

第一種使用規程承認申請書

令和 5年 12月 19日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社
申請者 代表取締役医薬事業ユニット統括社長 荻村 正孝
住所 東京都品川区大崎 二丁目 1 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。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	遺伝子組換え水疱性口内炎ウイルス（VSV-GP / BI 1831169）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	ヒトの遺伝子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	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，治療施設内の施錠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最小限に留め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。 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，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) 投与後，患者の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，医師の判断により必要とされる期間におい

	て対策を講じる。 (7) 投与を受けた患者を他の区画と明確に区別された個室に入室させ、投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、当該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見直す。 (8) 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。 (9) 個室管理の期間中に患者がやむを得ず一時的に個室外に出る場合は、当該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当該患者に適切な指導を行う。 (10) 投与を受けた患者がやむを得ず個室管理の期間中に当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける必要がある場合には、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、当該患者に適切な指導を行う。 (11) 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、鼻腔スワブ、口腔スワブ、肛門スワブ検体等について、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。 (12) 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 (13) 患者から採取した検体は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に加え、他と区別された検査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て行う。 (14) 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、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加え、他と区別された検査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て行う。 (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) 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。 (17) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液並びに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) 患者が自宅等で用いたドレッシング材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で治療施設が回収し、不活化処理を行った上で廃棄する。 (19) 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、本遺伝子組換え生物等の原液は、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。 (20) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液、検体等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は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。 (21) 治療施設外で保管された未使用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処理又は焼却処理等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

表面糖タンパク質(G)を欠失し、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) (内臓向性、非神経向性株) のエンベロープ糖タンパク質(GP) で置換した遺伝子組換え水疱性口内炎ウイルス(VSV-GP) の作製には、野生型水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus, VSV) のインディアナ株を用いた。

分類

マイナス一本鎖RNAウイルス (ssRNA(-))

目：モノネガウイルス (Mononegavirales)

科：ラブドウイルス (Rhabdoviridae)

属：ベシクロウイルス (Vesiculovirus)

種：水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus, VSV)

VSVにはインディアナ株とニュージャージー株の2つの血清型があり、それぞれのウイルスのサイズ及び形態は同一であるが、感染動物において異なる中和抗体産生を誘発する (Cartwright & Brown, 1972; Kelley et al., 1972)。これまでに発生した米国におけるVSV流行のほとんどはニュージャージー株が原因であり (Rozo-Lopez et al., 2018)、インディアナ株による流行発生の頻度は低いことが報告されている (Fenner, 2017)。

VSVの分布

VSVは中南米及び北米の一部において生態学的ニッチで安定した状態にあり、熱帯地域で出現し、それよりも涼しい地域では夏季に散発的な流行を引き起こす (Letchworth et al., 1999)。VSV感染は主としてウシ、ウマ、ブタなどの家畜にみられ、まれにヒツジ、ヤギやラクダ科の動物に認められる。感染は通常、短期間で自己限定的であるが、乳牛又は授乳中のウマでは、乳房炎などの二次性細菌感染が発生する場合がある (Rozo-Lopez et al., 2018)。VSVは節足動物媒介ウイルスであり、サンドフライの刺咬により自然宿主間での伝播が発生する。また、高濃度 (約 10^6 TCID₅₀) のウイルスが存在する感染病変に直接接触することによる感染も認められるが、広範なウイルス拡散に至る可能性は低い (Stallknecht et al., 2001)。流行地域では、VSV中和抗体が家畜に限らず、多くの野生動物種で産生されていることが確認されているが、明確な媒介動物と野生生物との間でのウイルス感染環は明らかにされていない (Rozo-Lopez et al., 2018)。

1980年代に米国西部で発生したVSV感染事例において、VSVニュージャージー株のヒト感染パターン及び有病率が検証されている。この研究では中和抗体保有率は、臨床症状を示した感染者 (23%) の方が、ウイルスに曝露されているが臨床的に感染の病歴のないヒト (7%) に比べて有意に高かった。また、全体的にVSVが動物で流行している期間でもヒトに対する感染力は低かった (Reif et al., 1987)。

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。)

VSVは、増殖効率が高くさまざまな細胞で培養可能であることから、古くから代表的な非分節型マイナス鎖RNAウイルスとして研究用に用いられている。また、VSVをプラットフォームとした医薬品開発も進んでいる。

VSV-EBOV（Ervebo）は初のエボラウイルス予防ワクチンであり、FDA及びEMAから承認された（<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/ervebo>, EMA/CHMP/557387/2019, 2019）。Erveboの有効成分は、VSVインディアナ株のエンベロープ糖タンパク質を欠失させてザイル種エボラウイルスの表面糖タンパク質に置換した遺伝子組換えVSVである。非臨床試験では、サルでの有効性及び安全性が確認され、野生型VSVでみられる神経毒性が排除されていることが確認されている（De Wit et al., 2015）。臨床試験では、有効性及び安全性が確認されている。Erveboの使用及び廃棄による環境への潜在的な影響評価では、成人でのウイルス排出が限定的であること、ブタにおいて水平感染が認められないことなどから、ヒトの健康及び環境へのErveboの全体的なリスクは無視しうる程度と判断された（https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ervebo-epar-product-information_en.pdf; <https://www.fda.gov/media/134227/download>）。

VSV-IFN β -NISはインターフェロン（IFN） β 及びナトリウム・ヨウ素共輸送体（sodium iodide symporter, NIS）を発現する腫瘍溶解性遺伝子組み換えVSVであり、現在、腫瘍溶解性ウイルス候補品として各種の腫瘍に対する臨床試験が進行中である（<http://abedia.com/wiley>）。この腫瘍溶解性VSVは、注入時間が長い場合でもウイルス排出は認められず、介護者に対しても安全であったことが示されている（Merchan J.R. et al., 2020）。

VSVは、ウマ、ウシ及びブタを含む家畜において口蹄疫様疾患を引き起こすことから、これらのVSVをプラットフォームとする医薬品については、VSVの自然宿主であるブタにおけるバイオセーフティ評価が行われている。Ervebo及びVSV-IFN β -NISはいずれも、局所投与しても口蹄疫様症状を誘発せず、VSVと比較して病原性が減弱されていることが明らかになっている。VSV-IFN β -NISでは、ウイルスを接種したブタ及びそれらのブタとの直接接触によりウイルスに曝露された未接種ブタの排泄物中に、検出可能な感染性ウイルスの排出は認められなかった（Velazquez-Salinas et al., 2017）。Erveboはブタ体内で複製されるが、このワクチンウイルスが明白な臨床疾患を誘発することはなく、ウイルス排出はごくわずかであった（De Wit et al., 2015）。

3. 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

VSVは他のラブドウイルス科のウイルスと同じく、マイナス一本鎖RNAゲノムを収めた構造を持つ約70 × 180 nmの砲弾型ビリオンであり、中和抗体産生を促進する抗原性ペプロマー（スパイク）を有する脂質二重層エンベロープで周囲が覆われている（Banerjee, 1987）。

