

様式第1（第7条関係）

第一種使用規程承認申請書

令和3年2月24日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 コアメッド株式会社
申請者 代表取締役社長 田村 昌美 印
住所 大阪府大阪市中央区北浜二丁目1番21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5型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、ヒト血液凝固第IX因子 Padua 誘導体を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（AAV5-hFIXco-Padua）
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	<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蔵庫又は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、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。</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、漏出させない措置を執って行う。</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。</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) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。患者の排出</p>

	<p>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>患者検体の取扱い</p> <p>(9) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設又は外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。</p> <p>(10) 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。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検体である旨を情報提供して行う。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。</p> <p>(11) 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。</p> <p>感染性廃棄物等の処理</p> <p>(12) 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>(13) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液並びに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> <p>(14) 必要に応じ、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。</p> <p>(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。</p> <p>(16) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び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、本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び患者から採取した検体は漏出しない容</p>

	<p>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。</p> <p>(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、密封された状態で高圧蒸気滅菌等により不活化処理を行い、廃棄する。</p>
--	--

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

AAV5-hFIXco-Padua【以下、「本遺伝子組換え生物等」、(治験製品コード: AMT-061)】の宿主は、アデノ随伴ウイルス（以下、「AAV」）である。

(1) 分類学

群：第2群（一本鎖DNA）
科：パルボウイルス科
亜科：パルボウイルス亜科
属：ディベンドウイルス属
種：アデノ随伴ウイルス（AAV）

本遺伝子組換え生物等はrep及びcapを欠失した組換えAAV（rAAV）である。

(2) 分布

AAVには複数の種類の血清型が存在するが、ヒトで発見された野生型AAVの血清型は靈長類に限定されるとみられる（Arbeterman 2005）。野生型AAV感染は世界中で蔓延しており、ヒトを含む靈長類は一定の割合でAAVに対する中和抗体を保有している。野生型AAV感染は非病原性（無症候性）である。

野生型AAVの複製に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を要する（Berns 2007）。野生型AAVが宿主細胞に感染すると、宿主細胞の核にウイルスゲノムが放出される。しかし、ヘルパーウイルス非存在下では野生型AAVのゲノムは宿主細胞ゲノムに組み込まれて潜伏感染し、増殖しない。詳細は別紙1に記載する。

Arbeterman AE, Lochrie M, Zhou S, Wellman J, Scallan C, Doroudchi MM, et al. Novel caprine adenovirus (AAV) capsid (AAV-Go.1) is closely related to the primate AAV-5 and has unique tropism and neutralization properties. *J Virol.* 2005;79(24):15238-45.

Berns K, Parrish CR. Parvoviridae. In: Fields NF, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.2437-77.

2 使用等の歴史及び現状

rAAVは遺伝子治療に最もよく使用されているウイルスの1つである（Daya 2008）。www.clinicaltrials.govには、150以上のrAAVを用いた遺伝子治療の臨床試験が登録されている。

これまでに13種類のAAV血清型が発見されており (Mietzsch 2014) 、標的組織によって各種血清型は特定の細胞へ様々な程度の指向性を示す (Daya 2008)。rAAVによる遺伝子治療技術は、良好なリスク・ベネフィットプロファイルを確立しうる疾患領域では有用な治療法である。このことは、2012年に欧州で承認された家族性リポ蛋白リバーゼ欠損症 (LPLD) 治療用の筋注rAAV1である alipogene tiparvovec (Glybera®) 、2017年に米国で、2018年に欧州で承認された遺伝性網膜ジストロフィー治療用の網膜下注射rAAV2である voretigene neparvovec-rzyl (Luxturna™) 並びに2019年に米国で、2020年に日本及び欧州で承認された脊髄性筋萎縮症治療用の静注rAAV9であるオナセムノゲンアベバルボベク (ゾルゲンスマ®) により認められている。

AAV5に由来するキャプシドタンパク質及びAAV2に由来する末端逆行反復配列 (ITR) を有する遺伝子組換え生物等については、複数の臨床試験が実施されている。

Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):583-93.

Mietzsch M, Broecker F, Reinhardt A, Seeberger PH, Heilbronn R. Differential adeno-associated virus serotype-specific interaction patterns with synthetic heparins and other glycans. J Virol. 2014;88(5):2991-3003.

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

野生型AAVは、小さく（直径約25 nm）、エンベロープのない、正二十面体の非病原性パルボウイルスである。野生型AAVは受容体介在性プロセスにより細胞に感染し、その後ウイルスDNAが核に輸送される。野生型AAVの複製には、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスを要する。ヘルパーウイルス非存在下では、二本鎖DNAのエピソームとして、又は宿主染色体に組み込まれて潜伏感染する。

野生型AAVは、約4.7 kbの線状一本鎖DNAゲノムを有する。ゲノムは、複製とパッケージングに必要なレプリカーゼ (Rep ; Rep78、Rep68、Rep52及びRep40) をコードするレプリカーゼ遺伝子 (rep) と、キャプシドタンパク質 (VP1、VP2及びVP3) をコードするキャプシド遺伝子 (cap) の2つの遺伝子で構成される。これらの要素には、ゲノムの複製及びパッケージング中にRepの基質として機能する2つのITRが隣接している。ゲノムは、プラス鎖又はマイナス鎖で構成される。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトで発見されたAAV血清型は壺長類に限定されるとみられる (Arbeterman 2005)。野生型AAVは、非常に安定したキャプシドを有する小さなノンエンベロープウイルスである。

野生型AAVの増殖はヘルパーウイルスと同時感染した場合や野生型AAVが潜伏感染した細胞にヘルパーウイルスが重複感染した場合に起こりうる。

(3) 捕食性又は寄生性

該当なし

(4) 繁殖又は増殖の様式

野生型AAVは、呼吸器又は消化器を介して感染する可能性が高い (Berns 2007)。野生型AAV 感染は世界中で蔓延している。野生型AAVの複製に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を要する。活動性のヘルパーウイルス存在下では、新たに形成された野生型 AAV粒子がヘルパーウイルスと共に拡散しうる。したがって、野生型AAVの拡散は、ヘルパーウイルスが存在するか否か、またそのヘルパーウイルスが同一コンパートメント内（活動性感染部位）に存在するか否かによって異なる (Berns 2007)。ヘルパーウイルス非存在下では宿主細胞の第19番染色体 (19q13.4) に組み込まれることにより潜伏感染状態となる (Samulski 1991、 Berns 2020)。一方で、rAAVは*rep*を欠失しているため宿主細胞染色体への部位特異的な組込みは発生せず、rAAVゲノムのほとんどは染色体に組み込まれずに宿主細胞の核内にエピソームとして存在する (Daya 2008)。一般的に、rAAVは非病原性であり、複製しない。

