

## ii) 標的細胞の前培養

前培養は、SCF(Amgen), Flt-3L(Immunex), TPO(Amgen)をそれぞれ最終濃度 50, 150, 50ng/ml で添加した 1%人血清アルブミン/X-VIVO 15™培地で 24 時間行う。細胞は  $5 \times 10^5$ /ml の濃度で、CO<sub>2</sub>透過性バッグ (LifeCell X-Fold™ bags) を用い、炭酸ガス培養器内で 37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件で培養する。培養バッグは予め組換え型フィブロネクチン CH-296 (1-5 µg/cm<sup>2</sup>) でコートしておく。

## iii) 標的細胞への遺伝子導入 (付 1-2)

培養第 2 日目に、遠心後に培養上清を半量とり、37℃で迅速に凍結融解した GCsap M-ADA を加え、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーター内で培養する。ここで採取した培養上清は、細菌検査などに使用する。同様の操作を 12 時間ごと 4 回実施する。48 時間後に遺伝子導入細胞を回収し、生理食塩水で 2-3 回洗浄する。トリパンブルー染色にて生細胞数を算出し、一部を、無菌性検査 (グラム染色)、細菌培養 (BACTEC™ NR16A および NR17A)、エンドトキシン検査 (エンドスピー法)、マイコプラズマ検索、ベクター挿入の確認 (ADA 遺伝子 PCR 法、ADA 活性)、RCR の検索 (env 遺伝子 PCR 法、S+L-法)、細胞表面マーカー解析 (FACS) 等の検査に使用し、残りを冷凍保存する。

## iv) 遺伝子導入細胞の患児への投与方法

最終的に得られた遺伝子導入細胞の 5%を検査用に保存する。残りを生理食塩水に再浮遊し、シリンジまたは輸血バッグに入れる (総投与量: 10ml/kg 以内、総投与細胞数:  $6 \times 10^7$ /kg 以内)。培養上清の培養検査等に異常がないのを確認後、患児への投与を行う。最初はテスト量として、総投与量の 2-5%をゆっくりと静脈内投与し、その後 5-10 分間状態を観察する。特別な異常が認められなければ、5 分毎にゆっくり混和しながら点滴静注を続ける。

## v) 無菌性の確保

P2 レベルの培養室を使用し、入室時には消毒液による手洗いとともにガウンテクニックを励行する。細胞の採取、刺激、培養、洗浄、静脈内投与等に使用する器具、試薬類はすべて滅菌済みの使い捨て製品を使用する。また、インキュベーターは専用のものを使用する。培養液の交換などの処理は、できうる限り非開放的に操作する。

#### vi) ベクターの入手、保存法

米国 NIH が作製し、ヒトへの臨床研究に FDA が定めた安全性試験を通過したベクター GCsap M-ADA 培養上清は、FDA の輸出許可のもとに輸入される。輸入にあたっては本遺伝子治療臨床研究に関する厚生労働省の許可が FDA に提出され、これらにもとづいて通関手続きが行われる。

GCsap M-ADA ベクターは数ヶ月以内の凍結保存にてその遺伝子導入の効率は著減しないことが確認されているので、ドライアイス詰め凍結状態で輸送され、入手後は使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ に保存される。

#### ③前処置及び併用療法の有無

化学療法剤、免疫抑制剤による前処置は行われぬ。

患児は現在 PEG-ADA の週一回の筋注投与（症例 1, 2）と静注用 $\gamma$ -グロブリン製剤の 3 週毎 2.5g 投与、ST 合剤の予防内服を継続（症例 2）している。無菌室での管理下に PEG-ADA は症例 1 では現在量の隔週投与後に中断、症例 2 では現在量の隔週投与、次いで 1/2 量の隔週投与後に中断される。

症例 1 は既に受けた遺伝子治療によって FCS に含まれるウシセルロプラスミンに対する IgG 抗体を獲得した。治療前に血清 IgG 抗体検査、プリックテストで安全性を確認する。

