

様式第 1 (第 7 条関係)

第一種使用規程承認申請書

令和 元年 11 月 11 日

厚生労働大臣 加藤 勝信殿
環境大臣 小泉 進次郎殿

氏名 ファイザー株式会社
申請者 代表取締役社長 原田 明久 印
住所 東京都渋谷区代々木 3 丁目 22 番 7 号
新宿文化クイントビル

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>rep</i> 及び <i>cap</i> 遺伝子を欠失し、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 型の ITR を有し、ヒトミニジストロフィン遺伝子 (<i>Opti-dys Δ3978</i>) を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (AAV9-Dys Δ3978)</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投与、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>本遺伝子組換え生物等の原液の保管</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物等の原液の保管は、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行う。</p> <p>本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管</p> <p>(2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、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。</p> <p>(3) 希釈液は、容器に密封された状態で保管する。</p> <p>運搬</p>

	<p>(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>患者への投与</p> <p>(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、患者に静脈内投与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。</p> <p>投与後の患者からの排出等の管理</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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拡散を最小限に留めるために必要となる期間、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、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。</p> <p>(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、血液、唾液、尿に対し、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。</p> <p>患者検体の取扱い</p> <p>(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。</p> <p>(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期間までに、検体の検査が外部の受託</p>
--	--

	<p>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程に従って取り扱う。</p> <p>(1 2) 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）に基づいて施設等及び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。</p> <p>感染性廃棄物等の処理</p> <p>(1 3) 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。</p> <p>(1 4) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び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っては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。</p>
--	---

生物多様性影響評価書

I 宿主又は宿主に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

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、パルボウイルス科デペンドウイルス属 (*Parvoviridae Dependovirus*) に分類される一本鎖 DNA ウイルスである (文献1)。デペンドウイルス属に分類されるウイルスは、複製にヘルパーウイルス (アデノウイルス及び単純ヘルペスウイルス等) を必要とし、ウイルス単独では増殖しない。

AAV はヒト以外にサル、イヌ及びげっ歯類等の哺乳動物に感染し、塩基配列解析に基づいて 108 株以上が同定されている (文献2及び文献3)。これまでに AAV は、キャプシドの違いから複数の血清型に分類されている (文献3)。AAV は自然界に広く分布しており、成人の約 85% は AAV に対する抗体を有するとされるが (文献4)、病原性は報告されていない (文献5)。本遺伝子組換え生物等は、AAV の血清型 2 型 (AAV2) 由来の逆位末端反復 (ITR) 配列に挟まれた治療遺伝子及びその発現調節エレメントを含む一本鎖 DNA を含み、骨格筋、心筋、中枢神経、肝臓及び肺に組織指向性がある AAV の血清型 9 型 (AAV9) (文献6) 由来のキャプシドタンパク質を有する。

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 のウイルスタンパク質 (Rep 及び Cap) をコードする遺伝子を取り除き、遺伝子治療用の供与核酸に置き換えることにより作製された遺伝子組換え AAV は、様々な疾患の遺伝子治療の臨床試験で用いられている (文献7、8及び9)。さらに、AAV を利用したヒトの遺伝子治療として、欧米にて 2 製品が承認されている。

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

AAV は直径約 25 nm の正 20 面体構造の、エンベロープを持たないキャプシド粒子である。AAV ゲノムは約 4.7 kb の線状一本鎖 DNA である。DNA 鎖は両端に位置する ITR 配列と、それらに挟まれた 2 つの遺伝子 (*rep* 及び *cap*) 領域により構成されている (文献10)。ITR 配列は複製及びパッケージングに必要なシスエレメントを含んでいる。*rep* 遺伝子は、DNA 複製に必要な 4 つの Rep タンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40) をコードし、*cap* 遺伝子は、相互作用して正 20 面体のキャプシドを形成する 3 つのキャプシドタンパク質 (VP1、VP2 及び VP3) をコードする (文献6)。AAV の感染は、細胞

表面に発現している血清型非特異的受容体 AAVR を介して感染するが、血清型により組織移行性を規定している受容体（又はコレセプター）が異なることが報告されている（文献11）。例えば、AAV2 では、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、FGF 受容体、HGF 受容体、 α V β 5 インテグリン、 α V β 1 インテグリン及びラミニン受容体等に結合し、血管平滑筋細胞、骨格筋、中枢神経及び肝臓等に組織指向性を示すことが知られている。また、本遺伝子組換え生物等のキャプシドタンパク質である AAV9 は、末端ガラクトースに結合し、骨格筋、心筋、中枢神経、肝臓及び肺等に組織指向性を示すことが報告されている。AAV の各構成要素の機能を以下に示す。

