

第一種使用規程承認申請書

令和3年8月27日

厚生労働大臣 殿

環境大臣 殿

申請者 住所 東京都中央区日本橋1-4-1
氏名 バイオジェン・ジャパン株式会社
代表取締役社長 ニコラス・リース・ジョーンズ

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 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、ヒト網膜色素変性症 GTPase 調節因子 (RPGR ^{ORF15} タンパク質) を発現する非増殖性遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (cotoretigene toliparvovec)
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。 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、

	<p>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) 希积液は、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、患者の網膜下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。</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拡散を最小限に留めるために、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。</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</p>
--	--

	<p>に従って取り扱う。</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、検体の検査を外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託する場合は、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>(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。</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って行う。</p> <p>(13) 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つては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。</p> <p>(14) 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>(15) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び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厳重な密閉を行った上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>(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。</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

アデノ随伴ウイルス（以下、AAV）は、パルボウイルス科ディペンドウイルス属に分類される小型のウイルスである。自然界において AAV は、ヒトその他の霊長類、ウマ、トリ、ウシ、ヒツジ等の脊椎動物に感染すると考えられており、現在までにヒトその他の霊長類から 100 種類以上の血清型の AAV が分離されている。AAV の系統や血清型により感染する動物種や組織・細胞指向性が互いに異なるものの、いずれもヒトに対する病原性は知られていない（文献 1）。このうち、サルから分離された AAV8 型（以下、AAV8）は、自然界ではヒト及び複数の哺乳動物に感染しうることが知られており（文献 2）、それ以外の植物及び微生物に感染するとの報告はない。AAV8 に対する中和抗体を保持している人の割合は凡そ 40%程度と報告されている（文献 3）。

文献 1： 村松 慎一. 筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療. 神経治療学. 2017;34:262-5.

文献 2： Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol. 2016;21:75-80.

文献 3： Kruzik A, Fetahagic D, Hartlieb B, *et al.* Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Immune Responses in International Cohorts of Healthy Donors. Mol Ther Methods Clin Dev. 2019;14:126-133.

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）

遺伝子組換え AAV は、治療用供与遺伝子を細胞内で発現させるための遺伝子治療用ベクターとして世界的に汎用されており、ClinicalTrials.gov のデータベースには、2018 年 11 月 13 日時点で種々の疾患を対象とした遺伝子組換え AAV の臨床試験が 145 件登録されていた（文献 4）。2020 年 11 月時点で、遺伝子組換え AAV8 の臨床試験に限っても 24 件実施されている（別紙 1 参照）。ヒト用又は動物用の医薬品又は再生医療等製品として、

米国で 2019 年 5 月 24 日に脊髄性筋萎縮症 (SMA) のヒト遺伝子治療用医薬品として承認された遺伝子組換え AAV9 の Zolgensma (ノバルティスファーマ株式会社) が、国内でも令和 2 年 3 月 19 日に販売名「ゾルゲンスマ点滴静注」(一般的名称: オナセムノゲンアベパルボベク、製造販売承認番号: 30200FZX00001000) として製造販売承認を取得した(文献 5)。国内では、ゾルゲンスマ点滴静注が唯一の遺伝子組換え AAV 承認品目であるが、欧米では遺伝子組換え AAV2 (voretigene neparvovec ; 網膜下投与) が両アレル性 RPE65 変異を伴う網膜ジストロフィー (レーバー先天性黒内障) を対象としたヒト遺伝子治療用医薬品として 2017 年に米国で、2018 年には欧州で、それぞれ承認されている(文献 6)。また、欧州では遺伝子組換え AAV1 (alipogene tiparvovec ; 筋肉内投与) が家族性リポタンパク質リパーゼ欠損症を対象としたヒト遺伝子治療用医薬品として 2012 年に承認されている(2017 年に販売終了 ; 文献 7)。

