

様式第1（第7条関係）

第一種使用規程承認申請書

令和4年3月28日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 シミック株式会社
申請者 代表取締役 社長執行役員 藤枝 徹 (印)
住所 東京都港区芝浦 1-1-1 浜松町ビルディング

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 6 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、抗 CD70 キメラ抗原受容体を発現する非増殖性遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV-145b)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>ヒトの治療を目的とした、本遺伝子組換え生物等の残存が否定できない細胞の投与、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を用いて作製した細胞（以下「CTX130」という。）について、本遺伝子組換え生物等の残存が否定できない状況で使用する場合、以下の方法により第一種使用等を行う。</p> <p>CTX130 の保管</p> <p>(1) CTX130 は、漏出しない容器に入れた状態で、遺伝子組換え生物等を含有する旨を表示し、治療施設内の適切に管理された液体窒素の気相中において保管する。</p> <p>運搬</p> <p>(2) CTX130 の治療施設内での運搬は、漏出しない容器に入れた状態で行う。</p> <p>患者への投与</p> <p>(3) 患者への CTX130 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>感染性廃棄物等の処理</p> <p>(4) CTX130 並びに CTX130 に直接接触した注射針、バッグ、カテーテル等の器具類及び患者血液の付着した器材等は、廃棄物の処理及び清掃</p>

	<p>に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づき治療施設で定められている医療廃棄物の管理に係る規程に従って廃棄する。</p> <p>(5) 治療施設外で保管された未使用の CTX130 を廃棄する場合は、密封された状態で焼却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

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、パルボウイルス科ディペンドウイルス属 (*Parvoviridae Dependovirus*) に分類される一本鎖 DNA ウイルスである (文献 1、2)。野生型 AAV は、複製にアデノウイルスや単純ヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスの存在が必須であり、単独では増殖しない (文献 3)。

AAV はヒト及びその他の霊長類を含む、複数の脊椎動物から発見されているが、現在のところヒトに対する病原性は認められていない (文献 4)。成人の約 85% は AAV に対する抗体を有するとされるが (文献 5)、これまで AAV による既知の病原性は報告されていない。

AAV には、100 を超える血清型が存在しており (文献 1)、いずれの血清型においても複製及び宿主域は共通した特性を示す。一方で、AAV はその血清型によって特定の組織指向性を示す (文献 1、6)。各血清型の組織指向性の違いは、細胞特異的な受容体に結合するキャプシドタンパク質の違いに起因している (文献 2)。

本遺伝子組換え生物等は、アデノ随伴ウイルス 2 型 (AAV2) 由来の逆位末端反復配列 (ITR) に挟まれた導入用遺伝子及びその発現調節エレメントをから成る一本鎖 DNA を含み、心臓、肝臓、骨格筋及び肺に組織指向性があるアデノ随伴ウイルス 6 型 (AAV6) (文献 6、7) 由来のキャプシドタンパク質を有している。

2. 使用等の歴史及び現状 (人用若しくは動物用医薬品としての利用の歴史又は産業的な利用の歴史及び現状を含む。)

1980 年代後半に野生型 AAV のウイルスタンパク質 (Rep 及び Cap) をコードする遺伝子を遺伝子治療の対象となる遺伝子に置き換えることにより作成された遺伝子組換え AAV (rAAV) が開発されたことにより、AAV の遺伝子治療への利用が可能になり、AAV は遺伝子治療における効果的かつ安全な送達手段として有望視されてきた (文献 8)。

AAV は様々な疾患の遺伝子治療の臨床試験において利用実績がある (文献 8)。AAV6 を利用した遺伝子治療の臨床試験も実施されている (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03587116、NCT04370054)。また、AAV は、*ex vivo* と *in vivo* のいずれにおいても、標的細胞のゲノム編集を目的とした遺伝子編集カーゴを送達するための手段としても利用されている (文献 9、10、11)。

AAV を利用したヒトの遺伝子治療として、欧米にて 2 製品が承認されており (文献 12、13)、そのうち 1 製品は日本においても承認されている (文献 14)。

