

第一種使用規程承認申請書

平成28年8月10日

農林水産大臣 山本 有二 殿

環境大臣 山本 公一 殿

氏名 国立大学法人東京農工大学

申請者

学長 松永 是 印

住所 東京都府中市晴見町三丁目8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>SLAM blind 変異導入麻疹ウイルス (HL 株) (<i>SLAM blind H, measles virus</i>) SLAM blind 変異及び <i>EGFP</i> 遺伝子導入麻疹ウイルス (HL 株) (<i>SLAM blind H, EGFP, measles virus</i>)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>獣医療法に基づいて開設の届出が行われ、その構造設備が獣医療法に基づく基準に適合している診療施設（以下「治療施設」という。）における動物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 東京都府中市幸町 3-5-8 国立大学法人東京農工大学</p> <p>治療施設の名称 農学部 7 号館 1 階 1-4A 室及び 1-8A P2A 動物飼育室</p> <p>治療施設の内容 1-4A 室（以下「P2 試験室」という。）は研究開発二種省令 P2 レベル試験室として確認済みである。1-8A P2A 動物飼育室（以下「治療室」という。）は研究開発二種省令 P2A レベル試験室として確認済みである。 治療対象となる患犬は、東京農工大学動物医療センターに来院後、治療前の検査を受けてから、治療室に移動し、治療及び管理飼育はすべて治療室で行う。定期的な採血や採尿もこの治療室内で行う。患犬に対する接種及び接種後の管理を治療室で行うことは動物医療センター会議で承認されている。 構造としては、P2 試験室は安全キャビネット、オートクレーブ、ウイルスを保管する冷凍庫が設置されている。治療室は、患犬の飼育ケージとオートクレーブを設置し、飼育ケージはクリーンブース内に設置し、ブースの天井に設置されている HEPA フィルターにより 10m²/分の換気を行う。</p> <p>治療対象疾患 イヌの乳がん</p> <p>治療方法等 (1) 本遺伝子組換え MV (rMV-SLAMblind 又は rMV-SLAMblind-EGFP。以下同じ。) は、P2 試験室にて感受性細胞で複製・増殖後、ウイルス液を調製し治療に用いる。一部を用いてウイルス力価を測定し、残りを P2 試験室内の冷凍庫に保管する。 (2) 凍結状態の本遺伝子組換え MV 溶液の融解、希釈、分注及び注入セットへの充填操作は、P2 試験室内の安全キャビネット内で行う。本遺伝子組換え MV 溶液の保管は、P2 試験室内の冷凍庫において行う。なお、本遺伝子組換え MV 溶液又はその凍結品を、開放系区域を通過して他の P2 レベル区域に運搬する必要がある場合には、三重に密閉した容器に入れて運搬する。</p>

- (3) 本遺伝子組換え MV（希釈済み溶液を含む）を廃棄する際には、厚生労働省「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」の 5 類感染症の項に従い 0.1～0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液（以下「消毒薬」という。）による消毒又は高圧蒸気滅菌処理（121℃、20 分間）によるウイルスの不活化処理を行った後、東京農工大学安全マニュアルで定められている医療廃棄物処理規程（以下「医療廃棄物処理規程」という。）に従い廃棄する。
- (4) P2 安全キャビネット内で本遺伝子組換え MV 溶液（ウイルス力価 10^6 – 10^7 TCID₅₀）を生理的食塩水で希釈し所定の接種量（1 ml）に調製したもの（以下「治療溶液」という。）を、P2 安全キャビネット内で専用の注射針及び注射器から成るデバイス（以下「注入セット」という。）に充填し、三重に密閉した容器に入れて、直ちに治療室に運搬する。
- (5) 臨床動物に対する本遺伝子組換え MV の選択及び接種法については、治療開始時に遠隔転移が確認されない場合には rMV-SLAMblind を使用し、遠隔転移が認められる場合は転移巢の状態に応じて rMV-SLAMblind-EGFP あるいは rMV-SLAMblind を使用することとする。治療の途中で変更することはない。本遺伝子組換え MV の接種は獣医師が実施する。治療溶液の接種は、注入セットで当該溶液を腫瘍内、静脈内あるいは皮下注入することにより行う。注入針の刺入及び抜去は慎重に行い、治療溶液の漏出及びエアロゾル化を最小限にとどめる。注入部位の周辺には布（滅菌した不織布）を二重に敷き詰める。また施術者への汚染を防ぐために、施術者はディスポーザブルキャップ、マスク、グローブ及び術衣を着用して施術にあたる。
- (6) 本遺伝子組換え MV 接種後、接種動物の接種部位を消毒する。治療溶液漏出予防のために安静にさせ、絆創膏等により局所からの漏出を防ぐ措置を行い、治療室内に設置した飼育ケージ（以下「飼育ケージ」という。）に移送する。
- (7) 上記 (5) 及び (6) で用いた注入セット等の器具並びに布及びガーゼ類、施術者が要した術衣、グローブ、マスク、帽子等は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物処理規程に従い廃棄する。これらの不活化を治療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。治療後の当該治療室は床を消毒薬で拭き掃除する。
- (8) 本遺伝子組換え MV 接種後、毎日一般状態と体温を記録するとともに、当該ウイルスが尿、糞便、血液（血球及び血漿中の両方を含む）、分泌液（唾液及び涙液）から RT-PCR 法で検出できなくなるまで、接種動物を飼育ケージ内で管理する。腫瘍が自壊する等した結果、滲出液を出すケースがあった場合は、これも「分泌液」に含め検査対象とする。腫瘍の大きさに応じて (4) と同じ治療溶液を数日～2 週間おきに計 1～5 回程度 (5) 及び (6) と同様に接種する。飼育ケージ内で飼育される本遺伝子組換え MV 接種を受けたイヌの管理は、必ず獣医師が行い、毎回ディスポーザブルのキャップ、マウス、グローブ、術衣を着用する。

- (9) 飼育ケージにおける管理期間中の接種動物の排泄物（尿、糞便、血液、分泌液等）は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物処理規程に従い廃棄する。なお、本遺伝子組換え MV が検出されるか否かを調べるウイルス排泄試験に使用する接種動物の排泄物等の取扱いも同様とする。排泄物等が床等へ落下した場合は床を消毒薬で拭き掃除をする。
- (10) 飼育ケージにおける管理期間中、接種動物に使用した器具、接種動物の排泄物等に接触した器具、管理者が着用した術衣等は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物処理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。
- (11) 治療室又は飼育ケージにおける管理期間中、接種動物が死亡した場合は、遺体から本遺伝子組換え MV が逸出することがないように、飼い主の同意を得た上で適切な処置を講ずる。具体的には、遺体を二重に密封したのち、厚生労働省「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」の5類感染症の項に従い、高圧蒸気滅菌処理によるウイルスの不活化処理を治療室内にて講ずる。
- (12) 接種動物の尿、糞便、血液及び分泌液への本遺伝子組換え MV の検出は、管理期間中は毎週1回実施するが、最後の接種から2週間以上経過したのちに2回続けて陰性となった場合には、当該イヌの管理解除を東京農工大学イヌ遺伝子組換え麻疹ウイルス治療安全委員会に審査依頼する。管理解除が承認された場合には、飼育ケージにおける接種動物の管理を解除する前日には、接種動物の尿、糞便、血液及び分泌液中の本遺伝子組換え MV が陰性であることを RT-PCR 法で必ず確認する。本遺伝子組換え MV が確認されたときは、飼育ケージにおける接種動物の管理を継続する。また、排泄物等の床等への落下の有無にかかわらず、飼育ケージにおける管理終了後は床を消毒薬で拭き掃除をする。また室内全体に消毒薬を3日間連続で噴霧し、次の治療試験実施までに少なくとも1週間以上の間隔をあける。
- (13) 飼育ケージにおける接種動物の管理解除後は、一定期間接種動物に対して定期的な検査を行い（管理解除後1ヶ月間は毎週1回、2ヶ月目以降半年目までは2週間に1回、それ以降1年目までは1ヶ月に1回）、接種動物の尿、糞便、血液及び分泌液中から本遺伝子組換え MV が検出された場合には、直ちに接種動物を飼育ケージにおける管理下に移し、上記(8)から(11)までと同様の措置を講ずる。これまでの研究結果から、本遺伝子組換え MV は腫瘍細胞で効率的に増殖し、腫瘍塊の消滅又は縮小に伴って接種動物の体液及び排泄物中の量は検出限界以下となり、その後再び増殖して体外排出に至る現象は認められていない。このような特性は接種動物においても同様と考えられるものの、自然発生の胆がんと動物での実証例はこれまでにないことから、本定期検査を行うこととする。

- (14) 飼育ケージにおける接種動物の管理解除後は、飼い主により最低1年間は室内あるいはそれに準ずる区域（飼い主が管轄あるいは管理する区域であり、庭、バルコニー、ベランダ、駐車場などを含む）での飼養を行うなど、飼養環境から接種動物が逃げ出すことがないように適切に管理を行うこととする。また動物愛護に配慮して、首輪やリードなどの逃亡防止措置を行った上で、散歩をさせることを可能とするが、排泄物は消毒薬を噴霧したのちに処理を行う。接種動物にはマイクロチップを皮下に埋め込み、同定や追跡を可能とする。ただし、すでに埋め込まれている場合、あるいはマイクロチップの埋め込みが患犬の病状に著しい悪影響を及ぼすと獣医師が判断した場合には、この限りではない。
- (15) 飼い主の住所・電話番号は電子ファイルに保管し、モニタリング期間中、モニタリング期間終了から1年は定期的を確認し、更新する。この期間中に接種動物が死亡した場合は、飼い主は直ちに東京農工大の研究代表者に連絡するとともに、遺体から本遺伝子組換えMVが逸出することがないように適切な処置を講ずる。具体的には、遺体を二重に密封したのち、飼い主が治療施設へ運搬し、高圧蒸気滅菌処理によるウイルスの不活化処理を治療室内にて講ずる。また管理解除後の飼養区域は、消毒液により消毒する。患犬が使用していた食器やトイレなどのすべての器具、敷物・タオル・衣服などは、消毒液に1時間以上浸漬しウイルスを不活化したのちに廃棄する。しかし、本遺伝子組換えMVの排出が確認できない場合に、患犬の管理解除を行うこととしており、管理解除後にも、最初の1ヶ月は毎週、2ヶ月目以降は2週ごとに検査を行いウイルスが排出されないことを確認することから、周囲への拡散が起こる可能性は低いと考えられる。
- (16) 宿主及び本遺伝子組換えMVは、接触動物の染色体への目的遺伝子の組込みの可能性は極めて低いため、繁殖能力をなくすための措置は行わない。

SLAM blind 変異導入麻疹ウイルス (HL 株)
(*SLAM blind H*, measles virus) 並びに
SLAM blind 変異及び *EGFP* 遺伝子導入麻疹ウイルス (HL 株)
(*SLAM blind H*, *EGFP*, measles virus) の
生物多様性影響評価書

国立大学法人
東京農工大学

I 生物多様性影響評価に当たり収集した情報

1 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

① 分類学上の位置・学名

麻疹ウイルス (measles virus) (以下「MV」という。) はヒトの麻疹の原因ウイルスで、一本鎖マイナス鎖 RNA をウイルスゲノムにもち (モノネガウイルス目) パラミクソウイルス科・モービリウイルス属に属する。

② 宿主の株名

SLAMblind 変異導入 MV (以下「rMV-SLAMblind」という。) 並びに SLAMblind 変異導入及び *EGFP* (enhanced green fluorescent protein) 遺伝子導入 MV (以下「rMV-SLAMblind-EGFP」という。) とともに、HL 株を宿主とした。

③ 自然環境における分布状況

麻疹は弱毒生ワクチンの接種による感染防御が有効であり、1960年代から導入された世界的なワクチンプログラムによって劇的な減少を示している (2000年から2013年で死亡者75%減少)。自然感染動物はヒトのみであり、WHOの排除計画の対象とされている。日本においては2015年にWHOが麻疹排除状態であると認定した (参考情報1)。一方、発展途上国ではワクチン接種率の低さから未だに野外株の流行が起きており (参考情報2)、感染によって引き起こされる免疫抑制による二次感染のため、アフリカやアジアを中心に現在でも年間10万人以上 (主に小児) が死亡している。

MVは系統樹解析で8つ (A~H) の分岐群に分類され、流行年や地域ごとに流行の特色がある (参考情報3)。

宿主MV-HL株は、B95a細胞 (マーマセットBリンパ球由来細胞株) を用いて、1988年に日本の麻疹患者の末梢血リンパ球から分離された野外株である (参考文献1)。HL株はD分岐群に属する。D分岐群は世界中 (南北アメリカ、アジア、アフリカ、ヨーロッパ、オセアニア) で分離された野外株を含む。

(2) 使用等の歴史及び現状

産業利用の実績はない。

(3) 生理学的及び生態学 (生物学) 的特性

イ 基本的特性

① ウイルスの構造 (ゲノム、粒子)

MVは15,894塩基の一本鎖マイナス鎖RNAをゲノムとして有する。ウイルスゲノムはnucleo (N) 蛋白質にコートされてヌクレオカプシド構造をとる。large (L) 蛋白質とphospho (P) 蛋白質複合体で構成されるRNA依存RNAポリメラーゼ (RdRp) がヌクレオカプシドに結合し、リボヌクレオ蛋白質複合体 (RNP) を形成する。

RNPは直径100-300nmのエンベロープに包まれており、エンベロープの外側には受容体への結合を担うhemagglutinin (H) 蛋白質と細胞膜への融合を誘導するfusion (F) 蛋白質が突き出し、それらをエンベロープの内側からmatrix (M) 蛋白質が裏打ちすることでウイルス粒子が形成されている (別添資料1図1)。

② ウイルスゲノムの構造とウイルス蛋白の機能

ウイルスゲノム上には、N-P-M-F-H-L の順でウイルス遺伝子が配列する（別添資料 1 図 2）。細胞に感染後、細胞質に RNP が放出され、RdRp がヌクレオカプシド内のゲノム RNA を鋳型として各遺伝子を転写し、生じた mRNA から細胞の翻訳系によって各ウイルス蛋白質が合成される。さらに RdRp はゲノム RNA 全長およびアンチゲノム RNA を合成する。これらは合成の進行と共に直ちに N 蛋白質によってコートされヌクレオカプシドを形成する（別添資料 1 図 3）。

パラミクソウイルス科のウイルス共通の特徴として、P 遺伝子からは P 蛋白質に加え V、C 2 種の非必須アクセサリ蛋白質が産生される。V 蛋白質は、RdRp による P 遺伝子転写時に、一定の割合で特定の部位へグアニンヌクレオチド (G) 残基が挿入されることで (RNA 編集)、下流の読み枠が異なる蛋白質として合成される（別添資料 1 図 2）。C 蛋白質は、リボソームによる翻訳時に P 蛋白質とは異なる翻訳開始点から異なる読み枠の蛋白質として翻訳される（別添資料 1 図 2）。V、C 蛋白質共に多機能であり、培養細胞での単独発現実験系では主にウイルス感染後のインターフェロン (IFN) 産生の抑制（参考文献 2, 3）および IFN シグナル伝達系の阻害活性（参考文献 4）を有することが報告されている。

③ 感受性動物、感染経路及び感染様式

MV 野外株 (HL 株を含む。以下同) では、自然環境下ではヒトで増殖を伴う感染が起こる（参考文献 5）。飛沫および飛沫核によって感染し、垂直感染の報告はない（参考文献 6）。

サルについては、動物実験において、旧世界ザル（狭鼻猿類）のアカゲザルやカニクイザルへ静脈、経鼻、皮下接種することで感染・増殖し、ヒトの麻疹同様の症状を呈するが、症状の程度はヒトよりも軽度である（参考文献 1, 8）。新世界ザル（広鼻猿類）のマーモセットでも実験下での感染例はあるが、ヒトの麻疹の特徴と異なる点が多い（参考文献 9）。

サルに係る疫学調査では、ヒトの生活圏から隔離したエリアに生息するサルは MV 抗体陰性であるが（参考文献 7）、捕獲された群内での感染報告（参考文献 7）や、実験動物のサルのコロニー内で MV 抗体陽性のサルが複数検出される例が知られており、ヒトとの接触によって MV が伝染すると考えられている。

その他の野生動物への感染例は知られていない。

MV 野外株のレセプターは 2 種同定されており、リンパ系細胞レセプター SLAM (signaling lymphocyte activation molecule)（参考文献 10）及び極性上皮細胞レセプター PVRL4 (poliovirus receptor-like 4)（参考文献 11）である。

SLAM を有する動物種は広く、少なくともニワトリ SLAM 遺伝子まで遺伝子バンクに登録されている。SLAM は生体内の胸腺細胞、活性化リンパ球、成熟樹状細胞、活性化マクロファージの表面に発現し、ウイルス膜表面の H 蛋白質と結合する（参考文献 12, 13）。

PVRL4 も発現する動物種は広く、ゼブラフィッシュも相同遺伝子を持つ。PVRL4 の構造的性状について資料 6 にまとめた。ヒトとイヌの PVRL4 の相同性は 94% である。PVRL4 内の V ドメインにウイルス H 蛋白質が結合する（参考文献 14）。V ドメイン内の H 蛋白質との結合領域は 3 カ所で、該当するアミノ酸は哺乳類では高度に保存されている（参

考文献 15)。そのため MV はイヌ PVRL4 を介して PVRL4 陽性細胞へ感染できる。一方、鳥類や魚類では相同性は限定的である。PVRL4 はヒトでは気道上皮や胎盤での発現が確認されている。イヌでは加えて腸管上皮、膀胱上皮等でも検出されている。他の正常細胞では発現しない(参考文献 16, 17)。また PVRL4 は多くの腫瘍組織で発現の上昇がみられる分子の一つである。

MV-H 蛋白高次構造上の各レセプター結合領域は同定されている(別添資料 2 図 2)(参考文献 18)。

ロ 生息又は生育(増殖)可能な環境の条件

① 増殖可能な環境条件

MV 野外株は、SLAM または PVRL4 を発現する細胞に感染し、増殖して細胞融合を引き起こす。MV 野外株非感受性培養細胞に各種哺乳類の SLAM を発現させ MV 感受性獲得試験を行った試験から、イヌ SLAM を発現する細胞に効率良く感染することが明らかになった(参考文献 19)。一方マウス SLAM への親和性は低く、マウス SLAM を介した細胞への感染効率はヒト SLAM の 10^{-3} 程度である(参考文献 20)。

PVRL4 V ドメイン内の H 蛋白結合領域のアミノ酸はヒトとイヌで全て保存されている。ヒト以外の哺乳類 PVRL4 発現による感受性獲得試験では、我々の試験においてイヌ PVRL4 を介して MV が効率良く培養細胞に感染することが明らかになった(参考文献 21・別添資料 3)。マウス PVRL4 を介した感染効率はヒト PVRL4 の 40%程度である(参考文献 11)。

これらレセプターを発現しない細胞株(Vero 細胞等)で継代を繰り返すと、ウイルスの多種性(quasispecies)により、H 蛋白質内に CD46 をレセプターとして使用できる変異を有するウイルスが選択的に増殖するが、それに伴い動物に対する病原性が減弱し弱毒化することが報告されている(参考文献 1, 8)。MV ワクチン株はこの性質を利用して弱毒化されたものである。

② 自然環境下での安定性

MV は細胞随伴性であるため、細胞外の環境では増殖および生存することはできない。他のエンベロープウイルス同様耐久性は低く、熱、紫外線、pH5 以下の酸、pH10 以上のアルカリ、エーテル、クロロホルムによって速やかに不活化される。空気中や物体表面での生存時間は 2 時間以下である(参考情報 4)。

ハ 捕食性又は寄生性

-

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 生存能力又は増殖能力

「体内動態」

MV 野外株は、飛沫によって個体の気道に侵入した後、気道上の樹状細胞やマクロファージへ SLAM を介して感染する。感染した樹状細胞がリンパ節へ移動することでリンパ系細胞へ感染・増殖し、ウイルス血症によって全身に感染が拡大する。その後、極性気道上皮細胞の細胞間密着結合構造に発現する PVRL4 を介して気道上皮細胞へ感染

し、増殖したウイルス粒子が上部気道から管腔側へ放出され、再び飛沫感染により次の個体へ伝播する。体内でのウイルス増殖期では、発熱や咳などに加え、発疹や舌のコプリック斑など特徴的な症状を呈す。最終的に個体の免疫系の働きによりウイルスは排除される。ごく稀に、乳幼児期に麻疹に感染した患者で7-10年後に致死性の亜急性硬化性汎脳炎を起こす事が知られており（10万人に1人の割合）、脳内での持続感染のためと考えられている。感染個体の病理組織所見では、細胞融合による多核巨細胞と封入体が観察される。

「感染・増殖の様式」

細胞への感染は、まずウイルス粒子上のH蛋白質とレセプターが結合後にウイルスエンベロープと細胞膜がF蛋白質の活性により融合し、RNPが細胞質へ放出される。その後RdRpによってウイルス遺伝子の転写およびウイルスゲノムの複製が細胞質内で行われ、合成された各蛋白質とヌクレオカプシドが細胞膜上でパッケージングされ、出芽して次の細胞へ感染する。通常、感受性培養細胞100個に対しMVを感染力価1の割合で感染させると、3-4日後に増殖はプラトーに達し、培養上清に 10^4 - 10^5 /mlのウイルス粒子を放出する。

② 複製の様式及び交雑性

「複製様式」

MVの複製はすべて細胞質で行われる（別添資料1図3）。

「感染動物のゲノムの組み込みの可能性」

複製においてDNAフォームを形成する過程がない。そのため、感染個体のゲノムへの挿入は起こらないと考えられている。ヒトゲノム解析によってMV由来の遺伝子はヒトゲノム内に存在しないことが報告されている（参考文献22）。

「交雑と核酸の水平伝達の可能性」

複製の過程において、ウイルスRNAゲノムは常にN蛋白質によってコーティングされ、ヌクレオカプシド構造をとる。そのため裸のRNAゲノムが他の核酸と塩基対を形成して組換えが起こることは原理的に考えにくく、これまでにそのような報告はない（参考文献23）。また、MVの一本鎖RNAゲノムは非分節型であるため、他のウイルスとの交雑性は考えにくい。

「ウイルスゲノムの変異導入率と変異復帰の可能性」

*in vitro*におけるMV複製時のRNAゲノム内への自然発生的変異導入率は、複製1回あたり 1.8×10^{-6} /塩基と算出されており、全ゲノム内に計算上0.03塩基の変異が生じる（参考文献24）。1塩基変異の復帰はこの変異導入率の確率で生じると考えられる。また、当該文献内の試験では2塩基変異の復帰は確認されなかった。

中和抗体存在下での選択圧のかかる培養条件においては、MVの変異導入率は 4.4×10^{-5} /塩基、他のRNAウイルスでは水泡性口内炎ウイルスで 6.0×10^{-6} /塩基、インフルエンザAウイルスで 9.0×10^{-6} /塩基と算出されている（参考文献25）。