AAV ベクターを用いた治療に伴う有害事象の発現頻度及び重症度は、その投与方法に大きく依存する。毒性は用量依存的である可能性があり、ベクター及び/又は導入遺伝子に対する免疫応答、オフターゲット組織への曝露、又は理論的には宿主細胞への組込みに関連する。眼への投与経路(硝子体内、網膜下)は主に局所炎症を伴うが、抗炎症療法により消失し、場合によっては視力障害に至ることがある(文献 6、8~15)。AAV の遺伝子治療における他の投与経路である全身、実質内又は髄腔内は、より急性の重篤な有害事象と関連している。これまでに報告された最も重要な全身の安全性所見は、AAV の静脈内投与による遺伝子治療に伴う肝毒性である(例:ゾルゲンスマ「文献 16」及び MTM1 遺伝子を発現する AAV 8 ベクター「文献 17~19」)。その他に発現頻度の低い毒性として、静脈内投与による遺伝子治療で血栓性微小血管症(文献 20、12)、実質内及び髄腔内投与による遺伝子治療で神経炎症(文献 17、21~22)が認められた。AAV ベクターの組込みは非常に非効率であるため、これまでのところ、ヒト又は非げっ歯類で腫瘍を引き起こすことは示されておらず、非肝組織における AAV 組込みに関連した発癌の報告もない。要約すると、全身送達と高用量の併用は、神経炎症、肝毒性及び血栓性微小血管症をもたらす抗 AAV 及び抗導入遺伝子免疫応答を誘発するリスクを増加させる可能性がある。眼内投与で認められた毒性は、主に全身反応を伴わない眼局所炎症反応によるものであった。

- 文献 4 : Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18:358-378.
- 文献 5 : 令和元年度承認品目一覧（再生医療等製品）
<https://www.pmda.go.jp/files/000235215.pdf>
- 文献 6 : Spark Therapeutics. “Luxturna” Prescribing Information. 2017.
- 文献 7 : a) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA). “Glybera” assessment report. 2012. b) CHMP, EMA. “Glybera” product information. 2017.
- 文献 8 : <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/07/22/2267699/32452/en/Adverum-Provides-Update-on-ADVM-022-and-the-INFINITY-Trial-in-Patients-with-Diabetic-Macular-Edema.html>
- 文献 9 : Heier JS, Kherani S, Desai S, et al. Intravitreal injection of AAV2-sFLT01 in patients with advanced neovascular age-related macular degeneration: a phase 1, open-label trial. *Lancet*. 2017;390:50–61
- 文献 10 : Khanani AM, Kiss S, Turpcu A, et al. Phase 1 study of intravitreal gene therapy ADVM022 for neovascular AMD (OPTIC Trial). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61:1154.
- 文献 11 : Ronzitti G, Gross DA, Mingozzi F. 2020. Human immune responses to adeno-associated virus (AAV) vectors. *Front Immunol* 11:670.
- 文献 12 : Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, et al. 2021. Current clinical applications of in vivo gene therapy with AAVs. *Mol Ther* 29:464-488.
- 文献 13 : Mehta N, Robbins DA, Yiu G. 2021. Ocular inflammation and treatment emergent adverse events in retinal gene therapy. *Int Ophthalmol Clinics* 61:3. 151-177.
- 文献 14 : Cukras C, Wiley HE, Jeffrey BG, et al. Retinal AAV8-RS1 gene therapy for X-linked retinoschisis: initial findings from a phase I/IIa trial by intravitreal delivery. *Mol Ther*. 2018;26:2282–2294.
- 文献 15 : Bouquet C, Vignal Clermont C, Galy A, et al. Immune response and intraocular inflammation in patients with Leber hereditary optic neuropathy treated with intravitreal

injection of recombinant adeno-associated virus 2 carrying the ND4 gene: a Secondary analysis of a phase 1/2 clinical trial. JAMA Ophthalmol. 2019;137:399–406.

文献 16 : Feldman AG, Parsons JA, Dutmer CM, et al. 2020. Subacute liver failure following gene replacement therapy for spinal muscular atrophy type 1. J Pediatr 225:252-258 e1.

文献 17 : Bonnemann CG. 2020. AAV related immunological safety and toxicity: Preliminary clinical observations in the GAN and MTM1 Trials. Virtual workshop on systemic immunogenicity considerations of AAV-mediated gene therapy, NIH, NCATS. <https://videocast.nih.gov/watch=38547>.