VSVゲノムはヌクレオカプシド又はリボ核酸タンパク質（N）、リン酸タンパク質（P）、マトリックスタンパク質（M）、糖タンパク質（G）及びラージプロテイン又はポリメラーゼ（L）の主要な5種類のタンパク質の情報から構成される（Rozo-Lopez et al., 2018）。Gタンパク質はエンベロープ上のスパイクを形成し、これを介して細胞を認識、融合することで細胞内への侵入が可能になる。Mタンパク質はウイルスのアッセムブリー及び粒子出芽、並びに宿主細胞の自然免疫応答の阻害に関与する。Nタンパク質は、ヌクレオカプシド核におけるウイルスゲノムのアッセムブリーを促進し、mRNA合成からゲノム複製への切り替えを制御することによりリボヌクレアーゼ耐性コア環境を形成する。Pタンパク質とLタンパク質

は、RNA依存性RNAポリメラーゼ反応を引き起こし、プラス鎖RNAのテンプレートとしてゲノムRNAを合成し、mRNA転写がN-P-M-G-Lの順で連続的に行われるように協働する(Rozo-Lopez et al., 2018)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

VSVは培養の容易さから幅広く研究され、その特徴が明らかにされている。VSVは昆虫から哺乳類まで、様々な動物の細胞で生育可能であるが、組み換えVSVの培養には主に以下の2種の細胞株が使用されている：シリアンハムスター腎細胞(BHK21細胞)、アフリカミドリザル腎細胞(Vero細胞)(Clarke et al., 2016)。

VSV感染は主にウシ、ウマ、ブタなどの家畜にみられる。実験室及び野外の条件下では、VSVはげっ歯類やウサギなどの動物種において感染の可能性があることが示されている(Martinez et al., 2003)。一般に、VSVの指向性は幅広く(Mead, et al., 2000)、これは、VSVのGタンパク質が全身に幅広く発現している低比重リポタンパク質(LDL)受容体を使って細胞に侵入することに基づくと考えられる(Muik et al., 2014)。

VSVはI型IFN反応に対する感受性を有している。実験的に、VSVは腫瘍細胞内で選択的に複製して細胞溶解を生じる一方、正常組織内でのウイルスの増殖は抗ウイルスIFN反応によって抑えられるため、正常細胞内で行き止まり感染を生じることが明らかになっている(Thacore, 1978)。

(3) 捕食性又は寄生性

該当なし

(4) 繁殖又は増殖の様式

ウイルスの転写及び複製は感染後数時間以内に起こり、接種後6時間～12時間でウイルス複製がピークとなる。検出可能な感染性ウイルスによるウイルス血症期は家畜では明らかではなく、おそらく血清タンパク質による阻害作用のためと考えられる(Rozo-Lopez et al., 2018)。VSVの曝露経路は、宿主応答及びそれに続く臨床症状の発現に影響を及ぼし、水疱性病変は口腔粘膜、ブタの鼻鏡、ウシの乳頭、ブタ、ウシ及びウマの蹄冠帯等、特定の曝露部位のみに認められる。

VSVによる宿主細胞の感染はまず、宿主細胞の細胞膜上に発現しているLDL受容体にGタンパク質が付着し、受容体を介したエンドサイトーシスによる細胞侵入により開始される。エンドソーム小胞内のpHの低下によって、Gタンパク質の構造変化がおこり、ウイルスエンベロープがエンドソーム膜と融合する。膜融合の結果、らせん状のヌクレオカプシドが細胞質内に放出される(Fenner, 2017; McCluskey, 2014)。

ヌクレオカプシドの放出に続いて開始される生合成過程は、ウイルスゲノムRNAの翻訳可能なmRNAへの転写である。ラブドウイルスなどのマイナス鎖RNAウイルスは、RNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)をウイルス粒子内にパッケージングしており、これはウイルスゲノムがmRNAに転写されるまでウイルスタンパク質の合成が進められないためであり、細胞質中にはこの機能を持つ宿主細胞由来の酵素が存在しない。RdRp複合体はヌクレオカプシドの成分として細胞質中に入る。ウイルスヌクレオカプシド遺伝子が転写されると、5'末端がキャップ化され、3'末端がポリアデニル化された単シストロン性mRNAの合成が行われる。ウイルスゲノムの複製には、マイナス鎖ゲノムRNAの合成のテンプレートとなる完全長のプラス鎖RNAを必要とする(Strauss & Strauss, 2008)。

一般にウイルス感染においては、ウイルスの侵入に対して、直ちに宿主の自然免疫応答が作動する。自然免疫応答では、パターン認識受容体によって、ウイルスRNA若しくはDNA、又はウイルス中間体など特定のウイルス成分が検出され、感染細胞及びその他の免疫細胞によって、I型IFN及び他の炎症性サイトカインが誘導される（Koyama et al., 2008）。

VSVの腫瘍選択性はこのI型IFN反応への感受性に基づくものである。VSVは全身に広範に分布するLDL受容体を使って侵入する段階では、非悪性「正常」細胞と腫瘍細胞を区別することはできない。VSVは正常細胞に感染することもあるが、正常細胞がウイルスの感染を認識し、I型IFNを産生・分泌して感染細胞及び隣接細胞に抗ウイルス状態を誘導することで、ウイルスの複製が妨げられている（Hastie et al., 2012; Hastie et al., 2013）。

これに対して、多くのヒト腫瘍、特に末期がんでは、抗増殖性、抗血管形成性、アポトーシスを促進し、抗腫瘍免疫を促進すべきI型IFN反応経路が正常に機能しない又は阻害された状態にあると考えられる（Felt & Grdzlishvili., 2017）。

(5) 病原性

VSV感染は主としてウシ、ウマ、ブタなどの家畜でみられ、まれにヒツジ、ヤギやラクダ科の動物に認められる。ウマの感染は、米国で時折みられるが、短期間で自己限定性であることが多い（McCluskey, 2014）。家畜におけるVSVのウイルス感染価に関するデータは限られている。ある研究において（Smith et al., 2012）、ウシ及びブタの両方に対して、感染したブユの咬傷を介して異なるVSVニュージャージ一株を実験的に曝露し、ウイルスの排出をモニターしている。ブタでは鼻腔スワブで最大のウイルス排出が認められ、力価 10^6 及び 10^7 TCID₅₀/mLに達した。ウシでも鼻腔スワブで最大のウイルス排出が認められ、力価は $10^2 \sim 10^6$ TCID₅₀/mLの範囲であった。さらに、感染したウシと感染していないウシを同居飼育し、VSVの接触感染の可能性をモニターした。接触した動物8例中2例で伝播が認められたが、接触感染動物で感染による臨床症状を示した動物はなかった。

実験室及び野外の条件下で、VSVはげっ歯類やウサギなどの動物種において感染の可能性があることが示されている（Martinez et al., 2003）。また、VSVはげっ歯類及びサルでは神経毒性を惹起することが知られている（Muik et al., 2014）。

VSV感染は主として自然免疫応答によって制御されるが、獲得免疫も誘導されることが知られている。VSVをマウス、イヌ、及びサルに単回接種すると、典型的な獲得免疫反応が惹起され、中和抗体産生を含むT細胞及びB細胞応答が認められることが報告されている（Hangartner et al., 2006; Jenks et al., 2010; LeBlanc et al., 2013）。

