

## 分担研究開発課題名：制御性T細胞の効率的誘導と・増殖法の開発

- a. 至適抗体濃度の検討
- b. e-Bio 抗体と Belatacept の比較検討
- c. リコンビナント抗体開発と機能検討

### ・研究開発成果の内容

#### a. 至適抗体濃度の検討

##### i. 目的：

北大グループによるパイロット研究では、レシピエントの末梢血リンパ球  $5 \times 10^9$  個、ドナーの末梢血リンパ球  $2 \times 10^9$  個、培養液 1000ml とし、その中に抗 CD80/CD86 抗体 (eBioscience 社製、2D10、IT2.2) を  $10 \mu\text{g/ml}$  添加して 7 日間培養、得られた培養細胞とドナー末梢血リンパ球  $2 \times 10^9$  個を更に培養液 1000ml (抗体を各  $10 \mu\text{g/ml}$  添加) で 7 日間培養することにより、ドナー抗原特異的アナジー細胞を誘導していた。ただ、アナジー細胞を誘導するのに必要十分な抗体濃度については未検証であったため今回改めて検討することとした。

##### ii. 方法：

(アナジー細胞の誘導) 反応細胞提供者と刺激細胞提供者を募り、各人の末梢血からリンパ球を取り出した。刺激細胞には 30Gy の放射線を照射した。反応細胞(R)、刺激細胞(S)ともに  $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調整、反応細胞 10ml、刺激細胞 5ml、合計 15ml を混合培養した。その中に抗 CD80/CD86 抗体 (eBio 社製、2D10、IT2.2) を各  $150 \mu\text{g}$  ( $10 \mu\text{g/ml}$ )、 $45 \mu\text{g}$  ( $3 \mu\text{g/ml}$ )、 $15 \mu\text{g}$  ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) 添加した。培養一週間後に生細胞を取り出し、 $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調整した。R/S 比 2:1 になるように刺激細胞を加え、各抗体を  $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$  の濃度で添加した。培養 1 週間後に生細胞を取り出し、アナジー細胞とした。

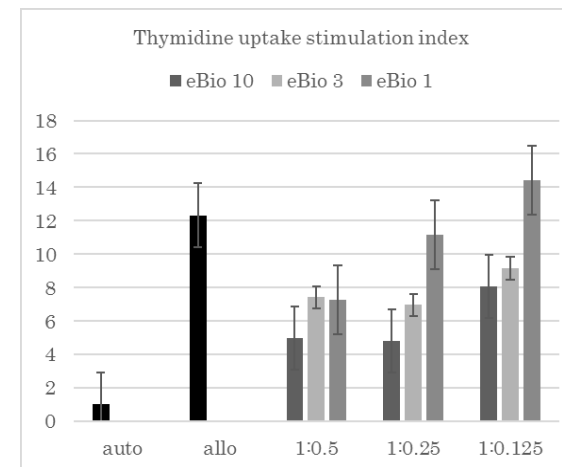
(MLR inhibition assay 刺激細胞には 30Gy の放射線を照射し、反応細胞、刺激細胞ともに  $2 \times 10^5/\text{ml}$  に調整した。一方、培養誘導したアナジー細胞(A)も  $2 \times 10^5/\text{ml}$  に調整した。96 穴 round bottom のプレートの 1well に、反応細胞  $100 \mu\text{l}$ 、刺激細胞  $100 \mu\text{l}$ 、(種々

の割合に)希釈したアナジー細胞 50 $\mu$ l を撒き、6 日間混合培養 (Mixed Lymphocyte Reaction(以下 MLR と略す))した。R/A 比は 0.5、0.25、0.125 とした。一方、刺激細胞提供者とは主要組織抗原複合体(MHC)の異なるボランティア(3<sup>rd</sup>-party)からリンパ球を取り出し、30Gy の放射線を照射し、先述の系と同様の系に組み込んだ。培養 5 日目に <sup>3</sup>H-Thymidine を入れ、その 18 時間後にシンチレーションカウンターにてその取り込みを測定した。アナジー細胞を添加していない well の <sup>3</sup>H-Thymidine 取り込みに比較して、アナジー細胞を添加した群の <sup>3</sup>H-Thymidine 取り込みがどの程度抑制されるかを調べた。)

### iii. 結果

#### (順天堂大学)

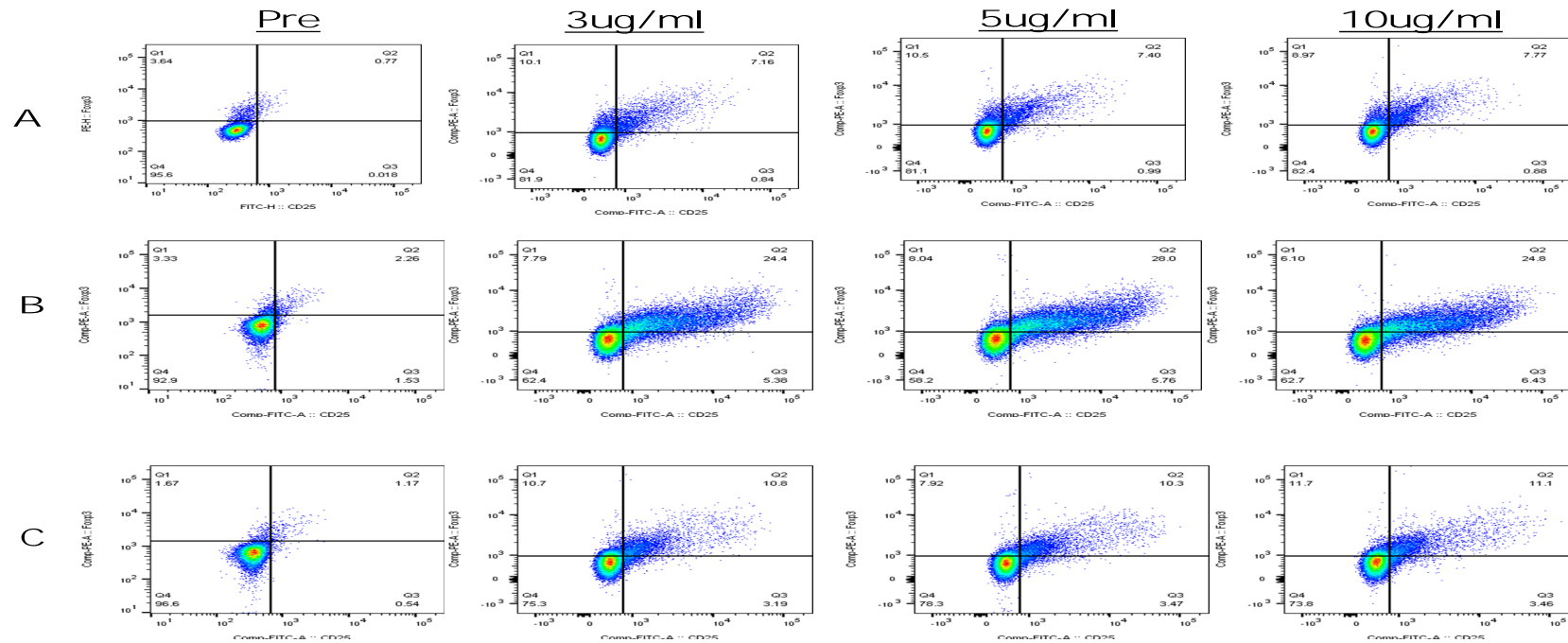
	Naive	eBIO 10	eBIO 1	eBIO 3
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> (%)	0.63 $\pm$ 0.57	7.02 $\pm$ 3.4	7.58 $\pm$ 3.10	5.78 $\pm$ 4.22
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> (%)	2.92 $\pm$ 2.61	13.46 $\pm$ 5.29	14.01 $\pm$ 4.66	10.87 $\pm$ 5.98
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CTLA4 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> (%)	0.17 $\pm$ 0.23	0.77 $\pm$ 0.16	1.34 $\pm$ 0.24	2.55 $\pm$ 2.57
CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> FOXP3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> (%)	1.95 $\pm$ 0.58	6.05 $\pm$ 3.73	6.36 $\pm$ 0.98	5.95 $\pm$ 4.17



通常の R/S の組み合わせでは <sup>3</sup>H-Thymidine 取り込みは Stimulation Index (S.I.) で 12 程度であった。培養液中の抗体濃度 10 $\mu$ g/ml で誘導されたアナジー細胞は通常の MLR を 60%抑制した (R/A 比 0.5)。また R/A 比を 0.25、0.125 とするとその比率は低下した。一方、培養液中の抗体濃度 1 $\mu$ g/ml で誘導されたアナジー細胞は R/A 比を 0.5 とした場合、MLR を 50%抑制し、ある程度有効な抑制細胞が得られたが、R/A 比を 0.25 から 0.125 まで減じると MLR 抑制効果は弱くなった。培養液中の抗体濃度 3 $\mu$ g/ml で誘導され

たアナジー細胞は通常の MLR を 50%抑制した (R/A 比 0.5)。しかし、R/A 比を 0.125 にしても抗体濃度 10 $\mu$ g/ml の群と同程度の MLR 抑制効果を保持していた。

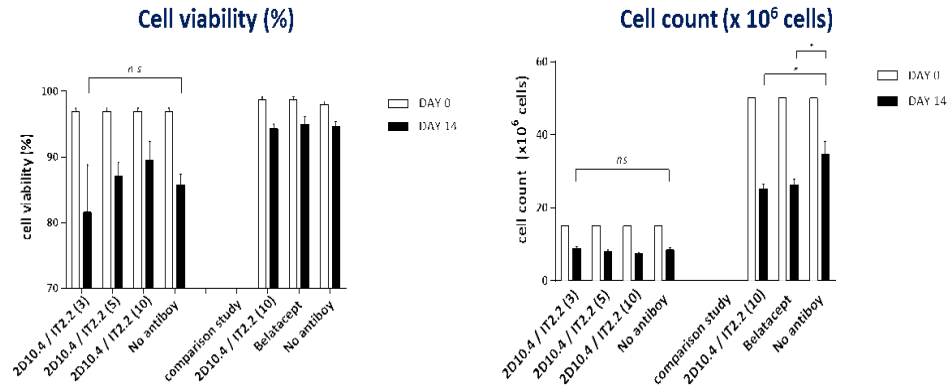
**(広島大学)**



CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞中 7.2~26.0%に CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 細胞が誘導された。

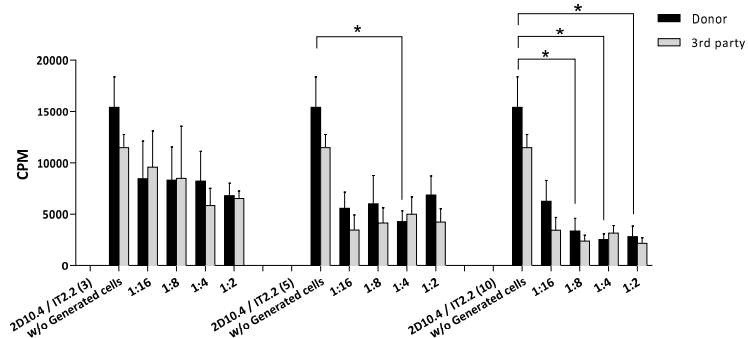
抗 CD80/86 抗体 3, 5, 10 $\mu$ g/ml のいずれの濃度も同等の Treg 細胞誘導効率を示した。

**(カロリンスカ大学)**



Cultured cells	Phenotype	Cell Culturing				
		Before	DAY 14			
Cell count (% of initial)	-	100	H3: 58.70%	H5: 53.57%	H10: 49.28%	NA(H0): 56.02%
cell viability (%)	-	97.00%	81.58%	87.08%	89.55%	85.73%
CD4+ T cell (%)	CD3+CD4+	37.89	27.39	29.74	27.45	31.44
CD8+ T cell (%)	CD3+CD8+	58.30	66.66	63.98	66.99	61.24
B cells (%)	CD3-CD19+	1.69	4.24	4.66	3.51	5.29
NK cell (%)	CD3-CD16+CD56+CD45+	7.52	3.51	3.67	3.65	4.80
Monocyte (%)	CD14+CD45+	18.81	2.40	2.76	4.78	3.76
Myeloid DC (%)	Lin1-CD11c+HLA-DR+	6.18	9.13	7.10	5.85	9.90
Plasmacytoid DC (%)	Lin1-CD123+HLA-DR+	4.70	3.92	3.39	2.76	4.15
Regulatory T cells (%)	CD4+CD25+CD127 <sup>low</sup> Foxp3+	4.26	7.82	7.07	7.58	7.11

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg は、培養開始時の 4.26 ± 1.0% から 7.82% (3 μg/ml 群)、7.07% (5 μg/ml 群)、7.58% (10 μg/ml 群) にそれぞれ増加した。Treg を含め、以下に示す全ての phenotype で各濃度群間において統計学的有意差は見られなかった。



2D10.4/IT2.2、10 µg/ml 群の培養細胞は、Belatacept との比較試験時と同様に Recipient 細胞の Donor 抗原に対する反応を、統計学的有意に濃度依存的に 1 : 8 - 1 : 2 までの濃度で抑制した。この抑制効果は Recipient 細胞の 3rd party 抗原に対する反応に対しては弱いものであった。同様に 5 µg/ml 群の培養細胞は、1 : 4 の濃度で抑制効果が見られたものの、2D10.4/IT2.2 を 3 µg/ml まで濃度を減少させると最高添加濃度でも統計学的に有意な抑制効果はみられなかった。

#### **iv. 考察：**

2D10.4/IT2.2、10 µg/ml 群の培養細胞は、Recipient 細胞の Donor 抗原に対する反応を、統計学的有意に濃度依存的に 1 : 8 - 1 : 2 の濃度まで抑制し、同様に 5 µg/ml 群の培養細胞は、1 : 4 の濃度で抑制効果が見られたものの、2D10.4/IT2.2 を 3 µg/ml まで減少させると最高添加濃度でも抑制効果はみられなかった。これら結果から、我々の strategy において 2D10.4/IT2.2 をこれまでの半量の 5 µg/ml に減少させることができると結論する。

#### **b. e-Bio 抗体と Belatacept の比較検討 （カロリンスカ大学）**

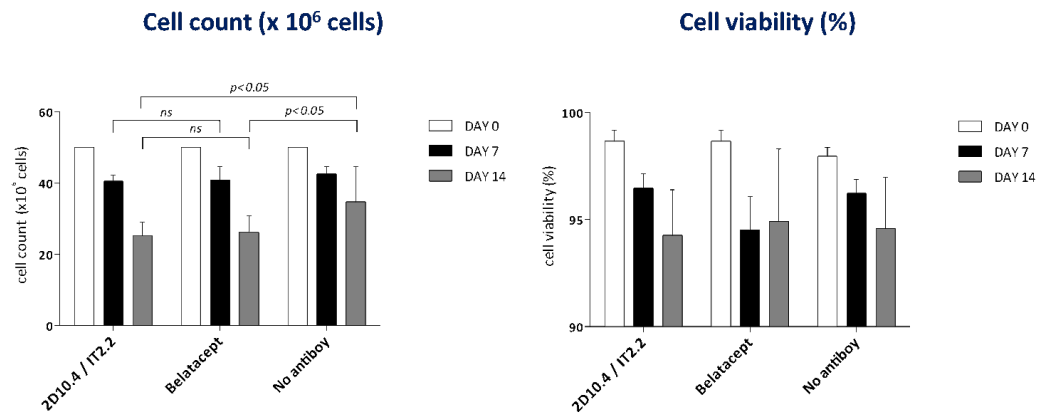
##### **i. 目的：**

e-Bio 抗体は非 GMP レベルで生産性に限りがあり、FDA で認可されている Belatacept と e-Bio 抗体を比較検討して、本プロトコールのより広い臨床応用の可能性を図る。

## ii. 方法:

健常ボランティアから採取された血液から、Lymphoprep™を用いた比重分離法でヒト末梢血単核細胞を分離した。Recipient 細胞 ( $50 \times 10^6$  細胞) を、異なる血液ドナーから同様に採取分離した放射線照射 (30Gy) ヒト末梢血単核細胞 (Donor 細胞;  $20 \times 10^6$ ) を e-Bio 抗体 (2D10.4/IT2.2;  $10 \mu\text{g/ml}$ ) もしくは、CTLA4-Ig (Belatacept;  $133 \mu\text{g/ml}$ ) と共に培養した。培養は、upright  $25 \text{ cm}^2$  culture flasks を用い、非動化した recipient serum ( $0.15\text{ml}$ ; 1%, v/v) を含む RPMI 溶液を最終容量 15 mL に調整し、 $37^\circ\text{C}$ 、5% 二酸化炭素濃度下で行った。培養 7 日目に細胞を回収洗浄した後、培地、抗体 (2D10.4/IT2.2 もしくは、CTLA4-Ig) 放射線照射 (30Gy) ヒト末梢血単核細胞 (Donor 細胞;  $20 \times 10^6$ ) を加えさらに培養を継続した。培養 14 日目に細胞を回収洗浄後以下に示す解析を行った。培養は、比較対象群として何ら抗体を加えない群 (no antibody 群) も作成し、HLA ミスマッチの 8 ペアで検討した。

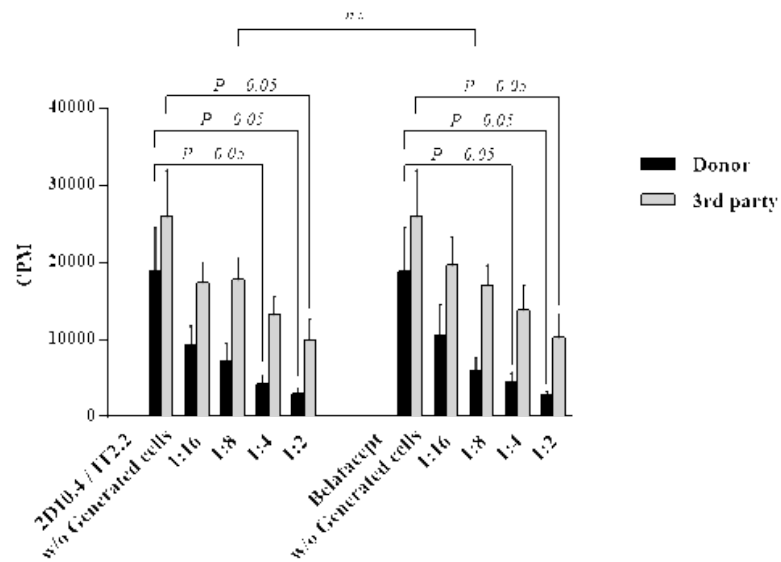
## iii. 結果:



細胞数は、14 日間の培養で、培養開始時の細胞数 ( $50 \times 10^6$  細胞) の 64.5% (2D10.4/IT2.2 群)、66.5% (Belatacept 群)、85.4% (no antibody 群) にそれぞれ減少した。Viability は、いずれの群の細胞も 94% 以上であった。細胞数、viability いずれにおいても、2D10.4/IT2.2 群と Belatacept 群間で統計学的有意差は見られなかった。

Cultured cells	Phenotype	Cell Culturing						
		Before	DAY 7			DAY 14		
			2D10.4/IT2.2	Belatacept	NA	2D10.4/IT2.2	Belatacept	NA
Cell count (% of initial)	-	100	80.99%	81.65%	87.95%	64.47%	66.54%	85.39%
cell viability (%)	-	98.65%	95.49%	94.64%	96.81%	94.73%	95.16%	94.52%
CD4+ T cell (%)	CD3+CD4+	48.81	49.59	49.45	51.51	54.43	52.32	52.02
CD8+ T cell (%)	CD3+CD8+	46.62	45.43	45.44	43.07	40.61	41.44	41.54
B cells	CD3-CD19+	4.63	3.61	3.70	3.50	4.11	4.67	2.58
NK cell (%)	CD3-CD16+CD56+CD45+	11.90	7.49	7.59	8.82	5.75	5.84	9.43
Monocyte (%)	CD14+CD45+	9.28	0.76	0.56	0.50	0.08	0.10	0.03
Myeloid DC (%)	Lin1-CD11c+HLA-DR+	2.38	1.28	0.95	1.51	0.39	0.57	0.89
Plasmacytoid DC (%)	Lin1-CD123+HLA-DR+	0.75	0.11	0.11	0.33	0.36	0.78	0.90
Regulatory T cells (%)	CD4+CD25+CD127 <sup>low</sup> Foxp3+	4.11	4.51	4.44	4.55	7.11	7.34	6.71

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg は、14 日間の培養中に培養開始時の 4.1 ± 1.0% から 7.1 ± 2.6% (2D10.4/IT2.2 群)、7.3 ± 2.6% (Belatacept 群) にそれぞれ増加した。Treg は主に後半の培養期間中に増加した。Treg を含め、いずれの phenotype においても、2D10.4/IT2.2 群と Belatacept 群間で統計学的有意差は見られなかった。



2D10.4/IT2.2 群と Belatacept 群の培養細胞は、Recipient 細胞の Donor 抗原に対する反応を、統計学的有意に濃度依存的に抑制した。この抑制効果は Recipient 細胞の 3rd party 抗原に対する反応に対しては弱いものであった。この抑制効果において、2D10.4/IT2.2 群と Belatacept 群間では統計学的有意差は見られなかった。

#### iv. 考察

Recipient 細胞の Donor 抗原に対する反応に対して、2D10.4/IT2.2 群と Belatacept 群の培養細胞はいずれも、濃度依存性に抑制効果を示した。また、培養中に 2D10.4/IT2.2 群と Belatacept 群でいずれにおいても Treg の%、delta-2 FOXP3 mRNA 発現はいずれも増加し、ELISpot assay 及び、MLC では IFN $\gamma$  産生は抑制され、IL-10 は増加していた。いずれの結果も培養細胞の Donor 抗原特異的な免疫抑制効果を示す結果である。特記すべきは、



