

遺伝子治療臨床研究実施計画について

【 自治医科大学附属病院 】

課題名 : AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究

遺伝子治療臨床研究実施計画の申請

- 審査委員会の意見 P. 1
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書 及び概要書 P. 7
- 実施計画書 P. 19
- 同意説明文書 P. 89

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する申請

- 審査委員会の意見 P. 125
- 第一種使用規程承認申請書 P. 127
- 生物多様性影響評価書 P. 129

【 自治医科大学附属病院 】

課題名 : AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病
遺伝子治療の第 I / II 相臨床研究

遺伝子治療臨床研究実施計画の申請

- 審査委員会の意見 P. 171
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書 及び概要書 P. 177
- 実施計画書 P. 189
- 同意説明文書 P. 277

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する申請

- 審査委員会の意見 P. 315
- 第一種使用規程承認申請書 P. 317
- 生物多様性影響評価書 P. 319

(参考)

- 遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会委員名簿 P. 359

平成27年3月2日

自治医科大学附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施
計画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

自治医科大学附属病院から申請のあった下記の遺伝子治療臨床研究実施計
画について、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 安田 是和
申請日：平成26年7月23日

1. 遺伝子治療臨床研究実施計画の概要

(1) 研究課題名： AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究

(2) 申請年月日： 平成 26 年 7 月 23 日

(3) 実施施設： 自治医科大学附属病院
代表者： 病院長 安田 是和

(4) 総括責任者： 自治医科大学
医学部小児科学
教授 山形 崇倫

(5) 対象疾患： 芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) 欠損症

導入遺伝子： ヒト AADC 遺伝子

ベクターの種類： 2 型アデノ随伴ウイルスベクター (AAV)

用法・用量： 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、片側の被殻あたり 2 か所、両側で計 4 か所に各最大 50 μ L の本ベクター (AAV-hAADC-2) を注入する。ウイルスの注入量 (vector genomes : vg) については、1 症例あたり 200 μ L で 2×10^{11} vg となる。

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

目標症例数： 4 例

(6) 研究の概略：

本臨床研究は、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 ベクターを定位脳手術的に注入し、主要評価項目として安全性を検証するとともに、副次評価項目として有効性及び発現量を評価することを目的とする。

なお、申請者により同時に申請された臨床研究 (AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相臨床研究) とは、対象疾患等で異なるものの、同一のベクターが用いられている点で共通である。

(7) その他 (外国での状況等)：

台湾において、本臨床研究と構造的に同一のベクターを用いた AADC 欠損症に対する遺伝子治療が 4 例に対して実施されているが、重篤な副作用は報告されていない。

パーキンソン病に対しては、申請者の施設において臨床研究が 6 例に対して実施されている (「AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」(平成 18 年 1 月 25 日申請、平成 21 年 6 月 21 日終了報告。以下「前臨床研究」という。))。うち 1 例に手術後、静脈性脳出血が認められたが、カニューレの挿入に伴う外科的手技が原因と判断されており、ベクターとの因果関係は否定され

ている。また、申請者の施設と同様のプロトコルでカリフォルニア大学サンフランシスコ校（UCSF）においても臨床試験が実施された。

2. 遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会における審議概要

1) 事前の意見・照会事項及びその回答

審査委員会の開催に先立ち、各委員より申請者に対して、遺伝子治療臨床研究実施計画申請書等に係る意見・照会事項を送付し、平成26年10月10日に申請者よりそれに対する回答を得た。主な意見・照会事項及び回答の概要は以下のとおりである。

(審査委員会からの主な意見・照会事項及びそれに対する回答)

【パーキンソン病に係る臨床研究と共通する指摘事項】

ア. 前臨床研究で用いたベクター（以下「前ベクター」という。）と本ベクターとの相違点について、説明すること。

【回答】製造業者の変更や産生効率を上昇させるための遺伝子（Bcl-XL、miR342）を使用する等の製造工程の変更を行っているものの、最終製剤であるベクターの構造自体は、前ベクターと同一である。

イ. 前ベクターの研究結果（基礎・臨床）を参考資料として利用するためには、本ベクター及び前ベクター間の同等性を示す必要がある。ア. で回答した本ベクターと前ベクターとの相違点を踏まえ、両ベクター間の同等性について、安全性、有効性に関する評価結果を提示すること。

【回答】今回新たに用いたプラスミド pRC-BI-khB342-2 が本ベクター最終製剤中に残存する量は、 6.6×10^7 copies/mL で、前ベクター最終製剤中に含まれるプラスミド pRC 量 (9.84×10^7 copies/mL) 以下であった。また、極めて微量のプラスミドが脳内に注入されても細胞に取り込まれて遺伝子発現を生じる可能性はほとんどないと考えられる。なお、最終製剤と同一の製法により作製した試験製造ベクターに対して非臨床試験を実施し、モデルマウスへの脳内投与で AADC 遺伝子の発現を確認しており、特段の組織障害も認めていない。

さらに、試験製造した本ベクターと前ベクターのドーパミン産生量を比較した結果では、それぞれ 25.6 pmole/tube、27.7 pmole/tube と同等であった。

また、製造方法のうち、重要な部分については、責任医師を通じて、過去の製造業者の製造法を参照し、実質的な問題がないことを確認した。

ウ. ベクター希釈用の溶液として、国内承認経口医薬品を使用することについて、脳内投与であるにもかかわらず経口医薬品レベルの製品を使用して問題がないか再検討すること。

【回答】ご指摘を受け、希釈用には注射用として承認されている生理食塩水を使用することとした。

エ. 前臨床研究時から、除外基準「AAV-2に対する中和抗体価が高い患者」を削除した理由を説明すること。

【回答】過去の臨床研究の報告を踏まえ、血液中の AAV-2 に対する中和抗体は、肝臓や筋肉への投与と異なり脳内への直接注入では遺伝子導入効率に影響する可能性は低いと考える。

【本臨床研究に対する指摘事項】

オ. 本ベクターの投与量、投与速度において、年齢にかかわらず成人とほぼ同等とすることについて、特に年少児の脳体積（容量）に鑑み、減量や体重別とする必要はないのか、台湾での事例や前臨床研究、非臨床試験成績等を踏まえ、再度検討すること。

【回答】本臨床研究での投与量 (2×10^{11} vg) は、成人を対象とする「AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相臨床研究に対する臨床研究」における低用量群 (3×10^{11} vg) の $2/3$ の量で、高用量群 (9×10^{11} vg) からすると $1/4.5$ の量と設定している。また、台湾では、最低年齢 2 歳の被験者に対して本研究とほぼ同用量 (1.6×10^{11} vg) で実施されていることから、量的には問題ないと考える。また、投与速度についても、台湾での事例と同様に $3 \mu\text{L}/\text{min}$ に設定した。

カ. AADC に対する抗体を臨床検査項目として設定する必要があるか検討すること。

【回答】ご指摘を踏まえ、抗 AADC 抗体について、base line と投与後 6 か月に測定することとし、その旨、研究実施計画書等に記載した。

キ. 本臨床研究の投与対象について、典型的 AADC 欠損症患者のみを対象とするのか、あるいは軽症例も対象とするのか説明すること。

【回答】投与対象は、臥床状態にある典型例のみとし、立位・歩行可能である軽症例を対象とすることは考えていない。そのため、選択基準の該当部を「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。」と規定し、また、除外基準についても「立位・歩行可能な AADC 欠損症軽症例。」と規定しており、立位保持が不可能ということで典型例の識別を行う旨明確化している。

ク. ベクターの製造企業との利益相反を明確化すること。

【回答】本臨床研究は、自治医科大学とベクター製造企業との共同研究であるパーキンソン病に係る臨床研究とは異なり、臨床研究用ベクターの作製をベクター製造企業に委託した委託研究であり、利益相反はないと考える。

ケ. 研究実施計画書等において、AAV ベクターの宿主染色体への組み込み活性が極めて低い旨記載されていることについて、組織や投与患者の年齢によって組み込み活性が変化する可能性がないか等の詳細を記載すること。

【回答】ご指摘を踏まえ、以下のとおり、記載の見直しを行う。

「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ありませんが、分裂細胞ではactive siteに入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、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が明らかではありません。」

コ. 研究実施計画書に記載されている「AADC遺伝子導入に伴う副作用」の内容については、実施計画書だけでなく、同意・説明文書等にも追記し、情報提供を行うこと。

【回答】ご指摘を踏まえ、同意・説明文書の予測される危険性および副作用の項等に以下の追記を行う。

「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。」

2) 審査委員会における審議

① 開催日時： 平成 26 年 11 月 17 日(月) 15:00～18:00

② 議事概要：

平成 26 年 7 月 23 日付けで自治医科大学附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：AADC 欠損症）についての審議を行った。

まず、実施計画について総括責任者等より説明を受けた後、委員間で実施計画の妥当性等について審議が行われた。その結果、申請のあった実施計画について、概ね妥当であるが、被験者の体重等を踏まえた投与量設定の必要性等について確認した後、再生医療等評価部会に報告することとされた。

なお、指摘事項は平成 26 年 12 月 1 日に発出され、申請者より平成 26 年 12 月 10 日に回答が提出された。

指摘事項の内容及び回答の概要は以下のとおりである。

(審査委員会からの主な意見・照会事項及びそれに対する回答)

ア、「AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相臨床研究」同様、副責任医師を設置し、研究実施体制を整備すること。

【回答】ご指摘を踏まえ、総括責任者以外の研究者のうち、2名を副責任医師として位置付け、研究実施体制の整備を行うこととする。

イ、想定される被験者が小児であることを踏まえ、被験薬の投与量について、体重当たりの投与量とする必要がないか、再度検討すること。

【回答】対象疾患の患者においては、年齢と身長・体重が必ずしも相関していないことに加え、脳の大きさ、さらにその一部である被殻の大きさは、体重によって大きくは変わらないと考えられる。実際に、台湾の事例では、2歳から8歳まで、体重では8.3kgから17.3kgまで、同一の投与量で治療し、同様な治療効果が得られ、また、投与量の差による有害事象は認めていない。

以上のことから、当初の計画どおり、全症例一律の投与量とすることに問題はないと考える。

3. 遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会の検討結果

自治医科大学附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：AADC欠損症）に関して、遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会は、主として科学的観点から以上のおり論点整理を進め、それらの結果を実施計画及び患者への同意説明文書に適切に反映させた。

その上で、本審査委員会は本実施計画の内容が科学的に妥当であると判断した。

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成26年 7月23日

厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所在地	〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1
	名称	自治医科大学附属病院 (電話番号) 0285-44-2111 (FAX 番号) 0285-40-8303
	代表者 役職名・氏名	自治医科大学附属病院長 安田 是和 (職印)

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・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 



遺伝子治療臨床研究 実施計画 概要書

H26年7月23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 安田是和	
	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
	・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
	・渡辺英寿	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・学内教授	ウイルスベクターの管理・検出
	・竹内謙	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・講師	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
	・小野さやか	自治医科大学・神経内科学・助教	PET 解析
	・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
・加藤光広	山形大学医学部・小児科学・講師	対象患者の治療前および安定後の診療	
・野村芳子	瀬川クリニック・副院長	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	

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 自治医科大学地域医療学センター 地域医療学部門 教授	梶井英治 
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	<p>(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</p> <p>① AADC 欠損症に関する現時点での知見・</p> <p>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。</p> <p>現在、世界中で報告例は 100 症例未満である。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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、頸定が得られず、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-[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。また、PET で判る活性評価として、AADC の基質である</p>

	<p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>② 当該遺伝子治療臨床研究の概要</p> <p>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。</p> <p>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</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>
<p>6 遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質</p> <p>① 人に導入する遺伝子の構造</p> <p>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。</p> <p>② 人に導入する遺伝子の性質</p> <p>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が明らかではない。</p> <p>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</p>

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ンド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、pH3 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 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。

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源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、患者に投与する際には必要に応じて 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

	<p>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。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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>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。</p> <p>③ 被検者に投与する細胞の安全性 被験者には細胞成分を投与することはない。</p>
<p>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</p>	<p>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。</p> <p>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</p>

	<p>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。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。</p> <p>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。</p>
<p>9 遺伝子治療臨床研究の実施計画</p>	<p>(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。</p> <p>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。</p> <p>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。対象患者は4例を予定している。AAV-hAADC-2 の注入量は 1×10^{12} vg/mL の濃度で、最大 50μL を被殻内の4個所に分けて注入する。具体的には片側の被殻あたり2個所、両側で計4個所に各々最大 50μL を注入する。注入量（vector genomes : vg）は1症例あたり 200μL で 2×10^{11} vg である。</p> <p>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。</p> <p>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</p> <p>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。</p> <p>(2) 被験者の同意の取得方法 本臨床研究の対象者は、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。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い、文書により同意を得る。</p> <p>(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。</p> <p>(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</p>

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）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。

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。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。

PET スキャンはBase line（Day -14～-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。

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と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

定位的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

	<p>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。</p> <p>c. AADC 遺伝子導入に伴う副作用</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>
備考	<p>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。</p>

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

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	
AI-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・バール・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ぺプチターゼ
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リンパ向姓ウイルス
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	Vanillic 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	3
IV 遺伝子治療臨床研究の目的	3
V 遺伝子治療臨床研究の対象疾患およびその選定理由	4
V.1 研究の区分	4
V.2 対象疾患に関する現時点での知見	4
V.3 当該遺伝子治療臨床研究の概要	7
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	8
VI 遺伝子の種類およびその導入法	9
VI.1 人に導入する遺伝子の構造と性質	9
VI.1.2 人に導入する遺伝子の性質	10
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	11
VI.2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質	11
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	12
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	12
VI.5 ウイルスベクターを用いて遺伝子導入	13
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	13
VI.5.2 AAV-hAADC-2 の作製方法	14
VI.5.3 AAV-hAADC-2 の構造	16
VI.5.4 AAV-hAADC-2 の生物学的特徴	17
VII 安全性についての評価	19
VII.1 遺伝子導入方法の安全性	19
VII.1.1 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの純度	19
VII.1.1.1 プラスミド MWCB の作製	19
VII.1.1.2 プラスミドベクターの製造	21
VII.1.1.3 293T/17 MCB の作製	23
VII.1.1.4 293T/17 WCB の作製法	25
VII.1.1.5 AAV-hAADC-2 の製造方法	27
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	29
VII.1.3 増殖性ウイルスの出現の可能性	29

VII.1.4	遺伝子導入に用いる AAV ベクターの細胞傷害性	30
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	30
VII.1.6	患者以外の人に遺伝子が導入される可能性	30
VII.1.7	染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	30
VII.1.8	がん原性の有無	31
VII.2	遺伝子産物の安全性	31
VII.3	細胞の安全性	31
VII.3.1	培養細胞の純度	31
VII.3.2	細胞の遺伝子型、表現型の安全性	31
VII.3.3	被験者に投与する細胞の安全性	32
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	32
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	33
VIII.1	臨床ニーズ	33
VIII.2	本臨床研究の品質、安全性	34
VIII.3	本臨床研究の期待される有効性	34
VIII.4	当施設・研究者の能力	34
IX	遺伝子治療臨床研究の実施計画	34
IX.1	遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	34
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	34
IX.1.2	本臨床計画の実施手順	35
IX.2	被験者の選択基準および除外基準	37
IX.2.1	選択基準	37
IX.2.2	除外基準	37
IX.2.3	対象者の参加取りやめ	38
IX.3	倫理的事項	38
IX.3.1	被験者の保護	38
IX.3.2	被験者の同意取得方法	38
IX.3.3	被験者の安全性確保および健康被害補償	40
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	41
IX.5.1	対照群の設定方法	41
IX.5.2	遺伝子導入方法	41
IX.5.3	前処置および併用療法の有無	42
IX.5.4	臨床検査項目および観察項目	42

IX.5.4.1 検査・観察のスケジュール	42
IX.5.5 予測される副作用およびその対処方法	48
IX.5.5.1 ベクターによる合併症	48
IX.5.5.2 手術による合併症	48
IX.5.5.3 AADC 遺伝子導入に伴う副作用	49
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	49
IX.5.6.1 主要評価項目	49
IX.5.6.2 副次的評価項目	50
IX.5.6.3 臨床研究の中止基準	51
IX.5.6.4 臨床研究への参加取りやめおよび脱落基準	51
IX.5.7 有害事象が発生した場合の措置	51
IX.5.7.1 有害事象が発生した場合	51
IX.5.7.2 重篤な有害事象が発生した場合	53
IX.5.8 症例記録に関する記録用紙等の様式	54
IX.5.9 記録の保存および成績の公表の方法	54
IX.5.9.1 記録の保存	54
IX.5.9.2 成績の公表の方法	54
IX.5.10 個人情報保護の徹底	54
(1) 実施施設での安全管理措置	54
(2) 本研究における個人情報の保護	56
(3) 第三者提供の制限	56
(4) 個人情報の開示	57
X.1 遵守する法令／省令等	57
X.2 引用文献	59

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 : 臨床研究「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」参加のしおり

V.5 : 注入用カニューレおよびポンプ

V.6 : 評価スケジュール

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
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
渡辺 英寿	自治医科大学 脳神経外科	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	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	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 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	講師	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
小野 さやか	自治医科大学 神経内科学	助教	PET 解析
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

外部協力者

加藤 光広	山形大学医学部 小児科学	講師	対象患者の治療前、および安定後の診療
野村 芳子	瀬川クリニック	副院長	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、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。

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、頸定が得られず、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^{1,6}。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。

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 Tranylcypramide 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、運動発達が得られた例はなく、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。

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}。

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¹⁸。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 cctgcgggccg
121 ctgatccctg ccgctgcccc tcaggagcca gacacgtttg aggacatcat caacgacgtt
181 gagaagataa tcatgcctgg ggtgacgcac tggcacagcc cctacttctt cgcctacttc
241 cccactgcca gctcgtaccc ggccatgctt gcgacatgc tgtgcggggc cattggctgc
301 atcggcttct cctgggaggc aagcccagca tgcacagagc tgggagactgt gatgatggac
361 tggctcggga agatgctgga actaccaaa gcatTTTTga atgagaagc tggagaaggg
421 ggaggagtga tccagggaag tgccagtga gccaccctgg tggccctgct ggccgctcgg
481 accaaagtga tccatcggtc gcaggcagcg tccccagagc tcacacaggc cgctatcatg
541 gagaagctgg tggcttactc atccgatcag gcacactcct cagtggaaag agctggggtta
601 attggtggag tgaattaaa agccatcccc tcagatggca acttcgccat gcgtgcgtct
661 gccctgcagg aagccctgga gagagacaaa gcggtggcc tgattccttt ctttatggtt
721 gccaccctgg ggaccacaac atgctgctcc tttagacaatc tcttagaagt cggctctatc
781 tgcaacaagg aagacatatg gctgcacgtt gatgcagcct acgcaggcag tgcatcctc
841 tgccctgagt tccggcacct tctgaatgga gtggagttag cagattcatt caactttaat
901 cccacaaat ggctattggt gaattttgac tgttctgcca tgtgggtgaa aaagagaaca
```

961 gacttaacgg gaggcttttag actggacccc acttacctga agcacagcca tcaggattca
 1021 gggcttatca ctgactaccg gcattggcag ataccactgg gcagaagatt tcgctctttg
 1081 aaaatgtggt ttgtatttag gatgtatgga gtcaaaggac tgcaggctta tatccgcaag
 1141 catgtccagc tgtcccatga gtttgagtca ctggtgcgcc aggatccccg ctttgaatc
 1201 tgtgtggaag tcattctggg gcttgtctgc tttcggctaa agggttccaa caaagtgaat
 1261 gaagctcttc tgcaagaat aaacagtgcc aaaaaatcc acttggttcc atgtcacctc
 1321 agggacaagt ttgtcctgcg ctttgccatc tgttctcgca cggtggaatc tgcccatgtg
 1381 cagcgggcct gggaacacat caaagagctg gcggccgacg tgctgcgagc agagagggag
 1441 tag
 MNASEFRRRGKEMVDYVANYMEGIEGRQVYPDVEPGYLRPLIPAAAPQEPDTFEDIINDVEKIIM
 PGVTHWHSPYFFAYFPTASSYPAMLADMLCGAIGCIGFSWAASPACTELETVMMDWLKML
 ELPKAFLEKAGEGGGVIQGSASEATLVALLAARTKVIHRLQAASPELTQAAIMEKLVAYSSDQA
 HSSVERAGLIGGVKLKAIPSDGNFAMRASALQEALERDKAAGLIPFFMVATLGTTCOSFDNLE
 VGPICKEDIWLHVDAAYAGSAFICPEFRHLLNGVEFADSFNPNPHKWLNVNFDCSAMWVKKR
 TDLTGAFRLDPTYLKHSQDSGLITDYRHWQIPLGRRFRSLKMWFVFRMYGVKGLQAYIRKHV
 QLSHEFESLVRQDPRFEICVEVILGLVCFRLKGSNKVNEALLQRINSAKKIHLVPCHLRDKFVLR
 AICSRTVESAHVQRAWEHKELAADVLRAERE

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。

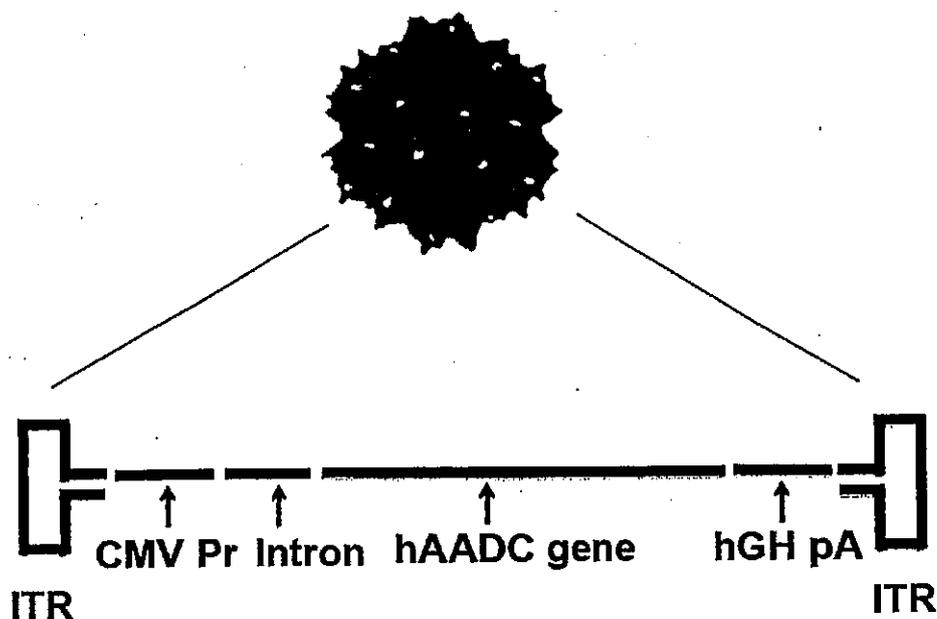


図 2：ウイルスベクターに搭載される遺伝子

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て遺伝子導入

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)。v2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、pH3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。

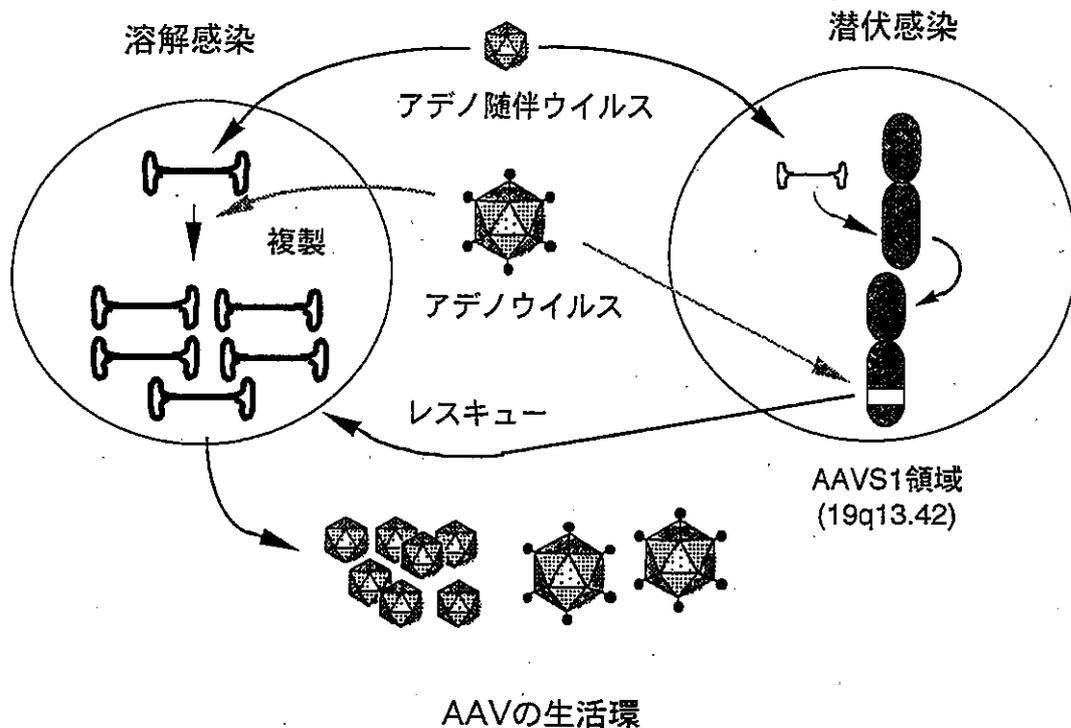


図 3 : AAV の生活環

VI.5.2 AAV-hAADC-2 の作製方法

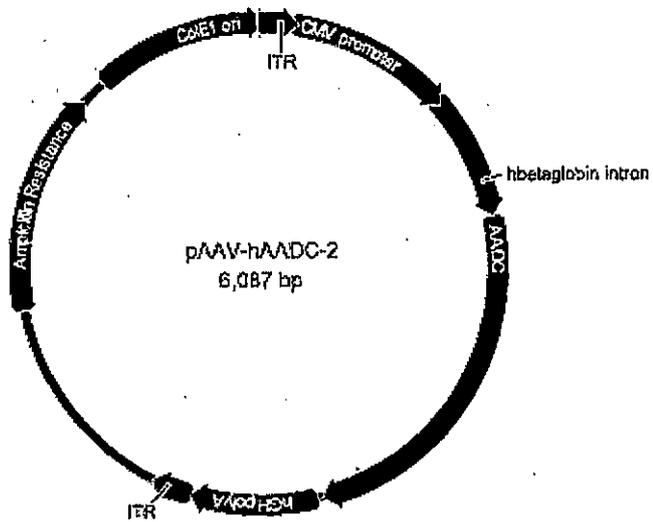
AAV-hAADC-2 の作製には、以下の 3 種類のプラスミドを使用した。

①pAAV-hAADC-2 : サイトメガロウイルスのプロモーター、 β グロブリンイントロン、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。

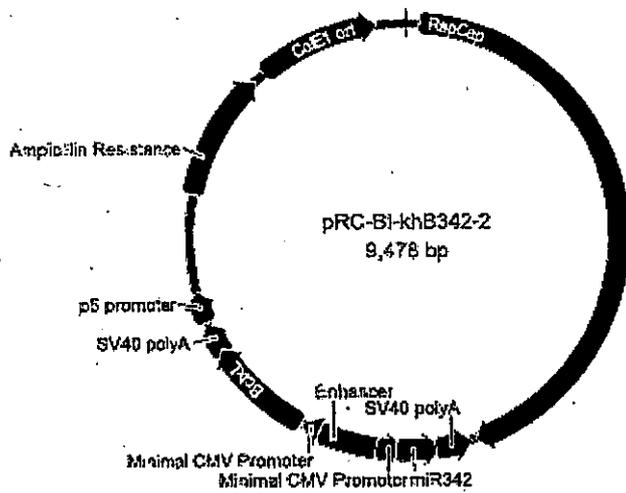
②pRC-BI-khB342-2 : AAV ゲノムの ITR を除き AAV2 の rep、cap 遺伝子をクローニングした pRC2 の SnaBI サイトに、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットを挿入した AAV2 ヘルパープラスミド。なお、ヒト Bcl-XL 遺伝子及び hsa-miR342 を発現するカセットは、バイディレクショナルに 2 種の遺伝子を発現可能な pBI-CMV1 のマルチクローニングサイト 2 か所にそれぞれ、ヒト BclXL cDNA 及び hsa-miR342 をクローニング後、発現カセットごと PCR で増幅したものである。

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。



☒ 4 pAAV-hAADC-2



☒ 5 pRC-BI-khB342-2

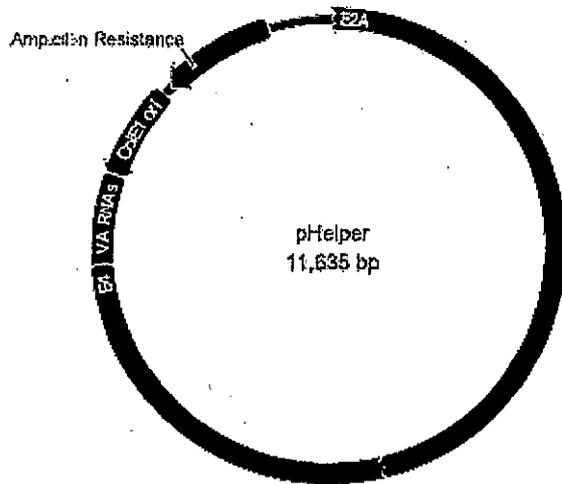


図 6 pHelper

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 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

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。

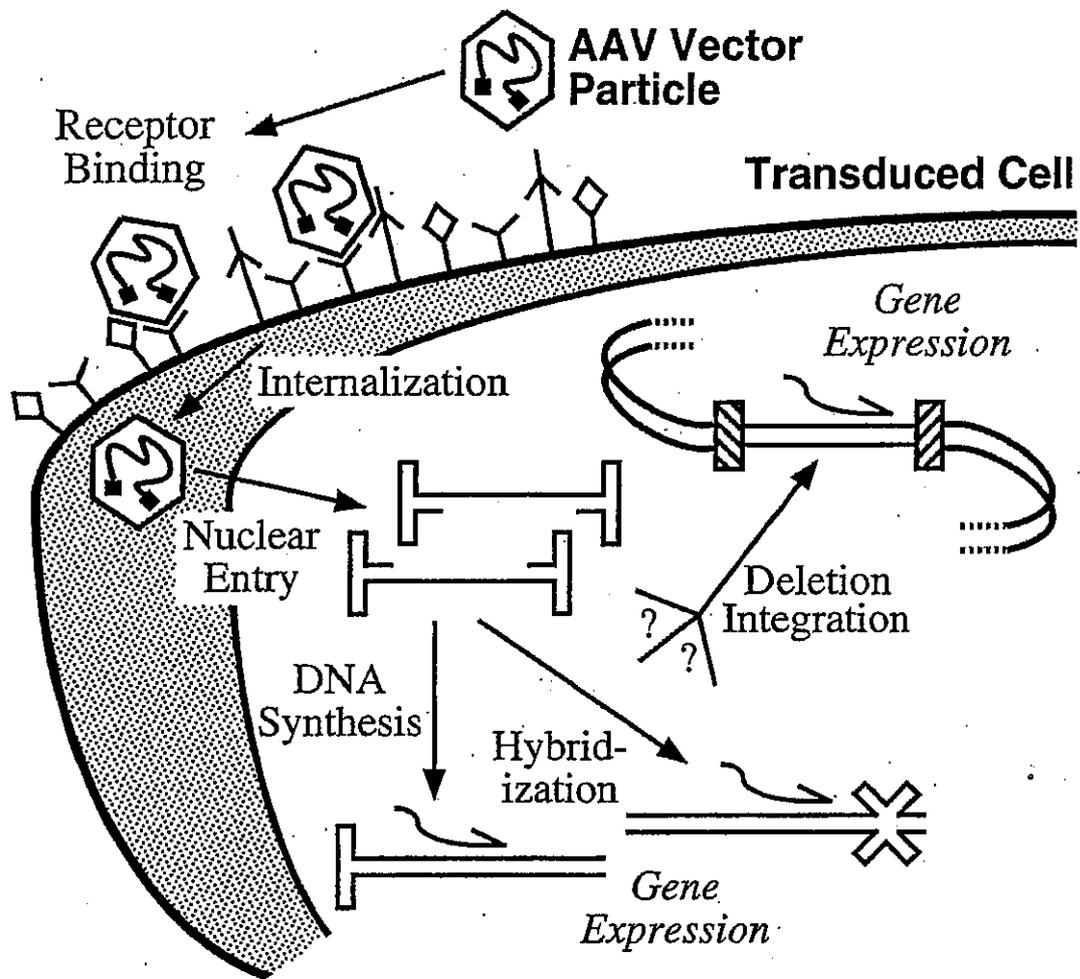


図 7. AAV の感染と発現様式²⁷

VII 安全性についての評価

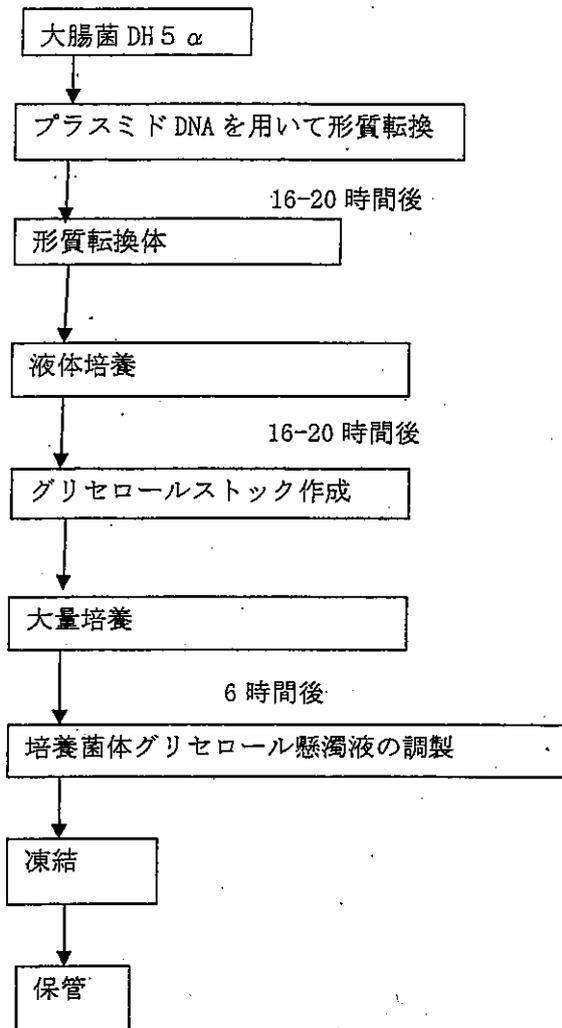
VII.1 遺伝子導入方法の安全性

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 パイアルの 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。

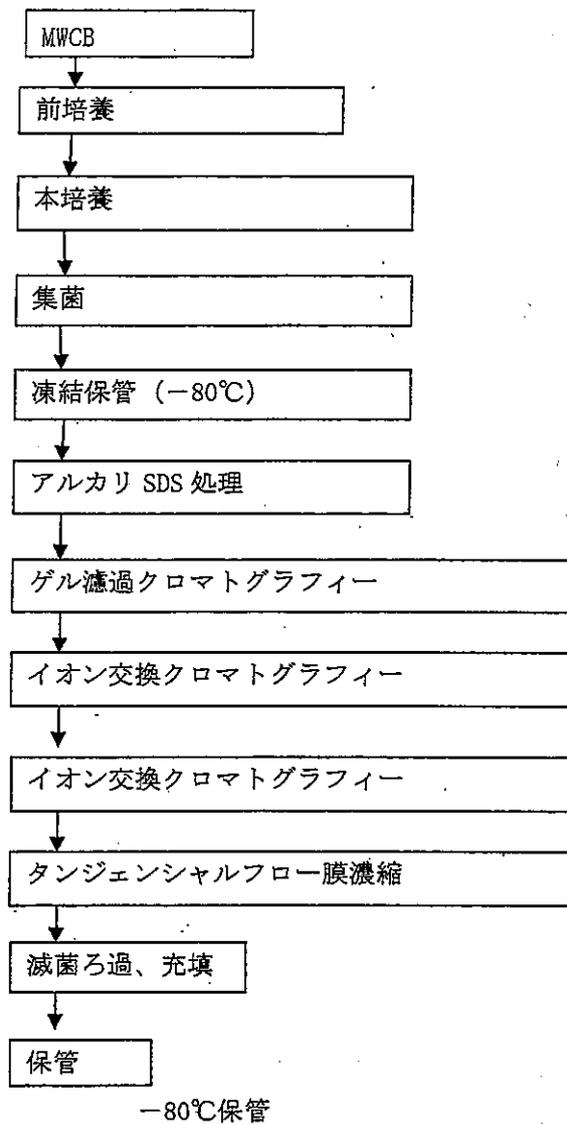


図9 プラスミドベクター 製造フローチャート

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。

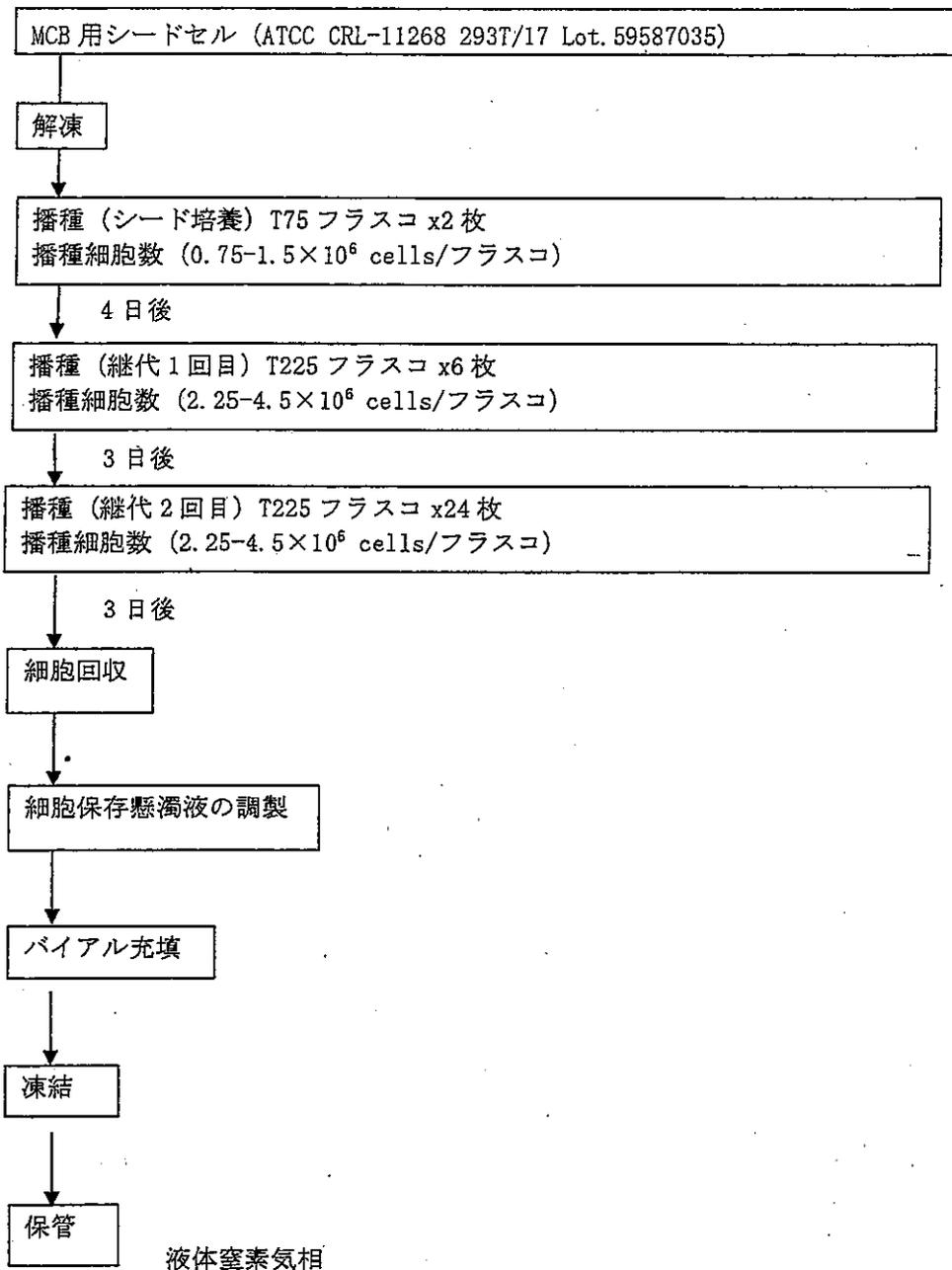


図 10 293T/17 MCB 作製フローチャート

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。

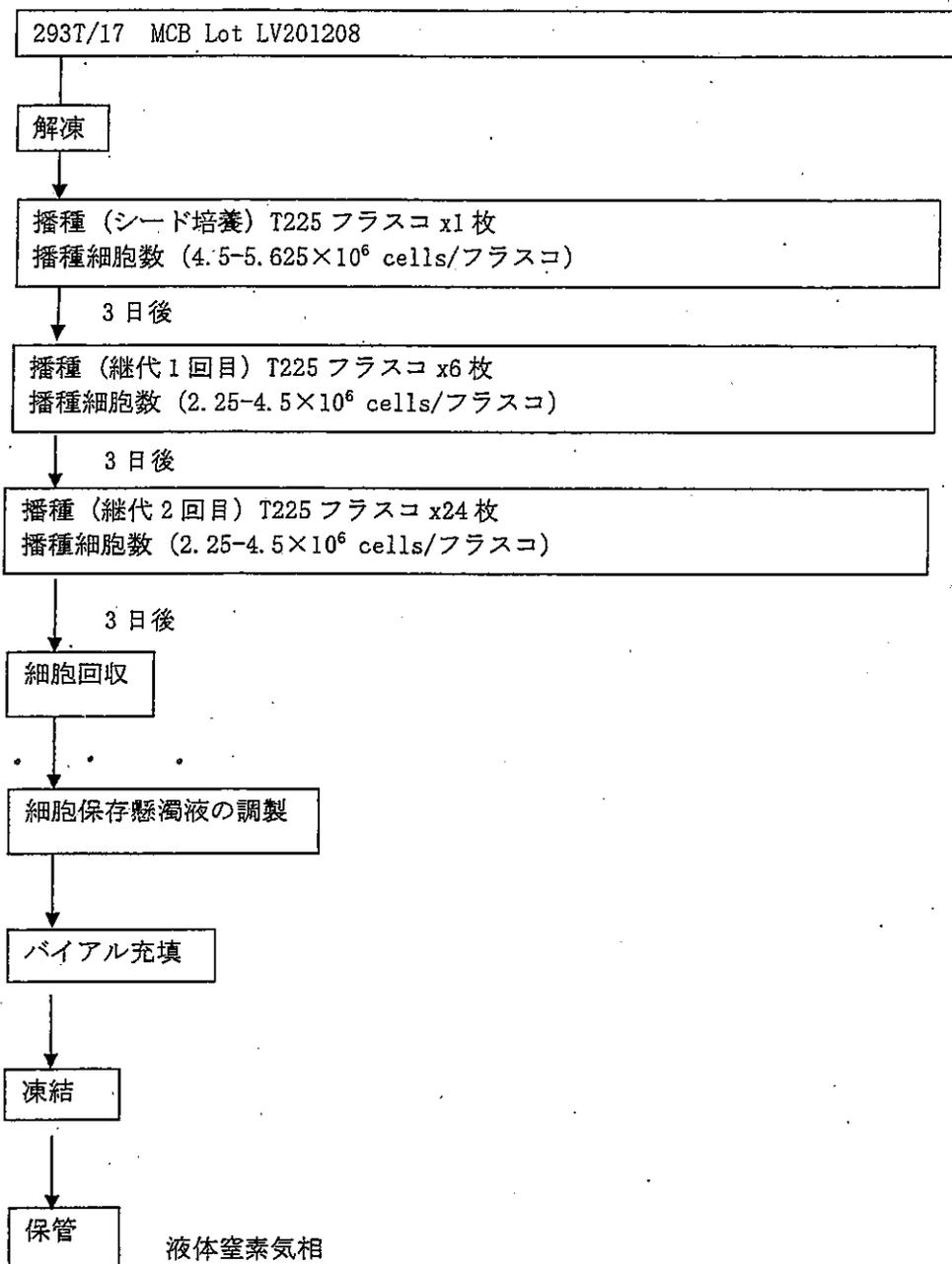


図 11 293T/17 WCB 作製フローチャート

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) によってバッファ一交換を行い、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整を行い 0.22 μm 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。

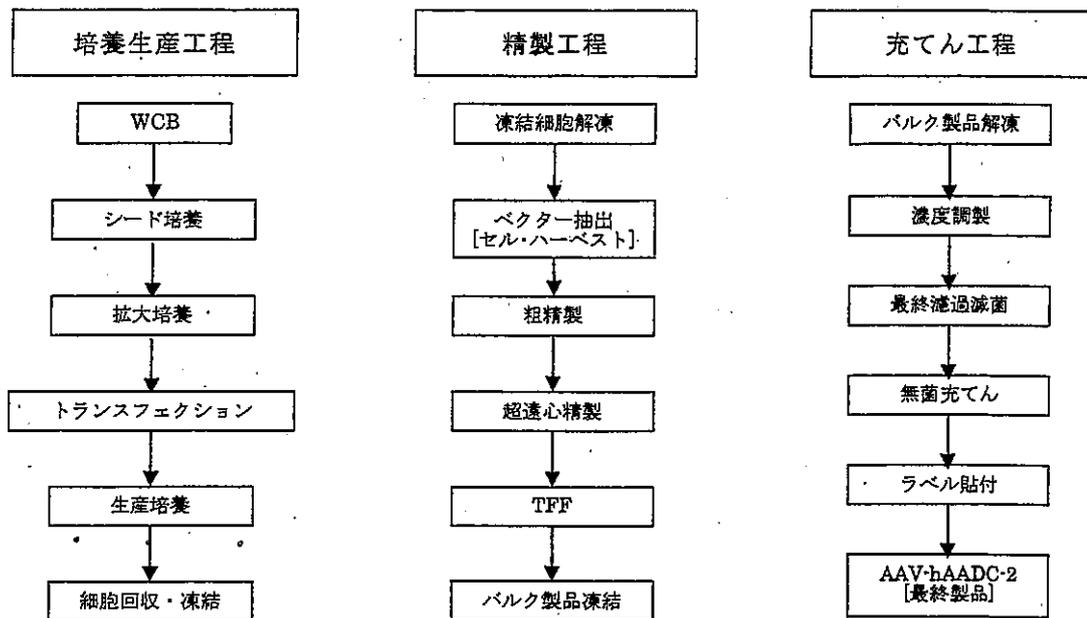


図 12 AAV-hAADC-2 の製造フロー

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（「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ー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 をドー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、ドーパミン、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ー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。

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 8 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。

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 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正)に基づき審査を行うため、病院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を

設置する。上記の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、AACDC 欠損症患者被殻内への AAV-hAACDC-2 注入療法の安全性である。副次的評価項目は、① AAV-hAACDC-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-hAACDC-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-hAACDC-2 の投与方法

AACDC 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-hAACDC-2 を注入する。対象患者は 4 例を予定している。AAV-hAACDC-2 の注入量は 1×10^{12} vg/mL の濃度で、最大 50 μ L を被殻内の 4 個所に分けて注入する。具体的には片側の被殻あたり 2 個所、両側で計 4 個所に各々最大 50 μ L を注入する。注入量 (vector genomes : vg) は 1 症例あたり 200 μ L で 2×10^{11} vg である。

(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。

(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 AACDC 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。

(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。

- 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、5HTP、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 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。
- ② 治療実施時年齢 4 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
- 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 立位・歩行可能な AADC 欠損症軽症例。
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 血液凝固異常症、あるいは抗凝固療法が必要な患者
- ⑦ 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）
- ⑧ MRI が撮影できない患者
- ⑨ FMT-PET で異常所見を認めない症例
- ⑩ 重篤な薬物アレルギーの既往のある患者
- ⑪ 過去 6 ヶ月以内に、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
- ⑫ 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 %）
- ⑬ 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「臨床研究に関する倫理指針」（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号

<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/index.html>）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「臨床研究機関」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、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。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センターのコーディネーター（薬剤師、看護師または臨床検査技師）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まかなわれること、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

現在の一般的な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思わ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場合には、その内容

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・臨床研究支援センターに所属し、薬剤師、看護師または臨床検査技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。

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) 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4cm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 Base line の 8 週間前から、評価 9 (Month 6) までに変更しない。なお適切なり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 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。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。

PET スキャンは Base line (Day -14 ~ -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。

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 -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

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 3)

有害事象、頭部 CT 検査、PCR 検査

(Day 7)

有害事象、PCR 検査

評価 1 (Day 7 ± 2 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 ± 5 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 ± 5 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 ± 5 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 ± 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
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 ± 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
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 ± 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

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 ± 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

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 歳以上では実施可能である。

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。

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

委員：

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。

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、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-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

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】

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
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かか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施設内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い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碎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等など、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 14 年文部科学省・厚生労働省告示第一号、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正)

2. 「臨床研究に関する倫理指針」

(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 intraputaminally delivered 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 Valdmanis 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

自治医科大学用

目次

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

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「AACDC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と、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、動物で安全であって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、安全性と効果を確かめる必要があります。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。

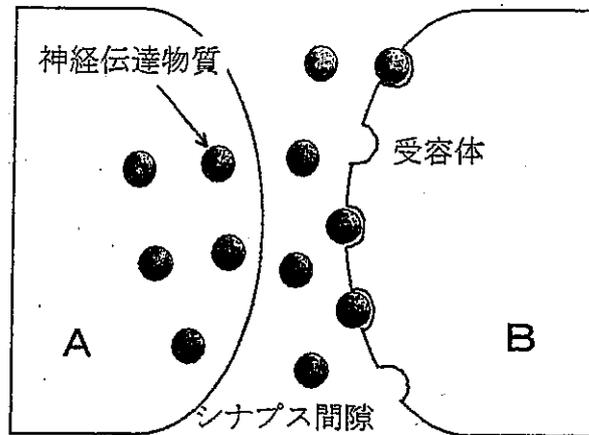


図1 神経細胞間の情報の伝達

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)の間のすきま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、チロシンからドーパミンに、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。ドー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、ドーパミン作動薬、ドー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 の働きによってドーパミンに変えられ

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。その結果ドー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。

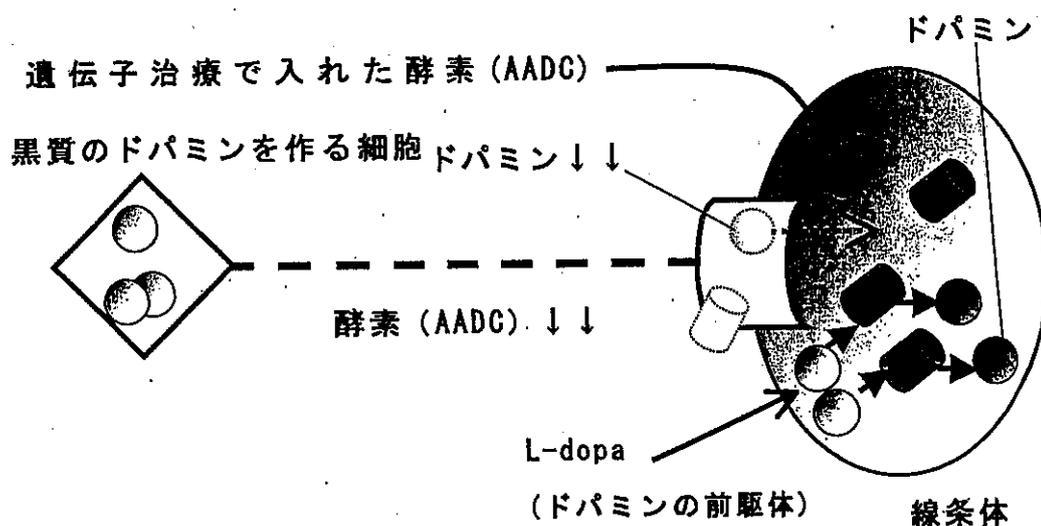


図2 この治療法の模式図

AADC 欠損症はドーパミンを合成する AADC がいないため、黒質の神経細胞から線条体へ来るドーパミンが減ることで発病します。ドー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、ドーパミンの前駆体である L-dopa からドー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例で座位保持可能のうち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。

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 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。
- ② 治療実施時に4歳以上の方。
- ③ 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。
- 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。

- ⑤ 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 立位・歩行可能な AADC 欠損症であっても軽症な方。
- ② 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 ヶ月以内に他の臨床治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相当と判断した方。

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 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。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、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。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。

表1 臨床研究のスケジュール(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 1	Day 3	Day 7	Day 14 (術後)	Day 28	Day 42	Day 56	3M	4M	5M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M
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	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
服用薬の承認	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
有害事象の有無	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PET scan	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
頭部MRI	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
頭部CT	○	○ (術後)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
脳液	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
髄液	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
凝固	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
生化学	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
AAV抗体	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PCR (血漿) (GR1)			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

*全ての臨床検査はBase line 評価の時に実施します。注1. PCR に関しては Day 7以降は3回連続陰性になるまで採取します。
注2. PCR 陽性の時は、Day 4以降も個室で過ごします。注3. 手術後は最低2週間、入院することになります。

表 2 臨床研究のスケジュール (2年目～5年目)

	評価 16	評価 17	評価 18	評価 19	評価 20	評価 21	評価 22	評価 23	評価 24	評価 25	評価 26	評価 27	評価 28	評価 29	評価 30	評価 31
	15M	18M	21M	24M	27M	30M	33M	36M	39M	42M	45M	48M	51M	54M	57M	60M
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		○		○		○		○		○		○		○		○
服用薬の 確認	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
有害事象の 有無	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PET scan				○												○
脳波				○				○					○			○
髄液								○								
血液				○				○					○			○
生化学				○				○					○			○
PCR (血清) (H1)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)

注 1. PCR に関しては 3 回連続陰性になるまで採取します。

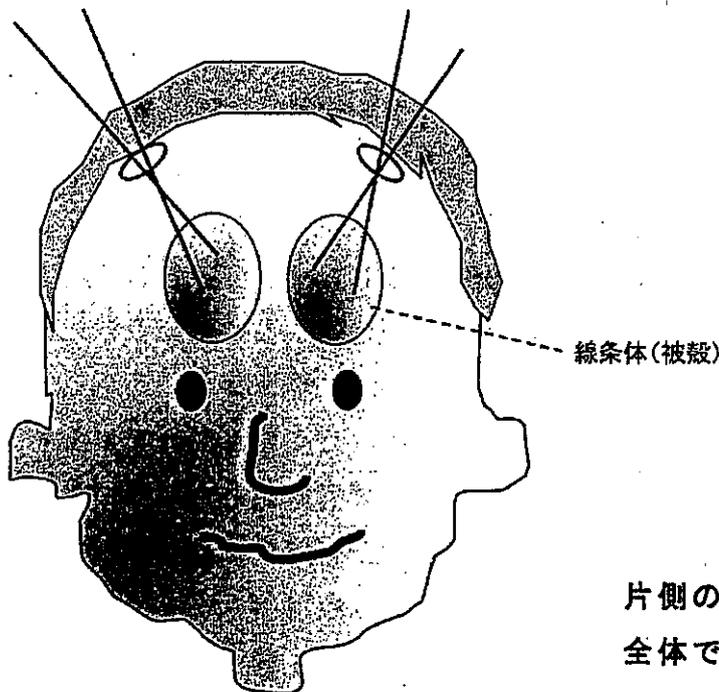
C. 線条体への治療用ベクターの注射

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ヶ所、全体で4ヶ所に注射します（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ヶ所
全体で4ヶ所に注射する

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ヶ所に注射します。

治療用ベクターは、各場所に最大 50 μ l ずつ、4ヶ所に分けて合計 200 μ 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 μ l の速さで注射しますので、1ヶ所につき17分かかります。計4ヶ所に注射するのに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、自治医大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います。

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ため、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しています。

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み込みが起

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せん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せんが、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、その間あなたの尿・便・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 72 時間（3日間）は個室に入ってください。3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。画像検査では、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。

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 ヶ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 4 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。

1 1. 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。

1 2. 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

に命が助かっていても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ヶ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ましても、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、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。

15. 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。また、本臨床研究の客観性を保証するために当院以外の外部の監査担当者があなたのお子さんの診療記録を閲覧することがあります。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もありません。

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

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

情報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。

17. 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。その代わりに、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ヶ月後から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。

18. 臨床研究に参加する間にお願いすること

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。

19. 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。

20. 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）：門田 行史

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。

21. 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 タカラバイオ寄付講座	客員教授
小坂 仁	自治医科大学 小児科学	教授
渡辺 英寿	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	助教
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	講師
中村 幸恵	自治医科大学 小児科学	大学院生
小野 さやか	自治医科大学 神経内科学	助教
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

外部協力者

加藤 光広	山形大学医学部 小児科学	講師
瀬川 昌也	瀬川クリニック	院長
野村 芳子	瀬川クリニック	副院長
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

22. 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ことがわかった場合は、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だけでしょうか？

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。ついでに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。）

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

私は前頁の項目すべての口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。ついでに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。）

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

私は前頁の項目すべての口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。ついでに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。）

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

私は前頁の項目すべての口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

平成 27 年 3 月 2 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 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II
相臨床研究
申請者：自治医科大学附属病院 病院長 安田 是和
申請日：平成 26 年 7 月 23 日
2. 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 安田 是和
申請日：平成 26 年 7 月 23 日

※両臨床研究については、対象疾患や治療施設(病棟)に差違はあるものの、用いるベクター
や使用方法等は同様であることから、評価結果はひとつにまとめている。

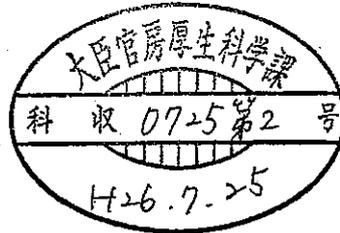
【審査委員会の評価結果（自治医科大学附属病院）】

1. 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 (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 安田 是和
<p>(1) 生物多様性影響評価の結果について</p> <p>① 他の微生物を減少させる性質</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <hr/> <p>② 病原性</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <hr/> <p>③ 有害物質の産生性</p> <p>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。</p> <hr/> <p>④ 核酸を水平伝達する性質</p> <p>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。</p> <p>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、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。</p> <p>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。</p>
<p>(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論</p> <p>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。</p>

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 7 月 23 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿



氏名 自治医科大学附属病院
申請者 病院長 安田 是和
住所 栃木県下野市薬師寺 3311-1

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>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 (AAV-hAADC-2)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>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</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物の溶液は、スクリュウ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。</p> <p>(2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物の溶液の融解、希釈及び分注操作は、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溶液の保管は、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溶液又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。</p> <p>(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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。</p> <p>(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。</p> <p>(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脳手術により注入することで行う。</p> <p>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3μ</p>

l/min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希釈溶液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。

(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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却）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。

(8) 投与後72時間まで、被験者を個室で管理する。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開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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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扱いに準じる。

(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。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。

(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ときは、個室における管理を継続する。

(12) 個室における管理解除後に被験者の血液又は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。

「ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素
(aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) を
発現する遺伝子組換え2型アデノ随伴ウイルス
ベクター (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)

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

AAV-hAADC-2 (以下、本遺伝子組換え生物という) は、ヒト芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) を発現する遺伝子組換え 2 型アデノ随伴ウイルスベクターである。

アデノ随伴ウイルス (AAV) はパルボウイルス科デンドウイルス属に分類されている (文献1、2)。これまでに霊長類で分離されたウイルスは、血清型およびゲノムの違いに基づき100以上の型に分けられており (文献1、3、4)、本遺伝子組換え生物は AAV 2 型 (AAV2) を宿主として作製された。

AAV2 は自然界に広く分布しており、哺乳類に感染する。ヒトでは小児期に初感染が起ること、成人の約半数が中和抗体を有することが知られている (文献1) が、ヒトへの病原性は知られていない。

文献 1 : Kaipe DM, Howley PM. ed., Fields VIROLOGY 4th edition, pp.2327-2379, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)

文献 2 : Tijssen P. ed., Handbook of Parvoviruses, Volume I, pp.11-30, CRC press, Boca Raton, FL (1990)

文献 3 : Gao G, et al. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J. Virol. 78: 6381-6387 (2004)

文献 4 : Mori S, et al. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudo-typing characterization of capsid protein. Virology 330: 375-383 (2004)

2 使用等の歴史及び現状

AAV2 を含めいかなる血清型も生ワクチン等に使用した報告はない。また、AAV2に由来する遺伝子組換えウイルスは遺伝子治療で汎用されている (IV 章参照)。

3 生理・生態学的特性 (文献1、2)

(1) 基本的特性

AAVは約4.7 kb の線状1 本鎖DNAウイルスであり、エンベロープを持たず直径約26 nmの正二十面体構造のキャプシドを有している。

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、非分裂細胞にも導入が可能である。野生型 AAV は標的細胞に感染すると Rep が関与して第 19 染色体長腕の AAVS1 領域に組み込まれることが知られているが、プラスミド

ベクターから作成した 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 5)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染はするが、ウイルス粒子を構成するために必要な E1A、E1B、E2A、E4 及び VA 遺伝子を有さず、自律的な増殖能を欠損したウイルスである。増殖にはこれらの遺伝子を供給する「ヘルパーウイルス」(アデノウイルス又はヘルペスウイルスなど)の存在が必要である。培養細胞でも同様に、rep 及び cap を搭載した「アデノ随伴ウイルスヘルパープラスミド (AAV ヘルパープラスミド)」及び、E2A、E4 及び VA を発現する「アデノウイルスヘルパープラスミド (Ad ヘルパープラスミド)」を、E1A 及び E1B を発現するヒト胎児腎培養細胞 (293T/17細胞) にコトランスフェクションした場合にのみ増殖が起こる。本ウイルスは物理化学的に比較的堅牢であり、常温においても比較的安定である。

(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)。

(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に感染個体で増幅し、分泌物と一緒に排泄されて、ヘルパーウイルスと共に次の生物に感染する。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6、7)。

(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。

(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蛋白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°C 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。

文献 5 : Nakai H, et al. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nature Genetics* 34 :297-302 (2003)

文献 6 : Chen C, et al. Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J. Virol.* 79: 14781-14792 (2005)

文献 7 : Schnepf B, et al. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J. Virol.* 79: 14793-14803 (2005)

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

AAV2 の両末端にあるITR (Inverted terminal repeat) の間の領域を供与核酸となる AAV-hAADC-2 (3,457bp)と置換した。AAV-hAADC-2の全塩基配列を別紙1に示した。AAV-hAADC-2はAAV2にヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素human aromatic L-amino acid decarboxylase (hAADC) の発現カセットを挿入したものであり、その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poly 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 NotI 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 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、ウイルス固有の蛋白質である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、2型アデノウイルスの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Ampicilin 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 遺伝子をクローニングし、更に、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。なお、rep遺伝子のp5プロモーターは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ている。pHelperは、アデノウイルス2型のE2A、E4、VARNA 遺伝子をクローニングして構築した(別紙4)。構築したpAAV-hAADC-2、pHelper 及びpRC-BI-khB342-2のそれぞれを大腸菌DH5 α に導入して形質転換し、アンピシリン耐性株のグリセロールストックを作製して、MWCBとした。各プラスミドベクター溶液は、MWCB を培養して菌体を集め、溶菌後、ゲル濾過クロマトグラフィー及び2種類のイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、更に、タンジェンシャルフロー膜濃縮にて濃縮後、0.22 μ mフィルターで濾過して作製した。得られたpAAV-hAADC-2、pHelper 及びpRC-BI-khB342-2 を共に、リン酸カルシウム法によってヒト胎児腎細胞 (293T/17 細胞) に導入し、本遺伝子組換え生物を得た(別紙5)。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本組換え生物は、293T/17生産細胞から抽出及び粗精製処理後、セシウム密度勾配超遠心により精製し、更に、タンジェンシャルフロー膜濃縮にてバッファー置換後、0.22 μ mフィルターで濾過して、クライオバイアルにて-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

プラスミドの製造及び品質試験並びに本遺伝子組換え生物の製造及び品質試験は、タカラバイオ株式会社草津事業所(滋賀県草津市野路東七丁目2番62号)の細胞・遺伝子治療センターにおいて、GMP 基準に従って実施した(各バンク及び本遺伝子組換え生物の品質管理試験の詳細は別紙6及び別紙7)。本遺伝子組換え生物は、自治医科大学附属病院本館1階臨床用細胞調製室(P2レベル)にて受け入れ、同室内のディープフリーザーに施錠の上、保管する(当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙8)。

4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸は本遺伝子組換え生物の1本鎖DNA ゲノムの一部としてAAVのITRに挟まれて存在し、保管中は極めて安定で、感染する動植物等の種類及び感染様式が保管中に変化することはない(文献8)。

細胞に感染するとAAV-hAADC-2のゲノムは核内に移行して2本鎖DNAとなり、多くは染色体とは独立したエピソームとして存在すると考えられる(文献9、10、11)。この2本鎖

DNA となったものからhAADC が転写される。細胞のゲノムへの組込みは稀で低頻度である。hAADC の発現は発現する細胞の遺伝子に変化が起こらないかぎり、また細胞が分裂しないかぎり継続するものと考えられる。一般に神経細胞は非分裂細胞であるので長期的な発現が期待される。

本遺伝子組換え生物を293T/17 細胞で作製する過程でpRC-BI-khB342-2 とpAAV-hAADC-2 が非相同組換えを起こして増殖能を獲得したウイルス (replication-competent AAV、以下RCA とする) を生ずる可能性は否定できない。しかしそのRCA はパッケージできるサイズを考慮すれば、ほぼ全ての供与核酸を失っていると考えられる。さらにこのRCA も野生型の AAV と同様にAAV のヘルパーウイルスであるアデノウイルスや単純ヘルペスウイルス等がないかぎり実際には増殖することは不可能である。

文献 8 : Xu R, et al. Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. Med. Sci. Monit. 11 : 305-308 (2005)

文献 9 : Yan Z, et al. Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. J. Virol. 79: 364-379 (2005)

文献 10 : Schnepf B, et al. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. J. Virol. 77: 3495-3504 (2005)

文献 11 : Grimm D, et al. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. J Virol 80: 426-439 (2006)

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。

- ・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。
- ・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、rep及びcap 遺伝子が組み込まれた又はトランスフェクションされた細胞でなければ増殖は起こらない。
- ・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。

・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11）。

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 遺伝子をもつ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9、10、11）。

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

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

(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。

(2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物の溶液の融解、希釈及び分注操作は、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溶液の保管は、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溶液又はその凍結品を開放系区域を通過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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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。

(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。

(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脳手術に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 μ l/min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希釈溶液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。

(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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却）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。

(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開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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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扱いに準じる。

(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。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。

(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ときは、個室における

管理を継続する。

(12)個室における管理解除後に被験者の血液又は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。

3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

被験者体内におけるRCA の出現の有無については、被験者への投与後、適切な時期に血液及び尿を用いてPCR 法にて検査し、連続した2回の検査結果が陰性であることを確認する。

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

遺伝子組換えウイルス投与後の被験者についてはPCR 法にて血液、尿中の遺伝子組換えウイルスが連続した2回の検査において検出されなくなるまで追跡する。

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キンソン病モデルに対して脳内へAAV-hAADC-2 の注入を行った前臨床試験では、明らかな毒性は認められていない（文献12、13、14、15、16、17、18、19）。また、血液中でAAV-hAADC-2 は検出されていない。

文献 12: Fan DS, et al. Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and atomatic L-amino acid decarboxylase genes using two separete adeno-associated virus vectors. Hum. Gene Ther. 9: 2527-2535 (1998)

文献 13: Shen Y, et al. Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase I for gene therapy of Parkinson's disease. Hum. Gene Ther. 11: 1509-1519 (2000)

文献 14: Muramatsu S, 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. 13: 345-354 (2002)

文献 15: Sanftner ML, et al. AAV2-mediated gene delivery to monkey putamen: Evaluation of an infusion device and delivery parameters. Experimental Neurology 194 476 – 483 (2005)

文献 16: Cunningham J, et al. Biodistribution of Adeno-associated Virus Type-2 in Nonhuman Primates after Convection-enhanced Delivery to Brain. Molecular Ther. 16:1267–1275 (2008)

文献 17: Daadi MM, et al. Distribution of AAV2-hAADC-transduced cells after 3 years in Parkinsonian monkeys. Neuroreport 17:201-204 (2006)

文献 18 : Fiandaca SM, et al. Real-time MR imaging of adeno-associated viral vector delivery to the primate brain. *Neuroimage* 47(Suppl 2): T27-T35 (2009)

文献 19 : Sebastian WS, 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.* 23:210-217 (2012)

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20）。

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21）。

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、本研究と同じ目的遺伝子を搭載した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から67歳の男女5人に総量 9×10^{10} のベクターゲノムを投与したところ、1か月及び6か月後に、6-[18F]フルオロ-L-mチロシン(FMT)の取込みが30%向上し、ベクターに関連する有害事象は認められなかった。引き続き、総量 3×10^{11} のベクターゲノムが男女5人に注入され、FMT取込みは75%増加したが、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、ベクターの異常増殖による有害事象は認められていない（文献22、23、24）。

文献 20 : Manno CS, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101: 2963-2972 (2003)

文献 21 : Manno CS, 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)

文献 22 : Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, et al. Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 70:1980-1983 (2008)

文献 23 : Christine CW, Starr PA, Larson PS, et al. Safety and tolerability of putaminal AADC

gene therapy for Parkinson disease. Neurology 73:1662-1669 (2009)

文献 24 : 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. 23:377-381 (2012)

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、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、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載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、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 又は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。

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。

なお、AAV2 に由来する遺伝子組換えウイルスは1999 年以後、米国で使用され(文献10、11)、血清型が異なる遺伝子組み換えAAVが欧州で医薬品(Glybera)として承認されたが、

環境への悪影響に関する報告はない。また、これまで当該ウイルスを投与されたヒトにおいて当該ウイルスに由来する重篤な副作用は報告されていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来RCA が環境中へ拡散する可能性は低く、また、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはない。また、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ため、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来RCA が被験者以外のヒトに対して病原性を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、病原性について、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、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、有害物質の産生性について、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、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、マウスなどのほ乳動物に感染することが報告されている。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物が感染したヒト又はヒト以外のほ乳類で一過性に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核酸の水平伝達は知られていない。本遺伝子組換え生物由来の遺伝子組換え生物に該当するRCA が出現したとしても、核酸を水平伝達する性質は野生型AAV2 と同等である。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、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いても野生型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、拡散を水平伝達する性質について、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、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。

文献 25 : Kay MA, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. Nat. Genet. 24: 257-261 (2000)

文献 26 : Manno CS, 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)

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、ほ乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物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いても野生型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。

生物多様性影響評価書 別紙 目次

- 別紙 1: AAV-hAADC-2 の全塩基配列
- 別紙 2: hAADC のアミノ酸配列
- 別紙 3: AAV-hAADC-2 の構造
- 別紙 4: プラスミドの構造
- 別紙 5: 組換え AAV ウイルス作製の概略図
- 別紙 6: AAV-hAADC-2の品質管理試験
- 別紙 7: 293T/17細胞 (MWCB)の品質管理試験
- 別紙 8: 治療施設の地図及び保管場所の概略図
- 別紙 9: 治療施設医療廃棄物管理規程

別紙1 AAVベクター-AAV-hAAD-2の塩基配列

