

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 9 月 30 日

厚生労働大臣 塩崎 恭久 殿

環境大臣 望月 義夫 殿

申請者 氏名 東京大学医科学研究所附属病院

病院長 小澤 敬也

住所 東京都港区白金台 4 丁目 6 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 | 大腸菌 lacZ 遺伝子を発現し、 γ 34.5 遺伝子・UL39 遺伝子・ α 47 遺伝子を不活化された制限増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型（F株由来）（G47 Δ ） |
| 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容 | 治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、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>(1) G47Δ 溶液は、容器に密封した状態で、遺伝子組換え生物である旨を容器等の見やすい箇所に表示した上で、他の薬剤等から識別可能な状態で施設内の冷凍庫に保管する。</p> <p>(2) G47Δ 溶液の希釈及び分注操作は、施設内の安全キャビネット内で行う。G47Δ 希釈溶液の保管は、遺伝子組換え生物である旨を容器等の見やすい箇所に表示した上で、他の薬剤等から識別可能な状態で施設内の保冷库又は冷凍庫において行う。なお、G47Δ 希釈溶液又はその凍結品の施設内での運搬は、容器に密閉した状態で行う。</p> <p>(3) 患者に対するG47Δ の投与は、治療室において、患者の腫瘍内にG47Δ 希釈溶液を注入することによって行う。単純ヘルペスウイルス1型の回帰症状が疑われた場合等であって、医療上必要と判断される場合、唾液等のサンプリングを行い遺伝子組換えウイルスの有無の確認等を行う。</p> <p>(4) G47Δ 溶液（希釈溶液を含む。）及び上記(2)及び(3)で用いた機器や材料は、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）に基づいて当該施設で定められている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。）に従い処理し、又は医療廃棄物として廃棄する。未使用のG47Δ 溶液を含む廃棄物は廃棄前に不活化し、又は厳重な密封を行う。投与部位等、高力価のG47Δ 溶液と直接接触した可能性のある部位の被覆材や器具等については、他の患者の廃棄物と分けて保管した上で医療廃棄物管理規程に従い医療廃棄物として処理する。患者由来の検体の取扱いは、施設の規定に従い、医療廃棄物として処理する。</p> |

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

単純ヘルペスウイルスはヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科単純ウイルス属に分類されている。これまでに分離されたウイルスは、1型 (HSV-1) と2型 (HSV-2) の二つであり (文献1)、G47Δは単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) F株から作製された (文献2)。

ヒトにおけるHSV-1の初感染は通常小児期に起こり、無症候性であることが多い。HSV-1に対する中和抗体の保有率は成人で7-8割程度である (文献1)。HSV-1の感染は種特異的であり、自然環境においては本来の宿主であるヒト以外での複製は報告されていない。実験室内では、一部の系統のマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルには注射等による接種により感染させることができ、それらを用いてワクチンや遺伝子組換えHSV-1の安全性評価などの感染実験が報告されている (文献3-5)。また、ペット等として飼育されている動物 (ウサギ、マーモセット、チンチラ) にまれにヒトからの接触感染が起こることが報告されている (文献6-8)。

- 文献1 : Roizman, B. *et al.*. Herpes simplex viruses. In *Fields' Virology*, 6th edn, ed. Knipe, D. M., Howley, P. M. ed. pp1823-1897, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2013).
- 文献2 : Todo, T. *et al.* Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6396-6401 (2001).
- 文献3 : Lopez, C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 258: 152-153(1975)
- 文献4 : Barahona, H. *et al.*, The owl monkey (*Aotus trivirgatus*) as an animal model for viral diseases and oncologic studies. *Lab Anim Sci.* 6: 1104-1112 (1976).
- 文献5 : Deisboeck, T. S. *et al.* Development of a novel non-human primate model for preclinical gene vector safety studies. Determining the effects of intracerebral HSV-1 inoculation in the common marmoset: a comparative study. *Gene Ther.* 15: 1225-1233 (2003).
- 文献6 : Grest P *et al.* Herpes Simplex Encephalitis in a Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Comp Patho* 126: 308-11 (2002)
- 文献7 : Huemer HP *et al.* Fatal Infection of a Pet Monkey with Human herpesvirus1. *Emerg Infect Dis.* 8: 639-42 (2002)
- 文献8 : Lefaux B *et al.* *Veterinary Pathology Online.* *Vet Pathol.* 41: 302-4 (2004)

