

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 申 請 書

平成26年 7月23日

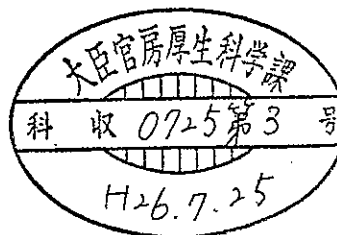
厚生労働大臣 殿

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)



別紙様式第1の添付

遺伝子治療臨床研究 実施計画 概要書

平成26年7月23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 (印)	
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	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
	ト部匡司	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	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 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

	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 (印)
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、進行したパーキンソン病患者の被殻に、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 疾患およびその 選定理由	(1) パーキンソン病の現状と遺伝子治療臨床研究を選定する理由 ① パーキンソン病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 歳で発症し、10 年前後で臥床状態となる進行性神経変性疾患である。パーキンソン病は、線条体に投射する黒質ドパミン合成ニューロンが脱落する結果、線条体のドパミンが欠乏して発症すると考えられている。パーキンソン病に対しては薬物療法や深部脳電気刺激療法など、複数の治療法があるが、いずれも問題を有している。治療の主流となる薬物療法では、長期投与により①効果が減弱し、②wearing-off 現象、on-off 現象、ジスキネジアが出現、③幻覚や妄想が現れるようになり、これらは線条体におけるド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。一方、深部脳電気刺激療法は進行して L-dopa の効果が無くなった症例には無効である。そのため新規治療法の開発が望まれている。 ② 当該遺伝子治療臨床研究の概要 AADC 遺伝子を搭載した AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を進行したパーキンソン病患者の被殻に定位脳手術的に注入する。AADC は L-dopa をドパミンに変換する酵素であり、L-dopa の服用でドパミン産生が増加し、症状の改善が期待できる。仮に AADC が過剰に発現した場合には L-dopa 服用量を減らすことでジスキネジアを予防できる。 ③ 他の治療法との比較および遺伝子治療を選択した理由 a. ドパミン産生細胞の移植 ドパミン産生細胞を被殻に移植する治療法で、これまで自家副腎髄質細胞、交感神経節細胞の移植が行われてきたが、効果は不十分である。近年、米国においてパーキンソン病患者の両側被殻に中絶胎児の黒質ドパミン細胞を移植する二重盲検試験が実施された。治療 1 年後、一部の症例で運動症状の多少の改善が認められたが、全体としては偽手術より有意な改善が得られなかった。また、多くの症例でジスキネジアが出現した。この治療では、患者 1 人当たり胎児 4 人分のドパミン細胞が必要であり、さらに移植細胞の生着のために免疫抑制剤を使用した場合、免疫能力の低下に起因する様々な合併症の危険が考えられる。また本邦で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、この治療法を実施することは困難である。 b. 幹細胞治療 幹細胞は適切な条件下で神経細胞を含む種々の細胞に分化させることができ、これをパーキンソン病の移植治療に用いる研究がなされている。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、ドナー細胞の腫瘍化を阻止するにはどうすればよいのか、ヒト ES 細胞の利用に際しては、倫理面も含め実用化の前に解決すべき問題が多い。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が、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や、患者自身の細胞を使用した場合、脆弱性が存続する可能性がある。本来黒質に存在するドパミン神経細胞を被殻に移植する場合は、異所性の移植になる。

	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。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。 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。 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。 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。
6 遺伝子の種類及びその導入方法	(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質 ① 人に導入する遺伝子の構造 ヒト AADC 遺伝子は第7染色体上に位置する 85,000 塩基対以上におよぶ大きな DNA で、メッセンジャーRNA に対応する 15 のエクソンからなり、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。本臨床研究ではメッセンジャーRNA から逆転写で合成されたヒト AADC の相補的 DNA を治療遺伝子として用いる。 ② 人に導入する遺伝子の性質 2 型 AAV 由来のベクターに神経細胞で安定に遺伝子を発現するサイトメガロウイルス由来のプロモーター配列を組み込み、その下流に配置した AADC 遺伝子を発現させる。導入遺伝子が AAV ベクターにより染色体に組み込まれる可能性は極めて低く、導入遺伝子は基本的に染色体外に存在すると考えられている。AAV ベクター内では導入遺伝子は一本鎖 DNA であるが、細胞内で二本鎖 DNA に変換され導入遺伝子が発現する。ラットでは、この AAV ベクターによる発現は 1 年以上持続することが示唆され、サルにおいても遺伝子導入の効果が 3 年以上持続することが示されている。さらに米国で実施された neurturin 遺伝子治療の臨床試験に剖検例では、4 年後にも neurturin 遺伝子の発現が確認されている。 ③ 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性 AADC は 53.9kDa の二量体として存在し、ドパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の合成に関わっている。この酵素は、チロシン水酸化酵素により生合成された L-dopa の脱炭酸によりドパミンを合成する。本臨床研究では、経口投与する L-dopa の投与量を調節することにより、AADC によるドパミンの合成量を制御することが可能である。また、AADC はトリプトファン水酸化酵素により生合成された 5-HTP (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ブ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 (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。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。 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、0.22µm 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、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。

	⑧ がん原性の有無 元来、非常に高率（～80％）に肝細胞癌を生じるマウスに AAV ベクターを投与した際に、肝細胞癌の発生率が上昇したという報告があるが、通常の動物では癌原性はほとんどないと考えられる。 (2) 遺伝子産物の安全性 AADC は正常でも線条体内のドパミンニューロン終末に存在する酵素である。この酵素は L-dopa をドパミンに変換する働きを有するので、原料である L-dopa の供給がなくてはドパミンを産生することはできない。したがって本臨床研究では、L-dopa の投与量を調節することで線条体内のドパミン濃度が過剰とならないように制御することが可能であり、遺伝子発現における安全性は高いと考えられる。また、ドパミンの他に AADC により 5-HTP を基質としてセロトニンが生成されるが、内因性の 5-HTP は少量であり、AADC の過剰発現が起こっても生成されるセロトニンの量は生理的範囲内であると予想されるため、これによる副反応は生じないと考えられる。 (3) 細胞の安全性 ① 培養細胞の純度 293T/17 細胞はタカラバイオ社の 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。 ② 細胞の遺伝子型、表現型の安定性 複数の細胞内酵素 (Nucleoside phosphorylase (NP), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Malate dehydrogenase (MD), Aspartate aminotransferase (AST)) の発現パターンを電気泳動法によって比較し、他種の細胞の混入の有無をテストし、混入を認めないことを確認している。また実際のベクター作製には 293T/17 ワーキングセルバンクを用いており、表現型が安定している細胞をベクター作製に使用している。 ③ 被検者に投与する細胞の安全性 被験者には細胞成分を投与することはない。
8 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	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。 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。
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。 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 注入療法的安全性である。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。

