

子量以外のバンドは認められないこととする。一方、産生細胞およびプラスミドに由来する DNA の混入についてはそれぞれ特異的な配列を標的とした定量的 PCR 法を用いて検討し、基準は 120 pg/ml 以下とする。エンドトキシンは LAL アッセイにより測定し、基準は 10 EU/ml 以下とする。この方法の測定感度は 0.005 EU/ml である。また、精製に使用した塩化セシウムの残留に関しては、NEL Laboratories において ICP-MS 法により測定する。この方法の感度は 5 ng/mL であり、1.4 μ g/ml 以下を合格とする。無菌性の確認は BioReliance 社に委託して行われ、14 日間にわたる培養で細菌および真菌が検出されないことを基準とする。なお、本研究で使用するヒト AADC 遺伝子を搭載した 2 型 AAV ベクター (AAV-hAADC-2) の品質検査の結果を添付する (参考資料 2)。

② 患者に投与する AADC 遺伝子の純度およびその安全性

AAV-hAADC-2 に搭載されたヒトサイトメガロウイルスプロモーター (略称 CMV) は、ヒト AADC 遺伝子のみを転写し AADC (EC 4.1.1.28) が発現する。また、ヒト成長ホルモンの poly A 付加シグナル (略称 GH pA) により転写が終了する。細胞培養および動物実験において AADC の過剰発現による毒性は報告されていない。

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相同組換えにより生成した野生型 AAV がヘルパーウイルスの存在下で複製することがあり得る。野生型 AAV の混入を検出するため、作製したベクターを野生型のアデノウイルスとともに HEK293 細胞に感染させ、低分子量の DNA を回収し電気泳動を行って AAV に相当するバンドを確認する。この方法の検出感度は 10^7 ゲノムあたり 1 コピーであり、検出感度以下を基準とする。

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に低い。本研究に用いる濃度以上の AAV ベクターをサル脳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³⁶⁾、骨格筋内への注入では悪影響は認められていない。米国で行われているパーキンソン病に対する AAV ベクターによる 3 種類の遺伝子治療については、2006 年 8 月の時点で手術操作によって生じたと推察される軽度の頭痛が報告されているのみで、ベクター自体によると考えられる副作用は生じていない。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³⁷⁾。本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。

⑥ 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本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、血液および唾液はPCR法でベクターDNAが陰性になるまで検査する（「9-(5)-④. 臨床検査および観察項目」を参照のこと）。なお、本研究の対象患者は女性では閉経期以降の患者、男性では治療後には子供をもうけることを希望しない患者としている。

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。

⑧ がん原性の有無

これまでのところ野生型のAAVやAAVベクターを原因とする腫瘍発生の報告はなく、がん原性はないものと考えられる。

(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

AAVベクターはHEK293細胞（ヒト胎児腎細胞由来の5型アデノウイルスによる形質転換株）に3種類のプラスミドをトランスフェクションして製造される。このHEK293細胞はベクターを製造するAvigen社およびGenzyme社において厳密に品質管理がなされている。

① 培養細胞の純度

HEK293 細胞は Avigen 社において希釈法によって AAV ベクターに適したクローンが選択され、品質管理試験が施行されている。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は専門の検査会社 (BioReliance Corp. (Rockville, MD)) にてテストされ、安全性が確認されている。実際に細菌および真菌については直接培地に接種して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による検出法および Vero 細胞による培養試験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 HEK293 細胞の安全性が確認された。また細胞の培養に用いられている培地、FBS などは全て FDA の基準を満たすものである。

② 細胞の遺伝子型、表現型の安全性

いくつかの細胞内酵素 (lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase, nucleoside phosphorylase) 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。また実際ベクター作製にはマスターセルバンクからの継代数が 4 から 20 までの HEK293 細胞を用いており、表現型が安定していると考えられる時期の細胞をベクター作製に使用している。

