

遺伝子治療臨床研究に係る第一種使用規程について (国立がんセンター)

- ④ 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に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について（遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会） P1
- ④ 遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会委員名簿 P3
- ④ 第一種使用規程承認申請書 P4
- ④ 生物多様性影響評価書（改訂後） P7

平成 21 年 3 月 19 日

**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
法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について**

遺伝子治療臨床研究に係る
生物多様性影響評価に関する
作業委員会 委員長 吉倉 廣

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（平成 15 年法律第 97 号）に基づき申請のあった下記の遺伝子組換え生物等の第一種使用規程について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. 単純ヘルペスウイルス 1 型－チミジンキナーゼ及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体を発現し、マウスアンフォトロピックウイルス 4070A の env 蛋白質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス(SFCMM-3)

申請者：国立がんセンター 総長 廣橋 説雄

申請日：平成 20 年 6 月 9 日

【作業委員会の評価結果（国立がんセンター）】

1. 遺伝子組換え生物等の種類の名称：単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体を発現し、マウスアノトロポウイルス 4070A の env 蛋白質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス(SFCMM-3)
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
申請者：国立がんセンター 総長 廣橋 説雄
<p>(1) 生物多様性影響評価の結果について</p> <p>① 他の微生物を減少させる性質</p> <p>申請されている第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、SFCMM-3 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微量と考えられる。</p> <p>さらに、SFCMM-3 は増殖能を失っているため、マウス白血病ウイルス (MLV) の感染等により gag, pol 及び env 遺伝子を発現している細胞に感染した場合等を除いて増殖することはない。</p> <p>したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、SFCMM-3 は環境中に拡散したとしてもやがて環境中から消滅すると考えられる。</p> <p>SFCMM-3 及びそれに由来する増殖能を獲得したウイルス (RCR) の感染性は、野生型 MLV と同等と考えられ、野生型 MLV の微生物への感染性は知られていない。また、SFCMM-3 及び RCR は単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子及び細胞内欠損ヒト低親和性神経成長因子 (ΔLNGFR) 遺伝子を発現するが、HSV-TK 及び ΔLNGFR が競合等で他の微生物を減少させる性質はないと考えられる。</p> <p>これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。</p> <p>② 病原性</p> <p>SFCMM-3 及び RCR は野生型アノトロポウイルス MLV4070A と同様に、広範囲の動物に感染し、挿入変異によりがん化を引き起こす可能性がある。しかし、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、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微量と考えられる。SFCMM-3 は、ヒト血清 (補体) により速やかに不活化され、さらに、SFCMM-3 は増殖能を欠損している上、RCR 出現の可能性が極めて低い第三世代のパッケージング細胞を使用して製造していること等により、患者体内に RCR が侵入する可能性も極めて低く、RCR が万一患者体内に侵入した場合も、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、RCR が環境中に放出される可能性は極めて低い。HSV-TK 遺伝子及び ΔLNGFR 遺伝子の発現により病原性を示す可能性は非常に低い。</p> <p>これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。</p> <p>③ 有害物質の産生性</p> <p>SFCMM-3 及び RCR の有害物質の産生性は知られておらず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。</p> <p>④ 核酸を水平伝達する性質</p> <p>SFCMM-3 及び RCR が患者体外に排出された場合には、広範囲の動物に感染し、その核酸がゲノム中に組み込まれる可能性がある。しかし、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、SFCMM-3 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微量と考えられ、野生動物に核酸が伝達される可能性は非常に低い。RCR が多量に出現した場合には、血液、体液等を通じてその核酸が伝達される可能性はあるが、RCR 出現の可能性は極めて低い。</p> <p>これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。</p> <p>⑤ その他の性質</p> <p>SFCMM-3 及び RCR が感染可能な野生動物等の生殖系細胞のゲノム中に組み込まれて、核酸を垂直伝達する可能性は完全には否定できないが、RCR が出現する可能性は極めて低い上、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、増殖性を失った SFCMM-3 が生殖系細胞に感染する可能性は非常に低い。</p> <p>これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を垂直伝達する性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。</p>
<p>(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論</p> <p>以上を踏まえ、SFCMM-3 を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生じるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。</p>

厚生科学審議会科学技術部会遺伝子治療臨床研究作業委員会
遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会委員名簿

氏 名	所 属
岩崎 一弘	独立行政法人国立環境研究所主任研究員
小澤 敬也	自治医科大学医学部教授
神田 忠仁	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター長
笹月 健彦	国立国際医療センター名誉総長
島田 隆	日本医科大学医学部教授
早川 堯夫	独立行政法人医薬品医療機器総合機構顧問
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長
○ 吉倉 廣	厚生労働省医薬食品局食品安全部企画情報課参与
渡邊 信	筑波大学生命環境科学研究科教授

○委員長（五十音順 敬称略）
（平成 21 年 3 月 29 日現在）

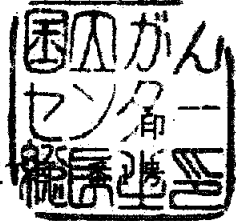
第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 6 月 9 日

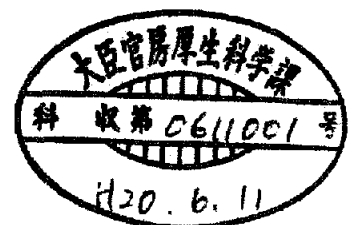
厚生労働大臣 舩添 要一 殿

環境大臣 鴨下 一郎 殿

氏名 国立がんセンター
申請者 総長 廣橋 説雄
住所 東京都中央区築地五



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	単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体を発現し、マウスアンフォトロピックウイルス 4070A の env 蛋白質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス (SFCMM-3)
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	<p>治療施設の所在地 東京都中央区築地五丁目 1 番 1 号</p> <p>治療施設の名称 国立がんセンター中央病院</p> <p>(1) SFCMM-3 溶液は、容器に密封され、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。</p> <p>(2) 凍結状態の SFCMM-3 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 実験室内の安全キャビネット内又は P2 実験室内で閉鎖系にて行う。ドナーリンパ球への SFCMM-3 導入操作、SFCMM-3 導入細胞の培養その他の SFCMM-3 希釈溶液及び SFCMM-3 導入細胞の取扱いも同様に P2 実験室内の安全キャビネット内又は P2 実験室内で閉鎖系にて行う。SFCMM-3 希釈溶液及び SFCMM-3 導入細胞の保管は、P2 実験室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、SFCMM-3 希釈溶液若しくはその凍結品又は SFCMM-3 導入細胞を開放系区域を通して他の P2 レベル区域に運搬する場合には、密閉した容器に入れ、容器の落下や破損を防止するために当該容器を箱等に入れ運搬する。</p> <p>(3) SFCMM-3 溶液（希釈溶液を含む。）又は SFCMM-3 導入細胞を廃棄する際には、滅菌処理（121℃、20 分間以上の高圧蒸気滅菌処理又は 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液への 2 時間以上の浸漬処理による。以下同じ。）を行った後、国立がんセンター中央病院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。</p> <p>(4) 被験者に対する遺伝子導入細胞の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「クリーンルーム」という。）内において、輸注により行う。なお、投与時に SFCMM-3 導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具類は使い捨てとし、適切に滅菌処理を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらの滅菌処理をクリーンルーム外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。</p> <p>(5) 投与後 3 日まで、被験者をクリーンルーム内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的にクリーンルーム外の開放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。</p> <p>(6) クリーンルーム内における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に滅菌処理を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、被験者の尿及び糞便等の排泄物は、投与翌日以降に行われる被験者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応法試験にて自己増殖能を獲得したレトロウイルス（以下「RCR」という。）の存在が否定されるまで、適切に滅菌処理を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらの滅菌処理をクリーンルーム外の区域で行う場合には、二重に密閉</p>

	<p>した容器に入れて運搬する。また、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、SFCMM-3 溶液及び SFCMM-3 導入細胞の取扱いに準ずる。</p> <p>(7) クリーンルーム内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、適切に滅菌処理を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。なお、これらの滅菌処理をクリーンルーム外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。</p> <p>(8) クリーンルーム内における被験者の管理を解除する前に、RCR が被験者の末梢血単核球（以下「PBMC」という。）及び血漿において陰性であることを確認する。RCR が検出されたときは、クリーンルーム内における管理を継続する。</p> <p>(9) クリーンルーム内における管理解除後に被験者の PBMC 又は血漿から RCR が検出された場合は、直ちに被験者をクリーンルーム内における管理下に移し、上記(5)から(8)までと同様の措置を執る。</p>
--	--

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

単純ヘルペスウイルス 1 型—チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体 (Δ LINGFR) 遺伝子を含むレトロウイルスベクター-SFCMM-3 (以下、本遺伝子組換え生物という) は増殖能欠損型レトロウイルスベクターである。本遺伝子組換え生物の宿主はモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus: MoMLV) である。

レトロウイルス科はアルファ〜イプシロンレトロウイルス及びレンチウイルス (以上はオルソレトロウイルス亜科) 並びにスプーマウイルス (スプーマレトロウイルス亜科) の 7 つの属に分類される。マウス白血病ウイルス (Murine leukemia virus: MLV) はガンマレトロウイルス属に属する種である (文献1)。MLV は AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスとして発見された。MoMLV は、実験室内で MLV を継代することにより、病原性の高いウイルス株として Sarcoma 37 細胞から単離されたエコトロピック (同種指向性) レトロウイルスである。MoMLV は発がん遺伝子を持たず、マウスの年齢及び系統にかかわらず感染し、長期間感染したマウスのほぼすべてがリンパ性白血病を発症することが報告されている (文献2)。MoMLV はマウスやラット等のげっ歯類にのみ感染し、ヒトを含む他の動物に対する感染性や病原性の報告はない (文献3)。

文献1: Büchen-Osmond C ed., ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB Management, Columbia University, New York, USA (2004)

文献2: Moloney JB. Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. J Natl Cancer Inst 24:933-951 (1960)

文献3: Coffin JM, Hughes S, Varmus HE ed., Retroviruses, pp14, 478-502, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1997)

2 使用等の歴史及び現状

レトロウイルスは、医学生物学領域において遺伝子導入ベクターとしての応用が最も早く進んだウイルスであり、米国で行われた遺伝子治療の最初の臨床例もレトロウイルスベクターを用いたものであった (文献4)。遺伝子治療/遺伝子マーキングの臨床プロトコルでは、レトロウイルスベクター法を用いたものが 23.2% を占める (文献5)。レトロウイルスの中でも MoMLV は遺伝子導入用ベクターとして広く使われている。

文献4: Blaese RM, et al. T Lymphocyte-directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results after 4 Years. Science 270:475-480 (1995)

文献5: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性 (文献6)

MoMLV 粒子は直径約 100 nm の球形の C 型粒子であり、ウイルスゲノムを内包するコアとそれを取り囲むエンベロープ (外被) からなる。コアは主としてカプシド蛋白質 (CA) により構築されており、その中に 2 分子の RNA ゲノムを有する。そのほか、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、プロテアーゼ (PR)、核酸結合蛋白質 (NC) もコア内部に存在する。コアの周囲にはウイルス産生細胞の細胞膜に由来する脂質二重膜のエンベロープが存在する。エンベロープとコアの間にはマトリックス蛋白質 (MA) が存在する。エンベロープには膜貫通蛋白質 (TM) が突き刺さっており、それに表面蛋白質 (SU) が弱く結合している。SU と TM の複合体はウイルス粒子のエンベロープ上で多量体 (おそらくは三量体) を形成する。

(2) 生息又は生育可能な環境の条件

他のウイルスと同様に、MoMLV は宿主細胞に感染した場合にのみ増殖が可能である (I-3-(4)「繁殖又は増殖の様式」参照)。レトロウイルスは比較的不安定なウイルスであり、体液中、培地中等の限られた環境中でしか感染性を保持できない。なお、ショ糖とゼラチンを添加して凍結乾燥を行うと安定に保存できるとの報告がある (文献7)。

(3) 捕食性又は寄生性

MoMLV はマウス及びラットの細胞に感染し、ウイルスゲノムは逆転写により DNA に変換された後、細胞の染色体に組み込まれる (プロウイルス)。他の生物を捕食することはない。

(4) 繁殖又は増殖の様式

レトロウイルスはキャリアーである動物の血液中や体液中に存在し、他の個体がそれに接触することにより感染する。レトロウイルスが細胞に感染し増殖するときは、1) 吸着、2) 侵入、3) 逆転写、4) 宿主染色体への組み込み、5) RNA 合成、6) 蛋白質合成、7) アセンブリー・放出、8) 成熟といった各段階を経る。一方、レトロウイルスのゲノム配列が生殖系細胞の染色体中にプロウイルスとして組み込まれている場合には、動物の繁殖によって子孫に受け継がれる。

野生型 MoMLV がヒト細胞に感染することはない。ヒト細胞に感染可能なエンベロープ蛋白質 (env 蛋白質) [例えば、4070A アンフトロピック env 蛋白質、gibbon ape leukemia

virus (GaLV) env 蛋白質] を持つ MoMLV を人為的に作製した場合にはヒトへの感染が可能である。

(5) 病原性 (文献8)

MoMLV の病原性に関して、下記のことが報告されている。

- 1) MoMLV は、マウスに悪性腫瘍を含む多様な疾患を発生させる。
マウスで起こる疾病・病態としては、白血病、リンパ腫、貧血、免疫不全、腫瘍及び神経変性が知られている。
- 2) レトロウイルスはランダムに宿主染色体に挿入されるため、細胞機能に重要な遺伝子を活性化又は不活化し、がん性の変化をもたらす危険性がある。
- 3) 内在性ウイルスとの組換えにより増殖性レトロウイルス (replication competent retrovirus: RCR) が出現する可能性がある。
- 4) MoMLV はマウスやラットにのみ感染するので、ヒトに対する感染性及び病原性はない。
- 5) 感染により宿主細胞が破壊されることはない。

(6) 有害物質の産生性

MoMLV が有害物質を産生することはない、また、MoMLV に感染したことにより細胞が有害物質の産生能を獲得するとの情報はない。

(7) その他の情報

1) MoMLV の不活化条件

MoMLV と同じレトロウイルス科に属するヒト免疫不全ウイルス (HIV) の滅菌、消毒法として、①121℃、20 分間の蒸気滅菌、②170℃、2 時間の乾熱滅菌、③20～30 分間の煮沸消毒、④有効塩素濃度 0.1～1.0%の次亜塩素酸ナトリウム、⑤70%エタノール又は 70%イソプロピルアルコール、⑥3.5～4%ホルマリン、⑦2%グルタラル、が有効である (文献9)。また、10%及び 1%ポピドンヨード液 (文献10)、0.3%過酸化水素水 (文献11) で不活化が可能との報告がある。

紫外線及び熱による液体中の MoMLV 及び HIV の不活化を比較した研究によると (文献12)、MoMLV を 1/10 まで不活化するのに必要な紫外線照射量 (D_{10}) は 2,800 erg/mm² であり、熱処理時間 (T_{10}) は 50℃では 50 秒、55℃では 20 秒、70℃では 8 秒である。したがって、55℃、2 分間又は 70℃、50 秒間の熱処理により、MoMLV の感染価を 1/10⁶ に低下させることができると考えられる。また、50℃における T_{10} が 80～90 秒であるとの報告もある (文献13)。

マウス由来のウイルス産生細胞により産生されたレトロウイルスベクターが仮にヒト体内に侵入したとしても、ヒト血清 (補体) により速やかに不活化される (文献14)。抗

α -galactosyl 自然抗体を有する旧世界ザル (文献15) の体内に侵入したときにも同様のメカニズムにより不活化される (文献16) と考えられる。

2) MoMLV からの、増殖能欠損型レトロウイルスベクターの構築 (別紙1)

本遺伝子組換え生物は増殖能欠損型レトロウイルスベクターである。野生型 MoMLV のゲノムから gag、pol 及び env 遺伝子を除去するとともにネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (neo) が挿入されたゲノムを持つ増殖能欠損型レトロウイルスベクター-N2 が作製された。N2 のプロウイルス DNA をもとに、パッケージングシグナル (Ψ) とオーバーラップする gag 構造たん白質 (Pr65 gag) 遺伝子の発現を防止するために開始コドンを終止コドン (TAG) に改変するとともに、グリコシル化 gag (gPr85 gag) の発現を防止するために 5'-long terminal repeat (LTR) と Ψ の前半を含む 5' 側の非翻訳領域をモロニー Maus 肉腫ウイルス (MoMSV) の相同配列で置き換えることにより、LNL6 DNA が作製された。LNL6 DNA に含まれる env 遺伝子の断片と neo の 3' 非コード領域の一部を除去することにより、LN DNA が作製された。これにマルチプルクロニングサイト (MCS) 及び Simian virus 40 (SV40) 初期プロモーター配列を挿入することにより LXSNDNA が構築された。増殖能欠損型レトロウイルスベクター-LXSNDNA (文献17) は、LXSNDNA をパッケージング細胞に導入することにより作成可能である。LXSNDNA を含むプラスミドである pLXSNDNA の塩基配列は、NCBI Nucleotide M28248 に登録されている。本遺伝子組換え生物は、LXSNDNA のゲノムから neo の大半が除去され、HSV-TK 遺伝子及び Δ LINGFR 遺伝子が挿入されたゲノムを持つ。

文献6: 遺伝子治療開発研究ハンドブック 第3章、第2節、1.1 レトロウイルスの増殖サイクル (p. 322)

文献7: Levy JA, et al. Freeze-drying is an effective method for preserving infectious type C retroviruses. J Virol Methods 5:165-171 (1982)

文献8: 遺伝子治療開発研究ハンドブック 第6章、第2節、1. ウイルスベクターの安全性 (p. 627)

文献9: 日本ウイルス学会: ウイルス研究におけるバイオセーフティ指針. ウイルス 43:199-232 (1993)

文献10: 加藤真吾、他. プラーク法を用いた各種消毒剤による HIV-1 不活化の検討. 基礎と臨床 30:3615-3620 (1996)

文献11: Martin LS, et al. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. J Infect Dis 152:400-403 (1985)

文献12: Yoshikura H. Thermostability of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in a liquid matrix is far higher than of an ecotropic murine leukemia virus. Jpn J Cancer Res 80:1-5 (1989)

文献13: Yoshikura H. Ultraviolet sensitivity of helper function of murine leukemia virus. Arch Biochem Biophys 154:76-83 (1973)

文献14: Takeuchi Y, et al. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. J Virol 68:8001-8007

(1994)

文献15 : Galili Uri, et al. Significance of α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) Epitopes and α 1,3 Galactosyltransferase in Xenotransplantation. Trends Glycosci Glycotechnol 11:317-327 (1999)

文献16 : Rother RP, et al. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti- α -galactosyl natural antibody. J Exp Med 182:1345-1355 (1995)

文献17 : Miller AD, et al. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Biotechniques 7:980-991 (1989)

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

本遺伝子組換え生物のゲノムを構成する供与核酸は HSV-TK 遺伝子、SV40 初期プロモーター、 Δ LNGFR 遺伝子、5'-LTR、 Ψ の前半、3'-LTR の R 領域、neo の断片及び制限酵素認識部位等の人工配列である。本遺伝子組換え生物のゲノムの構成と、その配列を DNA 配列に変換したものの制限酵素地図を別紙 2 に示す。また、供与核酸の塩基配列及び蛋白質をコードするものについてはそのアミノ酸配列を別紙 3 に示す。

1) HSV-TK 遺伝子

HSV-TK 遺伝子は、単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼの遺伝子であり、1981 年、Wagner らによりヒト単純ヘルペスウイルス 1 型の CL101 株由来の遺伝子配列が明らかにされている（文献18）。本遺伝子組換え生物のプロウイルス（但し、3'-LTR の R 領域は MoMLV 由来）である SFCMM-3 DNA 中の HSV-TK 遺伝子は単一エクソンからなり、376 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 1,128 塩基対と TAG を終止コドンとする 1,131 塩基対で構成されている。

本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において、HSV-TK 遺伝子は 5'-LTR から転写される。レトロウイルスが細胞に感染して染色体に組み込まれると、3'-LTR 由来の U3 領域と 5'-LTR 由来の R 及び U5 領域からなる LTR がプロウイルス DNA の両端に配置される。したがって、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において、MoMLV LTR 由来の U3 領域が HSV-TK 遺伝子のプロモーターとして機能する。このプロモーターは多くの種類の細胞において構成的に機能する。

2) SV40 初期プロモーター

SV40 はポリオマウイルス科ポリオマウイルス属に属するウイルスであり、ゲノムは環状 2 本鎖 DNA である。SFCMM-3 DNA 中の SV40 由来 DNA は 328 塩基対であり、上流側から順に、72 塩基対のエンハンサー配列（2 回繰り返す）、21 塩基対の 3 回繰り返す構造（6 箇所の Sp1 結合配列を含む）及び TATA ボックスからなる SV40 初期プロモーターを含んでいる。

3) Δ LNGFR 遺伝子

Δ LNGFR 遺伝子は、細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体をコードする遺伝子である（文献19、20、21）。ヒト低親和性神経成長因子受容体（LNGFR）遺伝子は、1986 年 Johnson らによってヒトメラノーマ細胞株 A875 から単離された（文献 19）。LNGFR 遺伝子は 427 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 1,281 塩基対と終止コドン TAG より

成り立っており、LNGFR 前駆体は、N 末端から順に、28 アミノ酸からなるシグナルペプチド、細胞外ドメインとして 6 個のシステイン残基を有する 40 アミノ酸からなるポリペプチドの 4 回繰り返し配列、セリン/スレオニンリッチ領域、1 回膜貫通領域、及び 155 アミノ酸からなる細胞内領域を有している。SFCMM-3 DNA に含まれる Δ LNGFR 遺伝子は、LNGFR 遺伝子を制限酵素 Sst I 及び Pvu II で処理して細胞内領域をコードする塩基対を除去した 940 塩基対のフラグメントを pUC19 の Sma I サイトにサブクローニングして終止コドンを導入したもので、開始コドン ATG の上流に 113 塩基対の非翻訳領域 (UTR) を有し、細胞外ドメイン及び細胞膜貫通領域の 280 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 956 塩基対の遺伝子である。

4) 5'-LTR、 Ψ の前半及び 3'-LTR の R 領域

これらは MoMSV 由来である。I-3-(7)-2) 「MoMLV からの、増殖能欠損型レトロウイルスベクターの構築」に記載したとおり、SFCMM-3 DNA では 5'-LTR から Ψ の前半にかけての部分が MoMSV 由来の配列で置換されており、その結果、産生細胞により産生される本遺伝子組換え生物のゲノムの 5'-LTR、 Ψ の前半及び 3'-LTR の R 領域が MoMSV 由来となる。5'-LTR 及び 3'-LTR はプロウイルスの細胞染色体への組み込みに必須である。プロウイルスの 5'-LTR は、本遺伝子組換え生物の産生細胞においてウイルスゲノムの転写を行うとともに、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において HSV-TK 遺伝子の転写を行う。 Ψ は、産生細胞において本遺伝子組換え生物のゲノムがウイルス粒子にパッケージングされる際に必須である。なお、これらの部分を MoMSV 由来の配列で置換してもウイルスタイターやパッケージング効率は影響を受けないことが報告されている (文献22)。

5) neo の断片

大腸菌 Tn5 由来の neo は 264 アミノ酸からなる蛋白質をコードし、ネオマイシン耐性遺伝子として機能する。本遺伝子組換え生物のゲノムには neo のうち C 末端部分の 53 アミノ酸をコードする 161 塩基の配列、終止コドン及び 17 塩基からなる 3'-UTR が含まれる。

6) 制限酵素認識部位等の人工配列

SFCMM-3 DNA 構築の過程で挿入された制限酵素認識部位等の人工配列は別紙 3-6 に示すとおりであり、本遺伝子組換え生物のゲノム中での位置を別紙 2 に示す。

(2) 構成要素の機能

1) HSV-TK 遺伝子

HSV-TK 遺伝子は、ウイルス特有のチミジンキナーゼであり、376 アミノ酸からなる HSV-TK をコードしている。HSV-TK の基質特異性はヒト細胞が有するチミジンキナーゼとは異なっており、グアノシンの類似物質であるアシクロビル (ACV) やガンシクロビル (GCV)

をリン酸化する活性を有する（文献23、24）。ACV や GCV は生物活性が低いプロドラッグ（prodrug）と呼ばれ、これらを基質とするキナーゼを発現していない細胞に対しては毒性を示さないが、ウイルス感染や HSV-TK 遺伝子導入等により HSV-TK が発現している細胞では ACV や GCV がリン酸化され（一リン酸化物）、さらには内在性のグアニル酸キナーゼとチミジンキナーゼにより二、三リン酸化物へと変換される。この最終産物である三リン酸化物が DNA ポリメラーゼ阻害や DNA 伸長障害を引き起こすことで細胞に強い障害を与え、最終的に細胞を死に至らせる。このように HSV-TK は ACV や GCV との組み合わせにより生物活性を示す特異的な酵素であり、HSV-TK 遺伝子は自殺遺伝子と呼ばれる。尚、Ebeling らによって、T 細胞に導入された HSV-TK 遺伝子の 4.2+/-1.2% に splicing variant が見られることが報告されている。MolMed 社の欧州における治験並びに筑波における臨床研究症例においても splicing variant の出現の可能性は十分想定されるものの、両研究の中で遺伝子導入細胞投与後に引き起こされた移植片対宿主病がガンシクロビルの投与によって鎮静化されていること、また、仮に splicing variant に起因する HSV-TK 不応性の移植片対宿主病が出現したとしても、ステロイドの使用によって鎮静化させることが可能であることから、本試験の遂行上重大な問題とならないと考えられる（文献25）。その他、プロモーターのメチル化により HSV-TK 遺伝子発現が抑制される可能性も考えられるが、splicing variant と同様の理由にて、本研究の遂行上重大な問題とならないと考えられる。

HSV-TK はウイルス由来の蛋白質であるためヒトに対して免疫原性を有しており、本遺伝子組換え生物又はこれと類似のレトロウイルスベクター-SFCMM-2 (HSV-TK/neo 融合蛋白質の遺伝子を持つ) による遺伝子導入 T リンパ球が白血病患者に輸注された結果、8 例中 3 例 (SFCMM-2) 又は 15 例中 4 例 (本遺伝子組換え生物) において、HSV-TK に特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導が確認されている（文献26）。

2) SV40 初期プロモーター

多くの細胞において構成的に機能するプロモーターであり、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入した細胞においては Δ LNGFR 遺伝子の転写を行う。

SV40 初期プロモーター配列中には、23 アミノ酸から成る early leader protein (SELP) をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれる。SV40 を感染させた培養細胞において SELP と同等の分子量を有する蛋白質の発現が確認されており（文献27）、類縁のウイルスにも保存されていることから重要な機能を有することが示唆されるが、その機能についてはほとんど知られていない（文献28）。なお、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入した細胞における SELP の発現の有無に関しては不明である。

3) Δ LNGFR 遺伝子

LNGFR は神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) に対する受容体であり、膜貫通型

の蛋白質である。LNGFR は主に神経系細胞において発現しており、このほかに筋肉、精巣で発現しているが、ほとんどの造血系細胞では発現していない（文献29）。Tropomyosin related kinase (Trk) と結合することで高親和性の神経成長因子受容体を形成すると報告されており、LNGFR 単独では NGF の刺激を細胞内に伝達することはない（文献30）。SFCMM-3 DNA がコードする Δ LNGFR は LNGFR の細胞内領域を欠損させたものであり、 Δ LNGFR を発現する細胞に抗 LNGFR 抗体を加えても細胞内に刺激が伝達されることはない。

4) 5'-LTR、 Ψ の前半及び 3'-LTR の R 領域

これらの供与核酸は MoMSV 由来であるが、MoMLV の相同配列と同等の機能を有していると考えられる。5'-LTR 及び 3'-LTR はウイルスゲノムの細胞染色体への組込みに必須である。また、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において、プロウイルスの 5'-LTR は HSV-TK 遺伝子の転写を行う。 Ψ は、産生細胞において本遺伝子組換え生物のゲノム RNA がウイルス粒子にパッケージングされる際に必須である。

5) neo の断片

本遺伝子組換え生物のゲノムにおいて、neo の断片の上流には同じ読み枠に終止コドンが存在するので、翻訳されることはないと考えられる。また、仮に翻訳されたとしても、野生型 neo が 264 アミノ酸からなる蛋白質をコードしているのに対して、本断片は 53 アミノ酸をコードするだけなので、機能を有する蛋白質を発現する可能性は非常に低いと考えられる。

6) 制限酵素認識部位等の人工配列

本遺伝子組換え生物の生物学的機能には影響を及ぼさないと考えられる。

7) SFCMM-3 DNA 中の有害配列の有無

SFCMM-3 DNA の全塩基配列中の有害配列（がん遺伝子、有害物質、トキシン）の有無について相同性の検索を行ったところ、有害配列は見当たらなかった。

文献18 : Wagner MJ, et al. Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. Proc Natl Acad Sci USA 78:1441-1445 (1981)

文献19 : Johnson D, et al. Expression and structure of the human NGF receptor. Cell 47:545-554 (1986)

文献20 : Hempstead BL, et al. Deletion of cytoplasmic sequences of the nerve growth factor receptor leads to loss of high affinity ligand binding. J Biol Chem 265:9595-9598 (1990)

文献21 : Mavilio F, et al. Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral

- vector-mediated gene transfer. Blood 83:1988-1997 (1994)
- 文献22 : Bender MA, et al. Evidence that the packaging signal of Moloney Murine Leukemia Virus extends into the gag region. J Virol 61:1639-1646 (1987)
- 文献23 : Moolten FW, et al. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res 46:5276-5281 (1986)
- 文献24 : Reardon JE. Herpes simplex virus type 1 and human DNA polymerase interactions with 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate analogues: kinetics of incorporation into DNA and induction of inhibition. J Biol Chem 264:19039-19044 (1989)
- 文献25 : Ebeling SB, et al. Development and application of quantitative real time PCR and RT-PCR assays that discriminate between the full-length and truncated herpes simplex virus thymidine kinase gene. J Virol Methods 109(2):177-186 (2003)
- 文献26 : Bonini C, et al. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. Nat Med 9:367-369 (2003)
- 文献27 : Khalili K, et al. Translational regulation of SV40 early mRNA defines a new viral protein. Cell 48:639-645 (1987)
- 文献28 : Khalili K, et al. The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. J Cell Physiol 204:1-7 (2005)
- 文献29 : Casaccia-Bonnel P, et al. Neurotrophins in cell survival/death decisions. Adv Exp Med Biol 468:275-282 (1999)
- 文献30 : Klein R, et al. The trk protooncogene encodes a receptor for nerve growth factor. Cell 65:189-197 (1991)

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ゲノムの構成と制限酵素地図を別紙2に示す。本遺伝子組換え生物のゲノムは1本鎖RNAであるが、別紙2の制限酵素認識部位はDNA配列に変換したときのものである。本遺伝子組換え生物のゲノムの構成成分は、5'末端側から順に、5'-LTR、 Ψ 、HSV-TK 遺伝子、SV40 初期プロモーター、 Δ LINGFR 遺伝子、neo の断片及び3'-LTRである(詳細はII-1-(1)「構成及び構成要素の由来」及びII-1-(2)「構成要素の機能」を参照)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

SFCMM-3 DNA はサンラファエル研究所(イタリア、ミラノ)において構築された。SFCMM-3

DNA 構築にあたっては、pLXSN [I-3-(7)-2]「MoMLV からの、増殖能欠損型レトロウイルスベクターの構築」参照] (文献 17) の Hpa I 部位 (MCS 内) に HSV-TK 遺伝子が、Hind III (SV40 初期プロモーターの下流) -Nae I (neo の内部) 部位に Δ LNGFR 遺伝子が組み込まれた。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

1) パッケージング細胞株

SFCMM-3 DNA は、ウイルス粒子形成に必要な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、この DNA を通常の細胞に導入してもウイルス粒子を産生することはない。したがって、ウイルス粒子の産生にはパッケージング細胞が必要となる。本遺伝子組換え生物の産生細胞株の作製に使用したパッケージング細胞株は GP+envAml2 (文献31) で、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミド (一方は gag と pol、他方は env 遺伝子) により別々に導入した細胞株である。古い世代のパッケージング細胞株と比較して、このパッケージング細胞を使用した場合には RCR 出現のリスクが極めて少ないことが知られている。

2) ウイルス産生細胞株の作製

エコトロピックパッケージング細胞 GP+E-86 (文献32) に SFCMM-3 DNA をトランスフェクションし、培養上清を回収した。この培養上清をアンフォトロピックパッケージング細胞 GP+envAml2 に感染させることにより、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞を作製した。本遺伝子組換え生物の産生性が高いクローンを選択し、シードセルとした。パッケージング細胞株である GP+envAml2 及び GP+E-86 の作製に用いられたパッケージングプラスミド中の、gag、pol、env 遺伝子の塩基配列及びコードする蛋白質のアミノ酸配列並びにこれらの遺伝子産物からプロセッシングにより生ずるウイルス構成蛋白質を別紙 3 に示す。

シードセルからマスターセルバンク (MCB) を作製し、MCB からワーキングセルバンク (WCB) を作製した。MCB 及び WCB はモルメド社 (イタリア、ミラノ) において作製され、同社内の液体窒素保存容器において保管されている (品質試験の詳細を別紙 4 に、MCB 及び WCB の監視計画を別紙 5 に記載)。

3) 本遺伝子組換え生物の最終製品の製造・輸送

すべての製造はモルメド社の管理された製造エリアにて、GMP 遵守下で行われた (別紙 6)。MCB 又は WCB を融解し、拡大培養及び生産培養を行うことにより本遺伝子組換え生物を含む培養上清を得、これを無菌ろ過して小分け分注することにより、本遺伝子組換え生物を有効成分とする本臨床研究に用いる製剤 (以下、本製剤) を製造した。本製剤の各ロットについて、品質試験を実施する (別紙 7)。

モルメド社において製造された本製剤は国立がんセンター中央病院（以下、中央病院）が輸入する。運搬にあたっては適切な拡散防止措置を執り、ドライアイス詰めで日本まで空輸し、中央病院が受入れ試験を実施する（別紙7）。合格した本製剤は中央病院12階の施設可能な製剤保管室に設置した超低温フリーザー（-80℃）に保管する（当該治療施設の地図、保管場所の概略図及び本遺伝子治療を行う病室を別紙8に示す）。

文献31：Markowitz D, et al. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167:400-406 (1988)

文献32：Markowitz D, et al. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62:1120-1124 (1988)

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ゲノム RNA の一部として存在する。凍結保管中は安定である。感染する動植物の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。