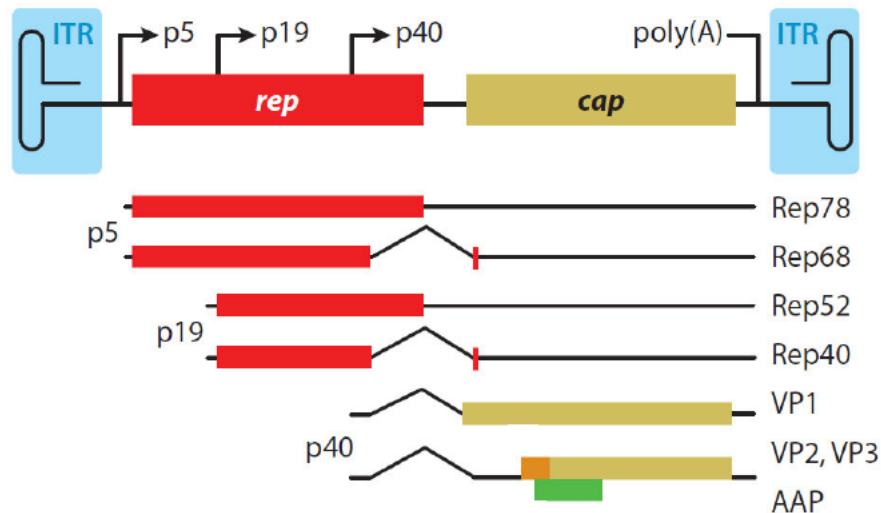
3. 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

AAV は、約 4700 塩基の一本鎖 DNA をもつ、エンベロープを持たない正 20 面体構造のキャプシド粒子である。AAV ゲノムは、二つのオープンリーディングフレーム (ORF) の *rep* 及

び *cap* 遺伝子と、ゲノムの両端に存在するウイルスの複製起点及びパッケージングシグナルとなる ITR から構成されている (文献 4、15)。図 1 に野生型 AAV のゲノム構造を示す。いずれの血清型もほぼ同じ長さのゲノムを有し、基本構造は同じである (文献 2)。

図 1. 野生型 AAV のゲノム構造



矢印 (→) はプロモーター配列 (p5、p19 及び p40) の位置を示す。ITR は *rep* 及び *cap* 遺伝子の両端に位置する。*rep* 遺伝子は p5 及び p19 プロモーターから転写開始され、複製及びキャプシドへのゲノムのパッケージングに必要な 4 つの非構造タンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40) をコードする (赤色)。*cap* 遺伝子は p40 プロモーターから転写開始され、キャプシド (外殻) を形成する 3 つの構造タンパク質 (VP1、VP2 及び VP3) をコードする (黄色)。VP2/VP3 mRNA はアセンブリ活性化タンパク質 (AAP) もコードする (緑色) (文献 2)。

AAV の各構成要素の機能を以下に示す (文献 2、16)。

- Rep タンパク質 : *rep* 遺伝子は、4 つのタンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40) をコードする。このうち、Large Rep タンパク質 (Rep78 及び Rep68) は、AAV の DNA 複製に必要な部位特異的一本鎖エンドヌクレアーゼ、DNA ヘリカーゼ及び ATP アーゼとして機能する。Small Rep タンパク質 (Rep52 及び Rep40) は DNA ヘリカーゼドメインを有しており、キャプシドにゲノム DNA をパッケージングするために必要である。
- Cap タンパク質 : *cap* 遺伝子は 3 種のキャプシドタンパク質 (VP1/VP2/VP3) をコードしている。これらは、AAV ゲノムを保護するように取り囲むキャプシドを形成し、AAV の細胞への結合と内在化に関与する。キャプシドは、キャプシドタンパク質を 1 : 1 : 10 (VP1 : VP2 : VP3) のモル比で構成された 60 のサブユニットから構成されている。VP1 及び VP2 に存在する N 末端配列は核局在化シグナルである。VP1 の N 末端配列はホスホリパーゼ A2 活性を有しており、ウイルス感染に必要である。VP2/VP3 mRNA は、CTG 開始コドン (図 1) からのリーディングフレームで翻訳されるアセンブリ活性化タンパク質 (AAP) をコードする。
- アセンブリ活性化タンパク質 (AAP) : AAP は、主要な VP3 キャプシドタンパク質の核内移行、キャプシドの構築及び成熟を促進する。
ゲノムは、VP1、VP2 及び VP3 から構成されるキャプシド内にパッケージングされる。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