```

1 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTT 60
    left ITR 領域
61 GGTGCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT 120
121 AGGGGTTCCTGCGGCCGCACGCGTCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG 180
    CMV promoter
181 TTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT 240
241 GACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC 300
301 CAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG 360
361 CAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT 420
421 GGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA 480
481 TCTAGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG 540
541 TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAG 600
601 TTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAACAAC TCCGCCCAT 660
661 GACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGT 720
721 GAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCG 780
781 GGACCGATCCAGCCTCCGCGGATTGGAATCCCGGGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGA 840
    β-globin intron
841 TTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAATG 900
901 CTTTCTTCTTTAATATACTTTTTTGTATTCTTATTTCTAATACTTCCCTAATCTCTT 960
961 TCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATCTAAAGAATAAC 1020
1021 AGTGATAATFTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATAT 1080
1081 AAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAT 1140
1141 TCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTT 1200
1201 TTGCTAATCATGTTTACACCTCTTATCTTCCCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTC 1260
1261 TGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTCGAACATCGATTGAATCCCCG 1320
1321 GGGATCCACCATGAACGCAAGTGAATCCGAAGGAGAGGGAAGGAGATGGTGGATTACGT 1380
    E1 AADC
1381 GGCCAACTACATGGAAGGCATTGAGGGACGCCAGGTCTACCCTGACGTGGAGCCCGGGTA 1440
1441 CCTGCGGCCGCTGATCCCTGCCGCTGCCCTCAGGAGCCAGACACGTTTGAGGACATCAT 1500
1501 CAACGACGTTGAGAAGATAATCATGCCTGGGGTGACGCACTGGCACAGCCCCCTACTTCTT 1560
    