本遺伝子組換え生物が細胞に感染すると、移入した核酸を含むウイルスゲノム RNA は逆転写され、プロウイルスとして細胞染色体に組み込まれる。プロウイルスは細胞染色体の複製に伴って複製されるので、移入された核酸は細胞が生きているかぎり安定に保持される。

HSV-TK 遺伝子は MoMLV の LTR により、 Δ LNFR 遺伝子は SV40 初期プロモーターにより転写される。これらのプロモーターは持続的に機能するので、両遺伝子の発現は構成的である。

本遺伝子組換え生物を製造する際に、ウイルス産生細胞の細胞内で本遺伝子組換え生物のゲノム、gag-pol 遺伝子断片及び env 遺伝子断片が相同組換えを起こし、RCR が出現する可能性がある。RCR の出現機構から、その大部分は gag、pol 及び env 遺伝子を持ち、HSV-TK 遺伝子及び Δ LNFR 遺伝子を持たないものである（env 遺伝子は MLV 4070A 由来、LTR の一部は MoMSV 由来であり、これらは MLV の変異体の範囲と考えられる）。しかし、HSV-TK 遺伝子又は Δ LNFR 遺伝子を持つ RCR（遺伝子組換え生物等に該当）の出現する可能性は否定できない。実際、本研究で用いているマウス NIH3T3 細胞由来のパッケージング細胞・Am12 は、RCR を生成しうることが文献的に知られている（文献33）。また、RCR 産生への関与が指摘されている内因性レトロウイルス（Endogenous Retrovirus：ERV）の存在も指摘されている（文献34）。本遺伝子組換え生物を用いた臨床試験において RCR 出現の報告はないが、上に述べたリスクが存在するため、感度の高い RCR 検出系を用い、感染用レトロウイルスベクター溶液並びに遺伝子導入細胞中の RCR の検出検査を行い、陰性を確認した上で使用する。本遺伝子組換え生物を用いて遺伝子導入したリンパ球の投与

は、イタリア MolMed 社並びに筑波大学において既に行われているが、RCR が出現したとの報告はない。RCR が出現する可能性は理論的にゼロではないものの、きわめて低く、かつそれが原因で長期間にわたり個室管理が必要になる可能性はきわめて低いと考えられる。万が一 RCR が出現した場合は、AZT 等の抗ウイルス剤を用いたウイルス感染症治療を含めて専門家と協議することとする。

文献 33 : Chong H, et al. Replication-competent retrovirus produced by a 'split-function' third generation amphotropic packaging cell line. Gene Ther 3(7):624-629 (1996)

文献 34 : Patience C, et al. Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. J Virol 72(4):2671-2676 (1998)

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

1) 本遺伝子組換え生物の検出方法

本遺伝子組換え生物は宿主である MoMLV にはない HSV-TK 遺伝子を持つので、HSV-TK 遺伝子をリアルタイム RT-PCR 法で定量することにより本遺伝子組換え生物の検出が可能である。

2) 本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞の検出方法

細胞から調製したゲノム DNA を鋳型に、HSV-TK 遺伝子をリアルタイム PCR で定量することにより検出可能である。この方法による定量の下限は、遺伝子導入細胞の非導入細胞中の希釈率として 10^{-3} であることを確認している。

3) RCR の検出方法

・ Mus dunni を用いた増幅法

Mus dunni 細胞に検体を添加し、5 回の継代培養を行う。この培養上清を PG-4 細胞に接種し、S-I-Aッセイを行う。この方法は増殖能を持つレトロウイルスを検出する方法であり、本遺伝子組換え生物に由来する RCR を特異的に検出するものではない。検出感度は 1 RCR/接種物であることを確認している。100 mL あたり 1 RCR が含まれる検体から 300 mL の被検試料をサンプリングして接種した場合、95%の確率で被検試料中に RCR が含まれ、検出される。

・ RT-PCR 法

被検試料から RNA を調製し、4070A env 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物を検出する。本試験の感度は、パッケージング細胞の末梢血リンパ球中の希釈率として $10^{-4} \sim 10^{-5}$ であることを確認している。

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 MoMLV と本遺伝子組換え生物の間には以下の相違点がある。

- ・本遺伝子組換え生物は gag、pol 及び env 遺伝子を欠損しているため、本遺伝子組換え生物が感染した通常の細胞はウイルス粒子形成に必要な蛋白質を合成できない。したがって、本遺伝子組換え生物は gag、pol 及び env 遺伝子を発現する細胞においてのみ増殖できる。
- ・本遺伝子組換え生物は HSV-TK 遺伝子及び SV40 初期プロモーターの支配下にある Δ LINGFR 遺伝子を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物が感染した細胞は HSV-TK と Δ LINGFR を発現する。
- ・MoMLV がマウス、ラット等のげっ歯類にだけ感染しうるのに対して、アンフォトロピック MLV 4070A はこれらのほか、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターの細胞にも感染するとの報告がある（文献35）。本遺伝子組換え生物はウイルス粒子表面に 4070A アンフォトロピック env 蛋白質を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物はマウス、ラット等に加えてヒト、サル、イヌ等、幅広い動物種の細胞に本遺伝子組換え生物の核酸を伝達しうる。

本遺伝子組換え生物が自立的増殖能を欠損している点を除いて、I-3「生理・生態学的特性」に記載した性質は同等であると考えられる。

遺伝子組換え生物等に該当するものを含めて、本遺伝子組換え生物由来の RCR が感染可能な生物種は宿主である MoMLV のそれと異なっているものの、感染様式、病原性及び挿入変異の可能性などの、生物多様性に影響を及ぼす程度に大きな違いはないと考えられる。

文献35 : Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 93:11407-11413 (1996)

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

- (1) SFCMM-3 溶液は、容器に密封され、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態の SFCMM-3 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 実験室内の安全キャビネット内又は P2 実験室内で閉鎖系にて行う。ドナーリンパ球への SFCMM-3 導入操作、SFCMM-3 導入細胞の培養その他の SFCMM-3 希釈溶液及び SFCMM-3 導入細胞の取扱いも同様に P2 実験室内の安全キャビネット内又は P2 実験室内で閉鎖系にて行う。SFCMM-3 希釈溶液及び SFCMM-3 導入細胞の保管は、P2 実験室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、SFCMM-3 希釈溶液若しくはその凍結品又は SFCMM-3 導入細胞を開放系区域を通して他の P2 レベル区域に運搬する場合には、密閉した容器に入れ、容器の落下や破損を防止するために当該容器を箱等に入れ運搬する。
- (3) SFCMM-3 溶液（希釈溶液を含む。）又は SFCMM-3 導入細胞を廃棄する際には、滅菌処理（121℃、20 分間以上の高圧蒸気滅菌処理又は 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液への 2 時間以上の浸漬処理による。以下同じ。）を行った後、国立がんセンター中央病院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) 被験者に対する遺伝子導入細胞の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「クリーンルーム」という。）内において、輸注により行う。なお、投与時に SFCMM-3 導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具類は使い捨てとし、適切に滅菌処理を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらの滅菌処理をクリーンルーム外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。
- (5) 投与後 3 日まで、被験者をクリーンルーム内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的にクリーンルーム外の開放区域に出る場合には、マスク及びガウン着用等のウィルス漏出予防措置を義務付ける。
- (6) クリーンルーム内における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に滅菌処理を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、被験者の尿及び糞便等の排泄物は、投与翌日以降に行われる被験者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応法試

験にて自己増殖能を獲得したレトロウイルス（以下「RCR」という。）の存在が否定されるまで、適切に滅菌処理を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらの滅菌処理をクリーンルーム外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。また、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、SFCMM-3 溶液及び SFCMM-3 導入細胞の取扱いに準ずる。

- (7) クリーンルーム内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、適切に滅菌処理を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。なお、これらの滅菌処理をクリーンルーム外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。
- (8) クリーンルーム内における被験者の管理を解除する前に、RCR が被験者の末梢血単核球（以下「PBMC」という。）及び血漿において陰性であることを確認する。RCR が検出されたときは、クリーンルーム内における管理を継続する。
- (9) クリーンルーム内における管理解除後に被験者の PBMC 又は血漿から RCR が検出された場合は、直ちに被験者をクリーンルーム内における管理下に移し、上記(5)から(8)までと同様の措置を執る。

別紙 9：国立がんセンター中央病院医療廃棄物管理規程

別紙 10：医療廃棄物適正管理処理マニュアル

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

遺伝子導入細胞を患者に投与した後、患者の末梢血単核球（PBMC）及び血漿を試料として、4070A env 遺伝子に対する RT-PCR 法により RCR のモニタリングを実施する。RCR のモニタリングは、クリーンルームにおける管理解除前、投与 14 日後、28 日後、56 日後及び 84 日後並びに生存中にわたり 1 年ごとに実施する。

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

本遺伝子組換え生物を用いた遺伝子導入細胞は、P2 レベルの拡散防止措置を執ることが出来る細胞調製室において、第一種使用規程に従い調製される。本遺伝子組換え生物が細胞調製室の床等に漏出した場合には、ただちにペーパータオル、布等で拭き取る。拭き取った後は、消毒用エタノールを当該箇所が完全に覆われるまで噴霧して 1 分以上放置し、ペーパータオル、布等で拭き取ることにより本遺伝子組換え生物を不活化する。当該ペーパータオル、布等は 121℃、20 分間以上オートクレーブにより滅菌した後、廃棄する。以上により、本遺伝子組換え生物が環境中に漏出して生物多様性影響が生じることはない。

と考えられる。

クリーンルームにおける管理解除後の患者の PBMC 又は血漿において RCR が検出された場合には、第一種使用規程に従い患者を直ちにクリーンルームにおける管理下に移すとともに、血液及び体液の消毒等、第一種使用規程に定められた措置を執る。

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

本製剤を用いて、国立がんセンター中央病院において前臨床研究として5回の遺伝子導入を行った。RT-PCR 法による RCR 試験を5回すべての遺伝子導入細胞最終産物について、また、Mus dunni 細胞を用いた増幅法による RCR 試験をそのうち2回の遺伝子導入細胞最終産物及びその培養上清について行った。その結果、すべて RCR 陰性であった。このようにして調製した遺伝子導入細胞を免疫不全マウス (NOG マウス) に投与したところ、毒性は認められず、遺伝子導入細胞の毒性は極めて少ないことが示唆された。

本遺伝子組換え生物を用いて臨床用遺伝子組み換え細胞を調製する際に、細胞の洗浄工程や遺伝子導入細胞選択工程において本遺伝子組換え生物は除去され、また、本遺伝子組換え生物は他のレトロウイルスと同様比較的不安定なので、細胞培養の過程で不活化が進む。工程に用いる試薬量や機器の設定等から、残留により患者に投与される本遺伝子組換え生物は多くとも 4×10^{-3} 個程度と算出された。本遺伝子組換え生物はマウス由来細胞によって産生されるので、仮に患者に投与されても血清 (補体) により速やかに不活化されと考えられる。したがって、遺伝子導入細胞に混入する本遺伝子組換え生物により、患者体内で遺伝子導入が起きる可能性は極めて低いと考えられる。

筑波大学附属病院において、本遺伝子組換え生物を用いた同様の遺伝子治療臨床研究が実施されている。5例の患者に遺伝子導入細胞が投与されたが、RCR の発生は報告されていない。また、当該臨床研究においては、挿入変異によるがん化等、本遺伝子組換え生物による核酸の伝達が原因と考えられる有害事象は報告されていない。

6 国外における使用等により得られた情報

モルメド社において、現在本製剤の製造に使用されている MCB の 1%細胞及び 5%上清について、Mus dunni 細胞を用いた増幅法による RCR 試験を含む品質試験が行われた。この結果、いずれも品質規格を満たし、RCR 陰性であった。

モルメド社において、本製剤と同様の方法により、治験薬としての生産スケールで独立に製造された 3 ロットの本遺伝子組換え生物製剤及びそれらの生産培養終了時点の細胞 (EPC) について、Mus dunni 細胞を用いた増幅法による RCR 試験を含む品質試験が行われた。この結果、すべてのロットは品質規格を満たし、RCR 陰性であった。

モルメド社において、本製剤と同様の方法で製造された本遺伝子組換え生物製剤による遺伝子導入細胞調製のバリデーションの目的で、4 バッチの遺伝子導入細胞が試験製造され、RT-PCR 法による RCR 試験を含む品質試験が行われた。その結果、すべてのバッチは品質規格を満たし、RCR 陰性であった。また、遺伝子治療臨床試験のために3 バッチの遺伝子導入細胞が調製され、RT-PCR 法による RCR 試験を含む品質試験が行われた。その結果、すべてのバッチは品質規格を満たし、RCR 陰性であった。

本遺伝子組換え生物を用いた遺伝子治療の臨床研究及び治験がイタリア、イギリス及びイスラエルで実施され、合計 40 例の患者に遺伝子導入細胞が投与されたが、RCR の発生は報告されていない。また、挿入変異によるがん化等、本遺伝子組換え生物による核酸の伝達が原因と考えられる有害事象は報告されていない。

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 RCR はアンフォトロピック env 蛋白質を持つので、広範囲の動物に感染しうるが、微生物への感染性は知られていない。したがって、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及び RCR はアンフォトロピック env 蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピック MLV 4070A と同様、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターを含む広範囲の動物に感染しうる。したがって、これらの生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物はヒト、イヌ、サル等の細胞への挿入変異によってがん化を引き起こす可能性がある。マウス、ラットに対する病原性は宿主と同等であると考えられる。

本遺伝子組換え生物からの発現産物である HSV-TK は、GCV や ACV 等のプロドラッグが存在するときのみ感染した細胞で自殺装置として機能する。これらのプロドラッグは自然界に存在しないので、HSV-TK 遺伝子が自然界で自殺機能を示すことはない。また、発現産物である ΔLNGFR は細胞内領域を欠損しているので NGF のシグナルを細胞内に伝達することはなく、ΔLNGFR 遺伝子を導入したリンパ球の増殖に NGF は影響を及ぼさなかった。

との報告がある(文献 26)。したがって、これらの導入遺伝子が発現することにより、本遺伝子組換え生物がヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。

本遺伝子組換え生物が有害物質を産生することではなく、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞が有害物質の産生能を獲得するとの情報もない。したがって、有害物質の産生により病原性を示すことはないと考えられる。

(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がドナーリンパ球とともに患者に投与されることによって当該施設外に出る可能性は極めて低く、出たとしてもごく微量である。また、I-3-(7)「その他の情報」に記載したように、マウス由来の産生細胞により産生された本遺伝子組換え生物はヒト血清により速やかに不活化される(文献 14)。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しているため、通常の細胞に感染してもウイルス粒子を産生することはない。

一方、本遺伝子組換え生物の製造工程中に出現した RCR がドナーリンパ球に混入して患者に輸注された場合には患者体内で RCR が産生される可能性がある。しかし、本遺伝子組換え生物は RCR 出現の可能性が極めて低い第 3 世代のパッケージング細胞を使用して製造されているうえに、本製剤及び遺伝子導入細胞の RCR 陰性を確認してから使用するため、患者体内に RCR が侵入する可能性は極めて低い。また、RCR 試験で検出されなかった RCR が万一患者体内に侵入したとしても、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、RCR が環境中に放出される可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずる可能性の有無等の判断

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及び RCR の有害物質の産生性は知られていない。したがって、影響を受ける可能性の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) 生物多様性影響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RCRはアンフォトロピック env 蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピック MLV 4070A と同様、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターを含む広範囲の動物に感染しうる。したがって、これらの生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物又は遺伝子組換え生物等に該当する RCR によってこれらの遺伝子組換え生物の核酸が野生動物のゲノム中に組み込まれる可能性がある。

(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がドナーリンパ球とともに患者に投与されることによって当該施設外に出たとしてもごく微量である。ごく微量の本遺伝子組換え生物によって野生動物に核酸が伝達される可能性は非常に低い。

遺伝子組換え生物等に該当する RCR が多量に出現した場合には、血液、体液等を通じて他の個体に RCR が感染し、その核酸が伝達される可能性が否定できないが、RCR 出現の可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずる可能性の有無等の判断

よって、核酸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

核酸を垂直伝達する性質

本遺伝子組換え生物が感染可能な野生動物等の生殖系細胞のゲノム中に組み込まれて、核酸を垂直伝達する可能性は完全には否定できない。しかし、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りその核酸が野生動物に伝達される可能性は非常に低い。RCR が出現しないかぎり、本遺伝子組換え生物の核酸が伝達される細胞は本遺伝子組換え生物が最初に感染した細胞に限られ、その細胞が生殖系細胞である確率は低い。また、RCR が出現する可能性は極めて低い。以上から、本遺伝子組換え生物又は RCR の核酸が生殖系細胞に伝達される可能性は極めて低い。よって、核酸を垂直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。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動物種は4070A アンフォトロピック env 蛋白質によって規定されるため、げっ歯類及びヒトを含む広範囲の動物であり、野生型アンフォトロピック MLV 4070A と同じである。自然界で植物及び微生物に感染することはないと考えられる。

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。導入された HSV-TK 遺伝子及び Δ LNgFR 遺伝子が発現することにより、本遺伝子組換え生物がヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しているため、MLV の感染等により gag、pol 及び env 遺伝子を発現している細胞に感染した場合を除いて増殖することはない。MLV に感染しているマウスに本遺伝子組換え生物が感染すれば、MLV がヘルパーとなって増殖する可能性がある。しかしその場合でも、MoMLV は血液を介してのみ感染するので、本遺伝子組換え生物の感染が他個体に広がる可能性はほとんどない。ヘルパーを必要とする本遺伝子組換え生物が野生型 MoMLV と同等に増殖することはないので、やがて環境中から消滅すると考えられる。

環境中でマウスに感染し、MLV ゲノムとの相同組換えによって RCR が出現する可能性や、当該第一種使用によって極めて微量の本遺伝子組換え生物由来 RCR が環境中に放出される可能性は完全には否定できないが、RCR の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は MLV と同等である。ヒトに MLV が感染しても病原性は報告されておらず、RCR がヒト体内に侵入しても、血清中の補体により急速に失活することを考慮すると、ヒト及び他の哺乳動物、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。

したがって、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。

遺伝子治療臨床研究終了報告について

(東京大学医科学研究所附属病院)

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 終 了 報 告 書

平成 2 / 年 / 月 / 日

厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所 在 地	東京都港区白金台4-6-1 (〒108-8639)
	名 称	東京大学医科学研究所附属病院 (TEL03-3443-8111、Fax03-3443-5402)
	代 表 者 役職名・氏名	病院長 山下 直 秀

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の終了報告書を提出します。

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
腎細胞がんに対する免疫遺伝子治療-IV期腎細胞がん患者を対象とする GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究-	東京大学医科学研究所附属病院・内科・ 講師・中岡 隆志

遺伝子治療臨床研究終了報告書


(当初申請日) 平成8年12月2日

研究の名称	腎細胞がんに対する免疫遺伝子治療－IV 期腎細胞がん患者を対象とするGM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究－
研究実施期間	平成10年8月10日から 平成20年3月31日まで

総括責任者	所属部局の所在地	東京都港区白金台4-6-1 (郵便番号 108-8639)	
	所属機関・部局・職	東京大学医科学研究所附属病院・内科・講師	
	氏名	中岡 隆志	
実施の場所	所在地	東京都港区白金台4-6-1 (郵便番号 108-8639)	
	名称	東京大学医科学研究所附属病院	
	連絡先	東京都港区白金台4-6-1 (電話番号 03-3443-8111)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	谷 憲三朗	九州大学・生体防御医学研究所・教授	免疫解析及び内科的診療
	富川 伸二	虎ノ門病院・腎センター・部長	外科切除
	東條 有伸	東京大学・医科学研究所・教授	内科的診療
	長村 文孝	東京大学・医科学研究所・准教授	内科的診療
	内丸 薫	東京大学・医科学研究所・准教授	内科的診療
	東 みゆき	東京医科歯科大学・教授	免疫学的検査の実施
	小柳津直樹	東京大学・医科学研究所・准教授	病理学的診断・評価
	藤目 眞	順天堂大学・医学部・教授	泌尿器科からみた適応患者の選定
	河合 弘二	筑波大学・臨床医学系泌尿器科・講師	腎細胞がん摘出と免疫学的検査の実施
	濱田 洋文	札幌医科大学・医学部・教授	免疫学的効果検査の実施
	奥村 康	順天堂大学・医学部・教授	免疫学的効果検査の管理と指導
	Richard Mulligan C.	ハーバード大学・医学部・教授	遺伝子導入ベクターの作製、遺伝子導入腎細胞がん細胞の品質管理と安全性検査の指導
	Stephen Sherwin A.	セルジェネシス社(CellGenesys)・社長、臨床試験責任者	レトロウイルスベクター産生細胞の管理、遺伝子導入腎細胞がん細胞の大量培養、品質管理と安全性検査

審査委員会の開催状況	<p>平成7年7月28日 第1回委員会開催、実施計画を審査</p> <p>平成7年9月14日 第2回委員会開催、実施計画を審査</p> <p>平成7年10月18日 第3回委員会開催、実施計画を審査</p> <p>平成7年11月15日 第4回委員会開催、実施計画を審査</p> <p>平成7年12月15日 第5回委員会開催、実施計画を審査</p> <p>平成8年3月27日 第6回委員会開催、実施計画を審査</p> <p>平成8年7月2日 第7回委員会開催、実施計画を審査</p> <p>平成8年8月6日 第8回委員会開催、実施計画を承認</p> <p>(平成8年12月2日 厚生大臣及び文部大臣に実施計画申請)</p> <p>平成9年5月20日 第9回委員会開催、実施計画変更を審査</p> <p>平成10年4月28日 第10回委員会開催、実施計画変更を承認</p> <p>(平成10年8月10日 厚生大臣及び文部大臣の承認)</p> <p>平成10年9月29日 第11回委員会開催、対象患者の適応について承認(接種第1例目)</p> <p>平成10年12月10日 書面審査(1例目の患者に対する接種開始を承認)</p> <p>平成11年3月15日 書面審査(1例目の患者に対する追加接種を承認)</p> <p>平成11年4月5日 第12回委員会開催、対象患者の適応について承認(接種第2例目)</p> <p>平成11年6月2日 書面審査(2例目の患者に対する接種開始を承認)</p> <p>平成11年8月5日 第13回委員会開催、対象患者の適応について承認(旧第3例目、後に登録除外。)</p> <p>平成11年12月6日 第14回委員会開催、対象患者の適応について承認(接種第3例目)</p> <p>平成11年7月15日 書面審査(1例目の患者死亡報告書を承認)</p> <p>平成11年9月1日 書面審査(2例目の患者に対する追加接種を承認)</p> <p>平成11年9月17日 書面審査(旧3例目の患者登録除外を承認)</p> <p>平成11年12月14日 書面審査(期間延長を承認)</p> <p>平成13年1月18日 書面審査(期間延長を承認)</p> <p>平成12年1月19日 書面審査(2例目の患者に対する追加接種を承認)</p> <p>平成12年2月18日 書面審査(3例目の患者に対する接種開始を承認)</p> <p>平成12年5月29日 書面審査(3例目の患者に対する追加接種を承認)</p> <p>平成12年6月12日 第15回委員会開催、経過報告を受ける。</p> <p>平成12年7月7日 書面審査(3例目の患者に対する追加接種を承認)</p> <p>平成12年8月21日 書面審査(3例目の患者に対する追加接種を承認)</p> <p>平成12年9月14日 第16回委員会開催、対象患者の適応について承認(接種第4例目)</p>
------------	---

平成12年12月12日	書面審査（4例目の患者に対する接種開始を承認）
平成13年5月10日	第17回委員会開催、対象患者の適応について承認（第5例目）
平成13年6月27日	書面審査（第5例目の患者登録除外を承認）
平成14年2月5日	書面審査（期間延長、責任者変更、第2段階完了報告書を承認）
平成15年3月24日	書面審査（期間延長を承認）
平成15年12月18日	書面審査（3例目患者死亡の報告書を承認）
平成16年3月23日	書面審査（期間延長を承認）
平成17年3月14日	書面審査（期間延長を承認）
平成18年3月20日	書面審査（期間延長を承認）
平成18年9月1日	書面審査（責任者変更を承認）
平成19年1月10日	書面審査（4例目患者死亡の報告書を承認）
平成20年2月4日	書面審査（2例目患者死亡の報告書を承認）

審査委員会の長の職名	氏 名
東京大学医科学研究所附属 ヒトゲノム解析センター長	中 村 祐 

研究の区分	遺伝子治療臨床研究
研究の目的	<p>ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下 hGM-CSF と略する）は 124 個のアミノ酸から構成される糖タンパク質であり、骨髄系前駆細胞の増殖・分化を促進する作用を有するため、ヒトに投与すると好中球、好酸球、単球数を増加させ、それらの機能を活性化させる。また他のサイトカインとも共同し、赤血球系、血小板系造血も刺激する。一方 hGM-CSF には、抗原提示細胞、とくに樹状細胞に作用して、その抗原提示能を増強し、最終的には CD8+ 細胞障害性 T 細胞を介して宿主の抗腫瘍免疫能を増強する作用もあることが報告されており、最近注目されている。本遺伝子治療臨床研究では、hGM-CSF のこの作用に着目し、IV 期腎細胞がん患者に hGM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失自家腎細胞がん細胞を皮内接種する。これにより、hGM-CSF 遺伝子導入自家腎細胞がん細胞接種局所の反応ならびに全身における毒性と、遺伝子導入に用いたレトロウイルスベクターの安全性の評価を行う。さらに本治療法の効果についても、評価・検討する計画をたてた。特に抗腫瘍効果については、臨床的に腫瘍縮小効果を検討することはもちろんのこと、さらに免疫学的研究方法を多く取り入れ、患者体内で誘導される可能性のある抗腫瘍免疫反応を詳細に解析する予定である。これにより将来的に遺伝子治療法を機軸にした、より効果的な腫瘍免疫療法への足掛かりを得ることを期待している。また患者自家腎細胞がん細胞の大量培養ならびに遺伝子導入を本附属病院内臨床細胞工学室にて行うことで、本邦における ex vivo 遺伝子治療の本格的実施に向けての基盤を作ることも目的の 1 つである。</p>
対象疾患	第 IV 期腎細胞がん
実施方法	<p>1) 患者の選択 候補患者に対しては、規定の説明および同意書を用いて本臨床研究についての説明を少なくとも 2 回行った。その段階で患者が本臨床研究への参加を強く希望した場合、東大医科研附属病院・遺伝子治療臨床検討会を開催し、患者の病状が、本臨床研究に参加する上での適応基準を満たし除外基準を満たさないことについて、臨床的観点より検討した。適応症例である可能性が高いと判断された場合にのみ、患者からの文書による同意を取得し、最終的に東大医科研附属病院・遺伝子治療臨床研究審査委員会において、患者の遺伝子治療臨床研究への適応判定を行った。適応と判定された患者に対しては、遺伝子治療臨床研究第 1 段階への参加が認められた。</p> <p>2) 患者数と実施期間 当初、患者計 5 名に対して遺伝子治療臨床研究第 2 段階として、GM-CSF 遺伝子導入放射線照射自家腎癌細胞の作製と 1.4×10^6 個 (4×10^7 個 $\times 1$ 回、2×10^7 個 $\times 5$ 回) 細胞の皮内接種を予定した。研究期間は、厚生省ならびに文部省の承認が得られてから全ての患者への腫瘍細胞接種が終わるまでの約 2 年間で当初予定したが、実際には約 3 年間で要した。最終的には患者計 6 名の GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞を作製し、全例で安全性（細菌、真菌、マイコプラズマ、エンドトキシンならびに複製可能レトロウイルスが検出されないこと）が確認された。その内 4 名の GM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞より規定量以上 ($>40\text{ng}/10^6$ 細胞/24 時間) の GM-CSF 産生を確認できたため、4 名の患者への皮内接種を行った。</p>

	<p>3) 臨床研究計画</p> <p>第1段階(遺伝子導入腎細胞がん細胞製造)：東大医科研附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会において、本遺伝子治療臨床研究の適応症例と判定された患者に対して、腫瘍側腎臓全摘出を行った。手術で摘出した腎癌組織を、同日より東大医科研附属病院臨床細胞工学室内で培養、MFG-S レトロウイルスベクターを用いて hGM-CSF cDNA を導入し、さらに大量培養を行った。これらの遺伝子導入腎癌細胞は、150 グレイの放射線照射後、凍結・保存した。遺伝子導入腎癌細胞の安全性確認は、米国の専門会社(BioReliance 社(一部英国支社を利用)) に依頼して行った。同社にて安全性検査の実施中に、東大医科研分子療法研究分野に於いて、遺伝子導入自家腎癌細胞からの GM-CSF 産生量を ELISA 法を用いて測定した。</p> <p>第2段階(遺伝子導入腎細胞がん細胞接種)：上記の放射線照射 GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞が得られ、その安全性ならびに GM-CSF 産生量が遺伝子治療臨床研究適応判定の為の基準を満たすことが確認された段階で、東大医科研附属病院・遺伝子治療臨床検討会を再度開催し、臨床的な適応について検討した。接種開始に対する患者の意志に変化がなく、臨床的にも接種可能な状態と判断された場合、患者より2度目の文書による同意を取得した。最終的には東大医科研附属病院・遺伝子治療臨床研究審査委員会において、患者への接種開始に関する適応判定がなされた。適応と判定された患者に対してのみ、GM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞を、14 日毎、6 回にわたり皮内に接種した。GM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞に残余分があり、患者が追加接種を希望し、患者への継続接種が医療的に患者に対して有益と判断された場合には、東大医科研附属病院遺伝子治療審査委員会の了承を得た後、同様の方法で追加接種を行った。接種後は患者に出現する可能性のある急性ならびに慢性毒性に関して、血液および尿検査ならびに画像検査等で定期的にモニターすると共に、抗腫瘍免疫誘導効果ならびに臨床的效果に関しては、免疫学的および病理学的検査、ならびに画像検査を用いて詳細にモニターを行った。</p> <p>第3段階(長期観察)：接種後、晩発性の免疫学的反応、抗腫瘍効果や副作用については、患者の生存期間中は米国がん研究所の一般毒性評価基準に従い定期的に観察および評価し、もし原疾患の増悪を認めた場合は、医学的に妥当と思われる補助療法があれば患者の希望に基づいてそれを行った。</p>
<p>研究結果の概要 及 び 考 察</p>	<p>平成 10 年 8 月 10 日に本遺伝子治療臨床研究実施についての公的承認を得た後、平成 13 年 7 月まで、第 IV 期腎癌患者 6 症例において GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞の作製を行った。以下に、遺伝子治療臨床研究第 1 段階の対象となった 6 症例に関する略病歴と、GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞作製結果について記す。</p> <p>I. 遺伝子治療臨床研究第 1 段階結果</p> <p>1) 60 歳、男性 (筑波大学医学部附属病院より紹介)</p> <p>平成 10 年 6 月より血尿、腰痛を自覚し始め、同年 8 月に右腎細胞がん、多発性肺、肝転移と診断された。PS (performance status) は 0-1 であり、同年 9 月 29 日に遺伝子治療臨床研究審査委員会が開催され、本遺伝子治療臨床研究への適応患者との判断がなされた。同年 10 月 5 日に右腎臓全摘出を行い、腎癌細胞培養を開始した。同年 10 月 20 日に規定量以上の GM-CSF を産生する GM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞を得た。同細胞の安全性 (細菌、真菌、マイコプラズマ、エンドトキシン、複製可能レトロウイルスの混入が無いこと)</p>

が確認され、患者の2回目の同意が得られたため、遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認を得た後、同年12月10日よりGM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞接種を開始した。

2) 71歳、男性（国立がんセンターより紹介）

平成10年9月頃より、右脚のしびれ、右大腿部の疼痛を自覚し始め、同年12月に右腎癌、仙骨転移と診断された。疼痛コントロール目的で平成11年2月1日より2月22日までに30Gyの放射線照射を仙骨局所に対して行ったが改善なく、2月18日より硬膜外カテーテルならびに経口にてモルヒネの投与を行い、疼痛をコントロールした。PSは0-1であり、同年4月5日に遺伝子治療臨床研究審査委員会が開催され、本遺伝子治療臨床研究への適応患者との判断がなされた。同4月6日に右腎臓全摘出を行い、腎癌細胞培養を開始した。同年4月19日に規定量以上のGM-CSFを産生するGM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞を得た。同細胞の安全性が確認され、患者の2回目の同意が得られたため、遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認を得た後、同年6月3日よりGM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞接種を開始した。

3) 48歳、男性（独協大学医学部・越谷病院より紹介）

平成11年4月頃より咳が出現し次第に増強し、同年6月に右腎癌、多発性肺・胸膜転移と診断された。PSは0-1であり、同年8月5日に遺伝子治療臨床研究審査委員会が開催され、本遺伝子治療臨床研究への適応患者との判断がなされた。同年8月17日に右腎摘出を行って腎癌細胞培養を開始し、同年9月6日にGM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞を得た。GM-CSF 遺伝子導入細胞の安全性に問題はなかったものの、同細胞よりのGM-CSF 産生量が規準を満たさなかった為、本患者は本遺伝子治療臨床研究第2段階への適応症例ではないとの判断が、同年9月17日に遺伝子治療臨床研究審査委員会によりなされた。

4) 57歳、女性（国立がんセンターより紹介）

平成11年10月頃よりめまいを自覚し始めた。同年10月30日に左腎癌、多発性肝転移と診断された。PSは0であり、同年12月6日に遺伝子治療臨床研究審査委員会が開催され、本遺伝子治療臨床研究への適応患者との判断がなされた。同年12月9日に左腎摘出後腎癌細胞培養を開始し、同年12月27日に規定量以上のGM-CSFを産生するGM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞を得た。同細胞の安全性が確認され、患者の2回目の同意が得られたため、遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認を得た後、同年2月22日よりGM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞接種を開始した。

5) 50歳、男性（国立がんセンターより紹介）

平成11年11月頃より運動時の呼吸困難を自覚していたが放置、平成12年7月に胸部異常陰影を指摘され、精査にて左腎癌、多発性肺転移と診断された。PSは0であり、同年9月14日に遺伝子治療臨床研究審査委員会が開催され、本遺伝子治療臨床研究への適応患者との判断がなされた。同年9月20日に左腎摘出後腎癌細胞培養を開始し、同年10月25日に規定量以上のGM-CSFを産生するGM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞を得た。同細胞の安全性が確認され、患者の2回目の同意が得られたため、遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認を得た後、同年12月13日よりGM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞接種を開始した。

