

第一種使用規程承認申請書

令和 4 年 11 月 21 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 国立大学法人北海道大学 北海道大学病院
申請者 病院長 渥美 達也
住所 北海道札幌市北区北 14 条西 5 丁目

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（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）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	<i>rep</i> 及び <i>cap</i> 遺伝子領域を欠失し、アデノ随伴ウイルス 9 型に由来する改変型キャプシドタンパク質及びアデノ随伴ウイルス 3 型に由来する ITR を有し、HMGB1 遺伝子発現カセットを搭載する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス(AAV.GTX-HMGB1)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	ヒトの遺伝子治療を目的とした投与、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	本遺伝子組換え生物等の原液の保管 (1) 本遺伝子組換え生物等の原液は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において保管する。 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管 (2) 本遺伝子組換え生物等は原液を希釈せずに投与する。原液の投与準備は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。 (3) 投与準備済みの原液は、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。 運搬 (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。 患者への投与 (5) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、患者の髄腔内に注入することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。 投与後の患者からの排出等の管理

	(6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間対策を講じる。 (7) 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。 (8) 投与を受けた患者が当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、当該患者に適切な指導を行う。 (9) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。 患者検体の取扱い (10) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。 (11) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。 (12) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和45年法律第137号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。 感染性廃棄物等の処理 (13) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。 (14) 本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあたっては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。 (15) 患者が自宅で用いたドレッシング材及び洗浄に用いた器材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で廃棄する。 (16) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和46年政令第300号）の別表第1の4の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。 (17) 患者から採取した検体等の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、漏出しない容器に入れ、本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。 (18) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等を
--	--

廃棄する場合は、密封された状態で高圧蒸気滅菌等により不
活化処理を行い、廃棄する。

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

AAV.GTX-HMGB1（以下「本遺伝子組換え生物等」という。）の宿主は、アデノ随伴ウイルス（以下「AAV」という。）である。国際ウイルス分類委員会による分類体系上、ウイルスとしての AAV は以下のように位置付けられている(1) (2)。

パルボウイルス科 (Parvoviridae)

パルボウイルス亜科 (Parvovirineae)

デペンドパルボウイルス属 (Dependoparvovirus)

ヒトアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus)

AAV は自然界に広く分布しており、哺乳動物に感染する。2008 年までにヒト及び霊長類で分離されたウイルスは抗原性に基づいて 12 の血清型に分けられていたが、さらにその後の検索も合わせると、これまでに 100 以上の型が見つかっている(3) (4)。ヒトでは主に小児期に初感染が起こり、成人の約半数が中和抗体を有するが、ヒトへの病原性は知られていない。AAV 自体は複製機能を欠損しており、動物細胞における複製はヘルパーウイルスの機能に依存している(2)。

本遺伝子組換え生物等は、AAV3 型 (AAV3) の *rep/cap* 遺伝子領域がヒト *HMGB1* 発現カセットに置換されたゲノム構造を持ち、AAV9 型 (AAV9) に由来するキャプシドタンパク質により形成されるウイルス粒子外殻（キャプシド）及び AAV3 型に由来する Rep タンパク質を有する。本遺伝子組換え生物等は AAV3 に由来する ITR を有している。

AAV3 型の生活環について報告はないが、AAV3 型は AAV2 型と相溶性が高いことから AAV3 型と AAV2 型の生活環に大きな差はないと考えられる。

野生型 AAV2 型の場合、生活環については、AAV2 型の外殻タンパク質には突出したループ構造があり、この構造が細胞へ結合し、共受容体を介してエンドサイトーシスにより AAV が感染する。単独で感染した場合、AAV ウイルスゲノムは第 19 番染色体に特異的に組込まれ、サイレントな状態（潜伏感染）となる。潜伏感染状態の細胞にヘルパーウイルスが感染、又は AAV の感染時にヘルパーウイルスが同時に感染した場合、AAV の増幅が起こり、細胞外へ排出される。(5) (6)。AAV9 型の外殻タンパク質のコード領域(*cap*)は、AAV2 との相溶性が 78%であり、細胞への結合（感染）は AAV2 と同様であると推察される。また AAV3 型の複製コード領域(*rep*)は、AAV2 との相溶性が Gaps を含めて 85%であり、本遺伝子組換え生物等の生活環は AAV2 と同様であると推察される（別紙 1）。

