

作製された MCB に関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 12「293T/17 MCB 試験成績書」参照）。なお、品質試験の概要は、参考資料 11「293T/17 MCB の品質試験および結果」に示す。

1. 細胞生存率試験（トリパンブルー法）
2. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定
3. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）
4. 無菌試験
5. *in vitro* ウイルス試験
6. *in vivo* ウイルス試験
7. *in vitro* ウシウイルス／ブタウイルス試験
8. 形質転換試験
9. レトロウイルス粒子試験
10. *in vitro* レトロウイルス試験（培養法）
11. *in vitro* レトロウイルス試験
12. PCV/BCV ウイルス否定試験
13. HIV-1/2 ウイルス否定試験
14. HTLV-1/2 ウイルス否定試験
15. HAV ウイルス否定試験
16. HBV ウイルス否定試験
17. HCV ウイルス否定試験
18. HHV-6/7/8 ウイルス否定試験
19. hCMV ウイルス否定試験
20. EBV ウイルス否定試験
21. HPV B-19 ウイルス否定試験
22. SV40 ウイルス否定試験
23. AAV ウイルス否定試験

VII.1.1.4 293T/17 WCB の作製法

293T/17 WCB の作製フローを図 11 に示す。タカラバイオ社の GMP 製造施設の管理区域にて 1 バイアルのマスターセルバンク（293T/17 MCB）より拡大培養され、最終的に 183 バイアルの 293T/17 WCB が GMP 遵守下で作製された。293T/17 WCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件及び保存条件等を参考資料 13「293T/17 WCB の作製方法」に記載する。

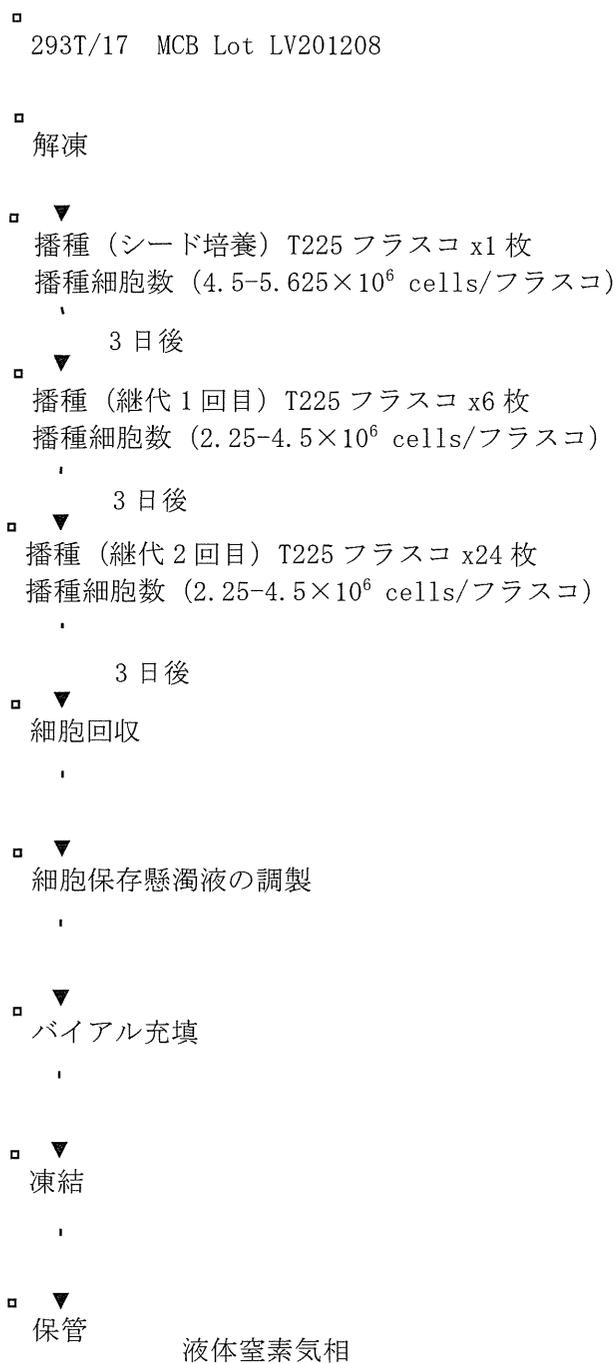


図 11 293T/17 WCB 作製フローチャート

作製された 293T/17 WCB に関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 15 「293T/17 WCB 試験成績書」参照）。なお、試験方法の概要は、参考資料 14 「293T/17 WCB の品質試験および結果」に示す。

