様式第１（第７条関係）

2017年5月16日

第一種使用規程承認申請書

厚生労働大臣　加藤　勝信　殿

環境大臣　　中川　雅治　殿

氏名　アステラス・アムジェン・バイオファーマ株式会社

申請者　代表取締役　　スティーブ・ケンジ・スギノ　　印

住所　東京都千代田区丸の内１－７－１２　サピアタワー

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	2 つの *γ34.5* 遺伝子及び *α47* 遺伝子を欠失し、2 つの *γ34.5* 遺伝子領域にヒト顆粒球･マクロファージコロニー刺激因子をコードする配列が挿入された JS1 株に由来する遺伝子組換え 1 型単純ヘルペスウイルス（JS1/ICP34.5-/ICP47-/hGM-CSF）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	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	**保管** (1)　本遺伝子組換え生物等の保管は、遺伝子組換え生物等である旨を表示した容器の中でバイアルに密封された状態で、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において行う。 **運搬** (2)　本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。 **投与液の調製** (3)　本遺伝子組換え生物等溶液の希釈は、治療施設内の安全キャビネット内で行う。 **投与** (4)　本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設内で、固形がん

	患者の腫瘍内に直接注入することにより行う。 (5)　(4) の投与を受けた患者の注入部位は、注入後、消毒用アルコールで拭い、乾いた密閉ドレッシング材で覆う。 **患者等の管理** (6)　(5) の密閉ドレッシング材による被覆は、医師の判断により必要とされる期間継続する。 (7)　本遺伝子組換え生物等の使用等によるヘルペス感染症の発生が疑われた場合には、発生部位から検体採取を行い、遺伝子組換え生物等の有無の確認を行う。 (8)　(4) の投与を受けた患者がその他の外部医療施設で治療を受ける際は、その他の外部医療施設に第一種使用等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であることが情報提供されるよう (4) の投与を受けた患者に適切な指導を行う。 **患者検体の取扱い** (9)　治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）で、患者から採取した検体は、施設等の規定に従って取り扱う。検体（注入部位及び注入部位の腫瘍由来の検体を除く）の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合には、検体は検査機関の規定に従って取り扱う。 (10)　施設等から検査機関への検体（注入部位及び注入部位の腫瘍由来の検体を除く）の運搬は、本遺伝子組換え生物等が拡散しない構造の容器に入れ、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。 **感染性廃棄物等の処理** (11)　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）に基づき施設等又は検査機関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。）に従って行う。 (12)　未使用の本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物の廃棄は、不活化処理した上で医療廃棄物管理規程に従って行う。 (13)　患者由来の検体の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。

	(14) 患者が自宅で用いたドレッシング材及び洗浄に用いた器材等の廃棄は、不活化処理した上で行う。 (15) 治療施設外で保管された本遺伝子組換え生物等を含有する未開封のバイアルの廃棄は、不活化処理した上で行う。

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

群：第 1 群（二本鎖 DNA）
目：ヘルペスウイルス（*Herpesvirales*）
科：ヘルペスウイルス（*Herpesviridae*）
亜科：アルファヘルペスウイルス（*Alphaherpesvirinae*）
属：単純ウイルス（*Simplexvirus*）
種：単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）（*Herpes simplex virus 1*［HSV-1］）

2 つの *γ34.5* 遺伝子及び *α47* 遺伝子を欠失し、2 つのγ34.5 遺伝子領域にヒト顆粒球･マクロファージコロニー刺激因子をコードする配列が挿入された JS1 株に由来する遺伝子組換え 1 型単純ヘルペスウイルス（JS1/ICP34.5-/ICP47-/hGM-CSF）（以下、本遺伝子組換え生物等又は本遺伝子組換えウイルス）の作成に用いた HSV-1 親株は JS1 と命名された。本株は健常人から新規に分離した新株で、細胞バンクに登録している（ECACC 登録番号 01010209）。

JS1 は、口唇ヘルペス以外に健康上問題のないボランティアのヘルペス病変部よりスワブを用いて採取し、BHK 細胞内（ベビーハムスター腎臓繊維芽細胞：ECACC 登録番号 85011433）で継代的に増殖させた。JS1 ウイルス株が HSV-1 であることは、HSV-1 特異的培養試験により確認した。JS1 株の塩基配列シークエンスは未解析であるが、HSV-1 株 17*syn*+、HSV-2 株 HG52 と JS1 を比較するプロファイリング試験を実施した結果、JS1 株は HSV-1 株 17*syn*+に酷似しているが HSV-2 株 HG52 とは異なっていた（4647-00132 試験）。

HSV-1 の分布

HSV-1 は、世界中に分布するヒトに特異的な病原体であり、ヒトは HSV-1 の唯一の自然宿主である。ヒト以外の動物種への感染は稀であるものの、ペットを含めて様々な動物種（げっ歯類、ウサギ、ハリネズミ、非ヒト霊長類）に対する感染が報告されている（Weissenbock et al., 1997; Grest et al., 2002; Huemer et al., 2002; Wohlsein et al., 2002; Allison et al., 2002; Lefaux et al., 2004; Muller et al., 2009; Longa et al., 2011）。これらの感染はウイルスを活発に体外排出しているヒトと密接に接触した後に生じていた。なお、実験室内では、HSV-1 の感染モデル動物として、マウス、サル、マーモセット等が使用されている（Lopez, 1975; Barahona et al., 1976; Deisboeck et al., 2003）。一方，非ヒト霊長類に急性の致死的疾患を引き起こした HSV-1 の症例報告について考察した総説に、「捕獲動物における HSV-1 感染を検討した最近の試験は依然として少ない」と記載されている（Epstein and Price, 2009）。文献検索では、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ及びその他の家畜におけるヒト HSV-1 感染は確認されなかったが、これらの動物はアルファヘルペスウイルス亜科の他のウイルスに感染することがある（McGeoch et al., 2006）。

成人における抗体保持率は、先進国で 70%、発展途上国で 100%と推定される（Gupta et al., 2007; Nahmias et al., 1990）。日本での抗体保持率は若干低く、約 50% ~ 63%の人が HSV-1 抗体を、

1% ~ 17%の人が HSV-2 抗体を保持するのみである（Doi et al., 2009; Hashido et al., 1999; Hashido et al., 1998; Smith & Robinson, 2002）。

2　使用等の歴史及び現状

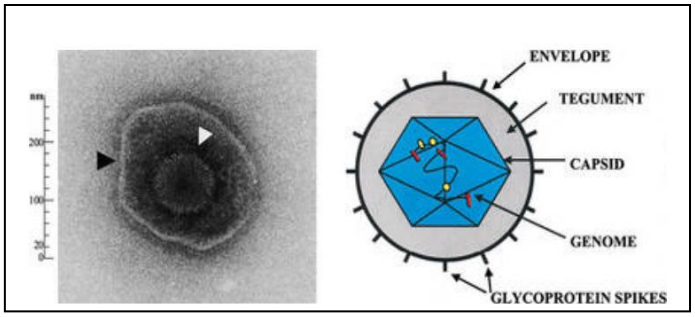
各種の進行性腫瘍（進行性固形がん、黒色腫、頭頸部扁平上皮癌［SCCHN］、膵癌）を対象とした臨床試験が実施されている。詳しくは III-6 項にて述べる。

3　生理学的及び生態学的特性

（1）基本的特性

野生型 HSV-1 は、他のヘルペスウイルス科ウイルス同様、直径約 100 nm の正 20 面体ヌクレオカプシド中に巨大な二本鎖 DNA ゲノムを納めた構造をもち、エンベロープを有する。エンベロープのリン脂質膜は感染細胞のゴルジ体等に由来し、埋込まれたウイルス性糖タンパクのスパイクが外に向かって突出している。さらに、テグメントと呼ばれる無定形構造をヌクレオカプシドとエンベロープの間にもつことが特徴的で、感染初期に重要な役割を担うウイルス性タンパクを含んでいる。完全ウイルス粒子の大きさにはばらつきがあるが、平均的なウイルス粒子径は 186 nm で、糖タンパクスパイク部分も含めると約 225 nm である（Grunewald et al., 2003）。HSV-1 ウイルス粒子の電子顕微鏡像および概略図を図 1 に示す。

図 1　　HSV-1 ウイルス粒子の電子顕微鏡像及び概略図（エンベロープ、テグメント、DNA、カプシド）



HSV-1 ウイルス粒子の電子顕微鏡像（Drs. Elisabeth Schraner and Peter Wild, University of Zürich）及び略図。エンベロープを黒矢印、カプシドを白矢印で示す。
出典：Jacobs et al., 1999

これらの構造的特性に加えて、ヘルペスウイルス科ウイルスは次のような特有の性質を有する：

- 溶菌複製サイクルでは、感染細胞核内でウイルス DNA の合成およびヌクレオカプシドの構築が行われる。DNA を収納したヌクレオカプシドは、感染細胞のゴルジ網と形質膜を通して出芽する。子孫ウイルスの放出には、常に感染細胞の破壊を伴う。
- 一部のヘルペスウイルス科ウイルス（HSV-1 を含む）は、自然宿主内で感覚神経節での潜伏感染を確立する能力がある。

HSV-1 は、生物学的特性によりヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科にさらに分類される。アルファヘルペスウイルス亜科ウイルスは次の特性を有する：

- 種により大きく異なる感染細胞特異性
- 比較的短いウイルスサイクル
- 培養細胞への急速な拡散
- 感染細胞を効率的に破壊
- 感覚神経節での潜伏感染を確立する能力

ヒトに感染するアルファヘルペスウイルスサブファミリーは、HSV-1、HSV-2 及び水痘・帯状疱疹ウイルス（VZV）である。

（２）生育又は生育可能な環境の条件

HSV はヒトに感染し増殖する。ヒト細胞や Vero（アフリカミドリザル）細胞といった特定の哺乳動物由来細胞培養中で効率よく増殖する。粘膜表面への直接的な接触を主な感染経路とする。HSV は宿主から離れると通常環境条件で長時間生存することはできない。

（３）捕食性又は寄生性

自然界では、ほぼヒトでのみ増殖を伴う感染が起こるといえる。ヒト以外の動物種への感染は非常に稀である［I -1 項、I -3（５）項、IV -1 項参照］。

（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）への直接的な接触により感染する。ウイルスは感染部位で複製した後、神経末端から感覚神経節（しばしば三叉神経節）の核内に移行して潜伏感染を確立する。潜伏感染時のウイルスは別の宿主への感染性を有しない。潜伏感染したウイルスの再活性化が起きると、感染性ウイルスは無症候性に体外排出されるか、又は皮膚粘膜（初感染部位、通常は口唇）で水疱を形成する。

（５）病原性

HSV-1 は口唇ヘルペスの原因となる病原性ウイルスで、免疫能を有する人であれば初感染は一般に軽症あるいは無症状である。また、発がん性はない。再活性化ウイルスは無症状のまま体外排出されるか、又は初感染部位に水疱を形成する。合併症として眼感染症（角膜炎）や脳炎などが報告されている。ヘルペス脳炎の発生は日本では年間 100 万人に 2～4 人（Kamei & Takasu, 2000）であり、世界的にみても同様である（Rozenberg et al., 2011）。米国では 50 万人（全人口の約 0.1%）が HSV 角膜炎の既往歴があると推定される（Farooq & Shukla, 2012）。日本において、ある外来施設に来院した HSV 角膜炎患者を対象に 30 年間にわたるレトロスペクティブ試験を実施し、これらの患者を来訪時期により 2 群（1963～1979 年、1980～1992 年）に分けて検討した。最初の群では最初の角膜炎が 2.4%の患者に平均 7.06 歳で発現し、2 番目の群では 5.7%の患者に平均 24.2 歳で発現した。抗体保持率の低下により初感染の平均年齢の上昇が起こったものと推察された（Uchio et al., 1994）。HSV-1 は、新生児や免疫不全など特殊な条件下を除けば、初期感染後にウイルス血症を生じることはなくウイルスの全身への分布は生じない。

