

平成 24 年 7 月 13 日

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
法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性
影響評価に関する作業委員会

委員長 小澤 敬也

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（平成 15 年法律第 97 号）に基づき申請のあった下記の遺伝子組換え生物等の第一種使用規程について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙 1 のとおりとりまとめたので報告いたします。

なお、本作業委員会においては、とくにウイルスのモニタリングに関して慎重な審議が行われましたので、その概要を別紙 2 のとおり報告いたします。

記

1. 大腸菌 LacZ 遺伝子を発現し、 γ 34.5 遺伝子・ICP6 遺伝子・ α 47 遺伝子を不活化された制限増殖型遺伝子組換えヒト単純ヘルペスウイルス 1 型(G47 Δ)

申請者：東京大学医学部附属病院 病院長 門脇 孝

申請日：平成 23 年 9 月 22 日

【作業委員会の評価結果（東京大学医学部附属病院）】

1.大腸菌 LacZ 遺伝子を発現し、 γ 34.5 遺伝子・ICP6 遺伝子・ α 47 遺伝子を不活化された制限増殖型遺伝子組換えヒト単純ヘルペスウイルス 1 型(G47 Δ)
第一種使用等の内容：治療施設における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
申請者：東京大学医学部附属病院 病院長 門脇 孝
(1) 生物多様性影響評価の結果について ① 他の微生物を減少させる性質 申請されている第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、G47Δ の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしてもその量は微量と考えられる。 さらに、G47Δ は制限増殖型であり、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・複製することはない。 したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、G47Δ は環境中に拡散したとしても比較的早期に消滅すると考えられる。 G47Δ が感染する動植物等の種類は野生型ヒト単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)と同等で、HSV-1 が微生物に感染するとの報告はない。大腸菌 LacZ 遺伝子を発現すること及び制限増殖型であること以外は、その他の特性についても G47Δ は野生型 HSV-1 と同等と考えられ、G47Δ が競合や有害物質の産生により他の微生物を減少させる性質はないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。 ② 病原性 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、自然界で他の哺乳動物、植物及び微生物に感染するとの報告はない。さらに、腫瘍細胞でのみウイルス複製が可能であり、自然界では伝搬・複製し得ず、ヒト正常組織に対しても病原性はない。 一方、これまで欧米で遺伝子組換え HSV-1 が臨床試験に使用されているが、環境への悪影響及び野生型 HSV-1 を超える病原性を示したとする報告はない。G47Δ が感染した腫瘍細胞では LacZ 遺伝子が一過性に発現するが、LacZ 遺伝子からの生成物である β-ガラクトシダーゼが人体に対し毒性や病原性を有するという報告はない。 G47Δ の遺伝子変異は 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。 したがって、G47Δ は野生型 HSV-1 を超える病原性は示さないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。 ③ 有害物質の産生性 G47Δ の有害物質の産生性は知られておらず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。 ④ 核酸を水平伝達する性質 G47Δ の感染性は野生型 HSV-1 と同等で、自然界で感染する対象はヒトのみである。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いるが、G47Δ は正常細胞でのウイルス複製能を失っているため、自然界では伝搬・複製することはない。 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、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、環境中への拡散は極力抑えられている。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と考えられる。 G47Δ の遺伝子変異は 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。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。 (2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論 以上を踏まえ、G47Δ を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

作業委員会における審議の概要
(ウイルスのモニタリングに関して)

(1) 審議の経緯

本作業委員会は、以下の2回の会合を開催して審議を行った。

第1回：平成24年1月13日(金) 19:00～19:45

第2回：平成24年3月27日(火) 18:55～20:00

また、各会合の前後においても、各委員より申請者に対して意見・照会事項を送付し、申請者よりそれに対する回答を得るなどした。

(2) 本作業委員会における意見

- 本件第一種使用規程の申請に係る遺伝子組換え生物 (G47Δ) は、腫瘍選択的に増殖するウイルスである。

そのため、投与後腫瘍細胞内において増殖したウイルスが血液、尿中等に移行することにより、セカンドピーク (投与後いったん減少した血液、尿中等のウイルスが再び増加すること) が検出される可能性がある。とくに、本遺伝子治療臨床研究では前立腺腫瘍内に投与されるため、尿中にセカンドピークが検出される可能性は否定できない (なお、G47Δを前立腺腫瘍内に投与する臨床試験はこれまで実施されていない。)

