

9. 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 DLT が行われ、CML に対する DLT 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 DLT から考えて GVHD を引き起こす可能性が比較的低いこと。

2. 過去の末梢血 T 細胞を用いた遺伝子治療臨床研究(マーキングスタディを含む)において、長期にわたる治療効果とその安全性が確認されていること。また、本研究で採用される遺伝子導入法は、平成 7 年に北海道大学で行われた ADA-SCID 患者に対する遺伝子治療臨床研究の際に用いられたものとほぼ同様に、ADA-SCID 患者においても高い遺伝子導入効率、治療効果および安全性が確認されていること。

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 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。

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関し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。

10. 遺伝子治療臨床研究の計画

10-1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

本研究の治療計画は大きく以下の 3 項目から成り立っている。また、各項目は以下のように評価される。

1. 同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対する DLT において、レトロウイルスベクターにより HSV-TK 遺伝子が導入されたドナー T 細胞が患者に対して安全であるかどうか。

遺伝子導入操作の安全性についてはエンドトキシン、無菌性、細胞状態より判定され、遺伝子導入細胞の安全性に関しては、RCR の存在、遺伝子導入細胞の増殖能により判定される。

2. 上記遺伝子導入 T 細胞が患者体内で治療効果 (GVL 効果) を示すかどうか。

「DLT 治療効果の判定基準 (別添 9)」に基づき、各々の疾患に対する HSV-TK 遺伝子導入ドナー T 細胞の治療効果を判定する。統計学的検討が可能なだけ症例数が集積できれば、現行の治療成績との比較・検討を行う。

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 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。

この遺伝子治療臨床研究により安全な DLT が確立され、さらには輸注ドナーリンパ球数の増量が可能となれば、現在 GVL 効果が薄いとされる AML、CML の急性転化への治療効果も期待できる。また、今後骨髄バンクの充実化に伴い、非血縁者による骨髄移植の症例が増加すると思われるが、その際の重篤な GVHD 対策としても利用できるものと思われる。

10-2. 被験者の選択基準及び除外基準

同種造血幹細胞移植の施行後再発を認めた CML、AML、ALL、MDS のうち「10-2-2. 被験者の選択基準」の 1-6 の全ての条件を満たし、かつ除外規定 1-11 のいずれにも該当しない症例を対象とする。遺伝子治療適応患者の選定にあたっては、本研究の主治医が遺伝子治療実行委員会 (10-2-1 参照) の開催を

遺伝子治療実行委員会委員長に要請する。遺伝子治療実行委員会にて患者の適応性が迅速に、かつ十分に審議される。

10-2-1. 遺伝子治療実行委員会

実施施設長は当該遺伝子治療を了承した時点で、学内に遺伝子治療実行委員会を設置し、その委員長職を本研究者以外の当院の医師に依頼、任命する。以後、遺伝子治療実行委員会委員長が遺伝子治療実行委員会を開催する。本研究者は遺伝子治療実行委員会への参加資格を有するが、常に公正な判断を得るため、本研究者以外の複数の委員も遺伝子治療実行委員会委員長の指名により参加する。遺伝子治療実行委員会は当該遺伝子治療の患者選定以外に、症例の臨床報告(治療効果や副作用)の妥当性や遺伝子治療プロトコールの変更を審議し、その審議結果を実施施設長に報告する。

10-2-2. 再発の定義

「再発」を以下の1-4のごとく疾患別に定義する。

1. CML 慢性期再発

染色体解析または FISH 法で異常クローンの存在が明らかであるが、芽球の増加を認めない場合 (cytogenetic relapse、hematological relapse とともに含む)。

2. CML 移行期および急性転化時再発

異常芽球の増加が顕微鏡上明らかな場合

3. Ph1 陽性 ALL の細胞遺伝学的再発 (cytogenetic relapse)

Ph1 陽性 ALL において、染色体検査、FISH、PCR の何れかの方法で異常クローンの存在が明らかになった場合

4. AML、ALL、MDS の血液学的再発 (hematological relapse)

異常芽球の増加が顕微鏡上明らかな場合

10-2-3. 被験者の選択基準

1. ドナーリンパ球輸注後4週間以上、生存が可能であると思われる症例。
2. ドナーもしくはその法定代理人(家族、配偶者、親権者)が末梢血単核球の採取に同意している症例。
3. 以下に示す心肺肝腎機能を有する症例。
performance status (PS) 0~2(別添7)