2 使用等の歴史及び現状

AAV は、1965 年にアデノウイルス調製物の混入物として発見されたが、病原性が認められないため、医学的関心を引かなかった。しかしその非病原性、潜伏性及び広汎な感染性などの特性から遺伝子治療用ウイルスとしての有用性が注目され、遺伝子治療で汎用されている(4) (7) ; IV章参

照。また、AAV9 は、血液脳関門を通過し中枢神経系に到達できるという特性から、神経疾患に対する遺伝子治療ベクターとして使用されるようになった(8)。なお、AAV3 及び AAV9 を含めいかなる血清型の AAV もヒト用の生ワクチン等に使用された報告はない。

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

野生型 AAV のウイルス粒子は、直径約 25nm の正二十面体構造のキャプシドを有しており、エンベロープを持たない。AAV のゲノムは約 4.7kb の線状一本鎖 DNA であり、プラス鎖 DNA を持つウイルス、マイナス鎖 DNA を持つウイルス共に感染性を有する。AAV ゲノム DNA の両端には逆位末端反復配列 (ITR) があり、その間に *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子が挟まれている。*rep* 遺伝子は、DNA の複製に必要な 4 つの Rep タンパク質をコードする。*cap* 遺伝子は、AAV の正二十面体キャプシドを形成する 3 つのタンパク質 (VP1、VP2 及び VP3) をコードする。ITR は、DNA 複製、パッケージング、宿主細胞ゲノムへの組み込み及びその後の切り出しに必要な配列を含む。AAV には、キャプシドタンパク質のアミノ酸配列の違いによって 100 以上の型があり、それぞれ感染指向性が異なる。多くの AAV には共通する受容体 (AAVR) があることが知られているが(9)、感染には血清型ごとに異なる副受容体 (co-receptor) も関与しており、これらの組み合わせによって指向性の違いが生ずると考えられている(10)。AAV9 キャプシドタンパク質の組織指向性は、血液脳関門を通過し、神経細胞に感染する。

AAV2 型の場合、野生型 AAV が単独で標的細胞に感染すると核内でエピソームとして存在するか Rep が関与して第 19 染色体長腕の AAVS1 領域への組み込みが起こるが、プラスミドベクターから作製した組換え AAV ではこのような部位特異的組み込みは起こらない。組換え AAV の細胞染色体への組み込みは低頻度で起こりうるが、その場合には活発に転写されている遺伝子領域にランダムに挿入されやすいとの報告がある(11) (12) (13)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

細胞に感染した野生型 AAV が核内に侵入すると、キャプシドからウイルスゲノムが放出されるが、AAV が単独感染した場合は自律的増殖ができず、潜伏感染する。

アデノウイルスやヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスが共存する場合は AAV ゲノムの複製とウイルス粒子の構築が起こる。なお、アデノウイルスがヘルパーウイルスの場合は、*E1A*、*E1B*、*E2A*、*E4* 及び *VA* 遺伝子が供給される。

(3) 捕食性又は寄生性

他の生物を捕食することはない。野生型 AAV が哺乳動物に感染することは知られているが、自然界においてヒト以外で増殖を伴う感染が起こるかどうかは明らかでない。ヒトの正常フローラに存在するか否かについては明らかにされていないが、急性感染時には便中に排泄されることもある(2)。AAV が単独で感染し、ヘルパーウイルスが存在しない場合は、二本鎖 DNA の形でエピ

ソームとして、又は宿主染色体（多くの場合ヒト第 19 染色体又はそのホモログ）に組み込まれて潜伏感染する(14) (15)。

(4) 繁殖又は増殖の様式

野生型 AAV のヒトへの感染経路として、経気道感染、糞口感染、接触感染が挙げられている。ヒト以外にも多くの哺乳動物に感染しうる。感染の際には、AAV は、細胞表面受容体を介したエンドサイトーシスにより取り込まれる。細胞内侵入後は、エンドソーム内の弱酸性環境下で細胞質に放出されて核周囲に蓄積し、さらに核膜孔複合体を通して核内に移行すると考えられている。この時、アデノウイルス又はヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスが同時に感染していれば、AAV の増殖が起きて溶解感染の経路に進む。ヘルパーウイルスが共存しない場合は、感染細胞において複製することなく潜伏する(16)。

(5) 病原性

AAV の感染は不顕性に終わると考えられており、これまで感染に伴ういかなる病原性も知られていない。ヒトの肝細胞癌組織を解析したところ AAV ゲノム配列が見出されたという報告がある(17)。しかし、病的な意義は見出されていない(18)。