1. 細胞生存率試験（トリパンブルー法）
2. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定
3. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）
4. 無菌試験
5. *in vitro* ウイルス試験
6. *in vivo* ウイルス試験

VII.1.1.5 AAV-hAADC-2 の製造方法

AAV-hAADC-2 の製造フローを図 12 に示す。AAV-hAADC-2 の製造は、1 バイアルの 293T/17 WCB を用いて行う。WCB の細胞を解凍後、培養を開始し、製造に必要なスケールまで増殖させる。培養用容器において培養細胞が接着面のおよそ 50～80% に広がった状態に達した後、リン酸カルシウム法により 3 種のプラスミドを導入する。導入翌日、培地を交換し生産培養を経て生産細胞を回収する。回収した細胞は、-80℃で保存して抽出・精製工程に用いる。ウォーターバスにて生産細胞を解凍・ベクター抽出後、粗精製処理を行い、セシウム密度勾配超遠心によって精製し、-80℃で保存する。精製品は解凍後タンジェンシャルフローフィルトレーション (TFF) によってバッファー交換を行い、これをバルク製品として-80℃で凍結する。バルク製品は解凍後濃度調製を行い 0.22 μ m のフィルターにより最終濾過滅菌を行ってクライオバイアルに充てんし-80℃で保存したものを最終製品とする。

製造に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養・精製条件及び保存条件等を参考資料 17 「AAV-hAADC-2 の製造方法」に記載する。製造は全てタカラバイオ社の GMP 製造施設の管理区域（参考資料 16 「製造施設（位置・構造設備）」）にて GMP 遵守下で行われる。また、タカラバイオ社の製造施設から自治医科大学附属病院へのウイルスベクターの輸送は、凍結・ドライアイス詰で、輸送中の温度変化をモニター・記録して行う。

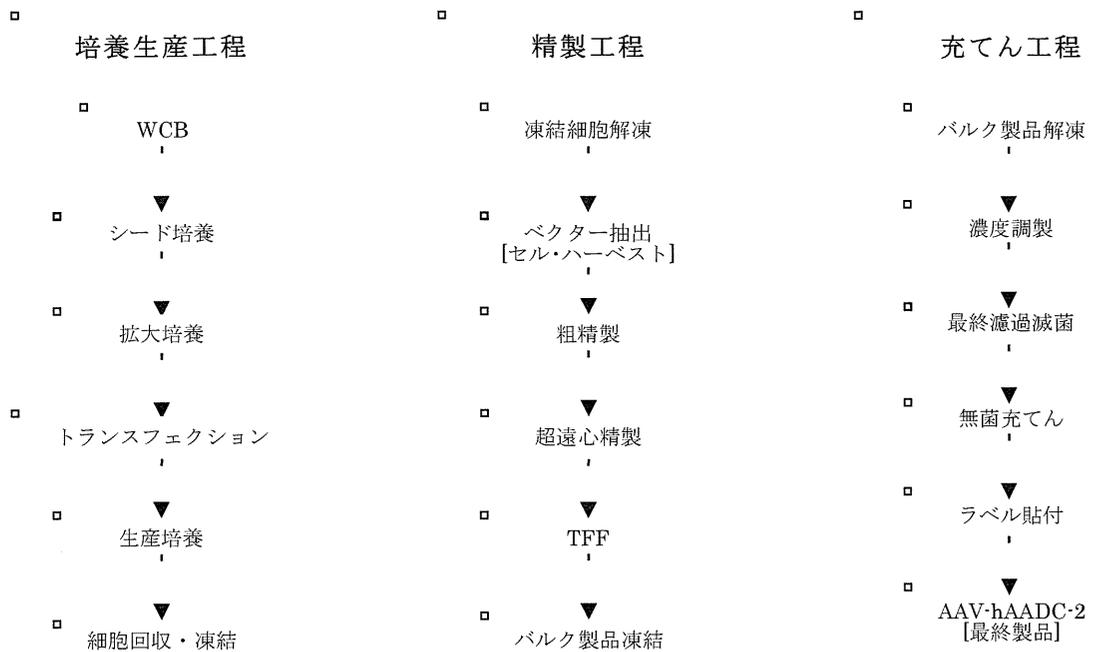


図 12 AAV-hAADC-2 の製造フロー

AAV-hAADC-2 に関しては、以下の品質試験を行う（1 ロットの結果を参考資料 19 「AAV-hAADC-2 試験成績書」に示す）。なお、品質試験方法の概略は、参考資料 18 「AAV-hAADC-2 の品質試験及び結果」に示す。

