

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12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

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> 遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス6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、Bドメイン欠失型ヒト血液凝固第VIII因子を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV2/6-hF8BDD）
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、患者に静脈内に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、精液に対し、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。
--	--

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

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 (以下、SB-525) 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、肝臓及び肺に組織指向性がある AAV の血清型 6 型 (AAV6) (文献6、7、8) 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9、10及び11)。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12)。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8)。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13）。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、 $\alpha V\beta 5$ インテグリン、 $\alpha V\beta 1$ 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、SB-525 のキャプシドタンパク質は AAV6 由来であり、AAV6 は EGF 受容体、ヘパリン、シアル酸に結合することが報告されている（文献 13、14、15）。

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16）。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17）。

（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18）。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 17）。

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19、20）。

（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21）。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 24）。

パルボウイルスは、加熱（74℃ 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22、23）、AAV は、高圧蒸気滅菌（121℃、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24）。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 24）。

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

SB-525 発現カセットでは、血清型 2 の AAV ゲノムの *rep* 及び *cap* 遺伝子が削除され、以下の構成要素が導入されている（別紙 2、Figure 2）。なお、各構成要素は合成由来の短いスパーサー配列と ITR 配列の一部により連結されている。

- ・ マウス 5'-上流インスレーター配列を含む領域

- ・ 改変型ヒト遺伝子エンハンサー領域
- ・ マウス遺伝子プロモーター領域
- ・ 改変型マウス微小ウイルス (mouse minute virus) 遺伝子イントロン領域
- ・ ヒト血液凝固第 VIII 因子コード遺伝子シグナルペプチド
- ・ コドン最適化 B ドメイン欠失型ヒト血液凝固第 VIII 因子遺伝子
- ・ ポリアデニル化シグナル配列を含む領域
- ・ マウス 3'-上流インスレーター配列を含む領域

SB-525 発現カセットの構成要素及び構成要素の塩基配列の由来、SB-525 のアミノ酸配列及び SB-525 の塩基配列をそれぞれ別紙 2、Table 1、Figure 3 及び Figure 4 に示す。

(2) 構成要素の機能

SB-525 発現カセットの構成要素の機能を以下に示す。

- マウス 5'-上流インスレーター
 - ・ インスレーターは収率および発現効率を向上させる。
- 改変型ヒト遺伝子エンハンサー
- マウス遺伝子プロモーター
- 改変型マウス微小ウイルス (mouse minute virus) 遺伝子イントロン
 - ・ 改変型ヒト肝臓特異的遺伝子エンハンサー、マウス遺伝子プロモーター、改変型マウス微小ウイルス (mouse minute virus) 遺伝子イントロンは、導入遺伝子であるヒト血液凝固第 VIII 因子を転写制御する肝臓特異的な制御因子である。これらの構成要素は、患者の他の細胞からの発現を排除または最小化しながら、肝臓細胞においてヒト血液凝固第 VIII 因子の安定した転写に寄与する。
- ヒト血液凝固第 VIII 因子コード遺伝子シグナルペプチド
- コドン最適化 B ドメイン欠失型ヒト血液凝固第 VIII 因子遺伝子
- ポリアデニル化シグナル
- マウス遺伝子 3'-上流インスレーター
 - ・ インスレーターは収率および発現効率を向上させる。

詳細は別紙 2.2 に示す。SB-525 は野生型の AAV6 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、SB-525 は自然界で SB-525 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。

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

AAV の *rep* 及び *cap* 遺伝子配列を含む遺伝子組換えバキュロウイルスヘルパーウイルス (Rep2-Cap6 ヘルパー) 及び SB-525 ゲノム配列をもつ遺伝子組換えバキュロウイルス (SB-525) を、Invitrogen 社製 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System を用いて構築する。

バキュロウイルス (SB-525) の構築：

AAV ITR を両側に有する発現カセットを含む DNA 断片を pFASTBAC 由来のベクターに挿入させ、組換えバクミドの中間体とする。hF8 cDNA 発現カセットが挿入された pFASTBAC ベクターでバキュロウイルス (AcMNPV) ゲノムを内包する大腸菌 DH10Bac コンピテント細胞を形質転換し、組換え hF8 cDNA バクミドを作製する。単離された組換えバクミドで Sf9 細胞を形質転換することにより組換えバキュロウイルス (SB-525) を作製する。

