第 64 回 科学技術部会	資料 4－3
平成 23 年 7 月 25 日	

遺伝子治療臨床研究実施計画の申請及び 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申請について （（財）田附興風会医学研究所 北野病院）

（遺伝子治療臨床研究実施計画の申請）

○ 諮問 及び付議 .... P 1

○ 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書 及び概要書 .... P 3

○ 同意説明文書 .... P 21

（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申請）

○ 諮問 及び付議 .... P 45

○ 第一種使用規程承認申請書 .... P 49

○ 生物多様性影響評価書 .... P 53

厚 科 審 第 18 号
平成 23 年 7 月 20 日

科学技術部会部会長
永 井　良 三　殿

厚生科学審議会会長
垣 添　忠 生

遺伝子治療臨床研究実施計画について（付議）

標記について、平成 23 年 7 月 20 日厚生労働省発科 0720 第 3 号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第 3 条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

厚生労働省発科 0720 第 3 号
平成 23 年 7 月 20 日

厚生科学審議会会長
垣添　忠生　殿

厚生労働大臣　細川　律夫

諮　問　書

下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、その医療上の有用性及び倫理性に関し、厚生労働省設置法（平成 11 年法律第 97 号）第 8 条第 1 項第 1 号イ及び遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）の規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

1．平成 23 年 7 月 5 日に大阪大学医学部附属病院長から提出された「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」計画

2．平成 23 年 7 月 6 日に財団法人 田附興風会医学研究所 北野病院長から提出された「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」計画

大臣官房厚生科学課
科 収0711第2号
23.7.11

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: 06-6361-0588
	代　表　者 役職名・氏名	病院長　　藤 井 信 吾

財団法人田附興風会北野病院長印

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

別紙様式第1の別添

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）

	氏　　名	所属機関・部局・職	役　割
総括責任者以外の研究者	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　愼一	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	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日文部科学省・厚生労働省告示第1号（平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正））」の必要条件を満たしていると認める。 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。	
	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　（印）

研究の区分	遺伝子治療臨床研究（囲み）　　遺伝子標識臨床研究
研究の目的	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）α鎖及びβ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。 ① 主要エンドポイント ・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）〕

	② 副次エンドポイント ・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 ・腫瘍縮小効果 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。
対象疾患及びその選定理由	1. 対象疾患に関する現時点での知見 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。 2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要 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 TCRα 鎖及び β 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-$A4_{143-151}$ 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-$A4_{143-151}$ 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。 3. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由 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

	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。
遺伝子の種類及びその導入方法	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TCRα鎖及びβ鎖遺伝子である。 1.1. 人に導入する遺伝子の構造 本臨床研究に用いるTCRα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。TCRβ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-$A4_{143-151}$ペプチドに特異的なCTLクローン #2-28から単離された。 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 α鎖とβ鎖をコードするcDNAである。ヒトにおいてTCRα鎖は14番染色体上に、β鎖は7番染色体上にコードされ、多様なクロノタイプが存在する。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α鎖の可変領域はV-Jでβ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TCRα鎖はVα8-1、Jα10、Cであり、TCRβ鎖はVβ7-9、Jβ2-5、C2の配列である。 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、TCRα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513bpのマウスゲノム由来DNA断片に含まれる。 TCRβ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。 1.3. 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性 TCRα鎖及びβ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、

	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（γ、δ、ε及びζ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TCRα鎖及びβ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$_{143-151}$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TCRα鎖及びβ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TCRα鎖及びβ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、もとになる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った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 3×10^6 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ーニングサイトに、TCRβ鎖 cDNA のコード域、マウス PPGK 及び TCRα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

	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。 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Ψ+を有し、gag、pol、envをコードする配列を持たない。 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。
安全性についての評価	1. 遺伝子導入方法の安全性 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。 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。 1. マイコプラズマ否定試験（培養法、DNA染色法） 2. in vivoウイルス試験 3. in vitroウイルス試験 4. RCR試験（細胞）（293細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ） 5. RCR試験（上清）（293細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ） 6. XCプラークアッセイ 7. マウス抗体産生試験（MAP試験） 8. 無菌試験（日本薬局方） 9. ウシウイルス試験 10. ヒトウイルス試験 11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定 12. 組み込まれたベクター遺伝子の組み込み数試験 13. 導入遺伝子配列解析 14. 細胞生存率試験（トリパンブルー） 15. 産生ウイルスの力価試験 16. 導入遺伝子の機能確認 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 μm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。 1. マイコプラズマ否定試験（培養法） 2. in vivo ウイルス試験 3. in vitro ウイルス試験 4. RCR試験（293細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）

