

事務連絡

令和 8 年 3 月 16 日

(別記) 御中

独立行政法人医薬品医療機器総合機構
再生医療製品等審査部

「第一種使用規程承認申請書における生物多様性影響評価書の記載に当たっての留意事項に関する補足解説（令和 8 年 2 月版）」及び「生物多様性影響評価書 AAV 記載例（令和 8 年 2 月版）」について（Early Consideration）

日頃より、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の審査等業務に対し、ご理解とご協力を賜り厚く御礼申し上げます。

総合機構の再生医療製品等審査部では、「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」（平成 15 年法律第 97 号）（以下、「カルタヘナ法」）の対象となる遺伝子組換え生物等を含有し又は遺伝子組換え生物等から構成される医薬品、医療機器、医薬部外品、化粧品及び再生医療等製品（以下、「遺伝子組換え生物等含有医薬品等」）の第一種使用規程承認申請に必要な生物多様性の評価に当たっての留意事項をまとめた「遺伝子組換え生物含有医薬品等の第一種使用規程の承認申請に必要な生物多様性影響の評価を実施する際の留意事項について」（平成 19 年 9 月 13 日、薬食発第 0913005 号）の補足文書として、遺伝子組換えウイルスを用いる場合の留意事項を補足した解説書（以下、「補足解説」）及びアデノ随伴ウイルスを用いる場合の生物多様性影響評価書記載例（以下、「AAV 記載例」）を示してきたところです。今般、総合機構での経験、国内研究班による議論等を踏まえ、補足解説及び AAV 記載例をそれぞれ別添 1 及び別添 2 のとおり改訂いたしましたので、お知らせします。

改訂内容

< 補足解説・AAV 記載例共通 >

- ・ 「ウイルス/ベクターを用いた遺伝子治療用製品の排出評価について」（令和 7 年 11 月 25 日付け厚生労働省医薬局医療機器審査管理課事務連絡）を参考情報として追加
- ・ 非臨床試験結果及び臨床試験結果として記載すべき情報の明確化

<AAV 記載例>

- ・ 供与核酸に関する情報として記載すべき相同性検索結果等の明確化

なお、**Early consideration** とは、科学的知見や情報等が必ずしも十分に集積されていない段階ではあるものの、新たな技術等のイノベーションの実用化と革新的な医薬品等の開発を促進するための参考情報として、その時点における考え方を示したものであり、今後、新たに得られる知見や科学の進歩等により、変わり得るものであることにご留意ください。

(別記)

日本製薬団体連合会

日本製薬工業協会

米国研究製薬工業協会在日執行委員会

一般社団法人欧州製薬団体連合会

再生医療イノベーションフォーラム

(別添1)

生物多様性影響評価書

(全体的な留意事項)

遺伝子組換え生物等の使用等が適正に行われることを確保するため、生物多様性影響評価書は、原則として、第一種使用規程承認後に日本版バイオセーフティクリアリングハウス(J-BCH、<https://www.biodic.go.jp/bch/>)において公表されます(別紙は非公表)。したがって、生物多様性影響評価書に具体的な情報を一切記載せず別紙を引用するのみ、という形式は認められないことに留意してください。

生物多様性影響評価書には、各項に対応する情報の要点を記載し、詳細な情報については引用する形で別紙に記載することが認められます。また、特許情報等、公表することにより知的財産権に支障が生じる情報等については、マスキングが認められます。

なお、遺伝子組換え生物等の名称はマスキング不可であることに留意して名称を決定することを勧めます。

I 宿主^(※2) 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

- ・遺伝子組換え生物等^(※3)である遺伝子組換えウイルスの宿主(例えば、モロニーマウス白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型、アデノウイルス5型、アデノ随伴ウイルス2型、単純ヘルペスウイルス1型等)の分類学上の位置付け(科名、属名、種名)及び自然環境における分布状況を記載する。
- ・宿主に血清型、遺伝型、株名等がある場合は、文献を引用して記載する。宿主の詳細な遺伝型や樹立方法が明らかになっている場合には、別紙に記載する。
- ・遺伝子組換えウイルスのゲノムの構成要素が複数の種に由来する場合は、複製様式等のウイルスの増殖に関わる機能に基づき宿主を選定する。
- ・遺伝子組換えウイルスの宿主を1つに選定できない場合は、複数の宿主を羅列してもよい。

