6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

G47Δはウイルスゲノムに遺伝子操作が加えられた遺伝子組み換えHSV-1であり、ICP6、 γ 34.5、 α 47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。ICP6遺伝子 (ribonucleotide reductase (RR)の大サブユニットをコードする) および γ 34.5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。

γ 34.5はHSV-1の病原性に関連した遺伝子で、これを欠失させた変異株は正常細胞でのウイルス複製能が著しく減弱することが判明している (文献 29)。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質を含む細胞内での蛋白合成が遮断される。 γ 34.5遺伝子産物はリン酸化PKRに拮抗してウイルス蛋白質の合成を可能にするが、 γ 34.5遺伝子欠失HSV-1は正常細胞では複製を行えない。しかし、正常細胞とは異なり、腫瘍細胞では普遍的にPKRのリン酸化が低いため、 γ 34.5遺伝子欠失のHSV-1でも複製可能となると考えられている (文献 30)。

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。

一方、 α 47遺伝子を欠失したウイルスは感染細胞でのtransporter associated with antigen presentation (TAP)に拮抗する機能を失うため、感染細胞のMHCクラスIの発現が維持され、免疫系による認識を促進する。同時にゲノム上で重複して位置するUL11遺伝子の発現を早めることで、 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 (文献 2、24、31)。

ICP6領域には大腸菌LacZ cDNAが挿入されており、G47Δの感染した細胞内で一過性に発現される。

G47Δ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。腫瘍細胞でのみウイルス複製が可能であることから、自然界では伝搬・複製し得ない。

文献 29 : Chou, J. *et al.* Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to γ 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 250: 1262-1266 (1990)

文献 30 : Farassati, F. *et al.* Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nat Cell Biol* 3: 745-750 (2001)

文献 31 : Cassady, K. *et al.* The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the γ 134.5 genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2alpha. *J Virol.* 72: 7005-7011 (1998).

Ⅲ 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1 使用等の内容

治療施設におけるヒト遺伝子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

治療施設の所在地： 東京都文京区本郷 7-3-1

治療施設の名称： 東京大学医学部附属病院

(1) G47Δ溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の実験室内の冷凍庫に保管する。

(2)凍結状態のG47Δ溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2レベルの実験室（以下「P2実験室」という。）内の安全キャビネット内で行う。G47Δ希釈溶液の保管は、P2実験室内の保冷库または冷凍庫において行う。なお、G47Δ希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通して他の区域に運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(3) G47Δ溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理または70%イソプロパノール、70-90%エタノール、0.2%次亜塩素酸ナトリウム、10%ポビドンヨード、0.5～0.1%グルコン酸クロルヘキシジン及び0.2～0.05%塩化ベンザルコニウムなどの消毒薬（以下「消毒薬」という。）処理による。以下同じ。）を行った後、東京大学医学部附属病院で定められた医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。

(4) P2実験室内の安全キャビネット内でG47Δ希釈溶液を専用のシリンジに充填し、それを二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない手術室（以下「手術室」という。）に運搬する。

(5) 被験者に対するG47Δの投与は、手術室内において、被験者の腫瘍内にG47Δの入った緩衝液（以下「G47Δ液」という。）を定位脳手術により注入することによって行う。被験者の頭蓋骨に開けた直径約12mmの骨穴から、定位手術装置に装着した専用の注入針を刺入し、用手的に遅い速度でG47Δ液を注入する。注入後は注入針をそのままの位置で数分間保持した後、遅い速度で抜去する。特に脳表からの抜去は慎重に行ない、G47Δ液の漏出およびエアロゾル化を防止する。G47Δ液を予定量全て投与し注入針を抜去した後は速やかに閉創する。なお、頭部の周辺には布を二重に敷き詰める。

(6) 被験者へのG47Δの投与終了後、被験者の創部を消毒薬にて消毒してガーゼで覆い、さらに頭部をキャップで覆う。ウイルス漏出予防のためにマスクおよびガウンを着用した被

験者を手術室から、環境中の拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室の病室（以後、「個室」という。）に移送する。

