

- (f) 妊娠中あるいは授乳中の症例
- (g) 活動性重複癌を有する症例
- (h) 担当医師が本研究の対象として不適当と判断した症例

(B) 遺伝子治療の対象症例の選択基準

- (a) 本遺伝子治療の対象症例となることについて、文書にて同意が得られている症例
- (b) 上記自己造血幹細胞移植併用大量化学療法の対象症例の選択基準、除外基準の全てを満たしている

(3) 対象症例の同意の取得方法

本プロトコルに関する充分なる説明は、患者および患者の家族、後見人等に対して総括責任者および担当医師によってなされるものとする。インフォームドコンセントの文面については、第16章に記した。

(4) 対象症例の登録方法

本プロトコルに関する充分な説明がなされ、インフォームドコンセントに署名の得られた患者に対して、上記対象症例の選択基準、除外基準の全項目についての検査を行い、これら基準の全てを満たした患者に対して、総括責任者が患者選定を決する。患者選定について癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会に報告を行い、審査委員会の了承の得られた患者を本遺伝子治療の対象症例として登録する。

(5) 実施期間および目標症例数

本研究は、平成12年2月24日より平成18年12月31日まで、2段階に分けて実施する。

本研究の第1段階では、研究の安全性の確認を主たる目的とする。この第1段階においては、3症例に対してMDR1遺伝子導入細胞の移植を行う。これらの患者に対しては、前の患者の骨髄再構築が確認されてから次の患者への移植を行う。このため、遺伝子導入細胞の移植は4週間以上の間隔を置いて行う。これらの患者に対して、引き続きdecetaxelを中心とする化学療法を施行する。3症例目の患者にMDR1遺伝子導入細胞の移植を行ってから6カ月間を第1段階における急性毒性の観察期間とする。この時点までにMDR1遺伝子導入細胞の移植に起因する急性毒性あるいは有害な副作用がおきないことを確認する。

上記第1段階での安全性の確認の後、本研究は第2段階へと移行する。

本研究の第2段階では、taxane類抗癌剤治療6コース完了かつtaxane類抗癌剤投与量100%到達症例として10例を目標症例として臨床研究を行い、遺伝子治療の安全性と有効性を検証する。

13 遺伝子治療臨床研究を含む一連の治療計画の実施方法

(1) 通常量による導入化学療法

抗癌剤に対する反応性(効果)をチェックし、また腫瘍量を減少させ、そして自己造血幹細胞移植併用大量化学療法を施行するまでに病勢をコントロールするため、通常量の抗癌剤によるACF療法(adriamycin, cyclophosphamide, 5-fluorouracil)等を寛解導入化学療法として施行する。ACF療法は米国での標準的寛解導入化学療法のひとつであるFAC療法の変法である。有用な新薬や新しい化学療法の臨床導入により再発あるいは進行乳癌に対する寛解導入療法の治療戦略が変更される場合には、本プロトコルの寛解導入化学療法もその戦略に準拠することを考慮する。財団法人癌研究会附属病院化学療法科において現在行われているACF療法のプロ

トコールは以下の通りである。

・ adriamycin	40 mg/m ² , day1
・ cyclophosphamide	500 mg/m ² , day 1
・ 5-fluorouracil	500 mg/m ² , day 1, day 8

この治療を3から4週間ごとに反復し、4から6サイクル程度行う。これらの先行する化学療法によりCRあるいはPRが得られた症例を本研究の対象症例とする。それらの症例に対してインフォームド・コンセントを取得の後、自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法およびMDR1遺伝子治療を行う。