- ITR：ゲノムの両末端には、T字型のヘアピン構造が存在し、複製の開始、ウイルス粒子へのパッケージング、宿主細胞の染色体 DNA への組込み等に関与するとされる。
- *rep* 遺伝子：*rep* 遺伝子は、野生型 AAV ウイルスの複製に必要な 4 種の Rep タンパク質（Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40）をコードする。そのうち、large Rep と呼ばれる Rep78 及び Rep68 タンパク質の発現は、p5 プロモーター制御下に生じる 2 つのスプライシングバリエント mRNA にコードされ、ともに部位特異的エンドヌクレアーゼ、インテグラーゼ及びヘリカーゼとして機能する。small Rep と呼ばれる Rep52 及び Rep40 は下流のプロモーター（p19）による制御下に転写されるスプライシングバリエント mRNA によりコードされ、そのアミノ酸配列は、それぞれ Rep78 及び Rep68 タンパク質の C 末端側の部分配列である。Rep52 及び Rep40 タンパク質の正確な役割は分かっていないが、ヘリカーゼドメインが含まれている。
- *cap* 遺伝子：*cap* 遺伝子は 3 種のキャプシドタンパク質（VP1、VP2 及び VP3）をコードしている。これらのタンパク質は AAV の構造を構成している。いずれの mRNA も同一のプロモーター p40 の制御下に転写されるが、VP1 と VP2/VP3 は異なるスプライシングバリエントにコードされる。また、VP2 及び VP3 の翻訳には異なる開始点が用いられる。更に最近、異なるリーディングフレームから Assembly-activation protein（AAP）が翻訳されていることが報告されている。

（2） 生育又は生育可能な環境の条件

AAV は、宿主への持続感染又は感染細胞の核内に潜伏感染して環境中に生存しており、ヒト、サル、イヌ、げっ歯類等の哺乳動物に感染することが報告されているが、ヘルパーウイルス非存在下では増殖しない（文献12）。アデノウイルス及び単純ヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスの同時感染、又は、AAV が潜伏感染した細胞にさらにヘルパーウイルスが重複感染することにより、AAV が複製され増殖する可能性がある（文献13）。

（3） 捕食性又は寄生性

AAV はヒト以外の哺乳動物にも感染することが知られているが、捕食性はない。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 のヒトへの感染は、主に呼吸器で粘膜接触を介して起こる。AAV は塩基配列の比較解析により、ヒトとサル、ブタ間での種間伝播について示唆されている (文献 2 及び 14)。AAV のヒトでの増殖は、ヘルパーウイルスとの共存下で起こる。ヘルパーウイルス存在下の AAV の増殖様式として、ヘルパーウイルスとしてアデノウイルスが共感染した場合には、ヘルパーウイルス由来の *E1a*、*E1b*、*E2a*、*E4* 及び *VA* 遺伝子の産物により、*rep* 及び *cap* 遺伝子の産物が産生され、AAV の複製が可能となる (文献 13)。

ヘルパーウイルス非存在下では AAV は複製されず、主にエピソームとして存在するが、まれに第 19 番染色体に組み込まれて潜伏することが知られている (文献 15 及び 16)。本遺伝子組換え生物等のキャプシドタンパク質である AAV9 は、骨格筋、心筋、中枢神経、肝臓及び肺等に組織指向性を示すことが報告されている (文献 11)。

(5) 病原性

AAV の病原性は報告されていない (文献 5)。

(6) 有害物質の産生性

AAV2 のウイルス粒子自体及びそのゲノムにコードされるタンパク質に、有害物質を産生する活性はない。

(7) その他の情報 (不活化条件等を含む。)

AAV が属するパルボウイルスは、エンベロープがない一本鎖 DNA で、物理化学的に安定なキャプシドを有し、自然環境中での生存期間が長く、数か月間感染能を有する場合がある。AAV は乾いたプラスチック表面に付着した場合は 15 日間感染力のある AAV が生存すること、マウスのケージの敷物に付着した場合は少なくとも 3 日間は生存することが報告されている (文献 17)。また、バイオセーフティキャビネットあるいは金属製の実験室ベンチ表面を模倣したステンレス板上に AAV1 が付着した場合、室温で少なくとも 6 日間感染力のある AAV が生存することが報告されている (文献 20)。