EF \geq 50%

動脈血酸素分圧 \geq 70mmHg

AST、ALT \leq 正常上限の 2 倍

血清 Cre \leq 2.0mg/dl

4. 治療効果の判定が可能な症例。
5. 治療開始にあたり、患者もしくはその法定代理人(家族、配偶者、親権者)などから文書による同意の得られた症例。
6. 妊娠する可能性のある女性の場合、治療開始前 7 週以内の β -hCG 検査が陰性であり、かつ治療期間中および治療終了後 5 年間の避妊に同意した症例。男性においても、治療期間中のおよび治療終了後 5 年間の避妊に同意した症例。

10-2-4. 被験者の除外基準

1. Grade II 以上の急性 GVHD を発症している症例(別添 8)。
2. 中枢神経系に腫瘍細胞の浸潤を認める症例。
3. 妊婦、妊娠の可能性のある症例、あるいは授乳中の症例。
4. CMV 感染症を発症、または CMV 抗原血症を呈し、GCV の投与が必要な症例。
5. 重篤な感染症を有する症例。
6. HIV 感染症例。
7. 重篤な精神障害を有する症例。
8. 重篤な合併症を有する症例(心疾患、肺疾患など)。
9. 本臨床研究に用いられる薬剤に対してアレルギー既往のある症例。
10. これまでにマウス血清を含む薬剤投与をうけた既往のある症例。
11. その他、総括責任者が不相当と認めた症例。

10-3. 被験者の同意の取得方法

ドナーより末梢血単核球(ドナーリンパ球)を採取するにあたって、主治医はドナーの同意を得るに際しての説明用資料(「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」におけるリンパ球提供を考えておられるドナーの方へ)を参考に、下記の 1~3 をドナーに十分に説明し、自由意志による末梢血単核球提供の同意を文書にて得る(別添 2)。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、親権者を含む)の同意を文書にて得るものとする。

1. 末梢血単核球、および血漿採取の目的および方法。
2. 予想される危険性。
3. 採取前後の健康診断の必要性。

本遺伝子治療臨床研究を開始するにあつては、主治医は患者の同意を得るに際しての先ず説明用資料(別添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」を考へておられる方へ)を参考に、下記の1-6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)。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. 治療の目的および方法。
2. 予想される効果および危険性。
3. 当該疾患に対する他の治療法の有無およびその内容。
4. 患者が治療への参加に同意しない場合でも不利益を被らないこと。
5. 患者が治療への参加に同意した場合でも随時これを撤回できること。
6. その他、患者の人権保護に関し必要な事項。

10-3-1 小児患者に対する同意の取得と患者・家族に対する支援体制の構築

被験者が小児の場合には、保護者からの当該遺伝子治療についての同意の取得、ならびに治療経過中の精神的負担に関して特別の配慮が必要である。患者及び保護者について、これらの精神的負担を少しでも軽減するために、臨床心理学の専門家を含むチームをつくり、同意、施行からその後の全経過を通じて積極的に心理的介入を行う。

10-4. 実施期間および目標症例数

実施期間は文部科学大臣及び構成労働大臣の承認が得られた時点から3年間で、目標症例数は10例と設定するが、5症例終了時に遺伝子治療実行委員会を開催し、当該遺伝子治療臨床研究の目標が十分に評価されると判断された場合には、その5症例をもって当該遺伝子治療臨床研究は終了とする。

10-5. 遺伝子治療臨床研究の実施方法

10-5-1. 対照群の設定方法

特に設けない。

10-5-2. 遺伝子導入方法(安全性および有効性に関する事項を除く)

