

第一種使用規程承認申請書

令和2年2月21日

厚生労働大臣 加藤 勝信 殿
環境大臣 小泉 進次郎 殿

氏名 バイエル薬品株式会社
申請者 代表取締役社長 ハイケ・プリンツ (印)
住所 大阪市北区梅田二丁目4番9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。)の規程により、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 hu37 に由来する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 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 (AAVhu37FⅧ)</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、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。</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</p>

子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるように、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、尿、糞便、唾液及び精液に対し、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密封容器に入れ、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定（以下「施設等及び検査機関の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。
- (15) 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を、漏出しない密封

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。

(16) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体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の希釈液及び検体は漏出しない密封容器に入れ、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厳重な密閉を行った上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。

(17) 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、密封された状態で焼却又は高圧蒸気滅菌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

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、パルボウイルス科ディペンドウイルス属 (*Parvoviridae Dependovirus*) に分類される一本鎖 DNA ウイルスである (文献 1、2)。野生型 AAV は、ヘルパーウイルス (例; アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス) の存在下でのみ複製が可能である (文献 3)。ヘルパーウイルスの存在下で新しく形成された野生型 AAV ウイルス粒子は、ヘルパーウイルスとともに拡散する。したがって、野生型 AAV が拡散するかどうかは、ヘルパーウイルスが同じ細胞内に存在しているかどうか依存する。

AAV の宿主域は広く、霊長類、イヌ、ウシ、ウマ等の哺乳類から分離されているが、いずれも病原性は知られていない (文献 4)。ヒトのおよそ 90% 近くがいずれかの血清型の AAV に対する抗体を有しているものの、これまで AAV による既知の病原性は報告されていない (文献 3)。

AAV には、100 を超える血清型が存在する (文献 2)。前述の複製、拡散、宿主域及び病原性は、いずれの血清型にも共通する AAV の特性であるが、感染組織の指向性には、血清型による違いがみられる (文献 2、5)。各血清型の組織指向性を決定づけているのがカプシドタンパク質である (文献 2)。カプシド VP1 遺伝子の分子系統解析により、血清型が系統的に幾つかの分岐群 (クレード) に分類されている (別紙 1 の図 1 参照)。

本遺伝子組換え生物等のカプシドには、血清型 hu37 が使用されている。AAVhu37 はヒト組織から分離された AAV であり、AAV8 と同じクレード E に分類される (別紙 1 の図 1 参照)。クレード E に属する AAV は、肝臓指向性を有し、肝臓に効率的に導入されることが知られている (文献 6、7、8、9)。AAVhu37 と AAV8 のカプシドタンパク質のホモロジーは 94% [アミノ酸配列 738 残基のうち 48 残基が異なる (文献 10)] と高い (AAV8 と他のクレードに属する AAV1~9 のホモロジーは 58%~88%)。したがって、AAVhu37 の組織指向性や排出は、同じクレードの AAV8 と類似すると推定される。AAVhu37 及び AAV8 を含む複数の血清型の AAV ベクターについて、発現効率、発現安定性、肝毒性、肝臓病理所見、T 細胞活性化、中和抗体保有率の低さ、並びに肝臓以外の組織への分布等を比較した結果、AAVhu37 は肝臓を標的とする遺伝子治療用ベクターとして最も好ましい特性を有する血清型の一つであることが示されている (文献 6)。

また、本遺伝子組換え生物等のゲノムには、AAV2 由来の ITR が使用されている。AAV2 はヒト由来の AAV であり、最も高頻度にヒト検体でその抗体が検出される血清型であ

る（文献4）。また、最初に全塩基配列が決定された AAV でもあることから、AAV 研究の主な対象とされてきた（文献4、27）。そのため、野生型 AAV のゲノム構造の説明の多くは、AAV2 に関する知見に基づいている。遺伝子治療研究においてもプロトタイプとして AAV2 が用いられてきたことから、AAV ベクターの多くが 2 型をベースにしており（文献4、27）、本遺伝子組換え生物等も ITR に AAV2 由来の ITR を使用している。

