

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

AAVベクターを用いた進行期パーキンソン病  
遺伝子治療の臨床研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中 野 今 治

平成18 (2006) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

AAVベクターを用いた進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究-----	1
中野今治	

### II. 分担研究報告書

1. AAVベクターシステムの開発-----	14
小澤 敬也	
2. 重症パーキンソン病遺伝子治療に向けた定位的遺伝子導入法の研究----	17
一定位脳手術19例のまとめ	
加藤 正哉	
3. 6-FMT合成プロセス確立に関する研究-----	21
佐藤 俊彦	
4. パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床研究-----	25
村松慎一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	27
IV. 研究成果の刊行物・別冊-----	30

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）  
総括研究報告書

AAVベクターを用いた進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究

主任研究者 中野今治 自治医科大学医学部 教授

研究要旨

進行したパーキンソン病患者に対し、安全性の高いアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いて遺伝子治療臨床研究を実施することを目指してプロトコール（実施計画書や患者説明文書等）の作成と改訂を重ね、「AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」の名称にて自治医大 IRB での承認を受けた（2005 年 5 月 12 日）。同年 8 月 12 日には米国 Avigen 社と自治医科大学との間で、同社から自治医科大学に GMP レベルのベクター（hAAV-AADC-2）が供給されるとの条項を含むパーキンソン病遺伝子治療に関する臨床契約が締結された。これらを踏まえて、厚生労働省大臣官房厚生科学課に出向いて事前相談および e-mail での相談を行い、逐次プロトコールの改訂を行った。2006 年 2 月 1 日に開催された厚生科学審議会科学技術部会（中野が傍聴）にて、本臨床研究を審議するための作業委員会の設置が決定された。2006 年 3 月 20 日に開催された第 1 回パーキンソン病遺伝子治療作業委員会に中野、小澤、村松が出席して本臨床研究の骨子を説明し、委員から予め提示されていたコメントや委員会での質問に対して回答した。本臨床研究で使用する AAV ベクターに関しての生物多様性影響評価書、第一種使用規程承認申請書を作成して関係省庁に提出した。

$6\text{-}^{18}\text{FMT}$  を用いて PET 検査を行うと、パーキンソン病の診断が確実になり、かつ導入した aromatic l-amino acid decarboxylase (AADC) 遺伝子の発現を *in vivo* で観察できる。今回、この  $6\text{-}^{18}\text{FMT}$  の合成プロセスを確立した。その合成プロセスは、① $^{18}\text{O}$  ガスと  $\text{Ar}+\text{F}_2$  混合ガスへの 10 MeV の陽子線を順次照射による  $^{18}\text{F}$  ガスの製造、② $^{18}\text{F}$  ガスを酢酸ナトリウムカラムに通じる  $^{18}\text{F}$ -acetylhyposulfite の製造、③ $^{18}\text{F}$ -acetylhyposulfite と  $6\text{-}^{18}\text{FMT}$  前駆体の N-Trifluoroacetyl-5-acetoxy-2-trimethylstannyl-L-phenylalanine ethyl ester との反応とその後の臭化水素による加水分解、④高速液体クロマトグラフィーでの  $6\text{-}^{18}\text{FMT}$  分取である。このプロセスにより、 $6\text{-}^{18}\text{FMT}$  を合成できることが確認された。

ベクターは定位脳手術的に注入するため注入手技の検討を行い、当施設で行っている深部脳電気刺激療法の手技を応用できることが判明した。手術記録をもとに調査し

た結果、過去1年間に定位脳手術が行われたパーキンソン病 19 例において視床または視床下核の目標点 39 個所に達するための電極穿刺は 129 トラックであった。従来の MRI を用いた画像誘導法による手技では平均 3.3 回の穿刺で目標を捕らえることが可能で、出血などの合併症は認められなかった。この方法はパーキンソン病の遺伝子治療を行う際の脳内遺伝子導入にあたり、安全・確実に目的を達することができる手技であることが判明した。また、2005 年 7 月には、類似のプロトコールで先行して行われているカリフォルニア大学サンフランシスコ医療センターでの第 2 例目の治療に合わせて中野と村松が渡米し、実際的な注入手法を見学した。

本臨床研究で用いる手法を MPTP にて作成したパーキンソン病サルで追加実験し、本手法の安全性と有効性を追認した。さらに、パーキンソン病サルにおいて、 $[^{11}\text{C}]$ -L-DOPA を用いた PET にて AAV-AADC 注入側の線条体では注入 3 ヶ月後でも AADC が発現していることを観察し、臨床的効果は少なくとも 3 年間持続することを確認した。また、パーキンソン病モデルサルに対する本ベクターの線条体内注入に伴う免疫反応並びに AAV ベクターゲノムの全身的な分布についても検討した。その結果、ベクターキャプシドに対する抗体価は有意の変動を認めず、ベクター由来の配列は注入した部位及びその近傍の脳組織では検出されたが、それ以外の臓器においては見出されなかった。さらに、AAV ベクターの作製・精製法につき検討を加え、より高効率に純度の高いベクターを得る方法を見出した。

#### 分担研究者

小澤敬也

自治医科大学医学部  
教授

加藤正哉

自治医科大学医学部  
助教授

佐藤俊彦

宇都宮セントラルクリニック  
院長

#### 研究協力者

村松慎一

自治医科大学医学部  
助教授

#### A. 研究目的

1) 我が国では、人口の高齢化とともにパーキンソン病患者は確実に増加している。現在、L-DOPA に代表される薬物療法や、定位脳手術などの治療法があるが、いずれも本症の進行を阻止することはできず、新しい治療法の開発が切望されている。本研究は、

