

第一種使用規程承認申請書

平成 30 年 11 月 9 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

申請者 氏名 東京大学医科学研究所附属病院
病院長 東條 有伸
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	融合型ヒト IL-12 遺伝子及び大腸菌 <i>lacZ</i> 遺伝子を発現し、 γ 34.5 遺伝子・ <i>U_L39</i> 遺伝子・ α 47 遺伝子を不活化された遺伝子組換えヒト単純ヘルペスウイルス 1 型 (F 株由来) (T-hIL12)
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	保管及び希釈液の調製 (1) T-hIL12 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治療施設内の冷凍庫に保管する。 (2) T-hIL12 液の希釈操作は、施設内の安全キャビネット内で行う。T-hIL12 希釈液の保管は、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治療施設内の保冷库または冷凍庫において行う。 運搬 (3) T-hIL12 希釈液又はその凍結品の治療施設内での運搬は、容器に密封した状態で行う。 患者への投与 (4) 患者に対する T-hIL12 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において、患者の腫瘍内に T-hIL12 液もしくは T-hIL12 希釈液を注入することによって行う。 投与後の患者からの排出等の管理 (5) T-hIL12 の排出等の挙動が明らかになるまで、注射部位のスワブ、血液、尿、唾液検体を用いて、T-hIL12 の排出等の検査を行う。また、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にも、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。 (6) 患者の投与部位は、密閉ドレッシング材等による被覆を行う。被覆は、医師の判断により必要とされる期間継続する。 (7) T-hIL12 の排出等が認められなくなるまでの間に、T-hIL12 の投与を受けた患者が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、T-hIL12 の投与を受ける患者に適切な指導を行う。

- (8) 患者からの排出物等から第三者への T-hIL12 の伝播を防止するために、T-hIL12 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) 患者検体は、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) T-hIL12 の排出等が認められなくなるまでの間に、患者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、T-hIL12 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。

感染性廃棄物の処理

- (11) T-hIL12 液（希釈液を含む）及び T-hIL12 が付着した可能性のある機器や器材は、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 T-hIL12 液を含む廃棄物は廃棄前に不活化するか、又は厳重な密封を行っ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) 投与部位等、高力価の T-hIL12 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。

- (13) 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

	<p>して処理する。</p> <p>(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は、直接周囲に接触しない工夫をした上で廃棄する。</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）の二つである¹⁾。T-hIL12は単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）F株をもとに作製された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⁶⁻⁸⁾。

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^{1,9,10)}。また近年、米国及び英国においてHSV-1に由来する種々の遺伝子組換えウイルスが、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¹¹⁻¹⁴⁾。2015年10月、米国においてヒト顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子（human GM-CSF）発現型の遺伝子組換えHSV-1であるtalimogene laherparepvecが、悪性黒色腫に対する治療薬として承認された¹⁵⁻¹⁷⁾。国内では、膠芽腫、前立腺癌、嗅神経芽細胞腫に対するウイルス療法として、2009年以降、遺伝子組換えHSV-1であるG47 Δ ¹⁸⁾を用いた臨床試験が、東京大学において実施されている。2014年からは膠芽腫を対象に第II相臨床試験（医師主導治験）が進められている（UMIN000015995）。自然変異型の弱毒HSV-1であるHF-10も、悪性腫瘍に対するウイルス療法として治験が行われている^{19,20)}

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1に記載する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、ヒトの細胞及び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。粘膜表面への直接の接触による感染を主な感染経路とし、外界及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2に記載する^{1,21)}。

(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、ウイルスは皮膚や粘膜（通常は口唇）で顕在化し、水疱を形成する²²⁾。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²³⁾。

(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²⁴⁾、欧米では年間20万人に1人^{22,25)}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²⁶⁾。

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²⁷⁾。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²⁸⁾。HSV-1を速やかに不活化する消毒薬 (chemical disinfectants) としては、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%ポビドンヨードなどがあり、またHSV-1は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に対して感受性がある²⁸⁻³³⁾。物理的不活法 (physical inactivation) として、HSV-1は56℃ (30分間) の加熱や紫外線照射 (40 μ W/cm²、15分間)、pH4以下で速やかに感染性を失う。

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①融合型ヒトIL-12コード領域のcDNA②大腸菌(略称 *E.Coli*) 由来の*lacZ* 遺伝子のcDNAを有する。構成の詳細は別紙3に、供与核酸の塩基配列は別紙4に、対応するアミノ酸配列は別紙5に記載する。

