

## 7.2. 対照群の選択を含む治験デザインについての考察

再生不良性貧血に対する同種造血幹細胞移植における最大の問題点は拒絶と GVHD である。本治験は再生不良性貧血に対する同種造血幹細胞移植においてアテムツズマブを用いることによって拒絶と重症 GVHD を許容範囲内の頻度に抑制できるかどうかを評価する多施設共同による第 I/II 相試験であり、主要変数は移植後 60 日以上生存し、60 日以内に生着、かつ grade II 以上の急性 GVHD が発症していない症例の比率とする。副変数として移植前処置関連毒性、感染症発症率、day 365 の全生存率を評価する。

既述のとおり、本治験の対象は同種造血幹細胞以外に根治が期待できないやや重症、重症あるいは最重症の再生不良性貧血患者である。対照群については、本治験の対象となる症例が移植以外の治療法で根治が期待できず、移植を行うとしても従来の GVHD 予防のみではその成績が著しく悪く、標準的な治療法が存在しないこと、またこれまでの国内外の臨床試験成績からアテムツズマブを用いた同種造血幹細胞移植が安全に行えることが考えられるため、同時対照群は設けない。なお、移植前処置療法は、ドナーとの HLA 一致度に応じて、少線量 TBI の有無の 2 つの前処置群に分け、両群を一括して評価する。これは、過去の臨床試験の結果<sup>14</sup>から、ドナーに応じて少線量 TBI の有無を定めることによってほぼ同等の生着率が期待できることと、重症 GVHD の発症に関しては移植前処置の差異が大きな影響を与えないと考えられるからである。

治験のデザインについては、日本人における用量設定の根拠を明確にするため複数用量を用いて推奨用量を決定し、上記主要変数について検討するデザインとした。具体的には、まずコホート法により複数用量（候補となる 3 用量のうち 2 用量）を投与して、その結果を踏まえて CRM の開始用量を決定し、その後の CRM で推奨用量を推定することとした。

主要変数である急性 GVHD の評価対象期間については、造血細胞移植学会のガイドライン<sup>15</sup>では移植後 100 日とされているが、小島らの重症再生不良性貧血に対する非血縁ドナーからの骨髄移植の調査結果<sup>16</sup>では 61 日以降 grade II 以上の急性 GVHD の発症はみられない。また、東京大学での造血器腫瘍を対象としたパイロット試験では 61 日以降にはじめて GVHD が発現した症例はなかったことから、本治験での急性 GVHD の評価対象期間を移植後 60 日までとした。なお、予定外の発症を考慮し、移植後 61～100 日については主要変数とは別に評価する。

本治験での推奨用量における期待成功率、閾値成功率は 7.7.2 に示したとおり、それぞれ 90%、及び 60%とし、 $\alpha=0.05$ 、 $\beta=0.20$  の条件で二項分布に従って症例数を算定すると、必要な有効性評価可能例数は 14 例となる。

東京大学医学部附属病院 血液腫瘍内科・無菌治療部における再生不良性貧血に対する同種造血幹細胞移植症例が年間 1～2 例であることから、予定登録期間を 3 年 9 ヶ月と設定した。

### 7.3. 治験対象母集団の選択

以下の選択基準を全て満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない患者を対象とする。なお、性別は問わないものとする。

#### 7.3.1. 仮登録時患者選択・除外基準

##### 7.3.1.1. 仮登録時患者選択基準

下記の全ての条件を満たす患者を適格とする。

- (1) CSP と ATG の併用あるいは ATG 単独による免疫抑制療法施行後、6 ヶ月以上経過したにもかかわらず、輸血依存性が解消されなかったやや重症、重症又は最重症の後天性再生不良性貧血患者。ただし、HLA 一致血縁ドナーを有する場合は、免疫抑制療法の前治療の有無を問わない。

なお、診断基準は旧厚生省特発性造血障害調査研究班の分類に従う。また、重症度分類は再生不良性貧血の新重症度分類（1998 年度）に従う。

(診断基準)

- 1) 臨床所見として貧血、出血傾向、ときに発熱を呈する
- 2) 末梢血において汎血球減少症を認める  
(成人において赤血球数は男 400 万/ $\mu$ L、女 350 万/ $\mu$ L 未満、白血球数 4000/ $\mu$ L 未満、血小板数 10 万 / $\mu$ L 未満を呈する状態を汎血球減少とする)
- 3) 汎血球減少となる原因疾患を認めない
- 4) その他
  - ・末梢血における相対的リンパ球の増加
  - ・末梢血の網赤血球絶対数が正常よりも増加していない
  - ・骨髓穿刺所見で細胞数が減少、あるいは巨核球の減少とリンパ球比率の増加を認める
  - ・異形成は顕著ではない
  - ・骨髓生検所見で造血細胞の減少

(重症度分類)

・ stage 1 軽症	下記以外の場合
・ stage 2 中等症	少なくとも下記の 2 項目を満たすもの 顆粒球 < 1,000 / $\mu$ L 血小板 < 50,000 / $\mu$ L 網赤血球 < 60,000 / $\mu$ L
・ stage 3 やや重症	少なくとも下記の 2 項目を満たし、かつ定期的な輸血が必要なもの* 顆粒球 < 1,000 / $\mu$ L 血小板 < 50,000 / $\mu$ L 網赤血球 < 60,000 / $\mu$ L
・ stage 4 重症	少なくとも下記の 2 項目を満たすもの 顆粒球 < 500 / $\mu$ L 血小板 < 20,000 / $\mu$ L 網赤血球 < 20,000 / $\mu$ L
・ stage 5 最重症	顆粒球 < 200 / $\mu$ L に加えて、少なくとも下記の 1 項目を満たすもの 血小板 < 20,000 / $\mu$ L 網赤血球 < 20,000 / $\mu$ L

\*定期的な輸血とは毎月 2 単位以上の赤血球輸血が必要なものを指す。

重症度は、仮登録前 28 日以内に輸血の影響が少ないと判断される検査値を用いて評価する。

- (1) HLA 一致血縁ドナー、HLA 一座不一致血縁ドナー、HLA 一致非血縁ドナーあるいは HLA DRB1 一座不一致非血縁ドナーを有する。
- (2) 同意取得時の年齢が 20 歳以上かつ 65 歳以下。
- (3) ECOG performance status 0 又は 1 (別添 2)。
- (4) 以下のすべての主要臓器機能が保持されている。
  - (a) 酸素非投与での動脈血液中酸素飽和度が 94%以上 (非観血的測定でも可)。
  - (b) 血清クレアチニン値が 1.5 mg/dL 以下。
  - (c) 血清総ビリルビン値が 1.5 mg/dL 以下。
  - (d) GOT (AST) 及び GPT (ALT) 値が施設基準値上限の 3 倍以下。
  - (e) 心電図上、治療を要する異常所見がない。
  - (f) 心エコー上、左室駆出率 (ejection fraction) が 55%以上。
- (5) 治験薬投与後、最低 6 ヶ月は有効な避妊方法を使用することに同意している。
- (6) 治験参加について本人から文書での同意が得られている。

