

第一種使用規程承認申請書

令和4年10月20日

厚生労働大臣

環境大臣

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。

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、ヒト RPE65 タンパク質発現カセットを搭載する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス2型（AAV2-hRPE65v2）
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><b>本遺伝子組換え生物等の原液の保管</b></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凍庫又は冷蔵庫において行う。</p> <p><b>本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管</b></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><b>運搬</b></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><b>患者への投与</b></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、患者の網膜下に直接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><b>投与後の患者からの排出等の管理</b></p> <p>(6) 投与後、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、必要とされる期間対策を講じる。</p> <p>(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。</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。

#### 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、必要とされる期間に、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つては、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等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で保管し、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、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。

## 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：ディペンドウイルス

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]。本遺伝子組換え生物等は、アデノ随伴ウイルス 2 型 (AAV2) から末端逆位配列 (ITR) 以外のウイルス配列すべてを削除し、目的の遺伝子及び関連する調節エレメントを挿入することにより作製しており、AAV2 に由来するカプシドタンパク質を有する。

文献 1: Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE(2003) Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors. *Curr Gene Ther*; 3: 545-65.

文献 2: Samulski RJ, Muzyczka N(2014) AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu Rev Virol*; 1:427-51.

文献 3: Daya S, Berns KI(2008) Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin Microbiol Rev*; 21:583-93.

#### 2. 使用等の歴史及び現状

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[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 25 nm 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 鎖の両端にある末端逆位配列 (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 種類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、宿主ゲノムへの組込み及びその後の切り出しに必要な配列を含む。AAV には複数の血清型があり、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、カ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)。AAV2 は、ヒト以外にもマウス[6], イヌ[6], [7], [8], [9], ブタ[10], [11], [12]及びサル[9], [13], [14], [15]等の哺乳動物に感染する。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体、組織指向性及び感染効率は異なる。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へ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、溶解感染または潜伏感染を起こす。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 2 kb 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ない。

**(7) その他の情報（不活性化条件を含む）**

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°C 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[16]。

文献 4: Srivastava(2016) In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol*; 21: 75-80.

文献 5: Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ et al. (1990) Site-Specific Integration by Adeno-Associated Virus. *Proc Natl Acad Sci USA*;87:2211-5.

文献 6: Bennicelli J, Wright JF, Komaromy A et al. (2008) Reversal of blindness in animal models of Leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther*;16:458-65.

文献 7: Acland GM, Aguirre GD, Ray J et al.(2001) Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet*;28:92-5.

文献 8: Acland G, Aguirre G, Bennett J et al.(2005) Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther*;12:1072-82.

文献 9: Amado D, Mingozzi F, Hui D. et al.(2010) Safety and efficacy of subretinal readministration of a viral vector in large animals to treat congenital blindness. *Sci Transl Med*;2:21ra16–21ra16.

文献 10: Hai B, Yan X, Voutetakis A et al.(2009) Long-term transduction of miniature pig parotid glands using serotype 2 adeno-associated viral vectors. *J Gene Med* ;11:506-14.

文献 11: Su H, Yeghiazarians Y, Lee A et al.(2008) AAV serotype 1 mediates more efficient gene transfer to pig myocardium than AAV serotype 2 and plasmid. *J Gene Med*;10:33-41.

文献 12: Guy J, Qi X, Muzyczka N et al.(1999) Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch Ophthalmol*;117:929-37.

文献 13: Koilkonda RD, Hauswirth WW, Guy J (2009) Efficient expression of self-complementary AAV in ganglion cells of the ex vivo primate retina. *Mol Vis*;15:2796-802.

文献 14: Yin L, Greenberg K, Hunter JJ et al. (2011) Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* ;52:2775-83.

文献 15: Favre D, Provost N, Blouin V et al. (2001) Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther*;4:559-66.

