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（※3）  *rep*及び*cap*遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス〇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〇型に由来するITRを有し、ヒト〇〇を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（※1）（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）と呼ばれるウイルスの一つである（文献1、2（※2））。  AAVの主な血清型（AAV-2、AAV-5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は、adeno-associated virus-〇（以下「AAV-〇」という。）に、キャプシドタンパク質は、adeno-associated virus-●（以下「AAV-●」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。 |

（※1）ITRとキャプシドの血清型の由来が異なる場合の記載例。ITR及びキャプシドのそれぞれの血清型の由来を記載する。ITRとキャプシドの血清型の由来が同じ場合には、「*rep*及び*cap*遺伝子を欠失し、ヒト〇〇を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス◆型」とし、◆にはITRとキャプシドの血清型の由来を記載する。なお、名称はマスキング不可であることに留意すること。

（※2）引用文献は一般的なものとした。より適切な文献がある場合は、引用先を変更して差し支えない。以後の引用文献についても同じ。

（※3）本記載例に示した文章を定型文とし、重要な情報が報告された場合等においては追記を検討すること。また、生物多様性影響評価書への記載の有無にかかわらず、申請者の責任として最新の情報を説明できるようにすること。以後の文章についても同じ。

|  |
| --- |
| 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Ⅳ章参照）。  （遺伝子組換えAAVを用いた臨床試験における安全性に関する最新の知見を記載） |

|  |
| --- |
| 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23～28nm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4～6kb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AAV○は○○○に特異性が高いことが報告されている（文献8）。  （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は、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、核膜孔複合体を通っ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タンパクの関与により、第19染色体長腕のAAVS1領域への組み込まれることがある（文献9、10）。  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7）。  （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11）。  （６）有害物質の産生性  野生型AAVの感染に際して細胞内で産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℃、数分間）、次亜塩素酸ナトリウム（1,000ppm）、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℃、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*遺伝子配列を〇〇〇に置換している。  本遺伝子組換え生物等のゲノムは、〇〇〇及びその両側の野生型AAV〇のウイルス遺伝子由来のITRからなり、組換えAAV〇のキャプシドに内包される。  〇〇〇は、〇〇〇プロモーター、〇〇〇コード配列、〇〇〇ポリアデニル化シグナル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。  ・ヒト〇〇〇をコードする領域（h〇〇〇）  ヒト〇〇〇遺伝子は〇番染色体（〇〇〇）上に位置しており、〇個のエクソン、〇〇〇塩基対からなり、〇〇〇アミノ酸よりなる〇〇〇をコードしている。  h〇〇〇は、開始コドンATGから終始コドンTGAまでの〇〇〇bpとそれに続く3’末端非翻訳領域を含むDNAを制限酵素〇〇〇で切り出した配列である。  ・〇〇〇プロモーター  〇〇〇由来の〇〇〇遺伝子上流に位置するプロモーターである。  ・制限酵素認識部位の人工配列  プラスミドの構築過程で便宜的に挿入されたもので、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。  ・〇〇〇ポリアデニル化シグナル  〇〇〇に由来する。  ・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AAV〇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（※5）  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。  ・ヒト〇〇〇をコードする領域（h〇〇〇）  ヒト〇〇〇遺伝子により発現される〇〇〇は、〇〇アミノ酸より構成される分子量約〇〇kDaの〇〇局在タンパク質である。〇〇酵素として全ての細胞において発現しており、〇〇を〇〇化する〇〇活性を有する。〇細胞において特に発現が強いため、〇活性が先天的に欠損することで、〇患者は・・・を呈する。  ・〇〇〇プロモーター  〇〇〇プロモーターは〇〇〇に由来する。〇〇〇の遺伝子発現は〇〇遺伝子、〇〇遺伝子の順に転写翻訳され、それぞれのタンパク質が形成されるが、その〇〇遺伝子プロモーターである。強力なプロモーターとして知られ、発現ベクターとして広範囲に使用されている。  ・〇〇〇ポリアデニル化シグナル  〇〇〇ポリアデニル化配列はmRNAの安定化に寄与する。  ・ITR  ITRは、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9）。なお、ITRはタンパク質を発現するオープン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、〇〇〇データベース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が生じることで産生されるタンパク質は特定されなかった（別紙1）。  別紙1に記載すべき内容：   * 本遺伝子組換え生物等の情報（構成要素のゲノム上の位置・由来・機能等、本遺伝子組換え生物等のゲノムの全塩基配列、アミノ酸配列（供与核酸に由来する、又は供与核酸と結合したタンパク質のアミノ酸配列に加え、エンベロープ、キャプシド等を宿主以外から供給している場合はそのアミノ酸配列）、相同性検索・ORF検索結果等）（※5） |

