

(ii) 患者に投与する物質の純度及び安全性

患者に投与する物質は、遺伝子導入された患者骨髄血 CD34 陽性細胞のみで、それ以外の物質は投与しない。遺伝子導入に使用する GCsap M-ADA については、FDA の基準に従って純度および安全性に関する項目すべての検査が終了し、保証されたものを使用する（ベクター関連資料 2-10, 4-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7）。それらの項目には、ウイルス力価、ベクター遺伝子配列、無菌性試験、マイコプラズマ検査、一般安全性試験、RCR 検査などが含まれる。

前遺伝子治療では、培養液中に胎児牛血清 (FCS) が含まれており、治療の後半には ADA 欠損症患者に FCS 中セルロプラスミンに対する抗体が認められ、これに関連する可能性のある発熱・悪寒等の症状を認めた。本遺伝子導入操作時の培養ではヒトアルブミンを使用し、FCS を極力含まない系を確立したが、ベクター溶液に微量に混入している可能性のある FCS に対する IgG 抗体検査、アレルギー反応の検査を予め行って対応する。また、体外での遺伝子導入に使用される培養液やその他種々の試薬については、培養細胞を体内に戻す前に十分に洗浄するため、実際上の問題はないと考えられる。培養中に混入する危険性のある細菌、マイコプラズマ、エンドトキシンなどについては、患者に投与する前に検査を行う（付帯資料 2）。

(iii) RCR 出現の可能性

PG13/GCsap M-ADA はパッケージング細胞の改良の結果、PA317/LASN よりも RCR が発生する確率が、理論上より低いと考えられている。我々の基礎実験においても GaLV 由来の env 遺伝子に対する PCR 法を用いて RCR の発生は認められない事を確認した。実際の治療に使用する PG13/GCsap M-ADA については、米国において RCR の検査 (S+L-法を含む) を通過した後に輸入し、治療開始前後にもその都度 RCR が存在しないことを確認する。なお S+L-法については検体を SRL に輸送し、測定を依頼する。

(iv) 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞障害性

レトロウイルスは RNA ウイルスであり、感染後細胞内で逆転写酵素にて 2 重鎖 DNA となり宿主の DNA に組み込まれる。この過程において宿主の DNA に障害を及ぼすことはないと考えられている。今回使用する GCsap M-ADA もレトロウイルス由来であり、理論的には他のレトロウイルスベクターと同様と考えられるが、現在までレトロウイルスベクターによる細胞障害性の報告はない。

(v) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

今回の遺伝子治療臨床研究計画は患者の骨髄由来の血液幹細胞を標的細胞とし、*ex vivo*で遺伝子導入を行うものである。遺伝子が導入された細胞を介して他の細胞への遺伝子導入が体内で起こる可能性はRCRが存在しない限りありえない。また、レトロウイルスベクターは細胞外では非常に不安定であるので、患者に遺伝子導入細胞を投与する際に細胞外のレトロウイルスベクターが同時に体内に入り、標的細胞以外の細胞へ遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。

(vi) 患者以外の人への遺伝子導入の可能性

今回の遺伝子導入操作は*ex vivo*で行われるので、遺伝子導入に携わる関係者は細胞外のレトロウイルスベクターを含む上清の扱いに注意が必要であり、レトロウイルスベクターを含む廃液のすべては高圧滅菌後に廃棄する。しかし、前項で述べた様に、レトロウイルスベクターは非常に不安定であり、レトロウイルスベクターを含む上清に直接接触したりしても感染が成立するとは考えられない。また、患者を介して他の人へ感染することは、RCRが存在しない限りありえない。

