

同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルス・チミ
ジンキナーゼ導入ドナーTリンパ球輸注療法の臨床研究新旧対照表

(新)

(旧) (筑波大学・平成21年11月)

<p>1 遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書及び実施計画書</p> <p>(1) 研究実施期間 平成14年3月14日から平成24年3月13日(10年間)</p> <p>(2) 総括責任者 筑波大学人間総合科学研究科 血液内科 教授 千葉 滋 ○ 総括責任者であった血液内科の前教授の後任者 として就任したことによる変更。</p> <p>(3) 総括責任者以外の研究者 須磨崎 亮 筑波大学・人間総合科学研究科・教授 患者の選定、患者への 説明および同意の取得、治 療効果の判定 (小児科)</p> <p>長谷川 雄一 筑波大学・人間総合科学研究科・講師 内科的診療 (内科)</p>	<p>1 遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書及び実施計画書</p> <p>(1) 研究実施期間 平成14年3月14日から平成22年3月13日(8年間)</p> <p>(2) 総括責任者 筑波大学人間総合科学研究科 血液内科 講師 小野寺 雅史(代理・副総括責任者)</p> <p>(3) 総括責任者以外の研究者 小野寺 雅史 筑波大学・人間総合科学研究科・講師 ウィルスベクター全般 に関する情報の収集、なら びに安全管理・遺伝子導入 条件の設定および遺伝子導 入細胞の動態解析</p> <p>小島 寛 筑波大学・人間総合科学研究科・准教授 患者の選定、患者への</p>
--	--

		<u>末梢血単核球分離・細胞保存</u>			<u>説明および同意の取得、治療効果の判定 (内科)</u>
福島 敬	筑波大学・人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (小児科)	須磨崎 亮	筑波大学・人間総合科学研究科・教授	患者の選定、患者への説明および同意の取得、治療効果の判定 (小児科)
鈴木 和己	筑波大学・人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (内科)			
		<u>分子生物学的検査</u>			
大越 靖	筑波大学・人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (内科)	長谷川 雄一	筑波大学・人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (内科)
		<u>遺伝子導入、安全管理</u>	向井 陽美	筑波大学・人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (内科)
金子 新	筑波大学・人間総合科学研究科・非常勤講師	<u>遺伝子導入条件の設定</u>	大越 靖	筑波大学・人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (内科)
	東京大学医科学研究所・助教	<u>遺伝子導入細胞の動態解析、免疫学的検査、ウイルスベクターの安全管理、PCRを用いた遺伝子導入細胞のクロナリティの解析、総括責任者の補佐</u>	福島 敬	筑波大学・人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (小児科)
大塚 藤男	筑波大学・人間総合科学研究科・教授	移植片対宿主病の診断	大塚 藤男	筑波大学・人間総合科学研究科・教授	移植片対宿主病の診断
野口 雅之	筑波大学・人間総合科学研究科・教授	移植片対宿主病の診断	野口 雅之	筑波大学・人間総合科学研究科・教授	移植片対宿主病の診断
			松井 良樹	筑波大学・人間総合科学研究科・助教	<u>末梢血単核球分離・細胞保存</u>
			金子 新	筑波大学・人間総合科学研究科・講師	遺伝子導入細胞の動態解析
中内 啓光	東京大学医科学研究所・教授	免疫学的検査の管理と指導	中内 啓光	東京大学医科学研究所・教授	免疫学的検査の管理と指導
大津 真	東京大学医科学研究所・助教	PCRを用いた遺伝子導入細胞のクロナリティの解析	大津 真	東京大学医科学研究所・助教	<u>ウイルスベクターの安全管理・PCRを用いた遺伝子導入細胞のクロナリティの解析</u>
			坂巻 壽	都立駒込病院血液内科・部長	適応患者の選定 (内科)
			大橋 一輝	都立駒込病院血液内科・医員	適応患者の選定 (内科)

小野寺 雅史 国立成育医療センター研究所・室長 遺伝子治療全般に関する情報の収集と助言

坂巻 壽 都立駒込病院血液内科・副院長 適応患者の選定 (内科)

大橋 一輝 都立駒込病院血液内科・医長 適応患者の選定 (内科)

土田 昌宏 茨城県立こども病院小児科・病院長 適応患者の選定 (小児科)

小池 和俊 茨城県立こども病院小児科・部長 適応患者の選定 (小児科)

加藤 俊一 東海大学・総合医学研究所・教授 適応患者の選定 (小児科)

担当研究者の異動に伴い、修正。

(4) 変更時期

平成21年11月20日

2 遺伝子治療臨床研究実施計画書

(1) 2-2 副総括責任者氏名およびその担当する役割
削除

担当研究者転出に伴い、副総括責任者を廃止する。

土田 昌宏 茨城県立こども病院小児科・部長 適応患者の選定 (小児科)

小池 和俊 茨城県立こども病院小児科・医員 適応患者の選定 (小児科)

加藤 俊一 東海大学総合医学研究所・教授 適応患者の選定 (小児科)

