

7. 安全性についての評価

7-1. 遺伝子導入方法の安全性

7-1-1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

本遺伝子治療臨床研究で使用されるレトロウイルスベクターMFGSgp91 を産生するウイルス産生細胞株 293-SPA-gp91-155 は、共同研究者である NIH の Malech 博士らによって樹立され、米国 Magenta 社 (Rockville, MD) が、同博士が所属する National Institute of Allergy and Infectious Diseases との契約に基づき、GMP (Good Manufacturing product) ベクターとして管理・保管しているものである。そして、本遺伝子治療臨床研究においては、Magenta 社が製造した 293-SPA-gp91-155 のマスターセルバンク (Master Cell Bank: MCB) よりワーキングセルバンク (Working Cell Bank: WCB) を作製し、そこから産生したウイルス上清を使用する。

Working Cell Bank からのウイルスベクター産生法は、上記、MCB より 1 バイアルを融解し、Magenta 社内で管理された製造エリアで GMP 準拠のもとで以下のように行われる。

225cm² のプラスチックフラスコに 1cm² あたり 8x10⁴ 個の細胞を 10% の胎仔牛血清 (FBS) を含む Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium (IMEM) にて播種して培養する (1.8x10⁷ 個)。6 日間の培養により細胞数はおおよそ 10 倍になると予想されるので、1% のヒト血清アルブミン (HSA) を含む X-vivo 10 に培地を交換し、さらに 10 時間培養する。その後、培養上清を回収し、新しい培地 (X-Vivo 10/ 1% HSA) に交換してから、さらに 14 時間培養を続け、培養上清を回収する。この操作 (14 時間培養後の培養上清の回収) を計 3 回繰り返した後、回収したすべての培養上清をひとつにまとめ、無菌濾過した後、小分けに分注して凍結・保存する。

Magenta 社において製造されたウイルスベクター上清に適切な拡散防止措置を講じた上で、ドライアイス詰めで日本まで空輸し、国立成育医療センター研究所において受け入れ試験を実施する。検査の結果、適切と判断されたウイルスベクター上清のみを、同研究所の管理区域内 (資料 2 に参照) にある超低温フリーザーにて凍結・保管する。なお、次頁以降に、MCB、大量産生によるウイルス上清ならびに受け入れ試験において行われる品質検査項目を示す。

レトロウイルスベクター産生細胞の品質検査項目
(293-SPA-MFGSgp91-155 Master Cell Bank #2037-0022)

検査	方法	基準値	結果
核型検索	アイソザイム	ヒト	ヒト
細胞状態	トリパンブルー染色	30%以上	90%以上
細菌・真菌 (無菌性)	21CFR610.12	陰性	陰性
マイコプラズマ	FDA points to consider	陰性	陰性
〈ヒトウイルス〉 EBウイルス サイトメガロウイルス B型肝炎ウイルス HTLV 1/2 アデノ随伴ウイルス パルボB19 HIV	PCR PCR PCR PCR PCR PCR 共培養法	陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性	陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性
偶発的ウイルスの確認	In vivo法 In vitro法	陰性 陰性	陰性 陰性
ウシ由来ウイルス (使用ロット)	ウシウイルス 感受性細胞	陰性	陰性
ブタウイルス (使用ロット)	ブタウイルス 感受性細胞	陰性	陰性
野生型ウイルス (上清)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
野生型ウイルス (細胞)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
ベクターコピー数	Southern blot法	1コピー	1コピー
gp91 ^{phox} 配列	DNA sequence法	一致	一致
MFGS配列	DNA sequence法	一致	一致
パッケージング ベクターコピー数	Southern blot法	pCRIPenv- > 1copy pCRIPMgag- > 1copy	pCRIPenv- > 1copy pCRIPMgag-> 1copy
K562を用いた ウイルスカ価	Southern blot法 Flow cytometry	0.1 copy以上 10%以上の発現	10%以上の発現
患者CD34陽性細胞への 導入	ケミルミネッセンスに よる活性酸素	5%以上の発現	5%以上の発現
患者CD34陽性細胞への 導入	DHR flow cytometry	5%以上の発現	5%以上の発現
酸化補酵素K562に よるgp91 ^{phox} の発現	Nitroblue tetrazolium blue	5%以上の発現	5%以上の発現

