識するプライマー及び蛍光標識プローブを用いた定量的 PCR 法により本品の排出の有無を検出する。

なお、本品の体外排出の情報収集は一定期間、検出が認められなくなるまで継続的に実施する。国内第 I 相試験において検体を採取する時期については別紙 8 に記載した。

実施予定のウイルス排出試験については別紙 6 に記載した。

### 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

本品を投与した患者は、可能な限り、免疫力の低下した者、湿疹のある者及び妊婦への接触を避ける。

天然痘ワクチンの副反応対策として、現在流通している静注グロブリンを標準量として 4～6 本投与することが理論的に有効であるとされている（文献 8）。また、抗 DNA ウイルス剤であるシドフォビルが有効であると考えられている（文献 8）。米国においてはワクシニアウイルス感染症に対してシドフォビルの有効例、抗ワクシニアウイルス静注グロブリンの有効例が報告されている（文献 21）。また、抗 DNA ウイルス剤であるアシクロビルの有効例も報告されている（文献 36）。静注グロブリン及び抗ワクシニアウイルス静注グロブリンはポリクローナルな抗体の集団であり、SCR ドメインに対する抗体に限らず IMV 及び EEV 表面上の様々な抗原に対する抗体が含まれる。したがって、上記静注グロブリンは本遺伝子組換え生物等に対し、感染性ウイルス粒子の大部分を占める IMV に対してはその表面抗原を標的として中和し、さらには EEV に対しては SCR ドメイン以外の EEV 表面抗原を標的として中和できると考えられる。シドフォビル及びアシクロビルは DNA 合成阻害により、本遺伝子組換え生物等の増殖を抑制すると考えられる。したがって、本遺伝子組換え生物等による天然痘ワクチンの副反応様の症状が認められた場合は、上記の薬剤の使用を検討する。

### 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

本遺伝子組換え生物等に搭載されているヒト IL-7 遺伝子がコードするヒト IL-7 タンパクは、マウスの免疫細胞に対して活性を有することが知られている。一方で、ヒト IL-12 遺伝子がコードするヒト IL-12 タンパクは、マウスの免疫細胞に対して活性を有しないことが知られている。このため、[ ]を用いる一部の非臨床試験では、[ ] [ ] [ ]





の hGM-CSF の発現が認められた。さらに、投与後 15～36 日の血中において、遅延性に JX-594 ゲノムが検出されたことから、腫瘍内での JX-594 ゲノムの複製及び全身循環への漏出が示唆された（文献 12）。2010 年より韓国で実施された第 1 相試験において、15 例の直腸がん患者に JX-594 が 14 日毎に反復静脈内投与された。当該試験において、尿中における JX-594 の排出は検出されなかったものの、低用量群に割り付けられた 6 例の患者のうち 1 例、及び高用量群に割り付けられた 9 例の患者のうち 5 例において、投与後 5～8 日の咽頭スワブにおいて排出が検出された。高用量群で咽頭スワブにおいて排出が検出された患者のいずれも、口腔又は口唇に膿疱が認められた（文献 13）。2007 年より米国で実施された第 1/2 相臨床試験において、10 例の黒色腫患者に JX-594 が毎週反復腫瘍内投与された。当該試験において、6 例において投与後 15 分の血中に JX-594 が検出されたが、投与後 3 時間の血中では 1 例のみで検出された。その後、5 例の患者における投与後 5～7 日時点の血中において、遅延性に JX-594 が再検出されたが、これらの患者で著しい有害事象は認められなかった（文献 14）。

JX-929 は、ワクシニアウイルス Western Reserve 株を宿主とし、TK 及び VGF をコードする遺伝子を欠失させ、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のシトシン脱アミノ酵素をコードする FCY1 遺伝子を発現させた遺伝子組換えウイルス剤である。本ウイルスを用いて、北米で第 1 相臨床試験が実施され、10 例の結腸がん患者、4 例の乳がん患者、2 例の膵臓がん患者及び 1 例の黒色腫患者に JX-929 が単回腫瘍内投与された。当該試験において、9 例において投与後 15 分、30 分、及び 4 時間の血清中において、用量依存的に JX-929 ゲノムが検出された。投与後 1 日、3 日、8 日、15 日、22 日の尿中及び唾液中において、排出は検出されなかった（文献 15）。

