


	片山 直之	三重大学大学院医学系研究科・病態制御医学講座 造血病態内科学・教授	試験登録患者の診療
	中瀬 一則	三重大学医学部附属病院・血液内科、腫瘍・免疫内科 ・科長	試験登録患者の診療
	梶屋 正浩	三重大学大学院医学系研究科・病態制御医学講座・ 造血病態内科学・准教授	試験登録患者の診療
	水野 聡朗	三重大学大学院医学系研究科・病態制御医学講座・ 腫瘍・免疫内科学・助教	試験登録患者の診療
	北野 滋久	三重大学医学部附属病院・腫瘍・免疫内科・医員	試験登録患者の診療、 遺伝子導入細胞製剤の体内動態及び 免疫反応の評価
	大石 晃嗣	三重大学医学部附属病院・輸血部・部長、講師	アフェレーシスの 管理
	田中 匡介	三重大学医学部附属病院・光学医療診療部・助教	試験登録患者の診療
	白石 泰三	三重大学大学院医学系研究科・病態解明医学講座 腫瘍病態解明学・教授	病理組織学的診断
	佐藤 永一	東京医科大学・病理学講座・助教	病理組織学的診断
	大谷 明夫	独立行政法人国立病院機構 水戸医療センター・ 研究検査科・臨床研究部長	病理組織学的診断
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

審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	<p>本臨床研究は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日 文部科学省・厚生労働省告示第1号（平成16年12月28日全部改正）」の必要条件を満たしている」と認める。</p> <p>本臨床研究で遺伝子導入する細胞はレトロウイルスベクターによる癌化リスクは低く、対象疾患の利益・不利益を総括すると遺伝子治療臨床研究の実施に問題は少ない。また本臨床研究実施計画に先立ち施行された実験動物に遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性試験の結果、遺伝子導入細胞投与群に毒性所見は観察されなかった。また遺伝子導入細胞は本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、細胞治療等の経験者であり計画施行に適切な構成である。</p>
------------------------	--

	審査委員会の長の職名	氏名
	三重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 三重大学大学院医学系研究科 病態解明医学講座 臨床検査医学分野 教授	登 勉 

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>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 (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。</p> <p>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 (RCR)、linear amplification mediated-PCR (LAM-PCR)]</p> <p>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</p>	
対象疾患及びその選定理由	<p>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 (1999 年、年齢調整) は男性 12,402 人、女性 2,428 人、死亡数 (2003 年、年齢調整) は男性 9,397 人、女性 1,651 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%、II a 期 : 51.5%、II b 期 : 34.0%、III 期 : 19.8%、IV a 期 : 13.7%、IV b 期 : 5.5% と未だ予後不良である。現在、病期進行食道癌に対する治療法として、シスプラチン (CDDP:白金系抗腫瘍剤) /5-フルオロウラシル (5-FU : 葉酸代謝拮抗剤) による化学療法と放射線療法の併用療法 (化学放射線療法) が標準的治療法として選択されているが、無効例も少なくない。また、CDDP/5-FU の他、ドセタキセルやパクリタキセル (本邦では食道癌の適応未承認) 等のタキソイド系製剤の併用が検討されている。食道癌では、初回治療が適正に行われたにもかかわらず再発を認めることが多く、再発食道癌に対する治療法は、現在のところ一定のコンセンサスが得られていない。治療にあたっては、もっぱら延命効果の期待あるいは患者の生活の質 (QOL) の改善を目的とし、再発食道癌の 50% 生存期間は約 6 ヶ月とされている。</p> <p>2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要 本臨床研究では、治療抵抗性の食道癌患者から採取した末梢血リンパ球に、MAGE-A4 特異的 TCR α 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-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド (9 アミノ酸 : NYKRCFPVI) 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 は食道癌の多くに発現する腫瘍抗原であり、癌組織と精巣においてのみ発現される。また、HLA-A2402 は日本人の約 60% が有する主要組織適合抗原である。</p>	

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-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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。なお、精巣細胞は HLA 分子を発現しないため MAGE-A4 抗原を認識する T リンパ球による傷害を受けない。

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、RECIST 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。実際に、当施設で調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性のヒト腫瘍細胞株に対して特異的な細胞傷害活性を示すことが *in vitro* において確認されている。また、免疫不全マウスに MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性のヒト腫瘍細胞株を接種したモデル実験において、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与群に特異的な腫瘍径増大の抑制効果が認められた。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。

4. MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与を併用する理由

近年の T 細胞の養子免疫療法における研究により、可能な限り短期の培養において必要な移入量を達成し、担癌宿主への移入後に *in vivo* において抗原刺激を加え活性化することにより効果的な抗腫瘍効果が得られると考えられている。これまでに、抗原ペプチドと不完全フロイントアジュバントのエマルジョンを含む、様々な形態のワクチンの投与を腫瘍抗原特異的 T 細胞の輸注療法に組み合わせることにより、輸注療法の抗腫瘍効果を増大させることが動物実験により報告されている。また、臨床試験においても同様にワクチン投与を腫瘍抗原特異的 T 細胞療法と組み合わせることでメラノーマ患者の治療が試みられている。このような知見に基づき、本臨床研究においては試験細胞の *in vitro* 培養を短期間とし、試験細胞の患者への移入後 2 週目と 4 週目に MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドを投与することを計画した。本治療スケジュールにより、まず患者体内における MAGE-A4 反応性 T 細胞の頻度を飛躍的に増大させ、その後に抗原ペプチドを投与することにより輸注した MAGE-A4 反応性 T 細胞を患者体内で活性化すると共にさらなる増殖を引き起こし、より高い免疫応答と臨床効果を期待するものである。

ペプチドの投与量については、マウスを用いた研究において、腫瘍抗原ペプチド特異的な免疫応答を誘導するために、約 100 μ g のペプチドを不完全フロイントアジュバントとエマルジョン化して用いると有効であることが示されてきた。腫瘍抗原由来ペプチドを用いた初期のペプチドワクチン療法の臨床試験では当初 100 μ g から 10 mg の投与量の範囲で用いられたが、その最大投与量においても毒性は認められなかった。加えて、ワクチン投与患者の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell : PBMC) を用いた *in vitro* の解析において、ワクチン投与による抗原特異的な T 細胞免疫応答の誘導と投与ペプチド量との間には特定の相関を認

	<p>めるに至っていない。これらの結果に基づき、以後の第 I 相臨床試験の多くでは、100 μg から 1 mg 程度の固定した投与量が設定されており、これまでに重篤な副作用は報告されていない。このような経緯と、従来の化学療法剤と腫瘍ワクチンとの根本的な性質の違いから、腫瘍抗原ペプチドを用いたワクチン療法の臨床試験においては用量試験の意義は限られていると考えられている。これらの知見に基づき、本臨床研究においては安全に投与可能であり、かつ免疫反応を誘導することが期待される投与量として 300 μg を設定した。</p>
<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>1. 人に導入する遺伝子の構造と性質 本臨床研究において発現する遺伝子は TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子である。</p> <p>1.1. 人に導入する遺伝子の構造 本臨床研究に用いる TCR α 鎖遺伝子は 272 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、この遺伝子にコードされる蛋白は、111 アミノ酸からなる V8-1 領域、20 アミノ酸からなる J10 領域、141 アミノ酸からなる C 領域という構造からなっている。TCR β 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-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28 から単離された。</p> <p>1.2. 人に導入する遺伝子の性質 本臨床研究において使用するレトロウイルスベクターMS-bPa が細胞に感染すると、MS-bPa のゲノムは逆転写を経て細胞染色体に組み込まれ、プロウイルスとなる。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 TCR α 鎖は 14 番染色体上に、β 鎖は 7 番染色体上にコードされ、多様なクロナイプが存在する。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 TCR α 鎖は Vα 8-1、Jα 10、C であり、TCR β 鎖は Vβ 7-9、Jβ 2-5、C2 の配列である。</p> <p>レトロウイルスベクターMS-bPa により遺伝子導入された細胞において、TCR α 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 (P_{PGK}) によって転写される。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り、レトロウイルスベクターMS-bPa により導入される P_{PGK} は 513 bp のマウスゲノム由来 DNA 断片に含まれる。</p> <p>TCR β 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、胎児癌細胞及びその他の哺乳動物細胞において高い発現レベルを持続的に保持することが可能である。</p> <p>1.3. 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性 TCR α 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</p>

