

第一種使用規程承認申請書

令和3年10月4日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 株式会社新日本科学 PPD
申請者 ゼネラルマネージャー 栗岡 康雅 印
住所 東京都中央区明石町8番1号 聖路加タワー12階

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 8 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、改変型ヒトグルコース-6-ホスファターゼを発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (AAV8G6PC)</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及び冷蔵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</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、患者の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>

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、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。

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保管し、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つては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。

	<p>(14) 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、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。</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

本遺伝子組換え生物等は、組換え型アデノ随伴ウイルス血清8型（組換えAAV8）である。

組換え型アデノ随伴ウイルス血清8型：

アデノ随伴ウイルス（AAV）は一本鎖DNAウイルスで、パルボウイルス科ディペンドパルボウイルス属（Parvoviridae Dependoparvovirus）ファミリーに分類される（Cotmore 2019）。ディペンドウイルス属に分類されるウイルスは、ウイルス単独では増殖せず、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）の共感染を必要とする。AAVは、カプシドタンパク配列の違いから複数の血清型に分類されており（Srivastava 2016）、その違いが細胞指向性に影響を与えている。AAV8は肝指向性のため、本遺伝子組換え生物等ではこのカプシドを使用している。

分類：ウイルス、ssDNAウイルス、パルボウイルス科、パルボウイルス亜科、ディペンドパルボウイルス属、未分類ディペンドウイルス属、アデノ随伴ウイルス

宿主の範囲：

AAVは、ヒト、サル、イヌ、コウモリ及びげっ歯類を含む哺乳類や、ヘビ、アヒル、ガチョウ、アゴヒゲトカゲのような非哺乳類にも感染する（Gao 2004; Srivastava 2016; Cotmore 2019; Kerr 2005）。

範囲：細胞性生物、真核生物、後方鞭毛生物、後生動物、真正後生動物、左右相称動物、後口動物、脊索動物門、有頭動物、脊椎動物

地理的分布：

AAVは事実上、世界中に分布し、既知の環境宿主は脊椎動物である。欧州と米国の人口の90%超がAAVに曝露されている（Chirmule 1999; Boutin 2010; Jeune 2013; Tenenbaum 2003）。約85%の成人がAAVに対する抗体をもっている（Tenenbaum 2003）。

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。）

1980年代初期に遺伝子導入ベクターとして野生型AAVが最初に遺伝子操作されて以来、遺伝子組換えAAV（以下、「組換えAAV」という。）は、疾患治療のための有効かつ安全な遺伝子導入媒体として有望視されてきた（Gao 2004）。アデノ随伴ウイルスはエンベロープをもたない正二十面体構造をもつ一本鎖DNAウイルスである。野生型AAVが幅広い組織指向性を示し、病原性をもたず、組織中に長期間存続可能であることから、組換えAAVは、遺伝子導入の手段として広く利用されている。さらに、組換えAAVは自らで複製できず、そのベクターゲノムは組織形質導入後にエピソームとして存在するため、挿入突然変異のリスクが最小限となっている（Nakai 2001）。組換えAAVはウイルスタンパク質をコードする遺伝子である*rep*及び*cap*を取り除き、ドナー核酸に置き換えることで作成される。組換えAAV中の唯一のウイルス配列は、ベクターゲノムの両端に1つずつコードされている145塩基の非翻訳領域である末端逆位反復配列（ITR）である。

最初の組換えAAV遺伝子治療試験は、嚢胞性線維症患者を対象に1995年に実施された（Flotte 1995）。それ以後、組換えAAVはさまざまな疾患の遺伝子治療臨床試験で使用されている（Mingozzi 2011; Chapin 2018; Ginn 2018）。現在まで、組換えAAVを用いた遺伝子治療は広く実施されており、全般として安全と考えられている（Colella et al. 2017）。2020年時点で、約202件