(5) 病原性

野生型AAVの感染は無症候性であり、野生型AAVが病原性を示すことは知られていない (Berns 2007)。

(6) 有害物質の產生性

感染細胞で產生される宿主ウイルスゲノムに由来するタンパク質の有害性は知られていない。

(7) その他の情報（不活化条件等を含む）

（遺伝子組換え）AAVは、熱、紫外線、極限pH及び塩素への曝露により不活化する。
使い捨てではない器具／装置は、使用後、殺ウイルス作用のある消毒剤【0.1%の有効塩素（1000 ppm）を含む次亜塩素酸塩等】で洗浄し、可能な場合はオートクレーブ処理を行う。接触面は同様の消毒剤で消毒する。

詳細は別紙1に記載する。

Arbetman AE, Lochrie M, Zhou S, Wellman J, Scallan C, Doroudchi MM, et al. Novel caprine adeno-associated virus (AAV) capsid (AAV-Go.1) is closely related to the primate AAV-5 and has unique tropism and neutralization properties. *J Virol.* 2005;79(24):15238-45.

Berns K, Parrish CR. Parvoviridae. In: Fields NF, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.2437-77.

Berns KI. The unusual properties of the AAV inverted terminal repeat. *Hum Gene Ther.* 2020;31:518-23.

Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):583-93.

Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. EMBO J. 1991;10:3941-50.

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(AMT-061)は、ヒト血液凝固第IX因子のPadua変異体(hFIX-Padua)のコドン最適化したコード配列(hFIXco-Padua)を導入した、遺伝子組換え5型アデノ随伴ウイルス(rAAV5)を基にしている。本遺伝子組換え生物等のゲノムでは、野生型AAVにおけるウイルス遺伝子であるrep及びcap配列をhFIXco-Padua発現カセットに置換している。

本遺伝子組換え生物等のゲノムは、hFIXco-Padua発現カセット及びその両側の野生型AAV2のウイルス遺伝子由来のITRからなり(Samulski 1987)、rAAV5のキャップシドに内包される。

hFIXco-Padua発現カセットは、LP1プロモーター、SV40イントロン、コドン最適化したhFIXco-Paduaコード配列、SV40ポリアデニル化シグナル及びプラスミド構築時に移入された複数の人工配列(Cloning/joining sites)からなる。

本遺伝子組換え生物等のゲノムのDNA配列を別紙2の図1に示す。また、本遺伝子組換え生物等のゲノムの各要素の配置について別紙2の表1に示す。

各要素の由来について以下に述べる。

- hFIXco-Paduaコード配列(hFIXco-Padua)

hFIXco-Paduaコード配列は、hFIX cDNAに対しコドン最適化及び部位特異的変異を導入することで得た。

- LP1プロモーター

LP1エンハンサー/プロモーターはヒトアポリポ蛋白肝細胞調節領域(hepatic control region)及びヒト α 1-アンチトリプシンプロモーターの連続したセグメントからなる。

- SV40イントロン

シミアンウイルス40に由来する。

- SV40ポリアデニル化シグナル

シミアンウイルス40に由来する。

- Cloning/joining sites(制限酵素切断部位)に由来する人工配列

プラスミド構築時に移入された人工配列である。

- ITR

AAVゲノムの5'及び3'末端領域はITRとして知られている。野生型AAV2のウイルスゲノムからクローニングして得られた。

(2) 構成要素の機能

hFIXco-Padua発現カセットの要素の一つであるhFIXco-Paduaコード配列、LP1プロモーター、SV40イントロン、SV40ポリアデニル化シグナル及びCloning/joining sites（制限酵素切断部位）に由来する人工配列並びにITRの機能について以下に述べる。

- hFIXco-Paduaコード配列 (hFIXco-Padua)

この配列は、ヒト血液凝固第IX因子 (hFIX) の天然の機能獲得型変異体であるhFIX-Paduaタンパク質をコードする。hFIX-Paduaタンパク質は野生型のhFIXタンパク質と1残基のアミノ酸が異なっており、成熟タンパク質における388番目のアルギニンがロイシンに置換されている。

翻訳後のhFIX-Paduaタンパク質は461個のアミノ酸残基からなる（別紙2の図2）。Padua変異は、翻訳後の全長タンパク質において384番目のアミノ酸に存在する（アルギニン→ロイシン）。分泌過程で46アミノ酸残基のリーダー配列が切除され、その結果、338番目のアミノ酸にPadua変異を有する415アミノ酸残基の成熟hFIX-Paduaタンパク質が生成する。

- LP1プロモーター

LP1エンハンサー／プロモーターにより、治療用導入遺伝子の肝特異的で安定した発現が得られる。

- SV40イントロン

遺伝子発現を増大させるため、LP1エンハンサー／プロモーターの下流に改変したSV40 small T抗原イントロンが位置している。

- SV40ポリアデニル化シグナル

SV40ポリアデニル化配列はmRNAの安定化に寄与する。

- Cloning/joining sites（制限酵素切断部位）に由来する人工配列

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等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。

- ITR

ITRは、本遺伝子組換え生物等の製造において、粒子中にウイルスゲノムをパッケージするために必要である。また、標的細胞への導入の後、ウイルスゲノムの安定化にITRが必要となる。ITRは、宿主のポリメラーゼによる一重鎖DNA（不安定）から二重鎖DNA（安定）の形成の起点となる。また、ITRは繰り返し構造であるため複数のウイルスゲノムのITRとITRが複合化し、コンカテマーとして知られるより大きな二重鎖DNAを形成する。このコンカテマーは転写活性を保持しており、持続的に安定なエピソーム構造を有する（Schnepp 2005）。なお、ITRはタンパク質を発現するオープンリーディングフレームを有していない。

Schnepp 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.