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）

野生型の AAV は広い組織指向性を持ち、ヘルパーウイルスの非存在下では増殖することが不可能であり、組織内に長期に存在することから、1980 年代の初めに野生型を遺伝子改変した AAV を用いた遺伝子導入が初めて行われて以来、遺伝子組換え AAV (rAAV) は遺伝子治療における効果的で、安全なベクターとして有望視されてきた（文献11、12）。最初に全塩基配列が決定された 2 型（AAV2）を用いて研究が進められてきたことから、遺伝子治療の AAV ベクターとして当初 AAV2 が主に用いられてきた。血友病 B の遺伝子治療の検討でも、AAV2 が最初にベクターとして用いられたが、血友病 B の動物モデルにおいて、血液凝固第 IX 因子の効果発現を数年間維持することができたものの（文献13、14、15）、ヒトにおいては数ヶ月の効果しか維持することができなかった（文献16、17）。その後、AAV8 を用いた検討が行われ、血友病 B の動物試験及び臨床試験において、形質導入の効率性、肝臓への組織指向性、導入遺伝子の発現の安定性、ヒトにおける抗体保有率の低さ等で、AAV8 は AAV2 よりも優れていることが判明している（文献18、19、20、21、22、23）。

これまで AAVhu37 を遺伝子治療用ベクターとして用いた臨床試験の報告はなく、本遺伝子組換え生物等が最初と考えられるが、血液凝固第 VIII 因子の主たる産生場所である肝臓を標的とする AAV ベクターとして、AAVhu37 は好ましい特性を有する血清型であり（1 項参照）、類似した組織指向性と排出を示すことが予想される同クレードの AAV8 の有効性と安全性が臨床試験で示されている。

AAV を利用したヒトの遺伝子治療として、欧米にて承認された製品がある（文献24、25）。血友病を対象とした遺伝子治療は国内外において未承認である。2018 年 9 月現在、血友病 A 及び B を対象とした遺伝子組換え AAV を利用した臨床試験が多数行われている。

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

AAV は、エンベロープを持たない正 20 面体のカプシドと、その内部に約 4700 塩基の一本鎖 DNA をもつウイルスである (文献 1)。AAV ウイルスゲノムは、DNA 鎖両末端のフランキング領域の Inverted Terminal Repeats (ITR) と二つの Open Reading Frame (ORF) の *rep* 及び *cap* から構成されている (文献 3)。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 (文献 26)。*rep* 遺伝子は AAV のライフサイクルに必要な 4 つの調節タンパク質を、*cap* 遺伝子はカプシドタンパク質 (VP1、VP2、VP3) をそれぞれコードしている (文献 1)。別紙 1 の図 2 に野生型 AAV のゲノム構造を示す。いずれの血清型もほぼ同じ長さのゲノムを有し、基本構造は同じである (文献 27)。

Large Rep タンパク質 (Rep78 及び Rep68) は、AAV の DNA 複製に必要な部位特異的一本鎖エンドヌクレアーゼ、DNA ヘリカーゼ及び ATP アーゼ活性を有する。Small Rep タンパク質 (Rep52 及び Rep40) はカプシドに DNA をパッケージングするために必要であり、DNA ヘリカーゼドメインのみを有する。カプシドタンパク質 (VP1 / VP2 / VP3) は、AAV ゲノムを保護するように取り囲むカプシドを形成し、AAV の細胞への結合と内在化に関与する。カプシドは、カプシドタンパク質をおよそ 1 : 1 : 10 (VP1 : VP2 : VP3) のモル比で有する正 20 面体構造に配置された 60 個のタンパク質からなる。VP1 及び VP2 に存在する N 末端配列は核局在化シグナル及びホスホリパーゼ A2 活性を有し、感染に必要である。VP2 / VP3 mRNA は、CTG 開始コドンからのリーディングフレームで翻訳される AAP をコードする。AAP は、主要な VP3 カプシドタンパク質の核内への局在、カプシドの構築及び成熟を促進する。ゲノムは、VP1、VP2 及び VP3 から構成されるカプシド内にパッケージングされる (文献 28)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

AAV は、増殖性感染を確立するためにヘルパーウイルスとの同時感染が必要である (文献 1)。ヘルパーウイルス非存在下では、AAV は細胞核に輸送され潜伏感染する (文献 3)。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 3)。AAV は自然界において物理的および化学的に安定である (文献 29)。