(4) 変更時期

平成19年4月1日

2 遺伝子治療臨床研究実施計画書

(1) 2-2 副総括責任者氏名およびその担当する役割

小野寺 雅史

筑波大学・人間総合科学研究科・講師

ウィルスベクター全般に関する情報の収集、ならびに安全管理・遺伝子導入条件の設定および遺伝子導入細胞の動態解析

(2) 4. 遺伝子治療臨床研究の目的

3. GCV 投与による GVHD の沈静化

GVHD 発症時に GCV の投与を行った症例に対し、その GVHD 沈静化の程度を「急性 GVHD の Grade (別添 8)」を参考に判定する (例 皮膚 III→0)。また、同時に抗 LINGFR 抗体を用いた Flow cytometry 解析ならびに HSV-TK 遺伝子に対する polymerase chain reaction (PCR) 法にて遺伝子導入細胞の推移を測定する。CMV 発症の際に GCV を投与した症例に関しては、上記 Flow cytometry、PCR にて遺伝子導入細胞の推移を検討し、GCV 投与による遺伝子導入細胞の排除率を測定する。

[○ 正式な表記に変更]

(3) 6-2. 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに標的細胞とした理由

本臨床研究の標的細胞はドナー由来の末梢血 T 細胞である。これは GVL 効果のメカニズムが未だ解明されていないものの、GVL 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T 細胞であることが多くの実験から支持されているためである。最近これら T 細胞が GVHD の原因となる T 細胞と

(2) 4. 遺伝子治療臨床研究の目的

3. GCV 投与による GVHD の沈静化

GVHD 発症時に GCV の投与を行った症例に対し、その GVHD 沈静化の程度を「急性 GVHD の Grade (別添 8)」を参考に判定する (例 皮膚 III→0)。また、同時に抗 LINGFR 抗体を用いた FACS 解析ならびに HSV-TK 遺伝子に対する polymerase chain reaction (PCR) 法にて遺伝子導入細胞の推移を測定する。CMV 発症の際に GCV を投与した症例に関しては、上記 FACS、PCR にて遺伝子導入細胞の推移を検討し、GCV 投与による遺伝子導入細胞の排除率を測定する。

(3) 6-2. 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに標的細胞とした理由

本臨床研究の標的細胞はドナー由来の末梢血 T 細胞である。これは GVL 効果のメカニズムが未だ解明されていないものの、GVL 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T 細胞であることが多くの実験から支持されているためである。最近これら T 細胞が GVHD の原因となる T 細胞と

異なることが示唆されているが、現実的には両者を区別することは不可能であるため、本研究においてはリコンビナント・ヒト・インターロイキン 2 (rhIL-2) と抗 CD3/CD28 抗体結合ビーズにて刺激した末梢血リンパ球 (T 細胞) 全体が標的細胞として使用される。

末梢血リンパ球は上記のサイトカインの存在下で長期間培養可能であり、レトロウイルスの感染効率も極めて高いことが過去の臨床治験より証明されている (42、43)。

(4) 6-4-4. 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 Am12 はアンフトロピック系のパッケージング細胞株で、感染宿主は広範であり、マウス、ラット、サル、ヒト等の細胞に感染する。ただレトロウイルスの場合、静止期の細胞には感染せず、遺伝子導入に際しては種々のサイトカインで標的細胞に刺激を与え、細胞を細胞周期に誘導しなければならない。本臨床研究では末梢血 T 細胞を rhIL-2 と抗 CD3/CD28 抗体結合ビーズで刺激する。レトロウイルスベクターにより導入された遺伝子は一般的に安定で、細胞分裂ごとに娘細胞へと伝えられていくが、導入された遺伝子発現に関しては in vivo において、種々の shut off 機構により減弱していくことが知られている。本臨床研究で使用されるウイルスベクターは増殖能を欠いているので、RCR が存在しない限り、感染した末梢血 T 細胞から周囲の細胞へ感染することはない。

異なることが示唆されているが、現実的には両者を区別することは不可能であるため、本研究においてはリコンビナント・ヒト・インターロイキン 2 (rhIL-2) と抗 CD3 抗体 (OKT3) にて刺激した末梢血リンパ球 (T 細胞) 全体が標的細胞として使用される。

末梢血リンパ球は上記のサイトカインの存在下で長期間培養可能であり、レトロウイルスの感染効率も極めて高いことが過去の臨床治験より証明されている (42、43)。

(4) 6-4-4. 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 Am12 はアンホトロピック系のパッケージング細胞株で、感染宿主は広範であり、マウス、ラット、サル、ヒト等の細胞に感染する。ただレトロウイルスの場合、静止期の細胞には感染せず、遺伝子導入に際しては種々のサイトカインで標的細胞に刺激を与え、細胞を細胞周期に誘導しなければならない。本臨床研究では末梢血 T 細胞を rhIL-2 と OKT3 で刺激する。レトロウイルスベクターにより導入された遺伝子は一般的に安定で、細胞分裂ごとに娘細胞へと伝えられていくが、導入された遺伝子発現に関しては in vivo において、種々の shut off 機構により減弱していくことが知られている。本臨床研究で使用されるウイルスベクターは増殖能を欠いているので、RCR が存在しない限り、感染した末梢血 T 細胞から周囲の細胞へ感染することはない。

○ 近年、抗 CD3 抗体 (OKT3) に替えて抗 CD3/CD28 抗体結合ビーズ (ClinExVivo) を用いて樹立した TK-T 細胞は、白血病治療に有効な強い抗原反応性を維持していることがヒト化マウスモデルで報告されたため (Bondanza A et al Blood 2006, Kaneko S et al Blood 2008)

