

図 20 HSV-TK/GCV 自殺システム

一方、HSV-TK を発現しない細胞では、GCV 又は ACV は未変化のままであり、毒性を示さない。したがって、HSV-TK は、GCV との組み合わせにより選択的自殺作用（HSV-TK/GCV 自殺システム）を示す分子であり、発現そのものの毒性はないと考えられる。

また、GCV 等のプロドラッグ非存在下、HSV-TK が触媒する反応は通常の細胞内で行われている代謝反応であり、遺伝子過剰発現による体細胞への影響は小さいものと思われる。ただし、HSV-TK がヒトにとって異種たん白質であることから、HSV-TK 遺伝子発現細胞の投与を受けた患者において免疫原となり、患者体内で HSV-TK 発現細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) が誘導されることが過去の遺伝子治療臨床研究で示唆されている (57)。実際、同遺伝子治療を行ったイタリアの症例においても、遺伝子治療を受けた患者において CTL の誘導が報告されている (82)。このことは CTL による患者体内からの HSV-TK 遺伝子発現ドナー T 細胞の排除を意味しており、GVM 効果の長期継続に対する障害となっている。過去の症例から遺伝子導入リンパ球の投与回数と CTL の出現頻度はある程度相関していることから、投与回数を減らすことで CTL の誘導を抑えられることができる可能性がある。また、イタリアの症例で観察された CTL は全て HSV-TK 発現細胞に対するものであり、この CTL が患者自身の細胞に影響を及ぼすことはないと思われるが、遺伝子治療後はこれら CTL の動態について注意深く観察する必要がある。

VII. 2.2 HSV-TK/GCV 自殺システムの臨床実績

HSV-TK/GCV 自殺システムに関しては、イタリアで 2 件、フランスで 1 件、アメリカで 1

件の臨床実績がある(42, 51, 82-87)。これらでは、遺伝子導入に用いられたレトロウイルスベクターや遺伝子導入細胞の調製法が一部異なるものの、GCV 製剤との組み合わせによる自殺機能は、いずれの臨床研究でも確認されている。

すなわち、計 52 例の HSV-TK 遺伝子導入細胞投与例のうち、急性 GVHD 発症に対して GCV 製剤が投与された症例が 8 例、慢性 GVHD 発症に対して GCV 製剤が投与された症例が 3 例、CMV 感染症で GCV 製剤が投与された症例が 8 例あるが、これら 19 例の症例では、GCV 製剤の投与により、慢性 GVHD で効果が部分的であった症例 1 例（イタリアの臨床研究）(51, 83) と、急性 GVHD を発症したものの最初から遺伝子導入細胞の血中レベルが低かった 1 例（フランスの臨床研究）(87)を除き、残りの 17 例において、HSV-TK 遺伝子導入細胞数が検出限界以下に又は顕著に減少しており、自殺機能がヒトにおいて発揮されることが確認されている。いずれにおいても、本自殺システムに関連する有害事象は報告されていない。

Ⅶ. 2. 3 ΔLNGFR 遺伝子の異常発現

LNGFRはNGFに対する膜貫通型の受容体である。LNGFRは主として神経系細胞で発現しているが、これ以外では筋肉、精巣で発現しており、殆どの造血系細胞には発現していない(45)。ΔLNGFRは細胞内領域を欠損させており、細胞外領域及び細胞膜貫通領域を有するたん白質であるため、内因性のNGFや抗体を含む外来性リガンドに反応して細胞内シグナル伝達を発揮することはなく、発現細胞に対して標識以外の影響を与える可能性は低い。実際、Bonini らの報告(51)により、今回の臨床研究で用いるレトロウイルスベクター-SFCMM-3と同じΔLNGFR遺伝子を別のレトロウイルスベクター-SFCMM-2により活性化ヒトTリンパ球に導入し、NGF濃度依存的な、i)細胞増殖、ii) CD25発現、及びiii) 腫瘍壊死因子 (TNF) - α 産生による細胞傷害活性を経時的に調査した結果、遺伝子導入ヒトリンパ球は、遺伝子非導入ヒトリンパ球と同様に、NGFに対する反応を示さないことが確認されている。また、SFCMM-3及び類似のベクターであるSFCMM-2を用いた遺伝子治療例においても細胞傷害性は報告されていない。ΔLNGFRマーカー遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入したマウス骨髄細胞を別のマウスに移植し、更に、再移植を繰り返して長期観察した結果、レトロウイルスベクターがEvi1遺伝子内に挿入されたことによるプロトオンコジーン*13活性化が原因と考えられる白血病が高率に発症したとの報告(88)があるが、実際のメカニズムの詳細は明らかとされていない。

Ⅶ. 3 細胞の安全性

Ⅶ. 3. 1 遺伝子導入細胞の調製方法

以下に示す遺伝子導入細胞の調製にかかわる全ての操作は国立がんセンター中央病院内に設置された P2 レベルの無菌細胞調整施設内にて、タカラバイオ(株)からの技術提供と助言を受け行われる。

本臨床研究に用いるレトロウイルスベクターSFCMM-3はイタリア・モルメド社により製造され、総括責任者が輸入して受入れ試験（参考資料 5 参照）を行い、国立がんセンター中央病院 11 階の施設可能な製剤保管室に設置した超低温フリーザー（-80℃）に保管する。レトロウイルスベクターSFCMM-3 を用いた Add-back 用遺伝子導入 T リンパ球調製工程の概略を以下に、調製フローを参考資料 6 に示す。なお、本細胞調製工程は、第 10 日目の遺伝子導入細胞の濃縮・洗浄・懸濁液を RPMI 1640 に変更している点のみが参考資料 6 に記載の調製フローと異なる。