③ 被験者に投与する細胞の安全性

被験者にはこの HEK293 細胞は投与されない。AAV ベクターの精製の過程でこの HEK293 細胞は破碎、除去される。その残留物に関しては必要に応じ適切な純度試験が設定される。

(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 2 つ報告されている。1 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 1 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 歳、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³⁸⁾。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³⁹⁾。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^{40) 41)}。

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 (γc) 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 原がん遺伝子の近傍にレトロウイルスが組み込まれ、その異常活性化ががん化の引き金となった⁴²⁾。最近報道された白血病第 3 例目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⁴³⁾。レトロウイルスベクターによる挿入発がん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がんに至ったのはフランスでの X-SCID の事例だけである。細胞のがん化には複数の遺伝子異常が蓄積する必要があるが、1 個の原がん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 γc 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⁴⁴⁾。

本臨床試験が上記と異なる点

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、パーキンソン病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、本臨床試験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がんの危険性は極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 γc 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個所に組み込まれて発がん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が⁴⁵⁾、死亡した患者 (Jessie Gelsinger) はこれよりも少ない投与量 (6×10^{11} vg/kg) であった。

(5) これまでに実施された臨床試験における成績

これまで 2 型 AAV ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究として、米国で 12 種類の疾患に対して合計 30 のプロトコールが提唱されている {Office of Biotechnology Activities, NIH, USA による⁴⁶⁾⁴⁰⁾}。このうちパーキンソン病に対しては、以下のような 3 種類の臨床研究が行われている。いずれも primary outcome を safety assessment とした、phase I non-randomized, open label, uncontrolled, single group assignment study である。2006 年 4 月の米国神経学会で公表された結果では、これまでに AADC の 3 例、GAD の 12 例、CERE120 の 6 例にベクターの投与が行われ、AAV-hAADC-2 投与例で術後すぐに軽快した頭痛を生じた以外に有害事象は報告されていない。

導入遺伝子	Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)	Glutamic acid decarboxylase (GAD)	Neurturin (CERE-120)
遺伝子の性状	ドパミン合成系の酵素	抑制性神経伝達物質 GABAの合成酵素	神経栄養因子
ベクター投与量	低用量群 9×10^{10} 中用量群 3×10^{11} 高用量群 9×10^{11} (vector genomes)	低用量群 3.5×10^9 中用量群 1.0×10^{10} 高用量群 3.5×10^{10} (particles)	低用量群 2×10^{11} 高用量群 8×10^{11} (vector genomes)
予定症例数	15 (各群5)	12 (各群4)	12 (各群6)
投与経路	定位脳手術	定位脳手術	定位脳手術
投与部位	両側の被殻	片側の視床下核	両側の被殻
評価	臨床症状 (UPDRS, 患者日記, GDS, MMSE, Hoehn & Yahr) FMT-PET, MRI	臨床症状 (CAPIT, UPDRS) FDG-PET	臨床症状 (UPDRS, 患者日誌など) ^{18}F -dopa PET
予定観察期間	5年間 FMT-PETは、ベクター投与1ヶ月後と6ヶ月後	1年間	1年間
2006年4月に米国神経学会 (AAN) で公表された結果 (資料5)	低用量群の3名に遺伝子導入を行った。それぞれ術後1、3、6ヶ月の時点で、患者日記による評価で症状の改善がみられた。FMT-PETでは、平均15%のFMTの取込みの増加が認められた。術後すぐに軽快した頭痛があったが、重篤な副作用は認めない。	12症例に遺伝子導入完了。11例で6ヶ月後の評価まで終了。安全性に問題はなかった。FDG-PETで、期待された効果 (淡蒼球内節と視床VL核におけるFDGの取込み減少と大脳皮質運動野の取込みの増加) が認められた。	低用量群の6例に遺伝子導入を完了。2-17ヶ月の観察期間において、副作用は認められなかった。

