

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 11 月 24 日

厚生労働大臣 殿  
環境大臣 殿

氏名 BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社  
申請者 代表取締役 中村 圭 印  
住所 東京都渋谷区代々木 2 丁目 11 番 17 号  
ラウンドクロス新宿

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>rep及びcap 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、B ドメインを欠失したヒト第 VIII 因子を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (AAV5-hFVIII-SQ)</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において保管する。</p> <p>投与液の調製及び保管</p> <p>(2) 本遺伝子組換え生物等は原液を希釈せずに投与する。原液の投与準備は、治療施設内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) 投与準備済の原液は、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、漏出させない処置を執って行う。</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>

- (6) 投与後、患者の創部を消毒し、創部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、当該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）に基づく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っては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。
- (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。
- (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) 血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、血液検体等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処理等により不活化処理を行い、廃棄する。

(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

群：第2群（一本鎖DNA）

科：パルボウイルス科 (*Parvoviridae*)

亜科：パルボウイルス亜科 (*Parvovirinae*)

属：デペンドパルボウイルス属 (*Dependoparvovirus*)

種：アデノ随伴ウイルス (*Adeno-associated virus*)

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、第2群 (Group II) に分類される一本鎖DNAウイルスであり、パルボウイルス科パルボウイルス亜科デペンドパルボウイルス属に分類される (文献1)。AAVは、アデノウイルス又はヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスの存在下でのみ増殖する。AAVは、これまでにヒトを含む霊長類においてウイルス粒子のキャプシドの違いに基づき13の血清型に分類されている (文献2)。AAVは自然界に広く分布し、ヒトを含む霊長類 (文献3、4) 及び他の哺乳動物へ感染することが知られている (別紙1)。ヒトでは小児期に初期感染が起こり、AAVに対する血清中の抗体陽性率は成人の約半数以上である (文献5)。AAV5の感染宿主及び組織指向性については別紙1に示した。

#### 2 使用等の歴史及び現状

遺伝子組換えAAVは、遺伝子治療用ベクターとして、多数の臨床試験 (臨床研究) において使用されており、現在、欧米で承認されているAAVによる治療は3製品である。最初にGlyberaが家族性リポタンパクリパーゼ欠損症と診断された成人患者を対象として2012年に欧州で承認されたが、使用される数が少なかったため販売中止となっている。二番目の製品 (Luxturna) は、両アレル性RPE65変異を伴う網膜ジストロフィーと診断された患者を対象として、2017年に米国及び2018年に欧州で承認された。三番目の製品である Zolgensma は、*survival motor neuron 1 (SMN1)* 遺伝子に両アレル性変異を有する小児の脊髄性筋萎縮症 (SMA) 患者を対象として、2019年に米国で、2020年にEUおよび日本で承認された。

Glybera CT-AMT-001-01臨床試験の2年間の追跡調査では、全14例の被験者で1件または複数の軽度から中等度の有害事象が報告された。12例の被験者で、数日から数週持続する局所的および一過性の挫傷、浮腫、過敏症、疼痛などの注射部位事象が

報告された。1例に薬剤投与に関連すると思われる重篤な有害事象が発現し、注射10時間後に発熱がみられたが、12時間以内に自然消失した。治験期間中、臨床検査評価、バイタルサイン、胸部X線および身体検査において臨床的に重要な変化は生じなかった。一般的に、Glyberaは最長2年間の忍容性が良好であると報告されている（文献6）。

第3相Luxturna臨床試験（NCT00999609）では、製品に関連した重篤な有害事象および有害な免疫反応は発生しなかった。手術に関連する有害事象は、ほとんどが一過性、軽度であり、治療可能であった。介入群の2例に、治験薬または投与とは無関係な重篤な有害事象が認められた。最も多かった眼の有害事象は、一過性の軽度の眼の炎症、一過性の眼圧上昇、術中の網膜裂孔であった。本試験の1年間の観察期間における安全性アウトカムでは、Luxturnaの投与に対する許容できない問題は確認されず、遺伝子組換えAAV関連の有害事象も発生しなかった（文献7）。

