

様式第1（第7条関係）

第一種使用規程承認申請書

令和6年7月26日

厚生労働大臣 殿

環境大臣 殿

氏名 株式会社レストアビジョン

申請者 代表取締役社長 堅田 侑作

住所 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号

虎ノ門ヒルズビジネスタワー15階

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6型に由来するキャッ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、改変型ロドプシンを発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (AAV6-GHCR, 開発コード: RV-001)
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>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>本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管</p> <p>(2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設の他とは明確に区別された室内で行い、当該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>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、漏出させない措置を執って行う。</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、治療施設の他とは明確に区別され</p>

	<p>た室内で、患者の硝子体内に（直接）注入することにより行う。投与時は、当該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> <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、医師の判断により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> <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規程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。</p> <p>(9) 患者の排出モニタリングは必要に応じて実施する。</p> <p>患者検体の取扱い</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>感染性廃棄物等の処理</p> <p>(13) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活性化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。</p> <p>(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</p>
--	---

	<p>等が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理条例に従って行う。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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(17) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液、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、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含まれる可能性のある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。</p> <p>(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。</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

*rep*及び*cap*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、改変型ロドプシンを発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（AAV6-GHCR、開発コード：RV-001。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（*Parvovirinea*）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、*adeno-associated virus-2*（以下「AAV2」という。）に、キャプシドタンパク質は、*adeno-associated virus-6*（以下「AAV6」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は直径23～28nm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、アクセサリータンパク質、ヒストンなどは持たない。

AAVゲノムDNAは4～6kb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、両端には逆位末端反復配列（以下「ITR」という。）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の受容体は（以下「AAVR」という。）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、非ヒト靈長類より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、組織指向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AAV6は筋肉、肝臓、神経に指向性が高いことが報告されている（文献8）。

（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、核膜孔複合体を通じ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、エピソーム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領域への組み込まれることがある（文献9、10）。

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み込みは起こらない。組換えAAVの細胞染色体へのランダムな組み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7）。

（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）有害物質の產生性

野生型AAVの感染に際して細胞内で產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°C、数分間）、次亜塩素酸ナトリウム（1,000ppm）、水酸化ナトリウム、紫外線（UV）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°C、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CMV-GHCRに置換している。

本遺伝子組換え生物等のゲノムは、CMV-GHCR及びその両側の野生型AAV2のウイルス遺伝子由来のITRからなり、組換えAAV6のキャプシドに内包される。

CMV-GHCRは、CMVプロモーター、 β -グロビンイントロン配列、ER2配列、ポリアデニル化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。

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。

・GHCRをコードする領域 (GHCR)

Gloeobacter ロドプシンの細胞質側第2および第3ループを、ヒトロドプシンのそれぞれのループと組換えたキメラロドプシン (GHCR) をコードする遺伝子である。

・CMV プロモーター

ヒトサイトメガロウイルス (CMV) IE enhancer 配列に由来するプロモーターである。多くの細胞腫で安定した発現を示す。

・ β -グロビンイントロン配列

ヒト β -グロビン遺伝子に由来する 400bp の領域である。ヒト β -グロビン (Genbank AF007546.1) の 1128～1527 番目の領域と 1 塩基以外が一致する。

・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。

・ポリアデニル化シグナル

ポリA付加シグナル及びその周辺配列より成る。

・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。

・GHCRをコードする領域 (GHCR)

GHCR タンパクは動物型と微生物型のロドプシンの特徴を兼ね備えたキメラロドプシンであり、網膜内層中の双極細胞に GHCR を発現させることで光駆動性に G タンパク質を刺激して視覚伝達経路を活性化させる機能を持つ（別紙1）。

・ CMV プロモーター

CMV プロモーターはヒトサイトメガロウイルスに由来する。動物細胞で、組織非特異的なプロモーターとして働く。強力なプロモーターとして知られ、発現ベクターとして広範囲に使用されている。

・ ポリアデニル化シグナル

ポリアデニル化配列は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 9）。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。

・ ER2

酵母由来の配列であり、目的の発現タンパク質の輸送の効率化に寄与する。

これらの供与核酸について、Genbank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、遺伝子操作により目的外のORFが生じることで產生されるタンパク質は特定されなかった（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及び発現されるGHCRタンパク質の構成を別紙1に示す。本遺伝子組換え生物等のゲノムはGHCR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。GHCR発現カセットは、CMVプロモーター、ER2配列、ポリアデニル化シグナル及び制限酵素切断部位に由来する人工配列からなる（別紙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等は、以下の供与核酸、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を搭載した3種類のプラスミド pGOI、pRC6（パッケージングプラスミド）及び pHelper（ヘルパープラスミド）を HEK293T 細胞に同時に導入することで作製される。