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。

本遺伝子治療において導入する MAGE-A4 特異的 TCR は、TCR α 鎖及び β 鎖のヘテロダイマーによって機能的な MAGE-A4 特異的 TCR 分子を構成している。この MAGE-A4 特異的 TCR 分子は、標的細胞あるいは抗原提示細胞上の MHC-class I 分子である HLA-A2402 分子と MAGE-A4 分子由来の抗原ペプチドである MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体によって形作られる構造を特異的に認識し、結合する。T 細胞表面上に存在する CD8 分子は、HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体が MAGE-A4 特異的 TCR 分子と結合する際の結合の安定化に必要であり、CD8 分子の非存在下では本 MAGE-A4 特異的 TCR 分子は機能しない。

導入された MAGE-A4 特異的 TCR による HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体の認識が起こると、複合体を形成した CD3 分子群を通して遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞内に活性化シグナルが伝達され、遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞の分裂・増殖、IFN- γ をはじめとしたサイトカインの産生、及びグランザイム B、パーフォリン等の細胞傷害性分子の放出が起こり、標的細胞の破壊を導く。

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、腫瘍組織に MAGE-A4 発現) 末梢血由来の T リンパ球である。その生物学的特徴として、①CTL は癌細胞を認識して破壊する能力を有する、②自己の T リンパ球を輸注した場合は、非自己では生じる可能性のある移植片対宿主病 (GVHD) 等の副作用がないことが挙げられる。T リンパ球を標的として MAGE-A4 特異的 TCR α 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-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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ン OKT3 (OKT3) による活性化と T リンパ球増殖因子であるインターロイキン 2 (IL-2) の存在下で増殖する T リンパ球が標的細胞として使用される。

4. 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由

4.1. 遺伝子導入方法の概略

自己末梢血リンパ球 (PBL) に TCR α 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 TCR α 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、癌であり、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

①ウイルスプラスミドベクターpMS-bPa 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ウイルスプラスミドベクターpMS-bPa 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ウイルスプラスミドベクターpMT であり、pMT の 3' -LTR を MSCV プロウイルスの 3' -LTR で置換したものがウイルスプラスミドベクターpMS である。pMT のマルチプルクローニングサイトに、TCR β 鎖 cDNA のコード域、マウス P_{PK} 及び TCR α 鎖 cDNA のコード域を組み込んだ後、これら発現ユニットを pMS に載せ換えることにより pMS-bPa 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

	<p>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。</p> <p>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、ウイルス産生細胞株 MCB 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。</p> <p>5.3. ウイルスベクターの構造 レトロウイルスベクターMS-bPa はパッケージングシグナルとして Ψ+ を有し、gag、pol、env をコードする配列を持たない。</p> <p>5.4. ウイルスベクターの生物学的特徴 パッケージング細胞株 PG13 は、GaLV のエンベロープ蛋白を持つレトロウイルスベクターを製造するためのパッケージング細胞株で、この細胞により産生されるレトロウイルスベクターはマウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。また、レトロウイルスベクターMS-bPa は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した末梢血 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。したがって、RCR が出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p>1. 遺伝子導入方法の安全性</p> <p>1.1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度 レトロウイルスベクターMS-bPa を安定かつ安全に供給するために、ウイルス産生細胞にはセルバンクシステムを使用する。MCB の作製・保存及びレトロウイルスベクターMS-bPa の製造は GMP 管理下で行う。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生国産のものを使用する。</p> <p>①MCB の作製法 ウイルス産生細胞 MS-bPa #20 の初代細胞ストックより作製された Primary Seed Bank が拡大培養され、ウイルス産生細胞 MCB が GMP 遵守下で作製された。MCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。作製された MCB に関しては、以下の品質試験が行われた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 <p>②レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法 MCB の細胞を拡大培養した後、培地を交換し生産培養を経て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</p>

一製造工程に用いる。回収した培養上清液を 0.22 μm の濾過フィルターによる無菌濾過を経て培養上清液を回収した後、ウイルスベクターとして凍結保存バッグに小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。

製造は、本遺伝子治療臨床研究の研究者が製造管理責任者となり、全てタカラバイオ社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。また、タカラバイオ社の製造施設から三重大学医学部内細胞調製施設へのウイルスベクターの輸送は、凍結・ドライアイス詰で、輸送中の温度変化をモニター・記録して行う。

レトロウイルスベクターMS-bPa に関しては、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 TCR α 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。この細胞は、RPMI1640 培地とヒト血清アルブミン（HSA）含細胞凍害保護液（CP-1）とが 1:1 の割合で混合された溶液の懸濁液として投与される。

