

様式第1（第7条関係）

第一種使用規程承認申請書	
令和5年4月5日	
厚生労働大臣 殿 環 境 大 臣 殿	
氏名 アステラス製薬株式会社 申請者 代表取締役社長 岡村 直樹 住所 東京都中央区日本橋本町二丁目5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、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、ヒト酸性 α -グルコシダーゼを発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV8-eMCK-hGAA）
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	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、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、患者の投与部位を消毒し、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に、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、当該患者等に適切な指導を行う。 (9) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。 患者検体の取扱い (10) 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。 (11) 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。 (12) 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 (13) 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。 (14) 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。 (15) 患者が自宅等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廃棄する。 (16) 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。 (17) 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。 (18) 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。
--	--

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

rep 及び *cap* 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 型に由来する逆位末端反復配列（以下「ITR」という。）を有し、ヒト酸性 α -グルコシダーゼ（acid α -glucosidase, 以下「GAA」という。）を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（株名, 以下「本遺伝子組換え生物等」という。）の宿主は、パルボウイルス科（*Parvoviridae*）パルボウイルス亜科（*Parvovirineae*）デペンドパルボウイルス属（*Dependoparvovirus*）に属するヒトアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus, 以下「AAV」という。）と呼ばれるウイルスの一つである（文献 1, 2）。

AAV の主な血清型（AAV2, AAV5 等）では、小児期の感染により、成人の約半数が中和抗体を有するとされるが、ヒトへの病原性を有する AAV の報告はない。

AAV 自体は、自己複製機能を欠損しているため、複製には AAV の感染細胞に共感染したアデノウイルス等のヘルパーウイルスの複製機能を利用する必要がある。

本遺伝子組換え生物等のゲノムの一部は、AAV-2 型（以下「AAV2」という。）に、キャプシドタンパク質は、AAV-8 型（以下「AAV8」という。）に由来する。

AAV は通常ヒトを自然宿主とするが、サル等の霊長類から単離される場合もあり、哺乳動物へ感染することも知られている。

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。）

AAV は、病原性がないこと、感染が長期化すること、組織指向性が柔軟であること等の特性が知られており、遺伝子治療用製品のベクターウイルスとして開発が盛んに行われている（文献 3, 4 及び IV 章参照）。

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

野生型 AAV のウイルス粒子は、直径 23~28 nm 程度の正二十面体構造のエンベロープを有さないウイルス粒子で構成されており、必須の脂質、糖質、アクセサリタンパク質、ヒストンなどは持たない。

AAV ゲノム DNA は 4~6 kb の直鎖の DNA 分子であり、ゲノム DNA がプラス鎖かマイナス鎖

かに関わらず感染性を有する。AAV ゲノム DNA は、両端には ITR が存在し、その間に *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子が挟まれた構造となっている。

rep 遺伝子は、DNA の複製に必要な 4 つの非構造タンパク質である Rep タンパク質 (Rep40, Rep52, Rep68 及び Rep78) をコードする。*cap* 遺伝子は、構造タンパク質である 3 つのタンパク質 (VP1, VP2 及び VP3) をコードする。ITR は、DNA の複製開始、ウイルス粒子へのウイルスゲノムのパッケージング、宿主細胞ゲノムへのウイルスゲノムの組込み及びその後のウイルスゲノムの切出しに必要な配列を含む。

AAV は、キャプシドタンパク質のアミノ酸配列の違いによって 100 以上の型に分類され、型によって感染組織指向性は異なる。AAV の受容体 (以下「AAVR」という。) は多くの型で共通していることが知られているが (文献 5)、型ごとに異なる副受容体 (以下「副受容体」という。) が感染に必要なことも知られており、副受容体の違いによって指向性が異なると考えられている (文献 6)。

自然界においてヒト以外で増殖を伴う感染が起こるかどうかは明らかでない。ヒトより AAV2, AAV3, AAV5, AAV6 が、非ヒト霊長類より AAV1, AAV4, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 が同定されている。ほとんどの AAV のキャプシドタンパク質はどれも構造的に類似しており、2 型キャプシドのアミノ酸配列に対して 80~88% の相同性、DNA 配列で 78~82% の相同性を有する。

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宿主である AAV8 は肝臓、筋組織及び網膜組織に特異性が高いことが報告されている (文献 7)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