10-5-2-1. ドナーからの末梢血単核球の採取

ドナーの健康診断[血算、生化学、感染症(B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、成人T細胞白血病ウイルス、梅毒血清反応、HIV、CMV、EBV)、尿、胸部単純写真、心電図]を行い、異常がないことを確認する。血球分離装置(Baxter社 CS-3000、Cobe社 Spectra など)にてドナーより末梢血単核球分画を採取する(血液処理量は200ml/kgを上限とする)。

10-5-2-2. 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より Ficoll 比重遠心法にて末梢血単核球をさらに純化し、Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS)にて洗浄後、遺伝子導入操作を行う。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、100 µg/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)を用いる。この培養液を用いて細胞濃度を 1×10^6 /ml に調整し、CO₂透過性バッグ(オプティサイト、Nexell)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(62)。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 5×10^6 /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り(63)、当該遺伝子治療においては宝酒造より供与される。

10-5-2-3. 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0.5% HSAにて3回洗浄した後、-150°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%以上を越えたドナーT細胞のみ本遺伝子治療臨床研究で使用される。

下記に遺伝子導入法のフローチャートを示す。

SFCMM-3作製システム－詳細

ドナーリンパ球への遺伝子導入

Day 0	<p><u>リンパ球の解凍と培養</u></p> <p>新鮮、あるいは解凍リンパ球を10^6 cells/mlに調整し、CO₂透過性バックにて細胞を培養する。培地：X-vivo10 + 3% autologous plasma + 600U/ml rhIL-2 + 30ng/ml 抗CD3抗体 + アンホテリシンB + ペニシリン/ストレプトマイシン</p>
Day 3	<p><u>第1回 遺伝子導入</u></p> <p>ウイルスベクター上清中に5×10^6 cells/mlのリンパ球を調整し、protamine 4μg/mLを加える。1000xgで2時間遠心。</p>
Day 4	<p><u>第2回 遺伝子導入</u></p> <p>第1回と同様の操作を行う。</p>
Day 7	<p><u>遺伝子導入細胞の選択</u></p> <p>LNGFRの発現をFACSを用いて評価する。</p> <p>磁気細胞分離装置にて遺伝子発現細胞を選択する。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 5×10^6 cells/ml に抗LNGFR抗体を加え、22°Cで20分反応させる。2) 洗浄後、25×10^6 cells/ml に免疫磁気ビーズを加え、22°Cで30分反応させたのち洗浄する。3) 磁気細胞分離装置を用いて、ΔLNGFR陽性細胞を回収し1×10^6 cells/ml で培養を続ける。培地：X-vivo10 + 3% autologous plasma + 600U/ml IL-2
Day 8	<p><u>磁気ビーズの除去</u></p> <p>分離用磁石を用いて磁気ビーズを除去し、1×10^6 cells/ml で培養を続ける。</p> <p>培地：X-vivo10 + 3% autologous plasma + 600U/ml IL-2</p>
Day 11	<p><u>遺伝子導入細胞の大量培養</u></p> <p>細胞数を計数後、1×10^6 cells/ml に希釈し培養を続ける。</p> <p>培地：X-vivo10 + 3% autologous plasma + 600U/ml IL-2</p>
Day 13	<p><u>遺伝子導入細胞の回収と凍結</u></p> <p>細胞数を計数後、遠心と洗浄を行い、CP-1 (Cell Protection) を用いて凍結し、使用時まで-150°Cの冷凍庫にて保存する。</p>

10-5-2-4. 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 $2 - 5 \times 10^7 / \text{kg}$ 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。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よい。

10-5-2-5. 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（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。

10-5-2-6. サイトメガロウイルス感染発症時の対応

経過中に治療を要する重篤な CMV 感染症が発症した際には、臨床研究を中止して直ちに GCV が投与する。ただし、抗原血症のみを認める CMV 感染症に限っては、患者の状態を注意深く観察することで、CMV 感染症治療薬として抗 CMV 高力価グロブリン製剤およびホスカルネットを使用してもよい。