6) 58歳、男性（山梨厚生病院より紹介）

平成12年9月頃より右肩に皮下腫瘍・疼痛が出現し近医を受診したが、抗炎

症剤のみで経過観察されていた。平成 13 年 2 月に疼痛悪化し、精査にて右腎癌、胸膜、骨、肝臓転移と診断された。PS は 0-1 であり、同年 5 月 10 日に遺伝子治療臨床研究審査委員会が開催され、本遺伝子治療臨床研究への適応患者との判断がなされた。同年 5 月 15 日に右腎摘出後腎癌細胞培養を開始し、同年 6 月 7 日に GM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞を回収した。GM-CSF 遺伝子導入細胞の安全性に問題はなかったものの、同細胞よりの GM-CSF 産生量が規準を満たさなかった為、本患者は本遺伝子治療臨床研究第 2 段階への適応症例ではないとの判断が、同年 6 月 28 日に遺伝子治療臨床研究審査委員会によりなされた。

GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞を東大医科研病院細胞プロセスセンターに於いて作製した結果、6 症例の中で遺伝子導入細胞より規定量($>40\text{ng}/10^6$ 細胞/24 時間)以上の GM-CSF 産生が確認された 4 症例に対しては、上述の如く遺伝子治療臨床研究第 2 段階として GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞(以下ワクチン細胞と省略)の皮内接種を開始し、以下の様な臨床経過を辿った。

II 遺伝子治療臨床研究第 2 及び第 3 段階結果

A. 全症例臨床経過

1) (接種第 1 症例) 60 歳男性、右腎細胞癌、多発性肺転移、肝臓浸潤

平成 10 年 12 月 10 日に 4×10^7 個の GM-CSF 遺伝子導入細胞(以下ワクチン細胞と略)の皮内接種を行い、その後 2 週間毎に 2×10^7 個のワクチン細胞の皮内接種を 5 回、さらに 4 回の追加接種を平成 11 年 4 月 27 日まで行った(計 10 回、 2.2×10^8 細胞)。この間患者においては、本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。下記のごとく、接種後より DTH 反応(培養自家腎癌細胞の皮内接種に対する遅延性皮膚反応)は陽性化し、患者末梢血リンパ球解析ならびに病理組織検査結果も、接種により抗腫瘍免疫が誘導されたことを強く示唆する結果であった。臨床的には、最大評価病変の右肺門部転移巣の増殖速度がワクチン細胞接種後に鈍化した、「腎細胞がんの治療効果判定基準」による判定では PD(進行)であった。10 回接種後に MRI で大脳内に 1 cm 弱の腫瘍が 2 個発見され、腎癌の脳転移と診断されたため、それ以降の接種は行われなかった。同年 5 月 10 日に共同研究施設の筑波大学医学部附属病院に転院し、脳転移腫瘍部分への γ ナイフ治療を実施した。その後第 9 胸椎転移病巣による腰痛が出現し、放射線照射を行ったが、下肢対麻痺を来した。患者ならびに家族の強い希望により、同年 5 月 21 日より 7 月 7 日まで 70-140 万単位/日の低量 IL (インターロイキン) -2 の全身投与を行い、最大評価病変のサイズは 1 ヶ月後には約 30% 程度縮小したが、胸水貯留やその他の小転移巣数の増加及びサイズの増大を来した。患者は平成 11 年 7 月 8 日に腫瘍死された。家族の承諾が得られたために剖検を同日に実施した(筑波大学付属病院)。

主要病理解剖診断

腎細胞癌(右腎原発、右腎摘出後、手術標本組織型: 明細胞癌) GM-CSF 免疫遺伝子治療臨床研究後・放射線療法後、

剖検時転移巣組織型:

明細胞癌に加え顆粒細胞癌、紡錘細胞癌の組織型が混在

同上転移: 両肺(多発性)、肝、脾、十二指腸、左腎、胸膜、横隔膜、縦隔リンパ節、鎖骨下リンパ節、傍大動脈リンパ節、

副病理所見

1. 左腎代償性肥大、急性尿細管壊死、
2. 胃・十二指腸出血（腎細胞癌の十二指腸転移巣による）
3. 両側血性胸水（左 3000ml; 右 60ml）
4. 慢性甲状腺炎(30g)
5. 全身のうっ血傾向
6. 心マッサージ術後状態（肺骨髄塞栓）

病理医コメント

- ① 腫瘍免疫作動状態につき：多臓器に多数の腎癌転移結節を認めた。主な転移臓器である肺では、両肺ともにその約 1/2 が腫瘍組織に置換されており、最大の転移巣は右肺の肺門周囲にみられ、その大きさは 70x62mm であった。転移巣の組織型は、原発巣の明細胞癌に加え顆粒細胞癌、一部紡錘細胞癌に相当する像も混在していた。大部分の結節で巣状の壊死を観察した。右肺門部には、広範壊死に陥った結節がみられた。癌組織内へ浸潤するリンパ球はいずれの転移結節にても多数認めたが、広範壊死を示す結節では壊死巣の周囲に少数観察する程度であった。従って当該肺転移巣の広範壊死部分は必ずしも腫瘍免疫作動の帰結ではなく、循環障害など他の要因も推定しうる。免疫染色の結果、肺転移巣内浸潤リンパ球の大部分が CD3+T 細胞であった。腫瘍組織内、特に小壊死巣近傍では多数の CD8+T 細胞を観察した。肝右葉にも転移結節を認めた。組織学的には肺の転移巣と同様の組織型を示し一結節では比較的広範な壊死を伴っていた。この肝転移内にも、CD8+T 細胞を主体とするリンパ球浸潤を観察した。腫瘍内における CD4+T 細胞は少数であった。一方、転移巣周囲の正常組織にも CD3+T 細胞の浸潤を観察したが、肺・肝臓ともにその構成は CD4+T 細胞が優位であった。CD20+B 細胞は、腫瘍内・外ともに少数であった。これらの所見から、腫瘍組織内へ選択的に CD8+細胞障害性 T 細胞が誘導されたことが示唆される。
- ② 遺伝子治療に関する有害事象につき：腎には急性尿細管壊死を認めたが、これは死戦期変化と考えられる。血管炎等、今回の遺伝子治療に関連すると思われる形態学的変化はいずれの臓器にも認められなかった。多臓器にみられた腎細胞癌の転移巣の大部分では、わずかに壊死を認める程度で殆どの癌細胞が生存していたが、肺と肝に比較的広範囲の壊死を伴う結節を 1 個ずつ認めた。これらの細胞では、他の結節に比して CD8 陽性 T リンパ球の浸潤が目立った。ただし、この細胞浸潤は壊死による二次性変化の可能性もあり、遺伝子治療による真の効果と断定はできない。
- ③ 死因につき：腫瘍死と思われる

2) (接種第2症例) 71歳男性、右腎細胞癌、仙骨転移

平成 11 年 6 月 3 日に 4×10^7 個のワクチン細胞の皮内接種を行い、その後 2 週間毎に 2×10^7 個の皮内接種を計 5 回、さらに 11 回の追加接種を平成 12 年 2 月 3 日まで行った（計 17 回、 3.7×10^8 細胞）。この間、患者においては、本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。ワクチン細胞接種に伴い、タリウムシンチグラフィにて仙骨転移腫瘍部分へのタリウム取り込み量の低下を認めたほか、CT 検査でも同部位の造影効果の減少所見を認め、腫瘍血管増生の減少が示唆されたが、治療効果の判定は NC（不変）であった。また、ワクチン接種前には増加していた腫瘍マーカー IAP（inactivated acidic protein）が、6 回接種以降は正常化した。平成 12 年 5 月 11 日に順天堂大学病院・整形外科において仙骨転移部分の開

放生検を実施し、同部分の壊死を病理学的に確認した。なお下記のごとく、同生検部分への浸潤リンパ球は DTH 反応の際に認めたリンパ球と同一クローンであることが確認され、細胞障害性 T リンパ球の可能性が示唆された。患者においては、その後も無治療にて仙骨転移病巣は徐々に縮小傾向にあり、他臓器への新たな転移病巣の出現も認められず、さらには腫瘍マーカー (IAP: inactivated acidic protein) は正常レベルでその後も安定化した。平成 13 年 12 月迄 PSO の状態で、経過観察していたが、同年 12 月に右大腿骨転移病変の出現を認めた為、局所放射線照射と低量インターロイキン-2 投与を開始した。その後 PSO で東京大学医科学研究所附属病院 (東大医科研病院) 外来にて経過観察した。平成 17 年 1 月末頃より左腰痛が出現、MRI 等の画像検査結果から左坐骨/左寛骨部位への転移と診断し、同年 2 月 17 日から 3 月 10 日にかけて同部位に対して 30Gy の放射線照射を行った。同年 12 月には腰椎 (L1 から L4) の転移を認め、同年 12 月 7 日から 28 日に同部位に 30Gy の放射線照射を追加した。その後は腰痛等の症状は抗炎症剤の投与下にて軽快し、PSO の安定した状態で外来通院ができていたが悪性腫瘍に伴う貧血 (Hb 9g/dl 程度) が出現した。平成 18 年 4 月より再度腰痛が出現したため、同部位に 30Gy の追加照射を行った。平成 19 年 10 月末頃より左頸部腫瘍の出現を認め、摘出標本病理検査結果から腎がん転移であることが判明し同年 12 月 7 日より局所への照射を計 42Gy 行った。その後、肺ならびに胸膜への腎がん転移病巣の増大とともに全身状態の悪化を認め、平成 19 年 12 月 26 日に東大医科研病院に入院された。入院後対症療法を行ったが、転移病巣は急速に増大し両側胸膜炎の悪化をきたし、平成 20 年 1 月 19 日午前 7 時 35 分に死亡された。家族の承諾が得られたために剖検を 2 日後に実施した (東大医科研病院)。

主要病理解剖診断

腎細胞癌 (右腎原発、摘出後) GM-CSF 遺伝子腫瘍免疫活性化療法後、

組織型: 明細胞癌主体、紡錘細胞癌部分も混在する

同上転移: 両肺 (多発性)、両胸膜 (癌性胸膜炎)、横隔膜、胃壁、骨 (両側大腿骨、仙骨腰椎 L4) 同上リンパ節: 左肺門、左頸部

副病理所見

1. 左頸部、両側大腿骨骨頭部放射線照射後状態
2. 下部消化管術後癒着状態、右腎、胆嚢摘出後状態
3. 両肺鬱血水腫 (肺重量 左 750g、右 680g)、胸水 (黄色透明液 左 700ml、右 1,200ml)
4. 脾臓萎縮 (30g)、副腎萎縮 (Lt 4.3g、Rt 4.5g)
5. 骨髓低形成骨髓
6. 開頭は許されず

病理医コメント

- ① 腫瘍免疫作動状態につき: 全身性の広範な転移を認めるが、いずれの転移巣に於いても強い腫瘍壊死を認める。頸部リンパ節転移巣は瘰癧・硝子化するが、当該領域は放射線照射の効果と思われる。非放射線照射域での腫瘍組織の免疫組織化学的解析では、壊死領域近傍腫瘍組織内に比較的強いリンパ球浸潤を認め、その殆どが CD3+T 細胞より構成される。CD20+B 細胞は観察しない。CD4/CD8 の二重染色では、T 細胞の殆どが CD8+T 細胞であり、CD4+T 細胞は少数であった。CD8/Ki-67 の二重染色では、細胞回転にある CD8+T 細胞は少数であった。これらの所見は、治療開始後の比較的長期生

存と併せ、意図した抗腫瘍免疫が誘導された証左であると思われる。

② 遺伝子治療に関する有害事象につき：剖検上、遺伝子治療に関連すると思われる有意な有害事象は同定し得なかった。

3) (接種第3症例) 57歳女性、左腎細胞癌、多発性肝転移、多発性肺転移ならびに対側腎転移

平成12年2月22日に 4×10^7 個のワクチン細胞の皮内接種を行い、その後2週間毎に 2×10^7 個の皮内接種を計5回、さらに9回の追加接種を同年9月19日まで行った(計15回、 3.2×10^8 細胞)。この間患者においては、本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。肝転移病巣の総腫瘍量の増加速度は鈍化したものの次第に増加し、治療効果の判定はPD(進行)であった。ただし、肺ならびに腎臓の小転移病巣のサイズには殆ど変化がなかった。平成12年9月29日に東京大学医科学研究所附属病院を退院後、順天堂大学附属病院へ転院し、入院観察下IL-2、インターフェロン α の接種をそれぞれ検討したが、いずれも開始1週間目より肝機能異常が出現したため各投与を中止した。肝機能異常は投与中止にて改善したため、東大医科研附属病院と順天堂大学附属病院の両外来にて定期的に経過観察を行った。その後、肝転移病巣のサイズが徐々に増加したことから、本人の希望により民間病院にて活性化Tリンパ球療法を受けたが改善を認めず病勢は次第に進行し、東京大学医科学研究所附属病院に入院し、対症療法を実施されたが、平成15年11月2日に腫瘍の全身への転移のため死亡された。家族の承諾が得られたために剖検を同日に実施した(東大医科研病院)。

主病理解剖診断

腎癌 淡明細胞癌 GM-CSF 遺伝子治療後(3年11ヶ月)

左腎原発(摘出後) 同上転移：肝、右腎、両肺、脾、脳(放射線照射後)
リンパ節(左肺門、右腎門、腹部大動脈周囲)

副病理病変

1. 多発性胃潰瘍+消化管出血
2. 漿膜炎(浸出性心外膜炎、胸膜炎、胸水(左300ml、右80ml))
3. 僧帽弁閉鎖不全および三尖弁閉鎖不全症、心肥大(430g、両房室拡大)
4. 急性尿細管壊死初期像
5. [高カルシウム血症(PTH-rP ↑ Humoral hypercalcemia of malignancy, compatible)]
6. [麻痺性イレウス]

病理医コメント

① 腫瘍免疫誘導効果につき：腎癌の壊死・アポトーシスは殆ど検出できない。浸潤リンパ球はCD8 T cell 優位であるが、granzyme は発現しておらず、またKi-67でもラベルされない。過去に腫瘍免疫が作動した可能性は否定出来ないが、死亡時点でのactiveな抗腫瘍免疫の作動は観察しない。

② 副作用につき：自己免疫性腎炎を示唆する正常腎組織へのリンパ球浸潤、上皮の破壊像、糸球体の変化等は認めない。GM-CSF 静脈内投与の副作用として漿膜炎が惹起されたとの報告があるが(ref: Blood 83:2707-2714, 1994)、本例で観察された心外膜炎は① 静脈内投与と遺伝子発現ではその血中GM-CSF量に圧倒的な差をもって後者による発現量が低い点、② 組織像から比較的近い過去に発生した病変である(数ヶ月以内)ことが示唆され遺伝子療法実施期間と時間的隔たりがある点、および③ 当該遺伝子療法を受けた一例の剖検

例では当該病変は検出されていない；の根拠により本遺伝子療法に関連した変化ではないと判定する。おそらく心不全に併発した変化であると推定する。

③ 死因につき：消化管出血（出血源は胃）を引き金とし循環血量の減少などの前腎性の影響により尿細管壊死（腎不全）が加わりあらかじめ存在した心不全と合併し複合的要因により死に至ったと思われる。癌性悪液質は背景にあるが直接死因ではないと思われる。脳転移は放射線照射によく反応している。

④ 筋力低下につき：それを説明する形態的变化は同定し得なかった。電解質異常に関連した症状と思われる。

⑤ 心につき：弁膜症による心拡大を認める。心不全としては肺鬱血よりは肝鬱血が前景に立つ。

⑥ 腸閉塞につき：腸閉塞はモルヒネによる麻痺性イレウスの可能性が高い。器質的閉塞は認めない。

⑦ 血小板減少につき：骨髓での巨核球産生はほぼ正常であった。末梢での破壊機序が示唆される。

4) (接種第4症例) 50歳男性、左腎細胞癌、多発性肺転移

平成12年12月13日に 4×10^7 個のワクチン細胞の皮内接種を行い、その後2週間毎に 2×10^7 個の皮内接種を計5回、平成13年2月20日まで行った（計6回、 1.4×10^8 細胞）。この間患者においては、本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。6回接種後、同年2月26日に実施したCT検査において、右前側頭葉皮質に径1cm弱の腫瘍ならびに周辺浮腫像を認めた。本臨床研究の規定に従い、それ以降の追加接種は行わず、東京大学医学部附属病院放射線科において、同年3月15日に転移性脳腫瘍部位へのγナイフ治療を実施した。その後患者ならびに家族の希望により、同年5月7日より東大医科研附属病院にてIL-2、35-70万単位/日の全身投与を開始した。開始後約1ヶ月目より肺腫瘍量の減少を認めはじめ、約2ヶ月目には23%の縮小を認め、IL-2投与中止後の同年10月現在も約33%の減少状態が維持された。IL-2の投与開始時に一過性に脳浮腫の悪化による痙攣発作を認めたものの、脳腫瘍・浮腫の縮小化に伴いこれらの症状は全く認められなくなり、PSO-1の状態での入院観察中であつたが、平成14年1月に脳腫瘍摘出を東京大学医学部附属病院で行った。平成14年夏頃から肺転移巣の徐々の増大を認め、平成16年7月には脳内に新たな転移巣を認めたため、同年8月にγナイフ治療を施行した。その後脳には新たな病変の出現は認められず、しばらくは外来にて低量IL-2の接種を継続し、PSO-1の状態を経過した。平成18年4月に右胸水貯留に伴う呼吸困難のため入院し、胸腔穿刺、廃液ならびに胸膜癒着術治療を施行した。胸椎への多発転移に伴う痛みのため、放射線治療も要した。肺の多発転移も増加、増大傾向にあり、高カルシウム血症も繰り返した。呼吸困難に対して在宅酸素療法（HOT）を導入し、平成18年8月11日に退院したが、同年10月より呼吸困難が増悪し、10月22日に再入院した。入院後、呼吸不全、貧血、疼痛及び高カルシウム血症等に対して対症療法を行ったが、呼吸不全は徐々に進行し、平成18年12月11日午後6時40分に死亡された。家族の承諾が得られたために剖検を翌日に実施した（東大医科研病院）。

主病理解剖診断

腎癌（左腎原発、明細胞癌）術後および免疫遺伝子治療（GM-CSF導入ワクチン）

ン細胞6回接種、IL-2投与)後6年、同上浸潤転移:

両肺多発性転移巣形成、右肺下葉より連続性に横隔膜および肝への浸潤巣形成、下大静脈内浸潤を伴う、肝右葉下面から右副腎を巻き込み腹部大動脈周囲浸潤と進展する浸潤転移巣形成、右前頭葉転移、術後、放射線療法後(腫瘍残存認めず)

主要副病理所見

1. 高度うっ血肝・肝内胆汁鬱滞(1,350g:下大静脈浸潤および肝外胆管圧迫による)
2. 脾腫(720g 慢性うっ血脾[脾機能亢進症])
3. 右胸膜癒着術後
4. 急性尿細管壊死
5. 慢性肺炎
6. 腹水(黄色透明液; 2,600ml)

病理医コメント

- ① 汎血球減少症につき: 骨髄は軽度過形成で3系統細胞に形態的異常を認めない。脾臓の形態所見と併せ脾機能亢進症による汎血球減少症と思われる。その背景要因としては腫瘍の下大静脈浸潤による慢性うっ血が示唆される。
- ② 腫瘍免疫誘導効果につき: 剖検時の腫瘍組織は治療前に採取された手術標本に比し有意に増加する細胞死(TUNEL 標識アポトーシス細胞)およびその体積の50%以上の広範な壊死を認めた。
- ③ 腫瘍内浸潤リンパ球の免疫組織化学的解析につき: 剖検時の腫瘍組織と手術標本との比較において・浸潤CD3+T細胞数・CD4/CD8細胞比・Ki67標識CD8+T細胞数(CTLの指標)・CD25+細胞数(regulatory T細胞の指標)の諸パラメーターにて有意な差は検出し得なかった。
- ④ 有害事象の有無につき: 病理解剖検索において本遺伝子治療により惹起されたとと思われる有害事象は認めなかった。
- ⑤ 死因につき: 腫瘍死と思われる。

B. 有害事象

すべての患者でGM-CSF遺伝子導入自家腎癌細胞接種皮膚部分に発赤、腫脹、硬結ならびに掻痒感を認めた。これらの皮膚所見は約2週後には軽度の硬結を残すのみで、無処置にても自然に軽快した。接種第4症例に於いては、第6回目の接種約48時間後に同部位に水疱形成を認めたが、消毒と皮膚部分の保護により数日で軽快し、2週後には軽度の硬結を残すのみの状態に改善した。全身性の副作用として、37度台の発熱(第1度副作用)を接種第1症例で第7-9回の接種時に、接種第2症例で第1-4回の接種時に認めたが、いずれも無処置にて48時間以内に解熱した。接種第2症例では、第12回の接種後、一過性にイレウス症状を来したが、2日間の絶食にて軽快した。本件は腎摘出術に伴う腹膜癒着に由来する機械的イレウスによるものと診断した。なお本症状が治癒した後さらに5回の追加接種を実施したが、同症状の再発は認められなかった事実からも、本事象はワクチン接種との関連性はないものと判断した。その他、血液・生化学検査、尿検査等の一般臨床検査結果からは、ワクチン接種との関連性が示唆される異常所見は認められなかった。また、接種後に定期的に行われた患者末梢血中の複製可能レトロウイルス検査結果から、患者末梢血中にはワクチン接種直後を含め複製可能レトロウイルスは検出されなかった。

その後の長期的観察結果からも、本ワクチン接種は安全に実施されたものと判断された。

C. 免疫反応関連検査結果

(1) 血液・生化学検査等結果：

ワクチン細胞接種後に末梢血中の好酸球の増加が観察された。各例においてはそのピークが GM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞接種後 48-96 時間後であった。その他腎機能、肝機能などへのワクチン細胞接種の影響は全く認められなかった。また、各種自己抗体の新たな出現も認められなかった。

(2) DTH (遅延性皮膚反応) 検査結果：

DTH 反応は、いずれの患者においてもワクチン細胞接種後より陽性(硬結サイズが 1cmx1cm 以上を陽性と定義)となった。接種第 1-4 症例とも、第 3 回目もしくは第 6 回目のワクチン接種後に培養自家腎癌細胞接種部位は陽性となり、その中でも接種第 1 症例における反応が最も顕著であった。各患者とも、ワクチン接種回数が多い場合に、培養自家正常腎細胞接種部位も陽性となったが、その反応の程度は、接種第 4 症例を除いては腎癌細胞接種部位と比較した場合には減弱していた。

(3) 病理組織検査：

ワクチン細胞接種部位：各患者間での相違はあるものの、第 3 回接種後までには CD4 陽性細胞優位の T 細胞浸潤と脱顆粒を伴う好酸球浸潤を認めた。接種第 3 症例では好酸球浸潤は少なかったが、単核球浸潤の程度は最も顕著であった。その後の細胞浸潤は、接種第 1,4 症例では減少し、接種第 2,3 症例では増加した。皮内 S100 陽性樹状細胞は特に接種第 1,4 症例で明らかに認められたが、接種第 2,3 症例では明らかではなかった。浸潤細胞の HLA-DR 発現は当初は低レベルであったが 30 日目には各患者で著明に増加していた。

DTH 反応部位：DTH 接種部位の浸潤細胞としては、CD4 陽性細胞が CD8 陽性細胞よりも優位であり、さらには CD68 陽性マクロファージの浸潤も顕著であった。好酸球浸潤も全例で認められたが、その程度は様々であった。浸潤細胞数は腎癌細胞接種部位で優位に多かったが、浸潤細胞の種類と比率は腎癌細胞接種部位とコントロール腎細胞接種部位との間に明らかな差は認められなかった。

腫瘍部位：接種第 1 症例においては、原発巣(手術摘出腎癌)、ワクチン細胞 10 回接種終了後に出現した皮膚転移病巣の生検標本、死亡後に剖検が許可されたことから、IL-2 使用後の転移腫瘍部分標本についての病理学的解析が可能であった。この結果、原発腎癌病巣では CD4 陽性細胞の浸潤が主体であった。皮膚転移病巣では CD8 陽性 T 細胞の浸潤を優位に認め、特にアポトーシスを起こしている部分の周辺には CD68 陽性マクロファージの浸潤も著明に認めた。なお好酸球の浸潤は、DTH 部位とは異なり明らかではなかった。

接種第 2 症例においては、ワクチン細胞 17 回接種終了後 3 ヶ月後に仙骨転移病巣の生検を行った。採取できた同部分の組織は全て壊死に陥っており、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を顕著に認めた。

(4) T 細胞レパトリー検査：

患者末梢血リンパ球の TCRV β CDR3 配列を検討した結果、接種第 1 症例の末梢血、DTH 部位、皮膚浸潤部位ならびに肺転移縮小部分に、共通な

オリゴクローン性Tリンパ球の浸潤・増生が認められた。接種第2症例でも、末梢血中にオリゴクローン性のTリンパ球増生を認め、これらの一部は仙骨部腫瘍生検部分にも優位に認められた。接種第3症例でも、接種後に末梢血中にオリゴクローン性のTリンパ球増殖を認め、これらのクローンは皮内反応部分ならびに術中の肝生検部分にも認められた。接種第4症例では、明らかなTリンパ球クローンの出現は検出されなかった。

(5) T細胞機能検査

全4例の患者末梢血リンパ球のCD3抗体もしくはIL-2への反応性がワクチン接種後に増加し、自家腎癌細胞障害(CTL)活性の出現も認めた。特に接種第2, 3症例では、培養自家腎癌細胞へのCTL活性を持つリンパ球が末梢血中に長期間存在することが確認された。接種第4症例でも、弱いながらもCTL活性はワクチン接種期間中増加傾向を認め、IL-2投与後もこの活性は維持された。接種第1症例では、CTL活性は腫瘍増大に従って低下する傾向を認めた。

III. 考察

本遺伝子治療臨床研究を終了するにあたり、これまでに得られた結果をもとに、本臨床研究に関して以下の重要な3点を結論としてあげた。

- (1) レトロウイルスベクターを用いて、臨床研究用のスケールで患者接種において短期的ならびに長期的安全性に問題のない GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞ワクチンを作製することが出来た。しかし、規定以上の GM-CSF 産生量を本ウイルスベクター導入によって確保することは必ずしも容易ではなく、その作製には長い時間と高い費用を要した。今後は、より簡便かつ安定した遺伝子導入細胞の作製法を導入・開発する必要がある。
- (2) GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞ワクチンの接種により、in vitro での検査結果では患者への抗腫瘍特異的免疫誘導効果は検出されたものの、臨床効果としては腫瘍細胞量の多い患者への本療法のみでの腫瘍縮小効果には限界があることが示唆された。今後は腫瘍量が少なく、再燃までの期間が短いことが予想される腫瘍をもつ患者への使用や、手術後アジュバントとしての使用を臨床研究として考慮すべきであると考えられた。
- (3) 本臨床研究に参加した4名の患者さんにおいては、第1回目のワクチン接種後から、各々11ヶ月、8年7ヶ月、3年9ヶ月ならびに6年間生存されている。特に、2患者が6年以上生存されたことは、腫瘍縮小効果自体は明らかでないものの、第IV期腎癌患者の5年生存率が通常10%程度であることを考慮に入れると、本ワクチン接種が腫瘍増殖速度を遅延化させ生存期間延長に大きく寄与した可能性はあり、この観点からも今後(2)で記載した様な方法を検討していく必要があると考えられた。さらに、免疫遺伝子治療臨床研究の臨床効果の評価項目としては、他の免疫療法と同様に、従来の抗癌剤などに対する効果判定基準以外に、再燃までの期間延長効果や生存期間などの特別な評価基準を設ける必要があるものと考えられた。

IV. 今後の方針

上記のように、本遺伝子治療臨床研究は安全に実施され、科学的に評価可能な抗腫瘍免疫反応が患者体内に誘導されたことを確認できた。但し、上述のごとく GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞ワクチンの作製は必ずしも容易ではなく、当初準備されたレトロウイルスベクターを全て使用し、6例の患者の GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌ワクチン細胞の作製を試み、4例で GM-CSF 産生

	<p>量が基準を満たした。今回の我々の臨床研究結果をふまえ、現在センダイウイルスベクターを用いた GM-CSF 遺伝子導入同種腫瘍細胞を用いた新規樹状細胞療法等の新たな方法を準備中である。この方法を用いる利点としては以下の4点が挙げられる。すなわち、1) 接種局所で高 GM-CSF 濃度を確実に得られる、2) センダイウイルスベクターによる GM-CSF 遺伝子導入を行うため、レトロウイルスベクターを用いて ex vivo での遺伝子導入を行うことに伴う費用と時間が大きく節約できる、3) レトロウイルスベクターを用いる場合に比較し、安全性が高いと考えられる、4) 樹状細胞療法を併用するため、抗腫瘍免疫誘導能が高いと考えられる。</p> <p>無論、マウスを用いた前臨床動物実験では確認されてきているものの、本遺伝子治療臨床研究で検出できた様な抗腫瘍免疫が患者体内に安全に誘導できるか否かに関しては未知数であることから、新しい免疫遺伝子治療臨床研究を第 I-II 相研究として行っていく必要がある。但し、理論的に本方法は全ての種類の腫瘍患者に対しても用い得る汎用性の高い方法である為、本方法を用いた臨床研究に早期に移行し、その療法の可能性を検討していくことが、現段階での妥当な選択であると考えられる。</p>
研究成果の公表状況	<p>(関連研究結果の公表状況)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 第1回外科遺伝子治療研究会、平成11年3月25日(福岡)、<u>谷 憲三朗</u>「腎癌の遺伝子治療」 2 第25回日本医学会総会、ランチョンセミナー、平成11年4月3日(東京)<u>谷 憲三朗</u>「悪性腫瘍に対する遺伝子治療の現状」 3 <u>谷 憲三朗</u>他「腎がんに対する免疫遺伝子治療」第87回日本泌尿器科学会総会、シンポジウム4、平成11年4月14日(大阪) 4 The Japan Society of Gene Therapy, 5th Annual Meeting、平成11年6月19日(東京) K.Tani et al. "Clinical Studies of Immunogene Therapy Using GVAX Autologous GM-CSF Transduced Tumor Vaccines for Stage IV Renal Cell Cancer. 5 日本ヒト細胞学会、シンポジウムI、平成11年8月26日(鹿児島)<u>谷 憲三朗</u>他「腎癌に対する免疫遺伝子治療：実施までの経緯と現状報告」 6 日本がん治療学会、特別ワークショップ、平成11年10月14日(岐阜)<u>谷 憲三朗</u>他、「腎癌に対する遺伝子治療」 7 日本遺伝子診療学会主催、市民向けフォーラム、遺伝子診断と治療の今—21世紀の主役になれるか?—、<u>谷 憲三朗</u>、遺伝子治療：現実化への道のり、平成11年11月6日(東京) 8 Kawai, K., <u>Tani, K.</u>, Asano, S. and Akaza, H. Gene-modified immunotherapy for renal cell carcinoma. Contrib Nephrol 128: 75-81, 1999. 9 <u>Tani, K.</u>, Nakazaki, Y., Hase, H., Takahashi, K., Azuma, M., Ohata, J., Oiwa, M., Kitamura, R., Masunaga, A., Maekawa, T., Satoh, N., Adachi, D., Soda, Y., Watari, K., Tojo, A., Yamashita, N., Yoshikawa, H., Tomikawa, S., Eriguchi, M., Wakumoto, Y., Hanazawa, K., Shuin, T., Kawai, K., Hamada, H., Okumura, K., Akaza, H., Fujime, M., Clift, S., Ando, D., Sherwin, S., Mulligan, R., and Asano, S. Progress reports on immune gene therapy for stage IV renal cell carcinoma using lethally irradiated GM-CSF transduced autologous renal cancer cells. Cancer Chemother Pharmacol 46 (Suppl) S73-S76, 2000 10 Hase, H., <u>Tani, K.</u>, Nagayama, H., Watari, K., Takahashi, S., Ooi, J., Shirafuji,