ホ 病原性

① 病原性

自然環境下では、ヒトで増殖を伴う感染が起こる（参考文献 5, P. 1567）。不顕性感染はほとんどなく、感染した 90%以上のヒトが発症する。

動物モデル実験において MV 野外株を接種したカニクイザルやアカゲザルは典型的な麻疹症状を再現し、炎症性サイトカインをはじめとする免疫応答が誘導される（別添資料 4・参考文献 1, 26）。

野生型マウスは MV 非感受性であるが、ヒト SLAM トランスジェニックに加えて IFN レセプター（IFN を感知し IFN 応答シグナルを下流に伝達する）ノックアウト（参考文献 27）もしくは STAT1（signal transducers and activator of transcription 1: IFN レセプター下流のシグナル伝達因子の 1 つ）ノックアウト（参考文献 28）を導入した遺伝子改変マウスにおいて、MV 野外株のリンパ節での増殖が報告されている。しかし麻疹の症状は再現しない。

MV をげっ歯類動物で継代を繰り返した順化株がげっ歯類動物に感染・増殖する報告があるが、病原性は非常に弱く、麻疹の症状と異なる点も多い（参考文献 29）。

その他の動物については、不顕性感染を含め麻疹の自然感染症例や動物実験による感染の報告は知られていない。

② 他の病原体の病原性への影響

MV 野外株は感染後に激しい免疫抑制（白血球数減少やリンパ球の機能不全など）を引き起こし、その結果他の病原体に対する感受性が著しく上昇する。この二次感染が麻疹による小児の死亡の主な原因の一つとなっている。

③ 予防・治療法

MV 野外株がヒトに感染すると、10-14 日の潜伏期間後に体内で増殖複製し、発熱、咳、結膜炎などを引き起こし、その後麻疹に特徴的な症状（コプリック斑や全身性発疹）を示す。さらに、著しい白血球減少や刺激に対するリンパ球の無応答化などによる激しい免疫抑制が引き起こされ、数週間にわたって免疫抑制状態が持続する。一方で、一連の症状の後に感染個体の免疫応答によって回復した個体は終生免疫が付与されることも MV の大きな特徴の一つである（参考文献 5, P. 1558, 1562, 1563）。MV は血清学的に単一型（monotypic）で、通常一回のワクチン接種もしくは自然感染によって、中和抗体が産生され、終生免疫が付与される。

予防法はワクチン接種のみであるが、野生動物に対しては現実的ではない。診断方法は血中の中和抗体価の測定が一般的である。ワクチン接種率は日本では現在 91% 以上である（参考情報 5）。麻疹に対する特効薬は現在までに存在せず、対処療法が中心になる。

へ 有害物質の産生性

MV が産生する各ウイルス蛋白質およびウイルス RNA に毒性はなく、有害物質を産生するという報告もない（参考情報 6）。

ト その他の情報

麻疹は飛沫や飛沫核によって伝播する。MV はウイルスの中で最も感染力が高いものの一つであり、免疫のない集団内に一人の発症者がいると、15-17 人が感染する（参考文献 30）。これまで感染個体における垂直感染の報告はない（参考文献 6）。

一方、イヌでは MV の自然感染の報告はない。

また、MV は腫瘍溶解活性を持つことが報告されており（参考文献 31-35）、様々な腫瘍に感染して腫瘍の増大を抑制することから、近年ウイルス療法の候補として研究が進められている。主に MV ワクチン株を用いた研究が進められており、ワクチン株レセプターである CD46 が多くの癌種で正常細胞と比べて過剰発現しているため、効率良く感染することを利用する。その後、感染細胞間で細胞融合を引き起こして多核巨細胞を形成し、最終的に細胞を死に至らしめる。

2 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

イ 構成及び構成要素の由来

- ① MV-HL 株 RNA ゲノムの全長 cDNA および各遺伝子はクローニングされており、全配列が明らかとなっている（別添資料 5）。別添資料 5, 6 に示すように、全長 cDNA 内の各遺伝子間の非翻訳領域内に、塩基置換および 2 箇所の 6 塩基挿入による特異的制限部位を人為的に導入しており、対応する制限酵素によってそれぞれの遺伝子をカセットとして容易に入れ替えたり、外来遺伝子を挿入することが可能である。全塩基配列と使用したプライマー配列は別添資料 5, 7 に示した。導入した制限部位には下線を付し、挿入した塩基配列はハイライトで示した。

H 遺伝子カセットは 2022 塩基であり、H 遺伝子翻訳領域（open reading frame; ORF）は 1854 塩基（617 アミノ酸）である。市販のクローニングプラスミド pBluescriptSK-（Stratagene 社）に挿入したのち、後述の変異を導入した（別添資料 8）。

マーカー蛋白質として使用する緑色蛍光蛋白質 *EGFP* 遺伝子は、オワンクラゲ（*Aequorea coerulea*）由来であり、哺乳細胞発現プラスミド pEGFP-N1（clontech 社）から PCR 法によりクローニングした。*EGFP* 遺伝子カセットは 852 塩基で両端に *FseI* 制限部位を導入してある。ORF は 720 塩基（239 アミノ酸）である。クローニングプラスミド pBluescriptSK-に挿入した（別添資料 8）。

- ② 制限酵素地図は別添資料 6, 8 に示した。制限部位は、各遺伝子カセットの PCR 増幅時に用いるプライマー内に設計して導入した。

「rMV-SLAMblind」

H 遺伝子の変異体としては、H 蛋白質上の SLAM 結合部位にアミノ酸変異を導入した変異体（H SLAM blind）を作製した。これにより SLAM 陽性細胞への感染能が消失する（別添資料 9・参考文献 35, 36）。

「rMV-SLAMblind-EGFP」

上記 rMV-SLAMblind をもとに、さらにウイルスゲノム N-P 遺伝子間に *EGFP* 遺伝子を挿入した。これにより感染細胞内でウイルスの複製に伴い EGFP が産生される。

これらの変異導入部位は別添資料 8 に示した。変異導入には通常の site-directed mutagenesis 法を用い、目的部位以外に変異がないことをシーケンシングで確認した。

ロ 構成要素の機能

- ① 別添資料 8 に示すように、各遺伝子カセットは、ウイルスゲノム上の遺伝子間介在配列、非翻訳領域および ORF を含み、両端にそれぞれ特異的制限配列を導入している。本遺伝子組換え MV の作出に用いた供与核酸の構成要素の由来および機能は別添資料 10 とした。
- ② 産生される H SLAM blind 蛋白質は、533 番目の Arg が Ala に置換されており、PVRL4 には結合するが SLAM への結合はできないことを確認している（別添資料 9・参考文献 21, 35）。
EGFP は感染細胞内で発現し、紫外線照射により感染部位を特定できる。
- ③ 各蛋白質の機能上、宿主の代謝系を変化させることは考えにくい。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

前述のように MV-HL ゲノム全長 cDNA の各遺伝子間に制限配列を導入した cDNA を、研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令第二条第十三号の文部科学大臣が定める認定宿主ベクター系 EK1 (pGEM-5zf(+)) を元にして作製した pMDB1 (別添資料 11) の *BsmI*-*EagI* 間に挿入した。これを組換えウイルス作出用のベクター pMV-HL (7+) として用いた (別添資料 6・参考文献 37)。

ロ 特性

- ① ベクター pMV-HL (7+) は、pMDB1 3168 塩基と制限部位を導入した MV-HL ゲノム全長 cDNA 15906 塩基からなる。
- ② pMV-HL (7+) は、T7 RNA polymerase 発現細胞内でウイルスゲノム RNA を転写するための T7 promoter 領域を含む。また転写後に正確な RNA ウイルスゲノム長に切り取るための ribozyme 配列が含まれる (別添資料 6)。
- ③ pMV-HL (7+) はアンピシリン耐性遺伝子をもつ大腸菌でのみ増殖可能な伝達性のないプラスミドである。哺乳類細胞内では病原性・伝達性はなく、組換えも起こしにくい。
- ④ 制限部位を導入した MV-HL ゲノム cDNA を挿入する以外の改造、修飾は行っていない。
- ⑤ pGEM-5zf (+) (accession No. X65308) のプラスミドマップは別添資料 11 に示した。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入する核酸全体の構成

ベクター内での供与核酸の位置、方向、制限配列は別添資料 12 に示した。

ロ 宿主内に移入する核酸の移入方法

供与核酸の移入方法は、ベクターおよび遺伝子カセットを特異的制限酵素で切り出し同じ制限酵素で処理したベクターへ遺伝子カセットを挿入する、通常の遺伝子組換え法を用いた（別添資料 12）。

rMV-SLAMblind を作製するため、pMV-HL (7+) の H 遺伝子を H SLAMblind に入れ替えた pMV-SLAMblind を作出した。

また、rMV-SLAMblind-EGFP を作製するため、EGFP 遺伝子カセットを pMV-SLAMblind の N-P 遺伝子間 *FseI* 制限部位に挿入した。

後述のリバースジェネティクスに用いる T7 RNA polymerase 遺伝子組換えワクシニアウイルス (MVA-T7) (参考文献 38) およびウイルス構成蛋白質 N, P, L 発現プラスミド (参考文献 39, 40) は、英国 Pirbright 研究所の Dr. T. Barrett からの譲渡を受けた。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

我々はモノネガウイルスの人工作出技術であるリバースジェネティクスを MV-HL 株で樹立しており (参考文献 37)、宿主内への核酸移行はそれを用いた。原理としては、MVA-T7 感染細胞に、各組換え pMV-HL (7+)、および N, P, L 発現プラスミドを市販のトランスフェクション試薬を用いて導入することで、擬似的に細胞内でウイルス複製が起こり、組換えウイルスが得られる。概要は別添資料 13 に示した。

得られた遺伝子組換え MV は、PVRL4 陽性の感受性細胞株 (ヒト乳癌由来 MCF7 細胞) で感染・増殖させ、通常の MV と同様にウイルス液を調製した (参考文献 35)。一部を RT-PCR 法によりシーケンシングを行い (別添資料 14)、塩基置換及び遺伝子挿入が正しく導入されていることを確認した。rMV-SLAMblind への変異導入は、SLAM 発現細胞への感染能の消失により確認した。EGFP の発現は、感染細胞の蛍光顕微鏡観察で確認した。それぞれ確認後、MCF7 細胞に感染させ、常法に従ってウイルス液を調製した。

リバースジェネティクスで用いた MVA-T7 は哺乳類細胞複製欠損型であり、調製したウイルス液に含まれないことを PCR 法で確認してある (別添資料 15)。

なお、これらは研究開発段階の第二種使用等 (微生物使用実験) として実施した。

(4) 宿主内に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

- ① rMV-SLAMblind において、H SLAM blind 遺伝子は、ウイルスゲノム上の元の遺伝子と同じ位置に移入されている。

rMV-SLAMblind-EGFP において、EGFP 遺伝子は、ウイルスゲノム上の N 遺伝子と P 遺伝子の間に挿入されている (別添資料 12)。

- ② 移入された遺伝子は、ウイルス複製時に一本鎖 RNA ゲノムとして複製され、もしくは各遺伝子 mRNA として転写される。複製の過程で、変異導入遺伝子の変異 (3 塩基置換) の復元の起きる確率は、前述のウイルスゲノム変異率から推察して著しく低いと考えられる。実際これまでに、PVRL4 発現 Vero 細胞を用いて rMV-SLAMblind の継代を 9 代行った後にウイルスゲノムのシーケンシングを行ったところ、導入した変異は安定して保持されていた (別添資料 16)。また、ヒト乳癌および膵臓癌細胞移植マウスへ rMV-SLAMblind を接種後 76 および 84 日後の癌組織から回収されたウイルスの塩基配列

を調べたところ、導入した変異が保持されていることを確認した（別添資料 17）。

rMV-SLAMblind-EGFP の移入核酸“EGFP”の安定性については、ウイルスゲノムの複製機序において、一本鎖 RNA ゲノムと N 蛋白から構成されるヌクレオカプシドを鋳型としてゲノム末端から末端までの完全長 RNA が合成されるため、その過程で挿入遺伝子の欠失が起きるとは考えにくく、ウイルス継代後も安定して伝達すると考えられる。

ウイルス複製時に生じるウイルスゲノムの変異は、RdRp を構成する L 蛋白質が有する RNA polymerase 活性によるものであり、これら移入した核酸により変異率が変化することはないと考えられる。

- ③ MV は感染細胞内で各ウイルス蛋白質間の発現量比がそれぞれ常に一定の値を取ることが知られている（polar attenuation 効果：別添資料 1 図 3）。そのため、目的遺伝子の発現量はウイルス増殖に比例し、増殖に伴い一定の割合で目的蛋白質が産生される。

- ④ 本遺伝子組換え MV はリンパ系細胞への親和性が欠損されているが、ヒト細胞へ侵入し感染を成立させる可能性は否定できない。そのため、癌疾患犬の飼い主には麻疹ワクチン接種の有無を確認し、本申請の従事者は血清中の麻疹中和抗体価をあらかじめ測定する。免疫をもたない者は麻疹ワクチン接種後に実験に従事することとする。

ヒトにおいて MV 野外株と共感染した場合、MV 野外株から産生される H 蛋白質が本遺伝子組換え MV 粒子に取り込まれ、個体内において SLAM を発現するリンパ系細胞で複製・増殖することが予想されるが、野外株を保有する麻疹患者の感染細胞内で共存する可能性は極めて低く、無視できると考える。

他のウイルスとのキメラウイルスの産生が考えられるケースとしては、同じモービルウイルス属に属するイヌジステンパーウイルス（CDV）が癌疾患犬に共感染した場合に、上記と同様に CDV の H 蛋白質を粒子内に取り込んだ本遺伝子組換え MV が産生され、CDV 感受性である食肉目の動物へ感染する可能性が考えられるが、イヌ個体内で両者が共存する可能性は極めて低く、無視できると考えられる。さらに、通常ペットの犬は CDV ワクチン接種を受けており、自然経路で CDV が感染することは考えにくい。

- (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

本遺伝子組換え MV は、宿主同様 RT-PCR 法を用いることで、高感度に感染の有無を検出できる。検出方法の設定は別添資料 18 による。失活ウイルスを除外するため、具体的には、培養細胞を用いたウイルス力価測定試験によって感染性ウイルスが 1 粒子存在するウイルス液量を算出し、そのウイルス液から回収した RNA から RT-PCR によってウイルスを検出できる感度に校正し設定する。また導入した変異の確認は、変異部位の RT-PCR 産物の通常のシーケンシングにより簡易に同定できる（別添資料 14）。

その他の検出法としては、回収したサンプルを段階希釈し感受性細胞に接種後ウイルスによる細胞変性の有無により感染性ウイルスの存在を直接確認できる。しかし、糞便、尿、分泌液等を低希釈率で用いる事は現実的ではなく、細胞変性を確認するために最低 1 週間かかる。末梢血を分離し感受性細胞と共培養する検出方法もあるが、やはり細胞変性の確認に 1 週間かかる。また、分離されたウイルスが本遺伝子組換え MV であることの確認も最終的には RT-PCR とシーケンシングによるため、これらの方法

は利点に乏しい。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 増殖様式

rMV-SLAMblind は SLAM 結合能を欠失しているため、SLAM 陽性リンパ系細胞に感染する能力を欠き、病原性を示さない。正常ビーグル犬による安全性試験では、接種後の尿、糞便、唾液、血液でウイルスは検出されなかった（別添資料 19）。よってイヌ個体内で感染成立は起きなかったと考えられる。

rMV-SLAMblind-EGFP が産生する EGFP はウイルス感染・増殖能を変化させる性質は持たないため、増殖様式は rMV-SLAMblind と同様であると考えられる。

どちらも、レセプターPVRL4 を高発現する腫瘍部位で宿主と同様の様式で感染・増殖し腫瘍の増大を抑制すると考えられるが、リンパ節に感染しないため病原性は示さないと考えられる。

② 遺伝的特性

宿主同様、複製において DNA フォームを形成しないことから感染個体のゲノムへの挿入は起こらないと考えられる。

③ 病原性

導入した変異は SLAM への結合能の欠損及び EGFP の発現であり、これらの変異によって感受性動物の範囲を変えないと考えられる。

これまでの知見から、SLAM 陽性のリンパ節への感染・増殖が MV の病原性発現に重要と考えられており、我々の試験においても、rMV-SLAMblind を接種したカニクイザル、アカゲザルはウイルス血症を初めとする臨床症状を全く示さなかった（別添資料 20・参考文献 35）。過去のアカゲザル感染モデル系の報告でも、用いた野外株 MV の鼻腔内接種によりウイルスはリンパ組織で増殖しウイルス血症を起こすのに対し、SLAM 結合能を欠損した組換え MV（本遺伝子組換え MV とは異なる株）は 6 頭中 1 頭で接種後初期に低いウイルス力価のウイルス血症を起こしたのみで、全ての個体で臨床症状は示さなかった（別添資料 20・参考文献 41）。このことから、SLAM への結合能を欠失した MV は正常個体において一部 PVRL4 陽性細胞へ感染して増殖する可能性があるが、PVRL4 発現組織の限局のため感染・増殖の効率は低く、またリンパ節での増殖がないため病原性発現に至らないと考えられる。

健康なイヌでは MV の感染は成立せず、rMV-SLAMblind を接種した際も、体内におけるウイルスの増殖および体外への排出は起こらないことを、ビーグル犬を用いた安全性試験により確認している（別添資料 19）。一方、癌疾患犬ではレセプターPVRL4 を高発現する腫瘍部位で rMV-SLAMblind の感染・増殖が起こると予想される。よって PVRL4 発現腫瘍組織へ接種すると腫瘍内で複製し腫瘍の増大を抑制すると考えられるが、リンパ節では感染・増殖できないため、サルでの実験成績と同様に病原性は示さないと考えられる。また rMV-SLAMblind-EGFP が産生する EGFP は病原性を変化させる性質は持たないため、rMV-SLAMblind と同様の病原性を示すと考えられる。

rMV-SLAMblind は治療開始時に遠隔転移が確認できない場合に使用し、rMV-SLAMblind-EGFP は遠隔転移が認められる場合に使用することとしており、途中で

変更することはないため、接種動物体内で共存する可能性は考えにくく、万が一共存したとしても病原性等の特性に影響は与えないと考えられる。

本遺伝子組換え MV が万が一癌疾患犬体内で CDV 等モービリウイルス属ウイルスと共感染した場合、感染能を持つキメラウイルス粒子が産生される可能性があるが、当該ウイルスの H 遺伝子は SLAM 結合能を欠失しているため、新たに産生されるウイルス粒子は再感染はせず、持続感染能を持たない

④ 有害物質の産生性

導入した変異は SLAM への結合能の欠損及び EGFP の発現であり、これらの変異によって有害物質の産生性が変化することはないと考えられる。

⑤ 環境中への放散量

正常犬では感染が成立せず、体内での増殖・体外排出は起こらないことを確認している。癌疾患犬においては腫瘍内で本遺伝子組換え MV の増殖が起こればと考えられるため、増殖中は尿や患部からの滲出液などからの排出が考えられる。腫瘍の縮小に伴いウイルス増殖も減少するため、排出は収束すると考えられる。

⑥ 自然界での生存能力

SLAM への結合能の欠損により感染個体内での増殖が減少するため、自然界での生存能力は低下すると考えられる。EGFP の発現によって自然界での生存能力が変わることはないと考えられる。

⑦ 水平感染性・垂直感染性

SLAM への結合能の欠損により感染個体内での増殖が減少するため、水平感染性は低下するが、垂直感染性は変化しないと考えられる。EGFP の発現によって水平感染性・垂直感染性に影響を与えることはないと考えられる。

⑧ その他の生理学的性質

これまでに、MV が産生するウイルス蛋白質およびウイルス RNA が野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす報告はない。また、MV 自体に細菌や真菌などの微生物を減少させる影響は報告されておらず、むしろ MV 感染による免疫抑制のために感染個体の他の微生物への感受性が上昇することが知られている。本遺伝子組換え MV の性状は、SLAM への結合能の欠損及び EGFP 発現であり、免疫抑制を誘導しないことから、宿主と比較して他の微生物や野生生物に対して影響はないと考えられる。

また、腫瘍溶解活性については、SLAM への結合能の欠損は感染できる細胞種を限定するものであり、感染が成立した細胞内では宿主と同様に複製・増殖し腫瘍溶解性を示す。PVRL4 を発現するヒト乳癌細胞を移植した担癌マウスに接種すると腫瘍増大を著しく抑制し（別添資料 21・参考文献 35）、イヌ PVRL4 を発現するイヌ乳癌細胞移植マウスでも同様の成績が得られている（別添資料 3・参考文献 21）。EGFP の発現は本遺伝子組換え MV の腫瘍溶解活性に対して影響しないと考えられる。

⑨ 内在性ウイルスの活性化等

前述のように、MV の複製はすべて細胞質で行われ、DNA フォームを形成する過程がないため、感染個体ゲノムへの挿入は起こらないと考えられている（参考文献 24）。また、MV を含むモノネガウイルス目共通の複製機序として、ウイルス RNA ゲノムは常に N 蛋白質によってコーティングされたヌcleoカプシド構造をとるため、裸の RNA ゲノムが露出するステップがなく他の核酸と塩基対を形成し組換えが起こることは原理的に考えにくく、これまでにそのような報告はない（参考文献 23）。

MV の一本鎖 RNA ゲノムは非分節型であるため、インフルエンザウイルスのように他のウイルスとの交雑が起こることは考えにくい。そのため、宿主、本遺伝子組換え MV 共に内在性ウイルスとの組換え体が出現する可能性は極めて低い。また、万が一 2 種類の本遺伝子組換え MV が接種動物体内で共存しても両ウイルス間で組換えが生じることは考えにくい。

癌疾患犬個体で CDV との共感染等によって、rMV-SLAMblind のゲノムと CDV の膜蛋白を持つ感染性ウイルス粒子が一時的に生じる可能性は極めて低く、万一生じたとしてもこのキメラウイルスのゲノムは rMV-SLAMblind と同一であり、継続的に感染性を有する組換えウイルスが生じる可能性は考えにくい。

⑩ 検出方法及び識別方法

本遺伝子組換え MV と宿主は、ウイルスゲノムの変異導入部位を RT-PCR し、PCR 産物のシーケンシングによって容易に識別が可能である。方法を別添資料 14 に示した。

3 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

獣医療法に基づいて開設の届出が行われ、その構造設備が獣医療法に基づく基準に適合している診療施設（以下「治療施設」という。別添資料 22, 23）における動物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。

(2) 使用等の方法

治療方法等

- ① 本遺伝子組換え MV は、施設内の研究開発二種省令 P2 レベル試験室（以下「P2 試験室」という。別添資料 24-26）にて、感受性細胞で複製・増殖後、ウイルス液を調製する。本遺伝子組換え MV 溶液の調製、融解、希釈及び分注操作は、P2 試験室内の安全キャビネット内で行う。本遺伝子組換え MV 溶液の保管は、P2 試験室内の冷凍庫において行う。なお、本遺伝子組換え MV 溶液又はその凍結品を、開放系区域を通過して他の P2 レベル区域に運搬する必要がある場合には、三重に密閉した容器（別添資料 27 図 1：以下同じ。）に入れて運搬する。これらを廃棄する際には、厚生労働省「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」（参考情報 7）の 5 類感染症の項に従い 0.1～0.5% の次亜塩素酸ナトリウム溶液（以下「消毒薬」という。）による消毒又は高圧蒸気滅菌処理（121℃、20 分間）によるウイルスの不活化処理を行った後、東京農工大学安全マニュアルで定められている医療廃棄物処理規程（以下「医療廃棄物処理規程」という。別添資料 28）に従い廃棄する。