(6) 有害物質の産生性

野生型 AAV の感染に際して細胞内で産生されるタンパク質が病原性又は毒性を示すという報告はない。

(7) その他の情報

パルボウイルスに共通する性質として物理化学的に安定なキャプシドを有し、エンベロープを持たないことから、乾燥に対しても抵抗性を示す。本ウイルスは物理化学的に比較的堅牢であり、常温において安定である。

不活化には加熱（85℃で数分間）、次亜塩素酸ナトリウム（1000 ppm）などのウイルス消毒剤、水酸化ナトリウム、紫外線（UV）照射などの処理が必要とされている(1)。通常のオートクレーブ処理により完全に不活化される。

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

遺伝子組換え生物等ゲノム DNA の供与核酸の全塩基配列を別紙 2 に、構造模式図を別紙 3 に、HMGB1 のアミノ酸配列を別紙 4 に示す。

本遺伝子組換え生物等のゲノムにおいて、宿主である AAV3 に由来するのは両末端の ITR 配列のみであり、これらに挟まれた形で供与核酸である [REDACTED] プロモーター領域、ヒト HMGB1 コード領域、[REDACTED] 配列、[REDACTED]

polyadenylation signal (pA) 由来ポリ A 付加シグナル領域、及び非コーディング人工配列が存在する。また、ウイルス粒子は AAV9 のキャプシドタンパク質を外殻に有する。

本遺伝子組換え生物等の構成要素は以下のとおりである。括弧内に本遺伝子組換え生物等ゲノム DNA の供与核酸の塩基番号（別紙 2）と塩基長を示した。

- ① Inverted terminal repeat (ITR) (Left ITR 塩基、Right ITR 塩基)
AAV3 に由来する。
- ② プロモーター () (塩基)
プロモーター領域に由来する。
- ③ ヒト HMGB1 コード領域 (648 塩基)
ヒト *HMGB1* 遺伝子 cDNA の HMGB1 タンパク質コード領域である。
- ④ 配列 (塩基)
mRNA を安定させ、発現レベルを増加させる
に由来する。
- ⑤ pA コード領域 (塩基)
polyadenylation signal (pA) の発現遺伝子領域に由来する転写終結シグナル。
- ⑥ 人工配列 (塩基)
プラスミド構築時に移入された人工配列。

(2) 構成要素の機能

本遺伝子組換え生物等の供与核酸構成要素の機能は以下のとおりである。

- ① Inverted terminal repeat
AAV ゲノムの複製及びパッケージング等に必要配列。
- ② プロモーター
HMGB1 遺伝子の転写を開始させる。
- ③ ヒト HMGB1 コード領域
ヒト HMGB1 をコードする。発現産物の HMGB1 は損傷 DNA への結合、DNA 構造の変化、修復酵素又は補因子との相互作用、及び核 DNA を修復するなど DNA 構造を調整する。
- ④ 配列
ポリ A 部位のリードスルーを防ぐ、RNA のプロセッシングと成熟を促進する、RNA の核外への輸送を増大させる、等の働きにより導入遺伝子の発現を増大させる。
- ⑤ pA 領域
RNA ポリメラーゼ II による転写終結に寄与し、転写産物末端にアデノシンを付加することにより RNA の安定性と転写効率を増加する。
- ⑥ 人工配列

プラスミド構築の過程で挿入された制限酵素認識部位等であり、本遺伝子組換え生物に新たな生物学的機能を付与するものではないと考えられる。

(3) AAV.GTX-HMGB1 の供与核酸の相同性検索

NCBI (National Center for Biotechnology Information) の Web サイト Nucleotide BLAST を使用し、供与核酸配列 (左右の ITR, █████ HMGB1, █████ pA) を含む █████ letters を対象とし相同検索を実施した。検索は相同領域が █████ █████ を抽出する条件で実施し、構成要素又はそのホモログ配列と不一致の配列について、既知の有害配列との相同性を確認した。供与核酸配列において、既知の有害配列との相同性は認められなかった。(別紙 2)

2 ベクターに関する情報

- (1) 名称及び由来
- (2) 構成要素の機能

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造

宿主である AAV に移入された供与核酸は、1 項の (1) に記載された HMGB1 タンパク質発現カセットである。それらの塩基配列を別紙 2 に示す。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法 (別紙 5 を参照)