文献 18 : Shieh PB, Bonneman CG, Muller-Felber W, et al. 2020. Letter to the editor Re: “Moving forward after two deaths in a gene therapy trial of myotubular myopathy” by Wilson and Flotte. Hum Gene Ther 31: 787

文献 19 : Wilson JM, Flotte TR. 2020. Moving forward after two deaths in a gene therapy trial of myotubular myopathy. Hum Gene Ther 31:695-696.

文献 20 : Chand D, Zaidman C, Arya K, et al. 2021. Thrombotic microangiopathy following onasemnogene abeparvovec for spinal muscular atrophy: a case series. J Pediatrics: 231:265-8.

文献 21 : Sondhi D, Kaminsky SM, Hackett NR, et al. 2020. Slowing late infantile Batten disease by direct brain parenchymal administration of a rh.10 adeno-associated virus expressing CLN2. Sci Transl Med 12.

文献 22 : Mueller C, Berry JD, McKenna-Yasek DM, et al. 2020. SOD1 Suppression with adeno-associated virus and microRNA in familial ALS. N Engl J Med 383:151-158.

3. 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

AAV は、エンベロープを有さず、キャプシドタンパク質から構成される正 20 面体構造のキャプシド (外殻) の中に約 4.7 kb の線状 1 本鎖 DNA をゲノムとして含む直径 20-26 nm のウイルスである (文献 1、文献 2、文献 23)。AAV のキャプシドは物理的／化学的に比較的堅牢であり、温度や pH による影響を受けにくい (文献 23、文献 24)。AAV のゲ

ノムはプラス鎖とマイナス鎖が混在しており、両端の末端逆行反復配列（以下、ITR）の間に、①ウイルス遺伝子の複製・転写にかかわる4種のRepタンパク質（Rep78、Rep68、Rep52及びRep40）をコードする*rep*遺伝子、②3種のキャプシドタンパク質（VP1、VP2及びVP3）をコードする*cap*遺伝子が存在する（文献1、文献23）。

AAVのゲノム構造を別紙2に示す（文献23）。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

AAVは、自然界において、その系統や血清型に応じた特定の動物種への選択性が知られており、AAV8についても、ヒト、マウス、イヌ、サル等の哺乳動物に感染しうることが知られている（文献2）。

自然界でのAAVの安定性に関して、細胞の染色体に潜伏感染しているAAVゲノムは、細胞が生存しているかぎり安定に存在する（ただし、核内の染色体外にエピソームとして存在するAAVは、細胞分裂のたびに希釈される）。また、感染細胞から放出されるAAV粒子は、物理的／化学的に比較的堅牢なキャプシドで覆われていることから、自然界で安定に存在する（文献24）。

(3) 捕食性又は寄生性

（該当せず）

(4) 繁殖又は増殖の様式

AAVが細胞に感染する際には、細胞表面に存在する一次受容体（グリカン）、共受容体及び膜貫通型タンパク質KIAA0319Lに結合して細胞内に取り込まれることが示唆されている（文献2、文献25）。当該一次受容体及び共受容体は、AAVの血清型によって異なり、いくつかのAAV血清型に対する一次受容体として23の異なるグリカンが同定されているが、AAV8については明らかになっていない（文献2）。ラミニン受容体（LamR）がAAV8に対する共受容体であることが報告されているが（文献26）、AAV8が標的細胞に侵入する機構の詳細は明らかになっていない。

AAVは、DNA合成酵素や1本鎖DNA結合タンパク質等のウイルスが自律的に複製・増

殖するために必要なタンパク質をコードする遺伝子をもたないことから、細胞に単独感染しただけでは自律的に増殖できない（潜伏感染）（文献 23）。この状態では、AAV ゲノム DNA の多くは核内で染色体外環状 DNA 分子（エピソーム）として存在するが、稀に AAV 自身の Rep タンパク質の働きによってヒト第 19 番染色体 AAVS1 領域に組み込まれた状態で存在する（文献 23）。細胞の分裂・増殖時には細胞の染色体とともに AAV ゲノムも複製されるものの、AAV がウイルス粒子を構成することはない。なお、組換え AAV ベクターでは、*rep* 遺伝子を欠損させていることから、感染した細胞の第 19 番染色体 DNA の AAVS1 領域に組み込まれず、殆どが核内でエピソームとして存在する。一方、AAV がアデノウイルスやヘルペスウイルス等のいわゆる「ヘルパーウイルス」と共感染すると、ヘルパーウイルスの複製・増殖機能を同一細胞内で AAV が共用することによって AAV も自律的な複製・増殖が可能となり、結果として、細胞内で複製・増殖した大量の AAV 粒子が細胞破壊を引き起こし、AAV 粒子が放出され、隣接細胞への感染が継続する（溶解感染）（文献 23、文献 24）。