- ② 本遺伝子組換え MV を接種する患畜の飼い主には麻疹ワクチン接種の有無を確認し、接種歴の無い場合は試験開始前に医療機関で麻疹ワクチンの接種を受け、証明書を取得後に試験に参加することとする。飼い主及びその家族に妊婦が含まれる場合は当該患畜を治療の対象としない。なお、その家族の中に、イヌが麻疹ウイルス治療を受けたのちに妊娠する可能性のある者がいる場合には、飼い主同様麻疹ワクチンの接種歴を確認するとともに、接種歴が無い場合には医療機関で麻疹ワクチンの接種を受けてもらうこととする。本申請に携わる試験従事者はあらかじめ血清中の中和抗体価を測定し、免疫のない者は同様に医療機関で麻疹ワクチンの接種を受け証明書を取得後に試験に従事することとする。本遺伝子組換え MV 溶液（ウイルス力価 10^6 - 10^7 TCID₅₀ [50% tissue culture infectious dose]）を生理的食塩水で希釈し所定の接種量（1 ml）に調製したもの（以下「治療溶液」という。）を、P2 試験室内の安全キャビネット内で専用の注射針及び注射器から成るデバイス（以下「注入セット」という。別添資料 27 図 2）に充填し、三重に密閉した容器に入れて、直ちに施設内の研究開発二種省令 P2A レベル動物飼育室（以下「治療室」という。別添資料 24-26）に運搬する。
- ③ 臨床動物に対する本遺伝子組換え MV の選択及び接種法としては、治療開始時に遠隔転移が確認されない場合には rMV-SLAMblind を使用し、遠隔転移が認められる場合は転移巢の状態に応じて rMV-SLAMblind-EGFP または rMV-SLAMblind を使用することとする。治療の途中で変更することはない。これらの接種は、治療溶液を注入セットで腫瘍内、静脈内あるいは皮下注入することにより行う。詳細については別添資料 29 に示した。注入針の刺入及び抜去は慎重に行い、治療溶液の漏出及びエアロゾル化を最小限に止める。注入部位の周辺には布（滅菌された不織布）を二重に敷き詰める。また施術者への汚染を防ぐために、施術者はディスポーザブルキャップ、マスク、グローブ、及び術衣を着用して施術にあたる。また、接種後、接種動物の接種部位を消毒する。ウイルス漏出予防のために安静にさせ、絆創膏等による局所からの漏出を防ぐ措置を行い、治療室内に設置した飼育ケージ（以下「飼育ケージ」という。別添資料 26, 30）に移送する。
- ④ 後述の担癌動物での消長試験（別添資料 31）でウイルスの排出が検出された項目は尿サンプルで、安全性試験で正常犬への大量接種で検査した項目が尿、糞便、血液（血球及び血漿中の両方を含む）、分泌液（唾液及び涙液）である。感染性ウイルス 1 粒子を検出できる感度の RT-PCR であればウイルスの排出を捕捉し検出できる。よって、本遺伝子組換え MV 接種後、MV が排出される尿、糞便、血液、分泌液を回収し、同条件の RT-PCR 法（別添資料 18, 19）にて当該ウイルスの検出を週 2 回実施し、最後の接種から 2 週間以上経過したのちに続けて 2 回検出できなくなるまで、接種動物を飼育ケージ内で管理する。なお腫瘍が自壊する等した結果、滲出液を出すケースがあった場合は、これも「分泌液」に含め検査対象とする。飼育ケージ内で飼育される本遺伝子組換え MV 接種を受けたイヌの管理をする者は、毎回ディスポーザブルキャップ、マスク、グローブ、及び術衣を着用する。
- ⑤ 飼育ケージにおける管理期間中の接種動物の排泄物（尿、糞便、血液、分泌液等）は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物処理規程に従い廃棄する。なお、本遺伝子組換え

MV が検出されるか否かを調べるウイルス排出試験に使用する接種動物の排泄物等の取扱いも同様とする。排泄物等が床等へ落下した場合は床を消毒薬で拭き掃除をする。飼育管理期間中、接種動物に使用した器具、接種動物の排泄物等に接触した器具、管理者が着用した術衣等は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物処理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。

- ⑥ 飼育ケージにおける接種動物の管理期間中には、毎週 1 回、尿、糞便、血液及び分泌液中の本遺伝子組換え MV を RT-PCR 法（別添資料 18）で検出する。採取したサンプルは、直ちに凍結し専用の液体窒素保存槽中で保管する。最後の接種から 2 週間以上経過したのちに続けて 2 回検出限界以下となった場合には、その結果を東京農工大学イヌ遺伝子組換え麻疹ウイルス治療安全委員会（別添資料 32）に報告し、管理解除に関する審議を要請する。管理解除が承認された場合には、管理解除前日に接種動物の尿、糞便、血液及び分泌液中の本遺伝子組換え MV を再度 RT-PCR 法にて検査し、検出限界以下であることを確認したのちに管理解除を行う。本遺伝子組換え MV を接種したイヌは、原則として管理解除が承認されるまで管理区域を出ることはない。管理期間中、接種動物が死亡した場合は、飼い主の同意を得た上で、遺体から遺伝子組換え MV が逸脱することがないように遺体を 2 重に密封したのち、厚生労働省「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」（参考情報 7）の 5 類感染症の項に従い、高圧蒸気滅菌処理によるウイルスの不活化処理を治療室内にて講ずる。
- ⑦ 本遺伝子組換え MV による治療を行ったイヌにはマイクロチップを皮下に埋め込み、同定や追跡を可能とする。ただし、すでに埋め込まれている場合、あるいはマイクロチップの埋め込みが患犬の病状に著しい悪影響を及ぼすと獣医師が判断した場合には、この限りではない。飼育ケージにおける接種動物の管理解除後は、飼い主により最低 1 年間は室内あるいはそれに準ずる区域（飼い主が管轄あるいは管理する区域であり、庭、バルコニー、ベランダ、駐車場などを含む）での飼養を行うなど、飼養環境から接種動物が逃げ出すことがないように適切に管理を行うこととする。また動物愛護に配慮して、首輪やリードなどの逃亡防止措置を行った上で、散歩をさせることを可能とするが、排泄物は吸収パッド等で回収し消毒液を噴霧したのちに処理を行う。一定期間接種動物に対して定期的な検査を行い（管理解除後 1 ヶ月間は毎週 1 回、2 ヶ月日以降半年目までは 2 週間に 1 回、それ以降 1 年目までは 1 ヶ月に 1 回）、接種動物の尿、糞便、血液及び分泌液中から本遺伝子組換え MV が検出された場合には、直ちに接種動物を飼育ケージにおける管理下に移し、上記④、⑤と同様の措置を講ずる。定期的な検査の期間中および検査終了から 1 年以内に接種動物が死亡した場合は、飼い主の同意を得た上で、遺体から本遺伝子組換え MV が逸脱することがないように遺体を 2 重に密封したのち、飼い主が治療施設へ運搬し、厚生労働省「感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き」（参考情報 7）の 5 類感染症の項に従い、高圧蒸気滅菌処理によるウイルスの不活化処理を治療室内にて講ずる。万が一接種動物が逃げ出した場合は、法に基づき飼い主が直ちに接種動物を捕獲し飼養環境へ戻すとともに農工大の管理主任者へ連絡する。農工大管理主任者は情報を収集し、農林水産省・環境省に届け出る。なお、飼い主が定期検査（通院）できなくなる、室内飼養できなくなる等の問題が生じた場合には、農工大の治療室内に留め置き、経過観察ができるようにする。

これらのことは、試験に参加するための同意書（別添資料 33）に記載する。

(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
モニタリング計画書を参照。

(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
緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用等の結果

これまでに P2A 実験室内で、rMV-SLAMblind を健康なビーグル犬に接種し、血液や尿、
糞便中への排出を 28 日間 RT-PCR 法にて検出したが、ウイルスの排出は確認されな
かった（別添資料 19）。

(6) 国外における使用等に関する情報
国外での使用実績は無い。

(7) 接種動物の体内における挙動に関する情報

① 接種動物の体内における遺伝子組換えウイルスの消長に関する情報

健康なビーグル犬 6 頭に rMV-SLAMblind を静脈内接種し、28 日間一般状態の観察、
体重測定、尿検査、血液学的検査、及び血液生化学的検査を実施した。観察期間終了
後に安楽殺し、剖検を行った。試験期間中、発熱や体重減少、その他の症状は何も示
さなかった。ウイルス接種 1、4、7、14、28 日目に採取した血液、糞便、尿、唾液、
涙液から RT-PCR 法にてウイルス遺伝子の検出を試みたが、検出されなかった（別添資
料 19）。以上のことから、接種された遺伝子組換え MV は健康なイヌの体内では増殖せ
ず、速やかに排除されているものと考えられる。

担癌動物での消長については、ヒト乳癌移植 SCID マウスの実験において
rMV-SLAMblind を接種した場合、腫瘍塊が消失するまで腫瘍塊内でのみウイルスの増殖
が認められた（別添資料 21・参考文献 35）。イヌ乳癌移植 SCID マウスの実験でも同
様の腫瘍サイズの経過を示したことから（別添資料 3・参考文献 20）、ウイルス増殖
は腫瘍塊内に限局すると考えられる。一方、尿中からの排出を検索するために、別添
資料 18 の条件で検出試験を行った結果、ウイルス増殖極期（ウイルス接種 8 日後）に
1 個体でごく微量のウイルス遺伝子が検出された。また、腫瘍の縮小とウイルス量の
減少に伴いウイルス遺伝子は検出されなくなった（別添資料 31）。

これらのことから、癌疾患犬である接種動物においては腫瘍細胞の増殖期間中は本
遺伝子組換え MV は存在すると考えられるが、ウイルス増殖により腫瘍が縮小するに伴
い産生されるウイルス量も減少し、健康なイヌでの試験（別添資料 19）で接種したウ
イルス量と同程度以下まで減少すれば、ウイルスは検出できなくなると予想される。

② 接種動物体及び接種動物の排泄物、血液・体液等からの遺伝子組換えウイルスの環境
への拡散の有無に関する情報

rMV-SLAMblind は、健康なイヌでの感染試験においてウイルス血症及び唾液、尿、便

への排出は認められないことから（別添資料 19）、この試験での接種量（ウイルス力価 2×10^7 TCID₅₀）以下の範囲において健康なイヌから本遺伝子組換え MV の環境への拡散の可能性はないと考えられる。

よって、癌疾患犬である接種動物においては、腫瘍の縮小により産生されるウイルス量が減少し、健康なイヌでの実験で用いた接種ウイルス量と同程度以下になれば、①同様ウイルスの排出は検出限界以下になり環境中への拡散は生じないと考えられる。

③ 接種動物において本遺伝子組換えウイルスが垂直感染する可能性の有無に関する情報

宿主である MV はこれまで感染個体における垂直感染の報告がない（参考文献 6）。本遺伝子組換え MV が有する変異は H SLAMblind 及び EGFP 遺伝子挿入であり、組織指向性を拡大するとは考えにくいいため、宿主と同様に、接種動物において垂直感染する可能性は極めて低いと考えられる。

④ 野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

宿主である MV は、自然環境下でヒトで増殖を伴う感染が起こる。実験動物のサルにウイルス力価 $10^{4.5}$ TCID₅₀ 以上を静脈、経鼻、皮下接種した場合に感染・発症する例は報告されているが、野生動物への自然環境下での感染は知られていない。

本遺伝子組換え MV が有する変異は、H SLAMblind 及び EGFP 遺伝子挿入であり、感染性が著しく減弱され、感受性動物の範囲を変えないため、宿主と同様、野生動物に感染する可能性は極めて低く無視できると考えられる。

なお、癌疾患犬である接種動物においては、ウイルスの増殖により腫瘍が縮小すればウイルス産生量も減少し、①及び②同様、産生されるウイルス量が健康なイヌでの実験で用いた接種ウイルス量と同程度以下になれば、ウイルスの排出は検出限界以下になると考えられる。

⑤ その他必要な情報

前述のように、宿主である MV および本遺伝子組換え MV の複製はすべて細胞質で行なわれ、増殖の過程において DNA フォームを形成しない。そのため、感染個体のゲノムに組み込まれることはない。また最終的に個体の免疫系の働きによりウイルスは排除されることから、接種動物からの排出が消失した後に再びウイルス増殖が起こることは考えにくい。さらに MV は、リアソータントが出現しやすいインフルエンザウイルスなどの分節型ウイルスとは異なり、非分節型-鎖 RNA ウイルスであるため、ウイルス遺伝子のリアソートメントが起こることはなく、高い病原性を有する新型ウイルスが出現する可能性は極めて低い。

II 項目ごとの生物多様性影響評価

1. 他の微生物を減少させる性質（競合、有害物質の産生等により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

宿主 MV-HL 株を含む MV 野外株では、これまでに他の微生物を減少させる性質を持つ報告はなされていない。rMV-SLAMblind は宿主と比較して病原性が低下し、感染個体から速やかに排除される（別添資料 20・参考文献 35, 41）。外来遺伝子として組み込むオワンクラゲ由来 EGFP は、これまでに毒性を示すという報告はなく、野生動植物に影響を与えるという報告もない。

これらのことから、他の微生物を減少させる性質に起因し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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、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ずるおそれはないものと判断した。

2. 病原性（野生動物に感染し、それらの野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質）

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

MV 野外株は自然環境下でヒトで増殖を伴う感染が起こる。実験動物のサルに対し鼻腔内接種などの特殊な条件下で感染が成立することが知られているが、野生動物への自然環境下での感染は知られていない。本遺伝子組換え体は、H SLAM blind 変異によって SLAM への結合能を欠くことから、宿主に比べ病原性が低下している。これらのことから、病原性に起因して影響を受ける可能性のある野生生物は特定されなかった。

なお、ヒトは麻疹ワクチン接種によって終生免疫が付与される。麻疹ワクチン接種は本遺伝子組換え MV に対しても宿主同様有効と考えられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、使用方法が限定された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ものと判断した。

また、本遺伝子組換え MV は感染性が減弱されているもののヒトに感染する可能性が否定できないことから、使用に当たっては治療従事者等ヒトへの悪影響の排除に十分留意する。具体的には、患畜の飼い主には麻疹ワクチン接種歴の有無を聴取し、接種歴がない場合にはあらかじめ麻疹ワクチンを接種する。また、治療に従事する者は中和抗体を測定し、免疫を持たない者にはあらかじめ麻疹ワクチンを接種する。

3. 有害物質の産生性（野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質）

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主である MV 野外株が産生するウイルス蛋白質およびウイルス RNA 自体が毒性を持つ報告はこれまでにない。また野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質も報告されていない。本遺伝子組換え MV に導入された変異によって新たに有害物質の産生能が付与されることは起こらないと予測され、外来遺伝子として組み込む EGFP（オワンクラゲ由来）が有害性を示す報告もこれまでにない。

以上のことから、有害物質の産生性によって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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、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ものと判断した。

4. 核酸を水平伝達させる性質（法が対象とする技術により移入された核酸を野生動植物または他の微生物に伝達する性質）

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

MV 複製の過程において、MV の RNA ゲノムは常に N 蛋白質によってコーティングされ、ヌクレオカプシド構造をとる。そのため裸の RNA ゲノムが他の核酸と塩基対を形成して組換えが起こることは原理的に考えにくく、これまでにそのような報告はない（参考文献 23）。また、MV は非分節型の鎖 RNA ウイルスであるため、他のウイルスと交雑種ができることは考えられない。本遺伝子組換え MV に導入した変異によってこれらの性質が変化するとは考えにくいし、外来遺伝子として組み込む EGFP がこれらの性質を示す報告もこれまでになく、核酸の水平伝達による野生動植物への影響が生ずる可能性はないと評価できる。

以上のことから、使用方法が限定された第一種使用規程に基づく使用の範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、使用方法が限定された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ものと判断した。

5. その他の性質（生態系の基盤を変化させることを通じて間接的に野生動植物等に影響を与える性質等生物多様性影響評価を行うことが適切であると考えられるもの）

上記の他に、本遺伝子組換え MV に関して生物多様性影響の評価を行うことが適切であると考えられる性質はないと判断された。

Ⅲ 生物多様性影響の総合的評価

他の微生物を減少させる性質については、宿主を含む MV 野外株でそのような性質の報告がなく、本遺伝子組換え MV に導入した変異および挿入した外来遺伝子によってその性質が変化することはないと考えられることから、第一種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ものと判断した。

病原性については、本遺伝子組換え MV は宿主に比べて病原性が減弱していることから、使用方法が限定された第一種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じるおそれはないものと判断した。なお、使用に当たっては、ヒトへの悪影響の排除に十分留意することとし、患畜の飼い主及び治療に従事する者に対し、必要に応じてあらかじめ麻疹ワクチンを接種する。

有害物質の産生性については、宿主を含む MV 野外株でそのような性質の報告がなく、本遺伝子組換え MV に導入した変異および挿入した外来遺伝子によってその性質が変化することはないと考えられることから、第一種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じるおそれはないものと判断した。

核酸を水平伝達する性質については、宿主を含む MV 野外株でそのような性質の報告がなく、本遺伝子組換え MV に導入した変異および挿入した外来遺伝子によってその性質が変化することはないと考えられることから、使用方法が限定された第一種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じるおそれはないものと判断した。

以上を総合的に評価し、本遺伝子組換え MV を使用方法が限定された第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

別添資料

1. 麻疹ウイルスの分類・構造・複製様式
2. PVRL4 の構造と MV-H との相互作用
3. イヌ乳ガン細胞株を用いた rMV-SLAMblind の抗腫瘍能評価
4. MV 野外株のカニクイザルに対する病原性試験
5. MV-HL(7+) ゲノム cDNA 塩基配列
6. rMV-HL(7+)構築図
7. pMV-HL(7+) 構築 primer 配列
8. 本遺伝子組換え MV 作出用遺伝子カセット構築図
9. rMV-SLAMblind の in vitro 感受性試験
10. 供与核酸の由来および機能
11. pGEM-5z, pMDB1 プラスミドマップ
12. pMV-SLAMblind 構築図
13. リバースジェネティクス模式図
14. シーケンシングによる接種ウイルス内の導入変異部位の配列確認
15. PCR 法によるワクチニアウイルス検出試験
16. rMV-EGFP-SLAMblind の細胞継代による変異復帰の有無の確認試験
17. rMV-SLAMblind のヒト膵臓癌及び乳癌細胞移植マウス接種後のウイルス H 遺伝子配列解析
18. 組換え MV 接種動物からのウイルス排出検出試験
19. rMV-SLAMblind のビーグルに対する安全性試験
20. rMV-SLAMblind の霊長類サルに対する病原性試験
21. ヒト乳ガン細胞株 Xenograft モデルを用いた、rMV-SLAMblind の抗腫瘍効果の評価試験
22. 治療施設地図および室内配置図
23. 治療施設内動線
24. P2 試験室・P2A 治療室登録確認証明
25. 東京農工大 動物医療センター会議 議事録 2014 年 12 月 11 日
26. P2 試験室・P2A 治療室見取り図詳細および室内写真
27. 遺伝子組換え MV の運搬容器、注入セット
28. 東京農工大・医療廃棄物処理規程
29. 本遺伝子組換え MV の使用方法
30. クリーンブース、HEPA フィルター資料
31. rMV-SLAMblind の腫瘍移植マウス接種後の尿中ウイルス排出試験
32. 東京農工大学イヌ遺伝子組換え麻疹ウイルス治療安全委員会細則と第一回議事次第
33. 飼い主への同意説明書

参考文献

1. Kobune F, Takahashi H, Terao K, Ohkawa T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Sakata H, Yamanouchi K, Kai C. Nonhuman primate models of measles. *Lab Anim Sci.* 1996 46(3):315-20.
2. Irie T, Kiyotani K, Igarashi T, Yoshida A, Sakaguchi T. Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation by paramyxovirus V protein. *J Virol.* 2012 86(13):7136-45.

3. Sparrer KM, Pfaller CK, Conzelmann KK. Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *J Virol.* 2012 86(2):796-805.
4. Palosaari H, Parisien JP, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol.* 2003 77(13):7635-44.
5. Griffin DE. Measles Virus; in *Fields Virology, Fifth Edition Volume 2.* p1558-1567. 2006. Editor-in-chief: David M. Knipe and Peter M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins. ISBN-13: 978-0-7817-6060-7
6. 医科ウイルス学 改訂第 2 版 第 11 章 ウイルスの生態と伝播 著者：浦澤正三 p.205-206. 2000 年 大里外誉郎編集 南江堂 ISBN 4524214488
7. Meyer HM Jr, Brooks BE, Douglas RD, Rogers NG. Ecology of measles in monkeys. *Am J Dis Child.* 1962 103:307-13.
8. Kobune F, Sakata H, Sugiura A. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol.* 1990 64(2):700-5.
9. van Binnendijk RS, van der Heijden RW, Osterhaus AD. Monkeys in measles research. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995;191:135-48.
10. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 2000 406(6798):893-7.
11. Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, Richardson CD. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* 2011 7(8):e1002240.
12. Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature.* 1995 376(6537):260-3.
13. Bleharski JR1, Niazi KR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol.* 2001 167(6):3174-81.
14. Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prüfer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB Jr, Cichutek K, von Messling V, Lopez M, Cattaneo R. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature.* 2011 480(7378):530-3.
15. Zhang X, Lu G, Qi J, Li Y, He Y, Xu X, Shi J, Zhang CW, Yan J, Gao GF. Structure of measles virus hemagglutinin bound to its epithelial receptor nectin-4. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 (1):67-72.
16. Delpeut S, Noyce RS, Richardson CD. The tumor-associated marker, PVRL4 (nectin-4), is the epithelial receptor for morbilliviruses. *Viruses.* 2014 6(6):2268-86.
17. Pratakpiriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R. Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. *J Virol.* 2012 86(18):10207-10.
18. Mateo M, Navaratnarajah CK, Syed S, Cattaneo R. The measles virus hemagglutinin β -propeller head β 4- β 5 hydrophobic groove governs functional interactions with nectin-4 and CD46 but not those with the signaling lymphocytic activation molecule. *J Virol.* 2013 87(16):9208-16.
19. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol.* 2001 75(13):5842-50.