#### <設定根拠>

- (1) 同種造血幹細胞移植が適応となる患者とした。
- (2) 造血細胞移植学会のガイドライン及び日本骨髄バンクの成績<sup>17,18</sup>を参考に設定した。
- (3) 患者本人からの同意が取得可能と考えられる年齢を下限とし、移植可能と考えられる年齢を上限とした。
- (4)~(5) 患者の全身状態、臓器予備能等、移植が適切に行えるよう安全性に配慮して設定した。
- (6) 本治験薬のがん原性、変異原性及び生殖発生毒性試験を調べる長期の動物試験は実施していないことから設定した。
- (7) 改正 GCP に基づく倫理的配慮より設定した。

#### 7.3.1.2. 仮登録時患者除外基準

下記のいずれかに該当する患者は除外する。

- (1) インスリンの継続的使用によっても治療困難なコントロール不良の糖尿病を合併。
- (2) コントロール不良な高血圧を合併している。
- (3) コントロール不良な活動性の感染症の現有。
- (4) 骨髄中に 5%以上の腫瘍細胞の現有。
- (5) 骨髄 G-banding 又は FISH 法による 7 番染色体の異常の検出。
- (6) 活動性の重複癌の現有。
- (7) 妊婦、授乳婦又は妊娠している可能性がある女性。
- (8) コントロール不良な精神症状を有し、試験への参加が困難と判断される。
- (9) B 型肝炎ウイルス抗原 (HBsAg) が陽性。

- (10) HIV 抗体が陽性。
- (11) 移植前処置薬（リン酸フルダラビン、シクロホスファミド）、GVHD 予防薬（シクロスポリン、メトトレキサート）に過敏症の既往を有する患者。
- (12) 造血幹細胞移植の既往。

#### <設定根拠>

- (1)～(2)、(11) 移植が適切に行えるよう安全性を配慮して設定した。
- (3) 治験薬の免疫抑制作用のため、米国において活動性の感染症が禁忌となっていること、及び移植後の感染症のコントロールが移植の成否の鍵であり、感染症対策の支障になるため設定した。
- (4) 骨髄異形成症候群を除外するために設定した。
- (5) 染色体異常を有する再生不良性貧血の予後は、染色体異常のない再生不良性貧血の予後と同等と考えられるが、7番染色体の異常を有する場合は予後が異なるため。
- (6) 造血幹細胞移植を行っても長期生存が期待できないため設定した。
- (7) 治験薬の生殖発生毒性試験及び乳汁への移行について検討されていないことから設定した。
- (8) 同意の取得及び臨床症状の評価が可能な患者を対象とした。
- (9)～(10) 移植に伴う高度の免疫抑制状態により潜在ウイルスが活性化することを考慮して設定した。
- (12) 造血幹細胞移植の既往を有する症例においては移植前処置に伴う毒性が重症化し、本治験の主要変数である生着や GVHD を評価できない可能性が高いため設定した。

### 7.3.2. 仮登録時ドナー選択・除外基準

#### 7.3.2.1. 仮登録時ドナー選択基準

下記の全ての条件を満たすドナーを適格とする。  
HLA 検査については下記に従う。

血縁ドナーの HLA 検査は HLA-A/B 座については血清学的検査、DR 座については血清学的検査あるいは DRB1 座の遺伝子検査を行う。日本人において血清学的検査で一致していても遺伝子型検査での不一致が高頻度に認められる HLA 血清型(HLA-A2、HLA-DR4 など)については遺伝子型検査を行うが、血縁者の HLA 型の検索によって一致していることが確認された場合には遺伝子型検査は不要である。

非血縁ドナーの HLA 検査は HLA-A/B 座の血清学的検査に加えて、DRB1 の HLA-DRB1 の遺伝子型検査が日本骨髄バンクでルーチンに行われている。HLA の A/B 座の遺伝子型検査については、日本人において血清学的検査で一致していても遺伝子型検査での不一致が高頻度に認められる HLA 血清型のみ(HLA-A2、A26 など)についてのみ検査を行う。

これらの検査を行った上で、不一致が認められた場合は、それが血清学的検査であるか遺伝子検査であるかにかかわらず、不一致座としてカウントする。

- (1) (a)～(b)のいずれかの条件を満たす。

- (a) 患者と二親等以内(患者とドナーが親子関係あるいは兄弟姉妹関係にある。孫、祖父母は除く)の同意取得時の年齢が 12 歳以上 65 歳以下の血縁者であり、HLA 不一致座が一座以下である(虎の門病院では、20 歳以上 65 歳以下の血縁者であり、HLA 不一致座が一座以下)。
  - (b) 日本骨髄バンクを介してコーディネートされている非血縁ドナーであり、HLA 不一致座が 0 座あるいは HLA DRB1 一座不一致である。
- (2) 血縁ドナーの場合、ECOG performance status 0 (別添 2)。非血縁ドナーの場合は、採取施設での健康診断で採取可能と判定された者
- (3) 血縁ドナーの場合、(a)～(e)に該当する十分な心・肺・腎・肝機能を有する者。非血縁ドナーの場合は、採取施設での健康診断で採取可能と判定された者
- (a) 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。
  - (b) 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 1.5 mg/dL 以下の者。
  - (c) 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 94% (非観血的測定でも可) 以上の者。
  - (d) 呼吸機能検査で%VC $\geq$ 70%かつ FEV1.0% $\geq$ 70%の者。
  - (e) 血清 GOT (AST) 及び血清 GPT (ALT) が施設基準値上限の 2 倍未満の者。
- (4) 血縁ドナーの場合、(a)～(c)に該当する十分な造血能を有する者。非血縁ドナーの場合は、採取施設での健康診断で採取可能と判定された者。
- (a) 白血球数が 3,000/ $\mu$ L 以上の者。
  - (b) 血小板数が 13 万/ $\mu$ L 以上の者。
  - (c) ヘモグロビン濃度が 13.0 g/dL 以上の男性、又は 12.0 g/dL 以上の女性。
- (5) 本治験参加に対する同意が本人から文書により得られている者。ただし、ドナーが未成年者の場合又は同意能力を欠く場合には、その代諾者から文書による同意が得られていることとするが、ドナー本人からも可能な限り同意を得ることとする。  
非血縁ドナーの場合は日本骨髄バンクを介して行われる最終同意面談で同意が得られた者。