第3相Zolgensma臨床試験（STRIVE）では、登録された22例全例で有害事象が報告された。Zolgensmaに関連すると考えられる重篤な有害事象は3例に認められ、2例は肝アミノトランスフェラーゼ（アラニンアミノトランスフェラーゼまたはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）上昇、1例は水頭症であった。主な有害事象は発熱であった。Zolgensmaとの因果関係なしと判定された重篤な有害事象のうち最も多く報告されたものは、細気管支炎、肺炎、呼吸窮迫、RSウイルス細気管支炎であった。2例の死亡が報告されたが、いずれも治療とは無関係であると考えられ、1例は呼吸窮迫によるものであり、もう1例は登録前および治療前のスクリーニング中に生じたものであった。バイタルサインに持続的な異常が認められた患者はいなかった。バイタルサインの一過性の異常はいずれも回復した。7例に肝アミノトランスフェラーゼ上昇の有害事象が認められたが、これはAAVベースの遺伝子治療に関する以前の治験でも見られている（文献8）。

### 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面体のエンベロープがないウイルス粒子であり、両ゲノム極性がパッケージングされている約4.7 kbの一本鎖DNAウイルスである（文献2）。

AAVゲノムは、*rep*及び*cap*遺伝子を有し、3つのプロモーター（AAV2 においてはp5、p19及びp40プロモーター）からmRNAが発現する。p5プロモーターはRep78及びRep68をコードするmRNAを発現させ、p19プロモーターはRep52及びRep40を発現させる。p40プロモーターは3つのキャプシドタンパク質（VP1、VP2及びVP3）及びアセンブリ活性化タンパク質（AAP）（別紙1）を発現させる。AAVは宿主細胞膜の表面に提示されるAAV受容体（AAVR）を介して宿主細胞に侵入する（別紙1）。

AAVは宿主細胞の核内へ侵入すると、2つの生活環（溶解感染又は潜伏感染）のいずれかの経路をたどる（別紙1）。溶解感染は、ヘルパーウイルス（アデノウイルス、ヒトパピローマウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス）と共感染した場合又はAAVが潜伏感染した細胞がその後ヘルパーウイルスに感染した場合に、AAVが複製し増殖することにより起こる。ヘルパーウイルスなしでは、AAVは潜伏感染のままである。野生型AAVではホストゲノムのAAVS1等への組込みがある頻度で起こる（文献9）。

#### (2) 生育又は生育可能な環境の条件

AAVのエピソームは、潜伏感染した細胞内で維持されている。AAVは、自己のプロモーターを活性化しゲノムの複製やウイルス粒子へのアセンブリを媒介するヘルパー機能を有さないため、AAVのみでは増殖しない（文献2、5）。アデノウイルス及びヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスが同時感染することで、複製し増殖が起こることがある（文献2、5）。

#### (3) 捕食性又は寄生性

AAVは自然界で複製するために共感染するウイルスのヘルパー機能を必要とする。AAVに捕食性はなく、ヒト、非ヒト霊長類及び他の哺乳動物に感染することが知られている。

#### (4) 繁殖又は増殖の様式

ヒトへの感染経路は、呼吸器による感染、粘膜接触が挙げられる。他の感染経路としては、糞口感染及び場合によっては水系感染により感染が起こりうる。AAVは多種多様な哺乳動物に感染するが、内在性AAVの塩基配列の特徴によりヒトとサル、ブタ、ウシ間での種間伝播について示唆されている（文献4、10）。AAVのみでは増殖できず、AAVの複製と増殖は、ヘルパーウイルスと共感染することにより起こる（文献2）。

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*、*E1b55k*、*E4orf6*、*E2a*及び*VA RNA*の産物の存在下、*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。

(5) 病原性

ヒト、非ヒト霊長類及び他の動物ではAAV感染と臨床症状及び病原性との関連はみられていない。ヒトの大半でAAVの血清型一種類以上に対する抗体がみられ、AAV5に対する免疫を示す個人の割合は、他のキャプシドの血清型に対する割合よりも概して低い（文献11）。