20. Ono N, Tatsuo H, Tanaka K, Minagawa H, Yanagi Y. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J Virol.* 2001 75(4):1594-600.
21. Shoji K, Yoneda M, Fujiyuki T, Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Ogihara K, Naya Y, Ikeda F, Matsuda H, Sato H, Kai C. Development of new therapy for canine mammary cancer with recombinant measles virus. *Mol Ther Oncolytics.* 2016 3:15022.
22. Katzourakis A, Gifford RJ. Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet.* 2010 6(11):e1001191.
23. Iida, A. et al. Concept and Technology Underlying Sendai Virus (SeV) Vector Development; in *Sendai Virus Vector: Advantages and Applications.* p.71. 2014. Editor: Yoshiyuki Nagai, Springer, ISBN 978-4-431-54555-2
24. Zhang X, Rennick LJ, Duprex WP, Rima BK. Determination of spontaneous mutation frequencies in measles virus under nonselective conditions. *J Virol.* 2013 87(5):2686-92.
25. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *J Virol.* 2010 84(19):9733-48.
26. Sato H, Kobune F, Ami Y, Yoneda M, Kai C. Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008 31(1):25-35.
27. Ohno S, Ono N, Seki F, Takeda M, Kura S, Tsuzuki T, Yanagi Y. Measles virus infection of SLAM (CD150) knockin mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol.* 2007 81(4):1650-9.
28. Welstead GG, Iorio C, Draker R, Bayani J, Squire J, Vongpunsawad S, Cattaneo R, Richardson CD. Measles virus replication in lymphatic cells and organs of CD150 (SLAM) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 102(45):16415-20.
29. Liebert UG, Finke D. Measles virus infections in rodents. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995;191:149-66.
30. Monto AS. Interrupting the transmission of respiratory tract infections: theory and practice. *Clin Infect Dis.* 1999 28(2):200-4.
31. Msaouel P, Iankov ID, Allen C, Morris JC, von Messling V, Cattaneo R, Koutsilieris M, Russell SJ, Galanis E. Prostate. Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer. 2009 69(1):82-91
32. Allen C, Paraskevakou G, Liu C, Iankov ID, Msaouel P, Zollman P, Myers R, Peng KW, Russell SJ, Galanis E. Oncolytic measles virus strains in the treatment of gliomas. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 8(2):213-20.
33. McDonald CJ, Erlichman C, Ingle JN, Rosales GA, Allen C, Greiner SM, Harvey ME, Zollman PJ, Russell SJ, Galanis E. A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 99(2):177-84.
34. Blechacz B, Splinter PL, Greiner S, Myers R, Peng KW, Federspiel MJ, Russell SJ, LaRusso NF. Engineered measles virus as a novel oncolytic viral therapy system for hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2006 44(6):1465-77.
35. Sugiyama T, Yoneda M, Kuraishi T, Hattori S, Inoue Y, Sato H, Kai C. Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activation molecule as a novel oncolytic virus for breast cancer treatment. *Gene Ther.* 2013 20(3):338-47.

36. Vongpunsawad S, Oezgun N, Braun W, Cattaneo R. Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. *J Virol.* 2004 78(1):302-13.
37. Terao-Muto Y, Yoneda M, Seki T, Watanabe A, Tsukiyama-Kohara K, Fujita K, Kai C. Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. *Antiviral Res.* 2008 80(3):370-6.
38. Wyatt LS1, Moss B, Rozenblatt S. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology.* 1995 210(1):202-5.
39. Baron MD, Barrett T. Sequencing and analysis of the nucleocapsid (N) and polymerase (L) genes and the terminal extragenic domains of the vaccine strain of rinderpest virus. *J Gen Virol.* 1995 76 (Pt 3):593-602.
40. Baron MD, Shaila MS, Barrett T. Cloning and sequence analysis of the phosphoprotein gene of rinderpest virus. *J Gen Virol.* 1993 74 (Pt 2):299-304.
41. Leonard VH, Hodge G, Reyes-Del Valle J, McChesney MB, Cattaneo R. Measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule (SLAM; CD150) is attenuated and induces strong adaptive immune responses in rhesus monkeys. *J Virol.* 2010 84(7):3413-20.

参考情報

1. 厚生労働省：日本の麻疹排除状態認定 Press Release 平成 27 年 3 月 27 日
2. WHO: Measles. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/>
3. WHO 発表による過去 5 年の麻疹 genotype 流行図
4. 国立感染症研究所: 麻疹 http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k03/k03_03/k03_03.html
5. 国立感染症研究所：平成 25 年度 麻疹風疹ワクチン接種状況
6. PubMed による麻疹ウイルス蛋白質の毒性に関する文献検索結果
7. 感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き

緊急措置計画書

平成28年8月10日

氏名 国立大学法人東京農工大学
学長 松永 是
住所 東京都府中市晴見町3-8-1

第一種使用規程の承認を申請している（乳癌治療用遺伝子組換え麻疹ウイルス）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

実施体制 国立大学法人 東京農工大学 環境安全管理センター（別添）

実施責任者 センター長（個人名は個人情報につき非開示）

実施責任者は（乳癌治療用遺伝子組換え麻疹ウイルス）（以下、本遺伝子組換え MV という）が生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合には、国立大学法人東京農工大学環境安全管理センターに報告するとともに、国立大学法人東京大学医科学研究所に報告し、国立大学法人東京農工大学環境安全管理センターは緊急措置対応のための学内体制及び連絡窓口を通じて、実施責任者とともに緊急処置を講じる。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

（1）本遺伝子組換え MV の接種を受けたイヌ及びその所有者に関する情報を整理して記録する。

（2）さらに、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、（1）により把握しているイヌの所有者に対して情報提供を依頼し、得られた情報を整理して記録する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

2で把握した関係者に対して、電話や文書などにより連絡を取る。また、大学のホームページにおいても本件についてのお知らせを掲載するとともに、問い合わせ専用窓口を設置する。

4 申請に係るがん疾患の犬・猫の治療に使用する遺伝子組換えウイルスを不活化する具体的な措置の内容又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

本遺伝子組換え MV を含む溶液は密閉容器に保管の上、オートクレーブ処理による不活化措置を実施する。また、P2A 実験室は、消毒薬による拭き取りや消毒薬の散布を行うことで、拡散を防止する。

5 申請に係るがん疾患の犬・猫の治療に使用する遺伝子組換えウイルスの接種動物を、拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

- (1) 接種動物を管理解除した後に、体内に本遺伝子組換え MV が残存していることが確認された場合には、本遺伝子組換え MV が自然環境に拡散しないよう必要な拡散防止措置（本遺伝子組換え MV によって汚染されたおそれのある施設、糞や敷料等の資材や死体等の消毒を含む）を直ちに執る。具体的には、本学治療施設に収容の上、管理下に置き、P2A 実験室内の飼育ケージ内で隔離飼育を行う。同時に、飼い主の飼養施設について消毒液による拭き取りや消毒薬の散布を行い、本遺伝子組換え MV の拡散を防止する。
- (2) 収容された接種動物については、尿、糞便、血液及び体液中に当該ウイルス遺伝子が検出されないことを確認した場合のみ、管理を解除することができる。また、接種動物が死亡した場合は、遺体を二重に密封したのち、高圧蒸気滅菌処理によるウイルスの不活化処理を治療室内にて講ずる。

6 農林水産大臣及び環境大臣への速やかな連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに、農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課 及び環境省自然環境局野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための学内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

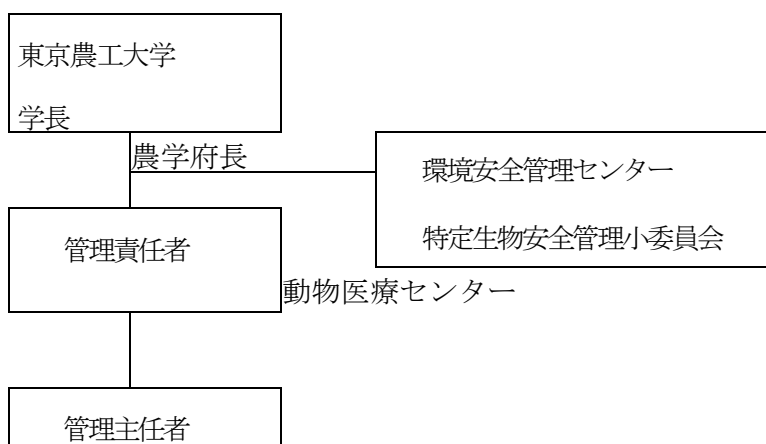
7 その他必要な事項

—

(別添) 国立大学法人東京農工大学 環境安全管理センター 組織

委員長	環境安全担当副学長・センター長	(個人名は個人情報につき非開示)
委員	副センター長	(個人名は個人情報につき非開示)
	副センター長	(個人名は個人情報につき非開示)
	専門職員	(個人名は個人情報につき非開示)
	兼務職員	(個人名は個人情報につき非開示)
	兼務教員	(個人名は個人情報につき非開示)
	事務職員	(個人名は個人情報につき非開示)

2 管理体制



管理責任者

農学研究院 教授 (個人名は個人情報につき非開示)

管理主任者

農学研究院 教授 (個人名は個人情報につき非開示)

モニタリング計画書

平成28年8月10日

氏名 国立大学法人東京農工大学

学長 松永 是

住所 東京都府中市晴見町3-8-1

イ 実施体制及び責任者

実施体制 国立大学法人 東京農工大学 環境安全管理センター (別添)

実施責任者 環境安全管理センター長

ロ モニタリングの対象となる野生生物等の種類の名称

治療に用いた本遺伝子組換え MV が接種動物の環境への拡散を極力抑制することを目的とするため、モニタリングの対象は、治療に用いた本遺伝子組換え MV とする。

ハ モニタリングを実施する場所及びその場所における対象となる野生動物等の生息又は生育状況

実施者が、飼い主に対し以下に定める期間内に同センターに定期的に来院させ、接種動物についての検査を実施することによって実施する。接種動物の尿、糞便、血液及び分泌液を対象とする。

ニ モニタリングの期間

管理解除後1年間とする。

接種動物の体内に本遺伝子組換え MV の残存が確認されたこと等により治療施設に収容され、再び管理解除がなされる場合には、当該解除日を起算日とする。

ホ 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

管理解除後1ヶ月は毎週1回、2ヶ月目以降半年間は2週間ごと、それ以降1年目までは1ヶ月ごとに定期的な検査を行い、接種動物の尿、糞便、血液及び分泌液を回収し、RT-PCR法で本遺伝子組換え MV の検出を行う。

ヘ モニタリングの結果の解析の方法

感染性ウイルス1粒子を検出できる感度の RT-PCR を行い、結果が陰性の場合、本遺伝子組換え MV の排出が検出限界以下と判定する。

ト 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告の方法

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに、農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための学内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

また、モニタリングの終了後、その結果概要を農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に報告する。

チ その他必要な事項

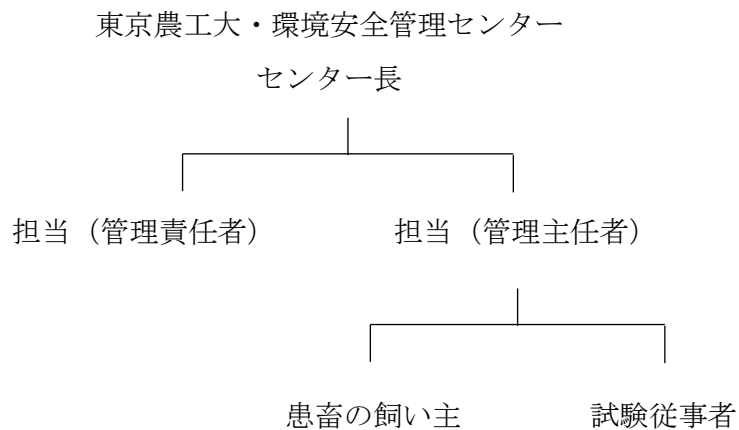
接種動物の尿、糞便、血液及び分泌液から本遺伝子組換え MV が検出された場合には、直ちに接種動物を治療施設内の飼育ケージで隔離飼育を行う。飼い主の飼養施設は、消毒液による拭き取りや消毒液の散布を行い、本遺伝子組換え MV の拡散を防止する。

また、モニタリング実施の実効性を確保するため、治療対象となる疾患犬の所有者に対して事前に十分な説明を行い、通院が困難な場合や情報収集及び経過観察が困難と判断される場合には治療対象から除外する。

(別添)

モニタリング実施体制

実施体制図



責任者	東京農工大・環境安全センター長	(個人名は個人情報につき非開示)
担当者 (管理責任者)	農学研究院 教授	(個人名は個人情報につき非開示)
担当者 (管理主任者)	農学研究院 教授	(個人名は個人情報につき非開示)
試験従事者	農学研究院	(個人名は個人情報につき非開示)
患畜の飼い主		(個人名は個人情報につき非開示)

資料1 麻疹ウイルスの分類・構造・複製様式

図1 麻疹ウイルス(measles virus: MV)の学問上分類とウイルス粒子構造

分類:
 一本鎖マイナス鎖RNAウイルス(モノネガウイルス目)
 パラミクソウイルス科モービリウイルス属

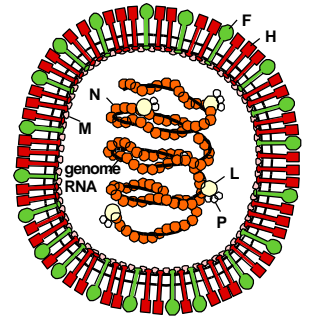
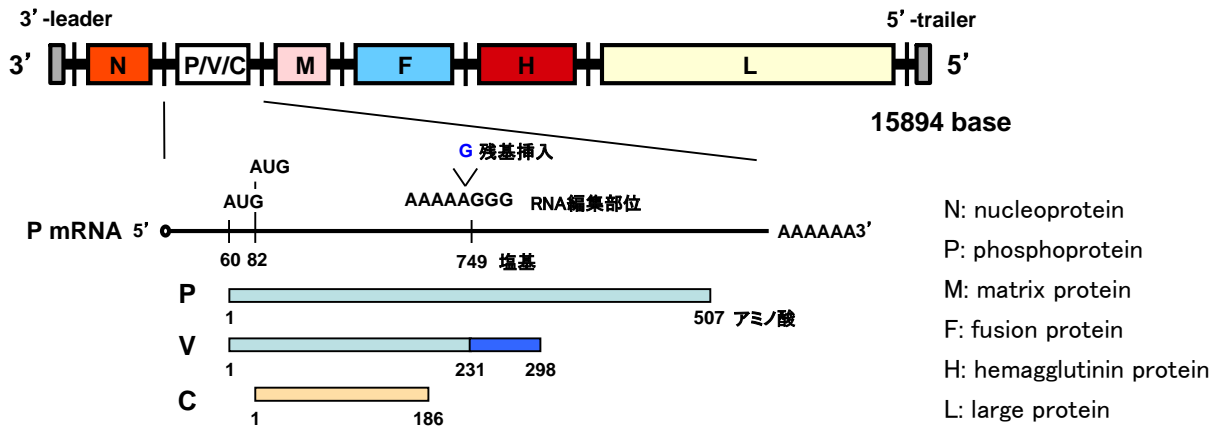
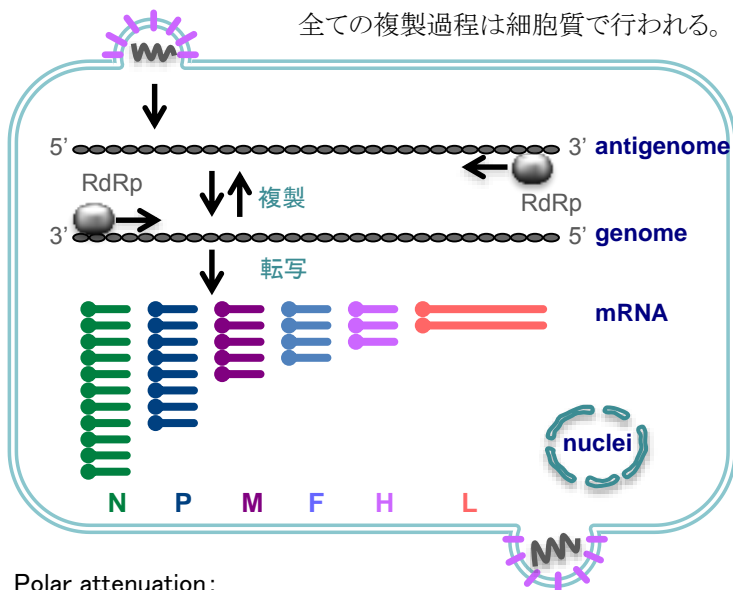


図2 MV RNA ゲノム構造



RNA編集:
 パラミクソウイルス科に共通の機構で、RNA依存RNAポリメラーゼ (RdRp)によるP遺伝子転写時に、一定の割合でRNA編集部位にG残基が挿入される。
 これにより、下流の読み枠がP蛋白と異なるV蛋白が産生される。

図3 麻疹ウイルスの細胞内増殖様式



Polar attenuation:
 モノネガウイルスに共通の機構で、RdRpによる各遺伝子転写の際に、ゲノム上流の遺伝子mRNA量が最も多く、下流に行くに従いmRNA量が段階的に減少する現象。

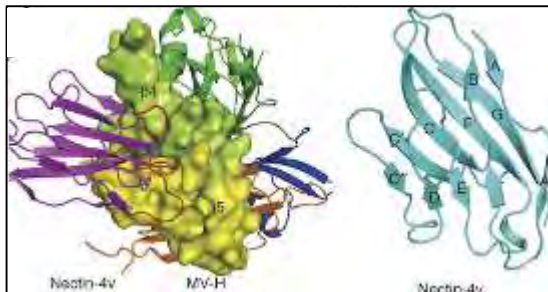
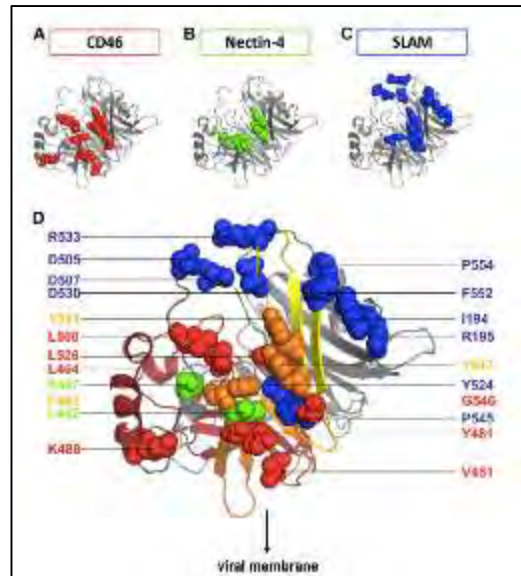
資料 2 PVRL4の構造とMV-H蛋白との相互作用

1) PVRL4の立体構造模式図
(文献11)



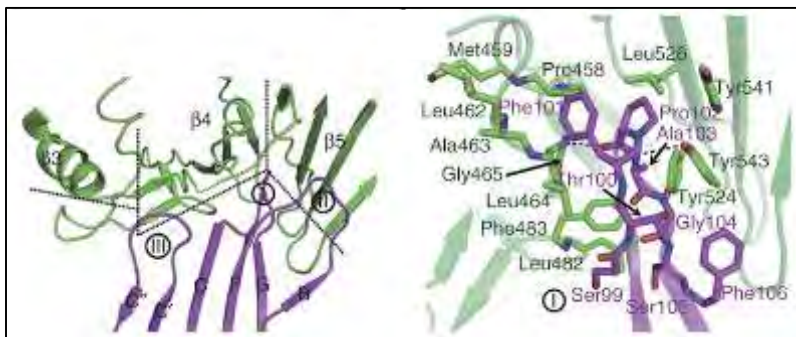
MV-H蛋白はPVRL4の
V domainに結合する(文献14)

2) MV-H蛋白の高次構造と
レセプター結合領域(文献18)



3) 左: PVRL4 V domain(紫)とMV-Hの
結合状態の立体構造

右: PVRL4 V domain立体構造(水色)
(文献15)



4) 右: PVRL4 V domainとMV-Hの結合
は3カ所(I, II, III)

左: 結合部位Iの立体構造の詳細。
PVRL4 V domain内F-G loop上
のsite I内 Phe-Pro-Ala-Glyが
H蛋白と相互作用する。(文献
15)

5) 動物種間での PVRL4 一次配列の比較

動物種によるヒト PVRL4(全長)との相同性

イヌ	94%
ヒツジ	92%
マウス	92%
ハヤブサ	78%
ゼブラフィッシュ	71%

PVRL4 V domain の配列比較

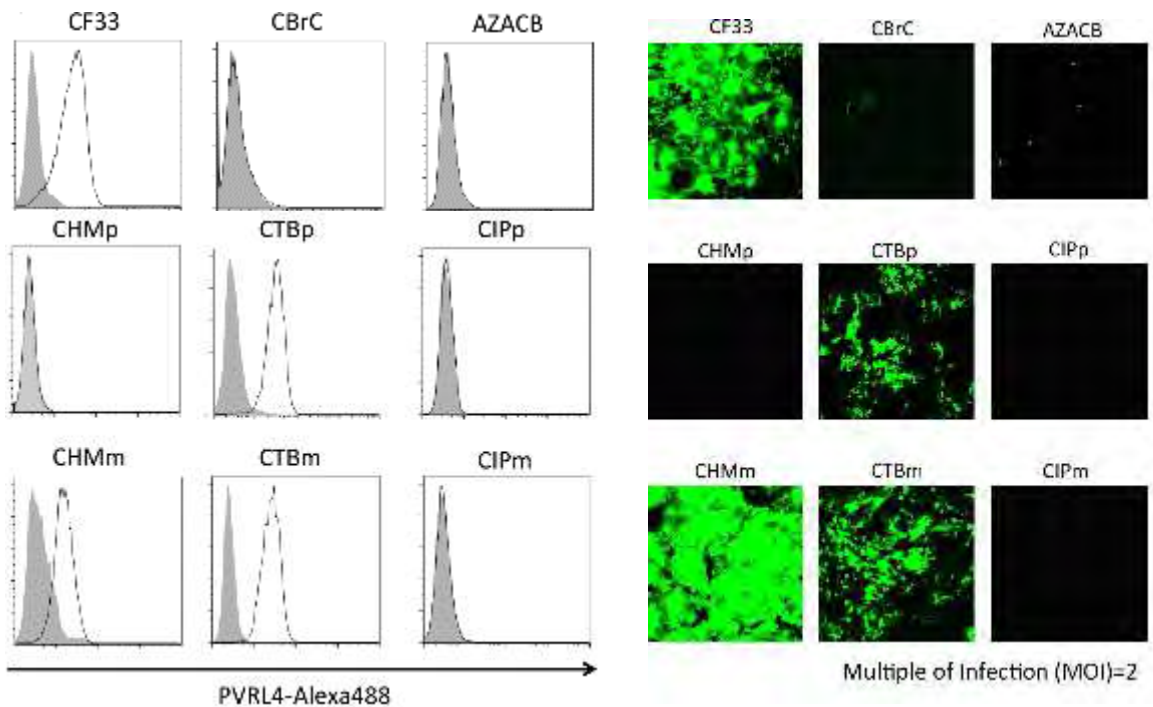
	site II	site III
ヒト	1 PAGELETSDEVTVVLGQDAKLPFCYRGDSGEQVGGVAWARVDAGEGAQELALLHSKYGLH	60
イヌ	1 -PGELETSDLVTVVLGQDAKLPFCYRGDPGEQVGGVAWARVDAGEGARELALLHSKYGLH	59
ヒツジ	1 LAGELETSDLVTVVLGQDARLPCFYRGDPGEQVEQVAWARVDAGEGGRELALLNSKYGLH	60
マウス	1 SAGELETSDEVTVVLGQDAKLPFCYRGDPDEQVGGVAWARVDPNEGIRELALLHSKYGLH	60
ハヤブサ	1 RSGVVEVERSVTAVLGGQDVVLPCTRYRAQEQEVVQVTWLKRGPTGEGAEVAVLNQQHGEH	60
ゼブラフィッシュ	1 DFVAPPPNYSLTSLAEEETILPCRYEPDAESTVVQVTWFQEKPDGKKEIITAHHVNGKT	60
*.....***.*... ..**.*.....**.*.....*	
	site I	
ヒト	61 VSPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPP	120
イヌ	60 VSAAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPP	119
ヒツジ	61 VSSAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPP	120
マウス	61 VNPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLVPP	120
ハヤブサ	61 VLEPYAGRVLRRAGGALE-DGAIILRNAVQGDYEGYCHLITFPLGNFEGRLTLKVLVPP	119
ゼブラフィッシュ	61 AFGPWADRVEFNSNQPTK-DSSLVIKITKISDEGKYTCHVSTFPFGNFETELSLLVYTHP	119
	. ..**.....*.....***.*...***.*...***.*...***.*...*	
ヒト	121 LP	122
イヌ	120 LP	121
ヒツジ	121 LP	122
マウス	121 LP	122
ハヤブサ	120 LP	121
ゼブラフィッシュ	120 IS	121
	..	

