

第一種使用規程承認申請書

平成 31 年 1 月 22 日

厚生労働大臣 根本 匠 殿  
環境大臣 原田 義昭 殿

氏名 ナノキャリア株式会社  
申請者 代表取締役社長 中富 一郎 印  
住所 千葉県柏市若柴 226 番地 39 中央 144 街区 15

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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>改変型マウス PPE-1 遺伝子プロモーター制御下に、Fas-TNFR 1 融合遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルス 5 型 (VB-111)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>ヒトの治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>本遺伝子組換え生物等の原液の保管</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 本遺伝子組換え生物等を含む原液は、遺伝子組換え生物等である旨を表示し、他の薬剤等から識別可能な状態で治療施設内の適切に管理された冷凍庫において保管する。</li> </ol> <p>本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>2. 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。</li> <li>3. 希釈液は、容器に密封された状態で保管する。</li> </ol> <p>運搬</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. 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。</li> </ol> <p>患者への投与</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、静脈内投与することにより行う。投与時は、治療室内で本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。</li> </ol> <p>投与後の患者からの排出等の管理</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>6. 投与後、患者の投与部位を消毒し、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。</li> <li>7. 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切</li> </ol>

な指導を行う。

8. 投与を受けた患者が排出等の管理が不要となる期間までに当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。

#### 患者検体の取扱い

9. 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
10. 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となる期間までに、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された患者の検体である旨を情報提供して行う。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
11. 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

#### 感染性廃棄物等の処理

12. 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。
13. 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあつては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。
14. 本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない密封容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和 46 年政令第 300 号）の別表第 1 の 4 の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。
15. 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体は漏出しない密封容器に入れ、本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材は厳重な密閉を行った上で感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。
16. 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等を廃棄する場合は、密封された状態で高圧蒸気滅菌により不活化処理を行い、廃棄する。

## 生物多様性影響評価書

### I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

#### 1. 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

ヒトアデノウイルスはアデノウイルス科マストアデノウイルス属に分類されており、これまでに分離されたウイルスは、中和抗体を誘導する抗原性の違いで 56 以上の血清型に分けられている（文献 1、2）。

本遺伝子組換え生物等（以下VB-111）は、非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルスとして、ヒトアデノウイルス 5 型（Ad5）を宿主として調製された（文献 3）。

Ad5 は 4 歳以下の乳幼児の多くに感染しており、咽頭及び糞便からウイルスが分離される（文献 2）。アデノウイルス 1 型、2 型、5 型、及び 6 型に対する中和抗体保有率は、20 歳までに 100%に達している（文献 4）。自然環境において、ヒト以外の動物での増殖は報告されていない。実験室内では、コトンラット及びニュージーランドウサギへの経鼻接種でウイルス増殖を伴う感染が報告されている（文献 1）。

文献 1： Field Virology, 6th edition, D. M. Knipe and P. M. Howley, pp.1732-1767, 2013

文献 2： 畑中正一編：ウイルス学, pp.198-208, 朝倉書店, 東京 (1997)

文献 3： Greenberger, S. et. al.: J. Clin. Invest. 113:1017-1024 (2004)

文献 4： 水田克巳など：山形県衛生研究所報, 32: 5-7 (1999)

#### 2. 使用等の歴史及び現状（人用若しくは動物用医薬品としての利用の歴史又は産業的な利用の歴史及び現状を含む。）

Ad5 を生ワクチンに使用した報告はない。Ad5 に由来する遺伝子組換えウイルスが遺伝子治療で汎用されている（IV章参照）。

米国、カナダ及びイスラエルにおいて、異なるがん種の患者を対象に、複数の臨床試験が行われている（III章、6項を参照）。

#### 3. 生理学的及び生態学的特性（文献 1、2）

以下に概要を記載する（詳細については別紙 1 参照）。

#### (1) 基本的特性

Ad5 はエンベロップを持たず、そのウイルスキャプシドは直径 80 nm の正二十面体である。Ad5 のゲノムは約 36 kb の 2 本鎖 DNA である。

#### (2) 生育又は生育可能な環境の条件

自然環境において、ヒト以外の動物での増殖は報告されていない。実験室内では、コトナラット及びニュージーランドウサギへの経鼻接種でウイルス増殖を伴う感染が報告されている（文献 1）。

