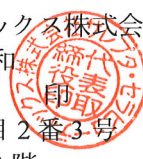


様式第 1（第 7 条関係）

第一種使用規程承認申請書		令和元年 11 月 25 日
厚生労働大臣 加藤 勝信 殿 環境大臣 小泉 進次郎 殿	氏名 サレプタ・セラピューティックス株式会社 代表取締役社長 中村 良和 申請者 住所 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 丸の内二重橋ビルディング 3 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	rep 及び cap 遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス 8 型 rh74 株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、ヒトマイクロジストロフィン遺伝子（hMicro-Dys）を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（rAAVrh74.MHCK7.Micro-Dys）	
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の保管は、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行う。 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、容器に密封された状態で保管する。 運搬 (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。 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、患者の末梢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	

	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) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、尿、糞便、唾液等に対し、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。 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。 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及び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。
--	--

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

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、パルボウイルス科デペンドウイルス属に分類される (文献 1、2)。AAV は、宿主細胞で複製するためにヘルパーウイルス (通常はアデノウイルスで、場合によってはヘルペスウイルス) を必要とする。当初アデノウイルス調製時の混入粒子として発見された AAV は、様々な指向性を有する多数の血清型が同定された。しかし、全ての血清型でゲノムの大きさや構成といった特性は共通している。AAV は、約 4.8 キロベース (kb) の単鎖 DNA ゲノムを保護するタンパク質の殻で囲まれている。

複数ある血清型のうち、AAV2 が最も研究されている。AAV 2 型は、そのゲノム配列も含め、最初に同定及び解析された AAV 血清型の 1 つである。生物学的特徴に関する早期の研究から、これまでに作製された大部分の組換え rAAV は、AAV 2 型 ITR を用いて遺伝子治療に利用されている (文献 3、4)。

本遺伝子組換え生物等は、4 つの AAV 2 型 rep タンパク質及び 3 つの rh74 株由来キャプシドタンパク質をコードしているヘルパープラスミドから製造される。rh74 株は、霊長類のみでみられており、広範囲な組織に分布する。AAV 8 型と、アミノ酸が 93% 合致する。また、クレード E ウイルス rh10 に最も類似しており、99% のアミノ酸が同一である (別紙 1)。系統群は、VP1 キャプシドタンパク質配列解析により決定される。興味深いことに、AAV 8 型を含むクレードは、ヒト及び非ヒト霊長類で認められている (アカゲサル、ヒヒ、ブタオサルを含む) (文献 5)。

AAV は、抗原性の違いに基づき多くの血清型に分けられている (文献 1、5、6)。これらの血清型は、自然界に広く分布している。ヒトでは小児期に初感染が起こること、成人の約半数が中和抗体を有することが知られている (文献 1)。

AAVrh74 株は、アカゲサルから分離された。rh74 株は、他の AAV 型で行われた非臨床及び早期臨床試験と比較して、リスクを増加させずに骨格筋及び心筋における遺伝子導入が効率的に行われる。

親 rh74 ウイルスは非病原性であり、ヒトの病気の原因となったことはない。

文献 1 : Knipe D.M. and Howley P.M., Fields VIROLOGY, 6th edition, Vol 2, pp. 1768-1791 (2013).

文献 2 : Tijssen, P., Handbook of Parvoviruses, Volume I, pp. 11-30 (1990).

文献 3 : Naso M.F., *et al.*, Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. Bio-Drugs, 31 (4), 317-334 (2017).

文献 4 : Pillay S., *et al.*, An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature, 530 (7588), 108-112 (2016)

文献 5 : Gao, G., *et al.*, Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J. Virol., 78 (12), 6381-6388 (2004).

文献 6 : Mori. S., *et al.*, Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudo-typing characterization of capsid protein. Virology, 330 (2) 375-383 (2004).

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。）

いかなる血清型も生ワクチンに使用した報告はない。遺伝子組換え AAV は、遺伝子治療で汎用されている（Ⅲ章 6. 「国外における使用等により得られた情報」参照）。

3 生理学的及び生態学的特性

（1）基本的特性

AAV2 型ゲノムは、4.7 kb の一本鎖 DNA である。ゲノムは、2 つのオープンリーディングフレームを有し、145 ヌクレオチド（nts）の ITR に隣接している。ITR は複製開始点であり、次の二本鎖合成時のプライマーとなる。複製工程では、ITR 内に位置する結合要素（RBE）

