

続いて図 12 に、パッケージング細胞株 PG13 を作製するために用いた 2 種のプラスミド、pLGPS と pMOV-GaLV Seato env の構造を示す。

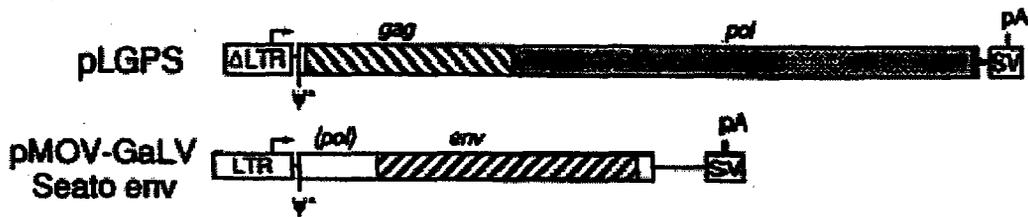


図 12 パッケージング細胞構築用プラスミド pLGPS 及び pMOV-GaLV Seato env の構造 (引用文献 46 より転載)

pLGPS と pMOV-GaLV Seato env は、どちらも  $\Psi$  パッケージングシグナルと 3'-LTR を欠失しているため、PG13 細胞が内在性のパッケージングシグナルと 3'-LTR を持つことはなく、gag-pol 遺伝子や env 遺伝子がウイルス粒子内にパッケージングされて細胞外に出ることはない。

以上のことから、パッケージング細胞株 PG13 を用いて作製したレトロウイルスベクターが RCR を含む可能性は極めて低く安全であると考えられる。

PG13 と同じ第 3 世代のアンフォトロピック系パッケージング細胞株 GP+envAm12 を用いて産生したレトロウイルスベクター中に RCR を検出したことが 1996 年に Chong ら (54) により初めて報告された。RCR 出現の頻度を測定することは困難であるが、過去 4 年間、GP+envAm12 細胞を用いてウイルス産生細胞株を樹立し、60 以上のウイルスについて RCR チェックを試みたが検出されなかったため、極めて低い頻度と考察されている (54)。なお、PG13 を用いてレトロウイルスベクターを作製する過程で RCR が出現したという報告はない。

#### VII. 1.4 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入過程において、細胞を傷害することはないと考えられている。一方、細胞染色体上の遺伝子導入位置によっては細胞の生存・増殖に必要な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがありうる。しかしながら、このような細胞の割合は少ないと考えられる。なお、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において細胞傷害性は報告されていない。

#### VII. 1.5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、標的細胞としての患者 T リンパ球に *ex vivo* (生体外) で TCR $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に患者に投与する。使用した

レトロウイルスベクターMS-bPaはこの過程でほぼ完全に除去され、また、レトロウイルスは比較的不安定なウイルスなので、細胞培養中に大部分は不活化されると考えられる。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株により生産されたレトロウイルスベクターはヒト血清中の補体により速やかに不活化される(55)ため、たとえレトロウイルスベクター粒子が患者体内に侵入しても、それが原因で患者体内において遺伝子導入が起こる可能性は低いと考えられる。

また、レトロウイルスベクターMS-bPaは増殖能を欠いているので、遺伝子導入した患者Tリンパ球内でウイルス粒子を形成することはなく、RCRが出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子導入が起きることはない。

#### Ⅶ.1.6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究の細胞調製は、当該操作に十分な知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、細胞調製作業中に遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。

遺伝子導入操作はP2レベルの細胞調製施設において、可能な作業は閉鎖系で行い、開放系での作業は細胞調製施設内に設置されたクラスII安全キャビネット内で行う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧蒸気滅菌後に廃棄される。以上のようにしてレトロウイルスベクターMS-bPaの環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。

レトロウイルスベクターMS-bPaは増殖能欠損型なので、患者を介して患者以外の人に遺伝子導入が起こる可能性は、大量のRCRが患者体内に存在しない限り非常に低い。

#### Ⅶ.1.7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その挿入位置によっては細胞の生存や増殖等の機能に影響を及ぼすことがある。細胞の生存や増殖に重要な遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現が抑制された場合には細胞は死に至る可能性がある。ただし、このような細胞は遺伝子導入細胞のごく一部であると考えられるので、患者への影響は極めて小さい。一方、癌遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターのLTRが有するエンハンサー・プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、癌抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、その細胞が異常増殖する可能性がある。

#### Ⅶ.1.8 癌原性の有無

レトロウイルスベクターの染色体への組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、上述のとおり異常増殖による癌化の問題が出現する。実際に、CD34陽性細胞を遺伝子導入

の標的細胞とした X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) のフランスでの遺伝子治療において、合計 4 例の白血病発症が報告されている (56-58)。この白血病発症については、①免疫系が成熟していない幼少の患者が対象であること、②遺伝子導入の標的細胞が分化・増殖能が旺盛な造血幹細胞であること、③導入された治療遺伝子 (IL-2 受容体  $\gamma c$  鎖) が細胞増殖に直接関与する機能を有すること等、この遺伝子治療に特殊な事情が重なることにより遺伝子導入細胞の癌化が発生したことが示唆されている (59)。なお、同様に X-SCID に対し、レトロウイルスベクターにより IL-2 受容体  $\gamma c$  鎖遺伝子を CD34 陽性細胞に導入するイギリスでの遺伝子治療においても、10 例中 1 例に白血病が発症したことが 2007 年 12 月に報告された (60, 61)。また、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした慢性肉芽腫症 (CGD) のドイツでの遺伝子治療において、2 例中 2 例の骨髄異形成症候群 (MDS) の発症が報告されている (62, 63)。一方、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞としたアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症のイタリアでの遺伝子治療においては、10 例中 8 例で酵素補充療法の必要がなくなり、遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、長期フォローアップにおいて癌化が見られなかったと報告されている (64)。このように、レトロウイルスベクターによる癌化の頻度は対象疾患、遺伝子導入の標的細胞、ベクターの種類等により大きく異なっており、本研究で行う分化した末梢リンパ球に対するレトロウイルスベクターによる遺伝子導入ではこれまで白血病化の報告はない (13, 37-40)。

本臨床研究では、遺伝子導入の標的細胞は分化を終えた成熟 T リンパ球であり、その癌化のリスクは造血幹細胞に比べて低いとの見解が、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) の遺伝子治療専門家グループから出されている (65)。実際に、過去に実施された T 細胞を遺伝子導入の標的細胞とした遺伝子治療において、遺伝子導入細胞の癌化は報告されていない (66)。また、イタリアのグループは、レトロウイルスベクターで遺伝子導入した T リンパ球を投与した 46 例のフォローアップ (最長 9 年間) において、遺伝子導入 T リンパ球のクローン増殖は認められなかったことを報告している (67)。

なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖を linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) によってモニタリングして、遺伝子導入細胞の異常増殖の有無を評価する。

## Ⅶ. 2 遺伝子産物の安全性

本臨床研究において、遺伝子導入の標的細胞は、PBMC を OKT3 により刺激増殖させた T 細胞である。これら T 細胞の大半は内在性に TCR  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖を発現している。導入遺伝子の産物は、可変領域の配列に違いがあるものの、もともと発現している TCR と同類の蛋白である。したがって、導入遺伝子が発現することにより標的細胞が獲得する性質は、異なる抗原特異性だけであると考えられる。

メラノーマ抗原である gp100 に対する T 細胞クローンをを用いた 2 件の臨床試験 (68, 69) において、*ex vivo* で培養、増殖させた約  $10^{10}$  個の細胞が投与された。1 件は T 細胞と IL-2

を併用するものであり、T細胞を単独投与した場合には治療に関連する重大な有害事象が発生せず、IL-2を併用した場合にはIL-2による毒性以外は認められなかった。一方、もう1件は化学療法の後、T細胞とIL-2を併用するものであり、血液学的又はそれ以外の毒性（血圧低下、吐き気など）が見られたが、これらは併用した化学療法剤又はIL-2を単独で使用した場合にも見られるものであった。このことから、特定のTCR可変領域を持つT細胞の大量投与による安全上の問題は小さいと考えられる。

前述したとおり、本臨床研究における遺伝子導入の標的細胞の大半はTCR $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖を発現している。ここに新たにMAGE-A4に対するTCR遺伝子を導入するので、遺伝子導入細胞において2種類の配列の $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖が発現する。このため、下記のいずれかのメカニズムにより、理論的には自己免疫疾患を発症する可能性が指摘されている(70)。

1. 導入したTCR鎖と内在性のTCR鎖が予測不可能な抗原特異性を持つ混合TCR 2量体を形成する。この場合、内在性TCRの配列によっては、自己抗原に対する混合TCRを形成する可能性が否定できないが、特定の自己抗原を認識する遺伝子導入T細胞の存在割合は非常に少ないので、正常細胞への影響は小さいと考えられる。
2. 自己抗原に特異的なTCRを有する無応答T細胞が、導入されたTCRからの刺激によって活性化され、自己の正常細胞を攻撃する。この場合、TCR $\alpha$ 鎖の対立遺伝子排除が完全ではないために、正常なT細胞の中にも2種類のTCRを発現しているものがあるが、これが自己免疫疾患に関与しているとの証拠はほとんどない。従って、このようなことを生じる可能性は小さいと考えられる。
3. 導入TCR分子が認識する腫瘍抗原ペプチドとHLA分子複合体の立体構造が、自己抗原ペプチドと患者のHLAアレル（対立遺伝子）との複合体の立体構造に酷似する場合、導入TCR分子が自己抗原と交差反応して正常細胞を認識することにより、遺伝子導入リンパ球が自己の細胞を攻撃する可能性がある。この可能性は、論理的には指摘されているが、頻度や危険性については今後の検討・確認が必要である。

メラノーマ抗原であるMART-1に対するTCR遺伝子を自己リンパ球に導入し、転移性悪性黒色腫患者に移入するという臨床試験において、遺伝子導入細胞による毒性は認められなかった(13)。このことから、TCR遺伝子を導入したT細胞が自己免疫疾患を引き起こす可能性は否定できないものの、臨床における安全性は確保されていると考えられる。

## Ⅶ.3 細胞の安全性

### Ⅶ.3.1 遺伝子導入細胞の調製方法

以下に示す細胞培養にかかわる全ての操作は三重大学医学部内に設置されたP2レベルの細胞調製施設内で行われる。また、細胞調製操作時には、品質が確認された試薬、培地類を使用し、クラスⅡ安全キャビネット内で、又は可能な工程については閉鎖系で細胞を取り扱うことにより、他の患者由来の細胞や外来微生物の混入を防止する。

レトロウイルスベクターMS-bPa を用いた遺伝子導入 T リンパ球調製工程について、細胞培養における操作概要を表 2 に、操作手順の概略図を図 13 にそれぞれ示す。

表 2 細胞培養における操作概要

日	操作内容
第 0 日	リンパ球刺激工程
第 2 日	ウイルス結合バッグ調製工程
第 3 日	遺伝子導入工程 (1 回目)
第 4 日	遺伝子導入工程 (2 回目)
第 7~9 日	最終産物調製工程

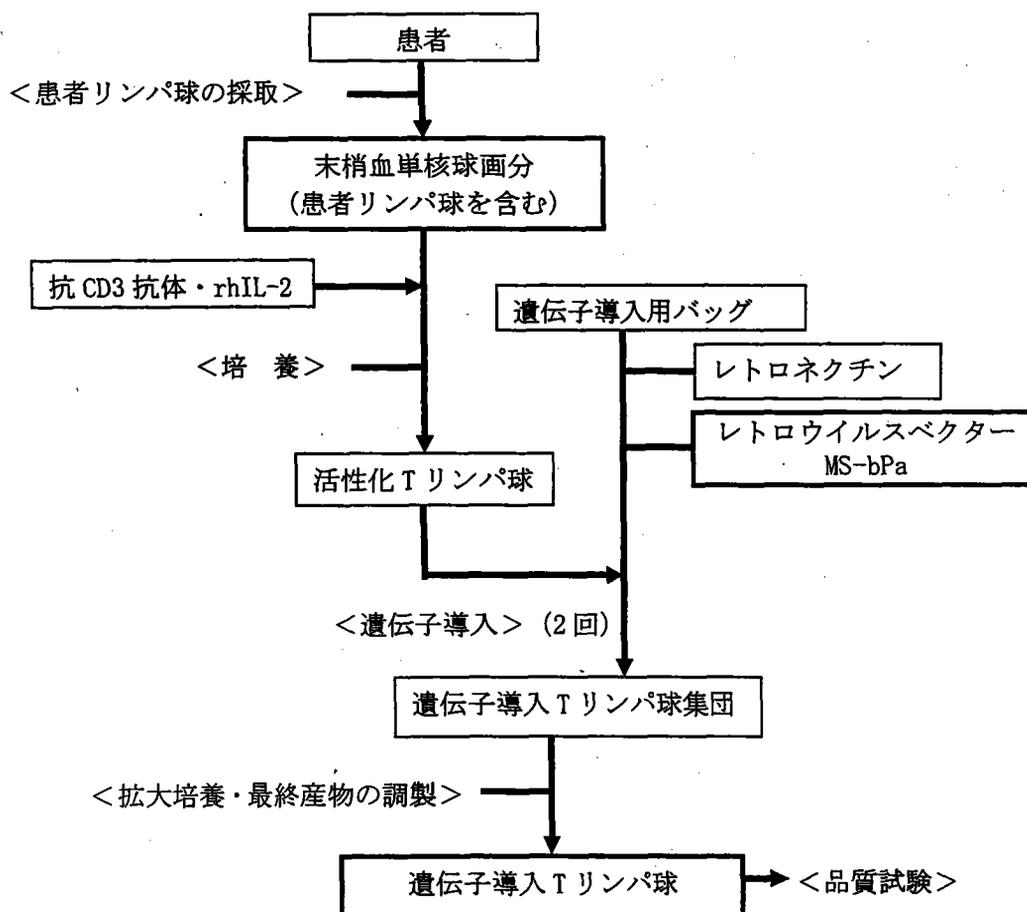


図 13 遺伝子導入細胞調製工程の概略

レトロウイルスベクターMS-bPaを用いた遺伝子導入Tリンパ球調製は、以下に示す標準操作法に従い調製される。

第0日：患者投与に必要な遺伝子導入細胞数（ $2 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^9$ 個、又は $5 \times 10^9$ 個）から、培養ユニットを決定し、培養ユニットに応じた以下の個数を満たす患者リンパ球を採取し、遺伝子導入細胞の調製に使用する。

培養ユニット数	1	2~4
患者投与に必要な遺伝子導入細胞数（個）	$2 \times 10^8$ 個又は $1 \times 10^9$ 個	$5 \times 10^9$ 個

患者からのリンパ球と血漿の採取は、大阪大学医学部附属病院輸血部において、血液成分分離装置 COBE SPECTRA (GAMBRO BCT 社) を用いて実施する。

採取された患者リンパ球を三重大学の細胞調製施設に搬送し、セルプロセッサを用いて患者リンパ球の濃縮と PBS/11.8% ACD-A 溶液による洗浄を行った後、生細胞数及び細胞生存率を測定する。抗 CD3 抗体 (30 ng/mL) を添加した培養用培地〔基本培地 GT-T503、600 IU/mL rhIL-2、1%非働化患者血漿、0.2% HSA 及び  $2.5 \mu\text{g/mL}$  アムホテリシン B 含有。〕に患者リンパ球を  $1(\pm 0.1) \times 10^6$  個/mL となるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグを使用し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内にて培養を開始する。

遺伝子導入用バッグにレトロネクチン CH-296 ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) を添加して薬用保冷庫にて保存する。

基本培地 GT-T503 の組成及びレトロネクチン CH-296 の試験成績書を参考資料 10-1 及び 10-2 に示す。

第2日：レトロネクチン CH-296 を添加した遺伝子導入用バッグを PBS で洗浄した後に、レトロウイルスベクターMS-bPa を添加 (30 mL/バッグ) する。 $2,000 \times g$ 、 $32^\circ\text{C}$ 、2 時間遠心した後に、MS-bPa を除き 1.5% HSA/PBS で洗浄した後に、同液を保存液として添加し薬用保冷庫にて保存する。

第3日：第0日から培養した活性化 T リンパ球の生細胞数及び細胞生存率を測定し、遠心分離機にて  $500 \times g$ 、 $32 \pm 3^\circ\text{C}$  で 20 分間遠心し、細胞を濃縮・回収する。レトロウイルスベクターMS-bPa 結合バッグの保存液を捨てる。ここに活性化 T リンパ球懸濁液を添加し、 $1,000 \times g$ 、 $32 \pm 3^\circ\text{C}$  で 10 分間遠心する。遺伝子導入操作後、4 時間、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで培養した後、細胞を回収し、新鮮な培養用培地にて  $1(\pm 0.1) \times 10^6$  個/mL となるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグを使用し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内にて培養を開始する。

第4日：第3日と同様の遺伝子導入操作を行う。遺伝子導入操作後の細胞濃度は  $0.5(\pm 0.05)$

×10<sup>6</sup>個/mLにて培養する。

第7～9日：セルプロセッサを用いて細胞の洗浄と濃縮をHSA含RPMI1640で行い、1.6～10×10<sup>7</sup>細胞/mLとなるようにRPMI1640に懸濁する。その後、HSA含CP-1と1:1の割合で混合する。HSA含CP-1と混合した遺伝子導入Tリンパ球は、投与に必要な細胞数に相当する液量を凍結保存専用バッグに充填した後に温度管理されたディープフリーザー（-80℃）にて凍結し使用時まで保存する。また、同懸濁液の一部を凍結保存後の細胞生存率試験用に凍結保存用バイアルに分注し同様に凍結保存する。

RPMI1640及びCP-1の組成を参考資料10-3及び10-4に示す。

投与前：凍結保存後の細胞生存率試験として、凍結保存バイアルをディープフリーザー（-80℃）より取り出し、37℃温浴にて急速に解凍した後、遺伝子導入Tリンパ球生存率を測定する。また、輸注用細胞と同時に搬送した凍結保存バイアルを用い実施施設にて凍結保存細胞の生存率を測定する。

投与日：凍結保存バッグにて保存された遺伝子導入Tリンパ球を投与直前に37℃温浴にて急速に解凍し、投与する。

### VII. 3. 2 培養細胞の純度

遺伝子導入される細胞は、OKT3により活性化され増殖期にある患者自己由来のTリンパ球である。健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝子導入後の細胞中の遺伝子導入細胞の比率は20%程度であり（参考資料11「遺伝子導入細胞試験成績書」参照）、Tリンパ球が95%以上を占め、若干のBリンパ球が含まれていた（参考資料12「遺伝子導入調製細胞構成」参照）。患者に投与される細胞中にも、遺伝子導入されていないTリンパ球やその他の細胞が混在すると予測されるが、もともと患者末梢血中にあった細胞であり問題ないと考えられる。また、仮にTリンパ球以外に遺伝子導入された場合には、発現したTCR分子は受容体としての機能を発揮しないと考えられることから、生体への影響が発生する可能性は低いと考えられる。

遺伝子導入により、導入遺伝子の本来の機能とは関係なく移入細胞の腫瘍化を誘導する確率が一定度に存在すると考えられる。ただし造血幹細胞以外の細胞に遺伝子導入された場合には、血液系細胞はいずれもその生理的寿命が限られていることから腫瘍が発生する確率は極めて低いと考えられる。なお、造血幹細胞の混入については、①培養開始時点の患者末梢血リンパ球中の造血幹細胞の比率は極めて低いこと（通常0.1%以下）、②Tリンパ球を活性化させる今回の培養条件ではレトロウイルス感染時に造血幹細胞が分裂増殖している可能性が極めて低いこと、③造血幹細胞の増殖に必要なサイトカイン等を含まない条件で増殖培養されることを総合すると、遺伝子導入された造血幹細胞が混入する可能性は極めて低いと考えられる。実際に、健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝

子導入後の細胞中の CD34 陽性細胞の比率は 0.1%未満（検出限界以下）であった（参考資料 12「遺伝子導入調製細胞構成」参照）。一方、レトロウイルスベクターでの遺伝子導入により白血病発症が認められた、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞としたフランス及びイギリスの X-SCID 遺伝子治療では、抗 CD34 抗体を用いて純化した CD34 陽性細胞を用いて、FLT3 リガンド、IL-3 及び幹細胞因子等のサイトカインを加えた条件で培養されており（参考資料 13「FDA CBER CTGTAC, March 4, 2005. Table 1」参照）、今回の遺伝子導入細胞の培養条件とは大きく異なっている。ただし、万が一、造血幹細胞に遺伝子導入された場合には腫瘍発生のリスクを否定できないことから、投与後の遺伝子導入細胞のクローン増殖をモニタリングする予定である。

培養細胞間の相互汚染及び取違えを防ぐために、細胞調製施設内の同一の部屋で同時に複数バッチの細胞調製は行わない。また、微生物の汚染を防ぐために、全ての操作は P2 レベルの細胞調製施設内で行う。細胞やレトロウイルスベクター等が作業エリア内の空気に直接暴露される操作は清浄度クラス 100、クラス II の安全キャビネット内で行い、感染性微生物の混入を防ぐとともにレトロウイルスベクター MS-bPa の環境中への拡散を防止する。

また、細胞培養の際に使用する OKT3 の洗浄後の残留濃度は極めて微量であり、これらの刺激性物質が生体に及ぼす影響は限りなく少ない。

TCR 遺伝子導入リンパ球は、三重大学医学部内に設置した P2 レベルの細胞調製施設において調製され、以下「VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性」に記載の試験によって品質が担保される。

### VII. 3. 3 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

遺伝子導入細胞調製にあたっては、患者リンパ球を OKT3 により刺激した後にレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行うとともに、*ex vivo* での培養を行う。

リンパ球と遺伝子導入細胞の遺伝子型の違いは、後者には TCR $\alpha$  鎖及び $\beta$  鎖の遺伝子が導入されていること、及び、レトロウイルスベクター MS-bPa のプロウイルス配列が染色体内のランダムな位置に挿入されていることである。本臨床研究で遺伝子導入する細胞は成人 PBL であり、挿入変異によって細胞の癌化が起きる可能性は大変低いと考えられるが完全には否定できないので、LAM-PCR によるモニタリングを行う予定である（「VII. 1. 8 癌原性の有無」参照）。

OKT3 で刺激することによって CD3 陽性細胞が活発に増殖し、その結果として CD3 陽性細胞の割合が増加する。また、一般にリンパ球を *ex vivo* で培養すると CD4 陽性細胞の割合が減少し、CD8 陽性細胞の割合が増加する。しかし、培養後の細胞集団を構成する個々の細胞のサブタイプは末梢血中に存在するものであり、これを患者に投与しても安全性に問題はないと考えられる。

2002 年のフランスの Sauce らによる報告では、リンパ球を含む PBMC を OKT3 や IL-2 を含む培地で *ex vivo* にて培養するとリンパ球表面の CD4/CD8 の比率は減少し、CD62L、CCR7、

CD45RA、CD27、CD28 の発現も徐々に低下する。代わりに、CD45RO、CD25、CD154、CD40、CD80、CD86、CD95、HLA-DR 等の発現は増大する。ただし、レトロウイルスベクターの感染によるリンパ球の表現型の変化は特に認められないことを報告している(71)。

ex vivo で培養したリンパ球や TCR 遺伝子を導入したリンパ球を用いた Rosenberg SA らの臨床研究では、移入 T 細胞の安全性に対する問題は報告されていない(9, 13, 72, 73)。さらに、レトロウイルスベクターにより TCR 遺伝子を導入した臨床試験では、6日から9日という比較的短期間の ex vivo 培養 T リンパ球の群において移入 T リンパ球が患者生体内で長期間観察されたことが報告されている(13)。本計画においても T リンパ球の培養期間はこれと同程度に抑えている。

#### Ⅶ. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性

被験者に投与する細胞は、レトロウイルスベクターMS-bPa により TCR $\alpha$  鎖及び $\beta$  鎖遺伝子を導入した被験者個人由来の T リンパ球である。細胞調製の際に用いられる培地の成分、レトロウイルスベクターMS-bPa の成分、種々の試薬、抗体等に関しては、遺伝子導入細胞を凍結保存する前に RPMI1640 で十分に洗浄される。そのため被験者に投与される量は極めて少なく、これらが直接影響を及ぼすことはないと考えられるが、細胞調製終了後、培養上清又は凍結保存専用バッグに充填する前の細胞懸濁液を検体として採取し、以下の試験を行うことにより品質を担保する(品質試験方法の概要を参考資料 14「遺伝子導入リンパ球の品質試験」に、健常人リンパ球での試験調製での結果を参考資料 11「遺伝子導入細胞試験成績書」に示す)。全ての品質試験結果が得られて安全性が確認されるまで遺伝子導入細胞は凍結保存され、安全性が確認された後に使用される。

1. マイコプラズマ否定試験 (PCR 法)
2. RCR 試験 (RT-PCR 法)
3. 無菌試験 (日本薬局方)
4. エンドトキシン試験 (日本薬局方)
5. 細胞生存率試験 (トリパンブルー)
6. 細胞数試験
7. 遺伝子導入効率試験
8. 導入遺伝子の機能試験

被験者への投与の際は、凍結保存専用バッグ中に凍結された細胞懸濁液を投与直前に 37°C 温浴にて急速に解凍し、RPMI1640 培地と HSA 含 CP-1 とが 1:1 の割合で混合された細胞懸濁液として静脈内投与される(生理食塩水の追加により投与液量を調整する場合がある)。

なお、品質試験の検体を採取した後の工程としては、閉鎖系操作による凍結保存専用バッグへの充填、凍結、解凍、及び閉鎖系操作による輸注用バッグ又は注射器への移し替え

であり、不純物混入のリスクは極めて低いと考えられる。また、凍結・解凍による細胞生存率の低下については、凍結保存専用バッグに充填する前の細胞懸濁液を別途バイアルに凍結保存し、投与日以前に細胞生存率を測定することにより確認する。

#### Ⅶ.4 ペプチドの安全性

##### Ⅶ.4.1 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドの純度

本臨床研究に用いられる MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドは米国 NeoMPS 社において GMP 準拠で製造された。その製造工程の概略と品質試験の結果を参考資料 15「ペプチド製造工程・品質試験報告書」に示す。その純度は逆相 HPLC による解析により 98.3%であった。またエンドトキシンは 0.100 EU/mg 未満であり、無菌試験により無菌性が確認されている。

##### Ⅶ.4.2 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドの安全性

腫瘍ワクチンの臨床試験はこれまでに国内外ですでに主要なものだけでも 1,300 名以上の対象者につき報告されている(74)。その中でも CTL 認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究は最も多数行われており、米国の Rosenberg らのグループだけでも 2004 年の時点で総数 381 名の患者に腫瘍抗原ペプチドワクチンを投与している(74)。しかしながらこれら CTL 認識腫瘍抗原ペプチドについて、現在までに重篤な副作用の報告はない(30)。軽微な副作用として、皮膚反応(注射部位の発赤、腫脹)、微熱、倦怠感等が報告されている。本臨床研究に用いられる MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドはラットにおける単回皮下投与毒性試験を実施した(株式会社三菱化学安全科学研究所 熊本研究所、熊本県宇土市栗崎町 1285 番地)。ヒトへの投与量として予定している 300 μg/body を投与した結果、一般状態の変化及びペプチド投与に関連する体重の変化は認められず、また病理学的検査においても異常は認められなかった。(参考資料 16「ラット単回皮下投与急性毒性試験」参照。MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドは資料中「MAGE-A4-A24」に該当)。以上より MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドの投与において重篤な副作用が出現する可能性は極めて小さいと考えられる。なお、有害事象が発現した場合には、「IX.5.5.3 ペプチド投与に伴う副作用」に従い、適切な処置を施す。

## Ⅷ. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由

以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。

### ①臨床ニーズ

再発食道癌の患者の50%生存期間は約6ヶ月である。さらに、化学療法等の治療に抵抗性となれば、もっぱら栄養管理等の緩和医療以外の手立てがないのが現状である。本臨床研究は、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者を対象としており、このような患者に対する有効な治療手段開発の臨床ニーズが存在する。

### ②品質・安全性

本臨床研究は、腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する CTL クローン由来の TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球を患者に投与する。この製造過程は十分に確立され、また、調製された輸注用の TCR 遺伝子導入リンパ球の品質は、調製時毎に確保される。

本臨床研究で遺伝子導入する細胞は、小児由来の造血幹細胞ではなく、成人末梢血由来の T リンパ球であり、T リンパ球への遺伝子導入の場合、レトロウイルスベクターによる癌化のリスクは極めて低く、対象疾患（治療抵抗性食道癌）とのリスク・ベネフィットを総括すると、レトロウイルスベクターを使用した遺伝子治療の施行に問題はない。

免疫不全マウスに TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性比較試験において、対照とした非遺伝子導入ヒトリンパ球投与群と比較して、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与群に特異的な毒性所見は観察されなかった（添付資料、52 ページ）。

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入で同様にして調製された、他の腫瘍抗原を認識する TCR 遺伝子導入リンパ球のヒトへの投与は、NIH の Rosenberg SA らのグループで既に実績がある（添付資料、62～64 ページ）。

