

において使用された陽性コントロールが、全てこれに該当する」、とのことであった。本 E-mail には参考資料として、以下の電子書類が添付してあった。

- (1) 本被験薬に関わる該当試験リスト (2 試験) (添付資料 4-4-1)
- (2) 九州大学への通知書類 (2006 年 10 月 16 日付) (添付資料 4-5)
- (3) BRL 社による見解報告書 (Position Statement) (2006 年 9 月 11 日付) (添付資料 4-6)
- (4) BRL 社より米国 FDA へ提出された 8-Discipline (8D) パッケージ書類 (添付資料 4-7)
- (5) BRL に対する米国 FDA の回答書 (2006 年 10 月 10 日付) (添付資料 4-8)

総括責任者と分担研究者はこれらの書類を至急精査し、問題点の洗い出しを行った。同時に、被験薬ロットの一部を研究用として保存しているディナベック株式会社 (外部研究協力者) へ、被験薬ロットのマイコプラズマ否定試験の追加試験を依頼した (試験期間 2006 年 11 月 1 日ー同 15 日まで、添付資料 4-9)。

送付書類に対する検討をもとに、日本時間 2006 年 11 月 1 日付で本案件に関する質疑と確認を行い、日本時間 2006 年 11 月 3 日付 BRL 社 Alison Hillier 氏から E-mail にて返答が得られた (添付資料 4-2)。

質疑・確認内容と回答は、以下の通りであった。

(1) BRL 社が採用しているマイコプラズマ検出システムは、*Mycoplasma pneumoniae*、*Acholeplasma laidlawii* を含むいくつかの種類マイコプラズマ科を検出できること (つまり九州大学病院の被験薬に対し、試験結果として陰性の判定が得られていることから、本被験薬にはこれら複数のマイコプラズマ科が陰性である、ということ)。

(2) 今回、マイコプラズマ否定試験の陽性コントロールとして使用されていた微生物が、本来の *Mycoplasma pneumoniae* ではなく、*Acholeplasma laidlawii* であったが、この事実自体は米 FDA 規制ガイドライン (US FDA PTC 1993) および欧州薬事法 2.6.7. に適合していること。

(3) (2) に関連して、この事実は唯一、21CFR610.30 規制にのみ適合していないこと。しかしこれ自体は九州大学病院における被験薬のリスク要因にはならないと、BRL 社は科学的に判断していること (細部に関する根拠は、BRL 社の見解報告書を参照: 添付資料 4-6)。

(4) BRL 社が提出した本事案に関する 8-Discipline (8D-0006) パッケージ書類 (添付資料 4-7) について、米 FDA の Blumenschein 氏より「科学的に妥当性のある判断である」という公式見解を得ていること。

という内容であった。

一方、本被験薬の GMP 生産時に原材料として使用されたマスターセルバンク (MCB : ロット番号 M0009.100550) ならびにマスターウイルスバンク (MVB : ロット番号 M0204.100747) に関するマイコプラズマ否定試験に関する情報が同封されていなかったため、ディナベック株式会社動物実験室長 岩崎 仁 氏より BRL 社へ 2006 年 11 月 6 日および同 11 月 19 日の 2 度にわたり問い合わせがなされた。BRL 社から 2006 年 11 月 21 日に回答が寄せられ、その結果 MCB (試験番号 : J02YD92.102003、送付年月日 : 2002 年 9 月 10 日、添付資料 4-4-5) ならびに MVB (試験番号 : J02YH15.102018- Vero 細胞による蛍光 DNA 検出法、送付年月日 : 2002 年 11 月 13 日、添付資料 4-4-6、および試験番号 : J02YH16.102016-アガー寒天培養法、送付年月日 : 2002 年 12 月 4 日、添付資料 4-4-7) は、共に本事案と無関係であることが明らかになった (添付資料 4-3)。

またディナベック株式会社 (外部研究協力者) へ依頼した、被験薬ロットのマイコプラズマ否定試験の追加試験 (試験期間 2006 年 11 月 1 日～同 15 日まで : 非 GLP 試験であるため参考データ) の結果、PCR 法ならびに培養法の 2 種類の異なる試験においてマイコプラズマの混入がないことが再確認され、同 11 月 21 日付で試験報告書を受領した (添付資料 4-9)。

以上から、九州大学病院において実施されている遺伝子治療臨床研究に使用されている被験薬に対し、本事案により安全性や信頼性は特段の影響を受けないと考えられた。

3. まとめ

九州大学病院において実施中の遺伝子治療臨床研究に使用されている被験薬（SeV/dF-hFGF2）の実生産細胞（ロット番号 M0204.100912）について、品質検定試験のうちマイコプラズマ否定試験（試験番号 J03YC49.102018 および J03YC53.102016）に関する報告に記載されている陽性コントロールが、実際は別の微生物であったという通知を、受託生産を実施した BRL 社より受領した。

臨床研究の総括責任者ならびに分担研究者は、関係資料を精査し、またいくつかの疑問点について同社へ質問と確認を行った。その結果、同社の見解報告書は妥当性があり、また米国 FDA も同意見であること、本被験薬生産に使用したマスター・セルバンク（ロット番号 M0009.100550）、マスター・ウイルスバンク（ロット番号 M0204.100747）にもマイコプラズマ否定試験が実施されているが、これらは本案件に該当しないことを確認した。さらに本件発覚後に実施された九州大学病院における被験薬（SeV/dF-hFGF2）と同一ロットに対するマイコプラズマ否定追加試験においてもマイコプラズマは検出されなかった。

以上から、今回の案件については被験薬（SeV/dF-hFGF2）の科学的、また規制上の観点から安全性・信頼性を損なうものではないため、総括責任者と分担研究者は臨床研究の継続に支障はないと判断した。