パルボウイルスは、加熱 (74°C 以上)、水酸化ナトリウム、UV 照射、ガンマ線照射、電子線照射又は化学薬品処理により不活化され (文献 18 及び 19)、AAV は、高圧蒸気滅菌 (121°C、20 分)、次亜塩素酸ナトリウム (1~10% 溶液、20 分)、ヨウ素又は 0.25% 過酢酸により不活化される (文献 20)。尚、金属接触面の不活化には、ヨウ素又は過酢酸の使用は腐食性のため適さないことから、0.25% 過酢酸の使用が望ましい (文献 20)。

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

供与核酸は以下の構成要素から成る。なお、各構成要素は合成由来の短いスペーサー配列により連結されている。

- i. [redacted] プロモーター：[redacted] の [redacted] 遺伝子のプロモーターを元にした [redacted] プロモーター由来
- ii. ミニジストロフィン遺伝子：[redacted] ドメインの一部と [redacted] ドメインを削除したヒトのジストロフィン遺伝子由来
- iii. 合成ポリアデニル化シグナル：合成由来（文献21）

(2) 構成要素の機能

供与核酸の構成要素の機能を以下に示す。

- i. [redacted] プロモーター：筋（骨格筋及び心筋）特異的に遺伝子の発現を調節する領域である。
- ii. ミニジストロフィン遺伝子：ジストロフィンタンパク質が機能するために最低限必要なドメインをコードする。
- iii. 合成ポリアデニル化シグナル：効率的なポリアデニル化に必要な最小配列で、ミニジストロフィン遺伝子の転写終了時にポリアデニル化する。合成されたポリ A は RNA の安定化、転写終結、核外輸送及び翻訳に補助的な役割を担う。

本遺伝子組換え生物等は野生型の AAV に由来しているが、ウイルスのタンパク質をコードする *rep* 及び *cap* 遺伝子を欠失している。*rep* 及び *cap* 遺伝子産物はウイルス DNA の複製、感染細胞染色体への組込み（潜伏感染時）、AAV 粒子の形成に必須であり、本遺伝子組換え生物等は自然界でその複製が生じないようにこれらの遺伝子を欠失させている。なお、本遺伝子組換え生物等の構築によって意図しないオープンリーディングフレーム（ORF）が生じる可能性及びそれらが有害な配列をコードしている可能性について、供与核酸の塩基配列を遺伝子情報解析ソフトウェアや NCBI nr データベースに対する BLAST 検索により検討したが、これまでのところ有害な可能性のある配列との相同性は見出されていない。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

該当なし

(2) 特性

該当なし

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

本遺伝子組換え生物等は、ウイルス粒子 (AAV2 由来) の複製及びパッケージングに必要な *rep* 及び *cap* 遺伝子を取り除き、II-1 供与核酸に関する情報に示す構成要素を含む供与核酸に置換している。本遺伝子組換え生物等のゲノム構造、供与核酸の構成要素及び全塩基配列を別紙 2 に示した。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への核酸の移入は、3 種類のプラスミド (pAAV-hCK-opti-dys3978-spolyA プラスミド<TR プラスミド>、ヘルパープラスミド及び *replcap* プラスミド) をヒト胎児腎臓由来細胞 (HEK293 細胞) へトランスフェクションすることにより行う (別紙 3)。

これらのプラスミドの概略を以下に示す。

- i. **TR** プラスミド：治療用遺伝子 (ミニジストロフィン) 発現カセットを含むプラスミドである。治療用遺伝子発現カセットは AAV2 ITR 間にクローニングされている。ITR 配列は、ゲノム複製及びパッケージングに必要な唯一のシス作用エレメントである。治療用遺伝子発現カセットは、XXXXXXXXXX、XXXXXXXXXX、ミニジストロフィン遺伝子、合成ポリアデニル化シグナルから成る。
- ii. ヘルパープラスミド：本プラスミドは内在性プロモーターの後に、ヘルパー遺伝子として必須の *E2a*、*E4* 及び *VA* 遺伝子を含んでいるが、アデノウイルスを生成するために必須の構造及び複製遺伝子は欠如している。本プラスミドは、マルチクローニングサイト、アンピシリンに対する耐性を付与する β -ラクタマーゼ遺伝子並びに β -ガラクトシダーゼ α ペプチド遺伝子 (*lacZ*) 領域 (*lac* プロモーター領域、M13 複製起点及び細菌の複製起点) を含む。
- iii. *replcap* プラスミド：供与核酸の複製に必要な AAV2 由来の *rep* 遺伝子と、AAV 粒子の形成に必要な AAV9 由来の *cap* 遺伝子を含むプラスミドである。プラスミドのバックボーンは、アンピシリン耐性遺伝子を含む。