#### <設定根拠>

- (1) 日本造血細胞移植学会「同種末梢血幹細胞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」の年齢基準 10 歳以上 65 歳以下のうち、本治験の目的及び概要を理解可能な年齢を設定した。また、本治験で検討するドナーの HLA 型の範囲を示した。
- (2)～(4) 一般状態、造血能に問題がなく、全身麻酔下で骨髄を採取することを考慮して具体的項目を設定した。
- (5) 全身麻酔下骨髄採取の必要性と危険性について理解の上、参加の意思を確認するため設定した。

### 7.3.2.2. 仮登録時ドナー除外基準

下記のいずれかに該当するドナーは除外する。

- (1) 静脈血栓症、動脈硬化性疾患の現有及び既往のある者。
- (2) 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。
- (3) 悪性腫瘍の現有及び既往のある者。
- (4) 薬物治療を必要とする高血圧、糖尿病を現有する者。
- (5) 重篤な薬剤アレルギーの既往のある者。
- (6) 悪性高熱の家族歴あるいは既往のある者。
- (7) 妊婦、授乳婦又は妊娠している可能性がある女性。
- (8) 治験参加に対する同意に影響を及ぼす精神的疾患、薬物依存のある者。
- (9) HBs 抗原、HIV 抗体のいずれかが陽性の者。
- (10) その他、治験責任／分担医師が不相当と判断した者。

#### <設定根拠>

- (1)～(7) 骨髄採取の適格性に抵触する項目を設定した。
- (8) 同意の取得及び臨床症状の評価に支障のある可能性が考えられるドナーを除外するため設定した。
- (9) 患者への感染を避けるため設定した。

### 7.3.3. 本登録時患者選択基準

下記の全ての条件を満たす患者を適格とする。

- (1) 本治験の参加の同意の撤回がない。
- (2) 以下のすべての主要臓器機能が保持されている。
  - (a) 酸素非投与での動脈血液中酸素飽和度が 94%以上（非観血的測定でも可）。
  - (b) 血清クレアチニン値が 1.5 mg/dL 以下。  
クレアチニン・クリアランス値が 30mL/min/m<sup>2</sup> 以上。
  - (c) 血清総ビリルビン値が 1.5 mg/dL 以下。
  - (d) GOT (AST) 及び GPT (ALT) 値が施設基準値上限の 3 倍以下。

#### <設定根拠>

- (1)、(2) 仮登録時から同意に変更のないこと、及び移植が適切に行える臓器予備能があるか、再度確認するため設定した。

### 7.3.4. 患者の治療又は評価の打ち切り

#### 7.3.4.1. 患者毎の中止

治験期間中に下記のような事例が発生した場合には、治験薬の投与を中止し、その時点で可能な限り、規定の検査及び調査を行った上で、評価結果とともに中止日、中止理由を症例報告書に記載する。中止日は、治験責任医師が中止を決定又は確認した日とする。

なお、中止時に副作用が発現している場合には回復するまで可能な限り追跡調査を行う。ただし、追跡調査は治験責任医師又は治験分担医師が医学的に問題ないと判断するか、原疾患の進行等により回復を判定するのが困難と判断するまでの期間とする。

また、day180、365 に、以下の転帰調査を実施する。

- ・生存の有無（死亡の場合、可能な限り死因）
- ・原疾患再発の有無
- ・二次性生着不全の有無

被験者が途中で来院しなくなった場合は、その後の経過について電話などにより確認し、症例報告書に記入する。

- (1) ドナーからの骨髄採取細胞数が本登録時患者体重 1kg 当たり  $1 \times 10^8$  個未満であった場合
- (2) 有害事象により治験薬の投与が継続できない場合  
NCI-CTC で grade IV の重篤な有害事象(血液毒性を除く)などで、治験責任医師の医学的判断により、本治験の継続が困難と判断された場合
- (3) 不生着、二次性生着不全時
- (4) day60 以内にプロトコール治療が継続できない場合(具体的には、免疫抑制剤の急激な減量が必要な場合、DLI、再移植などを施行した場合)
- (5) 治験中の死亡
- (6) 重大な治験実施計画書違反が認められた場合（登録後の診断変更などにより不適格性が判明した場合など）
- (7) 被験者が治験の中止を申し出た場合

##### 7.3.4.1.1. 治験中止時の検査

可能な限り、以下の検査を実施する。

- ◆ 身体所見： ECOG performance status
- ◆ 末梢血算： 白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、血小板数、白血球分画 (%)、網状赤血球数 (‰)
- ◆ 血液生化学等：総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、ALP、GOT (AST)、GPT (ALT)、LDH、BUN、クレアチニン、電解質 (Na、K、Cl、Ca)、 $\gamma$ -GTP、CRP
- ◆ 抗アレムツズマブ抗体
- ◆ 骨髄検査：有核細胞数、巨核球数（造血機能の評価）
- ◆ 心エコー（day30 に測定されている場合は、検査不要）
- ◆ キメラ解析

- ◆ 免疫機能
- ◆ 血中薬物濃度

#### 7.3.4.1.2. 治験中止後の治療

- (1) 不生着、二次性生着不全時の対応は治験責任／分担医師の判断にまかせる。
- (2) 「7.4.1.1.4. 急性 GVHD 予防及び治療」に記載した急性 GVHD の初期治療に不応性の場合の救療方法は規定せず、治験責任／分担医師の方法に委ねる。

#### 7.3.4.2. 治験全体の中止

#### 7.3.4.3. 治験全体の中止基準

治験調整委員会は、コホート法での CRM 開始用量を決定することができない場合、CRM において次ステップの用量が決められない場合、あるいはプロトコル治療が継続できない有害事象等、治験中に得られた安全性データについて必要に応じて、効果・安全性評価委員会に本治験の継続、変更あるいは中止を諮問することとする。

#### 7.3.4.4. 効果・安全性評価委員会による審査と治験の中止又は変更

治験調整委員会の諮問に基づき、効果・安全性評価委員会は審査を行い、治験調整委員会に治験の継続、中止又は変更を勧告する。効果・安全性評価委員会より治験の全部又は一部について中止又は変更の勧告がなされた場合、治験調整委員会は勧告内容を検討し、治験の中止又は一部の変更を行うか否かを決定する。

なお、治験全体を中止又は一部変更を行う場合は治験責任医師は速やかに、医療機関の長並びに治験薬提供者に文書で通知する。



## 7.4. 投与方法(治療法)

### 7.4.1. 投与方法(治療法)

#### 7.4.1.1. プロトコール治療

本治験におけるプロトコール治療とは、以下に示す移植前処置、ドナーからの骨髄採取、骨髄液の輸注、GVHD 予防及び治療、及び生着までの G-CSF 投与と定義する。

移植前処置は、HLA 一致血縁者からの移植においてはリン酸フルダラビン、シクロホスファミド、アレムツズマブの併用、HLA 一座不一致の血縁者、HLA 一致の非血縁者あるいは HLA DRB1 一座不一致非血縁者からの移植についてはリン酸フルダラビン、シクロホスファミド、少線量 TBI、アレムツズマブの併用で行う。

- ①移植前処置 (7.4.1.1.1.)
- ②ドナーからの骨髄採取 (7.4.1.1.2.)
- ③骨髄液の輸注 (7.4.1.1.3.)
- ④急性 GVHD 予防及び治療 (7.4.1.1.4.)
- ⑤生着までの G-CSF 投与 (7.4.1.1.5.)