### **c. リコンビナント抗体開発と機能検討（順天堂大学）**

#### **i. 目的：**

北海道大学グループによるパイロット研究では、ドナー抗原特異的アナジー細胞の確保に、マウス抗ヒト CD80/CD86 抗体（eBioscience 社製、2D10、IT2.2）を約 25mg (10 $\mu$ g/ml)もの高容量が必要であった。抗体に関わる多額なコスト、動物性タンパクによるロット間の不均一性による安定供給、さらにはヒト化抗体や GMP グレードへの発展性の乏しさが問題であった。今回、Abwizbio 社(以下 Abwiz)の協力を得て、抗体を酵母で産生するリコンビナント製法を用いて、70%ヒト化型した抗ヒト CD80/CD86 キメラ抗体（R3GB8, R2F1）を作成した。このリコンビナント製法により、よりヒト抗体に近く、動物性由来物のない、均一な抗体を安価大量生産する可能性が広がった。このリコンビナント抗体を既存の eBioscience 社製(以下 eBio)のものと比較検討した。

#### **ii. 方法：**

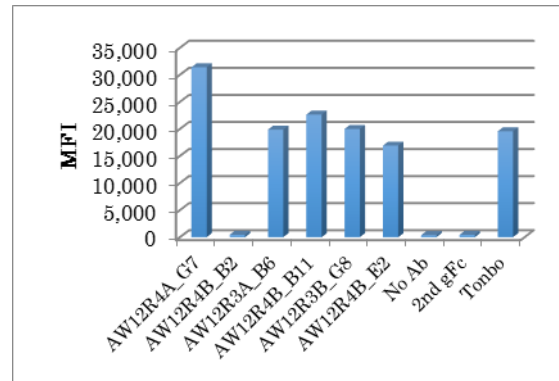
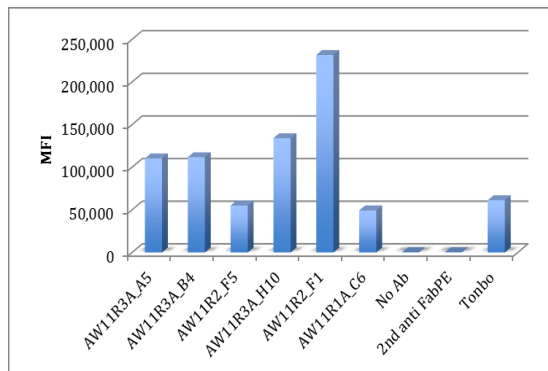
（抗 CD80/CD86 抗体（R3GB8, R2F1）の作成）Balb/c マウスにリコンビナント・ヒト CD80/86 Fc プロテインを免疫感作する。そのマウスの脾臓から mRNA を抽出し、cDNA を合成、RT-PCR により増幅した遺伝子よりファージディスプレイ・ライブラリーを構築する。ライブラリー内のクローンの、CD80-Fc、CD86-Fc を ELISA で定量評価する。同定した CD80/86 に結合する Fab 抗体の DNA 配列を解析し、フローサイトメーターで同 Fab 抗体の CD80 と CD86 の親和性を評価した。

（リコンビナント抗体の効果）反応細胞提供者と刺激細胞提供者を募り、各人の末梢血から末梢血単核球を分離した。刺激細胞には 30Gy の放射線を照射した。反応細胞(R)、刺激細胞(S)ともに 2x10<sup>6</sup>/ml に調整、R/S 比を 1:1 に設定し、リンパ球混合試験(mixed lymphocyte reaction: MLR)を施行した。MLR に Abwiz リコンビナント抗 CD80/CD86 抗体（R3GB8, R2F1）並びに既存 eBio 抗体(2D10、IT2.2)を種々の濃度で添加し、抑制効果の評価項目として、培養 2 日目に反応細胞の IL-2 メッセージと、培養 6 日目にトリチウム取り込みによる分化増殖能を確認した。

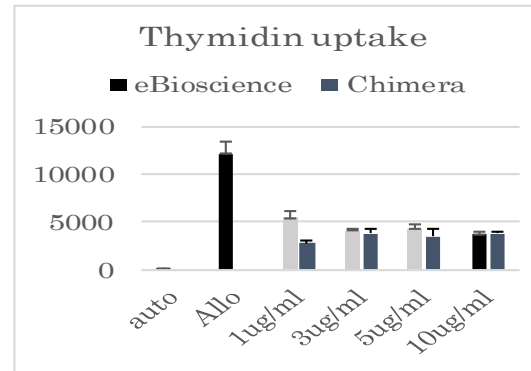
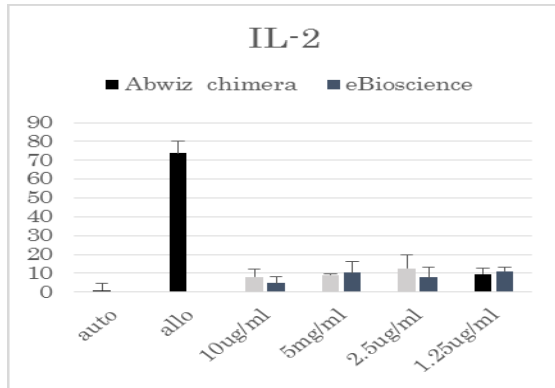
刺激細胞には 30Gy の放射線照射後、反応細胞(R)、刺激細胞(S)ともに 1x10<sup>6</sup>/ml に調整、臨床試験の培養条件に沿って、R/S 比 2 で混合培養した。その中に抗 CD80/CD86 抗体を既存 eBio 抗体(2D10、IT2.2)、Abwiz リコンビナント抗体（R3GB8, R2F1）を各 150 $\mu$ g (10 $\mu$ g/ml)、45 $\mu$ g (3 $\mu$ g/ml)、15 $\mu$ g (1 $\mu$ g/ml)添加した。培養一週間後に生細胞を取り出し、1x10<sup>6</sup>/ml に調整し、新たに各抗体を 10 $\mu$ g/ml、3 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml の濃度で添加した培地で、同数の刺激細胞とさらに 1 週間共培養し、抗原特異的アナジー細胞

を誘導した。同細胞の抑制効果は、同じ反応細胞と刺激細胞のペアで MLR を組み、その中に培養誘導したアナジー細胞をアナジー細胞/反応細胞比が 0.5、0.25、0.125 で移入する実験系を組んだ。培養 5 日目に  $^3\text{H}$ -Thymidine を入れ、その 18 時間後にシンチレーションカウンターにてその取り込みを測定した。

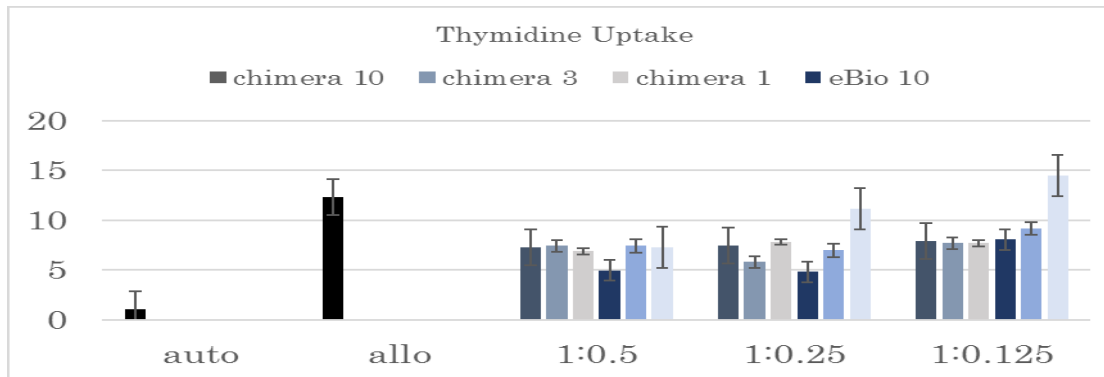
### iii. 結果：



ファージディスプレイ・ライブラリーから選定して FACS で親和性が高いものは、Anti-CD80 抗体は、3 種類のクローン(R2F1, R3AB4, R3AG8)、Anti-CD86 抗体は 2 種類(R3BG8, R4AG7)存在した。リンパ球混合試験を用いて各クローンのブロッキングによる抑制効果をそれぞれ 10ug/ml 濃度で施行した。その結果、anti-CD80 は R2F1, anti-CD86 は R3GB8 を選定した



培養 2 日目の反応細胞に発現する IL-2 の mRNA は、既存 eBio 抗体と Abwiz リコンビナント抗体ともに、抗体なしのコントロール群と比較していずれの抗体濃度でも十分に抑制されていた(図 1)。培養 6 日目の MLR の抑制効果は両群間で有意な差はなかった。



eBio 社製抗体使用群で、アナジー細胞/反応細胞比を 0.25、0.125 とすると培養液中の抗体濃度を 1 $\mu$ g/ml にした場合のみ他群と比較して抑制率は低かった(図 3)。一方で新規リコンビナント・キメラ抗体で誘導したアナジー細胞は 1 $\mu$ g/ml でも抑制効果は 10 $\mu$ g/ml と変わらない結果であった。

#### iv. 考察

今回の臨床研究において使用する抗 CD80/CD86 抗体は細胞培養の際にだけ用いるものである。培養液から取り出した細胞は 4~5 回生理食塩水で洗浄され、死滅したドナー細胞とともに抗体も除去されるため、臨床上問題となることはないと推測する。一方で、治療法の標準化と普及にあたり、今回のリコンビナント抗体開発に伴い、動物由来成分を含まず、ロット間差異の少ない均一な抗体を安定して大量に供給することが可能になった。さらには、本研究で確認された有効なリコンビナント抗体は、本治療法の医薬品として承認や海外輸出に向けての抗体の GMP(Good Manufacturing Practice)グレード化の基盤となると思われる。

### **・マイルストーンの達成状況**

制御性 T 細胞の効率的誘導・増殖法の開発については、e-Bio 抗体の至適濃度を確定でき ( 3 ~ 5  $\mu$ g / ml 以上 ) Belatacept は 4 0 n g / ml で e-Bio 抗体と同じような制御性 T 細胞誘導作用があることが分かった。また、リコンビナント抗体は GFMP 認証を得るにはいまだ時間が必要だが、少なくとも e-Bio 抗体と同じかそれ以上の制御性 T 細胞の誘導機能があることが分かった。達成状況は前 2 点で 1 0 0 %、リコンビナント抗体は 5 0 %といえる。

#### 4) 研究開発分担者

北海道大学大学院医学研究科教授 山下健一郎、  
東京女子医大大学院医学研究科教授 江川裕人  
広島大学大学院医学研究科教授 大段秀樹  
久留米大学医学部教授 奥田康司

#### 分担研究開発課題名：生体肝移植における制御性 T 細胞を用いた細胞治療法の確立

- a 再生医療法等安全確保法を遵守した生体肝移植の推進
- b. 細胞輸送法の開発

#### ・研究開発成果の内容

##### a 再生医療法等安全確保法を遵守した生体肝移植の推進

##### i. 目的：

先行研究で得られた制御性 T 細胞による細胞治療で免疫寛容を獲得した症例の臨床的及び移植免疫学的結果を、より多くの生体肝移植患者（目標 40 例）で確認して、本治療法の肝移植後の免疫療法における確立を図る。

##### ii. 方法：

認定細胞種（第三種）に従った認定再生倫理委員会の設置と、研究計画書、細胞加工施設、加工細胞などの承認：2014年11月25日に施行された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」を遵守して、認定再生倫理委員会の設置と、研究計画書、細胞加工施設、加工細胞などの承認を得る。

##### iii. 結果：

(1)。研究計画書：北海道大学認定倫理委員会に提出する研究実施計画書は以下の通りである。

##### ・参加施設

北海道大学大学院医学研究科・移植外科学講座

聖マリア学院大学院看護学研究科・移植医療研究講座

順天堂大学大学院医学研究科・アトピー疾患研究センター

東京女子医科大学病院・消化器外科

広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門 消化器・移植外科学

久留米大学医学部 外科学講座

##### ・研究代表者

所 属： 北海道大学大学院医学研究科・移植外科学講座

氏 名： 山下 健一郎

## ・研究実施計画書

### 1 研究の概要

#### 1.1 研究課題名

肝移植における自己由来制御性T細胞を用いた免疫寛容誘導法の多施設共同臨床研究

#### 1.2 目的

生体肝移植においてドナー抗原特異的な制御性T細胞を自己末梢血より体外 (*ex-vivo*) で誘導してこれを肝移植術後に輸注し、免疫抑制剤の減量・中止を図る。

#### 1.3 対象患者およびドナーの適格性基準

##### (1) 患者 (レシピエント)

再生医療等提供機関に入院中の末期肝不全患者を対象とし、以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とする。

##### (a) 選択基準

再生医療等提供機関の移植担当医チームおよび専門医師集団(内科・放射線科・麻酔科・精神科・病理など)で生体肝移植の適応と認められた者。

再生医療等提供機関に設置されている「医の倫理委員会」または同等の組織で、生体肝移植の実施に関して承認を受けた者または承認予定の者。

同意取得時において、年齢が20歳以上の者(上限は再生医療等提供機関における移植患者の適格性基準に準ずる)。

研究の参加にあたり、研究に関して十分な説明を受けた後、研究内容を十分理解の上で、本人の自由意志により文書で同意が得られた者。

##### 【設定根拠】

評価対象集団として適切な患者を選択するため  
生体肝移植の科学的・倫理的妥当性を評価するため

##### (b) 除外基準

研究に参加するにあたり、十分な判断力がないまたは意識がない者。

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律(平成25年11月27日法律第85号)」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令(平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて(平成26年10月31日医政研発1031第1号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知)第7条第3号関係に掲げられた既往歴のある者。但し、以下に該当する場合には除外する必要がない。

(1)-(ウ)悪性腫瘍のうち肝細胞がん

(1)-(カ)肝疾患

(2)-(ア)B型肝炎ウイルスおよび(イ)C型肝炎ウイルス

(3) 活動性の感染でないもの

血圧が以下の基準に該当するコントロール不良な者。

1) 収縮期血圧が90mmHg未満または180mmHg以上

2) 拡張期血圧が50mmHg未満または100mmHg以上

その他、医学的理由等により、研究責任医師または研究分担医師が不適切と判断した者。

#### 【設定根拠】

評価対象集団として適切な患者を選択するため

細胞提供者としての適格性を評価するために設定した。ただし、肝移植の適応となる患者は(1)-(ウ)悪性腫瘍のうち肝細胞がん、(1)-(カ)肝疾患、(2)-(ア)B型肝炎ウイルスおよび(イ)C型肝炎ウイルスによる原疾患の悪化に起因することから除外基準の例外とした。さらに、サイトメガロウイルス、EBウイルス及びウエストナイルウイルスは評価対象集団として適切な患者を選択するため活動期の感染のみを除外することとした。

アフエレーシス実施時の安全性を確保するため

#### (2) ドナー

以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とする。

##### (a) 選択基準

レシピエントの2親等または配偶者（ただし、許容されるレシピエントとの親等は再生医療等提供機関における適格性基準に準ずるものとする）。

心身ともに健康で、自発的な臓器提供意思を示している者。

同意取得時において、年齢が20歳以上、65歳以下の成人。

血液型が、患者と一致ないし適合した者。

再生医療等提供機関の移植担当医チームおよび専門医師集団（内科・放射線科・麻酔科・精神科・病理など）で生体肝移植のドナーとして適切であると認められた者。

再生医療等提供機関に設置されている「医の倫理委員会」または同等の組織で、生体肝移植の実施に関して承認を受けた者または承認予定の者。

スクリーニング時検査にて以下の基準に該当する者

1) 血小板が $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ 以上

2) ヘモグロビンが12.0g/dL以上

アフエレーシスに用いる血管を確保できる者。また、もし確保できない場合にはカテーテル挿入の同意を得られる者

研究の参加にあたり、研究に関して十分な説明を受けた後、研究内容を十分理解の上で、本人の自由意志により文書で同意が得られた者。

#### 【設定根拠】

生体肝移植を行うために適切なドナーを選択するため

生体肝移植の科学的・倫理的妥当性を評価するため

アフエレーシスを安全に施行するため

##### (b) 除外基準

研究に参加するにあたり、十分な判断力がない者。

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成25年11月27日法律第85号）」

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令（平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号）」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて（平成26年10月31日医政研発1031第1号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知）第7条第3号関係に掲げられた既往歴のある者。但し、以下に該当する場合には除外する必要がない。

(3) 活動性の感染でないもの

血圧が以下の基準に該当するコントロール不良な者。

1) 収縮期血圧が90mmHg未満または180mmHg以上

- 2) 拡張期血圧が 50mmHg 未満または 100mmHg 以上  
その他、医学的理由等により、研究責任医師または研究分担医師が不適切と判断した者。

#### 【設定根拠】

適切なドナーを選択するため  
細胞提供者としての適格性を評価するため  
アフエーシス実施時の安全性を確保するため

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて（平成26年10月31日医政研発1031第1号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知）第7条第3号関係に掲げられた既往歴について

(1) 次に掲げる既往歴を確認するとともに、輸血又は移植を受けた経験の有無等から、適格性の判断を行うこと。ただし、適格性の判断時に確認できなかった既往歴について後日確認可能となった場合は、再確認することとする。

- (ア) 梅毒トレポネーマ、淋菌、結核菌等の細菌による感染症
- (イ) 敗血症及びその疑い
- (ウ) 悪性腫瘍
- (エ) 重篤な代謝内分泌疾患
- (オ) 膠原病及び血液疾患
- (カ) 肝疾患
- (キ) 伝達性海綿状脳症及びその疑い並びに認知症
- (ク) 特定の遺伝性疾患及び当該疾患に係る家族歴

(2) 特に次に掲げるウイルスについては、問診及び検査（血清学的試験、核酸増幅法等を含む。）により感染していないことを確認すること。

- (ア) B型肝炎ウイルス（HBV）
- (イ) C型肝炎ウイルス（HCV）
- (ウ) ヒト免疫不全ウイルス（HIV）
- (エ) ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）
- (オ) パルボウイルスB19（ただし、必要な場合に限る。）

(3) 免疫抑制状態の再生医療等を受ける者に特定細胞加工物の投与を行う場合は、必要に応じて、サイトメガロウイルス、EBウイルス及びウエストナイルウイルスについて検査により感染していないことを確認すること。

#### 1.4 研究の方法

##### (a) 試験デザイン

探索的非対照非盲検非ランダム化多施設共同試験

##### (b) 試験物の調製方法

ドナーの末梢血から成分採血装置を用いて単核細胞（目標細胞数： $4 \times 10^9$  個以上）を採取し、凍結保存する。

患者末梢血から成分採血装置を用いて単核細胞（目標細胞数： $5 \times 10^9$  個以上）を採取する。採取したドナー単核細胞の半数（目標細胞数： $2 \times 10^9$  個以上）を解凍し、患者血漿と抗CD80抗体と抗CD86抗体の存在下で、患者単核細胞と共培養する。

1週間後、培養細胞を回収し、再度、残りのドナー単核細胞（目標細胞数： $2 \times 10^9$  個以上）を解凍し、患者血漿と抗CD80抗体と抗CD86抗体の存在下で、患者単核細胞と共培養する。1週間後、培養細胞を回収、洗浄し、生理食塩液100 mlに浮遊させる。

##### (c) 試験物の品質試験

試験物の製造工程にて発生する中間試験物および最終試験物は、以下の試験項目について判定基準を満たしたものとす。

- 1) 工程管理試験1：調製後ドナーリンパ球細胞



試験項目	工程管理規格
細胞数測定	なし（参考値）
生存率	70%以上

2) 工程管理試験2：調製後患者リンパ球細胞

試験項目	工程管理規格
細胞数測定	なし（参考値）
生存率	70%以上
表面抗原	なし（参考値）

3) 工程管理試験3：培養細胞（7日目）

試験項目	工程管理規格
細胞数測定	なし（参考値）
生存率	なし（参考値）

4) 工程管理試験4：培養細胞（10日目）

試験項目	工程管理規格
マイコプラズマ否定試験	適合
無菌試験	陰性

5) 最終試験物

項目	品質規格
外観	異物の混入を認めない 色調の異常を認めない 容器の損傷を認めない
総細胞数	1×10 <sup>8</sup> 個以上
生存率	70%以上
表面抗原	CD4+CD25+Foyp3+を含むこと
無菌試験	菌の発育を認めない
マイコプラズマ否定試験	陰性
エンドトキシン試験	1.0EU/mL 未満

6) 試験物の出荷判定基準

製造工程

製造の各工程について、異常・逸脱のないこと

品質試験

項目	試料	品質規格
外観	試験物	異物の混入を認めない
総細胞数	試験物	1×10 <sup>8</sup> 個以上
生存率	試験物	70%以上
無菌試験	工程管理試験4で 用いられる培地	微生物の増殖を認めない
マイコプラズマ否定試験	工程管理試験4で 用いられる培地	陰性
エンドトキシン試験	試験物	1.0EU/mL 未満

二次包装形態

項目	規格
ラベルの貼付	試験物の容器に、患者登録番号、製造番号、使用期限を記載したラベルが貼付されている
添付文書の有無	試験物に「用法・用量・効能または効果ならびに使用上の注意または取扱い上の注意」が添付されている