2 使用等の歴史及び現状

HSV-1を生ワクチンとして臨床に試みた報告としては、複製可能型遺伝子組換えHSV-1であるR7020が存在する（文献1、9、10）。また近年、米国および英国においてHSV-1に由来する種々の遺伝子組換えウイルスが、また国内において自然変異型の弱毒ウイルスが、悪性腫瘍に対するウイルス療法としてヒトに対し使用されている（文献11-16）。国内では、本遺伝子組換えウイルスが、膠芽腫に対するウイルス療法臨床研究として、東京大学においてヒトに対し使用されている（別紙1）。

- 文献9 : Cadoz, M. *et al.*, Phase 1 trial of R7020: A live attenuated recombinant herpes simplex (HSV) candidate vaccine. Presented at the 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, CA, October 11-14, 1992
- 文献10 : Whitley, R. *et al.* Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest* 110: 145-151.2002.
- 文献11 : Markert, J. *et al.* Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* 7: 867-874 (2000).
- 文献12 : Rampling, R. *et al.* Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther* 7: 859-866 (2000).
- 文献13 : Papanastassiou, V. *et al.* The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene Ther* 9: 398-406 (2002).
- 文献14 : Harrow, S. *et al.* HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther* 11: 1648-1658 (2004).
- 文献15 : Fujimoto, Y. *et al.* Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 126: 1115-1117 (2006).
- 文献16 : Kimata, H. *et al.* Pilot study of oncolytic viral therapy using mutant herpes simplex virus (HF10) against recurrent metastatic breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 13: 1078-1084 (2006).

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

単純ヘルペスウイルス1型はエンベロープを有し、成熟粒子は100-150nmの大きさである。エンベロープの内側にテグメント、更にその内側にカプシドがあり、カプシド内にウイルスDNAが存在する。ゲノムは約152kbの2本鎖DNAである。ゲノム構造及びゲノムの塩基配列に関しては別紙2に記載する。（文献1）

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染し、増殖する。培養細胞では、ヒトの細胞およびVero細胞などの哺乳動物由来

の一部の細胞で効率よく増殖する。粘膜表面の直接の接触による感染を主な感染経路とし、外界および室温では不安定である。飛沫感染は起こらない。ウイルスの感染機構（感染受容体、細胞内侵入経路、増殖機構、細胞外への排出、潜伏機構、野生型ウイルスで認められる Multiplicity Reactivation等）の概要については別紙3に記載する。（文献1および17）

(3) 捕食性又は寄生性

自然界では、ヒトでのみ増殖を伴う感染が起こる。

(4) 繁殖又は増殖の様式

HSV-1は、ヒトの粘膜表面（通常は口腔咽頭）への直接の接触により感染する。接触感染以外の感染形式はない。感染した局所で複製した後、神経末端から感覚神経節（しばしば三叉神経節）にウイルスは移送され、潜伏感染（latency）を確立する。潜伏感染においてはウイルスの複製は行われず、別の宿主への感染性を有しない。潜伏感染から再活性化（reactivation）が起きると、ウイルスは皮膚粘膜（通常は口唇）で顕在化し、水疱を形成する（文献18）。潜伏感染の再燃などに際してウイルスはまれに脳炎を発症する。そのウイルス侵入経路については三叉神経説と嗅神経説がある（文献19）。

(5) 病原性

HSV-1は口唇ヘルペスの原因ウイルスで、初期感染は一般に軽症あるいは無症状である。再活性化時に口唇に水疱を形成する。まれに、角膜炎や脳炎を起こす。ヘルペス脳炎の発生は日本の調査では年間100万人に2.9人（文献20）、欧米では年間20万人に1人（文献18、21）である。発癌性はない。免疫不全や新生児、あるいは乳児の初回重症感染症など特殊な条件下を除くと、HSV-1はウイルス血症を生じることがなく、初回感染後全身に分布しない（文献22）。

