

第一種使用規程承認申請書

令和 3 年 11 月 9 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 ノバルティスファーマ株式会社
申請者 代表取締役社長 李堯
住所 東京都港区虎ノ門 1 丁目 23 番 1 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。

<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 (1) 本遺伝子組換え生物等の原液は、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保管する。</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 (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。</p> <p>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。</p> <p>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、患者の静脈内又は髄腔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 (6) 投与後、患者の投与部位を消毒等し、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、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。 (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投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、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</p>

	<p>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。</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>(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。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廃棄する。</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) 自宅で患者に用いたドレッシング材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で廃棄する。</p> <p>(15) 原液及び未開封の本遺伝子組換え生物等を感染性廃棄物処理業者において廃棄する場合は、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) 感染性廃棄物業者において廃棄する場合、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。</p> <p>(17) 治療施設外で保管された原液及び未開封の本遺伝子組換え生物等を廃棄する場合は、密封された状態で不活化処理を行い、廃棄する。</p>
--	---

(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, 545-65.

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, 583-93.

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、宿主ゲノムへの組み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, 2211-5.

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TR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 (██████████)
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 (██████████)
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 (██████████)
ニワトリ β -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 (██████████)
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 (██████████)
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 (██████████)
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 (██████████)
AAV2由来に由来する。
- viii) 非コーディング配列 (██████████)
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（以下、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以下の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。

型	発症年齢	最高到達運動機能	平均余命
I	6ヵ月未満	生涯坐位保持不可能	大半が2歳までに死亡
II	6～18ヵ月	坐位までの運動発達を認めるも、立位保持・自立歩行を獲得せず	20～40歳
III	1.5～10歳	歩行可能であるが、経過によりさまざまな時期に歩行不能となる	正常
IV	35歳～	徐々に筋力低下を認める	正常

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な配列。

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, 1713-22.

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

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

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2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、米国の施設にて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℃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

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[10]。用いるddPCR法では、ヒトゲノム上の配列と区別できるように[REDACTED]及び[REDACTED]に特異的なプライマーとプローブを使用する。分析法の詳細、検出限界、感度及び信頼性については別紙5及び別紙6に記載する。

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): 115-25. 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

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保管する。

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、患者の静脈内又は髄腔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等し、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、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。
- (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投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、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、患者等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。
- (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。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廃棄する。
- (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) 自宅で患者に用いたドレッシング材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で廃棄する。
- (15) 原液及び未開封の本遺伝子組換え生物等を感染性廃棄物処理業者において廃棄する場合は、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) 感染性廃棄物業者において廃棄する場合、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原液及び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
本遺伝子組換え生物等の静脈内投与後における唾液、尿及び糞便についてベクター排出試験を実施済みである（III-6）。髄腔内投与後の排出は静脈内投与の結果を超えることはない予想されるが、生物多様性影響を防止するための措置は静脈内投与と同様に医師の判断により必要とされる期間行う。日本で実施予定の髄腔内投与の臨床試験では、唾液、鼻腔スワブ検体、尿及び糞便の検体を用いて排出を評価する予定である。

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
マウス、ブタあるいは霊長類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。詳細を別紙7に示した。

1. SMA疾患マウスモデルに本遺伝子組換え生物等を脳室内投与した結果、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。
2. 内因性SMNタンパク質の発現を低減させた疾患モデルブタに本遺伝子組換え生