10-5-2-7. 細菌、真菌感染症

症状に応じて、適当な抗生剤、抗真菌剤が投与される。

10-5-3. 他の抗白血病療法の併用

以下の場合には主治医の判断で他の抗白血病療法を併用、または追加してもよい。

1. CML 慢性期: 1) 遺伝子導入ドナーリンパ球輸注前にグリベック (STI571) 投与の適応があると判断される場合。2) 遺伝子導入リンパ球輸注後、2 ヶ月以上経過しても原病の改善が認められない場合、3) 遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後 2 ヶ月以内であるが、白血球増多、血小板増多の治療が必要であると主治医が判断する場合。
2. ALL の細胞遺伝学的再発 (cytogenetic relapse)、AML、ALL、MDS の血液学的再発 (hematological relapse)、CML の移行期および急性転化時再発: 遺伝子導入ドナーリンパ球輸注療法前に白血病細胞を減らすことが必要であると判断される場合。
3. その他、病状の急速な進行・悪化に伴い、他の抗白血病療法を併用することが望ましいと主治医が判断する場合。

10-5-4. 臨床検査項目及び観察項目

遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後 8 週間は、定期的に以下の観察、健康診断を行う。以後 3 年間は月に 1~2 回の健康診断を外来にて継続する。

1. 体温、血圧、脈拍、その他自他覚所見 (入院: 毎日; 外来: 週 1 回)
2. performance status (週 1 回)
3. 血算 (白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血小板数、網状赤血球) (入院: 週 2 回、必要に応じて適宜追加; 外来: 週 1 回)
生化学検査 (総タンパク、アルブミン、AST、ALT、LDH、Alp、 γ GTP、Bil、BUN、Cre、UA、Na、K、Cl、CRP、血糖)
(入院: 週 2 回、必要に応じて適宜追加; 外来: 週 1 回)
4. 血液凝固能 (PT、APTT、Fbg、FDP) (週 1 回、必要に応じて適宜追加)
5. 尿一般検査 (タンパク、糖、潜血、ウロビリノーゲン、沈渣)
(2 週に 1 回、必要に応じて適宜追加)
6. IgG、IgA、IgM (月 1 回)
7. CMV antigenemia、 β -D-glucan などの感染症検査、各種培養検査 (必要時)
8. 骨髄穿刺および骨髄染色体検査、FISH、PCR (月 1~2 回)
9. GVHD 評価のための肝生検、皮膚生検 (必要時)
10. HSV-TK に対する免疫学的検査
(HSV-TK に対する CTL の存在は、治療開始後の患者リンパ球を用いて、治

療前に保存していた末梢血リンパ球と HSV-TK 遺伝子発現自己リンパ球の細胞傷害能を比較・検討することで行う。)

10-5-5. 予測される副作用並びにその対処方法

10-5-5-1. ドナー末梢血リンパ球採取に伴うドナーへの危険性

ドナー末梢血リンパ球採取は、Baxter 社 CS-3000, Cobe 社 Spectra などの血球分離装置を用いて行われる。リンパ球採取中はクエン酸ナトリウム (ACD-A 液) が抗凝固剤として用いられるため、低カルシウム血症を来すことがあるので、これを予防するためにカルシウムを補充しながら行う。

リンパ球採取は通常は末梢静脈ラインを確保することによって可能であるが、ドナーの体格、血管の状態などにより十分な血流が確保できないときには、中心静脈ラインを確保する必要がある。この場合、ごく稀に静脈血栓症、動静脈瘻などを合併することがある。

リンパ球採取後の血球減少に関しても幾つかの報告がある。白血球に関しては一過性の好中球減少を合併したとの報告があるが、易感染性を来すまでには至らない。ヘモグロビン値が 2g/dl 以上低下する症例が 23.5%に、血小板数が 50,000/ μ l 以下に低下する症例が 10.8%に認められるという報告もあり、注意を要する。

以上の合併症に充分注意を払い、中心静脈穿刺に際しては習熟した医師が行うことが大切であるが、ドナーからのリンパ球採取は基本的には安全な確立された手技である。

10-5-5-2. ドナー末梢血リンパ球投与に伴う患者への危険性

遺伝子導入ドナーリンパ球投与時に、患者に発熱、悪寒、筋痛等を認めたとときには鎮痛解熱剤等の適切な薬剤にて対処する。重症の GVHD を発症したときには、前述の原則 (10-5-2-5) に従い治療をすすめる。遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後に発症した GVHD は、理論上は GCV 投与によって収束に向かうが、GCV 投与によってドナーリンパ球を排除できない可能性を完全には否定できない。その他、本臨床研究によって何らかの障害が生じた際には、主治医が適切な処置を行う。

