

遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書

平成21年11月27日

厚生労働大臣 殿

実施施設	所在地	〒305-8576 茨城県つくば市天久保2丁目1-1
	名称	筑波大学附属病院 TEL:029-853-3900 FAX:029-853-3904
	代表者役職氏名	筑波大学附属病院長 五十嵐 徹也 職印



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添のとおり実施計画を変更したことを報告します。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
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リンパ球輸注療法の臨床研究	筑波大学人間総合科学研究科 血液内科・教授 総括責任者 千葉 滋




遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書

平成13年9月17日

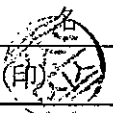
(申請年月日)

研究の名称	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リンパ球輸注療法の臨床研究
研究実施期間	平成14年3月14日 から 平成24年3月13日 (10年間)

総括責任者	所属部署の所在地	茨城県つくば市天王台1丁目1-1	〒305-8575
	所属機関・部局・職	筑波大学人間総合科学研究科 血液内科 教授	
	氏名	千葉 滋	

実施の場所	所在地	茨城県つくば市天久保2丁目1-1	〒305-8576
	名称	筑波大学附属病院	
	連絡先	茨城県つくば市天久保2丁目1-1 TEL: 029-853-3900、FAX: 029-853-3904	

総括責任者以外の研究	氏名	所属機関・部局・職	役割
	須磨崎 亮	筑波大学人間総合科学研究科・教授	患者の選定、患者への説明および同意の取得、治療効果の判定 (小児科)
長谷川 雄一	筑波大学人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (内科) 末梢血単核球分離・細胞保存	
福島 敬	筑波大学人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (小児科)	
鈴川 和己	筑波大学人間総合科学研究科・講師	内科的診療 (内科)	
大越 靖	筑波大学人間総合科学研究科・講師	分子生物学的検査 内科的診療 (内科) 遺伝子導入、安全管理	
金子 新	筑波大学人間総合科学研究科・非常勤講師 東京大学医科学研究所・助教	遺伝子導入条件の設定、遺伝子導入細胞の動態解析、免疫学的検査、ウイルスベクターの安全性の管理、PCRを用いた遺伝子導入細胞のクロナリティの解析、総括責任者の補佐	
大塚 藤男	筑波大学人間総合科学研究科・教授	移植片対宿主病の診断	
野口 雅之	筑波大学人間総合科学研究科・教授	移植片対宿主病の診断	
中内 啓光	東京大学医科学研究所・教授	免疫学的検査の管理と指導	
大津 真	東京大学医科学研究所・助教	PCRを用いた遺伝子導入細胞のクロナリティの解析	
小野寺 雅史	国立成育医療センター研究所・部長	遺伝子治療全般に関する情報の収集と助言	
坂巻 壽	都立駒込病院血液内科・副院長	適応患者の選定 (内科)	
大橋 一輝	都立駒込病院血液内科・医長	適応患者の選定 (内科)	
土田 昌宏	茨城県立こども病院小児科・病院長	適応患者の選定 (小児科)	
小池 和俊	茨城県立こども病院小児科・部長	適応患者の選定 (小児科)	
加藤 俊一	東海大学総合医学研究所・教授	適応患者の選定 (小児科)	

審査委員会の開催状況及び実施計画の変更を 適当と認める理由	別紙 (筑波大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会の意見) のとおり	
	審査委員会の長の職名	氏
	筑波大学人間総合科学研究科・教授	赤座 英之 