(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の製造は、Pfizer 社の施設 (ノースカロライナ州、Chapel Hill) にて行う。

本遺伝子組換え生物等の製造工程の概略を以下に示す。

解凍したセルバンクを培養して得られた HEK293 細胞に、TR プラスミド、ヘルパープラスミド及び *replcap* プラスミドをトランスフェクションして培養後、細胞を溶解し、細胞片を除去する。清澄化した液からウイルス粒子を精製し、濃縮後透析ろ過して原薬のプールを得る。原薬は無菌ろ過後に容器に充填して本遺伝子組換え生物等の製剤を得る。得

られた本遺伝子組換え生物等について、品質管理試験を実施する。なお、本遺伝子組換え生物等の品質管理試験においては複製コンピテント AAV を管理する試験（細胞によるアッセイ及び定量 PCR 法による）を設定している。
これらの詳細は別紙 2 及び 3 に示した。

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

本遺伝子組換え生物等に移入した核酸は、AAV2 由来の ITR 配列に挟まれた治療遺伝子及びその発現調節エレメントを含む一本鎖 DNA として存在する（別紙 2）。また、本遺伝子組換え生物等は複製に関わる遺伝子を欠損した非増殖型であり、ヘルパーウイルスが存在しても複製されることはない。

本遺伝子組換え生物等が標的細胞に感染すると、細胞の核内にてパッケージから解かれた一本鎖 DNA は、5'及び3'末端に位置する ITR 配列により複製され、環状二本鎖 DNA として存在する。染色体中への AAV ゲノムの組込み頻度は低いため、環状二本鎖 DNA は安定したエピソームとして核内に存在し（文献22、23）、導入遺伝子を発現するよう転写される。

また、本遺伝子組換え生物等は-70°C で凍結保存し、12 ヶ月間安定であることを確認中である。

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の検出には、本遺伝子組換え生物等の特異的配列をプライマーおよびプローブとして用いた定量ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）法を用いる。本方法は、排出物及び分泌物中の本遺伝子組換え生物等の増幅及び検出を目的とし、検体からウイルス DNA を抽出精製し、ウイルス DNA を検出する。検出感度（定量下限値）は血液、尿、唾液検体それぞれについて、8451 vg/mL、4263 vg/mL、3670 vg/mL であった。感染能試験については、培養細胞にウイルスを含む希釈調製した検体を導入した後、細胞内に含まれるウイルス DNA を qPCR により定量する。検出感度（定量下限値）は尿および唾液検体それぞれについて、 3.97×10^4 vg/mL、 4.24×10^4 vg/mL であった。血液検体の検出感度については、尿および唾液検体の検出感度の検討をしたときのウイルス量を添加した際に、凝固の問題が生じたため、検出感度を特定することが困難であった。このことから、血液検体の感染能試験の検出感度は、尿および唾液検体の感染能試験の検出感度と比較して低い検出感度であると推定された。試験方法の概略については別紙 7 に示す。非臨床で生体内分布及び排出について検討した試験においても上記と同様の qPCR 法により本遺伝子組換え生物等を測定しており、幼若雄性ラットにおける単回静脈内投与毒性及び生体内分布試験での定量下限値は 50 コピー/ μ g ゲノム DNA、筋ジストロフィーモデルイヌにおける生体内分布及びベクター排出試験での定量下限値は 6（尿及び唾液）～8（血清） $\times 10^3$ vg/mL であった。

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のキャプシドは、野生型 AAV のキャプシドと同様の構成である (VP1、VP2 及び VP3 の 3 つのキャプシドタンパク質から構成されている)。そのため、本遺伝子組換え生物等と野生型 AAV との感染宿主域に違いはない。

本遺伝子組換え生物等は、野生型 AAV9 を宿主として作成されたものであり、野生型 AAV9 と同様に、感染により細胞の核内に移行した一本鎖 DNA が複製され環状二本鎖 DNA となり、安定したエピソームとして存在する。また、野生型 AAV9 と同様に、骨格筋、心筋、中枢神経、肝臓及び肺に組織指向性がある。

