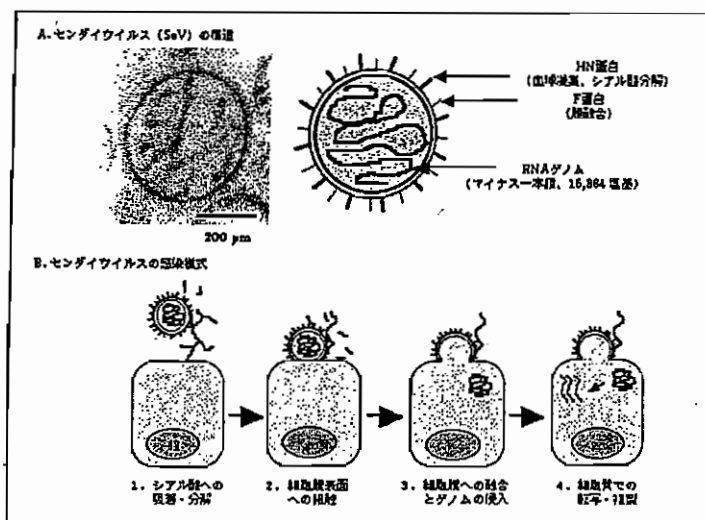


ミクソウイルスに属する。マウスなどげっ歯類に肺炎を起こすことで有名なウイルスであるが、現在までヒトに対する病原性は報告されていない。また、野生型 SeV をサル (African Green Monkey) の気道内投与した実験では、鼻水分泌が増加した他、重篤な副作用が見られず (40)、これに続く野生型 SeV による生ワクチン臨床研究でも同様であったことが報告されている (41)。

SeV/dF の特性は、概ねウイルス本来の特徴に由来する。第1の特性として、センダイウイルスはその生活環において、レトロウイルスと異なり DNA に変換されないことが挙げられる。また、転写ならびにゲノムの複製は細胞質内で、自前の RNA ポリメラーゼ (P 及び L 蛋白) を利用して行われるため、宿主細胞の染色体との相互作用をしない。これらの特徴は、同じ RNA ウイルスであるがプロウイルス DNA へ変換された後、宿主細胞染色体へ挿入されるレトロウイルスベクターなどで危惧されている発癌の危険性などを避けることができるという利点を持っている。



SeV/dF の第2の利点はその感染価の高さである。エンベロープは感染に必要な HN と F を持つ。哺乳動物細胞のほとんどに存在するシアル酸と HN を介して結合し、F 蛋白は細胞膜のコレステロールを認識して膜融合を起こす。このため SeV/dF は多種の哺乳動物細胞に感染可能である。本臨床研究で用いられる SeV/dF は、ゲノムにおいて F 遺伝子を欠失しているが、ベクター粒子そのものは製造過程で F タンパクをトランスに供給しているため、野生型センダイウイルスと同等の感染価を保持しつつ、遺伝子導入後は F 遺伝子の欠失のため感染性2次粒子を産生しない、則ち、非伝播型であるという特性を有する。

第3の利点はその転写能の高さである。SeV/dF は細胞に感染すると直ちにゲノムの転写・複製を開始し、以後遺伝子発現は対数的に増加する。感染後2日目で遺伝子発現は最大となり、多くの培養細胞において以後安定な持続感染に至る (in vivo ではベクターの排除により約2週間で消失)。これは増殖期の細胞で遺伝子発現が急激に減衰するアデノウイルスと好対照を成す。COS7 細胞を用いた実験では数  $10^5$  mg/ $10^5$  細胞/24 時間という、極めて高い発現量を示している。これは高発現系として有名なバキュロウイルス系、ワクシニアウイルス系に優るとも劣らない発現レベルである。転写能が高い場合の利点は、治療に必要なウイルス力価を下げるのが可能であり、組換えウイルス投与に関わる宿主反応を軽減することが可能である点である。

#### ⑥ 実施施設における当該遺伝子治療臨床研究に関する研究成果

##### A. 培養細胞を用いた研究成果

(a) SeV/dF-hFGF2 を投与した培養細胞より発現・分泌されるヒト FGF-2 タンパクに関する検討 (文献 14 及び未公表データ)

血管新生因子 VEGF (SeV-VEGF165: 付加型ベクター) と FGF-2 を搭載する SeV (付加型ベクター) ならびに SeV/dF (F 遺伝子欠損非伝播型ベクター) を細胞当たり 10 活性ウイルス粒子 (10 multiplicity of infections: MOI=10) 投与したその2日後に  $10^5$  細胞を 6-well 培養プレートに播種し、24 時間の間に培養液中に分泌される組換え蛋白量を ELISA 法 (R&D 社 Quantikine assay system) にて検出した。ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC: クラボウより購入)、ウシ大動脈平滑筋細胞 (BSMC: 屠殺ウシ大動脈より分離後6継代目)、ラット心筋芽細胞 (H9C2: 米国 ATCC 社より購入) イヌ腎臓尿管上皮細胞 (MDCK: 米国 ATCC 社より購入)、サル腎細胞 (COS7: 大日本製薬より購入) の全てにおいて、付加型・非伝播型あるいは VEGF・FGF-2 の違いに因らず、高い蛋白分泌量を示した (最大約  $5-10$  ng/ $10^5$  細胞/24 時間) (図 2)。

またこれらの培養上清は HUVEC、ウシ副腎由来毛細血管内皮細胞の増殖、コラーゲンゲル上の管腔形成を促進した。

(b) SeV/dF-hFGF2 を投与した培養細胞より分泌されるヒト FGF-2 タンパクの分泌機序に関する検討 (未公表データ)

FGF-2は旧来より古典的分泌シグナルを欠いていることが知られており、本臨床研究に使用する SeV/dF-hFGF2を再構成するベクターテンプレートに組み込まれているヒト FGF-2 cDNAも、遺伝子工学的に改変を加えていないため、同シグナル配列を持たない。しかしながら上記(a)で示したごとく、本ベクターにて発現させたヒト FGF-2は同シグナル配列を有する VEGF と同等の細胞外分泌を示す。

FGF-2の細胞外分泌には今なお不明な点があるが、少なくともその機序の一部には  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase の  $\alpha$ -サブユニットとの相互作用が関与することが、COS-1細胞を用いた研究で明らかにされている(42)。

SeV/dF-hFGF2より分泌されるヒト FGF-2について同様の機序が関与するかを明らかにするために、MDCK細胞およびCOS7細胞へ  $\text{MOI}=10$  で SeV/dF-hFGF2 を感染させ、培養液中へ分泌されるヒト FGF-2 量について検討した (ELISA法)。

双方の細胞株において、培養液中へ分泌される SeV/dF-hFGF2由来のヒト FGF-2は、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 阻害剤であるウツバイン処理にて抑制された (図3)。

このことから、SeV/dF-hFGF2由来のヒト FGF-2は論文報告と同様、少なくとも一部は  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase による能動的細胞外分泌を受けていると考えられた。

## B. 実験動物を用いた研究成果

(a) 非伝播型組換えセンダイウイルスベクター (F 遺伝子欠損型ベクター: SeV/dF) と増殖伝播型組換えセンダイウイルスベクター (付加型ベクター: SeV+18) の筋肉への大腸菌 lacZ 遺伝子導入・発現効率 (未公表データ: 図4)