パーキンソン病の新しい治療法として、病原性を有さない AAV ベクターを用いた遺伝子治療の早期実用化を目的とする。

我々は、パーキンソン病モデルサル  
の被殻に tyrosine hydroxylase (TH : チロシンを L-DOPA に変換する)、aromatic l-amino acid decarboxylase (AADC : L-DOPA をドパミンに変換する)、GTP cyclohydrolase 1 (GCH : TH の補酵素である BH<sub>4</sub> の合成に関与する) の 3 遺伝子を同時注入し、パーキンソン病症状が長期に渡って明らかに改善し、かつ症候のおよび病理学的に安全であることを確認した。

我々が目指すパーキンソン病治療の最終目標は、ヒトにおいて上記 3 遺伝子の注入により安全確実にパーキンソン病を治療することである。しかしながら、パーキンソン病患者に対してこの 3 遺伝子を当初から同時注入するのは安全性確保の面で問題がある。そこで、今回は臨床研究の第一段階として AADC の遺伝子のみを被殻に注入し、経口投与した L-DOPA からドパミン合成する戦略をとり、その安全性・有効性の確認を行う。本法では、L-DOPA の投与量を調節することによりドパミン産生量をコントロールでき、ドパミンの過剰産生に伴うジスキネジアを阻止することができると考えられる。

この治療法の速やかな実用化のためには、今回予定している第 1 段階の臨

床研究を早期に開始し、症例データを蓄積する必要がある。この結果により、最終目標である 3 遺伝子注入療法の早期確立に大きく前進することが期待される。

2 ) 6-FMT(6-fluorometatyrosine) を用いて PET 検査を行うことによりパーキンソン病の診断がより確実になり、導入した遺伝子の発現を非侵襲的かつ経時的に観察することが可能となる。今回は、パーキンソン病の遺伝子治療対象患者のスクリーニングが可能な PET 用 RI 検査薬の 6-FMT の合成プロセスを確立することを目指す。特に、<sup>18</sup>F ガスの製造、<sup>18</sup>F ガスと反応前駆体との標識反応、この反応物からの 6-FMT 分離などの各プロセスの詳細条件を決定する。

3 ) 進行したパーキンソン病患者の線条体 (被殻) に、AAV-AADC を定位脳手術的に注入し、パーキンソン症状を改善するための新しい治療法を確立する為に、脳内への遺伝子導入を確実に行うことを目指す手術手技を、従来の手術法をもとに発案する。

4 ) パーキンソン病に対する AAV ベクターを用いた遺伝子治療法はサルモデルにおいて有効性が証明されたものの、線条体内注入に伴う免疫反応の程度や、注入したベクターの体内動態については明らかになっていない。また、現在用いているベクター作製・精製法は本格的な臨床応用には不向き

であり、更に高い効率・純度のベクターが要求される。これらの点を検討・改善し、臨床応用をより円滑に行うことを目標とする。

## B. 研究方法

1) パーキンソン病遺伝子治療の実施に向けて、実施計画書や患者説明文書等の作成と改訂を行い、まず、自治医大 IRB での承認を受ける。これと併行して、米国 Avigen 社と自治医科大学との間でパーキンソン病遺伝子治療に関する臨床契約を取り交わし、同社から自治医科大学への GMP レベルのベクター (hAAV-AADC-2) 供給を取り付ける。これらをもとに厚生労働省大臣官房厚生科学課に出向いて事前相談を行い、逐次プロトコルの改訂を行う。次いで、本臨床研究計画を厚生科学審議会科学技術部会に提出し、作業委員会の審議に付す。一方、本臨床研究で使用する AAV ベクターに関しての生物多様性影響評価書、第一種使用規程承認申請書を作成して関係省庁に提出する。以上の過程を経て、平成 17 年度中に臨床研究を開始することを目指す。

2) これまでの 6-<sup>18</sup>FMT 合成事例を文献調査し、今回使用する 10MeV 陽子線加速器で実施可能なプロセスを選定すると同時に、このプロセスの妥当性を実験的に検証する。

### ① <sup>18</sup>F ガスの製造

<sup>18</sup>O ガスへの陽子線照射により <sup>18</sup>F ガ

ス

を製造するが、その際の <sup>18</sup>O ガスの適正充填圧力と照射電流を決定する。また、<sup>18</sup>F ガスの大部分は <sup>18</sup>O ガスを充填した金属ターゲット内壁に吸着されるため、この吸着 <sup>18</sup>F の回収方法を検討する。

### ② <sup>18</sup>F-acetyl hypo fluorite の製造

ターゲットより回収した <sup>18</sup>F ガスを酢酸ナトリウムと反応させて <sup>18</sup>F-acetyl hypo fluorite を製造するが、カラム法により実証する。

### ③ 6-<sup>18</sup>FMT 標識反応

<sup>18</sup>F-acetyl hypo fluorite と反応前駆体との反応により <sup>18</sup>F をフェニル基の 6 位置に置換する。今回は、反応前駆体として N-trifluoroacetyl-5-acetoxy-2-trimethyl-stannyl-L-phenylalanine ethyl ester を使用し、置換反応を確認する。また、その後の加水分解に臭化水素を使用し、加水分解反応も確認する。