### ③期待される有効性

共同実施施設である三重大学にて調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性のヒト腫瘍細胞株に対して特異的な細胞傷害活性を示すことが *in vitro* において確認されている（添付資料、38 ページ）。また、免疫不全マウスに MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性のヒト腫瘍細胞株を接種したモデル実験において、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与群に特異的な腫瘍径増大の抑制効果が認められた（添付資料、45 ページ）。

NIH の Rosenberg SA らは、転移性悪性黒色腫患者 17 例に腫瘍抗原 MART-1 の TCR 遺伝子導入リンパ球を投与する遺伝子治療臨床研究を行った結果、2 例（12%）に PR (partial response : 部分奏効) を認めており (13) (添付資料、62 ページ)、さらに、同グループは、高親和性ヒト MART-1 特異的 TCR 遺伝子 (DMF5)、又はマウス由来の gp100 特異的 TCR 遺伝

子 (gp100(154)) を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している(14) (添付資料、64 ページ)。

したがって、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。

#### ④当施設・研究者の能力

当施設の総括責任者及び研究者(宮田、山崎、和田、富山)はリンパ球アフェレーシス、細胞品質管理、腫瘍抗原由来蛋白を用いた癌ワクチン臨床試験の実施と末梢血を用いた免疫学的解析の経験者であり、さらに対象疾患である食道癌に対する十分な臨床経験(食道癌治療 150 例以上)を有している。これらのことから、当施設における研究者は本臨床研究を行うために必要な能力を十分に有していると判断する。

#### ⑤臨床研究薬の調製

被験者へ投与される TCR 遺伝子導入リンパ球は、遺伝子ベクター調製、リンパ球アフェレーシス、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び腫瘍抗原由来ペプチドワクチン臨床試験の経験者である三重大学大学院医学系研究科の珠玖、影山、池田による監督・管理下のもとで三重大学にて調製される。

#### ⑥安全・効果評価・適応判定部会

本臨床研究は多施設共同臨床研究として実施されることから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一された評価基準にて行うことが必要である。そのため、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会の委員から安全性や有効性の評価、適応の判定を行うための委員を選出し、安全・効果評価・適応判定部会を設置する。なお、安全・効果評価・適応判定部会の詳細については第IX章及び別途作成する手順書に従う。

## IX. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

### IX.1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

#### IX.1.1 臨床研究実施体制

本臨床研究は、三重大学大学院医学系研究科の珠玖洋を多施設共同臨床研究代表者として、三重大学医学部附属病院、大阪大学医学部附属病院、及び田附興風会医学研究所北野病院が参加する多施設共同臨床研究として実施する予定である。安全性、有効性の評価を統一するため、全施設共通の安全・効果評価・適応判定部会を設置する。また、TCR 遺伝子導入リンパ球の調製は細胞調製施設を有する三重大学にて行う。(図 14 参照)

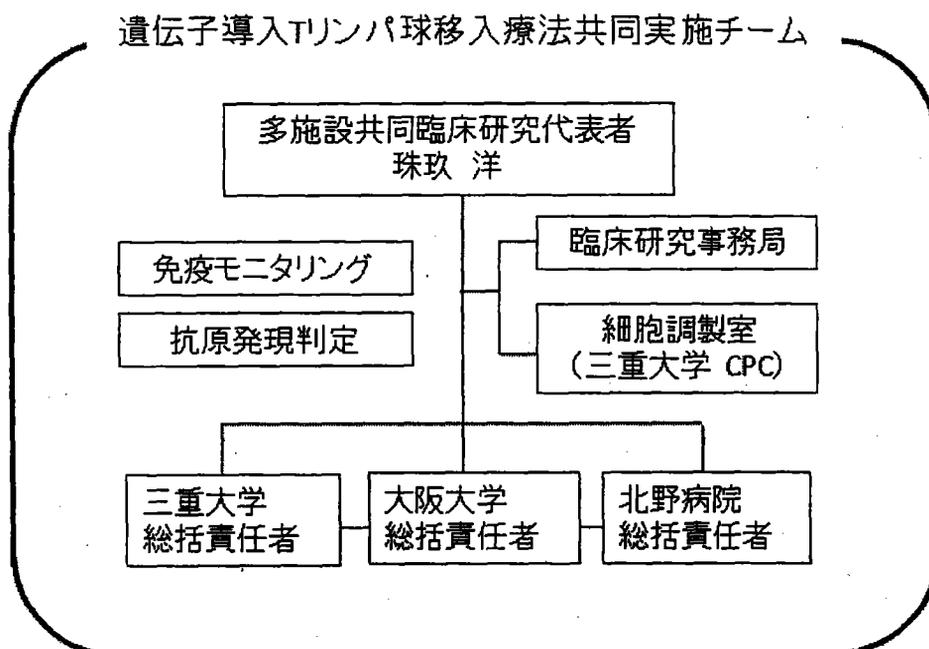


図.14 本臨床研究における実施体制

#### IX.1.1.1 本臨床研究の実施に際し医療機関内に設置される委員会

本臨床研究実施の適否及びその他本臨床研究に関する調査審議を行うため、各医療機関に遺伝子治療臨床研究審査委員会を設置する。なお、遺伝子治療臨床研究審査委員会の運営に関しては、医療機関毎に作成した手順書に従うものとする。

### IX. 1. 1. 2 安全・効果評価・適応判定中央部会

有効性や安全性の評価基準を統一することを目的とし、本臨床研究では、各医療機関で共通の安全性・効果評価・適応判定を検証するため、安全・効果評価・適応判定中央部会を設置する。なお、安全・効果評価・適応判定中央部会の委員については各医療機関から選出し、本臨床研究の安全性、効果並びに被験者の適応性に関する具体的事項について評価及び判定を行い、その適否及び留意事項、改善事項等について各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見を提出する。

#### 1) 適格性評価

被験者の本臨床研究への登録は、総括責任者から安全・効果評価・適応判定中央部会に被験者登録用紙を提出することで行われる。なお、本臨床研究に関する情報を共有することを目的として、安全・効果評価・適応判定中央部会への被験者登録用紙提出と同時に、本臨床研究参加医療機関の総括責任者に対して被験者情報の提供を行う。

安全・効果評価・適応判定中央部会は提出された被験者登録用紙をもとに、各被験者が全ての選択基準を満たし、除外基準のいずれにも抵触しないことを確認し、本臨床研究の対象被験者として適切かどうかを判定する。得られた判定結果については遺伝子治療臨床研究審査委員会を通じて総括責任者へ報告する。

#### 2) 用量増加における評価

コホート毎に規定された症例数を満了した場合、安全・効果評価・適応判定中央部会はコホート毎の各被験者から得られた、臨床研究終了・中止時検査までのデータをもとにコホート毎の安全性を判定する。安全性に問題がないと判定された場合、全ての医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会を通じて総括責任者へ報告したうえで、次のコホートに移行する。

#### 3) 重篤な有害事象発現時の対応

安全・効果評価・適応判定中央部会は、総括責任者より提出された重篤な有害事象に関する報告書（詳細報）をもとに、本臨床研究との因果関係並びに本臨床研究継続の可否について判定する。得られた判定結果については、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会を通じて総括責任者へ報告する。なお、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会は、安全・効果評価・適応判定中央部会からの判定結果をもとに臨床研究の継続に関する審査を行い、医療機関の長及び総括責任者へ審査結果を報告する。

#### 4) 臨床研究の総合判定

臨床研究終了後、安全・効果評価・適応判定中央部会は全ての被験者から得られたデータをもとに本臨床研究の安全性並びに効果について総合的に判定する。得られた判定結果については、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会及び総括責任者へ報告する。

### IX. 1. 1. 3 遺伝子治療臨床研究審査委員会遺伝子製剤検証部会

遺伝子製剤検証部会は、本臨床研究に用いる遺伝子導入細胞製剤の検証及びその品質の評価を行い、その結果を各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会に提出する。

### IX. 1.2 本臨床研究の実施手順

本臨床研究の治療計画は以下の図 15 のとおりである。

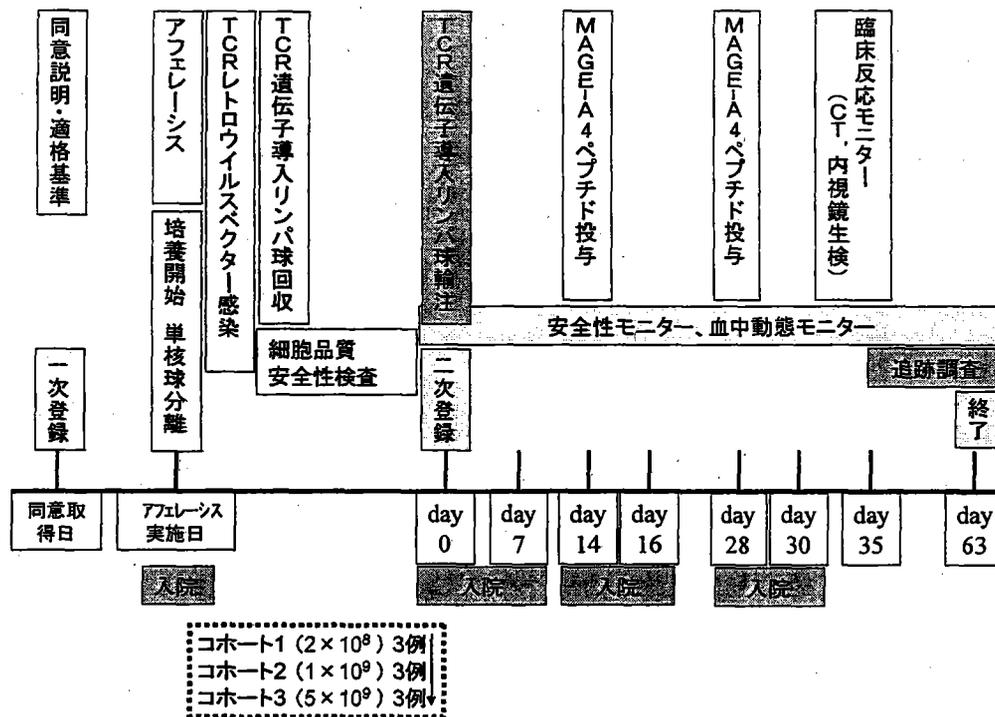


図 15 TCR 遺伝子導入リンパ球調製及び輸注計画

治療抵抗性食道癌患者より一次登録時の選択基準・除外基準に適合する患者を選定し、本臨床研究への一次登録を行う。

大阪大学医学部附属病院においてアフェレーシスにて自己 PBL を採取し、三重大学細胞調製施設に搬送する。三重大学細胞調製施設で自己 PBL に MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドを認識する TCR $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、得られた TCR 遺伝子導入リンパ球を ex vivo 培養し、一旦凍結保存する。

三重大学細胞調製施設にて調製した TCR 遺伝子導入リンパ球の品質が確認された後、大阪大学医学部附属病院に TCR 遺伝子導入リンパ球が提供される。二次登録の前に再度文書にて同意を取得し、二次登録時の選択基準を満たし、除外基準に抵触しないことを確認したうえで本臨床研究への二次登録を行う。

TCR 遺伝子導入リンパ球 (単回投与) を経静脈的に投与する。

1 日投与量 300  $\mu$ g の MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドと不完全フロイントアジュバントとの懸濁液を、TCR 遺伝子導入リンパ球投与日を 0 日として 14 日目及び 28 日目の 2 日間の計 2 回、皮下投与する。

追跡調査を行った後、本遺伝子治療の安全性 (有害事象、臨床検査、RCR、LAM-PCR)、TCR

遺伝子導入リンパ球の血中動態及び腫瘍組織への浸潤、腫瘍特異的免疫反応及び腫瘍縮小効果を評価する。

TCR 遺伝子導入リンパ球投与後 63 日目に本臨床研究を終了とする。

#### TCR 遺伝子導入リンパ球数の設定

投与する TCR 遺伝子導入リンパ球数は 1 回投与量  $2 \times 10^8$  個、 $1 \times 10^9$  個、 $5 \times 10^9$  個の各コホート別とする。各コホートは 3 例とし、1 回投与量を  $1 \times 10^9$  個、 $5 \times 10^9$  個へと増加させる。

腫瘍浸潤リンパ球や T 細胞クローンを体外で増殖後に投与する自家培養リンパ球輸注が米国を中心に行われ、 $3 \times 10^9 \sim 4 \times 10^{11}$  個のリンパ球が投与され細胞輸注に起因する重篤な有害事象の報告はない(9, 75)。また、TCR 遺伝子導入リンパ球を投与する類似研究 (NIH、米国) では、17 例において  $1 \times 10^9$  以上 ( $1 \times 10^9 \sim 8.6 \times 10^{10}$ ; 中央値  $7 \times 10^9$ ) のリンパ球が 1 回に静脈内投与され、投与リンパ球に起因する重篤な有害事象の報告はない (添付資料、62 ページ)。本計画では安全性を評価するために、その投与数より少ない  $2 \times 10^8$  個のリンパ球数を初期投与数と設定した。また、臨床試験のプロトコルに従うと、体外にて遺伝子導入細胞調製時に培養増殖される細胞数が  $1 \times 10^{10}$  程度と予想されるため、調製し投与可能な最大リンパ球数を  $5 \times 10^9$  個と設定した。

投与量増加基準は、以下のとおりとする (有害事象のグレードについては「IX. 5. 6 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準」参照)。

- 1) 3 例のうち 1 例も「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現しなかった場合、次のコホートに 3 例が登録される。
- 2) 3 例のうち 1 例に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、同じコホートに 3 例が登録される。
- 3) 3 例のうち 2 例又は 3 例に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、投与量の増加はそこで中止される。
- 4) 上記 2) に従った後、6 例のうち 1 例に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、投与量の増加は続けられる。
- 5) 上記 2) に従った後、6 例のうち 2 例以上に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、投与量の増加はそこで中止される。

## IX. 2 被験者の選択基準及び除外基準

### IX. 2. 1 一次登録

患者より文書にて同意を取得する。一次登録時の選択基準を全て満たし、かつ除外基準のいずれにも抵触しないことを確認し、登録を行う。

### IX. 2.1.1 選択基準（一次登録）

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 組織診で確定診断の得られた食道癌の患者
- 2) 根治切除不能かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）抵抗性となった臨床病期Ⅲ期あるいはⅣ期（TNM分類）の食道癌患者、又は術後あるいは初回放射線化学療法後に再発転移をきたし治療抵抗性となった食道癌患者
- 3) HLA-A2402 陽性の患者
- 4) PCR 法にて腫瘍組織に MAGE-A4 発現が確認\* されている患者
- 5) 画像診断等による臨床効果判定に必要とされる測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 6) ECOG Performance Status 0~1 の患者
- 7) 本臨床研究参加時点の年齢が 20 歳以上 75 歳以下の患者
- 8) 細胞採取時に前治療（手術、化学療法、放射線療法）終了から 4 週間以上の経過が見込める患者
- 9) 同意取得後 4 ヶ月以上の生命予後が見込める患者
- 10) 主要臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
  - ・白血球数  $\geq 3,000/\text{mm}^3$
  - ・好中球数  $\geq 1,500/\text{mm}^3$
  - ・ヘモグロビン  $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
  - ・血小板数  $\geq 100,000/\text{mm}^3$
  - ・総ビリルビン (T-Bil)  $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
  - ・AST (GOT)、ALT (GPT)  $\leq 150 \text{ IU/dL}$
  - ・クレアチニン (Cr)  $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
  - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 11) 免疫組織染色法にて腫瘍組織に HLA クラス I 分子発現が確認されている患者
- 12) 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

\*: 試験方法は参考資料 17 「MAGE-A4 抗原発現検査プロトコール」参照。MAGE-A4 発現陽性の判断基準は、定量的 RT-PCR 法により GAPDH 発現 10,000 コピー当たり MAGE-A4 発現が 50 コピー以上とする。

### IX. 2.1.2 除外基準（一次登録）

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
  - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
  - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症

- ・活動性の感染症
  - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
  - ・自己免疫疾患
  - ・出血傾向（プロトロンビン時間 (PT) <50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) >60 sec、フィブリノゲン (Fbg) <100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) >20  $\mu$ g/mL)
  - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
  - 3) HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-1 抗体のいずれかが陽性である患者
  - 4) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
  - 5) 制御困難な脳内転移を有する患者
  - 6) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
  - 7) MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチド投与に適さない患者（例えば MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者）
  - 8) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者
  - 9) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は挙子希望の男性患者（ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない）
  - 10) 一次登録前 4 ヶ月以内に他の臨床試験（臨床研究）に参加している患者
  - 11) その他、総括責任者又は分担研究者が不相当と認めた患者

## IX.2.2 二次登録

一次登録した患者における TCR 遺伝子導入リンパ球の調製が終了した後、再度患者より文書にて同意を取得する。二次登録時の選択基準を全て満たし、かつ除外基準のいずれにも抵触しないことを確認し、登録を行う。

### IX.2.2.1 選択基準（二次登録）

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 本臨床研究における最小輸注量 ( $2 \times 10^8$  個) の TCR 遺伝子導入リンパ球が得られた患者
- 2) 画像診断等による臨床効果判定に必要な測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 3) ECOG Performance Status 0~1 の患者
- 4) 主要臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
  - ・白血球数  $\geq 3,000/\text{mm}^3$
  - ・好中球数  $\geq 1,500/\text{mm}^3$
  - ・ヘモグロビン  $\geq 8.0 \text{ g/dL}$

- ・血小板数  $\geq 100,000/\text{mm}^3$
  - ・総ビリルビン (T-Bil)  $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
  - ・AST (GOT)、ALT (GPT)  $\leq 150 \text{ IU/dL}$
  - ・クレアチニン (Cr)  $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
  - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 5) 一次登録後に同意撤回がなく、治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

#### IX. 2. 2. 2 除外基準 (二次登録)

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
  - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
  - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
  - ・活動性の感染症
  - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
  - ・自己免疫疾患
  - ・出血傾向 (プロトロンビン時間 (PT)  $< 50\%$ 、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT)  $> 60 \text{ sec}$ 、フィブリノゲン (Fbg)  $< 100 \text{ mg/dL}$ 、フィブリン分解産物 (FDP)  $> 20 \mu\text{g/mL}$ )
  - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 3) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
- 4) 制御困難な脳内転移を有する患者
- 5) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
- 6) MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチド投与に適さない患者 (例えば MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者)
- 7) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者
- 8) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は挙子希望の男性患者 (ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない)
- 9) その他、総括責任者又は分担研究者が不相当と認めた患者

#### IX. 3 被験者の同意の取得方法

本臨床研究の開始に先立ち、総括責任者又は分担研究者は被験者の同意を得るに際し、大阪大学医学部附属病院内に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意・説明文書 (X. 7) を説明の前又は説明するときに渡し、以下の内容を口頭で詳しく

説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する（文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計2回行う）。なお、同意を取得する前には、質問する機会と本臨床研究に参加するか否かを判断するのに十分な時間を被験者本人に与え、全ての質問に対して被験者が満足するように答えるものとする。また、総括責任者又は分担研究者以外の臨床研究コーディネーター等が説明補助を行うことも可能とする。

1. はじめに
2. 臨床研究について
3. あなたの食道癌について
4. 遺伝子治療臨床研究の概要について
5. TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について
6. 臨床研究の方法
7. 参加できる方、参加できない方
8. 臨床研究のスケジュール
9. 期待される効果
10. 予想される危険性および副作用
11. 臨床研究への参加予定期間
12. 臨床研究への参加患者数
13. 他の治療法について
14. 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて
15. 健康被害の補償について
16. 新たな情報のお知らせについて
17. 遺伝子治療臨床研究の中止について
18. あなたに守っていただきたいこと
19. あなたの費用負担について
20. 個人情報の保護について
21. 個人情報の第三者への提供の制限について
22. 個人情報の開示、訂正、利用停止や問い合わせ・相談・苦情の窓口について
23. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について
24. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制

#### IX.4 実施期間及び目標症例数

実施期間は共同実施機関である三重大学医学部附属病院が厚生労働大臣から本臨床研究実施の承認を得た時点（2009年7月17日）から3年間とする。症例毎の実施期間はTCR遺伝子導入リンパ球輸注後63日であるが、本臨床研究終了後も当該被験者の生存期間（FDAのガイドライン(76)に従い、最短15年間）にわたり、1年に1回の頻度で遺伝子導入Tリンパ球の血中動態及び二次発癌やRCRの有無について追跡調査を実施する。

目標症例数は以下のとおり、全施設の症例を合わせて9例とするが、有害事象が発現した場合には、「IX.1.2 本臨床研究の実施手順」の投与量増加基準に従って、安全性の評価を強化する。

##### 1回当たりのTCR遺伝子導入リンパ球輸注量

コホート1	$2 \times 10^8$ 個	3例
コホート2	$1 \times 10^9$ 個	3例
コホート3	$5 \times 10^9$ 個	3例

また、TCR遺伝子導入リンパ球の増殖率は培養ごとに予測することができないため、症例の取り扱いを以下のとおりとする。

- ・コホート1で定められたTCR遺伝子導入リンパ球輸注量（ $2 \times 10^8$  個）を本臨床研究における最小輸注量とする。最小輸注量に満たない場合にはTCR遺伝子導入リンパ球を投与せず、本臨床研究における脱落例とする。
- ・コホート2で定められたTCR遺伝子導入リンパ球輸注量（ $1 \times 10^9$  個）が得られなかった場合にはその被験者に輸注可能な全てのTCR遺伝子導入リンパ球を投与する。投与したTCR遺伝子導入リンパ球輸注量が $0.8 \times 10^9$  個以上の場合、コホート2の症例数として数えるが、それ未満の場合は投与量増加の評価例としない。
- ・コホート3で定められたTCR遺伝子導入リンパ球輸注量（ $5 \times 10^9$  個）が得られなかった場合にはその被験者に輸注可能な全てのTCR遺伝子導入リンパ球を投与する。投与したTCR遺伝子導入リンパ球輸注量が $4 \times 10^9$  個以上の場合、コホート3の症例数として数えるが、それ未満の場合は投与量増加の評価例としない。
- ・コホート2及び3の投与量増加のための評価対象としない症例における臨床観察項目データは、当臨床研究の安全性評価解析対象とする。
- ・投与量増加の評価対象としない症例数は、コホート2、3において最大3例までとし、その症例をもって当該コホートへの登録を終了し、本臨床研究におけるTCR遺伝子導入リンパ球の臨床至適用量を決定する。

## IX. 5 遺伝子治療臨床研究の実施方法

### IX. 5.1 対照群の設定方法

本臨床研究では対照群を設定しない。

### IX. 5.2 遺伝子導入方法

#### IX. 5.2.1 PBMC の採取

大阪大学医学部附属病院輸血部において採取機種 COBE SPECTRA (GAMBRO BCT 社) を用いて、被験者より PBMC、及び T リンパ球培養に必要な血漿を採取する。被験者からの PBMC 採取条件及び被験者のアフエレーシス実施条件は以下のとおりとする。なお、アフエレーシスは日本造血細胞移植学会のガイドラインに準じて、手技に習熟した医師が被験者の状態を十分に観察しながら実施する。

#### 被験者からの PBMC 採取条件

- ・血液処理量：約 5,000 mL (最大で 150 mL/kg)
- ・処理速度：0.8~1.5 mL/kg/min
- ・処理時間：通常 90 分以内 (最大 120 分まで)

#### 被験者のアフエレーシス実施条件

- ・採取当日の身体的、精神的状態が良好であること
- ・採取当日に 37.0°C を超える発熱を有しないこと
- ・採取当日の収縮期血圧が 90 mmHg 以下又は 180 mmHg 以上でないこと
- ・その他、アフエレーシス実施医師が不可能と判断した場合は実施を延期する。

#### IX. 5.2.2 TCR 遺伝子導入リンパ球の調製

採取された PBMC 画分を別途手順書 (参考資料 18) に定められた条件で三重大学細胞調製施設へ搬送する。そして、三重大学細胞調製施設にて「VII. 3.1 遺伝子導入リンパ球の調製方法」に従い、細胞調製が行われる。細胞調製後、「VII. 3.4 被験者に投与する細胞の安全性」に示した各種試験により、TCR 遺伝子導入リンパ球としての品質を確認したうえで別途手順書 (参考資料 18) に定められた条件で大阪大学医学部附属病院に搬送され、投与に用いられる。また、輸注用細胞と同時に搬送した凍結保存バイアルを用い実施施設にて凍結保存細胞の生存率を測定する。

#### IX. 5.2.3 TCR 遺伝子導入リンパ球の投与

各コホートにて設定された細胞数の TCR 遺伝子導入リンパ球 (単回投与) を静脈内投与する。凍結保存されたリンパ球浮遊液を含むバッグを 37°C 恒温槽内で解凍、被験者静脈内へ投与し、投与直後より問診とバイタルサインを取りながら十分な観察を行い、有害事象が発現した場合には、「IX. 5.5.2 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用」に従い、適

切な処置を施す。

### IX. 5. 3 前処置及び併用療法の有無

#### IX. 5. 3. 1 前処置

前処置は特に必要としない。

#### IX. 5. 3. 2 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチド投与

1 回量 300  $\mu$ g の MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドを、TCR 遺伝子導入リンパ球投与日を 0 日として 14 日目及び 28 日目の 2 日間の計 2 回、不完全フロイントアジュバント (商品名: MONTANIDE™ ISA 51、SEPPIC 社) との懸濁液として皮下投与する。有害事象が発現した場合には、「IX. 5. 5. 3 ペプチド投与に伴う副作用」に従い、適切な処置を施す。

#### IX. 5. 3. 3 併用禁止療法及び併用禁止薬

以下の療法及び薬剤については、遺伝子を導入するための T リンパ球を採取する日より前 4 週間以内及び、二次登録 4 週間前から臨床研究終了時までの間、使用・実施を禁止する。

##### 併用禁止療法

- 1) 化学療法
- 2) 放射線療法
- 3) 手術

##### 併用禁止薬

- 1) 抗癌剤
- 2) 副腎皮質ステロイド剤 (全身投与)
- 3) 免疫抑制剤 (全身投与)

### IX. 5. 4 臨床検査項目及び観察項目

以下のとおり検査・観察を実施する。検査・観察スケジュールについては「X. 3 検査・観察スケジュール」に記載する。なお、TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態、免疫機能解析 (腫瘍特異的免疫反応)、遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度、RCR および LAM-PCR については、三重大学大学院医学系研究科遺伝子・免疫細胞治療学講座にて検査を行うものとし、当該検査のうち、PCR 法の工程はタカラバイオ (株) が担当する。

#### 同意取得日 (スクリーニング期間)

- 1) 同意取得 (一次登録)
- 2) 被験者背景

- ・性別、生年月日（年齢）、診断名、身長、体重、既往歴、合併症、過敏症の有無、前治療、併用療法・併用薬、妊娠の有無、HLA 型、MAGE-A4 発現の有無（PCR）、他の臨床試験（臨床研究）への参加の有無

3) 問診、バイタルサイン

- ・血圧、体温、脈拍数、動脈血酸素分圧または動脈血酸素飽和度

4) Performance status

5) 感染症検査

- ・HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-1 抗体

6) 臨床検査

- ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
- ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
- ・血液凝固能検査：プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン (Fgb)、フィブリン分解産物 (FDP)
- ・免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
- ・尿検査：尿定性、尿沈査
- ・腫瘍マーカー検査 (SCC、CEA、CA19-9)

7) 画像診断

- ・胸部 X 線検査、12 誘導心電図、頸部・胸部・腹部・骨盤 CT\*

8) 上部消化管内視鏡検査\*

\*：スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。

**アフエレーシス実施日（スクリーニング期間）**

1) 問診、バイタルサイン

- ・血圧、体温、脈拍数

2) Performance status

3) 臨床検査

- ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
- ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値

#### day 0 (治療期間)

- 1) 同意取得 (二次登録)
  - 2) 問診、バイタルサイン
    - ・ 血圧、体温、脈拍数、動脈血酸素分圧または動脈血酸素飽和度
  - 3) Performance status
  - 4) 臨床検査
    - ・ 血液学的検査<sup>※1)</sup>: 白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
    - ・ 血液生化学的検査<sup>※1)</sup>: AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
    - ・ 血液凝固能検査<sup>※1)</sup>: プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン (Fgb)、フィブリン分解産物 (FDP)
    - ・ 免疫血清<sup>※1)</sup>: C 反応性蛋白 (CRP)
    - ・ 尿検査<sup>※1)</sup>: 尿定性、尿沈査
    - ・ 腫瘍マーカー検査<sup>※1)</sup> (SCC、CEA、CA19-9。ただし、スクリーニング期間時高値例のみ)
  - 5) 画像診断
    - ・ 胸部 X 線検査<sup>※1)</sup>、12 誘導心電図<sup>※1)</sup>、頸部・胸部・腹部・骨盤 CT<sup>※2)</sup>、PET-CT<sup>※2)</sup>
  - 6) 上部消化管内視鏡検査<sup>※2)</sup>、腫瘍組織生検<sup>※2)</sup>
  - 7) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態 (投与前<sup>※1)</sup>、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間 (±2 時間) 後及び 12 時間 (±2 時間) 後)
    - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
  - 8) 免疫機能解析<sup>※1)</sup>
    - ・ テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
  - 9) TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度<sup>※2)</sup>、MAGE-A4 抗原発現検査<sup>※2)</sup>
    - ・ 浸潤リンパ球の検出
    - ・ PCR 法による MAGE-A4 発現
  - 10) 有害事象 (臨床検査値の異常変動含む)
    - ・ 内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置 (継続・中止の別等)、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係
- ※1) : 治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。  
※2) : 治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。