#### (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

ヒトアデノウイルスは標的細胞の受容体と結合した後、エンドサイトーシスにより細胞に取込まれ、細胞質を経て核へ移行、核内では染色体外遺伝子として存在する。最初に細胞由来の転写因子を利用して E1A 遺伝子産物が産生され、ウイルス DNA の複製及びウイルス粒子構成タンパク質の産生が開始される。ウイルス粒子は核内で組み立てられ、蓄積・凝集により核内封入体が形成された後、感染細胞の崩壊により、ウイルス粒子は細胞外に放出される。

#### (5) 病原性

Ad5 は、ヒトに経口感染し、増殖したウイルスは便と共に排泄される。

Ad5 の感染は不顕性に終わることが多いが、4 歳以下の乳幼児では急性熱性咽頭炎となる場合もある。いずれの場合も感染後に産生される中和抗体で再感染は阻止される。リンパ節に潜伏する例や小児の腸重積症に関わる可能性も指摘されている。

#### (6) 有害物質の産生性

野生型アデノウイルスゲノムにコードされるタンパク質が感染細胞外で有害な生理活性を示すとの報告はない。

#### (7) その他の情報（不活化条件等を含む。）

外界におけるアデノウイルスの生存期間は、衣類などの凸凹面で 8～10 日、テーブルやドアノブなどの平滑面で最大 49 日と報告されている（文献 5）。

物理的不活化法として Ad5 は 56°C、30 分の加熱で感染性を失う（文献 6）。また化学的不活化法として用いる消毒薬としては以下のものを含む：塩素系漂白剤（たとえば次亜塩素酸ナトリウム）、グルタールアルデヒドなど（文献 7）。特に次亜塩素酸ナトリウムはごく低濃度においても細菌に対して速効的な殺菌力を発揮し、またウイルスに対する効力の面でも最も信頼のおける消毒薬である（文献 8）。

文献 5 : Gordon YJ, et al.: Ophthalmology. 100:1835-1839 (1993)

文献 6 : Bardell, D.: J. Clin. Microbiol. 4: 322-325 (1976)

文献 7 : APIC guidelines for infection control practice

(<http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds3e-eng.php>)

文献 8 : [http://www.yoshida-pharm.com/text/05/5\\_2\\_3.html](http://www.yoshida-pharm.com/text/05/5_2_3.html)

## 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

VB-111 には、供与核酸として、改変型マウスプレプロエンドセリン-1 (PPE-1) 遺伝子プロモーター (以下「PPE-1-3xプロモーター」) 領域、ヒトのTumor Necrosis Factor Receptor 1 (以下「TNFR1」) 及びFasの融合タンパク質をコードする遺伝子 (以下「Fas-c遺伝子」)、SV40 由来のpoly A付加シグナル配列 (以下「SV40 poly A」) を含む領域より成るFas-cタンパク質発現カセットがアデノウイルス 5 型のE1 領域と置換された形で挿入されている。Fas-cタンパク質は、ヒトTNFR1 の細胞外ドメインと、ヒトFasの細胞膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインよりなる融合タンパク質である。なお、PPE-1-3xプロモーター領域及びFas-c遺伝子は、[REDACTED]に、poly A付加シグナル領域は[REDACTED]に由来するものが用いられている。各構成要素のDNA配列及び、VB-111 の構成とAd5 の対比は別紙2 に示した。

#### (2) 構成要素の機能

PPE-1-3xプロモーターはFas-c遺伝子の転写を制御する配列である。PPE-1 は、エンドセリン-1 の 21 アミノ酸残基の前駆体で血管内皮細胞選択的に発現する。PPE-1-3xプロモーターは、マウスPPE-1 プロモーターを改変したプロモーターであり、プロモーター活性及び新生血管選択性が高められている。