(6) 有害物質の産生性

AAVのウイルス粒子自体及びそのゲノムにコードす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を含むパルボウイルスは、エンベロープがない一本鎖DNAウイルスで、物理化学的に安定なキャプシドを有する。そのため、広範囲のpH（pH3-9）、加熱（56℃、1時間）及びプロテアーゼに安定である（文献2）。AAVは、乾燥又は凍結乾燥の後、室温で少なくとも1ヶ月間感染性を維持できる。

AAVは、0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液及び非エンベロープウイルスに対して効果的な洗浄剤又は手指消毒剤によって不活化する。また、パルボウイルスについては、加熱（74℃以上）（文献12、13）、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、エチルアミン及びヒドロキシルアミンにより不活化する（文献12）。オートクレーブ滅菌により、完全に不活化する。

## 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の供与核酸は、ハイブリッドヒト肝臓特異的プロモーター、コザックコンセンサス配列、Bドメイン欠損ヒト第VIII因子遺伝子、合成ポリアデニル化シグナルから構成される。なお、本遺伝子組換え生物等は、野生型AAVゲノムにある*rep*及び*cap*遺伝子（別紙1）が欠失し、供与核酸により置換されている。本遺伝子組換え生物等の供与核酸の構造、構成要素及び全塩基配列を別紙2に示した。

#### (2) 構成要素の機能

構成要素の機能を以下に示す。

##### 1) ハイブリッド肝臓特異的プロモーター（HLP）

肝臓特異的な遺伝子発現を担う領域で、隣接する*hFVIII-SQ*遺伝子の転写を制御する。詳細は別紙2参照。

##### 2) コザックコンセンサス配列

哺乳動物細胞の翻訳を促進する。

##### 3) Bドメイン欠損ヒト第VIII因子（*hFVIII-SQ*）遺伝子

本遺伝子組換え生物等が産生する治療用タンパク質である、Bドメイン欠損ヒトFVIII（*hFVIII-SQ*）タンパク質をコードする（文献14）（別紙2）。*hFVIII-SQ*タンパク質は下記の特徴を有する。

- a) シグナルペプチド：タンパク質を標的とし分泌経路に移行させるアミノ末端シグナル配列。
- b) 重鎖：*hFVIII*のA1及びA2ドメインを含む領域。
- c) SQ：A2ドメインとA3ドメインの間のアミノ酸リンカー配列；野生型*hFVIII*のBドメインの部分配列であり、Bドメインの全配列を置換している。
- d) 軽鎖：A3、C1及びC3ドメインを含む領域。

##### 4) 合成ポリアデニル化シグナル（SpA）

効率的なポリアデニル化に必要な最小配列で、*hFVIII-SQ*遺伝子の転写終了時にポリアデニル化する（文献15）。合成されたポリAはRNAの安定化、転写終結、核外輸送及び翻訳に補助的な役割を担う。

## 2 ベクターに関する情報

### (1) 名称及び由来

該当せず。

### (2) 特性

該当せず。

## 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内に移入された核酸は、AAV5-hFVIII-SQベクターゲノムのソース配列である。ベクターゲノムは、AAV2の逆位末端反復配列（ITR）及びそれらに挟まれる、ハイブリッドヒト肝臓特異的プロモーター、Bドメイン欠損ヒト第VIII因子遺伝子及び合成ポリアデニル化シグナルを含むhFVIII-SQ発現カセットから構成される。

II. 1. 供与核酸に関する情報」の項及び別紙2参照

### (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、*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子をトランスに供与する組換え*rep/cap*バキュロヘルパーウイルス（*rep/cap* rBV）及びヒトFVIII遺伝子を供与する組換えヒトFVIIIバキュロウイルス（hFVIII rBV）を、Sf9細胞に共感染させることにより製造する。製造方法の詳細は別紙3に示す。