(※2) 「宿主」とは、カルタヘナ法第2条第2項第1号に掲げる技術の利用により得られた核酸又はその複製物が移入されるカルタヘナ法上の生物をいい、遺伝子組換えウイルスの場合、当該遺伝子組換えウイルスの基となるウイルスをいう。

(※3) 「遺伝子組換え生物等」は法令用語で、遺伝子組換え微生物(ウイルスを含む)、遺伝子組換え動物、又は遺伝子組換え植物等であり、異科間で細胞融合された生物を含むが、本補足解説書では「遺伝子組換え生物等」のうち、「遺伝子組換えウイルス」を対象としている。

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又は産業的な利用の歴史及び現状を含む)

- ・同一宿主又は同種の生物を利用した遺伝子組換えウイルスについて、遺伝子治療等の目的で使用された実績又は産業利用実績について記載する。

3 生理学的及び生態学的特性^(※4)

(1) 基本特性

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

(3) 捕食性又は寄生性

- ・ウイルスの場合、捕食性や寄生性は該当しないので、「該当なし」と記載する。

(4) 繁殖又は増殖の様式

- ・細胞への感染様式・機構、感染細胞内でのゲノム増幅の様式、ウイルス粒子形成の様式、周囲の細胞への伝播の様式（細胞-細胞感染、細胞から出て遠隔感染する場合を含む）、組織・臓器指向性及びヒト以外の生物への感染の有無について記載する。

(5) 病原性

- ・感染個体での臓器別病原性、起こり得る疾患名、感染個体での発病率、不顕性感染の有無について記載する。特に人又は動物に対して著しい病原性が知られている場合は、その詳細を記載する。

(6) 有害物質の産生性

- ・ウイルスの場合、①感染細胞内で産生される宿主のウイルスゲノム由来タンパク質の有害性の有無、②有害性があるタンパク質については細胞外への分泌性の有無について説明する。有害物質の分泌性が認められない場合、「感染細胞内で宿主のウイルスゲノム由来のタンパク質が産生されるが、細胞外に分泌される有害物質は知られていない。」等のように記載する。

(7) その他の情報（不活化条件等を含む。）

- ・遺伝子組換えウイルスに対して実際に臨床適用時に使用される可能性がある不活化方法及びその使用条件を想定し、不活化条件とその根拠となる情報（文献等を含む）を記載する。使用等として実際に用いる不活化方法についても記載する。
- ・宿主の環境中（環境水^(※5)や環境接触面^(※6)）での生存性に関する情報があれば記載する。

その他留意点

- ・宿主の属する属の性質について記載する。
- ・宿主の属する種の一般的な性質に加えて、宿主に特有の性質も記載する。

(※4) 「生態」とは「生物が自然環境のもとで生活している様」を示す用語であり、「生態学的」とは動物や植物を念頭に記載されたものである。ウイルスの場合には感染性等の生理学的特性に関して記載する。

(※5) 「環境水」とは「水道水を含む淡水、下水汚泥、海水等」をいう。

(※6) 「環境接触面」とは「プラスチック、綿布、金属等」をいう。

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^(※7)に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

- ・ 供与核酸の構成要素にはタンパク質等のコード領域（シグナルペプチドやリンカーのコード領域を含む）、転写調節エレメント（プロモーター、エンハンサー、ポリA付加シグナル等）、転写後調節エレメント（WPRE領域等）、複数の遺伝子を発現させるための配列（IRES領域、P2Aペプチド領域等）、供与核酸作製や挿入の際の制限酵素切断部位に由来する人工配列等があり、上記供与核酸が由来する生物（核酸供与体）を記載する。ただし、制限酵素切断部位に由来する人工配列の核酸供与体については、由来する生物の記載は不要とし、「プラスミド構築時に移入された人工配列である。」等の説明とすることによい。
- ・ 別紙に、各構成要素の塩基配列を示す。塩基配列については塩基サイズ、当該塩基配列データを提供しているGenBank等のデータベース等の情報について記載する。タンパク質コード領域については、別紙にアミノ酸配列を記載する。