(5) 7-1-1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

(略)

レトロウイルスベクター産生細胞の品質検査項目

試験内容	方法	結果
ΔLNGFR の発現 (細胞解凍時、および 8 週目)	Flow cytometry 解析	>95%

○ 正式な表記に変更

(6) 7-1-2. 患者に投与する物質の純度および安全性

患者に投与する物質は、遺伝子が導入されたドナー末梢血リンパ球のみである。培養に用いられる血清は、ウシ血清が患者にとって異種タンパク質であり、時として患者にとって抗原となり得るため、末梢血 T 細胞培養に際しては

(5) 7-1-1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

(略)

レトロウイルスベクター産生細胞の品質検査項目

試験内容	方法	結果
ΔLNGFR の発現 (細胞解凍時、および 8 週目)	FACS 解析	>95%

(6) 7-1-2. 患者に投与する物質の純度および安全性

患者に投与する物質は、遺伝子が導入されたドナー末梢血リンパ球のみである。培養に用いられる血清は、ウシ血清が患者にとって異種タンパク質であり、時として患者にとって抗原となり得るため、末梢血 T 細胞培養に際しては

ドナーの自己血漿が用いられる。遺伝子導入の際に用いられる種々の試薬や抗体に関しては、遺伝子導入細胞を凍結保存する前に 3%ドナー自己血漿を含む PBS で十分に洗浄されるが、遺伝子導入終了後、細胞の一部を SRL 社ならびに筑波大学附属病院検査部に提出し、以下の検査を行うことで安全性を確かめる。安全性が確認されるまで遺伝子導入細胞は-80℃で保存され、安全性が確認された後に使用される。

なお RCR テストの一種である PG-4 S⁺L⁻テストは最終結果が判明するまで約 4 週間かかるため、逆転写酵素活性が測定感度以下であることならびに PCR により env 遺伝子が増幅されないことを確認された遺伝子導入ドナーリンパ球は RCR テスト陰性と判断され、患者に投与できるものとする。ただし、同検体を用いた PG-4 S⁺L⁻テストが後に陽性と判明した際は、速やかに投与後の患者末梢血ならびに血漿を用いて逆転写酵素活性と PCR による env 遺伝子増幅検査を行い、その結果、いずれの一つでも陽性と判明した場合は RCR 陽性と判断し、GVHD 時と同用量のガンシクロビルを投与する。いずれも陰性の場合 S⁺L⁻テストを再度行い、陽性の場合ガンシクロビル投与を行う。S⁺L⁻テスト陰性であれば次の定期検査までの経過観察とする。遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後の定期検査中に、上記 2 検査により RCR 陽性が疑われた場合も GVHD 時と同用量のガンシクロビルを投与

ドナーの自己血漿が用いられる。遺伝子導入の際に用いられる種々の試薬や抗体に関しては、遺伝子導入細胞を患者に投与する前に 3%ドナー自己血漿を含む培地で十分に洗浄されるが、遺伝子導入終了後、細胞の一部を SRL 社に送付し、以下の検査を行うことで安全性を確かめる。安全性が確認されるまで遺伝子導入細胞は-80℃で保存され、安全性が確認された後に使用される。

尚、RCR テストにおける PG-4 S⁺L⁻テストは最終結果が判明するまで約 4 週間かかるため、患者投与に際しては逆転写酵素活性が測定感度以下ならびに PCR により env 遺伝子が増幅されないことを確認の上、調整細胞を投与できるものとする。ただし、後に判明した PG-4 S⁺L⁻テストにて陽性が確認された場合は、即座に患者末梢血ならびに血漿を用いて逆転写酵素活性の測定、PCR 法による env 遺伝子の増幅、PG-4 S⁺L⁻テストを行い、いずれの一つでも陽性と判明した場合は GVHD 時と同用量のガンシクロビルを投与し、遺伝子導入細胞を死滅させる。更に抗ウイルス剤等も併用し、最善の治療を行う。そして、上記検査がすべて陰性化するまで患者を外界との接触を断った個室にて管理する（「遺伝子組み換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく）。その過程でリンパ腫を含む異常細胞の増殖が確認された場合、種々の検査結果を基に最適な治療法を選択し、治療を開始する。患者細胞を用いた検査にて

する。その他にも抗ウイルス薬など病態に適した治療が存在する場合は、それを併用する。そして、上記検査がすべて陰性化するまで患者を外界との接触を断った個室にて管理する（「遺伝子組み換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく）。その過程でリンパ腫を含む異常細胞の増殖が確認された場合、種々の検査の基に最適な治療法を選択し、治療を開始する。患者細胞を用いた検査にて陰性と判明した場合でも定期的に野生型ウイルスの存在を確認する。

1. 無菌性（細菌、真菌、マイコプラズマ）
2. 細胞の RCR テスト（逆転写酵素活性、env 遺伝子、Mus dunni 細胞との共培養後の PG-4 S⁺L⁻テスト；治療開始時の RCR の存在は逆転写酵素活性、env 遺伝子の有無によって判定する。）
3. 上清中の RCR テスト（逆転写酵素活性、env 遺伝子、Mus dunni 細胞との共培養後の PG-4 S⁺L⁻テスト；治療開始時の RCR の存在は逆転写酵素活性、env 遺伝子の有無によって判定する。）
4. Flow cytometry によるドナー細胞の Δ LNGFR 発現
5. エンドトキシン (LAL、gelation test)
6. 細胞状態
7. GCV の感受性