バキュロウイルスヘルパーウイルス (Rep2-Cap6 ヘルパー) の構築：

バキュロウイルス SB-525 の構築と同様に、AAV2 *rep* 及び AAV6 *cap* を含む DNA 断片を pFASTBAC 由来のベクターに挿入させる。AAV2 *rep* 及び AAV6 *cap* が挿入された pFASTBAC ベクターでバキュロウイルス (AcMNPV) ゲノムを内包する大腸菌 DH10Bac コンピテント細胞を形質転換し、組換え Rep2-Cap6 ヘルパーバクミドを作製する。単離された組換えバクミドで Sf9 細胞を形質転換することにより組換えバキュロウイルス (Rep2-Cap6 ヘルパー) を作製する。

SB-525 は、バキュロウイルスヘルパーウイルス Rep2-Cap6 ヘルパー及びバキュロウイルス SB-525 を、Sf9 細胞に共感染させることによって作製する。詳細は別紙 3 に示す。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

SB-525 は、上述の 2 種類の遺伝子組換えバキュロウイルスを共感染させた Sf9 細胞の培養上清を精製することにより得る。すなわち、バキュロウイルスを共感染させた Sf9 細胞を数日間培養し、培養後、細胞を溶解させる。溶解物をデプスフィルターで清澄化し、カラムクロマトグラフィーにより SB-525 を精製する。本精製工程では、ウイルス除去・不活化のために、界面活性剤処理によるウイルス不活化、クロマトグラフィーによる混入ウイルスの分離、フィルターによるウイルス除去を実施する。SB-525 の各臨床試験用ロットについて別紙 3、Table 5 に示す品質試験を行う。このとき、各ロットの出荷試験として複製能を有する AAV に関する試験 (規格は「複製可能な AAV が検出されない (検出限界は XXXXXXXXXX)

)」)を実施する。また、製造に用いたバキュロウイルスの最終製品中における残留は、検出限界以下 ()であった (別紙 3、Table 6)。

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25、26)、導入遺伝子を発現するよう転写される。

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

SB-525 は、定量的リアルタイム PCR 法を用い、SB-525 に特異的な領域を増幅することによって各種生体試料 (血漿、唾液、尿、精液および糞) 中の SB-525 を検出及び識別する。本試験法の検出限界は 10 コピー/反応、定量下限値は 10 コピー/反応、定量範囲は $10 \sim 1 \times 10^8$ コピー/反応である。日内および日間の真度は理論値の 91~119%および 99~105%、日内および日間の精度 (%相対標準偏差) は 0~3%および 1~2%である。なお、感染能を評価する検査法は確立していない。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

SB-525 は、2 つの ITR に挟まれた *rep* 及び *cap* 遺伝子領域が SB-525 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ヒト血液凝固第 VIII 因子が産生される。

SB-525 は *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠失しており、ヘルパーウイルスの存在下であっても複製できないため、その外界での生存性は極めて低く、野生型 AAV を上回ることはない。複製に必須な遺伝子を提供する野生型 AAV、ヘルパーウイルス及び SB-525 が同時に感染 (3 重感染) した場合には、SB-525 及び野生型 AAV が産生される可能性があるが、非常にまれであり、自然界で SB-525 の複製が起こる可能性は極めて低い。

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、患者に静脈内に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、精液に対し、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定に従って取り扱う。

- (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

- (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。
- (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
投与された SB-525 の排出等の挙動が明らかになるまで、血液、唾液、尿、精液に対し、II-5 で記載した定量的リアルタイム PCR 法を用いて、SB-525 の排出等の検査を経時的に実施する。現在予定している排出試験計画の概要を別紙 5 に記載する。

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
該当なし

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
C57BL/6 マウス及びカニクイザルを用いた SB-525 の非臨床毒性試験（それぞれ TX- HMA-007 試験、TX- HMA-008 試験）でベクターゲノム排出及び生体内分布を評価した。これらの試験における最高用量は 2×10^{13} vg/kg であった。なお、これらの試験における SB-525 のベクターゲノムの定量限界は 100 コピー／精製 gDNA 検体 5 μ L であり、マウスを用いた試験、カニクイザルを用いた試験の低用量群、及び対照動物において、ベクターゲノムはいずれの測定時点においても定量限界以下であった（詳細は別紙 4 参照）。また、生体内分布の結果より、SB-525 の生殖細胞への移行は認められないことから、垂直感染の可能性は低いと考える。