新生児 HSV 感染は出生時に女性生殖管に HSV が存在する場合に生じると考えられる。新生児 HSV は治療が大きく進化しているにもかかわらず罹患率、死亡率ともに非常に高い（Kimberlin, 2004; Thompson & Whitley, 2011）。現在、米国の新生児 HSV 疾患の発現率は出生件数約 3200 件中 1 件と推定されている。新生児 HSV 感染は 3 パターンに分類されるが、いずれもほぼ同じ頻度で発現する。新生児 HSV には、肺、肝臓、副腎、皮膚、眼及び脳を含む多臓器への播種性疾患、皮膚病変を伴う又は伴わない中枢神経系（CNS）疾患、ならびに皮膚、眼及び/又は口腔に限定した疾患（SEM 疾患）がある。播種性疾患及び SEM 疾患は一般に出生後 10～12 日後というごく早期に現れ、CNS 疾患は出生後 2～3 週間後に認められる。抗ウイルス療法ができる前は播種性 HSV 疾患患者の 85%及び CNS 疾患患者の 50%が 1 年以内に死亡していたが、抗ウイルス療法の開発により新生児 HSV の予後は改善している。高用量アシクロビルの使用によって 12 カ月以内の死亡率は新生児の播種性 HSV 疾患で 29%、CNS HSV 疾患で 4%にまで減少している（Kimberlin, 2004; Thompson & Whitley, 2011）。新生児 HSV 感染の大部分は HSV-2 によるものだが、約 15～30%が HSV-1 に起因すると考えられている（Rudnick & Hoekzema, 2002）。

HIV 感染患者を含む免疫不全の宿主において、HSV 疾患は特に重症化しやすく、慢性的かつ持続的な活動性（active）感染症をもたらし、中には生命を脅かすものもある（Stewart et al., 1995）。免疫抑制患者（特に T 細胞免疫不全患者）においては重度の病変が発現し、健常宿主よりも長期間持続するうえ、これらの病変が内臓疾患に進行することもある。したがって、野生型 HSV-1 で生じる重篤な合併症のほぼ全例が免疫不全患者で占められることになる。このような症例では免疫系が感染をコントロールできず全身性の症状を呈する。潜在的に感受性の高い免疫不全患者として、細胞障害性療法を受けている患者、移植患者及びヒト免疫不全ウイルス（HIV）患者が挙げられる（Brady & Bernstein, 2004）。アシクロビル耐性 HSV の出現は治療が長期に及ぶ免疫不全患者に主に観察される現象であり、これも問題となっている。しかし、アシクロビル耐性 HSV 株を原因とする脳炎はこれまでに報告されていない（Rozenberg et al., 2011）。

ウサギ及びげっ歯類に対する HSV-1 感染は、全身性及び神経病原性を有するヒトへの HSV-1 感染と同様な病理組織学的特徴を示し、ヘルペスウイルスの各性質（感染様式、ウイルス遺伝学、病原性、潜伏感染、再活性化）を解明する実験モデルとして汎用されている（Webre et al., 2012; Kumel et al., 1986; Leib et al., 2009; MacLean et al., 1991）。これらの試験において、動物への感染は、直接注入、鼻腔内投与又は粘膜表面の乱切処理によって行う。

非ヒト霊長類への実験感染及び自然感染から、非ヒト霊長類は HSV-1 に易感染性で、発熱、口周囲の潰瘍性病変、播種性感染及び致死的な脳炎を生じることが示唆されている（Lefaux et al., 2004; Longa et al., 2011）。同様に、チンチラにおいて眼感染後に痙攣、失見当識及び無関心・無欲が報告され、ペットのウサギにおいて脳炎に起因する重度の神経学的徴候が報告されている（Wohlsein et al., 2002; Weissenbock et al., 1997）。これらの動物の病理組織学的所見にて、大脳の様々な領域に神経細胞壊死及び核内封入体が観察された。

（６）有害物質の産生性

HSV-1 感染に伴い細胞内で産生されるタンパク質には、ウイルス病原性に関与するものがあるが、細胞外からの有害作用は報告されていない。

（７）その他の情報（不活性化条件を含む）

野生型 HSV-1 はエンベロープを有するウイルスであり、感染宿主（主としてヒト）の体外では複製せず、自然環境中での生存期間は非常に短いとされる（Slade et al., 1989; Nerurkar et al., 1983）。ガラスやタイル等の固体表面では、乾燥下では数時間から 8 週間生存しうるが、高湿度下では生存期間が短縮されることが報告されている（Mahl and Sadler, 1975）。プラスチック表面又はクロムめっき表面に HSV-1 を含む唾液が付着した場合、唾液が乾燥した場合には 30 分から 1 時間の間に約 1/100 に低下したが、唾液が残っている場合には生存していたとの報告がある（Bardell, 1993）。

エンベロープを有するウイルスである HSV-1 は宿主から離れると、物理的不活化（脱水、熱、低 pH）及び消毒薬（脂質溶媒、中性洗剤）に敏感に反応し、速やかに不活化する。野生型 HSV-1 は宿主から離れると、pH 4 未満、温度 56°C 超に 30 分間、低温殺菌（60°C に 10 分間）、及びマイクロ波加熱 4 分間で容易に不活化する（Croughan & Behbehani, 1988; Jerome, 2007）。

野生型 HSV は脂質溶媒によって容易に不活化する（Jerome, 2007）。0.5% Lysol 水溶液又は Listerine（1:1 混合液、水で希釈）で 5 分間インキュベートするか、漂白剤 2000 ppm（水 1 L に 2000 μL）で 10 分間処理するか、又は 70%イソプロピルアルコール（1:1 混合液、水で希釈）で処理することで不活化できる（Croughan & Behbehani, 1988）。HSV はまた、第 4 級アンモニウム化合物に感受性がある（Wood & Payne, 1998）。ほとんどの HSV は 30%エタノール、0.12%オルソフェニルフェノール、及び 0.04%グルタルアルデヒドにも感受性を示す（Prince, 2001）。

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

本遺伝子組換えウイルスは、野生型 HSV-1 ゲノム（新規分離株 JS1）から 2 箇所の *γ34.5*（*ICP34.5*）遺伝子、及び *γ47*（*ICP47*）遺伝子を機能的に削除し、双方の *ICP34.5* 遺伝子領域にヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子遺伝子のコード配列（以下、*hGM-CSF* 遺伝子）を挿入して作成した。

供与核酸は、hCMV IE プロモーター領域断片、hGM-CSF 遺伝子 cDNA、bGH polyA シグナル領域断片を結合したものである。hCMV IE プロモーター領域は、プラスミド pcDNA3 由来、hGM-CSF 遺伝子 cDNA は、I.M.A.G.E コンソーシアムの IMAGE cDNA clone コレクション由来、bGH polyA シグナル領域は、プラスミド pcDNA3 由来である（別紙 1 の 1 項参照）。

（２）構成要素の機能

ICP34.5 領域の欠失により、本遺伝子組換えウイルスの複製が腫瘍選択的となり、神経病原性が不活化される。*ICP47* 領域の欠失により、ウイルスがウイルス抗原および腫瘍抗原を効率的に提示させる。US11 の前初期発現により、本遺伝子組換えウイルスは腫瘍選択性を損なうことなく腫瘍内でより効率的に複製可能となる。免疫刺激タンパク hGM-CSF の発現により、注入された腫瘍内や周囲における樹状細胞前駆細胞の分化や増殖を誘導し、放出された腫瘍抗原に対する免疫応答を増強させる（Dranoff et al., 1993）。

hGM-CSF

hGM-CSF 遺伝子を本遺伝子組換えウイルスに挿入し、局所の腫瘍微小環境内で発現させる。腫瘍内注入後の GM-CSF の局所発現は、抗原提示細胞（死腫瘍細胞に由来する腫瘍関連抗原をプロセシングして提示する）の流入及び活性を促進する。これらの抗原提示細胞は、腫瘍特異的な CD4+及び CD8+ T 細胞を刺激し、全身性及び特異的な抗腫瘍免疫応答を促進及び惹起する（Dranoff et al., 1993; Huang et al., 1994）。

ヒト GM-CSF はマウス GM-CSF 受容体に結合せず、マウスで活性を示さないことから（Rasko and Gough, 1994）、安全性及び薬理を評価する一部の非臨床試験では、マウス GM-CSF をコードする代替 HSV-1 株（OncoVEX$^{mGM-CSF}$）を使用し、薬理活性を示す GM-CSF の発現が本剤の活性を増強させるか、並びに本剤の安全性に影響を及ぼすかについて検討した。また、一部の非臨床安全性試験では、OncoVEX$^{mGM-CSF}$ の安全性を評価することで、本遺伝子組換えウイルスの安全性を評価した（4648-00029 及び 4648-00052 試験）。これらの試験において、GM-CSF の発現による有害作用は認められなかった。

ヒト GM-CSF は既承認の薬剤である。遺伝子組換え hGM-CSF（販売名：Leukine®、一般名：sargramostim）が 1991 年に、また異なる剤型が 1996 年に、化学療法又は骨髄移植後の白血球の回復を適応として FDA により承認された。ヒトへの hGM-CSF 静脈内（i.v.）注入又は皮下注射における副作用は、一般に軽度で、主として発熱、筋肉痛、及び注射部位反応である（Leukine 添付文書）。最近では、hGM-CSF を含む体外受精用培地 EmbryoGen®が、流産の危険性が高い女性の胚着床を補助することが確認されている（EmbryoGen 添付文書）。

ICP34.5 (γ34.5)

神経病原性は神経系に疾患を引き起こす能力と定義されるが、野生型 HSV-1 の神経病原性はウイルスにコードされた ICP34.5 タンパク質が関与することが知られている。ICP34.5 は、感染細胞のウイルス防御に重要とされる翻訳停止（Chou et al., 1990）及びオートファジー（Orvedahl et al., 2007）に拮抗する作用を有する。さらに ICP34.5 は、新規形成ウイルスカプシドの細胞核からの放出及びウイルス粒子の出芽を促す（Brown et al., 1994）。*ICP34.5* 遺伝子の削除による神経病原性低下のレベルを検討するために、マウスの脳内接種が用いられている。ある報告では 10 万倍を上回る低下を示した（Chou et al., 1990; MacLean et al., 1991）が、別の報告では *ICP34.5* 変異ウイルスでの低下は 25 ~ 90 倍に留まった（Bolovan et al., 1994）。後者で使用した変異株は ICP34.5 をコードする遺伝子に終止コドンを挿入しているため、ある程度のリードスルーが起きた可能性もある。

