

様式第 1 (第 7 条関係)

第一種使用規程承認申請書

平成 30 年 3 月 20 日

厚生労働大臣 加藤 勝信 殿
環境大臣 中川 雅治 殿

氏名 アステラス製薬株式会社
代表取締役社長 畑中 好彦

申請者

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、改変型ボルボックスチャネルロドプシン 1 を発現するアデノ随伴ウイルス 2 型 (AAV-mVChR1)
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>原液の保管</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物等を含む原液（以下単に「原液」という。）は、遺伝子組換え生物等である旨を表示した容器の中でバイアルに密封された状態で、治療施設内の適切に管理された冷凍庫に保管される。</p> <p>希釈液の調製</p> <p>(2) 原液は、希釈が必要な場合、融解後、治療施設内の他の区域と明確に区別された作業室で、希釈用溶液により希釈され、希釈された液（以下単に「希釈液」という。）は密封した状態で保存される。</p> <p>運搬</p> <p>(3) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内の運搬は、密封した状態で行う。</p> <p>患者への投与</p> <p>(4) 患者への投与は、他の区域と明確に区別された治療室で行う。 (5) 希釈液又は原液は、患者の硝子体内に直接注入される。</p> <p>投与後の患者からの排出等の管理</p> <p>(6) 被験眼からのウイルス漏出を防止するため、ガーゼ及び眼帯による被覆が行われる。ガーゼ及び眼帯による被覆は、注入部位からの本遺伝子組換え生物等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継続する。 (7) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。必要に応じて、患者の排出物等から第三者への伝播を防止するための適切な指導を行う。 (8) 本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者がその他外部医療</p>

様式第 1 (第 7 条関係)

	<p>施設で治療を受ける際は、その他外部医療施設に第一種使用等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た患者に適切な指導を行う。</p> <p>検体の取扱い</p> <p>(9) 治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）で、患者から採取した検体は、施設等の規定に従って取り扱う。検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合には、検体は検査機関の規定に従って取り扱う。</p> <p>(10) 施設等から検査機関への検体の運搬は、本遺伝子組換え生物等が拡散しない構造の容器に入れて行う。</p> <p>感染性廃棄物等の処理</p> <p>(11) 希釈に用いた容器及び器具並びに投与に用いた注射器等及び患者体液の付着した器材等は、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）に基づいて施設等及び検査機関で定められている医療廃棄物の管理に関する規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って廃棄される。ただし、再利用するものにあつては、不活化処理を行う。</p> <p>(12) 原液及び未使用の本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物は、不活化処理を行った上で医療廃棄物管理規程に従って廃棄される。</p> <p>(13) 患者由来の検体の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って廃棄される。</p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(別紙様式)

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は、アデノ随伴ウイルス (AAV) の血清型の1つである2型AAV (AAV2) である。AAVはパルボウイルス科のディペンドウイルス属に属する。アデノウイルスの培養系に混入してくる小型ウイルスとして発見された。(+)鎖又は(-)鎖の線状一本鎖DNAウイルスであり、ウイルス粒子はエンベロープを持たず、正二十面体のカプシドを有し、物理的にきわめて安定である。アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下で増殖する(文献1)。

AAV2は自然界に広く分布し、哺乳類動物に感染するが病原性は知られていない。ヒトでは小児期に初感染が起こること、成人の約85%が抗体を有することが知られている。

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、医学生物学領域において遺伝子導入用ベクターとしての応用が最近とみに進んだウイルスの1つである。

特にAAV2に由来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(文献2、3)。しかし、本遺伝子組換え生物等について国内での臨床使用の報告はない。

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

AAVは約4.7 kbの線状一本鎖DNAウイルスであり、(+)鎖及び(-)鎖の両者が存在する。エンベロープを持たず直径20~26 nmの正二十面体構造のカプシドを有する。

AAVは種々の細胞の表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンやインテグリン等を受容体の1つとするため宿主域は広い。また、非分裂細胞にも感染が可能である。野生型AAVは標的細胞に感染すると核に輸送され、Repタンパク質が関与して第19染色体長腕のAAVS1領域(19q13.3-qter)に組み込まれることがある。一方、rep遺伝子を欠失した遺伝子組換えAAVではゲノムに組み込まれる場合には、ランダムに