第 0 日：Add-back 3 回分に必要な遺伝子導入細胞数(2.1×10^7 個/kg)及び患者の体重から、培養ユニット数を決定し、培養ユニットに応じた以下の個数を満たすドナーリンパ球を採取し、遺伝子導入細胞の調製に使用する。

培養ユニット数	1	2	3	4
培養に必要な生細胞数(個)	1.5×10^9 以下	1.5×10^9 超 3.0×10^9 以下	3.0×10^9 超 4.5×10^9 以下	4.5×10^9 超 6.0×10^9 以下

セルプロセッサを用いてドナーリンパ球の濃縮と PBS/11.8% ACD-A 液による洗浄を行ったあと、生細胞数及び細胞生存率を測定する。抗 CD3 抗体(30 ng/mL)を添加した培養用培地（基本培地 GT-T503。620~720 IU/mL rhIL-2、1~3% 非働化ドナー血漿、0.2% ヒト血清アルブミン及び 2.5 μ g/ml アムホテリシン B 含有。）にドナーリンパ球を $1(\pm 0.1) \times 10^6$ 個/mL となるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグを使用し、37℃、5% CO₂ インキュベーター内にて培養を開始する。基本培地 GT-T503 の組成を参考資料 7 に示す。

第 2 日：第 0 日から培養した活性化 T リンパ球の生細胞数及び細胞生存率を測定し、セルプロセッサを用いて細胞を濃縮し回収する。細胞濃縮液の濃度を 1×10^7 個/mL に調整した後、等量のレトロウイルスベクターSFCMM-3（感染タイター：0.72~ 2.16×10^6 Infectious units; IFU/mL）と混合し、硫酸プロタミンを添加する（4 μ g/mL）。これを遠心感染用バッグに移して 1000×g、32±3℃で 2 時間遠心し、遺伝子導入を行う。次に、細胞を回収し、セルプロセッサで濃縮と PBS による洗浄を行った後、新鮮な培養用培地に懸濁し、培養する。

第 3 日：第 2 日と同様の遺伝子導入操作を行う。

第 6 日：遺伝子導入率の測定を行う。遺伝子導入率は、マウス抗 LNGFR 抗体を用いたフローサイトメトリーにより測定した細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体（ Δ LNGFR）陽性細胞の割合とする。セルプロセッサを用いて細胞の濃縮と SB [PBS+0.04 mL/mL プミネート（アルブミン最終濃度 1.0%）+0.01mL/mL 輸血用チトラミン「フソー」（クエン酸 Na 最終濃度 0.1%）] による洗浄を行った後、ヒト IgG でブロッキング（最大使用量を 15 mL として、 4×10^8 個の細胞あたり 1 mL のガンマガードを使用）してから抗 LNGFR 抗体を添加（最大使用量を 2.5 mg として、

5×10⁶個の細胞あたり 1 μg の抗体) し、反応させる。細胞を SB で洗浄した後、MgSO₄ 液 (0.3 mL のマグネズール)、組換えヒト DNase (5 mL の Pulmozyme) 及びマウス IgG に対する二次抗体結合磁気ビーズ (最大使用量を 20 mL として、1×10⁶個の細胞あたり 12.5 μL の磁気ビーズ) を加えて反応させ、磁気細胞分離装置を用いて磁気ビーズに結合した ΔLNGFR 陽性細胞を選択する。得られた細胞はセルプロセッサにより培養用培地に懸濁し、培養する。

第 7 日 : 磁気細胞分離装置により細胞培養液中の磁気ビーズと遺伝子導入細胞を含む懸濁液を分離する。分離した遺伝子導入細胞は培養用培地に 0.5(±0.05)×10⁶ 個/mL となるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグにて 37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて培養する。磁気ビーズ画分も培養用培地に懸濁し、ガス透過性培養用バッグにて 37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて培養する。

第 8 日 : 第 7 日に培養を開始した磁気ビーズ画分から、第 7 日と同様の操作により磁気ビーズを除去する。

第 10 日 : セルプロセッサを用いて細胞の洗浄と濃縮を RPMI 1640 で行い、0.5×10⁷ 細胞/mL から 10×10⁷ 細胞/mL となるように RPMI 1640 に懸濁する。その後、ヒト血清アルブミン (ブミネート) 含細胞凍害保護液 (CP-1) と 1:1 の割合で混合する。ヒト血清アルブミン含 CP-1 と混合した遺伝子導入 T リンパ球は、投与に必要な細胞数に相当する液量を凍結保存専用バッグに充填したのちに温度管理されたディープフリーザー (-80°C) にて凍結し使用時まで保存する。

RPMI 1640 及び CP-1 の組成を参考資料 8 及び 9 に示す。

投与日 : 冷凍保存された遺伝子導入 T リンパ球を投与直前に 37°C 温浴にて急速に解凍し、投与する。

VII. 3.2 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、微生物の汚染を防ぐために、全ての操作は国立がんセンター中央病院内に設置した P2 レベルの無菌細胞調整施設内にて、タカラバイオ(株)からの技術提供と助言を受け行われる。細胞の取扱いはクラス II の安全キャビネット内で行われ、感染性微生物の混入を防ぐとともにレトロウイルスベクター-SFCMM-3 の環境中への拡散を防止する。