293-SPA-MFGS91-155 レトロウイルス (#1059-0001)

ウイルス上清と産生細胞の最終産物

検査	方法	基準値	結果
無菌性 (上清・細胞)	21CFR610.12	陰性	陰性
マイコプラズマ (細胞)	FDA法	陰性	陰性
K562を用いた ウイルスカ価	Southern blot法 Flow cytometry	0.1 copy以上 10%以上の発現	10%以上の発現
野生型ウイルス (上清)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
野生型ウイルス (細胞)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
患者CD34陽性細胞への 導入	ケミルミネッセンスに よる活性酸素	5%以上の発現	5%以上の発現
患者CD34陽性細胞への 導入	DHR flow cytometry	5%以上の発現	5%以上の発現
酸化補酵素K562による gp91 ^{phox} の発現	Nitroblue tetrazolium blue	5%以上の発現	5%以上の発現
エンドトキシン	LALテスト	陰性	陰性

国立成育医療センター研究所におけるウイルス上清の受け入れ試験

検査	方法	基準値	結果
無菌性 (上清・細胞)	SRL	陰性	陰性
マイコプラズマ (細胞)	SRL	陰性	陰性
K562を用いた ウイルスカ価	Flow cytometry	10%以上の発現	10%以上の発現
野生型ウイルス (上清)	Envに対するPCR法	陰性	陰性
エンドトキシン	LALテスト	陰性	陰性

7-1-2. 患者に投与される物質の純度及び安全性

患者に投与する物質は、CYBB 遺伝子が導入された患者末梢血由来 CD34 陽性細胞である。通常、本細胞を培養する際にはウシ胎仔血清を用いるが、これは患者にとって異種タンパク質であり、抗原となり得るため本遺伝子治療臨床研究では、CYBB 遺伝子を導入する際に用いるウイルス上清を無血清にて調製する。また、患者 CD34 陽性細胞の培養においても、1% ヒト血清アルブミンを含む無血清培地にて行う。

また、遺伝子導入に際して使用された各種試薬に関しては、1% ヒト血清アルブミンを含むリン酸緩衝液 (PBS) などで十分に細胞を洗浄し、取り除いてから患者に投与する。無菌性・無毒性に関しては、下記の検査の 1 と 2 を行い、安全性が確認された段階で遺伝子導入細胞 (末梢血由来患者 CD34 陽性細胞) を患者に投与する。

なお、安全性の観点からは、野生型ウイルス (replication competent retrovirus; RCR) 混入の有無を確認する必要がある。現在行われている RCR 検出法は複数あるが、結果判定に時間が掛かるものが多く、また、今回の全培養期間が 72 時間と短期間 (ウイルスと接している期間は 48 時間以内) であることを考慮して、本研究における主な RCR の検出法は、患者細胞を用いて PCR 法による Env 遺伝子の増幅で行うものとする。なお、投与する細胞の RCR の確認は、回収前日の細胞を用いる。

患者に投与する細胞及び患者の細胞を用いて行われる検査一覧

1. 無菌性 (細菌、真菌、マイコプラズマ)
2. エンドトキシン (LAL)
3. 遺伝子導入細胞の RCR 検出試験 (PCR 法による Env 遺伝子の検出)
4. 培養上清中の RCR 検出試験 (PCR 法による Env 遺伝子の検出)
5. FACS を用いた遺伝子導入細胞における gp91^{phox} の発現
6. コロニーアッセイによる遺伝子導入効率の測定
7. サイトカイン非存在下での増殖能試験
8. PCR 法によるプロウイルスコピー数

7-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性

本遺伝子治療臨床研究で使用されるレトロウイルスベクター MFSGsp91 は野生型ウイルス由来の Gag、Pol、Env をコードする遺伝子の全てあるいは一部を欠失している。さらに、使用されるパッケージング細胞株 293-SPA においても Gag-Pol を発現する DNA 断片と Env を発現する DNA 断片が異なったベクターによって発現さ