(vii) 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターが宿主のDNAに組み込まれる場合、導入部位は一定ではないので、レトロウイルスベクターが組み込まれた部位の近傍に血液幹細胞にとって重要な遺伝子や癌遺伝子が存在した場合に問題となる。レトロウイルスベクターの組み込みが血液幹細胞の増殖にとって負に働く場合は感染細胞は死滅し、生体には問題は起こらないと考えられる。レトロウイルスベクターの組み込みが増殖にとって正に働くときは、次項で述べる癌原性の可能性が問題になる。本遺伝子治療の標的細胞は血液幹細胞であり、遺伝子導入された細胞が長期間にわたって患者の体内で生存すると予測され、その安全性は長期間にわたって評価されることが必要である。

(viii) 癌原性の有無

レトロウイルスベクターの組み込みが細胞の増殖にとって正に働く時には癌原性の問題が出現する。例えば癌遺伝子の近傍にウイルスのLTRが存在すれば、強力なプロモーター活性を有するLTRにより癌遺伝子が発現し、腫瘍化する可能性も否定できない。また、組み込まれる事によって癌抑制遺伝子を分断し、その後他のalleleの同じ遺伝子の変異を誘導するこ

とも否定できない。このような可能性は、過去のレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の実施の際に常に問題となっていたが、実際の事象は確認されていなかった。フランスにおける γc を導入遺伝子とした血液幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究の2例で起こった白血病様の副作用では、ともにLMO2という癌遺伝子内/近傍にベクターが組み込まれ、非生理的な発現が引き起こされたのがこの事象の一因と考えられている^{11) 12)}。 γc 以外の導入遺伝子による過去多くの動物実験や、臨床研究例においてもこのような事象がないこと⁴⁹⁾(添付資料1-10)、遺伝子挿入部位はランダムであるが、遺伝子導入細胞数を考慮し、確率的に過去の遺伝子治療臨床研究においてもLMO2近傍に遺伝子が組み込まれる可能性があること等を考えあわせると、導入遺伝子 γc と癌遺伝子LMO2の発現がどちらも非生理的条件下に起こることが白血病様副作用の誘因の一つとして関わっていると推測された。本遺伝子治療においても治療後はクロナリティーを伴った異常な細胞増殖の発生を考慮し、3ヶ月ごとにT cell receptor (TCR) V β 、B cell receptor (BCR) spectratyping、TCR γ FCM、linear amplification-mediated (LAM) PCR等の検査を定期的に行って慎重に観察し、異常を認めたときは単クローン細胞増殖の検索、染色体検査等を含めて、さらに詳細な病態解析に関する検査を進める。

(2) 遺伝子産物の安全性

GCsap M-ADAの保有する遺伝子はヒトADAのみであり、LASNと異なりNeo^R遺伝子を保有しない。本来ヒトには無い遺伝子の導入が無く、その点で安全である。

(3) 細胞の安全性

(i) 培養細胞の純度

GCsap M-ADAによる遺伝子導入操作後の骨髓血CD34陽性細胞には、ベクター産生細胞が混入する可能性は極めて低いと考えられる。

(ii) 細胞の遺伝型、発現型の安全性

GCsap M-ADAの遺伝子導入はADA遺伝子の相同領域に起きるのではなく、その部位は一定でもない。すなわち遺伝子導入によって標的細胞中のゲノムADA遺伝子座には変化は起きない。

ADA 欠損症は ADA の絶対的不足が原因であり、異常蛋白質による細胞障害が原因でない。従って、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入により ADA 欠損の血液幹細胞へ ADA を補充することは 1 つの治療戦略となりうる。また ADA は触媒酵素であるので過剰産生されても基質がなくなるとその作用はなく、仮に遺伝子導入によって過剰に発現されても細胞の安全性において問題はないと考えられる。

(iii) 被験者に投与する細胞の安全性

被験者に投与する細胞は ex vivo で GCsap M-ADA による遺伝子導入を行った自己の血液幹細胞（骨髄血 CD34 陽性細胞）であり、投与する細胞の安全性は極めて高いものと思われる。GCsap M-ADA 産生細胞株と導入操作後の細胞の無菌性は血液培養用培地を用いた培養により確認する。