(2) 構成要素の機能

導入された融合型ヒトIL-12遺伝子は、p40サブユニットとp35サブユニットの融合タンパク質としてT-hIL12の感染した細胞で一過性に発現される。ヒトIL-12は、T細胞やNK細胞に対して、細胞増殖の促進、細胞傷害活性誘導、IFN- γ 産生誘導、LAK細胞誘導などの免疫賦活作用を示す。細胞性免疫を活性化させる働きから、IL-12は腫瘍免疫や感染防御に関わっている。病原性や毒素産生性には関与していない^{34, 35}。この供与核酸の導入の結果生じるヒトIL-12タンパク質によって、T-hIL12の感染性が野生型HSV-1から変化することはないと考えられる。

導入された*lacZ*遺伝子は宿主の*U_L39*プロモーターによりICP6タンパク質のN端領域との融合タンパク質として発現される。 β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質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 -ガラクトシダーゼ融合タンパク質によって、T-hIL12の感染性が野生型HSV-1から変化することはないと考えられる。

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UL39領域には1kbの欠失が加えられており、本来のUL39遺伝子は発現されない。その部位にlacZ cDNAと融合型ヒトIL-12発現カセットが挿入されている。また、宿主HSV-1の γ 34.5遺伝子(1kb)のTR_L及びIR_Lの双方のコピーは欠失しており、 α 47遺伝子(0.3kb)も欠失している(別紙3)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

HSV-1 (F株) ゲノムDNAのBamHI S1断片を含有するpRB143プラスミドから γ 34.5遺伝子領域のBstEII~StuI認識部位の約1kbを欠失させたものを得た。これとHSV-1 (F株) ゲノムDNAとの相同組換えにより、 γ 34.5遺伝子部位に1kbの欠失を有するHSV-1 (R3616) を得た。

次に、HSV-1 (KOS株) ゲノムDNAのHpaI F断片(13kb) に由来するXhoI断片(2.3kb) (UL39遺伝子領域) を含有するpKpX2プラスミドのBamHI認識部位にpDP503プラスミド由来のE.coli由来lacZ遺伝子BamHI断片を挿入したpKX2- β G3プラスミドを得た。これと、上述のR3616との相同組換えにより、 γ 34.5遺伝子部位の欠失とUL39遺伝子部位へのlacZ遺伝子挿入を有するHSV-1 (G207) を得た³⁶⁾。

次に、HSV-1 (17+株) ゲノムDNAのBamHI x断片内のBamHI認識部位~EcoRI認識部位の1818 bp (α 47遺伝子領域を含む) を含有するpIE12プラスミド³⁷⁾からBstEII認識部位~EcoNI認識部位の311 bpを欠失させたプラスミドpIE12 Δ を得た。これと上述のG207との相同組換えにより、 γ 34.5遺伝子部位の欠失、UL39遺伝子部位へのlacZ遺伝子挿入、及び α 47遺伝子部位の欠失を有するHSV-1 (G47 Δ) を得た^{20, 37)} (別紙6)。

T-BACはpBelobac11 (Research Genetics, Huntsville, AL)を基本骨格とし、chloramphenicol耐性遺伝子を有している。pVP22/myc-His2 (Invitrogen, Carlsbad, CA)とpEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA)から得た、CMVプロモーター-EGFP cDNA-BGH poly(A)、FRT配列、loxP配列、HSV-1 ICP6領域のゲノム配列 (StuIとXhoIの間の1kbは欠失) から構成されるpBAC-ICP6EFと、G47 Δ のDNAとの相同組み換えによりT-BACを得た。

SV-01はpUni/V5-HisA (Invitrogen)を基本骨格とし R6K γ ori、kanamycin耐性遺伝子、4kbのlambdaファージ配列断片、FRT認識配列、loxP配列、pVP22/myc-His2 (Invitrogen)由来のCMVプロモーターとBGA poly(A)配列、マルチクロニングサイト、pcDNA6E/Uni-lacZ (Clontech, Mountain View, CA)由来のlacZ cDNA-SV40 poly(A)配列を持つ。CMVプロモーターとlacZは逆方向に配置されている。

融合型ヒトIL-12コード領域のcDNA断片をSV-01のNot I/Sac II認識部位に挿入しhIL12/SV-01を得た。T-BACとhIL12/SV-01とのCre-loxP組み換えにより、T-BAC / hIL12/SV-01を得た。さらにFLPe-FRT組み換えによりT-BAC / hIL12/SV-01内からベクター由来の配列を除き、T-hIL12を得た。T-hIL12には挿入外来遺伝子配列のみが残り、薬剤耐性遺伝子などの配列は移されない(別紙3)^{2, 38)}。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