安全性情報：本遺伝子治療臨床研究に関して発生した有害事象一覧

- 注意 1. この一覧表は、本臨床研究において発生した有害事象を、症例報告書から抽出したものです。
2. 「有害事象」とは「副作用」と異なり、臨床研究薬との因果関係の有無に関わらず、患者様を起こした医学的な異常を指します。
3. 臨床研究薬との関連の有無に関わらず、入院の延長や死亡など、所轄官庁に報告を要する医学的に重大な事象の発生を「重篤な有害事象」といい、黄色で示しています。
4. 重篤ではない有害事象の場合、本一覧の最終更新日と投与後月数に数ヶ月の間隔がある場合があります。これは事務的な手続きによるものですので、ご了承ください。

スリージ1 (5x10e7 cilu/60 kg)


登録番号	性別	年齢	治療肢	臨床研究薬 投与日	有害事象 最終更新日	投与後月数 平成19年9月2日現在	有害事象の内容	発生日	臨床研究薬 投与前・後	程度	転帰	臨床研究薬との関連					
												主治医の 判断	第3者委 員判断	その他 コメント			
102	男性	59	右	平成18年7月4日	平成18年10月12日	約8ヶ月	有害事象の発生報告無し										
103	男性	74	左	平成19年1月9日	平成19年3月2日	約2ヶ月	造形剤アムギー 左第2趾潰瘍 便秘 右上腕部疼痛	平成18年12月26日 平成19年1月6日 平成19年1月7日 平成19年1月9日	投与前 投与前 投与前 投与日	中等度 中等度 軽度 軽度	回復 未回復 回復 回復	関連無し 関連無し 関連無し 関連無し	関連無し 関連無し 関連無し 関連無し				
							左下腿切斯	平成19年1月24日	15日後	重篤	未回復	関連無し	自然悪化と 考えられる が必ずしも 否定できな い 自然悪化 と考えられ るが必ず しも否定で きない				
							左下腿切斯後後遺症	平成19年1月24日	15日後	軽度	未回復	関連無し	関連無しと 考えられる が必ずしも 否定できな い				
							血清AST、ALT上昇	平成19年1月27日	18日後	軽度	回復	関連無し	関連無し	薬剤性（パブコマイ ン）			
							上気道炎	平成19年2月3日	25日後	軽度	回復	回復	関連無しと 考えられる が必ずしも 否定できな い				
104	未投与																




別紙様式第5の別添

遺伝子治療臨床研究重大事態等報告書

(受付番号)	(初回申請年月日)
	平成14年10月28日

研究の名称	血管新生因子（線維芽細胞増殖因子：FGF-2）遺伝子搭載非伝播型組換えセンダイウイルスベクターによる慢性重症虚血肢（閉塞性動脈硬化症、パージャヤー病）に対する血管新生遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	平成18年1月31日（承認日） から 平成21年1月31日（36ヶ月間）まで

総括責任者	所属部局の所在地	福岡市東区馬出3丁目1-1（郵便番号812-8582）	
	所属機関・部局・職	九州大学病院 第2外科・科長 九州大学大学院医学研究院 消化器・総合外科学・教授	
	氏名	前原 喜彦（まえはら よしひこ） 	
実施の場所	所在地	福岡市東区馬出3丁目1-1（郵便番号812-8582）	
	名称	九州大学病院 第2外科病棟、遺伝子治療室	
	連絡先	福岡市東区馬出3丁目1-1（電話番号092(642)5461）	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	居石 克夫	九州大学大学院医学研究院・病理病態学 ・教授	副総括責任者、基礎分野、臨床研究の評価と総括
	砂川 賢二	九州大学大学院医学研究院・循環器内科学 ・教授	副総括責任者、臨床分野、臨床研究の評価と総括
	小野原俊博	九州大学病院・第2外科 ・講師	臨床研究の実施、臨床分野からの研究計画の推進
	江頭 健輔	九州大学大学院医学研究院・循環器内科学 ・助教授	臨床分野からの研究計画の推進
	米満 吉和	九州大学大学院医学研究院・特任教員 ・教授	ベクターの設計、構築、管理、基礎分野からの研究計画の推進
協力研究者	(九州大学病院) 本田 浩（放射線科・教授）、高橋成輔（麻酔科蘇生科・教授）、井口 博之（第2外科・医員）、池田康博（眼科・助手） (九州大学大学院医学研究院) 柳 雄介（ウイルス学・教授）、中川和憲（病理病態学・講師）、岡野慎士（病理病態学・助手）、鬼丸満徳（病理病態学・助手）、高野壮史（大学院生）、藤井孝明（大学院生）、吉田久美（大学院生）、 (外部研究協力者) 永井美之（理化学研究所感染症研究ネットワークセンター長・名古屋大学名誉教授） 古森公浩（名古屋大学血管外科・教授）、今泉勉（久留米大学第3内科・教授） 室原豊明（名古屋大学器官制御内科・教授） 加藤 篤（国立感染症研究所・ムンプス感染研究部・室長） 長谷川護（ディナベック株式会社・代表取締役社長）		