本遺伝子組換え生物等は、HMGB1 遺伝子及びアデノ随伴ウイルス 3 型の ITR を組み込んだプラスミド (p██████)、改変型 9 型アデノ随伴ウイルスの *rep/cap* 遺伝子を組み込んだプラスミド (p██████)、並びにアデノウイルス 5 型の *E2A* 及び *E4* 遺伝子を組み込んだプラスミド (pHelper██████) を █████ 細胞に導入して作製される。なお、プラスミド p██████, p██████ は、GMP 基準に則った下記製造企業へ外注する。pHelper██████ は GMP 基準に則った下記製造企業の製品を購入する。

プラスミド p██████, p██████, pHelper██████ の製造所 : █████

(3) 遺伝子組換え生物等の 生育の経過

凍結した █████ 細胞のワーキングセルバンク (WCB) を拡大培養し、プラスミド p██████, p██████ 及び pHelper██████ を同時に導入する。細胞培養後に培養上清及び培養細胞を回収し、界面活性剤等により処理し、フィルターろ過、カラムクロマトグラフィー等の精製工程を経て、AAV.GTX-HMGB1 のバルクを調製する。目的の濃度に調整し、バイアル等の密封容器に小分け分注し、-70℃以下にて冷凍保管する。AAV.GTX-HMGB1 は、製造ロット毎に品質試験を行う (別紙 6)。

遺伝子組換え生物の製造は、[redacted] [redacted]
[redacted] [redacted] [redacted] [redacted]において GMP 基準に従って実施した。品質試験は、[redacted]、[redacted]等で実施する（本遺伝子組換え生物の品質管理試験の詳細は別紙 6）。

なお、増殖能を獲得したウイルス（replication-competent AAV、以下「rcAAV」という。）は [redacted]
[redacted]

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

移入された核酸は本遺伝子組換え生物等の一本鎖 DNA ゲノムの一部として存在し、凍結保管中は極めて安定で、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(20)。

動物細胞に感染すると、本遺伝子組換え生物等のゲノムが細胞染色体に組み込まれることはごく稀で、通常核内で染色体外 2 本鎖 DNA（エピソーム）として存在すると考えられる(21) (22) (23)。この 2 本鎖 DNA となったものから HMGB1 が転写される。HMGB1 タンパクの発現は細胞の遺伝子パターンに大きな変化が起こらない限り、また細胞が分裂しない限り継続するものと考えられる。一般に神経細胞は終末分化した静止期の細胞であり、遺伝子発現パターンの大きな変化やエピソームの希釈が起こらないので長期的な発現が期待される。

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

本遺伝子組換え生物等は宿主の AAV に存在しないヒト *HMGB1* 遺伝子をコードしているので、その配列の一部を PCR で特異的に増幅、定量することが可能である。このときに用いる PCR 反応では試料 [redacted] μ L 中に [redacted] コピーの AAV-HMGB1 があれば検出することができる。本検出法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既に臨床応用されていることから、十分に確立しているものと考えられる。（別紙 7 qPCR 法 試験方法、分析バリデーション試験）

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

宿主である AAV と本遺伝子組換え生物等の間には以下の相違がある。

- ・本遺伝子組換え生物等は発現プロモーターの下流に *HMGB1* 遺伝子を持つため、本遺伝子組換え生物等が感染した細胞は HMGB1 を発現する。
- ・本遺伝子組換え生物等はゲノムの複製やウイルス粒子の形成に必要な *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠失しているため、ヘルパーウイルスが共存しても増殖は起こらず、その生存力は野生型 AAV 以下である。本組み換え生物等の増殖が起こるのは、*rep* 及び *cap* 遺伝子が組み込まれた又はトランスフェクションされた細胞にヘルパーウイルスと共感染した場合、又は通常の細胞に本遺伝子組換え生物等・野生型 AAV・ヘルパーウイルスの 3 者が共感染した場合のみである。

- ・本遺伝子組換え生物の感染する動植物の種類、感染経路、伝播様式等は野生型 AAV と同等と考えられるが、感染してもそのゲノムの大半は染色体に組み込まれず、主に核内の染色体外にエピソームとして存在する。
- ・AAV ベクター作製時、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子をもつ p[REDACTED] と *HMGB1* 遺伝子をもつ p[REDACTED] の間での遺伝子組換えにより本遺伝子組換え生物等由来の増殖能を持つ replication-competent AAV (rcAAV) が生じる可能性がある。この場合でも、ウイルスゲノムの複製に必須な ITR と *rep* 遺伝子、及び細胞指向性 (cell tropism) を規定する外被蛋白の主要部分は野生型と同一であるので、遺伝子組換え生物等に該当するものも含め、rcAAV がヒトや動植物等への感染性、感染様式、病原性など、生物多様性に影響を与える性質は野生型 AAV と同等であると考えられる。また供与核酸の一部を保持した rcAAV が生じる可能性は否定できないが、パッケージングする供与核酸の長さは非常に短い(22) (23)。

