

第一種使用規程承認申請書

令和 6 年 4 月 23 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏 名 武田薬品工業株式会社
申請者 代表取締役社長 クリストフ ウェバー 印
住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1-1

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	デングウイルス 1 型に由来する膜タンパク前駆体及びエンベロープを発現する遺伝子組換えデングウイルス 2 型（TDV-1）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	デングウイルスによる感染症の予防を目的とした投与、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製剤の保管 (1) 本遺伝子組換え生物等の製剤は、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、投与施設内の適切に管理された冷蔵庫において保管する。 本遺伝子組換え生物等の投与液の調製及び保管 (2) 本遺伝子組換え生物等の投与液の調製は、投与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) 調製後の投与液は、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投与施設内での運搬は、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、投与施設の他の区画と明確に区別された投与室内で、被接種者の皮下に接種することにより行う。投与時は、投与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対策を講じる。 (7) 被接種者の血液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。 被接種者検体の取扱い (8) 被接種者から採取した検体（以下「検体」という。）は、投与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。 (9) 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、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。 (10) 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。以下「廃棄物処理法」という。)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に従って行う。

感染性廃棄物等の処理

- (11) 本遺伝子組換え生物等の製剤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製剤は、漏出しない容器に入れた上で、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。
- (12) 投与施設内で保管された又は開封後の本遺伝子組換え生物等の製剤の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託しない場合は、投与施設内で不活化処理を行った上で、廃棄物処理法に基づいて廃棄する。
- (13) 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、廃棄物処理法に基づいて行う。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。
- (14) 被接種者が自宅で絆創膏等を廃棄する場合は、漏出しない袋等に入れて廃棄する。
- (15) 投与施設以外の施設で保管された本遺伝子組換え生物等の未開封の製剤の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託しない場合は、保管施設内で不活化処理を行った上で廃棄する。

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

分類学上の位置づけ

科 フラビウイルス科 (Flaviviridae)

属 フラビウイルス属 (Flavivirus)

種 デングウイルス (Dengue virus、以下 DENV)

株 弱毒デングウイルス 2 型 (TDV-2)

本遺伝子組換え生物等〔TDV-1 (2/1 型デングウイルス組換え株)〕を作製するための宿主ウイルスは、TDV-2 である。TDV-2 は、デングウイルス 2 型 (DENV-2) の野生株である DENV-2 16681 をイヌ腎初代培養 (PDK) 細胞で継代培養し、弱毒化されたデングウイルス DENV-2 PDK-53 を基に作製した。DENV-2 PDK-53 (弱毒株) は PDK 細胞を用いた継代培養により、DENV-2 16681 から 9 つのヌクレオチドに変異が生じている。これらのヌクレオチド変異のうち、3 つ〔5'非翻訳領域 (5'NCR) (ヌクレオチド 57)、NS1 遺伝子 (アミノ酸 53) 及び NS3 遺伝子 (アミノ酸 250)〕は、DENV-2 PDK-53 の弱毒表現型の基盤を形成している。TDV-2 では GMP マスターウイルスシード作製中に prM (アミノ酸 52) 及び NS5 タンパク質 (アミノ酸 412) に更なる変異が認められている。

DENV-2 PDK-53 が属する分類学上の種である DENV は、主にネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) 及びヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) により媒介され、感染源となる蚊が DENV を保有している者の血液を吸血することでウイルスを保有し、この蚊が非感染者を吸血する際に感染が生じる。DENV は、120 を超える国で流行しており[1]、アジア、太平洋諸島、カリブ海諸国、アフリカ、オーストラリア、中央及び南アメリカで広がっている。

なお、DENV の感染宿主域はヒト以外の一部の霊長類、ヒト及び蚊に限定されており、日本脳炎ウイルスにおけるブタのような増幅動物は存在していないと考えられている[2]。

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)

宿主ウイルスである TDV-2 を単独で人に使用した実績はない。TDV-2 の元弱毒株である DENV-2 PDK-53 は 1 価のワクチンとして、また DENV-2 PDK-53 とは無関係の他の弱毒 DENV と組み合わせた多価ワクチンとして成人及び小児に投与され、様々な臨床試験にて検討され[3]-[12]、健常成人及び小児への接種において良好な忍容性及び免疫原性の結果が得られている。中和抗体価が示すワ

クチンにより誘導された免疫応答は少なくとも 1 年は継続し、一部のサンプルからは 2 年にわたる継続が確認されている[4]。

3. 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

DENV は、直径 40-50nm 程度のエンベロープを有する一本鎖プラス鎖 RNA [ssRNA(+)] ウィルスである。エンベロープの内側にはヌクレオカプシドが存在しており、その中にウィルスゲノムが格納されている。約 11000 塩基からなる ssRNA をゲノムとして持つ。ゲノムには 3 つの構造タンパク質 (C、prM 及び E) 並びに 7 つの非構造タンパク質 (NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及び NS5) がコードされている。

DENV は基本的にはヒトからヒトに直接伝播することではなく、ごくまれに供血者が DENV 血症でその血液が輸血された場合、又は DENV 血症を有する者における陣痛が始まってから分娩の間に起こる母子感染 (垂直感染率 1.6%~5.6%) が報告されているが[13][14]、例外的といえる。母乳を介した DENV 感染についても報告はされているが、情報は限定的である。小規模な試験による報告だが、DENV に感染した授乳婦 12 例中 9 例 (75%) の母乳試料より DENV が確認されている[15]。なお、尿中及び唾液中の DENV に由来する感染の症例報告はなかった[16]。

DENV-2 PDK-53 は 1964 年にタイで Halstead らにより報告された DENV-2 16681[17]を PDK 細胞で 53 代継代することにより得られたウィルスである[4]。DENV-2 PDK-53 は PDK 細胞にて継代する際に用いた DENV-2 16681 と比較して 9 つのヌクレオチドが異なっている[18]。9 つのうち 3 つの変異 [5'NCR (ヌクレオチド 57)、NS1 遺伝子 (アミノ酸 53) 及び NS3 遺伝子 (アミノ酸 250)] が弱毒化に重要であると考えられている[19]。なお、TDV-2 は、弱毒化 DENV-2 であり、タイの Mahidol 大学にて分離された DENV-2 PDK-53 をクローニングした cDNA より作製され[3]、in vitro でウィルスを回収する際にマイナーな塩基配列の変異が起こったものであり、TDV-1 の宿主ウィルスである。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

DENV は他のウィルスと同様に細胞内病原体であり、細胞内でのみ増殖する。また、DENV はヒト及びヒト以外の一部の霊長類、蚊でのみ増殖する。TDV-2 についても同様と考えられる。なお、TDV-2 では実験用免疫不全マウスである AG129 マウスにて増殖することができる。