また、遺伝子導入細胞の投与後に、MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドが不完全フロイントアジュバントとの懸濁液として皮下投与される。このペプチドの純度は逆相 HPLC による解析により 98.3%であり、エンドトキシン試験や無菌試験などにより品質が確認されている。

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 を欠失しているため、gag-pol 遺伝子や env 遺伝子がウイルス粒子内にパッケージングされて細胞外に出ることはない。

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

1.4. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

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

1.5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、患者 T リンパ球に *ex vivo* (生体外) で TCR α 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 はこの過程では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、癌遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターの LTR が有するエンハンサー・プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、癌抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、その細胞が異常増殖する可能性がある。

1.8. 癌原性の有無

レトロウイルスベクターの染色体への組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、上述のとおり異常増殖による癌化の問題が出現する。実際に、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療臨床研究において、フランスで 4 例及びイギリスで 1 例の合計 5 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 リンパ球の癌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、遺伝子導入細胞の癌化は報告されていない。また、レトロウイルスベクターで遺伝子導入した T リンパ球を投与した 46 例のフォローアップ (最長 9 年間) において、遺伝子導入 T リンパ球のクローン増殖が認められなかったとの報告がある。なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の患者体内におけるク

ローン増殖をLAM-PCRによってモニタリングして、遺伝子導入細胞の異常増殖の有無を評価する。

2. 遺伝子産物の安全性

導入遺伝子の産物は、可変領域の配列に違いがあるものの、標的細胞であるT細胞は内在性にTCR α 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TCR α 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TCR2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

以下に示す細胞培養にかかわる全ての操作は三重大学医学部内に設置されたP2レベルの細胞調製施設内で行う。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、ディープフリーザー(-80℃)にて凍結保存する。投与日には、凍結保存バッグをディープフリーザーより取り出し、37℃温浴にて急速に解凍し、投与する。

3.2. 培養細胞の純度

健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝子導入後の細胞中の遺伝子導入細胞の比率は20%程度であり、Tリンパ球が95%以上を占め、若干のBリンパ球が含まれていた。患者に投与される細胞中にも、遺伝子導入されていないTリンパ球やその他の細胞が混在すると予測されるが、もともと患者末梢血中にあった細胞であり問題はないと考えられる。また、仮にTリンパ球以外に遺伝子導入された場合には、発現したTCR分子は受容体としての機能を発揮しないと考えられることから、生体への影響が発生する可能性は低いと考えられる。

遺伝子導入により、導入遺伝子の本来の機能とは関係なく移入細胞の腫瘍化を誘導する確率が一定程度に存在すると考えられる。ただし造血幹細胞以外の細胞に遺伝子導入された場合には、血液系細胞はいずれもその生理的寿命が限られていることから腫瘍が発生する確率は極めて低いと考えられる。なお、造血幹細胞の混入については、①培養開始時点の患者末梢血リンパ球中の造血幹細胞の比率は極めて低いこと(通常0.1%以下)、②Tリンパ球を活性化させる今回の培養条件ではレトロウ

ウイルス感染時に造血幹細胞が分裂増殖している可能性が極めて低いこと、③造血幹細胞の増殖に必要なサイトカイン等を含まない条件で増殖培養されることを総合すると、遺伝子導入された造血幹細胞が混入する可能性は極めて低いと考えられる。実際に、健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝子導入後の細胞中の CD34 陽性細胞の比率は 0.1%未満（検出限界以下）であった。ただし、万が一、造血幹細胞に遺伝子導入された場合には腫瘍発生のリスクを否定できないことから、投与後の遺伝子導入細胞のクローン増殖をモニタリングする予定である。

また、細胞培養の際に使用する原材料の残留は極めて微量であり、これらが生体に及ぼす影響は限りなく少ない。TCR 遺伝子導入リンパ球は、「3.4. 被験者に投与する細胞の安全性」に記載の試験によって品質が担保される。

3.3. 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

リンパ球と遺伝子導入細胞の遺伝子型の違いは、後者には TCR α 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癌化が起きる可能性は大変低いと考えられるが完全には否定できないので、LAM-PCR によるモニタリングを行う予定である。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

細胞調製終了後、培養上清又は凍結保存専用バッグに充填する前の細胞懸濁液を検体として採取し、以下の試験を行うことにより遺伝子導入細胞の品質を担保する。全ての品質試験結果が得られて安全性が確認されるまで凍結保存され、安全性が確認された後に使用される。