#### day 1 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
  - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
  - ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
  - ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
  - ・免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
  - ・尿検査：尿定性、尿沈査
- 4) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入リンパ球投与 24 時間(±4 時間)後)
  - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象 (臨床検査値の異常変動含む)
  - ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置 (継続・中止の別等)、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係
- 6) RCR

#### day 2 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
  - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入リンパ球投与 48 時間(±4 時間)後)
  - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象 (臨床検査値の異常変動含む)
  - ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置 (継続・中止の別等)、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

#### day 3 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
  - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入リンパ球投与 72 時間(±4 時間)後)
  - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象 (臨床検査値の異常変動含む)

- ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

#### day 7 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
  - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
  - ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
  - ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
  - ・免疫血清：C反応性蛋白 (CRP)
  - ・尿検査：尿定性、尿沈査
- 4) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
  - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
  - ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

#### day 14 $\pm$ 3 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
  - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
  - ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
  - ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
  - ・免疫血清：C反応性蛋白 (CRP)
  - ・尿検査：尿定性、尿沈査
- 4) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態

- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 免疫機能解析
- ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
- 6) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
- ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

**day 16±3（治療期間）**

- 1) 問診、バイタルサイン
- ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
- ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

**day 28±3（治療期間）**

- 1) 問診、バイタルサイン
- ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
- ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
  - ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
  - ・免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
  - ・尿検査：尿定性、尿沈査
- 4) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 免疫機能解析
- ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
- 6) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
- ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、

転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 30±3 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
  - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
  - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象 (臨床検査値の異常変動含む)
  - ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置 (継続・中止の別等)、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 35±3 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
  - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
  - ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
  - ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
  - ・血液凝固能検査：プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン (Fgb)、フィブリン分解産物 (FDP)
  - ・免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
  - ・尿検査：尿定性、尿沈査
  - ・腫瘍マーカー検査 (SCC、CEA、CA19-9。ただし、スクリーニング期間時高値例のみ)
- 4) 画像診断
  - ・胸部 X 線検査、12 誘導心電図、頸部・胸部・腹部・骨盤 CT、PET-CT
- 5) 上部消化管内視鏡検査、腫瘍組織生検
- 6) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
  - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 7) 免疫機能解析
  - ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
- 8) TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度、MAGE-A4 抗原発現検査

- ・浸潤リンパ球の検出
- ・PCR法によるMAGE-A4発現

9) RCR

10) LAM-PCR

11) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）

- ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 63±3（追跡調査期間）

1) 問診、バイタルサイン

- ・血圧、体温、脈拍数

2) Performance status

3) 臨床検査

- ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
- ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
- ・血液凝固能検査：プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン (Fgb)、フィブリン分解産物 (FDP)
- ・免疫血清：C反応性蛋白 (CRP)
- ・尿検査：尿定性、尿沈査
- ・腫瘍マーカー検査 (SCC、CEA、CA19-9。ただし、スクリーニング期間時高値例のみ)

4) 画像診断<sup>\*1)</sup>

- ・胸部X線検査、12誘導心電図、頸部・胸部・腹部・骨盤CT、PET-CT

5) 上部消化管内視鏡検査<sup>\*1)</sup>、腫瘍組織生検<sup>\*1)</sup>

6) TCR遺伝子導入リンパ球血中動態

- ・リアルタイムPCR、テトラマー解析

7) 免疫機能解析

- ・テトラマー解析、ELISPOTアッセイ、細胞内サイトカイン染色

8) TCR遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度<sup>\*1)</sup>、MAGE-A4抗原発現検査<sup>\*1)</sup>

- ・浸潤リンパ球の検出
- ・PCR法によるMAGE-A4発現

9) RCR

10) LAM-PCR

11) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）

- ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

※1)：必要に応じて実施する。

**研究終了後の追跡調査**

- 1) RCR※1)
- 2) LAM-PCR※1)
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態※1)

※1)：生存期間（FDA のガイドライン(76)に従い、最短 15 年間）にわたり、1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施する。

IX. 5. 5 予測される副作用及びその対処方法

IX. 5. 5. 1 アフェレーシスに伴う副作用

1) 血管ルート確保に関すること

両側前肘部に十分な太さの血管がなく、鎖骨下静脈又は鼠径静脈に穿刺する場合、まれに出血、感染、気胸の合併の危険がある。穿刺皮膚部位を十分に消毒し、手技に習熟した医師が行う。また、常に救急カート等の設備を整え、出血、気胸の対処に備える。

2) 迷走神経反射

精神的緊張、不安、体調不良等の原因により血管迷走神経反射が起こり、約 10%のドナーでめまい、吐き気、嘔吐（グレード 1）が出現し、重篤な場合、意識障害、嘔吐、血圧低下、徐脈（グレード 2）、さらに高度では痙攣、失禁（グレード 3）がみられることもある。対処法は、グレード 1 の副作用が出現した場合、採取を一時休止して頭位を下げ、生理食塩水の点滴を行い、経過観察する。症状が容易に改善した場合は、厳重な観察の下、採取速度を低下させて採取を再開する。再度、症状が出現した場合は採取を中止とする。グレード 2 以上の副作用が出現した場合は、直ちに採取を中止し、補液、昇圧剤、硫酸アトロピン投与等、必要な処置を行う。

3) クエン酸反応

抗凝固剤に含まれるクエン酸による低カルシウム血症をきたすことがある。軽症では口唇、手指のしびれ感が出現する。また、進行により症状が悪化する他、手指の突っ張り感が出現する。対処法は、軽症の症状が出現した場合、採取速度を低下させて観察するが、それでも改善しない場合、グルコン酸カルシウムを緩徐に静注する。

4) 血小板減少

アフェレーシスの際に血小板も除去されるため、アフェレーシス後に血小板減少が高頻度（50%以上）にみられ、また、 $50,000/\text{mm}^3$  未満の高度の減少も 5%前後みられており、注意を要する。対処法は、アフェレーシス終了後 1 週間位は必ず血小板をチェックし、採取

前値への回復を確認する。また、アフエレーシス開始から終了までアスピリン製剤は使用しない。

#### IX. 5. 5. 2 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用

##### 1) 発熱、発疹、アレルギー類似反応等

TCR 遺伝子を導入し、一旦凍結後に解凍したリンパ球を投与した際に、解凍に伴い一部崩壊した細胞内のサイトカイン等による発熱、悪寒、皮疹、関節痛、嘔気等をきたす可能性がある。対処法は、経過観察、あるいは解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の適切な薬剤を投与する。また、グレード3以上の場合には副腎皮質ステロイド剤の投与を行う。

##### 2) 肺障害

重篤な輸血副作用として輸血関連急性肺障害 (TRALI: Transfusion-Related Acute Lung Injury) が知られている。抗白血球抗体 (抗 HLA 抗体、抗顆粒球抗体) による抗原抗体反応が原因と推測されているが、詳細は不明である。本臨床研究は自己血液細胞輸注によるものであり、TRALI 類似病態発症の可能性は考えにくい。TCR 遺伝子導入リンパ球投与後の肺障害に留意すべきと考えられる。対処法として、発症時は副腎皮質ステロイド剤の大量投与等、適切な処置を行う。

##### 3) 免疫反応に伴う事象

本臨床研究の標的抗原であるMAGE-A4は、Cancer-Testis抗原 (癌精巣抗原) の一つであり、腫瘍特異性が極めて高い。精巣組織ではHLA分子の発現が欠失しているため、正常組織への細胞傷害の可能性は極めて低いが、自己免疫疾患様症状 (発熱、皮疹、関節痛、筋肉痛等) には常に留意する必要がある。対処法は、グレード1では無処置で経過観察するが、グレード2以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与する。

##### 4) レトロウイルスベクターを用いる危険性

「VII. 1. 3 増殖性ウイルス出現の可能性」に記載のとおり、本臨床研究においてはRCRが出現する可能性は極めて低いと考えられるが、完全には否定できない。よって、本臨床研究では被験者体内におけるRCR出現をRT-PCR法によってモニタリングすることにより、評価を行う予定である。万が一、RCRが出現した場合には、抗ウイルス剤によるウイルス感染症治療等の最善の治療を行う。

「VII. 1. 8 癌原性の有無」に記載のとおり、レトロウイルスベクターで遺伝子導入したTリンパ球を投与することによる癌化の危険性は極めて低いと考えられるが、完全には否定できない。よって、本臨床研究では遺伝子導入細胞の被験者体内におけるクローン増殖をLAM-PCRによってモニタリングすることにより、評価を行う予定である。万が一、異常増殖が認められた場合には、当該クローンの遺伝子導入位置の同定や染色体検査等を行うとともに化学療法等の最善の治療を行う。

### IX. 5.5.3 ペプチド投与に伴う副作用

MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドは不完全フロイントアジュバント（商品名：MONTANIDE™ ISA 51、SEPPIC 社）とともに 2 回皮下投与される。CTL 認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究は種々行われており、現在までに重篤な副作用の報告はない。軽微な副作用として、皮膚反応（注射部位の発赤、腫脹）、微熱、倦怠感等が報告されている。本臨床研究ではペプチド反応性 T 細胞の頻度を上昇させた状態においてペプチドを投与する。ペプチド反応性 T 細胞の活性化に伴う微熱、倦怠感等の症状、あるいは予測できない症状が出現する可能性は否定できないが、これまでの異なるペプチド等の抗原と T 細胞を用いた同様な臨床試験ではそのような機序によると考えられる副作用の出現は報告されていない。副作用発生時の対処法は、グレード 1 の場合、無処置にて経過観察とするが、グレード 2 以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与する。

### IX. 5.6 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準

#### IX. 5.6.1 主要評価項目

##### ・安全性の評価

##### 1) 有害事象

有害事象とは、遺伝子導入 T リンパ球投与以降に被験者に生じるあらゆる好ましくないあるいは意図しない症状、徴候（臨床検査値の異常も含む）又は病気のことであり、当該治療との因果関係の有無は問わない。

重篤な有害事象とは、以下のものをいう。

1. 死亡に至るもの
2. 死亡につながるおそれのあるもの
3. 治療のため入院又は入院期間の延長が必要なもの
4. 障害（永続的又は顕著な障害もしくは機能不全に陥るもの）
5. 障害につながるおそれのあるもの
6. 上記 1 から 5 に準じて重篤であるもの
7. 後世代における先天性の疾病又は異常をきたすもの

総括責任者又は分担研究者は、本臨床研究実施期間中に発現した有害事象について、その内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係（明らかに関連あり、多分関連あり、関連あるかもしれない、関連なし）を調査する。なお、本臨床研究との因果関係を否定できない有害事象については、原則として消失又は軽快するまで追跡調査を行う。

発現した有害事象のグレードは、2003 年に米国 National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE v3.0) 有害事

象共通用語規準 v3.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版-2007年3月8日」に従い、判定を行う(表3)。また、CTCAE v3.0に記載のないもので、発現が予想される有害事象についてもCTCAE v3.0に準じて判定を行うものとする。

表3 有害事象のグレード

Grade 1	軽度の有害事象
Grade 2	中等度の有害事象
Grade 3	高度の有害事象
Grade 4	生命を脅かす又は活動不能とする有害事象
Grade 5	有害事象による死亡

## 2) 臨床検査

総括責任者又は分担研究者は、臨床検査値の正常・異常について判定する(大阪大学医学部附属病院の基準範囲を逸脱した場合、「異常」と判定する)。

また、総括責任者又は分担研究者は、臨床検査値の異常変動の有無について判定する。異常変動「有」とは、正常値→異常値もしくは異常値→異常値の増強がみられた場合、その臨床的意義を考慮して判定する(これに該当しない場合においても、その変動の臨床的意義を考慮した結果、異常変動「有」と判断した場合も含まれる)。なお、異常変動の有無の判定について、正常値→異常値もしくは異常値の増強が見られ、かつ異常変動「無」と判断した場合には、その理由について、臨床経過を踏まえて考察を行う。

## 3) RCR

本臨床研究期間中のRCRの出現の有無を検討する。検体からtotal RNAを調製してランダムプライマーで逆転写反応を行い、GaLVのエンベロープ遺伝子領域に設定した検出用プライマーを用いてPCRを行う。PCR生成物をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行って特異的増幅バンドの有無を確認する。

## 4) LAM-PCR

TCR遺伝子導入リンパ球のクローナリティーを検討する。検体から調製したゲノムDNAを鋳型としてLAM-PCR反応を行い、反応産物をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色による泳動パターンによりクローナリティーを確認する。

### IX.5.6.2 副次的評価項目

#### ・TCR遺伝子導入リンパ球の血中動態

被験者から末梢血採取し、Ficoll等を用いた比重遠心法により分離したPBMCについて、以下の試験を行う。

#### 1) TCR 遺伝子導入細胞の定量

分離した PBMC より QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN 社) や PUREGENE Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems 社) 等のキットを用いてゲノム DNA を調製する。調製したゲノム DNA をテンプレートとして、Cycleave 法を用いたベクター及び IFN- $\gamma$  の定量的 PCR を行う。ベクターの定量的 PCR の結果をそれぞれ IFN- $\gamma$  に対する定量的 PCR の結果で割ることによりノーマライズし、末梢血リンパ球における導入 TCR の定量化を行う。

#### 2) テトラマー解析による TCR 発現細胞の血中頻度測定

分離した PBMC と PE 標識化 HLA-A2402/ MAGE-A4<sub>143-151</sub> テトラマーとを 37°C、10 分~30 分間反応させ、その後、細胞表面マーカーに対する抗体を用いた染色を加えた後洗浄し、フローサイトメトリー解析を行い、末梢血 T 細胞中の導入 TCR 発現細胞の比率を測定する。

#### ・ TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織への浸潤度

治療期間中、腫瘍組織又はリンパ節の生検の可能な病変を有し、侵襲的検査のリスクが少ないと判断される場合、生検を行う。

生検試料について、以下の試験を行う。

#### 1) 腫瘍における抗原の発現の評価\*

腫瘍塊の一部を採取後速やかに RNeasy Lysis Buffer (Qiagen 社) を用いて保存する。保存した腫瘍塊を Trizol (Invitrogen 社) 中でホモジナイズし RNA を抽出する。抽出した RNA は RNeasy カラム (Qiagen 社) 等を用いて精製する。精製した RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を作製する。作製した cDNA をテンプレートとして MAGE-A4 の発現を定量的 PCR にて定量する。MAGE-A4 の発現はハウスキーピング遺伝子 GAPDH 発現でノーマライズし、GAPDH 発現 10,000 コピー当たりの MAGE-A4 発現コピー数により評価する。MAGE-A4 発現陽性の判断基準は、GAPDH 発現 10,000 コピー当たり MAGE-A4 発現が 50 コピー以上とする。

\*: 試験方法は参考資料 17 「MAGE-A4 抗原発現検査プロトコール」参照。

#### 2) 生検組織内へのリンパ球浸潤度の評価

腫瘍塊の一部をホルマリン固定し、パラフィン組織切片を作製する。作製したパラフィン組織切片と抗ヒト CD3 抗体及び抗ヒト CD8 抗体を用いて、生検組織内へのリンパ球の浸潤を評価する。

また、腫瘍塊の一部からゲノム DNA を調製し、TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態の解析における「TCR 遺伝子導入細胞の定量」で用いた手法と同様の手法により、生検組織内のリンパ球中の導入 TCR の定量化を行う。

#### ・ 腫瘍特異的免疫反応

被験者から末梢血を採取し、Ficoll 等を用いた比重遠心法により分離した PBMC について、以下の試験を行う。

### 1) ELISPOT アッセイによる MAGE-A4 反応性 T リンパ球の定量

分離した PBMC を MACS ビーズ (Miltenyi 社) を用いて、CD8 陽性細胞と CD8 非陽性細胞に分離する。CD8 非陽性細胞を 40 Gray にて放射線照射し、MAGE-A4 ペプチドをパルスし刺激細胞とする。CD8 陽性細胞と作製した刺激細胞を IL-2 (20 IU/ml) と IL-7 (40 ng/ml) 存在下に 37°C で 7 日から 10 日間培養する。その後、被験者由来 PBMC に EB ウイルスを感染させて樹立した B 細胞株 (EBV 細胞株) 又は被験者由来 PBMC を Con-A を用いて刺激し樹立した活性化 T 細胞株 (T-APC) に MAGE-A4 ペプチドをパルスした細胞を標的細胞とし ELISPOT アッセイを行う。ELISPOT アッセイは抗 IFN- $\gamma$  抗体をコーティングした ELISPOT プレート (Millipore 社) に培養 CD8 陽性細胞と標的細胞を入れ、1 日間培養し、細胞を洗浄後 2 次抗体 (ビオチン化抗 IFN- $\gamma$  抗体) とアルカリホスファターゼ標識化ストレプトアビジンを反応後、基質を加え発色させ、CD8 陽性 T 細胞から産生された IFN- $\gamma$  をスポットとして可視化し、MAGE-A4 特異的 T 細胞の存在を確認する。陰性コントロールとして、ペプチド非パルス標的細胞およびコントロールペプチド (HER2 由来 HLA-A2402 結合性ペプチド HER2<sub>63-71</sub>:TYLPTNASL) パルス標的細胞を用いる。

### 2) テトラマーによる MAGE-A4 反応性 T リンパ球の定量

分離した PBMC をそのまま、又は上記 ELISPOT アッセイと同様に MAGE-A4 ペプチドにより 7 日から 10 日間刺激培養した CD8 陽性 T 細胞を用いて、PE 標識化 HLA-A2402/ MAGE-A4<sub>143-151</sub> テトラマーと 37°C、10~30 分間反応させ、その後、細胞表面マーカーに対する抗体を用いた染色を加えた後洗浄し、フローサイトメトリー解析を行い、末梢血 T 細胞中の導入 TCR 発現細胞の比率を測定する。

### 3) 細胞内サイトカイン染色による MAGE-A4 反応性 T リンパ球の反応特性の解析

採取 PBMC 量が十分である場合は、上記テトラマー解析の際に細胞内サイトカイン染色を加えることにより MAGE-A4 反応性 T リンパ球の反応特性の解析を行う。PBMC をそのまま、又は刺激培養した CD8 陽性 T 細胞を、ELISPOT アッセイに使用する標的細胞と同様の手法により調製した標的細胞と GolgiStop (BD Bioscience 社) の存在下で数時間培養し、Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience 社) を用いて固定・穿孔化後に、抗サイトカイン抗体を用いて細胞内サイトカイン染色を行い、サイトカインの産生特性を解析する。

#### ・腫瘍縮小効果

「RECIST ガイドライン (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)」(77)にしたがって、腫瘍縮小効果を判定する (X.6)。

#### IX.5.6.3 中止基準

##### ・被験者ごとの中止基準

本臨床研究期間中に以下のような事例が発生した場合、総括責任者又は分担研究者は当該被験者における本臨床研究を中止する。また、必要な検査・観察を行うとともに、共同

実施医療機関の総括責任者、及び大阪大学医学部附属病院長に本臨床研究を中止した旨を連絡する。なお、有害事象の発現や対象疾患の悪化等、安全性に問題が生じ中止した場合、総括責任者又は分担研究者は速やかに適切な処置を行い、被験者の安全性が確認されるまで追跡調査を実施する。

- 1) 被験者が同意を撤回した場合
- 2) 本臨床研究開始後に対象として不適格であることが判明した場合
- 3) 本臨床研究継続困難な有害事象が発現した場合
- 4) 本臨床研究継続困難な対象疾患の悪化が生じた場合
- 5) その他、総括責任者又は分担研究者が本臨床研究の中止が必要と判断した場合

#### ・研究全体の中止

総括責任者又は分担研究者は以下の情報が得られ、臨床研究全体の続行が困難であると考えられる場合、安全・効果評価・適応判定中央部会に本臨床研究全体の中止について審査を依頼する。審査の結果、中止が決定した場合には、大阪大学医学部附属病院長及び共同実施医療機関の総括責任者に中止した旨を報告する。研究担当者は被験者に対し、可能な限り必要な検査・観察を行う。

- 1) 本臨床研究との因果関係を否定できない重篤な有害事象が発生した場合
- 2) 総括責任者又は分担研究者が本臨床研究の継続が不適切であると判断する情報を入力した場合

### IX. 5. 7 有害事象が発現した場合の措置

#### IX. 5. 7. 1 有害事象が発現した場合

総括責任者又は分担研究者は、有害事象に対する医療が必要になったことを知った場合、被験者にその旨を伝える。また、総括責任者又は分担研究者は、有害事象の発現に際して適切な処置を施し、被験者の安全確保に留意し、その原因究明に努める。

#### IX. 5. 7. 2 重篤な有害事象が発現した場合

総括責任者又は分担研究者は重篤な有害事象の発生を察知した場合は、「IX. 5. 7. 1 有害事象が発現した場合」の対応を行う。また、総括責任者は、本臨床研究薬との因果関係の有無に係わらず、重篤な有害事象の発現を察知した時点から72時間以内に大阪大学医学部附属病院長及び本臨床研究を実施している全ての総括責任者へ「重篤な有害事象に関する報告書（速報）」をもって報告を行う。なお、大阪大学医学部附属病院長への報告については分担研究者が行うことも可能とする。

総括責任者は、重篤な有害事象の発現を察知した時点から7日以内に大阪大学医学部附属

病院長、本臨床研究を実施している全ての総括責任者及び安全・効果評価・適応判定中央部会へ「重篤な有害事象に関する報告書（詳細報）」をもって報告を行う。

なお、大阪大学医学部附属病院長は、被験者が死亡もしくは因果関係の否定できない重篤な有害事象（因果関係：「関連なし」以外）に関する報告を受けた場合には、速やかにその概況及び対処の方針を第一報として厚生労働省大臣官房厚生科学課に報告し、15日以内を目安に文書にて厚生労働大臣に報告する。

表4 有害事象報告の必要性の有無について

	重篤な有害事象			非重篤な有害事象
	死亡 (因果関係問わず)	因果関係		
		否定 できない	なし	
厚生科学課及び大臣への報告	必要	必要	不要	不要
安全・効果評価・適応判定部会 医療機関の長への報告	必要	必要	必要	不要

#### IX. 5. 8 症例記録に関する記録用紙等の様式

総括責任者又は分担研究者は、本臨床研究専用の症例報告書を作成する。症例報告書に記載されたデータのうち、総括責任者又は分担研究者のコメント及び有害事象の重篤性、本臨床研究との因果関係等、判定に関する事項については症例報告書の記載をもって原データとする。

#### IX. 5. 9 記録の保存及び成績の公表の方法

記録の保存は大阪大学医学部附属病院長が指名した保管責任者が行う。保管責任者は適切な状態の下で、本臨床研究終了後少なくとも5年間保存するものとする。

成績の公表は、被験者の同意のもと、研究者全員の合意を得て行う。公表の際には、被験者のプライバシーに十分配慮し、個人情報特定できないよう必要な措置を講じる。

#### IX. 5. 10 個人情報の保護の徹底

##### IX. 5. 10. 1 個人情報保護に関する責務

大阪大学における個人情報の取扱いに関しては、独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律（平成15年5月30日法律第59号）その他関係法令に定めるものの他、国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程（平成17年4月1日施行）に必要な事項を定めている。

大阪大学における保有個人情報の管理に関する事務を総括するものとして理事（総務・企画・評価担当）を総括保護管理者に置き、総括保護管理者の下に保護管理者、保護担当者を置くことにより、個人情報保護管理の徹底を行っている。

大阪大学医学部附属病院においては、大阪大学医学部附属病院長が総括保護管理者から保護管理者として指名を受けており、大阪大学医学部附属病院長は国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程、大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程（平成17年4月1日施行）に従い、組織的に個人情報保護に対する措置を図っている。保護管理者である大阪大学医学部附属病院長はこれらの規程に従い、本臨床研究に関する個人情報保護に関する措置に関し、適正な実施を確保するために必要があると認めるときは、本臨床研究の総括責任者に対して、適宜必要な措置を講ずることができる。

#### IX. 5. 10. 2 個人情報の取得と利用に関する制限

##### 1) 診療・教育機関としての大阪大学医学部附属病院における個人情報の一般的な取扱い

大阪大学医学部附属病院は診療・教育機関として、良質な医療を提供すると共に、医療人の育成と医療の発展に貢献するという社会的使命の実現に向けて、一般的な診療行為・教育に関する以下に挙げる目的に限り、患者の個人情報を使用する。この使用に関しては、個人情報の保護の法律に基づいた国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程、大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程、研究活動の実施に関する法令や倫理指針等を遵守したうえで取り扱われる。また、大阪大学医学部附属病院を受診する患者には、大阪大学医学部附属病院で使用する個人情報の目的についての理解と協力を求めている。

##### (1) 大阪大学医学部附属病院での利用

- ・患者に提供する医療サービス
- ・医療保険事務
- ・患者に関係する管理運営業務（入退院等の病棟管理、会計・経理、医療事故の報告、医療サービスの向上）
- ・医療サービスや業務の維持・改善のための基礎資料

##### (2) 大阪大学医学部附属病院及び大阪大学での利用

- ・医学系教育
- ・症例に基づく研究
- ・外部監査機関への情報提供（本利用に当たっては、可能な限り匿名化する）

##### (3) 他の事業者等への情報提供

- ・他の病院、診療所、助産所、薬局、訪問看護ステーション、介護サービス事業者等との医療サービス等についての連携
- ・他の医療機関等からの医療サービス等についての照会への回答
- ・患者の診療等にあたり外部の医師等の意見・助言を求める場合
- ・検体検査業務の委託その他の業務委託
- ・家族等への病状説明

- ・医療保険事務（保険事務の委託、審査支払機関へのレセプトの提出）
- ・審査支払機関又は保険者からの照会への回答
- ・関係法令等に基づく行政機関及び司法機関等への提出等
- ・関係法令に基づいて事業者等からの委託を受けて健康診断を行った場合における、事業者等へのその結果通知
- ・医師賠償責任保険等に係る医療に関する専門の団体、保険会社等への相談又は届出等

## 2) その他本臨床研究の遂行に必要な被験者の個人情報の利用・取扱い

上記の診療・教育機関として的大阪大学医学部附属病院における個人情報の一般的な取扱いに加え、本臨床研究の遂行における個人情報の利用・取扱いについては、総括責任者はあらかじめ被験者の個人情報の利用目的を公表している場合を除き、速やかに、その利用目的を被験者に通知し、又は公表しなければならない。

本臨床研究で扱う被験者の診療録をはじめとする個人情報は、主として病状経過観察、本臨床研究の緊急事態発生のための連絡等、被験者の生命を守るために使用する。その他、特別な目的で使用する場合は、事前に被験者に説明し、了承を得てから使用する。

また、本臨床研究の成果検討時や医療向上のため等を目的に本臨床研究成績等を公表・公開する場合は、個人を特定できない形すなわち個人情報を保護して公開する。これらのことは、被験者への同意・説明文書中に記載し、被験者へ個人情報の保護及び使用目的について通知し、同意を得る計画とした。

被験者の同意取得は、自由意思によるものであり、本臨床研究に参加しない場合であっても被験者の不利益はない。このことは医学研究を行ううえで大切な倫理であるため、本臨床研究では、これらのことを同意・説明文書に記載し、被験者へ通知する。

総括責任者は利用目的の達成に必要な範囲内において、個人情報を正確かつ最新の内容に保つよう努めなければならない。

### IX. 5. 10. 3 個人情報保護に関する安全管理措置

大阪大学医学部附属病院長は国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程及び大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程に従い、個人情報保護に関して、組織的、人的、物理的及び技術的に安全性管理措置を実施し、個人情報の漏洩、滅失又は棄損の防止に対する措置を講じている。一方で個人情報の漏洩等に係わる新しい犯罪手法等が急速な勢いで多様化していることを鑑み、本臨床研究では規程等の柔軟な運用をもって、個別に適切な対応を行う。

さらに本臨床研究では、死者に関する個人情報が死者の人としての尊厳や遺族の感情及び遺伝情報が血縁者と共通していることに鑑み、生存する個人に関する情報と同様に死者に関する個人情報についても同様の措置を講じている。

#### IX. 5. 10. 4 第三者提供の制限

総括責任者は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」第六章第九で掲げる内容に従い、あらかじめ被験者の同意を得ずに個人情報を第三者に提供してはならない。本臨床研究では、タカラバイオ（株）が外部協力者として「ウイルスベクターに関する基礎的助言及び遺伝子導入 T リンパ球調製技術の提供と助言、遺伝子導入細胞製剤の体内動態検査、RCR 検査及び LAM-PCR に関する技術提供」に限定し、間接的に関与する。したがって、タカラバイオ（株）の担当者が研究協力のために一部データを閲覧する予定であるが、治験と同様に被験者識別コードを用いることにより個人を特定できない措置を講じて個人情報を保護する。なお、被験者識別コードから被験者を特定する情報については、総括責任者が厳重に管理するものとする。また、事前にその旨を被験者に通知し、文書にて同意を取得する（一部データとは、ウイルスベクター及び遺伝子導入 T リンパ球の調製に限定されたものであり、本臨床研究のデータの客観的かつ公正な記録はその意向に影響を受けることはない）。その他第三者への個人情報の提供は予定していないが、第三者への個人情報の提供を行う場合には、適切な目的であることを確認し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」第六章第九に従い、その旨を被験者へ通知する。

#### IX. 5. 10. 5 個人情報の開示、訂正、利用停止等

総括責任者は、保有する個人情報に関し、次に掲げる事項について、被験者等の知り得る状態にしなければならない。

- 1) 臨床研究実施機関の名称
- 2) 個人情報の利用目的
- 3) 個人情報の開示、訂正、利用停止等に関する手続き
- 4) 苦情の申し出先

本臨床研究においては、1)、2)、4)について同意・説明文書に明記した。また、3)については、それらの手続きができることを同意・説明文書に明記し、その申し出に応じて、手続きの詳細を大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程に従い、被験者に説明する。

総括責任者は被験者から当該被験者が識別される保有する個人情報についての開示、訂正、利用停止等について、大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程に従い求めがあった場合は、遅滞なく必要な対応を行う他、対応結果について被験者に通知しなければならない。

さらに、大阪大学医学部附属病院では個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口を設置し、被験者からの苦情や問い合わせ等に適切かつ迅速に対応できる体制を整えている。

【個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口】

大阪大学医学部附属病院 個人情報相談窓口

個人情報に関する内容と開示請求について：総務課広報評価係（TEL：06-6879-5020）

診療記録開示の手続き：医療課医事係（TEL：06-6879-5206）

## X. その他必要な事項

### X.1 遵守する法令/省令等

本遺伝子治療臨床研究は、以下の法令/省令等を遵守して実施される。

1. 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」  
(平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第二号、平成 16 年 12 月 28 日、  
平成 20 年 12 月 1 日一部改正)
2. 「臨床研究に関する倫理指針」  
(厚生労働省告示第四百十五号、平成 20 年 7 月 31 日)
3. 「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」  
(薬食発第 0219011 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成 16 年  
2 月 19 日)
4. 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」  
(薬発第 1062 号、各都道府県知事あて厚生省薬務局長通知、平成 7 年 11 月 15 日)
5. 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について」  
(医薬発第 329004 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬局長通知、平成 14 年 3 月  
29 日)
6. 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」  
(平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号)

## X.2 引用文献

1. がん研究振興財団. がんの統計 2009 年版
2. 横山 顕. 12-12 食道がん、頭頸部がんのリスクとアルコール代謝酵素の関連に関する研究 (厚生労働省がん研究助成金研究)
3. The Japan Society for Esophageal Disease. Comprehensive Registry of Esophageal Cancer in Japan (1998,1999) and long-term results of esophagectomy in Japan (1988-1997) 3<sup>rd</sup> Edition, 2002.
4. 日本食道疾患研究会. 食道癌治療ガイドライン 2007 年 4 月版
5. Haier J, Owzcareck M, Guller U, et al. Expression of MAGE-A cancer/testis antigens in esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 26:2281-2287, 2006.
6. Akcakanat A, Kanda T, Tanabe T, et al. Heterogeneous expression of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A and SSX proteins in esophageal cancer: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 118:123-128, 2006.
7. Friess H, Fukuda A, Tang WH, et al. Concomitant analysis of the epidermal growth factor receptor family in esophageal cancer: overexpression of epidermal growth factor receptor mRNA but not of c-erbB-2 and c-erbB-3. *World J Surg* 23:1010-1018, 1999.
8. Laskin JJ, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 30:1-17, 2004.
9. Yee C, Thompson JA, Byrd D, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16168-16173, 2002.
10. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-854, 2002.
11. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23:2346-2357, 2005.
12. Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, et al. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24(31):5060-5069, 2006.
13. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-129, 2006.

14. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114(3):535-546, 2009.
15. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest* 115(6):1616-1626, 2005.
16. Gattinoni L, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, et al. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6(5):383-393, 2006.
17. Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, et al. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 198(4):569-580, 2003.
18. Lou Y, Wang G, Lizée G, et al. Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of adoptively transferred T cells in vivo. *Cancer Res* 64(18):6783-6790, 2004.
19. Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, et al. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 174(5):2591-2601, 2005.
20. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 202(7):907-912, 2005.
21. Wrzesinski C, Paulos CM, Gattinoni L, et al. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells. *J Clin Invest* 117(2):492-501, 2007.
22. Powell DJ Jr, Dudley ME, Hogan KA, et al. Adoptive transfer of vaccine-induced peripheral blood mononuclear cells to patients with metastatic melanoma following lymphodepletion. *J Immunol* 177(9):6527-6539, 2006.
23. Noguchi Y, Chen YT and Old LJ. A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(8):3171-3175, 1994.
24. Nava-Parada P, Forni G, Knutson KL, et al. Peptide vaccine given with a Toll-like receptor agonist is effective for the treatment and prevention of spontaneous breast tumors. *Cancer Res* 67(3):1326-1334, 2007.
25. Boon T and Old LJ. Cancer Tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9(5):681-683, 1997.
26. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, et al. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:175-208, 2006.
27. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Immunologic and therapeutic

- evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4(3):321-327, 1998.
28. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411(6835):380-384, 2001.
  29. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188:22-32, 2002.
  30. Simon RM, Steinberg SM, Hamilton M, et al. Clinical trial designs for the early clinical development of therapeutic cancer vaccines. *J Clin Oncol* 19(6):1848-1854, 2001.
  31. Weber JS, Hua FL, Spears L, et al. A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma. *J Immunother* 22(5):431-440, 1999.
  32. Cormier JN, Salgaller ML, Pevette T, et al. Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am*. 3(1):37-44, 1997.
  33. Salgaller ML, Marincola FM, Cormier JN, et al. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res* 56(20):4749-4757, 1996.
  34. Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, et al. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* 5(10):2756-2765, 1999.
  35. Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, et al. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(31):12837-12842, 2007.
  36. Miyahara Y, Naota H, Wang L, et al. Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11(15):5581-5589, 2005.
  37. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475-480, 1995.
  38. Onodera M, Ariga T, Kawamura N, et al. Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91:30-36, 1998.
  39. Riddell SR, Elliott M, Lewinsohn DA, et al. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med* 2:216-23, 1996.

40. Heslop HE, Ng CY, Li C, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 2:551-555, 1996.
41. Dunbar C, Kohn D. Retroviral mediated transfer of the cDNA for human glucocerebrosidase into hematopoietic stem cells of patients with Gaucher disease. A phase I study. *Hum Gene Ther* 7:231-253, 1996.
42. Toneguzzo F, Hayday AC, Keating A. Electric field-mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 6:703-706, 1986.
43. Ohtani K, Nakamura M, Saito S, et al. Electroporation: application to human lymphoid cell lines for stable introduction of a transactivator gene of human T-cell leukemia virus type I. *Nucleic Acids Res* 17:1589-1604, 1989.
44. Harui A, Suzuki S, Kochanek S, et al. Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J Virol* 73:6141-6146, 1999.
45. Hanazono Y, Brown KE, Dunbar CE. Primary T Lymphocytes as Targets for Gene Therapy. *J Hematother Stem Cell Res* 9:611-622, 2000.
46. Miller AD, Garcia JV, von Suhr, et al. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65:2220-2224, 1991.
47. 渡辺 格、福見秀雄 編集. ウイルスの研究 181, 1984.
48. Weiss R, et al. RNA TUMOR VIRUSES, 901-911, 1982.
49. Kim S, Lee K, Kim MD, et al. Factors affecting the performance of different long terminal repeats in the retroviral vector. *Biochem Biophys Res Commun* 343(4):1017-1022, 2006.
50. Yu SS, Kim J-M, Kim S. High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Therapy* 7:797-804, 2000.
51. Lee J-T, Yu SS, Han E, et al. Engineering the splice acceptor for improved gene expression and viral titer in an MLV-based retroviral vector. *Gene Therapy* 11:94-99, 2004.
52. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 6:2895-2902, 1986.
53. 早川堯夫、山崎修道、延原正弘 編集. バイオ医薬品の品質・安全性評価 第2部、第1章、第1節 レトロウイルスベクター, 351-363.
54. Chong H, Vile RG. Replication-competent retrovirus produced by a 'split-function' third generation amphotropic packaging cell line. *Gene Therapy* 3:624-629, 1996.

55. Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, 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.
56. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419, 2003.
57. Check E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433:561, 2005.
58. Commentary from the Board of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) Fourth case of leukaemia in the first SCID-X1 gene therapy trial, and the diversity of gene therapy.
59. Recommendations of the Gene Therapy Advisory Committee/Committee on Safety of Medicines Working Party on Retroviruses. *Hum Gene Ther* 16:1237-1239, 2005.
60. Thrasher A and Gaspar B. Severe Adverse Event in Clinical Trial of Gene Therapy for X-SCID. ([http://www.esgct.org/upload/X-SCID\\_statement\\_AT.pdf](http://www.esgct.org/upload/X-SCID_statement_AT.pdf)) December 18, 2007.
61. Board of the European Society of Gene and Cell Therapy, Executive Committee of the Clinigene Network of Excellence, Executive of the Consort Integrated Project. Case of Leukaemia Associated with X-Linked Severe Combined Immunodeficiency Gene Therapy Trial in London. *Hum Gene Ther* 19(1):3-4, 2008.
62. Williams DA. An international conversation on Stem Cell Gene Therapy. 4th Stem Cell Conference on Stem Cell Gene Therapy, Thessaloniki, Greece, 13-17 September 2007. *Mol Ther* 15(12):2058-2059, 2007.
63. Fischer A and Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet* 371:2044-2047, 2008.
64. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 360(5):447-458, 2009.
65. Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting June 10, 2004 (Revised in February 2005)
66. Baum C, Kustikova O, Modlich U, et al. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 17:253-263, 2006.
67. Recchia A, Bonini C, Magnani Z, et al. Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1457-1462, 2006.
68. Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, et al. Adoptive transfer of cloned

- melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24:363-373, 2001.
69. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 25:243-251, 2002.
  70. Schumacher TNM. T-cell-receptor gene therapy. *Nature Rev Immunol* 2:512-519, 2002.
  71. Sauce D, Tonnelier N, Duperrier A, et al. Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions. *J Hematother Stem Cell Res* 11:929-40, 2002.
  72. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature Rev Cancer* 3:666-675, 2003.
  73. Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus<sup>+</sup> Hodgkin's disease. *J Exp Med* 200:1623-1633, 2004.
  74. Rosenberg SA, Yang JC and Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10(9):909-915, 2004.
  75. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14639-14645, 2004.
  76. Guidance for Industry Gene therapy Clinical Trials - Observing Subjects for Delayed Adverse Events
  77. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 92:205-216, 2000.

X.3 検査・観察スケジュール

表5 検査・観察スケジュール

臨床研究期間	スクリーニング期間		治療期間										追跡調査期間
	同意取得日	アフェレーシス実施日	day0*	day1	day2	day3	day7	day14±3	day16±3	day28±3	day30±3	day35±3	
入院		○	○										
同意取得	○		○										
一次登録	○												
二次登録			○										
被験者背景	○												
アフェレーシス		○											
TCR 遺伝子導入リンパ球投与			○										
MAGE-A4 ペプチド投与								○		○			
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
動脈血酸素分圧/動脈血酸素飽和度	○		○										
一般状態 (PS)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○												
血液学的検査	○	○	○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○
血液生化学的検査	○	○	○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○
血液凝固能検査	○		○ <sup>2</sup>									○	○
免疫血清 (CRP)	○		○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○
尿検査	○		○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○
腫瘍マーカー	○		○ <sup>2,4</sup>									○ <sup>4</sup>	○ <sup>4</sup>
胸部 X線検査	○		○ <sup>2</sup>									○	○ <sup>5</sup>
12誘導心電図	○		○ <sup>2</sup>									○	○ <sup>5</sup>
頸部・胸部・腹部・骨盤 CT	○ <sup>1</sup>		○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
PET-CT			○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
上部消化管内視鏡検査	○ <sup>1</sup>		○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
腫瘍組織生検			○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
TCR 遺伝子導入リンパ球			○ <sup>7</sup>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血中動態用採血 <sup>6</sup>													
免疫機能解析用採血			○ <sup>2</sup>					○		○		○	○
TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度、MAGE-A4 発現検査			○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
RCR <sup>6</sup>				○ <sup>8</sup>								○	○
LAM-PCR <sup>6</sup>												○	○
採血量 (mL)	15	-	110	23	10	10	18	68	10	68	10	70	70
有害事象			←										→

\*アフェレーシス実施日より約 40 日後 (遺伝子導入細胞製剤の調製・QC に要する日数により異なる)。

1. スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。
2. 治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。
3. 治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。
4. スクリーニング期間の測定値が高値例のみ実施。
5. 必要に応じて実施。
6. 臨床研究終了後も 1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施。
7. TCR 遺伝子導入リンパ球投与前 (治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする)、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間 (± 2 時間) 後、及び 12 時間 (± 2 時間) 後。
8. 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法として、個室管理を解除する前に実施。

X.4 TNM 病期分類 (TNM Classification of Malignant Tumours)

表 6 TNM 病期分類

病期分類			
0 期	Tis	NO	MO
I 期	T1	NO	MO
IIA 期	T2	NO	MO
	T3	NO	MO
IIB 期	T1	N1	MO
	T2	N1	MO
III 期	T3	N1	MO
	T4	N に関係なく	MO
IV 期	T, N に関係なく		M1
IVA 期	T, N に関係なく		M1a
IVB 期	T, N に関係なく		M1b

[UICC International Union Against Cancer - 第 6 版 (2002 年) 抜粋-]

T: 原発腫瘍

- TX 原発腫瘍の評価が不可能
- T0 原発腫瘍を認めない
- Tis 上皮内癌
- T1 粘膜固有筋層又は粘膜下層に浸潤する腫瘍
- T2 固有筋層に浸潤する腫瘍
- T3 外膜に浸潤する腫瘍
- T4 周囲組織に浸潤する腫瘍

N: 所属リンパ節

- NX 所属リンパ節転移の評価が不可能
- NO 所属リンパ節転移なし
- N1 所属リンパ節転移あり

M: 遠隔転移

- MX 遠隔転移の評価が不可能
- MO 遠隔転移なし
- M1 遠隔転移あり

- 胸部上部食道腫瘍: M1a 頸部リンパ節への転移
- M1b 他の遠隔転移
- 胸部中部食道腫瘍: M1a 該当なし
- M1b 所属リンパ節以外の転移又は他の遠隔転移
- 胸部下部食道腫瘍: M1a 腹腔動脈周囲リンパ節への転移
- M1b 他の遠隔転移

## X.5 Performance Status (Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG))

表 7 Performance Status

Grade	Performance Status (PS)
0	無症状で社会活動ができ、制限を受けることなく、発病前と同等にふるまえる。
1	軽度の症状があり、肉体労働は制限を受けるが、歩行、軽労働や坐業はできる。 例えば軽い家事、事務等。
2	歩行や身の廻りのことはできるが、時に少し介助が要ることもある。軽労働はできないが、日中の50%以上は起居している。
3	身の廻りのある程度のことはできるが、しばしば介助が要り、日中の50%以上は就床している。
4	身の廻りのこともできず、常に介助が要り、終日就床を必要としている。

ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group

この基準は全身状態の指標であり、局所症状で活動性が制限されている場合は、臨床的に判断する。〔出典先：Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982〕

## X.6 RECIST ガイドライン (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)

### 測定可能病変及び測定不能病変

測定可能病変とは、少なくとも一次元で正確に測定でき、最大径（以下、長径）が従来の検査法で $\geq 20$  mmあるいはヘリカルCTで $\geq 10$  mmの病変である。

測定不能病変とは、それ以外の全ての病変であり、小病変（長径が従来の検査法で $< 20$  mm又はヘリカルCTで $< 10$  mm）と真の測定不能病変を含む。

### 標的病変及び非標的病変の選択

登録時に認められた測定可能病変のうち、長径の大きい順に5つまでを選択して標的病変とする。選択した標的病変の部位、検査法、検査日、長径、全ての標的病変の長径の和（以下、長径和）を記録する。

標的病変として選択されなかった病変は、測定可能か否かを問わず全て非標的病変として部位、検査方法、検査日を記録する。

### 腫瘍縮小効果の判定

標的病変及び非標的病変の評価を登録時と同じ検査方法にて行い、標的病変の長径、非標的病変の消失又は増悪の有無を記録する。

### 標的病変の効果判定基準

- ・完全奏効 (CR) : 全ての標的病変の消失。
- ・部分奏効 (PR) : 治療開始前の長径和と比較して標的病変の長径和が 30%以上減少。
- ・進行 (PD) : 治療開始以降の最小の長径和と比較して標的病変の長径和が 20%以上増加。
- ・安定 (SD) : PR に該当する腫瘍縮小や PD に該当する腫瘍増大を認めない。

$$\text{長径和の縮小割合} = \frac{\text{治療前の長径和} - \text{評価時の長径和}}{\text{治療前の長径和}} \times 100$$

$$\text{長径和の増大割合} = \frac{\text{評価時の長径和} - \text{最小の長径和}}{\text{最小の長径和}} \times 100$$

### 非標的病変の効果判定基準

- ・完全奏効 (CR) : 全ての非標的病変が消失。
- ・不完全奏効/安定 (IR/SD) : 1 つ以上の非標的病変が消失しないか、腫瘍マーカーが院内基準値上限を超える（測定を行った場合）。
- ・進行 (PD) : 既存の非標的病変の明らかな増悪。

### 新病変出現の有無

「RECIST ガイドライン」における「新病変の出現」は「標的病変の効果」、「非標的病変の効果」いずれも「PD」となるとされているが、総合効果判定の規定と矛盾するため、「新病変の出現」は「標的病変の効果」と「非標的病変の効果」を左右しないこととし、「標的病変の効果」と「非標的病変の効果」とは別に評価する。

例えば、標的病変の長径和の増大割合 $< 20\%$ 、非標的病変の増大がない場合、それ以外に新病変が認められた場合、「標的病変=SD、非標的病変=IR/SD、新病変出現あり」として、「総合効果=PD」とする。

**総合効果**

総合効果は標的病変の効果と非標的病変の効果の組み合わせから、以下にしたがって判定する。

**表 8 標的病変と非標的病変の腫瘍縮小効果の組み合わせによる総合効果**

標的病変	非標的病変	新病変	総合効果
CR	CR	なし	CR
CR	IR/SD	なし	PR
PR	PD 以外	なし	PR
SD	PD 以外	なし	SD
PD	任意	任意	PD
任意	PD	任意	PD
任意	任意	あり	PD

CR=complete response (完全奏効)、IR/SD=incomplete response/stable disease (不完全奏効)、PR=partial response (部分奏効)、SD=stable disease (安定)、PD=progressive disease (進行)

## 臨床研究ご参加についての説明書

MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注  
による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究

この臨床研究の内容は人権と安全性に最大限の配慮をして、当院に設置されている倫理委員会において、患者さまの人権が保護され、科学的・倫理的に妥当であることが確認されております。

(遺伝子治療臨床研究審査委員会 承認日：2011 年 月 日)

第 1.0 版 作成年月日：2011 年 1 月 14 日

1. はじめに	3
2. 臨床研究について	3
3. あなたの食道癌について	4
4. 遺伝子治療臨床研究の概要について	5
5. TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について	6
6. 臨床研究の方法	7
7. 参加できる方、参加できない方	9
8. 臨床研究のスケジュール	10
9. 期待される効果	13
10. 予想される危険性および副作用	13
11. 臨床研究への参加予定期間	17
12. 臨床研究への参加患者数	17
13. 他の治療法について	18
14. 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて	18
15. 健康被害の補償について	18
16. 新たな情報のお知らせについて	18
17. 遺伝子治療臨床研究の中止について	19
18. あなたに守っていただきたいこと	19
19. あなたの費用負担について	19
20. 個人情報の保護について	20
21. 個人情報の第三者への提供の制限について	20
22. 個人情報の開示、訂正、利用停止や問い合わせ・相談・苦情の 窓口について	21
23. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について	21
24. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制	21

## 1. はじめに

近年、癌細胞の表面のみに発現する“目印”（この目印を「癌抗原」といいます）が存在することが科学的に解明され、また、この癌抗原を認識して、癌を攻撃・破壊することができる細胞（この細胞を「細胞傷害性 T 細胞」といいます）の存在も証明されました。

本臨床研究では、患者さま自身の細胞をいったん体の外に取り出し、そこに細胞傷害性 T 細胞が癌抗原を認識するために必要な「アンテナ」の遺伝子を導入した後、再びその細胞を患者さまに戻すことによって、治療効果を得る遺伝子治療を考えています。

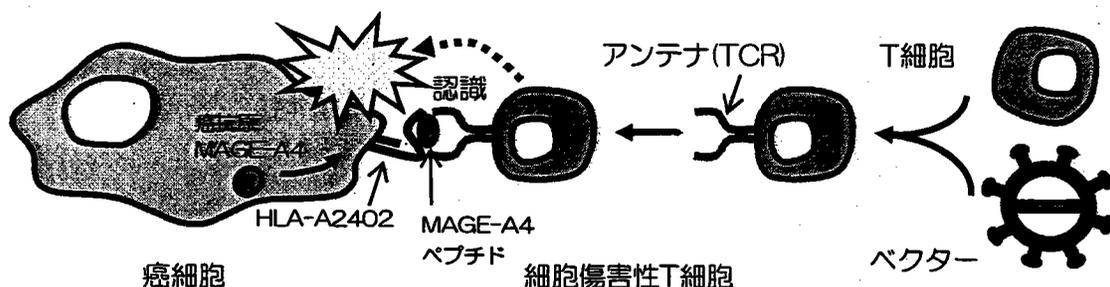


図 1 細胞傷害性 T 細胞による癌抗原の認識

## 2. 臨床研究について

これまでに多くの病気の原因が解明され、また、たくさんの「薬」や「治療法」が開発され、広く一般に使用されるようになりました。どの「薬」や「治療法」も、患者さまに使っていただけるようになるためには、はじめに試験管等を使った実験により、目的とする作用を持ったいくつかの「薬」や「治療法」を選び出し、次に動物を使ってそれがどれくらい効くか（効果）、また、安全かどうか（安全性）を調べる実験が行われます。そして、最終的に実際の患者さまに試みて、効果と安全性を検討する必要があります。

患者さまを対象にして、「薬」や「治療法」を評価するために行うものを臨床研究といいます。一般的に臨床研究には、安全性を調べる段階（第Ⅰ相試験）、効果（例えば、癌であればどの程度縮小するか）を調べる段階（第Ⅱ相試験）、現在一般的に使われている「薬」や「治療法」と比較する段階（第Ⅲ相試験）があり、段階を踏みながら進んでいきます。このように臨床研究には、研究的な一面があることを十分ご理解ください。

今回、患者さまに説明する臨床研究は、安全性を調べることを目的とした臨床研究（第Ⅰ相試験）に相当するものです。本臨床研究は、国が定めた指針に基づいて計画され、当院の倫理委員会（臨床研究を実施する者から独立した委員会）と国の審議会の厳しい審査を受け、承認されたものです。

### 3. あなたの食道癌について

癌にはその進行の程度をあらわす分類法があり、癌がどのくらいの大きさになっているか（深達度）、周辺のリンパ節にどれほど転移しているか（リンパ節転移）、遠く離れた臓器への転移があるか（他臓器の転移）、の3つの要素によって決められています。以下にその分類を示します。

表1 食道癌の病期分類（TNM分類一部改変）

病期分類			
I期	T1（粘膜下層にとどまる腫瘍）	NO（リンパ節転移なし）	M0 （遠隔転移なし）
IIA期	T2（固有筋層に浸潤する腫瘍） T3（外膜に浸潤する腫瘍）	NO（リンパ節転移なし）	
IIB期	T1（粘膜下層にとどまる腫瘍） T2（固有筋層に浸潤する腫瘍）	N1（リンパ節転移あり）	
III期	T3（外膜に浸潤する腫瘍） T4（周囲組織に浸潤する腫瘍）	N1（リンパ節転移あり） Nに関係なし	M1 （遠隔転移あり）
IV期	T, Nに関係なし		

食道癌に対する一般的な治療法として、内視鏡粘膜切除（内視鏡を用いて粘膜上の癌を切除する方法）、手術（身体から癌を切除する方法）、化学療法（抗癌剤による治療）および放射線療法（癌に放射線を照射する治療）の4つの治療法があります。

現在あなたは、

- 根治切除が不可能で、かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）に抵抗性となったIII期、IV期の食道癌
- 術後あるいは初回放射線化学療法（化学療法と放射線療法を組み合わせたもの）後に再発転移をきたし、その後の治療に抵抗性となった食道癌

であることが判明しました。

食道癌では、初回の治療がきちんと行われたにもかかわらず再発することが多いですが、化学療法や放射線療法が効果を示すことがあり、しばらくはこれらの治療をおこないます。しかし、効果がみられなくなった際に、その後の治療法について確立されたものがないのが実情で、病気による苦痛をとってQOL（「生活の質」といいます）の改善をはかる治療をするのが現状です。（本臨床研究以外の他の治療法については、後ほど説明します。）

#### 4. 遺伝子治療臨床研究の概要について

私たちの計画している遺伝子治療は、以下のとおりです。この臨床研究は、三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学（タカラバイオ株式会社との産学連携講座）を含む複数の医療機関とタカラバイオ株式会社（本社：滋賀県大津市瀬田）との共同研究に基づいて、大阪大学医学部附属病院で実施します。

- 1) 食道癌に癌抗原（本臨床研究で標的としている癌抗原を「MAGE-A4」といいます）が発現し、白血球の型が「HLA-A2402」である患者さまから末梢血（「末梢血」とは血管の中を流れている血液のことをいいます）中のリンパ球を採取します。
- 2) 採取した末梢血中のリンパ球に、MAGE-A4 を認識するアンテナ（これを「T細胞受容体：TCR」といいます）の遺伝子を、レトロウイルスベクターという運び屋を使って導入します。
- 3) TCR 遺伝子を導入したリンパ球を体外で培養して数を増やした後に、再び患者さま自身に投与します。
- 4) MAGE-A4 ペプチド（蛋白の小さいもので、9個のアミノ酸からできたもの）を投与し、患者さまの体内での TCR 遺伝子導入リンパ球の活性化（あるいは増殖）を図ります。
- 5) 癌細胞を認識するアンテナ（TCR）を発現した細胞が、患者さまの体内で活性化され、癌細胞に向かっていくことが期待されます。

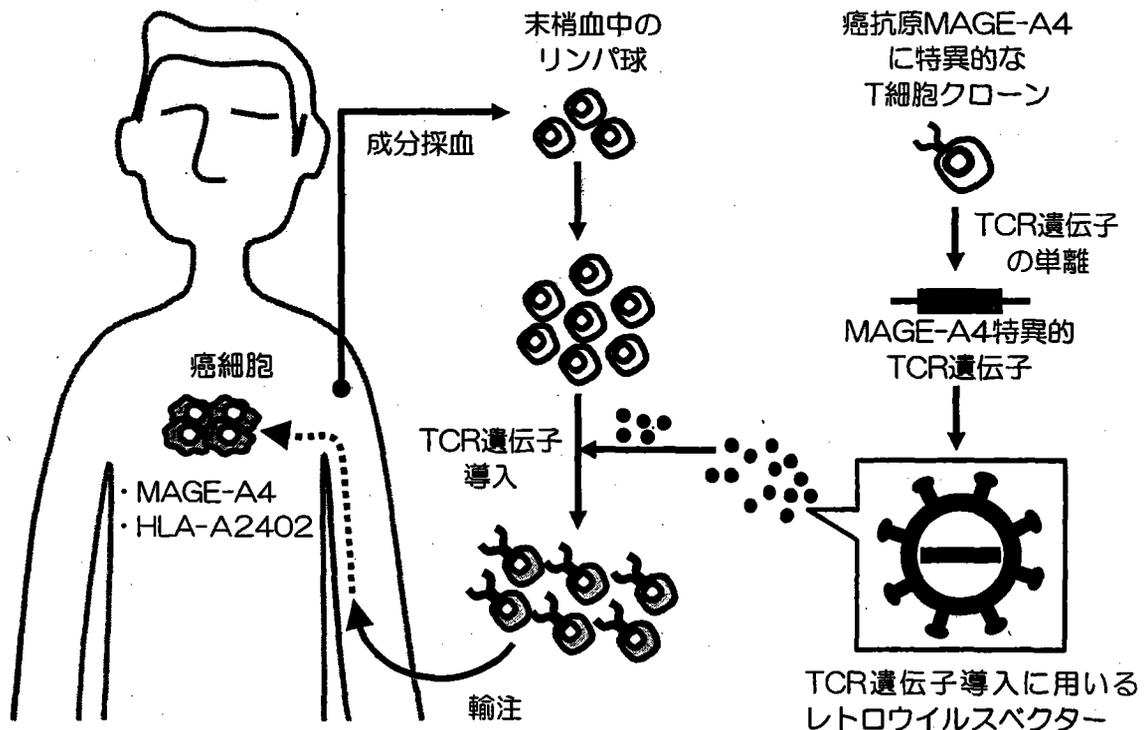


図2 遺伝子治療臨床研究の概要

### リンパ球について

血液は、血漿<sup>けっしょう</sup>という液体成分と血球という細胞成分からできていて、血球には赤血球、白血球、血小板の3種類の細胞があります。リンパ球は、白血球のうち約25%を占める細胞のことで、免疫系にかかわるB細胞（Bリンパ球）、T細胞（Tリンパ球）等から構成されています。

