

第一種使用規程承認申請書

令和3年3月3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 代表取締役社長 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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p><i>rep</i> 及び <i>cap</i> 遺伝子領域を欠失し、ヒト芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素（hAADC）を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス 2 型（AAV-hAADC-2）</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>ヒトの治療を目的とした投与、保管、運搬、廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>製剤の保管及び運搬</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物等の製剤は、遺伝子組換え生物である旨を表示した容器に密封された状態で治療施設に運搬される。治療施設において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、適切に管理された冷凍庫で保管する。</p> <p>(2) 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。</p> <p>投与液の調製及び保管</p> <p>(3) 製剤は希釈せずに投与する。治療施設の他の区画から明確に区別された作業室に、指定された温度を保ち密封状態で保管する。</p> <p>患者への投与</p> <p>(4) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画から明確に区別された治療室内で患者の両側線條体（被殻）に、定位脳手術の手法により注入することで行う。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>(5) 投与後は、患者の投与部位を消毒し、真皮に至る創傷用の皮膚欠損用創傷皮覆材を貼付して密閉する等、投与部位からの本遺伝子組換え生物等の排出が最少となるよう対策を講じる。</p>

- (6) 患者からの本遺伝子組換え生物等の排出が最少となる対策を講じるとともに、排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝搬を防止するため、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。
- (7) 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、血液、尿、唾液等に含まれる本遺伝子組換え生物等の検査を経時的に実施する。
- (8) 本遺伝子組換え生物等の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、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、患者に適切な指導を行う。

検体の取り扱い

- (9) 試験のために患者から採取した検体は、治療施設その他外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (10) 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構造の容器に入れ、施設等から検査機関に運搬する。検体は検査機関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は、施設等から検査機関への検体の運搬は、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が投与された患者の検体である旨を情報提供した上で行う。
- (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) 未投与の本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物は、治験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廃棄する。
- (14) 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機材の廃棄は、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。

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

AAV-hAADC-2（以下「本遺伝子組換え生物等」）の宿主は、アデノ随伴ウイルス（以下「AAV」）である。国際ウイルス分類委員会による分類体系上、ウイルスとしての AAV は以下のように位置付けられている（文献 1、2）。

Baltimore 分類：第 2 群（一本鎖 DNA ゲノム）

科：パルボウイルス（Parvoviridae）

属：デペンドウイルス（Dependovirus）

種：アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus）

AAV は自然界に広く分布しており、哺乳動物に感染する。2008 年までにヒト及び霊長類で分離されたウイルスは抗原性に基づいて 12 の血清型に分けられていたが、さらにその後の検索も合わせると、これまでに 100 以上の型が見つまっている（文献 3、4）。ヒトでは主に小児期に初感染が起こり、成人の約半数が中和抗体を有するが、ヒトへの病原性は知られていない。AAV 自体は複製機能を欠損しており、動物細胞における複製はヘルパーウイルスの機能に依存している（文献 2）。

本遺伝子組換え生物等は、AAV2 に由来する末端反復配列（inverted terminal repeat : ITR）をゲノムの両端に持ち、この間に芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素（Aromatic L-amino acid decarboxylase ; AADC）発現カセットが導入されたゲノム構造を持ち AAV2 型に由来するキャプシドタンパク質により形成されるウイルス粒子外殻（キャプシド）を有する。

2 使用等の歴史及び現状

AAV は、1965 年にアデノウイルス調製物の混入物として発見されたが、病原性が認められないため、医学的関心を引かなかった。しかしその非病原性、潜伏性及び広汎な感染性などの特性から遺伝子治療用ウイルスとしての有用性が注目され、遺伝子治療で汎用されている（文献 4、5 ; IV 章参照）。なお、AAV2 を含めいかなる血清型の AAV もヒト用の生ワクチン等に使用された報告はない。