非伝播型ベクターが野生型を基本骨格とした付加型ベクターと比較して、同等の遺伝子導入・発現効率を示すことを確認するため、大腸菌 lacZ 遺伝子を搭載した両ベクターをそれぞれ  $10^7$  ciu/50  $\mu\text{l}$ /head ずつ7週齢オス C57BL6/J マウス左大腿筋に投与し、2日後に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した (各群  $n=6$ )。

双方の群において、筋肉中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性は同等の値を示した (図4)。このことから、F 遺伝子欠損非伝播型ベクターは、野生型ウイルスの感染効率を示す増殖型付加型ベクターと比較して同等の遺伝子導入・発現効率を保持していることが確認された。

(b) マウス虚血後肢骨格筋に対するレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) 導入効率と遺伝子発現の経時的変化 (付加型ベクターを用いた検討: 図5: 文献14, Masaki I et al. Circ Res 2002)

C57BL6/J マウス (日本チャールズリバーより購入) の大腿動静脈を抜去し、軽度虚血モデルを作製した。同時にホタルルシフェラーゼ遺伝子をプラスミドベクター (pCMV-luciferase: ヒトサイトメガロウイルス前初期遺伝子プロモーター) あるいは SeV-luciferase を 100  $\mu\text{l}$  ずつ投与した (図5: 縦目盛りは対数表示)。

pCMV-luciferase は体重比にして欧米におけるプラスミドを用いた類似試験における臨床投与量の約50倍 (100  $\mu\text{l}$ /30g 体重) を投与し、2日後に発現量を測定したところ、高い遺伝子発現を認めた。SeV では用量依存性に発現が上昇し、 $10^7$  ciu (活性ウイルス粒子数) にて約5倍、 $10^8$  ciu にて約100倍の高い遺伝子発現が得られた。次に遺伝子発現を経時的に測定したところ、pCMV-luciferase においては低い発現が遅延したが、SeV では14日目にほぼ消失し、SeV が骨格筋において高発現・短期発現型ベクターであることが明らかとなった。

(c) ウサギ慢性虚血後肢骨格筋に対するヒト FGF-2 遺伝子導入効率と遺伝子発現の経時的変化 (付加型ベクターを用いた検討: 図6: 文献21, Shoji T et al. Am J Physiol 2003)

日本白色種家兎 (日本チャールズリバーより購入) 左後肢に既知の方法 (43) にて慢性虚血モデルを作製した。ヒト FGF-2 を発現するセンダイウイルスベクター (SeV-hFGF2:  $10^9$  ciu/head) あるいはルシフェラーゼ (SeV-luciferase: hFGF2:  $10^9$  ciu/head) を投与し、遺伝子発現を経時的に ELISA 法にて測定した (図6)。

マウスにて得られた所見と同様、投与後2日目に発現がピークとなり、以後漸減し14日目にほぼ消失した。従って SeV はウサギ骨格筋においても高発現・短期発現型ベクターであることが明らかとなった。

(d) マウス急性虚血後肢骨格筋に対する濃度依存性血管新生因子遺伝子発現効率 (付加型ベクターおよび F 遺伝子欠損非伝播型ベクターを用いた検討: 図 7: 文献 14、Masaki I et al. Circ Res 2002、および非公表データ)

C57BL/6J マウス (日本チャールズリバーより購入) の大腿動静脈を抜去し、軽度虚血モデルを作製した。同時にマウス FGF-2 を発現する付加型 SeV あるいはヒト FGF-2 を発現する非伝播型 SeV (SeV-mFGF2 および SeV/dF-hFGF2: 濃度  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  ciu/100  $\mu$ l) を 100  $\mu$ l ずつ大腿筋に投与した。2 日後大腿筋、下腿筋を採取、筋肉中の FGF-2 を R&D 社の ELISA system (ヒト、マウスともに検出する) にて検出した (図 7、縦軸は対数表示)。

いずれの構造のベクターの場合でも、FGF-2 はルシフェラーゼ遺伝子の場合と同様に濃度依存的に筋肉内蛋白発現が上昇し ( $10^7$  ciu=内因性 FGF-2 の約 50 倍、 $10^8$  ciu=約 300 倍)、血液中には FGF-2 蛋白は検出できなかった (検出限界: 5 pg/ml)。

(e) マウスおよびウサギ虚血後肢に対するセンダイウイルスベクターによる血管新生因子遺伝子導入の治療効果 (文献 14、Masaki I et al. Circ Res 2002、文献 21、Shoji T et al. Am J Physiol 2003、および非公表データ)

(e)-1 マウスにおける検討

計 4 種類 (C57BL/6、Balb/c、Balb/c nu/nu、C3H) のマウスに対し、外腸骨動静脈、大腿回旋動静脈、大腿深動脈、大伏在動静脈全てを抜去して得られる、マウス重症虚血肢モデルを作製した。安定して後肢が残存する C57BL/6 マウス (非脱落モデル)、例外なく後肢が脱落する Balb/c nu/nu マウス (後肢脱落モデル) を選択し、血管新生因子遺伝子導入による副作用と治療効果について検討した。

(e)-1-1 血管新生因子遺伝子導入に関わる副作用 (文献 14、Masaki I et al. Circ Res 2002)

C57BL/6 マウス (非脱落モデル) に対し、前述と同様の手技にて  $10^7$  ciu の付加型ベクター (SeV-luciferase、SeV-mFGF2、SeV-hVEGF165) を注入すると、コントロール群、マウス FGF-2 群では後肢脱落はほとんど認めなかったが、ヒト VEGF165 群では高率に脱落した (図 8 上段)。これは VEGF の過剰発現は虚血肢の予後を増悪させる副作用があることを示唆する。

(e)-1-2 血管新生因子遺伝子導入の治療効果 (文献 14、Masaki I et al. Circ Res 2002)

Balb/c nu/nu マウス (脱落モデル) に対し、前述と同様の手技にて  $10^7$  ciu の付加型ベクター (SeV-luciferase、SeV-mFGF2、SeV-hVEGF165) を注入すると、コントロール群、ヒト VEGF 群ではほとんどの個体で後肢が脱落したが、マウス FGF-2 群では高率に救肢された (図 8 下段)。これは FGF-2 の重症虚血肢に対する有意な治療効果を示唆する。

(e)-1-3 下肢脱落モデルに対するヒト FGF-2 遺伝子導入の用量依存的治療効果: 付加型ベクターと非伝播型ベクターの比較 (図 9: 文献 21、Shoji T et al. Am J Physiol 2003、および非公表データ)

Balb/c nu/nu マウス (脱落モデル) に対し、前述と同様の手技にて  $10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $10^7$ 、 $5 \times 10^7$  ciu のヒト FGF-2 を搭載した付加型ベクター (SeV-hFGF2: 図 9 上段) あるいはヒト FGF-2 を搭載した非伝播型ベクターを注入し、後肢脱落の状態を経時的に観察した。PBS 群、コントロールベクター群ではほとんどの個体で後肢が脱落したが、いずれのベクターでもヒト FGF-2 群では高率に救肢された (図 9)。最大治療効果は、 $3 \times 10^6$ 、 $10^7$  ciu/head にて得られた。

(e)-1-4 FGF-2 遺伝子導入による血管新生効果と血行回復効果 (文献 14、Masaki I et al. Circ Res 2002)