VII. 3.3 細胞の遺伝子型、表現型の安全性

遺伝子導入細胞の分離にあたっては、抗 LNGFR 抗体及び磁気ビーズを用いて遺伝子導入細胞を選択する。この選択により ΔLNGFR 陽性率が 90%以上の T リンパ球が得られることが知られている。また、過去の症例においても、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 により遺伝子導入した T リンパ球は非導入細胞と同様に、T リンパ球としての機能を保持しており、このことから遺伝子導入による末梢血 T 細胞の表現型の大きな変化はないものと考えられる。

なお本研究では、投与細胞の性質を同定するため、培養各段階において各種細胞表面マーカーに対する抗体を用いて投与細胞の特徴を解析する予定である。

Ⅶ. 3. 4 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により遺伝子導入したドナー由来の末梢血 T 細胞である。現在、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ドナーリンパ球輸注は広く行われており、ドナーT 細胞の投与は、GVHD 以外に患者に重大な影響を及ぼすことはない。

遺伝子導入細胞は、冷凍保存前の細胞を試験検体として採取し、参考資料 10 に示す試験によって品質が担保される。品質試験は国立がんセンター中央病院、または外部委託機関にて実施する。細胞生存率（トリパンプルー）と Δ LNGFR 発現試験については遺伝子導入細胞調製当日に、国立がんセンター中央病院において実施する。その他の試験については、採取した試験検体を凍結して外部委託機関に送付し、試験を実施する。

1. 細胞生存率（トリパンプルー）
2. エンドトキシン試験（日本薬局方）
3. Δ LNGFR 発現試験
4. RCR 試験（RT-PCR 法）
5. マイコプラズマ否定試験（PCR 法）
6. 無菌試験（日本薬局方）
7. RCR 試験（増幅法）
8. マイコプラズマ否定試験（日本薬局方、培養法）
9. GCV 感受性試験
10. IL-2 依存的増殖試験

なお、品質試験項目のうち、細胞生存率（トリパンプルー）、エンドトキシン試験（日本薬局方）、 Δ LNGFR 発現試験、RCR 試験（RT-PCR 法）及びマイコプラズマ否定試験（PCR 法）についていずれも適合の場合に、遺伝子導入細胞について仮合格として被験者に適切な時期に Add-back される。試験結果を得るまでに日数を要する試験項目である無菌試験（日本薬局方）、RCR 試験（増幅法）、マイコプラズマ否定試験（日本薬局方、培養法及び指標細胞を用いた DNA 染色法）、GCV 感受性試験及び IL-2 依存的増殖試験については、Add-back をする時点では結果が得られていない場合も考えられるが、万一不合格となった項目があれば、その時点で臨床研究を中止して適切な措置を講ずることとする。

遺伝子導入した細胞は閉鎖系で凍結保存専用バッグに充填・密封し、ディープフリーザー（ -80°C ）にて凍結保存するため、保存の間に外部からの細菌やエンドトキシン等の混入はなく安全が担保される。また、唯一冷凍保存による劣化の可能性がある細胞生存率につ

いて、細胞調製 10 日目に専用バッグに充填する際に品質試験用としてバイアルに充填する最終産物を、投与の前日以前に 37℃温浴にて急速に解凍し細胞生存率の確認（70%以上の生存率）を行い、Add-back が行われる。

Ⅶ. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由

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) 本臨床研究で使用されるレトロウイルスベクター-SFCMM-3 はイタリアのモルメド社により GMP に従って製造され、本邦では筑波大学附属病院における臨床研究に使用実績がある。またモルメド社は、これを用いて調製した HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球に対して、造血幹細胞移植における付加的治療として、2003 年に欧州におけるオーファン医薬品の指定を受けており、現在、同ベクターを用いて本臨床研究と同様の治験を欧州 4 施設において実施している。2005 年 12 月に開催された米国血液学会における発表では、登録患者 29 例のうち 17 例に遺伝子導入 T リンパ球が Add-back され、その 14 例 (82%) に免疫系再構築を確認している。また 14 例中 6 例 (43%) に Add-back 後の急性 GVHD が発症したが、うち 5 例に GCV 製剤が投与されいずれも GVHD 症状が完全に沈静化している。免疫系再構築に至った 14 例では、その後の感染症頻度及び治療関連死が減少しており、途中経過ではあるが 800 日時点での全般生存率は 46% に上り、EBMT が集計したハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植のみの場合に比し、有意に改善を示している。このことから、ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 “Add-back” 療法は、非常に有望であり、T 細胞除去ミスマッチ移植を安全かつ有効に行える可能性が示唆されている。
- (2) 国立がんセンター中央病院は我が国の悪性腫瘍治療の基幹病院である。本臨床研究対象疾患の診療では、国立がんセンター中央病院が設立されて以来の豊富な経験を有し、経験豊富なスタッフを擁している。また、本臨床研究対象疾患に合致する患者が多く受診している。
- (3) 本研究総括責任者である平家勇司は、国立がんセンター研究所並びに中央病院において、細胞療法並びに遺伝子治療の開発研究を行ってきた。また、1997～1998 年にかけて、米国アラバマ大学遺伝子治療センターにおいて、アデノウイルスベクター開発に携わると共に遺伝子治療臨床研究の研修を行った。前勤務地である国立病院四国がんセンター（現独立行政法人国立病院機構四国がんセンター）では、治験を含む複数の臨床研究に携わった。現在、国立がんセンター中央病院・薬物療法部・幹細胞移植療法室において細胞療法並びに遺伝子治療の開発研究を行うと共に、固形腫瘍に対する骨髄非破壊的前処置による同種造血幹細胞移植療法の臨床開発に従事している。分担研究者である、吉田輝彦並びに青木一教は、国立がんセンター研究所において、ベクター開発を含む遺伝子治療開発研究を行っている。高上洋一、飛内賢正、森慎一郎、