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 3×10^{11} vg とし、第2群では 9×10^{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。

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 DAT scan、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シ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DAT scan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が完全に否定することは出来ない。患者を注意深く観察することによって合併症の発生をいち早く察知し、適切な処置をとる。

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

AAVベクターが患者細胞の染色体に組み込まれる可能性は否定できないが、その確率は著しく低いものと推定される。万一、このような事態が生じた場合に最も懸念されるのは、発癌の危険性が高まることである。身体所見及び画像診断などを通じて、早期発見に努める。またベクターDNAが生殖細胞に組み込まれることは考えにくい、その可能性を完全に否定することはできない。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、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。 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。 ⑤ 症例記録に関する記録用紙等の様式 本臨床研究の記録に関する様式（症例報告書）は、別に定める。 ⑥ 記録の保存および成績の公表の方法 本臨床研究に関連した記録は、自治医科大学付属病院において、研究の中止もしくは終了の後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。
備考	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。 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。

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 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

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. 被験者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. 途中でやめたいと思ったら.....	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願いすること.....	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。

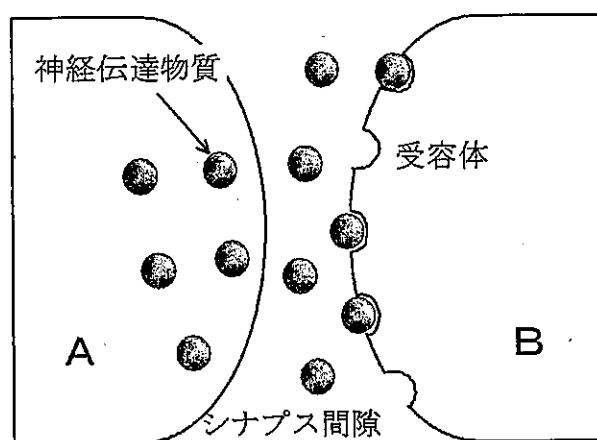


図1 神経細胞間の情報の伝達

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^{かんげき}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。

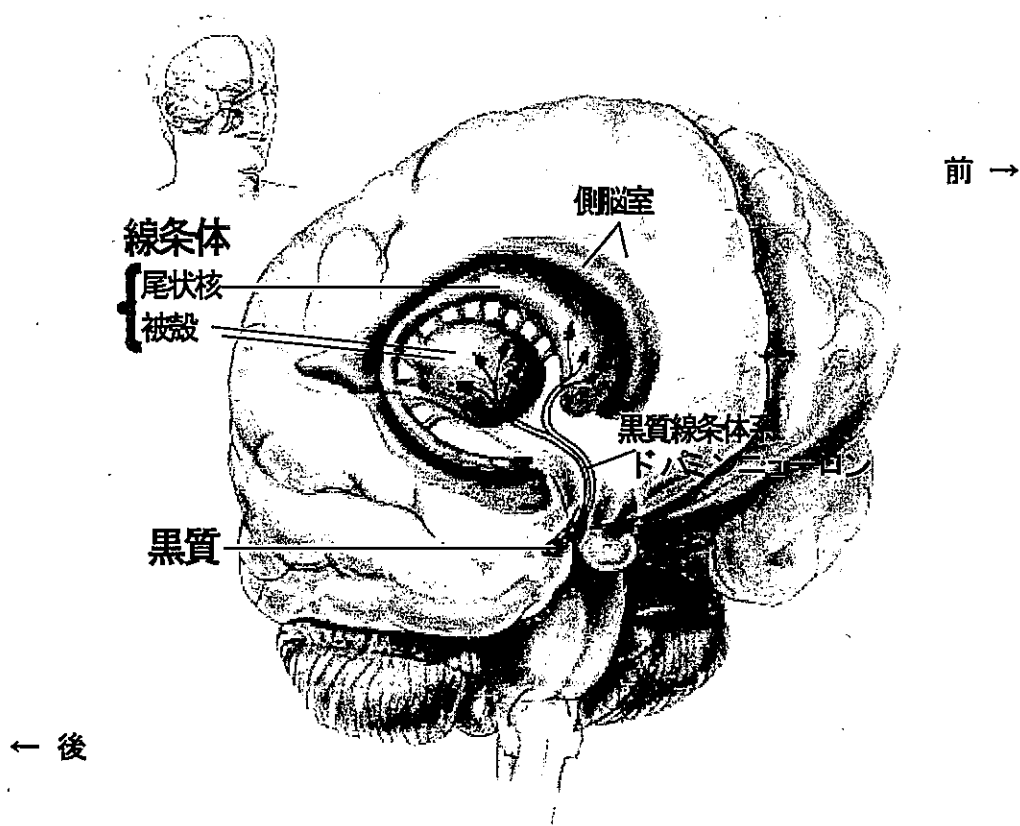


図2 脳内の黒質と線条体の位置

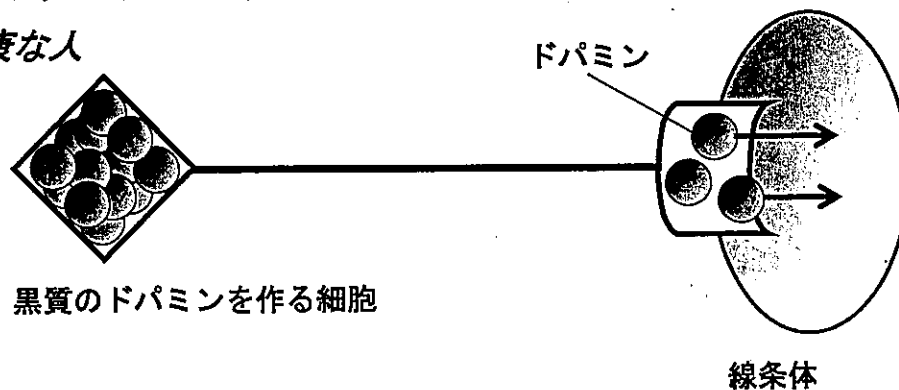
中脳に在る黒質の神経細胞からは突起が線条体に伸びています。この突起でドパミンが合成されて線条体に放出されることによって運動がなめらかに行われます。

