

**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
(千葉大学医学部附属病院)**

【遺伝子治療臨床研究実施計画の申請】

- 諮問・付議. P1
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書・概要書. P3
- 同意説明文書. P28

【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・付議. P53
- 第一種使用規程承認申請書. P55
- 生物多様性影響評価. P58
- 厚生科学審議会科学技術部会遺伝子治療臨床研究作業委員会
遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会
委員名簿. P77

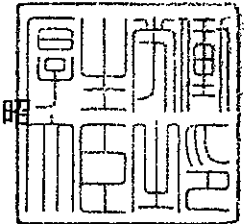


厚生労働省発科 0430 第 1 号
平成 22 年 4 月 30 日

厚生科学審議会会長

垣 添 忠 生 殿

厚生労働大臣 長 妻



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

平成 22 年 4 月 9 日に千葉大学医学部附属病院長から提出された「家族性 LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」計画

厚 科 審 第 4 号

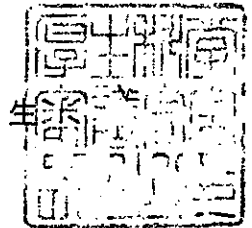
平成 22 年 4 月 30 日

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



遺伝子治療臨床研究実施計画について（付議）

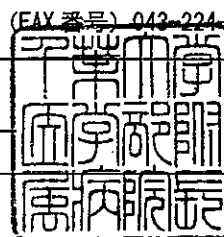
標記について、平成 22 年 4 月 30 日付け厚生労働省発科 0430 第 1 号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第 3 条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 22 年 4 月 9 日

厚生労働大臣 殿

実 施 設	所在地	〒 260-8677 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1
	名称	千葉大学医学部附属病院 (電話番号) 043-222-7171 (FAX 番号) 043-224-3830
	代表者 役職名・氏名	千葉大学医学部附属病院長 河野 陽 (職印)



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
家族性 LCAT (レシチン: コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究	医学研究院臨床遺伝子応用医学・教授 武城 英明

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成22年4月9日

研究の名称	家族性LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象としたLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究
研究実施期間	厚生労働大臣による了承の日より2年間

総括責任者	所属部局の所在地	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (郵便番号 260-8677)	
	所属機関・部局・職	千葉大学大学院医学研究院臨床遺伝子応用医学 教授	
	氏名	武城 英明	 (印)
実施の場所	所在地	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (郵便番号 260-8677)	
	名称	千葉大学医学部附属病院	
	連絡先	糖尿病・代謝・内分泌内科 (電話番号 043-222-7171)	
総括責任者以外研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	佐藤 兼重 松本 文昭	医学研究院形成外科学 教授 医学研究院形成外科学 非常勤講師	脂肪組織摘出術およびLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液移植
	横手 幸太郎	医学研究院細胞治療学 教授	被験者の診療、移植後の観察および評価
	花岡 英紀	医学部附属病院 臨床試験部長	臨床研究の円滑な遂行に関わる業務、スケジュール、記録管理
	黒田 正幸	医学研究院臨床遺伝子応用医学 准教授	遺伝子治療臨床研究に係わる培養細胞及び実験動物を用いる研究全般ならびにLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液の調製における工程管理試験および品質管理試験の管理
	セルジェンテック株式会社	創薬研究開発部	LCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液の調製（業務委託）

<p>審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由</p>	<p>「家族性 LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」について「遺伝子治療臨床研究実施計画概要書」ならびに「遺伝子治療臨床研究実施計画書」に基づき検討し、次の理由により本研究を適当と判断した。</p> <p>① 根本的治療法のない、稀な常染色体劣性遺伝性疾患である家族性 LCAT 欠損症に対する有効な治療法は確立されておらず、新規治療法の確立が必要であること。</p> <p>② LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が産生、分泌する LCAT は基礎研究の結果から本来の活性を発揮し、患者血清検体中でその病態を正常化させる機能を有することが示されたこと。</p> <p>③ 動物実験において、LCAT 血中濃度が患者の治療レベルに達していることが推察できる結果が得られたこと。</p> <p>④ 用いるレトロウイルスベクターは安全性が高く、また基礎研究の結果から、遺伝子導入後の細胞において有害事象は認められなかったこと。</p> <p>⑤ 移植する生成物は GMP 準拠施設で調製されること。</p> <p>⑥ 同意の取得方法が適切であること。</p> <p>⑦ プライバシーの保護、プロトコールの遵守、プロトコールの内容変更について、適切な対応が行われる体制があること。</p> <p>⑧ 遺伝子治療臨床研究に関する指針、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などの指針・基準を遵守した実施計画となっていること。</p> <p>以上の理由により本臨床研究を実施することを適当である、と判断した。</p>	
	<p>審査委員会の長の職名</p>	<p>氏 名</p>
	<p>千葉大学医学部附属病院 遺伝子治療臨床研究 審査委員会委員長</p>	<p>松 原 久 裕 </p>

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>家族性 LCAT 欠損症に対して、患者の自己前脂肪細胞より調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を自家移植することにより LCAT 補充を行う方法の安全性について検証する。また、併せて LCAT 欠損に起因する症状（低 HDL コレステロール血症、角膜混濁、腎障害、溶血性貧血）の改善効果についても評価することを目的とする。</p>	
対象疾患及びその選定理由	<p>家族性 LCAT 欠損症は、稀な常染色体劣性遺伝性疾患である。本症は、古典型 LCAT 欠損症、部分型 LCAT 欠損症、魚眼病に分類され、血中コレステロールのエステル化を担うコレステロール逆転送系酵素である LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）の先天的な欠損もしくは遺伝子異常による LCAT 活性の欠失や活性低下によって、低 HDL（高比重リポ蛋白）血症、角膜混濁、腎障害および溶血性貧血など多様な臨床症状を呈するとされている。本邦でも 22 家系が報告されている。</p> <p>家族性 LCAT 欠損症のうち、古典型 LCAT 欠損症の LCAT 活性（合成基質法による HDL 分画中 αLCAT）は、正常 LCAT 活性に比較しその活性は 10%未満、部分型 LCAT 欠損症および魚眼病は正常の 20%以下であることが知られている。このことから、LCAT を安定持続的に供給し、正常な LCAT 活性の 10%に相当する LCAT 活性を増加させることによって、臨床症状の改善が期待できるものと考えた。</p> <p>現在、LCAT 補充を目的とした遺伝子組換え型 LCAT を用いた医薬品開発は世界的に行われていない。一般的に欠損蛋白の補充療法は、その酵素の半減期から推定した補充頻度や通院頻度などから、患者・家族に大きな負担を強いると言われている。またこれまでに、新鮮血（全血または血漿）輸血（LCAT 補充）が行われた報告があり、一部の症状（溶血性貧血）が速やかに改善することが報告されているが、その効果は一時的であり、加えて新鮮血輸血は感染症の危険性を拭えない。</p> <p>そこで、患者の皮下脂肪組織から分離・培養した前脂肪細胞^{注1)}を用いて、正常な LCAT の持続供給が可能な LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞^{注2)}を調製し、患者の皮下脂肪組織内に自家移植することにより LCAT 補充を行う細胞・遺伝子治療法の開発を行うこととし、千葉大学大学院医学研究院細胞治療学、臨床遺伝子応用医学、形成外科及びセルジェンテック株式会社の間で共同研究を開始した。本共同研究においては、健康成人より提供を受けた皮下脂肪組織から分離・培養した前脂肪細胞を用いて LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を調製することに成功し、また、その LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が発現・産生する LCAT は、分子サイズ、免疫学的特性および生物活性の面から正常 LCAT であることを確認した。hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞のマウス移植実験での血中ヒト LCAT 活性測定が困難なため、マウス血中に分泌される hLCAT 蛋白量を測定し、健康人の血中 LCAT 蛋白量の 10%を補充できることを確認した。</p> <p>以上より、家族性 LCAT 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いた細胞・遺伝子治療法の安全性と臨床効果の検討を、本臨床研究において実施することとした。</p> <p>^{注1)} 前脂肪細胞は脂肪油滴を持たない細胞である。天井培養法（脂肪含有細胞が低比重特性を有することを利用した方法）を用いて脂肪油滴を含有する脂肪細胞から得られる。</p> <p>^{注2)} ヒトの皮下脂肪組織から調製した前脂肪細胞に hLCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターによって hLCAT 遺伝子を導入し、LCAT 蛋白質の持続発現をもたらすヒト前脂肪細胞</p>	

<p>遺伝子の種類及び その導入方法</p>	<p>1. 導入する遺伝子の構造と性質</p> <p>hLCAT 遺伝子はヒト肝がん細胞株 HepG2 から全 RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製後、PCR 法によって回収した。用いたプライマーを以下に示す。</p> <p>forward primer: 5' -atcggatccagggtggaaatggggccgccc-3' reverse primer: 5' -atcggatccgctcgacggaaggtctttattcaggaggcggggg-3'</p> <p>得られた塩基配列 (約 1.3kb) を以下の文献に発表されている hLCAT 遺伝子のオープンリーディングフレーム配列と比較し、一致していることを確認した。</p> <p>【Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 (8), 2335-2339 (1986) ACCESSION M12625】</p> <p>この遺伝子では、C 末端のグルタミン酸とストップコドンに重なった形でポリ A 付加シグナル (AATAAA) がコードされているため、ストップコドンを TAA より TGA に改変して導入遺伝子内のポリ A 付加シグナルを除いた。また、蛋白質合成の効率を上げるために開始コドン上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入した。</p> <p>2. 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに標的細胞として選択した理由</p> <p>酵素補充療法は生理活性を有する分泌蛋白質欠損または低下症の治療として有効であり、これには遺伝子組換え蛋白質製剤の投与あるいは遺伝子治療等がある。遺伝子治療は、遺伝子組換え蛋白質製剤に比べ、体内で持続的に蛋白質産生可能なため長期治療に適していると考えられている。</p> <p>LCAT 補充療法の効率的な遺伝子導入系として、皮下脂肪組織由来ヒト前脂肪細胞を標的細胞とし、<i>ex vivo</i>でのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法を選択した。分泌蛋白質の補充療法には、一定レベルの血中濃度を維持するのに必要な生産・供給体制の構築が不可欠であり、当該蛋白質の高発現細胞を充分量確保できるかどうか課題である。標的細胞とするヒト前脂肪細胞は、形成外科領域で実用化されている脂肪摘出術により皮下脂肪組織から容易に十分量採取することができ、また、体外で選別、増殖させたヒト前脂肪細胞に導入効率の高いレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入が可能である。さらに自家移植であるため、遺伝子導入されたヒト前脂肪細胞を脂肪組織内に移植した際、拒絶反応を起こさずに安定して生着するものと考えられる。なお、脂肪組織には血管網が発達しており、ヒト前脂肪細胞 (脂肪細胞) より分泌された LCAT は速やかに血中に移行するものと考えられる。</p> <p>ヒト前脂肪細胞が遺伝子導入の標的細胞として補充療法に有用であることは、以下の試験の結果からも推察される。</p> <p>マウスを用い修飾型ヒトインスリン遺伝子および標識遺伝子をレトロウイルスベクターにより <i>ex vivo</i>でマウス前脂肪細胞へ遺伝子導入し、体内に移植後に遺伝子発現状態を組織学的に観察した結果、マウス前脂肪細胞およびその分化した脂肪細胞で導入遺伝子の良好な発現が確認された。また、糖尿病モデルマウスを用いた試験では、修飾型ヒトインスリン遺伝子導入マウス前脂肪細胞の移植後、約 2 ヶ月以上にわたり安定・持続した血糖低下作用が観察されている。</p> <p>純度の高いヒト前脂肪細胞の調製には、まず皮下より摘出して得られる脂肪組織を酵素処理と遠心分離することにより、低比重脂肪細胞含有画分を得る。脂肪組織に存在する他の血液系細胞や内皮系細胞をさらに分離するために、この画分の比重特性を利用し、培養フラスコを培</p>
----------------------------	--

地で満たした天井培養を行って、フラスコの天井面に接着性の低比重細胞群を濃縮する。この1週間程度の天井培養で天井面に接着・増殖した細胞を初代ヒト前脂肪細胞とした。その形態は線維芽細胞様の細胞群である。最初の遠心分離により沈殿した Stromal Vascular Fraction (SVF) に多く存在する未分化間葉系細胞は、様々な細胞への分化能力を有しており、長期培養した細胞を免疫不全マウスに移植することにより細胞ががん化したことが報告されているが、天井培養にて単離・回収したヒト前脂肪細胞ではそのような形質転換は現在まで認められていない。

得られたヒト前脂肪細胞の細胞表面マーカーは、CD13⁺31⁺34⁺45⁺90⁺105⁺146⁺であり、脂肪細胞への分化能があり、かつレトロウイルスベクターによる遺伝子導入に不可欠な分裂・増殖能力を保持している。なお、ヒト体内への移植後は増殖せず脂肪細胞に成熟すると考えられる。

3. 遺伝子導入方法の概略および当該導入方法を選択した理由

ヒト前脂肪細胞への hLCAT 遺伝子の導入は、hLCAT 発現レトロウイルスベクター懸濁液を予め設定した割合 (multiplicity of infection: MOI) で、皮下脂肪組織から調製したヒト前脂肪細胞培養液に添加して培養することにより行う。遺伝子導入後、必要細胞数までに培養させ、移植用溶媒に懸濁させた細胞を採取時と同じ皮下脂肪組織内に注入移植する。皮下脂肪組織からのヒト前脂肪細胞調製より移植用 LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液 (以降「細胞懸濁液」という) 調製までの工程は治験薬 GMP 準拠の細胞調製室 (CPC) において行う。

遺伝子導入法としては *in vivo* での直接導入の系と、*ex vivo* での遺伝子導入の系が考えられる。*in vivo* の直接導入の系で、比較的感染効率の高いベクターとしてはアデノウイルスベクターがあるが、ヒトへの投与では免疫反応の惹起は避けがたく、長期にわたる治療で再投与も考慮せざるを得ない場合には適切とは言えない。非病原性ウイルスに由来するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) は、もともとなったウイルスの性質から安全性は高く、筋細胞、神経細胞、肝細胞などの非分裂細胞に効率よく遺伝子導入ができ、そのような細胞では遺伝子発現が長期間持続する。筋細胞を標的とした AAV による蛋白質補充遺伝子治療では当初ある程度の臨床的効果が得られたとの報告があったが、その後ベクター量を増量したものの明瞭な臨床効果が得られずこの臨床研究は中止となっている。AAV はそのゲノムが一本鎖であるため、遺伝子の発現には二本鎖になる必要がある。しかしながら現行の AAV ではその効率が必ずしも高くないため十分な発現が起きなかったためではないかと考えられる。その後肝臓への遺伝子導入に基づく臨床研究も行なわれたが、免疫反応の惹起に起因する肝細胞障害から導入遺伝子の発現が長期間持続しなかったと報告されている。したがって、ある程度の発現量を必要とする酵素補充療法における導入遺伝子方法としては *in vivo* での AAV の使用は適切ではないと考えられる。

本臨床研究では、*in vivo* での遺伝子導入ではなく、*ex vivo* でのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入を選択した。これは、レトロウイルスベクターの分裂細胞への遺伝子導入効率が高く、効率の良い遺伝子組み込みに基づく安定した持続蛋白質発現が可能な特徴を有するためである。*ex vivo* での遺伝子導入後の遺伝子の組み込みを考えた場合、ウイルスベクターの候補としてはレトロウイルスベクターの他に AAV の使用も考えられる。しかしながら現行の AAV は、遺伝子の挿入サイズを確保する目的で染色体への挿入に寄与する Rep 配列が除かれて

いるため染色体への挿入効率が非常に低く、また染色体外に環状 DNA として存在することが報告されている。したがって、この AAV を用いて前脂肪細胞のような分裂時期の細胞に導入された遺伝子は細胞の増殖に伴い希釈されるため、本臨床研究のように必要細胞数まで拡大培養すると、前述の二本鎖 DNA への変換効率の低さに加えて、染色体への組み込み能の低さから、十分な薬効を保証できるだけの LCAT 遺伝子が残存しなくなるおそれがある。以上から、*ex vivo* での AAV の使用も本酵素補充療法における導入遺伝子方法としては適切ではないと考えられる。一方、レトロウイルスベクターでは増殖性ウイルス (RCR) の出現が危惧されるが、本臨床研究で用いるレトロウイルスベクターとしては、*gag*、*pol*、*env* 遺伝子配列を完全に除いた Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) 由来の pDON-AI を用い、パッケージング細胞として *gag-pol* と *env* 遺伝子が別々の DNA 上に存在している GP+envAM-12 細胞を用いることで、相対的組換えによる増殖性ウイルス (RCR) 出現の可能性を低く抑えている。

1999 年からフランス、続いてイギリスでレトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked Severe Combined Immunodeficiency : X-SCID) に対する遺伝子治療が始まり、大半の患者が免疫能を獲得して通常の生活を送れるようになった。しかし、治療を受けた患者 20 名のうちフランスで 4 名、イギリスで 1 名計 5 名に T リンパ性白血病を発症し、1 名が死亡した。これは、患者の染色体中のがん遺伝子 LM02 のプロモーター領域近傍にレトロウイルスが組込まれ、LM02 が恒常的に活性化された結果、白血病を発症したと考えられる (フランスの 1 例は、CCDN2 遺伝子へのベクター組み込みによる)。これまでに全世界でレトロウイルス遺伝子治療を受けた数千名以上の患者のうち実際に発がんにいたったのはこれらの X-SCID 遺伝子治療例のみで、またフランス及びイギリス以外で実施された X-SCID に対するレトロウイルス遺伝子治療では安全性上の問題は報告されていない。細胞のがん化には複数の遺伝子異常の蓄積が必要である。X-SCID の場合、 γc 遺伝子自体が強力な T リンパ球増殖作用を持つという特殊事情が重なって白血病を発症したと考えられる。本研究は X-SCID 遺伝子治療と同様にレトロウイルスベクターを用いているが、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いた *in vitro* 及び *in vivo* の非臨床試験では形質転換が現在のところ認められていない。以上より、本臨床研究におけるがん化の危険性は極めて低いと考えられる。

ex vivo による遺伝子導入の利点は、細胞への遺伝子導入の工程を品質管理できる点にある。標的細胞をヒト前脂肪細胞に絞り込むことで、遺伝子導入した細胞を体内の脂肪組織に戻したときに、脂肪細胞以外の細胞に分化して予測外の副作用を引き起こす可能性を極力排除した。さらに、ヒトの脂肪組織 (前脂肪細胞) の状態にも個人差のあることが報告されており、投与前の LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の LCAT 活性を予め確認してから移植できることは移植細胞数のコントロール面からも大きなメリットである。

一方、脂肪細胞の体内での代謝回転が遅いことから安定した遺伝子発現が期待できるが、さらに導入遺伝子が染色体に組み込まれることは、細胞が分裂しても娘細胞に引き継がれていく点で長期間の発現には有利である。

4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法

(1) 野生型ウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響

使用するベクターは Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) 由来のレトロウイルスベクターである。MoMLV は sarcoma37 細胞より分離された RNA ウイルスであるが、発がん遺伝子は持たない。長期間感染したマウスにリンパ性白血病を起こすことが知られているが、ヒトには感染することはない。