せられているため、本遺伝子治療臨床研究において当ベクターを使用する限り RCR の出現率は極めて低いものと思われる。また、過去の 300 を越える同様なレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究においても、RCR 出現の報告は無い。

本遺伝子治療臨床研究で使用される MFGSgp91 上清は米国 Magenta 社により RCR が存在しないことが確認され、米国食品医薬品局 (FDA) により承認されたものを使用する。また、使用前の受け入れ試験においても RCR が存在しないことを確認し、さらに、治療開始後にも患者細胞や血清を用いて患者体内で RCR が出現していないことを定期的に確認する。

7-1-4. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

レトロウイルスベクターが感染細胞に外来遺伝子を導入する過程において、細胞に傷害を与えることはないと考えられている。実際、これまでの遺伝子治療臨床研究において細胞傷害性は報告されていない。

7-1-5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本遺伝子治療臨床研究では、標的細胞である患者末梢血由来の CD34 陽性細胞に体外で CYBB 遺伝子を導入し (ex vivo 遺伝子治療)、これらの遺伝子導入細胞のみを患者に投与する。したがって、RCR が存在しない限り、標的細胞以外の細胞に CYBB 遺伝子が導入される可能性は極めて少ない。また、たとえベクター粒子が遺伝子導入細胞の細胞膜表面に付着することで患者体内に混入されたとしても、頻回なる細胞洗浄によりその量は極めて微量になる。さらに、その多くは血清などで不活化することから、標的細胞以外へ新たに感染する可能性は極めて低い。

7-1-6. 患者以外の人への遺伝子導入の可能性

今回の遺伝子導入操作は試験管内で行われるため、患者以外の人に遺伝子が導入される可能性は否定できない。このため、遺伝子導入に十分な知識と経験を有する研究者のみが P2 レベルの遺伝子導入専用施設で、十分な注意をもってレトロウイルスベクター上清を扱う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧滅菌か次亜塩素酸によるウイルスの不活化操作の後に廃棄される。ただし、レトロウイルスベクターは非常に不安定であり、ウイルス上清を直接触れた程度では遺伝子の導入は成立しない。また、患者を介して患者以外の人に遺伝子が導入される可能性は大

量の RCR が患者体内に存在しない限りあり得ない。

7-1-7. 染色体へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

最近の報告で、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子を導入した場合、その挿入部位は細胞増殖に関わるような遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域、特に遺伝子の活性化部位に挿入されやすいことが明らかとなった^{33,46}。

挿入が問題となるのは、その近傍遺伝子の発現に何らかの影響を及ぼした場合である。ただ、ベクターの染色体挿入が細胞増殖に関わる遺伝子に対して負の影響を与えた場合は、その細胞は増殖できず細胞は死滅するため、患者への影響はない。一方、挿入部位近傍に癌原遺伝子が存在し、それがベクター挿入により発現誘導を起こして増強した場合、すなわちベクター挿入が癌原遺伝子の発現に対し正に働いた場合は、遺伝子導入細胞ががん化する可能性はある。実際、フランスで行われた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞遺伝子治療において使用されたレトロウイルスベクターが患者染色体の *LMO-2* 遺伝子近傍に挿入され、結果的に遺伝子導入細胞が白血病化 (T 細胞白血病) したとの報告がある⁴⁷⁻⁵¹。現在、この有害事象に対する種々の方策が検討されてはいるが、いまだ完全に白血病などの造血系異常を誘発しないベクターシステムは存在しない。そのため、本遺伝子治療臨床研究においても何からの造血系異常が発症する可能性は否定できない。

7-1-8. 癌原性の問題

ウイルス感染による癌原性は RCR が存在しない限り、その可能性は極めて低い。一方、前項で述べたように挿入部位近傍の遺伝子が活性化することによるがん化の可能性は決して低いものではない。これは本遺伝子治療臨床研究と同一の疾患を扱ったドイツ・スイスでの遺伝子治療臨床研究においても造血系異常を発症したことから推測される。