### (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

1) 本遺伝子組換え生物等は、BioMarin Pharmaceutical Inc.により米国カリフォルニア州Novatoの施設にてCurrent Good Manufacturing Practice（cGMP）に従い製造する。製造所の詳細は別紙3に示す。本遺伝子組換え生物等の製造工程は、Sf9細胞の拡大培養、バキュロウイルス感染及び産生、回収、ろ過、精製及び製剤化の各段階からなる（別紙3）。本遺伝子組換え生物等の製造及び充填は、米国のcGMPに従って行う（別紙3）。最終製品は、-60℃以下で保管及び輸送する。各ロットについて、同一性、純度、rcAAV及び外来性汚染物質が存在しないことを試験し、基準に適合することを確認している（別紙3）。さらに、原薬工程内管理試験において感染性バキュロウイルス否定試験を行い、検出限界未満であることを確認している。（別紙3）

#### 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は、凍結保管下において安定に保存される（別紙3）。移入した核酸は本遺伝子組換え生物等の一本鎖DNAゲノムとして存在する（別紙2）。本遺伝子組換え生物等はAAV5のキャプシドタンパク（未改変）を有し、AAV5と同様のゲノムサイズである。本遺伝子組換え生物等は、複製に必要な遺伝子を欠損するよう設計されたゲノムを持つ非増殖型であるため、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患者へ投与されると、細胞の核内にて本遺伝子組換え生物等ゲノムのパッケージが解かれ、直鎖状一本鎖DNAから相補鎖が複製され、環状二本鎖DNAのエピソームになると考えられる。

#### 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

本遺伝子組換え生物等の検出は、TaqManプローブを用いた定量的PCR法により行う（別紙4）。自動化されたプラットフォームを用いて様々な体液及び糞便からDNAを抽出及び精製する。5 µLの抽出DNAを試料として、バリデートされた qPCR反応を用いて、本遺伝子組換え生物等ゲノムの有無について検査する。定量限界（LOQ）は、50 vg/reactionである。試験方法等の詳細は別紙4に記載した。

#### 6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本遺伝子組換え生物等は、AAV5のキャプシドタンパク（未改変）を有し、ゲノムサイズもAAV5とほぼ同様である。野生型AAV5の全ゲノムは、AAV2由来のITR及び *hFVIII-SQ*発現カセットを含むよう設計されたゲノムにより置き換えられている。AAVの *rep*及び *cap*遺伝子を欠失しているため、ウイルスタンパク質を発現できない。そのため、ヘルパーウイルスと共感染しても、本遺伝子組換え生物等は複製できない。

細胞指向性を規定する本遺伝子組換え生物等のキャプシドは、野生型AAV5と同じであるため、本遺伝子組換え生物等がヒトや動植物等への感染により生物多様性に影響を与える可能性は野生型AAV5と同等であると考えられる。

導入遺伝子が増幅されうる唯一のメカニズムは、同じ細胞に、本遺伝子組換え生物等（導入遺伝子を含む）、野生型AAV（*rep*及び *cap*の機能を供与）そして、ヘルパーウイルスの三重感染が生じる場合である。このシナリオは、本遺伝子組換え生物等の標的組織（肝臓）が、ヘルパーウイルスの自然界における標的ではないため、まれである。もし、生じたとしても、野生型AAVと、本遺伝子組換え生物等（遺伝子組換えAAVが産生されても *rep*及び *cap*遺伝子が欠損し、自立的に複製し増殖できない）のウイルス粒子の産生という結果のみになる。

### 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凍庫において保管する。

投与液の調製及び保管

- (2) 本遺伝子組換え生物等は原液を希釈せずに投与する。原液の投与準備は、治療施設内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) 投与準備済の原液は、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、漏出させない処置を執って行う。

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、患者の創部を消毒し、創部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、当該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）に基づく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っては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。
- (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。
- (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) 血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、血液検体等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処理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  
患者から検体を採取し、qPCR法を用いて、十分な本遺伝子組換え生物等の排出データ  
が得られるまでの間、モニターを継続する。

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  
該当せず。

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、カニクイザル及びアカゲザルに本遺伝子組換え生物等を単回静脈投与した  
非臨床試験が実施された（別紙4）。

