

第一種使用規程承認申請書

平成 30 年 7 月 23 日

厚生労働大臣  
環境大臣

殿  
殿

氏名 エイツーヘルスケア株式会社  
申請者 代表取締役社長 香取 忠 (印)  
住所 東京都文京区小石川 1-4-1

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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p><i>cap</i> 及び <i>rep</i> 遺伝子を欠損し、アデノ随伴ウイルス 9 型のキャプシドタンパク質及びアデノ随伴ウイルス 2 型に由来する改変型 ITR を有し、ヒト SMN を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (scAAV9.CB.SMN)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>ヒトの遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p><b>溶液の保管</b>                  (1) 本遺伝子組換え生物等を含む溶液は、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蔵庫又は冷凍庫において行う。</p> <p><b>溶液の調製</b>                  (2) 本遺伝子組換え生物等を含む溶液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行う。                  (3) 調製時は、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。</p> <p><b>運搬</b>                  (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。</p> <p><b>患者への投与</b>                  (5) 本遺伝子組換え生物等は、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に静脈内投与される。                  (6) 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。</p> <p><b>投与後の患者からの排出等の管理</b>                  (7) 投与後、患者の投与部位を消毒等し、投与部位からの本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となる対策を講じる。                  (8) 患者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対策を講じるとともに、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防止するため、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者等に適切な指導を行う。                  (9) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を継続的に実施する。                  (10) 本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者が当該治療施</p>

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、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、患者等に適切な指導を行う。

#### **検体の取扱い**

（１１）試験のために患者から採取した検体は、治療施設その他外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。

（１２）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拡散しない構造の容器に入れ、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。

（１３）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期間まで、施設等から検査機関への検体の運搬は、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が投与された患者の検体である旨を情報提供した上で行う。

（１４）検体の廃棄は、施設等及び検査機関の医療廃棄物管理規定に従って行う。

#### **感染性廃棄物等の処理**

（１５）本遺伝子組換え生物等を含む溶液については、不活化処理を行ったうえで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）に基づき治療施設で定められている医療廃棄物の管理に係る規程（「医療廃棄物管理規程」）に従って廃棄する。

（１６）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つては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。

(別紙様式)

## 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

本遺伝子組換え生物等の宿主ウイルスは、アデノ随伴ウイルス（以下、AAV）である。分類学上の位置は以下の通りである。

群：第 II 群（一本鎖 DNA）

科：パルボウイルス

属：デペンドウイルス

種：アデノ随伴ウイルス

AAV は自然界に広く分布し、脊椎動物全般に感染することが知られている[1]。AAV は、現在までに 12 のヒト血清型及び 100 以上のヒト以外の霊長類由来血清型が発見されている。AAV はいずれも哺乳類に感染し、多くのヒト (>70%) が 1 つまたは複数の血清型に対して抗体を保有しているが、AAV に関連する疾患は知られていない[2]。AAV は単独で複製する能力を有しておらず、動物細胞における複製をヘルパーウイルスの機能に依存する[3]。分子内で 2 重鎖構造を取る自己相補型 (self-complementary) 遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (scAAV9.CB.SMN (以下、本遺伝子組換え生物等)) は、アデノ随伴ウイルス 2 型 (AAV2) に由来する Inverted Terminal Repeat (ITR) をゲノム DNA に、アデノ随伴ウイルス 9 型 (AAV9) に由来するキャプシドタンパク質をウイルス粒子外殻 (キャプシド) に有する。

文献 1: L. Tenenbaum, E. Lehtonen and P.E. Monahan. Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors: Curr. Gene Ther., 2003, 3, 545-565.

文献 2: R. J. Samulski and N. Muzyczka. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes: Annu. Rev. Virol. 2014. 1, 427-51.

文献 3: S. Daya and K.I. Berns. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors: Clin. Microbiol. Rev., 2008, 21, 583-593.