(3) 捕食性又は寄生性

(4) 繁殖又は増殖の様式

AAV は吸入、粘膜との接触、注射および経口摂取により伝播される (文献 30)。

宿主間の AAV 伝播の作用機序は現在のところ不明であるが、分離された AAV の分子系統学的解析によるとヒトと非ヒト霊長類の間の動物種間伝播の役割が示唆されている

(文献 31)。AAV は霊長類以外にも、ブタ、アシカ、コウモリ、ヘビからも分離されている (文献 31)。

AAV は、ヘルパーウイルスの存在下でのみ複製が可能である (文献 3)。

野生型 AAV ゲノムは、宿主細胞のゲノムに部位特異的に組み込まれることが知られているが (文献 32)、遺伝子組換え AAV は、野生型 AAV の *rep* 遺伝子が除去されているため、部位特異的な組込みは発生しない (文献 33)。そのため遺伝子組換え AAV ゲノムは殆ど染色体へ組込まれることなく、エピソームとして存在することから、本遺伝子組換え生物等の染色体挿入突然変異リスクは極めて低いと考えられる (文献 6)。本遺伝子組換え生物等のゲノムの生殖細胞系列への組込みの可能性についても、他の遺伝子組換え AAV の文献情報から極めて低いと考えられる (文献 17、19、34)。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 (文献 32)。

(5) 病原性

成人の殆どが AAV への抗体を有するが (文献 3)、AAV の病原性は報告されていない (文献 4)。

(6) 有害物質の産生性

感染細胞内で産生される宿主のウイルスゲノム由来タンパク質である Rep、VP、AAP タンパク質に有害性は認められていない。

(7) その他の情報 (不活化条件等を含む)

野生型 AAV および遺伝子組換え AAV は、1%次亜塩素酸ナトリウム、2%グルタルアルデヒド、0.25%ドデシル硫酸ナトリウム (文献 35)、1000ppm 塩素溶液、オートクレーブ及び/又は焼却 (文献 36) により不活化することができる。

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

本遺伝子組換え生物等は、肝細胞特異なトランスサイレチン (TTR) プロモーターの制御下でヒト第 VIII 因子をコードする一本鎖 DNA ゲノムを含む非増殖性遺伝子組換えウイルス (AAVhu37FVIII) である。

供与核酸は、B ドメインコード配列を除去しコドン最適化したヒト血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) コード配列 (*FVIIIco-SQ*) を含む。供与核酸の両側には、パッケージングに必要なシス作用性逆末端反復配列 (ITR) がある。

FVIII 遺伝子は長さ 186kb で、2351 個のアミノ酸からなるプロタンパク質をコードする 26 個のエクソンを含む。FVIII プロタンパク質は、構造ドメイン A1-A2-B-A3-C1-C2 を含み、タンパク質分解によるプロセッシングを経て 2 個の非共有結合サブユニットとなる。完全長の FVIII コード配列は AAV にパッケージングできるサイズよりもはるかに大きい。B ドメイン欠失 FVIII (FVIII-SQ) はヒト血液凝固第 VIII 因子と同程度の血液凝固活性を保持し、そのコード配列は AAV を介した遺伝子導入のために AAV カプシド内にパッケージングできるサイズである。

本遺伝子組換え生物等の供与核酸の構成要素及び構成要素の由来の詳細を以下に示す。

構成要素	構成要素の由来
enTTR	マウストランスサイレチン遺伝子上流のエンハンサー領域
TTRpro	ヒトトランスサイレチン遺伝子上流のプロモーター領域
<i>FVIIIco-SQ</i>	化学合成由来
pA75	ヒトアルファ-2 グロビン遺伝子のポリアダニル化シグナル

(2) 構成要素の機能

供与核酸の構成要素は、エンハンサー (肝臓特異的に *FVIIIco-SQ* 発現を制御)、肝臓特異的プロモーター (*FVIIIco-SQ* 発現を制御)、*FVIIIco-SQ* (B ドメイン欠失ヒト血液凝固第 VIII 因子コード領域) 及びポリアダニル化シグナルである。