ペット等として飼育されている動物（ウサギ、マーモセット、チンチラ）に、まれにヒトからの接触感染が起こり発病する場合があることが報告されている。

(6) 有害物質の産生性

HSV-1の感染で細胞内に産生される蛋白質等の毒性は報告されていない。

(7) その他の情報

HSV-1はエンベロープを有するウイルスで、エンベロープが破壊・変性すると容易に感染性を失う。宿主から離れると環境中では2時間で死滅する（文献24）。Biosafety上、消毒薬（chemical disinfectants）に対する感受性の点でlipid virusesに分類され、微生物の中で消毒薬に対する感受性が最も高い（文献23）。HSV-1を速やかに不活化する消毒薬（chemical disinfectants）は以下のものを含む：70%イソプロパノール、70-90%エタノール、塩素系漂白剤

(例えば0.2%次亜塩素酸ナトリウムなど)、ヨード溶液、グルタルアルデヒド、ホルマリン、10%ポビドンヨード、0.5~0.1% グルコン酸クロルヘキシジン、0.2~0.05% 塩化ベンザルコニウム、など(文献23、25-29)。物理的不活法(physical inactivation)として、HSV-1は[]加熱や紫外線照射[]で速やかに感染性を失う。

- 文献17 : Muylaert I *et al.* Contributions of nucleotide excision repair, DNA polymerase η , and homologous recombination to replication of UV-irradiated herpes simplex virus Type1. *J Biol Chem.* 285: 13761-13768 (2010)
- 文献18 : Wald, A. *et al.* Persistence in the population: epidemiology, transmission. In *Human Herpesviruses*. Arvin A. *et al.* eds., pp656-671, Cambridge University Press, Cambridge (2007)
- 文献19 : Mori, I. *et al.* Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J Neurovirol* 11: 129-137 (2005).
- 文献20 : Kamei, S. *et al.* Nationwide survey of the annual prevalence of viral and other neurological infections in Japanese inpatients. *Intern Med* 39: 894-900 (2000).
- 文献21 : Whitley, R. *et al.* Herpes simplex virus infections of the central nervous system: therapeutic and diagnostic considerations. *Clin Infect Dis* 20: 414-420 (1995)
- 文献22 : Harel L *et al.* Presence of viremia in patients with primary herpetic gingivostomatitis. *Clin Infect Dis.* 39: 636-640 (2004)
- 文献23 : Biosafety Manual: Lawrence Berkeley National Laboratory (<http://www2.lbl.gov/ehs/biosafety/manual/assets/docs/BIOSAFETY-MANUAL-FINAL-5-20.pdf>).
- 文献24 : Assar, S. *et al.* Survival of Microorganisms in the Environment. In *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 5th edn Block S. ed., pp1221-1242, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)
- 文献25 : Croughan, W. *et al.* Comparative study of inactivation of herpes simplex virus types 1 and 2 by commonly used antiseptic agents. *J Clin Microbiol* 26: 213-215 (1988)
- 文献26 : Material safety data sheet- infectious substances: Public health agency of Canada (<http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/herpes-eng.php>)
- 文献27 : Centers for Disease Control and Prevention ed., Guideline for hand hygiene in health-care settings: Morbidity and mortality weekly report (MMWR) 51 (2002)
- 文献28 : 大久保 憲 監修、消毒薬テキスト 新版: 協和企画 (2005)
- 文献29 : 川名林治 他: ポビドンヨード(PVP-I)によるウイルスの不活化に関する研究-市販の消毒剤との比較 臨床とウイルス 26: 371-386 (1998)

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

宿主は野生株ウイルス (HSV-1 F株) である。外来遺伝子としては①HSV-1ゲノム内の U_L39 遺伝子領域内 [redacted] に、大腸菌(略称 E.Coli) 由来の $lacZ$ 遺伝子の cDNA [redacted] の挿入を有する。また、HSV-1ゲノム内の② $\gamma34.5$ 遺伝子領域の [redacted] 欠失と、③ $\alpha47$ 遺伝子内の [redacted] 欠失を有する。 [redacted]