T-hIL12はウイルス製造に頻用されるVero細胞を使って増殖させる。T-hIL12の臨床製剤は東京大学医科学研究所治療ベクター開発センターで生産される。生産工程はセルバンクシステム及びウイルスバンクシステムを用い、治験薬GMPに従った標準作業手順（SOP）に基づき行う。Vero細胞（WHO RCB 10-87）のマスターセルバンクからワーキングセルバンクを構築し、ウイルス製造には継代数の低い細胞を使用する。正しい変異を有することが確認されたT-hIL12から作製したマスターウイルスシードストック（MVSS）あるいはMVSSから作製したワーキングウイルスシードストック（WVSS）をVero細胞に感染させる。2～3日後、細胞を回収し、凍結解凍操作で細胞内のT-hIL12を遊離させる。フィルターろ過により細胞成分を除去したのち、細胞由来のDNA及びRNAを酵素処理する。高速遠心にてウイルスを沈殿させ、混入する核酸及び蛋白を除去する。これを10% グリセリン加燐酸緩衝液（PBS）に再懸濁する（別紙7）。生産の4工程、すなわち、マスターセルバンク、精製前のウイルス回収液（バルクハーベスト）、精製後のウイルス、及びチューブに分注後の製剤において、██████████に委託して品質試験を行う（別紙8）。

T-hIL12製剤中に増殖型・非増殖型の各種ウイルスの混入がないことの品質試験を██████████に委託して行なう。また、最終製剤中のT-hIL12以外の組換えHSV-1の混入の有無については、ICP6改変部位をまたいで設計したプライマーを用いたPCRを行い、野生型由来するDNA断片が増幅されないことを確認する。

ウイルスの調製に使用するVero細胞のマスターセルバンク、ワーキングセルバンク、及びマスターウイルスシードストックは、東京大学医科学研究所治療ベクター開発センターに保管されている。

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。T-hIL12が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。

T-hIL12が細胞に感染すると、T-hIL12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（例：アフリカミドリザル腎細胞株Vero）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）。感染細胞内で一過性にヒトIL-12と大腸菌β-ガラクトシダーゼが発現される。

T-hIL12はHSV-1ゲノムの互いに離れた4箇所（3つの遺伝子）に欠失を生じる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。万一3つの遺伝子のうち2箇所または1箇所のみの変異に復元したものが生じたとしても、UL39またはγ34.5の少なくとも一方が不活化されていれば腫瘍選択的な複製は維持される。α47のみが不活化されたウイルスは宿主の免疫系に認識されやすく、宿主における複製能が低下する（II章6 「宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違」参照）。いずれも、野生型に比し毒性や病原性の増加はない。

臨床製剤の生産は、1つのプラークから得られたT-hIL12のロットを、十分量に増やしたVero細胞に一回感染させて回収することによって行われるため、ウイルスが継代されることはなく、従って重なるウイルス継代によってゲノムに変化が起こることはない。

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

T-hIL12は野生型のHSV-1に存在しない*lacZ*遺伝子を含むので、
PCRで増幅する方法でT-hIL12を検出できる（別紙9）。このときに用いるPCR反応では、
検出することができる。また、感染細胞のX-gal染色を行なうことによっても、T-hIL12（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。X-gal染色の感度は鋭敏であり、³⁹⁾。

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、さらに東京大学でのG47Δの臨床試験でも使用され、信頼性が確立している^{40,41)}。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

T-hIL12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)及び $\gamma34.5$ 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⁴²⁾。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の蛋白合成が遮断される。 $\gamma34.5$ 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、 $\gamma34.5$ 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、 $\gamma34.5$ 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⁴³⁾。

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⁴⁴⁾。

一方、*α47*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*US11*遺伝子の発現を早めることで、 γ 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^{20, 36, 45)} (別紙10)。

*UL39*領域には融合型ヒトIL-12コード領域cDNAと大腸菌*lacZ* 遺伝子cDNAが挿入されており、T-hIL12の感染した細胞内で一過性に発現される。

T-hIL12はVero細胞内では複製するが、T-hIL12の複製能力は親株 (F株) に比較すると減弱している。

T-hIL12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。腫瘍細胞及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。