- このため、投与後の血液、尿中等のウイルスのモニタリングについては、セカンドピークを考慮した適切な手法 (期間、頻度) を検討する必要がある。
- もっとも、第一種使用は、遺伝子組換え生物等が環境中に拡散することを前提とし、その場合であっても生物多様性影響が生ずるおそれがないことを確認して使用するものであるから、必ずしも厳格なモニタリングを行う必要はないとも考えられる。

しかしながら、第一種使用の場合であっても遺伝子組換え生物等の環境中への拡散はなるべく低減することが望ましいこと、また、G47Δの腫瘍選択的な増殖性を確認する上でもウイルスの体内動態データを収集することは意味があることから、一定のデータが蓄積されるまでの間は、ウイルスの体内動態等の評価を目的とした継続的なモニタリングを行うことを検討すべきである。

- なお、上記のとおり、第一種使用は、遺伝子組換え生物等が環境中に拡散することを前提とした使用であるから、仮に上記の継続的なモニタリング中に血液、尿中等からウイルスが検出されたとしても、直ちに患者を個室管理に移す必要はないものと考えられる。

(3) 申請者の対応

- 上記の意見を受け、ウイルスの体内動態等の評価を目的とした継続的なモニタリング及び患者の個室管理について、第一種使用規程等の見直しが行われた。

厚生科学審議会科学技術部会
 遺伝子治療臨床研究作業委員会に係る
 生物多様性影響評価に関する作業委員会 委員名簿

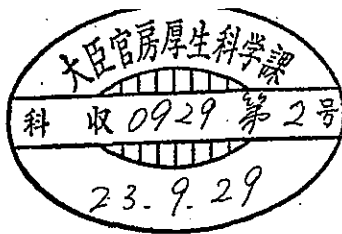
【東京大学医学部附属病院】

「ホルモン療法抵抗性再燃前立腺癌に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスG47Δを用いたウイルス療法の臨床研究」

○

氏 名	所 属
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	(独)国立環境研究所 主任研究員
おざわ けいや 小澤 敬也	自治医科大学 医学部教授
かんだ ただひと 神田 忠仁	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
はやかわ たかお 早川 堯夫	近畿大学 薬学総合研究所所長
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

○：委員長（五十音順 敬称略）



第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 9 月 22 日

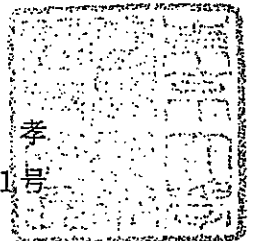
厚生労働大臣 殿

環境大臣 殿

申請者 氏名 東京大学医学部附属病院

病院長 門脇 孝

住所 東京都文京区本郷 7 丁目 3 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	大腸菌 LacZ 遺伝子を発現し、 γ 34.5 遺伝子、ICP6 遺伝子及び α 47 遺伝子を不活化された制限増殖型遺伝子組換えヒト単純ヘルペスウイルス 1 型 (G47 Δ)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	治療施設における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	治療施設の所在地 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 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、当該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、当該施設内の P 2 レベルの拡散防止措置を執ることができる実験室（以下「P 2 実験室」という。）内の安全キャビネット内において行う。G47Δ 希釈溶液の保管は、P 2 実験室内の保冷库又は冷凍庫において行う。 なお、G47Δ 溶液若しくはその凍結品又は G47Δ 希釈溶液若しくはその凍結品を、開放系区域を通して運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。 (3) G47Δ 溶液又は G47Δ 希釈溶液を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は 70% イソプロパノール、70% から 90% までのエタノール、0.2% 次亜塩素酸ナトリウム、10% ポビドンヨード、0.1% から 0.5% までのグルコン酸クロルヘキシジン及び 0.05% から 0.2% までの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（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。 (4) 被験者に対する G47Δ の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った手術室（以下「手術室」という。）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。）を経直腸超音波ガイド下に会陰部で経皮的に注入することにより行う。被験者の経直腸的に超音波を挿入し、超音波の画像をガイドにしながら、会陰部で経皮的に注入針を刺入し、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。特に皮膚からの抜去は慎重に行い、G47Δ 液の漏出及びエアロゾル化を防止する。 (5) 被験者への G47Δ の投与終了後、被験者の創部を消毒薬により消毒してガーゼで覆う。被験者を手術室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室の病室（以下「個室」という。）に移送する。 (6) 上記 (4) 及び (5) で用いた注射器などの器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化を行い、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個室以外の区域で行う場合には、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。