の実施中及び完了した組換えAAV遺伝子治療の臨床試験が登録されている (<http://clinicaltrials.gov>)。臨床試験の多くが、遺伝性の希少疾患を対象に実施されており、組換えAAV2に基づくベクターが広く用いられている。完了した組換えAAVの第I相、第I/II相、及び第III相試験で検討された適応症は、バッテン病、脊髄性筋萎縮症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、サンフィリポ症候群B、色覚異常、レーバー先天性黒内障、ポンペ病などである。糖原病 1a型 (GSD1a) 患者を対象として開発中の本遺伝子組換え生物等の他にも、X連鎖網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、ポンペ病、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症などに対する組換えAAV8に基づくベクターを使用した臨床試験が進行中である。さらに、2種類の製品 (ゾルゲンスマ [Zolgensma] 及びLuxturna) が、組換えAAVを用いるヒト遺伝子治療用製品として欧州及び米国で承認されている。ゾルゲンスマは本邦で2020年2月に承認された。なお、他の組換えAAVを用いた臨床試験における安全性に関する知見を本書別紙2に記載する。

本遺伝子組換え生物等は、GSD1aの治療薬として開発されている遺伝子治療用製品である。本遺伝子組換え生物等は、ヒトグルコース-6-ホスファターゼ特異的プロモーター及びエンハンサーエレメントによって発現が推進されるコドン最適化ヒト野生型グルコース-6-ホスファターゼ α (G6PC) 発現カセットを含んだ非複製型組換えAAV8ベクターで構成される。

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の正二十面体構造の、エンベロープをもたない一本鎖DNAである。野生型AAVゲノムは約4.7 kbで、両端に位置するITR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 (図1参照; Santiago-Ortiz and Schaffer 2016; Wu 2006)。ITR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。複数のプロモーター、選択的スプライシング、及び別の翻訳開始コドンを使用することにより、この2種のAAV遺伝子それぞれが複数のタンパク質をコードしている。

*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 (Naso 2017)。*cap*領域の異なるリーディングフレームにカプシドの形成を促進するアッセムブリ活性化タンパク質 (AAP) がコードされている。

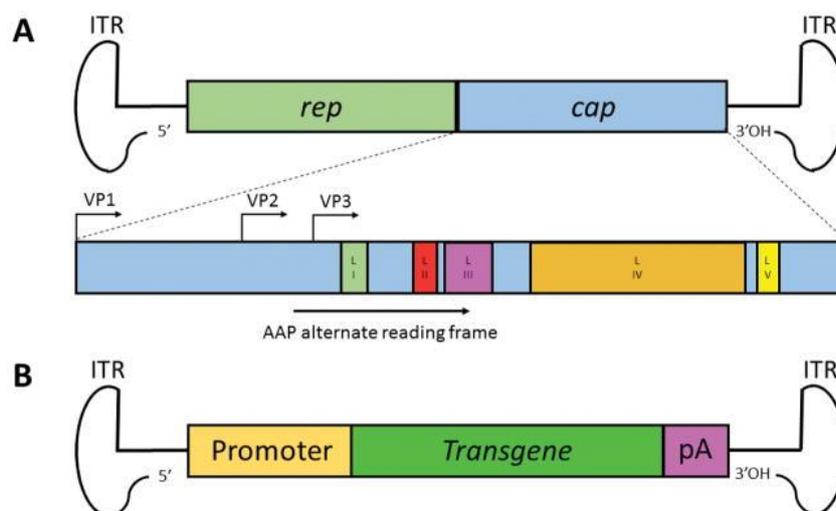


図1：野生型 AAV (A) と組換え AAV (B) のゲノム構造

AAVの感染は、細胞表面に発現している複数の血清型受容体であるAAVRを介して行われる。組織指向性を制御するその受容体 (もしくは補助受容体) は血清型によって異なっている