GL-ONC1 は、ワクシニアウイルス Lister 株を宿主とし、F14.5L, J2R, A56R 遺伝子領域にそれぞれ、*Renilla* ルシフェラーゼ—*Aequorea* 緑色蛍光タンパク質融合体 (RUC-GFP),  $\beta$ -ガラクトシダーゼ及び  $\beta$ -グルクロニダーゼの 3 つの遺伝子をコードする発現カセットを挿入した遺伝子組換えウイルス剤である。本ウイルスを用いて、2012 年より米国において第 1 臨床試験を実施しており、10 例の局所進行頭頸部がん患者に GL-ONC1 が単回又は反復静脈内投与（最大で 3 日、8 日、15 日、22 日）された。投与後 1～2 日に採取した尿及び口腔スワブにおいて、GL-ONC1 の排出は検出されなかった。また、2 例においてウイルス陽性の皮疹の発現が確認された（文献 16）。

PROSTVAC-VF 及び Pexa-Vec (JX-594) の宿主である Wyeth 株 (NYBH 株) や GL-ONC1 の宿主である Lister 株に比べ、本遺伝子組換え生物等の宿主 LC16mO 株は病原性が低いため（別紙 1）、国外で報告されている上記有害事象よりも重篤な事象が、本遺伝子組換え生物等の臨床試験において生じる可能性は低いと推察される。

## 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

本遺伝子組換え生物等の親株にあたる LC16mO 株やその元株である Lister 株のワクシニアウイルスが微生物に感染するとの報告はなく、本遺伝子組換え生物等についても同様に感染しないと考えられる。また、競合及び有害物質の産生により他の微生物を減少させることも無いと考えられる。したがって、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

以上より、他の微生物を減少させる性質について、本遺伝子組換え生物等の第一種使用規程に従って使用等を行う限り、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

本遺伝子組換え生物等は、宿主である LC16mO 株やその元株と同様に、ヒト及びマウス、ウサギ、サル等の動物に感染させることができるため、ヒトを含む複数の哺乳類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

ワクシニアウイルスを接種した後の副反応として、軽度の発疹・発熱、湿疹を有する小児における種痘性湿疹、免疫機能に欠陥のある小児における進行性種痘疹等が報告されている（文献 17）。本遺伝子組換え生物等の親株に該当する LC16mO 株については、1973 年から 1974 年にかけて国内諸施設において約 3,000 例の小児に対して接種が行われた実績があり、問題となる副反応は認められなかったことが報告されている（文献 7）。また、宿主に由来するワクチン株である LC16m8 株については、国内の約 50,000 例の小児に対して接種が行われた実績があり、うち経過観察を受けた 10,578 例において、種痘後発熱、種痘性湿疹、自己接種、種痘疹及び一過性の良性熱性痙攣が数例認められたが、いずれも軽症であった（文献 7）。本遺伝子組み換え生物等においては B5R タンパクの SCR ドメインが欠失しているが、この欠失は感染性粒子の主成分である IMV の病原性や抗原性には影響せず、EEV においても SCR ドメインが提示されないことは LC16m8 株と同じであることから、SCR ドメイン欠損による影響は宿主である LC16mO 株及び宿主に由来する LC16m8 株と同程度と考えられる。さらに、本遺伝子組換え生物等は腫瘍細胞において選択的に複製するため（別紙 7）、正常組織に対しては病原性が極めて低いと考えられる。

アジア及び欧米において、悪性腫瘍に対するウイルス療法として、腫瘍細胞選択的に複製する

ように設計された遺伝子組換えワクシニアウイルスを用いた臨床試験が複数完了又は進行中である。各種がん患者における Pexa-Vec (JX-594) 及び GL-ONC1 の忍容性が報告されており、一部のがん患者においては膿疱や皮疹の発現が報告されている (文献 11～文献 16)。本遺伝子組換え生物等を投与した患者において膿疱や皮疹が発現した場合、膿疱や皮疹、又は体液を介して、本遺伝子組換え生物等が医療従事者、同居家族等へ水平感染する可能性は否定できない。また、本遺伝子組換え生物等が免疫不全状態にある第三者に感染した場合、過去に種痘後副反応として報告されたような進行性種痘疹等が発現する可能性は否定できない。