(2) 自己末梢血単核細胞の採取

患者の自己末梢血単核細胞の採取に先立って、cyclophosphamide 2 g/m² を3時間点滴静注にて投与する。その後、9日目からG-CSF 6 µg/kg を皮下注にて連投してCD34抗原陽性細胞の末梢血への動員をはかる。G-CSFの投与は末梢血単核細胞採取の2日目まで続ける。ただし患者の末梢白血球数が30,000/µl付近に達した場合にはG-CSFの投与を中止する。末梢血幹細胞採取の前日までに鼠径部からdouble lumen catheter (Amco製)を挿入する。血液凝固によるカテーテルの閉塞を防止するため、ヘパリンでロックして採取に備えておく。通常cyclophosphamide投与より13日目、14日目、15日目の3日間にわたり、連日COBE Spectra 2991持続血球分離装置にて末梢血単核細胞を採取する。自己末梢血幹細胞移植に用いる患者の末梢血単核細胞の採取は連日3日間を1コースから3コース施行する。遺伝子治療を施行する症例については、各コース2日分(全採取細胞の2/3相当量)の末梢血単核細胞を、通常の自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法の手順に従い、未処理のまま、分離洗浄後dimethylsulfoxide (DMSO)を10%加えた自己血清に浮遊し、プログラムフリーザーにて凍結後、液体窒素中に凍結保存する。この際凍結前に細胞のviabilityの確認をする。患者より採取された末梢血単核細胞に含まれるCD34抗原陽性細胞の細胞数が2x10⁶/kgに達した場合は、自己末梢血単核細胞の採取は1コースあるいは2コースにて終了するが、CD34抗原陽性細胞の細胞数が不足している場合には、引き続き患者の自己末梢血単核細胞の採取を行う。

(3) 自己骨髄単核細胞の採取

骨髄血を採取する場合には予め下記の検査項目を施行し、正常範囲内であることを確認する。

検査項目

末梢血液所見(CBC)、プロトロンビン時間、部分トロンボテスト、電解質(ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、リン、マグネシウム)BUN、クレアチニン、血糖、アルブミン、肝機能検査、検尿、胸部単純レントゲン写真、EKG。

骨髄血の採取は導入化学療法4-5コース終了後で末梢血単核細胞採取終了後に行う。採取前の末梢血の好中球数1,500/µl以上、血小板数100,000/µl以上が骨髄血採取の最低条件である。骨髄血採取は病院手術室にて硬膜外麻酔下施行される。採取骨髄血は200mlのRPMI1640培養液にヘパリン10,000単位を加え手術室にて骨髄分離フィルター(Baxter)を用いて処理する。その後、骨髄血を濃縮用バッグに移し換え、骨髄血対ACD-A液を10:1の割り合いになるようにACD-A液を加え良く混和する。この骨髄細胞浮遊液をCOBE Spectraで濃縮し、buffy coat、すなわち濃縮骨髄単核細胞浮遊液を調製する。得られた骨髄単核細胞を洗浄の後、DMSOを10%加えた自己血清を加え凍結保存する。

(4) CD34抗原陽性細胞の調製

本遺伝子治療には、遺伝子治療を施行する症例の、各コースの1日分の末梢血単核細胞を使用する。

CD34抗原陽性細胞の分離には、磁気細胞分離システム(Isolex : Baxter)を用いる。まず末梢血単核細胞と抗CD34抗原モノクローナル抗体を反応させ、次に2次抗体の結合した磁気ビ

ーズと反応させて、ロゼットを形成させる。Isolex 磁気細胞分離機を用いて抗 CD34 抗原モノクローナル抗体に結合した細胞のロゼットを分離回収する。PR34 Stem cell releasing agent を用いて得られたロゼットより CD34 抗原陽性細胞を分離浮遊させ、残った抗体-磁気ビーズ複合体を Isolex 磁気細胞分離機に結合させて除去する。反応液中に浮遊する CD34 抗原陽性細胞を回収、洗浄し、遺伝子導入に使用する。

(5) CD34 抗原陽性細胞への遺伝子導入

分離された CD34 抗原陽性細胞は stem cell factor (SCF)、thrombopoietin (TPO)、interleukin-6 (IL-6)、flk-2/flt-3 ligand (FL ligand)、soluble IL-6 receptor の存在下で 2 日間培養する。その後、組み換え fibronectin fragment CH-296 をコートした培養器上で、細胞に HaMDR1 レトロウイルス培養上清を加え、遺伝子導入を行う。レトロウイルスを含む培養液は、1 日 2-3 回交換する。2 日間の遺伝子導入の後、移植時まで細胞を液体窒素タンクに凍結保存する。