```

1561	CGCCTACTTCCCCACTGCCAGCTCGTACCCGGCCATGCTTGCGGACATGCTGTGCGGGGC	1620
1621	CATTGGCTGCATCGGCTTCTCCTGGGCGGCAAGCCCAGCATGCACAGAGCTGGAGACTGT	1680
1681	GATGATGGACTGGCTCGGGAAGATGCTGGAACTACCAAAGGCATTTTGAATGAGAAAGC	1740
1741	TGGAGAAGGGGGAGGAGTGATCCAGGGAAGTGCCAGTGAAGCCACCCTGGTGGCCCTGCT	1800
1801	GGCCGCTCGGACCAAAGTGATCCATCGGCTGCAGGCAGCGTCCCCAGAGCTCACACAGGC	1860
1861	CGCTATCATGGAGAAGCTGGTGGCTTACTCATCCGATCAGGCACACTCCTCAGTGGAAAG	1920
1921	AGCTGGGTTAATTGGTGGAGTGAATTTAAAGCCATCCCCCAGATGGCAACTTCGCCAT	1980
1981	GCGTGCCTGCCCCTGCAGGAAGCCCTGGAGAGAGACAAAGCGGCTGGCCTGATTCCCTTT	2040
2041	CTTTATGGTTGCCACCCTGGGGACCACAACATGCTGCTCCTTTGACAATCTCTTAGAAGT	2100
2101	CGGTCTATCTGCAACAAGGAAGACATATGGCTGCACGTTGATGCAGCCTACGCAGGCAG	2160
2161	TGCATTCATCTGCCCTGAGTTCGGGCACCTCTGAATGGAGTGGAGTTGCAGATTCATT	2220
2221	CAACTTTAATCCCCACAAATGGCTATTGGTGAATTTGACTGTTCTGCCATGTGGGTGAA	2280
2281	AAAGAGAACAGACTTAACGGGAGCCTTTAGACTGGACCCCACTTACCTGAAGCACAGCCA	2340
2341	TCAGGATTCAGGGCTTATCACTGACTACCGGCATTGGCAGATAACCACTGGGCAGAAGATT	2400
2401	TCGCTCTTTGAAAATGTGGTTTGTATTTAGGATGTATGGAGTCAAAGGACTGCAGGCTTA	2460
2461	TATCCGCAAGCATGTCCAGCTGTCCCATGAGTTGAGTCACTGGTGCGCCAGGATCCCCG	2520
2521	CTTTGAAATCTGTGTGGAAGTCATTCTGGGGCTTGTCTGCTTTCCGGCTAAAGGGTCCAA	2580
2581	CAAAGTGAATGAAGCTCTTCTGCAAAGAATAAACAGTGCCAAAAAAATCCACTTGGTTC	2640
2641	ATGTCACCTCAGGGACAAGTTTGTCTGCGCTTTGCCATCTGTTCTCGCACGGTGAATC	2700
2701	TGCCCATGTGCAGCGGGCCTGGGAACACATCAAAGAGCTGGCGGCCGACGTGCTGCGAGC	2760
2761	AGAGAGGGAGTAGAGTGAAGCCAGGACCTGCAGAAGCTTGCCTCGAGCAGCGCTGCTCG	2820
2821	AGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGT	2880
2881	TGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGA	2940
2941	CTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGCAAGT	3000
3001	TGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGC	3060
3061	ACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCC	3120
3121	TCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTG	3180

hGH polyA

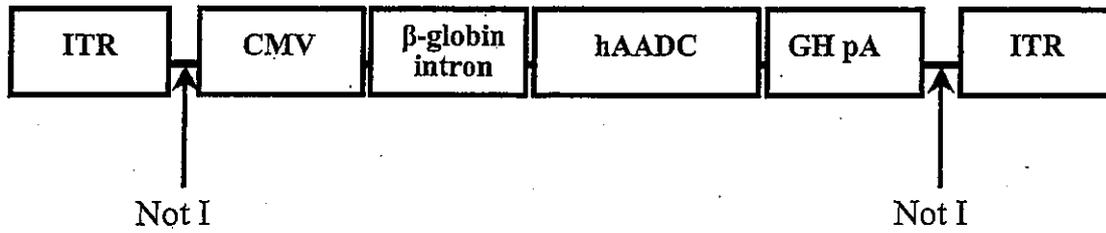
3181 GTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGAT 3240
3241 CTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCC 3300
3301 TGTCTTCTGATTTTGTAGGTAACGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTT 3360
3361 GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCC 3420
3421 ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG 3468

right ITR 領域

別紙2 hADC のアミノ酸配列

MNASEFRRRGKEMVDYVAN YMEGIEGRQVYPDVEPGYLRPLIPAAAPQEPDTFEDIINDVE
KIIMPGVTHWHSPYFFAYFPTASSYPAMLADMLCGAIGCIGFSWAASPACTELETVMMDWL
GKMLELPKAFLEKAGEGGVVIQGSASEATLVALLAARTKVIHRLQAASPELTQAAMEKL
VAYSSDQAHSSVERAGLIGGVKLKAIPSDGNFAMRASALQEALERDKAAGLIPFFMVATLG
TTTCCSFDNLLEVGPICNKEDIWLHVDAAYAGSAFICPEFRHLLNGVEFADSFNPNPKWLL
VNFDCSAMWVKKRTDLTGAFRLDPTYLKHSHQDGLITDYRHWQIPLGRRFRSLKMWVVF
RMYGVKGLQAYIRKHVQLSHEFESLVRQDPRFEICVEVILGLVCFRLKGSNKVNEALLQRIN
SAKKIHLVPCHLRDKFVLRFAICSRTVESAHVQRAWHEHIKELAADVLRARE

別紙3 AAV-hAADC-2 の構造



ITR: inverted terminal repeats

CMV: cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer

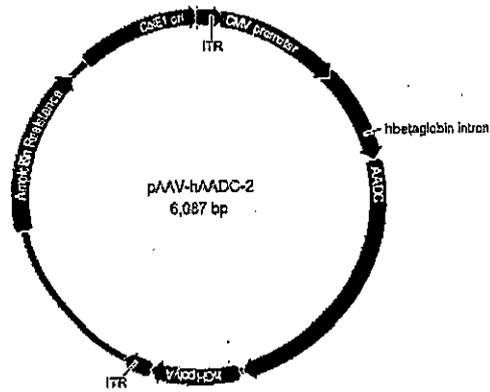
β-globin intron: human β-globin intron

hAADC: cDNA of human aromatic L-amino acid decarboxylase

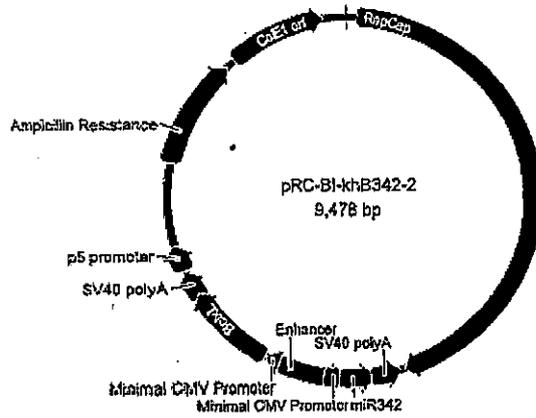
GH pA: human growth hormone polyadenylation signal

別紙4 プラスミドの構造

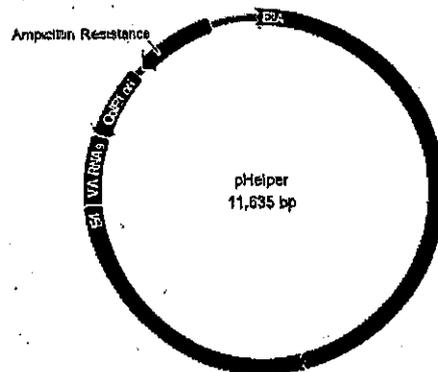
pAAV-hAADC-2



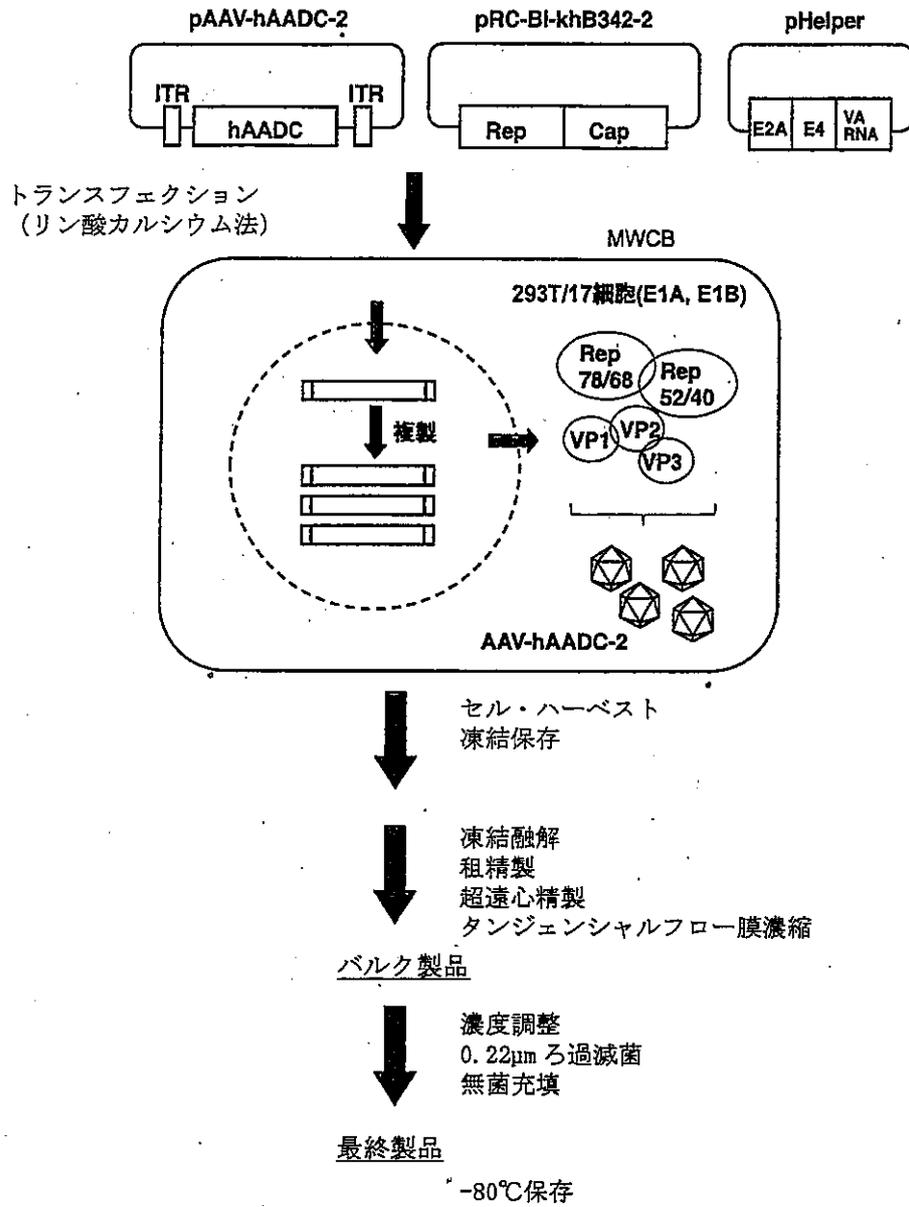
pRC-BI-khB342-2



pHelper



別紙5 組換え AAV ウイルス作製の概略図



別紙 6 AAV-hAADC-2 の品質試験

I. AAV-hAADC-2 の品質試験

AAV-hAADC-2 の最終製品の品質試験の試験結果と規格、並びに AAV-hAADC-2 の工程内（セル・ハーベスト）品質試験及び AAV-hAADC-2 のバルク製品の品質試験の試験結果と規格を、表 1、表 2 及び表 3 に示す。

表 1 AAV-hAADC-2 の最終製品の品質試験

試験項目	規格	結果 (Lot.)
ベクターゲノム濃度試験	未定	
エンドトキシン試験	≤10 EU/mL	
純度試験	標準品と同等	
導入効率試験	結果の報告	
感染力価試験	結果の報告	
性状試験	無色澄明～半透明の溶液	
pH 試験	未定	
浸透圧試験	未定	
無菌試験	適合	
ウイルスベクター純度試験（電子顕微鏡）	規格なし	
塩基配列試験	適合	
oriDNA 配列定量試験（Q-PCR 法）	結果の報告	
rcAAV 否定試験	<10 ³ AAV genomes/unit	
セシウム残留試験	≤1.4 µg/unit	
キャプシド率試験	規格なし	
ヒトゲノム DNA 残留試験	規格なし	
ベンゾナーゼ残留試験	≤1.0 ng/mL	

表 2 AAV-hAADC-2 の工程内（セル・ハーベスト）品質試験項目と規格

試験項目	規格	結果 (Lot.)
In vitro ウイルス試験	陰性	
マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）	陰性	

表 3 AAV-hAADC-2 のバルク製品の品質試験項目と規格

試験項目	規格	結果 (Lot.)
ベクターゲノム濃度試験	未定	

II. 試験方法の概要

上記試験方法の概要を以下に示す。

1. 無菌試験

製造数が、100 容器以下であるとき、各培地に対して 10%、また 101 容器以上 500 容器以下であるとき、各培地に対して 10 容器を検体とする。検体を液状チオグリコール酸培地 (TGC 培地) またはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (SCD 培地) に接種し、TGC 培地は 30~35℃で、SCD 培地は 20~25℃で 14 日間培養し、菌の発育の有無を確認する。培養最終日に検体によって培地が混濁し判定が困難な場合、培養液を新しい培地に接種して、元の培地と共に 4 日間以上培養し、菌の発育の有無を確認する。

2. マイコプラズマ否定試験 (欧州薬局方)

1) 培養法:

- ①マイコプラズマが増殖可能な寒天培地に WCB 破砕液を接種し、微好氣的条件で 35~37℃において 14 日間以上培養する。
 - ②マイコプラズマが増殖可能な液体培地に試料溶液を接種し、密栓して 35~37℃において 21 日間培養する。
 - ③試料溶液を接種した液体培地より、接種後 3±1 日目、7±1 日目、14±1 日目及び 20±1 日目に寒天培地上にその培地を接種し、これらを微好氣的条件下 35-37℃で 14 日間 (但し 20±1 日目に接種したものは 7 日間) 以上培養する。
- ①から③について、マイコプラズマの生育の有無を調べる。

2) DNA 染色法:

WCB 破砕液を Vero 細胞に接種し、3 日間培養する。スライド付の培養容器に継代後、3-5 日間培養する。培養後、スライド上の培養細胞を固定して DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡にてマイコプラズマの存在を検鏡する。

3. In vitro ウイルス試験

検体を各指標細胞 (MRC-5、Vero、NIH3T3) に接種後、36±2℃、5%炭酸ガス条件下で 28 日間培養し (期間中、必要に応じて継代を行う)、ウイルス特異的な細胞変性効果 (CPE) 出現の有無を観察する。

培養 28 日目の細胞について、ヒト O 型、モルモット及びニワトリの混合赤血球に対する吸着反応の有無を試験する。

また、培養 28 日目の培養上清を用いて、ニワトリ、モルモット及びアカゲザルの各赤血球に対する凝集反応の有無を試験する。

4. ベクターゲノム濃度試験

ウイルスベクターゲノム DNA に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、Ct 値を測定する。測定した Ct を元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線からベクターゲノム濃度を換算する。

5. oriDNA 配列定量試験 (Q-PCR 法)

プラスミド DNA 配列に含まれる oriDNA 配列に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、Ct 値を測定する。測定した Ct を元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線から検体中に含まれる oriDNA 配列の濃度を換算する。

6. rcAAV 否定試験

検体を、E1/E3 欠損型アデノウイルスとともに、293 細胞に共感染させる。共感染後の細胞を継代して、ウイルス増幅を起こした後、PCR により、AAV 配列の増幅の有無を検出する。

7. セシウム残留試験

GC-MS 法により、セシウム濃度を測定する。

8. キャプシド率試験

微量分光光度計を用いて、紫外線吸光度 (260 nm 及び 280 nm) を測定する。280 nm 測定値に対する 260 nm 測定値の比率をキャプシド率の指標とする。

9. ヒトゲノム DNA 残留試験

ヒトゲノム DNA に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、Ct 値を測定する。測定した Ct を元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線からヒトゲノム DNA 濃度を換算する。

10. エンドトキシン試験

日本薬局方 一般試験法 エンドトキシン試験 カイネティック-比濁法の項により、エンドトキシン濃度を測定する。

11. 純度試験

電気泳動法 (SDS-PAGE 法) により、タンパクを分子サイズで分離した後、銀染色を行なう。標準品と比較した純度を測定する。

12. 導入効率試験

検体を、HeLaRC32 細胞に共感染させる。共感染後の細胞の細胞膜を融解した後、抗 hAADC-2 抗体を用いた ELISA 法により、導入遺伝子の発現の有無を測定する。

13. 感染力価試験

検体を、野生型アデノウイルスとともに、HeLaRC32 細胞に共感染させる。共感染後の細胞から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて、増殖の有無を定性的に測定する。測定値をグラフ化し、TCID₅₀ とする。

14. 性状試験

性状を目視確認する。

15. pH 試験

pH 計を用いて、日本薬局方 pH 試験を実施する。

16. 浸透圧試験

浸透圧計を用いて、日本薬局方 浸透圧試験を実施する。

17. ウイルスペクター純度試験（電子顕微鏡）

ウイルス粒子とウイルスパーティクルのみの割合を電子顕微鏡法により確認する。

18. 塩基配列試験

塩基配列決定用シーケンスプライマーを用いて、シーケンス反応を行った後、反応産物を精製し、DNA シーケンサーで解析する。

19. ベンゾナーゼ残留試験

製造に使用したベンゾナーゼの残留量を、抗 Benzonase 抗体を用いた ELISA 法により測定する。

別紙 7 293T/17 細胞セルバンクの品質試験

I. 293T/17 MCB 及び WCB の品質試験の結果
 表 1 に MCB 及び WCB の品質試験の結果を示す。

表 1 293T/17 MCB の品質試験の試験結果

試験項目	規格	結果 (Lot. LV201208)
細胞生存率試験 (トリパンブルー法)	>50%	79.3%
アインザイム分析による細胞の由来動物種同定	ヒト	ヒト
マイコプラズマ否定試験 (欧州薬局方)	陰性	陰性
無菌試験	適合	適合
In vitro ウイルス試験	陰性	陰性
In vivo ウイルス試験	陰性	陰性
形質転換試験	規格なし	コロニー形成を認める。
レトロウイルス粒子試験	ウイルス様粒子なし	ウイルス様粒子なし
In vitro レトロウイルス試験 (培養法)	活性なし	活性なし
In vitro レトロウイルス試験	活性なし	活性なし
PCV/BCV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HIV-1/2 ウイルス否定試験	陰性	陰性
HTLV-1/2 ウイルス否定試験	陰性	陰性
HAV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HBV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HCV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HHV-6/7/8 ウイルス否定試験	陰性	陰性
hCMV ウイルス否定試験	陰性	陰性
EBV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HPV B-19 ウイルス否定試験	陰性	陰性
SV40 ウイルス否定試験	陰性	陰性
AAV ウイルス否定試験	陰性	陰性

表 2 293T/17 WCB の品質試験の試験結果

試験項目	規格	結果 (Lot. LV201307)
細胞生存率試験 (トリパンブルー法)	>50%	78.7%
アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定	ヒト	ヒト
マイコプラズマ否定試験 (欧州薬局方)	陰性	
無菌試験	適合	
In vitro ウイルス試験	陰性	
In vivo ウイルス試験	陰性	

II. 試験方法の概要

1. 細胞生存率試験 (トリパンブルー法)

MCB を融解後、トリパンブルー溶液で1区画の細胞数が30~100個となるように希釈し、血球計数盤を用いて上下の計算室の生細胞 (トリパンブルーで染まらない細胞) 及び死細胞 (トリパンブルーで青く染まった細胞) を計測し、以下の式で生細胞濃度、細胞生存率を求める。

生細胞濃度 (cells/mL) = 生細胞の総平均値 × 10,000 × 希釈倍率

総細胞濃度 (cells/mL) = 総細胞の総平均値 × 10,000 × 希釈倍率

細胞生存率 (%) = 生細胞濃度 ÷ 総細胞濃度 × 100

2. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定

MCB を拡大培養し生細胞を検体とする。細胞抽出液を調製し、アガロースゲル電気泳動を実施する。アガロースゲル上に分離された細胞抽出液中の各種の酵素について活性染色を行なう。各種酵素の電気泳動での移動距離を標準移動距離と比較して、そのパターンが最も一致する生物を、その細胞の由来生物と判定する。

3. マイコプラズマ否定試験 (欧州薬局方)

1) 培養法:

① マイコプラズマが増殖可能な寒天培地に MCB 破砕液を接種し、微好氣的条件で 35~37°C において 14 日間以上培養する。

② マイコプラズマが増殖可能な液体培地に試料溶液を接種し、密栓して 35~37°C において 21 日間培養する。

③ 試料溶液を接種した液体培地より、接種後 3±1 日目、7±1 日目、14±1 日目及び 20±1 日目に寒天培地上にその培地を接種し、これらを微好氣的条件下 35-37°C で

14日間（但し20±1日目に接種したものは7日間）以上培養する。

①から③について、マイコプラズマの生育の有無を調べる。

2) DNA 染色法：

MCB 破砕液を Vero 細胞に接種し、3日間培養する。スライド付の培養容器に継代後、3-5日間培養する。培養後、スライド上の培養細胞を固定して DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡にてマイコプラズマの存在を検鏡する。

4. 無菌試験（欧州薬局方）

MCB 製造量の2%分を検体とする。検体を液状チオグリコール酸培地（TGC 培地）またはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（SCD 培地）に接種し、TGC 培地は30~35°Cで、SCD 培地は20~25°Cで14日間培養し、菌の発育の有無を確認する。培養最終日に検体によって培地が混濁し判定が困難な場合、培養液を新しい培地に接種して、元の培地と共に4日間以上培養し、菌の発育の有無を確認する。

5. In vitro ウイルス試験

検体を各指標細胞（MRC-5、Vero、NIH3T3）に接種後、36±2°C、5%炭酸ガス条件下で28日間培養し（期間中、必要に応じて継代を行う）、ウイルス特異的な細胞変性効果（CPE）出現の有無を観察する。

培養28日目の細胞について、ヒトO型、モルモット及びニワトリの混合赤血球に対する吸着反応の有無を試験する。

また、培養28日目の培養上清を用いて、ニワトリ、モルモット及びアカゲザルの各赤血球に対する凝集反応の有無を試験する。

6. In vivo ウイルス試験

検体を、モルモット、成熟マウス、乳のみマウス、及び発育鶏卵に接種し、病原体による感染の有無を確認する。

モルモットと成熟マウスは28日間、乳のみマウスは14日間観察する。また乳のみマウスは14日目に安楽死後、破砕して新たな乳のみマウスに接種し、14日間観察する。

発育鶏卵の尿膜接種群では、接種後1日目と3日目に開卵し観察する。開卵後の尿膜液を再度接種し、接種後1日目と3日目に開卵し観察する。卵黄嚢接種群は接種後1日目と9~12日目に開卵し観察する。開卵後の卵黄嚢を破砕し、再度接種し、接種後1日目と9~12日目に開卵し観察する。

モルモットと発育鶏卵の尿膜接種群ではヒトO型、モルモット、及びニワトリの各赤血球に対する凝集試験を行う。

7. In vitro ウシウイルス／ブタウイルス試験

検体を各指標細胞 (ST, BT, Vero) に接種後、 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、5%炭酸ガス条件下で 21 日間以上培養し (期間中、継代を行う)、ウイルス特異的な細胞変性効果 (CPE) 出現の有無を観察する。

さらに、培養終了後の細胞について、ウイルス特異的抗体を用いた蛍光免疫染色により、蛍光の有無を試験する。

8. 形質転換試験

軟寒天コロニー法により、形質転換の有無を測定する。各細胞の培養培地より終濃度 0.5% Agar の軟寒天を調製する。軟寒天内に細胞を (コロニー形成の判定が容易な) 適切な濃度で播種し、 37°C 5% CO_2 の条件で 14 日間培養する。培養後の軟寒天内のコロニー形成の有無を判定する。

9. レトロウイルス粒子試験

固定化した後薄切した細胞を電子染色し、透過電子顕微鏡により観察し、ウイルス粒子の有無を測定する。

10. In vitro レトロウイルス試験 (培養法)

検体を 293 細胞に感染し、ウイルスの増幅工程を経た上で、RTase の活性測定 (FPERT assay : Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase) を行なう。活性がないとき陰性と判定する。

11. In vitro レトロウイルス試験

検体を直接 RTase の活性測定 (FPERT assay : Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase) を行なう。活性がないとき陰性と判定する。

12. PCV/BCV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を PCV/BCV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の PCV/BCV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

13. HIV-1/2 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) を

スパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HIV-1/2 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HIV-1/2 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

14. HTLV-1/2 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HTLV-1/2 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HTLV-1/2 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

15. HAV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) をスパイクした検体より、RNA を抽出する。抽出した RNA を HAV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム RT-PCR 反応を行い、検体中の HAV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

16. HBV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HBV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HBV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

17. HCV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) をスパイクした検体より、RNA を抽出する。抽出した RNA を HCV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム RT-PCR 反応を行い、検体中の HCV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照に

についても同時に実施する。

18. HHV-6/7/8 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HHV-6/7/8 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HHV-6/7/8 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

19. hCMV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を hCMV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の hCMV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

20. EBV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を EBV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の EBV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

21. HPV B-19 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HPV B-19 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HPV B-19 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

22. SV40 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) を

スパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を SV40 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の SV40 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

23. AAV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を AAV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の AAV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

別紙 8 治療施設の地図及び見取り図

I 自治医科大学医学部附属病院の周辺地図

自治医科大学医学部附属病院の所在地である栃木県下野市薬師寺 3311-1 周辺の地図を示す。自治医科大学医学部附属病院は黒線枠内、自治医科大学とちぎ子ども医療センターは赤線枠内である。

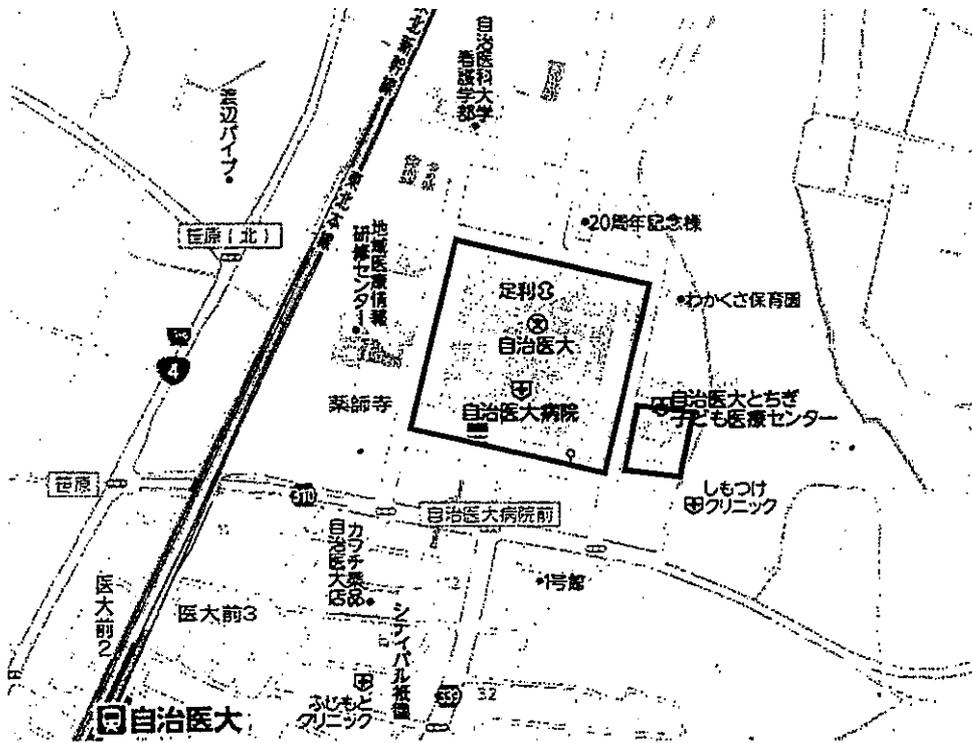


図. 自治医科大学医学部附属病院の周辺地図

自治医科大学附属病院を黒線枠、自治医科大学とちぎ子ども医療センターを赤線枠で示した。

II 自治医科大学の平面図

自治医科大学医学部附属病院及び自治医科大学医学部とちぎ子ども医療センター周辺の平面図を以下に示す。

本遺伝子組換え生物の保管は自治医科大学医学部附属病院本館、投与は自治医科大学医学部附属病院新館にて実施し、投与後の患者は自治医科大学医学部附属病院とちぎ子ども医療センター病棟にて管理する。

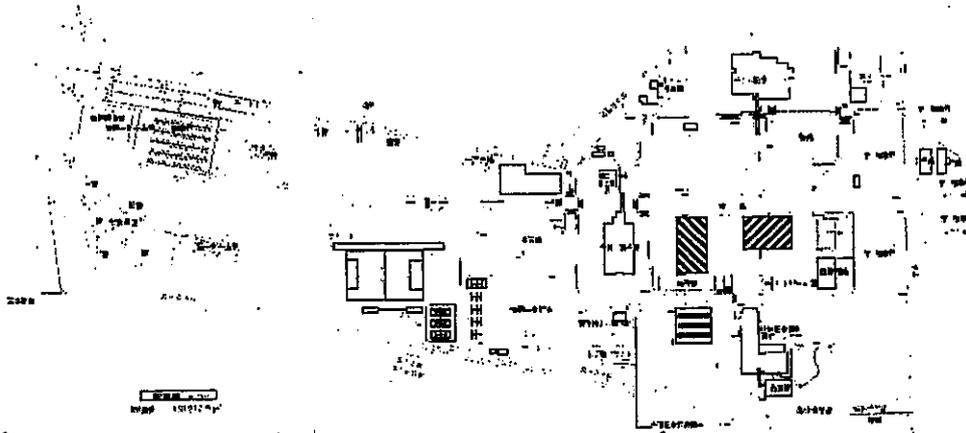


図. 自治医科大学構内敷地図

本遺伝子組換え生物の保管は自治医科大学医学部附属病院本館 1 階の無菌細胞調製室 (右上がり斜線枠内) にて、患者への投与は自治医科大学附属病院新館 (右下がり斜線枠内) 3 階手術室にて、投与後の患者の管理は自治医科大学とちぎ子ども医療センター病棟 (横線枠内) 3 階 PICU、4 階又は 2 階個室病室にて実施する。自治医科大学とちぎ子ども医療センター病棟と自治医科大学附属病院新館は渡り廊下で接続されている。

Ⅲ 本遺伝子組換え生物を保管する施設の平面図

本遺伝子組換え生物の保管はP2レベルの実験室である自治医科大学付属病院本館1階輸血細胞移植部細胞調製室に設置した超低温フリーザー内に保管する。

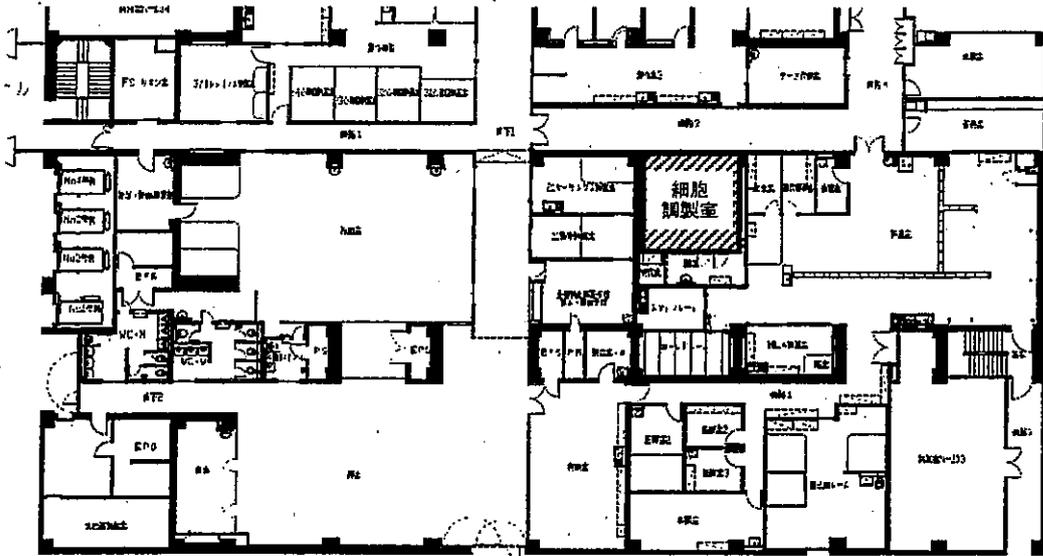


図. 自治医科大学付属病院輸血細胞移植部細胞調製室周辺の見取り図

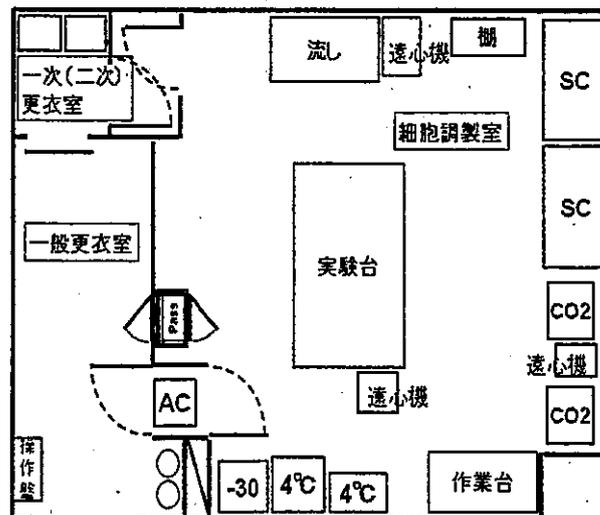


図. 細胞調製室の見取り図

IV 遺伝子治療を行う施設の見取り図

本組換え生物の投与は、自治医科大学医学部附属病院新館 3 階の手術室にて行う。投与終了後、被験者の創部を皮膚欠損用創傷被覆材により密閉し、さらに三角巾で覆う。マスク及びガウンを着用した被験者を、自治医科大学子ども医療センター病棟 3 階 PICU 個室、自治医科大学子ども医療センター病棟 4 階又は 2 階の環境中への拡散防止措置を適切に執った個室病室にて管理する。

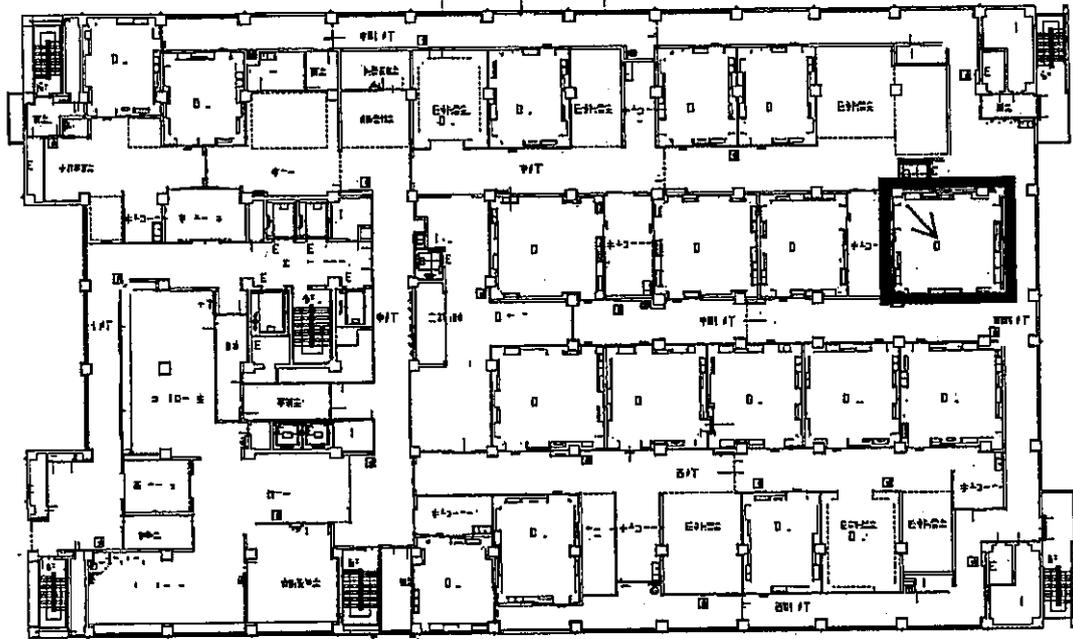


図. 自治医科大学医学部附属病院新館 3 階手術室の見取り図
手術室を赤線枠で示す。

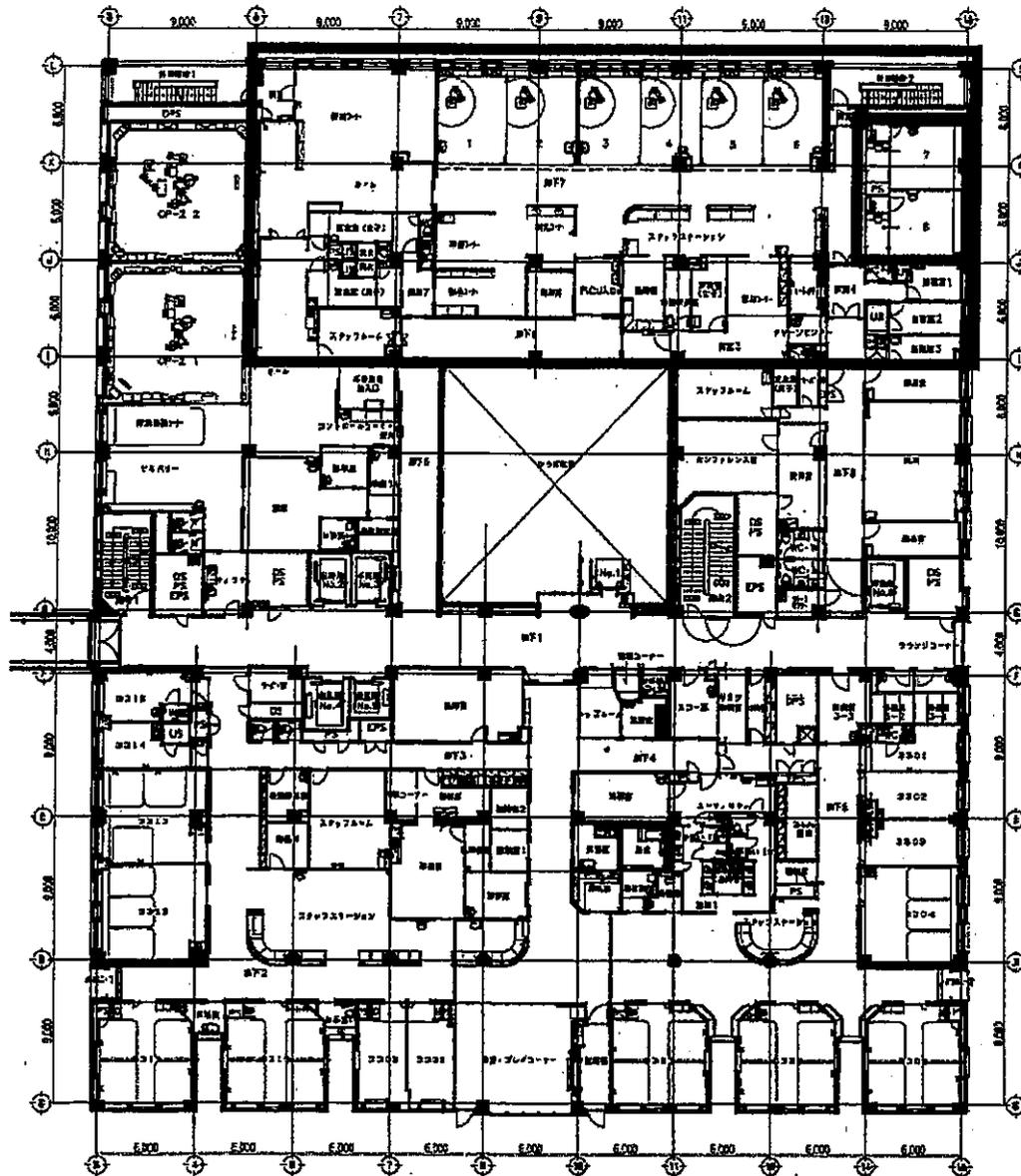


図. 自治医科大学医学部附属病院とちぎ子ども医療センター病棟3階PICU
及びPICU個室の見取り図

PICUを青線枠で、使用するPICU個室を赤線枠で示す。PICU個室は赤線枠内のどちらかを使用する。図面中央左は自治医科大学附属病院新館3階への渡り廊下を示す。

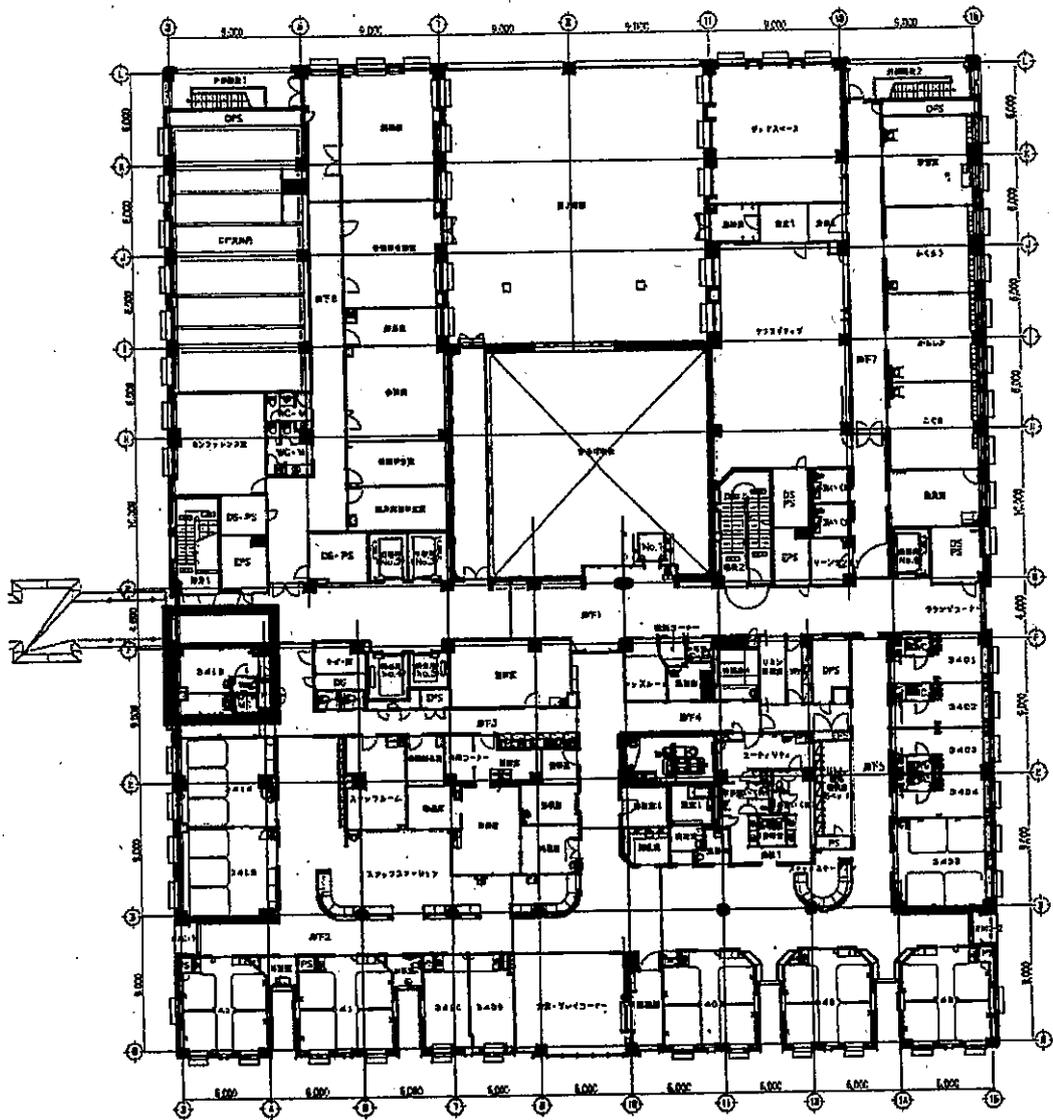


図. 自治医科大学医学部附属病院とちぎ子ども医療センター病棟4階及び病室の見取り図

使用する陰圧個室を赤線枠で示す。陰圧個室は赤線枠内のどちらかを使用する。

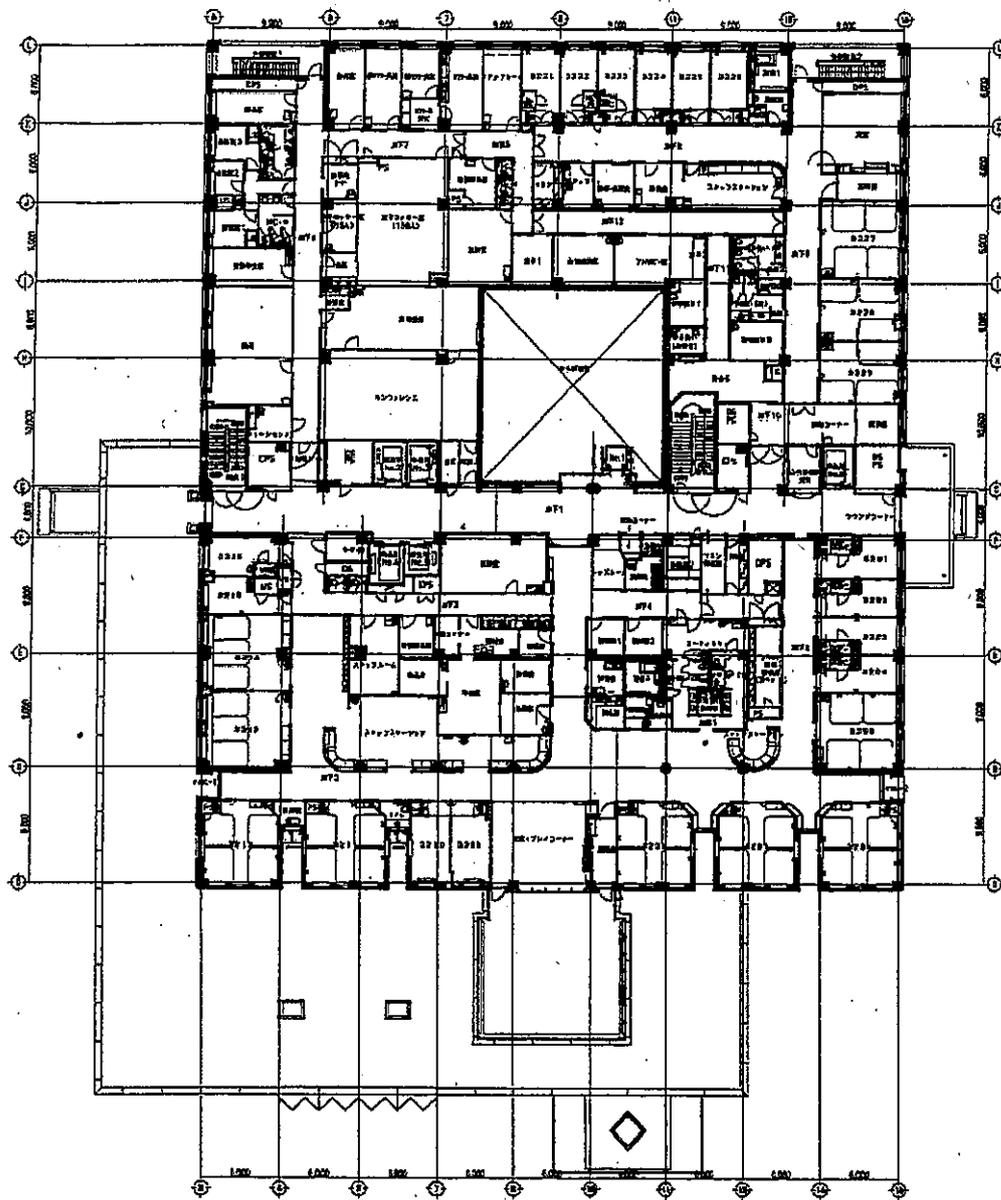


図. 自治医科大学医学部附属病院とちぎ子ども医療センター病棟2階及び病室の見取り図

(目的)

第1条 この規程は、自治医科大学及び自治医科大学附属病院(以下「病院等」という。)から排出される医療廃棄物のうち感染症を生ずる恐れがある廃棄物(以下「感染性廃棄物」という。)について、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。以下「廃棄物処理法」という。)及び医療廃棄物処理ガイドライン(以下「ガイドライン」という。)に沿って、適性に処理するために必要な具体的手順等を定めることを目的とする。

(定義)

第2条 この規程の用語の定義は、当該各号に定めるところによる。

- (1) 医療廃棄物とは、病院等における医療行為等に伴って発生する廃棄物をいう。
- (2) 感染性廃棄物とは、医療廃棄物のうち感染症を生ずるおそれのある廃棄物をいう。
- (3) 非感染性廃棄物とは、医療行為等に伴って発生する廃棄物のうち感染性廃棄物以外の廃棄物をいう。

(感染性廃棄物の範囲)

第3条 感染性廃棄物とは、次の各号に掲げるものをいう。

- (1) 血液、血清、血漿及び体液(以下「血液等」という。)並びに血液製剤(全血製剤、血液成分製剤)
- (2) 手術等により排出される病理廃棄物
- (3) 血液等が付着した鋭利な物
- (4) 病原微生物に関連した試験・検査等に用いられた試験器具、培地及び透析器具
- (5) その他血液等が付着した廃棄物

(感染性廃棄物の管理者)

第4条 病院等より排出される感染性廃棄物を適正に処理するため、管理責任者を置く。

- 2 管理責任者は、病院長をもって充てる。
- 3 管理責任者は、感染性廃棄物分別、収集、運搬、処理及び処分の状況を把握し、医師、看護師及び清掃作業員を指導する。

(分別及び排出方法)

第5条 病院等で発生する医療廃棄物は、次の各号に掲げる分別排出をする。

- (1) 感染性廃棄物
 - (2) 非感染性廃棄物
 - (3) 上記以外の廃棄物(紙くず類)
- 2 前項の区分による廃棄物の分別及び排出方法は、別に定める廃棄物取扱ガイドによる。

(収集・運搬)

第6条 収集・運搬(以下「運搬等」という。)は、運搬途中で内容物が飛散、流出するおそれのない容器及び車両で行うものとする。

- 2 感染性廃棄物と他の廃棄物は混載しないものとする。ただし、すべてのものを感染性廃棄物として取扱う場合は、この限りでない。

(梱包)

第7条 一時保管又は運搬等の目的で梱包する場合は、次の各号に掲げる容器又は材料を、廃棄物の性状に応じて適切なものを選択するものとする。

- (1) 鋭利な物(注射針、メス等)については、耐貫通性のある堅牢な容器
- (2) 固形状のもの(血液の付着したガーゼ等)については、丈夫なプラスチック容器等
- (3) 液状又はでい状のもの(血液等)については、漏洩しない密閉容器

(容器の管理)

第8条 分別排出及び運搬等に用いる容器は、定期的に次の各号に定める点検等を行う。

- (1) 割れ等の異常の点検
- (2) 洗浄及び消毒

(表示)

第9条 感染性廃棄物を梱包した容器及びこれを収納する容器には、感染性廃棄物及び感染性として取り扱う廃棄物である旨を表示する。

(保管)

第10条 保管は、極力短期間とする。

- 2 腐敗性のある感染性廃棄物をやむを得ず長期間保管する場合は、冷蔵庫で保管する。
- 3 保管場所は関係者以外の立入りを禁止するとともに、見やすい箇所に、感染性廃棄物の存在と取扱い注意事項を表示する。

(委託契約)

第11条 収集、運搬、処理及び処分の業務を業者に委託する場合は、廃棄物処理法及びガイドラインに定める委託基準に基づき、事前に委託契約を締結する。

- 2 委託業者は、廃棄物処理法に基づく資格、認可を得た業者の中から、信頼度の高い業者を選定する。

3 受託業者には、原則として再委託を禁止させる。

(委託の実施)

第12条 管理責任者は、受託者の適切な業務の遂行に協力するために、次の各号に定める事項を遵守する。

- (1) 廃棄物の種類、性状、取扱い方法等を告知する。
 - (2) 可能な限り安全な形で排出するように努める。
- 2 感染性廃棄物の処分等を院外で行うため、これらの業務を委託しようとする場合は、受託業者に対しマニフェスト(積荷目録)を交付し、適正に処理を行う。この場合において、マニフェストの保管は5年間とする。

附 則

この規程は、平成3年4月1日から施行する。

附 則(平成14年規程第8号)

この規程は、平成14年4月1日から施行する。

附 則(平成15年規程第12号)

この規程は、平成15年3月17日から施行し、平成14年12月1日から適用する。

附 則(平成21年規程第33号)

この規程は、平成21年4月1日から施行する。

平成 27 年 3 月 2 日

自治医科大学附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施
計画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

自治医科大学附属病院から申請のあった下記の遺伝子治療臨床研究実施計
画について、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 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療
の第 I/II 相臨床研究
申請者：自治医科大学附属病院 病院長 安田 是和
申請日：平成 26 年 7 月 23 日

1. 遺伝子治療臨床研究実施計画の概要

(1) 研究課題名： AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相臨床研究

(2) 申請年月日： 平成 26 年 7 月 23 日

(3) 実施施設： 自治医科大学附属病院
代表者： 病院長 安田 是和

(4) 総括責任者： 自治医科大学
医学部内科学講座 神経内科学部門
教授 (特命教授) 村松 慎一

(5) 対象疾患： パーキンソン病
導入遺伝子： ヒト AADC 遺伝子
ベクターの種類： 2 型アデノ随伴ウイルスベクター (AAV)
用法・用量： 進行期パーキンソン病患者の線条体 (被殻) に、定位脳手術の手法によって、片側の被殻あたり 2 か所、両側で計 4 か所に各 50 μ L (低用量群) 又は 150 μ L (高用量群) の本ベクター (AAV-hAADC-2) を注入する。ウイルスの注入量 (vector genomes : vg) については、1 症例あたり 3×10^{11} vg (低用量群) 又は 9×10^{11} vg (高用量群) となる。
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
目標症例数： 6 例 (低用量群、高用量群各 3 例)

(6) 研究の概略：

本臨床研究は、進行したパーキンソン病患者の線条体 (被殻) に、ヒト AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクターを定位脳手術的に注入し、主要評価項目として安全性を検証するとともに、副次評価項目として有効性及び発現量を評価することを目的とする。

なお、本臨床研究は、過去申請者の施設において実施された臨床研究 (「AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」 (平成 18 年 1 月 25 日申請、平成 21 年 6 月 21 日終了報告。以下「前臨床研究」という。)) の後継に位置付けられる臨床研究であり、前臨床研究とは、ベクターについて製造業者等の製造工程を変更した点や新たに高用量群を設定した点等が異なっている。

なお、申請者により同時に申請された臨床研究 (AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究) とは、対象疾患等で異なるものの、同一のベクターが用いられている点で共通である。

(7) その他（外国での状況等）：

台湾において、本臨床研究と構造的に同一のベクターを用いた AADC 欠損症に対する遺伝子治療が 4 例に対して実施されているが、重篤な副作用は報告されていない。

パーキンソン病に対しては、申請者の施設において前臨床研究が 6 例に対して実施されている。うち 1 例に手術後、静脈性脳出血が認められたが、カニューレの挿入に伴う外科的手技が原因と判断されており、ベクターとの因果関係は否定されている。また、申請者の施設と同様のプロトコルでカリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) においても臨床試験が実施された。

2. 遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会における審議概要

1) 事前の意見・照会事項及びその回答

審査委員会の開催に先立ち、各委員より申請者に対して、遺伝子治療臨床研究実施計画申請書等に係る意見・照会事項を送付し、平成 26 年 10 月 10 日に申請者よりそれに対する回答を得た。主な意見・照会事項及び回答の概要は以下のとおりである。

(審査委員会からの主な意見・照会事項及びそれに対する回答)

【AADC 欠損症に係る臨床研究と共通する指摘事項】

ア. 前臨床研究で用いたベクター（以下「前ベクター」という。）と本ベクターとの相違点について、説明すること。

【回答】製造業者の変更や産生効率を上昇させるための遺伝子 (Bcl-XL、miR342) を使用する等の製造工程の変更を行っているものの、最終製剤であるベクターの構造自体は、前ベクターと同一である。

イ. 前ベクターの研究結果（基礎・臨床）を参考資料として利用するためには、本ベクター及び前ベクター間の同等性を示す必要がある。ア. で回答した本ベクターと前ベクターとの相違点を踏まえ、両ベクター間の同等性について、安全性、有効性に関する評価結果を提示すること。

【回答】今回新たに用いたプラスミド pRC-BI-khB342-2 が本ベクター最終製剤中に残存する量は、 6.6×10^7 copies/mL で、前ベクター最終製剤中に含まれるプラスミド pRC 量 (9.84×10^7 copies/mL) 以下であった。また、極めて微量のプラスミドが脳内に注入されても細胞に取り込まれて遺伝子発現を生じる可能性はほとんどないと考えられる。なお、最終製剤と同一の製法により作製した試験製造ベクターに対して非臨床試験を実施し、モデルマウスへの脳内投与で AADC 遺伝子の発現を確認しており、特段の組織障害も認めていない。

さらに、試験製造した本ベクターと前ベクターのドーパミン産生量を比較した結果では、それぞれ 25.6 pmole/tube、27.7 pmole/tube と同等であった。

また、製造方法のうち、重要な部分については、責任医師を通じて、過去の製造業者の製造法を参照し、実質的な問題がないことを確認した。

ウ. ベクター希釈用の溶液として、国内承認経口医薬品を使用することについて、脳内投与であるにもかかわらず経口医薬品レベルの製品を使用して問題がないか再検討すること。

【回答】ご指摘を受け、希釈用には注射用として承認されている生理食塩水を使用することとした。

エ. 前臨床研究時から、除外基準「AAV-2に対する中和抗体価が高い患者」を削除した理由を説明すること。

【回答】過去の臨床研究の報告を踏まえ、血液中の AAV-2 に対する中和抗体は、肝臓や筋肉への投与と異なり脳内への直接注入では遺伝子導入効率に影響する可能性は低いと考える。

【本臨床研究に対する指摘事項】

オ. 高用量群（3症例）では前臨床研究の3倍量（ 9×10^{11} vg）が投与されることについて、経緯及び妥当性を説明し、研究実施計画書等に記載すること。

【回答】被殻におけるドパミン産生の不均衡はジスキネジア発現の一因となる可能性があるが、前臨床研究と同様に 3×10^{11} vg の AAV-hAADC-2 を被殻に投与した米国 UCSF の臨床研究では、PET 計測から推測されるベクターの分布は被殻の 25% 以下に留まると報告されていることから、本臨床研究においては高用量群を設定することとした。なお、現在、米国 UCSF では、 7.5×10^{11} vg と 2.3×10^{12} vg の 2 群を設定した臨床研究を開始しており、本臨床研究の高用量群は、その中間の量に相当する。

また、ご指摘を踏まえ、研究実施計画書等には、3 倍量が設定された理由として、「被殻のより広範な領域への遺伝子導入を目標として 3 倍量の第 2 群を設定する。」の文言を追記する。

カ. 前臨床研究と比較して、注入速度が3倍になっていることの安全性を踏まえ、研究実施計画概要書等に記載すること。

【回答】ご指摘を踏まえ、研究実施計画書等に「なお、注入速度は、前回の臨床研究の 3 倍の $3 \mu\text{L}/\text{min}$ に設定しているが、手術時間の短縮が期待できる。台湾で実施された AADC 欠損症に対する遺伝子治療では $3 \mu\text{L}/\text{min}$ としており、ベクター注入に関連した有害事象を認めていない。」を追記する。

キ. 本臨床研究の目的が「国産ベクターの安全性の検証」とされている一方で、同意・説明文書の臨床研究の概要の項には、有効性のみが記載されているため、記載を適切に整備すること。

【回答】ご指摘を踏まえ、当該項に下記の文言を追記する。

「今回の臨床研究の主な目的は、この治療法の安全性の確認であり、どのような副作用が起こるのか、ということ調べます。次にパーキンソン病の症状がどの程度改善するか、ということ併せて調べます。」

2) 審査委員会における審議

① 開催日時：平成26年11月17日(月) 15:00~18:00

② 議事概要：

平成26年7月23日付けで自治医科大学附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：パーキンソン病）についての審議を行った。

まず、実施計画について総括責任者等より説明を受けた後、委員間で実施計画の妥当性等について審議が行われた。その結果、申請のあった実施計画について、概ね妥当であるが、AAV ベクターの投与器具に係る新規性及び安全性、AAV ベクターに残存するプラスミドの安全性並びに AAV ベクターの作製工程の変更に伴う活性の差違等について確認した後、再生医療等評価部会に報告することとされた。

なお、指摘事項は平成26年12月1日に発出され、申請者より平成26年12月10日に回答が提出された。

指摘事項の内容及び回答の概要は以下のとおりである。

(審査委員会からの主な意見・照会事項及びそれに対する回答)

ア. 今回 AAV ベクターの注入に用いる薬事未承認の器具（注入用カニューレ及びポンプ）について、安全性・有効性・品質に問題がないか説明すること。

【回答】注入用カニューレは、台湾の AADC 欠損症に対する遺伝子治療で既に使用されており、特段の問題は生じていない。

注入用ポンプは、ヒトに対して初めて使用されるものではあるが、小動物の静脈内投薬用ポンプなど、高精度の微量注入装置に使用されている電子基盤を搭載し、50 μ L 注入時の誤差は1 μ L 未満である。また、注入速度と注用量を各2段階のみに限定した単純な制御機構として誤動作を防止しており、安全性等に問題はないと考える。

イ. 本ベクターの作製過程において、前回の臨床研究とは異なるプラスミドが用いられていることについて、これらのプラスミドの残存が患者に与える影響を説明すること。

【回答】脳内に投与されたプラスミドが、何のキャリアーもなく細胞に導入されることはほとんどないと考えられるが、万一、導入された場合は、Bcl-xL 遺伝子と miR342 遺伝子が発現する可能性が考えられるため、それぞれの因子について文献検索を行った。Bcl-xL は、脳内で何らかの疾患の発症と関係するという明確な論文は見いだせなかったが、最近の総説には、むしろ神経保護作用があることが記載されている。一方、miR342 は、アルツハイマー病のモデルマウスで軸索障害との関連が示唆されていたが、これらのプラスミド由来産物は残存量が極めて少なく、細胞への導入も困難であることから、脳内で発現することはほとんどないと予想されます。

ウ、本ベクターと前ベクターとの比活性について説明し、投与されるベクターが前回よりも活性量としてはより高い量が投与されることにならないか説明すること。

【回答】試験製造した本ベクターと前ベクターとを、培養細胞におけるドパミン定量法で直接比較したところ、本ベクター（60.1 nmole/ml）と前ベクター（55.5 nmole/ml）の活性はほぼ同等であった。なお、動物実験では、より高濃度（ 1×10^{13} vg/ml）で細胞あたりの AADC 発現量が 5 倍以上高いと予想されるベクターをラットとカニクイザルの脳内に注入しているが、組織障害や運動機能障害は認められていないことから、本ベクターの比活性が前ベクターよりも、仮に数倍高い場合においても有害事象が生じることはまずないと考える。

3. 遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会の検討結果

自治医科大学附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：パーキンソン病）に関して、遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会は、主として科学的観点から以上のおり論点整理を進め、それらの結果を実施計画及び患者への同意説明文書に適切に反映させた。

その上で、本審査委員会は本実施計画の内容が科学的に妥当であると判断した。

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成26年 7月23日

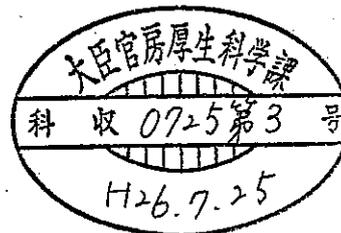
厚生労働大臣 殿

実施施設	所在地	〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1
	名称	自治医科大学附属病院 (電話番号) 0285-44-2111 (FAX 番号) 0285-40-8303
	代表者 役職名・氏名	自治医科大学附属病院長 安田 是 和 (職印)

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
AADC発現AAVベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第I/II相臨床研究	自治医科大学 医学部内科学講座 神経内科学部門 教授 (特命教授) 村松 慎一 (印)



遺伝子治療臨床研究 実施計画 概要書

平成 26 年 11 月 12 日 (申請年月日)

研究の名称	AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相臨床研究		
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 教授 (特命教授) 内科学講座 神経内科学部門	
	氏名	村松 慎一	
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 安田是和	
	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
	小澤敬也	自治医科大学・免疫遺伝子細胞治療学・客員教授	副責任医師, ウイルスベクターに関する全般管理
	渡辺英寿	自治医科大学・脳神経外科学・教授	副責任医師, 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
	安藤喜仁	自治医科大学・神経内科学・助教	患者評価・ケア統括
	小野さやか	自治医科大学・神経内科学・助教	適応患者の選択・評価および PET 解析
	奈良優子	自治医科大学・神経内科学・非常勤医員	適応患者の選択・評価および PET 解析
	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品質検査と管理・検出
	卜部匡司	自治医科大学・遺伝子治療研究部・講師	ウイルスベクターの解析
	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	
佐藤俊彦	宇都宮セントラルクリニック・院長	PET 計測	
外部協力者	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	
峰野純一			
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 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相臨床研究」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

	<p>c. 遺伝子導入療法</p> <p>細胞移植に伴う問題点を回避する方法として、遺伝子導入療法が考えられる。脳内に存在する自己細胞に遺伝子を導入することによって、失われた神経細胞の働きを遺伝子導入された自己細胞に代行させる。導入する遺伝子の種類によって、三種類の戦略が考えられている。第1はドパミン産生に関わる酵素遺伝子を導入してドパミンを産生させる方法である。ドパミン合成に必要な酵素遺伝子を線条体の神経細胞に導入してドパミンを産生させることで症状が改善することが期待される。</p> <p>遺伝子導入療法の第2の戦略は、線条体の細胞に神経栄養因子を産生させる方法である。神経細胞が長期間にわたって生存していくためには、神経栄養因子の存在が必要である。パーキンソン病ではドパミン細胞の生存に必要な栄養因子の不足が、ドパミン細胞の変性脱落を加速している可能性がある。そこで神経膠細胞由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor : GDNF) をはじめとするドパミン細胞の栄養因子を線条体に補充する治療が考案されている。</p> <p>第3の戦略は、抑制性伝達物質 GABA の合成酵素である glutamic acid decarboxylase (GAD-65 および GAD-67) の遺伝子を視床下核の細胞に導入して、視床下核の出力を興奮性から抑制性に変換する方法である。パーキンソン病では視床下核の神経細胞の活動性が異常に亢進しており、これが症状発現に大きく関与していることが、様々なデータから推察されている。</p> <p>このように、従来の薬物療法や手術療法では L-dopa の効果が減弱した進行例に対する治療には限界があり、また遺伝子導入以外の新しい治療法はそれぞれの問題があつて、直ちに広く臨床応用することは難しい。本研究では進行したパーキンソン病に対する新しい治療法として、ドパミン合成を促進する遺伝子治療を選択した。予定されている AADC 遺伝子の導入と L-dopa の経口投与を組み合わせる方法は安全性も高く、動物実験において有効性も確認されていることから、遺伝子治療臨床研究として、この方法を採用した。</p>
<p>6 遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質</p> <p>① 人に導入する遺伝子の構造</p> <p>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 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。</p> <p>② 人に導入する遺伝子の性質</p> <p>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。</p> <p>③ 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性</p> <p>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 (5-hydroxytryptophan) 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。</p> <p>(2) 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質</p> <p>本計画では他の組換え DNA は使用しない。</p>

(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

パーキンソン病では、線条体に投射している黒質ニューロンの脱落によって、線条体のドパミンが欠乏している。このため、黒質の神経細胞や、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出来ること、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良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凝固因子発現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は、AADC以外にも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すでに行われている。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ンドウイルス属に分類される直径約26nmのエンベロープを持たない球形ウイルスである。VP1(82kDa)、VP2(65kDa)、VP3(60kDa)が1:1:10の比率で合計60分子が集まって約3,600kDaのキャプシドを構成している。ゲノムは4,679ヌクレオチドから成る1本鎖DNA(約1,500kDa)であり、プラス鎖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時に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きわめて安定で、pH3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する。

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種の遺伝子が発現可能な

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 Poloxamer188 (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 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。

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ル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渡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 2kb 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。

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 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。更に 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同相組み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。

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 1/30 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。サル脳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り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見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、患者の尿、便、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、前回の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癌遺伝子が活性化したり、癌抑制遺伝子が不活化されたりすることで発癌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。

	<p>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。</p> <p>(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。</p> <p>(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 <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。</p> <p>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。</p> <p>③ 被検者に投与する細胞の安全性 被験者には細胞成分を投与することはない。</p>
<p>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</p>	<p>当施設で診療している多数の進行期パーキンソン病患者は、新しい治療法に大きな期待を寄せている。パーキンソン病モデルサル被験への AAV-hAADC-2 注入による前臨床研究では、AADC が長期間被験内で発現して治療効果が認められ、かつ副作用は見られず安全性が確認されている。さらに当施設で薬物治療で十分な効果が得られなくなった進行したパーキンソン病患者に対して 6 名の遺伝子治療を施行し既に安全性と有効性を確認している。また当施設と同様なプロトコルにより Avigen/Genzyme 社から供給された AAV ベクターを使用した臨床試験が UCSF で実施された。米国では、AAV ベクターを使用して抑制性神経伝達物質の合成酵素(GAD)遺伝子を視床下核に導入する臨床試験と、神経栄養因子 neurturin 遺伝子を被験に導入する臨床試験も実施された。さらに、台湾で AADC 欠損症の小児に対して AAV ベクターを使用して被験に AADC 遺伝子を導入する遺伝子治療が実施されている。これまで、AAV ベクターに関連した副作用は報告されていない。</p> <p>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。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。</p>
<p>9 遺伝子治療臨床研究の実施計画</p>	<p>(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画 本研究は患者間用量比較オープン試験であり、臨床試験の第 I/II 相に相当する。</p> <p>① 研究の目的 本臨床研究の主要評価項目は、進行期パーキンソン病患者被験内への AAV-hAADC-2 注入療法の実施である。副次的評価項目は、①AAV-hAADC-2 注入療法の有効性であ</p>

り、その判定は症状日誌、臨床的評価、服用するL-dopaの必要量に基づいて行う。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。被殻のより広範な領域への遺伝子導入を目標として3倍量の第2群を設定する。

② AAV-hAADC-2 の投与

進行期パーキンソン病患者の被殻に、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1群3例で2群を予定している。AAV-hAADC-2 の注入量は全体で200 μ L (第1群) または600 μ L (第2群) とし、被殻内の4ヶ所に分けて注入する。具体的には片側の被殻あたり2ヶ所、両側で計4ヶ所に各々50 μ L (第1群) または150 μ L (第2群) を注入する。第1群での注入量 (vector genomes : vg) は1症例あたり3 $\times 10^{11}$ vg とし、第2群では9 $\times 10^{11}$ vg を注入する。注入治療後の安全性の評価および治療効果の判定に関しては、各群とも同じとする。なお、注入速度は、前回の臨床研究の3倍の3 μ L/min に設定しているが、手術時間の短縮が期待できる。台湾で実施されたAADC欠損症に対する遺伝子治療では3 μ L/min としており、ベクター注入に関連した有害事象を認めていない。

③ 対象患者

対象は自治医科大学付属病院あるいはその関連病院に通院中の、進行期パーキンソン病患者6症例とする。

④ 評価項目 (詳細は実施計画書に記載)。

1) 一般身体所見 (バイタルサインを含む)、2) 神経学的所見、3) 有害事象、4) 抗パ
薬 (L-dopa) の必要量、5) 併用薬、6) 臨床検査 (血液検査、生化学検査、免疫検査、PCR
分析)、7) 心電図、8) 脳のPET scan、9) 脳のDaTScanを用いたSPECT検査、10) 脳
のMRI、11) 患者の記載する症状日誌、12) MDS-UPDRS、13) Hoehn & Yahr重症度、14)
Geriatric Depression Scale (GDS) のshort form、15) Mini-Mental State Examination (MMSE)、
16) Montreal Cognitive Assessment (MoCA)

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止めることができる。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。

対象者が参加を取りやめた場合、次の基準にしたがって他の対象者に振り替えることと
する。

- ① 対象者が遺伝子導入以前に参加を取りやめた場合、次の対象者に振り替える。
- ② 対象者が遺伝子導入後に参加を取りやめた場合、次の対象者への振り替えは
行わない。しかしながら、安全性に関する経過観察は継続する。

(2) 被験者の同意の取得方法

本臨床研究に参加する候補者は、自治医科大学付属病院あるいはその関連病院への通
院患者の中から募集する。募集に当たっては、この臨床治療研究についての情報を、そ
れらの病院に勤務する神経内科医に広く提供する。被験者に対しては臨床治療研究実施
医師より、臨床研究「パーキンソン病遺伝子治療」参加のしおりを基にして十分な説明
を行い、文書による同意を得る。

(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10年後まで長期フォローする。目標症例数
は6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) に自治医科大学付属病院に入院する。

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。

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4cm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）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。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。

PET scanとDaTScanを用いたSPECT検査はBase line（Day -14～1）と評価9（Month 6）に実施する。AADCのトレーサーであるFMTを使用したPET scan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。

AAVカプシド蛋白質に対する抗体は、screening visitと評価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

	<p>可能性を完全に否定することはできない。患者には避妊するよう指導し、将来子供をもうけることを希望する患者には、治療前に精子を凍結保存しておくようカウンセリングを行う。</p> <p>b. 手術による合併症</p> <p>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5%以下で、出血、感染および麻酔の合併症が主である。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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10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。</p>
備考	<p>1) 被験者の同意取得について：被験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。</p> <p>2) 前回実施した臨床研究との相違：今回申請している臨床研究は、2007年から自治医大で実施した「AADC発現 AAV ベクター線条体内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」と同様に、安全性を主要評価項目とし、副次評価項目は、①治療の有効性、および②AAV-hAADC-2 注入量と AADC 発現量との関係評価である。相違点は、今回の臨床研究では、国産の AAV-hAADC-2 を使用することと、前回と同様の 3×10^{11} vg に加え、高用量の 9×10^{11} vg を投与することである。安全性の評価は、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見、有害事象、抗パーキンソン病薬の必要量、併用薬、臨床検査について行う。①の効果判定は症状日誌、臨床的評価、服用する L-dopa の必要量に基づいて行う。②の発現量は FMT-PET によって判定する。</p>

遺伝子治療臨床研究実施計画書

課題名

「AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与による
パーキンソン病遺伝子治療の第 I/II 相
臨床研究」

自治医科大学附属病院

第1版：2013年12月11日作成

第2版：2014年4月2日作成

第3版：2014年5月2日作成

第4版：2014年6月9日作成

第5版：2014年10月10日作成

目 次

1	遺伝子治療臨床研究の名称.....	1
2	総括責任者及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
	(1) 総括責任者の氏名.....	1
	(2) 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割.....	1
3	実施施設の名称及びその所在地.....	2
4	遺伝子治療臨床研究の目的.....	2
5	遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由.....	2
	(1) 治療を直接の目的とした遺伝子治療臨床研究を行う場合.....	2
	① 対象疾患に関する現時点での知見.....	2
	② 当該遺伝子治療臨床研究の概要.....	4
	③ 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由.....	4
6	遺伝子の種類及びその導入法.....	8
	(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質.....	8
	① 人に導入する遺伝子の構造.....	8
	② 人に導入する遺伝子の性質.....	9
	③ 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性.....	10
	(2) 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質.....	10
	(3) 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由.....	10
	(4) 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由.....	10
	(5) ウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合.....	11
	① AAV-hAADC-2 の野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響.....	11
	② AAV-hAADC-2 の作製方法.....	12
	③ AAV-hAADC-2 の構造.....	14
	④ AAV-hAADC-2 の生物学的特徴.....	14
7	安全性についての評価.....	16
	(1) 遺伝子導入方法の安全性.....	16
	① 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの純度.....	16
	A) プラスミド MWCB の作製.....	16
	B) プラスミドベクターの製造.....	18
	C) 293T/17 MCB の作製.....	19
	D) 293T/17 WCB の作製.....	21
	E) AAV-hAADC-2 の製造方法.....	23
	② 患者に投与する AADC 遺伝子の純度及びその安全性.....	24
	③ 増殖性ウイルスの出現の可能性.....	24
	④ 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの細胞傷害性.....	25

⑤	体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性.....	25
⑥	患者以外の人に遺伝子が導入される可能性.....	25
⑦	染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点.....	25
⑧	がん原性の有無.....	26
(2)	遺伝子産物の安全性.....	26
(3)	細胞の安全性.....	26
①	培養細胞の純度.....	26
②	細胞の遺伝子型, 表現型の安全性.....	26
③	被験者に投与する細胞の安全性.....	26
(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.....	26
(5)	これまでに実施された臨床試験における成績.....	28
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.....	28
9	遺伝子治療臨床研究の実施計画.....	29
(1)	遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画.....	29
(2)	被験者の選択基準及び除外基準.....	31
(3)	被験者の同意の取得方法.....	32
(4)	期間及び目標症例数.....	34
(5)	遺伝子治療臨床研究の実施方法.....	34
①	対照群の設定方法.....	34
②	遺伝子導入方法 (安全性及び有効性に関する事項を除く).....	34
③	前処置及び併用療法の有無.....	35
④	検査項目及び観察項目.....	35
⑤	予測される副作用及びその対処方法.....	39
⑥	遺伝子治療臨床研究の評価方法, 評価基準及び中止判定基準.....	40
⑦	被験者の安全性確保および健康被害補償.....	42
⑧	症例記録に関する記録用紙等の様式.....	42
(6)	前回実施した臨床研究との相違.....	43
10	被験者のプライバシー保護と秘密の保全.....	43
(1)	実施施設での安全管理措置.....	43
(2)	本研究における個人情報の保護.....	44
(3)	第三者提供の制限.....	44
(4)	個人情報の開示.....	44
(5)	記録の保存.....	45
11	本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり.....	45
12	成績の公表の方法.....	45
別表 2	実施計画に添付すべき資料.....	47
1.	研究者の略歴及び研究業績.....	47
2.	実施施設の施設設備の状況.....	56
3.	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	

研究成果.....	56
(1) 培養細胞を用いた研究の成果.....	57
(2) 実験動物を用いた研究の成果.....	58
(3) 関連する研究の成果.....	62
4. 遺伝子治療臨床研究に関連する実施施設以外の内外の研究状況.....	64
(1) カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) で行われた動物実験の結果.....	64
(2) 実施施設以外での遺伝子治療臨床研究の成果.....	65
5. その他必要な事項.....	65
(1) 遵守する法令/省令など.....	65
(2) 類似の遺伝子治療臨床研究の成果.....	65
(3) 自治医科大学附属病院内規約.....	65
(4) 参考文献.....	79

資料 1 : 評価スケール (Modified Hoehn & Yahr 重症度, MDS-UPDRS, MMSE, MoCA, GDS)

資料 2 : 臨床研究「パーキンソン病遺伝子治療」参加のしおり

資料 3 : 注入用カニューレおよびポンプ

資料 4 : パーキンソン病に対する遺伝子治療の臨床試験

資料 5 : AADC 遺伝子治療の長期成績

資料 6 : 評価スケジュール

資料 7 : 外科手術マニュアル

資料 8 : パーキンソン病臨床研究対比表

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-B1-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-B1-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

参考資料 21: 受け入れ試験

1 遺伝子治療臨床研究の名称

AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第Ⅶ相臨床研究

2 総括責任者及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) 総括責任者の氏名

村松 慎一 自治医科大学医学部 教授 (特命教授)
内科学講座 神経内科学部門
遺伝子治療臨床研究の総括

(2) 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割

小澤敬也	自治医科大学・免疫遺伝子細胞治療学・客員教授 副責任医師, ウイルスベクターに関する全般管理
渡辺英寿	自治医科大学・脳神経外科学・教授 副責任医師, 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
安藤喜仁	自治医科大学・神経内科学・助教 患者評価・ケア統括
小野さやか	自治医科大学・神経内科学・助教 適応患者の選択・評価および PET 解析
奈良優子	自治医科大学・神経内科学・非常勤医員 適応患者の選択・評価および PET 解析
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品質検査と管理・検出
卜部匡司	自治医科大学・遺伝子治療研究部・講師 ウイルスベクターの解析
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
佐藤俊彦	宇都宮セントラルクリニック・院長 PET 計測
外部協力者	
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 AAV ベクターの製造, 品質管理および技術支援

3 実施施設の名称及びその所在地

名称：自治医科大学附属病院

所在地：329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

電話（代表）0285(44)2111

4 遺伝子治療臨床研究の目的

本臨床研究は、進行したパーキンソン病患者の被験に、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、経口投与する L-dopa によってドパミン産生を促し、パーキンソン症状を改善することを目的とする。ドパミンの過剰合成に伴って生じるジスキネジアは L-dopa の投与量を減らすことにより予防する。

今回の臨床研究は、新たに作製した国産のベクター(自治医科大学が製造委託したタカラバイオ社で作製され、同社により直接自治医科大学に供給される)を使用し、その安全性を検証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及びその選定理由

(1) 治療を直接の目的とした遺伝子治療臨床研究を行う場合

① 対象疾患に関する現時点での知見

パーキンソン病は振戦、暴動、筋強剛、姿勢反射障害を主たる症候とし、通常 40-70 歳で発症する進行性の神経変性疾患である。振戦は概して安静時に出現し、病初期には一側性である。衣服の着脱や靴の脱ぎはきなど日常生活動作に時間がかかるようになり、このことはボタンのかけ外しや靴ひもを結ぶなどの指先のこまかい動作において特に目立つ。また、歩行時の腕振り、瞬目、唾液のみこみなど、無意識におこなる動作が少なくなる。姿勢は前屈となり、股関節、膝関節、肘関節が屈曲傾向を示す。病気の進行とともに患者の動作はますます遅くなり、椅子やソファに人形のように身動きもせずすわっているようになる。この段階になると、患者はバランスを失って(立ち直り反射の障害)転倒しやすくなる。もっとも進行した状態では車椅子あるいはベッドに寝たきりとなり、濃厚な介護を要するようになる。

欧米におけるパーキンソン病の有病率は人口 10 万人当たり 120-130 人と推計されている。本邦でのそれは、従来は欧米よりもはるかに少ないと考えられてきたが、最近の調査では欧米とほとんど変わらないことが判明した¹。これは主に人口の高齢化によるものと考えられている。本症の経過には症例差があり、発症から寝たきりになるまでの期間は 3-15 年と幅がある。抗パーキンソン病薬の発達した現在では、発症 15 年を経ても、on 時には約 4 分の 3 の患者が Hoehn-Yahr のステージ分類で III 度以下との報告もある²。

パーキンソン病の病理は、黒質と青斑核のメラニン含有細胞の脱落と Lewy 小体の出現である。黒質のメラニン含有細胞数と体積は加齢でも減少する³。McGeer PL et al. は 80 歳では若年時の 425,000 個から 200,000 個に減少していたと報告している⁴。黒質のメラニン含有細胞の数、密度、および体積は 10 歳、歳をとるごとにそれぞれ 9.8%、7.4%、3.2%減少する⁴。その細胞数は、90 歳代では、10 歳代の約 3 分の 1 に減少している。McGeer PL et al. はパーキンソン病においてはメラニン含有細胞数が同年齢正常対照の約 30%に減少していたと報告した。さらに、Pakkenberg B et al. は、7 例のパーキンソン病患者

者と7例の同年代の正常対照例において黒質のメラニン含有細胞の数を計測した。その結果、正常人の黒質メラニン含有細胞の平均数は550,000個であるのに対しパーキンソン病ではその約70%が脱落していた、とほぼ一致した減少率を記載している⁵。このようにパーキンソン病で見られる黒質メラニン含有細胞の脱落は加齢のみでは説明しがたく、別の要素が関与しているものと考えられる。

黒質のドーパミンニューロンは線条体に投射しているので、黒質ニューロンの脱落によって線条体のドーパミンが欠乏する。ドーパミンニューロンの減少は¹⁸F-fluoro-L-dopaを使ったPET studyによっても示されており⁶⁷、パーキンソニズムを生ずる神経薬理学的背景と考えられている。

パーキンソン病の原因は不明である。原因究明はもっぱら遺伝、毒物、ウイルス、フリーラジカル、視床下部栄養因子欠乏の観点からおこなわれてきた²。これまでのところ、一部の家族性パーキンソン病に限って α -synuclein⁸や parkin⁹などの遺伝子変異が見つかったが、大部分の特発性パーキンソン病では遺伝子変異は明らかになっていない。

毒物に関しては、自然界には存在しない1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) という合成化合物によって黒質ニューロンが脱落してパーキンソニズムが生じることが報告された¹⁰。パーキンソン病はMPTP類似の、しかし、より慢性的に作用する外毒素により生ずる可能性が示されたわけであるが、これまでの精力的な研究にも拘わらずその毒素は特定されていない。

一方、ドーパミンニューロンは上述のように加齢とともに減少し、ドーパミンの分解酵素であるモノアミン酸化酵素の活性は加齢とともに上昇することから、内在毒素説が提唱された。細胞酸化反応により過酸化水素とフリーラジカルが発生し、これを取り除かないとドーパミンニューロンが傷害される。パーキンソン病患者の黒質では、過酸化水素の除去に対して主要な役割を果たす還元型グルタチオンが高度に減少している¹¹。しかしながら、この減少は酸化ストレスをもたらす(酸素ラジカルを増大させる)原因なのか、逆に酸化ストレスの結果(還元型グルタチオンは酸化ストレスで減少する)なのかは未確定である。一方、パーキンソン病患者の黒質ではミトコンドリアの複合体Iの活性が低下していることが示されている^{12,13}が、これは外毒素、酸化ストレス、あるいはミトコンドリアDNAの遺伝的欠陥のいずれでも生じうる。

現在、パーキンソン病に対しては複数の治療法がある。抗パーキンソン病薬(抗パ薬)だけでも数種類、すなわち最も強力なL-dopaのほか、ドーパミン作動薬、モノアミン酸化酵素阻害薬、抗コリン剤、アマンタジンなどが使用可能である。実際には臨床症状に合わせて、これらの中から1つあるいは複数を選んで使用する¹⁴。さらに、視床破壊術や淡蒼球破壊術などの定位脳手術も行われている。加えて脳内の諸核に刺激電極を留置し、前胸部に植え込んだ電気刺激装置によってこの電極を高頻度刺激する深部脳電気刺激療法(deep brain stimulation)も世界各地で行われている¹⁵。本邦でも、2000年4月より、深部脳電気刺激療法に保険が適用されるようになり、当施設でも脳神経外科と神経内科が協力して既に多数例で実施している。また、保険の適用は無いが、修正電気痙攣療法(modified electroconvulsive therapy)も試みられている¹⁶。

しかしながら、これらの治療法はそれぞれに問題点を有している。抗パ薬、特にL-dopaを長期服用するとさまざまな不都合が生じる；①効果の減弱、②運動症状の日内変動、すなわちwearing-off現象やon-off現象、あるいは過剰運動としてのジスキネジア(不随意運動)、③精神症状、すなわち幻覚や妄想がその代表である。これらは、線条体におけるドーパミンニューロンの軸索終末が減少することによって生じると推測されている。L-dopaからドーパミンへの変換は軸索終末で行われるために、これらの軸索終末が減少すればL-dopaを投与してもドーパミンへの変換は十分には行われなくなり、L-dopaの効果は減弱する。一方、線条体でのドーパミンニューロンの軸索終末の減少によってドーパミンに対する脱神経性

過敏が生じ、このために L-dopa 投与により線条体のドパミン量がわずかでも過剰になればジスキネジア（不随意運動）が出現すると考えられている¹¹。L-dopa 治療後 2 年で、運動症状の動揺は約 50%、不随意運動は 30% に出現する¹⁷。また、ドパミン受容体作動薬を単剤で長期間治療するのは困難で 3 年目までに約 50%、5 年目までに 70% 近くの患者は L-dopa との併用を要する^{18,19}。また、視床や淡蒼球などの定位脳破壊術や深部脳電気刺激療法も全てのパーキンソン病症例に対して有効なわけではなく、症状によって適用術式が限定される。例えば視床破壊術は振戦や筋強剛の改善効果は強いが、その他のパーキンソン症状に対する効果は弱い。また、両側手術では認知症などの合併症の危険がある。淡蒼球破壊術は筋強剛や抗パ薬の副作用としてのジスキネジア（不随意運動）に対する効果は強いが、歩行障害や寡動、姿勢反射障害などに対する効果は不十分である。深部脳電気刺激療法、とりわけ両側視床下核の同時刺激は振戦、寡動、筋強剛、姿勢反射障害など全てのパーキンソン症状に対して有効だが、進行して L-dopa の効果が無くなった症例には無効であり、長期予後も良好とは言えない²⁰。磁気刺激療法や修正電気痙攣療法はまだ研究段階であり、どのような症例に有効であるかの基準も無く、広く普及するには至っていない。

② 当該遺伝子治療臨床研究の概要

本臨床研究では、進行したパーキンソン病患者の被験に、AADC 遺伝子を組み込んだ 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及びセロトニンの前駆体である L-dopa および 5-HTP（5-hydroxytryptophan）を特異的基質とする酵素である。したがって AADC によってドパミンの他にセロトニンも生成されるが、セロトニンの生成量は 5-HTP の量に依存する。5-HTP はプロトコール上投与されることはなく、内因性の 5-HTP から AADC を介して生成されるセロトニンの量は生理的範囲内であるのでセロトニンが過剰生成されることはない。

本臨床研究に期待されるもう一つの点は、進行したパーキンソン病治療に伴って問題になる精神症状への対策である。ドパミンはパーキンソン病において不足する黒質-線条体路だけではなく、中脳-辺縁系路における神経伝達物質でもある。パーキンソン病の治療を目的として L-dopa などのドパミン受容体刺激薬を使用すると、中脳-辺縁系が刺激されて精神症状が発現する。本研究では、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、精神症状を発現させることなくパーキンソン症状を改善させることが期待される。

③ 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

進行したパーキンソン病に対しては、薬物療法のみならず外科的治療も無効である。また磁気刺激療法や修正電気痙攣療法は研究段階であり、パーキンソン病に対する効果が十分には確認されていない。特に進行例に対する効果は限定的であると考えられる。現在のところ、進行したパーキンソン病に対する新しい治療戦略として、ドパミン産生細胞の移植、幹細胞治療、そして遺伝子導入療法が考えられる。

A. ドパミン産生細胞の移植

ドパミン産生細胞の移植によってパーキンソン病を治療する試みは、1979 年に Bjorklund らがパーキンソン病のモデル動物の線条体に、胎仔の中脳黒質ドパミンニューロンを移植し、症状の改善を報告したことに端を発する。臨床応用では、ドパミンを産生する移植細胞をどこに求めるかが問題になった。最初に注目されたのは患者自身の副腎髄質細胞で、1982 年以来世界中で 300 例以上の自己副腎移植が行われたが、その結果は満足できるものではなかった。原因は細胞の生着率の悪さにあると考えられた。

そこで自己副腎と神経栄養因子の分泌がさかんな末梢神経を同時に移植する試みが行われている。治療成績は自己副腎のみの移植と比べて良好であるが、症例数も少なく、一般化するには至っていない。

板倉らはドパミン供給細胞として交感神経節に注目し、1991年以來、自己の頸部交感神経節（星状神経節）より採取した細胞を線条体に移植している²¹。治療効果は認められるものの、時間経過とともに効果は減弱するので、星状神経節はドパミン供給のためには量的に不十分と考えられた。より多くの交換神経節細胞を得るために、胸部交換神経節を利用する方法も検討されているが、長期的な効果は不明である。

1987年にメキシコのMadrazoらは中絶胎児の中脳黒質ドパミン細胞をパーキンソン病患者に移植し、症状の改善を報告した。米国の施設も追随しようとしたが、NIHは1988年に胎児を用いた移植研究を禁止した。宗教上の理由から人工妊娠中絶に反対する強い世論が存在し、一方で金銭と引きかえに胎児を売る人間が現れてもおかしくない社会情勢に配慮した決定だった。その後連邦政府および各州での法整備が進み、法律に準拠した胎児脳移植が再開され、胎児の黒質ドパミン細胞を用いた二重盲検試験が二つ実施された^{22,23}。いずれの試験でも移植群においてPETにより^[18F]L-dopaの取り込みの増加が認められ、剖検例で移植したドパミン神経細胞が生着していることが確認された。しかし、臨床効果については、当初期待されたほどではなかった。1番目の試験では、60歳以下の患者でのみプラセボ群と比較して軽度の症状の改善を認めた。また、2番目の試験では、移植前の運動障害が軽い患者のみ2年後の症状の増悪がプラセボ群より少なかったが、全体としてはプラセボ群と差がなかった。さらに、移植患者の一部でL-dopaを服薬しない状態においても不随意運動 graft-induced dyskinesia が出現することが明らかになった。これらの結果から、2番目の試験を行った Olanow らは、現時点では胎児細胞移植はパーキンソン病の治療として推奨できないとしている。

胎児細胞移植では、1人のパーキンソン病患者を治療するために、胎児4人分のドパミン細胞が必要である。さらに移植細胞の生着のためには、免疫抑制剤を使用した場合には、免疫能力の低下に起因する様々な合併症の危険がある。胎児の黒質ドパミン細胞移植の症例数は世界的にも限られており、効果についても議論が分かれている。また、現在我が国には中絶胎児組織の臨床応用に関するガイドラインが存在せず、直ちにこの治療法を実施することは困難である。

B. 幹細胞治療

脳内にも分化能力に富む神経幹細胞が存在することが発見され、その移植によって様々な神経疾患の治療が出来るのではないかと注目を集めている。多能性の幹細胞は適切な条件下では、神経細胞を含む種々の細胞に分化させることが出来る。パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経疾患の治療に際して、この幹細胞を修復用の細胞や組織の供給源として用いることが研究されている。この領域の研究は大きな成果をもたらす可能性を秘めているが、実用化の前には高いハードルが数多く横たわっている。たとえば、神経幹細胞をどこから得るかという問題がある。胎児の幹細胞を利用する場合は、胎児の黒質ドパミン細胞移植の場合と同様の問題が生じよう。成人の死体から神経幹細胞を分離したという報告もあるが、このようにして得た神経幹細胞を利用する場合には、臓器移植と同様の問題が生じる。成体内に元来少数存在する神経幹細胞を取り出して増殖する方法なら、多くの問題を解決出来るが、短期間で大量の移植用細胞を分化誘導する技術は確立していない。また増殖中の細胞を利用する場合には、未熟な細胞であるだけに、癌化の可能性も考慮する必要がある。胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES細胞) からドパミン細胞を分化させる方法も開発されてきているが、未分化細胞の混入による奇形種発生危険性がある。また、胎児細胞移植と同様、細胞移植後に不随意運動が生じる可能性があ

る。またヒト ES 細胞の利用に際しては、ヒト ES 細胞の臨床応用に関するガイドラインが未整備であることも問題である。2006年にヒト iPS 細胞が樹立され ES 細胞に代わるドパミン細胞の供給源として期待されている²⁴。しかし、ES 細胞と同様に未分化細胞の混入による腫瘍形成の可能性がある。また、患者自身の細胞から作製した iPS 細胞では、免疫学的な拒絶反応を回避できるという利点がある反面、正常に比べて α -synuclein の凝集を形成しやすいなどの脆弱性がある²⁵。

C. 遺伝子導入療法

細胞移植に伴う問題点を回避する方法として、遺伝子導入療法が考えられる。脳内に存在する自己細胞に遺伝子を導入することによって、失われた神経細胞の働きを遺伝子導入された自己細胞に代行させるという戦略である。導入する遺伝子の種類によって、三種類の戦略が考えられている。第1はドパミン産生に関わる酵素遺伝子を導入して、自己細胞にドパミンを産生させる方法である。パーキンソン病に対するドパミン神経細胞の移植治療では、その本来の存在部位である黒質への細胞移植は手技的に難しいこと、また仮に黒質に移植したとしても線条体にその軸索を投射させる手法がないことから線条体への細胞移植が行われており、Open-label study では、L-dopa 非服用時における unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS) の運動スコアで 30-40% の運動障害の軽減、1日のうちで L-dopa が無効な時間 (off) の 43-66% の減少、1日あたりに必要な L-dopa の 16-77% の減量など、実際ある程度奏効している²⁶。線条体に投射しているドパミンニューロンの軸索終末からドパミンが放出される機構は十分には解明されていないが、ドパミンは他の伝達物質とは異なって単に細胞間隙に一定量が徐々に漏れだしていれば十分であるとの考えもある。カプセル化細胞の線条体移植実験²⁷はこの仮説を支持するものである。また、上記の細胞移植治療が奏効することもこの推測に反しない。以上の知見を総合すれば、ドパミン合成に必要な酵素遺伝子を線条体の神経細胞に導入してドパミンを産生させれば症状が改善することが期待される。これが本臨床研究の基本的なコンセプトである。

遺伝子導入療法の第2の戦略は、線条体の細胞に神経栄養因子を産生させる方法である。神経細胞が長期間にわたって生存していくためには、神経栄養因子の存在が必要である。神経変性疾患では、たとえばパーキンソン病ではドパミンニューロンが障害され、アルツハイマー病ではアセチルコリンニューロンが障害され、筋萎縮性側索硬化症では運動ニューロンが障害されるというように、特定の系統のニューロンが障害される。特定の機能を持ったニューロンには、その生存に必要な栄養因子が存在し、その栄養因子の欠乏によって神経変性疾患が発病するという説がある。パーキンソン病ではドパミン細胞の生存に必要な栄養因子の不足が、ドパミン細胞の変性脱落を加速している可能性がある。そこで神経膠細胞由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF) をはじめとするドパミン細胞の栄養因子を線条体に補充する治療が考慮されている。神経栄養因子は分子量が大きいので、血液脳関門を通過することが出来ない。持続的に脳室内へ投与する工夫もあるが、感染の危険もあって臨床応用は現実的には難しい。そこで遺伝子導入によって、線条体の細胞に神経栄養因子を産生させる方法が考えられた²⁸。2004年から、AAV ベクターを使用して GDNF 類似の神経栄養因子である neurturin の遺伝子を被殻に導入する遺伝子治療の臨床試験が米国で開始された。第 I 相試験では 12 人の 1 年後の評価で有害事象はなく、オフ時の UPDRS 運動スコアが 36% (14 ポイント) 改善した²⁹。しかし、ベクターを注入した治療群と頭蓋骨に部分的な穿孔を開けるがベクターは注入しない対照群とを比較した第 II 相臨床試験では、両群の間で 1 年後の運動症状の改善度に有意差がなかった。その後、盲検状態で 18 か月後まで追跡した結果では、治療群で軽度ながら運動症状の改善効果が認められている³⁰。遺伝子治療後に亡くなった患者の脳組織解析では、被殻で Neurturin の発現が確認されたが黒質緻密部の神

経細胞への移送は5%以下であった³¹。これは、対象とした発症後5年以上の患者では黒質線状体路の脱落が著しく軸索輸送も障害されているためと考えられた。そのため、被殻に加えて黒質緻密部にも Neurturin 遺伝子を導入する臨床試験が実施されている。

第3の戦略は、抑制性伝達物質である GABA の合成酵素である glutamic acid decarboxylase (GAD-65 および GAD-67) の遺伝子を視床下核の細胞に導入して、視床下核の出力を興奮性から抑制性に変換する方法である。パーキンソン病では視床下核の神経細胞の活動性が異常に亢進しており、これが症状発現に大きく関与していることが、様々なデータから推察されている。AAV ベクターを使用して、片側の視床下核に GAD 遺伝子を導入したオープン試験に続き、偽手術群を対照として両側の視床下核に遺伝子導入した第 II 相試験が行われた。いずれも安全性に問題はなく1年後の評価で運動機能の改善効果が認められた^{32,33}。^{[18F] fluorodeoxyglucose (FDG)} をトレーサーとした PET では、運動機能の回復と合致して一次運動野とそれに隣接した外側前運動皮質で FDG の集積が増加した³³。

このように、従来の薬物療法や手術療法では L-dopa の効果が減弱した進行例に対する治療には限界があり、また遺伝子導入以外の新しい治療法はそれぞれの問題があって、直ちに広く臨床応用することは難しい。本研究では進行したパーキンソン病に対する新しい治療法として、ドパミン合成を促進する遺伝子治療を選択した。予定されている AADC 遺伝子の導入と L-dopa の経口投与を組み合わせる方法は安全性も高く、動物実験において有効性も確認されていることから、遺伝子治療臨床研究の第一歩として、この方法を採用した。

米国 Avigen 社 (1301 Harbor Bay Parkway, Alameda, CA 94502) と本研究チームは約10年間に亘って AAV ベクターに関する共同研究を幅広く進めてきた。Avigen 社は AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発を主目的に設置されたベンチャー企業であり、血友病 B に対する遺伝子治療臨床研究を実施したことで知られている。同社は二番目の遺伝子治療対象疾患としてパーキンソン病を取り上げ、その戦略としては、AADC 発現 AAV ベクターと L-dopa 内服を組み合わせる方法を採用した。我々は、TH 発現 AAV ベクター/AADC 発現 AAV ベクター/GCH 発現 AAV ベクターの三者を組み合わせる遺伝子治療法の開発を行い、パーキンソン病モデルサル系の系でその有効性を確認しているが、臨床応用の第一段階としてはドパミン産生量の制御が簡単であり、かつ一種類のベクターで済む Avigen 社の方法が適していると判断し、Avigen 社の臨床プロトコルにはほぼ沿った形で最初の臨床研究を実施することとした。この AAV-hAADC-2 と L-dopa 内服を組み合わせる遺伝子治療法に関しても、パーキンソン病モデルサルを用いた前臨床研究で、その安全性と有効性を既に確認している。

AADC 発現 AAV ベクターを両側の被殻に注入する第 I 相臨床試験が自治医科大学と米国 UCSF (400 Parnassus Ave. San Francisco, CA 94143) で実施された。自治医科大学では単群 (3×10^{11} vg) の6人を対象とし、UCSF では低用量群 (9×10^{10} vg) の5人と高用量群 (3×10^{11} vg) の5人の合計10人を対象とした。両施設とも6ヶ月後の評価で AAV ベクターに関連した有害事象は認められなかった。自治医科大学の6人ではオフ時の unified Parkinson disease rating scale (UPDRS) 運動スコアが46%改善した。AADC に結合する ^{[18F]fluoro-L-m-tyrosine (FMT)} をトレーサーとして使用した PET 計測では6ヶ月後に56%の被殻への集積増加を認め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³⁴。一方 UCSF の10人ではオフ時の UPDRS 運動スコアが36%改善し、FMT-PET 計測では6ヶ月後に低用量群で30%、中用量群では75%の集積増加を認め、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^{35,36}。自治医科大学における5年後までの成績を資料5に示した。

6 遺伝子の種類及びその導入法

(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 inverted terminal repeat (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 PA) によって置換されたベクターを用いる。

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 のエクソンからなり、各々のエクソンは 20 ないし 400 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³⁷。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 1440 塩基対と終止コドンを含む 1443 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 cctgcgcccg
121 ctgatccctg ccgctgcccc tcaggagcca gacacgtttg aggacatcat caacgacggt
181 gagaagataa toatgcctgg ggtgacgcac tggcacagcc cctacttctt cgctacttc
241 cccactgcca gctcgtaccc ggccatgctt gcgacatgc tgtgoggggc cattggctgc
301 atcggcttct cctgggogggc aagcccagca tgcacagagc tggagactgt gatgatggac
361 tggctcggga agatgctgga actaccaaag gcatttttga atgagaaagc tggagaaggg
421 ggaggagtga tccagggag tgccagtga gccaccctgg tggccctgct ggccgctcgg
481 accaaagtga tccatcggct gcaggcagcg tcccagagc tcacacagge cgctatcatg
541 gagaagctgg tggcttactc atccgatcag gcacactcct cagtggaaag agctgggtta
601 attggtggag tgaaattaa agccatcccc tcagatggca acttcgcat gctgctgctt
661 gccctgcagg aagccctgga gagagacaaa gcggtcggcc tgattccttt ctttatggtt
721 gccaccctgg ggaccacaac atgctgctcc tttgacaatc tottagaagt cggctctatc
781 tgcaacaagg aagacatag gctgcacgct gatgcagcct acgcaggcag tgcattcatc
841 tgccctgagt tccggcacct tctgaatgga gtggagtttg cagattcatt caactttaat
901 cccacaaaat ggctattggt gaattttgac tgttttgcca tgtgggtgaa aaagagaaca
961 gacttaacgg gagcctttag actggacccc acttacctga agcacagcca tcaggattca
1021 gggcttatca ctgactaccg gcattggcag ataccactgg gcagaagatt togtctcttg
1081 aaaatgtggt ttgtatttag gatgtatgga gtcaaaggac tgcaggctta tatccgcaag
1141 catgtccagc tgtcccatga gtttgagtca ctggtgcgcc aggatccccg ctttgaatc
1201 tgtgtggaag tcattctggg gcttgtctgc tttoggctaa agggttccaa caaagtgaat
1261 gaagctcttc tgcaaagaat aacagtgcc aaaaaatcc acttggttcc atgtcacctc
1321 agggacaagt ttgtcctgcg ctttgccatc tgttctcgca cggtggaatc tgcccattgt
1381 cagcgggctt gggaacacat caaagagctg gcggcgcagc tgctgcgagc agagagggag
1441 tag
```