<p>審査委員会の意見</p>	<p>後述「その後の対応状況」参照</p> <p>(参考資料)</p> <p>別添1：遺伝子治療臨床研究において発生した重篤な有害事象に関する委員会の意見等について（先進医療適応評価委員会委員長）</p> <p>別添2：先進医療適応評価委員会議事録（2007年1月31日）</p> <p>別添3：症例登録番号103切断肢に関する各種試験報告書</p> <p>別添4：遺伝子治療臨床研究審査専門委員会議事録（2007年3月1日）</p> <table border="1" data-bbox="362 555 1517 687"> <tr> <th data-bbox="362 555 1100 599">審査委員会の長の職名</th> <th data-bbox="1100 555 1517 599">氏名</th> </tr> <tr> <td data-bbox="362 599 1100 687">九州大学遺伝子治療臨床研究審査専門委員会・委員長 九州大学大学院医学研究院・腫瘍制御学・教授</td> <td data-bbox="1100 599 1517 687">片野 光男 </td> </tr> </table>	審査委員会の長の職名	氏名	九州大学遺伝子治療臨床研究審査専門委員会・委員長 九州大学大学院医学研究院・腫瘍制御学・教授	片野 光男 
審査委員会の長の職名	氏名				
九州大学遺伝子治療臨床研究審査専門委員会・委員長 九州大学大学院医学研究院・腫瘍制御学・教授	片野 光男 				
<p>研究の区分</p>	<table border="1" data-bbox="519 710 1282 765"> <tr> <td style="text-align: center;">遺伝子治療臨床研究</td> <td style="text-align: center;">遺伝子標識臨床研究</td> </tr> </table>	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究		
遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究				
<p>研究の概要</p>	<p>Fontaine III・IV度の重症虚血肢による肢切断は、QOLの悪化のみならず生命予後も進行大腸癌より悪い重篤な疾患であり、有効な治療法は確立していない。</p> <p>我々は独自に開発したセンダイウイルスベクターによる血管新生因子（塩基性線維芽細胞増殖因子：FGF-2）を用いた遺伝子治療が下肢重症虚血の救肢に最も効果的であることを動物実験で見い出した。</p> <p>本臨床研究計画では、1）ヒトにおけるSeV/dF-hFGF2投与の安全性を明らかにし（主要エンドポイント）、2）臨床効果を示すと考えられる投与量を決定する（副次エンドポイント）ことを目的とする。</p>				
<p>対象疾患</p>	<p>閉塞性動脈硬化症あるいは閉塞性血栓性動脈炎患者 [Fontaine III度あるいはIV度 (Rutherford慢性虚血肢重症度分類III度6群を除く)] で、人工血管あるいは自家静脈グラフトによる大腿動脈以下の血行再建術の適応がなく、2週間の継続した薬物療法（血管拡張剤および/または抗血小板剤）で改善が見られない患者、かつ40歳以上の症例。</p>				
<p>重大事態等の発生時期</p>	<p>2007年1月24日</p>				
<p>重大事態等の内容及びその原因</p>	<p>本臨床研究登録症例番号103（投与2例目）において、同意取得時（初診時）から左足に潰瘍（腫部）・乾性壊疽（第5趾）が認められていた。また同意取得時には認められなかったが、スクリーニング時期（12月26日）には左足外果にも潰瘍が新たに発生した。左足第5趾の壊疽については、既に回復は困難と考えられ、本臨床研究薬投与前より時期を見て切断することを予定していた。</p> <p>2007年1月4日に開催された九州大学病院先進医療適応評価委員会にて本症例は最終的に適格と判断されたが、患肢第5趾の乾性壊疽に関しては、投与後臨床経過を観察しながら、臨床研究薬の影響がほぼ消失すると考えられる2週目以降の適切な時期に、中足骨レベルの切断を判断することとされた。</p> <p>以前から行っている薬物療法を継続しつつ、臨床研究薬を同1月9日に投与したが、足関節以下の血流の臨床経過は自然経過（自然悪化）に近似するものの、臨床研究薬の投与直前より特に左第5趾の壊疽が急速に進行した。下腿部位（足関節より中枢側）の血流に関しては臨床研究薬投与後の悪化は認めないものの、左第5趾の壊疽が進行性であることに加えて外果や腫部にも難治性潰瘍・壊疽が存在し、中足骨切断では治癒不全により追加切断が必要となる可能性があること、また臨床研究薬投与後9日目には腫部潰瘍よりメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）が検出されたこと、そしてそれに伴い全身の炎症反応（発熱、白血球増多、CRP上昇）を認めた。以上から足関節の温存がきわめて困難な状態であることを被験者及び家族に十分に説明したところ、中足骨レベルの切断より下腿切断を希望され、下腿切断の同意に至ったため、同1月24日、左下腿切断術を施行した。</p>				

	<p>本症例の経過を以下に記す。</p> <p>[経過]</p> <p>2006年12月13日(初診):第1回目同意取得 同意取得時に左第5趾には乾性壊疽、左踵部に乾性潰瘍が存在していた。左第5趾は組織の回復は期待できない状態であり、緊急性はないものの切断は必至であると考えられた。本症例の左第5趾は、中足骨骨頭を含む趾切断が適応であると想定された。</p> <p>2006年12月26日:スクリーニング検査における細菌検査結果は、左第5趾;陰性、左踵部陽性(黄色ブドウ球菌2+)であった。またこの時点で左外果にも新たな潰瘍形成を認め細菌検査を実施したが陰性であった。さらに血液培養検査は陰性かつ全身の炎症性反応も否定的であり、また活動性の炎症性疾患は認めなかった。</p> <p>2007年1月4日:九州大学病院先進医療適応評価委員会にて症例103の適応が認められた。</p> <p>2007年1月6日:第2回目の同意取得を実施。臨床研究実施計画書に従い、感染の拡大に関する十分な説明を行い、同意を得た。同日、左第2趾先端部に潰瘍出現。</p> <p>2007年1月9日:臨床研究薬投与(投与量:5×10⁷ciu/60kg)</p> <p>2007年1月15日:38℃前後の発熱あり。重篤ではなく、解熱鎮痛剤で速やかに解熱した。以後も間歇的な発熱を認めるも、同処置にて対応可能であった。</p> <p>2007年1月18日:足踵部潰瘍が湿性となり、浸出液の少量の排出を認め、細菌検査を実施したところ、MRSA3+を検出。その他のすべての潰瘍・壊疽部位から弱毒菌が少量確認されたため、投与後9日目よりロセフィン、11日目よりバンコマイシンを投与した。 虚血の状況と感染を踏まえ、1月18日現在の臨床経過から下腿(膝下)切断が考慮される。</p> <p>2007年1月24日:左下肢下腿(膝下)の切断を実施。</p> <p>本被験者の潰瘍・壊疽の経過(写真)および切断肢に関する諸検査に関する報告書は、別添3として添付する。</p>
その後の対応状況	<p>標準業務手順書に則り、2007年1月24日、左下肢下腿(膝下)の切断を実施後、重篤な有害事象として速やかに九州大学病院長、医学研究院等倫理委員会、遺伝子治療臨床研究審査専門委員会、先進医療適応評価委員会、そして所轄官庁(厚生労働省および文部科学省)へ文書にて速報を行った。</p> <p>被験者に関しては、下腿切断後、全身状態は落ち着いており、発熱や白血球増加などの炎症症状もほぼ正常化した。切断端に少量の壊死組織の漏出を認めるも、明らかな感染等を認めていない。</p> <p>臨床研究薬と本有害事象である下腿切断との関連性に関しては、標準業務手順書に則り2007年1月31日に先進医療適応評価委員会にて詳細に検討された(別添2:先進医療適応評価委員会議事録)。その結果、「臨床研究薬投与前より壊疽が存在し、感染も併発していることから、臨床経過から判断する限り疾患の自然経過(自然悪化)と考えることが妥当であり、今般の重篤な有害事象は本臨床研究の進行に特段の影響を与えるものではないと判断する。しかし臨床研究薬投与後に感染・炎症所見が悪化していることを考慮すると、原疾患の自然経過に臨床研究薬投与が影響を与えた可能性については、現時点で必ずしも否定は出来ない。従って、本症例のみならずこれまで投与された症例、そして今後投与さ</p>