- pGOI

CMV プロモーター、GHCR をコードする領域、AAV2 に由来する ITR 等を搭載するプラスミド

- pRC6

AAV2 に由来する *rep* 遺伝子及び AAV6 に由来する *cap* 遺伝子を搭載するプラスミド

- pHelper

アデノウイルスの *E2A*、*E4* 及び *VA* 領域を搭載するプラスミド

（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■（海外の場合）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 HEK293T 細胞に、pGOI、pRC6 及び pHelper 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し、濃縮後透析ろ過して原薬を得る。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（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およびrcAAVの管理、ならびに品質管理試験項目を別紙2に示す。なおrcAAVについては、原薬を対象にqPCRを用いた細胞ベースのウイルス増殖性試験を実施することにより管理している。

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

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12）。

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9、10、13）。このエピソームからGHCR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。GHCR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 HEK293T 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。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ィ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の検出は、本遺伝子組換え生物等のGHCR配列の一部のDNA断片をqPCR法で増幅・定量することにより検出される。本qPCR法では血液200 μL、唾液100 μL、尿140 μL、涙液10 μLおよび糞便を約200 mg用い、いずれも100コピー以上のゲノムがあれば定量することができる。100コピー以下の場合でもqPCRによりCq値が得られることでウイルスを検出することができる。詳細を別紙3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ゲノムを抽出することによって得る。

臨床試験で用いるqPCR法では非臨床試験と同じプライマープローブセットを使用する。本測定法でヒトサンプル中の本遺伝子組換え生物等のゲノムを検出できることは確認済みである（別紙3）。

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 GHCR 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 GHCR 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、ヘルパーウィ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ィルスと共に

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 ウィ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ムとして存在する。

AAV ベクター作製時、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子をもつ pRC6 と GHCR 遺伝子をもつ pGOI 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、ウィ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 9、10）。

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。

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、治療施設の他と明確に区別された室内で行い、当該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、治療施設の他と明確に区別された室内で、患者の硝子体内に（直接）注入することにより行う。投与時は、当該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、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規程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。
(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、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本遺伝子組換え生物等が含まれる可能性のある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

患者への投与後、患者の血液、涙液、尿及び便を対象に GHCR 遺伝子 DNA の一部を PCR で增幅、定量する方法で本遺伝子組換生物等の排出を確認する。同遺伝子が検体から検出された場合は、当該試料に対して不活化処理を施した後に廃棄する。

本遺伝子組換生物等の検出法に関する詳細を別紙 3 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>

<安全性>

雌雄正常ラットに対し、本遺伝子組換え生物等を [REDACTED] vg/eye (低用量群) 、 [REDACTED] [REDACTED] vg/eye (中用量群) 、 [REDACTED] vg/eye (高用量群) の用量で片眼又は両眼硝子体内投与し、投与 4、8、29、92 及び 183 日目に剖検を実施し、毒性評価を行った (投与量はいずれも計算値)。高用量群の雌 1 例が瀕死となり安楽死したが、剖検の結果、自然白血病によるものと推察された。その他は、被験物質に起因すると推察される死亡例及び瀕死例はいずれの用量群でも観察されなかった。また、いずれの用量群において、全ての観察時点で一般状態、体重、摂餌量、眼科検査、尿検査、血液学、血液化学、剖検、臓器重量、病理組織学について、毒物学的に有意な変化は認められなかった。

一方、投与手順による変化が、対照群を含めた全群で眼科検査、剖検、病理組織検査で観察された。

以上の結果及び投与後の投与液分析の結果により、ラットにおける本遺伝子組換え生物等の無毒性用量は [REDACTED] vg/eye 以上と考えられた (別紙 4、文献17)。

<分布、排出>

正常ラットに対して、本遺伝子組換え生物等 ([REDACTED] [REDACTED]) を単回片眼硝子体内注射したときの非臨床生体内分布試験では、投与した本遺伝子組換え生物等のゲノム DNA は主に [REDACTED] に検出され、 [REDACTED] においても大きく減少する傾向は認められず、 [REDACTED] においては [REDACTED] が BLOQ となった (別紙 4、文献 18)。一方、 [REDACTED] については、同 DNA の存在は認められず、 [REDACTED] まで検出された。

同様に、本遺伝子組換え生物等 ([REDACTED] [REDACTED]) を両眼硝子体内注射したときの非臨床生体内分布試験では [REDACTED] 及び [REDACTED] において同 DNA は [REDACTED] 検出され、 [REDACTED] については、認められなかった (別紙 4)。なお、両眼投与群における投与間隔は 4 週間であり (1 日目 : 左眼、29 日目 : 右眼)、両眼投与群における最初の採取ポイントは、最初の投与から 92 日目である。