	(7) 投与後 72 時間まで、被験者を個室内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に手術室及び個室から開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留める。 (8) 個室における管理期間中の被験者の尿及び糞便等の排泄物は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、研究用検体として使用する被験者の血液及び尿の取扱いは、G47Δ 溶液及び G47Δ 希釈溶液の取扱いに準じる。 (9) 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等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。 なお、これらのウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。 (10) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液及び尿中の G47Δ が陰性であることを確認する。 なお、G47Δ が確認されたときは、それが消失するまでの期間、個室における管理を継続する。 (11) 個室における管理解除後に被験者の血液又は尿中から G47Δ が検出された場合には、被験者を個室における管理下に移す必要性について検討する。 なお、必要と判断された場合は、上記(7)から(10)までと同様の措置を執る。
--	--

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に分類されている。これまでに分離されたウイルスは、I型(HSV-1)とII型(HSV-2)の二つであり(文献1)、G47Δは単純ヘルペスウイルスI型(HSV-1)から作製された(文献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(文献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)。

文献1: Whitley, R. Herpes simplex viruses. In *Fields' Virology*, 4th edn, ed. Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed. pp2461-2509, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001).

文献2: Todo, T. *et al.* Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6396-6401 (2001).

文献3: Lopez, C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 258: 152-153(1975)

文献4: Barahona, H. *et al.*, The owl monkey (*Aotus trivirgatus*) as an animal model for viral diseases and oncologic studies. *Lab Anim Sci.* 6: 1104-1112 (1976).

文献5: 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.* 15: 1225-1233 (2003).

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(文献1、6、7)。また近年、米国および英国においてHSV-1に由来する種々の遺伝子組換えウイルスが、また国内において自然変異型の弱毒ウイルスが、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(文献8-13)。

文献6: 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

文献7: Whitley, R. *et al.* Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest* 110: 145-151.2002.

文献8: 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).

文献9: 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).
- 文献 1 0 : 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).
- 文献 1 1 : 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).
- 文献 1 2 : 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).
- 文献 1 3 : 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).

3 生理・生態学的特性 (文献 1)

(1) 基本的特性

単純ヘルペスウイルス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。

(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、ヒトの細胞および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。粘膜表面の直接の接触による感染を主な感染経路とし、外界および室温では不安定である。飛沫感染は起こらない。

(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、ウイルスは皮膚粘膜（通常は口唇）で顕在化し、水疱を形成する(文献 1 4)。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(文献 1 5)。

(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(文献 1 6)、欧米では年間20万人に1人(文献 1 7、1 8)である。発癌性はない。免疫不全や新生児など特殊な条件下を除くと、HSV-1はウイ

ルス血症を生じることがなく、初期感染後全身に分布しない。

(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（文献19）。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（文献14）。HSV-1を速やかに不活化する消毒薬（chemical disinfectants）は以下のものを含む：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、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、など（文献14、20-23）。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(15分間)、pH4以下で速やかに感染性を失う。

文献14：Biosafety Manual: Lawrence Berkeley National Laboratory

(http://www.lbl.gov/ehs/biosafety/Biosafety_Manual/html/decontamination.shtml).

文献15：Mori, I. *et al.* Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J Neurovirol* 11: 129-137 (2005).

文献16：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).

文献17：Whitley, R. *et al.* Herpes simplex virus infections of the central nervous system: therapeutic and diagnostic considerations. *Clin Infect Dis* 20: 414-420 (1995)

文献18：Wald, A. *et al.* Persistence in the population: epidemiology, transmission. In *Human Herpesviruses*. Arvin A. *et al.* eds., pp659-671, Cambridge University Press, Cambridge (2007)

文献19：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)

文献20：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)

文献21：Material safety data sheet- infectious substances: Public health agency of Canada (<http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds80e.html>.)