UPDRS: Unified Parkinson's Disease Rating Scale, GDS: Geriatric Depression Scale (Mood Assessment Scale -Short Form), MMSE: Mini Mental State Examination, CAPIT: Core Assessment Program for Intracerebral Transplantations, FMT: [^{18}F] Fluoro-metatyrosine, FDG: [^{18}F] Fluoro-deoxyglucose

パーキンソン病以外に、頭蓋内への2型 AAV ベクター注入を行った遺伝子治療としては、Canavan 病の小児に対して欠損した酵素の遺伝子を発現する AAV ベクターを大脳に投与した結果が最近報告され⁴⁷⁾⁴¹⁾、特段の副作用を認めることなくプロトコルが遂行されている。

嚢胞性線維症の治療を目指した臨床研究では、合計7つのプロトコルが実施されている。いずれも2型 AAV ベクターを経気道的に投与するもので、結果が既に報告されている4つのプロトコルにおい

て合計 80 例に対して最大で 1×10^{13} vg 相当量が使用されているが、ベクター自体の毒性による副作用は見出されていない^{48) 42) 49) 43) 50) 44) 51) 45)}。体内へのベクターの注入に基づく治療法としては、血友病 B の遺伝子治療を目指して骨格筋^{52) 46) 53) 47)}ならびに肝臓²⁴⁾を標的とするプロトコールが実施された。血友病 B に対して、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、その他の副作用は認められていない。体内への注入を行った臨床研究は全て第 I 相試験であるが、これらの報告をまとめると以下ようになる。

対象疾患	血友病 B	血友病 B	Canavan 病
標的組織	骨格筋	肝臓	大脳皮質
ベクター投与量	2×10^{11} , 6×10^{11} , 1.8×10^{12} (vg/kg)	8×10^{10} , 4×10^{11} , 2×10^{12} (vg/kg)	8×10^{11} , 1×10^{12} (vg, 総投与量)
投与経路・投与部位	大腿・下腿部骨格筋への直接注入	カテーテルによる肝動脈内注入	頭蓋骨 6 個所を開窓し脳実質内に注入 (定位脳手術)
症例数	8 例	7 例	10 例
年齢 (平均)	23-67 (39)	20-63 (34)	2.0-6.8 (4.1)
観察期間	1 年以上	1 年以上 (平均 2 年以上)	1 年以上 (平均 2 年以上)
その他特記事項	5 例で注入部に軽度の一過性の痛みまたは血腫。 全例で AAV キャプシドに対する中和抗体価の著明な上昇。	2 例で治療後に軽度の肝逸脱酵素の一過性上昇。 全例で AAV キャプシドに対する中和抗体価の著明な上昇	3 例で AAV キャプシドに対する中和抗体価の軽度の上昇

血友病 B に対する遺伝子治療では骨格筋・肝臓のいずれを標的とした場合においても全例で 2 型 AAV に対する中和抗体価の著明な上昇が認められた。Canavan 病を対象とした場合の中和抗体価の上昇は血友病 B の場合に比べて軽度であった。これは中枢神経系に対する遺伝子導入法の場合には①ベクター量が数十分の一程度であること、②ベクターが中枢神経内に留まっていれば免疫反応は起こりにくいこと、などによるものと考えられる。2 型 AAV に対する中和抗体価は健常人においても一定の割合で認められるものであり、かつベクターの有効性に著しい影響はおよぼしていないことから、有害事象としての副作用には該当しないと考えられる。以上の報告を総括すると、2 型 AAV ベクターの臨床的安全性に関してはこれまでのところ特段の疑念は見出されていない。