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

保管及び希釈液の調製

- (1) T-hIL12 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治療施設内の冷凍庫に保管する。
- (2) T-hIL12 液の希釈操作は、施設内の安全キャビネット内で行う。T-hIL12 希釈液の保管は、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治療施設内の保冷库または冷凍庫において行う。

運搬

- (3) T-hIL12 希釈液又はその凍結品の治療施設内での運搬は、容器に密封した状態で行う。

患者への投与

- (4) 患者に対する T-hIL12 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において、患者の腫瘍内に T-hIL12 液もしくは T-hIL12 希釈液を注入することによって行う。

投与後の患者からの排出等の管理

- (5) T-hIL12 の排出等の挙動が明らかになるまで、注射部位のスワブ、血液、尿、唾液検体を用いて、T-hIL12 の排出等の検査を行う。また、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にも、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。
- (6) 患者の投与部位は、密閉ドレッシング材等による被覆を行う。被覆は、医師の判断により必要とされる期間継続する。
- (7) T-hIL12 の排出等が認められなくなるまでの間に、T-hIL12 の投与を受けた患者が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、T-hIL12 の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (8) 患者からの排出物等から第三者への T-hIL12 の伝播を防止するために、T-hIL12 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) 患者検体は、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) T-hIL12 の排出等が認められなくなるまでの間に、患者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、T-hIL12 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。

感染性廃棄物の処理

- (11) T-hIL12 液（希釈液を含む）及び T-hIL12 が付着した可能性のある機器や器材は、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 T-hIL12 液を含む廃棄物は廃棄前に不活化するか、又は厳重な密封を行っ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) 投与部位等、高力価の T-hIL12 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。
- (13) 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。
- (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は、直接周囲に接触しない工夫をした上で廃棄する。

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

T-hIL12はG47Δと同じ基本骨格を持ち、その体外排出についてはG47Δと同様と予想される。G47Δに関してはその脳腫瘍内投与後の体外排出に関する臨床データを臨床試験から既に収集している。T-hIL12の使用においてもG47Δに準じて情報収集を行う（別紙9）。

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

第一種使用規程の内容に従って使用等を行う限り、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追加措置は行わない。T-hIL12は、HSV-TK遺伝子を保持しているため、アシクロビル等の抗ウイルス薬に対する感受性を有しており、ヒトへ感染した際には抗ウイルス薬投与によって制御できる。

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

T-hIL12は3つのウイルス遺伝子を変異させた遺伝子組換えHSV-1であり、その基本骨格はG47Δと同じである。G47Δは、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。投与の状況と排出データ等については別紙11に示す。概要は以下のとおりである。

膠芽腫に対するG47Δを用いたウイルス療法の臨床研究(UMIN000002661)においては、 3×10^8 pfu (3名) もしくは 1×10^9 pfu (10名) のG47Δが、定位脳手術により脳腫瘍内の同一座標へ2回、5～14日の間隔で投与された。各回の投与翌日(day1)、day2、day3と第二回投与の1週間後(day7)の血液、唾液、尿を採取し、定量的PCRを用いてウイルス排出を調査した。その結果、治療した13例においては、どの検体からもどのタイミングにおいても、一度もウイルスが検出されなかった(別紙11及び別添)。また、前立腺癌及び嗅神経芽細胞腫に対するG47Δを用いたウイルス療法の臨床研究(UMIN000010463及びUMIN000011636)においても、膠芽腫に対するG47Δを用いたウイルス療法の臨床研究(UMIN000002661)と同様にウイルス排出を調査した(別紙11別添)。

HSV-1に感受性のあるサル(*Aotus nancymae*)に、G207(G207は二重変異を有する遺伝子組換えHSV-1である。G207を基にG47Δは作製され、T-hIL12はG47Δを基に作製された。)を脳内に定位的に投与した非臨床試験において、野生型HSV-1(F株)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^{39,46)}。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及びG207のDNAは検出されなかった³⁹⁾。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、及び対側の前頭葉)に限局して検出された。

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⁴⁷⁾。

病変から単離された野生株に由来し、 γ 34.5遺伝子と α 47遺伝子を欠失した第2世代遺伝子組換えHSV-1にヒトGM-CSF遺伝子のcDNAを挿入したtalimogene laherparepvecを用いた非臨床試験（生体内分布及び体外排出）の結果の一部が、その生物多様性影響評価書に公開されている⁴⁹⁾。

