

別紙様式第2

遺 伝 子 治 療 等 臨 床 研 究 計 画 変 更 申 請 書

平成 29 年 9 月 14 日

厚生労働大臣 殿

研 究 機 関	所 在 地	栃木県下野市薬師寺3311-1 (郵便番号 329-0498)
	名 称	自治医科大学附属病院 (電話番号 0285-44-2111) (FAX番号 0285-44-8169)
	代 表 者 役職名・氏名	自治医科大学附属病院 病院長 ・ 佐田尚宏 

下記の遺伝子治療等臨床研究について、別添のとおり研究計画の変更に対する意見を求めます。

記

遺 伝 子 治 療 等 臨 床 研 究 の 課 題 名	研 究 責 任 者 の 所 属 ・ 職 ・ 氏 名
AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究	自治医科大学医学部小児科学 教授・山形 崇倫 

別紙様式第2の別添

遺伝子治療臨床研究等研究変更概要書

申請年月日	平成29年9月14日
-------	------------

1. 基本情報

研究の名称	AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究
研究実施期間	2015年4月1日から2020年3月31日まで
多施設共同臨床研究	該当 ☐ 非該当

2. 研究責任者及び研究機関に関する情報

研究責任者	所属部局の所在地	栃木県下野市薬師寺3311-1 (郵便番号 329-0498)	
	所属機関・部局・職	自治医科大学医学部・小児科学・教授	
	氏名	山形 崇倫 	
研究機関	所在地	栃木県下野市薬師寺3311-1 (郵便番号 329-0498)	
	名称	自治医科大学附属病院	
	連絡先	栃木県下野市薬師寺3311-1 (電話番号0285-44-2111)	
研究責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	村松 慎一	自治医科大学・神経内科学部門・教授	副責任者。適応患者の選択・評価およびウイルスベクターの管理、PET解析
	小澤 敬也	自治医科大学・免疫遺伝子細胞治療学・客員教授	ウイルスベクターに関する全般管理
	小坂 仁	自治医科大学・小児科学学・教授	副責任者。患者の管理・評価
	川合 謙介	自治医科大学・脳神経外科学・教授	脳内へのベクター注入の管理・助言
	中嶋 剛	自治医科大学・脳神経外科学・助教	遺伝子導入のための定位脳手術実施
	五味 玲	自治医科大学・脳神経外科学・教授	遺伝子導入の定位脳手術、術後管理
	水上 浩明	自治医科大学・遺伝子治療研究部・教授	ウイルスベクターの管理・検出
	竹内 護	自治医科大学・麻酔科学・集中治療医学・教授	麻酔・術後管理
	多賀 直行	自治医科大学とちぎ子ども医療センター小児手術・集中治療部・准教授	麻酔・術後管理
	門田 行史	自治医科大学・小児科学・准教授	患者の管理・評価
	小島 華林	自治医科大学・小児科学・助教	患者の管理・評価
	松本 歩	自治医科大学・小児科学・助教	患者の管理・評価
	宮内 彰彦	自治医科大学・小児科学・大学院生	患者の管理・評価
	中村 幸恵	自治医科大学・小児科学・大学院生	患者の管理・評価
	嵯峨 泰	自治医科大学・遺伝子治療研究部・准教授	ウイルスベクターの管理・検出
	吉尾 卓	自治医科大学・臨床研究支援センターとちぎ臨床試験推進部・部長	試験実施の支援

山崎 晶司	自治医科大学・臨床研究支援センターとちぎ臨床試験推進部・副部長	試験実施の支援
高津戸 文江	自治医科大学附属病院臨床研究支援部・臨床研究コーディネーター	患者ケア、試験実施の支援
山口 文江	自治医科大学附属病院臨床研究支援部・臨床研究コーディネーター	患者ケア、試験実施の支援
加藤 光広	昭和大学医学部・小児科学・講師	対象患者の治療前および安定後の診療
中村 和幸	山形大学医学部・小児科学・特任助教	対象患者の治療前および安定後の診療
久保田 哲夫	安城更生病院・小児科・小児神経科部長	対象患者の治療前および安定後の診療
井手 秀平	東京都立北療育センター城南分園・園長	対象患者の治療前および安定後の診療
益山 龍雄	東京都立東部療育センター・小児科診療部長	対象患者の治療前および安定後の診療
一瀬 宏	東京工業大学生命理工学研究科・教授	ベクター品質評価・患者検体解析
佐藤 俊彦	宇都宮セントラルクリニック・院長	PET 実施
峰野 純一	タカラバイオ株式会社 バイオ産業支援事業部門・本部長	ベクターに関する技術支援

3. 総括責任者及び総括責任者が所属する研究機関に関する情報（多施設共同臨床研究に該当する場合は、以下の項目を記載すること。）

総括責任者	所属部局の所在地	(郵便番号)
	所属機関・部局・職	
	氏 名	
研究機関	所 在 地	(郵便番号)
	名 称	
	連 絡 先	(電話番号)

4. 総括責任者以外の研究責任者及び当該研究責任者が所属する研究機関に関する情報（多施設共同臨床研究に該当する場合は、以下の項目を記載すること。）

研究責任者①	所属部局の所在地	(郵便番号)
	所属機関・部局・職	
	氏 名	
研究機関①	所 在 地	(郵便番号)
	名 称	
	連 絡 先	(電話番号)

研	所属部局の所在地	(郵便番号)
---	----------	---------

研究責任者②	所属機関・部局・職	
	氏 名	
研究機関②	所 在 地	(郵便番号)
	名 称	
	連 絡 先	(電話番号)

研究責任者③	所属部局の所在地	(郵便番号)
	所属機関・部局・職	
研究機関③	氏 名	
	所 在 地	(郵便番号)
	名 称	
	連 絡 先	(電話番号)

5. 倫理審査委員会の見解

倫理審査委員会の開催状況及び研究計画の変更を適当と認める理由	当該臨床研究は、平成27年3月27日に厚生労働省より認可を受け、これまで6例を実施した。実施症例においては重大な有害事象は発生しておらず、全ての患児において治療後の経過は良好であり、寝たきりの患児が立ち上がれるようになるなど著効例も見られている。今回、対象年齢をこれまでの4歳以上から2歳以上に変更したい旨、研究責任者より申し出があった。乳幼児に対する本治療実施の安全性を確保しつつ、当該疾患に伴う非可逆的な成育障害をより早期に回避できると考えられたことから、平成28年7月15日に開催された自治医科大学附属病院遺伝子治療等臨床研究審査委員会において、当該臨床研究の実施計画の変更は妥当であると判断され全会一致で承認となった。	
	倫理審査委員会の長の職名	氏 名
	自治医科大学附属病院遺伝子治療等臨床研究倫理審査委員会 委員長 自治医科大学医学部機能生化学部門 教授	遠藤 仁司 

6. 遺伝子治療臨床研究計画変更の概要

研究の区分	治療に係る臨床研究
研究の目的及び意義	本臨床研究は、ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(AADC)欠損症患者の線条体(被殻)に、ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(aromatic L-amino acid decarboxylase: AADC)遺伝子を組み込んだ2型アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV)ベクターを定位脳手術的に注入し、その安全性を検証するとともに、運動症状を改善することを目的とする。
	(1) AADC欠損症の現状と遺伝子治療臨床研究を選定する理由

対象疾患及び
その選定理由

① AADC 欠損症に関する現時点での知見

AADC 欠損症 (OMIM608643) は、カテコールアミンとセロトニンを合成する酵素である。

AADC をコードする遺伝子の変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。

現在、世界中で報告例は 100 症例未満である。日本では、本遺伝子治療臨床研究の申請時(2014 年 7 月)には 4 例診断されていたが、新たに 2 例診断された。脳性麻痺との鑑別が困難な場合もあり、正しく診断を受けていない症例も多いと考えられ、さらに症例は増えると考えられる。

AADC は、チロシンからチロシン水酸化酵素により生成された L-dopa をドパミンに、また、トリプトファンからトリプトファン水酸化酵素により生成された 5-OH-tryptophan をセロトニンに代謝する酵素で、ドパミンからは、ノルエピネフリン、エピネフリンが合成されるため、これらのカテコールアミン全体が低下する。また、セロトニンからメラトニンが合成されるために、メラトニンも低下する。

AADC 欠損症は、カテコラミンとセロトニンの合成が障害されることにより、乳幼児期に重度の運動障害で発症する。筋緊張低下、眼球上転発作を主症状とし、知的障害、発達の遅れ、運動異常、体温異常、摂食困難などを伴う。また、メラトニン低下による睡眠障害も来す。

発症年齢は、典型例では生後 1 か月以内に、過半数が 6 か月以下で発症する。新生児期には、筋緊張低下、哺乳困難、易刺激性、眼瞼下垂、低血圧、低血糖などを呈し、その後、運動障害を主体とした症状が出現してくる。主症状は、眼球上転発作あるいは注視痙攣、四肢ジストニア、全身性アテトーゼ、随意運動の障害、ジストニア発作、重度精神運動発達遅滞などである。てんかんの合併例も報告されている。また、自律神経機能障害による、心拍・血圧の調整障害、発作性発汗、唾液分泌増加や、情緒不安定、睡眠障害もみられる。生下時から動きが少なく、頭定が得られず、生涯臥床状態である患者がほとんどである。重症例では、症状の進行とともに嚥下困難や呼吸障害が出現し、多くの例が小児期に死亡する。台湾での死亡例 10 例の平均死亡年齢は 4.6 ± 2.0 歳 (1.0 - 7.0 歳) と報告されている。画像所見として、頭部 MRI 上、24% で大脳萎縮、白質変性様の所見、脳梁ひ薄化等の異常が報告されているが、大半の例では有意な所見を示していない。PET (2-deoxy-2-[^{18}F] fluoro-D-glucose 使用) で、前頭前野皮質と両側基底核の糖代謝の低下が示されている。また、PET で判る活性評価として、AADC の基質である fluorodopa (FDOPA) をラベルした 6-[^{18}F] fluorodopa (FDOPA)—PET で FDOPA の基底核への取り込みが低下している。

線条体の機能不全は AADC 欠損症の主な運動症状であるジストニアと随意運動の障害の原因となり、前頭前野の機能不全が精神遅滞症状をひきおこす原因の一つとなっていると考えられる。

診断は、上記の臨床症状などから疑われた例に対し、髄液中のカテコールアミン代謝産物を測定する。L-dopa 高値、homovanillic acid 低値の特徴的所見が得られた場合、AADC 欠損症と診断する。確定診断は、血漿中あるいはリンパ球等での AADC 活性の低下、あるいは AADC 遺伝子変異同定が必要である。

② 当該遺伝子治療臨床研究の概要

AADC 遺伝子を搭載した AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を AADC 欠損症患者の線条体 (被殻) に定位脳手術的に注入する。AADC はそれぞれドパミンおよびセロトニンの前駆体である L-dopa および 5-HTP を特異的基質とする酵素であり、AADC を注入することにより、ドパミンやセロトニンの欠乏状態が改善される。本臨床研究では、黒質-線条体路の投射先である被殻の背外側部に選択的に AAV-hAADC-2 を注入するので、主に黒質-線条体路のドパミン活性が上昇することにより、運動機能を中心に症状の改善が期待される。

③ 他の治療法との比較および遺伝子治療を選択した理由

AADC 欠損症の軽症例に対しては、薬物療法により運動機能が改善した報告がある。また、基質結合部位に変異を持つ例で L-dopa 内服によりジストニア、筋緊張低下と発語が改善し、歩行が可能になった例が報告されている。しかし、典型例では、ジストニアや筋緊張低下がやや改善した例はあるが、運動発達が得られた例はなく、全く反応がない例がほとんどであり現状では、AADC 欠損症に対する有効な治療法はない。

	AADC 欠損症に対する新しい治療戦略として画像上、構造的な異常が検出されず、機能的な異常が主体でありドパミン、セロトニン系の機能を改善することにより、脳機能の回復する可能性が考えられ、遺伝子治療による機能回復が期待されている。 2012年に、台湾から、遺伝子治療成功例が報告された。方法は、ヒトAADC遺伝子を組み込んだ2型AAVベクター（AAV-hAADC-2）をAADC欠損症患者の線条体（被殻）に、定位脳手術的に注入した。治療効果として、臥床状態から立位可能になった患者もあるなど、運動機能に関して著明な改善を得た。副作用は、一過性のジスキネジアとチアノーゼを伴う無呼吸発作の反復があったが、これらの副作用はいずれも軽快した。これらの点から、また、患者家族からの強い希望もあり、遺伝子治療研究実施を計画した。
実 施 方 法	(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質 ① 人に導入する遺伝子の構造 ヒトAADC遺伝子は第7染色体上に位置する85,000塩基対以上におよぶ大きなDNAで、メッセンジャーRNAに対応する15のエキソンからなり、各々のエキソンは20ないし400の塩基対、イントロンは1,000ないし17,700塩基対の長さである。本臨床研究ではメッセンジャーRNAから逆転写で合成されたヒトAADCの相補的DNAを治療遺伝子として用いる。 ② 人に導入する遺伝子の性質 2型AAV由来のベクターに神経細胞で安定に遺伝子を発現するサイトメガロウイルス由来のプロモーター配列を組み込み、その下流に配置したAADC遺伝子を発現させる。導入遺伝子がAAVベクターにより染色体に組み込まれる可能性は極めて低く、導入遺伝子は基本的に染色体外に存在すると考えられている。AAVベクターは、非分裂細胞では染色体へ組み込まれることはほとんどないが、分裂細胞ではactive siteに入る可能性がある。小児では、脳内にも分裂細胞が少数ながらもあり、また、血中に入れば肝臓で分裂細胞に組み込まれる可能性は否定出来ない。しかし、小児でこれらを確認した報告はなく、実際に起こるかどうか明らかではない。 AAVベクター内では導入遺伝子は一本鎖DNAであるが、細胞内で二本鎖DNAに変換され導入遺伝子が発現する。ラットでは、このAAVベクターによる発現は1年以上持続することが示唆され、サルにおいても遺伝子導入の効果が3年以上持続することが示されている。さらに米国で実施されたNeurturin遺伝子治療の臨床試験に剖検例では、4年後にもNeurturin遺伝子の発現が確認されている。 ③ 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性 AADCは53.9kDaの二量体として存在し、ドパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の合成に関わっている。この酵素は、チロシン水酸化酵素により生合成されたL-dopaの脱炭酸によりドパミンを合成する。本臨床研究では、経口投与するL-dopaの投与量を調節することにより、AADCによるドパミンの合成量を制御することが可能である。また、AADCはトリプトファン水酸化酵素により生合成された5-HTPの脱炭酸によりセロトニンを合成するが、AADCにより内因性の5-HTPから生成されるセロトニンの量は生理的範囲内である。 (2) 本計画で使用するその他の組換えDNAの構造と性質 本計画では他の組換えDNAは使用しない。 (3) 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに当該細胞を標的細胞とした理由 AADC欠損症では、ドパミン、セロトニンを合成するAADC自体が欠損しているために、脳内のドパミン、セロトニンが減少している。特に、ドパミンの作用として最も主要である黒質-線条体路が運動機能の調節に重要である。よって、黒質-線条体路の投射先である被殻の神経細胞を標的として遺伝子導入を行うことが、治療効果を得るために効果的であると期待される。本計画では安全性を考慮し、被殻に存在する自己の神経細胞を標的として遺伝子導入を行い、ドパミンを産生させる。 (4) 遺伝子導入方法の概略および当該導入法を選択した理由 神経細胞に遺伝子導入する場合には、①非分裂細胞である神経細胞に目的遺伝子を効率よく導入できること、②導入遺伝子が長期間にわたり発現すること、③

生体に対して安全であること、が求められる。アデノウイルスベクターは細胞障害性が強く、導入遺伝子の発現が一過性である。レンチウイルスベクターは非分裂細胞に遺伝子を導入可能であるが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) を基本骨格としており、前臨床試験において十分に研究されておらず安全性の面で劣る。AAVベクターは神経細胞に効率よく遺伝子を導入できること、細胞毒性が少なく、静止期細胞で長期間発現が望めること、非病原性のウイルスを基本骨格としていることから上記3条件を満たす。霊長類の AAV には2型をはじめとして100以上の血清型が報告されており、2型 AAV は比較的特異的に神経細胞で導入遺伝子が発現する。2型 AAV ベクターは臨床研究に最も広く使用されており、血友病に対して第IX凝固遺伝子発現 AAV ベクターの骨格筋および肝臓への注射、パーキンソン病に対してグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 発現 AAV ベクターを視床下核に注入する臨床研究および神経栄養因子である neurturin 発現 AAV ベクターを被殻に注入する臨床研究が既に行われている。以上のことから今回の臨床研究では2型 AAV ベクターを利用するのが最適と考えられる。

(5) ウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合

① AAV-hAADC-2 の野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響

2型 AAV はパルボウイルス科デブドウイルス属に分類される直径約 26 nm のエンベロープを持たない球形ウイルスである。VP1 (82 kDa)、VP2 (65 kDa)、VP3 (60 kDa) が 1:1:10 の比率で合計 60 分子が集まって約 3,600 kDa のキャプシドを構成している。ゲノムは 4,679 ヌクレオチドからなる一本鎖 DNA (約 1,500 kDa) であり、プラスとマイナス鎖がほぼ同じ比率で混在する。ゲノム両末端 145 ヌクレオチドは T 字型ヘアピン構造を形成しており inverted terminal repeat (ITR) と呼ばれる。AAV ゲノムには rep と cap 遺伝子がありそれぞれ非構造蛋白質とキャプシド蛋白質をコードしている。AAV はアデノウイルス、ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下でのみ増殖でき、単独では増殖できない。単独で細胞に感染した場合、第19番染色体の AAVS1 領域 (19q13.42) に特異的にそのゲノムを組み込み、潜伏感染の状態となる。ヘルパーウイルスと同時に感染したり、潜伏感染状態でヘルパーウイルスが感染したときに AAV の増殖が起こる。2型 AAV は呼吸器を主たる感染経路として人から人へ感染するとされている。大部分は不顕性感染で AAV の感染に伴う特有の疾患は報告されておらず、非病原性と考えられている。米国での調査によると出生直後は AAV に対する抗体は検出できないが、学童期で人口の 50 %以上で抗体が陽性となる。rep 遺伝子より合成される Rep 蛋白質は過剰発現すると細胞増殖を抑制したり、ヘルパーウイルスを含めた他のウイルスの複製も抑制する。ウイルス粒子は物理化学的に極めて安定で、pH 3 から 9 の間で不活化されず、また 56°C1 時間の処理でも不活化されない。

② AAV-hAADC-2 の作製方法

AAV-hAADC-2 の作製には、以下の3種類のプラスミドを使用した。

- 1) pAAV-hAADC-2 : サイトメガロウイルスのプロモーター、 β グロビンイントロン、ヒト AADC cDNA、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルからなる AADC 発現カセットを AAV2 の ITR 間に挿入した AAV ベクタープラスミド。
- 2) pRC-BI-khB342-2 : AAV ゲノムの ITR を除き AAV2 の rep、cap 遺伝子をクローニングした pRC2 の SnaBI サイトに、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットを挿入した AAV2 ヘルパープラスミド。なお、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットは、バイディレクショナルに2種の遺伝子を発現可能な pBI-CMV1 のマルチクローニングサイト2か所にそれぞれ、ヒト Bcl-XL cDNA 及び hsa-miR342 をクローニング後、発現カセットごと PCR で増幅したものである。
- 3) pHelper : 2型アデノウイルスの E2A、E4、VARNA 遺伝子をクローニングしたアデノウイルスヘルパープラスミド。

これら3種類のプラスミドをリン酸カルシウム法にて 293T/17 細胞にトランスフェクションする。トランスフェクション3日後、細胞を回収し凍結融解酸抽出による操作によって細胞内の AAV ベクターを遊離させ、ベンゾナーゼ処理、PEG 処理による粗精製後、塩化セシウム密度勾配超遠心によって精製する。最終濃度 0.05%未満の Poloxamer 188 ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコールを含む pH7.4 の PBS (Phosphate-buffered Saline) にさらに最終

	濃度 200mM となるように塩化ナトリウムを加えた溶液により、タンジェンシャルフロー・フィルトレーションにより過濃縮し、0.22 μm のフィルターで滅菌処理を行いウイルスベクター液とする。 ③ AAV-hAADC-2 の構造 AAV ベクター AAV-hAADC-2 は両末端の ITR は野生型と同じであるがその間にはヒト AADC を発現させるための、サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー、ヒト β グロビンイントロン、ヒト AADC 遺伝子、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルに置換されており、Rep、Cap をコードする配列は持たない。 ④ AAV-hAADC-2 の生物学的特徴 AAV はヘパラン硫酸プロテオグリカンを受容体として感染する。この分子は様々な細胞表面に存在すると考えられるため AAV の組織特異性は低い。人以外の動物でも感染が成立すると考えられている。AAV ベクターは神経細胞、肝臓、骨格筋、心筋などで効率の良い遺伝子発現が起こる。一本鎖ベクターゲノムは核内でその相補鎖とアニールしたり、宿主の DNA 合成酵素の働きで二本鎖となり導入遺伝子を発現できるようになる。また、二本鎖となったベクター DNA は複数が連なり環状 DNA を形成したり、コンカタマーを形成し、その一部が染色体に組み込まれると考えられる。AAV ベクターにより分裂細胞、静止期の細胞双方に遺伝子導入が可能であるが、発現様式に違いがある。分裂細胞では宿主 DNA 合成酵素の働きで発現型二本鎖に変換され感染直後より良好な導入遺伝子の発現が認められる。染色体に組み込まれていない導入遺伝子は細胞分裂に伴い希釈され失われてゆき、染色体に組み込まれた導入遺伝子を持つ細胞が最終的に長期発現を維持する。一方静止期細胞では相補鎖同士のアニールが二本鎖ゲノムの主たる合成経路と考えられ、約 1 ヶ月程かかって徐々に導入遺伝子の発現が上昇してゆき、染色体外でコンカタマーの形態で長期間にわたって安定に保持される。動物実験では年余にわたる導入遺伝子の発現も報告されている。AAV ベクターゲノムの染色体での組込み部位は、rep 遺伝子を欠いているため AAVS1 領域へは組み込まれず、ランダムに組み込まれるが、その組込み効率は極めて低いと考えられている。マウスでの肝臓での組込み部位の解析では組込みは遺伝子存在領域に組み込まれていることが多く、組込み部位近傍のゲノムが約 2 kb 程まで欠失していることもある。ITR は弱いながらプロモーター活性を持つが、内向きにプロモーター活性を持ち、また染色体への組込みに伴い欠失することが多く、組込み部位近傍の遺伝子の発現を誘導する可能性は少ない。	
変 更 時 期	変更承認取得後	
変 更 内 容	研究計画書における 該 当 箇 所	変更の概要及びその理由
	1. 対象患者選択・除外基準の変更 ① 対象年齢を 4 歳以上から 2 歳以上に引き下げ。 ② 選択基準から、乳児期発症で典型例であることを削除し、除外基準から、歩行可能な軽症例を削除。 ③ 内服薬変更禁止期間の前 2 か月から 1 か月へ短縮。	① 骨の柔らかい低年齢の児には従来の機器を用いての定位脳手術は困難と考えられ、報告の多い 4 歳以上からの実施にしていた。新たな技術の導入により、2 歳以上で可能と判断されたため。 ② 軽症例でも、ジストニアの軽減やさらなる運動機能の改善が期待され、実施した 4 例で大きな有害事象は起きていないため、実施意義はあると考えられる。十分な説明の上、希望が強い患者さんに実施出来る様にする。実施にあたっては、評価部会の審議を経て実施する。 ③ 状態により、こまめに内服薬の変更が必要な患者がいる。前 1 か月変更禁止でも、十分、効果と有害事象の評価は可能と考えられ、短縮する。

	2. 対象症例数の増加	実施例を申請時に診断されていた4例、新たな患者が診断された場合は追加実施する、としていた。その後、2例診断されており、今後の患者増にも対応するため、8例とする。
	3. 術後隔離期間の3日から2日に短縮	術後、ベクターゲノムが排出され、拡散する危険性を考え、陰圧個室隔離として、血液、尿のPCRで3回(3日)連続して陰性の場合に隔離解除にしていた。頭蓋内への局所注入のため、理論上血中への移行やウイルス排出の可能性はほとんどないが、実際にこれまでウイルス排出を解析した14例(AADC欠損症6例及びパーキンソン病8例)において、投与翌日から血中及び尿中にベクターが検出された事例は皆無だった。よって、術後2日間、血液のPCRでゲノムが検出されなかった場合に隔離解除としたい。
	4. 術前、術後の観察、検査実施期間の許容範囲の拡大	術前検査として、PETやMRIなど、変化が少ない検査は実施期間を拡大する。PETは、特に、選択基準にもなっており、ギリギリに検査して、評価部会に急ぎ審査していただいていた。検査可能期間を延長し、余裕を持って審査していただくことや、全身麻酔での実施が必要な検査を、慌ただしく実施することや検査後に手術が延期になった場合に検査再実施を避けるなどのため。また、術後評価のための検査も余裕を持って実施し、休日等で過密になることを避けたい。 全身状態の把握のための血液検査等は必要期間に実施する。
	5. モニタリング・監査の実施	実施にあたっては、評価部会の審議を受けて実施し、実施後も報告していた。 臨床研究の新基準に従い、今後、モニタリングと監査も実施する。
今後の研究計画	現在、診断されているAADC欠損症患者2名、2歳男児および19歳男性、に対し、同意が得られた場合、順次遺伝子治療実施する。 また、新たな患者が診断されたら実施する。	
これまでの研究結果及び研究結果の公表状況	2015年6月から2017年7月にかけて、6例に治療実施した。6例とも運動機能の改善、ジストニアの消失、眼球上転発作の減少などの効果が得られた。有害事象として、動作時の舞踏病様運動が軽度から中等度見られたが、一時的で軽快傾向になっている。 これらの結果は、学会等で発表し、また、市民にも公開したシンポジウムも実施した。現在、論文作成中である。	
備考 (共同研究機関の実施状況等)		

(注意)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格A列4番とすること。
2. この報告書は、正本1通及び副本2通を提出すること。
3. 字は墨・インク等を用い、楷書ではっきり書くこと。
4. 各項目数行程度で簡潔に記載すること。記載欄に記載事項のすべてを記載できない時は、その欄に「別紙()のとおり」と記載し、別紙を添付すること。
5. 多施設共同臨床研究に該当する場合は、備考欄に共同研究機関における同様の変更の実施状況(実施の有無、変更時期)を記載すること。

別紙様式第1の添付

遺伝子治療臨床研究 実施計画 概要書

		平成 29 年 10 月 2 日	(申請年月日)
研究の名称		AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究	
研究実施期間		最終登録症例にベクターを投与した時点から9か月後まで	
総括責任者	所属部局の所在地	栃木県下野市薬師寺 3311-1 (郵便番号 329-0498)	
	所属機関・部局・職	自治医科大学医学部小児科学・教授	
	氏 名	山 形 崇 倫	
実施の場所	所 在 地	栃木県下野市薬師寺 3311-1 (郵便番号 329-0498)	
	名 称	自治医科大学附属病院 病院長 佐田 尚宏	
	連 絡 先	栃木県下野市薬師寺 3311-1 (電話番号 0285-44-2111)	

総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	・ 村松慎一	自治医科大学・神経内科学部門・教授	副責任者。適応患者の選択・評価およびウイルスベクターの管理、PET解析
	・ 小澤敬也	自治医科大学・免疫遺伝子細胞治療学・客員教授	ウイルスベクターに関する全般管理
	・ 小坂仁	自治医科大学・小児科学・教授	副責任者。患者の管理・評価
	・ 川合謙介	自治医科大学・脳神経外科学・教授	脳内へのベクター注入の管理・助言
	・ 中嶋剛	自治医科大学・脳神経外科学・講師	遺伝子導入のための定位脳手術実施
	・ 五味玲	自治医科大学・脳神経外科学・教授	遺伝子導入の定位脳手術、術後管理
	・ 水上浩明	自治医科大学・遺伝子治療研究部・教授	ウイルスベクターの管理・検出
	・ 竹内護	自治医科大学・麻酔科学・集中治療医学・教授	麻酔・術後管理
	・ 多賀直行	自治医科大学とちぎ子ども医療センター小児手術・集中治療部・准教授	麻酔・術後管理
	・ 門田行史	自治医科大学・小児科学・准教授	患者の管理・評価
	・ 小島華林	自治医科大学・小児科学・助教	患者の管理・評価
	・ 松本歩	自治医科大学・小児科学・助教	患者の管理・評価
	・ 宮内彰彦	自治医科大学・小児科学・大学院生	患者の管理・評価
	・ 中村幸恵	自治医科大学・小児科学・大学院生	患者の管理・評価
	・ 嵯峨 泰	自治医科大学・遺伝子治療研究部・准教授	ウイルスベクターの管理・検出
	・ 吉尾卓	自治医科大学・臨床研究支援センターとちぎ臨床試験推進部・部長	試験実施の支援
	・ 山崎晶司	自治医科大学・臨床研究支援センターとちぎ臨床試験推進部・副部長	試験実施の支援 患者ケア、試験実施の支援

総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	・高津戸文江 ・山口文江 ・加藤光広 ・中村和幸 ・久保田哲夫 ・井手秀平 ・益山龍雄 ・一瀬宏 ・佐藤俊彦 ・峰野純一	自治医科大学附属病院臨床研究支援部 臨床研究コーディネーター 自治医科大学附属病院臨床研究支援部 臨床研究コーディネーター 昭和大学医学部・小児科学・講師 山形大学医学部・小児科学・特任助教 安城更生病院・小児科・小児神経科部長 東京都立北療育センター城南分園・園長 東京都立東部療育センター・小児科診療部長 東京工業大学生命理工学研究科・教授 宇都宮セントラルクリニック・院長 タカラバイオ株式会社 バイオ産業支援事業 部門・本部長	患者ケア、試験実施の支援 患者ケア、試験実施の支援 対象患者の治療前および安定後の診療 対象患者の治療前および安定後の診療 対象患者の治療前および安定後の診療 対象患者の治療前および安定後の診療 対象患者の治療前および安定後の診療 ベクター品質評価・患者検体解析 PET 実施 ベクターに関する技術支援
審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	審査委員会では、提出された遺伝子治療臨床研究実施計画書「AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究」を慎重に審査した結果、本遺伝子治療臨床研究実施計画書は、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号、平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号により全部改正、平成 20 年文部科学省告示第 2 号により一部改正以下「国の指針」という。）の必要条件を全て満たしていると認められたため、所管官庁に遺伝子治療臨床研究実施計画を申請することを決定した。		
	審査委員会の長の職名		氏名
	自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 委員長 自治医科大学医学部機能生化学部門 教授		遠藤 仁司 
研究の区分	○遺伝子治療臨床研究 遺伝子標識臨床研究		

4 遺伝子治療臨床研究の目的	本臨床研究は、ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(AADC)欠損症患者の線条体(被殻)に、ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) 遺伝子を組み込んだ2型アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus : AAV) ベクターを定位脳手術的に注入し、その安全性を検証するとともに、運動症状を改善することを目的とする。
5 遺伝子治療臨床研究の対象疾患およびその選定理由	(1) AADC 欠損症の現状と遺伝子治療臨床研究を選定する理由 ① AADC 欠損症に関する現時点での知見 AADC 欠損症 (OMIM608643)は、カテコールアミンとセロトニンを合成する酵素である AADC をコードする遺伝子の変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。 現在、世界中で報告例は 100 症例未満である。日本では、<u>本遺伝子治療臨床研究の申請時 (2014 年 7 月) には 4 例診断されていたが、新たに 2 例診断された。脳性麻痺との鑑別が困難な場合もあり、正しく診断を受けていない症例も多いと考えられ、さらに症例は増えると考えられる。</u> AADC は、チロシンからチロシン水酸化酵素により生成された L-dopa をドパミンに、また、トリプトファンからトリプトファン水酸化酵素により生成された 5-OH-tryptophan をセロトニンに代謝する酵素で、ドパミンからは、ノルエピネフリン、エピネフリンが合成されるため、これらのカテコールアミン全体が低下する。また、セロトニンからメラトニンが合成されるために、メラトニンも低下する。 AADC 欠損症は、カテコラミンとセロトニンの合成が障害されることにより、乳幼児期に重度の運動障害で発症する。筋緊張低下、眼球上転発作を主症状とし、知的障害、発達の遅れ、運動異常、体温異常、摂食困難などを伴う。また、メラトニン低下による睡眠障害も来す。 発症年齢は、典型例では生後 1 か月以内に、過半数が 6 か月以下で発症する。新生児期には、筋緊張低下、哺乳困難、易刺激性、眼瞼下垂、低血圧、低血糖などを呈し、その後、運動障害を主体とした症状が出現してくる。主症状は、眼球上転発作あるいは注視痙攣、四肢ジストニア、全身性アトーゼ、随意運動の障害、ジストニア発作、重度精神運動発達遅滞などである。てんかんの合併例も報告されている。また、自律神経機能障害による、心拍・血圧の調整障害、発作性発汗、唾液分泌増加や、情緒不安定、睡眠障害もみられる。生下時から動きが少なく、頭定が得られず、生涯臥床状態である患者がほとんどである。重症例では、症状の進行とともに嚥下困難や呼吸障害が出現し、多くの例が小児期に死亡する。台湾での死亡例 10 例の平均死亡年齢は 4.6 ± 2.0 歳 (1.0 - 7.0 歳) と報告されている。画像所見として、頭部 MRI 上、24%で大脳萎縮、白質変性様の所見、脳梁ひ薄化等の異常が報告されているが、大半の例では有意な所見を示していない。PET (2-deoxy-2[^{18}F] fluoro-D-glucose 使用)で、前頭前野皮質と両側基底核の糖代謝の低下が示されている。また、PET で判る活性評価として、AADC の基質である fluorodopa (FDOPA) をラベルした 6-[^{18}F]fluorodopa (FDOPA)—PET で FDOPA の基底核への取り込みが低下している。 線条体の機能不全はAADC欠損症の主な運動症状であるジストニアと随意運動の障害の原因となり、前頭前野の機能不全が精神遅滞症状をひきおこす原因の一つとなっていると考えられる。 診断は、上記の臨床症状などから疑われた例に対し、髄液中のカテコールアミン代謝産物を測定する。L-dopa 高値、homovanillic acid 低値の特徴的所見が得られた場合、AADC 欠損症と診断する。確定診断は、血漿中あるいはリンパ球等での AADC 活性の低下、あるいは AADC 遺伝子変異同定が必要である。 ② 当該遺伝子治療臨床研究の概要 AADC 遺伝子を搭載した AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を AADC 欠損症患者の線条体(被殻)に定位脳手術的に注入する。AADC はそれぞれドパミンおよびセロトニンの前駆体である L-dopa および 5-HTP を特異的基質とする酵素であり、AADC を注入することにより、ドパミンやセロトニンの欠乏状態が改善される。本臨床研究では、黒質-線条体路の投射先である被殻の背外側部に選択的に AAV-hAADC-2 を注入するので、

	主に黒質-線条体路のドーパミン活性が上昇することにより、運動機能を中心に症状の改善が期待される。 ③ 他の治療法との比較および遺伝子治療を選んだ理由 AADC 欠損症の軽症例に対しては、薬物療法により運動機能が改善した報告がある。また、基質結合部位に変異を持つ例で L-dopa 内服によりジストニア、筋緊張低下と発語が改善し、歩行が可能になった例が報告されている。しかし、典型例では、ジストニアや筋緊張低下がやや改善した例はあるが、運動発達が得られた例はなく、全く反応がない例がほとんどであり現状では、AADC 欠損症に対する有効な治療法はない。 AADC 欠損症に対する新しい治療戦略として画像上、構造的な異常が検出されず、機能的な異常が主体でありドーパミン、セロトニン系の機能を改善することにより、脳機能の回復する可能性が考えられ、遺伝子治療による機能回復が期待されている。 2012 年に、台湾から、遺伝子治療成功例が報告された。方法は、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を AADC 欠損症患者の線条体 (被殻) に、定位脳手術的に注入した。治療効果として、臥床状態から立位可能になった患者もあるなど、運動機能に関して著明な改善を得た。副作用は、一過性のジスキネジアとチアノーゼを伴う無呼吸発作の反復があったが、これらの副作用はいずれも軽快した。これらの点から、また、患者家族からの強い希望もあり、遺伝子治療研究実施を計画した。
6 遺伝子の種類及びその導入方法	(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質 ① 人に導入する遺伝子の構造 ヒト AADC 遺伝子は第 7 染色体上に位置する 85,000 塩基対以上におよぶ大きな DNA で、メッセンジャー RNA に対応する 15 のエキソンからなり、各々のエキソンは 20 ないし 400 の塩基対、イントロンは 1,000 ないし 17,700 塩基対の長さである。本臨床研究ではメッセンジャー RNA から逆転写で合成されたヒト AADC の相補的 DNA を治療遺伝子として用いる。 ② 人に導入する遺伝子の性質 2 型 AAV 由来のベクターに神経細胞で安定に遺伝子を発現するサイトメガロウイルス由来のプロモーター配列を組み込み、その下流に配置した AADC 遺伝子を発現させる。導入遺伝子が AAV ベクターにより染色体に組み込まれる可能性は極めて低く、導入遺伝子は基本的に染色体外に存在すると考えられている。AAV ベクターは、非分裂細胞では染色体へ組み込まれることはほとんどないが、分裂細胞では active site に入る可能性がある。小児では、脳内にも分裂細胞が少数ながらもあり、また、血中に入れば肝臓で分裂細胞に組み込まれる可能性は否定出来ない。しかし、小児でこれらを確認した報告はなく、実際に起こるかどうか明かではない。 AAV ベクター内では導入遺伝子は一本鎖 DNA であるが、細胞内で二本鎖 DNA に変換され導入遺伝子が発現する。ラットでは、この AAV ベクターによる発現は 1 年以上持続することが示唆され、サルにおいても遺伝子導入の効果が 3 年以上持続することが示されている。さらに米国で実施された Neurturin 遺伝子治療の臨床試験に剖検例では、4 年後にも Neurturin 遺伝子の発現が確認されている。 ③ 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性 AADC は 53.9kDa の二量体として存在し、ドーパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の合成に関わっている。この酵素は、チロシン水酸化酵素により生合成された L-dopa の脱炭酸によりドーパミンを合成する。本臨床研究では、経口投与する L-dopa の投与量を調節することにより、AADC によるドーパミンの合成量を制御することが可能である。また、AADC はトリプトファン水酸化酵素により生合成された 5-HTP の脱炭酸によりセロトニンを合成するが、AADC により内因性の 5-HTP から生成されるセロトニンの量は生理的範囲内である。 (2) 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質 本計画では他の組換え DNA は使用しない。 (3) 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに当該細胞を標的細胞とした理由 AADC 欠損症では、ドーパミン、セロトニンを合成する AADC 自体が欠損しているた

めに、脳内のドパミン、セロトニンが減少している。特に、ドパミンの作用として最も主要である黒質-線条体路が運動機能の調節に重要である。よって、黒質-線条体路の投射先である被殻の神経細胞を標的として遺伝子導入を行うことが、治療効果を得るために効果的であると期待される。本計画では安全性を考慮し、被殻に存在する自己の神経細胞を標的として遺伝子導入を行い、ドパミンを産生させる。

(4) 遺伝子導入方法の概略および当該導入法を選択した理由

神経細胞に遺伝子導入する場合には、①非分裂細胞である神経細胞に目的遺伝子を効率よく導入できること、②導入遺伝子が長期間にわたり発現すること、③生体に対して安全であること、が求められる。アデノウイルスベクターは細胞障害性が強く、導入遺伝子の発現が一過性である。レンチウイルスベクターは非分裂細胞に遺伝子を導入可能であるが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) を基本骨格としており、前臨床試験において十分に研究されておらず安全性の面で劣る。AAV ベクターは神経細胞に効率よく遺伝子を導入できること、細胞毒性が少なく、静止期細胞で長期間発現が望めること、非病原性のウイルスを基本骨格としていることから上記3条件を満たす。霊長類の AAV には2型をはじめとして100以上の血清型が報告されており、2型 AAV は比較的特異的に神経細胞で導入遺伝子が発現する。2型 AAV ベクターは臨床研究に最も広く使用されており、血友病に対して第IX凝固遺伝子発現 AAV ベクターの骨格筋および肝臓への注射、パーキンソン病に対してグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 発現 AAV ベクターを視床下核に注入する臨床研究および神経栄養因子である neurturin 発現 AAV ベクターを被殻に注入する臨床研究が既に行われている。以上のことから今回の臨床研究では2型 AAV ベクターを利用するのが最適と考えられる。