金 成元、福田隆浩、田野崎隆二は、造血幹細胞移植の専門家であり、数多くの治験並びに医師主導の臨床試験の実績がある。

IX. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

IX.1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

IX.1.1 本臨床研究の実施に際し国立がんセンター中央病院内に設置される委員会・事務局

本遺伝子治療臨床研究実施計画が了承された後に、遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会及び遺伝子治療臨床研究実施事務局を国立がんセンター中央病院内に設置する。それぞれの委員会・事務局の運営に関しては、別途作成する業務手順書に従うものとする。

IX.1.1.1 遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会

遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会は、被験者選定の適格性確認の妥当性の判定、臨床研究の安全性の客観的な判定、臨床効果の客観的な判定、プロトコールの変更の妥当性確認、5例終了時点での臨床研究の目的が評価できたかについての判定等を行う。本委員会は国立がんセンター内外の専門家から構成される。本遺伝子治療臨床研究に関与する研究者は原則として本委員会への参加、審議への参加は行わない。但し、本委員会が特に必要と認めた場合には、総括責任者他の研究者の参加を要請することができるが、判定などの審議の際は退室する。また、必要に応じ、委員以外の専門家を招聘し、その意見を聴取し判定などの審議の参考とすることができる。本委員会で審議を行った場合には、その審議内容を記した議事録とともに審議結果を総括責任者に通知する。

委員：金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学 自治医科大学医学部内科学講座血液学部門、 輸血・細胞移植部、 及び分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 国立がんセンター中央病院総合病棟 14A	教授 中尾眞二 教授 小澤敬也 医長 國頭英夫
--	---------------------------------------

IX.1.1.2 遺伝子治療臨床研究実施事務局

遺伝子治療臨床研究実施事務局は、遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会との連絡等事務局業務、症例登録業務等の本遺伝子治療臨床研究を適切に実施するための支援業務を行う。

IX. 1.2 本臨床研究の実施手順

本臨床研究の実施手順は、個々の症例の該当する時期により、大きく以下の 4 期に分類される。全体の計画を図 21 に示す。

1. 被験者・ドナー選定、登録～遺伝子導入 T リンパ球調製・移植細胞の分離・移植前処置

総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）は、本遺伝子治療臨床研究への適応が予測される被験者及びそのドナーに対し、文書によるインフォームドコンセントを行い、文書による同意が得られた場合、適格性確認に必要な検査を開始する。適格性が確認できた被験者及びそのドナーについて、遺伝子治療臨床研究実施事務局に本臨床研究への仮登録及び登録をそれぞれ依頼する。遺伝子治療臨床研究実施事務局は、被験者及びドナーの適格性を確認したうえで、総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）に仮登録及び登録となった旨通知する。

総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）は、被験者及びドナーが仮登録及び登録となったことを確認した後、ドナーより、血漿、末梢血単核球（PBMC）画分及び末梢血幹細胞（PBSC）の採取を行い、一連の細胞調製を行う。遺伝子導入 T リンパ球は、品質を確認した後に Add-back に用いる。PBSC については、専用の細胞分離装置を用いて CD34 陽性細胞の分離を行い、この分離細胞を移植細胞とする。なお CD34 陽性細胞の分離に際しては、分離前後の T リンパ球数（CD3 陽性細胞数）を測定し、T リンパ球除去率を算出する。

総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）は、遺伝子導入 T リンパ球の調製及び移植細胞の採取後、被験者の適格性を確認し、遺伝子治療臨床研究実施事務局に本臨床研究への本登録を依頼する。遺伝子治療臨床研究実施事務局は、仮登録時と同様に被験者の適格性を確認したうえで、総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）に本登録となった旨通知する。

総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）は、被験者が本登録となったことを確認した後、Fludarabine 製剤、Thiotepa 製剤、Thymoglobulin 製剤、及び放射線全身照射（total body irradiation; TBI）を用いた骨髄破壊的前処置を移植前処置として施行し、移植前処置の安全性及び原疾患の状態を確認する。

2. 造血幹細胞移植

移植前処置後、CD34 陽性細胞の分離細胞 4.0×10^6 個/kg 以上を移植細胞として造血幹細胞移植を行う。

3. 造血幹細胞移植後～遺伝子導入 T リンパ球 Add-back

IX. 3 「臨床研究実施スケジュール」の項の記載に従い、移植直後の転帰の確認

及び自発的な免疫系再構築の開始の確認を目的に造血幹細胞移植 30 日後から 40 日後の間に被験者の検査・観察を行う。遺伝子導入 T リンパ球 Add-back は以下に従い、免疫再構築の確認が得られるまで最大 3 回、それぞれ定められた日から 7 日以内に行うものとする。