野生型 HSV-1 において ICP34.5 は、細胞内の抗ウイルスタンパク質、プロテインキナーゼ R（PKR）のタンパク合成阻害作用を妨害する。PKR は細胞の感染を感知すると、真核生物翻訳開始因子 eIF2α をリン酸化して不活化し、感染細胞の新規タンパク合成を阻害する。また、ICP34.5 は PKR のこの作用に拮抗するホスファターゼ（脱リン酸化酵素）を増加させることで感染細胞はウイルス感染にも拘らずタンパク合成を継続するようになる（He et al., 1997）。ICP34.5 は、哺乳動物オートファジータンパク質であるベクリン 1 に結合し、その作用を阻害することによりオートファジーに拮抗する（Orvedahl et al., 2007）。ベクリン 1 は、オートファゴソーム形成を開始するのに必要である。ベクリン 1 は PKR の下流経路としても機能するが、

ICP34.5 上のホスファターゼ補充領域とベクリン結合領域は異なる。HSV-1 の *ICP34.5* 上のベクリン結合領域を削除すると、HSV-1 がマウスに致死性脳炎を発症させる能力を完全に阻害するが、ICP34.5 の eIF2α 脱リン酸化能や感染細胞のタンパク合成阻害能には影響を与えない（Orvedahl et al., 2007）。このことから、神経病原性に不可欠なのは ICP34.5 の感染細胞のタンパク合成阻害能に対するものではなく、ベクリン結合能であることが示される。ICP34.5 の感染細胞のタンパク質合成阻害能は、他のウイルスタンパク質 US11 と部分的に重複していることから、この違いは重要である。

正常細胞に本遺伝子組換えウイルスを注入すると、ICP34.5 の欠失によってオートファジーやタンパク合成の遮断といった宿主の抗ウイルス防御作用に対抗できなくなり、複製は中止される。一方、腫瘍細胞に本遺伝子組換えウイルスを注入すると、生来の抗ウイルス防御作用は働かず、細胞溶解ウイルス複製サイクルは、野生型 HSV-1 と同様、子孫ウイルスのパッケージングと放出の前に、前初期、初期及び後期発現遺伝子のカスケードと共に進行する。

ICP47（γ47）

野生型 HSV-1 の免疫システム回避手段のひとつに、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラス I 及びクラス II 分子へのウイルス抗原ペプチド提示の妨害がある。ウイルスにコードされた *ICP47* 遺伝子由来タンパクは、抗原処理関連トランスポーターである TAP1 及び TAP2 をブロックする（Hill et al., 1995）。本遺伝子組換えウイルスの *ICP47* 遺伝子領域の欠失により、ウイルス抗原ならびに腫瘍抗原に由来するペプチドが効率的に提示される。また *ICP47* 遺伝子領域の欠失は、感染細胞による抗原提示を可能にすることに加え、隣接遺伝子 *US11* のアップレギュレーション（転写亢進）をもたらす。通常、*US11* は後期発現遺伝子として調節されているが、*ICP47* 遺伝子の欠失により ICP47 遺伝子の調節配列の制御下となり前初期（IE）遺伝子として発現するようになる（Mohr & Gluzman, 1996）。US11 は PKR に結合して eIF2a の自己リン酸化を妨げ、タンパク合成の低下を防止する。従って、*US11* の前初期発現により本遺伝子組換えウイルスは腫瘍選択性を損なうことなく、かつ神経病原性を回復することなく、腫瘍内でより効率的に複製できるようになり、このことは本遺伝子組換えウイルスの作用機序の重要な一面を担っている。

2　ベクターに関する情報

（１）名称及び由来

（２）特性

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 の新規分離株（JS1）への遺伝子組換えは別紙 1 に記述する。本遺伝子組換えウイルスゲノムでは、JS1 ウイルスゲノム上の 2 箇所の *ICP34.5* 遺伝子が hGM-CSF 発現カセット（hCMV

IE プロモーター、*hGM-CSF* 遺伝子、bGH polyA シグナルを含む）に置換されているとともに、*ICP47* 遺伝子を欠失している。

（２）宿主内に移入された核酸の移入方法

JS1 のウイルスゲノム上の 2 箇所の *ICP34.5* 遺伝子を緑色蛍光タンパク質（GFP）発現カセットに置換する。GFP マーカーを指標に正しく形質転換されたクローンを選択したのち、GFP 発現カセットを hGM-CSF 発現カセットに置換することで *ICP34.5* 遺伝子を欠失し hGM-CSF をコードする配列が挿入された JS1 株を得る。さらに、*ICP47* 遺伝子を GFP 発現カセットに置換し、GFP マーカーを指標に正しく形質転換されたクローンを選択した後に GFP マーカー遺伝子を除去することで、本遺伝子組換えウイルスを得た（別紙 1 の図 2 参照）。

（３）遺伝子組換え生物等の育成の経過

ウイルスシードストック

初期のウイルスシードストックには、ハムスター腎臓細胞（BHK 細胞）を用いていたが、安全性プロファイルが確立されているアフリカミドリザル肝臓由来の Vero 細胞（WHO 由来、ATCC X38）に変更された。Vero 細胞に本遺伝子組換えウイルスゲノム DNA を導入し、産生された本遺伝子組換えウイルスをマスターウイルスシードストック（MVSS）とした。

Vero 細胞より得られた MVSS をさらに Vero 細胞に感染させ、増殖した本遺伝子組換えウイルスをワーキングウイルスシードストック（WVSS）とした。全てのウイルスシードストックは、微生物及び他のウイルスの混入がないことが品質試験により確認されている（別紙 1 の 5 項参照）。

製造工程および工程管理

別紙 1 の 5 項に記載したように、本遺伝子組換えウイルスの製造工程は、Vero 細胞増殖、ウイルスの感染と産生、収集、ろ過、および精製の各段階からなり、異なるスケールでの製造に成功している。

本遺伝子組換えウイルスの製造・充填は、BioVex Inc.（Amgen Inc.の全額出資子会社）により米国マサチューセッツ州ウォーバーンの施設にて行われる。本遺伝子組換えウイルスを含む製剤は Vero 細胞ワーキングバンク（WCB）を用いて米国 current Good Manufacturing Practice（cGMP）に従って製造される。

本遺伝子組換えウイルスを Vero 細胞内で複製し、細胞を溶解し、ウイルス産物を培養培地に遊離させる。ウイルスや細胞片を含む未精製のバルクハーベストを回収してまとめ、ろ過、精製などにより不純物を除去する。

精製にはイオン交換クロマトグラフィー（IEX）及びサイズ排除（ゲル濾過）クロマトグラフィー（SEC）を実施する。回収された SEC ウイルス溶出物を滅菌濾過して原薬を精製する。その後、原薬を必要用量まで無菌的に希釈しバイアルに充填する。

本遺伝子組換えウイルスの外来性感染性物質に関する安全性は、原料の管理、製造施設の管理、製造工程の適切な段階での外来性感染性物質の検査実施により保証されている。また、本

遺伝子組換えウイルスの製造においては、遺伝子組換えにより削除された機能を補うためのヘルパープラスミド等を用いる必要がないことから、製造過程において組換えが起こり、新たな遺伝子組換えウイルスが生じる可能性はない。

4　移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

本遺伝子組換えウイルスの外界での生存性は、野生型と同じか、それ以下と考えられる。本遺伝子組換えウイルスを含む製剤の安定性、本遺伝子組換えウイルスの環境接触面における安定性及び不活化剤に対する安定性を別紙 2 に記載した。

移入した核酸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、宿主ゲノムには取り込まれない。HSV-1 は神経細胞で潜伏しエピゾームとして存在する可能性があるが、*ICP34.5* を欠損しているため、潜伏感染能と再活性化の際の複製能は低減化されている（Peng et al., 1996）。

遺伝的安全性試験は、2001 年から 2011 年にわたって本遺伝子組換えウイルスゲノムの一部の塩基配列を繰り返し測定することにより行った。例えば、本遺伝子組換えウイルスゲノムの *hGM-CSF* 遺伝子は、開発期間中に 4 回実施した大規模なシークエンシング・プロジェクトで徹底的に調査されたが、100%の維持が確認されている（別紙 1 の 6 項）。

HSV-1 株のウイルスゲノム同士の遺伝子組換えは自然に生じる可能性がある。遺伝子組換えには、2 種類の異なるウイルス株が一つの（ヒト）細胞に同時感染することが必要である。実験室内では、非相同組換え（2 種の HSV-1 ゲノムの異なる領域間で生じる遺伝子組換え）は検出可能レベルでは発生しないことが確認されている（Smith et al., 2003）。細胞外でウイルス間の遺伝子組換えが起こることは考えられない。

本遺伝子組換えウイルスの遺伝子変異体が自然発生するためには、本遺伝子組換えウイルスと野生型 HSV-1 の間でまず相同組換えが生じることが必要である。内在性の HSV-1 としては、患者の粘膜組織又は神経節に潜伏することが考えられる。一方、本遺伝子組換えウイルスは腫瘍細胞に直接注入され、正常組織に効率よく伝搬しない。従って、野生型ウイルスが本遺伝子組換えウイルスと同一細胞に共感染する可能性は極めて低い。さらに、仮にそのような組換えが生じたとしても、*GM-CSF* 遺伝子発現カセットが野生型ウイルスに転移するような相同組換えが起これば、本遺伝子組換えウイルスのデザインから考えて、結果的に受容ウイルスから *ICP34.5* が付随的に削除されることになる。つまり、複製能力という点で新たに生じた遺伝子組換えウイルスは、野生型ウイルスよりも劣る。さらに、宿主域、抗ウイルス剤への感受性、物理的又は化学的不活化法への感受性に関しても、野生株と同等であると考えられる。つまり、遺伝子組換え事象によって理論上作り出される可能性のある新たな遺伝子組換え株はいずれも、環境リスクを増大させることはないと考えられる。

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

本遺伝子組換えウイルスの検出には、定量ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）法を用いる。qPCR 法では、検出された本遺伝子組換えウイルスが感染性かどうかを判定できないが、本遺伝子組換えウイルス DNA に特異的である。リアルタイム qPCR 法は血中、尿中及びスワブ検体中の本遺伝子組換えウイルスの増幅及び検出を目的として、十分に開発されバリデートされている。

ウイルス感染性を確認するために、Amgen により開発された 50%組織培養感染量（TCID50）をエンドポイントとするウイルス定量法を用いる。1TCID50 は約 5 copies に相当し、TCID50 アッセイ法の定量下限は、5940 TCID50/mL である。

HSV-1 感染病変から採取したヒトのスワブ検体からリアルタイム PCR によりウイルスが検出された場合、TCID50 に基づき本遺伝子組換えウイルスの感染能を定量的に評価する。

これらの検出方法の詳細は別紙 3 に示した。

6　宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本遺伝子組換えウイルスでは、*ICP34.5* 及び *ICP47* の欠失により、その複製は腫瘍細胞で選択的に起こるため、野生型と比較して弱毒化されている。それ以外の機能は保持されており、感染宿主域は変わらない。また、*hGM-CSF* の導入により、免疫賦活機能が賦与されている。

詳細は別紙 4 に示した。

III　遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1　使用等の内容

ヒトの治療を目的とした使用、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

保管

(1)　本遺伝子組換え生物等の保管は、遺伝子組換え生物等である旨を表示した容器の中でバイアルに密封された状態で、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において行う。

運搬

(2)　本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

投与液の調製

(3)　本遺伝子組換え生物等溶液の希釈は、治療施設内の安全キャビネット内で行う。

投与

(4)　本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設内で、固形がん患者の腫瘍内に直接注入することにより行う。