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のゲノム及び発現されるhFIX-Paduaタンパク質の構造を別紙2の図3に示す。本遺伝子組換え生物等のゲノムはhFIXco-Padua発現カセット及びその両側の野生型AAV2のウイルスゲノム由来のITRからなる。hFIXco-Padua発現カセットは、LP1プロモーター、SV40イントロン、コドン最適化したhFIXco-Paduaコード配列、SV40ポリアデニル化シグナル及びCloning/joining sites（制限酵素切断部位）に由来する人工配列からなる。

(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製造には、昆虫由来細胞（*expressSF+*）及び遺伝子組換えバキュロウイルス発現ベクターシステム（BEVS）を使用する。*expressSF+*細胞株の起源は、ツマジロクサヨトウ（*Spodoptera frugiperda*）のサナギ卵巣由来のSf9細胞である。BEVSは3種の異なる遺伝子組換えバキュロウイルスからなり、これらによって*expressSF+*細胞株に原薬製造に必要な構成要素を導入する。3種の異なるバキュロウイルスについて以下に示す。

- : hFIXco-Padua発現カセット及びその両側にAAV2由来のITRを有する。
hFIXco-Paduaコード配列の作製は、hFIX cDNAを基に2段階で行った。まず、hFIX cDNAをコドン最適化することでhFIXco配列を得た。コドン最適化は、タンパク質発現を高めるため、過去に報告されたアルゴリズム（Haas 1996）に従い、野生型のhFIX配列においてヒトで高発現している遺伝子ではあまり見られないコドンを、真核生物で高発現している遺伝子で頻繁に見られる同義コドンに置換することで行った。最適化した配列は、複数のオリゴヌクレオチドを合成し、これらをライゲーションすることで構築した。このコドン最適化の方法によるタンパク質のアミノ酸配列への影響はない。したがって、コドン最適化されたメッセンジャーRNA（mRNA）から翻訳されるタンパク質は天然型のタンパク質と同じである。
次いで、hFIXcoコード配列に部位特異的変異を導入し、タンパク質に翻訳された際にアミノ酸1残基がアルギニン（AGG）からロイシン（CTG）に置き換わるよう、2つのヌクレオチドを置換することでhFIXco-Paduaコード配列を得た。
- : DNA複製及びhFIXco-Padua発現カセットをキャップシド中に内包させるために必須であるAAV2 Repの発現カセットを有する。*rep*発現カセットは、*rep78*及び*rep52*の2つの遺伝子からなる。*rep78*は*Orgyia pseudotsugata*核多角体病ウイルスのimmediate early 1遺

伝子の部分欠損 (Δ IIE1) プロモーターの制御下にあり、*rep52*は*Autographa californica*核多角体病ウイルスのpolyhedrin (polh) プロモーターにより発現される (Lubelski 2014)。これらのプロモーターはバキュロウイルス由来であり、昆虫由来の宿主細胞で適切に発現する。

■には、DNA不純物の低減及びrAAVの全粒子数に対する完全な粒子数の比の改善のため、*rep78*及び*rep52*の重複する配列をそれぞれ別のプロモーターで発現させ、また*rep52*の配列をコドン最適化する改良を施している。バキュロウイルスベクターの*rep*発現カセットでは2つの*rep*発現ユニットを互いに逆向きにクローニングし、大きな逆向きの繰り返し構造を形成している。このような繰り返し構造による*rep78*及び*rep52*間の相同組換えにより*rep*発現カセットが徐々に損なわれ、経時的な遺伝子の不安定化が引き起こされることを防ぐため、*rep52*に対しコドン最適化を実施した。

- : AAV5キャプシドの生成に必須である、AAV5由来の*cap*発現カセット (AAV5のキャプシドタンパク質であるVP1、VP2及びVP3をコードする) を有する。

AAVは哺乳類のウイルスであり、昆虫細胞中では感染せず、また複製もしない。このため、3種のキャプシドタンパク質について昆虫細胞での適正な発現を担保するため、*cap*遺伝子の構成にいくつかの改変が必要であった。VP1の開始コドン (ATG) を別の開始コドン (ACG) に置換し、これに続いてアラニンをコードするコドン (GCT) を追加した。これらの改変により、キャプシドタンパク質の発現比は野生型のAAV5に近いものとなっている。

各遺伝子組換えバキュロウイルスの作製方法を別紙3に示す。

BEVSは、安全性に関して優れた特性がある。1つ目に、バキュロウイルスは昆虫に特異的なウイルスであり、脊椎動物中では複製することができない (Airenne 2013)。2つ目に、AAVとは異なり大きなエンベロープウイルスであり、rAAVの作製中に界面活性剤での不活化及びナノ過によって容易に除去される。

rAAV用のBEVSは、Rep、Cap及びrAAVゲノムの3つの必要要素を別々に供給することにより機能性のあるAAVを製造できる、という事実に基づいて設計されている。すなわち、Rep及びCapが別途供給されるのであれば、rAAVゲノムにはこれらのタンパク質をコードする配列を組み込む必要がない。実際には、これらの配列はそれぞれ別のバキュロウイルスベクターによって供給される。よって、rAAVゲノムは、目的の治療タンパク質をコードする導入遺伝子の発現カセット以外をほとんど含めずに設計することができる。このようなrAAVゲノムの設計により、rAAVは*rep*及び*cap*を持たないため、ヘルペウイルスの存在下であっても完全に複製不能である。製造に用いる昆虫由来の宿主細胞内でAAVゲノムの存在下においてRep及びCapを発現させることにより、①RepによるAAVゲノムの複製、②Capによるキャプシド粒子の形成、及び③RepによるrAAVゲノムDNAのキャプシド粒子への封入が起き、本遺伝子組換え生物等が生成する。