4. パーキンソン病の治療法と問題点

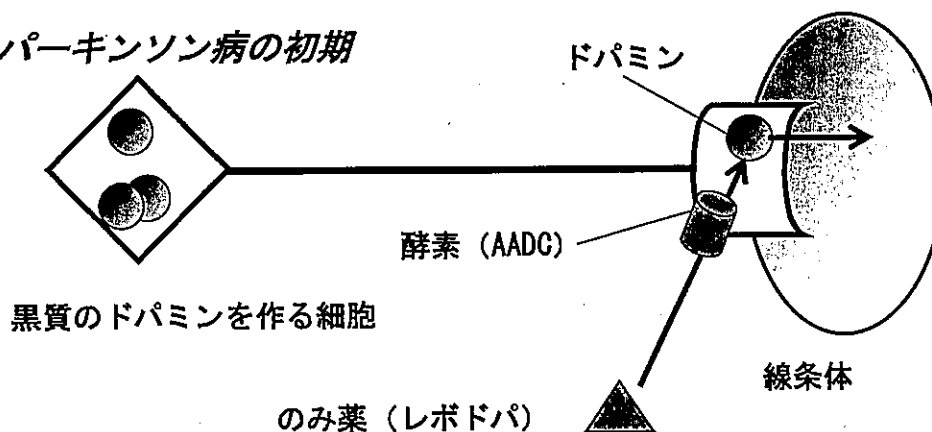
基本はお薬による治療です。しかし病気を根本的に治療する「原因療法」ではありません。不足したドパミンをお薬で補って症状を緩和する「補充療法」です。お薬の中で最も強力なのがレボドパです。ドパミンをのんでも脳に到達しないため、ドパミンの原料であるレボドパを使います。レボドパは線条体の中で芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の働きによってドパミンに変わります (図3A)。

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

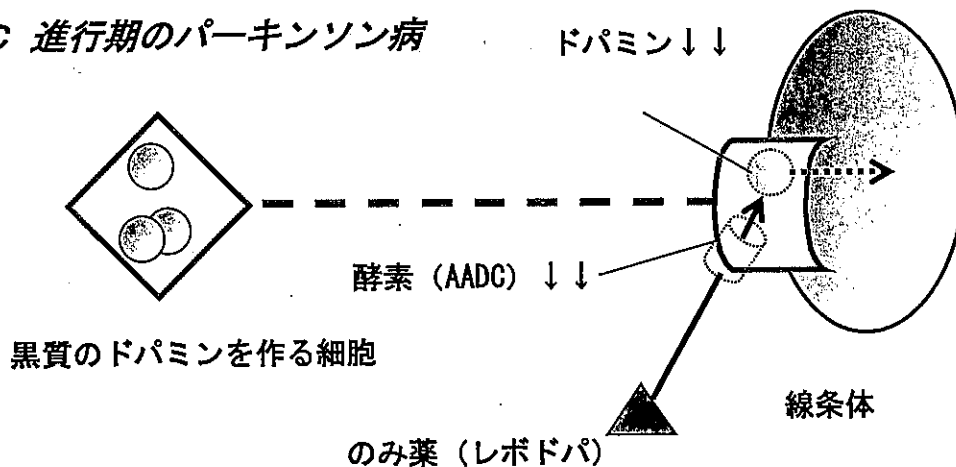


図3 パーキンソン病の病期による違い

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。

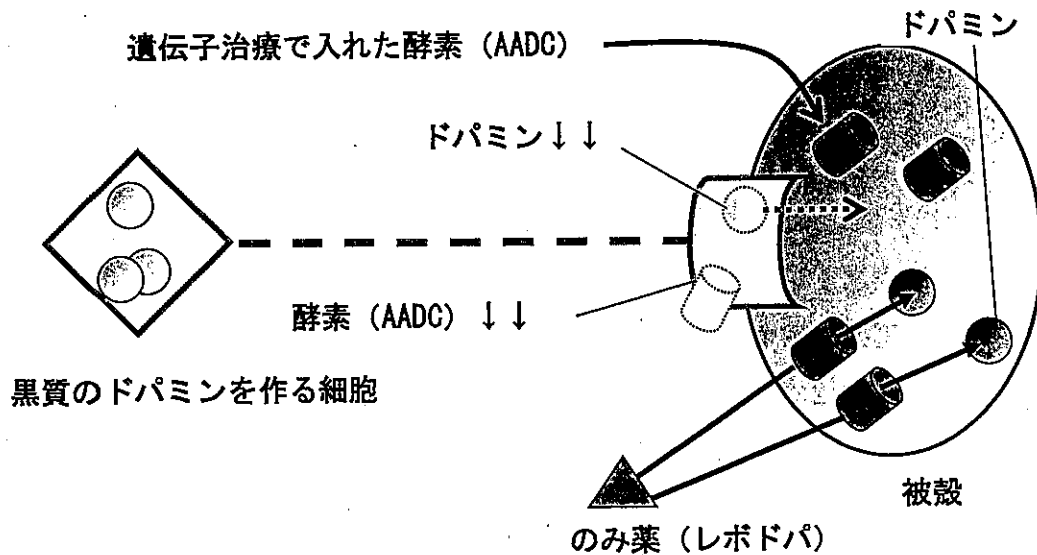


図4 この治療法の模式図

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によって発病します。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。

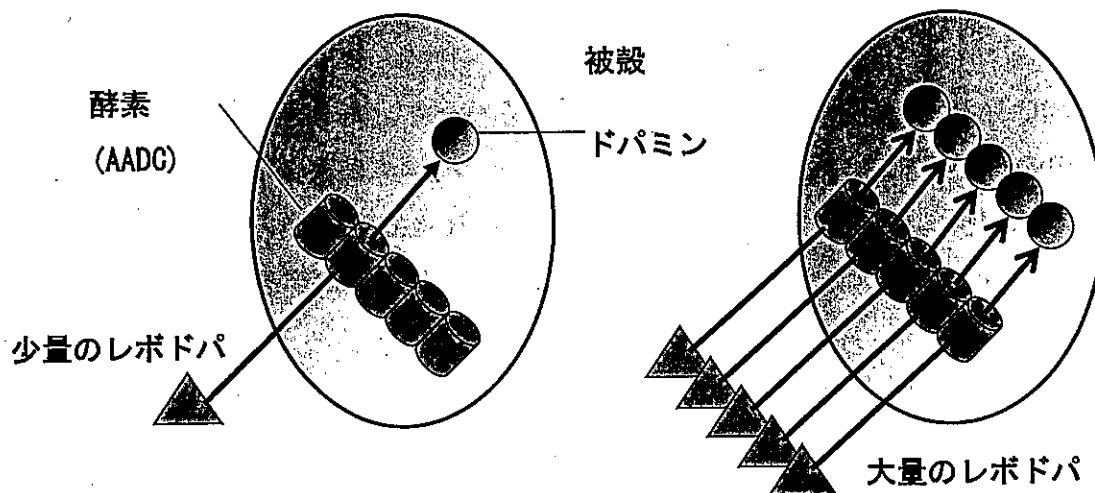


図5 作られるドパミンの量の調節

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、自分の意志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でタカラバイオ株式会社（以下、「タカラバイオ」という）との共同研究に基づいて当院で行います。