（RBE 及び RBE' ）及び末端分離部位（TRS）が重要となる。AAV 複製における役割に加えて、ITR は AAV ゲノムのパッケージ、転写、部位特異的組込み等において必須となる（文献 7）。*rep* 遺伝子は、DNA 複製のために 4 つの Rep タンパク質（Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40）を産生する。*cap* 遺伝子は、キャプシド（構造タンパク質）形成のために、キャプシドタンパク質（VP1、VP2 及び VP3）を産生する。

rh74 の主な受容体は、宿主細胞への効率的な接着を担う、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）である。ヒト線維芽細胞増殖因子 1（FGFR1）及び肝細胞増殖因子受容体（c-MET）は、AAV2 共受容体と考えられると報告されている（別紙 1、文献 4）。

遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス 2 型の構成及び機能を含む基本的な特性につき、別紙 1 に示す。

（2）生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染するが、増殖にはアデノウイルス又はヘルペスウイルス等（いわゆる「ヘルパーウイルス」）の存在が必要である。AAV は増殖のためには生きている細胞が必要で、細胞外ではいかなる環境でも増殖できないが、ウイルス粒子自体は常温において安定である。

（3）捕食性又は寄生性

自然界では、ヒトやサルなどの哺乳動物に感染する。ヘルパーウイルスが共感染した場合は増殖するが、ヘルパーウイルスが存在しない場合はエピソームとして潜伏する。まれに第 19 番染色体に組み込まれることがある（文献 8）。

（4）繁殖又は増殖の様式

AAV は、呼吸器又は消化管を介して伝播する。AAV の感染経路は、ウイルスの細胞表面への付着及びプライマリーグリカン受容体との結合である。ヘルパーウイルス由来の E1a、E1b、E2A 及び E4orf6 タンパク質、並びに VA RNA 存在下において、*rep* 及び *cap* 遺伝子の転写産物が産生され、AAV ゲノムが複製され、AAV 粒子が構築される。

（5）病原性

AAV の感染は不顕性に終わると考えられており、これまで感染に伴ういかなる病原性も知

られていない。

（６）有害物質の産生性

AAV2 型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。）

AAV の不活化は、環境中への拡散を最小化するために重要な安全対策である。少なくとも 5 分間、0.25%過酢酸、ヨード又は 10%クロロックスブリーチといった、試験施設で一般的に用いられている複数の薬剤を使用して熱処理を行うことにより、AAV は不活化される（文献 9）。

高圧蒸気殺菌法による蒸気滅菌（121 °C、30 分間）、さらに乾燥サイクルを 30 分間行うことで、AAV は効率的に不活化される（文献 9）。

本遺伝子組換え生物等は淡水、水道水、下水、海水及びその他の物質（プラスチック、カニューレ、針など）といった細胞外の環境中では、1 箇月を超えて生存できない（文献 10）。

文献 7 : Daya S. and Berns K. I., Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors, Clin. Microbiol. Rev., 21 (4), 583-593 (2008).

文献 8 : Chen, C., *et al.*, Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. J. Virol., 79 (23), 14781-14792 (2005).

文献 9 : Howard D. B. and Harvey B. K., Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. Hum. Gene Ther. Methods, 28 (1), 39-48 (2017).

文献 10 : Tenenbaum L., *et al.*, Evaluation of Risks Related to the Use of Adeno-Associated Virus-Based Vectors. Curr. Gene Ther., 3 (6), 545-565 (2003).

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

供与核酸の構成は、[REDACTED] プロモーター／エンハンサー、[REDACTED] [REDACTED]、ヒトマイクロジストロフィン遺伝子（以下、*hMicro-Dys* 遺伝子）、ポリ A 付加シグナル配列である。プラスミドは、最適化された *hMicro-Dys* 遺伝子及びポリ A シグナルの人口配列を有するコドンと共に構築される。詳細は、別紙 2 及び別紙 3 に示す。

(2) 構成要素の機能

- [REDACTED] プロモーター/エンハンサーは、骨格筋及び心筋にて、選択的に *hMicro-Dys* を発現する。
- [REDACTED] [REDACTED] は、[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] を有する。
- *hMicro-Dys* 遺伝子は、機能的な *hMicro-Dys* タンパク質をコードする発現させる。ポリ A シグナルは、効率的な *hMicro-Dys* mRNA のポリアデニル化及び転写終結を行う。

供与核酸（*hMicro-Dys*）配列の相同検索では、がん遺伝子、有害物質又は毒素に関する肯定的な結果は得られなかった。相同検索の結果を、別紙 6 に示す。また、供与核酸が宿主細胞へ組み込まれても、新たなオープンリーディングフレームは発生しない。加えて、科学文献にてこれまでに同定されたがん遺伝子関連配列に基づいて、遺伝子が同定及びランク付けされる「OncoScore」（<http://www.galseq.com/oncoscore.html>）を用いて、バイオインフォマティクスマイニングを実施した。供与核酸（完全長ヒト DMD 遺伝子）は 4.25 とランク付けされ、がん遺伝子としては極めて低いリスクに分類される。