#### 2 使用等の歴史及び現状（人用若しくは動物用医薬品としての利用の歴史又は産業的な利用の歴史及び現状を含む。）

AAV は、1965 年にアデノウイルス調製物の迷入ウイルスとして発見されたが、病原体として同定されていないため、医学的関心は示されなかった。しかし、ウイルスの非病原性、潜伏性、及び利用可能な血清型が多くあること等の特性により、遺伝子治療用ウ

ウイルスとしての有用性が示されるに至った。特に AAV2 に由来する遺伝子組換え AAV は現在、遺伝子治療用ウイルスとして汎用されている。また、AAV9 は、血液脳関門を通過し中枢神経系に到達できる特性から、神経疾患に対する遺伝子治療用ウイルスとして使用されている[2]。

### 3 生理学的及び生態学的特性

#### (1) 基本的特性

野生型AAVは、直径約25nmのエンベロープを持たない正二十面体カプシドを有する一本鎖DNAウイルスである。プラス鎖ウイルス及びマイナス鎖ウイルスともに感染性を有する。AAVゲノムは、約4.7 kbの長さで、DNA鎖の両端にある逆方向末端反復配列 (ITR) により、*rep*遺伝子及び *cap*遺伝子が挟まれている。*rep*遺伝子は、DNA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、正二十面体のカプシドを形成する3つのカプシドタンパク質 (VP1、VP2及びVP3) をコードする。ITRは、DNA複製、パッケージング、宿主ゲノムへの組込み及びその後の切り出しに必要な配列を含む。AAVには様々な血清型があり、受容体 (co-receptor) や組織指向性が異なることが知られている。AAVの血清型は、感染に不可欠なウイルス粒子のカプシドによって決定される。多くのAAVには、共通する受容体 (AAVR) があることも知られている [4]。

#### (2) 生育又は生育可能な環境の条件

野生型 AAV が核内に侵入すると、キャプシドが脱落しウイルスゲノムが放出されるが、ヘルパーウイルス (アデノウイルスやヘルペスウイルス等) 非存在下においては増殖することが出来ない[5]。一方、ヘルパーウイルスと共感染することにより、複製と増殖が起こる[2] (別紙 1 参照)。本ウイルスは常温において安定である。

#### (3) 捕食性又は寄生性

捕食性はない。AAV は哺乳動物に感染することが知られているが、血清型によって感染宿主域、組織指向性及び感染効率は異なる。また、ヘルパーウイルスが共存しない場合には、感染宿主細胞において複製することなく潜伏する。

#### (4) 繁殖又は増殖の様式

AAV の感染は、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共存下で起こる。ヒトへの感染は経気道感染、糞口感染、接触感染が挙げられる。AAV は多種多様な哺乳動物に感染する。

AAV は、細胞表面受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に侵入する。細胞内へ侵入すると、ウイルスはエンドソームでの弱酸性環境で、サイトゾルへ移行す

る。エンドサイトーシス開始後 30 分以内に核周囲に蓄積し、核膜孔複合体を介して核内に移行すると考えられている。

野生型 AAV は、宿主細胞核内への侵入後、溶菌的感染または溶原的感染を起こす。前者はヘルパーウイルス感染細胞で起こり、AAV はゲノム複製、ウイルス遺伝子発現、ウイルス粒子産生を特徴とする増殖を引き起こす。後者はヘルパーウイルス非感染細胞で起こり、主に環状二本鎖 DNA として核内に存在するが、まれに、ヒト染色体 19 の長鎖 (19q13.3-qter) 約 2kb 領域にウイルスゲノムを組み込み、潜伏する。

#### (5) 病原性

ヒトに対する AAV の病原性は知られていない[1]。

#### (6) 有害物質の産生性

AAV の感染に際し、細胞内で産生されるタンパク質に病原性または毒性を示す報告はされていない。

#### (7) その他の情報 (不活化条件等を含む。)

AAV は物理化学的に比較的安定で、乾燥に対しても抵抗を示す非エンベロープウイルスである。次亜塩素酸ナトリウム (1000 ppm) などのウイルス消毒剤に対して感受性を示す。なお、パルボウイルス科ウイルスは、加熱 (85℃で数分間)、次亜塩素酸ナトリウム水溶液、水酸化ナトリウム、UV 照射、焼却、エチルアミン、ヒドロキシルアミン等により不活化することが出来る[6]。

文献 4: Srivastava. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors: Curr Opin Virol. 2016 December ; 21: 75-80 .