(5) ウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合

① AAV-hAADC-2 の野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響

2型 AAV はパルボウイルス科デPENDウイルス属に分類される直径約26 nm のエンペロープを持たない球形ウイルスである。VP1 (82 kDa)、VP2 (65 kDa)、VP3 (60 kDa) が1:1:10の比率で合計60分子が集まって約3,600 kDaのキャプシドを構成している。ゲノムは4,679ヌクレオチドからなる一本鎖DNA (約1,500 kDa) であり、プラスとマイナス鎖がほぼ同じ比率で混在する。ゲノム両末端145ヌクレオチドはT字型ヘアピン構造を形成しており inverted terminal repeat (ITR) と呼ばれる。AAV ゲノムには rep と cap 遺伝子がありそれぞれ非構造蛋白質とキャプシド蛋白質をコードしている。AAV はアデノウイルス、ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下でのみ増殖でき、単独では増殖できない。単独で細胞に感染した場合、第19番染色体の AAVS1 領域 (19q13.42) に特異的にそのゲノムを組み込み、潜伏感染の状態となる。ヘルパーウイルスと同時に感染したり、潜伏感染状態でヘルパーウイルスが感染したときに AAV の増殖が起こる。2型 AAV は呼吸器を主たる感染経路として人から人へ感染するとされている。大部分は不顕性感染で AAV の感染に伴う特有の疾患は報告されておらず、非病原性と考えられている。米国での調査によると出生直後は AAV に対する抗体は検出できないが、学童期で人口の50%以上で抗体が陽性となる。rep 遺伝子より合成される Rep 蛋白質は過剰発現すると細胞増殖を抑制したり、ヘルパーウイルスを含めた他のウイルスの複製も抑制する。ウイルス粒子は物理化学的に極めて安定で、pH 3 から9の間で不活化されず、また56℃1時間の処理でも不活化されない。

② AAV-hAADC-2 の作製方法

AAV-hAADC-2 の作製には、以下の3種類のプラスミドを使用した。

- 1) pAAV-hAADC-2 : サイトメガロウイルスのプロモーター、βグロビンイントロン、ヒト AADC cDNA、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルからなる AADC 発現カセットを AAV2 の ITR 間に挿入した AAV ベクタープラスミド。
- 2) pRC-BI-khB342-2 : AAV ゲノムの ITR を除き AAV2 の rep、cap 遺伝子をクローニングした pRC2 の SnaBI サイトに、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットを挿入した AAV2 ヘルパープラスミド。なお、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットは、バイディレクショナルに2種の遺伝子を発現可能な pBI-CMV1 のマルチクローニングサイト2か所にそれぞれ、ヒト BclXL cDNA 及び hsa-miR342 をクローニング後、発現カセットごと PCR で増幅したものである。

	3) pHelper: 2 型アデノウイルスの E2A、E4、VARNA 遺伝子をクローニングしたアデノウイルスヘルパープラスミド。 これら3種類のプラスミドをリン酸カルシウム法にて 293T/17 細胞にトランスフェクションする。トランスフェクション 3 日後、細胞を回収し凍結融解抽出による操作によって細胞内の AAV ベクターを遊離させ、ベンゾナーゼ処理、PEG 処理による粗精製後、塩化セシウム密度勾配超遠心によって精製する。最終濃度 0.05%未満の Poloxamer 188 ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコール)を含む pH7.4 の PBS (Phosphate-buffered Saline) にさらに最終濃度 200mM となるように塩化ナトリウムを加えた溶液により、タンジェンシャルフロー・フィルトレーションによりろ過濃縮し、0.22 μm のフィルターで滅菌処理を行いウイルスベクター液とする。 ③ AAV-hAADC-2 の構造 AAV ベクター AAV-hAADC-2 は両末端の ITR は野生型と同じであるがその間にはヒト AADC を発現させるための、サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー、ヒト β グロビンイントロン、ヒト AADC 遺伝子、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルに置換されており、Rep、Cap をコードする配列は持たない。 ④ AAV-hAADC-2 の生物学的特徴 AAV はヘパラン硫酸プロテオグリカンを受容体として感染する。この分子は色々な細胞表面に存在すると考えられるため AAV の組織特異性は低い。人以外の動物でも感染が成立すると考えられている。AAV ベクターは神経細胞、肝臓、骨格筋、心筋などで効率の良い遺伝子発現が起こる。一本鎖ベクターゲノムは核内でその相補鎖とアニールしたり、宿主の DNA 合成酵素の働きで二本鎖となり導入遺伝子を発現できるようになる。また、二本鎖となったベクター DNA は複数が連なり環状 DNA を形成したり、コンカタマーを形成し、その一部が染色体に組み込まれると考えられる。AAV ベクターにより分裂細胞、静止期の細胞双方に遺伝子導入が可能であるが、発現様式に違いがある。分裂細胞では宿主 DNA 合成酵素の働きで発現型二本鎖に変換され感染直後より良好な導入遺伝子の発現が認められる。染色体に組み込まれていない導入遺伝子は細胞分裂に伴い希釈され失われてゆき、染色体に組み込まれた導入遺伝子を持つ細胞が最終的に長期発現を維持する。一方静止期細胞では相補鎖同士のアニーリングが二本鎖ゲノムの主たる合成経路と考えられ、約 1 ヶ月程かかって徐々に導入遺伝子の発現が上昇してゆき、染色体外でコンカタマーの形態で長期間にわたって安定に保持される。動物実験では年余にわたる導入遺伝子の発現も報告されている。AAV ベクターゲノムの染色体での組込み部位は、rep 遺伝子を欠いているため AAVS1 領域へは組み込まれず、ランダムに組み込まれるが、その組込み効率は極めて低いと考えられている。マウスでの肝臓での組込み部位の解析では組込みは遺伝子存在領域に組み込まれていることが多く、組込み部位近傍のゲノムが約 2 kb 程まで欠失していることもある。ITR は弱いながらプロモーター活性を持つが、内向きにプロモーター活性を持ち、また染色体への組込みに伴い欠失することが多く、組込み部位近傍の遺伝子の発現を誘導する可能性は少ない。
7 安全性についての評価	(1) 遺伝子導入方法の安全性 ① 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの純度 AAV ベクター AAV-hAADC-2 は、パッケージング細胞 293T/17 に 3 種類のプラスミドを導入し産生する。AAV ベクター AAV-hAADC-2 を安定かつ安全に供給するために、細胞ならびにプラスミドにはセルバンクシステムを使用する。293T/17 のマスターセルバンク (MCB) は、シードセル (ATCC CRL-11268) より、ワーキングセルバンク (WCB) は 293T/17 の MCB より、タカラバイオ株式会社 (滋賀県大津市瀬田 3-4-1) の GMP 製造施設の管理区域で製造する。また、プラスミドのマスターワーキングセルバンク (MWCB) は、株式会社 AMBiS (沖縄県南城市大里宇大里 2013) の GMP 製造施設の管理区域で製造する。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生国産のものを使用する。 ② 患者に投与する AADC 遺伝子の純度およびその安全性 ベクターは (最終濃度 0.05 %未満の Poloxamer 188 を含む pH 7.4 の PBS にさらに最終濃度 200mM となるように塩化ナトリウムを加えた溶液) 内に浮遊しており、患者に

投与するには必要に応じて PBS でベクター溶液を希釈する。PBS はリン酸水素二ナトリウム-リン酸二水素カリウム緩衝生理食塩水である。これらの物質はいずれも国内で医薬品添加物としての使用実績があり、国内承認経口医薬品、欧州薬局方もしくは米国医薬品集の生物学的製剤の製造に適合する製品、又は cGMP 下で製造された製品を使用する。いずれも同一投与経路での承認前例は無いが、静脈内投与、筋肉内投与あるいは皮下注射等での最大使用量を超えない投与量にて使用する。

③ 増殖性ウイルス出現の可能性

元来野生型の AAV は単独では複製できず、複製するためにはアデノウイルスや単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在を必要とする。さらに AAV ベクターは構築の段階でウイルス由来の遺伝子の大部分が除去されているため、ヘルパーウイルスが存在しても複製することはできない。唯一の可能性としてベクター作製時に非相同組換えにより増殖性ウイルスが出現することが考えられるが、ITR をコードする DNA 断片と Rep、Cap をコードする DNA 断片は異なったプラスミド上にあり、その可能性は極めて低いと考えられる。AAV ベクター AAV-hAADC-2 の試験項目に replication competent AAV 否定試験が含まれており、増殖性ウイルス陰性の AAV ベクターのみ臨床使用する。

④ 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの細胞傷害性

AAV ベクターを用いた場合の細胞傷害性は一般に低い。本臨床研究に用いる濃度以上の AAV ベクターをサル脳の脳内に注入した前臨床研究では、細胞傷害性は認められなかった。これまで血友病 B に対して行われた臨床研究においては、AAV ベクターの肝臓への遺伝子導入を行った 2 例で軽度の肝逸脱酵素の一過性上昇が認められたが、骨格筋内への注入では悪影響は認められていない。パーキンソン病に対する AAV ベクターによる遺伝子治療については、これまでにベクターに関連する副作用は報告されていない。今回の治療により細胞傷害が起こる可能性は極めて低いものと考えられる。

⑤ 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

AAV ベクターを用いた血友病 B の臨床研究において、肝動脈経路でベクターを投与した際に、数週間精液中へのベクターの排出が認められた。しかしながら、その後の検討で、生殖細胞に対して高力価のベクターを作用させた場合にも、遺伝子導入が起こる可能性は極めて低いことが示された。本臨床研究では血友病の臨床研究に用いられた量のおおよそ 1/100 程度の量のベクターを頭蓋内に局所投与するものであり、標的とした神経細胞以外に顕著な遺伝子導入が起こる可能性は低い。サルの脳へのベクター投与実験（最大投与量： 4.35×10^{10} vg）では脾臓、心臓、肝臓、卵巣へのベクターゲノムの取込みは認められなかった。

⑥ 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究では血友病の臨床研究に比べて極めて少ない量のベクターを局所に投与することから、ベクターを投与した患者から有意な量のベクター排出がみられる可能性は低いと考えられる。しかし、ベクターが排出された場合には、本臨床研究の対象となる患者以外に感染する可能性を否定することはできない。ベクター拡散の可能性を最小限にするために、本臨床研究の対象患者はベクター投与後一定の方法で隔離する。また、患者の血液は PCR 法でベクター DNA が陰性になるまで検査する。なお、当施設で実施されたパーキンソン病遺伝子治療臨床研究においては、被験者 6 人全員 3 日間体外へのベクターの排出が認められないことを確認した後、一般病棟へ移動した。

⑦ 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

AAV ベクターは遺伝子が導入された細胞の染色体に組み込まれる可能性があるが、その確率や程度は著しく低いものと推定される。宿主細胞の DNA に組み込まれた結果として最も懸念されるのは、外来遺伝子の挿入によりがん遺伝子が活性化したり、がん抑制遺伝子が不活化されたりすることで発がんの危険性が高まることである。遺伝子導入の結果として染色体内へ遺伝子が組み込まれる可能性は完全には否定できないが、極めて低いものと思われる。また、今回遺伝子導入の標的とするのは非分裂細胞と考えられる神経細胞であることから、遺伝子を導入した細胞が腫瘍化する危険性は低いものと考えられる。

⑧ がん原性の有無

	元来、非常に高率（～80%）に肝細胞癌を生じるマウスに AAV ベクターを投与した際に、肝細胞癌の発生率が上昇したという報告があるが、通常の動物では癌原性はほとんどないと考えられる。 (2) 遺伝子産物の安全性 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る。この酵素は L-dopa をドパミンに変換する働きを有するので、原料である 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。したがって本臨床研究では、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。 (3) 細胞の安全性 ① 培養細胞の純度 293T/17 細胞はタカラバイオ株式会社の GMP 製造施設における管理区域内でマスターセルバンク並びにワーキングセルバンクが作製されて使用される。各セルバンクの品質試験において、細菌、真菌、マイコプラズマ、ウイルス等による汚染の有無についてテストされ、安全性が確認されている。細菌および真菌については直接培地に接種する培養法により、細菌、真菌の発現を認めず安全であることが確認された。マイコプラズマに関しては寒天培地及び液体培地を用いた培養法および Vero 細胞を用いた DNA 染色法のいずれでも検出されず安全であることが確認された。ウイルスについては MCB を検体として <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> でウイルスの増殖試験を行ったがウイルスの感染を示す徴候は検出されず 293T/17 細胞の安全性が確認された。 ② 細胞の遺伝子型、表現型の安定性 複数の細胞内酵素 (Nucleoside phosphorylase (NP)、Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)、Malate dehydrogenase (MD)、Aspartate aminotransferase (AST)) の発現パターンを電気泳動法によって比較し、他種の細胞の混入の有無をテストし、混入を認めないことを確認している。また実際のベクター作製には 293T/17 ワーキングセルバンクを用いており、表現型が安定している細胞をベクター作製に使用している。 ③ 被検者に投与する細胞の安全性 被検者には細胞成分を投与することはない。
8 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	台湾において、本臨床研究と同じベクターを用いた AADC 欠損症に対する遺伝子治療実施例が 4 例報告され、効果が得られている。また、重篤な副作用は報告されていない。 当施設で、本臨床研究と同じベクターを用いたパーキンソン病に対する遺伝子治療が 6 例に対して施行し、既に安全性と有効性を確認している。うち 1 名に手術後、静脈性脳出血が認められたが、総括責任者はカニューレの挿入に伴う外科的手技が原因と判断し、AAV ベクターとの関連性は否定された。2015 年に新たな計画で同じベクターでの治療が再開された。治療を受けたパーキンソン病患者 1 名が、治療後 6 週間の時点で突然死した。治療後の経過は順調で、パーキンソン病の他にとくに症状はなかった。病理解剖では脳のベクター注入部位に出血などの病変はなく、心臓や肝臓などの全身の臓器にも死因となる病変は認められなかった。これらの経緯や病理所見について自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会において審議が行われた。この委員会では、上記の所見に加え、パーキンソン病では死因は不明であるものの突然死の頻度が 14% (6/44 例) あるという他施設の報告も考慮された結果、遺伝子治療と今回の 1 人目の方の突然死との間には因果関係は認められず、遺伝子治療を継続することに問題はないとされた。 また世界的に、AAV ベクターを使用した血友病、嚢胞性線維症、その他多くの疾患に対する臨床試験が行われており、これまで 2 型 AAV ベクターに関連した副作用は報告されていない。本臨床研究の遂行には、DNA 技術をはじめとする遺伝子工学、パーキンソン病診療、定位脳手術に精通した専門家の協力が必要である。術後管理に関しても、治療後は状態が安定するまで自治医科大学とちぎ子ども医療センター PICU で管理する。当

	施設はこの条件を満たし、綿密な協力体制が出来上がっており、遺伝子治療臨床研究の実施が可能である。
9 遺伝子治療臨床研究の実施計画	(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画 本臨床研究は抽出を行わない単一用量非対照オープン試験である。 ① 研究の目的 本臨床研究の主要評価項目は、AADC 欠損症患者被殻内への AAV-hAADC-2 注入療法の安全性である。副次的評価項目は、① AAV-hAADC-2 注入療法の有効性であり、その判定は発作記録と臨床的評価に基づいて行う。かつ、②被殻注入 AAV-hAADC-2 の発現量も副次的評価項目とし、FMT-PET によって判定する。 ② AAV-hAADC-2 の投与 AADC 欠損症患者の線条体（被殻）に、定位脳手術の手法によって AAV-hAADC-2 を注入する。AAV-hAADC-2 の注入量は 1×10^{12} vg/mL の濃度で、1 箇所あたり最大 50 μL を被殻内の 4 箇所に分けて注入する。具体的には片側の被殻あたり 2 箇所、両側で計 4 箇所に各々最大 50 μL を注入する。注入量（vector genomes : vg）は 1 症例あたり 200 μL で 2×10^{11} vg である。 ③ 対象患者 対象は当院および研究協力機関に通院中で、髄液検査、酵素活性測定、あるいは遺伝子診断で診断が確定されている AADC 欠損症患者 8 例とする。治療実施時の年齢が 2 歳以上。新たに診断が確定した患者が出た場合には、追加実施を検討する。 ④ 評価項目（詳細は実施計画書に記載）。 1) 患者情報調査、2) 一般身体所見（バイタルサインを含む）、3) 神経学的所見（乳幼児神経学的検査チャートを使用）、4) Alberta Infant Motor Scale (AIMS)、5) 新版 K 式発達検査、6) 有害事象、7) 併用薬、8) 臨床検査（血液検査、凝固検査、生化学検査、免疫検査、PCR 分析）、9) 心電図、10) AADC のトレーサーである FMT を使用した脳の PET スキャン、11) 脳の MRI、CT、12) 脳波、13) 髄液検査 ⑤ 対象者の参加取り止め 全ての対象者は本臨床研究のいかなる時点においても、不利益を被ることなく、本臨床研究への参加を取りやめることができる。この場合であっても、安全性に関する経過観察は、対象者に受け入れ可能な方法で実施すべきものとする。 (2) 被験者の同意の取得方法 本臨床研究の対象者の主体は未成年者で、発語がなく書字も不可能で、意思表示が困難であるため、同意を得ることは不可能である。成人も対象になる可能性はあるが、治療対象者は、発語がないかあってもごくわずかであり、書字も不可能で、意思表示が困難であるため、こちらについても同意を得ることは不可能である。よって、親権者または後見人を代諾者として承諾を得る。被験者の親権者または後見人に対して、臨床治療研究実施医師より、臨床研究「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」参加のしおり（資料 2）を基にして十分な説明を行い、文書により同意を得る。 (3) 期間および目標症例数 実施期間は、最終登録症例にベクターを投与した時点から 9 ヶ月後までとする。ただし、5 年後までは一定の評価を行い、さらに 15 年後まで安全性に関して長期フォローする。目標症例数は 8 例とする。 (4) 遺伝子治療臨床研究の実施方法：詳細は実施計画書参照 ① 遺伝子導入方法（安全性および有効性に関する事項を除く） 被験者は治療開始 10 日前（Day -10）までに自治医科大学附属病院に入院する。遺伝子の導入は定位的脳手術法によって被殻へ直接注入投与する。全ての外科的手技は、不随意運動疾患を対象とした定位的機能神経外科手術の標準的手法に準ずる。原則として、手術は全身麻酔下を実施することとし、麻酔の実際は自治医科大学附属病院麻酔科による管理下で実施する。AAV-hAADC-2 の注入目標である被殻は手術に先だって

撮影するMRI画像に基づき解剖学的・空間的位置を同定する。

頭蓋骨への穿孔は頭蓋骨円蓋部に左右各々1ヶ所とし、そこを刺入点とし4つの目標部位にAAV-hAADC-2を注入投与する。穿孔位置は通常の定位的脳手術で穿頭する位置に準じて冠状縫合の前方、正中より約4 cmの位置を目安としMRI画像で脳表からAAV-hAADC-2注入部位までの経路にて脳血管を回避すべく適宜調整する。注入部位までの穿刺には定位的脳手術装置に取り付けたmicromanipulator を用いてAAV-hAADC-2注入用カニューレを目標点まで刺入する。通常の定位的脳手術手技に則り、X線透視装置でカニューレ先端位置を確認しながら実施する。

AAV-hAADC-2を含む溶液は、専用のシリンジポンプを用いて3 μ l/min の速度で注入する。2ヶ所目の注入が終了したらカニューレを抜去し、2番目の注入部位にカニューレを刺入する。一つの刺入経路で十分離れた2カ所の注入目標を確保することが困難な場合には、1カ所目の注入後にカニューレを抜去し、別の経路から刺入し直す。先と同様に AAV-hAADC-2 を含む溶液を標的部位に注入する。対側も同様に、1つの穿孔部から被殻内2ヶ所の目標部位に AAV-hAADC-2 を含む溶液を注入する。4ヶ所への注入が終了したら、カニューレを抜去した通常の穿頭手術に準じて閉創を行う。頭蓋から定位的脳手術用フレームを取り外して、全身麻酔から覚醒後に頭部 CT 検査を実施し穿刺部位の確認および頭蓋内出血などの合併症の有無を確認する。定位的脳手術装置を含め、手術に用いた全ての医療器具はウイルスの核酸に対する不可逆的アルキル化作用を有するエチレンオキサイドガスを用いた滅菌処理を施す。

② 臨床検査項目および観察項目

遺伝子導入手術後2週間 (Day 14) までは入院することとする。患者はスケジュールにしたがって評価と臨床検査を受ける。ベクター投与直後 2 日間は個室に隔離し、外出・外泊は認めない。なお投与後 2 日目の時点で PCR 法による検査でベクターDNA を認める場合には、ベクターDNA が陰性になるまで個室への隔離期間を延長する。陰性になれば、スケジュールにしたがって外来における観察を受けることとする。隔離解除後も、投与後 7 日以内の患者に咳嗽・気道分泌物増加等の呼吸器症状、嘔吐・下痢等の消化器症状、頻尿・発熱等の尿路感染症状等が出現した場合は、個室に再隔離し、血液及び分泌物のウイルス検査を行う。個室隔離は、これらの症状が軽快するまで又は検査にて本遺伝子組換え生物の陰性が確認されるまで、医師の判断により必要とされる期間継続する。

PET スキャンは Base line (Day -30~-1)、評価 9 (Month 6)、評価 19 (Month 24)、評価 31 (Month 60) に実施する。PET スキャンによって、それぞれの用量ごとにどれだけの AADC が発現したかを予測することが可能である。尚、Base line に関しては、血液、凝固検査、生化学検査以外は、状態に変化がなければ 3 か月前までの検査結果の使用を可能とする。

AAV カプシド蛋白質に対する抗体および AADC に対する抗体は、Base line、評価 9 (Month 6) に患者の血清を採取して測定する。

③ 予測される副作用およびその対処方法

a. ベクターによる合併症

炎症反応を惹起し、発熱などの全身症状や脳浮腫による痙攣や意識障害をきたす可能性は低いが完全に否定することは出来ない。患者を注意深く観察することによって合併症の発生をいち早く察知し、適切な処置をとる。

AAV-hAADC-2 ベクターの投与により、ウィルスカプシドに対する免疫反応が生じる可能性がある。その場合には、ベクター再投与の際に治療遺伝子の発現に影響が生じるおそれがあり、以降の AAV を使った治療の対象から除外されることも考えられる。

AAV ベクターが患者細胞の染色体に組み込まれる可能性は否定できないが、その確率は著しく低いものと推定される。万一、このような事態が生じた場合に最も懸念されるのは、発癌の危険性が高まることである。身体所見及び画像診断などを通じて、早期発見に努める。またベクターDNA が生殖細胞に組み込まれることは考えにくい、その可能性を完全に否定することはできない。

	b. 手術による合併症 定位脳手術は侵襲の少ない手技であるが、予期しない合併症を起こす危険は避けられない。全ての定位脳手術における手術合併症の報告は、ほとんど無症状のものを含めても成人では5%以下で、出血、感染および麻酔の合併症が主である。小児での実施数は多くなく、合併症は明瞭ではないが、4歳以上は成人同様に実施可能と考えられる。<u>さらに、2歳～3歳の患者に対しては、安全性の高い実施方法を導入して実施する。</u> c. AADC 遺伝子導入に伴う副作用 治療前は、脳内でドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンおよびセロトニンが欠乏している状態で、その前駆体である L-dopa や 5-HTP が過剰になっている状態である。そこに、代謝酵素を導入するために、カテコールアミン、セロトニンが急激に増加し、一過性にドパミン、セロトニン過剰による症状が出現する可能性がある。台湾での治療で一番多かったのは一過性のジスキネジアで、口部から顔面のジスキネジアで嚥下障害を来し、3か月間経管栄養を要した例もあった。また、チアノーゼを伴う無呼吸発作が10か月間反復した例もあった。 術直後はPICUで管理し、副作用に留意して、出現時には対応する。 ④ 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準および中止判定基準 有効性及び安全性の判定を客観的に行うため、第三者が入る有効性及び安全性の判定検討委員会を設置する。 <u>まだ、臨床研究の実施状況に関しては、適宜、モニタリングおよび監査を行う。</u> ⑤ 症例記録に関する記録用紙等の様式 本臨床研究の記録に関する様式（症例報告書）は、別に定める。 ⑥ 記録の保存および成績の公表の方法 本臨床研究に関連した記録は、自治医科大学付属病院において、研究の中止もしくは終了の後15年間保存する。また遺伝子治療臨床研究に関する指針に基づき、研究に関する情報は適切かつ正確に公開するように努め、かつプライバシーの保護を徹底する。これは、文部科学省・厚生労働省の「遺伝子治療臨床研究に関する指針」〔平成14年3月27日（平成16年12月28日全部改正）〕に則って行う。
備考	1) 被験者の同意取得について：被験者（代諾者）は本遺伝子治療臨床研究について文書に基づいて説明を受け、その内容と期待される治療効果および危険性を十分に理解し、自由意思にて同意した上で、同意書に署名したものとする。なお、被験者（代諾者）はその申し出により同意を撤回し、本遺伝子治療臨床研究への参加、あるいは継続を取りやめることができる。

遺伝子治療臨床研究実施計画書

課題名

「AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究」

自治医科大学医学部附属病院

第1版：2013年11月13日作成
第2版：2013年12月11日作成
第3版：2014年1月10日作成
第4版：2014年6月6日作成
第5版：2014年10月8日作成
第6版：2015年1月13日作成
第7版：2016年4月25日作成
第8版：2017年9月14日（案）

略語一覧

略語	英語表記	日本語表記
AADC	Aromatic L-amino acid decarboxylase	ヒト芳香族アミノ酸脱炭酸酵素
AAV	Adeno-Associated Virus	アデノ随伴ウイルス
AIMS	Alberta Infant Motor Scale	
Al-P	Alkaline Phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニン・アミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BCV	Bovine Corona Virus	牛コロナウイルス
BUN	Blood Urea Nitrogen	血中尿素窒素
CAP	Capsid	カプシド
CDIIT	Comprehensive Development Inventory for Infants and Toddlers	-
CT	Computerized Tomography	コンピュータ断層撮影
CMV	Cytomegalovirus	サイトメガロウイルス
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EBV	Epstein Barr Virus	エプスタイン・バー・ウイルス
FBS	Fetal Bovine Serum	牛胎児血清
FDOPA	Fluorodopa	フルオロドーパ
FMT	Fluoro-L-m-tyrosine	フルオロメチルチロシン
GABA	γ -aminobutyric acid	ガンマアミノ酪酸
GAD	Glutamate Decarboxylase	グルタミン酸デカルボキシラーゼ
GH	Growth Hormone	成長ホルモン
GMP	Good Manufacturing Practice	医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準
GGT	γ -Glutamyl Transpeptidase	ガンマグルタミルトランスペプチターゼ
GOT	Glutamic Oxaloacetic Transaminase	グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ
G6PD	Glucose-6-Phosphate dehydrogenase	グルコース 6 リン酸脱水素酵素
GPT	Glutamic Pyruvic Transaminase	グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ
HAV	Hepatitis A Virus	A 型肝炎ウイルス
HBV	Hepatitis B Virus	B 型肝炎ウイルス
HCV	Hepatitis C Virus	C 型肝炎ウイルス
hCMV	Human cytomegalovirus	ヒトサイトメガロウイルス
HHV	Human Herpesvirus	ヒトヘルペスウイルス
HIAA	Hydroxyindoleacetic acid	ハイドロキシインドール酢酸
HIV	Human Immunodeficiency Virus	ヒト免疫不全ウイルス
HPV	Human Parvovirus	ヒトパルボウイルス
HTLV	Human T-cell lymphotropic virus	ヒトTリンパ向性ウイルス
HTP	Hydroxy tryptphan	ヒドロキシトリプトファン
HVA	Homovanillic Acid	ホモバニリン酸
INR	International Normalized Ratio	国際標準化比
ITR	Inverted Terminal Repeat	-

IVS	Intervening sequence	イントロン
MAO	Monoamine oxidase	モノアミン酸化酵素
MCB	Master Cell Bank	マスターセルバンク
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin	平均赤血球血色素量
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration	平均赤血球血色素濃度
MCV	Mean Corpuscular Volume	平均赤血球容積
MD	Malate dehydrogenase	リンゴ酸脱水素酵素
MO	Magnet Optical Disk	光磁気ディスク
MRI	Magnetic Resonance Imaging	磁気共鳴画像法
MWCB	Master Working Cell Bank	マスターワーキングセルバンク
NP	Nucleoside phosphorylase	ヌクレオシドホスホリラーゼ
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells	ヒト末梢血単核球
PBS	Phosphate-buffered Saline	リン酸緩衝生理食塩水
PCV	Porcine circovirus	豚サーコウイルス
PCR	Polymerase Chain Reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PDMS-II	Peabody Developmental Motor Scale, Second edition	-
PET	Positron Emission Tomography	陽電子放射線断層撮影法
PH	Potential Hydrogen	ピーエッチ
PICU	Pediatric Intensive Care Unit	小児集中治療室
PT	Prothrombin time	プロトロンビン時間
Rep	Replication	複写
RNA	Ribonucleic acid	リボ核酸
SDS	Sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SV	Simian virus	シミアンウイルス
UCSF	University of California, San Francisco	米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校
UPDRS	Unified Parkinson disease rating scale	パーキンソン病統一スケール
USB	Universal Serial Bus	ユーエスビー
VG	Vector genomes	ベクターゲノムズ
VLA	Vanillactic acid	バニル乳酸

目次

I 遺伝子治療臨床研究の名称	1
II 総括責任者およびその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割	1
II.1 総括責任者の氏名	1
II.2 総括責任者以外の研究者の氏名およびその担当する役割	1
III 実施施設の名称およびその所在地	4
IV 遺伝子治療臨床研究の目的	4
V.1 研究の区分	5
V.2 対象疾患に関する現時点での知見	5
V.3 当該遺伝子治療臨床研究の概要	9
V.4 他の治療法との比較および遺伝子治療を選択した理由	9
VI 遺伝子の種類およびその導入法	10
VI.1.1 人に導入する遺伝子の構造と性質	10
VI.1.2 人に導入する遺伝子の性質	11
VI.1.3 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性	12
VI.2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質	12
VI.3 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに当該細胞を標的細胞とした理由	13
VI.4 遺伝子導入方法の概略および当該導入法を選択した理由	13
VI.5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	14
VI.5.1 野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響	14
VI.5.2 AAV-hAADC-2 の作製方法	15
VI.5.3 AAV-hAADC-2 の構造	17
VI.5.4 AAV-hAADC-2 の生物学的特徴	18
VII 安全性についての評価	20
VII.1 遺伝子導入方法の安全性	20
VII.1.1 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの純度	20
VII.1.1.1 プラスミド MWCB の作製	20
VII.1.1.2 プラスミドベクターの製造	22
VII.1.1.3 293T/17 MCB の作製	24
VII.1.1.4 293T/17 WCB の作製法	26
VII.1.1.5 AAV-hAADC-2 の製造方法	28
VII.1.2 患者に投与する AADC 遺伝子の純度およびその安全性	30
VII.1.3 増殖性ウイルスの出現の可能性	30
VII.1.4 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの細胞傷害性	31

VII.1.5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	31
VII.1.6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性.....	31
VII.1.7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	31
VII.1.8 がん原性の有無	32
VII.2 遺伝子産物の安全性	32
VII.3 細胞の安全性.....	32
VII.3.1 培養細胞の純度	32
VII.3.2 細胞の遺伝子型、表現型の安全性.....	32
VII.3.3 被験者に投与する細胞の安全性	33
VII.4 AAV 以外のウイルスベクターに起因する重篤な有害事象	33
VIII 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	34
VIII.1 臨床ニーズ	34
VIII.2 本臨床研究の品質、安全性	35
VIII.3 本臨床研究の期待される有効性.....	35
VIII.4 当施設・研究者の能力	35
IX 遺伝子治療臨床研究の実施計画	35
IX.1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	35
IX.1.1 本臨床研究の実施に際し自治医科大学医学部附属病院内に設置される 委員会	35
IX.1.2 本臨床計画の実施手順	36
IX.2 被験者の選択基準および除外基準	38
IX.2.1 選択基準.....	38
IX.2.2 除外基準.....	38
IX.2.3 対象者の参加取りやめ	39
IX.3 倫理的事項	39
IX.3.1 被験者の保護	39
IX.3.2 被験者の同意取得方法	39
IX.3.3 被験者の安全性確保および健康被害補償.....	41
IX.4 実施期間および目標症例数	41
IX.4.1 予定登録数・登録期間・追跡期間	41
IX.5 遺伝子治療臨床研究の実施方法	42
IX.5.1 対照群の設定方法	42
IX.5.2 遺伝子導入方法	42
IX.5.3 前処置および併用療法の有無	43
IX.5.4 臨床検査項目および観察項目	43
IX.5.4.1 検査・観察のスケジュール	43

IX.5.5 予測される副作用およびその対処方法	49
IX.5.5.1 ベクターによる合併症	49
IX.5.5.2 手術による合併症.....	49
IX.5.5.3 AADC 遺伝子導入に伴う副作用	50
IX.5.6 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準および中止判定基準	51
IX.5.6.1 主要評価項目	51
IX.5.6.2 副次的評価項目	52
IX.5.6.3 臨床研究の中止基準.....	52
IX.5.6.4 臨床研究への参加取りやめおよび脱落基準	53
IX.5.7 有害事象が発生した場合の措置	53
IX.5.7.1 有害事象が発生した場合.....	53
IX.5.7.2 重篤な有害事象が発生した場合	55
IX.5.8 症例記録に関する記録用紙等の様式.....	55
IX.5.9 記録の保存および成績の公表の方法	56
IX.5.9.1 記録の保存	56
IX.5.9.2 成績の公表の方法.....	56
IX.5.10 個人情報保護の徹底.....	56
(1) 実施施設での安全管理措置.....	56
(2) 本研究における個人情報の保護	58
(3) 第三者提供の制限.....	58
(4) 個人情報の開示	58
X.1 遵守する法令／省令等.....	59
X.2 引用文献.....	61

臨床研究「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」参加のしおり

遺伝子治療臨床研究実施計画書添付資料

- I. 研究者の略歴及び研究業績
- II. 実施施設の施設設備の状況
- III. 実施施設における当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果
- IV. 遺伝子治療臨床研究に関する実施施設以外の内外の研究状況
- V. その他必要な資料
 - V.3：乳幼児神経学的検査チャート、AIMS、新版 K 式発達検査

V.4 : 注入用カニューレおよびポンプ

V.5 : 評価スケジュール

V.6 : モニタリング・監査計画書

参考資料 1 : AAV ベクターAAV-hAADC-2 の全塩基配列

参考資料 2 : プラスミドMWCB 作製方法

参考資料 3 : pAAV-hAADC-2 プラスミドMWCB の品質試験及び結果

参考資料 4 : pRC-BI-khB342-2 プラスミドMWCB の品質試験及び結果

参考資料 5 : pHelper プラスミドMWCB の品質試験及び結果

参考資料 6 : プラスミドベクターの製造方法

参考資料 7 : pAAV-hAADC-2 プラスミドベクターの品質試験及び結果

参考資料 8 : pRC-BI-khB342-2 プラスミドベクターの品質試験及び結果

参考資料 9 : pHelper プラスミドベクターの品質試験及び結果

参考資料 10 : 293T/17 MCB の作製方法

参考資料 11 : 293T/17 MCB の品質試験及び結果

参考資料 12 : 293T/17 MCB 試験成績書

参考資料 13 : 293T/17 WCB の作製方法

参考資料 14 : 293T/17 WCB の品質試験及び結果

参考資料 15 : 293T/17 WCB 試験成績書

参考資料 16 : 製造施設（位置・構造設備）

参考資料 17 : AAV-hAADC-2 の製造方法

参考資料 18 : AAV-hAADC-2 の品質試験及び結果

参考資料 19 : AAV-hAADC-2 試験成績書

参考資料 20 : AAV-hAADC-2 の安定性試験及び結果

I 遺伝子治療臨床研究の名称

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究

II 総括責任者およびその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割

II.1 総括責任者の氏名

山形崇倫

自治医科大学医学部小児科学・教授

遺伝子治療臨床研究の総括

II.2 総括責任者以外の研究者の氏名およびその担当する役割

氏名	所属	役職	役割分担
村松 慎一	自治医科大学 神経内科学	教授	副責任者。適応患者の選択・評価 およびウイルスベクターの管理、 PET 解析
小澤 敬也	自治医科大学 免疫遺伝子細胞治療学	客員 教授	ウイルスベクターに関する全般 管理
小坂 仁	自治医科大学 小児科学	教授	副責任者。患者の管理、評価
川合 謙介	自治医科大学 脳神経外科	教授	遺伝子導入のための定位脳手術 実施
中嶋 剛	自治医科大学 脳神経外科	講師	遺伝子導入のための定位脳手術 実施
五味 玲	自治医科大学 脳神経外科	教授	遺伝子導入の定位脳手術、術後管 理
水上 浩明	自治医科大学 遺伝子治療研究部	学内教 授	ウイルスベクターの管理、検出
竹内 護	自治医科大学 麻酔科学・集中治療医学	教授	麻酔、術後管理
多賀 直行	自治医科大学 とちぎ子ども医療セン ター 小児手術・集中治	准教授	麻酔、術後管理

	療部		
門田 行史	自治医科大学 小児科学	准教授	患者の管理、評価
小島 華林	自治医科大学 小児科学	助教	患者の管理、評価
松本 歩	自治医科大学 小児科学	助教	患者の管理、評価
宮内 彰彦	自治医科大学 小児科学	大学院 生	患者の管理、評価
中村 幸恵	自治医科大学 小児科学	大学院 生	ウイルスベクターの管理 患者の管理、評価
嵯峨 泰	自治医科大学 遺伝子治療研究部	准教授	ウイルスベクターの管理、検出
吉尾 卓	自治医科大学附属病院 臨床研究支援センター とちぎ臨床試験推進部	部長	試験実施の支援
山崎 晶司	自治医科大学附属病院 臨床研究支援センター とちぎ臨床試験推進部	副部長	試験実施の支援

研究協力者

高津戸 文江	自治医科大学附属病 院臨床研究支援部	臨床研究 コーディネーター	対象患者のケア、相談。インフ ォームドコンセント取得への協 力等、研究の支援。
山口 文江	自治医科大学附属病 院臨床研究支援部	臨床研究 コーディネーター	対象患者のケア、相談。インフ ォームドコンセント取得への協 力等、研究の支援。

外部協力者

加藤 光広	昭和大学医学部 小児科学	講師	対象患者の治療前、および安定後 の診療
中村 和幸	山形大学医学部小児科 学	特任助 教	対象患者の治療前、および安定後 の診療
久保田 哲夫	安城更生病院 小児科	小児神 経科部	対象患者の治療前、および安定後 の診療

		長	
井手 秀平	東京都立北療育センター城南分園	園長	対象患者の治療前、および安定後の診療
益山 龍雄	東京都立東部療育センター 小児科	診療部長	対象患者の治療前、および安定後の診療
一瀬 宏	東京工業大学 生命理工学研究科	教授	ベクター品質評価・患者検体解析
佐藤 俊彦	宇都宮セントラルクリニック	院長	PET 実施
峰野 純一	タカラバイオ株式会社 バイオ産業支援事業部門	本部長	ベクターに関する技術支援

III 実施施設の名称およびその所在地

名称：自治医科大学附属病院・自治医科大学とちぎ子ども医療センター

所在地：〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

電話：0285-44-2111

IV 遺伝子治療臨床研究の目的

本臨床研究は、ヒト芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)欠損症患者の線条体（被殻）に、ヒト芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC）遺伝子を組み込んだ2型アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus : AAV）ベクター（AAV-hAADC-2）を定位脳手術的に注入し、その安全性を検証するとともに、運動症状を改善することを目的とする。

本臨床研究に用いる AAV ベクターは、自治医科大学が製造委託したタカラバイオ株式会社で作製され、同社より直接自治医科大学に供給される。

① 主要評価項目

- AADC 欠損症患者被殻内への AAV-hAADC-2 注入療法の安全性
 - 有害事象
 - 発作記録、一般身体所見、神経学的所見の臨床評価
 - 臨床検査、髄液検査、頭部 MRI、脳波

② 副次的評価項目

- AAV-hAADC-2 注入療法の有効性
 - 発作記録、一般身体所見、神経学的所見の臨床評価
 - 運動、認知機能を評価スケールで評価
 - 臨床検査
 - 髄液検査（L-dopa、5HTP、HVA、5HIAA を含む）
 - 頭部 MRI、脳波
- 被殻注入 AAV-hAADC-2 の発現量
 - FMT-PET
 - AADC のトレーサ 6-^[18F]fluoro-L-m-tyrosine を使用した positron emission tomography

V 遺伝子治療臨床研究の対象疾患およびその選定理由

V.1 研究の区分

遺伝子治療臨床研究

V.2 対象疾患に関する現時点での知見

① アミノ酸脱炭酸酵素欠損症; Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)欠損症について

芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素欠損症 Aromatic L-amino acid decarboxylase、AADC 欠損症(OMIM608643)は、カテコールアミンとセロトニンを合成する酵素；AADC をコードする遺伝子の変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である¹⁾。