研究の区分	○遺伝子治療臨床研究 遺伝子標識臨床研究		
研究の目的	<p>本研究は、同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対し広く行われているドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の安全性を高めるため、ドナー末梢血リンパ球にあらかじめレトロウイルスベクターを用いて HSV-TK 遺伝子を導入し、重度移植片対宿主病 (GVHD) の際にはガンシクロビル (GCV) を投与することでドナーT細胞を死滅させ、GVHD の沈静化を図ることを目的としている。本研究の検討課題は以下の3点に要約される。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対して行われる DLI において、レトロウイルスベクターによる HSV-TK 遺伝子導入ドナーT細胞が患者にとって安全であるのか。 2. 上記遺伝子導入 T細胞が患者体内で治療効果を示すのか。 3. 上記遺伝子導入 T細胞が GVHD 発症の際に、GCV の投与により患者体内で死滅し、それにより GVHD が沈静化するのか。 		
対象疾患	<p>本研究では、その実施目的を十分に理解し、治療として DLI が考慮される同種造血幹細胞移植後の再発白血病 (慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病)、ならびに骨髄異形成症候群の患者が治療対象となる。</p>		
変更時期	平成21年11月20日		
変更内容	実施計画書における事項	変更前	変更後
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 研究期間の変更ならびに異動に伴う研究者変更 2. 所属部局名の変更 3. 研究者役割分担の変更 4. 7-1-2「患者に投与する物質の純度および安全性」の変更 5. 7-3-1「培養細胞の純度」における検査発注先の追加 6. 7-3-3「被験者に投与する細胞の安全性」の変更 7. 8「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」の追加 8. 9-5-2「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)」の変更 9. 9-5-4「臨床検査項目及び観察項目」の変更 10. 10「関連文献」56、58、59の変更及び60、61の追加並びに別添17、18、19の追加 11. 別添1-1、1-2及び別添2の「説明および同意書」に最新の情報を追記 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 別紙1のとおり 2. 別紙1のとおり 3. 別紙1のとおり 4. 別紙1のとおり 5. 別紙1のとおり 6. 別紙1のとおり 7. 別紙1のとおり 8. 別紙1のとおり 9. 別紙1のとおり 10. 別紙1のとおり 11. 別紙1のとおり 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 別紙1のとおり 2. 別紙1のとおり 3. 別紙1のとおり 4. 別紙1のとおり 5. 別紙1のとおり 6. 別紙1のとおり 7. 別紙1のとおり 8. 別紙1のとおり 9. 別紙1のとおり 10. 別紙1のとおり 11. 別紙1のとおり

	12. 資料「2. 実施施設の施設設備」に筑波大学附属病院 CPF 室を追加 13. 添付資料3の変更及び添付資料5の追加 14. 別紙3「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リンパ球輸注療法の臨床研究に参加される皆様へ」を追加	12. 別紙1のとおり 13. 別紙1のとおり 14. 別紙1のとおり	12. 別紙1のとおり 13. 別紙1のとおり 14. 別紙1のとおり
変更理由	別紙2のとおり		
今後の研究計画	上記変更内容を含む遺伝子治療臨床研究計画書をもとに遺伝子治療を進める。		
これまでの研究結果及び研究結果の公表状況	平成18年10月23日付けで、5症例に対する臨床経過等を本遺伝子治療の中間報告として作成した。 平成18年度に、日本血液学会総会において本治療の経過を報告した。 平成20年度に、日本輸血・細胞治療学会、日本小児血液学会において本治療の経過を報告した。 平成21年度に、欧州骨髄移植会議、日本遺伝子治療学会において本治療の経過を報告した。		

(注意)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格A列4番とすること。
2. この報告書は、正本1通及び副本2通を提出すること。
3. 字は墨・インク等を用い、楷書ではっきり書くこと。
4. 記載欄に記載事項のすべてを記載できない時は、その欄に「別紙()のとおり」と記載し、別紙を添付すること。
5. 大学等にあつては、この報告書を、厚生労働大臣のほか文部科学大臣にも提出すること。

筑波大学附属病院長 五十嵐 徹也 殿

筑波大学附属病院遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会「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リンパ球輸注療法の臨床研究」の変更に係る審査報告書

筑波大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会の遺伝子治療臨床研究実施計画に係る審査状況及び実施計画の変更が適当であると承認した理由は、次のとおりである。

