

参考資料 2

として使用することとした (5-3-2 参照)。

5-3-2 臨床分離 HIV 株の Gag28-9, Gag296-11, Nef138-10, Env584-11 シークエンス

HIV 感染者 19 名の血漿より PCR 法にて HIV 遺伝子断片を得て、各エピトープ部位のアミノ酸配列を決定した。PCR 法にて遺伝子断片の得られた症例のアミノ酸配列の頻度を表 5-3-2-1 に示すが、Gag296-11 以外はエピトープ解析のもととなった SF2 株のアミノ酸配列を有する症例は少なく、多くの症例は 1-2 個のアミノ酸変異を有していた。

表 5-3-2-1 臨床分離株のペプチドアミノ酸変異頻度

Gag 28-9	人数	Gag 296-11	人数	Nef 138-10	人数	Env 584-11	人数
KYKCLKHIVW ¹⁾	0	RDYVDRFYKTL ¹⁾	11	RYPLTFGWCF ¹⁾	0	RYLRDQQLLGI ¹⁾	1
R***	9	*****V*	1	*F*****	7	***K*****	5
R*L**	1	*****Y*	1	*F**C*****	2	***K*****L	1
R*V**	1			****C*****	1	***Q*****	1
H***	1					G*****	1
RML**	1						
計	13	計	13	計	10	計	9

¹⁾ SF2 株のコンセンサスシークエンス

変異ペプチドを有する症例が多かった Gag28-9、Nef138-10、Env584-11 については、コンセンサスシークエンス及び変異シークエンスのペプチドが患者の CTL を活性化し得るか否かを検討した (表 5-3-2-2)。使用したペプチドは、Gag28-9 に関しては SF2 株のシークエンスである Gag-wt、3 番目のアミノ酸が R に変異した Gag-3R、3 番目と 7 番目がそれぞれ R と V に変異した Gag-3R7V、3 番目と 7 番目がそれぞれ R と L に変異した Gag-3R7L を使用した。同様に、Nef138-10 に関しては Nef-wt、Nef-2F、Nef-2F5C、Nef-5C を使用し、Env584-11 に関しては Env-wt、Env-4K、Env-4Q を使用した。各ペプチドを患者由来の成熟樹状細胞に添加し、末梢血単核球と混合培養後 (24 時間)、ELISPOT アッセイでインターフェロン γ 産生細胞を検出した (表 5-3-2-2)。この結果から、3 種類のエピトープとも SF2 のコンセンサスシークエンスが多くの症例で活性化刺激を与えることが明らかになった。以上の結果から、本臨床研究においては患者のペプチド配列の変異に関わらず、Gag28-9、Gag296-11、Nef138-10、Env584-11 の SF2 コンセンサスシークエンスを抗原ペプチドとして使用することし、Gag28-9、Nef138-10、Env584-11 については変異ペプチド Gag-3R、Nef-2F、Env-4Q を追加することとした。すなわち、以下の 7 つのペプチドを使用することとした。

Gag28-9 (Gag-wt): KYKLNKHIWV
 Gag28-9 (Gag-3R): KYRLKHIWV
 Gag296-11: RDYVDRFYKTL
 Nef138-10 (Nef-wt): RYPLTFGWCF
 Nef138-10 (Nef-2F): RFPLTFGWCF
 Env584-11 (Env-wt): RYLRDQQLGI
 Env584-11 (Env-4Q): RYLQDQQLGI

表 5-3-2-2 各ペプチド特異的な T 細胞数¹⁾

Gag28-9	PN4	PN9	PN10	PN11	PN12	PN13	PN14	PN15	PN19
Gag-wt	355	30	0	5	5	0	67	37	13
Gag-3R	ND	10	10	0	10	0	53	33	120
Gag-3R7V	ND	40	0	5	0	17	60	67	105
Gag-3R7L	ND	ND	0	0	5	13	13	177	20

Nef138-10	PP2	PN4	PN10	PN11	PN12	PN12	PN13	PN14	PN15	PN19
Nef-wt	55	670	0	5	465	ND	87	913	10	0
Nef-2F	35	1145	0	35	55	ND	10	1130	10	0
Nef-2F5C	20	350	0	0	15	ND	20	697	0	5
Nef-5C	60	630	0	20	1810	585	33	437	10	10

Env584-11	PN10	PN11	PN12	PN12	PN13	PN14	PN15	PN19
Env-wt	215	5	0	0	0	737	43	37
Env-4K	ND	ND	0	0	0	67	40	20
Env-4Q	ND	ND	0	35	0	120	37	17

¹⁾ ELISPOT アッセイでインターフェロン γ 産生細胞を測定した ($/10^5$ PBMC)

5-4 HIV 特異的細胞性免疫の定量法

本臨床研究を行うに当たり、HIV 特異的細胞性免疫を正確に定量する方法の確立が必須である。リンパ球は自然界の様々な抗原に対応するレパートリーを持っており、HIV という特定の抗原に対応するリンパ球の全リンパ球中に占める割合は 0.1~3% 以下と非常に低く、その解析は容易ではない。そのため、我々は少数の HIV 特異的 T リンパ球を正確に同定するための方法を検討し、以下の 3 つの方法を用いて本臨床研究における抗原特異的細胞性免疫の解析を行うこととする。

5-4-1 フローサイトメーターによる IFN- γ 産生細胞の検出

患者末梢血単核球に不活化 HIV 粒子を加えて単球に貪食させ、単球細胞膜上に提示された抗原と反応したリンパ球を細胞質内 IFN- γ で検出する(図 5-4-1) (7)。