* site I内の FPAG 配列が H 蛋白との結合に特に重要。
ハヤブサ、ゼブラフィッシュは1アミノ酸異なるため、
H 蛋白との親和性は低いと考えられる。

イヌ乳ガン細胞株を用いたrMV-SLAMblindの抗腫瘍能評価

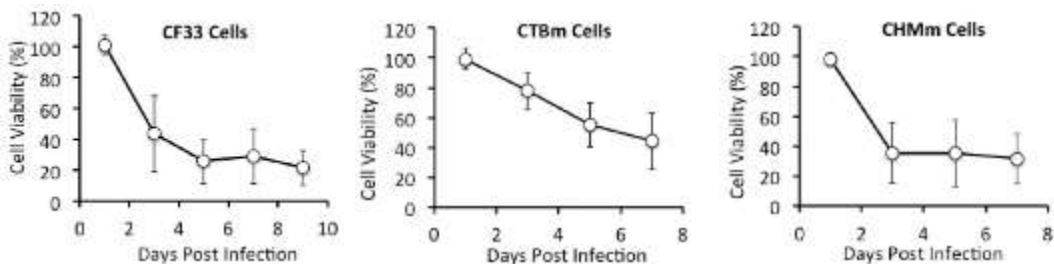
- ・イヌ乳ガン細胞株9種のPVRL4発現を検索し、陽性細胞にはrMV-SLAMblindが感染・増殖して細胞死を誘導することを明らかにした(図1)。
- ・PVRL4陽性イヌ乳ガン細胞株(CF33)を皮下移植したマウスXenograftモデルを用い、rMV-SLAMblindを腫瘍内投与することで抗腫瘍効果を示す事を明らかにした(図2)。

図1: イヌ乳がん細胞株のレセプターの発現およびウイルス感染



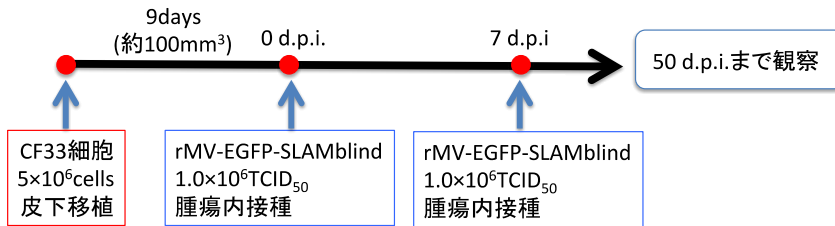
1) FACSによるPVRL4発現
イヌ乳ガン細胞株の検索

2) イヌ乳ガン細胞株への
rMV-EGFP-SLAMblind感染

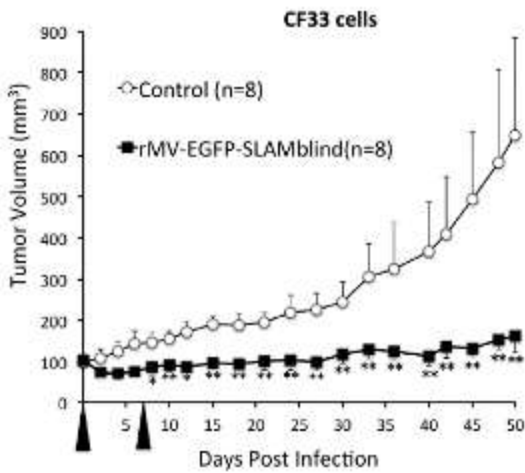


3) rMV-EGFP-SLAMblind感染による*In vitro*での細胞傷害性試験 (WST-1 assay)

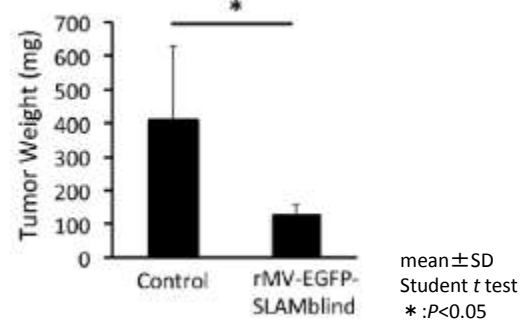
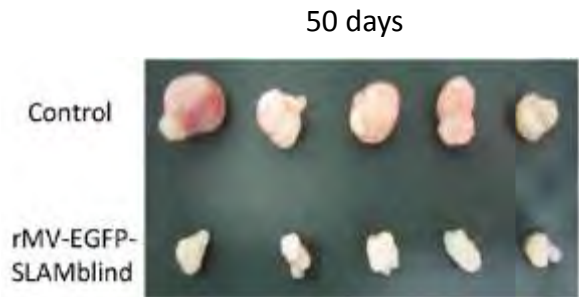
図2: イヌ乳ガン細胞株Xenograftモデルを用いた、rMV-SLAMblindの抗腫瘍効果の評価試験



1) 試験スケジュール



2) 腫瘍サイズの経時的測定



3) ウイルス接種50日後に摘出した腫瘍の写真および重量

資料4 MV野外株のカニクイザルに対する病原性試験

MV-HL株(ウイルスカ価 $10^{5.5}$ TCID₅₀) またはMV-IC-B株($10^{6.0}$ TCID₅₀) (共に野外株)をカニクイザルに接種

・接種14日まで臨床症状の観察

・IC-B株接種後8日目の発疹の様子

ウイルス	頭数	接種法	臨床症状	
			発疹	コプリック斑
HL株	4	皮下	++	+
	4	静脈	++	++
	3	鼻腔内	++	+
IC-B株	6	皮下	++	++
	4	静脈	++	++
	3	鼻腔内	++	+

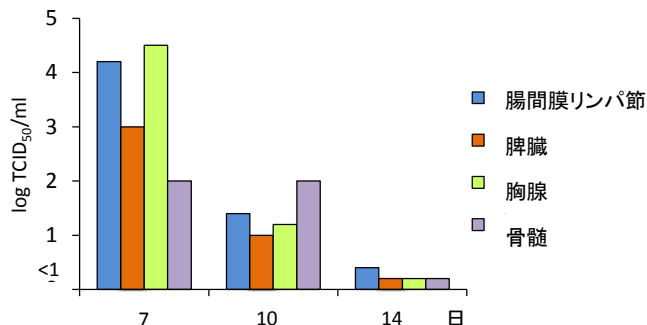
++ 全面; + 局所的



どの接種ルートにおいても発症し、ヒトのはしかと同様の症状をしめす。

文献1から引用改変

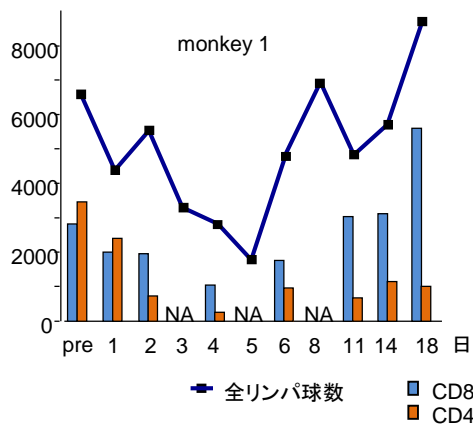
・HL株 皮下接種14日までの各リンパ組織のウイルスカ価



感染初期からリンパ組織で増殖する。また、血中白血球からもウイルスが検出される(data not shown)。

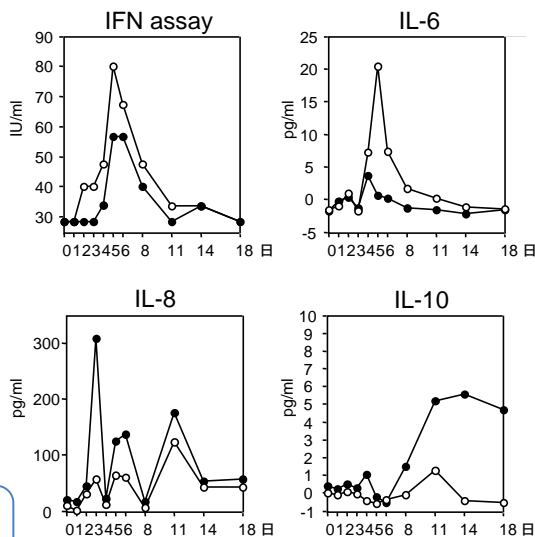
文献1から引用改変

・MV-HL株接種後のリンパ球数動態



感染後に一過性の激しい白血球減少と、各種サイトカインの産生が起こる。

・MV-HL株接種の血漿中サイトカイン濃度

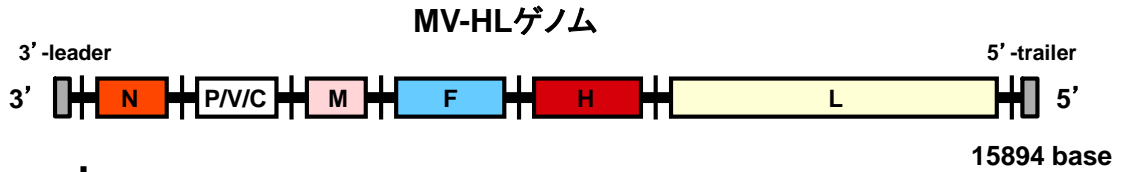


文献26から引用改変

<結果>

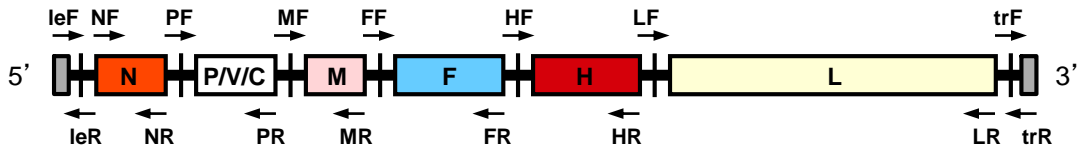
MV野外株は、カニクイザルに接種後、リンパ節で増殖してヒトの麻疹同様の症状と宿主免疫反応を引き起こす。

資料6 rMV-HL(7+)構築図

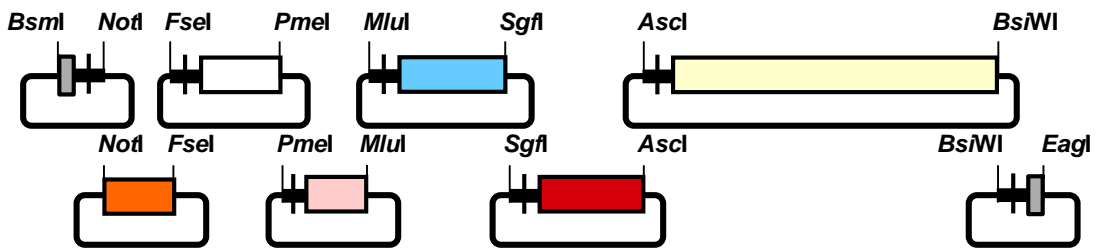


↓ MV-HL感染B95a細胞からtotal RNAを抽出
random primerと逆転写酵素によりcDNA合成

制限部位を付加した各遺伝子特異的primer pair(資料7)を用いて各遺伝子を増幅

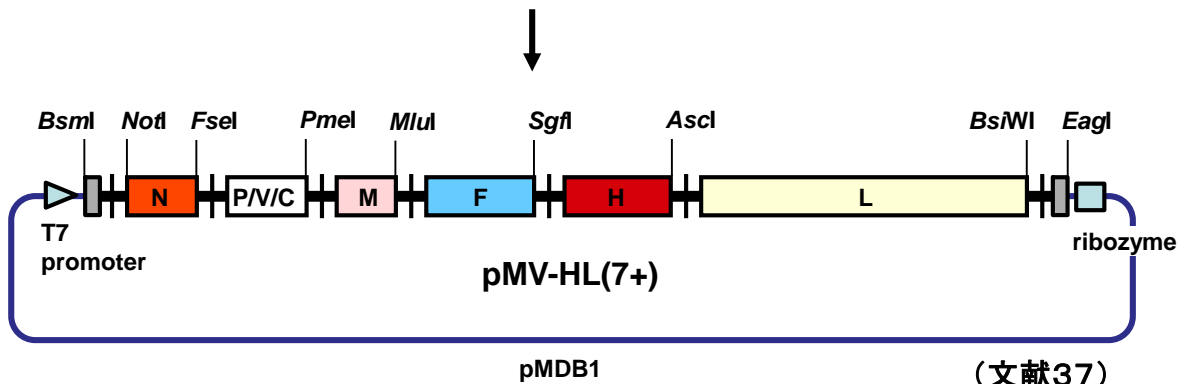


↓ クローニングプラスミドに挿入し、シーケンシングで配列を確認

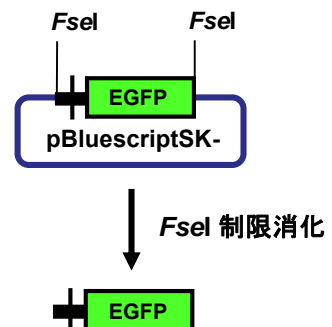
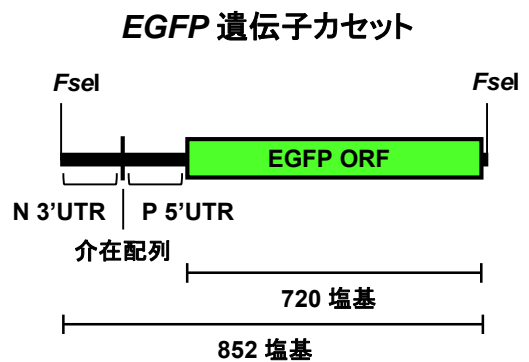
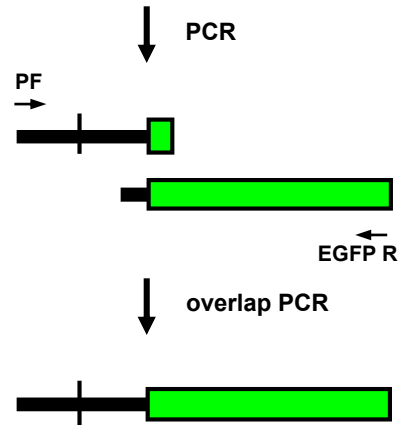
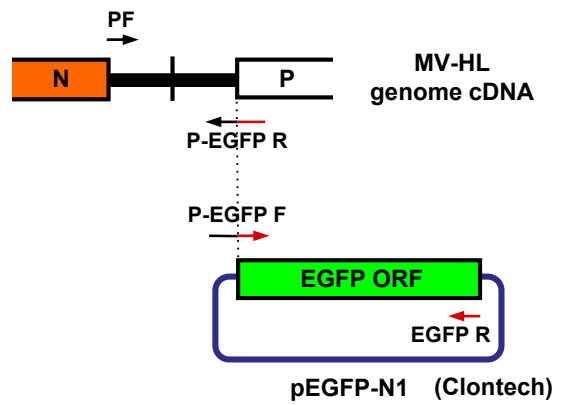
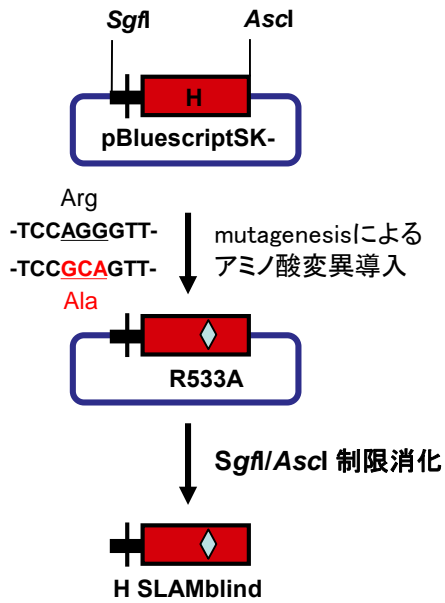
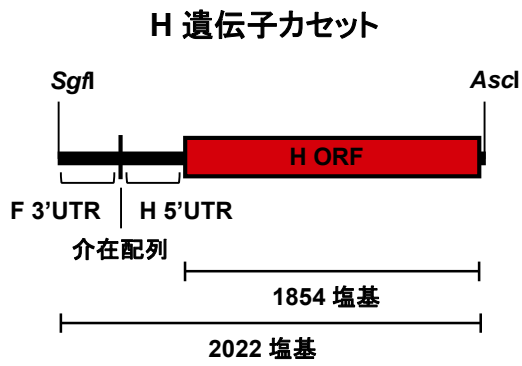


↓ 特異的制限酵素で遺伝子カセットを切り出し、隣接のカセットと結合していく

全長cDNAが連結されたら、*BsmI*/*EagI*で切り出し、pMDB1へ挿入

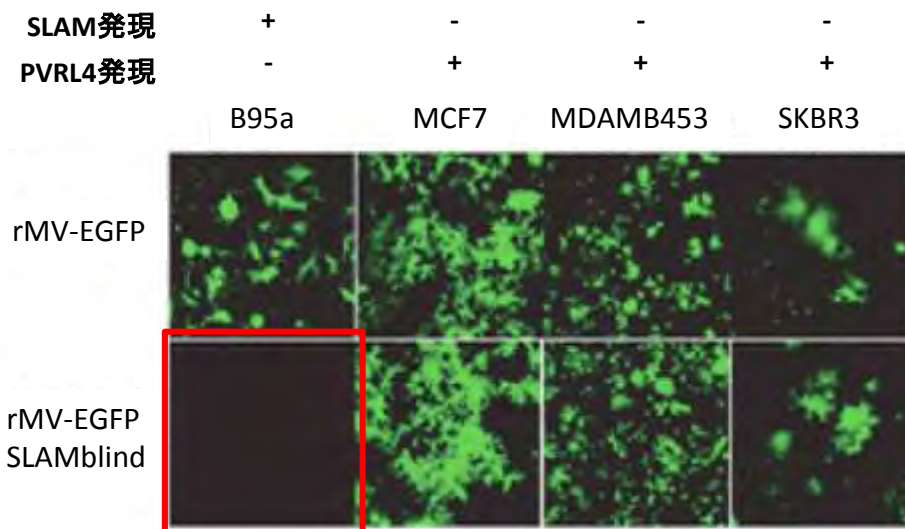


資料8 遺伝子組換えMV作出用遺伝子カセット構築図



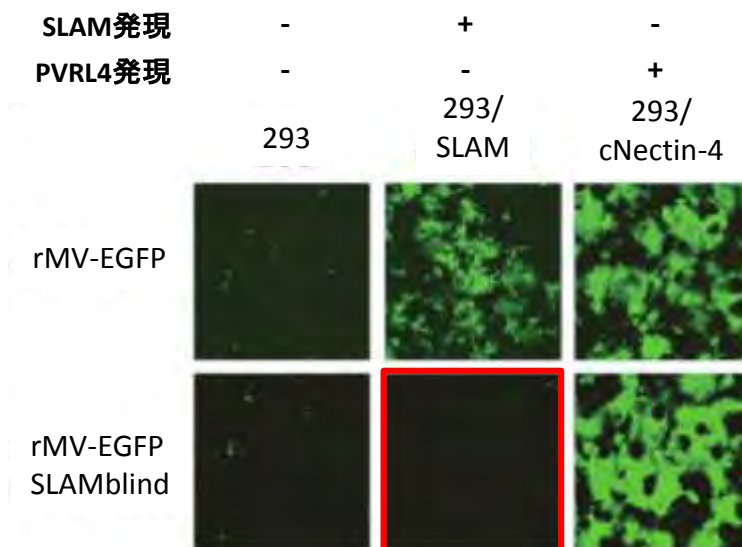
資料9 SLAMblind H遺伝子をもつ組換えMVの各種細胞株への感染性

1: SLAM/PVRL4発現ヒト細胞株への感染性試験



文献35より引用改変

2: イヌSLAM/PVRL4発現細胞株への感染性試験



文献21より引用改変

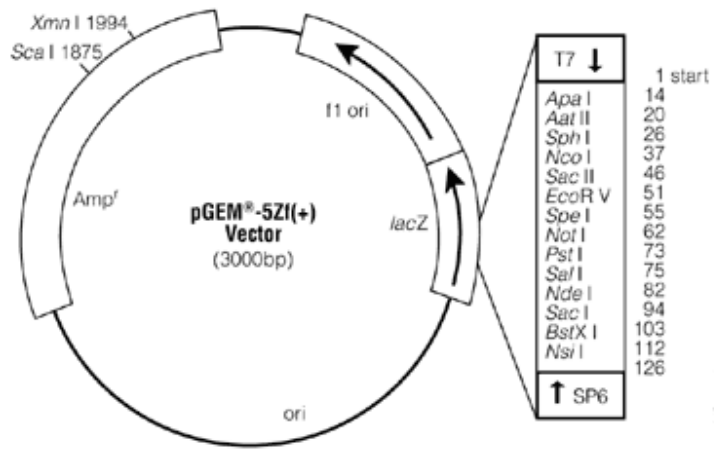
結果 SLAMblindウイルスはSLAM陽性細胞への感染能が消失した。

資料 10 本組換え体の作出に用いた供与核酸の構成要素の由来及び機能

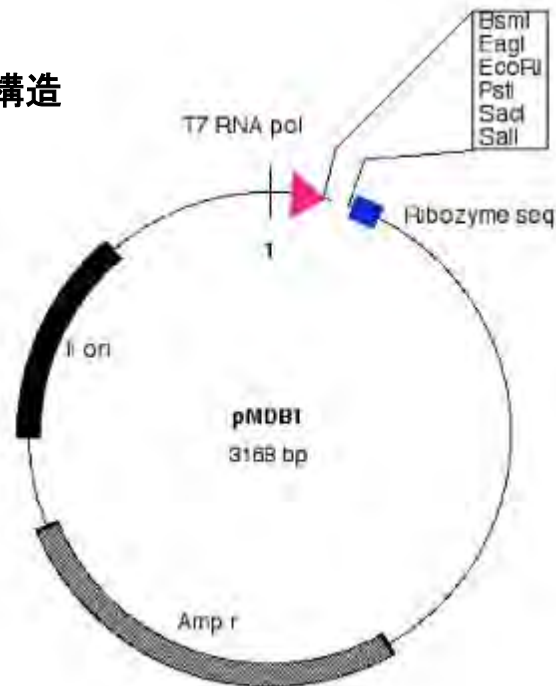
構成要素	サイズ (bp)	由来	機能
H SLAMblind 遺伝子カセット			
F 3'UTR	137	HV-HL ゲノム由来 cDNA	F 遺伝子 ORF 下流の非翻訳領域 (生理的機能を持つ報告はない)。 5'末端を <i>SgfI</i> 制限配列に置換。
介在配列	3	HV-HL ゲノム由来 cDNA	同上。
H 5'UTR	20	HV-HL ゲノム由来 cDNA	H 遺伝子 ORF 上流の非翻訳領域 (生理的機能を持つ報告はない)。
SLAMblind 遺伝子 ORF	1854 (+8)	HV-HL ゲノム由来 cDNA	H 遺伝子からは、細胞膜上の MV 受容体への結合を担う H 蛋白が産生される。 H 蛋白のリンパ系細胞受容体 SLAM への結合能を欠損することを目的に、533 残基 Arg の Ala へのアミノ酸変異に相当する 3 塩基置換を導入してある (資料 35)。3'末端に <i>AseI</i> 制限配列 8bp を付加。
EGFP 遺伝子カセット			
N 3'UTR	59	HV-HL ゲノム由来 cDNA	同上。
介在配列	3	HV-HL ゲノム由来 cDNA	同上。
P 5'UTR	59	HV-HL ゲノム由来 cDNA	同上。
EGFP 遺伝子 ORF	720 (+8)	オワンクラゲ由来 cDNA	紫外線照射により緑色蛍光を発する。3'末端に <i>FseI</i> 制限配列 8bp を付加。