MNASEFRRRGKEMVDYVANYMEGIEGRQVYPDVEPGYLRPLIPAAAPQEPDTFEDIINDVEKII
 MPGVTHWHSPYFFAYFPTASSYPAMLADMLCGAIGCIGFSWAASPACTELETVMMDWLKML
 ELPKAFLEKAGEGGGVIQGSASEATLVALLAARTKVIHRLQAASPELTQAAIMEKLVAYSSDQA
 HSSVERAGLIGGVKKAIPSDGNFAMRASALQEALERDKAAGLIPFFMVATLGTTCSSFDNLL
 E
 VGPICKEDIWLHVDAAYAGSAFICPEFRHLLNGVEFADSFNFPNPKWLLVNFDCSAMWVKKR
 TDLTGAFRLDPTYLKHSHQDGLITDYRHWQIPLGRRFRSLKMMWFVFRMYGVKGLQAYIRKHV
 QLSHEFESLVRQDPRFEICVEVILGLVCFRLKGSNKVNEALLQRINSAKKIHLVPCHLRDKFVLR
 F AICSRVESAHVQRAWEHIKELAADVLRARE

図 1 : AADC 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

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。さらに上記の米国で実施された 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³¹。

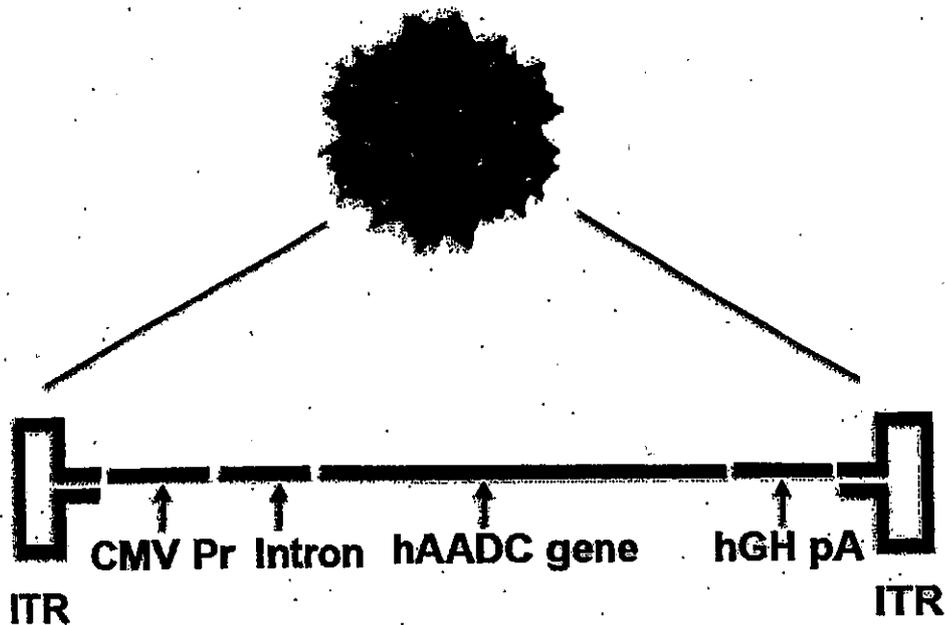


図 2 : ウイルスベクターに搭載される遺伝子

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

ター/エンハンサー (CMVPr), ヒトβグロビンイントロン (Intron), 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。

③導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性

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 (5-hydroxytryptophan)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及び生物学的特徴並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。パーキンソン病では、線条体に投射している黒質ニューロンの脱落によって、線条体のドパミンが欠乏している。このため、黒質の神経細胞や、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及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出来ること、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良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³⁸されている。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凝固因子発現AAVベクターの骨格筋³⁹および肝臓への注射⁴⁰、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^{32,33}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^{29,30}がすでに行われている。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. 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	ヘパラン硫酸プロ テオグリカン	神経
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

(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及び人に対する影響

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 26nm 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 ヌクレオチドから成る 1 本鎖 DNA (約 1,500 kDa) であり、プラス鎖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時に 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きわめて安定で、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。

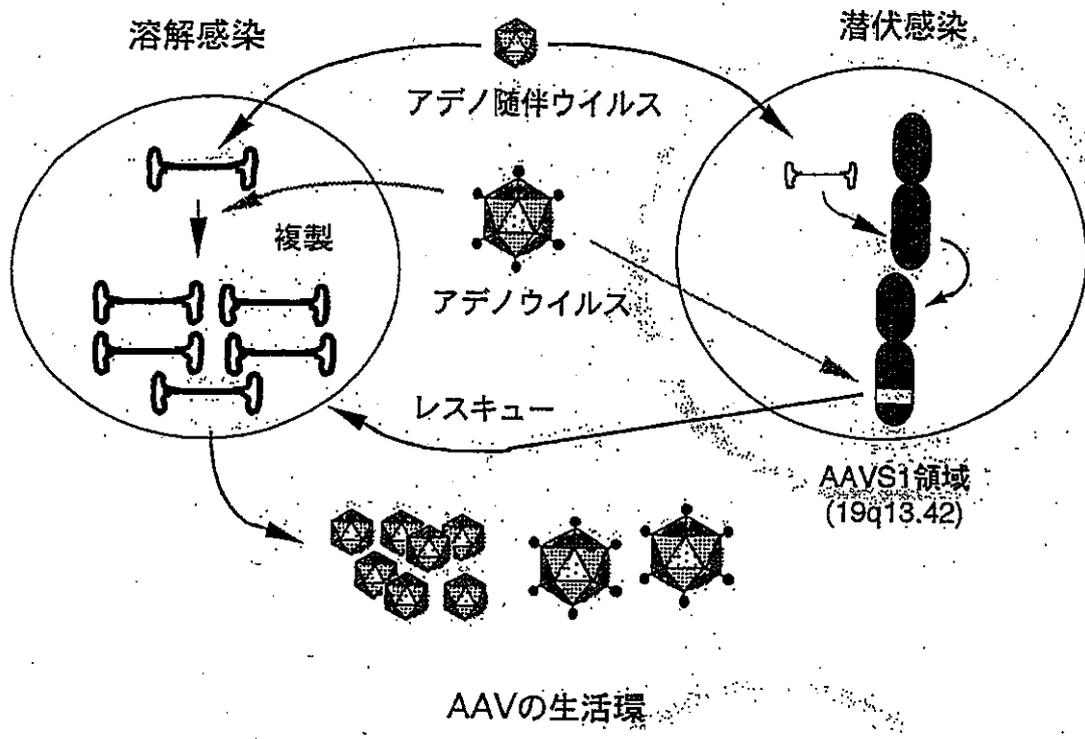


図3. AAV の生活環

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。

各プラスミドのマップを図4~6に示す。

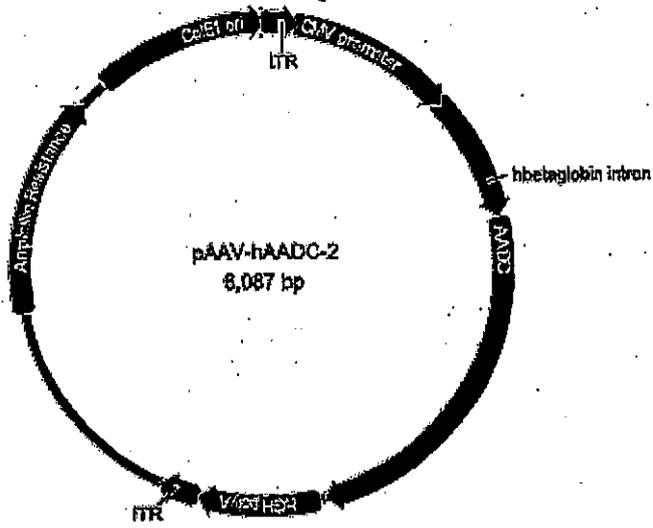


图 4 pAAV-hAADC-2

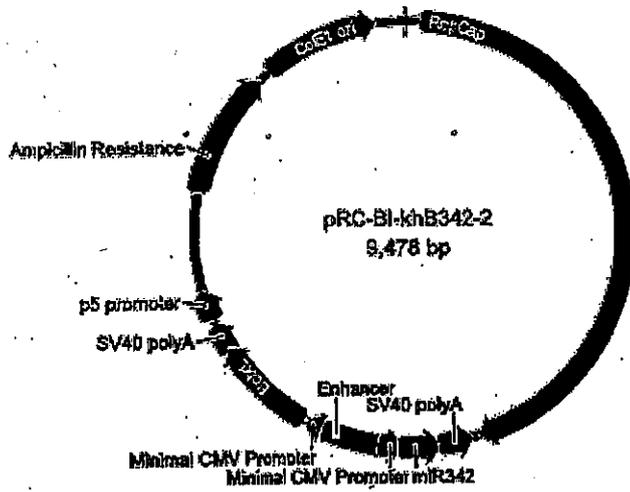


图 5 pRC-BI-khB342-2

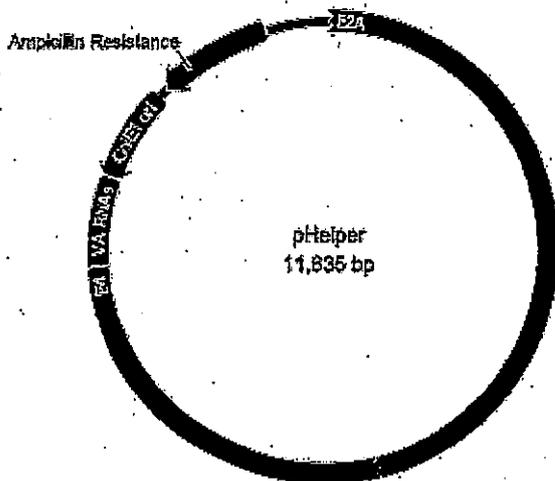


図 6 pHelper

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⁴¹。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 Poloxamer188 (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 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 (rcAAV) 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-khB342-2HLP19 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⁴²。

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。

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 (図7)。動物実験では年余に渡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⁴³、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2kb程まで欠失していることもある⁴⁴。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⁴⁵、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。

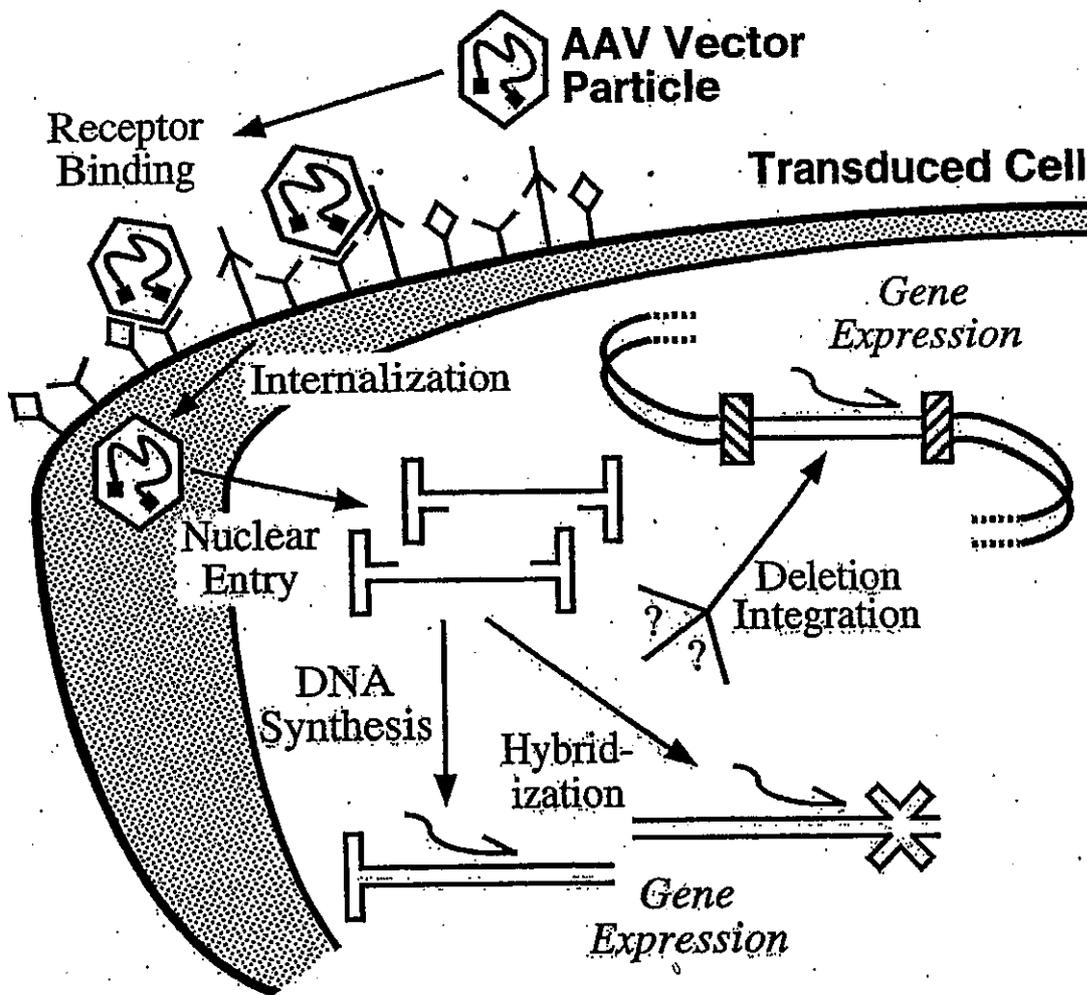


図7. AAVの感染と発現様式²³

7 安全性についての評価

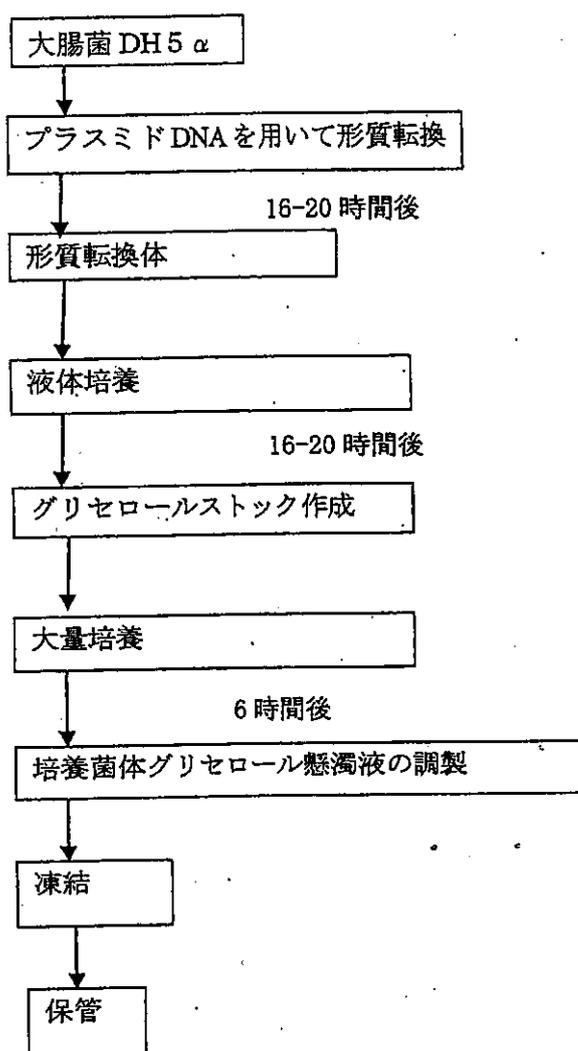
(1) 遺伝子導入方法の安全性

① 遺伝子導入に用いる AAV ベクターの純度

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。

A) 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 パイアルの 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

B) 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。

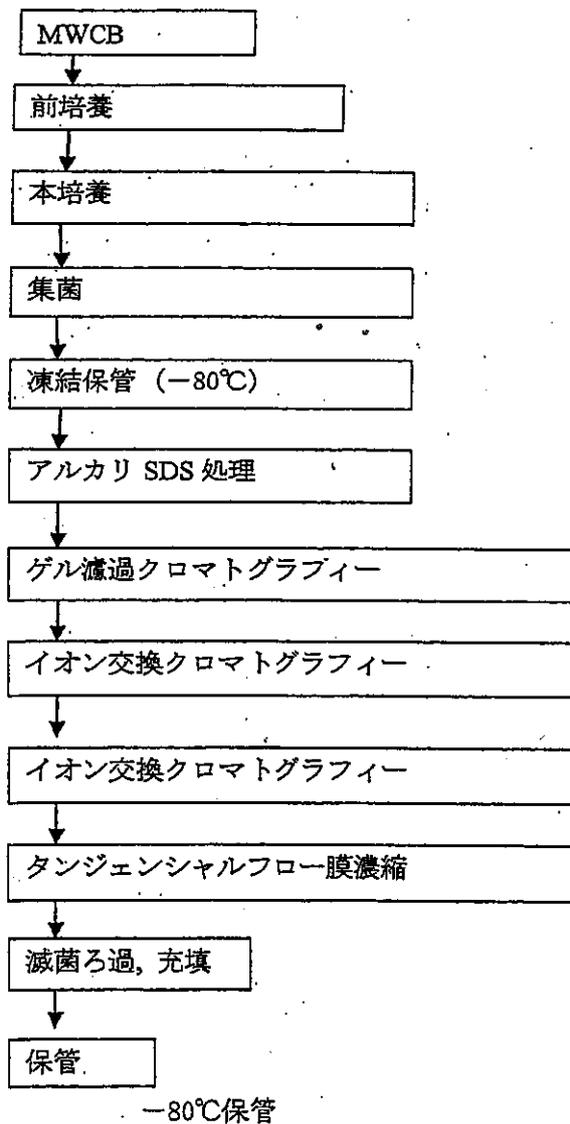


図 9 プラスミドベクター 製造フローチャート

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)

C) 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。

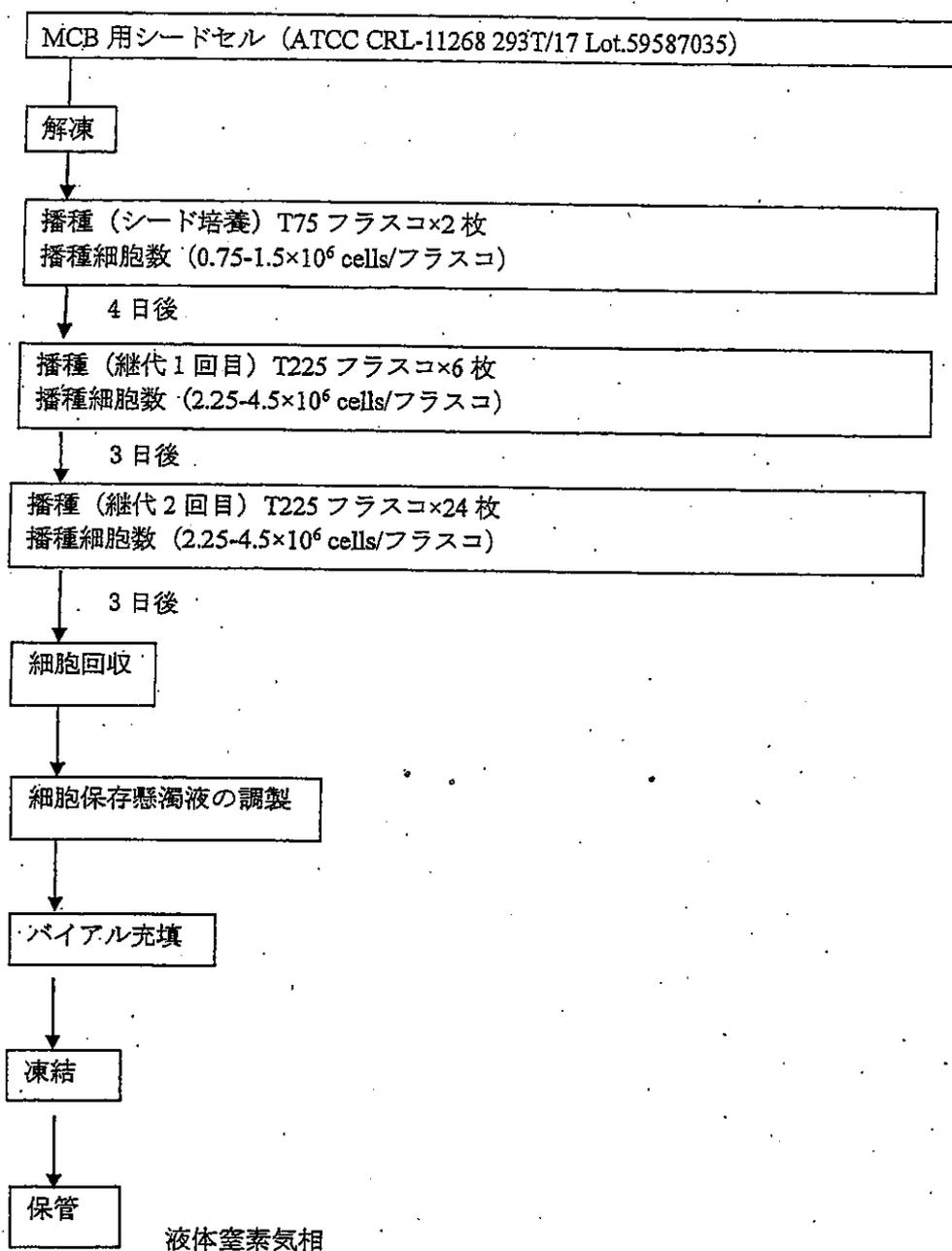


図10 293T/17 MCB 作製フローチャート

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 (Porcine circovirus) /BCV (Bovine circovirus) ウイルス否定試験
13. HIV (Human immunodeficiency virus) -1/2 ウイルス否定試験
14. HTLV (Human T-cell lymphotropic virus) -1/2 ウイルス否定試験
15. HAV (Hepatitis A virus) ウイルス否定試験
16. HBV (Hepatitis B virus) ウイルス否定試験
17. HCV (Hepatitis C virus) ウイルス否定試験
18. HHV (Human herpesvirus) -6/7/8 ウイルス否定試験
19. hCMV (Human cytomegalovirus) ウイルス否定試験
20. EBV (Epstein-Barr Virus) ウイルス否定試験
21. HPV (Human parvovirus) B-19 ウイルス否定試験
22. SV (Simian virus) 40 ウイルス否定試験
23. AAV (Adeno Associated virus) ウイルス否定試験

D) 293T/17 WCB の作製

293T/17 WCB の作製フローを図 11 に示す。タカラバイオ社の 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。

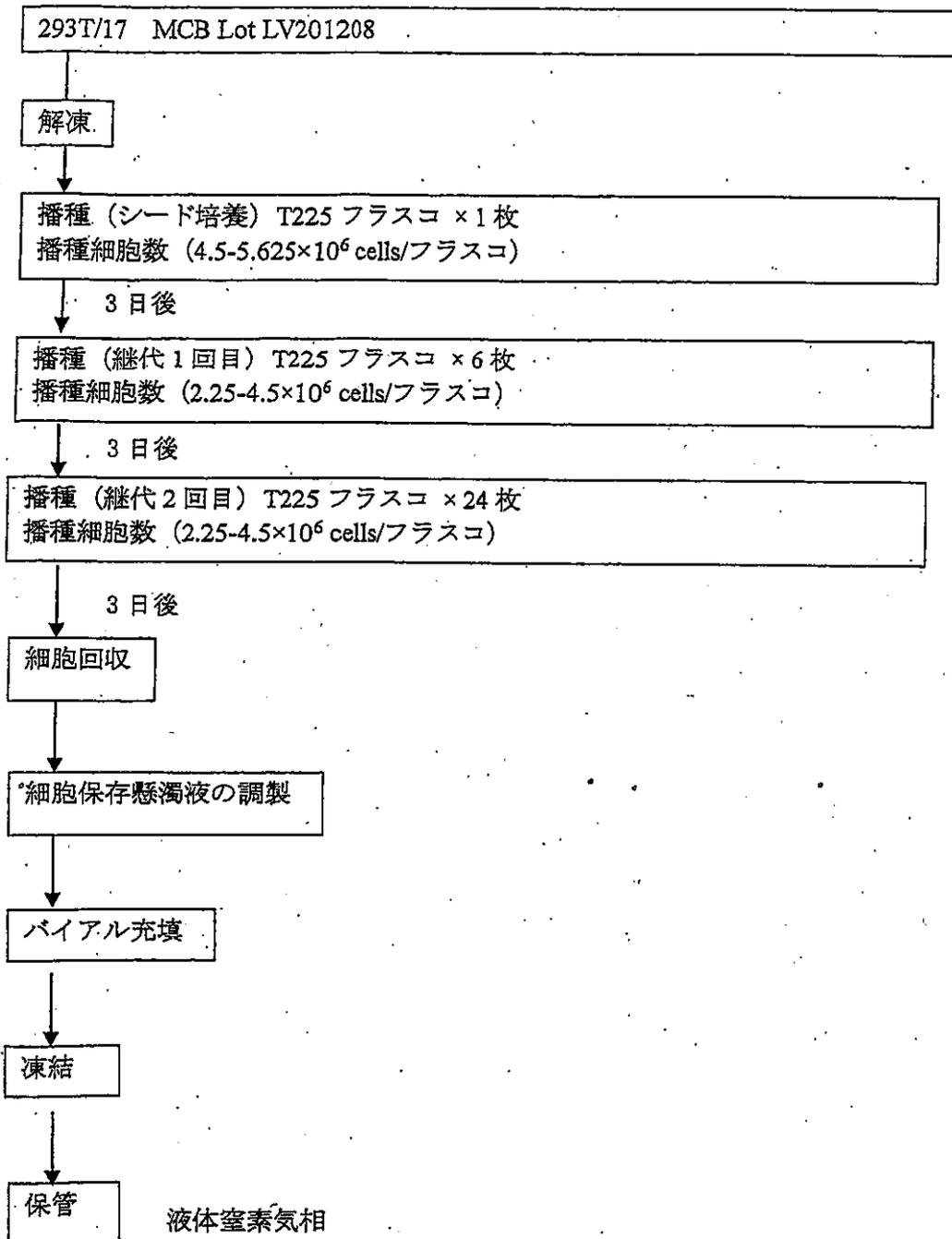


図 11 293T/17 WCB 作製フローチャート

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

E) 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 パイアルの 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。ウォータース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 μm 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。

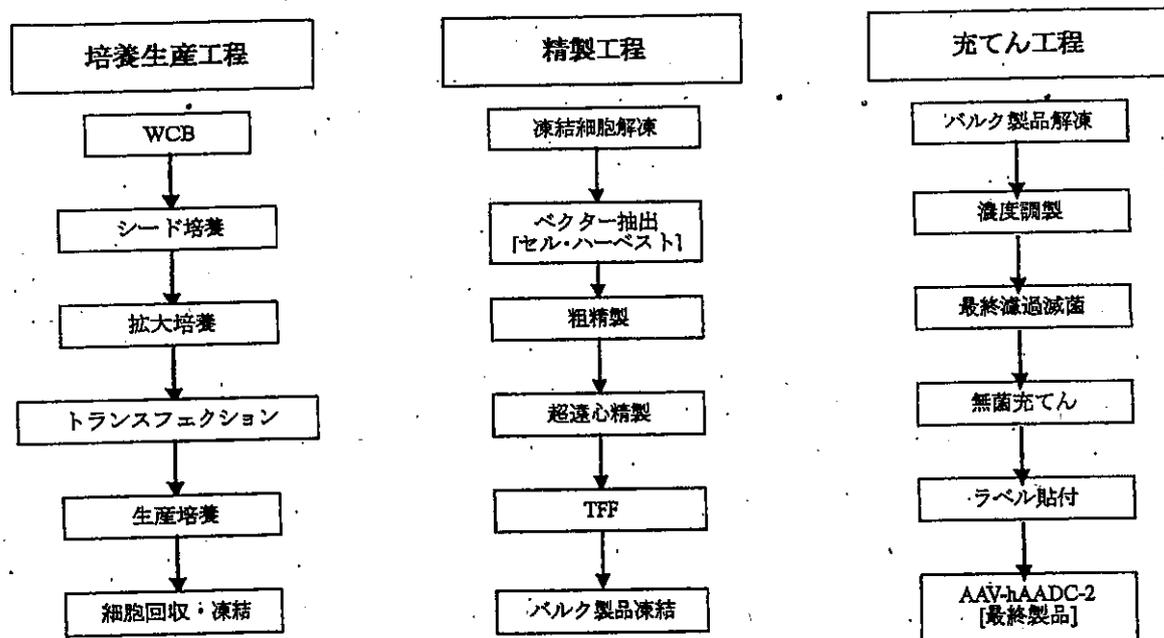


図 12 AAV-hAADC-2 の製造フロー

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

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

② 患者に投与する AADC 遺伝子の純度及びその安全性

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.