なお、2 型以外の AAV に由来するベクターを使用した遺伝子治療臨床研究はこれまで報告されていない。

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

以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。

- ① 米国において、2 型 AAV ベクターを使用した血友病や嚢胞性線維症に対する臨床試験が行われて

おり、これまで2型 AAV ベクターに起因する副作用は報告されていない。

- ② 薬物治療で十分な効果が得られなくなった進行した病期のパーキンソン病患者に対しても、本研究と同様なプロトコールにより、本研究と同じく Avigen 社から供給された2型 AAV ベクターを使用した臨床試験が2004年12月に既に開始されている。また、2型 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も2003年8月から行われている。さらに、神経栄養因子 neurturin 遺伝子を搭載した2型 AAV ベクターを使用した臨床試験も開始されている。これまで、副作用は報告されていない。
- ③ 申請者らは、パーキンソン病のモデル動物を使用して、前臨床試験を行っており、効果と安全性を確認している。特に、パーキンソン病患者と同様の症状を呈する MPTP サルにおいて運動障害の改善効果が得られている。
- ④ 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。
- ⑤ 申請者らは、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。

以上のことから、本研究の実施は理論的にも、実質的にも可能と思われる。

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

本研究は抽出を行わない患者間用量比較オープン試験であり、臨床治験の第 I/II 相に相当する。

9-(1)-1 研究の目的

本研究の主要評価項目は、進行期パーキンソン病患者被殻内への AAV-hAADC-2 注入療法の安全性である。副次評価項目は、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 の発現量も副次評価項目とし、FMT-PET によって判定する。

9-(1)-2 AAV-hAADC-2 の投与方法

進行期パーキンソン病患者の線条体(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群では第1群の3倍量である 9×10^{11} vg を注入する。具体的な注入法は表2に示す。なお、副作用が生じた場合には、必要に応じてその群の症例数を増やし、安全性の評価を強化する。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。

表 2 ベクターの群別投与量

群	症例数	総用量 (vg)	注入速度 (μ L/min)
1	3	3×10^{11}	1
2	3	9×10^{11}	3

9-(1)-3 前治療薬および併用薬

Screening の 8 週間以前より服用している薬を前治療薬、screening visit において患者が承諾書に署名した日以降に使用した薬を併用薬とする。

ドパミン受容体遮断作用を有する薬剤、抗てんかん薬、免疫抑制剤、抗凝固薬、抗血小板薬、他の治療薬は screening visit の 8 週間前より本研究が終了するまで原則として使用してはならない。抗バ薬は screening visit の 8 週間前より 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抗バ薬の効果が過剰になった場合には L-dopa を減量する。

9-(1)-4 対象患者

対象は自治医科大学附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。

9-(1)-5 評価項目 (資料 2)

- 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 抗パーキンソン病薬 (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、尿検査)

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、フィブリノゲン
生化学検査	BUN、クレアチニン、Na、K、Cl、Mg、P、Ca、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	PMBC、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。
尿検査	女性に対しては、念のため妊娠反応を検査する。

- ⑦ 心電図
- ⑧ 脳の PET スキャン
- ⑨ 脳の MRI スキャン

- ⑩ 患者の記載する症状日誌
症状を「ジスキネジアを伴う ON」、「ジスキネジアを伴わない ON」、「部分的な OFF」、「完全な OFF」に分類して評価
- ⑪ ON と OFF における UPDRS
ON は抗パーキンソン病薬の効果が最大限発揮されているときとする。OFF は抗パーキンソン病薬を 12 時間休薬後の症状とする。ただし 12 時間の休薬に耐えられない場合は、耐えられる最大休薬時間後の評価とし、研究中をとおして基準を変えないこととする。
- ⑫ Hoehn & Yahr の重症度
- ⑬ Geriatric Depression Scale (GDS) の short form
- ⑭ Mini-Mental State Examination (MMSE)

9-(1)-6 評価スケジュール (添付資料 6)

(2) 被験者の選択基準および除外基準

総括責任者は、研究を開始するに先立ち、対象者が選択基準に適合し除外基準に適合しないこと、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、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。