(2) 構成要素の機能

- ・ 供与核酸の各構成要素が持つ機能や特性を記載する。
- ・ 使用する転写調節エレメント（プロモーター、エンハンサー、ポリA付加シグナル等）に組織・細胞選択（指向）性があれば記載する。
- ・ 供与核酸について、当該供与核酸の挿入位置前後の宿主の塩基配列を含め、データベースを用いて相同性検索・ORF検索を行い、その結果のまとめを記載する。（例：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の有無。組換えにより目的外のオープンリーディングフレーム（ORF）が生じることで産生されるタンパク質が有害な機能や生理活性を有さないことの評価等）

(※7) 「供与核酸」とは、宿主に移入される核酸又はその複製物のうち、細胞外において核酸を加工する技術を用いて作製されたもの（ベクターを除く）をいう。

2 ベクター^(※8)に関する情報

(1) 名称及び由来

- ・ 「該当なし」と記載する。

(2) 特性

- ・ 「該当なし」と記載する。

(※8) カルタヘナ法ではベクターを、宿主内に供与核酸を導入し複製させる核酸（大腸菌に対するプラスミドを想定）と定義している。そのため遺伝子治療で使うベクター（遺伝子組換えウイルス）はカルタヘナ法ではベクターと呼ばないことに留意。

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造

- ・ 遺伝子組換えウイルスのゲノムの全体における供与核酸を含め、全ての構成要素の位置を示す。
- ・ 塩基配列上、各構成要素がどこからどこまで分かるよう示す。
- ・ ゲノムサイズが非常に大きなウイルスの場合や、反復配列が多い場合等で全塩基配列

の決定が困難なウイルスの場合には、部分的に宿主の文献情報を利用して説明することも可能である。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

- ・ 遺伝子組換えウイルスの調製にプラスミドを使用する場合は、その概要を示す。
- ・ 遺伝子組換えウイルスの調製にパッケージング細胞等が必要であれば、その細胞の由来と特性を示す。
- ・ 上記プラスミド、細胞株等を用いて遺伝子組換えウイルスを調製する方法を記載する。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- ・ 実施される製造方法の概要を記載する。具体的な製造方法は、概略図（フローチャート）等を用いて別紙に記載する。
- ・ 製造場所（国内／海外の別）を記載する。
- ・ 非増殖性の遺伝子組換えウイルスの場合、増殖可能な（replication competent）ウイルス（野生型、遺伝子組換え型）が検出されないこと並びに検出方法及び検出限界を記載する。詳細な品質管理方法は別紙に記載する。

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

- ・ 宿主に移入された核酸の存在状態を記載する。特別な性質が認められないのであれば、「移入された核酸は、遺伝子組換えウイルスのゲノムの一部として存在する。」等のように記載する。
- ・ 遺伝子組換えウイルス又は遺伝子組換えウイルスのゲノムが標的細胞内に留まる場合には、その存在位置と形態（染色体に挿入されたプロウイルス、エピソーム等）、安定性（持続性）及び供与核酸の発現の持続性について記載する^(※9)。
- ・ 体外遺伝子導入に用いる場合は、標的細胞への感染方法を記載する。

(※9) VSV レンチウイルスの場合は細胞外、AAV の場合は細胞内で長期生存している例が報告されている。

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>

- ・ 動態及び生体内分布試験で実施した遺伝子組換えウイルスの検出方法及び感度（検出限界、定量下限等）を記載し、詳細な試験方法は別紙に記載する。

<臨床試験>

- ・ 野生型及び遺伝子組換えウイルスを識別する方法を記載する。・ 採取検体、検出方法、検出方法の妥当性について概略を記載する。詳細は別紙に記載する。
- ・ 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。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。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- ・ 宿主又は宿主の属する分類学上の種と遺伝子組換えウイルスの構成要素や特性の相違点、生存能、増殖能、感染能、感染宿主等に関して記載する。
- ・ 宿主から除去された構成要素がある場合には、当該構成要素の機能及び当該構成要素を除去することによる遺伝子組換えウイルスの特性の変化についても記載する（別紙引用も可）。