(d) 移植術後の免疫抑制剤の使用

規定の方針（詳細は「7.7 免疫抑制療法と、免疫抑制剤の減量・離脱」を参照）に則り、患者の臨床所見に合わせて減量を行う。

1.5 評価項目

(a) 主要評価項目

肝移植術後30ヶ月時点における免疫抑制剤の完全離脱率

ここでの完全離脱率は“全免疫抑制剤の投与を中止してから、その1年後まで継続して免疫抑制剤の投与がなかった患者の割合”と定義する。

(b) 副次的評価項目

肝移植術後1年（12ヶ月）、2年（24ヶ月）、3年（36ヶ月）、4年（48ヶ月）、5年（60ヶ月）時点における各免疫抑制剤の投与量の推移

全免疫抑制剤の投与を中止してからの離脱期間

年齢別の、肝移植術後30ヶ月時点における免疫抑制剤の完全離脱率

自己由来制御性T細胞の安全性（有害事象の頻度と程度）

患者に対するアフエレーシス実施中の安全性（有害事象の頻度と程度）

1.6 目標症例数

40例

1.7 研究実施期間

症例登録期間：試験実施計画書承認日～平成32年3月31日

研究実施期間：試験実施計画書承認日～平成37年4月30日

1.8 再生医療等提供機関

国立大学法人北海道大学病院

学校法人東京女子医科大学病院

国立大学法人広島大学病院

1.9 研究体制

(1) 研究代表者：

山下 健一郎（北海道大学大学院医学研究科 移植外科学講座、特任教授）

(2) 研究分担者（試験分担医師）

藤堂 省（聖マリア学院大学院 看護学研究科・移植医療研究講座、教授）

奥村 康（順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター、教授）

江川 裕人（東京女子医科大学 消化器外科、教授）

大段 秀樹（広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門 消化器・移植外科学、教授）

奥田 康司（久留米大学病院 消化器外科 肝胆膵外科、教授）

## 2 研究の背景

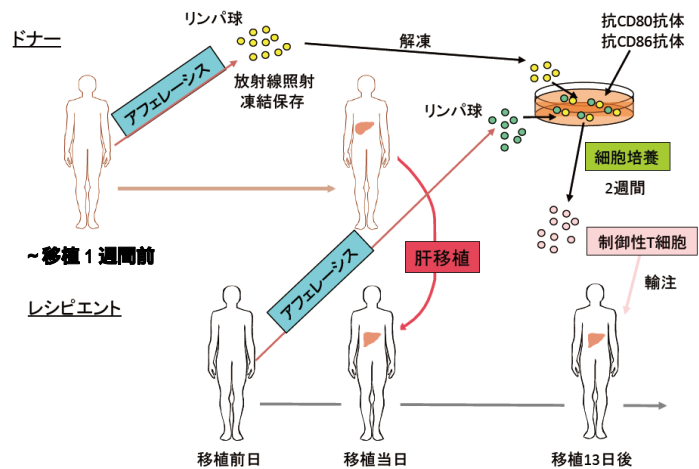
### 2.1 対象疾患について

肝臓移植は末期肝不全患者に対する究極の治療法として広く普及してきた。1963年に世界初の臨床肝移植が行われたが、これまでに約30万件以上、現在では、年間に海外で2万例以上、我が国でも500例以上の症例を数える。この肝移植の発展は手術手技・臓器保存・術前術後管理などの進歩によるが、中でも移植後の拒絶反応を抑制するために用いられる免疫抑制剤の改良が大きく貢献してきた。これまでに用いられた、アザチオプリン(1960-70年代)、シクロスポリン(1980年代)、タクロリムス(1990年代以降)により、1年および5年患者生存率はそれぞれ35%と20%、70%と60%、80%と70%と飛躍的に向上してきている<sup>1,2)</sup>。

しかし、これら免疫抑制剤の使用は生涯継続される必要があるため、患者は感染症・発癌・薬剤による副作用等の危険性に常に晒され、医学的にも又、医療経済の上からも未解決の重要な問題である。こうした課題を解決するには、免疫抑制剤を中止してもグラフトが正常に機能する、いわゆる免疫寛容の誘導が必須である。

### 2.2 本研究の概略

本研究は、生体肝移植手術を受ける末期肝不全患者を対象とする。生体ドナー(肝臓提供者)から原則として肝移植手術1週間前までに、また肝レシピエント(肝移植を受ける患者)からは肝臓移植手術の前日に、リンフォアフエレーシス法でリンパ球を採取する。採取したレシピエントリンパ球を、放射線を照射して不活化したドナーリンパ球(抗原)および抗CD80/抗CD86モノクローナル抗体と共に2週間、培養して制御性T細胞を誘導する。この制御性T細胞を含む患者リンパ



球を、肝移植後13日目に患者へ静脈内投与する。本研究で使用する免疫抑制剤は、通常の肝移植に使用するものと基本的に同じだが、体内リンパ球を一時的に減らす目的でシクロホスファミドを手術後5日目に投与する。副腎皮質ステロイドやミコフェノール酸モフェチルをはじめとした代謝拮抗薬は原則術後1ヶ月以内に中止する。その後、移植後6ヶ月目までタクロリムスもしくはシクロスポリンのカルシニューリン阻害薬単剤で免疫抑制を維持し、6ヶ月目以降は本剤を1日1回、その後は3ヶ月毎に、週3回、週2回、週1回と服用回数を減らし、最終的に免疫抑制剤の完全中止を図ることで『免疫寛容』の獲得を目標とする。

### 2.3 非臨床試験の成績

#### (1) 免疫寛容と制御性T細胞

1970年代初頭より、小動物を用いた自己免疫疾患や臓器移植モデルにおいて免疫寛容状態にあるレシピエントには抑制性(suppressor)T細胞が存在することが見いだされ、このリンパ球をnaïveな宿主に移入(adoptive transfer)することで、免疫寛容を移すことができる(infectious tolerance)ことなどからも、suppressor T細胞の研究は進んだ。共同研究者の奥村は<sup>3)</sup>このsuppressor T細胞を1970年代初頭に世界に先駆けて発表した移植免疫学分野における第一人者のひとりである。抑制性T細胞に関する研究は、その細胞学的同定法の確立が困難であったこと

からいったん衰退したが、最近、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>や Foxp3<sup>+</sup>といった phenotype/marker の発見から、再び制御性 T 細胞 (regulatory T cell: T-reg) として注目されるようになり<sup>4)</sup>、*in vitro* や小動物移植モデルを中心に同細胞を用いた有効性が多数報告されている<sup>5)</sup>。

## (2) 自己由来制御性 T 細胞の *ex vivo* 誘導・増殖

同種臓器移植において移植片拒絶反応は主にレシピエントの細胞性免疫によって引き起こされる。この細胞性免疫はドナー抗原特異的な反応で、樹状細胞などの抗原提示細胞によって提示されたドナー抗原をヘルパーCD4<sup>+</sup> T 細胞が認識し、エフェクターCD8<sup>+</sup> T 細胞が活性化されて、最終的に拒絶反応が引き起こされる。ヘルパー T 細胞の活性化には副刺激 (costimulation) が必要であることが 1990 年代始めに知られるようになったが、奥村らのグループは T 細胞上の CD28 と抗原提示細胞上の CD80/CD86 が結合することでこの副刺激が伝わること、細胞培養液中に抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体を添加することで、レシピエント T リンパ球はドナー抗原提示細胞に対して免疫反応を起こさないこと、その結果、ドナー抗原特異的に不応答 (anergy) の状態に陥ることを見いだした。最近の研究では、anergy となった T 細胞はドナー抗原特異的な制御性 T 細胞 (T-reg) として作用することが判明している。また、共同研究者の奥村・場集田・清野らは、抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体をリンパ球培養液に添加することで *ex vivo* において抗原特異的 T-reg 様細胞の誘導に成功し、本細胞を輸注することで移植片の長期生着をマウス心移植モデルで確認している<sup>6)</sup>。しかも、前臨床試験として同様のプロトコルをサル腎移植モデルで試みた研究で、末梢血単核細胞 (PBMC) をドナー脾細胞と抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体の存在下に共培養し誘導された T-reg 様細胞を移植後 2 週間前後にレシピエントに輸注することで、免疫抑制剤 Cyclosporine の早期離脱をもたらし、免疫抑制フリーの状態でも移植腎は長期生着 (>600 日) し、ドナー抗原特異的免疫寛容誘導に成功している<sup>7)</sup>。

## 2.4 臨床試験の成績

### 自己由来制御性 T 細胞用いた免疫寛容誘導の臨床研究

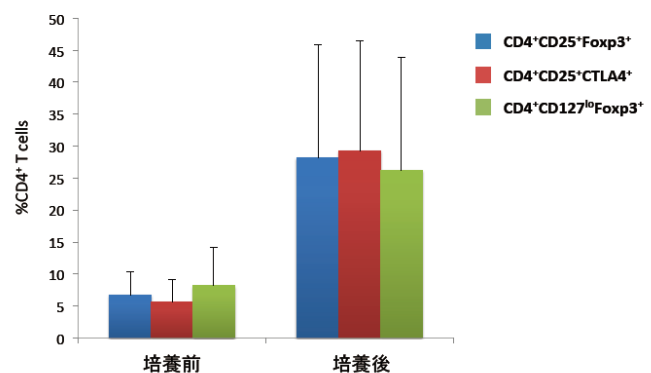
奥村らのサルを用いた前臨床試験の結果<sup>7)</sup>にもとづき、2008 年 8 月から現在までに東京女子医大腎センターにおいて、12 例の生体腎移植患者に対し同治療法が試みられた<sup>8)</sup>。腎移植患者とそのドナーから採取した PBMC を抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下に混合培養して誘導した制御性細胞を輸注し、腎移植後の免疫抑制剤シクロスポリン (CyA)、ミコフェノール酸モフェチル、メチルプレドニゾロンを漸減したところ、通常の免疫抑制療法を実施したコントロール群に比べ、シクロスポリンやミコフェノール酸モフェチルの 1/2-1/5 程度の投与量減量に成功している。

北海道大学では、奥村らの研究プロトコル<sup>7)</sup>を応用し、自主臨床研究 010-0070「制御性 T 細胞治療による肝移植における免疫寛容誘導法の開発 (UMIN 試験 ID:

UMIN000015789)」として 2010 年より生体肝移植患者 10 名において細胞治療の有効性を検証すべくパイ

ロット臨床試験を行った<sup>9)</sup>。*Ex vivo* において肝移植患者由来 PBMC をドナー抗原 (放射線照射済 PBMC) で刺激し、抗 CD80 および抗 CD86 抗体の存在下に 2 週間 PBMC を培養したところ、

図1



CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞や CD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞などの制御性 T細胞は高率に誘導された(図1)。また、これら誘導された細胞をリンパ球混合培養(MLC: mixed lymphocyte culture)に添加することで、*in vitro*においてドナー抗原に対するリンパ球増殖反応は添加細胞数に依存して抑制された(図2)。肝移植術後13日目に培養細胞を輸注し、術後6ヶ月目より免疫抑制剤の減量を図った。培養細胞の輸注に伴う有害事象は認められず、細胞治療の安全性は確認された。細胞治療を実施した10例中全症例で免疫抑制剤の早期減量が可能であった。なかでも7症例は免疫抑制剤から完全離脱しており、現時点において既に6~23ヶ月間、免疫抑制剤フリーで経過している(表1)。細胞治療後の症例では、術後末梢血中のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>やCD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞といったいわゆる制御性 T細胞を示すフェノタイプが増加しており、免疫寛容の誘導が期待される。

図2

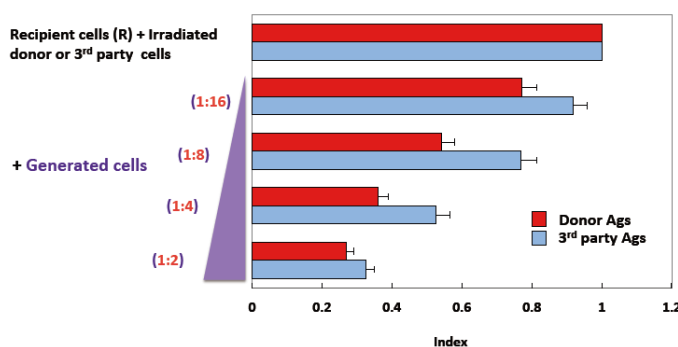


表1: 生体肝移植における制御性T細胞による細胞治療の有効性

Case	Infused Total (x10 <sup>8</sup> )	cells CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> (x10 <sup>7</sup> )	Days after LDLT	IS at present (trough level: ng/ml)	LFTs <sup>2</sup> : AST/ALT/γGTP (IU/L)	Time free of IS	DSA	Remarks
#1	6.1	3.1	1333	off	20/19/12	23 mo	Negative	CMV Hepatitis (POD 35)
#2	25.4	46.6	1256	off	23/26/18	22 mo	Class II (+)	Graft MHV thrombus (POD 608)
#3	7.9	9.4	1228	off	26/27/64	22 mo	Class II (+)	FK neurotoxicity (POD 14) FK→CsA conversion
#4	24.5	44.1	1123	off	5/5/8	19 mo	Negative	Intra-graft bleeding after LBx
#5	6.3	4.3	1039	FK 3.5 mg/d (7.9)	17/11/18	-	Negative	Mild ACR @ IS weaning (POD 394)
#6	11.8	27.2	997	MMF 500 mg/d + PSL 7.5 mg/d	22/13/16	-	Negative	Brachial plexus neuritis (POD 206) Mild ACR @ IS weaning (POD 311)
#7	25.9	31.8	976	off	33/36/23	13 mo	Negative	-
#8	7.0	30.4	899	off	19/15/14	8 mo	Negative	-
#9	5.9	3.3	836	FK 4 mg/d (4.6)	17/10/19	-	Negative	Mild ACR @ IS weaning (POD 365)
#10	12.0	28.9	731	off	22/14/16	6 mo	Negative	-

### 3 研究の目的

生体肝移植においてドナー抗原特異的な制御性T細胞を自己末梢血より体外 (*ex-vivo*) で誘導してこれを肝移植術後に輸注し、免疫抑制剤の減量・中止を図る。

### 4 試験物の概要

試験物名: 自己由来制御性T細胞

製造元: 院内調製

組成: ドナーリンパ球と患者リンパ球を、抗CD80抗体(2D10.4)と抗CD86抗体(IT2.2)の存在下で2週間培養して得られた細胞を、生理食塩液100 mlに浮遊させたもの。

原材料と規格:

ドナーリンパ球：成分採血装置で採取した末梢血単核球（目標細胞数： $4 \times 10^9$  個以上）

患者リンパ球：成分採血装置で採取した末梢血単核球（目標細胞数： $5 \times 10^9$  個以上）

抗CD80抗体（2D10.4）

製造元：バイバイオサイエンス株式会社

品質基準：非GMP製造、エンドトキシンフリー

抗CD86抗体(IT2.2)

製造元：バイバイオサイエンス株式会社

品質基準：非GMP製造、エンドトキシンフリー

性状・剤形：100mL中に自己由来制御性T細胞を含む有核細胞が $1 \times 10^8$ 個以上含まれる液剤。

製造方法：本計画書「7.3 試験物の調製方法」に記載。

品質基準：本計画書「7.4 試験物の品質コントロール」に記載。

作用機序：自己由来制御性T細胞による免疫寛容の誘導

効能効果：上記の作用機序により、肝移植術後の免疫抑制剤の減量、早期中止が期待される。

用法：輸血用フィルターを通して点滴静注する。投与に際しては、はじめはゆっくりと投与を開始し、バイタルサインなどに問題無いことを確認した上で、点滴投与速度を上げて30分程度で細胞輸注を完了する。

保管条件および投与可能期間

保管条件	室温( $20 \pm 10$ )
投与可能期間	充填後 4 時間以内

禁忌：特になし。

主な非臨床試験の成績：カニクイザル腎移植において申請中プロトコルで免疫寛容誘導に成功<sup>7)</sup>

主な臨床使用成績：東京女子医科大学において、腎移植患者を対象に第1/2相臨床試験が実施された。

これまでに12例の患者に本治療法が実施され、治療中止に至る有害事象は発生せず、免疫抑制剤の投与量は1/2-1/5に減量が可能となった<sup>8)</sup>。また、当科において10例の生体肝移植を対象として本細胞治療を行った<sup>10)</sup>。全例で培養細胞投与に付随した有害事象を認めず、7例で免疫抑制剤から完全離脱し、免疫寛容が誘導された。

副作用：本計画書「9.2 予想される不利益（副作用）」に記載。

使用上の注意事項：これまでの臨床試験において本試験物投与に伴う有害事象を認めてはいないが、投与時において担当医師は被験者に対してその安全性についても十分な注意を払う。

試験物の表示例：

試験物名：  
自己由来制御性 T 細胞

患者登録番号  
製造番号 C42- -YYMMDD  
容量 100 mL  
使用期限 充填後 4 時間以内  
( 月 日 : まで )  
保管温度 20 ± 10



本試験物 100mL を患者へ点滴静注する  
本剤は被験者本人に限り使用

研究代表者 山下 健一郎  
北海道大学大学院医学研究科・移植外  
科学講座  
北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目

細胞培養 北海道大学病院臨床研究開発センター  
加工施設 細胞プロセッシングセンター  
北海道札幌市北区北 14 条西 5 丁目

## 5 試験デザイン

探索的非対照非盲検非ランダム化多施設共同試験

### 【設定根拠】

本臨床試験の対象は生体肝移植患者であり、多様で集学的な治療を必要とすることから盲検化は不可能である。また、対象となる可能性がある肝移植患者は全国でも年間 400 例前後であり、対照群を設定することは困難である。

## 6 対象患者およびドナーの適格性基準と登録

### (1) 患者 (レシピエント)

再生医療等提供機関に入院中の末期肝不全患者を対象とし、以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とする。

#### (a) 選択基準

再生医療等提供機関の移植担当医チームおよび専門医師集団(内科・放射線科・麻酔科・精神科・病理など)で生体肝移植の適応と認められた者。

再生医療等提供機関に設置されている「医の倫理委員会」または同等の組織で、生体肝移植の実施に関して承認を受けた者または承認予定の者。

同意取得時において、年齢が 20 歳以上の者(上限は再生医療等提供機関における移植患者の適格性基準に準ずる)。

研究の参加にあたり、研究に関して十分な説明を受けた後、研究内容を十分理解の上で、本人の自由意志により文書で同意が得られた者。

### 【設定根拠】

評価対象集団として適切な患者を選択するため  
生体肝移植の科学的・倫理的妥当性を評価するため

#### (b) 除外基準

研究に参加するにあたり、十分な判断力がないまたは意識がない者。



「再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年 11 月 27 日法律第 85 号）」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて（平成 26 年 10 月 31 日医政研発 1031 第 1 号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知）第 7 条第 3 号関係に掲げられた既往歴のある者。但し、以下に該当する場合には除外する必要がない。

- (1)-(ウ)悪性腫瘍のうち肝細胞がん
- (1)-(カ)肝疾患
- (2)-(ア)B 型肝炎ウイルスおよび(イ)C 型肝炎ウイルス
- (3) 活動性の感染でないもの

血圧が以下の基準に該当するコントロール不良な者。

- 1) 収縮期血圧が 90mmHg 未満または 180mmHg 以上
- 2) 拡張期血圧が 50mmHg 未満または 100mmHg 以上

その他、医学的理由等により、研究責任医師または研究分担医師が不適切と判断した者。

#### 【設定根拠】

評価対象集団として適切な患者を選択するため

細胞提供者としての適格性を評価するために設定した。ただし、肝移植の適応となる患者は(1)-(ウ)悪性腫瘍のうち肝細胞がん、(1)-(カ)肝疾患、(2)-(ア)B 型肝炎ウイルスおよび(イ)C 型肝炎ウイルスによる原疾患の悪化に起因することから除外基準の例外とした。さらに、サイトメガロウイルス、EBウイルス及びウエストナイルウイルスは評価対象集団として適切な患者を選択するため活動期の感染のみを除外することとした。

アフエレーシス実施時の安全性を確保するため

#### (2) ドナー

以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とする。

##### (a) 選択基準

レシピエントの 2 親等または配偶者（ただし、許容されるレシピエントとの親等は再生医療等提供機関における適格性基準に準ずるものとする）。

心身ともに健康で、自発的な臓器提供意思を示している者。

同意取得時において、年齢が 20 歳以上、65 歳以下の成人。

血液型が、患者と一致ないし適合した者。

再生医療等提供機関の移植担当医チームおよび専門医師集団（内科・放射線科・麻酔科・精神科・病理など）で生体肝移植のドナーとして適切であると認められた者。

再生医療等提供機関に設置されている「医の倫理委員会」または同等の組織で、生体肝移植の実施に関して承認を受けた者または承認予定の者。

スクリーニング時検査にて以下の基準に該当する者

- 1) 血小板が  $100 \times 10^3/\mu\text{L}$  以上
- 2) ヘモグロビンが 12.0g/dL 以上

アフエレーシスに用いる血管を確保できる者。また、もし確保できない場合にはカテーテル挿入の同意を得られる者

研究の参加にあたり、研究に関して十分な説明を受けた後、研究内容を十分理解の上で、本人の自由意志により文書で同意が得られた者。



## 【設定根拠】

生体肝移植を行うために適切なドナーを選択するため  
生体肝移植の科学的・倫理的妥当性を評価するため  
アフレーシスを安全に施行するため

### (b) 除外基準

研究に参加するにあたり、十分な判断力がない者。

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成25年11月27日法律第85号）」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令（平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号）」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて（平成26年10月31日医政研発1031第1号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知）第7条第3号関係に掲げられた既往歴のある者。但し、以下に該当する場合には除外する必要がない。

#### (3) 活動性の感染でないもの

血圧が以下の基準に該当するコントロール不良な者。

- 1) 収縮期血圧が90mmHg未満または180mmHg以上
- 2) 拡張期血圧が50mmHg未満または100mmHg以上

その他、医学的理由等により、研究責任医師または研究分担医師が不適切と判断した者。

## 【設定根拠】

適切なドナーを選択するため  
細胞提供者としての適格性を評価するため  
アフレーシス実施時の安全性を確保するため

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて（平成26年10月31日医政研発1031第1号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知）第7条第3号関係に掲げられた既往歴について

(1) 次に掲げる既往歴を確認するとともに、輸血又は移植を受けた経験の有無等から、適格性の判断を行うこと。ただし、適格性の判断時に確認できなかった既往歴について後日確認可能となった場合は、再確認することとする。