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

ヒトの遺伝子治療を目的とした投与、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

本遺伝子組換え生物等の原液の保管

- (1) 本遺伝子組換え生物等の原液は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において保管する。

本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管

- (2) 本遺伝子組換え生物等は原液を希釈せずに投与する。原液の投与準備は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。
- (3) 投与準備済みの原液は、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。

運搬

- (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。

患者への投与

- (5) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、患者の髄腔内に注入することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

投与後の患者からの排出等の管理

- (6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間対策を講じる。
- (7) 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (8) 投与を受けた患者が当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期

(9) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。

(10) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。

- (11) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (12) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

(13) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。

- (14) 本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び機材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあたっては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。
- (15) 患者が自宅で用いたドレーシング材及び洗浄に用いた器材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で廃棄する。
- (16) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和 46 年政令第 300 号）の別表第 1 の 4 の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。
- (17) 患者から採取した検体等の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、漏出しない容器に入れ、本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。
- (18) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等を廃棄する場合は、密封された状態で高圧蒸気滅菌等により不活化処理を行い、廃棄する。

被験者からの本遺伝子組換え生物等の排出の確認は治験実施計画書に従って行う。

に被験者の血液、尿、糞便、唾液を用いて qPCR 法により、本遺伝子組換え生物等の排出を確認する。詳細は別紙 8 被験者からの本遺伝子組換え生物等の排出の確認のとおり。

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

非臨床試験

モデルマウスの小脳表層内に、本品と類似の AAV1-HMGB1 ベクターを投与して有効性が示されている(19)。

ラットにおける非臨床試験では、雌雄のラットに [REDACTED] [REDACTED] を単回髄腔内投与にて、投与後 [REDACTED] [REDACTED] 観察した。投与後 26 週まで、標的器官である小脳への分布が確認され、さらに導入遺伝子の転写も確認された。AAV.GTX-HMGB1 のベクターゲノムは、低用量群では、1 週目に尿から検出されたが、唾液および糞からは検出されず、4 週目以降はこれらすべての試料から検出されなくなった。この結果から、AAV.GTX-HMGB1 は、想定される最大臨床投与量である [REDACTED] [REDACTED] で投与後 4 週までに排泄されることが示された。(別紙 9 非臨床試験結果(分布・排出)の詳細)

AAV.GTX-HMGB1 と、マウス実験で使用した AAV1-HMGB1 は、カプシドとプロモーターが異なっている。AAV.GTX はチロシン変異型の AAV9 のカプシドで [REDACTED] promoter、AAV1 は AAV1 のカプシドで CMV promoter となる。AAV.GTX の方がより広範囲の神経細胞に送達されるが、個々の神経細胞での遺伝子発現レベルは、CMV promoter の方が [REDACTED] promoter より 10 倍以上強くなる。

従って、AAV1-HMGB1 で細胞毒性が認められなかったことから、AAV.GTX-HMGB1 の安全性が支持される。

臨床試験

本使用と同じ目的遺伝子を搭載した組換え AAV を用いた臨床試験等はない。

6 国外における使用等により得られた情報

本遺伝子組換え生物等と同じ目的遺伝子を搭載した組換え AAV を用いた臨床試験等はない。

- ・ 1999 年に承認され、米国ペンシルバニア大学で実施された第 I 相臨床試験(血友病 B に対するヒト凝固第 IX 因子を搭載する組換え遺伝子 AAV の骨格筋内投与による治療)において 8 名の患者に AAV に由来する遺伝子組換えウイルスを骨格筋に投与した結果、尿中への遺伝子組換えウイルスの排出は注入後 2 日目以降では検出されなかった(24)。
- ・ 一方、ヒト凝固第 IX 因子を搭載する遺伝子組換え AAV を肝動脈に注入した臨床試験では、 8×10^{10} vg/kg 2 名、 4×10^{11} vg/kg 3 名、 2×10^{12} vg/kg 2 名の合計 7 名において、術後 2 日目以降にも血清中にベクターゲノムが検出され、そのうち 2×10^{12} vg/kg を投与した 1 名では 14 週まで陽性であった。また、 4×10^{11} vg/kg 投与群の 1 名では、16 週まで精液中に検出され、別の 1 名では 20 週まで末梢血単核細胞中で検出された(25)。
- ・ AAV9 由来の遺伝子治療用製品 Zolgensma® は 2018 年 12 月に米国食品医薬品局 (FDA) の承認を取得し、国内では 2020 年 3 月に「効能、効果又は性能：脊髄性筋萎縮症(臨床所見は発現していないが、遺伝子検査により脊髄性筋萎縮症の発症が予測されるものも含む)ただし、抗 AAV9 抗体が陰性の患者に限る」として承認済みである。