(3) 捕食性又は寄生性

該当なし

(4) 繁殖又は増殖の様式

DENV 血症のヒトの血が蚊に吸血されると、DENV が蚊の中腸上皮の細胞に感染する。感染細胞内で DENV が増えるとその後血体腔 (昆虫などの無脊椎動物の組織・器官の間の間隙) を介して唾液腺を含めた他の組織に感染が広がる。唾液腺中で DENV が複製した状態で蚊が次の吸血を行うと、蚊の唾液を介して新しい宿主に感染しうる。ヒトへの自然感染では、皮膚常在ラ

ングハンス細胞を含む単核食細胞系細胞（単核球、マクロファージ、樹状細胞）が DENV の主要なターゲットとなっている。

培養細胞系では、ヒト由来細胞株（K562、U937、THP-1、HepG2、HUVEC、ECV304、Raji、HSB-2、Jurkat、LoVo 及び KU812）、蚊由来細胞株（C6/36）、サル由来細胞株（Vero、BS-C-1、CV-1 及び LLC-MK2）、ハムスター由来細胞株（BHK）並びにマウスマクロファージ由来細胞株（Raw、P388D1 及び J774）に DENV 感染が成立することが報告されている[20]。

なお、DENV 感染後の標的細胞内での複製過程については以下の通りである。ヌクレオカプシドよりウイルスゲノムが細胞質内に出ると、まずウイルスゲノムよりウイルスタンパク質が感染宿主の翻訳機構を利用して作られる。翻訳されたウイルスタンパク質はプロテアーゼによる切断などの後、それぞれのタンパク質としての機能を発揮する。このうち NS5 が RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能し、ゲノム RNA よりマイナス鎖 RNA が合成され、さらにゲノムとなるプラス鎖 RNA が合成される。合成されたウイルスゲノムは構造タンパク質である C タンパク質と会合し、ヌクレオカプシドを形成する。prM とエンベロープタンパク質（E タンパク質）は小胞体膜上に発現し、この小胞体膜に出芽する形でヌクレオカプシドはエンベロープを獲得する。その後ゴルジ体を通る間に粒子表面の prM が furin により切断されてウイルス粒子として完成し、複製されたウイルスが細胞より放出される[20]。

(5) 病原性

DENV は病原性のあるウイルスであり、感染により無症候性の場合もあればデング熱や多くの原因不明の発熱を引き起こしていると考えられる。一部のデング熱では、生命を脅かすデング出血熱やデングショック症候群に進行することもある。しかしながら、TDV-2 の由来となっている DENV-2 PDK-53 は、弱毒化された DENV であり、病原性は低い。DENV-2 PDK-53 はワクチンとして様々な臨床試験で使用されており[3]-[12]、健常成人及び小児への接種で良好な忍容性が確認されている。

(6) 有害物質の産生性

感染細胞内でウイルスゲノム由来のタンパク質が産生され、ウイルス粒子が産生される。これらのウイルス由来タンパク質により起こりうる有害性はアレルギー誘発である。

(7) その他の情報（不活化条件等を含む）

DENV はエンベロープを持つフラビウイルスであり、熱、乾燥、紫外線、家庭用消毒剤、界面活性剤などに対して比較的感受性がある。感染宿主や媒介生物の組織外で長期間感染性を保持していることはできない。熱に対して感受性があり、60℃、30 分で完全に失活する[21][22]。培地中の DENV は 37℃で急速に感染性を失い、24 時間後には感染性ウイルスは 0.01%未満にまで低下する[23]。

なお、蚊媒介感染症のガイドライン（第 5 版）[24]では「患者血液で床などの環境が汚染された場合には、一度水拭きで血液を十分に除去し、0.1%次亜塩素酸ナトリウムで消毒する。院内感染予防のための患者の個室隔離は必要ない。」とされている。

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

TDV-1 の作製にあたっては、TDV-2 中の DENV-2 prM 及び E 遺伝子を、DENV-1 16007 の prM 及び E 遺伝子に置換している。この置換操作中に、制限酵素部位が遺伝子組換え体作製の便宜のために導入されたが、TDV-2 に元来含まれない転写調節エレメント

は導入されていない。

TDV-1 ウイルスゲノムの RNA 配列及び各要素の配置を別紙 1-1 に示す。TDV-1 は DENV-1 の表面タンパク質を発現しており、TDV-2 の弱毒化に必要な遺伝子変異は TDV-1 でも保持されている。

TDV-2 中の DENV-2 prM 及び E 遺伝子を、DENV-1 16007 の prM 及び E 遺伝子に置換し、標準的な分子生物学的手法を用いて TDV-1 クローンを作製した。TDV-1 クローンから *in vitro* 転写により得られた RNA を Vero 細胞に導入し、得られたウイルスを継代、プラーク精製することによりプレマスターウイルスシード (Pre-MVS)、マスターウイルスシード (MVS)、ワーキングウイルスシード (WVS)、及び原液を製造した。

MVS 製造までに生じた塩基変異について、DENV-2 PDK-53 バックボーン (prM 及び E 遺伝子以外) と DENV-2 16681 との違い、TDV-1 の prM 及び E 遺伝子と DENV-1 16007 との違い、それらの変異が意図的か意図しないものであるかについては、別紙 1-2 に示す。TDV-1 MVS の表現型解析の結果、pre-MVS 及び MVS 製造において生じた追加の塩基変異のすべてについて、弱毒化や抗原の性状に影響を与えるものはなかった[25]。

(2) 構成要素の機能

DENV の prM 遺伝子は前駆膜タンパク質をコードしている。前駆膜タンパク質はタンパク質分解酵素の一種である furin により分解され、膜タンパク質となる。膜タンパク質は E タンパク質とともに発現しており、DENV の表面にある E タンパク質の下にある膜貫通タンパク質として存在している。ウイルスの複製における前駆膜及び膜タンパク質の役割は不明であるが、感染細胞の表面に存在することがわかっている一方で、細胞から分泌されるものもあり、分泌タンパク質としての役割も考えられている[26]。

DENV の E 遺伝子は E タンパク質をコードしている。E タンパク質はウイルスと感染宿主細胞が最初に接する部分であり、E タンパク質と感染宿主細胞の受容体との相互作用により、エンドサイトーシス経路によりウイルスが細胞の中に入ると考えられている[27]。E タンパク質はクラス II 融合タンパク質であり、低 pH のエンドソーム内に入ると、ウイルス膜とエンドソーム