### ④ 高速液体クロマトグラフィーによる 6-<sup>18</sup>FMT の分取

加水分解反応後の反応液から高速液体クロマトグラフィーにより、6-<sup>18</sup>FMT が分取可能であることを確認する。

3) Wearing-off 等の進行したパーキンソン病の諸症状に対する視床下核(STN)脳深部刺激(DBS)や、一側に強い振戦に対する視床腹側中間核凝固は、症状の改善に劇的な効果があり、従来の薬物療法による治療の次の選択肢として確立している。2005 年 1 月から 12 月の 1 年間に当

施設で行ったパーキンソン病に対する 19 例の手術を検討し、目標部位に凝固または留置電極が確実に到達していたか否かを検証する。凝固または刺激の目標点は患者本人の MRI 画像をもとに Radionics 社製定位脳手術支援ソフト StereoPlan を用いて仮決定し、目標部位に穿刺した準微小電極（ユニークメディカル社製）を用いた神経活動記録の結果と刺激電極穿刺後に行った電気的な試験刺激に対するパーキンソン病の症状の変化に基づいて決定する。

手術は全例局所麻酔下で、脳神経外科医と神経内科医が共同で行う。穿頭から電極刺入に至る侵襲的処置及び電極やリード線の留置、手術創の処置は脳神経外科医が行い、脳深部電極による電気生理学的観察と術中の試験的電気刺激に対する神経症状の変化は神経内科医が評価を行う。最終的な電極留置や凝固巣の位置はその場で脳神経外科医と神経内科医協議の上で決定する。

4) ①本臨床研究で用いる手法を MPTP にて作成したパーキンソン病サルで追加実験を行った。さらに、パーキンソン病サルにおいて、 $[^{11}\text{C}]\text{-L-DOPA}$  を用いた PET にて AAV-AADC の発現を経時的に観察した。

②線条体（被殻）への AAV ベクター注入に伴う個体への影響： AAV ベクターを注入したサルにおいて AAV ベクターに対する抗体価を注入の前後で比較した。また、注入後の個体におけるベクターの

動態を解析するため、各組織から DNA を抽出し PCR 反応によってベクターに特異的な配列が検出されるかどうかを検討した。

③ベクター作製に関する検討： ベクター作製効率を向上させるため、トランスフェクション法につき関連する諸条件の検討を行うとともに、バキュロウイルスを用いる方法に関しても開発を進めた。また、ベクター精製法についても関連する諸条件を最適化すると共に、しばしば問題となる空ベクターを取り除く方法及びその効果について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題は生じないと考えている。マウスを用いた動物実験に関しては自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行う。霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行う。

## C. 研究結果

1) 進行したパーキンソン病患者に対し、AAV ベクターを用いて遺伝子治療臨床研究を実施することを目指して実施計画書や患者説明文書等の作成と改訂を重ね、

「AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」の研究名称にて 2005 年 5 月 12 日、自治医大 IRB の承認を得た。同年 8 月 12 日には米国 Avigen 社と自治医科大学との間でパーキンソン病遺伝子治療に関する臨床契約を結び、GMP レベルのベクター (hAAV-AADC-2) が同社から自治医科大学に供給されることが決定された。これらを踏まえて、同月 23 日、厚生労働省大臣官房厚生科学課に出向いて臨床研究プロトコルの内容に関して事前相談を行い、種々の指示を受けた (中野・小澤)。その後、同課と e-mail での相談を逐次行って、指摘内容に応じてプロトコルの改訂を行い、2006 年 2 月 1 日に開催された厚生科学審議会科学技術部会に向けて「遺伝子治療臨床研究実施計画申請書、概要書、実施計画書、患者説明文書、添付資料」を提出した。件の厚生科学審議会科学技術部会において本臨床研究を審議するための作業委員会の設置が決定され (中野が傍聴)、2006 年 3 月 20 日に第 1 回パーキンソン病遺伝子治療作業委員会が開催された。この作業委員会には中野、小澤、村松が出席して研究の骨子を説明し、委員から予め示されていたコメントや委員会での質問に対して回答した。一方、本臨床研究で使用する AAV ベクターに関する生物多様性影響評価書、第一種使用規程承認申請書を作成して関係省庁に提出した。

本臨床研究の共同研究会社であった

Avigen 社 (米国) の AAV ベクター部門を Genzyme 社に移譲したが、Avigen 社と自治医科大学との間に締結された臨床研究契約も Genzyme 社に移譲されている。この件に関して中野、小澤、村松が San Diego に出向き、2006 年 4 月 3 日、Genzyme 社の AAV 担当責任者 Paul L. Kaplan 氏ほかと会合を持つ予定になっている。

2) 6-FMT 合成には  $^{18}\text{O}$  ガスへの陽子線照射によって製造する  $^{18}\text{F}$  ガスから合成するプロセスしかないことが判明したことから、このプロセスを順次実験的に検討すると同時に、適切な運転条件を決定した。

#### ① $^{18}\text{F}$ ガスの製造

##### (第 1 プロセス)

アルミターゲットに、 $^{18}\text{O}_2$  ガスを充填し、エネルギー 10 MeV の陽子線を照射 10 分間照射した ( $^{18}\text{O}_2$  ガス充填圧力: 1.3 Kg/cm<sup>2</sup>、照射電流: 3.1  $\mu\text{A}$ )。

##### (第 2 プロセス)

第 1 プロセス終了後に、ターゲットから  $^{18}\text{O}_2$  ガスを抜き出し、代わって Ar+F<sub>2</sub> ガス及び Ar ガスを充填し、陽子線を再度 15 分間照射した (Ar+F<sub>2</sub> ガス充填圧力: 4 Kg/cm<sup>2</sup>、Ar ガス充填圧力: 8 Kg/cm<sup>2</sup>)。