本遺伝子組換え生物等の複製には、野生型 AAV とヘルパーウイルスが同時に感染 (3 重感染) する必要があり、自然界で本遺伝子組換え生物等の複製が起こる可能性は極めて低い。すなわち、本遺伝子組換え生物等は、野生型 AAV9 と異なり、ウイルス粒子の複製及びパッケージングに必要な *rep* 及び *cap* 遺伝子を持たないことから、ヘルパーウイルスと共感染しても、本遺伝子組換え生物等は複製されない。また、本遺伝子組換え生物等は、ゲノム DNA が野生型 AAV9 と異なり、AAV2 由来の ITR 配列の間に治療遺伝子及びその発現調節エレメントを含む一本鎖 DNA が含まれる。

本遺伝子組換え生物等は *rep* 遺伝子を持たないため、宿主染色体への組込み頻度が野生型 AAV9 と比べて低いと考えられる。

本遺伝子組換え生物等は、2 つの ITR に挟まれた *rep* 及び *cap* 遺伝子領域がミニジストロフィン発現カセットに置換されており、感染細胞内で Rep 及び Cap タンパク質の代わりにミニジストロフィンタンパク質が産生される。

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

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の保管は、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行う。

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の原液の希釈液の調製は、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) 希釈液は、容器に密封された状態で保管する。

運搬

- (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、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、患者に静脈内投与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拡散を最小限に留めるために必要となる期間、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、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。
- (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、血液、唾液、尿に対し、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。

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期間までに、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程に従って取り扱う。
- (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）に基づいて施設等及び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の原液の希釈液及び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の患者への投与後、本遺伝子組換え生物等及び増殖能を獲得した
遺伝子組換えウイルス (rcAAV) について十分な排出データが得られるまでの間、患者か
ら血液・唾液・尿の各検体を採取し、ウイルス排出を定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)
法にて継続的にモニターする。現在予定している排出試験計画概要を別紙 4 に記載する。

4 生物多様性影響が生じるおそれが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
該当なし

5 実験室等での使用又は第一種の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

本遺伝子組換え生物等を幼若雄性 SD ラットに単回静脈内投与して 91 日間観察し、毒性
及び生体内分布を評価した。

また、本遺伝子組換え生物等を幼若雄性筋ジストロフィーモデルイヌに単回静脈内投与
したときのベクターの生体内分布及び排泄を評価した。詳細については別紙 5 に示す。

(1) 幼若雄性ラットにおける単回静脈内投与毒性及び生体内分布試験

28 日齢幼若雄性 SD ラットに本遺伝子組換え生物等の 3×10^{13} 、 3×10^{14} 又は 2×10^{15}
vg/kg を単回静脈内投与し、その影響を投与後 8、15、31 及び 91 日に評価した。一般状
態、体重、摂餌量、機能観察バッテリー (FOB) 評価、自発運動、全身プレチスモグラフ
ィーによる呼吸機能、性成熟、眼科的検査、心エコー検査、剖検及び病理組織学的検査に
ついて検討した。

本遺伝子組換え生物等に関連する死亡は認められなかった。高用量群 (2×10^{15} vg/kg)
では、体重、体重増加量及び摂餌量の低値、脳重量の低値及び器官相対重量の高値、骨格
成熟遅延 (ALP の高値及び後肢 splay distance の低値より示唆) 並びに性成熟遅延 (包
皮分離遅延) 等、発育遅延が認められたことから、無毒性量は 3×10^{14} vg/kg と推定され
た。

また、高用量群 (2×10^{15} vg/kg) では、投与後 8、31 及び 91 日に生体内分布について検
討した。その結果、投与後 8、31 及び 91 日のいずれにおいても検査した全組織及び血液
からベクター DNA が検出されたが、投与後 8 日から 91 日にかけて概して減少した。い
ずれの検査日においても肝臓で最も高く、次いで副腎、心血管であった。雄生殖器 (精巣及
び精巣上体) においても投与後 91 日まで検出された。

(2) 筋ジストロフィーモデルイヌにおける生体内分布及びベクター排出

2 ヶ月齢の雄性筋ジストロフィーモデルイヌに本遺伝子組換え生物等の 1×10^{14} vg/kg を
単回静脈内投与したときのベクターの生体内分布及び排出を評価した。