残留感染性バキュロウイルスについては、原薬の規格試験で検出限界以下であることを確認する。したがって、最終製品でも検出限界において感染性バキュロウイルスは検出されない。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- セルバンクの構築：*expressSF+*細胞株を拡大培養して、2段階のセルバンクシステム（マスター・セルバンク及びワーキングセルバンク）を作製した。⁴ 親細胞であるSf9細胞株を無血清培地に移行し、得られた細胞株が*expressSF+*である。
- ウイルスバンクの構築：無血清培地を用いて振とうフラスコ中で*expressSF+*細胞を拡大培養した。細胞に3種の異なるバキュロウイルスをそれぞれ感染させ、ウイルス増殖の後、バキュロウイルスを回収し、■■■、■■■及び■■■のマスターシードウイルスを得た。続いてワーキングシードウイルスを得るために、マスターシードウイルスからそれぞれのバキュロウイルスを細胞に接種した。ウイルス増殖後、培養液を回収しワーキングシードウイルスを得た。
- AMT-061原薬の製造：製造は、*expressSF+*細胞の拡大培養から開始する。別途、ワーキングシードウイルスの各バキュロウイルスを*expressSF+*細胞を用いて増殖し、十分な量のバキュロウイルスを得る。振とうバイオリアクター内で、原薬を構築するために*expressSF+*細胞に3つのバキュロウイルスを共感染させる。感染期間の終了後、細胞を溶解する。これを精製した後、最終処方化及びろ過を行い、原薬バルクを得る。
- AMT-061製剤の製造：製剤の製造は、解凍、希釀／無菌ろ過、充填、目視検査／表示及び保存工程からなる。

セルバンク及びウイルスバンクの構築並びに原薬及び製剤の製造方法についての詳細を別紙3に示す。

また、セルバンク、ウイルスバンク、原薬及び製剤の製造及び保管施設についても別紙3に示す。

潜在的な自己増殖可能なAAV (rcAAV) 生成についての考察

理論的には、本遺伝子組換え生物等にはヘルパー・ウイルス依存性のrcAAVが混入する可能性がある。rcAAVは、本遺伝子組換え生物等の製造時に使用するバキュロウイルスベクター中に存在するAAVの要素間の相同又は非相同組換えによって生成する。rcAAVを生成する配列へと再構築されるためには、以下の現象が起きる必要がある。

- 3つ（又は2つ）の異なる遺伝子要素間の非相同組換え（*rep*、*cap*及びITRカセット間には相同組換えを可能とするような十分な配列類似性はない）。
- AAVキャップシドへの*rep*、*cap*及びITRの内包。これは、AAVキャップシドの最大容量（4.7 kbp）を上回ると考えられる。
- cap*オペロンからのスプライシングシグナルの脱離。天然のスプライシングを復元させるためには、特異的な復帰変異が必要と考えられる。

- ・ 哺乳類の宿主でのバキュロウイルスプロモーターの活性は限られているため、哺乳類で活性のあるプロモーターに置き換わることが必要と考えられる。
- ・ 翻訳開始コドンが、強力な天然の開始コドンであるATGに戻る必要があると考えられる。

要約すると、哺乳類の細胞でCap及びRepが適正な比率で発現され、rAAVが構築される（すなわち、rcAAVが生成する）ためには、*cap*及び*rep*オペロンに哺乳類の細胞に適したプロモーターが導入され、これらについて哺乳類におけるスプライシングシグナルが復元し、また*cap*及び*rep*の開始コドンがATGに戻る必要がある。これらの変化が同時に起きる可能性は非常に低いと考えられる。したがって、例え*cap*及び*rep*の遺伝情報が1つの構築物中に再結合されたとしても、ヒトでrcAAVが生成するとは考えられない。

潜在的なrcAAV生成についてのより詳細な情報を別紙8に示す。

Airenne KJ, Hu YC, Kost TA, Smith RH, Kotin RM, Ono C, et al. Baculovirus: an insect-derived vector for diverse gene transfer applications. Mol Ther. 2013;21(4):739-49.

Haas J, Park EC, Seed B. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. Curr Biol. 1996;6(3):315-24.

Lubelski J, Hermens W, Petry H. Insect Cell-based Recombinant AAV Production: Molecular Process Optimization. BioProcess J. 2014;13(3):6-11.

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

rAAVである本遺伝子組換え生物等に移入された発現カセットは、AAVゲノムの一部として存在し、保管中は安定である。3年間の安定性試験において、生物活性（力価及び感染性）の低下は見られていないことから、本遺伝子組換え生物等のゲノムは安定であると推定できる。

概して、投与後、rAVVIは宿主細胞ゲノムへ組み込まれず、ほとんどがエピソームとして導入細胞の核内に存在している。本遺伝子組換え生物等の先行品であるAMT-060【FIX発現カセットのうちhFIX-Paduaのコード配列を野生型hFIXのコード配列に置換しているが、それ以外は本遺伝子組換え生物等と同一】を投与したマウス及びカニクイザルの肝組織を用いた宿主細胞ゲノムへの挿入部位解析において、AMT-060はエピソーム（コンカテマー）型及び組込み型の両形態で存在したが、そのほとんどは組み込まれていないエピソーム型であった。カニクイザルに本遺伝子組換え生物等を静脈内投与後、肝臓に特異的なhFIX mRNAの発現が認められ、血漿中hFIXタンパク質の明らかな上昇が少なくとも26週間安定して認められた。AMT-060を用いた第I/II相臨床試験において、AMT-060を投与した被験者10例での導入遺伝子発現を評価している。これまでに、10例の被験者全員に2つの用量コホート【 5×10^{12} gc/kg (n=5)、 2×10^{13} gc/kg (n=5)】のいずれかでAMT-060を単回静脈内投与した。低用量コホートの被験者では投与4年後までのデータが、高用量コホートの被験者では投与3.5年後までのデータが得られている。結果はIII- 6項に示す。

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

(1) 非臨床試験

定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）法により、マウス及びカニクイザルの組織中及び体液中の本遺伝子組換え生物等及びAMT-060のDNAの検出及び定量を行った。これらのqPCR法は、安全性試験での測定のために、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）に準拠してバリデートした。qPCR法に用いたプライマー及びプローブの標的領域は、hFIXco配列の3'末端及び導入遺伝子発現カセットの3'UTR/SV40-LpA領域の接合部であり、本遺伝子組換え生物等及びAMT-060に共通の部分である。詳細は別紙4に記載する。

(2) 臨床試験

バリデートしたqPCR法を用いて血液等の本遺伝子組換え生物等のDNAを検出する。臨床試験で用いるqPCR法では非臨床試験と同じプライマープローブセットを使用する。詳細は別紙4に記載する。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