Hyland and Clayton が 1990 年に、アラブ人の一卵性双胎児の患者を報告したのが最初である^{2,3)}。現在、世界中で報告例は 100 症例未満である^{1,4)}。台湾では、創始者効果から比較的発症率が高く、2012 年時点では生存例が 20 例、死亡例 10 例が確認されている⁴⁾。日本では、本遺伝子治療臨床研究の申請時(2014 年 7 月)には 4 例診断されていたが、新たに 2 例診断された。脳性麻痺との鑑別が困難な場合もあり、正しく診断を受けていない症例も多いと考えられ、さらに症例は増えると考えられる。

AADC は、チロシンからチロシン水酸化酵素により生成された L-dopa をドパミンに、また、トリプトファンからトリプトファン水酸化酵素により生成された 5-ハイドロキシトリプトファンをセロトニンに代謝する酵素である。ドパミンからは、ノルエピネフリン、エピネフリンが合成されるため、これらのカテコールアミン全体が低下する。また、セロトニンからメラトニンが合成されるために、メラトニンも低下する。

カテコールアミンとセロトニンの合成が障害されることにより、乳幼児期に重度の運動障害で発症する。筋緊張低下、眼球上転発作あるいは注視痙攣；oculogyric crisis を主症状とし、知的障害、発達の遅れ、運動異常、体温異常、摂食困難などを伴う。また、メラトニン低下による睡眠障害もきたす。

発症年齢は、典型例では生後 1 か月以内に発症する例が多く、過半数が 6 か月以下で発症する。新生児期には、筋緊張低下、哺乳困難、易刺激性、眼瞼下垂、低血圧、低血糖などを呈し、その後、運動障害を主体とした症状が出現してくる。主症状は、oculogyric crisis、四肢のジストニア（異常な筋緊張亢進）、全身性アテトーゼ（くねるような動き）、随意運動の障害、ジストニア発作（突然筋緊張が高まり動きづらくなる）、重度精神運動発達遅滞などである。てんかんの合併例も報告されている。また、自律神経機能障害による心拍・血圧の調整障害、突然の発汗上昇、唾液分泌増加や、情緒不安定、睡眠障害もみられる^{1,5)}。生下時から動きが少なく、顎定が得られず、生涯臥床状態である患者がほとんどである。重症例では、症状の進行とともに嚥下困難や呼吸障害が出現し、最重症例では乳幼児期に肺炎で死亡する例がある。予後としては、多くの例

が小児期に死亡する¹⁶。台湾での死亡例 10 例の平均死亡年齢は 4.6 ± 2.0 歳 (1.0 - 7.0 歳) と報告されている⁴。また非典型的な軽症例として、ジストニア、易疲労性、睡眠障害等を伴い、運動発達は遅れるものの、歩行可能な例が少数報告されている⁷。

画像所見として、頭部 MRI 上、2 割程度の患者では、大脳萎縮、白質変性の所見、脳梁のひ薄化等の異常が報告されているが、有意な所見を示さない例が大半である¹。PET: (2-deoxy-2-[¹⁸F] fluoro-D-glucose 使用)で、前頭前野皮質と両側基底核の糖代謝の低下が示されている⁸。また、AADC の基質である fluorodopa (FDOPA)をラベルした 6-[¹⁸F]fluorodopa (FDOPA)—PET で FDOPA の基底核への取り込みが低下している⁸。線条体の機能不全は AADC 欠損症の主な運動症状であるジストニアと随意運動の障害の原因となり、前頭前野の機能不全が精神遅滞症状をひきおこす原因の一つとなっていると考えられる。

検査所見としては、脳脊髄液中のドパミンの代謝産物である homovanillic acid (HVA) とセロトニンの代謝産物である 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)が非常に低値であり、ドパミンの前駆物質である L-dopa と、セロトニンの前駆物質である 5-hydroxy-tryptophan(5-HTP)が非常に高値である。また L-dopa がメチル化されて代謝された産物である 3-O-methyldopa も上昇する。髄液以外でも、血漿、尿中の L-dopa と 3-O-methyldopa、および 3-O-methyldopa の代謝産物である vanillic acid (VLA) が上昇する。

診断は、上記の臨床症状などから疑われた例に対し、髄液中のカテコールアミン代謝産物を測定する。L-dopa 高値、HVA 低値の特徴的所見が得られた場合、AADC 欠損症と診断する。髄液検査前に、尿中の上記カテコールアミン代謝産物の測定によるスクリーニングも試みられている。確定診断には、血漿中あるいはリンパ球等での AADC 活性の低下、あるいは AADC 遺伝子変異同定が必要である。

病因遺伝子変異

AADC 遺伝子は、染色体 7q12.1 に局在している。変異部位は多様で、BIOMDB データベースには 30 種類の変異が、JAKA データベースには 24 種類の変異が登録されている。また、Brun らは 49 人で 24 種類の異なった変異を報告している¹。

一方、台湾の患者では、16 例中 13 例で、IVS6+4 A>T 変異が確認されている。変異の種類としては、スプライス部位の変異である (IVS6+4A>T)がもっとも多く、45%の患者で検出されているが、全て中国・台湾人である。次に多いのは基質結合部位の変異である S250F で、10%にみられる。また、軽症例になる G102S が 8%で検出されている。日本の患者では、兄弟症例で g.329C > A がヘテロ接合性に検出されている。他の患者での変異は多様である。

既存の治療法

AADC の補酵素であるビタミン B6 (Pridoxine)、ドパミン作動薬である Bromocriptine、ドパミンとセロトニンを代謝する Monoamine oxidase (MAO) の阻害薬である Tranylcypromide や Selegiline、抗コリン薬の Trihexyphenidyl、および L-dopa などが単独で、あるいは併用で試みられている^{1,6,9}。軽症例では、これらの治療により、運動機能が改善した例が報告されている。しかし、典型例では、ジストニアや筋緊張低下がやや改善した例はあるが、運動発達を得られた例はなく、ほとんどの例で効果は認められていない。

② AADC 欠損症に対する遺伝子治療

2012 年に台湾から AADC 欠損症に対する遺伝子治療を実施した結果が報告された⁴。論文報告では、対象は 4 人の患者で、4・6 歳時に治療実施し、現在 5・6 歳の、男児 1 例、女児 3 例。全例、頸定なく、臥床状態であった。遺伝子変異は、3 例が IVS6+4 A>T のホモで、1 例が IVS6+4 A>T と c.1297_1298ins の複合ヘテロであった。方法は、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を AADC 欠損症患者の線条体 (被殻) に、定位脳手術的に注入した。

治療効果として、運動機能に関して著明な改善を得た。治療開始前は、全員寝たきりの状態で、自発運動は少しのみだったが、遺伝子治療実施 1-2 週間後には眼瞼下垂が改善し、1 か月後からジスキネジアが改善し始め、それと共に運動機能が改善し始めた。1 例は、3 か月後から頸定が得られ、6 か月後に坐位保持可能となり、13 か月後には、臥位から自分で坐位が取れて、おもちゃを手に持って遊べるように、16 か月後には支えての立位が可能になった。1 例は、3 か月後に頸定が、9 か月後に支えての坐位が可能になった。他の 2 例でも、頸定が得られ、改善傾向になっている。また運動機能評価として、Alberta Infant Motor Scale (AIMS)、Peabody Developmental Motor Scale, Second edition (PDMS-II) を用いて評価し、全例スケールが改善した。また、認知機能と運動機能を評価する Comprehensive Developmental Inventory for Infants and Toddlers (CDIIT) でも、運動、認知両者とも改善した。oculogyric crisis の改善、感情的な安定性の向上、多汗や体温上昇の改善なども得られた。PET 検査では、治療 6 か月後に 6-[¹⁸F]fluorodopa (FDOPA) の基底核への取り込みが改善した。髄液検査でも、ドパミンの代謝産物である HVA とセロトニンの代謝産物である 5-HIAA が増加した。しかし、L-dopa と 3-o-methyldopa は高値のままである。

治療に使われた AADC を発現する AAV ベクターは、自治医大でパーキンソン病に対する遺伝子治療の前臨床試験のために開発したものである。

その後の情報では、現在、実施例数は 8 例になっており、3 例で座位保持可能でうち 2 例は支えての立位可能に、4 例で支えての座位保持可能に改善している。

副作用に関しては、一番多かったのは一過性のジスキネジアであった。2例で口部から顔面のジスキネジアで嚥下障害を来し、1例では3か月間経管栄養を要した。1例で、チアノーゼを伴う無呼吸発作が10か月間反復した。しかし、これらの副作用はいずれも軽快した。

1例では、術前から全身状態が悪かった患者で、遺伝子治療実施後退院し自宅療養していたが、下痢と嘔吐からくる脱水、ショックにより心停止となり受診。蘇生したが、臥床状態が続いている。

日本では、本遺伝子治療臨床研究として、2015年6月から、5歳から19歳の患者6例に実施した。6例とも、大きな有害事象はなく経過している。一部の患者で、治療後、PETで被殻にAADCの発現が確認されている。OGC、ジストニア発作の減少、運動機能の改善が得られている。有害事象としては、四肢の小さな舞踏病様運動が起きたのみである。

③ パーキンソン病に対する AADC 遺伝子治療

パーキンソン病の遺伝子治療には、1)ドパミン合成系の酵素遺伝子を被殻に導入する、2)神経栄養因子の遺伝子を被殻と黒質に導入する、3)抑制性神経伝達物質である γ -aminobutyric acid (GABA)の合成酵素を視床下核に導入する、という三種類の方法があり、それぞれ臨床試験が実施されている。1)の方法のうち、AADCを発現する AAV ベクターを両側の被殻に注入する第1相臨床試験が自治医科大学と米国 UCSF (400 Parnassus Ave. San Francisco)で実施された。両施設では同一ロットの AAV ベクターを使用している。自治医科大学では単群(3×10^{11} vector genome)の6人を対象とし、UCSFでは低用量群(9×10^{10} vector genome)の5人と高用量群(3×10^{11} vector genome)の5人の合計10人を対象とした。両施設とも6か月後の評価で AAV ベクターに関連した副作用は認められなかった。自治医科大学の6人では、オフ時 (L-dopa の効果が切れている状態) の unified Parkinson disease rating scale (UPDRS)運動スコアが46%改善した。AADCに結合する [^{18}F]fluoro-L-m-tyrosine (FMT)をトレーサーとして使用した PET 計測では、6か月後に56%の集積増加を認め2年後にも計測した2名では集積の増加が持続していた¹⁰。UCSFの10人ではUPDRSの運動スコアはオフ時に36%、オン時に28%改善した。また、FMT-PET 計測では、遺伝子導入6か月後には低用量群で30%、高用量群では75%の被殻への集積の増加を認め、4年後にも計測した2名では集積の増加が持続していた^{11,12}。

また、2015年に新たな計画で同じベクターでの治療が再開された。治療を受けたパーキンソン病患者1名が、治療後6週間の時点で突然死した。治療後の経過は順調で、パーキンソン病の他にとくに症状はなかった。病理解剖では脳のベクター注入部位に出血などの病変はなく、心臓や肝臓などの全身の臓器にも死因となる病変は認められなかった。これらの経緯や病理所見について自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査

委員会において審議が行われた。この委員会では、上記の所見に加え、パーキンソン病では死因は不明であるものの突然死の頻度が14% (6/44 例) であるという他施設の報告も考慮された結果、遺伝子治療と今回の1人目の方の突然死との間には因果関係は認められず、遺伝子治療を継続することに問題はないとされた。 自治医科大学で実施された臨床研究については、総括報告書(添付資料Ⅲ.3 関連する研究の成果)を参照。

V.3 当該遺伝子治療臨床研究の概要

本臨床研究では、AADC 欠損症患者の線条体（被殻）に、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクター（AAV-hAADC-2）を定位脳手術的に注入する。

AADC（酵素番号 enzyme code:EC4.1.1.28）はそれぞれドパミンおよびセロトニンの前駆体である L-dopa および 5-HTP を特異的基質とする酵素である。したがって AADC によってドパミンとその代謝により産生されるノルアドレナリン、アドレナリン、およびセロトニンが生成される。よって、AADC を注入することにより、ドパミンやセロトニンの欠乏状態が改善される。本臨床研究では、黒質・線条体路の投射先である被殻の背外側部に選択的に AAV-hAADC-2 を注入するので、主に黒質・線条体路のドパミン活性が上昇することにより、運動機能を中心に症状の改善が期待される。

V.4 他の治療法との比較および遺伝子治療を選択した理由

AADC 欠損症の軽症例に対しては、薬物療法により運動機能が改善した報告がある。また、基質結合部位に変異を持つ例で L-dopa 内服によりジストニア、筋緊張低下および発語が改善し、歩行が可能になった例が報告されている。しかし典型例では、ジストニアや筋緊張低下がやや改善した例はあるが、運動発達が得られた例はなく、全く反応がない例がほとんどであり、現状では、AADC 欠損症に対する有効な治療法はない。

AADC 欠損症に対する新しい治療戦略として画像上、構造的な異常が検出されず、機能的な異常が主体でありドパミン、セロトニン系の機能を改善することにより、脳機能の回復する可能性が考えられ、遺伝子治療による機能回復が期待されている。

2012 年に、台湾から、遺伝子治療成功例が報告された。方法は、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクター（AAV-hAADC-2）を AADC 欠損症患者の線条体（被殻）に、定位脳手術的に注入した。治療効果として、前記(V.2)記載の様に、臥床状態から立位可能になった患者もあるなど、運動機能に関して著明な改善を得た。副作用は、一過性のジスキネジアとチアノーゼを伴う無呼吸発作の反復があったが、これらの副作用はいずれも軽快した。

これらの点から、また、患者家族からの強い希望もあり、遺伝子治療研究実施を計画した。

VI 遺伝子の種類およびその導入法

VI.1 人に導入する遺伝子の構造と性質

本臨床研究において用いる遺伝子は、ヒト AADC 遺伝子 (human AADC gene) で、AAV 由来の塩基配列は両端に存在する ITR 以外の部分が除かれ、サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー (CMV Promotor)、ヒト β グロビンイントロン、ヒト AADC 遺伝子 (human AADC cDNA)、ヒト成長ホルモンのポリ A 配列 (hGH poly(A)) によって置換されたベクターを用いる。

VI.1.1 人に導入する AADC 遺伝子の構造

ヒト AADC 遺伝子は第 7 染色体上に位置する 85,000 塩基対以上におよぶ大きな DNA で、メッセンジャー RNA に対応する 15 のエキソンからなり、各々のエキソンは 20 から 400 の塩基対、イントロンは 1,000 から 17,700 塩基対の長さである¹³。本臨床研究ではメッセンジャー RNA から逆転写で合成されたヒト AADC の相補的 DNA を治療遺伝子として用いるが、イントロンが除かれている点が、もとのゲノム DNA とは異なる。この相補的 DNA はヒト褐色細胞腫の相補的 DNA ライブラリーをもとに、480 個のアミノ酸をコードする 1,440 塩基対と終止コドンを含む 1,443 塩基対として単離されている。図 1 に AADC 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

```
1 atgaacgcaa gtgaattccg aaggagaggg aaggagatgg tggattacgt ggccaactac
61 atggaaggca ttgagggacg ccaggtctac cctgacgtgg agcccgggta cctgcggccg
121 ctgatccctg ccgctgcccc tcaggagcca gacacgtttg aggacatcat caacgacgtt
181 gagaagataa tcatgcctgg ggtgacgcac tggcacagcc cctacttctt cgcctacttc
241 cccactgcca gctcgtaccc ggccatgctt ggggacatgc tgtgcggggc cattggctgc
301 atcggcttct cctgggcggc aagcccagca tgcacagagc tggagactgt gatgatggac
361 tggctcggga agatgctgga actaccaaag gcatttttga atgagaaagc tggagaaggg
421 ggaggagtga tccagggaag tgccagtga gccaccctgg tggccctgct ggccgctcgg
481 accaaagtga tccatcggct gcaggcagcg tccccagagc tcacacaggc cgctatcatg
541 gagaagctgg ttggttactc atccgatcag gcacactcct cagtggaaag agctgggtta
601 attggtggag tgaaattaaa agccatcccc tcagatggca acttcgccat gcgtgcgtct
661 gccctgcagg aagccctgga gagagacaaa gcggctggcc tgattccttt ctttatggtt
721 gccaccctgg ggaccacaac atgctgctcc ttgacaatc tottagaagt cggtcctatc
781 tgcaacaagg aagacatatg gctgcacggt gatgcagcct acgcaggcag tgcattcatc
841 tgccttgagt tccggcacct totgaatgga gtggagtttg cagattcatt caactttaat
901 cccacaaaat ggctattggt gaattttgac tgttctgcca tgtgggtgaa aaagagaaca
```

961 gacttaacgg gagcctttag actggacccc acttacctga agcacagcca tcaggattca
 1021 gggcttatca ctgactaccg gcattggcag ataccactgg gcagaagatt tcgctctttg
 1081 aaaatgtggt ttgtatttag gatgtatgga gtcaaaggac tgcaggctta tatccgcaag
 1141 catgtccagc tgtcccatga gtttgagtca ctggtgcgcc aggatccccg ctttgaaatc
 1201 tgtgtggaag tcattctggg gcttgtctgc tttcggctaa agggttccaa caaagtgaat
 1261 gaagctcttc tgcaaagaat aaacagtgcc aaaaaaatcc acttggttcc atgtcacctc
 1321 agggacaagt ttgtcctgcg ctttgccatc tgttctcgca cggtggaatc tgcccatgtg
 1381 cagcgggcct gggaacacat caaagagctg gcggccgacg tgctgcgagc agagaggag
 1441 tag
 MNASEFRRRGKEMVDYVANYMEGIEGRQVYPDVEPGYLRPLIPAAAPQEPDTFEDIINDVEKII
 MPGVTHWHSPYFFAYFPTASSYPAMLADMLCGAIGCIGFSWAASPACTELETVMMDWLKML
 ELPKAFLNEKAGEGGGVIQGSASEATLVALLAARTKVIHRLQAASPELTQAAIMEKLVAYSSDQA
 HSSVERAGLIGGVKLKAIPSDGNFAMRASALQEALERDKAAGLIPFFMVATLGTTTCCSFDNLL
 E
 VGPICKEDIWLHVDAAAYAGSAFICPEFRHLLNGVEFADSFNPNPHKWLLVNFDCSAMWVKKR
 TDLTGAFRLDPTYLKHSQDGLITDYRHWQIPLGRRFRSLKMWFVFRMYGVKGLQAYIRKHH
 QLSHEFESLVRQDPRFEICVEVILGLVCFRLKGSNKVNEALLQRINSAKKIHLVPCHLRDKFVLR
 F AICSRVESAHVQRAWEHKELAADVLRARE

図 1 : AADC 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

VI.1.2 人に導入する遺伝子の性質

本臨床研究では、2 型 AAV 由来のベクターに神経細胞で安定に遺伝子を発現するサイトメガロウイルス由来のプロモーター配列を組み込み、その下流に配置した AADC 遺伝子を発現させる（図 2）。導入遺伝子が AAV ベクターにより染色体に組み込まれる可能性は極めて低く、導入遺伝子は基本的に染色体外に存在すると考えられている。AAV ベクター内では導入遺伝子は 1 本鎖 DNA であるが、細胞内で 2 本鎖 DNA に変換され導入遺伝子が発現する。ラットでは、この AAV ベクターによる発現は 1 年以上持続することが示唆され、サルにおいても遺伝子導入の効果が 3 年以上持続することが示されている。さらに米国で実施された Neurturin 遺伝子治療の臨床試験における剖検例では、4 年後にも Neurturin 遺伝子の発現が確認されている¹⁴。

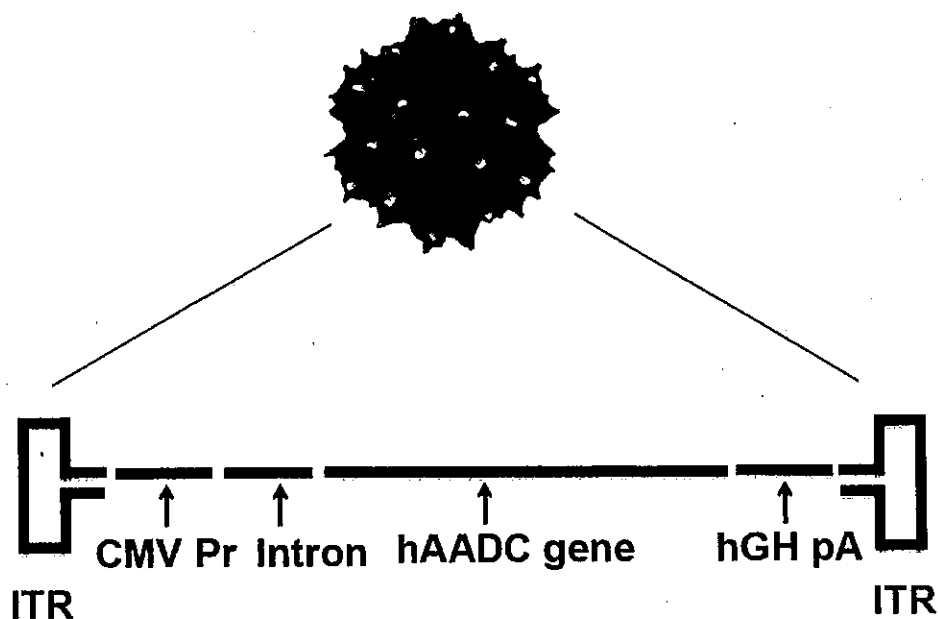


図 2：ウイルスベクターに搭載される遺伝子

AAV 由来の塩基配列は両端に存在する ITR 以外の部分が除かれ、サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー (CMV Pr)、ヒト β グロビンイントロン、ヒト AADC 遺伝子 (hAADC gene)、ヒト成長ホルモンのポリ A 配列 (hGH PA) によって置換されている。

VI.1.3 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性

AADC は 53.9kDa の 2 量体として存在し、ドパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の合成に関わっている。この酵素は、チロシン水酸化酵素により生合成された L-dopa の脱炭酸によりドパミンを合成する。本臨床研究では、経口投与する L-dopa の投与量を調節することにより、AADC によるドパミンの合成量を制御することが可能である。また、AADC はトリプトファン水酸化酵素により生合成された 5-HTP の脱炭酸によりセロトニンを合成するが、AADC により内因性の 5-HTP から生成されるセロトニンの量は生理的範囲内である。

VI.2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質

本計画では他の組換え DNA は使用しない。

VI.3 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに当該細胞を標的細胞とした理由

本臨床研究における標的細胞は被殻の神経細胞である。AADC 欠損症では、ドパミン、セロトニンを合成する AADC 自体が欠損しているために、脳内のドパミン、セロトニンが減少している。特に、ドパミンの作用として最も主要である黒質-線条体路が運動機能の調節に重要である。よって、黒質-線条体路の投射先である被殻の神経細胞を標的として遺伝子導入を行うことが、治療効果を得るために効果的であると期待される。本計画では安全性を考慮し、被殻に存在する自己の神経細胞を標的として遺伝子導入を行い、ドパミンを産生させる。

VI.4 遺伝子導入方法の概略および当該導入法を選択した理由

遺伝子導入法に関しては、ウイルスベクターあるいは非ウイルスベクターが用いられるが、それぞれには一長一短があるため、標的細胞の種類や必要とされる発現期間などを考慮して目的に応じて使い分ける必要がある。神経細胞に遺伝子導入する場合には、①非分裂細胞である神経細胞に目的遺伝子を効率よく導入できること、②導入遺伝子が長期間にわたり発現すること、③生体に対して安全であること、が求められる。アデノウイルスベクターは細胞障害性が強く、導入遺伝子の発現が一過性である。レンチウイルスベクターは非分裂細胞に遺伝子を導入可能であるが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) を基本骨格としており、前臨床試験において十分に研究されておらず安全性の面で劣る。AAV ベクターは神経細胞に効率よく遺伝子を導入できること、細胞毒性が少なく、静止期細胞で長期間発現が望めること、非病原性のウイルスを基本骨格としていることから上記 3 条件を満たす。霊長類の AAV には 2 型をはじめとして 100 以上の血清型が報告されている¹⁵。代表的な血清型について表 1 に示す。5 型では神経細胞以外にグリア細胞にも導入遺伝子の発現が多く認められるが、2 型 AAV は比較的特異的に神経細胞で導入遺伝子が発現する。2 型 AAV ベクターは臨床研究に最も広く使用されており、血友病に対して第 IX 凝固遺伝子発現 AAV ベクターの骨格筋¹⁶および肝臓への注射¹⁷、パーキンソン病に対してグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 発現 AAV ベクターを視床下核に注入する臨床研究^{18,19}および神経栄養因子である neurturin 発現 AAV ベクターを被殻に注入する臨床研究^{20,21}が既に行われている。以上のことから今回の臨床研究では 2 型 AAV ベクターを利用するのが最適と考えられる。

表 1. 主な霊長類 AAV の血清型

血清型	2 型との相同性	由来	レセプター	標的組織
1	中	サル	シアル酸	骨格筋
2	・	ヒト	ヘパラン硫酸プ	神経

ロテオグリカン				
3	高	ヒト	不明	神経
4	低	サル	シアル酸	脳室上皮
5	低	ヒト	シアル酸	気道・網膜・神経
6	中	1+2 型	シアル酸	骨格筋
7	中	サル	不明	骨格筋
8	中	サル	ラミニン受容体	肝臓
9	中	ヒト	β ガラクトース	気道・肝臓・骨格筋

VI.5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

VI.5.1 野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響

2 型 AAV はパルボウイルス科デPENDウイルス属に分類される直径約 26 nm のエンペロープを持たない球形ウイルスである。VP1 (82 kDa)、VP2 (65 kDa)、VP3 (60 kDa) が 1:1:10 の比率で合計 60 分子が集まって約 3,600 kDa のキャプシドを構成している。ゲノムは 4,679 ヌクレオチドからなる 1 本鎖 DNA (約 1,500 kDa) であり、プラスとマイナス鎖がほぼ同じ比率で混在する。ゲノム両末端 145 ヌクレオチドは T 字型ヘアピン構造を形成しており inverted terminal repeat (ITR) と呼ばれる。AAV ゲノムには rep と cap 遺伝子がありそれぞれ非構造蛋白質とキャプシド蛋白質をコードしている。AAV はアデノウイルス、ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下でのみ増殖でき、単独では増殖できない。単独で細胞に感染した場合、第 19 番染色体の AAVS1 領域 (19q13.42) に特異的にそのゲノムを組み込み、潜伏感染の状態となる。ヘルパーウイルスと同時に感染したり、潜伏感染状態でヘルパーウイルスが感染したときに AAV の増殖が起こる (図 3)。2 型 AAV は呼吸器を主たる感染経路として人から人へ感染するとされている。大部分は不顕性感染で AAV の感染に伴う特有の疾患は報告されておらず、非病原性と考えられている。米国での調査によると出生直後は AAV に対する抗体は検出できないが、学童期で人口の 50 % 以上で抗体が陽性となる。rep 遺伝子より合成される Rep 蛋白質は過剰発現すると細胞増殖を抑制したり、ヘルパーウイルスを含めた他のウイルスの複製も抑制する。ウイルス粒子は物理化学的に極めて安定で、pH 3 から 9 の間で不活化されず、また 56°C 1 時間の処理でも不活化されない。

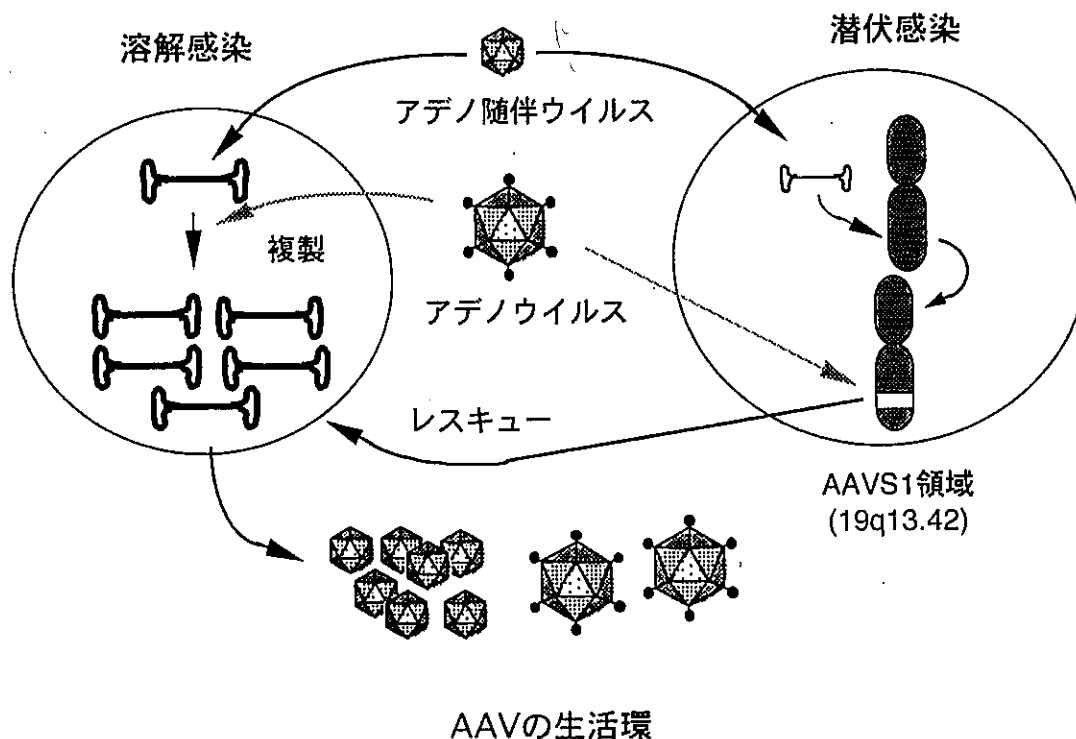


図 3 : AAV の生活環

VI.5.2 AAV-hAADC-2 の作製方法

AAV-hAADC-2 の作製には、以下の 3 種類のプラスミドを使用した。

- ①pAAV-hAADC-2 : サイトメガロウイルスのプロモーター、 β グロビンイントロン、ヒト AADC cDNA、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルからなる AADC 発現カセットを AAV2 の ITR 間に挿入した AAV ベクタープラスミド。
 - ②pRC-BI-khB342-2 : AAV ゲノムの ITR を除き AAV2 の rep、cap 遺伝子をクローニングした pRC2 の SnaBI サイトに、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットを挿入した AAV2 ヘルパープラスミド。なお、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットは、バイディレクショナルに 2 種の遺伝子を発現可能な pBI-CMV1 のマルチクローニングサイト 2 か所にそれぞれ、ヒト BclXL cDNA 及び hsa-miR342 をクローニング後、発現カセットごと PCR で増幅したものである。
 - ③pHelper : 2 型アデノウイルスの E2A、E4、VARNA 遺伝子をクローニングしたアデノウイルスヘルパープラスミド。
- 各プラスミドのマップを図 4~6 に示す。

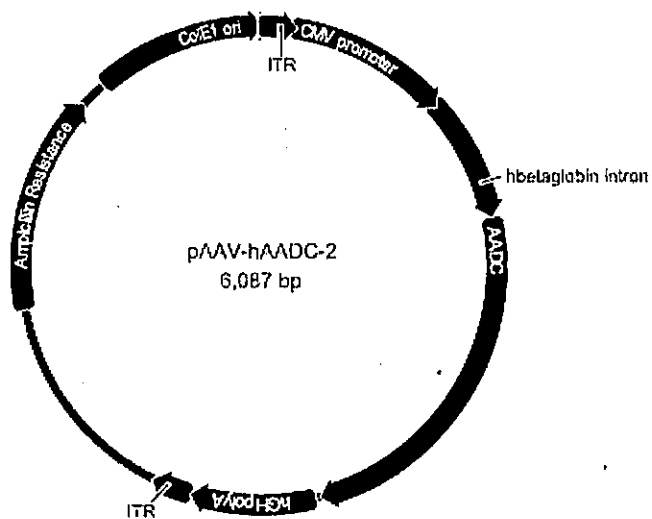


图 4 pAAV-hAADC-2

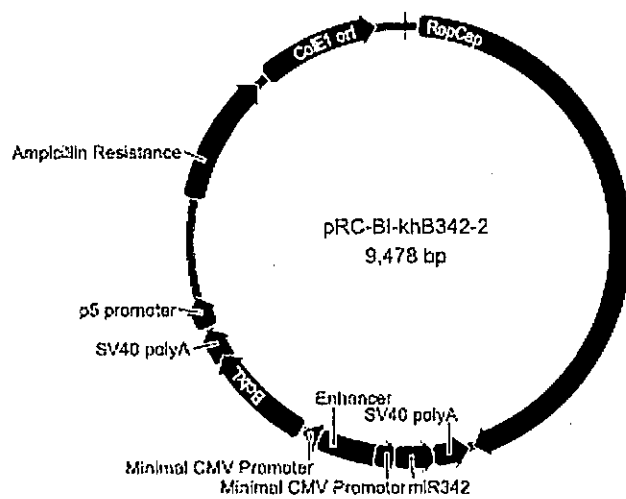


图 5 pRC-BI-khB342-2

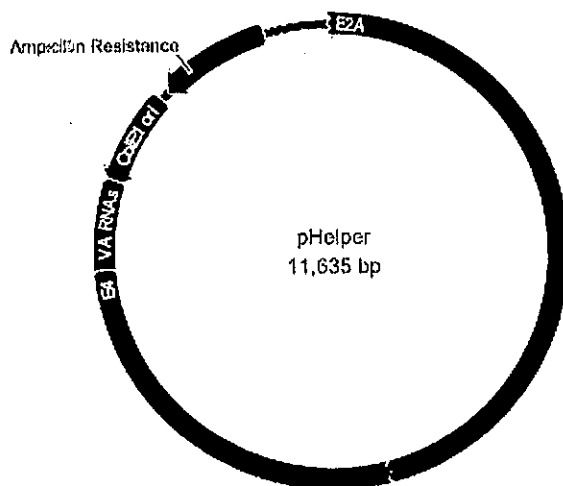


図 6 pHHelper

これら 3 種類のプラスミドをリン酸カルシウム法にて 293T/17 細胞にトランスフェクションする²²。トランスフェクション 3 日後、細胞を回収し凍結融解酸抽出による操作によって細胞内の AAV ベクターを遊離させ、ベンゾナーゼ処理、PEG 処理による粗精製後、塩化セシウム密度勾配超遠心によって精製する。最終濃度 0.05%未満の Poloxamer 188 ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコールを含む pH7.4 の PBS (Phosphate-buffered Saline) にさらに最終濃度 200mM となるように塩化ナトリウムを加えた溶液により、タンジェンシャルフロー・フィルトレーションにより過濃縮し、0.22 μ m のフィルターで滅菌処理を行いウイルスベクター液とする。

ITR は AAV キャプシドへのパッケージングシグナルであるが、rep、cap 遺伝子を持つ AAV ヘルパープラスミド pRC-BI-khB342-2 は ITR 配列を持たないため、replication-competent AAV の出現は極力抑えられている。また rep 遺伝子の p5 プロモーター配列は AAV ヘルパープラスミドと AAV ベクタープラスミドの間で組換えを促進し、偽野生型 AAV の産生を起こすことが知られているが p5 プロモーターの TATA box を破壊し rep、cap 遺伝子のポリ A 配列の下流に移動させることにより偽野生型 AAV が生じなくなることが分かっている。pRC-BI-khB342-2 では偽野生型 AAV の産生を抑えるため p5 プロモーター配列を移動してある²³。

VI.5.3 AAV-hAADC-2 の構造

AAV-hAADC-2 の全塩基配列を参考資料 1「AAV ベクター AAV-hAADC-2 の全塩基配列」に示す。AAV ベクター AAV-hAADC-2 は両末端の ITR は野生型と同じであるがその間にはヒト AADC を発現させるための、サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー、ヒト β グロビンイントロン、ヒト AADC 遺伝子、ヒト成長ホルモン遺伝子ポリ A シグナルに置換されており、Rep、Cap をコードする配列は持たない。

VI.5.4 AAV-hAADC-2 の生物学的特徴

2型 AAV はヘパラン硫酸プロテオグリカンを受容体として感染する。この分子は色々な細胞表面に存在すると考えられるため AAV の組織特異性は低い。人以外の動物でも感染が成立すると考えられている。AAV ベクターは神経細胞、肝臓、骨格筋、心筋などで効率の良い遺伝子発現が起こる。一本鎖ベクターゲノムは核内でその相補鎖とアニールしたり、宿主の DNA 合成酵素の働きで二本鎖となり導入遺伝子を発現できるようになる。また、二本鎖となったベクター DNA は複数が連なり環状 DNA を形成したり、コンカタマーを形成し、その一部が染色体に組み込まれると考えられる。AAV ベクターにより分裂細胞、静止期の細胞双方に遺伝子導入が可能であるが、発現様式に違いがある。分裂細胞では宿主 DNA 合成酵素の働きで発現型二本鎖に変換され感染直後より良好な導入遺伝子の発現が認められる。染色体に組み込まれていない導入遺伝子は細胞分裂に伴い希釈され失われてゆき、染色体に組み込まれた導入遺伝子を持つ細胞が最終的に長期発現を維持する。一方静止期細胞では相補鎖同士のアニーリングが二本鎖ゲノムの主たる合成経路と考えられ、約 1 か月程かかって徐々に導入遺伝子の発現が上昇してゆき、染色体外でコンカタマーの形態で長期間にわたって安定に保持される (図 7)。動物実験では年余にわたる導入遺伝子の発現も報告されている。AAV ベクターゲノムの染色体での組み込み部位は、rep 遺伝子を欠いているため AAVS1 領域へは組み込まれず、ランダムに組み込まれるが²⁴、その組み込み効率は極めて低いと考えられている。マウスでの肝臓での組み込み部位の解析では組み込みは遺伝子存在領域に組み込まれていることが多く、組み込み部位近傍のゲノムが約 2 kb 程まで欠失していることもある²⁵。ITR は弱いながらプロモーター活性を持つが、内向きにプロモーター活性を持ち²⁶、また染色体への組み込みに伴い欠失することが多く、組み込み部位近傍の遺伝子の発現を誘導する可能性は少ない。

AAV ベクターは、非分裂細胞では染色体へ組み込まれることはほとんどないが、分裂細胞では active site に入る可能性がある。小児では、脳内にも分裂細胞が少数ながらもあり、また、血中に入れば肝臓で分裂細胞に組み込まれる可能性は否定出来ない。しかし、小児でこれらを確認した報告はなく、実際に起こるかどうか明らかではない。