文献 16: Sofer G, Lister DC, Boose JA. (2003) Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century. *BioPharm Int*;Apr: 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 には、RPE65 cDNA 配列、サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー、ニワトリ  $\beta$  アクチン (CBA) プロモーター、第 1 エクソン及び一部の第 1 イントロンからなる CBA 遺伝子由来配列、ウシ成長ホルモン (BGH) ポリアデニル化配列及びプラスミド構築時に移入された人工配列が含まれている。供与核酸の構成及び塩基配列を別紙 2 に示す。

また、本遺伝子組換え生物の調製に使用するベクタープラスミド (pAAV2-hRPE65v2)、パッケージングプラスミド (pAAV2PKv2)、ヘルパープラスミド (pAD2HPv2) の 3 つのプラスミドの構造、構成要素及び全遺伝子配列を別紙 3 に示す。

#### (2) 構成要素の機能

各構成要素の機能の概略は以下のとおりである。

##### 1) RPE65 cDNA 配列

RPE65 タンパク質をコードする。RPE65 タンパク質は網膜色素上皮に局在し、酵素として視細胞における光受容反応に重要な役割を果たすレチノールの再生に関与しており、視覚機能の維持に不可欠である。

##### 2) CMV エンハンサー

転写亢進に関与する配列。RPE65cDNAの転写を恒常的に高める。

##### 3) CBA プロモーター

転写開始に関与する配列。

##### 4) CBA 第 1 エクソン及びイントロン

転写亢進に関与する配列。

##### 5) BGH ポリアデニル化配列

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。

## 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

II-1-(1) (詳細は別紙 2 及び別紙 3) を参照。

### (2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

別紙 3 に示す 3 つのプラスミドはローラーボトル内の HEK293 細胞に形質導入する。hRPE65 発現カセットとその両端に隣接する rAAV2 ITR からなるベクターゲノムが複製し、pAAV2PKv2 上の AAV2 *cap* 遺伝子から発現する AAV2 ビリオン内にパッケージングされる。HEK293 細胞のマスターセルバンク ( ) は、 の ( ) から入手した HEK293 細胞 ( ) のバイアル 1 本 ( ) を用いて作製された。

### (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

ローラーボトルで増殖させた HEK293 細胞の一過性形質導入により製造する。また、ベクターの精製は、2 つの異なる原理から成る精製工程を用いて実施する。バイアルに充填した最終製品は  $-65^{\circ}\text{C}$  以下 ( ) で凍結保管される。原薬及び製剤の製造方法、IPC、並びに製造国を別紙 4 に示す。

本薬の各ロットについては、確認試験、純度試験 (残留プラスミド DNA 及び複製可能 AAV を含む)、外来性感染性物質否定試験を実施し、規格に適合することを使用前に確認している。原薬及び製剤の規格を別紙 5 に示す。

## 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

本薬は、レスキュー/パッケージングに必要な *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠くため、ヘルパーウイルス存在下でも単独で複製することができない。さらに、野生型 AAV 種とは異なり、*rep* 遺伝子を持たない rAAV ベクターは AAVS1 遺伝子座への部位特異的組込みが起こらない。Rep タンパク質の非存在下で、rAAV ベクターは非分裂細胞内でエピソームとして染色体外に長期間存続する。しかし、宿主ゲノムに組み込まれる可能性も極わずかだが存在する[17]。

本薬の長期治療活性は rAAV ベクターの複製に依存せず、野生型 AAV を保有する患者で知られている遺伝的安定性を踏まえると、当該遺伝子組換え生物の遺伝形質は安定であると考えられる。

本薬と野生型 AAV が同じ細胞に存在し、その細胞がヘルパーウイルスにも感染している場合、本薬と野生型 AAV の間で相同組換えが起きる可能性がある。しかし、このような組換えでは、RPE65 発現カセットが野生型ウイルスの *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子で置換されるのみである。AAV ゲノムが *rep/cap* 遺伝子と導入遺伝子の両方を含むことは、ビリオンのパッケージングの限界を超えるため不可能である。さらに、本薬からは *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子が削除されているため、同時感染の可能性がある野生型 AAV と本薬の相同性領域は ITR に限定される。これにより、組換えが起こる可能性はさらに低くなると考えられる。

従って、導入遺伝子が移動する唯一の機序は、同一細胞が本薬（導入遺伝子を含む）、野生型 AAV（*rep* 及び *cap* 機能を提供）及びヘルパーウイルスで三重感染することである。組換えが起きた場合でも、より多くの野生型 AAV 及び本薬ベクター粒子（*rep* 及び *cap* 遺伝子は欠失しており自己持続不能）が産生されるにすぎない。

文献 17: Smith, R. H. (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Therapy*, 15(11), 817-822.

