

第一種使用規程承認申請書

2021年1月25日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

氏名 株式会社 Ascent Development Services
申請者 代表取締役 ワインバーガー ジョン ロス

住所 東京都渋谷区道玄坂一丁目21番1号 渋谷ソラスト3F

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組み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条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> 遺伝子領域を欠失し、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、抗血管内皮増殖因子（VEGF）抗体の抗原結合性フラグメント（Fab）の発現カセットを有する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（AAV8.CB7.CI.amd42.RBG）
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) 投与準備済みの原液は、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眼の網膜下又は脈絡膜上腔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、患者の投与部位／創部を消毒し、投与部位／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。 (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期間までに、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。 (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。 (13) 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期間までに採取された検体（血液検体等）について、施設等から検査機関への検体の運搬の際、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が投与された患者の検体である旨を情報提供した上で行う。 感染性廃棄物等の処理 (14) 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。 (15) 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。 (16) 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。 (17) 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。
--	---

	(18)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。 (19)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、密封された状態でオートクレーブ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

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

- 遺伝子組換え生物等である遺伝子組換えウイルスの宿主

アデノ随伴ウイルス（AAV）はパルボウイルス科のデペンドウイルス属に分類されるエンベロープのないウイルスである¹⁾。AAVは自然界に広く分布し、これまでにヒトを含めた哺乳類の様々な組織から発見されており²⁻⁶⁾、13種の異なる血清型（AAV1～AAV13）が知られている⁷⁾。

AAVは単独では増殖せず、アデノウイルス又はヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスにより増殖性感染を引き起こすことが知られている¹⁾。

本遺伝子組換え生物等は、AAVのうちAAV8由来のカプシドを有する。

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

- 遺伝子組換えウイルスの、一般的に知られているこれまでの使用実績

AAVをベクターとする遺伝子組換えウイルスは遺伝子治療で汎用されている⁸⁾。特にAAV（2、8、9型）は、血友病B^{9),10)}、レーバー先天性黒内障¹¹⁾、脊髄性筋萎縮症¹²⁾などの数多くの臨床試験で使用されており、その安全性が確認されている。

しかしながら、AAV8を含めてAAVが生ワクチン等に使用されたとの報告はこれまでない。

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本特性

AAV8のウイルスカプシドは直径約26 nmの正二十面体で、エンベロープはない。ゲノムは約4.7 kbの一本鎖デオキシリボ核酸（DNA）である。肝臓におけるAAV8により導入された遺伝子の発現量は他のAAV血清型ベクターよりも10～100倍多いことが報告されている⁵⁾。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

AAV8はもともとアカゲザルで発見され、アカゲザルで高力価の中和抗体が検出された。AAV8に対する抗体は、まれではあるがヒト血清でも確認されている⁵⁾。AAV8はヒトを含めた哺乳類に感染すると考えられているが⁷⁾、その増殖にはアデノウイルス又はヘルペスウイルスなど（いわゆるヘルパーウイルス）との共存が必要である。培養細胞内でも同様にヘルパーウイルスが共存する場合にのみAAV8が増殖する。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

該当しない。

(4) 繁殖又は増殖の様式

ヘルパーウイルスと同時に感染した場合、AAV8は感染した個体で増殖し、ヘルパーウイルスと共に次の個体に感染する。ヘルパーウイルスとともに増殖したAAV8ウイルスは分泌物とともに排出される。ヘルパーウイルスが存在しない場合、AAV8ゲノムは、筋肉・肝臓な

どの組織細胞の核内で二本鎖環状DNAとして存在し、まれに染色体に組み込まれることもある^{13),14)}。

(5) 病原性

これまでAAV8の感染に伴ういかなる病原性も知られていない。また、AAV8単独では増殖しないことが知られているため、AAV8による感染は不顕性であると考えられる。

(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

AAV8が含まれるパルボウイルス科に共通する性質として物理化学的に安定なカプシドを有していることから、不活化には85℃、数分の加熱処理が必要とされている¹⁵⁾。AAV8を含むAAVは通常の15～20分の高圧蒸気滅菌又は10%の塩素漂白剤処理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ゲノムDNAはAAV2の*rep*遺伝子と*cap*遺伝子を削除し、導入遺伝子及びその発現に必要な遺伝子を挿入したものである。挿入した遺伝子及びそれらの由来は以下の通りである。また、本遺伝子組換え生物等の構造を別紙2-1に示した。