細胞培養に使用した各種サイトカインは、繰り返す洗浄後にその生物活性を示す濃度以下に十分希釈されており、また本来ヒト生体内に存在する物質であることからこれらの生体におよぼす影響はほとんど無いものと考えられる。

11. 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

今回使用するベクターについては 10(1)(ii) に記述したように FDA により臨床応用が安全性の点からも承認されている。

我々は、末梢血単核球を標的とした ADA 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究を学内、旧文部省、旧厚生省の審査・認可を受け、1995 年 8 月から 1997 年 3 月まで実施した。その結果、レトロウイルスベクターを用いたこの方法での遺伝子治療の有効性と安全性を確認している。この経験は今回の遺伝子治療の実施に大変役立つ。事実、前回使用した器機、機材が使用可能であり、ほぼ同様の細胞分離等の技術は修得している。また、検査や治療に関わる施設内の協力も前回同様に得る事が可能である。

GCsap M-ADA を用いた血液幹細胞への遺伝子導入に関しては、これまでに臍帯血や、健康人ボランティアの骨髄血を用いて繰り返し基礎実験を行っている。また、ADA 欠損症患者

から試験的に骨髓血を採取し遺伝子導入基礎実験を行っている。一方、遺伝子導入・発現等に関する評価法は、以前の方法に加え、遺伝子導入を定量的に解析できるシステムを新たに開発した。また、NOD/SCID マウスを用いた系において遺伝子導入細胞が生体内で増殖分化し、遺伝子を保持し、発現を継続することを確認している。

新たに適応患者の選択基準、モニタリングプランを設定して遺伝子治療臨床研究適応・評価小委員会を設置した（付帯資料 5）。これらによって本遺伝子治療臨床研究の適応患者の選定が適切に行われ、治療後の有害事象に対する細心の対応が可能になっていると考える。

12. 遺伝子治療臨床研究の計画

(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

PEG-ADA 療法を 6 ヶ月以上継続するも、その効果が十分ではなくその時点においても HLA 一致同胞が存在しないなど、次項に示す適応患者としての選定基準、適応除外基準に適合する ADA 欠損症患者を対象とする。

遺伝子導入細胞が患者体内で増殖優位性を損なわないため、治療実施の 2-4 週前から PEG-ADA 療法を中断し、遺伝子導入細胞の優位性が発揮できる状況になったかを判断して治療実施日を決定する。また、無菌室に準じた環境下で感染の兆候がでてこないかをより注意深く観察する。

遺伝子導入は患者の自己骨髓血 CD34 陽性細胞を標的として行う。全身麻酔下で患者から骨髓血を採取し、Isolex300i にて CD34 陽性細胞を分離する。この細胞に対し ex vivo で遺伝子導入を行い、良く洗浄後、静脈内へ遺伝子導入 CD34 陽性細胞を投与する。ベクターは GCsap M-ADA を使用する。このベクターは共同研究者の米国 NIH の F. Candotti 博士より供与され、安全性に関して米国 FDA で既に承認されたものである（添付資料 2-1, -2, -3）。

投与後は患者の末梢血単核球または骨髓細胞を用いて導入遺伝子の存在、ADA 遺伝子の発現、免疫機能、クロナリティーを伴った異常な細胞増殖、RCR などを検索しながら患者の状態を経過観察する。導入遺伝子の検索は LASN と GCsap M-ADA を区別して検出する系を

用いて検討する。

(2) 適応患者の選定基準及び適応除外基準（付帯資料 4）

選定基準

- (i) HLA 一致血縁骨髄ドナーがない。
- (ii) 両親の選択によりハプロタイプ一致の何れかの両親からの HST ではなく、PEG-ADA 療法が実施されている。
- (iii) 6 ヶ月以上にわたる PEG-ADA 療法の継続にもかかわらず、末梢リンパ球数が $1000/\mu\text{l}$ 以下、レクチン刺激によるリンパ球芽球化反応が正常の 50% 以下、低 γ グロブリン血症の状態が持続している。
- (iv) 以上の状況下で両親が本遺伝子治療臨床研究を選択している。