AAV の生活環及び遺伝子組換え AAV ベクターによる遺伝子導入経路を別紙 3 に示す（文献 23、文献 27）。

AAV の増殖様式を考慮すると、AAV はアデノウイルスやヘルペスウイルスと同時に細胞へ共感染する可能性が高いと考えられることから、AAV の感染経路として、経気道、経口及び経結膜、並びに糞便や性行為を介した経路が想定されている（文献 24）。ヘルパーウイルスと同時に感染した場合には、感染したヒト個体内で増幅し、ヘルパーウイルスとともに分泌物中に排出され、他のヒトに感染する（水平感染）と推定される。

In vitro の条件下では、非分裂細胞を含めた広範な細胞種に AAV を感染させることが可能である。さらに、AAV をヘルパーウイルスと共感染させると、本来感染しない異なる動物種に由来する培養細胞内でも複製が起こり得る。このことから、自然界においても、複数の異なる系統の AAV がヘルパーウイルスと共感染した場合には、AAV 間で相同組換えを起こす可能性を完全には否定できない。

(5) 病原性

AAV の感染はいずれも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

文献 29 : Rutgers Environmental Health and Safety, Rutgers, The State University of New Jersey University. Adeno-associated viral vectors: Standard operating procedures. 2013.

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

非増殖性の遺伝子組換え AAV である cotoretigene toliparvovec (以下「本遺伝子組換え生物等」という。)に含有される一本鎖 DNA は、以下①～⑤の配列を含む供与核酸及び [REDACTED] 塩基対の複数のリンカーにより構成されている (文献 30)。

① AAV2 由来 5'-ITR

② [REDACTED] プロモーター

③ [REDACTED] ヒト網膜色素変性症 GTP アーゼ制御因子 (RPGR) ^{ORF15} ([REDACTED] RPGR) コード領域

④ [REDACTED] ポリ A 付加シグナル

⑤ AAV2 由来 3'-ITR

各供与核酸の詳細を別紙 4 に示す。

なお、本遺伝子組換え生物等は、AAV の複製・転写に関わる *rep* 遺伝子を欠くことからヘルパーウイルス存在下においても増殖性を失っており、一方で、「2. ベクターに関する情報」の項で後述するプラスミド [REDACTED] 由来のウイルスキャプシド (AAV8 の VP1、VP2 及び VP3) に上記一本鎖 DNA がパッケージされて産生されることから、野生型 AAV8 と同様の標的細胞に感染し、感染した細胞内でヒト RPGR^{ORF15} が発現される。

(2) 構成要素の機能

上記①～⑤の供与核酸がもつ機能は、それぞれ以下のとおり。

① AAV2 由来 ITR : AAV2 のゲノム両末端に存在する [REDACTED] 構造。複製の開始点となり、プライマーの役割を担う (文献 23)。

② [REDACTED] プロモーター : [REDACTED] 下流に存在する遺伝子の転写を強力に促進する (文献 31)。

③ [REDACTED] RPGR コード領域 : [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]

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

(Ⅱ-1-(1) 項及び別紙 4 参照)

(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の製造には、以下の 3 種のプラスミドが使用される。

① [REDACTED] : 本遺伝子組換え生物等のゲノム塩基配列を含む。Ⅱ-1-(1) 項の供与核酸が挿入されている。

② [REDACTED] : [REDACTED] を搭載し、ヘルパーウイルスの代わりに用いられる。

③ [REDACTED] : AAV2 由来の Rep タンパク質群及び AAV8 由来のキャプシドタンパク質群をコードする。

パッケージング細胞としては、アデノウイルス 5 型 E1 領域を有するヒト胎児腎臓細胞 293 (ATCC CRL-1573 : 以下、HEK293 細胞) を用いる。