VSVは口蹄疫様疾患を引き起こす。VSV感染の最も特徴的な症状として、口腔内、乳房及び蹄冠帯周辺に粘膜小水疱及び潰瘍が形成される。臨床的に、VSV感染による症状は口蹄疫との鑑別が難しく、このため、世界中の口蹄疫コントロールプログラムにおいて重要な検討事項となっている。VSVによる死亡率は低いものの、感染動物における体重減少、肥育不良、乳量減少及び乳房炎などの感染に伴う一般状態の変化や症状は、生産性に悪影響を及ぼす。

VSVはヒトの病原体ではないとみなされているが、家畜におけるVSV感染の発生地域に在住しているヒトは血清有病率が高いことが報告されている。しかしながら、ほとんどの血清反応陽性者は臨床疾患を発症しておらず、発症しても重度の症状はみられない（通常は軽度のインフルエンザ様症状）（Fine et al., 2015; Holman et al., 2009）。VSVによる脳炎の1症例が報告されている（Quiroz et al., 1988）。

患者はパナマの3歳の男児で、発熱、悪寒、嘔吐、全身性強直性間代性発作を呈して来院し、第5病日に喉のサンプルからVSVインディアナ株が分離され、抗体価の上昇が認められた。

(6) 有害物質の産生性

ウイルス成分及び感染性ウイルス粒子自体を除き、VSV感染中に他の成分は産生されない。

(7) その他の情報（不活化条件等を含む）

物理作用及び化学作用に対するVSVの抵抗性

VSVは、1%ホルマリン、10%次亜塩素酸ナトリウム、及びその他の有機溶媒（二酸化塩素、70%エタノール、2%グルタルアルデヒド、2%炭酸ナトリウム、4%水酸化ナトリウム、及び2%ヨードフォア消毒剤など）並びにその他の一般に使用されている消毒剤に曝露することにより容易に不活化される。また、VSVは58℃で30分間置くことによっても不活化される。VSVは日光によっても不活化されるが、低温では長期間生存する（CABI - Invasive Species Compendium, 2019; OIE - World Organisation for Animal Health, 2020）。

VSV-GPの不活化条件は野生型VSVに対する条件と同一である。VSVのGタンパク質の代わりにLCMV GPタンパク質を発現するVSV-GPでは、細胞侵入に利用する受容体が異なるものの、物理作用及び化学作用に対するウイルスの抵抗性への影響は認められないことから、同じ不活化条件を適用する。

VSV-GPを用いた*in vitro*の検討では、乾燥によって感染性が低下することが明らかになっている。乾燥条件下で1時間以内に力価は着実に100分の1以下に低下し、24時間後には、感染性ウイルスは検出されず、意図しない伝播の可能性はさらに低くなる。

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

供与核酸はLCMV GPタンパク質をコードする[redacted]である。[redacted]

[redacted]などの要素は含まない。

VSV骨格に導入されたLCMV GPタンパク質の配列はLCMV [redacted]のGPタンパク質（GenBank Accession番号は[redacted]に記載）に由来する。この配列はヒトでの発現に対して[redacted]され、[redacted]されたものである。[redacted]されたLCMV GPタンパク質の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を[redacted]の[redacted]及び[redacted]にそれぞれ示す。

LCMVは1933年に初めて分離されたアレナウイルス科に属するウイルスで、ヒトにおいてげっ歯類媒介性のウイルス感染症であるリンパ球性脈絡髄膜炎を引き起こす（CDC Fact Sheet; <https://www.cdc.gov/vhf/lcm/pdf/factsheet.pdf>）。LCMVの自然宿主はハツカネズミ（*Mus musculus*）とされる。ハツカネズミにおける感染は地理的な位置によって異なる可能性があるが、米国における調査ではハツカネズミの5%がLCMVを保有しており、病気を発症しないまま生涯にわたってウイルスを伝播することができると推定されている。他の種類のげっ歯類、例えばハムスターは自然の保有宿主ではないが、ブリーダー、ペット店、または家庭内でハツカネズミ由来のLCMVに感染する可能性がある。LCMVのヒトへの感染は、野生ハツカネズミからの感染が最も起こりやすいが、ペットのげっ歯類からの感染も報告されている。LCMV感染はヨーロッパ、アメリカ大陸、オーストラリア、日本で報告されており、このウイルスに感染したげっ歯類は世界中どこにでも存在する可能性がある。LCMV感染はこれまで過小報告されていると考えられ、発生率または地理的地域別の有病率の推定値を決定することは困難であることが多い。都市部で実施されたいくつかの血清学的研究によれば、ヒト集団におけるLCMV抗体の保有率は2%～5%の範囲であることが示されている。また、妊娠中の感染により、先天性水頭症、脈絡網膜炎、及び精神遅滞が引き起こされ得ると考えられている。

(2) 構成要素の機能

LCMV GPタンパク質はエンベロープを形成するタンパク質で、広範に細胞表面に発現している α -ジストログリカン（ α DG）のような細胞表面の受容体に結合することが知られている（R21-2987 Hastie et al., 2016）。LCMV [redacted]のGPタンパク質が有する結合能と複数の受容体が存在することにより、幅広い細胞や生物が宿主となり得る。VSVのGタンパク質がLCMV [redacted]のGPタンパク質に置き換わっても、広範な指向性は血液細胞及び神経細胞を除いて保持されていると考えられている（R19-0813 Muik et al., 2014）。別の細胞の受容体の利用やVSV-GPIにおける神経毒性の消失を除き、VSVが介在するインターフェロン感受性のようなウイルスの特性は保持されていると考えられる。LCMV GPタンパク質は細胞毒性を示さない（Beyer et al., 2001）。LCMV GPを含むプラスミド、[redacted]は[redacted]されたものである。このプラスミドは汎用されており、構成要素の塩基配列及び機能は明らかになっている。LCMV GPタンパク質の[redacted]やこの配列の[redacted]ことから、相同性検索は省略した。

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造

プラスミド [REDACTED] にはVSV-GPの完全なゲノム配列が含まれている（[REDACTED] の [REDACTED] ）。VSV骨格の塩基配列はVSVの公表配列（VSVインディアナ株セロタイプ；R20-0621 Lawson et al., 1995）に由来している。VSVのエンベロープを形成するGタンパク質の配列がすべて、ヒト発現用に [REDACTED] され、[REDACTED] されたLCMVのエンベロープを形成するGPタンパク質の配列に置き換えられた。VSV-GPの全ゲノムは [REDACTED] に制御され、ゲノムの正しい終点を示す [REDACTED] の [REDACTED] 配列と [REDACTED] の配列が続く。VSV-GPのプラスミドマップを [REDACTED] の [REDACTED] 及び [REDACTED] に、VSV-GPの全ゲノム配列を [REDACTED] の [REDACTED] に、VSV-GPを構成する各タンパク質のアミノ酸配列を [REDACTED] の [REDACTED] に示す。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