9-(2)-1 選択基準

- ① 「厚生省特定疾患：神経変性疾患調査研究班（1995 年度）の診断基準」を満たす特発性パーキンソン病で、初期には L-dopa が有効であり、また他の神経変性疾患を示唆する所見を認めない患者
- ② 治療時点での年齢は 75 歳以下
- ③ 発症年齢は 40 歳以上
- ④ L-dopa による 5 年以上の治療歴を有する
- ⑤ 治療開始時の OFF state での Hoehn & Yahr の重症度が IV 度
- ⑥ UPDRS のスコアの合計 (OFF state) が 20~80 点
- ⑦ ドパミン治療に対する反応が明らかで、on と off で UPDRS-III (運動スコア) の改善が明らかであること。具体的にはドパミン治療によって UPDRS-III が 8 点以上改善する
- ⑧ 耐え難い運動合併症、具体的には UPDRS-IV の項目 B (症状の日内変動) のスコアが 3~7 であり、適切な薬物療法によっても満足できる治療効果が得られず、定位脳手術が可能な患者
- ⑨ 女性の場合は閉経していること。男性の場合子供をつくらないことに同意すること (ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を使用して子供をつくる場合はこの規定に該当しない)
- ⑩ 治療後の頻回の診察を含め、研究に必要な条件を守ることが可能なこと
- ⑪ 研究に参加する前の少なくとも 2 ヶ月間、パーキンソン病治療薬を変更しないこと
- ⑫ 患者本人から、インフォームドコンセントが得られること

9-(2)-2 除外基準

- ① 脳血管障害、抗精神病薬や毒物への暴露、脳炎等の病歴によって、あるいは進行性核上性麻痺や

- 小脳症状、錐体路徴候、自律神経徴候、認知症、幻覚や妄想などの症状によって、あるいはラクナー梗塞や中脳被蓋部の萎縮、橋と小脳の萎縮などの magnetic resonance imaging (MRI) 所見によって、二次性あるいは非典型的パーキンソニズムであることが示唆される患者
- ② 過去6ヶ月以内に、日に3時間以上続く強く激しいジスキネジアの病歴を有する患者
 - ③ 既にパーキンソン病に対する定位脳手術（淡蒼球凝固術、視床凝固術、脳深部刺激）を実施済みの患者
 - ④ MMSE (Mini-Mental State Examination) で20点以下、あるいは神経心理検査で認知症と診断される患者
 - ⑤ 過去6ヶ月以内に幻覚や妄想を認めた患者、統合失調症あるいは affective disorder の病歴のある患者
 - ⑥ 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
 - ⑦ 脳内の悪性新生物、臨床的に明らかな神経疾患（例えば年齢相応でない、明らかな脳萎縮）
 - ⑧ 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
 - ⑨ 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
 - ⑩ 血液凝固異常症、あるいは抗凝固療法が必要な患者
 - ⑪ 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）
 - ⑫ GDS (Geriatric Depression Scale) の short scale が10点以上、抗うつ薬服薬中は5点以上
 - ⑬ MAO-A 阻害薬、あるいは抗精神薬を服薬中
 - ⑭ MRI が撮影できない患者
 - ⑮ FMT-PET で異常所見を認めない症例
 - ⑯ AAV-2 に対する中和抗体価が高い患者 (1:1200 以上)
 - ⑰ 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該当しない
 - ⑱ 3年以内に痙攣発作の既往のある患者、抗てんかん薬を服薬中の患者、あるいは脳波検査でてんかん性の異常を認める患者
 - ⑲ 重篤な薬物アレルギーの既往のある患者
 - ⑳ 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
 - ㉑ 以下の管理不良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) 管理不良な糖尿病患者（随時あるいは食後血糖値 > 200 mg/dl かつヘモグロビン A1c > 9%）
 - ㉒ その他、主任研究者が本研究の対象として不適当と判断した患者

9-(2)-3 対象者の参加取りやめ

全ての対象者は研究のいかなる時点においても、不利益を被ることなく、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。

