

第一種使用規程承認申請書	
令和5年4月5日	
主務大臣 殿	
氏名 株式会社 ID ファーマ 申請者 代表取締役社長 森 豊隆 住所 東京都千代田区富士見二丁目10番2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。	
遺伝子組換え生物等の種類の名称	Foldon 配列を付加した新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）S1 サブユニット内部ドメインを発現する F 遺伝子欠損非伝播型遺伝子組換えセンダイウイルス(SeV18+S-RBD-foldon/ΔF)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	ヒトの予防接種用ワクチンの開発を目的とした治験における投与、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>本遺伝子組換え生物等の原液の保管</p> (1) 本遺伝子組換え生物等の原液は、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保管する。 <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</p> (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、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。 <p>運搬</p> (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。 <p>被接種者への投与</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、被接種者の鼻腔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。

投与後の被接種者からの排出等の管理

- (6) 投与後、被接種者の鼻腔周囲皮膚を消毒し、外鼻孔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、医師の判断により必要とされる期間対策を講じる。
- (7) 被接種者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける被接種者に適切な指導を行う。
- (8) 投与を受けた被接種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、本遺伝子組換え生物等の投与後排出等の管理が不要となるまでの期間、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、当該被接種者に適切な指導を行う。
- (9) 投与された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、接種部位の鼻腔ぬぐい液について、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。

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、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。
- (11) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、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、医療施設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被接種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。
- (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

- (13) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、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。
- (14) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液、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並びに被接種者が治療施設で用いたマスク等の廃棄は、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。

	<p>(15)被接種者が自宅で用いたマスク等は、排出等の管理が不要となるまでの期間、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で保管し、不活化処理を行った上で廃棄する。</p> <p>(16)本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、漏出しない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和46年政令第300号）の別表第1の4の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。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を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。</p> <p>(17)本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体を漏出しない容器に入れ、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は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。</p>
--	---

備考

- 1 申請者が法人の場合にあっては、「申請者の氏名」については、法人の名称及び代表者の氏名を記載し、「申請者の住所」については、主たる事務所の所在地を記載すること。
- 2 「申請者の氏名」及び「申請者の住所」については、法第9条第1項の承認を受けようとする場合であって、当該承認を受けようとする者が本邦内に住所（法人にあっては、その主たる事務所）を有する者以外の者であるときは、国内管理人の氏名及び住所を記載すること。
- 3 「遺伝子組換え生物等の種類の名称」については、当該遺伝子組換え生物等の宿主又は親生物の属する分類学上の種の名称及び当該遺伝子組換え生物等の特性等の情報を含めることにより、他の遺伝子組換え生物等と明確に区別できる名称とすること。また、開発者が付した識別記号及び国際機関において統一的な識別記号が付されている場合にあっては当該記号を括弧内に記載すること。
- 4 「遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容」には、当該遺伝子組換え生物等について行う一連の使用等について、食用、飼料用その他の用に供するための使用（具体的な使用内容を記載）、栽培その他の育成（具体的な使用内容を記載）、加工、保管、運搬及び廃棄のうち該当する使用等を列記し、「及びこれらに付随する行為」と付記すること。
- 5 「遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法」には、当該遺伝子組換え生物等について、その使用等の方法又は場所若しくは期間を限定して生物多様性影響が生ずることを防止する場合には、それぞれ、使用等の方法、使用等を限定する場所の具体的な地域名若しくは施設の名称及び所在地又は使用等の期間を具体的に記載すること。
- 6 生物多様性影響評価書その他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施行規則第6条に規定する書類を添付して提出すること。
- 7 用紙の大きさは、日本産業規格A4とすること。

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

基本骨格に用いられているセンダイウイルス（以下、「SeV」とする。）は、分類学的にはパラミクソウイルス科、レスピロウイルス属に分類されている（文献1、2）。パラミクソウイルス科のウイルスは、ラブドウイルス科・フィロウイルス科とともにモノネガウイルススーパーファミリーを形成している（文献3）。SeVという通称が一般的であるが、**Hemagglutinating virus of Japan (HVJ)** 又は**1型マウスパラインフルエンザウイルス**（文献1）とも呼ばれる。

SeVは(-)RNA鎖をゲノムに持ち、このRNAはタンパク質に包まれ、ゲノムRNA-タンパク質複合体(ribonucleoprotein complex, RNP)を形成する。このRNPは脂質二重層の膜とそれを裏打ちするタンパク質で覆われウイルス粒子を形成している。膜上には感染に必要なタンパク質が含まれる（文献1、2）。

SeVはマウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類動物を主な自然宿主とし、これらげっ歯類動物に肺炎を生じる呼吸器病ウイルスであり、自然環境においてげっ歯類動物以外の動物（ヒトを含む）でのSeVの病原性は報告されていない。通常SeVはげっ歯類動物の鼻汁及び唾液から分離される。ヒトにおけるSeVの分布状況について、血清学的に把握することは現時点で困難と考えられている。これは多くの小児に既感染が認められるヒトパラインフルエンザウイルス1型と免疫学的に交差性を示すことが理由と考えられている（文献2）。

F遺伝子を欠失し、SARS-CoV-2の目的タンパク質を発現するSeV18+S-RBD-foldon/ Δ F（以下「本遺伝子組換え生物等」という。）の宿主に用いられているのは、上記の様な性状を有する弱毒性のSeV（Z株）である。

文献1：Lamb RA, Kolakofsky D: Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In Fields virology fourth edition, Philadelphia: Lippincott-Raven; pp.1305-1340 (2001)

文献2：高田賢蔵編, 医科ウイルス学第3版, pp.342-352, 南江堂, 東京 (2009)

文献3：Nagai Y and Kato A. Paramyxovirus reverse genetics is coming of age, Microbiol. Immunol., 43(7):613-624 (1999)