VSV-GPは以下の5つのプラスミドをHEK293T細胞に導入することにより作製される。

- [REDACTED]
LCMV GPタンパク質の配列も含めたVSV-GPのゲノムの完全配列を含む（[REDACTED] の [REDACTED] ）
- [REDACTED], [REDACTED] 及び [REDACTED]
ウイルス複製に必須の、ウイルスを構成する3つのタンパク質（Nタンパク質、Pタンパク質及びLタンパク質）をコードするヘルパープラスミド（[REDACTED] の [REDACTED] ）
- [REDACTED]
[REDACTED] をコードするヘルパープラスミド（[REDACTED] の [REDACTED] ）

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

VSV-GPはドイツにて製造される。VSV-GPの製造工程の概略は以下のとおりである。

融解したマスターセルバンク [REDACTED] させる。[REDACTED] を回収し、[REDACTED] した後、[REDACTED] を行う。[REDACTED] 工程でウイルスを精製し [REDACTED] 工程で処方調製して原薬を得る。この原薬を無菌ろ過してガラスバイアルに充填し、製剤を得る。得られた原薬及び製剤について、それぞれ出荷試験を実施する。VSV-GPの育成の経過の詳細は [REDACTED] 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

移入した核酸は上記3 (2) に記載した要領で宿主細胞に導入された後、そして、細胞培養中に行われる VSV-GPの再構築プロセスにおいて、マイナス一本鎖RNAゲノムの一部として存在している。

VSVのようなマイナス鎖のRNAウイルスでは通常遺伝子組換えは起こらないとされている (R21-3000 Pringle, 1982)。VSV-GPの複製は宿主細胞の細胞質で起こる。複製の際にDNA中間体は生成されず、複製は宿主細胞の核内では起こらず、複製サイクルにおいて宿主細胞の核タンパク質を必要としない (Fields, 2013)。宿主細胞のmRNAとの組換え現象は確認されているが、組換えが起きてはならないとされているVSVのポリメラーゼ (Lタンパク質) に関しては専門家の議論の余地がある (R21-2989 Lai, 1992)。

以上のことから、VSV-GPのゲノムが宿主細胞のゲノムに組み込まれるリスクは無視できる。さらに、VSVは一本鎖ゲノムであり、常にヌクレオカプシド構造を形成していることから、他のウイルスとの組換えが起こる可能性は極めて低く、染色体への組み込み、組換え及び再集合に係るリスク、加えて、持続感染性、潜伏感染又は再活性化の可能性は極めて低い。

マスターシードウイルスを用いて[]及び[]スケールで製造されたVSV-GPの[]を調べたところ、元の塩基配列と完全に一致していた。

治験製品におけるVSV-GPの遺伝的安定性は[]により確認する予定である。

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

非臨床試験

非臨床におけるVSV-GPの薬物動態及び生体内分布の評価では、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) 法を用いた総ゲノム量の測定、及び50%組織培養感染量 (TCID₅₀) 法を用いた感染性ゲノム量の測定を行った。健康及び担癌モデルマウスを用いた生体内分布評価で使用したqRT-PCR法の検出限界 (LOD) 及び定量下限 (LLOQ) を含む各分析方法の詳細を[]に記載する。

臨床試験

VSV-GPは野生型ウイルスとして存在しない。VSV-GPは[]された偽型VSVであり、エンデミックな様式で自然界に存在しない。

VSV-GPは、最新のシーケンシング分析によってGPの存在を確認することで、野生型のVSVと区別することができる。

ウイルス排出の検査のための検体は[]に従って収集する。計画している国内臨床試験では、[] [] 検体として血液検体を、ウイルス排出検体として口腔スワブ、鼻腔スワブ、肛門スワブ及び尿検体を収集する。

臨床試験検体の分析方法の詳細は[]に記載する。

6. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

構成要素 VSV-GPは、野生型VSVのGタンパク質を内臓向性、非神経向性██████であるLCMVのGPタンパク質で置換した遺伝子組換えキメラウイルスである。置換された糖タンパク質のほかに、宿主と異なる要素はない。

特性 ウイルスの糖タンパク質はビリオンのエンベロープ上のスパイクを形成し、これを介してウイルスは細胞を認識、融合することで細胞内へ侵入する。VSVの糖タンパク質はVSVの指向性の主要な決定因子であり、幅広い宿主動物種の様々な真核細胞の感染を仲介することが知られている。VSVの広い指向性は、ウイルスの主要な細胞内侵入口となるLDL受容体の広範な発現によるものである。また、このVSVのGタンパク質の性質によりIFN反応が欠如している神経細胞へウイルスの侵入が可能となり、ウイルスの複製と神経毒性が引き起こされる（Hastie et al., 2013）。LCMVの██████の糖タンパク質は神経細胞への侵入をおこさないと報告されていることから、この糖タンパクがVSVのGタンパク質と置き換えるために選択された（Muik et al., 2011）。実験的に、この置換により神経毒性が起こらなくなることが証明されている（Muik et al., 2014）。

VSVは、マウスで迅速かつ強固な中和抗体応答を引き起こすことがよく知られており、中和抗体は全身反復投与時に腫瘍溶解効果を阻害すると予想される。中和抗体応答の標的は免疫原性が極めて高いVSVのGタンパク質であるが、LCMV-GPIは中和抗体応答を誘発しないことが示された（Muik et al., 2014）。

VSV感染は主として感染動物の自然免疫応答によって制御される。VSVをマウス、イヌ及びサルに単回接種すると、典型的な獲得免疫反応が惹起され、中和抗体産生を含むT細胞及びB細胞応答が起こることが報告されている（Hangartner et al., 2006; Jenks et al., 2010; LeBlanc et al., 2013）。健康なビーグル犬におけるVSV-GPの忍容性評価でも同様の結果が得られ、2回目又は3回目の投与後にのみ少量の中和抗体が検出された。

VSV-GPIは、異なる細胞受容体を利用すること及び神経毒性の排除を除き、VSVが介するIFN感受性などウイルスのその他の特性は保持されると考えられる。

生存能 VSVとの直接の比較は行っていないが、VSV-GPIは風乾により、速やかにその感染性が低下する。風乾開始後1時間以内に力価は着実に100分の1以下に低下し、24時間後には、感染性ウイルスは検出されない。また、糞中にウイルスを混和した場合、VSV-GPの生残性は非常に低い。

増殖能 VSV-GPIは野生型VSVと同様の増殖キネティクスを有することが明らかになっているが、最大力価は若干小さい。力価の算出には、コンフルエントBHK-21単層に対するプラークアッセイを使用した（Muik et al., 2014）。

ヒトの各種細胞を用いた*in vitro*評価において、ヒトの肝細胞、神経細胞／神経膠細胞及び線維芽細胞に比べてVSV-GPIは腫瘍細胞で選択的に増殖することが確認されている。

感染能・感染宿主 VSVの広い指向性は、VSV-GPでも保持されていると考えられる。しかしながら、VSV-GPIは、VSVと異なり神経細胞及び血液細胞に対して感染力を持たないことが示されている（Muik et al., 2011）。

病原性 VSV-GPの病原性についても、神経向性（神経細胞へのウイルスの侵入を可能にするGタンパク質に関連する）を除きVSVの特性がほぼ保持されると考えられる。また、Gタンパク質をLCMV GPIに置換すると、神経毒性が完全に排除されることが知られている。