(Nonnenmacher 2012)。

本遺伝子組換え生物等の全てのAAVウイルスゲノム配列は除去されている。唯一残る配列は、導入遺伝子発現カセットに隣接する小さな2つのITRである。ITRによって、ベクターカプシド内へベクターゲノムが封入される。親ウイルスとは異なり、このベクターはヘルパーウイルス存在下でも複製を行うことはない。ウイルスのDNAが94%削除されているため、関連ウイルスとの相同組換えや、宿主細胞のクロモソームDNAへの組込みの確率は低い。本遺伝子組換え生物等の詳しい特徴は第II章に記載した。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

野生型AAVは、宿主への感染又は感染細胞の核内に潜伏感染して環境中に存続している。AAVはヒト、サル、イヌ、げっ歯類等の哺乳動物に感染することができるが、例えばアデノウイルスや、単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルス非存在下では増殖しない (Lisowski 2015, Tenenbaum 2003)。

AAVは、エンベロープをもたないウイルスで、比較的安定かつ乾燥に強い (Gruntman 2015) ため、環境中で長期間潜在的に生存する可能性がある。ただし、AAVは、ヘルパーウイルス又は他のヘルパー機能が存在しないと感染を確立できない。AAV血清型が異なると、熱融解温度もpHにより異なる (Lins-Austin 2020)。AAV1、AAV2及びAAV8の安定性は酸性条件下で上昇したが、AAV5の安定性は酸性条件下で低下した。

(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のヒトでの増殖は、アデノウイルスのようなヘルパーウイルスとの共存下で起こる。アデノウイルスが共感染している間、AAV Repを産生するp5プロモーターのトランス活性を含むいくつかの必須のヘルパー機能が、ヘルパーウイルス由来のE1a、E1b、E2a、E4及びVA RNAにより供給され、AAVの複製が可能となる (Tenenbaum 2003; Weitzman 2012; Berns 1990)。

AAVの生活環は、宿主細胞表面のグリカン受容体及びタンパク性コレセプター (AAV8ではLamR) にウイルスが付着することから始まる (Nonnenmacher 2012; Akache 2006)。続いて、AAVはエンドサイトーシスによって取り込まれる。ビリオンは、細胞内膜系内で逆行性輸送によって輸送される。カプシド立体配座の変化の後、ビリオンはゴルジ装置又は小胞体から細胞質内へ放出され、核膜孔複合体を介して核内に輸送される。その後、核内で部分的脱殻によるゲノム放出が起こる (Nonnenmacher 2012)。核侵入後、適切なヘルパーウイルスの有無に応じて、AAVの生活環が溶菌経路又は溶原経路に沿って進行する。アデノウイルスや単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスが存在することで、AAV遺伝子の発現、ゲノム複製及びウイルス粒子の産生が促進される (Daya 2008)。ヘルパーウイルス非存在下では、野生型AAVは複製能をもたない。このように、AAVの世代時間は適切なヘルパーウイルスの有無によって変わる。

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 (Gao 2004; Zimm 2014)。

(5) 病原性

ヒトでの推定される血清抗体陽性率が共通に高いにもかかわらず、AAV感染による病原性は報告されていない (Flotte 1995) (第II章6)。その結果、AAVは欧州での指令2000/54/ECに基づいてリスクグループ1の生物学的因子 (ヒトに病気を発症させる可能性が低い生物学的因子) として定義される。また、米国国立衛生研究所 (NIH) の遺伝子組換え又は合成核酸分子を含む研

究に関するガイドラインでは、バイオセーフティレベル1として定義される（[NIH Guidelines, USA; 2019年4月](#)）。

（6）有害物質の産生性

感染細胞内で宿主のウイルスゲノム由来のタンパク質が産生されるが、細胞外に分泌される遊離有害物質は知られていない。

（7）その他の情報（不活化条件等を含む。）

他のパルボウイルスと同様に、AAV は物理化学的に非常に安定である。そのため、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。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 AAV 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（[Howard 2017](#)）。