### HLA (human leukocyte antigen : ヒト白血球抗原) について

HLAとは白血球の型のことで、自己と非自己を区別して認識する重要な抗原であり、ヒトの6番染色体に存在します。ここには多数の遺伝子が存在しますが、HLAの検査では、A、B、DRの3種類の遺伝子座が検査されます。ヒトの細胞はA抗原、B抗原、DR抗原の遺伝子を各2個、計6個有しており、これらの抗原が細胞表面に発現しています。HLA-A2402の日本人における頻度はおよそ60%です。

### T細胞受容体 (TCR) について

T細胞（Tリンパ球）とは例えば癌細胞のような標的細胞を攻撃する役割と、抗体の産生を調節する役割を担う重要な細胞であり、免疫系の司令塔的な役割を担っています。T細胞の表面に出ている、抗原を認識するためのアンテナをT細胞受容体（TCR）といいます。

### MAGE-A4 について

MAGE-A4とは癌組織のみに過剰に発現する“目印”蛋白であり、正常組織では精巣以外ほとんど発現が認められません。MAGE-A4は食道癌の他に、頭頸部癌や肺癌等の多くの癌で発現が確認されていますが、個々のケースでは、MAGE-A4が適切に癌細胞に発現していることを調べる必要があります。しかし、現在、この蛋白の発現を直接調べる方法がないため、MAGE-A4蛋白のもととなるRNAの量で推定しています。

### レトロウイルスベクターについて

ベクターとは『運び屋』という意味で、細胞や体に異種のDNAを入れる際に用いる、二本鎖の環状DNAや無毒化したウイルス等を指します。また、レトロウイルスとは遺伝子を導入するベクターとして最も応用が早く進んだウイルスであり、これを用いて遺伝子を導入することで、導入した遺伝子が標的細胞の染色体に組み込まれるため、細胞分裂後も確実に娘細胞に伝達され、長期間安定に遺伝子を発現させることが可能です。

## 5. TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について

アメリカの国立衛生研究所において、私たちの計画と同しくTCR遺伝子を患者さま自身の細胞に導入して戻す臨床試験が行われ、2006年にその報告がさ

れました。ただし、この臨床試験は、あなたと同じ食道癌ではなく、悪性黒色腫（メラノーマと呼ばれる皮膚癌の一種です）の患者さまを対象として行われたものです。

進行性の転移性悪性黒色腫の患者さま 17 名に対して、悪性黒色腫に特有な癌抗原（ここではこれを「MART-1」といいます）を認識する TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した患者さま自身のリンパ球を輸注したものです。この臨床試験において、17 名の患者さまのいずれにおいても、TCR 遺伝子導入細胞の輸注による毒性は認められませんでした。また、そのうち 2 名の患者さまでは、輸注された TCR 遺伝子導入細胞が、輸注後 1 年を超えても末梢血単核球（白血球の約 25% を占めるリンパ球と、約 5% を占める単球の総称）中の 40% 前後という非常に高い水準で維持され、この 2 名の患者さまでは癌の明らかな縮小が観察されました。なお、この臨床試験の後に行われた、MART-1 抗原との反応性がより強い TCR 遺伝子を使った臨床試験では、自己免疫反応と思われる目および耳の障害が発生したとの情報があります。

ただし、TCR 遺伝子を患者さま自身の細胞に導入して戻す臨床試験は、悪性黒色腫を対象とした上に述べる試験以外には報告がなく、悪性黒色腫以外の癌にどの程度効果があるかは未知数です。また、標的となるがん抗原、導入された TCR 遺伝子、TCR に対して抗原ペプチドを提示する HLA 分子の種類、投与されたペプチドの種類などが、アメリカの国立衛生研究所で行われた試験とあなたが受けようとしている今回の試験とは異なるために、安全性や効果の程度が異なる可能性があります。

また、今回の臨床研究で使う TCR 遺伝子については、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した細胞が、これまで人に投与されたことはありません。

## 6. 臨床研究の方法

本臨床研究は以下のステップで行います。

### 第 I 段階：T 細胞への TCR 遺伝子の導入

#### 1) T リンパ球の採取

あなたの全身状態に問題がないことを確認し、採取機械を使ってあなたの末梢血から T リンパ球を採取します。これをアフエレーシス（成分採血）といいます。

あなたの腕（あるいは太もも）の静脈血管から約 90 分かけて約 5,000 mL の血液を採取し、リンパ球の濃縮された成分、およびその T リンパ球を培養するために必要な血漿（～最大 400 mL）を採血します。残りの血液は採血した腕と反対の腕からあなたに戻します。

#### 2) TCR 遺伝子導入細胞の調製

採取した T リンパ球と血漿は三重大学内の細胞処理センターに搬送され、前述

したレトロウイルスベクターを使ってTCR 遺伝子が導入されます。この施設では細胞の処理はすべて無菌操作で行います。遺伝子導入を含めて試験管内で7日間培養し、いったん凍結させて保存します。そして、TCR 遺伝子導入細胞の品質を確認後、三重大大学の細胞処理センターから大阪大学医学部附属病院に搬送されます。

この試験ではTCR 遺伝子導入細胞の品質が確認されて、投与することが可能になるまで、40日程度かかります。その間は無治療で経過をみせていただきます。さらに、投与前に選択基準を満たすかどうかを確認して投与することになります。基準を満たさない際は、投与することができなくなることをご了解いただきたいと思います。

### 第Ⅱ段階：TCR 遺伝子導入リンパ球の投与

TCR 遺伝子導入リンパ球を投与します。治療効果が最も期待でき、かつ、安全なTCR 遺伝子導入リンパ球の量は、現時点でははっきりしていません。投与するTCR 遺伝子導入リンパ球の量は、参加いただいた患者さまに対して、次の3段階を予定しています。最初の3人には $2 \times 10^8$ 個（2億個）、次の3人には $1 \times 10^9$ 個（10億個）、最後の3人には $5 \times 10^9$ 個（50億個）の細胞を投与します。

なお、各段階で、もし日常生活に支障をきたしたり、また治療が必要なほどの重い副作用（高度な有害事象と言われます）が、3人のうち1人に発現した場合には、増量せずに同じ細胞数でさらに3人の患者さまに対して投与を続け、合計2人以上に重い副作用が発現した場合には、その細胞数は重い副作用がよく起こるものとして次の段階には進みません。

あなたには、（      $\times 10$       個）の細胞を投与します。その後十分な観察を行い、副作用が発現した場合には、適切な処置を行います。

### 第Ⅲ段階：MAGE-A4 ペプチドの投与

あなたの体内でTCR 遺伝子導入細胞をさらに活性化（あるいは増殖）させるため、MAGE-A4 ペプチド 1回量 300  $\mu$ g を、TCR 遺伝子導入細胞投与後 14日目および28日目の2日間の計2回、アジュバント（ペプチドの作用を修飾・増強するために加えられるものを「アジュバント」といいます）とともに投与します。

本臨床研究終了後、大阪大学医学部附属病院では患者さまの生存期間（アメリカ食品医薬品局（FDA）のガイドラインに従い、最短15年間）にわたり、二次発癌や増殖能を持つレトロウイルスの有無についてフォローアップを行う予定であることをご了解ください。これは遺伝子治療の長期にわたる安全性がまだ確立していないことから、臨床研究後に問題が生じることがないかを追跡するために行います。

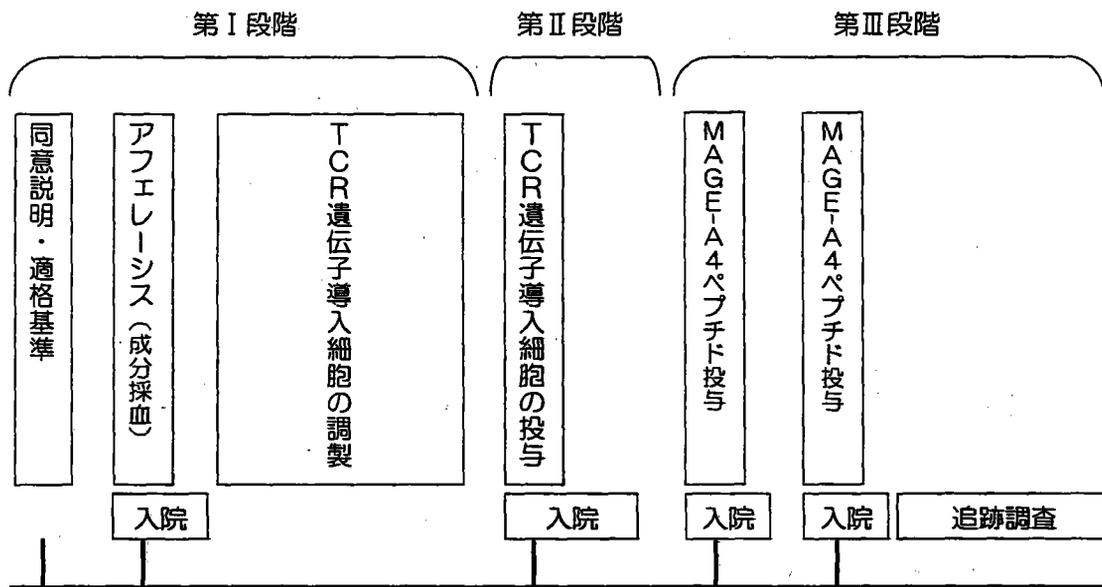


図3 遺伝子治療臨床研究のステップ

#### 7. 参加できる方、参加できない方

本臨床研究に参加できるのは以下のすべての条件を満たす患者さまです。

- ① 組織診断によって食道癌であることが確認されている方
- ② 根治切除不可能で、かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）抵抗性となった臨床Ⅲ期、Ⅳ期（表 1）の食道癌の方、又は、術後あるいは初回放射線化学療法後に再発転移をきたし、治療抵抗性となった食道癌の方
- ③ HLA-A2402（白血球の型）陽性の方
- ④ 癌組織に MAGE-A4 の発現が確認されている方
- ⑤ 画像診断に必要とされる、測定可能な癌病変を持っている方
- ⑥ Performance Status（全身一般状態）が 0～1 の方
- ⑦ 本臨床研究に参加時点の年齢が 20 歳以上 75 歳以下の方
- ⑧ 細胞採取時に前治療（手術、化学療法、放射線療法）終了から 4 週間以上の経過が見込まれる方
- ⑨ 同意取得後 4 ヶ月以上の生存が見込まれる方
- ⑩ 主要な臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす方
  - ・白血球数  $\geq 3,000/\text{mm}^3$
  - ・好中球数  $\geq 1,500/\text{mm}^3$
  - ・ヘモグロビン  $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
  - ・血小板数  $\geq 100,000/\text{mm}^3$
  - ・総ビリルビン (T-Bil)  $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
  - ・AST (GOT)、ALT (GPT)  $\leq 150 \text{ IU/dL}$

- ・クレアチニン (Cr)  $\leq 2.0$  mg/dL
- ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- ⑪ 癌組織にHLA クラス I 分子の発現が確認されている方
- ⑫ 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた方
- ⑬ 本臨床研究における最小輸注量 ( $2 \times 10^8$  個) の TCR 遺伝子導入リンパ球輸注量が得られた方 (二次登録時)

本臨床研究に参加できないのは以下のいずれかの条件に該当する患者さまです。

- ① 以下の重篤な合併症を有する方
  - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
  - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
  - ・活動性の感染症
  - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症<sup>かんしつせい はいせんいししょう</sup>
  - ・自己免疫疾患
  - ・出血傾向 (プロトロンビン時間 (PT) < 50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) > 60 秒、フィブリノゲン (Fbg) < 100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) > 20  $\mu$ g/mL)
  - ・血栓形成傾向
- ② 重篤な過敏症の既往歴を有する方
- ③ HCV 抗体、HBs 抗原、HTLV-1 抗体、HIV 抗体のいずれかが陽性である方
- ④ コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水<sup>しんのう</sup>を有する方
- ⑤ 制御困難な脳内転移を有する方
- ⑥ 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の方
- ⑦ MAGE-A4 ペプチドの投与に適さない方
- ⑧ 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する方
- ⑨ 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性の方。又は挙子希望の男性の方 (ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合はこの限りではありません)
- ⑩ 一次登録前 4 ヶ月以内に他の臨床試験 (臨床研究) に参加している方
- ⑪ その他、総括責任者又は分担研究者が不相当と認めた方

## 8. 臨床研究のスケジュール

あなたが先に説明した「参加できる条件」に当てはまる場合、次ページの「表 2」に示したスケジュールに従って本臨床研究を実施します。概要としては、はじめに、あなたから遺伝子を導入する細胞を採取するために数日間入院していただきます。その後、いったん退院いただき、あなたから採取した細胞は三重大学内にある細胞処理センターに搬送します。そして、TCR 遺伝子を導入する

一連の作業を行い、その細胞の安全性を確認します。細胞の安全性が確認された後投与することになりますが、TCR 遺伝子導入細胞を投与する日から投与後 7 日間、および 2 回の MAGE-A4 ペプチド投与後 2 日間（詳細は次項をご覧ください。）は、再度入院していただくこととなります（患者さまの状態によっては長く入院することもあります）。この間に診察や画像診断、各種の検査を実施しますが、それ以外は外来通院での治療が可能です。本臨床研究は、TCR 遺伝子導入細胞投与の 63 日後に終了となります。それ以降も、8 ページに記載したように患者さまの生存期間にわたり、フォローアップとして 1 年に 1 回の頻度で、TCR 遺伝子導入細胞の血中動態、および二次発癌や増殖能を持つレトロウイルスの有無について注意深く経過を観察します。なお、臨床研究で実施する検査のうち TCR 遺伝子導入細胞の血中動態、TCR 遺伝子導入細胞の腫瘍組織浸潤度、RCR、LAM-PCR および免疫機能解析は三重大学で検査を行います。

今回使用するレトロウイルスベクターは増殖能力を欠損していますが、万が一増殖能力を持つレトロウイルスが患者さまの血液に出現する場合に備えて、遺伝子導入細胞投与後、最低 3 日間は個室に入院していただく必要があります。また、その個室入院期間中には個室外に出る自由が制限されること、検査等のために個室外に出る際にはマスク及びガウンの着用が義務付けられること、および排泄物が特別な消毒をされること等、増殖能力を持つレトロウイルスが環境中に放出される可能性を最小限にするための措置にご協力していただく必要があります。

表 2 遺伝子治療臨床研究の検査・観察のスケジュール

臨床研究期間	スクリーニング期間		治療期間										追跡調査期間
	同意取得日	アフェレーシス実施日	day0*	day1	day2	day3	day7	day14 ±3	day16 ±3	day28 ±3	day30 ±3	day35 ±3	
入院		○	○	→	→	→	→	○	→	○	→		
同意取得	○		○										
一次登録	○												
二次登録			○										
被験者背景	○												
アフェレーシス		○											
TCR 遺伝子導入 リンパ球投与			○										
MAGE-A4 ペプチド投与								○		○			
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
動脈血酸素分圧/動 脈血酸素飽和度	○		○										
一般状態 (PS)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○												
血液学的検査	○	○	○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○
血液生化学的検査	○	○	○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○
血液凝固能検査	○		○ <sup>2</sup>					○		○		○	○
尿検査	○		○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○
免疫血清 (CRP)	○		○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○
腫瘍マーカー	○		○ <sup>2,4</sup>									○ <sup>4</sup>	○ <sup>4</sup>
胸部 X 線検査	○		○ <sup>2</sup>									○	○ <sup>5</sup>
12 誘導心電図	○		○ <sup>2</sup>									○	○ <sup>5</sup>
頸部・胸部・ 腹部・骨盤 CT	○ <sup>1</sup>		○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
PET-CT			○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
上部消化管 内視鏡検査	○ <sup>1</sup>		○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
腫瘍組織生検			○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
TCR 遺伝子導入 リンパ球 血中動態用採血 <sup>6</sup>			○ <sup>7</sup>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫機能解析 用採血			○ <sup>2</sup>					○		○		○	○
TCR 遺伝子導入 リンパ球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検査			○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>
RCR <sup>6</sup>				○ <sup>8</sup>								○	○
LAM-PCR <sup>6</sup>												○	○
採血量 (mL)	15	-	110	23	10	10	18	68	10	68	10	70	70
有害事象			←										→

\*アフェレーシス実施日より約 40 日後 (遺伝子導入細胞製剤の調製・QC に要する日数により異なる)。

- 1.スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。
- 2.治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。
- 3.治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。
- 4.スクリーニング期間の測定値が高値例のみ実施。
- 5.必要に応じて実施。
- 6.臨床研究終了後も 1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施。
- 7.TCR 遺伝子導入リンパ球投与前 (治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする)、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間 (±2 時間) 後、及び 12 時間 (±2 時間) 後。
- 8.遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法として、個室管理を解除する前に実施。

※RCR 検査	遺伝子治療に用いるレトロウイルスベクターは増殖能力を欠損していますが、何らかの理由によって増殖を始めてしまう可能性が皆無ではありません。増殖能力を持つようになったレトロウイルスをRCRといい、その出現の有無を確認する検査です。
※LAM-PCR	レトロウイルスを用いた遺伝子治療において、あなたに投与された遺伝子導入細胞の中である特定の細胞だけが増えていないかどうかを調べる検査です。また、特別に増えた細胞がある場合には、染色体のどの場所に治療用遺伝子が挿入されたかを確認します。
※有害事象	副作用等の好ましくないすべての事象のことで遺伝子治療との因果関係は問いません。

## 9. 期待される効果

臨床効果は、実際に患者さんに投与されたことがないため、はっきりとわかっていません。

「5. 海外での状況について」の項で説明しましたとおり、今回の抗原とは別の悪性黒色腫の癌抗原MART-1に対するTCR遺伝子導入リンパ球を用いた臨床試験は、アメリカで悪性黒色腫の患者さま 17 名に対して行われ、2 名の患者さまで明らかな癌の縮小が認められました。しかし、悪性黒色腫以外の癌である食道癌に対して、また別の癌抗原であるMAGE-A4を用いた今回の遺伝子治療により、どの程度の効果が得られるかについては、これまで人に投与されたことがないため、不明です。

私たちが実験小動物や試験管内で行った実験においては、MAGE-A4 を認識するTCR 遺伝子を導入したリンパ球が、MAGE-A4 陽性/HLA-A2402 陽性の癌細胞株を攻撃・破壊することが認められており、本臨床研究においても同様の効果が期待されています。但し、実験小動物や試験管内での実験結果は、リンパ球投与量や投与時期、腫瘍量など実験室における最適と思われる条件下で得られたものであり、必ずしも人での効果を反映するものではありません。

「2. 臨床研究について」の項で説明したとおり、臨床研究には研究的な一面があります。今回の試験は、安全性を主目的として調べる段階（第Ⅰ相試験）ですが、あなたに御参加いただくことで本研究の発展に非常に助けになり、将来同じ病気になった患者さんの治療に役立つ可能性があります。

## 10. 予想される危険性および副作用

### 1) レトロウイルスベクターを用いることによる危険性

レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、現在までアメリカを中心とした全世界で 280 件以上が実施されており、多くの実績があります。しかし、何らかの原因により、治療を受けた患者さまの体内でこのウイルスベクターが増殖をはじめめる可能性や、遺伝子を導入した細胞が腫瘍性に増殖する可能性は皆無とはいえません。

そこで、この可能性を最小限にするために、遺伝子治療についての規則やガイドラインにしたがって、ウイルスベクターの安全性と品質の管理が行われています。また、この臨床研究で使われるのは人工的に改良した安全性の高いレトロウイルスベクターです。しかしながら、レトロウイルスベクターによって導入された治療用の遺伝子が、患者さまの T リンパ球の染色体に組み込まれたときに悪影響を及ぼす可能性は皆無とはいえません。そこで、レトロウイルス

ベクターを用いることによる副作用および危険性の可能性について、もう少し詳しく説明します。

第1点目は、レトロウイルスベクターの無秩序な増殖という問題です。今回の遺伝子治療で使われるレトロウイルスベクターは、一度細胞に感染すると二度は感染しないように、安全性を高める工夫が施されています。しかし、何らかの理由によってこのレトロウイルスベクター自身が増殖を始め、患者さまにウイルス性の疾患を引き起こす可能性は皆無とはいえません。この危険性を可能な限り取り除くために、あらかじめ定められた品質規格に合格した遺伝子導入Tリンパ球のみが投与され、投与後も体内で増殖性ウイルスが発生していないことを確認する検査が繰り返し行われる計画になっています。

第2点目は、「挿入変異」といわれる、治療用の遺伝子が細胞の染色体に組み込まれる際におこる可能性のある問題です。染色体には、蛋白の設計図に相当する多数の遺伝子が並んでいます。レトロウイルスベクターは治療用の遺伝子をこの染色体のいずれかの場所に組み込みます。ただし、この組み込まれる場所はあらかじめ予測することができないため、組み込まれる場所によっては、大切な遺伝子を壊したり、他の遺伝子に悪い影響を与えたりして、遺伝子導入された細胞を癌細胞に変えてしまう危険性があります。通常、染色体には、癌遺伝子や癌の発生を抑える働きをする遺伝子が含まれていますが、遺伝子導入によってこれらの遺伝子の働きに何らかの影響がおきて、癌化へと進む可能性もあります。一般的には、1つの遺伝子に影響が生じただけでは、癌化する可能性は極めて低いと考えられていますが、その危険性は完全には否定できません。

特に「挿入変異」による癌化の可能性については、極めて大切なことですので具体例についてさらに詳しく説明します。X連鎖重症複合性免疫不全症（遺伝的に身体の抵抗力が弱く、重症の細菌やウイルス感染症を起こしやすい病気）という先天性の病気の乳幼児に対して、レトロウイルスベクターを用いて、欠けている遺伝子を血液のもとになる造血幹細胞造血幹細胞に導入する遺伝子治療の臨床研究がフランスで1999年3月から行われました。当初、この遺伝子治療では11例中9例で治療が成功し、遺伝子治療の最大の成功例として注目を集めました。しかしながら、その後2002年に2例の患者さまが白血病を発症（治療後30又は34ヶ月後）したという報告がなされ、解析の結果、遺伝子治療による「挿入変異」が白血病の原因と考えられました。具体的には、この白血病発症の原因として、特定の癌遺伝子の近くにレトロウイルスベクターの遺伝子が挿入され、その結果、この癌遺伝子が活性化されて、細胞が腫瘍性に増殖してしまったという可能性が考えられています。さらに、レトロウイルスベクターで導入した治療用遺伝子が、細胞の増殖をコントロールする遺伝子だったことが、白血病の発症リスクをさらに高くしたと考えられています。この報告の後に、アメリカでは、同様の先天性免疫不全症に対するレトロウイルスベクター遺伝子治療臨床研究を一時中断し、公聴会での議論がなされ、この症例に関する内容を患者さまやそのご家族に正しく伝えたいと再開することとなりました。しかし、2005年1月には上記フランスの臨床研究で3例目の白血病発

症（治療後 33 ヶ月後）の報告がなされるとともに、白血病発症第 1 例目の患者さまが白血病によって亡くなられたという報告がありました。また、2007 年 3 月には 4 例目の白血病発症の報告がなされました。現在フランスのグループは、より安全なベクターが開発されるまでこの遺伝子治療を中断しています。なお、この X 連鎖重症複合性免疫不全症に対して、イギリスのグループもフランスと同様の遺伝子治療臨床研究を行っていましたが、治療を受けた 10 例中 1 例で白血病が発症したことが 2007 年 12 月に報告されました。

また、慢性肉芽腫症（好中球などの食細胞が機能しないため重症な細菌・真菌性感染症を反復して発症する先天性免疫不全症）に対して、レトロウイルスベクターを用いて、欠けている遺伝子を血液のもとになる造血幹細胞に導入するドイツの遺伝子治療では、遺伝子導入細胞を投与された 2 例の患者さまで、特定の癌遺伝子の近くにレトロウイルスベクターの遺伝子が挿入された細胞が多く認められており、骨髓異形成症候群という前白血病状態の発症が報告されています。一方、アデノシンデアミナーゼ欠損症（アデノシンデアミナーゼという酵素が先天的に欠けているために血液中の正常に働くリンパ球が減少し、感染症が発症しやすくなる病気）に対して、レトロウイルスベクターを用いて欠けている遺伝子を血液のもとになる造血幹細胞に導入するイタリアの遺伝子治療では、10 例中 8 例で酵素補充療法の必要がなくなり、遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、癌化は見られなかったと報告されています。このように、レトロウイルスベクターによる癌化の可能性は、対象となる病気、遺伝子を挿入する細胞、ベクターの種類等によって大きく異なっています。ちなみに、本研究で行うような末梢リンパ球に対するレトロウイルスベクターによる遺伝子導入ではこれまで癌化の報告はありません。

上記の先天性免疫不全症以外のレトロウイルスベクターを使用する遺伝子治療では、白血病の発症の頻度は比較的低いと考えられ、その危険性について患者さまに十分に説明したうえで実施してもよいとの決定が各実施国の所轄官庁からなされています。日本においても同様の状況で、実施が承認されている 4 件のレトロウイルスを使用する遺伝子治療臨床研究のうち、X 連鎖重症複合性免疫不全症に対する遺伝子治療については実施施設が開始を保留していますが、それ以外の 3 件の遺伝子治療臨床研究については、長期間にわたって被験者の追跡調査を行うとともに、それぞれの遺伝子治療臨床研究のリスク／ベネフィットに関する評価を最新の知見に基づき定期的に実施することを条件に継続されています。

今回の TCR 遺伝子導入リンパ球輸注療法では、遺伝子を導入する細胞は T リンパ球であり、先に述べた先天性免疫不全症に対する遺伝子治療のような造血幹細胞に遺伝子を導入するものではありません。造血幹細胞は未熟な細胞であり、骨髓等で再生する能力があるため、癌化がおこりやすい細胞ですが、T リンパ球は分化や再生能を失った細胞であるため、癌化しにくい細胞と考えられています。このことから、治療用遺伝子が染色体に組み込まれることによる挿入変異のリスクは T リンパ球と造血幹細胞の間で同程度ではあるものの、今回の治療法で癌化がおきる危険性は、先天性免疫不全症に対する遺伝子治療と

比較して低いものと考えています。実際に、過去に日本や海外で実施された、Tリンパ球にレトロウイルスベクターで遺伝子を導入する臨床研究において、遺伝子治療による癌化は1件も報告されていません。また、イタリアのグループは、レトロウイルスベクターで遺伝子導入したTリンパ球を投与した患者さま46人について、最長9年間の追跡調査をした結果、遺伝子導入した細胞の異常増殖は認められなかったと報告しています。

以上より、今回の遺伝子治療臨床研究における、遺伝子治療に起因する癌化の危険性は極めて低いと考えられます。ただし、万が一、癌化が認められた場合には、化学療法等の最善の治療が行われることとなります。

## 2) 本遺伝子治療による危険性

### ①成分採血（アフエーシス）に伴う副作用

#### ・ルート確保に関すること

両腕に十分な太さの血管がなく、鎖骨下静脈又は鼠径静脈に針を刺す場合、まれに出血、感染気胸の合併の危険がありますが、消毒を十分に行い、ルート確保に習熟した医師が行います。また、常に救急カート等の設備を整え、出血、気胸の対処に備えます。

#### ・迷走神経反射

精神的な緊張、不安、体調不良等の原因により血管迷走神経反射が起こり、約10%の方でめまい、吐き気、嘔吐が出現し、重篤な場合には、意識障害、嘔吐、血圧低下、徐脈、さらに高度では痙攣、失禁、そして心停止に至る可能性もあります。血圧や脈拍をモニターしながら十分に観察し、このような副作用の兆候が出現した場合は、採取を一時休止もしくは中止し、薬剤投与等適切な処置を施します。

#### ・クエン酸反応

成分献血は、血液が固まらないように抗凝固剤を加えながら採血していきます。抗凝固剤に含まれるクエン酸による低カルシウム血症をきたすことがあります。軽い症状では、口唇、手指のしびれ感が出現し、進行により症状が悪化する他、手指の突っ張り感が出現します。軽い症状が出現した場合は、採取速度を低下させて観察しますが、それでも改善しない場合は薬剤を投与します。

#### ・血小板減少

アフエーシスの際に血小板も一部除去されるため、アフエーシス後に血小板の減少が高頻度（50%以上）にみられ、また、 $50,000/\text{mm}^3$ 未満の高度の減少も5%前後みられます。そのため、アフエーシス終了後1週間位は必ず血小板をチェックし、採取前値への回復を確認します。また、アフエーシス開始から終了までアスピリン製剤（血小板の働きを抑え、血液を固まりにくくする作用があります）は使用しません。