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

rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィンは、3 種類のプラスミドより作製される。

- (i) [REDACTED] プロモーターで転写調節される、*hMicro-Dys* 遺伝子を含む、AAV ベクタープラスミド [REDACTED]
- (ii) 複製、増殖及びキャプシドの形成に必要な、ウイルス固有のタンパク質 [REDACTED] 及び [REDACTED] 遺伝子をコードしている、AAV ヘルパープラスミド [REDACTED]
- (iii) [REDACTED] ([REDACTED], [REDACTED], [REDACTED])の一部を含有するヘルパープラスミド、

rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィンは、細胞に感染すると、主に核内の染色体外に存在する。組換えエピソームの DNA が、宿主のゲノムに組み込まれる頻度は極めて低い（文献 3）。

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の保管は、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行う。

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、容器に密封された状態で保管する。

運搬

- (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

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、患者の末梢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) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、尿、糞便、唾液等に対し、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。

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。

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及び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おいては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。

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

ウイルス排出試験は、まだ実施されていない。非臨床及び臨床試験におけるウイルス排出試験が2019年末までに開始予定である。

申請者は、遺伝子組換え生物の第一種使用開始後、以下の情報を確実に収集する。

- ウイルス排出試験では、唾液、尿、及び便（便スワブ）を、本遺伝子組換え生物投与開始後 Day 1、3、7、10、14、21、その後は2週に1回、1群あたり12例から採取する。これらの検体は、他の rAAV ベクターに関する公表論文のデータ、静脈内投与経路、そして患者の年齢を考慮して決定した。
- FDA（文献15）の規制ガイダンスに従い、検体は投与後、下記のタイミングで採取する。Day 1、3、7、10、14、21、その後は3回連続の一貫した成績が得られるまで、又は当該排出の分析方法の検出限界（LOD）以下となるまでは、2週に1回採取する。検体の選択、採取間隔に関する詳細は、別紙9を参照のこと。
- ウイルス排出の解析は、qPCR法を用いて行う。本試験方法は、臨床検体のウイルス排出解析前に、ICH規制に従った検出限界が含む全ての品質特性に対して最適化を行う。分析試験用の検体採取量は、通常の臨床診療手順に従い、医師が決定する。qPCR法は、生物検体分析用に、まだ最適化されていない。
- qPCR試験法は、検体の定量限界及び検出限界を含めて、ICHガイドライン（文献16）に従い、出荷試験用にバリデートされている。バリデーションの結果から、試験の性能及び一貫性を確認している。製品出荷試験用 qPCR法のバリデーションレポートを、別紙5に示す。
- 対象患者及び試験期間は、治験実施計画書に従うこととする。
- 生体内排出試験は、本遺伝子組換え生物では、まだ実施していない。ウイルス排出及び製法変更間で毒性データのブリッジングを明らかにするため、GLP試験を実施する。予定し

ている試験の概要を、別紙 4 に示す。

- qPCR 法はバリデートされており、生物分析検体でも測定可能であることを確認中である。製品出荷において、バリデートされた qPCR 法の LOD は、500 コピー/μL と設定されている。生体内分布及び排出試験の生物学的分析法を最適化するため、同じ試験方法のパラメータで LOD 50 コピー/μL を起点として使用する。

rcAAV アッセイは、*cap* 遺伝子をターゲットとした qPCR を使用する。複製可能な粒子を形成するには、*rep* 及び *cap* の両遺伝子は、同じ粒子にパッケージされる必要がある。したがって、複製可能な AAV が存在する場合、どちらの遺伝子も増幅され、検出可能となる。*rep* 及び *cap* 遺伝子のいずれかが検出された場合、rcAAV が存在することを意味する。*rep* 又は *cap* のいずれも検出されない場合、rcAAV は存在しないという裏付けになる。以上より、*cap* 遺伝子をターゲットとするアッセイの結果が陰性の場合には rcAAV が存在しないことが確定し、*rep* 遺伝子の試験を実施しても重複する結果になる。

文献 15 : Guidance for Industry: Design and Analysis of Shedding Studies for Virus or Bacteria-Based Gene Therapy and Oncolytic Products. FDA. Aug 2015

文献 16 : Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH. Nov 2005

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 実験室等での使用等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