れる症例についても、このような観点から定期的に注意深い観察が必要である。」という結論に至った（別添1：遺伝子治療臨床研究において発生した重篤な有害事象に関する委員会の意見等について）。

先進医療適応評価委員会における以上の検討内容を踏まえ、2007年2月9日に遺伝子治療臨床研究審査専門委員会にて議論がなされた。しかし同日は先進医療適応評価委員会委員長ならびに主治医である第2外科小野原講師が所用により欠席であったため、詳細な症例の検討は保留とした。同3月1日に両者の出席を得て、また新たに提出された試験報告書（別添3：症例登録番号103切断肢に関する各種試験報告書）を踏まえ、改めて本症例の医学的・倫理的検討がなされた。その結果、先進医療適応評価委員会における検討内容と判断は概ね妥当であるとされたが、本臨床研究が世界的に投与例のない新規のウイルスベクターによる、安全性を主眼とした臨床研究であることを鑑み、被験者に対するより詳細かつ正確な情報の提供、そしてそれを踏まえた同意取得を行うため、具体的に以下の点について改善するように、研究者へ勧告した。

(1) 安全第一の試験であることを鑑み、特に Fontaine IV 度の症例については治療前、治療中、治療後の検討を先進適応評価委員会にて実施すること。現行プロトコールでは、各ステージごとに3症例の1ヶ月までのデータを総合して先進適応評価委員会にてステージでの安全性を判断することになっているが、今後は Fontaine IV 度の症例の場合については、それ以外に少なくとも投与後1ヶ月経過し症例ごとの症例報告書へのデータ仮固定が行われた時点、そしてそれ以降は重大事態の内容と程度にて判断して適宜、先進適応評価委員会での症例検討を実施すること。

(2) インフォームド・コンセント取得時に現在までの症例の経過を追加説明すること。新たな病態に対する説明については、記録を文書として残すこと。

(3) 当委員会のこの結論を医学研究院等倫理委員会で討議し、了承後に第3例目をスタートすること。

(4) 症例経過を適宜、当委員会においても説明すること。現在は研究者の自主的な判断で半年に一度、データ仮固定された症例報告書を基にした臨床研究の経過報告が倫理委員会、当委員会、先進適応評価委員会にてなされている。今後はそれ以外にも、先進適応評価委員会での症例検討内容などを含め、被験者の治療経過などについては、適宜当委員会への周知がなされるよう、研究者は十分に配慮すること。

以上を踏まえて、臨床研究の継続を可とした（別添4：遺伝子治療臨床研究審査専門委員会議事録）。今後、本被験者については病状だけでなく、臨床研究薬との関連性について十分に留意したフォローを継続していく予定である。

以上をもって、所轄官庁に報告することとした。

(注意)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 A 列 4 番とすること。
2. この申請書は、正本 1 通及び副本 2 通を提出すること。
3. 字は墨・インク等を用い、楷書ではっきり書くこと。
4. 記載欄に記載事項のすべてを記載できない時は、その欄に「別紙 () のとおり」と記載し、別紙を添付すること。
5. 大学等にあつては、この報告書を、厚生労働大臣のほか文部科学大臣にも提出すること。

血管新生因子（線維芽細胞増殖因子：FGF-2）遺伝子搭載
非伝播型組換えセンダイウイルスベクターによる
慢性重症虚血肢（閉塞性動脈硬化症、バージャー病）に対する
血管新生遺伝子治療臨床研究

総括研究責任者 前原喜彦（第2外科・科長）

症例登録番号 103 切断肢に関する
各種試験報告書

平成 19 年 2 月 26 日

報告書作成者

分担研究者 米満吉和（医学研究院・特任教授）

報告内容

【報告書の目的】

本報告書は九州大学病院にて実施されている「血管新生因子（線維芽細胞増殖因子：FGF-2）遺伝子搭載非伝播型組換えセンダイウイルスベクターによる慢性重症虚血肢（閉塞性動脈硬化症、バージャー病）に対する血管新生遺伝子治療臨床研究（以下、臨床研究：総括研究責任者 第2外科科長 前原喜彦教授）において症例登録番号 103 として登録され、2007年1月9日に臨床研究薬（SeV/dF-hFGF2）を投与された被験者（投与2例目）の左下腿切断肢（左下腿切断術：2007年1月24日）に対して実施された、各種検査の結果をまとめたものである。