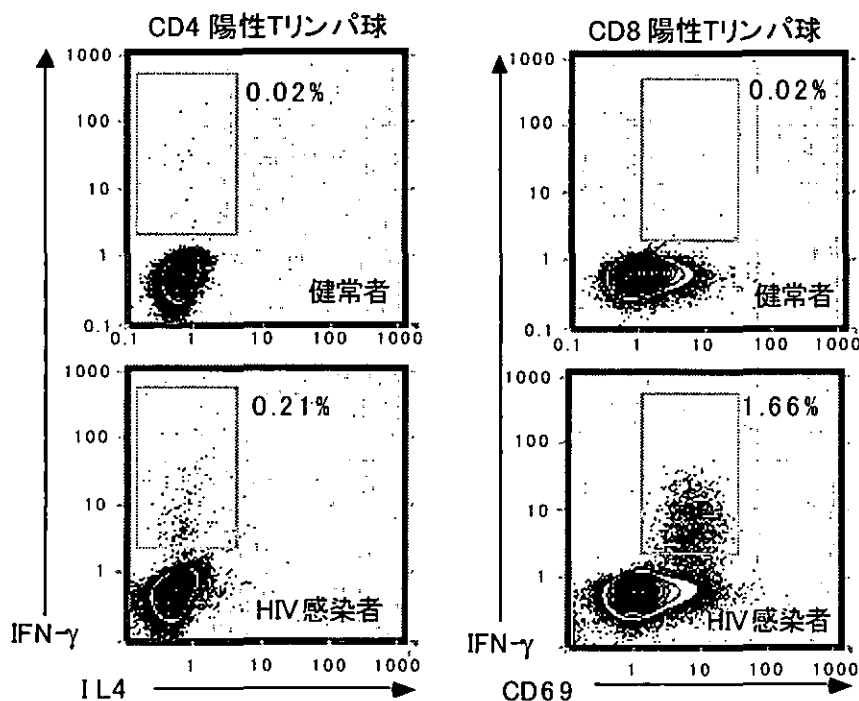


図 5-4-1 IFN- γ 産生を指標にした HIV 特異的 T リンパ球 (FACS)

5-4-2 フローサイトメータによる HLA class I テトラマー結合の解析

この方法は、遺伝子工学的に作成した HLA class I 分子とそれに親和性のある HIV 抗原ペプチドを結合させ、さらにその 4 量体 (テトラマー) を作成する。このテトラマーが抗原ペプチド特異的な T 細胞の抗原受容体と結合する性質を利用して、フローサイトメーターで抗原特異的な T 細胞を検出する (図 5-4-2) (8, 9)。

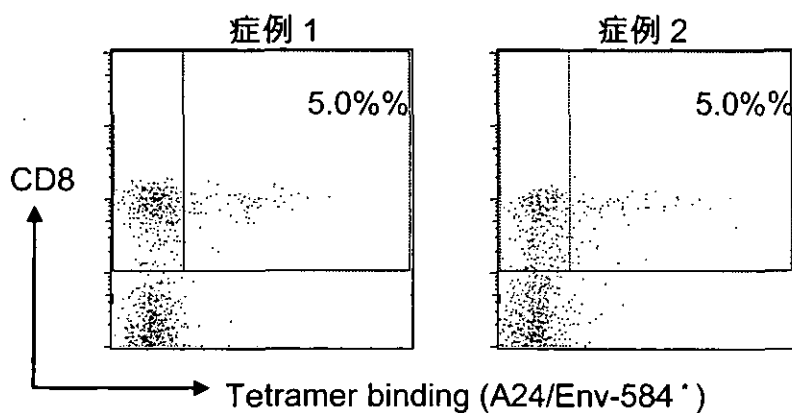


図 5-4-2 テトラマー結合性を指標にした HIV 特異的 T リンパ球 (FACS)

5-4-3 ELISPOT による IFN- γ 産生細胞の検出

患者末梢血と抗原ペプチドを混合し、抗 IFN- γ 抗体を底面に付着させた 96 穴プレートで培養を行う。培養中に産生された IFN- γ が抗体に結合するので、これを

別の抗 IFN- γ 抗体を用いて検出し、IFN- γ を産生した細胞を同定する (図 5-4-3) (10, 11)。

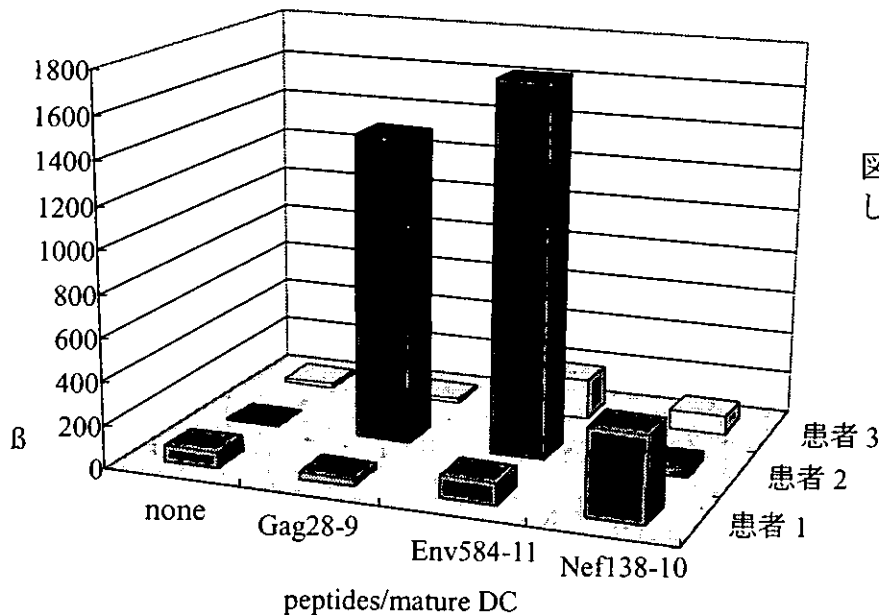


図 5-4-3 IFN- γ 産生を指標にした HIV 特異的 T リンパ球 (ELISPOT、/10⁵ PBMC)

5-5 樹状細胞の特徴

5-5-1 樹状細胞を用いる理由

樹状細胞は 1868 年に *Langerhans* による皮膚のランゲルハンス細胞の記載に始まる。1973 年に *Steinmann* と *Cohn* らがマウス脾由来樹状細胞を用いて一連の系統だった実験を始めることにより、一次免疫反応を誘導する抗原提示細胞として、その機能が認識されるに至った。近年までに明らかとなっている樹状細胞の機能としては、以下のことがあげられる。