（※4）生物多様性影響評価書には補足解説に記載されているものと同等の情報は記載すること。詳細については別紙1に記載することで差し支えない。

（※5）別紙の本文は原則日本語とすること。ただし、図表等に英語が含まれることは差支えない。必要な情報が含まれていれば、治験製品概要書（日本語版）の抜粋でも差し支えない。

|  |
| --- |
| 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〇〇〇タンパク質の構成を別紙1（※6）に示す。本遺伝子組換え生物等のゲノムは〇〇〇発現カセット及びその両側の野生型AAV〇のウイルスゲノム由来のITRからなる。〇〇〇発現カセットは、〇〇〇プロモーター、〇〇〇コード配列、〇〇〇ポリアデニル化シグナル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3種類のプラスミドp〇〇〇、p〇〇〇（パッケージングプラスミド）及びp〇〇〇（ヘルパープラスミド）を〇〇〇細胞に同時に導入することで作製される。   * p〇〇〇   〇〇〇プロモーター、ヒト〇〇〇をコードする領域、AAV〇に由来するITR等を搭載するプラスミド   * p〇〇〇   AAV〇に由来する*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子を搭載するプラスミド   * p〇〇〇   アデノウイルス〇型の*E2A*、*E4*及び*VA*領域を搭載するプラスミド  （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/〇国（海外の場合）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。  解凍したセルバンクを培養して得られた〇〇〇細胞に、p〇〇〇、p〇〇〇及びp〇〇〇をトランスフェクションして培養後、細胞を溶解し、清澄化した液からウイルス粒子を精製し、濃縮後透析ろ過して原薬を得る。原薬は無菌ろ過後に希釈し容器に充填して本遺伝子組換え生物等の製剤を得る。得られた本遺伝子組換え生物等について、品質管理試験を実施する。  なお、増殖能を獲得したウイルス（replication-competent AAV、以下「rcAAV」という。）は原薬の規格試験において管理される。  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。  別紙2に記載すべき内容：   * 本遺伝子組換え生物等の製造方法（フロー図による概要等でも可） * 増殖能を獲得したAAV（rcAAV）の管理状況 |

（※6）【解説】生物多様性影響評価書には記載例に記載されているものと同等の情報は記載すること。詳細については別紙1に記載することで差支えない。

|  |
| --- |
| 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12）。  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9、10、13）。このエピソームから〇〇〇が転写される。細胞のゲノムへの組込みは稀で低頻度である。〇〇〇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〇〇〇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  ＜非臨床試験＞  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、宿主のAAV〇の配列と供与核酸である○○配列にまたがるDNA断片をqPCR法で増幅・定量することにより検出される。本qPCR法では試料〇μL中に〇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（※8）に示す。  ＜臨床試験＞  qPCR法により本遺伝子組換え生物等のDNAの検出及び定量を行う。qPCR法で用いる検体はヒトからの採取検体からAAVゲノムを抽出する。  臨床試験で用いるqPCR法では非臨床試験と同じプライマー－プローブセットを使用する（※9）。 |

（※8）【解説】検出方法の概要（定量限界及び検出限界含む）、検体の種類毎のゲノム抽出効率の目安を記載すること。

（※9）【解説】非臨床試験と同じプライマー－プローブセットを使用する場合は、その旨を記載すること。

また、動物のデータしかない場合でも、それらのデータを用いてヒトサンプルの測定が行える系であることを説明すること。

|  |
| --- |
| 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〇〇〇遺伝子を持つため、本遺伝子組換え生物等が感染した細胞は〇〇〇を発現する。  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パ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、及びヘルパ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p〇〇〇と〇〇〇遺伝子をもつp〇〇〇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9、10）。 |