(6) 遺伝子導入細胞の安全性の確認

遺伝子導入された細胞の一部は各種サイトカインを含む培養液で更に培養された後、MDR1 遺伝子の導入効率の検定および種々の安全性試験に使用される。安全性試験としては、無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマの検索および RCR の検索が行われるが、これらの試験のほとんどは、株式会社エスアールエルもしくは MA 社において実施される。また、MDR1 遺伝子導入細胞を患者に戻す前に、MDR1 遺伝子導入細胞中の乳癌細胞関連抗原を発現する細胞の有無をイムノサイトケミストリーで確認する。

(7) 大量化学療法

財団法人癌研究会附属病院化学療法科において行われる乳癌に対する大量化学療法のプロトコールに従って大量化学療法を施行する。現在の大量化学療法のプロトコールは以下の通りである。ただし、患者の状態により投与量を 75%まで減量することを認めている。

・ cyclophosphamide	6 g/m ²	(3 日に分けて 3 等分し各日に 3 時間にて静注)
・ thiotepa	200 mg/m ²	(72 時間持続静注)
・ carboplatin	1600 mg/m ²	(72 時間持続静注)

(8) 造血幹細胞移植

標準的な造血幹細胞移植ユニットおよびその方法に従って、自己造血幹細胞移植術が施行される。

大量化学療法終了 72 時間後に凍結保存されていた患者の未処理の自己末梢血単核細胞を移植するが、この時に、MDR1 遺伝子導入した CD34 抗原陽性細胞を同時に移植する。

造血幹細胞輸注 1 時間前よりハプトグロビン 2,000 単位およびヒドロコチゾン 200mg を 2 時間で点滴静注する。凍結保存されていた未処理の自己末梢血単核細胞および MDR1 遺伝子導入した CD34 抗原陽性細胞をベッドサイドの 37℃の恒温水槽内で急速解凍し、直ちに点滴静注にて患者に移植する。ハプトグロビン 2,000 単位の 2 時間での点滴静注はこの日にもう一度行われる。

患者は大量化学療法の標準的な支持療法として、骨髄機能が回復するまで骨髄移植クリーンルームにおいて十分なケアを受ける。

(9) 抗癌剤の投与計画

大量化学療法施行後、患者の生理機能が回復した時点で docetaxel の投与を考慮する。

(a) 生理機能回復の目安

大量化学療法施行後、docetaxel の投与を開始される患者は以下の生理的条件を満たすものとする。

・PS	0、1、2
・末梢血好中球数	$\geq 1,500/\mu\text{l}$
・血小板数	$\geq 100,000/\mu\text{l}$
・GOT・GPT	正常上限の3倍以下（癌浸潤のある場合を除く）
・血清総ビリルビン	$\leq 1.2 \text{ mg/dl}$ （施設正常値）
・血清クレアチニン	$\leq 1.2 \text{ mg/dl}$ （施設正常値）
・EKG	正常範囲

(b) docetaxel による治療

患者の精神・心理状態が安定化し、大量化学療法による負担から回復し病変の re-staging が終了して上記項目が満たされた後、docetaxel の投与を開始する。docetaxel は'97年6月に日本で市販化され、現在のところ日本で乳癌に対して使用できる taxane 類抗癌剤の中でより使用実績がある。

(c) docetaxel の投与計画

docetaxel の投与量は、推奨標準投与量の50% (30 mg/m²) より開始し、75% (45 mg/m²)、100% (60 mg/m²) の3段階とする。docetaxel は、1時間の点滴静注にて投与される。1コースごとに投与量の増量を行う。ただし、docetaxel の投与後、好中球の最低値が500/ μl 未満に減少した場合には、次コースの docetaxel の投与量の増量は行わない。

投与量の増量は投与量が通常投与量に達したところで完了する。通常投与量より多い量の投与は行わない。

docetaxel の投与は、21日毎に反復するのを原則とする。

(d) docetaxel の投与量および投与間隔の修正

次コース投与予定日に好中球数 1,500/ μl 未満あるいは血小板数 100,000/ μl 未満の場合は、次コースの投与を7日間延期する。延期後の末梢血により上記の条件をクリアしたことを確認した後、次コースの投与を行う。

前回の docetaxel の投与量が通常投与量の50%であった場合には、患者末梢血の好中球数および血小板数が上記条件をクリアするまで次コースの投与は延期される。