本報告書に記載されている各種検査は、本来実施計画書において定められた安全性ならびに効果を判定するための検査ではなく、従って本臨床研究の安全性判定等に使用されるべきものではない。しかし一方で、臨床研究薬の投与をされた部位の組織の解析は、医学的価値が高く、また今後の臨床研究の安全性等を予測する上で貴重な情報と成り得ると判断されたため、ここに各種検査結果とその医学的考察について、報告書として提出する。

【検体採取までの経過】

2007年1月24日に左下腿切断術を施行（第2外科小野原俊博講師、井口博之医員）。切断肢は清潔なビニール袋にて被い、氷冷した状態で保存。約3時間後から組織採取を開始した（米満吉和特任教授、他大学院生2名）。以下の組織が採取された（別紙1参照）。

- 1) 左ヒラメ筋（上部）および皮膚（4%パラホルムアルデヒド固定）
左ヒラメ筋（上部）（凍結切片用標本）
左ヒラメ筋（上部）（snap frozen: 数カ所）
- 2) 左ヒラメ筋（切断端）（4%パラホルムアルデヒド固定）
左ヒラメ筋（切断端）（凍結切片用標本）
- 3) 左ヒラメ筋（下部）（4%パラホルムアルデヒド固定）
左ヒラメ筋（下部）（凍結切片用標本）
左ヒラメ筋（下部）（snap frozen: 数カ所）
- 4) 左ヒラメ筋（下部）（4%パラホルムアルデヒド固定）
左ヒラメ筋（下部）（凍結切片用標本）
- 5) 左内果部皮膚（4%パラホルムアルデヒド固定）
- 6) 左前脛骨筋（上部）（4%パラホルムアルデヒド固定）
左前脛骨筋（上部）（凍結切片用標本）
左前脛骨筋（上部）（snap frozen: 数カ所）
- 7) 左前脛骨筋（下部）+左前脛骨動脈（4%パラホルムアルデヒド固定）
左前脛骨筋（下部）+左前脛骨動脈（凍結切片用標本）
- 8) 左足底部皮膚（4%パラホルムアルデヒド固定）

【試験結果の概要】

1. 筋肉内ベクター検出試験 (RT-nested real-time PCR 法、検出限界: 10 copy/mg muscle)

* 参考: 血中・尿中ベクター検出試験 (同、検出限界: 100 copy/ml)

— いずれの検査でも 1 反応チューブにつき 1 コピーの検出が可能

(別紙2: 試験報告書)

snap frozen 組織を採取した筋肉標本 (1) (3) (6) より、それぞれ 3 個の組織片を使用した。結果は全ての組織で、陽性対照の GAPDH 遺伝子の増幅が認められ、一方いずれの組織においても、ベクターの遺伝子配列は確認できなかった。

(別紙3: 試験報告書)

治療前から臨床研究薬投与後 10 日までの全血および尿から、ベクターの遺伝子配列は検出できなかった。

2. 病理組織学的検査

2-1. H.E.、EVG 標本による一般病理組織検査

(別紙4)

1) A-1~3 左ヒラメ筋 (上部)

A-1, -2 : 筋組織はほぼ正常。炎症細胞浸潤なし。筋壊死像なし。

A-3 : A-1 囲み部分の拡大。筋線維束がエオジン好性、間質の拡大を認め、虚血性の変化と考えられる。頻度は少ない。

B-1, 2 : 真皮がやや線維化。皮下脂肪の間質にも軽度の線維化を認める。

C-1~3 : 皮下組織内の血管。弾性線維の増生と層化を認めるも未熟であり、静脈の動脈化の可能性が考えられる。

(別紙5)

2) 左ヒラメ筋 (切断端)

3) 左ヒラメ筋 (下部)

6) 左前脛骨筋 (上部)

7) 左前脛骨筋 (下部)

: いずれの標本も、虚血性の変化と考えられる部位が時に存在するが、大部分が正常筋組織。炎症細胞浸潤なし。筋壊死像なし。

5) 左内果部皮膚: 真皮の線維化と皮下脂肪層のびまん性の線維化

(別紙6)

7) 左前脛骨動脈: 器質化血栓による完全閉塞。一部毛細血管再疎通を認める。

8) 左足底部皮膚: 真皮の線維化と皮下脂肪層のびまん性の線維化。

皮下組織内に、細胞線維性に閉塞した小細動脈と、周辺に増生した毛細血管を多数認める。

(別紙7)

- 4-1) 左ヒラメ筋 (下部: ヘモジデリン沈着)
: 数カ所のスポット状の筋再生像ならびに同部位に一致したヘモジデリンの沈着を認める。
(亜急性出血-注射針刺入部位を示唆)
- 4-2) 左ヒラメ筋 (下部: 炎症細胞浸潤)
: 4-1の周辺の小血管周囲に、CD3陽性リンパ球の浸潤を認める。一部はT細胞 (UCHL-1)、B細胞 (MX-panB)、単球 (KP-1)より成り、同部位に一致して増殖細胞 (MIB-1)も存在する。但し、好中球浸潤など、化膿性炎症を示唆する所見はない。
(ベクターの感染を示唆)
- 4-3) 左ヒラメ筋 (下部: 筋再生像)
: 4-1の周辺に、数カ所にスポット状の筋再生像を認める。
(前臨床試験でも同様の所見を認めた: Masaki I, et al. *Circ Res* 2002)
- 4-4) 左ヒラメ筋 (下部: 孤在性筋再生像)
: 4-3のような筋線維内だけでなく、筋層間結合組織内にもスポット状の筋再生像を認める。この融合像を呈す多核細胞はvimentin陽性であり、既に筋細胞への分化へ進んでいると考えられる
- 4-5) 左ヒラメ筋 (下部: 小動脈)
: 二重染色ではないため増殖細胞の種類は明らかではないが、内皮細胞と平滑筋細胞層に一致してMIB-1陽性増殖細胞を認める。
- 4-6) 左ヒラメ筋 (下部: 毛細血管)
: 二重染色ではないため増殖細胞の種類は明らかではないが、CD31陽性の毛細血管内皮の部分に一致してMIB-1陽性増殖細胞を認める。