ただし、ドイツ・スイスの症例で使用されたベクターはマウス急性白血病ウイルスに属する Friend spleen focus-forming virus (SFFV) 由来であり、このウイルスが本遺伝子治療臨床研究で使用される MoMLV 由来ベクターとは異なり癌遺伝子を有し、数十倍も転写活性が高いことから、造血系異常を誘発したと考えられている³³⁵²。ただ、疾患は異なるものの本遺伝子治療臨床研究と同じ MoMLV 系のベクターを使用した遺伝子治療臨床研究において、同様に造血系異常 (白血病) を発症したことから、本遺伝子治療臨床研究においても造血系異常が発症する可能性は否定できない。

なお、現在まで本遺伝子治療臨床研究で使用されるベクターを用いて行われた CGD に対する遺伝子治療臨床研究において造血系異常を発症した報告はない⁵³。

7-2. 遺伝子産物の安全性

レトロウイルスベクター-MFGSgp91 の遺伝子導入により、感染細胞であるヒト造血細胞は CYBB 遺伝子産物である gp91^{phox} を獲得する。gp91^{phox} は前述のようにヒト由来のタンパク質で、細胞膜表面で p22^{phox} を会合し、菌体成分などの刺激にて細胞質内構成タンパク質と結合することで活性酸素産生などの機能を発揮する性質を有している。そのため、gp91^{phox} を過剰発現しても、過剰な p22^{phox} の発現がない限り、活性酸素産生などの機能は発揮せず、それ自身では細胞に傷害を与えないと考えられる。事実、現在まで gp91^{phox} による細胞傷害性の報告はみられない。

7-3. 細胞の安全性

7-3-1. 培養細胞の純度

使用するレトロウイルスベクター上清はMagenta社において微細孔フィルター (0.22 μ m) を通しており、ウイルス産生細胞株や細胞破砕物などの混入はない。また、国立成育医療センターにおいては、培養期間中に異なる患者同士の細胞が混入することを防ぐために、同一時期に複数の患者細胞を扱わないこととする。また、微生物などの汚染を防ぐために、全ての操作を P2 レベルの施設内で行い、特に細胞の取り扱いに関してはクラス IIa の安全キャビネット内で操作する。なお、細胞の安全性に関する検査は遺伝子導入前と患者投与前に行われ、その主な検査項目は好気性細菌、嫌気性細菌、真菌、マイコプラズマと RCR の検査であり、これら検査は SRL 社に対して委託して実施する。

7-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安全性

前述のように、レトロウイルスベクターの染色体挿入部位は一定でなく、また、感染細胞よりあらたなウイルスが出現しないため、患者細胞の遺伝型の変化は報告されていない。ただ、過去の報告でその挿入部位は全染色体にわたり、少なからず導入部位近傍遺伝子の発現に何らかの変化を与えることがあるとの報告もあることから、微細な遺伝型の変化、表現型の変化をきたしている可能性は否定できない。た

だ、これら変化は臨床症状などの変化を伴わないようなごくわずかなものであり、一般的な臨床検査では異常を示さない。

7-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性

被験者に投与する細胞はレトロウイルスベクター-MFGSgp91 により正常 CYBB 遺伝子を導入した患者由来の末梢血 CD34 陽性細胞である。現在、リンパ腫や固形腫瘍に対して自家幹細胞移植が一般的に行われていることを考えると、自家 CD34 陽性細胞の投与が患者に対して重大な影響を及ぼすとは考えにくい。また、細胞培養に使用するサイトカインなどの細胞増殖因子の残存濃度についても、細胞を患者に投与する前に洗浄することで、生体への影響はほとんどないものと考えられる。