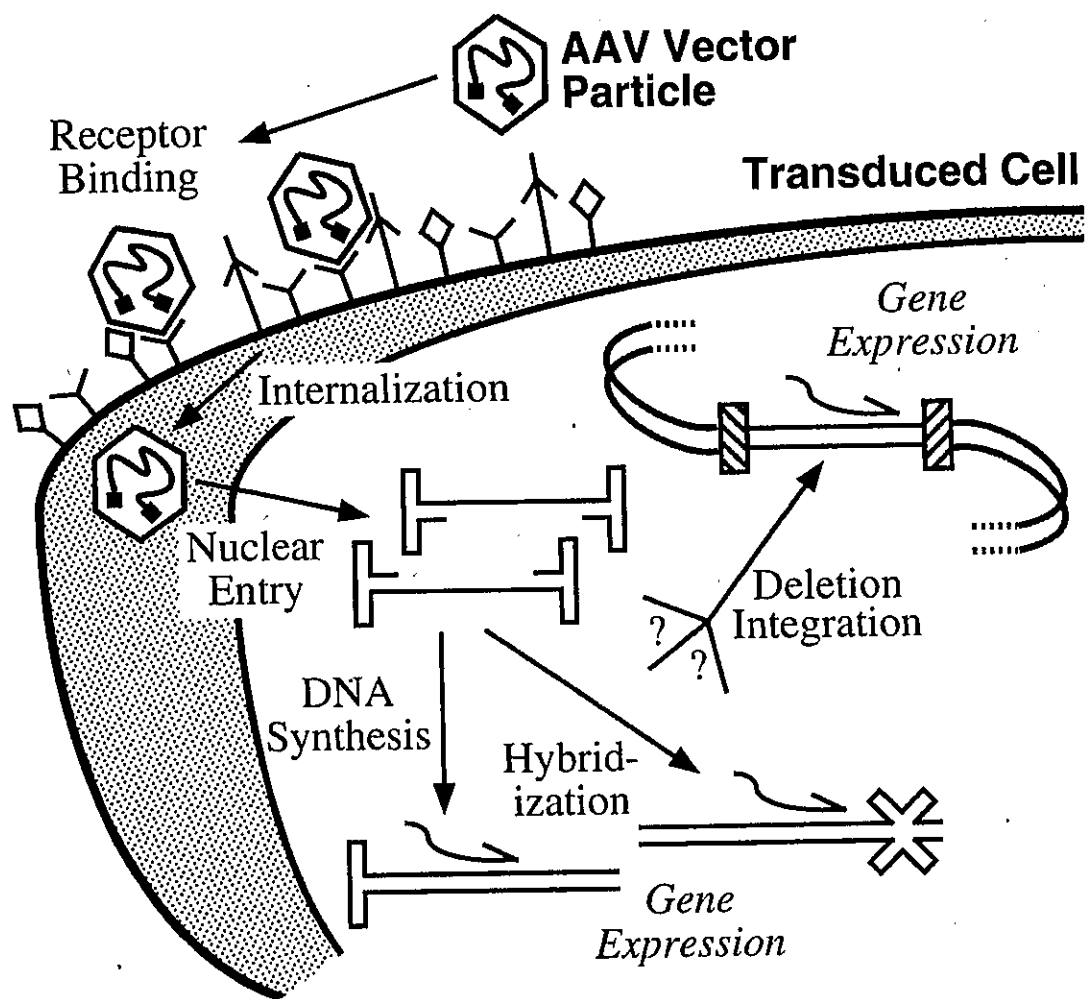


図 7. AAV の感染と発現様式²⁷

VII 安全性についての評価

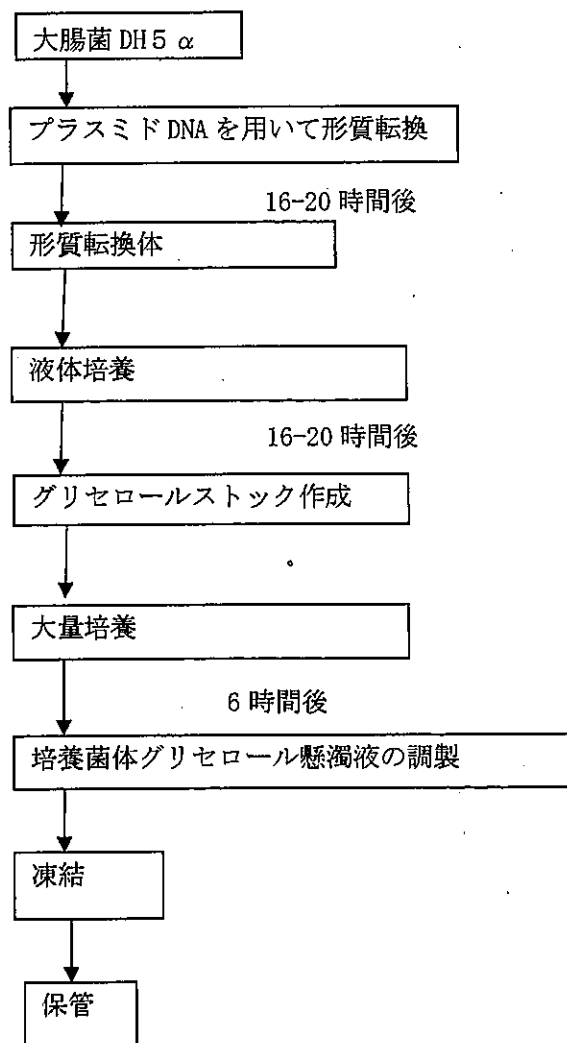
VII.1 遺伝子導入方法の安全性

VII.1.1 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの純度

本臨床研究に用いる AAV ベクター AAV-hAADC-2 は、パッケージング細胞 293T/17 に 3 種類のプラスミドを導入し産生する。AAV ベクター AAV-hAADC-2 を安定かつ安全に供給するために、細胞ならびにプラスミドにはセルバンクシステムを使用する。293T/17 のマスターセルバンク (MCB) は、シードセル (ATCC CRL-11268) より、ワーキングセルバンク (WCB) は 293T/17 の MCB より、タカラバイオ株式会社 (滋賀県大津市瀬田 3-4-1) の GMP 製造施設の管理区域で製造する。また、プラスミドのマスターワーキングセルバンク (MWCB) は、株式会社 AMBiS (沖縄県南城市大里字大里 2013) の GMP 製造施設の管理区域で製造する。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生国産のものを使用する。

VII.1.1.1 プラスミド MWCB の作製

プラスミド MWCB の作製フローを図 8 に示す。株式会社 AMBiS の GMP 製造施設の管理区域にてプラスミドを用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。形質転換体を液体培養し、グリセロールストックを作製した。グリセロールストックを大量培養し、150 バイアルの MWCB が GMP 遵守下で作製された。プラスミド MWCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件及び保存条件等を参考資料 2「プラスミド MWCB 作製方法」に記載する。



液体窒素保管容器（気相）

図 8 プラスミド Master Working Cell Bank (MWCB) 作製フローチャート

作製された MWCB に関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 3-5

「pAAV-hAADC-2 プラスミド MWCB の品質試験及び結果」「pRC-BI-khB342-2 プラスミド MWCB の品質試験及び結果」「pHelper プラスミド MWCB の品質試験及び結果」参照）。

1. 生菌数試験
2. コロニー形態試験（単一性試験）
3. プラスミド DNA 保持率試験
4. プラスミド DNA 制限酵素地図試験

5. プラスミド DNA 塩基配列試験

VII.1.1.2 プラスミドベクターの製造

プラスミドベクターの製造フローを図 9 に示す。作製したマスターワーキングセルバンク (MWCB) を株式会社 AMBiS の GMP 製造施設の管理区域にて拡大培養する。培養後、回収した菌体はアルカリ SDS 処理し、遠心後上清液を回収する。さらにゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを行い、膜濃縮処理にて最終組成バッファーに置換する。バッファー置換後、濃度調整を行い無菌濾過処理後、2 mL クライオバイアルに目標 250 μ g/バイアルとなるように充填する。充填後、 -80°C にて凍結保存する。

プラスミドベクターの製造においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件を参考資料 6「プラスミドベクターの製造方法」に記載する。

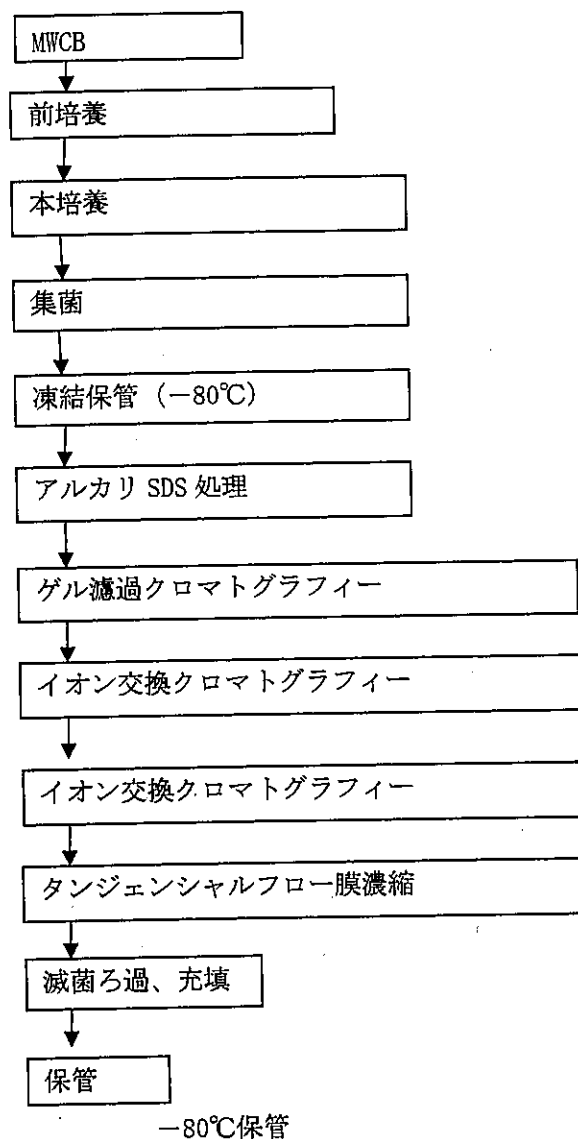


図9 プラスミドベクター 製造フローチャート

製造されたプラスミドベクターに関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 7-9 「pAAV-hAADC-2 プラスミドベクターの品質試験及び結果」「pRC-BI-khB342-2 プラスミドベクターの品質試験及び結果」「pHelper プラスミドベクターの品質試験及び結果」参照）。

1. 性状試験
2. DNA 濃度及び純度試験
3. pH 測定試験

4. エンドトキシン試験
5. 制限酵素地図試験
6. 塩基配列試験
7. 純度試験（電気泳動法）

VII.1.1.3 293T/17 MCB の作製

293T/17 MCB の作製フローを図 10 に示す。タカラバイオ株式会社の GMP 製造施設の管理区域にて 1 バイアルの 293T/17 MCB 用シードセル（ATCC CRL-11268）より拡大培養され、最終的に 56 バイアルの 293T/17 MCB が Good Manufacturing Practice (GMP) 遵守下で作製された。293T/17 MCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件を参考資料 10「293T/17 MCB の作製方法」に記載する。

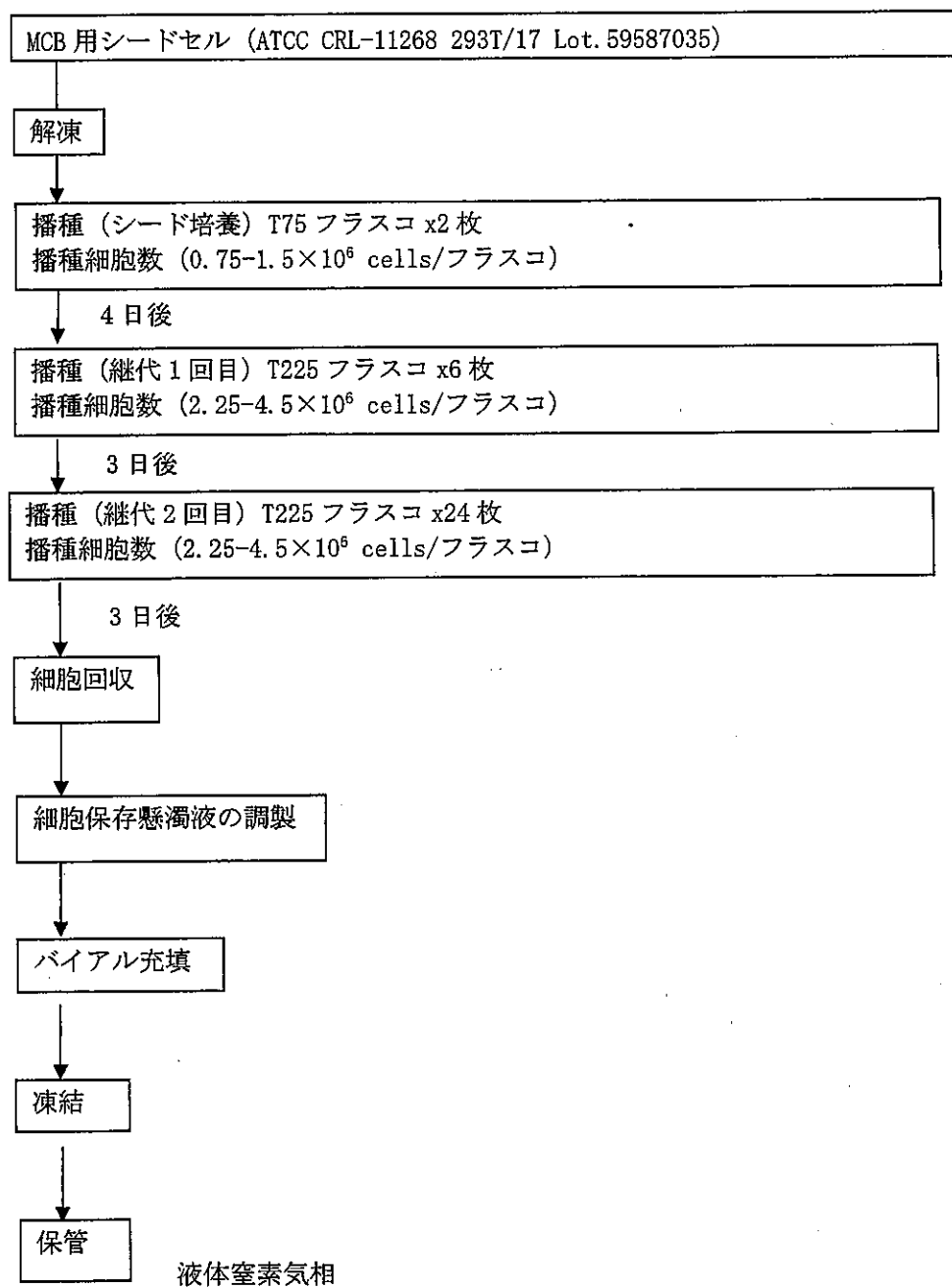


図 10 293T/17 MCB 作製フローチャート

作製された MCB に関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 12「293T/17 MCB 試験成績書」参照）。なお、品質試験の概要は、参考資料 11「293T/17 MCB の品質試験および結果」に示す。

1. 細胞生存率試験（トリパンブルー法）
2. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定
3. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）
4. 無菌試験
5. *in vitro* ウイルス試験
6. *in vivo* ウイルス試験
7. *in vitro* ウシウイルス／ブタウイルス試験
8. 形質転換試験
9. レトロウイルス粒子試験
10. *in vitro* レトロウイルス試験（培養法）
11. *in vitro* レトロウイルス試験
12. PCV/BCV ウイルス否定試験
13. HIV-1/2 ウイルス否定試験
14. HTLV-1/2 ウイルス否定試験
15. HAV ウイルス否定試験
16. HBV ウイルス否定試験
17. HCV ウイルス否定試験
18. HHV-6/7/8 ウイルス否定試験
19. hCMV ウイルス否定試験
20. EBV ウイルス否定試験
21. HPV B-19 ウイルス否定試験
22. SV40 ウイルス否定試験
23. AAV ウイルス否定試験

VII.1.1.4 293T/17 WCB の作製法

293T/17 WCB の作製フローを図 11 に示す。タカラバイオ株式会社の GMP 製造施設の管理区域にて 1 バイアルのマスターセルバンク (293T/17 MCB) より拡大培養され、最終的に 183 バイアルの 293T/17 WCB が GMP 遵守下で作製された。293T/17 WCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件及び保存条件等を参考資料 13「293T/17 WCB の作製方法」に記載する。

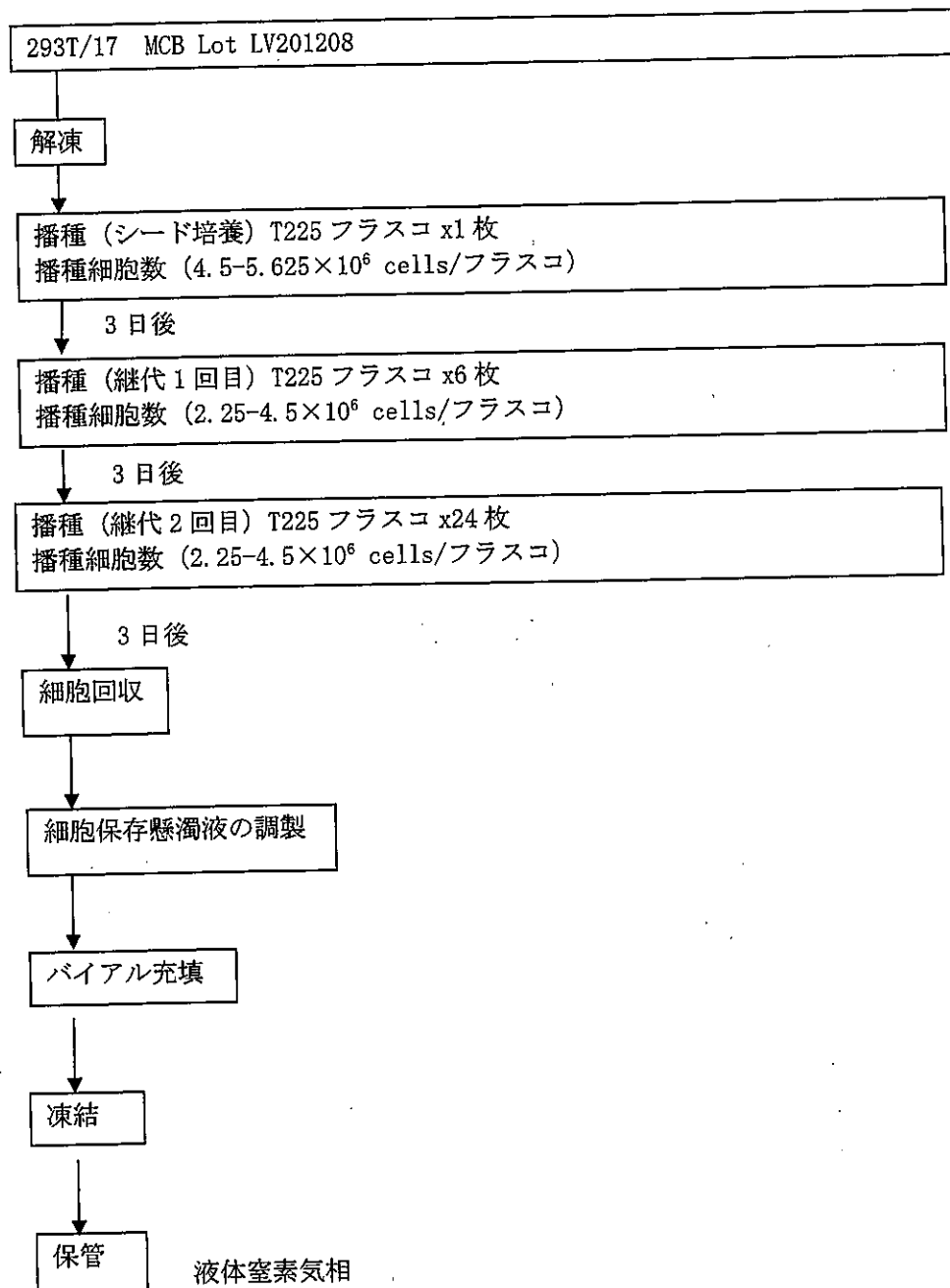


図 11 293T/17 WCB 作製フローチャート

作製された 293T/17 WCB に関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 15「293T/17 WCB 試験成績書」参照）。なお、試験方法の概要は、参考資料 14「293T/17 WCB の品質試験および結果」に示す。

1. 細胞生存率試験（トリパンプルー法）
2. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定
3. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）
4. 無菌試験

VII.1.1.5 AAV-hAADC-2 の製造方法

AAV-hAADC-2 の製造フローを図 12 に示す。AAV-hAADC-2 の製造は、1 バイアルの 293T/17 WCB を用いて行う。WCB の細胞を解凍後、培養を開始し、製造に必要なスケールまで増殖させる。培養用容器において培養細胞が接着面のおよそ 50～80% に広がった状態に達した後、リン酸カルシウム法により 3 種のプラスミドを導入する。導入翌日、培地を交換し生産培養を経て生産細胞を回収する。回収した細胞は、-80℃で保存して抽出・精製工程に用いる。ウォーターバスにて生産細胞を解凍・ベクター抽出後、粗精製処理を行い、セシウム密度勾配超遠心によって精製し、-80℃で保存する。精製品は解凍後タンジェンシャルフローフィルトレーション（TFF）によってバッファー交換を行い、これをバルク製品として-80℃で凍結する。バルク製品は解凍後濃度調製を行い 0.22 μ m のフィルターにより最終濾過滅菌を行ってクライオバイアルに充てんし-80℃で保存したものを最終製品とする。

製造に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養・精製条件及び保存条件等を参考資料 17「AAV-hAADC-2 の製造方法」に記載する。製造は全てタカラバイオ株式会社の GMP 製造施設の管理区域（参考資料 16「製造施設（位置・構造設備）」）にて GMP 遵守下で行われる。また、タカラバイオ社の製造施設から自治医科大学附属病院へのウイルスベクターの輸送は、凍結・ドライアイス詰で、輸送中の温度変化をモニター・記録して行う。

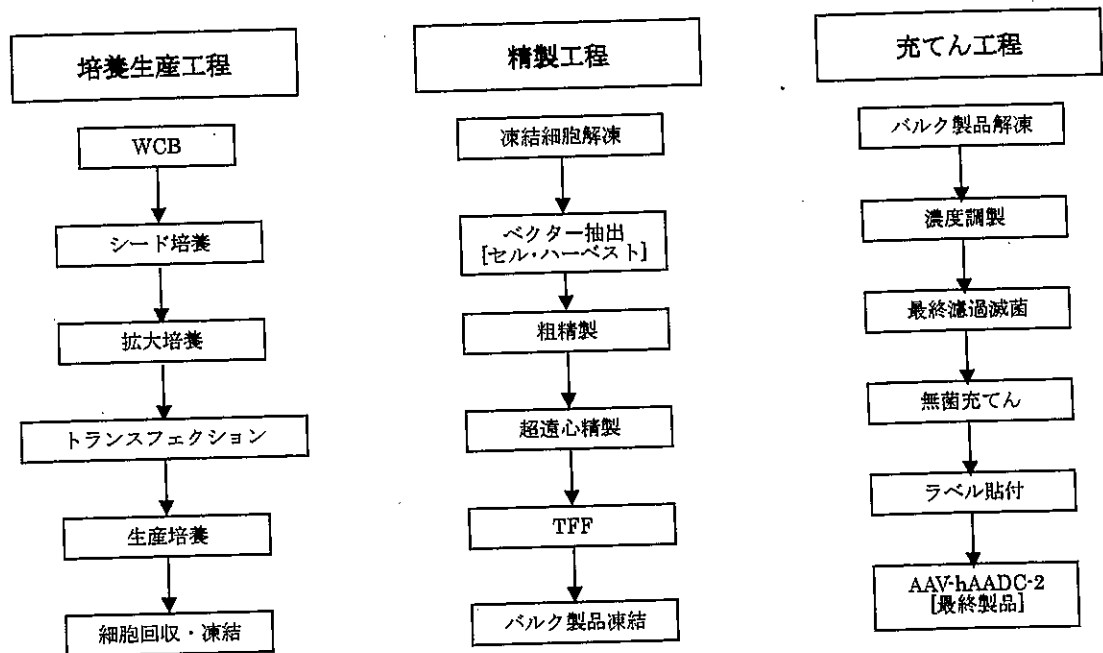


図 12 AAV-hAADC-2 の製造フロー

AAV-hAADC-2 に関しては、以下の品質試験を行う（1ロットの結果を参考資料 19「AAV-hAADC-2 試験成績書」に示す）。なお、品質試験方法の概略は、参考資料 18「AAV-hAADC-2 の品質試験及び結果」に示す。

工程内（セル・ハーベスト）

1. *In vitro* ウイルス試験
2. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）

バルク製品

1. ベクターゲノム濃度試験

最終製品

1. ベクターゲノム濃度試験
2. エンドトキシン試験
3. 純度試験

4. 導入効率試験
5. 感染力価試験
6. 性状試験
7. pH 試験
8. 浸透圧試験
9. 無菌試験
10. ウイルスベクター純度試験（電子顕微鏡）
11. 塩基配列試験
12. oriDNA 配列定量試験（Q-PCR 法）
13. rcAAV 否定試験
14. セシウム残留試験
15. キャプシド率試験
16. ヒトゲノム DNA 残留試験
17. ベンゾナーゼ残留試験

VII.1.2 患者に投与する AADC 遺伝子の純度およびその安全性

ベクターは最終濃度 0.05 %未満の Poloxamer 188 を含む pH 7.4 の PBS にさらに最終濃度 200mM となるように塩化ナトリウムを加えた溶液内に浮遊しており、患者に投与する際には必要に応じて生理食塩水でベクター溶液を希釈する。PBS はリン酸水素二ナトリウム-リン酸二水素カリウム緩衝生理食塩水である。これらの物質はいずれも国内で医薬品添加物としての使用実績があり、国内承認注射用医薬品、欧州薬局方もしくは米国医薬品集の生物学的製剤の製造に適合する製品、又は cGMP 下で製造された製品を使用する。いずれも同一投与経路での承認前例は無いが、静脈内投与、筋肉内投与あるいは皮下注射等での最大使用量を超えない投与量にて使用する。

VII.1.3 増殖性ウイルスの出現の可能性

元来野生型の AAV は単独では複製できず、複製するためにはアデノウイルスや単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在を必要とする。さらに AAV ベクターは構築の段階でウイルス由来の遺伝子の大部分が除去されているため、ヘルパーウイルスが存在しても複製することはできない。唯一の可能性としてベクター作製時に非相同組換えにより増殖性ウイルスが出現することが考えられるが、ITR をコードする DNA 断片と Rep、Cap をコードする DNA 断片は異なったプラスミド上にあり、その可能性は極めて低いと考えられる。AAV ベクター AAV-hAADC-2 の試験項目に rcAAV 否定試験が含まれており、増殖性ウイルス陰性の AAV ベクターのみ臨床使用する。

VII.1.4 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの細胞傷害性

AAV ベクターを用いた場合の細胞傷害性は一般的に低い。本臨床研究に用いる濃度以上の AAV ベクターをサルの脳内に注入した前臨床研究では、細胞傷害性は認められなかった。これまで血友病 B に対して行われた臨床研究においては、AAV ベクターの肝臓への遺伝子導入を行った 2 例で軽度の肝逸脱酵素の一過性上昇が認められたが²⁸、骨格筋内への注入では悪影響は認められていない。パーキンソン病に対する AAV ベクターによる遺伝子治療については、これまでにベクターに関連する副作用は報告されていない。今回の治療により細胞傷害が起こる可能性は極めて低いものと考えられる。

VII.1.5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

AAV ベクターを用いた血友病 B の臨床研究において、肝動脈経路でベクターを投与した際に、数週間精液中へのベクターの排出が認められた。しかしながら、その後の検討で、生殖細胞に対して高力価のベクターを作用させた場合にも、遺伝子導入が起こる可能性は極めて低いことが示された²⁹。本臨床研究では血友病の臨床研究に用いられた量のおおよそ 1/100 程度の量のベクターを頭蓋内に局所投与するものであり、標的とした神経細胞以外に顕著な遺伝子導入が起こる可能性は低い。サルの脳へのベクター投与実験（最大投与量： 4.35×10^{10} vg）では脾臓、心臓、肝臓、卵巣へのベクターゲノムの取込みは認められなかった。

VII.1.6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究では血友病の臨床研究に比べて極めて少ない量のベクターを局所に投与することから、ベクターを投与した患者から有意な量のベクター排出がみられる可能性は低いと考えられる。しかしながらベクターが排出された場合には、本臨床研究の対象となる患者以外に感染する可能性を否定することはできない。ベクター拡散の可能性を最小限にするために、本臨床研究の対象患者はベクター投与後、一定の方法で隔離する。また、患者の血液は PCR 法でベクター DNA が陰性になるまで検査する（「IX.5.4. 臨床検査および観察項目」を参照のこと）。なお、当施設で施行されたパーキンソン病遺伝子治療臨床研究においては、被験者 6 人全員 3 日間体外へのベクターの排出が認められないことを確認した後、一般病棟へ移動した。

VII.1.7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

AAV ベクターは遺伝子が導入された細胞の染色体に組み込まれる可能性があるが、その確率や程度は著しく低いものと推定される。宿主細胞の DNA に組みこまれた結果として最も懸念されるのは、外来遺伝子の挿入によりがん遺伝子が活性化したり、がん抑制遺伝子が不活化されたりすることで発がんの危険性が高まることである。遺伝子導入の結果として染色体内へ遺伝子が組み込まれる可能性は完全には否定できないが、極

めて低いものと思われる。また、今回遺伝子導入の標的とするのは非分裂細胞と考えられるニューロンであることから、遺伝子を導入した細胞が腫瘍化する危険性は低いものと考えられる。

VII.1.8 がん原性の有無

元来、非常に高率（～80%）に肝細胞癌を生じるマウスに AAV ベクターを投与した際に、肝細胞癌の発生率が上昇したという報告³⁰があるが、通常の動物では癌原性はほとんどないと考えられる³¹。

VII.2 遺伝子産物の安全性

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る。本臨床研究では、遺伝子変異により本酵素が先天的に合成できずに欠損している患者において、酵素を発現するものであり、遺伝子発現における安全性は高いと考えられる。また、AADC は、L-dopa をドパミンに変換すると共に、5-HTP を基質としてセロトニンを生成する。よって、ドパミン、セロトニンの合成は内因性の L-dopa と 5-HTP に規定され、AADC の過剰発現が起こっても生成されるドパミンと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。

VII.3 細胞の安全性

VII.3.1 培養細胞の純度

293T/17 細胞は VII.1.1.3 及び VII.1.1.4 に示すようにタカラバイオ社の GMP 製造施設における管理区域内でマスターセルバンク並びにワーキングセルバンクが作製されて使用される。各セルバンクの品質試験において、細菌、真菌、マイコプラズマ、ウイルス等による汚染の有無についてテストされ、安全性が確認されている。細菌および真菌については直接培地に接種する培養法により、細菌、真菌の増殖を認めず、安全であることが確認された。マイコプラズマに関しては寒天培地及び液体培地を用いた培養法および Vero 細胞を用いた DNA 染色法のいずれでも検出されず安全であることが確認された。ウイルスについては MCB を検体として *in vitro*、*in vivo* でウイルスの増殖試験を行ったがウイルスの感染を示す徴候は検出されず 293T/17 細胞の安全性が確認された。

VII.3.2 細胞の遺伝子型、表現型の安全性

複数の細胞内酵素（Nucleoside phosphorylase (NP)、Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)、Malate dehydrogenase (MD)、Aspartate aminotransferase (AST)）の発現パターンを電気泳動法によって比較し、他種の細胞の混入の有無をテ

ストし、混入を認めないことを確認している。また実際のベクター作製には 293T/17 ワーキングセルバンクを用いており、表現型が安定している細胞をベクター作製に使用している。

VII.3.3 被験者に投与する細胞の安全性

本計画では被験者に細胞を投与することはない。

VII.4 AAV 以外のウイルスベクターに起因する重篤な有害事象

これまで臨床遺伝子治療における重篤な有害事象の例は二つ報告されている。一つはアデノウイルスベクター全身投与を受けた患者が死亡した例、もう一つはレトロウイルスベクターによる治療を受けた免疫不全症患者に白血病が発症した事例である。

① アデノウイルスベクターによる全身性炎症反応症候群（1999 年、米国）

1997 年米国ペンシルベニア大学にて、アデノウイルスベクター肝動脈内投与によるオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症の遺伝子治療が始まった。ベクター量を漸増しつつ臨床試験を継続していたところ、第 18 例目の患者（18 才、男性）が血液凝固異常と多臓器不全を起こし 4 日後に死亡した³²。この症例では、多量のアデノウイルス全身投与により患者の自然免疫系が強く活性化され、全身性炎症反応症候群（SIRS）と呼ばれる重篤な状態に陥った。一方、より低いベクター量を投与した先行 16 例および本患者と同用量を用いた第 17 例目でもこのような副作用は起こらなかったことから、SIRS の発症には宿主側の要因も寄与していると考えられる³³。動物実験においても、ウイルス投与量の増加に伴う免疫反応の増大は直線的ではなく、SIRS 発症の予測は難しいことが示されている^{34,35}。

② レトロウイルスベクターによる白血病（2002-2005 年、フランス）

X 連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）は、サイトカイン受容体コモンガンマ鎖（gc）遺伝子の変異により細胞性および液性免疫が高度に障害される疾患である。1999 年からフランスでレトロウイルスベクターを用いた X-SCID の遺伝子治療が始まり、大半の患者が免疫能を獲得して通常の生活を送れるようになった。ところが、同国で治療を受けた患者 15 名のうち、約 3 年後に 3 名が T リンパ性白血病を発症し、1 名が死亡した。2002 年に発症した 2 例では、患者染色体中の LMO2 原癌遺伝子の近傍にレトロウイルスが組み込まれ、その異常活性化が癌化の引き金となった³⁶。最近報道された白血病第 3 例についての詳細は不明だが、LMO2 とは異なる部位へのベクター組み込みによるらしい³⁷。レトロウイルスベクターによる挿入発癌の危険性は従来から指摘されてきたが、これまで世界中でレトロウイルスが投与された数千名の患者のうち実際に発癌に至ったのは X-SCID の事例だけである。

細胞の癌化には複数の遺伝子異常が蓄積する必要がある、1個の原癌遺伝子活性化だけでは不十分である。X-SCIDの場合、治療用の gc 遺伝子自体が強力な T リンパ球増殖作用を持つという特殊事情が重なって白血病を発症したと考えられる³⁸。

本臨床研究が上記と異なる点

上記有害事象①を引き起こしたアデノウイルスは、現在臨床で用いられている遺伝子治療ベクターの中では最も免疫原性・炎症惹起性が強く、全身投与については特に慎重を期すべきであるが、死亡した患者の術前の状態は必ずしも良好ではなかったようである。一方、アデノ随伴ウイルス (AAV) は野生型にも病原性がなく、免疫原性もアデノウイルスに比べて格段に弱い。しかも、AADC 欠損症に対する本遺伝子治療では脳内の線条体に限局してベクターを注入するので、血管内にベクターを注射するのに比べて、全身の反応はさらに出にくいと考えられる (注 1)。

一方、本臨床研究では以下に掲げるいくつかの理由から、上記有害事象②のようなベクター挿入発癌の危険性はきわめて小さいと考えられる。第一に、ベクター化した AAV には、染色体に遺伝子を組み込む力は殆どない。第二に、ベクターを投与する脳内の大部分の細胞、特に標的となる神経細胞は既に増殖能力を失っている。一部の造血系由来の細胞 (ミクログリアなど) は分裂能力を有しているが、2 型 AAV はこれらの細胞に殆ど感染できない。第三に、本ベクターで発現させる AADC には、細胞増殖促進やアポトーシス抑制などのシグナル伝達機能がなく、X-SCID 遺伝子治療における gc 遺伝子の作用とは根本的に異なる。以上の点から、AADC 発現 AAV ベクターが患者の同一細胞染色体の複数箇所に組み込まれて発癌に至る可能性は非常に小さいと予想される。

注 1: ただし、大動物における AAV の急性毒性の閾値は今のところ不明である。サルへの AAV8 門脈内投与自験例では、少なくとも 1×10^{12} vg/kg までは明らかな副作用は観察されなかった。

一方サルへのアデノウイルス投与については、 5×10^{12} vg/kg を越えると急性毒性を示す³⁹が、Jessie Gelsinger はこれよりも少ない投与量 (6×10^{11} vg/kg) で死亡した。

VIII 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由

VIII.1 臨床ニーズ

AADC 欠損症は、進行により、発語がなく、臥床状態のままで、ジストニアやミオクロニーなどの不随意運動や睡眠障害も強く、苦痛が大きい疾患である。典型的患者に

おける治療法はなかった。台湾での遺伝子治療の成功例が報告されたことから、日本人患者に対しても AADC 欠損症に対する遺伝子治療実施が求められている。

日本では 4 人の患者が確認されており、患者家族の強い要望もあり、本臨床研究を計画したが、その後さらに 2 例の患者が確認された。

VIII.2 本臨床研究の品質、安全性

台湾において、本臨床研究と同じベクターを用いた AADC 欠損症に対する遺伝子治療が 4 例に実施され、効果が得られている。また、重篤な副作用は出現していない。自治医科大学で、本臨床研究と同じベクターを用いたパーキンソン病に対する遺伝子治療が 6 例に対して実施され、効果が得られている。うち 1 名に手術後、静脈性脳出血が認められたが、総括責任者はカニューレの挿入に伴う外科的手技が原因と判断し、AAV ベクターとの関連性は否定された。

本臨床研究で実施した 6 例においても、軽度の舞踏病様運動以外に問題となる有害事象は起きていない。

世界的に、AAV ベクターを使用した血友病、嚢胞性線維症、その他多くの疾患に対する臨床試験が行われており、これまで 2 型 AAV ベクターに関連した副作用は報告されていない。

VIII.3 本臨床研究の期待される有効性

AADC 欠損症患者の運動機能が改善することが期待される。

VIII.4 当施設・研究者の能力

申請者らは、AAV ベクターを使用した多くの研究を行っており、ベクターの扱いに習熟している。また、パーキンソン病患者に対して視床下核の深部電気刺激を施行しており、定位脳手術の手技を確立していると共に機能的定位脳手術認定施設として日本定位・機能神経外科学会より認定されている。小児に対する経験もある術者が実施する。

術後管理に関しても、治療後は状態が安定するまで自治医科大学とちぎ子ども医療センター PICU で管理する。小児の全身管理に習熟しており、無呼吸等の合併症があっても対応可能である。

以上のことから、本臨床研究の実施は理論的にも、実質的にも可能と思われる。

IX 遺伝子治療臨床研究の実施計画

IX.1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

IX.1.1 本臨床研究の実施に際し自治医科大学医学部附属病院内に設置される委員会

本臨床研究について、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 27 年厚生労働省告示第 344 号）に基づき審査を行うため、附属病院内に自治医科大学附属病院遺伝子治療臨

床研究審査委員会（以下、「委員会」）を設置する。委員会の設置に関しては、自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会設置規程に従うものとする。

IX.1.2 本臨床計画の実施手順

本臨床研究は抽出を行わない単一用量非対照オープン試験である。遺伝子導入手術は自治医科大学医学部附属病院手術室で、術前・術後管理は自治医科大学とちぎ子ども医療センターで行う。親権者からのインフォームドコンセントが得られた患者に対し、治療を実施する。

(1) 本臨床研究の目的

臨床研究の主要評価項目は、AADC 欠損症患者被殻内への AAV-hAADC-2 注入療法の安全性である。副次的評価項目は、① AAV-hAADC-2 注入療法の有効性であり、その判定は発作記録と臨床的評価に基づいて行う。かつ、②被殻注入 AAV-hAADC-2 の発現量も副次的評価項目とし、FMT-PET によって判定する。

(2) AAV-hAADC-2 の投与方法

AADC 欠損症患者の線条体（被殻）に、定位脳手術の手法によって AAV-hAADC-2 を注入する。対象患者は 8 例を予定し、新たに診断された患者は随時追加実施を検討する。AAV-hAADC-2 の注入量は $1 \times 10^{12} \text{vg/mL}$ の濃度で、1 箇所あたり最大 50 μL を被殻内の 4 箇所に分けて注入する。具体的には片側の被殻あたり 2 箇所、両側で計 4 箇所に各々最大 50 μL を注入する。注入量（vector genomes : vg）は 1 症例あたり 200 μL で $2 \times 10^{11} \text{vg}$ である。

(3) 前治療薬および併用薬

臨床研究治療実施日の 4 週間以前より服用している薬を前治療薬、Base line から終了または中止時の観察及び検査日まで使用した全ての薬を併用薬とする。

ドパミン受容体遮断作用を有する薬剤、免疫抑制剤、抗凝固薬、抗血小板薬、他の治療薬は Base line の 4 週間前より本臨床研究が終了するまで原則として使用してはならない。筋緊張緩和薬、抗てんかん薬は Base line の 4 週間前から評価 6（Month 3）まで変更してはならない。ただし遺伝子治療後に薬剤の効果が過剰になった場合には減量する。

(4) 対象患者

対象は当院および研究協力機関に通院中で、髄液検査、酵素活性測定、あるいは遺伝子診断で診断が確定されている AADC 欠損症患者 8 例とする。新たに診断が確定した患者が出た場合には、追加実施する。

(5) 評価項目 (資料 1)

- ① 患者情報調査 (家族に記載依頼)
 - 発作記録 - oculogyric crisis およびてんかん発作の頻度、持続時間
 - 自律神経症状 発汗、体温、脈、血圧、下痢の記録
- ② 一般身体所見 (バイタルサインを含む)
- ③ 神経学的所見 (乳幼児神経学的検査チャートを使用)
- ④ 運動機能評価スケール Alberta Infant Motor Scale(AIMS)
 - ビデオ撮影
- ⑤ 認知機能・発達検査 新版 K 式発達検査
- ⑥ 有害事象
- ⑦ 併用薬
- ⑧ 臨床検査 (血液検査、凝固検査、生化学検査、免疫検査、PCR 分析)

血液検査	赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、MCV、MCH、MCHC、白血球数、好中球数、リンパ球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、血小板数
凝固検査	PT、aPTT、INR
生化学検査	BUN、クレアチニン、Na、K、Cl、血糖、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、GOT (AST)、GPT (ALT)、Al-P、GGT (γGTP)
免疫検査	AAV 抗体、AADC 抗体
PCR 分析	患者の血液に対し、連続 2 検体が陰性になるまで、採取と分析を継続する。

- ⑨ 心電図
- ⑩ AADC のトレーサーである FMT を使用した脳の PET スキャン
- ⑪ 脳の MRI、CT
- ⑫ 脳波
- ⑬ 髄液検査
 - 髄液圧、細胞数、蛋白、糖
 - L-Dopa、Dopamine、HVA、5HIAA

(6) 評価スケジュール (資料 4)