(5)　(4) の投与を受けた患者の注入部位は、注入後、消毒用アルコールで拭い、乾いた密閉ドレッシング材で覆う。

患者等の管理

(6) (5) の密閉ドレッシング材による被覆は、医師の判断により必要とされる期間継続する。

(7) 本遺伝子組換え生物等の使用等によるヘルペス感染症の発生が疑われた場合には、発生部位から検体採取を行い、遺伝子組換え生物等の有無の確認を行う。

(8) (4) の投与を受けた患者がその他の外部医療施設で治療を受ける際は、その他の外部医療施設に第一種使用等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であることが情報提供されるよう (4) の投与を受けた患者に適切な指導を行う。

患者検体の取扱い

(9) 治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）で、患者から採取した検体は、施設等の規定に従って取り扱う。検体（注入部位及び注入部位の腫瘍由来の検体を除く）の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合には、検体は検査機関の規定に従って取り扱う。

(10) 施設等から検査機関への検体（注入部位及び注入部位の腫瘍由来の検体を除く）の運搬は、本遺伝子組換え生物等が拡散しない構造の容器に入れ、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。

感染性廃棄物等の処理

(11) 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）に基づき施設等又は検査機関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。）に従って行う。

(12) 未使用の本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物の廃棄は、不活化処理した上で医療廃棄物管理規程に従って行う。

(13) 患者由来の検体の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。

(14) 患者が自宅で用いたドレッシング材及び洗浄に用いた器材等の廃棄は、不活化処理した上で行う。

(15) 治療施設外で保管された遺伝子組換え生物等を含有する未開封のバイアルの廃棄は、不活化処理した上で行う。

3 承認を取得し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

本遺伝子組換えウイルスの生体内分布、体外排出及び安全性に関する臨床データを病変内注射による複数の臨床試験から既に収集している（III -6 項参照）。生体内分布及び体外排出が日本人とこれまでに検討した被験者で異なる根拠はないが、安全性に関する新たな兆候がないこ

とを確認するため、日本での治験においても以下のモニタリングを行う。HSV-1 感染の兆候をモニターするため、治験実施計画書に従って検査を行い、被験者の臨床症状を観察する。被験者、被験者と密な接触のあった者、及び医療提供者でヘルペスウイルス感染症によると考えられる事象が報告された場合、本遺伝子組換えウイルスによる病変であるか否かを調べる PCR 検査を必要に応じて行う。

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

HSV はヒト病原体であり、ヒト以外の動物への影響は極めて低いと推定される。本遺伝子組換えウイルスは、HSV チミジンキナーゼ（*TK*）遺伝子をそのまま保持しているため、アシクロビル等の抗ウイルス剤に対する本遺伝子組換えウイルス感受性を有しており、ヒトでの感染は抗ウイルス薬投与によって制御できる。なお、プラークアッセイによる解析では、アシクロビルの親株 JS1 に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）は 0.22 μg/mL、本遺伝子組換えウイルスに対する IC_{50} は 0.39 μg/mL であり、治療標準用量から一般に推測されるアシクロビル血中濃度で、本遺伝子組換えウイルスの複製は阻害された。

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の安全性及び生体内分布を評価するため，包括的な非臨床安全性試験を実施した。これらの試験は、医薬品規制調和国際会議（ICH）の見解、米国食品医薬品局及び欧州医薬品庁のガイダンスに従って行われたものである。

<u>生体内分布及び体外排出</u>

- 5 x 10^5 PFU までの本遺伝子組換えウイルスを A20 腫瘍内に 3 回（1、4、及び 7 日目）注入した後、調べた検体の 95%でウイルス DNA は最終注入から 24 時間後に腫瘍内に検出され、20%の動物では最終投与から 84 日間にわたり検出された。ウイルス DNA は骨髄、眼、精巣、涙腺、鼻粘膜、または糞便中には検出されなかった（投与開始後 8 ~ 91 日目）。腫瘍以外の組織で、ウイルス DNA が高頻度で検出されたのは、血液、脾臓、リンパ節、肝臓、心臓、肺、腎臓等であった。ウイルス DNA は、投与開始 42 日後に採取した唾液腺 1 検体を除き、ウイルス排出組織（涙腺、鼻粘膜、唾液腺、または糞便中）には検出されなかった（別紙 5、115878 試験）。
- マウスの静脈内及び皮下投与し、尿中へのウイルス DNA の排出を検討した。静脈内投与及び皮下投与を行ったマウスで低レベル（60 ~ 170 copies/μg DNA）の排出が最終投与後 2 日までに検出された（別紙 5、4648-00027、4648-00028 及び 4648-00030 試験）。
- 最終投与後 84 日までのマウス脳の計 157 検体のうち、5 検体で定量可能なウイルス DNA が検出されている。脳の qPCR 検査でウイルス陽性となったすべての動物に、有害な臨床徴候は認められなかった。
- 胚－胎児発生試験の結果、胎盤通過は無視できる程度であった。
- 本遺伝子組換えウイルスの皮下注射または静脈内注入後、全てのマウスで抗 HSV-1 抗体の産生が認められた。腫瘍内注入の場合には、抗体価の測定は行われていない。

- 本遺伝子組換えウイルスの腫瘍内単回注入後、腫瘍内の GM-CSF 発現量は注入後 7 日まで、血清中の GM-CSF 発現量は注入後 24 時間まで、時間依存性の減少を示した。

非臨床毒性試験

- 本遺伝子組換えウイルスのマウスへの皮下、静脈内及び腫瘍内注入、ラットへの動脈内注入、並びにイヌへの前立腺内注入を含む複数の非臨床毒性試験が行われた。いずれの場合にも、忍容性は良好であった。
  - マウスの反復投与後の重要所見は、可逆性の注射部位の炎症、可逆性のリンパ球・好中球の増加、および一過性の脾臓胚中心の増大、及び脾臓や骨髄のリンパ組織過形成などであった。これらの影響は、ウイルス感染に対する液性及び細胞性免疫応答の結果と考えられる。
  - 最長 12 週間投与したマウスの無毒性量（NOAEL、10^7 PFU/マウス、試験した最高用量）を用いると、最大予定臨床用量の 60 倍の安全マージン（体重に基づく）が算出される。
  - 本遺伝子組換えウイルス投与（$4 \times 10^6 \sim 4 \times 10^8$ PFU/kg を週 1 回、12 週投与）を受けた正常動物において、いずれの組織にも顕性毒性は認められず、ウイルス関連の神経病原性／神経毒性も認められなかった。
  - 本遺伝子組換えウイルスを投与された SCID マウス（T および B 細胞欠損）や BALB/c ヌードマウス（T 細胞欠損）などの免疫不全マウスにおいて全身感染が確認された。これらのデータから、本遺伝子組換えウイルスに対する宿主防御において正常な獲得免疫が必要とされることが確認された。
- 神経毒性試験では、マウスへの OncoVEX$^{mGM\text{-}CSF}$ の脳内投与、及び本遺伝子組換えウイルスの鼻腔内投与を評価したが、野生型ウイルスに比べて、神経毒性の著明な低減が示されている（OncoVEX$^{mGM\text{-}CSF}$ の脳内投与後は 1/10,000、本遺伝子組換えウイルスの鼻腔内投与後は 1/100 以下に。［別紙 6、4648-00004 及び 4648-00014 試験］）。
- 胚－胎児発生毒性試験として、妊娠マウスに妊娠日数（GD）6、9、12、および 15 日で本遺伝子組換えウイルスを静脈内注入した結果、GD 18 で評価した胚－胎児の生存および発生に影響はなく、骨格の変異や異常も認められなかった。胚－胎児安全性について、体重に基づく約 60 倍のアロメトリーを用いた安全マージンが、発生に対する無影響量（NOEL、10^7 PFU/マウス［4×10^8 PFU/kg］、試験した最高用量）を用いて算出された（別紙 6、115689 試験）。

アシクロビル感受性

- HSV チミジンキナーゼ遺伝子は本遺伝子組換えウイルスに維持されている。チミジンキナーゼはチミジンをリン酸化してチミジン一リン酸とする酵素であり、多くの標準的抗ウイルス療法に用いられるプロドラッグ（アシクロビル等）をその活性型に転換するために必要とされる。抗ウイルス療法のモデルとして、本遺伝子組換えウイルスのアシクロビル感受性が確認されている。

潜伏期間と再活性化

- HSV-1 の潜伏感染の確立とその後の再活性化の能力に直接影響すると考えられる遺伝子の大部分は、本遺伝子組換えウイルスに残されている。しかし、*ICP34.5* の欠失は正常組織におけるウイルス複製能を著明に低下させ、神経毒性を低減することから、本遺伝子組換えウイルスが神経細胞内での潜伏を確立し、その後再活性化しても、臨床徴候や症状が発現する可能性はないと推察される。

腫瘍細胞選択性

- 本遺伝子組換えウイルスは ICP34.5 が欠失している。ICP34.5 欠失 HSV-1 は、正常細胞における PKR 依存性のタンパク質合成遮断等の先天的な抗ウイルス作用に対して拮抗できず、ウイルス複製に必要とされるタンパク質合成が低下する。そのため、ICP34.5 欠失ウイルスの正常細胞での増殖能は著しく減弱するとされている（Chou et al., 1990）。
- 本遺伝子組換えウイルスの腫瘍細胞殺傷能力を *in vitro* で評価した。その結果、様々な種類の固形癌、すなわちメラノーマ、乳腺癌、神経膠芽腫、星細胞種、前立腺癌、咽頭扁平上皮細胞癌、大腸癌、肺癌、膵癌などにおいて *in vitro* での腫瘍溶解効果が認められた。小児癌について評価した追加試験でも、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、および横紋筋肉腫様腫瘍に対する作用が認められた。しかし、白血病およびリンパ腫に対する本遺伝子組換えウイルスの活性は低かった。これらの結果より、本遺伝子組換えウイルスは、白血病やリンパ腫に対しては活性が低いあるいはないものの、固形癌に対しては幅広い活性を持つ可能性が示された。

6　国外における使用等により得られた情報

臨床試験で報告された有害事象

2015 年 6 月 30 日現在、1 名以上の被験者を組み入れた臨床試験は 15 試験あり、7 試験は臨床試験が完了、7 試験は進行中、1 試験は早期中止された。 加えて、臨床試験に参加し、本遺伝子組換えウイルスを過去に投与された患者の長期生存、及び安全性を確認する非介入試験が継続中である。これまでに 15 試験で 400 名以上の被験者が本遺伝子組換えウイルスの投与（10^4 ~ 10^8 PFU/mL）を受け、その安全性データが得られている。

全体として、本遺伝子組換えウイルスを投与された患者で最も頻回にみられた有害事象はインフルエンザ様疾患と injection site reaction であった。また、本遺伝子組換えウイルスを投与された患者で最も頻回に確認された死亡イベントは病勢進行によるものであった。いずれの臨床試験においても、本遺伝子組換えウイルス投与に関連する致死的な有害事象は報告されていない。

表 1　　本遺伝子組換えウイルスの臨床試験（完了または早期中止）

治験番号: 治験タイトル及び進行状況	状況	投与例数	汚染予防措置
001/01: 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子の導入遺伝子を含む腫瘍溶解性ヘルペスウイルス-1 ベクター（OncoVEX^{GM-CSF}）のヒトへの初めての投与：安全性、生体内分布及び生物活性の検討	完了	30	• 投与時、病院スタッフは保護衣、手袋及び保護メガネを着用 • 感染が発生した場合はアシクロビルを投与