##### 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

ロット出荷試験では、PCR と制限酵素消化及びアガロースゲル電気泳動を組み合わせ、ベクター製品中の導入遺伝子を検出し、確認している。PCR は *hRPE65* 遺伝子配列に特異的なプライマーを用いて実施する。この PCR/制限酵素消化法は、本薬の *hRPE65* 導入遺伝子に特異的であり、他の rAAV ベクター及び野生型 AAV 種は検出されない。

第 3 相試験で被験者から得られる全血、血清及び涙液試料中の本薬の定量法として、頑健な定量ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）法を開発し、バリデーションを行った。ウェブツールのプライマーBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) により、使用したプライマーは本薬ベクター配列に特異的であり、ヒトゲノム中には増幅対象が他に存在しないことを確認した。qPCR 法のバリデーション結果より検出限界（分析感度）は、1 反応あたり AAV2-*hRPE65v2* が 10 コピー（10 copies/ $\mu\text{g}$  of DNA）である。試験内及び試験間の CV は、真度/併行精度のすべての試料で 30%以下であった。詳細を別紙 9 に示した。

##### 6. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

親ウイルス AAV2 と本遺伝子組換え生物には以下の相違がある。

- 野生型 AAV ゲノムは *rep* と *cap* の 2 つの遺伝子をコードし、隣接した 2 つの遺伝子の両端に末端逆位配列（ITR）がある。本遺伝子組換え生物は、ウイルスがコードする 2 つの遺伝子を削除し、目的の治療遺伝子と共に遺伝子発現のための適切な調節エレメントを 2 つの ITR の間に挿入することによって構築される。
- 本遺伝子組換え生物は、6 kDa の網膜色素上皮（RPE）特異的タンパク質（RPE65）

を送達し発現させるよう設計された複製欠損型 AAV ベクターである。

- 野生型 AAV 種とは異なり, *rep* 遺伝子を持たない本遺伝子組換え生物は AAVS1 遺伝子座への部位特異的組込みが起こらない。Rep タンパク質の非存在下で, 本遺伝子組換え生物は, 非分裂細胞内でエピソームとして染色体外に長期間存続する。
- 本遺伝子組換え生物の導入遺伝子が移動する唯一の機序は, 同一細胞が本遺伝子組換え生物 (導入遺伝子を含む), 野生型 AAV (*rep* 及び *cap* 機能を提供) 及びヘルパーウイルスで三重感染することである。

### 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

治療施設におけるヒト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凍庫又は冷蔵庫において行う。

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, 患者の網膜下に直接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, 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, 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、必要とされる期間に、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つては、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等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で保管し、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、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. 承認を取得し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

病変内に投与後の本遺伝子組換えウイルスの生体内分布、体外排出及び安全性に関する臨床データを複数の臨床試験から既に収集している（III-6 項参照）。日本で実施予定の臨床試験では、血液及び涙液を用い、ウイルスの生体内分布及び体外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、イヌあるいは霊長類（カニクイザル）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ことからヒトを対象に本遺伝子組換え生物等を投与する段階に移行しても問題はないと考えられる。詳細を別紙 6 に示した。

1. イヌあるいはサルに本遺伝子組換え生物等を網膜下投与した結果、眼に炎症性変化が認められ、主に投与手技に起因した変化と考えられた。血液学的検査、血液生化学的検査、病理組織学的検査等に毒性学的変化は認められなかった。