# **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  ※「第一種使用規程申請書」と同じ記載とすること。 |

|  |
| --- |
| ２　使用等の方法  ※「第一種使用規程申請書」と同じ記載とすること。 |

|  |
| --- |
| 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、○、○か月目に被験者の血液、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。  詳細を別紙3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  ※主に非臨床の生体内分布及び排出試験結果並びに臨床におけるウイルス排出評価について記載する。  ＜非臨床試験（※10）＞  本遺伝子組換え生物等（〇×10〇 vg/kg、〇×10〇 vg/kg）を〇〇〇（動物名）に単回〇〇投与（投与経路）した生体内分布及び排出試験の結果、～（以下、状況に応じて下記を参考に記載すること。）   * 〇〇（検体名）中の本遺伝子組換え生物等の濃度は、〇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。 * 〇〇（検体名）中の本遺伝子組換え生物等の濃度は、〇群では投与後〇日に高値であったが、投与後〇日に対照群と同程度に低下した。 * 〇〇（検体名）中の本遺伝子組換え生物等の濃度は、〇群では投与後〇日に高値であったが、投与後〇日以降は低下傾向が認められた。   生体内分布及び排出試験の詳細を別紙4に示す。  ＜臨床研究（※11）＞  本遺伝子組換え生物等の供与核酸である〇〇が〇〇に置き換わった遺伝子組換えAAV（〇〇〇）を用いた遺伝子治療臨床研究において、患者〇名に対して当該遺伝子組換えAAVが投与された。〇か月後の評価で遺伝子組換え生物等に関連した有害事象は認められず、〇〇〇の症状改善が認められ、さらに5年が経過後も〇〇〇が発現し続けた（文献〇）。また、排出試験が実施されており、～（上記非臨床試験の記載を参考とすること。）。当該遺伝子組換えAAVを用いて実施された〇〇〇病に対する臨床研究の一覧を別紙5に示す。  ＜臨床試験（治験）（※11）＞  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。 |

（※10）【解説】非臨床生体内分布試験等によって本遺伝子組換え生物等が体外に排出される可能性が極めて低いことが推測できる場合、臨床の排出データがある場合等の適切な理由があれば非臨床排出試験を必ずしも実施する必要はない。非臨床試験において排出試験を実施していない場合には、その旨及び排出試験を実施しなくてもよいと考えた理由を説明すること。安全性に係る情報については、特筆すべき異常所見が認められない場合は詳細な内容は不要である。

（※11）【解説】臨床研究・臨床試験において、本遺伝子組換え生物等による排出データを既に取得している場合には記載すること。なお、臨床研究・臨床試験における排出データは必ずしも必要ではないが、排出データがない場合には、類似の遺伝子組換え生物等に関する文献等を用いて本遺伝子組換え生物等のヒトでの排出等の挙動を考察すること。考察においては、類似の遺伝子組換え生物等の排出等の情報が本遺伝子組換え生物の挙動を把握するにあたって利用可能と考えた理由を合わせて説明すること。

|  |
| --- |
| ６　国外における使用等により得られた情報  海外における本遺伝子組換え生物等を使用した臨床データ（排出試験結果、安全性等）を簡潔に記載する。  〇〇〇病の患者〇名に対して本遺伝子組換え生物等（〇×10〇vg/kg）を〇〇投与した海外臨床試験（〇〇試験）において、○○○（検討された検体を記載。例：血液、尿、唾液等）への排出が検討されておりの排出も検討されており、～（上記非臨床の記載を参考とすること。）。また、当該試験において有害事象は～。  また、これまでに、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。  （投与経路、供与核酸、AAVの血清型などが本遺伝子組換え生物及びその用途に近い文献、臨床研究があれば、簡潔に情報を記載すること。） |