002/03: ステージ III c 及び IV の悪性黒色腫患者を対象として OncoVEX$^{GM\text{-}CSF}$ の有効性、安全性及び免疫原性を検討する第 II 相試験	完了	50	• 投与時、病院スタッフは保護衣、手袋及び保護メガネを着用 • 感染が発生した場合はアシクロビルを投与
002/03-E: ステージ III c 及び IV の悪性黒色腫患者を対象として OncoVEX$^{GM\text{-}CSF}$ の有効性、安全性及び免疫原性を検討する第 II 相試験の継続試験	完了	3	• 投与時、病院スタッフは保護衣、手袋及び保護メガネを着用 • 感染が発生した場合はアシクロビルを投与
005/05: ステージ IIIb、IIIc、IV の切除不能な悪性黒色腫患者を対象として OncoVEX$^{GM\text{-}CSF}$ と GM-CSF 皮下投与の有効性及び安全性を比較するランダム化第 III 相試験	完了	292	• 投与時、病院スタッフは保護衣、手袋及び保護メガネを着用 • 感染が発生した場合はアシクロビルを投与
005/05-E: ステージ IIIb、IIIc、IV の切除不能な悪性黒色腫患者を対象として OncoVEX$^{GM\text{-}CSF}$ と GM-CSF 皮下投与の有効性及び安全性を比較するランダム化第 III 相試験の継続試験	完了	27	• 投与時、病院スタッフは保護衣、手袋及び保護メガネを着用 • 感染が発生した場合はアシクロビルを投与
005/04: 切除不能の膵癌患者を対象とした超音波内視鏡（EUS）ガイド下での微細針注射（FNI）による OncoVEX$^{GM\text{-}CSF}$ の腫瘍内注入： 安全性及び概念実証に関する国際パイロット試験	完了	17	• 投与時、病院スタッフは保護衣、手袋及び保護メガネを着用 • 感染が発生した場合はアシクロビルを投与
004/04: 局所進行性頭頸部扁平上皮癌の治療に放射線療法及びシスプラチンと併用した場合の OncoVEX$^{GM\text{-}CSF}$ の安全性及び生物活性の探索研究	完了	17	• 投与時、病院スタッフは保護衣、手袋及び保護メガネを着用 • 感染が発生した場合はアシクロビルを投与
006/09: 局所進行の頭頸部扁平上皮癌患者を対象として OncoVEX$^{GM\text{-}CSF}$ とシスプラチン、放射線併用療法の有効性及び安全性を検討するランダム化第 III 相試験	早期中止	2	• 投与時、病院スタッフは保護衣、手袋及び保護メガネを着用 • 感染が発生した場合はアシクロビルを投与

悪性黒色腫を対象とした第 III 相試験（005/05）のデータ（Andtbacka et al., 2015）によると、本遺伝子組換えウイルスを投与された被験者で最も一般的に報告された有害事象は疲労を含むインフルエンザ様症候群、悪寒、発熱、悪心、インフルエンザ様疾患及び注射部位疼痛であり、それぞれが 25%を超える被験者で発現した。発熱、悪寒及びインフルエンザ様疾患の発現率は、最初の 3 サイクルの治療中、及びベースライン HSV-1 血清反応陰性の被験者においてより高かった。2 つの投与群で報告された有害事象の大多数は重症度が軽度又は中等度であった。注射部位反応は両群で高頻度に報告され（本遺伝子組換えウイルス群 n=122 ［41.8%］、GM-CSF 群 n=64 ［50.4%］）、本遺伝子組換えウイルス群で最も一般的に報告された有害事象は注射部位疼痛であった。重篤な注射部位反応の報告はなかった。

本遺伝子組換えウイルス群で最も一般的に報告されたグレード 3 の有害事象は蜂巣炎であり、本遺伝子組換えウイルスを投与された被験者の 2.1%［n＝6］で報告された。グレード 4 及びグレード 5 の蜂巣炎は認められなかった。

致死的な有害事象は本遺伝子組換えウイルス群の 10 名（3.4%）及び GM-CSF 群の 2 名（1.6%）で報告された。事象発現までの時間を考慮すると、致死的な有害事象の経時的リスクは投与群間で類似していた（Cox モデルによる推定 HR=1.02、95%CI：0.21, 4.89）。本遺伝子組換えウイルス投与に関連すると治験医師もしくは治験依頼者に判断された致死的な有害事象は報告されていない。致死的な有害事象の多く（本遺伝子組換えウイルス群の 10 件のうち 8 件、GM-CSF

群の 2 件のうち 2 件）は黒色腫の進行と関連するものであった。本遺伝子組換えウイルス群で報告された 2 つの致死的な有害事象は、経尿道的前立腺切除後の心筋梗塞と、脳転移に対するコルチコステロイド投与後のサルモネラ敗血症であった。両治療群で最も高頻度に報告された重篤な有害事象は疾患の進行であった。

HSV 関連事象は本遺伝子組換えウイルス群の 5.5%（n=16）及び GM-CSF 群の 1.6%（n=2）の被験者で報告された。両治療群で最も高頻度に報告された有害事象は口唇ヘルペスであった（本遺伝子組換えウイルス群の 4.8%［n=14］、GM-CSF 群の 1.6%［n=4］）。野生型 HSV-1 によるヘルペス性角膜炎の既往歴のある本遺伝子組換えウイルスを投与された被験者 1 名で、ヘルペス性角膜炎が 1 件報告された。重篤なヘルペス性感染症の報告はなかった。ウイルス確認検査は実施しなかったため、報告された症例は治験責任（分担）医師の臨床観察に基づいている。ヘルペス脳炎または播種性のヘルペス感染症を発現した被験者はなかった。一般集団の血清陽性の人における発症率約 30 %で、そのうち 1 年以内に 1 回以上再発する人は 40%程度であることを踏まえると（Wald and Corey, 2007）、上記の両群での発生率は、欧米における一般集団の年間発生率を大きく上回るものではない。注入した腫瘍と直接関連しない部位に発現したヘルペス性病変が報告されているが、本臨床試験の中で本遺伝子組換えウイルスの存在を確認する検査を実施しておらず、本遺伝子組換えウイルス投与に伴って生じた可能性が完全に否定されていないため、今後もモニタリング等を継続したい。

本遺伝子組換えウイルスに対する免疫系を介する過剰な応答はリスクの一つとして挙げられるが、免疫介在性と考えられる有害事象は、本遺伝子組換えウイルス群の 5 名（1.7%）及び GM-CSF 群の 2 名（1.6%）で報告されたが、交絡因子があることから治療との因果関係は明らかではなかった。

<u>生体内分布及び体外排出</u>

病変内に投与後の本遺伝子組換えウイルスの生体内分布及び体外排出を様々なタイプの腫瘍の臨床試験で検討した。以下に試験ごとの詳細を示す。

001/01 試験

本遺伝子組換えウイルスの生体内分布及び体外排出を、進行性固形腫瘍（乳癌、悪性黒色腫、及び結腸・直腸癌）を対象にした第 I 相試験で評価した。3 段階の用量（10^6、10^7、10^8 PFU/mL）を腫瘍内に単回投与したところ、投与後 7 週間の検体採取期間中に 3%未満の被験者の血中及び尿中からウイルス DNA が検出された。本治験における反復投与においては、初回投与後 14 週間の検体採取期間中に血液検体内でのみウイルス DNA が検出された（尿検体では陽性なし）。反復投与試験では、高用量の本遺伝子組換えウイルスの投与後に DNA レベルの上昇がみられたが、次回投与時までには消失していた。本遺伝子組換えウイルス DNA が検出されたのは、主としてベースライン時の血清反応が陰性の被験者であった。両試験を併せると、被験者 10 名（33%）の血液検体ならびに被験者 2 名（7%）の尿検体中に低レベルのウイルス DNA が検出され、投与後 2 週間以内に本遺伝子組換えウイルス DNA の完全な消失が確認された。

単回投与試験の被験者 10 名のうち 3 名（30%）の注射部位スワブから投与後 7 週間の検体採取期間中に感染能のあるウイルスが検出され、反復投与試験の被験者 17 名のうち 1 名（6%）の注射部位スワブから初回投与後 14 週間の検体採取期間中に感染能のあるウイルスが検出さ

れた。単回投与試験では（hGM-CSF RNA レベルをモニターするために）注射から 48 時間後に注入腫瘍の細針生検を実施しており、この針生検の実施により注入腫瘍表面にウイルスが流出した為，単回投与試験においてウイルス陽性が多くみられた可能性がある。本治験中、注射部位を覆ったドレッシング材の外側からプラークアッセイ法による感染能のあるウイルスは検出されなかった。

004/04 試験

頭頸部扁平上皮癌に対して本遺伝子組換えウイルス、シスプラチン、放射線療法の併用治療を行った第 I/II 相試験においても、本遺伝子組換えウイルスの生体内分布を評価した。本試験の初回投与は転移性頸部リンパ節に行った。初回投与量は 10^6 PFU/mL 、続けて 10^6 PFU/mL、10^7 PFU/mL 又は 10^8 PFU/mL を 3 回、所属リンパ節に追加投与した。本治験では血液及び尿検体は採取しなかった。本遺伝子組換えウイルスの DNA 解析のため、頸部郭清術を実施する前に、注入を行った所属リンパ節及び行わなかった所属リンパ節から針生検サンプルを採取した結果、7 名（44%）で本遺伝子組換えウイルス DNA 陽性であった。被験者 5 名（31%）の本遺伝子組換えウイルス DNA レベルは注入量よりもさらに高く、腫瘍組織内でウイルス複製が生じていることを示唆していた。被験者の 18%では全ての時点で注射部位スワブから感染能のあるウイルスが検出されたが、ドレッシング材の外側のスワブから感染能のあるウイルスが検出された被験者はいなかった。

005/04 試験

膵癌に対する第 I 相試験でも本遺伝子組換えウイルスの生体内分布を評価した。本遺伝子組換えウイルスは、超音波エコーによるガイド下で消化管経由で内視鏡的に腫瘍に注入して投与した。10^4 PFU/mL、10^5 PFU/mL 又は 10^6 PFU/mL のいずれかを初回投与量とし、続けて用量 10^5 PFU/mL、10^6 PFU/mL 又は 10^7 PFU/mL を 2 回追加投与した。初回投与後 24 時間まで、3 週後の 2 回目投与後 2 時間まで、6 週後の 3 回目投与後 2 時間までに被験者 17 名から血液検体を採取した結果、5 名（29%）の血液検体で本遺伝子組換えウイルス DNA 陽性であった。尿検体は 16 名の被験者より採取され、7 名（44%）の尿検体で本遺伝子組換えウイルス DNA 陽性であった。本治験では、注入腫瘍へ到達できないため注射部位スワブは採取していない。

002/03 試験

ステージ III ~ IV の悪性黒色腫に対する第 II 相試験でも本遺伝子組換えウイルスの生体内分布を評価した。初回投与量は 10^6 PFU/mL、継続用量は 10^8 PFU/mL であった。血液及び尿検体は初回投与後 1、4、8、24、48 時間に採取した。qPCR の結果、本治験で血液検体を提供した被験者 46 名のうち 13 名（28%）で血中本遺伝子組換えウイルス DNA 陽性、尿検体を提供した 49 名のうち 39 名（80%）で尿中本遺伝子組換えウイルス DNA 陽性であった。ほとんどは尿検体のウイルス量は qPCR 法の定量限界（51.2 copies/reaction）以下であった。本試験では血液検体、尿検体に対しウイルスの感染能を確認する試験は行わなかった。最初の被験者 28 名から初回投与後 24 時間、48 時間に注射部位スワブを採取しプラークアッセイ法による感染能のあるウイルスの検出を行ったところ、1 名のみ注射部位スワブからウイルスが検出された。初回