組み込まれる傾向にあり、アクティブな遺伝子領域に挿入されやすいとの報告がある(文献4)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

AAVはヒトに感染はするが、ウイルス粒子を構成するために必要とされる遺伝子を有しないことから自律的な増殖能を欠損している。増殖には、E1A、E1B、E2A、E4及びVA遺伝子等を供給しうる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の存在が必要である。

培養細胞を用いたインビトロでのAAV産生系においても同様に、供与核酸が搭載されたAAVゲノム領域を含むプラスミドに加え、*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子を搭載したAAVヘルパープラスミド並びにアデノウイルスE2A、E4、VAを発現するヘルパープラスミドを、E1A及びE1Bを発現するヒト胎児腎培養細胞(HEK293細胞等)にコトランスフェクションした場合にウイルスの複製が起きる。

本ウイルスは物理化学的に極めて堅牢であり、常温においても安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

捕食性はない。AAV2はヒト以外に、げっ歯類、サル等の哺乳類動物に感染することが知られている。

(4) 繁殖又は増殖の様式

AAVは主に、経気道で、又は経口で感染する。AAVの生活環は潜伏感染と溶解感染の2ステージに分けられる。

1) 潜伏フェーズ

野生型AAVが単独で感染した場合、細胞膜の表面レセプターを介したエンドサイトーシスにより取り込まれ、エンドソームとして細胞質に存在する。エンドソームから脱出したAAV粒子は核へ移行し、脱殻後に二本鎖DNAの生成が起きる(別紙1-図1)。宿主ゲノムへの組込みに際しては、ITRのRep結合領域とAAVS1領域に共通の配列にRep78/Rep68が結合し、Repを介した組換えにより標的細胞の第19染色体長腕のAAVS1領域(19q13.3-qter)に組み込まれると考えられている(文献2)。

2) 溶解フェーズ

例えば、ヘルパーウイルスとしてアデノウイルスが共感染した場合には、ヘルパーウイルス由来のE1A、E2A、E4、VA遺伝子の産物の存在下、*rep*及び*cap*遺伝子の産物であるRepタンパク質やカプシドタンパク質が産生され、Repを介したAAVゲノムの複製がおこり、パッケージングされたウイルス粒子が

産生され、感染細胞の破壊により大量のウイルスが細胞外に放出される（別紙1-図2）。

3) AAVゲノムの構造及び転写

AAVゲノムは両端に145塩基のITR（inverted terminal repeat）構造を持ち、（+）鎖の場合、その間の上流側半分はRepタンパク質のコード領域に相当し、下流側半分はカプシドタンパク質であるVP1、VP2及びVP3をコードする（別紙1-図3）。RepはAAVプロモーターの活性調整、AAVゲノムの複製及び第19番目染色体AAVS1領域への組込みに関与する。ITRはセルフプライマーとして複製の開始点となり、ニックにより乖離した3'端から二重鎖が合成され、両端にITRを持つ構造が複製される（別紙1-図2）。

（5）病原性

パルボウイルス科のパルボウイルス属であるパルボウイルスB19やサルパルボウイルスはウイルス複製にヘルパーウイルスを必要とせず、ヒトに感染し宿主細胞内で自律的に増殖し、宿主動物に、発疹症（伝染性紅斑等）、貧血、胎児水腫等の様々な病態を引き起こす。しかし、パルボウイルス科のディペンドウイルス属であるAAVは、特に病原性が認められていない。なお、溶解フェーズにおける感染細胞の破壊は、AAVによるものではなく、ヘルパーウイルスによるものであり、AAV自体が病原性を示すことがない。

（6）有害物質の産生性

AAV2のウイルス粒子自体及びそのゲノムにコードされるタンパク質に、有害物質を産生する活性はない。

（7）その他の情報（不活化条件等を含む。）

パルボウイルスに共通する性質として物理化学的に安定なキャプシドを有していることから、不活化には85℃で数分の加熱処理が必要とされている。通常のオートクレーブ処理（121℃、20分間）、次亜塩素酸ナトリウム処理又は0.25%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)15分処理により完全に不活化される。

AAVは、エンベロープを持たないウイルスであり、上述の加熱に加えて、pH変化、プロテアーゼ処理、界面活性剤などに対して抵抗性を示し、環境中で比較的安定であると云われている。

文献1：小澤敬也, AAVを利用した遺伝子治療. ウイルス. 第57巻1号, 47-56, 2007.