- 物等を髄腔内投与した結果、運動機能が改善し、SMA様疾患の兆候を認めなかった。
3. ブタにGFPを発現するAAV9ベクターを髄腔内投与した結果、運動神経細胞への遺伝子導入が観察された。
 4. 霊長類（カニクイザル）に本遺伝子組換え生物等を髄腔内投与した結果、投与後12ヵ月まで脳及び脊髄全域にSMN mRNAの発現が認められた。
 5. カニクイザル単回髄腔内投与毒性試験（GLP適用）において、肝臓、後根神経節、及び脊髄におけるAVXS-101ベクターゲノムが最も高濃度であり、脾臓及びリンパ節においても検出された（別紙7参照）。
 6. マウスに本遺伝子組換え生物等を単回静脈内投与（12週間観察:GLP）した結果、主な毒性標的臓器は心臓及び肝臓であった。マウスを用いた毒性試験のNOAELは 2.37×10^{14} vg/kgであった（20122446）。マウスを用いた追加毒性試験の無毒性量（NOAEL）は特定されなかったが、最大耐量は 1.5×10^{14} vg/kgであり、静脈内投与時の申請用量（ 1.1×10^{14} vg/kg）の約1.4倍であった（8384031）。
 7. カニクイザルに本遺伝子組換え生物等を単回髄腔内投与した結果、投与後2週間の全投薬群において、頸髄、胸髄、腰髄又は仙髄の複数箇所又は全箇所の後根神経節に軽微から顕著な炎症性単核細胞が認められた。別のカニクイザル単回髄腔内投与毒性試験（GLP適用）においても、全投薬群で投与後6週間に後根神経節及び周囲組織に病理組織学的変化が認められた。投与後12ヵ月では、当該所見の発現率及び/又は重篤度は概ね低下した。認められた神経細胞所見は非進行変化であり、その他の所見は回復性が示唆された（別紙7参照）。
 8. サルに高用量のAAVhu68（rAAV9とは異なるベクター）を静脈内投与した結果、肝臓及びDRGに毒性変化が報告されている[11]。
 9. 野生型AAV2において肝がん発現リスクが知られているが、AAV9ベクターの発がんリスクは報告されていない[12]。

文献11：Hinderer C, Katz N, Buza EL, et al. (2018) Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Hum Gene Ther*; 29(3):285-98.

文献12：Tatsuno K, Midorikawa Y, Takayama T, et al. (2019) Impact of AAV2 and Hepatitis B Virus Integration Into Genome on Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Prior Hepatitis B Virus Infection. *Clin Cancer Res*; 25(20):6217-27.

6 国外における使用等により得られた情報

現時点までにSMA I型患者を対象とした静脈内投与試験として海外第I相試験（CL-101試験）及び2つの海外第III相試験（CL-302試験及びCL-303試験）が完了している。また、現在実施中の静脈内投与試験としてCL-101試験に参加した患者を対象とした長期安全性フォローアップ試験（LT-001試験）、遺伝子解析においてSMAと診断されかつ臨床症

状を発症前の患者を対象とした国際共同第III相試験（CL-304試験）が実施中である。さらに、髄腔内投与試験として、SMA II型又はIII型患者を対象とした海外第I相試験（CL-102試験）が実施中である。

最初の臨床試験である第I相静脈内投与試験（CL-101試験）において、SMN2遺伝子のコピー数が2のSMA I型患者15例に本遺伝子組換え生物等を単回静脈内投与した際の安全性と有効性を評価した。当該試験は2種類の投与量別のコホートが設定され、コホート1では3例に低用量、コホート2では12例に承認用量の本遺伝子組換え生物等を静脈内投与した。本遺伝子組換え生物等を静脈内投与したときの安全性について、有害事象は、コホート1で100.0%（3/3例）、コホート2で100.0%（12/12例）に認められた。死亡は認められず、その他の重篤な有害事象は、コホート1で100.0%（3/3例）、コホート2で83.3%（10/12例）に認められ、全体で3例以上に認められた重篤な有害事象は、肺炎7例、パラインフルエンザウイルス感染、RSウイルス肺炎、RSウイルス細気管支炎及び上気道感染各3例であった。重篤な有害事象のうちトランスアミナーゼ上昇2例については、本遺伝子組換え生物等との因果関係が否定されていない。本遺伝子組換え生物等との因果関係が否定できない有害事象は、コホート1で33.3%（1/3例；トランスアミナーゼ上昇1例）、コホート2で25.0%（3/12例；トランスアミナーゼ上昇3例、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ増加1例）に認められた。重篤な有害事象に該当するトランスアミナーゼ上昇2例が認められたものの副腎皮質ステロイドの投与等により管理可能であると考えられ、安全性に明らかな懸念は示されなかった。詳細を別紙8に示した。