野生型 AAV が細胞に感染し核内に侵入すると、ウイルスゲノムがキャプシドから核内放出される。ウイルスゲノムは一本鎖及び／又は二本鎖環状 DNA (エピソーム) 分子のモノマー又はオリゴマーとして核内に存在する。AAV のゲノムは、宿主細胞のゲノムへのランダムな組込みが低頻度で起こり得る。ヒト第 19 染色体の AAVS1 領域への組込みには、AAV *rep* 遺伝子の翻訳産物である AAVRep タンパク質の関与が必要であるが、rAAV は *rep* 遺伝子を欠失しているため、AAVS1 領域への組込みは起こらない。したがって、本遺伝子組換え生物等に *rep* 遺伝子は含まれないことから、本遺伝子組換え生物等が染色体に挿入されることによる突然変異のリスクは極めて低いと考えられる (文献 2)。他の rAAV の文献情報から、本遺伝子組換え生物等のゲノムが生殖細胞系列へ組込まれる可能性も低いと考えられる (文献 17、18、19)。

AAV ゲノムは、そのほとんどが非複製状態のエピソームとして、又は潜伏感染した細胞の染色体 DNA 中に存在する。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の共感染、又は、AAV が潜伏感染した細胞にヘルパーウイルスが重複感染することにより、AAV の複製が起こる (文献 2、3)。細胞外に放出された AAV は常温において安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

野生型 AAV が哺乳動物に感染することは知られているが、血清型によって宿主域は異なる。AAV は血清型や系統に応じて、特異性の高い臓器が異なることが知られており、本遺伝子組換え生物等のキャプシドを有する AAV6 は心臓、肝臓、筋肉及び網膜に対して指向性を示すことが報告されている (文献 20)。

(4) 繁殖又は増殖の様式

AAV は吸入、粘膜との接触、飛沫及び AAV を含む物質の摂取により伝播される (文献 21)。

宿主間の AAV 伝播の作用機序は現在のところ不明であるが、分離された AAV の塩基配列の比較解析により、ヒトとサルの間もしくは、ヒトと他の哺乳類の間での種間伝播が示唆されている (文献 1、22)。

細胞が AAV に曝露されると、AAV はエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれ、核膜孔複合体を通して核内に侵入するが、AAV はアデノウイルスやヘルペスウイルスのようなヘルパーウイルスが共感染した場合のみ複製が可能である (文献 3)。ヘルパーウイルス非存在下では、AAV ゲノムは潜伏状態で核内に保持される (文献 2)。AAV が潜伏感染した細胞にヘルパーウイルスが重複感染することで、増殖性感染が再確立される可能性がある (文献 3)。

(5) 病原性

成人のほとんどが AAV への抗体を有するが、AAV と既知の病原性に直接的な関連性はない (文献 3)。なお、ヒト疾患のマウスモデルにおいて野生型 AAV2 の染色体への組込みと肝がん発症との関連を示唆する報告があるが、これまでに AAV を用いて実施されたヒトでの臨床試験において AAV の染色体への組込みに起因する肝がんの発症は観察又は確認されていない。

(6) 有害物質の産生性

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

(7) その他の情報（不活化条件等を含む。）

野生型 AAV 及び rAAV は、次亜塩素酸ナトリウム（1～10%溶液）、0.25%過酢酸、UV 照射、オートクレーブ（121℃、20 分）、焼却、ヨウ素及び 0.45%ペルオキシ－硫酸カリウムにより不活化される（文献 23、24、25）。金属接触面及び金属製のシリンジ／注射針に付着した野生型 AAV 及び rAAV の不活化には、0.25%過酢酸の使用が望ましい（文献 23）。

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では、野生型 AAV におけるウイルス遺伝子である *rep* 及び *cap* 遺伝子配列を、[redacted] の相同配列であるホモロジーアーム（[redacted]）に挟まれた抗 CD70 指向性キメラ T 細胞抗原受容体（CAR）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、抗 CD70 CAR 発現カセット、左右のホモロジーアーム及びその両側の野生型 AAV2 由来の ITR からなり、遺伝子組換え AAV6 のキャプシドに内包される。

抗 CD70 CAR 発現カセットは、[redacted] プロモーター、抗 CD70 CAR コード配列（[redacted]）、合成ポリアデニル化シグナル配列（合成ポリ（A））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供与核酸の構成要素の詳細については、別紙 2 に示した。