工程内（セル・ハーベスト）

1. *In vitro* ウイルス試験
2. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）

バルク製品

1. ベクターゲノム濃度試験

最終製品

1. ベクターゲノム濃度試験
2. エンドトキシン試験
3. 純度試験

4. 導入効率試験
5. 感染力価試験
6. 性状試験
7. pH 試験
8. 浸透圧試験
9. 無菌試験
10. ウイルスベクター純度試験（電子顕微鏡）
11. 塩基配列試験
12. oriDNA 配列定量試験（Q-PCR 法）
13. rcAAV 否定試験
14. セシウム残留試験
15. キャプシド率試験
16. ヒトゲノム DNA 残留試験
17. ベンゾナーゼ残留試験

VII.1.2 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。

VII.1.3 増殖性ウイルスの出現の可能性

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。さらに 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同組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。

VII.1.4 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²⁸、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。

VII.1.5 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²⁹。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 1/100 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込みは認められなかった。

VII.1.6 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みられる可能性は低いと考えられる。しかしながら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、および血液は PCR 法でベクター DNA が陰性になるまで検査する（「IX.5.4. 臨床検査および観察項目」を参照のこと）。なお、当施設で施行された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。

VII.1.7 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 に組み込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がん遺伝子が活性化したり、がん抑制遺伝子が不活化されたりすることで発がん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ニューロンであることから、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。

VII.1.8 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³⁰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³¹。

VII.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。本臨床研究では、遺伝子変異により本酵素が先天的に合成できずに欠損している患者において、酵素を発現するものであり、遺伝子発現における安全性は高いと考えられる。また、AADC は、L-dopa をドパミンに変換すると共に、5-HTP を基質としてセロトニンを生成する。よって、ドパミン、セロトニンの合成は内因性の L-dopa と 5-HTP に規定され、AADC の過剰発現が起こっても生成されるドパミンと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。

VII.3 細胞の安全性

VII.3.1 培養細胞の純度

293T/17 細胞は VII.1.1.3 及び VII.1.1.4 に示すようにタカラバイオ社の 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したコントロールとの比較試験を行いサンプルからはいかなる細菌、真菌の発現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 *in vitro*、*in vivo* 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。

VII.3.2 細胞の遺伝子型、表現型の安全性

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。

VII.3.3 被験者に投与する細胞の安全性

本計画では被験者に細胞を投与することはない。

VII.4 AAV 以外のウイルスベクターに起因する重篤な有害事象

これまで臨床遺伝子治療における重篤な有害事象の例は二つ報告されている。一つはアデノウイルスベクター全身投与を受けた患者が死亡した例、もう一つはレトロウイルスベクターによる治療を受けた免疫不全症患者に白血病が発症した事例である。

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）

1997 年米国ペンシルベニア大学にて、アデノウイルスベクター肝動脈内投与によるオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症の遺伝子治療が始まった。ベクター量を漸増しつつ臨床試験を継続していたところ、第 18 例目の患者（18 才、男性）が血液凝固異常と多臓器不全を起こし 4 日後に死亡した³²。この症例では、多量のアデノウイルス全身投与により患者の自然免疫系が強く活性化され、全身性炎症反応症候群（SIRS）と呼ばれる重篤な状態に陥った。一方、より低いベクター量を投与した先行 16 例および本患者と同用量を用いた第 17 例目でもこのような副作用は起こらなかったことから、SIRS の発症には宿主側の要因も寄与していると考えられる³³。動物実験においても、ウイルス投与量の増加に伴う免疫反応の増大は直線的ではなく、SIRS 発症の予測は難しいことが示されている^{34,35}。