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。）

SeVは1950年代に日本で分離され、細胞生物学の分野では、その強い細胞融合活性を活かして膜融合機構の解析や雑種細胞の作製等の研究に広く用いられた実績を持つ（文献4～6）。SeVは増殖や取り扱いが容易であることから、パラミクソウイルスのプロトタイプとして、ウイルス遺伝学及びウイルスタンパク質の構造と機能、転写・複製機構の解析等、分子生物学の研究対象として、又、持続感染や呼吸器感染のモデルとして感染病理学や免疫学でも最も広く用いられるウイルスの一つである。さらに、cDNAからSeVを調製する技術が開発され、ウイルスの改変・改良が可能となった（文献7、8）。

2004年、SeV（Enders株）をヒトパラインフルエンザウイルス1型への生ワクチンとして使用した臨床試験成績が報告された（文献9）。最大ウイルス量は 5×10^7 EID₅₀ (egg infectious dose 50)の経鼻投与であったが、有害事象の発現は認められず、投与前に比較して4.0～24倍の抗ヒトパラインフルエンザウイルス1型中和抗体が血清中に認められている。本遺伝子組換え生物等の宿主となるSeV（Z株）は、1955年に大阪大学微生物病研究所で分離された（文献10）。九州大学病院では、このSeV（Z株）を宿主とする本遺伝子組換え生物等の類似の遺伝子組換え生物等の重症虚血肢症例に対する遺伝子治療臨床研究（オープンラベル、4段階用量漸増試験）の症例登録を2006年4月より開始し、2010年9月末日までに12症例の投与及び観察期間が完了した。

なお、SeV（Z株）及びSeV（Enders株）はともに遺伝子組換え生物等として臨床試験に供されていることから本遺伝子組換え生物等の宿主の株の情報として利用できると考えている。

- 文献4 : Kim J, Okada Y. Morphological changes in Ehrlich ascites tumor cells during the cell fusion reaction with HVJ (Sendai Virus). I. Alterations of cytoplasmic organelles and their reversion. *Exp Cell Res.* 130:191-202 (1980)
- 文献5 : Kim J, Okada Y. Morphological changes in Ehrlich ascites tumor cells during the cell fusion reaction with HVJ (Sendai virus). II. Cluster formation of intramembrane particles in the early stage of cell fusion. *Exp Cell Res.* 132:125-136 (1981)
- 文献6 : Kim J, Okada Y. Morphological changes in Ehrlich ascites tumor cells during the cell fusion reaction with HVJ (Sendai virus). III. Morphological characterization of HVJ glycoproteins integrated into the plasmamembrane and their internalization by coated vesicles. *Exp Cell Res.* 140:127-136 (1982)
- 文献7 : Kato A, Kiyotani K, Sakai Y, et al. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J.* 16:578-587 (1997)
- 文献8 : Kato A, Sakai Y, Shioda T, et al. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells.* 1:569-579 (1996)
- 文献9 : Slobod KS, Shenep JL, Lujan-Zilbermann J, et al. Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine.* 22:3182-3186, (2004)
- 文献10 : Fukai, K., and Suzuki, T. On the characteristics of a newly-isolated hemagglutinating virus of Japan. *Med. J. Osaka Univ.* 6: 1-15, (1955)

3. 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

SeVは直径150-250 nmのほぼ楕円形で、大きさと形状に多形性を示すエンベロープウイルスである。一本鎖の非分節型(-)鎖RNAをゲノムとして持つ。ゲノムRNAは、ヌクレオカプシド(NP)タンパク質と非常に強く結合しており、この状態でのみRNA合成の鋳型活性を有す。ウイルスの全長15,384塩基のゲノムRNAには主に6個の遺伝子がコードされ、3'端から順にNPタンパク質遺伝子、RNAポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化タンパク質(P)遺伝子、ウイルス粒子構造を内側から維持し、ウイルス粒子のアセンブリーと出芽に関与するマトリックスタンパク質(M)遺伝子、そして宿主細胞への侵入にかかわる膜融合タンパク質(F)遺伝子、結合に関わる赤血球凝集素/ノイラミニダーゼ(HN)遺伝子、及びRNAポリメラーゼの大サブユニットである巨大(ラージ)タンパク質(L)遺伝子が直線的に並ぶ。各遺伝子がコードするタンパク質のうち、NP、P及びLの3種類のタンパク質は、ウイルスのゲノムRNAとともに転写・複製の鋳型となり、自律複製可能なレプリコンであるRNPを形成する。それぞれの遺伝子は個々の転写制御ユニットを有し、単独のmRNAとして転写され、それぞれ1個のタンパク質が翻訳される。例外的にP遺伝子からはPタンパク質以外に、異なるタンパク質の読み枠を利用して翻訳される非構造タンパク質(C)とmRNAを読み取り途中のRNAポリメラーゼが特定の場所でスリップし、グアニン塩基を1分子余計に付加(RNA編集)することによりPタンパク質の読み枠が変えられてできる新しいタンパク質(V)の3つが翻訳される。このような巧みな方法により、SeVゲノムRNAから総計8種類のタンパク質が産生される。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

SeVは、細胞膜上に広く分布するシアル酸を認識、結合し、宿主細胞と膜融合を引き起こすことで感染する。発育鶏卵或いは初代発育鶏卵細胞や LLC-MK2 細胞等、ヒト、ウシ、サル由来の培養細胞で増殖する。培養細胞での増殖には、トリプシンを必要とする。エーテル、クロロホルム、ホルムアルデヒド、界面活性剤や加熱で不活化される。SeVは、室温では安定であり、実験室内でマウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類動物に空気感染若しくは接触感染し増殖する。特に幼若マウスにおいて感受性が高く、食欲不振、元気消失、異常呼吸音等を示すが、幼若マウス以外では無症状或いは軽度の症状しか示さずに自然治癒し、死亡例は稀である。伝播力は強いが、抗体が産生されると感染個体からウイルスは消失する(文献2、11、12)。