膜が融合するよう、その立体構造が変化する[28]。E タンパク質及び前駆膜タンパク質はヒトの免疫機構の標的となる抗原であり、E タンパク質は中和抗体の主な標的である[29][30]。

「(1) 構成及び構成要素の由来」に記載したとおり、転写調節エレメント [REDACTED] はワクチンに含まれる最終的な組換え RNA ウイルスには存在しない。また、すべての制限酵素部位は、DENV-2 cDNA に元々含まれていたものであるか、サイレント変異によって導入したものである。そのため、相同性検索は省略可能であると考える。

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) 宿主ウイルス内に移入された核酸全体の構成

移入された DENV-1 由来の prM 及び E 遺伝子は C 遺伝子の下流、そして NS1 遺伝子の上流に位置している（別紙 1-3 参照）。これは感染性の TDV-1 cDNA を有するプラスミドの DNA シーケンス解析で決定したものである。

TDV-1 MVS の塩基配列とアミノ酸配列を別紙 1-4 に示す。prM 遺伝子と E 遺伝子は DENV-1 16007 のものであり、その他のゲノムは TDV-2 のものである。MVS で同定された、野生型のウイルス（DENV-1 16007 や DENV-2 16681）と異なる置換部位や変異は別紙 1-4 に示す。

(2) 宿主ウイルス内に移入された核酸の移入方法

a) TDV-2 感染性 cDNA クローンの作製[18][19]（実験方法の詳細は別紙 1-5 参照）

DENV-2 PDK-53 ワクチンロット 1（1983 年 4 月 8 日に Mahidol 大学で作製）からゲノム RNA を抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により 6 つの cDNA 断片を得た〔ゲノムヌクレオチド（nt）領域 1～1380（*SphI* 部位）、1380～2676（*HpaI*）、2676～4493（*KpnI*）、4493～6646（*NheI*）、6646～9719（*BspHI*）及び 9719～10723（*XbaI*）〕。各断片の末端にあるすべての制限酵素部位は、DENV-2 cDNA に元々含まれていたものであるか、サイレント変異によって導入したものである。制限酵素認識部位及び T7 RNA ポリメラーゼに対するプロモーター（5' -AAATTTAATACGACTCACTATA-3'）を cDNA の 5' 末端〔領域 1～1380（*SphI* 部位）の上流〕に導入した。RNA 転写前に cDNA を直鎖状にするため、ゲノム cDNA の 3' 末端に独自の *XbaI* 部位を導入している。これらの cDNA をクローニングし、大腸菌で増幅してプラスミド DNA を得た（実験方法の詳細は別紙 1-5 参照）。

DENV-2 PDK-53 の完全長感染性 cDNA は[18]に示す方法にて調製した。まず、3 個の中間 cDNA クローンをクローニングした。F1 クローンには T7 プロモーター及び DENV-2 PDK-53

cDNA の nt 1～1380、F2 クローンには DENV-2 PDK-53 cDNA の nt 1380～4493、F3 クローンには DENV-2 PDK-53 cDNA の nt 4493～10723 が含まれる。F1・F2 クローンをそれぞれ制限酵素により切り出したフラグメントを F3 クローンにライゲーションすることで、完全長 cDNA クローン pD2/IC-130V を作製した。

DENV-2 PDK-53 のゲノムをすべてシーケンシングし、米国疾病予防管理センター（CDC）の Division of Vector-Borne Diseases（DVBD）で保有する DENV-2 16881 親ウイルスと比較した。その結果、弱毒である DENV-2 PDK-53（TDV-2 ウイルス株の元弱毒株）と DENV-2 16681 では、PDK 細胞中でのウイルスの連続継代中に自然に変化した 9 つのヌクレオチドが異なっていた[18]。これらのヌクレオチド変化のうち、3 つは 5'NCR（ヌクレオチド 57）、NS1 遺伝子（アミノ酸 53）及び NS3 遺伝子（アミノ酸 250）に位置し、DENV-2 PDK-53 の弱毒化表現型の基盤を形成している[19]。また、nt 900 には単一のサイレントアーティファクト変異（T から C）も組み込まれている[18]。

クローンから作製した DENV-2 PDK-53 の遺伝子確認の過程で、nt 6665 の A から G（NS4A-97 の Tyr から Cys）と nt 8840 の A から G（NS5-424 の Glu から Gly）の 2 つの cDNA クローニングエラーが発見された[19]。これらのエラーを、新たに作製した DENV-2 PDK-53 ウイルス特異的クローン（pD2/IC-VV45R プラスミド）で修正した。TDV-2 は、「(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過」に記載のとおり、この感染性 cDNA クローン pD2/IC-VV45R から作製した。

b) GMO TDV-1 感染性 cDNA クローンのクローニング[31][32]（実験方法の詳細は別紙 1-6 を参照）

CDC の研究室にて、TDV-2（pD2-PDK53-V48 プラスミド）をバックボーンとした DENV-1 16007 ウイルスの prM-E 遺伝子領域を含む組換え感染性クローンを作製した[32]。pD2-PDK-53-V48 プラスミドは、組換え体作製の利便性を高めるため、DENV-2 PDK-53-V cDNA をクローニングした pD2/IC-VV45R プラスミドに、*Mlu*I 及び *Ngo*MIV 制限酵素部位を導入して改変したものである[31]。

TDV-1 ワクチン株を作製するための感染性クローンは、CDC の野生型 DENV-1 16007 の C-prM-E cDNA を含む既存の組換えクローンから作製し、中間的に別のプラスミドにサブクローニングした。*Mlu*I 及び *Ngo*MIV を用いて中間クローンから切断したフラグメントを、pD2-PDK53-V48 にクローニングし、完全長 TDV-1 組換えプラスミド pD2/1-V を得た[32]。*Xba*I でプラスミドを直鎖状にし、RNA 転写に用いる cDNA の 3'末端を得た。

この組換えクローンは、DENV-2 PDK-53 由来の NS タンパク質をコードする塩基配列が含まれている。また、3823 番目の核酸の変異が含まれており、NS2A 遺伝子の 116 位のアミノ酸がイソロイシンからロイシンに置換されている。さらに、NS2B の 92 番目のアミノ酸はグルタミン酸からアスパラギン酸に置換されており、DENV-2 PDK-53 と異なる 7311 番目の変異も含まれている。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

完全長 cDNA プラスミド (pD2/1-V) の 3'末端を *Xba*I で制限酵素消化し、in vitro 転写によりウイルス RNA を得た後、この完全長プラス鎖ウイルス RNA をトランスフェクションによりワクチン製造用 Vero 細胞に導入することにより、感染性ウイルスストックを得た。