遺伝子治療製品治験薬の非臨床安全性は、生体内分布試験により特徴付けられた。本遺伝子組換え生物を雄 *mdx* マウスへ投与した後、化学及び血液学に関連する変化、ベクターに関連する死亡や臨床症状は、観察されていない。hMicro-Dys タンパク質の発現は、遺伝子投与後 Week 12 の時点で、骨格筋、心筋及び横隔膜組織にて、顕著に認められた（別紙 4 中の図 5）。非臨床排出試験は、まだ実施されていない。

- 臨床試験及び非臨床試験で使用する製品は、同一の工程で製造される。本遺伝子組換え生物の生体内分布は、複数の組織で検討されている。当該データは、別紙 4 に示す。生殖器組織における生体内分布は、検討していない。対象集団（4～7 歳の男児）は、性的に活発ではないと考える。

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の臨床試験は、現在 [REDACTED] 試験及び [REDACTED] 試験の 2 試験が進行中である。安全性データの要約を、以下に示す。筋細胞中のタンパク質の発現及び局在を評価する筋生検を除き、これらの試験では分布及び排泄データは収集していない。

試験は、単施設、36 箇月間の非盲検試験で、DMD 患者を対象に本遺伝子組換え生物（ $2 \times 10^{14} \text{vg/kg}$ ）の安全性と概念実証（POC）を検討する。4 例の患者が投与を受け、全例が本遺伝子組換え生物を投与されている。症例の追加登録は行っていない。

本試験は、本遺伝子組換え生物が静脈内投与により、骨格筋の形質転換を安全に引き起こし、機能的な hMicroDys を効率的に発現させるどうか、並びに運動機能アウトカムの検討及びクレアチンキナーゼ (CK) の経時的変化の検討を行うよう設計されている。

本試験の主要アウトカムは、安全性である。20 年 月 日時点で、本試験で重篤な有害事象の報告はなく、最も頻度の高い有害事象は嘔吐であった。

主な副次的アウトカムは、ウエスタンブロット法により測定されるベースライン/投与前と Day 90 で比較する、hMicroDys の骨格筋での発現及び免疫組織染色による発現した hMicroDys の局在性である。

主な機能性アウトカムには、NSAA 並びに Day 30、60、90、180 及び Month 9、12、18、24、30、36 に行う時間機能性評価が含まれる。

試験は、本遺伝子組換え生物（ 2×10^{14} vg/kg）を用いた単施設、無作為化（1:1）、二重盲検、プラセボ対照、48 週間試験で、24 例の DMD 患者に対する、全身性の臨床試験である。20 年 月 日時点で、 例が本試験で投与を受けた（本遺伝子組換え生物又はプラセボに 1:1 で無作為化）。本試験の登録は継続中で、盲検は維持されている。

臨床開発の包括的な情報は、別紙 7 に示す。

現在市場に出ている AAV ベースの承認済み製品は、欧州医薬品庁（EMA）により認可された alipogene tiparvovec（Glybera®）と、voretigene neparvovec-RPE65（Luxturna®）の 2 種類（遺伝性網膜症に対する AAV2 局所眼内注射）がある。AAV 導入は、安全かつ効果的であることが証明されている。その他多くのプログラムが、先端的な第 III 相試験をはじめとする各開発段階にある。詳細は、別紙 8 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

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は野生型 AAV と同じであると考えられ、ヒト細胞を含む広範囲の動物種の細胞に感染するが、微生物には感染せず、影響を受ける可能性のある微生物は特定されていない。

(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

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、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

本遺伝子組換え生物等の感染宿主域は野生型 AAV と同等で、ほ乳動物が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

Micro-Dys タンパク質を発現することにより、本遺伝子組換え生物等が病原性を獲得することはない。さらに、本遺伝子組換え生物等における、病原性や重篤な副作用が報告された例はない。

霊長類宿主から分離されたアデノ随伴ウイルス（例：rh74）は、動物及び植物種で既知の病原性はない。

親 rh74 ウイルスは非病原性で、ヒトの病気との関連性は示されていない。同様に、遺伝子組換えウイルスベクター（本遺伝子組換え生物）にも、病原性はない。

本遺伝子組換え生物等が感染した動物で、一過性に rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィン遺伝子が発現する可能性はある。動物体内の生理学的範囲の限界内で生産される少量のジ

ストロフィン、何らかの副作用をもたらさない。本遺伝子組換え生物等に由来する rcAAV は、野生型又は本遺伝子組換え生物等と同様に病原性をもたないと考えられている。AAV に由来する遺伝子組換えウイルスは 1999 年以後、米国で使用されているが（文献 3、17）、環境への悪影響に関する報告はない。また、これまで当該ウイルスを投与されたヒトにおいて当該ウイルスに由来する重篤な副作用は報告されていない。

（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 rcAAV 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は、ヘルパーウイルス無しでは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

病原性について、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、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

文献 17 : Kay, M. A., *et al.*, Evidence for gene transfer and expression of factor IX in Haemophilia B patients treated with an AAV vector. Nat. Genet., 24 (3), 257-261 (2000).