文献2：Russell DW and Kay MA. Adeno-Associated Virus Vectors and Hematology. Blood

94(3): 864-874, 1999.

文献3 : Coura NS and Nardi NB. A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1, 1-11, 2008.

文献4 : Nakai H., et al. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nature Genetics* 34 :297-302, 2003.

文献5 : Balakrishnan Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene. *Current Gene Therapy*, 14, 86-100, 2014.

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

供与核酸は、両端のITRに挟まれた次の①～⑤よりなる。

① CAGプロモーター (CAG promoter)

ヒトサイトメガロウイルス (CMV) IE enhancer配列と、ニワトリβアクチンのプロモーターからイントロン1にわたる領域をつなげた構造の人工プロモーターである。このプロモーターはpVITRO4-neo-mcsプラスミド (別紙2) に搭載のCAGプロモーターと同一の配列である。

② mVChR1遺伝子

緑藻綱クラミドモナス目に属する*Chlamydomonas reinhardtii*由来のチャンネルロドプシン1と緑藻綱ボルボックス目に属する*Volvox carteri f. nagariensis*由来のチャンネルロドプシン1の融合タンパク質 (mVChR1タンパク質) のアミノ酸配列をコードする。

③ WPRE領域

ウッドチャック肝炎ウイルスに由来する遺伝子発現増強因子配列である。この領域に含まれる肝癌の発症に関係していると考えられるXタンパク質の発現を抑制するための塩基置換が施されている。

④ bGHpA領域

ウシ成長ホルモン遺伝子のポリA付加シグナル及びその周辺配列より成る。

⑤ その他の核酸断片

プラスミド構築時に移入された人工配列である。

なお、本遺伝子組換え生物等を構成するカプシドタンパク質は、pRC2-mi342に搭載されたAAV2由来のcap遺伝子にコードされたものである。

(2) 構成要素の機能

① CAGプロモーター (CAG promoter)

動物細胞で、組織非特異的なプロモーターとして働く。

② *mVChR1* 遺伝子

mVChR1 タンパク質は、幅広い波長の光に反応する光受容イオンチャネルで、光による刺激を受けることで活性化され、イオンの流出入を行う。

③ WPRE 領域

WPREは、mRNAのプロセッシングを促進し、核外への輸送を促進させることで細胞質でのmRNA濃度を増加させる。

④ bGHpA 領域

ウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリA付加シグナルである。

⑤ その他の核酸断片

プラスミド構築の過程で便宜のために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等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。

タンパク質コード領域の全塩基配列において、既知の有害配列（がん遺伝子、有害物質、トキシン）との相同性は認められなかった。

AAV2の増殖と複製には、ゲノム両端に存在する反復配列ITRとウイルス固有の非構造タンパク質であるRepタンパク質（及びヘルパーウイルスの働き）が必要であり、また感染の標的細胞はウイルスカプシドによって規定される。そこで、ウイルスゲノム両端のITRの間のウイルスタンパク質コード領域を*mVChR1*に置き換えたAAV-*mVChR1*（ウイルスカプシドは野生型AAV2と同じ組成）については、ヘルパーウイルス存在下でも増殖性をもたず、また感染の標的細胞は野生型AAV2と同様であると考えられる（文献6、7、8）。

文献 6 : Yan, Z., et al., Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. *J. Virol.* 79:364-379 (2005)

文献 7 : Schnepf, B., et al, Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J. Virol.* 77: 3495-3504 (2003)

文献 8 : Grimm, D., et al. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *J Virol* 80: 426-439 (2006)

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

AAV-mVChR1の調製には、pAAV-VChR1、pRC2-mi342及びpHelperの3種類のプラスミドが用いられる。pAAV-VChR1プラスミドは、AAVpro® Helper Free System (AAV2) (タカラバイオcode 6230) のコンポーネントであるpAAV-CMVに目的遺伝子の発現カセットを挿入して作製した。pAAV-VChR1はITR及びCAGプロモーターの転写制御下にある*mVChR1*遺伝子発現カセットを含む。pRC2-mi342はAAV2ゲノムのうち、ウイルス固有のタンパク質であるRepタンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52、Rep40) (複製と増殖に関与) およびCapタンパク質 (VP1、VP2、VP3) (カプシドを形成) をコードする領域とmiRNAの一種であるhsa-miR-342 (AAV2ベクター作製系でタイター向上効果のあるmiRNA) 発現カセットを含むパッケージングプラスミドである。pHelperはアデノウイルス由来のE2A、E4、VA領域配列を含むヘルパープラスミドである。