3. 筋肉内各種サイトカイン量測定(附:血清中測定):ELISA法

(別紙8)

snap frozen 組織を採取した筋肉標本(1)(3)(6)より、それぞれ2個の組織片を使用した。また血清中の濃度について、同時に測定し、附記した。

IL-6を除き、いずれの炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-8、IFN- γ)においても、血清中ならびに筋肉中の発現レベルは、検出限界以下、あるいは極低レベルであった。

血清中IL-6は、経過中ベクター投与後10日目に最大値(144.24 pg/ml)を示した。

4. 筋肉内各種血管新生因子量測定(附:血清・血漿中測定):ELISA法

(別紙9)

snap frozen 組織を採取した筋肉標本(1)(3)(6)より、それぞれ2個の組織片(試験3と同一サンプル)を使用した。また血清中ならびに血漿中の濃度について、同時に測定し、附記した。

FGF-2 の血清レベルは経過中検出限界以下であった。これは症例 102 と同様の結果であり、FGF-2 がフィブリンに結合し固相へ移動したためと考えられた。

FGF-2 の血漿レベルについては、一定の傾向を示さなかった。

血清 VEGF は、経過と共に上昇したが、血漿レベルは大きく変化しなかった。

血清 HGF、血漿中 HGF には、特に一定の傾向を認めなかった。

対照となる筋組織がないために結論は困難であるが、FGF-2、VEGF、HGF 共に、筋肉内発現量に一定の傾向は認めなかった。

【考察】

症例登録番号 103 は臨床経過において、臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2 : 5×10^7 ciu/60 kg) 投与後に足関節以下の虚血症状の悪化、ならびに踵部潰瘍から細菌 (MRSA) が検出され、その後全身の炎症反応が認められており、その結果として投与後 15 日目に左下腿切断に至った。

従って、切断肢における解析では、特に以下の点の可能性について留意して解析を実施した。

(1) 投与された臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2) が、動物実験の結果と異なり投与局所あるいは全身性に遷延して残存していないか？

(2) 臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2) 投与が MRSA 等の感染の契機となった可能性があるか？

(3) 臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2) 投与が、臨床的に得られている所見以外に、何らかの医学的異常 (例：骨格筋の壊死等) を誘発している可能性はないか？

(4) 臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2) 投与により発現した血管新生因子 (FGF-2) が、病態の進行に影響を与えた可能性があるか？

(1) 投与された臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2) が、動物実験の結果と異なり投与局所あるいは全身性に遷延して残存していないか？

前臨床試験 (マウス) においては、投与後 2 日目を発現のピークに以後発現は低下、2 週目にはほぼ発現は消失することから、被験薬は左下腿切断が実施された投与後 15 日目には、被験者の体内よりほぼ排除されていることが予測された。

別紙 2 (切断肢筋肉内) および別紙 3 (血中・尿中) に示す検査結果から、少なくとも全経過中に血中・尿中にベクター由来遺伝子配列は確認されず、また切断肢筋肉内も同様であったことから、これはマウスにおける前臨床試験の結果と矛盾しないものと考えられた。

但し、切断肢から採取された筋組織のうち、後に述べるように病理組織学的にベクター投与部位を採取し得たと考えられたのは、標本 4) 左ヒラメ筋 (下部) のみであり、この部分は今回の対象に含まれていない (snap frozen 組織が採取されていない) ことから、臨床研究薬が残存していないとは明言できない。

(臨床研究薬投与部位は、1箇所あたり 0.5 ml であるため、投与部の骨格筋組織を正確に採取することは、必ずしも容易ではないと思われた。)

また別紙 8 に示すように、IL-6 を除く他の炎症性サイトカイン発現は、経過中大きく変動せず、またレベルの変化も軽度であった。一方で炎症の急性相で発現が上昇する IL-6 は、経過中最大値 144 pg/ml と中等度の上昇を一過性に示した。本症例では IL-6 の推移と臨床経過における発熱等の経過がほぼ一致し、またこの時期に臨床研究薬の遷延等は認められていないことから、IL-6 の一過性の上昇は踵部潰瘍の感染によるものと判断することが妥当であると考えられた。

(2) 臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2) 投与が MRSA 等の感染の契機となった可能性があるか？

病理組織学的には、標本 4) 左ヒラメ筋 (下部) 以外にリンパ球などの炎症細胞浸潤は認めず、また採取した全ての骨格筋組織において細菌感染を示唆する化膿性炎症巣を認めなかった。さらに、骨格筋組織には一部に虚血性変化を示唆する所見があるものの、ほとんどは正常所見であり、広汎な壊死所見なども認めていない。従って、臨床研究薬の投与が MRSA 等の感染の契機となったとする積極的な所見には乏しいと考えられた。

別の解釈として、投与部位から少量の細菌が混入し、血流で末梢部へ到達した後に感染が拡大した可能性も残る。但しその場合は、足関節以下に多発性の感染巣を認める可能性があるが、少なくとも採取した足底部組織においては、明らかな感染巣を認めなかった。

以上から、可能性は否定できないものの、臨床研究薬の投与が MRSA 等の感染における直接の契機になったことを積極的に示唆する所見には乏しいものと考えられた。

(3) 臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2) 投与が、臨床的に得られている所見以外に、何らかの医学的異常 (例: 骨格筋の壊死等) を誘発している可能性はないか?