② レトロウイルスベクターによる白血病（2002-2005 年、フランス）

X 連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）は、サイトカイン受容体コモンガンマ鎖（gc）遺伝子の変異により細胞性および液性免疫が高度に障害される疾患である。1999 年からフランスでレトロウイルスベクターを用いた X-SCID の遺伝子治療が始まり、大半の患者が免疫能を獲得して通常の生活を送れるようになった。ところが、同国で治療を受けた患者 15 名のうち、約 3 年後に 3 名が T リンパ性白血病を発症し、1 名が死亡した。2002 年に発症した 2 例では、患者染色体中の LMO2 原癌遺伝子の近傍にレトロウイルスが組み込まれ、その異常活性化が癌化の引き金となった³⁶。最近報道された白血病第 3 例についての詳細は不明だが、LMO2 とは異なる部位へのベクター組み込みによるらしい³⁷。レトロウイルスベクターによる挿入発癌の危険性は従来から指摘されてきたが、これまで世界中でレトロウイルスが投与された数千名の患者のうち実際に発癌に至ったのは X-SCID の事例だけである。

細胞の癌化には複数の遺伝子異常が蓄積する必要がある、1個の原癌遺伝子活性化だけでは不十分である。X-SCIDの場合、治療用の gc 遺伝子自体が強力な T リンパ球増殖作用を持つという特殊事情が重なって白血病を発症したと考えられる³⁸。

本臨床研究が上記と異なる点

上記有害事象①を引き起こしたアデノウイルスは、現在臨床で用いられている遺伝子治療ベクターの中では最も免疫原性・炎症惹起性が強く、全身投与については特に慎重を期すべきであるが、死亡した患者の術前の状態は必ずしも良好ではなかったようである。一方、アデノ随伴ウイルス (AAV) は野生型にも病原性がなく、免疫原性もアデノウイルスに比べて格段に弱い。しかも、AADC 欠損症に対する本遺伝子治療では脳内の線条体に限局してベクターを注入するので、血管内にベクターを注射するのに比べて、全身の反応はさらに出にくいと考えられる (注 1)。

一方、本臨床研究では以下に掲げるいくつかの理由から、上記有害事象②のようなベクター挿入発癌の危険性はきわめて小さいと考えられる。第一に、ベクター化した AAV には、染色体に遺伝子を組み込む力は殆どない。第二に、ベクターを投与する脳内の大部分の細胞、特に標的となる神経細胞は既に増殖能力を失っている。一部の造血系由来の細胞 (ミクログリアなど) は分裂能力を有しているが、2 型 AAV はこれらの細胞に殆ど感染できない。第三に、本ベクターで発現させる AADC には、細胞増殖促進やアポトーシス抑制などのシグナル伝達機能がなく、X-SCID 遺伝子治療における gc 遺伝子の作用とは根本的に異なる。以上の点から、AADC 発現 AAV ベクターが患者の同一細胞染色体の複数箇所に組み込まれて発癌に至る可能性は非常に小さいと予想される。

注 1: ただし、大動物における AAV の急性毒性の閾値は今のところ不明である。サルへの AAV8 門脈内投与自験例では、少なくとも 1×10^{12} vg/kg までは明らかな副作用は観察されなかった。

一方サルへのアデノウイルス投与については、 5×10^{12} vg/kg を越えると急性毒性を示す³⁹が、Jessie Gelsinger はこれよりも少ない投与量 (6×10^{11} vg/kg) で死亡した。

VIII 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

VIII.1 臨床ニーズ

AADC 欠損症は、進行により、発語がなく、臥床状態のまま、ジストニアやミオクロニーなどの不随意運動や睡眠障害も強く、苦痛が大きい疾患である。典型的患者に

おける治療法はなかった。台湾での遺伝子治療の成功例が報告されたことから、日本人患者に対しても AADC 欠損症に対する遺伝子治療実施が求められている。

日本では 4 人の患者が確認されており、患者家族の強い要望もあり、本臨床研究を計画した。

VIII.2 本臨床研究の品質、安全性

台湾において、本臨床研究と同じベクターを用いた AADC 欠損症に対する遺伝子治療が 8 例に実施され、効果が得られている。また、重篤な副作用は出現していない。自治医科大学で、本臨床研究と同じベクターを用いたパーキンソン病に対する遺伝子治療が 6 例に対して実施され、効果が得られている。うち 1 名に手術後、静脈性脳出血が認められたが、総括責任者はカニューレの挿入に伴う外科的手技が原因と判断し、AAV ベクターとの関連性は否定された。