前回の docetaxel の投与量が通常投与量の75%あるいは100%であった場合には、投与の延期は14日間までとする。14日間延期しても好中球数および血小板数が上記の条件を満たさない場合は、投与量を1段階減量して投与を行う。

docetaxel の投与後の患者の好中球減少が著しい場合には、G-CSF の投与を考慮する。

(e) docetaxel の投与回数

大量化学療法でCRが得られて臨床的に残存病変の認められない患者に対しては、本プロトコールによる docetaxel の投与は6コースで終了する。

大量化学療法終了後も残存病変を認めた患者に対しては、docetaxel による治療が有効と判断される間は継続して docetaxel による化学療法を施行する。

(f) paclitaxel の選択

もうひとつの taxane 類抗癌剤である paclitaxel は、1999年2月に乳癌に対する市販薬としての承認を受けた。よって個々の症例でより適切な taxane 類抗癌剤を選択する。特に、患者の過去の化学療法において心循環器系に著しい副作用が認められた場合には、paclitaxel を第一選択とする。この場合の paclitaxel の投与計画は、上記の docetaxel の投与計画に準じる。また、

docetaxel 治療によって患者に著しい副作用がみとめられた場合には、paclitaxel への変更を考慮する。

paclitaxel を投与する場合には、アナフィラキシー反応を予防するため、前投薬として dexamethasone、diphenhydramine、lanitidine 等を適宜使用する。

(g) taxane 類抗癌剤以外の抗癌剤投与

taxane 類抗癌剤の投与による治療の継続が不可能と判断される著しい副作用を認めた場合、taxane 類抗癌剤による治療は中止する。この場合、anthracycline 系抗癌剤 (adriamycin, epirubicin) が有効と考えられる場合は、これらの抗癌剤による治療を考慮する。この場合の抗癌剤の投与計画は、本プロトコールに準ずる。

通常投与量の 100% の taxane 類抗癌剤の 2 コースの投与によっても癌が増悪した場合 (PD, progressive disease) には、taxane 類抗癌剤の投与が不相当であると判断されるので、taxane 類抗癌剤による治療は中止する。その後は患者ごとに治療計画を考える。患者の癌に対して anthracycline 系抗癌剤 (adriamycin, epirubicin) が有効と考えられる場合は、これらの抗癌剤による治療を考慮する。この場合の抗癌剤の投与計画は、本プロトコールに準ずる。

(10) 臨床検査項目及び観察項目

(a) 一般の臨床検査項目及び観察項目

検査の頻度は以下に定める。これは、大量化学療法施行後患者が入院中の期間についてのものである。患者退院の後はこのスケジュールに準じて施行する。

- ・血液一般：赤血球数、Hb 量、Ht 値、白血球数、白血球分画、血小板数、網赤血球、血沈
(頻度) 末梢好中球数が 500/ μ l になるまでは週 3 回、その後は週 2 回検査する。
- ・尿検査：蛋白、糖、ウロビリノーゲン、沈渣
(頻度) 週 3 回検査する。
- ・血液生化学：総蛋白、A/G、総ビリルビン値、Al-P、GOT、GPT、LDH、BUN、クレアチニン、電解質 (ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、マグネシウム)
(頻度) 週 2 回検査する。
- ・身体的所見、体重、PS
(頻度) 週 1 回検査する。
- ・心電図
(頻度) 3 週間に 1 回検査する。
- ・骨髄穿刺
(頻度) docetaxel 投与の開始までに必ず 1 回は行う。

(b) 患者の血液細胞における MDR1 遺伝子の組み込みと発現の評価

上記の血液検査のために採取された患者の末梢血あるいは骨髄液の一部を用いて、患者の CD34 抗原陽性細胞へ導入されたヒト多剤耐性遺伝子 (MDR1) の血液細胞における発現を、抗ヒト P-糖蛋白モノクローナル抗体 MRK16 による細胞の免疫染色後の FACS 解析により評価する。また、PCR 法を用いて HaMDR レトロウイルス遺伝子の患者の細胞への導入と発現を調べる。HaMDR レトロウイルス遺伝子の患者の細胞への組み込みは、LAM-PCR を用いて調べる。LAM-PCR で得られた主要なバンドについてはクローニングし、組み込み部位の同定を行う。特に上記の FACS および PCR において抗癌剤治療期間以外に MDR1 遺伝子導入細胞が異常に増加し、また LAM-PCR において特定の遺伝子導入細胞クローン由来と推定されるバンドが強く検出されるようになった場合には、その遺伝子導入細胞クローンにおける特異的な primer を用いた PCR によってそのクローンの異常増幅が起こっているかどうかを確認する。そのクローンの増幅が確認された場合には、組み込み部位近傍の遺伝子の発現の変化、および組み込みが細胞の増幅に与える効果について調べる。

