

安全性について  
の評価  
(続き)

### (3) 組換えセンダイウイルスベクターの細胞傷害性

培養系において、いくつかの細胞では、ウイルス量依存的細胞傷害性 (cytopathic effect: CPE) が報告されており、また一部の培養細胞ではアポトーシスを起こすことも報告されている。但し、血管内皮細胞などでは、一時的な細胞傷害様所見を示すが、細胞死に至らずに次第に増殖が回復してくるものも存在する (FASEB J 2001)。

筋肉内投与においては、筋肉の壊死など、組織学的に重篤な細胞傷害性がないことは、マウス、ラットなどの小動物に対する投与実験にて確認した。

カニクイサルを用いた予備安全性試験 (急性毒性試験: lacZ 遺伝子搭載非伝播型センダイウイルスベクターを使用: 安全性に関わる成績 [添付資料] を参照) においても、組織学的に筋組織の壊死など重篤な副作用がないことは確認されている。

### (4) 標的細胞以外への遺伝子導入の可能性

センダイウイルスは多くの哺乳動物細胞へ感染可能であるため、筋肉以外の臓器への遺伝子導入が危惧されたが、マウスを用いた成績では、 $10e7$  ciu/30g までの筋肉内投与 (luciferase 遺伝子搭載付加型ベクター) では他臓器での遺伝子発現は確認できなかった。血液成分と本ベクターを混じた実験では、ウイルスの急激な不活化が観察され、一般的な非働化操作 (56°C、30分過熱) を施した全血、血清、血漿でこの効果が消失したため、ベクターの不活化には補体が関与していることが推察される。

カニクイサルを用いた lacZ 遺伝子搭載ベクターによる安全性試験 (安全性に関わる成績 [添付資料] を参照) においても、少なくとも全実験期間を通じて血液中、尿中にベクターの遺伝子配列を検出することはできなかった。

### (5) 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性

厚生労働省吉川班によるカニクイサルを用いた水平感染に関する検討 (増殖伝播型組換えセンダイウイルスベクターを使用) では、同一ケージ内で飼育された非感染動物への水平感染は認められなかったことが示されていることから、本ベクターの水平感染能力は低いと考えられる。

<p>安全性についての評価 (続き)</p>	<p>(6) 染色体内への遺伝子が組み込まれる場合の問題点 非伝播型組換えセンダイウイルスベクターは細胞質で転写・複製が行なわれるため、宿主染色体と相互作用を行なわない。よって染色体内へ遺伝子が組み込まれることは理論的にないと考えられる。</p> <p>(7) 癌原性の有無 上記のごとく、非伝播型組換えセンダイウイルスベクターは細胞質で転写・複製が行なわれるため、宿主染色体と相互作用を行なわない。よって染色体内へ遺伝子が組み込まれることは理論的になく、<u>宿主癌遺伝子の活性化</u>などの危険性はレトロウイルスベクターなどと比較して極めて低い。</p> <p>またセンダイウイルスの構造蛋白に関しては、宿主細胞の細胞周期制御蛋白や細胞内増殖シグナルを活性化することを示した報告はなく、事実我々のセンダイウイルスベクターを投与した経験においても、細胞が増殖亢進を示した例は全くない。</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p><u>本臨床試験研究計画は有効性が大きい期待できる上、ヒトに対し非病原性ウイルスを用いているため安全性が高い。さらには懸念される急性毒性が、少なくとも治療効果発現投与量においてアデノウイルスベクターより遥かに少ないことが証明されており、宿主染色体との相互作用をしないことから発癌の可能性や子孫への影響が極めて低い。</u></p> <p><u>それに加え、既にベクターのGMP生産技術の確立・ベクター供給体制の整備も既に終了しており、近日中に九州大学医学部附属病院内に遺伝子治療専用病室を設置する予定としている。</u>さらには九州大学医学部附属病院第2外科は、重症虚血肢に関する永年の豊富な診療経験と優れた診断技術・治療成績、経験豊富なスタッフを擁しており、本臨床試験の対象となる患者も多く診療している。</p> <p>以上から本遺伝子治療臨床研究は十分に実施可能であると判断する。</p>