投与後 24 時間、48 時間に採取したドレッシング材の外側のスワブから感染能のあるウイルスが検出された被験者はいなかった。

ここまでをまとめると、生体内分布試験で調査した血液及び尿検体中に検出された本遺伝子組換えウイルスの DNA は、一過性かつ低レベルであった。注入部位スワブから感染能を有するウイルスが検出された例は稀であり、密閉ドレッシング材の外側からは一度も検出されなかった。これらの治験で採取した注入部位スワブから感染能を有するウイルスが検出された最長期間は、最終の投与後 14 日であった（治験 001/01）。

20120324 試験

これまでに黒色腫患者で得られた本遺伝子組換えウイルスの生体内分布及び体外排出に関するデータを補足する臨床試験 20120324 が進行中である。本試験は切除不能のステージ IIIb ~ IV M1c 黒色腫患者を対象とする単一群第 II 相試験である。血液および尿検体を採取し、qPCR 分析により生体内分布を評価した。密閉ドレッシング材外側、注射部位、口腔粘膜、生殖器粘膜及びヘルペス性が疑われる自然発生した病変からスワブを採取し、体外排出（緊密な物理的接触のあったものへの伝播の可能性）を評価した。検体は qPCR で分析し、PCR 陽性サンプルはさらに検出されたウイルスが感染性であるか否かを TCID50 アッセイにより評価した。密接な接触者や医療従事者でのヘルペス性病変の報告を収集し、被疑病変で本遺伝子組換えウイルスが検出されるかどうかを調査する qPCR 検査を行った。投与した患者からもデータを収集し、投与終了時に本遺伝子組換えウイルスの無症候性体外排出を調査した。

進行中の本試験で本遺伝子組換えウイルスを少なくとも 1 回以上投与された 60 例の患者から得られたデータを解析対象とした。血液中から本遺伝子組換えウイルス DNA が検出されたのは 60 例中 59 例（98.3%）、尿中からは 60 例中 19 例（31.7%）であった。注射部位のスワブ検体から本遺伝子組換えウイルス DNA が検出されたのは 60 例中 60 例（100.0%）であった。TCID50 アッセイによる注射部位スワブのウイルス感染性検査では、7 例が陽性であった（6 例はサイクル 1、1 例はサイクル 2 で陽性）。密閉ドレッシング材の外側からウイルス DNA が検出されたのは 60 例中 48 例（80.0%）であったが、感染性ウイルスは検出されなかった。口腔粘膜のスワブ検体から本遺伝子組換えウイルスが検出されたのは 60 例中 7 例（11.7%）であったが、感染性ウイルスは検出されなかった。

詳細な本遺伝子組換えウイルスの生体内分布及び体外排出に関するデータについては別紙 5 の 2 項に記載した。

第三者への伝播のリスク

Amgen 社は、各種再発固形がんを有する被験者 30 名（Hu et al., 2006）、ステージ III ~ IV の悪性黒色腫を有する被験者 50 名（Senzer et al., 2009）、SCCHN を有する被験者 17 名（Harrington et al., 2010）、ステージ IIIB ~ IV の悪性黒色腫を有する被験者 439 名（Andtbacka et al., 2015）に関する臨床データを発表している。本遺伝子組換えウイルスを用いて実施されたこれまでの臨床試験では、ごく少数の医療従事者で本遺伝子組換えウイルスへの予期しない曝露が報告された。そのうちの 1 名は医師が針刺し事故を起こしたもので、局所症候性ヘルペス性感染症（ヘ

ルペス性ひょう疱様病変）であったがアシクロビル経口剤による治療により消失した。本遺伝子組換えウイルス治療を受けた被験者が家庭内で触れたものに二次伝播したことが確認された事例はこれまでに報告されていない。

本遺伝子組換えウイルスが、被験者が触れたもの、病院職員、又は他の従事者へ伝搬されるという報告はない。Virus Surveillance Program は第三者に本遺伝子組換えウイルスが伝播するリスクの定量化を目的としており，005/05 試験において癌患者に本遺伝子組換えウイルスを投与後に実施された。2013 年 4 月 30 日にデータカットオフを行い、177 名の被験者から 1217 の家族及び医療従事者による調査質問票の回答が得られた。全体として、回収、審査した質問票及び追跡情報から、被験者への本遺伝子組換えウイルス投与後に第三者に本遺伝子組換えウイルスが伝播することを示唆する結果は得られなかった。

20120324 試験の結果に基づき、本遺伝子組換えウイルスを投与された被験者の血液及び尿検体を媒介して第三者への伝播するリスクを評価した。TCID50 アッセイはウイルスによって引き起こされる細胞変性を指標として、Vero 細胞が 50%感染する濃度を評価する手法であるが、血液及び尿検体中には、細胞変性を引き起こす他の成分の影響を排除することが難しかったため、それらの TCID50 アッセイは行われていない。そこで、qPCR で検出された DNA がすべて完全な talimogene laherparepvec DNA であり、血液または尿中で感染力を保持した本遺伝子組換えウイルスに由来したものであるとする非常に保守的な仮定を置き、ワーストケースのウイルス感染性を評価した（別紙 5 の 2 項）。その結果、保守的な仮定を置いた場合においても、血液及び尿検体中の本遺伝子組換えウイルスは TCID50 アッセイの検出限界値未満であった。さらに、I の３の（７）及び４に述べた本遺伝子組換えウイルスの外界での生存性を考慮すると、第三者への伝播のリスクは極めて限定的であると考えられた。

医療従事者及び第三者への伝播は、本遺伝子組換えウイルスの投与における潜在的なリスクと考えられる、従って、現在進行中及び今後の臨床試験、並びに市販後においても慎重なモニタリングを実施する予定である（III の３を参照）。

IV　生物多様性影響評価

1　他の微生物を減少させる性質

（１）影響を受ける可能性のある微生物の特定

本遺伝子組換えウイルスの感染宿主域は HSV-1 の同一と考えられ、他の微生物に感染するとの報告はなく、有害物質の産生を通じて、他の微生物へ影響を与える可能性も極めて低い。従って、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

影響を受ける可能性のある微生物は特定されず、微生物に関して生物多様性に関する影響が生ずるおそれはないと判断される。

２　病原性

（１）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換えウイルスの感染宿主域は、野生型 HSV-1 と同等と考えられる。影響を受ける可能性のある動植物等としては、ヒト及び非ヒト霊長類等の一部の動物が考えられる。

（２）影響の具体的内容の評価

ICP34.5 を欠失した数種の HSV-1 株は数種の公表されているヒト臨床試験においてこれまで問題なく広く利用されている。

これらの臨床試験中に HSV 脳炎を発現した被験者はいなかった。*ICP34.5* のみを欠失したウイルスを使用した治験では、悪性神経膠腫を伴う被験者 21 名（Papanastassiou et al., 2002; Rampling et al., 2000）や転移性黒色腫を伴う被験者 5 名（MacKie et al., 2001）に最大 10^5 PFU までのウイルスを i.t.投与した後に毒性は確認されていない。上記治験において、ウイルス投与に関連すると考えられた有害症状を発現した被験者はいなかった。後に、同ウイルスが神経膠腫の外科的治療を受けた被験者 12 名の切除部辺縁（Harrow et al., 2004）又は口腔扁平上皮癌を伴う被験者 20 名の腫瘍内（Mace et al., 2008）に注入されたが、ウイルス投与に関連すると考えられた毒性反応はいずれの被験者にも認められなかった。

さらに、類似の *ICP34.5* 欠失 HSV ウイルスに関する数種の臨床試験が存在する。それらのひとつである G207 は、リボヌクレオチド還元酵素をコードする遺伝子も削除されており、*ICP34.5* 欠失ウイルスとは結果を直接比較することはできないが、悪性神経膠腫患者 27 名を対象にした治験で G207 最大 10^9 PFU まで安全性が確認されている（Markert et al., 2009; Markert et al., 2000）。

本遺伝子組換えウイルスは、*ICP34.5* の機能的削除に加えて *ICP47* を削除し、*ICP34.5* に代えて *hGM-CSF* 表現カセットを挿入している。*hGM−CSF* 表現カセットは免疫賦活作用を有するが、ウイルスの毒性及び病原性には影響を与えず、さらなるウイルスの不活化を生じさせることはない。*ICP47* の欠失は、腫瘍細胞内におけるウイルス複製能に間接的に影響するものの弱毒性は保っている。この特徴は *ICP47* 欠失が感染細胞での抗原提示を可能にすることに加え、隣接遺伝子 *US11* を速やかに発現させることによりもたらされる。通常、*US11* は後期発現遺伝子として調節されているが、*ICP47* 欠失により *ICP47* 調節配列の制御下となり前初期遺伝子として発現するようになる（Mohr & Gluzman, 1996）。*US11* のアップレギュレーションにより本遺伝子組換えウイルスが腫瘍細胞内でより効率的に複製できるようになることから、この作用は本遺伝子組換えウイルスの作用機序の重要な一面を担っている。さらに、*ICP34.5* 欠失ウイルスにおける *US11* アップレギュレーションは、非腫瘍細胞内での毒性に影響を与えないことが示

されている。免疫能を有するマウス又は免疫不全マウスにおいて、*US11* をアップレギュレートした *ICP34.5* 欠失ウイルスは、*ICP34.5* 欠失のみのウイルスと同等に弱毒化されていた。ある試験において、野生型 HSV-1 ウイルスを 10^6 PFU 投与された免疫不全マウスは、腹膜内投与から 8 日目までに 100%死亡したのに対し、*US11* をアップレギュレートした *ICP34.5* 欠失ウイルス又は *ICP34.5* 欠失ウイルスを 10^6 PFU 投与されたマウスは、いずれも投与後最低 21 日間は 100%生存していた（Mohr et al., 2001）。

Amgen 社は、各種再発固形がんを有する被験者 30 名（Hu et al., 2006）、転移性黒色腫を伴う被験者 50 名（Senzer et al., 2009）、及び SCCHN を伴う被験者 17 名（Harrington et al., 2010）に関する臨床データを発表している。これまでに本剤の投与に関連する致死的な有害事象の報告はなく、本遺伝子組換えウイルス治療を受けた被験者と家庭で接触した者への二次感染例も確認されていない。

日本人患者において腫瘍溶解性 HSV-1 が過去に使用されているが、脳炎は認められていない。例えば、グリア芽腫の患者を対象とする複製可能な遺伝子組換え単純ヘルペス 1 型ウイルス（G47Δ）の臨床試験が 2009 年に実施されている（UMIN000002661）。2013 年には同ウイルスが進行性嗅神経芽腫の患者に使用された（UMIN000011636）。両試験とも治験依頼者は東京大学医科学研究所附属病院/東京大学である。G47Δ は、*ICP34.5* 及び *ICP47* 遺伝子領域が欠失し、UL39 に不活性化 LacZ を挿入した第 3 世代の複製可能な腫瘍溶解性 HSV ベクターである。

（３）影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換えウイルスは、ヒト正常細胞内のウイルス複製が抑制するように遺伝子改変されているが、マウス以外の動物種における感染性及び神経病原性の減弱に関しては検討されていない。免疫能を有するマウスにおいて、*ICP34.5* の欠損は、本遺伝子組換えウイルスの親株の直接的な脳内注射後又は鼻腔内投与後の神経病原性を顕著に減弱させ、最大予定臨床用量の 60 倍までの用量で反復投与後の毒性は認められなかった（III の 5 項参照）。これらのデータから、本遺伝子組換えウイルスは他の動物種における全身病原性及び神経病原性のリスクを低減させることが示唆される。