10-5-5-3. RCR の危険性

本臨床研究において RCR が出現する可能性は極めて低い。また、たとえ RCR が PCR 等で検出されても、マウス由来のパッケージング細胞株より産生されるレトロウイルスはヒト補体により破壊されるので、ウイルス血症は一過性に終わる可能性が高いが、ヒト細胞から RCR の出現した場合、悪性リンパ腫を発症する

可能性も否定できないので、患者の経過を注意深く観察して対処する。

10-5-6. 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

10-5-6-1. 遺伝子導入の評価方法

10-5-6-1-1. 患者への遺伝子導入ドナーリンパ球投与前

1. 磁気ビーズ処理前後での Δ LNFR 発現率を FACS で確認することで、遺伝子導入効率と抗体を用いたウイルスベクター導入細胞の回収率を決定する。さらに *in vitro* において GCV を添加することで遺伝子導入細胞の死滅も確認する。
2. 細菌感染、マイコプラズマ感染、エンドトキシンの混入の有無を検査する。
3. 遺伝子導入細胞の表面形質 (CD3、CD4、CD8、CD56、CD19、CD20、CD14、CD11b) を FACS にて解析する。
4. RCR の出現を否定するために、遺伝子導入リンパ球を材料として、逆転写酵素活性、env 遺伝子発現の有無を検討する。
5. 遺伝子導入細胞のウイルスベクターゲノムのコピー数、ならびに組み込まれたベクターゲノムの状態を Southern blot 法、PCR 法にて確認する。

Southern blot 法は遺伝子導入ドナーリンパ球を制限酵素の *Xba*I あるいは *Bam*HI で消化して、HSV-TK をプローブとして Hybridization を行う。*Xba*I 消化にて HSV-TK 遺伝子を含む 5' LTR から Δ LNFR までの 3.7kb のバンドが得られ、また *Bam*HI が SFCMM-3 において unique site であることから *Bam*HI 消化にて感染したウイルスのコピー数が得られる。PCR 法では「7.これまでの研究成果」で示した HSV-TK および actin 遺伝子に対する primer を用いた sub-quantitative PCR を行う (HSV-TK sense: 5' GCT CCA TAC CGA CGA TCT GC 3' antisense: 5' GGA CTT TCC ACA CCC TAA CTC AA 3' actin sense: 5' CAT TGT GAT GGA CTC CGG AGA CGG 3', antisense 5' CAT CTC CTG CTC GAA GTC TAG AGC 3')。

これらの方法で遺伝子導入細胞の状態、ならびにウイルスコピー数に関してある程度の情報は得られるが、遺伝子導入部位のより詳細な解析を求めて linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) の導入を検討する。しかし、信頼性のある LAM-PCR 法の確立には多少の時間を要するため、当面は上記 Southern blot や PCR を行いながら遺伝子導入細胞を十分量保存しておき、確立した段階で遺伝子導入細胞のクロナリティー等を検討していく。

10-5-6-1-2. 患者への遺伝子導入ドナーリンパ球投与後

遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後に以下の検査を行う。全治療終了後も 3 年間または遺伝子導入ドナーリンパ球が完全に消退するまで、下記の 1, 2 の検

査を繰り返す。検査の時期は、投与後 4-6 週目に1回、その後は3ヵ月毎とし、2年目からは年に1回とする。3、4 に関しては必要時に検査を行う。

1. 末梢血中での遺伝子導入ドナーリンパ球の存在を FACS、PCR によって確認する。
2. PCR 出現の可能性を否定するために、患者末梢血単核球を材料として、逆転写酵素活性、env 遺伝子の発現の有無を検討する。
3. GVHD が出現した際には、生検材料を用いて抗 LNGFR 抗体による免疫染色、PCR によって輸注リンパ球の組織への浸潤を観察する。
4. GVHD 治療目的で GCV が投与された際には、最初の週は毎日、その後は1週間おきに FACS、PCR にて遺伝子導入細胞の消退を観察する (Southern blot 法、ならびに PCR 法に関しては「10-5-6-1-1. 患者への遺伝子導入ドナーリンパ球投与前」の 5 参照)。