陰性と判明した場合でも定期的に野生型ウイルスの存在を確認する。

1. 無菌性（細菌、真菌、マイコプラズマ）
2. 細胞の RCR テスト（Mus dunni 細胞との共培養後の PG-4 S⁺L⁻テスト、逆転写酵素活性、env 遺伝子。治療開始時の RCR の有無は逆転写酵素活性、env 遺伝子の有無によって行う。）
3. 上清中の RCR テスト（Mus dunni 細胞への感染後の PG-4 S⁺L⁻テスト、逆転写酵素活性、env 遺伝子。治療開始時の RCR の有無は逆転写酵素活性、env 遺伝子の有無によって行う。）
4. FACS によるドナー細胞の Δ LNGFR 発現
5. エンドトキシン (LAL、gelation test)
6. 細胞状態
7. GCV の感受性

○ 筑波大学附属病院検査部において施行可能な検査項目（無菌性試験、env 遺伝子 PCR）が増えたため。

(7) 7-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性

本研究で使用するレトロウイルスベクターDNA SFCMM-3 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部、もしくは一部を欠除しており、また用いるパッケージング細胞株 GP+envAm12 においても gag、pol を発現する DNA 断片と env を発現する DNA 断片とが異なったベクターにより発現されることから RCR の出現は極めて少ないと考えられる。また、過去の症例においても細胞傷害性は報告されていない。実際の治療に使用される SFCMM-3 ウイルスベクター上清は使用前に MolMed 社により RCR が存在しないことが確認されたものを使用する。また、治療開始以後の患者体内での RCR の有無に関しても、患者の細胞や血清を用いて SRL 社もしくは筑波大学附属病院検査部において測定する（別添 12）。

○ ウイルス汚染の検査は、筑波大学附属病院検査部においても可能なため修正。

(7) 7-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性

本研究で使用するレトロウイルスベクターDNA SFCMM-3 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部、もしくは一部を欠除しており、また用いるパッケージング細胞株 GP+envAm12 においても gag、pol を発現する DNA 断片と env を発現する DNA 断片とが異なったベクターにより発現されることから RCR の出現は極めて少ないと考えられる。また、過去の症例においても細胞傷害性は報告されていない。実際の治療に使用される SFCMM-3 ウイルスベクター上清は使用前に MolMed 社により RCR が存在しないことが確認されたものを使用する。また、治療開始以後の患者体内での RCR の有無に関しても、患者の細胞や血清を用いて SRL 社に輸送して RCR の測定を依頼する（別添 11）。

(8) 7-1-5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本遺伝子治療臨床研究では、標的細胞としてのドナー末梢血 T リンパ球に試験管内で HSV-TK 遺伝子および ΔLNGFR 遺伝子を導入し、導入細胞のみを患者に投与することから、標的細胞以外の細胞に遺伝子が導入される可能性は RCR が存在しない限りあり得ない。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株より産生されたレトロウイルスベクターの場合、ヒト血清（補体）により直ち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感染細胞の細胞膜表面に付着することで患者体内に混入されても、それが原因で新たな細胞に遺伝子導入が起こることは極めて少ない。

〔 ○ 遺伝子導入前に T リンパ球のみに純化するため。 〕

(9) 7-1-7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

事実、フランスおよびイギリスの X 連鎖性重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血前駆細胞 (CD34 陽性細胞) を用いた遺伝子治療において発症した白血病 5 例のうち 4 例において、使用したレトロウイルスベクターが患者染色体上の癌原遺伝子 LMO-2 近傍に挿入されていたとの報告もある (56)。

(8) 7-1-5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本遺伝子治療臨床研究では、標的細胞としてのドナー末梢血単核球に試験管内で HSV-TK 遺伝子および ΔLNGFR 遺伝子を導入し、導入細胞のみを患者に投与することから、標的細胞以外の細胞に遺伝子が導入される可能性は RCR が存在しない限りあり得ない。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株より産生されたレトロウイルスベクターの場合、ヒト血清（補体）により直ち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感染細胞の細胞膜表面に付着することで患者体内に混入されても、それが原因で新たな細胞に遺伝子導入が起こることは極めて少ない。

(9) 7-1-7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

事実、フランス X 連鎖性重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血前駆細胞 (CD34 陽性細胞) を用いた遺伝子治療において、使用したレトロウイルスベクターが患者染色体の LMO-2 近傍に挿入され、2 例において白血病が発症したとの報告もある (56)。

○ イギリスでの報告を追記し、引用文献も更新。

(10) 7-3-1. 培養細胞の純度

培養細胞間の細胞汚染を防ぐために、各ドナー細胞への遺伝子導入は日時を変えて行う。また、各々の細胞は培養器の別個の棚を用いて培養される。また、微生物の汚染を防ぐために、全ての操作はP2レベルの実験室で行われる。細胞の取り扱いはクラスIIの安全キャビネット内で行われ、細胞自体や未知の感染性微生物の相互混入を防ぐ。無菌性の検査は遺伝子導入前、及び導入後の凍結貯蔵直前に行われる。検査項目として好気性、嫌気性細菌、真菌ならびにマイコプラズマ、RCRを含むウイルス汚染の検査である。これらの検査はSRL社ならびに筑波大学附属病院検査部によって行われる。