(c) RCR の出現の有無の観察

患者の末梢血、骨髓における RCR の出現の有無を、env 遺伝子を検出する PCR を用いて調べる。この試験は患者入院中は最低月に 1 回、退院後は 2 から 4 カ月に 1 回行う。その結果、RCR の存在が疑われるときは、S+L 試験を行い、RCR の存在を確認する。S+L 試験において RCR の存在が証明された場合は、凍結保存してあるレトロウイルス液および患者に導入する前の細胞、遺伝子導入にしようとした培養上清を用いて再度 RCR の確認試験を行う。これらの試験は、株式会社エスアールエルもしくは MA 社において実施される。RCR の存在が確認されたときは、その RCR 遺伝子の単離と構造解析を行い、RCR が出現してきた理由を明らかにする。

(11) 予想される副作用、抗癌剤の投与量修正、および臨床的管理

本プロトコールで施行される化学療法では、稀に不可避免的な骨髓低形成（敗血症、出血）を合併することがある。このような致死的な副作用が発現する可能性は 5 % 程度と考えられる。

(12) 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準

自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法施行後の乳癌症例に対する化学療法の有効性と安全性は、進行、再発乳癌患者における治療効果の判定基準（参考資料 C）に準じて評価する。

自己造血幹細胞移植により骨髓再構築された後の docetaxel による化学療法における骨髓毒性の程度（その重篤性とその発現期間）を評価する。また、この時の患者末梢血中の MDR1 遺伝子導入細胞の出現頻度を調べ、抗癌剤投与との関連性について評価する。

(13) 遺伝子治療臨床研究の中断および中止判定基準

患者末梢血中に本臨床研究で用いた MDR1 レトロウイルスに起因する RCR の出現が確認された場合、あるいは本臨床研究による治療が患者に著しい不利益をもたらすことが明らかになった場合には、本臨床研究を中止する。患者に対しては、再発進行乳癌の標準的な治療計画に準じた治療を行う。ただし、すでに MDR1 遺伝子導入細胞の移植を受けた患者に対しては、定期的に導入遺伝子および RCR のモニターを行う。この中止が患者の治療に不利益をもたらさないように十分な配慮を行う。

個々の患者の臨床研究の中断および中止の基準を以下に記す。

本臨床研究の対象症例として登録された後、その患者の病状の悪化などによって第 12 章に記した遺伝子治療の対象症例の選択基準のいずれかに不適合あるいは除外基準のいずれかに適合となった場合には、たとえその患者の造血幹細胞の採取と末梢血単核細胞由来 CD34 抗原陽性細胞への MDR1 遺伝子導入が終了していても、末梢血幹細胞移植併用大量化学療法の施行は延期される。上記の選択基準に不適合あるいは除外基準に適合の状態が一時的な場合は、その後の病状の回復を待って患者が対象症例の基準の全てをを満たしていることを確認した後、末梢血幹細胞移植併用大量化学療法を施行し、臨床研究を継続する。選択基準に不適合あるいは除外基準に適合の状態が回復不能であると総括責任者が判断した場合には、その症例は本臨床研究の対象症例より除外される。ただし、これらの症例に対しても、CD34 抗原陽性細胞への MDR1 遺伝子導入および RCR の出現などに対する in vitro での評価は行う。

患者に末梢血幹細胞移植を施行した後、末梢血の好中球数の回復が遅れ、14 日以内に 500/ μ l を越えないときは骨髓穿刺を施行する。その結果骨髓低形成を認めた場合は移植不全と判断し、バックアップとして凍結保存しておいた骨髓単核細胞の移植を行う。この場合、この患者には MDR1 遺伝子導入細胞が十分に移植されていないと判断されるので、本臨床研究のプロトコールによる docetaxel などを用いた治療は原則として行わない。しかしながら、この患者には MDR1 遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞の移植は施行されているので、その後の患者の経過観察、MDR1 遺伝子導入および RCR の出現などに対する評価は本プロトコールに従って行われる。なお、骨髓穿刺の結果、骨髓正形成と判断された場合には、この中止基準に該当しないものとし、