妊娠状態にある母親がワクシニアウイルスに感染した場合、胎児へ垂直感染するリスクが有ることが報告されている (文献 22)。なお、本遺伝子組換え生物等の宿主である LC16mO 株、及び LC16m8 株に関しては垂直感染の報告は無い。妊娠状態にある母親に対するワクチン接種と催奇形性については相関が無いとする報告がある (文献 22)。

本遺伝子組換え生物等が感染した動物がオルソポックスウイルス属に属する他のウイルスにも同時に感染している場合、もしも相同組換えが起こった場合は、新たな別の遺伝子組換え生物等が生じ、病原性を示す可能性は否定できない。

### (3) 影響の生じやすさの評価

ワクシニアウイルスは種痘として世界中で使われていたにもかかわらず、現在自然界に存在しないことから、外界においては不安定であると考えられる。さらに本遺伝子組換え生物等は腫瘍細胞において選択的に複製が可能であることから (別紙 7)、本遺伝子組換え生物等の外界での生存性はさらに低いと考えられる。したがって、正常な免疫機能を有し腫瘍組織を有さない第三者や動物に感染したとしても、本遺伝子組換え生物等が病原性を示す可能性は極めて低いと考えられる。本遺伝子組換え生物及び ██████████ について、██████████ における生体内分布及び排出評価等を実施しており、それぞれの試験結果については別紙 6 に記載した。

オルソポックスウイルス属に属するウイルスとしてワクシニアウイルスの他に痘瘡ウイルス、サルポックスウイルス、牛痘ウイルス等が知られているが、現在、日本において存在は検出されおらず、本遺伝子組換え生物等と他のオルソポックスウイルスとが動物において共存する可能性は低く、もしも共存したとしても、そもそも相同組換えが起こる確率は非常に低いため、新たな別の遺伝子組換え生物等が生じる可能性はほとんど無い。

### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、病原性について、本遺伝子組換え生物等の第一種使用規程に従って使用等を行う限り、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

### 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

本遺伝子組換え生物等は、宿主である LC16mO 株やその元株と同様に、ヒト及びマウス、ウサギ、サル等の動物に感染させることができるため、ヒトを含む複数の哺乳類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

本遺伝子組換え生物等が細胞に感染すると、本遺伝子組換え生物等のウイルスゲノムに組み込まれた供与核酸が転写され、ヒト IL-12 (ヒト IL-12 サブユニット p40 及びヒト IL-12 サブユニット  $\alpha$  によって構成されるヘテロダイマー)、及びヒト IL-7 が産生される。また、B5R に代わり改変 B5R が産生される。

IL-12 は T 細胞や NK 細胞を活性化する機能を有し、IL-7 は T 細胞や B 細胞の生存・維持に寄与することが知られている (文献 25, 文献 26)。IL-7 は IL-12 による T 細胞の活性化を促進することも知られている (文献 27)。IL-7 及び IL-12 は免疫活性化に寄与するが、免疫反応の過度な活性化により自己免疫性の重篤な有害事象が生じる可能性がある。

改変 B5R については有害性に関する報告は無い。

#### (3) 影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換え生物等は腫瘍細胞において選択的に複製するため (別紙 7)、高濃度の IL-7 や IL-12 が長期間全身に貯留し、正常組織において長期的に自己免疫性の炎症反応をもたらす可能性は極めて低いと考えられる。本遺伝子組換え生物及び ██████████ について、██████████ における生体内分布及び排出評価等を実施しており、それぞれの試験結果については別紙 6 に記載した。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、有害物質の産生性について、本遺伝子組換え生物等の第一種使用規程に従って使用等を行う限り、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

### 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

本遺伝子組換え生物等は、宿主である LC16mO 株やその元株と同様に、ヒト及びマウス、ウサギ、サル等の動物に感染させることができるため、ヒトを含む複数の哺乳類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