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TCRα鎖及びβ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Ψパッケージングシグナルと3'-LTRを欠失しているので、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TCRα鎖及びβ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 TCRα 鎖及び β 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 TCRα 鎖及び β 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 α 鎖及び β 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TCRα鎖及びβ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）

	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
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	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。 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in vitro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。 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。 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。

	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。
実 施 計 画	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 $MAGE\text{-}A4_{143\text{-}151}$ ペプチドを認識するTCR α 鎖及び β 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 μ gの $MAGE\text{-}A4_{143\text{-}151}$ 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。 <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 2×10^8 個、1×10^9 個、5×10^9 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 1×10^9 個、5×10^9 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。 2. 被験者の選択基準及び除外基準 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 ≧ 3,000/mm³ ・好中球数 ≧ 1,500/mm³ ・ヘモグロビン ≧ 8.0 g/dL ・血小板数 ≧ 100,000/mm³ ・総ビリルビン（T-Bil） ≦ 2.0 mg/dL ・AST（GOT）、ALT（GPT） ≦ 150 IU/dL ・クレアチニン（Cr） ≦ 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)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

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 μg/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$_{143-151}$ペプチド投与に適さない患者（例えばMAGE-A4$_{143-151}$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（2×10^{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 ≧ 3,000/mm^3
- 好中球数 ≧ 1,500/mm^3
- ヘモグロビン ≧ 8.0 g/dL
- 血小板数 ≧ 100,000/mm^3
- 総ビリルビン（T-Bil）≦ 2.0 mg/dL
- AST（GOT）、ALT（GPT）≦ 150 IU/dL
- クレアチニン（Cr） ≦ 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

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

・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 μg/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$_{143-151}$ペプチド投与に適さない患者(例えばMAGE-A4$_{143-151}$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適当と認めた患者

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、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。

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。

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。

1 回当たりの TCR 遺伝子導入リンパ球輸注量

コホート 1	2×10^{8}個	3 例
コホート 2	1×10^{9}個	3 例
コホート 3	5×10^{9}個	3 例

5. 臨床検査項目及び観察項目

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。

備　考	

（別紙）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
日数	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	○	○	○[2]	○			○	○		○		○	○
血液生化学的検査	○	○	○[2]	○			○	○		○		○	○
血液凝固能検査	○		○[2]									○	○
免疫血清（CRP）	○		○[2]	○			○	○		○		○	○
尿検査	○		○[2]	○			○	○		○		○	○
腫瘍マーカー	○		○[2,4]									○[4]	○[4]
胸部 X 線検査	○		○[2]									○	○[5]
12 誘導心電図	○		○[2]									○	○[5]
頸部・胸部・腹部・骨盤 CT	○[1]		○[3]									○	○[5]
PET-CT			○[3]									○	○[5]
上部消化管内視鏡検査	○[1]		○[3]									○	○[5]
腫瘍組織生検			○[3]									○	○[5]
TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態用採血[6]			○[7]	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫機能解析用採血			○[2]					○		○		○	○
TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度、MAGE-A4 発現検査			○[3]									○	○[5]
RCR[6]				○[8]								○	○
LAM-PCR[6]												○	○
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。

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　2月14日）

第 1.0 版　作成年月日：2011 年　1 月　26 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-----------------------------19
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。

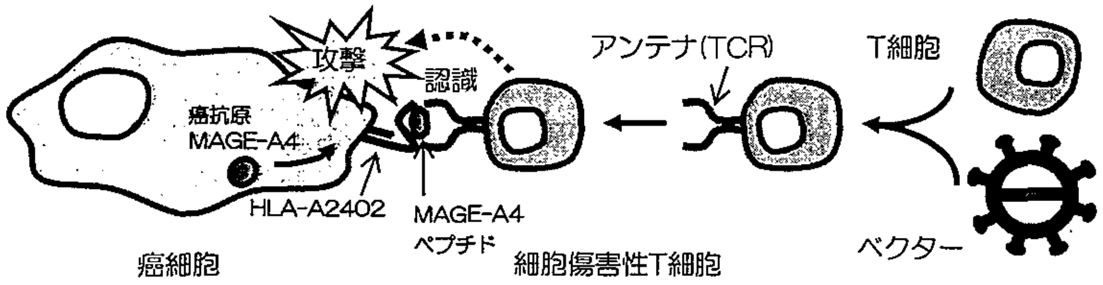

図 1　細胞傷害性T細胞による癌抗原の認識

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）	N0（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）	N0（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	
Ⅳ期	T, N に関係なし		M1 （遠隔転移あり）