原則として移植前処置から移植片の生着までは入院とする。その後は患者の全身状態により外来治療も許容する。

##### 7.4.1.1.1. 移植前処置

本登録後 14 日以内に以下のレジメンによる前処置療法を開始する。なお、アレムツズマブの用量については以下に従い、0.16、0.2 あるいは 0.25 mg/kg のいずれかを投与する。

移植前処置薬の投与時刻を逸脱した場合は、その逸脱分を考慮して血中濃度測定 of 採血時刻を調整する。

day -10~-5	アレムツズマブ 0.16、0.2 mg/kg あるいは 0.25 mg/kg +生理食塩水 100 mL	10:30-14:30 4 時間点滴静注
day -6~-3	リン酸フルダラビン 30 mg/m <sup>2</sup> + 生理食塩水 100 mL	15:00-15:30 30 分点滴静注
day -6~-3	シクロホスファミド 25 mg/kg	15:30-18:30 3 時間点滴静注
day -1	(HLA 一座不一致の血縁者、HLA 一致の非血縁者あるいは HLA DRB1 一座不一致非血縁者からの移植の場合のみ) 全身放射線照射 2 Gy 1 回照射/日	

			-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
アレムツズマブ <sup>1)</sup>			↓	↓	↓	↓	↓	↓					
リン酸フルダラビン	30	mg/m <sup>2</sup> /day					↓	↓	↓	↓			
シクロホスファミド	25	mg/kg/day					↓	↓	↓	↓			
全身放射線照射 <sup>2)</sup>	2	Gy/day										↓	
幹細胞移植													◎

<sup>1)</sup>: 投与量は、0.16、0.2 mg/kg、あるいは 0.25 mg/kg/day

<sup>2)</sup>: HLA 一座不一致の血縁者、HLA 一致の非血縁者あるいは HLA DRB1 一座不一致非血縁者からの移植の場合のみ

薬剤の投与量は、本登録時の身長・体重から別添 9 に従って算定される体重、及び別添 8 に従って求める体表面積に従って計算する。

➤ 計算に用いるための体重及び体表面積算出

(a) 本登録時の身長、体重を用いて標準体重を算出する。

$$(\text{標準体重}) = (\text{身長} - 100) \times 0.9$$

(身長、標準体重は、小数点以下を四捨五入して整数を代入する。)

(b-1) 実体重が標準体重を下回る場合は、実体重を用いる。

(b-2) 実体重が標準体重を上回る場合は、以下の計算において下記の計算式で得られた体重を用いる。

$$(\text{計算に用いる体重}) = (\text{標準体重}) + (\text{実体重} - \text{標準体重}) / 3$$

(標準体重、実体重、計算に用いる体重は小数点以下を四捨五入して整数にする。)

(C) (b-1)あるいは(b-2)で得られた体重を用いて、付表 6 の体表面積表から体表面積を算出する。

(a) アレムツズマブ

アレムツズマブは、本登録確認通知に記載された用量を day-10 から day-5 までの 6 日間投与する。

アレムツズマブ 1 バイアル 30mg/mL から 1ml シリンジで必要量を正確に抜き取り、生理食塩水 100mL に希釈する。その際、激しく振ってはならず、ゆっくりと転倒混和する。沈殿物が見える場合や着色している場合は投与してはならない。希釈後は 8 時間以内に投与しなくてはならない。

前投薬としてコハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム(例：ソル・メドロール®)1 mg/kg とマレイン酸クロロフェニラミン 10 mg/body を投与する。またアセトアミノフェン(例：ピリナジン®)0.4~0.5 g を経口投与する。

アレムツズマブは遮光バッグをかぶせて点滴静注する。同じラインからは同時に他の薬剤は投与しない。

投与初日は安全性確認のため、まず 3mg 分を生理食塩水 100mL に希釈して、10:30-12:30 に 2 時間かけて投与する。問題がなければ、残りの投与量を生理食塩水 100mL に希釈して 12:30-14:30 の 2 時間かけて投与する。例えば、アレムツズマブの 1 日投与量が 12mg であれば、1 本目の生理食塩水 100mL には 3mg、2 本目の生理食塩水 100mL には 9mg を希釈しておき、各々を 2 時間かけて投与する。

2 回目以降のアレムツズマブの投与時は全量を 4 時間かけて点滴静注する。

アナフィラキシー様の反応が出現した場合には一旦点滴静注を中止し、リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム(例：ハイドロコートン®) 200 mg あるいはコハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム(例：ソル・コーテフ®) 200 mg を静注する。反応が落ち着いてからアレムツズマブを再開する。発熱および軽度の皮疹のみの場合はそのまま投与を継続しても構わない。

(b) リン酸フルダラビン

リン酸フルダラビンは 30 mg/m<sup>2</sup>/day を、day -6 から day -3 までの 4 日間投与する。

1 バイアルに対して 2.5 mL の注射用水で溶解した後 (20 mg/mL)、体表面積より計算した必要量を取り、生理食塩水 100 mL に希釈し、15:00-15:30 に 30 分かけて点滴静注する。

ただし、腎機能が低下している患者 (対表面積あたりのクレアチニン・クリアランスが 20 ~47 mL/min/m<sup>2</sup>) では、腎機能の低下に応じて、以下に示す式により投与量を減量して、安全性を確認しながら慎重に投与する。

➤ 体表面積あたりのクレアチニン・クリアランスの算出。

- (a) クレアチニン・クリアランスを Ccr、患者体表面積を Bsa、施設で Ccr の標準化のために用いられている体表面積を Ssa とする。
- (b-1) クレアチニン・クリアランスを治験責任/分担医師が計算する場合  
(体表面積あたりの Ccr[mL/min/m<sup>2</sup>]) = (尿中 cre[mg/dL] × 尿量[mL]) / (血清 cre[mg/dL] × Bsa[m<sup>2</sup>] × 1440)
- (b-2) クレアチニン・クリアランス値が返却される場合  
(体表面積あたりの Ccr[mL/min/m<sup>2</sup>]) = (施設標準体表面積で補正された Ccr[mL/min/m<sup>2</sup>]) / Ssa[m<sup>2</sup>]