血友病A患者への単回静脈内投与を裏付ける目的で、*hFVIII-SQ*タンパクの形質導  
入、相対発現量及び活性を明らかにし、また本遺伝子組換え生物等におけるAAV5キャ  
プシド、導入遺伝子のDNA及び*hFVIII-SQ*導入遺伝子産物の全体的な安全性プロファイ  
ルを明確にするために非臨床試験プログラムがデザインされた。1つの*in vitro*試験及  
び、ノーマルCD-1又はC57BL6マウス、*Rag2*<sup>-/-</sup>（B6.129S6*Rag2*<sup>tm1Fwa</sup> N12）マウス、  
*Factor VIII*<sup>-/-</sup>（B6;129S F8*tm1Kaz*/J）マウスと*Rag2*<sup>-/-</sup>（*Rag2*<sup>-/-</sup> x *FVIII*<sup>-/-</sup>）マウスを交配  
したホモ接合型マウス、カニクイザル又はアカゲザルを用いた複数の*in vivo*試験におい  
て本遺伝子組換え生物等を評価した。

肝臓の生体内分布を評価した非臨床試験において、肝臓の本遺伝子組換え生物等の  
DNA及びRNAレベルは本遺伝子組換え生物等をマウスとサルに単回静脈投与後に増加  
した。マウスでは、 $2 \times 10^{11}$  vg/kg ~  $2 \times 10^{14}$  vg/kg、サルでは、 $2 \times 10^{11}$  vg/kg ~  $6 \times 10^{13}$   
vg/kg の投与量で評価した。本遺伝子組換え生物等を投与後 4 ~ 13週間の雄マウス  
で、肝臓の本遺伝子組換え生物等のDNAレベルは減少し、RNAレベルは増加した。こ  
れらの結果は、AAV遺伝子治療では、投与後数週間は不安定な一本鎖直鎖DNAが分解  
し、安定な二本鎖DNAがエピソームとして形成されるという仮説と一致している。こ  
れらの安定なDNAが、RNAレベルの維持及び*hFVIII-SQ*タンパクの発現に貢献してい  
る。

本遺伝子組換え生物等を $6 \times 10^{13}$  vg/kg または  $2 \times 10^{14}$  vg/kg でマウスに単回静脈投  
与した結果、本遺伝子組換え生物等のDNAは主に肝臓に集積した。組織（mg/mL）当  
たり、または、DNA量（ $\mu$ g）によって換算した本遺伝子組換え生物等のDNA量は、  
脳、腎臓、肺、腸間膜リンパ節、精巣、心臓、骨髄、血液、脾臓と比較し、肝臓で多  
く検出された。総じて、マウスを用いた生体内分布試験では、本遺伝子組換え生物等  
のDNAは肝臓に集積した。

非臨床試験により、 $2 \times 10^{14}$  vg/kg までの単回静脈投与における本遺伝子組換え生物等の有効性及び安全性がマウスで示されている。血友病モデルマウス、免疫不全Rag-/-マウス、ノーマルCD-1マウス、並びにカニクイザル及びアカゲザルの試験から、本遺伝子組換え生物等は、臨床における治療レベルを達成する用量を単回静脈投与した場合に安全かつ忍容性が良好であることが示唆されている。

## 6 国外における使用等により得られた情報

本遺伝子組換え生物等を使用した臨床試験の概要について別紙4に示す。本遺伝子組換え生物等を使用した第I/II相臨床試験（270-201試験）が現在進行中で、英国における用量漸増試験を、合計15名の男性を対象に、 $6 \times 10^{12}$  vg/kg ~  $6 \times 10^{13}$  vg/kgの用量で単回静脈投与にて実施した。

さらに、重症血友病A患者における本遺伝子組換え生物等（ $6 \times 10^{13}$  vg/kg）の有効性及び安全性を評価する第3相臨床試験（270-301試験）を実施中であり、134名の男性が登録されている。本遺伝子組換え生物等（ $4 \times 10^{13}$  vg/kg）を評価する別の第3相臨床試験（270-302試験）は登録を終了した。