IX.2 被験者の選択基準および除外基準

総括責任者あるいは総括責任者が指名した研究者は、本臨床研究を開始するに先立ち、被験者が選択基準に合致し除外基準に抵触しないこと、インフォームドコンセントが得られていることを確認しなくてはならない。対象者は、本臨床研究にエントリーする前に、以下に示す選択基準の全ての項目を満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しないものとする。

IX.2.1 選択基準

- ① 運動機能障害、ジストニア等の症状を持つ、AADC 欠損症患者で、髄液検査所見、酵素活性測定あるいは遺伝子診断のいずれかにより診断が確定している者。
- ② 治療実施時年齢 2 歳以上。年齢の上限は設定しない。
- ③ 他の神経変性疾患を示唆する所見を認めない患者
- ④ 治療後の頻回の診察を含め、臨床研究に必要な条件を遵守することが可能なこと
- ⑤ 臨床研究治療を実施する前の少なくとも 1 か月間、内服薬を変更しないこと
- ⑥ 患者の親権者から、インフォームドコンセントが得られること

IX.2.2 除外基準

- ① 脳血管障害をはじめ、明らかな心血管系疾患を有する患者
- ② 脳内の悪性新生物、臨床的に明らかな他の神経疾患の合併
- ③ 5 年以内の、治療済みの皮膚がんを除くその他の悪性腫瘍の病歴
- ④ コントロールされていない高血圧、具体的には収縮期血圧 160 mmHg 以上
- ⑤ 血液凝固異常症、あるいは抗凝固療法が必要な患者
- ⑥ 臨床的に明らかな免疫異常症（例えば免疫抑制薬が必要な症例）
- ⑦ MRI が撮影できない患者
- ⑧ FMT-PET で異常所見を認めない症例
- ⑨ 重篤な薬物アレルギーの既往のある患者
- ⑩ 過去 6 か月以内に、本臨床研究、他の臨床研究、治験のいずれかに参加したことのある患者
- ⑪ 以下のコントロールが困難な疾患を合併する患者
 - a) 高度な腎障害患者（血清クレアチニン > 2.0 mg/dl かつ BUN > 25 mg/dl）
 - b) 高度な肝障害（AST/GOT あるいは ALT/GPT が正常域上限の 2.5 倍以上）
 - c) コントロールが困難な糖尿病患者（随時あるいは食後血糖値 > 200 mg/dl かつヘモグロビン A1c > 9 %）
- ⑫ 全身状態が重篤な状態である患者
- ⑬ その他、総括責任者が本臨床研究の対象として不適当と判断した患者

IX.2.3 対象者の参加取りやめ

全ての対象者は本臨床研究のいかなる時点においても、不利益を被ることなく、本臨床研究への参加を取りやめることができる。この場合であっても、安全性に関する経過観察は、対象者に受け入れ可能な方法で実施すべきものとする。

IX.3 倫理的事項

IX.3.1 被験者の保護

本臨床研究に関係するすべての研究者は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号、平成29年2月28日一部改正）（及びヘルシンキ宣言（2009年韓国ソウル）に従って本臨床研究を実施する。

本プロトコールでの「医療機関」は、上記指針における「研究機関」に対応する。

IX.3.2 被験者の同意取得方法

本臨床研究の対象者は、未成年で、あるいは未成年でなくても、発語がないかわずかであり、書字も不可能で、意思表示が困難であるため、同意を得ることは不可能である。よって、親権者を代諾者として承諾を得る。被験者の親権者に対して、臨床治療研究実施医師より、臨床研究「AADC欠損症に対する遺伝子治療」参加のしおり（資料2）を基にして十分な説明を行う。さらに、研究実施医師と利害関係のない自治医科大学附属病院臨床研究支援部のコーディネーターが、研究実施医師とは独立してわかりやすく説明を行い、自由意思による同意を文書にて得ることとする。

【患者（代諾者）への説明事項】

- 1) 病名、病期、推測される予後に関する説明
- 2) 本研究が臨床研究であること
- 3) 本臨床研究のデザイン及び根拠（rationale：意義、登録数、必要性、目的）
- 4) 臨床研究治療の内容

治療用ベクター、投与方法、投与量、臨床研究全体の期間など

- 5) 臨床研究治療により期待される効果
- 6) 予期される有害事象、合併症、後遺症とその対処法について

合併症、後遺症、治療関連死を含む予期される有害事象の程度と頻度、及びそれらが生じた際の対処法に関する説明

- 7) 費用負担と補償

通常の治療にかかる費用は保険制度で賄われること、健康被害が生じた場合の補償は一般診療での対処に準ずることなど、一般診療と同様であることの説明

- 8) 代替治療法

現在の一般的治療や標準治療法の内容、効果、毒性など代替治療を選択した場合の利益と不利益

9) 予想される利益と可能性のある不利益について

臨床研究に参加することによって享受できるとされる利益と被る可能性のある不利益に関する説明

10) 病歴の直接閲覧について

「精度管理のため他の医療機関の医療関係者が医療機関の長の許可を得て病歴などを直接閲覧すること」など監査の受け入れに関する説明

11) 同意拒否と同意撤回

臨床研究参加に先立っての同意拒否が自由であることや、いったん同意した後の撤回も自由であり、それにより不当な診療上の不利益を受けないこと

※ 同意撤回とは、研究参加への同意の撤回（下記①、②）を意味し、同意の撤回が表明された場合には、下記①か②のいずれであるかを明確にし、速やかに病院長に報告すること。

① 同意撤回：研究参加への同意を撤回し、以後のプロトコールに従った治療、フォローアップのすべてを不可とすること

②（すべてのデータの研究利用を含む）同意撤回：研究参加への同意を撤回し、参加時点からのすべてのデータの研究利用を不可とすること

12) 人権保護

氏名や個人情報を守秘されるための最大限の努力が払われること

13) 臨床研究に関わる利益相反

各々の研究者が本研究に関する利益相反の有無の申告書を提出していること

利益相反があっても、それにより研究の倫理性及び科学性がゆるがないこと

14) 研究に関わる費用

本研究、またはその一部が研究費によって行われること。すなわち、臨床研究治療の実施に関わる急性期の治療費、検査費、入院費は本研究グループが負担すること

15) 研究成果の公表

本臨床研究で得られた結果は学術論文、学会にて公表すること。その際にも公表内容には個人情報に関することは含まないこと

16) データの二次利用

委員会が承認した場合に限り、個人識別情報とリンクしない形でデータを二次利用する可能性があること

17) 知的財産権の帰属

本臨床研究から生じる知的財産権は研究者に帰属すること

18) 研究組織

本臨床研究が研究助成金などの資金提供を受けている場合には、それらを記載する。

19) 質問の自由

担当医師の連絡先のみでなく、医療機関の研究責任者、臨床研究の総括責任者（または研究事務局）の連絡先を文書で知らせ、研究や治療内容について自由に質問できることの説明

代諾者の同意

本臨床研究の開始に先立ち、総括責任者、又は分担研究者が代諾者より文書による同意を得る。代諾者が臨床研究参加に同意した場合、本臨床研究の同意書を用い、説明をした医師名、説明を受け同意した患者と代諾者名、同意を得た日付の記載があることを確認する。同意の取得に際しては質問の機会と、本臨床研究に参加するか否かを決断するのに十分な時間を与え、全ての疑問点に関して被験者が満足する様に説明する事とする。また、別途定めた自治医大附属病院臨床研究支援部に属する看護師の資格を有する施設コーディネーターが説明補助を行うものとする。同意文書は2部写しを作成し、1部は患者・代諾者に手渡し、1部は施設コーディネーターが保管する。原本はカルテに保管する。

IX.3.3 被験者の安全性確保および健康被害補償

A. 安全性確保

- a. 安全性を確保するために、遺伝子導入は入院して実施し経過観察を密に行う計画である。
- b. さらに、本実施計画書の IX.5.5 「予測される副作用およびその対処方法」 に則って適切に対応する。

B. 健康被害補償

本臨床研究に関連して副作用等、本臨床研究と因果関係を有する健康被害が生じた場合の補償に関しては以下のように対応する。

- a. 急性期および症状が固定または治癒するまでの治療費、検査費、入院費は本研究グループが負担する。これは他の医療機関で治療された場合にも適用する。
- b. 但し、医療費以外の実費や、副作用等による症状が固定した後の治療費を含む費用については補償しない。

IX.4 実施期間および目標症例数

IX.4.1 予定登録数・登録期間・追跡期間

実施期間は、最終登録症例にベクターを投与した時点から9か月後までとする。ただし、5年後までは一定の評価を行い、さらに15年後まで安全性に関して長期フォローする。目標症例数は8例とする。

IX.5 遺伝子治療臨床研究の実施方法

IX.5.1 対照群の設定方法

本臨床研究は無作為抽出を行わないオープン試験であり、対照群の設定は行わない。

IX.5.2 遺伝子導入方法

被験者は治療開始 10 日前 (Day -10) までに自治医科大学附属病院に入院する。遺伝子の導入は定位的脳手術法によって被殻へ直接注入投与する。全ての外科的手技は、不随意運動疾患を対象とした定位的機能神経外科手術の標準的手法に準ずる。原則として、手術は全身麻酔下に実施することとし、麻酔の実際は同附属病院麻酔科による管理下で実施する。AAV-hAADC-2 の注入目標である被殻は手術に先だって撮影する MRI 画像に基づき解剖学的・空間的位置を同定する。具体的には、同附属病院における通常臨床で使用している定位的脳手術装置並びに定位的脳手術支援ソフトウェア

(FrameLink, Medtronic 社) を用いて被殻に AAV-hAADC-2 の注入点 2 ヶ所を設定する。注入点は被殻の中心に近い背外側よりで十分に離れている事を条件として症例ごとの脳画像に基づいて決定する。

頭蓋骨への穿孔は頭蓋骨円蓋部に左右各々 1 ヶ所とし、そこを刺入点とし 4 つの目標部位に AAV-hAADC-2 を注入投与する。穿孔位置は通常的定位的脳手術で穿頭する位置に準じて冠状縫合の前方、正中より約 4 cm の位置を目安とし MRI 画像で脳表から AAV-hAADC-2 注入部位までの経路にて脳血管を回避すべく適宜調整する。注入部位までの穿刺には定位的脳手術装置に取り付けた micromanipulator を用いて AAV-hAADC-2 注入用カニューレを目標点まで刺入する。通常的定位的脳手術手技に則り、X 線透視装置でカニューレ先端位置を確認しながら実施する。

AAV-hAADC-2 を含む溶液は、専用のシリンジポンプを用いて 3 μ l/min の速度で注入する。2 ヶ所目の注入が終了したらカニューレを抜去し、2 番目の注入部位にカニューレを刺入する。一つの刺入経路で十分離れた 2 カ所の注入目標を確保することが困難な場合には、1 カ所目の注入後にカニューレを抜去し、別の経路から刺入し直す。先と同様に AAV-hAADC-2 を含む溶液を標的部位に注入する。対側も同様に、1 つの穿孔部から被殻内 2 ヶ所の目標部位に AAV-hAADC-2 を含む溶液を注入する。4 ヶ所への注入が終了したら、カニューレを抜去した通常の穿頭手術に準じて閉創を行う。頭蓋から定位的脳手術用フレームを取り外して、全身麻酔から覚醒後に頭部 CT 検査を実施し穿刺部位の確認および頭蓋内出血などの合併症の有無を確認する。定位的脳手術装置を含め、手術に用いた全ての医療器具はウイルスの核酸に対する不可逆的アルキル化作用を有するエチレンオキシドガスを用いた滅菌処理を施す。

IX.5.3 前処置および併用療法の有無

通常の全身麻酔時に行う処置の他には特に前処置を行わない。内服薬の投与量は臨床研究治療を実施する前の4週間前から、評価6 (Month 3) までは変更しない。なお適切なリハビリテーションは随時行って良いこととする。

IX.5.4 臨床検査項目および観察項目

IX.5.4.1 検査・観察のスケジュール

遺伝子導入手術後2週間 (Day 14) までは入院することとする。患者は資料4に表示したスケジュールにしたがって評価と臨床検査を受ける。ベクター投与直後2日間は個室に隔離し、外出・外泊は認めない。なお投与後2日目の時点でPCR法による検査でベクターDNAを認める場合には、ベクターDNAが陰性になるまで個室への隔離期間を延長する。陰性になれば、スケジュールにしたがって外来における観察を受けることとする。隔離解除後も、投与後7日以内の患者に咳嗽・気道分泌物増加等の呼吸器症状、嘔吐・下痢等の消化器症状、頻尿・発熱等の尿路感染症状等が出現した場合は、個室に再隔離し、血液及び分泌物のウイルス検査を行う。個室隔離は、これらの症状が軽快するまで又は検査にて本遺伝子組換え生物の陰性が確認されるまで、医師の判断により必要とされる期間継続する。

PETスキャンはBase line (Day -30 ~ -1)、評価9 (Month 6)、評価19 (Month 24)、評価31 (Month 60) に実施する。その結果によって、それぞれの用量ごとにどれだけのAADCが発現したかを予測することが可能である。尚、Base line に関しては、血液、凝固検査、生化学検査以外は、状態に変化がなければ3か月前までの検査結果の使用を可能とする。

AAVカプシド蛋白質に対する抗体は、Base line、評価9 (Month 6) に患者の血清を採取して測定する。

Baseline

手術直前の評価 (Day -30 ~ Day -1)

対象者はDay -10 までには自治医科大学とちぎ子ども医療センターに入院する。

インフォームドコンセント、病歴の聴取、発作記録

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

Alberta Infant Motor Scale (AIMS)

ビデオ撮影、新版K式発達検査

併用薬、有害事象

PET scan、頭部MRI検査、脳波

臨床検査 (血液、凝固検査、生化学、AAV抗体、AADC抗体)

PCR検査

心電図

手術 (Day 0)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

併用薬、有害事象

頭部 CT 検査：手術直後に実施

(Day 1)

有害事象、PCR 検査、臨床検査 (血液、凝固検査、生化学)

(Day 2)

有害事象、PCR 検査

(Day 3)

有害事象、頭部 CT 検査

(Day 7)

有害事象、PCR 検査

評価 1 (Day 7 ± 3 days) 入院中の評価

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

併用薬、有害事象、頭部 MRI 検査

臨床検査 (血液、生化学)

評価 2 (Day 14 ± 3 days) 入院中の評価

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

併用薬、有害事象

臨床検査 (血液、生化学)

<1 年目の経過観察開始>

評価 3 (Day 28 ± 7 days) Month 1

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

頭部 MRI 検査、脳波

臨床検査（血液、生化学）、髄液検査

評価 4 （Day 42 ± 7 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見
併用薬、有害事象

評価 5 （Day 56 ± 7 days） Month 2

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見
併用薬、有害事象

評価 6 （Month 3 ± 14 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見
AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

臨床検査（血液、生化学）

評価 7 （Month 4 ± 7 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）

併用薬、有害事象

評価 8 （Month 5 ± 7 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）

併用薬、有害事象

評価 9 （Month 6 ± 14 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見

AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

PET scan、頭部 MRI 検査、脳波

臨床検査（血液、生化学、AAV 抗体、AADC 抗体）

評価 10 （Month 7 ± 7 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）

併用薬、有害事象

評価 11 (Month 8 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)

併用薬、有害事象

評価 12 (Month 9 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

評価 13 (Month 10 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)

併用薬、有害事象

評価 14 (Month 11 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む) 併用薬、有害事象

評価 15 (Month 12 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査、脳波

併用薬、有害事象

臨床検査 (血液、生化学)

< 2 年目の経過観察開始 >

評価 16 (Month 15 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

併用薬、有害事象

評価 17 (Month 18 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

評価 18 (Month 21 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見
併用薬、有害事象

評価 19 （Month 24 ± 14 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見

AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

PET scan、脳波

臨床検査（血液、生化学）

<3 年目の経過観察開始>

評価 20 （Month 27 ± 14 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）

併用薬、有害事象

評価 21 （Month 30 ± 14 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見

併用薬、有害事象

評価 22 （Month 33 ± 14 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）

併用薬、有害事象

評価 23 （Month 36 ± 14 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見

AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査、脳波

併用薬、有害事象

髄液検査

臨床検査（血液、生化学）

<4 年目の経過観察開始>

評価 24 （Month 39 ± 14 days）

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）

併用薬、有害事象

評価 25 (Month 42 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見
併用薬、有害事象

評価 26 (Month 45 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)
併用薬、有害事象

評価 27 (Month 48 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見
AIMS
ビデオ撮影、新版 K 式発達検査、脳波
併用薬、有害事象
臨床検査 (血液、生化学)

<5 年目の経過観察開始>

評価 28 (Month 51 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)
併用薬、有害事象

評価 29 (Month 54 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見
併用薬、有害事象

評価 30 (Month 57 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)
併用薬、有害事象

評価 31 (Month 60 ± 14 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見
AIMS
ビデオ撮影、新版 K 式発達検査
PET scan、脳波
併用薬、有害事象
臨床検査 (血液、生化学)

研究終了後の長期追跡調査

AADC 遺伝子治療実施後 15 年間にわたり、1 年に 1 回の頻度で以下の項目についてサンプリングを行い、必要時に検査を実施する。

- 1) 転帰
- 2) 一般身体所見、神経学的所見、ビデオ撮影
- 3) AIMS
- 4) 臨床検査（血液、生化学）

IX.5.5 予測される副作用およびその対処方法

IX.5.5.1 ベクターによる合併症

ベクターの投与が炎症反応を惹起し、発熱などの全身症状や脳浮腫による痙攣や意識障害を招来する可能性は低いと考えられるが完全には否定することはできない。患者を注意深く観察することによって合併症の発生をいち早く察知し、発熱に対しては解熱剤を、痙攣に対しては抗痙攣薬を、意識障害に対してはグリセオール等の脳浮腫治療薬を適切に使用して重篤な続発症に陥るのを予防する。

AAV-hAADC-2 ベクターの投与により、ウィルスカプシドに対する免疫反応が生じる可能性がある。その場合には、ベクター再投与の際に治療遺伝子の発現に影響が生じるおそれがあり、以降の AAV を使った治療の対象から除外されることも考えられる。

AAV ベクターが患者細胞の染色体に組み込まれる可能性は否定できないが、その確率は著しく低いものと推定される。万一、このような事態が生じた場合に最も懸念されるのは、発がんの危険性が高まることである。身体所見および画像診断などを通じて、早期発見に努める。またベクター DNA が生殖細胞に組み込まれることは考えにくいですが、その可能性を完全に否定することはできない。将来、生殖が可能になった場合には、妊娠・出産について相談する。

IX.5.5.2 手術による合併症

定位脳手術は侵襲の少ない手技であるが、予期しない合併症を起こす危険は避けられない。全ての定位脳手術における手術合併症の報告は、大人では 5 % 以下で、出血、感染および麻酔の合併症が主である⁴⁰。小児では実施例が少なく、合併症の頻度は明瞭ではないが、4 歳 0 ヶ月以上の児については当該研究機関での使用経験もあり、安全に実施可能である。一方台湾では、さらに若年（2～3 歳）の患者について、金属フレームに比べ接触は柔軟でありながら安定した固定が可能な樹脂フレームを用いた脳定位手術機器を使用して AAV-AADC 遺伝子治療の実績を積み重ねている。そこで当該研究機関でも、患者の年齢・頭蓋骨の厚さ・体格・全身状態等を総合的に判断して従来用いら

れてきた機器と新規導入機器を使い分けることにより、これまでと同等以上の安全性が確保できると判断した。

頭蓋内出血：cannula の刺入経路に血管があれば、それを傷つけて出血する危険がある。その可能性は 2～3 % と報告⁴¹されているが、その大半は無症候性の小さい出血である。しかし稀に麻痺などの重篤な神経脱落症状を残す危険もゼロではない。液体の遺伝子溶液を注入する操作は、通常の定位脳手術で行われる熱凝固や生検などに比して出血を来す可能性は低いと思われる。被殻で出血が起こり、中等度以上の血腫を形成した場合、対側の運動麻痺を起こす可能性がある。また被殻に到達するまでの経路は主に前頭葉であるが、この領域では出血が起こっても神経症状や後遺症を出すことは少ない。前頭葉内で中等度以上の出血が起こったときにみられる可能性のある症状は、注意力の障害、感情の障害、意欲の障害、記憶障害、運動性失語、構音障害、運動麻痺などである。出血の部位にかかわらず、万一、後遺症を残す可能性があるほどの出血を来した場合は、この遺伝子治療を中断して、開頭による血腫除去手術を含む脳出血に対する治療を優先する。

感染：治療用ベクターを溶かした液は完全に無菌であり、感染の危険は極めて低いと考えられる。ただし皮膚を切開し、頭蓋骨に穴をあける操作自体が、術後に髄膜炎などの感染症を引き起こす危険性は低い、完全に否定できない。そこで定位脳手術の際に、通常の脳神経外科手術時に行われている抗生物質の予防投与を行う。

麻酔の副作用・合併症：全身麻酔の副作用と合併症については、担当する麻酔科医より説明を行い、別途麻酔についての承諾を得る。

上記以外にも手術に関係して、予想し得ない重篤な副作用が現れる可能性がある。有害事象の一部は個体差によるものが考えられるが、予想し得ない副作用の中には回復不可能なものも含まれる可能性がある。副作用が生命に影響をおよぼしたり、重篤な後遺症を残す可能性がある場合は本臨床研究を中断し、外科的治療を含む適切な処置を優先する。

IX.5.5.3 AADC 遺伝子導入に伴う副作用

治療前は、脳内でドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンおよびセロトニンが欠乏している状態で、その前駆体である L-dopa や 5-HTP が過剰になっている状態である。そこに、代謝酵素を導入するために、カテコールアミン、セロトニンが急激に増加し、一過性にドパミン、セロトニン過剰による症状が出現する可能性がある。台湾での治療で一番多かったのは一過性のジスキネジアで、口部から顔面のジスキネジアで嚥下障害を来し、3 か月間経管栄養を要した例もあった。また、チアノーゼを伴う無呼吸発作が 10 か月間反復した例もあった。

術直後は PICU で管理し、副作用に留意して、出現時には対応する。

IX.5.6 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準および中止判定基準

IX.5.6.1 主要評価項目

AADC 欠損症患者被験者内への AAV-hAADC-2 注入療法の安全性

有害事象に関し、発作記録、一般身体所見、神経学的所見の臨床評価、臨床検査、髄液検査、頭部 MRI、脳波で判定。

A. 安全性の評価

有害事象とは、研究開始から観察終了時（5 年後）あるいは観察中止時までの間に、被験者に生じたあらゆる好ましくない医療上の出来事を指す。治療用ベクターとの因果関係の有無は問わない。有害事象の症状、発現日、程度、処置の有無、治療用ベクターとの因果関係、経過（回復した場合はその回復日）を調査し、症例報告書に記入する。

総括責任者またはその他の研究者は、有害事象に対する医療が必要になった場合には、速やかに被験者にその旨を伝える。同時に、適切な処置を施し、被験者の安全確保に留意し、その原因究明に努める。

重篤な有害事象が発現した場合、総括責任者またはその他の研究者は直ちに適切な処置をとるとともに、治療用ベクターとの因果関係の有無にかかわらず速やかに病院長に報告する。すべての重篤な有害事象および治療用ベクターとの因果関係が否定できない有害事象（副作用）が最終観察日までに消失または軽快しなかった場合には、観察終了時または観察中止時までの症状の経過を症例報告書または追跡調査用紙に記載するとともに、有害事象（副作用）消失、あるいはその原因が明らかになり症状が安定するまで経過観察を継続する。経過観察の結果については別途追跡調査用紙に記載する。なお、何らかの理由により追跡調査が不可能であった場合はその理由を症例報告書または追跡調査用紙に記入する。

また、本臨床研究期間中あるいは終了後に対象患者が死亡したときには、死亡原因の特定および治療の病理学的評価を行うため、死亡原因の如何を問わず剖検を行うよう努力する。被験者に対しても、本治療の開始前にその可能性について説明を行っておく。

B. 有効性および安全性の安全・効果評価・適応判定部会

有効性および安全性の判定を客観的に行うため、第三者が入る有効性および安全性の判定検討委員会を設置する。同委員会の名称、構成員は下記のとおりとする。

名称：自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 安全・効果評価・適応判定部会（以下、「部会」

委員の構成：自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会委員長、同委員会規程第 7 条第 1 項第 1 号で規定される委員 2 名、同委員会規程第 3 条第 1 項第 1 号で規定されるその他委員会委員長が必要と認めた者若干名をもって構成する。部会員のうち、少なくとも 1 名は外部の者とする。

事務局：部会の事務局は自治医科大学大学事務部研究支援課が行うこととする。

部会では、被験者の一次登録後の適格性評価の判定や重篤な有害事象の報告を受けた場合における対応等について審議を行う。

また、治療開始から1か月、3か月、12か月時点での安全性及び効果の報告を研究総括責任者より受け付ける。

全被験者の臨床研究が終了し、研究総括責任者又は自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会が必要と判断した場合には臨床研究の総合判定を行う。

C. モニタリング・監査

本臨床研究におけるモニタリング及び監査については、自治医科大学が定める「人を対象とした医学系研究に関するモニタリング及び監査の標準手順書」に基づき「研究毎のモニタリングに関する計画（手順書）」と「研究毎のモニタリングに関する計画書（手順書）」を作成して実施する。

IX.5.6.2 副次的評価項目

AAV-hAADC-2 注入療法の有効性

発作記録、一般身体所見、神経学的所見の臨床評価

運動、認知機能を評価スケールで評価

臨床検査

髄液検査（L-dopa、HVA、5HIAA を含む）

頭部 MRI、脳波

被殻注入 AAV-hAADC-2 の発現量

FMT-PET : AADC のトレーサ 6-[¹⁸F]fluoro-m-tyrosine を使用した positron emission tomography

IX.5.6.3 臨床研究の中止基準

下記の情報が得られ、本臨床研究の続行が困難であると考えられる場合には、総括責任者またはその他の研究者は速やかに自治医科大学附属病院長ならびに施設内遺伝子治療臨床研究審査委員会に報告し、本臨床研究を中止する。

- a. 「予測できない」重篤な副作用の発生
- b. 「予測できる」重篤な副作用の発生数、発生頻度、発生条件等の発生傾向が、予測できないことを示す情報が得られたとき
- c. 副作用の発生数、発生頻度、発生条件等が著しく変化したことを示す研究報告があったとき

- d. がん、その他の重大な疾患、障害若しくは死亡が発生するおそれがあることを示す研究報告があったとき
- e. タカラバイオ株式会社が AAV-hAADC-2 の開発、評価、あるいは研究の中止を決めたとき

IX.5.6.4 臨床研究への参加取りやめおよび脱落基準

本臨床研究では、治療は1回の定位脳手術による脳内注入であるため、治療行為自体の中止はできない。治療後の観察期間に①被験者から参加取りやめの申し出があった場合、②再三の連絡にもかかわらず被験者が来院しなくなったときなど、治療用ベクター注入後の調査・観察および検査が実施不能となった場合や、③他の治療への変更を必要とした場合、④有害事象（治療用ベクター注入との因果関係がないものを含む）が発現し、総括責任者またはその他の研究者が観察を中止すべきと判断した場合には、観察中止日およびその理由を症例報告書に記入する。なお、有害事象の発現など安全性に問題が生じ中止した場合には、総括責任者またはその他の研究者は速やかに適切な処置を行い、被験者の安全が確認されるまで追跡調査を行う。

IX.5.7 有害事象が発生した場合の措置

IX.5.7.1 有害事象が発生した場合

有害事象とは、研究開始から観察終了時（5年後）あるいは観察中止時までの間に、被験者に生じたあらゆる好ましくない意図しない徴候（臨床検査値の異常も含む）、症状、疾患であり、治療用ベクターとの因果関係は問わない。

本臨床研究で治療用ベクターが注入された被験者に生じるあらゆる好ましくないあるいは意図しない反応（臨床検査値の異常変動を含む）のうち、治療用ベクターとの因果関係が否定できない反応を副作用と定義する。

総括責任者又は分担研究者は、有害事象に対する処置が必要になったことを知った場合、被験者にその旨を伝える。また、総括責任者又はその他の研究者は、有害事象の発現に際して適切な処置を施し、被験者の安全確保に留意し、その原因究明に努める。

また、以下の分類を用いて、症例報告書に記入する。

1) 有害事象名と有害事象の程度

有害事象名：総括責任者またはその他の研究者は、可能な限り個々の症状または徴候ではなく、特定の疾患や症候群を確認して症例報告書に記載する。しかし、報告された症状や徴候が特定の疾患や症候群の構成要素とは考えられない場合、別の有害事象として症例報告書に記載する。また、症例報告書に記入する事象名は診療録等の原資料と一致させる。

発現日（時）：有害事象が発現した日時を記入する。

程度 (Grade) : 有害事象の重症度。「医薬品等の副作用の重篤度分類基準 (平成 4 年 6 月 29 日 薬発第 80 号) および以下の基準を参考とし軽度、中等度、高度の 3 段階で判定する。

程度	判定基準 (参考)
軽度	一過性で容易に耐えられる、あるいは日常生活に支障とならない程度のもの
中等度	日常生活に支障を来す程度のもの
高度	日常生活を不可能にする程度のもの

2) 因果関係

治療用ベクターとの因果関係は被験者の状態、既往歴、併用薬剤及び発症の時間的關係などを考慮し、以下の 4 段階で判定する。因果関係が否定できないもの、すなわち①～③と判定されたものを「副作用」として取り扱う。また、いずれの場合も、判定した根拠を症例報告書のコメント欄に記入する。

因果関係判定基準 (参考)

- ① 明らかに関連あり：治療用ベクターと時間的に明白な関係があり、その治療に既知 (基礎実験及び今までの臨床試験) の反応を示す場合
- ② 多分関連あり：治療用ベクター注入と時間的に明白な関係があり、その治療の作用から予想される反応を示し、かつ被験者の既往などの要因が否定され、治療用ベクターとの関連性が否定できない場合
- ③ 関連ないともいえない：治療用ベクター注入と時間的に明白な関係があり、被験者の既往などの本治療以外の要因も推定されるが、治療用ベクターによる可能性も除外できない場合
- ④ 関連なし：治療用ベクター注入と時間的に関係がないと判断される場合、または本治療に関連ないとする情報がある場合

3) 経過

有害事象 (症状及び臨床検査値異常変動) の経過は、以下の 5 段階で判定する。

経過判定基準 (参考)

- 消失 : 症状の消失、検査値の正常化あるいは投与前値への回復が認められたもの
- 軽快 : 程度が軽減したもの、あるいは症状に改善傾向が認められたもの
- 不変 : 症状や検査値に変化がないもの
- 悪化 : 症状や検査値の増悪があるもの
- 追跡不能 : 消失または軽快することなく追跡不能となった場合

IX.5.7.2 重篤な有害事象が発生した場合

上記 IX.5.7.1 にて定義した有害事象のうち、下記の 5 分類のいずれかに該当するものを重篤な有害事象と定義する。

【重篤な有害事象の定義】

1. 死に至るもの
2. 生命を脅かすもの
3. 治療のための入院または入院期間の延長が必要となるもの。ただし、臨床研究治療前に計画された入院や被験者の負担を軽減する目的で計画された入院、検査目的のための入院は除く
4. 永続的または顕著な障害・機能不全に陥るもの
5. その他、被験者にとって著しく有害なことが示唆されるもの

重篤な有害事象が発現した場合、総括責任者またはその他の研究者は直ちに適切な処置をとるとともに、治療用ベクターとの因果関係の有無に関わらず速やかに病院長に報告する。病院長はその有害事象が重篤で予測できない場合には、本臨床研究の継続の可否について自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会の意見を求める。また、総括責任者またはその他の研究者は重篤な有害事象発現から 48 時間以内に、臨床研究終了後の期間も含めて、実施施設の長を介して厚生労働省に連絡することとする。遺伝子治療臨床研究の実施に影響をおよぼすおそれがある情報を得た場合にも、速やかに厚生労働省に報告を行う。

なお、本臨床研究期間中あるいは終了後に対象患者が死亡したときには、死亡原因の特定および治療の病理学的評価を行うため、死亡原因の如何を問わず剖検を行うよう努力する。被験者に対しても、本治療の開始前にその可能性について説明を行っておく。

治療用ベクターとの因果関係が否定できない有害事象（副作用）が最終観察日までに消失または軽快しなかった場合には、観察終了時または観察中止時までの症状の経過を症例報告書または追跡調査用紙に記載するとともに、有害事象（副作用）消失、あるいはその原因が明らかになり症状が安定するまで経過観察を継続する。経過観察の結果については別途追跡調査用紙に記載する。なお、何らかの理由により追跡調査が不可能であった場合はその理由を症例報告書または追跡調査用紙に記入する。

IX.5.8 症例記録に関する記録用紙等の様式

本臨床研究の記録に関する様式（症例報告書）は、別に定める。

IX.5.9 記録の保存および成績の公表の方法

IX.5.9.1 記録の保存

本臨床研究に関する記載のすべては、治療中においては、総括責任者が病院内にて管理し、終了後は症例毎に、総括責任者が保存する。保存期間に関しては、本臨床研究の特殊性に鑑み、15年間とする。

IX.5.9.2 成績の公表の方法

(1) 遺伝子治療臨床研究に関する指針に基づき、自治医科大学附属病院長は、遺伝子治療臨床研究に関する情報の適切かつ正確な公開に努めるものとする。

(2) 本研究の結果は、本研究に用いた薬剤・技術の厚生労働省への製造（輸入）販売承認申請における参考資料として使用する。また、本臨床研究から得られたデータを学会などで発表、論文として医学雑誌などに発表する場合がある。なお、承認後、結果の一部を添付文書及びインタビューフォームに記載することがあるが、それ以外の目的には使用しない。また、前記の資料に公表する場合にあっても被験者のプライバシーは確保される。

IX.5.10 個人情報保護の徹底

被験者のプライバシー保護と秘密の保全に関しては、「自治医科大学附属病院の患者等の個人情報保護に関する取扱要領」ならびに「自治医科大学附属病院の患者等の個人情報保護に関する規定」を遵守することとする。以下、これらの文書から要点となる事項を転記する。

(1) 実施施設での安全管理措置

① 自治医科大学附属病院は、個人情報の適切な管理を図るため、次の各号に掲げる管理者等を置く。

- A 個人情報保護管理者
- B 個人情報保護管理補助者
- C 個人情報保護取扱責任者

② 自治医科大学附属病院は、個人情報の適切な取扱に関する事項を審議するため、附属病院個人情報保護検討委員会を置く。

③ 個人情報の安全管理措置として、物理的・人的・技術的な安全管理措置を講じることとする。

A 物理的安全管理措置：個人情報を保管している部屋には必ず施錠する。ファイル・台帳・MO等は鍵のついた棚や書庫、机の引き出し、金庫などに保管し施錠する。

B 人的安全管理措置：個人の所有するパソコン、USB、ノートなどの記録媒体には個人情報を登録しない。やむを得ない事情により個人のパソコン等に個人情報を登録

するときは、「個人のパソコン等への個人情報登録許可申請書」に必要事項を記載し、管理者に申請し許可を得ることとする。

個人のパソコン等に個人情報を登録するときはできるだけ匿名化を図る。

C 技術的安全管理措置：個人情報を保管したパソコン、システム等については、ウイルス対策ソフト等の安全管理措置を講じる。

④ 自治医科大学附属病院は、患者等から得た個人情報をあらかじめ本人の同意を得ないで第三者に提供してはならない。ただし、次のいずれかに該当するときはこの限りではない。

A 法令に基づくとき。

B 人の生命、身体または財産の保護のために必要がある場合であって本人の同意を得ることが困難であるとき。

C 公衆衛生の向上または児童の健全な育成の推進のために特に必要がある場合であって、本人の同意を得ることが困難であるとき。

D 国の機関若しくは地方公共団体またはその委託を受けた者が法令の定める事務を遂行することに対して協力する必要がある場合であって本人の同意を得ることにより当該事務の遂行に支障をおよぼすおそれがあるとき。

E 患者への医療の提供に必要であり、かつ、個人情報の利用目的として院内掲示等により患者等に明示してあるとき。

⑤ 自治医科大学附属病院は、個人情報または個人情報が記録されている媒体を廃棄する場合には、復元または判読が不可能な方法により、当該情報の消去または当該媒体の廃棄を行わなければならない。

A 紙ファイル、台帳等の廃棄についてはシュレッダーによる廃棄または専用業者による廃棄とする。専用業者による廃棄を行うときは必ず病院職員立ち会いのもと行う。

B フロッピーディスク、USB 等の電子記録媒体については、保存されているデータを全て消去した上で粉砕などの物理的な廃棄を行う。

⑥ 自治医科大学附属病院の職員および学校法人自治医科大学と雇用関係にある者で病院に勤務する職員は、個人情報を適切に取り扱い、業務上知り得た個人情報を漏洩し、または不当な目的に使用してはならない。また、その職を退いた後も同様とする。

⑦ 自治医科大学附属病院の職員等は、誤り、犯罪行為、システムエラー等による個人情報の漏洩等の事故を発見したときは直ちに取扱責任者に報告すること。取扱責任者が不在のときは、管理者または管理補助者に報告すること。

⑧ 自治医科大学附属病院の患者および患者の家族等の個人情報に関する取扱に関する庶務は、経営管理課が行う。

(2) 本研究における個人情報の保護

本臨床研究の遂行における個人情報の利用・取り扱いについては、総括責任者は予め被験者の個人情報の利用を公開している場合を除き、速やかに、その利用目的を被験者等に通知し、又は公表しなければならない。本臨床研究で扱う被験者の診療記録をはじめとする個人情報は、主として年齢、病状経過観察、検査データ、本臨床研究の緊急事態発生のための連絡など、被験者の生命を守るために用いる。その他特別の目的で使用する場合は、事前に被験者に再度説明し了解を得てから使用する。また、本臨床研究の成果検討時や医療向上のためなどを目的に試験成績などを公表・公開する場合は、個人を特定できない形すなわち個人情報を保護して公開する。これらのことは、被験者への同意説明文書中に記載し、被験者へ個人情報の保護および使用目的について通知し同意を得る計画とした。被験者の同意取得は、自由意思によるものであり、臨床研究に参加しない場合であっても被験者の不利益はない。このことは医学研究を行う上で大切な倫理であるため、本臨床研究では、これらのことを同意説明文書に記載し、被験者へ通知している。総括責任者は利用目的の達成に必要な範囲において、個人情報を正確かつ最新の内容に保つよう努めなければならない。

自治医科大学においては、個人情報は、「個人情報の保護に関する法律」（平成 15 年 5 月 30 日法律第 57 号）にしたがって厳重に取り扱い、外部に漏れることのないようにする。

(3) 第三者提供の制限

総括責任者は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」第六章第九に掲げる内容に従い、あらかじめ被験者等の同意を得ないで個人情報を第三者に提供してはならない。

本臨床研究では、外部協力者としてタカラバイオ株式会社が「AAV ベクターの製造、品質管理および技術支援」に限定し関与する。タカラバイオ株式会社の担当者が AAV ベクターに限定した副作用、および効果発現に関する一部データを閲覧するが、本臨床研究の客観的かつ公正な記録が影響を受けることはない。閲覧に際しては、個人を特定できない措置を講じて個人情報を保護する。被験者を特定する情報については総括責任者が厳重に管理する。

第三者への個人情報の提供は予定しておらず、第三者へ個人情報の提供を行う場合は、適切な目的であることを確認し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」第六章第九に従い、その旨被験者等へ通知する。

(4) 個人情報の開示

総括責任者は、保有する個人情報に関し、次に掲げる事項について、被験者等の知り得る状態にしなければならない。

1) 臨床研究実施機関の名称

- 2) 個人情報の利用目的
- 3) 個人情報の開示に関する手続き
- 4) 苦情の申し出先

本臨床研究においては、上記事項についての手続きが出来ること、手続きの方法を同意・説明文書に明記した。また、手続きの詳細は自治医科大学の保有する個人情報管理規程に従い、被験者に説明する。

総括責任者は被験者から当該被験者が識別される保有する個人情報についての開示について、自治医科大学の保有する個人情報管理規程に従い求めがあった場合は、遅滞なく必要な対応を行う他、対応結果について被験者に通知しなければならない。さらに、自治医科大学では個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口を設置し、被験者からの苦情や問い合わせ等に適切かつ迅速に対応できる体制を整えている。

【個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口】

個人情報の保護に関する事項：自治医科大学附属病院経営管理課
(電話 0285-58-7103)

診療情報の開示に関する事項：自治医科大学附属病院医事課
(電話 0285-58-7115)

その他必要な事項

X.1 遵守する法令／省令等

本遺伝子治療臨床研究は、以下の法令／省令を遵守して実施される。

1. 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
(平成 27 年厚生労働省告示第 344 号))
2. 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」
(平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号、平成 29 年 2 月 28 日一部改正)
(厚生労働省告示第四百十五号、平成 20 年 7 月 31 日)
3. 「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」
(平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号)
4. 「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」
(薬食発第 0219011 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成 16 年 2 月 19 日)
5. 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」
(薬食発第 1062 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成 7 年 11 月 15 日)
6. 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について」

(薬食発第 329004 号、各各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成 14 年 3 月 29 日)

X.2 引用文献

- 1 Brun L, Ngu LH, Keng WT, Ch'ng GS, Choy YS, Hwu WL, et al. Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurology*. 75:64-71,2010.
- 2 Hyland K, Clayton PT. Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins. *J Inherit Metab Dis*. 13:301-4,1990.
- 3 Hyland K, Clayton PT. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: diagnostic methodology. *Clin Chem*. 38:2405-10,1992.
- 4 Hwu WL, Muramatsu S, Tseng SH, Tzen KY, Lee NC, Chien YH, et al. Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Sci Transl Med*. 4:134ra61,2012.
- 5 Swoboda KJ, Saul JP, McKenna CE, Speller NB, Hyland K. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: overview of clinical features and outcomes. *Ann Neurol*. 54 Suppl 6:S49-55,2003.
- 6 Manegold C, Hoffmann GF, Degen I, Ikonomidou H, Knust A, Laass MW, et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, drug therapy and follow-up. *J Inherit Metab Dis*. 32:371-80,2009.
- 7 Tay SK, Poh KS, Hyland K, Pang YW, Ong HT, Low PS, et al. Unusually mild phenotype of AADC deficiency in 2 siblings. *Mol Genet Metab*. 91:374-8,2007.
- 8 Hsieh HJ, Lin SH, Liu HM. Visualisation of impaired dopamine biosynthesis in a case of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency by co-registered ¹⁸F-FDOPA PET and magnetic resonance imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 32:517,2005.
- 9 Allen GF, Land JM, Heales SJ. A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 297:6-14,2009.
- 10 Muramatsu S, Fujimoto K, Katou S, et al.: A Phase I Study of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Mol Ther* 18: 1731-1735, 2010.
- 11 Christine CW, Starr PA, Larson PS, et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 73,1662-1669, 2009.
- 12 Gabriele Mittermeyer, Chadwick W. Christine, Kathryn H. Rosenbluth, et al. Long-Term Evaluation of Phase 1 of AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Hum Gene Ther* 23:377-381, 2012.
- 13 Sumi-Ichinose C, Ichinose H, Takahashi E, Hori T, Nagatsu T. Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human

-
- aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis. *Biochemistry* 31: 2229-2238, 1992.
- 14 Bartus RT, Baumann TL, Siffert J et al. Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients. *Neurology* 80, 1698-701, 2013.
 - 15 Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. Clades of Adeno-associated virus are widely disseminated in human tissues. *J Virol.* 78,6381-6388, 2004.
 - 16 Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 24: 257-261, 2000.
 - 17 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* 12: 342-347, 2006.
 - 18 Kaplitt MG, Feigin A, Tang C. et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase 1 trial. *Lancet* 369, 2097-105, 2007.
 - 19 Lewitt PA, Rezai AR, Leehey MA et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol* 10, 309-19, 2011.
 - 20 Marks WJ, Ostrem JL, Verhagen L, et al. Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* 7, 400-08, 2008.
 - 21 Marks WJ, Bartus RT, Siffert J, et al. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* 9, 1164-1172, 2010.
 - 22 Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman G J, Iwaki Y, Colosi P. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5:938-45, 1998.
 - 23 Natsoulis G, Kurtzman GJ, Colosi P. High-efficiency AAV helper functions. USA patent 6,365,403, November 29, 1999, 2002.
 - 24 Kearns WG, Afione SA, Fulmer SB, Pang MC, Erikson D, Egan M, Landrum MJ, Flotte TR, Cutting GR: Recombinant adeno-associated virus (AAV-CFTR) vectors

-
- do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Ther* 3: 748-755, 1996.
- 25 Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm T-A, Grompe M, Kay M-A: AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34: 297-302, 2003.
- 26 Flotte TR, Afione SA, Solow R, Drumm ML, Markakis D, Guggino WB, Zeitlin PL, Carter BJ. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 268: 3781-3790, 1993.
- 27 Dass B, Olanow W, Kordower J-H. Gene transfer of trophic factors and stem cell grafting as treatments for Parkinson's disease. *Neurology* 66 (Suppl 4): S89-S103, 2006.
- 28 Russell D-W, Kay M-A: Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood* 94: 864-874, 1999.
- 29 Couto L, Parker A, Gordon JW. Direct exposure of mouse spermatozoa to very high concentrations of a serotype-2 adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Hum Gene Ther* 15: 287-291, 2004
- 30 Rosas LE, Grieves JL, Zaraspe K, La Perle KMD, Fu H, McCarty DM. Patterns of scAAV vector insertion associated with oncogenic events in a mouse model for genotoxicity. *Mol Ther* 20: 2098-2110, 2012.
- 31 Valdmann PN, Lisowski L, Kay MA. rAAV-mediated tumorigenesis: still unresolved after an AAV assault. *Mol Ther*. 20: 2014-2017, 2012.
- 32 Raper SE, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80: 148-158, 2003.
- 33 Raper SE, et al. A pilot study of in vitro liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther* 13:163-175, 2002.
- 34 Schnell MA, et al. Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors. *Mol Ther* 3:708-722, 2001.
- 35 Zhang Y, et al: Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol Ther* 3:697-707, 2001.
- 36 Hacein-Bey-Abina S, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419, 2003.