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、北野病院で実施します。

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、癌細胞を攻撃・破壊することが期待されます。

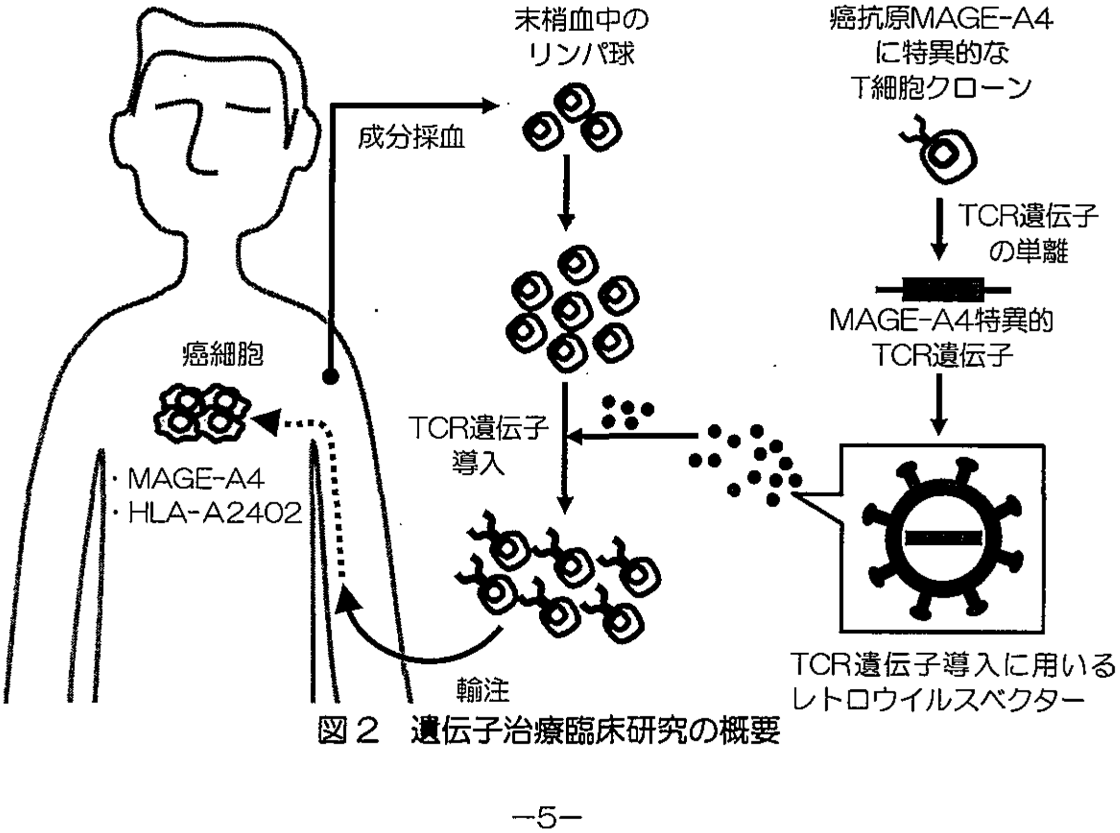

図２　遺伝子治療臨床研究の概要

リンパ球について

血液は、血漿(けっしょう)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、私たちの計画と同じく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(こくしょくしゅ)

（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（マート）-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（まっしょうけつたんかくきゅう）（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（マート）-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。

<u>第 I 段階：T 細胞への TCR 遺伝子の導入</u>

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。これをアフェレーシス（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、三重大学の細胞処理センターから北野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。細胞調製の結果、予定していた細胞量が得られなかったり、品質に問題があったりするなど、定められた基準を満たしていないことが判明した場合には、投与することができなくなる場合があります。さらに、投与前にあなたの身体の状態等が基準を満たすかどうかを再度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存じます。

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 2×10^8 個（2 億個）、次の３人には 1×10^9 個（10 億個）、最後の３人には 5×10^9 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、（　×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 300μg 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、北野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。