本遺伝子組換え生物等の排泄は臨床開発プログラムの一部として評価中である。270-201試験及び270-301試験において、本遺伝子組換え生物等のDNAは本遺伝子組換え生物等を投与したすべての被験者のすべての試料で検出された。本遺伝子組換え生物等を $6 \times 10^{13}$  vg/kg 投与の本遺伝子組換え生物等のDNAレベルは血液で最も高く、続いて、唾液、精液、便、尿となった。本遺伝子組換え生物等のDNA濃度のピークは本遺伝子組換え生物等を投与後早い時期に見られ、すべての試料において、 $t_{max}$  は投与後1~9日であった。本遺伝子組換え生物等のDNA濃度はピークに達した後、血液、唾液、精液、便、尿でモニター期間中確実に減少した。詳細については別紙4を参照。

臨床試験での本遺伝子組換え生物等の生体内分布は血液で評価され、排出は唾液、尿、精液及び便で評価された。それぞれの試料は、以下の表1に示すようなスケジュールで、3回連続陰性となるまで評価された。精液では、3回連続陰性の結果を得た後も12週までモニターした。qPCR法の詳細は別紙4参照。

表1 本遺伝子組換え生物等の生体内分布及び排出試験用試料採取計画

試験番号	サンプリング計画
270-201	ベースライン、2、4、8日目、その後、4~16週目までは2週間に1回、その後、2年目の終わりまでは、4週間に1回、その後、5年目の終わりまでは、6週間に1回

270-301	ベースライン、1（投与後 2～24時間）、4、8日目、その後、2、3、4、6、8、12、16、20、24、26、32、36、40、42、44、48及び52週目、その後、2年目の終わりまでは、4週間に1回、その後、5年目の終わりまでは、6週間に1回
270-301	ベースライン、1（投与後 2～24時間）、2、3、8日目、その後、2、3、4、6、8、12、16、20、24、26、32、34、36、44及び52週目、その後、2年目の終わりまでは、4週間に1回、その後、5年目の終わりまでは、6週間に1回
270-302	ベースライン、1（投与後 2～24時間）、4、8日目、その後、2、3、4、6、8、12、16、20、24、26、32、36、40、44、48及び52週目、その後、2年目の終わりまでは、4週間に1回、その後、5年目の終わりまでは、5週間に1回

#### 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

野生型AAVは、競合、有害物質の産生等により他の微生物を減少させることは知られていない。本遺伝子組換え生物等は、*rep*及び*cap*遺伝子を含むウイルスゲノムを目的物質発現のための供与核酸で置き換えた以外は野生型AAVと本質的に同一であり、カプシドタンパクの構造も野生型AAVと同じであることから、これらの改変による感染宿主域の変化はない。よって、本遺伝子組換え生物等により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

本遺伝子組換え生物等により影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかったため、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、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* 及び*cap* 遺伝子を含むウイルスゲノムを目的物質発現のための供与核酸で置き換えた以外は野生型AAVと本質的に同一であり、カプシドタンパクの構造も野生型AAVと同じであることから、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

野生型AAVの病原性は知られていない。本遺伝子組換え生物等のカプシドタンパクは野生型AAV5と同一であり、供与核酸の病原性は知られていないことから、AAVと同様に病原性を持つ可能性は低いと考えられる。

これまでの20年にわたり3,000人以上の患者に施された遺伝子組換えAAVを用いた臨床試験の結果から、遺伝子組換えAAVが肝細胞癌を起こすという証拠はない（文献16）。また、遺伝子組換えAAVを用いた治療が、肝障害を有する患者に新たな癌発生リスクを与えるという証拠はない。遺伝子組換えAAV治療患者で起こった肝細胞癌の例は遺伝子組換えAAVとは無関係であることが結論付けられている（文献17）。

### (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、弊社の製造工程では、以下の理由により複製可能なAAV (rcAAV) が製造されるリスクは非常に低い。

1. ITRは████████ カセットを欠いている。
2. 製造時、████████ 及び ██████████ カセットは別の ██████████ によって保持されており、それぞれの配列は組換えを起こさないようにホモロジーのある配列は削除されている。
3. ██████████ の制御配列は削除されており、████████ 遺伝子発現は、████████ によってのみ制御される。
4. ██████████ 遺伝子のコード領域は████████ カセットだけでAAVのパッケージングサイズを超えるように設計されている。