供与核酸の ORF 解析を行った結果、目的タンパク質以外のタンパク質を発現させる可能性のある ORF はなかった。また、推定 ORF について相同性検索を行った結果、有害作用を及ぼす可能性のある既知のタンパク質と相同な配列は検出されなかった。

本遺伝子組換え生物等の供与核酸の構成要素の機能の詳細を以下に示す。

構成要素	機能
enTTR	肝臓特異的に <i>FVIIIco-SQ</i> 発現を制御するエンハンサー
TTRpro	<i>FVIIIco-SQ</i> 発現を制御する肝臓特異的プロモーター
<i>FVIIIco-SQ</i>	コドン最適化した B ドメイン欠失ヒト血液凝固第 VIII 因子をコードする
pA75	ポリアダニル化シグナル

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

宿主内に移入された核酸全体の構成については、1 供与核酸に関する情報及び別紙 2 に示した。

(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の原薬の製造工程では、産生細胞株を細胞基材として用いる。産生細胞株には、本遺伝子組換え生物等のゲノムに加え、本遺伝子組換え生物等の DNA 増幅及びパッケージングに必要な AAV *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を含む発現プラスミドが安定的に組み込まれている。発現プラスミドの構造を別紙 3 の図 1 に示した。

宿主内に移入された核酸の移入方法の詳細は別紙 3 に示した。

(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原薬及び最終製品の製造は米国で行う。

培養した産生細胞株に、ヘルパーウイルス（野生型アデノウイルス）を感染させ、本遺伝子組換え生物等を産生させる。細胞残渣を除去し、精製した後、残存アデノウイルスを不活化する。更に精製して不純物や残存アデノウイルスを除去し、原薬を得る。

原薬を無菌ろ過し、ガラスバイアルに無菌充填する。バイアルをゴム栓で密封して最終製品とし、冷凍保存する。

原薬の品質管理試験において、自己複製型 AAV 及び残存アデノウイルスが検出されないことを確認する。最終製品において、濃度、力価を含む試験を実施する。

製造工程及び品質管理試験の詳細は別紙 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

AAV ゲノムは、ITR 配列を介した環化およびコンカテマー化によって、非分裂宿主細胞中で安定に存在するが、更に、遺伝子組換え AAV は AAV のコード領域配列を除去しているため、細胞に導入後そのゲノムの大部分はエピソームとして染色体外に存在し、突然変異のリスクが低い。

細胞へ導入された本遺伝子組換え生物等のゲノムは、主として染色体外にエピソームとして存在し、肝臓のような非分裂細胞に導入された場合、比較的長期間発現が持続する。

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は定量ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）法を用いて行う。

排出については、AAV8 を用いた動物試験及び臨床試験の結果より、ヒトにおける排出を予測する上で、動物の排出試験結果は必ずしも有用ではないと考えられたことから、本遺伝子組換え生物等の非臨床排出試験は実施しなかった。本遺伝子組換え生物等の排出は、臨床試験において評価する予定であるが、本遺伝子組換え生物等と同じクレード E に属する AAV8 ベクターを用いたヒトでの排出試験結果が報告されており、本遺伝子組換え生物等の排出パターンはこれと類似すると予想される。

臨床試験における本遺伝子組換え生物等の検出に用いる対象検体、採取時期、検出方法及び感度の概略は以下の通りである（別紙 4 の 2 項）。

- 採取する検体は、AAV8 型を宿主とする遺伝子組換え生物等で排出が報告されている全血、唾液、糞便、尿及び精液とする（文献 18、19）。
- 全血、唾液、糞便、及び尿の検体採取時期について、
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- 検体の採取を終了する基準として、
[REDACTED]
[REDACTED]
- 採取した検体（全血、唾液、糞便、精液及び尿）からの DNA の精製は、
[REDACTED]
[REDACTED]
- 本遺伝子組換え生物等の DNA の定量は、qPCR 法を用いて行う。
- 本遺伝子組換え生物等の DNA の検出限界は、
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

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カプシドは血清型 hu37 (AAVhu37) であり、野生型 AAV カプシドと同様に VP1、VP2 及び VP3 の 3 つのカ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の感染宿主域及び感染経路等は野生型 AAVhu37 と同じ特性を示すと考えられる。AAVhu37 のカプシドタンパク質は分子系統学的解析から、AAV8 と同じクレード E に分類されており、最も近縁である。また、感染する組織の指向性は AAV の血清型により違いがあることが知られているが、本遺伝子組換え生物等の組織指向性は、野生型 AAVhu37 と同じ特性を有すると考えられ、クレード E の AAV に共通する肝臓指向性を示す (I 章 1 項参照)。