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. 更に 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み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。

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⁴⁶、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⁴⁷。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1/30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。サル脳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り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見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、患者の尿、便、血液および唾液はPCR法でベクターDNAが陰性になるまで検査する（「9-(5)-④. 臨床検査および観察項目」を参照のこと）。なお、前回の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癌遺伝子が活性化したり、癌抑制遺伝子が不活化されたりすることで発癌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。

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⁴⁸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⁴⁹。

(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 7 (1) ① C) 及び 7 (1) ① D) 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、したコントロールとの比較試験を行いサンプルからはいかなる細菌、真菌の発現増殖を認めず、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。

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。

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。

(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⁵⁰。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⁵¹。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^{52, 53}。

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⁵⁴。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⁵⁵。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が、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⁵⁶。

本臨床試験が上記と異なる点

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、パーキンソン病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、本臨床試験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が⁵⁷、Jessie Gelsinger はこれよりも少ない投与量 (6×10^{11} vg/kg) で死亡した。

(5) これまでに実施された臨床試験における成績

これまで AAV ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究として、米国で 48 種類のプロトコールが提唱されている (ClinicalTrials.gov のホームページによる⁵⁸)。このうち頭蓋内への 2 型 AAV ベクター注入を行った遺伝子治療としては、資料 4 に示すパーキンソン病以外に Canavan 病の小児に対して欠損した酵素の遺伝子を発現する AAV ベクターを大脳に投与した結果が報告され⁵⁹、特段の副作用を認めることなくプロトコールが遂行されている。

嚢胞性線維症の治療を目指した臨床研究では、2 型 AAV ベクターを経気道的に投与した 4 つのプロトコールにおいて合計 80 例に対して最大で 1×10^{13} vector genome (vg) 相当量が使用されているが、ベクター自体の毒性による副作用は見出されていない^{54,55,56,57,60,61,62,63}。体内へのベクターの注入に基づく治療法としては、血友病 B の遺伝子治療を目指して骨格筋^{59,64,65}並びに肝臓²⁶を標的とするプロトコールが実施された。血友病 B に対して、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、その他の副作用は認められていない。

血友病 B に対する遺伝子治療では骨格筋・肝臓のいずれを標的とした場合においても全例で 2 型 AAV に対する中和抗体価の著明な上昇が認められた。Canavan 病を対象とした場合の中和抗体価の上昇は血友病 B の場合に比べて軽度であった。これは中枢神経系に対する遺伝子導入法の場合には (1) ベクター量が数十分の一程度であること、(2) ベクターが中枢神経内に留まっていれば免疫反応は起こりにくいこと、などによるものと考えられる。2 型 AAV に対する中和抗体価は健常人においても一定の割合で認められるものであり、かつベクターの有効性に著しい影響は及ぼしていないことから、有害事象としての副作用には該当しないと考えられる。以上の報告を総括すると、2 型 AAV ベクターの臨床的安全性に関してはこれまでのところ特段の疑念は見出されていない。

なお、2 型以外に 1 型、2.5 型、6 型、8 型、self-complementary AAV に由来するベクターを使用した遺伝子治療臨床研究が実施されている。

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

以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。

- (1) 米国において、AAV ベクターを使用した血友病や嚢胞性線維症に対する臨床試験が行われており、これまで AAV ベクターに起因する副作用は報告されていない。
- (2) 薬物治療で十分な効果が得られなくなった進行した病期のパーキンソン病患者に対して、自治医科大学附属病院で 6 例の遺伝子治療を実施した。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技法が原因と判断し、AAV ベクターとの関連性は否定された。自治医科大学附属病院と同様なプロトコールにより、Avigen/Genzyme 社から供給された AAV ベクターを使用した臨床試験が UCSF で実施された。また、AAV ベクターを使用して抑制性神経伝達物質の合成酵素(GAD)遺伝子を視床下核に導入する臨床試験も 2003 年 8 月から行われた。神経栄養因子 neurturin 遺伝子を搭載した AAV ベクターを使用した臨床試験も実施された。さらに、台湾で

AADC 欠損症の小児に対して AAV ベクターを使用して被殻に AADC 遺伝子を導入する遺伝子治療が実施されている。これまで、AAV ベクターに関連した副作用は報告されていない。

- (3) 申請者らは、パーキンソン病のモデル動物を使用して、前臨床試験を行っており、効果と安全性を確認している。特に、パーキンソン病患者と同様の症状を呈する MPTP サルにおいて運動障害の改善効果が得られている。
- (4) 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。
- (5) 申請者らは、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。

以上のことから、本研究の実施は理論的にも、実質的にも可能と思われる。

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

本研究は抽出を行わない患者間用量比較オープン試験であり、臨床試験の第 I/II 相に相当する。

9-1-1 研究の目的

本研究の主要評価項目は、進行期パーキンソン病患者被殻内への AAV-hAADC-2 注入療法の安全性である。副次的評価項目は、①AAV-hAADC-2 注入療法の有効性であり、その判定は症状日誌、臨床的評価、服用する L-dopa の必要量に基づいて行う。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。被殻のより広範な領域への遺伝子導入を目標として 3 倍量の第 2 群を設定する。

9-1-2 AAV-hAADC-2 の投与方法

進行期パーキンソン病患者の被殻に、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 1 群 3 例で 2 群を予定している。AAV-hAADC-2 の注入量は全体で 200 μ L (第 1 群) または 600 μ L (第 2 群) とし、被殻内の 4 ヶ所に分けて注入する。具体的には片側の被殻あたり 2 ヶ所、両側で計 4 ヶ所に各々 50 μ L (第 1 群) または 150 μ L (第 2 群) を注入する。第 1 群での注入量 (vector genomes: vg) は 1 症例あたり 3×10^{11} vg とし、第 2 群では 9×10^{11} vg を注入する。具体的な注入法は表 2 に示す。注入治療後の安全性の評価および治療効果の判定に関しては、各群とも同じとする。なお、注入速度は、前回の臨床研究の 3 倍の 3 μ L/min に設定しているが、手術時間の短縮が期待できる。台湾で実施された AADC 欠損症に対する遺伝子治療では 3 μ L/min としており、ベクター注入に関連した有害事象を認めていない。

表 2 ベクターの群別投与量

群	症例数	総用量 (vg)	注入速度 (μ L/min)
1	3	3×10^{11}	3
2	3	9×10^{11}	3

9-1-3 前治療薬および併用薬

Screening の 8 週間以前より服用している薬を前治療薬、screening visit 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、抗てんかん薬、免疫抑制剤、抗凝固薬、抗血小板薬、治療薬は screening visit の 8 週間前より本研究が終了するまで原則として使用してはならない。抗パ薬は screening visit の 8 週間前より 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抗パ薬の効果が過剰になった場合には L-dopa を減量する。

9-(1)-4 対象患者

対象は自治医科大学付属病院あるいはその関連病院に通院中の、進行期パーキンソン病患者 6 症例とする。

9-(1)-5 評価項目 (資料 2)

- ① 一般身体所見 (バイタルサインを含む)
- ② 神経学的所見
- ③ 有害事象
- ④ 抗パ薬 (L-dopa) の必要量
- ⑤ 併用薬
- ⑥ 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, 総タンパク, アルブミン, 総ビリルビン, GOT (AST), GPT (ALT), Al-P, GGT (γ GTP)
免疫検査	AAV 抗体
PCR 分析	連続 3 検体が陰性になるまで, 採取と分析を継続する。

- ⑦ 心電図
- ⑧ 脳の PET scan
- ⑨ 脳の DaTScan を用いた SPECT 検査
- ⑩ 脳の MRI
- ⑪ 患者の記載する症状日誌
症状を「ジスキネジアを伴う ON」, 「ジスキネジアを伴わない ON」, 「OFF」に分類して評価
- ⑫ ON と OFF における MDS-UPDRS
ON は抗パ薬の効果が最大限発揮されているときとする。OFF は抗パ薬を 12 時間休薬後の症状とする。ただし 12 時間の休薬に耐えられない場合は, 耐えられる最大休薬時間後の評価とし, 本臨床研究中をとおして基準を変えないこととする。
- ⑬ Hoehn & Yahr の重症度
- ⑭ Geriatric Depression Scale (GDS) の short form
- ⑮ Mini-Mental State Examination (MMSE)
- ⑯ Montreal Cognitive Assessment (MoCA)

9-(1)-6 評価スケジュール (資料6)

(2) 被験者の選択基準及び除外基準

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、対象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に合致し且つ除外基準のいずれにも抵触しないものとする。

9-(2)-1 選択基準

- ① 「厚生省特定疾患：神経変性疾患調査研究班（1995年度）の診断基準」を満たす特発性パーキンソン病で、初期にはL-dopaが有効であり、また他の神経変性疾患を示唆する所見を認めない患者
- ② 治療時点での年齢は75歳以下
- ③ 発症年齢は35歳以上
- ④ L-dopaによる5年以上の治療歴を有する
- ⑤ 治療開始時のOFF stateでのHoehn & Yahrの重症度がIV度
- ⑥ MDS-UPDRS-III（運動スコア）のスコアの合計（OFF state）が30～100点
- ⑦ ドパミン治療に対する反応が明らかで、onとoffでMDS-UPDRS-III（運動スコア）の改善が明らかであること。具体的にはドパミン治療によってMDS-UPDRS-IIIが16点以上改善する
- ⑧ 耐え難い運動合併症、具体的にはMDS-UPDRS-IVの項目B（症状の日内変動）のスコアが4～9であり、適切な薬物療法によっても満足できる治療効果が得られず、定位脳手術が可能な患者
- ⑨ 治療後の頻回の診察を含め、本臨床研究に必要な条件を遵守することが可能なこと
- ⑩ 本臨床研究に参加する前の少なくとも2ヶ月間、パーキンソン病治療薬を変更しないこと
- ⑪ 患者本人から、インフォームドコンセントが得られること

9-(2)-2 除外基準

- ① 脳血管障害、抗精神病薬や毒物への暴露、脳炎等の病歴によって、あるいは進行性核上性麻痺や小脳症状、錐体路徴候、自律神経徴候、認知症、幻覚や妄想などの症状によって、あるいはラクナ梗塞や中脳被蓋部の萎縮、橋と小脳の萎縮などのmagnetic resonance imaging (MRI) 所見によって、二次性あるいは非典型的パーキンソンニズムであることが示唆される患者
- ② 過去6ヶ月以内に、日に3時間以上続く強く激しいジスキネジアの病歴を有する患者
- ③ 既にパーキンソン病に対する定位脳手術（淡蒼球凝固術、視床凝固術、脳深部刺激）を実施済みの患者
- ④ MMSE (Mini-Mental State Examination) で20点以下、あるいは神経心理検査で認知症と診断される患者
- ⑤ 過去6ヶ月以内に幻覚や妄想を認めた患者、統合失調症あるいはaffective disorderの病歴のある患者
- ⑥ 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
- ⑦ 脳内の悪性新生物、臨床的に明らかな神経疾患（例えば年齢相応でない、明らかな脳萎縮）
- ⑧ 5年以内の、治療済みの皮膚癌を除くその他の悪性腫瘍の病歴
- ⑨ 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

- ⑩ 血液凝固異常症、あるいは抗凝固療法が必要な患者
- ⑪ 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）
- ⑫ GDS (Geriatric Depression Scale) の short scale が 10 点以上、抗うつ薬服薬中は 5 点以上
- ⑬ MAO-A 阻害薬、あるいは抗精神薬を服薬中
- ⑭ MRI が撮影出来ない患者
- ⑮ FMT-PET で異常所見を認めない症例
- ⑯ 閉経前の女性、子供をもうけることを希望する男性、ただし遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない。
- ⑰ 3 年以内に痙攣発作の既往のある患者、抗てんかん薬を服薬中の患者、あるいは脳波検査でてんかんの異常を認める患者
- ⑱ 重篤な薬物アレルギーの既往のある患者
- ⑲ 過去 6 ヶ月以内に他の治験に参加したことのある患者
- ⑳ 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 > 2.0mg/dl かつ BUN > 25mg/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 > 200mg/dl かつ HbA1c > 9%）
- ㉑ 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

9-(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。

対象者が参加を取りやめた場合、次の基準にしたがって他の対象者に振り替えることとする。

- ① 対象者が遺伝子導入以前に参加を取りやめた場合、次の対象者に振り替える。
- ② 対象者が遺伝子導入後に参加を取りやめた場合、次の対象者への振り替えは行わない。しかしながら、安全性に関する経過観察は継続する。

(3) 被験者の同意の取得方法

本臨床研究に参加する候補者は、自治医科大学付属病院あるいはその関連病院への通院患者の中から募集する。募集に当たっては、この臨床研究についての情報を、それらの病院に勤務する神経内科医に広く提供する。被験者に対しては臨床治療研究実施医師より、臨床研究「パーキンソン病遺伝子治療」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付属病院臨床研究支援センターのコーディネーター（薬剤師、看護師、または臨床検査技師）が、研究実施医師とは独立してわかりやすく説明を行い、文書による同意を得ることとする。同意文書は 2 部写しを作成し、1 部は患者に手渡し、1 部は施設コーディネーターが保管する。原本は総括責任者が保管する。

【患者への説明事項】

- 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まかなわれること, 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思わ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
 - 臨床研究への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場合には, その内容
- 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

(4) 期間及び目標症例数

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10年後まで長期フォローする。目標症例数は6例とする。

(5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法

① 対照群の設定方法

本研究は無作為抽出を行わない患者間用量比較オープン試験であり、対照群の設定は行わない。

② 遺伝子導入方法（安全性及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）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、自治医科大学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4cm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。注入部位までの穿孔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検査を実施し穿孔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。

③ 前処置及び併用療法の有無

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。薬物療法、特に L-dopa の投与が本治療では必須であるので、必ず併用する。抗バ薬の投与量は screening visit の 8 週間前から、評価 9 (Month 6) までに変更しない。ただし遺伝子治療後に抗バ薬の効果が過剰になった場合は L-dopa を減量する。なお適切なりハビリテーションは随時行って良いこととする。

④ 検査項目及び観察項目

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。患者は資料 6 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 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。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。

PET scan と DaTScan を用いた SPECT 検査は Base line (Day -14~1) と評価 9 (Month 6) に実施する。AADC のトレーサーである FMT を使用した PET scan 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。

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

Screening 手術 (遺伝子の注入) 前 8 週間以内
インフォームドコンセント、病歴の聴取、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I ~ IV, OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)
Hoehn & Yahr, MMSE, MoCA, GDS (Mood Assessment Scale- Short Form)
服薬中の抗バ薬、その他の併用薬、症状日誌の記録トレーニング
臨床検査 (血液、生化学、AAV 抗体)、心電図

Baseline 手術直前の評価 (Day -14 ~ Day -1) 対象者は自治医科大学附属病院脳神経センターに入院する。
一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I ~ IV, OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)
服薬中の抗バ薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象
PET scan, DaTScan を用いた SPECT 検査、頭部 MRI 検査、臨床検査 (凝固検査、尿検査)

手術 (Day 0)
一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
服薬中の抗バ薬、その他の併用薬、有害事象
頭部 CT 検査: 手術直後に実施

評価 1 (Day 7 ± 2 days) 入院中の評価
一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
服薬中の抗バ薬、その他の併用薬、有害事象
臨床検査 (血液、生化学)
頭部 MRI 検査

評価 2 (Day 14 ± 3 days) 入院中の評価
一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part II と III のみ評価
服薬中の抗バ薬、その他の併用薬、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 ± 5 days) Month 1
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I ~ IV, OFF で part II と III
Hoehn & Yahr
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象
頭部 MRI 検査
臨床検査 (血液, 生化学)

評価4 (Day 42 ± 5 days)
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価5 (Day 56 ± 5 days) Month 2
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価6 (Month 3 ± 7 days)
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I ~ IV, OFF で part II と III
Hoehn & Yahr
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象
臨床検査 (血液, 生化学)

評価7 (Month 4 ± 7 days)
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価8 (Month 5 ± 7 days)
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価9 (Month 6 ± 7 days)
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I ~ IV, OFF で part II と III (part IIIはそれぞれビデオ撮影)
Hoehn & Yahr, MMSE, MoCA, GDS (Mood Assessment Scale-Short Form)
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 症状日誌の確認, 有害事象
PET scan, DaTScan を用いた SPECT 検査, 頭部 MRI 検査
臨床検査 (血液, 生化学, AAV 抗体)

評価10 (Month 7 ± 7 days)
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価11 (Month 8 ± 7 days)
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価12 (Month 9 ± 7 days)
一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価 13 (Month 10 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価 14 (Month 11 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価 15 (Month 12 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I ~ IV, OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)
Hoehn & Yahr, MMSE, MoCA, GDS
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 症状日誌の確認, 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)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価 17 (Month 18 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価 18 (Month 21 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価 19 (Month 24 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I ~ IV, OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)
Hoehn & Yahr, MMSE, MoCA, GDS
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 症状日誌の確認, 有害事象
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)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価 21 (Month 30 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価 22 (Month 33 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 有害事象

評価 23 (Month 36 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む), 神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I ~ IV, OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)
Hoehn & Yahr, MMSE, MoCA, GDS
服薬中の抗バ薬, その他の併用薬, 症状日誌の確認, 有害事象

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)

一般身体所見（バイタルサインを含む），神経所見
服薬中の抗バ薬，その他の併用薬，有害事象

評価25 (Month 42 ± 14 days)

一般身体所見（バイタルサインを含む），神経所見
服薬中の抗バ薬，その他の併用薬，有害事象

評価26 (Month 45 ± 14 days)

一般身体所見（バイタルサインを含む），神経所見
服薬中の抗バ薬，その他の併用薬，有害事象

評価27 (Month 48 ± 14 days)

一般身体所見（バイタルサインを含む），神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I～IV，OFF で part II と III （part III はそれぞれビデオ撮影）
Hoehn & Yahr, MMSE, MoCA, GDS
服薬中の抗バ薬，その他の併用薬，症状日誌の確認，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)

一般身体所見（バイタルサインを含む），神経所見
服薬中の抗バ薬，その他の併用薬，有害事象

評価29 (Month 54 ± 14 days)

一般身体所見（バイタルサインを含む），神経所見
服薬中の抗バ薬，その他の併用薬，有害事象

評価30 (Month 57 ± 14 days)

一般身体所見（バイタルサインを含む），神経所見
服薬中の抗バ薬，その他の併用薬，有害事象

評価31 (Month 60 ± 14 days)

一般身体所見（バイタルサインを含む），神経所見
MDS-UPDRS の評価 ON で part I～IV，OFF で part II と III （part III はそれぞれビデオ撮影）
Hoehn & Yahr, MMSE, MoCA, GDS
服薬中の抗バ薬，その他の併用薬，症状日誌の確認，有害事象
臨床検査（血液，生化学）

⑤ 予測される副作用及びその対処方法

A. 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，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，ウイ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。患者には避妊するよう指導し、将来子供をもうけることを希望する患者には、治療前に精子を凍結保存しておくようカウンセリングを行う。

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、5%以下で、出血、感染および麻酔の合併症が主である⁶⁶。

頭蓋内出血：カニューレ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⁶⁷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きた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時に見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きたした場合は、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書を頂く。

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及ぼしたり、重篤な後遺症を残す可能性がある場合は本研究を中断し、外科的治療を含む適切な処置を優先する。

⑥ 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準

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。本臨床研究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。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）は、消失または軽快するまで追跡調査を行う。

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。病院長はその有害事象が重篤で予測できない副作用の場合には、治療研究の継続の可否について学内倫理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 48 時間以内に、厚生労働省に連絡することとする。

なお、臨床治療研究期間中あるいは終了後に被験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。

a. 程度

「医薬品等の副作用の重篤度分類基準（平成 4 年 6 月 29 日 薬安第 80 号）」（付録参照）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	日常生活に支障をきたす程度のもの
高度	日常生活を不可能にする程度のもの

b. 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、併用薬剤およ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	治療用ベクター注入と時間的に明白な関係があり、その治療用ベクターに既知（基礎実験およ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、その治療用ベクターの薬理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剤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、または治療用ベクターに関連ないとする情報がある場合

c. 経過

有害事象（症状およ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

d. 重篤な有害事象

次の場合は「重篤な有害事象」と判定する。

- i) 死に至るもの
- ii) 生命を脅かすもの
- iii) 治療のため入院または入院期間の延長が必要となるもの
- iv) 永続的または顕著な障害・機能不全に陥るもの
- v) その他、患者にとって著しく有害なことが示唆されるもの

B. 治療効果の評価

- a. 評価 9 (Month 6) における患者のパーキンソン症状の程度の改善度を一次評価項目とする。治療前の症状と評価 9 (Month 6) において、MDS-UPDRS の Part II (日常生活動作), Part III (運動スコア), Part IV (治療の合併症), Hoehn & Yahr Stage, MMSE, GDS, MoCA を比較する。なお MDS-UPDRS Part IV の項目 4-1, 4-2 (ジスキネジア) 及び 4-3, 4-4 (運動症状の変動) の判定に当たっては、患者が記載した「症状日誌」を参考にする。さらに、L-dopa の必要量の変化を評価する。
- b. FMT-PET による被殻注入 AAV-hAADC-2 の発現量を 2 次評価項目とする。評価 9 (Month 6) における FMT-PET を遺伝子導入前と比較し評価する。

C. 臨床研究の中止判定基準

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. 癌、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

D. 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出来ない。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、治療用ベクター投与終了後の調査・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、観察中止日及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。

E. 安全・効果評価・適応判定部会

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(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)を設置する。

1) 適格性評価

各被験者が全ての選択基準に合致し、除外基準のいずれにも抵触しないことを確認し、本臨床研究の対象被験者として適切かどうかを判定する。

2) 用量増加における評価

第1群の遺伝子治療を実施した後、全症例の6ヶ月後の評価が終了した時点で、上記委員会において有効性及び安全性を判定し、第2群(増量群)への移行の可否を決定する。この際、次に該当する場合には第2群への移行を行わないこととする。

a. 9-(5)-⑥-C 臨床研究の中止判定基準に該当する事象が確認された場合

b. 明らかに関連あり、あるいは多分関連ありと判定される中等度(日常生活に支障をきたす程度のもの)以上の有害事象が発生した場合。(参照:9-(5)-⑥-A-a 程度, 9-(5)-⑥-A-b 因果関係)ただし手術手技に基づく有害事象は、遺伝子治療とは直接関係ないため、この判定基準の対象とはしないこととする。

3) 臨床研究の総合判定

臨床研究終了後、全ての被験者から得られたデータをもとに本臨床研究の安全性及び効果について総合的に判定する。

⑦ 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9-(5)-⑤「予測される副作用及びその対処方法」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。

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。

(6) 前回実施した臨床研究との相違

今回申請している臨床研究は、2007年から自治医大で実施した「AADC発現 AAV ベクター線条体内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」と同様に、安全性を主要評価項目とし、副次評価項目は、①治療の有効性、および②AAV-hAADC-2 注入量と AADC 発現量との関係評価である。相違点は、今回の臨床研究では、国産の AAV-hAADC-2 を使用することと、前回と同様の 3×10^{11} (vg) に加え、高用量の 9×10^{11} (vg) を投与することである。安全性の評価は、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見、有害事象、抗パーキンソン病薬の必要量、併用薬、臨床検査について行う。①の効果判定は症状日誌、臨床的評価、服用する L-dopa の必要量に基づいて行う。②の発現量は FMT-PET によって判定する。

10 被験者のプライバシー保護と秘密の保全

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おく。
 - 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い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、MO、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出来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、ファイヤウォール、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、被験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。但し、次のいずれかに該当する時はこの限りではない。
 - A 法令に基づくとき
 - B 人の生命、身体又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 公衆衛生の向上又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又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

及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、個人情報又は個人情報が記録されている媒体を廃棄する場合には、復元又は判読が不可能な方法により、当該情報の消去又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又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元行う。

B フロッピーディスク、MO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及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、又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時は、管理者又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及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

本臨床研究で利用される個人情報は患者の年齢、治療成績、検査データ、ビデオ記録などで、それらを利用する者は自治医科大学でこの研究に携わった者に限ることとする。

これらの情報の利用目的は、学会発表や論文作成およびこの治療法を関係する国に申請するための資料作成である。患者の個人情報の管理は自治医科大学で行う。

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。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。

本臨床研究では、外部協力者としてタカラバイオ社が「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。

(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、遅延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)

(5) 記録の保存

本臨床研究に関連した記録は、自治医科大学附属病院において、研究の中止もしくは終了の後 10 年間保存することとする。

11 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり

(1) 資金源

本臨床研究の経費には、共同研究先である遺伝子治療研究所から提供された資金が使用される。また、共同研究先であるタカラバイオ社が製造したベクターを無償で提供を受ける。

(2) 起こり得る利益相反

利益相反はある。ただし、共同研究先である遺伝子治療研究所及びタカラバイオ社ともに、本臨床研究の実施、結果の公表に影響を与えない。

(3) 研究者等の関連組織との関わり

研究責任者は、共同研究先である遺伝子治療研究所の役員である。また、研究副責任者はタカラバイオ社との共同研究経費を財源として設置された共同研究講座の客員教授である。しかし、本臨床研究において、研究結果及び解釈に影響を及ぼすような利害の衝突は存在しない。また、本臨床研究の実施が被験者の権利、利益を損ねることはない。

12 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) 本臨床研究の結果は、本臨床研究に用いた薬剤の厚生省への製造（輸入）承認申請に際して添付する資料として使用する。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、前期の資料に公表する場合にあっても患者のプライバシーは確保される。

別表2 実施計画に添付すべき資料

1. 研究者の略歴及び研究業績

村松慎一

- 1983年 自治医科大学卒業
- 1991年 自治医科大学大学院卒業 (医学博士)
- 1991年 自治医科大学神経内科 助手
- 1992年 長野原町へき地診療所長
- 1995年 米国 NIH, visiting associate
- 1997年 自治医科大学神経内科学 (現 内科学講座神経内科部門) 助手
- 2004年 自治医科大学神経内科学 講師
- 2005年 自治医科大学神経内科学 助教授
- 2008年 自治医科大学地域医療学センター東洋医学部門 特命教授
自治医科大学神経内科学 特命教授 (兼任)

- Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, and Nakano I: A phase I study of aromatic l-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 18:1731-1735,2010.
- Hwu WL, Muramatsu S, Tseng SH, Tzen KY, Lee NC, Chien YH, Snyder RO, Brnne BJ, Tai CH, Wu RM: Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Sci Transl Med*, 2012;4:134-161.
- Miyazaki M, Adachi H, Katsumo M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G: Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med* 2012;18:1136-1141.
- Lee NC, Shieh YD, Chien YH, Tzen KY, Yu IS, Chen PW, Hu MH, Hu Mk, Muramatsu S, Ichinose H, Hwu WL: Regulation of the dopaminergic system in a murine model of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurobiol Dis*, 2013;52:177-190.
- Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenberg M, Muramatsu S, Saido TC: Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep*, 2013;3:1472.
- Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K, Muramatsu S: Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice. *Bio Med Res Int*, 2013;974819.
- Kondo Y, Okuno T, Asari S, Muramatsu S: Cell therapy for Parkinson's disease. In *Human Fetal Tissue Transplantation* (editors: Stubblefield P and Bhattacharya N), Springer-Verlag London, 2013;193-203.

小澤敬也

- 1977年 東京大学医学部医学科卒業
- 1980年 自治医科大学血液医学研究部門造血発生講座助手
- 1984年 東京大学医学部第3内科助手

- 1985年 米国 NIH (CHB, NHLBI) 留学 (Fogarty Fellow)
- 1987年 東京大学医科学研究所病態薬理学研究部講師, 附属病院内科講師
- 1990年 東京大学医科学研究所病態薬理学研究部助教授, 附属病院内科助教授
- 1994年 自治医科大学血液医学研究部門分子生物学講座教授
- 1998年 自治医科大学血液学講座 (現 内科学講座血液学部門) 主任教授
輸血部 (現 輸血・細胞移植部) 教授 (兼任)
分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部教授 (兼任)
- 2008年 自治医科大学分子病態治療研究センター・センター長 (併任)
- 2011年 自治医科大学免疫遺伝子細胞治療学 (タカラバイオ) 講座教授 (兼任)
- 2014年 東京大学医科学研究所附属病院長
自治医科大学免疫遺伝子細胞治療学 (タカラバイオ) 客員教授 (兼任)

- Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, and Nakano I: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 18:1731-1735, 2010.
- Tatara R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, Matsu H, Sato K, and Ozawa K: Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytotherapy* 13: 686-694, 2011.
- Meguro A, Ozaki K, Hatanaka K, Oh I, Sudo K, Ohmori T, Matsu H, Tatara R, Sato K, Sakata Y, Nakae S, Leonard WJ, and Ozawa K: Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. *Bone Marrow Transplant* 46:1557-1565, 2011.
- Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito C, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, and Ozawa K: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther* 19: 476-482, 2012.
- Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res* 73: 364-372, 2013.
- Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, Sakata Y: Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther*. 2013;21: 318-332.

渡辺英寿

- 1976年 東京大学医学部医学科 卒業
- 1976年 東京大学脳神経外科入局
- 1977年 三井記念病院脳神経外科医師
- 1979年 都立墨東病院脳神経外科医師
- 1980年 東京大学医学部 第一生理学教室助手
- 1983年 東京大学脳神経外科助手
- 1985年 西ドイツ・エルランゲン大学脳神経外科に留学
- 1988年 東京警察病院脳神経外科医幹
- 1999年 東京警察病院脳神経外科部長

2004年 自治医科大学脳神経外科教授
2009年 先端医療技術開発センター・センター長 (兼任)
2012年 血管内治療部センター長 (兼任)

- Nagai M, Watanabe E: Benefits of Clipping Surgery Based on Three-Dimensional Computed Tomography Angiography. *Neurol med-chirurgica* 50:630-637, 2010.
- Yamaguchi T, Shojima M, Delashaw JB, Watanabe E: Wada test using secobarbital sodium (Ional) to determine language dominance. *Brit J Neurosurg* 2011;25:203-209.
- Ebihara A, Tanaka Y, Konno T, Kawasaki S, Fujiwara M, Watanabe E: Evaluation of cerebral ischemia using near-infrared spectroscopy with oxygen inhalation. *J Biomed Opt* 2012;17:096002-1~096002-8.
- Moriai-Izawa A, Dan H, Dan I, Sano T, Oguro K, Yokota H, Tsuzuki D, Watanabe E: Multichannel fNIRS assessment of overt and covert confrontation naming. *Brain Lang* 2012;121:185-193.
- Nakajima T, Taira T, Kimura Y, Yokota H, Oguro K, Watanabe E: Modified axillary skin incision for implantation of deep brain stimulator: Elegant technique for DBS surgery. *Stereotact Funct Neurosurg* 2012;90(suppl 1):129.
- Tsuzuki D, Cai DS, Dan H, Kyutoku Y, Fujita A, Watanabe E, Dan I: Stable and convenient spatial registration of stand-alone NIRS data through anchor-based probabilistic registration. *Neurosci Res* 2012;72:163-171.
- Saito T, Uga M, Tsuzuki D, Yokota H, Oguro K, Yamamoto T, Dan I, Watanabe E: Evoked potential mapping of the rostral region by frameless navigation system in Mexican hairless pig. *J Neurosci Method* 2013;212:100-105.

中嶋剛

1997年 秋田大学医学部卒業
1997年 東北大学脳神経外科学
1999年 東北大学サイクロトロンRIセンター
2003年 東北大学大学院修了
2007年 東京女子医科大学脳神経外科学
2009年 Unit of Functional Neurosurgery, Institute of Neurology, University College London
2011年 自治医科大学脳神経外科学 (助教)

- Nakajima T, Shamoto H, Shirane R, Rikimaru H, Yamaguchi K, Itoh M, Yoshimoto T: Clinical application of SPM and PET to define epileptogenic focus in individual epileptic patients. *Neuroimage* 2000;11:S673.
- Nakajima T, Nimura T, Yamaguchi K, Ando T, Itoh M, Yoshimoto T, Shirane R: The impact of stereotactic pallidal surgery on the dopamine D2 receptor in Parkinson disease: a positron emission tomography study. *J Neurosurg* 2003;98:57-63.
- Nakajima T, Taira T, Ochiai T, Akagawa H, Sasaki T, Hori T: Clinical efficacy of intrathecal baclofen for complex regional pain syndrome. *Acta Neurochir (Wien)* 2008;150:974.
- Nakajima T, Kumabe T, Kanamori M, Saito R, Tashiro M, Watanabe M, Tominaga T: Differential diagnosis between radiation necrosis and glioma progression using sequential proton magnetic resonance spectroscopy and methionine positron emission tomography. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2009;49:394-401.

Nakajima T, Zrinzo L, Foltynie T, Olmos LA, Taylor C, Hariz MI, Limousin P. MRI-guided subthalamic nucleus deep brain stimulation without microelectrode recording: can we dispense with surgery under local anaesthesia? *Stereotact Funct Neurosurg* 2011;89:318-325.

Nakajima T, Taira T, Kimura Y, Yokota H, Oguro K, Watanabe E: Modified axillary skin incision for implantation of deep brain stimulator: Elegant technique for DBS surgery. *Stereotact Funct Neurosurgery* 2012;90:129.

Horisawa S, Taira T, Goto S, Ochiai T, Nakajima T. Long-term improvement of musician's dystonia after stereotactic ventro-oral thalamotomy. *Ann Neurol* 2013. Epub ahead of print

安藤 喜仁

1998年 自治医科大学医学部卒業 同附属病院初期研修

2000年 福島県立宮下病院 内科

2004年 自治医科大学神経内科 後期研修

2005年 益田医師会病院 内科

2007年 公立邑智病院 内科

2009年 自治医科大学神経内科 シニアレジデント

2010年 小山市民病院 神経内科

2011年 自治医科大学神経内科 病院助教

2013年 自治医科大学神経内科 助教

安藤喜仁 . 薬剤性パーキンソン症候群. In: *Medical Practice*. 文光堂, 東京, 2013, 30(1), p76-82

安藤喜仁, 森田光哉, 中野今治. 筋萎縮性側索硬化症・ハンチントン病の認知機能. In: *Modern Physician*. 新興医学出版社, 東京, 2013, 33(1), p95-98

Shimazaki H, Ando Y, Nakano I, Dalmau J. Reversible limbicencephalitis with antibodies against the membrane of neurones of the hippocampus. *BMC Case Rep*. 2009; 2009. pii: bcr07.2008.0509. doi: 10.1136/bcr.07.2008.0509. Epub 2009 Jan 23

小野さやか (旧姓 浅利)

2003年 弘前大学医学部医学科卒業

2003年 自治医科大学附属病院内科研修医

2005年 自治医科大学内科学講座神経内科学部門研修医

2008年 自治医科大学大学院入学

2012年 自治医科大学大学院卒業

2012年 自治医科大学内科学講座神経内科学部門特命病院助教

Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther*, 18(9):1731-1735, 2010.

Muramatsu S, Asari S, Fujimoto K, Ozawa K, and Nakano I: Gene therapy for Parkinson's disease: Strategy for the

- local production of dopamine. *Gene Ther Reg*, 5:57-65, 2010.
- Asari S, Fujimoto K, Miyauchi A, Sato T, Nakano I, and Muramatsu S: Subregional 6- ^{18}F fluoro-L-m-tyrosine uptake in the striatum in Parkinson's disease. *BMC Neurol*, 11-35, 2011.
- Muramatsu S and Asari S: Assessment of dopaminergic function in Parkinson's disease by SPECT/PET. in "Horizons in Neuroscience Research", NOVA, New York, pp219-224, 2012.
- Kondo Y, Okuno T, Asari S, and Muramatsu S: Cell therapy for Parkinson's disease. Clinical implications of fetal transplantation in *Medicine* (editors: Stubblefield P and Bhattacharya N), Springer-Verlag, London, 193-203, 2013.

奈良優子

- 1994年 福島県立医科大学 卒業
- 1994年 自治医科大学付属病院一般内科ジュニアレジデント
- 1995年 福島県立医科大学付属病院神経内科研修医
- 1996年 自治医科大学付属病院一般内科シニアレジデント
- 2003年 自治医科大学大学院 卒業
- 2003年 自治医科大学付属病院神経内科 副手
- 2007年 自治医科大学付属病院健診センター 非常勤医員
- 2013年 自治医科大学内科学講座神経内科学部門 非常勤医員

- 奈良優子, 村松慎一, 中野今治. ES細胞による治療, *日本臨床*. 62(9): 1643-1647, 2004.
- 奈良 優子, 村松慎一. パーキンソン病の再生医療, *BRAIN MEDICAL*, 17(3):41-45, 2005.
- 奈良 優子, 村松慎一: パーキンソン病における細胞治療の可能性は?—パーキンソン病Q&A. 服部信孝編, *jmed04*. 日本医事新報社, 東京, 91-94, 2009.

水上浩明

- 1986年 防衛医科大学校卒業
- 1988年 潜水医学実験隊実験部員
- 1990年 防衛医科大学校第3 内科
- 1993年 Hematology Branch, NHLBI, NIH, Visiting Associate
- 1995年 自衛隊横須賀病院
- 1998年 自治医科大学助手 (分子病態治療研究センター・遺伝子治療研究部)
- 2004年 同 講師
- 2011年 同 准教授
- 2014年 同 学内教授

- Lock, M., McGorray, S., Auricchio, A., Ayuso, E., Beecham, E.J., Blouin, V., Bosch, F., Bose, M., Byrne, B., Caton, T., Chiorini, J., Chtarto, A., Clark, K.R., Conlon, T., Darmon, C., Doria, M., Douar, A.M., Flotte, T.R., Francis, J., Francois, A., Giacca, M., Korn, M., Korytov, I., Leon, X., Leuchs, B., Lux, G., Melas, C.,

- Mizukami, H., Moullier, P., Muller, M., Ozawa, K., Philipsberg, T., Poulard, K., Raupp, C., Riviere, C., Roosendaal, S., Samulski, R.J., Soltys, S., Surosky, R., Tenenbaum, L., Thomas, D.L., van Montfort, B., Veres, G., Wright, J.F., Xu, Y., Zelenia, O., Zentilin, L., Snyder, R.O.: Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Reference Standard Material. *Human Gene Therapy*, 21:1723-85, 2010.
- Yagi, H., Ogura, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hamada, H., Yoshikawa, H., Ozawa, K., Kume, A.: Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J Gene Med* 13:114-22, 2011.
- Kaneda, K., Kasahara, H., Matsui, R., Katoh, T., Mizukami, H., Ozawa, K., Watanabe, D., Isa, T.: Selective optical control of synaptic transmission in the subcortical visual pathway by activation of viral vector-expressed halorhodopsin. *PLoS One* 6:e18452, 2011.
- Ogura, M., Urabe, M., Akimoto, T., Onishi, A., Ito, C., Ito, T., Tsukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Muto, S., Kusano, E., Ozawa, K.: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther*, 19:476-82, 2012.
- Mimuro, J., Mizukami, H., Hishikawa, S., Ikemoto, T., Ishiwata, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ono, F., Ozawa, K., Sakata, Y.: Minimizing the Inhibitory Effect of Neutralizing Antibody for Efficient Gene Expression in the Liver with Adeno-associated Virus 8 Vectors. *Mol Ther*, 21:318-23, 2013.
- Shimada, M., Abe, S., Takahashi, T., Shiozaki, K., Okuda, M., Mizukami, H., Klinman, D.M., Ozawa, K., Okuda, K.: Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein. *PLoS One*, 8(3):e57606. 2013.

卜部匡司

- 1985年 自治医科大学医学部卒業，福井県立病院研修医
 1987年 社会保険高浜病院内科医員
 1989年 福井医科大学第二内科助手
 1995年 自治医科大学大学院卒業（医学博士），自治医科大学ウイルス学講座助手
 1999年 米国 NIH 分子血液学教室留学
 2004年 自治医科大学遺伝子治療研究部助手
 2005年 自治医科大学遺伝子治療研究部講師

- Urabe, M., Xin, K. Q., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., and Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther* 13: 823-828, 2006.
- Urabe, M., Nakakura, T., Xin, K. Q., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, R. M., and Ozawa, K.: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80: 1874-1885, 2006.
- Rahim, A., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Reduction of MBS85 gene expression after the targeted integration of a transgene into the AAVS1 site using adeno-associated virus integration machinery *Int J Genet Gene Ther* 1: 1-7, 2011.
- Ogura, M., Urabe, M., Akimoto, T., Onishi, A., Ito, C., Ito, T., Tsukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Muto, S.,

- Kusano, E., and Ozawa, K.: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther* 19: 476-482, 2012.
- Miyata, S., Urabe, M., Gomi, A., Nagai, M., Yamaguchi, T., Tsukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K., and Watanabe, E.: An R132H Mutation in Isocitrate Dehydrogenase 1 Enhances p21 Expression and Inhibits Phosphorylation of Retinoblastoma Protein in Glioma Cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2013.

吉尾卓

- 1979年 秋田大学医学部卒業
 1979年 昭和大学藤が丘病院内科レジデント
 1981年 昭和大学藤が丘病院呼吸器内科後期助手
 1982年 東京大学物療内科研究生
 1983年 昭和大学藤が丘病院呼吸器内科後期助手
 1985年 St. Jude Children's Research Hospital 免疫学部門 Postdoctoral Fellow
 1988年 自治医科大学アレルギー膠原病科臨床助手
 1990年 自治医科大学アレルギー膠原病学講座講師
 2003年 自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学部門准教授
 2008年 自治医科大学附属病院臨床試験センター准教授/センター長
 自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学部門兼任
 2010年 自治医科大学附属病院臨床試験センター 教授
 自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学部門兼任

- Kasai H, Kashima Y, Izawa A, Tomita T, Miyashita Y, Koyama J, Takahashi M, Yoshio T, Yazaki Y, Higuchi M, Ikeda U: Immunoabsorption therapy reduces oxidative stress in patients with dilated cardiomyopathy. *World Journal of Cardiovascular Diseases* 2:305-12, 2012.
- Matsuyama Y, Okazaki H, Hoshino M, Onishi S, Kamata Y, Nagatani K, Nagashima T, Iwamoto M, Yoshio T, Ohto-Ozaki H, Tamemoto H, Komine M, Sekiya H, Tominaga SI, Minota S: Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor: possible association with persistent IL-1 β signaling and a poor clinical response. *Rheumatol Int* 32:1397-401, 2012.
- Yoshio T, Okamoto H, Onishi S, Minota S: Antiribosomal-P protein antibodies are associated with proliferative glomerulonephritis more strongly than with membranous glomerulonephritis in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 22:488-90, 2012.
- Maruyama A, Nagashima T, Kamata Y, Nagatani K, Murosaki T, Yoshio T, Minota S: An unusual cause of hemichorea-hemiballism in a patient with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 33: 267-8, 2013.
- Yoshio T, Okamoto H, Hirohata S, Minota S: Anti-NR2 glutamate receptor auto-IgG antibodies from patients with systemic lupus erythematosus activate endothelial cells. *Arthritis Rheum* 65: 457-63, 2013.

1977年 3月 明治薬科大学衛生薬学科卒業
 1977年 4月 自治医科大学附属病院薬剤部入職
 1989年 4月 自治医科大学附属病院薬剤部主任薬剤師
 2001年 4月 自治医科大学附属病院臨床薬理センター治験推進室室長(兼) 副薬局長
 2008年 4月 自治医科大学附属病院 臨床試験センター 副センター長
 2009年 4月 明治薬科大学客員教授
 2013年 4月 自治医科大学附属病院 臨床試験推進部 副部長

Yamazaki S, Nakanishi M, Hamamoto T, Hirata H, Ebihara A, Tokue A, Kagawa Y. EXPRESSION OF HUMAN METALLOTHIONEIN-II FUSION PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI*. BIOCHEMISTRY INTERNATIONAL, 1992; 28: 451-460.

Inoki Y, Hakamata Y, Hamamoto T, Kinouchi T, Yamazaki S, Kagawa Y, Endo H. Proteoliposomes Colocalized with Endogenous Mitochondria in Mouse Fertilized Egg. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000;278: 183-191.

Yamazaki S, Morita T, Endo H, Hamamoto T, Baba M, Joichi Y, Kaneko S, Okada Y, Okuyama T, Nishino H, Tokue A. Isoliquiritigenin Suppresses Pulmonary Metastasis of Mouse Renal Cell Carcinoma. Cancer Letters, 2002; 183: 23-30.

Harada K, Ikebe K, Okada M, Komiyama S, Senba F, Ohbayashi M, Nakano K, Tomokiyo Y, Yamazaki S, Fujimura A. Frequency of Prescriptions that could Cause Harmful Drug Interactions and Usefulness of Providing such Information. Jpn J Clin Pharmacol Ther, 2002; 33: 127-130.

佐藤俊彦

1985年 福島県立医科大学卒業, 同大学放射線科入局
 1987年 日本医科大学第一病院放射線科入局
 1989年 獨協医科大学附属病院放射線科入局
 1993年 鷺谷病院副院長就任, 獨協医大越谷病院放射線科非常勤講師
 1996年 有限会社ドクターネット設立
 1997年 宇都宮セントラルクリニック (現 (医) DIC 宇都宮セントラルクリニック) 設立
 2012年 米国財団法人 野口医学研究所 常務理事
 野口記念インターナショナル画像診断クリニック院長

佐藤俊彦: 臨床家のための Clinical-PET, デジタルメデイスン社, 東京, 2004.

Moriya H, Midorikawa S, Igarashi Y, Hashimoto N, Honjo H, Shishido F, Suzuki K, Katakura T, Sato T: Multi-slice of CT of the Lung. NICHIDOKU-IHO 48:39-55, 2003.

Sato T: Clinical Experience with GSO-PET Allegro. Medix 40:21-26, 2004.

Asari S, Fujimoto K, Miyauchi A, Sato T, Nakano I, and Muramatsu S: Subregional 6-[¹⁸F]fluoro-L-m-tyrosine uptake in the striatum in Parkinson's disease. BMC Neurol, 11:35, 2011.

峰野 純一

- 1984年 京都大学農学部（酵素化学）卒業
 1984年 宝酒造株式会社入社
 1998年 宝酒造株式会社 バイオ研究所 主任研究員
 2003年 タカラバイオ株式会社 DNA機能解析センター 副センター長
 細胞・遺伝子治療センター 副センター長
 2004年 タカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター長
 2009年 タカラバイオ株式会社 遺伝子医療事業部門副本部長
 細胞・遺伝子治療センター 副センター長
 2012年 タカラバイオ株式会社 常務執行役員
 遺伝子医療事業部門副本部長
 細胞・遺伝子治療センター長

- Okamoto S, Amaishi Y, Goto Y, Ikeda H, Fujiwara H, Kuzushima K, Yasukawa M, Shiku H, Mineno J: A Promising Vector for TCR Gene Therapy: Differential Effect of siRNA, 2A Peptide, and Disulfide Bond on the Introduced TCR Expression. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012 Dec 18;1:e63. doi: 10.1038/mtna.2012.52.
- Iwamura K, Kato T, Miyahara Y, Naota H, Mineno J, Ikeda H, Shiku H: siRNA-mediated silencing of PD-1 ligands enhances tumor-specific human T-cell effector functions. *Gene Ther* 19(10): 959-966, 2011.
- Nagai K, Ochi T, Fujiwara H, An J, Shirakata T, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Melenhorst JJ, Gostick E, Price DA, Ishii E, Yasukawa M: Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T lymphocytes to display effective anti-leukemia reactivity. *Blood* 119: 368-376, 2012.
- Chono H, Goto Y, Yamakawa S, Tanaka S, Tosaka Y, Nukaya I, Mineno J: Optimization of lentiviral vector transduction into peripheral blood mononuclear cells in combination with the fibronectin fragment CH-296 stimulation. *J Biochem* 149: 285-292, 2011.
- Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, Kato I: Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res* 69: 9003-9011, 2009.

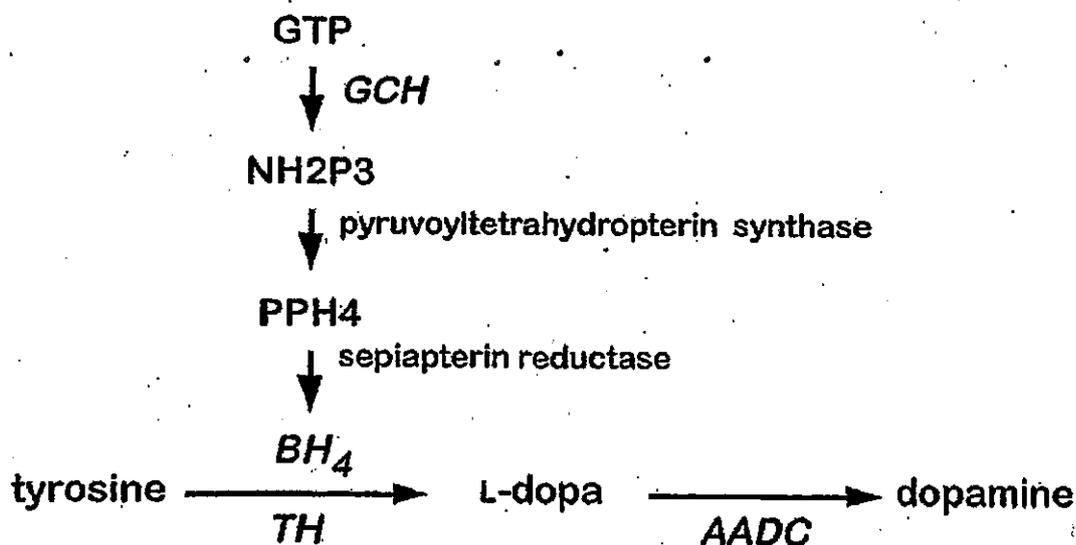
2. 実施施設の施設設備の状況

当該遺伝子治療臨床研究は自治医科大学医学部付属病院手術室、回復室および脳神経センター病室にて行う。本院では、手術室に定位脳手術装置を備えている。手術に用いた器具はエチレンオキサイドガス滅菌装置を用いて処理し、患者排泄物は本院が有する高圧滅菌機で処理する。また、ウイルスベクターの取り扱いに関しては、タカラバイオ(株)社から提供された臨床用 AAV ベクターの脳内注入のための試験管分注と注射器への吸引は、自治医科大学付属病院「臨床用細胞プロセッシング室」(クリーンかつ P2 レベル対応)の中の安全キャビネット内(クラス 100)において、担当者が行う。

3. 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

効率よくドパミンを生合成するためには、アミノ酸のチロシンを L-dopa に変換するチロシン水酸化酵素 tyrosine hydroxylase (TH); L-dopa をドパミンに変換する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC), TH の補酵素である tetrahydrobiopterin (BH₄)を合成するのに必要な GTP cyclohydrolase I (GCH)の三種類の酵素が必要である(図1)。

図1: ドパミンの生合成経路



TH, Tyrosine hydroxylase; AADC, aromatic-L-amino-acid decarboxylase;
 BH₄, tetrahydrobiopterin, a cofactor of TH; PPH₄, 6-pyruvoyl tetrahydropterin; NH₂P₃,
 D-erythro-7, 8-dihydroneopterin triphosphate;
 GTP, guanosine triphosphate; GCH, GTP cyclohydrolase I.

自治医科大学では、AAV ベクターを使用して、これらの酵素の遺伝子を導入することによりドパミン産生を回復する遺伝子治療法を開発してきた。

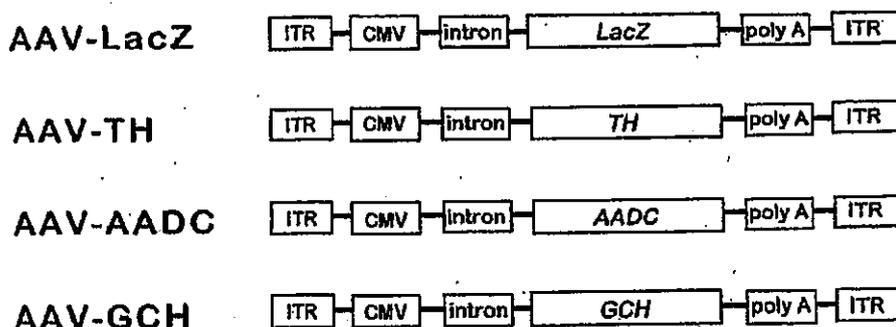
(1) 培養細胞を用いた研究の成果

① 実験計画の概要

ラット脳の初代培養神経細胞およびヒト胎児腎臓由来の 293 細胞において、LacZ マーカー遺伝子を発現する AAV ベクター(AAV-LacZ)を使用して遺伝子導入効率を検討した。また、TH, AADC, GCH の各遺伝子を発現する AAV ベクター(AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH)を使用して、AAV-TH 単独の場合と AAV-AADC および AAV-GCH を併用した場合とで、ドパミン産生への効果を比較検討した。

使用した AAV ベクターは、いずれも臨床研究と同じく 2 型 AAV (AAV-2) 由来で、CMV プロモーターにより各遺伝子を発現する (図 2)。

図 2 : 実験に使用したベクターの構造



ITR, AAV inverted terminal repeat; CMV, cytomegalovirus immediate-early promoter; intron, the human growth hormone first intron; poly A, the SV40 polyadenylation signal sequence.