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

- ・ 「第一種使用規程承認申請書」と同一の内容を記載する。

2 使用等の方法

- ・ 「第一種使用規程承認申請書」と同一の内容を記載する。

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

- ・ 以下の場合に記載する。
 - ① 遺伝子組換えウイルスの動態、生体内分布、排出に関し、評価、試験が必要な場合。
 - ② 遺伝子組換えウイルスの水平伝播（第三者への感染）又は垂直伝播（生殖細胞や子孫への感染）に関し、評価、試験が必要な場合。
 - ③ 遺伝子組換えウイルスの環境への放出及び環境中での生存能力に関し、評価、試験が必要な場合。
- ・ ①に該当する場合、排出試験計画（採取検体、採取時期、検出方法）の概略について記載する。詳細は別紙に記載する。
- ・ 情報収集をしない場合にはその理由を記載する。

(参考)

- ・ 「ウイルス/ベクターを用いた遺伝子治療用製品の排出評価について」（令和7年11月25日付け厚生労働省医薬局医療機器審査管理課事務連絡）

4 生物多様性影響が生ずるおそれが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

- ・生物多様性に影響が生ずるおそれがない場合には、「該当なし」と記載する。
- ・農林水産省における緊急措置計画書に類する措置を予め定める必要があるとされた場合には、その旨記載する。
- ・事故等緊急時の対応について記載する。

5 実験室等での使用または第一種使用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>

- ・国内外で行われた非臨床試験（生体内分布、排出等）の結果を記載する。
- ・排出の結果に関しては、特に、遺伝子組換えウイルスの投与量及び投与方法、ヒトへの想定投与量との比較、排出経路、排出期間が明確になるように記載する。
- ・分布の結果に関しては、特に、生殖器官への分布の有無が明確になるように記載し、分布が認められる場合には、生殖細胞の染色体への組込みリスクについて評価すること。
- ・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その旨のみを記載すること。

<臨床試験>

- ・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已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。詳細は別紙に記載する。
- ・先行する臨床試験の患者管理法があれば併せて記載する（「6 国外における使用等により得られた情報」にまとめて記載してもよい。）。詳細は別紙に記載する。

6 国外における使用等により得られた情報

- ・遺伝子組換えウイルスを用いた国外の排出データがあれば記載する。詳細は別紙に記載する。

- ・国際共同治験等の臨床データを、「5 実験室等での使用または第一種使用が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果」の項に記載した場合は、「5 実験室等での使用または第一種使用が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果」の項を引用してもよい。

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
 - (2) 影響の具体的内容の評価
 - (3) 影響の生じやすさの評価
 - (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断
- ・(1)～(4)の順を追った説明を記載する(以下、「2 病原性」、「3 有害物質の産生性」、「4 核酸を水平伝達する性質」についても同様に対応する)。
 - ・競合における優位性、感染細胞で発現又は分泌される供与核酸由来のタンパク質等により他の微生物(ウイルスを含む)を減少させる性質について記載する。ウイルスの場合には、(1)で特定されない場合が多い。

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
 - (2) 影響の具体的内容の評価
 - (3) 影響の生じやすさの評価
 - (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断
- ・第三者が水平感染を受ける可能性があるため、第三者たるヒトも対象にし、特定された野生動植物等について記載する。
 - ・宿主がもつ病原性についての記載は不要であるが、宿主の病原性に関する遺伝子を改変した場合は、具体的に説明をした上で、その病原性の変化について記載する。
 - ・感染細胞で発現又は分泌される供与核酸由来のタンパク質の病原性について記載する。IV章 3 有害物質の産生性(2)に記載した場合は、IV章「3 有害物質の産生性」(2)を引用してもよい。
 - ・当該第一種使用規程に従って第一種使用等を行う場合に、(1)で特定した野生動植物等に対する(2)の影響に関して、それらが起こる可能性(確率や頻度)を記載する。可能性がないと判断する場合には、その判断の結果を根拠とともに記載する。
 - ・上記、(1)～(3)の内容を踏まえ、特段の問題がない場合、「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。」等と記載する。