各プラスミドの構造及び全塩基配列を別紙 5 に、また、各プラスミドの構築方法を別紙 6 にそれぞれ示す。さらに、HEK293 細胞のセルバンクの構築方法及び品質管理試験の詳細を別紙 7 に示す。

(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、[REDACTED]) において、上記の 3 種のプラスミド [REDACTED] を、HEK293 細胞へ同時に導入することによって産生する。

本遺伝子組換え生物等の産生方法及び品質管理試験の詳細を別紙 8 に示す。

本遺伝子組換え生物等を HEK293 細胞内で産生する過程で、[REDACTED] 及び [REDACTED] が組換えを起こすことによって「本遺伝子組換え生物等に由来する、増殖能を獲得したウイルス」(replication-competent AAV ; 以下「rcAAV」という。)が生じる可能性が考えられる。しかし、そのような rcAAV は、AAV 粒子内にパッケージングできるゲノム長を踏まえると、ほぼすべての供与核酸を喪失していると考えられる。また、このような rcAAV も、野生型 AAV と同様、AAV のヘルパーウイルスとなるアデノウイ

ルスや単純ヘルペスウイルス等が同一細胞内に共存しないかぎり、増殖することは不可能である。

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

II-1-(1)に記載した供与核酸は本遺伝子組換え生物等の1本鎖DNAゲノムの一部としてAAV2 ITRに挟まれた領域に存在しており、本遺伝子組換え生物等の保管中には極めて安定であることから、感染する動植物等の種類、感染様式等が本遺伝子組換え生物等の保管中に変化することはない(文献32)。

また、本遺伝子組換え生物等が細胞に感染すると、そのゲノムが細胞の核内に移行して2本鎖DNAとなるが、本遺伝子組換え生物等がAAV rep 遺伝子をもたないことから、その多くが細胞の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、細胞の染色体への組込みは稀である(文献33、文献34、文献35)。この2本鎖環状DNA状態にあるエピソームから■RPGRが転写される。ヒトRPGR^{ORF15}の発現は、本遺伝子組換え生物等が感染した細胞のゲノム構造等に大きな変化が起こらないかぎり、又はエピソームの消失につながる細胞分裂が誘導されないかぎり継続すると考えられる。網膜細胞は一般的に非分裂細胞であることから、ヒトRPGR^{ORF15}の長期的な発現が期待される。

文献 32 : Xu R, Rahimi M, Ma H, *et al.* Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. *Med Sci Monit.* 2005;11:BR305-8.

文献 33 : 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;79:364-79.

文献 34 : Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, *et al.* Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol.* 2003;77:3495-504.

文献 35 : 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;80:426-39.

核内に留まり、稀にしか細胞の染色体 DNA に組み込まれない。遺伝子組換え AAV は、仮に、細胞の染色体 DNA に組み込まれる場合には、野生型 AAV と異なり組み込まれる位置がランダムであるという傾向があり、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 38）。

文献 38 : Nakai H, Wu X, Fuess S, *et al.* Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol.* 2005;79(6):3606-14.

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、患者の網膜下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、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、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。

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に、検体の検査を外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託する場合は、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、施設等及び検査機関の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、施設等及び検査機関の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) 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、漏出しない密封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。
- (15) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体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検体は漏出しない密封容器に入れ、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厳重な密閉を行った上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。
- (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、厳重に密閉した状態で保管し、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

現在、海外で実施中の臨床試験（第 I/II/III 相 XIRIUS 試験）における本遺伝子組換え生物等の投与量及び投与回数は、 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{11}$ vg/眼の片眼 1 回のみでの投与で、当該試験における本遺伝子組換え生物等の排出を検討した結果は別紙 11 のとおりである。

第 III 相試験のデザインはまだ確定していないが、無作為化盲検下での網膜下投与用量は、XXXXXXXXXX 予定である。第一種使用において計画している本遺伝子組換え生物等の投与量は、現在、海外で実施中の臨床試験における本遺伝子組換え生物等の投与量の範囲内であり、第一種使用における投与回数は、両眼への計 2 回の計画であるが、最初の片眼に投与した後、もう一方の片眼に投与するまでの間には、XXXX
XXXX の間隔を設けるので、第一種使用において片眼に投与を行った後の本遺伝子組換え生物等の排出は、海外で実施中の臨床試験における本遺伝子組換え生物等の排出と概ね相違ないと考えられる。したがって、第一種使用等開始後の情報収集は省略可能である。

