

マウス脳内に形成された U87MG ヒトグリオーマや Neuro2a マウス神経芽細胞腫に対し、それぞれ 1×10^6 pfu 単回および 2×10^5 pfu 2 回の腫瘍内投与を行うと、G47 Δ は G207 に比べ生存期間を延長した。U87MG 対照群の生存期間中央値が 27 日であったのに対し、G207 治療群は 36 日、G47 Δ 治療群は 42 日と有意に生存期間を延長した。Neuro2a においては対照群の生存期間中央値が 11 日であったのに対し、G207 治療群は 14 日、G47 Δ 治療群は 15 日と生存期間を延長する傾向が見られた。

7) マウス乳癌モデルにおける抗腫瘍効果：

マウス乳癌細胞株 M6c の皮下腫瘍および脳内移植腫瘍のモデルにおいて、それぞれ 2×10^7 pfu の 4 回腫瘍内投与および 2×10^6 pfu の単回腫瘍内投与を施行したところ、G47 Δ は G207 に比し有意に優れた抗腫瘍効果を示した^{22, 23)}。また、ヒト乳癌 MDA-MB-435 の脳内移植腫瘍に対して血液脳関門開放薬剤との併用で 1×10^7 pfu 単回の頸動脈内投与を行ったところ、対照群の生存期間中央値が 12.9 日であったのに対し、G47 Δ 治療群は 17.4 日と有意に生存期間を延長した。乳癌を自然発生する C3(1)/T-Ag マウスモデルにおいて、 2×10^7 pfu の G47 Δ を毎週 1 回腫瘍内に投与したところ、対照群の生存期間中央値が 5.5 週であったのに対し、G47 Δ 治療群は 8.5 週と有意に優れた抗腫瘍効果を示した^{22, 23)}。

8) マウス神経線維腫モデルにおける抗腫瘍効果：

マウス神経線維腫症 2 型(NF2)の自然発生腫瘍モデル P0-Sch Δ (39-121) line 27 において腫瘍の大きさを経時的に MRI にて観察したところ、 1×10^7 pfu の 6 日おき 2 回の G47 Δ 腫瘍内投与にて腫瘍増殖が抑制される傾向が見られた。またヌードマウス皮下で継代した NF2 患者由来のヒト神経鞘腫において、 1×10^7 pfu の 6 日おき 2 回の G47 Δ 腫瘍内投与を行なうと、腫瘍縮小効果が見られた²⁴⁾。

9) G207 を用いた調査

G207 は、ヒトグリオーマ及び悪性髄膜腫細胞株に対し高い殺細胞効果を示し、*in vitro* では MOI 0.1 で 3~6 日以内に腫瘍細胞を全滅させる。一方、同じ投与量でラットの初代培養の神経細胞や星状細胞には影響を及ぼさない。この効果は *in vivo* にも反映され、ヌードマウスの頭蓋内に形成された U87MG グリオーマや F5 悪性髄膜腫に G207 ($2\sim 5 \times 10^6$ pfu) を 1 回腫瘍内投与すると有意に生存期間が延長する²⁴⁾。G207 は現在までに 60 種以上の細胞株で試され、脳腫瘍に限らず、多種のヒトの腫瘍に (血液腫瘍を除く)有効であることが確かめられている。

正常免疫下における G207 の抗腫瘍効果は、A/J マウス及び同系の N18 (神経芽細胞腫)細胞や Neuro2a (神経芽細胞腫)細胞の脳腫瘍および皮下腫瘍モデル、および BALB/c マウスの CT26 (大腸癌)皮下腫瘍モデルで調べられた。その結果、G207 は正常免疫下においても高い抗腫瘍効果を呈するのみならず、腫瘍内投与により特異的抗腫瘍免疫を惹

起するため、抗腫瘍効果が増強されることが示された。この抗腫瘍免疫は腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞活性 (CTL) の上昇を伴い、脳内と皮下のいずれでも効果を示した²⁵⁾。同じマウス腫瘍モデルでステロイド投与の影響を調べたところ、免疫抑制下においても腫瘍内のウイルス複製に変化はなく、基本的な抗腫瘍効果に影響は無かったが、ステロイド長期投与では CTL 活性の抑制に伴い、腫瘍の治癒率が減少した。また、成人の 60～70%は HSV-1 に対する抗体を保有するが、予め非致死量の HSV-1 を投与して抗体を形成させたマウスで調べた結果、G207 の抗腫瘍効果は血中の抗 HSV-1 抗体には全く影響されなかった²⁶⁾。