- (1) 腫瘍・ウイルス由来の抗原を貪食や微小貪食などの細胞内取り込み機構を介して細胞内に取り込みプロセッシングを行い、HLA 分子に結合した 9 個から 12 個のアミノ酸配列からなる特異的ペプチド断片として細胞膜表面に抗原提示する。
- (2) 高い遊走能を持つため、組織中を遊走し所属リンパ節に定着し、免疫反応を誘導する。
- (3) リンパ節内でヘルパー T 細胞、細胞障害性 T 細胞、B 細胞に対して抗原提示を行い、一次免疫反応を誘導する。

単球・マクロファージや、活性化 B 細胞、内皮細胞などの細胞も抗原提示能を有するが、これらが活性化できる T 細胞はメモリーもしくは活性化 T 細胞などの二次応答を行う細胞に限られている。これに対し、樹状細胞は強力な抗原提示能を有し、免疫学的記憶や活性化を受けていないナイーブ T 細胞を活性化して一次免疫を誘導することが可能である。5-2 で述べたように慢性期 HIV 感染者では HIV 特異的細胞性免疫が破壊されており、HAART 施行中に胸腺から供給されるナ

参考資料 2
CD86

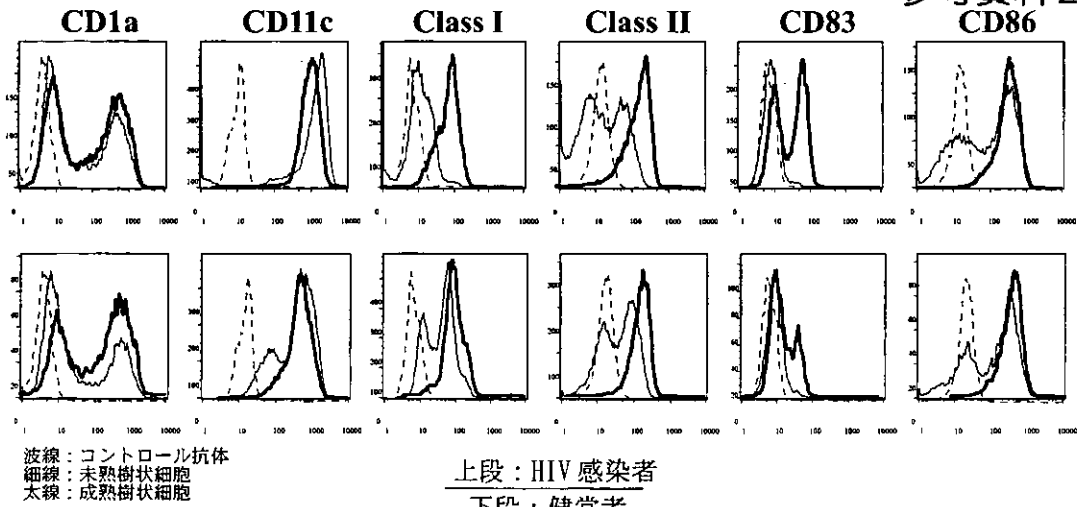


図 5-5-2 末梢血単球から誘導した樹状細胞の表面抗原発現

イーブ T リンパ球に対しても抗原提示が出来る樹状細胞を用いることが、本臨床研究を行う上で非常に有用であると考えられる。

5-5-2 HIV 感染者末梢血単球からの樹状細胞の誘導

患者末梢血よりアフエレーシスにて単核球を採取し、プラスチックシャーレに付着する単球を分離する。これを IL4 と GM-CSF 存在下に 7 日間培養し未熟樹状細胞を誘導したのち、TNF- α を加えて培養し成熟樹状細胞に分化させる（詳細は別添の「標準手技」参照）。

現在までの予備的なデータでは、末梢血 10 ml より未熟樹状細胞が健常者で平均 9.0×10^5 個、HIV 感染者で 6.1×10^5 個誘導され、成熟樹状細胞が健常者で平均 7.7×10^5 個、HIV 感染者で 4.9×10^5 個得られた（表 5-5-2）。誘導した未熟および成熟樹状細胞の表面抗原の発現を図 5-5-2 に示すが、CD83、CD86、MHC class I、MHC class II の発現に、健常者と HIV 感染者の間で差を認めなかった。また、成熟樹状細胞の培養上清中の HIV p24 抗原は ELISA 法で検出感度以下であり（3 例、データ省略）、培養の過程で HIV が増殖する可能性は低いと考えられた。

表 5-5-2 末梢血 10 ml から誘導される樹状細胞数

健常者				HIV 感染者			
	MNC	iDC	mDC		MNC	iDC	mDC
donor 1	1.0×10^7	1.9×10^6	1.0×10^6	donor 1	6.0×10^6	4.8×10^5	5.2×10^5
donor 2	7.0×10^6	9.0×10^5	6.0×10^5	donor 2	6.0×10^6	4.8×10^5	6.0×10^5
donor 3	ND	6.0×10^5	4.8×10^5	donor 3	7.8×10^6	1.3×10^6	6.0×10^5
	ND	1.2×10^6	1.0×10^6	donor 4	7.8×10^6	4.8×10^6	2.8×10^5
				donor 5	1.2×10^7	3.2×10^5	4.6×10^5
平均	8.5×10^6	9.0×10^5	7.7×10^5	平均	7.9×10^6	6.1×10^5	4.9×10^5

MNC：単核球数、iDC：未熟樹状細胞数、mDC：成熟樹状細胞数

5-5-3 *in vitro*での HIV 由来ペプチド添加樹状細胞の抗原提示能

HIV 由来ペプチドを添加した樹状細胞が、T 細胞に対する抗原提示能を有するか否かを HIV 感染者において検討した。すでに図 5-4-3 に示したように患者ごとに差は認められるが、Gag28-9、Nef138-10、Env584-11 (いずれも wt) の3つのペプチドは特異的 T 細胞のインターフェロン γ 産生を誘導することが確認された。