生体内分布

投与後 1、2 又は 3 ヶ月に採取した前肢及び後肢筋肉生検試料、剖検時（1 例：投与後 2 ヶ月、6 例：投与後 8 ヶ月）に採取した

におけるベクターコピー数を測定した。

緩衝液群及び投与前の本遺伝子組換え生物等群からはベクターDNA は検出されなかった。本遺伝子組換え生物等群の投与後では、

vg/diploid genome (dg) で検出され、

ベクターDNA は で検出された。

排出

体液（血清、尿及び唾液）中のベクター濃度と持続時間を測定した。試験期間中に性成熟に達した動物がいなかったため、精液は採取しなかった。

血清中では、投与後 3 日に検出されたベクターコピー数は総投与量の 0.01~0.32%であったが、その後速やかに減少し、投与後 7 日では総投与量の 0.001%未満であった。投与後 4 週ではいずれの個体においても検出されなかった。尿及び唾液中のベクターコピー数は、多くの個体で血清中のそれぞれ 1/100 及び 1/10000 程度であり、それぞれ投与後 4 週間及び 2 週間までにすべての個体で検出不可能なレベルまで顕著に減少した。

（3）本遺伝子組換え生物等と類縁株を用いた非臨床安全性試験結果

野生型 AAV の病原性は報告されておらず、一般的に AAV を用いた遺伝子治療用ベクターは良好な安全性プロファイルを示す。AAV9 又は類似のウイルスベクターを用いた非臨床試験でみられた主な毒性所見として以下のものが報告されている。

C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制するために shRNA を導入した AAV8 (AAV9 キャプシドペプチド配列に対して 85%の相同性を有する) ベクターをマウス及びカニクイザルに投与したところ、いずれの種においても shRNA が過剰発現し、投与後 4~6 週に肝毒性がみられたが、shRNA 発現を調節するプロモーターの強度を低下させることによって肝毒性は軽減した(文献24)。類似した肝毒性はムコ多糖症の治療を目的として α -N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAGLU) 遺伝子を導入した AAV9 ベクターでも報告されており、C57BL/6 マウス (雄のみ) において投与後 6~8 日に肝毒性がみられた (文献25)。このベクターを内因性の NAGLU 欠損マウス (文献 25) 又はカニクイザル (文献26) に投与した場合は肝毒性は認められなかった。

AAV ベクターによる免疫関連の毒性所見がみられた例として、ホモ接合型の家族性高コ

レステロール血症の治療を目的としてヒト低密度リポタンパク質受容体遺伝子を導入した AAV8 ベクターのアカゲザルを用いた非臨床試験において、キャプシド及び導入遺伝子に対する細胞性応答とそれへの関連が示唆される肝酵素の軽度で一過性の増加がみられたことが報告されている（文献27）。しかしながら、血友病の治療を目的とした他の AAV8 ベクターでは、ヒトでみられた細胞性免疫応答によると考えられる肝酵素の上昇は、非臨床試験では認められなかった（文献28）。

また、AAV の改変が毒性プロファイルに影響を及ぼす例が最近報告されている。脊髄性筋萎縮症の治療を目的として SMN1 遺伝子を導入した改変型 AAV9 (AAVhu68 ; VP1/VP2 における N 末端の 2 アミノ酸残基を置換) ベクターのアカゲザルへの高用量 (2×10^{14} vg/kg) での投与によって重篤な毒性が認められた（文献29）。すなわち、3 例中 1 例のサルに呼吸困難、低体温、散瞳等の一般状態の悪化及び肝酵素上昇がみられ、投与後 4 日に瀕死期安楽殺した。一方、同一ベクターを同じ用量で投与したミニブタ（ユカタンマイクロ系）では、肝毒性は認められず、後根神経節における単核細胞浸潤と関連する運動失調がみられた。ミニブタではサルと比較して肝臓におけるウイルスベクターゲノムのコピー数は顕著に低かった（文献 29）。これらの AAVhu68 を用いた結果は、SMN1 遺伝子を導入した AAV9 ベクターの小児患者（文献30）及び GFP 遺伝子を導入した AAV9 ベクターのカニクイザル（文献31）への高用量投与における良好な安全性プロファイルとは対照的であり、AAV の軽微な改変が毒性プロファイルに大きな影響を及ぼし得ることを示したものである。AAV の改変による毒性の増強は、同じく AAV9 の軽微な改変型である AAV-PHP.b を用いた非臨床試験でも認められている（文献32）。

以上のように、AAV を用いた遺伝子治療用ベクターの非臨床試験で認められる毒性所見は、免疫関連のものと導入遺伝子の過剰発現に関連するものに分類することができる。これらの所見は概して用量依存的であり、種差もみられている。また、AAV の軽微な改変が安全性プロファイルに大きく影響し得ることが報告されている。しかしながら、一般的に AAV を用いた遺伝子治療用ベクターは良好な安全性プロファイルを示すことから、多数の AAV9 及びその類縁株を含む AAV を用いた遺伝子治療用ベクターの臨床試験が実施されている。