生体内分布試験及び毒性試験において、VSV-GPIはVSVと同様のプロファイルを示したが、神経毒性は排除されていることが確認された。したがって、免疫抑制状態の患者を含め、VSV-GPでは、VSVでみられる神経毒性のリスクはないと考えられる。

VSV-GPが神経細胞を標的とせず、神経毒性が排除されていることは、非臨床試験において明らかにされている（██████参照）。

また、種々のヒト細胞を用いた*in vitro*評価において、VSV-GPIは腫瘍細胞で選択的に増殖することが確認された（██████参照）。

さらに、健康なブタを用いて、病原性および排出を評価した。ブタは鼻の先端部に██████ TCID₅₀ のVSVまたはVSV-GPを皮内接種した。VSV-GPIはブタにおいて病原性を示さず（すなわちVSV-GP感染動物の鼻端に水疱性の病変は観察されなかった）、投与部位である鼻腔スワブにおけるわずかにウイルスがみられたことを除き、排出は検出されなかった（██████参照）。

結論として、VSV-GPIはVSVの自然宿主動物種であるブタに対して病原性がなく、VSV-GPIはVSVと比較して病原性が減弱され、したがってヒトへの治療のための使用中に家畜に感染リスクをもたらす可能性は極めて低いことが示唆された。

野生型VSV、LCMV、VSV-GPの感染と宿主範囲に関する比較考察

VSVは節足動物媒介ウイルスであり、サンドフライの刺咬により自然宿主間での伝播が発生する。VSVはヒトへも感染するが、ヒトからヒトへの感染は報告されておらず、ヒトは「行き止まり」宿主であることが示唆されている。

LCMVはげっ歯類の病原体で、自然宿主（ハツカネズミ）間における感染は、感染宿主における感染性成分（例：尿、糞、唾液、巣材）が非感染宿主に直接接触（例：目、鼻、切り傷）することで起こる。LCMVについてはベクター媒介感染または昆虫細胞感染は報告されていない。

VSV-GPの感染が起こる場合の経路は不明であるが、両宿主ウイルスの感染経路を考慮すると、直接接触、排泄物や体液への接触、または媒介感染によって起こる可能性が考えられる。VSV-GPの標的細胞選択性はLCMVのGPIに依存することから、ベクター媒介によるVSV-GPの感染の可能性は低いと思われる。VSV-GPの宿主範囲は、まず宿主細胞上の受容体によって決定され、その受容体にGPタンパク質が結合した場合に細胞がウイルスに曝露されて感染が成立し得る。このことからおそらくVSV-GPの感染は、VSVに感染する細胞よりもLCMVに感染する細胞で起こりやすくなると考えられる。VSVは宿主の自然免疫による抑制を受けるため、VSV-GPの標的細胞選択性に関してはLCMVと同様、あるいはそれ以下に制限される可能性が高い。VSV-GPでは、VSV（げっ歯類、ウシ、ブタ）およびLCMV（ハツカネズミ）の宿主範囲は維持されると予想される。しかし、感受性の高い宿主の範囲が変化する可能性については、今のところ否定できない。

III. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1. 使用等の内容

ヒトの遺伝子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

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、治療施設内の施設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

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最小限に留め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。

希釈液は、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。

運搬

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。

患者への投与

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、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

投与後、患者の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、医師の判断により必要とされる期間において対策を講じる。

投与を受けた患者を他の区画と明確に区別された個室に入室させ、投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、当該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見直す。

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。

個室管理の期間中に患者がやむを得ず一時的に個室外に出る場合は、当該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当該患者に適切な指導を行う。

投与を受けた患者がやむを得ず個室管理の期間中に当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける必要がある場合には、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、当該患者に適切な指導を行う。

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、鼻腔スワブ、口腔スワブ、肛門スワブ検体等について、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。

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

患者から採取した検体は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に加え、他と区別された検査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て行う。

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、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加え、他と区別された検査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て行う。

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

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。

本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び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。

患者が自宅等で用いたドレッシング材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で治療施設が回収し、不活化処理を行った上で廃棄する。

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、本遺伝子組換え生物等の原液は、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。

本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液、検体等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は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。

治療施設外で保管された未使用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処理又は焼却処理等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

以下の検体を用いてウイルス排出に関する評価を行う予定である。本遺伝子組み換え生物等を投与した患者から、以下の検体を採取することとする。

- ・ 口腔スワブ
- ・ 鼻腔スワブ
- ・ 肛門スワブ
- ・ 尿

上記の採取した検体は、qPCR及びウイルス培養により評価する。まず、ウイルスが検出されるかどうかqPCRを実施して検討する。qPCRの結果が陰性である場合、追加の試験は必要ない。qPCRの結果が陽性である場合、ウイルス複製／感染性を裏付ける又は否定するためにウイルス培養を実施する。

検体採取時期は[]に示す。

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

生物多様性影響を防止するための措置報告の手順を[]に示す。

なお、III.2に記載したとおり、治療施設特有の手順に従い、バイオハザード廃棄物に関連する正規措置を適用する。患者への投与、投与後の管理、患者検体の取扱い及び感染性廃棄物の廃棄において、VSV-GPの環境への放出を最小限に留めるよう治験実施施設の措置を適用し、治験実施計画書及び規則に準拠する。さらに、患者から第三者へ放出される可能性は極めて低いものの、中和するための予防措置を定める一方、PCR測定による迅速且つ正確な診断が可能、インフルエンザ様症状を呈する場合には対症療法を行う。

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

5.1 非臨床試験

VSV-GPの生体内分布及び安全性を評価するため、一連の非臨床試験を実施した。以下に各試験の結果を要約するとともに、非臨床試験の概要を[]に一覧で示す。

5.1.1 環境安全性

健康マウスにおける生体内分布

健康なマウスにVSV-GPを[] TCID₅₀の用量で単回静脈内＋皮下投与したときの生体内分布を検討した。試料は投与後2, 24, 72時間, 8, 61日に採取した。qRT-PCR法でゲノム物質を測定した結果、投与後61日では脾臓以外の組織でLLOQ以上のゲノム物質は検出されなかった。一方、脾臓では投与後61日の動物[]例中[]例で、LLOQ以上のゲノム物質が定量された。TCID₅₀法で分析した結果、感染性物質は検出されなかった（LOD：[] TCID₅₀ units/mL or g）[]。この生体内分布の結果の詳細を[]に示す。

担癌マウスにおける生体内分布及び排出

担癌マウスにVSV-GPを[] TCID₅₀の用量で単回静脈内、又は[] TCID₅₀の用量で単回腫瘍内投与したときの生体内分布を検討した。試料は投与後2, 24, 72時間, 8, 61日に採取した。qRT-PCR法でゲノム物質を測定した結果、静脈内投与後61日の動物[]例中[]例の脾臓で、LLOQ以上のゲノム物質が定量された。それ以外のすべての組織で、ゲノム物質濃度はLLOQ未満であった[]。