文献 5: R.M. Kotin, M. Siniscalco and R.J. Samulski et al. Site-Specific Integration by Adeno-Associated Virus: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 2211-2215.

文献 6: G. Sofer, D.C. Lister and J.A. Boose. Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century: BioPharm Int., 2003, April, 42-52.

## 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

本遺伝子組換え生物等のゲノム DNA は、両端を AAV2 由来 ITR 領域に挟まれた形で、CMV エンハンサー/CB プロモーター領域、SMN タンパク質コード領域及び BGH polyA 付加シグナル領域よりなる供与核酸を有する。また、ウイルス粒子は AAV9 のカ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。詳細は別紙2に記載する。括弧内に、本遺伝子組換え生物等ゲノムDNAの塩基番号（別紙2、図2）と塩基長を示した。

- i) 改変型Left ITR ( [REDACTED] )  
AAV2由来の配列である。自己相補的 (self-complementary) ゲノム (2本鎖DNA) が生成するように、改変されている。
- ii) CMVエンハンサー領域 ( [REDACTED] )  
サイトメガロウイルス (CMV) に由来するimmediate early enhancer配列を含む。
- iii) CBプロモーター領域 ( [REDACTED] )  
ニワトリ  $\beta$ -アクチン遺伝子プロモーター (CBプロモーター) 配列を含む。
- iv) SV40イントロン領域 ( [REDACTED] )  
Simian virus 40 (SV40) に由来するイントロン領域である。
- v) SMNタンパク質コード領域 ( [REDACTED] )  
ヒトSMN2 (Survival Motor Neuron 2) 遺伝子由来のSMNタンパク質コード領域。
- vi) BGH poly A付加シグナル領域 ( [REDACTED] )  
ウシ成長ホルモン (BGH) 遺伝子のpoly A付加シグナル配列を含む。
- vii) Right ITR ( [REDACTED] )  
AAV2由来に由来する。
- viii) 非コーディング配列 ( [REDACTED] )  
pSMNプラスミド、pAAV-MCSプラスミドのクローニング及び構築に利用可能な骨格に由来する。

## (2) 構成要素の機能

各構成要素の機能の概要は、以下の通りである。詳細を別紙2に記載する。

- i) 改変型Left ITR  
AAVゲノムの複製及びパッケージング等に必要な配列。相補鎖DNAよりの転写が可能となり、発現効率が高まる。
- ii) CMVエンハンサー  
転写亢進に関与する配列。SMNタンパク質の合成を恒常的に高める。
- iii) CBプロモーター  
転写因子の結合部位。
- iv) SV40イントロン  
スプライス部位を付与し、転写を促進する。
- v) SMNタンパク質コード領域

運動ニューロンの機能維持を始め、多様な細胞機能に関与するSMNタンパク質をコードする。SMNタンパク質をコードする遺伝子には、近接して存在する*SMN1*と*SMN2*がある。*SMN1*はSMNタンパク質の産生を担う主な遺伝子である。一方、*SMN2*では、エクソン7に一塩基置換があり、アミノ酸置換を伴わないものの、それに起因するエクソン7スキッピングにより、完全長SMNタンパク質（*SMN1*及び*SMN2*遺伝子のコードするタンパク質は同一のアミノ酸配列。）の生産が*SMN1*遺伝子の約10%に低下する[7][8]。

脊髄性筋萎縮症（SMA）は、主として*SMN1*遺伝子の欠失または活性低下に起因する小児遺伝性疾患で、運動ニューロンの変性及び喪失による筋萎縮を引き起こす。SMAは、発症年齢及び症状に基づいて4つのタイプに分けられるが、中でもタイプIは、非侵襲的/侵襲的人工呼吸器の使用等積極的な治療を行わなければ、ほぼ全例が乳児期に死亡する。

vi) BGH polyA付加シグナル

mRNAの3'末端をポリアデニル化するためのシグナル配列であり、mRNAの安定化、核外輸送等に関係する。

vii) Right ITR

AAVゲノムの複製及びパッケージング等に必要配列。

viii) 非コーディング配列

タンパク質または機能はコードしていない。

文献 7: J.R. Mendell, S. Al-Zaidy, R. Shell, W.D. Arnold, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy: N. Engl. J. Med. 2017, 377, 1713-1722.