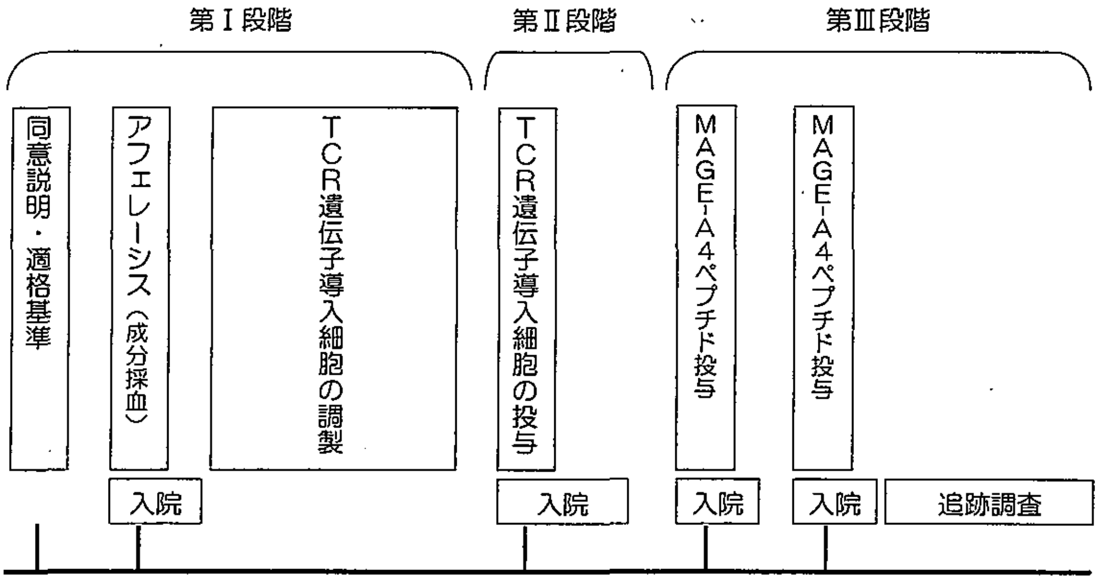

図３　遺伝子治療臨床研究のステップ

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　≧ 3,000/mm³
　・好中球数　≧ 1,500/mm³
　・ヘモグロビン　≧ 8.0 g/dL
　・血小板数　≧ 100,000/mm³
　・総ビリルビン（T-Bil）　≦ 2.0 mg/dL
　・AST（GOT）、ALT（GPT）　≦ 150 IU/dL

・クレアチニン（Cr）　　　　　≦ 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（2×10^8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
・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 μg/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適当と認めた方

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、12 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になります（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
日数	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	○	○	○[2]	○			○	○		○		○	○
血液生化学的検査	○	○	○[2]	○			○	○		○		○	○
血液凝固能検査	○		○[2]					○		○		○	○
尿検査	○		○[2]	○			○	○		○		○	○
免疫血清（CRP）	○		○[2]	○			○	○		○		○	○
腫瘍マーカー	○		○[2,4]									○[4]	○[4]
胸部Ｘ線検査	○		○[2]									○	○[5]
12 誘導心電図	○		○[2]									○	○[5]
頸部・胸部・腹部・骨盤 CT	○[1]		○[3]									○	○[5]
PET-CT			○[3]									○	○[5]
上部消化管内視鏡検査	○[1]		○[3]									○	○[5]
腫瘍組織生検			○[3]									○	○[5]
TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態用採血[6]			○[7]	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫機能解析用採血			○[2]					○		○		○	○
TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度、MAGE-A4 発現検査			○[3]									○	○[5]
RCR[6]				○[8]								○	○
LAM-PCR[6]												○	○
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

先の説明のとおり、アメリカでの悪性黒色腫の患者さま 17 名に対する同様の臨床試験では、２名の患者さまで明らかな癌の縮小が認められています。

今回の食道癌の抗原 MAGE-A4 のように、他の癌抗原（あるいは他の癌の種類）でどの程度の効果が得られるかについてはっきりとわかっていませんが、私たちが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・破壊することが確認されており、本臨床研究においても同様の効果が期待されています。

ただし、今回の MAGE-A4 を認識する TCR 遺伝子を導入したリンパ球は、本臨床研究において初めて人に投与されます。

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が、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(ぞうけつかん)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うえで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、骨髄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、骨髄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になります。