初回の遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 以降、GVHD が発症した場合には IX. 6. 2. 6 「GVHD 発症時の対応」の項の記載に従い、治療を行う。GCV 製剤を投与した場合には GCV 製剤投与による GVHD の沈静化能に関する検査・観察を行う。

初回の遺伝子導入 T リンパ球以前に治療を要する GVHD が発症した場合には、本遺伝子治療臨床研究を中止し、適切な治療を施す。治療の内容については本実施計画では規定しない。

初回の Add-back

ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植を受けた後、自発的な免疫系再構築の開始（移植後 30 日から 40 日の免疫表現型評価で循環血液中 CD3 陽性細胞 >100 個/ μ l となった場合）が確認されない場合、かつ GVHD を発症しないあるいは Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合には造血幹細胞移植日を 0 日として 42 日目に 1×10^6 個/kg の細胞数の遺伝子導入 T リンパ球を Add-back する。

2 回目の Add-back

初回の Add-back 以降、免疫系再構築（初回の Add-back 後 14 日、21 日、28 日の免疫表現型評価で連続して循環血液中 CD3 陽性細胞が >100 個/ μ l となった場合）が確認されない場合、かつ GVHD を発症しないあるいは Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合には初回の Add-back から 30 日後（造血幹細胞移植日を 0 日として 72 日目）に 1×10^7 個/kg の細胞数の遺伝子導入 T リンパ球を Add-back する。

3 回目の Add-back

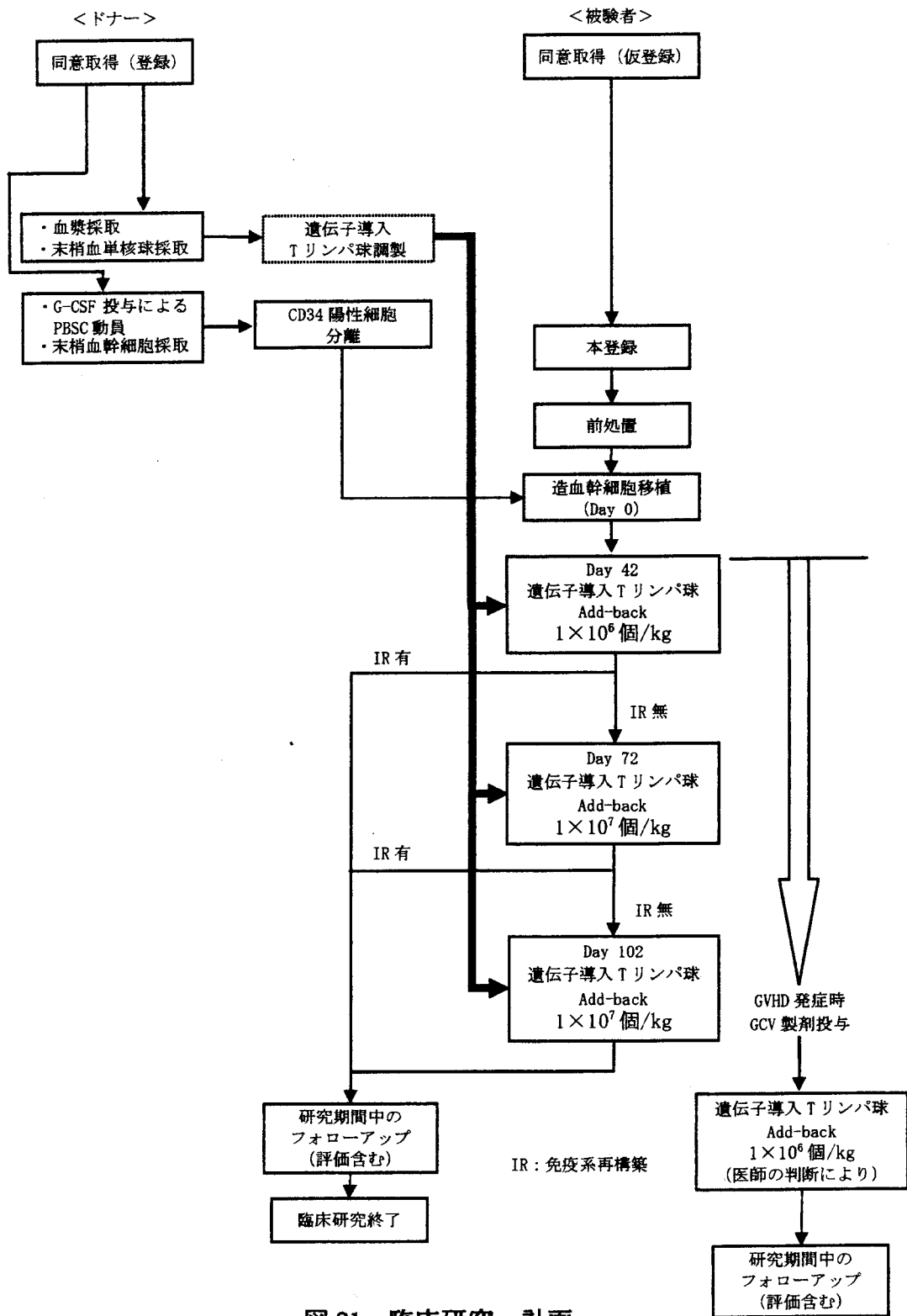
2 回目の Add-back 以降、免疫系再構築（2 回目の Add-back 後 14 日、21 日、28 日の免疫表現型評価で連続して循環血液中 CD3 陽性細胞が >100 個/ μ l となった場合）が確認されない場合、かつ GVHD を発症しないあるいは Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合には 2 回目の Add-back から 30 日後（造血幹細胞移植日を 0 日として 102 日目）に 1×10^7 個/kg の細胞数の遺伝子導入 T リンパ球を Add-back する。