資料11 pGEM-5z, pMDB1プラスミドマップ

pGEM-5zf(+)⁺のマップ



pMDB1の構造

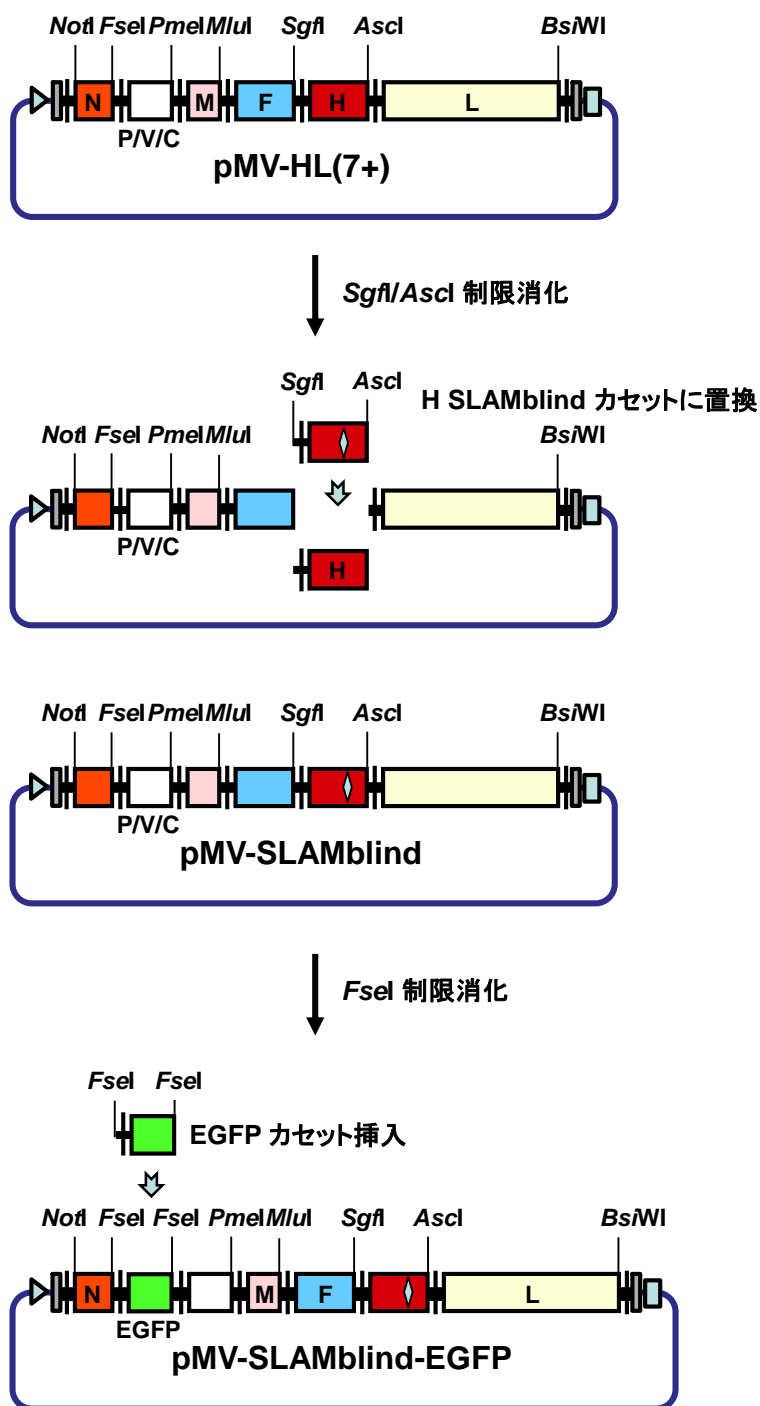


Plasmid name:pMDB1
Plasmid size:3168 bp
Constructed by:MD Baron and T barrett
Construction date:1997
Comment&Reference:J Virol, 1997, 71, 1265-1271

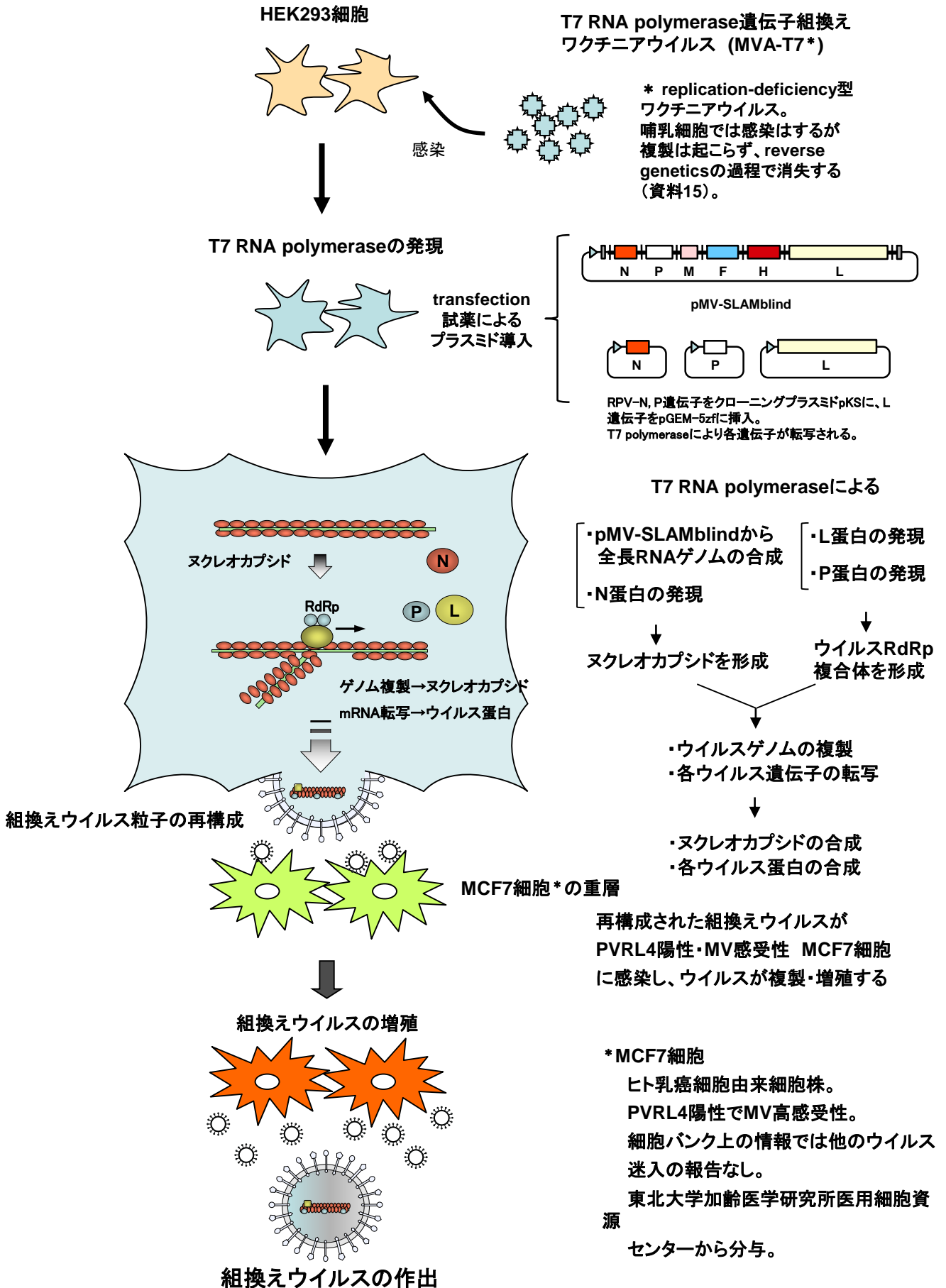
ウイルスゲノムcDNAは*BsmI*-*EagI*間に挿入した。

* T7RNA pol: T7RNA polymerase promoter
 Ribozyme seq: hepatitis delta virus ribozyme sequence

資料12 pMV-SLAMblind構築図



Reverse Geneticsの概要



資料 14 シーケンシングによる接種ウイルス内の導入変異部位の配列確認

試料を RNA 抽出試薬 (ISOGEN; Nippon gene 社) で溶解し、プロトコールに従い total RNA を回収

random primer (6 mer) と逆転写酵素 (Primescript reverse transcriptase; タカラバイオ社) を用いてプロトコールに従い逆転写

増幅用特異的 primer pair (下記) と DNA polymerase (LA Taq; タカラバイオ社) を用い、以下の条件で PCR

94°C	30"	} 30 cycles
50°C	1'	
72°C	1'	

PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、バンドを切り出した後 DNA 精製キット (QiaEX II; Qiagen 社) で精製

シーケンシング用特異的 primer (下記) と BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit; Applied Biosystems 社) を用いてプロトコールに従いシーケンシングサンプル調製

DNA sequencer (3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems 社) で配列を解読

変異・挿入	primer	annealing site	配列
SLAMblind	増幅 forward	MV ゲノム 8469-8488	5' CACCATTGAAGGATAACAGG 3'
	増幅 reverse	MV ゲノム 9269-9288	5' GGCTATCTAGGTGAACTTCA 3'
	シーケンシング	MV ゲノム 9269-9288	
EGFP	増幅 forward	MV ゲノム 1301-1320	5' AATGCATACTACTGAGGACA 3'
	増幅 reverse	EGFP 79-98	5' TCGCCGGACACGCTGAACTT 3'
	シーケンシング	MV ゲノム 1301-1320	

資料15 PCR法によるワクチニアウイルス(MVA-T7)検出試験

リバースジェネティクス(資料13)の概要

HEK293細胞

↓ T7 polymerase遺伝子組換えワクチニアウイルス(MVA-T7)感染

↓ 各プラスミド導入

↓ 麻疹ウイルス感受性細胞の重層

組換え麻疹ウイルス(rMV)のレスキュー (P0)

↓

ウイルス継代(計3回) (P3)

<検出法>

・ MVA-T7の検出

* ワクチニアウイルス = DNAウイルス

各ウイルス液50μlをフェノール・クロロホルム処理し、DNAを回収*

↓

資料14と同条件のPCRでT7 polymerase遺伝子を以下のprimer pairで増幅

Forward primer : T7 pol. gene 678-697 (5' ggt tag ctt aca ccg cca aa 3')

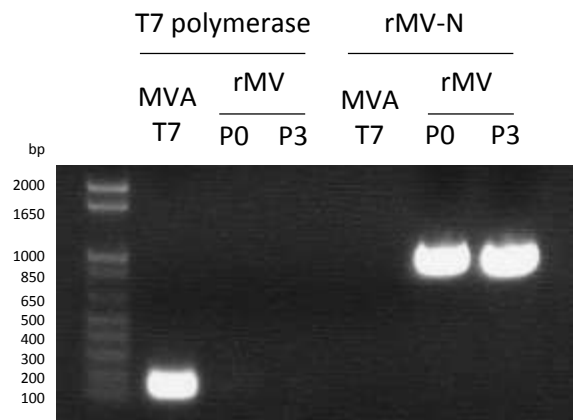
Reverse primer : T7 pol. gene 802-821 (5' gga act acg caa ggt tgg aa 3')

・ 組換え麻疹ウイルスの検出

各ウイルス液50 μlを資料14と同条件でRT-PCRし、N遺伝子を増幅

<結果>

組換え麻疹ウイルスレスキュー後のウイルス液にMVA-T7は検出されなかった。



資料16

rMV-SLAMblind-EGFP の細胞継代による変異復帰の有無の確認

1) 使用細胞およびウイルス

- Vero-Nectin4 細胞・・・Vero 細胞にヒト nectin4 (PVRL4 と同じ) 遺伝子を導入し発現細胞を得た
- rMV-SLAMblind-EGFP

2) ウイルス継代方法

Vero-Nectin4 細胞に、rMV-SLAMblind-EGFP 作出後 [REDACTED] のウイルス液を感染させて培養し、CPE が全面に広がった時点でウイルス液を回収して [REDACTED] とした。以下同様にウイルス液を細胞へ感染と回収を繰り返し、[REDACTED] までのウイルス液を調製した。

3) 各代数のウイルスのゲノムシーケンス解析

回収した各ウイルス液を RNA 回収試薬 (TRIzol LS) に懸濁し、次世代シーケンサーによる配列解析を行った。

4) 結果

H 遺伝子内に導入した SLAM blind 変異 (ウイルスゲノム 8867-8869 残基 AGG→GCA) は [REDACTED] まで完全に維持され、変異の復帰は認められなかった。

非公開

資料17 rMV-SLAMblindのヒト膵臓癌および乳癌細胞移植マウス接種後のウイルスH遺伝子配列解析

実験 1

マウスおよび細胞

マウス: CB17/lcr-SCIDマウス メス 5w

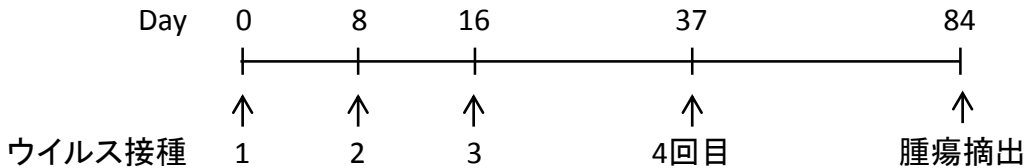
ヒト膵臓癌細胞(KLM-1)を皮下移植し、150-200 mm³ となったところで最初のウイルス接種を行った。

ウイルス接種

腫瘍内接種

rMV-SLAMblind-EGFP、 1×10^6 TCID₅₀/shot/ 100 μ l

試験スケジュール



腫瘍からのウイルス分離

腫瘍片に1mlのRPMI1640+2%FCS中にてホモジナイズし、液体窒素中で3回凍結融解を行った。凍結融解の試料を3000rpm, 10分間遠心分離し、上清をウイルス液とした。

ウイルス液をMCF7T細胞に添加し、37°Cで培養した。

培養開始後ウイルスの増殖は蛍光顕微鏡にて観察し、4日目にウイルス液を回収した。

ウイルス液からRNAをTRIZOL LSを用いて分離。

分離したRNAを逆転写酵素PrimeScript RTaseとランダムプライマーを用いて逆転写。

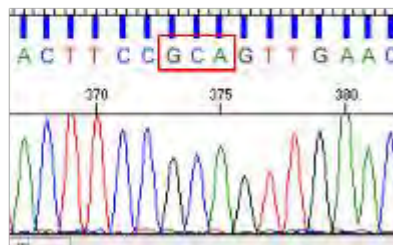
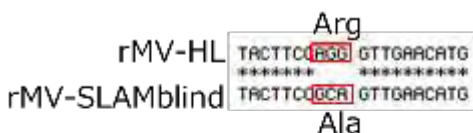
MV-HのR533Aを含む領域(ゲノム配列7109-9288領域)をDNA polymerase Phusionを用いてPCR。

(98°C30秒⇒(98°C10秒、55°C15秒、72°C45秒)×30サイクル⇒72°C5分)

得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、シーケンス反応を行った。

エタノール沈殿により精製した反応産物について配列を解析した。

結果



ウイルス接種84日後において導入した変異の復帰は認められなかった。

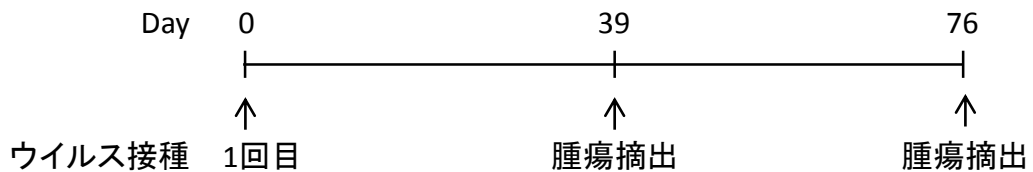
本実験は膵臓癌由来細胞株を用いたが、ウイルス増殖は乳癌細胞と同等なので、結果の評価も乳ガン細胞株と同じと考えられる。

実験 2

マウスおよび細胞 SCIDマウス 2匹
MCF7細胞(ヒト乳ガン細胞由来)

ウイルス接種 腫瘍内接種
rMV-SLAMblind-luc 10^6 TCID₅₀/400 μ l

試験スケジュール



腫瘍からのウイルス分離

腫瘍をRNA回収試薬 (ISOGEN) 内でホモジナイズし、RNAを回収した。
各RNAを実験1と同様にRT-PCRで増幅した。
PCR産物をダイレクトシーケンシングし、配列を決定した。

結果

39日、76日回収サンプル共にH遺伝子内に元の配列との差異はなく、変異復帰は認められなかった。(data not shown)

資料 18 組換え MV 接種動物からのウイルス排出検出試験

試料（糞便、尿、体液、抹消血）を採集

糞便：1回あたり4本以上の1.5ml チューブに1/3 程度採取する。

尿：1回あたり約1ml ずつ4本以上のチューブに採取する。

体液：唾液、涙液および腫瘍滲出液を綿棒でぬぐい、濡れたのを確認後ハンクス液に浸ける。

抹消血：ディスポーサブル注射器を用いて5ml 採血を行い、EDTA-2K 添加溶液に採取する。

全ての試料はディープフリーザーに保存する。

RNA 抽出試薬（ISOGEN もしくは ISOGEN LS; Nippon gene 社）で溶解し、プロトコールに従い total RNA を回収

random primer (6 mer) と逆転写酵素 (Primescript reverse transcriptase; タカラバイオ社) を用いてプロトコールに従い逆転写

DNA polymerase (AmpliTaq Gold; Life Technologies 社) を用い、以下の条件で PCR

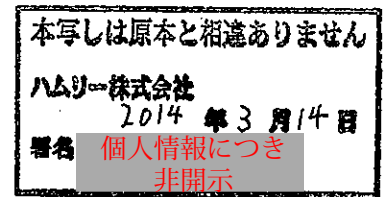
Forward primer : MV genome 757-775 (5' atg tgg tga gga aca gga t 3')

Reverse primer : MV genome 1661-1680 (5' cta gaa gat ttc tgt cat tg 3')

* 共に N 遺伝子内

95°C	10'	} 30 cycles
94°C	30"	
50°C	30"	
72°C	1' 10"	

PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド染色



最終報告書

低病原性 MV のビーグルに対する安全性試験

[試験番号 HC13011]

試験施設：ハムリー株式会社 筑波研究センター 試験研究所
〒306-0101 茨城県古河市尾崎 2654-3

試験開始日： 2013年 12月 20日

試験終了日： 2014年 3月 14日

1. 要旨

低病原性ウイルスである MV-HL-dSLAM の安全性評価を行うために、 2×10^7 TCID₅₀/body ウイルスをビーグルに静脈内接種した。試験期間中、一般状態観察、体重測定、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査を実施した。また接種後 28 日目に剖検し、臓器重量測定、臓器の肉眼的観察および組織病理学的測定を行った。さらに各臓器における残存ウイルスおよび排泄物へのウイルス排出の有無を検討した。

その結果、いずれの検査においてもウイルス接種に起因した変化および残存・排出は認められず、当該試験条件下において本ウイルスの安全性には問題ないものと考えられた。

2. 目的

低病原性 MV をビーグルに接種した際の安全性を検討する。

3. 遵守した基準および準拠したガイドライン

本試験は、非 GLP で実施したが、全ての操作はハムリー株式会社 筑波研究センター 試験研究所の SOP に従って実施した。

4. 動物愛護（福祉）

試験中の動物の健康管理および試験に伴う苦痛等の軽減に対する対応は、試験受託者の管理獣医師の判断に従い、試験委託者と試験受託者が協議の上、動物愛護（福祉）の観点を十分に考慮して対応した。

5. 試験委託者

所在地：東京都港区白金台 4-6-1

名称：東京大学 医科学研究所

委託責任者： 個人情報につき非開示

委託担当者： 個人情報につき非開示

6. 試験受託者

所在地：茨城県古河市尾崎 2654-3

名称：ハムリー株式会社 筑波研究センター 試験研究所

試験責任者： 個人情報につき非開示

7. 試験日程

試験開始	2013年12月20日
動物入荷	2013年12月24日
観察期間	2013年12月24日～2014年2月6日
ウイルス接種	2014年1月9日
剖検	2014年2月6日
病理組織学的検査	2014年2月7日～2014年2月28日
最終報告書提出	2014年3月14日