文献22：Centers for Disease Control and Prevention ed., Guideline for hand hygiene in health-care settings: Morbidity and mortality weekly report (MMWR) 51 (2002)

文献23：大久保 憲 監修、消毒薬テキスト 新版：協和企画 (2005)

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

大腸菌(略称 E.Coli) LacZ (3kb) cDNAを宿主に導入した(Gene bank Accession Number:V00296)。(供与核酸の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は別紙1、2参照)

(2) 構成要素の機能

導入されたLacZ遺伝子は宿主のICP6プロモーターにより発現される。LacZ遺伝子にコードされる大腸菌beta galactosidaseは基質X-galを加水分解し青色の沈殿物とする。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によって、G47Δの感染性が野生型HSV-1から変わることはないと考えられる。なお、LacZ遺伝子の挿入により宿主のICP6遺伝子は不活化され、G47Δの複製を腫瘍細胞選択的とする機序の一つを担っている。

2 ウイルスに関する情報

(1) 名称及び由来

G47Δは、HSV-1 F株由来の二重変異遺伝子組換えHSV-1 G207 (文献24) から、pIE12Δプラズミドを用いて相同遺伝子組換えで作製された。pIE12Δは、HSV-1のα47遺伝子を含むBamHI x フラグメントのうちBamHI-EcoRI の1818 bpを有するpIE12プラズミド (文献25) から、α47遺伝子領域の312 bp (BstEII-EcoNI) を欠失させたプラズミドである (文献2)。G47Δの構造の模式図は別紙3参照。

(2) 特性

pIE12ΔはAmpicillin 耐性遺伝子を有している。宿主にはpIE12Δの挿入外来遺伝子配列のみが移入され、薬剤耐性遺伝子などのベクター配列は移されない。

文献24 : Mineta, T. *et al.* Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1: 938-943 (1995).

文献25 : Johnson, P. *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).

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ICP6領域にLacZ cDNAが挿入されている。これにより、ICP6プロモーターは供

与核酸を発現し、本来のICP6遺伝子は発現されない。また、宿主HSV-1の γ 34.5遺伝子(1kb)の双方のコピーは欠失しており、また、 α 47遺伝子(312bp)も欠失している(別紙4参照)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

G47 Δ の親ウイルスであるG207は野生型HSV-1であるF株から2箇所の γ 34.5遺伝子の双方(1kb)を削除し、ICP6遺伝子領域に大腸菌のLacZ遺伝子を挿入して作製された。G47 Δ は、G207からさらに α 47領域内の312bpを削除して作製された。pIE12 Δ は、pBluescript KSを基本骨格とし、BstEII-EcoNIの312 bpを欠失したHSV-1の α 47遺伝子を含むフラグメントをインサートとして含むプラスミドである。G207のウイルスDNAとpIE12 Δ プラスミドDNAの共移入に伴うVero細胞内での相同組換えにより、遺伝子組換えHSV-1であるG47 Δ を得た(文献24、25 および別紙4)。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

G47 Δ はウイルス製造に頻用されるVero細胞を使って増殖させた。G47 Δ の臨床製剤は東京大学医科学研究所治療ベクター開発室で生産される。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、米国cGMPに準じた標準作業手順(SOP)に基づき行う。製造は、東京大学医学部脳神経外科・講師・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。WHO Vero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G47 Δ から作製したマスターウイルスストックをVero細胞に感染させる。2日後、細胞を回収し、凍結融解操作で細胞内のG47 Δ 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およびRNAを酵素処理する。高速遠心にてウイルスを沈殿させ、混入する核酸および蛋白を除去する。これを10% グリセリン加磷酸緩衝液(PBS)に再浮遊する(別紙5参照)。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行う(品質試験項目に関しては別紙6参照)。東京大学医科学研究所治療ベクター開発室からは凍結した状態で東京大学医学部附属病院へ搬送する。上述の品質試験の合格が確認された製剤の機関内での移動であり、受入れ試験は予定しない。

G47 Δ 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G47 Δ 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。

臨床製剤は東京大学医科学研究所治療ベクター開発室の専用の冷凍庫に保管し、施錠のうえ管理する。(当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙7参照)。

ウイルスの調製に使用する細胞はWHO-Vero細胞を用いる。マスターセルバンク、ワーキングセルバンク、およびマスターウイルスシードストックも、東京大学医科学研究所治療ベクター開発室に保管されている。

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

移入した核酸は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。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。