○ ウイルス汚染の検査は、筑波大学附属病院検査部においても可能なため追記。

(11) 7-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性

投与する細胞はレトロウイルスベクターSFCMM-3を導入したドナー由来の末梢血T細胞である。現在、再発

(10) 7-3-1. 培養細胞の純度

培養細胞間の細胞汚染を防ぐために、各ドナー細胞への遺伝子導入は日時を変えて行う。また、各々の細胞は培養器の別個の棚を用いて培養される。また、微生物の汚染を防ぐために、全ての操作はP2レベルの実験室で行われる。細胞の扱扱いはクラスIIの安全キャビネット内で行われ、細胞自体や未知の感染性微生物の相互混入を防ぐ。無菌性の検査は遺伝子導入前、及び導入後の凍結貯蔵直前に行われる。検査項目として好気性、嫌気性細菌、真菌ならびにマイコプラズマ、RCRを含むウイルス汚染の検査である。これらの検査はSRL社によって行われる。

(11) 7-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性

投与する細胞はレトロウイルスベクターSFCMM-3を導入したドナー由来の末梢血T細胞である。現在、再発

白血病に対する治療としてドナー由来の末梢血リンパ球を患者に投与する DLI は広く行われており、GVHD を除いてドナーT 細胞の投与自体では患者に重大な影響を及ぼさない。また、細胞培養の際に使用した抗 CD3/CD28 抗体結合ビーズ、rhIL-2 の洗浄後の残存濃度は極めて微量で、これらの抗体やサイトカインが生体に及ぼす影響は限りなく無に等しい。

細胞の安全性として、 Δ LINGFR 発現細胞の分離度を 90% とすると 10% 程度の細胞は非ウイルスベクター導入細胞であり、これらの細胞が導入細胞と一緒に患者に投与されることとなる。また、 Δ LINGFR 発現細胞の 10% 以下の割合で短縮した HSV-TK 発現細胞が混入している可能性がある(57)。これら非導入細胞と短縮 HSV-TK 発現細胞は GVHD 発症の際に GCV の投与によっても細胞死に至らず、GVHD が持続する可能性がある。しかし、1 細胞にウイルスベクターが 1 コピーのみ入っているという条件の元に、投与量から換算するとこれら GCV 不応細胞は多くても 1.9×10^7 cells/kg を超えず、この程度の量では重症 GVHD が起こりにくいことが報告されているので(58)、GCV 投与に加え従来の免疫抑制療法を併用することで重篤な GVHD は沈静化するものと思われる。

白血病に対する治療としてドナー由来の末梢血リンパ球を患者に投与する DLI は広く行われており、GVHD を除いてドナーT 細胞の投与自体では患者に重大な影響を及ぼさない。また、細胞培養の際に使用した OKT3、rhIL-2 の洗浄後の残存濃度は極めて微量で、これらサイトカインが生体に及ぼす影響は限りなく無に等しい。

細胞の安全性として、 Δ LINGFR 発現細胞の分離度 90% とすると 10% 程度の細胞は非ウイルスベクター導入細胞であり、これらの細胞が導入細胞と一緒に患者に投与されることとなる。これら非導入細胞は GVHD 発症の際に GCV の投与によっても細胞死に至らず、GVHD が持続する可能性がある。しかし、投与量から換算するとこれら非導入細胞は多くても 10×10^6 cells/kg を超えず、この程度の量では重症 GVHD が起こりにくいことが報告されているので、GCV 投与に加え従来の免疫抑制療法を併用することで重篤な GVHD は沈静化するものと思われる。

○ 抗 CD3 抗体 (OKT3) に替えて抗 CD3/CD28 抗体結合ビーズ (ClinExVivo) を用いる予定であるため、GCV 非感受性細胞の存在を計算に反映した。

(1 2) 8. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠

以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。

1. 現在、白血病の治療や EBV-LPD に対して広く DLI が行われ、白血病治療における DLI の位置づけがある程度確立していること。また、遺伝子導入率を 90%とした時、GCV の投与により患者体内に残存するドナー T 細胞は 1.9×10^7 cells/kg 以下と考えられ、GVHD を引き起こす可能性が比較的低下すること。

○ GCV 非感受性細胞の存在を計算に反映した。

3. 本研究で使用されるベクターはイタリアの Claudio Bordignon 博士との共同研究で MolMed 社から供与または購入されるものであり、同博士はイタリアで同ベクターを用い 51 名の白血病患者に遺伝子治療を行い、遺伝子導入細胞の安全性、GVL 効果と GVHD 発症の際の GCV による GVHD の沈静化を報告していること。(59)

(1 2) 8. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠

以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。

1. 現在、白血病の治療や EBV-LPD に対して広く DLI が行われ、CML に対する DLI の有効性は既に確立していること。また、遺伝子導入率を 90%とした時、GCV の投与により患者体内に残存するドナー T 細胞は 1×10^7 cells/kg 程度と考えられ、この程度のドナー T 細胞では現行の DLI から考えて GVHD を引き起こす可能性が比較的低いこと。

3. 本研究で使用されるベクターはイタリアの Claudio Bordignon 博士との共同研究で MolMed 社から供与されるものであり、同博士はイタリアで同ベクターを用い 23 名の白血病患者に遺伝子治療を行い、遺伝子導入細胞の安全性、GVL 効果と GVHD 発症の際の GCV による GVHD の沈静化を報告していること。