C57BL/6 マウス (非脱落モデル) に前述の方法にて SeV-mFGF2 あるいは SeV-hVEGF165 ( $10^7$  ciu/head) を投与し、10 日目の筋肉内微小血管数 (免疫組織化学的に PECAM-1 を染色し算出) および鏡面切片にて周皮細胞を伴う微小血管数 (免疫組織化学的に  $\alpha$ -SM アクチンを染色し算出) を計測した (図 10 上段)。FGF-2 治療群ではコントロールに比べ、3.5 倍の新生血管数を認めた。さらに、VEGF 群と比較して FGF-2 群では周皮細胞の被覆が有意に多く、新生血管がより成熟していることが示唆された。

また下肢血流量をレーザードップラー血流計 (Moor Instruments Inc. U.K.) にて計測すると、FGF2 群で有意な血行の改善を認め、逆に VEGF 群では血行回復の遅延が認められた (図 10 下段)。

(e)-2 ウサギ慢性虚血後肢に対する付加型センダイウイルスベクターによる血管新生因子遺伝子導入の治療効果 (図 11、12: 文献 21、Shoji T et al. Am J Physiol)

日本白色種家兔 (日本チャールズリバーより購入) の左後肢に対し、既知の方法で慢性虚血モデルを作製した (文献 43、44)。血行動態が安定する 2 週目にヒト FGF-2 を発現する付加型 SeV

(SeV-hFGF2 : 濃度  $10^9$  ciu/ml) あるいは対照のレポーター遺伝子 luciferase を発現する SeV (SeV-luciferase) を合計 1 ml、大腿および下腿筋に計 6 ケ所投与した。2 日後大腿筋、下腿筋を採取、FGF-2 タンパク量を R&D 社の ELISA system にて検出した。

SeV-luciferase 投与群では平均 128.8 pg/mg protein (n=10) であったのに対し、SeV-hFGF2 投与群では 1,711.9 pg/mg protein (n=10) であった。

同一の実験系において、レーザードップラーによる血流測定を経時的に行った。SeV-hFGF2 投与群では投与一週目より有意な血流上昇を認め、以後 1 ヶ月以上維持された (図 1 1)。

また、本ウサギモデルはヒト疾患と同様の血行動態を示すが、ヒトの閉塞性動脈硬化症では浅大腿動脈閉塞に伴い大腿深動脈の血流が増加しこれが側副血行路となるため、SeV-hFGF2 投与により側副血行路が実際に増加するか否かを直接的に検討した。図 1 1 に示すように外腸骨動脈血流総量に対する大腿深動脈血流量の相対的血流測定値は、SeV-hFGF2 投与群で有意に高値であった。

## 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ウイルスベクター (担体) の純度

GMP ベクターの生産、精製、供給は BioReliance 社により行われる。同社が生産したウイルスベクター (レトロウイルス、アデノウイルスを含む) は、これまで多数の遺伝子治療臨床研究に使われており、十分な実績を有する。GMP 生産ラインによる SeV/dF-hFGF2 生産の 3 度に亘るテストランにおいて GMP 基準に合致することが確認された。さらに本臨床研究に用いるロットのベクター生産も終了し、GMP 基準を満たすことを確認している。詳細は以下に表にして記載する。

② 患者に投与する物質の純度及びその安全性

本遺伝子治療臨床研究に用いるベクターの生産には、以下のマスターセルバンク、マスターウイルスバンクを用いた。以下のバンクは全て管理試験項目に合格している。

マスターセルバンク	
製造年月日	2002年6月27日 (製造ロット: M0009.100550)
製造場所	BioReliance 社 (Innovation Park, Hillfoots Road, Stirling, UK) : Scion House Lab2
保存条件	保存補助剤 (80%D-MEM, 10% FBS, 10% DMSO) 存在下で、Controlled Rate Freezer にて -130℃までに凍結後、液体窒素気相タンクにて保存
製造本数	1ml バイアルを149本
管理方法(QC)	下記13検査項目をパスすること
管理試験項目	試験方法の概略
1) 細胞増殖性	ダブリング・タイム
2) 無菌試験	細胞融解物接種により培養法で陰性
3) 静菌・静真菌試験	細胞融解物接種により陽性対照菌の発育への影響を調べる
4) マイコプラズマ培養試験	マイコプラズマ用液体培地及び寒天培地で培養、また、PCR によりその有無を判定
5) ウィルス・コンタミ否定試験 1	In vitro : 細胞融解物接種により培養細胞にて blind passage 法で CPE, HAD, HA の有無をみる。陽性対照ウイルスと比較
6) ウィルス・コンタミ否定試験 2	In vivo : 細胞融解物接種により乳飲みマウスの blind passage 法での異常の有無、ニフトリ胎児への blind passage 法での viability と HA の有無、成熟マウスへの投与による異常検出
7) 電子顕微鏡検査	細胞形態の特徴、ウィルス、細菌、真菌などの有無
8) ウシ・ウィルス否定試験	細胞融解物接種により BT 細胞、Vero 細胞培養で CPE の有無、免疫抗体法、HAD で陰性
9) ブタ・ウィルス否定試験	細胞融解物接種により PT-1 細胞培養で CPE の有無、免疫抗体法で陰性
10) Isoenzyme 試験	MCB 細胞と L929 マウス細胞、HeLa ヒト細胞、BHK ハムスター細胞の LD, G6PD, MD, NP のゲル電気泳動パターンからサル細胞由来であることを確認する
11) レトロ・ウィルス否定試験	PCR 法により Reverse transcriptase の否定
12) SV40 否定試験	PCR 反応による否定
13) RCA 否定試験	細胞融解物接種により A549 細胞培養で CPE 観察。Blind passage を 2 回実施することにより判定する。

マスターウイルスバンク	
製造年月日	2002年10月19日 (製造ロット: M0205.100748)
製造場所	BioReliance 社 (Innovation Park, Hillfoots Road, Stirling, UK) : Scion House Lab1
保存条件	ドライアイス/エタノールにて凍結後、-60℃以下のディープフリーザーに保存
製造本数	40ml バイアルを123本
管理方法(QC)	下記9検査項目をパスすること
管理試験項目	試験方法の概略
1) 無菌試験	細胞融解物接種により培養法で陰性
2) 静菌・静真菌試験	細胞融解物接種により陽性対照菌の発育への影響を調べる
3) マイコプラズマ培養試験1	マイコプラズマ用液体培地及び寒天培地で培養、また、PCRによりその有無を判定
4) マイコプラズマ培養試験2	マイコプラズマ用液体培地及び寒天培地で培養、また、PCRによりその有無を判定
5) ウィルス・コンタミ否定試験1	In vitro: 細胞融解物接種により培養細胞にて blind passage 法で CPE, HAD, HA の有無をみる。陽性対照ウィルスと比較
6) ウィルス・コンタミ否定試験2	In vivo: 細胞融解物接種により乳飲みマウスの blind passage 法での異常の有無、ニワトリ胎児への blind passage 法での viability と HA の有無、成熟マウスへの投与による異常検出
7) ベクタータイター検定	ベクターのタイターを蛍光法により測定する
8) アデノウィルス否定試験	細胞DNAをアデノウィルス検出用 primer を用いた PCR 後、サザンハイブリダイゼーション法で判定する。
9) RT-PCRによるベクター定量	ベクターのゲノム量を RT-PCR により定量する

BioReliance 社 (GMP 製造責任者: Jon Marshall 氏) より電子メールにて送付されて来た、臨床研究にて患者へ使用される予定の最終生産物 (SeV/dF-hFGF2) に関する GMP 検査試験合格証明書を次ページに添付する。

実施したマイコプラズマ否定試験、ウィルス混入否定試験、増殖性ウィルス否定試験、エンドトキシン混入否定試験に全て合格している。ベクター力価も  $2.35 \times 10^9$  ciu/ml であり、本臨床研究の実施に十分な力価を得ている。