[redacted] [redacted]にて、エレクトロポレーションにより [redacted] μg の RNA 転写物を [redacted] 個の Vero 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞を培養し、1 代目 (P1) のウイルスシードを得た。P1 シードを Vero 細胞中で 1 回増幅して P2 TDV シードを得た。P2 TDV シードをプラーク形態及び全ウイルスゲノムシーケンシングにより評価した結果、TDV-1 のゲノム配列は予想配列と一致した。

TDV P2 ウイルスストックを Vero 細胞からさらに 3 回プラーク精製した (P3~P5)。これは、最大 6 個の個々のプラーク精製ウイルスストックを連続的にプラーク精製したものである。

Vero 細胞中でさらに 2 回増幅して P7 シードストックを作製した後、ゲノムシーケンス、ブ
ラーク形態の解析、及び TaqMan mismatch amplification mutation assay (TaqMAMA) による
5'NCR (ヌクレオチド 57) 弱毒化遺伝子変異の解析により、その特性を評価した [25][33]。

TDV-1 の Pre-MVS として、元のワクチンウイルスと遺伝子型及びプラーク表現型がほぼ同じである最適な P7 シードストックを選択した。Vero 細胞中で Pre-MVS を 1 回増幅 (P8) し、MVS を得た。TDV-1 MVS 製造方法の概略を別紙 1-7 に示す。

TDV-1 MVS の全塩基配列は、[REDACTED]において自動ジデオキシヌクレオチド配列解析により決定した。TDV-1 の prM 及び E 遺伝子配列を別紙 1-8 に示す。TDV-1 MVS の塩基配列は Pre-MVS の配列と同一であった。この配列解析中に外来性の異種配列は検出されなかった。Pre-MVS 及び MVS 中には、TDV-1 の完全長ウイルス cDNA のみ存在することが示された。その他の TDV-1 MVS の品質管理方法については別紙 1-9 に示す。Vero 細胞中で TDV-1 MVS を増幅し、WVS を得た。TDV-1 WVS 製造方法及び品質管理方法の概略を別紙 1-10 に示す。

Vero 細胞中で TDV-1 WVS を増幅し、原液及び製剤を製造した。TDV-1 原液及び製剤製造方法、並びに品質管理方法の概略を別紙 1-11、-12、-13 及び-14 に示す。

(1)～(3)を要約した、TDV-1 の樹立過程及びその間で生じた変異について、別紙 1-15 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

「II 1 供与核酸に関する情報」及び「II 3 遺伝子組換え生物等の調製方法」に記載したとおり、TDV-1 の遺伝的バックボーンは TDV-2 である。DENV-2 PDK-53 の弱毒化につながる遺伝子型は、DENV-2 PDK-53 とその元になった DENV-2 16681 間の 9 つのヌクレオチドの違いの組合せを変えた組換えウイルスを用いて詳細に検討されている。「I 3 生理学的及び生態学的特性」で記載したとおり、5'NCR (ヌクレオチド 57)、NS1 (アミノ酸 53) 及び NS3 (アミノ酸 250) の 3 座位における突然変異は、DENV-2 PDK-53 の弱毒化に個々に、また相乗的に寄与することが判明した[19]。

米国食品医薬品局（FDA）及び欧州医薬品庁（EMA）のガイダンスに従い、製造工程においてウイルス弱毒化と関連する 3 つの遺伝子座の遺伝的安定性を評価した[34][35]（USP <1235>）。
で製造された Pre-MVS、MVS、WVS 及び原薬を対象に、TDV-1 の全ゲノム配列解析を実施し、全体的な遺伝的安定性を評価し、製造工程を通じて発生する可能性のあるヌクレオチド変異を特定した（別紙 1-16 参照）。

細胞及びウイルスの継代は、ワーキングセルバンク（WCB）及び WVS それぞれのセルバンクシステム及びシードバンクシステムを介して、また、製造工程自体を通じて厳格に管理及びモニタリングされる。TDV-1 原薬の品質試験において、原薬に 3 つの弱毒化変異が存在することの確認が組み込まれている。

さらに、TDV-1 の遺伝的安定性を、弱毒生 Dengue 熱ワクチンウイルスを Vero 細胞で連続継代して検討した。Vero 細胞で 10 回継代した後の TDV-1 ワクチンウイルスの配列解析でも、NS1（アミノ酸 53）又は NS3（アミノ酸 250）遺伝子座における復帰変異の証拠は認められなかった。対照的に、5' NCR（ヌクレオチド 57）変異は、Vero 細胞での 10 回の継代中に元に戻る傾向を示した[33]。先行研究において、DENV-2 PDK-53 をバックグラウンドとする 5'NCR の 57 位に野生型ヌクレオチドを含むよう設計された組換え DENV-2 ウイルスは、LLC-MK₂ 細胞上で増殖させた場合でも、DENV-2 PDK-53 の小さなプラークサイズ及び温度感受性表現型を維持することが示された[19]。本ウイルスは、ICR マウスにおける神経毒性及び蚊由来の C6/36 細胞における複製に関して、親株である DENV-2 16681 と比較して弱毒化されたままであった[19]。したがって、5' NC-57 変異が復帰変異しても、依然として野生型ウイルスと比較して大幅に弱毒化されたウイルスが得られる。

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

TDV-1 の同定は、TDV-1 に対して特異的な E 遺伝子配列の PCR 増幅が陽性であること、及び他の 3 つの Dengue 血清型に対して特異的な類似の E 遺伝子配列が PCR 増幅されないことによって確認する。4 つのプライマーセットは、Dengue 熱ワクチンウイルスの 4 つの血清型を区別できるように設計されている。プライマーセットは、各ウイルスに固有の E 遺伝子配列内でアニールするウイルス特異的なセンスプライマーと、全ウイルスに共通の NS1 遺伝子配列内でアニールする普遍的なアンチセンスプライマーが含まれるように設計した。試験サンプルからウイルス RNA を単離し、普遍的なアンチセンスプライマーを用いて単離した RNA を cDNA に変換した後、4 つの血清型特異的センスプライマーのいずれかと普遍的なアンチセンスプライマーを含む 4 回の個別の反応で増幅する。

弱毒化変異の遺伝的安定性を保証するため、PCR 及びディープシーケンシングによりワクチンウイルスの 3 つの主要な弱毒化遺伝子座を同定し、TDV-1 原薬中の弱毒化遺伝子型の存在を確認する。