	<p>N., Izeke, T., Nakazaki, Y., Yamashita, T., Nakamura, T., Masunaga, A., Maekawa, T., Tojo, A. and Asano, S. . Case Report: The availability of TCR-V β repertoires analysis with RT-PCR methods for the early detection of pulmonary relapsed T-cell malignancy after the autologous stem cell transplantation. Am J Hematol 64: 124-127, 2000</p>
11	<p><u>Tani, K.</u>, Nakazaki, Y., Hase, H., Asano, S., et al. Clinical studies of immunogene therapy using autologous GM-CSF transduced tumor vaccines (GVAX) for stage IV renal cell cancer. Molecular Therapy 1: S259, 2000.</p>
12	<p>American Society of Gene Therapy: The 3rd Annual Meeting: June 3, 2000. Denver, Colorado <u>Tani, K.</u>, Nakazaki, Y., Hase, H., Asano, S. et al., Clinical studies of immunogene therapy using autologous GM-CSF transduced tumor vaccines (GVAX) for stage IV renal cell cancer.</p>
13	<p>The Japan Society of Gene Therapy: The 6th Annual Meeting: July 27, 2000. Tokyo <u>Tani, K.</u>, Nakazaki, Y., Hase, H., Asano, S. et al., Clinical studies of immunogene therapy using autologous GM-CSF transduced tumor vaccines (GVAX) for stage IV renal cell cancer: Three cases report.</p>
14	<p><u>谷憲三朗</u>、東條有伸、山下直秀、増永敦子、佐藤典治、江里口正純、富川伸二、花澤喜三郎、濱田洋文、垣添忠生、藤目真、赤座英之、浅野茂隆。GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞を用いた抗腫瘍免疫療法の解析：第 59 回日本癌学会総会 10 月, 2000.</p>
15	<p>Wang, Z., Sumimoto, H., Tani, K., Kang, X., Nakazaki, Y., Asano, S. IL-12 synergizes with B7-1 enhance the antitumor immunity in C57BL/6 mice. Int J Mod Cancer Therapy 3: 51-53, 2000</p>
16	<p>Tani K., Nakazaki Y., Hase H., Takahashi K., Monna M., Soda Y., Kitamura R., Machida U., Ohata J., Watari K., Oyaizu N., Satoh N., Tojo A., Yamashita N., Maekawa T., Eriguchi M., Tomikawa S., Hanazawa K., Wakumoto Y., Akaza H., Fujime M., Kakizoe T., Mulligan R., Clift S., Ando D., Sherwin S., Asano S. Case reports on clinical studies of immunogene therapy using autologous. Molecular Therapy 3(5):S76, 2001. American Society of Gene Therapy. May, 2001, Seattle, Washington.</p>
17	<p>Tani K., Nakazaki Y., Hase H., Takahashi K., Monna M., Komine F., Kitamura R., Machida U., Ohata J., Soda Y., Watari K., Oyaizu N., Satoh N., Tojo A., Yamashita N., Maekawa T., Eriguchi M., Tomikawa S., Hanazawa K., Wakumoto Y., Kawai K., Azuma M., Kamada H., Okumura K., Kakizoe T., Akaza H., Fujime M., Mulligan R., Clift S., Ando D., Sherwin S., Asano S. Clonical studies of immunogene therapy using autologous GM-CSF transduced tumor vaccines (GVAX) for IV renal cell cancer: progress report. The JAPAN Society of gene Therapy, The 7th Annual Meeting, July 5, 2001, Tokyo.</p>
18	<p><u>谷 憲三朗</u>、中崎有恒、東條有伸、小柳津直樹、富川伸二、和久本芳彰、河合弘二、東みゆき、垣添忠生、藤目真、赤座英之、浅野 茂隆。GM-CSF 遺伝子導入自家がん細胞を用いた免疫遺伝子治療臨床研究経過報告 第 60 回日本癌学会総会 10 月. 2001 (横浜)</p>
19	<p>Kawai K. Tani K. Yamashita N. Tomikawa S. Eriguchi M. Fujime M. Okumura K. Kakizoe T. Clift S. Ando D. Mulligan R. Yamauchi A. Noguchi M. Asano S. Akaza H. (2002) Advanced renal cell carcinoma treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene therapy: a clinical</p>

	course of the first Japanese experience. <i>International Journal of Urology</i> . 9(8):462-6
20	Tani, K. Immunotherapy using GM-CSF gene for metastatic renal cell cancer. <i>International Symposium: Cancer Gene Therapy</i> . 213-223, 2002 (Eds)
21	Kawai, K., Tani, K., Yamashita, N., Tomikawa, S., Eriguchi, M., Fujime, M., Okumura, K., Kakizoe, T., Clift, S., Ando, D., Mulligan, R., Yamauchi, A., Noguchi, M., Asano, S., Akaza, H. Advanced renal cell carcinoma treated with granulocytemacrophage colony-stimulating factor gene therapy: A clinical course of the first Japanese experience, <i>Int. Journal of Urology</i> , 9:462-466, 2002
22	谷憲三朗、中崎有恒、長谷英徳、高橋圭介、曾田泰、大岩真希、前川平、東條有伸、山下直秀、佐藤典治、江里口正純、富川伸二、小柳津直樹、和久本芳彰、花澤喜三郎、河合弘二、東みゆき、濱田洋文、垣添忠生、奥村康、藤目真、赤座英之、Shirley Clift, Dale Ando, Stephan Shirwin, Richard Mulligan, 浅野茂隆 第IV期腎癌に対する免疫遺伝子治療臨床研究結果報告 日本泌尿器科学会、東京(2002.2.17)
23	Tani, K., Azuma, M., Nakazaki, Y., Oyaizu, N., Hase, H., Ohata, J., Takahashi, K., Oiwa Monma, M., Hanazawa, K., Wakumoto, Y., Kawai, K., Noguchi, M., Soda, Y., Kunisaki, R., Watari, K., Takahashi, S., Machida, U., Satoh, N., Tojo, A., Maekawa, T., Eriguchi, M., Tomikawa, S., Inoue, Y., Tahara, H., Inoue, Y., Yoshikawa, H., Yamada, Y., Iwamoto, A., Hamada, H., Yamashita, N., Okumura, K., Kakizoe, T., Akaza, H., Fujime, M., Clift, S., Ando, D., Mulligan, R., Asano, S. Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan. <i>Clinical and Immunological Findings. Mol Ther</i> . 10: 799-816, 2004.
24	谷憲三朗、橋口隆生、中崎有恒、東みゆき、浅野茂隆、GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞接種患者において誘導された腎癌細胞に対する抗腫瘍免疫の検討、第 63 回日本癌学会総会シンポジウム 30、福岡(2004.9.30)
25	Hashiguchi, T., Nakazaki, Y., Clift, S., Ando, D., Asano, S., Tani, K. Detection of enhanced serum antibody production to renal cell cancer proteins and identification of serological tumor antigens in patients treated with the GM-CSF gene transduced-autologous tumor vaccines. <i>Mol. Ther</i> 9:S 220, 2004.
26	Nakazaki, Y., Hase, H., Inoue, H., Beppu, Y., Meng Xin K., Sakaguchi, G., Ryo Kurita, R., Asano, S., Nakamura, Y., Tani, K. Serial analysis of gene expression in progressing and regressing mouse tumors implicates the involvement of RANTES and TARC in antitumor immune responses. <i>Mol Ther</i> 14: 599-606, 2006
27	Moon Y, Cho SG, Lee JW, Min WS, Kim CC, Lee HK, Kim YG, Chang HS, Chae HS, Kim HY, Tani K., Protective effect of irradiated renal carcinoma expressing hepatitis B surface antigen against renal-cell carcinoma-mediated tumors. <i>Cancer Biother Radiopharm</i> . 21:211-216, 2006.
28	Inoue, H., Iga, H., Nabeta, H., Yokoo, T., Suehiro, Y., Okano, S., Inoue, M., Kinoh, H., Katagiri, H., Takayama, K., Yonemitsu, Y., Hasegawa, M., Nakamura, Y., Nakanishi, Y., Tani, K. Non-transmissible SeV encoding GM-CSF is a novel and potent vector system to produce autologous tumor vaccines. <i>Cancer Science</i> 2008 (in press)

	<p>(申請中特許)</p> <p>1. 発明の名称：遺伝子治療用ウイルスベクター</p> <p>出願日：2008 年 4 月 25 日 (優先日：2007 年 4 月 27 日)</p> <p>発明者：谷 憲三朗他</p>
--	--

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の申請について

○ 諮問及び付議..... P1

○ ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書等

【京都府立医科大学】

- 重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子 bFGF のハイブリッド自家移植療法の検討..... P3

【(財) 先端医療振興財団先端医療センター病院】

- 難治性骨折（偽関節）患者を対象とした自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による骨・血管再生療法に関する第 I・II 相試験..... P11

【大阪大学医学部附属病院】

- 重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発..... P22

【松本歯科大学】

- ヒト培養自己骨髄間葉系細胞移植による顎骨増生法の確立..... P62

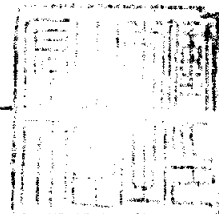
厚生労働省発医政第 0218005 号

平成 21 年 2 月 18 日

厚生科学審議会会長

垣 添 忠 生 殿

厚生労働大臣 舩 添 要 一



諮 問 書

下記のヒト幹細胞臨床研究実施計画について、その医療上の有用性及び倫理性に関し、厚生労働省設置法（平成11年法律第97号）第8条第1項イ及びヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成18年厚生労働省告示第425号）の規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

1. 平成20年12月12日に京都府立医科大学長から提出された「重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子 bFGF のハイブリッド自家移植療法の検討」計画
2. 平成20年12月18日に財団法人先端医療振興財団先端医療センター病院長から提出された「難治性骨折（偽関節）患者を対象とした自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による骨・血管再生療法に関する第 I・II 相試験」計画
3. 平成20年12月25日に大阪大学医学部附属病院長から提出された「重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発」計画
4. 平成20年12月25日に松本歯科大学長から提出された「ヒト培養自己骨髄間葉系細胞移植による顎骨増生法の確立」計画

厚 科 審 第 1 号

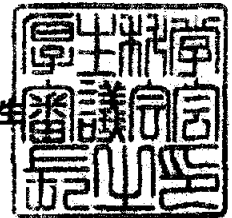
平成 21 年 2 月 18 日

科学技術部会部会長

永 井 良 三 殿

厚生科学審議会会長

垣 添 忠 生



ヒト幹細胞臨床研究実施計画について（付議）

標記について、平成 21 年 2 月 18 日付け厚生労働省発医政第 0218005 号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第 3 条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成20年12月12日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	京都市上京区河原町通広小路上る梶井町465 (郵便番号602-8566)
	名称	京都府立医科大学 075-251-5208(電話番号), 075-211-7093(Fax番号)
	研究機関の長 役職名・氏名	京都府立医科大学 学長 山岸 久一

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添の通り実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
重症慢性虚血性心不全に対するヒト 心臓幹細胞と幹細胞増幅因子bFGF のハイブリッド自家移植療法の検討	京都府立医科大学医学部医学研究科 循環器内科・教授 松原 弘明

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子 bFGF のハイブリッド自家移植療法の検討
申請年月日	平成20年12月12日
実施施設及び研究責任者	実施施設：京都府立医科大学 研究責任者：松原 弘明
対象疾患	重症慢性虚血性心不全
ヒト幹細胞の種類	ヒト自家（心臓組織由来）心臓幹細胞
実施期間及び対象症例数	登録期間 2年（試験期間は登録開始～最終症例の移植後1年まで）、6症例
治療研究の概要	カテーテルにより、心臓内壁より心筋組織を約15～20mg採取し、心臓幹細胞を分離、培養する。5～8週間後、冠動脈バイパス手術の際、障害心筋組織に心臓幹細胞を直接注入すると共に、線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含むブタ皮膚由来ゼラチンシートで注入箇所を被覆する。
その他（外国での状況等）	骨髄又は末梢血から採取した単核球もしくは内皮前駆細胞を経冠動脈的に投与する方法、大腿部骨格筋より分離した骨格筋芽細胞を直接心筋に注入、あるいはシート状にして移植する方法等による臨床研究の報告例がある。ヒト心臓前駆細胞を用いた研究については、マウスモデルによる研究が2007年に報告されているが、臨床研究の報告は今のところない。
新規性について	本研究は幹細胞（心臓組織由来心臓幹細胞）を用いている点、bFGFを含有したシートを用いる点などで新規性を有している。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称	重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増殖因子bFGFのハイブリッド自家移植療法の検討
研究機関	
名称	京都府立医科大学
所在地	〒602-8566 京都府京都市上京区河原町通広小路上の梶井町465
電話番号	075-251-5208
FAX番号	075-211-7093
研究機関の長	
氏名	山岸 久一
役職	学長
研究責任者	
氏名	松原 弘明
役職	京都府立医科大学大学院医学研究科 循環器内科学講座・教授
最終学歴	S67 関西医科大学 卒業
専攻科目	循環器内科学
その他の研究者	別紙1及び2参照
臨床研究の目的・意義	<p>心臓病は現在の循環器先進的医療を持ってしても国民死亡率の第二病因を占めており、その過半数が心不全死である。重症慢性虚血性心不全とは、完全冠動脈再建術を持ってしても心機能の改善が見込めず、心臓移植以外の従来型の代替先進治療でもなお、難治性心不全を繰り返す致死率の高い予後不良な病態である。しかしながら本邦における心臓移植の実態は、そのドナー不足から上記のごとき必要不可欠な症例を救命するには充分であるとは言えず、心筋再生を機序とした革新的な治療の開発が急務である。本臨床試験の目的は、LVEF 15%以上、35%以下の重症慢性虚血性心不全という病態に対して、冠動脈形成術と体外培養にて増殖させた自家ヒト心臓幹細胞とbFGF徐放シートの移植を併用するハイブリッド治療を、探索的臨床第Ⅰ相 pilot試験として安全性及び有効性(臨床効果)を評価することである。臨床第Ⅰ相pilot試験としての本試験の性質上、安全性の評価項目を心臓疾患関連死および主要心疾患関連イベントとし、有効性の評価項目を臨床効果として治療前と治療8ヶ月後のNYHA分類による心不全症状、左室駆出率、梗塞部重量、局所壁運動の改善をもって評価を行う。重症慢性虚血性心不全は進行性で、致死率も高く心臓移植以外の代替治療では改善困難な疾患像である。障害心筋が再生することで心臓移植までのブリッジや自宅退院、社会復帰が可能となり、疾病に苦む国民生活の向上に対する本研究の意義は極めて高い。さらに、本臨床研究の6例の結果が優れたものであり、高度医療に相当するものと考えられた場合は、所定の審査手続きを踏まえて高度医療として申請し、本治療法の安全性・有効性を検証し標準治療化を目標として、多施設共同の臨床第Ⅱ相単盲検プラセボコントロール試験を計画している。</p>
臨床研究の対象疾患	
名称	重症慢性虚血性心不全
選定理由	<p>重症慢性虚血性心不全は完全冠動脈再建術を持ってしても心機能の改善が見込めず、心臓移植以外の従来型の代替先進治療でもなお、難治性心不全を繰り返す致死率の高い改善困難な病態である。現在、冠動脈再建術、左心室形成術、心室再同期療法等の様々な先進的医療や、欧米で行われた骨髄細胞、骨格筋芽細胞を用いたヒト細胞移植による再生医療の臨床試験が行われているが、いずれも未だ十分な成果を上げていたとは言い難い。本病態は虚血性心疾患を原因とし、臨床経過が把握され、病期分類等が確立されている疾患であることより、本試験の対象疾患として選定した。プロトコル「2.背景と根拠」を参照。</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

<p>被験者等の選定基準</p>	<p>適格規準</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 年 齢 : 症例登録時において年齢20歳以上80歳以下 2) 左心機能 : 前項5-2-1のLVEFにて15%以上、35%以下 3) 臨床病期(心不全分類) : stage D 4) 臨床症状(心不全重症度) : NYHA III~IV度 5) 冠動脈バイパス術適応病変 : 前項5-2-2の冠動脈造影法において主要冠動脈に有意狭窄を有し、冠動脈バイパス術の適応がある 6) viabilityのある領域 : 上記冠動脈病変に起因する障害心筋領域で、造影心MRIによる評価において以下の規準が満たされていること <ol style="list-style-type: none"> ① 梗塞領域が18分割心区域分類法で2領域以上存在する ② すべての梗塞領域の遅延造影増強部が、短軸像において心筋壁に対し50%以下の場合、または遅延造影増強部が51%以上の領域を含む場合でも、同部位が1領域以下に限定される場合 <p>注1) 両部位に対するバイパス術の既往は問わない 注2) 冠動脈の罹患枝数は問わない 注3) 該当のviabilityのある領域が複数存在する場合は、梗塞領域の大きい方を細胞移植領域とする</p> <p>7) 試験参加について文書による説明がなされ、文書同意の得られた者</p> <p>除外規準</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 28日以内の新規の心筋梗塞、不安定狭心症発症 2) 左室切除術もしくは弁形成術(置換術を含む)を必要とする症例 *1 3) 心筋生検禁忌の症例*2 4) 悪性新生物を有する患者及び3年以内にその既往のある患者 5) 血液透析患者 6) 肝硬変患者(ICG15分滞留率 30%以上) 7) コントロール不良の糖尿病患者(HbA1c>8.0) 8) 5cm以上の大動脈瘤(解離性含む) 9) 心原性ショック 10) 活動性感染症(サイトメガロ感染症を含む) 11) 薬物依存症(アルコール心筋疾患を含む) 12) HIV抗体陽性 13) 活動性出血性疾患(消化管出血、外傷その他) 14) ゼラチンアレルギーの既往*3 <p>*1左室切除術の必要な症例とは、造影心MRIにおいて梗塞部心筋の増強部が心筋壁に対して51%以上の領域が2領域以上にわたる症例とする。 *2 心筋生検禁忌の症例とは以下の症例とする ① 心原性ショック状態の患者 ② カテコラミン等を治療に必要とする鬱血性心不全状態の患者 ③ II度以上の房室ブロックの患者 *3 ゼラチンアレルギーについては詳細な既往歴の聴取及び、登録前にパッチテスト、ゼラチンIgEの検査において陰性であることを確認する 臨床試験プロトコル「5.診断基準と病期・病型分類」「6.適格基準」参照</p>				
<p>臨床研究に用いるヒト幹細胞</p>	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="277 1361 571 1496">種類</td><td data-bbox="571 1361 1332 1496">ヒト自家心臓幹細胞(cardiac stem cell, CSC) 自家心臓幹細胞概要書「2.1.1 試験細胞の生物学的特徴」「3.試験細胞情報」を参照。 臨床試験プロトコル「4.1ヒト自家心臓組織由来心臓幹細胞(cardiac stem cell, CSC)」を参照。</td></tr> <tr> <td data-bbox="277 1496 571 1769">採取、調製、移植又は 投与の方法</td><td data-bbox="571 1496 1332 1769">被験者患者右心室から、心筋生検法を用いて15~20mgの心筋組織を採取し、平成19年8月通達「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従いGMP準拠の細胞調整施設である京都府立医科大学 再生医療・細胞治療研究センター(以下CPCと略す)において、無菌的に自家心臓幹細胞を単離、体外増幅培養を行う。被験者の400mL末梢血から採取分離した血清を用いて5~6週間の細胞培養の後、CPCにおいて生理食塩水に5×10^5個/kgに調整、懸濁する。プロトコル治療はまず冠動脈バイパス術を行い、その後、培養自家心臓幹細胞を障害心筋領域に均等に20箇所、筋肉注射する。その後、bFGF徐放シートを同部位に貼付する。自家心臓幹細胞概要書「3.2 調製方法」、臨床試験プロトコル「8 試験計画と移植スケジュール変更基準」を参照。</td></tr> </table>	種類	ヒト自家心臓幹細胞(cardiac stem cell, CSC) 自家心臓幹細胞概要書「2.1.1 試験細胞の生物学的特徴」「3.試験細胞情報」を参照。 臨床試験プロトコル「4.1ヒト自家心臓組織由来心臓幹細胞(cardiac stem cell, CSC)」を参照。	採取、調製、移植又は 投与の方法	被験者患者右心室から、心筋生検法を用いて15~20mgの心筋組織を採取し、平成19年8月通達「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従いGMP準拠の細胞調整施設である京都府立医科大学 再生医療・細胞治療研究センター(以下CPCと略す)において、無菌的に自家心臓幹細胞を単離、体外増幅培養を行う。被験者の400mL末梢血から採取分離した血清を用いて5~6週間の細胞培養の後、CPCにおいて生理食塩水に 5×10^5 個/kgに調整、懸濁する。プロトコル治療はまず冠動脈バイパス術を行い、その後、培養自家心臓幹細胞を障害心筋領域に均等に20箇所、筋肉注射する。その後、bFGF徐放シートを同部位に貼付する。自家心臓幹細胞概要書「3.2 調製方法」、臨床試験プロトコル「8 試験計画と移植スケジュール変更基準」を参照。
種類	ヒト自家心臓幹細胞(cardiac stem cell, CSC) 自家心臓幹細胞概要書「2.1.1 試験細胞の生物学的特徴」「3.試験細胞情報」を参照。 臨床試験プロトコル「4.1ヒト自家心臓組織由来心臓幹細胞(cardiac stem cell, CSC)」を参照。				
採取、調製、移植又は 投与の方法	被験者患者右心室から、心筋生検法を用いて15~20mgの心筋組織を採取し、平成19年8月通達「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従いGMP準拠の細胞調整施設である京都府立医科大学 再生医療・細胞治療研究センター(以下CPCと略す)において、無菌的に自家心臓幹細胞を単離、体外増幅培養を行う。被験者の400mL末梢血から採取分離した血清を用いて5~6週間の細胞培養の後、CPCにおいて生理食塩水に 5×10^5 個/kgに調整、懸濁する。プロトコル治療はまず冠動脈バイパス術を行い、その後、培養自家心臓幹細胞を障害心筋領域に均等に20箇所、筋肉注射する。その後、bFGF徐放シートを同部位に貼付する。自家心臓幹細胞概要書「3.2 調製方法」、臨床試験プロトコル「8 試験計画と移植スケジュール変更基準」を参照。				

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

安全性についての評価	細菌試験、真菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドキシン試験を、培養工程における無菌性の検証を細胞調整の各工程において、細胞製剤標準書SOPに従い行う。幹細胞としての安全に関しては長期維持株における核型異常発生の有無の確認、免疫不全マウス皮下へのヒト自家心臓幹細胞の移植試験における造腫瘍性の確認を全症例において行う。有害事象発現時・中間評価の際は、本臨床研究から独立した専門家で構成される効果安全性評価委員会が研究責任者の依頼を受けて情報を評価する。自家心臓幹細胞標準書「3.3品質管理」「3.3.1細胞培養工程における無菌性の検証」、臨床試験プロトコル「13.4中間評価」「15.モニタリング」、別添「重篤な有害事象発生時の報告・対応マニュアル」を参照。
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	ヒト細胞を用いた先行研究では、先天性心疾患患者における手術手術時の微小心筋組織材料を用いた自家心臓幹細胞の単離・増殖培養に100例以上成功し、また対象年齢の虚血性心疾患患者(5名)虚血心筋組織からの微小心筋組織患者全例において心筋分化能を有した細胞であることが確認されている。末梢血からの自家血清単離及び冷凍保存、更に溶解した自己血清を用いての心臓幹細胞培養が可能であることも確認している。移植細胞の採取・培養過程において、長期維持株における核型異常発生の有無の確認、免疫不全マウス皮下へのヒト自家心臓幹細胞の移植試験(8ヶ月)における造腫瘍性の確認を行ったが染色体異常、奇形腫の発生は認めなかった。実験中止に至るような事象の発生はなく、安全に遂行できた。またブタを用いた移植試験においても最長4ヶ月間の観察期間中に細胞移植部位の炎症、腫脹、その他特筆すべき全身症状の発生は認められず、最終時点での剖検所見においても、移植部位には異常所見は検出されなかった。併用するbFGF、人工心臓は既に医薬品として認可・使用されている。臨床試験プロトコル「2 背景と根拠」を参照。ゼラチンハイドロゲルシートの安全性、有効性についてはbFGFゼラチンハイドロゲルシート概要書「4.試験医療材料情報」を参照。
臨床研究の実施計画	患者自身の心筋組織から分離した心臓幹細胞を患者自身の心臓から採取した血清を用いて5-6週間培養する(予定細胞数 5×10^5 個/kg)。手術治療にて自家心臓幹細胞を障害心筋領域に筋肉注射し、同部位をbFGF含有ゼラチンハイドロゲルシートにて被覆する。概略は臨床試験プロトコル「0.シエマ」を参照。計画の詳細はプロトコル「8.試験計画」を参照。
被験者等に関するインフォームド・コンセント	
手続	担当医師は、被験者が試験に参加する前に、説明文書を用いて十分説明し、試験への参加について自由意思による同意を本人から文書として得る。細胞の採取・移植、検査の実施については、試験参加の同意とは別にその都度、インフォームド・コンセントを行い、文書にて同意を取得する。プロトコル「15.3. 説明と同意(インフォームド・コンセント)」を参照。
説明事項	「世界医師会ヘルシンキ宣言」「臨床研究に関する倫理指針」「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」で規定されている内容に準じて施行する。臨床試験プロトコル「16.1. 遵守すべき諸規則」「16.2. 説明文書・同意書の作成と改訂」を「16.3. 説明と同意(インフォームド・コンセント)」を参照。説明・同意文書を参照。
単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難な者を被験者等とする臨床研究の場合	
研究が必要不可欠である理由	該当しない
代諾者の選定方針	該当しない
被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法	研究責任者は下に定義する重篤な有害事象又は新たな重大情報において重大な事態の発生が予測される場合、もしくは発生した場合は、重篤な有害事象の場合は付録2「重篤な有害事象発生時の報告・対応マニュアル」の別添2「重篤な有害事象に関する報告書」を、新たな重大情報の場合は「新たな重大情報に関する報告書」を作成し、所属する研究機関の長へ提出しなければならない。所属する研究機関の長は、所属する研究機関の倫理審査委員会等の意見を聴き、研究責任者に対し試験の中止その他の必要な措置を講じるよう指示しなければならない。なお、必要に応じ、所属する研究機関の倫理審査委員会等の意見を聴く前に、所属する研究機関の長は研究責任者に対し、試験の中止その他の暫定的な措置を講じるよう指示することができる。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>さらに所属する研究機関の長は、所属する研究機関の倫理審査委員会等若しくは厚生労働大臣の意見を受け、又は必要に応じ、研究責任者に対して改善、試験の中止、調査の実施その他の必要な措置を講じるよう指示するものとする。なお、所属する研究機関の倫理審査委員会等から本試験を中止するべきである旨の意見を述べられたときは、その中止を指示しなければならない。</p> <p>1) 重篤な有害事象のうち、効果安全性評価委員会にて本臨床試験の継続に大きな影響を与えると判断された重篤な有害事象</p> <p>2) 類似治療、その他の研究報告等から得られた新たな重大情報のうち、効果安全性評価委員会にて本臨床試験の継続に大きな影響を与えると判断された重大情報</p> <p>臨床試験プロトコル「9-1-4 重大な事象」を参照。また、臨床情報・細胞は試験終了後、臨床試験の統括報告書を厚生労働大臣に提出してから10年間保存する。</p>
臨床研究終了後の追跡調査の方法	<p>2年間の臨床研究終了後も通常の保険診療行為として被験者の追跡を、10年以上を目安として行う。被験者に病原体感染等の有害事象が生じた場合は、適切な医療措置を行うとともに、最終調製物に関する確認を行い、原因究明に努める。他の被験者の健康状態も確認し、被験者の安全性確保に努める。</p> <p>プロトコル「9.5. 臨床研究終了後の追跡調査」を参照。</p>
臨床研究に伴う補償	
補償の有無	有 <input type="radio"/> 無 <input checked="" type="radio"/>
補償が有る場合、その内容	該当しない
個人情報保護の方法	
連絡可能匿名化の方法	<p>被験者の特定には被験者識別番号、登録番号を用いる。細胞の特定には照合認識システム(メルコードシステム®)と台帳を用いて行う。</p> <p>プロトコル「18.4. 個人情報の保護」を参照。プロトコル「8.1.5. 移植細胞(CSC)の調製」を参照。</p>
その他	<p>「個人情報保護の方法」</p> <p>試験に係わる関係者は被験者の個人情報保護に最大限の努力を払う。主任研究者等が試験で得られた情報を公表する際には、被験者が特定できないよう十分配慮する。「世界医師会ヘルシンキ宣言」「臨床研究に関する倫理指針」「ヒト細胞を用いる臨床研究に関する指針」で規定されている内容に準じて施行する。</p> <p>プロトコル「18.1. 遵守すべき諸規則」「18.4. 個人情報の保護」を参照。</p> <p>「その他必要な事項」</p> <p>①当該研究に関わる研究資金の調達方法</p> <p>本試験は京都府立医科大学大学院医学研究科循環器内科学講座の厚生科学研究費及び奨学金で実施される。</p> <p>②既に実施されているヒト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認められる事項</p> <p>詳細は「臨床試験計画書 2 背景と根拠」参照</p> <p>申請者らは既に行った前臨床試験により、今まで臨床研究は全く行われていない新規のヒト心筋より採取した心臓幹細胞を含む細胞群が成人ヒト血清を用いて多分化能を有したまま培養することが可能であること、心臓幹細胞とbFGF徐放シート移植を併用することでホスト心筋への生着能、実質的心筋再生が著しく促進され、慢性虚血による機能不全心であっても実質的な心筋再生による心機能改善が生じることを確認した。これまで難治性重症不全心患者に対して、心臓幹細胞を用いた細胞治療を施行した報告は世界的に一例の報告もない。また急性虚血心に対する骨髄細胞移植(冠動脈注入及びカテーテルによる心筋移植)、米国で行われた小動物への心臓幹細胞単独移植と比較しても、多くの新規性が見いだせる。以下に本研究の新規性について列挙する。</p> <p>1) 新規の幹細胞群である(心臓幹細胞)</p> <p>2) 体外細胞培養工程により移植細胞数を均一化することで、細胞移植効果を正確に判定できる</p> <p>3) 直視下に細胞移植操作を行うことで、治療有効領域への確実な移植が可能にできる</p> <p>4) bFGF徐放シート移植の併用により、心臓幹細胞の生着率を向上、心筋再生を飛躍的に改善(新規の幹細胞移植と組織再生工学のハイブリッド治療)</p> <p>5) 必要最小限の有効細胞数の移植により、移植後組織障害の軽減を図ることが可能であり、かつ体外細胞増幅にかかる期間の短縮は必要とされるヒト血清量の節減(患者侵襲の低減)および手術待機期間の短縮を図ることができる(有効細胞数の規定)</p> <p>したがって、本研究はヒト幹細胞を用いた臨床研究として、多くの新規性が認められるものと考えられる。</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

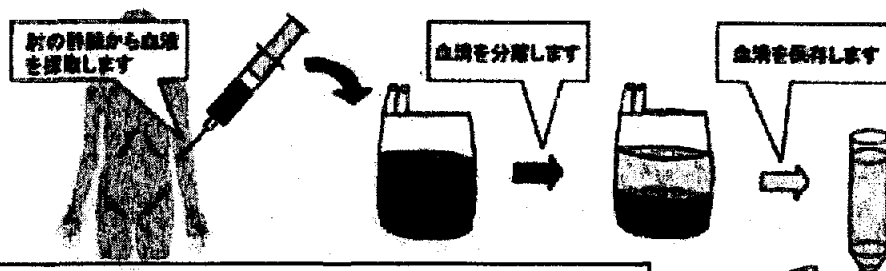
備考1 各用紙の大きさは、日本工業規格A4とすること。

備考2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙〇参照」と記載すること。

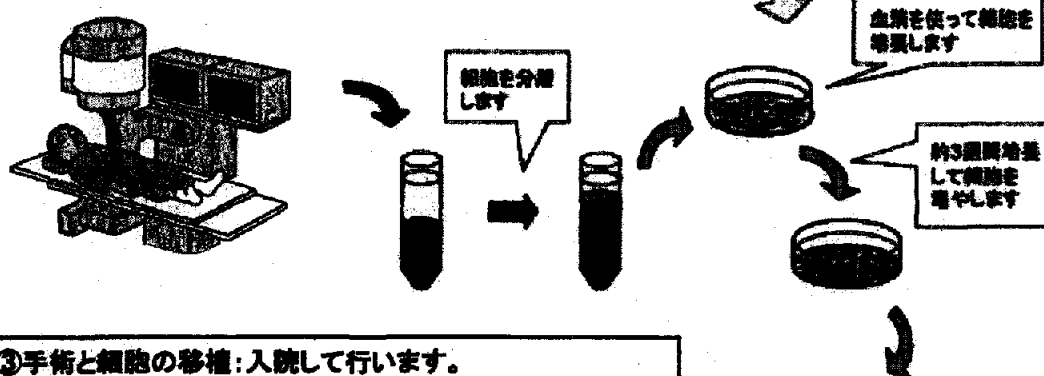
添付書類(添付した書類にチェックを入れること)

- ☒ 研究者の略歴及び研究業績
- ☒ 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況
- ☒ 臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果
- ☒ 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況
- ☒ 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨
- ☒ インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同意文書様式
- ☒ その他(資料内容:自己心臓幹細胞に関する概要書、bFGF含有ゼラチンハイドロゲルシートに関する概要書)
- ☒ その他(資料内容:試験実施計画書(プロトコル))
- ☒ その他(資料内容:試験実施計画書(プロトコル) 臨床Ⅱ相試験 試験計画)
- ☒ その他[資料内容:重篤な有害事象発生時の報告と対応マニュアル(プロトコルAPENDIX1)]

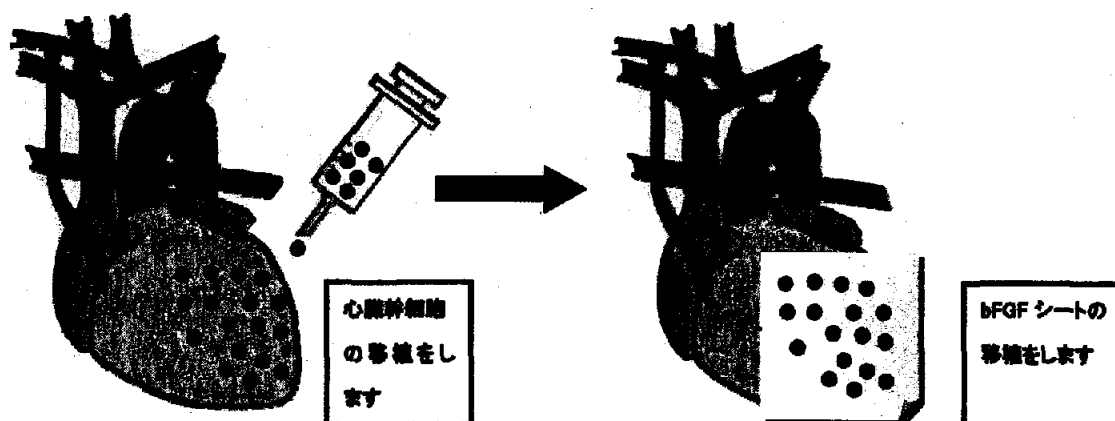
①血清の採取:手術の約5~8週前に行います。



②心筋組織の採取:手術の約5~8週前に行います。




③手術と細胞の移植:入院して行います。



ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書


平成 20 年 12 月 18 日

厚生労働大臣殿

研究機関	所在地	神戸市中央区港島南町 2-2	(郵便番号 650-0047)
	名称	財団法人先端医療振興財団 先端医療センター病院	078-306-1700 (電話番号) 078-306-1708 (FAX 番号)
	研究機関の長 役職名・氏名	病院長 西尾 利	

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
難治性骨折（偽関節）患者を対象とした自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による骨・血管再生療法に関する第Ⅰ・Ⅱ相試験	整形外科・非常勤嘱託医師（兼 神戸大学医学部附属病院整形外科 講師）・ 黒田 良祐 