文献 8: V. Parente and S. Corti. Advances in Spinal Muscular Atrophy Therapeutics: Ther. Adv. Neurol. Disord. 2018, 11, 1-13.

## 2 ベクターに関する情報

### (1) 名称及び由来

### (2) 特性

## 3 遺伝子組換え生物等の調製方法

### (1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主に移入された供与核酸は 1 項の (1) に記載のSMNタンパク質発現カセットである。本遺伝子組換え生物等の塩基配列を別紙3に示す。

## (2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

本遺伝子組換え生物等は、以下に示す3つのDNAプラスミドを同時にHEK293細胞に導入することで製造される。

### 1) pscAAV.CB.SMNプラスミド

AAV2 ITRにより挟まれたSMN発現カセットよりなるゲノム配列を搭載する。

### 2) pAAV2-9プラスミド

AAV2由来の*rep*遺伝子及びAAV9由来の*cap*遺伝子を搭載する。AAV粒子の形成に必要とされる4つのRepタンパク質及び3つのキャプシドタンパク質を発現する。

### 3) pHELPアデノウイルスヘルパープラスミド

ヘルパーウイルスとして知られるアデノウイルスの5型のE2A、E4、VA領域を有し、必要とされる因子を供給する。

なお、HEK293細胞は、アデノウイルス5型由来のE1領域を有する。各々のプラスミドは、期待される配列と100%同一であることが確認されている。なお、3つのプラスミドの構成及び構成要素の由来の詳細は、別紙3に記載する。

上述の3つのプラスミドを用いるコトランスフェクション法によるAAVの調製においては、ヘルパーウイルス依存的な増殖性AAV (rcAAV) が生ずる確率が極めて低いことが知られている。

## (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本遺伝子組換え生物等は、AveXis, Incにより米国イリノイ州の施設にてcGMP基準に従い、HEK293細胞に3つのプラスミドを導入して調製し、精製される。バイアルに充填した最終製品は-60°C以下で凍結保管される。

各ロットについて、同一性、純度(残留プラスミドを含む)、rcAAV及び外来性汚染物質が存在しないことを試験し、使用前の合格基準に適合することを確認する。

なお、精製・調製の方法、品質管理方法の概要や最終製品中の遺伝子組換え生物等の含量については、別紙4に記載する。

## 4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

ヒトに投与された本遺伝子組換え生物等は標的細胞に感染するが、新しいウイルス粒子は形成されない。細胞内に移入された組換え AAV ゲノム DNA は、染色体外に 2 本鎖 DNA のコンカテマーの形で比較的安定に存在し、その発現も安定しているものと考えられる[9]。

文献 9: M. Penaud-Budloo, C. Le Guiner, A. Nowrouzi, et al. Adeno-Associated Virus Vector Genomes Persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle: J. Virol., 2008, 82, 7875–7885.



## 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AAV9に存在しないSMNコード領域を含むので、その配列の一部を絶対的定量することが可能なdroplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)法で本遺伝子組換え生物等を検出する(別紙8[10]。用いるddPCR法では、当該配列に特異的なプライマー ( ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ██████████ ) とプローブ ( ██████████ ) を使用する。検出限界は尿(未希釈)または唾液では約 $1.10 \times 10^5$  genome copies (GC) /mL、便では約 $1.1 \times 10^6$  GC/gである。また、定量下限は、尿で約 $1.1 \times 10^6$  GC/ml (CV: 16%~57%)、唾液で約 $1.1 \times 10^6$  GC/ml (CV: 9%~14%)、便で約 $1.1 \times 10^7$  GC/g (CV: 14%~29%) である。

文献10: Lock, Martin et al. “Absolute Determination of Single-Stranded and Self-Complementary Adeno-Associated Viral Vector Genome Titers by Droplet Digital PCR.” Human Gene Therapy Methods 25.2 (2014): 115–125. PMC. Web. 30 Aug. 2018.