➤ 腎機能が低下している患者への 1 日投与量

1 日投与量 (mg/m<sup>2</sup>/day) = 30 × (0.4+0.01 × 体表面積あたりの Ccr) × (体表面積)  
CLcr (mL/min/m<sup>2</sup>) : 体表面積あたりの Ccr

Ccr (mL/min/m<sup>2</sup>) = (Ucr × Uv) / { (Scr × BSA) × 1,440 }

Ucr = 尿中クレアチニン濃度

Uv = 尿量

Scr = 血清クレアチニン濃度

BSA = 患者の体表面積

[施設での Ccr (mL/min) が標準体表面積 1.48 m<sup>2</sup> で算出されている場合は 1.48 で、1.73 m<sup>2</sup> で算出されている場合は 1.73 で割ることにより、Ccr (mL/min/m<sup>2</sup>) が求められる]

(c) シクロホスファミド

シクロホスファミドは 25 mg/kg/day を、day -6 から day -3 までの 4 日間投与する。

シクロホスファミド 500 mg あたり 25 mL の生理食塩水で溶解した後、生理食塩水 500 mL に希釈し、15:30-18:30 に 3 時間かけて点滴静注する。シクロホスファミド投与期間は 1 日尿量 2 L を目安に輸液を行い、メスナ 400 mg を生理食塩水 50 mL に希釈し、シクロホスファミド投与開始時及び 4 時間後、8 時間後の合計 3 回 30 分で点滴静注する。

水分バランスをモニターしながら適宜利尿剤を投与する。

(d) 全身放射線照射

HLA 一座不一致の血縁者、HLA 一致の非血縁者あるいは HLA DRB1 一座不一致非血縁者からの移植の場合のみ、1 回 2Gy、1 日 1 回の全身放射線照射を移植前日に行う<sup>6</sup>。肺の遮蔽は行わない。

(e) 薬剤投与量、放射線照射量設定の根拠

シクロホスファミドと全身放射線照射については、一般的に行われている移植前処置の投与量を採用した。アレムツズマブについては再生不良性貧血が移植後の拒絶の頻度が高いため、パイロット試験での HLA 二座あるいは三座不一致の移植時と同じ投与量とした。

#### 7.4.1.1.2. ドナーからの骨髄採取

移植日当日に全身麻酔下にてドナー腸骨稜から骨髄液を採取する。採取の目標細胞数は有核細胞数でドナー体重 1 kg 当たり、 $3.0 \times 10^8$  個とする。目標細胞数の  $3.0 \times 10^8$  個に到達していなくても、 $1.0 \times 10^8$  個以上採取できた場合にはプロトコールどおり移植を行う。ABO 型の不一致がある場合には施設の方針に従って赤血球除去、血漿除去などの処理を行う。

最終的な有核細胞量が患者体重 1 kg あたり、 $1.0 \times 10^8$  個未満の場合には本登録後の不適格症例とし、その後の対応は各施設の判断に委ねる。

#### 7.4.1.1.3. 骨髄液の輸注

移植前処置開始前に末梢ラインあるいは中心静脈ラインを確保する。採取した骨髄液を、末梢ラインあるいは中心静脈ラインから患者に輸注する。

#### 7.4.1.1.4. 急性 GVHD 予防及び治療

免疫抑制剤は以下の方法に従う。

day -1~	シクロスポリン 3 mg/kg/day	24 時間持続点滴静注
day 1	メトトレキサート 10 mg/m <sup>2</sup> /day	30 分点滴静注あるいは緩徐静注
day 3, 6	メトトレキサート 7 mg/m <sup>2</sup> /day	30 分点滴静注あるいは緩徐静注

##### (1) シクロスポリン

- (a) シクロスポリン (CSP) 3 mg/kg/day の 24 時間持続点滴静注を day -1 より開始する。初回投与時に Cr 1.5 mg/dL 以上の腎障害を有する症例においても同用量より開始し、血中濃度をみて調節する。  
静注を経口投与へ変更する場合は、静脈内投与量の 2 倍量のネオール®を 2 分割で 12 時間おきに経口投与する。経口投与を静注にする場合は逆に経口投与量の半量を持続点滴静注する。CSP の投与量は血中濃度に合わせて調節する。血中濃度のモニターは、入院中は週 1~2 回、外来へ移行後は 2 週に 1~2 回を目安にする。
- (b) 静注の CSP 投与量は血中濃度を 250~350 ng/mL に保つように調節する。(別添 7)
- (c) 経口の CSP 投与量は血中濃度を 150~250 ng/mL (トラフ値) に保つよう調節する。
- (d) 原則として day 100 までは CSP の減量を開始しない。Day 100 を過ぎた時点で GVHD の症状がなければ CSP は day 100 時点の投与量の 5%ずつを目安に 1 週間ごとに減量し適宜終了とする。急速減量を行わない。減量中に GVHD が出現した場合には (e)、(f) の対応に従う。
- (e) grade I の急性 GVHD 出現時は、原則として免疫抑制剤を維持量とし経過観察とする。
- (f) grade II 以上の急性 GVHD が出現した際には、7.4.1.1.4. (3)、(4)に従い治療を行う。
- (g) 腎障害等の毒性出現時の対応は各施設の判断に委ねる。CSP 投与継続困難な毒性が生じた場合は適宜他剤 (プレドニゾロン 0.5~1 mg/kg/day など) に切り替え GVHD 予防を実施する。

##### (2) メトトレキサート

メトトレキサートはシアトルの短期メトトレキサートの原法<sup>19</sup>を減量し、移植 day 1 に 10 mg/m<sup>2</sup>、移植 day 3, 6 に 7 mg/m<sup>2</sup>を投与する。口内炎などの症状があっても、メトトレキサートは極力プロトコールとおりに投与する。ただし、気道閉塞を来すような口内炎が出現した場合や、高度の肝障害を認める場合には治験責任/分担医師の判断で減量を行う。また、腎機能低下時には減量が必要となる。減量の明確な基準はないが、一例として 7.4.1.1.1 (b) に従って体表面積あたりのクレアチニン・クリアランス Ccr (mL/min/m<sup>2</sup>)を算出し、30 mL/min/m<sup>2</sup>未満の場合にはメトトレキサートを半量に減量することを推奨する。

##### (3) 急性 GVHD の治療開始規準

Grade II 以上の急性 GVHD を治療対象と規定する。

##### (4) 急性 GVHD の治療

シクロスポリンの減量中又は中止後に生じた場合には、シクロスポリンを減量開始前の投

与量まで増量又は再開する。GVHD 所見改善後の減量速度は各施設の方針に従う。増量の効果が不十分な場合、又は、シクロスポリンの毒性のために投与困難な場合は、メチルプレドニゾロン (mPSL) 1 日量 1~2 mg/kg を、1~2 回/日、点滴静注若しくは経口投与を開始し、最大 14 日間継続して漸減する。減量速度は各施設の方針に従う。初期治療にも関わらず増悪した症例に対してはそれまでの初期治療を中止し、救援療法に移行する。救援療法の内容は規定せず、各施設の方法に委ねるが、アテムツズマブの再投与は行わない。