- 逆位方向末端反復配列 (ITR) [REDACTED]
ウイルスベクターの両端に存在するITRはアデノ随伴ウイルス2型 (AAV2) 由来である。
- [REDACTED] プロモーター
[REDACTED] エンハンサー [REDACTED]、
[REDACTED] プロモーター [REDACTED] 及び [REDACTED]
[REDACTED] イントロン [REDACTED] から構成される。
- 導入遺伝子 [REDACTED]
ヒト由来の抗VEGF抗体の抗原部位 (Fab) の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子で、その間には [REDACTED] リンカーをコードする配列が挿入されている。
- ポリアデニル化シグナル [REDACTED]
[REDACTED] 由来である。

また、本遺伝子組換え生物等のウイルスカプシドは、AAV8由来の [REDACTED]、[REDACTED] 及び [REDACTED] からなる。

各構成要素の塩基配列を別紙2-2に、発現されるタンパク質領域のアミノ酸配列を別紙1に記載した。

(2) 構成要素の機能

- 逆位方向末端反復配列 (ITR)
ベクター遺伝子の複製とパッケージングに必要である。
- [REDACTED] プロモーター
[REDACTED] エンハンサー、[REDACTED] プロモーターは導入遺伝子 (抗VEGF抗体のFabの重鎖及び軽鎖遺伝子) を転写し発現させる。
[REDACTED] イントロンは、重鎖及び軽鎖遺伝子からのmRNAの生成を増強する。
- 導入遺伝子
ヒト由来の抗VEGF抗体のFabの重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子と、この間に挿入された [REDACTED] リンカーをコードする領域からなる。抗VEGF抗体のFabポリペプチドが産生されると、[REDACTED]、リンカー部位で切断され、等量の重鎖及び軽鎖ポリペプチドが作られる (別紙1)。
- ポリアデニル化シグナル
[REDACTED] プロモーターにより開始された転写を終結させる。

また、本遺伝子組換え生物等のカプシドは、AAV8と同じ [REDACTED]、[REDACTED] 及び [REDACTED] によって構成されている。そのため感染の標的細胞は、野生型AAV8と同じと考えられる。

各構成要素に由来する配列及び機能は明確であり、かつ繁用されているものであり、毒性、がん原性等の有害性を有する可能性のある塩基配列はない。また、組換えにより新たに生じた目的のタンパク質以外のタンパク質を発現させるオープンリーディングフレーム (ORF) について、有害な機能や生理活性を有する可能性のあるものもない (別紙2-3)。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

(空欄)

(2) 構成要素の機能

(空欄)

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造

AAV2の両末端にあるITR以外の領域を供与核酸と置換した。AAV2由来の塩基配列は両端に存在するITR領域を除き、[] プロモーター、導入遺伝子（ヒト由来の抗VEGF抗体のFabの重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子）及びポリアデニル化シグナルによって置換されている（別紙2-1）。

(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の調製には、[]、[] 及び [] の3種類のプラスミドが使用される。[] には、[] プロモーター遺伝子及びその制御下にある抗VEGF抗体の軽鎖及び重鎖の遺伝子が挿入されている。また、[] には、AAV2由来のDNA複製に必須なタンパク質をコードする遺伝子（*rep*）及びAAV8由来のカプシドをコードする遺伝子（*cap*）が挿入されている。更に、[] は、アデノウイルスヘルパープラスミドであり、アデノウイルスの []、[] 及び [] 領域が挿入されている。それらの構造を別紙3に示した。

(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の原薬バルクは、トランスフェクション試薬を用いて []、[] 及び [] の3種類のプラスミドをヒト [] 細胞に導入して製造する（別紙4-1(1)）。細胞内でつくられる目的の本遺伝子組換え生物等は、カプシドで包まれたウイルス粒子として細胞培養上清に放出される。なお、[] 細胞は、マスターセルバンクから供給された株化細胞である。

次に、ハーベスト工程及び精製工程を経て原薬バルクとなり（別紙4-1(2)）、最終的に希釈・滅菌ろ過工程を経て製剤となる（別紙4-1(3)）。

なお、原薬及び製剤の製造並びに品質管理試験はすべて米国で行われる。製造施設及び試験施設を別紙4-2に、製品出荷判定基準を別紙4-3に、試験方法を別紙4-4に示した。原薬において増殖性アデノ随伴ウイルス（rcAAV）が検出されないことを確認する。