(参考)

- ・非増殖性の遺伝子組換えウイルスであっても、被験者体内で増殖能を獲得した（replication competent）遺伝子組換え生物に該当するウイルスが生じるおそれが完全に否定できない場合には、その増殖性ウイルスについても評価する。
- ・被感染生物のゲノム内に組み込まれない非増殖性の遺伝子組換えウイルスであっても、野生型ウイルスと共感染すれば増殖し得ることに留意する。
- ・パッケージング細胞を使用して作製された遺伝子組換えレトロウイルスについては、エンベロープタンパク質の性質により宿主域が変わり得ることに留意する。
- ・類似の遺伝子組換えウイルスを用いた他の遺伝子治療における重篤な副作用発現例についても評価する。

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

(2) 影響の具体的内容の評価

- ・感染細胞で発現又は分泌される供与核酸由来のタンパク質の有害性、当該タンパク質が過剰にヒト生体内で発現した場合のハザードを記載する。IV章「2 病原性」(2)に記載した場合には、IV章「2 病原性」(2)を引用してもよい。

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

- ・上記、(1)～(3)の内容を踏まえ、特段の問題がない場合、「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。」等と記載する。

4 核酸を水平伝達^(※10)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

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

- ・核酸の水平伝達（伝播）が起こる前提として、遺伝子組換えウイルスの投与を受けたヒトから感染性を持った組換えウイルスが排出され、第三者のヒト等に伝播することがあるので、その確率も考慮して第三者、野生動植物、他の微生物（宿主を含む）に供与核酸を伝達する性質について以下の点を考慮し評価を記載する。

① 遺伝子組換えウイルスが投与された患者からの排出経路や排出量

② 遺伝子組換えウイルスの核酸が、感染細胞の染色体に組み込まれる可能性

③ 自然環境中に遺伝子組換えウイルスが拡散した場合のヒトを含む野生動植物等又は微生物への影響

④ 宿主又は宿主の類縁株等との相同組換え等により、宿主と同等以上の増殖性を獲

得する可能性

(※10) 「水平伝達」とは、遺伝子組換え生物等から遺伝子又は遺伝子の一部が他の生物に伝達することをいう。

5 その他の性質

- ・上記以外の性質であって、評価を行うことが適切であると考えられるものがあれば、記載する。
- ・垂直感染が生じうる場合には、そのリスクを評価。必要に応じて対応策をⅢ章「4 生物多様性影響が生ずるおそれが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」の項に記載する。

(参考) 「遺伝子組換え生物含有医薬品等の第一種使用規程の承認申請に必要な生物多様性影響の評価を実施する際の留意事項について」(平成19年9月13日、薬食発第0913005号)(抜粋)

生物多様性影響の評価の手順

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

- ・生物多様性に関して悪影響を受ける可能性のある野生動植物等の種類を、想定される組換え生物含有医薬品等の使用条件下で、非改変生物等を使用した場合と比較するなどして、分類学上の種その他の属性により特定すること。この場合、潜在的悪影響を、蓋然性が低いという理由で無視することがないようにすること。
- ・遺伝子組換え生物等の潜在影響として以下のようなものが考えられる。
 - －毒性及びアレルギー性影響を含む野生動植物の病気
 - －受入れ環境中の種又は各生物集団の遺伝的多様性への影響
 - －感染性疾患の伝播又は新たな宿主又は媒介者の発生を促す病原体への感受性の変化
 - －人用又は動物用医薬品に用いられる抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子を伝達することにより、治療薬等を無効にすること
 - －土壌における有機物質の分解の変化を通じた炭素及び窒素の再循環等の生物地球科学的影響
 - －遺伝子組換え生物等の環境への伝播
 - －挿入遺伝子の他の生物への伝達
 - －他の生物との相互作用