本遺伝子組換えウイルスは、切除不能又は転移性病変を伴う黒色腫患者の治療目的で厳重に管理された医療施設において使用される。投与患者からの体外排泄による本遺伝子組換えウイルスの放出は最小限かつ一過性である（III の 6 項参照）。さらに、注入部位を密閉ドレッシング材で覆い本遺伝子組換えウイルスが第三者に伝搬するリスクを軽減する。また、血液及び尿検体中の本遺伝子組換えウイルスは TCID50 アッセイの検出限界値未満であった（III の 6 及び別紙 5 の 2 項参照）ことに加え、本遺伝子組換えウイルスの外界での生存性も考慮すると（I の３の（７）及び４項参照）、本遺伝子組換えウイルスによる治療を受けた患者の血液又は尿への偶発的曝露による感染リスクは限定的であるため、血液及び尿検体を外部の受託検査機関で測定することによる第三者への伝搬リスクも極めて低いと考える。植物種や（治療対象外の）動物種への曝露は最小限であり、万が一曝露が発生したとしてもリスクはないと考える。

本遺伝子組換えウイルスの *ICP34.5* 欠失は、本遺伝子組換えウイルスが正常細胞内では不活化されることを意味する。つまり、患者以外が本遺伝子組換えウイルスと偶然的に接触しても、有害事象を生じさせる可能性は低いと予想される。さらに、野生型 HSV-1 はヒトの集団の至る所に広く流布しているものの重度の障害をほとんど惹起しないウイルスである。

以上より、本遺伝子組換えウイルスにおける *ICP34.5* 欠失は、非腫瘍組織でのウイルスの複製能低下を意味することから、正常な免疫能を有する人では本遺伝子組換えウイルスの投与により重篤な有害事象が発現する可能性は低いと考えられる。また、自然界において、動物に感染し複製する可能性も低いと考えられる。

（４）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程に記載された方法に従う場合にあっては、本遺伝子組換えウイルスの病原性に基づいて、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物種等の特定

本遺伝子組換えウイルスによるウイルスタンパクの産生能は、欠失遺伝子を除いて、野生型 HSV-1 と同様であると考えられ、これらのウイルスタンパクの形質発現は野生型 HSV-1 を超える追加リスクを引き起こさない。本遺伝子組換えウイルスに挿入した外来遺伝子は *hGM-CSF* であり、影響を受ける可能性のある動植物等としては、ヒト及び非ヒト霊長類等の一部の動物が考えられる。

（２）影響の具体的内容の評価

hGM-CSF は､マクロファージと樹状細胞の生成と分化を誘導するという明確な特性を有した天然の内因性タンパクである。本遺伝子組換えウイルスによる hGM-CSF の形質発現は、腫瘍細胞を攻撃し腫瘍抗原を提示するよう免疫細胞を刺激することを意図しており、その結果、免疫システムを惹起して腫瘍特異的な免疫応答を促進させる（Liu et al., 2003a）。本遺伝子組換えウイルスが感染した動物において､hGM-CSF が放出される可能性があるが､その生理作用はヒトにおけるものと同等又はそれ以下と考えられる。

hGM-CSF の投与は広く検討され､多様な種における安全性が確認されている（Baiocchi et al., 2001; Davis et al., 1990; Liu et al., 2003a; Liu et al., 2003b; Nemunaitis et al., 1991; Rowe et al., 1995; Soiffer et al., 1998; Wang et al., 2002）。また、hGM-CSF は数種の臨床試験に広く使用され、各種悪性腫瘍に対して安全性及び有効性が確認されている（Bendandi et al., 1999; Daud et al., 2008; Jager et al., 1996; Sato et al., 2008; Schmittel et al., 1999; Spitler et al., 2009）。最近では、術後のハイリスク黒色腫を伴う 800 名を超える被験者の無病生存率を調査した臨床治験において、hGM-CSF の安全性及び有効性が確認されている（Lawson DH, 2010）。

遺伝子組換え hGM-CSF（米国での商標名：Leukine®、一般名：sargramostim）が 1991 年に、また異なる剤型が 1996 年に、化学療法又は骨髄移植後の白血球細胞の回復を刺激する目的で FDA により承認された。hGM-CSF の治療用量は本遺伝子組換えウイルス投与後に推定される産生量と比べ概して高量である。ヒトへの hGM-CSF 静脈内（i.v.）点滴又は皮下注射における有害事象は、一般に軽度で、主として発熱、筋肉痛及び注射部位反応である。

（３）影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換えウイルスが感染したヒトの細胞から放出される hGM-CSF の量は、医薬品として投与される量に比べて低く、毒性を示す可能性は低いと考えられる。また、動物に本遺伝子組換えウイルスが感染する可能性は低く、hGM-CSF により野生毒物で有害事象が生ずる可能性は低い。本遺伝子組換えウイルスの使用は医療施設やがん専門クリニックに限られ、これらの施設では、治療レジメンを越えた使用や環境への曝露を限定する努力が適切に施されている。

（４）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、新たな有害物質の産生により、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

4　核酸を水平伝達する性質

（１）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換えウイルス及びその変異ウイルスの水平感染により影響を受ける可能性のある動物種は主としてヒトである。他の動植物等への影響は考えにくい。

（２）影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換えウイルスが第三者又は哺乳動物等に水平感染した場合には、腫瘍細胞でのみ複製が起きると予想されるが、水平感染が起きる可能性は極めて低いと考えられる。また、本遺伝子組換えウイルスの核酸が感染宿主の細胞のゲノムに組み込まれる可能性も低い。核酸の水平伝達としては、本遺伝子組換えウイルスと類縁ウイルスの間の核酸交換の可能性は完全には否定できないが次項で述べるように、可能性は低いと考えられる。

（３）影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換えウイルスの生体内分布及び体外排泄に関するデータは III-6 項に示した。開発期間中、本遺伝子組換えウイルスの被験者から意図しない他者へのヒト伝搬症例は観察されていない。さらに、治験薬投与を受けた被験者が一般集団における HSV-1 性疾患の発現率を上昇させたという根拠もみられず、ウイルス伝搬が健康なヒトに疾病を発症させる可能性はないと考える。

万が一、意図しない健康な他者へウイルスが伝搬し本遺伝子組換えウイルスに起因するとみられる活動性（active）感染症が発生するという不測の事態が起こったとしても、健康人における安全性プロファイルは最悪でも野生型HSV-1感染症で観察されるものと同様であると考える。適宜、承認済み抗ウイルス薬（例、アシクロビル）によって治療することができる。

意図しない特性を有した新たな遺伝子組換えウイルスが発生する可能性はほとんどないと考える。本遺伝子組換えウイルスの新規遺伝子変異株の産生には、本遺伝子組換えウイルスと野生型HSV-1との間に遺伝子変異株を作り出すような遺伝子組換え事象がまず発生する必要がある。しかし、内在性 HSV-1 が患者の粘膜組織又は神経節に潜伏する一方で、本遺伝子組換えウ

イルスは腫瘍細胞内に直接注入される上に正常組織に効率的に拡散することができない。また HSV-1 に由来する遺伝子組換えウイルスの供与核酸が他の動植物等のゲノムに組み込まれることはないので、*hGM-CSF* 領域が他の動植物等に水平伝達されることはない。

意図しない特性を有した遺伝子の安定変異株が発生する可能性は、本遺伝子組換えウイルスの遺伝子構成デザインからも最小限に抑えられる。仮に、野生型 HSV-1 と本遺伝子組換えウイルスの間で相同組換えが発生し、hGM-CSF 領域が野生型 ICP34.5 に復帰したとしても、新たに生じる遺伝子組換えウイルスの増殖能及び病原性は、野生型と同等又はそれ以下である。

野生型 HSV-1 と本遺伝子組換えウイルスの間で、欠失型 *ICP47* を野生型 *ICP47* へ復帰させる相同組換えが生じたとしても、新たに生じる遺伝子組換えウイルスの増殖能及び病原性は、野生型と同等又はそれ以下である。

ICP34.5 と *ICP47* 領域の双方で相同組換えが発生した場合の結果は、野生型 HSV-1 又は本遺伝子組換えウイルスが生じる。

実験室内では、非相同組換え（2 種のウイルスゲノムの異なる領域間で生じる遺伝子組換え）は検出レベルでは発生しないことが確認されている（Smith et al., 2003）。

（４）生物多様性に対する影響が生ずるおそれの有無等の判断

本遺伝子組換えウイルスは悪性腫瘍患者にのみ投与され、投与患者の正常細胞、又は投与患者に接触した健常人の正常細胞では複製しないように設計されている。HSV-1 の複製が生じる際は症候性であるため、衛生学的な対処により、第三者及びその他の動植物等への水平感染は防止される。また、野生型ウイルスとの間で相同組換えが生じ、新たな遺伝子組換えウイルスが生じたとしても、それを介して供与核酸が水平伝達されることはない。以上より、核酸の水平伝達により生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

5　その他の性質

特になし。

Ⅴ　総合的評価

本遺伝子組換えウイルスは人畜共通感染性が低く、自然宿主となる生物はヒトに限られる。健常人において、HSV-1、特に *ICP34.5* が欠損しているものは、免疫系により容易に排除される。また、HSV-1 ゲノムの核酸は、感染細胞のゲノムに組み込まれることはない。本遺伝子組換えウイルスは、腫瘍細胞内でのみ選択的に複製するように改変されている。従って、正常細胞では増殖せず、意図しない第三者又は哺乳動物に感染し、その体内で複製する可能性は極めて低い。本遺伝子組換えウイルスは *hGM-CSF* をコードしているが、本遺伝子組換えウイルスが感染した腫瘍細胞から一過性に放出された場合の有害性は低いと考えられる。

以上より、本遺伝子組換えウイルスが、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、第一種使用規程に記載された使用等の方法に従えば、本遺伝子組換えウイルス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。

参考文献

Allison N, Chang T C, Steele K E, Hilliard J K. Fatal herpes simplex infection in a pygmy African hedgehog (Atelerix albiventris). J Comp Pathol. 2002;126(1): 76-8.

Andtbacka R H I, Kaufman H L, Collichio F, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. J Clin Oncol. 2015:33.

Baiocchi RA, Ward JS, Carrodeguas L, et al. GM-CSF and IL-2 induce specific cellular immunity and provide protection against Epstein-Barr virus lymphoproliferative disorder. J Clin Invest. 2001;108:887-94.

Barahona H, Melendez LV, Hunt RD, Daniel MD. The owl monkey (Aotus trivirgatus) as an animal model for viral diseases and oncologic studies. Lab Anim Sci. 1976Dec;26(6 Pt 2):1104-12.

Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, et al. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. Nat Med. 1999;5:1171-77.

Bolovan CA, Sawtell NM, Thompson RL. *ICP34.5* mutants of herpes simplex virus type 1 strain 17syn+ are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. J Virol. 1994;68:48-55.

Brady RC, Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. Antiviral Res. 2004;61:73-81.

Brown SM, Harland J, MacLean AR, Podlech J, Clements JB. Cell type and cell state determine differential in vitro growth of non-neurovirulent *ICP34.5*-negative herpes simplex virus types 1 and 2. J Gen Virol. 1994;75(Pt 9):2367-77.