照射終了後に上記ガスを回収し、 $^{18}\text{F}$  約 20 mCi を得た。

#### ② $^{18}\text{F}$ -acetylhyposulfite の製造

上記の Ar+F<sub>2</sub> ガスを酢酸ナトリウム (ソーダライム) カラムに通じて  $^{18}\text{F}$ -acetylhyposulfite を製造した。 $^{18}\text{F}$  収量に



対し、 $^{18}\text{F}$ -acetylthiofluoride の製造収率は 93%であった。

### ③ $6\text{-}^{18}\text{F}$ FMT 標識反応

N-Trifluoroacetyl-5-acetoxy-2-trimethylstannyl-L-phenylalanine ethyl ester を酢酸水溶液に溶かし、 $^{18}\text{F}$ -acetylthiofluoride ガスを吹き込み標識反応を実施した。反応液を減圧蒸留により酢酸を除去した後、臭化水素溶液を加え、 $130^\circ\text{C}$ で加水分解を実施した。

④高速液体クロマトグラフィーによる  $6\text{-}^{18}\text{F}$ FMT の分取：上記加水分解後の反応液を減圧蒸留により臭化水素を除去し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により  $6\text{-}^{18}\text{F}$ FMT を分離生成した。合成収率は、 $^{18}\text{F}$  ガスを基準に約 20%であった。

3) パーキンソン病 19 例に行った定位置脳手術の内訳は視床腹側中間核凝固術 1 例、STN-DBS 手術 15 例、視床腹側中間核凝固と STN-DBS の同時手術 3 例であった。単独視床腹側中間核凝固術は 1 例のみ、STN-DBS 手術は 14 例が両側同時、1 例で一側手術が行われ、視床と STN の組み合わせ手術を行った 3 例はいずれも一側の視床腹側中間核凝固と両側の STN-DBS 手術が行われた。

それぞれの手術において、脳内の目標神経組織に穿刺電極が到達するまでに要した穿刺路の数を診療録の手術所見から調査し、併せて術後に撮影した MRI 画像で電極位置または凝固位置を確認した。

19 手術例で凝固または電極留置を行った目標は 39 個所で、その内訳は視床腹

側中間核 4 個所、視床下核が 35 個所であった。視床下核両側同時手術は、原則としてパーキンソン病症状の強い側の対側を先に行い、電極を留置した後にもう一側を穿刺した。振戦に対する視床凝固と両側 STN の一期的手術を行う際は、まず振戦と対側の視床を穿刺して凝固巣を作成し、次に視床と同側の STN に電極を留置、その後対側に移って、もう一方の STN 手術を行った。

1 個所の目標に対する穿刺経路の数は、最低 1 トラック、最大 8 トラックであった。STN を目標として穿刺を行った 35 個所の電極留置について、初回側の穿刺と、一側の電極留置を終えた後の 2 回目 (対側手術) 穿刺における穿刺経路を比べてみると、初回穿刺では最低 2 トラック、最大 8 トラックで平均 4.2 トラックの穿刺 ( $n=18$ ) を行っていたのに対して、その対側の穿刺では最低 1 トラック、最大 5 トラック、平均 2.3 トラック ( $n=17$ ) と、初回側に比して少ない傾向があった。

術後に撮影した MRI 画像上での電極位置は、ほぼ全例で目標とする STN 内ないしその近傍に確認されており、両側手術例を検討しても、初回穿刺側と 2 回目穿刺側での電極位置の差は確認されなかった。

4) ①本臨床研究で用いる手法を MPTP にて作成したパーキンソン病サルで追加実験し、本手法の安全性と有効性を追認した。さらに、パーキンソン病サルにおいて、 $[^{11}\text{C}]\text{-L-DOPA}$  を用いた PET にて

AAV-AADC注入側の線条体では注入3ヶ月後でもAADCが発現していることを観察し、臨床的効果は少なくとも3年間持続することを確認した。

②線条体（被殻）へのAAVベクター注入に伴う個体への影響：ヒトで予定している量( $4 \times 10^{11}$ )のAAVベクターを注入したサルにおいて、ベクターキャプシドに対する抗体価を比較したところ、有意の変動を認めなかった。また、ベクター由来の配列は注入した部位及びその近傍の脳組織では検出されたが、それ以外の臓器においては見出されなかった。

③トランスフェクション法に関しては、重層化したフラスコ（十段積層フラスコ）で培養を行う際に、フラスコ内に積極的に空気を供給することでベクター収量が著明に向上することを見出した。また、5型のAAVベクターをバキュロウイルスで作製する方法を確立した。更にはカラムを用いて空ベクターを効率良く分離する条件を見出すと共に、空ベクターを除去することで遺伝子導入効率が数倍程度向上することを見出した。

#### D. 考察

パーキンソン病の線条体において欠乏するドパミンの合成に関わる主な酵素にはTH、AADC、GTCがある。我々は、パーキンソン病モデルサルにおいて、これらの酵素遺伝子を搭載したベクター（AAV-TH、AAV-AADC、AAV-