# **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11）。  （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、原薬の規格試験で陰性であることを確認するため、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  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）影響の具体的内容の評価  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が有害物質の産生性を持つことはないと考えられる。  本遺伝子組換え生物等由来のDNAが〇〇〇細胞の核に導入されると、導入遺伝子は転写及び翻訳され、〇〇〇タンパク質が産生される。  （以下を参考にタンパク質の発現による影響を考察すること。これ以外にもトランスジェニック動物のデータなど、説明に利用できると考えるデータは使用してよい。）  （特異的プロモーターにより特定臓器/組織で発現する場合）  〇〇〇タンパク質の発現は〇〇〇プロモーターの制御により、自然界で〇〇〇タンパク質が発現している〇〇〇（臓器/組織）に限定される。したがって、本遺伝子組換え生物等を介した〇〇〇タンパク質の発現に対する局所反応は生じないと考えられる。  （タンパク質のアミノ酸配列がヒト由来の配列である場合）  本遺伝子組換え生物等由来の〇〇〇タンパク質は、ヒトにおいて発現している〇〇〇タンパク質と同一であるため、この〇〇〇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。  （タンパク質の過剰発現について、健常人のデータから考察が可能な場合）  患者又は第三者における〇〇〇の過剰発現はこれまで報告されていないため、過剰発現によりもたらされる結果は不明であるが、健常人の〇〇〇タンパク質発現レベルは正常基準値の〇～〇%の範囲であるため、軽度の過剰発現は有害性を示さない可能性がある。  （タンパク質の過剰発現について非臨床試験から考察が可能な場合）  〇〇〇に本遺伝子組換え生物等〇×10〇vg/kg（治験における用量の〇倍以上）を〇〇投与する非臨床試験において、〇〇〇タンパク質は約〇〇倍過剰発現していたが、この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、〇〇〇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、〇〇〇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、ヘルパーウイルスと共感染しても増殖することはなく、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、原薬の規格試験で陰性であることを確認するため、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〇〇〇タンパク質が第三者、野生動植物等に対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、有害物質の産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）影響の具体的内容の評価  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〇〇〇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感染しても増殖することはなく、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、原薬の規格試験で陰性であることを確認するため、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AAV〇と同等で、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〇〇〇遺伝子の発現はヒト及び他の哺乳動物に病原性、有害物質の産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及びヘルパーウイ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AAV〇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、有害物質の産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イ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：本遺伝子組換え生物等の情報（構成要素のゲノム上の位置・由来・機能等、本遺伝子組換え生物等のゲノムの全塩基配列、アミノ酸配列（供与核酸に由来する、又は供与核酸と結合したタンパク質のアミノ酸配列に加え、エンベロープ、キャプシド等を宿主以外から供給している場合はそのアミノ酸配列）、相同性検索・ORF検索結果等）

別紙2：本遺伝子組換え生物等の製造方法（フロー図による概要等でも可）及びrcAAVの管理状況

別紙3：本遺伝子組換え生物等の検出試験（試験方法、定量限界・検出限界））

別紙4：非臨床生体内分布試験結果概要

別紙5：臨床試験結果概要（分布・排出）

なお、別紙の構成は申請者により適宜変更して差し支えない。例えば、欧州の治験の開始等にあたって当局へ提出するEnvironment Risk Assessment（ERA）の情報を、本生物多様性環境影響評価に転用可能な場合には、当該ERAの邦文の概要を別紙とし、ERAを添付資料として提出することも可能である。

**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-associared viral vectors. Curr Opin Virol (2016) 21. 75-80.

7. 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.

8. 伴野太郎, 岡田浩典, 岡田尚巳. 遺伝子導入用ウイルスベクターの特徴と作製法 Pharma Medica 33 .15-22, 20159.

9. Schnepp BC, Clark KR, Klemanski DL, et al. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. J Virol (2003) 77. 3495-3504.

10. 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.

11. Srivastava A, Carther BJ. AAV Infection: Protection from Cancer. Hum Gene Ther. (2017) 28(4). 323-327.

12. Xu R., et al., Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. Med. Sci. Monit. (2005) 11. 305-308

13. 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.

14. Mingozzi 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.