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の感染宿主域は野生型 AAV と同等で、ほ乳動物が影響を受ける可能性がある。

（２）影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等の生産により、感染細胞内で hMicro-Dys タンパク質が新たに産生されるが、hMicro-Dys タンパク質の過剰生産による有害性は知られていない。他に新たな有害物質が産生されることはない。

（３）影響の生じやすさの評価

第一種使用規程に基づいて使用する限り、影響を生じることはない。また、臨床試験等で有害性は示されていない。

（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限

り、有害物質の産生性に基づいて、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

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の感染宿主域は野生型 AAV と同等で、ほ乳動物が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

患者に投与された本遺伝子組換え生物等は、野生型 AAV 及びヘルパーウイルスとの 3 種のウイルスが同一の細胞に感染した場合（三重感染）に限り、水平感染が発生する可能性がある。また、rcAAV が発生した場合は、ヘルパーウイルスと共感染すると水平感染が発生する可能性がある。野生型 AAV ゲノムは、低い確率で感染細胞ゲノムに挿入されることが知られている。

(3) 影響の生じやすさの評価

患者に投与された本遺伝子組換え生物等が水平感染を生ずるためには、三重感染が必要であり、その可能性は極めて低い。また、rcAAV が発生した場合であっても、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、rcAAV の発生率も考慮すると、その可能性は極めて低い。野生型 AAV は低い確率で感染細胞ゲノムに挿入されることが知られているが、本遺伝子組換え生物等は *rep/cap* 遺伝子を失っているために増殖能力がなく、水平感染が発生したとしても、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。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

拡散を水平伝達する性質について、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限り、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

mdx マウスにおける本遺伝子組換え生物等の非臨床試験において、男性生殖器官（精巣）でベクター DNA が検出された。また、AAV の生殖細胞への組込みに関する公表文献（文献 18、19、20、21）及び AAV の臨床試験に関する公表文献（文献 22）に基づき、本遺伝子組換え生物等が生殖細胞に組込まれる可能性及び垂直感染する可能性は極めて低いと判断される。

文献 18 : Favaro, P., *et. al.*, Host and Vector-Dependent Effects on the Risk of Germline Transmission of AAV Vectors.

Mol. Ther, 17(6), 1022-1030 (2009).

文献 19 : Ferla, R., *et. al.*, Non-clinical Safety and Efficacy of AAV2/8 Vector Administered Intravenously for Treatment of Mucopolysaccharidosis Type VI, Mol. Ther. Methods Clin Dev, 24(6):143-158. (2017).

文献 20 : Spronck, L., *et. al.*, No evidence of germline transmission of vector DNA following intravenous administration of AAV5-hFIX to male mice. Poster presentation at the National Hemophilia Foundation's "71st Bleeding Disorders Conference", October 3 - October 5, 2019, Anaheim, California. (2019).

文献 21 : Rajasekaran, S., *et. al.*, Infectivity of adeno-associated virus serotypes in mouse testis. BMC Biotechnology, 18(70), (2018).

文献 22 : Arruda, V., *et. al.*, Lack of Germline Transmission of Vector Sequences Following Systemic Administration of Recombinant AAV-2 Vector in Males. Mol Ther.; 4(6): 586-92, (2001).

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 AAV と同等で、ほ乳動物に感染する可能性がある。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限り、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、本遺伝子組換え生物等の量は極めて少ないと考えられる。

AAV の病原性に関する文献はないことから、ヒトに対する影響はないと考えられる。さらに、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 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等との三重感染がない限り、環境中で増殖することはない。したがって、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。

極めて微量の本遺伝子組換え生物等由来の rcAAV の環境中への放出も完全には否定できないが、AAV 粒子へパッケージングできる DNA のサイズに上限があるため、rcAAV は野生型 AAV と同じになるか、あるいは短い外来遺伝子を含んでいても野生型 AAV2 に極めて近い構造になると考えられる。rcAAV の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は野生型 AAV と同等であり、ヒト及び他のほ乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

従って、上述した包括的な評価より、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限り、日本において、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。