6. 安全性についての評価

(1) 遺伝子導入方法の安全性

① 遺伝子導入方法の安全性

G47Δの投与は脳腫瘍の生検などを目的に一般に用いられる、通常的定位脳手術の手法で行われる。遺伝子組換え HSV-1 の定位脳手術による脳腫瘍内投与法は、G207 の第 I 相臨床試験 (米国) でも採用され、G207 に起因する grade 3 以上の有害事象は観察されず、安全性が確認されている。

② 遺伝子導入に用いる G47Δの純度

臨床研究に使用される G47Δ製剤は、cGMP 準拠の管理施設である東京大学医科学研究所治療ベクター開発室において cGMP 生産される。製造は、東京大学大学院医学系研究科・TR センター (脳神経外科)・藤堂 具紀を責任者とし、東京大学医学部脳神経外科が行なう。正しい変異を有することが確認された G47Δを用い、WHO Vero 細胞のマスターセルバンクを用いて臨床製剤は作製される。G47Δ製剤は 10%のグリセリンを含む磷酸緩衝液(Phosphate-buffered Saline: PBS) 内に浮遊している。これらの物質はいずれも純度および安全性に問題のないものを用いることとする。

これらは臨床製剤生産の 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、およびチューブに分注後の製剤において、英国 BioReliance 社に委託して品質試験を施行する。精製前のウイルス回収液 (バルクハーベスト) において最も重点的な試験を行なう。ろ過と遠心による精製、およびチューブへの分注過程では細胞成分および動物由来の試薬を使用しておらず、各種ウイルスの混入の可能性は極めて少ないと考えられ、この 2 工程においては無菌試験およびエンドトキシン試験のみを行う。

品質試験項目を以下に記載する。その概要およびすでに得られている結果については添付資料 5 (2) 7 に記載する。

A. Vero 細胞のマスターセルバンクの品質管理試験

無菌・真菌否定試験

マイコプラズマ否定試験

- 透過型電子顕微鏡によるウイルス粒子の評価
- レトロウイルス否定試験（FPERT：逆転写酵素活性）
- ウイルス存在否定 *in vitro* 試験
- ウイルス存在否定 *in vivo* 試験
- SIV ウイルス 検出 PCR 試験
- アインザイムによる細胞確認試験
- ウシ由来ウイルス存在否定 *in vitro* 試験
- ブタ由来ウイルス存在否定 *in vitro* 試験
- サルD型レトロウイルス 検出 PCR 試験
- STLV ウイルス 検出 PCR 試験
- サル Spuma ウイルス 検出 PCR 試験
- HIV-I・HIV-II 検出 PCR 試験
- HTLV-I・HTLV-II 検出 PCR 試験
- B. G47Δ精製前のウイルス回収液（バルクハーベスト）の品質管理試験
 - 無菌・真菌否定試験
 - マイコプラズマ否定試験
 - 電子顕微鏡によるウイルス粒子の評価
 - ヒトウイルス検出定量的 PCR 試験
 - SIV ウイルス 検出 PCR 試験
 - STLV ウイルス 検出 PCR 試験
 - サルD型レトロウイルス 検出 PCR 試験
 - サル Spuma ウイルス 検出 PCR 試験
 - レトロウイルス否定試験（FPERT：逆転写酵素活性）
 - ウシ由来ウイルス検出 PCR 試験
 - ブタ由来ウイルス検出 PCR 試験
- C. 精製後の G47Δウイルス液の品質管理試験
 - 無菌・真菌否定試験
 - エンドトキシン試験（Limulus Amebocyte Lysate（LAL）法）
- D. G47Δ最終製品の品質管理試験
 - 無菌・真菌否定試験
 - エンドトキシン試験（Limulus Amebocyte Lysate（LAL）法）
- E. 東京大学脳神経外科で行なう品質管理試験
 - 力価測定試験
 - 野生型 HSV-1 ウイルス混入否定試験
 - Benzonase 定量