患者の末梢血血液所見の改善を待って治療を継続する。

taxane 類抗癌剤の投与による治療の継続が不可能と判断される著しい副作用を認めた場合、taxane 類抗癌剤による治療は中止する。この場合、anthracycline 系抗癌剤 (adriamycin, epirubicin) が有効と考えられる場合には、これらの抗癌剤による治療を考慮する。この場合の抗癌剤の投与計画は、本プロトコールに準ずる。

通常投与量の 100%量の taxane 類抗癌剤を 2 コース施行しても癌が増悪した場合 (PD, progressive disease) には、無効と考えられるので、taxane 類抗癌剤による継続治療は中止する。この場合は患者の癌を治療することを第一に考えて治療を行う。患者の癌に対して anthracycline 系抗癌剤 (adriamycin, epirubicin) が有効と考えられるに場合は、これらの抗癌剤による治療を考慮する。この場合の抗癌剤の投与計画は、本プロトコールに準ずる。

taxane 類抗癌剤以外の抗癌剤治療も受けるこれらの患者に対しても、MDR1 遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞は既に移植されており、抗癌剤の投与が行われているので、その後の患者の経過観察、MDR1 遺伝子導入および RCR の出現などに対する評価は本プロトコールに従って行われる。

患者および患者の家族、後見人等、インフォームドコンセントに対して責任を持つ同意者がその同意を撤回した場合は、その患者は本臨床研究から除外し、再発進行乳癌の標準的な治療計画に準じた治療を継続する。この場合に、同意の撤回が患者本人の治療に不利益をもたらさないように十分な配慮を行う。患者末梢血中の RCR の検査は継続して行う。

(14) 症例記録に関する記録用紙の様式

症例記録の様式は、参考資料 I の通りとした。

(15) 途中経過の報告

総括責任者は、本臨床研究の開始後、3 カ月ごとに、附属病院長および癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会委員長あてに経過報告書を提出する。また、患者が死亡した場合、本臨床研究による重大な副作用を認めた場合、あるいは患者末梢血中に RCR の出現を認めた場合には、速やかに附属病院長および癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会委員長あてに報告書を提出する。その他は国の指針の定めるところに従う。

(16) 記録の保存及び成績の公表の方法

記録の保存は総括責任者が行う。この記録は財団法人癌研究会附属病院において保存されるものとする。ただし、全ての対象患者の死亡が確認されて 5 年を経過した後は廃棄を考慮する。

総括責任者は、遺伝子治療臨床研究の進行状況および結果について実施施設の長たる財団法人癌研究会附属病院長に随時報告をし、附属病院長は必要に応じて厚生大臣に報告を行う。また、被験者が死亡した場合や重篤な副作用が発生したときなどは、附属病院長は速やかに厚生大臣に報告を行う。また、これらの情報は、患者のプライバシーを侵害しない範囲で公表するように努める。また学術結果は、患者のプライバシーを侵害しない範囲で総括責任者および共同研究者が積極的に関連学会等に発表して遺伝子治療研究の発展に寄与するように努める。

14 当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況

当施設では 1987 年 4 月より自己骨髄移植併用大量化学療法 of 臨床研究を開始しており、また漸時自己末梢血造血細胞移植へと至り、治療環境の設備に務め現在は特殊治療ユニットとしてその体制は確立されている。

末梢血幹細胞採取は、病院クリーンルーム隣室の COBE Spectra 2991 持続血球分離装置にて施行される。CD34 抗原陽性細胞の分離等その後の処理については、癌化学療法センター別館 2

階のクリーンルーム内で行う。別館クリーンルームはクリーンベンチ2台、インキュベーター4台をはじめ遺伝子治療の無菌操作に必要な機器類、設備を擁しており、また、クラス1,000 (NASA ユニット) の清浄度を保持している (別館2階クリーンルームについては参考資料 H 参照)。この別館2階クリーンルームは本研究のために作られたものであり、他の用途には使用されることがない。