(3) 捕食性又は寄生性

該当なし

(4) 繁殖又は増殖の様式

SeVは、細胞膜上に広く分布するシアル酸を認識、結合し、宿主細胞と膜融合を引き起こす。その結果、宿主細胞質内にRNPが放出され、PとLのRNAポリメラーゼ活性*により、SeV遺伝子の転写及びde novoタンパク質合成が開始される。それらde novo合成されたウイルスタンパク質を利用して(+)鎖ゲノムRNAの鋳型が合成され、それを鋳型に(-)鎖ゲノムRNAが合成される。新たに合成された(-)鎖RNAゲノムはde novo合成されたNとともにRNPを構成する。このRNPはPとL複合体と相互作用した上で、宿主細胞膜とその細胞膜に局在するM、HN及びFに取り込まれて、次世代のSeV粒子として宿主細胞から出芽していく(文献11)。SeVは、一段増殖に12~18時間を要し、野生型ウイルスの場合、最終的には1細胞あたり約1,000個のウイルス粒子が産生されると考えられている。細胞への導入後、導入されたゲノムRNP複合体は核へは移行せず、細胞質においてウイルス構成タンパク質遺伝子の複製及びウイルスRNAゲノムの複製を行う。ウイルス由来のRNAポリメラーゼで行われるため細胞種を選ばず発現効率が高い。又、全ての生活環においてRNA相でありDNA相を経ない。核への移行がないこと、DNA相がないことから、宿主細胞の染色体と相互作用する可能性が少なく、宿主染色体への組込みはない。これらの特徴は、同じRNAウイルスであるが、プロウイルスが宿主染色体へ挿入されるレトロウイルス(遺伝子治療臨床研究、基礎研究に汎用されている代表的遺伝子組換え生物等)と異なる。SeVはアフリカミドリザル(及びチンパンジー)の上気道及び下気道において、ヒトパラインフルエンザウイルス1型(hPIV1)と同じように効率的に増殖することが確認された(文献13)。一方で、SeVはヒトに対する病原性が知られておらず、SeVをhPIV1に対するワクチンとして評価した、アフリカミドリザルでの検討(文献13)及びヒトでの臨床試験(文献9)においてもSeVに関連する重篤な副反応は確認されなかった。

SeVは、宿主細胞への侵入に関わる膜融合Fタンパク質、宿主細胞への結合に関わるHNタンパク質の特性により、ヒト由来を含む多様な哺乳類細胞に短時間での感染が可能であり、気道上皮細胞に対しても高い指向性がある。本遺伝子組換え生物等の開発で使用されるSeVのplatformの基本的な特性は野生型SeVと同様であるが、F遺伝子を欠失させているため宿主の生体内で感染性の二次粒子を産生することはない(文献14、15)。従って、経鼻接種された本遺伝子組換え生物等は、鼻腔内や上気道の細胞等に感染した後は増殖せずに時間とともに消失する。又、感染せずに血管に漏れ出た本遺伝子組換え生物等は血液中の補体に速やかに不活化され、嚥下された本遺伝子組換え生物等は、胃内で失活するものと想定される。

*: P及びLは複合体としてウイルスのRNAポリメラーゼとして機能する(文献2、11)。

(5) 病原性

SeVはマウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類動物に感染し、風邪、肺炎等の呼吸器病を引き起こす。伝播に関しては、空気感染や同居による接触感染により起きるが、空気伝播は予想されるほど強くはなく、主な原因は水又はエサを介しての接触伝播による(文献12)。増殖したウイルスは、唾液、鼻水等により排出される。SeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fの由来株であるSeV(Z株)は、1955年に大阪大学微生物病研究所で分離され、その後実験室で継代された株であり、弱毒性であることが報告されている(文献10)。

げっ歯類動物から分離された5系統のSeV株(MN株、Z株、KN株、Mol株、Hm株)をマウスへ投与した実験では、死亡率及び肺硬化の発現率に基づくと、Mol、MN、KN、Z、Hmの順に強い毒性であり(Z株、Hm株は死亡例なし)、最も毒性の強いMol株とZ株の50%致死量は、 10^6 以上差があった。このように、SeVは株の種類で、毒性の違いが認められるが、その強さを決定する特性等は不明である(文献16)。SeV(Enders株)のサル(アフリカミドリザル)への気道内投与による実験では、臨床所見に異常は認められていない。(文献17)。又、ヒトへの感染に関しては、SeV(Enders株)を用いて、ヒトパラインフルエンザウイルス1型に対する生ワクチンとして使用した臨床試験(文献9)、今回の遺伝子組換え生物等のベースとなった野生型を利用したHIVワクチンで臨床試験(文献18)が行われているが、いずれも重篤な副作用は報告されていない。

(6) 有害物質の産生性

SeVから有害物質を産生するという報告はなく、又、感染に起因して有害物質が産生されるという報告はない。

(7) その他の情報（不活化条件等を含む。）

物理化学的安定性に関しては、SeVはエンベロープを有しており、有機溶媒（エーテル、クロロホルム、エタノール等）、界面活性剤(SDS、Triton X-100、Tween205/21等)、塩素系漂白剤或いは第4級アンモニウム塩等の処理で容易に失活し、感染性を失う（文献12）。例えば、有機溶媒としては100%のエーテル或いはクロロホルムで10分、70%エタノールで10分処理、塩素化合物としては1,000 ppmの次亜塩素酸或いは第4級アンモニウム塩として0.05%ベンザルコニウム塩化物で10分処理することで容易に失活する（文献19、20）。界面活性剤としては、1% Triton X-100で60分、1% Tween20で30分間処理することでウイルスタンパク質を可溶化できる（文献21、22）。又、50%イソプロパノール、2%ホルマリン、52ppmヨードホルム、1%クレゾール石鹼での処理、或いは、60℃、1分の処理で失活する（文献23）。又、実験室においては、通常の高圧蒸気滅菌（121℃、20分間）による滅菌処理により失活する。ただし、凍結融解を繰り返すと、エンベロープが障害を受けて感染性が急激に低下する。

宿主の環境中での生存性に関する情報は、別紙3-1に示す。

文献11：川口 実太郎， センダイウイルス：ベクター化と先端医療開発への応用, 生物工学 第99巻, 第3号 (2021)