除外基準

- (i) 両親のインフォームドコンセントを得られない。
- (ii) HLA 一致の同胞がその後出生している。
- (iii) 悪性腫瘍が発生している。
- (iv) 家族内で悪性腫瘍が多発している。
- (v) 感染症などがあって全身状態が不良で PEG-ADA 療法の中断に耐えられない。

(3) 適応患者の選定方法

前項の選定基準、適応の除外基準に基づいて患者を選定し、インフォームドコンセントを得る。患者選定の結果を遺伝子治療適応・評価小委員会に報告し、遺伝子治療の適応があるとの小委員会の判断を得て治療を開始する。

遺伝子治療適応・評価小委員会は適応患者の選定及び臨床評価（有害事象の問題も含めて）に関する専門医から構成されて、委員の選定は遺伝子治療審査委員会が行う。小委員会は申請者からの報告に基づいて患者が前項の選定基準、適応除外基準に適合しているかどうかの判定を行い、その結果を申請者と審査委員会に報告する。

(4) 被験者の同意の取得方法

一般に被験者は幼少であるので、具体的な治療方法、予想される効果と副作用等を書面をもとに両親に説明し、同意を得る（添付資料 3-1）。被験者がある程度理解できる年齢の場合は、具体的な手順を主体に説明書を作成して十分な説明を行い、理解を得る。

(5) 実施期間及び目標症例数

許可が得られた時点から 5 年間。目標症例数：4 例。

(6) 遺伝子治療臨床研究の実施方法

(i) 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。

骨髓血採取の際、多量の血液喪失が予想される。これを防ぐために予め自己保存血用の採血 10ml/Kg 体重を実施して冷蔵保存しておき、骨髓採取後に輸血を行う。

治療前の患者に実施されている治療；定期的な PEG-ADA 療法、静注用γグロブリン製剤の補充、ST 合剤などの感染の予防内服に関しては PEG-ADA 療法のみを中断する。中断後は、無菌室に準じた管理下で以下の項目を 1-2 回/週行い、遺伝子治療実施の時期を判断する。

- ①末梢血リンパ球数、
- ②リンパ球表面マーカー検索
- ③血漿 ADA 活性
- ④赤血球 ADA, dAdo, SAHase

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。

(ii) 遺伝子導入方法（付帯資料 1）

患者骨髓血 CD34 陽性細胞を標的とし、GCsap M-ADA を用いて ex vivo で遺伝子導入を行う。

① 標的細胞の調整

全身麻酔下で患者の腸骨を数回穿刺し、一カ所につき 5-10ml の骨髓血を採取する(全量で 10-15ml/kg を越えないようにする)。骨髓血からバッフィーコート分離し、更に Isolex300i にて CD34 陽性細胞を採取、その純度と数量等を検査後、生理食塩水で洗浄して標的細胞とする。一部を検査用に保存する。

② 標的細胞の前培養

前培養は、SCF(R & D), Flt-3L(R & D), TPO(R & D), IL-6(R & D), sIL-6R(R & D) をそれぞれ最終濃度 50, 300, 50, 100, 500ng/ml で添加した 1% 人血清アルブミン/X-VIVO 1 5™ 培地で 24 時間行う。細胞は 5×10^5 /ml の濃度で、CO₂ 透過性バッグ (LifeCell X-Fold™ bags) を使い、炭酸ガス培養器内で 37℃、5% CO₂ 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/cm²) でコートしておく。

③ 標的細胞への遺伝子導入（付帯資料 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% CO₂ 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。

④ 遺伝子導入細胞の患者への投与方法

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： 6×10^6 /kg

以内)。培養上清の培養検査等に異常がないのを確認後、患者への投与を行う。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。

⑤ 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。

⑥ 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、ドライアイス詰めの凍結状態で輸送され、入手後は使用するまで-80℃に保存される。