(2) 構成要素の機能

導入された $lacZ$ 遺伝子は宿主 [redacted] により [redacted] 発現される。 β -ガラクトシダーゼ [redacted] は酵素活性を保持し、基質X-galを加水分解し青色の沈殿物とする。大腸菌 β -ガラクトシダーゼは、形質転換した大腸菌やベクター感染細胞のマーカーとして用いられ、それらにX-galを加えて識別する方法は一般に広く用いられている。病原性や毒素産生性には関与していない。この供与核酸の導入の結果生じる β -ガラクトシダーゼ [redacted] によって、G47 Δ の感染性が野生型HSV-1から変わることはないと考えられる。なお、 $LacZ$ 遺伝子の挿入により宿主の U_L39 遺伝子は不活化される。不活化される遺伝子の機能に関しては別紙6に記載する。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

HSV-1 [redacted] から $\gamma34.5$ 遺伝子領域 [redacted] を欠失させたもの。これとHSV-1 [redacted] との [redacted] 組換えにより、 $\gamma34.5$ 遺伝子部位に [redacted] 欠失を有するHSV-1 (R3616) を得る。

HSV-1 [redacted] の [redacted] U_L39 遺伝子領域 [redacted] に、 [redacted] $LacZ$ 遺伝子 [redacted] を挿入したもの。これと上述のR3616との [redacted] 組換えにより、 $\gamma34.5$ 遺伝子部位の欠失と U_L39 遺伝子部位への $LacZ$ 遺伝子挿入を有するHSV-1(G207)を得る (文献30)。

HSV-1 [redacted] の [redacted]

α47遺伝子領域を含有する プラズミドpIE12Δ。これと上述のG207との組換えにより、γ34.5遺伝子部位の欠失、U_L39遺伝子部位へのLacZ遺伝子挿入、及びα47遺伝子部位の欠失を有するHSV-1(G47Δ)を得る（文献2）。

(2) 特性

宿主にはpIE12Δの挿入外来遺伝子配列のみが移入され、薬剤耐性遺伝子などのベクター配列は移されない。

文献30 : Mineta, T. *et al.* Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1: 938-943 (1995).

文献31 : Johnson, P. *et al.* Improved cell survival by the reduction of immediate-early gene expression in replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1 but not by mutation of the virion host shutoff function. *J Virol* 68 : 6347-6362 (1994).

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

HSV-1のU_L39領域にLacZ cDNAが挿入されている。これにより、本来のU_L39遺伝子は発現されない。また、宿主HSV-1のγ34.5遺伝子のTR_L及びIR_Lの双方のコピーは欠失しており、また、α47遺伝子も欠失している。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主細胞に遺伝子組換えウイルスを感染させる。感染後、宿主細胞内で複製が行われ、遺伝子組換えウイルスが産生される。産生されたウイルスを宿主細胞から回収し、宿主細胞内に再移入させる。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

遺伝子組換えウイルスを宿主細胞に感染させ、宿主細胞内で複製が行われ、遺伝子組換えウイルスが産生される。産生されたウイルスを宿主細胞から回収し、宿主細胞内に再移入させる。

[Redacted text block]

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

移入及び欠失させた核酸はHSV-1の2本鎖DNAゲノムの一部として存在し、保管中は安定である。感染する動植物等の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。

G47Δが細胞に感染すると、G47Δのゲノムは核内の染色体外に存在し、感受性を有する培養増殖細胞 [Redacted]

もしくはヒト体内では腫瘍細胞に限ってウイルス複製が起こる（「6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違」の項に詳述）。ウイルス複製の際に感染細胞内で一過性にβ-ガラクトシダーゼが発現される。

G47ΔはHSV-1ゲノムの互いに離れた4箇所（3つの遺伝子）に操作が加えられているため、組換えにより自然に野生型のHSV-1に復する可能性はきわめて低い。 [Redacted]

[Redacted text]

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

G47Δは野生型のHSV-1に存在しないLacZ遺伝子を含むので、[Redacted] PCRで[Redacted] G47Δを検出できる(文献3 2)。

[Redacted] また、感染細胞のX-gal染色を行なうことによっても、G47Δ(青色に染色)と野生型HSV-1(染色されない)を区別することができる。(文献3 3)。

PCR法による検出の信頼性については、同様の定量的PCR法を用いたウイルス検出法がすでにG207(二重変異遺伝子組換えHSV-1)の臨床試験で用いられており、[Redacted] 信頼性が確立している。(文献1 1、3 4 [Redacted])。

文献3 2 : Todo, T. *et al.* Viral shedding and biodistribution of G207, a multimitated, conditionally replicating herpes simplex virus type 1, after intracerebral inoculation in aotus. *Mol Ther* 2: 588-595 (2000).