AAV のようなパルボウイルスは、オートクレーブ、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る（例えば、水酸化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム、ヨウ素、過酢酸）（[Howard 2017; WHO 2004](#)）。

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、コドン最適化ヒト野生型 G6PC を含んだ一本鎖、非複製型組換え AAV8 ベクターである。本遺伝子組換え生物等は、2つの野生型 AAV2 ITR が隣接しているコドン最適化ヒト野生型 G6PC 配列を含む。この発現カセットは、ヒト G6PC 特異的プロモーター及びエンハンサー (GPE) エレメントを含む。本遺伝子組換え生物等のウイルス粒子は、3種類のカプシドタンパク質 VP1、VP2 及び VP3 で構成される。[redacted] [redacted] より、これらは約 [redacted] の相対比で存在し、[redacted] による分子量測定値はそれぞれ約 [redacted] [redacted] [redacted] Da である。このウイルス粒子 (ウイルス DNA を含む) の理論的計算による大きさは約 [redacted] Da であり、正二十面体であることがわかっている。

発現カセットとプラスミドバックボーン的全構成要素を [redacted] で明らかにした。図 1 と図 2 に本遺伝子組換え生物等の概略図を示す。



略語

ITR	末端逆位反復配列
[redacted]	[redacted] [redacted] [redacted] プロモーター及びエンハンサー領域
[redacted]	[redacted]
[redacted]	ヒトグルコース-6-ホスファターゼ [redacted]
[redacted] pA	[redacted] [redacted] ポリアデニル化シグナル

(2) 構成要素の機能

供与核酸の構成要素の機能を以下に記載する。詳細情報は、本書別紙 1 に記載する。

ヒト [redacted] / [redacted] プロモーター及びエンハンサー:

[redacted] は [redacted] [redacted] [redacted] プロモーターであり、[redacted] [redacted] [redacted] が選択された。[redacted] [redacted] [redacted]

[redacted]

[redacted] は [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] から構成される。

[redacted]

[redacted] してある。[redacted] [redacted]

[redacted] :

GSDIa 患者へ G6PC 遺伝子を導入するための優れた臨床試験候補ベクターを作成するために、G6PC 遺伝子配列 [redacted] [redacted] [redacted]

[redacted] [redacted] [redacted]

[redacted] この手法は、[redacted] [redacted] 採用した。

共通点は、カプシドタンパク質及びベクターゲノムの両端に1つずつコードされている [REDACTED] の非コード ITR である。

本遺伝子組換え生物等の製剤は、肝臓での発現を促進するような特性をもつようにデザインされている。例えば、ベクターの血清型 (AAV8)、肝臓特異的G6PC遺伝子の内在性GPEプロモーターである。本遺伝子組換え生物等の製剤は、組換えAAV8ベクター粒子内にカプシドで包まれたヒトG6PCコード配列から成る。組織指向性はAAVカプシドタンパク質の構造に基づいており、宿主細胞受容体に作用することで、ウイルス粒子の細胞内への移行及び形質導入を媒介する。AAVの血清型について、AAV8は強い肝指向性を示すものの1つで (Gao et al., 2002)、他の組織にも形質導入されるが、量は十分に低い。本遺伝子組換え生物等は、GPEエレメントによって発現が推進されるコドン最適化ヒトG6PCを含む。GPEプロモーターは、肝臓への特異性をさらに促進するために選択した。さらに、内在性G6PCの発現は主に、循環するグルコースのそれぞれ約80%、20%を占める肝臓と腎臓で制限されている (Chou et al., 2010)。 [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

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凍庫及び冷蔵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、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。

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保管し、運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。

- (1 1) 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 2) 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 3) 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つては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。
- (1 4) 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。
- (1 5) 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。
- (1 6) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液、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。
- (1 7) 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