野生型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hFIXco-Padua遺伝子を有するため、hFIX-Paduaを产生する。
- 本遺伝子組換え生物等は*rep*及び*cap*を欠失しているため、本遺伝子組換え生物等はヘルペスウイルス存在下でも複製することができない。

本遺伝子組換え生物等において野生型AAVの他の機能は保持され、宿主範囲に相違はない。

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蔵庫又は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静脈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) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。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。

患者検体の取扱い

- (9) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設又は外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (10) 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。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検体である旨を情報提供して行う。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (11) 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

- (12) 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。
- (13) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液並びに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。

- (14) 必要に応じ、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。
- (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。
- (16) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び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、本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び患者から採取した検体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。
- (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、密封された状態で高圧蒸気滅菌等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

本邦で実施する治験においては、海外第III相試験（CT-AMT-061-02試験）と同様に血液等への本遺伝子組換え生物等の排出をバリデートされたqPCR法を用いてモニタリングする。（詳細は別紙7参照）

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

生体内分布及び体外排出

非臨床試験での生体内分布及び排出をqPCR法により評価した。カニクイザルに本遺伝子組換え生物等を $5.0 \times 10^{11} \sim 9.0 \times 10^{13}$ gc/kgで単回静脈内投与後の生体内分布及び排出を評価した（NR-061-17-001試験）。最低用量を除いた全ての用量で、低値ではあるが検出可能な血漿中本遺伝子組換え生物等のDNAがweek 26に検出された。尿中本遺伝子組換え生物等のDNAはweek 13には検出されなかった。Week 26で本遺伝子組換え生物等のDNA量が最も高かったのは肝臓及び副腎で、その他の標的組織以外の組織中では肝臓の約1/10～1/100であった。カニクイザルにAMT-060を $5.0 \times 10^{11} \sim 9.3 \times 10^{13}$ gc/kgで単回静脈内投与後、複数時点の血清、唾液及び尿を採取した（NR-060-14-010試験）。血清中AMT-060のDNA量はweek 26までに減少した。AMT-060の排出パターンは唾液／尿及び血清で類似していたが、唾液／尿で検出されたAMT-060のDNA量は血清中よりも数桁低かった。血清及び唾液中の大部分のAMT-060のDNAは、それぞれweek 12～26及びweek 8～12に消失した。

尿中AMT-060のDNA量は低く、最高用量でもweek 8付近で検出限界に達した。AMT-060のDNA量は肝臓、副腎及び脾臓で高く、その他の標的組織以外の組織中では肝臓の約1/10～1/100であった。これらの試験から、本遺伝子組換え生物等及びAMT-060の生体内分布、血漿からの消失及び尿からの排出は同様であることが示唆された。

非臨床安全性試験

雄C57BL/6マウスに 5×10^{11} 、 5×10^{12} 及び 5×10^{13} gc/kgの本遺伝子組換え生物等を単回静脈内投与し、安全性を評価した（NR-061-18-002試験、GLP準拠）。観察期間は13週間とした。本試験に毒性所見は認められず、無毒性量（NOAEL）は 5×10^{13} gc/kgであった。

雄カニクリザルに 5×10^{11} 、 5×10^{12} 、 2.5×10^{13} 及び 9×10^{13} gc/kgの本遺伝子組換え生物等を単回静脈内投与し、安全性を評価した（NR-061-17-001試験、GLP準拠）。観察期間は26週間（ 5×10^{11} gc/kg群は13週間）とした。本試験に毒性所見は認められず、NOAELは 9×10^{13} gc/kgであった。

雄C57BL/6マウスに 5×10^{11} 、 5×10^{13} 及び 2.3×10^{14} gc/kgのAMT-060を単回静脈内投与し、安全性を評価した（NR-060-14-002試験、GLP準拠）。観察期間は26週間とした。本試験に毒性所見は認められず、NOAELは 2.3×10^{14} gc/kgであった。

雄カニクリザルに 5×10^{11} 、 5×10^{12} 、 2.5×10^{13} 及び 9.3×10^{13} gc/kgのAMT-060を単回静脈内投与し、安全性を評価した（NR-060-14-010試験、GLP準拠）。観察期間は26週間とした。本試験に毒性所見は認められず、NOAELは 9.3×10^{13} gc/kgであった。

マウス及びカニクリザルにおけるAMT-060の単回静脈内投与毒性試験（NR-060-14-002及びNR-060-14-010試験、GLP準拠）から得られた肝組織を用いて宿主細胞ゲノムへの挿入部位解析を実施した（NR-060-14-007試験、非GLP）。片方向增幅を介するPCR（LAM-PCR）法及びハイスクレーブットシーケンスによりエピソーム（コンカテマー）型及び組込み型のAMT-060のDNAを解析した結果、ほとんどのAMT-060は組み込まれていないエピソーム型として存在することが示された。悪性形質転換又はクローナルドミナンスを示唆する所見は認められなかった。いずれの動物種においても宿主細胞ゲノムへのAMT-060のDNAの挿入が認められたが、挿入部位はランダムに分布し、その挿入頻度は低かった。宿主細胞ゲノムへのAMT-060の挿入部位のプロファイルは特別ながん原性リスクを示さなかった。

雄C57BL/6マウスにAMT-060を 2.3×10^{14} gc/kgの用量で単回静脈内投与し、投与6日後に非投与雌と交配させ、雄性生殖系列移行及び生殖能を評価した（NR-060-14-001試験、GLP準拠）。その結果、AMT-060の次世代への雄性生殖系列移行は確認されず、生殖能に影響はなかった。rAAVは宿主細胞ゲノムへほとんど組み込まれないため、AMT-060の生殖細胞を介した次世代への移行リスクは無視できると考えられ、本試験においてもそれが裏付けられた。

いずれの試験も試験方法及び結果の詳細は別紙5に記載する。

臨床試験

III-6項参照。

6 国外における使用等により得られた情報

海外で実施中のAMT-060を用いた第I/II相臨床試験並びに本遺伝子組換え生物等（AMT-061）を用いた後期第II相臨床試験及び第III相臨床試験の概略を示す。

第III相試験（CT-AMT-060-01試験）

AMT-060を用いたヒト初回投与試験である第I/II相試験（CT-AMT-060-01試験）を実施中である。本試験は中等症又は重症の血友病Bの成人患者における2用量のAMT-060の安全性及び有効性を検討するためにデザインされ、5年間のフォローアップが計画されている。同等量のrAAV5が急性間欠性ポルフィリン症の患者集団に投与されており、本試験の用量設定の参考となった。