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性

野生型 AAV のウイルス粒子は、直径約 25nm の正二十面体構造のキャプシドを有しており、エンベロープを持たない。AAV のゲノムは約 4.7kb の線状一本鎖 DNA であり、プラス鎖 DNA を持つウイルス、マイナス鎖 DNA を持つウイルス共に感染性を有する。AAV ゲノム DNA の両端には逆位末端反復配列（ITR）があり、その間に *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子が挟まれている。*rep* 遺伝子は、DNA の複製に必要な 4 つの Rep タンパク質をコードする。*cap* 遺伝子は、AAV の正二十面体キャプシドを形成する 3 つのタンパク質（VP1、VP2 及び VP3）をコードする。ITR は、DNA 複製、パッケージング、宿主細胞ゲノムへの組み込み及びその後の切り出しに必要な配列を含

む。AAVには、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以上の型があり、それぞれ感染指向性が異なる。多くのAAVには共通する受容体(AAVR)があることが知られているが(文献6)、感染には血清型ごとに異なる副受容体(co-receptor)も関与しており、これらの組み合わせによって指向性の違いが生ずると考えられている(文献7)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

細胞に感染した野生型AAVが核内に侵入すると、キャプシドからウイルスゲノムが放出されるが、AAVが単独感染した場合は自律的増殖ができず、潜伏感染する。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が共存する場合は、これらからE1A、E1B、E2A、E4及びVA遺伝子機能を供給され、AAVゲノムの複製とウイルス粒子の構成が起こる。

野生型AAVが単独で標的細胞に感染すると核内でエピソームとして存在するかRepが関与して第19染色体長腕のAAVS1領域への組み込みが起こるが、プラスミドベクターから作製した組換えAAVではこのような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ランダムに挿入されやすいとの報告がある(文献8)。

(3) 捕食性又は寄生性

他の生物を捕食することはない。野生型AAVが哺乳動物に感染することは知られているが、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。ヒトの正常フローラに存在するか否かについては明らかにされていないが、急性感染時には便中に排泄されることもある(文献2)。AAVは哺乳動物に感染するが、血清型や系統によって感染宿主域は異なる。

(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、接触感染が挙げられている。ヒト以外にも多くの哺乳動物に感染しうる。感染の際には、AAVは、細胞表面受容体を介したエンドサイトーシスにより取り込まれる。細胞内侵入後は、エンドソーム内の弱酸性環境下で修飾を受けたのち細胞質に放出されて核周囲に蓄積し、さらに核膜孔複合体を通して核内に移行すると考えられている。この時、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が同時に感染していれば、AAVの増殖が起きて溶解感染の経路に進む。ヘルパーウイルスが共存しない場合は、感染細胞において複製することなく潜伏する。

(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。ヒトの肝細胞癌組織を解析したところAAVゲノム配列が見出されたという報告がある(文献9)。しかし、病的な意義は見出されていない(文献10)。

(6) 有害物質の産生性

AAVの感染に際して細胞内で産生されるタンパク質に病原性又は毒性を示す報告はされていない。

(7) その他の情報

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、エンベロープを持たないことから、乾燥に対しても抵抗性を示す。本ウイルスは物理化学的に比較的堅牢であり、常温において安定である。

不活化には加熱（85℃で数分間）、次亜塩素酸ナトリウム（1000 ppm）などのウイルス消毒剤、水酸化ナトリウム、紫外線（UV）照射などの処理が必要とされている（文献1）。通常のオートクレーブ処理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

遺伝子組換え生物等ゲノム DNA の供与核酸の全塩基配列を別紙1に、構造模式図を別紙3に示す。

本遺伝子組換え生物等のゲノムにおいて、宿主である AAV2 に由来するのは両末端の ITR 配列のみであり、これらに挟まれた形で供与核酸である ████████ enhancer/promoter、██████████、hAADC、h██████ pA 及び非コーディング人工配列が存在する。また、ウイルス粒子は AAV2 のキャプシドタンパク質を外殻に有する。