5-6 国内外での本臨床研究に関連した研究成果

5-6-1 HIV 感染症に対するワクチン療法

これまで、ペプチドを含め約 30 種類の HIV ワクチンが開発され、約 60 種類の第 I/II 相試験が行われている。第 I 相試験を経て有望視されたワクチンには、canarypox ベクターを利用したもの、不活化 HIV 粒子、遺伝子組み替え Env タンパクの3種類があり、一部は第 III 相試験に入っている。これらはいずれも、健康人において HIV 特異的な液性免疫・細胞性免疫を惹起することが明らかになっている。ペプチドワクチンは免疫誘導能が十分でない場合が多く、多量体にする試みや他のタンパクとの重合体にする工夫がなされている。

一方、樹状細胞を利用した HIV 感染者に対する免疫療法としては、Shapero たちが HLA 適合同胞または自己の末梢血から樹状細胞を精製し、HIV Gag160 およびペプチドを添加したのち HIV 感染者に静脈内投与をする試みを報告している。CD4 数、ウイルス量に変化が見られなかったが、特異的免疫が誘導されたことが示されている (12, 13)。また、Fan らは自己樹状細胞に HIV ペプチドを添加し、*in vitro*の系で HIV 特異的 T リンパ球が活性化されることを示している (14)。

5-6-2 過去に報告された樹状細胞を用いた免疫療法

樹状細胞利用した免疫 (ワクチン) 療法として現在までに報告されているのは、腫瘍特異抗原の明らかな悪性腫瘍を対象としたものがほとんどである。代表的な臨床研究を表 5-6-2 にまとめた。それぞれにおいてある程度の効果が得られているが、共通して言えることは局所反応を除くと重篤な副作用がほとんど認められないことである (15)。全身的な副作用としては、樹状細胞を誘導する際に使用したウシ胎児血清に対するアレルギーでアナフィラキシー反応を起こした報告はあるものの、それ以外は抗核抗体や抗甲状腺抗体などの自己抗体の出現が報告されている程度である (16, 17)。後者の場合も、自己抗体の出現に伴う臓器障害は認められていない。また、東京大学医科学研究所でも悪性黒色腫を対象にした樹状細胞療法を行ってきたが、10 症例に対し同療法を行った範囲では大きな副作用は認めていない。

1 回に投与する樹状細胞数は、 10^6 から 10^8 個とばらつきが大きい (表 5-6-2)。Dhodapkar らは、インフルエンザウイルスの matrix タンパクのペプチドを自己樹状細胞に添加して健常人に皮下注射し、ELISPOT 法でペプチド特異的 T リンパ球を正確に定量したデータを発表している (18)。それによれば、 2×10^6 個の樹状細胞を 1 回皮下注射することにより、有意な T リンパ球の IFN- γ 産生を誘導できることを示している。また、注射部位・投与経路に関しても報告ごとに様々であるが、ラベルした樹状細胞を用いたチンパンジーの実験では、皮下注射した樹状細胞はその多くが 24 時間以内に注射部位から移動し、所属リンパ節に移

行することが示されている (19)。Dhodapkar らのデータとあわせると、 10^6 オーダーの樹状細胞を皮下注射することで添加するペプチドに対する免疫応答が誘導されることが期待される。

表 5-6-2 過去の樹状細胞療法リスト

対象	例数	抗原	接種細胞数	樹状細胞作成法	IL2併用	経路	文献 (年)
リンパ腫	4	イデオタ イブ抗体	$2-32 \times 10^6$	比重遠心法 ¹⁾	無し	IV	20 (1996年)
メラノーマ	16	腫瘍組織 ペプチド	1×10^6	サイトカイン ²⁾	無し	リンパ節内	21 (1998年)
腎癌	4	腫瘍組織	不明	サイトカイン	無し	IV	22 (1999年)
転移性癌	21	CEAペプ チド	$1-10 \times 10^7$	サイトカイン	120万単位 x 4日間	IV	23 (1999年)
メラノーマ	12	ペプチド	$1.5-12 \times 10^6$	サイトカイン	無し	静注+皮下注	24 (1999年)
前立腺癌	31	遺伝子 組換え蛋白	$3-28 \times 10^7$	比重遠心法	無し	静注	25 (2000年)
乳癌	10	ペプチド	6.5×10^6	サイトカイン	無し	LN近くの皮下	26 (2000年)
メラノーマ	10	ペプチド	$3-4 \times 10^6$	サイトカイン	$2 \times 10^6/\text{kg}$ を 3日間	静注	27 (2000年)
メラノーマ	14	ペプチド	$5-50 \times 10^6$	サイトカイン	無し	静注	28 (2000年)
前立腺癌	107	ペプチド	不明	サイトカイン	無し	静注	29 (2000年)
グリオーマ	7	ペプチド	1×10^6	サイトカイン	無し	皮内注	30 (2001年)
メラノーマ	11	ペプチド	$8-12 \times 10^6$	サイトカイン	無し	LN内	31 (2001年)
メラノーマ	16	ペプチド	$6-60 \times 10^7$	サイトカイン	無し	静注	32 (2001年)

¹⁾ 末梢血単核球から比重遠心法で樹状細胞前駆細胞を精製

²⁾ 末梢血単球から GM-CSF、IL4 で未熟樹状細胞を誘導

5-6-3 過去に報告された抗 HIV 療法の計画的中断

1999 年以降、いくつかのグループが抗 HIV 療法を中止する試みを行っている。これまでに報告されている文献の情報を表 5-6-3 にまとめた。文献 34, 36, 39, 41 の成功例 (治療中断後も血中 HIV 量が低いレベルで維持できた症例) は、HIV 感染初期から抗 HIV 療法を開始した症例である。

HAART を中断する際に最も危惧される危険性は、ウイルスの増殖が見られたときに再治療が成功するかという点と、薬剤耐性ウイルスの出現を誘導しないかという点である。前者に関しては、表 5-6-3 に示すように再治療により増殖した HIV はすみやかに検出感度以下にまで低下しており、問題はないようである。薬剤耐性に関しては、2001 年の Conference on Retrovirus and Opportunistic Infection で 1 例の報告が見られている (42)。その原因の一つとして、薬剤の血中半減期が長い efavirenz を含んだ抗 HIV 療法での中断があげられる。efavirenz を含んだ 3 剤併用療法を中断すると、他の 2 剤の細胞内濃度がすみやかに低下するのに対し、efavirenz は 1 週間以上残存する。したがって、ウイル