文献3 3 : Carew, J. *et al.* Selective infection and cytolysis of human head and neck squamous cell carcinoma with sparing of normal mucosa by a cytotoxic herpes simplex virus type 1 (G207). *Hum Gene Ther.* 10: 1599-1606, 1999

文献3 4 : DeBiasi, R. *et al.* Use of PCR for the diagnosis of herpes virus infections of the central nervous system. *J Clin Virol.* 25: S5-11 (2002)

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

G47Δはウイルスゲノムに遺伝子操作が加えられた遺伝子組換えHSV-1であり、*UL39*、*γ34.5*、*α47*の領域にコードされているウイルス蛋白質を発現できない。*UL39*遺伝子(ribonucleotide reductase (RR)の大サブユニットをコードする)および $\gamma34.5$ 遺伝子はともに正常細胞でのウイルス複製に必要な遺伝子であり、これらを欠失したウイルスは腫瘍細胞でのみ複製が可能となる。

$\gamma34.5$ はHSV-1の病原性に関連した遺伝子で、これを欠失させた変異株は正常細胞でのウイルス複製能が著しく減弱することが判明している(文献3 5)。正常細胞ではウイルス感染が起こると二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ(double stranded RNA-activated protein kinase: PKR)がリン酸化され、それが翻訳開始因子eIF-2aをリン酸化し、その結果ウイルス

蛋白を含む細胞内での蛋白合成が遮断される。 $\gamma 34.5$ 遺伝子産物はリン酸化PKRに拮抗してウイルス蛋白の合成を可能にするが、 $\gamma 34.5$ 遺伝子欠失HSV-1は正常細胞では複製を行えない。しかし、正常細胞とは異なり、腫瘍細胞では普遍的にPKRのリン酸化が低いため、 $\gamma 34.5$ 遺伝子欠失のHSV-1でも複製可能となると考えられている（文献36）。

RRはウイルスDNA合成に必要な酵素であるが、この遺伝子を不活化すると、ウイルスは非分裂細胞では複製できず、分裂が盛んでRR活性の上昇した細胞でのみウイルスの欠落酵素が補われてウイルス複製が可能となる（文献37）。

一方、 $\alpha 47$ 遺伝子を欠失したウイルスは感染細胞でのtransporter associated with antigen presentation (TAP)に拮抗する機能を失うため、感染細胞のMHCクラスIの発現が維持され、免疫系による認識を促進する。同時にゲノム上で重複して位置するUL11遺伝子の発現を早めることで、 $\gamma 34.5$ 欠失ウイルスの減弱した複製能力を腫瘍細胞において選択的に回復させる（文献2、30、38）。

UL39領域には大腸菌LacZ cDNAが挿入されており、G47 Δ の感染した細胞内で一過性に発現される。

G47 Δ の感染性は野生型HSV-1と同じであり、ヒトを宿主とする。ヒトや動植物等への感染性、感染様式、潜伏性など、生物多様性に影響を与える性質は野生型HSV-1と同等であると考えられる。腫瘍細胞および実験室内における一部の増殖中の培養正常細胞でのみウイルス複製が可能であることから、自然界では伝搬・複製し得ない。

文献35 : Chou, J. *et al.* Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to $\gamma 34.5$, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 250: 1262-1266 (1990)

文献36 : Farassati, F. *et al.* Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nat Cell Biol* 3: 745-750 (2001)

文献37 : Goldstein, D.J. *et al.* Factor(s) present in herpes simplex virus type 1-infected cells can compensate for the loss of the large subunit of the viral ribonucleotide reductase: characterization of an ICP6 deletion mutant *Virology* 166: 41-51 (1988)

文献38 : Cassady, K. *et al.* The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the $\gamma 34.5$ genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2 α . *J Virol.* 72: 7005-7011 (1998).