③ 被験者に投与する物質の純度およびその安全性

臨床研究用 G47Δ製剤は、cGMP 生産され、10% グリセリン/リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS)の懸濁液として、滅菌状態で凍結用バイアルに分注され、-75℃以下で凍結保存される。使用する培地、血清、試薬等は全て cGMP 規格に準拠しており、医薬品、医薬品原料、またはそれに準じている。ウシ血清についてはオーストラリア産でウイルスなどの病原体の混入がなく、さらにガンマ線照射されたものを使用する。

④ 増殖性ウイルスの出現の可能性

G47Δ自体が複製可能型であるが、前述の通り、複数の機序を介して、そのウイルス複製は、高い特異性をもって腫瘍細胞に限られる。G47Δは、ウイルスゲノム上、間隔の離れた4箇所の人為的変異を有することから、野生型 HSV-1 に戻る(revert)可能性はゼロに等しい。野生型 HSV-1 が既に脳に潜伏している状態で脳内に複製型遺伝子組換え HSV-1 を投与した場合の、潜伏野生型 HSV-1 の活動を誘発する可能性 (reactivation) については、二重変異複製型遺伝子組換え HSV-1 G207 を用いてマウスで調査されており、潜伏野生型 HSV-1 の活動を誘発しないことが実証された。

上記②および添付資料5(2)7に記載のように、G47Δ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英国 BioReliance 社に委託して行なう。また、最終製剤中の G47Δ以外の組換え HSV-1 の混入の有無については、LacZ 挿入部位の外側に設計したプライマーを用いた PCR を行い、野生型に由来する長さの DNA 断片が増幅されないことを検証する。

⑤ 遺伝子導入に用いる G47Δの細胞傷害性

A/J マウスや BALB/c マウスは、HSV-1 に感受性の高いマウス系として知られる²⁷⁾。三重変異を有する第三世代複製型遺伝子組換え HSV-1 G47Δは、臨床応用を目的に安全性を主眼に開発された第二世代複製型遺伝子組換え HSV-1 G207 の二重変異ウイルスゲノムに更に遺伝子工学的に変異を加えて作製された、G207 の改良型である。A/J マウスを用いて、G47Δ (2×10^6 pfu) の脳内単回投与の安全性を、野生型 HSV-1 (strain F; 2×10^3 pfu) および G207 の可能最高投与量 (2×10^6 pfu) を対照として盲検法で比較した¹⁾。野生型 HSV-1 は10匹全て死亡したのに対し、G207 は2/8匹が一過性の軽度の外観異常、G47Δは1/10匹が一過性の軽度の外観異常を呈したに過ぎず、脳内単回投与において G47Δが G207 と同等以上の安全性を有していること、野生型 HSV-1 の少なくとも1000倍以上安全であることが示された(添付資料5(2)12-1)。

更に A/J マウスを用い、G47Δの脳内単回投与、静脈内単回投与、腹腔内単回投与の安全性を、野生型 HSV-1 (strain F) を対照に、繰り返し徹底的に調査した。脳内単回投与

では、野生型 HSV-1 (2×10^3 pfu)で 29/30 匹が死亡したのに対し、G47 Δ ではその 1000 倍量 (2×10^6 pfu) で 30 匹全て、2500 倍量 (5×10^6 pfu) で 29/30 匹が生存した。静脈内単回投与では、野生型 HSV-1 は 1×10^5 pfu で 11/15 匹、 1×10^6 pfu で 22/25 匹、 1×10^7 pfu で 6/10 匹が死亡したのに対し、G47 Δ は 1×10^7 pfu で 10 匹全て、 4×10^7 pfu で 15 匹全て、 2×10^8 pfu で 19/25 匹が生存した。腹腔内単回投与では、野生型 HSV-1 は、 2×10^4 pfu で 2/25 匹、 2×10^5 pfu で 2/25 匹、 2×10^6 pfu で 3/10 匹が死亡したのに対し、G47 Δ は試験に用いた 60 匹全てが生存した (1×10^7 pfu が 5 匹、 3×10^7 pfu が 25 匹、 1×10^8 pfu が 20 匹、 3×10^8 pfu が 10 匹)。以上より、脳内単回投与では、G47 Δ は野生型 HSV-1 に比べ 1000 倍以上の安全性を示すことが再確認された。また、静脈内単回投与や腹腔内単回投与では、野生型 HSV-1 でも全例死亡するほどの毒性を呈するに至らなかったが、死亡例が出始める最低投与量を比較すると、いずれの投与経路においても、G47 Δ は野生型 HSV-1 に比べ、少なくとも 1000 倍以上の安全性を呈することが示された。