自家骨髄採取は当施設附属病院手術室において麻酔科医師の管理下に施行される。採取された骨髄細胞を手術室内にて骨髄分離フィルターで処理した後、上記 Spectra 2991 にて骨髄単核細胞の濃縮が行われる。濃縮後の細胞は調製バッグに無菌的に回収され、凍結保存される。

治療用クリーンルームは病院南6階に2室あり、室内は層流清浄気流にてクリーン化された隔離病室である。食事は加熱滅菌食が供され、必要に応じ各種日用雑貨も中央医療材料室にてオートクレーブ滅菌、ガス滅菌等の処理の後、供給される。

以上主たる実施設備・装備について不足はなく、本研究を完遂し得る状況にあると考えられる。

15 当該遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の研究状況

米国においては、1995年に、国立癌研究所 (NCI)、コロンビア大、テキサス大MDアンダーソン癌センターの3施設において、MDR1 レトロウイルスを癌患者の CD34 抗原陽性細胞に導入する遺伝子治療の臨床研究が開始された。それぞれのプロトコールで、使用する MDR1 cDNA、レトロウイルス、レトロウイルス産生細胞、対象とする癌の種類などが異なっている。

(1) 米国国立癌研究所 (NCI) の臨床研究 (O'Shaughnessy et al, 1994)

- ・使用する MDR1cDNA 野生型 (Gly-185)
- ・レトロウイルス G1MD (MoMLV 由来)
- ・レトロウイルス産生細胞 PA317
- ・対象とする癌の種類 乳癌

(2) コロンビア大の臨床研究 (Hesdorfer et al, 1994)

- ・使用する MDR1cDNA colchicine 耐性変異型 (Val-185)
- ・レトロウイルス HaMDR1/A (HaMSV 由来)
- ・レトロウイルス産生細胞 GP+envAM12
- ・対象とする癌の種類 進行癌

(3) テキサス大MDアンダーソン癌センターの臨床研究 (Deisseroth et al, 1994, 1996)

- ・使用する MDR1cDNA colchicine 耐性変異型 (Val-185)
- ・レトロウイルス pVMDR1 (MoMLV 由来)
- ・レトロウイルス産生細胞 PA317
- ・対象とする癌の種類 卵巣癌、乳癌

NCI およびコロンビア大の臨床研究については、その経過および結果が詳細に報告されている (Cowan et al, 1999, Moscow et al, 1999, Hesdorffer et al, 1998)。

米国 NCI の第1の臨床研究では、4人の患者が遺伝子導入された細胞の移植を受けた。PCR法で推定した体外での遺伝子導入の頻度は0.1%から0.5%までの範囲であった。このうち3人の患者では、MDR1 遺伝子導入された細胞の生着が見られた。末梢の有核細胞中の MDR1 遺伝子導入顆粒球の割合は最大9%から検出限界である0.01%までであった。これらの患者で、末梢血中の有核細胞の9%が MDR1 遺伝子導入細胞となっても、何ら有害反応はみられなかった。MDR1 遺伝子導入細胞の異常増殖も観察されなかった。MDR1 遺伝子導入細胞の生着は低率であったが、外来性 MDR1 遺伝子をもつ顆粒球の相対数と、タキソール治療での顆粒球数の減少の最低値との間に相関が見られた。即ち、外来性 MDR1 遺伝子をもつ顆粒球が検出されなかった計9回のタキソール投与では、顆粒球数の減少の最低値の平均は354個/ μ lであった。これに対して、外来性 MDR1 遺伝子をもつ顆粒球が0.01%以上検出された計6回のタキソール投与

では、顆粒球数の減少の最低値の平均は 1243 個/ μ l であった。このレベルは、タキソール投与後の骨髄抑制による感染症を防ぎうるレベルと考えられる。また、外来性 MDR1 遺伝子をもつ顆粒球が 0.01%以下ではあるが検出された計 7 回のタキソール投与では、顆粒球数の低下の最低値の平均は 552 個/ μ l であった。外来性 MDR1 遺伝子をもつ顆粒球が 0.01%以上検出されたのは 6 回のうち 4 回が患者 3 のタキソール治療 1 回目から 4 回目のものであり、この患者では 4 回とも末梢の有核細胞中の MDR1 遺伝子導入顆粒球の割合は 1%より高く、最大 9%であった。よって、末梢の有核細胞中の MDR1 遺伝子導入顆粒球の割合が高いほどタキソール治療による顆粒球数低下が防げる可能性が示唆される。この結果は preliminary なものであるが、MDR1 遺伝子治療の有効性を予測するデータと考える。(Cowan et al, 1999)。