(7) 上記(5)及び(6)で用いたシリンジなどの器具、布、ガーゼ類は、ウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルス不活化を他の区域で行なう場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。術後の当該手術室は床を消毒薬で拭き清掃する。なお、手術室内の空気は換気により約5分間に一回（1時間に約12回）入れ替わる。

(8) 投与後72時間まで、被験者を個室で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に手術室および個室から外の開放系区域に出る場合には、マスクおよびガウン着用などのウイルス漏出予防措置を義務づける。

(9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物は、ウイルス不活化を行なった後、一般の医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。研究用検体として使用する被験者の血液および尿の取り扱い、G47Δ液の取り扱いに準じる。

(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具および被験者の排泄物に接触した器具等は、ウイルスの不活化を行なった後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄または十分洗浄する。これらのウイルス不活化を他の区域で行なう場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液および尿中のG47Δが陰性であることを確認する。G47Δが確認されたときは、それが消失するまでの期間個室での管理を継続する。

(12) 個室における管理解除後に被験者の血液または尿中からG47Δが検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(8)～(10)までと同様の措置を執る。

(13) G47Δ脳内投与後G47Δが脳病巣内に存在していると推定される期間内に、病状の悪化等により、G47Δ投与目的以外の開頭手術等を行う場合には、(5)～(12)と同様の措置を執る。

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

被験者への投与後、別途規定のスケジュールに従い被験者の血液および尿のPCR法による検査を実施する。また、HSV-1感染症の発症の有無につき被験者の臨床症状を観察する。PCR法による検査結果が陽性の場合には、検出されたウイルスのゲノム構造を確認しG47Δ以外の組換えHSV-1の混在の有無を、また、感染性ウイルスの存在の有無を確認する。

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

遺伝子組換えウイルス投与後の被験者については、PCR法にて血液および尿中の遺伝子組換えウイルスの存在の有無を確認し、陽性の場合にはそれが消失するまで追跡する。

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

HSV-1に感受性のあるサル (*Aotus nancymae*) に、G47Δを作製する基となったG207(二重変異を有する遺伝子組換えHSV-1)を脳内に定位的に投与した非臨床試験において、野生型HSV-1 (strain F) は 1×10^3 pfuで脳炎を生じ投与後5日で死亡させたが、G207は 10^9 pfuでも毒性を示さなかった(文献26、32)。G207の脳内投与後(3×10^7 pfu)、1, 3, 7, 10, 14, 21, 31日めに唾液、涙、膺分泌液を採取し、ウイルス排出の有無が検証されたが、いずれの検体からも感染性ウイルスおよびG207のDNAは検出されなかった(文献26)。G207の脳内投与1ヶ月後(3×10^7 pfu) もしくは2年後(10^9 pfu) の解剖で採取した全身の組織検体からのPCRによるDNA残存の検索では、G207のDNAが中枢神経系(注入部位、同側の前頭葉、側頭葉、頭頂葉、脳幹、および対側の前頭葉)に限局して検出された(安全性試験の詳細は計画書添付資料5(2)12に記載)。BALB/cマウスにLD₅₀量の野生型HSV-1の脳内投与を行い、生き延びてHSV-1の潜伏感染を確立したマウスに、G207(1×10^7 pfu)を脳内投与しても潜在HSV-1の再活性化を誘発しなかった(文献33)。

文献32 : Hunter, W.D. *et al.* Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. *J Virol* 73: 6319-6326 (1999).

文献33 : Sundaresan, P *et al.* Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice. *J. Virol.* 74: 3832-3841 (2000).