本遺伝子組換え生物等のゲノム DNA は、野生型 AAV とほぼ同じ長さであるが、ゲノムの構成要素が、野生型 AAV とは異なる [I 章 3 項 (1) 及び II 章 1 項 (1) 参照]。本遺伝子組換え生物等のゲノムは、野生型 AAV には存在するコード領域配列 (*rep* 及び *cap* 遺伝子) を除去しているため、ウイルスタンパク質は発現されない。そのため、ヘルパーウイルスと重複感染しても、本遺伝子組換え生物等は複製されない。

本遺伝子組換え生物等は、野生型 AAV と同様に、分裂細胞及び非分裂細胞に感染可能であり、細胞へ導入された AAV ゲノムは主として染色体外にエピソームとして存在する。本遺伝子組換え生物等は *rep* 遺伝子を持たないため、野生型 AAV が有するヒト染色体への部位特異的な組込み能を喪失しており (文献 32)、宿主染色体への組込み頻度は野生型 AAV と比べて低いと考えられる。

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、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に、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、尿、糞便、唾液及び精液に対し、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密封容器に入れ、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定（以下「施設等及び検査機関の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。
- (15) 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を、漏出しない密封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。
- (16) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体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の希釈液及び検体は漏出しない密封容器に入れ、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厳重な密閉を行った上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。
- (17) 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、密封された状態で焼却又は高圧蒸気滅菌により不活化処理を行い、廃棄する。

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

現在、本遺伝子組換え生物等を治療経験のある重症血友病 A 成人男性患者に単回静脈内投与する第 I/II 相臨床試験（19429 試験：オープンラベル、シングルアーム、多施設）が米国及び欧州で実施中である。当該試験でウイルス排出を測定するために採取する対象検体、採取時期、検出方法及び感度は II 章の 5 項及び別紙 4 に示すとおりである。

日本で実施する治験においても、上記と同様の方法でウイルス排出を継続的にモニターする。

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

該当しない。

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

本遺伝子組換え生物等の非臨床試験として、第 VIII 因子欠損マウス (B6;129S-F8^{tm1Kaz}/J) 及びカニクイザルを用いた *in vivo* 薬理試験、並びにマウス (C57BL/6N) の単回静脈内投与毒性試験及び生体内分布試験が実施されている。主な試験の概要を以下に示し、各試験の概要を別紙 4 の 1 項に示す。

● *In vivo* 薬理試験

第 VIII 因子欠損マウス (雄 10 例/群) に本遺伝子組換え生物等の $3 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{13}$ GC/kg を単回静脈内投与した結果、肝臓における本遺伝子組換え生物等の DNA 及び hFVIII mRNA レベルは用量依存的に増加し、hFVIII 活性は用量・時間依存的に増加した。最小有効量 (MED) は約 3×10^{11} GC/kg 超と推定された。抗 hFVIII 抗体は、最高用量群においてのみ検出された。

カニクイザル (雄 5 例) に本遺伝子組換え生物等の 1.2×10^{13} GC/kg を単回静脈内投与した結果、hFVIII 発現が投与後 61 週まで持続した。hFVIII 発現の持続時間は、4/5 例で抗 hFVIII 抗体の発生により制限された。1 例では試験期間を通じて抗体は検出されなかった。ヒトと異なり、抗 hFVIII 抗体の検出後の免疫抑制療法開始は、hFVIII 活性の損失を救うことができなかった。

● 単回静脈内投与毒性及び生体内分布試験

C57BL/6N マウス (雄 17 例/群) に本遺伝子組換え生物等の 1×10^{13} 、 3×10^{13} 及び 10×10^{13} GC/kg を単回静脈内投与し、最長 92 日間観察して毒性及び生体内分布を評価した。その結果、死亡は観察されず、臨床検査、体重、摂餌量、臨床病理学検査 (凝固、血液学及び血液生化学)、臓器重量、剖検及び病理組織学的検査においても、投与に関連した所見は観察されなかった。本遺伝子組換え生物等を投与したすべての動物に高力価の抗 AAVhu37 抗体が検出されたが、用量依存的ではなかった。無毒性量は 10×10^{13} GC/kg と推定された。