(2) 影響の具体的内容の評価

(1) で特定又は選定された野生動植物等が組換え生物等含有医薬品等から受ける潜在的悪影響の具体的内容とその重篤度について評価すること。本評価は、影響の重篤度は組換え生物等含有医薬品等が放出される環境及び放出の方法に影響を受けるものであることに留意し、そのような悪影響が起きるものと仮定して行うこと。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程に従って第一種使用等した場合に、(1) で特定又は選定された野生動植物等が遺伝子組換え生物等から受ける悪影響の生じやすさの程度について評価すること。悪影響の生じやすさを評価する際の主たる要素は、遺伝子組換え生物等の放出が意図されている環境の特性と放出の方法であること。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

悪影響を引き起こす可能性のある遺伝子組換え生物等により引き起こされる生物多様性へのリスク(当該野生動植物の種又は個体群の維持に支障が生じるおそれ)の推定は、最新の方法を用い、悪影響が生じる可能性とそれが起こった場合の帰結の重篤度とを組み合わせることにより、可能な限り行わなければならないこと。

V 総合評価

IV章の全項目の評価結果の概要を説明した上で、総合的判断を記載する。最後は、「したがって、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ずるおそれがないと判断される。」等で締める。

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RCV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）

※別紙の構成は申請者により適宜変更して差し支えない。

※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し支えない。

※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。また、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。

生物多様性影響評価補足解説 新旧対照表

変更箇所	新	旧
III.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	<u>(参考)</u> ・「 <u>ウイルス/ベクターを用いた遺伝子治療用製品の排出評価について</u> 」 (令和7年11月25日付け厚生労働省医薬局医療機器審査管理課事務連絡)	[新設]
III.5 実験室等での使用または第一種使用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>	・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 <u>その旨のみを記載すること。</u>	・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 <u>詳細な内容は不要である。</u>
III.6 国外における使用等により得られた情報	・遺伝子組換えウイルスを用いた国外の <u>排出データ</u> があれば記載する。詳細は別紙に記載する。	・遺伝子組換えウイルスを用いた国外の <u>臨床データ</u> (安全性、分布、排出等) があれば記載する。詳細は別紙に記載する。

(別添2)

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○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○型に由来するITRを有し、ヒト○○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 (*Parvovirineae*) デPENDOPALBO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-○ (以下「AAV-○」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○○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を留意すること。

(※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み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AAV₀は ϕ 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、核膜孔複合体を通過し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*遺伝子を欠失しているため、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 ○○○ に置換している。

本遺伝子組換え生物等のゲノムは、○○○及びその両側の野生型 AAV ○ のウイルス遺伝子由来の ITR からなり、組換え AAV ○ のキャプシドに内包される。

○○○は、○○○プロモーター、○○○コード配列、○○○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 ○○○ をコードする領域（h○○○）

ヒト○○○遺伝子は○番染色体(○○○)上に位置しており、○個のエクソン、○○○塩基対からなり、○○○アミノ酸よりなる○○○をコードしている。

h○○○は、開始コドン ATG から終始コドン TGA までの○○○bp とそれに続く 3' 末端非翻訳領域を含む DNA を制限酵素○○○で切り出した配列である。

・○○○プロモーター

○○○由来の○○○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。

・○○○ポリアデニル化シグナル

○○○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 ○○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○○○をコードする領域(h○○○)

ヒト○○○遺伝子により発現される○○○は、○○アミノ酸より構成される分子量約○○kDa の○○局在タンパク質である。○○酵素として全ての細胞において発現しており、○○を○○化する○○活性を有する。○細胞において特に発現が強いため、○活性が先天的に欠損することで、○患者は・・・を呈する。

・○○○プロモーター

○○○プロモーターは○○○に由来する。○○○の遺伝子発現は○○遺伝子、○○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○○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。

・ ○○○ポリアデニル化シグナル

○○○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、供与核酸の挿入位置前後の宿主の塩基配列を含めて、○○○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、エンベロップ、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）、供与核酸の挿入位置前後の宿主の塩基配列を含めた相同性検索・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し支えない。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○○○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○○○発現カセット及びその両側の野生型AAV○のウイルスゲノム由来のITRからなる。○○○発現カセットは、○○○プロモーター、○○○コード配列、○○○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○○○、p○○○ (パッケージングプラスミド) 及び p○○○ (ヘルパープラスミド) を○○○細胞に同時に導入することで作製される。