1. 審査の経過状況

- (1) 平成11年12月20日付けで基礎医学系中内啓光教授から申請された「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リンパ球輸注療法の臨床研究」は3度に亙る筑波大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会（以下「審査委員会」、第1回平成12年2月14日、第2回平成12年6月7日、第3回平成13年6月28日）で慎重な審議がなされ、本研究が臨床研究であることを考慮し、総括責任者を中内啓光教授から臨床医学系血液内科長澤俊郎教授に変更、また筑波大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会細則第8条に基づき、速やかな対応を必要とする事項に対応できるよう新たに「専門委員会（遺伝子治療実行委員会）」をもうけた上で、本申請書が文部省告示第79号、厚生省告示第23号、及び筑波大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会細則の必要要件を満たしていることを委員全員で承認した。
- (2) 審査委員会の承認を受け、平成13年9月17日付けで筑波大学附属病院遺伝子治療臨床研究実施計画申請書は文部科学省および厚生労働省に提出された。これを受け、遺伝子治療臨床研究（がん）審査ワーキンググループ・がん遺伝子治療臨床研究作業委員会が2度に亙り開催され（第1回平成13年11月14日、第2回平成14年1月29日）、慎重な審議の結果、平成14年3月14日付けで、筑波大学遺伝子治療臨床研究実施計画は文部科学省および厚生労働省から承認された。
- (3) フランスで行われたX連鎖性重症複合免疫不全症に対する遺伝子治療において有害事象（単クローナルT細胞増殖）が発症したことから、平成14年10月28日に第1回遺伝子治療実行委員会が開催され、今後の対応が検討された。その結果、本臨床研究の修正項目として遺伝子治療を受ける患者へのインフォームド・コンセントの変更、遺伝子導入細胞のクロナリティーの解析法の確立、ならびにイタリアで同様の遺伝子治療を受けている患者の情報収集体制の強化などが求められた。これに対して修正された実施計画書ならびに患者用説明文書が第2回遺伝子治療実行委員会（平成14年12月25日）に提出され、第3回遺伝子治療実行委員会（平成15年3月4日）において慎重な審議の結果、修正は適当と認められ、上記有害事象に係る修正項目が審査委員会で審議されることが決定した。
- (4) 平成16年11月2日に行われた第1回遺伝子治療臨床研究において対象となった再発白血病患者が同年12月19日死亡（重大事態の発生）したことから、平成17年1月20日に遺伝子治療審査委員会が開催され、その対応が検討された。その結果、死因は病理解剖より白血病による多臓器不全と診断され、今回の遺伝子治療との直接的な因果関係は否定された。しかし、今後も安全性の確認、治療効果の把握ならびに有害事象が起きないように遺伝子治療の継続が求められた。また、第一症例の経過と結果を踏まえ、遺伝子導入ドナーリンパ球の繰り返し投与ならびに患者に投与する物質の純度および安全性検査の採択順位の変更等、さらには個人情報保護に関する修正の申請があり、これらについても適当と判断し、本臨床研究実施計画の変更について承認した。
- (5) 平成18年10月23日付けで、5症例に対する臨床経過等を本遺伝子治療の中間報告として作成し、厚生労働省へ報告した。その報告を含め本院の臨床計画に対し厚生科学審議会科学技術部会がん遺伝子治療作業委員会からの指導事項があり、その指導事項に対する回答を

基に本臨床研究実施計画を変更したことから、平成19年1月31日に第6回遺伝子治療臨床研究審査委員会が開催された。その結果、研究実施期間の延長（8年間）、目標症例数10例の実施、臨床計画の変更及び同意書の修正について承認された。