- TX- HMA-007 試験：C57BL/6 マウスに SB-525 を 2×10^{13} vg/kg の用量で単回静脈内投与し、唾液、尿、糞及び精液を 90 日目（剖検）の 3 日前まで採取した。試験終了時までマウスの唾液、尿、糞及び精液中で SB-525 のベクターゲノム排出のエビデンスは認められなかった。生体内分布の検討では、SB-525 ベクターゲノムは肝臓で最高値を示し、 $1.28 \times 10^5 \sim 1.13 \times 10^6$ コピー/ μ g gDNA の範囲であった。投与部位におけるベクターゲノムのコピー数は $3.29 \times 10^4 \sim 2.87 \times 10^5$ コピー/ μ g gDNA であった。ベクターの肝臓親和性を反映し、リンパ節、心臓、腎臓及び脾臓では 1/100～1/10 のコピー数の SB-525

ベクターゲノムが検出され、脳、腸、胃又は精巣においては検出されなかった。

- TX-XXXXXXXXXX-HMA-008 試験：免疫抑制雄カニクイザルに SB-525 を 2×10^{11} vg/kg（また 60 日後に 2 度目の投与として 9×10^{11} vg/kg を投与）、 6×10^{11} 、 2×10^{12} 又は 6×10^{12} vg/kg の用量で投与した。全動物から -11、1 日目（投与前）、2、4、14、59/60 日目に、また第 2 群（2 回投与した群）の動物のみ 61、63、73 日目及び 86 日目に唾液、尿及び糞を採取した。SB-525 のベクターゲノムを特定の条件を満たした定量的 PCR 分析法を用いて定量した。高用量群（ 6×10^{12} vg/kg）のみ、投与後 4 日間にわたり唾液、尿及び糞中に SB-525 のベクターが検出されたが、それ以降は検出されなかった。生体内分布の検討では、試験 60 日（第 2 群は 87 日）に組織試料を採取し、qPCR 及び qRT-PCR 法を用いて SB-525 ベクターゲノム及び hF8 mRNA 量を定量した。ヒト F8 mRNA 発現は肝臓に限定され、測定した他の組織（心臓、腎臓、脳、脾臓、精巣及び肺）では発現が認められなかった。SB-525 ベクターゲノムの qPCR 解析において、測定した他の組織と比較して肝臓で高コピー数のベクターゲノムが検出された。第 2 群の 1 例及び第 3 群の 2 例はそれぞれ試験 87 日と試験 60 日に SB-525 ベクターゲノムが検出されなかった。脾臓、肺、心臓及び腎臓では肝臓と比較して 1/100～1/10 のコピー数の SB-525 ベクターゲノムが検出され、脳（前頭皮質、小脳）又は精巣からは検出されなかった。

6 国外における使用等により得られた情報

現在までに、遺伝子治療用の AAV ベクターは、血友病 A、B の他、様々な疾患を対象とする臨床試験でヒトに投与されている。AAV ベクターを投与された数百人のデータが査読付き論文に報告されており、安全性プロファイルは全般的に良好であった。これらの臨床試験において、増殖能を持つ AAV の出現は報告されていない。また、静脈内投与後の体液への AAV ベクターの排出は一定期間認められるものの、その量は投与量に比して少なく、また経時的に減少し、最終的に検出されなくなることが報告されている（文献27、28、29、別紙4 参照）。

SB-525については、現在XXXXXXXXXX試験（XXXXXXXXXX）を実施中である。現在までにXXXXXXXXXX試験から得られているSB-525の安全性情報を別紙4に記載する。