世界的に、AAV ベクターを使用した血友病、嚢胞性線維症、その他多くの疾患に対する臨床試験が行われており、これまで 2 型 AAV ベクターに関連した副作用は報告されていない。

VIII.3 本臨床研究の期待される有効性

AADC 欠損症患者の運動機能が改善することが期待される。

VIII.4 当施設・研究者の能力

申請者らは、AAV ベクターを使用した多くの研究を行っており、ベクターの扱いに習熟している。また、パーキンソン病患者に対して視床下核の深部電気刺激を施行しており、定位脳手術の手技を確立していると共に機能的定位脳手術認定施設として日本定位・機能神経外科学会より認定されている。小児に対する経験もある術者が実施する。

術後管理に関しても、治療後は状態が安定するまで自治医科大学とちぎ子ども医療センター PICU で管理する。小児の全身管理に習熟しており、無呼吸等の合併症があっても対応可能である。

以上のことから、本臨床研究の実施は理論的にも、実質的にも可能と思われる。

IX 遺伝子治療臨床研究の実施計画

IX.1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

IX.1.1 本臨床研究の実施に際し自治医科大学医学部附属病院内に設置される委員会

本臨床研究について、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 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正)に基づき審査を行うため、病院に自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会を

設置する。上記の委員会の設置に関しては、自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会設置規程に従うものとする。

IX.1.2 本臨床計画の実施手順

本臨床研究は抽出を行わない単一用量非対照オープン試験である。遺伝子導入手術は自治医科大学医学部附属病院手術室で、術前・術後管理は自治医科大学とちぎ子ども医療センターで行う。親権者からのインフォームドコンセントが得られた患者に対し、治療を実施する。

(1) 本臨床研究の目的

臨床研究の主要評価項目は、AADC 欠損症患者被殻内への AAV-hAADC-2 注入療法の安全性である。副次的評価項目は、① AAV-hAADC-2 注入療法の有効性であり、その判定は発作記録と臨床的評価に基づいて行う。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 の投与方法

AADC 欠損症患者の線条体（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 4 例を予定している。AAV-hAADC-2 の注入量は 1×10^{12} vg/mL の濃度で、最大 50 μ L を被殻内の 4 個所に分けて注入する。具体的には片側の被殻あたり 2 個所、両側で計 4 個所に各々最大 50 μ L を注入する。注入量（vector genomes : vg）は 1 症例あたり 200 μ L で 2×10^{11} vg である。

(3) 前治療薬および併用薬

Base line の 8 週間以前より服用している薬を前治療薬、Base line から終了または中止時の観察及び検査日まで使用した全ての薬を併用薬とする。

ドパミン受容体遮断作用を有する薬剤、免疫抑制剤、抗凝固薬、抗血小板薬、他の治療薬は Base line の 8 週間前より本臨床研究が終了するまで原則として使用してはならない。筋緊張緩和薬、抗てんかん薬は Base line の 8 週間前から Visit 9 (Month 6) まで変更してはならない。ただし遺伝子治療後に薬剤の効果が過剰になった場合には減量する。

(4) 対象患者

対象は当院および研究協力機関に通院中で、髄液検査、酵素活性測定、あるいは遺伝子診断で診断が確定されている AADC 欠損症患者 4 例とする。新たに診断が確定した患者が出た場合には、追加実施する可能性がある。

(5) 評価項目 (資料 1)

- ① 患者情報調査 (家族に記載依頼)
発作記録 - oculogyric crisis およびてんかん発作の頻度、持続時間
自律神経症状 発汗、体温、脈、血圧、下痢の記録
- ② 一般身体所見 (バイタルサインを含む)
- ③ 神経学的所見 (乳幼児神経学的検査チャートを使用)
- ④ 運動機能評価スケール Alberta Infant Motor Scale(AIMS)
ビデオ撮影
- ⑤ 認知機能・発達検査 新版 K 式発達検査
- ⑥ 有害事象
- ⑦ 併用薬
- ⑧ 臨床検査 (血液検査、凝固検査、生化学検査、免疫検査、PCR 分析)