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	難治性骨折（偽関節）患者を対象とした自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による骨・血管再生療法に関する第 I・II 相試験
申請年月日	平成 20 年 12 月 18 日
実施施設及び 研究責任者	実施施設：先端医療振興財団 先端医療センター病院 研究責任者：黒田 良祐
対象疾患	難治性骨折（偽関節）
ヒト幹細胞の種類	自家末梢血 CD34 陽性細胞
実施期間及び 対象症例数	3 年間 目標症例数 17 例
治療研究の概要	5 日間の G-CSF 投与により動員した、末梢血中の CD34 陽性細胞を採取分離し、偽関節となった下肢骨折部の手術の際に、アテロコラーゲンと共に患部に移植する。
その他（外国での状況等）	骨再生については、これまで間葉系幹細胞を用いた臨床研究が主に行われ、報告されている。一方 CD34 陽性細胞については、国内外の複数のグループにより、G-CSF で動員された末梢血単核球から CD34 陽性細胞を単離・純化し、慢性重症下肢虚血患者に対して投与する臨床研究はすでに報告されている。
新規性について	本研究はこれまで血管再生等に用いられてきた CD34 陽性細胞を、骨折の治療へ応用する臨床研究であるという点で、新規性を有する。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称	難治性骨折(偽関節)患者を対象とした自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による骨・血管再生療法に関する第Ⅰ・Ⅱ 相試験
研究機関	
名称	財団法人先端医療振興財団 先端医療センター病院
所在地	〒650-0047 神戸市中央区港島南町 2-2
電話番号	078-306-1700
FAX 番号	078-306-1708
研究機関の長	
氏名	西尾 利一
役職	病院長
研究責任者	
氏名	黒田 良祐
役職	非常勤嘱託医師 (兼 神戸大学医学部附属病院整形外科 講師)
最終学歴	神戸大学大学院医学研究科博士課程修了
専攻科目	整形外科
その他の研究者	詳細については、別紙 1「研究者の氏名、所属、略歴(最終学歴)、専攻科目、臨床研究において果たす役割」を参照されたい。
臨床研究の目的・意義	<p>本臨床研究の目的は、既存治療に抵抗性を示す難治性骨折(偽関節)患者を対象に、自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による骨・血管再生療法の安全性及び臨床効果を検討する点にある。</p> <p>本臨床研究の意義は、治療に難渋し、かつ QOL を著しく低下させる難治性骨折(偽関節)に対する治療法を確立する点にある。</p>
臨床研究の対象疾患	
名称	難治性骨折(偽関節)
選定理由	これまでの研究から、治療に難渋し QOL を著しく低下させる難治性骨折(偽関節)に対する新たな治療法として、自家末梢血 CD34 陽性細胞移植の有用性が示唆されたため。
被験者等の選定基準	<p>以下に適格規準の抜粋を示す。詳細については、別紙 7「試験実施計画書」を参照されたい。</p> <p>【選択規準】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 大腿骨、または脛骨骨折患者 ・ 同意取得時の年齢が 20 歳以上 70 歳未満で、本人から文書による同意が得られている患者 <p>【除外規準】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 先天性偽関節の患者 ・ 何らかの中樞神経障害による下肢運動麻痺(脳梗塞、脊髄損傷による下肢麻痺など)を合併する患者 ・ 悪性腫瘍を合併する、又は 5 年以内の既往を有する患者 ・ 末期腎不全のために維持透析中の患者 ・ 肝硬変の患者 ・ 白血球 4,000/μL 未満または 10,000/μL を超える患者 ・ 血小板 10 万/μL 未満の患者

		<ul style="list-style-type: none"> ・ ヘモグロビン 8g/dL 未満の患者 ・ AST(GOT)が 100 IU/L 以上または ALT(GPT)100 IU/L 以上の患者 ・ 38℃以上の発熱を伴う感染症を合併する患者 ・ コントロール困難な精神障害を合併する患者 ・ 他の臨床試験に参加中の患者 ・ 妊婦、授乳婦、妊娠している可能性のある又は治療終了時までには妊娠を計画している女性患者、あるいはパートナーの妊娠を希望する男性患者
臨床研究に用いるヒト幹細胞		
	種類	自家末梢血 CD34 陽性細胞
	採取、調整、移植又は投与の方法	詳細については、別紙 7「試験実施計画書」を参照されたい。
安全性についての評価		使用する医薬品は、薬事承認に基づく用法用量である。さらに、使用する医療用品は、異なる用途であるものの広く使用されている。また、使用する CD34 陽性細胞分離機器は滅菌された閉鎖回路を用いた清潔操作であり、担体として使用するアテロコラーゲンゲルと分離細胞の混和作業を CPC にて行うため、コンタミネーションの可能性が極めて低い。
臨床研究の実施が可能であると判断した理由		下肢重症虚血患者に対する自家末梢血 CD34 陽性細胞移植血管再生治療の有用性が報告されており、さらに基礎研究において難治性骨折モデルラットに対するヒト末梢血 CD34 陽性細胞移植の有効性が確認できたため。
臨床研究の実施計画		従来の保存的治療に抵抗性を示す難治性骨折患者を対象に、自家末梢血 CD34 陽性細胞移植による骨・血管再生療法の安全性、有効性を検討する。 目標症例数は主要評価項目解析対象症例として 17 例で、臨床試験参加期間は登録から細胞移植後 1 年間とする。試験予定期間は 2009 年 3 月～2012 年 3 月(うち、登録期間は 2009 年 3 月～2011 年 2 月)とする。
被験者等に関するインフォームド・コンセント		
手続		<p>研究責任医師及び分担医師は、被験者が本臨床試験に参加する前に、被験者に対して説明・同意文書を用いて十分に口頭で詳しく説明し、本臨床試験の参加について自由意思による同意を被験者から文書により得る。さらに、同意を得る前に被験者が質問をする機会と、本臨床試験に参加するか否かを判断するのに十分な時間を与える。その際、研究責任医師及び分担医師、又は補足説明者としての研究協力者は、全ての質問に対して被験者が満足するように答える。</p> <p>同意文書には、説明を行った研究責任医師、分担医師及び被験者が各自日付を記入し、記名捺印又は署名する。その同意文書は被験者へ交付し、実施医療機関ではその写し等をカルテに添付して保管する。なお、本臨床試験協力者が補足的に説明を行った場合には、協力者も記名捺印又は署名し、日付を記入する。</p> <p>被験者が本臨床試験に参加している間に、説明・同意文書が改訂された場合は、研究責任医師及び分担医師は、その都度当該情報を速やかに被験者に伝え、本臨床試験に参加するか否かについて被験者の意思を確認するとともに、改訂された説明・同意文書を用いて改めて説明し、本臨床試験の参加継続について被験者から自由意思による同意を文書により得る。</p> <p>本臨床試験参加中の被験者が同意の撤回を申し出た場合、研究責任医師及び分担医師、ならびに被験者はその旨を記載した文書(同意撤回文書)に各自日付を記入し、記名捺印又は署名する。その同意撤回文書は被験者へ交付し、実施医療機関ではその写し等をカルテに添付して保管する。</p>

	説明事項	<p>同意説明文書には以下項目に係る内容が含まれる。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 臨床試験について 2. 本臨床試験の必要性 3. 本臨床試験の目的 4. 本臨床試験の方法 5. 試験への予定参加人数 6. 予想される効果と副作用 7. 他の治療法 8. 個人情報の保護 9. 研究期間中及び終了後の試料及び資料等の取扱い方針について 10. 臨床試験の費用 11. 健康被害が発生した場合 12. 試験参加の意思に影響を与える情報の伝達 13. プロトコル治療の中止について 14. 自由意志による参加について 15. 同意の撤回について 16. 試験期間中の遵守事項 17. 試験結果の取り扱い 18. 研究成果の公表 19. 研究計画書等の開示について 20. 研究結果の開示について 21. 連絡先・相談窓口
単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難なものを被験者等とする臨床研究の場合		
	研究が必要不可欠である理由	該当せず
	代諾者の選定方針	該当せず
	被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法	<ol style="list-style-type: none"> 1. 研究責任者の責務 研究責任者は、発現した事象又は情報について重大な事態であるかどうかを判断する。研究責任者は重大な事態と判断した事象又は情報について、医療機関の長に対して速やかに報告する。また、医療機関の長の指示を受ける前に、必要に応じ、本臨床試験の中止その他の暫定的な措置を講じる。 2. 医療機関の長の責務 <ol style="list-style-type: none"> (1) 研究責任者から重大な事態が報告された場合には、原因の分析を含む対処方針につき、速やかに倫理審査委員会等の意見を聴き、研究責任者に対し、中止その他の必要な措置を講じるよう指示する。なお、必要に応じ、倫理審査委員会等の意見を聴く前に、医療機関の長は、研究責任者に対し、中止その他の暫定的な措置を講じるよう、指示する。 (2) 倫理審査委員会等の意見を受け、その原因を分析し、研究責任者に中止その他の必要な措置の指示を与えた上で、厚生労働大臣に速やかに報告する。 (3) 医療機関の長は、倫理審査委員会等若しくは厚生労働大臣の意見を受け、又は必要に応じ、研究責任者に対して改善、中止、調査の実施その他の必要な措置を講じるよう指示する。なお、倫理審査委員会等から当該臨床試験を中止するべきである旨の意見を述べられたときは、その中止を指示する。

臨床研究終了後の追跡調査の方法	本臨床試験終了から1年間は定期的に診察を行い、プロトコル治療の安全性及び有効性に係る情報を収集する。
臨床研究に伴う補償	
補償の有無	有 無
補償がある場合、その内容	本臨床試験期間中に副作用が発現した場合、その治療費を負担する。 なお、金銭での補償は行わない。
個人情報保護の方法	
連結可能匿名化の方法	被験者毎に被験者識別コードを付し、個人の特定を不能とする。
その他	研究責任医師及び分担医師は、症例登録票及び症例報告書等を当該医療機関外に提供する際には、連結可能匿名化を行うために新たに被験者識別コードを付し、それを用いる。 医療機関外の者が、被験者を特定できる情報(氏名・住所・電話番号など)は記載しない。 データセンターが医療機関へ照会する際の被験者の特定は、研究責任医師及び分担医師が管理する被験者識別コード又はデータセンターが発行した登録番号を用いて行う。 原資料の直接閲覧を行ったモニタリング担当者、監査担当者、規制当局の担当者などは、そこで得られた情報を外部へ漏洩しない。 研究責任者等が試験で得られた情報を公表する際には、被験者が特定できないよう十分に配慮する。
その他必要な事項(細部を確認してください)	
当該研究に係わる研究資金の調達方法	本臨床試験は、文部科学省「橋渡し研究支援推進プログラム」からの助成等を充てるものとする。
既に実施されているヒト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認められる事項	これまでに、骨再生を目的とした骨髄間葉系細胞移植の臨床応用が実現しているが、必ずしも十分な治療効果が得られている状況ではなく、さらに骨髄からの細胞採取の侵襲性や手間、手技に関する問題点も指摘されている。 本臨床研究で検討する治療法は低侵襲であり、かつ、これまでの非臨床試験の結果から高い治療効果が期待されることから、新規性を具備する研究であると考えられる。
実施医療機関及び体制	先端医療センターにて、細胞の採取・分離、偽関節手術及び細胞移植を実施する。 神戸大学医学部附属病院にて、被験者の選定、同意取得、登録前検査、的確性判断、移植後リハビリテーション等を実施する。 なお、両機関では医療の質を確保するため、「神戸大学医学部附属病院と先端医療センターとの診療部門の連携に関わる基本協定」が締結されている。

備考1 各用紙の大きさは、日本工業規格 A4 とすること。

備考2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙〇参照」と記載すること。

添付書類

- 別紙 1 : 研究者の略歴および研究業績
- 別紙 2 : 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況
- 別紙 3 : 臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果
- 別紙 4 : 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況
- 別紙 5 : インフォームド・コンセントにおける説明文章及び同意文章様式
- 別紙 6 : 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨
- 別紙 7 : 試験実施計画書
- 別紙 8 : 自家末梢血 CD34 陽性細胞の採取と移植の標準作業手順書

臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨

1. この臨床試験の目的

この臨床試験では、試験参加基準を満たす患者さんに対して自身の血液から採りだした CD34 陽性細胞を偽関節となった下肢骨折部にコラーゲンとともに移植することにより、新しい血管・骨をつくりだす（血管・骨再生）ことができるかどうか及び新しくできた骨により骨折治癒が得られるかどうかに関して、有効性と安全性を調べます。

2. 偽関節について

偽関節は、長期間にわたり骨折の治癒が認められない状態をいい、特に、下肢偽関節は歩行が大きく制限されるため、日常生活に著しい支障をきたします。さらに、多くの場合で治癒までに手術を繰り返すため、患者さんは大きな負担を強いられます。

3. これまでの治療法

下表のとおり、通常、下肢偽関節に対しては、再治療として外科的な髓内釘などによる再内固定術に骨移植（血管柄付き骨移植も含む）や骨皮質剥離手術を組み合わせで行います。この外科的手術と平行して低出力超音波パルス治療を行うこともあります。これらの治療により、骨折治癒が得られる可能性もありますが、確実な方法とはいえません。さらに、骨折治癒が得られるまで何度も手術を繰り返すことになる可能性があります。

また、研究段階の治療法もいくつか報告されていますが、いずれも確立された治療法ではありません。

従来の治療法	
外科的な手術	再内固定術（髓内釘等） 骨移植（血管柄付き骨移植も含む） 骨皮質剥離手術
保存的治療	低出力超音波パルス治療
研究段階の治療法	
細胞移植による骨再生療法	骨髓細胞
成長因子による骨再生療法	BMP-2, FGF-2

4. 自家末梢血 CD34 陽性細胞（末梢血幹細胞）移植による骨・血管再生治療法

CD34 陽性細胞という細胞は、骨髓や血液中に存在する未分化な細胞で、血管の閉塞した臓器や組織に注入されると血管を形成する細胞になる能力があると考えられています。これまでに、ヒトの CD34 陽性細胞を血管の閉塞したマウスの下肢に筋肉注射（細胞移植）することによって、新しい血管がつくりだされ（これを血管再生と呼んでいます）、血流が改善することが示されています。また、下肢以外の臓器（心臓）について、ブタにおける実験では血流が改善し臓器機能の改善が示されています。

さらに、これまでの動物実験で、ヒトの CD34 陽性細胞を骨折したラットに局所投与（細胞移植）することで新しい血管だけでなく骨もつくりだされ（これを骨・血管再生とよんでいます）、骨折の治癒が示されています。

よって、ヒト CD34 陽性細胞を用いた骨・血管再生治療法は、下肢偽関節に対する新しい治療法になる可能性があります。

5. 治療方法

この臨床試験で計画された治療の実施方法は、1)血液から CD34 陽性細胞（血管の幹細胞）を採り出す処置、と 2)手術時に下肢骨折部に細胞を注入する処置、の大きく 2 つに分けることができます。この臨床試験では、これら 1) 及び 2) の行為を先端医療センターで実施し、それ以外の検査・診察等については神戸大学医学部附属病院で実施いたします。

(1) 血液から血管の幹細胞を採り出す処置

血管の幹細胞は、通常は骨髓中に多数あり、血液中にはごく少数しか存在していません。そこで、治療に必要な数の細胞を自己の血液中から得るために、骨髓にある細胞を血液中に送り出す効果のある顆粒球コロニー刺激因子製剤 (G-CSF) を 1 日に体重 1 kg 当たり 5 μ g（末期腎不全を合併する患者では半量の 1 日体重 1 kg あたり 2.5 μ g）の用量で、5 日間皮下注射いたします。

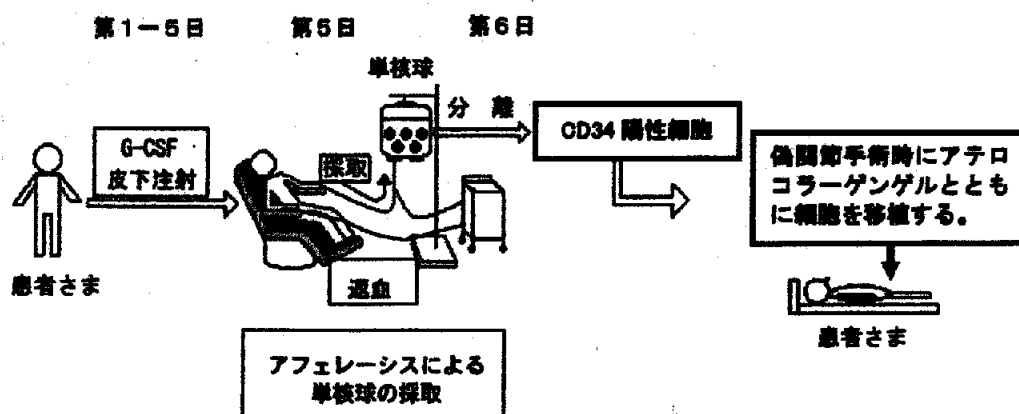
さらに、効率よく細胞を採り出すため、注射開始 5 日後に静脈から必要な成分を血液成分分離装置の使用により採り出します（この作業をアフェレシスといいます）。

以上の細胞のとり出し方は、既に一般的な治療法として確立されています。

また、アフェレシスで採り出した血液細胞には移植に用いる CD34 陽性細胞だけではなく、他の種類の細胞も含まれるため、磁気細胞分離装置の使用により、CD34 陽性細胞を分離します。使用する磁気細胞分離装置について、本邦では医療機器として未承認ですが、海外では多くの国（アメリカ合衆国、ヨーロッパ諸国など）で承認され実際に使用されています。

(2) 手術時に下肢骨折部に細胞を注入する処置

以上のような方法で分離された CD34 陽性細胞を従来の偽関節手術（髓内釘入れ替え、骨移植、骨皮質剥離手術）時に下肢の骨折部にコラーゲンとともに体重 1 kg 当たり 5×10^5 個を移植します。なお、使用するコラーゲンはいわゆる狂牛病の感染リスクなしに分類される「皮」を使用して製造されています。



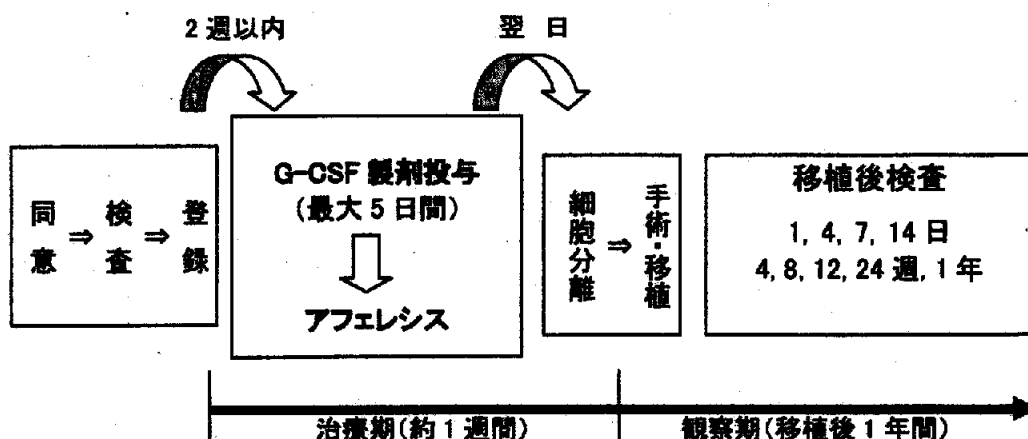
6. 臨床試験のスケジュール

はじめに、本臨床試験に参加する前に、医師により患者さんに対して説明・同意文書を用いて十分に口頭で詳しく説明し、本臨床試験の参加について自由意思による同意を文書により取得します。

そして、本臨床試験の対象者としての適格性を判断する検査を行い、適格と判断された場合には登録を行い、プロトコル治療を開始します。

登録から2週間以内に血液から血管の幹細胞を採り出す処置を開始し、続いて手術時に下肢骨折部に細胞を注入する処置を行います。

さらに、移植後1, 4, 7, 14日, 4, 8, 12, 24週及び1年時に規定の検査を実施します。



7. 併用禁止薬・併用禁止療法

以下の薬剤や治療は本臨床試験の評価に影響を及ぼす細胞移植の日を以て試験期間中は使用や実施を禁止します。

- (1) この臨床試験で規定しない G-CSF の使用
- (2) 他の臨床試験薬／治験薬の使用
- (3) この臨床試験で規定しない骨再生療法の実施

8. 併用制限薬

抗血小板薬及び抗凝固薬について、医師の指導により手術前後の期間における使用を制限します。

9. 有効性、機器性能及び安全性評価

(1) 有効性評価

1) 主要評価項目

治療後 12 週におけるレントゲンの骨折治癒の有無を評価します。

2) 副次評価項目

① 臨床症状

- ・ 治療後 12 週, 24 週, 1 年における臨床的骨折治癒の有無を評価します。
- ・ 臨床的骨折治癒期間：細胞移植時から臨床的骨折治癒に至るまでの期間を評価します。

② 下肢レントゲン所見

- ・ 治療後 24 週, 1 年におけるレントゲンの骨折治癒の有無を評価します。
- ・ 治療後 12 週, 24 週, 1 年における骨癒合スコアを出して評価します。
- ・ レントゲンの骨折治癒に至った期間を評価します。

(2) 機器性能評価項目

磁気細胞分離機器の性能を総合的に評価します。

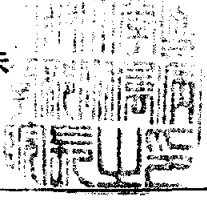
(3) 安全性評価項目

本臨床試験期間内に発現した全ての有害事象を評価します。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成20年12月25日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	大阪府吹田市山田丘 2-15 (郵便番号 565-0871)
	名称	大阪大学医学部附属病院 06-6879-5111 (電話番号) 06-6879-5207 (FAX 番号)
	研究機関の長 役職名・氏名	大阪大学医学部附属病院 病院長 林 紀夫 

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発	大阪大学大学院医学研究科・外科学講座 心臓血管外科・教授 澤 芳樹

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発
申請年月日	平成20年12月25日
実施施設及び研究責任者	実施施設：大阪大学医学部附属病院 研究責任者：澤 芳樹
対象疾患	重症心筋症（拡張型心筋症および虚血性心筋症）
ヒト幹細胞の種類	骨格筋筋芽細胞
実施期間及び対象症例数	登録期間 2年間 目標症例数：DCM 症例5例及びICM 症例5例
治療研究の概要	LVAS装着を必要とする前段階、または年齢などにより心移植適応とならない重症心筋症患者に対し、自己の骨格筋から単離した筋芽細胞を、温度応答性培養皿を用いてシート化し、心臓外壁に移植する。
その他（外国での状況等）	注射針によって直接心臓に筋芽細胞を移植する方法は既にいくつかの海外施設で臨床試験が開始され、報告されている（米国 CAuAMIC Trial 23 症例、欧州 MAGIC Trial 67 症例など）。しかし、筋芽細胞をシート化して移植する方法についての報告はない。申請者により、LVAS 装着患者に対する筋芽細胞シート移植の臨床研究が、指針施行以前より開始され、現在進行中。
新規性について	本研究は、指針施行後でははじめて筋芽細胞シートによる臨床研究である。また、対象を「LVAS装着を必要とする前段階、または年齢などにより心移植適応とならない重症心筋症患者」としている点で新規性がある。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

①臨床研究の名称	重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発
②研究機関	
名称	大阪大学医学部附属病院
所在地	〒565-0871 吹田市山田丘 2-15
電話番号	06-6879-5111
FAX 番号	06-6879-5207
③研究機関の長	
氏名	林 紀夫
役職	病院長
④研究責任者	
氏名	澤 芳樹
役職	大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科 教授
最終学歴	大阪大学医学部
専攻科目	心臓血管外科
⑤その他の研究者	別紙 1 参照
⑥臨床研究の目的・意義	<p>1. 目的</p> <p>重症心筋症 (拡張型心筋症, 虚血性心筋症) 患者を対象として, 自己由来細胞シート移植術に基づく再生療法の安全性, 効果及び実施可能性を評価することを目的とする。主要評価項目は有害事象の有無, 種類, 重症度, 安全度, 発現頻度及び発現期間, 副次評価項目は左室壁運動の経時変化, 心拡大の経時変化, 自己由来細胞シート移植術の完遂の可否とする。</p> <p>2. 背景と提議</p> <p>心筋症 (cardiomyopathy) は, 従来「原因不明の心筋疾患」とされ「特発性心筋症」と呼ばれていたが, 近年では「心機能障害を伴う心筋疾患」と定義されている⁽¹⁾。心筋症はその臨床病態に基づいて拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy; DCM), 肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy; HCM), 拘束型心筋症 (restrictive cardiomyopathy; RCM), 不整脈源性右室心筋症</p>

(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; ARVC) に分類され、それらのいずれにも属さないものは分類不能の心筋症 (unclassified cardiomyopathy) とされる。また、「原因または全身疾患との関連が明らかな心筋疾患」として、従来「二次性心筋症」と呼ばれていた特定心筋症 (specific cardiomyopathy; SCM) も存在する。

我が国では心筋症に関する系統的な疫学調査は、心筋症の発生頻度が低く、多数の集団検診に適用できる検査法がなく、疾患の概念や診断基準が確立されていなかった等を理由に実施が困難であったが、1998年に実施された厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班による病院受診者を対象とした全国調査^(2,3)で我が国における特発性心筋症の疫学像が明らかにされ、その1次調査で報告された症例数はDCMが6341例、HCMが7262例、RCMが112例、ARVCが245例であり、全国推計患者数はそれぞれ17700例、21900例、300例、520例であった。そのなかでもHCMあるいはDCMは、日常診療では決して稀な疾患ではない心不全の大部分を占め、高齢化社会の進行に伴って増加していくことが予想される。

さらに、SCMのなかでの虚血性心筋症 (ischemic cardiomyopathy; ICM) は、心筋梗塞などの重篤な冠動脈疾患に基づく左室機能不全が原因疾患であり⁽⁴⁾、DCM及びHCMとともに、心筋症の大部分を占めている^(5,7)。このICMは、欧米では非常に多い疾患であるが⁽⁶⁾、日本でも食生活をはじめとした生活習慣の欧米化とあいまって増加傾向にある⁽⁷⁾。

これら心筋症の対症的治療法としてはジギタリス、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬、β遮断薬といった内科的治療が存在するが、それらも奏功しないほど重症化した場合には、もはや根治的治療法として心臓移植しかない^(8,9)。現時点では、内科的治療に抵抗性の心筋症に対して、機能的僧帽弁閉鎖不全症に対する僧帽弁形成術や、左室形成術などが一部の患者で有効である。しかし、これらの治療が有効なのは、まだある程度心機能が保たれ他の臓器不全が進行していない心筋症患者に限られており、術後心不全症状が残存する患者も多い。一方でショック状態や他臓器障害を伴うような場合においては、左室補助人工心臓 (left ventricle assisting system; LVAS) の装着が有効であるが、血栓形成、脳塞栓の合併が多く、また感染症・敗血症による死亡の危険性が高く、1年生存率は50%程度しかない。このように、心臓移植及びLVASの装着は深刻なドナー不足や合併症など多くの問題を抱えており、前述のように重症心不全患者が今後増加する状況においてLVASあるいは心臓移植を回避する、新たな治療

法の開発が待たれている。

最近、このような重症心不全に対する心機能回復戦略として、細胞移植法が有用であることが報告されており^(10,11)、すでに自己筋芽細胞による臨床応用が欧米で開始されている⁽¹²⁾。しかし、自己筋芽細胞を直接心筋内に注入する細胞移植方法では、移植細胞の損失が多く、その効果が十分に発揮できない点や、さらに不整脈等の副作用等の発生など種々の問題の解決が不可欠である。

そこでより広範囲な心筋への有効な細胞移植治療の開発をめざし、我々は、温度感応性培養皿を用いた細胞シート工学の技術⁽¹³⁾により、細胞間接合を保持した細胞シート作製技術の心筋再生治療への応用を試みてきた⁽¹⁴⁾。そして、温度感応性培養皿を用いて筋芽細胞シートを作製し、ラット心筋梗塞モデル⁽¹⁵⁾、DCM ハムスター⁽¹⁶⁾ならびに、イヌ DCM 様モデルを用いた大動物前臨床研究を行い⁽¹⁷⁾、リモデリング抑制をともなう心機能改善効果を示すことを明らかにした。そして、これらの研究結果に基づき、LVAS 装着患者に対する筋芽細胞シート移植術の臨床研究を大阪大学医学部附属病院において開始した。この臨床研究は現在進行中であるが、筋芽細胞シート移植術は重症心筋症患者に対して安全かつ有効な治療法であるという結果が得られつつある。

前臨床段階の研究において筋芽細胞シート移植術の効果は、いわゆるサイトカイン療法による効果が中心であると考えられ、残存している生存心筋細胞多いほど、より高い効果を発揮する可能性が示唆されている。本研究は、すでに進行中の臨床研究である LVAS 患者に対する筋芽細胞シート移植術よりも心筋細胞の viability (生存度) の高い患者を対象とするため、より高い効果を発揮することが期待される。そこで、本研究では、LVAS 装着が必要となる前の段階のあるいは心臓移植が適応とならない重症心筋症 (DCM 及び ICM) を対象とした新たな治療法として、自己由来細胞シート移植術による再生的治療法を実施し、その安全性、効果及び実施可能性を評価することを目的とした。

3. 意義

本研究の意義は、重症心筋症患者を対象とした自己由来細胞シート移植術の安全性を明らかにし、LVAS の装着および心臓移植が回避できる、新たな再生医療の確立の礎を築くことにある。この治療法の確立により最終的には重症心筋症患者の生活の質の向上および早期の社会復帰の実現に大きく寄与す

	ることが期待される。
⑦臨床研究の対象疾患	
名称	重症心筋症 (DCM 及び ICM)
選定理由	<p>内科的治療に抵抗性の重症心筋症で心機能がある程度保たれ、他の臓器不全が進行していない心筋症患者に対しては、機能的僧帽弁閉鎖不全に対する僧帽弁形成術や、左室形成術などが行われているが、これらの術式が対象となるのは一部の患者のみである。また、「⑥ 臨床研究の目的・意義」で述べた背景も考慮して、本研究では重症心筋症として DCM 及び ICM に焦点をあて、とくに LVAS 装着が必要となる前の段階のあるいは高齢などの理由により心臓移植が適応とならない重症心筋症 (DCM 及び ICM) 患者を対象とする。</p>
⑧被験者等の選定基準	
<p>本研究では、自己由来細胞シート移植術の効果及び実行可能性を評価することも目的としているため、2 段階登録を採用する。したがって、被験者の選定基準を以下のように段階ごとに設定する。</p>	
<p>1. 一次登録時選定基準</p> <p>本研究への（一次）登録時に、以下の選択基準のすべての項目を満たし、除外基準のいずれの項目にもあてはまらない患者を被験者とする。</p>	
<p>1.1. 選択基準</p>	
<p>1) 拡張型心筋症あるいは虚血性心筋症と診断されている。</p>	
<p>2) ジギタリス、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、β 遮断薬といった内科的治療によっても改善が見られない、New York Heart Association (NYHA) 分類 III 度以上の心不全が持続している。</p>	
<p>3) 登録前 4 週以内に心臓超音波検査で左室駆出率が 35% 以下である。</p>	
<p>4) 年齢 20 歳以上 75 歳以下である。</p>	
<p>5) 文書によるインフォームド・コンセントが得られている。</p>	
<p>選択基準の設定根拠</p>	
<p>1) 「⑥臨床研究の目的・意義」を参照。</p>	

- 2) 最大限の内科的治療に抵抗性を示している。
- 3) 埋め込み型除細動機 (ICD) の埋め込み適応基準を満たす。
- 4) 成人でかつ手術に対する危険性を考慮した。
- 5) 臨床研究の内容を説明し、参加への同意を文書で残すため。

1.2. 除外基準

- 1) 筋変性疾患を有している。
- 2) 活動性の感染症を有する。
- 3) 登録前 6 ヶ月以内にアルコール中毒症又は薬物依存症の既往を有している。
- 4) 登録前 5 年以内に悪性腫瘍を有している。
- 5) HIV, HBV, HCV, HTLV 陽性である。
- 6) 本研究で使用する薬剤に対する過敏症の既往を有している。
- 7) 妊娠あるいは妊娠している可能性がある。
- 8) 精神病または精神症状を合併しており研究への参加が困難と判断される。
- 9) その他、研究責任医師の判断により、当研究への参加が不適当と考えられる。

除外基準の設定根拠

- 1) 筋芽細胞の単離、培養が困難である。
- 2) 筋芽細胞培養中の作業者の安全を考慮した。
- 3) 研究に対する正確な理解が不可能の可能性があるので。
- 4) 転移による再発の可能性があるので。
- 5) 筋芽細胞培養中の作業者の安全を考慮した。
- 6) 被験者の安全性を考慮した。
- 7) 母子への安全性を考慮した。
- 8) 臨床研究の内容を理解し、正しい意思決定ができない可能性があるため。

2. 二次登録時選定基準

以下の選択基準のすべての項目を満たし、除外基準のいずれの項目にもあてはまらない被験者を二次登録する。

2.1. 選択基準

- 1) 一次登録が完了している。
- 2) 製品標準書（別紙9参照）に規定された品質をみたす自己由来細胞（培養骨格筋筋芽細胞シート）が作製されている。

選択基準の設定根拠

- 1) 本研究への適格基準を満たしている。
- 2) 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術の実施が可能である。

2.2. 除外基準

- 1) 被験者が、自己由来細胞（培養骨格筋筋芽細胞シート）作製完了後の本研究への参加継続を拒否している。
- 2) その他、研究責任医師の判断により、本研究への参加継続が不適当と考えられる。

除外基準の設定根拠

- 1) 被験者の意思による

⑨臨床研究に用いるヒト幹細胞	
種類	骨格筋筋芽細胞 (詳細は「⑫臨床研究の実施計画」の「3. 本研究で用いるヒト幹細胞に関する情報」を参照)。
採取、調製、移植又は投与の方法	1) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取及び培養 2) 培養骨格筋筋芽細胞シートの作製 3) 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術 (詳細は「⑫臨床研究の実施計画」の「6. 治療計画」を参照)。
⑩安全性についての評価	有害事象の有無、種類、重症度、安全度、発現頻度及び発現期間を評価する (詳細は「⑫臨床研究の実施計画」の「7. 観察・検査・評価項目とスケジュール」, 「9. エンドポイントの定義と評価」, 「14. 統計的考察」を参照)。
⑪臨床研究の実施が可能であると判断した理由	研究責任者らは、重症心不全に対して培養骨格筋筋芽細胞シート移植術が心機能改善効果を有することをラット心筋梗塞モデル ⁽¹⁵⁾ 、DCM ハムスター ⁽¹⁶⁾ ならびに、イヌ DCM 様モデルを用いた大動物前臨床研究 ⁽¹⁷⁾ において示してきた (詳細は別紙 3 試験物概要書を参照)。また、既に開始されている LVAS 装着済み DCM 患者を対象とした培養骨格筋筋芽細胞シート移植術の臨床研究で、培養骨格筋筋芽細胞シート移植術が安全な治療法であるという結果が得られつつある(別紙 3 参照)。また、培養骨格筋筋芽細胞シート移植術の効果はサイトカイン療法による効果を中心であると考えられており、LVAS 装着前の重症心筋症では自己心筋細胞の生存率がより高く、培養骨格筋筋芽細胞シート移植術後の心機能改善効果は高いものと期待される。
⑫臨床研究の実施計画	1. 研究の概要 研究の概要は以下の通りである (シェーマを参照)。 1.1. 目的 1) 自己由来細胞シート移植術に基づく再生療法の安全性、効果及び実施可能性の評価。 2) 主要評価項目：有害事象の有無、種類、重症度、安全度、発現頻度及び発現期間。 3) 副次評価項目：左室壁運動の経時変化、心拡大の経時変化、培養骨格筋筋芽細胞シート移植術の完遂の可否。 1.2. 対象 重症心筋症 (DCM 及び ICM)。