Fas-cは分子量約 53kDaのタンパク質で、ヒトTNFR1 の細胞外ドメインとヒトFasの細胞膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインからなる融合タンパク質である。Fas-cに腫瘍周囲 (原発巣だけでなく転移巣も含む) に常在するTNF $\alpha$ が結合することにより、新生腫瘍血管内皮細胞に選択的なアポトーシスが誘導され、腫瘍増殖が抑制される (文献3)。

SV40 poly A配列は、Fas-c遺伝子の発現に必要とされるpoly A付加シグナルとして挿入されている。

また、VB-111 はアデノウイルスの増殖に不可欠なE1 遺伝子を含まないため、増殖性はない。

### 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

Ad5 のE1 遺伝子を全て含む領域を供与核酸と置換した。供与核酸とは、PPE-1-3xプロモーター、ヒトFas-c遺伝子、及びSV40 由来poly A付加シグナル配列である（VB-111 の構成については、別紙2 参照）。

#### (2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

##### (a) PPE-1-3xプロモーター

BALB/cマウスのゲノムライブラリーから得たマウスPPE-1 遺伝子から、マウスPPE-1 プロモーター領域をクローニングした。[REDACTED]

[REDACTED] DNA断片を化学的に合成したDNAを用いて作製し、本プロモーター中に挿入しPPE-1-3xプロモーターを得た（別紙3 参照）。

##### (b) Fas-c遺伝子

ヒトcDNAライブラリーから調製したTNFR1 遺伝子及びFas遺伝子のcDNAを得て、TNFR1 [REDACTED] とFas [REDACTED] [REDACTED] を融合したキメラ遺伝子を構築した（文献9）。

##### (c) 第1世代VB-111

第1世代のVB-111 アデノウイルスは、ウイルス骨格を供するプラスミド（以下「バックボーンプラスミド」）としてE1 遺伝子が不活性化されたアデノウイルスゲノムを含む [REDACTED] [REDACTED] を、供与核酸を供するプラスミド（以下「アダプタープラスミド」）としてPPE-1-3xプロモーター、Fas-c遺伝子及びSV40 poly A付加シグナルを含む [REDACTED] を用い、 [REDACTED] [REDACTED] 導入することにより調製した（別紙3 参照）。

##### (d) 第2世代VB-111

アダプタープラスミド [REDACTED] は、上述の [REDACTED] [REDACTED] をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法により増幅し、 [REDACTED] に導入して作製し、直線状にしたものを用いた。これを直線状にした [REDACTED] [REDACTED] と共に、リポフェクタミンを用いて [REDACTED] [REDACTED] 細胞（アデノウイルスE1 領域が導入されている）に導入し第2世代VB-111 を得て、マスターウイルスバンクを調製した（別紙3 参照）。第2世代VB-111 は、非臨床毒性試験及び臨床試験に用いている。

### (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

VB-111はAd5のE1領域を欠失している。ウイルスDNAの複製に必要なE1領域に含まれるE1A及びE1B遺伝子の産物を継続的に発現している[ ]細胞を使って増殖させる。

樹立したVB-111からマスターウイルスバンク及びワーキングウイルスバンクを調製・管理し、VB-111製剤の調製はワーキングウイルスバンクを用いて行う。

VB-111製剤は、イスラエルのVascular Biogenics Ltd (VBL社)で製造された製剤をナノキャリア株式会社が輸入して使用する。ラベルを貼り凍結された製剤(バイアル)は、温度管理された状態で日本に輸入する。

なお、原薬に増殖性アデノウイルスが残存しないことが確認されている。

文献9: Boldin MP, et al.: J. Biol. Chem. 270:7795-7798 (1995)

### 4. 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸はVB-111の2本鎖DNAゲノムの一部として存在し、保管中は極めて安定で、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。

VB-111が細胞に感染すると、VB-111のゲノムは核内の染色体外に存在し、Fas-c遺伝子が転写される。一方、VB-111はE1領域を欠いているため非増殖性である。すなわち、Fas-c遺伝子の発現は一過性である。