10-5-6-1-3. 造血器悪性腫瘍治療の評価方法

遺伝子導入ドナーリンパ球輸注の直前、4 週後、8 週後に骨髄穿刺を施行し、別添 9 の評価基準に従って治療効果を判定し記載する。形態学的観察を行うとともに、分子マーカーによる評価が可能な症例においては、PCR、FISH などの方法を駆使して、残存病変を評価し、効果判定に付記する。

10-5-6-1-4. GCV 投与にともなう GVHD 消退の評価

GCV 投与後 3 日、7 日、14 日、21 日、28 日目の急性 GVHD の状態を別添 8 の重症度分類に従って記載する。

10-5-6-1-5. 副作用の評価方法

当該遺伝子治療臨床研究の再発白血病に対する治療原理は従来の DLT となんら変わることはないが、レトロウィルスベクターを用いた HSV-TK 遺伝子導入操作に伴うドナー細胞の性状変化を鑑み、今回の遺伝子治療の副作用評価は日本癌治療学会薬物有害反応判定基準 (別添 10) に基づいて行う。また、GVHD に関しては別添 8 の急性 GVHD の重症度分類に従って評価、記載するが、当該遺伝子治療において GCV 投与による GVHD の沈静化は今回の遺伝子治療の極めて重要な評価項目となるので、GCV 投与症例は全て遺伝子治療実行委員会に投与開始時点よりその経過を報告するものとする。

尚、下記の有害事象を認めた場合は、直ちに遺伝子治療実行委員会を開催し、本プロトコールの変更を含めて今後の治療方針を協議する。

1. grade 3 以上の非血液学的毒性を示した場合。
2. grade 3 以上の血液学的毒性 (血球減少) を認め、かつ他の有害事象 (例えば

白血球減少に伴う肺炎)を合併した場合。但し、たとえ grade3以上の血液学的毒性(血球減少)を認めたとしても、それが治療効果によるものと考えられ、他の有害事象が認められない場合は協議の対象とはならない。

3. GVHD 発症後、ガンシクロビル投与にもかかわらず GVHD が消退しなかった場合。

4. 上記基準に満たない毒性でも、患者に過度の危険や不快感を与える場合。

当該遺伝子治療臨床研究の抗白血病効果(GVL 効果)に関しては、別添9の DLT 治療効果の判定基準に従って評価するが、たとえ抗白血病効果が認められなくても、これのみをもって治療法の変更の理由としない。

治療に直接関連した重篤有害事象が発生した場合には、本遺伝子治療を直ちに中止し、遺伝子治療実行委員会にて当該遺伝子治療の全体的な延期、あるいは中止を含めた以後の方針を協議する。重篤有害事象とは、(1) 死亡、(2) 日常生活に支障をきたす程度の永続的な機能障害、(3) (1) または(2)に至る可能性が強いと判断された場合、と定義する。

10-5-6-2. 脱落および中止基準

治療中に下記のような理由で治療の継続が困難になった場合は、総括責任者が治療の中止を決定する。

1. 原病悪化のため治療の継続が困難な場合。
2. 重篤な疾患の併発が認められた場合。
3. 重篤な副作用のため治療継続が困難な場合。
4. 患者の都合により治療継続が困難であると判断した場合。
5. その他、主治医が治療継続困難と判断した場合。

5症例毎に副作用、治療効果について遺伝子治療実行委員会で審議を行い、必要があればプロトコルを変更を検討する。その審議結果に基づき実施施設長は、プロトコル変更を文部科学省および厚生労働省合同のワーキンググループに申請する。

10-5-7. 症例記録に関する記録用紙等の様式

一般入院患者と同様に、カルテに患者の容態、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。また成績の公表は研究者全員の合意のもとに行われる。