## ②TCR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用

### ・発熱、発疹、アレルギー類似反応等

TCR 遺伝子を導入し、一旦凍結後に解凍したリンパ球を投与した際に、解凍に伴って一部崩壊した細胞内のサイトカイン（細胞から分泌される蛋白のこと）等による発熱、悪寒、皮疹、関節痛、嘔気等をきたす可能性があります。その際には、経過観察、あるいは解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の適切な薬剤の投与にて対処します。また、高度な副作用の場合には副腎皮質ステロイド剤の投与を行います。

### ・肺障害

重篤な輸血副作用として「輸血関連急性肺障害」が知られています。抗白血球抗体（抗HLA抗体、抗顆粒球抗体）による抗原・抗体反応が原因と推測されていますが、現在のところ詳細は不明です。本臨床研究は自己血液細胞輸注によるものであり、「輸血関連急性肺障害」に類似の病態が発症する可能性は考えにくいですが、TCR 遺伝子導入リンパ球投与後の肺障害に注意すべきと考えられます。発症時には、副腎皮質ステロイド剤の大量投与等、適切な処置を行います。

### ・免疫反応に伴う事象

本臨床研究の標的抗原であるMAGE-A4は、「癌・精巢抗原」の一つであり、腫瘍特異性が極めて高いのが特徴です。精巢組織ではHLA分子の発現が欠失しているため、正常組織への細胞傷害の可能性は極めて低いのですが、自己免疫疾患様症状（発熱、皮疹、関節痛、筋肉痛等）には常に注意する必要があります。対処法として、軽度の副作用では無処置で経過観察しますが、中等度以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与します。

## ③ペプチド投与に伴う副作用

MAGE-A4 ペプチドはアジュバントとともに2回の皮下投与が予定されています。MAGE-A4と同様な癌抗原のペプチドを用いた臨床研究は種々行われていますが、現在までに重篤な副作用の報告はありません。軽微な副作用として、皮膚反応（注射部位の発赤、腫<sup>しゅちよう</sup>脹）、微熱、倦怠感等が報告されています。軽度の副作用の場合、無処置にて経過観察しますが、中等度以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与します。また、予期せぬ副作用の発現に十分注意する必要があります。

## 3) その他予測できない副作用

上記以外にも予測できない副作用が発現する可能性があります。その場合にも必要に応じて、できる限り適切な処置を行います。

#### 11. 臨床研究への参加予定期間

本臨床研究への参加予定期間は、最長で約 110 日間です（TCR 遺伝子導入リンパ球の準備にかかる時間や副作用の有無により変化します）。

#### 12. 臨床研究への参加患者数

本臨床研究に参加していただく患者さまは、9 名（最大で 18 名）を予定しています。

#### 13. 他の治療法について

あなたの食道癌に対する治療に関しては、既に手術、あるいは化学療法や放射線療法が行われておりますので、根治療法はありません。再発形式がリンパ行性、血行性、複合性のいずれであるか、初回治療におけるステージがどの程度であったか、初回治療は何か、などにより治療方法が異なってきますが、一定のコンセンサスが得られている治療法はありません。また、新しい治療法としては、分子標的治療の開発が期待されているところですが、まだ確立された治療法ではありません。

その他、最良支持療法という症状緩和を目指す治療（栄養管理や QOL 向上のための緩和医療）を受けることもできますので、十分に担当医師とご相談ください。

#### 14. 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて

この臨床研究に参加するかどうかは、あなたの自由意思でお決めください。たとえ臨床研究への参加をお断りになっても、あなたが不利益を受けることは一切ありません。その場合、あなたにとって最も良いと考えられる治療を行います。

また、この臨床研究に参加することに同意された後でも、中止を希望される場合には、どんな理由であっても担当医師に申し出てください。あなたの自由意思でいつでも参加を取りやめることができます。その場合でもあなたが不利益を受けることは一切ありません。ただし、TCR 遺伝子導入リンパ球の輸注を受けた後は、あなたの体内の TCR 遺伝子導入リンパ球を取り除くことはできません。あなたが TCR 遺伝子導入リンパ球輸注の後に本臨床研究への参加の中止を申し出られても、あなたの体内から TCR 遺伝子導入リンパ球がすべて消失したことが検査によって確認されるまでは検査等を実施します。

#### 15. 健康被害の補償について

本臨床研究に関連する健康被害が生じた場合には、最も適切な治療を行います。健康被害がこの臨床研究と関係があるかどうかの判定は、本遺伝子治療臨床研究を行っている医療機関が共同で設置する「安全・効果評価・適応判定中

央部会」で検討します。なお、「安全・効果評価・適応判定中央部会」は私たちと利害関係はありません。この臨床研究との関連が否定できないと判断された副作用の検査や治療に対する医療費は当院が負担いたします。一方、この臨床研究との関連が認められない健康被害に関する医療費の支払いには、あなたの加入している健康保険が適用されます。また、当院に過失がない限り、補償金は支払われないことをご了承ください。

#### 16. 新たな情報のお知らせについて

本臨床研究に参加中、新しい情報（例えば本臨床研究と同様の試験が海外で行われた場合の成績等）が得られることがあります。このような新しい情報を知ることによって、あなたが本臨床研究への参加をやめるという判断をされるかもしれません。よって、本臨床研究に関連する全ての情報はできるだけ速やかにお知らせし、本臨床研究に継続して参加されるかどうかについて、担当医師があらためてお尋ねします。

#### 17. 遺伝子治療臨床研究の中止について

あなたに本臨床研究参加の意思があったとしても、以下の場合には本臨床研究を中止させていただきます。なお、必要な検査・観察を行うとともに、有害事象の発現や対象疾患の悪化など、安全性に問題が生じて中止した場合には、速やかに適切な処置を行い、安全性が確認されるまで追跡調査を行います。

- 1) 本臨床研究開始後に対象として不適格であることが判明した場合
- 2) 本臨床研究の継続が困難な有害事象が発現した場合
- 3) 本臨床研究の継続が困難な対象疾患の悪化が生じた場合
- 4) 担当医師が本臨床研究の中止が必要と判断した場合

#### 18. あなたに守っていただきたいこと

- ① 何らかの理由で担当医師以外の医師による治療を受けている場合や、本臨床研究の途中で新たに担当医師以外の医師による治療を受けた場合は、必ずその旨をお知らせください。本臨床研究参加中に服用することが好ましくない薬があった場合には、その薬をやめていただくか、本臨床研究への参加をやめていただくことがあります。
- ② 担当医師の指示に従い、定められた来院日は必ず守るようにしてください。その際には診察や定められた検査を受けていただきます。どうしても来院できない場合には、できるだけ早く担当医師にお知らせください。
- ③ 本臨床研究期間中、今までと比べて身体の調子がおかしいと感じたときは、必ず担当医師等に相談してください。
- ④ 本臨床研究での遺伝子導入リンパ球による生殖器や胎児への影響に関する検討がなされておりません。研究ご参加期間中と終了後5年間は避妊することをお願いします。

## 19. あなたの費用負担について

臨床研究には、健康保険等の公的な医療保険は適用されません。その代わりに、本臨床研究にかかる費用、たとえばレトロウイルスベクターや TCR 遺伝子導入にかかわる費用、遺伝子治療臨床研究の安全性を確認するために必要な検査の費用、および入院中の個室使用料等は当院または共同実施機関で負担します。

ただし、今回の臨床研究の期間内であっても、この研究と関係のない病状に対する治療費には、通常の診療と同じようにあなたの加入している健康保険が適用され、その医療費にかかる一部負担金はあなたの負担となります。

なお、この臨床研究の経費の一部には、共同研究先であるタカラバイオ株式会社から提供された資金が使用されています。

## 20. 個人情報の保護について

あなたの診療録をはじめとする個人情報は、「独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律」（平成 15 年 5 月 30 日法律第 59 号）その他関係法令に定めるものの他、「国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程」（平成 17 年 4 月 1 日施行）および「大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程」（平成 17 年 4 月 1 日施行）にしたがって保護されます。

本臨床研究で扱うあなたの個人情報は、主として病状の経過観察、緊急事態発生のための連絡等、あなたの生命を守るために使用します。その他、特別な目的で使用する場合には、事前にあなたに説明し、ご了解を頂いてから使用します。また、本臨床研究の成果を検討する時や、医療向上等を目的に本臨床研究の成績を公表・公開する場合には、個人を特定できない形すなわち個人情報を保護して公開します。

## 21. 個人情報の第三者への提供の制限について

個人情報は適切に管理し、あらかじめあなたの同意を得ることなく第三者に提供することは絶対にありません。

国の審議会における審査の過程において、厚生労働省の担当官および審議会の委員が、あなたの個人情報を取り扱うことがあります。あなたの個人情報はすべて秘密として取り扱われます。

当院の倫理委員会における審査の過程において、審査の客観性を保つために当院以外の外部委員が、あなたの個人情報を取り扱うことがあります。また、本臨床研究の客観性を保証するために当院以外の外部の監査担当者があなたの診療記録を閲覧することがあります。このような方々は第三者に相当しますので、このような場合は当院との秘密保持契約のもとで行われますので、あなたの個人情報はすべて秘密として取り扱われます。

本臨床研究では、タカラバイオという会社が外部協力者としてレトロウイル

スペクターに関する基礎的助言や TCR 遺伝子導入リンパ球の調製技術の提供・助言と遺伝子導入細胞製剤の体内動態検査、RCR 検査及び LAM-PCR に関する技術提供に限定し、間接的に関与しています。調製されたリンパ球をあなたに投与した場合の安全性や機能に関する記録は、通常の治験と同様に被験者識別コードを用いることにより個人が特定できないように個人情報完全に匿名化してから、タカラバイオの担当者が閲覧する可能性があります（被験者識別コードから患者さまを特定する情報については、担当医師が厳重に管理します）。

## 22. 個人情報の開示、訂正、利用停止や問い合わせ・相談・苦情の窓口について

本臨床研究で取り扱う個人情報について、あなたは開示、訂正、利用停止を求めることができます。個人情報に関する疑問等がある場合は、担当医師にお問い合わせください。お申し出に応じ、その手続きに関する詳細を説明します。

また、担当医師とは別に個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口もございますので、疑問等がございましたらお問い合わせください。

### 【個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口】

大阪大学医学部附属病院 個人情報相談窓口

・個人情報の内容と開示請求について：総務課広報評価係（TEL：06-6879-5020）

・診療録開示の手続き：医事課医事係（TEL：06-6879-5206）

## 23. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について

緊急時、またこの臨床研究について何かご心配やご質問がありましたら、下記にご連絡ください。

大阪大学大学院医学系研究科 消化器外科

TEL：06-6879-3251

休日・夜間の緊急連絡先 TEL：06-6879-5111

## 24. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制

1) 研究の正式名称：

MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究

2) 実施施設：

大阪大学医学部附属病院

3) 総括責任者：

土岐 祐一郎：大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻  
外科学講座 消化器外科 教授

4) 分担研究者：

- 和田 尚：大阪大学医学部附属病院 消化器外科 臨床登録医  
山崎 誠：大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座  
消化器外科 助教  
宮田 博志：大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座  
消化器外科 助教  
富山 佳昭：大阪大学医学部附属病院 輸血部 部長
- 珠玖 洋：三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座  
教授  
影山 慎一：三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座  
准教授  
池田 裕明：三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座  
准教授  
今井 奈緒子：三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座  
助教  
佐藤 永一：東京医科大学 人体病理学講座 助教

## 臨床研究参加同意書

大阪大学医学部附属病院 病院長 殿

私は、本臨床研究（研究課題名：MAGE-A4抗原特異的TCR遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究）について、文書と口頭にて説明を受け、以下の事項について十分了解しました。

了解した事項は□内にレを付けて示します。

- はじめに
- 臨床研究について
- あなたの食道癌について
- 遺伝子治療臨床研究の概要について
- TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について
- 臨床研究の方法
- 参加できる方、参加できない方
- 臨床研究のスケジュール
- 期待される効果
- 予想される危険性および副作用
- 臨床研究への参加予定期間
- 臨床研究への参加患者数
- 他の治療法について
- 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて
- 健康被害の補償について
- 新たな情報のお知らせについて
- 遺伝子治療臨床研究の中止について
- あなたに守っていただきたいこと
- あなたの費用負担について
- 個人情報の保護について
- 個人情報の第三者への提供の制限について
- 個人情報の開示、訂正、利用停止や問い合わせ・相談・苦情の窓口について
- 緊急連絡先およびお問い合わせ先について
- 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制

どちらかにレ又は○で囲む。

同意します

同意しません

同意年月日：平成 年 月 日

患者さま

ご署名： \_\_\_\_\_

説明年月日：平成 年 月 日

同席者さま

ご署名： \_\_\_\_\_

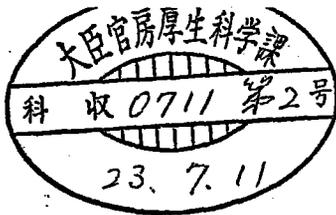
説明年月日：平成 年 月 日

総括責任者（又は分担研究者）所属・氏名： \_\_\_\_\_

説明年月日：平成 年 月 日

その他説明補助者

所属・氏名： \_\_\_\_\_



別紙様式第1

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 申 請 書

平成 23年 7月 6日

厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所 在 地	(530-8480) 大阪市北区扇町2丁目4番20号
	名 称	財団法人田附興風会医学研究所北野病院 tel: 06-6312-1221 fax: 06-6312-0588
	代 表 者 役職名・氏名	病院長 藤井信吾



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

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
MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注 による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究	消化器センター・副部長 上田修吾

## 遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成 23 年 7 月 6 日

(申請年月日)

研究の名称	MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	平成 21 年 7 月 17 日 (三重大学医学部附属病院の実施計画の承認日) から 3 年間

総括責任者	所属部局の所在地	大阪市北区扇町 2 丁目 4 番 20 号 (郵便番号 530-8480)	
	所属機関・部局・職	田附興風会医学研究所 北野病院 消化器センター 外科・副部長	
	氏名	上田 修吾 	
実施の場所	所在地	大阪市北区扇町 2 丁目 4 番 20 号 (郵便番号 530-8480)	
	名称	財団法人 田附興風会医学研究所 北野病院	
	連絡先	大阪市北区扇町 2 丁目 4 番 20 号 (電話番号 06-6312-8831)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	尾崎 信弘	田附興風会医学研究所 北野病院 副院長 消化器センター長	試験登録患者の診療
	珠玖 洋	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 教授	多施設共同臨床研究 代表者、臨床研究薬 品質管理者
	影山 慎一	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 准教授	レトロウイルスベクター製剤の品質管理 責任者、遺伝子導入 細胞製剤の品質管理 責任者
	池田 裕明	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 准教授	レトロウイルスベクター製剤の製造管理 責任者、遺伝子導入 細胞製剤の製造管理 責任者 遺伝子導入細胞製剤 の体内動態及び免疫 反応の評価

	今井 奈緒子	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 助教	遺伝子導入細胞製剤 の体内動態及び免疫 反応の評価
外部 協力者	峰野 純一	タカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター センター長	ウイルスベクターに 関する基礎的助言及 び遺伝子導入 T リン パ球調製技術の提供 と助言、遺伝子導入 細胞製剤の体内動態 検査、RCR 検査及び LAM-PCR に関する技 術提供

審査委員会が研究 計画の実施を適当 と認める理由	<p>本臨床研究は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日文科科学省・厚生労働省告示第1号（平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正）」の必要条件を満たしていると認める。</p> <p>本臨床研究で遺伝子導入する細胞はレトロウイルスベクターによる癌化リスクは低く、対象疾患の利益・不利益を総括すると遺伝子治療臨床研究の実施に問題は少ない。また本臨床研究実施計画に先立ち施行された実験動物に遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性試験の結果、遺伝子導入細胞投与群に毒性所見は観察されなかった。また、遺伝子導入細胞は三重大学内細胞調製施設において GMP 基準に準拠して調製され、細胞品質は調製時毎に確認される。本臨床研究を担当する研究者は、遺伝子ベクター調製、癌免疫療法・細胞治療等の経験者であり計画施行に適切な構成である。</p>	
	審査委員会の長の職名	氏名
	北野病院遺伝子治療臨床研究審査委員 会 委員長 田附興風会医学研究所 北野病院 副院長 心臓センター長	野原 隆司 

研究の区分	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">遺伝子治療臨床研究</div> 遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>本臨床研究は、標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）による効果が期待できない治療抵抗性の食道癌患者を対象として、腫瘍抗原 MAGE-A4 を HLA-A2402 存在下で特異的に認識する T 細胞受容体（T cell receptor：TCR）<math>\alpha</math> 鎖及び <math>\beta</math> 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球（TCR 遺伝子導入リンパ球）輸注について、その安全性、体内動態及び臨床効果を以下のエンドポイントにより評価することを目的とする。</p> <p>① 主要エンドポイント</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・本遺伝子治療の安全性〔有害事象、臨床検査、増殖性レトロウイルス（replication competent retrovirus：RCR）、linear amplification mediated-PCR（LAM-PCR）〕</li> </ul>

	<p>② 副次エンドポイント</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態及び腫瘍組織への浸潤</li> <li>・ 腫瘍特異的免疫反応</li> <li>・ 腫瘍縮小効果</li> </ul> <p>尚、本臨床研究は三重大学大学院医学系研究科の珠玖洋を多施設共同臨床研究代表者として、三重大学医学部附属病院、大阪大学医学部附属病院、及び田附興風会医学研究所北野病院が参加する多施設共同臨床研究として実施する予定である。</p>
<p>対象疾患及びその選定理由</p>	<p>1. 対象疾患に関する現時点での知見</p> <p>食道癌は60歳代男性に多くみられる疾患であり、本邦での年間罹患数(2003年、年齢調整)は男性13,658人、女性2,742人、死亡数(2007年、年齢調整)は男性9,900人、女性1,769人である。食道癌は縦隔等へ浸潤傾向が強く、また、早期からリンパ節転移をきたす治療困難例が多いため、予後不良癌とされている。食道癌の治療法はその進行度により、内視鏡的粘膜切除、手術、放射線療法及び化学療法から選択される。近年、食道癌の治療成績は手術や補助療法の進歩により改善が得られているが、全国食道癌登録調査報告書によれば、全体の5年生存率(TNM病期分類)は、0期:70.2%、Ⅰ期:64.5%、Ⅱa期:51.5%、Ⅱb期:34.0%、Ⅲ期:19.8%、Ⅳa期:13.7%、Ⅳb期:5.5%と未だ予後不良である。現在、病期進行食道癌に対する治療法として、シスプラチン(CDDP:白金系抗腫瘍剤)/5-フルオロウラシル(5-FU:葉酸代謝拮抗剤)による化学療法と放射線療法の併用療法(化学放射線療法)が標準的治療法として選択されているが、無効例も少なくない。また、CDDP/5-FUの他、ドセタキセルやパクリタキセル(本邦では食道癌の適応未承認)等のタキソイド系製剤の併用が検討されている。食道癌では、初回治療が適正に行われたにもかかわらず再発を認めることが多く、再発食道癌に対する治療法は、現在のところ一定のコンセンサスが得られていない。治療にあたっては、もっぱら延命効果の期待あるいは患者の生活の質(QOL)の改善を目的とし、再発食道癌の50%生存期間は約6ヶ月とされている。</p> <p>2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要</p> <p>本臨床研究では、治療抵抗性の食道癌患者から採取した末梢血リンパ球に、MAGE-A4 特異的 TCR<math>\alpha</math> 鎖及び<math>\beta</math>鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入し、その自己リンパ球を経静脈的に投与する。遺伝子導入リンパ球を投与後、MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドを投与し、患者体内での TCR 遺伝子導入リンパ球の増殖を図る。本臨床研究は、ヒト白血球抗原(HLA)-A2402 拘束性 MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球を輸注することにより、腫瘍特異的免疫反応、更には腫瘍縮小効果を期待するものである。MAGE-A4 は食道癌、頭頸部癌及び非小細胞肺癌等に多く発現する腫瘍抗原であり、正常組織においては HLA を発現しない精巣のみに発現する。そして、TCR 遺伝子導入リンパ球による細胞傷害活性は、遺伝子導入された細胞傷害性 T リンパ球(CTL)表面上の MAGE-A4 特異的 TCR が、腫瘍細胞表面上の HLA-A2402 分子と MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドの複合体を特異的に認識することにより発揮される。本臨床研究における評価項目は、遺伝子治療の安全性、TCR 遺伝子導入リンパ球の体内動態及び臨床効果である。</p> <p>3. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由</p> <p>治療抵抗性食道癌に対する根治療法は現時点では存在せず、栄養管理や QOL 向上のための緩和医療を行っているのが現状である。食道癌に対する抗癌剤以外の治療として、分子標的治療の開発が期待されているが、臨床研究結果の報告はない。このような現状において、食道癌に発現する腫瘍抗原を標的とした新規治療の開発が期待される。腫瘍抗原を標的とした免疫療法の1つとして、抗腫瘍活性を有する自己 T リンパ球を投与する細胞療法が積極的に研究されており、複数の臨床試験において有効例が報告されている。中でも、米国国立衛生研究所(NIH)の Rosenberg らのグループは、転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、体外で増殖させた腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を患者に再移入する養子免疫療法を実施し、RESIST ガイドラインによる判定として51%の腫瘍縮小効果を報告している。これら養子免疫療法における従来の細胞調製法と比較して、本遺伝子治療では、HLA-A2402</p>

	<p>陽性患者の T リンパ球に MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子を導入することによって、腫瘍細胞に対する傷害活性を付与するものであり、必要量の MAGE-A4 抗原特異的 T リンパ球を調製することが可能である。なお、上記の Rosenberg らのグループは、腫瘍抗原 MART-1 特異的 TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を投与した臨床試験において、悪性黒色腫患者 17 名中 2 名について転移腫瘍巣の明らかな退縮を観察しており、この戦略が有望な新規癌治療法となる可能性を示唆している。更に、同グループは、より親和性の高い TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している。</p>
<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>1. 人に導入する遺伝子の構造と性質 本臨床研究において発現する遺伝子は TCR <math>\alpha</math> 鎖及び <math>\beta</math> 鎖遺伝子である。</p> <p>1.1. 人に導入する遺伝子の構造 本臨床研究に用いる TCR <math>\alpha</math> 鎖遺伝子は 272 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、この遺伝子にコードされる蛋白は、111 アミノ酸からなる V8-1 領域、20 アミノ酸からなる J10 領域、141 アミノ酸からなる C 領域という構造からなっている。TCR <math>\beta</math> 鎖遺伝子は 313 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、この遺伝子にコードされる蛋白は、116 アミノ酸からなる V7-9 領域、3 アミノ酸からなる N 領域、15 アミノ酸からなる J2-5 領域、179 アミノ酸からなる C2 領域という構造からなっている。これらの遺伝子は、HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28 から単離された。</p> <p>1.2. 人に導入する遺伝子の性質 本臨床研究において導入する遺伝子は、TCR <math>\alpha</math> 鎖と <math>\beta</math> 鎖をコードする cDNA である。ヒトにおいて TCR <math>\alpha</math> 鎖は 14 番染色体上に、<math>\beta</math> 鎖は 7 番染色体上にコードされ、多様なクロナタイプが存在する。TCR 遺伝子は免疫グロブリン (Ig) と同様に多数の亜型からなる V、D、J の可変領域と少数の C の定常領域からなる。その中で <math>\alpha</math> 鎖の可変領域は V-J で <math>\beta</math> 鎖の可変領域は V-D-J で形成される。TCR 遺伝子は T 細胞の分化に伴い、これらの領域の遺伝子再構成という特徴的な過程を経て機能的遺伝子を形成する。まず D-J の遺伝子再構成が起こり、続いて V-DJ の再構成が生じる。再構成に伴い V-D 及び D-J 間にランダムな塩基配列 (N 領域) が組み込まれ TCR の多様性はさらに増加する。本臨床研究にはこの再構成を経た後の TCR 遺伝子の cDNA を導入する。われわれの使用する TCR <math>\alpha</math> 鎖は V<math>\alpha</math>8-1、J<math>\alpha</math>10、C であり、TCR <math>\beta</math> 鎖は V<math>\beta</math>7-9、J<math>\beta</math>2-5、C2 の配列である。</p> <p>レトロウイルスベクター MS-bPa により遺伝子導入された細胞において、TCR <math>\alpha</math> 鎖遺伝子はマウスホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) 遺伝子プロモーター (PPGK) によって転写される。マウス PPGK はヒトを含む広範囲の哺乳類細胞において、細胞が増殖中であるか否かを問わずに機能するプロモーターであり、レトロウイルスベクター MS-bPa により導入される PPGK は 513 bp のマウスゲノム由来 DNA 断片に含まれる。</p> <p>TCR <math>\beta</math> 鎖遺伝子は LTR プロモーターによって転写される。レトロウイルスベクター MS-bPa ゲノム RNA の 5'-LTR は R 領域と U5 領域、3'-LTR は U3 領域と R 領域からなり、U5 領域と両端の R 領域は Moloney murine leukemia virus (MoMLV) 由来、U3 領域は murine leukemia virus (MLV) の変異株である murine stem cell virus (MSCV) 由来である。細胞に遺伝子導入されてプロウイルスになると、両末端の LTR はいずれも U3-R-U5 領域の構造をとる。LTR 中では、MSCV 由来の U3 領域が強いプロモーター活性とエンハンサー活性を有する。MSCV LTR は胚性幹細胞、胎児がん細胞及びその他の哺乳動物細胞において高い発現レベルを持続的に保持することが可能である。</p> <p>1.3. 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性 TCR <math>\alpha</math> 鎖及び <math>\beta</math> 鎖は S-S 結合でヘテロダイマーとして機能的な TCR 分子を構成し、主要組織適合抗原 (MHC) 拘束性に標的細胞の MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識する。このことにより、T 細胞は抗原特異性を示す。抗原認識の際の結合力の強弱や補助レセプターからのシグナルの有無により、T 細胞の活性化、アナジューの誘導、分化、生存と細胞死等を司る。TCR 鎖は Ig スーパーファミリー分子に属し、</p>

2つのIgドメインからなる細胞外領域、20アミノ酸からなる膜貫通領域、数個のアミノ酸からなる細胞内領域で構成される。2つのIgドメインのうち、N末端側が可変領域、C末端側が定常領域に相当する。細胞外領域に存在する相補性決定領域(CDR)1、CDR2領域はMHCとの結合に貢献し、CDR3領域は主としてペプチドを認識するのに必要とされる。

TCRの発現とシグナル伝達にはTCRと複合体を形成する4種類のCD3鎖( $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 及び $\zeta$ 鎖)が重要であり、これらとTCRとが複合体を形成している。抗原認識の際にTCR/CD3複合体とCD4・CD8が会合してCD3の活性化モチーフITAMのチロシンがリン酸化されることによりTCRのシグナルが開始される。以上のシグナルにより、T細胞の抗原特異的な上記生理活性が発現される。

2. 本計画で使用するその他の組換えDNAの構造と性質  
本計画では使用しない。

3. 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由

本臨床研究における標的細胞は、治療抵抗性食道癌患者(HLA-A2402陽性、腫瘍組織中にMAGE-A4発現)末梢血由来のTリンパ球である。その生物学的特徴として、①CTLは癌細胞を認識して破壊する能力を有する、②自己のTリンパ球を輸注した場合は、非自己では生じる可能性のある移植片対宿主病(GVHD)等の副作用がないことが挙げられる。Tリンパ球を標的としてMAGE-A4特異的TCR $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入することで、腫瘍細胞表面上のHLA-A2402分子とMAGE-A4<sub>143-151</sub>ペプチド複合体の特異的認識能を獲得した自己Tリンパ球を輸注することにより、腫瘍特異的免疫反応、更には腫瘍縮小効果が期待される。レトロウイルスベクターは増殖中の細胞に高効率で遺伝子導入することから、本臨床研究では、抗CD3抗体であるオルソクローンOKT3(OKT3)による活性化とTリンパ球増殖因子であるインターロイキン2(IL-2)の存在下で増殖するTリンパ球が標的細胞として使用される。

4. 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由

4.1. 遺伝子導入方法の概略

自己末梢血リンパ球(PBL)にTCR $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖遺伝子を導入するにあたっては、組換えフィブロネクチンフラグメント(レトロネクチンCH-296;タカラバイオ(株))をコートした培養バッグ中にて、Tリンパ球にレトロウイルスベクターMS-bPaを感染させる。

4.2. 当該導入法を選択した理由

レトロウイルスベクターは感染した後に逆転写を経て細胞染色体に組み込まれ、細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、導入遺伝子を長期にわたり発現しうる。また、レトロウイルスベクターによる末梢血Tリンパ球への遺伝子導入効率が高いことが知られている。さらに、多くのMoMLVベースのレトロウイルスベクターがヒト血液細胞への遺伝子導入に利用されており、過去のT細胞遺伝子治療において重篤な副作用は報告されていない。以上の理由により、自己PBLへのTCR $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖遺伝子を導入する方法として、レトロウイルスベクターを選択した。