○ 治療症例数が増えたため。

4. 本臨床研究の研究者である金子はイタリア・サンラファエレ研究所の Bordignon 博士、Bonini 博士（再発白血病に対する TK 遺伝子治療の臨床研究の開発者）の元で3年にわたり、SFCMM-3 ベクターを用いた T 細胞遺伝子治療の基礎研究・臨床研究を行っており、本遺伝子治療に用いられる手法に関して熟知していること。

5. 本臨床研究の研究者である大津は平成 7 年ならびに平成 16 年に北海道大学で行われた日本初の ADA-SCID に対する遺伝子治療臨床研究において中心的な役割を果たしており、遺伝子治療臨床研究における遺伝子導入法について熟知していること。また、米国国立衛生研究所のブレース博士（世界初の遺伝子治療での中心的人物）の元で3年半にわたり、遺伝子治療臨床研究に使用されるベクターの開発に携わっており、レトロウイルス一般に関することも熟知していること。

6. 本臨床研究の研究者である小野寺は平成 7 年に北海道大学で行われた日本初の ADA-SCID に対する遺伝

4. 本臨床研究の研究者である小野寺は平成 7 年に北海道大学で行われた日本初の ADA-SCID に対する遺伝

子治療臨床研究において中心的な役割を果たしており、遺伝子治療臨床研究における遺伝子導入法について熟知していること。また、米国国立衛生研究所のブレース博士（世界初の遺伝子治療での中心的人物）の元で3年半にわたり、遺伝子治療臨床研究に使用されるベクターの開発に携わっており、レトロウイルス一般についても熟知していること。

以上のことから本研究の実施は理論的にも、実質的にも可能と思われる。

○ 遺伝子治療臨床研究を行うにあたり、レトロウイルスの研究者である小野寺の他に、遺伝子導入法並びに遺伝子治療に精通している大津と金子について説明。

(13) 9-1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

3. 上記遺伝子導入T細胞が重篤なGVHD発症の際に、GCVの投与により患者体内で死滅し、重篤GVHDが沈静化するかどうか。

GVHD発症時にGCVの投与を行った症例に対し、そのGVHD沈静化の程度を「急性GVHDのGrade(別添8)」を参考に判定する(例 皮膚 III → 0)。また、同時に抗

子治療臨床研究において中心的な役割を果たしており、遺伝子治療臨床研究における遺伝子導入法について熟知していること。また、米国国立衛生研究所のブレース博士（世界初の遺伝子治療での中心的人物）の元で3年半にわたり、遺伝子治療臨床研究に使用されるベクターの開発に携わっており、レトロウイルス一般についても熟知していること。

以上のことから本研究の実施は理論的にも、実質的にも可能と思われる。

(13) 9-1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

3. 上記遺伝子導入T細胞が重篤なGVHD発症の際に、GCVの投与により患者体内で死滅し、重篤GVHDが沈静化するかどうか。

GVHD発症時にGCVの投与を行った症例に対し、そのGVHD沈静化の程度を「急性GVHDのGrade(別添8)」を参考に判定する(例 皮膚 III → 0)。また、同時に抗

LNGFR 抗体を用いた Flow cytometry 解析ならびに HSV-TK 遺伝子に対する PCR 法にて遺伝子導入細胞の推移を測定する。CMV 発症の際に GCV を投与した症例に関しては、上記 Flow cytometry、PCR にて遺伝子導入細胞の推移を検討し、GCV 投与による遺伝子導入細胞の排除率を測定する。

[○ 正式な表記に変更]

(1 4) 9-3 被験者の同意の取得方法

本遺伝子治療臨床研究を開始するにあたっては、主治医は患者の同意を得るに際して先ず説明用資料（別添 1-1 後半の「本研究の詳細な説明」）を用いて当該遺伝子治療の概略を患者に説明し、その後「同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ導入ドナーTリンパ球輸注療法を考慮しておられる方、あるいは親族の方へ」を参考に、下記の 1~7 に関して再度患者に説明し、自由意志による本治療参加の同意を文書にて得る（別添 1-1）。患者の同意を得ることが困難な場合には、その代理人等（家族、配偶者、保護者、親権者を含む）の同意を文書にて得るものとする。

(1 5) 9-5-2 遺伝子導入方法（安全性および有効性に関する

LNGFR 抗体を用いた FACS 解析ならびに HSV-TK 遺伝子に対する PCR 法にて遺伝子導入細胞の推移を測定する。CMV 発症の際に GCV を投与した症例に関しては、上記 FACS、PCR にて遺伝子導入細胞の推移を検討し、GCV 投与による遺伝子導入細胞の排除率を測定する。

(1 4) 9-3 被験者の同意の取得方法

本遺伝子治療臨床研究を開始するにあたっては、主治医は患者の同意を得るに際して先ず説明用資料（別添 1-1 の「本研究の詳細な説明」）を用いて当該遺伝子治療の概略を患者に説明し、その後「同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ導入ドナーTリンパ球輸注療法」を考慮しておられる方へ）を参考に、下記の 1~7 に関して再度患者に説明し、自由意志による本治療参加の同意を文書にて得る（別添 1-1）。患者の同意を得ることが困難な場合には、その代理人等（家族、配偶者、保護者、親権者を含む）の同意を文書にて得るものとする。