安全性評価として、有害事象、AAV5キャプシドに対するT細胞応答（ELISpot）、AAV5に対する中和抗体及び全抗体（IgG及びIgM）並びに抗FIX抗体及びFIXインヒビターを評価した。また、血液、尿、唾液、鼻分泌物、糞便及び精液からのAMT-060のDNAの排出も評価した。AMT-060のDNA排出については、Day 1及びDay 2（精液及び糞便はDay 1のみ）、Week 1～12の各週（精液及び糞便是Week 1、3、6、9及び12のみ）、Week 12～26の隔週、Week 26～156の13週ごと、Week 156～260の26週ごとに検体を採取した。Day 1以降、連続した3回の検査結果が陰性となるまで当該検体の採取は継続した。全検体はqPCRによりAMT-060のDNA量を分析した。

これまでに10例の被験者全員が2つの用量コホート [5×10^{12} gc/kg (n=5)、 2×10^{13} gc/kg (n=5)] のいずれかでAMT-060の単回静脈内投与を受けており、低用量コホートの被験者については投与後4年までのフォローアップデータが、高用量コホートの被験者については投与後3.5年までのフォローアップデータが得られている。

CT-AMT-060-01試験の安全性中間結果の要約を以下に示す。

- (1) AMT-060の単回静脈内投与は、低用量及び高用量コホートのいずれにおいても安全であり良好な忍容性を示した。
- (2) 両コホートにおいてキャプシド特異的T細胞応答はみられなかった。
- (3) 10例中3例の患者（低用量コホート5例中1例、高用量コホート5例中2例）は、軽度で無症候性のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）増加を示し、コルチコステロイドの漸減投与による治療を受けた。
- (4) ALT増加はキャプシド特異的T細胞応答の活性とは関連せず、内因性FIX活性喪失との関連はなかった。
- (5) 以下のAMT-060と関連性ありと判断された重篤な有害事象が報告された。
 - 1) ALT増加 2件
 - 2) 入院期間の延長に関連した一過性の発熱 1件
- (6) FIXインヒビターを発現した被験者はいなかった。

AMT-060のDNAの排出について、高用量コホート (2×10^{13} gc/kg) ではDay 2及びWeek 1における血液中のAMT-060のDNA量はそれぞれ $1.4 \times 10^9 \sim 9.7 \times 10^9$ gc/mL及び $2.5 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^8$ gc/mLの範囲であったのに対し、その他の体液／排泄物では血液と比較してピーク時のAMT-060のDNA量が約2～5オーダー低い値を示した。消失までの期間は血液で484～1111日の範囲であったのに対し、その他

の体液／排泄物では49～282日の範囲であり、より早期に消失した。（詳細は別紙6参照）

後期第II相臨床試験（CT-AMT-061-01試験）

後期第II相臨床試験（CT-AMT-061-01試験）では、本遺伝子組換え生物等（AMT-061）が3例に投与された。本試験は、中等症又は重症の血友病Bの成人患者を対象に 2×10^{13} gc/kgの本遺伝子組換え生物等を投与したときのFIX活性並びにその他の有効性及び安全性パラメータを評価するために計画した。これらの3例について52週までのフォローアップデータが得られている。

CT-AMT-061-01試験の安全性中間結果の要約を以下に示す。

- (1) 52週間のデータから、本遺伝子組換え生物等（ 2×10^{13} gc/kg）は安全で良好な忍容性を示した。
- (2) 投与後44週までにキャプシド特異的T細胞応答（疑い含む）はみられなかつたが、1例からWeek 48の時点で孤発の陽性反応が1件報告された。
- (3) 本遺伝子組換え生物等と関連性ありと判断された重篤な有害事象は報告されていない。
- (4) FIXインヒビターを発現した被験者はいなかつた。

本遺伝子組換え生物等のDNA排出について、血液及び精液の検査を実施した。いずれかの被験者が最初に本遺伝子組換え生物等のDNA排出が陰性となった週は、血液でWeek 31、精液ではWeek 26であった。

第III相臨床試験（CT-AMT-061-02試験）

主要第III相臨床試験（CT-AMT-061-02試験：HOPE-B試験）は、血友病B患者を対象とした本遺伝子組換え生物等（AMT-061）の国際共同、単回投与、非盲検試験である。スクリーニング期及び導入期の完了後、被験者は本遺伝子組換え生物等（ 2×10^{13} gc/kg）の単回投与を受け、有効性と安全性を評価するために1年間のフォローアップを受ける（52週間の投与後フォローアップ期）。投与後フォローアップ期の後、被験者はさらに4年間の長期フォローアップ期に入り、治験を継続する。本試験は全症例（54例）の組入れ及び投与が完了している。

本試験では、被験者1例に、投与後約1年時点に行った腹部超音波検査で肝病変が認められ、組織病理学的評価から肝細胞癌と診断された。当該被験者はC型肝炎（完治済み）及びB型肝炎の既往、年齢50歳超、飲酒、脂肪肝、癌の家族歴を含む肝細胞癌のリスク因子を複数有していた。本事象の第一報に基づき、米国では本試験が保留（clinical hold）された。外部の研究機関において病変部及び隣接組織の分子解析及び挿入部位解析が実施され、外部専門家によるレビューを受けた。これらの結果に基づき、本遺伝子組換え生物等の投与と肝細胞癌の発現はおそらく関連がないと結論された。2021年4月に当該clinical holdが解除された（詳細は別紙6参照）。

臨床試験では、あらゆる臓器における生体内分布の評価は、生検の必要性が生じることから試験デザインに含まれていない。しかし、生体内分布は、血漿、精液、唾液、鼻分泌物、尿などの体液及び糞便中のrAAVのDNAの有無を検査することにより頻繁に研究されている。

血友病BにおけるAMT-060又は本遺伝子組換え生物等（AMT-061）に関するこれまでの臨床結果

は、rAAV5の投与後に尿、唾液、糞便、鼻分泌物、精液及び血液に排出される（qPCRで検出される）ことを示している。これらの体液検体を用いた感染性試験は実施していない。ただし、rAAV2を用いたヒト以外の霊長類（NHP）の研究から、投与直後（2～3日間）の血液で感染性のrAAVが認められることを除き、体液中のrAAVは感染性がないことが報告されていることから（Favre 2001）、本遺伝子組換え生物等でも同様の感染性プロファイルであると類推される。したがって、当該第一種使用規程に従った使用において感染性rAAVが移行及び拡散する可能性は非常に低いと考えられる。（詳細は別紙6参照）

Favre D, Provost N, Blouin V, Blancho G, Chérel Y, Salvetti A, et al. Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. Mol Ther. 2001;4(6):559-66.