第6回遺伝子治療臨床研究審査委員会で承認された実施計画変更について、平成19年10月31日付けで厚生労働省へ報告した。

- (6) 平成19年12月に厚生労働省から、イギリスにおいて遺伝子治療中の患者が白血病を発症した旨の連絡があり、本臨床研究実施計画の同意書の内容の修正を検討することとした。
- (7) 遺伝子治療臨床研究の対象である症例7の患者が、平成20年10月31日に死亡（重大事態の発生）したこと、また、治療終了者（5名）の最長約4年に亘る長期治療成績を受け、より治療効果の期待できる改定遺伝子導入プロトコール（抗CD3／CD28抗体による刺激と遺伝子導入開始時期および培養終了時期の短縮）を使用すること、改定プロトコールにより治療される症例（5名）は治療終了者（5名）とは別群として解析・評価を行うこと、院内に新しく設置された細胞調製室を遺伝子導入等に用いること、新規参加症例向けに現在までの治療成績と今後の変更点についての補足説明文書を追加すること等に関する変更の申請があり、平成21年7月14日に第7回遺伝子治療審査委員会が開催された。その結果、委員会において、死因については病理解剖により白血病の増悪とそれに伴う肺炎と診断され、今回の遺伝子治療との直接的な因果関係は否定され、また、上記内容の本臨床研究実施計画の変更について、適当と判断した。

第7回遺伝子治療臨床研究審査委員会で承認された実施計画変更について、平成21年7月31日付けで厚生労働省へ連絡した。

- (8) 平成19年1月31日付けで承認された研究実施期間が平成22年3月13日までであり、改定遺伝子導入プロトコールでの遺伝子治療後には十分な観察期間を設定することが必要と判断し、平成21年11月16日から20日にかけて、持ち回り審議により第8回遺伝子治療臨床研究審査委員会が開催された。その結果、研究実施期間を延長（2年間）する実施計画の変更について承認された。

2. 変更を適当と認める理由

審査委員会は、遺伝子治療臨床研究に係る変更された遺伝子治療臨床研究実施計画書等を慎重に審議した結果、本審査委員会に提出された変更項目は適当と判断し、また本臨床研究が「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（平成14年文部科学省・厚生労働省告示第1号・平成16年12月28日全部改正）及び筑波大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会細則の必要要件を満たしているものと結論した。

平成21年11月20日

遺伝子治療臨床研究審査委員会 委員長 赤座 英之



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リンパ球輸注療法の臨床研究新旧対照表

(新)

(旧) (筑波大学・平成21年11月)

<p>1 遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書及び実施計画書 (1) 研究実施期間 平成14年3月14日から平成24年3月13日(10年間)</p> <p>(2) 総括責任者 筑波大学人間総合科学研究科 血液内科 教授 千葉 滋 ○ 総括責任者であった血液内科の前教授の後任者 として就任したことによる変更。</p> <p>(3) 総括責任者以外の研究者 須磨崎 亮 筑波大学・人間総合科学研究科・教授 患者の選定、患者への説明および同意の取得、治療効果の判定(小児科)</p> <p>長谷川 雄一 筑波大学・人間総合科学研究科・講師 内科的診療(内科)</p>	<p>1 遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書及び実施計画書 (1) 研究実施期間 平成14年3月14日から平成22年3月13日(8年間)</p> <p>(2) 総括責任者 筑波大学人間総合科学研究科 血液内科 講師 小野寺 雅史(代理・副総括責任者)</p> <p>(3) 総括責任者以外の研究者 小野寺 雅史 筑波大学・人間総合科学研究科・講師 ウイルスベクター全般に関する情報の収集、ならびに安全管理・遺伝子導入条件の設定および遺伝子導入細胞の動態解析</p> <p>小島 寛 筑波大学・人間総合科学研究科・准教授 患者の選定、患者への</p>
---	---