スの再増殖が短期間で起こる症例では efavirenz の単剤治療の期間が生じ、耐性ウイルスの出現の確率が高まると考えられる。また、efavirenz, nevirapine, lamivudine は 1 塩基置換により高度の耐性を生じるため、治療中断時に耐性が誘導される危険が他の薬剤に比べ高いと考えられる。それ故、抗 HIV 療法を計画的に中断する際には、efavirenz, nevirapine, lamivudine を含まない抗 HIV 療法を施行している症例に限定する必要があると考えられる。

表 5-6-3 過去の抗 HIV 療法の計画的中断

例数	成功例 (%) [*]	失敗例での抗 HIV 療法再開後のウイルス量	抗 HIV 療法中断後の新たな薬剤耐性の誘導	文献 (年)
18	0	全例 UD ^{**}	(記載なし)	33 (2000 年)
12	2 (17)	全例 UD	なし	34 (2000 年)
10	0	全例 UD	なし	35 (2000 年)
8	3 (38)	全例 UD	なし	36 (2000 年)
3	0	全例 UD	(記載なし)	37 (2000 年)
18	0	全例 UD	(記載なし)	38 (2000 年)
9	5 (56)	(記載なし)	なし	39 (2001 年)
10	0	全例 UD	なし	40 (2001 年)
12	2 (17)	全例 UD	(記載なし)	41 (2001 年)
128	判定不能 ^{***}	判定不能 ^{***}	1 例耐性ウイルス出現	42 (2001 年)

*抗 HIV 療法中断後、HIV の急速な増殖が見られなかった症例

**検出感度以下

***2 週間中断、8 週間治療を 4 回繰り返すプロトコールの途中経過

6. 本臨床研究の安全性について

6-1 物質の混入

培養の際に GM-CSF, IL-4, TNF- α が加わるが、これらは生理的発熱物質としても知られている。GM-CSF は米国等の海外では製薬として認可を受けており数多くの投与実績があるが、IL-4, TNF- α は国内ではもちろんのこと海外でも製薬としての認可を受けていない。そのため研究用試薬を *in vitro* で使用することとなる。ただし、培養細胞は3回の洗浄後に皮下注射されることとなる。この際、10 ml の生理食塩水で洗浄した場合、細胞ペレットは 100 μ l 以下であり一回の洗浄で混入物質の濃度は 1/100 以下、3回の洗浄で 1/10⁶ 以下となり、殆ど無視できる濃度と考えられる。実際に洗浄後の上清でサイトカイン濃度を測定したところ、GM-CSF、IL-4、ヒト TNF- α ともに検出感度以下であった（それぞれ 2.0 pg/ml 未満、2.0 pg/ml 未満、4.0 pg/ml 未満：ELISA 法、大塚アッセイ）。

また、本臨床研究で使用するペプチドは Multiple Peptide Synthesis 社が GMP grade で合成したもので、残存有機物（Dichloromethane, Acetonitrile, Isopropyl Alcohol）、エンドトキシンに関して以下の基準を満たしており、臨床使用のための安全性が確保されている。

Dichloromethane < 5 ppm
 Acetonitrile < 20 ppm
 Isopropyl Alcohol < 100 ppm
 エンドトキシン < 0.100 endotoxin unit/mg

6-2 微生物の混入

末梢血単核球は細胞プロセッシング研究部門／輸血部の臨床細胞工学室で処理され、室内が NASA grade 10,000、ブースは NASA grade 1,000、クリーンベンチ内は NASA grade 100 に管理されている。よって細菌・真菌・ウイルス・マイコプラズマの混入する危険は少ないと考えられる。また、皮下注射前に微生物学的検査およびエンドトキシンのチェックを行う。

樹状細胞の培養のためのヒト AB 型血清については、肝炎ウイルス (B, C 型)、HIV、HTLV-1、梅毒の検査で陰性のものを使用する。また、患者由来の HIV、Epstein-Barr ウィルスが *in vitro* の培養で増殖しないことも確認する。

6-3 自己免疫の誘導の可能性

樹状細胞はナイーブ T 細胞を活性化できるため、マウスモデルなどで自己免疫誘導の可能性が指摘されている。ただし、体内では胸腺での positive selection, negative selection を介して自己反応性の T 細胞は取り除かれているはずであり、培養に用いた血清やサイトカイン等への抗体産生の危険を除けば可能性はかなり低いと考えられる。しかし、1998 年度の米国の樹状細胞会議では慢性関節リウマチが発症したという報告があり、慎重に有害事象に有無について観察を行う。

6-4 腫瘍原性

樹状細胞の寿命は *in vitro* のデータから少なくとも1週間程度と考えられ、培養系中に発ガンウイルスである Epstein-Barr ウィルス等の混入がない限り、腫瘍原性はないと考えられる。サイトカインに関しても前述の通り洗浄操作を繰り返すので、腫瘍原性は考えなくてもよいと考えられる。

6-5 細胞数

造血幹細胞移植の場合、細胞として 10^{10} 以上の細胞が経静脈的に投与されるが、副作用としては、骨髄移植の際などに稀に肺塞栓／脂肪塞栓の報告があるのみである。樹状細胞の場合若干細胞の大きさが大型であるが、表 5-6-2 に示したように最大で 2.8×10^8 の細胞が安全に投与されており、 10^7 オーダーの細胞数の投与に問題はなく、また今回は皮下注射法を用いるのでさらに危険は少ないと考えられる。

7 本臨床研究の実施施設の状況

東京大学医科学研究所附属病院では、本臨床研究と同様のものとして、GM-CSFを用いた腎臓癌に対する免疫遺伝子治療と、悪性黒色腫に対する樹状細胞療法を実施している。腎臓癌に対する免疫遺伝子療法は、これまでに4例の患者の治療を終了した。樹状細胞療法は、10例の患者に治療を行い、平成14年1月現在9例が終了、1例が治療続行中である。細胞操作などは、医科学研究所附属病院臨床細胞工学室バイオハザード室内において行っている。本臨床研究も、上記の臨床研究とほぼ同様の細胞操作を行うことになり、当院細胞工学室を使用し細胞の調整、保存を行う予定である。