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

被験者への投与の際は、凍結保存専用バッグ中に凍結された細胞懸濁液を投与直前に 37°C 温浴にて急速に解凍し、RPMI1640 培地と HSA 含 CP-1 とが 1:1 の割合で混合された細胞懸濁液として静脈内投与される。

なお、品質試験の検体を採取した後の工程としては、閉鎖系操作による凍結保存専用バッグへの充填、凍結、解凍、及び閉鎖系操作による輸注用バッグ又は注射器への移し替えであり、不純物混入のリスクは極めて低いと考えられる。また、凍結・解凍による細胞生存率の低下については、凍結保存専用バッグに充填する前の細胞懸濁液を別途バイアルに凍結保存し、投与日以前に細胞生存率を測定することにより確認する。

	<p>4. ペプチドの安全性</p> <p>本臨床研究に用いられる MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドは米国 NeoMPS 社において GMP 準拠で製造された。その純度は逆相 HPLC による解析により 98.3%であった。またエンドトキシンは 0.100 EU/mg 未満であり、無菌試験により無菌性が確認されている。</p> <p>腫瘍ワクチンの臨床試験はこれまでに国内外ですでに主要なものだけでも 1,300 名以上の対象者につき報告されている。その中でも CTL 認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究は最も多数行われており、米国の Rosenberg らのグループだけでも 2004 年の時点で総数 381 名の患者に投与されている。しかしながらこれら CTL 認識腫瘍抗原ペプチドについて、現在までに重篤な副作用の報告はない。軽微な副作用として、皮膚反応、微熱、倦怠感等が報告されているのみである。本臨床研究に用いられる MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドはラットにおける単回皮下投与毒性試験を実施した。ヒトへの投与量として予定している 300 μg/body を投与した結果、一般状態の変化及びペプチド投与に関連する体重の変化は認められず、また病理学的検査においても異常は認められなかった。以上より MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの投与において重篤な副作用が出現する可能性は極めて小さいと考えられる。なお、有害事象が発現した場合には、「7.3 ペプチド投与に伴う副作用」に従い、適切な処置を施す。</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p>以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。</p> <p>①臨床ニーズ</p> <p>再発食道癌の患者の 50%生存期間は約 6 ヶ月である。さらに、化学療法等の治療に抵抗性となれば、もっぱら栄養管理等の緩和医療以外の手立てがないのが現状である。本臨床研究は、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者を対象としており、このような患者に対する有効な治療手段開発の臨床ニーズが存在する。</p> <p>②本臨床研究の品質・安全性</p> <p>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。</p> <p>本臨床研究で遺伝子導入する細胞は、小児由来の造血幹細胞ではなく、成人末梢血由来の T リンパ球であり、T リンパ球への遺伝子導入の場合、レトロウイルスベクターによる癌化のリスクは極めて低く、対象疾患とのリスク・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。</p> <p>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。</p> <p>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り、調製された TCR 遺伝子導入リンパ球の品質に起因する有害事象の報告はない。</p> <p>③本臨床研究の期待される有効性</p> <p>当施設で調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性の腫瘍細胞株に対して特異的な細胞傷害活性を示すことが <i>in vitro</i> において確認されている。また、免疫不全マウスにヒト腫瘍細胞株を接種したモデル実験において、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与に特異的な腫瘍径増大抑制効果が認められた。</p> <p>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、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。</p> <p>④当施設・研究者の能力</p> <p>当施設内に設置された細胞調製施設は GMP 準拠で運営・管理される体制にあり、TCR 遺伝子導入リンパ球は同基準に準拠して調製される。本臨床研究の研究者は、</p>