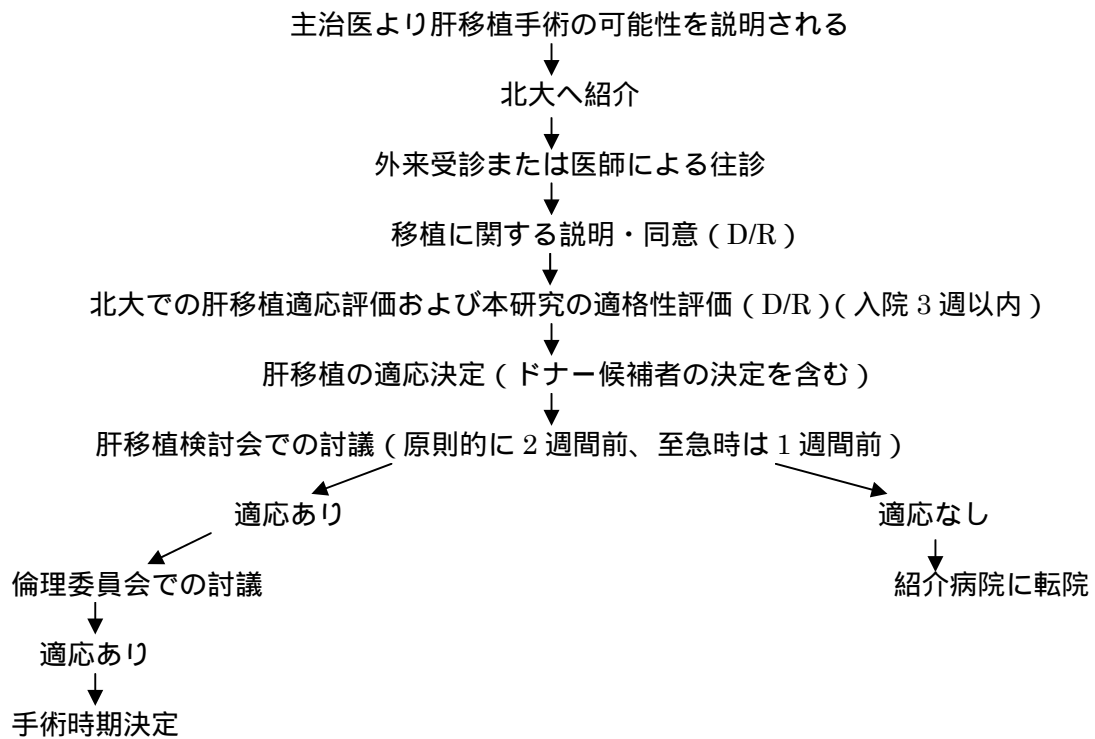
- (ア) 梅毒トレポネーマ、淋菌、結核菌等の細菌による感染症
- (イ) 敗血症及びその疑い
- (ウ) 悪性腫瘍
- (エ) 重篤な代謝内分泌疾患
- (オ) 膠原病及び血液疾患
- (カ) 肝疾患
- (キ) 伝達性海綿状脳症及びその疑い並びに認知症
- (ク) 特定の遺伝性疾患及び当該疾患に係る家族歴

(2) 特に次に掲げるウイルスについては、問診及び検査（血清学的試験、核酸増幅法等を含む。）により感染していないことを確認すること。

- (ア) B型肝炎ウイルス（HBV）
- (イ) C型肝炎ウイルス（HCV）
- (ウ) ヒト免疫不全ウイルス（HIV）
- (エ) ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）
- (オ) パルボウイルスB19（ただし、必要な場合に限る。）

(3) 免疫抑制状態の再生医療等を受ける者に特定細胞加工物の投与を行う場合は、必要に応じて、サイトメガロウイルス、EBウイルス及びウエストナイルウイルスについて検査により感染していないことを確認すること。

<参考> 北海道大学病院における、生体肝移植の実施が決定されるまでの過程



### (3) 登録

#### (a) 同意の取得

研究責任医師または研究分担医師は、対象となる患者およびドナーに対して説明文書に基づいて本臨床研究の内容を説明の上、文書により同意を取得する。

#### (b) スクリーニングの実施と登録

研究責任医師または研究分担医師は、同意を取得したすべての患者およびドナーについてスクリーニングを実施し、選択基準及び除外基準に従って患者およびドナーとしての適格性を検討する。研究責任医師または研究分担医師は、適格と判断される患者およびドナーについて必要情報をEDCへ入力し、症例登録を行う。症例登録により、EDCから患者およびドナーへ登録番号が発番される。

#### (c) 製造に関する情報との連結

製造に関する情報は各細胞培養加工施設の規定に従って番号で管理される。それを製造番号として収集し、登録番号と連結可能な状態で管理する。患者およびドナーの個人情報「22. 個人情報の取扱い」に基づき取り扱う。

## 7 研究の方法

### 7.1 試験のアウトライン

患者およびドナーのリンパ球を採取し、抗CD80抗体、抗CD86抗体存在下で14日間共培養することで、制御性T細胞を誘導・増殖させる。誘導された自己由来制御性T細胞を、肝移植術後13日目に患者へ投与する。免疫抑制療法を規定に従って行い、免疫寛容状態が得られたかを評価する（図3および図4）。

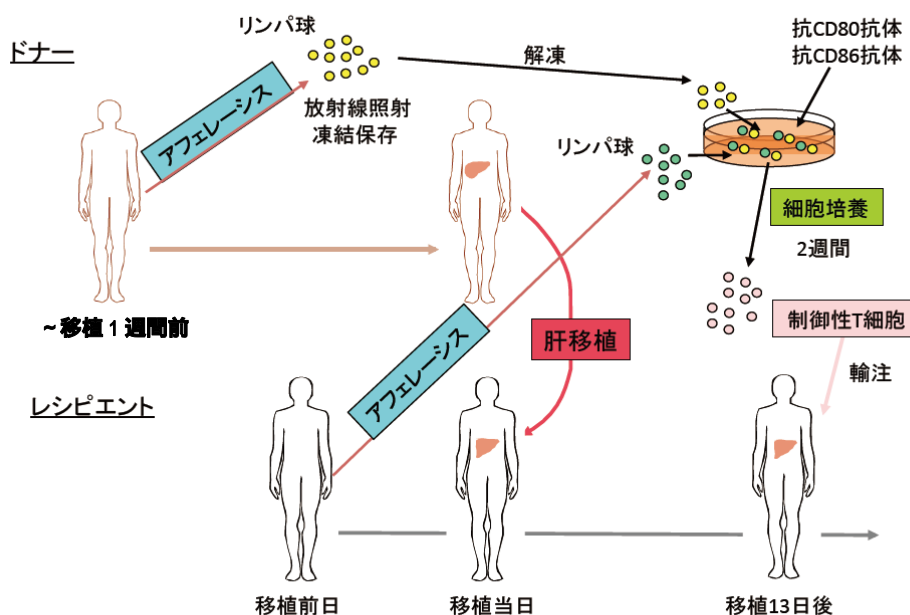


図3 自己由来制御性T細胞を用いた細胞治療法の概略

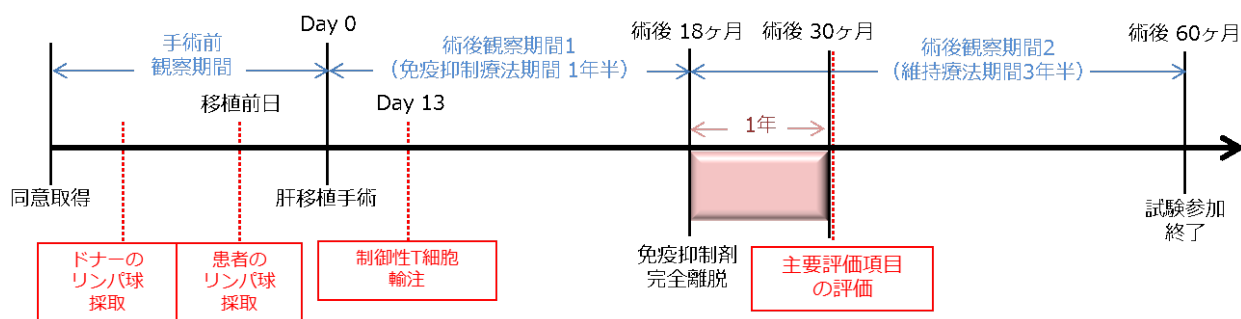


図4 試験期間のアウトライン

## 7.2 患者およびドナーの適格性の判定

「6. 対象患者およびドナーの適格性基準と登録」に従って、患者およびドナーの適格性を判定する。

## 7.3 試験物の調製方法

試験物の調製方法は、別に規定する「特定細胞加工物標準書」に従って実施する。ここでは概要を示す。

### (a) ドナーリンパ球の採取

研究責任医師または研究分担医師は、当日の検査値を踏まえてドナーのアフェレーシス実施の可否を決定する。採取は、日本骨髄バンクドナーリンパ球輸注ドナー適格性基準、採取マニュアル、日本造血細胞移植学会および日本輸血・細胞治療学会のガイドラインを遵守し、各再生医療等提供機関および各細胞培養加工施設の規定に従って、以下の手順で実施する。なお採血および返血ラインの確保に際しては、穿刺部位の消毒を十分に行之、微生物等による汚染について十分配慮することとする。

採取担当者は、細胞採取に習熟した医師および臨床工学技士、臨床検査技師とし、本研究の研究責任医師または研究分担医師はその指示に従うものとする。研究責任医師または研究分担医師は、アフェレーシス実施に立ち合い患者の状態を観察することで、患者の安全確保に努める。

原則として肝移植手術1週間前までに、成分採血装置 (Spectra Optia (テルモBCT) または同等品) を用いてアフェレーシスによりリンパ球を採取する。採取担当者は、穿刺不可と判断した場合で、事前に同意が得られている場合にはカテーテル挿入も検討する。

処理血液量はドナー体重換算 100 ~ 200 ml/kgを目安とし、各再生医療等提供機関における単核球採取効率をもとに決定する。ただし250 ml/kgを超えないこととする。

採取中はドナーの状態に注意し、血管迷走神経反射等の出現により採取の継続が困難となった場合は、採取担当者の判断で採取の一時中断または中止を検討する。

抗凝固剤としてACD液のみを単独で用い、ヘパリンは使用しない。クエン酸中毒予防のため、アフェレーシスの間グルコン酸カルシウムの持続静注を行う。

単核球採取に先立ち自己血漿40 mlを採取する。

再生医療等提供機関に設置されている血液照射装置により、採取細胞に30Gyの放射線照射を行う。

採取細胞を、室温で速やかに細胞培養加工施設へ納品する。

採取目標値は、白血球数で $4 \times 10^9$  個以上とする。なお $1 \times 10^9$  個を超えない場合には、研究責任医師または研究分担医師の判断で再採取を検討する。

(b) ドナーリンパ球の凍結保存

凍結保存は、各再生医療等提供機関の細胞培養加工施設で行う。

採取細胞から、比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離する。

凍結保存は規定された方法で実施する。採取する単核細胞は目標数 $4 \times 10^9$ 個以上で、これを2つの凍結バッグに2分して保存する。

凍害保護液はCP-1（極東製薬）を用い、DMSO 5%、HES 6%の凍結条件とする。CP-1は医薬品ではないが、造血細胞移植の際には、広く日本国内で使用されている。

凍害保護液を加えた細胞は、 $-150$  の冷凍庫に静置して凍結し、そのまま使用時まで $-150$  の冷凍庫に保管する。

(c) 患者リンパ球の採取

研究責任医師または研究分担医師は、当日の実施可否判定基準に従って患者のアフェレーシス実施の可否を決定する。採取は、各再生医療等提供機関の規定に従って、以下の手順で実施する。なお採血および返血ラインの確保に際しては、穿刺部位の消毒を十分に行い、微生物等による汚染について十分配慮することとする。

採取担当者は、細胞採取に習熟した医師および臨床工学技士、臨床検査技師とし、本研究の研究責任医師または研究分担医師はその指示に従うものとする。研究責任医師または研究分担医師は、アフェレーシス実施に立ち合い患者の状態を観察することで、患者の安全確保に努める。

手術前日に、成分採血装置（Spectra Optia（テルモBCT）または同等品）を用いてアフェレーシスによりリンパ球を採取する。

処理血液量は患者体重換算  $100 \sim 200$  ml/kgを目安とし、各再生医療等提供機関における単核球採取効率をもとに決定する。

採取中は患者の状態に注意し、血管迷走神経反射等の出現により採取の継続が困難となった場合は、採取担当者の判断で採取を中止する。

抗凝固剤としてACD液のみを単独で用い、ヘパリンは使用しない。クエン酸中毒予防のため、アフェレーシスの間グルコン酸カルシウムの持続静注を行う。

採取細胞を、室温で速やかに細胞培養加工施設へ納品する。

採取目標値は、白血球数で $5 \times 10^9$ 個以上とする。

単核球採取に先立ち自己血漿40 mlを採取する。

アフェレーシス実施前に血小板が $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ を下回っていた場合には、アフェレーシス終了後に血小板輸血を行う。

(d) リンパ球培養（制御性T細胞の誘導と増殖）

以下の作業は、各再生医療等提供機関の製造担当者が細胞培養加工施設で行う。

患者の採取細胞から、比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離する。

患者の自己血漿を、 $56$  にて30分間加温し、非動化する。

洗浄後、リンパ球用無血清培養液（ALyS505N液）入りの培養バッグに添加し、更に非動化した患者血漿 10 ml、抗CD80抗体（2D10.4）10 mg、抗CD86抗体（IT2.2）10 mgを加える。

凍結保存されたドナー細胞（1バッグ、 $2 \times 10^9$ 個相当）を、 $37$  恒温槽で解凍する。

の培養バッグに加える。

1週間、 $37$  インキュベーターで培養する。

< 1週間後 >

培養バッグから回収した細胞液を遠心・洗浄し、細胞を50 mlのALyS505N液に再浮遊する。細胞浮遊液をALyS505N液の入った培養バッグに添加し、更に非動化した患者血漿10 ml、抗CD80抗体（2D10.4）10 mg、抗CD86抗体（IT2.2）10 mgを加える。

凍結保存されたドナー細胞（1バッグ、 $2 \times 10^9$ 個相当）を、37 恒温槽で解凍する。  
 解凍したドナー細胞を の培養バッグに加える。  
 1週間、37 インキュベーターで培養する。  
 培養を開始してから10日目に、検査用検体として培養液の一部を採取する。

(e) 試験物の出荷（培養2週間目、肝移植手術後13日目）

以下の作業は、各再生医療等提供機関の製造担当者が細胞培養加工施設で行う。  
 培養バッグから細胞を回収、遠心、生理食塩液にて洗浄した後、細胞を生理食塩液に浮遊する。  
 細胞浮遊液から比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離し、回収した細胞を、さらに生理食塩液で4回洗浄する。  
 細胞を規定量の生理食塩液に浮遊し、検査用検体を採取する。  
 出荷判定を行い、再生医療等提供機関へ出荷する。試験物の輸注については「7.6 自己由来制御性T細胞の輸注」を参照する。

(f) ウイルス試験を目的とした検体の一部保管

以下の作業は、各細胞培養加工施設の製造担当者が行う。

7.4 試験物の品質コントロール

試験物の製造工程にて発生する中間試験物および最終試験物は、以下の試験項目について判定基準を満たしたものとする。試験内容については、厚生労働省通知「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について（平成12年12月26日医薬発第1314号）」および「第3回厚生科学審議会科学技術部会ヒト幹細胞を用いた臨床研究の在り方に関する専門委員会（平成14年5月2日開催）」議事録等を参考とする。なお、各試験の試験方法については、各細胞培養加工施設にて定める特定細胞加工物標準書に準拠する。

7.4.1 中間試験物

培養細胞については、調製後および調製 7 日目、調製 10 日目において、以下の試験項目について判定基準を満たしたものとする。

1) 工程管理試験1：調製後ドナーリンパ球細胞

試験項目	工程管理規格
細胞数測定	なし（参考値）
生存率	70%以上

2) 工程管理試験2：調製後患者リンパ球細胞

試験項目	工程管理規格
細胞数測定	なし（参考値）
生存率	70%以上
表面抗原	なし（参考値）

3) 工程管理試験3：培養細胞（7日目）

試験項目	工程管理規格
細胞数測定	なし（参考値）
生存率	なし（参考値）

4) 工程管理試験 4：培養細胞（10 日目）

試験項目	工程管理規格
------	--------

マイコプラズマ否定試験	適合
無菌試験	陰性

#### 7.4.2 最終試験物

特定細胞加工物からの検体は、最終加工物を得る直前の細胞浮遊液から採取したものとする。特定細胞加工物の検査及び判定基準は以下の通りである。

項目	品質規格
外観	異物の混入を認めない 色調の異常を認めない 容器の損傷を認めない
総細胞数	1×10 <sup>8</sup> 個以上
生存率	70%以上
表面抗原	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> を含むこと
無菌試験	菌の発育を認めない
マイコプラズマ否定試験	陰性
エンドトキシン試験	1.0EU/mL 未満

#### 7.4.3 出荷判定基準

試験物を出荷する際の判定基準として、以下を定める。

##### 1) 製造工程

製造の各工程について、異常・逸脱のないこと

##### 2) 品質試験

項目	試料	品質規格
外観	試験物	異物の混入を認めない
総細胞数	試験物	1×10 <sup>8</sup> 個以上
生存率	試験物	70%以上
無菌試験	工程管理試験 4 で用いられる培地	微生物の増殖を認めない
マイコプラズマ否定試験	工程管理試験 4 で用いられる培地	陰性
エンドトキシン試験	試験物	1.0EU/mL 未満

##### 3) 二次包装形態

項目	規格
ラベルの貼付	試験物の容器に、患者登録番号、製造番号、使用期限を記載したラベルが貼付されている
添付文書の有無	試験物に「用法・用量・効能または効果ならびに使用上の注意または取扱い上の注意」が添付されている

#### 7.5 生体肝移植の実施方法

生体ドナーの肝グラフト採取術および対象患者の肝移植術、ならびに生体ドナーと肝レシピエントの術後管理法は各再生医療等提供機関にて行われている標準的肝移植術および術後管理法に準じる。また、本研究では生体肝移植手術日を Day 0 として以降の検査・評価を実施する。

## 7.6 自己由来制御性 T 細胞の輸注

肝移植手術後13日目に培養リンパ球（最終試験物）を患者へ輸注する。研究責任医師または研究分担医師は、患者への輸注の可否を決定し、患者病室内にて輸血用フィルターを通して患者に静脈内投与する。投与に際しては、はじめはゆっくりと投与を開始し、バイタルサインなどに問題無いことを確認した上で、点滴投与速度を上げて30分程度で細胞輸注を完了する。

研究責任医師または研究分担医師は、細胞輸注において患者のバイタルサイン等に常に注意を払う。予期不能な血圧低下などの症状が出現した場合、直ちに投与を中断し、再開の可否について検討する。再開した場合、再度中断を要する状況が起きた際には以降の投与を中止する。

## 7.7 免疫抑制療法と、免疫抑制剤の減量・離脱

### 7.7.1 減量の対象とならないもの（自己由来制御性 T 細胞の輸注前投与を目的とする）

シクロホスファミド：術後5日目（Day 5）に40 mg/kg/dayを静脈内投与する。本剤は、自己由来制御性T細胞を輸注する前に、患者のリンパ球を減少させる目的で使用される。なお、シクロホスファミドは揮発性を有し、調製者への曝露防止のため、薬剤部において閉鎖システム等を用いて調製する。

### 7.7.2 減量の対象となるもの

肝移植手術後は、以下の規定で免疫抑制療法を実施する。定期的に血液生化学検査や免疫学的検査および必要に応じて肝生検を行い、グラフトに拒絶反応（T-Bil/AST/ALT/γ-GTPのいずれかが施設基準値の2倍以上）を認めなければ、免疫抑制剤（副腎皮質ステロイド 代謝拮抗薬 カルシニューリン阻害薬）を段階的に減量する。減量方法は北海道大学において行った本細胞治療の先行研究に準じる<sup>9)</sup>。その後、術後6ヶ月にはカルシニューリン阻害薬単剤で免疫抑制を維持し、その後はこれをウィーニング（減量）していき、術後18ヶ月にはカルシニューリン阻害薬完全離脱へと移行する。このスケジュールを目安として、各薬剤の減量・投与中止を目指す。減量・投与中止の時点は患者の状態を見ながら研究責任医師または研究分担医師の判断で決定することとする。

なお、本免疫抑制療法を実施中に拒絶反応と診断・治療された場合には、本プロトコルにおける免疫抑制剤の完全離脱を目的とした減量をやめ、従来の免疫抑制療法へと移行する。

副腎皮質ステロイド：再灌流時1000 mg、手術翌日（Day 1）から 20 mg/day を 1 週間投与する。本剤は 1 週間毎に 5 mg/day ずつ減量し、術後 28 日目（Day 28）に中止する。

代謝拮抗薬（ミコフェノール酸モフェチル等）：ミコフェノール酸モフェチルの場合、手術翌日（Day 1）から 500 mg/day（分2）を投与し、約 1 週間を目処として必要に応じ 1000 から 2000 mg/day まで増量する。原則として肝移植術後 1 ヶ月を目標に 500 mg/day ごと減量し、原則として術後 1 ヶ月目（Day 30）に投与を中止する。

カルシニューリン阻害薬（タクロリムス等）：カルシニューリン阻害薬は原則としてタクロリムスを第一選択とする。その場合、移植術後 0 または 1 日目（Day 0 or Day 1）から投与（分2）開始し、術後 3 ヶ月間は血中トラフ濃度 8-12 ng/ml を維持する。全身状態や肝機能検査、拒絶反応の有無などにより血中トラフ濃度を 5-8 ng/ml まで漸減し、術後 6 ヶ月以降は以下の漸減スケジュールを遵守して行う。副作用等によりタクロリムスをシクロスポリンへ変更した場合も減量方法および漸減スケジュールは同様とする。なお、変更時のシクロスポリン投与量や血中トラフ濃度は、その時点でのタクロリムス血中トラフ濃度を参考に設定する。また、カルシニューリン阻害薬の至適な投与量および血中トラフ濃度は、各研究責任医師または分担医師の判断にて決定する。

1) 1 日 1 回（3 ヶ月間）：血中トラフ値は減量前の約 75% を目標に投与量を設定する。



この際、タクロリムスは徐放型製剤へスイッチする。

- 2) 週3回(3ヶ月間)
- 3) 週2回(3ヶ月間)
- 4) 週1回(3ヶ月間)
- 5) 投与中止

## 7.8 拒絶反応の定期確認と診断および治療

免疫抑制剤の減量・離脱時には、肝機能検査が正常でも肝線維化や慢性拒絶の存在があり得る。そのため、以下のスケジュールを通して定期的な肝生検を行って拒絶反応が起きていないか確認を行うとともに、拒絶反応が疑われる際には臨時で随時肝生検等の検査を実施し、拒絶反応の診断および必要があればその治療を行う。

### 7.8.1 拒絶反応の定期確認

免疫抑制剤の減量・離脱時の拒絶反応を確認するため、以下のスケジュールで定期的な肝生検を行う。なお、「7.7.2 減量の対象となるもの」で定めたスケジュール以外の日程で免疫抑制剤を完全離脱する場合には、その直前に肝生検を行う。

また、免疫抑制剤を離脱後、拒絶反応により従来の免疫抑制療法を再開している場合には、そのスケジュールに準拠した肝生検は必須ではない。

術後観察期間1： 移植術後1ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、18ヶ月(完全離脱直前)