本遺伝子組換え生物等の構成要素は以下のとおりである。括弧内に本遺伝子組換え生物等ゲノム DNA の供与核酸の塩基番号（別紙1）と塩基長を示した。

- ① Left ITR (██████-██████、██████ 塩基) : AAV2 由来の配列。
- ② ████████ enhancer/promoter 領域 (██████-██████、██████ 塩基) : ████████ (██████████) 遺伝子プロモーターを含む領域。
- ③ ████████ 領域 (██████-██████、██████ 塩基) : ヒト β -globin に由来する領域。
- ④ hAADC 遺伝子領域 (██████-██████、██████ 塩基) : ヒト芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (hAADC) コード領域を含む領域。
- ⑤ h██████ pA 領域 (██████-██████、██████ 塩基) : human ████████ 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。
- ⑥ Right ITR (██████-██████、██████ 塩基) AAV2 由来の配列である。
- ⑦ 人工配列 : プラスミド構築時に移入された人工配列。

2) 構成要素の機能

本遺伝子組換え生物等の供与核酸構成要素の機能は以下のとおりである。

- ① Left ITR : AAV ゲノムの複製及びパッケージング等に必要な配列。
- ② ████████ enhancer/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。
- ③ ████████ 領域 : 発現タンパクのレベルを高めるエンハンサーとして機能する。
- ④ hAADC 遺伝子領域 : AADC タンパク質は L-ドーパをドパミンに、5-ヒドロキシトリプトファンをセロトニンに脱炭酸化する酵素である。

- ⑤ h \square 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。
- ⑥ Right ITR：AAV ゲノムの複製及びパッケージング等に必要配列。
- ⑦ 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。
- 供与核酸配列（Left ITR、Right ITR、 \square enhancer/promoter、 \square 、hAADC、h \square pA）において、既知の有害配列との相同性は認められなかった。

2 ベクターに関する情報

(該当せず。)

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

宿主である AAV に移入された供与核酸は、1 項の (1) に記載された hAADC タンパク質発現カセット (①～⑦) である。それらの塩基配列を別紙 1 に示す。

(2) AAV-hAADC-2 の作製方法 (別紙 4 を参照)

本遺伝子組換え生物等は hAADC 遺伝子及びアデノ随伴ウイルス 2 型の ITR を組み込んだプラスミド (p \square)、2 型アデノ随伴ウイルスの *cap* 及び *rep* 遺伝子を組み込んだプラスミド (p \square)、並びにアデノウイルス *E2A* 及び *E4* 遺伝子を組み込んだプラスミド (pHelper) をヒト胎児腎臓由来の HEK293T 細胞に同時に導入して作製される。

調製方法は以下の (3) に示す通りであるが、AAV-hAADC-2 の製造に関しては、別途、第二種使用等拡散防止措置の大臣確認が得られている。大臣確認取得者は \square であり、確認日時、確認番号は以下の通りである。

・ AAV-hAADC-2

平成 \square 年 \square 月 \square 日 厚生労働省発薬生 \square 第 \square 号

(3) 遺伝子組換え生物等の製造方法概要

凍結保存してある HEK293T 細胞のワーキングセルバンク (WCB) を拡大培養し、プラスミド p \square 、p \square 及び pHelper を同時に導入する。細胞培養後に培養上清及び培養細胞を回収し、界面活性剤等により処理し、フィルターろ過、カラムクロマトグラフィー等の精製工程を経て、AAV-hAADC-2 のバルクを調製する。目的の濃度に調整し、バイアル等の密封容器に小分け分注し、 -60°C 以下にて冷凍保管する。AAV-hAADC-2 は、製造ロット毎に品質試験を行う (ゲノムタイター試験、感染力価試験、rcAAV 否定試験、プラスミド残留試験、In vitro ウイルス試験等)。詳細を別紙 5 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様式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2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12～14）。この2本鎖DNAとなったものからhAADC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。hAADC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。一般に神経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を HEK293T 細胞で作製する過程で p[REDACTED] と p[REDACTED] が非相同組換えを起こして増殖能を獲得したウイルス（replication-competent AAV、以下 RCA）を生ずる可能性は否定できない。しかしその RCA は AAV のウイルス粒子にパッケージできるサイズを考慮すれば、ほぼ全ての供与核酸を失っていると考えられる。さらにこの RCA も野生型の AAV と同様に AAV のヘルパーウイルスであるアデノウイルスや単純ヘルペスウイルス等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

