

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9月20日

厚生労働大臣 殿

環境大臣 殿

氏名 株式会社遺伝子治療研究所

申請者 代表取締役 浅井 克仁

住所 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-22

ライフイノベーションセンター414

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GTPシクロヒドロラーゼI (GCH) を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス2型 (AAV2-GCH)
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調製及び保管</p> <p>(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。</p> <p>(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。</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、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、患者の両側線条体被殻内に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>投与後の患者からの排出等の管理</p> <p>(6) 投与後、患者の創部を消毒し、創部から排出される本遺伝子組換え</p>

	<p>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>患者検体の取扱い</p> <p>(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。）の規定に従つて取り扱う。</p> <p>(10) 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つて取り扱う。</p> <p>(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。）に従つて行う。</p> <p>感染性廃棄物等の処理</p> <p>(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つて行う。</p> <p>(13) 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つて行う。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>(14) 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>(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</p>
--	---

	<p>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>(16) 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・尿・糞便・唾液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>(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、ヒトGTPシクロヒドロラーゼI (GCH) 遺伝子を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス2型（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 (*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及びキャップシドタンパク質は、adeno-associated virus-2（以下「AAV2」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III章参照）。

国内では、AAV2由来の遺伝子治療用製品 LUXURNA®と、AAV9由来の遺伝子治療用製品 zolgensma®が承認されている。

株式会社遺伝子治療研究所では、遺伝子治療用ウイルスベクター作製の目的でAAVを使用している。

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 23~28 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、アクセサリータンパク質、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、キャッ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 のキャップシドタンパク質はどれも構造的に類似しており、2 型キャッ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 AAV2 は筋肉、肝臓、神経細胞に特異性が高いことが報告されている。

（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、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 タンパク質の関与により、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 7、8）。

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 9）。

（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 10）。

（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（1,000 ppm）、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*GCH*を含む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、供与核酸となる*GCH*遺伝子領域 (■塩基) を含む発現カセット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AAV2のキャプシドに内包される。

*GCH*を含む発現カセットは、それぞれ ■/promoter領域、■遺伝子 ■領域、*GCH*遺伝子領域、■pA領域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。

- /promoter 領域

■遺伝子プロモーターを含む領域。

- 遺伝子 ■領域

■に由来する領域。

- GCH* 遺伝子領域

GCH コード領域を含む領域。

- pA 領域

■polyadenylation signal の発現遺伝子領域に由来する転写終結ポリアデニル化シグナル配列を含む領域。

- 人工配列

プラスミド構築時に移入された人工配列。

- 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。

- /promoter 領域

多くの哺乳動物細胞における強力なプロモーターである。

・ [] 遺伝子 [] 領域

発現タンパク質のレベルを高める [] として機能する。

・ GCH 遺伝子領域

基質である GTP に作用し、テトラヒドロビオプテリン (BH₄) を產生する。産物の BH₄ は、神經伝達物質であるドパミンの前駆体である L-ドパがチロシン水酸化酵素 (TH) によりチロシンから合成される際に TH の補酵素として必須である。

・ [] pA 領域

RNA ポリメラーゼIIによる転写終結に寄与し、転写産物末端にアデノシンを付加することにより RNA の安定性と転写効率を増加する。

・ 人工配列

プラスミド構築の過程で挿入された制限酵素認識部位等であり、本遺伝子組換え生物に新たな生物学的機能を付与するものではないと考えられる。

・ ITR

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7）。なお、ITR はタンパク質を発現するオープソ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、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の Web サイト Nucleotide BLAST (Program : BLASTN 2.8.0+) 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GCH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GCH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。GCH発現カセットは、[REDACTED]/promoter、GCHコード配列、[REDACTED]pA及び制限酵素切断部位に由来する人工配列からなる。

(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、以下の供与核酸、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を搭載した2種類の[REDACTED]細胞に[REDACTED]させることで作製される。.

[REDACTED]
アデノ随伴ウイルス2型に由来する *rep* 遺伝子及びアデノ随伴ウイルス2型に由来する *cap* 遺伝子を搭載する[REDACTED]

[REDACTED]
rep 及び *cap* 遺伝子を欠失し、GCH 遺伝子を含む発現カセットを搭載したアデノ随伴ウイルス2型のゲノムDNAが導入された[REDACTED]

(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国内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。

● 原薬の製造工程

[REDACTED]細胞に[REDACTED]させる。続いてその[REDACTED]細胞を用いて、拡大培養していた[REDACTED]細胞に[REDACTED]させて培養を行った後、[REDACTED]等を目的とした[REDACTED]等を行う。この工程で[REDACTED]。その後、[REDACTED]等により精製し、AAV2-GCHのバルクを調製する。目的の濃度に調製し、バイアル等の密封容器に小分け分注し、[REDACTED]℃以下にて凍結保存する。また、得られた原薬は、製造ロットごとに品質試験を行う。なお、増殖能を獲得したウイルス（replication-competent AAV、以下「rcAAV」という。）は[REDACTED]。