術後観察期間2： 移植術後21ヶ月、24ヶ月、30ヶ月、36ヶ月、48ヶ月、60ヶ月

### 7.8.2 拒絶反応が疑われる際の診断と治療

#### (a) 拒絶反応の診断

身体所見

発熱や全身倦怠などの出現に注意を払う。

血液/生化学的検査

T-Bil/AST/ALT/γ-GTPのいずれかが施設基準値の2倍以上に上昇した場合、拒絶反応を疑う。

肝生検と病理学的診断

拒絶反応が疑われたら直ちに肝生検を行い、迅速診断に続いて、永久標本でも拒絶反応を確認する。凍結切片は免疫組織染色、浸潤細胞の解析用に保存しておく。Glisson鞘の細胞浸潤、胆管上皮細胞異形、細胆管壁内リンパ球浸潤、中心静脈炎などの所見により拒絶反応の組織診断を行う。拒絶反応の病理診断および所見は「ヒト移植臓器拒絶反応の病理組織診断基準-第2版」(日本移植学会・日本病理学会/編)に準じて行う。

【設定根拠】 発熱・全身倦怠の出現は拒絶反応初期に認められることがあり観察を要する身体所見とした。拒絶反応を疑う際に一般的に用いられているパラメータを設定した。拒絶反応の確定診断に必要であることから設定した。

#### (b) 拒絶反応の治療とその後の対応

免疫抑制剤の減量を開始する移植術後6ヶ月以降に、上記の方法により拒絶反応と診断された場合には、本プロトコルにおける免疫抑制剤の完全離脱を目的とした更なる免疫抑制剤の減量をやめ、従来の免疫抑制療法へと移行する。従来の免疫抑制療法では、再生医療等提供機関の治療プロトコルに従い、カルシニューリンインヒビター、代謝拮抗薬や副腎皮質ステロイド

等を用いて必要十分な治療を行う。但し、完全離脱する前に拒絶反応を認め、一度も完全離脱を達成せずに従来の免疫抑制療法へ移行する場合、また完全離脱へ移行した後に拒絶反応を認め免疫抑制剤の使用を再開した場合のいずれにおいても、本研究からの中止とはせず、術後観察期間 1 および 2 にて定める検査を継続的に実施する。

【設定根拠】完全離脱が得られない場合でも細胞治療による免疫抑制剤の減量効果が期待できることから、試験中止とはせずに拒絶反応出現後も観察を継続することが妥当と判断した。

(参考) 北海道大学病院における拒絶反応の治療法

細胞性拒絶反応

ステロイドパルス療法を行う。これに不応性の場合は抗胸腺細胞グロブリン(ATG)を静脈内投与する。

液性拒絶反応(抗体関連)

血漿交換を行い、リツキシマブ 50~375 mg/m<sup>2</sup> や  $\gamma$ -グロブリンを静脈内投与する。また、代謝拮抗薬(ミコフェノール酸モフェチル等)の投与を開始する。

(c) 拒絶反応後の検査

拒絶反応と診断された場合には、その確定診断から 2 週間目、1 ヶ月目に規定の検査を行う。

7.9 被験者の研究参加予定期間

各被験者は、同意取得後、肝移植手術から5年の観察期間にて参加する。

なお、ドナーについてはアフエレーシス実施日から1週間の安全性モニタリングを行う。

7.10 研究終了後の対応

本研究終了後は、この研究で得られた成果も含めて、研究責任医師および研究分担医師は被験者に対し最も適切と考える医療を提供する。

8 観察および検査項目

8.1 試験参加期間の定義

同意取得後、被験者となる患者の試験参加期間を次のように定める。

- 手術前観察期間：同意取得日～肝移植手術日 (Day 0)
- 術後観察期間 1 (免疫抑制療法期間)：肝移植手術後 (Day 1)～すべての免疫抑制剤の完全離脱日 (術後 18 ヶ月を目安とする)
- 術後観察期間 2 (維持療法期間)：すべての免疫抑制剤の完全離脱日 (術後 18 ヶ月を目安とする)～3年6ヶ月 (術後 60 ヶ月)

研究責任医師および研究分担医師は、以降の項目について診療録等の原資料から調査し、別途定める症例報告書(EDC)に記録する。また、本研究の評価に係る所見や行った処置等は、もれなく診療録等の原資料に記載すること。なお、同一の時期に複数の観察・検査を行った場合は、基準日(表参照)に最も近い時期を採用する。

## 8.2 検査来院の概要

試験参加期間中の定期来院について、「8.3 手術前観察期間」から「8.5 定期来院：術後観察期間 2」に定める。なお、拒絶反応または有害事象の発現が疑われた場合には、「8.7 臨時検査：拒絶反応が疑われる場合の検査」および「8.8 有害事象」に従い規定の検査を実施する。

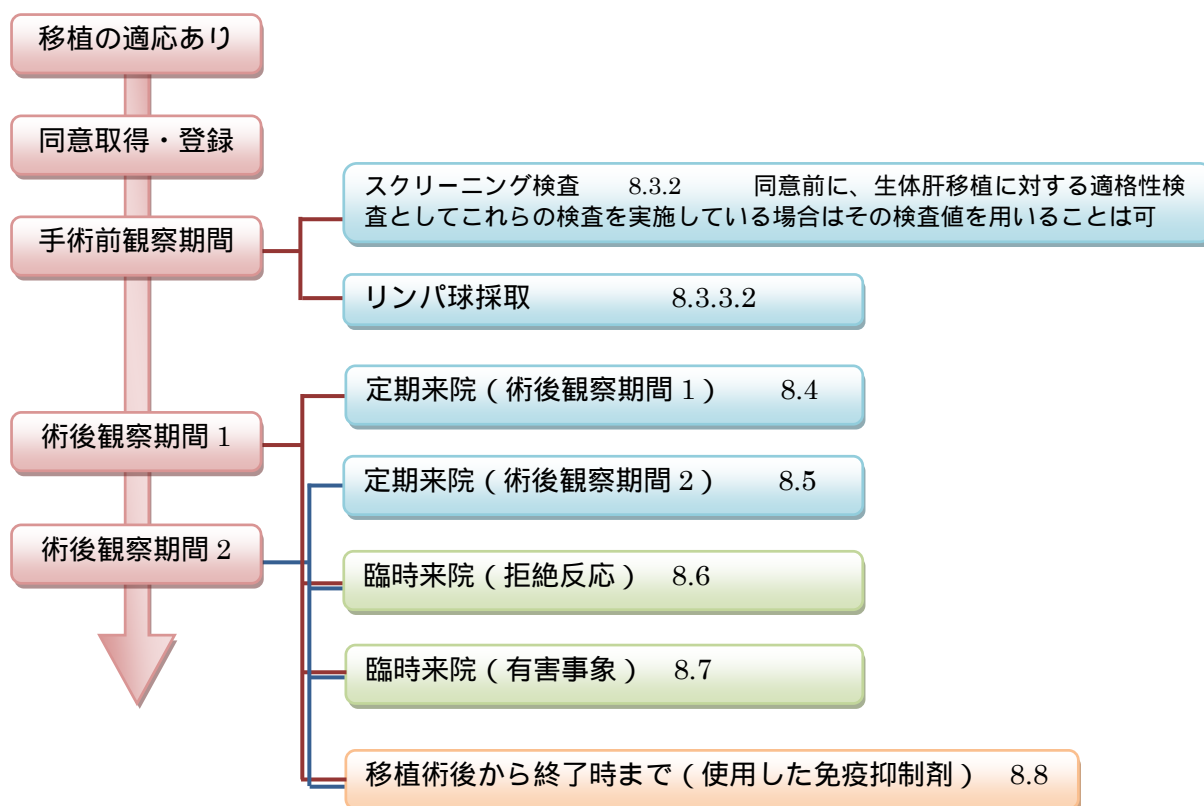


図 4 試験参加期間の流れ

## 8.3 手術前観察期間

### 8.3.1 ドナーのスクリーニング検査

ドナーとしての適格性を判定するため、移植前に以下の諸検査を行う。なお本研究の同意前に、生体肝移植に対する適格性検査としてこれらの検査を実施している場合には、その結果を用いてもよいこととする。

項目	内容
同意取得・登録	同意年月日、登録年月日
ドナー基本情報	生年月日、性別、同意取得時年齢、身長、体重 生体肝移植に関する臓器提供の同意日、臓器提供の適否 アフェレーシス実施の適否 ドナー登録番号
ドナー背景	合併症 既往歴（重症な血管迷走神経反射の有無、血栓塞栓症の有無を含む） 手術歴 輸血歴
バイタル	体温、血圧、呼吸数、脈拍

臨床検査	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ WBC、Hb、Ht、Plt</li> <li>・ 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、<math>\gamma</math>-GTP</li> </ul>
組織適合性試験	ABO 型検査、HLA-DNA タイピング、クロスマッチ試験用採血 (FCM 法*、LCT 法**)

\*FCM：Flow Cytometry、\*\*LCT: Lymphocyte Cytotoxicity Test

### 8.3.2 患者（レシピエント）のスクリーニング検査

被験者としての適格性を判定するため、移植前に以下の諸検査を行う。なお本研究の同意前に、生体肝移植に対する適格性検査としてこれらの検査を実施している場合には、その結果を用いてもよいこととする。

臨床検査 1 については、全ての患者に共通して確認が必要な項目について記載する。臨床検査 2 では、原疾患ごとに感染または再発のリスクが高く、確認が必要なものについて記載する。

項目	内容
同意取得・登録	同意年月日、登録年月日
患者基本情報	生年月日、性別、同意取得時年齢、身長、体重 生体肝移植に関する同意日、移植の適否 アフェレーシス実施の適否 患者登録番号
患者背景	原疾患 合併症 既往歴（重症な血管迷走神経反射の有無、血栓塞栓症の有無を含む） 手術歴 輸血歴
バイタル	体温、血圧、呼吸数、脈拍
身体所見	全身倦怠感
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画（好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球） 凝固系：PT、PT-s、aPTT 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、 $\gamma$ -GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR 電解質：Na、K、Cl、Ca、Mg、P CRP ウイルス 1：HBV/HCV/HIV/HTLV-1 ウイルス 2：CMV antigenemia（C10、C11）、EBV PCR 真菌、原虫：カンジダ抗原、 $\beta$ -D グルカン
臨床検査 2 （原疾患に応じて実施）	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B 型肝硬変 HBsAg、HBsAb</li> <li>➤ C 型肝硬変 HCV-RNA(定量)</li> <li>➤ 肝細胞癌 AFP、AFP-L3、PIVKA-</li> <li>➤ PBC 抗ミトコンドリア抗体、抗ミトコンドリア M2 抗体、IgM、IgG</li> <li>➤ AIH/PSC 抗核抗体、IgM、IgG</li> </ul>
組織適合性試験	ABO 型検査、HLA-DNA タイピング、クロスマッチ試験(FCM 法*、LCT 法**)

\*FCM：Flow Cytometry、\*\*LCT: Lymphocyte Cytotoxicity Test

### 8.3.3 ドナーのアフェレーシス

ドナーは原則として肝移植手術 1 週間前までに、成分採血装置を用いてアフェレーシスによりリンパ球を採取する。アフェレーシスの実施については日本骨髄バンクドナーリンパ球輸注ドナー適格性基準、採取マニュアル、日本造血細胞移植学会および日本輸血・細胞治療学会のガイドラインを遵守し、各再生医療等提供機関および各細胞培養加工施設の規定に従って実施する。また採取担当者は、穿刺不可と判断した場合で、事前に同意が得られている場合にはカテーテル挿入も検討する。

ドナーについては、アフェレーシス実施後に以下の検査を実施するとともに、アフェレーシス実施日から 1 週間後までの有害事象を記録する。なお、採取最低値である  $1 \times 10^9$  個を超えない場合には、研究責任医師または研究分担医師の判断で再採取を検討する。

#### 【アフェレーシス実施後】

項目	内容
アフェレーシスに関する情報	<ul style="list-style-type: none"> <li>アフェレーシス実施日、採血速度、処理血液量、採取血液量、採取有核細胞数、採取単核球数</li> <li>血中イオン化 Ca</li> </ul>
バイタル	体温、血圧、呼吸数、脈拍
臨床検査	<ul style="list-style-type: none"> <li>WBC、Hb、Ht、Plt</li> <li>肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、<math>\gamma</math>-GTP</li> </ul>

### 8.3.4 患者（レシピエント）のアフェレーシス

患者は肝移植手術の前日に、成分採血装置を用いてアフェレーシスによりリンパ球を採取する。研究責任医師または研究分担医師は、アフェレーシス実施に立ち合い患者の状態を観察することで、患者の安全確保に努める。なお、アフェレーシス実施前に血小板が  $50 \times 10^3 / \mu\text{L}$  を下回っていた場合には、アフェレーシス終了後に血小板輸血を行う。

なお患者については、アフェレーシス実施中の有害事象を記録する。

#### 【アフェレーシス実施後（Day -1）】

項目	内容
アフェレーシスに関する情報	<ul style="list-style-type: none"> <li>アフェレーシス実施日、採血速度、処理血液量、採取血液量、採取有核細胞数、採取単核球数</li> <li>血中イオン化 Ca</li> </ul>
バイタル	体温、血圧、呼吸数、脈拍
臨床検査 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>WBC、Hb、Ht、Plt</li> <li>WBC 分画（好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球）</li> </ul>

### 8.3.5 肝移植手術日

患者に対し、肝移植手術日（手術前）に以下の検査を実施する。

#### 【肝移植手術前（Day 0）】

項目	内容
肝移植手術に関する情報	肝移植手術実施日
臨床検査 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>WBC、Hb、Ht、Plt</li> <li>WBC 分画（好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球）</li> <li>凝固系：PT、PT-s、aPTT</li> <li>肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、<math>\gamma</math>-GTP</li> </ul>

	腎機能：BUN、Cr、eGFR 電解質：Na、K、Cl、Ca、Mg、P CRP
--	---

#### 8.4 定期来院：術後観察期間 1（免疫抑制療法期間）

術後 1 週間、術後 13 日（自己由来制御性 T 細胞輸注日）、術後 2 週間、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、12 ヶ月、15 ヶ月、18 ヶ月時に定期来院し、以下の検査を実施する。なお、術後 13 日目の自己由来制御性 T 細胞輸注以降に発現した有害事象は「8.8 有害事象」に従い記録する。

なお、「7.8.2 拒絶反応が疑われる際の診断と治療」に則し、T-Bil/AST/ALT/γ-GTP のいずれかが施設基準値の 2 倍以上に上昇した場合には、拒絶反応を疑い肝生検を行う。

#### 【術後 1 週間（Day 7）】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画（好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球） 凝固系：PT、PT <sub>s</sub> 、aPTT 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、γ-GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR CRP

#### 【術後 13 日目（Day 13、自己由来制御性 T 細胞輸注日）】

項目	内容
細胞輸注に関する情報	輸注日、輸注細胞数、使用期限までに輸注を終了したか否か
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画（好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球） 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、γ-GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR CRP

#### 【試験物の情報】

項目	内容
試験物の情報	製造番号 総細胞数 生存率 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> 陽性細胞数

#### 【術後 2 週間（Day 14）】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画（好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球） 凝固系：PT、PT <sub>s</sub> 、aPTT 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、γ-GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR CRP ウイルス 2：CMV antigenemia（C10、C11）、EBV PCR

	真菌、原虫：カンジダ抗原、β-D グルカン
臨床検査 2 (原疾患に応じて実施)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B 型肝炎変 HBsAg/HBsAb</li> <li>➤ C 型肝炎変 HCV-RNA(定量)</li> </ul>

【術後 1 ヶ月 (Day 30)】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 凝固系：PT、PT's、aPTT 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、γ-GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR 電解質：Na、K、Cl、Ca、Mg、P CRP ウイルス 2：CMV antigenemia (C10, C11)、EBV PCR 真菌、原虫：カンジダ抗原、β-D グルカン
臨床検査 2 (原疾患に応じて実施)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B 型肝炎変 HBsAg/HBsAb</li> <li>➤ C 型肝炎変 HCV-RNA(定量)</li> <li>➤ 肝細胞癌 AFP、AFP-L3、PIVKA-II</li> <li>➤ PBC 抗ミトコンドリア抗体、抗ミトコンドリア M2 抗体、IgM、IgG</li> <li>➤ AIH/PSC 抗核抗体、IgM、IgG</li> </ul>
肝生検	拒絶反応の有無、病理組織学的スコアリング、線維化の有無

【術後 2 ヶ月 (Day 60)、3 ヶ月 (Day 90)】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、γ-GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR CRP ウイルス 2：CMV antigenemia (C10, C11)、EBV PCR 真菌、原虫：カンジダ抗原、β-D グルカン
臨床検査 2 (原疾患に応じて実施)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B 型肝炎変 HBsAg/HBsAb</li> <li>➤ C 型肝炎変 HCV-RNA(定量)</li> <li>➤ 肝細胞癌 AFP、AFP-L3、PIVKA-II</li> </ul>

【術後 6 ヶ月 (Day 180)】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、γ-GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR CRP
臨床検査 2 (原疾患に応じて実施)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B 型肝炎変 HBsAg/HBsAb</li> <li>➤ C 型肝炎変 HCV-RNA(定量)</li> <li>➤ 肝細胞癌 AFP、AFP-L3、PIVKA-II</li> </ul>
肝生検	拒絶反応の有無、病理組織学的スコアリング、線維化の有無

【術後 9 ヶ月 (Day 270) 15 ヶ月 (Day 450)】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、 $\gamma$ -GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR CRP

【術後 12 ヶ月 (Day 360)】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、 $\gamma$ -GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR 電解質：Na、K、Cl、Ca、Mg、P CRP ウイルス 1：HBV/HCV/HIV/HTLV-1 ウイルス 2：CMV antigenemia (C10, C11)、EBV PCR 真菌、原虫：カンジダ抗原、 $\beta$ -D グルカン
臨床検査 2 (原疾患に応じて実施)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B 型肝硬変 HBsAg/HBsAb</li> <li>➤ C 型肝硬変 HCV-RNA(定量)</li> <li>➤ 肝細胞癌 AFP、AFP-L3、PIVKA-II</li> <li>➤ PBC 抗ミトコンドリア抗体、抗ミトコンドリア M2 抗体、IgM、IgG</li> <li>➤ AIH/PSC 抗核抗体、IgM、IgG</li> </ul>
肝生検	拒絶反応の有無、病理組織学的スコアリング、線維化の有無
悪性腫瘍併発の有無	悪性腫瘍併発の有無

【術後 18 ヶ月 (Day 540)】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、 $\gamma$ -GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR 電解質：Na、K、Cl、Ca、Mg、P CRP
肝生検 免疫抑制剤の離脱直前	拒絶反応の有無、病理組織学的スコアリング、線維化の有無
免疫抑制剤の完全離脱の可否	免疫抑制剤を完全離脱できるか否か

8.5 定期来院：術後観察期間 2 (療法維持期間)

術後 21 ヶ月、24 ヶ月、以降は 6 ヶ月おきに 60 ヶ月まで来院し、以下の検査を実施する。なお、「7.8.2 拒絶反応が疑われる際の診断と治療」に則し、T-Bil/AST/ALT/ $\gamma$ -GTP のいずれかが施設基準値の 2 倍以上に上昇した場合には、拒絶反応を疑い肝生検を行う。



【術後 21 ヶ月 (Day 630)】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、 $\gamma$ -GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR CRP
肝生検 (免疫抑制剤の完全離脱が継続している場合のみ実施)	拒絶反応の有無、病理組織学的スコアリング、線維化の有無
離脱の継続に関する確認 (免疫抑制剤の完全離脱が継続している場合のみ実施)	免疫抑制剤の完全離脱が継続しているか否か

【術後 24 ヶ月 (Day 720)、36 ヶ月 (Day 1080)、48 ヶ月 (Day 1440)、60 ヶ月 (Day 1800)】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、 $\gamma$ -GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR 電解質：Na、K、Cl、Ca、Mg、P CRP ウイルス 2：CMV antigenemia (C10, C11)、EBV PCR 真菌、原虫：カンジダ抗原、 $\beta$ -D グルカン
臨床検査 2 (原疾患に応じて実施)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B 型肝炎変 HBsAg/HBsAb</li> <li>➤ C 型肝炎変 HCV-RNA(定量)</li> <li>➤ 肝細胞癌 AFP、AFP-L3、PIVKA-II</li> <li>➤ PBC 抗ミトコンドリア抗体、抗ミトコンドリア M2 抗体、IgM、IgG</li> <li>➤ AIH/PSC 抗核抗体、IgM、IgG</li> </ul>
肝生検 (免疫抑制剤の完全離脱が継続している場合のみ実施)	拒絶反応の有無、病理組織学的スコアリング、線維化の有無
悪性腫瘍の有無	悪性腫瘍併発の有無
離脱の継続に関する確認 (免疫抑制剤の完全離脱が継続している場合のみ実施)	免疫抑制剤の完全離脱が継続しているか否か

【術後 30 ヶ月 (Day 900)、42 ヶ月 (Day 1260)、54 ヶ月 (Day 1620)】

項目	内容
臨床検査 1	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、 $\gamma$ -GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR 電解質：Na、K、Cl、Ca、Mg、P

	CRP
離脱の継続に関する確認 (免疫抑制剤の完全離脱が継続している場合のみ実施)	免疫抑制剤の完全離脱が継続しているか否か

### 8.6 被験者の中止時

個々の患者またはドナーが「14.1 個々の被験者における中止と対応」に則り、研究を中止する場合、中止時検査は以下の通りとする。ただし、患者またはドナーが中止時検査を含め、全ての検査についても同意を撤回した場合はその限りではない。なお、患者またはドナーが研究を中止する場合は、当該患者またはドナーの診療録及び症例報告書に中止日および中止理由を記載する。

- (1) 患者またはドナーのアフェレーシスを実施できなかった場合（中止基準 ）  
アフェレーシス後の検査を中止時検査と見なす。
- (2) 移植術後 13 日目に規定量の自己由来制御性 T 細胞を患者へ輸注できなかった場合（中止基準 ）  
術後 13 日目（自己由来制御性 T 細胞輸注日）の検査を中止時検査と見なす。
- (3) その他の場合（中止基準 、 、 および ）  
中止時まで規定された定期来院時の検査を実施している場合には、追加の検査なし。