4.3. レトロウイルスベクターの選択根拠

他の遺伝子導入ベクターとして、アデノウイルスベクターやウイルスを利用しないNaked DNAベクターが使用されるが、それらは導入遺伝子が細胞染色体に組み込まれて長期にわたり安定に発現する効率が低いことが知られている。一方、レトロウイルスにより遺伝子導入する場合、他のベクターに比べて効率よく遺伝子を細胞染色体に組み込むことが可能である。レトロウイルスベクターMS-bPaを選択したもうひとつの根拠は安全性である。すなわち、もともなるMS-bPa DNAは、野生型レトロウイルス由来のgag、pol、envをコードする遺伝子の全てを欠如しており、このDNAのみを通常の細胞に導入したのではウイルス粒子を産生することはない。また、ウイルスベクター製造に用いるパッケージング細胞株PG13は、すでに世界的

に広く使用されているパッケージング細胞株であり、American Type Culture Collection (ATCC) から購入可能である (CRL-10686)。本パッケージング細胞株において、gag、pol をコードする DNA 断片と env をコードする DNA 断片とが染色体上の異なる位置に導入されているため、RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる。

## 5. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

### 5.1. 野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

レトロウイルスベクターMS-bPaのもとになる野生型ウイルスはMoMLVであり、以下のようなウイルス学的特徴を持つ。形態的には直径約100 nmの球形のC型粒子に分類され、ウイルスコアをエンベロープが囲っている。ウイルスゲノムは分子量約 $3 \times 10^6$ の1本鎖RNAで、相同のRNA分子が2分子、ウイルスコア中に存在する。レトロウイルス科は、オルソレトロウイルス及びスプーマレトロウイルスの2つの亜科に分類される。MoMLVはオルソレトロウイルス亜科のガンマレトロウイルス属に属する、マウスを宿主とする白血病ウイルスの一種である。マウス白血病ウイルスはAKRやC58系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスであるが、MoMLVは実験室内での継代により病原性の高いウイルス株として単離されたものである。

オルソレトロウイルスの病原性として、主体となるものは、肉腫、急性白血病、白血病、がんであり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経向性ウイルスも知られている。肉腫ウイルスや急性白血病ウイルスはウイルスと細胞の間での遺伝子の組換えにより形成されるが、MoMLVは細胞由来の遺伝子を持たないウイルスであり、AKRやC58系マウスでのみ白血病を誘発する。病理学的には胸腺リンパ腫を原発とした白血病所見を示し、脾臓への浸潤が顕著に認められる。AKRマウスの自然発症白血病に対しては抗AKR MLV血清が効果を示し、発症を遅延させることが報告されているが、MoMLVに対する血清の効果については不明である。ヒトへの感染の報告はない。

### 5.2. ウイルスベクターの作製方法

#### ①MS-bPa DNAベクターの構築

レトロウイルスベクターMS-bPa産生細胞株の構築に使用したプラスミドであるMS-bPa DNAベクターは、標準的な遺伝子工学的手法を用いて構築された。MoMLVプロウイルスの5'-LTR及び3'-LTRを含み、ウイルス蛋白をコードする配列を全く含まないレトロウイルスベクターであるMTベクターのプロウイルス配列を含むプラスミドがMT DNAベクターであり、MT DNAベクターの3'-LTRをMSCVプロウイルスの3'-LTRで置換したものがMS DNAベクターである。MS DNAベクターのマルチプルクロニングサイトに、TCR $\beta$ 鎖cDNAのコード域、マウスPPGK及びTCR $\alpha$ 鎖cDNAのコード域を組み込むことによりMS-bPa DNAベクターを構築した。

#### ②パッケージング細胞株の構築

本臨床研究において使用するパッケージング細胞株は、PG13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(1つはgagとpol、もう1つはenv遺伝子)で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、このアプローチはRCR出現のリスクは極めて少ないことが知られている。

#### ③ウイルス産生細胞株の構築

gag-pol遺伝子発現プラスミドであるpGP、エコトロピックenv遺伝子発現プラスミドであるpE-eco及びウイルスプラスミドベクターpMS-bPaを293T細胞にコトランスフェクトした。培養上清中には、マウス由来のパッケージング細胞であるPG13に効率よく感染するエコトロピックレトロウイルスベクターMS-bPaが一過性に産生される。この培養上清をPG13細胞に感染させ、限界希釈法により細胞をクローニングした。こうして得られたクローンから、高力価なアンフォトロピックウイルスを産生するクローンMS-bPa #20を得た。これをマスターセルバンク(MCB)用シードセルとして樹立し、これを培養してMCBを作製した。

#### ④レトロウイルスベクターMS-bPaの製造

本臨床研究において使用するレトロウイルスベクターMS-bPaは、バンキングされたウイルス産生細胞株[MCB又はワーキングセルバンク(WCB)]の培養上清を回収

	<p>することにより製造する。製造は全て管理された製造エリアにてGMP遵守下で行われる。</p> <p>5.3. ウイルスベクターの構造 レトロウイルスベクターMS-bPaはパッケージングシグナルとして<math>\Psi</math>+を有し、gag、pol、envをコードする配列を持たない。</p> <p>5.4. ウイルスベクターの生物学的特徴 パッケージング細胞株PG13は、GaLVのエンベロープ蛋白を持つレトロウイルスベクターを製造するためのパッケージング細胞株で、この細胞により産生されるレトロウイルスベクターはマウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。また、レトロウイルスベクターMS-bPaは増殖能を欠いているので、遺伝子導入した末梢血Tリンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。したがって、RCRが出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p>1. 遺伝子導入方法の安全性</p> <p>1.1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度 レトロウイルスベクターMS-bPaを安定かつ安全に供給するために、ウイルス産生細胞にはセルバンクシステムを使用する。MCBの作製・保存及びレトロウイルスベクターMS-bPaの製造はGMP管理下で行う。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生国産のものを使用する。</p> <p>①MCBの作製法 ウイルス産生細胞MS-bPa #20の初代細胞ストックより作製されたPrimary Seed Bankが拡大培養され、ウイルス産生細胞MCBがGMP遵守下で作製された。MCBの作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。作製されたMCBに関しては、以下の品質試験が行われた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. マイコプラズマ否定試験（培養法、DNA染色法）</li> <li>2. in vivo ウイルス試験</li> <li>3. in vitro ウイルス試験</li> <li>4. RCR試験（細胞）（293細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）</li> <li>5. RCR試験（上清）（293細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）</li> <li>6. XCプラークアッセイ</li> <li>7. マウス抗体産生試験（MAP試験）</li> <li>8. 無菌試験（日本薬局方）</li> <li>9. ウシウイルス試験</li> <li>10. ヒトウイルス試験</li> <li>11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定</li> <li>12. 組み込まれたベクター遺伝子の組み込み数試験</li> <li>13. 導入遺伝子配列解析</li> <li>14. 細胞生存率試験（トリパンブルー）</li> <li>15. 産生ウイルスの力価試験</li> <li>16. 導入遺伝子の機能確認</li> </ol> <p>②レトロウイルスベクターMS-bPaの製造方法 MCBの細胞を拡大培養した後、培地を交換し翌日に培養上清液を回収する。回収した培養上清は、保管、精製することなく引き続きレトロウイルスベクター製造工程に用いる。回収した培養上清液を0.22 <math>\mu</math>mのミリポアフィルターで濾過滅菌した後、ウイルスベクターとして凍結保存バックに小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。以下の品質試験を行う。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. マイコプラズマ否定試験（培養法）</li> <li>2. in vivo ウイルス試験</li> <li>3. in vitro ウイルス試験</li> <li>4. RCR試験（293細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）</li> </ol>

5. 無菌試験 (日本薬局方)
6. エンドトキシン試験 (日本薬局方)
7. 導入遺伝子配列解析
8. 産生ウイルスの力価試験
9. 導入遺伝子の機能確認

#### 1.2. 患者に投与する物質の純度及びその安全性

患者に投与されるのはレトロウイルスベクターMS-bPaにより TCR $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖遺伝子を導入した患者由来Tリンパ球である。

#### 1.3. 増殖性ウイルス出現の可能性

##### ①レトロウイルスベクターの安全性

本臨床研究で使用するレトロウイルスベクターMS-bPaのゲノムはMoMLV由来のgag、pol、envをコードする遺伝子を完全に欠如している。また、パッケージング細胞株としてPG13を用いるので、RCRの出現する可能性は極めて低いと考えられる。レトロウイルスベクターMS-bPaの試験項目にRCR試験が含まれており、RCR陰性のレトロウイルスベクターを臨床使用する。また、治療後には患者末梢血中のRCRを測定する。

##### ②パッケージング細胞の安全性

レトロウイルスベクターMS-bPaを作製する際に使用されるパッケージング細胞PG13は、第3世代のパッケージング細胞株であり、RCRを産生する可能性は極めて低い。すなわち、パッケージングに必要なウイルス遺伝子がpLGPS及びpMOV-GaLV Seato envという2個のDNA断片として別々に導入されていることに加え、どちらのDNA断片も $\Psi$ パッケージングシグナルと3'-LTRを欠失しているため、gag-pol遺伝子やenv遺伝子がウイルス粒子内にパッケージングされて細胞外に出ることはない。

PG13と同じ第3世代のアンフォトロピック系パッケージング細胞株GP+envAm12を用いて産生したレトロウイルスベクター中にRCRを検出したことが1996年にChongらにより初めて報告された。RCR出現の頻度を測定することは困難であるが、過去4年間、GP+envAm12細胞を用いてウイルス産生細胞株を樹立し、60以上のウイルスについてRCRチェックを試みたが検出されなかったため、極めて低い頻度と考察されている。なお、PG13を用いてレトロウイルスベクターを作製する過程でRCRが出現したという報告はない。

#### 1.4. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入過程において、細胞を傷害することはないと考えられている。一方、細胞染色体上の遺伝子導入位置によっては細胞の生存・増殖に必須な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがありうるが、このような細胞の割合は少ないと考えられる。なお、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において細胞傷害性は報告されていない。

#### 1.5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、患者Tリンパ球にex vivo (生体外)でTCR $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に患者に投与する。使用したレトロウイルスベクターMS-bPaはこの過程でほぼ完全に除去され、また、レトロウイルスは比較的不安定なウイルスなので、細胞培養中に大部分は不活化されると考えられる。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株により生産されたレトロウイルスベクターはヒト血清中の補体により速やかに不活化されるため、たとえレトロウイルスベクター粒子が患者体内に侵入しても、それが原因で患者体内において遺伝子導入が起こる可能性は低いと考えられる。また、レトロウイルスベクターMS-bPaは増殖能を欠いているので、遺伝子導入した患者Tリンパ球内でウイルス粒子を形成することはなく、RCRが出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子導入が起きることはない。

#### 1.6. 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究の細胞調製は、当該操作に十分な知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、細胞調製作業者に遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。遺伝子導入操作は P2 レベルの細胞調製施設において、可能な作業は閉鎖系で行い、開放系での作業は細胞調製施設内に設置されたクラス II 安全キャビネット内で行う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧蒸気滅菌後に廃棄される。以上のようにしてレトロウイルスベクター MS-bPa の環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。レトロウイルスベクター MS-bPa は増殖能欠損型なので、患者を介して患者以外の人に遺伝子導入が起こる可能性は、大量の RCR が患者体内に存在しない限り非常に低い。

#### 1.7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その挿入位置によっては細胞の生存や増殖等の機能に影響を及ぼすことがある。細胞の生存や増殖に重要な遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現が抑制された場合には細胞は死に至る可能性がある。ただし、このような細胞は遺伝子導入細胞のごく一部であると考えられるので、患者への影響は極めて小さい。一方、がん遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターの LTR が有するエンハンサー-プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、がん抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、その細胞が異常増殖する可能性がある。

#### 1.8. がん原性の有無

レトロウイルスベクターの染色体への組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、上述のとおり異常増殖によるがん化の問題が出現する。実際に、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) のフランスでの遺伝子治療において、合計 4 例の白血病発症が報告されている。本臨床研究における遺伝子導入標的細胞である成熟 T リンパ球のがん化のリスクは造血幹細胞に比べて低いとの見解が、ICH の遺伝子治療専門家グループから出されている。過去に実施された T 細胞を遺伝子導入の標的細胞とした遺伝子治療において、遺伝子導入細胞のがん化は報告されていない。また、レトロウイルスベクターで遺伝子導入した T リンパ球を投与した 46 例のフォローアップ (最長 9 年間) において、遺伝子導入 T リンパ球のクローン増殖が認められなかったとの報告がある。なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖を LAM-PCR によってモニタリングして、遺伝子導入細胞の異常増殖の有無を評価する。

#### 2. 遺伝子産物の安全性

導入遺伝子の産物は、可変領域の配列に違いがあるものの、標的細胞である T 細胞は内在性に TCR  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖を発現している。したがって、導入遺伝子が発現することにより標的細胞が獲得する性質は、異なる抗原特異性だけであると考えられる。Ex vivo で培養、増殖させた T 細胞クローンを大量に投与する臨床試験において、重大な有害事象は併用した化学療法剤又は IL-2 によるものだけであったとの報告がある。このことから、特定の TCR 可変領域を持つ T 細胞の大量投与による安全上の問題は小さいと考えられる。

前述したとおり、本臨床研究における遺伝子導入の標的細胞の大半は内在性に TCR  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖を発現している。ここに新たに MAGE-A4 に対する TCR 遺伝子を導入するので、遺伝子導入細胞において 2 種類の配列の  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖が発現する。このため、(1) 予測不可能な抗原特異性を持つ混合 TCR 2 量体の形成、(2) 自己抗原特異的 TCR を有する無応答 T 細胞の、導入された TCR からの刺激による活性化及び (3) 腫瘍抗原ペプチドと HLA 分子との複合体が、自己抗原ペプチドと患者の HLA アレル (対立遺伝子) との複合体の立体構造に酷似していることによる、自己細胞の攻撃、のいずれかのメカニズムにより、理論的には自己免疫疾患を発症する可能性が指摘されている。

ただし、メラノーマ抗原に対する TCR 遺伝子を用いた臨床試験において遺伝子導入細胞による毒性は認められていないことから、TCR 遺伝子を導入した T 細胞が自己免疫疾患を引き起こす可能性は否定できないものの、臨床における安全性は確保されていると考えられる。

### 3. 細胞の安全性

#### 3.1. 遺伝子導入細胞の調製方法

以下に示す遺伝子導入細胞の調製にかかわる全ての操作は三重大学医学部内に設置された P2 レベルの細胞調製施設内で行う。また、細胞調製操作時には、品質が確認された試薬、培地類を使用し、清浄度クラス 100、クラス II 安全キャビネット内で、又は可能な工程については閉鎖系で細胞を取り扱うことにより、他の患者由来の細胞や外来微生物の混入を防止する。

遺伝子導入 T リンパ球調製工程の概略は以下に示すとおりである。すなわち、OKT3 及び組換えヒト IL-2 を含む培地で患者リンパ球の培養を開始し、レトロウイルスベクター MS-bPa を結合させたレトロネクチン CH-296 コートバッグに上記活性化 T リンパ球懸濁液を添加して遠心することにより遺伝子導入を合計 2 回行い、拡大培養後に細胞を洗浄・濃縮・回収するというものである。こうして得られた細胞懸濁液に凍害保護液を添加し、凍結保存バッグに移した後、凍結保存する。

#### 3.2. 培養細胞の純度

遺伝子導入後の細胞中に遺伝子導入されていない T リンパ球やその他の細胞が混在すると予測されるが、もともと患者末梢血中にあった細胞であり問題はないと考えられる。また、細胞培養の際に使用する原材料の残留は極めて微量であり、これらが生体に及ぼす影響は限りなく少ない。TCR 遺伝子導入リンパ球は、「3.4. 被験者に投与する細胞の安全性」に記載の試験によって品質が担保される。

#### 3.3. 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

リンパ球と遺伝子導入細胞の遺伝子型の違いは、後者には TCR  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖の遺伝子が導入されていること、及び、レトロウイルスベクター MS-bPa のプロウイルス配列が染色体内のランダムな位置に挿入されていることである。本臨床研究で遺伝子導入する細胞は成人 PBL であり、挿入変異によって細胞のがん化が起きる可能性は大変低いと考えられるが完全には否定できないので、LAM-PCR によるモニタリングを行う予定である。OKT3 で刺激することによって CD3 陽性細胞が活発に増殖し、その結果として CD3 陽性細胞の割合が増加する。また、一般にリンパ球を ex vivo で培養すると CD4 陽性細胞の割合が減少し、CD8 陽性細胞の割合が増加する。しかし、培養後の細胞集団を構成する個々の細胞のサブタイプは末梢血中に存在するものであり、これを患者に投与しても安全性に問題はないと考えられる。Sauce らは、PBMC を OKT3 や IL-2 を含む培地で ex vivo にて培養すると、リンパ球の表現型が変化するが、レトロウイルスベクターの感染による変化は特に認められないことを報告している。ex vivo で培養したリンパ球や TCR 遺伝子を導入したリンパ球を用いた Rosenberg らの臨床研究では、移入 T 細胞の安全性に対する問題は報告されていない。また、レトロウイルスベクターにより TCR 遺伝子を導入した臨床試験では、6 日から 9 日という比較的短期間の ex vivo 培養 T リンパ球の群において移入 T リンパ球が患者生体内で長期間観察されたことが報告されている。本計画においても同様に短期間培養した遺伝子導入 T リンパ球を使用する予定である。

#### 3.4. 被験者に投与する細胞の安全性

以下の試験を行うことにより遺伝子導入細胞の品質を担保する。安全性が確認されるまで凍結保存され、安全性が確認された後に使用される。

1. マイコプラズマ否定試験 (PCR 法)
2. RCR 試験 (RT-PCR 法)
3. 無菌試験 (日本薬局方)
4. エンドトキシン試験 (日本薬局方)
5. 細胞生存率試験 (トリパンブルー)

	<p>6. 細胞数試験 7. 遺伝子導入効率試験 8. 導入遺伝子の機能試験</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p>以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。</p> <p>①臨床ニーズ 再発食道癌の患者の50%生存期間は約6ヶ月である。さらに、化学療法等の治療に抵抗性となれば、もっぱら栄養管理等の緩和医療以外の手立てがないのが現状である。本臨床研究は、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者を対象としており、このような患者に対する有効な治療手段開発の臨床ニーズが存在する。</p> <p>②品質・安全性 本臨床研究は、腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する CTL クローン由来の TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球を患者に投与する。この製造過程は十分に確立され、また、調製された輸注用の TCR 遺伝子導入リンパ球の品質は、調製時毎に確保される。 本臨床研究で遺伝子導入する細胞は、小児由来の造血幹細胞ではなく、成人末梢血由来の T リンパ球であり、T リンパ球への遺伝子導入の場合、レトロウイルスベクターによるがん化のリスクは極めて低く、対象疾患とのリスク・ベネフィットを総括すると、レトロウイルスベクターを使用した遺伝子治療の施行に問題はない。 免疫不全マウスに TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性比較試験において、対照とした非遺伝子導入ヒトリンパ球と比較して、遺伝子導入に起因する毒性所見は観察されなかった。 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入で同様にして調製された、他の腫瘍抗原を認識する TCR 遺伝子導入リンパ球のヒトへの投与は、NIH の Rosenberg らのグループで既に実績がある。</p> <p>③期待される有効性 三重大学にて調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性の腫瘍細胞株に対して特異的な細胞傷害活性を示すことが <i>in vitro</i> において確認されている。また、免疫不全マウスにヒト腫瘍細胞株を接種したモデル実験において、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与に特異的な腫瘍径増大抑制効果が認められた。 NIH の Rosenberg らは、転移性悪性黒色腫患者 17 例に腫瘍抗原 MART-1 の TCR 遺伝子導入リンパ球を投与する遺伝子治療臨床研究を行った結果、2 例 (12%) に PR (部分奏功) を認めており、更に、同グループは、より親和性の高い TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している。 従って、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。</p> <p>④当施設・研究者の能力 当施設の総括責任者及び研究者 (上田修吾、尾崎信弘) は対象疾患である食道癌に対する十分な臨床経験 (手術 約 40 例、化学療法 約 30 例) 及び臨床研究 (CHP がんワクチン臨床試験、抗癌剤感受性に関する研究: 文部科学省科学研究費) に対する知識を有している。これらのことから、当施設における研究者は本臨床研究を行うために必要な能力を十分に有していると判断する。</p> <p>⑤臨床研究薬の調製 被験者へ投与される TCR 遺伝子導入リンパ球は、遺伝子ベクター調製、リンパ球アフレーション、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び腫瘍抗原由来ペプチドワクチン臨床試験の経験者である三重大学大学院医学系研究科の珠玖、影山、池田による監督・管理下のもとで三重大学にて調製される。</p> <p>⑥安全・効果評価・適応判定中央部会 本臨床研究は多施設共同臨床研究として実施されることから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一された評価基準にて行うことが必要である。</p>

	<p>そのため、各医療機関から安全性や有効性の評価、適応の判定を行うための委員を選出し、安全・効果評価・適応判定中央部会を設置する。</p>
<p>実施計画</p>	<p>1. 本臨床研究の実施手順  治療抵抗性食道癌患者より一次登録時の選択基準・除外基準に適合する患者を選定し、本臨床研究への一次登録を行う。  北野病院においてアフェレーシスにて自己PBLを採取し、三重大学細胞調製施設に搬送する。三重大学細胞調製施設で自己PBLにMAGE-A4<sub>143-151</sub>ペプチドを認識するTCR<math>\alpha</math>鎖及び<math>\beta</math>鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、得られたTCR遺伝子導入リンパ球をex vivo培養し、一旦凍結保存する。  三重大学細胞調製施設にて調製したTCR遺伝子導入リンパ球の品質が確認された後、北野病院にTCR遺伝子導入リンパ球が提供される。二次登録の前に再度文書にて同意を取得し、二次登録時の選択基準を満たし、除外基準に抵触しないことを確認したうえで本臨床研究への二次登録を行う。  TCR遺伝子導入リンパ球（単回投与）を経静脈的に投与する。  1日投与量300<math>\mu</math>gのMAGE-A4<sub>143-151</sub>ペプチドと不完全フロイントアジュバントとの懸濁液を、TCR遺伝子導入リンパ球投与日を0日として14日目及び28日目の2日間の計2回、皮下投与する。  追跡調査を行った後、本遺伝子治療の安全性（有害事象、臨床検査、RCR、LAM-PCR）、TCR遺伝子導入リンパ球の血中動態及び腫瘍組織への浸潤、腫瘍特異的免疫反応及び腫瘍縮小効果を評価する。  TCR遺伝子導入リンパ球投与後63日目に本臨床研究を終了とする。</p> <p><u>TCR遺伝子導入リンパ球数の設定</u>  投与するTCR遺伝子導入リンパ球数は1回投与量<math>2 \times 10^8</math>個、<math>1 \times 10^9</math>個、<math>5 \times 10^9</math>個の各コホート別とする。各コホートは3例とし、1回投与量を<math>1 \times 10^9</math>個、<math>5 \times 10^9</math>個へと増加させる。ただし、有害事象が発現した場合には、投与量増加基準に従ってそのコホートの症例数を増加し、安全性の評価を強化する。</p> <p>2. 被験者の選択基準及び除外基準  <b>選択基準（一次登録）：</b>  以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。  1) 組織診で確定診断の得られた食道癌の患者  2) 根治切除不能かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）抵抗性の臨床病期Ⅲ期あるいはⅣ期（TNM分類）の食道癌患者、又は術後あるいは初回放射線化学療法後に再発転移をきたし治療抵抗性となった食道癌患者  3) HLA-A2402陽性の患者  4) PCR法にて腫瘍組織にMAGE-A4発現が確認されている患者  5) 画像診断等による臨床効果判定に必要とされる測定可能な腫瘍病変を有する患者  6) ECOG Performance Status 0~1の患者  7) 本臨床研究参加時点の年齢が20歳以上75歳以下の患者  8) 細胞採取時に前治療（手術、化学療法、放射線療法）終了から4週間以上の経過が見込める患者  9) 同意取得後4ヶ月以上の生命予後が見込める患者  10) 主要臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者  ・白血球数 <math>\geq 3,000/\text{mm}^3</math>  ・好中球数 <math>\geq 1,500/\text{mm}^3</math>  ・ヘモグロビン <math>\geq 8.0 \text{ g/dL}</math>  ・血小板数 <math>\geq 100,000/\text{mm}^3</math>  ・総ビリルビン (T-Bil) <math>\leq 2.0 \text{ mg/dL}</math>  ・AST (GOT)、ALT (GPT) <math>\leq 150 \text{ IU/dL}</math>  ・クレアチニン (Cr) <math>\leq 2.0 \text{ mg/dL}</math>  ・動脈血酸素分圧 70torr以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上  11) 免疫組織染色法にて腫瘍組織にHLAクラスI分子発現が確認されている患者</p>

12) 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

除外基準（一次登録）：

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
  - ・ 不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
  - ・ コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
  - ・ 活動性の感染症
  - ・ 胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
  - ・ 自己免疫疾患
  - ・ 出血傾向〔プロトロンビン時間 (PT) < 50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) > 60 sec、フィブリノゲン (Fbg) < 100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) > 20  $\mu$ g/mL〕
  - ・ 血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 3) HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-1 抗体のいずれかが陽性である患者
- 4) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
- 5) 制御困難な脳内転移を有する患者
- 6) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
- 7) MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチド投与に適さない患者(例えば MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者)
- 8) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者
- 9) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は精子希望の男性患者（ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない）
- 10) 一次登録前 4 ヶ月以内に他の臨床試験（臨床研究）に参加している患者
- 11) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた患者

選択基準（二次登録）：

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 本臨床研究における最小輸注量 ( $2 \times 10^8$  個) の TCR 遺伝子導入リンパ球が得られた患者
- 2) 画像診断等による臨床効果判定に必要とされる測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 3) ECOG Performance Status 0~1 の患者
- 4) 主要臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
  - ・ 白血球数  $\geq 3,000/\text{mm}^3$
  - ・ 好中球数  $\geq 1,500/\text{mm}^3$
  - ・ ヘモグロビン  $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
  - ・ 血小板数  $\geq 100,000/\text{mm}^3$
  - ・ 総ビリルビン (T-Bil)  $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
  - ・ AST (GOT)、ALT (GPT)  $\leq 150 \text{ IU/dL}$
  - ・ クレアチニン (Cr)  $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
  - ・ 動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 5) 一次登録後に同意撤回がなく、治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

除外基準（二次登録）：

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
  - ・ 不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
  - ・ コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
  - ・ 活動性の感染症

	<ul style="list-style-type: none"> <li>・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症</li> <li>・自己免疫疾患</li> <li>・出血傾向〔プロトロンビン時間 (PT) &lt;50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) &gt;60 sec、フィブリノゲン (Fbg) &lt;100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) &gt;20 <math>\mu</math>g/mL〕</li> <li>・血栓形成傾向</li> </ul> <ol style="list-style-type: none"> <li>2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者</li> <li>3) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者</li> <li>4) 制御困難な脳内転移を有する患者</li> <li>5) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者</li> <li>6) MAGE-A4<sub>149-151</sub> ペプチド投与に適さない患者(例えば MAGE-A4<sub>149-151</sub> ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者)</li> <li>7) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者</li> <li>8) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は挙子希望の男性患者(ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない)</li> <li>9) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた患者</li> </ol> <p>3. 被験者の同意の取得方法</p> <p>本臨床研究の開始に先立ち、総括責任者又は分担研究者は被験者の同意を得るに際し、北野病院内に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意・説明文書を説明の前又は説明するときに渡し、内容を口頭で詳しく説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する(文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計 2 回行う)。なお、同意を取得する前には、質問する機会と本臨床研究に参加するか否かを判断するのに十分な時間を被験者本人に与え、全ての質問に対して被験者が満足するように答えるものとする。また、総括責任者又は分担研究者以外の臨床研究コーディネーター等が説明補助を行うことも可能とする。</p> <p>4. 実施期間及び目標症例数</p> <p>実施期間は共同実施機関である三重大学医学部附属病院が厚生労働大臣から本臨床研究実施の承認を得た時点(2009年7月17日)から3年間とする。症例毎の実施期間は TCR 遺伝子導入リンパ球輸注後 63 日であるが、本臨床研究終了後も当該被験者の生存期間にわたり、遺伝子導入 T リンパ球の血中動態及び二次発がんや RCR の有無について追跡調査を実施する。</p> <p>目標症例数は以下のとおり全施設の症例を合わせて 9 例とするが、有害事象が発現した場合には、投与量増加基準に従ってそのコホートの症例数を最大 6 例まで増加し、安全性の評価を強化する。</p> <p><u>1 回当たりの TCR 遺伝子導入リンパ球輸注量</u></p> <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>コホート 1</td> <td><math>2 \times 10^8</math> 個</td> <td>3 例</td> </tr> <tr> <td>コホート 2</td> <td><math>1 \times 10^9</math> 個</td> <td>3 例</td> </tr> <tr> <td>コホート 3</td> <td><math>5 \times 10^9</math> 個</td> <td>3 例</td> </tr> </table> <p>5. 臨床検査項目及び観察項目</p> <p>検査・観察スケジュール(別紙)に定められたとおりに検査・観察を実施する。</p>	コホート 1	$2 \times 10^8$ 個	3 例	コホート 2	$1 \times 10^9$ 個	3 例	コホート 3	$5 \times 10^9$ 個	3 例
コホート 1	$2 \times 10^8$ 個	3 例								
コホート 2	$1 \times 10^9$ 個	3 例								
コホート 3	$5 \times 10^9$ 個	3 例								
備 考										