(1 5) 9-5-2 遺伝子導入方法（安全性および有効性に関する事

事項を除く)

9-5-2-2. ドナーリンパ球への遺伝子導入

採取された末梢血単核球分画を用いて遺伝子操作を行う (添付資料3参照)。培養時に使用される血漿としては 56°C、30 分で非働化されたドナー血漿を用い、培養液は 3% ドナー血漿、2.5µg/ml アンフォテリシン B (ファンギゾン、プリストル)、100U/ml penicillin、100µg/ml streptomycin、600U/ml rhIL-2 (イムネース 塩野義、セロイク 武田薬品、またはプロロイキン カイロン)、3x10⁶beads/ml 抗 CD3/ CD28 抗体結合磁気ビーズ (ClinExVivo CD3/CD28 Beads インビトロジェン) を添加した X-vivo10 培地 (BioWhittaker、Cambrex) あるいは RPMI1640 (シグマ) を用いる。この培養液を用いて細胞濃度を 1x10⁶/ml に調整し、CO₂ 透過性バッグ (Cultilife、タカラバイオ) を用いて、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養する。48 時間後、バッグを遠心して細胞を集め、10µg/ml 硫酸プロタミンを含むレトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞培養上清液で 1x10⁶/ml の濃度になるように調整し、ファイブロネクチンコートバック、またはフラスコを用いて 1000xg、2 時間の遠心後、ウイルス上清を培養液に置換し、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養する。翌日、再度同様の遺伝子導入操作を行う (59)、(60)。

項を除く)

9-5-2-2. ドナーリンパ球への遺伝子導入

採取された末梢血単核球分画を用いて遺伝子操作を行う (添付資料3参照)。培養時に使用される血漿としては 56°C、30 分で非働化されたドナー血漿を用い、培養液は 3% ドナー血漿、2.5µg/ml アンホテリシン B (ファンギゾン、プリストル)、100U/ml penicillin、100µg/ml streptomycin、600U/ml rhIL-2 (イムネース 塩野義、またはセロイク 武田薬品)、30ng/ml OKT3 (抗 CD3 抗体、Orthoclone OKT3、ヤンセン - 協和醗酵) を添加した X-vivo10 培地 (BioWhittaker、Cambrex) あるいは RPMI1640 を用いる。この培養液を用いて細胞濃度を 1x10⁶/ml に調整し、CO₂ 透過性バッグ (オプティサイト、Nexelle) を用いて、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 72 時間培養する (58)。72 時間後、バッグを遠心して細胞を集め、4µg/ml 硫酸プロタミンを含むレトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞培養上清液で 1x10⁶/ml の濃度になるように調整し、ファイブロネクチンコートバック、またはフラスコを用いて 1000xg、2 時間の遠心後、ウイルス上清を培養液に置換し、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養する。翌日、再度同様の遺伝子導入操作を行う。ファイブロネクチンの使用により遺伝子導入率が飛躍的に向上することが確かめられてお

○ 現在、本邦においてはセロイク（武田薬品）、イムネース（塩野義製薬）に加えてプロロイキン（カイロン/ニプロ）が GMP グレードの rhIL-2 として入手可能であるため、追記した。

(16) 9-5-2-3. 遺伝子導入細胞の選択

48 時間にわたるウイルスベクター導入操作終了後、細胞をマウス抗ヒト LNGFR 抗体 (20.4, MolMed 社より供与) と 22°C にて 20 分間反応させ、さらにヤギ抗マウス IgG 抗体磁気ビーズ (Dynabeads M-450 goat anti-mouse IgG) を結合させて、磁気細胞分離装置により遺伝子導入細胞 (ヒト ΔLNGFR 発現細胞) を分離する。分離された細胞をさらに 24 時間培養し、磁気ビーズを磁石により取り除く。細胞の増殖を観察しながら、さらに 3~5 日程度培養を続け、最終的に 3% ドナー血漿 PBS にて 3 回洗浄した後、-80°C 冷凍庫にて使用時まで保存する。遺伝子導入率、ならびにその純度は Flow cytometry にて解析され、ヒト ΔLNGFR 発現細胞の陽性率が 90% 以上を超えたドナー T 細胞のみ本遺伝子治療臨床研究で使用される。

○ 正式な表記に変更

り (59)、当該遺伝子治療においては宝酒造より供与される。

(16) 9-5-2-3. 遺伝子導入細胞の選択

48 時間にわたるウイルスベクター導入操作終了後、細胞をマウス抗ヒト LNGFR 抗体 (20.4, MolMed 社より供与) と 22°C にて 20 分間反応させ、さらにヤギ抗マウス IgG 抗体磁気ビーズ (Dynabeads M-450 goat anti-mouse IgG) を結合させて、磁気細胞分離装置により遺伝子導入細胞 (ヒト ΔLNGFR 発現細胞) を分離する。分離された細胞をさらに 24 時間培養し、磁気ビーズを磁石により取り除く。細胞の増殖を観察しながら、さらに 3~5 日程度培養を続け、最終的に 3% ドナー血漿にて 3 回洗浄した後、-80°C 冷凍庫にて使用時まで保存する。遺伝子導入率、ならびにその純度は FACS にて解析され、ヒト ΔLNGFR 発現細胞の陽性率が 90% 以上を超えたドナー T 細胞のみ本遺伝子治療臨床研究で使用される。