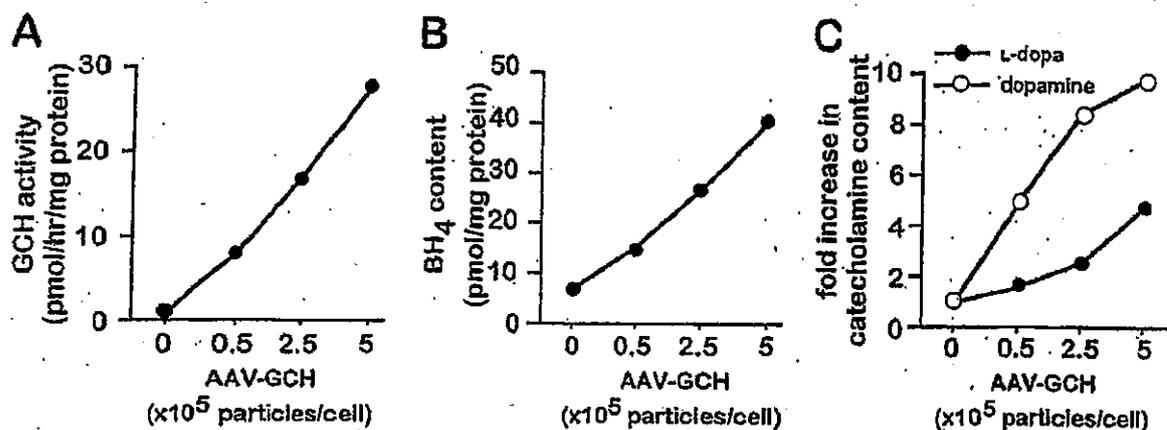
① 培養細胞における遺伝子導入効率及び導入された遺伝子の構造と安定性

ラット胎仔 (Wistar, 胎生 20 日) 線条体の初代培養神経細胞に、AAV-LacZ を 5×10^2 から 1×10^5 vector genome (vg) /cell の力価範囲で感染させると、 1×10^4 vg/cell 以上の力価では、1 週間後にほぼ 30% の細胞が LacZ 陽性となった。2 週間後にも同様の発現が持続して認められた⁶⁸。各 1×10^5 vg/cell の AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH を感染させた 293 細胞において、Western blot により TH, AADC, GCH 各蛋白質の発現が確認された。

② 培養細胞に導入された遺伝子の機能

293 細胞に 4.5×10^3 vg/cell の AAV-TH を感染させると 23.35 fg/cell の L-dopa の産生が認められたがドパミンは検出されなかった。しかし、AAV-TH に加えて 4.5×10^2 から 4.5×10^3 vg/cell までの範囲の AAV-AADC を感染させると、AAV-AADC の量が増えるに従い L-dopa が減少してドパミンが増加した。このことは、導入された AADC 遺伝子が発現し、L-dopa からドパミンへの変換が行われた結果と考えられた。ラットの初代培養神経細胞において、各 1.4×10^4 vg/cell の AAV-TH と AAV-AADC を感染させた場合には、 0.91 ± 0.03 fg/cell のドパミンが産生された。AAV-TH 単独の感染では、ドパミン産生量は 0.20 fg/cell 未満であった⁶⁸。293 細胞において、AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH (各 5×10^5 vg/cell) の三種類を同時に感染させると、ドパミンの産生量は AAV-GCH を加えないときに比べて約 10 倍に増加した (図 3)。

図3：培養細胞における AAV-GCH 添加によるドパミン産生の増強



HEK293 細胞に各 5×10^5 の AAV-TH と AAV-AADC, および 0, 0.5, 2.5, 5×10^5 の AAV-GCH を添加した。AAV-GCH の用量依存的に BH₄ の産生増加が認められ, ドパミンも増加した。

③ 培養細胞を用いた実験の評価

AAV ベクターによりラットの初代培養神経細胞では 30% 程度に遺伝子導入された。TH, AADC, GCH の各遺伝子を 293 細胞に導入することによりドパミンが産生された。AADC 遺伝子導入により, L-dopa からドパミンの変換が行われると考えられる。

(2) 実験動物を用いた研究の成果

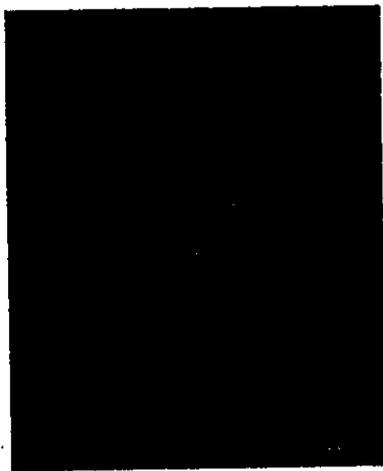
① 実験計画の概要

選択的に黒質ドパミン神経細胞を傷害する 6-hydroxydopamine (6-OHDA) と 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) によるパーキンソン病モデル動物を使用した。6-OHDA を黒質線条体路に注入したラット, および MPTP を慢性的に全身投与したカニクイサル (*Macaca fascicularis*) の線条体に, AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH を注入して, 遺伝子導入によるドパミン産生と運動障害の改善効果を検討した。

② 実験動物における遺伝子導入効率及び導入された遺伝子の構造と安全性

6-OHDA モデルラットの線条体に各 5×10^7 vg の AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH を 3 か所に分けて注入 (合計 1.5×10^8 vg) した場合, 免疫蛍光染色の結果から遺伝子導入された細胞の 95% 以上は抗 microtubule-associated protein (MAP2) 抗体に反応する神経細胞であった。線条体の神経細胞への遺伝子導入効率は約 2.0% で, ベクター注入部位では 1.2×10^5 の神経細胞が遺伝子導入された⁶⁹。AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH の各遺伝子は 18 か月後にも発現していた⁷⁰ (図 4)。

図 4: モデルラット線条体の免疫染色



AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH の三種類のベクターを注入
18 か月後の抗 TH 抗体による免疫染色。
二本の注入トラックを中心に遺伝子導入されている。
Scale bar = 2 mm

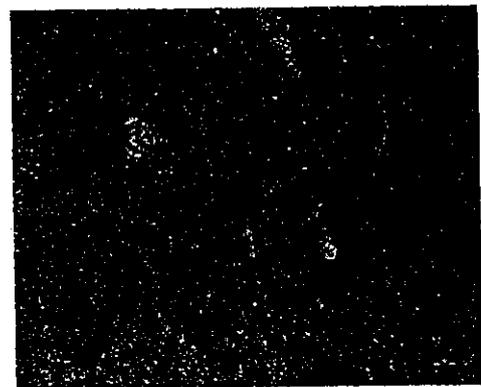
MPTP サルにおいて、各 1.5×10^{11} vg のベクターを被殻の 9 か所に注入した場合には、被殻の 92-94% の領域に遺伝子導入された (図 5)

図 5. MPTP サル脳(冠状断)の免疫染色

左図: AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH の三種類のベクターを注入 65 日後の抗 AADC 抗体による免疫染色。被殻の広範な領域に遺伝子導入されている (矢印)。選択的神経毒 MPTP により黒質からのドパミン神経終末が脱落し、遺伝子非導入側の被殻および両側の尾状核では染色性が低下している。
右図: 遺伝子導入側の被殻では多数の TH 陽性細胞が認められる。



Scale bar = 5 mm



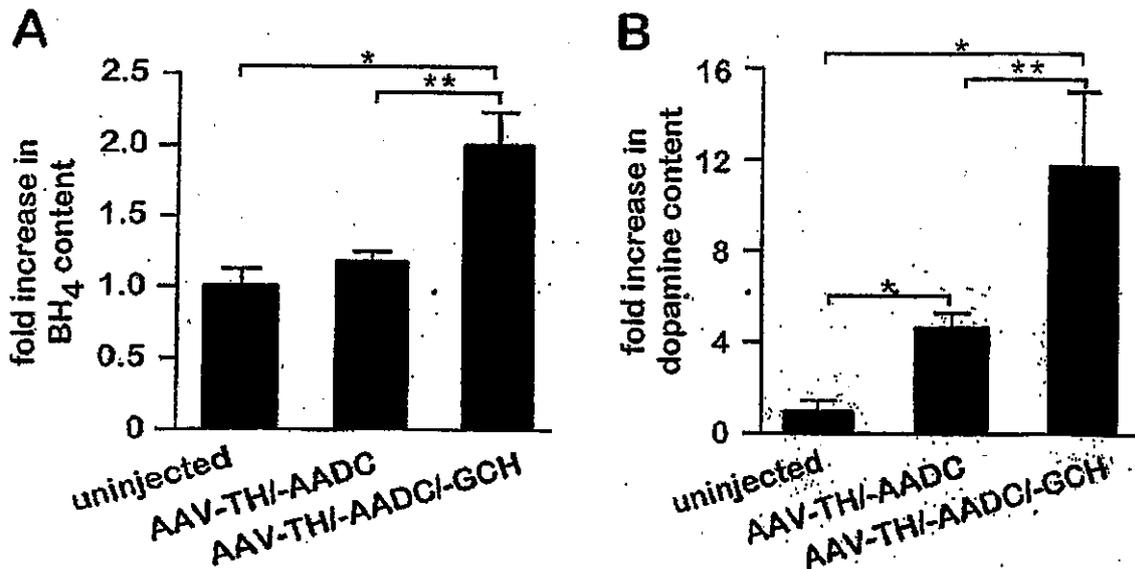
Scale bar = 50 mm

MPTP サルでは, positron emission tomography (PET)により遺伝子導入 3 か月後にも被殻で $[b-^{11}C]L$ -dopa の取り込みの増加が認められ, AADC 遺伝子の発現が持続していると考えられた⁷¹.

③ 実験動物に導入された遺伝子の機能

6-OHDA モデルラットの傷害側線条体に総量 1.5×10^9 vg の AAV-TH を注入し、6週間後に線条体の L-dopa の含有量を測定すると非注入群に比べて有意に増加した。AAV-TH と AAV-AADC を同時に注入した場合には、ドパミンの代謝産物である 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) が増加した⁶⁸。さらに AAV-GCH も加えて AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH の三種類のベクター (各 1.5×10^7 vg) を注入すると、AAV-TH 単独注入の場合と比較して、線条体の BH₄ 含量は約 2 倍に増加し、ドパミン含量も約 3 倍に増加した (図 6)。

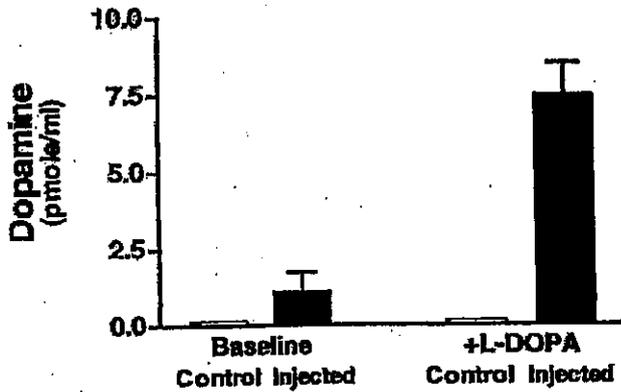
図 6 : モデルラット線条体における遺伝子導入後の BH₄ およびドパミン含量の増加



AAV-TH と AAV-AADC の二種類のベクターの投与によってアポモルフィン誘発の回転運動は抑制されたが、AAV-GCH を加えるとその効果は増加した。運動障害の改善効果は、ベクター注入後 18 か月間の観察期間の間持続した。

MPTP サル (4頭) の片側の被殻に AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH (各 1.5×10^{11} vg) を定位脳手術により注入すると、反対側の上下肢では動作が速くなり、筋強剛、振戦も消失した。ドパミン受容体作動薬であるアポモルフィンの筋肉注射によりベクター注入側を向いた体軸の回転傾向が出現し、同側 (ベクター注入側) の被殻でドパミンが産生されドパミン受容体の super-sensitivity が改善されたと考えられた。in vivo dialysis によって、同側の被殻でドパミンとその代謝物の増加が確認され、さらに L-dopa の全身投与によりドパミン生成の増加が認められた (図 7)。

図7：MPTPサル線条体のドパミンの増加



遺伝子導入側 (injected) の被殻では、非導入側 (control) に比べてドパミンの量が多かった。さらに L-dopa を静注すると遺伝子導入側ではドパミンの産生量が増加した。

特に副作用は認められず、脳組織標本でも炎症反応や神経細胞の脱落などの異常を認めなかった。治療前の症状が最も重く臥床状態であった1頭のサルについては、治療後対側の上下肢の運動障害の改善とともに起立可能となり4年後にも症状の悪化は認めない。

AAV-AADCのみを注入したMPTPサル3頭のうちPET計測を行った2頭 (各 5.4×10^{10} , 7.2×10^{10} vg 注入) では、遺伝子導入した被殻で $[b-^{11}C]L$ -dopa の取り込みの増加が認められ AADC 活性が回復していた (図8)。

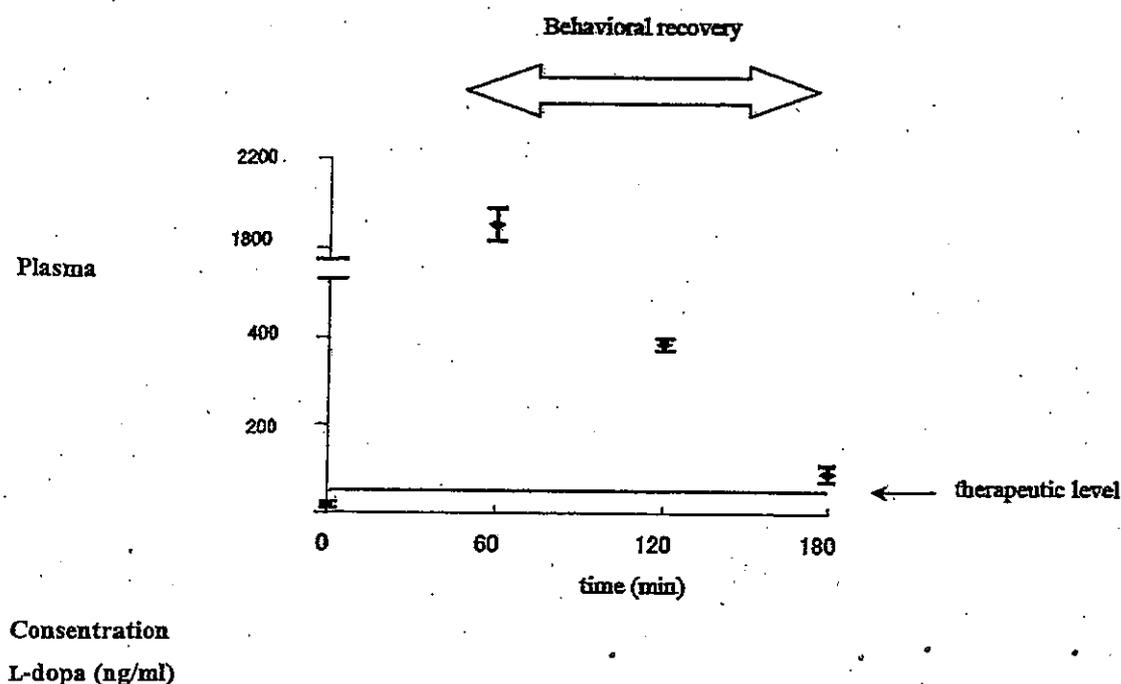


図8：MPTPサルの遺伝子治療後のPET画像
左側の被殻に AAV-AADC 5.4×10^{10} vg を注入12週間後の $[b-^{11}C]L$ -dopa PET 画像

また、L-dopa 5mg/kg を末梢性脱炭酸阻害剤の Benserazide 1.25mg/kg とともに経口投与すると、注入反対側の上下肢では運動障害が改善し、その効果は L-dopa の血中濃度を反映して3-4時間持続した (図9)。

長期観察中のサル (4.35×10^{10} vg 注入) では、ベクター注入1年後にも L-dopa による症状の改善効果が認められている。

図9: L-dopa 投与後の血中濃度と運動障害の改善



④ 実験動物の評価

選択的神経毒によるパーキンソン病モデル動物において, AAVベクターによるドパミン合成系の酵素遺伝子(TH, AADC, GCH)を線条体で発現させることにより運動障害の改善が得られた. 動作緩慢・筋強剛・振戦などパーキンソン病患者と同様の運動障害を呈するMPTPサルにおいて, 臨床研究と同様, AADCの遺伝子導入とL-dopaの経口投与により運動症状の改善が認められた.

(3) 関連する研究の成果

パーキンソン病の遺伝子治療の第二の戦略として, ドパミン神経細胞の変性を抑制するために神経保護作用のある物質を脳内に持続的に供給する遺伝子治療がある. 神経栄養因子の Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) は, 微量でも培養ドパミン神経細胞に対して保護効果を示すことが知られている. GDNFを発現するAAVベクター(AAV-GDNF)を作製し, ラットの初代培養系においてドパミン神経細胞へ感染させることにより, 神経細胞の生存率が高まることを明らかにした⁷². また, 6-OHDAを線条体に注入して

から4週間を経て既に黒質線条体路の変性が進行している状態のラットの線条体に AAV-GDNF を注入する実験では、黒質ドパミン細胞の変性脱落が抑制され運動障害の改善効果が得られることを示した⁷³。さらに、GDNF は培養運動ニューロンにも保護効果があることが知られているため、筋萎縮性側索硬化症のモデル動物である SOD1 トランスジェニックマウスを使用して、四肢の筋肉に AAV-GDNF を発現させることにより、脊髄の運動ニューロンの脱落を抑制し、延命効果が得られることを報告した⁷⁴。

4. 遺伝子治療臨床研究に関連する実施施設以外の内外の研究状況

(1) カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) で行われた動物実験の結果

- ① 6-OHDA モデルラットの実験では、総量 4×10^9 particles の AAV-AADC または AAV-GFP を傷害側の線条体に注入した結果、AAV-AADC 群では、遺伝子導入前には反応の見られなかった低用量 (5 mg/kg) の L-dopa を腹腔内投与すると対側への回転運動を生じるようになった。この回転運動量は AAV-AADC 注入線条体における AADC の活性と相関し、AADC 活性は正常側線条体の 50% にまで達した。遺伝子導入線条体における L-dopa (50 mg/kg) 腹腔内投与 2 時間後のドパミン産生量は、AAV-AADC 群 (4.34 ± 0.78 mols/fraction, $n=6$) では AAV-GFP 群 (1.69 ± 0.53 mols/fraction, $n=6$) より有意に高かった。なお、この実験では AADC 遺伝子が導入された領域は、線条体の 30% 未満 ($6.7 \pm 0.4 \text{ mm}^3$) である⁷⁵。
- ② アカゲサルに MPTP 2.5-3.5mg を右側の内頸動脈に注入するとともに 0.3 mg/kg を 4 回静脈注射することによって作製した、右側の線条体に傷害の強いパーキンソン病モデルを使用した実験では、総量 3.6×10^{11} vg の AAV-AADC (2 頭) または 1.5×10^{11} particles の AAV-LacZ (2 頭) を、尾状核に 2 か所と被殻に 4 か所の合計 6 か所に注入した結果、遺伝子導入 7-8 週間後の FMT-PET で、AAV-AADC 注入側の被殻における FMT の取込みは顕著に増加しており、1 頭では、反対側を超える程度まで増加していた。AAV-AADC を注入した 2 頭の免疫染色で AADC 抗体に反応する細胞 (AADC-IR) の密度は、被殻において各 $7709000/\text{mm}^3$, $5925000/\text{mm}^3$ で、大部分は典型的な medium spiny neuron の形態を示していた。AAV-AADC を注入したサルに L-dopa 250 mg/carbidopa 25 mg を投与して 30-45 分後に回収した被殻では、L-dopa が減少し HVA が増加しており、AADC 活性の回復により速やかに L-dopa が代謝されて HVA が生成したと推察された⁷⁶。
- ③ ②と同様に行ったアカゲサルの MPTP 片側モデルを使用した実験で、AADC-IR 細胞数を定量したところ、AAV-AADC 注入 8 週後と 3 年後に安楽殺した各 2 頭では、総数 1711867 ± 204852 および 2539212 ± 531186 であった。AAV 注入側の被殻における抗 NeuN 抗体 (神経細胞のマーカー) に反応する細胞 (NeuN-IR) 数は 37555406 ± 2690866 であり、注入 8 週後と 3 年後で NeuN-IR 細胞のうちそれぞれ 4.6% と 6.8% に、AADC 遺伝子が導入されたことになる⁷⁷。
- ④ アカゲサル 7 頭を使用して、4 頭は右側の内頸動脈に 2.5-3.5mg の MPTP を注入 (そのうち 1 頭は 0.3 mg/kg を静脈注射で追加) する方法により、3 頭は 2-3mg の MPTP を 2-7 日の間隔で皮下注射する方法によってパーキンソン病のモデルを作製した。両側の線条体に総量 1×10^{12} vector genomes (このベクター溶液は 4:1 の割合で empty capsid を含むため、 5×10^{12} particles に相当する) の AAV-AADC を注入し、遺伝子導入の前後で線条体における FMT の取込みの変化を、小脳を reference として計測し、抗 AADC 抗体を使用した免疫染色の画像解析により推定した遺伝子導入領域の大きさ (全線条体に対する%) との相関を検討した。その結果、より傷害の強い右側では相関係数 0.78 を示した。このことから、FMT-PET は、*in vivo* で AADC の発現をモニターするのに有用である⁷⁸。
- ⑤ 今回の臨床研究で使用するものと同じ注入用のカニューレの安全性を検証するため、4 頭の正常アカゲサルの両側被殻の合計 4 か所の総量 3×10^{11} vg の AAV-hAADC-2 を注入した。その結果、遺伝子導入後の AAV に対する血中の中和抗体価の上昇は軽度で、5.5 週間後の脳組織では注入針のトラックに沿って軽微な限局した炎症反応を認めたのみであった。注入速度を $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$ から $1 \mu\text{L}/\text{min}$ に漸増した場合と、 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ の一定にした場合で遺伝子導入された容積には差がなかった⁷⁹。
- ⑥ 7 年前に MPTP の慢性皮下注射により作製し、その後 AAV-5 ベクターによる Neurturin の遺伝子治療実験に使用した既往のあるモデルサル 5 頭において、総量 1×10^{12} vg の AAV-AADC (3 頭)、または AAV-NUL を両側の線条体 (各半球について、尾状核 1 か所、被殻 2 か所) に注入し、注入前 3 週間および注入後 6 か

月間で、L-dopaに対する反応を検討した。その結果、AAV-AADC導入群では、治療効果が得られるL-DOPAの必要量は減少した。しかし、L-dopa誘発性不随意運動L-dopa induced dyskinesia (LID)がより低用量のL-dopaで生じるようになった。これらの3頭では、遺伝子導入された領域が狭くAADCの発現が線条体の小領域に限局していたためと考えられる⁸⁰。

- ① ②と同様に作製したアカゲサル MPTP 片側モデル12頭を使用した実験で、片側の被殻の2箇所、10頭では総量各6, 18, 55, 170, 500×10^9 vgのAAV-AADCを各2頭ずつ投与し、2頭では総量 500×10^9 vgのAAV-GFPを投与した。FMT-PETの線条体/小脳の比は、正常では2.72(n=8)であり、MPTP投与後1.51に低下していた(n=12)。遺伝子導入4～6週間後には、 170×10^9 vg以上のAAV-AADCを注入した5頭では2.0以上に回復したが、 55×10^9 vg未満ではほとんど改善は認められず、FMT-PETの変化には 55×10^9 vg付近に関値があるものと推察された。同様にL-dopa投与後の運動障害の改善効果も 55×10^9 vg以上の投与群でのみ認められた。さらに、遺伝子導入6か月後の線条体と淡蒼球におけるAADC活性は、 55×10^9 vgまでは投与量に比例して増加が認められた⁸¹。

(2) 実施施設以外での遺伝子治療臨床研究の成果

「資料5 Parkinson病に対する遺伝子治療の臨床試験」を参照。

5. その他必要な事項

(1) 遵守する法令/省令など

本遺伝子治療臨床研究は、以下の法令/省令等を遵守して実施される。

- ・「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第二号, 平成16年12月28日)
- ・「臨床研究に関する倫理指針」
(平成20年厚生労働省告示第四百十五号, 平成20年7月31日)
- ・「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)
- ・「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)
- ・「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)
- ・「遺伝子組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)

(2) 類似の遺伝子治療臨床研究の成果

- 4 (2) 実施施設以外での遺伝子治療臨床研究の成果を参照。

(3) 自治医科大学附属病院内規約

1. 自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会規程

(目的)

第1条 自治医科大学附属病院(以下「病院」という.)において実施する遺伝子治療臨床研究(以下「治療研究」という.)について、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、以下「指針」という.)に基づき審査を行うため、病院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」という.)を置く。

(任務)

第2条 委員会は、自治医科大学附属病院長(以下「病院長」という.)の諮問に基づき、次に掲げる業務を行うものとする。

- (1) 治療研究の実施計画を記載した書類(以下「実施計画書」という.)等に基づき、当該治療研究の実施(当該治療研究の重大な変更を含む、以下同じ.)について指針に則し審査を行い、その適否及び留意事項、改善事項等について、病院長に対し意見を提出するとともに、当該審査の過程の記録を作成し、これを保管すること。
- (2) 治療研究の進行状況及び結果について報告を受け、必要に応じて調査を行い、その留意事項、改善事項等について、病院長に対し意見を提出すること。
- (3) その他治療研究に関して諮問された事項について、病院長に対し意見を提出すること。

(構成、任期等)

第3条 委員会は、次に掲げる委員をもって構成する。

- (1) 分子生物学、細胞生物学、遺伝学、臨床薬理学、病理学等の専門家 5名以上
- (2) 法律に関する専門家 1名以上
- (3) 生命論理に関する意見を述べるにふさわしい識見を有する者 1名以上
- (4) 当該治療研究の対象となる疾患に係る臨床医 1名以上

2 委員会は、男性委員及び女性委員双方から構成され、複数の外部委員を含むものとする。

3 委員は、病院長補佐会議において選出し、病院長が委託する。

4 第1項第1号から第3号までの委員の任期は2年とし、再任を妨げない。ただし、補欠の委員の任期は、前任者の残任期間とする。

5 第1項第4号の委員は、選出された実施計画書ごとに選出する。

(委員長及び副委員長)

第4条 審査委員会に、委員長及び副委員長を置く。

2 委員長及び副委員長は、前条第1項第1号から第3号までの委員の中から、病院長補佐会議の議を経て、病院長が委嘱する。

3 委員長に事故があるとき、又は欠けたときは、副委員長がその職務を代理し、又は職務を行う。

(会議)

第5条 委員長は、委員会を招集し、その議長となる。

2 委員会は、委員の3分の2以上が出席し、かつ、第3条第1項第2号又は第3号の委員が1名以上出席しなければ会議を開くことができない。

3 委員会の議事は、出席委員の4分の3以上の合意をもって決する。

4 審査の対象となっている実施計画書を提出している委員は、当該実施計画に係る審査に参加できない。

5 委員会は、必要があると認めるときは、実施計画書を提出した総括責任者その他委員以外の者を会議に出席させ、当該実施計画の内容等について説明を求め、又は意見を聴くことができる。

6 委員会は、原則として、非公開とする。

(報告)

第6条 委員長は、審査の終了後速やかにその結果を文書をもって病院長に報告するものとする。

(議事録の作成)

第7条 委員長は、委員会の議事について、次に掲げる事項を記載した議事録を作成しなければならない。

- (1) 開催日時及び場所
- (2) 委員の現在数
- (3) 会議に出席した委員の氏名
- (4) 議決事項
- (5) 議事の経過及び発現の要旨
- (6) その他必要な事項

2 議事録には、委員長及び委員長の指名する委員1名が署名押印するものとする。

(議事録の公開)

第8条 委員会の議事録は、公開するものとする。ただし、公開することによって、個人の情報、研究の独創性及び知的財産権の保護に支障を生じるおそれのある部分は、非公開とすることができる。

2 委員会は、議事録の全部又は一部を非公開とする場合は、その理由を公開しなければならない。

(議事録の保存)

第9条 委員会の議事録(委員会提出資料を含む。)は、委員会開催日の属する年度の翌年度の初日を起算日として5年間保存しなければならない。

(秘密の保護)

第10条 委員その他委員会の関係者は、審査を行う上で知り得た個人に関する秘密を正当な理由なしに漏らしてはならない。その職を辞した後も同様とする。

(審査の公正保持)

第11条 委員会における審査の公正を保持するため、病院長その他の関係者は、委員会の活動の自由及び独立が保障されるよう努めなければならない。

(庶務)

第12条 委員会の庶務は、大学事務部研究支援課が行う。

(規程の改正)

第13条 この規程の改正は、自治医科大学生命倫理委員会の議を経て、自治医科大学医学部教授会の承認を得るものとする。

(その他)

第14条 この規程に定めるもののほか、委員会の運営に関し必要な事項は、別に定める。

附 則

この規程は、平成14年9月9日から施行する。

附 則(平成22年規程第37号)

この規程は、平成22年4月1日から施行する。

2.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・適応判定部会設置細則

(趣旨)

第1条 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(平成14年規程第29号以下「規程」という。)第14条の規定に基づき、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」という。)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安全・効果評価・適応判定部会(以下「部会」という。)を置く。

2 部会は、委員会に提出された遺伝子治療臨床研究(以下「治療研究」という。)の実施計画ごとに置くものとする。

(任務)

第2条 部会は、委員会の諮問に基づき、治療研究の安全性及び効果並びに被験者の適応性に関する具体的事項について評価及び判定を行い、その実施の適否及び留意事項、改善事項等について、委員会に意見を提出するものとする。

(構成, 任期等)

第3条 部会は、それぞれ次に掲げる委員をもって構成する。

(1) 委員会委員長

(2) 規程第3条第1項第1号の委員 1名

(3) 規程第3条第1項第4号の委員 1名

(4) その他委員会委員長が必要と認めた者 若干名

2 委員は、委員会の議を経て、自治医科大学附属病院院長が委嘱する。

3 第1項2号から第4号までの委員の任期は、当該治療研究の終了までとする。

(部会長)

第4条 部会に部会長を置き、委員会委員長をもって充てる。

2 部会長は、部会を招集し、その議長となる。

3 部会長に事故があるとき、又は欠けたときは、部会長があらかじめ指名する委員がその職務を代理し、又は職務を行う。

(審査)

第5条 部会長は、必要があると認めるときは、当該治療研究の総括責任者その他委員以外の者を会議に出席させ、当該治療研究の実施計画の内容等について説明を求め、又は意見を聴くことができる。

(重大事態等の報告)

第6条 部会長は、治療研究の進行状況及び結果についての評価及び判定の結果、当該治療研究の実施に重大な事態が生じたと認めるとき、又は実施に影響を及ぼすおそれのある情報を入手したときは、速やかにその旨を委員会に報告しなければならない。

(秘密の保護)

第7条 委員その他部会の関係者は、審査を行う上で知り得た個人に関する秘密を正当な理由なしに漏らしてはならない。その職を辞した後も同様とする。

(庶務)

第8条 部会の庶務は、大学事務部研究支援課が行う。

(その他)

第9条 この細則に定めるもののほか、部会の運営に関し必要な事項は、別に定める。

附則

この細則は、平成14年9月9日から施行する。

附 則(平成22年細則第5号)

この細則は、平成 22 年 4 月 1 日から施行する。

3. 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程 (平成17年規程第3号)

(目的)

第1条 この規程は、「個人情報の保護に関する法律(平成15年法律第57号)」、「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取り扱いの為のガイドライン(厚生労働省平成16年12月24日作成)」及び「学校法人自治医科大学が保有する個人情報の保護に関する規程(以下「個人情報保護規程」という。)に基づき自治医科大学附属病院(以下「病院」という。)が保有する患者等の個人情報の適切な取扱いに関し必要な事項を定めることにより、個人の権益利益の保護を図ることを目的とする。

(定義)

第2条 この規程において、「患者等」とは、病院の患者及び患者の家族又は自治医科大学健診センターの受診者並びに患者の診療又は受診者の受診に関して病院が個人情報を取得したものをいう。

2 この規程において、「個人情報」とは、個人に関する情報であつて、当該情報に含まれる氏名、生年月日その他の記述等により特定の個人を識別することができるもの(他の情報と容易に照合することができ、それにより特定の個人を識別することができることとなるものを含む。)をいい、死者に関する情報もこれに含むものとする。

3 この規程において、「個人情報データベース等」とは、特定の個人情報をコンピューターを用いて検索することができるように体系的に構成した個人情報を含む情報の集合体又はコンピューターを用いない場合であっても、紙面等で処理した個人情報を一定の規則に従って整理・分類し、特定の個人情報を容易に検索することができる状態においているものをいう。

4 この規程において、「個人データ」とは、「個人情報データベース等」を構成する個人情報をいう。

5 この規程において、「保有個人データ」とは、「個人データ」のうち、本院が開示、内容の訂正、追加又は削除、利用の停止、消去及び第三者への提供の停止を行うことのできる権限を有するものをいう。ただし、その存否が明らかになることにより公益その他の利害が害されるもの及び6ヵ月以内に消去する(更新するものは除く。)こととなるものは除くものとする。

(責務)

第3条 病院は、個人情報の性格と重要性を十分認識し、また、個人の権益利益の保護に十分配慮し、本院の理念及び基本方針に基づいた医療の提供ができるよう、個人情報の適切な取扱いに関して、必要な措置を講じなければならない。

2 職員及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(以下「病院職員」という。)は、前項に基づき、個人情報を適切に取扱い、業務上知り得た個人情報を漏えいし、又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。

(利用目的の特定)

第4条 病院は、患者等から得た個人情報を、次のいずれかに該当するとき以外の目的のために利用してはならない。ただし、第9条に定める附属病院個人情報保護検討委員会が必要と認めた場合で患者等の同意が得られたときはこの限りでない。

(1) 患者等への医療、福祉、健診サービスの提供

(2) 病院の管理運営業務のうち、医療安全対策、患者サービスの向上、医療保険事務、会計・経理事務、入退院等の病棟管理等

(3) 病院内において行われる症例研究

(4) 病院内において行われる学生実習

(5) (1)から(4)までに掲げる以外の目的であって、病院の業務遂行上の必要性から取得したとき(個人情報の取扱いに関して正当な理由があり、かつ患者等の同意が得られた場合に限る。)

2 前項の規定は、次の各号に該当する場合は、適用しない。

(1) 法令に基づく場合

(2) 人の生命、身体又は財産の保護のために必要な場合であって緊急かつやむを得ない場合

(3) 公衆衛生の向上又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、本人の同意を得る事が困難である場合

(4) 国の機関若しくは地方公共団体又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及ぼすおそれがある場合

(利用目的の通知)

第5条 病院は、前条第1項第1号から第4号までに掲げる目的で個人情報を利用するときは、院内掲示等により利用目的を公表しなければならない。

2 病院は、前項の定め以外の目的で個人情報を利用するときは、患者等に個別に利用目的を通知し、同意を得なければならない。

(管理組織)

第6条 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。

(1) 個人情報保護管理者

(2) 個人情報保護管理補助者

(3) 個人情報保護取扱責任者

2 個人情報保護管理者(以下「管理者」という。)及び個人情報管理補助者(以下「管理補助者」という。)は、個人情報保護規程第6条第1項で定める病院の個人情報管理者及び個人情報保護管理補助者とする。

3 個人情報保護取扱責任者(以下「取扱責任者」という。)は管理者が指名する者をもって充てる。

(管理者、管理補助者及び取扱責任者の責務)

第7条 管理者は、個人情報の漏えい、滅失又はき損(以下「漏えい等」という。)防止、その他個人情報の安全管理のため、組織的、人的、物理的及び技術的安全管理措置を講じなければならない。

2 管理補助者は、管理者が個人情報の安全管理を行うにあたり、安全管理措置を円滑に行うことができるよう、業務の遂行を補助しなければならない。

3 取扱責任者は、取扱責任者が属する部門が保有する個人情報の適切な管理及び所属職員が取扱う個人情報に関して管理監督を行わなければならない。

(附属病院個人情報管理表)

第8条 管理者は、個人データを適切に管理するため、附属病院個人情報管理表(別記様式)(以下「管理表」という。)を作成し、安全管理措置を講じなければならない。

2 管理者は、管理表により、個人データの管理状況を常に明らかにしておかなければならない。

3 取扱責任者は、管理表に追加、修正、削除等が生じた場合は、速やかに管理表を修正し、管理者へ提出しなければならない。

4 取扱責任者は管理表で管理されない個人情報の取得、利用、保管、廃棄等について十分に配慮した上で取扱わなければならない。

(附属病院個人情報保護検討委員会)

第9条 病院は、個人情報の適正な取扱い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(以下「委員会」という。)を置く。

2 委員会の委員長は、管理者が指名した者とし、委員は、委員長が指名したものとする。

3 委員会は、次の事項について審議する。

- (1) 病院における個人情報保護の基本方針に関すること。
- (2) 病院における個人情報保護の規程等に関すること。
- (3) 病院が取扱う個人情報の管理、運用に関すること。
- (4) 個人情報保護に関する病院職員の教育、研修に関すること。
- (5) 関連法の遵守に関すること。
- (6) その他個人情報保護のための重要事項に関すること。

(附属病院個人情報保護検討委員会)

第10条 病院は、個人情報の取扱いに係る業務の全部又は一部を外部に委託する場合には、個人情報の安全管理措置を十分に行うことができる委託業者を選択するとともに、個人情報の適切な管理が行われるよう委託契約書等に明記し、当該委託業者に対し必要な監督を行わなければならない。

2 前項の委託契約を締結するときは、委託業者が業務上知り得た個人情報を、漏えい、滅失、き損、改ざん等の行為により、第三者からの損害賠償請求に関する病院の委託業者に対する求償権の行使等について、委託契約書等により明確にしなければならない。

3 病院は、個人情報の取扱いに係る業務を派遣労働者によって行わせる場合には、労働者派遣契約書等に秘密保持義務等、個人情報の取扱いに関する事項を明記しなければならない。

(廃棄)

第11条 病院は、個人情報又は個人情報が記録されている媒体を廃棄する場合には、復元又は判読が不可能な方法により、当該情報の消去又は当該媒体の廃棄を行わなければならない。

(第三者提供の取扱い)

第12条 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社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。

- (1) 法令に基づくとき
- (2) 人の生命、身体又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
- (3) 公衆衛生の向上又は児童の健全な育成の推進のために特に必要である場合であって、本人の同意を得ることが困難であるとき

(4) 国の機関若しくは地方公共団体又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及ぼすおそれがあるとき

(5) 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

(保有個人情報の開示、訂正、追加又は削除)

第13条 管理者は、患者等から当該患者を識別できる保有個人情報について開示を求められた場合には、必要な確認を行い、別に定める方法により、遅滞なく処理しなければならない。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。

- (1) 本人又は第三者の生命、身体、財産その他の権利利益を害するおそれがあるとき
- (2) 病院の業務の適正な実施に著しい支障を及ぼすおそれがあるとき
- (3) 他の法令に違反することとなるとき

2 管理者は、保有個人情報の開示を求められた場合には、別に定める「診療情報の提供に関する指針」に準じて行うものとする。

3 管理者は、患者等から当該患者が識別できる保有個人情報について、訂正、追加又は削除(以下「訂正等」という。)を求められた場合には、必要な確認を行い、遅滞なく処理しなければならない。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。

- (1) 利用目的から見て訂正等が必要でないとき
- (2) 患者等からの誤りであるという指摘が正しくないとき
- (3) 訂正等の対象が評価に関する個人情報であるとき

4 保有個人情報の訂正等に当たっては、訂正した者、内容、日時等が分かるように記録しなければならない。

(漏えい等の対策)

第14条 病院職員は、個人情報の漏えい等、問題となる事案の発生を知った場合には、速やかに当該個人情報を管理する取扱責任者に報告しなければならない。

2 取扱責任者は、事案が発生した場合には、以下の措置を講じなければならない。

- (1) 事案の内容、被害状況等について速やかに管理者に報告し、被害の拡大防止又は復旧のために必要な措置に関する指示を仰がなければならない。ただし、当該事案による被害の程度、業務遂行に与える影響等が軽微な場合はこの限りでない。
- (2) 事業の事実関係、被害の範囲及び程度、被害の拡大防止又は復旧のために講じた措置等について記録し、管理者に報告しなければならない。

(相談、苦情等への対応)

第15条 病院は、個人情報の取扱いに関する窓口を設け、患者等の個人情報に関する相談、苦情等に関する申し出について、適切かつ迅速な対応に努めなければならない。

(教育研修等の実施)

第16条 病院は、病院の個人情報を取扱う者に対し個人情報の重要性を十分認識させ、適切な取扱いがされるよう、教育、研修等の必要な措置を講じなければならない。

(監査)

第17条 管理者は、個人情報の取扱いが適切に行われているかを把握するため、監査員を定め、定期的に監査を行わなければならない。

(違反に対する措置)

第18条 この規程に違反した病院職員に対しては、個人情報保護規程第11条に定める規定が適用される、
2 病院職員が故意又は過失により、個人情報を漏えい、滅失、き損、改ざんする等の不適切な行為を行った場合において、病院が第三者に対する損害賠償等の責めを負うときは、病院は病院職員に対し求償権を行使するものとする。ただし、病院職員が行った当該行為について、やむを得ない事情があると認められる場合にはこの限りではない。

(その他)

第19条 この規程に定めるもののほか、必要な事項は、管理者が別に定める。

附 則

この規程は、平成17年4月1日から施行する。

4. 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

1 目的

この要領は、「自治医科大学附属病院の患者及び患者の家族等の個人情報保護に関する規程」を適切かつ円滑に運用するために、自治医科大学附属病院（以下「病院」という。）における患者等の個人情報（以下、「個人情報」という。）の管理、運用等について必要事項を定めるものである。

2 適用範囲

(1) 適用対象

病院における患者等の個人情報。

(2) 適用対象者

- ① 職員及び学校法人自治医科大学と雇用関係にある者で附属病院の業務に従事する職員（以下「病院職員」という。）
- ② 病院の個人情報を取扱う委託業者（派遣職員含む。）（以下「委託業者」という。）
- ③ 病院の個人情報を取扱う自治医科大学の学生、研究生、留学生等（以下「学生等」という。）

3 関係法令等の遵守

- (1) 病院職員、委託業者及び学生等（以下、「病院職員等」という。）は、個人情報保護に関する法律及び個人情報保護に関する関係法令等（以下「法律等」という）を遵守すること。
- (2) 学校法人自治医科大学が保有する個人情報の保護に関する規程、自治医科大学附属病院個人情報保護規程等、学内及び院内における個人情報に関する規程等（以下「規程等」という）を遵守すること。

4 管理体制

病院は、規程等に基づき個人情報について適切な管理、運用等を図るため、以下の責任者を置き、次の事項を行わせること。

(1) 個人情報保護管理者（以下「管理者」という。）

- ① 附属病院の個人情報の適切な管理、運用等に関する総括的な業務。
- ② 附属病院の個人情報が適切に管理、運用等の管理監督。
- ③ 病院職員等に対する法令等の遵守の励行。

(2) 個人情報保護管理補助者（以下「管理補助者」という。）

- ① 管理者の業務補助。
- ② 管理者が不在のときの業務の代理。
- ③ 管理者の命による附属病院の個人情報の管理、運用等の管理監督。

(3) 個人情報取扱責任者（以下「取扱責任者」という。）

管理者又は管理補助者の命により、取扱責任者の属する部門の個人情報の管理、運用等の管理監督。

(4) 個人情報管理表

- ① 管理者は必要に応じて定期的に附属病院個人情報管理表（以下「管理表」という）の見直しを行い、各部門における個人情報が適切に管理されているか把握しておくこと。
- ② 管理者及び管理補助者は管理表に登録されている個人情報について管理、運営等が適切でないとは判断したときは、取扱責任者に適切な措置を講ずるよう指示し、安全管理を

図ること。

- ③ 取扱責任者は、管理表に登録されている内容について、追加、訂正、削除等が生じたときは速やかに訂正を行い、管理者に報告すること。
- ④ 取扱責任者は管理表の定める「管理レベル1」の個人情報については、速やかに必要な措置を講じ、「管理レベル2」以上にすること。
- ⑤ 取扱責任者は「重要度3」である個人情報についてはできる限り「管理レベル3」以上にすること。

(5) 相談窓口

- ① 管理者は、個人情報の取り扱いについて患者等から相談、苦情、疑義等（以下「相談等」という。）が寄せられたときの対応として相談窓口を設置すること。
- ② 相談窓口業務は、経営管理課が行うこと。
- ③ 経営管理課は、患者等から相談等を受けた場合は速やかに管理者に報告するとともに、必要な措置を講ずること。

5 個人情報の取得、利用、第三者提供

- (1) 病院職員等は、個人情報を取得するとき、利用目的をはっきりさせ、目的を遂行するための必要最小限の個人情報を取得すること。
- (2) 電話、メール等の通信機器を利用しての個人情報を取得にあたっては、必ず本人かどうかを確認したうえで取得すること。
- (3) 個人情報を業務以外の目的で取得、利用しないこと。個人情報をこれらの目的で取得、利用したときは規程等の処分の対象となるので注意すること。
- (4) 誤って取得、利用した個人情報については、取扱責任者に報告し必要な措置を講ずること。取扱責任者は誤って取得、利用した個人情報が重大問題を引き起こす可能性があるかと判断したときは、管理者に報告すること。
- (5) 個人情報の第三者提供については、提供先の相手が法令等に違反しないかを確認した上で提供すること。特に、電話、メール等の通信機器からの照会については、必ず相手の身元を確認したうえで提供すること。

6 個人情報の安全管理措置

(1) 物理的安全管理措置

- ① 病院職員等は、個人情報を保管している部屋から退室する際は必ず施錠を行うこと。
- ② スタッフステーション等部屋の施錠が不十分な場所については、部屋の施錠と同等の安全管理が図れるよう、適切な入退室管理をすること。
- ③ ファイル、台帳、MO等の記録媒体を保管するときは鍵のついた棚、書庫、机の引き出し、金庫等に保管し、施錠すること。
- ④ パソコン等のハードウェアについてはチェーンロック等を行い盗難防止に努めること。
- ⑤ 鍵等の管理については担当者を決めて一括管理を行うこと。

(2) 人的安全管理措置

- ① 病院職員等は、個人情報が保存されている記録媒体を院外に持ち出さないこと。やむを得ない事情により院外に持ち出す必要があるときは、「個人情報院外持出申請書」（様式第1号）に必要事項を記載して、管理者に申請のうえ許可を得ること。なお、持ち出した記録媒体については、申請者が責任を持って管理すること。

② 個人の所有するパソコン、MO、ノート等の記録媒体等（以下、「個人のパソコン等」という）に個人情報を登録しないこと。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」（様式第2号）に必要事項を記載し、管理者に申請し許可を得ること。なお、個人のパソコン等に保管された個人情報については、申請者が責任を持って管理すること。

③ 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こと。また、必要最小限の個人情報のみ登録すること。

④ 個人情報を登録した個人のパソコン等を転売、譲渡するときは、登録されている個人情報を市販のシュレッダーソフト等を用いて、完全に消去した上で行うこと。

⑤ 個人情報の学外送信については、機密性の高い方法を選択し、メール、FAX等による学外送信は行わないこと。業務の都合上やむを得ない場合においては、自動送信ソフト等を用いるなど安全管理措置を講じたうえで送信すること。

⑥ 自己のパスワードを他人に教えないこと。また、パスワードはセキュリティ維持のため、他の者が容易に類推できるようなものは避け、必要に応じて変更すること。

⑦ 他の者のパスワードを勝手に使用しないこと。

(3) 技術的安全管理措置

① 病院職員等は、パソコン、システム等（以下「システム等」という）のサーバに個人情報を保管するとき、必ずログイン時にID、パスワード等のアクセス管理を行うこと。

② 個人情報を保管したシステム等については、ファイヤーウォール、ウィルス対策ソフト等の安全管理措置を講じること。

③ パスワード、IDの管理については担当者を決めて一括管理を行うこと。病院情報システムについては医療情報部職員を担当者とする。それ以外の部門単位で使用しているシステム等については、部門に所属している病院職員のうち取扱責任者が指名した者を担当者とする。

④ パスワード付スクリーンセーバー等の設定などを行い、離席時に他の者が勝手に閲覧、利用できないような工夫を行うことを行うこと。

(4) 廃棄

① 取扱責任者は、個人情報又は個人情報を記録した媒体の廃棄にあたって、取扱責任者が担当者を決め、担当者が一括して廃棄処理を行うこと。

② 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又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会いのもと行うこと。

③ 電話メモやチェック表などの一定期間保管しないものについては、専用の廃棄箱等を用意し、一括して廃棄を行うこと。廃棄箱等は必ず施錠できる場所で保管し施錠管理を行うこと。

④ フロッピーディスク、MO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うえで粉碎等の物理的な廃棄を行うこと。

⑤ システム等のハードウェアを廃棄するときは保存されているデータを全て消去削除したうえで専門の業者により粉碎等の物理的な廃棄を行うこと。

7 業務の外部委託等

(1) 病院は、外部に業務を委託するとき、出来る限りプライバシーマークを取得している業者と契約すること。

(2) 外部に業務を委託するときは、契約書の他に適切な個人情報の取扱いについて必要な事項を定めた覚書等を交わすこと。

覚書等で交わす内容については、例として以下のものがあげられる。

① プライバシーポリシー

② 個人情報保護に関する規程等

③ プライバシーマーク取得の促進

④ 個人情報の適切な取扱いに関する職員教育の実施及び実施状況の報告

⑤ 委託職員名簿の提出、名札着用の義務化

(3) 病院職員と同様に、委託職員にも個人情報の適切な取扱いについて、法令等の内容を理解させ、遵守させること。

8 監査

(1) 管理者は、各部門が法令及び規程等を遵守しているか、適切な管理がされているかなど、運用実態を把握するため、少なくとも年1回監査を実施すること。

(2) 必要に応じ外部監査を行うこと。

9 教育

(1) 管理者は病院職員等に対して個人情報の適切な取扱いに関し、定期的に研修、講演、訓練等（以下、「研修等」という。）の教育を行うこと。

(2) 病院職員等は、前項の個人情報に関する研修等が開催された場合、業務、学業等に支障のない限り、できるだけ参加すること。

10 漏えい事故等

(1) 病院職員等は、誤り、犯罪行為、システムエラー等による個人情報の漏えい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。

(2) 取扱責任者は、病院職員、委託業者等、学生等から漏えい等の事故の報告を受けたときは、直ちに管理者または管理補助者に報告すること。

(3) 管理者は漏えい等の事故があった場合は直ちに必要な措置を講じ、二次被害、類似事故の発生を防止すること。

(4) 管理者は発生した漏えい等の事故についての事項を記録し、一定期間保存すること。

11 開示、訂正、追加、削除、利用停止、消去

(1) 開示

① 患者等から個人情報の開示を求められたときは、担当部門に連絡し、必要な措置を講ずること。

② 個人情報を開示しない旨決定したときは、患者等が開示しない理由を遅滞なく通知すること。

③ 開示の方法については、「自治医科大学附属病院診療情報の提供に関する指針」に準じて行うこと。

(2) 訂正、追加、削除、利用停止、消去

① 患者等から個人情報の訂正、追加、削除、利用停止、消去（以下「訂正等」という）

を求められたときは、担当部署に連絡し、必要な措置を講ずること。

② 利用目的から見て訂正等が必要でないとき、患者等からの誤りであるという指摘が正しくないとき、訂正等の対象が事実でなく評価に関する情報であるときは、訂正等の必要はない。

(3) 開示及び訂正等の業務は経営管理課が行う。

12 罰則

病院職員等が、個人情報の取扱いに関して、附属病院に重大な影響を与える行為、または、患者等或いは第三者に対し損害を与える行為等を行ったと認められる場合には、「病院職員」にあつては、学校法人自治医科大学職員就業規則、自治医科大学附属病院レジデント研修規程、雇用契約書等に定める処分を行うこと、「委託業者」にあつては、委託契約書等に定める事項に基づく処分を行うこと、「学生等」にあつては自治医科大学学則に定める処分を行うこと、あるいは民事訴訟の対象となることがある。

13 庶務

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

(附 則)

この要領は平成17年4月1日から施行する。

(4) 参考文献

- 1 ミニシンポジウム：パーキンソン病をめぐって（2）．厚生科学研究補助金特定疾患対策事業「神経変性疾患に関する研究」班・2001年度研究報告書．pp.35-46; 2002.
- 2 水野美邦：パーキンソン病の基礎と臨床．臨床神経 44:741-750, 2004.
- 3 Ma SY, et al.: Unbiased morphometrical measurements show loss of pigmented neurons with ageing. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25:394-399, 1999.
- 4 McGeer PL, McGeer EG, Suzuki JS: Aging and extrapyramidal function. *Arch Neurol* 34(1):33-35, 1977.
- 5 Pakkenberg B, et al.: The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54:30-33, 1991.
- 6 Otsuka M, et al.: Striatal blood flow, glucose metabolism and 18F-dopa uptake: difference in Parkinson's disease and atypical parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54: 898-904, 1991.
- 7 Eckert T, et al.: FDG PET in the differential diagnosis of parkinsonian disorders. *Neuroimage* 26:912-921, 2005.
- 8 Polymeropoulos MH, et al.: Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276:2045-2047, 1997.
- 9 Kitada T, et al.: Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608, 1998.
- 10 Langston JW, et al.: Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979-980, 1983.
- 11 Jenner P: Pathophysiology and biochemistry of dyskinesia: clues for the development of non-dopaminergic treatments. *J Neurol* 247(Suppl 2:II): 43-50, 2000.
- 12 Schapira AH, et al.: Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1(8649):1269, 1989.
- 13 Mizuno Y, Suzuki K, Ohta S: Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 96:49-57, 1990.
- 14 日本神経学会治療ガイドライン—パーキンソン病治療ガイドライン
(<http://www.neurology-jp.org/guideline/parkinson/index.html>)
- 15 Breit S, Schulz JB, Benabid AL: Deep brain stimulation. *Cell Tissue Res* 318:275-288, 2004.
- 16 Kennedy R, Mittal D, O'Jile J: Electroconvulsive therapy in movement disorders: an update. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15:407-421, 2003.
- 17 Parkinson Study Group: Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring levodopa. *Ann Neurol* 39: 37-45, 1996.
- 18 Rascol O, et al.: Ropinirole in the treatment of early Parkinson's disease: a 6-month interim report of a 5-year levodopa-controlled study. 056 Study Group. *Mov Disord* 13: 39-45, 1998.
- 19 Rascol O, et al.: A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N Engl J Med* 342: 1484-1491, 2000
- 20 Volkmann J, et al.: Long-term results of bilateral pallidal stimulation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 55:871-875, 2004.
- 21 Itakura T, et al.: Transplantation of autologous sympathetic ganglion into the brain with Parkinson's disease. Long-term follow-up of 35 cases. *Stereotact Funct Neurosurg*. 69:112-115, 1997.
- 22 Freed CR, et al.: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *The New Eng J Med* 344: 710-719, 2001.

- 23 Olanow CW, et al.: A double-blind controlled trial of bilateral fetal Nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54: 403-414, 2003.
- 24 Sundberg M, et al.: Improved Cell Therapy Protocols for Parkinson's Disease Based on Differentiation Efficiency and Safety of hESC-, hiPSC-, and Non-Human Primate iPSC-Derived Dopaminergic Neurons. *Stem Cells* 31(8):1548-1562, 2013.
- 25 Byers B, et al.: SNCA triplication Parkinson's patient's iPSC-derived DA neurons accumulate α -synuclein and are susceptible to oxidative stress. *PLoS One*. 6(11):e26159, 2011.
- 26 Dunnett SB, Bjorklund A, Lindvall O: Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci*. 2(5): 365-369, 2001.
- 27 Yoshida H, et al.: Stereotactic transplantation of a dopamine-producing capsule into the striatum for treatment of Parkinson disease: a preclinical primate study. *J Neurosurg* 98(4): 874-881, 2003.
- 28 Dass B, Olanow CW, Kořdower JH: Gene transfer of trophic factors and stem cell grafting as treatments for Parkinson's disease. *Neurology* 66 (Suppl 4): S89-S103, 2006.
- 29 Marks WJ, et al.: Safety and tolerability of intraputaminial 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, 400-408, 2008.
- 30 Marks WJ, et al.: Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* 9, 1164-1172, 2010.
- 31 Bartus RT, et al.: Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients. *Neurology* 80, 1698-1701, 2013.
- 32 Kaplitt MG, 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 I trial. *Lancet* 369, 2097-2105, 2007
- 33 Lewitt PA, et al.: AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol* 10, 309-319, 2011.
- 34 自治医科大学総括報告書
- 35 Christine CW, et al.: Safety and tolerability of putaminial AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 73, 1662-1669, 2009
- 36 Mittermeyer G, et al.: Long-Term Evaluation of Phase 1 of AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Human Gene Ther* 23:377-381, 2012.
- 37 Sumi-Ichinose C, et al.: 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.
- 38 Gao G, et al.: Clades of Adeno-associated virus are widely disseminated in human tissues. *Journal of virology*. 78(12), 6381-6388, 2004.
- 39 Kay MA, et al.: Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 24: 257-261, 2000.
- 40 Manno CS, 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.
- 41 Matsushita T, et al.: Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5:938-945, 1998.
- 42 Natsoulis G, Kurtzman GJ, Colosi P: High-efficiency AAV helper functions. USA patent 6,365,403, November 29, 1999, 2002.
- 43 Kearns WG, et al.: 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.