MoMLV のゲノムは 5' LTR、パッケージングシグナル (Ψ)、*gag*、*pol*、*env*、および 3' LTR よりなる。LTR にはエンハンサー/プロモーター活性があり、 Ψ はウイルスゲノム RNA がウイルス粒子に取り込まれるのに必要な配列である。*gag* はウイルスのコア構造蛋白質を、*pol* は逆転写酵素及びインテグラーゼを、*env* はウイルス外被蛋白質をそれぞれコードする遺伝子である。レトロウイルスはウイルス粒子外被に存在する ENV と標的細胞の表面にある特異的受容体が結合した後、膜融合によりウイルス粒子が細胞内に取り込まれる。その後、逆転写酵素によりウイルスゲノム RNA が 2 本鎖 DNA に逆転写され、核に移行してインテグラーゼにより宿主染色体に組み込まれる。宿主 DNA 上のウイルスゲノム (プロウイルス) は宿主の転写機構によってウイルス RNA へと転写されるが、一部は GAG、POL、ENV へと転写・翻訳され、ウイルス粒子を形成する。ウイルス RNA を取り込んだウイルス粒子は出芽により細胞外へと放出され、次々と周囲の細胞に感染していく。MoMLV はエコトロピックウイルス (同種指向性ウイルス) のため、マウス細胞にしか感染しないが、異なる種にも感染性を示すアンフォトロピックウイルス (多種指向性ウイルス) 由来の ENV を用いることで、ヒト細胞への感染も可能となる。

(2) ウイルスベクター (マスターセルバンク) の作製方法

ヒト肝がん細胞株の cDNA ライブラリーから調製した hLCAT 遺伝子を用い、 μ DON-AI DNA ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の *Bam* HI 切断部位と *Sa*II 切断部位の間に、当該制限酵素配列を含むプライマーにより増幅させた hLCAT 遺伝子を挿入した。次に、蛋白質合成効率の向上のために開始コドン ATG 上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入し、また、hLCAT 遺伝子ストップコドン近傍に存在する poly A 付加配列の AATAAA (TAA がストップコドン) を別のストップコドン TGA に改変した。さらに、目的以外の不用な遺伝子の発現を避けるために、*Sa*II 切断部位から *Xho*I 切断部位までを切り出し、Minimal SV40 promoter 配列及び *Neo*^r (ネオマイシン耐性遺伝子配列) を除去し、レトロウイルス産生用プラスミド (μ CGThLCAT) を構築した。

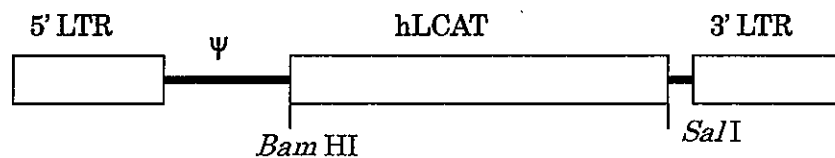
MoMLV の *gag-pol* 遺伝子とエコトロピックエンベロープ遺伝子を発現するパッケージング細胞 GP+E-86 細胞に、レトロウイルスベクター産生用プラスミド (μ CGThLCAT) をハイグロマイシン耐性遺伝子と同時に、Lipofectamine2000CD (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いてトランスフェクションした。これらについて Hygromycin B 選択を行うことにより薬剤耐性細胞プールを獲得し、この細胞の培養上清から調製した hLCAT 発現エコトロピックレトロウイルスベクターを、RetroNectin (タカラバイオ株式会社) を用いて、同じく MoMLV の *gag-pol* 遺伝子およびマウスウイルス 4070A 由来アンフォトロピックエンベロープ遺伝子を発現する GP+envAM-12 細胞 (マウス由来細胞) に接種させた。

遺伝子導入細胞をプレートに限界希釈して播種し、ウイルスベクター産生細胞のスクリーニングを行い、シングルクローンと考えられるウェルについてその上清をリアルタイム RT-PCR で分析して得た陽性クローンの中から、最も高タイターのウイルス産生細胞を選択した。この細胞を hLCAT 発現アンフォトロピックレトロウイルスベクター産生細胞としてプレマスターセルバンクを作製し、さらにこのプレマスターセルバンクよりマスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) を作製した。

(3) ウイルスベクターの遺伝子構造と性質

hLCAT 発現レトロウイルスベクターの塩基配列の基本骨格は、pDON-AI プラスミド (タカラバイオ株式会社) に由来しているが、マスターセルバンクを作製する際に GP+envAM-12 細胞にエコトロピックウイルスベクターを感染させてアンフォトロピック hLCAT 発現レトロウイルスベクターを構築する過程で、宿主染色体に組み込まれる時に、逆転写酵素によりウイルスゲノム上の 3' LTR 配列が 5' LTR 領域へとコピーされるため、5' LTR 領域塩基配列はオリジナルの MFG ベクターと同一となる。従って、MCB により生産されるウイルスベクターでは、hLCAT 遺伝子の発現は元の MoMLV 由来の LTR エンハンサー/プロモーターにより誘導されることになる。ウイルスゲノム RNA をウイルス粒子に取り込むのに必要なパッケージングシグナルとしての Ψ 配列を有するが、ウイルス粒子形成に必須な *gag*、*pol*、*env* が除かれているため、*gag*、*pol*、*env* のすべての遺伝子を発現しているパッケージング細胞 (GP+envAM-12 細胞) でのみ感染性ウイルス粒子を形成することが出来る。従って、細胞内で組換えを起こしてこれらの遺伝子を全てウイルスゲノムに取り込まない限り、通常の細胞でも増殖可能な増殖性ウイルス (RCR) が出現することはない。

以下に hLCAT 発現レトロウイルスベクター遺伝子の構造概略を示す。



LTR : Long terminal repeat、 Ψ : パッケージング配列

hLCAT 発現レトロウイルスベクター遺伝子の構造概略図

(4) ウイルスベクター (マスターセルバンク) の生物学的特徴

hLCAT 発現レトロウイルスベクター作製には、パッケージング細胞として GP+envAM-12 を用いた。GP+envAM-12 細胞は野生型 MoMLV の *gag-pol* 及びマウスアンフォトロピックウイルス 4070A 由来の *env* を効率よく発現する NIH3T3 由来のマウス細胞株である。 Ψ 配列を持たないためウイルス粒子中に RNA を取り込むことが出来ず、単独で野生型ウイルスを産生することはない。上記 hLCAT 発現レトロウイルスベクター製造用マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) から産生されるウイルスベクターの遺伝子導入可能宿主は広範囲のもの (アンフォトロピック) になり、マウス、ラットのみでなくヒト、サル等にも遺伝子導入可能である。なお、レトロウイルスの特質として、細胞への遺伝子導入には標的細胞が増殖期にあることが必要であるが、一度染色体に組み込まれた遺伝子は安定して娘細胞へと伝えられ、長期にわたる発現が期待できる。パッケージング細胞内で hLCAT 発現ベクター

	<p>遺伝子が宿主遺伝子と組換えを起こす可能性は否定できないが、GP+envAM-12 細胞では <i>gag-pol</i> と <i>env</i> が独立して存在していることから、野生型の増殖性レトロウイルス (RCR) が出現するには複数回の組換えが同時に必要であること、また、このウイルスベクターは <i>gag</i>、<i>pol</i>、<i>env</i> が完全に欠落しているため、相同的組換えに必要な元のウイルス由来配列はより少なくなっていることから、RCR 出現の可能性は極めて低いと考えられる。RCR が出現しない限り、体内で周囲の細胞や他の臓器へ伝播することはない。</p> <p>5. 導入遺伝子からの生成物の構造および生物活性</p> <p>LCAT は、血中コレステロールのエステル化を担うコレステロール逆転送系 (コレステロールの末梢組織から肝臓へ転送) の最初の段階を支配する重要な酵素である。肝臓で合成され、血中では HDL と結合して存在し、遊離コレステロールにレシチンの脂肪酸を転移してコレステロールエステルを生成するコレステロールエステル化酵素である。N 末端にシグナル配列をもつ分泌型蛋白質 (440 アミノ酸残基) として合成されるが、分泌された成熟 LCAT はアミノ酸 416 個よりなる分子量約 63,000 の糖蛋白質 (糖鎖含量約 25%) である。血中半減期は約 4 日と報告されている。ヒトでの LCAT 欠損症については低 HDL コレステロール血症はじめ全ての血中リポ蛋白分画に異常がみられるが、臨床症状としては、角膜混濁や腎機能障害などがみられている。LCAT を過剰発現させたトランスジェニックマウスではコレステロール逆転送の亢進や高 HDL コレステロール血症が報告されている。</p>
<p>安全性についての 評価</p>	<p>1. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特性</p> <p>健康成人より提供された腹部皮下脂肪から天井培養法によってヒト前脂肪細胞を分取し、硫酸プロタミンを補助試薬としてレトロウイルスベクターを用いて hLCAT 遺伝子を導入して調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特性評価の結果は、以下のとおりである。</p> <p>(1) 形態</p> <p>ヒト前脂肪細胞は、顕微鏡下で線維芽細胞用の形態を示した。遺伝子導入の有無に係わらず細胞形態に差は認められなかった。培養期間が 1.5 ヶ月程度までは形態的には大きな変化は示さなかった。</p> <p>(2) 細胞プロファイル</p> <p>上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト脂肪細胞について、腹部皮下脂肪採取後 28 日目に、20 種の膜蛋白質プロファイリングを行った結果、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は CD31⁻CD45⁻ (血球系マーカー及び血管系マーカーがともに陰性) 細胞であり、その他の特徴として以下のことが判明した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ CD45 及び CD34 が陰性であることから血球系幹細胞の混入はないと考えられる ・ CD105、CD146 が陽性であることから、線維芽細胞ではない ・ CD36 (脂肪酸トランスポーター) は培養初期には moderate な発現が見られ、培養により徐々に低下していく ・ 間葉系幹細胞マーカーとして知られる CD13、CD29、CD44、CD73、CD90 が陽性であり、未分化な多能性幹細胞や全細胞系統の造血前駆細胞に発現が認められる CD34 は陰性であり、また、すべての組織に幅広く発現されているとされる CD59 (補体による細胞溶解を防ぐ膜蛋白質) は陽性である <p>これらより、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、CD13⁺31⁻34⁻45⁻90⁺105⁺146⁺ と表さ</p>

れ、この細胞プロファイル結果は、天井培養法により分取したヒト前脂肪細胞の性質に関する宮崎らの報告と概ね一致していた。また、吉村らが示した脂肪由来細胞の細胞プロファイルでは CD34 の発現は陽性を示したが、この相違は天井培養法の利用の有無や培養期間の相違によるものと考えられる。

(3) 増殖速度

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の腹部皮下脂肪採取後 9 日目（遺伝子導入翌日）から 21 日目（移植予定日）までの倍加時間は 1.4~2.0 日であった。増殖速度は遺伝子導入の有無で影響を受けなかった。

(4) 分化能

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞について、腹部皮下脂肪採取後 21 日目（移植時）の細胞を播種し、3 日間の前培養の後に分化誘導した。その 2 週間後、約 50% の LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞に、脂肪細胞への分化が認められた。分化能は LCAT 遺伝子導入の有無で影響を受けなかった。

(5) hLCAT 遺伝子導入コピー数と導入遺伝子の安定性

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞について、hLCAT 遺伝子の導入を行い、経時的に細胞を回収し、導入遺伝子コピー数を測定したところ、導入後 8 日目の導入遺伝子コピー数は 1 細胞あたり 1~2 コピーであり、移植予定日（遺伝子導入 14 日後、脂肪組織出 21 日後）を 3 週間程度経過しても安定に推移することが確認された。

また、導入後 19 日目（脂肪採取後 34 日目）に抽出したゲノム DNA 中の導入 hLCAT 遺伝子塩基配列を解析したところ、その塩基配列に変化は見られなかった。

(6) hLCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターのヒト前脂肪細胞への導入効率

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞について、hLCAT 遺伝子を導入後 12 日目（脂肪採取後 20 日目）に固定し、抗ヒト LCAT ウサギ抗体にて免疫染色を行ったところ、LCAT 発現陽性細胞の割合はおおよそ 30%であった。

(7) LCAT の発現性および発現した LCAT の活性

上記方法で調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞について、hLCAT 遺伝子を導入後 12 日目（脂肪採取後 20 日目）から 3 日間（脂肪採取後 23 日まで）までの期間において、培地交換を行わず培養した培養液を回収しその LCAT 活性を合成基質法で測定した。また、ウェスタンブロットにより、培養上清中への LCAT 蛋白質の分泌を確認した。

LCAT の分子サイズはヒト HDL 由来のものと同様（60~65kDa）であることから、糖鎖修飾された LCAT と考えられる。また、培養液の LCAT 活性測定結果から、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞（ 10^5 cells、平均導入コピー数 0.37 コピー/細胞）は、3 日間でおおよそ 1.31 nmol E-Cho/h の酵素活性相当の LCAT を生産・分泌することができるものと考えられた。

(8) アポ A1 蛋白分布変化による LCAT 活性の評価

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が分泌する LCAT 蛋白質は用量依存的に魚眼病（FED）患者血清中のアポ A1 蛋白含有粒子のサイズを高分子側にシフトする活性を有していることが分かった。この検討結果から、FED 患者血清の状態が、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が培養上清中に分泌する LCAT 蛋白質の作用により、健常人の血清状態により近づくことが確認された。この分布変化は血清中コレステロールのエステル化活性と相関していた。すな

わち、分泌された LCAT 蛋白質は患者血清中で所望する薬効を発揮することが示された。

同じ培養上清検体を用い、コレステロールのエステル化活性を測定した。PA/LCAT 濃縮培養上清中の hLCAT は rLCAT (市販品) の 2~3 倍のエステル化活性を示した。すなわち市販の rLCAT と同等以上の活性を示すことが明らかになった

(9) 長期培養による形質変化の有無 (軟寒天培地でのコロニー形成能の検討)

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を hLCAT 遺伝子の導入後、継代培養を実施し、移植予定日の細胞について 96 well plate に 1 well あたり 10,000 個の細胞を軟寒天培地に播種しコロニー形成能の有無を確認したところ、移植実施予定日までにコロニー形成能を獲得することはなかった。in vitro での形質変化の有無を確認するため、長期培養を実施すると 130~150 日で増殖を停止することが分かった。すなわち長期培養を実施しても不死化、がん化などの形質変化は認められなかった。一方、陽性対照として HeLa 細胞を 100 個/well となるように播種したものをを用いたところ、平均約 30 個のコロニーが検出された。

(10) 遺伝子導入細胞における染色体異常の有無

天井培養終了後の初期段階での細胞と、移植予定日を経過した細胞 (脂肪組織摘出約 40 日後) には、細胞の in vitro での培養と加工に伴う染色体異常は認められなかった。

(11) hLCAT 遺伝子導入による前脂肪細胞の特性変化

上記(1)~(4)及び(8)~(10)の各検討項目に関して、LCAT 遺伝子非導入ヒト前脂肪細胞についても検討を行ったが、いずれの検討項目でも hLCAT 遺伝子導入による細胞の特性変化は観察されなかった。

2. 実験動物を用いた研究の成果

(1) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の in vivo における LCAT の発現性

C57B6J マウス前脂肪細胞をヒトと同様な方法で皮下脂肪より調製し、hLCAT 遺伝子を導入後、同系マウスの皮下に移植した。移植後 28 日目の剖検で、hLCAT の発現が免疫染色で確認された。以上のことより、hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞は in vivo においても hLCAT を発現していることが確認できた。

(2) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス皮下移植における生着性と生体への影響

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を免疫不全 (NOG) マウスの皮下組織内に移植し、投与 28 日後に PKH26 による細胞表面蛍光標識法により観察したところ、移植部位と考えられる皮下組織内に蛍光を確認した。また、他の臓器には PKH26 由来と考えられる蛍光は検出されなかった。

(3) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の皮下移植によるがん化

C57B6J マウス前脂肪細胞をヒトと同様な方法で皮下脂肪より分取し、hLCAT 遺伝子を導入後 (低コピー群: 0.97 コピー/細胞、高コピー群: 7.90 コピー/細胞)、同系マウスの皮下に移植した。細胞移植されたマウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は確認されなかった。移植後約 7 ヶ月及び 1 年後の剖検では、臓器重量、血液学的検査、各臓器、組織の肉眼所見について、異常は認められなかった。導入コピー数に

関わらずがん化は認められず、遺伝子導入を行っていないマウス前脂肪細胞を移植したマウスにおいてもがん化は認められなかった。

(4) hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞の自家移植による生体への影響

カニクイザル前脂肪細胞をヒトと同様な方法で皮下脂肪より分取し、hLCAT 遺伝子を導入して調製した hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞の hLCAT 遺伝子の導入コピー数は 0~3 コピー程度であった。

さらに、hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞を、皮下脂肪採取を行ったカニクイザルに自家移植し、移植後 2 週間後および 2 ヶ月後に剖検を行ったところ、移植後の全例において、一般状態、体重、摂餌量に異常は見られなかったことに加え、行動観察、心電図、呼吸数といった薬理的異常所見も観察されなかった。また、剖検後の各臓器重量、血液学的変化、各臓器、組織の肉眼所見においても異常は観察されなかったことより、hLCAT 遺伝子導入サル前脂肪細胞のサルへの自家移植では、移植後 2 ヶ月において安全性の観点から異常は認められなかった。

(5) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の脂肪組織内他家移植における生着性と生体に対する影響

LCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を C57BL/6J マウスの腰部脂肪組織内に移植し、移植後 1 日、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、7 ヶ月後に移植細胞の生着性と試験期間内の投与動物の健康状態を観察した。PKH26 蛍光組織染色観察より移植細胞は移植部位内に残存していることが確認された。LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の投与群では観察期間を通して一般状態、体重推移、生化学検査値に異常は認められなかった。

(6) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の NOG マウス脂肪移植における生着性と生体に対する影響、および hLCAT 蛋白質の分泌

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を NOG マウスの肩甲骨間脂肪組織内に移植し、移植後 1 日、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、8 ヶ月後に移植細胞の生着性と試験期間内の動物の一般状態を観察した。PKH26 蛍光組織染色観察より移植細胞は移植部位内に残存していることが確認され、当該組織への傷害は認められなかった。LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の投与群では一般状態、体重変化に観察期間中、異常は認められなかった。また、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が少なくとも 1 ヶ月 (29 日) まで NOG マウスで分泌する能力を有することが確認された。

(7) LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の Nude マウス皮下移植によるがん化

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を Nude マウス皮下に移植した。細胞移植されたマウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は確認されなかった。移植後約 3 ヶ月の剖検では、臓器重量、各臓器、組織の肉眼所見について、異常は認められなかった。陽性対照群である HeLaS3 細胞投与群ではがん化を認めた。