AAV が細胞に単独感染した場合は、自律的な増殖ができず、二本鎖環状 DNA (以下「エピソーム」という。) として又は染色体へ組み込まれた状態で潜伏感染する。一方で、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 (以下「ヘルパーウイルス」という。) が共存する場合は、これらの *E1A*, *E1B*, *E2A*, *E4* 及び *VA* 遺伝子機能を利用して、AAV ゲノムの複製とウイルス粒子の構成が起こる。培養細胞でも同様にヘルパーウイルスの感染が成立する場合にのみ増殖が起こる。

細胞外に放出された AAV は常温において感染性が維持される。

(3) 捕食性又は寄生性

AAV が他の生物を捕食することはない。

(4) 繁殖又は増殖の様式

野生型 AAV のヒトへの感染経路としては、経気道感染、糞口感染、接触感染などが知られている。感染する際には、AAV 受容体及び副受容体を介したエンドサイトーシスによりウイルス粒子

が取り込まれ、細胞内侵入後は、核膜孔複合体を通して核内に移行すると考えられている。

AAV とアデノウイルス等のヘルパーウイルスが同時に感染している場合、AAV は感染細胞及び感染個体で増幅し、ヘルパーウイルスと共に分泌物と一緒に排泄され、次の生物に感染する。

ヘルパーウイルスが共存しない場合は、AAV のゲノムは感染細胞において複製することなく、エピソードとして核内に潜伏するが、まれに、Rep タンパクの関与により、第 19 染色体長腕の AAVS1 領域へ組み込まれることがある（文献 8, 9）。

一般的な遺伝子組換え AAV（以下「組換え AAV」という。）では、*rep* 遺伝子を欠失しているため、染色体への部位特異的組込みは起こらない。組換え AAV の細胞染色体へのランダムな組込みは低頻度で起こりうるが、その場合でも活発に転写されている遺伝子領域に挿入されやすいとの報告がある（文献 10）。

(5) 病原性

野生型 AAV の感染は不顕性に終わると考えられており、これまで野生型 AAV の感染に伴う病原性は知られていない。

なお、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臨床試験において AAV 感染が原因の肝がんの発症は確認されていない（文献 11）。

(6) 有害物質の産生性

野生型 AAV の感染に際して細胞内で産生されるタンパク質が病原性又は毒性を示すという報告はない。

(7) その他の情報（不活化条件等を含む。）

AAV は、一般的なパルボウイルスと同様に、エンベロープを持たないウイルスであるため、物理化学的に比較的安定であり、乾燥に抵抗性があり、常温において感染性が維持される。

AAV の不活化には、加熱（85℃、数分間）、次亜塩素酸ナトリウム（1000 ppm）、水酸化ナトリウム、紫外線照射等による処理が必要とされている（文献 1）。また、オートクレーブ処理（121℃、20 分間）により完全に不活化される。

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ゲノム (rAAV8-eMCK-hGAA) では、野生型 AAV におけるウイルス遺伝子である *rep* 及び *cap* 遺伝子配列をヒト GAA 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、ヒト GAA 発現カセット及びその両側の野生型 AAV2 のウイルスゲノム由来の ITR からなり、組換え AAV8 のキャプシドに内包される。

ヒト GAA 発現カセットは、筋肉クレアチンキナーゼ (muscle creatine kinase, 以下「MCK」という。) エンハンサー, MCK プロモーター, SV40 イントロン, コザック配列, ヒト GAA コード配列, SV40 ポリアデニル化シグナル (以下「SV40 poly(A)シグナル」という。) 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ゲノムの DNA 配列及びゲノムの各要素の配置を別紙 1 に示す。

各要素の由来について以下に示す。

・ヒト GAA をコードする領域 (hGAAc01)

野生型ヒト *GAA* 遺伝子は 17 番染色体 (NC_000017.11) 上に位置しており, 20 個のエクソン, 2859 塩基対からなり, 952 アミノ酸よりなるヒト GAA をコードしている。

hGAAc01 は, 開始コドン ATG から終始コドン TGA までの 2859 塩基からなる DNA であり, 野生型ヒト *GAA* 遺伝子配列にコドン最適化のため 403 個のサイレント変異を導入した配列である。

・MCK エンハンサー (eMCK)

マウス由来の *MCK* 遺伝子上流に位置するエンハンサーである。

・MCK プロモーター (MCK promoter)

マウス由来の *MCK* 遺伝子上流及びエクソン 1 の非翻訳領域を含むプロモーターである。

・SV40 イントロン (SV40 intron)