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AAV5と同一であり、AAV5が他の微生物に感染するという報告はない。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) 影響の具体的な内容の評価

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

影響を受ける可能性のある微生物は特定されず、微生物に関して生物多様性に関する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AAV5と同一であり、影響を受ける可能性のある動植物は、ヒト及びNHPと考えられる。

(2) 影響の具体的な内容の評価

本遺伝子組換え生物等の宿主である野生型AAVは非病原性と考えられている。野生型AAVによる感染は無症候性であり、AAVが明らかな病態を引き起こすことは知られていない（Berns 2007）。野生型AAVと本遺伝子組換え生物等の構造及びそれに基づく感染の可能性が変わらな

いことを考慮すると、両者の安全性プロファイルは類似していると想定される。また、本遺伝子組換え生物等の作製に使用されるバキュロウイルスもヒトに対する有害性はない (Berns 2007)。

本遺伝子組換え生物等は、野生型AAV2又はAAV5に存在する*rep*及び*cap*を欠失している。これら2つの遺伝子の欠失により、本遺伝子組換え生物等には複製能力がない。このため、ヘルパーウイルス存在下でも本遺伝子組換え生物等は複製されず、キャプシドも形成されない。このように、本遺伝子組換え生物等感染後に野生型AAV感染に関連する2つのプロセス（すなわち、複製及びキャプシド形成）は発生しない。したがって、本遺伝子組換え生物等の安全性プロファイルは、厳密には野生型AAVよりも理論的に優れている。

(3) 影響の生じやすさの評価

拡散した本遺伝子組換え生物等の複製は、同一細胞に本遺伝子組換え生物等とヘルパーウイルス及び野生型AAVが同時感染するという仮定的状況でのみ起こりうる。この状況が発生することは考えにくく、起きたとしても野生型AAVゲノム又は本遺伝子組換え生物等のいずれかの複製及びパッケージングと考えられる。仮定的な最悪のシナリオは、ヒト又は環境が*rep*及び*cap*未欠失の遺伝子組換え生物等に曝露されることである。

感染細胞で発現した供与核酸由来タンパク質の病原性についてはIV-3項を参照のこと。

(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に従って使用等を行うかぎり、病原性に起因した生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

Berns K, Parrish CR. Parvoviridae. In: Fields NF, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.2437-77.

3 有害物質の產生性

(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AAV5と同一であり、影響を受ける可能性のある動植物は、ヒト及びNHPと考えられる。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等由来のDNAが肝細胞の核に導入されると、導入遺伝子は転写及び翻訳され、hFIXタンパク質が肝細胞により産生される。肝臓はFIXタンパク質が通常産生される臓器であり、導入遺伝子は自然環境で発現する。したがって、本遺伝子組換え生物等を介したFIX発現に対する局所反応は生じないと考えられる。本遺伝子組換え生物等由来のFIXタンパク質は、本遺伝子組換え生物等による遺伝子治療の対象患者が補充療法として投与されているヒトタンパク質であるため、このFIXタンパク質に対する免疫応答は起こらないと考えられる。hFIX-Padua

コード配列は、正常なタンパク質機能を持つ野生型hFIXコード配列と類似しているが、hFIX-Paduaの生物的活性は野生型hFIXよりも5～10倍高い（Simioni 2009、Spronck 2019）。

本遺伝子組換え生物等の意図する目的は、血友病B患者の肝細胞に天然のhFIXをコードする遺伝子を導入することである。意図する曝露による影響は、(1) 正常なhFIXの発現（すなわち、正常な状態）、及び(2) AAV5-hFIXキャプシドタンパク質に対する免疫応答の発現（導入遺伝子に対する免疫応答ではない）の2つである。AAV5キャプシドタンパク質に対する免疫応答は、野生型AAVの自然感染による無症候性の免疫応答と同様に、無症候性であると考えられる。

本遺伝子組換え生物等のヒトへの意図しない曝露は、意図する曝露と同じ2つの影響を及ぼす。ただし、これらの影響が有害な又は顕著な影響をもたらす可能性はほとんどない。

第三者又は患者におけるhFIXの過剰発現はこれまで報告されていないため、過剰発現によりもたらされる結果は不明である。健常人のhFIXレベルは正常基準値（1 IU/mL）の50%～150%の範囲である（Kessler 2006）ため、軽度の過剰発現は正常とみなされる可能性がある。FIXは、遺伝子治療の導入遺伝子として広い治療濃度域を有している。血友病患者では、わずか2%でも治療効果が期待でき、極度の過剰発現が発生した場合のみ血栓症のリスクとなる。

また、野生型AAVの感染と異なり、大量の組換えAAVを全身投与したときには免疫炎症反応による肝障害や血栓性微小血管症を発症した例が報告されているが、投与量の減量や一時的免疫抑制等により発症を抑えることができる事が確認されている（Mingozzi 2013、Muhuri 2021）。

(3) 影響の生じやすさの評価

マウスにおける安全性試験において 2.3×10^{14} gc/kg（第I/II相臨床試験の高用量の10倍以上）のAMT-060を投与後、hFIXタンパク質は（通常ヒトでみられるレベルの）約70倍過剰発現していたが、この過剰発現に関連する有害事象はみられなかった。マウスで発現したhFIXは正常な機能を示し、FIX欠損マウスの凝固不全を回復することが示されたことから、有害事象を認めなかつた理由はhFIXの機能障害又は機能欠如によるものではないと考えられる。これらの非臨床試験結果は、hFIXの過剰発現が必ずしも有害事象と関連しないことを示唆している。

(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に従って使用等を行うかぎり、有害物質の產生性に起因した生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

Kessler CM, Mariani G. Clinical manifestations and therapy of the hemophilias. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2006. p.887-904.

Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. Blood. 2013;122:23-36.

Muhuri M, Maeda Y, Ma H, Ram S, Fitzgerald KA, Tai PW, et al. Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors. *J Clin Invest.* 2021;131(1):e143780.

Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med.* 2009;361(17):1671-5.

Spronck EA, Liu YP, Lubelski J, Ehlert E, Gielen S, Montenegro-Miranda P, et al. Enhanced Factor IX Activity following Administration of AAV5-R338L "Padua" Factor IX versus AAV5 WT Human Factor IX in NHPs. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;15:221-31.

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の感染宿主域はAAV5と同一であり、影響を受ける可能性のある動植物は、ヒト及びNHPと考えられる。

(2) 影響の具体的な評価

野生型AAVの感染宿主は靈長類に限られているため、複製能力を欠損した本遺伝子組換え生物等に環境が曝露されたとしても、有害な影響の可能性は考えられない。また、野生型AAV感染は非病原性で無症候性であるため、感染により悪影響を生じる可能性は小さい。

(3) 影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換え生物等由来のDNAは、血液、尿、唾液、糞便及び精液から排出されることが想定される。体液や排泄物から排出される本遺伝子組換え生物等由来のDNAは感染性ではないと考えられている。

本遺伝子組換え生物等はヘルパーウイルス存在下であっても複製しない。理論的には、rcAAVが本遺伝子組換え生物等の作製中に生成されるが、rcAAVの存在は本遺伝子組換え生物等の品質管理の一環として常時監視されており、これまでにrcAAVは検出されていない（検出限界： $10 \text{ rcAAV} / 2 \times 10^{10} \text{ gc}$ 本遺伝子組換え生物等）。特定のロットでrcAAV濃度が増加した場合でも、このロットはrcAAVの許容基準を満たさないため、患者に投与されることはない。以上より、rcAAVが患者に投与される可能性は考えられない。

このように、rcAAVが生成される可能性はほとんどない。また、本遺伝子組換え生物等又は本遺伝子組換え生物等由来のゲノムが投与後に患者の体内で複製される可能性はほとんどないため、理論上拡散される可能性のある本遺伝子組換え生物等の絶対量が投与量を上回ることはない。本遺伝子組換え生物等の拡散は、ヘルパーウイルス、rcAAVの存在や本遺伝子組換え生物等と野生型AAV間の組換えによって起こりやすくなることはない。

(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に従って使用等を行うかぎり、核酸の水平伝達により生物多様性影響が生

するおそれないと判断される。

5 その他の性質

(1) 核酸を垂直伝播する性質

マウスにおけるAMT-060の雄性生殖系列移行試験を実施した（NR-060-14-001試験、GLP準拠）。雄C57Bl/6マウス（溶媒投与群5匹、AMT-060投与群15匹）は、交配開始6日前に溶媒（リン酸緩衝生理食塩水）又はAMT-060（ 2.3×10^{14} gc/kg）を単回静脈内投与し、非投与の雌（溶媒投与群10匹、AMT-060投与群30匹）と交配させ、交尾成立後適切な時点での剖検した。雌は妊娠17日に剖検し、子宮内検査を実施した。全例について一般症状、体重、摂餌量、交尾行動、受胎率及び妊娠成績を評価した。AMT-060の雄性生殖系列移行並びに雌雄生殖器及び胎児への分布を評価するため、溶媒投与群の雌雄各1匹及びAMT-060投与群の雌雄各5匹から採取した組織及び胎児におけるAMT-060のDNA量を測定した。

AMT-060の 2.3×10^{14} gc/kg投与では、投薬に関連した一般症状は認められず、母動物の体重、摂餌量、交尾行動、受胎率、妊娠成績、胎児の外表検査及び胎児体重に投薬の影響はみられなかった。単回投与後、検査したすべてのAMT-060投与雄の組織（精巣上体、精嚢、精子及び精巢）で高濃度のAMT-060のDNAが検出された。投与雄との交配後、非投与雌で検討した組織（子宮、胎児及び胎盤）にAMT-060のDNAは検出されず、雄性生殖系列移行は認められなかった。本試験条件下では、AMT-060の胎児への移行はなく、生殖能及び次世代への有害作用はなかった。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域はAAV5と同一であり、影響を受ける可能性のある動植物は、ヒト及びNHPと考えられる。本遺伝子組換え生物等は、血液、尿、糞便、唾液、鼻分泌物及び精液を介して患者から環境に拡散する可能性がある。しかしながら、rAAVを用いたNHPの研究において、投与直後の血液で感染性のrAAVが認められることを除き、体液中のrAAVには感染性がないことが報告されており（Favre 2001）、本遺伝子組換え生物等でも同様の感染性プロファイルであると類推される。本遺伝子組換え生物等の排出は尿、糞便、唾液等の体液によってのみ行われるため、本遺伝子組換え生物等が体液を介して環境に拡散しても、感染の拡大はないと考えられる。

遺伝子の複製や組込みの持続性は、（天然の）宿主感染に依存する。上述したように、患者の体液を介して感染が広がることは考えられない。さらに、本遺伝子組換え生物等はゲノムからrep及びcap配列が除去されており複製能力を欠損している。高用量で静脈内投与された場合でも、遺伝子への組込みは低頻度でしか発生せず、組み込まれたとしてもランダムである。

まとめると、本遺伝子組換え生物等が自然環境で持続して生息する可能性は非常に低いと考えられる。また、本遺伝子組換え生物等においてrcAAV濃度が増加する可能性は低いと考えられる。

したがって、当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、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ないと判断される。

Favre D, Provost N, Blouin V, Blancho G, Chérel Y, Salvetti A, et al. Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. Mol Ther. 2001;4(6):559-66.

別紙

- 別紙 1 宿主及び本遺伝子組換え生物等に関する補足情報
- 別紙 2 本遺伝子組換え生物等のゲノムの構造
- 別紙 3 遺伝子組換え生物等の調製方法の詳細
- 別紙 4 qPCR 法のバリデーション
- 別紙 5 非臨床試験
- 別紙 6 海外で実施している臨床試験
- 別紙 7 臨床ウイルス排出試験計画
- 別紙 8 rcAAV に関する考察