- p○○○
○○○プロモーター、ヒト○○○をコードする領域、AAV○に由来する ITR 等を搭載するプラスミド
- p○○○
AAV○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○○○
アデノウイルス○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/○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○○○細胞に、p○○○、p○○○及び p○○○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○○○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。○○○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○○○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○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○ μ L中に○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○○○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○○○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○○○と○○○遺伝子をもつ p○○○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。

(参考)

- ・「ウイルス/バクテリアを用いた遺伝子治療用製品の排出評価について」（令和 7 年 11 月 25 日付け厚生労働省医薬局医療機器審査管理課事務連絡）

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 ($\text{O} \times 10^{\text{O}}$ vg/kg、 $\text{O} \times 10^{\text{O}}$ vg/kg) を $\text{O} \text{O} \text{O}$ (動物名) に単回 $\text{O} \text{O}$ 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。)

- ✓ $\text{O} \text{O}$ (検体名) 中の本遺伝子組換え生物等の濃度は、 O 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。
- ✓ $\text{O} \text{O}$ (検体名) 中の本遺伝子組換え生物等の濃度は、 O 群では投与後 O 日に高値であったが、投与後 O 日に対照群と同程度に低下した。
- ✓ $\text{O} \text{O}$ (検体名) 中の本遺伝子組換え生物等の濃度は、 O 群では投与後 O 日に高値であったが、投与後 O 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 $\text{O} \text{O}$ が $\text{O} \text{O}$ に置き換わった遺伝子組換え AAV ($\text{O} \text{O} \text{O}$) を用いた遺伝子治療臨床研究において、患者 O 名に対して当該遺伝子組換え AAV が投与された。 O 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、 $\text{O} \text{O} \text{O}$ の症状改善が認められ、さらに5年が経過後も $\text{O} \text{O} \text{O}$ が発現し続けた (文献 O)。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 $\text{O} \text{O} \text{O}$ 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その旨のみを記載することによい。

(※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排出データがあれば記載する。詳細は

別紙に記載する。

〇〇〇病の患者〇名に対して本遺伝子組換え生物等 ($\text{O} \times 10^{\text{O}} \text{vg/kg}$) を〇〇投与した海外臨床試験 (〇〇試験) において、〇〇〇 (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、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○○○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、○○○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)

○○○タンパク質の発現は○○○プロモーターの制御により、自然界で○○○タンパク質が発現している○○○（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○○○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 $\times 10^{10}$ 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い、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○○○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い、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い、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-associated 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. 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.
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.

生物多様性影響評価書 AAV 記載例 新旧対照表

変更箇所	新	旧
II.1 供与核酸に関する情報	<p>これらの供与核酸について、<u>供与核酸の挿入位置前後の宿主の塩基配列を含めて、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）。</u></p> <p>別紙1に記載すべき内容： <ul style="list-style-type: none"> 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）、<u>供与核酸の挿入位置前後の宿主の塩基配列を含めた相同性検索・ORF 検索結果等</u>） </p>	<p>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）。</p> <p>別紙1に記載すべき内容： <ul style="list-style-type: none"> 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）、<u>相同性検索・ORF 検索結果等</u>） </p>
III.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	<p><u>(参考)</u> <ul style="list-style-type: none"> 「<u>ウイルス/ベクターを用いた遺伝子治療用製品の排出評価について</u>」 <u>(令和7年11月25日付け厚生労働省医薬局医療機器審査管理課事務連絡)</u> </p>	[新設]
III.5 実験室等での使用または第一種使用が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果 脚注	<p>(※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<u>その旨のみを記載すること。</u></p>	<p>(※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<u>詳細な内容は不要である。</u></p>
III.6 国外における使用等により得られた情報	<ul style="list-style-type: none"> 海外における本遺伝子組換え生物等を使用した<u>排出データ</u>があれば記載する。<u>詳細は別紙に記載する。</u> 	<ul style="list-style-type: none"> 海外における本遺伝子組換え生物等を使用した<u>臨床データ</u>（<u>排出試験結果、安全性等</u>）を簡潔に記載する。