#### 7.4.1.1.5. 生着までの G-CSF 投与

G-CSF (フィルグラスチム 300  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{day}$ ; グラン®(最も近いバイアルサイズに丸めて良い。但し、実投与量は、計算量の $\pm 10\%$ 以内とする。)) を予防的に移植後 day 7 から 1 日 1 回点滴投与する(急速静注は行わない)。G-CSF は好中球の別項に定める生着時までを目安に投与する。ただし、重症感染症などに対して治療的に用いる場合の投与量、投与時期、投与経路などは治験責任/分担医師の判断によることとし、特に規定しない。G-CSF 以外の増殖因子(ミリモスチム、エポエチンアルファ、エポエチンベータなど)の投与は原則として行わない。

なお、G-CSF 投与中のショック、間質性肺炎、急性呼吸窮迫症候群などの重篤な副作用や生着時にみられる capillary leak syndrome の発生に十分留意し、これらの症状がみられた場合には直ちに G-CSF の投与を中止し、ステロイド剤の投与など適切な処置を速やかに実施する。

#### 7.4.1.2. キメラ形成の検索と対処法

混合キメラ形成が認められた場合は移植片拒絶に注意をしなければならない。キメラ解析検査 (STR 解析) を定期的に施行する。移植前にドナーの末梢血およびレシピエント(患者)の末梢血を用いて解析対象とすべき遺伝子部位を決定する。移植後は day 30 $\pm$ 7、day 60 $\pm$ 7、day 90 $\pm$ 7、day 180 $\pm$ 15、day 365 $\pm$ 15 に各 1 回施行する。ドナー・レシピエント細胞比は T 細胞分画で検討する。株式会社ファルコバイオシステムズに検体を提出する。

これらの検査で day 60 $\pm$ 7 以降にレシピエントの細胞を 10% 以上認めた場合は免疫抑制剤の減量を検討する。GVHD の症状がない場合には 4 週間で免疫抑制剤を漸減・中止する。免疫抑制剤減量中にグレード II 以上の GVHD が出現した場合には、減量を中止し GVHD の治療を適宜開始する。グレード I の GVHD 出現時には、免疫抑制剤を同量で継続する。

#### 7.4.1.3. プロトコール治療中止、治療変更規準

移植前治療で用いる薬剤の投与量や放射線照射量の変更は原則として行わない。プロトコール治療の中止、治療変更の基準は、7.3.4.1 に従う。治療変更に関する相談がある場合は、治験調整委員会のプロトコール委員に問い合わせる。

プロトコール委員 (代表)

(連絡先)

神田善伸

東京大学医学部附属病院 血液腫瘍内科

〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1

TEL: 03-3815-5411 内線: 35602

FAX: 03-5804-6261

E-mail: ycanda-ky@umin.ac.jp

## 7.4.2. 治験薬の同定

### 7.4.2.1. 使用薬剤

本治験に対しては、日本シエーリング株式会社から治験薬であるアレムツズマブが無償供与される。治験薬は治験薬中央管理者である国家公務員共済組合連合会虎の門病院 薬剤部 林 昌洋が保管し、仮登録終了後、症例ごとに各施設に配布される。

表 1 治験薬の識別番号、物理化学的性質等

識別番号	SH L03520B
一般名	alemtuzumab (INN)
特性	ヒト化モノクローナル抗体
剤型	液剤
含量	30 mg (バイアル)
濃度	30 mg/mL
PH	6.8~7.4
保存条件	遮光にて凍結を避け、2~8℃（希釈後に直ちに使用しない場合は、遮光の上、室温にて保存し、8時間以内に使用する）

アレムツズマブ (alemtuzumab) はリンパ球などの細胞の表面に存在する CD52 に対するモノクローナル抗体で、Chinese hamster ovary の細胞株を用いて作製されている。米国では B 細胞性慢性リンパ性白血病に対する治療薬として認可されているが本邦では未承認薬である。移植前処置として 20 mg を 5 日間連続投与した場合、終末相半減期は約 8 日であり、最終投与後 60 日間にわたって in vitro でリンパ球をオプソニン化する濃度である 0.1 μg/mL 以上の濃度を維持すると考えられている<sup>20</sup>。

### 7.4.2.2. 治験薬の表示

治験薬の被包に次に掲げる事項を記載する。

治験用である旨  
治験調整委員会（委員長）の氏名及び職名並びに住所  
化学名又は識別記号  
製造番号又は製造記号  
貯蔵方法、有効期間

### 7.4.2.3. 治験薬の包装

SH L03520B 1 mL バイアル 7 瓶（予備 1 瓶を含む）を 1 症例分として箱に納め、配布用とする。

### 7.4.2.4. 主な有害事象

本剤の主な毒性は血液毒性（汎血球減少症、骨髄形成不全など）、並びに免疫抑制に起因する日和見感染症である。また、投与時の注入関連事象として悪寒、発熱、嘔気・嘔吐、疲労、低血圧、息

切れ、気管支痙攣、皮疹などなどが報告されている<sup>21</sup>。

#### 7.4.2.5. 禁忌

活動性の全身性感染、潜在性の免疫不全（例えば、HIV 血清陽性）、あるいはアテムツズマブやその構成成分に対する既知の I 型過敏症あるいはアナフィラキシー反応を示す患者には投与しない。

#### 7.4.2.6. 併用薬剤

##### 7.4.2.6.1. リン酸フルダラビン(前処置療法)

本治験に対しては、日本シエーリング株式会社からリン酸フルダラビンが無償供与される。リン酸フルダラビンは、仮登録終了後、日本シエーリング株式会社より症例ごとに各施設に配布する。

##### (1) 薬剤の特徴

リン酸フルダラビン(fludarabine phosphate、フルダラ®)は adenosine deaminase 耐性の purine nucleoside 誘導体である。投与後細胞内へ取りこまれ、活性体で 2F-ara-ATP に代謝され、ribonucleotide reductase と DNA polymerase を抑制することによって DNA 合成を阻害する。本剤は静注後速やかに 2F-ara-A に代謝される。血漿中 2F-ara-A 濃度は、半減期 0.6-0.8 時間及び 11-20 時間の二相性で消失し、代謝産物は主に尿中に 2F-ara-A として排泄される<sup>22</sup>。本邦では貧血又は血小板減少症を伴う慢性リンパ性白血病<sup>23</sup>を適応として承認されている。

成分：リン酸フルダラビン (fludarabine phosphate)