血液検査	赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、MCV、MCH、MCHC、白血球数、好中球数、リンパ球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、血小板数
凝固検査	PT、aPTT、INR
生化学検査	BUN、クレアチニン、Na、K、Cl、血糖、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、GOT (AST)、GPT (ALT)、Al-P、GGT (γ GTP)
免疫検査	AAV 抗体
PCR 分析	連続 3 検体が陰性になるまで、採取と分析を継続する。

- ⑨ 心電図
- ⑩ AADC のトレーサーである FMT を使用した脳の PET スキャン
- ⑪ 脳の MRI、CT
- ⑫ 脳波
- ⑬ 髄液検査
髄液圧、細胞数、蛋白、糖
L-Dopa、Dopamine、5HTP、HVA、5HIAA

(6) 評価スケジュール (資料 4)

IX.2 被験者の選択基準および除外基準

総括責任者あるいは総括責任者が指名した研究者は、本臨床研究を開始するに先立ち、被験者が選択基準に合致し除外基準に抵触しないこと、インフォームドコンセントが得られていることを確認しなくてはならない。対象者は、本臨床研究にエントリーする前に、以下に示す選択基準の全ての項目を満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しないものとする。

IX.2.1 選択基準

- ① 髄液検査所見、酵素活性測定あるいは遺伝子診断により診断が確定している
AADC 欠損症日本人患者 4 名
- ② 治療実施時年齢 4 歳以上
- ③ 他の神経変性疾患を示唆する所見を認めない患者
- ④ 治療後の頻回の診察を含め、臨床研究に必要な条件を遵守することが可能なこと
- ⑤ 臨床研究に参加する前の少なくとも 2 ヶ月間、内服薬を変更しないこと
- ⑥ 患者の親権者から、インフォームドコンセントが得られること

IX.2.2 除外基準

- ① 脳血管障害をはじめ、明らかな心血管系疾患を有する患者
- ② 脳内の悪性新生物、臨床的に明らかな他の神経疾患の合併
- ③ 5 年以内の、治療済みの皮膚がんを除くその他の悪性腫瘍の病歴
- ④ コントロールされていない高血圧、具体的には収縮期血圧 160 mmHg 以上
- ⑤ 血液凝固異常症、あるいは抗凝固療法が必要な患者
- ⑥ 臨床的に明らかな免疫異常症（例えば免疫抑制薬が必要な症例）
- ⑦ MRI が撮影できない患者
- ⑧ FMT-PET で異常所見を認めない症例
- ⑨ 重篤な薬物アレルギーの既往のある患者
- ⑩ 過去 6 ヶ月以内に、本臨床研究、他の臨床研究、治験のいずれかに参加したことのある患者
- ⑪ 以下のコントロールが困難な疾患を合併する患者
 - a) 高度な腎障害患者（血清クレアチニン > 2.0 mg/dl かつ BUN > 25 mg/dl）
 - b) 高度な肝障害（AST/GOT あるいは ALT/GPT が正常域上限の 2.5 倍以上）
 - c) コントロールが困難な糖尿病患者（随時あるいは食後血糖値 > 200 mg/dl かつヘモグロビン A1c > 9 %）
- ⑫ 全身状態が重篤な状態である患者
- ⑬ その他、総括責任者が本臨床研究の対象として不相当と判断した患者

IX.2.3 対象者の参加取りやめ

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やめることができる。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。

IX.3 倫理的事項

IX.3.1 被験者の保護

本臨床研究に関係するすべての研究者は「臨床研究に関する倫理指針」（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号 <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/index.html>）及びヘルシンキ宣言（2009 年韓国ソウル）に従って本臨床研究を実施する。

本プロトコールでの「医療機関」は、上記指針における「臨床研究機関」に対応する。

IX.3.2 被験者の同意取得方法

本臨床研究の対象者は、未成年で、かつ発語がなく書字も不可能で、意思表示が困難であるため、同意を得ることは不可能である。よって、親権者を代諾者として承諾を得る。被験者の親権者に対して、臨床治療研究実施医師より、臨床研究「AADC 欠損症に対する遺伝子治療」参加のしおり（資料 2）を基にして十分な説明を行う。さらに、研究実施医師と利害関係のない自治医科大学附属病院臨床研究支援センターのコーディネーター（薬剤師、看護師または臨床検査技師）が、研究実施医師とは独立してわかりやすく説明を行い、自由意思による同意を文書にて得ることとする。