ワクシニアウイルスは種痘として世界中で使われていたにもかかわらず、現在、自然界に存在しないことから、外界においては不安定であると考えられる。本遺伝子組換え生物等の複製は感染した細胞の細胞質内で完結し、核に移行することは無いため、本遺伝子組換え生物等のウイルスゲノム及び供与核酸が感染細胞のゲノムに組み込まれる可能性は無い。しかし、本遺伝子組換え生物等が感染した動物がオルソポックスウイルス属に属する他のウイルスにも同時に感染している場合、相同組換えにより、本遺伝子組換え生物等の供与核酸が他のウイルスに組み込まれる可能性は否定できない。

### (3) 影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換え生物等の自然界での感染対象はヒトに限定されること、ヒトからヒトへ腫瘍細胞を介して直接的に水平伝達してウイルス複製することはほぼ不可能である。オルソポックスウイルス属に属するウイルスとしてワクシニアウイルスの他に痘瘡ウイルス、サルポックスウイルス、牛痘ウイルス等が知られているが、現在、日本において存在は検出されておらず、本遺伝子組換え生物等と他のオルソポックスウイルスとが動物において共存する可能性は低い。したがって、影響の生じやすさ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

以上より、核酸を水平伝達する性質について、本遺伝子組換え生物等の第一種使用規程に従って使用等を行う限り、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

## 5 その他の性質

なし。

## V 総合的評価

本遺伝子組換え生物等は遺伝子組換えワクシニアウイルスであり、Lister (Elstree) 株を弱毒化した LC16mO 株を宿主とする。本遺伝子組換え生物等が感染し得る動物種は LC16mO 株や Lister (Elstree) 株と同じくヒト、げっ歯類又はサル等の哺乳動物であり、影響を受ける可能性のある植物及び他の微生物はない。

本遺伝子組換え生物等には病原性はなく、ヒト腫瘍細胞において選択的に複製する。また、本遺伝子組換え生物等のゲノムが感染細胞のゲノムに挿入される可能性はないため、伝播性及び核酸の水平伝達性は極めて低い。したがって、第一種使用規程に従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等により生物多様性影響が生ずるおそれは極めて低いと考えられる。

文献 1 杉本正信, 大石和恵, 木所稔他. 国産天然痘ワクチンの新たな役割. 蛋白質 核酸 酵素. 48:1693-1700, 2003.

- 文献 2 高田賢藏. 病原因子としてのウイルス. 医科ウイルス学 (改訂第 3 版). 南江堂. 51-73, 2009.
- 文献 3 志田壽利. ワクシニアウイルス・ベクター—ワクシニアウイルスの分子生物学と新型ワクチンの開発—. ウイルス. 36:23-33, 1986.
- 文献 4 Nakao S et al, inventors. National University Corporation Tottori University and Astellas Pharma Inc., assignees. New genetically-modified vaccinia virus. WO Patent WO/2017/209053. 7 December 2017.
- 文献 5 橋爪壮. 細胞培養弱毒痘瘡 LC16m8 株ワクチンの開発. モダンメディア. 50:28-33, 2004
- 文献 6 武内安恵, 原勝, 青山好作. 種痘廃止して 28 年目の痘瘡抗体保有状況. モダンメディア. 52:24-27, 2006.
- 文献 7 山口正義, 木村三生夫, 平山宗宏. 種痘研究班研究報告書—厚生省特別研究: 種痘後副反応および合併症の治療に関する研究—. 臨床とウイルス. 3:269-279, 1975.
- 文献 8 厚生労働省健康局結核感染症課. 天然痘対応指針 (第 5 版). 2004.
- 文献 9 Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y et al. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN": Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice. Vaccine. 33:6120-6127, 2015.
- 文献 10 Arlen PM, Skarupa L, Pazdur M et al. Clinical safety of a viral vector based prostate cancer vaccine strategy. J Urol. 178:1515-1520, 2007.
- 文献 11 Park BH, Hwang T, Liu TC et al. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. Lancet Oncol. 9:533-542, 2008.
- 文献 12 Heo J, Reid T, Ruo L et al. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. Nat Med. 19:329-336, 2013.
- 文献 13 Park SH, Breitbach CJ, Lee J et al. Phase 1b Trial of Biweekly Intravenous Pexa-Vec (JX-594), an Oncolytic and Immunotherapeutic Vaccinia Virus in Colorectal Cancer. Mol Ther. 23(9):1532-1540, 2015.
- 文献 14 Hwang TH, Moon A, Burke J et al. A mechanistic proof-of-concept clinical trial with JX-594, a targeted multi-mechanistic oncolytic poxvirus, in patients with metastatic melanoma. Mol Ther. 19:1913-1922, 2011.
- 文献 15 Zeh HJ, Downs-Canner S, McCart JA et al. First-in-man study of western reserve strain oncolytic vaccinia virus: safety, systemic spread, and antitumor activity. Mol Ther. 1:202-214, 2015.
- 文献 16 Mell LK, Brumund KT, Daniels GA et al. Phase I trial of intravenous oncolytic vaccinia virus (GL-ONC1) with cisplatin and radiotherapy in patients with locoregionally advanced head and neck carcinoma. Clin Cancer Res. 23:5696-5702, 2017.
- 文献 17 White DO and Fenner FJ. 医学ウイルス学 (第 4 版). 近代出版, 1996.
- 文献 18 Roberts KL and Smith GL. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. Trends Microbiol. 16:472-479, 2008.