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ひとつで、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）。

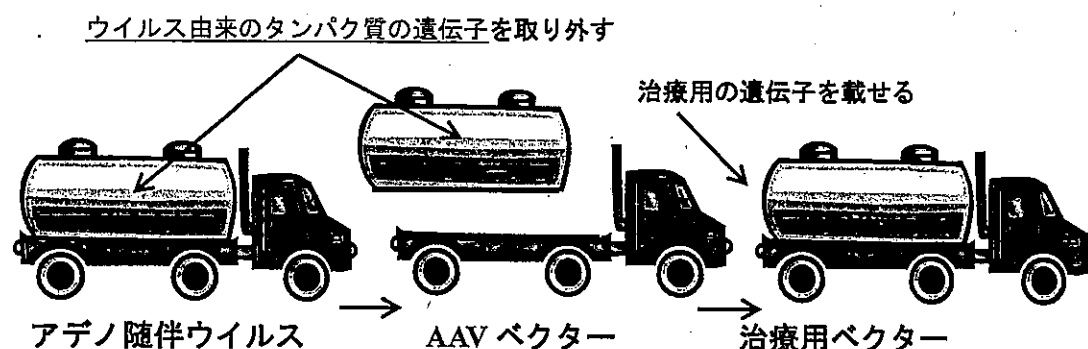


図6 治療用ベクターの構造

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1.2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 EIAV 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、他の臨床試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適当と判断した方。

これらの条件に当てはまるかどうかの判断には、高度の医学的知識が必要なことが含まれています。あなた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)

	スクリーニング	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
	8週以前	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
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スキャン DATスキャン		○																	
頭部MRI		○			○		○												
頭部CT			○ (直後)	○															

PCR検査は血液、尿、便の中にウイルススペ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）。

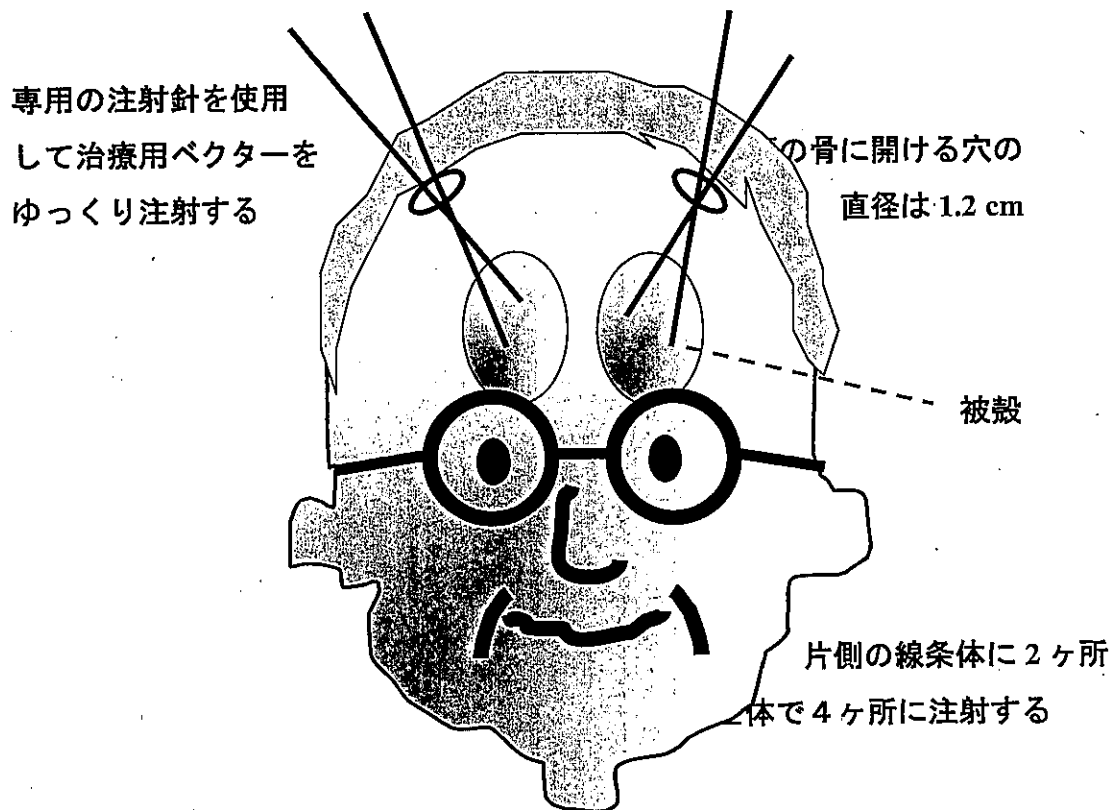


図7 治療用ベクターの注射

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 ヶ所につき最大 50 μ l (1 ml の 1/20 の量) から 200 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 50 分かかります。計 4 ヶ所に注射するのに 3 時間 20 分かかることになります。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^{12} 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は異なり，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，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す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すが、出された場合にそのベクターが他人に感染する可能性がないとはいえません。このような事情から治療の後一定の期間（2週間を予定しています）は外出や退院を控えていただき、その間あなたの尿・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人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人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. 途中でやめなくなったら

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なくなったら、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。

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。

1.5. 臨床研究の成績の使用と公表について

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

当院の倫理委員会における審査や国の審議会における審査の過程において、厚生労働省の担当官および審議会の委員が、あなたの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：自治医科大学付属病院医事課

(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、自治医科大学付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。

1 7. 臨床研究に参加するために必要な費用について

臨床研究には、健康保険等の公的な医療保険は適用されません。その代わり、臨床研究に参加するために必要な経費、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。

1 8. 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。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	非常勤医員