【患者（代諾者）への説明事項】

- 1) 病名、病期、推測される予後に関する説明
- 2) 本研究が臨床研究であること
- 3) 本臨床研究のデザイン及び根拠（rationale：意義、登録数、必要性、目的）
- 4) 臨床研究治療の内容

治療用ベクター、投与方法、投与量、臨床研究全体の期間など

- 5) 臨床研究治療により期待される効果
- 6) 予期される有害事象、合併症、後遺症とその対処法について

合併症、後遺症、治療関連死を含む予期される有害事象の程度と頻度、及びそれらが生じた際の対処法に関する説明

- 7) 費用負担と補償

通常の治療にかかる費用は保険制度でまかなわれること、健康被害が生じた場合の補償は一般診療での対処に準ずることなど、一般診療と同様であることの説明

8) 代替治療法

現在の一般的治療や標準治療法の内容、効果、毒性など代替治療を選択した場合の利益と不利益

9) 予想される利益と可能性のある不利益について

臨床研究に参加することによって享受できると思われる利益と被る可能性のある不利益に関する説明

10) 病歴の直接閲覧について

「精度管理のため他の医療機関の医療関係者が医療機関の長の許可を得て病歴などを直接閲覧すること」など監査の受け入れに関する説明

11) 同意拒否と同意撤回

臨床研究参加に先立っての同意拒否が自由であることや、いったん同意した後の撤回も自由であり、それにより不当な診療上の不利益を受けないこと

※ 同意撤回とは、研究参加への同意の撤回（下記①、②）を意味し、同意の撤回が表明された場合には、下記①か②のいずれであるかを明確にし、速やかに病院長に報告すること。

① 同意撤回：研究参加への同意を撤回し、以後のプロトコールに従った治療、フォローアップのすべてを不可とすること

②（すべてのデータの研究利用を含む）同意撤回：研究参加への同意を撤回し、参加時点からのすべてのデータの研究利用を不可とすること

12) 人権保護

氏名や個人情報を守秘されるための最大限の努力が払われること

13) 臨床研究に関わる利益相反

各々の研究者が本研究に関する利益相反の有無の申告書を提出していること
利益相反があっても、それにより研究の倫理性及び科学性がゆるがないこと

14) 研究に関わる費用

本研究、またはその一部が研究費によって行われる場合には、その内容

15) 研究成果の公表

本臨床研究で得られた結果は学術論文、学会にて公表すること。その際にも公表内容には個人情報に関することは含まないこと

16) データの二次利用

委員会が承認した場合に限り、個人識別情報とリンクしない形でデータを二次利用する可能性があること

17) 知的財産権の帰属

本臨床研究から生じる知的財産権は研究者に帰属すること

18) 研究組織

本臨床研究が研究助成金などの資金提供を受けている場合には、それらを記載する。

19) 質問の自由

担当医師の連絡先のみでなく、医療機関の研究責任者、臨床研究の総括責任者（または研究事務局）の連絡先を文書で知らせ、研究や治療内容について自由に質問できることの説明

代諾者の同意

本臨床研究の開始に先立ち、総括責任者、又は分担研究者が代諾者より文書による同意を得る。代諾者が臨床研究参加に同意した場合、本臨床研究の同意書を用い、説明をした医師名、説明を受け同意した患者と代諾者名、同意を得た日付の記載があることを確認する。同意の取得に際しては質問の機会と、本臨床研究に参加するか否かを決断するのに十分な時間を与え、全ての疑問点に関して被験者が満足する様に説明する事とする。また、別途定めた自治医大附属病院・臨床研究支援センターに所属し、薬剤師、看護師または臨床検査技師の資格を有する施設コーディネーターが説明補助を行うものとする。同意文書は2部写しを作成し、1部は患者・代諾者に手渡し、1部は施設コーディネーターが保管する。原本はカルテに保管する。

IX.3.3 被験者の安全性確保および健康被害補償

A. 安全性確保

- a. 安全性を確保するために、遺伝子導入は入院して実施し経過観察を密に行う計画である。
- b. さらに、本実施計画書の IX.5.5 「予測される副作用およびその対処方法」に則って適切に対応する。