G47Δが細胞に感染すると、G47Δ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：ヒト前立腺癌細胞株LNCaP、ヒト前立腺癌細胞株PC-3、ヒト前立腺癌細胞株DU145、および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）。また、ウイルス複製の際に感染細胞内で一過性にLacZ蛋白質が発現される。

G47ΔはHSV-1ゲノムの互いに離れた4箇所（3つの遺伝子）に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に復する可能性は無に等しい。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、ICP6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つのウイルスから得られたG47Δ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

G47Δは野生型のHSV-1に存在しないLacZ遺伝子を含むので、挿入されたLacZ遺伝子と隣接するHSV-1のICP6遺伝子との境界部をPCRで増幅、定量する方法でG47Δを検出できる（文献26）。このときに用いるPCR反応では、試料1μl中に1-10 コピーのG47Δ DNAがあれば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、G47Δ（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、理論上は、細胞内に1 pfuのG47Δが存在すれば検出できる（文献27）。

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、信頼性が確立している（文献8、28）。

文献26 : Todo, T. *et al.* Viral shedding and biodistribution of G207, a multimitated, conditionally replicating herpes simplex virus type 1, after intracerebral inoculation in aotus. *Mol Ther* 2: 588-595 (2000).

文献27 : Carew, J. *et al.* Selective infection and cytolysis of human head and neck squamous cell carcinoma with sparing of normal mucosa by a cytotoxic herpes simplex virus type 1 (G207). *Hum Gene Ther.* 10: 1599-1606, 1999

文献28 : DeBiasi, R. *et al.* Use of PCR for the diagnosis of herpes virus infections of the central nervous

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(文献31)。

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、32)。

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はVero細胞で増殖させるが、この細胞においてG47Δの増殖力は親株(StrainF)に比較し低下しており、親株が 10^8 pfu/mlのタイターまで増殖する条件下で、G47Δは 10^7 pfu/mlのタイターにしか達しない(文献2)。

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 3 1 : 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)
- 文献 3 2 : Cassady, K. *et al.* The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the γ_1 34.5 genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2 α . *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 東京都文京区本郷七丁目3番1号

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、当該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、当該施設内のP2レベルの拡散防止措置を執ることができる実験室（以下「P2実験室」という。）内の安全キャビネット内において行う。G47Δ 希釈溶液の保管は、P2実験室内の保冷库又は冷凍庫において行う。

なお、G47Δ 溶液若しくはその凍結品又はG47Δ 希釈溶液若しくはその凍結品を、開放系区域を通して運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(3) G47Δ 溶液又はG47Δ 希釈溶液を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は70%イソプロパノール、70%から90%までのエタノール、0.2%次亜塩素酸ナトリウム、10%ポビドンヨード、0.1%から0.5%までのグルコン酸クロルヘキシジン及び0.05%から0.2%までの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（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。

(4) 被験者に対するG47Δ の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った手術室（以下「手術室」という。）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。）を経直腸超音波ガイド下に会陰部で経皮的に注入することにより行う。被験者の経直腸的に超音波を挿入し、超音波の画像をガイドにしながら、会陰部で経皮的に注入針を刺入し、手動的に遅い速度で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。特に皮膚からの抜去は慎重に行い、G47Δ 液の漏出及びエアロゾル化を防止する。

(5) 被験者へのG47Δ の投与終了後、被験者の創部を消毒薬により消毒してガーゼで覆う。被験者を手術室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室の病室（以下「個室」という。）に移送する。

(6) 上記(4)及び(5)で用いた注射器などの器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化を行い、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個室以外の区域で行う場合には、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。

(7) 投与後 72 時間まで、被験者を個室内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に手術室及び個室から開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留める。

(8) 個室における管理期間中の被験者の尿及び糞便等の排泄物は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、研究用検体として使用する被験者の血液及び尿の取扱いは、G47Δ 溶液及び G47Δ 希釈溶液の取扱いに準じる。

(9) 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等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。

なお、これらのウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(10) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液及び尿中の G47Δ が陰性であることを確認する。

なお、G47Δ が確認されたときは、それが消失するまでの期間、個室における管理を継続する。

(11) 個室における管理解除後に被験者の血液又は尿中から G47Δ が検出された場合には、被験者を個室における管理下に移す必要性について検討する。

なお、必要と判断された場合は、上記(7)から(10)まで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