Simian virus 40 由来の small T antigen intron のスプライスドナー部位及びスプライスアクセプター部位を含む配列からなる。

・コザック配列 (Kozak)

真核生物のコザックコンセンサス配列である。

・制限酵素認識部位の人工配列

プラスミドの構築過程で便宜的に挿入されたものである。

• SV40 ポリアデニル化シグナル (SV40 poly(A)シグナル)

Simian virus 40 由来の large T antigen 遺伝子の一部と poly(A)シグナルを含む配列である。

• ITR

一般的に AAV ゲノムの 5'及び 3'末端領域は ITR として知られている。野生型 AAV2 のウイルスゲノムからクローニングして得られた。

(2) 構成要素の機能

本遺伝子組換え生物等の供与核酸の構成要素の機能は以下のとおりである。

• ヒト GAA をコードする領域 (hGAAc1)

ヒト *GAA* 遺伝子により発現されるヒト GAA は、952 アミノ酸より構成される分子量約 105 kDa のライソゾーム局在タンパク質である。ライソゾーム酵素として全ての細胞において発現しており、グリコーゲンをグルコースへ加水分解する。ヒト GAA の機能欠損は常染色体潜性遺伝（劣性遺伝）形式で遺伝し、細胞のライソゾームにグリコーゲンが蓄積してポンペ病を発症する。ポンペ病は乳児期早期に発症する乳児型 (infantile-onset Pompe disease, 以下「IOPD」という。) と、それ以降に発症する遅発型 (late-onset Pompe disease, 以下「LOPD」という。) に分類される。IOPD 患者は心肥大、肝肥大及び筋力低下を呈し、LOPD 患者は主に筋力の低下を呈する (文献 12, 13)。

• MCK エンハンサー (eMCK) 及び MCK プロモーター (MCK promoter)

MCK は骨格筋及び心筋に特異的に高い発現レベルを示すため、MCK エンハンサー及び MCK プロモーターは筋組織特異的なエンハンサー／プロモーターとして発現ベクターに広く使用されている (文献 14, 15, 16)。

• コザック配列 (Kozak)

コザックコンセンサス配列はタンパク質の翻訳に寄与する。

• 制限酵素認識部位の人工配列

プラスミドの構築過程で便宜的に挿入されたもので、本遺伝子組換え生物等に新たな生物学的機能を付与するものではない。

• SV40 ポリアデニル化シグナル (SV40 poly(A)シグナル)

SV40 poly(A)シグナルは mRNA の安定化に寄与する。

・ ITR

ITR は、本遺伝子組換え生物等の製造において、粒子中にウイルスゲノムをパッケージするために必要である。また、標的細胞への導入の後、ウイルスゲノムの安定化に ITR が必要となる。ITR は、宿主のポリメラーゼによる不安定な一本鎖 DNA から安定した二本鎖 DNA の形成の起点となる。また、ITR は繰り返し構造であるため、複数のウイルスゲノムの ITR と ITR が複合化し、線状多量体（以下「コンカテマー」という。）として知られるより大きな二本鎖 DNA を形成する。このコンカテマーは転写活性を保持しており、持続的に安定なエピソーム構造を有する（文献 8）。なお、ITR はタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）を有していない。

これらの供与核酸について、the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide Collection (nr/nt) データベースを用いて相同性検索を行った結果、毒素、がん原性等の有害性を有する可能性のある塩基配列は認められなかった。また、遺伝子操作により 6 個の目的外の ORF が生じるものの、産生されるタンパク質に有害な機能や生理活性を有するアミノ酸配列は認められなかった（別紙 1）。

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

本遺伝子組換え生物等のゲノムの構成を別紙 1 に示す。本遺伝子組換え生物等のゲノムはヒト GAA 発現カセット及びその両側の野生型 AAV2 のウイルスゲノム由来の ITR からなる。ヒト GAA 発現カセットは、MCK エンハンサー、MCK プロモーター、SV40 イントロン、コザック配列、ヒト GAA コード配列、SV40 poly(A)シグナル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。

(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、XXXXXXXXXX プラスミド XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX をヒト胎児腎臓 293 (HEK293) 細胞に XXXXXXXXXX 導入することで作製される。プラスミドマップ等の詳細は別紙 2 に示す。

(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製造施設において製造される。

本遺伝子組換え生物等の製造工程の概略は以下のとおりである。

解凍したセルバンクを培養して得られた HEK293 細胞に、
をトランスフェクションして培養後、細胞を溶解し、清澄化した液からウイルス粒子を精製する。濃縮後、無菌ろ過することで原薬を得る。原薬は無菌ろ過後に希釈し容器に充填して本遺伝子組換え生物等の製剤を得る。得られた本遺伝子組換え生物等について、品質管理試験を実施する。