## 6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

本遺伝子組換え生物等は、AAV2由来ITR配列の間にSMN発現カセットを含み、感染細胞内でSMNタンパク質を発現する。

本遺伝子組換え生物等は*rep*、*cap* 遺伝子を欠失しているため、ヘルパーウイルス共存下であっても複製することはできず、その外界での生存性は野生型AAVを上回ることはない。また、本遺伝子組換え生物等の複製には、野生型AAV、アデノウイルス又は単純ヘルペスウイルス等のヘルパーウイルス及び本遺伝子組換え生物等が同時に一つの細胞に共感染する必要がある。

### III. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### 1 使用等の内容

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

#### 2 使用等の方法

##### 溶液の保管

(1) 本遺伝子組換え生物等を含む溶液は、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蔵庫又は冷凍庫において行う。

##### 溶液の調製

(2) 本遺伝子組換え生物等を含む溶液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行う。

(3) 調製時は、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。

##### 運搬

(4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

##### 患者への投与

(5) 本遺伝子組換え生物等は、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に静脈内投与される。

(6) 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

(7) 投与後、患者の投与部位を消毒等し、投与部位からの本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となる対策を講じる。

(8) 患者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対策を講じるとともに、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防止するため、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者等に適切な指導を行う。

(9) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を継続的に実施する。

(10) 本遺伝子組換え生物等の投与を受ける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、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、患者等に適切な指導を行う。

#### 検体の取扱い

(11) 試験のために患者から採取した検体は、治療施設その他外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。

(12) 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拡散しない構造の容器に入れ、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。

(13) 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期間まで、施設等から検査機関への検体の運搬は、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が投与された患者の検体である旨を情報提供した上で行う。

(14) 検体の廃棄は、施設等及び検査機関の医療廃棄物管理規定に従って行う。

#### 感染性廃棄物等の処理

(15) 本遺伝子組換え生物等を含む溶液については、不活化処理を行ったうえで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）に基づき治療施設で定められている医療廃棄物の管理に係る規程（「医療廃棄物管理規程」）に従って廃棄する。

(16) 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つては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。

### 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

本遺伝子組換え生物等投与後における唾液、尿、糞便についてウイルス排出試験をddPCR法により実施する予定である。海外においても他試験でのウイルス排出試験を実施中または実施予定である。実施予定のウイルス排出試験については、詳細を別紙9に記載した。

### 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

1. 医療スタッフ等が本遺伝子組換え生物等及び本遺伝子組換え生物投与後の患者と接触する際の留意事項

- 治療施設内での運搬には、必ず漏出防止措置が施された容器を用い、本遺伝子組換え生物等を取り扱う者は、使い捨て手袋等の個人用防護具を装着する。
- 投与後最低4週間は、良好な手指衛生に加え、患者の体液および/または排泄物と直

接接触する場合の保護手袋及びマスクの使用が推奨される。

- 体液および/または排泄物（鼻水、唾液、尿、嘔吐、糞便、下痢）に暴露した場合、衣服/寝具等はその他の洗濯物と区別して洗濯する。
- 汚れたおむつ、ティッシュ等の廃棄物は二重の袋詰めにし、通常のごみとして処分する。
- 排泄物（嘔吐物、尿、糞便、下痢）が固体表面に付着した場合、付着した部分を端から中心に向かって吸湿剤で覆い、消毒液に浸したペーパータオルで清掃する。清掃に使用した資材は袋詰めし、通常のごみとして廃棄する。

## 2. 感染性廃棄物の処理方法

投与に使用し、本遺伝子組換え生物等と接触した全ての用具は、漏出防止措置が施された一次容器及び二次容器に封入する。全ての廃棄物はバイオハザードマークを表示した袋により二重に密閉し、専用の廃棄物容器に入れる。

## 5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

マウスあるいは霊長類等に本遺伝子組換え生物等を投与した非臨床試験から以下の結果が得られている。複数の動物モデルで安全性が観察され、有効性が確認されたことからヒトを対象に本遺伝子組み換え生物等を投与する段階に移行しても問題はないと考えられる。詳細を別紙5に示した。