骨髓血採取は全身麻酔下で実施されるため、必要な検査、麻酔医による診察等が行われる。

#### ④臨床検査項目及び観察項目（付 1-3）

i)末梢血リンパ球数

ii)T 細胞数

iii)遅延型過敏反応

iv)レクチン（PHA, PWM, ConA）,アロ抗原に対するリンパ球芽球化反応

v)血清 IgG, IgA, IgM, IgE 値

vi)同種血球凝集素価

vii)特異抗体価（ジフテリア・百日咳・破傷風・肺炎球菌）

viii)赤血球 ADA, dAdo, SAHase の測定

ix)血漿 ADA 活性の測定

- x) 定期的な血液生化学検査 尿酸、血清電解質、SGOT, SGPT, LDH, ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、総蛋白、血糖、血液一般検査、白血球分画、血小板数、尿一般検査、骨髓検査
- xi) 逆転写酵素活性、env 遺伝子の PCR
- xiv) S+L-法

#### ⑤ 予測される副作用並びにその対処方法

患児に発熱、悪寒、筋痛などを認めるときはアスピリン、アセトアミノフェンで対応される。前回の遺伝子治療では合計 11 回の遺伝子導入細胞の投与を行い、後半の 2-3 回のみ軽度の発熱を認めたが、上記の処置で対応可能であった。また、前回は FCS 中セルロプラスミンに対する抗体が患児で産生され、それに基づくと思われる血清病様の反応が認められた。今回は培養液から FCS が除かれているが、(5) ③で述べた検査を実施して同様の症状発現を注意深く観察の上、必要な場合はステロイドの使用も考慮する。常に S+L-法を含む検査で RCR の陰性が確認されたレトロウイルスベクターを用いるため、治療後に RCR が発生する可能性は理論上極めて低い。RCR が万一治療後に検出されてもレトロウイルス血症は補体、中和抗体の出現などで一過性に終わる可能性が高い。しかし免疫機構が再建されていない時点での RCR の発生は悪性リンパ腫を発症する可能性が十分に考えられるので、患児のリンパ節腫脹などに十分留意しながら注意深く経過を観察して対処する。

#### ⑥ 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準

- i) 治療後 72 時間と 1 週以降に毎週以下の検査も行う。
  - a. 血液一般検査、白血球分画、血小板数
  - b. 生化学検査
  - c. 細胞表面マーカー検査 (CD3, 4, 8, 20, 56, 45RA, 45RO 等)
  - d. 血漿 ADA 活性の測定
- ii) 血清 IgG, IgA, IgM, IgE 値は 2 週毎に測定する。
- iii) 1 週以降は 4 週毎に以下の検査も行う。
  - a. レクチン (PHA, PWM, ConA)、アロ抗原に対するリンパ球芽球化反応
  - b. 同種血球凝集素価
  - c. 特異抗体価の測定 (ジフテリア・百日咳・破傷風・肺炎球菌)
  - d. RCR 検索 (env 遺伝子 PCR 法)

e.赤血球 ADA, dAdo , SAHase の測定

f.導入 ADA 遺伝子の検査 (PCR 法、RT-PCR 法、ADA タンパク発現、ADA 活性)

上記の免疫学的検査から免疫機構の再建を判定する。末梢血単核球における遺伝子導入の検出と末梢血リンパ球数、ADA 活性、SAHase 活性、dAdo、血清免疫グロブリン値の推移(補充後の減少速度の変化)が重要である。患児には、末梢での遺伝子発現を確認するまでは PEG-ADA 療法を継続するので仮に遺伝子導入が不十分でも治療前よりも免疫能の低下をきたすことはないと考えられる。中止基準はベクターの安全性に問題が生じた場合 (RCR の発生等)、家族からの要請があった場合とする。