1.3. 治療

培養骨格筋筋芽細胞シート移植術。ただし、本研究では自己骨格筋からの筋芽細胞採取から培養骨格筋筋芽細胞シート移植完遂までをプロトコル治療と定義する（定義の根拠は「6. 治療計画」の「6.1. プロトコル治療の定義」を参照）。

1.4. 目標症例数と研究期間

- 1) 目標症例数：DCM 症例 5 例及び ICM 症例 5 例。
- 2) 登録期間：2 年。
- 3) 追跡期間：被験者ごとに培養骨格筋筋芽細胞シート移植術後 24 週又は研究の中止まで。
- 4) 研究期間：登録開始から最終登録症例の追跡終了又は研究の中止まで。

1.5. デザインの概要

- 1) 試験の相：第 I 相。
- 2) デザインの型：単群。
- 3) 対照：無。
- 4) ランダム化：無。
- 5) 遮蔽化：無。

2. 本研究で用いる基準及び定義

2.1. 診断基準

- 1) 拡張型心筋症とは、病理組織学的検査にて、拡張型心筋症の所見を呈していることを指す。
- 2) 虚血性心筋症とは、登録時から 4 週間以上前に心筋梗塞の既往があることを指す。

2.2. 心不全の重症度分類

NYHA 分類

- I 身体活動を制限する必要のないもの、日常生活における身体活動では、疲れ、動悸、息切れ、狭心症症状はおこらない。
- II 身体活動を軽度ないし中等度に制限する必要があるもの、日常生活にお

- ける身体活動でも、疲れ、動悸、息切れ、狭心症症状がおこるもの。
- III 身体活動を中等度ないし高度に制限する必要があるもの、日常生活における軽い身体活動でも、疲れ、動悸、息切れ、狭心症症状がおこるもの。
- IV 身体活動を制限し安静にしても、心不全症状や狭心症症状がおこり、少しでも安静をやめると症状が増悪するもの。

3. 本研究で用いるヒト幹細胞に関する情報

「別紙 3 試験物概要書」を参照。

4. 適格基準

「⑧被験者等の選定基準」を参照。

5. 登録

5.1. 一次登録の手順

以下の手順に従い被験者を本研究へ一次登録する。

1) 同意の取得

研究責任医師又は研究分担医師は、本研究への参加候補となる患者本人に対して、同意説明文書を提供し十分な説明を行った後、本研究への参加の同意を文書で取得する（「⑨被験者に関するインフォームド・コンセント」を参照）。

2) 被験者名簿の作成

研究責任医師、研究分担医師は、研究参加に文書で同意を得た患者に対して、被験者識別コードを付与し、「被験者名簿」（別紙 8 参照）に記載する。研究責任医師は被験者名簿を実施医療機関内で保管する。

被験者識別コードは、プロジェクト承認番号を特定する 6 桁の英数字、実施医療機関ごとに被験者を特定する 3 桁の数字から構成される。後者の 3 桁は同意を取得した患者に 001 番から順に番号を付与する。

3) スクリーニング検査の実施

研究責任医師又は研究分担医師は、研究参加に文書で同意を得た患者に対して、「7. 観察・検査・評価項目及びスケジュール」に従ってスクリ

ーニングを実施する。

4) 一次症例登録票の作成

研究責任医師又は研究分担医師は、患者背景及びスクリーニング結果に基づいて、「4. 適格基準」で規定する一次登録時の選択基準のすべての項目を満たし、除外基準のいずれの項目にも該当しないことを確認し、「一次症例登録票」(別紙8参照)に必要事項をすべて記載する。

5) 一次症例登録票の送付

研究責任医師、研究分担医師は、「一次症例登録票」を複写して診療録とともに保管し、データセンターにその原本を送付する。

6) 適格性の判定

データセンターは送付されてきた「一次症例登録票」の記載内容に基づいて適格性を確認する。データセンターはこの記入済み「一次症例登録票」を保管しておく。

7) 被験者の一次登録

データセンターは、適格と判定した場合には、適格と判定された被験者に「登録番号」を付与し、登録番号を記載した「一次症例登録確認書」を研究責任医師に送付する。この「一次症例登録確認書」を送付した時点で、適格と判定した患者を被験者として「一次登録」したものとする。不適格と判定した場合には、「一次症例登録における不適格連絡書」を研究責任医師に送付する。

8) プロトコル治療の開始

研究責任医師または研究分担医師は、送付されてきた「一次症例登録確認書」に一次登録完了の旨が記載されていることを確認して、一次登録後の必要な検査及びプロトコル治療を開始する。

研究責任医師、研究分担医師は、「一次症例登録確認書」又は「一次症例登録における不適格連絡書」を保管し、「一次症例登録確認書」に記載された登録番号を被験者名簿に記載する。

5.2. 二次登録の手順

以下の手順に従い被験者を二次登録する。

1) 二次症例登録票の作成

研究責任医師又は研究分担医師は、培養骨格筋筋芽細胞シート作成完了後、「4. 適格基準」で規定する二次登録時の選択基準のすべての項目を

満たし、除外基準のいずれの項目にも該当しないことを確認し、「二次症例登録票」(別紙 8 参照) に必要事項をすべて記載する。

2) 二次症例登録票の送付

研究責任医師、研究分担医師は、「二次症例登録票」を複写して診療録とともに保管し、データセンターにその原本を送付する。

3) 適格性の判定

データセンターは送付されてきた「二次症例登録票」の記載内容に基づいて適格性を確認する。データセンターはこの記入済み「二次症例登録票」を保管しておく。

4) 被験者の二次登録

データセンターは、適格と判定した場合には、「二次症例登録確認書」を研究責任医師に送付する。この「二次症例登録確認書」を送付した時点で、適格と判定した患者を被験者として「二次登録」したものとする。不適格と判定した場合には、「二次症例登録における不適格連絡書」を研究責任医師に送付する。

5) プロトコル治療の開始

研究責任医師または研究分担医師は、送付されてきた「二次症例登録確認書」に二次登録完了の旨が記載されていることを確認して、二次登録後の培養骨格筋筋芽細胞シート移植術を開始する。研究責任医師、研究分担医師は、「二次症例登録確認書」又は「二次症例登録における不適格連絡書」を保管し、二次症例登録の完了の可否について被験者名簿に記載する。

6. 治療計画

6.1. プロトコル治療の定義

本研究におけるプロトコル治療とは、以下の「6.1.1. 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取」開始から「6.1.4. 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術」完遂までとする。

6.1.1. 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取

一次登録完了後（「5. 登録」参照）に、手術室において、局所麻酔下あるいは全身麻酔にて内側広筋 (vastus medialis) より、骨格筋を約 10-20g を採取する。

6.1.2. 自己骨格筋から採取した筋芽細胞の培養

採取した骨格筋を保存溶液に浸漬し、大阪大学医学部附属病院未来医療センターの細胞分離培養システム (Cell Processing Center) に搬送し、同施設にて筋芽細胞を単離し、移植細胞数に達するまで、3-4 週間程度の継代培養を行う。筋芽細胞が移植細胞数に達したら凍結保存液にて-150℃で凍結保存する。筋芽細胞凍結時に培養上清の細菌、マイコプラズマ、エンドトキシンのチェックを行う。なお、筋芽細胞凍結時に重要管理項目（別紙 9 参照）を満たさない場合には、「6.1.1. 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取」を再度実施する。2 回実施しても重要管理項目（別紙 9 参照）を満たさない場合には「6.4. プロトコル治療の中止」に従う。

6.1.3. 培養骨格筋筋芽細胞シートの作製

筋芽細胞融解後、培養を行う。8 日以内に細胞を回収し、温度感受性培養皿に播種する。培養終了後、出荷判定を行い、温度感受性培養皿を手術室へ搬入する。温度感受性培養皿内で細胞シートが剥離していることを確認後、二次登録の手続きを行う（「5. 登録」を参照）。なお、筋芽細胞シートの作製時に重要管理項目（別紙 9 参照）を満たさない場合もしくは筋芽細胞シートの剥離が確認できない場合には、「6.1.1. 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取」を再度実施する。2 回実施しても重要管理項目（別紙 9 参照）を満たさない場合には「6.4. プロトコル治療の中止」に従う。

6.1.4. 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術

二次登録完了後（「4. 登録」を参照）に、外科手術としては、僧帽弁形成術、左室形成術、冠動脈バイパス術、およびそれらに付随する術式として僧帽弁乳頭筋間縫縮術、三尖弁形成術、両心室ペーシングリード装着術、メイズ手術など症例に応じて必要な術式を行う。その後、同術野より筋芽細胞シート（約 4cm 径、 2.5×10^7 個/1 シートを 12-32 枚程度）を移植する。外科手術が適応とならない症例では、左側開胸または胸骨正中切開にて筋芽細胞シート移植を行う。

6.2. プロトコル治療の定義の根拠

培養骨格筋筋芽細胞シート移植術そのものをプロトコル治療と定義することもできるが、その移植術に必要な筋芽細胞を被験者自身の骨格筋から採取することを考えると、その採取開始から治療行為の一環としての被験者への介入が開始されているとも考えることができる。それ故、本研究ではプロトコル治療を上述のように定義した。実際に、この定義に基づくプロトコル治

療が重症心筋症 (DCM 及び ICM) の標準的治療として確立し、重症心筋症 (DCM 及び ICM) 患者に本プロトコル治療が提示された場合を想定しても、プロトコル治療を上述のように定義しておく方が自然であると考えた。

6.3. プロトコル治療の定義の根拠

培養骨格筋筋芽細胞シート移植術の完遂をプロトコル治療完了とする。

6.4. 併用療法及び支持療法

プロトコル治療に関連して予期される有害事象として不整脈が挙げられる (「8.3. 予期される有害事象」を参照)。プロトコル治療中に致死性不整脈が検出された場合にはニフェカランなどの抗不整脈薬等の適切な薬物治療を行う。治療抵抗性である場合には植込み型除細動器 (Implantable Cardioverter Defibrillator, ICD) を装着する。

6.5. 後治療

プロトコル治療終了後またはプロトコル治療中止後、致死性不整脈が検出された場合には「6.4. 併用療法及び支持療法」と同様に適切な薬物治療を行い、治療抵抗性である場合には植込み型除細動器 (Implantable Cardioverter Defibrillator, ICD) を装着する。

6.6. 心臓移植に移行した際の摘出心臓及び患者死亡後の病理解剖

心臓移植に移行した際の摘出心臓の組織採取について、被験者本人及び家族の同意のもとに実施し、被験者死亡後の病理解剖時の心臓組織採取について、家族の同意のもとに実施し以下の項目を検討する。心臓移植時には摘出心の病理的検討を、死亡時には病理解剖を、学内の病理解剖担当医師に依頼する。退院後、自宅もしくは他病院にて死亡した際は、当該科に連絡してもらい、家族の同意のもとに、阪大病院にて病理解剖をおこなうよう努める。

- ・ HE 染色、マッソントリクローム染色による移植細胞や線維化の検討
- ・ Fast type MHC 染色による移植筋芽細胞シート生着の可否
- ・ アルカリフォスファターゼ免疫染色による血管密度の検討

死亡時には、肝臓、腎臓、脾臓、腸管、肺等主要臓器を摘出し、大阪大学医学部附属病院病理部に組織解析を依頼し、死因の検討を行う。組織評価に関しては、心移植時または死亡時に採取した組織より上記項目を比較検討する。

	<p>7. 観察・検査・評価項目及びスケジュール</p> <p>7.1. 観察・検査・評価項目</p> <p>研究責任医師及び研究担当医師が、被験者の状態により検査をおこなうこと自体に危険が伴うと判断したときは、当該検査の中止や延期等を考慮する。</p> <p>7.1.1. 臨床症状の観察</p> <p>7.1.1.1. 検査時期</p> <p>一次登録前，二次登録前，プロトコル治療直後，プロトコル治療後（2 週後，4 週後，12 週後，24 週後）。</p> <p>7.1.1.2. 方法および注意点</p> <p>平静状態で観察する。</p> <p>7.1.1.3 観察項目</p> <p>1) バイタルサイン</p> <p>血圧（収縮期，拡張期），脈拍，体重，体温</p> <p>2) 臨床症状</p> <p>NYHA 分類</p> <p>3) 臨床症状-自覚症状</p> <p>安静時息苦しさ，労作時息切れ，睡眠時息苦しさ，動悸，倦怠感・易疲労感</p> <p>4) 身体所見</p> <p>湿性ラ音，浮腫，過剰心音</p> <p>7.1.2. 血液検査・尿検査</p> <p>7.1.2.1. 検査時期</p> <p>一次登録前，二次登録前，プロトコル治療直後，プロトコル治療後（2 週後，4 週後，12 週後，24 週後）。</p> <p>7.1.2.2. 方法および注意点</p> <p>原則として大阪大学医学部附属病院臨床検査部にて測定をおこなう。</p> <p>7.1.2.3. 検査項目</p> <p>1) 血液学的検査</p> <p>赤血球，ヘモグロビン値，白血球数，血小板数，白血球分画</p> <p>2) 生化学的検査</p> <p>血清電解質（Na,K,Cl），BUN，クレアチニン，総蛋白，アルブミン，総ビ</p>
--	--

	<p>リルビン、抱合型ビリルビン、AST、ALT、アルカリフォスファターゼ、CRP、BNP</p> <p>3) 尿検査</p> <p>尿蛋白、尿糖（定性）、潜血、ケトン、PH、沈査</p> <p>7.1.3. 十二誘導心電図</p> <p>7.1.3.1. 検査時期</p> <p>一次登録前、二次登録前、プロトコル治療直後、プロトコル治療後（2 週後、4 週後、12 週後、24 週後）。</p> <p>7.1.3.2. 方法および注意点</p> <p>平静状態で、ベッド上に仰臥位の状態で、検査技師、または担当医が、十二誘導心電図を計測する。</p> <p>7.1.4. ホルター心電図</p> <p>7.1.4.1. 検査時期</p> <p>プロトコル治療後（4 週後、12 週後、24 週後）。</p> <p>7.1.4.2. 方法および注意点</p> <p>検査技師が、ホルター心電図を装着する。症状行動等を可能であれば患者に詳細に記載させる。平静状態で、ベッド上に仰臥位の状態で、担当医がホルター心電図を装着する。</p> <p>7.1.5. 心臓超音波検査</p> <p>7.1.5.1. 検査時期</p> <p>一次登録前、二次登録前、プロトコル治療後（2 週後、4 週後、12 週後、24 週後）。</p> <p>7.1.5.2. 方法および注意点</p> <p>平静状態で、ベッド上で、担当医師が、心臓超音波検査装置を用いて各測定項目を計測する。</p> <p>7.1.5.3. 検査項目</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 左室駆出率 2) 左室拡張、収縮末期径 3) 局所収縮能、局所拡張能 <p>7.1.6. 胸部 X 線検査</p> <p>7.1.6.1. 検査時期</p> <p>一次登録前、プロトコル治療直後、プロトコル治療後（2 週後、4 週後、12 週後、24 週後）。</p> <p>7.1.6.2. 方法および注意点</p>
--	---

立位もしくは仰臥位にて、検査技師が胸部 X 線を撮影する。正確に評価するために立位で撮影することを原則とするが、被験者の状態によって立位が困難な場合は、仰臥位での撮影も可とする。

7.1.6.3. 検査項目

心胸郭比

7.1.7. 心臓カテーテル検査

7.1.7.1. 検査時期

プロトコル治療後 (4 週後(可能であれば施行する), 12 週後, 24 週後)。

7.1.7.2. 方法および注意点

スワンガンツカテーテルを挿入し、仰臥位にて心係数を測定する。

7.1.7.3. 検査項目

心係数

7.2. 観察・検査・評価スケジュール

以下のスケジュール表に従って、観察・検査・評価を実施する。

観察・検査・ 評価日	一次登 録前	二次登 録前	プロトコ ル 治療完了 直後	プロトコル治療後			
				2 週	4 週	12 週	24 週
実施許容期間	3 週以内	3 週以内	+3 日	±6 日	±1 週	±4 週	
臨床症状の観 察	○	○	○	○	○	○	○
血液検査・ 尿検査	○	○	○	○	○	○	○
十二誘導心電 図	○	○	○	○	○	○	○
ホルター心電 図					○	○	○
心臓超音波検 査	○	○		○	○	○	○
胸部レントゲ ン	○		○	○	○	○	○
心臓カテーテ ル検査					△	○	○

○：被験者の状態により検査をおこなうこと自体に危険が伴うと判断されたと
きを除いて、実施許容期間内に観察、検査、評価を必ず実施する。
△：可能であれば実施する。

8. 有害事象の定義及び評価

8.1. 有害事象の定義

有害事象 (Adverse Event) とは、本臨床研究の因果関係の有無に関わらず、
本臨床研究中に生じた全ての随伴症状及び臨床検査値異常変動を示す。

重篤な有害事象 (SAE: Serious Adverse Event) とは、有害事象のうち、以下
のものをいう。

- 1) 死亡
- 2) 死亡につながる恐れのあるもの
- 3) 入院または治療のために入院期間の延長が必要とされるもの
- 4) 障害
- 5) 障害につながるおそれのあるもの
- 6) 後世代における先天性の疾病または異常

8.2. 有害事象の評価

研究責任医師又は研究分担医師は、被験者に有害事象を認め、有害事象の
治療が必要である場合は、その旨を被験者に伝え、適切な処置を講じるとと
もに、当該有害事象を評価し、以下の事項を症例報告書に記載する。なお、
有害事象名は、可能な限り疾患名を記載する。

- 1) 有害事象名
- 2) 発現日 (又は症状・徴候の確認日)
- 3) 重症度 (軽度, 中等度, 高度)
 - a) 「軽度」とは、無処置で研究が可能であることを指す。
 - b) 「中等度」とは、何らかの処置により研究が可能であることを指す。
 - c) 「高度」とは、研究の継続が不可能であることを指す。
- 4) 重篤性 (重篤でない, 重篤 [重篤因子]) (「8.1 有害事象の定義」を参照)
- 5) 処置の有無
- 6) 転機及びその確認日 (回復 [転機日], 転快 [転機日], 未回復, 後遺症 [後
遺症名], 死亡 [死亡日], 不明)
- 7) プロトコル治療との因果関係 (関連なし, 関連あるかもしれない, おそ

らく関連あり，関連あり)

- a) 「関連なし」とは，プロトコル治療と有害事象発現との間に時間的な合理性がない．又は，併用薬剤や原疾患・合併症等，患者の要因の影響が大きいと考えられる．
- b) 「関連あるかもしれない」とは，プロトコル治療と有害事象発現との間に時間的な合理性がある．かつ，併用薬剤や原疾患・合併症等，患者の要因を考えても，プロトコル治療との関連を否定できない．
- c) 「おそらく関連あり」とは，プロトコル治療と有害事象発現との間に時間的な合理性がある．かつ，併用薬剤や原疾患・合併症等，患者の要因を考えても，おそらくプロトコル治療と関連が考えられる．
- d) 「関連あり」とは，プロトコル治療と有害事象発現との間に時間的な合理性がある．かつ，併用薬剤や原疾患・合併症等，患者の要因を考えても，明らかにプロトコル治療と関連が考えられる．

研究責任医師又は研究分担医師は，有害事象の予後が明らかになるまで追跡調査するが，追跡調査終了時期は研究責任医師又は研究分担医師の医学的判断による．

評価の時点については「7.2. 観察・検査・報告スケジュール」を参照．また，有害事象の報告と対応については「⑮被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法」を参照．

8.3. 予期される有害事象

プロトコル治療に関連して予期される有害事象として不整脈が挙げられる．筋芽細胞移植による不整脈の誘発は議論の多いところである．注射針による筋芽細胞移植の場合は，細胞数が多いと不整脈を発症する確率が高いことが報告されている(別紙 3 試験物概要書を参照)が，針による心筋組織の損傷も不整脈の温床になりうるものと考えられる．また，心筋組織内に不整脈の発生源となりうる筋芽細胞が存在することも不整脈発生の原因のひとつとも考えられる．ただし，筋芽細胞シート移植は，針による心筋組織のダメージはなく，心外膜上に移植するため直接心筋細胞とコンタクトするわけではないので，従来法と比較して，不整脈の発生の確率は少ないものと考えられる．ブタおよびイヌを用いた実験においても，致死性不整脈の発生は認められず，すでに研究責任者が提案してきた二つの臨床研究においても，現在のところ致死性不整脈は検出されていない(別紙 3 参照)．

9. エンドポイントの定義及び評価

9.1. 主要評価項目

本研究における有害事象の有無，種類，重症度，安全度，発現頻度及び発現期間とする。

9.2. 副次評価項目

9.2.1. 左室壁運動の経時変化

心臓超音波検査に基づいて，左室駆出率，収縮率，及び Color kinesis index による移植部位の局所収縮能，拡張能を定量化し，心機能を経時的に観察する。

9.2.2. 心拡大の経時変化

単純正面胸部 X 線に基づいて，心胸郭比を測定し，心拡大の程度について経時的に観察する。

9.2.3. 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術の実施・完遂の可否

自己骨格筋からの筋芽細胞の採取から培養骨格筋筋芽細胞シート移植術成功までの被験者が辿った過程を明らかにし，培養骨格筋筋芽細胞シート移植術が実施及び完遂できたか否かを把握する。実施及び完遂できなかった場合の理由も収集する。

10. 症例報告書

10.1. 症例報告書の作成及び報告

- 1) 研究責任医師又は研究分担医師は，登録した被験者について症例報告書を作成し，記名捺印又は署名の上，データセンターに提出し，その写しを保存する。
- 2) 研究責任医師は，研究分担医師が症例報告書を作成した場合は，その内容を点検し，問題がないことを確認した上で記名捺印又は署名する。
- 3) 研究責任医師は，データセンターに提出する症例報告書が，正確かつ完全で読みやすく，提出の時期が適切であること，及び被験者の識別に登録番号を用いていることを保証する。
- 4) 症例報告書内の医学的判断を伴わない箇所への記載及び修正は，研究責

任医師または研究分担医師の監督のもと、その他の者が行ってもよい。

10.2. 症例報告書の変更又は修正

研究分担医師が症例報告書を変更又は修正した場合には、研究責任医師はその変更又は修正を点検・確認する。

10.3. 症例報告書の記載及び修正方法

- 1) 黒色のボールペンまたはペンで記載する。
- 2) □は該当するものにレ印又は×印を記載する。
- 3) 観察・検査・評価未実施でデータがない場合には、記載欄に斜線 (/) を入れる。
- 4) データセンターへ提出前の症例報告書の変更又は修正方法
 - a) 変更又は修正箇所は、二重線 (=) で消し、捺印又は署名し、変更又は修正日を記載する。当初の記載内容を不明瞭にしないよう修正液、砂消しゴム等は使用しない。
 - b) 重要事項 [同意、エンドポイントの評価 (有害事象名、重症度、重篤性、転帰、プロトコル治療との因果関係、コメント、異常変動の判定)] に関する変更又は修正では、捺印又は署名、変更又は修正日に加えて変更又は修正の理由を記載する。
 - c) データセンターへ提出後の症例報告書の変更又は修正は、データセンターが指定する DCF (Data Clarification Form) を経由してこれを行う。ただし、データセンターがデータ固定を宣言した後の症例報告書の変更又は修正は認められない。

11. 被験者ごとの研究中止基準と手順

11.1. 研究中止基準

研究責任医師又は研究分担医師は、以下の項目のいずれかに該当する場合には、当該被験者の研究 (あるいはプロトコル治療) を中止する。

- 1) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取又は再採取を完遂できなかった場合。
- 2) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取を 2 回実施し、自己骨格筋からの筋芽細胞培養が 2 回とも不完遂にいたった場合。
- 3) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取を 2 回実施し、自己骨格筋の筋芽細胞

	<p>培養の結果が 2 回とも凍結時に重要管理項目（別紙 9 参照）を満たなかった場合。</p> <p>4) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取を 2 回実施し、培養骨格筋筋芽細胞シート作製時の結果が 2 回とも凍結時に重要管理項目（別紙 9 参照）を満たなかった場合。</p> <p>5) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取を 2 回実施し、培養骨格筋筋芽細胞シート作製が 2 回とも不完遂であった場合。</p> <p>6) 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術が完遂できなかった場合。</p> <p>7) 被験者が LVAS を装着した場合。</p> <p>8) 被験者が心移植を受けた場合。</p> <p>9) 1) から 8) の他、研究実施計画書を遵守したプロトコル治療が不可能となった場合。</p> <p>10) 被験者が有害事象と関連する理由により同意撤回の申し出があった場合。</p> <p>11) 被験者が有害事象と関連しない理由により同意撤回の申し出があった場合。</p> <p>12) 有害事象の発現を認め、研究責任医師又は分担医師が研究の継続を困難と判断した場合。</p> <p>13) プロトコル治療開始後、被験者が適格規準を満たしていなかったことが判明した場合。</p> <p>14) 「15.2.1. 中止又は中断の基準」により研究全体が中止又は中断された場合。</p> <p>15) その他、研究責任医師又は研究分担医師が、研究の中止を適切と判断した場合。</p> <p>11.2. 研究中止手順</p> <p>研究責任医師又は研究分担医師は、研究を中止する旨を当該被験者に速やかに説明し、適切な医療の提供その他必要な措置を講じる。また、研究中止時における所定の項目を評価するとともに、中止日及びその理由を症例報告書に記載する。</p> <p>12. 被験者の内訳と研究実施計画書からの逸脱</p>
--	--

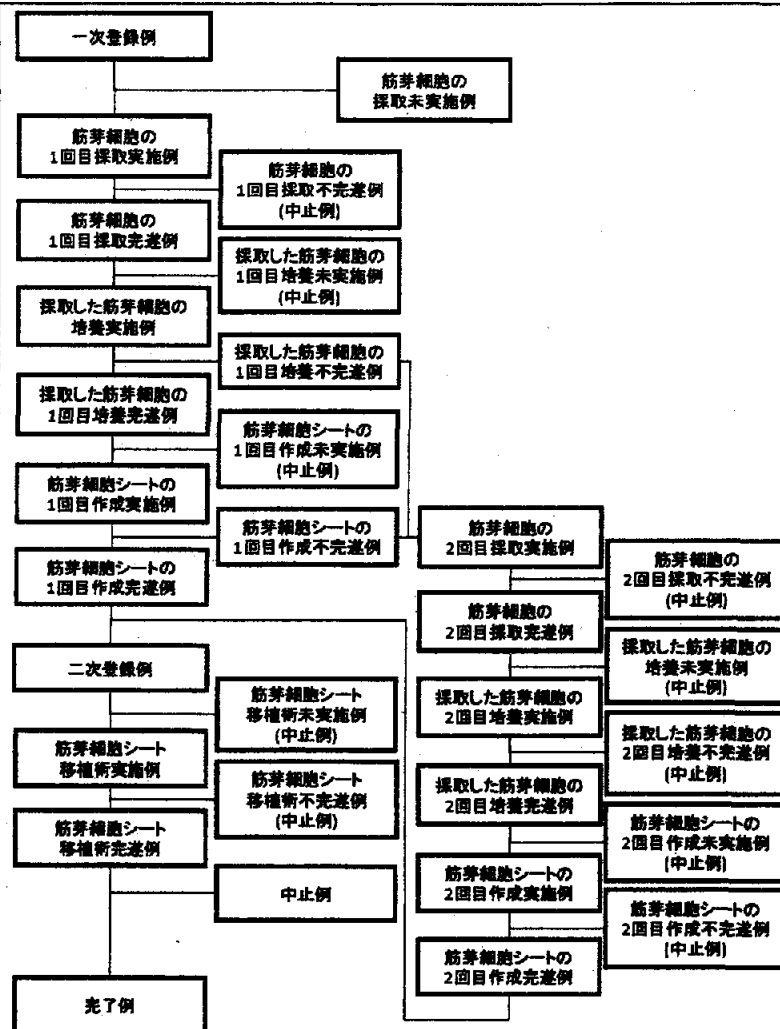
12.1. 被験者の内訳

本研究では、被験者の内訳について以下の用語を定義する。

- 1) 一次登録例：一次登録時適格基準（「4. 適格基準」を参照）で規定した選択基準をすべて満たし、除外基準に該当しないと、研究責任医師等及びデータセンターが確認できた被験者。
- 2) 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取未実施例：一次登録後、自己骨格筋からの筋芽細胞の採取開始までに研究が中止され、その後のプロトコル治療が全く実施されていない被験者。
- 3) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 1 回目採取実施例：一次登録後、自己骨格筋からの筋芽細胞の採取が実施された被験者。
- 4) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 1 回目採取不完遂例：自己骨格筋からの筋芽細胞の採取が実施されたが、それが完遂しなかった被験者。
- 5) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 1 回目採取完遂例：自己骨格筋からの筋芽細胞の採取が実施され、それが完遂した被験者。
- 6) 自己骨格筋から採取した筋芽細胞の 1 回目培養未実施例：自己骨格筋からの筋芽細胞の採取完遂後、自己骨格筋から採取した筋芽細胞の培養開始までに研究が中止され、その後のプロトコル治療が全く実施されていない被験者。
- 7) 自己骨格筋から採取した筋芽細胞の 1 回目培養実施例：自己骨格筋からの筋芽細胞の採取完遂後、自己骨格筋から採取した筋芽細胞の培養が実施された被験者。
- 8) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 1 回目培養不完遂例：自己骨格筋からの筋芽細胞の培養が実施されたが、それが完遂しなかった被験者。
- 9) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 1 回目培養完遂例：自己骨格筋からの筋芽細胞の培養が実施され、それが完遂した被験者。
- 10) 培養骨格筋筋芽細胞シートの 1 回目作製未実施例：自己骨格筋からの筋芽細胞の培養完遂後、培養骨格筋筋芽細胞シートの作製開始までに研究が中止され、その後のプロトコル治療が全く実施されていない被験者。
- 11) 培養骨格筋筋芽細胞シートの 1 回目作製実施例：自己骨格筋からの筋芽細胞の培養完遂後、培養骨格筋筋芽細胞シートの作製が実施された被験者。
- 12) 培養骨格筋筋芽細胞シートの 1 回目作製不完遂例：培養骨格筋筋芽細胞シートの作製が実施されたが、それが完遂しなかった被験者。

- 13) 培養骨格筋筋芽細胞シートの 1 回目作製完遂例：培養骨格筋筋芽細胞シートの作製が実施され、それが完遂した被験者。
- 14) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目採取実施例：筋芽細胞凍結時に重要管理項目を満たさない場合、筋芽細胞シートの作製時に重要管理項目満たさない場合又は筋芽細胞シートの剥離が確認できない場合で、自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目の採取が実施された被験者。
- 15) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目採取不完遂例：自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目の採取が実施されたが、それが完遂しなかった被験者。
- 16) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目採取完遂例：自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目の採取が実施され、それが完遂した被験者。
- 17) 自己骨格筋から採取した筋芽細胞の 2 回目培養未実施例：自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目の採取完遂後、自己骨格筋から採取した筋芽細胞の 2 回目の培養開始までに研究が中止され、その後のプロトコル治療が全く実施されていない被験者。
- 18) 自己骨格筋から採取した筋芽細胞の 2 回目培養実施例：自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目の採取完遂後、自己骨格筋から採取した筋芽細胞の 2 回目の培養が実施された被験者。
- 19) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目培養不完遂例：自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目の培養が実施されたが、それが完遂しなかった被験者。
- 20) 自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目培養完遂例：自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目の培養が実施され、それが完遂した被験者。
- 21) 培養骨格筋筋芽細胞シートの 2 回目作製未実施例：自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目の培養完遂後、培養骨格筋筋芽細胞シートの 2 回目の作製開始までに研究が中止され、その後のプロトコル治療が全く実施されていない被験者。
- 22) 培養骨格筋筋芽細胞シートの 2 回目作製実施例：自己骨格筋からの筋芽細胞の 2 回目の培養完遂後、培養骨格筋筋芽細胞シートの 2 回目の作製が実施された被験者。
- 23) 培養骨格筋筋芽細胞シートの 2 回目作製不完遂例：培養骨格筋筋芽細胞シートの 2 回目の作製が実施されたが、それが完遂しなかった被験者。
- 24) 培養骨格筋筋芽細胞シートの 2 回目作製完遂例：培養骨格筋筋芽細胞シートの 2 回目の作製が実施され、それが完遂した被験者。
- 25) 二次登録例：二次登録時適格基準（「4. 適格基準」を参照）で規定した選択基準をすべて満たし、除外基準に該当しないと、研究責任医師等及び

	<p>データセンターが確認できた被験者。</p> <p>26) 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術未実施例：二次登録後，培養骨格筋筋芽細胞シート移植術開始までに研究が中止された被験者。</p> <p>27) 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術実施例：二次登録後，培養骨格筋筋芽細胞シート移植術が実施された被験者。</p> <p>28) 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術不完遂例：培養骨格筋筋芽細胞シート移植術が実施されたが，それが完遂しなかった被験者。</p> <p>29) 培養骨格筋筋芽細胞シート移植術完遂例：培養骨格筋筋芽細胞シート移植術が完遂した被験者。</p> <p>30) 完了例：培養骨格筋筋芽細胞シート移植術が成功し，「7. 観察・検査・評価項目およびスケジュール」で規定した，観察・検査・評価及びスケジュールを完了した被験者。</p> <p>31) 中止例：自己骨格筋からの筋芽細胞の採取が実施されたが，理由の如何に関わらず，上記の完了に到達せずに研究が中止された被験者。</p>
--	--



<図 被験者の内訳>

12.2. 研究実施計画書からの逸脱

登録例について、以下の通り逸脱を定義する。

- 1) 不適格例：対象外疾患，選択基準あるいは除外基準に違反したにもかかわらず，一次あるいは二次登録され，プロトコル治療が一部でも実施された被験者。なお，プロトコル治療が一部でも実施された後に，対象外疾患，選択基準あるいは除外基準に違反していたことが判明した被験者を含む。
- 2) 登録後逸脱例：一次登録後に本研究実施計画書の規定を違反した被験者。具体的には以下の被験者が含まれる。
 - a) 「6.1. プロトコル治療」で規定したプロトコル治療を違反した被験者。

- b) 「7. 観察・検査・評価項目およびスケジュール」で規定した、観察・検査・評価及びスケジュールを違反した被験者。
- c) 「11. 被験者ごとの研究中止基準と手順」で規定した項目に該当しない中止例、又はこの項目に該当するにもかかわらず中止しなかった被験者。