-
- 44 Nakai H, Montini E, Fuess S, et al.: AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34: 297-302, 2003.
 - 45 Flotte TR, Afione SA, Solow R, et al.: Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 268: 3781-3790, 1993.
 - 46 Russell DW, Kay MA: Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood* 94: 864-874, 1999.
 - 47 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.
 - 48 Rosas LE, et al.: Patterns of scAAV vector insertion associated with oncogenic events in a mouse model for genotoxicity. *Mol Ther* 20: 2098-2110, 2012
 - 49 Valdmantis PN, Lisowski L, Kay MA: rAAV-mediated tumorigenesis: still unresolved after an AAV assault. *Mol Ther* 20(11): 2014-2017, 2012.
 - 50 Raper SE, et al.: Fatal systemic inflammatory response syndrome in an ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80: 148-158, 2003.
 - 51 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.
 - 52 Schnell MA et al.: Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors. *Mol Ther* 3:708-722, 2001.
 - 53 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.
 - 54 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.
 - 55 Check E: Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433:561, 2005.
 - 56 Williams D, Baum C: Gene therapy - new challenges ahead. *Science* 302:400-401, 2003.
 - 57 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.
 - 58 ClinicalTrials.gov のホームページ (<http://clinicaltrials.gov/>)
 - 59 McPhee SWJ, et al.: Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. *J Gene Med* 8: 577-588, 2006.
 - 60 Aitken ML, et al.: A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 12: 1907-1916, 2001.
 - 61 Wagner JA, et al.: A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther* 13: 1349-1359, 2002.
 - 62 Flotte TR, et al.: Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther* 14: 1079-1088, 2003.
 - 63 Moss RB, et al.: Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis. *Chest* 125:509-521, 2004.
 - 64 Kay MA, et al.: Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 24: 257-261, 2000.

-
- 65 Manno CS, et al.: AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101: 2963-2972, 2003.
- 66 寺尾 亨 他:不随意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.
- 67 Anderson WS, Lenz FA: Surgery insight: deep brain stimulation for movement disorders. *Nature Clinical Practice Neurology* 2: 310-320, 2006.
- 68 Fan DS, 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* 9: 2527-2535, 1998.
- 69 Shen Y, et al.: Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 11:1509-1519, 2000.
- 70 Muramatsu S, 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* 13: 345-354, 2002.
- 71 Muramatsu S, et al.: AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase restored L-dopa efficacy in a primate model of Parkinson's disease. 2004 Society for Neuroscience, Washington, DC, Oct. 23, 2004.
- 72 Fan DS, et al.: Prevention of dopaminergic neuron death by adeno-associated virus vector-mediated GDNF gene transfer in rat mesencephalic cells in vitro. *Neuroscience Letters* 248: 61-64, 1998.
- 73 Wang LJ, et al.: Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 9(6): 381-389, 2002.
- 74 Wang LJ, et al.: Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 22: 6920-6928, 2002.
- 75 Sanchez-Pernaute R, et al.: Functional effect of adeno-associated virus mediated gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase into the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Mol Ther* 4(4): 324-330, 2001.
- 76 Bankiewicz KS, et al.: Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol* 164(1): 2-14, 2000.
- 77 Daadi MM, et al.: Distribution of AAV2-hAADC-transduced cells after 3 years in Parkinsonian monkeys. *Neuroreport* 17(2): 201-204, 2006. Erratum in: *Neuroreport* 17(4): 453, 2006.
- 78 Eberling JL, et al.: In vivo PET imaging of gene expression in Parkinsonian monkeys. *Mol Ther* 8(6): 873-875, 2003.
- 79 Sanftner LM, et al.: AAV2-mediated gene delivery to monkey putamen: evaluation of an infusion device and delivery parameters. *Exp Neurol* 194(2): 476-483, 2005.
- 80 Bankiewicz KS, et al.: Focal striatal dopamine may potentiate dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Exp Neurol* 197(2): 363-372, 2006.
- 81 Forsayeth JR, et al.: A dose-ranging study of AAV-hAADC therapy in Parkinsonian monkeys. *Mol Ther* 14(4):571-577. 2006.

よくお読み下さい

臨床研究 「パーキンソン病遺伝子治療」

参加のしおり

このしおりは 『AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与による進行期
パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究』 に参加される予定の患者
さんに、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。

第1版：平成25年11月5日5日 作成

第2版：平成26年4月2日 作成

第3版：平成26年5月2日 作成

第4版：平成26年6月9日 作成

第5版：平成26年10月10日 作成

目次

1. はじめに.....	1
2. 臨床研究とは.....	1
3. パーキンソン病とドパミン.....	2
4. パーキンソン病の治療法と問題点.....	3
5. この臨床研究の概要について.....	5
6. AAV ベクターとは.....	7
7. AAV ベクターを使ったパーキンソン病遺伝子治療臨床研究の状況.....	8
8. 臨床研究の具体的な方法.....	9
A. 参加できる人, できない人.....	9
B. 臨床研究のスケジュール (表).....	11
C. 被験への治療用ベクターの注射.....	14
D. 期待される効果.....	15
E. 予想される危険性および副作用.....	15
9. 臨床研究への参加予定期間, 参加患者数.....	20
10. 臨床研究の参加をことわったら.....	20
11. 途中でやめなくなったら.....	20
12. 健康被害の治療とその医療費に関して.....	21
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問い合わせすること.....	24
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. 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり.....	25
21. 緊急連絡先及びお問い合わせ先について.....	25
22. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制.....	26
23. その他.....	27

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「パーキンソン病」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、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. 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、動物で安全であって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言いきれません。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、安全性と効果を確かめる必要があります。このように、臨床研究には文字通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。

3. パーキンソン病とドパミン

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、ドパミンはその1つです。ドパミンが不足するとパーキンソン病になります。

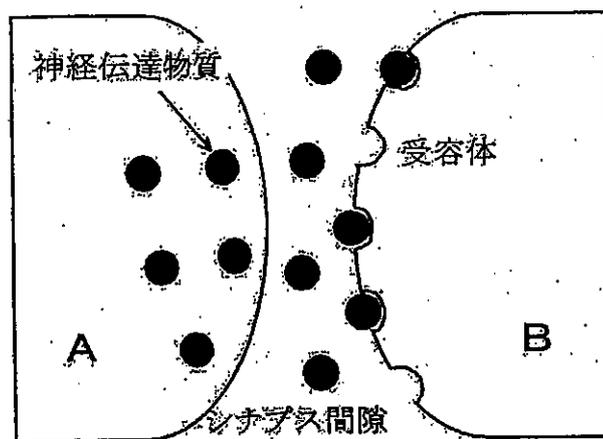


図1 神経細胞間の情報の伝達

神経伝達物質は一つの神経細胞(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)の間のすきまをシナプス間隙と呼びます。

ドパミンを作る神経細胞は、黒質と呼ばれる部分にたくさん集まっています。ドパミンを作る細胞は突起を伸ばして線条体にドパミンを送ります(図2)。ドパミン

は、線条体細胞の受容体に結合して情報を伝えます。パーキンソン病では黒質のドパミンを作る細胞が減って線条体に情報が届かなくなり、その結果①ふるえ、②関節が硬い、③動作が遅い、④さっと足が出なくて転びやすいなどの症状が出ます。



図2 脳内の黒質と線条体の位置

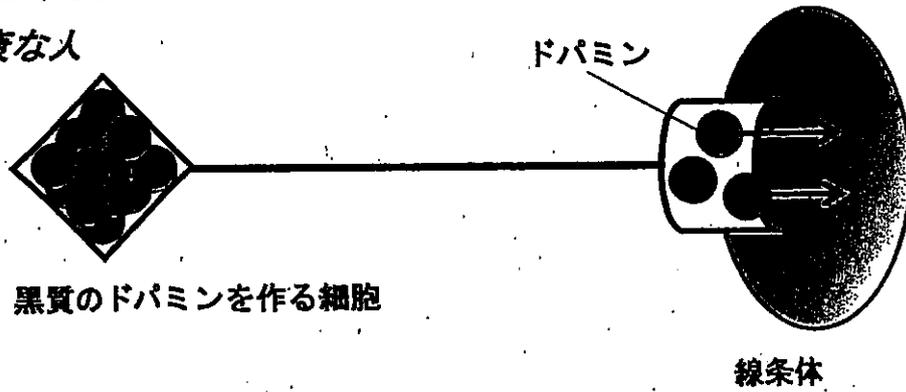
中脳に在る黒質の神経細胞からは突起が線条体に伸びています。この突起でドパミンが合成されて線条体に放出されることによって運動がなめらかに行われます。

4. パーキンソン病の治療法と問題点

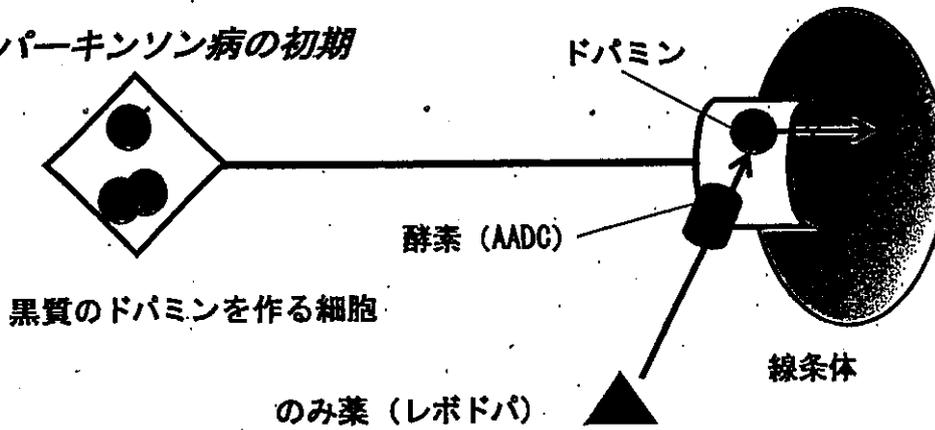
基本はお薬による治療です。しかし病気を根本的に治療する「原因療法」ではありません。不足したドパミンをお薬で補って症状を緩和する「補充療法」です。お薬の中で最も強力なのがレボドパです。ドパミンをのんでも脳に到達しないため、ドパミンの原料であるレボドパを使います。レボドパは線条体の中で芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の働きによってドパミンに変わります (図3A)。

パーキンソン病の初期には AADC が十分にあるため、レボドパをのむと速やかに
 ドパミンとなり症状が良くなります (図 3 B)。しかし進行すると AADC が減って
 しまうので、レボドパをのんでもドパミンが出来ません (図 3 C)。あなたがレボド
 パをのんでも満足できる効果が得られない原因の一つは、線条体における AADC の
 極端な減少と考えられています。

A 健康な人



B パーキンソン病の初期



C 進行期のパーキンソン病

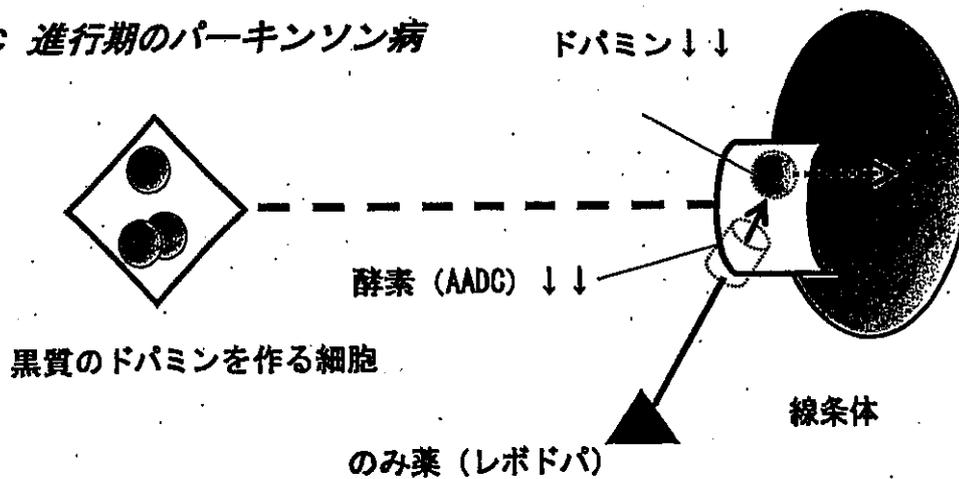


図3 パーキンソン病の病期による違い

パーキンソン病の初期には黒質の細胞が作るドパミンが減るので、レボドパを服用して補うことが出来ます。進行期パーキンソン病では、レボドパをドパミンに変える AADC という酵素が極端に減りますので、レボドパを服用してもドパミンを補えなくなります。

お薬以外の治療法として①手術によって脳の一部を熱凝固する凝固療法、②手術によって脳内に電極を植え込み前胸部の刺激装置で持続刺激する脳深部刺激療法、③ドパミンを作る細胞の移植 ④幹細胞の移植 ⑤カプセルに入れた腫瘍細胞の移植などがあります。このうち保険適用があつて現実に実施可能な治療法は①と②です。

凝固療法は原則として片側にしか実施できないため、あなたのように両側に症状があるときには効果が不十分です。またふるえや関節の硬さ、不随意運動には効果があつても、歩行障害や転びやすさに対しては十分な効果が期待できません。脳深部刺激療法は両側に行うことが可能ですが、レボドパの効果が無い症例には効きません。また根本的な治療法ではありませんので、一時的には有効でも症状は徐々に進行します。さらに脳内の刺激電極や前胸部の刺激装置が異物として体内に残る点も問題です。

5. この臨床研究の概要について

『AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療』は現在開発中の治療法です。極端に減少した AADC という酵素の遺伝子を、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを使って被殻の細胞に入れ AADC を作らせます。その結果レボドパからドパミンが効率よく作られるようになり、症状が改善することが期待されます。今回の臨床研究の主な目的は、この治療法の安全性の確認であり、どのような副作用が起こるのか、ということ調べます。次にパーキンソン病の症状がどの程度改善するか、ということ併せて調べます。

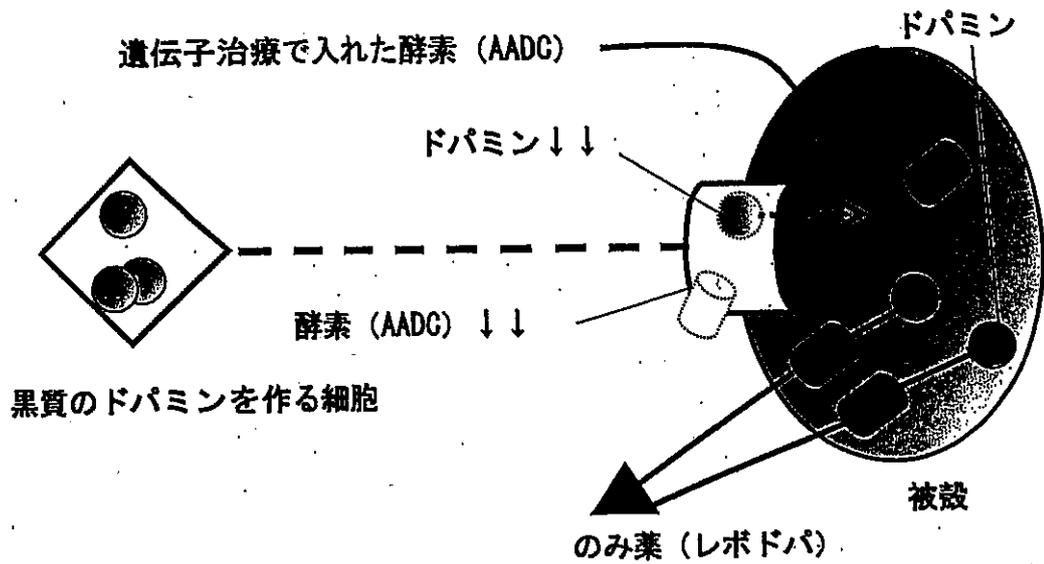


図4 この治療法の模式図

パーキンソン病は黒質の神経細胞が減少して被殻で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被殻に注射して酵素を合成し、レボドパをのんでドパミンの合成を回復させます。

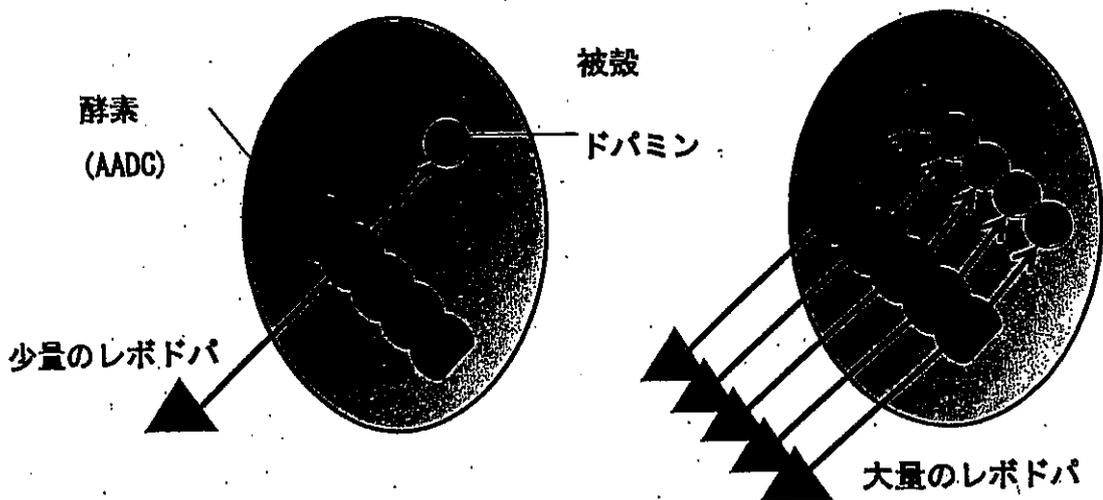


図5 作られるドパミンの量の調節

ドパミンを合成する酵素 (AADC) は十分量作られますが、実際に作られるドパミンの量は、服用するレボドパの量で調節できますので、副作用が防げます。

ドパミンが作られ過ぎると、自分の意思とは関係なく身体が勝手に動く「不随意運動」が起こる心配がありますので、レボドパをのむ量を変えることによって作られるドパミン量を調整します（図5）。

この臨床研究は、既に自治医科大学附属病院で実施されたパーキンソン病の遺伝子治療と同様の方法により当院で行います。また、株式会社遺伝子治療研究所とタカラバイオ株式会社（以下、「タカラバイオ」という）との共同研究です。

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ひとつで、多くの方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6）。

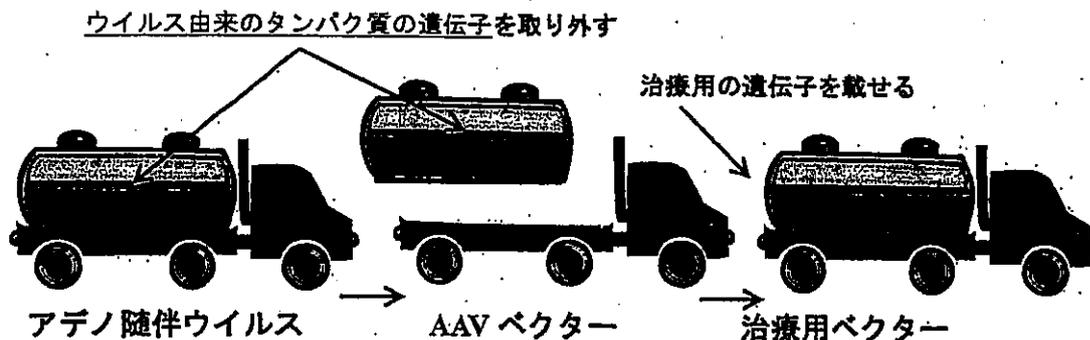


図6 治療用ベクターの構造

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。この遺伝子を取り除いて、ドパミンを合成する酵素の遺伝子 (AADC) に積み替えたトラックが治療用ベクターです。

あなたに注射するベクターは、私たちと共同研究を行っているタカラバイオという会社で作られます。

7. AAVベクターを使ったパーキンソン病遺伝子治療臨床研究の状況

AAVベクターを用いてAADC遺伝子をパーキンソン病患者さんの脳の線条体(被殻)に手術により注入した遺伝子治療臨床研究が当院とアメリカで行われました。

当院で行われた臨床試験では、進行した病期のパーキンソン病の患者さんに対して6ヶ月後UPDRSの総スコアが28%改善され、UPDRSの運動スコアもオフ時に46%の改善が認められました。さらにPET検査で、線条体に入れたAADCの遺伝子からAADCが合成されていることが確認されました。アメリカで行われた同様の臨床試験では、6ヶ月後UPDRSの総スコアがオフ時に31%、オン時に32%改善され、UPDRSの運動スコアも同様にオフ時に36%、オン時に28%の改善が認められました。さらにPET検査で、線条体に入れたAADCの遺伝子からAADCが合成されていることが確認されました。なお両試験ともにベクターに関連する副作用は報告されませんでした。

AAVベクターを使って、抑制作用のある神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)を作るために必要なGADという酵素の遺伝子を脳の視床下核に手術により注入した遺伝子治療臨床研究(第I相および第II相)がアメリカで行われました。第I相の臨床試験では、進行した病期のパーキンソン病の患者さんに対して12か月後UPDRSの運動スコアがオン時に27%の改善が認められました。第II相の臨床試験では、6か月後UPDRSの運動スコアが治療群で23.1%、偽手術群で12.7%の改善が認められました。なお両試験ともにベクターに関連する副作用は報告されませんでした。

AAVベクターを使って神経細胞に対して保護作用があるneurturinという神経栄養因子の遺伝子を脳の被殻に手術により注入した遺伝子治療臨床研究(第I相および第II相)がアメリカで行われました。第I相の臨床試験では、特発性のパーキンソン病の患者さんに対して12か月後UPDRSの運動スコアがオフ時に36%改善しました。第II相の臨床試験では、進行期パーキンソン病の患者さんに対して治療群と偽手術群においてUPDRSの運動スコアの改善に違いは認められませんでした。なお両試験ともにベクターに関連する副作用は報告されませんでした。現在、被殻に加えて黒質にもベクターを注入する第III相の臨床試験が実施されており、重篤な副作用は報告されておりません。

neurturin と同じ特徴がある GDNF という神経栄養因子の遺伝子を AAV ベクターを使って脳の被殻に手術により注入した遺伝子治療臨床研究（第 I 相）が現在、アメリカで行われています。

AAV ベクターよりも大きな遺伝子を細胞内に導入することが可能な ELAV ベクターを使って AADC だけでなくチロシン水酸化酵素（TH）とグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼ（GCH）というドパミンの生合成に関わる遺伝子を脳の被殻に手術により注入した遺伝子治療臨床研究（第 I 相）が現在、フランスで行われています。

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. パーキンソン病の患者さん。
2. 年齢が 75 歳以下の方。
3. パーキンソン病の発症が 35 歳以降の方。
4. レボドパによる治療を 5 年以上続けられた方。
5. OFF の状態（お薬の切れたとき）で、Hoehn & Yahr の重症度が IV の方。
6. OFF の状態で MDS-UPDRS のスコアの合計が 30～100 点の方。
7. ドパミン治療に対する反応が明らかで、ON（お薬の効いているとき）と OFF での MDS-UPDRS-III（運動スコア）の改善が明らかであること。具体的には UPDRS-III が 16 点以上改善する方。
8. 耐え難い運動合併症を認め（具体的には MDS-UPDRS-IV の項目 B：症状の日内変動のスコアが 4～9）、適切なお薬によって満足できる治療効果が得られず、かつ定位脳手術を受けようと思えば受けることのできる方。
9. 治療後の頻回の診察を含めて、臨床研究に必要な条件を守ることが可能な方。
10. 臨床研究に参加する前の少なくとも 2 ヶ月間、パーキンソン病のお薬を変更していない方。
11. 患者さん本人に十分な説明が行われたうえで同意が得られ、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. パーキンソン病以外の病気と思われる患者さん.
2. 過去6ヶ月以内に、3時間以上続く激しいジスキネジアを経験した方.
3. 既にパーキンソン病に対する手術治療を受けたことのある方.
4. 認知症、統合失調症、重度のうつ病、薬物依存症の患者さん.
5. 過去6ヶ月以内に精神疾患に基づく幻覚や妄想を認めた方.
6. 脳血管障害をはじめ、明らかな心血管疾患を有する方.
7. 脳腫瘍や、年齢に比べて明らかな脳萎縮など、臨床的に明らかな脳の病気を持っている方.
8. 5年以内に、治療済みの皮膚癌以外の悪性腫瘍を認めた方.
9. 収縮期血圧160 mmHg以上の高血圧を認める方.
10. 血液凝固異常のある方、あるいは抗凝固療法の必要な方.
11. 臨床的に明らかな免疫異常のある患者さん、あるいは免疫抑制剤の必要な方.
12. MAO-A阻害薬あるいは抗精神薬をのんでいる方.
13. MRIが撮影できない方.
14. FMT-PET検査で、パーキンソン病で一般的に認められる異常所見を認めない方.
15. 閉経前の女性、子供をもうけることを希望する男性、ただし遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合はこの限りではありません.
16. 3年以内に痙攣発作を起こした方、てんかんの薬をのんでいる方、脳波検査でてんかん性の異常がみられる方.
17. 重い薬物アレルギーのある方.
18. 過去6ヶ月以内に、他の臨床治験に参加したことのある方.
19. 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.
20. その他、総括責任者が本臨床研究の対象として不相当と判断した方.

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。あなたがこの条件に当てはまるかどうかの最終判断は、総括責任者が行います。

B. 臨床研究のスケジュール (表)

治療用ベクターの注射のほぼ10日前から注射後ほぼ2週間の間は、自治医科大学附属病院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する目的で行われます。定期的に症状日誌を記載していただくことも予定されていますので、ご協力をお願いします。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2ヶ月前から注射6ヶ月後の間は、原則としてパーキンソン病の治療薬は変更出来ません。ただしドパミンの合成が多すぎるときにはレボドパをのむ量を減らして対処します。

あなたから治療用ベクターがどのように体の外に出るかを調べるため、あなたの血液、尿、便を手術前、手術の後連続3日間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。

臨床研究のスケジュール(1年目)

	術前評価	手術	経過観察	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	
	14日以内		3日	7日	14日	28日	42日	56日	3ヶ月	4ヶ月	5ヶ月	6ヶ月	7ヶ月	8ヶ月	9ヶ月	10ヶ月	11ヶ月	12ヶ月	
スクリーニング	8週以前																		
診察	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
記憶検査	○																		
うつの評価						○													
症状日誌	○																		
ビデオ撮影	○								○										○
心電図検査	○																		
血液検査	○			○	○	○			○										○
生化学検査	○																		
免疫検査	○																		
PCR検査	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PETスキヤン	○																		
DATスキヤン																			
頭部MRI	○			○															
頭部CT			○																

PCR検査は血液、尿、便の中にウイルスベクターが残っていないか調べる検査です。手術後1, 2, 3日目にも実施します。3回連続して陰性のときには実施しません。
 **は遺伝子導入後の入院期間中に行います。

臨床研究のスケジュール (2年目～5年目)

	評価 16	評価 17	評価 18	評価 19	評価 20	評価 21	評価 22	評価 23	評価 24	評価 25	評価 26	評価 27	評価 28	評価 29	評価 30	評価 31
	15ヶ月	18ヶ月	21ヶ月	24ヶ月	27ヶ月	30ヶ月	33ヶ月	36ヶ月	39ヶ月	42ヶ月	45ヶ月	48ヶ月	51ヶ月	54ヶ月	57ヶ月	60ヶ月
診・察	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
記憶検査 うつの評価			○									○				○
症状日誌				○				○				○				○
ビデオ撮影				○				○				○				○
血液検査* 生化学検査				○				○				○				○
PCR検査	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎

C. 被殻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為の枠（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。被殻の左右それぞれ2ヶ所、全体で4ヶ所に注射します（図7）。

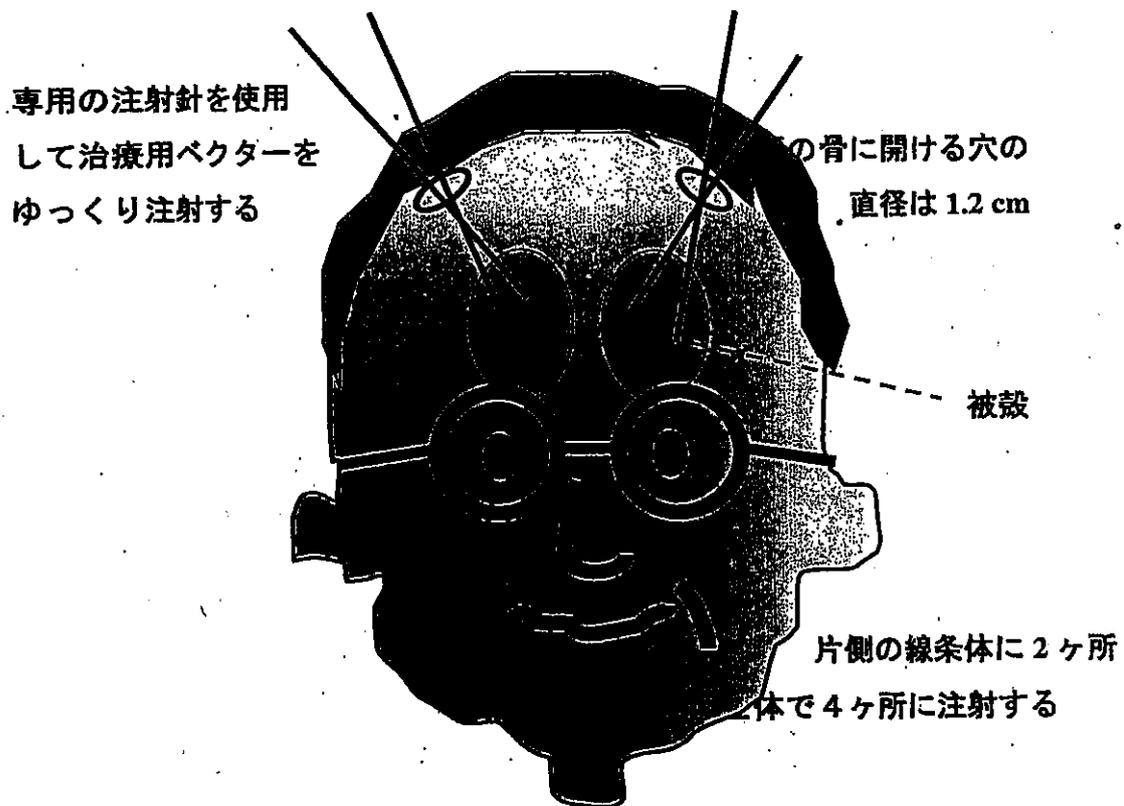


図7 治療用ベクターの注射

治療用ベクターは、全身麻酔をしたあなたの頭の骨に、右と左に1つずつ小さな穴を開け、そこから被殻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、片側の被殻の異なる2ヶ所に注射します。

治療用ベクターは1ヶ所につき 50 μ l (1 ml の 1/20 の量) か 150 μ l 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 μ l の速さで注射しますので、1ヶ所につき17分か50分かかります。計4ヶ所に注射するのに1時間7分か3時間20分かかることとなります。手術全体にかかる時間は約4時間か約8時間を予定しています。

治療用ベクターは最も適切なベクター量はまだ判りませんので、使用するベクターの濃度は2段階を予定しています。最初の3人は 3×10^{11} ベクター量、次の3人は 9×10^{11} ベクター量を注入します。

D. 期待される効果

この治療によって、次の効果が期待されます。1) 服用したレボドパが線条体で効率よくドパミンに変わり、パーキンソン病の運動症状が改善すること。2) この効果は、服用するレボドパの量で調節できること。

私たちが行っております、パーキンソン病のサルを用いた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分かっています。

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」と言います）。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。しかも安全性を増すために、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、生命に関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才男性に対し，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，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（2002-2005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異なり，全身性の反応（全身性炎症反応症候群）はお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，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きわ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AAVベクターをヒトの脳に注射します．サルもこのベク

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言い、昏睡などの重篤な症状をひき起こします。

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おきる可能性があり、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、この様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 ベクターを使った治療が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、その染色体に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。ベクターは脳に注射しますので、もし起きるならば、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み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こ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だしたり、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きわめて低いものと思われませんが否定はできません。そのため、臨床研究に参加中は避妊して下さい。なお、あなたが男性で将来子供をつくることを希望する場合は、手術前に精子を凍結保存するようおすすめします。凍結保存の費用は本臨床研究グループが負担します。

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せんが、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、その間あなたの尿・便・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72時間（3日間）は個室に入ってください。3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。

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所をとおりますので、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きたすこともあります。

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、言葉が出なかつ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きたした場合には、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。

この臨床研究では、これまでに自治医大で手術した6人の患者さんのうち1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。画像検査では、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人中の2の方に脳出血を生じました。そのうちの1人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人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。

4. その他、手術に関係した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頂きます。

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10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6名を予定しております。

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下さい。参加をことわったからといって、あなたが不利になるようなことはありませんのでご安心下さい。

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下さい。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に最も適した他の治療を行います。その場合あなた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、あなたの体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、あなたの安全のために、手術後の定期的な診察や血液や尿の検査などは可能な方法で実施します。

1 2. 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、医師の方に過失が無くても、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も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。その時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ヶ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見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、たとえばお見舞い等でご家族が病院においでになる時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、研究グループが出来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。

14. 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個人情報は、あなたの年齢、症状の経過観察、検査データ、ビデオ記録等です。これらは本臨床研究の目的である安全性の評価と治療効果を判定す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。

15. 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、あなたの個人情報を取り扱うことがあります。また、本臨床研究の客観性を保証するために当院以外の外部の監査担当者があなたの診療記録を閲覧することがあります。いずれの場合も、あなたの個人情報はすべて秘密として取り扱われます。

本臨床研究では、タカラバイオが共同研究者として遺伝子治療 AAV ベクターに関する技術提供に限定し、間接的に関与しています。タカラバイオが作製した AAV ベクターをあなたに注入した場合の安全性や機能に関する記録は、個人が特定できないように個人情報を完全に匿名化してから、タカラバイオの担当者が閲覧する可能性があります。（患者さんを特定する情報については、担当医師が慎重に管理しま

す)。

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。

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

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通りです。

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

- ・ あなた自身
- ・ 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あなたの世話を実際に行っている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

- ・ あなた自身が申請する場合は、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もちください。
- ・ 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）をおもちください。

2) 申請の仕方：上の書類をお持ち頂き、自治医科大学附属病院医事課で所定の書類に記入頂きます。

3) 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。

17. 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。その代わりに、臨床研究に参加するために必要な経費、例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負担します。この臨床研究に参加することで、あなたに今まで以上に余分なお金（自己負担分の医療費）がかかることはありません。ただし、この臨床研究の間でもこの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負担となります。

18. 臨床研究に参加する間にお願いすること

あなた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る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。

・いつもと体調が違ふ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。

19. 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にはその権利を持つことはないことをご了承ください。

20. 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり

本臨床研究の経費の一部には、共同研究先である遺伝子治療研究所から提供された資金が使用されています。また、共同研究先であるタカラバイオ社が製造したベクターを無償で提供を受けます。研究責任者は、遺伝子治療研究所の役員です。また、研究副責任者はタカラバイオ社との共同研究経費を財源として設置された共同研究講座の客員教授です。そのため毎年定期的に自治医科大学利益相反委員会にて利害の衝突に関する審査を行うことで、本臨床研究の利害関係についての公正性を保ちます。また本臨床研究における治療行為の実施、自治医科大学遺伝子治療臨床研究審査委員会安全効果評価・適応判定部会など、あなたの診療に直接関わり、かつ臨床的判断を行う議決組織の全てにおいて、遺伝子治療研究所およびタカラバイオ社は除外されているため、中立性と客観性は保たれています。

21. 緊急連絡先及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 神経内科・脳神経外科

電話番号：0285-58-7352（神経内科）

0285-58-7373 (脳神経外科)

総括責任者 (神経内科) : 村松 慎一

分担研究者 (免疫遺伝子細胞治療学) : 小澤 敬也

分担研究者 (遺伝子治療研究部) : 水上 浩明, 卜部 匡司

分担研究者 (神経内科) : 安藤 喜仁, 小野 さやか, 奈良 優子

分担研究者 (脳神経外科, 救急医学) : 渡辺 英寿, 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) 経由で神経内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。

2.2. 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 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病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

(3) 総括責任者

村松 慎一 (自治医科大学医学部 内科学講座 神経内科学部門 教授 (特命教授))

(4) 分担研究者

氏名	所属	役職
小澤 敬也	自治医科大学 免疫遺伝子細胞治療学	客員教授
渡辺 英寿	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	助教
安藤 喜仁	自治医科大学 神経内科学部門	助教

小野 さやか	自治医科大学 神経内科学部門	助教
奈良 優子	自治医科大学 神経内科学部門	非常勤医員
水上 浩明	自治医科大学 遺伝子治療研究部	学内教授
卜部 匡司	自治医科大学 遺伝子治療研究部	講師
佐藤 俊彦	宇都宮セントラルクリニック	院長
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 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

23. 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ことがわかった場合は、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。

この研究に参加された方がお亡くなりになられた場合は、ご遺族に対して解剖をお願いすることがあります。

この臨床研究について十分に理解していただけただけでしょうか？

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下さい。

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 発現 AAV ベクター被殻内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療」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。ついでには自らの自由意思により、本臨床研究に参加することに同意いたします。

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

□パーキンソン病とドパミン

□この臨床研究の概要について

□AAV ベクターを使ったパーキンソン病遺伝子治療臨床研究の状況

□参加できる人、できない人

□被殻への治療用ベクターの注射

□予想される危険性および副作用

□臨床研究の参加をことわったら

□健康被害の治療とその医療費に関して

□あなたの個人情報の保護について

□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

□臨床研究に参加する間にお願ひすること

□本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり

□臨床研究とは

□パーキンソン病の治療法と問題点

□AAV ベクターとは

□臨床研究の具体的な方法

□臨床研究のスケジュール（表）

□期待される効果

□臨床研究への参加予定期間、参加患者数

□途中でやめなくなったら

□新たな情報のお知らせについて

□臨床研究の成績の使用と公表について

□臨床研究に参加するために必要な費用について

□緊急連絡先およびお問い合わせ先について

□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

私は左頁の項目すべての□にチェックの印を記入した上で、「AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」に参加することに同意いたします。

平成	年	月	日	
	本人の住所	_____		
	署名・捺印	_____		印
	電話番号	_____	()	_____

説明日 平成 年 月 日
説明者の職名 _____
説明者の署名・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 発現 AAV ベクター被殻内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療」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。ついでには自らの自由意思により、本臨床研究に参加することに同意いたします。

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。）

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> はじめに | <input type="checkbox"/> 臨床研究とは |
| <input type="checkbox"/> パーキンソン病とドパミン | <input type="checkbox"/> パーキンソン病の治療法と問題点 |
| <input type="checkbox"/> この臨床研究の概要について | <input type="checkbox"/> AAV ベクターとは |
| <input type="checkbox"/> AAV ベクターを使ったパーキンソン病遺伝子治療臨床研究の状況 | <input type="checkbox"/> 臨床研究の具体的な方法 |
| <input type="checkbox"/> 参加できる人、できない人 | <input type="checkbox"/> 臨床研究のスケジュール（表） |
| <input type="checkbox"/> 被殻への治療用ベクターの注射 | <input type="checkbox"/> 期待される効果 |
| <input type="checkbox"/> 予想される危険性および副作用 | <input type="checkbox"/> 臨床研究への参加予定期間、参加患者数 |
| <input type="checkbox"/> 臨床研究の参加をことわったら | <input type="checkbox"/> 途中でやめなくなったら |
| <input type="checkbox"/> 健康被害の治療とその医療費に関して | <input type="checkbox"/> 新たな情報のお知らせについて |
| <input type="checkbox"/> あなたの個人情報の保護について | <input type="checkbox"/> 臨床研究の成績の使用と公表について |
| <input type="checkbox"/> 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 | <input type="checkbox"/> 臨床研究に参加するために必要な費用について |
| <input type="checkbox"/> 臨床研究に参加する間に願いますること | <input type="checkbox"/> 緊急連絡先およびお問い合わせ先について |
| <input type="checkbox"/> 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり | <input type="checkbox"/> この臨床研究の結果から生じる知的財産権について |
| | <input type="checkbox"/> 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制 |
| | <input type="checkbox"/> その他 |

私は左頁の項目すべての□にチェックの印を記入した上で、「AADC 発現 AAV ベクタ

「被殻内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」に参加することに同意いたします。

平成	年	月	日	
	本人の住所	_____		
	署名・捺印	_____	印	
	電話番号	_____	()	_____

説明日 平成 年 月 日
説明者の職名 _____
説明者の署名・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 発現 AAV ベクター被殻内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療」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。ついでには自らの自由意思により、本臨床研究に参加することに同意いたします。

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

□パーキンソン病とドパミン

□この臨床研究の概要について

□AAV ベクターを使ったパーキンソン病遺伝子治療臨床研究の状況

□参加できる人、できない人

□被殻への治療用ベクターの注射

□予想される危険性および副作用

□臨床研究の参加をことわったら

□健康被害の治療とその医療費に関して

□あなたの個人情報の保護について

□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

□臨床研究に参加する間にお願いますること

□本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり

□臨床研究とは

□パーキンソン病の治療法と問題点

□AAV ベクターとは

□臨床研究の具体的な方法

□臨床研究のスケジュール（表）

□期待される効果

□臨床研究への参加予定期間、参加患者数

□途中でやめなくなったら

□新たな情報のお知らせについて

□臨床研究の成績の使用と公表について

□臨床研究に参加するために必要な費用について

□緊急連絡先およびお問い合わせ先について

□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

私は左頁の項目すべての□にチェックの印を記入した上で、「AADC 発現 AAV ベクター被殻内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」に参加することに同意いたします。

平成	年	月	日
本人の住所	_____		
署名・捺印	_____		印
電話番号	_____ () _____		

説明日 平成 年 月 日

説明者の職名 _____

説明者の署名・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 発現 AAV ベクター被殻内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療」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 _____

署名・捺印 _____ 印

電話番号 _____ () _____

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 発現 AAV ベクター被殻内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療」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 _____

署名・捺印 _____ 印

電話番号 _____ () _____

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 発現 AAV ベクター被殻内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療」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 _____

署名・捺印 _____ 印

電話番号 _____ () _____

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

平成 27 年 3 月 2 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 発現 AAV ベクター被殻内投与によるパーキンソン病遺伝子治療の第 I/II
相臨床研究
申請者：自治医科大学附属病院 病院長 安田 是和
申請日：平成 26 年 7 月 23 日
2. 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 安田 是和
申請日：平成 26 年 7 月 23 日

※両臨床研究については、対象疾患や治療施設（病棟）に差違はあるものの、用いるベクター
や使用方法等は同様であることから、評価結果はひとつにまとめている。

【審査委員会の評価結果（自治医科大学附属病院）】

1. 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（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 安田 是和
(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、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。 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。

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 7 月 23 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿



氏名 自治医科大学附属病院
申請者 病院長 安田 是和 印
住所 栃木県下野市薬師寺 3311 番地

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項、(同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。)の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>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 (AAV-hAADC-2)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>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</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物の溶液は、スクリュュ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。</p> <p>(2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物の溶液の融解、希釈及び分注操作は、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溶液の保管は、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溶液又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。</p> <p>(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 (高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。) 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。</p> <p>(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。</p> <p>(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脳手術により注入することで行う。</p> <p>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 μl/min 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</p>

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希釈溶液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。

(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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却）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。

(8) 投与後72時間まで、被験者を個室で管理する。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開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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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扱いに準じる。

(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。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。

(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ときは、個室における管理を継続する。

(12) 個室における管理解除後に被験者の血液又は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。

「ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素
(aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) を
発現する遺伝子組換え2型アデノ随伴ウイルス
ベクター (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

AAV-hAADC-2 (以下、本遺伝子組換え生物という) は、ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) を発現する遺伝子組換え2型アデノ随伴ウイルスベクターである。

アデノ随伴ウイルス (AAV) はパルボウイルス科デペンドウイルス属に分類されている (文献1、2)。これまでに霊長類で分離されたウイルスは、血清型およびゲノムの違いに基づき100以上の型に分けられており (文献1、3、4)、本遺伝子組換え生物はAAV2型 (AAV2) を宿主として作製された。

AAV2は自然界に広く分布しており、哺乳類に感染する。ヒトでは小児期に初感染が起こること、成人の約半数が中和抗体を有することが知られている (文献1) が、ヒトへの病原性は知られていない。

文献 1 : Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed., Fields VIROLOGY 4th edition, pp.2327-2379,

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)

文献 2 : Tijssen, P. ed., Handbook of Parvoviruses, Volume I, pp.11-30, CRC press, Boca Raton, FL (1990)

文献 3 : Gao, G., et al., Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J. Virol. 78: 6381-6387 (2004)

文献 4 : Mori, S., et al., Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudo-typing characterization of capsid protein. Virology 330: 375-383 (2004)

2 使用等の歴史及び現状

AAV2を含めいかなる血清型も生ワクチン等に使用した報告はない。また、AAV2に由来する遺伝子組換えウイルスは遺伝子治療で汎用されている (IV章参照)。

3 生理・生態学的特性 (文献1、2)

(1) 基本的特性

AAVは約4.7 kbの線状1本鎖DNAウイルスであり、エンベロープを持たず直径約26 nmの正二十面体構造のキャプシドを有している。

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、非分裂細胞にも導入が可能である。野生型 AAV は標的細胞に感染すると Rep が関与して第19染色体長腕の AAVS1 領域に組み込まれることが知られているが、プラスミド

ベクターから作成した 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 5)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染はするが、ウイルス粒子を構成するために必要な E1A、E1B、E2A、E4 及び VA 遺伝子を有さず、自律的な増殖能を欠損したウイルスである。増殖にはこれらの遺伝子を供給する「ヘルパーウイルス」(アデノウイルス又はヘルペスウイルスなど)の存在が必要である。培養細胞でも同様に、rep 及び cap を搭載した「アデノ随伴ウイルスヘルパープラスミド (AAV ヘルパープラスミド)」及び、E2A、E4 及び VA を発現する「アデノウイルスヘルパープラスミド (Ad ヘルパープラスミド)」を、E1A 及び E1B を発現するヒト胎児腎培養細胞 (293T/17 細胞) にコトランスフェクションした場合にのみ増殖が起こる。本ウイルスは物理化学的に比較的堅牢であり、常温においても比較的安定である。

(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)。

(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に感染個体で増幅し、分泌物と一緒に排泄されて、ヘルパーウイルスと共に次の生物に感染する。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 6、7)。

(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。

(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蛋白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°C 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。

文献 5 : Nakai H., et al. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nature Genetics* 34 :297-302 (2003)

文献 6 : Chen, C., et al., Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J. Virol.* 79: 14781-14792 (2005)

文献 7 : Schnepf, B., et al., Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J. Virol.* 79: 14793-14803 (2005)

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

AAV2 の両末端にあるITR (Inverted terminal repeat) の間の領域を供与核酸となる AAV-hAADC-2 (3,457bp)と置換した。AAV-hAADC-2の全塩基配列を別紙1に示した。AAV-hAADC-2はAAV2にヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素human aromatic L-amino acid decarboxylase (hAADC) の発現カセットを挿入したものであり、その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poly 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 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、ウイルス固有の蛋白質である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、2型アデノウイルスの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Ampicilin 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 遺伝子をクローニングし、更に、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。なお、rep遺伝子のp5プロモーターは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ている。pHelperは、アデノウイルス2型のE2A、E4、VARNA 遺伝子をクローニングして構築した(別紙4)。構築したpAAV-hAADC-2、pHelper 及びpRC-BI-khB342-2のそれぞれを大腸菌DH5 α に導入して形質転換し、アンピシリン耐性株のグリセロールストックを作製して、MWCBとした。各プラスミドベクター溶液は、MWCB を培養して菌体を集め、溶菌後、ゲル濾過クロマトグラフィー及び2種類のイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、更に、タンジェンシャルフロー膜濃縮にて濃縮後、0.22 μ mフィルターで濾過して作製した。得られたpAAV-hAADC-2、pHelper 及びpRC-BI-khB342-2 を共に、リン酸カルシウム法によってヒト胎児腎細胞 (293T/17 細胞) に導入し、本遺伝子組換え生物を得た(別紙5)。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本組換え生物は、293T/17生産細胞から抽出及び粗精製処理後、セシウム密度勾配超遠心により精製し、更に、タンジェンシャルフロー膜濃縮にてバッファー置換後、0.22 μ mフィルターで濾過して、クライオバイアルにて-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

プラスミドの製造及び品質試験並びに本遺伝子組換え生物の製造及び品質試験は、タカラバイオ株式会社草津事業所(滋賀県草津市野路東七丁目2番62号)の細胞・遺伝子治療センターにおいて、GMP 基準に従って実施した(各バンク及び本遺伝子組換え生物の品質管理試験の詳細は別紙6及び別紙7)。本遺伝子組換え生物は、自治医科大学附属病院本館1階臨床用細胞調製室(P2レベル)にて受け入れ、同室内のディープフリーザーに施錠の上、保管する(当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙8)。

4. 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸は本遺伝子組換え生物の1本鎖DNA ゲノムの一部としてAAVのITRに挟まれて存在し、保管中は極めて安定で、感染する動植物等の種類及び感染様式が保管中に変化することはない(文献8)。

細胞に感染するとAAV-hAADC-2のゲノムは核内に移行して2本鎖DNAとなり、多くは染色体とは独立したエピソームとして存在すると考えられる(文献9、10、11)。この2本鎖

DNA となったものからhAADC が転写される。細胞のゲノムへの組込みは稀で低頻度である。hAADC の発現は発現する細胞の遺伝子に変化が起こらないかぎり、また細胞が分裂しないかぎり継続するものと考えられる。一般に神経細胞は非分裂細胞であるので長期的な発現が期待される。

本遺伝子組換え生物を293T/17 細胞で作製する過程でpHelper及びpRC-BI-khB342-2 と pAAV-hAADC-2 が非相同組換えを起こして増殖能を獲得したウイルス

(replication-competent AAV、以下RCA とする)を生ずる可能性は否定できない。しかしそのRCA はパッケージできるサイズを考慮すれば、ほぼ全ての供与核酸を失っていると考えられる。さらにこのRCA も野生型のAAV と同様にAAV のヘルパーウイルスであるアデノウイルスや単純ヘルペスウイルス等がないかぎり実際には増殖することは不可能である。

文献 8 : Xu R. et al., Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. Med. Sci. Monit. 11: 305-308 (2005)

文献 9 : Yan, Z., et al., Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. J. Virol. 79: 364-379 (2005)

文献 10 : Schnepf, B., et al, Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. J. Virol. 77: 3495-3504 (2005)

文献 11 : Grimm, D., et al, Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. J Virol 80: 426-439 (2006)

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。

- ・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。
- ・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、rep及びcap 遺伝子が組み込まれた又はトランスフェクションされた細胞でなければ増殖は起こらない。
- ・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。

・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11）。

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-khB342-2pHelperとhAADC 遺伝子をもつ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9、10、11）。

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

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

(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。

(2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物の溶液の融解、希釈及び分注操作は、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溶液の保管は、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溶液又はその凍結品を開放系区域を通過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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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。

(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。

(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脳手術に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 μ l/min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希釈溶液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。

(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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却）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。

(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開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。

(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（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）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扱いに準じる。

(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。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。

(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ときは、個室における

管理を継続する。

(12)個室における管理解除後に被験者の血液又は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。

3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

被験者体内におけるRCA の出現の有無については、被験者への投与後、適切な時期に血液及び尿を用いてPCR 法にて検査し、連続した2回の検査結果が陰性であることを確認する。

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

遺伝子組換えウイルス投与後の被験者についてはPCR 法にて血液、尿中の遺伝子組換えウイルスが連続した2回の検査において検出されなくなるまで追跡する。

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12、13、14、15、16、17、18、19）。また、血液中でAAV-hAADC-2 は検出されていない。