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。

(3) 被験者の同意の取得方法

本研究に参加する候補者は、自治医科大学附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、「パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究参加のしおり」(資料3)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のコーディネーター(治験推進室の薬剤師あるいは看護師)が、研究実施医師とは独立してわかりやすく説明を行い、文書による同意を得ることとする。

(4) 実施期間および目標症例数

実施期間は、厚生労働大臣の承認後、自治医科大学附属病院病院長による開始承認の日から、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年後までは有効性・安全性に関して一定の評価を行い、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6例とする。副作用が生じた場合には、必要に応じてその群の症例数を増やし、安全性の評価を強化する。治療後の評価に関しては各群とも同じとする。

(5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法

① 対照群の設定方法

本研究は無作為抽出を行わない患者間用量比較オープン試験であり、対照群の設定は行わない。

② 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)に自治医科大学附属病院に入院する。遺伝子の導入は定位脳手術によって線条体(被殻)内へ直接注入する。全ての外科的な手技は、運動異常症に対して行われる大脳基底核を目標とした定位・機能神経外科手術の標準的な手技にしたがうものとする。原則として、手術は全身麻酔下に行う。全身麻酔の方法は、麻酔科医と相談の上、ラリングアルマスクを用いた気道確保等、安全かつ最も侵襲の少ないと思われる方法を選択する。AAV-hAADC-2を注入する目標となる被殻は手術に先立って撮影したMRI画像上で同定する。具体的には、自治医科大学附属病院において通常使用しているRadionics社製CRW-FN定位脳手術装置ならびにImage Fusion softwareを含む定位脳手術支援ソフトウェアStereo Planを用いてワークステーション上に表示されるMRI画像の中で、AAV-hAADC-2の注入点となる被殻内の2個所のポイントを決定する。2個所の目標点は、被殻の中心に近い背外側よりで十分に離れていることを条件として、患者本人の画像上で手術中に決定する。

頭蓋骨にあけるburr holeは1側につき1つとし、そこから2トラックの刺入路で先の2つの目標部位にAAV-hAADC-2を注入する。Burr holeの位置は通常の視床や視床下核を目標とする定位脳手術で穿頭する位置とし、Hair lineより後方でBregmaの前方、正中より約4cmを目安とするが、撮像したMRI画像で脳表およびAAV-hAADC-2注入部位までの経路に存在する血管構造を避けるように適宜移動する。穿刺には定位脳手術装置に取り付けたmicromanipulatorを用い、Avigen Device Cannulaを直接、目標点に刺入する。先端が目標に達していることは、Cアームを用いたレントゲン透視で確認する。

AAV-hAADC-2を含む溶液は、専用のシリンジポンプを用いて1 μ l/min(第1群)または3 μ l/min(第

2群)の速度で50分かけて注入する。1個所の注入が終了したら、cannulaを引き抜き、同じburr holeから、2番目の注入目標点に新たなcannulaを刺入する。1個所目と同様にAAV-hAADC-2を含む溶液を注入後、対側も全く同じように、1つのburr holeから2個所の被殻内の目標部位にAAV-hAADC-2を含む溶液を注入する。4個所の注入が完了したら、cannulaを抜去した後、通常の穿頭手術同様に出血がないことを確認して、皮膚を縫合閉鎖する。定位脳手術用フレームを取り外して麻酔覚醒後、直ちに頭部CTスキャンを撮影し、血腫などの合併症の有無を確認する。定位脳手術装置をはじめとする手術に用いた器具は、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て十分に滅菌する。

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。薬物療法、特にL-dopaの投与が本治療では必須であるので、必ず併用する。抗パ薬の投与量はscreening visitの8週間前から、評価9 (Month 6)までは変更しない。ただし遺伝子治療後に抗パ薬の効果が過剰になった場合はL-dopaを減量する。なお適切なリハビリテーションは随時行って良いこととする。