3つのプラスミドの構造、AAV-mVChR1のゲノムの構造及び全塩基配列を別紙3に示した。

(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3種類のプラスミド (pAAV-VChR1、pRC2-mi342及びpHelper) を [] 細胞に導入させて作製される。3つのプラスミドの調製方法は、別紙3に記載した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

以下の工程及び品質管理は [] 株式会社 [] [] で実施する。凍結保存の [] 細胞を37°Cで振とうしながら融解し、拡大培養し、pAAV-VChR1、pRC2-mi342及びpHelperを同時に導入し、培養後に細胞溶解・破碎処理を行う。AAV-mVChR1を回収し、フィルターろ過、カラムクロマトグラフィーや超遠心分離等による精製を行い、目的の濃度に希釈してバイアル等の密封容器に小分け分注し、冷凍庫にて凍結保管する (別紙3)。品質管理の詳細は別紙3に示した。精製バルク (原薬) の品質試験では、力価及び含量に加え、プラスミド残留試験及び増殖性ウイルス (replication-competent AAV、以下rc-AAVとする) 試験等を実施する。

本遺伝子組換え生物等は、ITR、*rep*及び*cap*遺伝子並びにE2A、E4及びVA領域を3種類のプラスミドに分割して、同時に導入することにより製造される。従って、確率的観点からは、pRC2-mi342とpAAV-VChR1が組換えを起こして増殖能を獲得したウイルス (rc-AAV) 出現の可能性は極めて低いと考えられる。rc-AAVの混入した本遺伝子組換え生物等溶液を使用することがないように、本遺伝子組換え生物等溶液について [] 細胞で増幅後にrc-AAVウイルスを検出するリアルタイムPCRによるrc-AAV試験を実施し、適合することを確認する。

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

AAVに移入された核酸は1本鎖DNAゲノムの一部として存在し、凍結下、安定に保存される。

細胞に感染すると、本遺伝子組換え生物等のゲノムは通常、核内で染色体外の2本鎖DNA(エピゾーム)として比較的長期にわたって存在し、発現カセットに挿入されているCAGプロモーター制御下、mVChR1タンパク質が構成的に発現する。mVChR1の発現は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。網膜神経節細胞は非分裂細胞であるので長期的な発現が期待される。

本遺伝子組換え生物等は野生型ウイルスであるAAV2の*rep/cap*領域を欠失しているため、ヘルパーウイルス依存性の複製能を喪失している。アデノウイルス等のヘルパー機能を持ったウイルスが感染しており、且つ*rep*遺伝子と*cap*遺伝子を発現している細胞に感染した場合に限り、本遺伝子組換え生物等は感染性ウイルスを産生しうるが、自然環境中でこのような細胞に感染する可能性はほとんど無いと考えられる。従って、本遺伝子組換え生物等は外界に漏出しても、複製して増殖することは無く、減少する一方である。

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

AAV-mVChR1は宿主のAAV2に存在しないmVChR1遺伝子を含むことから、mVChR1遺伝子DNAの一部を定量的PCR (qPCR) で増幅、定量する方法でAAV-mVChR1を検出する(別紙5)。このときに用いるPCR反応では血液200 μ L、尿1.5 mL及び涙液10 μ Lを用いて、いずれも50 コピーのAAV-mVChR1遺伝子DNAがあれば検出することができる。同遺伝子配列が検体から検出された場合は、当該検体を培養細胞に感染させ、定量的RT-PCRにて細胞内のAAV-mVChR1に由来するmRNAを定量することで感染性を有するAAV-mVChR1の存在の有無を確認する(別紙4)。このときに用いるRT-PCR反応では血漿及び尿では20 μ L中に 1.5×10^4 virus genomes (vg)、涙液では10 μ L中に 7.5×10^4 vgのAAV-mVChR1があれば感染性の有無を評価することができる。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