T-hIL12に関連する事項は別紙12に記載する。

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ガ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)¹¹⁾。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及び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ガム校からG207第Ib相試験の結果が報告された⁴⁸⁾。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、及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ガム校から報告された放射線治療併用G207第I相試験では⁴⁰⁾、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。

γ 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¹²⁾。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¹³⁾。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。

Talimogene laherparepvecを用い、主に悪性黒色腫を対象に進行性固形腫瘍患者に対する臨床試験が行われた^{15-17, 49)}。腫瘍内単回投与（ 10^6 、 10^7 、もしくは 10^8 pfu/mL）（被験者13名）では、2名の被験者の投与後8時間から1週間の血液と、2名の被験者の投与後8時間から1週間の尿から、定量的PCRによりtalimogene laherparepvecのDNAが検出された。反復3回投与（ 10^6 、 10^7 、もしくは 10^8 pfu/mL）（被験者17名）においては、8名の被験者の投与後1時間から8時間の血液からtalimogene laherparepvecのDNAが検出された。尿からはいずれの被験者からもtalimogene laherparepvecのDNAは検出されなかった。投与部位のスワブからのプラークアッセイでは、単回投与を受けた被験者のうち3名から投与後最長2週間後まで感染能を有するウイルスが検出され、反復投与を受けた被験者うち1名から1回のみ感染能を有するウイルスが検出された。投与部位を覆ったドレッシング材の外側からは感染能を有するウイルスは検出されなかった。

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

T-hIL12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、T-hIL12は腫瘍細胞及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

T-hIL12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T-hIL12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T-hIL12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

T-hIL12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。実験室内における一部の増殖中の培養細胞では正常細胞において複製可能であると考えられる。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または進行中であり、国内でも東京大学でG47Δを用いた臨床試験が行われたが、重大な有害事象や死亡の報告はなく、環境への悪影響に関する報告もない^{11-17, 40, 48)}

(別紙11)。T-hIL12には融合型ヒトIL-12コード領域cDNAと大腸菌*lacZ*遺伝子cDNAが挿入されており、T-hIL12が感染した腫瘍細胞に導入され、一過性に発現される。ヒトIL-12は人体に対し病原性を有しない。*LacZ*遺伝子からの生成物であるβ-ガラクトシダーゼ融合タンパク質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、また東京大学のG47Δ臨床試験においても、*lacZ*遺伝子生成物の安全性は示されている。T-hIL12に加えられた遺伝子変異はいずれも欠失変異であり、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、T-hIL12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非常に低い。

(3) 影響の生じやすさの評価

T-hIL12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T-hIL12が伝搬・複製する可能性は低いことから、T-hIL12が被験者以外の第三者や動物に病原性を示す可能性は非常に低い。

(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、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

T-hIL12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T-hIL12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

T-hIL12には融合型ヒトIL-12コード領域cDNAと大腸菌*lacZ*遺伝子のcDNAが挿入されて

おり、T-hIL12が感染した腫瘍細胞に導入され、一過性に発現される。ヒトIL-12の局所での一過性の産生が人体に対して毒性を生じる可能性は限定的であると推定される。*LacZ*遺伝子からの生成物であるβ-ガラクトシダーゼ融合タンパク質は人体に対し毒性を有しない。

(3) 影響の生じやすさの評価

T-hIL12の産生するヒトIL-12のヒトに対する毒性は限定的かつ一過性であると推定される。T-hIL12は正常組織では複製せず、自然界においてもT-hIL12が伝搬・複製する可能性は低いことから、T-hIL12が被験者以外の第三者や動物に感染して毒性を示す可能性は非常に低い。

(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、有害物質の産生性について、第一種使用規模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

T-hIL12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T-hIL12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

T-hIL12の投与を受けたヒトでは、一過性に腫瘍内に限局して複製したT-hIL12が生じるが、これは体外へ排出されないと考えらえる。投与を受けたヒトから体外にT-hIL12が排出されたとしても、意図的にペット等として飼育されている動物に接種しない限り、動物には感染しない。動物に感染したとしても、腫瘍細胞以外ではT-hIL12は複製できないため動物体内でT-hIL12は複製せず、さらに他の動物に感染させることはない。

(3) 影響の生じやすさの評価

T-hIL12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、T-hIL12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。T-hIL12はHSV-1ゲノム上の離れた4箇所（3つの遺伝子）に欠失変異が加えられているため、T-hIL12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

T-hIL12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。

T-hIL12による融合型ヒトIL-12遺伝子及び大腸菌 *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、T-hIL12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T-hIL12が直接水平感染する可能性は極めて低く、T-hIL12が環境中に拡散する可能性はきわめて低い。