### 5. 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

VB-111 DNA、Fas-c遺伝子の発現及びTNF受容体の発現は、QPCR法により検出することができる。別紙4に記載したとおり、各分析法はいずれも適合条件に合致し、臨床サンプルに適用できることが検証済みである。

### 6. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

VB-111はAd5のE1領域の遺伝子を欠失しているため、これらの領域にコードされているウイルスタンパク質群を発現できない。E1領域に含まれるE1A及びE1B遺伝子から作られるタンパク質はウイルスDNAの複製に必要なため(文献1、2)、E1A及びE1B遺伝子を持続的に発現している細胞[ ]やAd5と共感染した細胞でなければVB-111の増殖は起こらない。一方、VB-111には改変型PPEプロモーターが存在するため、これにより発現制御を受けているFas-c遺伝子が新生血管の内皮細胞選択的に発現することになる。これらの点を除くと、VB-111の感染する動植物等の種類、感染経路、伝播様式等は野生型Ad5とまったく同等である。



### 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

ヒトの治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

#### 2. 使用等の方法

##### 本遺伝子組換え生物等の原液の保管

- (1) 本遺伝子組換え生物等を含む原液は、遺伝子組換え生物等である旨を表示し、他の薬剤等から識別可能な状態で治療施設内の適切に管理された冷凍庫において保管する。

##### 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管

- (2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。
- (3) 希釈液は、容器に密封された状態で保管する。

##### 運搬

- (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

##### 患者への投与

- (5) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、静脈内投与することにより行う。投与時は、治療室内で本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

##### 投与後の患者からの排出等の管理

- (6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、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) 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (8) 投与を受けた患者が排出等の管理が不要となる期間までに当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。

#### 患者検体の取扱い

- (9) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (10) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となる期間までに、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された患者の検体である旨を情報提供して行う。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (11) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

#### 感染性廃棄物等の処理

- (12) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。
- (13) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあつては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。
- (14) 本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない密封容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和 46 年政令第 300 号）の別表第 1 の 4 の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。
- (15) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体は漏出しない密封容器に入れ、本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材は厳重な密閉を行った上で感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。
- (16) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等を廃棄する場合は、密封された状態で高圧蒸気滅菌により不活化処理を行い、廃棄する。

### 3. 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

モニタリングの一環として、血中のVB-111 DNA及びFas-c遺伝子の発現レベルについて経時的な検査を実施する。試験は別紙 4 に記載の定量PCRによる。検体採取時期は、主として投与直前及び投与後の短時間とするが、詳細な時期は試験計画書で定める。なお、尿中のVB-111 DNAに関しては、投与後 6 時間で測定感度以下になることが確認

されており（別紙 6）、環境中への拡散は殆どないと考えられることから、検査は実施しない。

#### 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. 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

VB-111 は、 $-65^{\circ}\text{C}$ 以上の温度に高感受性であることが示されており、 $-65^{\circ}\text{C}$ 以上の温度環境では、細胞外での生存が極端に制限される。 $0^{\circ}\text{C}$ の氷水中での安定性試験では、6 時間後のプラーク形成能が半減することが示されている。

VB-111 は、*in vitro*における検討から、PPE-1-3xプロモーターはその制御下にある遺伝子の発現を増殖中の血管内皮細胞特異的に誘導し、この特異性は*in vivo*においてより顕著となることが示されている。VB-111 の抗腫瘍効果については、マウスB16 メラノーマの皮下移植モデルやLewis肺がん（LLC）の肺転移モデルにおいて腫瘍増殖抑制効果が、またラットU87 グリオーマモデルやLLLCモデルにおいて延命効果が認められている。

マウスにVB-111  $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$  virus particles (VPs) を一回静脈内投与した結果、全血及び検索したすべての臓器で投与後 90 日までVB-111 のDNAが確認された。なお、5 日後から 90 日後の間に有意にDNA量の減少が確認されている。一方、Fas-cの発現は一部の例外を除き、腫瘍組織に限られていた。