### 8.7 臨時来院：拒絶反応が疑われる場合の検査

拒絶反応が疑われる場合には、「7.9 拒絶反応の定期確認と診断および治療」に基づき、以下の検査を行う。なお、拒絶反応と診断された場合には、診断 2 週間後および 1 ヶ月後に臨床検査 1 を行う。診断 2 週間後および 1 ヶ月後の来院が通常来院のアロワンスと重なる場合、重複項目は省略可能とする。

項目	内容
バイタル	体温、血圧、呼吸数、脈拍
身体所見	全身倦怠感
臨床検査 1 (拒絶反応と診断された場合、診断 2 週間後および 1 ヶ月後にも実施)	WBC、Hb、Ht、Plt WBC 分画 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球) 肝機能：T-Bil、AST、ALT、LDH、 $\gamma$ -GTP 腎機能：BUN、Cr、eGFR CRP
肝生検	拒絶反応の有無、病理組織学的スコアリング、線維化の有無
臨床検査 2 (原疾患に応じて実施)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B 型肝炎 HBsAg/HBsAb</li> <li>➤ C 型肝炎 HCV-RNA(定量)</li> <li>➤ 肝細胞癌 AFP、AFP-L3、PIVKA-II</li> </ul>
拒絶反応の治療	薬剤名、用法・用量、治療開始日、治療終了日、血漿交換の有無

### 8.8 有害事象

「8.3.3 ドナーのアフェレーシス」で定めるドナーのアフェレーシス時における有害事象の収集の他、患者についてアフェレーシスに起因するもの、シクロホスファミドに起因するもの、自己

由来制御性 T 細胞輸注に起因するものについて、「11. 安全性評価項目と有害事象の取扱い」で定める規定に基づき有害事象の情報を収集する。

項目	内容
有害事象	発現日、有害事象名、重症度、本研究の手順（アフェレーシスによるもの、シクロホスファミドによるもの、細胞輸注によるもの）との因果関係、本研究の手順との因果関係を否定する場合にはその理由、有害事象の治療のためにとられた処置、転帰、転帰日

### 8.9 使用した免疫抑制剤

術後観察期間 1 および術後観察期間 2 において、使用した免疫抑制剤の用法・用量等の推移を観察する。

項目	内容
副腎皮質ステロイド	薬剤名 用法・用量 開始日・終了日 用法・用量の変更理由
代謝拮抗薬	薬剤名 用法・用量・トラフ濃度 開始日・終了日 用法・用量の変更理由
カルシニューリン阻害薬	薬剤名 用法・用量 開始日・終了日 用法・用量の変更理由
シクロホスファミド	薬剤名 用法・用量 投与日 用法・用量の変更理由

### 8.10 免疫学的モニタリング

#### (a) 培養細胞の特性解析

最終試験物の規格試験のための検体を用い、培養細胞中の制御性 T 細胞を含む細胞種を解析する。同定する細胞種とそのフェノタイプを以下に示す。フェノタイプ解析には各種抗体を用いてフローサイトメトリーを用いて解析する。

細胞種	フェノタイプ	使用する抗体
CD4 <sup>+</sup> T 細胞	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	抗 CD3、抗 CD4
CD8 <sup>+</sup> T 細胞	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	抗 CD3、抗 CD8
B 細胞	CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	抗 CD3、抗 CD19
NK 細胞	CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>	抗 CD3、抗 CD16、抗 CD45、抗 CD56

単球	CD14 <sup>+</sup> SCC <sup>mid</sup>	抗 CD14、抗 SCC
骨髄系樹状細胞	Lin1 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	抗 Lin、抗 CD11c、抗 HLA-DR
形質細胞様樹状細胞	Lin1 <sup>-</sup> CD123 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	抗 Lin、抗 CD123、抗 HLA-DR
顆粒球	Lin1 <sup>-</sup> CD123 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	抗 Lin、抗 CD123、抗 HLA-DR
制御性 T 細胞 (#1)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	抗 CD3、抗 CD4、抗 CD25、抗 Foxp3
制御性 T 細胞 (#2)	CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	抗 CD3、抗 CD4、抗 CD127、抗 Foxp3
制御性 T 細胞 (#3)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CTLA4 <sup>+</sup>	抗 CD3、抗 CD4、抗 CD25、抗 CTLA-4

(b) 自己由来制御性 T 細胞の免疫学的検討 (*in vitro*)

*Ex vivo* にて誘導した自己由来制御性 T 細胞を含む培養細胞を用い、放射線照射 (30 Gy) したドナーおよびレシピエントリンパ球と共に 5-7 日間混合培養し (MLC: mixed lymphocyte culture)、レシピエントリンパ球増殖の抑制反応をチミジン取り込み法もしくはフローサイトメトリー法で検討する。なお、誘導した自己由来制御性 T 細胞は追加解析のため、検体を一部凍結保存する。

(c) レシピエントの免疫学的モニタリング

末梢血リンパ球やグラフト肝組織を用いて行う免疫学的特性解析については、別途定める各々の自主臨床研究計画書に従って検討する。

### 8.11 観察および検査スケジュール

観察・検査スケジュールを表に示す。なお、スケジュール通りに規定の観察・検査が実施できない場合には調査日の許容範囲の規定に示した許容範囲内に規定の観察・検査を実施する。なお、治療スケジュールについては肝移植手術日を 0 日として表記した。

患者の参加スケジュール

期間	手術前 観察期間	術後観察期間 1 (免疫抑制療法期間)															術後観察期間 2 (維持療法期間)						2 拒絶反応が 疑われた場合						
		スクリーニン 後	リンパ球採取 前	肝移植手術 開始	免疫抑制療法			性T細胞輸注	自己由来抑制						免疫抑制剤完 全離脱														
術後●ヶ月										1	2	3	6	9	12	15	18	21	24	30	36	42	48	54	60				
Day		-1	0	1	3	5	7	13	14	30	60	90	180	270	360	450	540	630	720	900	1080	1260	1440	1620	1800				
許容範囲(±)				-		-	-	-	-	2	5	7	7	7	7	7	7	14	14	14	14	14	14	14	14	3			
同意取得	同意年月日																												
登録	登録年月日																												
アフエレーシス	実施日/採血速度/処理血液量/ 採取血液量/採取有核細胞数/ 採取単核球数 血中イオン化 Ca																												
肝移植手術																													
細胞輸注	輸注日/輸注開始時間・終了時間/ 輸注細胞数																												
試験物の情報	製造番号/総細胞数/生存率/ CD4+CD25+Foyp3+陽性細胞数																												
免疫抑制剤投与	副腎皮質ステロイド				←————→																								
	代謝拮抗薬				←————→																								
	カルシニューリン阻害剤				←————→																								
	シクロホスファミド				↔																								
患者基本情報	生年月日、性別、同意取得 時年齢、身長、体重 生体肝移植に関する同意 日、移植の適否 アフエレーシス実施の適否 患者登録番号																												
患者背景	原疾患 合併症 既往歴 (重症な血管迷走神 経反射の有無、血栓塞栓症の 有無を含む) 手術歴																												

期間	検査・記録項目	手術前 観察期間		術後観察期間 1 (免疫抑制療法期間)														術後観察期間 2 (維持療法期間)						疑 <sup>2</sup> わ れ た 場 合 が 拒 絶 反 応 が				
		スクリーニング後	リンパ球採取前	肝移植手術前	免疫抑制療法開始					性T細胞輸注	自己由来制御							免疫抑制剤完 全離脱										
術後●ヶ月											1	2	3	6	9	12	15	18	21	24	30	36	42	48	54	60		
Day		-1	0	1	3	5	7	13	14	30	60	90	180	270	360	450	540	630	720	900	1080	1260	1440	1620	1800			
許容範囲(±)				-	-	-	-	-	-	2	5	7	7	7	7	7	7	7	14	14	14	14	14	14	14	14	3	
	輸血歴																											
バイタル	体温/血圧/呼吸数/脈拍																											
身体所見	全身倦怠感																											
臨床検査 1	WBC/Hb/Ht/Plt																											
	WBC 分画																											
	凝固系(PT/PT-S/aPTT)																											
	肝機能 (T-Bil/AST/ALT/LDH/γ-GTP)																											
	腎機能(BUN/Cr/eGFR)																											
	電解質(Na/K/Cl/Ca/Mg/P)																											
	CRP																											
	ウイルス 1 (HBV/HCV/HIV/HTLV-1)																											
ウイルス 2 (サイトメガロCMV antigenemia ) (EB)																												
真菌・原虫 (カンジダ抗原/β-Dグルカン)																												
臨床検査 2 (原疾患に応じて 実施)	B型肝硬変: HBsAg/HBsAb																											
	C型肝硬変: HCV-RNA(定量)																											
	肝細胞癌: AFP/AFP-L3/PIVKA-II																											
	PBC: AMA/AMA-M2/ IgM/IgG																											
	AIH/PSC: 抗核抗体/IgM/IgG																											
免疫抑制剤使用 状況の確認	薬剤名/用量変更日/用法・用量																											
肝生検	拒絶反応の有無/病理組織学的 スコアリング/線維化の有無																		1	1	1	1			1		1	

期間	手術前 観察期間	術後観察期間 1 (免疫抑制療法期間)														術後観察期間 2 (維持療法期間)						疑 <sup>2</sup> わ <sub>2</sub> れ <sub>2</sub> た <sub>2</sub> 場 <sub>2</sub> 合 <sub>2</sub> が					
		スク リ ン グ リ ン	肝 移 植 手 術 前	免 疫 抑 制 療 法 開 始																							
術後●ヶ月											1	2	3	6	9	12	15	18	21	24	30	36	42	48	54	60	
Day		-1	0	1	3	5	7	13	14	30	60	90	180	270	360	450	540	630	720	900	1080	1260	1440	1620	1800		
許容範囲(±)				-		-	-	-	-	2	5	7	7	7	7	7	7	7	14	14	14	14	14	14	14	14	3
拒絶反応時の治療	薬剤名/用法・用量/治療開始日/治療終了日、血漿交換の有無																										
組織適合性試験	ABO 型検査、HLA-DNA タイピング、クロスマッチ試験 (FCM 法、LCT 法)																										
悪性腫瘍併発の有無	問診																										
有害事象	発現日、有害事象名、重症度、本研究の手順との因果関係、本研究の手順との因果関係を否定する場合にはその理由、有害事象の治療のためにとられた処置、転帰、転帰日	←→																									→

1 免疫抑制剤の完全離脱が可能な場合には、離脱直前および離脱以降は移植術後 21 ヶ月、24 ヶ月、30 ヶ月、36 ヶ月、48 ヶ月、60 ヶ月に相当する来院時に肝生検を行う。なお、規定した来院時点で免疫抑制剤の使用を再開していた場合には肝生検は必須ではない。

2 拒絶反応時の検査：拒絶反応が疑われた日（肝生検はこの日のみ実施）、拒絶反応の診断 2 週間後、1 ヶ月後に実施する。これらが通常来院のアロワンスと重なる場合、重複項目は省略可能とする。また については、拒絶反応の診断から 2 週間後および 1 ヶ月後の全 3 来院に実施する。

3 拒絶反応の確定診断から 2 週間後、1 ヶ月後の検査日アロワンスについては、2 週間後の場合には基準日から ±1 日、1 ヶ月後の場合には基準日から ±2 日とする。

ドナーの参加スケジュール

期間	検査・記録項目	手術前観察期間			肝移植手術
		スクリーニング	リンパ球採取後		
Day			4	4	0
許容範囲(Day)				-	
同意取得	同意年月日				
登録	登録年月日				
アフエーシス	実施日/採血速度/処理血液量/ 採取血液量/採取有核細胞数/ 採取単核球数 血中イオン化 Ca				
肝採取術					
ドナー基本情報	生年月日、性別、同意取得時年齢、身長、体重 生体肝移植に関する臓器提供の同意日、臓器提供の適否 アフエーシス実施の適否 ドナー登録番号				
ドナー背景	合併症 既往歴（重症な血管迷走神経反射の有無、血栓塞栓症の有無を含む） 手術歴 輸血歴				
バイタル	体温/血圧/呼吸数/脈拍				
臨床検査	WBC/Hb/Ht/Plt				
	肝機能 (T-Bil/AST/ALT/LDH/γ-GTP)				
組織適合性試験	ABO 型検査、HLA-DNA タイピング、クロスマッチ試験用採血（FCM 法、LCT 法）				
有害事象			←————→		

4 原則として肝移植手術 1 週間前までとする。またアフエーシス実施日から 1 週間後までの有害事象を記録する。



表 2. 調査日の許容範囲の規定

期間	調査日	許容範囲*1
手術前 観察期間	同意取得	各再生医療等提供機関の規定に準ずる
	スクリーニング検査	
	ドナーリンパ球採取日	原則として肝移植手術7日前まで
	患者リンパ球採取日	肝移植手術前日
	肝移植手術日	なし
術後観察 期間 1	術後 1 週間	なし
	術後 13 日	なし
	術後 2 週間 (基準日: 14 日)	なし
	術後 1 ヶ月 (基準日: 30 日)	28 日 ~ 32 日 (±2 日)
	術後 2 ヶ月 (基準日: 60 日)	55 日 ~ 65 日 (±5 日)
	術後 3 ヶ月 (基準日: 90 日)	83 日 ~ 97 日 (±7 日)
	術後 6 ヶ月 (基準日: 180 日)	173 日 ~ 187 日 (±7 日)
	術後 9 ヶ月 (基準日: 270 日)	263 日 ~ 277 日 (±7 日)
	術後 12 ヶ月 (基準日: 360 日)	353 日 ~ 367 日 (±7 日)
	術後 15 ヶ月 (基準日: 450 日)	443 日 ~ 457 日 (±7 日)
	術後 18 ヶ月 (基準日: 540 日)	533 日 ~ 547 日 (±7 日)
術後観察 期間 2	術後 21 ヶ月 (基準日: 630 日)	616 日 ~ 644 日 (±14 日)
	術後 24 ヶ月 (基準日: 720 日)	706 日 ~ 734 日 (±14 日)
	術後 30 ヶ月 (基準日: 900 日)	886 日 ~ 914 日 (±14 日)
	術後 36 ヶ月 (基準日: 1080 日)	1066 日 ~ 1094 日 (±14 日)
	術後 42 ヶ月 (基準日: 1260 日)	1246 日 ~ 1274 日 (±14 日)
	術後 48 ヶ月 (基準日: 1440 日)	1426 日 ~ 1454 日 (±14 日)
	術後 54 ヶ月 (基準日: 1620 日)	1606 日 ~ 1634 日 (±14 日)
術後 60 ヶ月 (基準日: 1800 日)	1786 日 ~ 1814 日 (±14 日)	
拒絶 反応時*2	診断から 2 週間後 (14 日後)	診断より 13 日 ~ 15 日 (±1 日)
	診断から 1 ヶ月後 (30 日後)	診断より 28 日 ~ 32 日 (±2 日)

\*1: 祝日、休診等の理由により治療・観察が定期的に行えない場合は、この限りではない。

\*2: 診断2週間後および1ヶ月後の来院が通常来院のアロワンスと重なる場合、重複項目は省略可能とする。

## 9 予想される利益および不利益（副作用）

### 9.1 予想される利益

通常の免疫抑制療法では、免疫抑制剤の完全離脱は非常に困難であるが、本免疫寛容プロトコルを用いた場合には、移植術後早期の免疫抑制剤の減量が可能となり、免疫抑制剤からの完全離脱（免疫寛容誘導）し得る可能性が高まる。同時に、免疫抑制療法に伴う感染症や悪性腫瘍発生の危険性、免疫抑制剤の薬物による様々な副作用を軽減でき、免疫抑制剤を減量もしくは離脱することにより患者各々の薬剤費用また免疫抑制療法に起因する種々の合併症の治療に用いることになる医療費の低減に寄与する可能性がある。また、研究の成果により、将来的に肝移植のみならず他の臓器移植を受ける患者にも幅広く貢献でき、さらには移植免疫学の進歩にも寄与すると考えられる。

### 9.2 予想される不利益（副作用）

#### 9.2.1 アフェレーシスによる不利益

リンパ球採取のための成分採血装置によるアフェレーシスに伴う有害事象には以下のものが挙げられる。

血管迷走神経反射（VVR）：過度の緊張や採血に伴う胃神経生理学反応で、悪心嘔吐、発汗、血圧低下、徐脈、重症例では意識消失や痙攣を来す。モニターの装着や患者の観察による早期発見、対処により重症化の予防が可能である。

クエン酸中毒：アフェレーシスに用いる抗凝固剤のACD液によるクエン酸中毒は必発である。予防のためグルコン酸カルシウム溶液の持続静注を併用する。また症状悪化時には急速静注も併用する。

出血：アフェレーシス用の17G穿刺針の穿刺部、またはカテーテル留置部の出血の可能性。抜針後の確実な圧迫止血により予防する。

神経損傷（穿刺の場合）：アフェレーシス用の17G穿刺針の穿刺による神経損傷の可能性がある。神経損傷を避けるためには、なるべく橈側の静脈を穿刺するよう心がける。的確な血管が確保できない場合は、採取を中止するかカテーテルを留置することを検討する。

血小板減少：アフェレーシスにより2～5万前後の血小板減少を来す。

#### 9.2.2 シクロホスファミドによる不利益

自己由来制御性T細胞輸注に際し、あらかじめ末梢血中リンパ球数を減少させる必要があり、その目的でシクロホスファミドを使用する。同剤により、嘔気、易感染性、脱毛、出血性膀胱炎等の副作用が出現する可能性がある。そのため、予防薬（メスナ等）を併用投与し、これらの症状を厳重に監視して、必要に応じて迅速に対応する。

#### 9.2.3 自己由来制御性 T 細胞輸注による不利益

治療に用いる細胞は無菌室で培養を行い、各種菌検査で菌混入が無いことを確認の上で輸注するが、細胞輸注に伴い悪寒、発熱、体熱感、ふるえ、発疹、かゆみ等のアレルギー症状や血圧低下・ショックを来す可能性がある。そのため、医師の同伴下に細胞輸注を行い、バイタルサインなどを厳重に監視し、これら症状などが生じた場合には症状に応じて迅速に対応する。

#### 9.2.4 免疫抑制剤の減量による不利益

免疫抑制剤の減量に伴い、拒絶反応が惹起される可能性がある。そのため、全身状態や血液生化学検査、肝生検などにより早期に拒絶反応を診断し、迅速に治療を行うことでこれに対応する。

#### 9.2.5 肝移植手術による不利益

患者およびドナーから肝移植手術に関する同意を得る際に用いる、「別紙 3 生体肝移植術（保険適用の場合）説明書」に記載された不利益とする。

#### 9.2.6 免疫抑制剤による不利益

使用する免疫抑制剤の添付文書に記載された副作用とする。

### 9.3 その他の有害事象

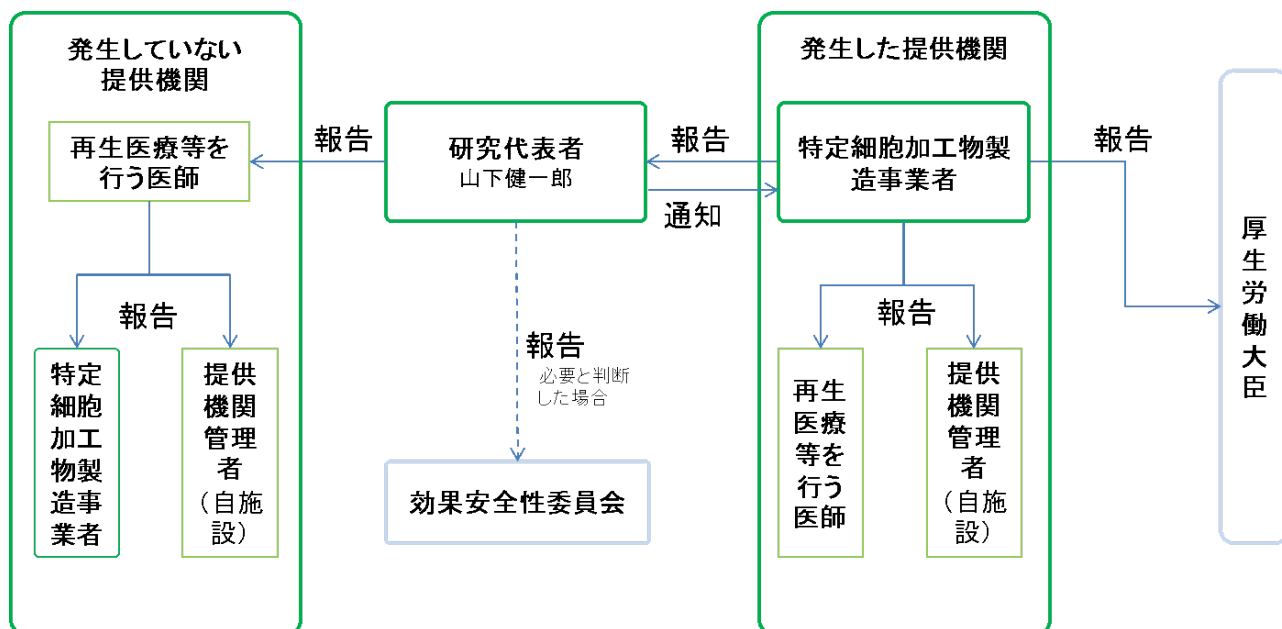
本研究実施中に上記以外の副作用と考えられる症状が認められた際には、研究責任医師または研究分担医師である主治医が迅速に対応する。被験者には異常を感じた場合にはすぐに病院スタッフへ連絡するよう説明する。

### 9.4 細胞の安全性に関する疑義が生じた場合の措置

細胞調製に伴う無菌性の担保ができなくなった場合には、被験者に適切な抗生剤投与、種々による移植細胞の除去等の対応を行い、細胞調製過程の検証と対応ができるまで新たな登録、リンパ球採取および自己由来制御性 T 細胞輸注を中断する。

過増殖、異所性増殖、腫瘍化を認めた場合には新たな登録、リンパ球採取および自己由来制御性 T 細胞輸注を中断し、原因または問題点を検討し、必要な対策を講じる。対策を取るために必要な場合には、試験実施計画書を改訂する。