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

・ 遺伝子組換えウイルスに移入された核酸の存在状態

本遺伝子組換え生物等の冷凍保存条件下での長期安定性試験が進行中であり、現在のところ [] ヶ月まで安定であることが確認されている。Xuらによると、導入遺伝子は、AAVのITRに挟まれた組換えAAVの一本鎖ゲノムDNAの一部として存在し、冷凍保存条件下では極めて安定である¹⁶⁾。また、本遺伝子組換え生物等のカプシド構造はAAV8と同じであることから、本遺伝子組換え生物等の感染性は変化することはないと考えている。

- 遺伝子組換えウイルスの標的細胞内の存在位置と形態

本遺伝子組換え生物等は、通常のAAVウイルスと同様に、感染後は細胞内で核内に移行し、最初是一本鎖DNAとして存在した後、最終的には二本鎖DNAを形成すると考えられている¹⁷⁻¹⁹⁾。核内で二本鎖DNAの状態が存在する本遺伝子組換え生物等は、目的の遺伝子を発現し、細胞及び分裂細胞の遺伝子が増殖しない限りその発現を継続すると考えられている。また、本遺伝子組換え生物等は*rep*遺伝子を欠くため染色体への組み込みは起こらず、染色体と独立して存在すると考えられている。

5 遺伝子組換え生物等の検出法及びその感度並びにそれらの信頼性

非臨床試験

- 動態及び生体内分布試験で実施した遺伝子組換えウイルスの検出方法及び感度（検出限界、定量下限等）

本遺伝子組換え生物等ゲノムコピー（GC）の検出及び同定は定量ポリメラーゼ連鎖反応法（qPCR法）により行う。[REDACTED]

上記のqPCR法による測定のために、予めバックグラウンドレベルをベースライン時及び比較対照の注射動物から採取した検体の値の平均の3SDとし、バックグラウンドレベル以上の値を本遺伝子組換えウイルス値とする。本試験における判定基準は以下の通りである。

- 標準曲線の相関係数（ R^2 ）> [REDACTED] であること
- テンプレートなしのコントロール試験の結果は標準曲線の検出下限以下であること
- 標的配列のコピー数が定量可能なサンプル（定量の範囲内）については、重複反応のサイクル閾値（Ct）値の差が [REDACTED] Ct以下であること

臨床試験

- 野生型及び遺伝子組換えウイルスを識別する方法

本遺伝子組換え生物は宿主のAAV8に存在しない抗VEGF Fabの発現遺伝子を含むため、同遺伝子の一部を上記のqPCR法で増幅、定量する方法により組換えウイルスを検出できる。

- 採取検体、検出方法、検出方法の妥当性（検出限界、定量限界、定量範囲、精度等）の概略
 - 1) 米国第1/2a相 [REDACTED] 試験での網膜下投与の場合、検体は [REDACTED] 及び [REDACTED] サンプルであり、本遺伝子組換え生物等投与の [REDACTED] 週間前、[REDACTED] 日後、[REDACTED] 週間後、[REDACTED] 週間後、及び [REDACTED] 週間後に検体を採取した。
 - 2) 米国第2相 [REDACTED] 試験での網膜下投与の場合、検体は [REDACTED]、[REDACTED] 及び [REDACTED] であり、投与 [REDACTED]、投与の [REDACTED] 週間後、[REDACTED] 週間後、[REDACTED] 週間後、[REDACTED] 週間後、[REDACTED] 週間後及び [REDACTED] 週間後に検体を採取する。もし [REDACTED] 週間後の時点で検出された場合は、検出されなくなるまで、試験を継続する予定である。
 - 3) 米国第2相 [REDACTED] 試験での脈絡膜上腔投与の場合、検体は [REDACTED]、[REDACTED] 及び [REDACTED] サンプルであり、投与 [REDACTED]、投与の [REDACTED] 日後、[REDACTED] 週間後、[REDACTED] 週間後、[REDACTED] 週間後、[REDACTED] 週間後、及び [REDACTED] 週間後に検体を採取し、最終時点で検出された場合は、検出されなくなるまで試験を継続する予定である。