本遺伝子組換え生物等の DNA は検査したすべての組織に広く分布し、ほぼすべての組織で 4 日目に比べ 92 日目では減少した。いずれの検査時においても、本遺伝子組換え生物等の DNA は肝臓で最高レベルを示し、他の組織と比較して概して肝臓で高い持続性を示した。

6 国外における使用等により得られた情報

申請時において、本遺伝子組換え生物等を治療経験のある重症血友病 A 成人男性患者に単回静脈内投与する第 I/II 相臨床試験 (19429 試験 : オープンラベル、シングルアーム、

多施設) が米国及び欧州で実施中である。

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

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は野生型 AAV の感染宿主域とおおむね同じであると考えられ、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野生型 AAV の感染宿主域とおおむね同じであると考えられ、霊長類、イヌ、ウシ、ウマ等の哺乳類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

野生型 AAV に病原性は認められておらず、本遺伝子組換え生物等も同様に病原性を有さないと考えられる。本遺伝子組換え生物等の非臨床試験の実績から、本遺伝子組換え生物等に病原性について認められていない。

供与核酸由来タンパク質の病原性については、3 有害物質の産生性に示すとおり。

(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、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の感染宿主域は野生型 AAV の感染宿主域とおおむね同じであると考えられ、霊長類、イヌ、ウシ、ウマ等の哺乳類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が、肝臓特異的に感染し、感染細胞内で新たに FVIII が産生される可能性がある。ヒト血液凝固第 VIII 因子の薬理作用は血液凝固であることから、ヒト体内において過剰に産生された場合には有害作用を示す可能性が考えられる。

(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野生型 AAV の感染宿主域とおおむね同じであると考えられ、霊長類、イヌ、ウシ、ウマ等の哺乳類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が野生型 AAV 及びヘルパーウイルスと共感染した場合には、感染性の本遺伝子組換え生物等が複製され、非管理下で排泄等を介して第三者や野生動物に水平感染する可能性は否定できないが、水平感染した場合でも、下記 (3) に示すよう

に、本遺伝子組換え生物等の核酸が水平伝達される可能性は低い。核酸が水平伝達された場合には、FVIII がその細胞で発現する可能性があり、3 (2) で示したような有害作用を示す可能性が考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

感染性を有する本遺伝子組換え生物等が複製されるのは、野生型 AAV 及びヘルパーウイルスが共感染した場合に限られ、極めて限定的な条件下でのみである。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が環境中へ拡散する可能性は低く、本遺伝子組換え生物等が水平感染を生ずる可能性は低い。

また、野生型 AAV は感染細胞の染色体に特異的に組込まれることが知られているが、本遺伝子組換え生物等は、ヒト染色体への特異的組込みに必要な *rep* 遺伝子を失っているため、水平感染したとしても核酸が感染細胞に水平伝達される可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

核酸を水平伝達する性質について、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

本遺伝子組換え生物等の雄性マウスを用いた生体内分布試験(別紙4 表1)において、ベクターゲノム DNA は精巣を含む検査したすべての組織に広く分布することから、本遺伝子組換え生物等が生殖系細胞のゲノム中に組込まれて、核酸を垂直伝播する可能性は完全には否定できない。しかしながら、4 (3) に示したように、本遺伝子組換え生物等が野生動物等に感染したとしても、本遺伝子組換え生物等が複製されるのは極めて限定的な条件下でのみであることに加え、特異的組込みに必要な *rep* 遺伝子を失っており染色体には組込まれ難いこと、本遺伝子組換え生物等の生体内分布試験において、精巣中のベクターゲノム DNA 濃度は投与後3 ヶ月で約20分の1まで経時的に減少していること、本遺伝子組換え生物等に用いている AAV ベクターと同じクレードに属する AAV8 をベクターとしている類薬のウサギ及びマウスでの非臨床試験において、核酸の雌雄生殖細胞を介した伝達の可能性は低いことが報告されていること(文献34、37)、並びに AAV8 をベクターとする類似製品の臨床試験結果においても、精液におけるベクターDNA 濃度は経時的に減少し、検出限界以下まで低下することが確認されていること(文献19) から、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が垂直伝播する可能性は極めて低いと考えられる。