1. 安全性についてマウスあるいは霊長類（カニクイザル）に本遺伝子組換え生物等を静脈内投与した結果、血液学的検査、血液生化学的検査、病理検査等に毒性学的変化は観察されなかった。
2. ブタにGFPを発現するAAV9ベクターを髄腔内投与した結果、運動神経細胞への本遺伝子組換え生物等DNAの導入が観察された。
3. 霊長類（カニクイザル）に本遺伝子組み換え生物等を髄腔内投与した結果、投与後18ヶ月まで脳及び脊髄全域にSMN mRNAあるいはタンパク質の発現が認められた。
4. マウスに本遺伝子組み換え生物等を静脈内投与した結果、生存期間が有意に長くなった。また、運動機能及び体重にも改善が認められた。

なお、AAV2に肝がん発生のリスクが報告されているが、AAV2はAAV9とは異なる血清型であり、AAV9と肝がんの関連性は認められていないため、AVXS-101との関連性は不明である。また、HUMAN GENE THERAPY VOLUME 29,ISSUE 3,2018によれば、サルに高濃度のAAVhu68（rAAV9とは異なる）を静脈内投与したことによる毒性が報告されているが、AVXS-101との関連性は不明である。

## 6 国外における使用等により得られた情報

最初の臨床試験である第I相試験（試験AVXS-101-CL-101）では、SMN2のコピー数が2のSMAタイプI患者15例に本遺伝子組換え生物等を単回点滴静注した際の安全性と有効性を評価した。この試験は2種類の投与量コホートを設定した。コホート1では3例に低用量を静注し、コホート2では12例に予定している治療用量を静注した。本遺伝子組換え生物等を静注したときの安全性及び有効性に関する初期のデータから、有効性には用量反応性があり、また遺伝子治療を行った時期における患者の年齢（6ヶ月齢以前）と重症度が有効性に影響することが示唆された。安全性に関しては、良好な安全性プロファイルと忍容性が示された。また、生後20ヵ月までに、生存、CHOP-INTENDスコアによる運動機能、運動達成度（手を口に運ぶ、首が座る、寝返り、お座り）において改善が認められた。さらに、嚥下障害による摂食サポート（例：Gチューブ、NJチューブの使用）を必要とする割合が、無治療のSMA患者と比較して低下した[7]。詳細を別紙6に示した。

現在までに実施された臨床試験において、5例を対象に本遺伝子組換え生物等の唾液、尿及び糞便中への排出が検討され、唾液中及び尿中の本遺伝子組換え生物等のDNAは投与後1日目で投与量の0.1～0.01%となり、投与後14日以内に定量限界以下となった。それ以降は減少するものの、投与後18ヵ月においても検出された（定量限界：唾液及び尿； $1.1 \times 10^6$  genome copy/mL、検出限界：唾液及び尿； $1.1 \times 10^5$  genome copy/mL）。一方、糞便中の本遺伝子組換え生物等のDNAは、投与後21日目には定量限界付近まで、投与後30日目には検出限界付近まで低下するものの、投与後18ヵ月においても検出された（定量限界； $1.1 \times 10^7$  genome copy/g、検出限界； $1.1 \times 10^6$  genome copy/g）。詳細については、別紙7-1及び7-2に示した。

## 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宿主域は AAV9 のものと同一であり、他の微生物に感染することはなく、競合や有害物質の産生を通じて他の微生物に影響を与えることもない。したがって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されない。

#### (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

以上より、他の微生物を減少させる性質について、当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

### 2 病原性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は、AAV9 の感染宿主域と同一であり、ヒト及びマウスや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 AAV2 に、キャプシドタンパク質は AAV9 に由来する。野性型 AAV には病原性が認められておらず、本遺伝子組換え生物等はさらに *rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失によりヘルパーウイルス存在下であっても複製しないことから、病原性を示す可能性はさらに低い。

なお、SMA の乳児患者へ本遺伝子組換え生物等を投与した試験において、本遺伝子組換え生物等の安全性と忍容性が確認されている。

#### (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従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低い。また、本遺伝子組換え生物等はヘルパーウイルスが共存

