

遺伝子治療臨床研究に係る第一種使用規程について (東京大学医学部附属病院)

- 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 P1
(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)
- 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名簿 P3
- 第一種使用規程承認申請書..... P4
- 生物多様性影響評価書 (改訂後) P7

平成 21 年 3 月 31 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 吉倉 廣

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、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

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 武谷 雄二・
申請日：平成 19 年 10 月 23 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 武谷 雄二

(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、G47 Δ 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、G47 Δ 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、G47 Δ 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。

G47 Δ 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 G47 Δ は野生型 HSV-1 と同等と考えられ、G47 Δ 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

G47 Δ 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。G47 Δ 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。

G47 Δ 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、G47 Δ 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、G47 Δ 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

G47 Δ 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

G47 Δ 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、G47 Δ 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。

G47 Δ の投与を受けたヒトでは、腫瘍内に限局して複製した G47 Δ 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。

G47 Δ 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、G47 Δ 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、G47 Δ 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。

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
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名簿

氏名	所属
岩崎 一弘	独立行政法人国立環境研究所主任研究員
小澤 敬也	自治医科大学医学部教授
神田 忠仁	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター長
笹月 健彦	国立国際医療センター名誉総長
島田 隆	日本医科大学医学部教授
早川 堯夫	独立行政法人医薬品医療機器総合機構顧問
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長
○ 吉倉 廣	厚生労働省医薬食品局食品安全部企画情報課参与
渡邊 信	筑波大学生命環境科学研究科教授

○委員長（五十音順 敬称略）
（平成21年2月28日現在）

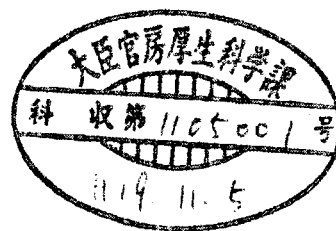
第一種使用規程承認申請書

平成19年10月23日

厚生労働大臣 舛添 要一 殿
環境大臣 鳩下 一郎 殿

申請者 氏名 東京大学医学部附属病院
病院長 武谷 雄二
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。



<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>大腸菌 LacZ 遺伝子を発現し、γ34.5 遺伝子・ICP6 遺伝子・α47 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 (G47Δ)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>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</p> <p>(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。</p> <p>(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にて行う。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希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通過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。</p> <p>(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。</p> <p>(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手術室（以下「手術室」という。）に運搬する。</p> <p>(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り行う。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、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。特に脳表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。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。</p> <p>(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</p>

	<p>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（以下「個室」という。）に移送する。</p> <p>(7) 上記(5)及び(6)で用いたシリンジなどの器具並びに布及びガーゼ類は、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1回（1時間に約12回）入れ替わる。</p> <p>(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及び個室から外の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、マスク着用によるウイルス漏出予防措置を義務付ける。</p> <p>(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った後、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溶液の取扱いに準じる。</p> <p>(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等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。これらのウイルス不活化を他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。</p> <p>(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、唾液及び尿中の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、個室における管理を継続する。</p> <p>(12) 個室における管理解除後に被験者の血液、唾液又は尿中から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)から(10)までと同様の措置を執る。</p> <p>(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)から(12)と同様の措置を執る。</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 ベクターに関する情報

(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遺伝子を含有する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