含量：1 バイアル中にリン酸フルダラビン 50 mg を含有。

剤型：バイアル(凍結乾燥製剤)

保存条件：室温保存。防腐剤無添加。溶解後は 8 時間以内に使用する。

##### (2) 主な有害事象

本薬剤の主な毒性は血液毒性（好中球及び血小板減少）、並びに免疫抑制に起因する日和見感染症である<sup>22</sup>。また、間質性肺炎<sup>24</sup>、精神神経障害、自己免疫性溶血性貧血、消化管出血、出血性膀胱炎、皮膚障害、心不全などが重大な副作用として報告されている。その他、悪心・嘔吐、発熱、疲労、脱力感、呼吸困難、不整脈、肝・腎機能障害などが報告されている。

##### (3) 禁忌

ペントスタチン製剤（コホリン®）との併用により、致命的な肺毒性・自己免疫性溶血が報告されているので併用しない。

##### 7.4.2.6.2. シクロホスファミド(前処置療法)

##### (1) 薬剤の特徴

シクロホスファミドは nitrogen mustard 系のアルキル化剤で、エンドキサン®の商品名で注射薬、内服薬として市販されている。

##### (2) 主な有害事象

##### (a) 嘔気・嘔吐

投与日から嘔気・嘔吐は強くなる。予防的かつ症状にあわせて制吐剤を投与する。

##### (b) 出血性膀胱炎

大量のシクロホスファミド投与後に出血性膀胱炎を生じることがある。

##### (c) 心筋障害



シクロホスファミドは大量投与で心筋障害の頻度を高める<sup>11</sup>。移植前処置においては心筋障害がシクロホスファミドの **dose limiting toxicity** となる。

(3) 禁忌

本剤の成分に対し重篤な過敏症の既往歴のある患者

#### 7.4.2.6.3. シクロスポリン(急性 GVHD 予防)

(1) 薬剤の特徴

シクロスポリンの作用機序は直接的な細胞障害性によるものではなく、リンパ球に対し特異的かつ可逆的に作用し、強力な免疫抑制作用を示す。また本薬剤は T 細胞においてシクロフィリンと複合体を形成し、T 細胞活性化のシグナル伝達において重要な役割を果たしているカルシニューリンに結合し、カルシニューリンの活性化を阻害する<sup>25</sup>。

(2) 主な有害事象

本薬剤に関する承認時までの調査及びその後の使用成績調査による適応疾患別の副作用発現状況は以下のとおりである。

骨髄移植：218 例中、何らかの副作用が報告されたのは 126 例 (57.8%) で、主なものは腎機能障害 67 件 (30.7%)、多毛 47 件 (21.6%)、高血圧 9 件 (4.1%)、振戦 9 件 (4.1%) 等であった。

(3) 禁忌

タクロリムス (プログラフ®) 投与中の患者では本剤の代謝が阻害されること、及び副作用が相互に増強されるので併用しない。

なお、腎・肝・膵機能障害等の副作用が起こることがあるので、頻回に臨床検査 (血球数算定、クレアチニン、BUN、ビリルビン、GOT、GPT、アミラーゼ、尿検査等) を行うなど、患者の状態を十分に観察する。

異常が認められた場合には減量・休薬等の適切な処置を行う。感染症の発現又は増悪に十分注意する。副腎皮質ホルモン剤以外の免疫抑制剤と併用する場合には、過度の免疫抑制により感染に対する感受性の上昇、リンパ腫発生の可能性があるので十分注意する。

#### 7.4.2.6.4. メトトレキサート(急性 GVHD 予防)

(1) 薬剤の特徴

メトトレキサートは核酸合成に必要な活性葉酸を産出させる転換酵素 dihydrofolate reductase (DHFR) の働きを阻止することにより細胞の増殖を抑制する。正常細胞や感受性の高い癌細胞には能動的に取り込まれ、殺細胞作用を示す。同種造血幹細胞移植後に投与した場合にはリンパ球を強く抑制することにより GVHD 予防効果を示す。

(2) 主な有害事象

GVHD 予防目的で投与する場合は 10~15 mg/m<sup>2</sup> の少量投与であるが、主な有害事象として、肝障害、口腔・消化管粘膜障害、骨髄機能回復の遷延などが認められる。

(3) 禁忌

本剤の成分に重篤な過敏症の既往歴ある患者、胸水、腹水等を有する患者

### 7.4.3. 治療群への患者の割付け方法

#### 7.4.3.1. 割付け方法

本治験ではドナーの種類により、2種類の前処置療法のうちいずれかに決まることから薬剤の割付けは実施しない。

#### 7.4.3.2. 登録

治験責任／分担医師は本治験に登録可能と判断される患者及びドナーがいる場合、患者及びドナーから同意を取得した後に以下に示す手順で登録を行う(図3)。連絡先、受付時間などを以下に示す。

##### 患者登録の連絡先(治験支援センター)と受付時間

日本臨床研究支援ユニット  
〒113-0034 東京都文京区湯島 1-2-13  
西山興業御茶ノ水ビル 3F  
TEL: 03-5297-6258  
FAX: 03-5297-6259  
平日: 9~17時(祝祭日、土曜・日曜は受け付けない)

##### 患者・ドナー選択・除外規準に関する問い合わせ先

プロトコール委員(代表)  
神田善伸  
東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科  
〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1  
TEL: 03-3815-5411 内線: 35602  
FAX: 03-5804-6261  
E-mail: [ycanda-tky@umin.ac.jp](mailto:ycanda-tky@umin.ac.jp)

#### 7.4.3.3. 登録に際しての注意事項

プロトコール治療開始後の登録は例外なく許容されない。

電話での登録は受け付けない。

登録されると「登録確認通知」が治験支援センターから FAX にて治験責任医師又は治験責任／分担医師に送付されるので実施施設ごとに保管する。

本登録時の「登録確認通知」によって、治験薬投与群について治験支援センターより指示される。

また、登録の延期・中止となる場合は速やかに治験支援センターに連絡する。

感染症等により本登録を 1 ヶ月以上延期した場合は、仮登録時検査及び本登録時検査を再度実施する。この場合、HLA タイピング及び血液型 (ABO、RhD) については、再検査は必要としない。