各構成要素の由来について以下に示す。

・抗 CD70 CAR コード配列

- [redacted] をコードする領域
[redacted]
- ヒト化抗 CD70 [redacted] をコードする領域
ヒト抗 CD70 に対する [redacted] に由来し、[redacted] されている。
- [redacted] をコードする領域
[redacted] に由来し、[redacted] の配列の一部と同一である。
- [redacted] をコードする領域
[redacted] に由来し、[redacted] の配列の一部と同一である。
- [redacted]

スクリーキャップで密閉して本遺伝子組換え生物等の最終製品とし、 \blacksquare °C以下で凍結保存する。

精製後の品質管理試験において、増殖能を獲得したウイルス (rcAAV) が検出されないことを確認する。本遺伝子組換え生物等の最終製品において、品質管理試験を実施する。

製造工程及び品質管理試験の詳細は別紙 3 に示した。

4. 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

本遺伝子組換え生物等に移入した核酸は、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。また、本遺伝子組換え生物等は野生型 AAV のコード領域配列 (*rep* 及び *cap* 遺伝子) を除去しており、自己複製能を持たないため、細胞に導入後、本遺伝子組換え生物等のゲノムの大部分はエピソームとして染色体外に存在し、染色体への組込みによる突然変異のリスクは低い。

本遺伝子組換え生物等が細胞へ導入されると、本遺伝子組換え生物等の一本鎖 DNA が複製され環状二本鎖 DNA となり、染色体外にエピソームとして存在する。非分裂細胞において、本遺伝子組換え生物等の感染及び遺伝子発現は比較的長時間持続するが、活発に分裂している細胞においては、本遺伝子組換え生物等のゲノムは一定の期間で希釈され、消失する。

本遺伝子組換え生物等は、CTX130 を製造する過程で \blacksquare での *ex vivo* 遺伝子導入に用いられる。標的細胞である \blacksquare に対し、 \blacksquare

\blacksquare を用いて \blacksquare \blacksquare

\blacksquare し、本遺伝子組換え生物等を感染させることにより、 \blacksquare \blacksquare \blacksquare 遺伝子座に対し相同組換えにより目的配列 (CAR 発現カセット) が組込まれる。本遺伝子組換え生物等は、供与核酸に含まれる発現カセットを \blacksquare へ導入するためのターゲティングベクターとして用いられる。供与核酸配列が \blacksquare \blacksquare 遺伝子座に組込まれる際、本遺伝子組換え生物等のゲノム両端の ITR は組込まれない (別紙 2)。

本遺伝子組換え生物等を \blacksquare 細胞で作製する過程で rcAAV を生ずる可能性は否定できないが、極めて稀である。さらにこの rcAAV も野生型 AAV と同様にヘルパーウイルスであるアデノウイルス及びヘルペスウイルスとの共感染がないかぎり実際には複製することは不可能である。

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及び識別は、本遺伝子組換え生物等の特異的配列を増幅する定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) 法を用いて行う。本遺伝子組換え生物等の出荷試験における qPCR 法の概要を別紙 3 に記述する。

CTX130 に残存する本遺伝子組換え生物等を検出する試験方法を別紙 4 及び別紙 6 に記述する。 \blacksquare \blacksquare \blacksquare \blacksquare に添加することにより調製した標準試料及び被験試料からウイルス DNA を抽出し、 \blacksquare \blacksquare \blacksquare に特異的なプライマーを用いた qPCR を実施することで、本遺伝子組換え生物等を定量する。本 qPCR 法の定量限界 (下限値) は \blacksquare vg/cell であった。

6. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

宿主である野生型 AAV6 と本遺伝子組換え生物等の間には、以下の相違点がある。

本遺伝子組換え生物等のゲノムは、野生型 AAV には存在するコード領域配列 (*rep* 及び *cap* 遺伝子) を除去しているため、これらの領域にコードされているウイルスタンパク質は発現されない。*rep* 及び *cap* 遺伝子はそれぞれウイルス DNA の複製及び AAV 粒子の形成に必要であることから、ヘルパーウイルスと共感染した場合でも本遺伝子組換え生物等は複製されない。