8. 試験従事者

(入荷検収) 個人情報につき非開示

(一般状態観察) 個人情報につき非開示

(体重測定) 個人情報につき非開示

(ウイルス接種) 個人情報につき非開示

(尿検査) 個人情報につき非開示

(糞便・唾液・涙液採取) 個人情報につき非開示

(採血) 個人情報につき非開示

(血液学的検査) 個人情報につき非開示

(血液生化学的検査) 個人情報につき非開示

(剖検および肉眼所見) 個人情報につき非開示

(臓器・組織重量測定) 個人情報につき非開示

(病理学的検査) 個人情報につき非開示

(ウイルス検出) 個人情報につき非開示

9. 材料と方法

9.1 接種ウイルス

名称：MV-HL-dSLAM

入手先：東京大学医科学研究所

入手量：0.9mL×4本

ウイルス力価： 6.3×10^7 TCID₅₀/ml

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

：大臣確認実験（承認番号 25 受文科振第 2078 号）

実験分類：クラス 2

性状：液体

保存：-60℃以下（実測値：-82.7～-77.7℃）

残余ウイルスの取り扱い：-60℃に保管、残ウイルスは入手先に返送

9.2 使用動物

動物種：ビーグル犬

入手先：北山ラベス

系統：Narc ビーグル（抗ジステンパー抗体フリー）

性別：雌

月齢：4ヶ月齢（入荷時体重：5.08～6.86kg）

使用頭数：9頭

9.3 動物管理条件

部屋番号：12号棟 P2 動物室

飼育条件：室温 24±3℃（実測値：18.2～25.1℃）、湿度 50±20%（実測値 26.27～81.05%）、
換気(10～25回/1時間)、

照明：12時間(8:00～20:00)

飼料：TC-1（オリエンタル酵母工業㈱、Lot 131011）を1日約250g給餌

飲料水：市水を自由摂取

ケージ：飼育ケージ（92cm(D)×65cm(W)×72cm(H), 南新東洋製作所）を使用。
1匹/ケージ飼育とした。

収容動物数：1匹/ケージ

検疫及び馴化：一般状態を17日間毎日観察し、健康状態が良好であることを確認した。

入荷した動物は馴化・検疫期間中、一般状態と体重変化から全例健康状態が良好であったことから、そのまま実験に供した。

群分け：群分け時の体重（6.75～8.60kg）を用いて、体重層別化無作為抽出法により各群に動物を振り分けた。各群の体重範囲は平均体重±20%以内になるように実施した。

動物の識別：各個体の片側の耳介に油性インクにより個体識別し、ケージには試験番号、動物番号、試験期間等を記載したラベルを付けた。

9.4 群構成

群	接種ウイルス	動物番号	匹数
1. MV-HL-dSLAM 群	MV-HL-dSLAM	11-16	6

2. 陰性対照群	RPMI1640 培地・生理食塩液混合液	21-23	3
----------	----------------------	-------	---

9.5 ウイルスの接種方法

生理食塩液（株式会社大塚製薬工場、Lot K3D73）でウイルス液を 2×10^7 TCID₅₀ /mL に希釈した（氷上）。このウイルス溶液をイヌ 1 頭あたり 1mL 静脈内接種した。対照群には、生理食塩液を用いてウイルス液と同じ比率で希釈した RPMI1640 培地（Life Technologies 社、Lot 1397041）1mL を静脈内接種した。

9.6 観察・測定項目

9.6.1 一般状態

1 日 1 回、観察した。

9.6.2 体重測定

入荷時、ウイルス接種時（群分け時；Day0）、その後週に 1 回体重測定した。

9.6.3 尿検査

ウイルス接種 1、4、7、14、28 日後に、尿を採取した。

採取した尿は尿試験紙（N-マルティスティックス[®]SG-L：シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス株式会社、Lot 310073）を用いて測定した。また、尿の一部は 1 回あたり約 1mL ずつ 4 本以上のチューブに採取し、ディープフリーザー（日本フリーザー(株)、CLN-51UD1）で冷凍保存（実測値：-82.8～-70.8℃）し、試験委託者へ送付した。

測定項目は、以下の通りとした。

pH（複合指示薬法）

タンパク質（指示薬のタンパク誤差反応）

ブドウ糖（GOD・POD クロモゲン反応）

ケトン体（ランゲ反応の応用）

ビリルビン（ジアゾカップリング反応）

ウロビリノーゲン（Ehrlich 反応の応用）

潜血（ヘモグロビンの POD 作用）

比重（高分子電解質共重合体の pKa 値変化）

9.6.4 糞便採取

ウイルス接種 1、4、7、14、28 日後に、糞便採取を行う。糞便は 1 回あたり 4 本以上の 1.5mL チューブに 1/3 程度採取し、ディープフリーザー（日本フリーザー㈱、CLN-51UD1）で冷凍保存（実測値：-82.8～-70.8℃）し、試験委託者へ送付した。

9.6.5 粘膜液の採取

ウイルス接種 1、4、7、14、28 日後に、唾液および涙液採取を行った。綿棒が濡れたのを確認後、TRIzol (Life Technologies 社、Lot 74107) 液およびハンクス液 (0.1%BSA、ペニシリン・ストレプトマイシン含有) にそれぞれ浸けて、ディープフリーザー（日本フリーザー㈱、CLN-51UD1）で冷凍保存（実測値：-82.8～-70.8℃）し、試験委託者へ送付した。採取はそれぞれ 1 回あたり各溶液 2 本のチューブに行った。

また、鼻汁排出は認められなかったため、採取しなかった。

9.6.6 血液採取、血液学的検査および血液生化学的検査

9.6.6.1 採血法

ウイルス接種 1、4、7、14、28 日後に、一夜絶食させた動物についてディスポーザブル注射器を用いて機側被静脈より 5mL 採血を行った。

血液は EDTA-2K 添加容器に 2mL、残りを血清分離剤入スピッツ（セパクリーン A、栄研化学株式会社、Lot 30405）に採取する。検査終了後の残血液はディープフリーザー（日本フリーザー㈱、CLN-51UD1）で冷凍保存（実測値：-82.8～-70.8℃）し、試験委託者へ送付した。

9.6.6.2 血液学的検査

EDTA-2K 添加容器に入れた血液は十分に転倒混和して抗凝固剤の EDTA-2K を溶解させ、血液が凝固しないようにした。得られた血液は剖検当日に動物用自動血球計測装置（pochH-100iV Diff、シスメックス株式会社）を用いて測定した。

血液学的検査項目は、以下の通りとした。

白血球数 (WBC : DC 検出法)

赤血球数 (RBC : DC 検出法)

ヘモグロビン量 (HGB : ノンシアン HGB 測定法)

ヘマトクリット値 (HCT : 赤血球パルス波高値検出法)

平均赤血球容積 (MCV : HCT/RBC 算出)

平均赤血球色素量 (MCH : HGB/RBC 算出)

平均赤血球血色素濃度 (MCHC : HGB/HCT 算出)

血小板数 (PLT : DC 検出法)

小型白血球 (リンパ球) 数

9.6.6.3 血液生化学的測定

血清分離用に採取した血液を約 30 分間放置後、3,000 rpm、15 分間、4℃で遠心分離し、血清を分離し、得られた血清について動物用生化学自動分析装置 (富士ドライケム 7000V、富士フィルム株式会社) を用いて測定した。血清は使用するまでディープフリーザーにて凍結保存した。また測定後の残血清は試験委託者へ送付した。

測定項目は、以下の通りとした。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

(AST : オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ・POP・POD・ロイコ色素法)

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT : POP・POP・ロイコ色素法)

クレアチンフォスフォキナーゼ

(CPK : クレアチンリン酸基質・ジアホラーゼ・ホルマザン色素法)

アルカリフォスファターゼ (ALP : p-ニトロフェニルリン酸基質法)

グルコース (GLU : GOD/POD 法)

クレアチニン (CRE : クレアチニンデイミナーゼ・BPB 指示薬法)

無機リン (IP : XOD・POD 法)

尿素窒素 (BUN : ウレアーゼ・BCG 指示薬法)

カルシウム (Ca : クロロフォスフォナゾ III 法)

総コレステロール (TCHO : COD・POD 法)

中性脂肪 (TG : LPL・GK・GPO・POD 法)

総ビリルビン (TBIL : 2,4-ジクロロベンゼンジアゾニウム塩法)

総タンパク (TP : ビウレット法)

アルブミン (ALB : BCG 法)

ナトリウム (Na : イオン選択電極法)

カリウム (K : イオン選択電極法)

クロール (Cl : イオン選択電極法)

A/G 比 (A/G 算出)

9.7 剖検 (肉眼的観察)

検査に使用する血液を採取した後、ペントバルビタール (共立製薬株式会社、Lot

3038101) 麻酔下で、頸動脈、腹大動脈もしくは大腿動脈を切断して放血致死させ、以下の臓器を採取し、下線のついたものについては、重量を測定した。また、測定した最終体重をもとに相対臓器重量を算出した。なお、採取した臓器の一部は病理組織学的検査用に 10%中性緩衝ホルマリン溶液固定し、残りを使用して 1.5mL チューブ (4 本分) に 1/3 程度入れて凍結保存 (実測値: -81.6~-70.8°C) を行った。また臓器が 2 つあるものに関しては、肉眼所見で異常が認められなかった際には片側のみ固定および保存した。

脳 (大脳・小脳)、心臓、肺・気管支、肝臓、腎臓 (左右)、脾臓、副腎 (左右)、膵臓、甲状腺、胸腺、舌、食道、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、胸骨 (骨髄含む)、皮膚・乳腺、腸間膜リンパ、膀胱、卵巣、子宮および異常を認めた器官・組織

9.8 病理組織学的検査

採取した臓器は、パラフィン包埋し、薄切後ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色し、光学顕微鏡を用いて病理組織学的検査を行った。

9.9 各臓器における残存ウイルスおよび排泄物へのウイルス排出検出

凍結保存した MV-HL-dSLAM 群の各臓器に関して、各個体より抽出した total RNA からランダムプライマーおよび Primescript reverse transcriptase (タカラバイオ社) を用いて合成した cDNA を臓器ごとに等量ずつ混合し、ウイルス N 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行った。血液、スワブおよび排泄物についても同様に解析した。

これらは試験委託者が東京大学医科学研究所にて実施した。

9.10 統計処理方法

試験データとして得られた計量データは、平均値±標準偏差を算出した。

10. 生データおよび標本保存

下記資料は、筑波研究センターの保管施設に保存した。保存期間は最終報告書作成後 10 年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。

- ・試験計画書
- ・被験物質関連資料
- ・動物および施設関連資料
- ・試験期間中に発生する生データ

・最終報告書

11. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかつたこと

2014年1月6日9時～11時に温度が18.6～20.8℃を記録し、許容範囲(21.0～27.0℃)からの下限の逸脱を認めた。

また、2014年1月6日に29.25%、1月20日に26.27℃を記録し、許容範囲(30.0～70.0%)からの下限の逸脱を認めた。加えて2014年1月6日(81.05%)、1月20日(70.62～73.62%)、1月25日(70.12～71.79%)、1月26日(71.74%)、1月27日(71.50%)に清掃による一過性の湿度上限の逸脱を認めた。

一般状態においてビーグルに異常は認められなかつたことから、温湿度の逸脱は本試験結果に影響しなかつたと判断した。

12. 結果

12.1 一般状態

Table 1 および Appendix 1 に一般状態を示した。

すべての個体において特記すべき異常は認められなかつた。

12.2 体重推移

Table 2 および Appendix 2 に体重推移を示した。

ウイルス接種後7日目(Day 7)に一過性的に体重が減少した個体が認められたものの、その後増加し、剖検時(Day 28)には1.MV-HL-dSLAM群(1群)で $7.97 \pm 0.58\text{kg}$ 、2.陰性対照群(2群)では $8.05\text{kg} \pm 0.72\text{kg}$ であり、両群において特記すべき差は認められなかつた。

12.3 尿検査

Table 3 および Appendix 3 に尿検査結果を示した。

すべての項目において特記すべき差は認められなかつた。

12.4 血液学的検査

Table 4 および Appendix 4 に血液学的検査結果を示した。

ウイルス接種時の白血球数は1群および2群で $131.7 \pm 18.5 \times 10^2/\mu\text{L}$ および $145.7 \pm 20.1 \times 10^2/\mu\text{L}$ であった。その後、両群ともに接種後4日目まで減少傾向を示し、接種後4日目の1群および2群の白血球数は $83.0 \pm 4.1 \times 10^2/\mu\text{L}$ および $107.7 \pm 26.0 \times 10^2/\mu\text{L}$ で

あった。その後、変動は認められず、剖検時の 1 群および 2 群の白血球数は $82.3 \pm 6.8 \times 10^2/\mu\text{L}$ および $100.3 \pm 19.7 \times 10^2/\mu\text{L}$ であった。

ウイルス接種時のリンパ球数は 1 群および 2 群で $26.5 \pm 8.1 \times 10^2/\mu\text{L}$ および $29.7 \pm 14.8 \times 10^2/\mu\text{L}$ であった。その後、両群ともに接種後 1 日目に減少傾向を示し、1 群および 2 群のリンパ球数は $18.0 \pm 5.6 \times 10^2/\mu\text{L}$ および $25.0 \pm 14.7 \times 10^2/\mu\text{L}$ であった。

接種後 1 日目以降は、両群ともに増加傾向にあり、剖検時の 1 群および 2 群のリンパ球数はそれぞれ $26.8 \pm 7.3 \times 10^2/\mu\text{L}$ および $32.3 \pm 10.7 \times 10^2/\mu\text{L}$ とウイルス接種時とほぼ同様の値であった。

その他の項目では特記すべき差は認められなかった。

12.5 血液生化学検査

Table 5 および Appendix 5 に血液生化学的検査結果を示した。

すべての項目において特記すべき差は認められなかった。

12.6 剖検時肉眼所見

Table 6 および Appendix 6 に剖検時の肉眼所見を示した。

すべての個体において特記すべき異常は認められなかった。

12.7 臓器重量

Table 7 および Appendix 7 に臓器重量を示した。

Table 8 および Appendix 8 に相対臓器重量を示した。

すべての測定した臓器において特記すべき差は認められなかった。

12.8 病理組織学的検査

Table 9 および Appendix 9 に病理組織学的検査結果を示した。

1 群の 1 例に皮膚の皮脂腺過形成が認められた。加えて、対照群を含めた各群において単核細胞浸潤（肺、舌）、肝の小肉芽腫、皮膚の毛包炎、胃の糜爛など自然発生性と考えられる変化が観察された。その他の臓器および組織において組織学的変化は認められなかった。

12.9 各臓器における残存ウイルスおよび排泄物へのウイルス排出検出

Table 10 に各臓器における残存ウイルス検出結果を示した。

Table 11 に排泄物へのウイルス排出検出結果を示した。

経時的な採取を行った血液、糞、尿、涙液および唾液スワブのいずれにおいても、ウイ

ルス由来 RNA の存在を認めなかった。また、剖検時に採取した臓器のいずれにおいても、同様にウイルス由来 RNA の存在を認めなかった。

13. 考察

低病原性 MV をビーグルに接種した際の安全性を確認するために、ウイルス接種後の各種パラメーターについて検討を行った。

その結果、血液学的検査において白血球およびリンパ球数は両群ともにウイルス接種後、減少傾向にあったが、いずれもビーグルの正常値として報告されている範囲内¹⁾であるため、毒性学的に意味のない変化であると考えられた。

これらの検査項目以外はウイルス接種に起因すると考えられる変化は認められなかった。

病理組織学的検査においては MV-HL-dSLAM 接種群の 1 例に皮膚の皮脂腺過形成が認められた。自然発生的にもまれな病変ではあるが、MV-HL-dSLAM 接種群で 6 例中 1 例のみであったため、MV-HL-dSLAM 接種に起因すると考えられる病理組織学的変化は認められなかったと推測された。

また RT-PCR の結果、投与翌日以降の体外へのウイルス排出は認められず、投与 28 日後における正常組織でのウイルス残存も認めなかった。

以上の結果より、MV-HL-dSLAM を 2×10^7 TCID₅₀/body 接種しても毒性学的変化は認められず、当該試験条件下において本ウイルスの安全性には問題ないものと考えられた。

14. 参考文献

- 1) 田嶋 嘉雄監修 実験動物の生物学的特性データ ソフトサイエンス社 p110, 1989

資料20 rMV-SLAMblindの霊長類サルに対する病原性試験（2例）

1 本遺伝子組換え麻疹ウイルス rMV-SLAMblind 10^6 TCID₅₀ を皮下接種

↓

- ・接種21日まで臨床症状の観察
- ・抹消血 10^5 個あたりのウイルスカ価の経時的測定（ウイルス血症）

ウイルス	サル	臨床症状			ウイルス血症				
		発疹	食欲不振	下痢	2日	4日	7日	14日	21日
rMV-SLAMblind	カニクイザル 1頭	0/1頭	0/1頭	0/1頭	<1	<1	<1	<1	<1
rMV-SLAMblind	アカゲザル 2頭	0/2頭	0/2頭	0/2頭	<1	<1	<1	<1	<1

文献35から引用改変

<結果>

rMV-SLAMblindは臨床症状を示さず、ウイルス血症も引き起こさなかった。

2 MV野外株 (IC-B株) およびそれを元に作出されたrMV-SLAMblind $10^{4.5}$ TCID₅₀ (1ml)を

- 結膜へ一滴滴下
- 残りを半量ずつ両鼻腔へ接種

↓

- ・接種14日後まで臨床症状の観察
- ・抹消血 10^6 個あたりのウイルスカ価の経時的測定（ウイルス血症）

ウイルス	サル	臨床症状		ウイルス血症		
		発疹	食欲不振	3日	7日	14日
野外株	アカゲザル 6頭	2/6頭	3/6頭	(-)	$10^{3.76}$	$10^{1.08}$
rMV-SLAMblind	アカゲザル 5頭	0/5頭	0/5頭	<1	<1	<1
rMV-SLAMblind	アカゲザル 1頭	0/1頭	0/1頭	$10^{1.38}$	<1	<1

改変

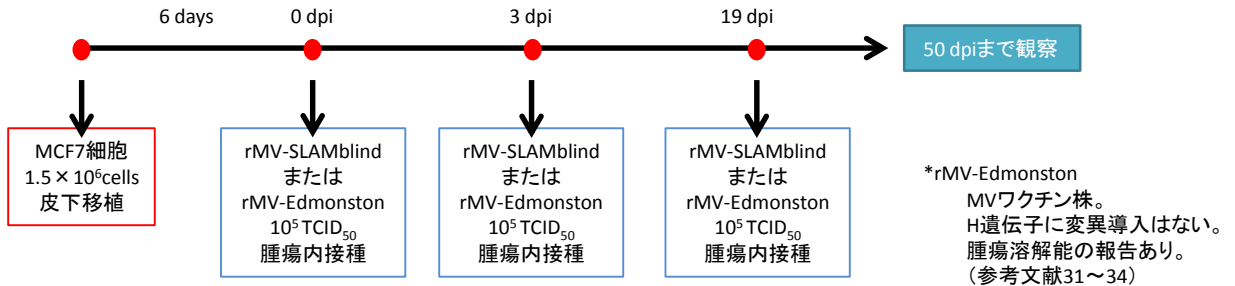
<結果>

MV野外株はアカゲザルに臨床症状を示し、ウイルス血症を引き起こした。

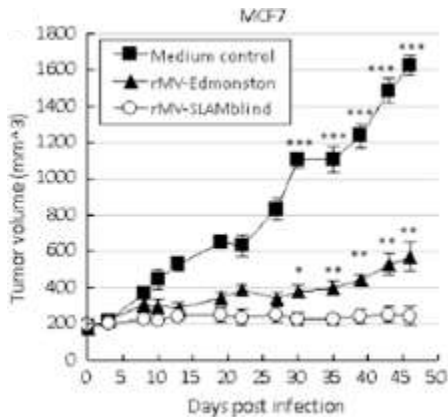
一方、rMV-SLAMblindは臨床症状を示さず、1頭で感染初期にわずかなウイルス血症を引き起こしたのみであった。

資料21 ヒト乳ガン細胞株Xenograftモデルを用いた、rMV-SLAMblindの抗腫瘍効果の評価試験

1) 試験スケジュール

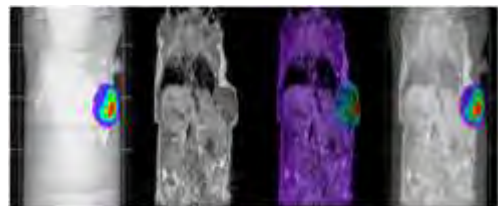
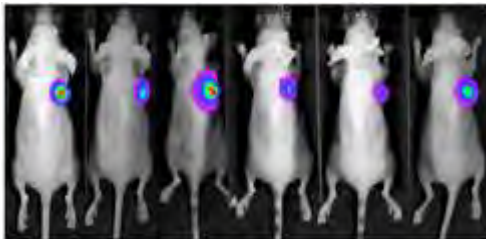


2) 腫瘍サイズの経時的測定



rMV-SLAMblindは腫瘍の増大をほぼ完全に抑制し、Edmonston株による腫瘍抑制よりも高い効果を示した。

3) 体内分布の検出



Luciferase遺伝子組換えrMV-SLAMblindを腫瘍内に接種し、2日後にD-Luciferinを投与しウイルス局在を検出した。その結果、ウイルスの分布は腫瘍部位にのみ限局することが確認された。

本遺伝子組換えMVの使用方法

外科手術や抗ガン剤治療が不可能な再発乳癌の症例

遠隔転移が認められないケース

SLAM blind変異導入麻疹ウイルス
(rMV-SLAMblind)

- ・ 10^6 - 10^7 TCID₅₀/ml × 1ml
- ・ 数日～2週間おきに計1～5回接種
- ・ 腫瘍内または皮下接種



経過観察(一般状態、体温)
ウイルス排出試験

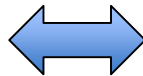
遠隔転移が確認されるケース

SLAM blind変異導入及び
EGFP遺伝子導入麻疹ウイルス
(rMV-SLAMblind-EGFP)

- ・ 10^6 - 10^7 TCID₅₀/ml × 1ml
- ・ 数日～2週間おきに計1～5回接種
- ・ 腫瘍内接種、または状況に応じ
静脈接種



経過観察(一般状態、体温)
ウイルス排出試験
(一定の期間後)
飼い主の許可を得て生検法に
よる採材
↓
EGFPの蛍光によるウイルス
増殖の有無の確認



※ ウイルスの併用や治療の途中での変更はない。

資料31

rMV-luc-SLAMblindの腫瘍移植マウス接種後の尿中ウイルス排出試験

・使用細胞およびウイルス
H441細胞
rMV-luc-SLAMblind

・ウイルス接種
腫瘍細胞移植25日後のSCIDマウス2匹(#1、#2)に、rMV-luc-SLAMblindをウイルスカ価
 $1 \times 10^6/100\mu\text{l}$ ずつ腫瘍内接種した。

・腫瘍内ウイルス量の測定
rMV-luc-SLAMblindから産生されるluciferase量をウイルス量の指標とした。具体的に、マウスにD-luciferinを皮下接種し、発光量をin vivo imaging system (IVIS)で測定した。
また、腫瘍サイズも経時的に測定した。

・尿からのウイルスRNA検出
回収した尿100 μl をRNA回収試薬(TRIZOL LS)で懸濁し、RNAを回収した。
各RNAを逆転写し、資料18と同条件でPCRを行った。
各PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロミド染色した。