本遺伝子組換え生物等と宿主であるAAV2の間には以下の相違点がある。

(1) *rep*遺伝子、*cap*遺伝子の有無による相違について

本遺伝子組換え生物等はAAV2のウイルス粒子を構成するために必要な遺伝子を有しないため、ヘルパーウイルス存在下でもウイルス粒子を複製しない。ヘルパーウイルスと共感染した細胞やヘルパーウイルス由来の増殖に必要な遺伝子を持続的に発現している細胞（例えば██████細胞）において、*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子が供給されなければ本遺伝子組換え生物の複製は起こらない。

(2) 挿入遺伝子について

本遺伝子組換え生物等はmVChR1発現カセットを有する。mVChR1遺伝子の上流に配置されたCAGプロモーターは哺乳類細胞で遺伝子発現することが期待される。また、下流に配置されたWPREにより、転写産物のポリアダニル化の増強等による導入遺伝子の発現の向上が期待される。

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

原液の保管

(1) 本遺伝子組換え生物等を含む原液（以下単に「原液」という。）は、遺伝子組換え生物等である旨を表示した容器の中でバイアルに密封された状態で、治療施設内の適切に管理された冷凍庫に保管される。

希釈液の調製

(2) 原液は、希釈が必要な場合、融解後、治療施設内の他の区域と明確に区別された作業室で、希釈用溶液により希釈され、希釈された液（以下単に「希釈液」という。）は密封した状態で保存される。

運搬

(3) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内の運搬は、密封した状態で行う。

患者への投与

- (4) 患者への投与は、他の区域と明確に区別された治療室で行う。
- (5) 希釈液又は原液は、患者の硝子体内に直接注入される。

投与後の患者からの排出等の管理

- (6) 被験眼からのウイルス漏出を防止するため、ガーゼ及び眼帯による被覆が行われる。ガーゼ及び眼帯による被覆は、注入部位からの本遺伝子組換え生物等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継続する。
- (7) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。必要に応じて、患者の排出物等から第三者への伝播を防止するための適切な指導を行う。
- (8) 本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者がその他外部医療施設で治療を受ける際は、その他外部医療施設に第一種使用等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た患者に適切な指導を行う。

検体の取扱い

- (9) 治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）で、患者から採取した検体は、施設等の規定に従って取り扱う。検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合には、検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (10) 施設等から検査機関への検体の運搬は、本遺伝子組換え生物等が拡散しない構造の容器に入れて行う。

感染性廃棄物等の処理

- (11) 希釈に用いた容器及び器具並びに投与に用いた注射器等及び患者体液の付着した器材等は、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）に基づいて施設等及び検査機関で定められている医療廃棄物の管理に関する規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って廃棄される。ただし、再利用するものにあつては、不活化処理を行う。
- (12) 原液及び未使用の本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物は、不活化処理を行った上で医療廃棄物管理規程に従って廃棄される。
- (13) 患者由来の検体の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って廃棄される。

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、患者の血液中、尿中及び涙液中を対象にmVChR1遺伝子DNAの一部をPCRで増幅、定量する方法でAAV-mVChR1を検出する。同遺伝子配列が検体から検出された場合は、当該検体を培養細胞に感染させ、定量的RT-PCRにて細胞内のAAV-mVChR1に由来するmRNAを定量することで感染性を有するAAV-mVChR1の存在の有無を確認する（別紙4）。

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

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
ラット網膜色素変性症モデルに対して、AAV2-mVChR1-Venus（Venus:蛍光タグ蛋白）の硝子体内注入（ $1-10 \times 10^{12}$ virions/mL）を行った非臨床試験では、投与後10か月時点での網膜病理および血液生化学的検査において異常所見は認められなかった。また、AAV2-mVChR1-Venus由来のmRNA発現は網膜のみで検出され、全身各組織では検出されなかった（文献9、10）。
また、AAV-mVChR1について、感染細胞での薬理活性評価、ラット網膜色素変性症モデル評価、ラット及びサルでの毒性評価、及び生体内分布評価等を実施しており、それぞれの試験結果については別紙4及び5に記載した。

文献9：Tomita H, et al. (2014) Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified Volvox channelrhodopsin-1. *Mol Ther* 22:1434-40

文献10：Sugano E, et al. (2016) Local and systemic responses following intravitreal injection of AAV2-encoded modified Volvox channelrhodopsin-1 in a genetically blind rat model. *Gene Ther* 23:158-66