#### ⑦PEG-ADA 療法再開、再度中断の基準

i)臨床的、検査的に悪化が認められた場合は、迅速に PEG-ADA 療法を再開する。

ii)PEG-ADA 療法再開後でも、治療によって末梢血中に ADAcDNA、ADA 活性を発現する T 細胞が繰り返し確認された場合は再度中断を考慮する。

#### ⑧症例記録に関する記録用紙等の様式

一般入院患者同様に、カルテに患児の容態、治療内容、検査内容と結果および、家族への説明などを記載し、保存する。

#### ⑨記録の保存及び成績の公表方法

カルテに準じて実施施設内で保存される。また成績の公表は院内審査委員会の判断の基に行われる。

### 12.当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況

遺伝子治療臨床研究は北海道大学医学部附属病院 3 階遺伝子治療臨床研究室にて行う。この研究室は前室を有しているので、関係者以外の人や昆虫、げっ歯類等の侵入を防ぐ事が出来る。さらに実験室内にはクラス II 安全キャビネット、遠心器や高圧滅菌器を備えており、その物理的封じ込めレベルは P2 である。

「9.これまでの研究成果」の項で述べた研究の成果はこの実験施設にて行われたものであり、現在に至るまで安全性上問題はない。

### 13.当該遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の研究状況

既に記載したように ADA 欠損症における遺伝子治療臨床研究は 10 数症例に行われている。D. Kohn 博士らのグループでは ADA 欠損症の出生前診断がなされた新生児に対する臍帯血 CD34 陽性細胞を標的としたレトロウイルスベクター LASN による遺伝子治療を実施して、末梢血単核球、好中球に ADA 遺伝子の発現を認めているが、PEG-ADA 療法は継続されている<sup>24)</sup>。

米国以外では 1992 年 3 月イタリアで骨髄血細胞と末梢血リンパ球の両者を標的とする遺伝子治療が行われており、PEG-ADA 併用下に臨床的効果を見出している<sup>4)</sup>。1993 年 3 月にオランダで骨髄細胞を標的に遺伝子治療が行われているが、PEG-ADA は継続されて、遺伝子発現は一時的であったことが報告されている<sup>5)</sup>。

現在、米国の NIH とロサンゼルス小児病院は共同で ADA 欠損症における血液幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究が進行中である。この計画では、我々が使用を予定しているベクター；GCsap M-ADA ともう一つのベクター；MND-ADA の二種類を同時に使用する。我々のプロトコールは GCsap M-ADA のみを使用し、遺伝子導入方法や培養条件等はほぼ同一である（添付資料 2-4）。

#### 14.研究者の略歴、研究業績

総括責任者：崎山幸雄

略歴：

昭和 43年 4月 北海道大学医学部小児科学教室入局  
同 48年 4月 北海道大学結核研究所（現遺伝子病制御研究所）  
病理部門にて研修  
同 51年 7月 ハーバード大学医学部附属小児病院医学  
センター免疫部門に留学  
同 53年 8月 帰国  
同 54年 11月 北海道大学医学部附属病院小児科助手  
同 58年 9月 同 講師  
平成 6年 4月 北海道大学医学部小児科助教授  
同 10年 1月 同退職  
2月 手稲溪仁会病院小児センター長  
同 11年 4月 北海道大学医学部遺伝子治療講座客員教授（寄付講座）

専門：原発性免疫不全症、小児感染免疫学、アレルギー学

研究業績：アデノシンデアミナーゼ欠損症に対する polyethylene glycol-modified  
adenosine deaminase 酵素補充療法  
アデノシンデアミナーゼ欠損症に対する遺伝子治療臨床研究