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**  
**FGF2-SeV/dF Sendai virus Vector**

Sponsor:	Kyushu University		
Final Product Designation:	SeV (FGF2)deltaF CL4		
Lot number:	M0209.100911	Part number:	M8.50056
Date of final product filling:	25-Mar-03	Number of vials produced:	147
Volume per vial:	0.2 ml	Storage conditions:	Store at <-60°C
<b>Test Description</b>	<b>Study Number</b>	<b>Result</b>	
<b>Mock Cell Lysate (5 x 10<sup>5</sup> cells/ml) Lot Number M0204.100912</b>			
Test for the Detection of Non-Cultivable Mycoplasmas in Accordance with US FDA Points to Consider (1993) Recommendations using an Extended Vero Cell Assay	J03YC49.102018	Negative	
<b>Cell Lysate (5 x 10<sup>5</sup> cells/ml) Lot Number M0204.100912</b>			
Test for the Presence of Agar-Cultivable Mycoplasmas in Accordance with the US FDA Points to Consider (1993) and 21 CFR 610.30 Recommendations for Agar and Broth Cultures	J03YC52.102016	Negative	
<b>Cell Lysate (1 x 10<sup>7</sup> cells/ml) Lot Number M0204.100912</b>			
Test for the Presence of Inapparent Viruses in Suckling Mice, Adult Mice and Embryonated Hens' Eggs	AA74DA.005900.BSV	No evidence of contamination with adventitious viral agents	
Extended <i>in vitro</i> Assay (with preliminary passage) for the detection of Viral Contaminants using 3 Detector Cell Lines	J03YC51.003014	No evidence of viral contaminants	
<b>Pooled Filtered Bulk Lot Number M0204.100912</b>			
Quantitative Product Enhanced Reverse Transcriptase (Q-PERT) Assay for the Detection of Retroviral Reverse Transcriptase Activity	J03YC50.002107	No activity found	
<b>Post snap freezing final product Lot Number M0209.100911</b>			
Sterility Test in Accordance with 21 CFR, USP 26 and/or European Pharmacopoeia (EP) for Final Product	AA74DB.510036.BSV	Satisfactory	
USP Procedure for the <i>Limulus</i> Amebocyte Lysate Assay using the Gel Clot Method	J03YC48.360001	<1.2 EU/ml	
Determination of Sendai Virus Titre Using Fluorescence Foci Formation	J03YC48.022828	2.35 x 10 <sup>9</sup> PFU/ml	
Electron Microscopic Evaluation of Biological Fluids: Detection and Quantitation of Viral Particles	J03YC48.013004	1.3 x 10 <sup>10</sup> particles/ml	

I certify that the above information has been accurately transcribed.

By M Henderson Date 27 Oct 2004  
QA Auditor 11 Signed on behalf of Alex Kelliech Date 27 Oct 2004

Approved:  
Jon Marshall  
Jon Marshall  
Director of Manufacturing Services  
BioReliance

27 Oct 2004  
Date

M Henderson  
Maria Henderson, BSc  
QA Manager, BioReliance

27 Oct 2004  
Date



### ③ 増殖性ウイルス出現の可能性

SeV/dF は、ベクター粒子は F タンパクを持つ（製造過程でトランスに供給される）ため野生型ウイルスと比較して遜色のない遺伝子導入効率を保持するが、ゲノムには感染に必要な F 遺伝子を欠損しているため、一端感染したのちには理論的に感染性 2 次粒子は放出しない。これは培養細胞レベルの実験でも明らかにされている（23）。このベクター構築過程は、（1）細胞内においてゲノム RNA-タンパク複合体（RNP）を形成させる過程、（2）RNP を F タンパク発現細胞へ導入し、ベクター粒子を回収する増幅過程、に分けられており、ウイルスゲノムの相同組み換えがほとんどないことも影響して、野生型ウイルスの混入は全く認められていない。これは英国のベクター生産委託企業（BioReliance 社）で行った GMP 生産 3 回のテストランサンプルにおいて全て同様の結果であり、本臨床研究で使用される最終生産物においても試験結果は陰性であった。

以上の様に増殖性ウイルス出現の可能性は低いと考えられるが、本臨床研究は SeV/dF の世界で最初の使用例となるため、投与前、ならびに投与 6 ヶ月後まで定期的に血中抗センダイウイルス抗体価をモニタリングし、安全性の確認を行う。但し SeV のヒトにおける既感染については、血清学的に必ずしも検出が容易ではない。これは SeV とヒトパラインフルエンザ 1 型、3 型の間に免疫学的交叉性があるためであり（45）、事実 SeV がヒトパラインフルエンザの生ワクチンとしてサルやヒトへ投与された報告（40、41）、逆にヒトパラインフルエンザ 1 型をマウスにおける SeV への生ワクチンとして使用したとする報告もある（46）。これらのことから、血中抗センダイウイルス抗体価のモニタリングデータは、ベクター投与前後の推移を以て参考データとして取り扱う。

### ④ 遺伝子導入に用いるウイルスベクター（担体）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（35）。

ヒトあるいはマウス FGF-2 を搭載した付加型ベクター、ヒト FGF-2 を搭載した非伝播型ベクターのみならず、その他種々の遺伝子を搭載したベクターを多種に渡りマウスの後肢骨格筋へ投与を経験しているが、筋肉の壊死など、組織学的に重篤な細胞傷害性を示唆する所見は得られていない。

カニクイサルを用いた SeV/dF-lacZ および SeV/dF-hFGF2 に関する安全性試験（添付資料参照）においても、ベクター投与に特異的な組織学的に筋組織の壊死あるいは筋肉酵素の著明な逸脱など重篤な副作用がないことは確認されている。

ラットおよびサルを用いた安全性試験（臨床研究使用予定の GMP 生産ラインで生産した SeV/dF-lacZ および SeV/dF-hFGF2 を使用した GLP コンプライアンス下の急性毒性試験、生体内分布試験）に関しても、同様の所見であった。

### ⑤ 体内の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種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、 $10^7$  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（ $56^{\circ}\text{C}$ 、30分加熱）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（図 13、非公表データ：非働化ありあるいはなしの血清に SeV-luciferase を添加、1、5、30、60、180 分後に COS7 細胞へ MOI=10 で投与、2 日後の相対的ルシフェラーゼ活性を測定）。

カニクイサルを用いた SeV/dF-lacZ および SeV/dF-hFGF2 に関する安全性試験（添付資料参照）においても、少なくとも血液、尿中には、全経過を通じてベクターの遺伝子配列は確認されておらず、全身散布の可能性は低いと考えられる。

### ⑥ 患者以外のヒトに遺伝子が導入される可能性

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。

本臨床試験においてはさらに安全性を確保するため、また生物学的多様性への影響を最小限にするため、ベクター投与後少なくとも 1 週間は陰圧で制御される遺伝子治療室にて管理する（サルを用いた安全性試験成績では、投与後 2 週間の経過全てにおいて、血液ならびに尿中にベクターの遺伝子配列は検出されていないため、1 週間の管理期間で十分であると考えられる）。排泄物よりベクターが検出されないことを確認（RT-PCR 法、血球凝集法にて検定）した後に、陰性の場合にのみ一般病棟へ移送する。



### ⑦ 染色体内へ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。

### ⑧ がん原性の有無

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、宿主癌遺伝子の活性化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。