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ウイルス遺伝子の複製及びカプシド形成のための*rep*及び*cap*遺伝子を欠いているため本遺伝子組換え生物等は自己複製ができない。本遺伝子組換え生物等の複製のためには、*rep*及び*cap*遺伝子の産物を供給するAAVウイルスとアデノウイルスもしくはヘルペスウイルス（ヘルパーウイルス）が同じ細胞内に組み込まれる必要がある。
- 本遺伝子組換え生物等のカプシドはAAV8ウイルスの■、■及び■タンパク質から構成されているため、その標的細胞、感染経路及び感染メカニズムはAAV8ウイルスと同じであると考えられる¹⁷⁾。そのため、感染性に関して本遺伝子組換え生物等とAAV8ウイルスとの間に差はない。
- AAVはまれに染色体に組み込まれるが、細胞に感染した本遺伝子組換え生物等は染色体への組み込みに必須である*rep*遺伝子が欠損しているため染色体に組み込まれない。このため主に核内の染色体外で二本鎖DNAの状態が存在する。
- 本遺伝子組換え生物は発現プロモーターの下流に抗VEGFのFab遺伝子が配置されているため、本遺伝子組換え生物が感染した細胞では抗VEGF Fabが生産される。

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) 投与準備済みの原液は、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眼の網膜下又は脈絡膜上腔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、患者の投与部位／創部を消毒し、投与部位／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。
- (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期間までに、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。
- (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。
- (13) 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期間までに採取された検体（血液検体等）について、施設等から検査機関への検体の運搬の際、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が投与された患者の検体である旨を情報提供した上で行う。

感染性廃棄物等の処理

- (14) 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。
- (15) 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。
- (16) 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。
- (17) 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。
- (18) 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。
- (19) 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、密封された状態でオートクレーブ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

本遺伝子組換え生物等が意図せずに第三者に感染する可能性は潜在的なリスクである。この拡散は、排出（標的細胞に感染せず、糞便又は体液を介して体内からの放出）、可動化（導入遺伝子の複製及び標的細胞から体内での移動）、又は生殖系細胞への伝播（精液を介した子への遺伝的伝達）から起こりうる。しかしながら、本遺伝子組換え生物等及び組換えAAV2ウイルス^{11),20)}の網膜下投与に関するヒトのデータでは臨床試験でウイルスの排出があったとしても第三者への感染はほとんど起こらないことを示している。同様に、本遺伝子組換え生物等の脈絡膜上腔投与の場合においても、網膜下投与と比較して投与量がほぼ同じであり、動物での生体内分布試験の結果においても類似した体内分布を示していることから、網膜下投与と同様に第三者への感染のリスクはほとんどないと考えられる。

更に、本遺伝子組換え生物等には病原性や健康障害性はなく、排出は短期間であるため、臨床的な警戒が必要であるとは考えられない。これらの理由から、本遺伝子組換え生物等の排出は、進行中及び計画中の米国臨床試験において、qPCR法により投与後■週間（網膜下投与）又は投与後■週間（脈絡膜上腔投与）まで測定される予定である。仮に最終時点で検出された場合は、本遺伝子組換え生物等が検出されなくなるまで試験を継続する。進行中及び計画中の米国臨床試験における排出試験計画（採取検体、採取時期、検出方法）の概略、並びに■中及び■中サンプルの試験結果の詳細は別紙7に記載の通りである。なお、AAVを含むウイルスの排出に関して民族的要因による影響は報告されていないことから、日本が参加する臨床試験において新たな排出試験を実施する計画はない。

- 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予定されている第一種使用等と類似の環境での使用等の結果
非臨床試験（網膜下投与）

1) 毒性試験

本遺伝子組換え生物等を■の網膜下への単回投与した■の非臨床毒性試験が実施されている。本試験では、本遺伝子組換え生物等及び導入遺伝子産物の正常な■及び本遺伝子組換え生物等の排出を調査した。本試験結果の概略を別紙 5-1(1)に示した。なお、■は、■での本遺伝子組換え生物等の体内分布試験の結果を考慮し、生殖系又は生殖細胞系への潜在的影響のリスクが低いと考えられるため実施されていない。