(別紙) 検査・観察スケジュール

臨床研究期間 日数	スクリーニング 期間		治療期間										追跡 調査 期間	
	同意 取得日	アフェレーシス 実施日	day0 *	day1	day2	day3	day7	day14 ±3	day16 ±3	day28 ±3	day30 ±3	day35 ±3		day63 ±3
入院		○	○					→	○	→	○	→		
同意取得	○		○											
一次登録	○													
二次登録			○											
被験者背景	○													
アフェレーシス		○												
TCR 遺伝子導入 リンパ球投与			○											
MAGE-A4 ペプチド 投与									○		○			
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
動脈血酸素分圧・動 脈血酸素飽和度	○		○											
一般状態 (PS)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○													
血液学的検査	○	○	○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○	○
血液生化学的検査	○	○	○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○	○
血液凝固能検査	○		○ <sup>2</sup>									○	○	○
免疫血清 (CRP)	○		○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○	○
尿検査	○		○ <sup>2</sup>	○			○	○		○		○	○	○
腫瘍マーカー	○		○ <sup>2,4</sup>									○ <sup>4</sup>	○ <sup>4</sup>	○ <sup>4</sup>
胸部 X 線検査	○		○ <sup>2</sup>									○	○ <sup>5</sup>	○ <sup>5</sup>
12 誘導心電図	○		○ <sup>2</sup>									○	○ <sup>5</sup>	○ <sup>5</sup>
頸部・胸部・ 腹部・骨盤 CT	○ <sup>1</sup>		○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>	○ <sup>5</sup>
PET-CT			○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>	○ <sup>5</sup>
上部消化管 内視鏡検査	○ <sup>1</sup>		○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>	○ <sup>5</sup>
腫瘍組織生検			○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>	○ <sup>5</sup>
TCR 遺伝子導入 リンパ球 血中動態用採血 <sup>6</sup>			○ <sup>7</sup>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫機能解析 用採血			○ <sup>2</sup>					○		○		○	○	○
TCR 遺伝子導入 リンパ球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検査			○ <sup>3</sup>									○	○ <sup>5</sup>	○ <sup>5</sup>
RCR <sup>8</sup>				○ <sup>4</sup>								○	○	○
LAN-PCR <sup>8</sup>												○	○	○
採血量 (mL)	15	-	110	23	10	10	18	68	10	68	10	70	70	70
有害事象														

\*アフェレーシス実施日より約 40 日後 (遺伝子導入細胞製剤の調製・QC に要する日数により異なる)。

1. スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。
2. 治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。
3. 治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。
4. スクリーニング期間の測定値が高値例のみ実施。
5. 必要に応じて実施。
6. 臨床研究終了後も 1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施。
7. TCR 遺伝子導入リンパ球投与前 (治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする)、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間 (± 2 時間) 後、及び 12 時間 (± 2 時間) 後。
8. 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法として、個室管理を解除する前に実施。

## 遺伝子治療臨床研究に係る第一種使用規程について

三重大学医学部附属病院  
 大阪大学医学部附属病院  
 (財) 田附興風会医学研究所 北野病院

課題名 : MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による  
 治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究

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

- 作業委員会の意見 . . . . . P. 1
- 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 名簿 . . . . . P. 5

**【 三重大学医学部附属病院 】**

- 第一種使用規程承認申請書 . . . . . P. 7
- 生物多様性影響評価書 . . . . . P. 11

**【 大阪大学医学部附属病院 】**

- 第一種使用規程承認申請書 . . . . . P. 29
- 生物多様性影響評価書 . . . . . P. 33

**【 (財) 田附興風会医学研究所 北野病院 】**

- 第一種使用規程承認申請書 . . . . . P. 51
- 生物多様性影響評価書 . . . . . (略)

平成 24 年 5 月 16 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  
委員長代理 島田 隆

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. HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖を発  
現し、Gibbon ape 白血病ウイルスの env 蛋白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 (MS-bPa)  
申請者：① 三重大学医学部附属病院 病院長 竹田 寛  
申請者：② 大阪大学医学部附属病院 病院長 福澤 正洋  
申請者：③ 田附興風会医学研究所北野病院 病院長 藤井 信吾  
申請日：① 平成 23 年 7 月 6 日  
申請日：② 平成 23 年 7 月 5 日  
申請日：③ 平成 23 年 7 月 6 日

(別紙)

【作業委員会の評価結果（① 三重大学医学部附属病院、② 大阪大学医学部附属病院、  
③ 田附興風会医学研究所北野病院）】

- 本申請に係る臨床研究は、現在三重大学医学部附属病院において行われている遺伝子治療臨床研究について、新たに大阪大学医学部附属病院及び田附興風会医学研究所北野病院を含めた多施設共同研究として実施するものである。
- また、現在三重大学医学部附属病院において実施されている遺伝子治療臨床研究に関する第一種使用規程については、すでに平成21年7月17日に承認されているところ、大阪大学医学部附属病院及び田附興風会医学研究所北野病院における臨床研究は、現在の三重大学医学部附属病院と同様の手法により管理が実施されるものである。
- このため、当作業委員会においては、現在からの変更点（三重大学医学部附属病院から他施設への遺伝子組換え生物等の運搬等）を中心に検討を行い、その結果、第一種使用規程に従って使用する限り生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

※ 以下は、平成21年7月17日に承認された三重大学医学部附属病院の同遺伝子治療臨床研究に関する評価結果を踏まえた評価結果である。

<p>1. 遺伝子組換え生物等の種類の名称:HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体 <math>\alpha</math> 鎖及び <math>\beta</math> 鎖を発現し、Gibbon-ape 白血病ウイルスの env 蛋白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 (MS-bPa)</p>
<p>第一種使用等の内容: ① 1. 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 2. 共同実施施設への運搬 3. 1 及び 2 に付随する行為 ②、③ 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</p>
<p>申請者: ①三重大学医学部附属病院 病院長 竹田 寛 申請者: ②大阪大学医学部附属病院 病院長 福澤 正洋 申請者: ③田附興風会医学研究所北野病院 病院長 藤井 信吾</p>
<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、MS-bPa 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であると考えられる。さらに、MS-bPa 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。したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、MS-bPa 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>MS-bPa 及びそれに由来する増殖能を獲得したウイルス (RCR) は、Gibbon ape leukemia virus (GaLV) env 蛋白質を持つため、広範囲の動物に感染し得るが、微生物への感染性は知られていない。また、MS-bPa 及び RCR は T 細胞受容体 <math>\alpha</math> 鎖及び <math>\beta</math> 鎖遺伝子を発現するが、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>MS-bPa 及び RCR は、広範囲の動物に感染し、挿入変異によっては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であると考えられる。MS-bPa は、ヒト血清 (補体) により速やかに不活化され、さらに、MS-bPa は増殖能を欠損しており、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と考えられる。また、RCR 出現の可能性が極めて低い第三世代のパッケージ細胞を使用して製造されていること等から、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としても、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。</p> <p>導入遺伝子発現が影響を及ぼす可能性は HLA-A2402 陽性のヒトに限られており、MAGE-A4 を発現する正常組織である精巣に HLA 発現は知られていないため、病原性を示す可能性は非常に低いと考えられる。</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、病原性に起因する生物多様性影響が生ず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>MS-bPa 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ず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>MS-bPa 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、MS-bPa 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ず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>MS-bPa 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 MS-bPa 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ず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、MS-bPa 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ず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

【三重大学、大阪大学、北野病院】

「MAGE-A4抗原特異的TCR遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究」

氏名	所属
いわさき かずひろ 岩崎 一弘	(独)国立環境研究所 主任研究員
かんだ ただひと 神田 忠仁	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
さいとう いずむ 斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
○ しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
はやかわ たかお 早川 義夫	近畿大学 薬学総合研究所所長
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

○：委員長代理（五十音順 敬称略）

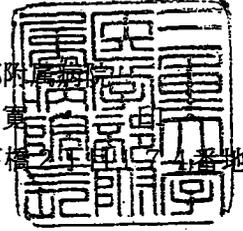


第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 7 月 6 日

厚生労働大臣 細川 律夫 殿  
環境大臣 江田 五月 殿

氏名 三重大学医学部附属病院  
申請者 病院長 竹田 寛  
住所 三重県津市江戸橋 2-1-1 番地



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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体 <math>\alpha</math> 鎖及び <math>\beta</math> 鎖を発現し、Gibbon ape 白血病ウイルスの env 蛋白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 Maus 白血病ウイルス (MS-bPa)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>1. 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 2. 共同実施施設への運搬 3. 1 及び 2 に付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>治療施設の所在地 三重県津市江戸橋二丁目 174 番地  治療施設の名称 三重大学医学部附属病院</p> <p>(1) MS-bPa 溶液は、容器に密閉され、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 MS-bPa 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。患者リンパ球への MS-bPa 導入操作、MS-bPa 導入細胞の培養その他の MS-bPa 希釈溶液及び MS-bPa 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。MS-bPa 希釈溶液及び MS-bPa 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、MS-bPa 希釈溶液若しくはその凍結品又は MS-bPa 導入細胞を、開放系区域を通過して他の 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) MS-bPa 導入細胞を、開放系区域を通過して他の共同実施施設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、凍結状態で輸送する。</p> <p>(4) MS-bPa 溶液 (希釈溶液を含む。) 又は MS-bPa 導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活化 (高圧蒸気滅菌処理、0.5% 以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液への浸漬処理又は消毒用アルコール処理による。以下同じ。) を行った後、三重大学医学部附属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>(5) 被験者に対する MS-bPa 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陽圧でない個室 (以下「個室」という。) 内において輸注により行う。なお、投与時に MS-bPa 導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具等は使い捨てとし、適切にウイルス不活化を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらのウイルス不活化を個室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>(6) 投与後 3 日まで、被験者を個室で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に個室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>(7) 個室における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切にウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従</p>

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、適切にウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらのウイルス不活化を個室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、MS-bPa 溶液及び MS-bPa 導入細胞の取扱いに準ずる。

(8) 個室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、適切にウイルス不活化を実施した後、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、これらのウイルス不活化又は洗浄を個室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。

(9) 個室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、個室における管理を継続する。

(10) 個室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、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(6)から(9)までと同様の措置を執る。

「HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖を発現し、Gibbon ape 白血病ウイルスの env 蛋白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白血病ウイルス (MS-bPa)」

生物多様性影響評価書

三重大学医学部附属病院

# 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 分類学上の位置づけ及び自然環境における分布状況

HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖を発現し、Gibbon ape 白血病ウイルスの env 蛋白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白血病ウイルス MS-bPa (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クトロピック (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1: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>

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).

### 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3)。遺伝子治療/遺伝子マーキングの臨床プロトコールでは、レトロウイルスベクター法を用いたものが 22.6% を占める (文献4)。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3: 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4: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

### 3 生理・生態学的特性

#### (1) 基本的特性 (文献5)

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6)。

#### (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 アンフォトロピック 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

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無い。

(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°C、20分間の高圧蒸気滅菌、②170°C、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7)。また、10%及び1%ピドンヨード液(文献8)、0.3%過酸化水素水(文献9)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10)、MoMLVを1/10まで不活化するのに必要な紫外線照射量(D<sub>10</sub>)は2,800 erg/mm<sup>2</sup>であり、熱処理時間(T<sub>10</sub>)は50°Cでは50秒、55°Cでは20秒、70°Cでは8秒である。したがって、55°C、2分間又は70°C、50秒間の熱処理により、MoMLVの感染価を1/10<sup>6</sup>に低下させることができると考えられる。また、50°CにおけるT<sub>10</sub>が80~90秒であるとの報告もある(文献11)。

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12)。抗α-galactosyl自然抗体を有する旧世界ザル(文献13)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14)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

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遺伝子及びenv遺伝子の蛋白質コード領域のすべてを除去した増殖能欠損型レトロウイルスベクターMT(文献15,16)が構築された。MTのプロウイルス配列(MT

DNA) 中の 3'-long terminal repeat (LTR) を murine stem cell virus (MSCV) 由来の配列で置換したものが MS DNA であり、gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を発現する細胞に MS DNA を導入することによりレトロウイルスベクター-MS が産生される。本遺伝子組換え生物のゲノムは、HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR)  $\beta$  鎖遺伝子、マウスホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子プロモーター ( $P_{pgk}$ ) 及び TCR  $\alpha$  鎖遺伝子が MS のゲノムに挿入された構造を有する。

- 文献5：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6：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7：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8：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9：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10：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11：Yoshikura H. Ultraviolet sensitivity of helper function of murine leukemia virus. *Arch Biochem Biophys* 154:76-83 (1973).
- 文献12：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13：Galili Uri, et al. Significance of  $\alpha$ -Gal (Gal  $\alpha$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc-R) Epitopes and  $\alpha$ 1,3 Galactosyltransferase in Xenotransplantation. *Trends Glycosci Glycotechnol* 11:317-327 (1999).
- 文献14：Rother RP, et al. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti- $\alpha$ -galactosyl natural antibody. *J Exp Med* 182:1345-1355 (1995).
- 文献15：Yu SS, et al. High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Therapy* 7:797-804 (2000).
- 文献16：Lee J-T, et al. Engineering the splice acceptor for improved gene expression

and viral titer in an MLV-based retroviral vector. Gene Therapy 11:94-99 (2004).

## 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TCR  $\beta$  鎖遺伝子、P<sub>PGK</sub>、TCR  $\alpha$  鎖遺伝子、3'-LTRのU3領域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1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2に示す。

#### 1) TCR $\beta$ 鎖遺伝子

本遺伝子は、HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチド特異的なヒト由来細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte : CTL) クローン #2-28 (文献17) から、TCR  $\beta$  鎖遺伝子に特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法により単離された cDNA である。本遺伝子は 313 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 939 塩基対と終止コドン TAG より成り立っており、コードされる蛋白質は 116 アミノ酸からなる V7-9 領域、15 アミノ酸からなる J2-5 領域及び 179 アミノ酸からなる C2 領域からなっている。TCR  $\beta$  鎖遺伝子は 7 番染色体に存在し、多数の亜型から構成される。

#### 2) P<sub>PGK</sub>

P<sub>PGK</sub> は 513 bp からなるマウスゲノム由来の DNA 断片に含まれる。

#### 3) TCR $\alpha$ 鎖遺伝子

本遺伝子は、クローン #2-28 (文献 17) から TCR  $\beta$  鎖遺伝子と同様の方法により単離された cDNA である。本遺伝子は 272 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 816 塩基対と終止コドン TGA より成り立っており、コードされる蛋白質は 111 アミノ酸からなる V8-1 領域、20 アミノ酸からなる J10 領域及び 141 アミノ酸からなる C 領域からなっている。TCR  $\alpha$  鎖遺伝子は 14 番染色体上に存在し、多数の亜型から構成される。

#### 4) 3'-LTR の U3 領域

本遺伝子組換え生物の 5'-LTR の全域及び 3'-LTR の R 領域は MoMLV 由来であり、3'-LTR の U3 領域は MSCV 由来である。本遺伝子組換え生物を作製するために用いた MS-bPa DNA (II-3-(2)「宿主内に移入された核酸の移入方法」参照) の 5'-LTR は MoMLV 由来、3'-LTR は MSCV 由来であるが、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、産生細胞から産生される本遺伝子組換え生物の 3'-LTR の U3 領域は MSCV 由来、LTR のそれ以外の領域は MoMLV 由来となる。

MSCV は人工的に作製されたレトロウイルスベクターであり、その LTR は

PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus (PCMV) 由来である。Myeloproliferative sarcoma virus (MPSV) は、MoMLV に由来するモロニーマウス肉腫ウイルス (Moloney murine sarcoma virus: MoMSV) を実験室で継代することにより得られた変異株であり、マウス胚性がん細胞株である PCC4 細胞で MPSV を継代することにより、PCMV が得られた。

#### 5) 制限酵素認識部位等の人工配列

MS-bPa 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 2-5 に示すとおりである。

### (2) 構成要素の機能

#### 1) TCR $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖遺伝子

TCR は T 細胞及び NKT 細胞に特異的に発現する抗原認識レセプターであり、免疫系における T 細胞、NKT 細胞の抗原特異性を決定している。機能的 TCR 分子は抗原認識を行う TCR  $\alpha$   $\beta$  鎖又は  $\gamma$   $\delta$  鎖のヘテロダイマーからなり、細胞内へのシグナル伝達を担う CD3 分子群と会合し、TCR-CD3 複合体を形成している。

TCR 分子は主要組織適合抗原 (MHC) 拘束性に、標的細胞の MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識する。このことにより、T 細胞や NKT 細胞は抗原特異性を示す。抗原認識の際の結合力の強弱や補助レセプターからのシグナルの有無により、T 細胞や NKT 細胞の活性化、アナジの誘導、分化、生存、細胞死等を司る。

TCR 鎖は免疫グロブリンスーパーファミリー分子に属し、2つの Ig ドメインからなる細胞外領域、20 アミノ酸からなる膜貫通領域、数個のアミノ酸からなる細胞内領域で構成される。2つの Ig ドメインのうち、N 末端側が可変領域、C 末端側が定常領域に相当する。 $\alpha$  鎖が 45-60 kDa、 $\beta$  鎖が 40-50 kDa で  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖は S-S 結合でヘテロ 2 量体を形成し、2つの Ig ドメインをもって MHC・ペプチド複合体との接合面を構成している。細胞外領域に存在する CDR1、CDR2 領域は MHC との結合に貢献し、CDR3 領域は主としてペプチドを認識するのに必要とされる。

TCR の発現とシグナル伝達には TCR と複合体を形成する 4 種類の CD3 鎖が重要である。抗原認識の際に TCR-CD3 複合体と CD4 又は CD8 が会合することにより Lck や Fyn 分子が複合体に近づき、CD3 の活性化モチーフ ITAM のチロシンをリン酸化することにより TCR のシグナルが伝達され、T 細胞や NKT 細胞の抗原特異的な生理活性が発現される。

#### 2) P<sub>PGK</sub>

ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) は解糖系の酵素であり、ほとんどの組織において構成的に発現している。マウス P<sub>PGK</sub> はヒトを含む広範囲の哺乳類細胞において、細胞が増殖中であるか否かを問わずに機能するプロモーターである。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、TCR  $\alpha$  鎖遺伝子の転写を行う。

#### 3) 3'-LTR の U3 領域

LTR 中の MoMLV 由来の他の部分とともにプロウイルスの 5'-LTR 及び 3'-LTR を形成し、これらは細胞染色体への組込みに必須である。また、MoMLV 由来の相同配列と同様に、強いプロモーター活性とエンハンサー活性を有する。MSCV LTR は MoMLV LTR に比べて、胚性幹細胞、胎児がん細胞及びその他の哺乳動物細胞において高い発現レベルを持続的に保持することが可能である。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、TCR  $\beta$  鎖遺伝子の転写を行う。

4) 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。

5) MS-bPa DNA 中の有害配列の有無

MS-bPa 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17：Miyahara Y, et al. Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. Clin Cancer Res 11(15):5581-5589 (2005).

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1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1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、 $\Psi$ 、TCR  $\beta$  鎖遺伝子、 $P_{PCR}$ 、TCR  $\alpha$  鎖遺伝子及び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

本遺伝子組換え生物は、MS-bPa 産生細胞から産生される。この産生細胞は、本遺伝子組換え生物のプロウイルス配列をパッケージング細胞の染色体に挿入することにより作製された。本遺伝子組換え生物のプロウイルスDNA（但し、5'-LTRはMoMLV由来、3'-LTRはMSCV由来；MS-bPa DNAと呼ぶ）を挿入したプラスミドであるpMS-bPaは、標準的な遺伝子工学的手法を用いて構築された。以下にその概要を、別紙3に詳細及びフローチャートを示す。

MTベクターはMoMLVプロウイルスの5'-LTR及び3'-LTRを含み、ウイルス蛋白質をコードする配列を全く含まないレトロウイルスベクターである（文献15, 16）。pMTはMTベ

ターのプロウイルス配列を含むプラスミドであり、pMTの3'-LTRをMSCVプロウイルスの3'-LTRで置換したものがpMSである。pMSの3'-LTRの上流に、TCR $\beta$ 鎖cDNAのコード域、マウスP<sub>gk</sub>及びTCR $\alpha$ 鎖cDNAのコード域を組み込んだものがpMS-bPaである。

### (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

pMS-bPaは、ウイルス粒子形成に必須なgag-pol遺伝子及びenv遺伝子を欠いているため、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に使用するパッケージング細胞株は、PG13(ATCC CRL-10686)(文献18)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(1つはgag-pol遺伝子、もう1つはenv遺伝子)で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、この第3世代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

gag-pol遺伝子発現プラスミドであるpGP、エトロピックenv遺伝子発現プラスミドであるpE-eco及びMS-bPa DNAベクターを293T細胞にコトランスフェクトした。培養上清中には、マウス由来のパッケージング細胞であるPG13に効率よく感染するエトロピックレトロウイルスベクターMS-bPaが一過性に産生される。この培養上清をPG13細胞に感染させ、限界希釈法により細胞をクローニングした。こうして得られたクローンから産生されるレトロウイルスベクターMS-bPaの力価をリアルタイムRT-PCRにより測定し、高力価なウイルスを産生するクローンMS-bPa #20を得た。これをマスターセルバンク(MCB)用シードセルとして樹立し、これを培養してMCBを作製した。MCBの作製のフローチャートを別紙4に、MCBの品質試験項目と結果を別紙5に示す。

#### 3) 本遺伝子組換え生物の最終製品の製造

本遺伝子組換え生物の製造は、本遺伝子治療臨床研究の研究者が製造管理責任者となり、タカラバイオ株式会社草津センター(滋賀県草津市野路町2257番地)の細胞・遺伝子治療センターの全て管理された製造エリアにてGMP遵守下で行われる。

MCBを解凍後、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る。これを無菌ろ過した後、小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。本遺伝子組換え生物の製造方法のフローチャートを別紙6に示す。こうして製造された本遺伝子組換え生物の最終製品の各ロットについて品質試験を行う(別紙7)。

文献18: Miller AD, et al. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. J Virol 65:2220-2224 (1991).

#### 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。

TCR  $\beta$  鎖遺伝子は MSCV 由来 LTR の U3 領域により、TCR  $\alpha$  鎖遺伝子は  $P_{\text{pol}}$  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 遺伝子及び env 遺伝子を持ち、TCR  $\alpha$  鎖遺伝子及び  $\beta$  鎖遺伝子を持たないものである。しかし、TCR  $\alpha$  鎖遺伝子又は  $\beta$  鎖遺伝子を持つ RCR の出現する可能性は否定できない。なお、これらの RCR は遺伝子組換え生物等に該当する。

#### 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) MS-bPa 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 TCR  $\alpha$  鎖遺伝子及び  $\beta$  鎖遺伝子を持つので、これらの遺伝子のいずれかを RT-PCR 法で増幅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) MS-bPa 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、パッケージングシグナルに相当する配列をリアルタイム PCR で定量することにより検出可能である。

##### 3) RCR の検出方法

###### ・293 細胞増幅法

293 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+L-アッセイを行う。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、GalV 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 遺伝子及び 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 遺伝子及び 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 TCR  $\alpha$  鎖遺伝子及び  $\beta$  鎖遺伝子を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物が感染した細胞は TCR  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖を発現する。

・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、GaLV はラット、ハムスター、ウサギ、ミンク、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒト及びニワトリの細胞に感染するとの報告がある（文献19）。本遺伝子組換え生物はウイルス粒子表面に GaLV env 蛋白質を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物はヒト、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。

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19：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

1. 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 2. 共同実施施設への運搬 3. 1及び2に付随する行為

#### 2 使用等の方法

治療施設の所在地 三重県津市江戸橋二丁目174番地

治療施設の名称 三重大学医学部附属病院

(1) MS-bPa 溶液は、容器に密閉され、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 MS-bPa 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。患者リンパ球への MS-bPa 導入操作、MS-bPa 導入細胞の培養その他の MS-bPa 希釈溶液及び MS-bPa 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。MS-bPa 希釈溶液及び MS-bPa 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、MS-bPa 希釈溶液若しくはその凍結品又は MS-bPa 導入細胞を、開放系区域を通過して他の 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) MS-bPa 導入細胞を、開放系区域を通過して他の共同実施施設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、凍結状態で輸送する。
- (4) MS-bPa 溶液（希釈溶液を含む。）又は MS-bPa 導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理、0.5%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液への浸漬処理又は消毒用アルコール処理による。以下同じ。）を行った後、三重大学医学部附属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。
- (5) 被験者に対する MS-bPa 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陽圧でない個室（以下「個室」という。）内において輸注により行う。なお、投与時に MS-bPa 導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具等は使い捨てとし、適切にウイルス不活化を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらのウイルス不活化を個室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。
- (6) 投与後 3 日まで、被験者を個室で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に個室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。
- (7) 個室における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切にウイルス不活化を行い、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、適切にウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらのウイルス不活化を個室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、MS-bPa 溶液及び MS-bPa 導入細胞の取扱いに準ずる。
- (8) 個室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、適切にウイルス不活化を実施した後、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、これらのウイルス不活化又は洗

浄を個室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。

- (9) 個室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、個室内における管理を継続する。
- (10) 個室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、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記（6）から（9）までと同様の措置を執る。

別紙 8：治療施設の地図及び見取り図

別紙 9：三重大学医学部附属病院医療廃棄物管理規程

### 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 PBMC 及び血漿を試料として、GalV 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、個室における管理解除前、投与 35±3 日後及び 63±3 日後並びに生存中にわたり実施する。

### 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 レベルの実験室において、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。

個室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個室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

#### (1) 本遺伝子組換え生物の産生細胞及び最終製品の RCR 試験

本遺伝子組換え生物産生細胞の MCB、本遺伝子組換え生物最終製品及び end of production cell (EPC) について品質試験を実施した。その結果、いずれも RCR 陰性であった（別紙 5、別紙 7）。

#### (2) 遺伝子導入リンパ球の RCR 試験

本遺伝子組換え生物を用いて健常人由来 PBMC に遺伝子導入を行い、7 日間培養後の遺

伝子導入細胞について品質試験を実施した。その結果、RCR陰性であった（別紙10）。

### (3) 遺伝子導入リンパ球の毒性

本遺伝子組換え生物及び健常人由来PBMCを用いて調製した遺伝子導入リンパ球（GMC）又は遺伝子導入を行わずにGMCと同様に培養したリンパ球（NGMC）を免疫不全マウスであるNOD/SCID/ $\gamma c^{null}$ （NOG）マウスに静脈内投与した。GMC群とNGMC群の間で、投与後7日目及び14日目における生存率、体重及び一般症状、剖検時の臓器重量並びに肝臓、腎臓、脾臓及び肺の病理組織学的所見に差は認められなかった（別紙11）。

### (4) 本遺伝子組換え生物がヒトに投与され、感染する可能性

遺伝子治療用の遺伝子導入細胞を調製する際には、本遺伝子組換え生物を固相化したバッグ内でPBMCに遺伝子導入を行い、培養後に細胞を濃縮・洗浄する。このため、細胞調製に使用される本遺伝子組換え生物のほとんどは患者に投与される細胞懸濁液から除去されるが、最大0.7個程度の本遺伝子組換え生物が患者に投与されると推定できる。しかし、マウス由来の産生細胞により製造された本遺伝子組換え生物は、ヒト血清（補体）により速やかに不活化され、患者体内で遺伝子導入が起きる可能性は低いと考えられる。

## 6 国外における使用等により得られた情報

米国国立衛生研究所のRosenbergらのグループは、レトロウイルスベクターを用いて腫瘍抗原MART-1特異的TCR遺伝子を患者自己リンパ球に導入し、悪性黒色腫患者に輸注する臨床試験を実施した（文献20）。この試験は、TCR遺伝子導入ヒトリンパ球を用いた臨床研究として現在まで唯一の論文報告である。17名の患者に対して遺伝子導入細胞が輸注され、いずれの患者にも遺伝子導入細胞輸注による毒性はみられなかった。なお、国内外において、ヒトに対する本遺伝子組換え生物の使用経験はない。

文献20：Morgan RA, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-129 (2006).

## 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GaLV 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GaLV 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GaLVと同様、ラット、ハムスター、ウサギ、ミンク、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒト及びニワトリ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TCR  $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖がTリンパ球において発現した場合、このTリンパ球はHLA-A2402拘束性にMAGE-A4発現細胞特異的な細胞傷害活性を獲得する。このTリンパ球の影響を受ける可能性のある生物はHLA-A2402陽性のヒトに限られ、MAGE-A4を発現する正常組織である精巣においてHLAは発現していないので、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と考えられる。

本遺伝子組換え生物が有害物質を産生することはなく、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患者T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12)。さらに、本遺伝子組換え生

物は増殖能を欠損しているので、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 が患者 T 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、本遺伝子組換え生物の最終製品及び遺伝子導入細胞の RCR 陰性を確認してから使用するの、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の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR は GaLV 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 GaLV と同様、ラット、ハムスター、ウサギ、ミンク、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒト及びニワトリ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 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患者 T 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

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と考えられる。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 GaLV 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 GaLV 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 TCR  $\alpha$  鎖遺伝子及び  $\beta$  鎖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。