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

この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志により、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 | ☐ 臨床研究とは |
| ☐ パーキンソン病とドパミン | ☐ パーキンソン病の治療法と問題点 |
| ☐ この臨床研究の概要について | ☐ AAV ベクターとは |
| ☐ 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 | ☐ 臨床研究の具体的な方法 |
| ☐ 参加できる人、できない人 | ☐ 臨床研究のスケジュール（表） |
| ☐ 被殻への治療用ベクターの注射 | ☐ 期待される効果 |
| ☐ 予想される危険性および副作用 | ☐ 臨床研究への参加予定期間、参加患者数 |
| ☐ 臨床研究の参加をことわったら | ☐ 途中でやめなくなったら |
| ☐ 健康被害の治療とその医療費に関して | ☐ 新たな情報のお知らせについて |
| ☐ あなたの個人情報の保護について | ☐ 臨床研究の成績の使用と公表について |
| ☐ 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ために必要な費用について |
| ☐ 臨床研究に参加する間にお願いすること | ☐ 緊急連絡先およびお問い合わせ先について |
| ☐ 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 | ☐ 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志により、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

「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志により、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

□途中でやめたいとなったら

□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、自らの自由意志により、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、自らの自由意志により、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、自らの自由意志により、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 _____

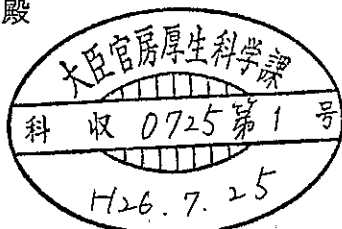
研究担当者氏名 _____ 印

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 3311-1

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。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	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)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	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、スクリュ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3μl/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。

「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ブ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, 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℃ 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、充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。

(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。

(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 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 : Sanfner, 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・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, 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い、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が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には知られていない。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に感染しないかぎり、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, 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	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTT	60
	left ITR 領域	
61	GGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT	120
121	AGGGGTTCCTGCGGCCGCACGCGTCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG	180
	CMV promoter	
181	TTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT	240
241	GACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC	300
301	CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG	360
361	CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT	420
421	GGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA	480
481	TCTAGTATTAGTCATCGCTATTACCATTGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG	540
541	TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAG	600
601	TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT	660
661	GACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGT	720
721	GAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCG	780
781	GGACCGATCCAGCCTCCGCGGATTTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGA	840
	β-globin intron	
841	TTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAAATG	900
901	CTTCTCTCTTTAATATACTTTTTTGTATTATCTTATTTCTAATACTTCCCTAATCTCTT	960
961	TCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAAC	1020
1021	AGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATAT	1080
1081	AAATTGTAAGTGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAT	1140
1141	TCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTT	1200
1201	TTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTC	1260
1261	TGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTTCGAACATCGATTGAATTCCCCG	1320
1321	GGGATCCACCATGAACGCAAGTGAATTCCGAAGGAGAGGGAAGGAGATGGTGGATTACGT	1380
	ヒト AADC	
1381	GGCCAACTACATGGAAGGCATTGAGGGACGCCAGGTCTACCCTGACGTGGAGCCCGGGTA	1440
1441	CCTGCGGCCGCTGATCCCTGCCGCTGCCCTCAGGAGCCAGACACGTTTGAGGACATCAT	1500
1501	CAACGACGTTGAGAAGATAATCATGCCTGGGGTGACGCACTGGCACAGCCCCTACTTCTT	1560

1561	CGCCTACTTCCCCACTGCCAGCTCGTACCCGGCCATGCTTGCGGACATGCTGTGCGGGGC	1620
1621	CATTGGCTGCATCGGCTTCTCCTGGGCGGCAAGCCCAGCATGCACAGAGCTGGAGACTGT	1680
1681	GATGATGGACTGGCTCGGGAAGATGCTGGAAGTACCAAAGGCATTTTTGAATGAGAAAGC	1740
1741	TGGAGAAGGGGGAGGAGTGATCCAGGGAAGTGCCAGTGAAGCCACCCTGGTGGCCCTGCT	1800
1801	GGCCGCTCGGACCAAAGTGATCCATCGGCTGCAGGCAGCGTCCCCAGAGCTCACACAGGC	1860
1861	CGCTATCATGGAGAAGCTGGTGGCTTACTCATCCGATCAGGCACACTCCTCAGTGGAAAG	1920
1921	AGCTGGGTTAATTGGTGGAGTGAAATTAAGGCCATCCCCTCAGATGGCAACTTCGCCAT	1980
1981	GCGTGCCTCTGCCCTGCAGGAAGCCCTGGAGAGAGACAAAGCGGCTGGCCTGATTCTTTT	2040
2041	CTTTATGGTTGCCACCCTGGGGACCACAACATGCTGCTCCTTTGACAATCTCTTAGAAGT	2100
2101	CGGTCCTATCTGCAACAAGGAAGACATATGGCTGCACGTTGATGCAGCCTACGCAGGCAG	2160
2161	TGCATTCTCTGCCCTGAGTTCCGGCACCTTCTGAATGGAGTGGAGTTTGCAGATTCATT	2220
2221	CAACTTTAATCCCCACAAATGGCTATTGGTGAATTTTGAAGTGTCTGCCATGTGGGTGAA	2280
2281	AAAGAGAACAGACTTAACGGGAGCCTTTAGACTGGACCCCACTTACCTGAAGCACAGCCA	2340
2341	TCAGGATTCAGGGCTTATCACTGACTACCGGCATTGGCAGATACCACTGGGCAGAAGATT	2400
2401	TCGCTCTTTGAAAATGTGGTTTGTATTTAGGATGTATGGAGTCAAAGGACTGCAGGCTTA	2460
2461	TATCCGCAAGCATGTCCAGCTGTCCCATGAGTTTGAGTCACTGGTGCGCCAGGATCCCCG	2520
2521	CTTTGAAATCTGTGTGGAAGTCATTCTGGGGCTTGTCTGCTTTTCGGCTAAAGGGTTCCAA	2580
2581	CAAAGTGAATGAAGCTCTTCTGCAAAGAATAAACAGTGCCAAAAAATCCACTTGGTTCC	2640
2641	ATGTCACCTCAGGGACAAGTTTGTCTGCGCTTTGCCATCTGTTCTCGCACGGTGAATC	2700
2701	TGCCCATGTGCAGCGGGCCTGGGAACACATCAAAGAGCTGGCGGCCGACGTGCTGCGAGC	2760
2761	AGAGAGGGAGTAGGAGTGAAGCCAGGACCTGCAGAAGCTTGCCCTCGAGCAGCGCTGCTCG	2820
2821	AGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGT	2880
2881	TGCCACTCCAGTGCCCAACAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGA	2940
2941	CTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGT	3000
3001	TGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGC	3060
3061	ACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCC	3120
3121	TCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTG	3180