また、担癌マウスにVSV-GPを[] TCID₅₀の用量で単回静脈内＋腫瘍内投与したときの生体内分布及び排出を検討した。生体内分布検討用の試料は投与後2, 24, 72時間, 8, 61日に採取した。qRT-PCR法でゲノム物質を測定した結果、投与後61日では生殖臓器を含むほとんどの組織で、ゲノム物質濃度はLLOQ付近あるいはLLOQ未満であった。一方、脾臓では投与後61日の動物[]例中[]例で、LLOQ以上のゲノム物質が定量された。さらにTCID₅₀法で分析した結果、感染性物質は検出されなかった（LLOD：[] TCID₅₀ units/mL or g）。排出検討のために、口鼻スワブ及び注射部位スワブを投与後2, 24, 72時間に、尿及び糞を投与後24時間に採取した。ゲノム物質の排出は投与後24時間の腫瘍内注射部位スワブで最も高く、投与後72時間でも腫瘍内注射部位スワブ試料の40%でゲノム物質が残存していた。投与後2時間では大部分の口鼻スワブ試料で、投与後24時間では一部の口鼻スワブ、尿、糞試料で、排出されたゲノム物質が定量された。投与後72時間ではすべての試料がLOD又はLLOQ未満であった。TCID₅₀法で分析した結果、腫瘍内注射部位スワブにはLLOQ以上の感染性物質が含まれていた。口鼻スワブ、尿、糞試料にはLLOQ以上の感染性物質は含まれていなかった[]。これらの試験における生体内分布及び排出の結果の詳細を[]に示す。

マウスにおける排出及び伝播

正常免疫を有する[]担癌マウス又は免疫抑制状態の[]担癌マウスに、VSV-GPを[]又は[] TCID₅₀の用量でそれぞれ腫瘍内投与したときの排出を検討した。いずれの群のいずれの時点から採取した排出試料（糞、尿、鼻スワブ、肛門スワブ及び注射部位スワブ）中にも生存している複製VSV-GPは検出されなかった[]。この試験における排出の結果の詳細を[]に示す。また、[]担癌マウスに[] TCID₅₀を単回腫瘍内投与後、健康な共飼育マウスへのVSV-GP伝播は認められず、VSV-GPが排出されないことが確認された[]。

ウサギにおける生体内分布及び排出

健康なウサギにVSV-GPを[] TCID₅₀の用量で単回静脈内投与したときの生体内分布及び排出を検討した。感染性物質は、投与後7日の臓器（脾臓、心臓、腎臓、脳、肺、肝臓及び生殖腺）では検出されなかった。また、投与後いずれの時点においても排出試料（鼻スワブ、唾液、糞）中に感染性物質は検出されなかった[]。

イヌにおける排出

健康なビーグル犬にVSV-GPを[] TCID₅₀の皮下投与及び[] TCID₅₀の静脈内投与を組み合わせ、反復投与したとき、排出試料（糞、尿、鼻スワブ、口腔スワブ及び注射部位スワブ）及び血液中に感染性物質は検出されなかった []。

家畜における病原性及び排出

健康なブタにおける病原性及び排出を検討した。ブタの鼻鏡に[] TCID₅₀のVSV又はVSV-GPを皮内投与した。VSV-GPはブタに対して病原性がなく（VSV-GPを接種したブタの鼻鏡に水疱性病変は認められなかった）、投与部位の鼻スワブで極めて少量のウイルスが検出されたことを除き、排出は認められなかった []。

生残性

風乾ウイルス又は糞中に混合したウイルスを用いた試験から、VSV-GPの生残性は非常に低いことが示された。したがって、接触したヒト又は環境中にVSV-GPが拡散するリスクは極めて限定的であると予測される []。これらの試験結果の詳細を[]に示す。

5.1.2 毒性

VSV-GPを用いた毒性試験の結果は、[] 及び[]に記載する。

臨床試験

VSV-GPを用いた国内臨床試験は未実施であるため、該当する結果はない。

6. 国外における使用等により得られた情報

VSV-GP（BI 1831169）を用いた臨床試験が2022年3月から欧米諸国で開始されている。（[] 参照）

その他のベクター

VSV-EBOV（Ervebo）はエボラウイルス糖タンパク質を発現する組換えVSVインディアナ株ウイルスで、EMA及びFDAから最近承認された(EMA/CAT/852602/2018, 2019; R19-0719 De Wit et al., 2015)。Erveboの有効性と安全性は臨床試験で確認されており、Erveboの使用と廃棄による潜在的な環境への影響も評価された。成人でのウイルス排出は限定的、非ヒト霊長類における毒性試験の結果、及びブタにおける水平感染の欠如に基づきヒトの健康及び環境へのErveboの全体的なリスクは無視しうる程度と判断された（EPAR-Ervebo, 2019; FDA-Ervebo, 2019）。Erveboはブタ体内で複製されるが、明らかな臨床疾患を誘発することはなく、ウイルス排出もごくわずかであった（R19-0719 De Wit et al., 2015）。

VSV-IFN β -NISは、インターフェロン（IFN） β 及びナトリウム・ヨウ素共輸送体（sodium iodide symporter, NIS）を発現する腫瘍溶解性遺伝子組み換えVSVであり、現在、様々な腫瘍に対する臨床試験が行われている（<http://abedia.com/wiley>）。この腫瘍溶解性VSVは注入時間が長い場合でもウイルス排出は認められず、介護者にとって安全であることが実証された（Merchan et al., 2020）。VSV-IFN β -NISでは、ウイルスを接種したブタ及びそれらのブタとの直接接触によりウイルスに曝露された未接種ブタの排泄物中に、検出可能な感染性ウイルスの排出は認められなかった（R19-0720 Velazquez-Salinas et al., 2017）。

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

VSV-GPの宿主動物種の範囲は、野生型VSVより広くなることはないと考えられる。VSVも、GPタンパク質遺伝子の由来であるLCMVも微生物に感染することは報告されていないことから、VSV-GPが有害物質の産生を通じて他の微生物に影響を及ぼす可能性は極めて低い。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い。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当なし

(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

影響を受ける可能性のある微生物は特定されず、このため、生物学的多様性に関する微生物に対する有害作用のリスクはないと考えられる。

2. 病原性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

VSV感染は、主にウシ、ウマ、ブタなどの家畜でみられる。実験室条件下で、VSVはげっ歯類やウサギなど、他の動物種において感染の可能性があることが示されている。このため、国内では、イノシシや野生のウマなどのほか、野生のげっ歯類、ウサギ及びヒトを含む他の野生動物がVSV-GPIにより影響を受ける可能性があると思われる。異なる細胞受容体を使用することを除けば、VSV媒介IFN感受性など、他のウイルス特性は保持されると考えられる。したがって、野生型VSVと比較してVSV-GPがより広い宿主動物種の範囲を示す、又は野生動物へのリスクが高くなるとは考えられない。

(2) 影響の具体的内容の評価

VSV-GPIは、自然宿主であるブタでの病原性が認められなかったこと、VSVでげっ歯類及びサルで証明されている神経毒性が減弱されるよう遺伝子改変されていること、VSV-GPIは様々な実験動物への投与により忍容性が確認されていること、各種ヒト細胞における検討により腫瘍細胞選択性が示されていることから、感受性のあるヒト又は動物に感染しても、病原性を示す可能性は低いと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