G47 Δ は G207 の改良型ウイルスであり、G47 Δ は A/J マウスに対する脳内単回投与で G207 と同等以上の安全性を示すことが確認されている。G207 に関しても、動物を用いた徹底的な安全性評価が行われている。BALB/c マウスの脳内または脳室内単回投与では最高量 1×10^7 pfu で何の症状も認めず、LD₅₀ 量の野生型 HSV-1 の脳内単回投与を生き延びた BALB/c マウスの脳に再度 G207(1×10^7 pfu)を投与しても潜在 HSV-1 の再活動を誘発しなかった²⁸⁾。また、ヨザル (*Aotus nancymae* (owl monkey)) は HSV-1 に感受性が高い霊長類として知られており、合計 22 匹が G207 の安全性評価に用いられた^{10, 29)}。ヨザルの脳に野生型 HSV-1 (strain F)を 10^3 pfu 単回投与すると脳炎を生じて 5 日以内に死亡するが、G207 では 10^9 pfu までの単回投与或いは 10^7 pfu の反復投与でも症状を呈さず、MRI や病理学上も異常を示さなかった¹⁰⁾ (添付資料 5(2)12-3)。カラムで精製した臨床用 (clinical grade) の G207 の安全性は 4 匹のサルで詳細に検討され、 3×10^7 pfu が脳内に単回投与された²⁹⁾。観察期間中、サルは全く無症状の上、1, 3, 7, 10, 14, 21, 31 日目に唾液、涙、膈分泌液を採取し、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。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は、いずれも感染性ウイルスが検出されず、PCR により G207 の DNA が中枢神経系に限局して検出された。(添付資料 5(2)12-2)。また、全例で血清抗 HSV-1 抗体が G207 脳内投与約 3 週間後より上昇した。ヨザルを用いた安全性評価の結果は、マウスを用いた安全性評価の結果を再確認した。

米国アラバマ大学バーミングサ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)³⁰⁾。一投与量ごとに 3 例ずつ、 1×10^6 pfu から 3 倍ずつ投与量を増やして 3×10^9 pfu まで、増強 CT の増強部位に定位脳手術により腫瘍内に単回投与された。その結果、

G207 に起因する grade 3 以上の有害事象は認めず、軽度の adverse events として痙攣発作 2 例、脳浮腫 1 例を認めた。1 例 (3×10^8 pfu) が投与後 24 時間以内に見当識障害と構語障害を呈したが、投与 14 日後の定位的生検は腫瘍所見のみで炎症を認めず、HSV 免疫染色も陰性であった。投与 3 ヶ月以上後の、腫瘍増大では説明できない神経症状悪化が 2 例あったが、いずれも生検で HSV 免疫染色が陰性であった。生検或いは再摘出術で得られた腫瘍組織 7 例中 2 例で PCR にて G207 DNA が検出された(投与後 56 日と 157 日)。G207 投与後、Karnofsky スコアの改善が 6 例 (29%) に認められた。経時的 MRI 評価を行った 20 例中 8 例に腫瘍の縮小を認めたが、脳梗塞で死亡した 1 例を除いた全例にて再増大を認めた。ステロイド投与にも関わらず、術前抗 HSV-1 抗体が陰性であった 5 例中 1 例に陽転を認めた。剖検が 5 例で行われ、脳病理はいずれも脳炎や白質変性を認めず、HSV-1 免疫染色陰性であった。3 例にて腫瘍が脳の 1 領域に局限し、膠芽腫に通常見られるような腫瘍細胞の周囲脳組織への著明な浸潤を認めなかった。脳梗塞で死亡した 1 例では残存腫瘍を認めなかった。この臨床試験で、G207 の 3×10^9 pfu までの脳内投与の安全性が確認された。