VB-111 は、正常及びLLLCモデルマウスを用いた単回投与毒性試験及び正常マウスを用いた反復投与毒性試験において比較的安全なプロファイルを示し、アデノウイルス投与後に一般的に認められる軽度かつ一時的なVB-111 に特異的ではない変化のみが観察されている。単回投与による毒性と反復投与による毒性に差異は認められなかった。無毒性量は、 $1 \times 10^{10}$  VPs/マウスと推定され、これをヒトに換算すると、ヒト臨床用量（ $1 \times 10^{13}$  VPs）に対して 3 倍の安全マージンとなる。上記の非臨床における*in vitro*及び*in vivo*の成績は別紙 5 により詳細にデータとともに記載した。

ヒトAd5 ベクターをヒトの血管内へ投与したとき、血漿、尿、直腸綿棒及び含嗽から採取した試料において、最大で投与後 28 日までベクターDNAの存在が確認されている。詳細データについては別紙 6 に示した。VB-111 とは供与核酸が異なるものの、Ad5 ベクターとしての体内動態は類似と考えられることから、VB-111 においても、尿、唾液、喀痰、糞便等からAd5 ベクターが排出されると予想される。

## 6. 国外における使用等により得られた情報

VB-111 を用いた臨床試験は、海外において複数実施されている（進行転移性がん患者を対象とした第 I 相試験、進行甲状腺がん患者を対象とした第 II 相試験、再発膠芽腫患者を対象とした第 I / II 相試験、プラチナ耐性卵巣がん患者を対象とした第 I / II 相試験）。すべての試験において VB-111 の忍容性は良好であり、臨床的に重大な安全性上の懸念は認められていない。また、すべての試験において、腫瘍縮小効果及び生存期間の延長又はそのいずれかを示す結果が得られている。現在は、米国、カナダ及びイスラエルにおいて再発膠芽腫患者を対象とした第 III 相検証的試験及びプラチナ耐性卵巣がん患者を対象とした第 III 相検証的試験が進行中である。

VB-111 の生体内分布について以下に概説する。詳細データについては別紙 6 に示した。

米国で実施された臨床第 I 相試験（VB-111001 試験）において、 $1 \times 10^{13}$  VPs の VB-111 を投与された被験者の尿中及び血中 VB-111 DNA の推移を検討した。尿中では、VB-111 投与後 6 時間に全例測定感度以下になっていた。血中では、用量漸増で単回投与した時、飽和に達することなく、ベクター DNA の濃度が増加することが示された。投与直後に高レベルのベクター DNA が認められたが、これらのレベルは経過とともに減少した。一方、全血中の mRNA を定量的逆転写 PCR（Q-RT-PCR）法で検討した結果、Fas-c 遺伝子の転写産物は検出されなかった。

米国及びイスラエルで実施した再発悪性膠芽腫患者を対象とした第 I / II 相試験（VB-111-122 試験）において、 $1 \times 10^{13}$  VPs の VB-111 を少なくとも 2 回投与された 6 名の被験者について生体内分布の評価を行った。血中のウイルス DNA レベルは、VB-111 投与直後に約  $10^7$  コピー/ $\mu\text{g}$  DNA の均一なピークを示したが、投与後数時間で急速に低下した。ピークレベルは反復投与でも減衰しなかった。血中からウイルス DNA が消失したことは、血中にウイルスが蓄積していないことを示しており、反復投与の安全性を支持するものである。

## IV 生物多様性影響評価

### 1. 他の微生物を減少させる性質

#### (1) 影響を受ける可能性のある微生物の特定

VB-111 の感染性は野生型Ad5 と同一と考えられるので、微生物に感染せず、また、競合、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

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よる限り、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

VB-111 の感染性は野生型Ad5 と同一と考えられるので、自然宿主はヒトのみである (文献 1、2)。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