最新の添付文書による不具合・副作用に関しては、脊髄性筋萎縮症患者を対象とした臨床試験において、本品が投与された 82 例(日本人 2 例を含む)中 35 例(42.7%)に副作用が

認められた。主な副作用は、AST 増加 9 例 (11.0 %)、ALT 増加、トランスアミナーゼ上昇及び嘔吐が各 6 例 (7.3%) であった。(2019 年 3 月 8 日カットオフ)

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微生物の特定

本遺伝子組換え生物等の感染性は野生型 AAV9 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、競合や有害物質を産生する報告もなく、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

当該第一種使用規程申請書に記載され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、他の微生物を減少させる性質はなく、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

本遺伝子組換え生物等が自然界で感染する対象は、野生型 AAV9 と同じく哺乳動物であり、ヒト及びサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等の ITR は AAV3 に、キャプシドタンパク質は AAV9 に由来する。野生型 AAV には病原性がないことが示されているが、本遺伝子組換え生物等は、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠落させているため、万が一ヘルパーウイルスが標的細胞に共感染したとしても、複製・増殖は起こらず、病原性はさらに低いと考えられる。

なお、AAV を宿主とする遺伝子組換えウイルスはこれまで欧米の臨床試験で使用されているが (24) (25)、環境への悪影響に関する報告はない。

(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限り、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来 rcAAV が環境中へ拡散する可能性は低く、また、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはない、本遺伝子組換え生物由来 rcAAV も、ヘルパーウイルスであるアデノウイルス等と共感染しない限り、環境中で増殖することはない。さらに、本遺伝子組換え生物が効率よく感染する対象はヒトに限られるため、本遺伝子組換え生物が及び本遺伝子組換え生物由来 rcAAV が被験者以外のヒトに対して病原性を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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規程等の方法による限り、病原性によって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

本遺伝子組換え生物等が自然界で感染する対象は、野生型 AAV9 と同じく哺乳動物であり、ヒト及びサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物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

本遺伝子組換え生物等は非病原性である。本組換え生物が発現する HMGB1 は DNA 構造を調整するタンパク質であって、HMGB1 タンパク質が毒性を持つことは知られていない。

AAV.GTX-HMGB1 のカニクイサルへの非臨床試験においては、全身臓器に有意な炎症増加の所見を認めなかった。カニクイサルの後頭下大槽内もしくは腰椎髄腔内に AAV.GTX-HMGB1 [REDACTED] [REDACTED] を投与し、[REDACTED] [REDACTED] 観察した（それぞれ [REDACTED] 頭）。[REDACTED] 後に、うち2頭を剖検して、脳（大脳、小脳、延髄）、脊髄（腰部）、坐骨神経、心臓、大動脈（胸部）、気管、気管支、肺、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、顎下腺、耳下腺、肝臓、胆嚢、膵臓、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、下垂体、甲状腺、上皮小体（可能な限り）、副腎、皮膚、乳腺、胸骨・大腿骨（骨髄を含む）、大腿筋、眼球（視神経含む）の病理組織学的検査を行った。臓器の肉眼所見に異常なく、HE 染色組織所見において、リンパ球浸潤を含む異常を認めなかった。HMGB1 に関するカニクイサルおよびヒト配列比較資料（別紙 10）に示すように、両者は 100% 同一であり、カニクイサルにおいて機能することは自明である。HMGB1 はネクロシスの際に細胞外に放出され、逆にアポトーシスでは放出されないとされる(26)。

次に、細胞外 HMGB1 に起因する炎症については非常によく知られた事実であるので、細胞外 HMGB1 の増加については注意が必要であるが、本 AAV.GTX-HMGB1 での危険性は低いと考える。その理由は、第一に特許発明者の論文報告(19)において AAV1-HMGB1 を投与されたマウスの脳内炎症反応について検討し否定されていること（19 および Sup Fig 2）、第二に AAV.GTX-HMGB1 が HMGB1 を発現できるのは健常な細胞であり、ネクロシスを起こしている細胞で