現在実施中のヒトへの初めての投与試験である 401GSDIA01 試験において、ベクター排出は本遺伝子組換え生物等の投与後、被験者の血液、唾液、尿及び糞便において qPCR を用いて定期的に測定している。ベクター排出は全ての検体で、少なくとも ■■■■■■■■ して陰性の結果となるまで観察される。401GSDIA01 試験に参加した 9 名の患者からのデータより、本遺伝子組換え生物等の単回投与後、血液、唾液、糞便及び尿で GC は検出された。唾液、尿及び糞便全てにおいて 1 回目の陰性（BL0D）となったのは 8 日目から 11 週目で、陰性が確認された（■■■■■■■の陰性結果）のは 13 日目から 13 週目である。ピークは概して投与後 8 日目以内に確認された。本書別紙 1 に、ベクター排出データ及びゲノム濃度データを記載した。■■■■■■■ ■■■■■■■■ ■■■■■■■■ ■■■■■■■■ 今後の試験ではベクター排出に関するデータは収集しない予定である。

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

本遺伝子組換え生物等に起因する即時的又は遅延的な環境への影響は分かっておらず、予測もできない。非標的生体と接するリスクを軽減するために、製剤は制御条件下で管理される予定である。

本遺伝子組換え生物等は、訓練を受けた医療従事者が保管、調製及び投与する。施設スタッフは、本遺伝子組換え生物等の調製及び投与に使用した消耗品の廃棄に関して、現地医療機関の要件に応じた廃棄物処理の方針に従う。使い捨て以外の容器・資材等は、施設等の手順に従

って除染する。なお、偶発的または不適切な廃棄によって、下水等への漏洩が発生するリスクは非常に低く、発生したとしても環境へのリスクはわずかである。

5. 実験室等での使用等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プログラムには、動物モデルである GSDIa マウス及び野生型マウス (C57BL/6N) での潜在的な有効性、生体内分布及び毒性の評価を含めた。

一連の GLP 非適合の薬理試験にて、本遺伝子組換え生物等の薬理作用を評価した。これらの試験により、臨床試験に使用する [REDACTED] ヒト G6PC 遺伝子を含む AAV8 ベクター (本遺伝子組換え生物等) が選択でき、また、臨床開始用量 [REDACTED] が特定された。

[REDACTED]

腫瘍原性及びがん原性に関するリスク評価を、本遺伝子組換え生物等で実施した。文献調査を詳細に実施した結果、AAV 組込みと肝細胞腺腫 (HCA) 又は、肝細胞がん (HCC) の形成の明確な相関関係は示されず、腫瘍原性／がん原性リスクは低いと考えられた。 [REDACTED]

[REDACTED]

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と同様であると考えられており、微生物に感染せず、また影響を受ける可能性のある微生物は特定されていない。

(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かぎり、他の微生物を減少させる性質に基づいて、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

野生型AAVはヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型AAVと本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等に病原性はない。

本遺伝子組換え生物等の非臨床試験及び臨床試験結果に基づくと、本遺伝子組換え生物等への曝露による病原性は予想されない。さらに、ヒトでの推定される血清抗体陽性率が共通に高いにもかかわらず、AAV感染による病原性は報告されていない (Flotte 1995)。その結果、AAVは欧州での指令2000/54/ECに基づいて、リスクグループ1の生物学的因子（ヒトに病気を発症させる可能性が低い生物学的因子）として定義される。また、NIHの遺伝子組換え又は合成核酸分子を含む研究に関するガイドラインでは、バイオセーフティレベル1として定義される (NIH Guidelines, USA; 2019年4月)。

また、AAV粒子がパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、本遺伝子組換え生物等は野生型AAVと同一又は極めて近い構造になると考えられるため、本遺伝子組換え生物等が病原性を持つことはないと考えられる。

(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記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、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、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスが標的細胞に共感染しても増殖することなく、野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ増殖が起こりうるが、その可能性は極めて低い。さらに、rcAAVが発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じうるrcAAVは、XXXXXXXXXXで陰性であることを確認するため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。