6 国外における使用等により得られた情報

米国にて本遺伝子組換え生物等を使用した臨床試験を実施中である（別紙 6）。本遺伝子組換え生物等を含む遺伝子組換え AAV ベクターを用いた国外の臨床試験の情報および米国にて実施中の本遺伝子組換え生物等を使用した ██████████ 臨床試験における安全性情報の概略を別紙 6 に示す。

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 と同一と考えられ、微生物に感染することではなく、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

該当なし

(3) 影響の生じやすさの評価

該当なし

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載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限り、生物多様性の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 と同様と考えられ、ヒト及びサルやマウス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非臨床試験及び臨床試験の実績からは、本遺伝子組換え生物等及び感染細胞で産生されるヒトのジストロフィンタンパク質に由来するミニジストロフィンタンパク質等の病原性は認められていない。

(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は環境中への拡散が殆どなく、ヘルパーウイルスが共存しても野性型 AAV が共感染しない限り増殖しない。

野生型 AAV による病原性は認められていないことから、本遺伝子組換え生物等により病原性が生じる可能性は極めて小さい。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

病原性について、第一種使用規程承認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と同様と考えられ、ヒト及びサルやマウス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により、感染細胞でヒトのジストロフィンタンパク質に由来するミニジストロフィンタンパク質が新たに産生されるが、本遺伝子組換え生物等の非臨床試験及び臨床試験の実績からは免疫原性を含む有害性は認められていない。また、他に新たな有害物質が産生されることはない。

(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は環境中への拡散が殆どなく、ヘルパーウイルスが共存しても野性型AAVが共感染しない限り増殖しない。

そのため、本遺伝子組換え生物等により有害物質が生じる可能性は極めて小さい。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

有害物質の産生性について、第一種使用規程承認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限り、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

4 核酸を水平伝播する性質

(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と同様と考えられ、ヒト及びサルやマウス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投与を受けた患者の排泄物等から第三者（ヒト及び哺乳類）へ伝播する可能性があるが、相同組換えにより本遺伝子組換え生物等の核酸が、感染細胞の染色体に組み込まれる可能性は極めて低い。しかしながら、野生型AAV DNAは感染細胞の特定の染色体DNAの部位に組み込まれることが知られており、外来性のRepタンパク質の存在下、本遺伝子組換え生物等の核酸が、感染細胞の染色体に組み込まれる可能性は否定できない。

(3) 影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者の排泄物等から第三者（ヒト及び哺乳類）へ伝播する可能性は、第一種使用規程に従う限り、極めて低い。野生型AAV及びヘルパーウイルスとの共感染により、第三者や野生動物に水平感染する可能性はあるものの、患者に投与された本遺伝子組換え生物等が水平感染を生ずるおそれは極めて低い。また、

本遺伝子組換え生物等は rep 及び cap 遺伝子を失っているために核酸が感染細胞の特定の染色体DNA部位に挿入される可能性も極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

核酸を水平伝播する性質について、第一種使用規程承認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限り、生物多様性の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

幼若雄性ラットにおける本遺伝子組換え生物等の生体内分布について評価した非臨床試験において、観察期間を通して生殖器官でベクターDNAが検出されたものの、精巣及び精巣上体のベクターDNAは経時的に減少したこと、また、AAVの生殖細胞への組込みに関する公表文献（文献33、34、35、36、37）に基づき、本遺伝子組換え生物等が生殖細胞に組込まれる可能性及び垂直感染する可能性は極めて低いと判断される。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物等が感染する動物は野生型 AAV と同じくヒトを含む哺乳動物であり、植物及び他の微生物への感染はない。本遺伝子組換え生物等による病原性はなく、第三者や哺乳動物に核酸を水平伝播する可能性は極めて低い。したがって、第一種使用規程承認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を行う限り、本遺伝子組換え生物等による生物多様性影響が生ずるおそれがないと判断される。