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

SB-525 の感染宿主域は AAV6 と同一と考えられ、微生物に感染することはなく、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
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 SB-525 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
SB-525 の感染宿主域は、AAV6 と同様であると考えられ、ヒトを含む複数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
SB-525 の非臨床試験及び臨床試験の実績からは、SB-525 及び感染細胞で産生される血液凝固第 VIII 因子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、SB-525 は環境中への拡散がほとんどなく、ヘルパーウイルスが共存しても野生型 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、SB-525 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
SB-525 の感染宿主域は、AAV6 と同様であると考えられ、ヒトを含む複数の哺乳類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
SB-525 感染細胞で、血液凝固第 VIII 因子が産生され、血中の凝固活性が上昇する可能性がある。

(3) 影響の生じやすさの評価
第一種使用規程に基づいた使用等を行う限り、第三者及び野生動物に、SB-525 が伝播する可能性は低く、ヘルパーウイルスが共存しても野生型 AAV が共感染しない限り増殖しない。そのため、SB-525 により有害物質が生じる可能性は極めて低い。また、例え、微量の血液

凝固第 VIII 因子が産生されても、有害事象が生じる可能性は低い。

(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又は他の微生物の特定

SB-525の感染宿主域は、AAV6と同様であると考えられ、ヒトを含む複数の哺乳類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

SB-525 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 SB-525 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、SB-525 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

SB-525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SB-525が水平感染を生ずるおそれは極めて低い。また、SB-525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

なし

V 総合的評価

SB-525 が感染しうる対象は野生型 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が影響を受ける可能性はない。SB-525 は野生型 AAV と同様に病原性はなく、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、SB-525 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。

引用文献

- 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. 2004;78(12):6381-8.
- 3 Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol. 2016;21:75-80.
- 4 Berns KI. Parvovirus Replication. Microbiological Reviews, Sept. 1990, 316-29.
- 5 Flotte TR, Carter BJ. Adeno-associated virus for gene therapy. Gene Ther. 1995;2:357-62.
- 6 Wu Z, Miller E, Agbandje-McKenna M, et al. Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. J Virol. 2006;80(18):9093-103.
- 7 Wu Z, Asokan A, Grieger JC, et al. Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. J Virol. 2006;80(22):11393-7.
- 8 Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. BioDrugs. 2017;31(4):317-34.
- 9 Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges. Nat Rev Genet. 2011;12:341-55.
- 10 Chapin JC, Monahan PE. Gene Therapy for Hemophilia: Progress to Date. BioDrugs. 2018;32:9-25.
- 11 Ginn, SL., et al. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2017: An update, J Gene Med., 2018, e3015.
- 12 Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. Mol Ther. 2006;14:316-27.
- 13 Nonnenmacher M, Weber T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. Gene Ther. 2012;19(6):649-58.
- 14 Arnett AL, Beutler LR, Quintana A, et al. Heparin-binding correlates with increased efficiency of AAV1- and AAV6-mediated transduction of striated muscle, but negatively impacts CNS transduction. Gene Ther. 2013;20(5):497-503.
- 15 Seiler MP, Miller AD, Zabner J, et al. Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry. Hum Gene Ther. 2006;17(1):10-9.

-
- 16 Lisowski L, Tay SS, Alexander IE. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;24:59-67.
 - 17 Tenenbaum L., et al. Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors. *Current Gene Therapy.* 2003;3:545-65.
 - 18 Zinn E, et al. Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol.* 2014, 90-97.
 - 19 Chen CL, Jensen RL, Schnepf BC, et al. Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol.* 2005;79:14781-92.
 - 20 Schnepf BC, Jensen RL, Chen CL, et al. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol.* 2005;79:14793-803.
 - 21 Reuter JD, et al. Assessment of Hazard Risk Associated with the Intravenous Use of Viral Vectors in Rodents. *Comparative Medicine.* 2012;62(5):361–70.
 - 22 WHO Technical Report, Series No. 924, 2004.
 - 23 Sofer G, et al. Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century. *BioPharm International* 2003, 42-68.
 - 24 Howard DB and Harvey BK. Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Human Gene Therapy Methods.* 2017;28(1):39-48.
 - 25 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.
 - 26 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.
 - 27 Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med.* 2014;371(21):1994-2004.
 - 28 D'Avola D, López-Franco E, Sangro B, et al. Phase I open label liver-directed gene therapy clinical trial for acute intermittent porphyria. *J Hepatol.* 2016;65(4):776-83.
 - 29 Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Eng J Med.* 2017;377(26):2519-30.