本遺伝子組換え生物等は宿主の AAV2 に存在しないヒト AADC 遺伝子及びその発現カセットをコードしているので、その配列の一部を PCR で特異的に増幅、定量することが可能である。このときに用いる PCR 反応では試料 μL 中に コピーの発現カセットがあれば検出することができる。本検出法の信頼性については、同様の定量的 PCR 法を用いたウイルス検出法が既に臨床応用されていることから、十分に確立しているものと考えられる。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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 AADC 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 AADC 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。本組み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イルスと共感染した場合、又は通常の細胞に本遺伝子組換え生物等・野生型 AAV・ヘルパーウイルスの 3 者が共感染した場合のみである。

- ・本遺伝子組換え生物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 p[REDACTED] と AADC 遺伝子をもつ p[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 replication-competent AAV (RCA) 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 (cell tropism) を規定する外被蛋白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、RCA がヒトや動植物等への感染性、感染様式、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 RCA が生じる可能性は否定できないが、パッケージングしうる供与核酸の長さは非常に短い (文献 12~14)。

III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1 遺伝子組換え生物等の使用等の内容

ヒトの治療を目的とした投与、保管、運搬、廃棄並びにこれらに付随する行為。

2 遺伝子組換え生物等の使用等の方法

製剤の保管及び運搬

- (1) 本遺伝子組換え生物等の製剤は、遺伝子組換え生物である旨を表示した容器に密封された状態で治療施設に運搬される。治療施設においては、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、適切に管理された冷凍庫で保管する。
- (2) 本遺伝子組換え生物等の製剤の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

投与液の調製及び保管

- (3) 本遺伝子組換え生物等の製剤は希釈せずに投与する。治療施設の他の区画から明確に区別された作業室内に、指定された温度を保ち密封状態で保管する。

患者への投与

- (4) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画から明確に区別された治療室内で患者の両側線条体 (被殻) に、定位脳手術の手法により注入することで行う。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

- (5) 投与後は、患者の投与部位を消毒し、真皮に至る創傷用の皮膚欠損用創傷皮覆材を貼付して密閉する等、投与部位からの本遺伝子組換え生物等の排出が最少となるよう対策を講じる。
- (6) 患者からの本遺伝子組換え生物等の排出が最少となる対策を講じるとともに、排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝搬を防止するため、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。
- (7) 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、血液、尿、唾液等に含まれる本遺伝子組換え生物等の検査を経時的に実施する。
- (8) 本遺伝子組換え生物等の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、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、患者に適切な指導を行う。

検体の取り扱い

- (9) 試験のために患者から採取した検体は、治療施設その他外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (10) 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構造の容器に入れ、施設等から検査機関に運搬する。検体は検査機関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は、施設等から検査機関への検体の運搬は、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が投与された患者の検体である旨を情報提供した上で行う。
- (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) 未使用の本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物は、治験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廃棄する。
- (14) 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機材の廃棄は、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たっては、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

被験者体内における RCA 出現の有無及び排出の有無については、排出等の挙動が明らかになるまで本遺伝子組換え生物等の排出等の検出を経時的に実施する。

対象疾患：AADC 欠損症、パーキンソン病

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

(1) 医療スタッフが本遺伝子組換え生物等や投与後の患者と直接接触することを防ぐための処置：

治療施設内での運搬には、必ず漏出防止措置が施された容器を用い、本遺伝子組換え生物等を取り扱う者や投与後の患者の処置等を行う者は、ガウンや使い捨て手袋等の個人用防護具を装着する。

(2) 感染性廃棄物の処理方法：

投与に使用し、本遺伝子組換え生物等と接触した全ての用具は、漏出防止措置が施された一次容器及び二次容器に封入する。全ての廃棄物はバイオハザードマークを表示した袋により二重に密閉し、専用の廃棄物容器に入れる。