④ 検査項目および観察項目

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。患者は添付資料6に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 (表)。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 -10~-1)、評価3 (Day 28)、評価9 (Month 6)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。

このほか治療前後の検査で特記すべきことは、ベクター排泄の検討とAAVベクターに対する免疫反応の評価を行うことである。まずベクターの排泄量を調べるため、患者の血液を、screening visit、Day 1~3の連続3日間採取してPCRでベクターDNAを調べる。その後は、ベクターDNAが検出されなくなるまで評価ごとに採取・検査する。AAVカプシド蛋白質に対する抗体は、screening visit、評価2 (Day 14)、評価9 (Month 6)に患者の血清を採取して測定する。

Screening 手術 (遺伝子の注入) 前 8 週間以内

インフォームドコンセント、病歴の聴取、一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
UPDRS の評価 ON で part I~IV、OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)
Hoehn & Yahr、MMSE、GDS (Mood Assessment Scale - Short Form)
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の記録トレーニング
臨床検査 (血液、生化学、PMBC、AAV 抗体)、心電図

Baseline 手術直前の評価 (Day -10~Day -1)。対象者は自治医科大学附属病院脳神経センターに入院する。

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
UPDRS の評価 ON で part I~IV、OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象
PET scan、頭部 MRI 検査、臨床検査（凝固検査、尿検査）

手術

(Day 0)

一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経所見
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、有害事象
頭部 MRI 検査

評価 1

(Day 7 ± 2 days) 入院中の評価

一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経所見
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、有害事象
臨床検査（血液、生化学）

評価 2

(Day 14 ± 3 days) 入院中の評価

一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経所見
UPDRS の評価 ON で part II と III のみ評価
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、有害事象
頭部 MRI 検査
臨床検査（血液、生化学、PMBC、AAV 抗体）

<1年目の経過観察開始>

評価 3

(Day 28 ± 5 days) Month 1

一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経所見
UPDRS の評価 ON で part I~IV、OFF で part II と III（part III はそれぞれビデオ撮影）
Hoehn & Yahr
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象
PET scan、頭部 MRI 検査
臨床検査（血液、生化学、PMBC、尿検査）

評価 4

(Day 42 ± 5 days)

一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経所見
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、有害事象

評価 5

(Day 56 ± 5 days) Month 2

一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経所見
UPDRS の評価 ON で part II と III のみ評価
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 6

(Month 3 ± 7 days)

一般身体所見（バイタルサインを含む）、神経所見

UPDRS の評価 ON で part I~IV、OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)

Hoehn & Yahr

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象
臨床検査 (血液、生化学、PMBC)

評価 7

(Month 4 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 8

(Month 5 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 9

(Month 6 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見

UPDRS の評価 ON で part I~IV、OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)

Hoehn & Yahr、MMSE、GDS (Mood Assessment Scale -Short Form)

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

PET scan、頭部 MRI 検査

臨床検査 (血液、生化学、PMBC、AAV 抗体、尿検査)

評価 10

(Month 7 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 11

(Month 8 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 12

(Month 9 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 13

(Month 10 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 14

(Month 11 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見

服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 15 (Month 12 ± 7 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
UPDRS の評価 ON で part I~IV、OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象
臨床検査 (血液、生化学)

<2年目の経過観察開始>

評価 16 (Month 15 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 17 (Month 18 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 18 (Month 21 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 19 (Month 24 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
UPDRS の評価 ON で part I~IV、OFF で part II と III (part III はそれぞれビデオ撮影)
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象
臨床検査 (血液、生化学)

<3年目の経過観察開始>

評価 20 (Month 27 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 21 (Month 30 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 22 (Month 33 ± 14 days)

一般身体所見 (バイタルサインを含む)、神経所見
服薬中の抗パーキンソン病薬、その他の併用薬、症状日誌の確認、有害事象

評価 23 (Month 36 ± 14 days)