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

治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、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

- (1) G47Δ溶液は、容器に密封した状態で、遺伝子組換え生物である旨を容器等の見やすい箇所に表示した上で、他の薬剤等から識別可能な状態で施設内の冷凍庫に保管する。
- (2) G47Δ溶液の希釈及び分注操作は、施設内の安全キャビネット内で行う。G47Δ希釈溶液の保管は、遺伝子組換え生物である旨を容器等の見やすい箇所に表示した上で、他の薬剤等から識別可能な状態で施設内の保冷库または冷凍庫において行う。なお、G47Δ希釈溶液又はその凍結品の施設内での運搬は、容器に密閉した状態で行う。
- (3) 患者に対するG47Δの投与は、治療室において、患者の腫瘍内にG47Δ希釈溶液を注入することによって行う。単純ヘルペスウイルス1型の回帰症状が疑われた場合等であって、医療上必要と判断される場合、唾液等のサンプリングを行い遺伝子組換えウイルスの有無の確認等を行う。
- (4) G47Δ溶液（希釈溶液を含む）及び上記(2)、(3)で用いた機器や材料は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律に基づいて当該医療施設で定められている医療廃棄物の管理に係る規程に従い処理または医療廃棄物として廃棄する。未使用のG47Δ液を含む廃棄物は廃棄前に不活化もしくは厳重な密封を行う。投与部位等、高力価のG47Δと直接接触した可能性のある部位の被覆材や器具等については、他の患者の廃棄物と分けて保管した上で使用施設の規程に従い医療廃棄物として処理する。患者由来の検体の取扱いは使用施設の規定に従い、医療廃棄物として処理する。

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

東京大学で行われた膠芽腫に対するG47Δウイルス療法の臨床研究においては、G47Δ投与後の[]検査を実施し情報を収集した[]。十分な情報収集がすでに行われており、今回の申請においては[]検査は行わない。

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

生物多様性影響が生じるおそれはなく、生物多様性影響を防止するための措置は行わない。

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

本遺伝子組換えウイルスが、膠芽腫に対するウイルス療法臨床研究として、東京大学においてヒトに対し使用されている。 [REDACTED]

HSV-1に感受性のあるサル (*Aotus nancymae*) に、G47Δを作製する基となったG207(二重変異を有する遺伝子組換えHSV-1)を脳内に定量的に投与した非臨床試験において、野生型HSV-1 (strain F) は 1×10^3 pfuで脳炎を生じ投与後5日で死亡させたが、G207は 10^9 pfuでも毒性を示さなかった(文献32、39)。G207の脳内投与後(3×10^7 pfu)、1, 3, 7, 10, 14, 21, 31日めに唾液、涙、膺分泌液を採取し、ウイルス排出の有無が検証されたが、いずれの検体からも感染性ウイルスおよびG207のDNAは検出されなかった(文献32)。G207の脳内投与1ヶ月後(3×10^7 pfu)もしくは2年後(10^9 pfu)の解剖で採取した全身の組織検体からのPCRによるDNA残存の検索では、G207のDNAが中枢神経系(注入部位、同側の前頭葉、側頭葉、頭頂葉、脳幹、および対側の前頭葉)に局限して検出された。

BALB/cマウスにLD₅₀量の野生型HSV-1の脳内投与を行い、生き延びてHSV-1の潜伏感染を確立したマウスに、G207(1×10^7 pfu)を脳内投与しても潜在HSV-1の再活性化を誘発しなかった(文献40)。 [REDACTED]

文献39 : Hunter, W.D. *et al.* Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. *J Virol* 73: 6319-6326 (1999).

文献40 : Sundaresan, P *et al.* Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice. *J. Virol.* 74: 3832-3841 (2000).

