

5. 血清中サイトカインの測定

- ① 投与前、投与後 1～7 日目、14～21 日目、28 日目、42 日目、56 日目、57 日目、59 日目、63 日目、84 日目、以後 3 か月毎（術後 2 年まで）に 5 ml の注射器にて 5 ml の血液を採取する。
- ② 2,000×g、15 分、4℃で遠心分離後、0.5 ml の血清を分離し、-80℃で保存する。
- ③ IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12 を ELISA 法にて測定する。

6. 細胞障害性試験による NK 細胞の機能解析

- ① 投与前、投与後 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目、56 日目、84 日目、以後 3 か月毎（術後 2 年まで）に採取された PBMC を解析に用いる。
- ② PBMC の細胞数を測定し、⁵¹Cr で標識された標的細胞（K562）とエフェクター細胞/標的細胞（E/T）比、100 : 1、50 : 1、25 : 1、12.5 : 1 で混合培養する。
- ③ 4 時間後、上清に放出される放射活性を γ 線カウンターで測定する。ポジティブコントロールである最大放出は target cell 浮遊液に 1 N 塩酸を加えたものとし、ネガティブコントロールである自然放出は target cell だけの浮遊液の測定をするものとする。また下記の計算式により、細胞傷害活性を算出する。

$$(\text{共培養での放出} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出}) = \text{細胞傷害活性 (\% lysis)}$$

7. 生検組織及び摘出病理組織による導入遺伝子の解析

- ① 投与後 16～17 日目（2 回目のベクター投与後 48～72 時間後）、および投与後 56 日目の摘出病理組織において検討を行う。
- ② 生検組織ならびに摘出病理組織の凍結標本に DNazol（Invitrogen）を加えてホモジナイズする。
- ③ エタノールを加えて DNA を沈殿後、遠心分離により DNA を回収する。
- ④ アプライドバイオシステムズの Assays-by-Design サービスにより、HVS-tk gene の遺伝子配列から、TaqMan MGB プローブ、プライマーを設計、合成する。
- ⑤ TaqMan Universal PCR Master Mix を加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（Applied