B. 健康被害補償

本臨床研究に関連して副作用等、本臨床研究と因果関係を有する健康被害が生じた場合の補償に関しては以下のように対応する。

- a. 急性期および症状が固定または治癒するまでの治療費、検査費、入院費は本研究グループが負担する。これは他の医療機関で治療された場合にも適用する。
- b. 但し、医療費以外の実費や、副作用等による症状が固定した後の治療費を含む費用については補償しない。

IX.4 実施期間および目標症例数

IX.4.1 予定登録数・登録期間・追跡期間

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ヶ月後までとする。ただし、5年後までは一定の評価を行い、さらに10年後まで安全性に関して長期フォローする。目標症例数は4例とする。

IX.5 遺伝子治療臨床研究の実施方法

IX.5.1 対照群の設定方法

本臨床研究は無作為抽出を行わないオープン試験であり、対照群の設定は行わない。

IX.5.2 遺伝子導入方法

被験者は治療開始 10 日前 (Day -10) に自治医科大学附属病院に入院する。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投与する。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。具体的には、同附属病院における通常臨床で使用している定位的脳手術装置並びに定位的脳手術支援ソフトウェア (FrameLink, Medtronic 社) を用いて被殻に AAV-hAADC-2 の注入点 2 ヶ所を設定する。注入点は被殻の中心に近い背外側よりで十分に離れている事を条件として症例ごとの脳画像に基づいて決定する。

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 4 cm 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。注入部位までの穿孔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 検査を実施し穿孔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サイドガスを用いた滅菌処理を施す。

IX.5.3 前処置および併用療法の有無

通常の全身麻酔時に行う処置の他には特に前処置を行わない。内服薬の投与量は Base line の 8 週間前から、評価 9 (Month 6) までに変更しない。なお適切なりハビリテーションは随時行って良いこととする。

IX.5.4 臨床検査項目および観察項目

IX.5.4.1 検査・観察のスケジュール

遺伝子導入手術後 2 週間 (Day 14) までは入院することとする。患者は資料 4 に表示したスケジュールにしたがって評価と臨床検査を受ける。ベクター投与直後 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 スキャンは Base line (Day -14 ~ -1)、評価 9 (Month 6)、評価 19 (Month 24)、評価 31 (Month 60) に実施する。その結果によって、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、Base line、評価 9 (Month 6) に患者の血清を採取して測定する。

Baseline

手術直前の評価 (Day -14 ~ Day -1)

対象者は自治医科大学とちぎ子ども医療センターに入院する

インフォームドコンセント、病歴の聴取、発作記録

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

Alberta Infant Motor Scale (AIMS)

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

PET scan、頭部 MRI 検査、脳波

臨床検査 (血液、凝固検査、生化学、AAV 抗体)

PCR 検査

心電図

手術 (Day 0)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

併用薬、有害事象

頭部 CT 検査：手術直後に実施

(Day 1)

有害事象、PCR 検査、臨床検査（血液、凝固検査、生化学）

(Day 3)

有害事象、頭部 CT 検査、PCR 検査

(Day 7)

有害事象、PCR 検査

評価 1 (Day 7 ± 2 days) 入院中の評価

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見

併用薬、有害事象、頭部 MRI 検査

臨床検査（血液、生化学）

評価 2 (Day 14 ± 3 days) 入院中の評価

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見

併用薬、有害事象

臨床検査（血液、生化学）

<1年目の経過観察開始>

評価 3 (Day 28 ± 5 days) Month 1

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見

AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

頭部 MRI 検査、脳波

臨床検査（血液、生化学）、髄液検査

評価 4 (Day 42 ± 5 days)

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見

併用薬、有害事象

評価 5 (Day 56 ± 5 days) Month 2

発作記録、一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経学的所見

併用薬、有害事象

評価 6 (Month 3 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

臨床検査 (血液、生化学)

評価 7 (Month 4 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)

併用薬、有害事象

評価 8 (Month 5 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)

併用薬、有害事象

評価 9 (Month 6 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

AIMS

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象

PET scan、頭部 MRI 検査、脳波

臨床検査 (血液、生化学、AAV 抗体)

評価 10 (Month 7 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)

併用薬、有害事象

評価 11 (Month 8 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)

併用薬、有害事象

評価 12 (Month 9 ± 7 days)

発作記録、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経学的所見

ビデオ撮影、新版 K 式発達検査

併用薬、有害事象