ウイルスゲノム RNA は、市販のカラムベースのキットを用いてウイルスから抽出する。3 つの遺伝子座を包含する 3 つの cDNA アンプリコンは、ウイルス RNA テンプレートから 1 ステップ RT-PCR で増幅する。RT-PCR 産物をゲル精製し、DNA シーケンシングのテンプレートとして使用する。上述した方法は、陽性及び陰性抽出コントロールの使用、並びにシステム適合性基準を含む。本法は特異性が高く、多量の Vero 宿主細胞 DNA の存在下でも標的ウイルス核酸を検出できることが検証されている。本法は、弱毒化部位の位置にあるヌクレオチド塩基の変化を検出し、定量できる感度を有する。これにより、野生型 DENV に含まれるヌクレオチド塩基又は弱毒化ワクチンウイルスで予想されるものとは異なるその他のヌクレオチド塩基の復帰変異を検出することができる。変化又は復帰変異は、弱毒化塩基の位置に対して [REDACTED] の相対割合を形成した場合に検出される。

<非臨床試験>

AG129 マウスを用いた単回皮下投与後の生体内分布及び排出試験に用いた定量法として、リアルタイム RT-定量的 (q) PCR 法を開発し、バリデーションを行った。生体内分布及び排出試験では、組織（脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、下顎リンパ節、腋窩リンパ節、鼠径リンパ節、卵巣、接種部位の皮膚及び筋肉、脾臓、精巣並びに胸腺）、骨髓、糞便、体液（唾液及び尿）並びに血液を測定対象とした。組織及び糞便検体はウイルスゲノム (vg) コピー/mg、体液及び血液検体は vg コピー/mL、骨髓及び唾液検体は vg コピー/サンプルを算出し、定量下限は [REDACTED] コピーに設定した。マウスにおける分析法のバリデーションの詳細を別紙 1-18 に示す。

<臨床試験>

ヒトの血清試料中の TDV-1 の定量法として、リアルタイム RT-PCR 法を開発し、バリデーションを行った。DEN-204、DEN-205、DEN-301 及び DEN-313 試験におけるリアルタイム RT-PCR 法のバリデーション結果より、定量下限は [REDACTED] ゲノム当量 (ge) /mL であった。詳細については別紙 1-19 に示す。

6. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

TDV-1 と宿主ウイルスである TDV-2 についてのゲノム構造を別紙 1-20 に示す。

TDV-1 は、TDV-2 の prM 及び E タンパク質領域の遺伝子配列を、遺伝子工学的手法を用いて DENV-1 16007 の prE 及び E タンパク質領域の配列に組み換えたものである。なお DENV-1 16007 は 1964 年にタイでデング出血熱／デングショック症候群患者から分離された株である[17]。

よって、TDV-1 は DENV-1 の表面抗原を発現しているが、ウイルスの複製にかかわるタンパク質については TDV-2 由来である。表面抗原が宿主ウイルスとの差異になるが、自然界に存在している DENV-1 由来であることから TDV-1 の感染しうる感染宿主域等は DENV と同様であると考えられる。

III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1. 使用等の内容

ヒトの予防接種を目的とした投与、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製剤の保管

- (1) 本遺伝子組換え生物等の製剤は、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、投与施設内の適切に管理された冷蔵庫において保管する。

本遺伝子組換え生物等の投与液の調製及び保管

- (2) 本遺伝子組換え生物等の投与液の調製は、投与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) 調製後の投与液は、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投与施設内での運搬は、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、投与施設の他の区画と明確に区別された投与室内で、被接種者の皮下に接種することにより行う。投与時は、投与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対策を講じる。
- (7) 被接種者の血液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。

被接種者検体の取扱い

- (8) 被接種者から採取した検体（以下「検体」という。）は、投与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。
- (9) 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、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。

- (10) 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。以下「廃棄物処理法」という。）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に従って行う。

感染性廃棄物等の処理

- (11) 本遺伝子組換え生物等の製剤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製剤は、漏出しない容器に入れた上で、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。
- (12) 投与施設内で保管された又は開封後の本遺伝子組換え生物等の製剤の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託しない場合は、投与施設内で不活化処理を行った上で、廃棄物処理法に基づいて廃棄する。
- (13) 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、廃棄物処理法に基づいて行う。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。
- (14) 被接種者が自宅で絆創膏等を廃棄する場合は、漏出しない袋等に入れて廃棄する。
- (15) 投与施設以外の施設で保管された本遺伝子組換え生物等の未開封の製剤の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託しない場合は、保管施設内で不活化処理を行った上で廃棄する。

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
日本で実施予定の臨床試験では、体外排出試験は計画していない。

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
TDV を用いた毒性試験並びに生体内分布及びウイルス排出試験を実施した。詳細は別紙 1-21 に示す。

(1) 単回投与毒性試験

AG129 マウスに TDV を 4×10^5 プラーク形成単位 (PFU)（4 成分を各 1×10^5 PFU）皮下投与した結果、体重及び一般状態に影響は認められなかったが、白血球及び血小板の増加、アルカリホスファターゼの減少、脾臓の髄外造血、及び投与部位の炎症性反応が認められたことから、AG129 マウスは、TDV に感受性を示す *in vivo* モデルであることが確認された。

(2) 反復投与毒性試験

- 1) AG129 マウスに TDV を 8.2×10^5 PFU/回（TDV-1: 2.5×10^5 PFU、TDV-2: 0.5×10^4 PFU、TDV-3: 2.3×10^5 PFU、TDV-4: 3.3×10^5 PFU）の用量で 3 回皮下投与したときの忍容性は良好であ

った。一過性の投与部位の発赤又は浮腫、血液生化学検査でビリルビン、アルブミン、及びアルブミン／グロブリン比の低値、器官重量で脾臓重量の高値、病理組織学的検査で脾臓の造血亢進及び好中球浸潤、並びに投与部位の混合型細胞浸潤が認められた。また、TDV の複数回投与において、ワクチンウイルスの感染性の増強はみられなかった。