6 国外における使用等により得られた情報
国内外において、これまでにAAV-mVChR1の使用実績はない。
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った。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11)

2009年より、中国で実施された臨床試験において9例の患者にrAAV2-ND4が硝子体内投与された。この結果、投与前、1、3、6か月後のすべての時点で、血中のAAV protein濃度に有意な変化は見られなかった。投与量は 5.0×10^9 vg が3例、 1.0×10^{10} vg が6例であった。(文献12)

また、米国において、mVChR1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(文献13、14)、現在のところ有害性の報告はない。

文献 11 : Heier JS, et al.(2017) Intravitreal injection of AAV2-sFLT01 in patients with advanced neovascular age-related macular degeneration: a phase 1, open-label trial Lancet. 2017 May 17 pii: S0140-6736(17)30979-0

文献 12 : Wan X, et al.(2016) Efficacy and Safety of rAAV2-ND4 Treatment for Leber's Hereditary Optic Neuropathy. Sci Rep. 2016 Feb 19;6:21587.

文献 13 : Retrosense Therapeutics,
<http://www.businesswire.com/news/home/20160810005731/en>

文献 14 : NCT02556736, RST-001 Phase I/II Trial for Advanced Retinitis Pigmentosa
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02556736?term=02556736&rank=1>

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

AAV-mVChR1の感染宿主は野生型AAV2と同一と考えられ、微生物に感染するとの報告はない。また、競合及び有害物質の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。従って、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かぎり、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植物等の特定

AAV-mVChR1の感染宿主は野生型AAV2と同一と考えられるので、自然界で感染する対象は哺乳動物である。

(2) 影響の具体的内容の評価

野生型AAV2と同様に、AAV-mVChR1感染もしくは*rep/cap*領域を目的遺伝子で置換したAAV感染による病原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限り、AAV-mVChR1及びAAV-mVChR1由来rc-AAVの環境中への拡散は極めて微量である。また、AAV-mVChR1自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはない。AAV-mVChR1由来のrc-AAV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

以上より、病原性について、当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

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

AAV-mVChR1の感染宿主は野生型AAV2と同一と考えられるので、自然界で感染する対象は哺乳動物である。

(2) 影響の具体的内容の評価

AAV-mVChR1が感染した細胞内でmVChR1タンパク質が発現するが、分泌されることはない。異種動物においてアレルゲンとなる可能性を除いては、mVChR1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限り、AAV-mVChR1は投与を受けた患者の体内に限定的に留まるのみであり、AAV-mVChR1の環境中への拡散は極めて微量であるため、第三者及び他の動植物が影響を受けることはない。また、AAV-mVChR1自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはない。また、AAV-mVChR1由来のrc-AAV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

以上より、有害物質の産生性について、当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

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

AAV-mVChR1の感染宿主は野生型AAV2と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒト以外には、カニクイザル、アカゲザル、イヌ、ラット、マウスなどの哺乳動物である。

(2) 影響の具体的内容の評価

AAV-mVChR1は、感染動物のゲノムに組み込まれ得る確率は極めて低い。また、遺伝子組み換えAAVの供与核酸が他の動物にさらに水平伝達されるとの報告はない。

(3) 影響の生じやすさの評価

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限り、AAV-mVChR1の環境中への拡散は極めて微量である。また、AAV-mVChR1自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはない。また、AAV-mVChR1由来のrc-AAV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かぎり、環境中で増殖することはない。従って、仮に微量なAAV-mVChR1が環境中に拡散しても、やがて消滅すると考えられる。

(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かぎり、生物多様性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

なし。

V 総合的評価

AAV-mVChR1 の感染宿主は野生型 AAV2 と同一と考えられ、自然界で感染する対象は哺乳動物であり、他の微生物を減少させるおそれはない。AAV-mVChR1 では、野生型 AAV2 の *rep/cap* 領域が有害性の低い mVChR1 発現カセットに置換されており、ヘルパーウイルスに加えて、野生型 AAV が同時に共感染しない限り、増殖することはなく、病原性はもとより増殖性も著しく減退している。また野生型 AAV と共感染した感染細胞内で組換えが起こることにより、新たな rc-AAV が生じても、供与核酸がさらに水平伝達される可能性は極めて低い。