(8) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の B6 マウス皮下移植による足場の評価

hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞を用い、マウス実験で生着促進効果の知られているマトリゲルと臨床への適応を目指した足場素材フィブリングルとの比較を実施した。評価は hLCAT の血中への分泌能により実施した。経時的に採取したマウス血清について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した。移植した細胞は移植 28 日後まで、hLCAT 蛋白質を血中

に分泌することを確認した。この結果から hLCAT 分泌に対してフィブリンゲルがマウス体内でマトリゲルとほぼ同等の効果を発揮することを確認した。同時に移植した細胞の残存率をリアルタイム PCR 法により測定し、28 日後には投与翌日の 30 %程度が残存していることが分かった。

- (9) hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の Nude マウス皮下移植による血中への hLCAT の分泌
hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞をフィブリンゲルとして Nude マウス皮下に移植した。経時的に採取したマウス血漿について hLCAT 蛋白質の分泌を確認した。移植した細胞は移植 28 日後まで、hLCAT 蛋白質を血中に分泌することを確認した。

3. 遺伝子導入方法の安全性

(1) 遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクターの品質および安全性

hLCAT 発現レトロウイルスベクター製造用マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) は、タカラバイオ株式会社において GMP 製造されたものである。1 バイアルにウイルスベクター産生細胞を 4×10^6 個/mL 含み、液体窒素タンクにて保存されている。マスターセルバンクの品質試験結果は、Viability 98.2%、無菌試験にて適合、*in vivo* ウイルス試験、Bovine virus 試験、Isoenzyme 試験、抗体産生試験 (MAP 試験) はいずれも陰性を示した。

遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクターは、本マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) より、タカラバイオ株式会社において GMP 製造されたものである。

マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) より 3 本を融解して培養を開始し、2 回の継代培養を行った後、セルスタック (10 チャンバー 2 個及び 5 チャンバー 1 個) でセミコンフルエントまで培養後、ウイルスハーベスト培地に交換し、24 時間後に培地上清を回収した。回収後新たなウイルスハーベスト培地に交換し、次の 24 時間培養後に培地上清を回収し、同じ操作をさらにもう一度行った。回収したウイルス液はそれぞれ無菌ろ過を行った後、4 mL ずつ分注し -80°C にて凍結保存した。

hLCAT 発現レトロウイルスベクター溶液 2 ロットの品質試験概要 (参考実測値) は下表の通りであった。

試験項目	CRV07-1	CRV07-2	試験項目	CRV07-1	CRV07-2
無菌試験	適合	適合	エンドトキシン (EU/mL)	<0.02	<0.05
マイコプラズマ否定試験	陰性	陰性	ウイルスタイター (copies/mL)	3.63×10^9	3.91×10^9
RCR 簡易培養法	陰性	陰性	遺伝子産物発現試験 (copies/10 ngRNA)	4.99×10^5	7.96×10^5

(2) 被験者に移植する LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液 (細胞懸濁液) の品質および安全性

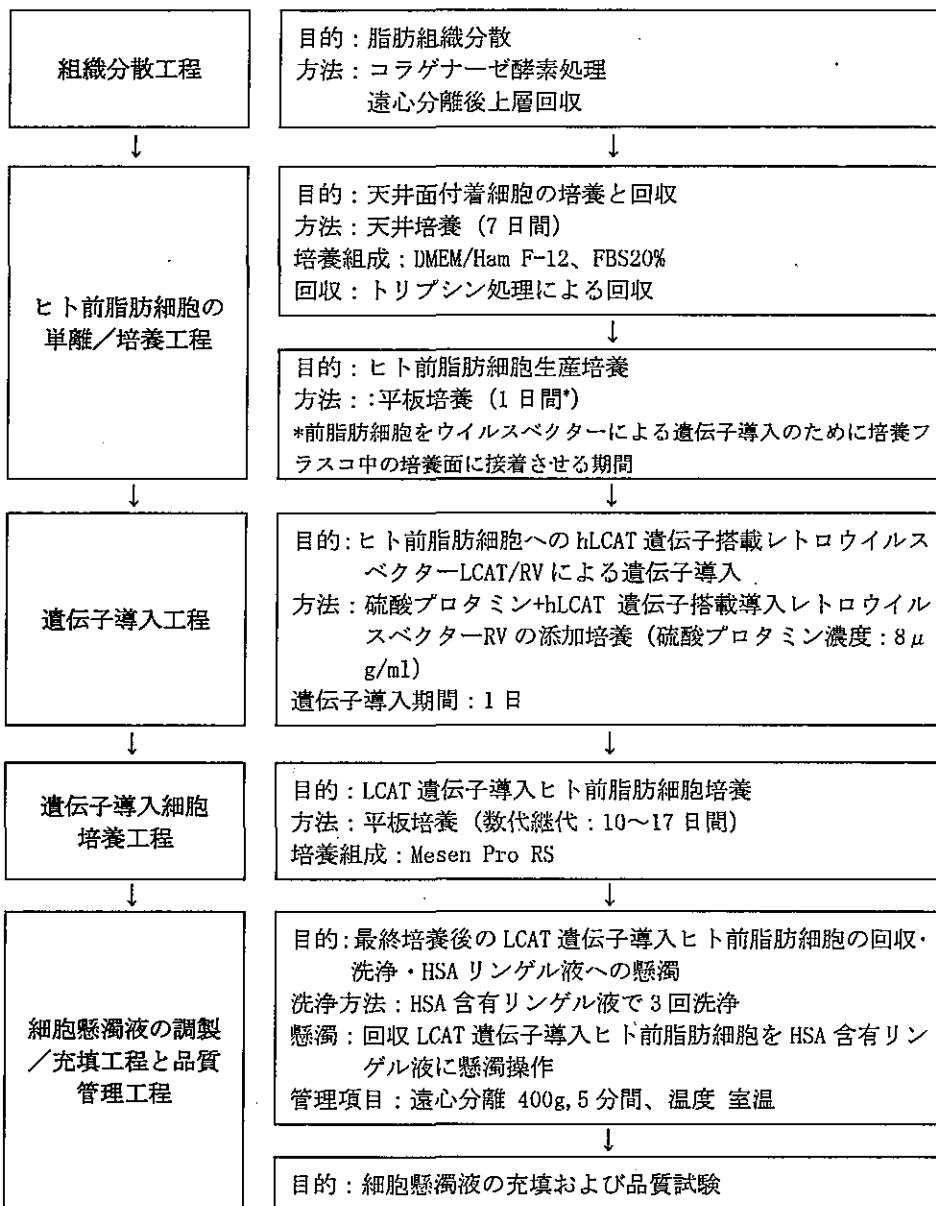
1) 細胞懸濁液製造フローチャート

以下に細胞懸濁液製造方法を示した。本製造方法は、千葉大学医学部倫理委員会承認の下、健康成人の皮下脂肪組織を用いて確立したものである。

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液製造フローチャート

細胞懸濁液製造工程

工程の詳細



予想される製造工程日数

工 程		日 数	採取から細胞懸濁液の調製
ヒト前脂肪細胞単離・培養工程	天井培養～継代培養	8日 (天井培養：7日)	18～25日
遺伝子導入工程		(1日)	
LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞培養・細胞懸濁液調製工程		10～17日	
細胞懸濁液の調製／充填工程と品質管理工程	細胞懸濁液の調製～移植まで	3時間以内（推定）	
	移植後の品質試験項目	30日以内	

2) 品質及び安全性

被験者に移植する成分は、被験者自身の脂肪組織より調製された LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞と懸濁溶媒に含まれるヒト血清アルブミン (HSA) 及び生理的組織接着剤 (いずれも既承認市販品) である。皮下脂肪組織より調製した細胞を再び自己組織に戻す試みは、美容形成外科で多く試みられており、安全性の面で特に問題とはなっていない。自家移植であることから、組織適合性や内在性ウイルス等についての考慮は不要と考えられる。

被験者体外での培養・遺伝子導入工程で混入する可能性のある不純物などについても品質試験を行い、安全性の確認を行う。細胞懸濁液での試験結果が移植予定日までに間に合わない項目については、工程途中の試料での検査結果を参考に細胞懸濁液の安全性を判断し、安全と判断した場合には、遅延なく細胞懸濁液を被験者に移植できることとする。そのために、細胞懸濁液の試験結果の一部を事後確認項目とし、もし事後確認項目において問題が生じた場合には、移植した細胞の除去の可能性も含め個別に対応する。

(3) 増殖性ウイルス出現の可能性

hLCAT 発現レトロウイルスベクター作製には pDON-AI を用いており、野生型ウイルス由来の *gag*、*pol* および *env* を完全に排除したことで、これまで RCR の出現が報告されていたパッケージング細胞「PA317 細胞」においてもその出現が否定されている。また、パッケージング細胞である GP+envAM-12 細胞においても、*gag-pol* と *env* とが別々の DNA 断片上に別れて存在しているため、相同的組換えにより野生型・増殖性ウイルス (RCR) が出現する可能性は極めて少ないと考えられる。本マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC Lot. CM06-1) およびそれから作製されたウイルスベクターロットにおいても RCR は検出されていない。細胞懸濁液である LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞においても RCR が出現していないことの確認を行うが、被験者への移植後に定期的実施する検査において血液中の RCR 検出検査を実施し、万一の RCR 発現に備え継続的なモニターを行う。

(4) 遺伝子導入に使用するウイルスベクターの細胞傷害性

本研究に用いる遺伝子導入用ウイルスベクターは、その遺伝子構造の骨格やウイルス外被構造において、現在までに遺伝子治療で使用されてきたレトロウイルスベクターと大きく異なるものではない。今まで、レトロウイルスベクターによる細胞性傷害の報告はないことから、本ウイルスベクターによる細胞傷害の危険性は低いものと考えられる。

(5) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本研究では、被験者の腹部皮下脂肪組織より採取し、天井培養等により選別・調製されたヒト前脂肪細胞を標的細胞として、ウイルスベクターを用いて *ex vivo* で遺伝子導入を行うものである。血管系や血管内皮系の細胞の混在のない比較的均一なヒト前脂肪細胞分画を用いてはいるが、ヒト前脂肪細胞以外の未分化な間葉系細胞の混入の可能性は否定できない。従って、移植後の遺伝子導入細胞の脂肪組織内での生着、遺伝子発現等については、同じ脂肪組織由来であっても標的以外の細胞へ遺伝子が導入されたケースも想定して、移植部位の観察を含め各種臨床検査値の推移などを注意深く観察し、異常が発生していないか否かを確認していく予定である。また、ウイルスベクターによる遺伝子導入から細胞移植までにはかなりの日数があることから、細胞に取り込まれなかったレトロウイルスベ

クターが細胞移植時までは全て失活すると考えられ、感染力のあるウイルスベクターが細胞とともに体内に持ち込まれる可能性はなく、RCR が出現しない限り遺伝子導入された細胞から他の細胞へと体内で遺伝子導入がなされることはないと考えられる。

(6) 被験者以外の人への遺伝子導入の可能性

本研究における遺伝子導入レトロウイルスベクターの使用、移植細胞の被験者への投与、保管、運搬および廃棄ならびにこれらに付随する行為等は、全て「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(カルタヘナ法：平成 15 年法律第 97 号)」第一種使用規程を遵守して行うため被験者以外の人へ遺伝子導入されるおそれはないと考えられる。すなわち、本研究における遺伝子導入作業は、治験薬 GMP 準拠の P2 レベルの拡散防止措置のとることができる細胞調製室 (Cell processing center:CPC) 内において、十分に教育を受け、経験のある担当者によって行われる。標的細胞へのレトロウイルスベクターの暴露は CPC 内においてのみ行われ、レトロウイルスベクターは細胞外にあっては非常に不安定であること、および CPC 内の作業は手順書に則り常時ゴム手袋及びマスクを着用していることから操作中に感染することは考えられない。また、ウイルスベクターを含む廃液等はすべてオートクレーブ処理後廃棄されるので、外部に漏出する危険性はない。二重に密閉された容器で運搬された移植用細胞は拡散防止措置のとられた個室で被験者に投与されるので、移植後の被験者に対して実施する定期的な検査において RCR の出現が認められない限り、細胞懸濁液を被験者へ組織内移植する操作過程も含め、被験者を介して他の人へ感染するおそれはないと考えられる。

(7) 染色体内へ遺伝子が組込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターが宿主 DNA に組み込まれる位置は決まっているわけではないので、その組み込まれた部位により細胞に大きな影響の出る可能性は否定できない。ヒト前脂肪細胞の染色体 DNA へのウイルスベクターの組み込みはランダムに起こると考えられ、遺伝子導入後は染色体の様々な部位に hLCAT 遺伝子の挿入された細胞の集合となる。外来遺伝子の挿入がその細胞の増殖に特にプラスに働かない場合、細胞集団内でのその細胞の影響は小さく生体に影響を与えることはないが、挿入がその細胞の増殖優位性をもたらす場合、細胞集団の中でそのクローンが増大し (クローナリティの出現)、状況によってはがん化する可能性も否定はできない。

ヒト前脂肪細胞調製の条件及およびウイルスベクター感染の条件をコントロールすることで、細胞あたりの平均導入コピー数を一定にして染色体 DNA への過剰な組み込みを抑え、導入後の細胞の導入コピー数を確認し、さらに、移植後も長期にわたってクローナリティ出現のチェックを行う。

(8) がん原性の有無

レトロウイルスベクターの宿主 DNA への組み込みがその細胞の増殖優位性をもたらす場合、幾つかの変異が重なってその細胞ががん化していく可能性は否定できない。フランスにおける X-SCID の遺伝子治療においては、がん遺伝子 *LMO2* の近傍にレトロウイルスが挿入されることでこのがん遺伝子が活性化され、細胞のがん化の引き金になった可能性があることが報告されている。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、X-SCID 以外にこのようながん化の事例は報告されていないこと、および本研究の標的細胞であるヒト

前脂肪細胞は X-SCID 遺伝子治療で用いられた造血系細胞とは細胞の性質がまったく異なることや移植後の環境も違うことから、この例をそのまま本研究のケースに当てはめることはできない。現在、*in vitro* で継代培養した移植細胞の細胞学的観察やクローナリティ出現、遺伝子導入細胞における染色体異常、マウスでの hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞の皮下移植によるがん化および Nude マウスでの LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の皮下移植によるがん化の検討を行っているが、がん化所見は認められていない。

4. 遺伝子産物の安全性

導入遺伝子により発現する遺伝子産物は正常の LCAT のみである。遺伝子導入したヒト前脂肪細胞で、天然型と変わらないサイズと活性をもつ LCAT の発現を *in vitro* で確認している。ヒト型蛋白質であることから、ヒトでは抗原性を持たないと考えられるが、LCAT 欠損または変異をもつ患者で発現した場合には、異物と認識される可能性もあるので、移植後には血中抗ヒト LCAT 抗体の出現の有無をモニターする。なお、ヒト前脂肪細胞からの分泌蛋白質プロファイルは hLCAT 遺伝子導入前後で変化は認められていない。

5. 細胞の安全性

(1) 培養細胞の純度

移植される細胞は GMP に準拠し十分にコントロールされた状態で製造される。移植細胞の純度はフローサイトメトリーおよび導入 hLCAT 遺伝子陽性率にて調査し、規格に適合する場合にのみ移植される。また、被験者以外の細胞の汚染を防ぐため、被験者の脂肪組織の搬入から細胞懸濁液調製までのプロセスが細胞調製室で終了するまで、別の被験者の脂肪組織等を扱わないこととする。また、遺伝子導入時に使用するウイルスベクター等の使用する原料や培地に関して、無菌性（好気性菌、嫌気性菌、真菌）、マイコプラズマ、増殖性レトロウイルス、その他迷入する恐れのあるウイルス汚染について検査を行い陰性のものを使用するため、微生物等による汚染の可能性も極めて低い。

(2) 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

ヒト前脂肪細胞は培養時に遺伝子型、表現型に大きな変化は観察されていない。レトロウイルスベクターによる導入 hLCAT 遺伝子はゲノム DNA にランダムに挿入されるため、特定の遺伝子型や表現型に変化をあたえる可能性予測することは難しいが、健康成人からのヒト前脂肪細胞を用いた検討では遺伝子導入による細胞の形質変化は観察されていない。被験者への移植前に、移植する細胞に関して、膜表面抗原マーカーに変化のないことを確認する。

(3) 被験者に投与する細胞の安全性

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、*ex vivo* にて必要量の hLCAT 遺伝子が導入され、導入遺伝子コピー数、細胞の表現型、発現する LCAT の活性を移植前に確認することで、移植細胞の安全性や有効性を最大限確保する。また、無菌性、マイコプラズマ、増殖性レトロウイルス、迷入ウイルスをはじめ、細胞培養に使用した FBS やトリプシンの混入など不純物試験も実施し、最大限の安全性確保を行う。

<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>本臨床研究の計画に当たり、細胞・遺伝子工学、細胞遺伝子治療、遺伝子関連医薬品および細胞薬品製造等に精通している専門家の協力体制が出来ており、以下、4点の理由より遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した。</p> <p>1. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植組成物の調製と移植</p> <p>皮下脂肪摘出と LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の脂肪組織内移植において</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) ヒト前脂肪細胞の単離・調製のため必要な皮下脂肪摘出量は、およそ 20 g 程度であり、外観上も摘出によるくぼみは生じず、摘出は約 15 分程度で完了する。(健康成人ボランティア研究より) 2) 脂肪組織内への LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の細胞懸濁液*の移植量は生理的組織接着剤(既承認市販品の血漿分画製剤)を含め 30 mL 以下である(細胞数で $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$)。 <ul style="list-style-type: none"> * 細胞懸濁液は 500 mL リンゲル液に献血アルブミン 25% 静注 12.5 g/50 mL 「ベネシス」(旧名: 献血アルブミン-WF) 10 mL を加えたものである。ベネシスとして 2 %v/v、ヒトアルブミンとして 0.5% を含む。 3) ヒト前脂肪細胞の足場材料として等量の生理的組織接着剤を細胞と混合し、直ちに脂肪組織内へ注入することにより高い生着性と hLCAT の持続的分泌が得られる。 <p>2. LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の特徴</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 皮下脂肪組織から一定以上のヒト前脂肪細胞の調製が可能である。 2) hLCAT 遺伝子導入後に安定した持続発現(培地中での LCAT 活性の蓄積)が認められている。 3) 2) の理由により、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植細胞数が決定可能である。 4) 自己ヒト前脂肪細胞を用いるため、脂肪組織内への移植による拒絶反応は生じないことが推察され、安定した生着が得られる。 <p>3. ベネフィットの予測</p> <p>家族性 LCAT 欠損症患者は、古典型 LCAT 欠損症で血中 LCAT が正常の 10% 未満、部分型 LCAT 欠損症で正常の 10~20% とされている。魚眼病で血中 αLCAT 活性(合成基質法)が、正常の 0~20% とされており、角膜混濁、溶血性貧血、血中リポ蛋白異常、特に HDL コレステロールの低下が顕著である。また古典型 LCAT 欠損症では、さらに腎障害を併発する場合が多く、そのほとんどが予後として人工透析治療を余儀なくされる。また幼少期より発症する角膜混濁についても青年期で視力障害、40 歳以降で角膜移植が必要とされる。</p> <p>治療法としては、低脂肪食による食事療法以外、現在のところ一時的な対処療法しかなく、腎機能障害を併発した場合の人工透析治療もしくは腎移植、あるいは一時的な LCAT 補充療法としての新鮮血(全血または血漿)輸血などが施行されている。家族性 LCAT 欠損症のうち、古典型 LCAT 欠損症、部分型 LCAT 欠損症、魚眼病の発症および進展阻止の LCAT 活性の境界線は、正常の 10% 未満(部分型 LCAT 欠損症では 20% 以下、魚眼病では αLCAT 活性が 0~20% もしくは完全欠失)であり、家族性 LCAT 欠損症患者に対して正常の 10% 程度の LCAT 活性量を付加補充するか否かによってその予後を左右することが推察される。</p> <p>LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞は、安定持続した正常 LCAT を供給することができることから、古典型 LCAT 欠損症の血中 LCAT 完全欠損による幼少期からの角膜混濁、青年期からの腎機能障害、魚眼病の αLCAT 活性の完全欠損による幼少期からの角膜混濁および部分型 LCAT 欠損</p>
----------------------------------	--