特定細胞加工製造事業者は再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則第 107 条（平成二十六年九月二十六日厚生労働省令第百十号）「製造に関する重大事態発生」に該当するかを判断し、該当する場合は厚生労働大臣および提供機関管理者に報告する。



省令110号第107条に基づき、実施体制を考慮し報告ルートを決めた。

図5 製造に関する重大事態発生時の報告ルート

### 9.5 公衆衛生上の配慮

本研究で用いられる細胞は、製造段階までは各細胞培養加工施設にて行われ、投与は患者病室にて実施される。細胞輸注の際に用いられた機器等は医療ゴミとして廃棄されるため、環境中に流出することはない。

## 10 評価項目（エンドポイント）

### 10.1 主要評価項目

肝移植術後30ヶ月時点における全免疫抑制剤の完全離脱率

ここでの完全離脱率は“全免疫抑制剤の投与を中止してから、その1年後まで継続して免疫抑制剤の投与がなかった患者の割合”と定義する。

#### 【設定根拠】

一般に、臨床的な免疫寛容状態（Operational tolerance）は免疫抑制剤を完全に中止してから少なくとも1年以上抑制フリーの状態と定義されるため。

## 10.2 副次評価項目

肝移植術後1年（12ヶ月）、2年（24ヶ月）、3年（36ヶ月）、4年（48ヶ月）、5年（60ヶ月）時点における各免疫抑制剤の投与量の推移  
全免疫抑制剤の投与を中止してからの離脱期間  
年齢別の、肝移植術後30ヶ月時点における全免疫抑制剤の完全離脱率  
自己由来制御性T細胞の輸注療法の安全性（有害事象の頻度と程度）  
患者に対するアフエーシス実施中の安全性（有害事象の頻度と程度）

### 【設定根拠】

免疫抑制剤の投与量推移は有効性を評価する指標となることから副次評価項目として適切と判断した。

本研究による治療法の効果の持続性を評価することは本治療法の臨床的有益性を評価する指標となることから副次評価項目として適切と判断した。

免疫寛容の誘導に年齢が影響を及ぼす可能性があり得ることから完全離脱率を指標に年齢の影響を検討するために設定した。

自己由来制御性T細胞を輸注した際の安全性を評価するために設定した。

アフエーシス施行の安全性を評価するために設定した。

## 11 安全性評価項目と有害事象の取扱い

### 11.1 安全性の評価・判定

#### 11.1.1 有害事象の定義

本研究における「有害事象」とは、アフエーシス実施以降に患者およびドナーに生じた全ての好ましくないまたは意図しない疾病、障害ならびにその徴候（臨床検査値の異常を含む）若しくは死亡又は感染症の発生をいい、本研究との因果関係の有無は問わず患者の場合には試験参加終了時まで、ドナーの場合にはアフエーシス実施日後1週間までの間の期間に生じたものを指す。なお有害事象には、肝移植手術に伴うものおよび免疫抑制剤によるものは含まない（肝移植手術および免疫抑制剤に伴う不利益については「9.2.5 肝移植手術による不利益」および「9.2.6 免疫抑制剤による不利益」を参照）。

本研究への登録前より発現している症状や疾病（スクリーニング時に認められた事象を含む）は合併症とし、有害事象としない。ただし、自己由来制御性T細胞輸注後に合併症が悪化した場合、有害事象として取扱い、悪化が確認された日を有害事象の発現日とする。

### 11.1.2 報告対象となる有害事象

再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則（平成二十六年九月二十六日厚生労働省令第百十号）第35条、36条に基づき、当該再生医療等の提供によるものと疑われるもの又は当該再生医療等の提供によるものと疑われる感染症によるもので下記に記載する有害事象が発生した場合は認定再生医療等委員会または厚生労働大臣への報告対象となる。

死亡

死亡につながるおそれのある症例

治療のために医療機関への入院又は入院期間の延長が必要とされる症例

障害

障害につながるおそれのある症例

重篤である症例

後世代における先天性の疾病又は異常

上記以外

### 11.1.3 予測できない有害事象

有害事象のうち、最新の研究実施計画書および併用薬の添付文書に記載されていないもの、あるいは記載されていてもその性質や重症度が記載内容と一致しないもの、または既知の有害事象の性質や重症度に関して重要な情報が追加される報告があった場合は、予測できない有害事象とみなす。例えば、研究実施計画書および添付文書に記載されているよりも限定的か、または重症である事象は予測できない有害事象と考える。

## 11.2 有害事象に関する評価・判定

### 11.2.1 有害事象の記載

- 1) 有害事象名は原則として診断名・疾患名（病名）で症例報告書に記載する。診断名・疾患名が特定できない場合や研究責任医師又は研究分担医師により診断名・疾患名としないことが妥当と判断された場合には臨床症状あるいは兆候を有害事象名とする。
- 2) 複数の臨床症状や徴候（臨床検査値異常を含む）が、ある有害事象（疾患）に随伴して現れた場合、原則としてそれらを一つの有害事象としてまとめて記載する。
- 3) 臨床検査値については、臨床的に意義のある異常の有無を判断し、臨床的に意義のある異常と判断した場合には有害事象とし取り上げ、症例報告書に記

載する。なお、臨床検査値が施設基準値を逸脱したが有害事象とみなさなかった場合、原資料にその理由を記載する。

#### 11.2.2 有害事象の重症度判断

有害事象の程度については次のように分類・定義する・

軽度：日常活動に支障なく、耐え得る程度

中等度：日常活動に支障を生じる程度

重度：日常活動を不可能にする程度

#### 11.2.3 有害事象と再生医療等の提供の因果関係

以下の表を参考にして当該有害事象が再生医療等の提供によるものと疑われるか否かの因果関係を判定する。

再生医療等の提供との因果関係が否定された事象については、因果関係否定の判断理由を必要とする。

因果関係	判断基準
疑われない	当該事象が明らかに再生医療等の提供以外の原因（疾患、環境等）によって引き起こされたと考えられる合理的な理由がある場合、あるいは再生医療等の提供と当該事象発生時期との間に合理的な時間的前後関係が認められない場合。
疑われる	再生医療等の提供後、当該事象が発現するまでの時間的関連性がみられ、再生医療等の提供との因果関係が疑われるもの。また、再生医療等の提供後、時間の経過と共に当該事象が減弱するが、その後の再治療とともに、当該事象が再発または悪化するような場合。

#### 11.2.4 有害事象の転帰

有害事象の転帰は以下の5段階で判定する。

転帰	判定基準
回復	有害事象が消失、または発現前の状態まで戻っている。
軽快	有害事象は完全に回復していないものの、ほぼ消失、または、発現前の状態にほぼ戻っている。
回復したが後遺症あり	有害事象は発現前の状態まで回復したものの、後遺症が残っている。
未回復	有害事象は継続中である。
死亡	有害事象の結果、死亡した。

### 11.3有害事象発生時の取扱い

#### 11.3.1 有害事象発生時の被験者への対応

研究責任医師および研究分担医師は、有害事象を認めたときは、直ちに適切な医学的処置を行い、被験者の安全を確保するとともに、診療録ならびに症例報告書に記載する。また、有害事象に対する治療が必要となった場合には、被験者にその旨を伝える。

#### 11.3.2 実施医療機関における対応

研究責任医師および研究分担医師は、最善の処置・治療を行い、症状または疾患、他覚所見の内容、発現日、重症度、処置の有無およびその内容、転帰およびその判定日、本研究との関連性およびその理由を診療録に記録する。

研究責任医師および研究分担医師は、11.1.2に規定する報告対象となる有害事象のため、研究の継続が困難と判断した場合は、研究を中止しその後の経過を観察する。なお、研究終了・中止時に再生医療等の提供との因果関係が否定できない疾病等の発生が未回復の場合は、回復または軽快するまで可能な限り観察を継続する。ただし、研究責任医師および研究分担医師が再生医療等の提供の影響は消失しており、被験者の安全性は十分確保され、それ以上の追跡調査は必要ないと判断した場合はこの限りではない。

研究責任医師は、臨床試験開始後、11.1.2に規定する報告対象となる有害事象を知ったときは、速やかに提供機関管理者に報告する。

#### 11.3.3 提供機関管理者の対応

研究責任医師より前項の報告を受けた提供機関管理者は、当該報告の内容を、共同研究を行っている他の提供機関管理者に報告する。

提供機関管理者は、研究責任医師に対し、当該再生医療等の中止その他の必要な措置を講ずるよう指示する。

提供機関管理者は、特定細胞加工物を製造した特定細胞加工物製造事業者に対し発生した事態及び講じた措置について速やかに通知する。

#### 11.3.4 認定再生医療等委員会への報告

提供機関管理者は、再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則第35条（平成二十六年九月二十六日厚生労働省令第百十号）に従い、当該再生医療等の提供によるものと疑われるもの又は当該再生医療等の提供によるものと疑われる感染症の発生を知った時は認定再生医療等委員会に報告する。



報告対象の有害事象	報告期限
死亡 死亡につながるおそれのある症例	7日以内
治療のために入院または入院期間の延長が必要とされる症例 障害 障害につながるおそれのある症例 重篤である症例 後世代における先天性の疾病または異常	15日以内
上記以外	再生医療等提供計画を厚生労働大臣に提出した日から起算して60日ごとに当該期間満了後10日以内

#### 11.3.5 厚生労働大臣への報告

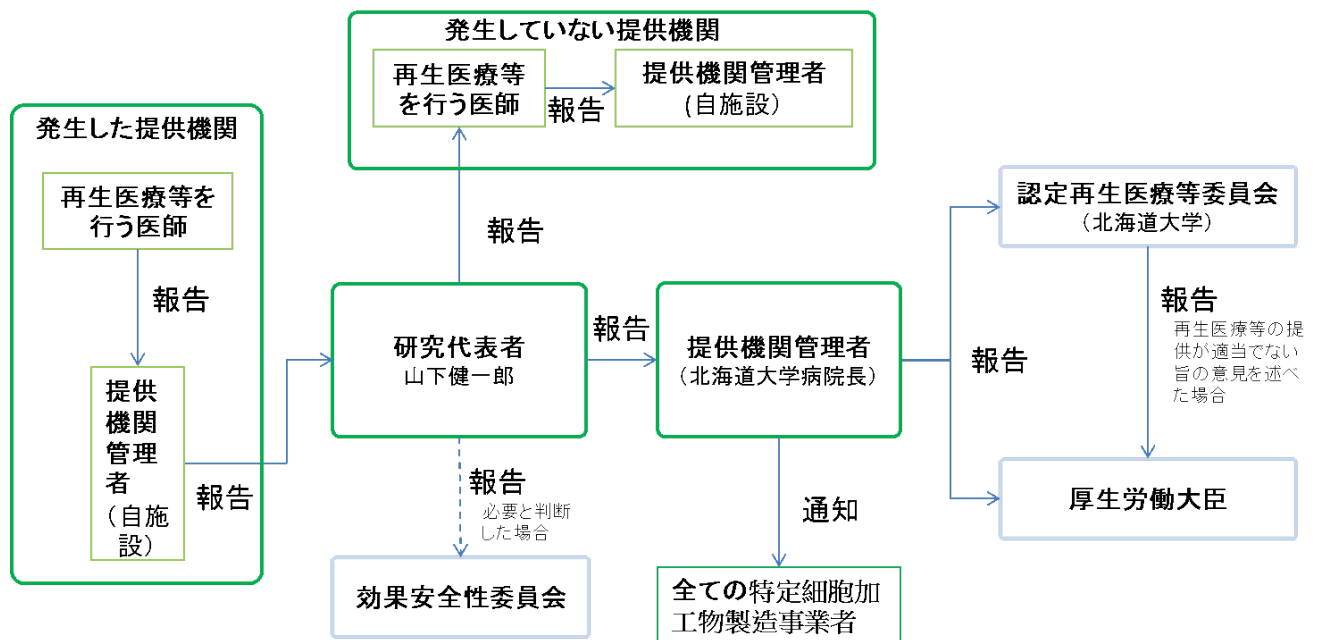
提供機関管理者は、再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則第36条（平成二十六年九月二十六日厚生労働省令第百十号）に従い、当該再生医療等の提供によるものと疑われるもの又は当該再生医療等の提供によるものと疑われる感染症の発生を知った時は厚生労働大臣に報告する。

報告対象の有害事象	報告期限
死亡 死亡につながるおそれのある症例	7日以内
治療のために入院または入院期間の延長が必要とされる症例 障害 障害につながるおそれのある症例 重篤である症例 後世代における先天性の疾病または異常	15日以内

#### 11.3.6 効果安全性評価委員会への報告

研究代表者は、厚生労働大臣への報告義務がある事項について効果・安全性評価委員会の審査が必要と判断した場合、発生から15日以内に効果・安全性評価委員会に報告し、研究責任医師の見解及び報告義務がある事項への対応に関する妥当性について意見を求める。

<p><b>【緊急連絡先】</b>          北海道大学病院          〒060-8638 札幌市北区北14条西5丁目 北大病院 7-2 病棟          TEL：011-706-5843（7-2 病棟直通）</p>
---



省令110号第17条、第35条、第36条に基づき報告ルートを決めた。  
本研究は第三種再生医療に該当するが、多施設共同研究であることを考慮した。

図6 報告対象となる疾病等の発生の場合の報告ルート

## 12 定期報告

### 12.1 提供機関管理者への定期報告

各提供機関の研究責任医師は、本研究で用いる再生医療等の提供の状況に関し、次に掲げる事項について、提供機関管理者に定期的な報告を行う。

- (1) 当該再生医療等を受けた者の数
- (2) 当該再生医療等に係る疾病等の発生状況及びその後の経過
- (3) 当該再生医療等の安全性及び科学的妥当性についての評価

(4) 当該再生医療等の提供を終了した場合にあっては、終了した日

#### 12.2 認定再生医療等委員会への定期報告

提供機関管理者は、本研究で用いる再生医療等の提供の状況に関し、「12.1 提供機関管理者への定期報告」で報告を受けた内容について、認定再生医療等委員会に定期的な報告を行う。

#### 12.3 厚生労働大臣への定期報告

提供機関管理者は、本研究で用いる再生医療等の提供の状況に関し、「12.1 提供機関管理者への定期報告」で報告を受けた内容について、厚生労働大臣へ定期的な報告を行う。なお、報告に際して認定再生医療等委員会が意見を述べた場合には、当該意見を添えることとする。

### 13 研究実施期間

症例登録期間：試験実施計画書承認日～平成 32 年 3 月 31 日

研究実施期間：試験実施計画書承認日～平成 37 年 4 月 30 日

### 14 研究の中止・変更・終了

#### 14.1 個々の被験者における中止と対応

研究責任医師および研究分担医師は、次に挙げる理由で個々の被験者について研究継続が不可能と判断した場合には、当該被験者についての研究を中止する。その際は、必要に応じて中止の理由を被験者に説明する。また、中止後の被験者の治療については、被験者の不利益とならないよう、誠意を持って対応する。

被験者またはドナーから研究参加の辞退の申し出や同意の撤回があった場合  
本研究全体が中止された場合

患者またはドナーのアフェレーシスを実施できなかった場合

移植術後 13 日目までに規格を満たした自己由来制御性 T 細胞が製造されなかった場合

移植術後 13 日目に規定量の自己由来制御性 T 細胞を患者へ輸注できなかった場合

その他の理由により、研究責任医師または研究分担医師が適当と判断した場合

#### 14.2 研究中止時の対応

本研究終了後は、この研究で得られた成果を説明することも含めて、研究責任医師および研究分担医師は被験者に対し最も適切と考える医療を提供する。

#### 14.3 研究実施計画書等の変更

本研究の研究実施計画書や同意説明文書の変更または改訂を行う場合は、あらかじめ認定再生医療等委員会へ報告する。

#### 14.4 研究の中止・中断

研究責任医師は、以下の事項に該当する場合は、研究実施継続の可否を検討する。また、研究の中止あるいは中断を決定した時は、速やかに再生医療等提供機関の管理者にその理由とともに文書で報告する。

被験者の組み入れが困難で、予定症例数に達することが極めて困難であると判断されたとき。

予定症例数または予定期間に達する前に、研究の目的が達成されたとき。

厚生労働大臣により、実施計画等の変更の指示があり、これを受入れることが困難と判断されたとき。

厚生労働大臣により中止の勧告あるいは指示があったとき。

#### 14.5 研究の終了

研究の終了時には、研究責任医師は速やかに研究終了報告書を病院長に提出する。

### 15 目標症例数とその設定根拠および統計解析方法

#### 15.1 目標症例数とその設定根拠

生体肝移植術を受ける患者計40例

##### 【設定根拠】

先行研究<sup>10)</sup>における少なくとも12ヶ月間免疫抑制剤を中止できた割合はおおよそ42%であった。また本試験の先行試験<sup>9)</sup>(10症例)における、肝移植3年後の免疫抑制剤使用中止割合は70%程度であった。上記の結果を踏まえ、本試験における肝移植3年後の免疫抑制剤使用中止割合を65%と仮定し、帰無仮説としての免疫抑制剤使用中止割合を42%とし、有意水準2.5%(片側)で検出力80%を達成する症例数は二項検定(正規近似)をもとに算出すると36例と算出された。また脱落(10%)や本試験での実施可能な例数を考慮し、目標症例数を40例とした。

#### 15.2 統計解析方法

主要評価において、閾値42%に対して有意水準2.5%(片側)でZ検定を実施する。

副次評価において、肝移植術後54ヶ月(4年6ヶ月間)における免疫抑制剤(カルシニューリン阻害薬、副腎皮質ステロイド、代謝拮抗薬)の投与量の推移プロットを作成する。全免疫抑制剤を離脱した場合の離脱期間の要約統計量を算出する。年齢別の全免疫抑制剤離脱の離脱率を算出する。自己由来制御性T細胞の安全性(有害事象の頻度と程度)を集計する。

## 16 データの収集と記録

### 16.1 症例報告書の作成

- 1) 本臨床試験の症例報告書は Electronic Data Capture ( EDC ) システムを利用した電子症例報告書を用いる。
- 2) 登録されたすべての被験者およびドナーの電子症例報告書を作成する。
- 3) 研究責任医師、研究分担医師、または研究協力者は「Web 登録・EDC システム入力マニュアル」に従って、症例報告書の作成および入力内容の変更または修正を行う。なお、診療録からの転記等、医学的判断を伴わない内容については、研究協力者が入力することも可とする。

### 16.2 症例報告書の変更、修正

症例報告書の変更または修正は「Web 登録・EDC システム入力マニュアル」に従う。変更または修正の記録は、EDC システム内に監査証跡として保存される。監査証跡として記録される内容は、変更実施者、変更日時、変更理由である。

### 16.3 症例報告書の提出

- 1) 本臨床試験の各実施施設における研究責任医師は本研究実施計画書に従って正確に作成された症例報告書を確認し、電子署名をする。
- 2) 症例報告書の中のデータのうち原資料に基づくものは原資料と矛盾しないものでなければならない。何らかの矛盾がある場合には、研究責任医師はその理由を説明する記録を作成して保存する。

## 17 原データの特定制および原資料等の直接閲覧

### 17.1 原データの特定制

本研究における本研究における原資料とは、以下のものをいう。

- 1) 対象患者およびドナーの同意および情報提供に関する記録
- 2) 診療録、看護記録、臨床経過記録表、検査データ類など、症例報告書作成の元となった記録
- 3) 本研究で規定された治療に関する記録

なお、以下のデータについては症例報告書に直接記録するとともに、症例報告書を原データとして取り扱うことができる。

- 1) 研究責任医師または研究分担医師のコメント
- 2) 検査：異常所見およびその内容
- 3) 有害事象：転帰、因果関係の有無、判断理由
- 4) プロトコル治療中止、研究の中止：中止理由

## 17.2原資料等の直接閲覧

研究責任医師および再生医療等提供機関は、研究代表者が指名したモニターによるモニタリング、研究代表者が指名した監査担当者による監査および規制当局等による調査時には、原資料等のすべての研究関連記録をモニター、監査担当者、厚生労働大臣等による調査担当者に供し、これに協力するものとする。

なお、再生医療等提供機関は、研究責任医師と協議の上、直接閲覧の方法、実施時期、原資料の特定および閲覧項目等を決定する。

## 18 品質管理および品質保証

研究機関および研究責任医師は、研究代表者が定める標準業務手順書に基づく品質管理および品質保証システムを履行することによって、臨床研究の実施、データの作成、記録が以下に掲げる項目を遵守して行われていることを保証する。

- 1) 研究実施計画書
- 2) 再生医療等の安全性の確保等に関する法律
- 3) 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針

### 18.1モニタリング

#### 18.1.1 施設モニタリング

指名を受けたモニタリング担当者は、下記を実施する。

- ・ 研究実施計画書の遵守確認、安全性情報の収集
- ・ 実施症例に対するサンプリングによる直接閲覧の実施

#### 18.1.2 中央モニタリング

指名を受けたデータセンターの担当者は、症例登録票及び症例報告書に関する整合性の確認と進捗状況に関して、必要に応じて中央モニタリングを実施することができる。

## 19 監査

研究代表者はモニタリングで重大な事項が認められ、研究実施部門から独立した立場の者（監査担当者）による監査が必要と判断された場合、監査担当者に監査を行わせ、本研究が倫理指針、再生医療等の安全性の確保等に関する法律および研究実施計画書に従って実施されたことを保証する。

## 20 試料・情報等の保管

研究責任医師または研究分担医師は、再生医療等を行った際に以下の事項について記録する。

- (1) 再生医療等を受けた者の住所、氏名、性別及び生年月日
- (2) 病名及び主要症状

- (3) 使用した特定細胞加工物又は再生医療等製品の種類、投与方法その他の再生医療等の内容及び評価
- (4) 再生医療等に用いる細胞に関する情報
- (5) 特定細胞加工物の製造を委託した場合は委託先及び委託業務の内容
- (6) 再生医療等を行った年月日
- (7) 再生医療等を行った医師又は歯科医師の氏名

提供機関の管理者は、 に定める記録を、再生医療等提供計画、同意に係る文書及び特定細胞加工物概要書とともに30年間保管する。

提供機関の管理者は、再生医療等を受ける者が感染症を発症した場合等の原因の究明のため、以下の試料について10年間保管する。なお、本研究では採取した血液、組織、細胞等の試料および培養細胞加工物の一部は、試験の安全性検証および追加解析等の二次利用の必要が生じた場合に備え、連結可能匿名化の状態凍結保管する。