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

ラット及びサルのパーキンソン病モデルに対して脳内へ AAV-hAADC-2 の注入を行った前臨床試験では、明らかな毒性は認められていない（文献 15～22）。本製品の幼若ラットを用いた単回線条体内投与による 26 週間観察毒性試験及び生体内分布試験（試験番号：19K5752G）の結果、血液中 AAV-hAADC-2 濃度は、低用量群ではいずれの測定時点でも対照群と明らかな差は認められなかった。高用量群では投与後 1 日に高値であったが、投与後 13 週群は投与後 3 日に、投与後 26 週群は投与後 7 日に対照群と同程度となった。尿中 AAV-hAADC-2 濃度は、低用量及び高用量群共に投与後 1 日に高値で、投与後 7 日まで低下したが、対照群よりは高値であった。糞中 AAV-hAADC-2 濃度は低用量及び高用量群共に投与後 1 日に高値であったが、低用量群は投与後 3 日に、高用量群は投与後 7 日に対照群と同程度となった。唾液中 AAV-hAADC-2 濃度は、いずれの測定時点でも対照群と投与群の間に差はなかった。

臨床研究

AADC 欠損症：

本品類似の自治医科大学臨床研究用 AAV-AADC ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究においては、2015 年 6 月からこれまでに 4～19 歳の AADC 欠損症患者 8 名（日本人患者 5 名と中国系オーストラリア人、ロシア人、在日カンボジア人患者各 1 名）に対して遺伝子治療が実施され、頸定が得られる等の運動機能の改善、ジストニアの消失や眼球回転発作の減少、発汗や唾液分泌異常の改善、認知機能の改善や気分の安定等、著明な効果が認められている。これまでのところ重篤な有害事象は認められていない（文献 23）。

進行期パーキンソン病：

本品類似の自治医科大学臨床研究用 AAV-AADC ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究においては、6 名に対して遺伝子治療が実施され、6 ヶ月後の評価で AAV ベクターに関連した有害事象は認められず、OFF 時の unified Parkinson disease rating scale (UPDRS) 運動スコアの改善等、パーキンソン病の症状改善が認められ、さらに 5 年が経過後も AADC が発現し続けた（文献 24）。

投与後の血中への分布及び尿中への排出を観察した臨床研究では AADC 欠損症患者 4 例及びパーキンソン病患者 8 例において投与翌日、2 日後、8 日後に PCR（検出限界は 30 vg/μl）にて確認したが、全患者で、手術後に血液、尿中ともにベクターゲノムは検出されなかった。なお、本品ベクター製造に用いる一部のプラスミドは本品類似品のプラスミドとは異なるが、遺伝子組換え生物等の構成（キャプシドのアミノ酸配列及び粒子中のゲノムの遺伝子配列）は同一である。

本品類似の AAV-AADC ベクターを用いて実施された進行期パーキンソン病、AADC 欠損症に対する臨床試験の一覧を別紙 6 表 1、2 に示す。

臨床試験（治験）

本遺伝子組換え生物等と同一の遺伝子を搭載した組換え AAV 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