AAV.GTX-HMGB1 が HMGB1 の発現を増大させることはない。マウスに投与した用量は、 5×10^{13} vg/kg（治験における用量の 10 倍）である。AAV.GTX-HMGB1 と、マウス実験で使用した AAV1-HMGB1 は、カプシドとプロモーターが異なり、AAV.GTX はチロシン変異型の AAV9 のカプシドで ████████ プロモーター、AAV1 は AAV1 のカプシドで CMV プロモーターを使用している。AAV.GTX の方がより広範囲の神経細胞に送達されるが、個々の神経細胞での遺伝子発現レベルは、CMV promoter の方が ████████ promoter より 10 倍以上強くなることが知られている。従って、AAV.GTX-HMGB1 投与による脳内の細胞外 HMGB1 上昇は起こり得ないと考えられる。

(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、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来 rcAAV が環境中へ拡散する可能性は低く、また、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはない、本遺伝子組換え生物由来 rcAAV も、ヘルパーウイルスであるアデノウイルス等と共感染しない限り、環境中で増殖することはない。

本遺伝子組換え生物等が有害物質を産生し、生物多様性に影響を及ぼす物質としては、発現産物の HMGB1 が想定される。(2)に記載した様に、本遺伝子組換え生物と類似の生物で、強力な発現プロモーター搭載のベクターによるマウス脳内投与では、炎症反応が否定されている。本遺伝子組換え生物の投与は脳内であり、発現プロモーターとしての作用は類似品の 1/10 以下である(27)。

以上より、本遺伝子組換え生物等が発現する HMGB1 タンパク質が被験者以外の第三者又は野生動植物等に対して有害作用を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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、有害物質の産生によって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

本遺伝子組換え生物等が自然界で感染する対象は、野生型 AAV9 と同じく哺乳動物であり、ヒト及びサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。自然界では、野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、ヒト以外で増殖を伴う感染が成立するかどうかは明らかではない。遺伝子組換え AAV を使用した実験結果から、ヒト以外にカンクイザル、アカゲサル、イヌ、ラット、マウス等の哺乳動物に感染することが報告されている。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等のゲノム DNA が、水平感染を受けた第三者や動物等に保持される可能性は完全には否定できないが、本遺伝子組換え生物等が増殖するためにはヘルパーウイルス及び野

生型 AAV との三重感染が必要になるため、さらなる水平伝達が起こる確率は極めて低い。三重感染時に相同組み換えが起こって生じた rcAAV が水平伝達される確率はさらに小さくなる。本遺伝子組換え生物が感染したヒト又はヒト以外の哺乳類で一過性に *HMGB1* 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによる他の哺乳類個体への核酸の水平伝達は知られていない。本遺伝子組換え生物由来の rcAAV が出現したとしても、核酸を水平伝達する性質は野生型 AAV と同等である。

(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、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来の rcAAV の環境中への拡散は極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖する能力は無く、本遺伝子組換え生物由来 rcAAV も、ヘルパーウイルスであるアデノウイルス等と共感染しない限り、環境中で増殖することはない。さらに、本遺伝子組換え生物が効率よく感染する対象はヒトに限られることから、本遺伝子組換え生物はやがて環境中から消滅すると考えられる。

極めて微量の本遺伝子組換え生物由来の rcAAV の環境中への放出も完全には否定できないが、AAV 粒子へパッケージングできる DNA のサイズに上限があるため、rcAAV は野生型 AAV と同じになるか、あるいは短い外来遺伝子を含んでいても野生型 AAV に極めて近い構造になると考えられる。rcAAV の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は野生型 AAV と同等であり、ヒト及び他の哺乳類動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

(4) 生物多様性が生ずるおそれの有無等の判断

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、核酸の水平伝達によって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

野生型 AAV については、トランスポゾンやプラスミド等の可動性遺伝因子 (mobile genetic elements) は知られておらず、当該第一種使用等によってそれらを介した遺伝子の伝搬が起こることはないと考えられる。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動植物等の種類は野生型 AAV と同等で、哺乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

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限り、本遺伝子組換え生物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、その量は検出レベル以下であると推定される。細胞外 HMGB1 に起因する炎症はよく知られているものの、動

物実験の結果から本遺伝子組換え生物による HMGB1 遺伝子の発現はヒトに病原性をもたないと示唆されるため、ヒトに対する影響はないと考えられる。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を失っているため、野生型 AAV 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等との三重感染が無い限り、環境中で増殖することはない。ヒト体内の同一の細胞に本遺伝子組換え生物と野生型 AAV 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等が感染する可能性は極めて低く、本遺伝子組換え生物はやがて環境中から消滅すると考えられる。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限り、本遺伝子組換え生物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。