G47Δ は G207 (二重変異を有する遺伝子組換え HSV-1) の改良型ウイルスであり、G47Δ は A/J マウスに対する脳内投与で G207 と同等以上の安全性を示すことが確認されている (文献 3 3)。G207 の前立腺内投与に関して、マウスとサルを用いた徹底的な安全性評価が行われている。BALB/c マウスの前立腺内に G207 の最高量 1×10^7 pfu を単回投与したところ、5 ヶ月の観察期間で何の症状も認めず、死亡したマウスも存在しなかった (文献 3 4)。一方、野

いる。BALB/c マウスの前立腺内に G207 の最高量 1×10^7 pfu を単回投与したところ、5 ヶ月の観察期間で何の症状も認めず、死亡したマウスも存在しなかった（文献 3 4）。一方、野生型 HSV-1 (strain F) 投与群では、50%に活動が鈍く、姿勢異常のマウスが認められ、13 日までに死亡した。病理組織学的検査では、G207 投与群では異常を認めなかったのに対して、野生型 HSV-1 投与群では、上皮の抜け落ち、間質の浮腫が見られた。また、カラムで精製した臨床用 (clinical grade) の G207 の安全性は HSV-1 に感受性のあるサル (*Aotus nancymae*) でも詳細に検討され、4 匹のサルに 1×10^7 pfu の G207 が前立腺内に単回投与された。全身組織の HSV-1 の分布を PCR 法とウイルス培養により検討し、また病理組織学的変化を検討した。観察期間中、サルは全く無症状の上、涙、唾液からは PCR 法、ウイルス培養いずれでも HSV-1 が検出されず、他臓器へのウイルスは検出されなかった。さらに、G47Δ の前立腺内投与に関して、マウスを用いた安全性評価が行われた。BALB/c マウスの前立腺内に G47Δ 1×10^7 pfu を単回投与したところ、3 ヶ月の観察期間で何の症状も認めず、死亡したマウスも存在しなかった。一方、野生型 HSV-1 (strain F) 投与群では、 1×10^4 pfu 投与にもかかわらず 7 日目までに 10 匹中 3 匹が死亡した。病理組織学的検査では、G207 投与群では異常を認めなかったのに対して、野生型 HSV-1 投与群では、上皮の抜け落ち、間質の浮腫が見られた。

文献 3 3 : 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 3 4 : Varghese S, *et al.* Preclinical safety evaluation of G207, a replication-competent herpes simplex virus type 1, inoculated intraprostatically in mice and nonhuman primates. *Hum Gene Ther.* 12: 999-1010 (2001).

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。同じく米国アラバマ大学バーミングハム校において、G207 を用いて再発悪性グリオーマ患者 6 例を対象に米国で第 Ib 相臨床試験が行われた (2002 年～2003 年) (文献 3 5)。腫瘍摘出前後の 2 回、G207 を投与するというプロトコールにて施行された。まず、 1.5×10^8 pfu の G207 を腫瘍内に投与し、2-5 日後に腫瘍を外科的に摘出した後で摘除部位に 1.0×10^9 pfu の G207 を投与した。G207 に起因する重篤な有害事象は認めず、ヘルペス脳炎やアシクロビルを要するような副作用は認めなかった。1 例で G207 投与 2 日後に一時的な高熱と見当識障害を認めたが、ステロイド投与にて 12 時間以内に快復した。腫瘍検体の培養から 1 例のみ HSV が単離され、PCR 解析では全ての腫瘍検体で HSV DNA が確認され

た。一方、唾液、尿、結膜、血清にはG207は認められなかった。効果に関しては、G207投与後にKarnofskyスコアの改善が3例（50%）に認められた。CRやPRは得られず、生存期間はG207投与後6.6ヶ月（中央値）であった。死亡原因は原病進行のためと考えられた。しかし、G207投与部位には進行した所見を認めない1例も見られた。剖検が行われた1例では、脳、肝臓、脾臓、血液全てでHSV陰性であった。

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。

東京大学附属病院脳神経外科においても、進行性膠芽腫患者に対してG47Δを用いた臨床試験が2009年11月より開始された。

文献 35 : 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 17: 199-207, 2009.

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、注射等による接種によりG47Δを感染させることができる。

(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が伝播・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。

(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いに等しい。

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いに等しい。

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。