よって、本遺伝子組換え生物等及びrcAAVが第三者、野生動植物等に対して病原性を示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

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従うかぎり、本遺伝子組換え生物等の使用によ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

野生型AAVはヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型AAVと本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等は、形質導入された細胞内でヒトG6PCを産生する。本遺伝子組換え生物等の用量試験における非臨床及び臨床試験結果に基づくと、G6PC及び本遺伝子組換え生物等の組換えAAVは、免疫原性を含む有害性を示さなかった。

また、AAV粒子がパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、本遺伝子組換え生物等は野生型AAVと同一又は極めて近い構造になると考えられるため、本遺伝子組換え生物等が有害物質の産生性を持つことはないと考えられる。

(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記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、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、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスと共感染しても増殖することはない、野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ増殖が起こりうるが、その可能性は極めて低い。さらに、rcAAVが発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じうるrcAAVは、XXXXXXXXXXで陰性であることを確認するため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。

よって、本遺伝子組換え生物等が発現するG6PCタンパク質が第三者、野生動植物等に対して有害作用を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

有害物質産生の可能性に関して、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従うかぎり、生物多様性へ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

動物（脊椎動物）は本遺伝子組換え生物等が形質導入される可能性がある。植物に影響はない。

(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や体液等から第三者（ヒト及び哺乳類）へ伝播する可能性は理論上あるが、予想される排出は低濃度であり、AAV粒子の低い感染力を考慮すると、ベクター排出による本遺伝子組換え生物等の核酸が細胞に形質導入することはほとんどありえない。

また、AAV粒子へパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、本遺伝子組換え生物等は野生型AAVと同一又は極めて近い構造になると考えられるため、本遺伝子組換え生物等が核酸を水平伝達する性質はないと考えられる。

(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記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、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、拡散したとしても極めて微量である。本遺伝子組換え生物等は*rep*及び*cap*遺伝子の欠失により増殖能力がないため、本遺伝子組換え生物等由来の核酸が感染細胞のゲノムに組み込まれる可能性は極めて低い。

また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスと共感染しても増殖することはない、野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ水平感染が発生する可能性があるが、その可能性は極めて低い。

さらに、rcAAVが発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じるrcAAVは、XXXXXXXXXXで陰性であることを確認するため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、核酸を水平伝播する性質に基づいて、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

該当なし

V 総合的評価

理論的に、本遺伝子組換え生物等が感染する動物はヒトを含む脊椎動物であり、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の方法に従うかぎり、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はないと判断される。