2. RPE65 遺伝子変異を有するイヌに本遺伝子組換え生物等を網膜下投与した結果、視細胞及び網膜色素上皮細胞への DNA の導入が認められた。

3. RPE65 欠乏マウスあるいは RPE65 遺伝子変異を有するイヌに本遺伝子組換え生物等を網膜下投与した結果、標的となる網膜色素上皮細胞に RPE65 タンパク質の発現が認められた。

4. RPE65 欠乏マウスあるいは RPE65 遺伝子変異を有するイヌに本遺伝子組換え生物等を網膜下投与した結果、網膜機能及び視覚機能の改善が認められた。

なお、AAV2 に肝がん発生のリスクが報告されている。しかしながら、野生型 AAV2 の組込みに関与する AAV Rep タンパク質は LTW888 では欠如していること、また、LTW888 は細胞分裂能のない網膜組織への単回投与であることから、LTW888 投与による発がんのリスクは低いと考えられる。

### 6. 国外における使用等により得られた情報

臨床試験で報告された有害事象

第1相安全性及び用量漸増試験（101試験）で、被験者12名に単眼網膜下投与を行った。次いで101試験の被験者12名中11名を対象とした継続試験（102試験）で反対の未投与眼への本薬投与を行い、安全性を評価した。第3相対照試験（301試験）ではRPE65遺伝子変異が確認されている31名を無作為割付けし、本薬の投与を受けた29名すべての追跡を現在行っている（301試験のピボタル期又は最初の1年を完了して対照群から介入群にクロスオーバーした9名を含む）。本臨床プログラムにおいて本薬の投与を受けた41名すべてで長期追跡を現在実施中である（投与した81眼。1名で2回目の投与を未実施）。

本臨床試験中に、投与方法に関連した重篤な有害事象が2名で報告されているが、いずれも本薬との関連は否定されている。1件は、投与手技に関連した眼内炎の処置に伴う眼圧上昇であり、もう1件は網膜障害（中心窩機能喪失）で、投与手技に関連すると判定されている。網膜沈着物（網膜下沈着）が非重篤な有害事象として3名報告されており、これらは本薬と関連ありと判定された。いずれも軽度かつ一過性であり、後遺症を伴わずに消失した。

本臨床試験で検討したすべての用量において、片眼ずつ連続投与したにもかかわらず免疫応答及び本薬の眼球外曝露は少なかった。本薬の第3相試験では、免疫原性の可能性を抑えるためすべて18日以内（12±6日）の投与間隔で両眼投与を行っている。第3相試験では、投与前と投与後の両方で抗AAV2抗体価に大きな被験者間変動があり、抗AAV2応答の有無と関連する臨床転帰は認められなかった。いずれの被験者でもベクターカプシド又は導入遺伝子産物（RPE65）に対する臨床的に有意な細胞傷害性T細胞応答はみられず、一過性かつ軽度な眼の発赤及び炎症を除き、用法用量と関連した炎症反応は報告されていない。

#### 生体内分布及び体外排出

301試験では、全血、血清及び涙液への本薬（AAV2-hRPE65v2）のベクターDNAを確認することにより、ベクターDNAの生体内分布及び体外排出を検討した。301試験では、ベースライン、Day 0A/B、Day 1A/B、Day 3A/B、Day 14B、Day 30B、Day 90B、Day 180B、Year 1B（A：1眼目投与、B：2眼目投与、を各々の起点とする）に、ベクターDNAの生体内分布及び体外排出を確認するため、全血、血清及び涙液を採取した（Day 180Bは涙液のみ）。301試験では、45%の被験者の投与眼の涙液試料から、また少数ではあるものの未投与眼の涙液試料から本薬のベクターDNAが投与3日後まで検出され、一過性かつ小数列で本薬のベクターDNAの体外排出が確認された。

本薬の両眼投与を受けた被験者29名中13名（45%）で、本薬のベクターDNAが涙液試料から検出された。涙液試料でベクターDNA量が最も高かったのは投与1日後であり、その後はほとんどの被験者でベクターDNAは検出されなかった（13名中8名）。ベクターDNAは、涙液試料より、被験者3名（10%）では投与3日後まで検出され、被験者2