症の角膜混濁など、家族性 LCAT 欠損症の予後（腎機能障害による腎不全、人工透析への移行、角膜混濁による視力障害と角膜移植）に好影響を与えると推察される。

4. リスクの予測と対応

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のリスクとその対応については、以下のように分析している。

LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のリスクとその対応

リスク予測	対応
移植後、治療効果を充足する血中 LCAT 活性レベルが補充し得なかった場合（被験者毎の状態により、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の生着が不十分もしくは LCAT 発現量が不十分な場合）には再投与が必要となる可能性	臨床研究において LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植後、高感度測定法 ^{注)} により、血中 LCAT 活性のモニタリングを行い、その活性推移により判断を行う
LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞のがん化に関する危険性	がんマーカー検査を含めた定期的観察を行い、因果関係を調査し、その対応をはかる
上記に伴い LCAT が過剰発現した場合の移植部位の摘出での対応の可能性	がんマーカー検査を含めた定期的観察を行い、因果関係を調査し、その対応をはかる
産出された LCAT の抗原性の有無と免疫反応の可能性	抗 LCAT 抗体を含めた定期的観察を行い、その対応をはかる
細胞移植時は細胞懸濁液とするため、経時的な劣化の可能性ある その一方で品質試験に時間を要するため、移植前は迅速試験にて品質確認を行い移植可否判定を行うが、移植後に規定の試験方法での結果が規格外として得られる可能性	総括責任者へ即時情報伝達を行い、移植を受けた被験者の全身状態を十分に観察し、移植部位の摘出など必要に応じて処置を行う

^{注)} 高感度測定法は、正常 LCAT 活性の 0~20%の低値域の測定方法として開発した。

実施計画

1. 遺伝子治療臨床研究概要

本遺伝子治療臨床研究（以下「本臨床研究」という）は、特定疾患に指定されている原発性高脂血症の疾患群のひとつである家族性 LCAT 欠損症（魚眼病を含む）の確定診断を受けた患者に対して、hLCAT 発現遺伝子を導入した自己のヒト前脂肪細胞を移植した場合の、安全性及び有効性について評価する。

本臨床研究における方法としては、局部麻酔下で被験者腹部から摘出した脂肪組織より分離、調製したヒト前脂肪細胞に hLCAT 発現遺伝子を導入し、移植に必要な細胞数まで培養した後に洗浄などの精製処理を施し、注射用に調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液（以下「移植用細胞」という）と生理的組織接着剤（既承認市販品の血漿分画製剤）を混合し、直ちに被験者皮下脂肪組織内に注射移植する。この一連の手順は「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」(カルタヘナ法：平成15年法律第97号)の第一種使用規程に基づいて実施する。

移植用細胞の移植後においては、6ヵ月間にわたり、被験者の移植部位における異常な細胞増殖の有無などの所見及び臨床検査・がんマーカー検査・RCR検査結果をもとにした全身状態についての観察を慎重に行ない、本臨床研究の方法の安全性を評価する。また併せて、血中LCAT活性・血中HDLコレステロール濃度・コレステロールエステル比などの疾病関連因子についての測定結果の推移および本疾患に起因する低HDLコレステロール血症・角膜混濁・腎機能障害・溶血性貧血(ただし、魚眼病においては腎機能障害・溶血性貧血は発現しない)など臨床症状の経過観察結果から、その有効性についても評価する。

これら評価が適正になされるために、この観察期間中においては従来から受けている治療(食事療法)の内容についての変更は行わず、また新たな治療および他の治療は行わないこととする。

また、移植用細胞の移植後における長期フォローの目的で、予後調査として移植6ヵ月後以降においても移植後5年間にわたり、3ヵ月に1回の頻度で移植部位・全身状態などの安全性についての観察を行うと同時に、疾病関連因子の測定結果を含む臨床症状の経過観察を行うなど本法の有効性についての調査を行う。移植後5年間の経過観察終了後も、定期的に症状の把握に努め必要であれば適切な処置を行う。

なお、本臨床研究においては、3症例の被験者に対して本法を施行することを計画しているが、各症例の移植後3ヵ月時点での1次評価が終了し、以下に記載する遺伝子治療臨床研究審査委員会における審議結果をもとに総括責任者が次の症例への施行を行うこととする。

症例における臨床研究スケジュールを表1に示した。

2. 遺伝子治療臨床研究審査委員会

遺伝子治療臨床研究審査委員会は本臨床研究の医療上の安全性、有用性、および倫理性を総合的に審査し、臨床研究の安全性および有効性を科学的小および医学的妥当性の観点から判定する。

3. 実施期間

厚生労働大臣による了承の日より2年間

4. 臨床研究実施症例数

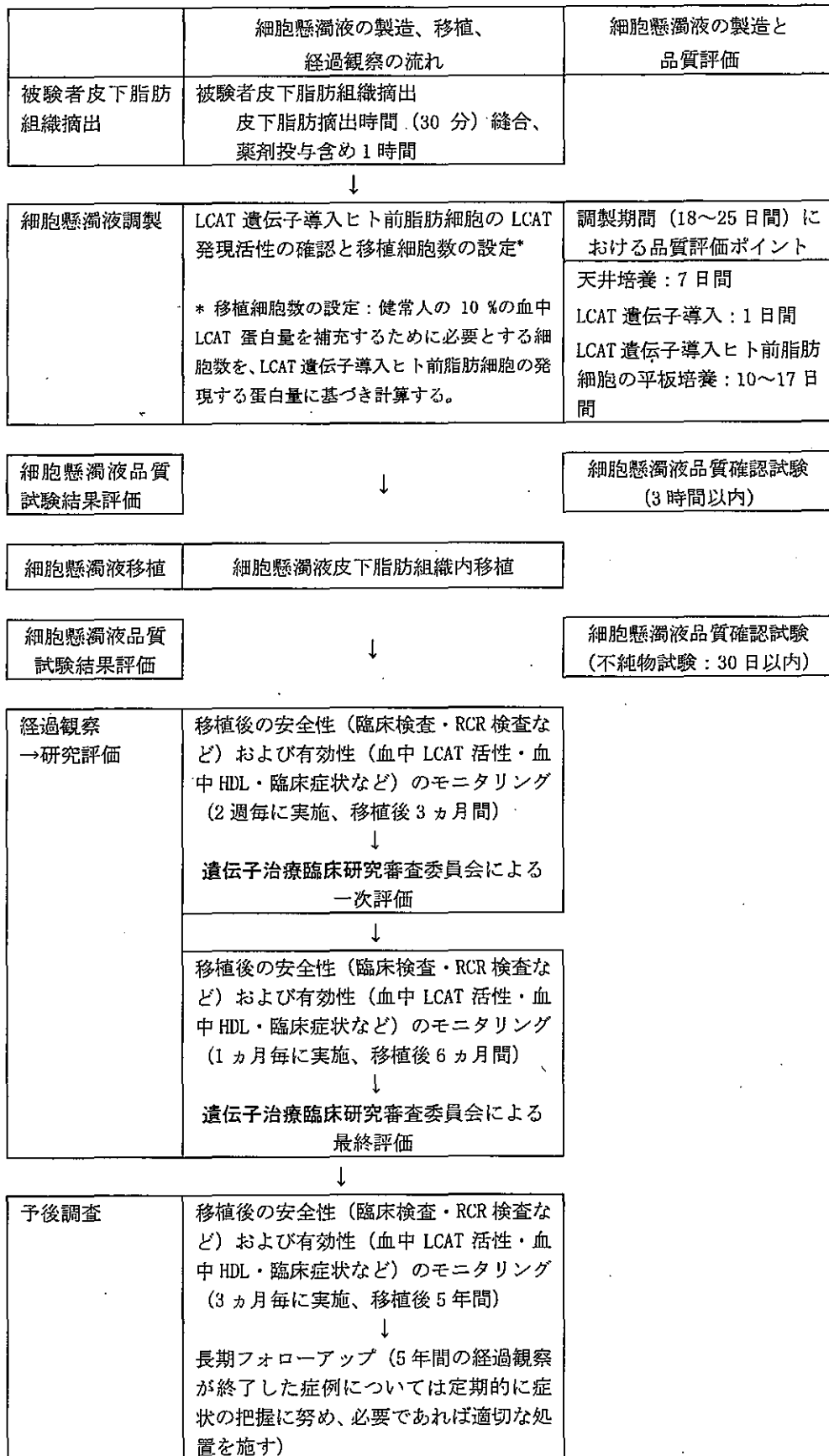
3症例

5. 被験者の治療計画

(1) 被験者の登録から適格性判定までの流れ

実施事項	家族性 LCAT 欠損症の被験者スクリーニングから適格性判定まで	留意点
スクリーニング	家族性 LCAT 欠損症の確定診断がなされた被験者もしくは低 HDL コレステロール血症、角膜混濁を認める被験者 (16 歳以上、40 歳以下)	B 型肝炎・C 型肝炎・ヒト免疫不全症・成人型 T 細胞白血病・パルボウイルス B19 感染症ウイルスの陽性患者であることが事前に診断されている場合、細胞調製技術者の安全性確保のため除外する
↓		
同意取得	同意取得 (臨床研究の意義・目的・方法・リスク/ベネフィット・参加条件・個人情報保護・倫理的配慮・費用負担・実施体制など) について詳細説明	特に個人情報保護および被験者保護の面から倫理面に配慮を行う
↓		
適格性調査	家族性 LCAT 欠損症の確定診断 <ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子診断 (LCAT およびアポ A1) ・ 臨床症状 (低 HDL コレステロール血症、角膜混濁、腎機能障害、溶血性貧血) ・ 血中 LCAT 活性 自己基質法では基準下限値未満 (魚眼病はこの限りではない) 高感度測定法 古典型 LCAT 欠損症: 正常域の 10% 未満 (α、β LCAT 活性) 部分型 LCAT 欠損症: 正常域の 20% 以下 (α、β LCAT 活性) 魚眼病: 正常域の 20% 以下 (α LCAT 活性) 	<除外基準> <ol style="list-style-type: none"> ① LCAT 産生に影響を及ぼす高度な肝疾患 (劇症肝炎、肝硬変) 及び腎不全 ② 不・低栄養、悪液質 ③ アポ A1 異常症、Tangier 病 ④ ウイルス感染症 (B 型肝炎、C 型肝炎、ヒト免疫不全症、成人型 T 細胞白血病、パルボウイルス B19 感染症) 検査陽性 ⑤ 皮下脂肪摘出 (20 g 程度) が困難な被験者 ⑥ 治療歴: 1 ヶ月以内の新鮮血輸血等による LCAT 補充療法 ⑦ 妊娠中、授乳中あるいは妊娠希望
↓		
遺伝子治療臨床研究審査委員会にて判定		

(2) 被験者からの皮下脂肪抽出、移植用 LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液（細胞懸濁液）の製造、移植、経過観察の流れ



備

考

表 1. 症例における臨床研究スケジュール

	同意説明 ～適格性調査			脂肪 組織 抽出	脂肪組織抽出後観察				移植	移植直後観察 (1 週間)							移植 3 ヶ月後観察				移植後 6 ヶ月後観察			予後調査 (移植後 5 年間調査)	
	同意 説明	同意 取得	調査 検査	21 日前	20 日前	14 日前	1 日前	0 日	1 日後	2 日後	3 日後	4 日後	5 日後	6 日後	7 日後	2 週後	4 週後	6 週後	8 週後	10 週後	12 週後	16 週後	20 週後	24 週後	3 ヶ月毎 260 週後まで
入院			○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○		○				○			○	○
外来	○	○				○										○	○	○	○		○	○			
同意説明	●																								
同意取得		●																							
適格性調査 (病歴調査など)			●																						
診察	一般診察		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	胸部 X 線・心電図		●																		●			●	
	臨床所見観察 (眼科検診含む)		●	●			●								●		●				●			●	●
検査 (採血・採尿)	ウイルス検査		●	●																					
	臨床検査 (血液・生化学・尿)		●	●			●		●					●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	RCR・悪性腫瘍検査						●		●												●			●	●
	抗 FBS 抗体検査						●							●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	抗 LCAT 抗体検査						●							●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	血中 LCAT 活性測定		●	●			●		●					●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
脂肪組織抽出術			●																						
脂肪抽出部位観察			●	●	●																				
移植用細胞調製						●																			
						(21 日間)																			
移植用細胞品質試験								●																	
移植用細胞移植								●																	
移植部位観察								●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
研究評価・判定				◎				◎													◎		◎		◎
				患者選択判定				移植用細胞移植可否判定													1 次評価		最終評価		予後評価

* 移植後 48 週、96 週、144 週、192 週、240 週に RCR 検査 (NAT 法及び培養法) と悪性腫瘍検査を実施する。ただし、96 週以降の RCR 検査は、NAT 法のみ実施し、培養法は検体を凍結保存する。

* 予後調査 (移植後 5 年間調査) を終了した症例については定期的に症状の把握に努め、必要であれば適切な処置を行う。

同意取得に際しての説明文書

家族性 LCAT 欠損症を対象とした
LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞
の自家移植に関する臨床研究

識別コード：LCAT-TRO1

版番号：第 1 版

遺伝子治療臨床研究の説明文書と同意書

患者さんへ

同意取得に際しての説明文書

1. はじめに

当病院では最善の治療を患者さんに提供するとともに、さらに優れた新しい治療法の開発を目指した研究を行っております。

これから説明します「遺伝子治療」の手法を用いた「家族性 LCAT (レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症」に対する新しい治療法の研究は、これまで有効で確実な治療法のなかったこの病気の治療に役立つことが期待される「臨床研究」です。

研究名称 : 家族性 LCAT (レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究

実施施設 : 千葉大学医学部附属病院

総括責任者 : 武城英明 (千葉大学医学部医学研究院臨床遺伝子応用医学教授)

研究者 : 武城英明、佐藤兼重、松本文昭、横手幸太郎

連絡先 : 千葉大学医学部医学研究院臨床遺伝子応用医学講座
TEL 043-222-7171 (内線 5252)
TEL 090-5773-8848 (夜間休日)

千葉大学医学部附属病院臨床試験部

連絡先 : TEL 043-222-7171 (内線 6460)

この臨床研究の内容について研究者 (以下「担当医師」という) の説明をお聞きになり、十分に理解され、納得されたうえで、この臨床研究に参加するかどうかを、あなたの自由意志で決めてください。そのうえで、この臨床研究にご協力いただける場合は、同意書に署名をお願いします。この判断をされるにあたりましては、あなたの考え方が尊重され、もし参加をお断りになられても、これからの治療などにおいて、なんら不利益を受けることはありません。また、一旦参加された後でも、途中で参加を止めたいと思われた場合は、いつでも止めることができます。この場合においても、

なんら不利益を受けることはありませんのでご安心ください。

更に、担当医師の説明をお聞きになった後や、以下の文章を読まれた後に、あなたがこの臨床研究についてもっと知りたいこと、わかりにくいこと、心配なことがありましたら遠慮なくどんなことでも担当医師にお尋ね下さい。

なお、この臨床研究を行うことについては、当病院の遺伝子治療臨床研究審査委員会で審査され認められており、更に厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会で承認を受けた後に、病院長の許可を得て実施するものであります。

(1) 臨床研究とは

病気の治療や予防あるいは診断の方法については、医療に関する技術や病気の原因や状態の理解の進歩とともに、これまで使われてきた方法が改善されたり、またいろいろな新しい方法が開発されたりしています。このため、その時々で、その病気に合った、あるいは患者さんに合った最善の治療法や予防法あるいは診断法がどの方法であるかを調べて、病気の治療や予防や診断に役立てる必要があります。そのために、患者さんに参加して頂き、実際の病気の治療や予防あるいは診断をする中で、改善されたあるいは新しく開発された方法を含めたいろいろな方法についての安全性や効果などのデータを集めて、それぞれの方法についての評価を行います。

このようにして、実際に患者さんに参加して頂いて、患者さんの病気の治療や予防や診断を行う中で、安全性や効果のデータを集める研究のことを「臨床研究」と言います。

この臨床研究では、時には、これまでに行われたことのない新しい治療法や予防法や診断法などが行われることもあります。この場合は、事前に動物などで安全性や効果については調べてはいますが、今までに多くの患者さんで行われ、その安全性や効果についてよく分かっている治療法や予防法や診断法などとは違い、予想できない副作用が発生したり、期待している効果が得られなかったりする場合があります。そのため、このような場合も考えて、臨床研究は国が定めた厳しい決まりや基準を守りながら、また、病院や専門家の間で十分に検討され、審査された後に、認められた「計画書」にもとづいて行われます。

(2) 遺伝子と病気について

「遺伝」とは、「親の体質が子に伝わること」です。「体質」には、顔かたち、体つきのほか、病気にかかりやすいことなどが含まれます。人の体の状態は、遺伝とともに、生まれ育った環境によって決まりますが、遺伝は基本的な部分で人の体や性格の形成に重要な役割を果たしています。

「遺伝」に「子」という字が付き「遺伝子」となると、「遺伝を決定する小単位」という科学的な言葉になります。遺伝子の本体は「DNA」という物質です。この「DNA」は、A（アデニン）、T（チミン）、G（グアニン）、C（シトシン）という四つの構成成分（塩基）の連続した鎖です。この構成成分（塩基）がいくつもつながって遺伝子になります。1つの細胞の中には数万種類の遺伝子が散らばって存在しています。人体は約60兆個の細胞から成り立っていて、細胞の一つ一つに全ての遺伝子が含まれています。

ほとんど全ての病気は、その人の生れながらの体質（遺伝素因＝遺伝子の違いに基づくもの）と病原体、生活習慣などの影響（環境素因＝生活環境の違いに基づくもの）の両者が合わさって起こりますが、最近の病気の原因に関係するいろいろな研究の結果、病気の中には、遺伝子が欠けているとか、遺伝子がうまく働かないために体のはたらきを正常に維持できず病気になってしまうといった遺伝素因だけによる病気があることが分かってきました。このような病気は、人が生まれながらに持っている遺伝子に問題があることから、なかなか根本的な治療が難しいものが多いことが知られています。