(17) 9-5-2-4. 遺伝子導入ドナーリンパ球の輸注

全対象疾患に対し遺伝子導入ドナーリンパ球の目標投与数を $1 \times 10^8 / \text{kg}$ と設定するが、最終的に回収できる遺伝子導入ドナーリンパ球数はドナーリンパ球の状態によりかなりのばらつきが見られることが、過去のイタリアの遺伝子治療臨床研究において報告されている。このため、最終的に投与する遺伝子導入ドナーリンパ球数を $1 \times 10^7 / \text{kg}$ 以上で $1 \times 10^8 / \text{kg}$ を越えない範囲の全細胞とする。イタリアの症例から平均投与数は概ね $2 \sim 5 \times 10^7 / \text{kg}$ 程度と予想される。遺伝子導入ドナーリンパ球を以下のスケジュールで投与する。ドナーリンパ球輸注にともない、Grade I の急性 GVHD が出現した場合には、そのまま経過観察する。Grade II の急性 GVHD が認められた場合には、主治医は総括責任者と協議し、総括責任者の判断のもとで GVHD に対する治療を開始してもよい。Grade III 以上の GVHD が出現した場合には、直ちに GVHD の治療を開始する。ドナーリンパ球輸注前に chlorpheniramine (成人 10mg、学童 4-6mg、幼児 2-3mg) または hydroxyzine (1mg/kg) およびハプトグロビン製剤を静注投与してもよい。各リンパ球輸注後 4 週間は入院にて経過観察するが、Grade II 以上の GVHD を認めな

(17) 9-5-2-4. 遺伝子導入ドナーリンパ球の輸注

全対象疾患に対し遺伝子導入ドナーリンパ球の目標投与数を $1 \times 10^8 / \text{kg}$ と設定するが、最終的に回収できる遺伝子導入ドナーリンパ球数はドナーリンパ球の状態によりかなりのばらつきが見られることが、過去のイタリアの遺伝子治療臨床研究において報告されている。このため、最終的に投与する遺伝子導入ドナーリンパ球数を $1 \times 10^7 / \text{kg}$ 以上で $1 \times 10^8 / \text{kg}$ を越えない範囲の全細胞とする。イタリアの症例から平均投与数は概ね $2 \sim 5 \times 10^7 / \text{kg}$ 程度と予想される。遺伝子導入ドナーリンパ球を以下のスケジュールで投与する。ドナーリンパ球輸注にともない、Grade I の急性 GVHD が出現した場合には、そのまま経過観察する。Grade II の急性 GVHD が認められた場合には、主治医は総括責任者(不在の際には、副総括責任者)と協議し、総括責任者の判断のもとで GVHD に対する治療を開始してもよい。Grade III 以上の GVHD が出現した場合には、直ちに GVHD の治療を開始する。ドナーリンパ球輸注前に chlorpheniramine (成人 10mg、学童 4-6mg、幼児 2-3mg) または hydroxyzine (1mg/kg) およびハプトグロビン製剤を静注投与してもよい。抗癌剤、インターフェロンなどによる併用治療は

いときは、以後の経過を外来で観察しても良い。

○ 副総括責任者を置かなくなったため、関連する記載を削除した。抗癌剤、インターフェロンなどによる併用治療の取り扱いは、別項目として9-5-3に記載した。

(18) 9-5-2-5. GVHD 発症時の対応

遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後に、①Grade III 以上の急性 GVHD を認めた場合、②Grade II であっても GVHD の治療が優先すると主治医が判断する場合、③治療が必要と判断される慢性 GVHD を認めた場合には、5 mg/kg の GCV を 1 日 2 回 7 日間点滴静注する。これら GCV の投与法はイタリアの遺伝子治療臨床研究のプロトコールに準じて行われる。7 日間の GCV 投与によって GVHD が改善しない場合には、ステロイド、サイクロスポリンなどの免疫抑制剤を投与する。止むを得ぬと考えられる場合には、主治医は総括責任者と協議し、総括責任者の判断のもとで 7 日間の GCV 投与終了前であっても、これらの免疫抑制療法を併用してもよい。一方、充分ではないものの GCV による改善傾向が明らかな場合は、総括責任者の判断のもとで 7 日目以降も他の免疫抑制療法と GCV を併用してもよい。

行わない。各リンパ球輸注後 4 週間は入院にて経過観察するが、Grade II 以上の GVHD を認めないときは、以後の経過を外来で観察しても良い。

(18) 9-5-2-5. GVHD 発症時の対応

遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後に、①Grade III 以上の急性 GVHD を認めた場合、②Grade II であっても GVHD の治療が優先すると主治医が判断する場合、③治療が必要と判断される慢性 GVHD を認めた場合には、5 mg/kg の GCV を 1 日 2 回 7 日間点滴静注する。これら GCV の投与法はイタリアの遺伝子治療臨床研究のプロトコールに準じて行われる。7 日間の GCV 投与によって GVHD が改善しない場合には、ステロイド、サイクロスポリンなどの免疫抑制剤を投与する。止むを得ぬと考えられる場合には、主治医は総括責任者と協議し、総括責任者(不在の際には、副総括責任者)の判断のもとで 7 日間の GCV 投与終了前であっても、これらの免疫抑制療法を併用してもよい。