製造工程で生じうるrcAAVは、製剤の規格試験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

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。

### 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* 及び*cap* 遺伝子を含むウイルスゲノムを目的物質発現のための供与核酸で置き換えた以外は野生型AAVと本質的に同一であり、 capsid タンパクの構造も野生型AAVと同じであることから、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の capsid タンパク質に対する免疫応答は、野生型AAVの免疫応答と同様に、自然界における感染と同等の量の暴露であれば無症候性であると考えられる。複数の臨床試験において、組換えAAVの大量投与によって重篤な免疫炎症反応等が報告されているが、これらの反応は急性で一時的であり、投薬で効果的に管理可能で、ステロイド剤の投与等によって、これらの免疫炎症反応の発生の軽減が可能であると考えられている（文献18、19）。

本遺伝子組換え生物等由来のDNAが肝臓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、hFVIII-SQタンパク質が産生される。

hFVIII-SQタンパク質はヒト肝臓特異的プロモーターの制御により、主に肝臓に発現する。したがって、本遺伝子組換え生物等を介したhFVIII-SQタンパク質の発現による肝臓以外の局所的な毒性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hFVIII-SQタンパク質は、ヒトにおいて発現している血液凝固第VIII因子と類似しているため、このhFVIII-SQタンパク質に対する免疫応答は起こりにくいと考えられる。

高投与量として、マウスを用いた用量反応試験において、本遺伝子組換え生物等を  $1.77 \times 10^{14}$  vg/kg で単回静脈投与した結果、平均 hFVIII-SQタンパク発現レベルは臨床時（投与量： $6 \times 10^{13}$  vg/kg）の約3倍であった。しかし、血漿hFVIII-SQタンパク発現レベルに関する有害事象はなかった。このマウスの試験は、hFVIII-SQタンパクの過

剰発現が必ずしも有害事象を引き起こすわけではないことを示している。臨床試験において、基準値上限以上のFVIII活性レベルを示した患者はいるが、追加介入なしで基準範囲に戻った。一過性の高FVIII活性に対して、有害事象及び後遺症は報告されていない。

### (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、製剤の規格試験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い。

よって、本遺伝子組換え生物等が発現するhFVIII-SQタンパク質が第三者、野生動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

当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、有害物質の産生性に起因した生物多様性影響が生ずるおそれはない。

#### 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

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*及び*cap*遺伝子を含むウイルスゲノムを目的物質発現のための供与核酸で置き換えた以外は野生型AAVと本質的に同一であり、カプシドタンパクの構造も野生型AAVと同じであることから、これらの改変による感染宿主域の変化はない。植物及び微生物がAAVに感染することは知られていない。

##### (2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等が感染したヒト以外の哺乳類に*hFVIII-SQ*遺伝子を水平伝播する可能性は低い。仮に起こったとしても、患者に投与されるベクターDNA量と比べると極めて少ないため、他の哺乳類への影響はないと考えられる。

また、AAV粒子へパッケージング可能なゲノムサイズを考慮すると、rcAAV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、rcAAV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い。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環境に影響の出る量、水平伝播さ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。

製造工程で生じうるrcAAVは、製剤の規格試験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

野生型AAVについては、トランスポゾンやプラスミド等の可動性遺伝因子 (mobile genetic elements) は知られておらず、当該第一種使用等によってそれらを介した遺伝子の伝搬が起こることはないと考えられる。

## V 総合的評価

本遺伝子組換え生物等が感染する動植物等の種類は野生型AAV5と同等で、哺乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

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の環境中への拡散は極力抑えられており、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、ウイルスゲノムを目的物質発現のための供与核酸で置き換えた以外は野生型AAVと本質的に同一である。本遺伝子組換え生物等による *hFVIII-SQ* 遺伝子の発現はヒト及び他の哺乳動物に病原性、有害物質の産生性及び核酸を水平伝達する性質をもたないことから、生物多様性への影響はないと考えられる。