(3) 遺伝子治療とは

遺伝子治療とは、もともとあるはずの遺伝子が欠けているとか、遺伝子が正常な状態でないためにうまく働かないことが原因で起こる病気に対して、患者さんから取り出した細胞に正常な遺伝子を組込んで患者さんの体内に戻す、または正常な遺伝子そのものをお薬の代わりに体に投与することにより、その正常な遺伝子が患者さんの体の中で本来のはたらきをすることで、体のはたらきを正常に働くように修正して、病気を治療しようとする治療法です。つまり、親から子へと伝わる遺伝子そのものに手を加えることによって、病気を治療しようとするものではありません。

したがって、将来生まれる子あるいはその子孫に影響を与えることはなく、またこれらの子が親と同じ病気にかからないようにする治療でもありません。

(4) 家族性LCAT欠損症とは

食事などで体内に摂り込まれた脂肪はコレステロールとなり、体のはたらきを維持するために使われますが、脂肪の摂り過ぎにより余ったコレステロールなどの不要となったコレステロールは、体に蓄積されにくい「善玉コレステロール」と言われているHDL-コレステロールに変換された後に肝臓に送られ分解処理されます。この不要となったコレステロールをHDL-コレステロールに変換し肝臓に送り込むには、LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）という酵素が必要であり、この酵素のはたらきがなければ不要となったコレステロールが分解処理されずに体のいろいろな組織に蓄積されてしまい、病気を引き起こす原因となります。

家族性LCAT欠損症とは、このLCATを作り出す遺伝子（以下「LCAT遺伝子」という）が生まれつき欠けていたり、遺伝子に異常があったりして正常に働かず、LCATを体内に作り出すことができない、または十分な量が作り出せないために、不要なコレステロールをHDL-コレステロールに変換し肝臓で分解処理することができず、血液中のHDL-コレステロールが異常に減少するとともにコレステロールが目や腎臓などに蓄積することによって、角膜混濁（角膜に濁りが生じ、目が見えにくくなったりする）や腎機能障害（腎臓のはたらきが悪くなり、血液から老廃物を取り除けなくなる）、溶血性貧血（動悸、息切れ、めまいなどの貧血症状に加えて、黄疸が起こったりする）などの障害を起こす病気のことを言います。特に、腎機能障害が進行すると、体内に不必要な物質あるいは有害な物質がたまり体に様々な悪影響（血圧の上昇、貧血症状、心不全、尿毒症、血液中のイオンバランスの異常など）を及ぼし、最悪の場合、生命に危険が及びます。

現在のところ、この病気に対する根本的な治療法はなく、低脂肪食などの食事療法により、食事からの脂肪の摂り込みを制限し、体内のコレステロールの量を抑えることで、不要なコレステロールの組織への蓄積を抑え、角膜混濁、腎機能障害あるいは溶血性貧血などといった障害の発生などの病状の進行を遅らせる治療がなされています。最近、体内のコレステロール量を下げる薬と血圧を下げる薬を同時

に服用することで腎機能障害の進行を遅らせたとの論文が公表されましたが、1 症例のみで得られた結果であり、他の多くの患者さんでも同様な効果が得られるかを確認しなくてはなりません。また、これまで、全血または血漿輸血による LCAT の補充治療が行われた例がまれにありますが、その補充効果は 1 週間程度しか維持できなかったとの報告があります。腎不全に対しては人工透析を行うことで症状を改善できますが、これは対症療法であり一生続けなくてはなりません。また、腎移植は人工透析の欠点を補うものですが、これも対症療法であり移植後には腎機能の低下が考えられること、また拒絶反応を抑えるために服用する免疫抑制剤が患者さんの免疫機能を低下させ感染症にかかりやすくなります。

(5) 前脂肪細胞とは

皮下脂肪組織などの脂肪組織を構成している細胞の大部分が脂肪細胞と言われる細胞であり、その大半は成熟した脂肪細胞（成熟脂肪細胞）であり、一部に未成熟で脂肪細胞になる一歩手前の脂肪細胞（未熟脂肪細胞）が含まれていることが知られています。

成熟脂肪細胞は、肥大し、また数が増えることによって脂肪組織の量を増加させ、肥満の原因となることでよく知られています。

一方、未熟脂肪細胞は、増殖力が強く、そのほとんど全ての細胞が成熟して脂肪細胞になることが確認されており、脂肪組織を作り上げる過程で重要な役割を果たしている細胞であることが知られています。この脂肪細胞の一歩手前の未熟脂肪細胞が「前脂肪細胞」と言われる細胞であり、その増殖力が強いことと脂肪細胞にしか成熟しない特徴から、この遺伝子治療臨床研究に用いる細胞として選択しました。

(6) 今回の臨床研究で実施する新しい治療法とは

この臨床研究で実施しようとしている新しい治療法は、患者さんから採り出した前脂肪細胞に LCAT 遺伝子を組み込み、その前脂肪細胞を培養して細胞数を増やした後に患者さん本人の皮下脂肪組織に戻すことにより、患者さんの体内で LCAT が作り出されるようにし、不要なコレステロールが正常に分解処理されることによって病状の進行を止める、または改善することを期待して行う遺伝子治療です。

これまで、マウスやサルを使った実験において、この方法を用いてLCATが体内で作り出されることを確認しています。また、培養しているヒトの前脂肪細胞を使った実験においても、培養液中でLCATを作り出すことを確認しています。更に、それぞれの場合において、前脂肪細胞が持っている本来の性質などが変わったりしないことや、動物実験においては、体に戻した前脂肪細胞が体に対して悪い影響を与えないことなどについても確認しています。

しかし、これまで、この治療法をヒトに対して行ったことがないことから、安全性に関して確実な証明はなく、まだ保証されていません。また、その効果についても不明であり、確実に成功する保証もありません。従って、副作用などが起こる可能性を確実に否定することはできませんし、また、効果がなかったり、効果があったとしても病気が完全に治療されない可能性もあります。

2. この臨床研究の目的

現在、この臨床研究で実施しようとしている新しい治療法（LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を用いた遺伝子治療）は、まだ世界で行われた例はありません。

患者さんから取り出した細胞に正常な遺伝子を組込んで患者さんの体内に戻す遺伝子治療の手法は、これまで国内においても幾つかの実施例はありますが、その場合に使用された細胞は患者さんから取り出された血液細胞（リンパ球など）であり、前脂肪細胞などの脂肪細胞を使用した例はありません。また、LCAT 遺伝子を対象とした遺伝子治療については、これまで世界でも実施例はありません。

このことより、今回の臨床研究の目的は、新しい治療法（前脂肪細胞にLCAT 遺伝子を組み込んだ遺伝子治療）を行った場合の、副作用があるかないか、多いか少ないか、重いか軽いかなどの安全性を調べることです。またそれにあわせて、患者さんの体に戻した前脂肪細胞に組み込んだLCAT 遺伝子が正常にはたらくて、LCAT が作り出されているかどうかを血液検査などを行って調べたり、患者さんの病気の症状の経過を調査してこの治療法の効果を調べたりもします。

3. この臨床研究の方法

(1) 対象となる患者さん

この臨床研究では、16歳から40歳までの家族性LCAT欠損症と診断された患者さんで、その病気の症状が進行していて将来において生活するうえで支障が出る可能性が高いと担当医師が判断した患者さんを対象とします。

またさらに、参加いただくためには、この臨床研究についての説明を受けられた後にご自身の判断で臨床研究への参加の同意を文書にて表明していただくことと、その後（あるいは直後）に行う検査などの結果をもとに「遺伝子治療臨床研究審査委員会（以下「審査委員会」という）」という専門家が集まった委員会で参加が妥当と判断されることが条件です。このため、あなたがこの臨床研究への参加に同意された場合でも、委員会での判断により参加できないことがありますのでご了承ください。

(2) 治療の方法

この臨床研究についての説明を受けられ、その内容を十分に理解されたうえであなたご自身の判断で文書にて参加することに同意された後に、以下の手順で治療を行います。

① 適格性の調査（臨床研究参加のための条件を満たしているかどうかの調査）

この臨床研究への参加について文書で同意をいただきましたら、できるだけ早い時期に事前検査（ウイルス検査と血液検査、尿検査）を受けていただきます。また、あなたのこれまでの病歴や病状などをカルテなどの記録から調べさせていただきます。この検査と調査によって、あなたの身体の状態や病気の状態を調べ、臨床研究に参加いただけるかどうかを審査委員会で判断します。

なお、検査項目の中に24時間の尿を集めて行う項目が含まれていることから、検査のために1日入院（1泊2日）をしていただくこととなります。

② 皮下脂肪組織の摘出

臨床研究への参加が決まりましたら、LCAT遺伝子を組み込む前脂肪細胞を採取するために、皮下脂肪組織の摘出手術を受けていただきます。摘出手術は、腹部に局所麻酔を行った後、メスで臍部（へそ）の周辺部を約3mm程度切り開き、手動の脂肪吸引器具を用いて約20gの皮下の脂肪組織を吸引摘出します。この際、

あなたの腹部の脂肪が少なかったり硬かったりして脂肪吸引による摘出手術ができない場合は、腹部の適当な場所を3~5cm程切り開いて皮下の脂肪組織を切り取る手術を行います。手術終了後は切開部を糸で縫い合わせ、手術翌日と1週間後に手術部位に問題がないかを診察します。また1週間後の診察時に手術部の抜糸を行います。

なお、手術日から翌日にかけて、手術後の診察と身体の状態を診るために1日入院（1泊2日）をしていただきます、また、この間のあなたの身体の状態を調べるために検査（血液検査、尿検査）を受けていただきます。

③ LCAT 遺伝子を導入した前脂肪細胞の製造と投与

摘出した皮下脂肪組織から脂肪細胞を分離し、更に特殊な培養法（天井培養法）を用いて前脂肪細胞のみを選別し、選別した前脂肪細胞にLCAT 遺伝子を組み込みます。LCAT 遺伝子を前脂肪細胞に入れ込むために、LCAT 遺伝子を組み込んだベクターといわれる遺伝子の運び屋が必要で、この臨床研究ではレトロウイルスベクターを使用します。レトロウイルスベクターを用いてLCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を、あなたの治療に必要な細胞数になるまで培養しますが、この間に、この前脂肪細胞の性質が変わったりしていないか、この細胞を体内に戻す際に副作用などをおこすような不純物が含まれていないかどうかについて、厳しい検査を行います。

これらの検査に合格し、また必要な細胞数まで増やされた前脂肪細胞は、培養液などを除くために十分に洗った後、あなたの腹部の皮下脂肪組織の中に注射により戻されます。なお、前脂肪細胞を皮下脂肪組織内に定着させるため医療用として広く用いられている生理的組織接着剤（血液を凝固させるフィブリノゲンを主成分とする製剤で、組織の接着や閉鎖に用います）と混ぜた後、注射します。

あなたの脂肪組織を摘出してから、LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞をあなたの体に戻すまでの期間は、おおよそ3週間から4週間かかります。

④ 投与前後のフォローアップ（検査や調査について）

このLCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞をあなたの体に戻すにあたって、あなたの体に対して副作用などの悪い影響が出ないかどうか、また体に戻した前脂肪細胞に組み込んだLCAT 遺伝子が期待通りにはたらき、あなたの病気の治療に

役立っているかどうかについて調べるために、投与する前から投与の後 5 年間において、その節目で何度となく検査や調査を受けていただきます。

そのスケジュールについては別紙に示す通りであります。これら検査のほとんどは採血を伴う血液検査であります。また、24 時間の尿を集めて行う検査も含まれていることから入院して検査を行っていただくこともあります。LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞をあなたの体に戻す前後におけるあなたの体の様子を慎重に観察し、血液中に増殖性ウイルス（「自己を複製し、増殖することのできるウイルス」のことをさします。詳しくは 11 ページを参照ください）が存在しないことが確認されるまで、個室に入院する必要があります。その期間は、投与前日から投与 1 週間（7 泊 8 日）程度と予想されますが、個室入院期間中には個室外に出る自由が制限されます。また、排泄物等は消毒薬などを使用して特別なウイルス不活性化処理（ウイルスを死滅させる処理）を行います。増殖性ウイルスの現れる危険性は極めて低いと考えられていますが、これらは増殖性ウイルスが環境中に散らばって自然界の生物及び微生物に影響を与える可能性を最小限に抑えるための予防的措置ですので、ご協力をお願いいたします。

これ以降にも、別紙のスケジュールに従って、通院診察あるいは入院診察（1 泊 2 日）にて検査や調査を行っていただきます。

この臨床研究の評価は投与した後の 6 ヶ月間で行いますが、体に戻した前脂肪細胞の長期における安全性や治療効果の持続性を調べるために、更に 4 年 6 ヶ月（投与後 5 年間）にわたり、検査や調査を行う予定です。

これ以降も、担当医師から定期的に連絡をとり、症状の把握に努めます。また必要と判断した場合は来院していただき適切な検査・処置を行う場合があります。

可能な限りの別紙のスケジュールに従って、通院診察あるいは入院診察（1 泊 2 日）にて検査や調査を行っていただきます。

⑤ この臨床研究期間中における注意事項

あなたが、この臨床研究による治療を受けている間は、この病気の治療のために新しい治療を始めたり、新しいお薬を飲み始めたりはしないでください。必ず、それらを始められる前に、担当医師に相談をしてください。また、熱が出たり、下痢を起こしたり、頭痛が起きたりして、その症状の治療のためにお薬を飲まれ

た場合には、その後の最初の診察の時に、必ず担当医師に連絡してください。

また、この臨床研究による治療を受ける前から、低脂肪食や低蛋白食などの食事療法を行っておられる場合は、担当医師とも相談しながらその治療内容を変えないで、この臨床研究期間の間も続けてください。

4. この臨床研究の予定参加期間

この臨床研究に参加された場合の予定参加期間は、あなたがこの臨床研究への参加に文書にて同意された日から脂肪組織摘出手術を受けるまで最低 1 週間、脂肪組織摘出術を受けられてから LCAT 遺伝子が組み込まれた前脂肪細胞があなたの体に戻されるまで 3 週間から 4 週間を要します。その後、この治療法の評価のために行う安全性や効果をみるための検査や調査を行う観察期間が 6 ヶ月間設定されていますので、合計で臨床研究の評価を終えるまでには 7 ヶ月から 7 ヶ月半の期間を要します。また、あなたの体に戻された前脂肪細胞の長期にわたる安全性や効果の持続性をフォローアップする目的で、臨床研究の評価後更に 4 年半の間にわたって検査や調査を行います。これら期間を全て含めて、5 年と 2 ヶ月の参加期間となります。これ以降も、担当医師から定期的に連絡をとり、症状の把握に努めます。また必要と判断した場合は来院していただき適切な検査・処置を行う場合があります。

5. この臨床研究への予定参加人数

この臨床研究では、3 名の家族性 LCAT 欠損症の患者さんに参加いただくことを予定しております。

6. この臨床研究において起こるかもしれない危険性と予想される治療の効果

この臨床研究で実施しようとしている新しい治療法（LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を用いた遺伝子治療）は、まだ実際の患者さんに行われたことがありませんので、その危険性や治療効果などについては、わかっていません。この臨床研究において起こるかもしれない危険性についていくつかの注意しなければならない点、またこの治療による予想される効果について以下に説明いたします。

(1) この臨床研究において起こるかもしれない危険性

1) レトロウイルスベクターを用いることにもなう危険性について

LCAT 遺伝子を前脂肪細胞に組込むためにはベクターといわれる遺伝子の運び屋が必要です。この臨床研究ではモロニーマウス白血病ウイルスと呼ばれ、マウスに白血病を引き起こすレトロウイルスベクターを用いています。このベクターは、安全性を高めるための種々の工夫が施され、細胞の中で単独で増えることができません。また、LCAT 遺伝子を含むベクターを患者さんに服用あるいは注射するようなことは行わず、前脂肪細胞にこれを取り込ませた後で患者さんの皮下脂肪組織へ戻します。したがって、前脂肪細胞以外の細胞にこのベクターが組込まれることはなく、また前脂肪細胞が皮下脂肪組織以外の組織へ移動することはないと考えられています。このようにこのベクターに伴う危険性は極めて低いと考えられますが、思いがけない副作用が起こる可能性は否定できません。

① 増殖性ウイルス（自己を複製し、増殖することのできるウイルス）に関する危険性について

この遺伝子治療に用いるレトロウイルスベクターは単独で増殖できないよう設計され、安全性や品質検査に合格したものを用いています。また、LCAT 遺伝子を導入した前脂肪細胞は安全性を確認した後、患者さんの皮下脂肪組織に戻しており、今までに行われた動物実験や基礎研究において増殖性ウイルスの発現は認められていません。さらに、1987年から欧米を中心に、すでに3000人を超える患者さんの遺伝子治療として類似のレトロウイルスベクターが使用されていますが、これまでのところ、増殖性ウイルスの発生、それに起因する副作用ともに認められていません。以上のように、このベクターの特性および使用経験から増殖性ウイルスが現れる可能性は極めて低いと考えられます。しかし、なんらかの理由により患者さんの体内で増殖性ウイルスが長期間にわたって発生した場合、がんを発症する可能性が考えられます。このため、この臨床研究では定期的に検査を行い、あなたを注意深く観察します。万が一増殖性ウイルスの発現が疑われる場合には、精密検査などを実施するなど十分な症状の把握を行った後、適切に対処いたします。

② 遺伝子が細胞の染色体に組み込まれることによる危険性について

レトロウイルスベクターは遺伝子を染色体に組み込むため長期間の治療効果が期待できます。反面、染色体の思い通りの位置に遺伝子を組み込むことができず、また一度組み込まれた遺伝子は取り除くことができません。レトロウイルスの組み込み位置によっては、他の遺伝子を壊したり、あるいは他の遺伝子に悪い影響を与えるなどして、細胞ががん化する危険性があり、実際、このような症例がフランスとイギリスで起きたことが報告されました。以下にこの報告について説明いたします。

I. X連鎖重症複合免疫不全症で報告された白血病の発症について、

ある種の白血球が足りず、細菌やウイルスに全く抵抗力を持たない X 連鎖重症複合免疫不全症という遺伝病に対して、1999年からフランスでレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が始まり、十分な治療効果が得られました。ところが、その後、フランスで治療を受けた10名の患者さんのうち4名が白血病（リンパ球のがん）を発症しました。これらの患者さんは化学療法を受け、3名の症状は改善されましたが、残念ながら1名は死亡しました。また、イギリスで行われた同様な治療では10名の患者さんのうち1名が白血病を発症しましたが、化学療法で症状は改善されました。がん化の引き金となるがん遺伝子の近くにレトロウイルスが組み込まれたことに加え、この治療はある種の白血球を増やす作用を期待した遺伝子治療であるという特殊な事情が重なり、白血病になってしまったと考えられます。