## 文献

- 1) Blaese R.M, Culver K.W, Miller A.D et al.  
T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years.  
*Science*, 270: 475-480, 1995
- 2) Onodera M, Ariga T, Kawamura N et al.  
Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency.  
*Blood*, 91: 30-36, 1998 (添付資料 1)
- 3) Kohn D.B, Weinberg K.I, Nolta J.A et al.  
Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency.  
*Nat Med*, 1: 1017-1023, 1996
- 4) Claudio B, Luigi D, Notarangelo N.N et al.  
Gene Therapy in Peripheral Blood Lymphocytes and Bone Marrow for ADA-Immunodeficient Patients.  
*Science*, 270: 470-474, 1995
- 5) Hoogerbrugge P.M, Van Beusechem V.W, Fischer A et al.  
Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency.  
*Gene Ther*, 3: 179-183, 1996
- 6) Kiem H.P, Andrews R.G, Morris J et al.  
Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor.  
*Blood*, 92: 1878-1886, 1998
- 7) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G et al.  
Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease.  
*Science*, 288: 669-672, 2000

- 8) Hirschhorn R.  
Adenosine deaminase deficiency.  
*Immunol Rev*, 2: 175-198, 1990
  
- 9) Regina Resta, Linda F. Thompson  
SCID: the role of adenosine deaminase deficiency.  
*Immunology Today*, 371-374, 1997
  
- 10) Hirschhorn R.  
Immunodeficiency disease due to deficiency of adenosine deaminase, in Ochs HD, Smith CIE, Puck JM(eds): *Primary Immunodeficiency diseases: a molecular and genetic approach*.  
New York, NY, Oxford University Press, p121-139, 1999
  
- 11) Giblett E.R, Anderson J.E, Cohen F et al.  
Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity.  
*Lancet*, 2: 1067-1069, 1972
  
- 12) Hirschhorn R.  
Overview of biochemical abnormalities and molecular genetics of adenosine deaminase deficiency.  
*Pediatr Res*, 33: s35-s41,1993
  
- 13) Arredondo-Vega, F.X, Santisteban I, Daniels S et al.  
Adenosine deaminase deficiency: genotype-phenotype correlations based on expressed activity of 29 mutant alleles.  
*Am J Hum Genet*, 63: 1049-1059, 1998
  
- 14) Silber G.M, Winkelstein R.C, Moen S.D et al.  
Reconstitution of T- and B-cell function after T-lymphocyte-depleted haploidentical bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency.  
*Clin Immunol Immunopath*, 44: 317-320, 1987



- 15) Stephan J.L, Vlekova V, Deeist F.L et al.  
Severe combined immunodeficiency: A retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients.  
J Pediatr, 123: 564-572, 1993
- 16) Fisher A, Gricelli C, Friedrich W et al.  
European experience of bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency.  
Lancet, 336: 850-854, 1990
- 17) Hilman B.C, Sorensen R.U.  
Management options: SCID with adenosine deaminase deficiency.  
Annals of Allergy , 72: 395-403, 1994
- 18) Haddad E, Landais P, Friedrich W, Gerritsen B et al.  
Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients.  
Blood, 91: 3646-3653, 1998
- 19) Buckley R.H, Schiff S.E, Schiff R.I et al.  
Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency.  
N Engl J Med, 340: 508-516, 1999
- 20) Hershfield M.S, Buckley R.H, Greenberg M.L.  
Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase.  
N Engl J Med, 316: 589-596, 1987
- 21) Hershfield M.S.  
PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: an update after 8.5 years.  
Clin Immunol Immunopathol, 76: S228-232, 1995