- 2) AG129 マウスに TDV を 5.93×10^6 PFU/回 (TDV-1: 2.53×10^5 PFU、TDV-2: 6.32×10^4 PFU、TDV-3: 7.55×10^5 PFU、TDV-4: 4.86×10^6 PFU) の用量で 3 回皮下投与したときの忍容性は良好であった。TDV 群では、可逆的な変化として、胸腺重量の低値及び脾臓重量の高値、骨髓細胞充実性の増加、脾臓の造血亢進、並びに皮膚及び投与部位の混合型細胞炎症が認められた。また、これら病理所見と関連する変化として、白血球、好中球、リンパ球、フィブリノーゲン、総蛋白及びグロブリンの高値、並びに好酸球、網状赤血球、アルカリホスファターゼ、グルコース、トリグリセライド及びアルブミンの低値が認められた。いずれの変化もワクチン投与後に予測される所見と考えられ、その程度及び可逆性から、毒性ではない可逆性の変化と考えられた。
- 3) AG129 マウスに TDV を 1.07×10^7 PFU/回 (TDV-1: 3.55×10^5 PFU、TDV-2: 9.6×10^4 PFU、TDV-3: 9.18×10^5 PFU、TDV-4: 9.3×10^6 PFU) の用量で 3 回皮下投与したときの忍容性は良好であった。TDV 群では、可逆的な変化として、胸腺重量の低値及び脾臓重量の高値、骨髓細胞充実性の増加、脾臓の造血亢進、並びに皮膚及び投与部位の混合型細胞浸潤、変性／壊死及び／又は出血が認められた。また、これら変化に伴う臨床病理検査の変化として白血球、好中球、リンパ球、フィブリノーゲン、総蛋白及びグロブリンの高値、並びに網状赤血球、アルカリホスファターゼ、グルコース及びアルブミンの低値が認められた。いずれの変化もワクチン投与後に予測される所見と考えられ、その程度及び可逆性から、毒性ではない可逆性の変化と考えられた。

(3) 生殖発生毒性試験

New Zealand White ウサギに、ヒトワクチン用量を超える用量の TDV (TDV-1: 5.4 log PFU、TDV-2: 4.8 log PFU、TDV-3: 5.7 log PFU、TDV-4: 6.2 log PFU) を 5 回 (交配前に 3 回、妊娠期間中に 2 回) 皮下投与した結果、ワクチンを接種したウサギの交尾能及び受胎能に対する毒性作用は認められず、催奇形性も認められなかった。また、出生前及び出生後の発生に対する影響はみられなかった。全体として、TDV を投与したときに母体毒性又は発生毒性を示す所見は認められなかった。

(4) 生体内分布及びウイルス排出試験

AG129 マウスに TDV (TDV-1: 5.1 log PFU、TDV-2: 4.5 log PFU、TDV-3: 5.4 log PFU、TDV-4: 5.9 log PFU) を単回皮下投与したときの生体内分布及びウイルス排出を単回投与 2、6、14 及び 42 日後にリアルタイム RT-qPCR 法により評価した。TDV は投与 6 日後までに広く分布し、投与 42 日後までに大多数の組織から消失した。投与 42 日後の時点で、接種部位の皮膚 1 検体、胸腺 1 検体及び脳 1 検体で低濃度の TDV-2 ウイルス RNA が検出された。TDV の忍容性は良好であり、いずれの時点においても、脳又は胸腺において TDV に関連する毒性所見は認められなかった。糞尿中に測定可能な濃度のウイルス RNA は認められず、試験の早期 (投与 6 日

後)に1例の唾液中に低濃度のウイルス RNA が検出されたのみであることから、ワクチンが環境中に排出されたり、接種者から伝播したりするリスクは低いことが確認された。

6. 国外における使用等により得られた情報

TDV を用いた国外の臨床試験の概略及び情報を別紙 1-22 に示す。2023 年 3 月 17 日時点で、合計 19 の臨床試験が完了又は実施中である。TDV は 2024 年 4 月 4 日時点で、インドネシア、欧州連合 (EU) / 欧州経済領域 (EEA) [すべての EU 加盟国及び北アイルランド、並びに EEA 諸国 (リヒテンシュタイン、ノルウェー、アイスランド) を含む]、グレートブリテン、ブラジル、アルゼンチン、タイ、コロンビア及びマレーシアにおいて DENV 血清型に起因するデング熱疾患の予防を目的として承認されている。承認された適応及び年齢範囲は国/地域によって異なっている。

完了した第 1 相及び第 2 相臨床試験 (INV-DEN-101、INV-DEN-102、INV-DEN-103、INV-DEN-104、INV-DEN-203 パート 1 及び DEN-205) で評価したワクチン接種者のワクチンウイルス血症の概要を以下に示す。詳細は別紙 1-23 及び 24 に示す。

いずれの臨床試験においてもワクチンウイルス血症が認められた。ワクチンウイルス血症は、主にワクチンの 1 回目接種後 (DEN-205 試験は単回接種後) に発現し、接種 10~12 日後にピークに達した。検出された血清型はほとんどが TDV-2 であった。蚊の伝播による TDV の環境中への放出は、(i) 蚊が蚊の中腸に感染するのに十分な血中ウイルス価を持つワクチン接種者を刺し、(ii) ウイルスが中腸上皮で複製可能で、(iii) 複製されたウイルスがその後中腸から拡散可能で、(iv) 拡散したウイルスが蚊の唾液腺複製し、唾液中に伝播に十分な量のウイルスを放出できる場合にのみ起こる。吸血した蚊の半数に感染させるのに必要なウイルス RNA 量 (MID_{50}) は、野生型 DENV-1、DENV-2、DENV-3 及び DENV-4 でそれぞれ 6.5、6.3、7.5 及び 7.5 $\log_{10}$ ge/mL であった [36]。ウイルス血症を有するデング熱患者を対象とした別の類似試験では、野生型 DENV-1、DENV-2、DENV-3 及び DENV-4 について、*Ae. Aegypti* の MID_{50} は 6.62、6.96、6.49 及び 7.37 $\log_{10}$ ge/mL、*Ae. albopictus* の MID_{50} は 6.74、7.03、6.70 及び 7.38 $\log_{10}$ ge/mL であった [37]。これらの報告では、蚊が摂取したヒト血液中のウイルス量と中腸又は唾液腺に感染したウイルスが存在する蚊の割合には用量反応関係があると報告されている。DENV-2 の近似曲線では蚊の種類により傾向は少し異なるものの、血中のウイルス量が概ね 6 $\log_{10}$ ge/mL から感染する蚊の割合が 0% に近付いており、特に日本に生息する *Ae. albopictus* では概ね 0% に近似する。ウイルス RNA 量を測定した DEN-205 試験において、TDV-1 は認められずほとんどが TDV-2 であり、TDV-2、TDV-3 及び TDV-4 の RNA 量の最大値は、野生型ウイルスで観察された MID_{50} より 1 mL あたり 1~2 $\log_{10}$ ge 低かった。前述の近似曲線を踏まえると、DEN-205 試験における TDV-2 の血中ウイルス量が 6 $\log_{10}$ ge/mL よりも低いことから、感染する蚊の割合はほぼ 0% であるといえる。これより、TDV 接種後数週間でワクチン接種者が蚊に刺された場合、その後の蚊の感染を引き起こす可能性は低いと考えられる。