II. この臨床研究で行われる遺伝子治療で白血病様の症状が起こる可能性について

フランスとイギリスの遺伝子治療で用いられた導入遺伝子は免疫という生存に直接関わる遺伝子であるのに対して、この臨床研究で用いる LCAT は不要なコレステロールを回収するために必要な酵素です。フランスとイギリスの場合は造血幹細胞という骨髄に存在し血液を造る働きをもつ細胞に遺伝子を導入しますが、この臨床研究では脂肪細胞のもととなる前脂肪細胞を用いています。フランスとイギリス以外で実施されているレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療では、白血病様の症状はこれまでのところ報告されていません。また、この臨床研究で用いるベクターはフランスとイギリスで用いられたそれよりもがん化の危険性が低く、今までに行われた動物実験や基礎研究においてがん化は認められていません。

現在の時点では、この臨床研究で同様な副作用が起こる可能性は低いと考えられますが、それを完全には否定できません。そこで、この臨床研究では定期的に検査を行い、あなたを注意深く観察します。万が一、がんの発症が疑われる場合、精密検査を実施します。これでがん化が認められた場合、周辺部位を含むがん化部位を摘出するなどして、適切に対処いたします。

2) 手術にともなう危険性

脂肪組織の摘出手術は形成外科および美容整形科で広く行われており、その安全性は十分確認されております。しかしながら、まれに下記のような症状があらわれることがあります。

① 痛み

脂肪組織の摘出手術は局所麻酔を注射した後で行ないますが、術後において、違和感や痛みが残る場合があります。この場合に鎮痛薬を飲んでいただくなど適切な処置を行います。

② 感染症の可能性

LCAT 遺伝子を組込んだ前脂肪細胞の製造は細菌などの不純物や不要物が紛れ込まないように細心の注意を払って作業を行い、しかもこれらの物質が含まれていないことを検査で確認した後治療に用いるため、この前脂肪細胞は完全に無菌的です。また、切開部の処置を含め手術は細菌感染が起こらないように慎重に行います。このようなことからこの治療に伴う感染の危険性は極めて低いと考えられます。また、この前脂肪細胞をあなたの皮下脂肪組織へ移植する際に血清アルブミンや生理的組織接着剤を加えますが、これはヒトの血液を原材料として用いているため製造工程において感染症の原因となる細菌やウイルスの不活性化・除去またこれらの混入防止などの様々な安全対策が講じられています。今までに本製剤の使用による感染症は報告されておらず、この使用にともなう感染症の危険性は極めて低いと考えられます。前脂肪細胞を培養する際に牛の血清を用いますが、狂牛病の発生が報告されていない国（オーストラリア等）で飼育された牛の血清に放射線を照射し細菌やウイルスの不活性化を確認した血清を用いております。したがって、この使用にともなう感染症の危険性は極

めて低いと考えられます。

この臨床研究では、前脂肪細胞移植後のあなたの経過を十分に観察するとともに、万が一、感染症が疑われるような症状が発生した場合には、抗生剤などの投与を行うなど適切な処置を行います。

3) 子孫（お子さん）への影響の可能性

この臨床研究では前脂肪細胞に遺伝子を体外から導入させ、服用や注射などで遺伝子を直接体内へ取り込むようなことは行いません。卵子や精子などの生殖細胞に遺伝子を直接導入することはなく、親から子へと伝わる遺伝子そのものに直接手を加えることもありません。この臨床研究で行う遺伝子治療はこのような特徴を持つため、この治療が将来生まれる子またはその子孫に影響を与えることはありません。しかし、この遺伝子治療はまだ実際の患者さんを対象に行われたことがなく、現在の段階では子孫への影響を完全に否定することができません。このため、あなたが現在妊娠またはお子さんに授乳している場合、あるいは妊娠を希望している場合はこの臨床研究に参加できませんのでご了承ください。

4) 免疫反応（体内に入ってきた異物を除去する生体反応）が起きる危険性について

今までに行われた動物実験や基礎研究から、LCAT 遺伝子が組み込まれた前脂肪細胞は正常なLCATを分泌することが確認されています。しかし、家族性LCAT欠損症の患者さんではLCATが存在しないあるいは分泌量が少ないため、このLCATを異物として認識しこれを除去しようとする反応（免疫反応）が起きる可能性が考えられます。一方、LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞の製造には細心の注意を払って作業を行い、しかもこれらの物質が含まれていないことを検査で確認した後治療に用いますが、万が一、製造工程において細菌などの不純物や不要物が紛れ込んだ場合には、これら不純物を異物として除去しようとする反応（免疫反応）が起きる可能性が考えられます。免疫反応が起きていないか定期的な検査や観察を行い、免疫反応が疑われた場合には適切な処置を行います。

5) その他、予想できない危険性

上記以外にも予想できない重い副作用が現れる可能性があります。その一部は個人

差によるものと考えられます。予想できない副作用の中には回復不可能なものが含まれる可能性があります。このような場合、できる限り適切な処置を速やかに行います。

(2) この臨床研究において予想される治療の効果

治療効果については、これまでに行った動物実験や基礎研究の結果から考えますと、LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を体に戻すことで、血中に LCAT が作り出され、LCAT 欠損によって引き起こされる角膜混濁による視力障害あるいは腎機能障害、溶血性貧血や HDL-コレステロールの異常な減少などの症状が改善される、あるいは好影響を与える可能性があることが推察されますが、まだヒトでの確認はなされていないことをご理解ください。

7. この臨床研究に参加しない場合の他の治療法

現在のところ、あなたの病気に対する根本的な治療法はありませんが、コレステロールの組織への蓄積を抑え、角膜や腎臓への障害の発生などの病状の進行を遅らせるために、低脂肪食などの食事療法により脂肪の採り込みを制限する治療がなされています。また、これまで、全血または血漿輸血による LCAT の補充治療が行われた例がありますが、その補充効果は 1 週間程度しか維持できなかったとの報告があります。

8. この臨床研究への参加中にあなたの健康に被害が生じた場合について

この臨床研究は、これまでの報告に基づいて科学的に計画され、慎重に行われますが、もし臨床研究の期間中あるいは終了後に、あなたに副作用などの健康被害が生じた場合には、医師が適切な診療と治療を行います。この診療と治療の費用については病院が負担しますので、あなたに負担をかけることはありません。しかし、この診療と治療に要する期間に対する休業補償、後遺障害に対する補償や医療手当てなどの金銭的な補償は受けることはできません。

また、あなたの故意または重大な過失によって健康に被害が生じた場合、病状が悪化して治療方法を変える必要が生じた場合や明らかにこの臨床研究と関係のない原因で健康に被害が生じた場合には、あなたがこの臨床研究への参加を中止した以降の診療と治療の費用は、通常の保険診療となります。

9. この臨床研究への参加はあなたの自由意思によるものです

この試験へ参加するかどうかは、あなたご自身が決めることであり、あなたの自由です。あなたご自身の意思を大切にしますので自由な判断で決めて下さい。また、一度参加を決められた後でも、いつでもどんな理由であっても途中で参加を止めることができます。

たとえば、参加することに同意されない場合や途中で止められる場合、担当医師に悪いのではないだろうか、適切な治療が行われなくなるのではないだろうかといったような心配をされるかもしれませんが、決してそのようなことはありません。あなたがこの試験に参加しなくても、あるいは途中で参加を止められても、今後の治療において何ら不利益を受けることはありません。いずれの場合もあなたの治療には最善を尽くします。

10. この臨床研究に関する情報は速やかにお伝えします

この臨床研究の計画が変更される場合や、研究期間中に副作用などの新しい情報があった場合など、あなたの臨床研究への参加する意思に影響を与える可能性がある情報が得られたり発生した場合は、担当医師より速やかに詳細な説明が行われます。あなたが不安を覚えるような重要な情報が得られた時には、このまま試験を続けるかどうかについてあなたの意思を確認いたします。

11. この臨床研究への参加を途中で中止させていただく場合があります

この臨床研究の実施中に、あなたを含めた患者さんにおいて、重い副作用が発生しこの治療法の安全性に問題がある、治療の効果が全く認められず臨床研究を継続する

こと自体に問題があるなどと審査委員会で判断された場合は、この臨床研究全体が中止されます。

また、あなたの病気の症状が進行し他の治療法に変更する必要性が生じた場合、重い副作用が起こり臨床研究の継続が難しくなった場合あるいはあなたの臨床研究への参加がこの臨床研究へ参加するための条件を満たしていないことが LCAT 遺伝子を組み込んだ前脂肪細胞を体に戻して以降にわかった場合など、担当医師あるいは審査委員会の判断であなたの参加を中止することがあります。

なお、いずれの場合においても、臨床研究への参加を中止した以降においても、担当医師が必要な適切な処置を行います。また、それと同時に、中止後の経過を引続き調べさせていただき、今後の治療のための貴重な資料としてまとめさせていただくこともありますことをご了承ください。

12. この臨床研究に参加された場合、あなたのカルテなどの臨床研究に関する資料などが臨床研究中あるいは臨床研究終了後に調査されることがあります

この臨床研究が、病院の審査委員会で認められ病院長が許可した臨床研究計画書に基づいて行われているか、患者さんの人権が守られて進められているかなどを確認するために、担当医師以外のこの臨床研究の関係者（病院の職員など）、審査委員会委員および厚生労働省担当官（厚生科学審議会員を含む）が、あなたのカルテなどの医療記録をみることがあります。しかし、どの場合においても、あなたから得られたデータが、報告書などにおいてあなた自身のデータであると特定されるようなことはありませんのでご安心ください。

13. この臨床研究結果が公表される場合においてもあなたの身元が明らかになることはありません

あなたがこの臨床研究への参加に同意をされた時から、あなたに関するデータやこの臨床研究で得られたあなたに関するデータは、コード番号などで匿名化されます。従いまして、この臨床研究で得られたデータが今後報告書などにまとめられ、またその結果を医学雑誌や学会において公表されることがありますが、いずれの場合においても、あなたの情報やデータ（診察や検査結果）を使用する際には、あなたの名前は

コード番号などで置き換えられ、あなたの個人的な情報は一切分からないようにしますので、プライバシーは守られます

また、この臨床研究で得られたデータは、この臨床研究以外の目的で使用されることはありません。

なお、あなたがこの臨床研究への参加同意書にご署名されますと、あなたに関するこれまでの診察記録や検査結果などのデータも使用させていただくことに同意されたこととなりますので、そのことをご了解ください。

14. この臨床研究への参加に同意された場合に守っていただきたい事項

あなたがこの臨床研究に参加いただく場合は、次のことを守ってくださるようお願いいたします。もし、守っていただけなかった場合、せっかく参加していただいているいろいろな検査や診察を行っていただいて得られたデータが使いえなくなることでございます。また、守っていただけなかった結果、副作用が起こったり、その発見が遅れたりして重大な状況になってしまう可能性や、治療の効果が得られなかったりする可能性もあります。

- ・ あなたが臨床研究を中断あるいは中止したくなった場合は、担当医師に相談してください。あなたの意思を十分に尊重して対応します。
- ・ あなたが他の医師あるいは他の病院などで治療を受けている場合、あるいはこれから受けようとする場合は、担当医師に相談してください。あなたに同意をしていただいたうえで、担当医師から他の医師あるいは病院に、あなたがこの臨床研究に参加していることを知らせさせていただきます。
- ・ もし、あなたが担当医師に相談しないで他の医師あるいは病院で治療を受けた場合は、その後でも結構ですので、必ず担当医師にそのことを伝えてください。
- ・ この臨床研究ではいろいろな検査や診察を受けていただきますが、その実施する時期が決まっていますので、決められた日に必ず来院するようにしてください。可能な範囲で日程の調整を行いますので、あなたに不都合などがある場合は、担当医師にお知らせください。
- ・ 受けていただいた検査や診察の結果によりましては、追加の検査や診察を受け

ていただくことがあります。その際にはご協力ください。

- ・ その他、各種検査、診察、処置などを受けていただく際には、担当医師あるいはこの臨床研究の関係者の指示を守ってくださるようお願いいたします。あなたに不都合などがある場合は、遠慮なく、担当医師あるいは臨床研究の関係者に相談をしてください。
- ・ その他、この臨床研究に関する質問やあなたにとって不都合なことなどがありましたら、必ず担当医師に問合せあるいは相談してください。

15. あなたの費用負担について

この臨床研究で行う治療法は全く新しい治療法であるために、あなたが受けていただく検査、診察および処置などは、これまであなたが受けてこられていた治療法では行われなかったものであります。従いまして、その全てがこの臨床研究のために特別に行われることから、この臨床研究で発生する費用に関しましては、研究費から支払われますので、あなたの費用負担はありません

ただし、臨床研究が終了しあるいは中止された後に、通常の治療に戻った場合は、これまで通りの通常の保険診療となります。

16. この臨床研究の結果から生じる知的財産権について

本臨床研究結果より、学会あるいは論文発表に伴うものやその他の知的財産権等が生じる可能性が考えられます。その権利は臨床研究を実施する研究機関や研究者に属し、本試験に参加していただいたあなたにはその権利を持つことはないことをご了承ください。

17. この臨床研究を実施する責任者と担当医師（研究者）

この臨床研究を行うにあたっての責任者（総括責任者）と実際にあなたの治療を担当する担当医師（研究者）は次の通りです。

総括責任者：武城英明（千葉大学医学部医学研究院臨床遺伝子応用医学教授）

担当医師：武城英明

同意説明・取得、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の調製・品質確認作業管理、および患者の診察（検査・診察）全般を担当

連絡先：千葉大学医学部医学研究院臨床遺伝子応用医学講座

TEL 043-222-7171（内線 5252）

TEL 090-5773-8848（夜間休日）

佐藤兼重（千葉大学医学部医学研究院形成外科学教授）

松本文昭（千葉大学医学部医学研究院形成外科学非常勤講師）

脂肪組織採取およびLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の移植

連絡先：千葉大学医学部医学研究院形成外科学講座

TEL 043-222-7171（内線 6257）

横手幸太郎（千葉大学医学部医学研究院細胞治療学教授）

患者の診療、移植後の観察および評価

連絡先：千葉大学医学部医学研究院細胞治療学講座

TEL 043-222-7171（内線 5253）

18. この臨床研究に関する相談窓口

この臨床研究へ参加することは、あなたの自由意思によるものですので、あなたの意思を尊重して臨床研究が行われます。そのことから、あなたがこの臨床研究について知りたいこと、わからないこと、心配なことあるいはご相談などがありましたら、どんな些細なことでも構いませんので、いつでも遠慮なく、担当医師または相談窓口
に申し出てください。

実施施設：千葉大学医学部附属病院

千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1

代表電話 043-222-7171

総括責任者：武城英明（千葉大学医学部医学研究院臨床遺伝子応用医学教授）

担当医師：武城英明

連絡先：千葉大学医学部医学研究院臨床遺伝子応用医学講座

TEL 043-222-7171（内線 5252）

TEL 090-5773-8848（夜間休日）

佐藤兼重（千葉大学医学部医学研究院形成外科学教授）

松本文昭（千葉大学医学部医学研究院形成外科学非常勤講師）

連絡先：千葉大学医学部医学研究院形成外科学講座

TEL 043-222-7171（内線 6257）

横手幸太郎（千葉大学医学部医学研究院細胞治療学教授）

連絡先：千葉大学医学部医学研究院細胞治療学講座

TEL 043-222-7171（内線 5253）

相談窓口：臨床試験部（月曜～金曜 8:30～17:00）

連絡先：TEL 043-222-7171（内線 6460）

以上の内容をよくお読みになり、ご理解いただき、この臨床研究にご参加されることに同意される場合は、次の同意書に署名、日付を記入して、担当医師にお渡しください。

(別紙) 臨床検査・観察項目

	適格性 調査	移植細胞製造					移植直後観察(入院管理)							
		脂肪 組織 摘出	脂肪組織摘出後観察				移植							
			20 日前 Day-20	14 日前 Day-14	1日前 Day-1	0日 Day 0		1日後 Day 1	2日後 Day 2	3日後 Day 3	4日後 Day 4	5日後 Day 5	6日後 Day 6	7日後 Day 7
同意 取得時	21 日前 Day-21	20 日前 Day-20	14 日前 Day-14	1日前 Day-1	0日 Day 0	1日後 Day 1	2日後 Day 2	3日後 Day 3	4日後 Day 4	5日後 Day 5	6日後 Day 6	7日後 Day 7		
診察 *1	◎	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
ウイルス検査 *2	○													
脂肪採取部位観察		○	○	○										
移植用細胞移植部位観察						○	○	○	○	○	○	○	○	
臨床 検査	血液学的検査 *3	○	○		○		○			○			○	
	血液生化学的検査*4	○	○		○		○			○			○	
	尿検査 *5	◎	◎		◎		○			○			◎	
RCR・悪性腫瘍検査 *6					◎		○							
抗 FBS 抗体検査 *7					○								○	
抗 LCAT 抗体検査 *7					○								○	
血中 LCAT 活性測定 *8	○	○			○		○			○			○	
臨床所見観察 *9	○	○			○								○	

	移植後3ヵ月観察 (2週毎)						移植後6ヵ月観察 (1月毎)			移植後5年間予後調査 (3月毎)
	2週後 2W	4週後 4W	6週後 6W	8週後 8W	10週後 10W	12週後 12W	16週後 16W	20週後 20W	24週後 24W	25週後~260週後 25W~260W
診察 *1	○	○	○	○	○	◎	○	○	◎	○
ウイルス検査 *2										
脂肪採取部位観察										
移植用細胞移植部位観察	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
臨床 検査	血液学的検査 *3	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	血液生化学的検査*4	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	尿検査 *5	○	◎	○	○	○	◎	○	◎	◎
RCR・悪性腫瘍検査 *6						◎		◎	◎*	
抗 FBS 抗体検査 *7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
抗 LCAT 抗体検査 *7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血中 LCAT 活性測定 *8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
臨床所見観察 *9		○				○		○		○

*1 : 体重, 身長, 体温, 血圧, 脈拍, 本疾患関連以外の異常所見 (◎の時期については, 胸部X線と心電図を付加する)

*2 : B型肝炎ウイルス, C型肝炎ウイルス, ヒト免疫不全ウイルス, 成人型T細胞白血病ウイルス, パルボウイルス B19

*3 : 白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 血小板数, 白血球像 (分画), 赤血球像 (形状)

*4 : 総蛋白, アルブミン, ハプトグロビン, 総ビリルビン, 間接ビリルビン, AST, ALT, LDH, ALP, γGTP, クレアチニン, 尿酸, BUN, Na, Cl, K, Ca, CRP, 中性脂肪, 総コレステロール, コレステロールエステル, LDLコレステロール, HDLコレステロール, リポ蛋白分画

*5 : 潜血, ウロビリノーゲン, 沈渣 (◎の時期については, 24時間尿蛋白量あるいは尿中アルブミン排泄量を付加する)

*6 : RCR 検査: NAT 法

◎の時期については, RCR 検査 (培養法) と悪性腫瘍検査 (TK 活性検出法) を付加する。

* 移植後 48 週, 96 週, 144 週, 192 週, 240 週に RCR 検査 (NAT 法及び培養法) と悪性腫瘍検査を実施する。ただし, 96 週以降の RCR 検査は NAT 法のみ実施し, 培養法のため採取した検体は凍結保存し, NAT 法で陽性と判定された場合にのみ実施する。