- ・ 国立台湾大学において、AADC 欠損症に対して本遺伝子組換え生物等と同じ宿主（AAV2）同じ目的遺伝子（hAADC）を搭載した本品類似の AAV ベクターを同じ経路で投与した報告があるが、ベクターに関連した有害事象は認められていない（文献 25）。
- ・ 1999 年に承認され、米国ペンシルバニア大学で実施された第 I 相臨床試験（血友病 B に対するヒト凝固第 IX 因子を搭載する組換え遺伝子 AAV の骨格筋内投与による治療）において 8 名の患者に AAV に由来する遺伝子組換えウイルスを骨格筋に投与した結果、尿中への遺伝子組換えウイルスの排出は注入後 2 日目以降では検出されなかった（文献 26）。
- ・ 一方、ヒト凝固第 IX 因子を搭載する遺伝子組換え AAV を肝動脈に注入した臨床試験では、 8×10^{10} vg/kg 2 名、 4×10^{11} vg/kg 3 名、 2×10^{12} vg/kg 2 名の合計 7 名において、術後 2 日目以降にも血清中にベクターゲノムが検出され、そのうち 2×10^{12} vg/kg を投与した 1 名では 14 週まで陽性であった。また、 4×10^{11} vg/kg 投与群の 1 名では、16 週まで精液中に検出され、別の 1 名では 20 週まで末梢血単核細胞中で検出された（文献 27）。
- ・ また、本遺伝子組換え生物等と同じ AAV ベクターを同じ経路で投与した第 I 相臨床試験が米国で実施されている。2008 年、カルフォルニア大学ローレンス・バークレイ国立研究所より、AAV-hAADC ベクターをパーキンソン患者の両側後方被殻に注入した第 I 相臨床試験結果が報告された。60 歳から 67 歳の男女 5 人に総量 9×10^{10} ベクターゲノム（vg）の組換えウイルスを投与したところ、1 か月及び 6 か月後に、6-[¹⁸F]フルオロ-L-m チロシン（FMT）の取込みが 30% 向上し、ベクターに関連する有害事象は認められなかった。引き続き、総量 3×10^{11} vg が男女 5 人に注入され、FMT 取込みは 75% 増加したが、AAV ベクターに関連する有害事象は認められなかった。その後、最長、4 年以上にわたり脳内での遺伝子の発現が観察され、若干の運動機能悪化などの 4 件の有害事象が報告されたが、本遺伝子組換え生物等の異常増殖による有害事象は認められていない（文献 28～30）。
- ・ AAV9 由来の遺伝子治療用製品 Zolgensma[®] は 2018 年 12 月に米国食品医薬品局（FDA）の承認を取得し、国内では 2020 年 3 月に「効能、効果又は性能：脊髄性筋萎縮症（臨床所見は発現していないが、遺伝子検査により脊髄性筋萎縮症の発症が予測されるものも含む）ただし、抗 AAV9 抗体が陰性の患者に限る」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、脊髄性筋萎縮症患者を対象とした臨床試験において、本品が投与された82例（日本人2例を含む）中35例（42.7%）に副作用が認められた。主な副作用は、AST増加9例（11.0%）、ALT増加、トランスアミナーゼ上昇及び嘔吐が各6例（7.3%）であった。（2019年3月8日カットオフ）

- ・ 本研究で用いるウイルス量は米国ペンシルバニア大学の血友病に対する臨床試験に比べておよそ100分の1以下であり、しかも脳内への投与であるため遺伝子組換えウイルスの環境への排出はより少ないものと考えられる。

なお、X連鎖性 Myotubular myopathy (XLMTM) 患者を対象とした AT132 の臨床試験で $3 \times 10^{14}/\text{kg}$ の AAV8 ベクターを投与した3例の死亡例が報告された。詳細は未公表であるが、直接の死因は消化管出血で、当該患者は肝胆道系疾患の既往歴を有していたことから、元々、肝病変のある患児に高用量のベクターを投与したことが要因と推察されている。本臨床試験は一旦差し止めとなったが、FDA は差し止め解除通知を発出した（2020年12月）。

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野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物等の感染性は野生型 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、競合や有害物質を産生する報告もなく、他の微生物を減少させることはないと考えられる。よって、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

当該第一種使用規程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はなく、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。細胞培養および動物実験において AADC の過剰発現による毒性は報告されていない。

AADC は正常でも線条体内のドパミンニューロン終末に存在する酵素であり、基質である L-dopa の供給がなくてはドパミンを産生することはできない。したがって、L-dopa の投与量を調節することで線条体内のドパミン濃度が過剰とならないように制御することが可能であり、遺伝子発現における安全性は高いと考えられる。また、ドパミンの他に AADC により 5-HTP を基質としてセロトニンが生成されるが、内因性の 5-HTP は少量であり、AADC の過剰発現が起こっても生成されるセロトニンの量は生理的範囲内であると予想されるため、これによる副反応は生じないと考えられる。