参考文献

1. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger AM, Hughes J, Mietzsch M, Modha S, Ogliastro M, Pénczes JJ, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol.* 2019 Mar;100(3):367-368. doi: 10.1099/jgv.0.001212. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30672729; PMCID: PMC6537627.
2. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol.* 2016 Dec;21:75-80. doi: 10.1016/j.coviro.2016.08.003. Epub 2016 Sep 3. PMID: 27596608; PMCID: PMC5138125.
3. Parvoviruses, Edited by J. Kerr, S. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden & C. R. Parrish. London: Hodder Arnold 2005
4. Gao, Guangping, et al. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J. Virol.* 78(12), 2004, 6381-6388.
5. Chirmule N, Propert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* 1999 Sep;6(9):1574-83. doi: 10.1038/sj.gt.3300994. PMID: 10490767.
6. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther.* 2010 Jun;21(6):704-12. doi: 10.1089/hum.2009.182. PMID: 20095819
7. Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, Weber T. Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods.* 2013 Apr;24(2):59-67. doi: 10.1089/hgtb.2012.243. Epub 2013 Apr 3. PMID: 23442094; PMCID: PMC3732124.
8. Tenenbaum L, et al. Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors. *Current Gene Therapy* 3, 2003, 545-565.
9. Nakai H, Yant SR, Storm TA, et al. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol.* 2001;75(15):6969-76.
10. Gao GP, Alvira MR, Wang L, et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(18):11854-59.
11. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Glycogen storage disease type I and G6Pase- β deficiency: etiology and therapy. *Nat Rev Endocrinol.* 2010;6(12):676-88.
12. Flotte TR, Carter BJ. Adeno-associated virus for gene therapy. *Gene Ther.* 2,1995, 357-362
13. Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges. *Nat Rev Genet.* 12, 2011, 341-355.
14. Chapin JC, Monahan PE. *Gene Therapy for Hemophilia: Progress to Date*, 2018.
15. Ginn, SL., et al. *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2017: An update*, *J Gene Med.*, 2018, e3015.
16. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017 Dec 1;8:87-104. doi: 10.1016/j.omtm.2017.11.007. PMID: 29326962; PMCID: PMC5758940.
17. Santiao-Ortiz and Shaffer. Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Cancer Gene Therapy. *J Control Release.* 2016 October 28; 240: 287–301. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.00
18. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther.* 14, 2006, 316-327
19. 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
20. Gruntman AM, Su L, Su Q, Gao G, Mueller C, Flotte TR. Stability and compatibility of recombinant adeno-associated virus under conditions commonly encountered in human gene therapy trials. *Hum Gene Ther Methods.* 2015 Apr;26(2):71-6. doi: 10.1089/hgtb.2015.040. PMID: 25819833; PMCID: PMC4403013
21. Lisowski L, Tay SS, Alexander IE. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 24, 2015, 59-67.
22. Bridget Lins-Austin, et al. Adeno-Associated Virus (AAV) Capsid Stability and Liposome Remodeling

- During Endo/Lysosomal pH Trafficking. *Viruses*. 2020 Jun 20;12(6):668. doi: 10.3390/v12060668.
23. Weitzman M.D., Linden R.M. (2012) Adeno-Associated Virus Biology. In: Snyder R., Moullier P. (eds) Adeno-Associated Virus. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 807. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-370-7_1
 24. Berns KI. Parvovirus replication. *Microbiol Rev*. 1990 Sep;54(3):316-29. PMID: 2215424; PMCID: PMC372780
 25. Nonnenmacher M, Weber T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther*. 2012 Jun;19(6):649-58.
 26. Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol*. 2006 Oct;80(19):9831-6. doi: 10.1128/JVI.00878-06.
 27. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Oct;21(4):583-93.
 28. Zinn E, et al. Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol*. 2014, 90-97.
 29. Directive 2000/54/EC <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000L0054&from=EN>
 30. NIH Guidelines 2019 (https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.pdf)
 31. Howard DB and Harvey BK. Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Human Gene Therapy Methods* 28(1), 2017, 39-48.
 32. WHO Technical Report, Series No. 924, 2004
 33. Tseng and Agbandje Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors. *Front Immunol*. 2014 Jan 30;5:9. doi: 10.3389/fimmu.2014.00009. eCollection 2014 Wang L, Morizono H, Lin J, Bell P, Jones D, McMenamin D, Yu H, Batshaw ML, Wilson JM. Preclinical evaluation of a clinical candidate AAV8 vector for ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency reveals functional enzyme from each persisting vector genome. *Mol Genet Metab*. 2012 Feb;105(2):203-11. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.10.020. Epub 2011 Nov 7. PMID: 22133298; PMCID: PMC3270700.
 34. Wang L, Morizono H, Lin J, et al. Preclinical evaluation of a clinical candidate AAV8 vector for ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency reveals functional enzyme from each persisting vector genome. *Mol Genet Metab*. 2012 Feb;105(2):203-11.
 35. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther*. 2008 Oct;16(10):1648-56. doi: 10.1038/mt.2008.171. Epub 2008 Aug 5. PMID: 18682697.
 36. Duan D, Sharma P, Yang J, et al. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol*. 1998;72:8568-77.
 37. Schnepp BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson, PR. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol*. 2003(77):3495-3504.