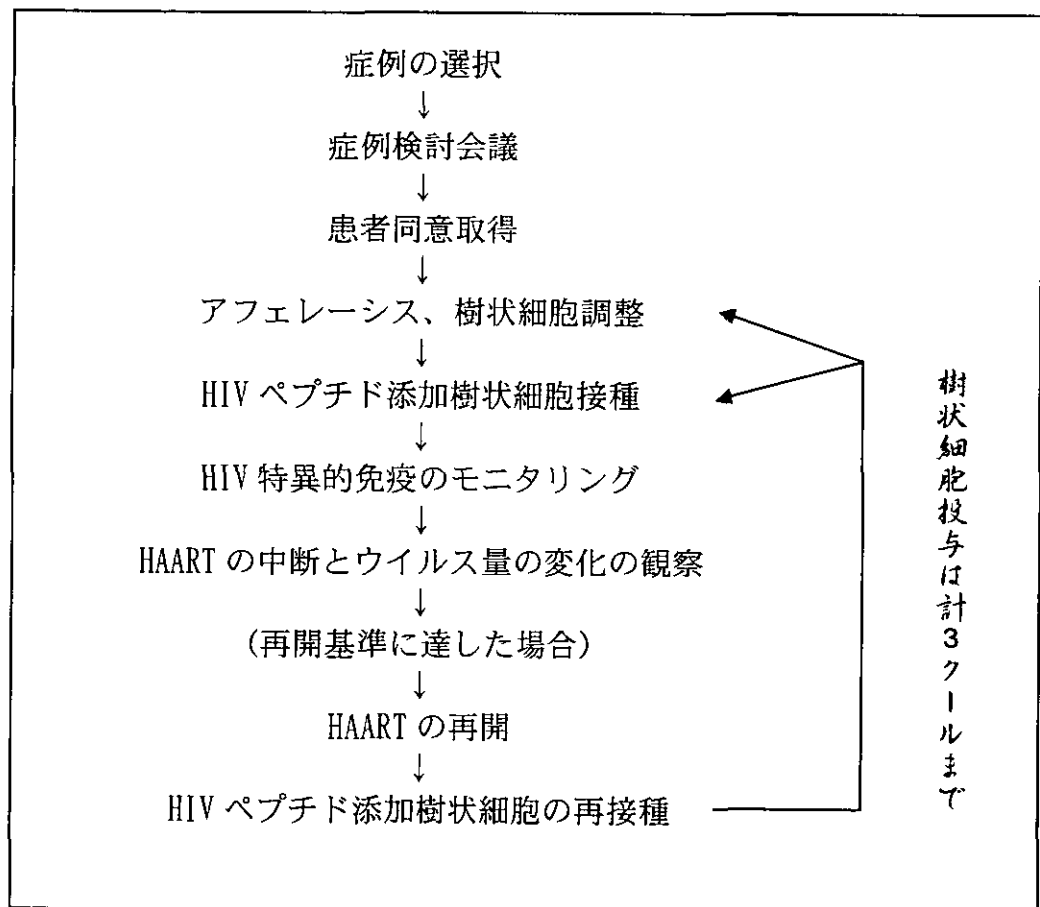
東京大学医科学研究所には遺伝子治療臨床研究審査委員会も設置されており、これまでに腎臓癌に対する遺伝子治療の他にp53遺伝子を用いた肝臓癌に対する遺伝子治療、GM-CSF遺伝子を用いた前立腺癌に対する遺伝子治療の審査も行ってきている。このように倫理に基づいた遺伝子治療の審査経験が十分にある。さらに医科学研究所附属病院では、医療現場での倫理性と公平性を監視し、かつ臨床研究遂行に必要なデータ管理と患者をサポートする、トランスレーショナルリサーチコーディネーターが養成されている。これまでに悪性黒色腫に対する樹状細胞療法と腎臓癌に対する遺伝子治療でその任務を全うし、本臨床研究においても十分な活動をする期待される。

東京大学医科学研究所には基礎・臨床を含めた多くの研究部門が存在し、遺伝子治療、細胞移植を共通のプロジェクトとして基礎並びに臨床医学の研究を全所的に行ってきている。本臨床研究に必要な解析は研究協力者とともに研究所全体で行うことになる。以上の状況をふまえ、本附属病院における本臨床研究の実施は十分可能であると判断される。

8 治療計画

抗 HIV 療法を施行中の HIV 感染者で、ウイルス量が良好にコントロールされている症例に対し、HIV 由来ペプチドを添加した自己樹状細胞を治療ワクチンとして皮下接種し HIV 特異的細胞性免疫を誘導する。その後 HAART を中断し、ウイルス量の変化を観察する。本臨床研究は特別な理由がなければアフエレーシス以外は外来で行う。図 9 にその概略を示す。各ステップごとに症例報告用紙 (CRF) に患者情報などを記載し保管する。

図 8 治療の概要



8-1 症例の選択

担当医師は、候補症例が下記の適応基準を満たし、除外基準に当てはまらないことを確認し総括責任医師に報告する (CRF Form 1)。総括責任医師は、症例検討会議議長に症例検討会議の開催を要請し、候補症例の本臨床研究参加の妥当性について倫理的問題を含めて検討を依頼する。

<適応基準>

- (1) 20 歳から 60 歳までの HIV 感染者で、同意を文書にて取得できる症例

- (2) MHC Class I の遺伝子型が A*2402 である
- (3) Performance status 0~2 (付 1 参照)
- (4) 3 種類以上の抗 HIV 薬が投与されており、複数回の測定で過去 6 ヶ月間の血中 HIV RNA 量が 400 コピー/ml 未満
- (5) CD4 陽性 T リンパ球数が 300/mm³ 以上
- (6) 重篤な臓器障害がなく、以下の条件を満たす
 - a. ヘモグロビン >12 g/dl (男性)、10 g/dl (女性)
 - b. 血清 ALT が正常上限の 5 倍未満
 - c. 血清クレアチニン <2 mg/dl
 - d. アフェレーシスに耐え得る心肺機能を有する
- (7) 活動性の日和見疾患がなく、臨床研究期間中の定期的な通院が見込める