	<p>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、品質管理及び当施設における腫瘍抗原由来ペプチドワクチン臨床試験の経験者により構成される。</p>
<p>実施計画</p>	<p>1. 本臨床研究の実施に際し三重大学医学部附属病院内に設置される委員会 遺伝子治療臨床研究審査委員会に安全・効果評価・適応判定部会及び遺伝子製剤 検証部会を設置する。</p> <p>1.1. 遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定部会 安全・効果評価・適応判定部会は、本臨床研究の安全性及び効果並びに被験者の 適応性に関する具体的事項について評価及び判定を行い、その適否及び留意事項、 改善事項等について遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見を提出する。</p> <p>1.2. 遺伝子治療臨床研究審査委員会遺伝子製剤検証部会 遺伝子製剤検証部会は、本臨床研究に用いる遺伝子導入細胞製剤の検証及びその 品質の評価を行い、その結果を遺伝子治療臨床研究審査委員会に提出する。</p> <p>2. 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。 アフェレーシスにて採取した自己PBLにMAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ペプチドを認識するTCRα 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。 TCR遺伝子導入リンパ球の調製を終了し、安全性を確認した時点で、二次登録時 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300μgのMAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁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。</p> <p>TCR遺伝子導入リンパ球数の設定： 投与するTCR遺伝子導入リンパ球数は1回投与量2×10^8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。</p> <p>3. 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。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 組織診で確定診断の得られた食道癌の患者 2) 根治切除不能かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）抵抗性となった 臨床病期Ⅲ期あるいはⅣ期（TNM分類）の食道癌患者、又は術後あるいは初回放 射線化学療法後に再発転移をきたし治療抵抗性となった食道癌患者 3) HLA-A2402陽性の患者 4) PCR法にて腫瘍組織にMAGE-A4発現が確認*されている患者 5) 画像診断等による臨床効果判定に必要とされる測定可能な腫瘍病変を有する患 者 6) ECOG Performance Status 0～1の患者 7) 本臨床研究参加時点の年齢が20歳以上75歳以下の患者 8) 細胞採取時に前治療（手術、化学療法、放射線療法）終了から4週間以上の経 過が見込める患者

- 9) 同意取得後 4 ヶ月以上の生命予後が見込める患者
- 10) 主要臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
- ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$
 - ・ヘモグロビン $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
 - ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・総ビリルビン (T-Bil) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 150 \text{ IU/dL}$
 - ・クレアチニン (Cr) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 11) 免疫組織染色法にて腫瘍組織に HLA クラス I 分子発現が確認されている患者
- 12) 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

*: MAGE-A4 発現陽性の判断基準は、定量的 RT-PCR 法により GAPDH 発現 10,000 コピー当たり MAGE-A4 発現が 50 コピー以上とする。

除外基準（一次登録）:

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
 - ・活動性の感染症
 - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
 - ・自己免疫疾患
 - ・出血傾向〔プロトロンビン時間 (PT) <50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) >60 sec、フィブリノゲン (Fbg) <100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) >20 $\mu\text{g/mL}$ 〕
 - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 3) 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-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者(例えばMAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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相当と認めた患者

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なとされる測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 3) ECOG Performance Status 0~1 の患者
- 4) 主要臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
 - ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$

- ・ヘモグロビン ≥ 8.0 g/dL
 - ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・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 $\mu\text{g/mL}$ 〕
 - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 3) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
- 4) 制御困難な脳内転移を有する患者
- 5) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
- 6) MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者(例えばMAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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相当と認めた患者

4. 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、三重大学医学部附属病院内に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意・説明文書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、二次登録時には治験コーディネーター等が説明補助を行うものとする。

5. 実施期間及び目標症例数

実施期間は厚生労働大臣から実施が差し支えない旨の回答を得た時点から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、1 年に 1 回の頻度で遺伝子導入 T リンパ球の血中動態及び二次発癌や RCR の有無について追跡調査を実施する。

目標症例数は以下のとおり 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 2×10⁸ 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

6. 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。

7. 予測される副作用及びその対処方法

7.1. アフェレーシスに伴う副作用

①血管ルート確保に関すること

まれに出血、感染、気胸の合併の危険がある。穿刺皮膚部位を十分に消毒し、手技に習熟した医師が行う。

②迷走神経反射

重篤な場合、意識障害、嘔吐、血圧低下、徐脈（グレード2）、さらに高度では痙攣、失禁（グレード3）がみられることもある。グレード2以上の副作用が出現した場合は、直ちに採取を中止し、補液、昇圧剤、硫酸アトロピン投与等、必要な処置を行う。

③クエン酸反応

抗凝固剤に含まれるクエン酸による低カルシウム血症をきたすことがある。軽症の場合、採取速度を低下させて観察するが、それでも改善しない場合、グルコン酸カルシウムを緩徐に静注する。

④血小板減少

アフェレーシス後に血小板減少が高頻度にみられ、高度の減少も 5%前後みられる。アフェレーシス終了後 1 週間位は必ず血小板をチェックし、採取前値への回復を確認する。