末梢血単核球分離・細胞保存	説明および同意の取得、治療効果の判定 (内科)
福島 敬	筑波大学・人間総合科学研究科・講師 内科的診療 (小児科)
鈴木 和己	筑波大学・人間総合科学研究科・講師 内科的診療 (内科)
大越 靖	筑波大学・人間総合科学研究科・講師 分子生物学的検査
金子 新	筑波大学・人間総合科学研究科・非常勤講師 内科的診療 (内科)
金子 新	筑波大学・人間総合科学研究科・助教、遺伝子導入条件の設定
大塚 雅之	東京大学医科学研究所・助教、遺伝子導入細胞の動態解析、免疫学的検査、ウイルスベクターの安全管理、PCRを用いた遺伝子導入細胞のクロナリテイの解析、総括責任者の補佐
大塚 雅之	筑波大学・人間総合科学研究科・教授 移植片対宿主病の診断
野口 雅之	筑波大学・人間総合科学研究科・教授 移植片対宿主病の診断
中内 啓光	東京大学医科学研究所・教授 免疫学的検査の管理と指導
大津 真	東京大学医科学研究所・助教 PCRを用いた遺伝子導入細胞のクロナリテイの解析
須磨崎 亮	筑波大学・人間総合科学研究科・教授 患者の選定、患者への説明および同意の取得、治療効果の判定 (小児科)
長谷川 雄一	筑波大学・人間総合科学研究科・講師 内科的診療 (内科)
向井 陽美	筑波大学・人間総合科学研究科・講師 内科的診療 (内科)
大越 靖	筑波大学・人間総合科学研究科・講師 内科的診療 (内科)
福島 敬	筑波大学・人間総合科学研究科・講師 内科的診療 (小児科)
大塚 雅之	筑波大学・人間総合科学研究科・教授 移植片対宿主病の診断
野口 雅之	筑波大学・人間総合科学研究科・教授 移植片対宿主病の診断
松井 良樹	筑波大学・人間総合科学研究科・助教 末梢血単核球分離・細胞保存
金子 新	筑波大学・人間総合科学研究科・講師 遺伝子導入細胞の動態解析
中内 啓光	東京大学医科学研究所・教授 免疫学的検査の管理と指導
大津 真	東京大学医科学研究所・助教 ウィルスベクターの安全管理、PCRを用いた遺伝子導入細胞のクロナリテイの解析
坂巻 壽	都立駒込病院血液内科・部長 適応患者の選定 (内科)
大橋 一輝	都立駒込病院血液内科・医員 適応患者の選定 (内科)

<p>小野寺 雅史 国立成育医療センター研究所・室長 遺伝子治療全般に関する情報の収集と助言</p> <p>坂巻 壽 都立駒込病院血液内科・副院長 適応患者の選定 (内科)</p> <p>大橋 一輝 都立駒込病院血液内科・医長 適応患者の選定 (内科)</p> <p>土田 昌宏 茨城県立こども病院小児科・病院長 適応患者の選定 (小児科)</p> <p>小池 和俊 茨城県立こども病院小児科・部長 適応患者の選定 (小児科)</p> <p>加藤 俊一 東海大学・総合医学研究所・教授 適応患者の選定 (小児科)</p> <p>[○ 担当研究者の異動に伴い、修正。]</p>	<p>土田 昌宏 茨城県立こども病院小児科・部長 適応患者の選定 (小児科)</p> <p>小池 和俊 茨城県立こども病院小児科・医員 適応患者の選定 (小児科)</p> <p>加藤 俊一 東海大学総合医学研究所・教授 適応患者の選定 (小児科)</p>
<p>(4) 変更時期 平成21年11月20日</p> <p>2 遺伝子治療臨床研究実施計画書 (1) 2-2 副総括責任者氏名およびその担当する役割 削除 [○ 担当研究者転出に伴い、副総括責任者を廃止する。]</p>	<p>(4) 変更時期 平成19年4月1日</p> <p>2 遺伝子治療臨床研究実施計画書 (1) 2-2 副総括責任者氏名およびその担当する役割 小野寺 雅史 筑波大学・人間総合科学研究所・講師 ウイルスベクター全般に関する情報の収集、ならびに安全管理・遺伝子導入条件の設定および遺伝子導入細胞の動態解析</p>