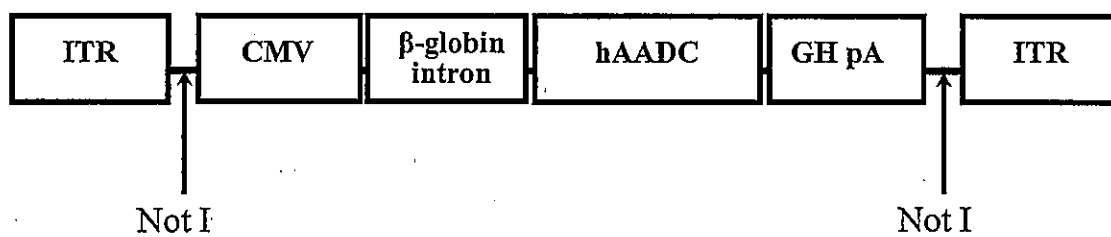
3181	GTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGAT	3240
3241	CTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCC	3300
3301	TGTCCTTCTGATTTTGTAGGTAACGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTT	3360
3361	GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCG	3420
3421	ACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG	3468

right ITR 領域

別紙2 hAADC のアミノ酸配列

MNASEFRRRGKEMVDYVANYMEGIEGRQVYPDVEPGYLRPLIPAAAPQEPDTFEDIINDVE
KIIMPGVTHWHSPYFFAYFPTASSYPAMLADMLCGAIGCIGFSWAASPACTELETVMMDWL
GKMLELPKAFLNEKAGEGGGVIQGSASEATLVALLAARTKVIHRLQAASPELTQAAMEKLV
AYSSDQAHSSVERAGLIGGVKLKAIPSDGNFAMRASALQEALERDKAAGLIPFFMVATLGTT
TCCSFDNLLEVGPICNKEDIWLHVDAAYAGSAFICPEFRHLNGVEFADSFNFNPHKWLLVN
FDCSAMWVKKRTDLTGAFRLDPTYLKHSHQDSGLITDYRHWQIPLGRRFRSLKMWVFVRM
YGVKGLQAYIRKHVQLSHEFESLVRQDPRFEICVEVILGLVCFRLKGSNKVNEALLQRINSA
KKIHLVPCHLRDKFVLRFAICSRTVESAHVQRAWEHKELAADVLRAERE

別紙3 AAV-hAADC-2 の構造



ITR: inverted terminal repeats

CMV: cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer

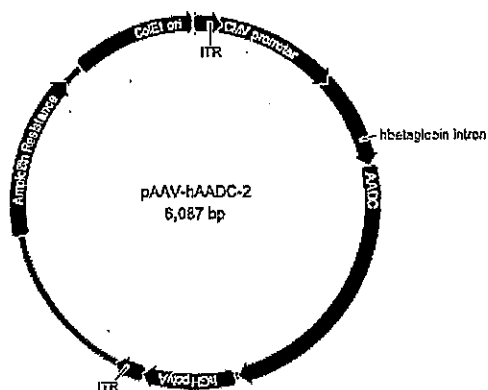
β -globin intron: human β -globin intron

hAADC: cDNA of human aromatic L-amino acid decarboxylase

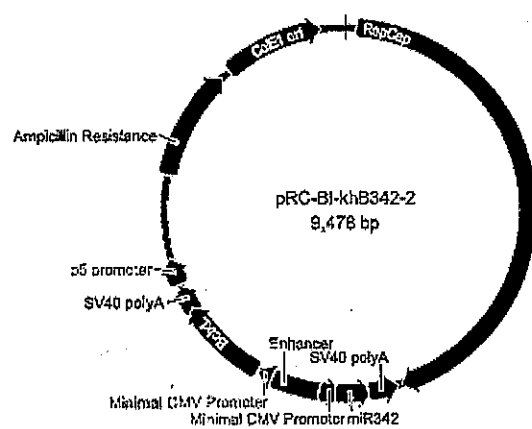
GH pA: human growth hormone polyadenylation signal