-
- 37 Check E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433:561, 2005.
- 38 Williams DA, Baum C. Gene therapy - new challenges ahead. *Science* 302:400-401, 2003.
- 39 Nunes FA, et al. Gene transfer into the liver of nonhuman primates with E1-deleted recombinant adenoviral vectors: safety of readministration. *Hum Gene Ther* 10:2515-2526,1999.
- 40 寺尾 亨, 沖山亮一, 高橋 宏, 横地房子, 谷口 真, 浜田生馬, 長谷川有美:不随運動に対する定位的温熱凝固術, 脳深部電極留置術の合併症についての比較, 検討. 脳神経外科31: 629-636, 2003.
- 41 Anderson WS, Lenz FA. Surgery insight: deep brain stimulation for movement disorders. *Nat Clin Pract Neurol* 2: 310-320, 2006.

よくお読みください

臨床研究「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」

参加のしおり

このしおりは『AADC 欠損症に対する遺伝子治療
の臨床研究』に参加される予定の患者様および御家族に、
具体的な内容を説明するために作られたものです。

内容について、 わからないことや聞きたいことがありましたら、
いつでもご遠慮なくお申し出ください。

平成 25 年 5 月 31 日

改訂：平成 25 年 11 月 14 日

改訂：平成 26 年 1 月 10 日

改訂：平成 26 年 10 月 8 日

改訂：平成 27 年 6 月 19 日

改訂：平成 27 年 7 月 8 日

改訂：平成 27 年 8 月 3 日

改訂：平成 29 年 9 月 XX 日

自治医科大学用

目次

1. はじめに	3
2. 代諾者について	3
3. 臨床研究とは	3
4. AADC 欠損症とは	4
5. この臨床研究の概要について	6
6. AAV ベクターとは	7
7. AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究の海外での状況	7
8. 臨床研究の具体的な方法	8
A. 参加できる人, できない人	8
B. 臨床研究のスケジュール	9
C. 線条体への治療用ベクターの注射	13
D. 期待される効果	14
E. 予想される危険性および副作用	14
9. 臨床研究への参加予定期間, 参加患者数	19
10. 臨床研究の参加をことわったら	20
11. 途中でやめたくになったら	20
12. 健康被害の治療とその医療費に関して	20
13. 新たな情報のお知らせについて	21
14. あなたの個人情報の保護について	22
15. 臨床研究の成績の使用と公表について	22
16. 個人情報の保護と診療情報の開示の問い合わせや苦情の窓口	23
17. 臨床研究に参加するために必要な費用について	24
18. 臨床研究に参加する間にお願いすること	25
19. この臨床研究の結果から生じる知的財産権について	25
20. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について	26
21. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制	26
22. その他	28

1. はじめに

当院では最善の治療を患者さんに提供するとともに、新しい治療法の開発を目指した研究を行っております。

この文書は当院で研究を進めている「遺伝子治療」の手法を用いた「AADC 欠損症」に対する新しい治療法に関する「臨床研究」について研究者（以下「担当医師」という）による説明を補い、あなたに研究内容、あなたのお子さんがこの研究に参加することによる利益と危険性について、理解を深めていただくためのものです。よく読まれて、研究にご協力いただけるかどうかご検討ください。説明の中でわかりにくいことや疑問、心配なことがありましたらどんなことでも、いつでも遠慮なく担当医師にお尋ねください。

2. 代諾者について

あなたのお子さんは、未成年者であること、あるいは成人であっても、病気のために意思表示が難しいために、本人に代わる代諾者の同意をいただきます。代諾者は、ご両親などの親権者をお願いします。よく相談して、同意書にご署名お願いいたします。同意をいただく過程で、自治医科大学附属病院が選定したコーディネーターがご相談に乗ると共に、この臨床研究への参加の意思を確認させていただきます。ご両親でご意見がまとまらない場合などは、担当医とコーディネーターも交えてご相談を繰り返し、方針を決めていきたいと思っております。

3. 臨床研究とは

臨床研究とは、ある病気の患者さんに新しい治療法を試みて、それが安全であるかどうか、あるいは効果があるかどうかを判定するために医師が行う研究です。その治療法は、患者さんで行う前に動物実験をはじめとして様々な実験を行って、少なくとも動物実験レベルでは安全であることと効果があることが確認されています。

今回参加をお願いする臨床研究は、厚生労働省の指針の中で「疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること」と定義されている遺伝子治療に相当するもので実際の診療に携わる医師が医学的必要性・重要性に鑑みて、立案・計画して行うものです。製薬会社等が行う新薬の安全性・有用性を調べ、厚生労働省の承認を得るための臨床試験、いわゆる治験で

はありません。この遺伝子治療臨床研究は、当院の倫理委員会と国の審議会の厳格な審議を受けて承認された後に行われます。私たちの研究もこのような厳しい審査を受けて認められたものです。

ただし、動物で安全な効果があったからといって人でも同じように安全で効果があるとはいいきれません。したがって、多くの患者さんに応用する前に、少ない患者さんで治療を行ってみて、安全性と効果を確認する必要があります。このように、臨床研究には文字どおり研究的な一面があることを十分ご理解の上、以下の文章を読み、説明をお聞きください。

4. AADC 欠損症とは

脳はものを考えたり動く命令を発するなど、様々な働きをしています。脳にはたくさんの神経細胞があります。肝臓にも細胞はたくさんありますが、肝臓はものを考えたり動く命令を発することはありません。脳と肝臓はどう違うのでしょうか？

脳はたくさんの神経細胞があり、お互いに情報をやりとりしながらネットワークを形成して複雑な働きをします。これに対して肝臓の細胞は、細胞それぞれが重要な働きをしますが、お互いに情報をやりとりすることはほとんどありません。

細胞間の情報のやりとりは「神経伝達物質」と呼ばれる化学物質によって行われます。たとえばA細胞がB細胞に情報を伝えるとしましょう(図1)。A細胞は神経伝達物質を放出します。これがB細胞の受容体に結合して情報が伝えられます。現在脳では約40種の神経伝達物質が見つかっており、ドパミン、セロトニン、ノルアドレナリンなどはそれらの1つです。

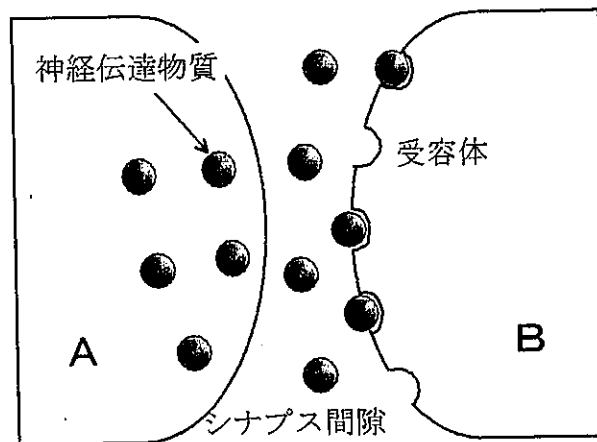


図1 神経細胞間の情報の伝達

神経伝達物質は1つの神経細胞(A)から放出され、次の神経細胞(B)の受容体に結合して情報を伝えます。この神経細胞(A)と神経細胞(B)の間のすきをシナプス間隙と呼びます。

芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) 欠損症は、カテコールアミンとセロトニンを合成する酵素である AADC をコードする遺伝子の変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患(患者さんのご両親から病気をおこす遺伝子を受け継いで起こる病気)です。この酵素は、チロシンからドパミンに、また、トリプトファンからセロトニンに代謝する過程に作用します。ドパミンからはノルエピネフリン、エピネフリンが合成されるため、これらのカテコールアミン全体が低下し、またセロトニンからはメラトニンが合成されるために、メラトニンも低下します。このような神経伝達物質であるカテコールアミンとセロトニンの合成が障害されて、適切な神経活動の情報が伝わらないために、著しい運動障害、異常眼球運動、自律神経症状、神経障害、睡眠障害を発症します。特徴的な発作は、眼球が上方や寄り目に固定、眼振をおこす異常眼球運動 (Oculogyric Crisis) で、異常な姿勢や喘鳴 (ゼロゼロとした呼吸) を伴いながら全身を硬直させる動作が長時間続きます。AADC 欠損症の治療薬としては、AADC の補酵素であるビタミン B6 や、ドパミン作動薬、ドパミンとセロトニンを代謝するモノアミン酸化酵素阻害薬、抗コリン薬、および L-dopa (レボドパ) などが単独、もしくは併用で試みられていますが、軽症例では運動機能の改善も報告されているものの、典型的な重症例ではほとんど効果がみられていません。レボドパは本来、線条体の中で AADC の働きによってドパミンに変えられるため、AADC がほと

んど働かない重症例では効果が乏しいのです。そのため、新たな治療法の開発が望まれていました。

5. この臨床研究の概要について

『AADC 欠損症に対する遺伝子治療』は現在開発中の治療法です。ほぼ欠損している AADC という酵素の遺伝子を、2 型アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを使って線条体の細胞に入れ AADC を作らせます。その結果ドパミンやセロトニンが効率よく作られるようになり、運動機能が改善することが期待されます。

進行性パーキンソン病に対する AADC を用いた遺伝子治療の臨床研究は、日本と米国において平行して行われています。自治医科大学附属病院では、症状が進行してレボドパの効きが悪くなった患者さんを対象にこの臨床研究を実施しました。

今回の AADC 欠損症に対する遺伝子治療は、台湾で治療が試みられ、すでに運動機能の改善が報告されています。その報告と同様の方法で自治医科大学附属病院とちぎ子ども医療センターで行います。

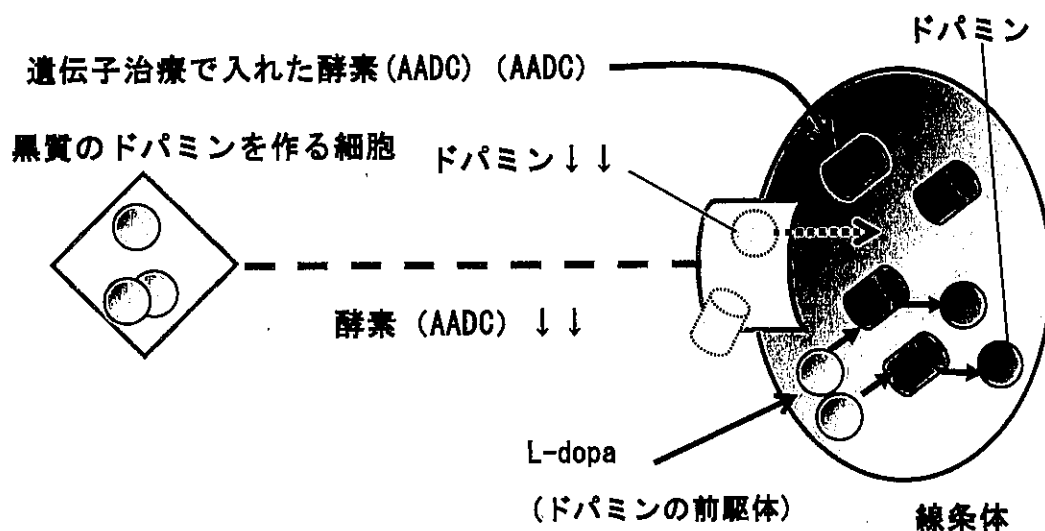


図2 この治療法の模式図

AADC 欠損症はドパミンを合成する AADC がいないため、黒質の神経細胞から線条体へ来るドパミンが減ることで発病します。ドパミンを合成する酵素の遺伝子を線条体に注射して酵素を産生させ、ドパミンの前駆体である L-dopa からドパミンを合成させます。

6. AAV ベクターとは

アデノ随伴ウイルス（AAV）は自然界に存在するありふれたウイルスの1つで、多くの人が気づかぬうちに感染しています。それ自身では増えることができず、人の病気を起こしません。ウイルス由来のタンパク質の遺伝子を取り外して、空いた部分に治療用の遺伝子を載せたものが治療用ベクターです。今回は空いた部分に AADC の遺伝子を入れます（図 3）。AAV にはウイルス表面のタンパク質の違いによっていくつかの型がありますが、今回使用するベクターはそのうちの 2 型の AAV を元にして作製されたものです。米国においては、2 型 AAV ベクターを使用したいくつかの臨床研究が既に行われており、これまでに、のう胞性線維症（欧米に多い遺伝病）80 名、血友病 15 名、カナバン病（小児の遺伝性病）10 名、パーキンソン病 23 名の合計 128 名の患者さんに使用されていますが、特段の問題は報告されていません。

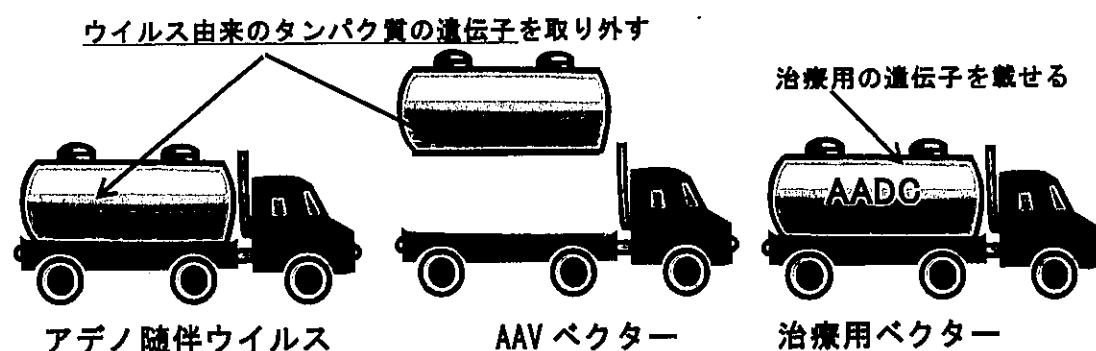


図3 治療用ベクターの構造

自然界のアデノ随伴ウイルスは、荷台にウイルスのタンパク質を合成する遺伝子を積んだトラックにたとえられます。このウイルス由来の遺伝子を取り除いて、ドパミンを合成するヒトの酵素の遺伝子（AADC）に積み替えたトラックが治療用ベクターです。

あなたのお子さんに注射するベクターは、タカラバイオという会社で作られます。

7. AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究の海外での状況

2012 年に、台湾から AADC 欠損症に対する遺伝子治療を実施した結果が報告されました。論文報告では、対象は 4 人の患者で、4-6 歳時に治療を実施し、現在

5-6歳の男児1例、女児3例でした。方法としては、ヒトAADC遺伝子を組み込んだ2型AAVベクターを脳の線条体（被殻）に定位脳手術的に注入しました。その結果、治療開始前は、全員寝たきりの状態で自発運動は少しのみでしたが、遺伝子治療実施1-2週間後には眼瞼下垂が改善し、1か月後からジスキネジアが改善し始め、それと共に運動機能が改善し始めました。1例は、3か月後から首が座り、6か月後にお座りが可能となり、13か月後には、臥位から自分で座ることができ、おもちゃを手に持って遊べるように、16か月後には支えて立つことが可能になりました。1例は、3か月後に首が座り、9か月後に体を支えて座ることが可能になり、他の2例でも首のすわりが確認できました。その後の情報では、実施例数は8例になっており、3例で座位保持可能でうち2例は支えての立位可能に、4例で支えての座位保持可能に改善しています。副作用に関して、一番多かったのは一過性のジスキネジアという不随意運動の悪化でした。2例で口部から顔面のジスキネジアで嚥下障害を来し、1例では3か月間チューブ栄養が必要になりました。1例で、チアノーゼを伴う無呼吸発作が10か月間繰り返されました。1例は、治療前から全身状態が悪かった例で、治療後に在宅療養していて、下痢と嘔吐からくる脱水、ショックにより心停止になり受診され、現在も臥床状態の方がおられます。

台湾では、現在、17例以上に実施されています。

日本では、この遺伝子治療臨床研究として、2015年6月から、4歳から19歳の患者6例に実施しました。6例とも、大きな有害事象はなく経過しています。眼球上転発作、ジストニア発作の減少、運動機能の改善が得られています。有害事象としては、四肢の小さな舞踏病様運動が起きたのみでした。

8. 臨床研究の具体的な方法

A. 参加できる人、できない人

この臨床研究に参加できるのは、次の患者さんです。

- ① 運動機能障害、ジストニア等の症状を持つ、AADC欠損症で、髄液検査所見、酵素活性測定あるいは遺伝子診断のいずれかにより診断が確定している患者さん。
- ② 治療実施時に2歳以上の方。

- ③ 他の神経変性疾患を示唆する所見を認めない患者さん。
- ④ 治療後の頻回の診察を含め、研究に必要な条件を守ることが可能な方。
- ⑤ 研究に参加する前の少なくとも 1 か月間、内服薬を変更していない方。
- ⑥ ご家族の方へ、十分な説明が行われた上で同意が得られ、同意書に署名された方。

この臨床研究に参加できないのは、次の患者さんです。

- ① 脳血管障害をはじめ、明らかな心血管疾患を有する方。
- ② 脳内の悪性新生物、臨床的に明らかな他の神経疾患を合併している方。
- ③ 5 年以内に治療済みの皮膚がん以外の悪性腫瘍を認めた方。
- ④ 収縮期血圧 160mmHg 以上の高血圧を認める方。
- ⑤ 血液凝固異常のある方、あるいは抗凝固療法の必要な方。
- ⑥ 臨床的に明らかな免疫異常のある患者さん、あるいは免疫抑制薬が必要な方。
- ⑦ MRI が撮影できない方。
- ⑧ 治療前に FMT-PET で AADC 欠損症で一般的に認められる異常所見を認めない方。
- ⑨ 重い薬物アレルギーのある方。
- ⑩ 過去 6 か月以内に他の臨床試験に参加したことのある方。
- ⑪ 重い肝臓病、重い腎臓病、コントロールが困難な糖尿病の方。
- ⑫ 全身状態が重篤な状態である方。
- ⑬ その他、総括責任者が本臨床研究の対象として不適当と判断した方。

これらの条件に当てはまるかどうかの判断には、高度の医学的知識が必要なことが含まれています。あなたのお子さんがこの条件に当てはまるかどうかの判断は、総括責任者が行います。

B. 臨床研究のスケジュール

治療用ベクターの注射 10 日前から注射後 2 週間の間は、自治医大とちぎ子ども医療センターに入院していただきます。この間に診察やビデオの撮影、各種の検査を行います。これらは治療効果の評価とともに、治療による副作用の有無を確認

認する目的で行われます。詳細については日程表をご覧ください。

治療効果の判定のため、治療用ベクターの注射 1 か月前から注射 3 か月後の間は、原則として筋緊張緩和薬や抗てんかん薬は変更できません。ただし治療後に薬剤の効果が強くなってしまう場合には、のむ量を減らして対処します。

あなたのお子さんから治療用ベクターがどのようにからだの外に出るかを調べるため、お子さんの血液を手術前、手術の後連続 2 日間および1週間目に採取して検査します。もし、これらの中から治療用ベクターが検出されたときは、検出されなくなるまで調べます。

V.6 評価スケジュール

＜評価スケジュール表＞

評価スケジュール 1 年目

	Base line	手術	術後管理		評価 1	評価 2	評価 3	評価 4	評価 5	評価 6	評価 7	評価 8	評価 9	評価 10	評価 11	評価 12	評価 13	評価 14	評価 15
	Day -30 ~ -1	Day 0	術後管理 (注 3)	Day 3	Day 7	Day 14 (注 3)	Day 28	Day 42	Day 56	3M	4M	5M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M
			Day 1	Day 2															
発作記録	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
一般身体所見	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
神経学的所見	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
AIMS	○						○			○			○						○
ビデオ撮影	○						○			○			○			○			○
認知・発達検査	○						○			○			○			○			○
服薬の確認	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
有害事象の有無	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PET scan	○																		
頭部 MRI	○				○		○						○						
頭部 CT		○ (直後)		○															
脳液	○						○						○						○
髄液	○						○						○						○
血液	○		○		○	○	○			○			○						○
凝固	○		○							○			○						○
生化学	○		○		○	○							○						○
AAV 抗体	○												○						○
PCR (血治) (注 1)			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

* 全ての臨床検査は Base line 評価の時に実施する (心電図も含む)。

注 1. PCR が陽性の場合、Day 3 以降は連続 2 検体が陰性になるまで採取を継続する。

注 2. 術後は降圧個室に隔離。Day 1, 2 とともに陰性であれば隔離解除。PCR 陽性ときは Day 3 以降も個室管理を継続する。

注 3. 術後は状態が安定するまで PICU に入院。最低、術後 2 週間まで入院予定。

[illegible]

血液検査、生化学検査、凝固検査、唾液検査に含まれる項目は、次に示すとおりである。

血液検査、生化学検査、凝固検査に含まれる項目は、次に示すとおりである。

血液検査	赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、MCV、MCH、MCHC、白血球数、好中球数、好中球数、リンパ球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、血小板数
血液検査	PT, aPTT, INR
凝固検査	BUN, クレアチニン, Na, K, Cl, 血糖, 総タンパク, アルブミン, 総ビリルビン, GOT (AST), GPT (ALT), Al-P, GGT (γ GTP)
生化学検査	髄液圧, 細胞数, 蛋白, 糖, L-Dopa, Dopamine, 5HTP, IHA, 5HIAA
髄液検査	

C. 線条体への治療用ベクターの注射

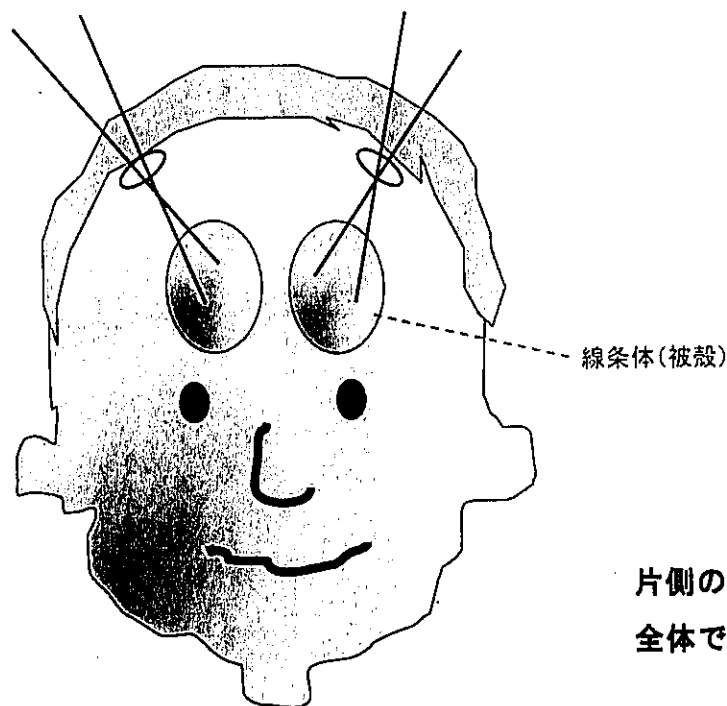
治療用ベクターは外科手術によって線条体（被殻）に注射します。手術は全身麻酔をかけて行いますので、患者さんは手術中に苦痛を感じることはありません。手術では、まず位置決めをするための枠（フレーム）を4つのネジで頭の骨に固定します。フレームを付けた状態で造影剤を使って頭部のCTスキャンを撮影し、前日にやはり造影剤を使って撮影しておいた脳のMRI画像（詳しい断層写真）と重ね合わせ、治療用ベクターの注射場所を決めます。線条体（被殻）の左右それぞれ2か所、全体で4か所に注射します（図4）。

専用の注射針を使用

して治療用ベクターを
ゆっくり注射する

頭の骨に開ける穴の

直径は1.2 cm



片側の線条体に2か所

全体で4か所に注射する

図4 治療用ベクターの注射

治療用ベクターは、全身麻酔をしたあなたのお子さんの頭の骨に、右と左に1つずつ小さな穴を開け、そこから線条体まで細い管を入れて注射します。

頭の骨に開ける穴の大きさは直径 1.2 cm です。1つの穴から方向を変えて2回針を刺すことによって、片側の線条体（被殻）の異なる2か所に注射します。

治療用ベクターは、各場所に最大 $50\mu\text{l}$ ずつ、4か所に分けて合計 $200\mu\text{l}$ を注射します。広く行きわたるように、注射は時間をかけてゆっくりと行います。具体的には専用のポンプを使って1分間に $3\mu\text{l}$ の速さで注射しますので、1か所につき17分かかります。計4か所に注射するのに70分程度かかることとなります。手術全体にかかる時間は約8時間を予定しています。治療用ベクターは、既に台湾の症例で報告された治療量と同等量を注射します。具体的には、 2.0×10^{11} ベクター量を注入します。手術直後は、自治医科大学とちぎ子ども医療センターPICUにて全身管理を行います。

D. 期待される効果

この治療によって、主に黒質-線条体路のドパミン活性が上昇することにより、運動機能を中心に症状の改善が期待されます。

当院で行われた、パーキンソン病モデルのサルを用いた同じ遺伝子治療研究では一度注射した遺伝子の効果は少なくとも数年間続くことがわかっています。

E. 予想される危険性および副作用

遺伝子治療では、病気を治すための遺伝子を患者さんの細胞の中に入れるための「運び屋」として、自然界に存在するウイルスを作り替えて利用します（これを「治療用ベクター」といいます）。ウイルスにはたくさんの種類があり、天然痘やポリオなど重い病気を起こすものから、軽い風邪を起こす程度のもの、かかったとしても全く症状の出ないものまで様々です。今回使う治療用ベクターのもとになるAAVは本来病気を起こしません。しかも治療用ベクターの安全性を増すために、からだの中で増えることができないように作り替えてあります。

AAVとは全く別のウイルスを用いた遺伝子治療では、生命にかかわる重い副作用がこれまでに2件報告されています。

ケース1：アデノウイルスベクターによる全身性炎症反応症候群（1999年、米国）

ある種の遺伝病（オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症）の18歳男性に対し、アデノウイルスベクター（今回使用するAAVベクターとは異なります）を全身投与したところ、血液障害と多臓器不全を起こし4日後に死亡しました。アデノウイルス投与を受けたときの患者さんの状態が良くなかったことに加え、血液中に投与したアデノウイルスの量が多くて免疫反応が強く出過ぎて、全身性炎症反応症候群と呼ばれる状態に陥ったと推定されています。

ケース2：レトロウイルスベクターによる白血病発症（2002～2008年、フランス）

ある種の白血球が足りず、細菌やウイルスに全く抵抗力を持たないX連鎖重症複合免疫不全症という遺伝病に対し、1999年からフランスでレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が始まり、めざましい効果をあげました。ところがその後、同国で治療を受けた15名の患者さんのうち3名が白血病になり、1名が亡くなりました。レトロウイルスは染色体に遺伝子を組み込むのが特徴で、その組み込む位置によって癌化の引き金となる可能性があります。これらの患者さんでは実際にそれが起こったことに加えて、この治療自体がある種の白血球をどんどん増やす作用をねらったものであるという特殊事情が重なり、白血病になったと考えられます。

今回の臨床研究では、病原性のないAAVをもとにしたベクターを使います。AAVに対する身体の反応は、アデノウイルスに比べればかなり弱いものです。しかも今回の臨床研究では頭の中のごく狭い範囲にベクターを注射するので、ケース1のように血管内にベクターを注射するのとは異なり、全身性の反応（全身性炎症反応症候群）は起こりにくいと考えられます。またAAVベクターはレトロウイルスベクターと異なり、あなたのお子さんの染色体に遺伝子を組み込む力はほとんどありません。たとえ組み込みが起こったとしても神経細胞は既に増える能力を失っているのです。ケース2のように癌が発生する可能性も極めて小さいと考えられます。

1) ウイルスベクターを使うことで起こる危険性

この臨床研究では2型AAVベクターをヒトの脳に注射します。サルの脳にこのベクターを注射する実験では副作用はありませんでした。また、このベクターを

ヒトの肺や筋肉に入れた臨床研究でも重い副作用はみられませんでした。しかし、思いがけない合併症が起こる可能性も考えられます。

① 炎症（白血球が局所に集まる反応）

ベクターを注射することで炎症反応が起こり、さらに免疫反応によって脳炎、脳浮腫や脳出血が起こる可能性はゼロではありません。強い炎症反応で頭の中の圧が上がったり、これによる脳の血流障害が起きたり、最も重症の場合には脳ヘルニアが引き起こされる可能性もあります。脳ヘルニアとは、脳の一部が大きく腫れて元の位置からはみ出すことで脳の他の部位を圧迫することをいい、昏睡などの重篤な症状を引き起こします。

この臨床研究では、患者さんを注意深く観察し、万一合併症が起こった場合にはそれをできるだけ早くとらえて、軽いうちにすばやく治療することになっています。

② 免疫反応（体内に入ってきた物質を除去しようとするからだの反応）

注射した治療用ベクターに対して免疫反応が起きる可能性があり、その結果遺伝子を入れた神経細胞が壊されたり、治療遺伝子が働く期間が短くなることも考えられます。しかしこれまでの動物実験の結果から、このようなことは起こりにくいと思われます。免疫反応によって、その後に行われる同じベクターを用いた遺伝子治療の効果が弱くなることも考えられます。その場合患者さんは、その後の AAV ベクターを使った遺伝子治療がすべて受けられなくなることがあります。

③ 神経細胞に遺伝子を入れることで起こる異常（発癌の可能性）

この治療用ベクターが細胞に入った場合、細胞の染色体に遺伝子が組み込まれる可能性があります。その確率は非常に小さいと考えられます。AAV ベクターは、神経細胞などの分裂していない細胞では染色体へ組み込まれづらいのですが、分裂する細胞では組み込まれる可能性があります。小児では、脳内にも分裂細胞が少数ながらもあり、また、血中に入れば肝臓で分裂細胞に組み込まれる可能性は否定出来ません。しかし、これらを確認した報告はなく、実際に起こるかどうか不明です。

ベクターは脳に注射しますので、もし起きるならば、遺伝子の組み込みは脳細胞で

起こる可能性が最も高いと考えられます。しかしそれ以外の場所でも組込みが起こる可能性はあります。

治療用ベクターが細胞の染色体に組み込まれたときに最も心配なことは、癌の危険が高まることです。染色体に外からの遺伝子が入ることにより、癌を起こす遺伝子が働き出したり、癌を抑える遺伝子が働かなくなったりすることがあります。もともと非常に高率（～80％）に肝臓癌を生じるマウスに AAV ベクターを投与した際に肝臓癌の発生率が上昇したという報告がありますが、通常の動物では AAV ベクターにより癌が発生したという報告はなく、危険性は極めて低いと考えられます。

④ ベクターが生殖細胞に感染する危険性（子孫への影響の可能性）

ベクターの遺伝子が卵子や精子などの生殖細胞に組み込まれる可能性は極めて低いものと思われますが否定はできません。将来、お子さんが子どもを作る時にはご相談下さい。

⑤ ベクターが増えて散らばる危険性

治療用ベクターが身体の中で増えることはありません。治療に使われたベクターのうち体外に出されるものはごく一部分と思われますが、出された場合にそのベクターが他人に感染する可能性がないとはいえません。このような事情から治療の後一定の期間（2週間を予定しています）は、外出や退院を控えていただき、その間あなたのお子さんの血液を検査してベクターが出ていないかどうかを確認します。術後 48 時間（2 日間）は個室に入ってください。2 日目にベクターの排出が認められた場合には、引き続き個室に入ってください。

2) 手術に伴う危険性（手術の合併症）

一般的に、このような脳手術に伴う合併症は軽いものを含めても大人では 5 % 以下と考えられています。出血、感染および麻酔の合併症がその主なものです。

ただし、小児に対するこのような定位脳手術は多く行われておりません。そのため、小児における合併症は明瞭ではなく、安全性は確立していませんが、成人と同じ方法で行います。また、小児での定位脳手術の経験がある脳外科医が手術を実施します。

① 出血（頭の中に出血する可能性）

脳に刺す針は、頭の骨に開けた小さな穴から、我々の目で見えないところをとおりますので、血管に当たるとそれを傷つけ出血する危険があります。その可能性は、2～3%と報告されています。仮に出血が起こった場合でも、症状を残さない程度の小さな出血が普通です。しかし稀には重い麻痺を残したり、命にかかわるほどの大出血を来すこともあります。

線条体（被殻）に至るまでに針がとおるのは前頭葉です。この場所では出血が起きても症状を出すことは比較的少ないと思われます。認められる可能性のある症状は、注意力や記憶、感情、意欲の障害、言葉が出なかったり呂律が回らないこと、手足の麻痺などです。万一、後遺症を残す可能性がある大きな出血を来した場合には、遺伝子治療を中止して、開頭による血腫除去手術を含む脳出血に対する治療を優先します。

パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床研究では、これまでに自治医大で手術した6名の患者さんのうち1名の方に、前頭葉の出血が生じ、術後に意欲の低下、軽い片側の手足の麻痺、呂律が回らないという症状がありました。これらの症状は一時的で、その後消失しています。像検査では、脳の出血した所に傷あとが検出されます。この部分の脳組織は完全には回復しません。また、米国で行われた同様の手術では、手術した10名中の2名の方に脳出血を生じました。そのうちの1名の方は麻痺を伴う出血でしたが、ほぼ回復しています。もう1名の方は無症状でした。このような出血が生じる可能性を低くするため、今後行われる手術に際してはベクター注入時に針先を同じ位置に固定しないようにするなど方法を改善します。

② 感染（細菌が入る可能性）

治療用ベクターを溶かした液は完全に無菌です。したがって感染の危険は極めて低いと考えられます。しかし皮膚を切開して頭の骨に穴を開ける操作によって髄膜炎などの感染症を引き起こす危険もごくわずかながらありますので、通常の脳神経外科手術時に使う抗生物質を予防的に使います。

③ 麻酔の副作用・合併症

全身麻酔の副作用と合併症については、この承諾書とは別に麻酔科医より説明

します。その際に、麻酔についての承諾書を頂きます。

3) AADC 遺伝子導入に伴う副作用

治療前は、脳内でドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンおよびセロトニンが欠乏している状態で、その前駆体である L-dopa や 5-HTP が過剰になっています。そこに、代謝酵素を導入するために、カテコールアミン、セロトニンが急激に増加し、一過性にドパミン、セロトニン過剰による症状が出現する可能性があります。台湾での治療で一番多かったのは一過性のジスキネジアで、口部から顔面のジスキネジアで嚥下障害を来し、3 か月間経管栄養を要した例もありました。また、チアノーゼを伴う無呼吸発作が 10 か月間反復した例もありました。

手術直後は PICU で管理し、副作用に留意して、出現時には迅速に対応します。

4) その他、予想できない副作用

上記以外にも予想できない重い副作用が現れる可能性があります。その一部は個人差によるものと考えられます。予想できない副作用の中には回復不可能なものが含まれる可能性があります。このような場合、できるだけ適切な処置をとらせていただきます。

5) 同じベクターでの治療を受けたパーキンソン病患者 1 名が、治療後 6 週間の時点で、突然死されました。治療後の経過は順調で、パーキンソン病の他に多くの症状はありませんでした。病理解剖では脳のベクター注入部位に出血などの病変はなく、心臓や肝臓などの全身の臓器にも死因となる病変は認められませんでした。これらの経緯や病理所見について自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会において審議が行われました。この委員会では、上記の所見に加え、パーキンソン病では死因は不明であるものの突然死の頻度が 14% (6/44 例) あるという他施設の報告も考慮された結果、遺伝子治療と今回の 1 人目の方の突然死との間には因果関係は認められず、遺伝子治療を継続することに問題はないとされております。

9. 臨床研究への参加予定期間、参加患者数

この治療用ベクターの注射手術の前 4 週間から 9 か月後までを研究期間としま

すが、長期における安全性や効果の持続性を調べるために、さらに4年3か月（合計5年間）にわたり検査や調査を行う予定です。ただし、これ以降も15年間にわたり定期的に受診していただき、診察と血液検査などを行います。