文献12：ウイルス実験学各論：国立予防衛生研究所学友会編. 15. パラミクソウイルス pp.331-340, 丸善, 東京(1982)

文献13：Skiadopoulos MH, Surman SR et al. Sendai virus, a murine parainfluenza virus type 1, replicates to a level similar to human PIV1 in the upper and lower respiratory tract of African green monkeys and chimpanzees. *Virology*.297:153-160 (2002)

文献14：Li, H., et al.: *Journal of Virology*, July,p.6564-6569(2000)

文献15：飯田章博ら，：ウイルス 第53巻 第2号, 171-175 (2003)

文献16：Yamaguchi R., Iwai H., Ueda K. Variation of virulence and other properties among Sendai virus strains. *Microbiol. Immunol.* 32(2): 235-240 (1988)

文献17：Hurwitz JL, Soike KF, Sangster MY, et al. Intranasal Sendai virus vaccine protects African green monkeys from infection with human parainfluenza virus-type one. *Vaccine* 15:533-540 (1997)

文献18：Julien Nyombayire, et al. :*The Journal of Infectious Diseases* 215(1 January), 95-103(2017)

文献19：Watanabe Y, Miyata H, Sato H. Inactivation of Laboratory Animal RNA-viruses by Physicochemical Treatment. *Exp. Anim* 38 (4):305-311(1989)

文献20：Meng ZD, Birch C, Heath R, et al. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl Environ Microbiol.* 53:727-730(1987)

文献21：Samuel I, Tomas E, Portocala R. Interaction between ceruloplasmin and Sendai virus envelope components. Note I. Gel-filtration of Tween20-solubilized envelope components. *Virologie*.27:119-125(1976)

文献22：Samuel I, Tomas E. Interaction between ceruloplasmin and Sendai virus envelope components. Note III. Separation of Sendai virus envelope components by affinity chromatography. *Virologie*. 27:193-201(1976)

文献23：Yoji Watanabe, et al. Inactivation of Laboratory Animal RNA-viruses by Physicochemical Treatment. *Exp.Anim.* 38(4):305-311(1989)

II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1. 供与核酸に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

本遺伝子組換え生物等は、SARS-CoV-2ウイルス起源株（Wuhan-Hu-1）に由来するスパイクタンパク質の分泌シグナル（S）及びスパイクタンパク質S1のAngiotensin-converting enzyme2（ACE2）受容体結合部位（RBD）からなるS-RBDタンパク質のC末端にバクテリオファ-

ジT4に由来するフィブリチン内の3量体化に関与するドメインであるfoldonの配列を付加したS-RBD-foldonを搭載している。

S-RBD-foldonタンパク質をコードする配列の大きさは747bpであり、そのうち分泌シグナル(S)をコードする39bpは、GenBankの遺伝子配列情報MN908947.3のコーディネート上で21563から21601まで、RBDをコードする612bpは、同22544から23155までのオリジナル配列をヒトコドン用に至適化した。また、Foldon配列をコードする93bpは、GenBankの遺伝子配列情報X12888における1372~1452の配列を含む。

テンプレートプラスミド作製のpSeV/ΔFには、SeV (Z株) ゲノムの3'末端付近 (+) 鎖cDNA上では5'末端付近) に遺伝子を搭載するため、18塩基のクロニングサイトが導入されている。S-RBD-foldon遺伝子をpSeV/ΔFに挿入するため、5'及び3'末にNot I認識配列を付加した。

又、S-RBD-foldonの3'末端にSeV (遺伝子配列情報GenBank) に由来する、転写終結シグナル(end) 及び開始シグナル(start)を挿入した。

本遺伝子組換え生物等の構成、全塩基配列、アミノ酸配列等は、別紙1-1に示す。

(2) 構成要素の機能

本遺伝子組換え生物等の供与核酸の構成要素の機能は以下の通りである。

・ S-RBD-foldon タンパク質をコードする配列

248個のアミノ酸からなる等電点8.22、分子量 28 kDの 1 本鎖ポリペプチドからなり、S は分泌シグナルとして働き、RBD はACE2への結合能があり、foldonは三量体化の機能を有する。

・ 転写開始 (start) シグナル、転写終結 (end) シグナル

遺伝子組換えSeVにおける供与核酸の転写は、アデノウイルス等のDNA を鋳型とする転写と異なり、プロモーター配列及びpolyA シグナルを必要としない。その代わりにウイルス自身のRNA ポリメラーゼ (L タンパク質) が認識する転写開始シグナル、転写終結シグナルが挿入されている。

相同性検索結果

S-RBD-foldonタンパク質をコードする塩基配列 (翻訳の転写開始シグナルから転写終結シグナルまでの747 塩基) を問い合わせ配列として、以下の相同性検索システム及び遺伝子データベースを用いて検索を行った。その結果、相同性で40%を超えるものはなく、又、現在までに知られている有害な遺伝子 (トキシン遺伝子、がん遺伝子等) と相同性の高い配列は含まれていないことが確認された。

核酸配列及び、対応するアミノ酸配列

供与核酸 (S-RBD-foldon 747 塩基) を含む配列及び、対応するアミノ酸配列を別紙1-1に示す。S-RBD-foldon 遺伝子領域断片の配列内には、目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームは存在しない。

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

pSeV/ Δ FのSeV leader配列（後述）とNP構造遺伝子の間にあるNot I 切断部位にS-RBD-foldon遺伝子領域断片を挿入し、テンプレートプラスミドpSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fを作製した。pSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fの構造は、別紙3-1 図3-1に示す。leader配列からtrailer配列（別紙3-1 図3-2参照）までのSeV遺伝子及びS-RBD-foldon遺伝子を含む範囲がrSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fのゲノムテンプレートである。

leader配列及びtrailer配列はSeVのRNA-dependent RNA polymerase（P及びL遺伝子産物から成る）が結合するプロモーター領域であり、(+)鎖ゲノムの複製及び転写（mRNA合成）の時にはこの酵素はleader配列に結合して複製及び転写を開始する。一方(-)鎖ゲノムの複製の時には、この酵素が(+)鎖ゲノムのtrailer配列の相補鎖部分に結合し、複製を開始する。