Cassady KA, Gross M, Roizman B. The herpes simplex virus US11 protein effectively compensates for the gamma1(34.5) gene if present before activation of protein kinase R by precluding its phosphorylation and that of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. J Virol. 1998a;72:8620-26.

Cassady KA, Gross M, Roizman B. The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the gamma134.5 genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2alpha. J Virol. 1998b;72:7005-11.

Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. Science. 1990;250:1262-66.

Croughan WS, Behbehani AM. Comparative study of inactivation of herpes simplex virus types 1 and 2 by commonly used antiseptic agents. J Clin Microbiol.1988;26:213-5.

Davis TA, Monroy RL, Skelly RR, Donahue RE, MacVittie TJ. Differential augmentation of in vivo natural killer cytotoxicity in normal primates with recombinant human interleukin-1 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Clin Exp Immunol. 1990;79:436-42.

Deisboeck TS, Wakimoto H, Nestler U, 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. 2003Aug;10(15):1225-33.

Doi Y, Ninomiya T, Hata J, et al. Seroprevalence of herpes simplex virus 1 and 2 in a population-based cohort in Japan. J Epidemiol. 2009;19:56-62.

Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:3539-43.

Drew WL. Herpesviruses. In: Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases, 4th ed. Toronto(ON): McGraw Hill Medical; 2004. p.555-576.

Epstein JH, Price JT, The significant but understudied impact of pathogen transmission from humans to animals. Mt Sinai J Med. 2004;76**:**448-55.

Farooq AV, Shukla D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. Surv Ophthalmol. 2012;57**:**448-62.

Goldsmith K, Chen W, Johnson DC, Hendricks RL. Infected cell protein (ICP) 47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. J Exp Med. 1998;187:341-8.

Grest P, Albicker P, Hoelzle L, Wild P, Pospischil A. Herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (Oryctolagus cuniculus). J Comp Pathol. 2002;126**:**308-11.

Grunewald K, Desai P, Winkler DC, et al. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. Science. 2003;302:1396-8.

Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. Lancet. 2007;370**:**2127-37.

Harrington KJ, Hingorani M, Tanay MA, et al. Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. Clin Cancer Res. 2010;16**:**4005-15.

Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, 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. 2004;11**:**1648-58.

Hashido M, Kawana T, Matsunaga Y, Inouye S. Changes in prevalence of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies from 1973 to 1993 in the rural districts of Japan. Microbiol Immunol. 1990;43:177-80.

Hashido M, Lee FK, Nahmias AJ, et al. An epidemiologic study of herpes simplex virus type 1 and 2 infection in Japan based on type-specific serological assays. Epidemiol Infect. 1998;120:179-86.

He B, Chou J, Brandimarti R, Mohr I, Gluzman Y, Roizman B. Suppression of the phenotype of gamma(1)34.5- herpes simplex virus 1: failure of activated RNA-dependent protein kinase to shut off protein synthesis is associated with a deletion in the domain of the alpha47 gene. J Virol. 1997;71:6049-54.

Hill A, Jugovic P, York I, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. Nature. 1995;375**:**411-5.

Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, et al. A phase I study of OncoVEX^{GM-CSF}, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. Clin Cancer Res. 2006;12:6737-47.

Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. Science. 1994;264:961-5.

Huemer HP, Larcher C, Czedik-Eysenberg T, Nowotny N, Reifinger M. Fatal infection of a pet monkey with Human herpesvirus. Emerg Infect Dis. 2002;8:639-42.

Jacobs A, Breakefield XO, Fraefel C. HSV-1-based vectors for gene therapy of neurological diseases and brain tumors: part I. HSV-1 structure, replication and pathogenesis. Neoplasia. 1999;1:387-401.

Jager E, Ringhoffer M, Dienes HP, et al. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. Int J Cancer. 1996;67:54-62.

Jerome KR and Morrow RA . Herpes simplex viruses and Herpes B virus. In: Murray P (ed). Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington (DC): ASM Press; 2009. p1523-1536.

Kamei S, Takasu T. Nationwide survey of the annual prevalence of viral and other neurological infections in Japanese inpatients. Int Med. 2000;39:894-900.

Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex infection. Clin Microbiol Rev. 2004;17**:**1-13.

Kumel G, Schroder CH, Kaerner HC. Neurovirulence and latency in inbred mice of two HSV-1 intrastrain variants of divergent pathogenicity. Med Microbiol Immunol. 1986;174(6):313-324.

Lawson DH LS, Tarhini AA, Margolin KA, Ernstoff MS, Kirkwood JM. E4697: Phase III cooperative group study of yeast-derived granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) versus placebo as adjuvant treatment of patients with completely resected stage III-IV melanoma. J Clin Oncol. 2010*;*28:8504.

Lefaux B, Duprez R, Tanguy M, Longeart L, Gessain A, Boulanger E. Nonhuman primates might be highly susceptible to cross-species infectivity by human alpha-herpesviruses. Vet Pathol. 2004;41:302-4.

Leib DA, Alexander DE, Cox D, Yin J, Ferguson TA. Interaction of ICP34.5 with Beclin 1 modulates herpes simplex virus type 1 pathogenesis through control of CD4+ T-cell responses. J Virol. 2009;83(23):12164-71.

Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P. *ICP34.5* deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. Gene Ther. 2003a;10:292-303.

Liu X, Tian PK, Ju DW, Zhang MH, Yao M, Cao XT. Systemic genetic transfer of p21WAF-1 and GM-CSF utilizing of a novel oligopeptide-based EGF receptor targeting polyplex. Cancer Gene Ther. 2003b;10:529-39.

Longa CS, Bruno SF, Pires AR, Romijn PC, Kimura LS, Costa CH. Human herpesvirus 1 in wild marmosets, Brazil, 2008. Emerg infect Dis. 2011;17:1308-10.

Lopez, C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. Nature. 1975;258:152-3.

Mace AT, Ganly I, Soutar DS, Brown SM. Potential for efficacy of the oncolytic Herpes simplex virus 1716 in patients with oral squamous cell carcinoma. Head Neck. 2008*;*30:1045-51.

MacKie RM, Stewart B, Brown SM. Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma. Lancet. 2001;357:525-26.

MacLean AR, ul-Fareed M, Robertson L, Harland J, Brown SM. Herpes simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene 1 and the 'a' sequence. J Gen Virol. 1991;72(Pt 3):631-9.

Markert JM, Liechty PG, Wang W, et al.Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre-and post-tumor resection for recurrent GBM. Mol Ther. 2009;17:199-207.

Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. Gene Ther. 2000;7:867-74.

McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. Virus Res. 2006;117**:**90-104

Mohr I, Gluzman Y. A herpesvirus genetic element which affects translation in the absence of the viral GADD34 function. EMBO J. 1996;15:4759-66.

Mohr I, Sternberg D, Ward S, Leib D, Mulvey M, Gluzman Y. A herpes simplex virus type 1 gamma34.5 second-site suppressor mutant that exhibits enhanced growth in cultured glioblastoma cells is severely attenuated in animals. J Virol. 2001;75:5189-96.

Muller K, Fuchs W, Heblinski N, et al. Encephalitis in a rabbit caused by human herpesvirus-1. J Am Vet Med Assoc. 2009;235:66-9.

Nahmias AJ, Lee FK, Beckman-Nahmias S. Sero-epidemiological and -sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. Scand J Infect Dis Suppl. 1990;69:19-36.

Nemunaitis J, Singer JW, Buckner CD, et al. Long-term follow-up of patients who received recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor after autologous bone marrow transplantation for lymphoid malignancy. Bone Marrow Transpl. 1991;7:49-52.

Orvedahl A, Alexander D, Talloczy Z, et al. HSV-1 *ICP34.5* confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. Cell Host Microbe. 2007;1:23-35.

Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, 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. 2002;9:398-406.

Prince HNaP DL. Principles of viral control and transmission. In: Block S (ed). Disinfection, Sterilization and Preservation. 5th edn. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp543-571.

Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, et al. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. Gene Ther. 2000;7:859-66.

Rasko JEJ, Gough NM. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor. In: Thompson AW (ed). The Cytokine Handbook. 2nd edn. London: Academic Press; 1994. pp343-369.

Roizman B, Jenkins FJ. Genetic engineering of novel genomes of large DNA viruses. Science. 1985;229:1208-14.

Rowe JM, Andersen JW, Mazza JJ, et al. A randomized placebo-controlled phase III study of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adult patients (> 55 to 70 years of age) with acute myelogenous leukemia: a study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E1490). Blood. 1995;86:457-62.

Rozenberg F, Deback C, Agut H. Herpes simplex encephalitis : from virus to therapy. Infect Disord Drug Targets. 2011;11:235-50.

Rudnick CM, Hoekzema GS. Neonatal herpes simplex virus infections. Am Fam Physician. 2002;65:1138-42.

Sato T, Eschelman DJ, Gonsalves CF, Terai M, Chervoneva I, McCue PA. Immunoembolization of malignant liver tumors, including uveal melanoma, using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J Clin Oncol. 2008;26:5436-42.

Schmittel A, Keilholz U, Max R, Thiel E, Scheibenbogen C. Induction of tyrosinase-reactive T cells by treatment with dacarbazine, cisplatin, interferon-alpha +/- interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. Int J Cancer. 1999;80:39-43.

Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2009;27:5763-71.

Slade JS, Pike EB, Eglin RP, et al. The survival of human immunodeficiency virus in water, sewage, and sea water. Water Sci Technol. 1989;21:55-9.

Smith J, Thomas SK, Coffin RS, Latchman DS. Examination of the potential interactions between herpes simplex virus vectors and replication-competent virus in vitro and in vivo. Gene Ther Reg. 2003;2:29-47.

Smith JS, Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. J Infect Dis. 2002;186 Suppl 1:S3-28.

Soiffer R, Lynch T, Mihm M, et al. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:13141-6.

Spitler LE, Weber RW, Allen RE, et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, sargramostim) administered for 3 years as adjuvant therapy of stages II(T4), III, and IV melanoma. J Immunother. 2009;32:632-7.

Stewart JA, Reef SE, Pellett PE, Corey L, Whitley RJ. Herpesvirus infections in persons infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 1995;21 Suppl 1:S114-20.

Thompson C, Whitley R. Neonatal herpes simplex virus infections: where are we now? Ad in Exp Med Biol. 2011;697:221-30.

Uchio E, Hatano H, Mitsui K, et al. A retrospective study of herpes simplex keratitis over the last 30 years. Jpn J Ophtalmol 1994;38:196-201.

Wald A and Corey L. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Chapter 36 Persistence in the population: epidemiology, transmission, 2007. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47447/

Wang L, Qi X, Sun Y, Liang L, Ju D. Adenovirus-mediated combined P16 gene and GM-CSF gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity. Cancer Gene Ther. 2002;9:819-24.

Webre JM, Hill JM, Nolan NM, et al. Rabbit and mouse models of HSV-1 latency, reactivation, and recurrent eye diseases. J Biomed Biotechnol. 2012;612316.

Weissenbock H, Hainfellner JA, Berger J, Kasper I, Budka H. Naturally occurring herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (Oryctolagus cuniculus). Vet Pathol. 1997;34:44-7.

Wohlsein P, Thiele A, Fehr M, et al. Spontaneous human herpes virus type 1 infection in a chinchilla (Chinchilla lanigera f. dom.). Acta Neuropathol. 2002;104:674-8.

Wood A, Payne D. The action of three antiseptics/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. J Hosp Infect. 1998;38:283-95.