GTC）を線条体に導入することにより、L-DOPAの服用無しにパーキンソン病症状が明確にかつ長期間にわたって軽減し、特段の有害事象も見られないことを示した。今回計画した臨床研究「AADC発現 AAVベクター線条体内投与による重症パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」では安全性を重視して、上記3遺伝子の中でAADC遺伝子のみを線条体に注入し、併用するL-DOPAから線条体でドパミンを合成させる戦略をとった。この方法であれば、導入したAADC遺伝子が仮に過剰に発現しても、L-DOPAの服用量を減らすことでドパミンの過剰産生を防ぐことができ、線条体でのドパミン過剰に伴って生じるジスキネジアを予防できると思われる。

本臨床研究のプロトコールは、2005年5月12日に自治医科大学IRBから承認された。これを受けて、厚生労働省大臣官房厚生科学課との数回の事前相談にて改訂を重ね、2006年2月の厚生科学審議会科学技術部会を経て、同年3月に第1回パーキンソン病遺伝子治療作業委員会が開催された。作業委員会には中野、小澤、村松が出席して研究の骨子を説明し、委員から予め示されていたコメントや委員会での質問に対して回答した。プロトコールの修正を求める意見も出されたので、十分な検討を行い、真摯かつ迅速に対応して速やかな承認を得るよう努力した

い。

本臨床研究に対して GMP レベルのベクター(hAAV-AADC-2)を供給する契約を結んでいた Avigen 社 (米国) がその AAV ベクター部門を Genzyme 社に移譲した。しかし、Avigen 社と自治医科大学との間に締結された臨床研究契約も Genzyme 社に移譲されており、本臨床研究の推進には支障ないものと考えられる。この件に関して中野、小澤、村松が San Diego に出向き、2006 年 4 月 3 日、Genzyme 社の AAV 担当チーム責任者 Paul L. Kaplan 氏ほかと会合を持つ予定になっている。また、これまでに交わした同氏との通信では Genzyme 社は本臨床研究を積極的に支援するとの態度を表明している。

PET 検査において使用する  $6\text{-}^{18}\text{FMT}$  は AADC に直に結合することから、線条体での AADC の減少を同定でき、パーキンソン病診断の精度を大きく高めることができる。一方、導入した AADC 遺伝子から産生される AADC の量を視覚的にかつ非侵襲的に捕らえることができ、遺伝子治療効果の経時的追跡が可能となる。この PET 検査に必要な  $^{18}\text{F}$  ガスの製造に関し、第 1 プロセスの照射のみでは、生成した  $^{18}\text{F}$  ガスがターゲットに吸着し、回収できなかった。第 2 プロセスにより、吸着  $^{18}\text{F}$  を Ar ガス中に回収できたが、回収効率は理論値に対し約 60%であった。この回収効率であれば、臨床応用には支障ないが、今後さらに最適化できる可能性がある。

パーキンソン病の遺伝子治療を開始するにあたっては、AAV-AADC を安全・確実に脳内の目標とする部位に到達させる技術が必要とされる。今回検討した視床・視床下核の穿刺に比して、被殻を目標とする穿刺はその構造の大きさから容易であることが予想される。視床下核穿刺を行う際のトラックは、それぞれ 2mm の間隔でグリッド状に配置されており、最多穿刺を要した 8 トラックの症例でも、最も離れた位置となる 2 つのトラック間の距離は 10mm に満たなかった。通常の画像誘導手術を行う場合、被殻を対象とすればこの距離は全てその構造内に収まる数値であり、複数回の穿刺を行うことなく、極めて確実な目標構造への到達が予想される。

仰臥位で前頭部に穿頭、硬膜切開を置くことで脳脊髄液が流出してクモ膜下腔へ空気が流入することから大脳組織が沈下し、目標が前後方向にずれることが報告されている。パーキンソン病に対する通常手術も遺伝子導入の手術も共に目標は大脳深部の基底核であることより、脳実質のシフトの影響は大脳皮質に比べ少ないが、STN の場合は約 2mm の誤差を生じうるといわれている。この差は髄液の流出量や頭部固定の高さ等により、症例毎に異なるので、初回穿刺時には前後方向での目標探索が必要となる。しかし、一側で目標部位が確定されれば、対側も同程度の脳沈下が起こっている事が予測されることより、最初から前後方向の目

標座標を修正して穿刺することができる。この判断により、2回目の穿刺（対側穿刺）では、初回穿刺に比して穿刺トラック数を減らすことが可能になっていると思われた。

手術に伴う有害事象に関しては、19例では39個所の目標点を捕らえる為に129トラックの準微小電極による穿刺が行われたが、術直後に撮影した頭部CTスキャンにて頭蓋内出血の合併は皆無であり、安全性の高い手技と考えられる。

パーキンソン病サルにおいて追加実験した結果、本臨床研究で用いる手法の安全性と有効性が追認された。さらに、 $[^{11}\text{C}]$ -L-DOPA を用いたPETにてAAV-AADC注入側の線条体では注入3ヶ月後でもAADCが発現していることが認められ、かつ少なくとも3年間は臨床的効果が見られることは、本臨床研究手法の長期間の有効性を示唆するものである。

パーキンソン病遺伝子治療におけるAAVベクターの安全性に関しては、前臨床研究においてもこれまで十分に踏み込めていなかった。今回ベクター投与を受けたパーキンソン病モデルサルにおいてキャプシドに対する免疫反応が殆ど認められなかった。このことは、脳内への注入では本ベクターに対する抗体産生は生じにくいことを示しており、一度ベクターの注入を行ったパーキンソン病患者において再度の治療が必要となった場合にも、効果が期待できるものと推定される。また、ベクター分布の解析結果は予想さ