別紙4 プラスミドの構造

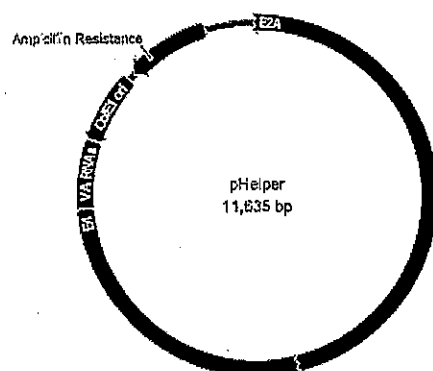
pAAV-hAADC-2



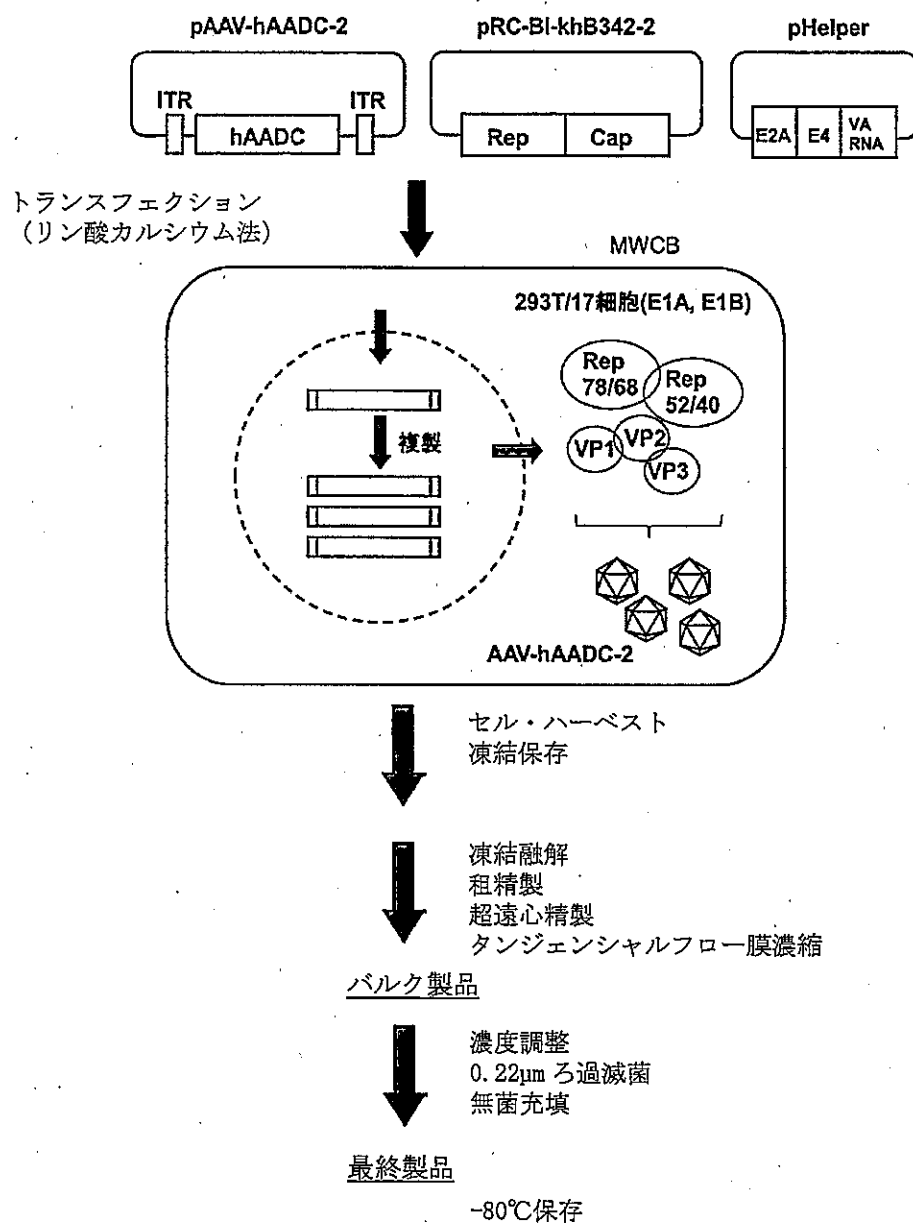
pRC-BI-khB342-2



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	$\leq 1.4 \mu\text{g/unit}$	
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	

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℃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、 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、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 α 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。

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 (トリパンプルー法)	>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（トリパンプルー法）	>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（トリパンプルー法）

MCB を融解後、トリパンプルー溶液で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（トリパンプルーで染まらない細胞）及び死細胞（トリパンプ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 破碎液を接種し、微好氣的条件下で 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：

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。

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。

I 自治医科大学医学部附属病院の周辺地図

図. 自治医科大学医学部附属病院の周辺地図
自治医科大学付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。