遺伝子発現調節における単位として転写開始シグナルと転写終結シグナルが各遺伝子間に存在し、SeVのRNA-dependent RNA polymeraseがこれらを認識して、mRNAを転写し、宿主の細胞内の小胞体にてタンパク質が作られる。

このcDNAプラスミドの全塩基配列の詳細は、別紙3-2、3-3に記載する。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

pSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fから、リバースジェネティクス法を用いてrSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fを構築する。

ヒト腎臓由来細胞293T細胞又はLLC-MK/F細胞に5種類のプラスミド及び本遺伝子組換え生物等をトランスフェクションすることにより、rSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fの遺伝子組換えSeVを再構成し、LLC-MK2/F/Ad細胞を用いて遺伝子組換え生物等を増幅しF欠失型遺伝子組換え生物SeVであるrSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fを作製する。

詳細は別紙3-1に示す。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 製造場所

茨城県

② 本遺伝子組換え生物等は、治験薬GMP基準に従いセルバンクシステム及びウイルスバンクシステムを用いて製造される。それぞれマスターセルバンク（MCB）、マスターウイルスバンク（MVB）は、Fタンパク質発現LLC-MK2細胞（LLC-MK2/F/Ad：Pre-MCB）及びF欠失型遺伝子組換え生物等である本遺伝子組換え生物等から調製した。品質試験が実施された両バンクは、IDファーマで保管されている。

詳細は別紙3-1に示す。

③ 製剤の製造及び品質管理

MCBより拡大培養されたLLC-MK2/F/Ad細胞に、MVBの本遺伝子組換え生物等を感染させ、本遺伝子組換え生物等の生産培養を行い、回収された培養上清をフィルターろ過する。さらに、アフィニティクロマトグラフィー、限外ろ過、ゲルろ過等により精製され、濃度調整の後バイアルに充填し、凍結保存されたものを製剤とする。又、製造工程、原薬、製剤に関して、必要とされる品質管理試験が行われる。凍結した状態で治療施設へ輸送した最終製品は、カテゴリ1レベルに管理された実験室において受け入れ、ディープフリーザーに施錠の上保管する。

本遺伝子組換え生物等の製造工程、工程内、原薬及び製剤各試験の品質規格の詳細は別紙3-1に示す。

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

供与核酸はrSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fの一本鎖RNA若しくは複製中の二本鎖RNAの一部として存在する。レポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子を供与核酸とした遺伝子組換えSeVが、長期の反復継代においても安定に外来遺伝子を発現することから遺伝子組換えSeVのゲノムは安定であると考えられる。実際に、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を供与拡散とした遺伝子組換えSeVの反復継代の検討では、9継代において安定に外来遺伝子が発現された

報告がされている（文献 24）。

細胞に感染すると、rSeV/ Δ FゲノムRNPは核へは移行せず、細胞質においてSeV由来のRNAポリメラーゼ（P、L）で搭載遺伝子が転写される（文献 1、3、12、13、25）。搭載遺伝子の発現は感染する動物内で、約2週間程度で消失することが示されている（文献 1、3、26）が、これは細胞障害性T細胞（cytotoxic T-cell: CTL）による感染細胞の排除によるものである。又、遺伝子組換えによりウイルスが感染する動物種や感染様式が変化したとする報告はない。

rSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fを増殖させる過程で、ゲノムから欠失したFタンパク質を細胞からトランスに供給するが（文献 27）、rSeV18+S-RBD-foldon/ Δ Fのゲノムと細胞のゲノムに導入したFタンパク質遺伝子には、相同部分はなく、相同組換えにより伝播性を有する野生型SeV、則ち増殖性ウイルスが出現する可能性は理論的にはない。

文献 24 : Hasan MK, Kato A, Shioda T, et al. Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3' proximal first locus. J Gen Virol. 78:2813-2820 (1997)

文献 25 : Bitzer M, Armeanu S, Lauer UM, et al. Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. J Gene Med. 5:543-553 (2003)

文献 26 : Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, et al. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. Circ Res. 90:966-973 (2002)

文献 27 : Hirata T, Iida A, Shiraki-Iida T, et al., An improved method for recovery of 9/21 F-defective Sendai virus expressing foreign genes from cloned cDNA, J Virol. Method, 104: 125-133 (2002)

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

<非臨床試験>

本遺伝子組換え生物等のRNAを鋳型とし、逆転写酵素を用いてDNAへの逆転写反応を行い、cDNAを合成し、定量的ポリメラーゼ連鎖反応法（以下、「qPCR法」という。）により本遺伝子組換え生物等の検出を行った。抽出RNA 1 μ gあたり（血液試料の場合には1 mL）の本遺伝子組換えSeVのコピー数（copies/ μ g RNA）をcDNAに変換されたtotal RNA量（ng/reaction）に換算して測定する。本遺伝子組換え生物等のウイルスゲノムのNP、P領域部分シーケンスが検出されるようデザインされたqPCR法を採用し、体内分布を検出する。即ちNP、P領域を跨る配列が増幅するよう設計し、本遺伝子組換え生物等のウイルスゲノムを特異的に検出する測定系である。

qPCR法で用いる検体はラットからの採取検体からtotal RNAを抽出し、本遺伝子組換え生物等のcDNAを合成し、検出を行った。本qPCR法では、試料 5 μ L中に 1.0×10^1 copies/reactionsのゲノムがあれば検出することができる。詳細を別紙4に示す。

<臨床試験>

本遺伝子組換え生物等を接種後、被接種者から鼻腔ぬぐい液を採取し、qPCR法を用いて、本遺伝子組換え生物等のウイルスゲノムの存在を確認する。

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SeVと本遺伝子組換え生物等の間には以下の相違がある。

- (1) 本遺伝子組換え生物等は、外来遺伝子（S-RBD-foldon）を搭載しているため、本遺伝子組換えSeVが感染した細胞では、SeV由来のタンパク質以外に搭載されたS-RBD-foldonが発現する。
- (2) 本遺伝子組換えSeVは、伝播に必要なF遺伝子を欠失しているため、本遺伝子組換えSeVが感染した細胞は、伝播に必要なタンパク質を合成できない（文献 14、15）。よって、哺乳類細胞に感染するものの感染性のウイルス粒子は形成されず、増殖しない。なお、供与核酸により発現するS-RBD-foldonは、伝播に必要な機能を持たないため、欠失したF遺伝子