*7 : ELISA 法

*8 : 自己基質法 (ネスコート®LCAT キット-S), 高感度検出法

*9 : 角膜混濁 (視力・視野, 角膜輪所見: 眼球写真), 腎機能障害 (尿蛋白量), 溶血性貧血 (間接ビリルビン, LDH, ハプトグロビン)

ID(カルテ)番号： _____

千葉大学医学部附属病院院長殿

遺伝子治療臨床研究参加の同意書

私は、「家族性LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象としたLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究について」（説明文書：平成 21 年 月 日作成 第 版）による下記の項目について十分な説明を受け、内容を理解したうえで、この臨床研究に参加することに同意いたしました。

ただし、研究参加の途中でお断りすることがあることを申し添えます。

- はじめに（臨床研究、遺伝子治療とは）
- 臨床研究の目的
- 臨床研究の方法
- 予定参加期間と予定参加人数
- 起こるかもしれない副作用と予想される治療効果
- 他の治療法
- 健康被害が生じた場合の対応
- 自由意思による臨床研究への参加
- 臨床研究に関する情報の伝達
- 臨床研究における参加中止
- 臨床研究に関する資料（カルテなど）の調査
- 個人情報の保護
- 臨床研究参加中に守って頂きたい事項
- 費用負担
- 知的財産の権利
- 臨床研究の責任者と担当者
- 相談窓口

本人	氏名			
	同意年月日	年	月	日
代 諾 者	氏名		続柄	
	同意年月日	年	月	日

（備考）「代諾者」とは、本人が未成年者の場合に、本人とともに同意いただける親権者の方です。

なお、代諾者の方が署名いただく場合においても、ご本人の署名もお願いします。

説明文書等を手渡した日 _____ 年 月 日 手渡者： _____

説明文書等を説明した日 _____ 年 月 日

説明者 所属： _____ 担当医： _____

説明補助者 所属： _____ 協力者： _____

同意取得日 _____ 年 月 日

同意取得者 所属： _____ 担当医： _____

同意取得者 所属： _____ 協力者： _____

同意文書控を手渡した日 _____ 年 月 日 手渡者： _____

ID(カルテ)番号： _____

千葉大学医学部附属病院院長殿

遺伝子治療臨床研究参加の同意書

私は、「家族性LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象としたLCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究について」（説明文書：平成21年 月 日作成 第 版）による下記の項目について十分な説明を受け、内容を理解したうえで、この臨床研究に参加することに同意いたしました。

ただし、研究参加の途中でお断りすることがあることを申し添えます。

- はじめに（臨床研究、遺伝子治療とは）
- 臨床研究の目的
- 臨床研究の方法
- 予定参加期間と予定参加人数
- 起こるかもしれない副作用と予想される治療効果
- 他の治療法
- 健康被害が生じた場合の対応
- 自由意思による臨床研究への参加
- 臨床研究に関する情報の伝達
- 臨床研究における参加中止
- 臨床研究に関する資料（カルテなど）の調査
- 個人情報の保護
- 臨床研究参加中に守って頂きたい事項
- 費用負担
- 知的財産の権利
- 臨床研究の責任者と担当者
- 相談窓口

本人	氏名			
	同意年月日	年	月	日
代諾者	氏名		続柄	
	同意年月日	年	月	日

（備考）「代諾者」とは、本人が未成年者の場合に、本人とともに同意いただける親権者の方です。

なお、代諾者の方が署名いただく場合においても、ご本人の署名もお願いします。

説明文書等を手渡した日 _____ 年 月 日 手渡者： _____

説明文書等を説明した日 _____ 年 月 日

説明者 所属： _____ 担当医： _____

説明補助者 所属： _____ 協力者： _____

同意取得日 _____ 年 月 日

同意取得者 所属： _____ 担当医： _____

同意取得者 所属： _____ 協力者： _____

同意文書控を手渡した日 _____ 年 月 日 手渡者： _____

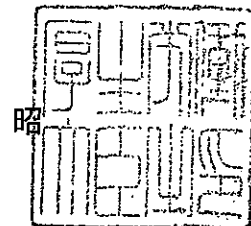


厚生労働省発科 0430 第 2 号
平成 22 年 4 月 30 日

厚生科学審議会会長

垣 添 忠 生 殿

厚生労働大臣 長 妻



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

家族性 LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究

・申請者 千葉大学医学部附属病院長 河野 陽一

・遺伝子組換え生物等の名称

ヒト レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（hLCAT）を発現し、マウスアンポトロピックウイルス 4070A の env 蛋白質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス（CGT_hLCAT RV）

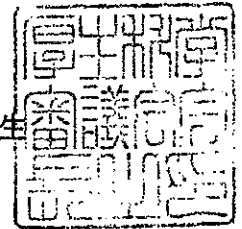
厚 科 審 第 5 号
平成 22 年 4 月 30 日

科学技術部会部会長

永 井 良 三 殿

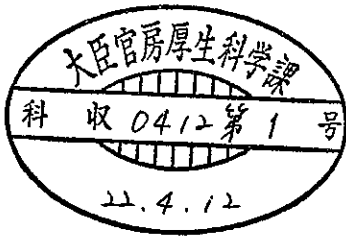
厚生科学審議会会長

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 22 年 4 月 30 日付け厚生労働省発科 0430 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。



第一種使用規程承認申請書

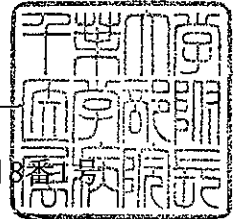
平成22年4月9日

厚生労働大臣 長妻 昭 殿
環境大臣 小沢 鋭仁 殿

申請者 氏名 千葉大学医学部附属病院長

河野 陽

住所 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番



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>ヒト レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ (hLCAT) を発現し、マウスアンフォトロピックウイルス4070Aのenv蛋白質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルス (CGT_hLCAT RV)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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>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：千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 治療施設の名称：千葉大学医学部附属病院</p> <p>(1) CGT_hLCAT RV (以下「本遺伝子組換え生物」という。) 溶液は、容器に密閉後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内のP2レベルの拡散防止措置を執ることのできる細胞調製室 (以下「細胞調製室」) の前室 (施設可能) に設置した超低温フリーザに保管する。</p> <p>(2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物溶液の溶解、希釈及び分注操作は、細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。被験者の前脂肪細胞への本遺伝子組換え生物導入操作、本遺伝子組換え生物導入細胞の培養その他の本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取扱いも同様に細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈溶液若しくはその凍結品又は本遺伝子組換え生物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、二重に密閉した容器に入れて運搬する。</p> <p>(3) 本遺伝子組換え生物溶液 (希釈溶液も含む) 又は本遺伝子組換え生物導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活性化を行った後、本施設で定められた医療廃棄物処理規程 (以下「医療廃棄物処理規程」という。) に従い廃棄する。</p> <p>(4) 細胞調製室内の安全キャビネット内で本遺伝子組換え生物導入細胞懸濁液を注射器に充填し、それを二重に密閉した後、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室 (以下「個室」という。) に運搬する。</p> <p>(5) 被験者に対する本遺伝子組換え生物導入細胞の投与は、個室において、被験者の皮下脂肪組織内に注射移植する。</p> <p>(6) 上記(5)で用いた、本遺伝子組換え生物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、布、ガーゼ類等は使い捨てとし、使用后、</p>

ウイルスの不活性化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルスの不活性化を他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。

(7) 投与後3日まで、被験者を個室内で管理し、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。

(8) 個室における管理期間中の被験者の排泄物は、投与翌日以降に行われる患者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）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、ウイルスの不活性化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、臨床検体として使用する患者の血液及び尿の取扱いは、本遺伝子組換え生物溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取扱いに準じる。

(9) 個室における管理期間中、患者に対して侵襲的に使用した器具及び患者の血液、体液、排泄物に接触した器具等は、ウイルスの不活性化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。これらのウイルスの不活性化を他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。

(10) 被験者の個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血清においてRCRが陰性であることを確認する。RCRが確認されたときは、個室における管理を継続する。

(11) 個室における管理解除後に被験者の血清からRCRが検出された場合は、直ちに被験者を上記個室における管理下に移し、上記(7)から(10)までと同様の措置を執る。

(別紙様式)

生物多様性影響評価書

(区分：遺伝子治療臨床研究)

I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

本遺伝子治療に用いるウィルスベクター (CGT_hLCAT RV) のもとになったウィルスはモロニーマウス白血病ウィルス (Moloney murine leukemia virus: MoMLV) である。

レトロウィルスは逆転写酵素を持ち一本鎖RNAを遺伝子として持つRNAウィルスの総称であるが、MoMLVはそのレトロウィルス科のガンマレトロウィルス属 (C-タイプウィルス) に所属するマウス白血病ウィルスであり、病原性の高いウィルス株としてSarcoma 37 細胞から単離されたエコトロピック (同種指向性) レトロウィルスである (文献1、2)。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。

MoMLV はマウスやラット等のげっ歯類にのみ感染し、ヒトを含む他の動物に対する感染性や病原性の報告はない (文献3)。

文献1 : Moloney JB. Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. J Natl Cancer Inst., 24:933-951, 1960.

文献2 : ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>

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

2 使用等の歴史及び現状

レトロウィルスは、遺伝子治療用の遺伝子導入ベクターとしてもっとも早くから開発改良が加えられてきており、現在までに試みられた遺伝子治療臨床プロトコルのうちの21.3% (336/1579 プロトコル; 2009年12月現在) でレトロウィルスベクターが使用されている (文献4)。その中でも、MoMLVは遺伝子導入ベクターとして広く用いられており、わが国で最初に行われた遺伝子治療でもMoMLV由来のベクターが使用された (文献5)。米国では、2000年から2009年 (11月23日現在) の間にレトロウィルスを用いた87のプロトコルがRecombinant Advisory Committeeに申請されたが、僅かな例外を除き、すべてが*ex vivo*での遺伝子導入の系である。血球系細胞への導入プロトコルが多くを占めるが、非血球系細胞への導入手法としても用いられている (文献6)。

文献4 : <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

文献5 : Otsu, M., et al.: American Society of Gene Therapy, 8th Annual Meeting (2005)

文献6 : Human Gene Transfer Protocols (Last updated: 11-23-09)

http://oba.od.nih.gov/rdna/adverse_event_oba.html

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性 (文献7)

MoMLV は直径約 100 nm の球形ウイルスであり、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は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8)。

(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た後、そのゲノムが逆転写酵素により DNA に逆転写され、プロウイルスとして細胞の染色体に組み込まれる。宿主細胞が増殖分裂する時には、染色体の一部として同時に複製され、娘細胞へと受け継がれて行く。MoMLV は他の生物を捕食することはない。

(4) 繁殖又は増殖の様式

レトロウイルスはキャリアーである動物の血液中や体液中に存在し、他の個体がそれに接触することにより感染する。レトロウイルスが細胞に感染し増殖するときは、1) 吸着、2) 侵入、3) 逆転写、4) 宿主染色体への組み込み、5) RNA 合成、6) 蛋白質合成、7) アセンブリ、8) 出芽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、細胞分裂時に同時に複製されて娘細胞へ分配されるが、生殖系細胞に導入された場合には動物の繁殖によって子孫に受け継がれることになる。

野生型 MoMLV がヒト細胞に感染することはない。ヒト細胞に感染可能なエンベロープ蛋白質

(env 蛋白質) [例えば、4070A アンフトロピック env 蛋白質、gibbon ape leukemia virus (GaLV) env 蛋白質] を持つ MoMLV を人為的に作製した場合にはヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスター細胞への感染が可能である。

(5) 病原性 (文献 9)

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ある。
- 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。レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 治療の遺伝子治療で、がん遺伝子である LMO-2 の近傍にレトロウイルスが組み込まれたために LMO-2 蛋白質の異常発現を招き、それが 3 年後に白血病を発症する原因の一つとなったことを示唆する報告が出されている (文献 10)。
- 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報告はない。

(7) その他の情報

MoMLV の不活化条件

MoMLV についての詳細な不活化条件の報告はないが、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、消毒法を以下にあげる。

- ① 121°C、20 分間の蒸気滅菌
- ② 170°C、2 時間の乾熱滅菌
- ③ 20~30 分間の煮沸消毒
- ③ 有効塩素濃度 0.1~1.0%の次亜塩素酸ナトリウム
- ④ 70%エタノール又は 70%イソプロピルアルコール
- ⑤ 3.5~4%ホルマリン
- ⑥ 2%グルタラル (以上文献 11)
- ⑦ 10%及び 1%ポピドンヨード液 (文献 12)

⑧ 0.3%過酸化水素水 (文献 13)

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 14)、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 $2,800 \text{ erg/mm}^2$ であり、熱処理時間 (T_{10}) 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 $1/10^6$ 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_{10} が 80~90 秒であるとの報告もある (文献 15)。

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 16)。抗 α -galactosyl 自然抗体を有する旧世界ザル (文献 17) 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 18) と考えられる。

- 文献 7 : 遺伝子治療開発研究ハンドブック (1999) 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 8 : Levy JA and Fieldsteel AH. Freeze-drying is an effective method for preserving infectious type C retroviruses. *J Virol Methods* 5:165-171, 1982.
- 文献 9 : 遺伝子治療開発研究ハンドブック (1999) 第 6 章、第 2 節、1. ウイルスベクターの安全性 (p. 627)
- 文献 10 : Hacein-Bay-Abina S, et al. LM02-associated clonal T cell roliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 *Science* 302:415-419, 2003
- 文献 11 : 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 12 : 加藤真吾、平石佳之、富永恵子、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 13 : Martin LS, McDougal JS, and Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152:400-403, 1985.
- 文献 14 : 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 15 : Yoshikura H. Ultraviolet sensivity of helper function of murine leukemia virus. *Arch Biochem Biophys* 154:76-83, 1973.
- 文献 16 : Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, Okada H, Weiss RA, and Collins MK. 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 17 : Galili Uri, Tanemura M. Significance of α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) Epitopes and α 1,3 Galactosyltransferase in Xenotransplantation. *Trends Glycosci Glycotechnol* 11:317-327, 1999.
- 文献 18 : Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, 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.

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（ウイルスベクター：CGT_hLCAT RV）を構成するおもな供与核酸は、hLCAT (human lecithin-cholesterol acyltransferase) 遺伝子、パッケージングシグナル (Ψ)、5'-long terminal repeat (5' LTR)、3' LTR である。以下にその構造概略図を示す。元となった野生型ウイルス、MoMLV と異なるところは、ウイルスの自立増殖に必要な遺伝子、*gag*、*pol* 及び *env* がすべて除かれ、その部分に hLCAT 遺伝子が挿入されたことである。本遺伝子組換え生物の全塩基配列及び蛋白質をコードする部分についてはそのアミノ酸配列を※別紙 1 及び 2 に示す。

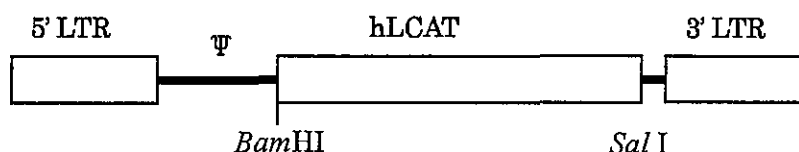


図 1. CGT_hLCAT RV 遺伝子の構造概略図

1) hLCAT 遺伝子

hLCAT 遺伝子はヒト型 LCAT をコードする遺伝子であり、hLCAT は 1986 年に、Mclean らによりクローニングされた。N 末端に 24 アミノ酸のシグナルペプチドを持つ、全長 440 アミノ酸よりなる分泌型蛋白質をコードしている。

ここでは hLCAT 遺伝子をヒト肝がん細胞株 HepG2 の cDNA ライブラリーより、PCR 法によってクローニングした。hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列) には、C 末端のグルタミン酸とストップコドンに重なった形でポリ A 付加シグナル (AATAAA) がコードされているため、ストップコドンを TAA より TGA に変更して導入遺伝子内のポリ A 付加シグナルを除き、また、蛋白質合成の効率を上げるために開始コドン上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入したものを用いている。

2) パッケージングシグナル (Ψ)

マウス MoMLV 由来のレトロウイルスパッケージングのための配列である。

3) 5' LTR 及び 3' LTR

マウス MoMLV 由来のエンハンサー・プロモーター配列である。

(2) 構成要素の機能

1) hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列)

hLCAT 遺伝子 (cDNA 配列) は上流の 5' LTR のエンハンサー・プロモーター機能により転写されて LCAT を発現する。LCAT は翻訳後に糖鎖が付加され、シグナルペプチドが切断された後、416 アミノ酸からなる分子量約 63,000 の糖蛋白質として細胞外へ分泌される。LCAT は遊離コレステロールにレシチンの脂肪酸を転移してコレステロールエステルを生成するコレステロールエステル化酵素であり、血中の HDL (High Density Lipoprotein) 上で作用し、コレステロールの逆転送 (各組織より肝臓へ) を亢進させる。被験者脂肪組織より調製した前脂肪細胞に遺伝子導入後、同じ被験者の脂肪組織に自家移植して発現させることで、血中正常値の 10% の LCAT 活性を維持することを目標としている。

2) パッケージングシグナル (Ψ)

パッケージング細胞 (GP+envAM-12) において、本ウイルスベクター (CGT_hLCAT RV) を製造する際にウイルスゲノム RNA がウイルス粒子にパッケージングされるのに必要である。

3) 5' LTR 及び 3' LTR

5' LTR は hLCAT 発現に必要な強力な転写活性をもつエンハンサー・プロモーターである。また、5' LTR 及び 3' LTR とともに、ウイルスゲノムの細胞染色体への組み込みに必須である。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

レトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) の構築には、MoMLV 由来のレトロウイルスベクターである MFG ベクターを改良した pDON-AI (タカラバイオ株式会社) を使用した (図 2)。pCGThLCAT は以下の構築過程 (※別紙 3) を通じて得られた。

Step 1 : 1-(1)-1) に記載されている通り、ヒト肝がん細胞株の cDNA ライブラリーから hLCAT 遺伝子 (1.3kb) を調製した。

Step 2 : pDON-AI DNA ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の *Bam* HI 切断部位と

Sal I 切断部位の間に、当該制限酵素配列を含むプライマーにより増幅させた hLCAT 遺伝子を挿入した。次に、蛋白質合成効率の向上のために開始コドン ATG 上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入した。また、hLCAT 遺伝子ストップコドン近傍に存在する ポリ A 付加配列の AATAAA (TAA がストップコドン) を別のストップコドン TGA に改変した。

Step 3 : 目的以外の不要な遺伝子の発現を避けるために、*Sal* I 切断部位から *Xho* I 切断部位までを切り出して、Minimal SV40 promoter 配列及び *Neo*^R (ネオマイシン耐性遺伝子配列) を除去した。