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ない。

### (2) 遺伝子産物の安全性

搭載する FGF-2 遺伝子に関しては、種々の間葉系細胞、血管内皮細胞などの増殖を促進することが知られているものの、トランスジェニックマウスを用いた成績においても悪性新生物が発生したとする報告はない。

FGF-2 の高発現時における生体への毒性は十分に明らかではないが、ヒト冠状動脈内への大量のタンパク投与の結果によると、一過性のタンパク尿、血圧低下が観察されているが、重篤な副作用は認められていない(29)。また FGF-2 のトランスジェニックマウスでは、特に血管系の異常は報告されておらず、主な形態の変化は大きな頭蓋骨と軟骨異栄養症のみであった(30)。さらに現在、FGF-2 のタンパク製剤はフィブラストスプレーとして科研製薬より発売されており、国内での人体投与実績がある。

### (3) 安全性に関連する研究の成果

#### ① マウスを用いた炎症性サイトカイン誘導に関する予備的検討

(FGF-2 搭載付加型ベクターによる予備的検討) (図14)

米国ペンシルバニア大学で1999年に報告された死亡例(19歳男性、オルニチンカルバミラーゼ欠損症患者)では、肝動脈内へのアデノウイルスベクター投与途中より発熱、悪寒などの症状が現れ、血液中のインターロイキン6(IL-6)が最高6,000 pg/ml以上に上昇し、全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome: SIRS)を発症したとされている。

そこでまずマウスを用いた SIRS 誘導に関する予備的検討として、FGF-2 搭載付加型ベクターによる炎症性サイトカイン誘導について検討を行なった。

(方法) C57BL/6 マウス(雄、8週齢)の左後肢に重症虚血(外腸骨動静脈、伏在動静脈、大腿回旋枝、大腿深動静脈を全て結紮・抜去)を作製、同時に  $10^7$  c.i.u./100  $\mu$ l のマウス FGF-2 搭載付加型ベクター(SeV-mFGF2: マウス FGF-2 とヒト FGF-2 では、アミノ酸配列上の相同性は98%である)を投与し、筋肉中、血清中の IL-6、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ )、ならびにウイルス感染の指標として、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の産生量を ELISA 法にて経時的に測定した。それぞれのサイトカインは同一の検体で測定した。実験群は以下の各群を設定した。

1) 手術のみ、2) SeV-mFGF2のみ(ベクターのみ)、3) 手術+SeV-mFGF2

(結果1: IL-6の動態) 筋肉局所において、虚血手術後1日目は大量の IL-6 (平均値 4,654 pg/mg 蛋白)を誘導したが、ベクター単独ではその約 1/20 (204 pg/mg 蛋白)に留まった。ベクター投与により虚血により誘導される局所の IL-6 の上昇は2日目まで遷延する傾向を認めたものの、以後激減した(図14上段)。

一方、血清中に誘導される IL-6 蛋白はベクター単独では全く検出不可能であり、虚血肢に投与してもわずかな上昇(8.9 pg/mg 蛋白)に留まった(図14下段)。

(結果2: IFN- $\gamma$ の動態) 筋肉局所において、虚血手術群は全観察期間において IFN- $\gamma$ はほとんど誘導されなかったが、ベクター投与群、手術+ベクター投与群では有意な上昇を認め、本実験系においてベクターの感染が成立していることを示唆した。一方、全観察期間において血清中には全く検出できなかった(図15)。

(結果3: TNF- $\alpha$ の動態) 筋肉局所において、ベクター投与群では全観察期間を通じて TNF- $\alpha$ を全く検出できなかった。ベクター投与群、虚血+ベクター投与群では有意な上昇を認めたが、両者に有意差は認めなかった。血清中には全観察期間において TNF- $\alpha$ は全く検出できなかった。

②カニクイサルを用いたレポーター遺伝子（大腸菌 lacZ 遺伝子）搭載  
非 GMP 生産非伝播型ベクター（SeV/dF）による安全性試験（添付資料）

（方法の概略）

本実験（急性毒性試験）は国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターにて平成13年3月29日より同4月12日に行なわれた（担当者：寺尾恵治博士、小野文子博士）。

中国産育成カニクイザル（*Macaca fascicularis* 雄2頭（体重約2.5kg）を用いた。ベクター投与量はkg当り臨床使用予定量のほぼ最大量に相当する約 $10^8$  ciu/kg（動物番号#G11）、さらにその10倍量にあたる約 $10^9$  ciu/kg（動物番号#G13）をそれぞれ10mlに調整し、右大腿部に4ヶ所、下腿部2ヶ所、それぞれ1～2ml、計6ヶ所に直接筋肉内注射を行なった。コントロールとして、生理食塩水を投与した個体も同様に検討した（動物番号#G14）。投与後2週間連続して動物を観察、検体を採取し、14日目に全身を解剖、諸臓器の一部を採取し、病理組織学的に検索した。

（主な結果）

<1>食物摂取量、運動性、体重（添付資料：Figure 2、Table 2）に変化は認められなかった。  
<2>収縮期血圧、拡張期血圧、心拍数に変化は認められなかった（添付資料：Figure 3、Table 3）。  
<3>尿検査：尿量、電解質、比重、pH、蛋白、糖質、ビリルビン、ウロビリノーゲン、色調、潜血に変化や異常は認められなかった。コントロールを含む全個体で投与後1～3日にケトン体が一過性に陽性となったが、これは操作に対する影響と考えられた（添付資料：Table 5）。

<4>血液学的検査（添付資料：Figure 6、Table 6）：

1) ベクター投与群にのみ軽度の一過性白血球減少を認めた。これはウイルス量が高い程減少の度合いが大きかった。

2) コントロールを含む全個体で軽い貧血を認めた（RBC、Hb、Hct共に）。これは採血量の影響であると考えられた。

3) 血小板数には全個体で有意な変化はなかった。

4) 血液凝固系において、ベクター投与群にのみ投与後3～7日目にフィブリンノーゲンの軽度の低下、APTTの軽度の延長が認められた。

<5>血清学的検査（添付資料：Figure 7、Table 7）：

1) 血清蛋白、アルブミン、A/G比、血清クレアチニン、血清コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセライド、血清リン、カルシウム、トランスアミナーゼ（GOT、GTP）、アルカリフォスファターゼ、LDH、 $\gamma$ -GTP、LAP、コリンエステラーゼ、血清電解質（ナトリウム、カリウム、塩素イオン）に顕著な変化は認められなかった。

2) 血清CRPは#G13（高用量）の個体でわずかに一過性（～1日目）の上昇を認めた。

3) 血清CPKは全個体において一過性（～1日目）に上昇した。これは筋肉内注射に関わる影響と考えられた。

<6>血清サイトカインレベル（九大病理病態学における検査）

1) 血清IL-6は#G13（高用量）の個体でわずかに一過性（～1日目）の上昇を認めた（最大値：11.95 pg/ml、投与6時間後）。

2) 血清TNF- $\alpha$ は観察期間中、全個体において検出できなかった。

3) 血清IFN- $\gamma$ は#G13（高用量）の個体でわずかに上昇を認めた（最大値：16.3 pg/ml、投与後5日目）。

<7>解剖・病理組織学的所見：

検索した全臓器において、肉眼的に異常は認められなかった。採取した諸臓器（脳、心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、大腸、精巣、対側筋肉）に病理組織学的異常は認められなかった。注入側筋肉にはごく一部に慢性炎症細胞浸潤（リンパ球）を認めたが、筋肉細胞の壊死などの所見は認めなかった。