別紙 4-7 に示すごとく、切断肢の骨格筋は一部の虚血性変化と考えられる所見は認めるものの、壊死や細菌感染などを含めて異常を示唆する所見は認めていない。

従って、臨床的に得られている所見以外に何らかの医学的異常を誘発している可能性は低いと考えられた。

(4) 臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2) 投与により発現した血管新生因子 (FGF-2) が、病態の進行に影響を与えた可能性があるか?

別紙 9 に示すように、被験者の臨床経過中に血清中 FGF-2 は検出限界以下であり、また血漿中 FGF-2 のレベルも低値であった。これは被験薬投与により発現した FGF-2 が血中に漏出することはほとんどないことを示した、マウスにおける前臨床試験の成績と矛盾しない所見と考えられた。

また解析した骨格筋内の FGF-2 レベルも低値であった。これは平行して解析した組織標本の所見から、解析サンプルに注入部位が含まれていなかった可能性、また既に被験薬の免疫学的排除がほぼ完了している可能性が考えられた。しかし骨格筋内の FGF-2 レベルについては、同一被験者の陰性対照が存在しないため、発現量の多寡を論じることは不可能と考えられた。

また、標本 4) 左ヒラメ筋 (下部) には刺入部位と考えられるヘモジデリン沈着 + 筋組織再生像が観察され、また周辺には巣状の骨格筋再生像ならびに増殖毛細血管が散在性に存在した。FGF-2 の生理活性から鑑みて、これらの所見は被験薬投与により発現した FGF-2 による反応と考えることも可能であるが、一方で被験薬注入により部分的に障害された筋組織の生理的反応の可能性も否定し得ず、判断は保留とした。

いずれにせよ以上を鑑みると、臨床研究薬投与により発現した FGF-2 そのものが、病態の進行に何らかの影響を及ぼした可能性は低いものと考えられた。

一方、血清中 VEGF および HGF が、左下腿切断術施行前に急激に上昇していたことが明らかになった (別紙 9)。我々のこれまでの基礎的研究では、これら内因性血管新生因子が FGF-2 の下流で誘導されることを明らかにしているが、本症例では VEGF・HGF の経時的変化と FGF-2 のそれは明らかに解離しており、これらの急激な上昇は FGF-2 ではなく、別の機序である可能性を否定できないが、その機序については本症例の限られた解析では明らかではなかった。また、骨格筋内の VEGF・HGF レベルについては、同一被験者の陰性対照が存在しないため、発現量の多寡を論じることは不可能と考えられた。

【まとめ】

症例登録番号 103 は臨床経過において、臨床研究薬 (SeV/dF-hFGF2 : 5×10^7 ciu/60 kg) 投与後に足関節以下の虚血症状の悪化、ならびに踵部潰瘍から細菌 (MRSA) が検出され、その後全身の炎症反応が認められており、その結果として投与後 15 日目に左下腿切断に至った。

切断された左下肢に対し、ベクター検出試験、病理組織学的検索、炎症性サイトカイン発現、血管新生因子発現に関する検索を実施した。

その結果総合的に考えて、被験薬投与に起因すると考えられる細菌感染や広汎な組織障害を示唆する所見を認めず、また全身炎症反応が顕著になっていた切断時にはベクター遺伝子配列も検出できなかったことから、本症例の経過に臨床研究薬が悪影響を及ぼした可能性は比較的低いものと考えられた。

しかしながら、本検討は限られた標本と検討内容によるものであり、以上を明確に結論づける論拠としては不十分であることは明らかである。従って、今後の症例でも被験薬の副作用に関して細心の注意を払いつつ、慎重に臨床研究を進めることが必要であると考えられた。

【附記】

以上の試験結果は、各々の生データを忠実かつ正確に反映したものであることを宣誓する。

各々の生データは以下に保存されている。

- 1) 筋肉内ベクター検出試験：実験ノート
一九大医系キャンパスコラポステーション II 505 号室
保管責任者：米満吉和
- 2) 病理組織標本（2セット作製）
一九大医系キャンパスコラポステーション II 505 号室
保管責任者：米満吉和
一九州大学大学院医学研究院病理病態学（居石克夫教授）
- 3) 筋肉内サイトカイン量測定：実験ノート
一九州大学大学院医学研究院病理病態学（藤井孝明院生）
- 4) 筋肉内血管新生因子量測定：実験ノート
一九州大学大学院医学研究院病理病態学（藤井孝明院生）

症例 No. 103 - 左第5趾壊疽の経過



Day -13 (2006 12/27)

潰瘍径 : 2.31 x 1.15 cm



Day -3 (2007 1/6)

潰瘍径 : 2.54 x 1.60 cm



Day 0 (2007 1/9)

ベクター投与日

潰瘍径 : 4.59 x 2.21 cm



Day 10 (2007 1/19)

潰瘍径 : 4.48 x 2.93 cm

症例登録番号 103 切断肢に対して実施した
各種検査のまとめ

1. 筋肉内ベクター検出試験(virus shedding): RT-nested real-time PCR 法
(附: 全血中および尿中)

試験実施者 吉田久美(病理病態学・大学院博士課程2年)
試験指導者 伴 浩志(ディナベック株式会社)
試験責任者 米満吉和(医学研究院・特任教授)

2. 病理組織学的検査

2-1. H.E.、EVG 標本による一般病理組織検査

試験実施者 米満吉和(医学研究院・特任教授)
指 導 居石克夫(病理病態学・教授)

2-2. 免疫組織化学的検査

試験実施者 米満吉和(医学研究院・特任教授)