● 製剤の製造工程

本遺伝子組換え生物等の原薬のみで製剤化は可能であるが、[REDACTED]

の製剤とすることを想定している。[REDACTED] 製剤の製造工程は以下のとおりである。

[REDACTED] 細胞にて製造され、凍結保存されていた原薬 [REDACTED]

[REDACTED] し、最終無菌ろ過を行う。バイアルに充填分注する。ラベルを貼付、包装して [REDACTED]

[REDACTED] 最終製品の包装状態にした後、[REDACTED] °C以下で凍結保存する。[REDACTED]

[REDACTED] は製造ロットごとに品質試験を行う。

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11）。

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7、8、13）。このエピソームからGCH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。GCH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 [REDACTED] 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

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、[REDACTED]

[REDACTED] DNA断片をqPCR法で增幅・定量することにより検出される。本qPCR法では [REDACTED] μL中に [REDACTED] コピーのゲノムがあれば検出することができる。詳細を別紙3に示す。

臨床試験で用いるqPCR法ではヒトからの採取検体からAAVゲノムを抽出し、[REDACTED] 配列用プライマープローブセットを使用する。使用するプライマープローブセットは [REDACTED]

[REDACTED] ように設計してある。

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 *GCH* 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 *GCH* 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、ヘルペ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ペ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、及びヘルペ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 [REDACTED] と *GCH* 遺伝子をもつ [REDACTED] 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 7、8）。

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、患者の両側線条体被殻内に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、患者の創部を消毒し、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。

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、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。

- (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。
- (14) 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。
- (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) 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・尿・糞便・唾液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

被験者からの本遺伝子組換え生物等の排出の確認は治験実施計画書に従って行う。被験者への投与後1日目に被験者の血液、尿、唾液等を用いてqPCR法により、本遺伝子組換え生物等の排出を確認する。なお、検査で検出が確認された場合には、1日目以降の任意のタイミングで実施する。

詳細を別紙4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>

- ラットを用いた [REDACTED] の単回線条体内投与による [REDACTED]
[REDACTED] (試験番号: [REDACTED])

本遺伝子組換え生物等を含んだ [REDACTED] の0 (媒体) 、 [REDACTED] ([REDACTED]) 又は [REDACTED] ([REDACTED]) vg/rat を [REDACTED] ラットに単回脳内 (被殻を含む両側線条体内) 投与した [REDACTED] に関する試験を行い、投与後 [REDACTED] の試験動物の大脳 (線条体、外側線条体及び線条体以外の部位)、小脳、延髄、脊髄 (頸・胸・腰髄) 、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓及び精巣中の本遺伝子組換え生物等の濃度を測定した。

その結果、投与後 [REDACTED] の試験動物の線条体では、 [REDACTED] 群、 [REDACTED] 群において用量依存的なAAV2-GCH濃度が認められた。投与後 [REDACTED] の大脳以外の器官では、 [REDACTED] 群、 [REDACTED] 群共に明らかなベクターゲノムは検出されなかった。

[REDACTED] に関する試験の詳細を別紙5に示す。

- ラットを用いた [REDACTED] の単回線条体内投与による [REDACTED]
[REDACTED] 試験 (試験番号: [REDACTED])

本遺伝子組換え生物等を含んだ [REDACTED] の0 (媒体) 、 [REDACTED] ([REDACTED]) それぞれ [REDACTED] 又は [REDACTED] ([REDACTED]) それぞれ [REDACTED] vg/rat を [REDACTED] ラットに単回脳内 (被殻を含む両側線条体内) 投与した [REDACTED] に関する試験を行った。

[REDACTED] に関する試験として、投与後 [REDACTED] の大脳 (線条体、線条体以外の部位) におけるAAV2-GCH濃度を測定した。その結果、線条体中のAAV2-GCH濃度は、雄の投与後 [REDACTED] では [REDACTED] 群及び [REDACTED] 群で用量増加に応じて検出され、投与後 [REDACTED] では [REDACTED] 群で減少したが、 [REDACTED] 群では同程度に検出された。 [REDACTED] 群では [REDACTED] 群と同程度に検出され (投与後 [REDACTED]) 同様の推移を示したが、高用量群では投与後 [REDACTED]

[REDACTED] に関する試験として、投与後 [REDACTED] の試験動物の血液、唾液、尿及び糞中の本遺伝子組換え生物等の濃度を測定した。その結果、投与後 [REDACTED] の血液、唾液、尿及び糞中にAAV2-GCHベクターゲノムは検出されず、投与後 [REDACTED] までに排泄されたか、脳内に残り、末梢循環に移動しない可能性が示唆された。