<p>実施計画</p>	<p><u>1) 全体の治療計画</u>  <u>十分なインフォームド・コンセントにより、患者ならびに親族の文書による2度にわたる了承を得た後、以下の方法によって臨床試験を実施する(添付資料2-1、2-2参照)。</u></p> <p>1) 術前に手術室にて腰椎硬膜持続麻酔チューブを挿入し、前日よりソル・メドロール125 mgを点滴静注する。以後3日間点滴を継続する。</p> <p>2) 術当日、23ゲージ注射針にて大腿および下腿に計20-30ヶ所、組換え非伝播型センダイウイルスベクター液を注入する。</p> <p>3) <u>血液中のVEGF、HGF、FGF2濃度、逆転写PCRによる血液中の組み換えセンダイウイルスゲノムの検出を投与7日前、投与6時間後、1、2、4、7、14、28日後に行う。また血液中のサイトカインレベル(IL-1、-4、-6、-8、TNF、INF-gamma)を同様に測定する。</u></p> <p>4) 同意の得られた患者から投与後2日目に筋生検により局所の組織細胞を採取し、<u>逆転写PCR、ELISA法にて遺伝子発現、蛋白の定量を行う。</u></p> <p>5) <u>施術前、施術後3、12、24、36、48、60ヵ月後に血管造影、MR血管造影により側副血行路形成状態などを経時的に観察し、毎月非侵襲的診断法にて臨床症状や血流状態の経過を観察する。</u></p> <p><u>2) 被験者の選択基準および除外項目</u>          以下の条件を満たす患者を対象とする。</p> <p><u>(1) 閉塞性動脈硬化症あるいは血栓性閉塞性血管炎(Fontaine III度~IV度)患者で、人工血管あるいは自家静脈グラフトによる大腿動脈以下の血行再建術の適応がない、かつ40歳以上の症例。</u></p> <p><u>(2) 閉塞性動脈硬化症あるいは血栓性閉塞性血管炎(Fontaine II度)患者で、人工血管あるいは自家静脈グラフトによる大腿動脈以下の血行再建術の適応がなく、歩行制限のため本人および家族が本臨床試験の実施を強く希望する患者。かつ40歳以上の症例。</u></p> <p><u>候補対象患者は申請に関わる研究者と外部評価委員の一部で構成される、対象患者適応評価委員会にて決定される。</u></p>
-------------	--

<p>実施計画 (続き)</p>	<p><u>除外項目：</u> 以下に適合する患者は今回の臨床試験の対象としない。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 重篤なアレルギーを有する、あるいは既往のある患者</li> <li>2) 術前に担癌状態が証明されている、あるいは疑われる患者</li> <li>3) 糖尿病性網膜症患者</li> <li>4) 慢性人工透析を受けている患者</li> <li>5) 重症の心機能障害、心不全を有する患者 (例：左室駆出率&lt;40%など)</li> <li>6) 重篤な肝機能障害、肝硬変を有する患者 (例：AST&gt;50、ALT&gt;50、ICG 15分値20%以上など)</li> <li>7) 腎機能障害を有する患者 (例：血清Cr&gt;2.0、CCr&lt;40ml/min)</li> <li>8) 活動性の炎症性疾患を有する患者 (活動期の膠原病、慢性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎など)</li> <li>9) 過去5年以内に悪性腫瘍の摘出手術を受けた患者</li> <li>10) 最近6ヶ月以内に脳出血、脳梗塞などの既往のある患者</li> <li>11) 血液疾患を有する患者 (例：重度の貧血Hb&lt;10mg/ml、白血病、再生不良性貧血など)</li> <li>12) アルコール依存、薬物依存症患者</li> <li>13) 妊娠中の女性、あるいは妊娠が疑われる女性患者</li> <li>14) その他、本臨床試験により不利益を受けると予測される患者、および本人ならびに家族の<u>承諾</u>が得られない患者など、<u>適応症例評価委員会</u>が不適当と見なした患者</li> </ol> <p>高率に腎機能障害など生命維持に関わる臓器障害を持つ症例が多い糖尿病性下肢壊疽の患者は、本臨床試験からは当面除外する。但し<u>多臓器合併症</u>を持たずインスリンなどで良好にコントロールされている症例は、本臨床研究計画の対象とする。</p> <p><u>3) 被験者の同意の取得方法</u> 下肢虚血性疾患の病態と重症虚血状態が従来の治療法に対し抵抗性であること、本臨床試験の理論的背景と動物実験成績、安全性に関する成績に関して十分な説明を患者本人ならびに<u>親族</u>に対して行い、十分な理解を得た上で本臨床研究の被験者となることについて文書により同意を得る。 同意の取得は<u>入院前</u>、および全身検索の終了した時点で、計2度行なう。</p>
----------------------	--

実施計画  
(続き)

**4) 実施期間および目標症例数**

研究実施期間 承認時より 18ヶ月  
 目標症例数 12例

**5) 実施方法**





**(1) 対象群の設定**

本研究計画に用いるベクターは世界的に使用例がないことを鑑み、安全性の検定を主眼とした最大使用量までの用量漸増式とし、対象群はおかない。

本臨床試験にて安全性が証明された場合に限り、別途対象群を設定した効果判定試験の申請を行なう。

**臨床試験実施方法**

用量漸増式安全性・効果判定試験 対象患者数 計12名  
(ciu=活性組換えウイルス粒子数)