ワクチン接種者における TDV の遺伝的安定性については、完了した第 1 相及び第 2 相試験（INV-DEN-101、INV-DEN-102、INV-DEN-103、INV-DEN-104、INV-DEN-203 パート 1 及び DEN-205）並びに実施中の第 3 相試験（DEN-301）で評価した。これらの試験では、3 つの主要な弱毒化遺伝子座〔5'NCR（ヌクレオチド 57）、NS1 遺伝子（アミノ酸 53）及び NS3 遺伝子（アミノ酸 250）〕に復帰変異が生じたかを判断した。これまでに単一の弱毒化遺伝子座〔主に 5'NCR（ヌクレオチド 57）遺伝子座〕における復帰変異が認められているが、他の 2 つの主な弱毒化遺伝子座は保持されていたことから、単一の弱毒化遺伝子座が復帰変異しても、他の 2 つの弱毒化遺伝子座の存在により、TDV の弱毒化表現型を維持するのに十分であることを示していた。弱毒化表現型の復帰変異が起こった場合の安全性上の懸念は確認されていない。詳細は別紙 1-25 及び-26 に示す。

ワクチンウイルス血症の発現時及びその前後に収集された安全性については、完了した第 1 相及び第 2 相試験（INV-DEN-101、INV-DEN-102、INV-DEN-103、INV-DEN-104、INV-DEN-203 パート 1 及び DEN-205）で評価した。特定有害事象及び特定外有害事象（いずれも大部分が軽度かつ一過性のもの）の発現割合の増加及び時間的関連性が示唆されたことを除き、ワクチンウイルス血症陽性被験者において重大な安全性の所見は認められなかった。ワクチンウイルス血症陽性被験者は、頭痛、関節痛又は筋肉痛などの全身症状を発現する可能性があるが、これらの事象はウイルス血症陰性の場合にも発現するため、非特異的なものであると示唆された。発疹は比較的まれな有害事象だが（ワクチン接種者で最大 10.2%の発現割合）、その発現はワクチンウイルス血症と密接な時間的關係が認められた。特定有害事象の発現について、全体として、安全性上の懸念はないと考えられた。

IV 生物多様性影響評価

1. 他の微生物を減少させる性質

(1) 影響を受ける可能性のある微生物の特定

TDV-1 の感染宿主は野生型 DENV と同様と考えられる。他の微生物等に感染するという報告はなく、有害物質の産生を通して他の微生物への影響を与える可能性も極めて低い。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

該当せず。

(3) 影響の生じやすさの評価

該当せず。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

影響を受ける微生物は特定されず、他の微生物を減少させることに起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

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

TDV-1 の感染宿主は TDV-2 及び野生型 DENV と同様であると考えられる。よって影響を受ける可能性があるのは、ヒト及び一部の霊長類、蚊が該当する。

(2) 影響の具体的内容の評価

TDV-1 が意図せずヒト及び動物に曝露され感染が成立しても、これまでに得られた非臨床試験及び臨床試験の結果から、感染による症状の重篤化は考えにくい。TDV-1 の宿主ウイルスである TDV-2 は高度に弱毒化されたウイルスであり、ヒト、ヒト以外の霊長類及び蚊において疾病の原因になるという報告はなく、蚊の体内での複製はできない、又は極めて低いレベルであると考えられる。TDV がコードする prM 及び E タンパク質はヒト又はその他の生物（非臨床試験で使用したヒト以外の霊長類、ウサギ及びマウス）に対して病原性を示さなかった。

(3) 影響の生じやすさの評価

当該第一種使用規定承認申請書に従って使用等を行う限り、TDV-1 が環境中に拡散する可能性は低い。TDV-1 は蚊の体内での複製できない、又は複製できても極めて低いレベルと考えられるため、TDV-1 が伝播するということは極めて考えにくい（別紙 1-27）。生殖発生毒性試験で TDV の毒性がみられなかったこと、野生型 DENV の垂直伝播がまれであること、TDV が弱毒化されており、ワクチン接種後のワクチンウイルスの複製が野生型 DENV 感染と比較して限られていることを考慮すると、TDV-1 が垂直伝播するリスクは無視できると考えられる。野生型 DENV は自然環境に既に存在しており、TDV-1 はその弱毒化により、生物学的適合性が低下しているため、環境中の野生型 DENV を置換することはないと考えられる。

よって、TDV-1 が被験者以外の野生動植物等に対して病原性を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程に基づいた使用等を行う限り、病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれは極めて低いと考えられる。

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の特定

TDV-1 による野生型 DENV を超える有害物質の産生は知られていないため、影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

TDV-1 により感染細胞内でウイルスゲノム由来のタンパク質が産生され、ウイルス粒子が産生されるが、ヒト又はその他の生物（非臨床試験で使用したヒト以外の霊長類、ウサギ及びマウス）に対して有害性を示さなかった。

(3) 影響の生じやすさの評価

当該第一種使用規定承認申請書に従って使用等を行う限り、TDV-1 が環境中に拡散する可能性は低い。TDV-1 は蚊の体内での複製できない、又は複製できても極めて低いレベルと考えられるため、TDV-1 が伝播するということは極めて考えにくい（別紙 1-27）。

よって、TDV-1 により産生される物質が被験者以外の野生動植物等に対して有害作用を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性への影響が生ずるおそれは極めて低いと考えられる。

4. 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物又は他の微生物の特定

影響を受ける可能性があるのは DENV の感染宿主であるヒト及び一部の霊長類、蚊である。また、DENV は組換えにより影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

TDV-1 はヒト及び一部のヒト以外の霊長類で効率的に複製することはできない。また、媒介生物である蚊の体内では複製できない、もしくは複製できても極めて低いレベルである。よって、核酸の伝播が発生する可能性は極めて低い。

組換えが起こるためには、同じ細胞に 2 つの DENV を同時感染させる必要がある。TDV-2 の元となっている DENV-2 PDK-53 は複製効率が低いことから、TDV-1 が他の DENV 等と同時に感染して組換え体を生み出す可能性は低い。理論的に組換えが起こったとしても、その結果、生じるウイルスは弱毒化していると考えられる[38][39]。また、TDV-1 と TDV-2 間での組換えが起こった場合も、弱毒化ウイルスとなると考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

TDV 接種後に TDV-1 のヒト体外への排出が起こる可能性は極めて低い。組換えが発生する可能性は極めて低く、具体的な影響は想定されない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程に基づいた使用等を行う限り、核酸を水平伝播する性質に起因する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。

5. その他の性質

該当なし

V 総合的評価

実施した環境リスク評価に基づき、本遺伝子組換え生物等の使用及び環境中への放出による危害のリスクは、ヒト及び動物又は環境のいずれに対しても無視できると考えられる。したがって、第一