＜除外基準＞

- (1) efavirenz または nevirapine または lamivudine を内服中の患者*
- (2) 妊婦および授乳中の患者
- (3) 試験開始前 4 週間以内に、免疫抑制剤や抗癌剤を使用したものおよびサイトカインなどの免疫賦活療法を受けたもの
- (4) 総括責任医師が不相当と認めたもの

* (1) に該当する場合、HAART 中断の 2 週間以上前にこれを含まない治療メニューに変更すれば除外基準に該当しないものとする。

8-2 症例検討会議

症例検討会議は下記の規約に基づき開催する。候補症例が適応基準を満たし、除外基準に当てはまらないことを確認すると同時に、その他の倫理的問題について協議を行う。候補症例の本臨床研究への参加が承認された場合、症例検討会議議長はその旨を総括責任医師に報告する (CRF Form 81)。

＜症例検討会議の規約＞

- (1) 症例検討会の議長は総括責任医師、分担医師、研究に対する助言者以外の医科研病院の医師とする。
- (2) 会議のメンバーは議長が指名する。メンバーには、総括責任医師、分担医師、研究に対する助言者以外の公平な判断が出来る複数のメンバーを含むものとする。トランスレーショナルリサーチコーディネーターはオブザーバーとして参加する
- (3) 症例検討会はメンバーの 2/3 以上の出席で成立し、適応の決定については出席メンバー全員の賛成が必要である。
- (4) 議長は、症例検討会議後に会議の議事要旨を作成し、総括責任医師に提出する (CRF Form 81)。

8-3 患者同意取得

トランスレーショナルリサーチコーディネーターの同席のもとに、本臨床研究についての説明を説明文書にしたがって行う。患者が署名した同意文書はカルテに保存し、そのコピーと CRF Form 2 を総括責任医師に提出する。同意が得られた段階で、患者登録番号を登録順に 5-1 (予定症例数 5 人中 1 人目の意味)、5-2、5-3、5-4、5-5 の様に割り振る。

8-4 アフェレーシス、樹状細胞調整 (標準手技参照)

アフェレーシスで得た白血球分画から Ficoll-Hypaque 比重遠心法で血小板、顆粒球を除去したのち、プラスチックシャーレに付着する単球を得る。得られた細胞数が 6 回の接種のために十分でない場合は、1 カ月以上の間隔をおいてアフェレーシスを繰り返す。ヒト組換え granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、ヒト組換えインターロイキン 4 (rIL-4) 存在下で培養し、未熟樹状細胞に分化させる (CRF Form 3, 4)。

8-5 HIV ペプチド添加樹状細胞接種

未熟樹状細胞に TNF- α および HIV 由来ペプチドを培養液中に加えて培養し、最終分化した成熟樹状細胞を得る (ver 1.5 以前の実施計画書では 7 種類のペプチドを混合して樹状細胞に添加したが、ver 2.0 以降は別個に添加することに変更した)。HIV ペプチド添加樹状細胞を洗浄したのち、各ペプチドあたり樹状細胞 1.4×10^6 個 (総数で 1.0×10^7 個、これに満たない場合は表面抗原解析に用いる細胞を除いた全量) を 1 ml の日本薬局方生理食塩水に浮遊させ、全量を浅い皮下に接種する。接種は、そ径部近くの大腿内測または腋窩近くの上腕内測のいずれかに 2 週間間隔で計 6 回行う (CRF Form 11, 12)。

8-6 HIV 特異的免疫のモニタリング

ペプチド添加樹状細胞接種前、接種中、接種後 (表 8-11-2 参照) の末梢血単核球を用いて、下記のいずれかの方法で HIV 特異的免疫の推移を検討する (CRF Form 13)。

- (1) 不活化 HIV 粒子刺激による T 細胞のインターフェロン γ 産生を、フローサイトメーターにより検出する。
- (2) 使用ペプチドを用いた ELISPOT アッセイにより、インターフェロン γ 産生 T 細胞を検出する。
- (3) MHC class I テトラマーを用いて、特異的 T 細胞をフローサイトメーターで解析する。

8-7 HAART の中断とウイルス量の変化の観察

最終接種日の 2-8 週後より全ての抗 HIV 薬を同時に中断する。HIV RNA 等の HIV 関連の検査は、樹状細胞接種開始前 0-4 週に 1 回、樹状細胞接種中は 2-4 週に 1 回、HAART 中断後の 8 週間は 1 週ごと、9 週以降は適宜測定間隔を延長する。HAART 中断後、2 年間の観察期間とする (CRF Form 21, 22)。

8-8 HAART の再開

HAART 中断後、下記の HAART 再開の基準のうち少なくとも一つに該当した場合は直ちに HAART を再開する (CRF Form 21、22、31)。

<HAART の再開基準>

- (1) 血中 HIV RNA 量 (RT-PCR 法) が 50,000 copy/ml を越えた場合。
- (2) 血中 HIV RNA 量 (RT-PCR 法) が 3 回続けて 5,000 copy/ml を越えた場合。
- (3) CD4 数が 2 回続けて 200/mm³ 未満となった場合。
- (4) 主治医が再開すべきと判断した場合。

8-9 HIV ペプチド添加樹状細胞の再接種

HAART を再開した症例で、再開後、6ヶ月以上にわたって血中 HIV RNA 量 (RT-PCR 法) が 400 copy/ml 未満を維持した場合は、患者が希望すれば HIV ペプチド添加樹状細胞療法 of 再開の適応とし、初回のクールと同様の手順を取る (図 8)。樹状細胞数が不足する場合は、アフエーシスを行う。ただし、再接種は 6 回の接種を 1クールとした場合、初回のクールと合わせて 3クールを越えないものとする。

8-10 評価方法

6 回の HIV ペプチド添加樹状細胞を接種し HAART を中断できた症例を評価可能症例とする。

8-10-1 観察項目

- (1) 一般的身体所見
- (2) 血液・尿一般検査
白血球数 (分画)、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット、血小板数、AST、ALT、ALP、LDH、 γ GTP、T.Bil、TP、Alb、Cr、UA、Na、K、血糖値、CRP、尿定性・沈査
- (3) HIV 関連の検査
血中 HIV RNA 量 (RT-PCR 法)、CD4 陽性 T リンパ球数、CD8 陽性 T リンパ球数
- (4) 免疫学的検査
ELISPOT、フローサイトメーターなどによる HIV 特異的 T リンパ球数の定量
- (5) 自己抗体検査など
抗核抗体、抗 DNA 抗体、リウマチ因子、TSH
- (6) 有害事象の有無