6 国外における使用等により得られた情報

米国アラバマ大学バーミングハム校とジョージタウン大学医療センターにおいて、再発神経膠腫を対象とし、腫瘍治療用に開発された第二世代遺伝子組換えHSV-1のG207を用いて再発悪性グリオーマ患者21例を対象に米国で第I相臨床試験が行われた(1998年~2000年)(文献

1 1)。G207は定位脳手術により脳腫瘍内に単回投与され、 1×10^6 pfuから 3×10^9 pfuまで3例ずつ用量を増加した。ジョージタウン大学では通常の手術室を用いて他の患者と同様の扱いで手術が施行され、患者は通常の病室で管理された。G207投与後4日、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年の各時点で患者の唾液と血液が採取され、ウイルス排出の有無が検証されたが、いずれの検体からも感染性ウイルスおよびG207のDNAは検出されなかった。

2009年には米国アラバマ大学バーミングラム校から G207 第 Ib 相試験の結果が報告された(文献4 1)。再発膠芽腫の患者6名に対し、 1.5×10^8 pfu の G207 を定位的に腫瘍内に投与した後、開頭手術にて投与部を含めた腫瘍切除と、摘出腔壁への 1×10^9 pfu の G207 注入を行なった。有害事象や腫瘍の画像変化の評価に加え、摘出組織内での G207 複製などが検討された。G207 投与後 24 時間、72 時間、7 日、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、1 年の各時点で患者の血液、唾液、尿、および結膜スワブが採取され、ウイルス排出の有無が検証されたが、いずれの検体からも G207 の DNA は検出されなかった。

2014年に同じく米国アラバマ大学バーミングラム校から報告された放射線治療併用 G207 第 I 相試験では(文献4 2)、9例の再発悪性神経膠腫に対し 1×10^9 pfu の G207 の腫瘍内投与と放射線局所照射(5Gy、1回照射)が行われた。G207 投与後 2 日、4 日、28 日、3 ヶ月、6 ヶ月の各時点で患者の血液と唾液が採取され、ウイルス排出の有無が検証されたが、いずれの検体からも G207 の DNA は検出されなかった。

34.5 遺伝子のみを欠失した第一世代遺伝子組換え HSV-1 の 1716 を用い、再発悪性グリオーマ患者 9 例を対象に英国で第 I 相臨床試験が行われた(文献1 2)。1716 は定位脳手術により脳腫瘍内に単回投与され、 10^3 pfu から 10^5 pfu まで 3 例ずつ用量を増加した。投与後 2 日目、6 日目、その後 4 週間まで週 1 回、血清と口腔粘膜を採取しウイルス排出検査を行ったところ、感染性の HSV-1 はいずれの患者からも検出されなかった。またヘルペスウイルス感染症の皮膚症状も見られなかった。次に行われた proof of principle (POP) 試験では、再発悪性グリオーマ 12 例に対して定位脳手術により 10^5 pfu を脳腫瘍内に単回投与し、その 4-9 日後に腫瘍摘出を行ってウイルス複製の有無について解析した(文献1 3)。2 例で、摘出腫瘍組織から感染性ウイルスが検出された。PCR では 10 例の投与部位から 1716 の DNA が検出された。1 例において、投与 5 日後(腫瘍摘出の翌日)の血清から HSV-1 の DNA が PCR で検出され、その後速やかに陰性化した。他の 11 例では一度も血清中から HSV-1 の DNA は検出されなかった。

- 文献 4 1 : Markert J. M., Liechty P. G., Wang W., et al. Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre-and post-tumor resection for recurrent GBM. *Mol Ther*;17:199-207, 2009
- 文献 4 2 : Markert J.M., Razdan S.N., Kuo H.C., et al. A phase I trial of oncolytic HSV-1, G207, given in combination with radiation for recurrent GBM demonstrates safety and radiographic responses. *Mol Ther*;22:1488-55, 2014

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

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同一と考えられ、微生物に感染するとの報告はない。また、G47Δは腫瘍細胞および実験室内における一部の増殖中の培養正常細胞でのみウイルス複製が可能であることから、自然界では伝搬・複製し得ない。有害物質の産生もなく、競合や有害物質の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。よって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず。)

(3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず。)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法において、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

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同一と考えられるので、自然宿主はヒトのみである。さらに、腫瘍細胞でのみウイルス複製が可能であることから、自然界では伝搬・複製し得ない。なお、実験室内で用いられる一部の系統のマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルは感受性があり、注射等による接種によりG47Δを感染させることができる。また、ペット等として飼育されている動物（ウサギ、マーモセット、チンチラ）は感受性があると推定され、注射等による接種を行えばG47Δを感染させることができると推定される。