2) 体内分布試験

本遺伝子組換え生物等を■の網膜下に投与し、眼及び眼以外の組織における本遺伝子組換え生物等の体内分布を qPCR 法により測定した。組織分布を調べた結果、本遺伝子組換え生物等は、投与 ■ 日目まで■中に認められているが、■日及び■日後にはほぼ投与された■に限定されていた。■日後の体内分布の結果を別紙 5-2(1)に示した。

非臨床試験（脈絡膜上腔投与）

1) 毒性試験

本遺伝子組換え生物等を■脈絡膜上腔へ単回投与した■の非臨床毒性試験が実施されている。本試験では、本遺伝子組換え生物等及び導入遺伝子産物の正常な■及び本遺伝子組換え生物等の排出を調査し、その結果を網膜下投与の結果と比較した。本試験結果の概略を別紙 5-1(2)に示した。

2) 体内分布試験

本遺伝子組換え生物等を■の脈絡膜上腔に投与し、眼及び眼以外の組織における本遺伝子組換え生物等の体内分布を qPCR 法により測定し、網膜下投与の結果と比較した。眼内で検出された本遺伝子組換え生物等 DNA に関して、網膜下投与の方が脈絡膜上腔投与より■における本遺伝子組換え生物等 DNA 量が■かった。また本遺伝子組換え生物等 DNA は、脈絡膜上腔投与動物においてのみすべての投与群で■から検出された。また、脈絡膜上腔投与の最高用量では、本遺伝子組換え生物等が■でも検出された。脈絡膜上腔投与 ■ 日後の体内分布の結果を別紙 5-2(2)に示した。

臨床試験（網膜下投与）

1) 米国第1/2a相臨床試験（XXXXXXXXXX試験）

本遺伝子組換え生物等の安全性及び忍容性をヒトで評価するために、2年間に渡る米国第1/2a相試験が実施中であるがすべての投与を完了している。本第1/2a相臨床試験では主要目的として安全性を評価するとともに、副次的評価項目として、有効性を評価する項目が含まれている。本遺伝子組換え生物等の網膜下への投与方法については別紙6(1)に示した。

2) 本遺伝子組換え生物等排出試験

現在進行中の米国第1/2a相臨床試験では組換えウイルス排出も調査されている。各患者から、経時的にXXXXXX及びXXXXXXの検体を採取しqPCR法を用いて試験した。結果を別紙7に示した。

文献情報として、レーバー先天性黒内障被験者に AAV2 型組換えウイルスを網膜下に投与した別の試験では、術後1日後に1例の涙液検体に組換えウイルス DNA が認められたが、いずれの被験者でも組換えウイルスの全身への分布は認められなかった¹¹⁾。

また、Constable らによると、AAV2 型組換えウイルスによる治療を受けた新生血管を伴う加齢黄斑変性（nAMD）患者24例中13例において投与眼の涙液に組換えウイルスを検出している。また、他眼の涙液（1例）、唾液（1例）、尿（1例）からも組換えウイルスを一時的に検出した。これらはいずれも4週間以内に消失し、血中より組換えウイルスが検出された被験者はいなかった²¹⁾。

AAV2 型組換えウイルスの網膜下投与時のこれらのデータから、組換えウイルスの排出が短期間であることが示唆されており、AAV8 を使用した本遺伝子組換え生物等の臨床試験においても本遺伝子組換え生物等の排出があるとしても極めて少ないことが示されている。また、本遺伝子組換え生物等は病原性や健康被害を起こしていない。

臨床試験（脈絡膜上腔投与）

1) 米国第2相臨床試験（XXXXXXXXXX試験）

脈絡膜上腔投与については、本遺伝子組換え生物等の有効性、安全性及び忍容性をヒトで評価するために米国において第2相臨床試験が開始された。本遺伝子組換え生物等の患者への投与手順は別紙6(2)に示した。

2) 本遺伝子組換え生物等排出試験

米国第2相臨床試験において、排出試験の検体はXXXXXX、XXXXXX及びXXXXXXである。また、検体の採取時期は、投与XXXXXX、投与のXXXXXX日後、XXXXXX週間後、XXXXXX週間後、XXXXXX週間後、XXXXXX週間後、及びXXXXXX週間後である。なお、XXXXXX週間後の時点で検出された場合は、検出されなくなるまで、試験を継続する計画である。概略を別紙7(2)に示した。