4. 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 後のフォローアップ

XI.3「臨床研究実施スケジュール」の項の記載に従い、安全性の判定に関する検査・観察、免疫系再構築の判定に関する検査・観察、GCV 製剤投与による GVHD 沈静化能の判定に関する検査・観察等を行う。

遺伝子導入 T リンパ球の Add-back に伴い、重篤な GVHD が発症した場合には IX.6.2.6「GVHD 発症時の対応」の項の記載に従って、GCV 製剤を投与する。その場合、GCV 製剤投与による GVHD の沈静化能に関する検査・観察を行う。

本研究終了後も、被験者の生存期間中にわたり、追跡調査を行う。



IX. 2 ドナー・被験者の選択基準及び除外基準

IX. 2. 1 ドナーの選択基準及び除外基準

IX. 2. 1. 1 選択基準

以下の基準を満たす健常人を対象とする。

なお、ドナーの選択基準・除外基準は、同種末梢血幹移植のための健常人ドナーからの、末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン（日本造血細胞移植学会・日本輸血学会、2003年4月21日：改訂第3版）をもとに設定した。また、各臓器機能及び造血機能の具体的な基準に関しては、日本骨髄バンク コーディネートマニュアル「ドナー適格性判定基準」（2005年1月1日：第4版）を参考に設定した。

- (1) 被験者の4親等以内の血縁者である者。4親等以内には、父母、兄弟姉妹、祖父母、孫、叔父叔母、甥姪、従兄弟などが含まれる。
- (2) 患者とのHLAが2抗原あるいは3抗原（血清型）不一致のドナーである者。なお、不一致の対象となるHLA抗原はHLA-A、B、DRとする。
- (3) 登録時の年齢が20歳以上65歳以下である者。
- (4) ECOG Performance Status (XI. 4「Performance StatusのGradeと判定基準」) が0である者。
- (5) ドナーとしてじゅうぶんな心・肺・腎・肝機能を有する者。
 - 1) 心電図上虚血性変化や治療を要する不整脈を認めない者。
 - 2) 血清クレアチニン値が1.5 mg/dL未満及び血清総ビリルビン値が2.0 mg/dL以下の者。
 - 3) 胸部X線写真で異常がなく、酸素非投与時の酸素飽和度が93%以上の者。
 - 4) ASTが56 IU/L未満の者。
 - 5) ALTが66 IU/L未満の者。
- (6) ドナーとしてじゅうぶんな造血能を有する者。
 - 1) 白血球数が3,000/ μ L以上の者。
 - 2) 血小板が130,000/ μ L以上の者。
 - 3) ヘモグロビン濃度が13.0 g/dL以上の男性、又は11.0 g/dL以上（鉄剤服用後でも可）の女性。
- (7) 本臨床研究協力に対する自由意思による同意が本人から文書により得られている者。

IX. 2. 1. 2 除外基準

以下のいずれかに該当するドナーは除外する。

- (1) 自己免疫疾患（膠原病を含む）の現有及び既往のある者。
- (2) 静脈血栓、動脈硬化性疾患の現有及び既往のある者。

- (3) うっ血性心不全、虚血性心疾患、脳血管病変の現有及び既往のある者。
- (4) 間質性肺炎の現有及び既往のある者。
- (5) 悪性腫瘍の現有及び既往のある者。
- (6) 薬物治療を必要とする高血圧、糖尿病を現有する者。
- (7) 脾腫を認める者。
- (8) 臨床研究参加に対する同意に影響を及ぼす精神的疾患、薬物依存がある者。
- (9) 重篤な薬剤アレルギーの既往がある者。
- (10) G-CSF 製剤に対するアレルギーがある者。
- (11) 妊婦あるいは妊娠している可能性がある者及び授乳中である者。
- (12) HBs 抗原、HIV 抗体のいずれかが陽性の者。
- (13) 他の臨床試験・臨床研究に参加している者。
- (14) その他、総括責任者（又は、治療に当たる分担研究者）が不適当と認めた者。

IX. 2. 2 被験者の選択基準及び除外基準

IX. 2. 2. 1 仮登録時の選択基準及び除外基準

IX. 2. 2. 1. 1 仮登録時選択基準

造血器悪性腫瘍患者の診断および分類は新 WHO 分類に従うものとし、本遺伝子治療臨床研究による治療効果が、現在可能な他の方法と比較して優れていることが予測され、かつ以下の(1)～(8)の全てを満たす患者を対象とする。

なお、選定にあたっては、提供可能な HLA 適合または 1 抗原不一致（血清型）の適切な血縁ドナーの存在の確認及び骨髄バンクの検索サービス〔海外骨髄バンク（全米、台湾、韓国、中国）を含む〕を用いての非血縁ドナーの存在の確認を行い、さらに日本さい帯血バンクネットワークの検索システムを用いての移植可能な臍帯血の存在を確認するものとする。なお、患者の疾患、病期、候補となる臍帯血ユニットの細胞数及び HLA 等を慎重に検討した上で、選定の時点で得られている日本さい帯血バンクネットワークが公式に公開している最新の治療成績で、95%信頼下限が 50%を超えている疾患、病期の組み合わせについては、臍帯血移植を優先する。