していても、野生型が共感染しない限り、環境中で増殖することはない。よって、本遺伝子組換え生物等が被験者以外の野生動植物等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**

以上より、病原性については、当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、生物多様性影響が生ずるおそれはない。

### **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の感染宿主域は、AAV9 の感染宿主域と同一であり、ヒト及びマウスや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は非病原性であり、発現する SMN タンパク質が毒性作用を有することは知られていない。SMN タンパク質は、動物界に普遍的に存在するハウスキーピングタンパク質であり、多様なタンパク質と相互作用することが知られている。そのため、RNA 代謝、転写、RNA 輸送、翻訳、細胞内情報伝達を始めとする多様な細胞機能に関与する。特に神経系においては、SMN タンパク質は、脊髄運動ニューロンの成熟及び維持に必須である。

#### **(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従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低い。また、本遺伝子組換え生物等はヘルパーウイルスが共存していても、野生型が共感染しない限り、環境中で増殖することはない。よって、本遺伝子組換え生物等が発現する SMN タンパク質が被験者以外の第三者及び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**

以上より、有害物質の産生性については、当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、生物多様性影響が生ずるおそれはない。

#### 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又は他の微生物の特定

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は、AAV9 の感染宿主域と同一であり、ヒト及びマウスや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ゲノム DNA が、水平感染を受けた第三者や動物等のゲノムに組み込ま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の増殖は、同一細胞にヘルパーウイルス、野生型が共感染しない限り起こらないため、その確率は極めて低い。さらに、野生株との相同組換えにより新たに生じた遺伝子組換え AAV の供与核酸が他の動物等に水平伝達される確率はさらに低い。

##### (3) 影響の生じやすさの評価

当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等の環境中へ拡散する可能性は低い。また、本遺伝子組換え生物等は、*rep*及び*cap*遺伝子を失っており、ヘルパーウイルスが共存していても、野生型が共感染しない限り、環境中で増殖することなく消滅する。従って、第三者や野生動物に水平感染する可能性は極めて稀である。さらに、本遺伝子組換え生物等と野生型AAVの相同組換えにより新たに生じた遺伝子組換えAAVが増殖性を獲得する可能性はなく、供与核酸が水平伝達される可能性はほとんどないと考えられる。

##### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、核酸を水平伝達する性質について、当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、生物多様性影響が生ずるおそれはない。

#### 5 その他の性質

本遺伝子組換え生物等の伝播の可能性について言及する。野生型AAVについてトランポゾンやプラスミドといった天然の可動遺伝因子 (mobile genetic elements) は報告されていない。本遺伝子組換え生物等では、ITRを除く全てのウイルス要素が除去されているために、遺伝物質の伝達及び伝播のリスクは非常に低いと考えられる。

また、垂直伝播について男性におけるAAVベクターによる偶発的な生殖細胞への伝播リスクは低いことが報告されている[11][12]。精液へのAAV伝播は、その他の体液（唾液、尿、糞便）と同様に急速に消失されると考えられる。生殖細胞に対して、AAVベクターの残留が重大なリスクを引き起こす情報は現在のところ得られていない。

文献 11 : Valder R. Arruda, Paul A. Fields, et al. Lack of Germline Transmission of Vector Sequences: MOLECULAR THERAPY Vol. 4, No. 6, December 2001.



文献 12 : Patricia Favaro, Harre D Downey, et al. Host and Vector-dependent Effects on the Risk of Germline Transmission of AAV Vectors: MOLECULAR THERAPY vol. 17 no. 6, 1022–1030 june 2009.

## V. 総合的評価

本遺伝子組換え生物等が感染しうる動物は哺乳類動物であり、影響を受ける可能性のある植物及び他の微生物はない。本遺伝子組換え生物等の病原性はなく、その伝播性は野生型 AAV よりもさらに低減されている。したがって、第一種使用規程に従って本遺伝子組換え生物等を使用する限り、他の微生物を減少させる性質、病原性、核酸を水平伝達する性質、その他の性質に基づいて生物多様性への影響が生じるおそれは極めて低いと考えられる。