の代用にはならない。従って、本遺伝子組換え生物等は、製造のために用いている F タンパク質を発現する細胞においてのみ増殖できる。

詳細は、別紙 3-1 に示す。

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

ヒトの予防接種用ワクチンの開発を目的とした治験における投与、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保管する。

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、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。

運搬

(4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。

被接種者への投与

(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、被接種者の鼻腔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。

投与後の被接種者からの排出等の管理

(6) 投与後、被接種者の鼻腔周囲皮膚を消毒し、外鼻孔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、医師の判断により必要とされる期間対策を講じる。

(7) 被接種者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける被接種者に適切な指導を行う。

(8) 投与を受けた被接種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、本遺伝子組換え生物等の投与後排出等の管理が不要となるまでの期間、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、当該被接種者に適切な指導を行う。

(9) 投与された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、接種部位の鼻腔ぬぐい液について、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。

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、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。

(11) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、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、治療施設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被接種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。

(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

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

- (13)本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、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。
- (14)本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液、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並びに被接種者が治療施設で用いたマスク等の廃棄は、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。
- (15)被接種者が自宅で用いたマスク等は、排出等の管理が不要になるまでの期間、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で保管し、不活化処理を行った上で廃棄する。
- (16)本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合は、漏出しのない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和46年政令第300号）の別表第1の4の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。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を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。
- (17)本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体を漏出しのない容器に入れ、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は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。

（追加補足事項は、別紙5）

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

被接種者からの本遺伝子組換え生物等の排出の確認は治験実施計画書に従って行う。臨床試験では、各接種用量において先行する2例の被接種者へ本遺伝子組換え生物等を接種3時間後、6時間後、9時間後、12時間後、24時間後、3日後、5日後、7日後、9日後、11日後、14日後、16日後、18日後及び20日後以降定期的に鼻腔ぬぐい液を採取し、感染能力のある本遺伝子組換え生物等の存否を確認する（連続する2ポイントにおいて陰性とならない場合には、連続する2ポイントで感染能力のある遺伝子組換え生物等が陰性となるまで2日毎に排出を確認する）。

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 該当なし。

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

(1) 本遺伝子組換え生物等を用いた試験（非臨床試験）

本遺伝子組換え生物等を用いた生体内分布及び排出の検討

ラットに本遺伝子組換え生物等を 4.0×10^7 CIU/bodyの用量で単回経鼻接種し、接種1日後（Day 2）、14日後（Day 15）、28日後（Day 29）に本遺伝子組換え生物等由来のRNAゲノムの組織分布をqPCR法で測定した。その結果、接種翌日（Day2）の時点で、血液、尿、糞便、組織〔気管、気管支、小腸（回腸）、大腸（結腸）、肝臓、心臓、腎臓、精巣又は卵巣、脳、嗅球、脾臓及び視神経〕ではRNAゲノムが検出されなかった。又、食道（胸部）、胃、眼球はDay2で検出されたものの、それぞれ1個体であり、それらは接種後にわずかに漏れ出した本遺伝子組換え生物等が検出されたものと考えられた。接種14日後（Day 15）においては、接種部位（鼻甲介を含む鼻腔）以外には、ウイルスゲノムは検出されなかった。接種

28日後（Day29）においては、接種部位（鼻甲介を含む鼻腔）以外には、RNAウイルスゲノムは検出されなかった（別紙7参照）。

本遺伝子組換え生物等を用いた反復投与毒性試験（経鼻）

ラットに本遺伝子組換え生物等を 4.0×10^7 CIU/bodyを2週間間隔で3回経鼻接種し、局所及び全身性毒性を評価した。対照群としてPBSを同様に接種した。

その結果、死亡例はなく、一般状態、体重、摂餌量、体温、眼科的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学検査、剖検時の肉眼的観察及び器官重量において、本遺伝子組換え生物等接種に起因する変化は認められなかった。接種部位の病理組織学的検査では、本遺伝子組換え生物等接種群で接種部位（鼻腔）において、炎症細胞浸潤（混合性）、鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）におけるリンパ球増加、気管において粘膜における炎症細胞浸潤（混合性）、肺において間質の非化膿性炎症、気管支関連リンパ組織（BALT）におけるリンパ球増加、嗅球系球体層における形質細胞浸潤及び血管周囲の単核細胞浸潤が認められ、所属リンパ節ではリンパ球及び形質細胞の増加が認められた。雄の1例で中等度の単核細胞浸潤が認められたが、その他の変化はごく軽度或いは軽度であった。初回接種と最終回接種の接種部位の変化を比較した結果、初回接種部位の所見の頻度及び程度が低下していることから、回復傾向を示すことが示唆された。又、所属リンパ節におけるリンパ球及び形質細胞の増加は、本遺伝子組換え生物等による免疫応答に関連する変化であると考えられた（別紙8参照）。

本遺伝子組換え生物等経鼻接種マウスにおける感染能力のある本遺伝子組換え生物等残存性試験

【試験概要】

本遺伝子組換え生物等を経鼻接種した際の鼻腔内での感染能力のあるSeVベクターの残存に関する時間的経過の情報は少ない。又、一般的なPCR法による本遺伝子組換え生物等由来のRNAゲノムの測定では、感染能力のある本遺伝子組換え生物等の量と排出の有無を予測することが困難である。そこで、マウスに本遺伝子組換え生物等を経鼻接種し、経時的に鼻咽頭洗浄液を採取して感染価（CIU）を測定し、生体内における感染能力のある本遺伝子組換え生物等の残存性を確認する試験を行った。