③カニクイサルを用いたヒト FGF-2 遺伝子搭載非 GMP 生産非伝播型ベクター（SeV/dF-hFGF2）による安全性試験（添付資料）

（方法の概略）

本実験（急性毒性試験）は国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターにて平成14年6月12日より同7月4日に行なわれた（担当者：寺尾恵治博士、小野文子博士）。

中国産育成カニクイザル（*Macaca fascicularis* 雄9頭（体重約3.0-3.5 kg）を用いた。ベクター投与量はkg当り臨床使用予定量のほぼ最大量の5倍にあたる $5 \times 10^8$  ciu/kg（動物番号#G4、G18、G20）、さらにその10倍量にあたる $5 \times 10^9$  ciu/kg（動物番号#G3、G15、G16）をそれぞれ10mlに調整し、右大腿部に4ヶ所、下腿部2ヶ所、それぞれ1～2ml、計6ヶ所に直接筋肉内注射を行なった。コントロールとして、生理食塩水を投与した個体も同様に検討した（動物番号#G9、G17、G19）投与後2週間連続して

動物を観察、検体を採取し、14日目に全身を解剖（投与群のみ）、諸臓器の一部を採取し、病理組織学的に検索した。

#### （主な結果）

<1>食物摂取量、運動性、便性状など（添付資料：Table 1）に有意な変化は認められなかった。

<2>体重に有意な変化は認められなかった（添付資料：Table 2）。

<3>体温に有意な変化は認められなかった（添付資料：Table 3）

<4>尿検査：尿量、電解質、比重、pH、蛋白、糖質、ビリルビン、ウロビリノーゲン、色調、潜血に変化や異常は認められなかった。コントロールを含む全個体で投与後1～3日にケトン体ならびに潜血が一過性に陽性となったが、これは操作に対する影響と考えられた（添付資料：Table 4）。

<5>血圧（添付資料：Table 5）：観察期間中、有意な血圧の変動は認められなかった。

<6>血液学的検査（添付資料：Table 6）：

1) 全群で軽度かつ一過性白血球減少を認める個体が存在した。

2) コントロールを含む全個体で軽い貧血を認めた（RBC、Hb、Hct 共に）。これは採血量の影響であると考えられた。

3) 血小板数には全個体で有意な変化はなかった。

4) 血液凝固系において、ベクター投与群にのみ投与後3～7日目にフィブリノーゲンの軽度の低下、APTTの軽度の延長が認められた。これは2週目までには回復した。

<7>血清学的検査（添付資料：Table 7）：

1) 血清蛋白、アルブミン、A/G比、血清クレアチニン、血清コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセリド、血清リン、カルシウム、トランスアミナーゼ（GOT、GTP）、アルカリフォスファターゼ、LDH、 $\gamma$ -GTP、LAP、コリンエステラーゼ、血清電解質（ナトリウム、カリウム、塩素イオン）に顕著な変化は認められなかった。

2) 血清CRPは全群でわずかに一過性の上昇を認める個体が存在した。

3) 血清CPKは全個体において中等度かつ一過性に上昇した。これは筋肉内注射に関わる影響と考えられた。

<8>ガン・バイオプシー採取骨格筋におけるFGF-2の発現レベル（九大病理病態学における検査）

（方法）筋肉採取はベクター投与後2日目に行った。採取部位は大腿筋のベクター投与部位から行った。ベクター投与時に部位を油性マジックでマークし、各部位から2回米粒大の筋肉片を採取した。1個体当たり2ヶ所（合計4回）バイオプシーを行い、1部位の2片の筋肉組織を一つにまとめて、ヒトFGF-2タンパク用ELISAキット（R&D社）を用いて測定した。それぞれの測定値は、Bradford法で測定した総タンパク量で標準化した。

（結果）コントロール群では、採取筋肉におけるFGF-2発現レベルは全て23.2-32.2pg/mg proteinであったため、これを内因性FGF-2レベルの概算値とした。

低用量群では測定値は21.5-111.8 pg/mg proteinであった。

高用量群では測定値は30.2-1,612.9 pg/mg proteinであった。

（考察）ガン・バイオプシーによる盲目的組織採取のために測定値にばらつきがあったと考えられるが、全ての部位で内因性FGF-2レベルの概算値を超えるFGF-2タンパクが認められる部位があり（内因性FGF-2と比較して最大50倍以上：高用量群）、サルにおけるベクターの遺伝子導入・発現効率はマウスとほぼ同等であると考えられた。

<9>血清サイトカインレベル（九大病理病態学における検査）

1) 血清TNF- $\alpha$ 値は観察期間中全個体において検出できなかった。

2) 血清IFN- $\gamma$ 値は観察期間中、高用量群の1個体だけに軽度かつ持続性の発現上昇を認めた。（今回は全体にバックグラウンドの測定値が高い傾向にあった）

3) 血清IL-6値は、低用量、高用量それぞれ1個体に有意かつ一過性の軽度の発現上昇を認めた。実験終了時採血ではこれらは検出感度以下に低下した。

<10>解剖・病理組織学的所見：

検索した全臓器において、肉眼的に異常は認められなかった。採取した諸臓器（脳、心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、大腸、精巣、対側筋肉）に病理組織学的異常は認められなかった。注入側筋肉にはごく一部に慢性炎症細胞浸潤（リンパ球）を認めたが、筋肉細胞の壊死などの所見は認めなかった。

安全性に関する試験として、以上に加え、さらに以下の試験を外委託企業にて実施、全てを終了した。以下の試験では特に特筆すべき異常所見は得ていない（下記試験は全て添付資料として提出済み）。

- (1) 大腸菌 lacZ 遺伝子搭載 GMP 生産非伝播型センダイウイルスベクターによる GLP コンプレックスライアンス準拠ラット急性毒性試験  
(経筋肉：試験番号 NDL1006、経静脈：同 NDL1002、経気道：同 NDL1001)
- (2) 大腸菌 lacZ 遺伝子搭載 GMP 生産非伝播型センダイウイルスベクターによる GLP コンプレックスライアンス準拠ラット生体内分布試験  
(経筋肉：試験番号 NDL1021)
- (3) ヒト FGF-2 遺伝子搭載 GMP 生産非伝播型センダイウイルスベクターによる GLP コンプレックスライアンス準拠ラット急性毒性試験  
(経筋肉：試験番号 NDL1015、経静脈：同 NDL1016)
- (4) ヒト FGF-2 遺伝子搭載 GMP 生産非伝播型センダイウイルスベクターによる GLP コンプレックスライアンス準拠サル生体内分布試験  
(経筋肉：試験番号 NDL1019)

#### 8. 遺伝子治療臨床研究が実施可能であると判断した理由

前臨床効能試験成績より考察すると、本臨床研究計画は既存の血管新生療法と比較してさらなる高い有効性が期待できる。ヒトに対し非病原性ウイルスをベクターの基本骨格として用いていること、ベクターゲノムが宿主染色体との相互作用をしないことなどから、発癌の可能性や子孫への影響に関する理論的危険性も低いと判断される。さらに各種安全性試験成績より、本研究計画で使用を想定している投与量であれば、免疫反応を含む生体への影響は比較的低いであろうと予測される。

既に本臨床研究に使用するベクターの GMP 生産と生産物の検定試験は終了しており、九州大学病院冠動脈疾患治療部内には既に遺伝子治療専用病室（遺伝子治療室）を設置している。さらに九州大学病院第 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、本臨床研究の対象となる患者も多く診療している。