CL-102試験において、データカットオフ時点（2019年3月8日）でSMN2コピー数が3のSMA II型又はIII型の患者30例（低用量コホート3例、中用量コホート25例、高用量コホート2例）に本遺伝子組換え生物等が髄腔内投与されている。安全性についても臨床的に大きな問題となるようなリスクは示唆されていない。詳細を別紙8に示した。

第I相静脈内投与試験（CL-101試験）において、本遺伝子組換え生物等の唾液、尿及び糞便中への排出（解析対象5例）を検討した。静脈内投与後、本遺伝子組換え生物等のDNAは主に糞便中に排出され、その大部分は投与後30日以内に排出された。唾液中及び尿中の本遺伝子組換え生物等のDNAは、投与後14日以内に定量限界未満となった。詳細については、別紙5に示した。現在のところ、このベクター排出に関するリスクは知られていない。ベクターが複製する可能性は極めて低いと考えられる。

また、現在実施中の第I相髄腔内投与試験（CL-102試験）において、本遺伝子組換え生物等を髄腔内投与した際のベクター排出の中間解析結果（予備データ）が得られ、第I相静脈内投与試験（CL-101試験）の結果と類似していることが示され、本遺伝子組換え生物等の臨床での髄腔内投与量は静脈内投与時よりも低いことを考慮すると、髄腔内投与時の本品のベクター排出は静脈内投与時を上回ることはないと予想される。詳細を別紙9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かった。

(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、マウス及び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。野生型 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においても病原性はない。細胞に本遺伝子組換え生物等により遺伝子導入された細胞からは SMN タンパク質が発現する可能性はあるが、IV-3 に記載の通り、SMN タンパク質の毒性作用は明らかになっていない。

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

第一種使用規定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 *rep* 及び *cap* 遺伝子を欠失しているため、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。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影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

(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可能性は低い。

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、マウス及び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が環境中に拡散し、宿主へ感染後、宿主細胞に遺伝子導入された場合には、SMNタンパク質が発現する可能性がある。SMNタンパク質は、動物界に普遍的に存在する内因性タンパク質であり、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。したがって、生体内で正常に働くレベルにおいてSMNタンパク質が発現した場合における有害作用はないと考えられる。一方で、SMNタンパク質が宿主において過剰に発現した場合の毒性は明らかになっていない。

(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。万一、環境中へ拡散した場合であっても、内因性タンパク質であるSMNタンパク質の生体内で正常に働くレベルを超えてSMNタンパク質が発現する可能性は低い。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なく消滅する。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物質を産生する可能性は極めて低いと考えられる。

(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可能性は低い。

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、マウス及び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がある。

(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。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。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り、水平感染が起こった場合であっても、野生型AAVと同様に本遺伝子組換え生物等のゲノムDNAは導入された細胞内にエピソームとして染色体外に存在すると考えられ、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低い。

(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可能性は低い。

5 その他の性質

本遺伝子組換え生物等の垂直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、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。垂直伝播については男性での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[13][14]。また、AAVベクターの精液への移行は、その他の体液等（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。カニクイザルに本遺伝子組換え生物等を単回髄腔内投与した結果、生殖器（精巣、卵巣）におけるAVXS-101ベクターゲノムは他の臓器に比べて低濃度であり、生殖器の病理組織学的変化は認め

られなかったことから、ヒトの生殖細胞に対する本遺伝子組換え生物等の影響は極めて低いと考えられた。一方で、本遺伝子組換え生物等が生殖器に長期間残存して生殖細胞に影響を及ぼす可能性は否定できないと考えられる（別紙10参照）。

文献 13 : Arruda VR, Fields PA, Milner R, et al. (2001) Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther*; 4(6):586-92.

文献 14 : Favaro P, Downey HD, Zhou JS, et al. (2009) Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol Ther*; 17(6):1022-30.

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、本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可能性は低いと考えられる。