検体名	採取量	保管条件
ドナー単核球	0.5mL×2本	-150 ~ -80
患者単核球	0.5mL×2本	-150 ~ -80
試験物	0.5mL×4本	-150 ~ -80

研究責任医師または研究分担医師は、 で規定されたもの以外で本研究の実施に係る情報（申請書類の控え、病院長からの通知文書、各種申請書・報告書の控、診療録、検査データ、症例報告書、その他データの信頼性を保証するのに必要な書類または記録等）を、本研究の終了について報告された日から10年を経過した日又は本研究の結果の最終の公表について報告された日から10年を経過した日のいずれか遅い日までの期間、各提供機関において、それぞれの施設の個人情報保護規定に従い、適切に保管する。

## 21 被験者の人権に対する配慮および個人情報の保護の方法

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言（2013年10月修正）」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」、および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施する。

保存される記録は監督官庁の監査の請求があれば閲覧可能であるが、その場合にも被験者の個人情報およびプライバシーは厳重に保護される。

個人情報保護法の定めるところにより、被験者または代理人が個人情報の訂正、エータ等の使用や停止、第三者へのデータ提供の停止等を希望する場合には、研究責任医師がその希望を確認し、必要な措置を講ずる。

## 22 個人情報の取扱い

研究実施に係る試料等を取扱う際は、患者およびドナーの個人情報とは無関係の番号を付して管理し、患者およびドナーの秘密保護に十分配慮する。研究として収集する情報は登録番号により管理し、また製造に関する情報は各細胞培養加工施設の規定に従って番号で管理する。製造に関する情報は製造番号として収集し、登録番号と連結可能な状態で管理する。研究の結果を公表する際は、患者およびドナーを特定できる情報を含まないようにする。また、研究の目的以外に、研究で得られた被験者の試料等を使用しない。

本研究実施に係わる生データ類および同意書等を扱う際には、患者およびドナーの秘密保護に十分配慮し、個人情報は外部には公開しない。患者およびドナーに関する個人

情報と個人識別情報はパスワードを設定して別々に保管管理する。解析されたデータは匿名化を行い、個人情報特定されないように配慮する。

研究結果の学術的発表に際しては、個人を特定できる情報は公表しない。

## 23 同意取得方法

研究責任医師または研究分担医師は、認定再生医療等委員会で適切と認められた同意説明文書を患者およびドナーに渡し、文書及び口頭による十分な説明を行った上で、患者およびドナーの自由意思による同意を文書で取得する。

研究責任医師または研究分担医師は、患者およびドナーの同意に影響を及ぼす情報が得られたときや、患者およびドナーの同意に影響を及ぼすような実施計画等の変更が行われるときは、速やかに研究対象者に情報提供し、研究に参加するか否かについて研究対象者の意思を予め確認するとともに、事前に同意説明文書等の改訂を行い、患者およびドナーの再同意を得ることとする。

細胞提供者となる患者およびドナーに対する説明として、以下の事項を記載する。

当該細胞の用途

当該細胞の提供により予期される危険及び不利益

細胞提供者となることは任意であること。

同意の撤回に関する事項

当該細胞の提供をしないこと又は当該細胞の提供に係る同意を撤回することにより不利益な取扱いを受けないこと。

当該細胞の提供に係る費用に関する事項

当該細胞の提供による健康被害に対する補償に関する事項

細胞提供者の個人情報の保護に関する事項

当該細胞を用いる再生医療等に係る特許権、著作権その他の財産権又は経済的利益の帰属に関する事項

その他当該細胞を用いる再生医療等の内容に応じ必要な事項

再生医療等を受ける患者に対する説明として、以下の事項を記載する。なお、以降には人を対象とした医学系研究に関する倫理指針に従うものとする。

提供される再生医療等の内容

当該再生医療等の実施により予期される効果及び危険

他の治療法の有無、内容、他の治療法により予期される効果及び危険との比較

再生医療等を受けることを拒否することは任意であること。

再生医療等を受けることを拒否すること又は同意を撤回することにより不利益な取扱いを受けないこと。

同意の撤回に関する事項

研究として行われる場合、当該再生医療等の実施による健康被害に対する補償に関する事項

再生医療等を受ける者の個人情報の保護に関する事項

当該再生医療等の実施に係る費用に関する事項

その他当該再生医療等の提供に関し必要な事項

研究対象者として選定された理由

研究に関する情報公開の方法



研究対象者等の求めに応じて、他の研究対象者等の個人情報等の保護及び当該研究の独創性の確保に支障がない範囲内で研究計画書及び研究の方法に関する資料を入手又は閲覧できる旨並びにその入手又は閲覧の方法

試料・情報の保管及び廃棄の方法

研究の資金源等、研究機関の研究に係る利益相反及び個人の収益等、研究者等の研究に係る利益相反に関する状況

研究対象者等及びその関係者からの相談等への対応

研究対象者から取得された試料・情報について、研究対象者等から同意を受ける時点では特定されない将来の研究のために用いられる可能性又は他の研究機関に提供される可能性がある場合には、その旨と同意を受ける時点において想定される内容

侵襲（軽微な侵襲を除く。）を伴う研究であって介入を行うもの場合には、研究対象者の秘密が保全されることを前提として、モニタリングに従事する者及び監査に従事する者が、必要な範囲内において当該研究対象者に関する試料・情報を閲覧する旨

#### 24 被験者の健康被害への対応と補償

本研究の実施に伴い、患者またはドナーに健康被害が発生した場合は、研究責任医師、研究分担医師、再生医療等提供機関は適切な処置を講じる。また、健康被害に対する補償を行うために補償保険に加入する。補償は、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に従って行う。すなわち、本研究に起因して発生した死亡又は後遺障害（再生医療を受ける者に対しては1級から2級、再生医療等に用いる細胞を提供する者に対しては1級から14級）に対し、補償金を準備する。これ以外の健康被害に対しては、患者またはドナーの保険診療内で検査や治療等、必要な処置を行う。

#### 25 被験者の費用負担

本研究での生体肝移植に伴う費用（手術や検査など）は通常の保険診療内で行う。リンパ球採取、培養、輸注にかかる費用およびこれに伴う特殊検査費用等は公的資金研究費で賄うため、患者の費用負担が増えることはない。なお、ドナーおよび患者に研究協力費等の金銭の支払いはない。

#### 26 研究に関する情報公開の方法及び研究結果の公表、知的財産権の帰属

研究代表者は、公開データベースに当該研究の概要をその実施に先立って登録し、研究計画書の変更及び研究の進捗に応じて適宜更新する。研究を終了したときは、遅滞なく、当該研究の結果を登録する。また、結果を公表する際は、研究対象者等及びその関係者の人権、又は研究責任医師および研究分担医師とその関係者の権利利益の保護のために必要な措置を講じた上で行う。結果の最終の公表を行ったときは、遅滞なく所属する再生医療等提供機関管理者へ報告する。

登録する公開データベースは、大学病院医療情報ネットワーク（UMIN-CTR）とする。

また、本研究に基づく成果が得られ知的財産権等が生じた場合、その権利は研究グループに帰属する。

#### 27 研究資金および利益相反

本研究は、研究責任者・分担者が所属する講座の研究費及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構公募事業等の公的資金で実施する。また、本研究の研究責任医師および研究分担医師は、各再生医療等提供機関が定める「臨床研究に係る利益相反マネジメント」の規定にしたがって、利益相反審査委員会に必要事項を申告し、その審査と承認を得るものとする。

## 28 教育・研修

研究責任医師は、再生医療等を適性の実施するために定期的に教育・研修の機会を確保する。また、研究分担医師および関連する病院スタッフが本研究の再生医療を適正に実施するため、被験者保護や研究促進の観点について定期的な教育・研修の機会を設ける。

## 29 研究体制

### 29.1再生医療等提供機関

国立大学法人北海道大学病院  
学校法人東京女子医科大学病院  
国立大学法人広島大学病院

### 29.2研究実施体制

再生医療等提供機関別の体制の詳細は、「別紙 1 多施設共同臨床研究の機関別実施体制」に示す。

#### (1) 研究代表者：

山下 健一郎（北海道大学大学院医学研究科・移植外科学講座、特任教授）

#### (2) 研究分担者（試験分担医師）

藤堂 省（聖マリア学院大学院 看護学研究科・移植医療研究講座、教授）

奥村 康（順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター、教授）

江川 裕人（東京女子医科大学 消化器外科、教授）

大段 秀樹（広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門 消化器・移植外科学、教授）

奥田 康司（久留米大学病院 消化器外科 肝胆膵外科、教授）

#### (3) 効果安全性評価委員

北海道大学大学院医学研究科 移植外科学講座 特任助教

深井 原

北海道大学病院・診療支援部・ME 器機管理センター 技師長

太田 稔

#### (4) 研究事務局

北海道大学院医学研究科 移植外科学講座

〒060-8638 札幌市北区北 15 条西 7 丁目

TEL：011-706-7765 FAX：011-706-7064

#### (5) データセンター

北海道大学病院 臨床研究開発センター データ管理部門

〒060-8648 札幌市北区北 14 条西 5 丁目

TEL：011-706-7413 FAX：011-706-7737

対応時間帯：平日 8:30～17:00

#### (6) 統計解析

北海道大学病院 臨床研究開発センター 生物統計部門

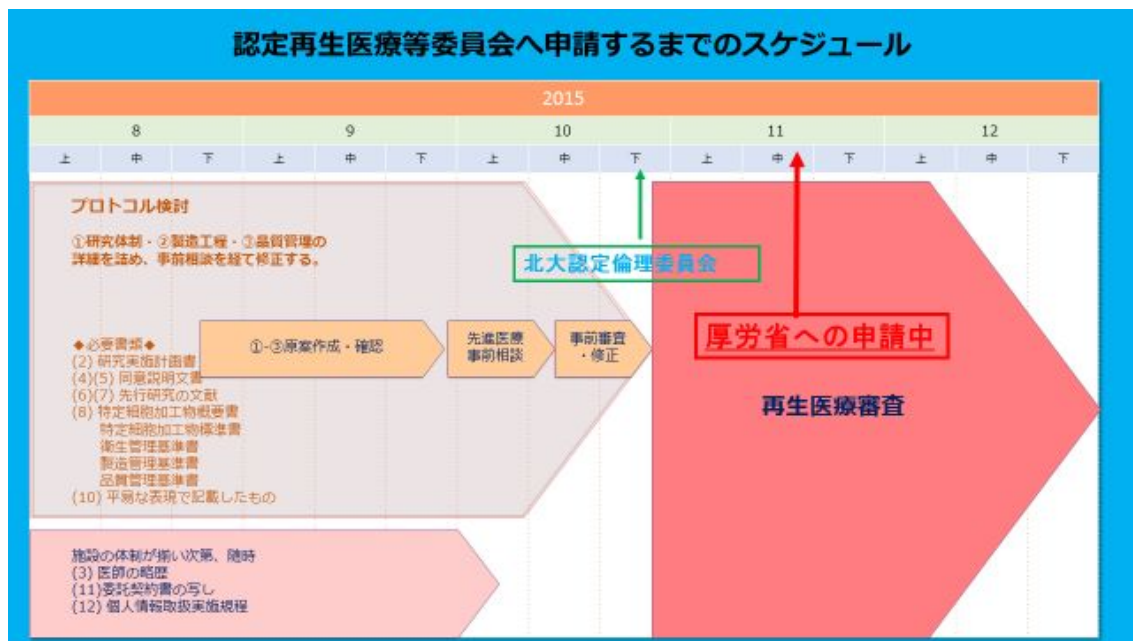
飯島 弘章  
 〒060-8648 札幌市北区北 14 条西 5 丁目  
 TEL : 011-706-5896 FAX : 011-706-7737

(7) 統計解析アドバイザー  
 聖マリア学院大学 学長  
 井手 三郎  
 〒830-8558 福岡県久留米市津福本町 422  
 TEL 0942-35-7271 FAX 0942-34-9125

(8) モニタリング  
 聖マリア学院・病院  
 阿部 広伸、井手 智子  
 〒830-8543 福岡県久留米市津福本町 422

(9) 緊急連絡先・問い合わせ窓口  
 北海道大学病院 消化器外科 I  
 山下 健一郎または移植グループ医師  
 〒060-8638 札幌市北区北 14 条西 5 丁目 北大病院 7-2 病棟  
 TEL : 011-706-5843 ( 7-2 病棟直通 )

(2) . 認定再生倫理委員会の設置と承認：細胞種の決定をうけ北海道大学の認定再生医療等委員会設置、及び、厚労省へ再生医療の審査を下記のスケジュールで受ける予定であったが、北海道大画の対応が遅れ、年度内には県各所申請と承認を受けることができず、生体肝移植患者の登録は一例も行えなかった。



**iv. 考察：**

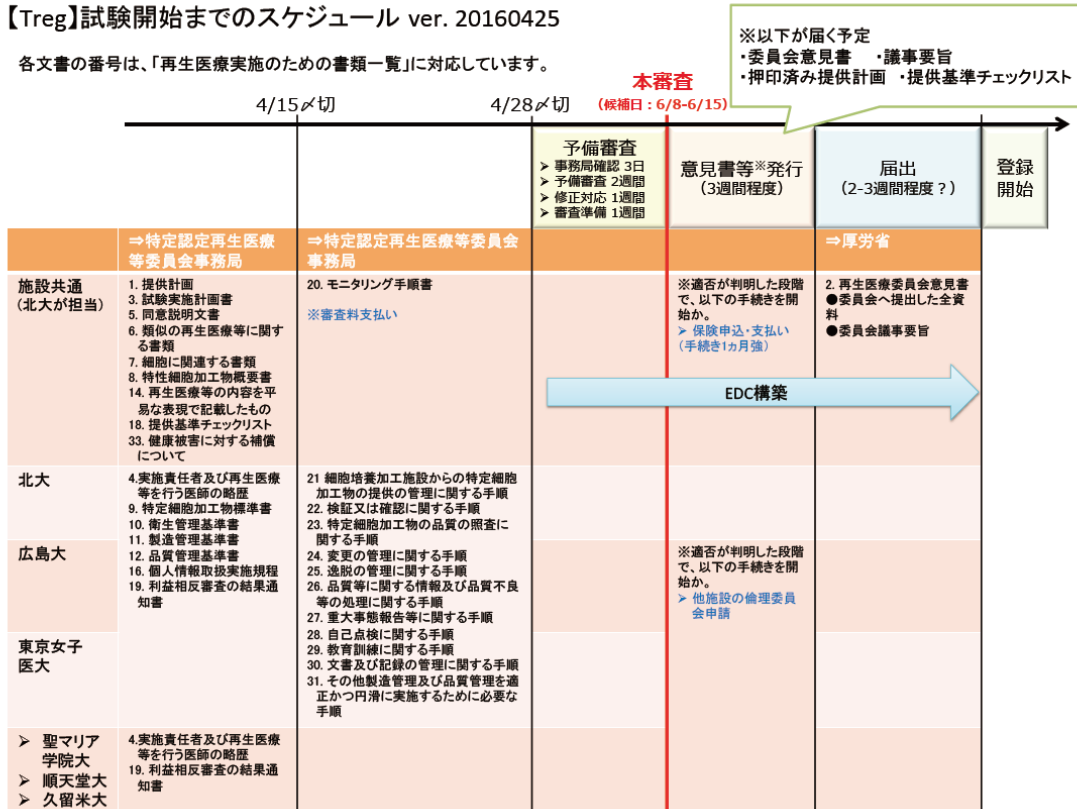
本多施設共同臨床試験では細胞治療を行うため、2013年11月27日に公布された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」を遵守して実施することが求められた。「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」は、2014年11月25日に施行されたものの、厚生労働省およびその各地方局の対応の遅れや国内での特性認定再生医療等委員会の設置・承認がなかなか進まず、このため、本臨床試験を開始するために必要な手続き自体も行えずに、患者登録や試験実施に大幅な遅れを余儀なくされている。なお、現時点において特性認定再生医療等委員会が設置され、厚生労働省の承認が得られた委員会は全国で38あるが、再生医療等提供計画の審査等の受付を開始している委員会は未だ1/3しかないのが現状である。

本研究において、実際に細胞治療を行う再生医療提供機関は、北海道大学（研究分担者：山下健一郎）、東京女子医科大学（研究分担者：江川裕人）、広島大学（研究分担者：大段秀樹）の3施設である。これら3施設の細胞培養加工施設は全て2015年度末までに厚生労働省の承認が得られている。本多施設共同研究の再生医療等提供計画は、東京女子医科大学および広島大学の研究分担者らの協力を得て、北海道大学大学院医学研究科 移植外科学講座（山下健一郎）から一括申請し、同大学に設置される特性認定再生医療等委員会で審査を受け、北海道地方局を通じて厚生労働省に届出の予定で、研究計画書（再生医療等提供計画）を含めた各種必要申請書類の準備を進めてきた。しかし、北海道大学では、特性認定再生医療等委員会は2016年1月に漸く厚生労働省の承認が得られて設置されたものの、審査開始の目処が経たない状況が続いていた。漸く審査受付開始がアナウンスされ、本多施設共同研究の臨床試験実施向け、受付開始日である4月28日に必要申請書類を同委員会事務局に提出し受理されたところである（第1号目の審査予定）。

今後、生体肝移植患者を対象とした本臨床試験の開始（症例登録開始）できるまでに必要な事務手続き等のスケジュール（ロードマップ）を下図に示す。

【Treg】試験開始までのスケジュール ver. 20160425

各文書の番号は、「再生医療実施のための書類一覧」に対応しています。



現在、北海道大学の委員会事務局では提出した申請書の書類確認中で、5月上旬の連休明けより特性認定再生医療等委員会で予備審査が開始される予定である。予備審査(約3週間の見込み)を経て、研究計画内容や書類内容に問題なければ6月上旬に第一回目の本審査が開催される予定である(審査日は未定:6月8-15日を予定)。本審査で承認が得られ次第(適否判定が確定するまで約3週間の見込み)、共同研究施設である東京女子医科大学、広島大学、久留米大学、順天堂大学は、本研究計画書を各施設の学内倫理委員会へ提出する予定である。また、北海道大学は厚生労働省へ再生医療等計画を届出る予定である。届出が受理されるまでには更に約3週間の期間を見込んでいるが、この間に本臨床試験の患者登録や試験実施に必要なEDC (Electronic Data Capture) システム構築等の準備を進める予定である。なお、久留米大学は細胞加工施設を有しておらず、

広島大学の細胞加工施設で細胞加工を行い、細胞を移送して使用する計画であるが、現在、これに必要な予備試験を実施中である。

## b.細胞輸送法の開発（久留米大学と広島大学間）

### i. 目的：

細胞治療に用いる制御性T細胞は、[再生医療等安全確保法]を順守したシステム（セルプロセッシングセンター）で細胞加工を行う必要がある。然し、生体肝移植を行うすべてのセンターにそのシステムがあるわけではなく、より広く本治療法を施行するためには、ドナーとレシピエントの血液をシステムがあるセンターに送り、細胞加工と輸送を図る必要がある。

### ii.方法：

久留米大学病院腎センターにおいて、培養開始5日前にドナーから成分採血装置（COBE Spectra Optia®、テルモ BCT 株式会社、東京）を用いて一次容器（Spectra Optia 成分採血回路採血バック）にリンパ球を採取する。採取リンパ球を輸送パッケージに格納し、2~8 の保冷下に広島大学先進イノベーション・細胞プロセッシングルーム（以下、広島大学CPC）へ輸送する。広島大学CPC内にて、輸送されたドナーリンパ球の一部検体を採取し、十分な規格を満たすことを品質検査にて確認する。久留米大学病院腎センターにおいて、培養開始当日にレシピエントから成分採血装置（同上）を用いて一次容器内にリンパ球を採取する。採取リンパ球を2次容器に格納し2~8 の保冷下に広島大学CPCへ輸送する。広島大学CPCにおいてドナー、レシピエントの採取リンパ球の共培養を行い、培養開始14日目で作成された試験物（制御性T細胞）の一部検体を用い、品質検査において十分な規格を満たしているかを確認する。培養開始14日目、培養細胞浮遊液を2次容器に格納し2~8 保冷下に久留米大学病院に輸送する。久留米大学病院と広島大学病院で発送、到着前後の試験物の一部検体を用い、品質検査（細胞数、生細胞数、エンドトキシン定量、マイコプラズマ、細菌検査）において十分な規格を満たしているかを確認する。

### iii.結果：

	久留米大学			新幹線		広島大学		
	リンパ球回収	梱包終了	病院出発	乗車	降車	病院到着	梱包解除	培養開始
時刻	11:40	11:42	11:50	12:23	13:55	14:17	14:38	18:10



採取リンパ球ならびに作製された試験物の輸送後の細胞生存率はともに 90%以上で、細菌汚染もなかった。今回の輸送パッケージでの保冷時間 3 時間、輸送総時間 6 時間 30 分程度におけるリンパ球の品質は十分確保できたと考える。ただし、今回の輸送パッケージの庫内温度は予想より高め（10~6℃）で推移していた。これは、3 次容器の容量が大きいために、梱包後の冷却に時間がかかっていることが推察される。また、パッケージ総重量も 15 kg、容器サイズも 560x450x360mm で、運搬が容易ではなかった。本臨床研究に際しても、輸送リンパ球の容量は 500ml 前後であり、次回輸送パッケージは 520 × 320 × 375mm で 9 Kg の容器に変更した。

#### **iv. 考察：**

本輸送シミュレーションにおいて、採取されたリンパ球ならびに作製された試験物は、輸送後においても細胞障害は少なく、感染もみられず、その品質は十分保持されていたと考えられる。しかしながら、作製された試験物が、期待された免疫学的機能を有するものかどうかは、今回のシリーズでは明確ではなく、北大における各症例の解析結果との比較と今後の症例の蓄積結果で判断する必要がある。今後、広島大学と再度細部の調整を行い、5 月下旬に第二回の検証を行う方針である。

#### **. マイルストーンの達成状況**

生体肝移植における制御性 T 細胞を用いた細胞治療法の確立では、その達成状況は、1 例も患者登録ができていないことから 0 %である。細胞輸送の安全性は確保されたが、細胞機能の解析がいまだされていないために達成状況は 50 %にとどまる。