- 22) Hershfield M.S.  
PEG-ADA An Alternative to Haploidentical Bone Marrow Transplantation and an Adjunct to Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency.  
*Human Mutation*, 5: 107-112, 1995
- 23) 有賀正、崎山幸雄  
ADA 欠損症に対する遺伝子治療の現状。  
蛋白質・核酸・酵素 40: 2772-2780, 1995
- 24) Kohn D.B, Hershfield M.S, Carbonaro D et al.  
T-Lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates.  
*Nature Medicine*, 4: 775-780, 1998
- 25) Mullen C.A, Snitzer K, Culver K.W et al.  
Molecular analysis of T lymphocyte-directed gene therapy for adenosine deaminase deficiency : long-term expression in vivo of genes introduced with a retroviral vector.  
*Hum Gene Ther* , 7: 1123-1129, 1996
- 26) Egashira M, Ariga T, Kawamura N et al.  
Visible Integration of the Adenosine Deaminase (ADA) Gene Into the Recipient Gene Therapy.  
*American Journal of Medical Genetics* , 75: 314-317, 1998 (添付資料 2)
- 27) Misaki Y, Ezaki I, Ariga T et al.  
Gene-transferred oligoclonal T cells predominantly persist in peripheral blood from an adenosine deaminase-deficient patient during gene therapy.  
*Mol Ther*, 3: 24-27, 2000 (添付資料 3)
- 28) Kawamura N, Ariga T, Ohtsu M et al.  
Elevation of serum IgE level and peripheral eosinophil count during T lymphocyte-directed gene therapy for ADA deficiency: implication of Tc2-like cells after gene transduction procedure.  
*Immunology Letters*, 64: 49-53, 1998

- 29) Kawamura N, Ariga T, Ohtsu M et al.  
In vivo kinetics of transduced cells in peripheral T cell-directed gene therapy: role of CD8+ cells in improved immunological function in an adenosine deaminase (ADA)- SCID patient.  
*J Immunol*, 163: 2256-2261, 1999 (添付資料 4)
- 30) 崎山幸雄、有賀正、川村信明  
遺伝子が変わる 21 世紀の医療現場。  
治療 83: 166-169, 2001
- 31) Onodera M, Nelson D.M, Yachie A et al.  
Development of improved adenosine deaminase retroviral vectors.  
*J Virol*, 72: 1769-1774, 1998 (添付資料 5)
- 32) Onodera M, Nelson D.M, Sakiyama Y et al.  
Gene Therapy for Severe Combined Immunodeficiency Caused by Adenosine Deaminase Deficiency: Improved Retroviral Vectors for Clinical Trials.  
*Acta Haematol*, 101: 89-96, 1999
- 33) Williams D.A, Smith F.O.  
Progress in the use of gene transfer methods to treat genetic blood diseases.  
*Hum Gene Ther*, 11: 2059-2066, 2000
- 34) Miller A.D, Garcia J.V, Von Suhr N et al.  
Construction and Properties of Retrovirus Packaging Cells Based on Gibbon Ape Leukemia Virus.  
*J Virol*, 65: 2220-2224, 1991
- 35) Hanenberg H, Xiao X.L, Dilloo D.  
Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells.  
*Nat Med*, 2: 876-882, 1996

- 36) Dao M.A, Hannum C.H, Kohn D.B et al.  
FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after ex vivo retroviral-mediated transduction.  
Blood, 89: 446-456, 1997
- 37) Tisdale JF, Hanazono Y, Sellers S.E et al.  
Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability.  
Blood, 92: 1131-1141, 1998
- 38) 小田展子、有賀 正、小野 暁、他。  
アデノシンデアミナーゼ欠損症の2家系における遺伝子解析と興味ある保因者の検出。  
アレルギー 49: 1173-1180, 2000 (添付資料6)
- 39) Anderson W. F.  
The Best of Times, the Worst of Times.  
Science, 288: 627-629, 2000
- 40) Fisher A, Hacein-Bey S, Le Deist F et al.  
Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies.  
Immunity, 15: 1-4, 2001
- 41) A.Fisher: Symposium on Primary Immunodeficiency Diseases.  
Lucerne,Switzerland-July 18-21, 2001
- 42) Ariga T, Oda N, Sanstisteban I, Arredondo-Vega F.X et al.  
Molecular basis for paradoxical carriers of adenosine deaminase (ADA) deficiency who show extremely low level of ADA activity in peripheral blood cells without immunodeficiency.  
J Immunol, 166: 1698-1702, 2001 (添付資料7).