2）本遺伝子治療による危険性

①成分採血（アフェレーシス）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（さこつか）静脈又は鼠径（そけい）静脈に針を刺す場合、まれに出血、感染気胸（ききょう）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（めいそうしんけい）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（けいれん）、失禁がみられることもあります。このような副作用が出現した場合は、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

アフェレーシスの際に血小板も一部除去されるため、アフェレ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/ 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します。また、アフェレ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・精巣抗原」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、腫脹（しゅちょう））、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、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、「北野病院個人情報保護規程」(平成 17 年 4 月 1 日施行) および「北野病院情報システム規程」(平成 14 年 1 月 8 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が、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ベ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を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】
北野病院　個人情報相談窓口
・個人情報の内容と開示請求について：患者相談窓口（TEL：06-6131-2988）、
医事第二課（TEL：06-6131-2968）
・診療録開示の手続き：地域医療サービス課（TEL：06-6131-2988）

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。

北野病院　医局　　　　TEL：06-6312-8831
休日・夜間の緊急連絡先　TEL：06-6312-1221

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：
田附興風会医学研究所　北野病院

3）総括責任者：
上田　修吾　：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

4）分担研究者：
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

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

田附興風会医学研究所　北野病院　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
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：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

厚科審第 17 号
平成 23 年 7 月 20 日

科学技術部会部会長
永　井　　良　三　殿

厚生科学審議会会長
垣　添　　忠　生

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価について（付議）

標記について、平成 23 年 7 月 20 日厚生労働省発科 0720 第 2 号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第 3 条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

厚生労働省発科0720第2号
平成23年7月20日

厚生科学審議会会長
垣添　忠生　殿

厚生労働大臣　細川　律夫

諮　問　書

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）第4条第1項に基づく第一種使用規程等の主務大臣承認に関し、下記の遺伝子治療臨床研究について、厚生労働省設置法（平成11年法律第97号）第8条第1項第1号イの規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

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

1．申請者　三重大学医学部附属病院　病院長　竹田　寛
遺伝子組換え生物等の名称
HLA-A2402拘束性MAGE-A4を特異的に認識するT細胞受容体α鎖及びβ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組換えモロニーマウス白血病ウイルス（MS-bPa）

2．申請者　大阪大学医学部附属病院　病院長　福澤　正洋
遺伝子組換え生物等の名称
HLA-A2402拘束性MAGE-A4を特異的に認識するT細胞受容体α鎖及びβ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組換えモロニーマウス白血病ウイルス（MS-bPa）

３．申請者　　財団法人 田附興風会医学研究所北野病院　　病院長　藤井　信吾

遺伝子組換え生物等の名称

HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 を特異的に認識する T 細胞受容体 α 鎖及び β 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組換えモロニーマウス白血病ウイルス（MS-bPa）

大臣官房厚生科学課
科 收0711第4号
23.7.11

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　財団法人　田附興風会医学研究所
　　　北野病院
申請者　病院長　　藤井信吾
住所　大阪市北区扇町2丁目4番20号

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項（同法第9条第4項において準用する場合を含む。）の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	HLA-A2402拘束性MAGE-A4を特異的に認識するT細胞受容体α鎖及びβ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）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	治療施設の所在地　大阪市北区扇町2丁目4番20号 治療施設の名称　財団法人　田附興風会医学研究所　北野病院 （1） MS-bPa導入細胞は、容器に密閉され、凍結状態で治療施設に運搬し、施設内の施錠可能な冷凍庫に保管する。 （2） MS-bPa導入細胞を、開放系区域を通って運搬する場合には、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、北野病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。 （4） 被験者に対する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。 （5） 投与後3日まで、被験者を個室内で管理する。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。 （6） 個室内における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に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導入細胞の取扱いに準ずる。 （7） 個室内における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、適切に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。 （８） 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。 （９） 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内における管理下に移し、上記（５）から（８）までと同様の措置を執る。

「HLA-A2402拘束性MAGE-A4を特異的に認識するT細胞受容体α鎖及びβ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)」

生物多様性影響評価書

田附興風会医学研究所　北野病院

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（TCR）α鎖及びβ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（以下、本遺伝子組換え生物という）は増殖能欠損型レトロウイルスベクターである。本遺伝子組換え生物の宿主はモロニーマウス白血病ウイルス（Moloney murine leukemia virus: MoMLV）である。

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

文献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 20.7%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く、また、MoMLVに感染したことにより細胞が有害物質の産生能を獲得するとの情報はない。