種使用規定承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等を行う限り、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がないと判断される。

文献

- [1] Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PloS Negl Trop Dis.* 2012;6(8):e1760.
- [2] 国立感染症研究所. デング熱とは. (2014 年 10 月 14 日更新、2023 年 6 月 27 日閲覧) .
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/encyclopedia/392-encyclopedia/238-dengue-info.html>.
- [3] Yoksan S, Bhamarapravati N, Halstead SB. Dengue virus vaccine development: study on biological markers of uncloned dengue 1-4 viruses serially passaged in primary kidney cells. *Arbovirus research in Australia.* 1986;35-8.
- [4] Bhamarapravati N, Yoksan S, Chayaniyayothin T, Angsubphakorn S, Bunyaratvej A. Immunization with a live attenuated dengue-2-virus candidate vaccine (16681-PDK 53): clinical, immunological and biological responses in adult volunteers. *Bull World Health Organ.* 1987;65(2):189-95.
- [5] Vaughn DW, Hoke CH, Yoksan S, LaChance R, Innis BL, Rice RM, et al. Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine.* 1996;14(4):329-36.
- [6] Bhamarapravati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 2000;18 Suppl 2:44-7.
- [7] Kanesa-Thanan N, Sun W, Kim-Ahn G, Van Albert S, Putnak JR, King A, et al. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine.* 2001;19(23):3179-88.
- [8] Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet.* 2012;380(9853):1559-67.
- [9] Guy B, Chanthavanich P, Gimenez S, Sirivichayakul C, Sabchareon A, Begue S, et al. Evaluation by flow cytometry of antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue infection by sera from Thai children immunized with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 2004;22(27):3563-74.
- [10] Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, et al. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five-to twelve-year-old Thai children. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(2):99-109.
- [11] Kitchener S, Nissen M, Nasveld P, Forrat R, Yoksan S, Lang J, et al. Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. *Vaccine.* 2006;24(9):1238-41.
- [12] Chanthavanich P, Luxemburger C, Sirivichayakul C, Lapphra K, Pengsaa K, Yoksan S, et al. Immune response and occurrence of dengue infection in Thai children three to eight years after vaccination with live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(1):26-8.
- [13] Tan PC, Rajasingam G, Devi S, Omar SZ. Dengue infection in pregnancy: prevalence, vertical transmission, and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol.* 2008;111(5):1111-7.
- [14] Basurko C, Carles G, Youssef M, Guindi WE. Maternal and foetal consequences of dengue fever during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;147(1):29-32.

- [15] Arragain L, Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Sigur N, Grangeon JP, Huguon E, et al. Vertical Transmission of Dengue Virus in the Peripartum Period and Viral Kinetics in Newborns and Breast Milk: New Data. *J Pediatr Infect Dis Soc.* 2017;6(4):324-331.
- [16] Chen LH, Wilson ME. Non-vector transmission of dengue and other mosquito-borne flaviviruses. *Dengue Bulletin.* 2005;29:18-31.
- [17] Halstead SB, Simasthien PH. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J Biol Med.* 1970;42(5):276-92.
- [18] Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, et al. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology.* 1997;230(2):300-8.
- [19] Butrapet S, Huang CY, Pierro DJ, Bhamarapravati N, Gubler DJ, Kinney RM. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *J Virol.* 2000;74(7):3011-9.
- [20] Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(16):2773-86.
- [21] Canadian Office of Laboratory Security. Pathogen Safety Data Sheet – Japanese encephalitis virus[updated 2011 Feb 18; cited 2023 Jun 30]. Available from: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/japanese-encephalitis-virus-material-safety-data-sheets-msds.html>.
- [22] Canadian Office of Laboratory Security. Pathogen Safety Data Sheet – Yellow fever virus[updated 2011 Apr 6; cited 2023 Jun 30]. Available from: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/yellow-fever-virus.html>.
- [23] Manning JS, Collins JK. Effects of cell culture and laboratory conditions on type 2 dengue virus infectivity. *J Clin Microbiol.* 1979;10(2):235-9.
- [24] 国立感染症研究所. 蚊媒介感染症診療ガイドライン 第5版. 2019.
- [25] Huang CY, Kinney RM, Livengood JA, Bolling B, Arguello JJ, Luy BE, et al. Genetic and phenotypic characterization of manufacturing seeds for a tetravalent dengue vaccine (DENVax). *PloS Negl Trop Dis.* 2013;7(5):e2243.
- [26] Wong SS, Haqshenas G, Gowans EJ, Mackenzie J. The dengue virus M protein localizes to the endoplasmic reticulum and forms oligomers. *FEBS Lett.* 2012;586(7):1032-7.
- [27] Mondotte JA, Lozach PY, Amara A, Gamarnik AV. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol.* 2007;81(13):7136-48.
- [28] Nemésio H, Palomares-Jerez F, Villalaín J. The membrane-active regions of the dengue virus proteins C and E. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1808(10):2390-402.
- [29] Plotkin SA. Immunologic correlates of protection induced by vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20(1):63-75.

- [30] Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1998;352(9132):971-7.
- [31] Huang CY, Butrapet S, Pierro DJ, Chang GJ, Hunt AR, Bhamarapavati N, et al. Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J Virol*. 2000;74(7):3020-8.
- [32] Huang CY, Butrapet S, Tsuchiya KR, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J Virol*. 2003;77(21):11436-47.
- [33] Butrapet S, Kinney RM, Huang CY. Determining genetic stabilities of chimeric dengue vaccine candidates based on dengue 2 PDK-53 virus by sequencing and quantitative TaqMAMA. *J Virol Methods*. 2006;131(1):1-9.
- [34] US Food and Drug Administration (FDA). Characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications. Rockville, MD: FDA Center for Biologics Evaluation and Research. 2010.
- [35] European Medicines Agency (EMA). Guideline on Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Live Recombinant Viral Vectored Vaccines. Committee for Medicinal Product for Human Use (CHMP), 2009.
- [36] Nguyet NM, Kien DT, Tuan TV, Quyen NT, Tran CN, Thi LV, et al. Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(22):9072-7.
- [37] Whitehorn J, Kien DT, Nguyen NM, Nguyen HL, Kyrylos PP, Carrington LB, et al. Comparative susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to dengue virus infection after feeding on blood of viremic humans: implications for public health. *J Infect Dis*. 2015;212(8):1182-90.
- [38] Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol*. 2001;75(16):7290-304.
- [39] Whitehead SS, Hanley KA, Blaney JE Jr, Gilmore LE, Elkins WR, Murphy BR. Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. *Vaccine*. 2003;21(27-30):4307-16.