T-hIL12はHSV-1ゲノム上の離れた4箇所（3つの遺伝子）に欠失変異が加えられているため、T-hIL12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、T-hIL12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

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).
2. Fukuhara, H. *et al.* Triple gene-deleted oncolytic herpes simplex virus vector double-armed with interleukin 18 and soluble B7-1 constructed by bacterial artificial chromosome-mediated system. *Cancer Res* 65: 10663-10668.2005.
3. Barahona, H. *et al.* The owl monkey (*Aotus trivirgatus*) as an animal model for viral diseases and oncologic studies. *Lab Anim Sci* 26: 1104-1112.1976.
4. 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* 10: 1225-1233.2003.
5. Lopez C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 258: 152-153.1975.
6. Grest, P. *et al.* Herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Comp Pathol* 126: 308-311.2002.
7. Huemer, H.P. *et al.* Fatal infection of a pet monkey with Human herpesvirus. *Emerg Infect Dis* 8: 639-642.2002.
8. Lefaux, B. *et al.* Nonhuman primates might be highly susceptible to cross-species infectivity by human alpha-herpesviruses. *Vet Pathol* 41: 302-304.2004.
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
10. Whitley, R. *et al.* Herpes simplex viruses: Is a vaccine tenable? *J Clin Invest* 110: 145-151.2002.
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.
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.
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.
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.
15. Hu, J.C. *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* 12: 6737-6747.2006.
16. Senzer, N.N. *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* 27: 5763-5771.2009.
 17. Andtbacka, R.H. *et al.* Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 33: 2780-2788.2015.
 18. Todo, T. *et al.* Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6396-6401.2001.
 19. 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.
 20. 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.
 21. Muylaert, I. *et al.* Contributions of nucleotide excision repair, DNA polymerase η , and homologous recombination to replication of UV-irradiated herpes simplex virus type 1. *J Biol Chem* 285: 13761-13768.2010.
 22. 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)
 23. Mori, I. *et al.* Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J Neurovirol* 11: 129-137.2005.
 24. 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.
 25. Whitley, R. *et al.* Herpes simplex virus infections of the central nervous system: therapeutic and diagnostic considerations. *Clin Infect Dis* 20: 414-420.1995.
 26. Harel, L. *et al.* Presence of viremia in patients with primary herpetic gingivostomatitis. *Clin Infect Dis* 39: 636-640.2004.
 27. 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)
 28. Biosafety Manual: Lawrence Berkeley National Laboratory.
 29. 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.
 30. 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>)
 31. Centers for Disease Control and Prevention ed., Guideline for hand hygiene in health-care settings: Morbidity and mortality weekly report (MMWR) 51 (2002)
 32. 大久保 憲 監修、消毒薬テキスト 新版：協和企画 (2005)
 33. 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)
34. Colombo, M.P. *et al.* Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 155-168.2002.
 35. Del Vecchio, M. *et al.* Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 13: 4677-4685.2007.
 36. Mineta, T. *et al.* Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1: 938-943.1995.
 37. Johnson, P.A. *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.
 38. Kuroda, T. *et al.* Flip-Flop HSV-BAC: bacterial artificial chromosome based system for rapid generation of recombinant herpes simplex virus vectors using two independent site-specific recombinases. *BMC Biotechnol* 6: 40.2006.
 39. Todo, T. *et al.* Viral shedding and biodistribution of G207, a multimutated, conditionally replicating herpes simplex virus type 1, after intracerebral inoculation in aotus. *Mol Ther* 2: 588-595.2000.
 40. Markert, J.M. *et al.* A phase 1 trial of oncolytic HSV-1, G207, given in combination with radiation for recurrent GBM demonstrates safety and radiographic responses. *Mol Ther* 22: 1048-1055.2014.
 41. DeBiasi, R.L. *et al.* Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 25 Suppl 1: S5-11.2002.
 42. Chou, J. *et al.* Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to $\gamma_134.5$, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 250: 1262-1266.1990.
 43. 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.
 44. 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.
 45. Cassady, K.A. *et al.* The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the $\gamma_134.5$ genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2 α . *J Virol* 72: 7005-7011.1998.
 46. 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.
 47. Sundaresan, P. *et al.* Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice. *J Virol* 74: 3832-3841.2000.
 48. Markert, J.M. *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.
49. http://www.biodic.go.jp/bch/download/lmo/H29.9.22_iyaku_ap1.pdf