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

以下の理由により本遺伝子治療臨床研究は実施可能と判断される。

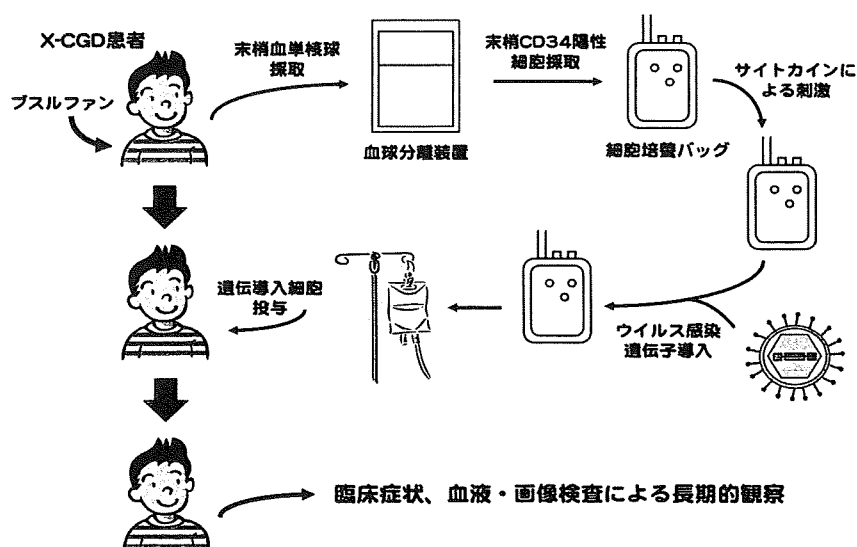
1. 近年、X-CGD に対する骨髄非破壊的前処置による HLA 一致同種造血幹細胞移植が行われ、適当なドナーの存在する症例では改善する例も報告されているが、これら移植医療がすべての症例に対して適応することができないこと。
2. 造血系細胞を用いたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療臨床研究が数多く行われ、本邦においても既に 3 件実施され（1995 年、ADA 欠損症に対する末梢血リンパ球遺伝子治療；2002 年、同疾患に対する骨髄造血幹細胞遺伝子治療；2004 年、白血病に対するドナーリンパ球輸注療法）、これら研究から遺伝子治療自体の安全性と有効性を確認していること。
3. 本遺伝子治療臨床研究で使用を予定しているレトロウイルスベクター MFGSgp91 は、すでに共同研究者である Malech 博士が NIH において複数の患者に対して使用しており、その安全性と有効性は確認されていること。
4. 先行研究である「難治性先天性異常症の克服に向けた包括的遺伝子医療体制の確立に関する研究(平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金・子ども家庭総合研究事業)」において、現在、『安全性を鑑みたとき X-CGD に対する治療の第一選択は移植医療であるが、ドナー不在など何からの理由により移植医療が行えない重症患者に対しては、治療の候補として遺伝子治療を考慮することも十分に妥当である』との結論を得たこと。
5. 実施施設である国立成育医療センターが、成育医療（小児医療、母性・父性医療及び関連・境界領域を包括する医療）に特化した高度専門医療センターであり、その使命が先天性疾患を含む難治性疾患の機序解明とその論理を応用した診断・治療法の開発ならびに臨床研究の実践であること。

なお、本遺伝子治療臨床研究には、本研究の主旨に賛同し、その実施に尽力を惜しまない多くの小児科医、免疫学者、細胞治療関係者、遺伝子治療関係者が参加する。

9. 遺伝子治療臨床研究の計画

9-1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

本遺伝子治療臨床研究では、X-CGD 患者より血球分離装置を用いて末梢血 CD34 陽性細胞を採取する。体外 (ex vivo) にて、細胞培養バッグ中で培養した細胞にレトロウイルスベクターを用いて正常 CYBB 遺伝子を導入し、再び、患者へ投与する。なお、これら遺伝子導入細胞の骨髄生着を促すため、患者は投与前にブスルファンが投与され、また、投与後は本遺伝子治療臨床研究の有効性・安全性を評価するため、長期にわたり臨床症状を含めた各種検査が行われる。下記のその概略を示す。