感染したヒトの新生血管の内皮細胞で一過性にFas-c遺伝子が発現する可能性はあるが、VB-111 は非増殖性であるため、伝播に基づく病原性はない。

なお、Ad5 を宿主とする遺伝子治療用ウイルスベクター (遺伝子組換え生物等) は 1990 年以後、国内外で汎用されているが (文献 10)、環境への悪影響に関する報告はない。1999 年に遺伝子治療薬の投与に起因する初めての死亡例が、当該アデノウイルスベクターを用いた米国での臨床研究において発生した。その後の調査により、当該事例は、アデノウイルスベクター大量投与の結果、循環血中に漏れ出たウイルスタンパク質により引き起こされた全身的免疫反応に起因するものであることが明らかにされている (文献 11)。

(3) 影響の生じやすさの評価

VB-111 は病原性が認められておらず、増殖能を失っているため、野生型アデノウイルスとの共感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。さらに、VB-111 が効率よく感染する対象はヒトに限られることを踏まえると、VB-111 が被験者以外の第三者や動物に病原性を示す可能性は極めて少ないと考えられる。

なお、VB-111 を感染させたマウスにおいて、Fas-cのリガンドであるTNF $\alpha$ を、正常臓器中でFas-c遺伝子が最も高発現となる時間に投与しても臓器毒性の誘導は認められなかった。米国などで実施された臨床試験においても安全性が確認されている。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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による限り、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

文献 10 : Herman, J. R., et al.: Human Gene Ther. 10: 1239-1249 (1999)

文献 11 : Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Human Gene Therapy 13:3-13 (2002)

3. 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

VB-111 の感染性は野生型Ad5 と同一と考えられるので、自然宿主はヒトのみである(文献 1、2)。

(2) 影響の具体的内容の評価

VB-111 に特異的な産物は、Fas-c遺伝子の産物のみである。Fas-cは、発現している細胞においてTNF $\alpha$ 依存的に細胞死を誘導する。

(3) 影響の生じやすさの評価

Fas-c遺伝子の発現は、PPE-1-3xプロモーターによって厳密に制御されており、その結果、非臨床毒性試験の高用量群においても、Fas-cの発現は腫瘍特異的であり、観察された毒性所見もウイルスを投与された動物が一般に示す症状以外は観察されていない。このことから、Fas-cが野生動植物等に影響を与える恐れはないと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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による限り、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又は他の微生物の特定

VB-111 の感染性は野生型Ad5 と同一と考えられるので、自然宿主はヒトのみである（文献 1、2）。

(2) 影響の具体的内容の評価

VB-111 が感染した細胞において、一過性にウイルスゲノムDNAが核内に侵入し、感染細胞ゲノムDNAとの相同組換えを起こす可能性は否定できない。

VB-111 と野生型アデノウイルスが共感染した場合に、相同組換えにより、新たな遺伝子組換えアデノウイルスが出現する可能性がある。

(3) 影響の生じやすさの評価

感染細胞ゲノムDNAとの相同組換えが生じても、組み込まれた供与核酸がさらに水平伝達される可能性は極めて低い。

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法において、VB-111 の環境中への拡散は極めて微量と考えられる。VB-111 は増殖能を失っているので、野生型アデノウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。さらに、VB-111 が効率よく感染する対象はヒトに限られること（文献 1、2）及びヒト体内の同一細胞にVB-111 及び野生型アデノウイルスが共感染する可能性は低いことを考えると、新たに遺伝子組換えアデノウイルスが出現する可能性も極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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よる限り、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

なし。

## V 総合的評価

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、VB-111 の環境中への拡散は極力抑えられており、たとえ拡散してもその量は極めて少なく、第三者への伝播の可能性は低いと考えられる。

VB-111 によるFas-c遺伝子の一過性発現は、これまでの動物を用いた予備的実験及び臨床試験からヒトに強い病原性を示す可能性は極めて小さいことが示されている。

VB-111 が感染する動植物等の種類は野生型Ad5 と同等で、ヒトにのみ感染し、自然界で他のほ乳動物、植物及び微生物には感染しないと考えられる。

結論として、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、他の微生物を減少させる性質、病原性、核酸を水平伝達する性質、その他の性質に基づいて影響が生じるおそれは極めて低いと考えられ、VB-111 使用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。