以上から本遺伝子治療臨床研究は実施可能であると判断する。

#### 9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

##### (1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

##### 【本臨床研究の実施に際し設置される委員会】

本遺伝子治療臨床研究においては、選定患者の適応、臨床研究の安全性、そして臨床効果を客観的に判定するため、九州大学病院内に以下の 2 種の委員会を設置する。

これら 2 委員会は学内外の専門家から構成され、本臨床研究に関与する医師他は含まれず原則として委員会会議への参加も行わない。但し、有害事象発現時の状況の説明など、委員会が必要と認めた場合には、総括責任者を含め本臨床研究に関与する医師の参加を要請することができるが、判定など決定事項の合議の際には退席させる。また以下の各委員会の委員は、必要に応じて患者の容態の診察や診療録などの直接閲覧する権限を有する。また各委員会は必要に応じて委員以外の外部の専門家を招聘し、その意見を聴くことにより判定の参考にすることができる。

各委員会の運営については、別途作成した手順書（別紙 1、2）に従って行う。

各委員会は、結果報告書ならびに参加委員全員の署名または記名捺印を受けた出席リストを添付した議事録を作成し、九州大学病院長へ提出する。九州大学病院長は委員会の結果を受けて通知書を作成し、委員会の記録の写しとともに、総括責任者に提出する。九州大学病院長はその写しを九州大学医学部倫理委員会および所轄官庁へ随時提出する。

##### ・九州大学病院先進医療適応評価委員会（別紙 1）:

##### 【役割 1】治療前適応評価

本臨床研究の候補として登録された患者の治療前検査が問題なく実施されたか検討する。治療前検査の実施に問題が無い場合、そのデータを参考に、患者の病状が選定基準に合致するか、そして除外項目に抵触しないかを検討することにより、本臨床研究の対象患者として適当か否かを判定する。

##### 【役割 2】ステージアップ適応評価

各ステージにおいて 3 名の投与が終了し、3 例目の投与が終了して 28 日間までのデータを収集、ステージごとの安全性を判定し、次ステージへの dose up が適当か否かについて判定する。

##### 【役割 3】有害事象・重大事態等発生時の対応

有害事象・重大事態等の発現に際し、総括責任者ならびに分担研究者・その他の

協力者より状況の報告と臨床データの提示を求め、本臨床研究薬との因果関係、臨床研究の続行の可否について判定する。

【役割4】 臨床研究全般の安全性評価総合判定

全12例の患者の投与が終了、全例で6ヶ月の観察期間を経た後、全例の転帰と臨床データを参考に、本臨床研究が安全であったか否かを総合的に判定する。

・ 効果判定委員会（別紙2）：

全12例の患者の投与が終了、全例で6ヶ月の観察期間を経た後、全例の転帰と臨床データを参考に、本臨床研究が有効であったか否かを総合的に判定する。

【本臨床研究の実施手順】

【患者選定、登録から治療前検査】

本遺伝子治療臨床研究の適応が予測される患者〔手術適応がなく、安静時疼痛あるいは虚血性潰瘍・壊死を有する患者：Fontaine分類IIIあるいはIV度（Rutherford慢性虚血肢重症度分類III度6群を除く）〕については、九州大学病院あるいは紹介病院において2週間の継続した薬物療法（血管拡張薬、抗血小板薬など、使用薬剤は個々の患者の症状による）を施行。症状に変化がない場合、九州大学病院にて患者ならびに家族（あるいは親族）に対し文書によるインフォームド・コンセント（第1回目）を行い、同意が得られた場合に限り、本臨床研究へエンロール（患者登録）し治療前検査を開始する。

【患者適応評価から治療実施】

治療前検査にて後述する選択基準に合致、さらに除外基準に抵触しないことが明らかになった場合、治療前検査データを基に九州大学病院内に設置する九州大学病院先進医療適応評価委員会にて適応を評価する。

九州大学病院先進医療適応評価委員会では本臨床研究の適応と判断された場合、九州大学病院にて患者ならびに家族（あるいは親族）に対し文書によるインフォームド・コンセント（第2回目）を行う。同意が得られた場合に限り、以下の方法によって治療を実施する。

- 1) 術前に腰椎硬膜外持続麻酔チューブを挿入し、前日よりソル・メドロール125mg、抗生物質を点滴静注する。以後3日間点滴を継続する。
- 2) 術当日、九州大学病院外来棟3階セルプロセッシングルームに-80℃にて凍結保管してある組換え非伝播型センダイウイルスベクター液を封入しているポリプロピレン製クリオチューブを同施設内安全キャビネット内へ移動、溶液を溶解する。最新の患者体重を参考に、生理食塩水にて最適に希釈する。
- 3) 希釈した組換え非伝播型センダイウイルスベクター液を専用のコンテナ内に厳重に封入して、保冷下で九州大学病院南棟3階冠動脈疾患治療部内遺伝子治療室へ搬入する。
- 4) 腰椎硬膜外持続麻酔下23ゲージ注射針にて下肢の一侧の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。注入部位は血管造影所見に基づき、概ねin flowが得られている動脈周辺より開始し、下大腿一足関節直上付近までに注入する。なお、ベクター液はベクター力価漸増式に4段階設定し、各ステージの安全性を注入後少なくとも28日目までのデータを基に九州大学病院先進医療適応評価委員会にて安全であることが確認できた後、次ステージを開始する。
- 5) 別紙6に掲げるタイムスケジュールで安全性の評価に関する検査（バイタルサイン、呼吸機能検査、腎機能検査、肝機能検査、一般血液・血清検査、尿検査、ベクターゲノム数測定、センダイウイルス価、センダイウイルス抗体価、血液中サイトカイン濃度、血管新生因子濃度など）を行う。
- 6) 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ELISA法にて遺伝子から発現した蛋白の定量を行う。
- 7) 別紙6に掲げるタイムスケジュールで効果判定に関する検査（血管造影による側副血行路形成状態の観察、非侵襲的診断法など）を行い臨床症状や血流状態の経過を観察する。
- 8) 本臨床研究終了後、患者のフォローアップとして九州大学病院において投与後60ヶ月まで追跡調査を行う。

## (2) 被験者の選定基準及び除外基準

選定基準：以下の条件を満たす患者を対象とする。

閉塞性動脈硬化症あるいは閉塞性血栓性血管炎 [Fontaine III 度あるいは IV 度 (Rutherford 慢性虚血肢重症度分類 III 度 6 群を除く)] 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、2 週間の継続した薬物療法で症状の改善が見られない患者、かつ 40 歳以上の症例。

選定根拠：

- ①適応疾患：閉塞性動脈硬化症、閉塞性血栓性血管炎 (バージャー病)

Fontaine III 度～IV 度は他に確立された治療法がなく、またこれまでの国内外の成績から血管新生療法の効果が期待できる。ただし、Fontaine IV 度であっても広範な組織喪失がみられ、本治療が適用されないと考えられる Rutherford 慢性虚血肢重症度分類 III 度 6 群を除くこととした。

- ②性別：男性及び女性 (妊娠中及び妊娠の可能性のある女性は除く)

性別による血管新生療法の効果の差異は報告されていないが、遺伝子治療は子孫への影響と安全性が確立していないため、妊娠中及び妊娠が疑われる女性は除く (除外項目 13)。