13. 目標症例数と研究期間

13.1. 目標症例数

DCM 症例 5 例及び ICM 症例 5 例とする。

13.2. 研究期間

登録期間を 2 年、追跡期間を被験者ごとに培養骨格筋筋芽細胞シート移植術後 24 週又は研究の中止までとする。したがって、研究期間は登録開始から最終登録症例の追跡終了又は研究の中止までとなる。

14. 統計的考察

14.1. 目標症例数の設定根拠

我が国における DCM 及び ICM (急性心筋梗塞) の有病率は、それぞれ人口 10 万に対して 14.0 人^(2,3)、40.6 人⁽⁷⁾と報告されている。大阪大学大学院医学部附属病院では、2007 年において、LVAS 及び心臓移植術以外の外科治療実施数は、DCM 症例で 10 例、ICM 症例で 5 例である。二次登録される被験者数が上記実施例の約半数と見積もると、登録期間 2 年間で集積可能な被験者数は、DCM 症例、ICM 症例でおおよそ 5 例程度と予測される。

本研究の主要評価項目は、プロトコル治療の安全性を評価することであり、その効果については副次評価項目としている。それ故、本研究では、プロトコル治療の効果についての推定精度又は効果の有無の仮説に対する統計的検定に基づく定型的な例数設計の方法論で目標症例数を規定しなかった。

また、本研究のように複数の仮説の探索を含意する早期の臨床研究に関

しては、プロトコル治療の安全性及び効果に及ぼす影響要因（患者基礎情報に関する要因、疾患要因、治療に関する要因等）を整理・把握し、臨床試験シミュレーション（Clinical Trial Simulation）に基づいて、本研究で獲得される結果を予測し、後続の第Ⅱ相試験への橋渡しの可能性に関して議論することは有効な一つの方策である。ただし、本研究でのプロトコル治療のヒトでの成績は存在せず、また本研究に関係しそうな海外での注射針による筋芽細胞移植の臨床試験の諸報告では安全性及び効果に及ぼす影響要因に関する統計的考察もなされていないため、後続の第Ⅱ相試験への橋渡しのための Clinical Trial Simulation を実施するのは困難であった。したがって、ここで設定した各疾患に関する症例数 5 例の適切性を、安全性及び効果について小規模のシミュレーションで吟味した。その結果を以下に示す：

安全性の視点：任意の一つの有害事象がプロトコル治療中もしくは追跡中に 1 被験者につき 1 回発現し、有害事象を発現した症例数が二項分布に従うと仮定すると、二次登録された DCM 症例数及び ICM 症例数の合計の水準を 3 例、5 例、10 例、当該有害事象の発現割合のパラメータの値の水準を 1/4、1/3、1/2 と設定したとき、これらの水準の組み合わせに対して、少なくとも 1 症例以上当該有害事象を観測する場合の確率は以下の表 1 で示される。

表 1. 少なくとも 1 症例以上有害事象を観測する確率

二次登録例数	発現割合のパラメータの値		
	1/4	1/3	1/2
3	0.58	0.70	0.86
5	0.76	0.87	0.97
10	0.94	0.98	0.99

ラット心筋梗塞モデル⁽¹⁵⁾、DCM ハムスター⁽¹⁶⁾ならびに、イヌ DCM 様モデルを用いた大動物前臨床研究⁽¹⁷⁾、及び大阪大学医学部附属病院で実施中の LVAS 装着患者に対する筋芽細胞シート移植術の臨床研究では、予期される有害事象である重篤な不整脈は発現しておらず、このような実験又は研究のように有害事象の発現割合が低い場合には、今回の各疾患の目標症例数は有害事象を観測するのに十分な症例数とは言い難い（例えば、表

1 に示されるように、発現割合のパラメータの値が 1/4 以下であれば、少なくとも 1 症例以上有害事象を観測する確率は 80%を下回る[0.76 以下である]]。

一方で、注射針での移植による臨床試験では 10 例中 4 例に持続性心室頻拍が認められており⁽¹⁸⁾ (この理由で、その後の Phase II Study である MAGIC trial*⁽¹⁹⁾では ICD の装着が実施の要件となった)、発現割合のパラメータの値が 0.4 (= 4/10) と想定すると、このような比較的頻回に観測される有害事象の場合には、今回の各疾患の目標症例数は十分な症例数といえそうである (例えば、表 1 に示されるように、発現割合のパラメータの真値が 1/3 以上であれば、少なくとも 1 症例以上有害事象を観測する確率は 80%を上回る[0.87 以上である])。

効果の視点：心機能の一つの効果指標として左室駆出率 (Left Ventricular Ejection Fraction; LVEF) を挙げることができる。MAGIC trial*では、高用量筋芽細胞移植群 (26 例) および低用量筋芽細胞移植群 (27 例)における 6 カ月の時点での LVEF のベースラインからの差の中央値 [四分位範囲] は、それぞれ、5.2 [-4.4; 11.0]および 3.4 [-0.3; 12.4]と報告されている。

ここで上記の成績を参考にして、本研究における各疾患の症例 5 例全員がプロトコル治療を完遂し、6 カ月まで LVEF を追跡できたと仮定し、対応のある t 検定において両側有意水準 0.05 で帰無仮説「6 カ月の時点とベースラインの時点での LVEF に差がない」に対して対立仮説「6 カ月の時点とベースラインの時点での LVEF に差が Δ [%]である」(Δ の値の水準は 3, 5, 7, 9, 11, 13 とし、 Δ の標準偏差の値の水準は 3, 5, 10 とした) を検出する確率 (検出力) を計算した。その結果を表 2 に示す：

表 2. 検出力

Δ の 標準偏差	Δ					
	3	5	7	9	11	13
3	0.40	0.79	0.96	0.99	0.99	0.99
5	0.18	0.40	0.65	0.84	0.94	0.98
10	0.08	0.14	0.22	0.33	0.46	0.59

表 2 に示されるように、注射針による筋芽細胞移植の LVEF の改善よりも大きく (Δ が 7 あるいは 9 以上)、 Δ の標準偏差が小さい (Δ の標準偏差

が3あるいは5以上) ならば, 本研究の各疾患の目標症例数は, 上記の対立仮説を 0.80 以上の確率で検出するのに十分な症例数である。

*MAGIC trial は, これまでの注射針での移植の臨床試験として報告されているもののなかで最大の規模を誇る二重盲検ランダム化試験である。主要評価項目は6カ月時とベースライン時の LVEF の差である。この主要評価項目に対してプラセボ群と移植群 (低用量筋芽細胞移植群+高用量筋芽細胞移植群) の差を検出するのに必要な症例数は120例と設計されたが, この試験での治療の無益性 (futility) が安全性評価委員会により指摘され, この試験は97例の割付を行った時点で早期中止されていることに注意したい。

14.2. 解析対象集団

本研究の解析対象集団は, 登録例のうち, 不適格例, 自己骨格筋からの筋芽細胞の採取未実施例, 登録後逸脱例のうち評価可能なデータが全くない被験者を除いた集団とする。

14.3. 解析項目・方法

14.3.1. 解析対象集団

DCM および ICM ごとに, 「11. 被験者の内訳と研究実施計画書からの逸脱」で定義した集団に属する症例数を集計する。中止例についてはその理由別に集計する。

14.3.2. 被験者背景情報

DCM 症例および ICM 症例ごとに背景情報について記述統計量を算出する。

14.3.3. 評価項目

以下の評価項目に対する解析を主に行うが, 後続の第Ⅱ相試験への橋渡しを意図して, 得られたデータに対して必要に応じて諸種の統計的方法を適用し, 探索的な解析も行う。

1) 主要評価項目

DCM 症例および ICM 症例ごとに有害事象の種類, 重症度, 安全度, 発現頻度, 発現期間を集計する。

2) 副次的評価項目

画像診断による左室壁運動の経時変化単純胸部 X 線による心拡大の経時変

化に関しては、各項目の経時変化を各被験者あるいは要約統計量を用いながらプロットする。さらに、図1の特性要因図も活用して心機能改善に及ぼす影響要因も探索する。

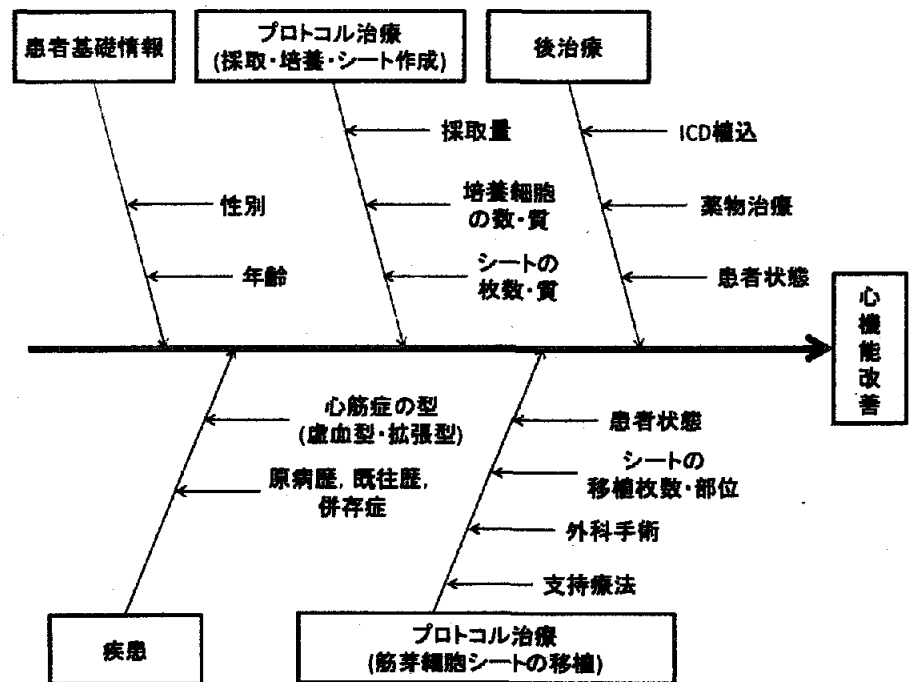


図1. 心機能改善に関する特性要因図

培養骨格筋筋芽細胞シート移植術の実施及び完遂の可否に関しては、自己骨格筋からの筋芽細胞の採取から培養骨格筋筋芽細胞シート移植術成功までの被験者が辿った過程を明らかにし、実施及び完遂の可否に及ぼす影響要因を探索する。

15. 研究の終了又は中断・中止

15.1. 研究の終了

最終登録症例の追跡終了およびデータベースの固定をもって研究の終了とする。研究責任医師は、研究を終了したときは、実施医療機関の長に研究が終了した旨を文書で報告する。その後、研究責任医師は、総括報告書を作成し、実施医療機関の長に提出する。

15.2. 研究全体の中止又は中断

15.2.1. 中止又は中断の基準

研究責任医師は、以下の場合に、研究全体を中止又は中断する。

1) 以下のプロトコル治療に関する情報

- a) 因果関係が否定できない有害事象の発生を示す情報
- b) がんその他の重大な疾病、障害もしくは死亡が発生するおそれを示す情報
- c) 研究の対象疾患に対して効能もしくは効果を有しないことを示す情報

を入手し、その内容を評価した結果、プロトコル治療の安全性に問題があると判断した場合、又は研究継続の意義がなくなったと判断した場合。

2) 症例登録の遅れ、登録後逸脱例の頻発などの理由により、研究の終了が困難であると判断した場合。

3) 研究責任医師から提示される研究実施状況の報告及び 2) で示すプロトコル治療に関する情報についてのヒト幹細胞臨床研究審査委員会の審査の結果に基づいて、実施医療機関の長が研究を中止又は中断すべきと判断した場合。

4) その他、研究を中止又は中断すべきと判断した場合。

15.2.2. 中止又は中断の手続き

1) 研究責任医師は、研究全体の中止又は中断する場合には、被験者に対して速やかにその旨を通知し、適切な医療の提供その他必要な措置を講じる。

2) 研究責任医師は、研究全体の中止又は中断する場合には、実施医療機関の長にその旨を文書で報告する。

3) 研究全体の中断後、ヒト幹細胞臨床研究審査委員会が研究全体の続行に関する審議を行う。研究全体の続行が可能と判断された場合には、研究責任医師は研究を再開できる。不可能と判断された場合には、実施医療機関の長に研究全体の中止及びその理由を速やかに文書で通知する。

16. 被験者の費用負担について

当該臨床研究にかかる費用は病院が負担する。

17. 研究結果の公表に関する取り決め

	<p>本臨床研究結果は、総括報告書としてまとめることとする。また必要に応じて論文または学会発表として公表する。その場合、被験者の名前が直接公表されることがない等、被験者の個人情報の保護については十分に配慮する。</p> <p>18. 研究実施計画書の遵守、逸脱又は変更、並びに改訂</p> <p>18.1. 研究実施計画書の遵守、逸脱又は変更 大阪大学医学部附属病院「ヒト幹細胞を用いる臨床研究規定」に従う。</p> <p>18.2. 研究実施計画書の改訂 大阪大学医学部附属病院「ヒト幹細胞を用いる臨床研究規定」に従う。</p> <p>19. 研究の品質管理・品質保証</p> <p>1) 本臨床研究に用いる筋芽細胞シートは、未来医療センターの定める各標準手順書に従い、臨床研究の品質管理及び品質保証を行う。</p> <p>2) 臨床研究実施計画書の正確な理解、判定・評価の標準化を目的とし、研究チームと研究協力者間で研究開始前に十分に話し合いを行う。</p> <p>20. 記録等の保存</p> <p>本研究に関わるすべての記録のうち、被験者の同意に関する記録、症例報告書の基礎となった記録（診療録、検査データ等）は、大阪大学医学部附属病院の規定に従って適切に保存する。</p> <p>申請書類、臨床研究審査・評価委員会の審査記録、臨床研究実施計画書、症例報告書、使用する医療材料等の管理・回収記録等については、大阪大学医学部附属病院未来医療センターおよび大阪大学大学院医学研究科心臓血管外科で適切かつ厳重に保存する。</p>
⑬被験者に関するインフォームド・コンセント	
<p>手続</p>	<p>別紙5「インフォームド・コンセントに関する手順書」参照</p>

<p>説明事項</p> <p>(被験者の受ける利益と不利益を含む)</p>	<p>説明文書「臨床研究に参加される患者さんへ」、「インフォームド・コンセントのチェックシート」および同意書、同意撤回書書式参照</p>
<p>⑭単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難な者を被験者等とする臨床研究の場合</p>	
<p>研究が必要不可欠である理由</p>	<p>該当しない</p>
<p>代諾者の選定方針</p>	<p>別紙5「インフォームド・コンセントに関する手順書」参照</p>
<p>⑮被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法</p>	<p>有害事象の発現に際しては、適切な救急処置を施し、研究被験者の安全の確保に留意し、また専門医師による診断を受けることにより原因究明に努める。研究被験者の研究参加中およびその後を通じて、臨床上問題となる研究に関連した重篤な有害事象に対して十分な医療措置を講じる。</p> <p>また、研究責任医師は症例報告書に種類、発現日、程度、重篤か否か、経過及び臨床研究との因果関係等を記載する。また、発生した有害事象、特に本研究との因果関係が否定できない事象については、可能な限り追跡調査を行う。</p> <p>また、重篤な有害事象が認められた場合は別紙6「有害事象への対応に関する手順書」に従い病院長に報告し、当該臨床研究との因果関係や臨床研究継続の可否などの審議を受ける。さらに、「重篤な有害事象発現時の対応に関する手順書」に従い、研究との因果関係が認められ厚生労働大臣への報告の必要があると認められた場合、病院長は厚生労働大臣に報告する。研究期間のみならず研究終了後の追跡調査において「重大な出来事」が明らかになった場合も厚生労働大臣への報告を行う。</p> <p>研究責任者は臨床研究期間中に当該研究に関わる新たな情報を得た場合、病院長に報告する。</p>
<p>⑯臨床研究終了後の追跡調査の方法</p>	<p>研究終了後も定期的外来診療により合併症の有無、有効性について評価を行い、カルテに記載するとともに追跡調査のデータとして保管する。なお、院内特殊救急部や近隣救急指定病院などとの連携のもと速やかに対応できる体制を構築する。</p> <p>臨床研究終了後の追跡調査期間は「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」にもとづき、研究終了後10年間以上とし、定期的な外来受診を促す。この期間の有害事象に関しても研究期間内と同様に扱う。</p>

⑪臨床研究に伴う補償	
補償の有無	有 <input type="radio"/> 無 <input checked="" type="radio"/>
補償がある場合、その内容	この臨床研究に起因する有害事象が発生した場合、研究者は医学上最善の処置を取る事により被験者の回復に努める。この際には、日常の治療の場合と同様に、被験者の主治医の属する医療機関において検査および治療を行うことになり、別途、補償制度はない。
⑫個人情報保護の方法	
連結可能匿名化方法	<p>連結可能匿名化の方法</p> <p>以下の項目を組み合わせて被験者識別コードを決定し、氏名を記述した同意書に記載する。以後、症例の取り扱いにおいては、決定されたコードを使用することとする。</p> <p>a) プロジェクト番号：HM****</p> <p>b) 症例通し番号：001～</p> <p>匿名化コードと氏名の対照表および氏名記載同意書は施錠可能な書類保管庫に厳重に保管する。</p>
その他	本研究にかかわる者は被験者の個人情報の保護に最大限の努力を払わなければならない。また、本研究に関与した者は原資料の直接閲覧などにより被験者の個人情報に係わる事項を知り得た場合にも、その内容をいかなる第三者に漏洩してはならない。
その他の必要な事項	<p>費用</p> <p>当該臨床研究にかかる費用は大阪大学医学部附属病院が負担する。</p> <p>本臨床研究の新規性について</p> <p>虚血性心筋症に対する、注射針を用いた筋芽細胞移植は、これまでにいくつかの海外施設で臨床試験が開始されている。</p> <p>当院において、左室補助人工心臓（LVAS）を装着した拡張型心筋症患者に対する筋芽細胞シート移植の臨床研究が現在進行中であるが、本臨床研究で対象としている LVAS 非装着の患者に対して筋芽細胞シート移植を行った報告はない。</p> <p>海外での注射針による筋芽細胞移植の臨床試験状況は、以下のとおり。</p>

	<ul style="list-style-type: none"> ・ 米国第 I 相臨床試験：CAuSMIC Trial で 23 症例実施。 2007 年 11 月 American Heart Association (AHA) で報告。 ・ 欧州第 I 相臨床試験：MAGIC trial で 67 例実施。 2008 年 Circulation で報告。 <p>研究の実施場所</p> <p>大阪大学医学部附属病院を実施場所とする。その実施は、学内の各内科学、麻酔科の各講座、中央手術部、集中治療部、中央検査部、中央放射線部などの関連部門および看護部との綿密な連携のもとに行う。退院後は外来通院にて経過観察を行うが、特殊救急部及び近隣救急隊との連携のもと、救急時の搬送が速やかに行われるような配慮を行う。</p>
--	---

参考文献

- (1) Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al.: Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. Circulation 1996, 93:841-842
- (2) Miura K, Nakagawa H, Morikawa Y et al.: Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy in Japan: results from a nationwide survey. Heart 2002, 87:126-130
- (3) Matsumori A, Furukawa Y, Hasegawa K et al: Epidemiologic and clinical characteristics of cardiomyopathies in Japan: results from nationwide surveys. Circ J 2002, 66:323-336
- (4) Burch GE, Tsui CY, Harb JM : Ischemic cardiomyopathy. Am Heart J 1972, 83:340-350
- (5) 土居 義典 他：循環器病の診断と治療に関するガイドライン (2006 年度合同研究班報告) 肥大型心筋症の診療に関するガイドライン (2007 年改訂版)
- (6) 北畠 顕 他：循環器病の診断と治療に関するガイドライン (2004 年度合同研究班報告) 虚血性心疾患の一次予防ガイドライン (2006 年改訂版) .
- (7) 平成 16 年 厚生労働省 人口動態統計特殊報告 心疾患－脳血管疾患死亡統計の概況
- (8) 北畠顕他：心筋症 診断の手引きとその解説. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 特発性心筋症調査研究班 2005, pp37-50
- (9) 松崎益徳他：循環器病の診断と治療に関するガイドライン (2004 年度合同研究班報告) 慢性心不全治療ガイドライン(2005 年改訂版). Circ J 2005, 66: suppl IV: 1351-141
- (10) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al.: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet. 360(9331):427-435, 2002
- (11) Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al.: Intramyocardial transplantation of autologous

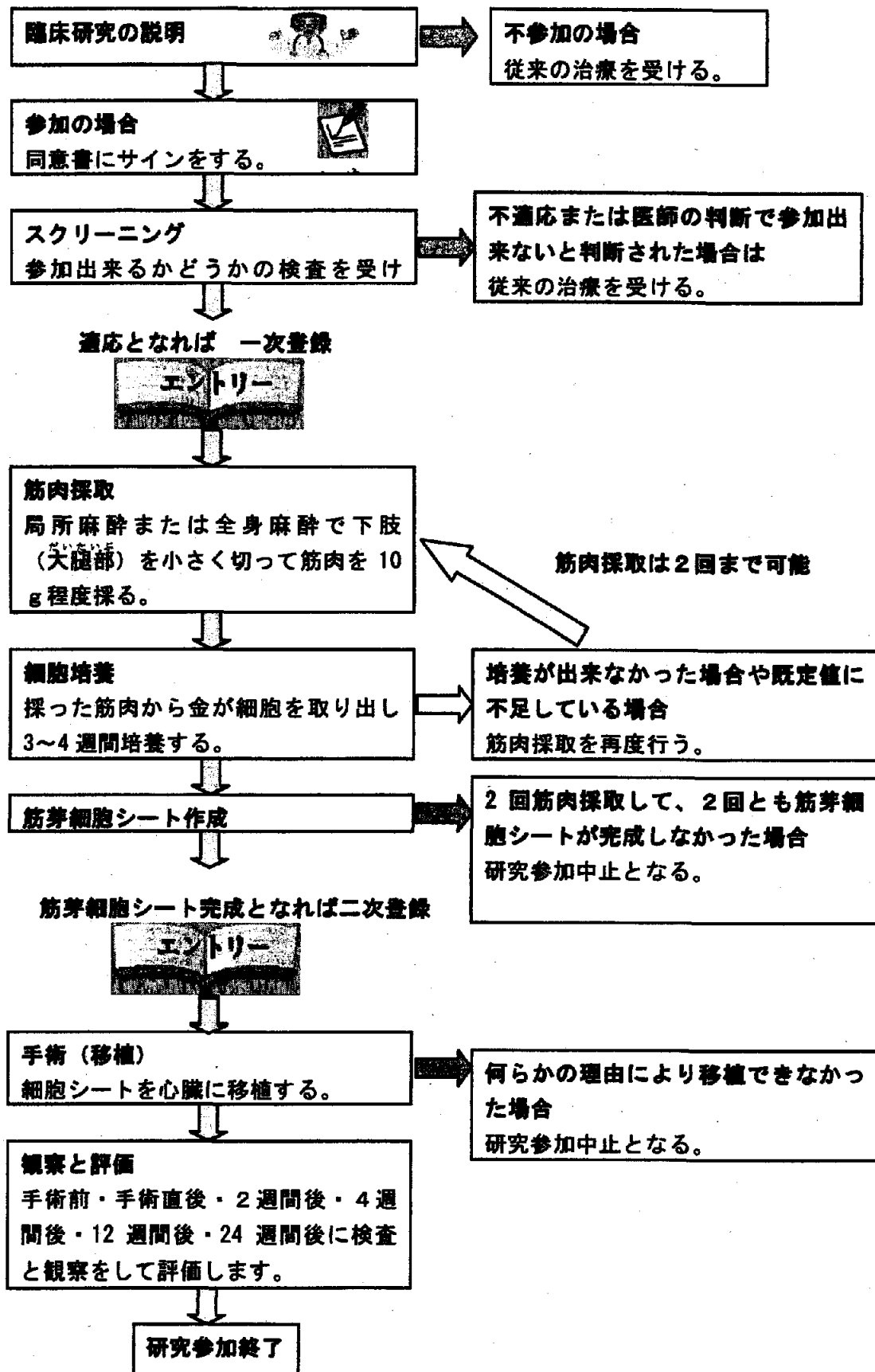
endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 107(3):461-468, 2003

- (12). Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, et al.: Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* 114(1 Suppl):II08-113, 2006
- (13). Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al.: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90(3):e40, 2002
- (14). Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, et al.: Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: their integration with recipient myocardium. *Transplantation* 80:1586-1595, 2005
- (15). Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, et al.: Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:1333-1341, 2005
- (16). Kondoh H, Sawa Y, Miyagawa S, et al.: Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res* 69(2):466-475, 2006
- (17). Hata H, Sawa Y, et al.: Grafted skeletal myoblast sheets attenuate myocardial remodeling in pacing-induced canine heart failure model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 132(4):918-24, 2006
- (18). Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Apr 2;41(7):1078-83.
- (19). Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008 Mar 4;117(9):1189-200.

添付書類（添付した書類にチェックをいれること）

- 研究者の略歴及び研究業績（別紙１）
- 研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況（別紙２）
- 臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果（「別紙３ 試験物概要書」に記載）
- 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況（「別紙３ 試験物概要書」に記載）
- 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨（別紙４）
- インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同意文書様式（別紙５）
- その他（資料内容：別紙６．有害事象への対応に関する手順書）
- その他（資料内容：別紙７．骨格筋筋芽細胞単離方法及びFBS等使用薬剤に関する安全性）
- その他（資料内容：別紙８．一次、二次症例登録票，被験者名簿見本，症例報告書様式）
- その他（資料内容：別紙９．製品標準書）
- その他（資料内容：別紙１０．大阪大学医学部附属病院ヒト幹細胞臨床研究審査委員会関係資料）
- その他（資料内容：別紙１１．手順書管理マスターリスト）


臨床研究の流れ



ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書


平成 20 年 12 月 25 日

厚生労働大臣 殿

研 究 機 関	所 在 地	長野県塩尻市広丘郷原1780 (郵便番号 399-0781)
	名 称	松本歯科大学 0263-52-3100(電話番号) 0263-53-3456(FAX番号)
	研究機関の長 役職名・氏名	松本歯科大学 学長 森本 俊文 

下記のヒト幹細胞臨床研究について、別紙のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
ヒト培養自己骨髄間葉系細胞移植による 顎骨増生法の確立	松本歯科大学口腔顎顔面外科学講座 准教授 上松 隆司 

ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	ヒト培養自己骨髄間葉系細胞移植による顎骨増生法の確立
申請年月日	平成20年12月25日
実施施設及び研究責任者	実施施設：松本歯科大学 研究責任者：上松 隆司
対象疾患	顎堤の高度骨吸収症例（上顎洞底挙上術または歯槽堤形成術を行う症例）
ヒト幹細胞の種類	自己骨髄間葉系幹細胞
実施期間及び対象症例数	3年間 16症例（上記症例8症例ずつ）
治療研究の概要	歯槽骨の増生を図るために上顎洞底挙上術または歯槽堤形成術を行う際、あらかじめ採取した培養した自己骨髄間葉系幹細胞を、自己血から調整した多血小板血漿と人工骨（β-リン酸三カルシウム）と共に移植して、その骨形成効果を評価する。細胞の調製は共同研究機関である信州大学医学部附属病院先端細胞治療センターのCPCにて行われる。
その他（外国での状況等）	国内では、骨髄細胞から分化させた骨芽細胞様細胞を用いて歯槽骨の骨形成を図る臨床研究が、Uedaらによって行われている。また、歯肉下骨骨膜、歯槽骨由来の骨芽細胞、コラーゲンと混和した骨髄間葉系幹細胞等を用いた研究もみられる。一方国外ではテヘラン大学のグループが、自己骨髄培養細胞を、β-リン酸三カルシウムを担体として上顎洞へ移植する研究（6例）を2008年に報告している。
新規性について	本研究は培養した自己骨髄間葉系幹細胞を骨芽細胞などに分化誘導させることなく、多血小板血漿とともに、β-リン酸三カルシウム単独キャリアで移植する点で新規性を認める。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称	ヒト培養自己骨髄間葉系細胞移植による顎骨増生法の確立		
研究機関			
名称	松本歯科大学		
所在地	〒390-0781 長野県塩尻市広丘郷原 1780		
電話番号	0263-52-3100 (代表)		
FAX 番号	0263-53-3456 (総務課)		
研究機関の長			
氏名	森本 俊文		
役職	松本歯科大学学長		
研究責任者			
所属	松本歯科大学口腔顎顔面外科学講座		
役職	准教授		
氏名	上松隆司		
連絡先	Tel/Fax	Tel: 0263-51-2066 / Fax: 0263-51-2066	
	E-mail	uematsu@po.mdu.ac.jp	
最終学歴	昭和 63 年松本歯科大学卒業		
専攻科目	口腔顎顔面外科学講座		
その他の研究者		添付書類 (別紙 1) 参照	
共同研究機関 (該当する場合のみ記載してください)			
名称	信州大学医学部附属病院		
所在地	〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1		
電話番号	0263-35-4600		
Fax 番号	0263-37-3024		
共同研究機関の長 (該当する場合のみ記載してください)			
役職	病院長		
氏名	小池健一		
臨床研究の目的・意義	<p>本臨床研究は、口腔機能の回復および審美障害の回復のための口腔インプラント埋入を可能とさせる顎骨増生が必要な症例を対象とする。力学的強度が高い強固な骨組織の増生を早期に得るために、培養自己骨髄間葉系細胞をβ-リン酸三カルシウム (β TCP) と多血小板血漿 (PRP) をキャリアとして混合し、顎骨部位に移植する新規の方法を確立し、本臨床研究の安全性と有効性を確認することを目的とする。</p> <p>厚生労働省による患者調査概況 (平成 17 年度)¹⁾によると、総患者数における傷病分類の第 1 位が「歯および歯の支持組織の疾患」(約 986 万人)であり、口腔の機能障害や審美障害を回復する社会的要請が高い。しかしながら、現在の歯科治療技術においては、これらの障害を回復させることができない症例も多数存在することも事実である。そこで、顎骨再生医療を推進することにより、自然修復されない骨欠損や口腔機能の回復のために口腔インプラント埋入</p>		

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>による骨増生が必要な症例に対して、自己骨髄間葉系細胞移植術の確立を目指す。</p> <p>信州大学医学部附属病院先端細胞治療センター（Cell Processing Center：CPC）を利用することにより、顎骨増生に十分な骨髄間葉系細胞の細胞数を確保する。そして、これらの細胞を口腔インプラント埋入困難な多数歯欠損症例に対する上顎洞底挙上術（サイナスリフト）や歯槽堤形成術（GBR）に応用し、新たな治療方法の開発に利用する。</p> <p>従来の顎骨増生を目的とした外科的治療方法としては、全身麻酔下で腸骨部皮膚に約 10 cmの切開を加え、腸骨稜から海面骨を採取していた。この方法では、①自家骨採取によって感染や骨吸収を生じる、②自家骨は、骨の欠損量以上の移植骨採取が必要である、③採取部位の外科的侵襲が大きく、普通に歩行が可能になるためには、約 2 週間必要であり、合併症がみられる場合もあるなどの欠点がある²⁾。そこで、低侵襲で造骨能が高い再生医療技術の確立が望まれてきた。今回開発する方法により、局所麻酔下において痛みがほとんどない状態での骨髄穿刺による骨髄細胞の採取（麻酔から止血まで約 10 分間）が可能となり、自家腸骨移植方法の欠点を克服した画期的な治療法になりうる。</p> <p>本臨床研究実施計画は、独立行政法人「新エネルギー産業技術総合開発機構（NEDO）」の支援による『基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発/橋渡し促進技術開発/再生・細胞医療の世界標準品質を確立する治療法および培養システムの研究開発』（平成 19 年度採択）の中で、既に基礎的研究およびドライランを推進している。</p> <p>なお、本臨床研究は「松本歯科大学研究等倫理審査委員会」にて審議され承認（許可番号 第 0064 号 2008 年 1 月 31 日）されている（別紙 9）。</p> <p>本臨床研究の成功により、自己骨髄間葉系細胞を用いた新しい骨増生法を長野県の地域医療に適用することが可能となる。</p> <p>（文献）</p> <p>1)厚生労働省大臣官房統計情報部 平成 17 年患者調査の概況 厚生労働省ホームページ</p> <p>2)Rawashdeh M. A. : Morbidity of iliac crest donor site following open bone harvesting in cleft lip and palate patients. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 37 : 223-227, 2008.</p>				
臨床研究の対象疾患	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="245 1727 603 1850">名称</td><td data-bbox="603 1727 1455 1850">顎堤の高度骨吸収症例を対象とする。 （上顎洞底挙上術または歯槽堤形成術を行う症例） 3 年間 16 症例（上記症例 8 症例ずつ）</td></tr> <tr> <td data-bbox="245 1850 603 2016">選定理由</td><td data-bbox="603 1850 1455 2016">高齢者における歯の喪失は、歯周疾患による歯槽骨吸収が大きな原因を占める。そして、歯の喪失は発音機能や咀嚼機能の低下を招き、全身の栄養状態やQOLの低下にもつながることが、高齢化社会の到来と共に問題となっている³⁾。歯の喪失部位には、常に歯槽骨吸収</td></tr> </table>	名称	顎堤の高度骨吸収症例を対象とする。 （上顎洞底挙上術または歯槽堤形成術を行う症例） 3 年間 16 症例（上記症例 8 症例ずつ）	選定理由	高齢者における歯の喪失は、歯周疾患による歯槽骨吸収が大きな原因を占める。そして、歯の喪失は発音機能や咀嚼機能の低下を招き、全身の栄養状態やQOLの低下にもつながることが、高齢化社会の到来と共に問題となっている ³⁾ 。歯の喪失部位には、常に歯槽骨吸収
名称	顎堤の高度骨吸収症例を対象とする。 （上顎洞底挙上術または歯槽堤形成術を行う症例） 3 年間 16 症例（上記症例 8 症例ずつ）				
選定理由	高齢者における歯の喪失は、歯周疾患による歯槽骨吸収が大きな原因を占める。そして、歯の喪失は発音機能や咀嚼機能の低下を招き、全身の栄養状態やQOLの低下にもつながることが、高齢化社会の到来と共に問題となっている ³⁾ 。歯の喪失部位には、常に歯槽骨吸収				