BALB/cA 雄性マウス21例を用いて検討した。21例のマウスを7群に分け、うち6群（3例/群）には、本遺伝子組換え生物等を 1.0×10^7 CIU/body経鼻接種し、1群3例ずつ、1時間毎に鼻咽頭洗浄液を採取した。1群3例については、本遺伝子組換え生物等未接種コントロール群とした。

採取した鼻咽頭洗浄液において、感染能力のある本遺伝子組換え生物等の残存性を感染価で測定した。

その結果、非接種群の0時間における感染能力のある本遺伝子組換え生物等の回収率を100%とした場合、接種1時間後 0.15%、接種2時間後 0.10%、接種3時間後 0.0080%、接種4時間後 0.018%、接種5時間後（試験群） 0.0095%、接種6時間後 0.00066%であった。

感染価の測定において、接種4時間後以降も本遺伝子組換え生物等は検出されてはいるが、すべての個体において20/well以下であり、検出限界未満に達していると考えられた。回収率において、減少率が最も高いのは接種1時間後であり、その後低下の割合は徐々に緩やかになった。本検討においては、本遺伝子組換え生物等を希釈していないため、希釈による感染価の低下はないと考えられる。従って、接種1時間後までの感染価の低下は、接種した感染能力のある本遺伝子組換え生物等が鼻腔内の接種部位に存在する細胞へ感染したことに起因すると考えられた。その後は、未感染の感染能力のある本遺伝子組換え生物等が経時的に検出されたと予想されるが、接種4時間後で検出限界未満となることが明らかとなった。

以上のことより、経鼻接種した本遺伝子組換え生物等は接種後短時間で細胞に感染し、鼻腔内に存在する未感染の感染能力のある本遺伝子組換え生物等は、接種4時間後で検出されないことが示唆された（別紙9参照）。

6. 国外における使用等により得られた情報

本遺伝子組換え生物等を用いた海外臨床試験は実施されていない。

伝播型のSeV (Z株) を用いた以下の試験が行われた。

SeV (Z株) にHuman immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)の遺伝子を搭載した本遺伝子組換えSeVの65例の健康成人を対象に経鼻接種した第I相試験がケニア、ルワンダ及び英国で行われた。

被験者65例のうち1回目接種時に遺伝子組換えSeV (SeV-Gag: Sendai Virus-Vectored HIV Type 1 Gag Vaccine) を接種した36例 (文献18 Table1) のうち15例より、中鼻甲介の鼻ぬぐい液、唾液及び尿の検体を採取し、SeV-GagのウイルスゲノムをqPCR法で測定の結果、鼻ぬぐい液では接種4日後以降の検体からはSeV-Gag由来のウイルスゲノムは認められず、唾液及び尿に関しては接種1日後から認められなかった (文献18 Supplementary Table 5)。

又、試験中の重篤な有害事象 (SAE) は認められず、接種後4週以内の有害事象の発現は、ワクチン接種群とプラセボ群で有意な差は認められなかった (文献18)。

臨床試験における排出試験計画及び排出等の管理の概要

健康成人及び高齢者を対象に、低用量 (1.0×10^7 CIU/body)、中用量 (3.0×10^7 CIU/body) 及び高用量 (1.0×10^8 CIU/body) の3つの用量にわけ、本遺伝子組換え生物等を先行グループ2例に接種し、排出確認を行う。

先行グループ2例では、接種3時間後、6時間後、9時間後、12時間後、24時間後、3日後、5日後、7日後、9日後、11日後、14日後、16日後、18日後及び20日後以降定期的に被接種者より鼻腔ぬぐい液を採取し、感染能力のある本遺伝子組換え生物等の排出確認を継続する。

各コホートの先行グループ2例で連続する2ポイントで本遺伝子組換え生物等が陰性になるまで、感染能力のある本遺伝子組換え生物等の排出確認を継続する。

先行グループでの結果を基に、感染能力のある本遺伝子組換え生物等の排出が確認される期間は、拡散防止の観点から、治療施設から帰宅後も治療施設から外してもよいとの連絡がくるまでの期間は、外出時や、自宅で同居人がいる場合は食事や入浴時以外はマスクを着用するように、同コホートの後行グループの被接種者も含めてすべての被接種者に指導する。

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

野生型SeVは、競合、有害物質の産生等により他の微生物を減少させることは知られていない。本遺伝子組換え生物等は、F遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型SeVと本質的に同一であり、微生物には感染せず、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。又、供与核酸による微生物への影響に関する報告はない。

よって、本遺伝子組換え生物等により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

本遺伝子組換え生物等は、野生型ウイルスであるSeVをベースに構築しているが、ウイルスゲノムから感染に必須であるF遺伝子を欠失させているため、それ自体伝播能を喪失し、F遺伝子を発現する特殊な細胞に感染した場合に限り感染性ウイルスを産生し得る (文献13、14)。自然環境中でこのような細胞に感染する可能性はほとんど無いと考えられる。従って、野生型ウイルスは自然環境中で増殖し得るのに対して、本遺伝子組換え生物等はたとえ外界に漏出しても、伝播して増殖することはなく、急激に減少すると考えられる。又、SeVと近縁のウイルス、例えばヒトパラインフルエンザウイルスI型 (hPIV-1) 等が共感染した場合であっても、両者ともに一本鎖のRNAウイルス、つまり非分節型であるため、インフルエンザウイルス (分節型) のウイルス同士の混合感染のようなRNA分節の混合は発生しない。又、ゲノムがRNAであり、DNAで生じる相同組換え反応の中間体構造をRNAでは取るこ

とができず相同組換えは起こさないため、欠損させているF遺伝子が復元する可能性は極めて低いと考えられる。

以上のことから、他の微生物等に影響を与えないと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

該当なし。

(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を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に基づいて、生物多様性影響を損なう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

野生型SeVはマウスやラットを自然宿主とし、自然界では、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、ウイルス構成タンパク質が野生型と同じであることから、ヒトを含むその他の動物で感染が成立する可能性はある。