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

野生型雄マウス（C57BL/6J）に本遺伝子組換え生物等を単回網膜下投与した非臨床試験（単回投与毒性試験）で毒性はみられなかった。また、野生型正常雄マウス（C57BL/6JWT）に本遺伝子組換え生物等（ 3.54×10^9 vg/眼；マウスとヒトの硝子体容積比換算 [ヒト約 4.4 ~ 4.8 mL（文献 39、文献 40） / マウス約 4.4 μ L（文献 41） = 約 1,000 倍] に基づき、この投与量をヒトに換算すると 3.54×10^{12} vp/眼に相当）を単回網膜下投与した非臨床試験

(生体内分布試験)において、投与後 1 週、4 週及び 26 週の血液、骨髄、ハーダー腺、涙腺、脳、眼、心臓、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、視神経、唾液、精巣、脾臓及び尿中の本遺伝子組換え生物等特異 DNA を定量 PCR (II-5 項参照) により計測したところ、大部分は投与眼に局所的に検出され、投与後 4 週目までに約 65%減少し、その後は試験期間終了の 26 週目まで大きな変化なく維持された。眼組織(視神経、視索、ハーダー腺)で、投与後 4 及び 26 週目に、非常に低値の本遺伝子組換え生物等特異 DNA が検出された。涙腺では、試験したすべての動物で投与 1 週目に非常に低値の本遺伝子組換え生物等特異 DNA が検出されたが、投与後 4 週目に有意に減少し、26 週目には検出不能又は定量下限(50 copies/5 µL)未満であった。血液では、2、8、15 日目及び 4 週目に本遺伝子組換え生物等が検出され、その後 13 及び 26 週目には検出されなかった。唾液では、2 日目のみ本遺伝子組換え生物等が検出された(LLOQ 未満)。いずれの時点においても、尿中にベクターは検出されなかった。精巣では、非常に低値の本遺伝子組換え生物等が 8 日目に全動物で検出され、4 週目には LLOQ 未満まで減少し、26 週目の時点では 6 匹中 2 匹のみで検出された(LLOQ 未満)。他のすべての組織において、検出された本遺伝子組換え生物等 DNA は非常に低値であり、試験期間を通して LLOQ 未満であった。(別紙 10)。

文献 39 : Girach A, Pakola S. Vitreomacular interface diseases: pathophysiology, diagnosis and future treatment options. *Expert Rev Ophthalmol.* 2012;7:311-23.

文献 40 : Azhdam AM, Goldberg RA, Ugradar S. In Vivo Measurement of the Human Vitreous Chamber Volume Using Computed Tomography Imaging of 100 Eyes. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9:2.

文献 41 : Kaplan HJ, Chiang CW, Chen J, et al. Vitreous Volume of the Mouse Measured by Quantitative High-Resolution MRI. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51: 4414.

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の国外臨床試験(XIRIUS 試験、進行中)において、本遺伝子組換え生物等(5 x 10⁹、1 x 10¹⁰、5 x 10¹⁰、1 x 10¹¹、2.5 x 10¹¹ 又は 5 x 10¹¹ vg)が網膜下投与さ

れた患者について本遺伝子組換え生物等の血液、涙液（投与眼及び非投与眼）、唾液、及び尿への排出が調べられている（継続中）。現在までに得られている臨床データでは、血液、尿、投与眼の涙液、非投与眼の涙液、及び唾液中に、それぞれ 31%、0%、33%、3%、及び 24%の被験者で本遺伝子組換え生物等が投与後 1 日目で検出された。血液中では投与後 7 日目にも 8%の被験者で本遺伝子組換え生物等が検出されたが、その後は定量下限未満又は陰性であった（別紙 11）。