VSVと同じくVSV-GPもI型IFN応答に感受性であり、正常組織中でのウイルス増殖は抗ウイルスIFN応答により抑制されて行き止まり感染となり、それ以降の感染は起こらないのに対して、がん細胞においては選択的に複製して細胞溶解につながるものが非臨床試験の結果から示唆されている。VSV-GPは、主に腫瘍細胞等のI型IFN応答が不十分な細胞で複製することから、動物及びヒトにおけるVSV-GPの病原性リスクは低いと予想される。

非臨床試験でVSV-GPの意図しない伝播及びこれに伴う排出リスクを評価した。マウス及びイヌでは排出は認められず、マウスでケージ内伝播は報告されなかった。このため、VSV-GPの複製を介した望ましくない伝播の可能性は無視しうる程度であると考えられる。さらに、VSV-GPがヒトへの治療のための使用中に家畜に感染リスクをもたらさないことを確認するため、VSVの自然宿主動物種であるブタを用いて試験を実施した。VSV-GPIはブタに対して病原性を示さず、VSV-GPIはVSVと比較して病原性が減弱され、したがってヒトへの治療のための使用中に家畜に感染リスクをもたらす可能性は低いことが示唆された。

また、VSV-GPを用いた*in vitro*データから、乾燥によって感染性が低下することが明らかになっている。乾燥条件下で1時間以内に力価は着実に100分の1以下に低下し、24時間後には、感染性ウイルスは検出されず、意図しない伝播の可能性はさらに低くなる。このため、適切な保存条件を欠く状況での排出又は漏出において、VSV-GPが引き続き生存するリスクは無視しうる程度であると考えられる。

健康な非担癌動物では高用量VSV-GPの投与後に疾患症状は認められないこと、これまで実験動物を用いて得られた排出試料中にVSV-GPは排出されないか、されても非常にわずかであること、共飼育マウス間での伝播が観察されてないこと、感受性の高い動物種であるブタにおいて病原性がないこと及び乾燥状態における室温でVSV-GPの安定性及び生残性が低いこと等の知見を総合すると、VSV-GPの病原性に基づき、生物多様性影響が生じる可能性は無視しうる程度であることが強く示唆される。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規定に従って使用等を行うかぎり、病原性に起因した生物多様性影響が生ずるリスクは無視しうる程度である。

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

VSV-GPのウイルスタンパク質産生能は、VSVと同一であると考えられる。ウイルス自体を除き他の有害物質は産生されず、遺伝子組換えウイルスに導入された外来遺伝子であるLCMV GPタンパク質は追加のリスクをもたらさない。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当なし

(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

有害物質の産生は特定されていないため、生物多様性影響を生じるリスクはない。

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

VSV感染は、主にウシ、ウマ、ブタなどの家畜でみられる。動物実験では、VSVはげっ歯類及びウサギなどの動物種においても感染の可能性があることが明らかになっている。したがって、日本国内ではイノシシや野生のウマなどのほか、野生のげっ歯類、ウサギ及びヒトを含む他の野生動物が影響を受ける可能性が考えられる。VSV-GPIは、VSVを宿主としており、細胞の侵入に用いる糖タンパク質の構造以外は宿主の特性をほぼ受け継いでいることから、VSVと同様の野生動物が影響を受ける可能性がある。野生型VSVと比較してVSV-GPがより広い宿主動物種の範囲を示す、又は野生動物へのリスクが高くなるとは考えられない。

また、VSV又はVSV-GPIにより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

宿主であるVSVを含むラブドウイルスは、感染細胞の細胞質で複製し、ゲノムがDNAの形態をとらないことから、感染動物の染色体に遺伝子を組み入れる性質を持たない。また、一本鎖ゲノムを有し、常にヌクレオカプシド構造をとること等から、他のウイルスとの交雑・組み換えを起こす可能性は極めて低い。

(3) 影響の生じやすさの評価

遺伝子組換えウイルスが第三者又は哺乳動物等水平感染する可能性は極めて低いと考えられる。さらに染色体の組込み、組換え及び遺伝子再集合、ならびに持続性、潜伏又は再活性化に伴うリスクが生じる可能性は極めて低い。

したがって、野生の動物／植物又は微生物において、核酸を水平伝達する特性による影響が生じる可能性がある種は特定されなかった。組換えウイルスの核酸が感染細胞の染色体に組み込まれ、2種類のウイルスゲノムの組換えが生じる可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程に記載した方法に従って取り扱う場合、この遺伝子組換えウイルスの水平伝達に基づき、生物多様性影響を生じるリスクは無視しうる程度である。

5. その他の性質

追加情報は必要としない。

V. 総合的評価

第一種使用規定に従った使用を行う限り、VSV-GPの環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしてもその量は極めて微量と考えられる。

VSV-GPが他の微生物に影響を及ぼす可能性は極めて低く、影響を受ける可能性のある微生物は特定されないことから、生物学的多様性に関する微生物に対する有害作用のリスクはないと考えられる。

VSV-GPにより家畜並びにヒトを含む野生動物が影響を受ける可能性があるが、野生型VSVと比較してVSV-GPがより広い宿主動物種の範囲を示すとは考えられない。しかし、VSV-GPは、自然宿主であるブタでの病原性を示さなかった。また、Gタンパク質をLCMV GPに置換すると、神経毒性が完全に排除されることが明らかになっている。非臨床試験では、検討された治療用量と経路においてVSV-GPは十分な忍容性を示しており、また薬理学的研究によれば、VSV-GPもVSVと同様に健康な細胞に感染するものの、短時間でI型IFNならびに自然免疫により制御されることが分かっている。これらのことから、感染した動物において症状を生じるリスクは非常に低いと考えられる。

以上を踏まえ、第一種使用規定に従って使用等を行うかぎり、病原性に起因した生物多様性影響が生ずるリスクは無視しうる程度である。

有害物質の産生は特定されていないため、生物多様性影響を生じるリスクはない。

宿主であるVSVを含むラブドウイルスは、感染細胞の細胞質で複製し、ゲノムがDNAの形態をとらないことから、感染動物の染色体に遺伝子を組み入れる性質を持たない。また、一本鎖ゲノムを有し、常にヌクレオカプシド構造をとること等から、他のウイルスとの組み換えを起こす可能性は極めて低い。したがって、野生の動物／植物又は微生物において、核酸を水平伝達する特性による影響が生じる可能性がある種は特定されなかった。組換えウイルスの核酸が感染細胞に組み込まれたり、2種類のウイルスゲノムが組換わる可能性は極めて低い。

以上より、VSV-GPが他の微生物やヒト及び野生動植物へ影響を与えるおそれは極めて低く、第一種使用規定承認申請書に記載された遺伝子組み換え生物等の第一種使用等を行う限り、VSV-GPによる生物多様性影響が生ずる恐れがないと判断される。