NCI の第 2 の臨床研究では、第 1 の臨床研究の結果をふまえてプロトコールの変更がされている。この第 2 の臨床研究では、レトロウイルス導入のために体外環境下で培養された細胞のみを移植しても造血機能が再構成されることが示された。遺伝子導入した細胞を患者に戻す時に未処理の細胞を加えなかったのはこれが初めてであるが、移植後の顆粒球数、血小板数などが回復するのに要した時間は遺伝子治療を行わなかった時に比べてあまり変わらなかった。この研究では、MDR1 遺伝子と比較するコントロールとしてネオマイシン耐性遺伝子 (NeoR 遺伝子) を用いたところ、MDR1 遺伝子の発現が血液細胞の生着に役立つかもしれないことが示唆された。患者に移植された外来性 NeoR 遺伝子陽性細胞の数の方が外来性 MDR1 遺伝子陽性細胞の数より 100 倍も多かったにもかかわらず、移植後は外来性 MDR1 遺伝子陽性細胞の方が高頻度に検出された。このことは、MDR1 遺伝子の発現が造血細胞の再構築に有利な効果をもたらしているか、あるいは NeoR 遺伝子の発現が不利な効果をもたらしたことを示唆する。また、遺伝子導入細胞の異常増殖は、本研究でもみられなかった。遺伝子導入細胞を患者に戻した後、患者にタキソール 4 コース、引き続いてアドリアマイシン 4 コースの治療を行ったところ、6 人の患者のうち 3 人で、抗癌剤治療後に外来性 MDR1 遺伝子陽性細胞が検出されるようになり、そのうち 2 人の患者では、その後治療終了まで外来性 MDR1 遺伝子陽性細胞が検出された。即ち、患者への抗癌剤投与により MDR1 遺伝子を導入された細胞が生体内で選択的に増幅されることが示唆された。

米国コロンビア大学において、HaMDR と同じレトロウイルス骨格に 185 位のグリシンがバリンに変異した MDR1 cDNA を組み込んだ HaMDR1/A レトロウイルスを用いた臨床研究が行われた (Hesdorfer et al, 1999)。その結果、HaMDR1/A レトロウイルスベクターによる MDR1 遺伝子導入細胞の移植後、2 名の患者でそれぞれ移植 10 週後と 3 週後に MDR1 遺伝子導入細胞が検出されたが、MDR1 遺伝子導入細胞の異常増殖その他の MDR1 遺伝子導入に起因するとみられる副作用は観察されなかった。遺伝子導入細胞を移植した後に患者に増殖性レトロウイルス (RCR) は検出されず、その他の有害反応も起きなかった。

これまでに M.D.Anderson 癌センターで 20 症例、NCI で 10 症例、コロンビア大で 5 症例に対し、MDR1 遺伝子導入細胞の移植が行われた。このうち、NCI の 10 症例全て、およびコロンビア大の 2 症例で、患者末梢血に MDR1 遺伝子導入細胞が確認された。これらの症例で MDR1 遺伝子導入細胞の異常増殖など、MDR1 遺伝子導入に起因すると考えられる副作用は起きなかった。これらの結果は、末梢白血球に MDR1 遺伝子を発現させることによる重大な副作用はおきないということを示している。

しかしながら、これまでの臨床研究はパイロット的なものであり、遺伝子導入法などにも問題が多かった。今後もより効率的な遺伝子導入のための基礎研究およびその実践としての臨床研究を続けていく必要がある。MDR1 遺伝子治療はこれからよりよいベクター、よりよい遺伝子導入法、よりよい化学療法プロトコールなどを模索する Medical Practice の段階に入っていくと考えられる。したがって我が国でも、基礎研究の結果をすぐに臨床研究に結びつけられるような体制の整備が重要と考える。