本遺伝子組換え生物等のウイルスゲノムには野生型 AAV6 由来の塩基配列は含まれず、両端に存在する ITR は野生型 AAV2 由来である。

本遺伝子組換え生物等は、野生型 AAV と同様に、分裂細胞及び非分裂細胞に感染可能であり、細胞へ導入された AAV ゲノムは主として染色体外にエピソームとして存在する。野生型 AAV では、極めて稀ではあるが、*rep* 遺伝子によりヒト染色体への AAV ゲノムの部位特異的組込みが起こる可能性が報告されている (文献 26)。しかし本遺伝子組換え生物等は *rep* 遺伝子を欠損しており、野生型 AAV が有するヒト染色体への部位特異的な組込み能を喪失しているため、宿主染色体への組込みはランダムであり、極めて稀であると考えられる。

本遺伝子組換え生物等の作製時、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子をもつプラスミド (AAV パッケージングプラスミド) と CAR 遺伝子をもつプラスミド (AAV ベクタープラスミド) の間での遺伝子組換えにより rcAAV が生じる可能性がある。この場合でも、ウイルスゲノムの複製に必須な ITR 及び *rep* 遺伝子、及び細胞指向性を規定するキャプシドの形成に必須な *cap* 遺伝子は野生型 AAV6 と同一であるので、遺伝子組換え生物等に該当するものも含め、rcAAV がヒトや動植物等への感染性、繁殖又は増殖の様式、病原性など、生物多様性に影響を与える性質は野生型 AAV6 と同等であると考えられる。

III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1. 使用等の内容

ヒトの治療を目的とした、本遺伝子組換え生物等の残存が否定できない細胞の投与、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を用いて作製した細胞 (以下「CTX130」という。) について、本遺伝子組換え生物等の残存が否定できない状況で使用する場合、以下の方法により第一種使用等を行う。

CTX130 の保管

- (1) CTX130 は、漏出しない容器に入れた状態で、遺伝子組換え生物等を含有する旨を表示し、治療施設内の適切に管理された液体窒素の気相中において保管する。

cells/mouse) 又は CTX130 (低用量: cells/mouse、高用量: cells/mouse) を単回静脈内投与し、を誘発する可能性及び忍容性を評価した (観察期間: 週間)。これらの投与量は、体重あたりに換算すると予定最大臨床用量の に相当する。 を投与したマウスでは、すべての個体において投与 日後までに致死的な を発症した。一方、 週間の試験期間中、いずれの CTX130 投与群のマウスにも致死的な は認められなかった。CTX130 投与群は全個体が投与 日後まで生存した。さらに、 検討試験において、最終剖検時 (試験 日目) に を評価した。CTX130 を投与したマウスの組織から、 は観察されなかった。

- 薬物動態

しかしながら、上述の安全性試験において採取した について qPCR、 並びに について CTX130 の存在を評価した。

の結果から、CTX130 群においては投与 日あたり (投与 日後まで) CTX130 が検出された。CTX130 群においては投与 日後 (投与後 週間) の間に CTX130 が検出された。投与 日後の試験終了時には、 群からも CTX130 は検出されなかった。

投与 日後に採取した からの検体における の結果から、 においては CTX130 投与群で 。 においては CTX130 群で が観察されたが CTX130 群では は観察されなかった。

では、 における に対する が認められ、 におけるより が認められた。

- CTX130 の最終製品に残存する本遺伝子組換え生物等が排出される可能性

CTX130 の最終製品の複数のロットで、残存する本遺伝子組換え生物等の検出を行う特性解析アッセイが実施され、残存する本遺伝子組換え生物等はすべてのロットから検出されなかった。

本遺伝子組換え生物等が別紙 6 で算出したように非常に低いレベルで CTX130 最終製品中に残存しても、本遺伝子組換え生物等は 増殖し細胞外に放出されることはないと考えられる。したがって、CTX130 を投与された患者では、CTX130 製品に残存する本遺伝子組換え生物等が される可能性は低いと考える。

また、

残存する本遺伝子組換え生物等が患者の
されても、CTX130 投与を受けた患者の が本遺伝子組換え生物等に対す
る と考えられる。また、
を考慮する
と、本遺伝子組換え生物等の
別紙6に示したように CTX130 から残留 AAV は検出されなかった。rcAAV が
であることが確認された本遺伝子組換え生物等 を臨床試験で用いる CTX130
の製造に使用するため、CTX130 において rcAAV 又は本遺伝子組換え生物等が検出される
可能性は非常に低い。
上述のように、CTX130 投与患者において rcAAV 又は本遺伝子組換え生物等が産生される
確率が低いこと、AAV 感染の効率が低いこと、及び健康人集団における AAV 血清反応陽
性のレベルが高いことから、rcAAV 又は本遺伝子組換え生物等を排出する患者のリスクは
極めて低い。したがって、感染性を有する遺伝子組換え生物等のウイルス排出はないと考
えられる。