6 国外における使用等により得られた情報

米国アラバマ大学バーミングハム校とジョージタウン大学医療センターにおいて、再発神経腫瘍を対象とし、腫瘍治療用に開発された第二世代遺伝子組換えHSV-1のG207を用いて再発悪性グリオーマ患者21例を対象に米国で第I相臨床試験が行われた(1998年～2000年)(文献8)。G207は定位脳手術により脳腫瘍内に単回投与され、 1×10^6 pfuから 3×10^9 pfuまで3例ずつ用量を増加した。ジョージタウン大学では通常の手術室を用いて他の患者と同様の扱いで手術が施行され、患者は通常の病室で管理された。G207投与後4日、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年の各時点で患者の唾液と血液が採取され、ウイルス排出の有無が検証されたが、いずれの検体からも感染性ウイルスおよびG207のDNAは検出されなかった。

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(文献9)。1716は定位脳手術により脳腫瘍内に単回投与され、 10^3 pfuから 10^5 pfuまで3例ずつ用量を増加した。投与後2日目、6日目、その後4週間まで週1回、血清と口腔粘膜を採取しウイルス排出検査を行ったところ、感染性のHSV-1はいずれの患者からも検出されなかった。またヘルペスウイルス感染症の皮膚症状も見られなかった。次に行われたproof of principle (POP)試験では、再発悪性グリオーマ12例に対して定位脳手術により 10^5 pfuを脳腫瘍内に単回投与し、その4-9日後に腫瘍摘出を行ってウイルス複製の有無について解析した(文献10)。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。

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野生動植物等の特定

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同一と考えられ、微生物に感染するとの報告はない。また、G47Δは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。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よるかぎり、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

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同一と考えられるので、自然宿主はヒトのみである。さらに、腫瘍細胞でのみウイルス複製が可能であることから、自然界では伝搬・複製し得ない。なお、実験室内で用いられる一部の系統のマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルは感受性があり、G47Δの感染が起こる。

(2) 影響の具体的内容の評価

G47Δは投与されたヒトの腫瘍細胞に局限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。欧米において遺伝子組換えHSV-1を用いたウイルス療法の臨床試験が複数完了した進行中であるが、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(文献8-13)。G47Δにはウイルス複製を検出するために大腸菌LacZ遺伝子cDNAが挿入されており、G47Δが複製する腫瘍細胞に導入され、一過性に発現される。LacZ遺伝子からの生成物であるβ-ガラクトシダーゼは人体に対し毒性や病原性を有しない。LacZ遺伝子を発現する第二世代複製型遺伝子組換えHSV-1であるG207が第I相臨床試

験において人の脳内（脳腫瘍内）に投与されており、LacZ遺伝子生成物の安全性は示されている。G47Δに加えられた遺伝子変異はHSV-1ゲノム上の離れた4箇所（3つの遺伝子）に位置しているため、G47Δ由来の遺伝子組換え生物に該当する野生型復元HSV-1が自然に生じる可能性も無に等しい。

(3) 影響の生じやすさの評価

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、G47Δの環境中への拡散は防止され、また自然界においてG47Δが伝搬・複製し得ないことから、G47Δが被験者以外に病原性を示す可能性は極めて低いと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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よるかぎり、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等の特定

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

(2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず。)

(3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず。)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、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

G47Δの感染性は野生型HSV-1と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである。実験室内では、感受性のある一部のマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルを用いた感染実験が報告されており、ワクチンや遺伝子組換えHSV-1の安全性評価に試用されている。

(2) 影響の具体的内容の評価

G47Δの投与を受けたヒトでは、腫瘍内に限局して複製したG47Δが生じるが、これは体外へ排泄される可能性は極めて低く、また腫瘍細胞以外でのウイルス複製能を有さず、これによる他の哺乳類への核酸の水平伝達は知られていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

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

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、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

G47Δが感染する動植物等の種類は野生型HSV-1と同等で、ヒトを自然宿主とし、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。

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かぎり、G47Δの環境中への拡散は防止される。G47ΔによるLacZ遺伝子の一過性発現はヒトに病原性をもたないので、ヒトに対する影響はないと考えられる。

さらに、G47Δは腫瘍細胞に限って複製することが可能で、正常細胞でのウイルス複製能を失っているため、自然界で伝播し増えることができない。環境中の別個体のヒトの腫瘍細胞にG47Δが直接水平感染する可能性は極めて低く、G47Δが環境中に拡散する可能性は無に等しい。

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

従って、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、G47Δによる生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。