[REDACTED] に関する試験の詳細を別紙5に示す。

<臨床研究>

本遺伝子組換え生物等を用いた臨床研究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。

本遺伝子組換え生物等と導入遺伝子は異なるものの、キャプシド、投与経路が同一であるAAVベクター[REDACTED]([REDACTED])の臨床試験結果を以下に記載する([REDACTED]試験、[REDACTED]試験)。

[REDACTED]の患者[REDACTED]名に対して本遺伝子組み換え生物等([REDACTED]vg)を脳内投与した[REDACTED]試験において、血液、尿、糞便及び唾液への排出が検討されており、血液、尿、糞便及び唾液を採取してベクターゲノム定量を実施した。[REDACTED]

[REDACTED]時点の全ての測定時点、全てのサンプルでベクターゲノムは検出されなかった。また、当該試験において[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]であった。

[REDACTED]の患者[REDACTED]名に対して本遺伝子組み換え生物等([REDACTED])を脳内投与した[REDACTED]試験において、血液、尿、糞便及び唾液への排出が検討されており、血液、尿、糞便及び唾液を採取してベクターゲノム定量を実施した。[REDACTED]

[REDACTED]時点の全ての測定時点、全てのサンプルでベクターゲノムは検出されなかった。また、当該試験において[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

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と同一の組換えAAVを用いた国外の臨床試験等は実施されていない。一方、これまでに、類似の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。

AAV2由来の遺伝子治療用製品LUXURNA[®]は2017年12月にFDAの承認を取得し、国内では2023年6月に「効能、効果又は性能：両アレル性RPE65遺伝子変異による遺伝性網膜ジストロフィー」として承認済みである。最新の添付文書による不具合・副作用に関しては、両アレル性RPE65遺伝子変異による遺伝性網膜ジストロフィーの成人及び小児患者を対象とした臨床試験において、本品が投与された症例は45例（日本人4例を含む）であった。10%以上の頻度で認められた眼局所の副作用は、白内障11例（24.4%）、結膜充血9例（20.0%）及び眼圧上昇6例（13.3%）であった（承認時までの集計）（文献12）。なお、LUXURNA[®]は本遺伝子組換え生物等と投与経路が異なるが、血清型が同一であるため本項に記載している。

AAV2由来の遺伝子治療用製品UpstazaTMは2022年7月に欧州医薬品庁（EMA）の承認を取得し、AADC欠損症への適応を有する製品である。海外で小児30例のAADC欠損症患者

を対象とした臨床試験が実施されており、確認された主な副作用は、ジスキネジア26例（86.7%）、AAV2抗体陽性反応18例（60.0%）、脳脊髄液漏出3例（10.0%）であった（文献13）。

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 10）。

（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、[REDACTED]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14、15）。

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。

本組換え生物が発現するGCHタンパク質が毒性を持つことは知られていない。

また、本遺伝子組換え生物等由来のGCHタンパク質は、ヒトにおいて発現しているGCHタンパク質と同一であるため、これらのGCHタンパク質に対する免疫応答は起こらないと考えられる。

ラットに本遺伝子組換え生物等を含んだ [REDACTED] を [REDACTED] vg/rat ([REDACTED] それぞれ [REDACTED] vg/rat、予定最大臨床用量の約 [REDACTED] 倍) 単回脳内（被殻を含む両側線条体内）投与する非臨床試験（ [REDACTED] 試験）において、 [REDACTED] は認められたが、過剰発現に関連する有害事象は認められなかった。この非臨床試験結果は [REDACTED] タンパク質の定量結果ではないが、 [REDACTED] タンパク質の過剰発現が必ずしも有害事象と関連しないことを示唆している。

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、GCHタンパク質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、ヘルパーウィルスと共に感染しても増殖することではなく、野生型AAV及びヘルパーウィ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、ヘルパーウィ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、 [REDACTED] するため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウィ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GCH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*GCH*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、[REDACTED]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 AAV2 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 *GCH* 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 及びヘルパーウィ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 AAV2 と同一又は極めて近い構造になるとと考えられるため、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ィ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：AAV2-GCHの情報

別紙2：AAV2-GCHの製造方法及びrcAAVの管理状況

別紙3：AAV2-GCHの検出試験

別紙4：AAV2-GCHの臨床試験における排出試験計画

別紙5：非臨床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. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Srivastava A, Carter BJ. AAV Infection: Protection from Cancer. *Hum Gene Ther.* (2017) 28(4). 323-327.
11. Xu R., et al., Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. *Med. Sci. Monit.* (2005) 11. 305-308
12. ルクスター注_添付文書
13. Upstaza EPAR Product Information
14. Mingozi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* (2013) 122. 23-36.
15. Muhuri M, Maeda Y, et al. Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors. *J Clin Invest* (2021) 131(1). e143780.