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自然界で感染する対象は、野生型 AAV2 と同じく哺乳動物である。たとえ本遺伝子組換え生物から RCA が生じて、ヘルパーウイルスが同時に感染しないかぎり複製は起こらない（文献 2）。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等の ITR 及びキャプシドタンパク質は AAV2 に由来する。野生型 AAV には病原性がないことが示されているが、本遺伝子組換え生物等は、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠落させているため、万が一ヘルパーウイルスが標的細胞に共感染したとしても、複製・増殖は起こらず、病原性はさらに低いと考えられる。ウイルスベクター作製過程で、ヒト胎児腎臓由来の細胞（HEK293 細胞）内で非相同組換えを起こして、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を有して RCA を生ずる可能性は否定できないが、その RCA はパッケージできるサイズを考慮すれば、ほぼ全ての供与核酸を *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子により失っており、RCA も野生型の AAV と同様に病原性を持たないと考えられる。

なお、AAV を宿主とする遺伝子組換えウイルスはこれまで欧米の臨床試験で使用されているが（文献 25～30）、環境への悪影響に関する報告はない。

(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限り、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来 RCA が環境中へ拡散する可能性は低く、また、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、本遺伝子組換え生物由来 RCA 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限り、環境中で増殖することはない。さらに、本遺伝子組換え生物が効率よく感染する対象はヒトに限られるため、本遺伝子組換え生物が及び本遺伝子組換え生物由来 RCA が被験者以外のヒトに対して病原性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

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規程等の方法による限り、病原性によって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自然界で感染する対象は、野生型 AAV2 と同じく哺乳動物であり、ヒト及びサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。しかし、ヒト以外の野生動植物等におい

て本遺伝子組換え生物等の有害物質の産生性は知られておらず、影響を受ける可能性がある野生動物等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

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、有害物質の産生によって生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

細胞培養および動物実験において AADC の過剰発現による毒性は報告されていない。

AADC は正常でも線条体内のドパミンニューロン終末に存在する酵素であり、基質である L-dopa の供給がなくてはドパミンを産生することはできない。したがって、L-dopa の投与量を調節することで線条体内のドパミン濃度が過剰とならないように制御することが可能であり、遺伝子発現における安全性は高いと考えられる。また、ドパミンの他に AADC により 5-HTP を基質としてセロトニンが生成されるが、内因性の 5-HTP は少量であり、AADC の過剰発現が起こっても生成されるセロトニンの量は生理的範囲内であると予想されるため、これによる副反応は生じないと考えられる。

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物等の特定

本遺伝子組換え生物等が自然界で感染する対象は、野生型 AAV2 と同じく哺乳動物であり、ヒト及びサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。自然界では、野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、ヒト以外で増殖を伴う感染が成立するかどうかは明らかではない。遺伝子組換え AAV を使用した実験結果から、ヒト以外にカニクイザル、アカゲサル、イヌ、ラット、マウス等の哺乳動物に感染することが報告されている。

(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、水平感染を受けた第三者や動物等に保持さ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が増殖するためにはヘルパーウイルス及び野生型 AAV との三重感染が必要になるため、さらなる水平伝達が起こる確率は極めて低い。三重感染時に相同組み換えが起こって生じた RCA が水平伝達される確率はさらに小さくなる。本遺伝子組換え生物が感染したヒト又はヒト以外の哺乳類で一過性に AADC 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。本遺伝子組換え生物由来の RCA が出現したとしても、核酸を水平伝達する性質は野生型 AAV と同等である。

(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限り、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来の RCA 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自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖する能力は無く、本遺伝子組換え生物由来 RCA 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限り、環境中で増殖することはない。さらに、本遺伝子組換え生物が効率よく感染する対象はヒトに限られることから、本遺伝子組換え生物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由来の RCA 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、RCA 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 AAV に極めて近い構造になると考えられる。RCA 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、ヒト及び他の哺乳類動物、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。

(4) 生物多様性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、核酸の水平伝達によって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

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が感染する動植物等の種類は野生型 AAV 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限り、本遺伝子組換え生物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、その量は検出レベル以下であると推定される。本遺伝子組換え生物による AADC 遺伝子の発現はヒトに病原性をもたないので、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無い限り、環境中で増殖することはない。ヒト体内の同一の細胞に本遺伝子組換え生物と野生

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が感染する可能性は極めて低く、本遺伝子組換え生物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由来の RCA 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、RCA 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 AAV に極めて近い構造になると考えられる。RCA 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、ヒト及び他の哺乳動物、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、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 : AAV-hAADC-2 の供与核酸の全塩基配列