- ③年齢：40 歳以上

遺伝子治療は子孫への影響と安全性が確立していないため予期せぬ副作用を起こす可能性がある 40 歳未満の若年者は除く。

- ④対象：大腿動脈以下の血行再建術の適応がなく、2 週間の継続した薬物療法で症状の改善が見られない患者

遺伝子治療の性質に鑑み、代替医療が無く、かつ厚生労働省、文部科学省のガイドラインを満たす患者を選定する。

候補対象患者は治療前検査データを基に九州大学病院内に設置する九州大学病院先進医療適応評価委員会にて適応を評価する。

除外項目：

以下に適合する患者は今回の臨床研究の対象としない。

- 1) 重篤なアレルギーを有する、あるいは既往のある患者
- 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
- 3) 糖尿病性網膜症患者
- 4) 慢性人工透析を受けている患者
- 5) 重症の心機能障害、心不全を有する患者 (例：左室駆出率 < 40% など)
- 6) 重篤な肝機能障害、肝硬変を有する患者  
(例：AST > 50U/L、ALT > 50U/L、ICG 15 分値 20% 以上など)
- 7) 腎機能障害を有する患者 (例：血清 Cr > 2.0mg/dl、CCr < 40ml/min)
- 8) 活動性の炎症性疾患 (活動期の膠原病、慢性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、敗血症など) を有する患者
- 9) 過去 5 年以内に悪性腫瘍の摘出手術を受けた患者
- 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
- 11) 血液疾患を有する患者 (例：重度の貧血 Hb < 10g/dl、白血病、再生不良性貧血など)
- 12) アルコール依存、薬物依存症患者
- 13) 妊娠中の女性、あるいは妊娠が疑われる女性患者
- 14) その他、本臨床研究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 (あるいは親族) の文書による同意が得られない患者など、九州大学病院先進医療適応評価委員会が不相当と見なした患者

(注 1) 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壊疽の患者は本臨床研究から除外する。但し他臓器合併症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。

(注2) 項目8)において、感染が潰瘍部に限局している場合、また下肢に広範囲の感染を認めるものの、抗生剤投与などにより感染がコントロールでき、さらに本人および家族(あるいは親族)に臨床研究参加の強い要望がある場合、感染拡大の危険性について十分なインフォームド・コンセントを行った上で、厳重な管理のもとで本研究の対象とする。

<患者選定に必要な検査項目(治療前4日までに施行)>

1) 外表所見:

虚血性潰瘍は写真撮影する。部位・深さ・壊死の形状を記録する。

潰瘍の大きさは、(長径) x (短径) で評価する。なお、趾間などの測定不能部位では、表面積を概算する。潰瘍の深さは下記の基準でスコア化する。

1 = 表在欠損; 2 = 皮下組織に達する; 3 = 腱もしくは骨の露出;

4 = 腱もしくは骨の壊死

注) 虚血性潰瘍を有する患者は、潰瘍部のぬぐい液を用いた細菌感染の有無の確認、さらに潰瘍部に細菌感染が検出された場合は血液培養を実施し全身性炎症性疾患の有無を確認する。

2) 現病歴・既往歴の問診:

特に以下の項目について、十分な問診を行う。

- (1) アレルギー歴(例: 喘息重積発作やアナフィラキシーなどの既往の有無)
- (2) 手術歴(例: 悪性腫瘍の摘出手術の有無)
- (3) 既往歴(例: 心不全、脳梗塞、血液疾患などの既往の有無)
- (4) 常用薬(例: 向精神薬などの常習性の有無)
- (5) 喫煙歴
- (6) 併存疾患

3) 病状に対する検査

以下の検査を、確定診断と臨床病期確定のために行う。

- (1) 仰臥位での ABPI (ankle-brachial pressure index)  
(足関節以下の閉塞などの場合、必ずしも ABPI の低下は見られない患者も存在することが想定されることから、本検査の結果は参考として取り扱い、患者選定の条件とはしない)
- (2) 仰臥位での TPI (toe pressure index)
- (3) 仰臥位での AP (ankle pressure)
- (4) PVR (趾尖脈波)
- (5) サーモグラフィー
- (6) レーザードップラー血流測定
- (7) 血管造影 (IA-DSA)
- (8) 疼痛の程度 (問診)
- (9) QOL 調査
- (10) トレッドミル運動負荷試験 (可能な場合)

4) 全身状態検索のための検査

- (1) バイタルサイン:  
体重、体温、血圧 (収縮期/拡張期)、脈拍
- (2) 呼吸機能検査:  
胸部 X 線 (正、横)、生理機能 (肺活量、1 秒率)
- (3) 心機能検査:  
12 誘導心電図、心エコー (左室駆出率、壁運動等)、  
ジピリダモール負荷心筋シンチグラム
- (4) 腎機能検査:  
BUN、クレアチニン、クレアチニンクリアランス、尿蛋白、尿潜血
- (5) 肝機能検査:  
アルブミン、総ビリルビン、直接ビリルビン、AST、ALT、アルカリフォスファターゼ、LDH、 $\gamma$ -GTP、ICG 15 分値  
肝炎ウイルス検査 (HBs 抗原、HCV 抗体)

(6) 血液・凝固系:

赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球数、白血球分画、  
血小板数、血小板凝集能、PT、APTT、FDP、プラスミノゲンアクチベ  
ーター、アンチトロンビン III、プロテイン C 活性、プロテイン S 活性、  
フィブリノーゲン

(7) 筋融解・炎症マーカー:

CPK、CPK アイソザイム、CRP

(8) 糖尿病関連検査

空腹時血糖、HbA1c、眼底検査

(9) 血液電解質:

Na、K、Cl、Ca

(10) 悪性腫瘍スクリーニング検査

a) 全身 PET

b) 頭部・胸部・腹部 CT

c) 血清 PSA-ACT (男性のみ)

d) 便潜血

e) 直腸診

f) 上部消化管内視鏡

g) 子宮頸部細胞診 (女性のみ)

(11) 妊娠検査 (女性のみ)

尿中 HCG

(12) HIV 否定検査

なお被験者の負担軽減のため、除外項目判定のための以下の検査については、同意日以前3ヶ月以内に実施された検査結果を用いることができることとする。九州大学病院以外の施設で実施された検査については、撮影フィルムおよび検査報告書のコピーを入手し、カルテ並びに臨床研究記録に保存するものとする。

(1) 全身 PET

(2) 頭部・胸部・腹部 CT

(3) 眼底検査

(4) 上部消化管内視鏡

(5) ジピリダモール負荷心筋シンチ

(6) クレアチニン・クリアランス

(7) ICG15 分値

(8) 子宮頸部細胞診

(3) 被験者の同意の取得方法

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、本臨床研究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被験者及び家族 (あるいは親族) に対して行い、十分な理解を得た上で自由な意思によって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。

同意の取得は患者登録時、および全身検索が終了し、九州大学病院先進医療適応評価委員会が適応有と判定した後の、計2度行う。

また、同意に関連し得る新たな重要な情報を入手した場合は、その情報を被験者及び家族 (あるいは親族) に伝え、継続して参加するか否かについて被験者の意思を確認する。

(4) 実施期間及び目標症例数

研究実施期間 承認時より36ヶ月

各症例の研究実施期間: 遺伝子導入後6ヶ月

(本臨床研究の効能・安全性は全症例への投与終了後、6ヶ月の観察を以て判定される)

追跡調査期間: 遺伝子導入後60ヶ月

(本臨床研究は上記のごとく全症例への投与終了後6ヶ月のデータにて判定される。しかしながら、本臨床研究において使用される組換えセンダイウイルスベクターの人体への投与は世界で初めてであることを