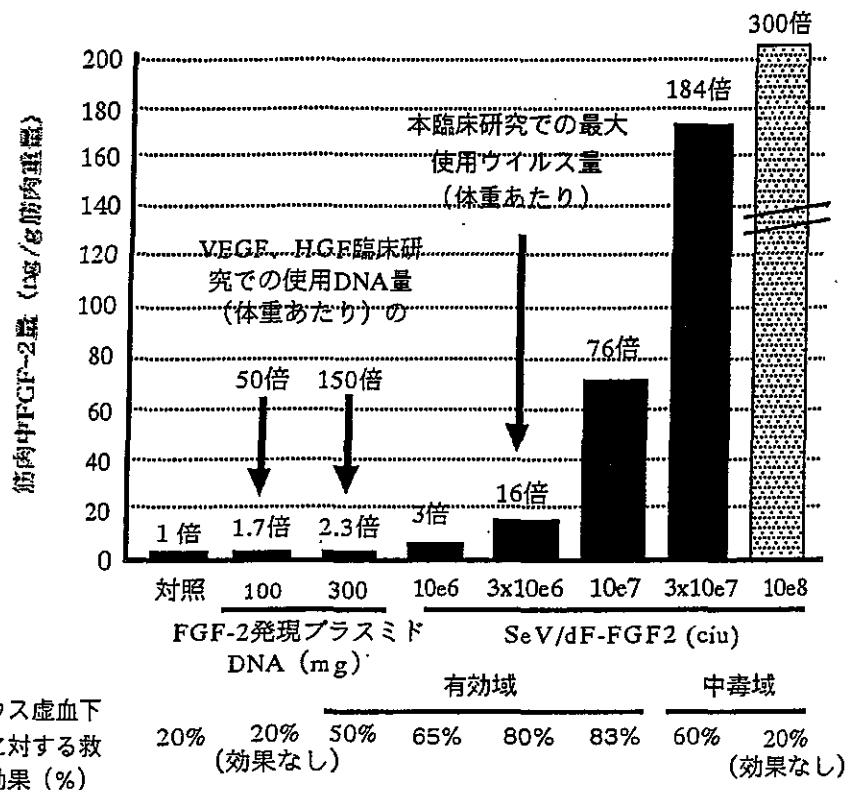
患者番号 <b>第1ステージ</b>		5x10 <sup>7</sup> ciu/ 60 kg =約3x10 <sup>6</sup> ciu/マウス に相当
患者番号 <b>第2ステージ</b>		2x10 <sup>8</sup> ciu/ 60 kg =約1x10 <sup>7</sup> ciu/マウス に相当
患者番号 <b>第3ステージ</b>		1x10 <sup>9</sup> ciu/ 60 kg =約5x10 <sup>8</sup> ciu/マウス に相当
患者番号 <b>第4ステージ</b>		5x10 <sup>9</sup> ciu/ 60 kg =約3x10 <sup>9</sup> ciu/マウス に相当

**(2) 遺伝子導入法**

術前血管造影所見をもとに、20~30ヶ所をマーキングし、それぞれの部位にベクター液を虚血筋肉内に注入する。

注入操作に関わる疼痛などの苦痛を避けるため、術前日に硬膜外麻酔チューブを挿入し、持続硬膜外麻酔を行なう。

実施計画  
(続き)



グラフ：マウス重症下肢虚血モデルにおける投与量依存的救肢効果  
(効果域・中毒域判定試験、プラスミドとの比較試験)

(3) 併用療法の有無

本臨床研究の対象は既存の外科手術を含めた治療が無効であることが自明である患者のみとする。

被験者の不利益を最小限にすること、本臨床研究が安全性試験を主眼にすることを考慮し、併用薬剤に関しては特に制限しない。

(4) 臨床検査項目

外科手術に準じ綿密かつ詳細な術前、術後検査を行なう  
(添付資料2-2：臨床検査プロトコール参照)。

備 考	<p>本臨床研究の研究実施デザイン、動物モデルによる前臨床効能試験、安全性試験は、</p> <p>(1) 米国FDA発行 (1998年3月) 「Guidance for Industry: guidance for human somatic cell therapy and gene therapy」</p> <p>(2) 英国MCA (Medicines Control Agency) 発行 「Draft Guidance Notes on Quality and Preclinical Safety Issues for Clinical Trials with Gene Therapy Products」</p> <p>を参考に、<u>計画あるいは実施されている。</u></p>
--------	--

(注意)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格A列4番とすること。
2. この申請書は、正本1通及び副本2通を提出すること。
3. 字は、墨・インク等を用い、楷書ではっきり書くこと。
4. 記載欄に記載事項のすべてを記載できない時は、その欄に「別紙 ( ) のとおり」と記載し、別紙を添付すること。
5. 備考欄には、「第4. その他」に掲げる各種指針への適合状況等、特記すべき事項について記載すること。
6. 大学等にあつては、この申請書の写しを文部科学大臣にも送付すること。