6 国外における使用等により得られた情報

本情報は、「5. 実験室等での使用又は予定されている第一種使用等と類似の環境での使用等の結果」の項に記載した。

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性は、カプシド構造が同じであるAAV8ウイルスと同等と考えられる。また、AAV8ウイルスが微生物に感染するとの報告はなく、実際これまで影響を受ける可能性のある微生物は特定されていない。したがって、本遺伝子組換え生物等が競合又は有害物質の産生により他の微生物を減少させる可能性はないと考えられる。

(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の判断

本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従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等は他の微生物を減少させることにより生物多様性に影響を与える可能性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が自然界で感染する対象は、ヒトを含めた哺乳類に限定される⁷⁾。また、本遺伝子組換え生物等からrcAAVが生じない限り感染した細胞でウイルスの複製は起こらない。また、たとえ増殖性ウイルスが生じて、ヘルパーウイルスが同時に共存しない限り伝播は起こらない。更にこのような条件が重なった場合でも増殖を伴う感染が起こりうる範囲は哺乳動物に限られる。

(2) 影響の具体的内容の評価

AAV（2、8及び9型）の組換えウイルスはこれまで、血友病B^{9),10)}、レーバー先天性黒内障¹¹⁾、及び脊髄性筋萎縮症¹²⁾を対象としたいくつかの臨床試験で使用され、その安全性が認められており、環境への悪影響についての関する報告はない。本遺伝子組換え生物等においてもAAV8と同様に病原性がない。また、本遺伝子組換え生物等が感染した細胞において抗VEGF Fab抗体は産生されるが、自然環境のいかなる生物に対しても害を及ぼす可能性はない。

(3) 影響の生じやすさの評価

本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従っている限り、本遺伝子組換え生物等及び本遺伝子組換え生物等由来の増殖性ウイルスの環境中への拡散は極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物等自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖する能力はなく、本遺伝子組換え生物等由来の増殖性ウイルスも、ヘルパーウイルスであるアデノウイルス等と共感染しない限り、環境中で増殖することはない。更に、本遺伝子組換え生物等が効率よく感染する対象は哺乳類に限られることから、本遺伝子組換え生物等及び本遺伝子組換え生物等由来の増殖性ウイルスが患者以外のヒトに感染し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の判断

本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従って使用等を行う限り、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

本遺伝子組換え生物等による有害物質の産生は知られておらず、影響を受ける可能性がある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等の感染細胞で発現又は分泌される供与核酸由来のタンパク質は、抗 VEGF Fab抗体であり、本邦においてもルセンティスが販売されている、また米国において臨床試験が先行しているがその有害性は知られていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換え生物等が網膜下に投与された米国での第1/2a相試験において、本遺伝子組換え生物等の排泄が短期間で極めて少ないこと及び本遺伝子組換え生物等が病原性や健康被害を起こしていない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

本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従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等による有害物質の産生に起因した生物多様性への影響が生じるおそれはない。

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

本遺伝子組換え生物等はAAV8と同じカプシド構造を有するため、その感染性はAAV8と同等と考えられる。AAV8の宿主として報告されているのは自然界では哺乳類であり、それ以外の増殖を伴う感染は知られていない。また、野生型AAV8及び本遺伝子組換え生物等がヒト細胞に共感染した場合に、本遺伝子組換え生物等の供与核酸と野生型のAAV8のゲノムに含まれている*rep*遺伝子*cap*遺伝子とでは配列が異なるため相同組換えにより本遺伝子組換え生物等の供与核酸がAAV8のゲノムに組み込まれ再びウイルスとして伝播する可能性はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等は、染色体への組込みに必須である*rep*遺伝子が欠損しているため、細胞に感染しても染色体に組み込まれることはない。

(3) 影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換え生物等が糞尿を介して患者から排泄されたとしても、一過性であり排水処理により分解される可能性が極めて高い。また、AAVは濃厚接触又は直接接触によって伝播すると考えられているため、本遺伝子組換え生物等が患者から第三者に伝達される可能性は低い。

また、野生型AAV8及び本遺伝子組換え生物等がヒト細胞に共感染し、相同組換えによって本遺伝子組換え生物等の供与核酸が野生型AAV8のゲノムに組み込まれ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の判断

本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従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等の水平伝達による生物多様性への悪影響のおそれはない。

5 その他の性質

(該当なし)