文献 12 : Fan, D. S., et al., Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and atomatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno-associated virus vectors. Hum. Gene Ther. 9: 2527-2535 (1998)

文献 13 : Shen, Y., et al., Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase I for gene therapy of Parkinson's disease. Hum. Gene Ther. 11: 1509-1519 (2000)

文献 14 : Muramatsu, S., 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. 13: 345-354 (2002)

文献 15 : Sanftner, M. L., et al., AAV2-mediated gene delivery to monkey putamen: Evaluation of an infusion device and delivery parameters. Experimental Neurology 194 476 - 483 (2005)

文献 16 : Cunningham, J., et al., Biodistribution of Adeno-associated Virus Type-2 in Nonhuman Primates after Convection-enhanced Delivery to Brain. Molecular Therapy vol. 16 no. 7, 1267-1275 (2008)

文献 17 : Daadi, M. M. et al., Distribution of AAV2-hAADC-transduced cells after 3 years in

Parkinsonian monkeys. NEUROREPORT Vol 17 No 2 201-204 (2006)

文献 18 : Fiandaca, S. M., et al. Real-time MR imaging of adeno-associated viral vector delivery to the primate brain. Neuroimage 47(Suppl 2): T27-T35 (2009)

文献 19 : Sebastian W. S., 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. HUMAN GENE THERAPY 23:210-217 (2012)

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20)。

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21)。

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、本研究と同じ目的遺伝子を搭載した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・パ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から67歳の男女5人に総量 9×10^{10} のベクターゲノムを投与したところ、1か月及び6か月後に、6-[18F]フルオロ-L-mチロシン(FMT)の取込みが30%向上し、ベクターに関連する有害事象は認められなかった。引き続き、総量 3×10^{11} のベクターゲノムが男女5人に注入され、FMT取込みは75%増加したが、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、ベクターの異常増殖による有害事象は認められていない(文献22、23、24)。

文献 20 : Manno, C. S., et al., AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. Blood 101: 2963-2972 (2003)

文献 21 : Manno, C. S., 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)

文献 22 : J.L. Eberling, W.J. Jagust, C.W. Christine, et al. Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. Neurology ;70 1980-1983, 2008

文献 23 : C.W. Christine, P.A. Starr, P.S. Larson, et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 73:1662-1669, 2009

文献 24 : G. Mittermeyer, C W. Christine, K H. Rosenbluth, et al. Long-Term Evaluation of a Phase 1 Study of AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease. *HUMAN GENE THERAPY* 23:377-381, 2012

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、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、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載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、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 又は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。

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。

なお、AAV2 に由来する遺伝子組換えウイルスは1999 年以後、米国で使用され(文献10、

11)、血清型が異なる遺伝子組み換えAAVが欧州で医薬品 (Glybera) として承認されたが、環境への悪影響に関する報告はない。また、これまで当該ウイルスを投与されたヒトにおいて当該ウイルスに由来する重篤な副作用は報告されていない。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来RCA が環境中へ拡散する可能性は低く、また、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはなく、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ため、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来RCA が被験者以外のヒトに対して病原性を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、病原性について、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、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、有害物質の産生性について、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、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、マウスなどのほ乳動物に感染することが報告されている。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物が感染したヒト又はヒト以外のほ乳類で一過性に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核酸の水平伝達は知られていない。本遺伝子組換え生物由来の遺伝子組換え生物に該当するRCA が出現したとしても、核酸を水平伝達する性質は野生型AAV2 と同等である。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、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。

(4) 生物多様性が生ずるおそれの有無等の判断

よって、拡散を水平伝達する性質について、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、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。

文献 25 : Kay, M. A., et al., Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. Nat. Genet. 24: 257-261 (2000)

文献 26 : Manno, C. S., 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)

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、ほ乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物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いても野生型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。

生物多様性影響評価書 別紙 目次

- 別紙 1: AAV-hAADC-2 の全塩基配列
- 別紙 2: hAADC のアミノ酸配列
- 別紙 3: AAV-hAADC-2 の構造
- 別紙 4: プラスミドの構造
- 別紙 5: 組換え AAV ウイルス作製の概略図
- 別紙 6: AAV-hAADC-2の品質管理試験
- 別紙 7: 293T/17細胞 (MWCB)の品質管理試験
- 別紙 8: 治療施設の地図及び保管場所の概略図
- 別紙 9: 治療施設医療廃棄物管理規程

図1 AAVベクターAAV-hAAD-2の塩基配列

```

1   CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGCGACCTTT 60
    left ITR 領域
61  GGTCCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT 120
121 AGGGGTTCCTGCGGCCGCACGCGTCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG 180
    CMV promoter
181 TTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT 240
241 GACCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTCCCATAGTAACGC 300
301 CAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG 360
361 CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT 420
421 GGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA 480
481 TCTAGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG 540
541 TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAG 600
601 TTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAT 660
661 GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAG 720
721 GAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCG 780
781 GGACCGATCCAGCCTCCGCGGATTCGAATCCCGGGCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGA 840
    β-globin intron
841 TTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAATG 900
901 CTTCCTTCTTTAATATACFTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCT 960
961 TCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTCACCATTCTAAAGAATAAC 1020
1021 AGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATAT 1080
1081 AAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAT 1140
1141 TCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCT 1200
1201 TTGCTAATCATGTTTACATCCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTC 1260
1261 TGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTCGAACATCGATTGAATCCCCG 1320
1321 GGGATCCACCATGAACGCAAGTGAATCCGAAGGAGAGGGAAGGAGATGGTGGATTACGT 1380
    ヒト AADC
1381 GGCCAACTACATGGAAGGCATTGAGGGACGCCAGGTCTACCCTGACGTGGAGCCCGGGTA 1440
1441 CCTGCGGCCGCTGATCCCTGCCGCTGCCCTCAGGAGCCAGACACGTTTGAGGACATCAT 1500
1501 CAACGACGTTGAGAAGATAATCATGCCTGGGGTGACGCACTGGCACAGCCCCCTACTTCT 1560
  
```

1561	CGCCTACTTCCCCACTGCCAGCTCGTACCCGGCCATGCTTGC GGACATGCTGTGCGGGGC	1620
1621	CATTGGCTGCATCGGCTTCTCCTGGGCGGCAAGCCCAGCATGCACAGAGCTGGAGACTGT	1680
1681	GATGATGGACTGGCTCGGGAAGATGCTGGA ACTACCAAAGGCATTTTTGAATGAGAAAGC	1740
1741	TGGAGAAGGGGGAGGAGTGATCCAGGGAAGTGCCAGTGAAGCCACCCTGGTGGCCCTGCT	1800
1801	GGCCGCTCGGACCAAAGTGATCCATCGGCTGCAGGCAGCGTCCCAGAGCTCACACAGGC	1860
1861	CGCTATCATGGAGAAGCTGGTGGCTTACTCATCCGATCAGGCACACTCCTCAGTGGAAAG	1920
1921	AGCTGGGTAAATTGGTGGAGTGAAATTA AAAGCCATCCCCTCAGATGGCAACTTCGCCAT	1980
1981	GCGTGCCTGCTGCCCTGCAGGAAGCCCTGGAGAGAGACAAAGCGGCTGGCCTGATTCTTT	2040
2041	CTTTATGGTTGCCACCCTGGGGACCACAACATGCTGCTCCTTTGACAATCTCTTAGAAGT	2100
2101	CGGTCCTATCTGCAACAAGGAAGACATATGGCTGCACGTTGATGCAGCCTACGCAGGCAG	2160
2161	TGCATTCATCTGCCCTGAGTTCGGGCACCTTCTGAATGGAGTGGAGTTTGCAGATTCATT	2220
2221	CAACTTTAATCCCACAAATGGCTATTGGTGAATTTGACTGTTCTGCCATGTGGGTGAA	2280
2281	AAAGAGAACAGACTTAACGGGAGCCTTTAGACTGGACCCCACTTACCTGAAGCACAGCCA	2340
2341	TCAGGATTCAGGGCTTATCACTGACTACCGGCATTGGCAGATAACCACTGGGCAGAAGATT	2400
2401	TCGCTCTTTGAAAATGTGGTTTGTATTTAGGATGTATGGAGTCAAAGGACTGCAGGCTTA	2460
2461	TATCCGCAAGCATGTCCAGCTGTCCCATGAGTTTGAGTCACTGGTGCGCCAGGATCCCCG	2520
2521	CTTTGAAATCTGTGTGGAAGTCATTCTGGGGCTTGTCTGCTTTGGGCTAAAGGGTTCCAA	2580
2581	CAAAGTGAATGAAGCTCTTCTGCAAAGAATAACAGTGCCAAAAAATCCACTTGGTTCC	2640
2641	ATGTCACCTCAGGGACAAGTTTGTCTGCGCTTTGCCATCTGTTCTCGCACGGTGGAAATC	2700
2701	TGCCCATGTGCAGCGGGCCTGGGAACACATCAAAGAGCTGGCGGCCGACGTGCTGCGAGC	2760
2761	AGAGAGGGAGTAGGAGTGAAGCCAGGACCTGCAGAAGCTTGCCCTCGAGCAGCGCTGCTCG	2820
2821	AGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCCTCTCCTGGCCCTGGAAGT	2880
2881	hGH polyA TGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAAATTAAGTGCATCATTTTGTCTGA	2940
2941	CTAGGTGTCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGT	3000
3001	TGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGC	3060
3061	ACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCC	3120
3121	TCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTTG	3180

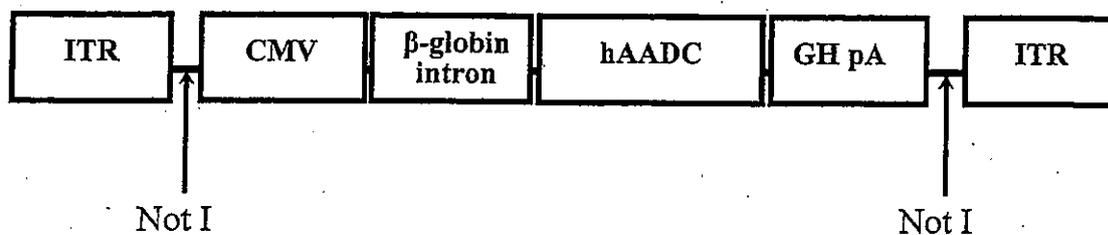
3181 GTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGAT 3240
3241 CTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCC 3300
3301 TGTCCCTTCTGATTTTGTAGGTAACGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTT 3360
3361 GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCG 3420
3421 ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG 3468

right ITR 領域

別紙2 haADCのアミノ酸配列

MNASEFRRRGKEMVDYVANYMEGIEGRQVYPDVEPGYLRPLIPAAAPQEPDTFEDIINDVE
KIIMPGVTHWHSPYFFAYFPTASSYPAMLADMLCGAIGCIGFSWAASPACTELETVMMDWL
GKMLELPKAFLNEKAGEGGGVIQGSASEATLVALLAARTKVIHRLQAASPELTQAAMEKLV
AYSSDQAHSSVERAGLIGGVKKAIPSDGNFAMRASALQEALERDKAAGLIPFFMVATLGTT
TCCSFDNLLEVGPICNKEDIWLHVDAAYAGSAFICPEFRHLLNGVEFADSFNFNPHKWLLVN
FDCSAMWVKKRTDLTGAFRLDPTYLKSHQDGLITDYRHWQIPLGRRFRSLKMWFVFRM
YGVKGLQAYIRKHVQLSHEFESLVRQDPRFEICVEVILGLVCFRLKGSNKVNEALLQRINSA
KKIHLVPCHLRDKFVLRFAICSRVESAHVQRAWHEHIKELAADVLRARE

別紙3 AAV-hAADC-2 の構造



ITR: inverted terminal repeats

CMV: cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer

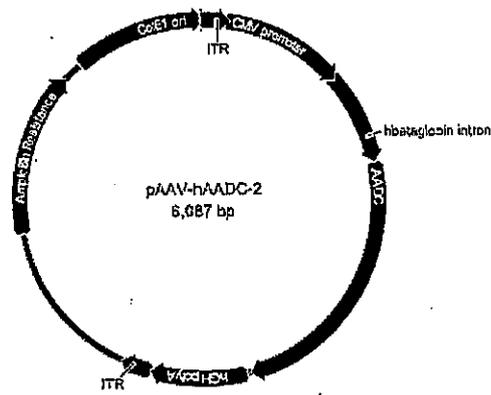
β-globin intron: human β-globin intron

hAADC: cDNA of human aromatic L-amino acid decarboxylase

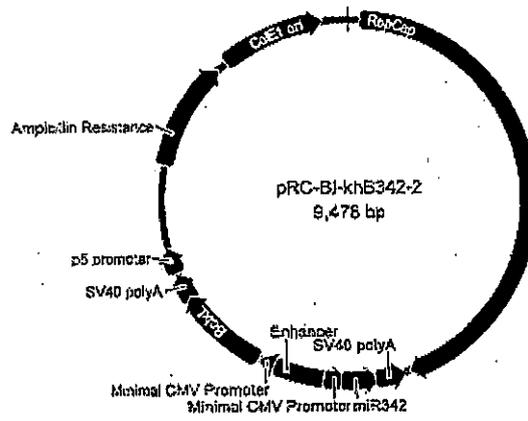
GH pA: human growth hormone polyadenylation signal

別紙4 プラスミドの構造

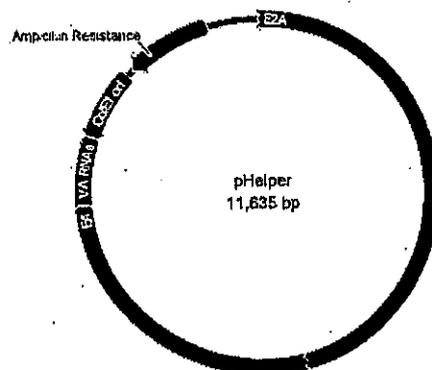
pAAV-hAADC-2



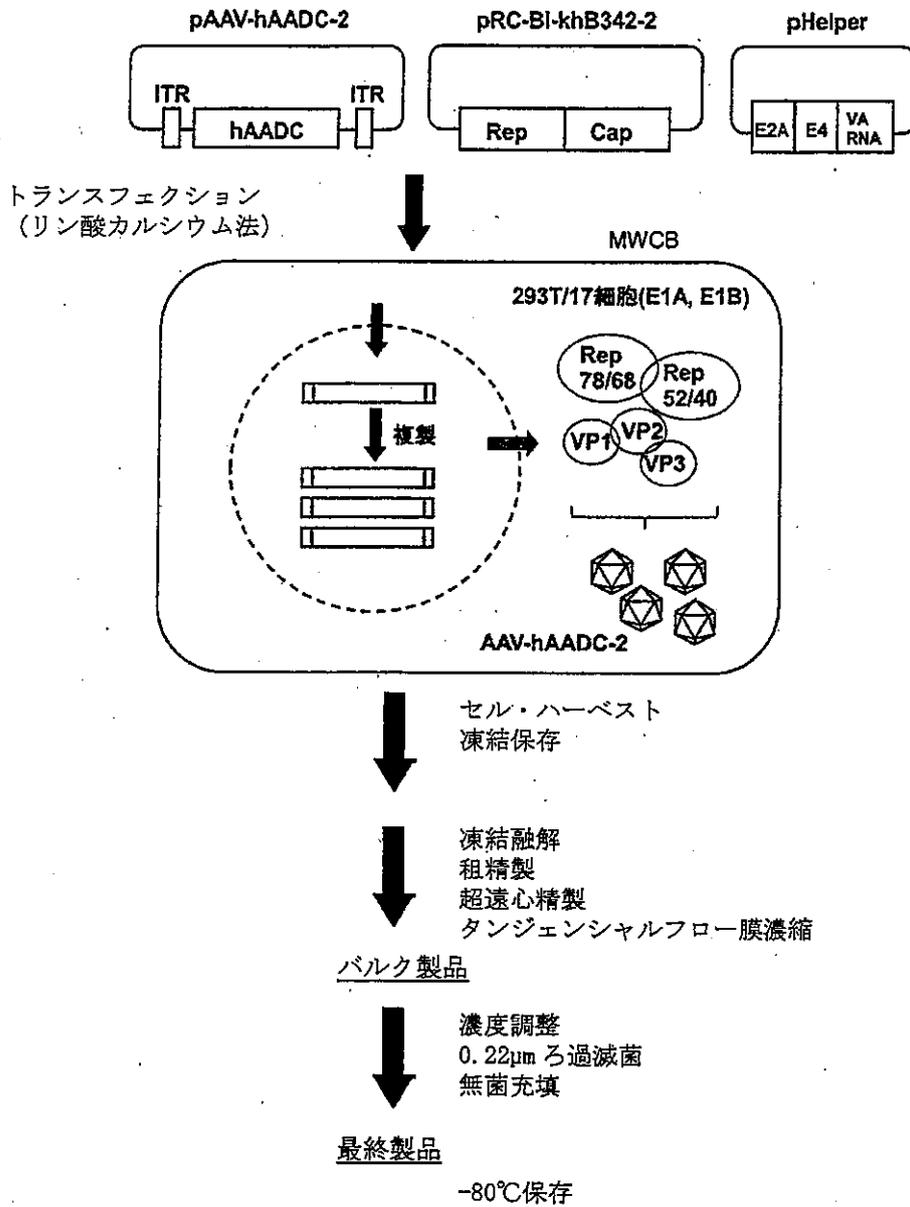
pRC-BI-khB342-2



pHelper



別紙5 組換え AAV ウイルス作製の概略図



別紙6 AAV-hAADC-2 の品質試験

I. AAV-hAADC-2 の品質試験

AAV-hAADC-2 の最終製品の品質試験の試験結果と規格、並びに AAV-hAADC-2 の工程内（セル・ハーベスト）品質試験及び AAV-hAADC-2 のバルク製品の品質試験の試験結果と規格を、表1、表2及び表3に示す。

表1 AAV-hAADC-2 の最終製品の品質試験

試験項目	規格	結果 (Lot.)
ベクターゲノム濃度試験	未定 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{14}$ vg/mL	
エンドトキシン試験	≤ 10 EU/mL	
純度試験	標準品と同等	
導入効率試験	結果の報告	
感染力価試験	結果の報告	
確認試験	標準品と同等	
性状試験	無色澄明～半透明の溶液	
pH 試験	未定	
浸透圧試験	未定	
無菌試験	適合	
ウイルスベクター純度試験（電子顕微鏡）	規格なし	
塩基配列試験	適合	
oriDNA 配列定量試験（Q-PCR 法）	結果の報告	
rcAAV 否定試験	$< 10^3$ AAV genomes/unit	
セシウム残留試験	≤ 1.4 μ g/unit	
キャプシド率試験	規格なし	
ヒトゲノム DNA 残留試験	規格なし	
ベンゾナーゼ残留試験	≤ 1.0 ng/mL	

表2 AAV-hAADC-2 の工程内（セル・ハーベスト）品質試験項目と規格

試験項目	規格	結果 (Lot.)
In vitro ウイルス試験	陰性	
マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）	陰性	

表3 AAV-hAADC-2 のバルク製品の品質試験項目と規格

試験項目	規格	結果 (Lot.)
ベクターゲノム濃度試験	未定	
プラスミドDNA 残留試験	未定	
rcAAV 否定試験	$<10^3$ AAV genomes/unit	
セシウム残留試験	≤ 1.4 $\mu\text{g}/\text{unit}$	
キャプシド率試験	規格なし	
ヒトゲノム DNA 残留試験	規格なし	

II. 試験方法の概要

上記試験方法の概要を以下に示す。

1. 無菌試験

製造数が、100 容器以下であるとき、各培地に対して 10%、また 101 容器以上 0~500 容器以下であるとき、各培地に対して 10 容器を検体とする。検体を液状チオグリコール酸培地 (TGC 培地) またはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (SCD 培地) に接種し、TGC 培地は 30~35°C で、SCD 培地は 20~25°C で 14 日間培養し、菌の発育の有無を確認する。培養最終日に検体によって培地が混濁し判定が困難な場合、培養液を新しい培地に接種して、元の培地と共に 4 日間以上培養し、菌の発育の有無を確認する。

2. マイコプラズマ否定試験 (欧州薬局方)

1) 培養法:

- ① マイコプラズマが増殖可能な寒天培地に WCB 破砕液を接種し、微好氣的条件で 35~37°C において 14 日間以上培養する。
 - ② マイコプラズマが増殖可能な液体培地に試料溶液を接種し、密栓して 35~37°C において 21 日間培養する。
 - ③ 試料溶液を接種した液体培地より、接種後 3 \pm 1 日目、7 \pm 1 日目、14 \pm 1 日目及び 20 \pm 1 日目に寒天培地上にその培地を接種し、これらを微好氣的条件下 35~37°C で 14 日間 (但し 20 \pm 1 日目に接種したものは 7 日間) 以上培養する。
- ①から③について、マイコプラズマの生育の有無を調べる。

2) DNA 染色法:

WCB 破砕液を Vero 細胞に接種し、3 日間培養する。スライド付の培養容器に継代後、3-5 日間培養する。培養後、スライド上の培養細胞を固定して DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡にてマイコプラズマの存在を検鏡する。

3. In vitro ウイルス試験

検体を各指標細胞（MRC-5、Vero、NIH3T3）に接種後、 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、5%炭酸ガス条件下で28日間培養し（期間中、必要に応じて継代を行う）、ウイルス特異的な細胞変性効果（CPE）出現の有無を観察する。

培養28日目の細胞について、ヒトO型、モルモット及びニワトリの混合赤血球に対する吸着反応の有無を試験する。

また、培養28日目の培養上清を用いて、ニワトリ、モルモット及びアカゲザルの各赤血球に対する凝集反応の有無を試験する。

4. ベクターゲノム濃度試験

ウイルスベクターゲノムDNAに特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイムPCRを行い、Ct値を測定する。測定したCtを元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線からベクターゲノム濃度を換算する。

5. ori プラスミドDNA 配列定量残留試験（Q-PCR法）

プラスミドDNA配列に含まれるoriDNA配列に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイムPCRを行い、Ct値を測定する。測定したCtを元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線から検体中に含まれるoriプラスミドDNA配列の濃度を換算する。

6. rcAAV 否定試験

検体を、E1/E3欠損型アデノウイルスとともに、293細胞に共感染させる。共感染後の細胞を5継代して、ウイルス増幅を起こした後、PCRにより、AAV配列の増幅の有無を検出する。

7. セシウム残留試験

GC-MS法により、セシウム濃度を測定する。

8. キャプシド率試験

微量分光光度計を用いて、紫外線吸光度（260 nm 及び 280 nm）を測定する。280 nm 測定値に対する260 nm 測定値の比率をキャプシド率の指標とする。

9. ヒトゲノムDNA 残留試験

ヒトゲノムDNAに特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイムPCRを行い、Ct値を測定する。測定したCtを元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線からヒトゲノムDNA濃度を換算する。

10. エンドトキシン試験

日本薬局方 一般試験法 エンドトキシン試験 カイネティック比濁法の項により、エンドトキシン濃度を測定する。

11. 純度試験

電気泳動法 (SDS-PAGE 法) により、タンパクを分子サイズで分離した後、銀染色を行なう。標準品と比較した純度を測定する。

12. 導入効率試験

検体を、HeLaRC32 細胞に共感染させる。共感染後の細胞の細胞膜を融解した後、抗 chAADC-2 抗体を用いた ELISA 法により、導入遺伝子の発現の有無を測定する。

13. 感染力価試験

検体を、野生型アデノウイルスとともに、HeLaRC32 細胞に共感染させる。共感染後の細胞から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて、増殖の有無を定性的に測定する。

測定値をグラフ化し、TCID₅₀ とする。

確認試験

検体より抽出したゲノムを PCR 法により増殖させる。増殖後の反応物をアガロース電気泳動法により分画し、検出する。

15.14. 性状試験

性状を目視確認する。

16.15. pH 試験

pH 計を用いて、日本薬局方 pH 試験を実施する。

17.16. 浸透圧試験

浸透圧計を用いて、日本薬局方 浸透圧試験を実施する。

18.17. ウイルスベクター純度試験 (電子顕微鏡)

ウイルス粒子とウイルスパーティクルのみの割合を電子顕微鏡法により確認する。

19.18. 塩基配列試験

塩基配列決定用シーケンスプライマーを用いて、シーケンス反応を行った後、反応産物を精製し、DNA シーケンサーで解析する。

19. ベンゾナーゼ残留試験

製造に使用したベンゾナーゼの残留量を、抗 Benzonase 抗体を用いた ELISA 法により測定する。

別紙7 293T/17 細胞セルバンクの品質試験

I. 293T/17 MCB 及び WCB の品質試験の結果
 表1に MCB 及び WCB の品質試験の結果を示す。

表1 293T/17 MCB の品質試験の試験結果

試験項目	規格	結果 (Lot. LV201208)
細胞生存率試験 (トリパンブルー法)	>50%	79.3%
アインザイム分析による細胞の由来動物種同定	ヒト	ヒト
マイコプラズマ否定試験 (欧州薬局方)	陰性	陰性
無菌試験	適合	適合
In vitro ウイルス試験	陰性	陰性
In vivo ウイルス試験	陰性	陰性
形質転換試験	規格なし	コロニー形成を認める。
レトロウイルス粒子試験	ウイルス様粒子なし	ウイルス様粒子なし
In vitro レトロウイルス試験 (培養法)	活性なし	活性なし
In vitro レトロウイルス試験	活性なし	活性なし
PCV/BCV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HIV-1/2 ウイルス否定試験	陰性	陰性
HTLV-1/2 ウイルス否定試験	陰性	陰性
HAV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HBV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HCV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HHV-6/7/8 ウイルス否定試験	陰性	陰性
hCMV ウイルス否定試験	陰性	陰性
EBV ウイルス否定試験	陰性	陰性
HPV B-19 ウイルス否定試験	陰性	陰性
SV40 ウイルス否定試験	陰性	陰性
AAV ウイルス否定試験	陰性	陰性

表 2 293T/17 WCB の品質試験の試験結果

試験項目	規格	結果 (Lot. LV201307)
細胞生存率試験 (トリパンブルー法)	>50%	78.7%
アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定	ヒト	ヒト
マイコプラズマ否定試験 (欧州薬局方)	陰性	
無菌試験	適合	
In vitro ウイルス試験	陰性	
In vivo ウイルス試験	陰性	

II. 試験方法の概要

1. 細胞生存率試験 (トリパンブルー法)

MCB を融解後、トリパンブルー溶液で 1 区画の細胞数が 30~100 個となるように希釈し、血球計数盤を用いて上下の計算室の生細胞 (トリパンブルーで染まらない細胞) 及び死細胞 (トリパンブルーで青く染まった細胞) を計測し、以下の式で生細胞濃度、細胞生存率を求める。

$$\text{生細胞濃度 (cells/mL)} = \text{生細胞の総平均値} \times 10,000 \times \text{希釈倍率}$$

$$\text{総細胞濃度 (cells/mL)} = \text{総細胞の総平均値} \times 10,000 \times \text{希釈倍率}$$

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \text{生細胞濃度} \div \text{総細胞濃度} \times 100$$

2. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定

MCB を拡大培養し生細胞を検体とする。細胞抽出液を調製し、アガロースゲル電気泳動を実施する。アガロースゲル上に分離された細胞抽出液中の各種の酵素について活性染色を行なう。各種酵素の電気泳動での移動距離を標準移動距離と比較して、そのパターンが最も一致する生物を、その細胞の由来生物と判定する。

3. マイコプラズマ否定試験 (欧州薬局方)

1) 培養法:

① マイコプラズマが増殖可能な寒天培地に MCB 破砕液を接種し、微好氣的条件下で 35~37°C において 14 日間以上培養する。

② マイコプラズマが増殖可能な液体培地に試料溶液を接種し、密栓して 35~37°C において 21 日間培養する。

③ 試料溶液を接種した液体培地より、接種後 3±1 日目、7±1 日目、14±1 日目及び 20±1 日目に寒天培地上にその培地を接種し、これらを微好氣的条件下 35~37°C で 14 日

間（但し20±1日目に接種したものは7日間）以上培養する。

①から③について、マイコプラズマの生育の有無を調べる。

2) DNA 染色法：

MCB 破砕液を Vero 細胞に接種し、3 日間培養する。スライド付の培養容器に継代後、3-5 日間培養する。培養後、スライド上の培養細胞を固定して DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡にてマイコプラズマの存在を検鏡する。

4. 無菌試験（欧州薬局方）

MCB 製造量の 2%分を検体とする。検体を液状チオグリコール酸培地（TGC 培地）またはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（SCD 培地）に接種し、TGC 培地は 30～35℃で、SCD 培地は 20～25℃で 14 日間培養し、菌の発育の有無を確認する。培養最終日に検体によって培地が混濁し判定が困難な場合、培養液を新しい培地に接種して、元の培地と共に 4 日間以上培養し、菌の発育の有無を確認する。

5. In vitro ウイルス試験

検体を各指標細胞（MRC-5、Vero、NIH3T3）に接種後、36±2℃、5%炭酸ガス条件下で 28 日間培養し（期間中、必要に応じて継代を行う）、ウイルス特異的な細胞変性効果（CPE）出現の有無を観察する。

培養 28 日目の細胞について、ヒト O 型、モルモット及びニワトリの混合赤血球に対する吸着反応の有無を試験する。

また、培養 28 日目の培養上清を用いて、ニワトリ、モルモット及びアカゲザルの各赤血球に対する凝集反応の有無を試験する。

6. In vivo ウイルス試験

検体を、モルモット、成熟マウス、乳のみマウス、及び発育鶏卵に接種し、病原体による感染の有無を確認する。

モルモットと成熟マウスは 28 日間、乳のみマウスは 14 日間観察する。また乳のみマウスは 14 日目に安楽死後、破砕して新たな乳のみマウスに接種し、14 日間観察する。

発育鶏卵の尿膜接種群では、接種後 1 日目と 3 日目に開卵し観察する。開卵後の尿膜液を再度接種し、接種後 1 日目と 3 日目に開卵し観察する。卵黄嚢接種群は接種後 1 日目と 9～12 日目に開卵し観察する。開卵後の卵黄嚢を破砕し、再度接種し、接種後 1 日目と 9～12 日目に開卵し観察する。

モルモットと発育鶏卵の尿膜接種群ではヒト O 型、モルモット、及びニワトリの各赤血球に対する凝集試験を行う。

7. In vitro ウシウイルス／ブタウイルス試験

検体を各指標細胞 (ST, BT, Vero) に接種後、 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、5%炭酸ガス条件下で21日間以上培養し (期間中、継代を行う)、ウイルス特異的な細胞変性効果 (CPE) 出現の有無を観察する。

さらに、培養終了後の細胞について、ウイルス特異的抗体を用いた蛍光免疫染色により、蛍光の有無を試験する。

8. 形質転換試験

軟寒天コロニー法により、形質転換の有無を測定する。各細胞の培養培地より終濃度0.5% Agar の軟寒天を調製する。軟寒天内に細胞を (コロニー形成の判定が容易な) 適切な濃度で播種し、 37°C 5% CO_2 の条件で14日間培養する。培養後の軟寒天内のコロニー形成の有無を判定する。

9. レトロウイルス粒子試験

固定化した後薄切した細胞を電子染色し、透過電子顕微鏡により観察し、ウイルス粒子の有無を測定する。

10. In vitro レトロウイルス試験 (培養法)

検体を293細胞に感染し、ウイルスの増幅工程を経た上で、RTaseの活性測定 (FPERT assay : Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase) を行なう。活性がないとき陰性と判定する。

11. In vitro レトロウイルス試験

検体を直接 RTase の活性測定 (FPERT assay : Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase) を行なう。活性がないとき陰性と判定する。

12. PCV/BCV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットをPBSで懸濁後、検体に阻害確認用対照DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノムDNAを抽出する。抽出したDNAをPCV/BCVの遺伝子領域、及び阻害確認用対照DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイムPCR反応を行い、検体中のPCV/BCVの有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及びPCR増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

13. HIV-1/2 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットをPBSで懸濁後、検体に阻害確認用対照DNA (CrMV DNA)

をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HIV-1/2 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HIV-1/2 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

14. HTLV-1/2 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HTLV-1/2 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HTLV-1/2 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

15. HAV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) をスパイクした検体より、RNA を抽出する。抽出した RNA を HAV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム RT-PCR 反応を行い、検体中の HAV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

16. HBV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HBV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HBV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

17. HCV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) をスパイクした検体より、RNA を抽出する。抽出した RNA を HCV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 RNA (CrMV RNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム RT-PCR 反応を行い、検体中の HCV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

認する。対照についても同時に実施する。

18. HHV-6/7/8 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HHV-6/7/8 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HHV-6/7/8 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

19. hCMV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を hCMV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の hCMV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

20. EBV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を EBV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の EBV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

21. HPV B-19 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を HPV B-19 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー／プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の HPV B-19 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

22. SV40 ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA)

をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を SV40 の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の SV40 の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

23. AAV ウイルス否定試験

検体である細胞ペレットを PBS で懸濁後、検体に阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) をスパイクした検体より、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を AAV の遺伝子領域、及び阻害確認用対照 DNA (CrMV DNA) 特異的領域に設計したプライマー/プローブにてリアルタイム PCR 反応を行い、検体中の AAV の有無を確認すると同時に、スパイク検体により、核酸抽出工程及び PCR 増幅工程における検体由来の阻害の有無を確認する。対照についても同時に実施する。

別紙 8 治療施設の地図及び見取り図

I 自治医科大学医学部附属病院の周辺地図

自治医科大学医学部附属病院の所在地である栃木県下野市薬師寺 3311-1 周辺の地図を示す。自治医科大学医学部附属病院は黒線枠内である。

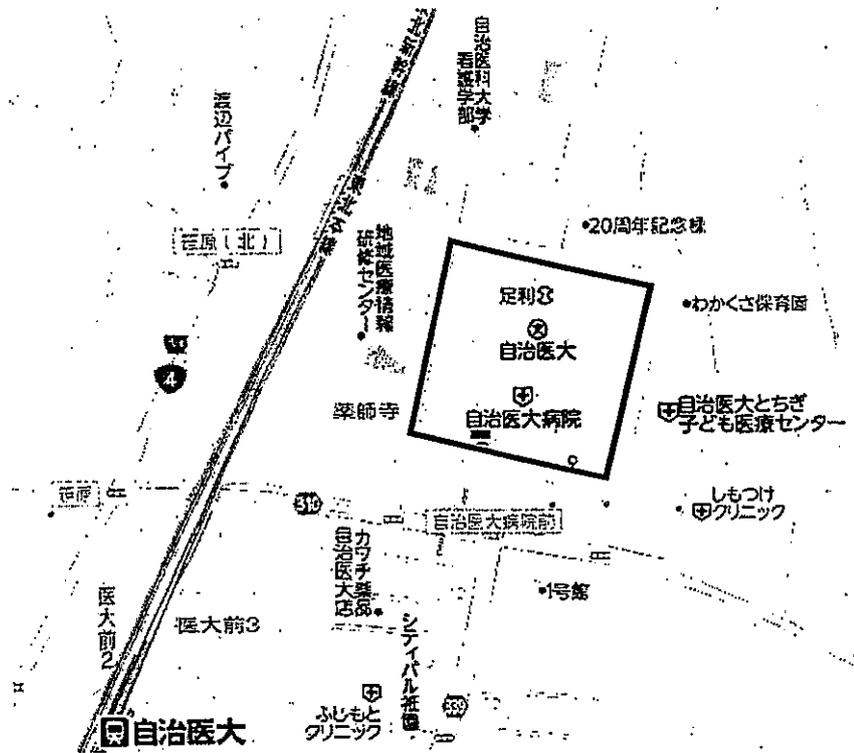


図. 自治医科大学医学部附属病院の周辺地図

自治医科大学附属病院を黒線枠で示した。

II 自治医科大学の平面図

自治医科大学医学部附属病院周辺の平面図を以下に示す。

本遺伝子組換え生物の保管は自治医科大学医学部附属病院本館、投与及び回復期の管理は自治医科大学医学部附属病院新館にて実施し、その後、患者は自治医科大学医学部附属病院本館にて管理する。

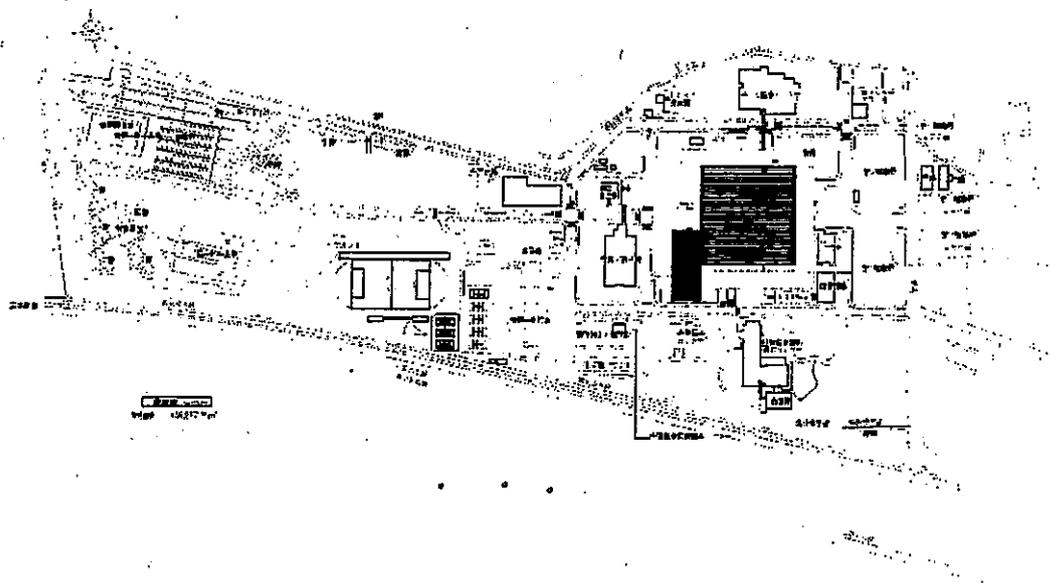


図. 自治医科大学構内敷地図

本遺伝子組換え生物の保管は自治医科大学医学部附属病院本館（右上がり斜線枠内）1階無菌細胞調製にて、患者への投与は自治医科大学附属病院新館（右下がり斜線枠内）3階手術室にて、投与後の患者の管理は自治医科大学附属病院新館3階回復室及び本館7階脳神経センター病室にて実施する。

Ⅲ 本遺伝子組換え生物を保管する施設の平面図

本遺伝子組換え生物の保管はP2レベルの実験室である自治医科大学付属病院本館1階輸血細胞移植部細胞調製室に設置した超低温フリーザー内に保管する。

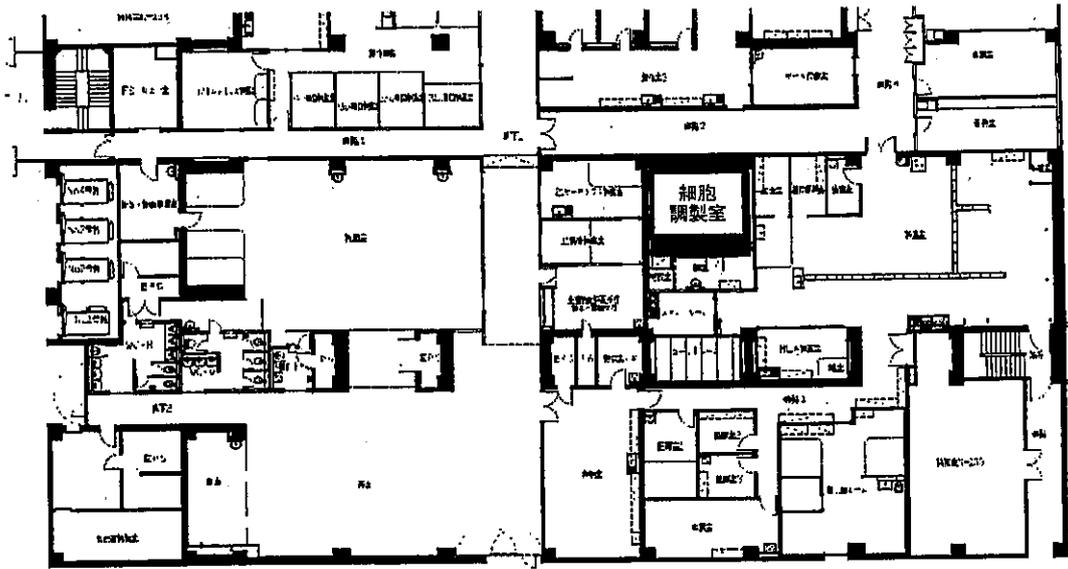


図. 自治医科大学付属病院本館1階輸血細胞移植部細胞調製室周辺の見取り図

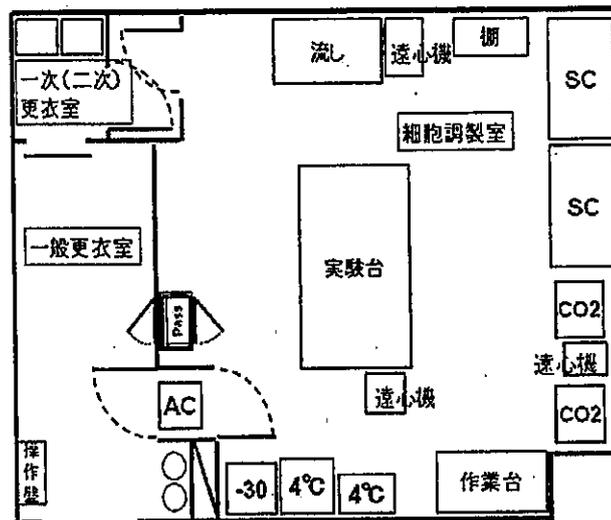


図. 細胞調製室の見取り図

IV 遺伝子治療を行う施設の見取り図

本組換え生物の投与は、自治医科大学医学部附属病院新館 3 階の手術室にて行う。投与終了後、被験者の創部を皮膚欠損用創傷被覆材により密閉し、さらに三角巾で覆う。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防止措置を適切に執った自治医科大学医学部附属病院新館 3 階の回復室に移送し、その後、自治医科大学医学部附属病院本館 7 階の脳神経センターの環境中への拡散防止措置を適切に執った個室病室にて管理する。

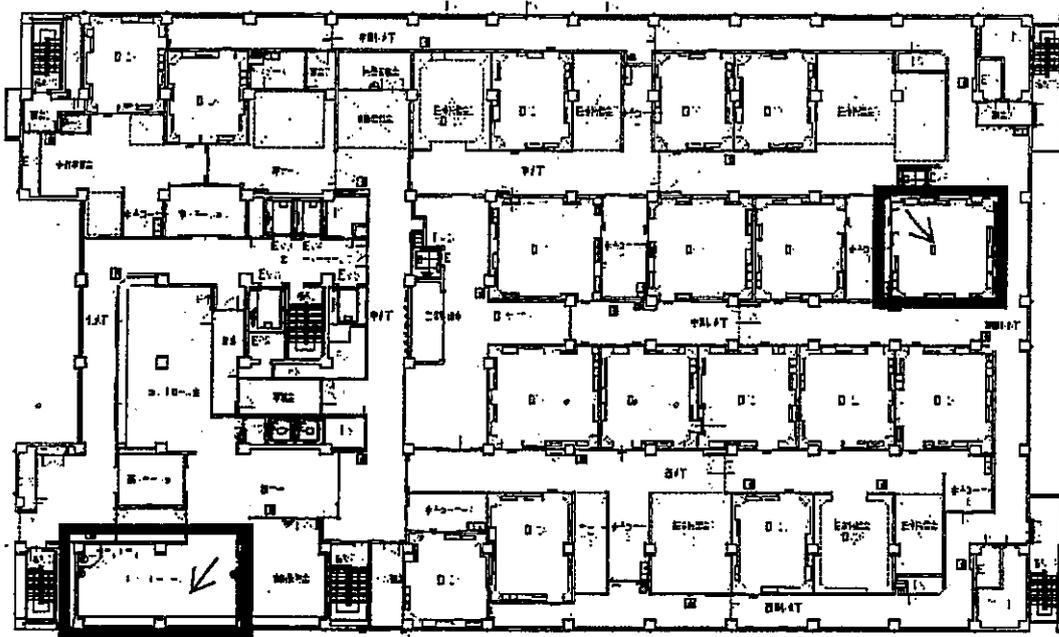


図. 自治医科大学医学部附属病院新館 3 階手術室及び回復室の見取り図
手術室を赤線枠で、患者を術後一次管理する回復室を青線枠で示す。

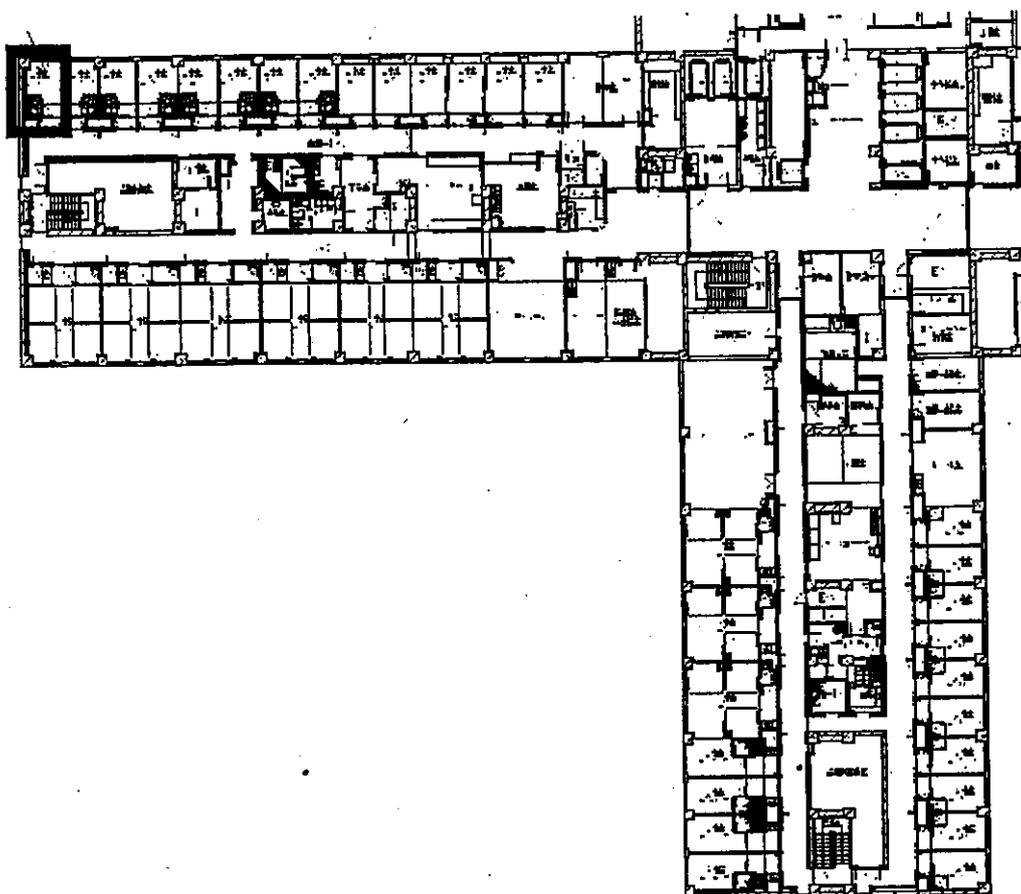


図. 自治医科大学医学部附属病院本館7階脳神経センター及び個室病室の見取り
図

術後の患者を管理する7F脳神経センター内の病室を赤線枠で示す。

(目的)

第1条 この規程は、自治医科大学及び自治医科大学附属病院(以下「病院等」という。)から排出される医療廃棄物のうち感染症を生ずる恐れがある廃棄物(以下「感染性廃棄物」という。)について、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。以下「廃棄物処理法」という。)及び医療廃棄物処理ガイドライン(以下「ガイドライン」という。)に沿って、適性に処理するために必要な具体的手順等を定めることを目的とする。

(定義)

第2条 この規程の用語の定義は、当該各号に定めるところによる。

- (1) 医療廃棄物とは、病院等における医療行為等に伴って発生する廃棄物をいう。
- (2) 感染性廃棄物とは、医療廃棄物のうち感染症を生ずるおそれのある廃棄物をいう。
- (3) 非感染性廃棄物とは、医療行為等に伴って発生する廃棄物のうち感染性廃棄物以外の廃棄物をいう。

(感染性廃棄物の範囲)

第3条 感染性廃棄物とは、次の各号に掲げるものをいう。

- (1) 血液、血清、血漿及び体液(以下「血液等」という。)並びに血液製剤(全血製剤、血液成分製剤)
- (2) 手術等により排出される病理廃棄物
- (3) 血液等が付着した鋭利な物
- (4) 病原微生物に関連した試験・検査等に用いられた試験器具、培地及び透析器具
- (5) その他血液等が付着した廃棄物

(感染性廃棄物の管理者)

第4条 病院等より排出される感染性廃棄物を適正に処理するため、管理責任者を置く。

- 2 管理責任者は、病院長をもって充てる。
- 3 管理責任者は、感染性廃棄物分別、収集、運搬、処理及び処分の状況を把握し、医師、看護師及び清掃作業員を指導する。

(分別及び排出方法)

第5条 病院等で発生する医療廃棄物は、次の各号に掲げる分別排出をする。

- (1) 感染性廃棄物
 - (2) 非感染性廃棄物
 - (3) 上記以外の廃棄物(紙くず類)
- 2 前項の区分による廃棄物の分別及び排出方法は、別に定める廃棄物取扱ガイドによる。

(収集・運搬)

第6条 収集・運搬(以下「運搬等」という。)は、運搬途中で内容物が飛散、流出するおそれのない容器及び車両で行うものとする。

- 2 感染性廃棄物と他の廃棄物は混載しないものとする。ただし、すべてのものを感染性廃棄物として取扱う場合は、この限りでない。

(梱包)

第7条 一時保管又は運搬等の目的で梱包する場合は、次の各号に掲げる容器又は材料を、廃棄物の性状に応じて適切なものを選択するものとする。

- (1) 鋭利な物(注射針、メス等)については、耐貫通性のある堅牢な容器
- (2) 固形状のもの(血液の付着したガーゼ等)については、丈夫なプラスチック容器等
- (3) 液状又はでい状のもの(血液等)については、漏洩しない密閉容器

(容器の管理)

第8条 分別排出及び運搬等に用いる容器は、定期的に次の各号に定める点検等を行う。

- (1) 割れ等の異常の点検
- (2) 洗浄及び消毒

(表示)

第9条 感染性廃棄物を梱包した容器及びこれを収納する容器には、感染性廃棄物及び感染性として取り扱う廃棄物である旨を表示する。

(保管)

第10条 保管は、極力短期間とする。

- 2 腐敗性のある感染性廃棄物をやむを得ず長期間保管する場合は、冷蔵庫で保管する。
- 3 保管場所は関係者以外の立入りを禁止するとともに、見やすい箇所に、感染性廃棄物の存在と取扱い注意事項を表示する。

(委託契約)

第11条 収集、運搬、処理及び処分の業務を業者に委託する場合は、廃棄物処理法及びガイドラインに定める委託基準に基づき、事前に委託契約を締結する。

- 2 委託業者は、廃棄物処理法に基づく資格、認可を得た業者の中から、信頼度の高い業者を選定する。

3 受託業者には、原則として再委託を禁止させる。

(委託の実施)

第12条 管理責任者は、受託者の適切な業務の遂行に協力するために、次の各号に定める事項を遵守する。

- (1) 廃棄物の種類、性状、取扱い方法等を告知する。
 - (2) 可能な限り安全な形で排出するように努める。
- 2 感染性廃棄物の処分等を院外で行うため、これらの業務を委託しようとする場合は、受託業者に対しマニフェスト(積荷目録)を交付し、適正に処理を行う。この場合において、マニフェストの保管は5年間とする。

附 則

この規程は、平成3年4月1日から施行する。

附 則(平成14年規程第8号)

この規程は、平成14年4月1日から施行する。

附 則(平成15年規程第12号)

この規程は、平成15年3月17日から施行し、平成14年12月1日から適用する。

附 則(平成21年規程第33号)

この規程は、平成21年4月1日から施行する。

厚生科学審議会科学技術部会

遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会 委員名簿

氏名	所属
荒戸 照世	北海道大学大学院 医学研究科教授
大橋 十也	東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター長
小野寺 雅史	(独)国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部長
神田 忠仁	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
竹内 隆正	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター主任研究官
谷 憲三朗	九州大学生体防御医学研究所・九州大学病院教授
中西 真人	(独)産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター副研究センター長
那須 保友	岡山大学病院 新医療研究開発センター教授
水口 裕之	大阪大学大学院 薬学研究科分子生物学分野教授
三宅 弘一	日本医科大学 医学部准教授
村田 美穂	(独)国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科診療部長
望月 秀樹	大阪大学大学院 医学系研究科神経内科学教授
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部主任研究官