参考文献

- Banerjee, A. K. (1987). Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiological Reviews*, 51(1), 66. R20-0615
- Beyer, W. R., Miletic, H., Ostertag, W., et al. (2001). Recombinant expression of lymphocytic choriomeningitis virus strain WE glycoproteins: a single amino acid makes the difference. *Journal of Virology*, 75(2), 1061-1064. (R20-0616)
- CABI - Invasive Species Compendium. (2019). Vesicular Stomatitis Virus. Retrieved from <https://www.cabi.org/isc/datasheet/60393>
- Cartwright, B., & Brown, F. (1972). Serological relationships between different strains of vesicular stomatitis virus. *Journal of General Virology*, 16(3), 391-398. R20-0614
- Clarke, D. K., Hendry, R. M., Singh, V., et al. (2016). Live virus vaccines based on a vesicular stomatitis virus (VSV) backbone: standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*, 34(51), 6597-6609.
- De Wit, E., Marzi, A., Bushmaker, T., et al. (2015). Safety of recombinant VSV-Ebola virus vaccine vector in pigs. *Emerging infectious diseases*, 21(4), 702. R19-0719
- EMA/CAT/852602/2018. (2019). Draft guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-non-clinical-clinical-requirements-investigational-advanced-therapy_en.pdf. R22-0706
- Felt, S. A., & Grdzlishvili, V. Z. (2017). Recent advances in vesicular stomatitis virus-based oncolytic virotherapy: a 5-year update. *Journal of General Virology*, 98(12), 2895-2911. R18-2382
- Fenner (2017). *Fenner's Veterinary Virology* (N. J. MacLachlan & E. J. Dubovi Eds. Fifth ed.). R21-3679
- Fields, B. N. (2013). *Fields Virology* (David M. Knipe & Peter M. Howley Eds. Sixth ed.): LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business. R21-3700
- Fine, S. M. (2015). Vesicular Stomatitis Virus and Related Vesiculoviruses. In Mandell, Douglas, and Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 1981-1983. e1981): Elsevier. R21-3702
- Hangartner, L., Zinkernagel, R. M., & Hangartner, H. (2006). Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), 231-243. R19-1560
- Hastie, E., & Grdzlishvili, V. Z. (2012). Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. *The Journal of general virology*, 93(Pt 12), 2529. R18-2380
- Hastie, E., Cataldi, M., Marriott, I., et al. (2013). Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus research*, 176(1-2), 16-32. R18-2381
- Hastie, E., Cataldi, M., Moerdyk, M. J., et al. (2016). Novel biomarkers of resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus. *Oncotarget*, 7(38), 61601. R21-2987
- Holman, D. H., Wang, D., Woraratanadharm, J., et al. (2009). *Viral Vectors. Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*, 77. R21-2988
- Jenks, N., Myers, R., Greiner, S. M., et al. (2010). Safety studies on intrahepatic or intratumoral injection of oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon- β in rodents and nonhuman primates. *Human Gene Therapy*, 21(4), 451-462. R19-1558

- Kelley, J. M., Emerson, S. U., & Wagner, R. R. (1972). The glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibody. *Journal of Virology*, 10(6), 1231-1235. R20-0613
- Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C., et al. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, 43(3), 336-341. R18-2378
- Lai, M. (1992). Genetic recombination in RNA viruses. *Genetic diversity of RNA viruses*, 21-32. R21-2989
- Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A., & Rose, J. K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4477-4481. R20-0621
- LeBlanc, A. K., Naik, S., Galyon, G. D., et al. (2013). Safety studies on intravenous administration of oncolytic recombinant vesicular stomatitis virus in purpose-bred beagle dogs. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 24(4), 174-181. R19-1559
- Letchworth, G., Rodriguez, L., & Del Cbarrera, J. (1999). Vesicular stomatitis. *The Veterinary Journal*, 157(3), 239-260. R19-1391
- Martinez, I., Rodriguez, L. L., Jimenez, C., et al. (2003). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is a determinant of pathogenesis in swine, a natural host. *Journal of Virology*, 77(14), 8039-8047. R21-2995
- McCluskey, B. J. (2014). *Equine Infectious Diseases* (D. C. Sellon & M. T. Long Eds. Second ed.): Elsevier.
- Mead, D. G., Ramberg, F. B., Besselsen, D. G., et al. (2000). Transmission of vesicular stomatitis virus from infected to noninfected black flies co-feeding on nonviremic deer mice. *Science*, 287(5452), 485-487. R21-2991
- Merchan, J. R., Patel, M., Cripe, T. P., et al. (2020). Relationship of infusion duration to safety, efficacy, and pharmacodynamics (PD): Second part of a phase I-II study using VSV-IFN β -NIS (VV1) oncolytic virus in patients with refractory solid tumors. In: *American Society of Clinical Oncology*. R21-3708
- Muik, A., Stubbert, L. J., Jahedi, R. Z., et al. (2014). Re-engineering vesicular stomatitis virus to abrogate neurotoxicity, circumvent humoral immunity, and enhance oncolytic potency. *Cancer Research*, 74(13), 3567-3578. R19-0813
- Muik A, Kneiske I, Werbizki M, Wilfingseder D, Giroglou T, Ebert O, et al. (2011). Pseudotyping vesicular stomatitis virus with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins enhances infectivity for glioma cells and minimizes neurotropism. *J Virol* 85(11), 5679-5684. R19-1556
- OIE - World Organisation for Animal Health. (2020). OIE-Listed diseases, infections and infestations. Retrieved from <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>
- Quiroz, E., Moreno, N., Peralta, P.H., and Tesh, R.B. (1988). A Human Case of Encephalitis Associated with Vesicular Stomatitis Virus (Indiana Serotype) Infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39, 312-4. R18-2850
- Pringle, C. (1982). The genetics of vesiculoviruses. *Archives of Virology*, 72(1), 1-34. R21-3000
- Reif, J. S., Webb, P., Monath, T., et al. (1987). Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982: infection in occupational risk groups. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 36(1), 177-182. R21-3711
- Rozo-Lopez, P., Drolet, B. S., & Londoño-Rentería, B. (2018). Vesicular Stomatitis Virus Transmission: A Comparison of Incriminated Vectors. *Insects*, 9(4), 190. R20-0622
- Smith, P. F., Howerth, E. W., Carter, D., et al. (2012). Host predilection and transmissibility of vesicular stomatitis New Jersey virus strains in domestic cattle (*Bos taurus*) and swine (*Sus scrofa*). *BMC Veterinary Research*, 8(1), 183. R19-1385

- Stallknecht, D. E., Perzak, D. E., Bauer, L. D., et al. (2001). Contact transmission of vesicular stomatitis virus New Jersey in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 62(4), 516-520. R19-1561
- Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (2008). *Viruses and human disease* (Second ed.): Elsevier. R21-3705
- Thacore, H. R. (1978). Effect of interferon on transcription and translation of vesicular stomatitis virus in human and simian cell cultures. *Journal of General Virology*, 41(2), 421-426. R19-1588
- Velazquez-Salinas, L., Naik, S., Pauszek, S. J., et al. (2017). Oncolytic recombinant vesicular stomatitis virus (VSV) is nonpathogenic and nontransmissible in pigs, a natural host of VSV. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 28(2), 108-115. R19-0720