<p>(2) 4. 遺伝子治療臨床研究の目的</p> <p>3. GCV 投与による GVHD の沈静化</p> <p>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 LINGFR 抗体を用いた <u>Flow cytometry 解析</u> ならびに HSV-TK 遺伝子に対する <u>polymerase chain reaction (PCR)</u> 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 <u>FACS</u>、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。</p>	<p>(2) 4. 遺伝子治療臨床研究の目的</p> <p>3. GCV 投与による GVHD の沈静化</p> <p>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 LINGFR 抗体を用いた <u>Flow cytometry 解析</u> ならびに HSV-TK 遺伝子に対する <u>polymerase chain reaction (PCR)</u> 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 <u>Flow cytometry</u>、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。</p>
<p>(3) 6-2. 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに標的細胞とした理由</p> <p>本臨床研究の標的細胞はドナー由来の末梢血 T 細胞である。これは GVL 効果のメカニズムが未だ解明されていないものの、GVL 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T 細胞であることが多くの実験から支持されているためである。最近これら T 細胞が GVHD の原因となる T 細胞と</p>	<p>(3) 6-2. 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに標的細胞とした理由</p> <p>本臨床研究の標的細胞はドナー由来の末梢血 T 細胞である。これは GVL 効果のメカニズムが未だ解明されていないものの、GVL 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T 細胞であることが多くの実験から支持されているためである。最近これら T 細胞が GVHD の原因となる T 細胞と</p>

[○ 正式な表記に変更]

異なることが示唆されているが、現実的には両者を区別することは不可能であるため、本研究においてはリコンビナント・ヒト・インターロイキン2 (rhIL-2) と抗CD3/CD28 抗体結合ビーズにて刺激した末梢血リンパ球 (T細胞) 全体が標的細胞として使用される。

末梢血リンパ球は上記のサイトカインの存在下で長期間培養可能であり、レトロウイルスの感染効率も極めて高いことが過去の臨床治験より証明されている (42、43)。

(4) 6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴

パッケージング細胞株 Am12 はアンフトロピック系のパッケージング細胞株で、感染宿主は広範であり、マウス、ラット、サル、ヒト等の細胞に感染する。ただレトロウイルスの場合、静止期の細胞には感染せず、遺伝子導入に際しては種々のサイトカインで標的細胞に刺激を与え、細胞を細胞周期に誘導しなければならぬ。本臨床研究では末梢血 T 細胞を rhIL-2 と抗 CD3/CD28 抗体結合ビーズで刺激する。レトロウイルスベクターにより導入された遺伝子は一般的に安定で、細胞分裂ごとに娘細胞へと伝えられていくが、導入された遺伝子発現に関しては in vivo において、種々の shut off 機構により減弱していくことが知られている。本臨床研究で使用されるウイルスベクターは増殖能を欠いているので、RCR が存在しない限り、感染した末梢血 T 細胞から周囲の細胞へ感染することはしない。

異なることが示唆されているが、現実的には両者を区別することは不可能であるため、本研究においてはリコンビナント・ヒト・インターロイキン2 (rhIL-2) と抗 CD3 抗体 (OKT3) にて刺激した末梢血リンパ球 (T細胞) 全体が標的細胞として使用される。

末梢血リンパ球は上記のサイトカインの存在下で長期間培養可能であり、レトロウイルスの感染効率も極めて高いことが過去の臨床治験より証明されている (42、43)。

(4) 6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴

パッケージング細胞株 Am12 はアンフトロピック系のパッケージング細胞株で、感染宿主は広範であり、マウス、ラット、サル、ヒト等の細胞に感染する。ただレトロウイルスの場合、静止期の細胞には感染せず、遺伝子導入に際しては種々のサイトカインで標的細胞に刺激を与え、細胞を細胞周期に誘導しなければならぬ。本臨床研究では末梢血 T 細胞を rhIL-2 と OKT3 で刺激する。レトロウイルスベクターにより導入された遺伝子は一般的に安定で、細胞分裂ごとに娘細胞へと伝えられていくが、導入された遺伝子発現に関しては in vivo において、種々の shut off 機構により減弱していくことが知られている。本臨床研究で使用されるウイルスベクターは増殖能を欠いているので、RCR が存在しない限り、感染した末梢血 T 細胞から周囲の細胞へ感染することはしない。

○ 近年、抗 CD3 抗体 (OKT3) に替えて抗 CD3/CD28 抗体結合ビーズ (ClinExVivo) を用いて樹立した TK-T 細胞は、白血病治療に有効な強い抗原反応性を維持していることがヒト化マウスモデルで報告されたため (Bondanza A et al Blood 2006, Kaneko S et al Blood 2008)

(5) 7-1-1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

(略)