れた通りであったが、治療法の安全性を確認する上では欠くことの出来ないデータである。

ベクターの作製法に関しては従来のトランスフェクション法ではヒトへの治療に必要な量を準備することは容易ではなかったが、今回行ったような工夫やバキュロウイルスを用いる方法などで状況が改善している。一方、精製法に関しても臨床グレードの純度を得るのは容易でなく、関連条件を最適化していく必要がある。空ベクターによる効果の減弱はしばしば問題と考えられていたことから、空ベクターを効率よく取り除く方法の開発は大きな意義がある。

#### E. 結論

1. 「AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与による重症パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」のプロトコールが自治医科大学IRBで承認された。
2. 本臨床研究を審議するために、厚生科学審議会科学技術部会での審議を経て、2006年3月に第1回パーキンソン病遺伝子治療作業委員会が開催された。
3.  $6$ - $^{18}\text{F}$ MT 合成のプロセス検証と詳細条件を決定できた。パーキンソン病治療のためのスクリーニング検査のための $6$ - $^{18}\text{F}$ MT 薬剤の製造が可能となった。
4. MRI と定位脳手術支援ソフト StereoPlan を用いた画像誘導定位脳手術

において、目標点は平均 3.3 回の穿刺で安全に捕らえることができ、目標に至るまでに仮穿刺を行った経路も目標トラックから数 mm 未満のところに位置していた。この方法であれば、被殻を対象とした定位脳手術では一回の穿刺で確実に目標部位に到達する事が可能と思われる。

5. 準微小電極による 129 トラックの穿刺を行ったが、術直後の頭蓋内出血の合併はゼロであり、本手技の安全性が確認された。

6. パーキンソン病サルにおいて追加実験した結果、本臨床研究で用いる手法の安全性と有効性を追認され、 $[^{11}\text{C}]$ -L-DOPA を用いた PET では本手法の有効性が示唆された。

7. パーキンソン病に対する AAV ベクターを用いた遺伝子導入法に関してサルに対する影響を評価し、安全性を確認した。また、臨床応用を視野に入れてベクター作製の関連技術を整備した。このような進歩の積み重ねによって、臨床研究がより安全かつ効果的に遂行されることが期待される。

#### F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamazaki M, Esumi E, Nakano I: Is motoneuronal cell death in amyotrophic

lateral sclerosis apoptosis? *Neuropathology* 25: 381-387, 2005.

2) Saito Y, Motoyoshi Y, Kashima T, Izumiyama-Shimomura N, Toda T, Nakano I, Hasegawa M, Murayama S: Unique tauopathy in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 64 (No. 12): 1118-1126, 2005.

3) Ishihara K, Araki S, Ihori N, Shiota J, Kawamura M, Yoshida M, Hashizume Y, Nakano I: Argyrophilic grain disease presenting with frontotemporal dementia: A neuropsychological and pathological study of an autopsied case with presenile onset. *Neuropathology* 25: 165-170, 2005.

4) Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Ando Y, Nakano I: A phenotype without spasticity in sarsinrelated ataxia. *Neurology* 64: 2129-2131, 2005.

5) Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I and Ozawa K: Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5(5):663-671, 2005.

6) Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-

- mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med* (in press)
- 7) Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther* (in press)
- 8) Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mizukami, H., Okada, T., Naka, H., Yoshioka, A., Ozawa, K., Sakata, Y.: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res* (in press)
- 9) Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther* (in press)
- 10) Urabe, M., Nakakura, T., Xin, KQ., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, RM., Ozawa, K.: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80:1874-85, 2006.
- 11) Hiraide, A., Yokoo, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Saito, T.: Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther* 16:1413-21, 2005.
- 12) Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Ogura, T., Iwata-Okada, M., Uchibori, R., Shimazaki, K., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* 16:1212-8, 2005.
- 13) Liu, Y., Okada, T., Sheykholeslami, K., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Kanazawa, T., Takeuchi, K., Ajalli, R., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 12:725-33, 2005.
- 14) Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., Mizukami, H., Muramatsu, S., Ozawa, K., Saido, T. C., Arai, H., Sasaki, H.: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 57:832-42, 2005.
2. 学会発表
- 1) Nakano I, Ishihara K, Sugie M, Shiota J, Kawamura M, Kitamoto T.: An autopsy

case of MV2 Creutzfeldt-Jakob disease(CJD) with marked and diffuse cortical spongiform changes: A cortical form? 8<sup>th</sup> European Congress of Neuropathology 2005. Amsterdam, The Netherlands, 25-28 June 2005.

2) Ishikawa T, Morita M, Nakano I: A SPECT study using eZIS and SPM97 in ALS with dementia cases. XVIIIth World Congress of Neurology, Sydney Australia, 5-11 November 2005.

3) Hishida R, Fujimoto K, Kawakami T, Nakano I: Abnormal posture in patients with Parkinson disease. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Dopaminergic and Nondopaminergic Mechanisms in Parkinson's Disease. Osaka, Japan, November 25-26, 2005.

4) Muramatsu S, Nara Y, Kakiuchi T, Onon F, Kodera M, Takino N, Nishiyama S, Harada N, Fukuyama D, Tsuchida J, Terao K, Tsukada H, Nakano I, Ozawa K: *In vivo* assessment of transgene-mediated dopamine synthesis by positron emission tomography in a primate model of Parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 11<sup>th</sup> annual meeting. Tokyo, July 29, 2005. (abstract p23).

5) Muramatsu S, Fujimoto K, Ozawa K and Nakano I : Gene therapy for Parkinson's disease : Strategies for clinical applications. The 2<sup>nd</sup> Nikko International Symposium 2005. Nikko,

September 30, 2005. (abstract p20-21).