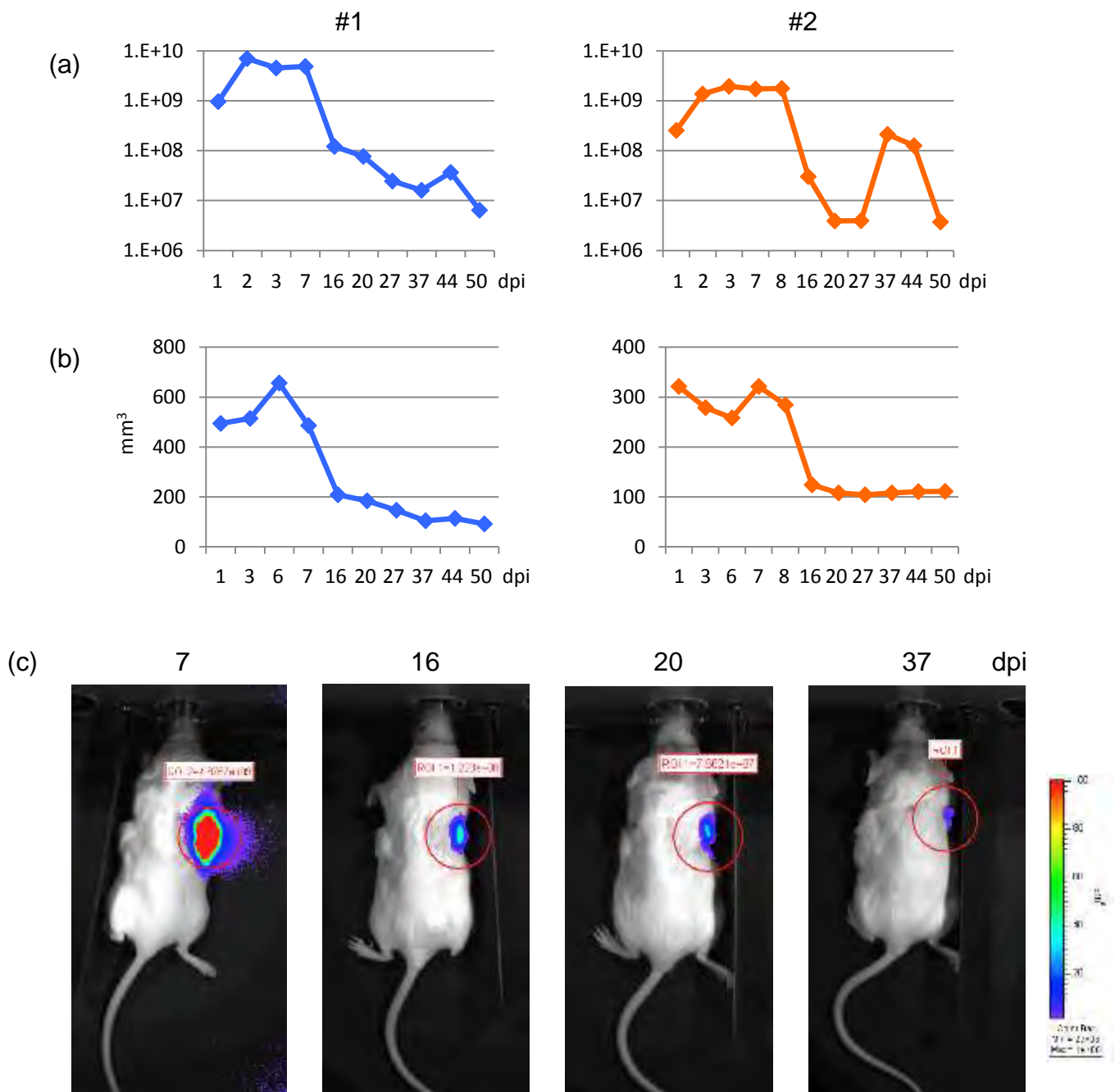
<結果>

マウス#1, #2共に、ウイルス接種後7-8日までがウイルス増殖極期で、その後ウイルスは急速に減少した(図1a, c)。
また、腫瘍サイズはウイルス量と相関しており(図1b)、腫瘍の縮小に伴いウイルス量も減少する事が確認された。

マウス尿中へのウイルス排出試験では、マウス#1において、ウイルス増殖極期(8 dpi)にウイルスカ価=1(感染性ウイルス1粒子に相当)よりうすいバンドが検出された(図2)。
その後、#1の尿中にはウイルスは検出されなかった。
また、マウス#2においては、採取期間中にウイルスは検出されなかった。

このことから、腫瘍内でのウイルス増殖の極期においてはごく微量なウイルスが排出される可能性があるが、腫瘍縮小に伴い排出はなくなると考えられる。

図1 : rMV-luc-SLAMblind接種後の腫瘍内ウイルス増殖量の経時的変化

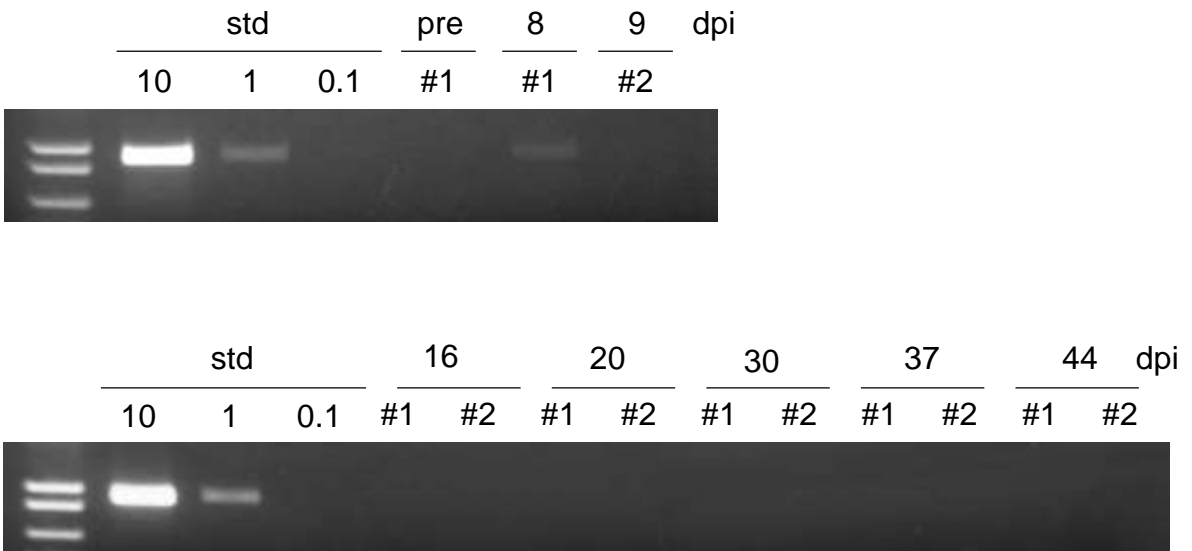


(a) IVISを用いた、Luciferase活性による腫瘍内ウイルス量の測定

(b) 腫瘍サイズの測定

(c) IVISによるマウス#1の腫瘍内ウイルス量の可視化像

図2: rMV-luc-SLAMblind腫瘍内接種後のマウス尿中のウイルス排出検出



std: ウイルスカ価 10, 1, 0.1相当量を同条件でRT-PCRしたスタンダードサンプル

東京農工大学イヌ遺伝子組換え麻疹ウイルス治療安全委員会細則

(設置)

第 1 条 国立大学法人東京農工大学農学部附属動物医療センターにおける臨床動物を対象とした遺伝子治療研究倫理等について、多角的な立場から審議するため、東京農工大学イヌ遺伝子組換え麻疹ウイルス治療安全委員会（以下「委員会」という。）を置く。

(審議事項)

第 2 条 委員会は、次の各号に掲げる事項を審議する。

- (1) 申請に係る第一種使用等の方法
- (2) モニタリング計画書の内容
- (3) 緊急措置計画書の内容
- (4) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められる事態か否かの判断
- (5) 申請に係る第一種使用等を行う者の教育訓練の方法
- (6) その他申請に係る第一種使用等による生物多様性影響の防止に関する事項

(組織)

第 3 条 委員会は、次の各号に掲げる委員をもって組織する。

- (1) 申請に係る癌疾患のイヌの治療に使用する遺伝子組換えウイルスの特性及び当該遺伝子組換えウイルスを使用したがん治療に関し専門の知見を有する者
- (2) 申請に係る癌疾患のイヌの治療に使用する遺伝子組換えウイルスの使用、作製、運搬その他の第一種使用等の実態に関し専門の知見を有する者
- (3) 申請に係る第一種使用等によって影響を受ける可能性のある野生動植物等、生態系等に関し専門の知見を有する者
- (4) 申請に係る第一種使用等を行う場所を管理する者

2 前項に規定する委員の任期は、本治療試験の終了までとする。

(委員長及び副委員長)

第 4 条 委員会に委員長を置き、委員長は委員の互選により選出する。

2 委員長は、委員会を主宰し、その議長となる。

3 委員長に事故があるときは、委員長が指名する副委員長がその職務を代行する。

(委員会)

第 5 条 委員会は、委員長が招集するものとする。

2 委員会は、委員の過半数の出席をもって成立する。

3 議事は、出席委員の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。

(招集の請求)

第6条 委員長は、次の各号に掲げる場合は、早急に委員会を招集しなければならない。

(1) 緊急性のある審議事項が発生した場合

(2) 委員3分の1以上の請求がある場合

(委員以外の者の出席)

第7条 委員会が必要と認めたときは、委員以外の者の出席を求め、意見を聴くことができる。

(雑則)

第8条 この規程に定めるもののほか、委員会において必要な事項は、委員会が定める。ただし軽微な変更については、委員長に一任する。

附則

この細則は、平成27年5月13日から施行する。

飼い主の皆様へ

遺伝子組換え麻疹ウイルスを用いた
犬の乳がん治療

についてのご説明

作成日：2017年 月 日

研究実施責任者

東京農工大学大学院農学研究院

個人情報につき非開示

はじめに

この冊子は、東京農工大学農学部附属動物医療センターにおいて行われている「イヌの乳がんを対象とした遺伝子組換え麻疹ウイルス治療の改善効果」という臨床研究について説明したものです。担当獣医師からこの研究についての説明をお聞きになり、研究の内容を十分にご理解いただいた上で、あなたの自由意思でこの研究に参加していただけるかどうか、お決めください。ご参加いただける場合は、別紙の「同意書」にご署名のうえ、担当獣医師にお渡しください。

1. 臨床研究について

それぞれの病気の診断や治療は、長い期間をかけて進歩・発展してきて現在の方法になっています。このような診断や治療の方法の進歩・発展のためには多くの研究が必要ですが、その中には健康な動物や病気に罹患した動物を対象に実施しなければならないものがあります。これを「臨床研究」と言います。臨床研究は飼い主の皆さんを始めとした多くの方々のご理解とご協力によって成り立つものです。

なお、この臨床研究に使用する遺伝子組換え麻疹ウイルスは、乳がんを患っている犬（以下、患犬と言います）に対して治療を目的として使用することについて農林水産省の承認を受けております。また患犬への治療試験については、東京農工大学農学部臨床動物試験・研究倫理委員会で厳密な審査を受けており、その承認により実施するものです。

2. この研究の意義と目的

本治療試験に使用する遺伝子組換え麻疹ウイルスは、遺伝子工学の技術を用いて、病気（麻疹）を起こさないように遺伝子を改変されたウイルスです。乳がん細胞に発現するPVRL4を介して、乳がん細胞内に入り、細胞を障害します。しかし、他の細胞に侵入することはできないため、乳がん細胞でのみ増殖し、次々と乳がん細胞を殺していくことから、乳がんに対する治療効果が期待されています。

本試験では、外科手術や既存の抗がん剤治療では治療ができなくなってしまった、再発や遠隔転移が認められる乳がんの犬を対象に、遺伝子組換え麻疹ウイルスを用いた乳がん治療を行い、この治療の有効性を検証することを最終目的としています。

3. 研究の方法

(1) 対象となる症例

東京農工大学農学部附属動物医療センターに外来として診察を受けた乳がんのイヌを対象とします。複数の獣医師が他に有効な治療法がないと判断し、本臨床試験への参加が東京農工大学農学部臨床動物試験・研究倫理委員会により承認されている症例が対象となります。ただし、外科手術や抗がん剤の治療で治療効果が得られると判断される症例は除きます。その他、合併症や治療経過により、担当獣医師が不適切と判断した症例は除きます。また、1年以内にイヌジステンパーワクチン（混合ワクチン可）を接種し、証明書を取得しているイヌが対象となります。

この研究では上記の症例が対象となるため、飼い主の方にご説明し、同意をいただくこととなりますので、ご理解ご協力をお願いします。

*飼い主さんへのお願い

本治療試験に使用する麻疹ウイルスは、人麻疹ウイルスを病原性を示さないよう遺伝子改変を行ったものです。しかしながら念のため、治療試験に参加する犬の飼い主さんには麻疹ワクチンの接種を必ず受けていただくようお願いいたします。試験参加の前には、麻疹ワクチン接種証明書のコピーを提出していただきます。また、飼い主さんやご家族の中に妊婦さんがいる場合には試験には参加できませんのでご了承ください。なお、ご家族の中に、イヌが麻疹ウイルス治療を受けたのちに妊娠する可能性のある方がいる場合には、飼い主さん同様麻疹ワクチンの接種歴を確認させていただくとともに、接種歴がない場合には医療機関で麻疹ワクチンの接種を受けていただきますのでご承知おきください。

(2) 研究の方法

飼い主の方から同意いただいたこの研究の対象となる症例に、本試験のために設置した治療室内で遺伝子組換え麻疹ウイルス溶液を接種します。接種は、直接乳がん注射する場合と、静脈注射する場合があります。接種を受けたイヌは、治療室内に設置した飼育ケージ内で飼育します。

本遺伝子組換え麻疹ウイルス接種後、毎日一般状態と体温を記録するとともに、当該ウイルスが尿、糞便、血液及び分泌液からウイルス遺伝子が検出できなくなるまで、接種動物を飼育ケージ内で管理します。腫瘍の大きさに応じて遺伝子組換え麻疹ウイルス溶液を数日～2週間おきに計1～5回程度接種する場合があります。

麻疹ウイルス治療を受けたイヌには、頸背部の皮下にマイクロチップを埋め込みます。これは個体識別を可能とするためです。このためには、一般的に登録用としてイヌに使用されているマイクロチップを使用します。

また、以下の「① 検体」をご提供いただき、「② 診療情報」を利用させていただきます。

① 検体

以下の検体を飼育期間中は週に2回採取し、ウイルス遺伝子の有無を調べます。

- 血液
- 糞便
- 尿
- 分泌液（唾液、涙液）

② 診療情報

体重、一般臨床症状（食欲、元気、排便、排尿）

乳がんの大きさの測定

(3) 研究の内容

診療情報によって、遺伝子組換え麻疹ウイルスのイヌ乳がんに対する治療効果を判定します。研究内容は専門的でやや難しいですが、詳しくお知りになりたい場合は、担当獣医師におたずねください。なお、検体を用いて測定する内容には、個体や血統などを特定できるような情報は含まれておりません。

(4) 研究へのご協力をお願いする期間

飼い主の皆様には、患犬から遺伝子組換え麻疹ウイルス遺伝子が検出されなくなるまで、飼育施設にて管理をさせていただきます。その間、注意事項に従って面会をしていただくことは可能です。飼育施設内で管理をする期間は、1ヶ月から4ヶ月程度を予測していますが、状況により短縮したり延長したりする場合があります。

(5) 研究終了後の対応

本遺伝子組換え麻疹ウイルスの排出が確認できない場合に、患犬の管理解除（退院）を行うこととしており、管理解除（退院）後にも、最初の1ヶ月は毎週、2ヶ月目以降は2週ごとに検査を行いウイルスの排出を確認させていただく必要があるため、必ず来院してください。管理解除（退院）後1年間は室内

あるいはそれに準ずる区域（飼い主が管轄あるいは管理する区域であり、庭、バルコニー、ベランダ、駐車場などを含む）での飼育を行ってください。散歩の際は、首輪やリードなどの着用をお願いします。排泄物は吸収パッド等で回収し消毒液を噴霧したのちに処理していただきます。管理解除（退院）後に患犬が逃げ出した場合、直ちに捕まえて室内に戻すとともに、すみやかに研究担当者へ連絡してください。もしも途中で通院や室内飼育ができなくなる場合には、農工大の管理区域内で飼育する必要がありますので、必ず事前に申し出てください。

この研究が終了した後は、担当獣医師は責任をもって最も適切と考える獣医療を提供いたします。また、万が一死亡した場合には、ビニール袋で二重に密封し、速やかに本学動物医療センターへ帯同してください。

4. 予想される利益と不利益

(1) 予想される利益

この研究の成果により、将来的に治療方法が改善し、利益を受ける可能性があります。また、同じ病気のイヌに対し貢献できる可能性があります。

(2) 予想される不利益

この研究で使用する遺伝子組換え麻疹ウイルスは、正常なイヌに投与しても、安全性に問題ないことが確認されています。

この研究にご参加いただく場合は、試験期間中、本学指定の飼育施設内で管理されます。その間は、獣医師や動物看護師が適切な管理を行います。病気の進行により状態が悪化したり、死亡したりする可能性があります。

患犬が死亡した場合には速やかに高圧蒸気処理によるウイルスの不活化を行います。遺体はペット火葬会社にて火葬したのち、遺骨としてあなたにお返しいたします。

5. ご協力をお願いすること

この研究への参加に同意いただけた場合にご協力をお願いすることは次の3点です。

- ① 同意文書に署名し提出していただくこと
- ② 1年以内に受けたイヌジステンパーワクチンの予防接種証明書のコピーを提出していただくこと
- ② 研究用の検体を提供していただくこと
- ③ あなたのイヌのカルテの記録を研究結果の分析に利用させていただくこと

6. 研究実施予定期間と参加予定者数

(1) 実施予定期間

この研究は、 年 月から 年 月まで行われます。

(2) 参加予定症例数

5症例の参加を予定しております。

7. 研究への参加とその撤回について

あなたのイヌがこの研究に参加されるかどうかは、あなたご自身の自由な意思でお決めください。たとえ参加に同意されない場合でも、あなたのイヌは一切不利益を受けませんし、これからの治療に影響することはありません。また、あなたが研究の参加に同意した場合であっても、いつでも研究への参加を書面によりとりやめることができます。この場合、得られたデータはすべて廃棄されます。

8. 研究への参加を中止する場合について

飼い主であるあなたがこの研究へ参加を同意されても、次の場合は参加を中止させていただくこととなります。あなたの意思に反して中止せざるをえない場合もありますが、あらかじめご了承ください。中止する場合は、その理由およびそれまでのデータの活用方法などを担当獣医師からご説明いたします。また、中止後も担当獣医師が誠意をもってあなたのイヌの治療にあたりますので、ご安心ください。

- ① 飼い主であるあなたが研究への参加の中止を希望された場合
- ② この臨床研究全体が中止となった場合
- ③ その他、担当獣医師が中止したほうがよいと判断した場合

9. この研究に関する情報の提供について

この研究は、標準的な対症治療を行いながら検体のご提供をうけて実施させていただくものですが、あなたのイヌの安全性や研究への参加の意思に影響を与えるような新たな情報が得られた場合にはすみやかにお伝えします。

また、この研究に関して、研究計画や関係する資料をお知りになりたい場合は、他の症例の個人情報や研究全体に支障となる事項以外はお知らせすること

ができます。研究全体の成果につきましては、ご希望があればお知らせいたします。なお、この研究期間中、あなたのイヌの検査データについては、随時説明致します。いずれの場合も担当獣医師にお申し出ください。

10. 個人情報の取扱いについて

この研究にご参加いただいた場合、あなた及びあなたのイヌから提供された検体や診療情報などのこの研究に関するデータは、個人を特定できない形式に記号化した番号により管理されますので、あなたの同意無く、あなた及びイヌの個人情報が外部に漏れることは一切ありません。

この研究から得られた結果が、学会や科学専門雑誌などで公表されることはあります。このような場合にも、あなた及びあなたのイヌのお名前など個人情報に関することが外部に漏れることは一切ありません。この研究で得られたデータは、他の目的で使用することはありません。

11. 健康被害が発生した場合の補償について

この研究は、標準的な対症治療を行いながら、遺伝子組換え麻疹ウイルスの乳がんに対する治療効果を検討するため、検体のご提供を受けて実施するものです。試験溶液の摂取や検体の採取に際して何らかの健康被害が発生した場合は、担当獣医師は速やかに適切な処置を行います。飼育施設内で管理している期間中に発生する治療のための費用はすべて当方が負担をします。また、管理期間中に患犬が死亡した場合、ペット火葬会社で火葬を行い遺骨とするための費用は当方で負担します。ただし管理解除後に生じた獣医療に関する費用は、通常の診療と同様に、あなたご自身によりお支払いいただきます。この研究による特別な補償はありません。

12. 費用負担、研究資金などについて

この研究における一部の研究用の検査および諸経費は、研究実施責任者及び研究代表者が所属する研究室の研究費で賄われます。したがって、ご参加いただくにあたって、あなたの費用負担が通常の診療より増えることはありません。なお、ご参加いただくにあたっての謝金などのお支払いもありません。

13. 知的財産権の帰属について

この研究から成果が得られ、知的財産権などが生じる可能性があります。その権利は研究グループに帰属します。

14. 研究組織

この研究は以下の組織で行います。

【研究実施責任者】

東京農工大学大学院農学研究院 個人情報につき非開示

【研究代表者】

東京農工大学大学院農学研究院 個人情報につき非開示

【参加施設】

東京農工大学大学院農学研究院

【検査施設】

東京農工大学農学部附属動物医療センター

住 所：183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

電 話：042-367-5785

15. 研究担当者と連絡先（相談窓口）

この研究について、何か聞きたいことやわからないこと、心配なことがありましたら、以下の研究担当者におたずねください。

【研究代表者】

東京農工大学大学院農学研究院 個人情報につき非開示

住 所：183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

電 話：非開示

同意書

飼い主氏名：

飼い主住所：

電話番号：

患犬名称：

性別：

年齢：

東京農工大学大学院 個人情報につき
非開示 殿

担当獣医師より十分な説明を受け、「遺伝子組換え麻疹ウイルスを用いた犬の乳がん治療」に参加することに同意いたします。また以下のことを厳守します。

- 1) 押印した同意書の提出
- 2) イヌジステンパーワクチン接種証明書の提出（コピー可）
- 3) 飼い主の麻疹ワクチン接種証明書の提出（コピー可）
- 4) 指定の飼育室内での管理
- 5) 検体の提供
- 6) 管理解除（退院）後の定期検診の受診
- 7) 管理解除（退院）後の飼育に関する注意事項
- 8) 住所等、管理解除（退院）後に変更があった場合の速やかな連絡
- 9) 死亡したのちの遺体の処理

平成 年 月 日

署名

_____ 印