なお、増殖能を獲得したウイルス（増殖性 AAV；replication-competent AAV，以下「rcAAV」という。）は原薬の規格試験において管理される。

本遺伝子組換え生物等の育成の経過の詳細を別紙 2 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

移入された核酸は本遺伝子組換え生物等の一本鎖 DNA ゲノムの一部として存在し、凍結保管中は極めて安定で、感染する動植物等の種類及び感染方法が保管中に変化することはない（文献 17）。

動物細胞に感染すると、本遺伝子組換え生物等のゲノムは核内に移行して二本鎖 DNA となり、多くは染色体とは独立したエピソームとして存在すると考えられる（文献 8, 9, 18）。このエピソームからヒト GAA が転写される。細胞のゲノムへの組込みは稀で低頻度である。ヒト GAA の発現は発現する細胞の遺伝子に変化が起こらないかぎり、また細胞が分裂しないかぎり継続するものと考えられる。

本遺伝子組換え生物等を産生細胞株で作製する過程で rcAAV を生ずる可能性は否定できない。しかしその rcAAV は AAV のウイルス粒子にパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すれば、ほぼ全ての供与核酸を失っている可能性が高いと考えられる。さらにこの rcAAV も野生型 AAV と同様にヘルパーウイルスの共存がないかぎり実際には増殖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

< 非臨床試験 >

定量的ポリメラーゼ連鎖反応法（以下「qPCR 法」という。）により本遺伝子組換え生物等の DNA の検出及び定量を行った。qPCR 法で用いる検体は動物からの採取検体から AAV ゲノムを抽出した。

本遺伝子組換え生物等は、宿主に存在しないヒト GAA 遺伝子及びその発現カセットをコードしているため、その配列の一部を本遺伝子組換え生物等に特異的なプライマーを用い qPCR 法で特異的に増幅させ、定量することが可能である。本 qPCR 法ではゲノム DNA 試料 1 µg 中に 50 コピーのゲノムがあれば定量することができる。非臨床試験における測定方法の詳細を別紙 4 に示す。

< 臨床試験 >

qPCR 法により本遺伝子組換え生物等の DNA の検出及び定量を行う。qPCR 法で用いる検体はヒトからの採取検体から AAV ゲノムを抽出する。

本遺伝子組換え生物等は、その配列の一部を本遺伝子組換え生物等に特異的なプライマーを用い qPCR 法で特異的に増幅させ、定量することが可能である。本 qPCR 法では、ゲノム DNA 試料中に 25 コピーのゲノムがあれば定量することができる。臨床試験における検出方法の詳細を別紙 3 に示す。

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 AAV と本遺伝子組換え生物等の間には以下の相違がある。

本遺伝子組換え生物等は発現プロモーターの下流にヒト *GAA* 遺伝子を持つため、本遺伝子組換え生物等が感染した細胞はヒト *GAA* を発現する。

本遺伝子組換え生物等はゲノムの複製やウイルス粒子の形成に必要な *rep* 遺伝子及び *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も増殖は起こらず、その生存力は野生型 AAV 以下である。本遺伝子組換え生物等の増殖が起こるのは、*rep* 及び *cap* 遺伝子が組み込まれた又はトランスフェクションされた細胞にヘルパーウイルスと共感染した場合、若しくは通常の細胞に本遺伝子組換え生物等、野生型 AAV、及びヘルパーウイルスが三重に共感染した場合のみである。

本遺伝子組換え生物等の感染する動植物の種類、感染経路、伝播様式等は野生型 AAV と同等と考えられるが、感染してもそのゲノムの大半は染色体に組み込まれず、主に核内の染色体外にエピソードとして存在する。

AAV ベクター作製時、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を持つヘルパープラスミドと *GAA* 遺伝子を持つトランスジーンプラスミドの間での遺伝子組換えにより本遺伝子組換え生物等由来の増殖能を持つ 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 と *rep* 遺伝子、及び細胞指向性を規定するキャプシドの主要部分は野生型と同一であるので、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、感染方法、病原性など、生物多様性に影響を与える性質は野生型 AAV と同等であると考えられる。また供与核酸の一部を保持した rcAAV が生じる可能性は否定できないが、AAV 粒子中にパッケージング可能なゲノムの長さは非常に短いため、供与核酸を保持したとしてもその長さは極めて短いと考えられる（文献 8, 9）。