生物多様性影響評価書 別紙 一覧

別紙 1 : AAV2, AAV3, AAV9 の塩基配列情報

別紙 2 : AAV.GTX-HMGB1 の供与核酸の全塩基配列

別紙 3 : AAV.GTX-HMGB1 供与核酸の構造

別紙 4 : HMGB1 のアミノ酸配列

別紙 5 : AAV.GTX-HMGB1 の作製方法

別紙 6 : AAV.GTX-HMGB1 の品質管理試験

別紙 7 : qPCR 法 試験方法、分析バリデーション試験

別紙 8 : 被験者からの本遺伝子組換え生物等の排出の確認

別紙 9 : 非臨床試験結果（分布・排出）の詳細

別紙 10 : HMGB1 に関するカニクイサルおよびヒト配列比較資料

参考文献

1. Chapter6, Parvoviridae. Fields VIROLOGY 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia (2022) 2.173.
2. <https://ictv.global/report/chapter/parvoviridae/parvoviridae>
3. Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, Zheng C, Mandikian D, Chiorini JA. Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. J Virol. 2008;82(3):1399-406.
4. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):583-93.
5. 小澤 敬. 【ウイルスを利用する】 AAV を利用した遺伝子治療. ウイルス. 2007;57(1):47-55.
6. 中井 浩. 【組換えウイルスキャリア 遺伝子治療・ワクチン応用への新展開】急速に進化をつづけるアデノ随伴ウイルスベクター カスタムメイドベクターによる遺伝子治療の可能性. Drug Delivery System. 2009;24(6):582-91.
7. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. Annu Rev Virol. 2014;1(1):427-51.
8. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. N Engl J Med. 2017;377(18):1713-22.
9. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature. 2016;530(7588):108-12.
10. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol. 2016;21:75-80.
11. Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M, Kay MA. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. Nat Genet. 2003;34(3):297-302.
12. 小澤 敬. 【ウイルスベクター 最新的话题】アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによる遺伝子治療. ウイルス. 2003;53(2):163-70.
13. ト部 匡, 小澤 敬. 【遺伝子治療用ウイルスベクターの開発と展望 最近的话题】アデノ随伴ウイルスベクターと遺伝子治療. ウイルス. 1997;47(2):221-30.

14. Chen CL, Jensen RL, Schnepf BC, Connell MJ, Shell R, Sferra TJ, et al. Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol.* 2005;79(23):14781-92.
15. Schnepf BC, Jensen RL, Chen CL, Johnson PR, Clark KR. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol.* 2005;79(23):14793-803.
16. Stone D, David A, Bolognani F, Lowenstein PR, Castro MG. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J Endocrinol.* 2000;164(2):103-18.
17. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, et al. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet.* 2015;47(10):1187-93.
18. Gil-Farina I, Fronza R, Kaepfel C, Lopez-Franco E, Ferreira V, D'Avola D, et al. Recombinant AAV Integration Is Not Associated With Hepatic Genotoxicity in Nonhuman Primates and Patients. *Mol Ther.* 2016;24(6):1100-5.
19. Ito H, Fujita K, Tagawa K, Chen X, Homma H, Sasabe T, et al. HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. *EMBO Mol Med.* 2015;7(1):78-101.
20. Xu R, Rahimi M, Ma H, Fung P, Chang C, Xu S, et al. Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. *Med Sci Monit.* 2005;11(9):Br305-8.
21. Yan Z, Zak R, Zhang Y, Engelhardt JF. Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. *J Virol.* 2005;79(1):364-79.
22. Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson PR. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol.* 2003;77(6):3495-504.
23. Grimm D, Pandey K, Nakai H, Storm TA, Kay MA. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *J Virol.* 2006;80(1):426-39.
24. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood.* 2003;101(8):2963-72.
25. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 2006;12(3):342-7.
26. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418(6894):191-5.
27. Yoshihide Sehara, Kuniko Shimazaki, Fumio Kurosaki, Naoki Kaneko, Ryosuke Uchibori, Masashi Urabe, Kensuke Kawai, Hiroaki Mizukami. Efficient transduction of adeno-associated virus vectors into gerbil hippocampus with an appropriate combination of viral capsids and promoters. *Neuroscience Letters.* 2018;682:27-31.

添付資料

患者への指導