レトロウイルスベクター産生細胞の品質検査項目

試験内容	方法	結果
Δ LINGFR の発現 (細胞解凍時、および 8 週目)	Flow cytometry_解析	>95%

[○ 正式な表記に変更]

(6) 7-1-2. 患者に投与する物質の純度および安全性
 患者に投与する物質は、遺伝子が導入されたドナー末梢血リンパ球のみである。培養に用いられる血清は、ウシ血清が患者にとって異種タンパク質であり、時として患者にとって抗原となり得るため、末梢血 T 細胞培養に際しては

(5) 7-1-1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

(略)

レトロウイルスベクター産生細胞の品質検査項目

試験内容	方法	結果
Δ LINGFR の発現 (細胞解凍時、および 8 週目)	FACS_解析	>95%

(6) 7-1-2. 患者に投与する物質の純度および安全性
 患者に投与する物質は、遺伝子が導入されたドナー末梢血リンパ球のみである。培養に用いられる血清は、ウシ血清が患者にとって異種タンパク質であり、時として患者にとって抗原となり得るため、末梢血 T 細胞培養に際しては

ドナーの自己血漿が用いられる。遺伝子導入の際に用いられる種々の試薬や抗体に関しては、遺伝子導入細胞を凍結保存する前に3%ドナー自己血漿を含むPBSで十分に洗浄されるが、遺伝子導入終了後、細胞の一部をSRL社ならびに筑波大学附属病院検査部に提出し、以下の検査を行うことで安全性を確かめる。安全性が確認されるまで遺伝子導入細胞は-80℃で保存され、安全性が確認された後に使用される。

なおRCRテストの一種であるPG-4 SLテストは最終結果が判明するまで約4週間かかるため、逆転写酵素活性性が測定感度以下であることを確認することならびにPCRによりenv遺伝子が増幅されないことを確認された遺伝子導入ドナーリンパ球はRCRテスト陰性と判断され、患者に投与できるものとする。ただし、同検体を用いたPG-4 SLテストが後に陽性と判明した際は、速やかに投与後の患者末梢血ならびに血漿を用いて逆転写酵素活性とPCRによるenv遺伝子増幅検査を行い、その結果、いずれの一つでも陽性と判明した場合はRCR陽性と判断し、GVHD時と同用量のガンシクロビルを投与する。いずれも陰性の場合はSLテストを再度行い、陽性の場合にはガンシクロビル投与を行う。SLテスト陰性であれば次の定期検査までの経過観察とする。遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後の定期検査中に、上記2検査によりRCR陽性が疑われた場合もGVHD時と同用量のガンシクロビルを投与

ドナーの自己血漿が用いられる。遺伝子導入の際に用いられる種々の試薬や抗体に関しては、遺伝子導入細胞を患者に投与する前に3%ドナー自己血漿を含む培地で十分に洗浄されるが、遺伝子導入終了後、細胞の一部をSRL社に送付し、以下の検査を行うことで安全性を確かめる。安全性が確認されるまで遺伝子導入細胞は-80℃で保存され、安全性が確認された後に使用される。

尚、RCRテストにおけるPG-4 SLテストは最終結果が判明するまで約4週間かかるため、患者投与に際しては逆転写酵素活性性が測定感度以下ならびにPCRによりenv遺伝子が増幅されないことを確認の上、調整細胞を投与できるものとする。ただし、後に判明したPG-4 SLテストにて陽性が確認された場合は、即座に患者末梢血ならびに血漿を用いて逆転写酵素活性性の測定、PCR法によるenv遺伝子の増幅、PG-4 SLテストを行い、いずれの一つでも陽性と判明した場合はGVHD時と同用量のガンシクロビルを投与し、遺伝子導入細胞を死滅させる。更に抗ウイルス剤等も併用し、最善の治療を行う。そして、上記検査がすべて陰性化するまで患者を外界との接触を断った個室にて管理する（「遺伝子組み換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく）。その過程でリンパ腫を含む異常細胞の増殖が確認された場合、種々の検査結果を基に最適な治療法を選択し、治療を開始する。患者細胞を用いた検査にて