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，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，患者の投与部位を消毒し，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に，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，当該患者等に適切な指導を行う。
- (9) 患者の排出モニタリングは，必要に応じて実施する。

患者検体の取扱い

- (10) 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。
- (11) 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。
- (12) 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

- (13) 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。
- (14) 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。
- (15) 患者が自宅等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廃棄する。
- (16) 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。
- (17) 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。
- (18) 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

国内での情報収集は現在のところ予定していない。米国及び欧州にて実施中の臨床試験（AT845-01 試験，文献 19）では、治験実施計画書に従って、被験者からの本遺伝子組換え生物等の排出の確認を行う。検出方法の詳細を別紙 3 に、ウイルス排出データ等の詳細を別紙 5 に示す。

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

<非臨床試験>

■■■■■に対して、 7.9×10^8 、 2.6×10^8 及び 6.6×10^8 vg/kg の本遺伝子組換え生物等を■■■■■投与した非臨床試験では、■■■■■検査において 7.9×10^8 vg/kg 以上の用量で心機能の変化が認められたが、■■■■■に対して■■■■■をコードした AAV8 を■■■■■投与（ 0.6×10^8 、 1×10^8 及び 2×10^8 vg/kg）した試験では、 2×10^8 vg/kg まで影響は認められなかったことからヒトタンパクへの免疫反応が原因として考えられた。

本遺伝子組換え生物等を■■■■■に■■■■■投与（ 7.9×10^8 、 2.6×10^8 及び 6.6×10^8 vg/kg）した生体内分布試験の結果、投与後■■■■■において対照群ではいずれの組織においてもベクターコピー数は検出下限未満であった。本遺伝子組換え生物等の投与群ではいずれの組織（■■■■■）においてもおおむね投与量に依存したベクターコピー数の増加が認められ、■■■■■で最も高い分布が認められた。

本遺伝子組換え生物等を■■■■■に■■■■■投与（ 3.9×10^8 、 1.3×10^8 、 3.9×10^8 vg/kg）した生体内分布試験の結果、投与後■■■■■において対照群ではいずれの組織においてもベクターコピー数は検出下限未満であった。本遺伝子組換え生物等の投与群では■■■■■においても投与量に依存したベクターコピー数の増加が認められた。

生体内分布試験の詳細を別紙 4 に示す。

<臨床試験（治験）>

国内では、本遺伝子組換え生物等と同一の遺伝子を搭載した組換え AAV を用いた臨床試験等は実施されていない。

6 国外における使用等により得られた情報

2021 年より米国及び欧州にて、18 歳以上の LOPD の患者を対象に、本遺伝子組換え生物等を静脈内投与する臨床試験 (AT845-01 試験) を実施中である (文献 19)。本試験では、3 用量 (3×10^{13} , 6×10^{13} 及び 1×10^{14} vg/kg) の忍容性及び安全性を評価している。申請日時点までに得られている情報として、AT845 (6×10^{13} vg/kg) 投与後に、1 例で末梢性感覚ニューロパチーの重篤な有害事象が認められた。当該重篤な有害事象に関する安全性情報の詳細を別紙 5 に示す。また、本試験において、患者の尿及び唾液へのウイルス排出が検討されている。ウイルス排出データ等の詳細を別紙 5 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

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。よって、本遺伝子組換え生物等及び rcAAV 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は、*rep* 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、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。

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、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 が病原性を持つことはないと考えられる。

なお、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臨床試験において AAV 感染が原因の肝がんの発症は確認されていない（文献 11）。

(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ではなく、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、原薬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* 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のキャプシド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、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 20, 21）。

AAV 粒子がパッケージ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 が有害物質の産生性を持つことはないと考えられる。

本遺伝子組換え生物等由来の DNA が筋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、ヒト GAA が産生される。

ヒト GAA は、MCK プロモーターの制御により、自然界で GAA が発現している筋組織に発現する。したがって、本遺伝子組換え生物等を介した GAA の発現に対する局所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 GAA は、ヒトにおいて発現している GAA と同一であるため、この GAA に対する免疫応答は起こらないと考えられる。