名 (7%) では投与約 2 週間後まで検出された。他の被験者 2 名 (7%) では、未投与眼 (又は先に投与された眼) の涙液試料からベクター-DNA が投与 3 日後まで検出された。被験者 29 名中 3 名 (10%) では、ベクター-DNA が血清資料から検出され、うち 2 名では涙液試料から各眼投与 3 日後まで検出された。

臨床試験におけるベクター-DNA の生体内分布及び体外排出の概略は別紙 7 に示す。測定には定量的 PCR 法を用いた。バリデーション結果を別紙 9 に示す。

#### 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 AAV2 と同一であり、他の微生物に感染することではなく、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い。

###### (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物種等の特定

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は、AAV2 の感染宿主域と同一であり、ヒト、サル及びブタ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

野生型 AAV2 には病原性が認められておらず、本遺伝子組換え生物等はさらに *rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失によりヘルパーウイルス存在下であっても複製しないことから、病原性を示す可能性はさらに低い。また、発現する RPE65 タンパク質が毒性作用を有することは知られていない。

遺伝性網膜ジストロフィー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。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はない。*In vitro* では臨床投与量の10倍量のLTW888を曝露したイヌ網膜色素上皮細胞においてアポトーシスは認められなかった。*In vivo* では臨床投与量の5倍量のLTW888をサルに投与した毒性試験において、本遺伝子組換え生物等に起因すると考えられる毒性所見は認められていない。視覚サイクルには複数の酵素が関与しておりRPE65のみが過剰発現した場合に視覚サイクルへの影響が生じるとは考えにくい。

さらに、LTW888の臨床試験で発現した有害事象について、LTW888投与後のRPE65タンパク質の過剰発現と関連があるかは不明である。

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病原性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

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物種等の特定

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は、AAV2の感染宿主域と同一であり、ヒト、サル及びブタ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は非病原性であり、発現するRPE65タンパク質が毒性作用を有することは知られていない。RPE65タンパク質は、網膜色素上皮に局在する酵素であり脊椎動物の視覚器に普遍的に存在する。RPE65タンパク質は、光エネルギーを電気信号に変換する過程で生じるオールトランスレチニルエステルを11-*cis*-レチナールに再生して視細胞へ供給する役目を有し、視覚機能の維持に不可欠である。

### (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はない。よって、本遺伝子組換え生物等が発現するRPE65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**

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物種等の特定**

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は、AAV2 の感染宿主域と同一であり、ヒト、サル及びブタ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、水平伝達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完全には否定できないが、本遺伝子組換え生物の増殖は、同一細胞にヘルパーウイルス、野生型が共感染しない限り起こらないため、その確率は極めて低い。さらに、野生株との相同組換えにより新たに生じた遺伝子組換え AAV の供与核酸が他の動物等に水平伝達される確率はさらに低い。

**(3) 影響の生じやすさの評価**

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に、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。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。従って、第三者や野生動物に水平伝達する可能性は極めて稀である。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。

**(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おそれはない。

**5. その他の性質**

垂直伝播について男性における 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[18][19]。精液への AAV 伝播は、その他の体液（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。LTW888 の生殖組織に対する影響の考察を別紙 8 に示す。

文献 18: 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: 586-92.

文献 19: 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: 1022–30.

## V. 総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動植物等の種類は、野生型 AAV2 と同等で、主にヒトに感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

第一種使用規定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、その量は検出レベル以下であると推定される。本遺伝子組換え生物による RPE65 遺伝子の発現はヒトに病原性を持たないので、ヒトに対する影響はないと考えられる。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を失っているため、野生型 AAV 及びそのヘルパーウイルスとの三重感染がない限り、環境中増幅することはない。ヒト体内の同一の細胞に本遺伝子組換え生物、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はやがて環境中から消滅すると考えられる。感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は野生型 AAV2 と同等であり、ヒト及び他の哺乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

従って、第一種使用規定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。