又、本遺伝子組換え生物等は、F遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型SeVと本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等は、F遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は、野生型SeVと本質的に同一であり、供与核酸による病原性は知られていないことから、野生型SeVと同様に、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類動物以外に病原性を持つ可能性は極めて低いと考えられる。しかしながら、増殖能を持たないことから、本遺伝子組換え生物等が持つ病原性について評価が可能である。マウス及びラットを用いた非臨床試験において、臨床的に異常をきたす個体は認められなかったことから、動物に対する影響はないと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換え生物等の第一種規程申請書に記載された方法を行うかぎり、本遺伝子組換え生物等の環境中への拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。又、本遺伝子組換え生物等は、野生型SeVのF遺伝子を欠失しているが、F遺伝子産物はウイルス感染に必須であるため、SeV-Fタンパク質をトランスに供給するヘルパー細胞にのみ感染する。しかしながら、環境中でヘルパー細胞に感染する可能性は極めて低い。さらに野生型SeVそのものがヒトへ経鼻接種された臨床試験において、重篤な副反応がなかったことが報告されている(文献9)。

よって、本遺伝子組換え生物等がヒトに対して病原性を示す可能性は極めて低いと考えられる(別紙3-1 p8 「(4) 環境中での生存能力」を参照)。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程承認申請書に記載した本遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法を行うかぎり、宿主の遺伝子にウイルスゲノムが組み込まれることがないこと、及びゲノム間での組換えが起こる可能性が低いことから、病原性に起因した生物多様性において影響が生ずるおそれはない。

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

野生型SeVはマウスやラットを自然宿主とし、自然界では、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類動物が特定される。又、本遺伝子組換え生物等は、F遺伝子の

欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型SeVと本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

SeVから有害物質を産生するという報告はなく、又、感染に起因して有害物質が産生されるという報告もない。本遺伝子組換えSeVは野生型SeVと同一又は極めて近い構造になると考えられ、F遺伝子の欠失並びに導入した供与核酸による有害物質の産生に関する報告はない。

(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本遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法を行うかぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。又、本遺伝子組換え生物等の感染は、F発現ヘルパー細胞においてのみ起こるので、自然環境中で感染する可能性は極めて低いと考えられる。

本遺伝子組換え生物等及び発現するS-RBD-foldonタンパク質が、第三者、野生動植物等に対して有害作用を示す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

当該第一種使用規程承認申請書に従って使用等を行うかぎり、本遺伝子組換え生物等は環境へ拡散する可能性が低く有害物質を産生する可能性もないため、有害物質の産生性に起因した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

野生型SeVはげっ歯類動物を自然宿主とし、自然界では、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、F遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型SeVと本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

野生型SeVはげっ歯類動物を自然宿主とし、自然界では、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類動物が影響を受ける可能性がある。

一方、本遺伝子組換え生物等はF遺伝子を欠失しており、感染した細胞ではFタンパク質を発現せず二次感染できない（文献13,14）。野生型SeVと同一又は極めて近い構造であるため、本遺伝子組換え生物等が水平伝達する性質はないと考えられる。従って、本遺伝子組換え生物等に含まれる遺伝子のすべてが水平伝達しないと考えられる。

実際に、本遺伝子組換え生物等と搭載遺伝子だけが異なる類似の組換え生物等（SeV18+GFP/ΔF）の生体外への排出の検討を行った。類似の組換え生物等 1.3×10^8 CIU/body(0.1 mL/body、0.05 mL/nosril×2 nostrils)を雌ラットに経鼻接種し、5分経過後に非接種動物と同居させ、接種1～2時間後に鼻粘膜スワブ及び組織（気管、肺）を採取し、SeV由来のRNAゲノムを測定した。その結果、同居動物からは類似の遺伝子組換え生物等に含まれる遺伝子は検出されなかった。

類似の組換え生物等についても本遺伝子組換え生物等と同様にF遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型SeVと本質的に同一である（表1参照）。本遺伝子組換え生物等と類似の組換え生物等は、搭載遺伝子の違いはあるものの本質的な性質は同一であり、水平伝達の結果の解釈において問題となる相違ではないと判断した。

よって、この結果からも本遺伝子組換え生物等は水平伝達する性質はないと判断された。

表1 本遺伝子組換え生物等及び類似の組換え生物等 (SeV18+GFP/ΔF) の比較

	本遺伝子組換え生物等 (SeV18+S-RBD-foldon/ΔF)	類似の遺伝子組換え生物等 (SeV18+GFP/ΔF)
抗原導入遺伝子	S-RBD-foldon	GFP
Platform	SeV/ΔF	SeV/ΔF

(3) 影響の生じやすさの評価

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の投与を受けたヒトからの環境中への排出は極めて微量である。

仮に微量の本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散しても、本遺伝子組換え生物等は伝播に必要なF遺伝子を欠失しており、さらに野生型SeVと共存しても相同組換えは起こさないことから、第三者、野生動植物、他の微生物に供与核酸を伝達する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

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、本遺伝子組換え生物等は環境へ拡散する可能性が低く、核酸を水平伝達する可能性も極めて低いため、生物多様性影響が生ずるおそれはない。

5. その他の性質

該当なし。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物等が感染する動植物等の種類は野生型SeVと同等で、哺乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

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を行うかぎり、本遺伝子組換え生物等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、極めて微量である。

本遺伝子組換え生物等は、F遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型SeVと本質的に同一であり、本遺伝子組換え生物等はヒト及び他の哺乳動物に病原性、有害物質の産生及び核酸を水平伝達する性質をもたないことから、生物多様性への影響はないと考えられる。

また、本遺伝子組換え生物等は、野生型SeVのF遺伝子を欠失しており、F遺伝子産物はウイルス感染に必須であり、SeV-Fタンパク質を継続的に発現し本遺伝子組換え生物等にトランスに供給するFタンパク質発現細胞への感染が必要であるが、環境中でFタンパク質発現細胞に感染する可能性は極めて低く、本遺伝子組換え生物等はやがて環境中から消滅すると考えられる。

従って、第一種使用規程承認申請書に記載した本遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法を行うかぎり、本遺伝子組換え生物等による生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。