(2) 影響の具体的内容の評価

G47Δは投与されたヒトの腫瘍細胞に限局してウイルス複製を行い、ヒト正常組織に対しては病原性がない。正常細胞において実験室内における一部の増殖中の培養細胞では複製

可能である。欧米において遺伝子組換えHSV-1を用いたウイルス療法の臨床試験が複数完了
した進行中

(文献 11-16、41、
42)。G47Δにはウイルス複製を検出するために大腸菌*LacZ*遺伝子cDNAが挿入
されており、G47Δが複製する腫瘍細胞に導入され、一過性に発現される。*LacZ*遺伝子から
の生成物であるβ-ガラクトシダーゼは人体に対し毒性や病原性を有しな
い。*LacZ*遺伝子を発現する第二世代複製型遺伝子組換えHSV-1であるG207が第I相臨床試
験において人の脳内(脳腫瘍内)に投与されており、
*LacZ*遺伝子生成物の安全性は示されている。G47Δに加えられた遺伝子変異はHSV-1
ゲノム上の離れた4箇所(3つの遺伝子)に位置しているため、G47Δ由来の遺伝子組換え
生物に該当する野生型復元HSV-1が自然に生じる可能性も無に等しい。

(3) 影響の生じやすさの評価

G47Δはヒト正常組織に対しては病原性がなく、自然界においてもG47Δが伝搬・複製する
可能性は低いことから、G47Δが被験者以外の第三者や動物に病原性を示す可能性は無に等
しいと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の
第一種使用等の方法において、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物又は他の微生物の特定

G47Δの有害物質の産生性は知られておらず、影響を受ける可能性のある野生動植物等は
特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず。)

(3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず。)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換

え生物等の第一種使用等の方法において、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等の特定

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである。実験室内では、感受性のある一部のマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルには注射等による接種により感染させることができ、ワクチンや遺伝子組換えHSV-1の安全性評価に使用されている。ペット等として飼育されている動物（ウサギ、マーモセット、チンチラ）は感受性があると推定され、注射等による接種を行えばG47Δを感染させることができると推定される。

(2) 影響の具体的内容の評価

G47Δの投与を受けたヒトでは、腫瘍内に限局して複製したG47Δが生じる[REDACTED]。また、G47Δの投与を受けたヒト体内において、腫瘍細胞以外でのウイルス複製能は有さず、これによる他の哺乳類への核酸の水平伝達は知られていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

G47Δは実験室内における一部の増殖中の培養正常細胞を除き正常細胞でのウイルス複製能を失っているため、自然界では繁殖し得ない。さらに、G47Δの自然界での感染対象は野生型HSV-1と同様にヒトに限られること、及びヒトからヒトへ腫瘍細胞を介して直接水平伝達して複製することはほぼ不可能であることを考慮すると、影響の生じやすさは極めて低いと考えられる。G47ΔはHSV-1ゲノム上の離れた4箇所（3つの遺伝子）に変異が加えられているため、G47Δ由来の遺伝子組換え生物に該当する野生型復元HSV-1が自然に生じる可能性も無に等しい。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝

子組換え生物等の第一種使用等の方法において、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

5 その他の性質

なし。

V 総合的評価

G47Δが感染する動植物等の種類は野生型HSV-1と同等で、ヒトを自然宿主とし、ペット動物以外では、自然界で他のほ乳動物、植物及び微生物には感染したり拡散したりするという報告はない。

G47Δによる*LacZ*遺伝子の一過性発現はヒトに病原性をもたないので、ヒトに対する影響はないと考えられる。

さらに、G47Δは腫瘍細胞に限って複製することが可能で、実験室内における一部の増殖中の培養正常細胞を除き正常細胞でのウイルス複製能を失っている。別個体のヒトにG47Δが直接水平感染する可能性は極めて低く、G47Δが環境中に拡散する可能性はきわめて低い。

G47ΔはHSV-1ゲノム上の離れた4箇所（3つの遺伝子）に変異が加えられているため、G47Δ由来の遺伝子組換え生物に該当する野生型復元HSV-1が自然に生じる可能性も無に等しい。

従って、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法に従えば、G47Δ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。