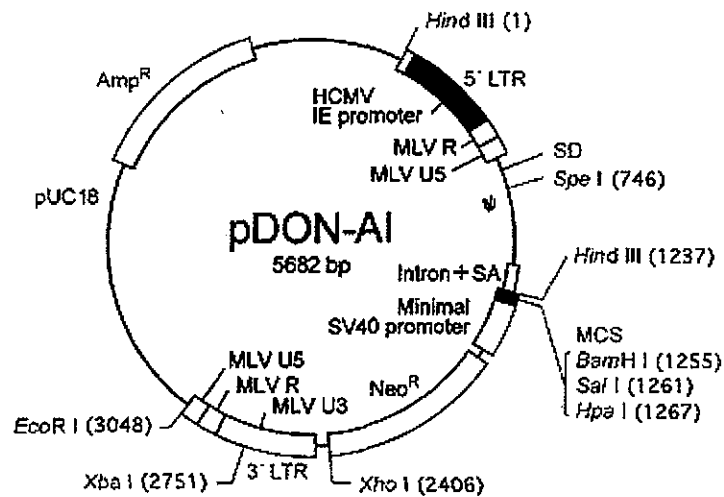


図 2 pDON-AI DNA ベクターの構造

(2) 特性

このレトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) は、基本的性質をベクター pDON-AI から受け継いでおり、LTR とパッケージングシグナル (Ψ 配列) 以外の MoMLV 由来遺伝子 (*gag*, *pol*, *env*) を含まず、かつ 5' LTR の U3 領域がより強力なサイトメガロウイルス由来のプロモーターに置換されている (文献 19、20)。従って、このベクターの特徴は MoMLV の構造遺伝子を完全に除くことによって、パッケージング細胞中での相同的組換えによる増殖性ウイルスの出現を抑え、かつ導入遺伝子の発現効率を上げていることにある。

文献 19 : Yu SS, Kim J-M, and Kim S: High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Therapy* 7:797-804, 2000

文献 20 : Kim SH, Yu SS, Park JS, Robbins PD, An CS, and Kim S: Construction of Retroviral Vectors with Improved Safety, Gene Expression, and Versatility. *J Virology* 72:994-1004, 1998

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は 1 本鎖 RNA であるが、DNA 配列に変換したプロウイルス配列を示す。1-(1)で示したとおり、ゲノムの構成成分は hLCAT cDNA 配列のほかは、パッケージングシグナル (Ψ) と 5' LTR 及び 3' LTR である。

注) マスターセルバンクを作製する際に GP+envAM-12 細胞にウイルスを感染させてアンフォトロピック hLCAT 発現レトロウイルスを構築する過程で、宿主染色体に組み込まれる時に、逆転写酵素によりウイルスゲノム上の 3' LTR 配列が 5' LTR 領域へとコピー・置換されるため、5' LTR 領域塩基配列はオリジナルベクターの 3' LTR 配列へと再変換され、レトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) の配列とは異なっている。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

MoMLV の *gag-pol* 遺伝子とエクトロピックエンベロープ遺伝子を発現するパッケージング細胞である GP+E-86 細胞に、レトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) をハイグロマイシン耐性遺伝子と同時にトランスフェクションした。トランスフェクションには Lipofectamine 2000CD (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いた。Hygromycin B 選択により薬剤耐性細胞プールを獲得し、この細胞の培養上清から hLCAT 発現エクトロピックレトロウイルスベクターを回収した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

1) パッケージング細胞株

本遺伝子組換え生物の産生細胞株の作製に使用したパッケージング細胞株は GP+envAM-12 (文献 21、22) である。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 (*gag-pol*、及び *env*) により別々に導入した細胞株であるので、相同的組換えによる野生型・増殖性ウイルス (RCR) 出現のリスクは極めて少ないと考えられている。

2) ウイルス産生細胞株 (MCB) の作製

hLCAT 発現エクトロピックレトロウイルスベクターを、RetroNectin (タカラバイオ株式会社) を用いて、MoMLV の *gag-pol* 遺伝子及びマウスウイルス 4070A 由来アンフォトロピックエンベロープ遺伝子を発現する GP+envAM-12 細胞 (マウス由来細胞) に感染させることで、ヒト細胞にも感染可能なアンフォトロピックレトロウイルスベクターを構築した。

感染させた GP+envAM-12 細胞を 96 穴プレート 50 枚に限界希釈して播種し、ウイルス産生細胞のスクリーニングを行った。シングルクローンと考えられる 201 ウェルにつ

いてその上清をリアルタイム RT-PCR で分析し、陽性クローン 9 個を得た。この中から最も高タイターのウイルス産生株を 1 ライン (GP+envAM-12/CGThLCAT A_17_4) 選択し、hLCAT 発現アンフォトロピックレトロウイルスベクター産生細胞としてプレマスターセルバンク (pre-MCB) を作製した。pre-MCB より継代を 3 回実施し、マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) の作製を行った。

マスターセルバンクは、タカラバイオ株式会社において GMP 製造されたものである。1 バイアルにウイルスベクター産生細胞を 4×10^6 個/mL 含み、液体窒素タンクにて保存されている。

以上のウイルスベクター調製からマスターセルバンク作製までの構築スキームを※別紙 4 に示す。

3) 本遺伝子組換え生物の最終製品の製造・輸送

遺伝子導入に使用する本遺伝子組換え生物 (レトロウイルスベクター) は、上記マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) より、タカラバイオ株式会社において GMP 製造された。

マスターセルバンクからの本遺伝子組換え生物 (Lot. CRV07-2) の製造は次の方法にて行った。

- ① MCB (CGT_hLMC Lot. CM06-1) より 7 本を融解して培養を開始した。
- ② 2 回の継代培養後、セルスタック (10 チャンバー 6 個および 5 チャンバー 1 個) でセミコンフルエントまで培養した。
- ③ 培養後、ウイルスハーベスト培地に交換し、24 時間後に培地上清を回収した。
- ④ 回収後新たなウイルスハーベスト培地に交換し、次の 24 時間培養後に培地上清を回収し、同じ操作をさらにもう一度行い 3 回ウイルス液の回収をおこなった。
- ⑤ 回収した 3 回分のウイルス液をプールした後、無菌ろ過を行ってフローズバック (100 mL 用、50 mL 用) 及びクライオバイアル (4 mL 用) に分注して -80°C にて凍結保存した。

凍結保存された本遺伝子組換え生物は、品質試験の後、適切な拡散防止措置を執ってドライアイス詰め、千葉大学医学部附属病院細胞調製室へ送られ、細胞調製室の前室 (施設可能) に設置した超低温フリーザーに保管される。

本遺伝子組換え生物の品質試験項目・暫定規格及び参考実測値を※別紙 5 に示す。また、当該治療施設、細胞調製施設及び保管場所の地図ならびに細胞調製室の概略図を※別紙 6、7 及び 8 に示す。

cell line. Virology 167:400-406, 1988.

文献 22 : Markowitz D, Goff S, and Bank A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. J Virol 62:1120-1124, 1988.

4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸は本遺伝子組換え生物のゲノム RNA の一部として存在する。凍結保管中は安定であり、本遺伝子組換え生物（レトロウイルス）の生物学的性質が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活着しているかぎり安定に保持される。

hLCAT 遺伝子は MoMLV の LTR 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、パッケージング細胞内で本遺伝子組換え生物のゲノムが細胞の *gag-pol* 及び *env* と相同組換えをおこして RCR が出現する可能性は否定できない。しかしながら、GP+envAM-12 細胞では *gag-pol* と *env* が独立して存在していることから、野生型の増殖性レトロウイルス（RCR）が出現するには複数回の組換えが同時に必要であること、また、本遺伝子組換え生物のゲノムは *gag*、*pol*、*env* が完全に欠落しているため、相同的組換えに必要な元のウイルス由来配列はより少なくなっていることから、RCR 出現の確率は極めて低いと考えられる。

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) 本遺伝子組換え生物の検出方法

本遺伝子組換え生物は野生型ウイルス MoMLV にはない hLCAT 遺伝子の cDNA 配列を持つので、hLCAT 遺伝子のイントロン部分を挟む塩基配列をプライマーにして RT-PCR 法による本遺伝子組換え生物の特異的検出が可能である。また検体中の含量も同様のプライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法により定量できる。

(2) 本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞の検出方法

細胞または組織から調製したゲノム DNA を鋳型に、上記 hLCAT 遺伝子のイントロン部分を挟む塩基配列をプライマーとして用いた PCR 法により、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞の特異的検出が可能である。ヒト細胞が本来持つ hLCAT 遺伝子はイントロンを含むため、この cDNA 配列特異的検出法では検出されない。前項同様リアルタイム PCR による定量も可能である。

(3) RCR の検出方法

・ Mus dunni を用いた増幅法

Mus dunni 細胞に検体を添加し、5 回の継代培養を行う。この培養上清を PG-4 細胞に接種し、S+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 1RCR/assay 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 が検出される。

・ RT-PCR 法

被検試料から RNA を調製し、4070A env 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物を検出する。本試験では、被検細胞 10^{-4} ~ 10^{-5} あたり 1 個の感染細胞の検出が可能である。

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。

- (1) 本遺伝子組換え生物は *gag*、*pol* 及び *env* を欠損しているため、本遺伝子組換え生物が感染した通常の細胞はウイルス粒子形成に必要な蛋白質を合成できない。したがって、本遺伝子組換え生物は *gag*、*pol* 及び *env* を発現する細胞においてのみ増殖できる。
- (2) 本遺伝子組換え生物は hLCAT 遺伝子を持つため、感染した細胞は LCAT を発現する。
- (3) MoMLV がマウス、ラット等のげっ歯類にだけ感染しうるのに対して、アンフォトロピック MLV 4070A はこれらのほか、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ミンク、ウサギ、ニワトリ、ウシ及びハムスターの細胞にも感染すると報告されている（文献 23）。したがって、ウイルス粒子表面に 4070A 由来 env 蛋白質を持つ本遺伝子組換え生物はマウス、ラット等に加えてヒト、サル、イヌ等、幅広い動物種の細胞に本遺伝子組換え生物の核酸を伝達しうる。本遺伝子組換え生物が自立的増殖能を欠いており、ヘルパー機能をもつ特殊な細胞においてしか増殖できない点と感染可能な生物種の範囲が異なる点を除いて、I-3「生理・生態学的特性」に記載した、宿主である MoMLV と本遺伝子組換え生物の分類学上の基本性質は同等であると考えられる。
- (4) 生物多様性に影響を及ぼす程度としては、本遺伝子組換え生物はより広い生物種に感染可能になるが、増殖能を持たないことから、たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはなく、野生型ウイルスよりも影響は小さいと考えられる。ただし、本遺伝子組換え生物が相同的組換えにより自立的増殖能を獲得する

ことがあれば、何らかの影響がでることも考えられる。

文献 23 : 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：千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号

治療施設の名称：千葉大学医学部附属病院

(1) 本遺伝子組換え生物溶液は、容器に密閉後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の細胞調製室内の冷凍庫に保管する。

(2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物溶液の溶解、希釈及び分注操作は、細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。被験者の前脂肪細胞への本遺伝子組換え生物導入操作、本遺伝子組換え生物導入細胞の培養その他の本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取扱いも同様に細胞調製室内の安全キャビネット内又は細胞調製室内で閉鎖系にて行う。本遺伝子組換え生物希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の保管は、細胞調製室前室に設置の冷蔵庫、冷凍庫、もしくは細胞調製室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈溶液若しくはその凍結品又は本遺伝子組換え生物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、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(3) 本遺伝子組換え生物溶液（希釈溶液も含む）又は本遺伝子組換え生物導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活性化を行った後、本施設で定められた医療廃棄物処理規程（以下「医療廃棄物処理規程」という。）に従い廃棄する。

(4) 細胞調製室内の安全キャビネット内で本遺伝子組換え生物導入細胞懸濁液を注射器に充填し、それを二重に密閉した後、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）に運搬する。

(5) 被験者に対する本遺伝子組換え生物導入細胞の投与は、個室において、被験者の皮下脂肪組織内に注射移植する。

(6) 上記(5)で用いた、本遺伝子組換え生物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、布、ガーゼ類等は使い捨てとし、使用后、ウイルスの不活性化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルスの不活性化を他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。

(7) 投与後3日まで、被験者を個室内で管理し、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。

(8) 個室における管理期間中の被験者の排泄物は、投与翌日以降に行われる患者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 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、ウイルスの不活性化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、臨床検体として使用する患者の血液及び尿の取扱いは、本遺伝子組換え生物溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取扱いに準じる。

(9) 個室における管理期間中、患者に対して侵襲的に使用した器具及び患者の血液、体液、排泄物に接触した器具等は、ウイルスの不活性化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。これらのウイルスの不活性化を他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。

(10) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血清においてRCRが陰性であることを確認する。RCRが確認されたときは、個室における管理を継続する。

(11) 個室における管理解除後に被験者の血清からRCRが検出された場合は、直ちに被験者を上記個室における管理下に移し、上記(7)から(10)までと同様の措置を執る。

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

被験者への本遺伝子組換え生物導入細胞の投与後、別途規程のスケジュール (※別紙9) に従い被験者の血清を試料として、4070A *env* 遺伝子に対するPCR法又は血清の培養法による検査を実施する。また、RCR発現の有無につき被験者の臨床症状を観察する。

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、細胞調製室において、第一種使用規程に従い調製される。本遺伝子組換え生物が細胞調製室の床等に漏出した場合には、直ちにペーパータオル、布等で拭き取る。拭き取った後は、消毒用エタノールを当該箇所が完全に覆われるまで噴霧して1分以上放置し、ペーパータオル、布等で拭き取ることにより本遺伝子組換え生物を不活性化する。当該ペーパータオル、布等は121℃、20分間以上で高圧蒸気滅菌処理した後、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被験者の血清のPCR法又は血清の培養法においてRCRが検出された場合には、第一種使用規程に従い被験者を直ちに個室における管理下に移すとともに、排泄物のウイルス不活性化等、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

マスターセルバンクMCB (CGT_hLMC Lot. CM06-1) 及びそれらから作製された本遺伝子組換え生物 (Lot. CRV07-1及びCRV07-2) についてMus dunni 細胞を用いた増幅法によるPCR 試験を実施した。その結果、すべてPCR 陰性であった (※別紙5)。本遺伝子組換え生物導入細胞を用いた以下の非臨床試験ではがん化は認められず、また毒性は極めて低いことが示唆された。

カニクイザルに、hLCAT (human Lecithin cholesterol acyltransferase) 遺伝子導入サル前脂肪細胞を自家移植した非臨床試験において、全症例で自家移植 2ヵ月後の一般状態、体重、摂餌量、また行動観察、心電図、呼吸数等の薬理的異常所見、また剖検後の各臓器重量、血液学的変化、各臓器、組織の肉眼所見においても、異常は観察されなかった。

C57BL6Jマウスに、hLCAT遺伝子導入マウス前脂肪細胞を同系マウス皮下に移植しそのがん化を検討したところ、一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診、また移植後約 7ヵ月及び1年後の剖検における臓器重量、血液学的検査、各臓器、組織の肉眼所見のいずれにも異常はなくがん化は認められなかった。また、遺伝子導入していないマウス前脂肪細胞投与マウスでもがん化は認められなかった。

健康成人から得たヒト前脂肪細胞にhLCAT遺伝子を導入し、6ヵ月間の継代培養後、軟寒天培地におけるコロニー形成能を検討した。遺伝子非導入ヒト前脂肪細胞を対照群、またHeLa細胞を陽性対照群とした。HeLa細胞ではコロニー形成を検出したが、hLCAT遺伝子導入ならびに非導入ヒト前脂肪細胞のいずれも、コロニー形成能を獲得した細胞は観察されなかった。

hLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞をNudeマウス皮下に移植しがん化を検討した。マウスの一般状態、体重、摂餌量、移植部位の触診に異常は確認されなかった。移植後約3ヵ月の剖検では、臓器重量、各臓器、組織の肉眼所見について、異常は認められなかった。

本遺伝子組換え生物導入細胞及び本遺伝子組換え生物を用いた臨床使用経験は現在までのところない。

6 国外における使用等により得られた情報

本遺伝子組換え生物導入細胞及び本遺伝子組換え生物を用いた使用経験は現在までのところない。

IV 生物多様性影響評価

1 他の微生物を減少させる性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及びRCRはアンフォトロピックenv蛋白質を持つので、広範囲の動物に感染しうるが、微生物への感染性は知られていない。したがって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず)

(3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

2 病原性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及びRCRはアンフォトロピックenv蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピックMoMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 4070Aと同様に、マウス、ラットのみならずヒト、サル等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、サル等の細胞への挿入変異によってがん化を誘発する可能性がある。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LCATは、遊離型コレステロールをコレステロールエステルに変換する酵素として機能する。本反応は、末梢組織から肝臓へコレステロールを転送・異化排泄するコレステロール逆転送系の最初の段階を支配する。ヒトでのLCAT過剰症にともなう有害な臨床症状はなく、本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。

(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前脂肪細胞とともに被験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、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性化される（文献15）。さらに、*gag*、*pol*、*env* 遺伝子を完全に欠如した本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しているため、通常の細胞に感染してもウイルス粒子を産生することはなく、たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはない。

一方、本遺伝子組換え生物の製造工程中に出現したRCRが前脂肪細胞に混入して被験者に移植された場合には被験者体内で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（GP+envAM-12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及び遺伝子導入細胞のRCR陰性を確認してから使用するため、被験者体内に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が万一被験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おそれの有無等の判断

よって、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及びRCRの有害物質の産生性は知られていない。したがって、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

（該当せず）

(3) 影響の生じやすさの評価

（該当せず）

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

4 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及びRCRはアンフォトロピックenv蛋白質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型アンフォトロピックMoMLV4070Aと同様に、マウス、ラットのみならずヒト、サル等を含む広範囲の動物に感染しうる。したがってこれらの生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物又は遺伝子組換え生物等に該当するRCRによってこれらの遺伝子組換え生物の核酸が野生生物のゲノム中に組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前脂肪細胞とともに被験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。さらに、増殖能を持たないことから、たとえ感染が成立しても生殖細胞に感染しない限り、その影響は感染した個体からさらに広がることはない。

本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は否定できないが、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おそれの有無等の判断

よって、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

5 その他の性質

核酸を垂直伝達する性質

本遺伝子組換え生物が感染可能な野生動物等の生殖系細胞のゲノム中に組込まれて、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とその娘細胞に限られ、その細胞が生殖系細胞である確率は低い。また、RCRが出現する可能性は極めて低い。以上から、本遺伝子組換え生物又はRCRの核酸が生殖細胞に伝達される可能性は極めて低い。よって、核酸を垂直伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動物種は4070Aアンフトロピック env蛋白質によって規定されるため、げっ歯類及びヒトを含む広範囲の動物であり、野生型アンフトロピック MoMLV4070 A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。本遺伝子組換え生物により導入されたhLCAT遺伝子が発現することにより、ヒトに病原性を示す可能性は非常に小さい。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠如しているため、MoMLV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。MoMLV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、MoMLV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は血液や体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、MoMLV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MoMLVと同等である。ヒトにMoMLV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。

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

氏名	所属
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
○ おざわ けいや 小澤 敬也	自治医科大学医学部教授
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 堯夫	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	(独)医薬品医療機器総合機構生物系審査第1部テクニカルエキスパート
わたなべ まこと 渡邊 信	筑波大学生命環境科学研究科教授

○委員長 (五十音順 敬称略)

(平成22年4月1日現在)