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用いて製造した CTX130 の第 I 相臨床試験である、試験 CRSP-ONC-003 (IND 番号 : 19948、EudraCT 番号 : 2019-004513-14、ClinicalTrials.gov Identifier : NCT04438083) 及び試験 CRSP-ONC-004 (IND 番号 : 19549、EudraCT 番号 : 2019-004526-25、ClinicalTrials.gov Identifier : NCT04502446) の 2 つの臨床試験が米国、カナダ、オーストラリア及び欧州で実施中である (別紙 5)。2021 年 4 月 22 日 で、被験者 例が CTX130 の投与を受けた。いずれの試験においても用量制限毒性は認められておらず、現在までのところ CTX130 は許容可能な安全性プロファイルを示している。

IV 生物多様性影響評価

1. 他の微生物を減少させる性質

(1) 影響を受ける可能性のある微生物の特定

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は野生型 AAV の感染宿主域と概ね同じであると考えられ、微生物に感染することはなく、影響を受ける可能性のある微生物は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当なし

(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野生型 AAV の感染宿主域と概ね同じであると考えられ、霊長類及び他の哺乳類が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

野生型 AAV に病原性は認められておらず、本遺伝子組換え生物等も同様に病原性を有さないと考えられる。本遺伝子組換え生物等を用いて製造した CTX130 を用いた非臨床試験の結果において、本遺伝子組換え生物等の病原性は認められていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等は環境中への拡散がほとんどなく、ヘルパーウイルスが共存しても野生型 AAV が共感染しない限り増殖しない。

野生型 AAV による病原性は認められていないことから、本遺伝子組換え生物等により病原性が生じる可能性は極めて小さい。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、増殖する可能性は極めて低い。

製造工程で生じうる rcAAV は、本遺伝子組換え生物等の規格試験及び CTX130 中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

病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

3. 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は野生型 AAV の感染宿主域と概ね同じであると考えられ、霊長類及び他の哺乳類が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等が感染した細胞では、抗 CD70 CAR タンパク質が新たに産生され、細胞表面に発現すると考えられる。本遺伝子組換え生物等を用いて製造したヒト同種 T 細胞製品である CTX130 はその特性上、CD70 発現腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を示すが、T 細胞以外の細胞に本遺伝子組換え生物等が感染して抗 CD70 CAR タンパク質を細胞表面に発現したとしても、細胞毒性はほとんど認められないと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

当該第一種使用規程に従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等は環境中への拡散がほとんどなく、ヘルパーウイルスが共存しても野生型 AAV が共感染しない限り増殖しない。そのため、本遺伝子組換え生物等により有害物質が生じる可能性は極めて小さい。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、増殖する可能性は極めて低い。

出荷規格において rcAAV の存在は「陰性」であるため、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は極めて低く、rcAAV が検出限界以下で存在していたとしても、ヘルパーウイルス非存在下では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

有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

4. 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物又は他の微生物の特定

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は野生型 AAV の感染宿主域と概ね同じであると考えられ、霊長類及び他の哺乳類が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等が野生型 AAV 及びヘルパーウイルスと共感染した場合には、感染性の本遺伝子組換え生物等が複製され、非管理下で排泄等を介して第三者や野生動物に水平感染する可能性は否定できないが、下記 (3) に示すように、本遺伝子組換え生物等の核酸が水平伝達される可能性は低い。核酸が水平伝達された場合には、抗 CD70 CAR がその細胞で発現する可能性があるが、3 (2) に記載のとおり、有害性は認められていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

感染性を有する本遺伝子組換え生物等は、野生型 AAV 及びヘルパーウイルスが共感染した場合という極めて限定的な条件下でのみ複製される。第一種使用規程に従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、本遺伝子組換え生物等が水平感染を生ずる可能性は低い。