<臨床研究>

本遺伝子組換え生物等を用いた臨床研究等は実施されていない。

＜臨床試験（治験）＞

本遺伝子組換え生物等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

海外における本遺伝子組換え生物等を使用した臨床試験等は実施されていない。

また、これまでに、AAVウイルスベクターを用いた遺伝子治療に関する情報が多数得られている。

国外における、AAV2に由来する遺伝子組換えウイルスの硝子体内投与による使用 実績は下記の通りである。

2009年より、米国で実施された臨床試験において19例の患者にAAV2-sFLT01が硝子体内投与された。この結果、投与前、Day1、3、7、Week 2、4、8、12、18、26、38、52 のすべての時点で血液、鼻咽頭、尿中からAAV2-sFLT01ベクターは検出されなかつた。投与量は 2.0×10^8 、 2.0×10^9 、 6.0×10^9 virus genomes (vg) が各3 例、 2.0×10^{10} vg が10例であった。 (文献14)

また、米国において、GHCRと同様の機能を有するChR2遺伝子を搭載したAAV2-ChR2を硝子体内へ投与する臨床試験が行われているが (Retrosense Therapeutics , <http://www.businesswire.com/news/home/20160810005731/en>, NCT02556736, RST-001 Phase I/II Trial for Advanced Retinitis Pigmentosa, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02556736?term=02556736&rank=1>) 、現在のところ有害性の報告はない。

なお、現在計画中の本遺伝子組換え生物等を用いた臨床試験における、ウイルス排出確認に用いる検体の採取ポイントは、試験の来院スケジュールに合わせ、Day 3, 7を予定している。また検体としては、血液・涙液、尿及び便を予定している。

文献14に示す硝子体内投与の遺伝子治療製品においては、いずれのポイントにおいてもベクターは未検出であり、また本遺伝子組換え生物等を用いたラット分布試験においては、ウイルス排出は投与4日後までであり、かつ検出量も定量下限値 (100 コピー) に近い低値であった。また、IV項に記載の通り、本遺伝子組換え生物等が環境に与える影響は非常に軽微と考えられることから、最終測定時期をDay 7とした。

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

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) 影響の具体的な内容の評価

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) 影響の具体的な内容の評価

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）。

一方、GHCR タンパク質は大半が *Gloebacter* ロドプシン由来のタンパク質のため、免疫応答が生じる可能性がある。また光駆動性に G タンパク質を刺激する機能があるため仮に他の組織に導入され、更に光照射がされた場合には何らかの生理活性が生じる可能性も考えられる。また、目的タンパク質が過剰発現した際には正常な細胞代謝が乱れ、細胞死などを誘発する可能性がある。しかし、III-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」の分布試験結果の部分に記載の通り、投与部位である目以外への分布も確認されていないことから、これらのリスクは低いと考えられる。

（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。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に感染しないかぎり、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 有害物質の產生性

（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）影響の具体的な評価

本遺伝子組換え生物等のキャッ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15、16）。

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が有害物質の產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が動物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、GHCRタンパク質が產生される。

ラットに本遺伝子組換え生物等を両眼硝子体内注射（[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]）

[REDACTED]を行った予備毒性試験（non-GLP試験）では、被験物質投与に起因すると考えられる眼球における炎症性変化が認められたが、炎症性変化には個体差が認められた。その他、重篤な有害作用は認められなかった。

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、GHCRタンパク質の有害性は知られていない。

また、GHCRタンパク質は大半が *Gloebacter* ロドプシン由来のタンパク質のため、免疫応答が生じる可能性があると考えている。また光駆動性に G タンパク質を刺激する機能があるため仮に他の組織に導入され、更に光照射がされた場合には何らかの生理活性が生じる可能性も考えられる。また、目的タンパク質が過剰発現した際には正常な細胞代謝が乱れ、細胞死などを誘発する可能性が考えられる。

（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。また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスと共に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に感染しないかぎり、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GHCRタンパク質が第三者、野生動植物等に對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、有害物質の產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）影響の具体的な内容の評価

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GHCR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に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に感染しないかぎり、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 AAV6 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 GHCR 遺伝子の発現はヒト及び他の哺乳動物に病原性、有害物質の產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く、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 AAV6 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、有害物質の產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製造方法及びrcAAVの工程内管理

別紙3：本遺伝子組換え生物等の検出試験（試験方法、定量限界・検出限界）

別紙4：非臨床毒性試験および生体内分布試験結果概要

参考文献

1. Chapter6, Parvoviridae. Fields VIROLOGY 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia (2022) 2.173.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2020)
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. 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.
8. 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, 2015.
9. 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.
10. 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.
11. Srivastava A, Carther BJ. AAV Infection: Protection from Cancer. Hum Gene Ther. (2017) 28(4). 323-327.
12. Xu R., et al., Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. Med. Sci. Monit. (2005) 11. 305-308
13. 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.
14. Heier JS, et al. Intravitreous injection of AAV2-sFLT01 in patients with advanced neovascular age-related macular degeneration: a phase 1, open-label trial Lancet. (2017) 390. 50-61
15. Mingozi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. Blood (2013) 122. 23-36.
16. Muhuri M, Maeda Y, et al. Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors. J Clin Invest (2021) 131(1). e143780.