本登録後に 2 週間以上前処置開始を延期せざるを得なかった場合は、本登録時検査を再度実施する。

仮・本登録時の再検査を実施した場合、各々仮・本登録票を治験支援センターに送付する。

なお、一旦登録不適格となった症例については、再登録不可とする。

誤登録・重複登録が判明した際には速やかに治験支援センターに連絡する。

#### 7.4.4. 治験における用量の選択

東京大学ではHLA不一致血縁者間移植において通常の移植で行われるシクロホスファミド(60 mg/kgを2日間)と全身放射線照射(2Gyを1日2回、3日間)に加えてアテムツズマブを患者体重あたり0.2 mg/kgを6日間併用(移植8日前から3日前まで)している<sup>26</sup>。ただし、55歳以上の高齢者や臓器障害を有する患者においては、リン酸フルダラビン(30 mg/m<sup>2</sup>を6日間)とブスルファン(4 mg/kgを4日間)とアテムツズマブの併用を行っている。これまでに12症例(年齢中央値49.5歳、範囲27~60歳、4名は55歳以上)に移植を行った。ドナーはGVHD方向、拒絶方向いずれも二座不一致が5名、三座不一致が7名であり、患者との関係は子父間3名、子母間3名、同胞間4名、叔父1名、従兄弟1名である。

乳癌切除・放射線照射後、胆嚢腫瘍切除直後、肺アスペルギルス症合併(5例)、感染性心内膜炎・僧帽弁置換術後、自家移植後再発など、移植前にさまざまな合併症を有していたが、全例にドナー細胞の生着がえられ、好中球(>500 / $\mu$ L)、血小板回復(>20,000 / $\mu$ L)までの期間の中央値はそれぞれ17.5日(12~29日)と16日(12~27日)である。grade III以上のGVHDを認めたのは1名だけであり、移植合併症による死亡はGVHDによる1名(移植後66日)と、間質性肺炎による1名(移植後197日)である。後者は、移植前に乳癌に対する放射線照射を受けていたことが影響したと考えられる。サイトメガロウィルスの再活性化は10名に認められ、2名が移植後半年前後にサイトメガロウィルス網膜症を発症したが、いずれもガンシクロビルで軽快した。移植後のGVHDの程度によってシクロスポリンの投与量、減量速度を調節することにより、過度な免疫抑制を行わずにGVHDをコントロールできる。実際、GVHDを発症しなかった患者では、移植後100日以内にすべての免疫抑制剤を中止することに成功している。

また、海外においては造血器腫瘍患者に対する同種造血幹細胞移植(HLA一致血縁、一致非血縁、不一致非血縁)後のGVHD抑制のため、主にアテムツズマブ20 mgが5日間投与され、良好な成績が得られている。20 mgを5日間投与した症例の体重当たりの投与量(総投与量)は、1.0~1.75 mg/kgであった。さらに、本用量を東京大学でのパイロット試験の投与日数(6日)から1日投与量を換算すると、0.16~0.29 mg/kgであり、パイロット試験での1日投与量(0.2 mg/kg)とほぼ同用量が用いられている。

同種造血幹細胞移植の前処置薬としてのアテムツズマブの投与量については、これまで詳しく検討されていない。そのため、本治験ではHLA不一致同種造血幹細胞移植におけるアテムツズマブの推奨用量を検討することとし、投与量としては良好な成績が得られている東京大学のパイロット試験での用量を含む、0.16、0.2及び0.25 mg/kg(公比は1.25)を検討用量とした。

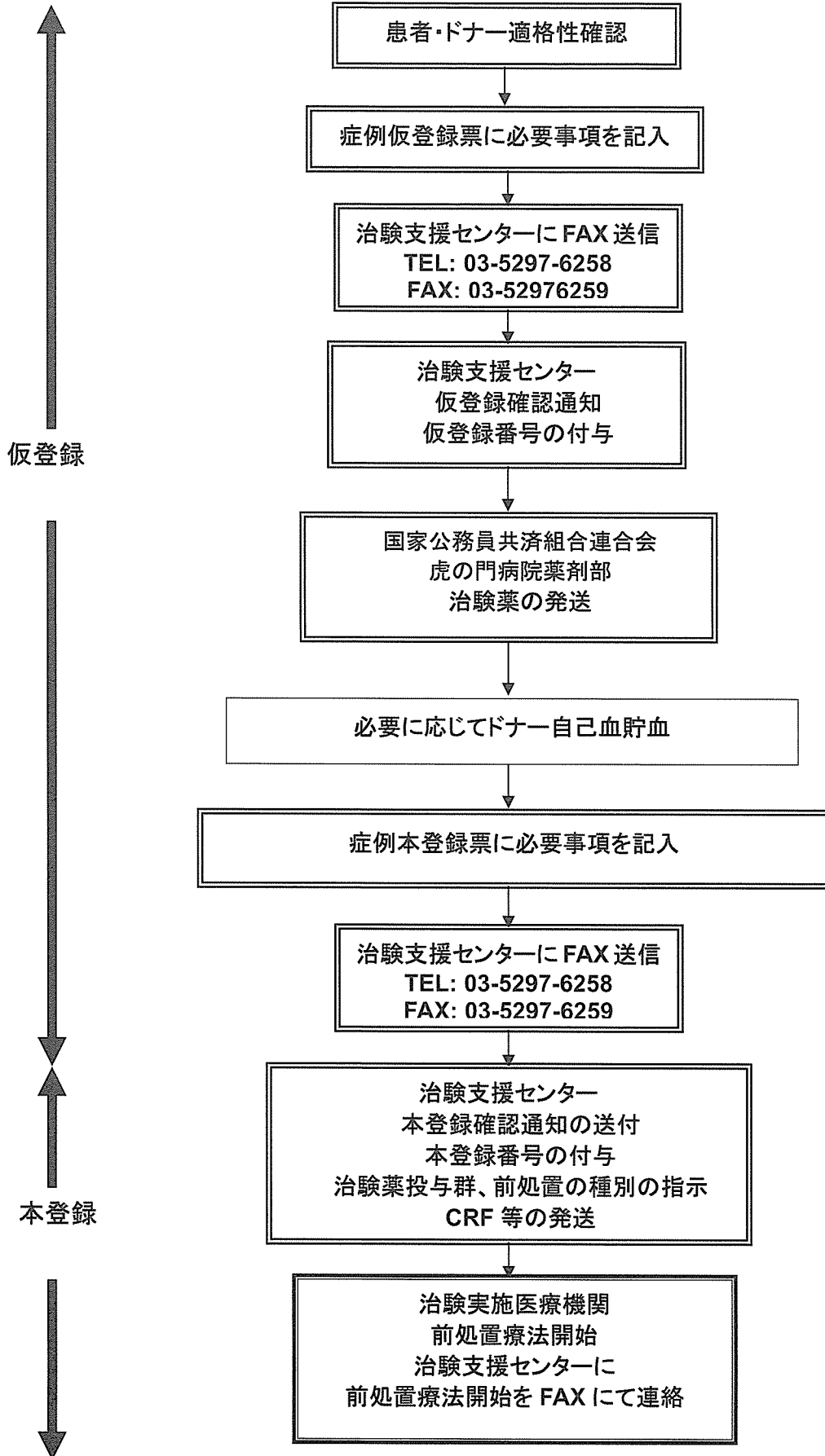


図 3 登録手順