- 1 Carter BJ. In Lasic DD and Templeton NS. Gene Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies. New York: Marcel Dekker, Inc. 2000, 41-59.
- 2 Gao, Guangping, et al. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J. Virol. 78(12), 2004, 6381-6388.
- 3 Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol. 21, 2016, 75-80.
- 4 Berns KI. Parvovirus Replication. Microbiological Reviews, Sept. 1990, 316-329.
- 5 Flotte TR, Carter BJ. Adeno-associated virus for gene therapy. Gene Ther. 2, 1995, 357-362.
- 6 Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. BioDrugs. 31(4), 2017, 317-334.
- 7 Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges. Nat Rev Genet. 12, 2011, 341-355.
- 8 Chapin JC, Monahan PE. Gene Therapy for Hemophilia: Progress to Date. BioDrugs. 32, 2018, 9-25.
- 9 Ginn, SL., et al. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2017: An update, J Gene Med., 2018, e3015.
- 10 Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. Mol Ther. 14, 2006, 316-327.

-
- 11 Nonnenmacher M, Weber T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* 2012 Jun;19(6):649-58.
 - 12 Lisowski L, Tay SS, Alexander IE. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 24, 2015, 59-67.
 - 13 Tenenbaum L., et al. Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors. *Current Gene Therapy* 3, 2003, 545-565.
 - 14 Zinn E, et al. Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol.* 2014, 90-97.
 - 15 Chen CL, Jensen RL, Schnepf BC, et al. Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol.* 79, 2005, 14781-14792.
 - 16 Schnepf BC, Jensen RL, Chen CL, et al. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol.* 79, 2005, 14793-14803.
 - 17 Reuter JD, et al. Assessment of Hazard Risk Associated with the Intravenous Use of Viral Vectors in Rodents. *Comparative Medicine* 62(5),2012, 361–370.
 - 18 WHO Technical Report, Series No. 924, 2004.
 - 19 Sofer G, et al. Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century. *BioPharm International* 2003, 42-68.
 - 20 Howard DB and Harvey BK. Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Human Gene Therapy Methods* 28(1), 2017, 39-48.
 - 21 Flotte TR, et al. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem.* 268(5), (1993) 3781-3790.
 - 22 Nakai H, Storm TA, Kay MA. Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of the liver in vivo. *J Virol.* 2000;74:9451-63.
 - 23 Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, et al. Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol.* 2008;82:7875-85.
 - 24 Suhy DA, Kao SC, Mao T, et al. Safe, long-term hepatic expression of anti-HCV shRNA in a nonhuman primate model. *Mol Ther.* 2012;20(9):1737-49.
 - 25 Meadows AS, Duncan FJ, Camboni M, et al. A GLP-compliant toxicology and biodistribution study: systemic delivery of an rAAV9 vector for the treatment of mucopolysaccharidosis IIIB. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2015;26(4):228-42.
 - 26 Murrey DA, Naughton BJ, Duncan FJ, et al. Feasibility and safety of systemic rAAV9-hNAGLU delivery for treating mucopolysaccharidosis IIIB: toxicology, biodistribution, and immunological assessments in primates. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2014;25(2):72-84.
 - 27 Greig JA, Limberis MP, Bell P, et al. Non-clinical study examining AAV8.TBG.hLDLR vector-associated toxicity in chow-fed wild-type and LDLR+/- rhesus macaques. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2017;28(1):39-50.
 - 28 Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med.* 2014;371:1994-2004.
 - 29 Hinderer C, Katz N, Buza EL, et al. Severe toxicity in nonhuman primates and piglets following high-dose intravenous administration of an adeno-associated virus vector expressing human SMN. *Hum Gene Ther.* 2018;29:285-98.
 - 30 Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377:1713-22.
 - 31 Bevan AK, Duque S, Foust KD, et al. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol Ther.* 2011;19:1971-80.
 - 32 Hordeaux J, Wang Q, Katz N, et al. The neurotropic properties of AAV-PHP.B are limited to C57BL/6J mice. *Mol Ther.* 2018;26:664-8.
 - 33 Rajesekaran S, Thatte J, Periasamay J, et al. Infectivity of adeno-associated virus serotypes in mouse testis. *BMC Biotech.* 2018;18:70-8.
 - 34 Couto LB, Parker A, Gordon JW. Direct exposure of mouse spermatozoa to very

high concentrations of serotype-2 adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Hum Gen Ther.* 2004;15(3):287-91.

- 35 Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, 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.
- 36 Schuettrumpf J, Liu J-H, Couto LB, et al. Inadvertent germline transmission of aav2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Molecular Therapy.* 2006;13(6):1064-73.
- 37 Favaro P, Downey HD, Zhou JS, et al. Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol Ther.* 2009;17(6):1022-30.