患者又は第三者における GAA の過剰発現はこれまで報告されていないため、過剰発現によりもたらされる影響は不明である。なお、遺伝子組換えヒト GAA を静脈内投与する酵素補充療法に用いられるアバクルグコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）は、ポンペ病患者（乳児型を除く）に対して 1 回体重 1 kg あたり 20 mg を隔週、乳児型には 1 回体重 1 kg あたり 40 mg を隔週、点滴静注投与の用法・用量で承認されており、安全性が確認されている。

■■■■■に本遺伝子組換え生物等 7.9×10^{11} 、 2.6×10^{11} 及び 6.6×10^{11} vg/kg を■■■■■投与する非臨床試験においては、ヒト GAA は十分量発現しており、■■■■■において 7.9×10^{11} vg/kg から心機能の変化が認められた。一方で、■■■■■に対して■■■■■をコードした AAV8 を■■■■■投与（ 0.6×10^{11} 、 1×10^{11} 及び 2×10^{11} vg/kg）した試験では、 2×10^{11} vg/kg の用量まで影響は認められなかったことからヒトタンパクへの免疫反応が原因と考えられた。

なお、異種動物においては、アレルゲンとなる可能性を除いては、GAA の有害性は知られていない。

(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、原薬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が発現するヒト GAA 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

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* 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

野生型 AAV は低い確率で感染細胞のゲノムに挿入されることが知られている。

一方、本遺伝子組換え生物等が感染したヒト又はヒト以外の哺乳類で一過性にヒト *GAA* 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによる他の哺乳類個体への核酸の水平伝達は知られていない。

また、AAV 粒子に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、環境中に拡散したとしても他の生物に感染を起こす可能性は低く、また、感染したとしても *rep* 遺伝子が欠失しているため、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、原薬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。

(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 AAV8 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、*rep* 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、本遺伝子組換え生物等によるヒト *GAA* 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っているため、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い、その可能性は極めて低い。

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、本遺伝子組換え生物等由来の rcAAV が環境中に放出される可能性は極めて低く、rcAAV は野生型 AAV8 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考えられる。

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：本遺伝子組換え生物等の情報

別紙 2：本遺伝子組換え生物等の特性、製造方法及び品質管理

別紙 3：臨床試験における本遺伝子組換え生物等の検出方法

別紙 4：非臨床生体内分布試験結果概要

別紙 5：臨床試験結果概要

参考文献

1. Condit RC. Principles of virology. In “Knipe DM, Howley PM eds, Fields VIROLOGY 6th ed”. pp21-51. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia (2013)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2015)
3. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. Clin Microbiol Rev (2008) 21. 583-593.
4. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. Annu Rev Virol (2014) 1. 427-451.
5. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature (2016) 530. 108-112.
6. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol (2016) 21. 75-80.
7. 伴野太郎, 岡田浩典, 岡田尚巳. 遺伝子導入用ウイルスベクターの特徴と作製法 Pharma Medica 33. 15-22, 20159.
8. Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, et al. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. J Virol (2003) 77. 3495-3504.
9. Grimm D, Pandey K, Nakai H, et al. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. J Virol (2006) 80.426-439.
10. Nakai H, Montini E, Fuess S, et al. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. Nat Genet (2003) 34. 297-302.
11. Srivastava A, Carter BJ. AAV Infection: Protection from Cancer. Hum Gene Ther. (2017) 28(4). 323-327.
12. Colella P, Mingozi F. Gene therapy for Pompe disease: the time is now. Hum Gene Ther (2019) 30 (10). 1245-1262.
13. 日本先天代謝異常学会. ポンペ病診療ガイドライン 診断と治療社 (2018)
14. Jaynes JB, Johnson JE, Buskin JN, et al. The muscle creatine kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle-specific enhancer. Mol Cell Biol (1988) 8 (1). 62-70.
15. Johnson JE, Wold BJ, Hauschka SD. Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. Mol Cell Biol (1989) 9 (8). 3393-3399.
16. Wang B, Li J, Fu FH, et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. Gene Ther (2008) 15. 1489-1499.
17. Xu R, Rahimi M, Ma H, et al. Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. Med. Sci. Monit. (2005) 11. 305-308.
18. Yan Z, Zak R, Zhang Y, et al. Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. J Virol (2005) 79. 364-379.
19. 臨床試験情報 (ClinicalTrials.gov) : NCT04174105, Gene Transfer Study in Patients With Late Onset Pompe Disease (FORTIS): <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04174105>
20. Mingozi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. Blood (2013) 122. 23-36.

21. Muhuri M, Maeda Y, Ma H, et al. Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors. *J Clin Invest* (2021) 131(1). e143780.