8-10-2 HIV 特異的ペプチド添加樹状細胞接種中の観察スケジュール

	樹状細胞接種 ¹⁾							接種終了後 2週目
	初回 0週	(-) 1週	2回目 2週	3回目 4週	4回目 6週	5回目 8週	6回目 10週	
一般身体所見	●	●	●	●	●	●	●	●
血液・尿一般検査	●	●		●		●		●
HIV 関連の検査	●			●		●		●
免疫学的検査 ²⁾	●			●		●		●
自己抗体検査など	●							●
有害事象の有無	●	●	●	●	●	●	●	●

¹⁾ 樹状細胞接種直前に観察する

²⁾ 末梢血 20ml を採取し、分離した単核球および血漿を凍結保存する。接種終了 2 週後以降に、まとめて融解し免疫学的解析を行う。

8-10-3 抗 HIV 療法中断中の観察スケジュール

抗 HIV 薬中断後は下記のスケジュールで経過観察し、中断後 2 年間で経過観察終了とする。

	治療中止前	治療中止後 8 週間	治療中止後 8 週～2 年
一般身体所見	●	4 週ごと	4 週ごと*
血液・尿一般検査	●	4 週ごと	4 週ごと*
HIV 関連の検査	●	毎週	2～4 週ごと*
免疫学的検査	●	4 週ごと	3～6 カ月ごと*
有害事象の有無	●	4 週ごと	4 週ごと*

*状態が安定している場合は、適宜延長する

8-10-4 有害事象の観察と樹状細胞接種時期の変更

有害事象の評価は日本癌治療学会薬物有害反応判定基準（1997 年）（付 4 参照）に基づいて行う。grade 3 以上の有害事象が発生した場合は、責任医師の判断で樹状細胞ワクチン接種時期の変更を行うか否かを決定する。

8-11 治験の中止基準

- (1) 重篤な副作用が報告された場合
- (2) 所内治験審査委員会から中止勧告がでた場合
- (3) 総括責任医師が臨床研究の継続を不適切と判断した場合

8-12 重篤な有害事象

次の(1)～(4)に該当する場合は、重篤な有害事象とする。

- (1) 死亡、または死亡につながるおそれのある場合
- (2) 治療のため入院が必要、または入院期間の延長が必要
- (3) 障害、または障害につながるおそれのある場合
- (4) 後世代における先天異常

重篤な有害事象が生じた場合、主治医は直ちに総括責任医師に連絡を取り、総括責任医師は病院長を通して治験審査委員会委員長に報告の義務を負う。臨床研究の中止が決まった場合、総括責任医師は病院長を通して治験審査委員会委員長に報告する (CRF Form 99)。

8-13 実施期間と目標症例数

承認から2年間、5症例(評価可能症例)

9 本臨床研究の評価

9-1 評価項目

9-1-1 安全性評価

有害事象の有無と程度、本臨床研究との関連性について解析を行う。

9-1-2 免疫学的評価

本臨床研究により使用するペプチド特異的な細胞性免疫がどの程度得られたかを、フローサイトメーターおよびELSPOTアッセイを用いて正確に定量化する。

9-1-3 臨床的評価

抗 HIV 療法中断後の血漿中 HIV RNA 量および末梢血中 CD4 陽性 T リンパ球数を定期的に測定する。HIV ペプチド添加樹状細胞接種により賦与された特異的細胞性免疫が、抗 HIV 薬中断後のウイルス増殖をどの程度抑えるかを解析する。

9-2 本臨床研究の完了

本臨床研究の完了は、最終の抗 HIV 薬中断後 2 年間である。

10 症例報告用紙と患者情報の保管

本臨床研究では、症例ごとに症例報告用紙（付2参照）が作成してある。患者が臨床研究の候補者となった段階から臨床研究が終了するまで、各ステップごとに患者情報を症例報告用紙に記載する。記載は重篤な有害事象の報告（CRF Form 99）以外は TRC が行い責任医師が署名したのち、症例ごとにファイルして鍵のかかる場所に厳重に保管する。

1 1 責任・分担医師と研究者の略歴、研究業績

1 1-1 総括責任医師

<岩本 愛吉>

1974年10月	東京大学医学部附属病院分院内科
1974年12月	東京大学医学部附属病院 内科研修医
1977年1月	東京大学医学部附属病院 医員
1979年9月	東京大学医学部附属病院医員
1980年1月	同上 助手
1989年10月	同上 講師
1992年6月	同上 助教授
1994年11月	東京大学医科学研究所 感染症研究部 教授
2000年4月	東京大学医科学研究所 先端医療センター・感染症研究分野に配置換え

1. Watanabe, N., Tomizawa, M., Tachikawa-Kawana, A., Goto, M., Ajisawa, A., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Quantitative and qualitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. *AIDS* 15:711-715, 2001.
2. Shioda, T., Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CC5. *J. Virol.* 75:3462-3468, 2001.
3. Takahashi, T., Hosoya, N., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., and Iwamoto, A. Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J. Clin. Microbiol.* 38:3161-3164, 2000.
4. Nakayama, E. E., Hoshino, Y., Xin, X., Liu, H., Goto, M., Watanabe, M., Taguchi, H., Hitani, A., Kawana-Tachikawa, A., Fukushima, M., Yamada, K., Sugiura, W., Oka, S., Ajisawa, A., Sato, H., Takebe, Y., Nakamura, T., Nagai, Y., Iwamoto, A. and Shioda, T. Polymorphism in the Interleukin-4 Promoter Affects Acquisition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Syncytium-Inducing Phenotype. *J. Virol.* 74: 5452-5459, 2000.
5. Yamada, T. and Iwamoto, A. Comparison of proviral accessory genes between long-term non-progressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch. Virol.* 145: 1021-1027, 2000.

1 1-2 副責任医師

<中村 哲也>