- 文献 19 Moss B. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science*. 252:1662-1667, 1991.
- 文献 20 Harrington KJ, Pandha HS, Vile RG. Poxviruses as immunomodulatory cancer therapeutics. In: *Viral Therapy of Cancer*. John Wiley & Sons, 2008.
- 文献 21 CDC MMWR. Household Transmission of Vaccinia Virus from Contact with a Military Smallpox Vaccinee --- Illinois and Indiana, 2007. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5619a4.htm>
- 文献 22 CDC MMWR. Recommendations for using smallpox vaccine in a pre-event vaccination program. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/m2d226.htm>
- 文献 23 厚生労働省健康局結核感染症課. 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).
- 文献 24 Hammond JM, Oke PG, Couper BEH. A synthetic vaccinia virus promoter with enhanced early and late activity. *J Virol Methods*. 66:135-138, 1997.
- 文献 25 Lasek W, Zangozdzon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother*. 63: 419-435, 2014.
- 文献 26 Gao J, Zhao L, Wan YY et al. Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 16:10267-10280, 2015.
- 文献 27 Mehrotra PT, Grant AJ, Siegel JP. Synergistic effects of IL-7 and IL-12 on human T cell activation. *J Immunol*. 154:5093-5102, 1995.
- 文献 28 Bell E, Shamim M, Whitbeck JC et al. Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. *Virology*. 325:425-431, 2004.
- 文献 29 de Magalhaes JC, Andrade AA, Silvia PNG et al. A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J Biol Chem*. 276:38353-38360, 2001.
- 文献 30 Andrade AA, Silvia PNG, Pereira ACTC et al. The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem J*. 381:437-446, 2004.
- 文献 31 McCart JA, Ward JM, Lee J et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res*. 61:8751-8757, 2001.
- 文献 32 Schweneker M, Lukessen S, Spath M et al. The vaccinia virus O1 protein is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes viral virulence. *J Virol*. 86:2323-2326, 2012.
- 文献 33 Nakamura T, inventors. National University Corporation Tottori University and The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, assignees. Mitogen-activated protein kinase-dependent recombinant vaccinia virus (MD-RVV) and use thereof. WO Patent WO/2015/076422. 28 May 2015.



- 文献 34 Nakatake M, Kurosaki H, Kuwano N et al. Partial Deletion of Glycoprotein B5R Enhances Vaccinia Virus Neutralization Escape while Preserving Oncolytic Function. *Mol Ther Oncolytics*. 14:159-171, 2019.
- 文献 35 Payne LG. Significance of Extracellular Enveloped Virus in the in vitro and in vivo Dissemination of Vaccinia. *J Gen Virol*. 50(1):89-100, 1980.
- 文献 36 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory-Acquired Vaccinia Virus Infection --- Virginia, 2008 *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 58(29):797-800, 2009.