7.2. TCR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用

①発熱、発疹、アレルギー類似反応等

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

②肺障害

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（TRALI: Transfusion-Related Acute Lung Injury）類似病態発症の可能性は考えにくい、TCR 遺伝子導入リンパ球投与後の肺障害に留意すべきと考えられる。対処法として、発症時は副腎皮質ステロイド剤の大量投与等、適切な処置を行う。

③免疫反応に伴う事象

MAGE-A4 は腫瘍特異性が極めて高いため正常組織への細胞傷害の可能性は極めて低い、自己免疫疾患様症状には常に留意する必要がある。対処法は、グレード2 以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与する。

④レトロウイルスベクターを用いる危険性

RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられるが、被験者体内における RCR 出現を RT-PCR 法によってモニタリングする。万が一、RCR が出現した場合には、抗ウイルス剤によるウイルス感染症治療等の最善の治療を行う。

遺伝子導入した T リンパ球の癌化の危険性は極めて低いと考えられるが、遺伝子導入細胞の被験者体内におけるクローン増殖を LAM-PCR によってモニタリングする。万が一、異常増殖が認められた場合には、化学療法等の最善の治療を行う。

7.3. ペプチド投与に伴う副作用

CTL 認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究での軽微な副作用として、皮膚反応、

微熱、倦怠感等が報告されている。本臨床研究ではペプチド反応性 T 細胞の頻度を上昇させた状態においてペプチドを投与する。ペプチド反応性 T 細胞の活性化に伴う微熱、倦怠感等の症状、あるいは予測できない症状が出現する可能性は否定できないが、これまでの異なるペプチド等の抗原と T 細胞を用いた同様な臨床試験ではそのような機序によると考えられる副作用の出現は報告されていない。対処法は、グレード 2 以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与する。

8. 評価方法、評価基準及び中止判定基準

8.1. 主要評価項目

①安全性の評価

1) 有害事象

有害事象とは、本治療が実施された被験者に生じるあらゆる好ましくないあるいは意図しない症状、徴候（臨床検査の異常も含む）又は病気のことであり、当該治療との因果関係の有無は問わない。有害事象のグレードは、2003 年に米国 National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAEv3.0) 有害事象共通用語規準 v3.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版-2004 年 10 月 27 日」に従い、判定を行う。

2) 臨床検査

総括責任者又は分担研究者は、臨床検査値の正常・異常について（三重大学医学部附属病院の基準範囲を逸脱した場合、「異常」と判定する）、及び臨床検査値の異常変動の有無について判定する。

3) RCR

本臨床研究期間中の RCR の出現の有無を RT-PCR により検討する。

4) LAM-PCR

TCR 遺伝子導入リンパ球のクローナリティーを検討する。

8.2 副次的評価項目

①TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態

被験者から採取した PBMC について、以下の試験を行う。

- 1) PBMC から DNA を分離し、定量的 PCR によって TCR 遺伝子及びベクター配列を定量する。
- 2) テトラマー解析により特異的 TCR 発現細胞の血中濃度を測定する。

②TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織への浸潤度

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

- 1) 腫瘍から RNA を抽出・精製し、定量的 RT-PCR によって MAGE-A4 抗原の発現を評価する。
- 2) 生検組織内へのリンパ球浸潤度を抗ヒト CD3 抗体及び抗ヒト CD8 抗体を用いて評価する。また、定量的 PCR によって生検組織内のリンパ球中の導入 TCR の定量化を行う。

③腫瘍特異的免疫反応

被験者から PBL を採取し、以下の試験を行う。

- 1) ELISPOT アッセイにより MAGE-A4 反応性 T リンパ球を定量する。
- 2) テトラマーにより MAGE-A4 反応性 T リンパ球を定量する。
- 3) 細胞内サイトカイン染色により MAGE-A4 反応性 T リンパ球の反応特性を解析する。

④腫瘍縮小効果

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

8.3 中止基準

①被験者ごとの中止基準

本臨床研究期間中に以下のような事例が発生した場合、総括責任者又は分担研究者は当該被験者における本臨床研究を中止する。また、必要な検査・観察を行うとともに、必要に応じて三重大学医学部附属病院長に本臨床研究を中止した旨を連絡する。なお、有害事象の発現や対象疾患の悪化等、安全性に問題が生じ中止した場合、総括責任者又は分担研究者は速やかに適切な処置を行い、被験者の安全性が確認されるまで追跡調査を実施する。