3. 筋肉内各種サイトカイン量測定(附: 血清中測定): ELISA 法

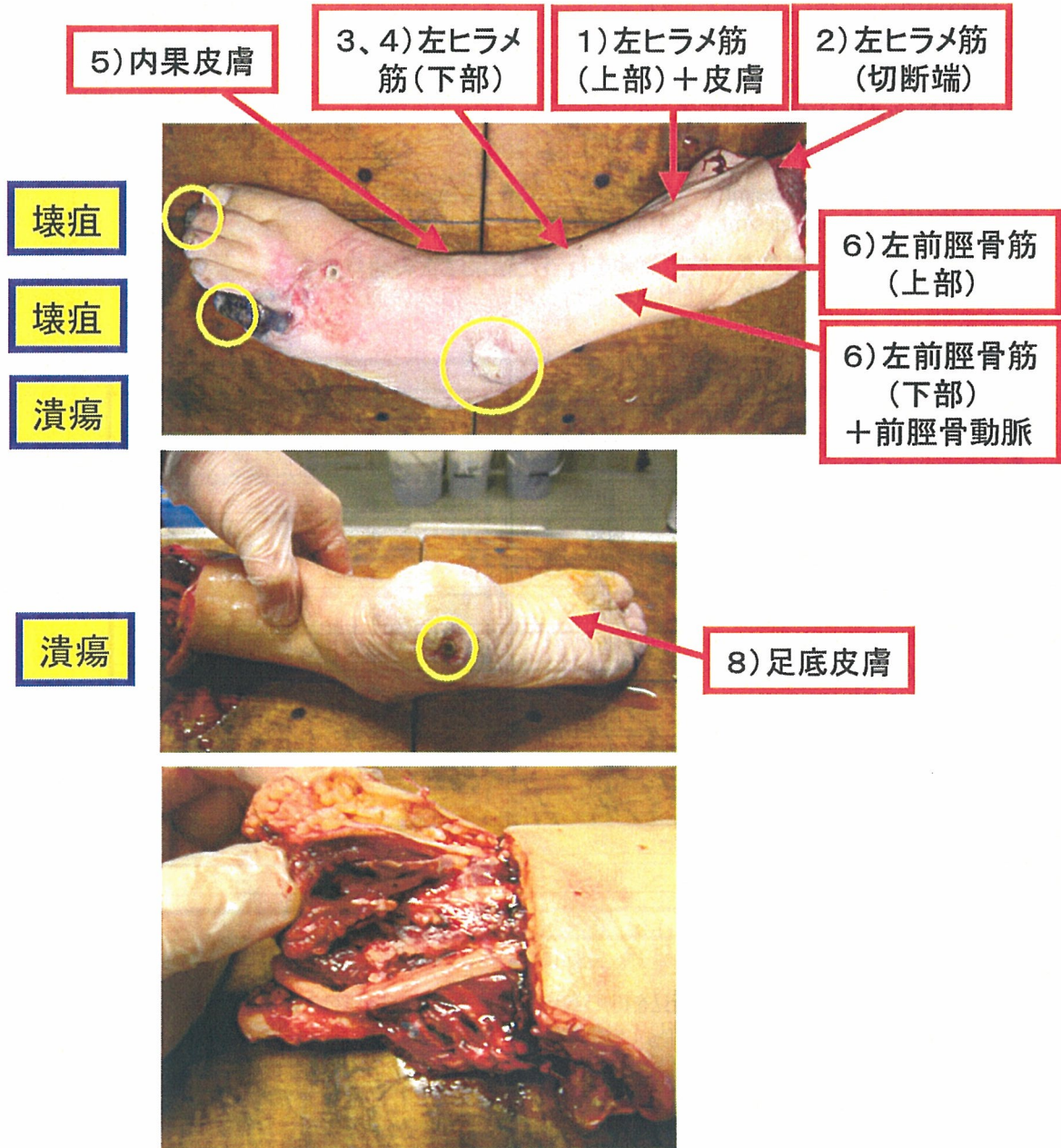
試験実施者 藤井孝明(病理病態学・大学院博士課程4年)
試験責任者 米満吉和(医学研究院・特任教授)

4. 筋肉内各種血管新生因子量測定(附: 血清・血漿中測定): ELISA 法

試験実施者 藤井孝明(病理病態学・大学院博士課程4年)
試験責任者 米満吉和(医学研究院・特任教授)

別紙 1

症例 No. 103 - 切断肢の肉眼所見



ベクター遺伝子検出試験報告書（速報・最終）

症例番号： 103

検体：全血および尿サンプル

試験日時： 2007 年 2 月 15 日

試験方法

RT-Nested Real-Time PCR 法

本試験の検出限界

尿検体：100 particles/ml 全血検体：100 particles/ml

上記検体についてベクター検出試験を行った結果は次の通りです。

試験結果

検体		検出結果
採取日	検体名	
2007年1月6日 (治療前)	血液	+ ・ ⊖
	尿	+ ・ ⊖
2007年1月9日 (治療当日6時間後)	血液	+ ・ ⊖
	尿	+ ・ ⊖
2007年1月10日 (治療1日後)	血液	+ ・ ⊖
	尿	+ ・ ⊖
2007年1月12日 (治療3日後)	血液	+ ・ ⊖
	尿	+ ・ ⊖
2007年1月16日 (治療7日後)	血液	+ ・ ⊖
	尿	+ ・ ⊖
2007年1月19日 (治療10日後)	血液	+ ・ ⊖
	尿	+ ・ ⊖

- ・ 本試験の実施記録ノートは、総括責任者あるいは試験責任者が保管する
- ・ 速報では治療3日目まで、最終報告では治療8～14日目の結果まで記載する
(治療3日目に陽性所見を得た場合は、陰転化まで適宜試験を追加する)

試験実施者： 山口 美  (2007年2月16日)

試験実施者： 伴 浩志  (2007年2月16日)

試験責任者： 米酒 吉和  (2007年2月17日)