(1) 以下のいずれかを満たす患者

- ・高リスク急性骨髄性白血病の初回寛解期。高リスクとは、1 回の寛解導入療法にて完全寛解が得られなかった、初発時白血球数が $20,000/\mu\text{l}$ 以上、二次性白血病、M0、M6、M7、又は予後不良染色体異常〔複雑な異常、-7, -5, abn (3q), del (5q)] を有する、のうちいずれかの条件を満たす例とする。
- ・急性骨髄性白血病（二次性含む）の第二以上の寛解期。
- ・骨髄異形成症候群のうち、IPSS (International Prognosis Scoring System) Intermediate-2 以上の予後不良群。

- ・骨髄異形成症候群であり、週 10 単位以上の血小板輸血、もしくは 2 週に 2 単位以上の赤血球輸血を要する輸血依存例。
 - ・慢性骨髄性白血病の第一慢性期以降の慢性期、又は移行期。メシル酸イマチニブによる治療歴を有する例に限る。
 - ・高リスク急性リンパ性白血病初回寛解期。高リスクとは、初発時年齢が 30 歳以上、初発時白血球数 30,000/ μ l 以上、表面形質が mature B-cell 又は early T-cell である、予後不良の染色体異常 [t (9;22) , t (4;11) , t (1;19) , hypodiploid, -7, +8] を有する例、寛解導入に 4 週間以上要した、のうちいずれかの条件を満たす例とする。
 - ・急性リンパ性白血病の第二以上の寛解期。
- (2) 提供可能な HLA 適合 (1 抗原不一致 (血清型) 含む) の適切な血縁ドナー及び非血縁ドナーがいない患者。
 - (3) 選択基準に合致し、除外基準に抵触しないドナーを有している患者。
 - (4) 造血幹細胞移植後 9 ヶ月以上の生存が可能であると思われる 20 歳以上 60 歳以下の患者。
 - (5) ECOG Performance Status 0 又は 1 の患者。
 - (6) 以下の全ての主要臓器機能が保たれている患者。
 - ・酸素非投与下での動脈血中酸素飽和度が 93%以上 (経皮的測定でも可)
 - ・血清クレアチニン値が施設基準値上限 (男性 : 1.1 mg/dL、女性 : 0.7 mg/dL) の 2 倍以内
 - ・血清ビリルビン値が 2.0 mg/dL 以下
 - ・AST が施設基準値上限 (33 IU/L) の 3 倍以内
 - ・ALT が施設基準値上限 (男性 : 42 IU/L、女性 : 27 IU/L) の 3 倍以内
 - ・心電図上、治療を要する異常を認めない
 - (7) 臨床研究参加期間中に安全性や免疫系再構築等、必要な評価が可能であると考えられる患者。
 - (8) 治療開始にあたり、自由意思により文書で同意が得られた患者。

IX. 2. 2. 1. 2 仮登録時除外基準

- (1) CMV 感染症を発症、又は CMV 抗原血症を呈し、ガンシクロビル製剤にて治療中の患者。
- (2) ACV 製剤で治療中の患者。
- (3) 心エコーにて安静時の心駆出率 (Ejection Fraction) が 50%未満の患者。
- (4) インスリンの継続使用によってもコントロール不良の糖尿病を有する患者。
- (5) コントロール不良の高血圧症を合併する患者。
- (6) 本臨床研究の参加に対する同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症などの疾患を有する患者。

- (7) 治療を要するアレルギー、又は本臨床研究で用いられる薬剤に対してアレルギーのある患者。
- (8) 活動性の感染症を有する患者。
- (9) 中枢神経系にコントロール不能な明らかな腫瘍細胞の浸潤を認める患者。
- (10) 活動性の重複癌がある患者。
- (11) 過去に TBI、全身リンパ節照射 (total lymphoid irradiation; TLI) を実施した患者。
- (12) HIV 抗体陽性、HBs 抗原陽性、又は HCV 抗体陽性の患者。
- (13) 妊婦、妊娠の可能性のある患者、授乳中の患者又は臨床研究終了後 5 年間の避妊に協力できない患者。
- (14) 他の臨床試験・臨床研究に参加している患者。
- (15) その他、総括責任者 (又は治療にあたる分担研究者) が不適当と認めた患者。

IX. 2. 2. 2 本登録時の選択基準及び除外基準

IX. 2. 2. 2. 1 本登録時選択基準

- (1) 本臨床研究への参加の同意の撤回がない患者。
- (2) 本臨床研究における Add-back に必要な量の遺伝子導入 T リンパ球が得られた患者。
- (3) ドナーから採取された純化後の CD34 陽性細胞数が 4.0×10^6 個/kg 以上の患者。*
- (4) 造血幹細胞移植後 9 ヶ月以上の生存が可能であると思われる患者。
- (5) ECOG Performance Status 0 又は 1 の患者。
- (6) 以下の全ての主要臓器機能が保たれている患者。
 - ・酸素非投与下での動脈血中酸素飽和度が 93% 以上 (経皮的測定でも可)
 - ・血清クレアチニン値が施設基準値上限 (男性: 1.1 mg/dL、女性: 0.7 mg/dL) の 2 倍以内
 - ・血清ビリルビン値が 2.0 mg/dL 以下
 - ・AST が施設基準値上限 (33 IU/L) の 3 倍以内
 - ・ALT が施設基準値上限 (男性: 42 IU/L、女性: 27 IU/L) の 3 倍以内
 - ・心電図上、治療を要する異常を認めない
- (7) 臨床研究参加期間中に安全性や免疫系再構築等、必要な評価が可能であると考えられる患者。