参加していただく患者さんは全部で8名を予定しておりますが、新たに診断された患者が出た場合には追加実施を検討します。

10. 臨床研究の参加をことわったら

この臨床研究に参加されるかどうかはあなた（あなたのお子さん）の自由です。もし、あなたがこの治療への参加をことわっても、担当医師はあなたのお子さんに合った他の治療法で治療を行いますので遠慮なくお申し出ください。参加をことわったからといって、あなたのお子さんが不利になるようなことはありませんのでご安心ください。

11. 途中でやめたくになったら

この臨床研究に参加することをお決めになった後でも、治療用ベクターの注射手術前にこの治療をやめたくになったら、担当医師にお知らせください。あなたの自由意思で、いつでも取りやめることができます。中止の後は、担当医師が責任を持ってあなたのお子さんに最も適した他の治療を行います。その場合あなたのお子さんが不利になるようなことはありません。

ただし、治療用ベクターの注射手術を受けた後は、脳に入れた治療用ベクターを取り除くことはできません。あなたが手術の後に臨床研究への参加の中止を申し出られても、あなたのお子さんのからだから治療用のベクターが排泄されないことが証明されるまでは、退院することができません。ベクターは体外に排泄されない可能性が高いのですが、仮に排泄されてもその期間は手術後14日以内と予想されています。またあなたが手術の後に臨床研究への参加の中止を申し出られた場合でも、あなたのお子さんの安全のために、手術後の定期的な診察や血液の検査などは実施します。

12. 健康被害の治療とその医療費に関して

この臨床研究に関してあなたのお子さんが副作用などによる何らかの健康被害を受けた場合は適切な治療が受けられますので、すぐに担当医師に連絡してくだ

さい。あなたのお子さんの健康被害がこの臨床研究と因果関係があるかどうかの判定は、研究者とは利害関係のない独立した審査委員会が行います。この臨床研究との関連が否定できない副作用に対する検査や治療にかかる医療費は、本臨床研究グループが支払いますので、患者さんの医療費負担はありません。また、臨床研究で起こった健康被害により、他の医療機関で検査・治療された場合は、症状が固定するまで（最長1年まで）の自己負担分の医療費を本臨床研究グループが支払います。ただし、医療費以外の実費や、症状が固定した後の治療費や療養費については補償されません。

たとえば、医師の側に過失がなくても、副作用として手術で大出血することがあります。そのような場合、医師は直ちに脳出血の治療に力を尽くします。幸いに命が助かって脳出血のために片麻痺などが残る場合や、最悪の場合はねたきりになることがあります。そのときにはリハビリテーション療法を十分に行って運動機能などの回復を図ります。このような急性期と回復期の医療費は研究グループが支払います。このような場合、リハビリテーションで運動機能などが回復するのは、大多数の方では6か月の間と考えられています。まれにはそれを超えて回復がみられるとの報告もありますが、回復のスピードは遅く、1年経ちますと実質的には症状が固定して、それ以上の回復が望めないと考えられます。このように症状が固定した後の医療費は補償されません。また、急性期と回復期にかかる医療費以外の費用、たとえば患者さんご自身やお見舞い等でご家族が病院においでになるときの交通費や食事代なども補償されません。さらに、急性期と回復期の治療の間に、あなたやご家族がこの治療に関係して仕事を休んだりしたために収入が減ったとしても、それも補償されません。

この臨床研究では、治療用ベクターを脳内に注射するという新規の治療を実施します。これまで動物実験を重ね、安全性には十分配慮してきましたが、予測できない副作用が起こる可能性はゼロではありません。このような場合でも、研究グループができるだけのことはいたします。

1 3. 新たな情報のお知らせについて

本臨床研究に参加中、新しい情報（例えば本臨床研究と同様の試験が海外で行

われた場合の成績等）が得られることがあります。このような新しい情報を知ることによって、あなたが本臨床研究への参加をやめるという判断をされるかもしれません。したがって、本臨床研究に関連する全ての情報はできるだけ速やかにお知らせし、本臨床研究に継続して参加されるかどうかについて、担当医師があらためてお尋ねします。

1 4. あなたの個人情報の保護について

自治医科大学においては、あなたのお子さんの個人情報（お名前、住所、電話番号などの個人を特定できる情報）は、「個人情報の保護に関する法律」（平成 15 年 5 月 30 日法律第 57 号）にしたがって取り扱われます。

本臨床研究で扱うあなたのお子さんの個人情報は、主として年齢、症状の経過観察、検査データ、ビデオ記録等、あなたのお子さんの生命を守るために使用します。その他、特別な目的で使用する場合には、事前にあなたに説明し、ご了解を頂いてから使用します。

1 5. 臨床研究の成績の使用と公表について

個人情報は適切に管理し、あらかじめあなたの同意を得ることなく第三者に提供することは絶対にありません。

当院の倫理委員会における審査や国の審議会における審査の過程において、厚生労働省の担当官および審議会の委員が、あなたのお子さんの個人情報を取り扱うことがあります。いずれの場合も、あなたのお子さんの個人情報はすべて秘密として取り扱われます。

本臨床研究から得られたデータを学会などで発表、論文として医学雑誌などに発表する場合は、個人を特定できない形すなわち個人情報を保護して公開します。

また、AAV ベクターを、将来一般の治療薬としてあなたのお子さんと同じ病気で悩む患者さんに使用するためには、厚生労働省で定められた基準に従って、さらに詳細な臨床試験を行い、より多くの患者さんの有効性と安全性のデータを集めなければなりません。そのためには、大学病院だけではなく、AAV ベクターを開発する企業にも臨床研究の企画・立案に参加してもらう必要がでてくるかもしれません。その際、この臨床研究の結果は、AAV を開発するための資料として、当該企業に開示されるかもしれません。もちろん、企業に開示する情報は今回の

臨床研究結果に限定したもので、参加していただいたあなたのお子さんの個人情報
は完全に匿名化した上で、プライバシー保護を厳守いたします。ただ、現時点
において、このような企業はなく、またそれを希望している企業也没有せん。

1 6. 研究者以外の者が試料・情報等を閲覧する可能性

本研究では、研究が適正に実施されているかどうかを確認するために、モニタ
リングと監査が行われます。そのため、研究対象者の秘密が保全されることを前
提として、自治医科大学の職員でモニタリング及び監査に従事する者や自治医科
大学の倫理審査委員会が、必要な範囲内において研究対象者等に関する試料・情
報を閲覧します。

1 7. 個人情報の保護と診療情報の開示の問い合わせや苦情の窓口

自治医科大学では、個人情報の保護や診療情報の開示に関する問い合わせや苦
情の窓口を設けております。この研究に関係した個人情報の保護や診療情報の開
示についてのご質問や苦情の窓口は以下のとおりです。

個人情報の保護に関する事柄：自治医科大学附属病院経営管理課
(電話 0285-58-7103)

診療情報の開示に関する事柄：自治医科大学附属病院医事課
(電話 0285-58-7115)

診療情報の開示は次のような手続きで申請できます。

1) 診療情報の開示を申請できる方

- ・ 対象者のご両親
- ・ あなたが何らかの身体的あるいは精神的な理由で申請できない場合は、法律
で決められた代理人あるいは2親等以内の親族です。

2) 診療情報の開示申請に必要な書類

- ・ 対象者のご両親が申請する場合は、運転免許証、パスポート、健康保険者証、
国民年金手帳、厚生年金手帳などの申請者の身分を証明する書類をお持ちくださ
い。
- ・ 法定代理人や上に述べた親族が申請する場合は、申請する人の身分を証明す
る書類（運転免許証、パスポート、健康保険者証、国民年金手帳、厚生年金手帳

など)と、あなたとの関係を証明する書類(戸籍謄本、健康保険者証など)をお持ちください。

3) 申請の仕方: 上の書類をお持ちいただき、自治医科大学附属病院医事課で所定の書類に記入いただきます。

4) あなたの申請書は、自治医科大学附属病院内に設置されております診療情報提供委員会で審議され、診療情報の開示を行うかどうか決定されます。

18. 研究の資金源、研究機関の研究に係る利益相反及び個人の収益等、研究者等の研究に係る利益相反に関する状況

(1) 資金源

この研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構の『難治性疾患実用化研究事業』委託研究費を用いて実施します。

(2) 利益相反の状況

直接的な利益相反に関する状況、利益相反マネジメント・ポリシーに定める年度別にとりまとめた利益相反の状況を記入し、自治医科大学利益相反委員会の審査を受けています。

分担研究者の村松慎一は、遺伝子治療を推進する企業である(株)遺伝子治療研究所の役員です。

19. 臨床研究に参加するために必要な費用について

臨床研究には、健康保険等の公的な医療保険は適用されません。その代わり、臨床研究に参加するために必要な経費、たとえば治療用ベクターの代金や手術にかかわる費用、入院中の個室の代金、PET 検査費用(治療用ベクターを注射して6か月後から5年後まで)などは本臨床研究グループがすべて負担します。この臨床研究に参加することで、あなたのお子さんに今まで以上に余分なお金を負担していただくことはありません。

ただし、この臨床研究の期間内であっても、この臨床研究と関係のない病気の医療費は、これまで通りあなたのお子さんの負担となります。

20. 臨床研究に参加する間をお願いすること

あなたのお子さんが本臨床研究に参加して頂く場合は、次のことを守ってくださるようお願いいたします。もし守って頂けなかった場合、せっかく参加して頂いていろいろな検査や診察を行って頂いて得られたデータが使えなくなることになってしまいます。また守って頂けなかった結果、副作用が起こったり、その発見が遅れたりして重大な状況になってしまう可能性や、効果が得られなかったりする可能性もあります。

- ・あなたのお子さんが他の診療科や他の病院などで治療を受けている（そこでもらったお薬や薬局で購入したお薬を含む）場合、あるいはこれから受けようとする場合は、担当医師に相談してください。あなたに同意をして頂いたうえで、担当医師から他の医師あるいは病院に、あなたのお子さんが本臨床研究に参加していることをお知らせします。

- ・もし、担当医師に相談しないで他の医師あるいは病院で治療を受けた場合、その後も結構ですので、必ず担当医師にそのことを伝えてください。

- ・担当医師の指示に従って、定期的に来院してください（通院中）。

ご都合が悪くなった場合には、可能な範囲で日程調整を行いますので、なるべく早めにご連絡をお願いいたします。

- ・住所や電話番号など連絡先が変更になる場合は、必ず担当医師までお知らせください。

- ・いつもと体調が違うと感じられた場合は、いつでも担当医師までご連絡ください。

- ・その他、本臨床研究に関する質問やあなたのお子さんにとって不都合なことがありましたら、必ず担当医師に問合せあるいは相談してください。

21. この臨床研究の結果から生じる知的財産権について

本臨床研究結果より、学会あるいは論文発表に伴うものやその他の知的財産権等が生じる可能性が考えられます。その権利は臨床研究を実施する研究機関や研究者に属し、本臨床研究に参加していただいたあなたのお子さんにはその権利を持つことはないことをご了承ください。

22. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について

緊急時、または本臨床研究について何かご心配やご質問がありましたら、下記にご連絡ください。

お問い合わせ先：自治医科大学附属病院 小児科・神経内科・脳神経外科・
救急医学

電話番号：0285-58-7366（小児科）

0285-58-7352（神経内科）

0285-58-7373（脳神経外科）

0285-58-7395（救急医学）

総括責任者（小児科）：山形 崇倫

分担研究者（小児科）：小坂 仁

分担研究者（神経内科）：村松 慎一

分担研究者（脳神経外科、救急医学）：中嶋 剛

あなたの担当医師：_____

夜間・休日連絡先：

自治医科大学附属病院 救急受付（電話：0285-44-2111）経由で
小児科宅直当番医師をご指名ください。当直医師経由で、上記の総括責任者または
分担研究者に連絡します。

23. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制

（1）臨床研究の正式名称

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究

（2）実施施設

自治医科大学附属病院、自治医科大学とちぎ子ども医療センター

（3）総括責任者

山形 崇倫（自治医科大学医学部小児科学・発達医学部門教授）

(4) 分担研究者

氏名	所属	役職
村松 慎一	自治医科大学 神経内科学	教授
小澤 敬也	自治医科大学 免疫遺伝子細胞治療学	客員教授
小坂 仁	自治医科大学 小児科学	教授
川合 謙介	自治医科大学 脳神経外科	教授
中嶋 剛	自治医科大学 脳神経外科	講師
五味 玲	自治医科大学 脳神経外科	教授
水上 浩明	自治医科大学 遺伝子治療研究部	准教授
竹内 護	自治医科大学 麻酔科学・集中治療医学	教授
多賀 直行	自治医科大学 とちぎ子ども医療センター 小児手術・集中治療部	准教授
門田 行史	自治医科大学 小児科学	准教授
小島 華林	自治医科大学 小児科学	助教
松本 歩	自治医科大学 小児科学	助教
宮内 彰彦	自治医科大学 小児科学	大学院生
中村 幸恵	自治医科大学 小児科学	大学院生
嵯峨 泰	自治医科大学 遺伝子治療研究部	准教授
吉尾 卓	自治医科大学附属病院 臨床研究支援センター とちぎ臨床試験推進部	部長
山崎 昌司	自治医科大学附属病院 臨床研究支援センター とちぎ臨床試験推進部	副部長

研究協力者

高津戸 文江	自治医科大学附属病院臨床研究支援部	臨床研究コーディネーター
山口 文江	自治医科大学附属病院臨床研究支援部	臨床研究コーディネーター

外部協力者

加藤 光広	昭和大学医学部 小児科学	講師
中村 和幸	山形大学医学部小児科学	特任助教
久保田 哲夫	安城更生病院 小児科	小児神経科部長
井手 秀平	東京都立北療育センター城南分園	園長
益山 龍雄	東京都立東部療育センター 小児科	診療部長
一瀬 宏	東京工業大学 生命理工学研究科	教授
佐藤 俊彦	宇都宮セントラルクリニック	院長
峰野 純一	タカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター	センター長

24. その他

事前検査の結果、この臨床研究に参加することが適当でないとわかった場合は、あなたに検査の結果をお知らせするとともに、研究には参加できなくなります。また副作用や血液検査の異常、その他の理由によって研究を続けることが適当ではないと判断されたときには、この研究を中止して他の適切な治療を行います。

この臨床研究に参加された方がお亡くなりになられた場合は、ご同意いただけましたら、解剖をお願いいたします。

この臨床研究について十分に理解していただけたでしょうか？

もし、この臨床研究に参加してもよいとお考えでしたら、次のページにある「臨床研究への参加に関する同意書」という用紙にご記入いただきたいと思います。また、心配なこと、わからないことがありましたら、遠慮なく総括責任者、分担研究者にお問い合わせください。

臨床研究への参加に関する同意書

自治医科大学附属病院

病 院 長 殿

私は「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」の臨床研究に参加するに当たり、担当医師から説明文書「参加のしおり」を用いて説明を受け、その内容について十分理解しました。ついては自らの自由意思により、私の子どもが本臨床研究に参加することに同意（代諾）いたします。

説明を受け理解した項目（□の中にご自分でチェックの印を付けてください。）

- | | |
|--|---|
| ☐ はじめに | ☐ 臨床研究とは |
| ☐ AADC 欠損症とは | ☐ この臨床研究の概要について |
| ☐ AAV ベクターとは | ☐ AADC 欠損症に対する遺伝子臨床研究の海外での概要 |
| ☐ 臨床研究の具体的な方法 | ☐ 臨床研究のスケジュール |
| ☐ 参加できる人、できない人 | ☐ 期待される効果 |
| ☐ 線条体への治療用ベクターの注射 | ☐ 臨床研究への参加予定期間、参加患者数 |
| ☐ 予想される危険性および副作用 | ☐ 途中でやめなくなったら |
| ☐ 臨床研究の参加をことわったら | ☐ 新たな情報のお知らせについて |
| ☐ 健康被害の治療とその医療費に関して | ☐ 臨床研究の成績の使用と公表について |
| ☐ あなたの個人情報の保護について | ☐ 臨床研究に参加するために必要な費用について |
| ☐ 個人情報の保護と診療情報の開示の問い合わせや苦情の窓口 | ☐ 緊急連絡先およびお問い合わせ先について |
| ☐ 臨床研究に参加する間に願うこと | ☐ この臨床研究の結果から生じる知的財産権について |
| ☐ 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制 | |
| ☐ その他 | |

私は前頁の項目すべての□にチェックの印を記入した上で、「AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究」に私の子どもが参加することに同意いたします。

平成	年	月	日
本人の住所	_____		
本人の氏名	_____		
電話番号	_____ () _____		
代諾者署名または記名捺印	_____		印
本人との関係	_____		
代諾者署名または記名捺印	_____		印
本人との関係	_____		

総括責任者または分担研究者による説明

説明日 平成 年 月 日

職名 _____

署名または記名捺印 _____ 印

補助的説明を行った臨床研究協力者

説明日 平成 年 月 日

職名 _____

署名または記名捺印 _____ 印

臨床研究への参加に関する同意書

自治医科大学附属病院

病 院 長 殿

私は「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」の臨床研究に参加するに当たり、担当医師から説明文書「参加のしおり」を用いて説明を受け、その内容について十分理解しました。ついては自らの自由意思により、私の子どもが本臨床研究に参加することに同意（代諾）いたします。

説明を受け理解した項目（□の中にご自分でチェックの印を付けてください。）

- | | |
|--|---|
| ☐ はじめに | ☐ 臨床研究とは |
| ☐ AADC 欠損症とは | ☐ この臨床研究の概要について |
| ☐ AAV ベクターとは | ☐ AADC 欠損症に対する遺伝子臨床研究の海外での概要 |
| ☐ 臨床研究の具体的な方法 | ☐ 臨床研究のスケジュール |
| ☐ 参加できる人、できない人 | ☐ 期待される効果 |
| ☐ 線条体への治療用ベクターの注射 | ☐ 臨床研究への参加予定期間、参加患者数 |
| ☐ 予想される危険性および副作用 | ☐ 途中でやめなくなったら |
| ☐ 臨床研究の参加をこどわったら | ☐ 新たな情報のお知らせについて |
| ☐ 健康被害の治療とその医療費に関して | ☐ 臨床研究の成績の使用と公表について |
| ☐ あなたの個人情報の保護について | ☐ 臨床研究に参加するために必要な費用について |
| ☐ 個人情報の保護と診療情報の開示の問い合わせや苦情の窓口 | ☐ 緊急連絡先およびお問い合わせ先について |
| ☐ 臨床研究に参加する間にお願いすること | ☐ この臨床研究の結果から生じる知的財産権について |
| ☐ 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制 | |
| ☐ その他 | |

私は前頁の項目すべての□にチェックの印を記入した上で、「AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究」に私の子どもが参加することに同意いたします。

平成	年	月	日
本人の住所	_____		
本人の氏名	_____		
電話番号	_____ () _____		
代諾者署名または記名捺印	_____		印
本人との関係	_____		
代諾者署名または記名捺印	_____		印
本人との関係	_____		

総括責任者または分担研究者による説明

説明日 平成 年 月 日

職名 _____

署名または記名捺印 _____ 印

補助的説明を行った臨床研究協力者

説明日 平成 年 月 日

職名 _____

署名または記名捺印 _____ 印。

臨床研究への参加に関する同意書

自治医科大学附属病院

病 院 長 殿

私は「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」の臨床研究に参加するに当たり、担当医師から説明文書「参加のしおり」を用いて説明を受け、その内容について十分理解しました。ついては自らの自由意思により、私の子どもが本臨床研究に参加することに同意（代諾）いたします。

説明を受け理解した項目（□の中にご自分でチェックの印を付けてください。）

- | | |
|--|---|
| ☐ はじめに | ☐ 臨床研究とは |
| ☐ AADC 欠損症とは | ☐ この臨床研究の概要について |
| ☐ AAV ベクターとは | ☐ AADC 欠損症に対する遺伝子臨床研究の海外での概要 |
| ☐ 臨床研究の具体的な方法 | ☐ 臨床研究のスケジュール |
| ☐ 参加できる人、できない人 | ☐ 期待される効果 |
| ☐ 線条体への治療用ベクターの注射 | ☐ 臨床研究への参加予定期間、参加患者数 |
| ☐ 予想される危険性および副作用 | ☐ 途中でやめたとなくなったら |
| ☐ 臨床研究の参加をことわったら | ☐ 新たな情報のお知らせについて |
| ☐ 健康被害の治療とその医療費に関して | ☐ 臨床研究の成績の使用と公表について |
| ☐ あなたの個人情報の保護について | ☐ 臨床研究に参加するために必要な費用について |
| ☐ 個人情報の保護と診療情報の開示の問い合わせや苦情の窓口 | ☐ 緊急連絡先およびお問い合わせ先について |
| ☐ 臨床研究に参加する間にお願いすること | ☐ この臨床研究の結果から生じる知的財産権について |
| ☐ 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制 | |
| ☐ その他 | |

私は前頁の項目すべての□にチェックの印を記入した上で、「AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究」に私の子どもが参加することに同意いたします。

平成	年	月	日
本人の住所	_____		
本人の氏名	_____		
電話番号	_____ () _____		
代諾者署名または記名捺印	_____		印
本人との関係	_____		
代諾者署名または記名捺印	_____		印
本人との関係	_____		

総括責任者または分担研究者による説明

説明日 平成 年 月 日

職名 _____

署名または記名捺印 _____ 印

補助的説明を行った臨床研究協力者

説明日 平成 年 月 日

職名 _____

署名または記名捺印 _____ 印

同意撤回書

自治医科大学附属病院

病 院 長 殿

私は「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」の臨床研究に参加するに当たり、担当医師から説明文書「参加のしおり」を用いて説明を受け、その内容について十分理解しましたが、自らの自由意思により、本臨床研究参加への同意を撤回したく、ここに同意撤回書を提出します。

平成 年 月 日

本人の住所 _____

本人の氏名 _____

電話番号 _____ () _____

代諾者署名または記名捺印 _____ 印

本人との関係 _____

本臨床研究に関する同意撤回書を受領したことを証します。

所属・職名 _____

研究担当者氏名 _____ 印

同意撤回書

自治医科大学附属病院

病 院 長 殿

私は「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」の臨床研究に参加するに当たり、担当医師から説明文書「参加のしおり」を用いて説明を受け、その内容について十分理解しましたが、自らの自由意思により、本臨床研究参加への同意を撤回したく、ここに同意撤回書を提出します。

平成 年 月 日

本人の住所 _____

本人の氏名 _____

電話番号 _____ () _____

代諾者署名または記名捺印 _____ 印

本人との関係 _____

本臨床研究に関する同意撤回書を受領したことを証します。

所属・職名 _____

研究担当者氏名 _____ 印

同意撤回書

自治医科大学附属病院

病 院 長 殿

私は「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」の臨床研究に参加するに当たり、担当医師から説明文書「参加のしおり」を用いて説明を受け、その内容について十分理解しましたが、自らの自由意思により、本臨床研究参加への同意を撤回したく、ここに同意撤回書を提出します。

平成 年 月 日

本人の住所 _____

本人の氏名 _____

電話番号 _____ () }

代諾者署名または記名捺印 _____ 印

本人との関係 _____

本臨床研究に関する同意撤回書を受領したことを証します。

所属・職名 _____

研究担当者氏名 _____ 印

}

第一種使用規程承認申請書

平成 29 年 4 月 4 日

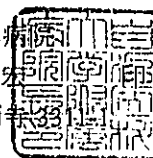
厚生労働大臣 塩崎 恭久 殿

環境大臣 山本 公一 殿

氏名 自治医科大学附属病院

申請者 病院長 佐田 尚宏

住所 栃木県下野市薬師



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（ <i>adenovirus associated virus: AAV</i> ）2型に由来するキャプシドタンパク質及び末端反復配列（ <i>inverted terminal repeats: ITRs</i> ）を有し、ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素を発現するAAV（AAV-hAADC-2）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、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	1 保管 本遺伝子組換え生物等の保管は、遺伝子組換え生物等である旨を表示した容器に納めバイアルに密封された状態で、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において行う。 2 運搬 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。 3 投与液の調製 本遺伝子組換え生物等の希釈は、治療施設内の安全キャビネット内で行う。 4 投与 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の手術室内で、患者の脳内に直接注入することにより行う。 5 投与後の患者の管理 (1) 投与後、患者の創部を消毒し、密閉ドレッシング材で覆う。密閉ドレッシング材による被覆は、創部が治癒し本遺伝子組換え生物等が排出されるおそれなくなるまで継続する。 (2) 投与後7日以内の患者に咳嗽・気道分泌物増加等の呼吸器症状、嘔吐・下痢等の消化器症状、頻尿・発熱等の尿路感染症状等が出現した場合は、個室に隔離し、血液及び分泌物のウイルス検査を行う。個室隔離は、これらの症状が軽快するまで又は検査にて本遺伝子組換え生物の陰性が確認されるまで、医師の判断により必要とされる期間継続する。 6 患者検体の取扱い 試験のため患者から採取した検体は、治療施設及び検査実施機関で定められている規程に従って取り扱う。

	7 感染性廃棄物等の処理 (1) 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等の廃棄は、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）に基づいて治療施設で定められている医療廃棄物の管理に関する規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。 (2) 本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物の廃棄は、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。 (3) 患者由来の検体の廃棄は、医療廃棄物管理規程及び検査実施機関で定められている規程に従って行う。
--	---

「rep 及び cap 遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス
(adeno-associated virus : AAV) 2 型に由来するキャプ
シドタンパク質及び末端反復配列 (inverted terminal
repeats : ITRs) を有し、ヒト芳香族 L アミノ酸脱炭酸
酵素を発現する AAV (AAV-hAADC-2)」

生物多様性影響評価書

自治医科大学附属病院

生物多様性影響評価書
(区分：遺伝子治療臨床研究)

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 (adeno-associated virus : AAV) は、パルボウイルス科 (Parvoviridae) の中で複製にヘルパーウイルスを必要とするデPENDウイルス属 (Dependovirus) に分類されるウイルスで、1本鎖 DNA をゲノムとして持つ (文献1)。これまでにヒト又は霊長類から分離された AAV は、血清型及びゲノムの違いに基づき100以上の型に分けられている (文献1～3)。その中で、ヒト検体から分離された2型 (AAV2) が最もよく研究されている。成人の多くは AAV に対する抗体を有するが (文献1)、ヒトへの病原性は知られていない。本遺伝子組換え生物等、AAV-hAADC-2 は、AAV2 に由来する末端反復配列 (inverted terminal repeats : ITRs) をゲノムの両端に持ち、キャプシドタンパク質も AAV2 に由来する。

2 使用等の歴史及び現状

2型を含めいかなる血清型の AAV も生ワクチン等に使用された報告はない。また、AAV に由来する遺伝子組換えウイルス (AAV ベクター) は血友病 B、パーキンソン病等様々な疾患の遺伝子治療臨床試験でヒトに投与されている (文献4～14)。既に数百人の被験者に AAV ベクターが投与されているが、安全性プロファイルは全般的に良好であった (文献14)。AAV1 型に由来する AAV ベクター (alipogene tiparvovec; Glybera®) は、既に欧州で承認されている。

3 生理・生態学的特性 (文献1)

(1) 基本的特性

AAV は直径約25 nm の正二十面体構造のキャプシドを有するウイルスで、エンベロープは持っていない。ウイルス粒子は物理化学的に比較的堅牢であり、常温においても比較的安定である。AAV ゲノムは約 4.7 kb の線状1本鎖 DNA であり、その両端に位置する ITR に挟まれて、2つの翻訳領域 (*rep*及び*cap*) が存在する。*rep* 遺伝子は、野生型 AAV の複製に必要な4種の Rep タンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40) をコードする。*cap*遺伝子は、AAV の正二十面体構造を構成する3種のキャプシドタンパク質 (VP1、VP2、VP3) をコードしている。

AAV2 は細胞膜の普遍的成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカンを認識して感染するため宿主域は広く、これに由来する AAV2 ベクターも非分裂細胞を含め広範な細胞種に遺伝子導入が可能である。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

AAVは自律的にウイルス粒子を構成するために必要な遺伝子を有さないため、単独では増殖できない。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」非存在下では、Rep の働きによ

り第19染色体長腕の AAVS1 領域に組み込まれて潜伏感染する。ヘルパーウイルスと共感染すると、これらから AAV の増殖に必要な遺伝子産物が供給され、増殖が起こる。

自然界においては、霊長類に感染する AAV が霊長類以外の生物に感染して遺伝物質を移入することは知られていないが、*in vitro* の実験では、AAV をヘルパーウイルスと共感染させると、異なる種の細胞内でも複製が起こりうる（文献15）。また、自然界でも、複数の異なる系統の AAV 及びヘルパーウイルスが共感染した場合、AAV ウイルスゲノムの相同的組み換えが起こる可能性がある。

(3) 捕食性又は寄生性

他の生物を捕食することはない。自然界では、ヒト以外で増殖を伴う AAV2 の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おける存在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があり得るとされる（文献1）。AAV は哺乳類動物に感染するが、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

AAV2 は、ヒトに主に経気道ないし経口感染し、ヘルパーウイルスと同時に感染した場合は感染個体で増幅し、ヘルパーウイルスと共に分泌物中に排出され、他の個体に感染する（水平感染）。ヘルパーウイルスが存在しない場合、AAV2 ゲノムは、扁桃・肺・脾臓などの組織において、2 本鎖環状 DNA として存在し、まれに染色体に組み込まれる（文献16、17）。

(5) 病原性

AAV2 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 のゲノム配列が見出されたという報告がある（文献18）。しかし、病的な意義は見出されていない。（文献19）

(6) 有害物質の産生性

AAV2 の感染に際して細胞内に産生されるタンパク質性の毒素等は報告されていない。

(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ていることから、不活化には85℃で数分の加熱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。その他にも、次亜塩素酸ナトリウム（1～10%に希釈）、アルカリ溶液（pH>9）又は5%フェノールによって不活化される。

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

AAV-hAADC-2 の全塩基配列（3,457bp）を別紙1に示す。本遺伝子組換え生物のゲノムからは *rep*

及び *cap* 遺伝子が削除されており、AAV2 ゲノムの両末端にある ITR の間にヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素 human aromatic L-amino acid decarboxylase (hAADC) の発現カセットが挿入されている。挿入された構成成分は以下のとおりである。

1) サイトメガロウイルス (CMV) のプロモーター/エンハンサー (CMV Pr)

塩基番号139から797の659 bp の配列である。hAADC 遺伝子を転写する。

2) ヒトβグロビンイントロン

塩基番号805から1,296の492 bp の配列である。cDNA からの発現レベルを増加させる。

3) ヒト AADC 遺伝子 (hAADC)

塩基番号1,331から3,307の1,443 bpの配列であり、hAADC (EC 4.1.1.28) をコードする。発現産物の hAADC は L-dopa をドパミンに、5-HTP (5-hydroxytryptophan) をセロトニンに脱炭酸化する酵素である。アミノ酸配列を別紙2に示した。

4) ヒト成長ホルモンのポリA 付加シグナル (hGH poly(A))

塩基番号2,829から3,307の479 bp の配列である。CMV プロモーターにより開始された転写が終了する。

5) 人工配列

塩基番号 131 から 138、798 から 1,004、1,298 から 1,330、2,774 から 2,828 及び 3,308 から 3,338 の配列である。これらは制限酵素認識サイトを含むクローニングサイト及びその周辺配列であり、131 から 138 及び 3308 から 3338 の配列には制限酵素 *Not*I 切断サイトを有する。

AAV-hAADC-2 の構造模式図を別紙3に示した。

2 ベクターに関する情報

(空欄)

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の調製に使用する pAAV-hAADC-2、pRC-BI-khB342-2 及び pHelper の3種類のプラスミドの構成を別紙4 に記載した。

pAAV-hAADC-2 は CMV プロモーターの転写制御下にある hAADC 遺伝子を含む。pRC-BI-khB342-2 は、AAV2 ゲノムのうち、ウイルス固有のタンパク質である Rep (複製と増殖に関与する) 及び VP (キャプシドを形成する) をコードする領域 (4,229 bp) を含む AAV ヘルパープラスミドである。pHelper は、アデノウイルス (Ad) 2型の E2A、E4及び VARNA 遺伝子を含む Ad ヘルパープラスミドである。いずれもアンピシリン耐性遺伝子を有している。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

pAAV-hAADC-2 は、AAV2 の末端反復配列 ITR 配列の間に、CMV Pr、βグロビンイントロン、hAADC、hGH poly(A)からなる発現カセットを制限酵素 *Not*I を使用して挿入し作製した。pRC-BI-khB342-2 は、AAV2 のゲノム DNA から ITR を削除して AAV2 の *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を

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は宿主の AAV2 に存在しない hAADC 遺伝子を含むので、hAADC 遺伝子 DNA の一部を PCR で増幅、定量する方法により検出される。このときに用いる PCR 反応では試料1 µL 中に12 コピーのAAV-hAADC-2 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 AAV2 と本遺伝子組換え生物の間には以下の相違がある。

- 1) 本遺伝子組換え生物は発現プロモーターの下流に hAADC 遺伝子を持つため、本遺伝子組換え生物が感染した細胞は hAADC を発現する。
- 2) 本遺伝子組換え生物はウイルス DNA の複製や AAV 粒子の形成に必要な *rep* 及び *cap* 遺伝子を欠失しているため、増殖にはヘルパーウイルスとの共感染が不可欠である。また、野生型 AAV が共感染するか、*rep* 及び *cap* 遺伝子が組み込まれた又はトランスフェクトされた細胞でなければ増殖は起こらない。
- 3) 本遺伝子組換え生物はヘルパーウイルスを介さずにプラスミドベクターを用いて製造するが、ヒトに感染してもほとんどがエピソームとして核内に留まり、稀に、細胞のゲノムにランダムに組み込まれる。Rep 遺伝子を持たない組換え AAV はランダムに組み込まれる傾向にあり、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25)。
- 4) 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 (文献24)。

本遺伝子組換え生物由来の RCA は、本遺伝子組換え生物作製時、*rep* 及び *cap* 遺伝子をもつ pRC-BI-khB342-2 と hAADC 遺伝子を持つ pAAV-hAADC-2 の間での遺伝子組換えにより生じる可能性がある。ウイルスゲノムの複製に必須な ITR と Rep、及び細胞向性 (cell tropism) を規定するキャプシドは野生型と同一であるので、遺伝子組換え生物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、供与核酸がベクター内の野生型 AAV 由来の生物多様性に影響を与える因子に関与する可能性は低い (文献22～24)。

AAV-hAADC-2 は細胞に感染すると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存在する。

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

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、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

保管

(1) 本遺伝子組み換え生物等の保管は、遺伝子組換え生物等である旨を表示した容器に納めバイアルに密封された状態で、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において行う。

運搬

(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。

投与液の調製

(3) 本遺伝子組換え生物等の希釈は、治療施設内の安全キャビネット内で行う。

投与

(4) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の手術室内で、患者の脳内に直接注入することにより行う。

投与後の患者の管理

(5) 投与後、患者の創部を消毒し、密閉ドレッシング材で覆う。密閉ドレッシング材による被覆は、創部が治癒し本遺伝子組換え生物等が排出されるおそれなくなるまで継続する。

(6) 投与後7日以内の患者に咳嗽・気道分泌物増加等の呼吸器症状、嘔吐・下痢等の消化器症状、頻尿・発熱等の尿路感染症状等が出現した場合は、個室に隔離し、血液及び分泌物のウイルス検査を行う。個室隔離は、これらの症状が軽快するまで又は検査にて本遺伝子組換え生物の陰性が確認されるまで、医師の判断により必要とされる期間継続する。

患者検体の取扱い

(7) 試験のため患者から採取した検体は、治療施設及び検査実施機関で定められている規程に従って取り扱う。

感染性廃棄物等の処理

(8) 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等の廃棄は、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）に基づいて治療施設で定められている医療廃棄物の管理に関する規程（以下、「医療廃棄物管理規程」）に従って行う。

(9) 本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物の廃棄は、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。

(10) 患者由来の検体の廃棄は、医療廃棄物管理規程及び検査実施機関で定められている規程に従って行う。

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

患者体内における RCA の出現の有無については、AAV 感染症状の出現等、必要に応じて血液や気道分泌物等を用いて PCR 法にて検査する。

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
呼吸器症状、消化器症状又は尿路感染症状等が出現し、組換えウイルス排出の疑いが生じた場合は患者を個室に隔離し、PCR 検査を行う。検査により遺伝子組換えウイルスの排出が確認された場合、個室隔離を継続する。隔離する期間は、連続した2回の PCR 検査にて遺伝子組換えウイルスの排出が検出されなくなるまで、又は上記症状が消退しウイルス排出のおそれがないと判断されるまでとする。

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
ラット及びサルのパーク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26～33）。また、AAV-hAADC-2 投与後の動物の血液中で本遺伝子組み換え生物等が検出されたことはない。
これまで、臨床研究において AAV-hAADC-2 の脳内投与を行なったパーキンソン病8例及び AADC 欠損症4例について投与後に血液及び尿の PCR 検査を行った。その結果、いずれの検体においても本遺伝子組換えウイルス又は RCA は検出されなかった（別紙8）。

6 国外における使用等により得られた情報

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6）。

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7）。

本研究で用いるウイルス量は血友病の場合に比べておよそ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。

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-[18 F]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34～36）。

さらに、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 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11）

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及び本遺伝子組換え生物由来 RCA 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、競合や有害物質の産生により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

よって、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、他の微生物を減少させる性質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。

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が自然界で感染する対象は、哺乳動物である。また、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1）。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物が感染した動物で一過性に hAADC 遺伝子が発現する可能性はあるが、hAADC の基質となる L-dopa 又は 5-HTP が供給されないかぎり、ドパミン又はセロトニンが産生されることはない。動物体内にある L-dopa 及び 5-HTP は少量であり、また自然界においてこれらの基質が外来性に供給されることはないため、たとえ hAADC が過剰発現しても生成するドパミン又はセロトニンの量は生理的範囲内であると予想される。従って、AAV-hAADC-2 由来 RCA は、野生型 AAV-hAADC-2 と同様に病原性をもたないと考えられる。

(3) 影響の生じやすさの評価

これまで我が国において、本遺伝子組換え生物等はパーキンソン病患者8名、AADC 欠損症患者5名に投与されたが、これらの患者において本遺伝子組み換え生物等に起因すると考えられる副作用は起こっていない。同様に、本遺伝子組換え生物等と同じ目的遺伝子を搭載した AAV ベクターを用いた米国の臨床試験においても、病原性は報告されていない。さらに、AAV に由来する遺伝子組換えウイルスは1999 年以後、欧米で数百人の被験者に対して投与されたが、全般的に良好な安全性プロファイルを示している（文献10、11）。以上を受け、欧州では AAV1 型を宿主とする遺伝子組み換えAAVが医薬品（Glybera®）として承認された。従って、本遺伝子組換え生物が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

よって、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、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のある野生動植物等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) 生物多様性が生ずるおそれの有無等の判断

よって、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、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。

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等の特定

本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来 RCA の感染性は野生型 AAV2 と同一と考えられる。自然界では、野生型 AAV2 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 AAV2 を使用した実験結果から、ヒト以外にカニクイサル、アカゲサル、イヌ、ラット、マウスなどの哺乳動物に感染する可能性はある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物が持つ hAADC 遺伝子は核酸を水平伝達する性質を持たないため、本遺伝子組み換え生物又は本遺伝子組換え生物由来の RCA が核酸を水平伝達する性質は野生型

AAV2 と同等である。野生型 AAV 及びヘルパーウイルスと共感染した場合に第三者や野性又は愛玩動物に水平感染する可能性はあるが、第一種使用規程に従う限り、患者に投与された AAV-hAADC-2 が水平感染するおそれは極めて小さい。

(3) 影響の生じやすさの評価

本遺伝子組換え生物が有する hAADC 発現カセットが環境中の微生物に導入される可能性があるが、それが起こるためには通常相同組み換えが必要で、その微生物が ITR 類似配列を持っていることが条件になるため、極めて起こりにくい現象である。万一起こったとしても、当該カセットには選択的優位性をもたらす要素が含まれていないため、導入された微生物は選択圧で淘汰されていくと考えられる。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及び本遺伝子組換え生物由来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なく、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かぎり、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 粒子へパッケージできるDNA のサイズに上限があるため、RCA は野生型AAV2 と同じになるか、あるいは短い外来遺伝子を含んでも野生型AAV2 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AAV2 と同等であり、ヒト及び他のほ乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

(4) 生物多様性が生ずるおそれの有無等の判断

よって、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、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

なし。

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 AAV2 と同等で、哺乳動物に限られる。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。また、野生型 AAV2と同様に、病原性はない。

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 hAADC 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ないかぎり、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 AAV2 と同じになるか、あるいは短い外来遺伝子を含んでも野生型 AAV2 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 AAV2 と同等であり、ヒト及び他のほ乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

従って、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。

文献

1. Berns KI, Parrish CR. Parvoviridae. In "Fields VIROLOGY 6th ed. (Kaipe DM, Howley PM eds.)", pp.1768-1791, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013.
2. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, *et al.* Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 2004;78:6381-6388.
3. Mori S, Wang L, Takeuchi T, *et al.* Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudo-typing characterization of capsid protein. *Virology* 2004;330:375-383.
4. Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV. *Nat Rev Genet* 2011; 12:341-355.
5. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, *et al.* Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000;24:257-261.
6. 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.
7. 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.
8. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011;365:2357-2365.
9. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, *et al.* Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994-2004.
10. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, *et al.* A phase I study of L-aromatic amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 2010;18:1731-1735.
11. Hwu W-L, Muramatsu S, Hong S, *et al.* Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Science Transl Med* 2012;4:134ra61.
12. Simonelli F, Maguire AM, Testa F, *et al.* Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective though 1.5 years after administration. *Mol Ther* 2010;18:643-650.
13. Testa F, Maguire AM, Rossi S, *et al.* Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital amaurosis type 2. *Ophthalmol* 2013;120:1283-1291.
14. High KA, Aubourg P. rAAV human trial experience. *Methods Mol Biol* 2011;807:429-457.
15. Berns KI, Bohensky RA. Adeno-associated viruses: an update. *Adv Virus Res* 1987;32:243-306.
16. Chen C, Jensen RL, Schnepf BC, *et al.* Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol* 2005;79:14781-14792.
17. Schnepf B, Jensen RL, Chen CL, *et al.* Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* 2005;79:14793-14803.
18. NNault JC, Datta S, Imbeaud S, *et al.* Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 2015;47:1187-1193.
19. Gil-Farina I, Fronza R, Kaeppl C, *et al.* Recombinant AAV integration is not associated with hepatic genotoxicity in nonhuman primates and patients. *Mol Ther* 2016;24:1100-1105.
20. Graham FL, Smiley J, Russell WC, *et al.* Characteristics of a human cell line transformed by DNA from

- human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-72.
21. Xu R, Rahimi M, Hsu M, *et al.* Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. *Med Sci Monit* 2005 ;11 :305-308.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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.
 35. Christine CW, Starr PA, Larson PS, *et al.* Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 2009;73:1662-1669.
 36. 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.