6) Muramatsu S, Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I and Ozawa K: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. Society for Neuroscience's 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington, DC, November 14, 2005.

7) 加藤正哉、藤本健一、小泉唯子、渡辺英寿：視床腹中間核凝固を組み合わせた視床下核法、第64回日本脳神経外科学会総会（2005.10.6、横浜）

8) 小泉唯子、加藤正哉、渡辺英寿：近赤外線光トポグラフィーを用いたSTN-DBS中の局所脳血流測定 第45回日本定位・機能神経外科学会（2006.1.21、大宮）

9) 加藤正哉、小泉唯子、藤本健一、渡辺英寿 振戦に対する視床下核刺激療法と視床凝固術の併用 第45回日本定位・機能神経外科学会（2006.1.21、大宮）

H. 知的財産権の出願・取得状況  
該当なし

## AAVベクターシステムの開発

分担研究者 小澤敬也 自治医科大学医学部 教授

**研究要旨** パーキンソン病に対するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた遺伝子治療法に関する前臨床研究をサル（*Macaca mulatta*）の系で実施し、線条体内への AAV ベクター注入に伴う免疫反応並びに AAV ベクターゲノムの全身的な分布につき検討し、治療法の安全性を評価した。また、AAV ベクターの作製・精製法につき検討を加え、より高効率に純度の高いベクターを得る方法を見出した。

### A. 研究目的

パーキンソン病に対する AAV ベクターを用いた遺伝子治療法はサル（*Macaca mulatta*）のモデルにおいて有効性が証明されたものの、線条体内注入に伴う免疫反応の程度や、注入したベクターの体内動態については明らかになっていない。また、現在用いているベクター作製・精製法は本格的な臨床応用には不向きであり、更に高い効率・純度のベクターが要求される。これらの点を検討し、臨床応用をより円滑に行うことを目標として研究を行った。

### B. 研究方法

1. 線条体（被殻）への AAV ベクター注入に伴う個体への影響： AAV ベクターを注入したサルにおいて AAV ベクターに対する抗体価を注入の前後で比較した。また、注入後の個体におけるベクターの動態を解析するため、各組織から DNA を抽出し PCR 反応によってベクターに特異的な配列が検出されるかどうかを検討した。
2. ベクター作製に関する検討： ベクター作製効率を向上させるため、トランスフェクション法につき関連する諸条件の検討を行うとともに、バキュロウイルスを用いる方法に関しても開発を進めた。

また、ベクター精製法についても関連する諸条件を最適化すると共に、しばしば問題となる空ベクターを取り除く方法及びその効果について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないと考えている。マウスを用いた動物実験に関しては自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。

### C. 研究結果

1. 線条体（被殻）への AAV ベクター注入に伴う個体への影響： ヒトで予定している量 ( $4 \times 10^{11}$ ) の AAV ベクターを注入したサルにおいて、ベクターキャプシドに対する抗体価を比較したところ、有意の変動を認めなかった。また、ベクター由



来の配列は注入した部位及びその近傍の脳組織では検出されたが、それ以外の臓器においては見出されなかった。

2. トランスフェクション法に関しては、重層化したフラスコ（十段積層フラスコ）で培養を行う際に、フラスコ内に積極的に空気を供給することでベクター収量が著明に向上することを見出した。また、5型のAAVベクターをバキュロウイルスで作製する方法を確立した。更にはカラムを用いて空ベクターを効率良く分離する条件を見出すと共に、空ベクターを除去することで遺伝子導入効率が数倍程度向上することを見出した。

#### D. 考察

これまでパーキンソン病に対する AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発においては、治療法の効果は様々な点で確かめられたものの、安全性に関する検討については十分に踏み込めていなかった。今回ベクター投与を受けた個体においてキャプシドに対する免疫反応が殆ど認められなかったことから、脳内への注入による全身的な免疫反応への影響は小さいものと考えられ、一度ベクターの注入を行った個体において再度の治療が必要となった場合にも、効果が期待できるものと推定される。また、ベクター分布の解析結果は予想された通りであったが、治療法の安全性を確認する上では欠くことの出来ないデータである。

ベクターの作製法に関しては従来のトランスフェクション法ではヒトへの治療に必要な量を準備することは容易ではなかったが、今回行ったような工夫やバキュロウイルスを用いる方法などで状況が改善している。また、精製法に関しても臨床グレードの純度を得ることは容易ではなく、関連条件を最適化していく必要がある。空ベクターによる効果の減弱はしばしば問題と考えられていたことから、効率よく取り除く方法の開発は大きな意

義がある。

#### E. 結論

パーキンソン病に対する AAV ベクターを用いた遺伝子導入法に関してサルに対する影響を評価し、安全性を確認した。また、臨床応用を視野に入れてベクター作製の関連技術を整備した。このような進歩の積み重ねによって、臨床研究がより安全かつ効果的に遂行されることが期待される。

#### F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med* (in press)
- 2) Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther* (in press)
- 3) Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mizukami, H., Okada, T., Naka, H., Yoshioka, A., Ozawa, K., Sakata, Y.: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res* (in press)
- 4) Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T.,

Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther* (in press)

5) Urabe, M., Nakakura, T., Xin, KQ., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, RM., Ozawa, K.: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80:1874-85, 2006.

6) Hiraide, A., Yokoo, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Saito, T.: Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther* 16:1413-21, 2005.

7) Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Ogura, T., Iwata-Okada, M., Uchibori, R., Shimazaki, K., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* 16:1212-8, 2005.

8) Liu, Y., Okada, T., Sheykholeslami, K., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Kanazawa, T., Takeuchi, K., Ajalli, R., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 12:725-33, 2005.

9) Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., Mizukami, H., Muramatsu, S., Ozawa, K., Saido, T. C., Arai, H., Sasaki, H.: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Annals*

of Neurology 57:832-42, 2005.

H. 知的財産権の出願・取得状況  
該当なし

重症パーキンソン病遺伝子治療に向けた定位的遺伝子導入法の研究  
— 定位脳手術 19 例のまとめ —

分担研究者 加藤正哉 自治医科大学医学部 助教授

**研究要旨** 進行したパーキンソン病の症状改善を目的に行っている視床腹中間核凝固術や視床下核脳深部刺激などの定位脳手術において、目標点に達する為に必要な脳実質の穿刺回数を、手術記録から調査した。1年間に19例のパーキンソン病に対する定位脳手術が行われ、視床または視床下核の目標点39箇所に対して129トラックの電極穿刺が行われていた。従来のMRIを用いた画像誘導法による手技では平均3.3回の穿刺で目標を捕らえることが可能で出血などの合併症は認められなかった。この方法はパーキンソン病の遺伝子治療を行う際の脳内遺伝子導入にあたり、安全・確実に目的を達することができる手技である、と思われた。

A. 研究目的

進行したパーキンソン病（パ病）患者の線条体（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、パーキンソン症状を改善するための新しい治療法を確立する為に、脳内への遺伝子導入を確実に行う為の手術手技を、従来の手術法をもとに検討する。

B. 研究方法

Wearing-off 等の進行したパ病の諸症状に対する視床下核 (STN) 脳深部刺激 (DBS) や、一側に強い振戦に対する視床腹側中間核凝固は、症状の改善に劇的な

効果があり、従来の薬物療法による治療の次の選択肢として確立している。2005年1月から12月の1年間に当施設で行ったパ病に対する19例の手術を検討し、目標部位に凝固または留置電極が確実に到達していた事を検証した。凝固または刺激の目標点は患者本人のMRI画像をもとにRadionics社製定位脳手術支援ソフトStereoPlanを用いて仮決定し、目標部位に穿刺した準微小電極（ユニークメディカル社製）を用いた神経活動記録の結果と刺激電極穿刺後に行った電気的な試験刺激に対するパ病の症状の変化に基づいて行っている。

手術は全例局所麻酔下で、脳神経外科医と神経内科医が共同で行った。穿頭から

電極刺入に至る侵襲的処置及び電極やリード線の留置、手術創の処置は脳神経外科医が行い、脳深部電極による電気生理学的観察と術中の試験的電気刺激に対する神経症状の変化は神経内科医が評価を行った。最終的な電極留置や凝固巣の位置はその場で脳神経外科医と神経内科医協議の上で決定した。

### C. 研究結果

対象となった症例はいずれも薬物療法で日常生活に支障をきたしている進行したパ病の患者で、年齢は49歳から72歳（平均59.6歳）、性別は男性12例、女性7例、パ病と診断されてから、外科治療を受けるまでの平均病悩期間は1.2年であった。症例は全例でL-Dopa製剤とアゴニストを内服しておりWearing off 症状を呈していた。術前のUPDRS 運動スコア（part III）はベストONの状態では16.3であった。

19手術の内訳は視床腹側中間核凝固術1例、STN-DBS手術15例、視床腹側中間核凝固とSTN-DBSの同時手術3例であった。単独視床腹側中間核凝固術は1例のみ、STN-DBS手術は14例が両側同時、1例で一側手術が行われ、視床とSTNの組み合わせ手術を行った3例はいずれも一側の視床腹側中間核凝固と両側のSTN-DBS手術が行われていた。

それぞれの手術において、脳内の目標神経組織に穿刺電極が到達するまでに要した穿刺路の数を、診療録の手術所見から調査し、併せて術後に撮影したMRI画像

で電極位置または凝固位置を確認した。

19手術で凝固または電極留置を行った目標は39個所で、その内訳は視床腹側中間核4個所、視床下核が35個所であった。視床下核両側同時手術は、原則としてパ病症状の強い側の対側を先に行い、電極を留置した後にもう一側を穿刺した。振戦に対する視床凝固と両側STNの一期的手術を行う際は、まず振戦と対側の視床を穿刺して凝固巣を作成し、次に視床と同側のSTNに電極を留置、その後対側に移って、もう一方のSTN手術を行った。

1個所の目標に対する穿刺経路の数は、最低1トラック、最大8トラックであった。STNを目標として穿刺を行った35個所の電極留置について、初回側の穿刺と、一側の電極留置を終えた後の2回目（対側手術）穿刺における穿刺経路を比べてみると、初回穿刺では最低2トラック、最大8トラックで平均4.2トラックの穿刺（n=18）を行っていたのに対して、その対側の穿刺では最低1トラック、最大5トラック、平均2.3トラック（n=17）と、初回側に比して少ない傾向があった。術後に撮影したMRI画像上での電極位置は、ほぼ全例で目標とするSTN内ないしその近傍に確認されており、両側手術例を検討しても、初回穿刺側と2回目穿刺側での電極位置の差は確認されなかった。図1に左視床凝固と両側STNへのDBSを行った症例の術後8日目に撮影したMRI画像と術中に設定した脳図譜上の目標点を示す。この症例では、凝固の為の視床