*: (3) の設定根拠

HLA ハプロタイプ一致ドナー由来造血幹細胞移植における必要最低 CD34 陽性細胞数についてはじゅうぶんな検討はなされていない。すでに報告されている論文 (22, 89, 90) では平均 1×10^7 個/kg 以上であり、ある程度大量の CD34 陽性細胞数を必要とすることが示されている。また、Aversa F らの報告 (22) では合計の CD34 陽性細胞数として $3.8 \sim 33.7 \times 10^6$ 個/kg の範囲で移植され、Handgretinger R らの報告 (90) では合計の CD34 陽性細胞数として

5. $4\sim 39\times 10^6$ 個/kg の範囲で移植され、ほとんどの症例で生着が確認されている。このことから、純化後の CD34 陽性細胞数としては 4.0×10^6 個/kg 以上が必要であるとした。

IX. 2. 2. 2. 2 本登録時除外基準

- (1) CMV 感染症を発症、又は CMV 抗原血症を呈し、ガンシクロビル製剤にて治療中の患者。
- (2) 移植した末梢血幹細胞の生着が確認できない患者。
- (3) 治療を必要とする GVHD が発症した患者。
- (4) ACV 製剤で治療中の患者。
- (5) 心エコーにて安静時の心駆出率が 50%未満の患者。
- (6) インスリンの継続使用によってもコントロール不良の糖尿病を有する患者。
- (7) コントロール不良の高血圧症を合併する患者。
- (8) 本臨床研究の参加に対する同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症などの疾患を有する患者。
- (9) 治療を要するアレルギー、又は本臨床研究で用いられる薬剤に対してアレルギーのある患者。
- (10) 体表面積当たりのクレアチニン・クリアランスが 20 mL/分/m^2 未満[標準体表面積 1.48m^2 で算出した場合のクレアチニン・クリアランスが 30 mL/分 未満]。
- (11) 活動性の感染症を有する患者。
- (12) 中枢神経系にコントロール不能な明らかな腫瘍細胞の浸潤を認める患者。
- (13) 活動性の重複癌がある患者。
- (14) 過去に TBI、TLI を実施した患者。
- (15) HIV 抗体陽性、HBs 抗原陽性、又は HCV 抗体陽性の患者。
- (16) 妊婦、妊娠の可能性のある患者、授乳中の患者又は臨床研究終了後 5 年間の避妊に協力できない患者。
- (17) その他、総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）が不相当と認めた患者。

IX. 3 登録

IX. 3. 1 ドナーの登録

総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）は、適格であると予測されるドナー候補者に対し、本臨床研究のための末梢血単核球採取及び末梢血幹細胞採取についてじゅうぶんな説明を行い、自由意思による文書同意を得る。文書同意を得た後、適格性確認に必要な検査・観察を行う。適格性が確認できた場合、国立がんセンター中央病院内に設置する遺伝子治療臨床研究実施事務局にドナーの登録を依頼する。

IX. 3. 2 被験者の仮登録

総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）は、適格であると予測される被験者候補者

に対し、本臨床研究参加について十分な説明を行い、自由意思による文書同意を得る。文書同意を得た後、適格性確認に必要な検査・観察を行う。適格性が確認できた場合、国立がんセンター中央病院内に設置する遺伝子治療臨床研究実施事務局に被験者の仮登録を依頼する。

IX. 3.3 被験者の本登録

総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）は、遺伝子導入 T リンパ球の調製及び移植細胞の採取後に、被験者の適格性を確認する。遺伝子導入 T リンパ球が調製後の品質試験に不合格となった場合、本臨床研究における Add-back に必要な細胞数の遺伝子導入 T リンパ球の確保ができなかった場合、純化後の CD34 陽性細胞数が移植に必要な数に満たなかった場合には、本登録には移行せず、臨床研究は中止とする。適格性が確認できた場合は、国立がんセンター中央病院内に設置する遺伝子治療臨床研究実施事務局に被験者の本登録を依頼する。

IX. 4 ドナー・被験者に対する説明及びその同意の取得方法

IX. 4.1 被験者に対する説明及びその同意の取得方法

本遺伝子治療臨床研究の開始に先立ち、総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）は被験者の同意を得るに際し、施設の遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意説明文書（XI. 7）を説明の前、又は説明するときに渡し、以下の内容を口頭で詳しく説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する。なお、同意を取得する前には、質問する機会と臨床研究に参加するか否かを判断するじゅうぶんな時間を被験者本人に与えることとし、質問についてはじゅうぶんに答える。

1. はじめに
2. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施施設、担当者
3. 遺伝子治療臨床研究の概要
4. 遺伝子治療臨床研究により予期される効果
5. 予期される危険（副作用）
6. 他の治療法（特にさい帯血移植について）
7. 今回用いるものと同じレトロウイルスベクターを使用したその他の遺伝子治療臨床研究・治験の状況
8. 遺伝子治療臨床研究の目的・意義
9. 遺伝子治療臨床研究の方法
10. 研究の公正性について
11. 遺伝子治療臨床研究に関する健康被害が発生した場合の治療及び補償
12. 個人情報の保護について