また、本遺伝子組換え生物等は増殖能を失わせるように設計されているため、野生型AAV及びヘルパーウイルスと三重感染しないかぎり、環境中で増殖することはなく、その可能性は極めて低い。

本遺伝子組換え生物等はrcAAVが発生しにくいように設計されているため (IV章参照)、rcAAVが発生する可能性はほとんどない。

rcAAVは野生型AAVと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由来のrcAAVが有害遺伝子を環境中に水平伝播する可能性は極めて低い。rcAAVは野生型AAV5と極めて近い構造になると考えられるため、rcAAVが病原性、有害物質の産生性及び核酸を水平伝達する性質によりヒト及び他の哺乳動物等に影響を与えることはないと考えられる。

ヒト体内の同一の細胞に本遺伝子組換え生物等と野生型AAV及びそのヘルパーウイルスが感染する可能性は極めて低く、本遺伝子組換え生物等はやがて環境中から消滅すると思われる。

したがって、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。

生物多様性影響評価書別紙一覧

別紙 1 : 宿主の属する分類学上の種に関する (補足) 情報

別紙 2 : 供与核酸に関する (補足) 情報

別紙 3 : 遺伝子組換え生物等の調製、品質管理及び性質に関する (補足) 情報

別紙 4 : 本遺伝子組換え生物等及び類縁株に関する非臨床及び臨床試験の結果

別紙 5 : 組換えバクミドの構成及び構成要素の由来

【生物多様性影響評価書 引用文献リスト】

1. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger AM, Hughes J, Mietzsch M, et al. and Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol*. 2019 Mar; 100(3): 367-8.
2. Samulski RJ and Muzyczka N. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu Rev Virol*. 2014; 1: 427–51.
3. Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J and Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *PNAS*. 2002; 99(18): 11854-9.
4. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, LuY, Calcedo R, Zhou X, and Wilson JM. Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *Journal of Virology*. 2004; 78(12): 6381–8.
5. Tenenbaum L, Lehtonen E, and Monahan PE. Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors. *Current Gene Therapy*. 2003; 3: 545-65.
6. Gaudet D, Méthot J, Déry S, Brisson D, Essiembre C, Tremblay G, and Tremblay K et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther*. 2013; Apr;20(4):361-9
7. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, and Yu ZF et. al., Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017; Aug 26;390(10097):849-860.
8. Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, Connolly AM, Crawford TO, and Darras BT et al., Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2021; Apr;20(4):284-293.
9. Samulski RJ, Zhu X, et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* (1991) 10 (12): 3941 -50.
10. Zinn E and Vandenberghe LH. Adeno-associated Virus: Fit to serve. Published in final edited form as: *Curr Opin Virol*. 2014 October; 0: 90–7.
11. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF and 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. *Human Gene Therapy*. June 2010; 21:704–12.
12. Annex 4: Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. WHO Technical Report, Series No. 924, 2004.
13. Sofer G, Lister DC and Boose JA. Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century. Part 6, Inactivation Methods Grouped by Virus. *BioPharm International*. APRIL 2003.
14. Sandberg H, Almstedt A, Brandt J, Gray E, Holmquist L, Oswaldsson U, Sebring S, et al.

- Structural and Functional Characteristics of the B-domain-deleted Recombinant Factor VIII Protein, r-VIII SQ. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 93-100.
15. Levitt N, Gil BA, and Proudfoot NJ. Definition of an efficient synthetic poly(A) site. *Genes & Development.* 1989; 3:1019-25.
  16. Kuzmin D, Shutova M, et al. The clinical landscape for AAV gene therapies. 2021 March; 20(3): 173-174
  17. Unique Press Release, uniQure Announces FDA Removes Clinical Hold on Hemophilia B Gene Therapy Program, April 26, 2021
  18. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* (2013) 122. 23-36.
  19. Muhuri M, Maeda Y, et al. Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors. *J Clin Invest* (2021) 131(1). e143780.