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

②研究全体の中止

総括責任者又は分担研究者は以下の情報が得られ、臨床研究全体の続行が困難であると考えられる場合、安全・効果評価・適応判定部会と本臨床研究全体の中止について協議のうえ決定する。また、必要な検査・観察を行うとともに三重大学医学部附属病院長に中止した旨を報告する。

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

9. 有害事象が発現した場合の措置

9.1 有害事象が発現した場合

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

9.2 重篤な有害事象が発現した場合

重篤な有害事象が発現した場合、総括責任者又は分担研究者は、「9.1 有害事象が発現した場合」の対応に加え、本臨床研究との因果関係の有無に係わらず、三重大学医学部附属病院の規定に従い、速やかに三重大学医学部附属病院長に報告する。報告を受けた三重大学医学部附属病院長は、文書をもって速やかに厚生労働大臣に報告する。

10. 記録の保存及び成績の公表の方法

記録の保存は三重大学医学部附属病院長が指名した保管責任者が行う。保管責任者は適切な状態の下で、本臨床研究終了後少なくとも5年間保存するものとする。

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

11. 個人情報の保護の徹底

11.1. 個人情報保護に関する責務

三重大学医学部附属病院においては、三重大学医学部附属病院長が総括保護管理者から保護管理者として指名を受けており、三重大学医学部附属病院長は国立大学法人三重大学個人情報保護規程、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程に従い、組織的に個人情報保護に対する措置を図っている。保護管理者である三重大学医学部附属病院長はこれらの規程に従い、本臨床研究に関する個人情報保

	<p>護に関する措置に関し、適正な実施を確保するために必要があると認めるときは、本臨床研究の総括責任者に対して、適宜必要な措置を講ずることができる。</p> <p>11.2. 個人情報の取得と利用に関する制限</p> <p>本臨床研究で扱う被験者の診療録をはじめとする個人情報は、主として病状経過観察、本臨床研究の緊急事態発生のための連絡等、被験者の生命を守るために使用する。その他、特別な目的で使用する場合は、事前に被験者に説明し、了承を得てから使用する。</p> <p>また、本臨床研究の成果検討時や医療向上のため等を目的に本臨床研究成績等を公表・公開する場合は、個人を特定できない形すなわち個人情報を保護して公開する。これらのことは、被験者への同意・説明文書中に記載し、被験者へ個人情報の保護及び使用目的について通知し、同意を得る計画とした。</p> <p>11.3. 個人情報保護に関する安全管理措置</p> <p>三重大学医学部附属病院長は国立大学法人三重大学個人情報保護規程及び三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程に従い、個人情報保護に関して、組織的、人的、物理的及び技術的に安全管理措置を実施し、個人情報の漏洩、滅失又は棄損の防止に対する措置を講じている。</p> <p>11.4. 第三者提供の制限</p> <p>総括責任者は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」第六章第九で掲げる内容に従い、あらかじめ被験者の同意を得ずに個人情報を第三者に提供してはならない。本臨床研究では、タカラバイオ（株）が外部協力者として「ウイルスベクターに関する基礎的助言及び遺伝子導入 T リンパ球調製技術の提供と助言」に限定し、間接的に関与する。したがって、タカラバイオ（株）の担当者が研究協力のために一部データを閲覧する予定であるが、治験と同様に被験者識別コードを用いることにより個人を特定できない措置を講じて個人情報を保護する。</p> <p>11.5. 個人情報の開示、訂正、利用停止等</p> <p>総括責任者は被験者から当該被験者が識別される保有する個人情報についての開示、訂正、利用停止等について、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程に従い求めがあった場合は、遅滞なく必要な対応を行う他、対応結果について被験者に通知しなければならない。</p> <p>さらに、三重大学医学部附属病院では個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口を設置し、被験者からの苦情や問い合わせ等に適切かつ迅速に対応できる体制を整えている。</p>
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
	同意取得日	アフェレーシス実施日	day0*	day1	day2	day3	day7	day14±3	day16±3	day28±3	day30±3	day35±3	
入院		○	○				▶	○	▶	○	▶		
同意取得	○		○										
一次登録	○												
二次登録			○										
被験者背景	○												
アフェレーシス		○											
TCR 遺伝子導入 リンパ球投与			○										
MAGE-A4 ペプチド 投与								○		○			
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
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			○ ²	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
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				○ ⁷								○	○
LAM-PCR ⁶												○	○
採血量 (mL)	15	-	70	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 14~40 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. 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。