(7)　その他の情報

1)　MoMLVの不活化条件

MoMLV と同じレトロウイルス科に属するヒト免疫不全ウイルス（HIV）の滅菌、消毒法として、①121℃、20分間の高圧蒸気滅菌、②170℃、2時間の乾熱滅菌、③20～30分間の煮沸消毒、④有効塩素濃度 0.1～1.0%の次亜塩素酸ナトリウム、⑤70%エタノール又は70%イソプロピルアルコール、⑥3.5～4%ホルマリン、⑦2%グルタラール、が有効である（文献7）。また、10%及び 1%ポピドンヨード液（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_{10}）は2,800 erg/mm^{2}であり、熱処理時間（T_{10}）は50℃では50秒、55℃では20秒、70℃では8秒である。したがって、55℃、2分間又は70℃、50秒間の熱処理により、MoMLVの感染価を1/10^{6}に低下させることができると考えられる。また、50℃におけるT_{10}が80～90秒であるとの報告もある（文献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）β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 α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 sensivity 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 a-Gal (Galα1-3Galβ1-4GlcNAc-R) Epitopes and α1,3 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-α-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 β鎖遺伝子、P_{PGK}、TCR α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 β鎖遺伝子

本遺伝子は、HLA-A2402拘束性MAGE-$A4_{143-151}$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 β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。TCRβ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_{PGK}

P_{PGK}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 α鎖遺伝子

本遺伝子は、クローン #2-28（文献17）からTCR β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。TCRα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 α鎖及びβ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 αβ鎖又はγδ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、アナジーの誘導、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。α鎖が 45-60 kDa、β鎖が 40-50 kDa でα鎖とβ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_{PGK}

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_{PGK} 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 α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 β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、Ψ、TCR β鎖遺伝子、P_{PGK}、TCR α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ベク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、TCRβ鎖cDNAのコード域、マウスP_{PGK}及びTCRα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、エコトロピック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共同実施施設である三重大学医学部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 (滋賀県草津市野路東七丁目2番62号) の細胞・遺伝子治療センターの製造エリアにて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 β鎖遺伝子は MSCV 由来 LTR の U3 領域により、TCR α鎖遺伝子は P_{PGK} 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 α鎖遺伝子及びβ鎖遺伝子を持たないものである。しかし、TCR α鎖遺伝子又はβ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 α鎖遺伝子及びβ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}～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ので、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 α鎖遺伝子及びβ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 α鎖及びβ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

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

2　使用等の方法

治療施設の所在地　大阪市北区扇町2丁目4番20号

治療施設の名称　財団法人　田附興風会医学研究所　北野病院

（1）MS-bPa 導入細胞は、容器に密閉され、凍結状態で治療施設に運搬し、施設内の施錠可能な冷凍庫に保管する。

（2）　MS-bPa 導入細胞を、開放系区域を通って運搬する場合には、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、北野病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。

（4）　被験者に対する 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。

（5）　投与後３日まで、被験者を個室内で管理する。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。

（6）　個室内における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に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 導入細胞の取扱いに準ずる。

（7）　個室内における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、適切に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。

（8）　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。

（9）　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内における管理下に移し、上記（5）から（8）までと

同様の措置を執る。

別紙8：治療施設の地図及び見取り図
別紙9：北野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、本遺伝子治療臨床研究の共同実施施設である三重大学医学部において調製され、適切な拡散防止措置を執って北野病院（以下、当院という）に運搬される。当該遺伝子導入細胞は、当院内の適切に拡散防止措置を執った冷凍庫に保管され、第一種使用規程に従って患者に投与される。

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/γc^{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）。この試験では、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。しかし、その後行われた MART-1 抗原に対する反応性がより強い TCR 遺伝子を使用した臨床試験では、正常色素細胞への傷害性が報告された（文献21）。なお、この正常色素細胞への傷害性は、MART-1 特異的 TCR 遺伝子の発現産物が患者生体内の MART-1 抗原を発現する正常色素細胞と反応することに起因しており、本遺伝子組換え生物の発現産物である MAGE-A4 特異的 TCR の場合には、MAGE-A4 抗原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、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞がヒト正常細胞を傷害する可能性は非常に低いと考えられる。

国外において、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).

文献21：Johnson LA, 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).

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 α鎖及びβ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で、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 α鎖遺伝子及びβ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ので、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。