当該試験において、2017 年 3 月 8 日から 2020 年 1 月 8 日時点（41 例）までに 286 件（眼に関連しないもの 61 件、眼に関連するもの 225 件）の治療下で発現した有害事象が報告されており、うち 234 件は軽度、40 件は中等度、11 件は重度であった。そのうち 219 件（眼に関連しないもの 19 件、眼に関連するもの 200 件）が本遺伝子組換え等生物又は治療の手技と妥当な関連性ありと判定された。本遺伝子組換え生物等と妥当な関連性ありとされた事象は、すべて眼に関連するものであり、25 件（投与眼 22 件、非投与眼 3 件）であった。166 件（眼に関連しないもの 12 件、眼に関連するもの 154 件）は治療の手技との関連あり、63 件（眼に関連しないもの 40 件、眼に関連するもの 23 件）は治療の手技又は本遺伝子組換え生物等との関連なし、6 件は治療の手技及び本遺伝子組換え生物等との妥当な関連性あり、22 件（眼に関連しないもの 7 件、眼に関連するもの 15 件）は、原因は不明ながら、治療の手技、本遺伝子組換え生物等、又はその両方に関連すると判定された。当該試験では、上記時点までに 10 件の重篤な有害事象が発現した。（別紙 12）。

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が感染する動植物等の種類は野生型 AAV8 と同等で、これらのウイルスが微生物に感染するとの報告はない。ヒト RPGR^{ORF15} を発現すること及び非増殖性であること以外は、その他の特性についても本遺伝子組換え生物等は野生型 AAV8 と同等と考えられ、本遺伝子組換え生物等が競合や有害物質の産生等で他の微生物を減少させる性質はないと考えられる。したがって、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、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する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が感染する動植物等の種類は、野生型 AAV8 と同様と考えられ、ヒトを含む哺乳類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

AAV8 に由来する非増殖性遺伝子組換えウイルスは国外で既にヒトに投与されており、当

該ウイルスによる病原性は確認されていない。本遺伝子組換え生物等により、感染細胞内でヒト内在性タンパク質であるヒト RPGR^{ORF15} が新たに産生されるが、その他に新たな有害物質が産生されることはない。ヒト RPGR^{ORF15} は、光受容体の結合繊毛におけるタンパク質輸送に関与するタンパク質であるが、その有害性は知られていない。また、ヒト RPGR^{ORF15} の過剰発現による有害性も認められていない（文献 30）。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程に従って使用する限り、本遺伝子組換え生物等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増殖能を失っていることから、環境中で増殖することはない、環境中に拡散しても、やがて消滅すると考えられる。したがって、本遺伝子組換え生物等が第三者及び野生動物に対して病原性を示す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

以上より、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、本遺伝子組換え生物等及び rcAAV は、野生型 AAV8 と同様に、ヒトを含む哺乳類に対して病原性を示さないと考えられ、病原性に起因する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

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 AAV8 と同様と考えられ、ヒトを含む哺乳類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により、感染細胞内でヒト内在性タンパク質であるヒト RPGR^{ORF15} が新たに産生されるが、その他に新たな有害物質が産生されることはない。ヒト RPGR^{ORF15} は、光受容体の結合繊毛におけるタンパク質輸送に関与するタンパク質であるが、その有害性は知られていない。また、ヒト RPGR^{ORF15} の過剰発現による有害性も認められていない（文献 30）。

XIRIUS 試験では、有害事象と新たに産生されたヒト RPGR^{ORF15} との関係を、投与後の RPGR^{ORF15} 特異的免疫反応の評価により検討した。パート I 及び II では、Month 12 まで被験者におけるキャプシド及び RPGR タンパク質に対する特異的な細胞性及び体液性免疫応答を評価した。次に、これらの反応の程度（enzyme-linked immune absorbent spot assay [ELISPOT] のみ）や、タイミング及び発生率（ELISPOT 及び RPGR 抗薬物抗体アッセイ [ADA]）と、眼の炎症及び視力低下の有害事象との関連を特徴づけた。

その結果、バリデートされた酵素免疫測定法（ELISA）で測定したタンパク質に対する ADA 反応（陽性/陰性）は非常に低いことが示された。この ADA 反応が、安全性又は有効性に悪影響を及ぼしたという徴候はない。

AAV8-RPGR キャプシド及び RPGR タンパク質の 3 つのプールに対する細胞性免疫は、これらの特異的刺激に応答するサイトカイン分泌細胞の量を測定する試験である ELISPOT によって評価した。結果は、主にスクリーニング時に非特異的 ELISPOT 刺激を示し、治療後の一貫した傾向はなかった。次に、眼の炎症事象の存在に対する ELISPOT 反応の関係を評価したところ、パート I 及びパート II のいずれの被験者にも傾向は認められなかった。