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類であり、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、第三者や哺乳類に核酸を水平伝達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。

<参考文献>

- 文献 1 : Samulski RJ and Muzyczka N, *Annu Rev Virol.* 2014;1: 427-51
- 文献 2 : Gao, G, et al. *J Virol.* 2004;78.12: 6381-8
- 文献 3 : Tenenbaum L, et al. *Curr Gene Ther.* 2003: 3: 545-65
- 文献 4 : 村松慎一, アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの開発と血友病 B 遺伝子治療への応用, *血栓止血誌.* 1998: 9:13-20
- 文献 5 : Zincarelli C, et al. *Mol Ther.* 2008;16:1073-80
- 文献 6 : Wang L, et al. *Mol Ther.* 2010;18:118-25
- 文献 7 : Gao GP, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:11854-9
- 文献 8 : Wang L, et al. *Mol Ther.* 2015;23:1877-87
- 文献 9 : Wang L, et al. *Mol Ther.* 2010;18:126-34
- 文献 10 : Vandenberghe LH, et al. *Gene Ther.* 2009;16:1416-28
- 文献 11 : Nakai H, et al. *J Virol.* 2001;75:6969-76
- 文献 12 : Gao G, et al. *Curr Gene Ther.* 2005;5:285-97
- 文献 13 : Mount JD, et al. *Blood.* 2002;99:2670-6
- 文献 14 : Snyder RO, et al. *Nat Med.* 1999;5:64-70
- 文献 15 : Nichols TC, et al. *Haemophilia.* 2010;16 Suppl 3:19-23
- 文献 16 : Manno CS, et al. *Blood.* 2003;101:2963-72
- 文献 17 : Manno CS, et al. *Nat Med.* 2006;12:342-7
- 文献 18 : Nathwani AC, et al. *N Engl J Med.* 2011;365:2357-65
- 文献 19 : Nathwani AC, et al. *N Engl J Med.* 2014;371:1994-2004
- 文献 20 : Davidoff AM, et al. *Mol Ther.* 2005;11:875-88
- 文献 21 : Jiang H, et al. *Blood.* 2006;108:3321-8
- 文献 22 : Nathwani AC, et al. *Blood.* 2006;107:2653-61
- 文献 23 : Nathwani AC, et al. *Blood.* 2007;109:1414-21
- 文献 24 : FDA , LUXTURNA
<<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/ucm589507.htm>> (Accessed: 2019 年 3 月 11 日)
- 文献 25 : EMA, Glybera <<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>> (Accessed: 2019 年 3 月 11 日)
- 文献 26 : Wu Z, et al. *Mol Ther.* 2006;14:316-27
- 文献 27 : 中井浩之、*Drug Delivery System* 2009:24-6
- 文献 28 : Naso MF, et al. *BioDrugs.* 2017;31:317-34
- 文献 29 : Howard HD and Harvey BK, *Hum Gene Ther.* 2016;28:39-48
- 文献 30 : Baldo A, et al. *Curr Gene Ther.* 2013: 13: 385-94
- 文献 31 : Zinn E and Vandenberghe LH, *Curr Opin Virol.* 2014: 90-7
- 文献 32 : Samulski RJ, et al. *The EMBO Journal.* 1991;10:3941-50
- 文献 33 : Surosky RT, et al. *J Virol.* 1997;71:7951-9
- 文献 34 : Favaro P, et al. *Mol Ther.* 2009;17:1022-30
- 文献 35 : University of California Berkeley, Office of Environment, Health & Safety BIOSAFETY MANUAL
<<https://ehs.berkeley.edu/sites/default/files/lines-of-services/biosafety/BiosafetyManual.pdf>> (Accessed: 2019 年 9 月 25 日)
- 文献 36 : 廃棄物処理法に基づく感染性廃棄物処理マニュアル, H30.3, 環境省
- 文献 37 : FerLa R, *Mol Ther: Methods Clin Development* 2017;6:144-54