(iii) 臨床検査項目及び観察項目（付帯資料 3）

- ① 末梢血リンパ球数
- ② T細胞数、リンパ球表面マーカー検索
- ③ 遅延型過敏反応
- ④ レクチン（PHA, PWM, ConA）, アロ抗原に対するリンパ球芽球化反応
- ⑤ 血清 IgG, IgA, IgM, IgE 値
- ⑥ 同種血球凝集素価
- ⑦ 特異抗体価（ジフテリア・百日咳・破傷風・肺炎球菌）
- ⑧ 赤血球 ADA, dAdo, SAHase の測定
- ⑨ 血漿 ADA 活性の測定
- ⑩ 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
- ⑪ TCR V β , BCR spectratyping, TCR γ FCM
- ⑫ LAM-PCR 法による clonality の解析
- ⑬ LMO2 遺伝子の RT-PCR 解析
- ⑭ 逆転写酵素活性、env 遺伝子の PCR
- ⑮ S+L-法
- ⑯ EBV PCR, Ig 重鎖遺伝子の再構成の検索

(iv) 予測される副作用並びにその対処方法

患者に発生した有害事象について遺伝子治療臨床研究適応・評価小委員会と審査委員会に報告する。重篤な結果が予想される有害事象が発生した場合、適切な対応処置を行い、すみやかに遺伝子治療臨床研究適応・評価小委員会、審査委員会に報告する。小委員会はその対応方法について助言を行うと共にその内容を審査委員会に報告する。

患者に発熱、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する。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者で産生され、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、患者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。

治療後の患者に白血病様の病態が発症する可能性を考慮し、類似の病態発生の早期発見、早期対策を目的として、共同研究者である F. Candotti 博士（米国 NIH）らの米国におけるモニタリングプラン（添付資料 2-4, -5）に準じてモニタリングを行う（付帯資料 6）。モニタリングの結果はその都度、遺伝子治療臨床研究適応・評価小委員会に報告し、白血病様事象が疑われたときには、直ちに小委員会に報告し、適切な対応策を講じると共に遺伝子治療との因果関係を可及的に明らかにするよう努める。

(v) 遺伝子治療臨床研究の評価、モニタリング

A. 臨床効果

- ① 治療後 72 時間と 1 週以降に毎週以下の検査を行う。
 - 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, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ 等)
 - d. 血漿 ADA 活性の測定
- ② 血清 IgG, IgA, IgM, IgE 値は 1 週以降に 2 週毎に測定する。
- ③ 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)
- ④ 3 ヶ月以降は 4 週ごとに①、②、3 ヶ月毎に③と以下の検査を実施する。
 - a. TCR V β spectratyping
 - b. TCR γ FCM
 - c. BCR spectratyping

上記の免疫学的検査から免疫機構の再建を評価する。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。

B. モニタリング（付帯資料 6）

有害事象をより早期に見いだすために 3 ヶ月以降、4 週毎に臨床症状（リンパ節腫大、肝脾腫大）、①、②、3 ヶ月毎に③、④、⑤の定期検査を 3 年まで継続する。以降、5 年までは 6 ヶ月毎、15 年までは 1 年毎に実施する。

一方、定時的血液検査で血液細胞数、性状に異常が示され、白血病様の重大な副作用が疑われる時には、⑥-⑨の検索を実施する。

- ⑤ LAM-PCR※
- ⑥ TCR のモノクロナリティ検索
- ⑦ Ig 重鎖遺伝子の再構成の検索
- ⑧ EBV-PCR
- ⑨ LMO2 RT-PCR

※LAM-PCR の評価は共同研究者 F. Candotti 博士（米国 NIH）, 高德正昭博士（自治医科大学）らとの共同研究下に行う。

さらに明らかな臨床症状がある場合、モノクロナリティーが示された場合は以下の検査を実施する。

- ⑩ 異常細胞を単離してベクター挿入部位の解析
- ⑪ 染色体検査
- ⑫ 白血病一般の検査

(vi) PEG-ADA 療法再開、再度中断の基準

①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。

②PEG-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。