9-2. 被験者の選定基準及び除外基準

X-CGD 患者のうち「9-2-1. 被験者の選定基準」の 1-9 の全ての条件を満たし、かつ「9-2-2. 被験者の除外基準」の 1-7 のいずれにも該当しない症例を対象とする。なお、遺伝子治療適応患者の選定にあたっては、人権保護の観点から、病状、年齢、同意能力などを十分に考慮し、慎重に選定する。また、実施症例の決定にあたっては、実施施設長が本遺伝子治療臨床研究の総括責任者からの要請により、諮問機関である「遺伝子治療臨床研究適応判定委員会 (9-3-1 参照)」の開催を同委員会委員長に要求する。同委員会は迅速に、かつ十分に症例の適応性を審議し、その適応性の有無を実施施設長に文書として提出し、実施施設長は実施許可に関する判断を委員会の判断を参考に総括責任者に伝える。

9-2-1. 被験者の選定基準

1. 遺伝子検査により gp91^{phox} に異常のある X-CGD と診断された男性
2. 3歳以上、体重 10kg 以上
3. 体重 (1kg) あたり 5×10^6 個の CD34 陽性細胞が回収可能と思われる症例
4. 最低 3 ヶ月以上の生存が可能と推測される症例
5. 患者もしくはその代諾者 (家族、配偶者、親権者など) からの本遺伝子治療臨床研究に対する文書による同意が得られている症例
6. ドナー不在あるいは全身状態不良など、なんらかの理由で主治医が移植の適応としないと判断した症例
7. 感染症の治癒を目指した抗菌剤等の投与を行っても、症状が軽減しない、あるいは病状が進行する症例
8. 以下に示す心肺肝腎機能を有する症例
performance status (PS) 0-2 (別添)
左室駆出率 $\geq 50\%$
安静時の動脈酸素飽和度 (SpO₂) $\geq 95\%$
AST、ALT ≤ 100 IU/L
体表面積 (1.73m²) 補正クレアチニン・クリアランス (Ccr) ≥ 70 ml/min
随時または食後 2 時間後の血糖値 ≤ 200 mg/dl、HbA1c $\leq 9\%$
9. 治療期間中及び治療終了後 5 年間の避妊に同意した症例

9-2-2. 被験者の除外基準

1. HIV 陽性例
2. 悪性腫瘍併発例
3. 同意に影響を及ぼす精神障害を有する症例
4. 現病と関連しない重篤な合併症を有する症例 (心疾患、肺疾患など)
5. 既往歴により重篤なアレルギー反応を起こす可能性のある症例
6. これまでにマウス血清を含む薬剤を受けた既往のある症例
7. その他、総括責任者が不相当と認めた症例

9-3. 本遺伝子治療臨床研究に関連する各委員会

本遺伝子治療臨床研究を円滑に、かつ適正に実施するために、国立成育医療センター内に下記の委員会を設置する。

9-3-1. 遺伝子治療臨床研究適応判定委員会

実施施設長は、本遺伝子治療臨床研究が承認された時点で、国立成育医療センター内に遺伝子治療臨床研究適応判定委員会（以下、「適応判定委員会」）を設置し、委員長を任命する。委員の選任法は別途定める。当適応判定委員会は遺伝子治療臨床研究において実施される症例の適応判定を行う。

9-3-2. 遺伝子治療臨床研究評価委員会

実施施設長は、本遺伝子治療臨床研究が承認された時点で、国立成育医療センター内に遺伝子治療臨床研究評価委員会（以下、「評価委員会」）を設置し、委員長を任命する。委員の選任法は別途定める。当評価委員会は遺伝子治療臨床研究において実施される症例の評価を行う。

9-3-3. 遺伝子治療臨床研究審査委員会

実施施設長は、本遺伝子治療臨床研究が、生命及び医の倫理に基づき、また、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」を遵守し、適正に行われるようにするために遺伝子治療臨床研究審査委員会（以下、「審査委員会」）を設置する。当審査委員会は、本遺伝子治療臨床研究の実施計画及び実施の適否について、科学的観点ならびに倫理的観点から審査する。委員長は実施施設長が任命し、委員の選任法は別途定める。