別紙 2 : hAADC のアミノ酸配列

別紙 3 : AAV-hAADC-2 の供与核酸の構造

別紙 4 : AAV-hAADC-2 の作製方法

別紙 5 : AAV-hAADC-2 の品質管理試験

別紙 6 : AAV-hAADC-2 の臨床試験一覧 (進行期パーキンソン病、AADC 欠損症)

別紙 7 : qPCR 法(試験方法、分析バリデーション試験結果)

別紙 8 : 非臨床試験結果 (分布・排出)

参考文献

1. Condit RC. Principles of virology. In “Kaipe DM, Howley PM eds, Fields VIROLOGY 6th ed”. pp21-51. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia ;2013
2. Berns KI, Parrish CR. Parvoviridae. ditto. pp1768-1791.
3. Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, *et al.* Adeno-associated virus type 12 (AAV12) : a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. J Virol; 2008. 82.1399-1406.
4. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. Clin Microbiol Rev;2008. 21.583-593.
5. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. Annu Rev Virol;2014. 1.427-451.
6. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, *et al.* An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature ; 2016.530.108-112.
7. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol ; 2016.21.75-80.
8. 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.
9. Nault JC, Datta S, Imbeaud S. *et al.* Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. Nat Genet; 2015. 47.1187-1193.

10. Gil-Farina I, Fronza R, Kaepfel C, *et al.* Recombinant AAV integration is not associated with hepatic genotoxicity in nonhuman primates and patients. *Mol Ther* ;24.1100-1105.
11. Xu R, Rahim M, Ma H, *et al.* Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. *Med Sci Monit* ; 2005.11.305-308.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Fan DS, Ogawa M, Fujimoto K, *et al.* Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* ;1998.9:2527-2535.
16. Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, *et al.* Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* ;2000.11.1509-1519.
17. Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, *et al.* Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* ;2002.13.345-354.
18. Sanftner LM, Sommer JM, Suzuki BM, *et al.* AAV2-mediated gene delivery to monkey putamen: Evaluation of an infusion device and delivery parameters. *Exp Neurol* ;2005.194:476-483.
19. Cunningham J, Pivrotto P, Bringas J, *et al.* Biodistribution of Adeno-associated Virus Type-2 in Nonhuman Primates after Convection-enhanced Delivery to Brain. *Mol Ther* ;2008.16.1267-1275.
20. Daadi MM, Pivrotto P, Bringas J, *et al.* Distribution of AAV2-hAADC-transduced cells after 3 years in Parkinsonian monkeys. *Neuroreport* ;2006.17.201-204.
21. Fiandaca MS, Varenika V, Eberling J, *et al.* Real-time MR imaging of adeno-associated viral vector delivery to the primate brain. *Neuroimage* ;2009.47.T27-T35.
22. San Sebastian W, Richardson RM, Kells AP, *et al.* Safety and tolerability of magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery of AAV2-hAADC with a novel delivery platform in nonhuman primate striatum. *Hum Gene Ther* ;2012.23.210-217.
23. Karin Kojima, Takeshi Nakajima, Naoyuki Taga, *et al.* Gene therapy improves motor and mental function of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *BRAIN* ;2019. 142. 322–333

24. Shin-ichi Muramatsu, Ken-ichi Fujimoto, Seiya Kato, *et al.* A Phase I Study of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Molecular Therapy*;2015. vol. 18 no. 9. 1731–1735.
25. Hwu W-L, Muramatsu S, Hong S, *et al.* Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Science Transl Med*; 2012.4:134ra61.
26. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, *et al.* AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* ;2003.101.2963-2972.
27. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* ; 2006. 12.342-347.
28. Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, *et al.* Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*;2008.70.1980-1983.
29. Christine CW, Starr PA, Larson PS, *et al.* Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* ;2009.73.1662-1669.
30. Mittermeyer G, Christine CW, Rosenbluth KH, *et al.* Long-Term Evaluation of a Phase 1 Study of AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Hum Gene Ther* ;2012.23.377-381.