- 文献 3 Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther.* 2003 Dec; 3(6):545-565.
- 文献 4 Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2019 May; 18(5):358-378.
- 文献 5 Berns KI. Parvovirus replication. *Microbiol Rev.* 1990 Sep; 54(3):316-329.
- 文献 6 Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.* 2008 Jun; 16(6):1073-1080.
- 文献 7 Halbert CL, Allen JM, Miller AD. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J Virol.* 2001 Jul; 75(14):6615-6624.
- 文献 8 Lapteva L, Purohit-Sheth T, Serabian M, Puri RK. Clinical Development of Gene Therapies: The First Three Decades and Counting. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 Oct 10; 19:387-397.
- 文献 9 Khan IF, Hirata RK, Russell DW. AAV-mediated gene targeting methods for human cells. *Nat Protoc.* 2011 Apr; 6(4):482-501.
- 文献 10 Gaj T, Staahl BT, Rodrigues GMC, Limsirichai P, Ekman FK, Doudna JA, Schaffer DV. Targeted gene knock-in by homology-directed genome editing using Cas9 ribonucleoprotein and AAV donor delivery. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jun 20; 45(11):e98.
- 文献 11 MacLeod DT, Antony J, Martin AJ, Moser RJ, Hekele A, Wetzel KJ, Brown AE, Triggiano MA, Hux JA, Pham CD, Bartsevich VV, Turner CA, Lape J, Kirkland S, Beard CW, Smith J, Hirsch ML, Nicholson MG, Jantz D, McCreedy B. Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells. *Mol Ther.* 2017 Apr 5; 25(4):949-961.
- 文献 12 U.S. Food and Drug Administration, LUXTURNA
<<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/luxturna>> (Accessed: 2021 年 9 月 2 日)
- 文献 13 U.S. Food and Drug Administration, ZOLGENSMA
<<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma>> (Accessed: 2021 年 9 月 2 日)
- 文献 14 医薬品医療機器総合機構, ズルゲンスマ点滴静注
<<https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/saiseiDetail/GeneralList/4900404X1020>> (Accessed: 2021 年 9 月 2 日)
- 文献 15 Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther.* 2006 Sep; 14(3):316-327.
- 文献 16 Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 2017; 31(4): 317–334.
- 文献 17 Rajasekaran S, Thatte J, Periasamy J, Javali A, Jayaram M, Sen D, Krishnagopal A, Jayandharan GR, Sambasivan R. Infectivity of adeno-associated virus serotypes in mouse testis. *BMC Biotechnol.* 2018 Nov 1; 18(1):70.
- 文献 18 Favaro P, Downey HD, Zhou JS, Wright JF, Hauck B, Mingozi F, High KA, Arruda VR. Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol Ther.* 2009 Jun; 17(6):1022-1030.

- 文献 19 Schuettrumpf J, Liu JH, Couto LB, Addya K, Leonard DG, Zhen Z, Sommer J, Arruda VR. Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol Ther*. 2006 Jun; 13(6):1064-1073.
- 文献 20 Korneyenkov MA, Zamyatnin AA Jr. Next Step in Gene Delivery: Modern Approaches and Further Perspectives of AAV Tropism Modification. *Pharmaceutics*. 2021 May; 13(5):750.
- 文献 21 Baldo A, van den Akker E, Bergmans HE, Lim F, Pauwels K. General considerations on the biosafety of virus-derived vectors used in gene therapy and vaccination. *Curr Gene Ther*. 2013 Dec; 13(6):385-394.
- 文献 22 Zinn E, Vandenberghe LH. Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol*. 2014 Oct; 8: 90-97.
- 文献 23 Howard DB, Harvey BK. Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Hum Gene Ther Methods*. 2017 Feb; 28(1):39-48.
- 文献 24 Korte J, Mienert J, Hennigs JK, Körbelin J. Inactivation of Adeno-Associated Viral Vectors by Oxidant-Based Disinfectants. *Hum Gene Ther*. 2020 Nov 6.
- 文献 25 国立成育医療センター, 国立精神・神経医療研究センター. 治療施設におけるカルタヘナ法第一種使用規程対応マニュアル カルタヘナ法第一種使用規程承認申請 アデノ随伴ウイルス (2020. 10. 15版) 対応. 2020年12月9日版.
- 文献 26 Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J*. 1991 Dec; 10(12):3941-3950.
- 文献 27 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):704-712.
- 文献 28 van Gestel MA, Boender AJ, de Vrind VA, Garner KM, Luijendijk MC, Adan RA. Recombinant adeno-associated virus: efficient transduction of the rat VMH and clearance from blood. *PLoS One*. 2014 May 23; 9(5):e97639.