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

		<p>が惹起されるため、義歯の装着による咀嚼機能の回復は十分なものではない。また、口腔インプラントの埋入に際しては、歯槽骨の厚さが要求される。つまり、口腔インプラントの適応症例はかなり限定されている⁴⁾。したがって、インプラント埋入の適応拡大を目指して、歯槽骨の増生をはかるための上顎洞底挙上術（サイナスリフト：Sinus Elevation Technique）や歯槽堤形成術（GBR:Guided Bone Regeneration）が従来行われてきた^{5・6)}。しかし、これらの外科的手術による骨増生には、長時間必要であることや、必ずしも全ての症例において成功が期待されないなど、問題点が指摘されている。特に高齢者に対するこれらの外科的手術の適応と成功が問題となっている。そこで、本臨床研究においては、自己骨髓細胞由来の間葉系細胞をCPCにおいて十分に増やし、これらの細胞をβ-リン酸三カルシウム（βTCP）と多血小板血漿（PRP）と共に移植することにより、量的に十分かつ力学的強度を有する骨形成を目指す。</p> <p>顎骨の骨欠損には、歯周病による歯の欠損が原因である歯槽骨の萎縮のほか、口唇口蓋裂などに認められる先天的奇形や腫瘍の摘出手術後に生じるものなどが存在する。これらの患者に対しては、全身麻酔下において腸骨からの海面骨採取とその移植が従来行われてきた。今回の臨床研究の成功により、これらの全身麻酔下の侵襲性の高い手術を行う必要性が無くなる可能性を秘めている。</p>
被験者等の選定基準		<p>被験者は、全身疾患を伴わず以下の除外基準に該当しない 20 歳以上の健常者のうち、口頭と文書で研究計画を説明し、研究に参加することに本人の同意が得られた者とする。</p> <p>〔選択基準〕</p> <p>症例 顎堤の高度骨吸収症例を対象とする。</p> <p>（上顎洞底挙上術または歯槽堤形成術を行う症例）</p> <p>〔除外基準〕</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 移植床が形成できない症例 (2) 骨髓液および末梢血液が採取できない症例 (3) ウイルス、細菌、真菌などの感染症患者 (4) 重篤な心血管系疾患患者 (5) 妊娠中または妊娠している可能性のある女性 (6) 抗菌薬によるアレルギー歴のある患者 (7) 知的障害者、精神疾患を有する者など同意能力に問題があると考えられる者 (8) 本治療開始前 3 か月以内に同様な顎骨再生医療を受けた者 (9) その他、臨床研究責任者が不適当と判断した者 <p>（文献）</p> <p>3) 咬合・咀嚼が創る健康長寿 野首孝祠（編著）噛み合わせと脳 p120 - 136, 咬合・咀嚼と QOL の向上 p156 - 168, 大阪大学出版, 2007.</p> <p>4) Block M.S. et al. : Reconstruction of severe anterior maxillary defects using distraction osteogenesis, bone grafts, and implants. J. Oral Maxillofac. Surg. 63 : 291-297,</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>2005.</p> <p>5) Lindhe 臨床歯周病学とインプラント 第4版「インプラント編」岡本 浩(監訳)第38章 歯槽堤形成法 p948-980, クインテッセンス出版, 2005.</p> <p>6) 開業医のためのインプラント治療の診断と治療計画 市川哲雄(編集)季刊歯科医療 Vol 21 No 4, インプラント治療の診察、検査、診断、治療計画の要点 p4 - 15, 開業医で行うインプラントのための骨移植 p32 - 50, 2007.</p>
臨床研究に用いるヒト幹細胞	
種類	骨髄間葉系幹細胞
由来	自己・非自己・株化細胞 生体由来 死体由来
採取、調製、移植又は投与の方法	<p>添付書類(以下)参照</p> <p>(1) 採取: 自己骨髄細胞採取 SOP</p> <p>(2) 調製: 自己骨髄細胞からの間葉系幹細胞培養の SOP</p> <p>(3) 移植: 間葉系幹細胞の移植 SOP</p>
調製(加工)行程	有
非自己由来材料使用	有 動物種(ブタ(ヘパリン))
複数機関での実施	有 信州大学医学部附属病院(間葉系幹細胞培養)
他の医療機関への授与・販売	無
安全性についての評価	<p>細胞の培養・調製を行う信州大学医学部附属病院先端細胞治療センターは、GMP に準拠した施設であり「汚染防止」、「人為的ミス防止」、「品質保証」を遵守している(添付書類【(別紙 4)信州大学医学部附属病院先端細胞治療センターが GMP に準拠している根拠】参照)。</p> <p>また、培養調製段階では形態観察、無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験(PCR)を行い、感染症の否定や細胞の形態変化、生存率のチェックをおこなう。マイコプラズマの PCR 検査が陽性と判明した場合は培養法で生菌か否かを確認する。また移植に用いる細胞の安全性評価のため核型試験を症例毎に行う。ただし、この結果は最終製品の移植後に判明するため出荷判定には用いない。陽性所見が得られた場合は被験者に結果を説明して本臨床研究の中止を協議し、被験者の血液疾患の精査を行う。</p> <p>被験者に対しては移植手術後には通常の手術の術後と同様に全身状態のチェックを綿密におこなうとともに、血液・生化学検査を術後1週、1・3・6か月・1年(以後1年毎)を目安におこない、感染症の有無などをチェックする。また単純エックス線撮影やCTエックス線撮影検査(臨床研究の実施計画(7)術後評価の項参照)などを通して移植部位に異常がないかどうかを確認する。</p>
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	<p>現在まで報告されたβ-リン酸三カルシウム(βTCP)を骨髄間葉系細胞と共に移植する動物実験の結果から、移植した培養骨髄間葉系細胞が実際にin vivoにおいて骨芽細胞に分化し骨形成が認めら</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

れることが明らかとなっている^{7, 8)}。

我々も、イヌ（ビーグル犬）の骨髓間葉系細胞を用いた骨再生に関する実験的研究を行っている。骨髓細胞を大腿骨骨幹部より採取し培養に供し、付着増殖した細胞群を未分化間葉系細胞として使用した。下顎両側小臼歯を各3本抜歯後3ヶ月経過した後、両側の下顎骨に骨欠損を形成し、同部にチタン製口腔インプラントを植立した。その際、インプラント周囲にβ-リン酸三カルシウム（βTCP）単独または骨髓由来の間葉系細胞を混合したβ-リン酸三カルシウム（βTCP）を移植した。術後84日目において骨形成を観察した結果、β-リン酸三カルシウム（βTCP）単独の移植インプラントにおいては、骨とインプラントの直接接触は一部に認められたのみで、その表面の広い範囲が結合組織によって覆われていた。一方、培養骨髓間葉系細胞を移植した群においては、β-リン酸三カルシウム（βTCP）単独群と比較して、インプラント周囲における骨形成の亢進が有意に認められた（未発表）（別紙10）。

また、我々の研究グループの一員である脇谷らは、ウサギの膝関節骨軟骨欠損に骨髓間葉系細胞移植を行った結果を既に報告している⁹⁾。ウサギ骨髓間葉系細胞を移植した結果、トルイジンブルーに異染性をしめす硝子軟骨様組織の形成がみられるとともに、移植後2-4週の早期に骨欠損部が血行の豊富な新生骨で修復されることを組織学的に確認している。さらに、信州大学医学部整形外科では、若年者の肘関節部の骨軟骨障害に対して、自己の骨髓間葉系細胞を移植する治療を行い、上腕骨小頭部の骨欠損部は術後8週までに大部分が修復されることをエックス線写真で確認している。

以上の実験結果は、骨髓由来の間葉系幹細胞の移植方法を臨床応用するための臨床研究の実施が可能であることを支持する大きな理由となると考えている。また、大阪大学のグループは、ヒトの良性骨腫瘍手術後の欠損部に培養骨髓間葉系細胞付加人工骨を移植する臨床応用を報告している¹⁰⁾。

最近、テヘラン大学（イラン）の研究グループが、ヒト自己骨髓細胞をβ-リン酸三カルシウム（βTCP）とヒドロキシアパタイトをキャリアとして上顎洞に移植することにより、2-3ヶ月で新生骨の形成が認められたという治療結果を発表した¹¹⁾。以上のように、ヒト幹培養細胞移植術は、侵襲が大きく採取量が制限される自家骨移植に代わる有効な骨増生方法になり得ると考えている。

さらに、本臨床研究を遂行する上で必要な環境として、GMP準拠した信州大学医学部附属病院先端細胞治療センター（CPC）を随時利用可能な点から、本臨床研究は十分に実施可能であると考ええる。

（文献）

- 7) Cancedda R, et al. : A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and clinical practice. Biomaterials 28 : 4240-4250, 2007.
- 8) Jafarian M, et al. : Marrow-derived mesenchymal stem

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod 105 : e14-e24, 2008.</p> <p>9) Wakitani S, et al. : Mesenchymal cell-based repair of large, full thickness defect of articular cartilage. J Bone Joint Surg 76-A : 579-592, 1994.</p> <p>10) 藤本哲穂 他 : 骨腫瘍に対する骨再生治療. 腎と骨代謝. 19 : 341-348, 2006.</p> <p>11) Shayesteh YS, et al. : Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into β-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. Oral Surg Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod 106 : 203-209, 2008.</p>
臨床研究の実施計画	<p>口腔機能の回復や審美障害の回復のために口腔インプラント埋入のための骨増生が必要である症例を対象とする。</p> <p>(1) インフォームド・コンセント 説明文書(別紙2)で説明し、同意を得た上で同意文書(別紙3)に署名をいただく。</p> <p>(2) 骨髄血および末梢血液採取 外来小手術室で医師または歯科医師(口腔外科専門医)が共同して行なう。患者にベッド上で臥位体位をとらせ、1%キシロカイン(約10 ml)にて後上腸骨棘部位を局所麻酔する。骨髄穿刺針(シャーマンのハーベスト針)を用いて、穿刺針の内筒に取り付けた10 ml シリンジ(ヘパリン処理)にて、3 ml ずつ骨髄液を採取(合計9-15 ml)する。骨髄液は直ちにヘパリン PBS アシストチューブに移し、しっかりと蓋をした後転倒混和する。その後、穿刺針を抜き圧迫止血する。 骨髄穿刺の止血中に、肘静脈に三方活栓を取り付けた自己血採取針を刺入し、三方活栓に取り付けた50ml シリンジで静脈血を吸引する。吸引した血液は清潔操作のまま50 ml ファルコンチューブに移し、合計400mlの末梢血液の採取を行う。 さらに、多血小板血漿(PRP)の調製のために、9mlの末梢血液を採取して、ACD-A液(生物学的製剤基準血液保存液A液1ml)を入れた15ml ファルコンチューブに移す。</p> <p>(3) 骨髄血および末梢血液の移送 採取した骨髄液と血液は、直ちに血液搬送用クーラーボックスに保存して信州大学医学部病院先端細胞治療センター(CPC)に移送する。移送交通手段は車内温度25℃とした本学公用車とする。 CPCまでの搬送時間は35-40分である。温度変化はクーラーボックスに設置された温度センサーでチェックして記録する。 細胞の移送およびその後の調製については、研究歯科医師(主治医)によって行われる。</p> <p>(4) 細胞、血清および多血小板血漿(PRP)の調製 CPCの使用に関する教育訓練を受けた松本歯科大学 CPC 担当者が</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

信州大学医学部附属病院先端細胞治療センター担当者と共同にて、細胞、血清および多血小板血漿 (PRP) の調製を行う。

(5) 調製細胞および多血小板血漿 (PRP) の移送

調製細胞および多血小板血漿 (PRP) を搬送用クーラーボックスに入れて信州大学医学部病院先端細胞治療センター (CPC) から松本歯科大学病院に移送する。移送交通手段は車内温度 25℃とした本学大学公用車とする。温度変化はクーラーボックスに設置された温度センサーでチェックして記録する。

(6) 間葉系幹細胞の移植手術

搬送された細胞の品質管理成績をチェックし、GMP 基準下で調製された細胞及び多血小板血漿であることを確認する。搬送された細胞を手術室において滅菌生理食塩水を用いて、遠心洗浄してペレットとする。移植時の際、上顎洞底挙上術では、上顎洞粘膜下に移植床を形成する。歯槽堤形成術では、骨欠損部に粘膜骨膜弁を作製して移植床を形成する。

骨補填のために、必要量の β -リン酸三カルシウム (オスフェリオン®) (通常 1-3g)、多血小板血漿 (PRP) (通常 1-3ml) および CPC にて培養した骨髄間葉系幹細胞 (通常 $0.5-1 \times 10^7$ cells) をチューブ内で混合する。必要に応じて、注射用塩化カルシウムを滴下することでゲル化させ、移植ペレットを調製する。移植ペレットを移植床に充填した後、粘膜骨膜弁を復位して縫合する。術後は抗菌薬を投与して感染予防を行う。

(7) 術後評価

①臨床評価: 臨床症状や局所所見を術後 1 週、1・3・6 か月・1 年、経過観察し、二次手術 (インプラント体の植立など) が可能かどうかを検討する。二次手術後も術後 1 週、1・3・6 か月・1 年、経過観察し、1 年から 5 年は 1 年毎に評価を行う。

②単純エックス線像: 骨増生の状態を評価する。(術後 1 週、1・3・6 か月・1 年で撮影。1 年から 5 年は 1 年毎に撮影する。)

③CT エックス線検査: 経時的な骨の形態、性状、密度の変化を評価する (術後 1・3・6 か月・1 年で撮影。1 年から 5 年は 1 年毎に撮影する)。

④3DXCT エックス線検査: 一次手術のほか二次手術でインプラント体を植立する場合には術前と術後に 3DXCT エックス線検査を行なう。

⑤骨性状検査: 二次手術時に骨表面の色調・硬さ・移植したペレット上の骨膜の状態を評価する。

⑥病理組織検査: 二次手術時に再生組織の一部を生検 (Biopsy) し、HE 染色、トルイジンブルー染色を行い、組織学的・形態計測学的評価を行う。

⑦有害事象の評価と逸脱症例に対する対応: 本臨床研究との因果関係の有無に関わらず期間中に被験者に生じたあらゆる好ましくない、あるいは意図しない徴候、症状、または病気を有害事象と定義

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>する。また臨床研究期間中に観察された有害事象のうち、以下のいずれかに相当するものは重篤な有害事象と定義する。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 死亡にいたるもの 2. 生命を脅かすもの 3. 治療のため入院または入院期間の延長が必要なもの 4. 永続的または顕著な障害／機能不全に陥るもの 5. 次世代に影響が及ぶと思われるもの <p>逸脱症例について下記の状況が生じた場合と定義する</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 被験者の不参加表明 2. 有害事象が生じたとき 3. 培養中の感染等培養過程での事故 <p>逸脱症例について、上記 2 の場合には起きた有害事象に対して速やかに適切な治療をおこなう。逸脱症例についてはすべて再度インフォームド・コンセントを行い、本臨床研究に従った研究を進めるか、一般的な治療法で治療を進めるかを確認する。</p> <p>(8) ドライランの実行</p> <p>現在、SOP に従ったドライラン（2008 年 3 月より現在まで合計 4 回）を施行中である。ドライランとしては、当該臨床研究の方法(1)から(6)（β-リン酸三カルシウム、多血小板血漿および調製細胞をチューブ内で混合し、ゲル化までのプロセス）までを実施中である。</p> <p>(9) 二次手術（インプラント体の植立）について</p> <p>顎骨増生後の口腔インプラント体の植立やその後の補綴処置については、原則として松本歯科大学病院歯科診療部口腔外科および総合歯科診療科において、保険外診療として行い、費用は患者負担とする。</p>				
<p>被験者等に関するインフォームド・コンセント</p>	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="231 1310 598 1556"> <p>手続</p> </td><td data-bbox="598 1310 1444 1556"> <p>研究担当者は、本研究の被験者に対して、研究に係る同意説明文（別紙 2）を口頭と文書で説明する。被験者本人から同意を得ることが困難な場合は、本研究にご協力頂かないこととする。全ての項目について同意が得られた場合に限り、同意書（別紙 3）に本人による自筆署名をいただく。原本は研究責任者が保管し、そのコピーを被験者に渡す。</p> </td></tr> <tr> <td data-bbox="231 1556 598 2013"> <p>説明事項 (被験者の受ける利益と不利益を含む。)</p> </td><td data-bbox="598 1556 1444 2013"> <p>説明事項は添付資料の「同意説明文」（別紙 2）、同意文書は添付資料の「同意書」（別紙 3）の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 研究の参加への任意性 ② 同意しないことにより不利益な対応を受けることがないこと ③ 同意後に随時同意を撤回できること ④ この研究への協力者として選ばれた理由 ⑤ 当該臨床研究の意義、目的、方法及び期間 ⑥ 当該研究を実施する機関名および研究担当者 ⑦ 期待される研究の利益及びこの研究への参加に伴い予期される危険または不快な状態、臨床研究終了後の対応 ⑧ この研究の計画及び方法についての資料の閲覧 </td></tr> </table>	<p>手続</p>	<p>研究担当者は、本研究の被験者に対して、研究に係る同意説明文（別紙 2）を口頭と文書で説明する。被験者本人から同意を得ることが困難な場合は、本研究にご協力頂かないこととする。全ての項目について同意が得られた場合に限り、同意書（別紙 3）に本人による自筆署名をいただく。原本は研究責任者が保管し、そのコピーを被験者に渡す。</p>	<p>説明事項 (被験者の受ける利益と不利益を含む。)</p>	<p>説明事項は添付資料の「同意説明文」（別紙 2）、同意文書は添付資料の「同意書」（別紙 3）の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 研究の参加への任意性 ② 同意しないことにより不利益な対応を受けることがないこと ③ 同意後に随時同意を撤回できること ④ この研究への協力者として選ばれた理由 ⑤ 当該臨床研究の意義、目的、方法及び期間 ⑥ 当該研究を実施する機関名および研究担当者 ⑦ 期待される研究の利益及びこの研究への参加に伴い予期される危険または不快な状態、臨床研究終了後の対応 ⑧ この研究の計画及び方法についての資料の閲覧
<p>手続</p>	<p>研究担当者は、本研究の被験者に対して、研究に係る同意説明文（別紙 2）を口頭と文書で説明する。被験者本人から同意を得ることが困難な場合は、本研究にご協力頂かないこととする。全ての項目について同意が得られた場合に限り、同意書（別紙 3）に本人による自筆署名をいただく。原本は研究責任者が保管し、そのコピーを被験者に渡す。</p>				
<p>説明事項 (被験者の受ける利益と不利益を含む。)</p>	<p>説明事項は添付資料の「同意説明文」（別紙 2）、同意文書は添付資料の「同意書」（別紙 3）の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 研究の参加への任意性 ② 同意しないことにより不利益な対応を受けることがないこと ③ 同意後に随時同意を撤回できること ④ この研究への協力者として選ばれた理由 ⑤ 当該臨床研究の意義、目的、方法及び期間 ⑥ 当該研究を実施する機関名および研究担当者 ⑦ 期待される研究の利益及びこの研究への参加に伴い予期される危険または不快な状態、臨床研究終了後の対応 ⑧ この研究の計画及び方法についての資料の閲覧 				

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	<p>⑨ この研究の結果の他機関への提供</p> <p>⑩ 知的財産権の帰属</p> <p>⑪ この研究の成果の公表</p> <p>⑫ 研究のための費用</p> <p>⑬ 健康被害に対する補償</p> <p>⑭ この研究の倫理的な配慮</p> <p>⑮ 問い合わせ・苦情の連絡先</p>
被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法	<p>(1) 局所麻酔に対する反応</p> <p>穿刺の際の局所麻酔などの薬剤に過敏反応が生じた場合、血圧低下などが起こることがある。これらの合併症が出現した場合は、処置(補液、昇圧剤投与)を行なう。</p> <p>(2) 穿刺による疼痛</p> <p>局所麻酔の刺入時と骨髄の吸引時に疼痛がみられることがある。しかし、これは数分間で消失する。</p> <p>(3) 骨髄穿刺による出血の可能性</p> <p>穿刺部位に皮下血腫は若干みられるが重篤な危険は非常にまれである。多量の出血をみた場合には、血管を結紮また焼灼して止血する。</p> <p>(4) 自己血採血に伴う副反応の可能性</p> <p>細胞培養に必要な自分の血液成分(自己血漿)を成分献血と同じように 400ml 採血する。その際に血腫、血管迷走神経反射、血圧低下等が起こることがあるが、一般医療と同じように安静、補液などで対応する。</p> <p>(5) 検体の取り違えのリスク</p> <p>個人情報の保護のために培養細胞および保存される細胞検体については個人情報を削除して符号をつける。細胞と患者本人とを対応表により結び付けるが、同時期に複数症例を扱う場合、取り違え(自分のものでない細胞移植)の可能性もあると推測されるため、細胞検体の厳重な管理を行なう(細胞の管理は一人の患者あたり一つのインキュベーターを割り当てて行い、培養期間中は他の人の検体をその場所で扱わない)。</p> <p>(6) 感染の問題</p> <p>自己細胞を培養して再び体内に戻すことから、輸血や他の臓器移植のように、他人の感染症に感染することはない。しかし、もともと体内に存在するか、培養工程における何らかの病原菌による汚染が生じる可能性は否定できない。その可能性を極力低くするために、医療用の細胞培養(加工)ができる信州大学部医学部付属先端細胞治療センター(CPC)のクリーンルームで培養する。無塵衣を着用した専門担当者が培養に従事し、感染症の有無など品質を検査する方法(無菌試験等の品質検査)が確立されている。</p> <p>(7) 癌化の問題</p> <p>動物実験のほか、同様の方法で行なったヒト培養骨髄間葉系細胞の移植治療では、現在までに細胞の癌化が生じた報告はない。</p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

	したがって、細胞の癌化の可能性は極めて低いと考えられるが、多分化能をもつ幹細胞を培養操作で増やすという操作の性格上、その可能性は否定できない。このため、移植後 5 年間定期的に患部の状況をチェックする。
臨床研究終了後の追跡調査の方法	被験者に対しては治療効果の評価だけでなく治療による有害事象の有無のチェックを、臨床研究終了後もおおよそ 1 年毎に定期的におこなっていく。
臨床研究に伴う補償	
補償の有無	有 無
補償が有る場合、その内容	<p>自己骨髄間葉系幹細胞を用いた骨増生法は、今までに行われている多血小板血漿およびβ-リン酸三カルシウムを用いた骨増生方法と同等の高い安全性が示されると考えられる。しかし、通常の外科治療で生じる感染や治療による何らかの生体反応が生じる可能性は残る。</p> <p>本臨床研究によって健康被害が生じた場合は、当方で補償する。ただし、検査の結果その後本研究とは関わりを持たない原因による歯科治療が必要となった場合は、通常の診療費を被験者の負担とする。</p>
個人情報保護の方法	
連結可能匿名化の方法	<p>本研究では被験者の個人情報として、氏名、年齢、性別と傷病名の提供を受ける。検体、資料及び得られたデータ等(以下、「被験者情報」という)は、連結可能匿名化を行い、被験者の個人情報を保護する。これらの被験者情報は、研究責任者上松隆司が管理し、松本歯科大学口腔顎顔面外科学講座の施錠された書庫で厳重に保管する。漏洩等の問題が発生した場合には、研究等個人情報管理者と協力して速やかに問題解決に努めるとともに、学長に報告する。また、本研究終了後又は被験者から同意の撤回等があった場合は、被験者情報を研究等個人情報管理者と協議の上廃棄する。その際には、匿名化の状況を確認し、被験者情報が漏洩することのないように配慮する。</p>
その他	<p>当該臨床研究終了後の対応</p> <p>本研究で採取する検体及び資料等は、研究責任者上松隆司が研究終了後 5 年間口腔顎顔面外科学講座で厳重に保管する。廃棄する際には、研究等個人情報管理者と協力して行う。</p>
その他必要な事項	<p><u><本臨床研究にかかる研究資金の調達方法></u></p> <p>この研究にかかる費用は、文部科学省、日本学術振興会、新エネルギー産業技術総合開発機構(NEDO)からの研究助成金や松本歯科大学病院および研究責任者・研究分担者の学内研究費によって負担される。この研究の成果により特許権等の知的財産権が生じた場合には、その権利は研究機関である松本歯科大学と共同研究機関に帰属する。共同研究機関は、NEDO プロジェクトの研究機関であり、研究機関の役割は明確化されている。</p> <p><u><既に実施されているヒト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認め</u></p>

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

られる事項>

患者自身の骨髄間葉系幹細胞を用いた骨・軟骨の再生療法に関しては、産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門組織・再生工学研究グループ（大串 始グループ長）によって、細胞培養技術が確立され、臨床応用が始まっている。すなわち、人工足関節や骨腫瘍掻爬後の欠損部に対する再生培養骨の応用、培養骨髄間葉系細胞移植による軟骨・心筋・血管再生療法などである。また、産業技術総合研究所の研究の流れを汲んで、大阪大学や奈良県立医科大学においては、骨腫瘍への再生培養骨移植の臨床応用が行われている。信州大学では、軟骨欠損修復への応用がなされている。さらに、奈良県立医科大学においては、培養骨髄間葉系細胞を用いた人工足関節置換術や大腿骨頭壊死の骨温存手術への臨床応用が行われている他、顎骨部位の腫瘍、骨髄炎、骨折などに対する培養骨芽細胞移植が計画されている。

一方、名古屋大学大学院医学系研究科の上田 実教授のグループは、患者由来の骨髄細胞を培養し骨芽細胞に分化誘導させ、これらの細胞を歯槽骨欠損部位に移植する治療を既に行っている（別紙 6 参照）。

その他、広島大学歯学部および新潟大学歯学部においても、培養細胞を用いた歯周組織再生療法の臨床研究が行われている。

最近、テヘラン大学（イラン）の研究グループは、ヒト自己骨髄細胞を、 β -リン酸三カルシウム（ β TCP）をキャリアとして上顎洞に移植することにより、2-3ヶ月で新生骨の形成が認められたという治療結果（6症例）を発表している（別紙 6 参照）。

本研究は、培養細胞を PRP と共に β TCP 単独キャリアで移植し、マイクロ CT など詳しく骨増生を評価する点で、新規性が認められる。また、CPC（Cell Processing Center）を有さない施設（本学）が近隣の CPC（信州大学先端細胞治療センター）を利用することにより、細胞移植治療を可能とさせる点でも新規性が認められる。ほぼ同様の臨床応用は既に上記のように行われているが、歯槽骨増生治療に関しての需要は大変高く、今後さらに注目されていくことは確実である。

備考 1 各用紙の大きさは、日本工業規格 A4 とすること。

備考 2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙〇参照」と記載すること。

添付書類（添付した書類にチェックを入れること）

■研究者の略歴及び研究業績（別紙 1）

■インフォームド・コンセントにおける説明文書及び同意文書様式（別紙 2 および別紙 3）

■研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況（別紙 4）

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

GMP 施設基準バリデーションマスタープラン (VMP、三洋電機からの文書)

- 臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果 (別紙 5)
- 同様のヒト幹細胞臨床研究に関する内外の研究状況 (別紙 6)
- その他 (資料内容: 製品基準書・標準書・工程順管理文書・CPC 機械・設備一覧) (別紙 7)
- 臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨 (別紙 8)
- 松本歯科大学研究等倫理規定、松本歯科大学研究等倫理審査委員会内規・名簿・審査の過程および結果、信州大学医学部医倫理委員会名簿および審査結果 (別紙 9)
- 基礎実験の概要: イヌの骨髄間質細胞を用いた骨再生に関する実験的研究 (別紙 10)

研究課題 「ヒト培養自己骨髄間葉系細胞移植による顎骨増生法の確立」

【患者様の治療の流れ】

松本歯科大学病院

骨髄液採取

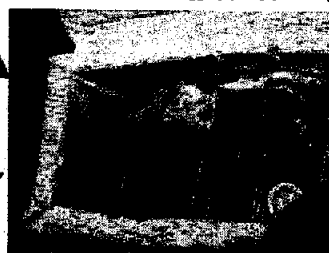


血液採取



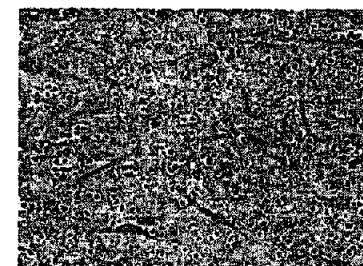
1. 口腔外科小手術室にて、腰に局所麻酔を行い、無痛下で骨髄液を9-15ml採取します。約10分かかります。

信州大学医学部附属病院へ



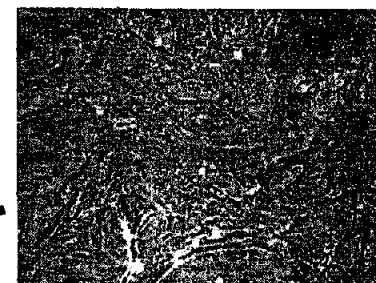
先端細胞治療センター
(CPC)における培養

初代培養時

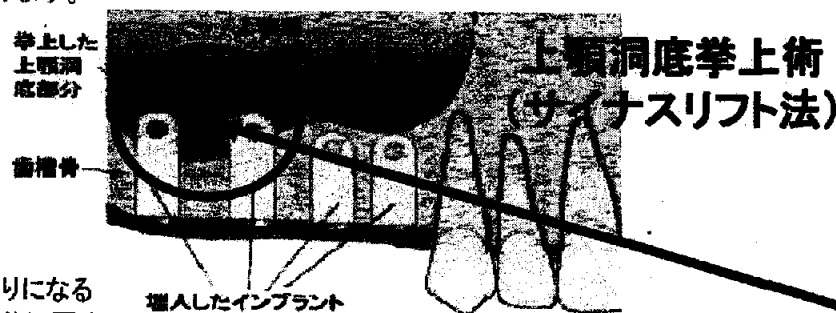


約3週間

細胞回収時



2. 腕の静脈から血液(約400ml)を採取します。これは、ご本人の細胞を増やすために使われます。採血後、少し休憩したら、お帰りいただけます。



骨補填材とともに移植

3. 次に来院していただくのは、増えた細胞を骨の代わりになる骨補填材とともに、患者様の顎の骨を増やしたい部分に戻す手術の時です。以降は通常の歯科の治療となります。

歯槽堤形成術(GTR法)



※ 従来の自家骨移植の場合、全身麻酔で手術を行い、入院が必要でしたが、この方法では、外来治療のみでお帰りいただけます。
※ 特別のご病気をお持ちの場合は、治療ができない場合がありますので担当者にご相談ください。

ヒト幹細胞臨床研究実施計画(松本歯科大学)

ヒト培養自己骨髄間葉系細胞移植による顎骨増生法の確立

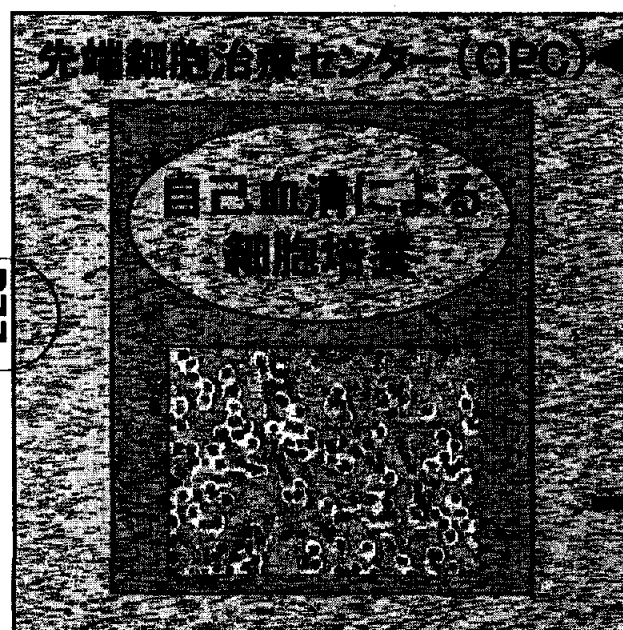
CPCを保有する信州大学と松本歯科大学の連携

信州大学医学部
附属病院(松本市)

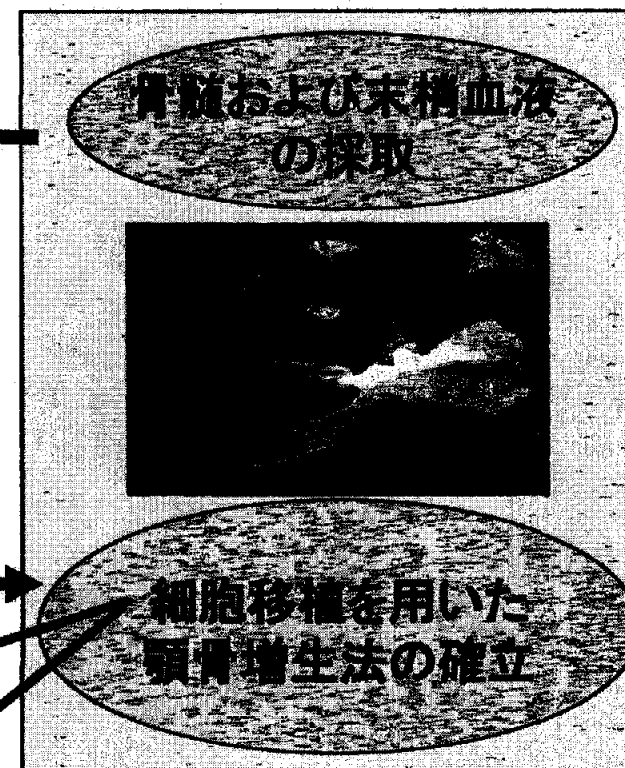
約12km

松本歯科大学病院(塩尻市)

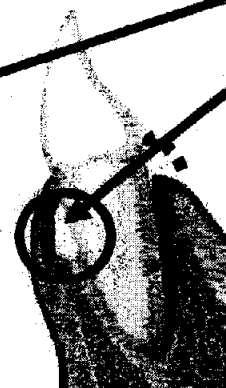
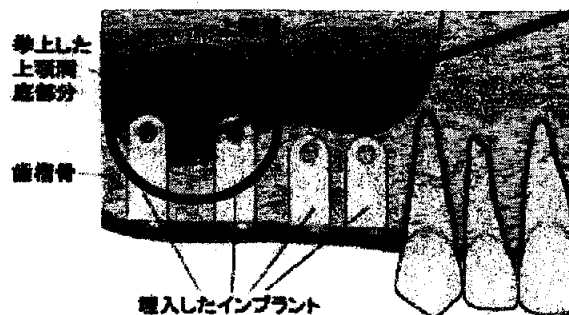
研究者自身による
骨髄および血液搬送



骨髄由来培養細胞搬送



上顎洞底挙上術
(サイナスリフト法)



歯槽堤形成術(GTR法)

ヒト幹細胞臨床研究実施計画(松本歯科大学)