これらの結果から、AAV8-RPGR 被験者に認められた有害事象は、新たに産生された RPGR から生じる特異的な免疫応答によるものではないことが示された。

これらの臨床結果は、治療した網膜で de novo 合成される可能性がある RPGR^{ORF15} が細胞性又は体液性免疫に関連する有害事象と関連しないことを示している。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程に従って使用する限り、本遺伝子組換え生物等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増殖能を失っていることから、環境中で増殖することはない、環境中に拡散しても、やがて消滅すると考えられる。さらに、上記に示すとおり本遺伝子組換え生物等によりヒト RPGR^{ORF15} 以外に新たな物質が産生されることはない、ヒト RPGR^{ORF15} の有害性は知られていない。したがって、本遺伝子組換え生物等が第三者及び野生動物に対して有害物質の産生性に起因する影響を及ぼす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

以上より、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物

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

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 AAV8 と同様と考えられ、ヒトを含む哺乳類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ゲノム DNA が第三者や動物等のゲノムに組み込まれる可能性は完全には否定できないが、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共感染しない限りは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のゲノム DNA が第三者や野生動物に水平伝達される可能性は低い。

また、本遺伝子組換え生物等を製造する過程で、本遺伝子組換え生物等に由来する rcAAV が生じる可能性が考えられるが、過去の製造実績において rcAAV は検出されていないことから、本遺伝子組換え生物等の製造において rcAAV が生じる可能性は低い。したがって、本遺伝子組換え生物等の製造において生じた rcAAV が、第三者及び野生動物に対して核酸を水平伝達する可能性は極めて低いと考える。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程に従って使用する限り、本遺伝子組換え生物等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が複製されるのは、野生型 AAV 及びヘルパーウイルスが共感染した場合に限られることから、環境中で増殖することはない、環境中に拡散しても、やがて消滅すると考えられる。したがって、本遺伝子組換え生物等が第三者及び野生動物に対して核酸を水平伝達する可能性は極めて低い。

また、本遺伝子組換え生物等を製造する過程で、本遺伝子組換え生物等に由来する rcAAV が生じる可能性が考えられるが、rcAAV は、野生型 AAV と同様に AAV のヘルパーウイルスとなるアデノウイルスや単純ヘルペスウイルス等が同一細胞内に共存しないかぎり、増殖することは不可能である。さらに、本遺伝子組換え生物等の製造において rcAAV

が生じた場合でも、そのような rcAAV は、AAV 粒子内にパッケージングできるゲノム長を踏まえると、ほぼすべての供与核酸を喪失していると考えられる。したがって、本遺伝子組換え生物等の製造において生じた rcAAV が、第三者及び野生動物に対して核酸を水平伝達す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

以上より、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する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

本遺伝子組換え生物等が感染しうる動物はほ乳類動物であり、影響を受ける可能性のある植物及び他の微生物はない。また、本遺伝子組換え生物等は野生型 AAV と同様に病原性はない。第一種使用規程に従う限り、第三者が本遺伝子組換え生物等に曝露される可能性は低く、有害な影響が生ずる可能性も低いと考えられる。さらに、本遺伝子組換え生物等は複製能を欠失している。

本遺伝子組換え生物等を製造する過程で rcAAV が生じる可能性が考えられるが、過去の製造実績において rcAAV は検出されておらず、本遺伝子組換え生物等の製造において rcAAV が生じる可能性は低い。rcAAV は、野生型 AAV と同様に AAV のヘルパーウイルスとなるアデノウイルスや単純ヘルペスウイルス等が同一細胞内に共存しないかぎり、増殖することは不可能である。さらに、本遺伝子組換え生物等の製造において rcAAV が生じた場合でも、そのような rcAAV は、AAV 粒子内にパッケージングできるゲノム長を踏まえると、ほぼすべての供与核酸を喪失していると考えられる。

したがって、第一種使用規程承認申請書に記載された本遺伝子組換え生物等の第一種使用等を行う限り、本遺伝子組換え生物等による生物多様性影響が生じるおそれがないと判断される。