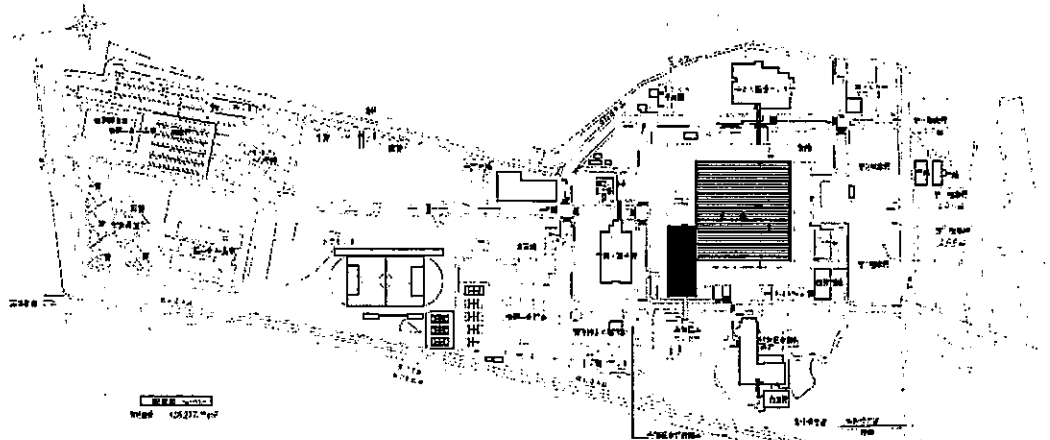


図. 自治医科大学構内敷地図

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。

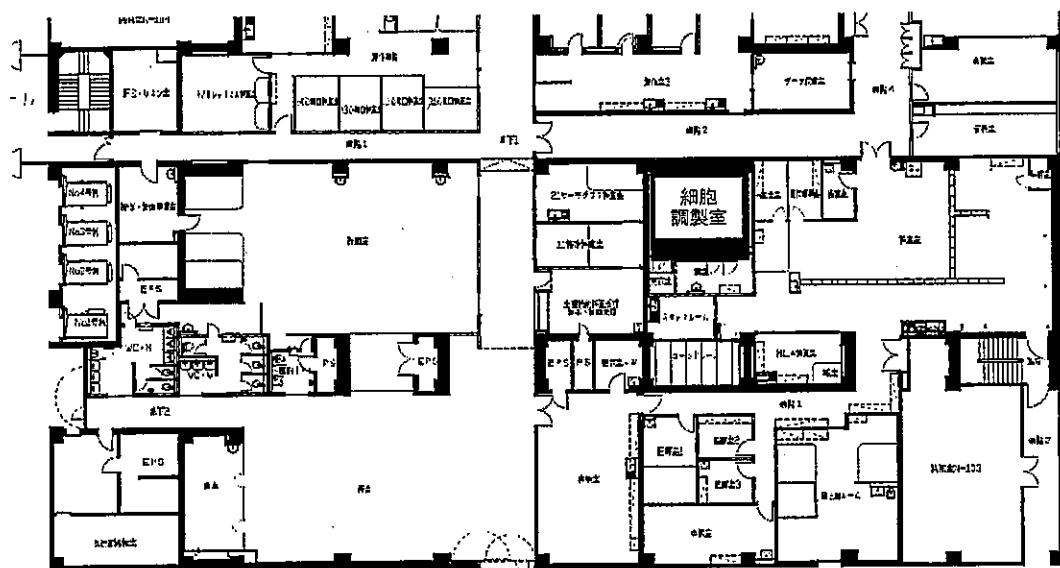


図. 自治医科大学付属病院本館 1 階輸血細胞移植部細胞調製室周辺の見取り図

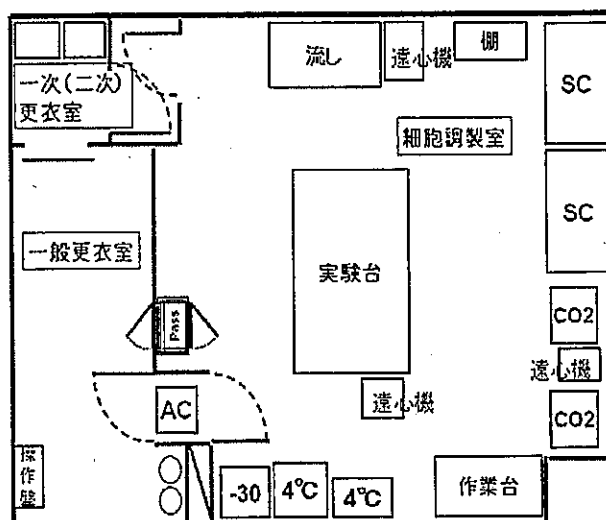


図. 細胞調製室の見取り図

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。

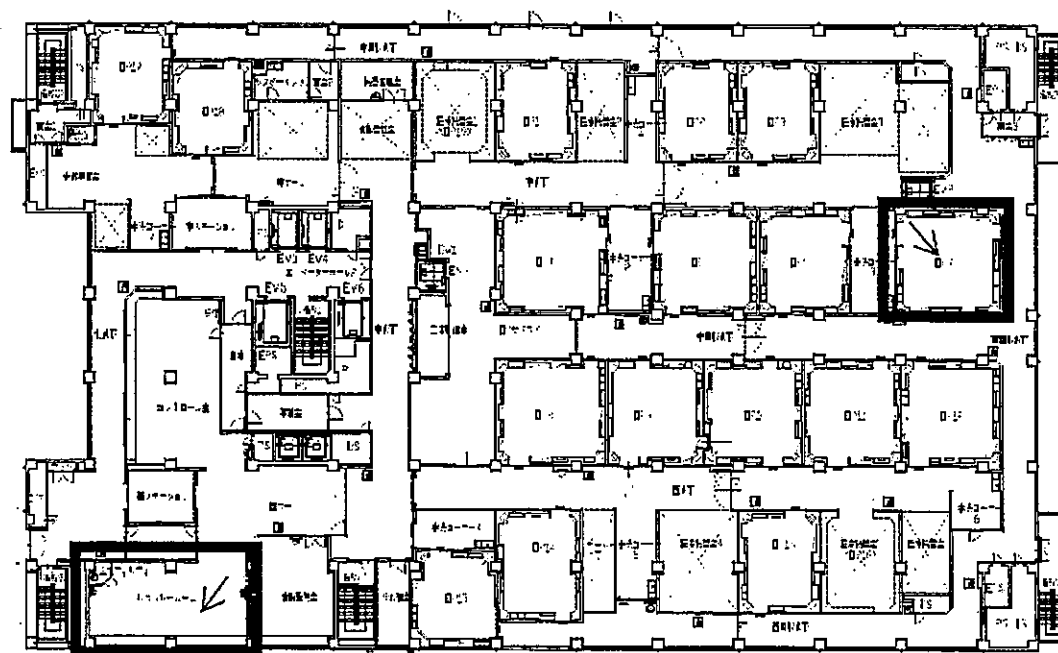


図. 自治医科大学医学部附属病院新館 3 階手術室及び回復室の見取り図
手術室を赤線枠で、患者を術後一次管理する回復室を青線枠で示す。

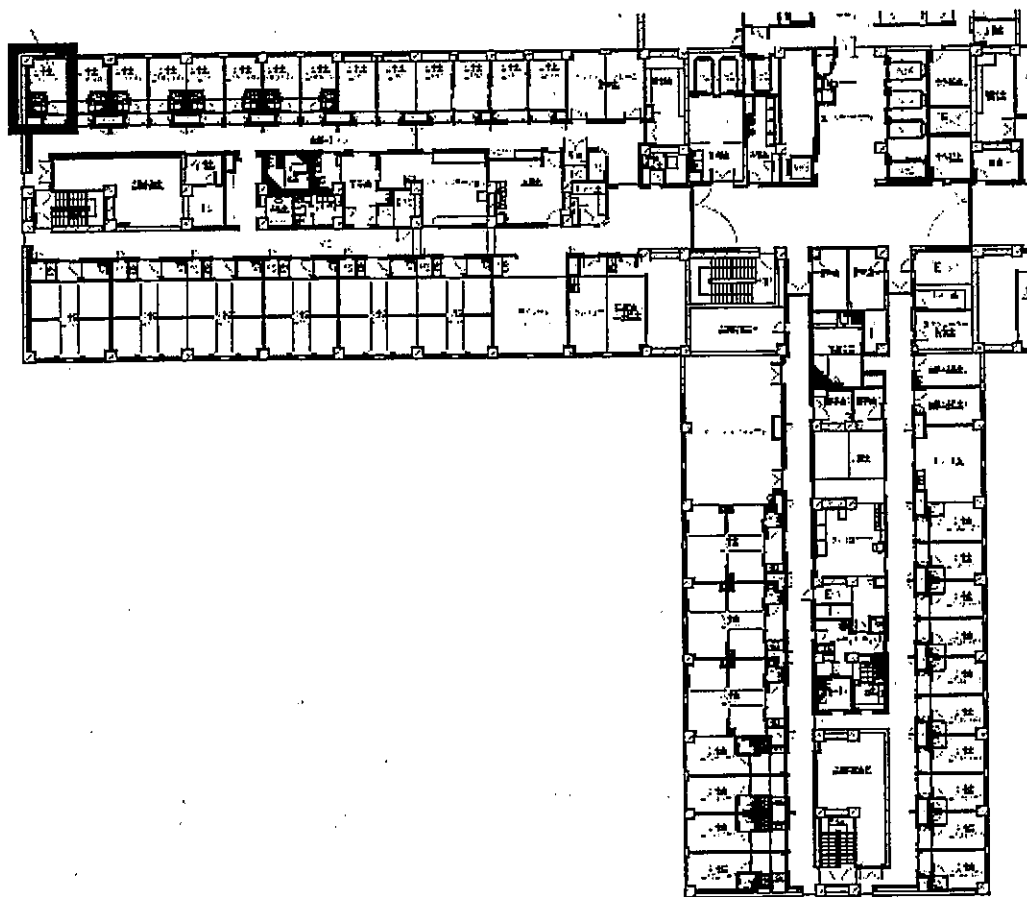


図. 自治医科大学医学部附属病院本館7階脳神経センター及び個室病室の見取り
図

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。