[REDACTED]

[REDACTED]

(P152～P174 については非公開)

新旧対照表

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究

自治医科大学

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書（様式第1の添付資料）

頁と行	新	旧	変更理由
1 頁	自治医科大学附属病院 病院長 佐田 尚宏	自治医科大学附属病院 病院長 安田 是和	病院長の交代
1-2 頁	以下の研究者の追加 川合 謙介、小島 華林、松本 歩、宮内 彰彦、嵯峨 泰、中村 和幸、久保田 哲夫、井手 秀平、益山 龍雄 以下の研究者の削除 渡辺 英寿、小野 さやか、野村 芳子 以下の研究協力者の追加 高津戸 文江、山口 文江		・人事異動による追加、削除及び役割分担の変更 ・患者の診療に関与する研究者及び研究協力者の追加
2 頁	自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 委員長 自治医科大学医学部機能生化学部門 教授 遠藤 仁司	自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 委員長 自治医科大学地域医療学センター 教授 梶井 英治	自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会委員長の交代
3 頁 10-13 行	日本では、本遺伝子治療臨床研究の申請時（2014年7月）には4例診断されていたが、新たに2例診断された。脳性麻痺との鑑別が困難な場合もあり、正しく診断を受けていない症例も多いと考えられ、さらに症例は増える	日本では、4例診断されているが、脳性麻痺との鑑別が困難な場合もあり、正しく診断を受けていない症例も多いと考えられる。	患者の報告例の増加に伴う変更

	と考えられる。			次項「③対象患者」に記載があるために削除
9 頁 10-14 行	② AAV-hADC-2 の投与 AADC 欠損症患者の線条体（被殻）に、定位脳手術の手法によって AAV-hADC-2 を注入する。AAV-hADC-2 の注入量は 1×10^{12} vg/mL の濃度で、1 箇所あたり最大 $50 \mu\text{L}$ を被殻内の 4 箇所に分けて注入する。	② AAV-hADC-2 の投与 AADC 欠損症患者の線条体（被殻）に、定位脳手術の手法によって AAV-hADC-2 を注入する。対象患者は 4 例を予定している。AAV-hADC-2 の注入量は 1×10^{12} vg/mL の濃度で、最大 $50 \mu\text{L}$ を被殻内の 4 箇所に分けて注入する。		
9 頁 16-19 行	③ 対象患者 対象は当院および研究協力機関に通院中で、髄液検査、酵素活性測定、あるいは遺伝子診断で診断が確定されている AADC 欠損症患者 8 例とする。治療実施時の年齢が 2 歳以上。新たに診断が確定した患者が出た場合には、追加実施を検討する。	③ 対象患者 対象は当院および研究協力機関に通院中で、髄液検査、酵素活性測定、あるいは遺伝子診断で診断が確定されている日本人 AADC 欠損症患者 4 例とする。治療実施時の年齢が 4 歳以上。新たに診断が確定した患者が出た場合には、追加実施する可能性がある。		・症例増加の追記 ・定位脳手術の方法の改良により、2 歳以上での実施が可能になったため対象年齢の変更。
9 頁 36-39 行	(3) 期間および目標症例数 実施期間は、最終登録症例にベクターを投与した時点から 9 ヶ月後までとする。ただし、5 年後までは一定の評価を行い、さらに 15 年後まで安全性に関して長期フォローする。目標症例数は 8 例とする。	(3) 期間および目標症例数 実施期間は、最終登録症例にベクターを投与した時点から 9 ヶ月後までとする。ただし、5 年後までは一定の評価を行い、さらに 10 年後まで安全性に関して長期フォローする。目標症例数は 4 例とする。		・長期フォロー期間の統一 ・対象患者数の増加
10 頁	ベクター投与直後 2 日間は個室に隔離し、外	ベクター投与直後 3 日間は個室に隔離し、外		遺伝子治療実施経験から、ベク

20-28 行	出・外泊は認めない。なお投与後 2 日目の時点で PCR 法による検査でベクター DNA を認められる場合には、ベクター DNA が陰性になるまで個室への隔離期間を延長する。 <u>隔離解除後も、投与後 7 日以内の患者に咳嗽・気道分泌物増加等の呼吸器症状、嘔吐・下痢等の消化器症状、頻尿・発熱等の尿路感染症の症状が出現した場合、個室に再隔離し、血液及び分泌物のウイルス検査を行う。</u>	出・外泊は認めない。なお投与後 3 日目の時点で PCR 法による検査でベクター DNA を認められる場合には、ベクター DNA が陰性になるまで個室への隔離期間を延長する。	ターゲノムが血液中から検出されることがなかったため、隔離期間を連続 3 日から 2 日に短縮する。隔離解除後早期に相同期換えイベントが起こり組換えウイルスの複製が疑われる場合は、再隔離してウイルス検査を行う。
10 頁 29 行	PET スキャンは Base line (Day -30~-1)、必要とされる期間継続する。	PET スキャンは Base line (Day -14~-1)、	AADC 欠損症は、先天性の疾患であり、PET での発現低下は早期に実施しても変化しないため、実施可能期間を延長する。
10 頁 31-33 行	尚、Base line に関しては、 <u>血液、凝固検査、生化学検査以外は、状態に変化がなければ 3 か月前までの検査結果の使用を可能とする。</u>		体調の変化を確認する血液、凝固、生化学検査以外は、数か月単位での変化はないと考えられるため、追記。
11 頁	<u>さらに、2 歳~3 歳の患者に対しては、安全性の高い実施方法を導入して実施する。</u>		定位脳手術の方法の改良により、2 歳以上での実施が可能に

3-4行			なったため、年齢変更を追記。
11 頁	また、臨床研究の実施状況に関しては、適宜、モニタリングおよび監査を行う。		新基準に対応した計画に変更するため、モニタリングと監査の実施について追記。
17 行			

遺伝子治療臨床研究実施計画書 課題名：AADC欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究

頁と行	新	旧	変更理由
1-3 頁	II.2 総括責任者以外の研究者の氏名およびその担当する役割 以下の研究者の追加 川合 謙介、小島 華林、松本 歩、宮内 彰彦、嵯峨 泰、中村 和幸、久保田 哲夫、井手 秀平、益山 龍雄 以下の研究者の削除 渡辺 英寿、野村 芳子 以下の研究協力者の追加 高津戸 文江、山口 文江		・ 人事異動による追加と削除 ・ 患者の診療に関与する研究者及び研究協力者の追加

5 頁 11-15 行	V. 2 対象疾患に関する現時点での知見 ① アミノ酸脱炭酸酵素欠損症; Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) 欠損症について 台湾では、創始者効果から比較的発症率が高く、2012 年時点では生存例が 20 例、死亡例 10 例が確認されている⁴。日本では、本遺伝子治療臨床研究の申請時(2014 年 7 月)には 4 例診断されていたが、新たに 2 例診断された。脳性麻痺との鑑別が困難な場合もあり、正しく診断を受けていない症例も多いと考えられ、さらに症例は増えると考えられる。	V. 2 対象疾患に関する現時点での知見 ① アミノ酸脱炭酸酵素欠損症; Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) 欠損症について 台湾では、創始者効果から比較的発症率が高く、生存例が 20 例、死亡例 10 例が確認されている⁴。日本では、3 例診断されていたが、新たに 1 例診断され、4 例確認されている。脳性麻痺との鑑別が困難な場合もあり、正しく診断を受けていない症例も多いと考えられる。	患者の報告例の増加に伴う変更
6 頁 33 行	他の患者での変異は多様である。		追記
8 頁 8-12 行	日本では、本遺伝子治療臨床研究として、2015 年 6 月から、5 歳から 19 歳の患者 5 例に実施した。4 例とも、大きな有害事象はなく経過している。一部の患者で、治療後、PET で被殻に AADC の発現が確認されている。OGC、ジストニア発作の減少、運動機能の改善が得られている。有害事象としては、四肢の小さな舞踏病様運動が起きたのみである。		AADC 欠損症遺伝子治療実施結果についての追記

8 頁 31-35 行 ～ 9 頁 1-4 行	また、2015 年に新たな計画で同じベクターでの治療が再開された。治療を受けたパーキンソン病患者 1 名が、治療後 6 週間の時点で突然死した。治療後の経過は順調で、パーキンソン病の他にとくに症状はなかった。病理解剖では脳のベクター注入部位に出血などの病変はなく、心臓や肝臓などの全身の臓器にも死因となる病変は認められなかった。これらの経緯や病理所見について自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会において審議が行われた。この委員会では、上記の所見に加え、パーキンソン病では死因は不明であるものの突然死の頻度が 14% (6/44 例) あるという他施設の報告も考慮された結果、遺伝子治療と今回の 1 人目の方の突然死との間には因果関係は認められず、遺伝子治療を継続することに問題はないとされた。		同ベクターを使用した遺伝子治療に関する情報の追記
31 頁 24 行	患者の血液は PCR 法でベクター DNA が陰性になるまで検査する	患者の尿、便、および血液は PCR 法でベクター DNA が陰性になるまで検査する	遺伝子治療実施経験から、ベクターゲノムが尿、便から検出されることはなかったため、尿、便の検査は実施しない。
35 頁	日本では 4 人の患者が確認されており、患者家族の強い要望もあり、本臨床研究	日本では 4 人の患者が確認されており、患者家族の強い要望もあり、本臨床研究	患者数増加の追記

3-4 行	を計画したが、その後さらに 2 例の患者が確認された。	を計画した。	
35 頁 12-13 行	本臨床研究で実施した 6 例においても、軽度の舞踏病様運動以外に問題となる有害事象は起きていない。		AADC 欠損症遺伝子治療実施有害事象についての追記
36 頁 15-16 行	対象患者は 8 例を予定し、新たに診断された患者は随時追加実施を検討する。	対象患者は 4 例を予定している。	症例増加の追記
36 頁 21-27 行	(3) 前治療薬および併用薬 臨床研究治療実施日の 4 週間以前より服用している薬を前治療薬、Base line から終了または中止時の観察及び検査日までに使用した全ての薬を併用薬とする。 ドパミン受容体遮断作用を有する薬剤、免疫抑制剤、抗凝固薬、抗血小板薬、他の治療薬は Base line の 4 週間前より本臨床研究が終了するまで原則として使用してはならない。筋緊張緩和薬、抗てんかん薬は Base line の 4 週間前から評価 6 (Month 3) まで変更してはならない。ただし遺伝子治療後に薬剤の効果が過剰になった場合には減量する。	(3) 前治療薬および併用薬 Base line の 8 週間以前より服用している薬を前治療薬、Base line から終了または中止時の観察及び検査日までに使用した全ての薬を併用薬とする。 ドパミン受容体遮断作用を有する薬剤、免疫抑制剤、抗凝固薬、抗血小板薬、他の治療薬は Base line の 8 週間前より本臨床研究が終了するまで原則として使用してはならない。筋緊張緩和薬、抗てんかん薬は Base line の 8 週間前から Visit 9 (Month 6) まで変更してはならない。ただし遺伝子治療後に薬剤の効果が過剰になった場合には減量する。	・基準日を Base line から臨床研究治療実施日とした。 ・前治療薬および併用薬の変更禁止期間の短縮。 ・遺伝子治療実施経験から、薬剤変更による効果判定の困難さや有害事象発生のリスクはないと考えられ、短縮可能と判断した。
36 頁	(4) 対象患者 対象は当院および研究協力機関に通院中で、	(4) 対象患者 対象は当院および研究協力機関に通院中で、	・診断確定者数の変更 ・追加実施するため、「可能性

29-31 行	髄液検査、酵素活性測定、あるいは遺伝子診断で診断が確定されている AADC 欠損症患者 8 例とする。新たに診断が確定した患者が出た場合には、追加実施する。	髄液検査、酵素活性測定、あるいは遺伝子診断で診断が確定されている AADC 欠損症患者 4 例とする。新たに診断が確定した患者が出た場合には、追加実施する可能性がある。	がある」を削除
37 頁の表中	⑧臨床検査（血液検査、凝固検査、生化学検査、免疫検査、PCR 分析） PCR 分析：患者の血液に対し、連続 2 検体が陰性になるまで、採取と分析を継続する。	⑧臨床検査（血液検査、凝固検査、生化学検査、免疫検査、PCR 分析） PCR 分析：患者の尿、便、および血液に対し、連続 3 検体が陰性になるまで、採取と分析を継続する。	遺伝子治療実施経験から、ベクターゲノムが尿や便から検出されることはなかったため、尿と便の検査は実施しない。併せて、連続検体数を 3 検体から 2 検体にする。
37 頁	⑨髄液検査 髄液圧、細胞数、蛋白、糖	⑨髄液検査 髄液圧、細胞数、蛋白、糖	5HTP は測定不要なため削除
19 行	L-Dopa、Dopamine、HVA、5HTAA	L-Dopa、Dopamine、5HTP、HVA、5HTAA	
38 頁	①運動機能障害、ジストニア等の症状を持つ、AADC 欠損症患者で、髄液検査所見、酵素活性測定あるいは遺伝子診断のいずれかにより診断が確定している者。	①乳児期に運動機能障害、ジストニア等の典型的症状で発症し、臥床状態にある、典型的 AADC 欠損症患者で、髄液検査所見、酵素活性測定あるいは遺伝子診断のいずれかにより診断が確定している者。	遺伝子治療実施にあたり、最初は典型例から実施した。4 例実施し、有害事象なく、非典型例での実施も可能と考えられ、対象を拡大する。
38 頁	②治療実施時年齢 2 歳以上。年齢の上限は設定しない。	②治療実施時年齢 4 歳以上。年齢の上限は設定しない。	定位脳手術の方法の改良により、2 歳以上での実施が可能になったため、年齢変更。
10 行			
38 頁	⑤臨床研究治療を実施する前の少なくとも 1 か月間、内服薬を変更しないこと	⑤臨床研究に参加する前の少なくとも 2 ヶ月間、内服薬を変更しないこと	基準日を臨床研究の治療を実施する前と明確にした。併せ

13 行				て、内服薬の変更制限期間を短縮する。
38 頁	IX. 2. 2 除外基準	IX. 2. 2 除外基準		軽症例でも実施可能とする。
16 行	①を削除	①を削除	①立位・歩行可能な AADC 欠損症軽症例。	
39 頁	尚、以降の項目の番号は順に変更される。	IX. 3. 2 被験者の同意取得方法	IX. 3. 2 被験者の同意取得方法	今後、非典型型例への治療対象拡大により、成人患者も対象になる可能性があるため、追記した。
12-13 行	本臨床研究の対象者は、 <u>未成年で、あるいは未成年でなくとも、発語がないかわずかであり、書字も不可能で、意思表示が困難であるため、同意を得ることは不可能である。</u>	本臨床研究の対象者は、 <u>未成年で、かつ発語がなく書字も不可能で、意思表示が困難であるため、同意を得ることは不可能である。</u>		
40 頁	本研究、またはその一部が研究費によって行われること。すなわち、 <u>臨床研究治療の実施に関わる急性期の治療費、検査費、入院費は本研究グループが負担すること</u>	本研究、またはその一部が研究費によって行われる場合には、その内容		内容の追記
25-26 行				
41 頁	IX. 4. 1 予定登録数・登録期間・追跡期間	IX. 4. 1 予定登録数・登録期間・追跡期間	IX. 4. 1 予定登録数・登録期間・追跡期間	・長期フォロー期間の統一
30-32 行	実施期間は、最終登録症例にベクターを投与した時点から 9 か月後までとする。ただし、5 年後までは一定の評価を行い、さらに 15 年後まで安全性に関して長期フォローする。目標症例数は 8 例とする。	実施期間は、最終登録症例にベクターを投与した時点から 9 ヶ月後までとする。ただし、5 年後までは一定の評価を行い、さらに 10 年後まで安全性に関して長期フォローする。目標症例数は 4 例とする。		・対象患者数の増加

42 頁 5 行	被験者は治療開始 10 日前 (Day -10) までに 自治医科大学附属病院に入院する。	被験者は治療開始 10 日前 (Day -10) に自治 医科大学附属病院に入院する。	入院を 10 日前と限定せず、そ れ以前も入院可能とする。
43 頁 2-3 行	IX. 5.3 前処置および併用療法の有無 通常の全身麻酔時に行う処置の他には特に前 処置を行わない。内服薬の投与量は臨床研究 治療を実施する前の 4 週間前から、評価 6 (Month 3) までは変更しない。なお適切なリ ハビリテーションは随時行って良いこととす る。	IX. 5.3 前処置および併用療法の有無 通常の全身麻酔時に行う処置の他には特に前 処置を行わない。内服薬の投与量は Base line の 8 週間前から、評価 9 (Month 6) までは変 更しない。なお適切なリハビリテーションは 随時行って良いこととする。	内服薬の変更制限期間を短縮 する。
44 頁 8-11 行	ベクター投与直後 2 日間は個室に隔離し、外 出・外泊は認めない。なお投与後 2 日目の時 点で PCR 法による検査でベクター DNA を認め る場合には、ベクター DNA が陰性になるまで 個室への隔離期間を延長する。	ベクター投与直後 3 日間は個室に隔離し、外 出・外泊は認めない。なお投与後 3 日目の時 点で PCR 法による検査でベクター DNA を認め る場合には、ベクター DNA が陰性になるまで 個室への隔離期間を延長する。	ベクターゲノムの検出を 3 日 から 2 日に短縮する。併せて、 個室隔離期間も 2 日に短縮す る。
43 頁 12-16 行	隔離解除後も、投与後 7 日以内の患者に咳嗽・ 気道分泌物増加等の呼吸器症状、嘔吐・下痢 等の消化器症状、頻尿・発熱等の尿路感染症 状等が出現した場合は、個室に再隔離し、血 液及び分泌物のウイルス検査を行う。個室隔 離は、これらの症状が軽快するまで又は検査 にて本遺伝子組換え生物の陰性が確認される まで、医師の判断により必要とされる期間継	追記	AAV-hAADC-2 と野生型 AAV 及びアデノウイルス・ヘルペス ウイルスの 3 重感染が起こっ た場合、一時的にせよ組換えウ イルスが複製する可能性を完 全には否定できないため。

	続する。		
43 頁 17-18 行	PET スキャンは Base line (Day -30 ~ -1)、 評価 9 (Month 6)、評価 19 (Month24)、評価 31 (Month60) に実施する。	PET スキャンは Base line (Day -14 ~ -1)、 評価 9 (Month 6)、評価 19 (Month24)、評価 31 (Month60) に実施する。	AADC 欠損症は、先天性の疾患 であり、PET での発現低下は早 期に実施しても変化しないた め、実施可能期間を延長する。
43 頁 19-21 行	尚、Base line に関しては、血液、凝固検査、 生化学検査以外は、状態に変化がなければ、3 か月前までの検査結果の使用を可能とする。		体調の変化を確認する血液、凝 固、生化学検査以外は、数か月 単位での変化はないと考えら れるため。
43 頁 25-26 行	Baseline 手術直前の評価 (Day -30~Day -1) 対象者は Day -10 までには自治医科大学とち ぎ子ども医療センターに入院する。	Baseline 手術直前の評価 (Day -14~Day -1) 対象者は自治医科大学とちぎ子ども医療セン ターに入院する。	術前の評価期間の延長と入院 時期を明記した。
44 頁 8-9 行	(Day 2) 有害事象、PCR 検査		新規で追加
44 頁 11 行	(Day 3) 有害事象、頭部 CT 検査	(Day 3) 有害事象、頭部 CT 検査、PCR 検査	PCR 検査は Day2 に実施するの で Day3 では削除
44 頁 14 行	評価 1 (Day 7 ± 3 days) 入院中の評価	評価 1 (Day 7 ± 2 days)	休日等で実施困難になること もあり、余裕を持たせた。

44 頁	評価 3 (Day 28 ± 7 days) Month 1	評価 3 (Day 28 ± 5 days) Month 1	同上
23 行			
45 頁	評価 4 (Day 42 ± 7 days)	評価 4 (Day 42 ± 5 days)	同上
2 行			
45 頁	評価 5 (Day 56 ± 7 days) Month 2	評価 5 (Day 56 ± 5 days) Month 2	同上
5 行			
45 頁	評価 6 (Month 3 ± 14days)	評価 6 (Month 3 ± 7 days)	同上
8 行			
45 頁	評価 9 (Month 6 ± 14 days)	評価 9 (Month 6 ± 7 days)	同上
20 行			
46 頁	評価 12 (Month 9 ± 14days)	評価 12 (Month 9 ± 7 days)	同上
4 行			
46 頁	評価 15 (Month 12 ± 14 days)	評価 15 (Month 12 ± 7 days)	同上
13 行			
49 頁	4 歳 0 ヶ月以上の児については当該研究 機関での使用経験もあり、安全に実施可 能である。一方台湾では、さらに若年 (2		2 歳以上で手術実施可能な技術 を導入することから追記した。
28-32 行			

～ 50 頁 1-2 行	～8歳)の患者について、金属フレームに比べ接触は柔軟でありながら安定した固定が可能な樹脂フレームを用いた脳定位手術機器を使用して AAV-AADC 遺伝子治療の実績を積み重ねている。そこで当該研究機関でも、患者の年齢・頭蓋骨の厚さ・体格・全身状態等を総合的に判断して従来用いられてきた機器と新規導入機器を使い分けることにより、これまでと同等以上の安全性が確保できると判断した。		
51 頁 29-34 行 ～ 52 頁 1-7 行	名称:自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 安全・効果評価・適応判定部会 (以下、「部会」) 委員の構成:自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会委員長、同委員会規程第7条第1項第1号で規定される委員2名、同委員会規程第3条第1項第1号で規定されるその他委員会委員長が必要と認めた者若干名をもって構成する。部会員のうち、少なくとも1名は外部の者とする。 事務局:部会の事務局は自治医科大学大学事	当該部会は被験者の生命に関わるような本臨床研究の実施に影響を及ぼすおそれのある情報が総括責任者またはその他の研究者により報告された場合に開催することとする。	委員構成の追記と開催規定等を明記した

	務部研究支援課が行うこととする。 部会では被験者の一時登録後の適格性評価の判定や重篤な有害事象の報告を受けた場合における対応等について審議を行う。 また、治療開始から1か月、3か月、12か月時点で安全性及び効果の報告を研究総括責任者より受け付ける。 全被験者の臨床研究が終了し、研究総括責任者又は自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会が必要と判断した場合には、臨床研究の総合判定を行う。			
52 頁 8-12 行	C. モニタリング・監査 本臨床研究におけるモニタリング及び監査については、自治医科大学が定める「人を対象とした医学系研究に関するモニタリング及び監査の標準手順書」に基づき、「研究毎のモニタリングに関する計画書(手順書)」と「研究毎の監査に関する計画書(手順書)」を作成して実施する。			新基準に対応した計画に変更するため、モニタリングと監査の実施について追記。
52 頁 18 行	IX. 5. 6. 2 副次的評価項目 髄液検査 (L-dopa、HVA、5HIAAを含む)	IX. 5. 6. 2 副次的評価項目 髄液検査 (L-dopa、5HTP、HVA、5HIAAを含む)		5HTP は測定不要なため削除
55 頁	上記 IX.5.1 にて定義した有害事象のうち、下記の 5 分類のいずれかに該当するものを重篤	重篤な有害事象の定義は下記の 6 分類に従う。		重篤な有害事象の定義の記載

2-3 行	な有害事象と定義する。		
55 頁	治療のための入院または入院期間の延長が必要となるもの。ただし、臨床研究治療前に計画された入院や被験者の負担を軽減する目的で計画された入院、検査目的のための入院は除く	治療のための入院または入院期間の延長が必要となるもの	入院の定義の記載
7-9 行			

臨床研究「AADC欠損症に対する遺伝子治療」参加のしおり

頁と行	新	旧	変更理由
8 頁	台湾では、現在、17 例以上に実施されています。		症例等の追加
18-22 行	日本では、この遺伝子治療臨床研究として、2015 年 6 月から、4 歳から 19 歳の患者 6 例に実施しました。6 例とも、大きな有害事象はななく経過しています。眼球上転発作、ジストニア発作の減少、運動機能の改善が得られています。有害事象としては、四肢の小さな舞踏病様運動が起きたのみでした。		
8 頁	A. 参加できる人、できない人	A. 参加できる人、できない人	選択基準の変更を反映
26-28 行	①運動機能障害、ジストニア等の症状を持つ、AADC 欠損症で、髄液検査所見、酵素活性測定あるいは遺伝子診断のいずれかにより診断が確定している患者さん。	①乳児期に運動機能障害、ジストニア等の典型的症状で発症し、臥床状態にある、典型的 AADC 欠損症で、髄液検査所見、酵素活性測定あるいは遺伝子診断のいずれかにより診断が	

		確定している患者さん。また他の神経変性疾患を示唆する所見を認めない患者さん。		
8 頁 29 行	②治療実施時に 2 歳以上の方	②治療実施時に 4 歳以上の方	選択基準の変更を反映	
9 頁 1 行	③他の神経変性疾患を示唆する所見を認めない患者さん		計画書と統一した記述に変更するため、①から移行	
9 頁 3 行	⑤研究に参加する前の少なくとも 1 か月間、内服薬を変更していない方。	④研究に参加する前の少なくとも 2 ヶ月間、内服薬を変更していない方	選択基準の変更を反映	
9 頁 7 行	削除	①立位・歩行可能な AADC 欠損症であっても軽症な方。	選択基準の変更を反映	
10 頁 2-3 行	治療効果の判定のため、治療用ベクターの注射 1 か月前から注射 3 か月後の間は、原則として筋緊張緩和薬や抗てんかん薬は変更できません。	治療効果の判定のため、治療用ベクターの注射 2 ヶ月前から注射 6 ヶ月後の間は、原則として筋緊張緩和薬や抗てんかん薬は変更できません。	研究計画書の変更を反映	
10 頁 6-7 行	あなたのお子さんから治療用ベクターがどのような外に出るかを調べるため、お子さんの血液を手術前、手術の後連続 2 日間および 1 週間目に採取して検査します。	あなたのお子さんから治療用ベクターがどのような外に出るかを調べるため、お子さんの血液、尿、便を手術前、手術の後連続 3 日間および 1 週間目に採取して検査します。	研究計画書の変更を反映	
11 頁	評価スケジュール表 PCR 欄 Day3、Day7 (○)に変更	評価スケジュール表 PCR 欄 Day3、Day7 の○	ベクター-DNA の PCR 検査を 2 日までに短縮するため、Day3 以降は、それまでの検査で陽性の場合に実施する。	
23 頁	1 6. 研究者以外の者が試料・情報等を閲覧		モニタリングと監査を実施す	

4-9 行	<u>する可能性</u> 本研究では、研究が適正に実施されているかどうかを確認するために、モニタリングと監査が行われます。そのため、研究対象者の秘密が保全されることを前提として、モニタリング及び監査に従事する者や自治医科大学の倫理審査委員会が、必要な範囲内において研究対象者等に関する試料・情報を閲覧します。		ることから追記
24 頁 7-15 行	18. 研究の資金源、研究機関の研究に係る利益相反及び個人の収益等、研究者等の研究に係る利益相反に関する状況 (1) 資金源 この研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構『難治性疾患実用化研究事業』委託研究費を用いて実施します。 (2) 利益相反の状況 直接的な利益相反に関する状況、利益相反マネージメント・ポリシーに定める年度別にとりまとめた利益相反の状況を記入し、大学の審査を受けています。 分担研究者の村松慎一は、遺伝子治療を推		資金源、利益相反の状況について追記

	進する企業である(株)遺伝子治療研究所の役員です。		
26 頁 11 行	2 2. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について 分担研究者 (小児科) : 小坂 仁	2 0. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について 分担研究者 (小児科) : 門田 行史	本臨床研究の副責任者へと変更 ・ 人事異動による追加と削除 ・ 患者の診療に関与する研究者の追加
27-28 頁	分担研究者 以下の研究者の追加 川合 謙介、小島 華林、松本 歩、宮内 彰彦、嵯峨 泰、中村 和幸、久保田 哲夫、井手 秀平、益山 龍雄 以下の研究者の削除 渡辺 英寿、小野 さやか、野村 芳子 以下の研究協力者の追加 高津戸 文江、山口 文江		

第一種使用規程承認申請書

頁・項目	新	旧	変更理由
1 頁 遺伝子組換え生物等の種類の名称	rep 及び cap 遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) 2 型に由来するキャプシドタンパク質及び末端反復配列 (inverted terminal repeats: ITRs) を有し、ヒト芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素を発現する AAV (AAV-hAADC-2)	ヒト芳香族 L アミノ酸立つ炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase: AADC) 遺伝子を組み込んだ 2 型アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクター (AAV-hAADC-2)	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施行規則 (平成 15 年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第 1 号) に従い、より具体的な記載とした。
1 頁 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	-	治療施設の所在地: 栃木県下野市薬師寺 3311 番地 1 治療施設の名称: 自治医科大学附属病院及び自治医科大学とちぎ子ども医療センター	治療施設を限定しない。
1 頁 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	保管 (1) 本遺伝子組み換え生物等の保管は、遺伝子組換え生物等である旨を表示した容器に納めバイアルに密封された状態で、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において行う。	(1) 本遺伝子組換え生物の溶液は、スクリーキャップ付き密閉容器に封入されており、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の実験室内の冷凍庫に保管する。	本規程による第一種使用は、組換え生物保管からとした。

1 頁 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	運搬 (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。 投与液の調製 (3) 本遺伝子組換え生物等の希釈は、治療施設内の安全キャビネット内で行う。	(2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物の溶液の融解、希釈及びび注操作は、P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の安全キャビネット内で行う。本遺伝子組換え生物希釈液の保管は、P2 実験室内の冷凍庫において行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈液またはその凍結品を開放系区域を通して他の区域に運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。 (4) P2 実験室内の安全キャビネット内で本遺伝子組換え生物希釈溶液を専用のシリンジ、チューブ及びカニューレからなるデバイスに充填し、それを専用のシリンジポンプに装着したもの（以下「注入セット」という。）を二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない手術室（以下「手術室」という。）に運搬する。なお、手術室は手術室区域の端に位置し、本遺伝子組換え生物投与当日は手術室で他の手術を行わない。	本組み換え生物の宿主（2 型 AAV）はクラス 1 に分類されていることから、P2 実験室における操作を義務付けないこととした。 第一種使用は環境中への拡散を防止する措置を執らずに行う使用であるので、当該措置については記載しない。
1 頁 遺伝子組換え生物	投与 (4) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療	(5) 被験者に対する本遺伝子組換え生物の投与は、手術室内において、両側の被殻の中に本遺伝子組換え生物希釈溶液を定位置手術に	投与手技や使用機材については、今後の改良を妨げないよう、細かく限定しない。

物等の第一種使用等の方法	施設の手術室内で、患者の脳内に直接注入することにより行う。	より注入することで行う。注入セットを定位脳手術装置に慎重に装着した後、被験者の頭蓋骨に開けた直径約 12mm の骨孔からカニューレを刺入して、シリンジポンプにより本遺伝子組換え生物希釈溶液を被殻内の 2 方向へ $3 \mu\text{Vmin}$ の速度で注入する。注入終了後は、カニューレをそのままの位置で約 3 分間保持した後、遅い速度で抜去する。特に、脳表からの抜去は、毎分約 3mm の速度で慎重に行う。先端を先細り構造にしたカニューレを用いることにより、カニューレ先端からの本遺伝子組換え生物希釈溶液の漏出及び抜去中の本遺伝子組換え生物のエアゾール化を防止する。カニューレ抜去後、被験者の創部を速やかに一時的に閉創する。もう一方の被殻への注入も、これと同様に行う。なお、頭部の周辺には布を二重に敷き詰める。	これまで本遺伝子組換え生物を投与された被験者についてのウイルス検査結果を踏まえ、投与後の個室隔離は義務付けない。
1 頁 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	投与後の患者の管理 (5) 投与後、患者の創部を消毒し、密閉ドレッシング材で覆う。密閉ドレッシング材による被覆は、創部が治癒し本遺伝子組換え生物等が排出されるおそれなくなるま	(6) 被験者へ本遺伝子組換え生物投与終了後、被験者の創部を消毒し、真皮に至る創傷用の創傷用の皮膚欠損用創傷被覆材を貼付して密閉してから、さらに三角巾で覆う。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を手術室から、環境中への拡散	

	で継続する。 (6) 投与後7日以内の患者に咳嗽・気道分泌物増加等の呼吸器症状、嘔吐・下痢等の消化器症状、頻尿・発熱等の尿路感染症状等が出現した場合は、個室に隔離し、血液及び分泌物のウイルス検査を行う。個室隔離は、これらの症状が軽快するまで又は検査にて本遺伝子組換え生物の陰性が確認されるまで、医師の判断により必要とされる期間継続する。	防止措置を適切に執った陽圧でない個室（以下「個室」という。）に移送する。 (8) 投与後 72 時間まで、被験者を個室内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に手術室及び個室から外の解放系区域に出る場合には、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。 (11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液及び尿中の本遺伝子組換え生物が陰性であることを確認する。本遺伝子組換え生物が確認された時は、個室における管理を継続する。 (12) 尿中から本遺伝子組換え生物が検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記 (8) から (11) までと同様の措置を執る。	ベクター投与後早期（7 日以内）に野生型 AAV 及びアデノウイルス・ヘルペスウイルスの重複感染が起こった場合、投与部位に残存する AAV-hAADC-2 との 3 重感染が成立し、一時的にせよ組換えウイルスが複製する可能性を完全には否定できないため、症状によりウイルス排出が疑われる場合のみ個室隔離する。投与 7 日以降は患者体内から AAV-hAADC-2 は消失し、野生型 AAV 及びアデノウイルス・ヘルペスウイルスの重複感染が起こっても、組換えウイルスの複製が起こる懸念はない。
1 頁 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	患者検体の取扱い (7) 試験のため患者から採取した検体は、治療施設及び検査実施機関で定められている規程に従って取り扱い扱う。	(9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物等（血液、体液、尿及び糞便等）は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理または焼却による。）を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルス不活化を他の区	本遺伝子組換え生物の宿主が属するクラス分類及び投与を受けた被験者からのウイルスは排出試験の結果を踏まえ、妥当な取扱いであるため。

		域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、本遺伝子組換え生物の溶液の取り扱いに準じる。	
1 頁 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	感染性廃棄物等の処理 (8) 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等の廃棄は、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）に基づいて治療施設で定められている医療廃棄物の管理に関する規程（以下、「医療廃棄物管理規程」）に従って行う。 (9) 本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物の廃棄は、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。 (10) 患者由来の検体の廃棄は、医療廃棄物管理規程及び検査実施機関で定められている規程に従って行う。	(3) 本遺伝子組換え生物（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理または焼却による。）を行った後、本施設で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。 (7) 上記 (5) 及び (6) で用いた注入セット等の器具及び布、ガーゼ類は、ウイルス不活化（高圧上記滅菌処理又は焼却）を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルス不活化を他の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、当該手術室は、術後12時間は閉鎖する。その後、床を紫外線照射し、さらに4級アンモニウム塩配合洗剤で液拭きして滅菌する。	本遺伝子組換え生物の宿主が属するクラス分類を踏まえ、適切な取扱いであるため。

生物多様性影響評価書

変更箇所が多数のため、赤で下線を施しました。

変更理由は、初回申請時からの時間経過に伴い、AAV に関する科学的知見が増大したとともに、AAV ベクターを用いた遺伝子治療臨床試験の蓄積がめざましく、それらを反映するためです。

平成 29 年 10 月 17 日

**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
法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について**

遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会
委員長 山口 照英

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）に基づき申請のあった下記の遺伝子組換え生物等の第一種使用規程について、本審査委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究

申請者：自治医科大学附属病院 病院長 佐田 尚宏

申請日：平成 29 年 4 月 4 日

【審査委員会の評価結果（自治医科大学附属病院）】

1.rep 及び cap 遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus : AAV) 2 型に由来するキヤプシドタンパク質及び末端反復配列 (inverted terminal repeats : ITRs) を有し、ヒト芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素を発現する AAV (AAV-hAADC-2)
第一種使用等の内容：治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
申請者：自治医科大学附属病院 病院長 佐田 尚宏
(1) 生物多様性影響評価の結果について ① 他の微生物を減少させる性質 申請されている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 (AAV-hAADC-2) 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極めて微量と考えられる。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を失っていることから、野生型 AAV2 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等との三重感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。したがって、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は、環境中に拡散しても比較的早期に消滅すると考えられる。 本遺伝子組換え生物及びそれに由来する増殖能を獲得したウイルス (RCA) が感染する動植物等の種類は野生型 AAV2 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。hAADC 遺伝子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は野生型 AAV2 と同等と考えられ、本遺伝子組換え生物及び RCA が競合等で他の微生物を減少させる性質はないと考えられる。 これらのことから、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じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。 ② 病原性 本遺伝子組換え生物及び RCA が感染する動植物等の種類は AAV2 と同等で、ほ乳動物に感染し、自然界でそれ以外の動植物及び微生物に感染するとの報告はない。また、RCA が生じるためには AAV2 及び AAV のヘルパーウイルスとの三重感染が必要であり、これはヒトにおいてのみ起こり得る。 さらに、AAV2 の病原性は報告されていない。本遺伝子組換え生物が感染したほ乳類で一貫性に hAADC 遺伝子が発現する可能性があるが、たとえ hAADC が過剰発現してもそれにより生成するドパミン又はセロトニンの量は生理的範囲内であると予想される。 したがって、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及び RCA は、AAV2 と同様に、ヒトを含むほ乳類に対して病原性を示さないと考えられる。 なお、AAV2 に由来する非増殖性遺伝子組換えウイルスが米国で用いられているが、環境への悪影響及び当該ウイルスに由来する重篤な副作用に関する報告はない。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、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した申請者の結論は妥当であると判断した。 ③ 有害物質の産生性 本遺伝子組換え生物の有害物質の産生性は知られておらず、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した申請者の結論は妥当であると判断した。 ④ 核酸を水平伝達する性質 本遺伝子組換え生物及び RCA の感染性は AAV2 と同等で、ほ乳動物に感染し、自然界でそれ以外の動植物及び微生物に感染するとの報告はない。本遺伝子組換え生物が感染したほ乳類で一過性に hAADC 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによる他のほ乳類個体への拡散の水平伝達は知られていない。RCA が出現したとしても拡散を水平伝達する性質は AAV2 と同等である。 また、申請されている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の環境中への拡散は極力抑えられており、これまで臨床研究で尿、血液における体外排出は認められていない。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を失っていることから、野生型 AAV2 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等との三重感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。したがって、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は、環境中に拡散する可能性は低く、万が一排出されたとしても比較的早期に消滅すると考えられる。 これらのことから、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した申請者の結論は妥当であると判断した。 (2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論 以上を踏まえ、本遺伝子組換え生物を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。