⑥ 体内の標的細胞以外の細胞へ、また被験者以外の人への遺伝子導入の可能性

本臨床研究はウイルス (G47Δ) のみの腫瘍内投与を行い、治療遺伝子の導入はない。G47Δは、ウイルス複製に関して腫瘍細胞に高い特異性を有し、腫瘍細胞以外では複製不能である。また、そのため自然界で増殖拡散し得ない。G207 の第 I 相臨床試験では、G207 の腫瘍内単回投与後 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³⁰⁾。またヨザルを用いた非臨床試験では、G207 の脳内単回投与後 (3×10^7 pfu)、1, 3, 7, 10, 14, 21, 31 日目に唾液、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。G207 の脳内単回投与 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は、中枢神経系を含めいずれも感染性ウイルスは検出されなかった。また 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、および対側前頭葉)に局限して検出された (添付資料 5(2)12-2)²⁹⁾。

⑦ 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

HSV-1 のウイルスゲノムまたは遺伝子は宿主の染色体には組み込まれない。

⑧ がん原性の有無

HSV-1 のウイルスゲノムまたは遺伝子は宿主の染色体には組み込まれず、HSV-1 にがん原性はない。遺伝子組換え HSV-1 を原因とするがんの発生は、臨床試験、非臨床試験い

ずれでも報告されていない。

(2) 遺伝子産物の安全性

G47Δは直接的な殺細胞作用により腫瘍細胞を破壊し、治療遺伝子を発現しない。「6章 遺伝子の種類および導入方法 (1)③導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性」の項に既述のように、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る。LacZ 遺伝子からの生成物はβ-ガラクトシダーゼである。β-ガラクトシダーゼは分子量 116 kDa で四量体として機能し、ラクトースを分解してグルコースとガラクトースを生成する。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。「7章 安全性についての評価 (1)⑤ 遺伝子導入に用いる G47Δの細胞傷害性」に後述の如く、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。

(3) 細胞の安全性

① 培養細胞の純度

G47Δウイルスはマスターウイルスストックを Vero 細胞(アフリカミドリザル由来腎細胞株)に感染させて作製する。Vero 細胞のマスターセルバンクは、ワクチン製造用に WHO で唯一認定されている Vero 細胞の Seed lot 10-87 (WHO Vero) をもとに構築され、英国 BioReliance 社において無菌性、病原性ウイルス混入の否定、他種細胞の混入の否定などに関して品質試験を行う。品質試験項目とその概要およびすでに得られている結果については添付資料 5 (2) 7 に記載する。

② 培養細胞の遺伝子型、表現型の安全性

マスターセルバンクの Vero 細胞については英国 BioReliance 社において品質試験を行う。G47Δウイルス作製にはマスターセルバンクからの継代数が低い Vero 細胞を用い、表現型は安定している。品質試験項目とその概要およびすでに得られている結果については添付資料 5 (2) 7 に記載する。

③ 被験者に投与する細胞の安全性

本臨床研究では被験者にはこの Vero 細胞は投与されない。G47Δの精製の過程でこの Vero 細胞は破碎、除去される。

7. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由

初期放射線治療後に進行または再発した膠芽腫に対して、確立された有効な治療法はなく、新しい治療法が必要とされる。培養細胞およびマウスを用いた前臨床研究では、G47Δ

の抗腫瘍効果と、安全性が示されている。複製型遺伝子組換え HSV-1 の G207 を用い、膠芽腫を対象とした第 I 相臨床試験が海外で行なわれており、その安全性が示されている。本臨床研究の遂行には、遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスの取り扱いや、悪性脳腫瘍診療、定位脳手術に精通した者による実施が必要である。当施設はこの条件を満たす研究チームが存在し、かつ実施に必要な設備を有している。以上から、本遺伝子治療臨床研究の実施は理論的にも、実質的にも可能であると判断される。