V 総合的評価

遺伝子治療に用いる本遺伝子組換え生物は第一種使用等の方法に従って使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等の生物多様性への悪影響のおそれは以下の理由からないと判断される。

- 本遺伝子組換え生物等の感染性は、カプシド構造が同じであるAAV8ウイルスと同等である。AAV8ウイルスが微生物に感染するとの報告はなく、影響を受ける可能性のある微生物は特定されていない。したがって、本遺伝子組換え生物等が競合又は有害物質の産生により他の微生物を減少させる可能性はないと考えられる。
- AAV（2、8及び9型）の組換えウイルスは臨床試験、治療の実績があり、その安全性が認められている。また環境への影響についての報告もない。本遺伝子組換え生物等においてもAAV8と同様に病原性はなく、本遺伝子組換え生物等が感染した細胞において抗VEGF Fab抗体を産生するが、自然環境のいかなる生物に対しても害を及ぼす可能性はない。
- 本遺伝子組換え生物等の感染細胞で発現又は分泌される供与核酸由来のタンパク質は、抗VEGF Fab抗体であり、その有害性は知られていない。
- 野生型AAV8及び本遺伝子組換え生物等がヒト細胞に共感染した場合に、本遺伝子組換え生物等の供与核酸と野生型のAAV8のゲノムに含まれている*rep*遺伝子*cap*遺伝子とでは配列が異なるため、相同組換えにより本遺伝子組換え生物等の供与核酸がAAV8のゲノムに組み込まれ再びウイルスとして伝播することはない。
- 原薬の出荷判断にあたってrcAAVの否定試験を実施し、その後製剤化されるため、rcAAVが製剤に含まれる可能性は極めて少ない。

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って使用等を行う限り、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。

引用文献

- 1) Muzyczka, N., and K. Berns. Parvoviridae: the viruses and their replication, p. 2327–2360. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York, NY (2001).
- 2) Burger, C., et. al., Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol. Ther.* 10:302–317 (2004).
- 3) Gao, G., et. Al. Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:6081–6086 (2003).
- 4) Gao, G., et. Al., Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J. Virol.* 78:6381–6388 (2004).
- 5) Gao, G., et. Al., Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11854–11859 (2002).
- 6) Mori, S., et. Al., Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 330:375–383(2004).
- 7) Srivastava A. “In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors.” *Current Opinion in Virology* 21: 75-80 (2016)
- 8) *J. of Gene Medicine*, <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>
- 9) Nathwani AC, et. al., Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *New Engl J Med.* 365(25):2357-65 (2011).
- 10) Nathwani AC, et. al., Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B., *New Engl J Med.* 371(21):1994-2004 (2014).
- 11) Maguire AM, et. al., Safety and efficacy of gene transfer for Leber’s congenital amaurosis. *New Engl J Med.* 358(21): 2240-2248 (2008)
- 12) NCT02122952: Gene Transfer Clinical Trial for Spinal Muscular Atrophy Type 1. *ClinicalTrials.gov* [NIH registry and results database] 24 May 2016 [cited 21 Nov 2016]. Available from: URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02122952>.
- 13) Chen, C., et. al., Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J. Virol.* 79: 14781-14792 (2005)
- 14) Schnepf, B., et. al., Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J. Virol.* 79: 14793-14803 (2005)
- 15) Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed., *Fields VIROLOGY* 4th edition, pp.2327-2379, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)
- 16) Xu, R., et al., Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. *Med. Sci. Monit.* 11: 305-308 (2005)
- 17) Fan, D. S., et al., Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* 9: 2527-2535 (1998)
- 18) Shen, Y., et al., Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* 11: 1509-1519 (2000)
- 19) Muramatsu, S., et al., Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum. Gene Ther.* 13: 345-354 (2002)
- 20) Rakoczy EP, Lai CM, Magno AL, et al. Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1-year follow-up of a phase 1 randomized clinical trial. *Lancet*, 386(10011):2395-403 (2015)

- 21) Constable et al, 2016 Constable IJ, Pierce CM, Lai CM, et al. Phase 2a randomized clinical trial: safety and post hoc analysis of subretinal rAAV.sFLT-1 for wet age-related macular degeneration. EBioMedicine 2016. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.11.016.
- 22) NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules (April 2016): (http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/NIH_Guidelines.html). Accessed October 31, 2016