9-4. 被験者の同意の取得法

本遺伝子治療臨床研究を実施するにあたっては、総括責任者あるいはその代理の医師が、本遺伝子治療臨床研究の適応となると考えられる患者（被験者）に対し、別添 1 で示す「慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究」参加のしおり」を基に、下記の 1～8 の事項について説明したうえで、患者自身の自由意思により本遺伝子治療臨床研究の参加の同意を文書にて得る。被験者が未成年者あるいは文書による同意を得ることが困難な被験者の場合は、その家族、配偶者、保護者、親権者などの代諾者に対して同様の説明を行ったうえで、本遺伝子治療臨床研究に参加する旨の同意を文書

にて得る。

1. X-CGD の病態説明
2. X-CGD に対する現行の治療法の説明及びその治療効果
3. 本遺伝子治療臨床研究の目的及びその方法
4. 本遺伝子治療臨床研究が実施される場所
5. 予想される効果及び危険性
6. 本臨床研究への参加は自由意思によるもので、参加しない場合であってもなんら不利益を被らないこと
7. 本臨床研究への参加を同意した場合であっても、随時これを撤回できること
8. 被験者の人権が保護されること
9. その他、本遺伝子治療臨床研究の体制など

9-4-1. 被験者と家族への心理的支援

本遺伝子治療臨床研究は、被験者本人のみならず保護者等代諾者とっても多大な精神負担と成り得るため、特別な配慮が必要である。これに対して、本臨床研究の全経過を通じて、臨床心理士による積極的な心理的支援を行う。

9-5. 実施期間及び目標症例数

実施期間は、関係各省より承認を得た時点から3年間で、目標症例数を5症例と設定する。

9-6. 遺伝子治療臨床研究の実施方法

9-6-1. 対照群の設定

特に設けない

9-6-2. 遺伝子導入方法（安全性及び有効性に関する事項は除く）

9-6-2-1. 無菌性の確保

本遺伝子治療臨床研究の実施施設である国立成育医療センター研究所内に

設置した P2 レベルの遺伝子導入専用培養室を使用する。入室時は消毒液による手洗いとガウンテクニックを確実に実行する。使用する器具、試薬品は全て無菌的なものを使用し、可能な限り使い捨てとする。また、同時に複数の被験者の細胞を扱わず、可能な限り閉鎖系操作により細胞を調製する。これら培養室への入室法は別途、標準作業手順書 (standard operating procedure; SOP) にて定める。

9-6-2-2. ベクターの入手先及び保存法

使用するウイルスベクターは米国の Magenta 社が GMP に準拠して製造したレトロウイルスベクター (293-SPA-MFGS91-155) を用いるが、輸入に関しては、厚生労働省からの本遺伝子治療臨床研究の承認が得られた段階で、必要な手続きを執った上で行う。ウイルスの感染力は、凍結状態で保たれるので、輸入後はウイルス上清を -80°C の冷凍庫に使用時まで保管する。なお、輸入したウイルス上清の一部を解凍し、前述の「国立成育医療センターにおけるウイルス上清の受け入れ試験」(30 頁) に基づき、遺伝子導入効率、RCR の存在の有無、マイコプラズマを含む無菌性ならびにエンドトキシンなどの検査を行う。

9-6-2-3. 被験者からの末梢血 CD34 陽性細胞の採取

被験者からの末梢血由来 CD34 陽性細胞の採取は、「同種末梢血幹細胞移植のための健康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」(2003 年 4 月 21 日改定第 3 版) ならびに共同研究者の Malech 博士らが報告した慢性肉芽腫症患者からの G-CSF 誘導末梢血 CD34 陽性細胞の採取法⁵⁴に基づいて行われる。採取に関する詳細は別途「被験者末梢血由来 CD34 陽性細胞採取のための手順書」に示されるが、概略は以下の通りである。

被験者の健康状態を視診、聴診、触診ならびに各種検査 (血液、尿、胸部単純 X 線写真、心電図など) にて確認し、末梢血由来 CD34 陽性細胞の採取が可能と判断された場合、体重あたり $10\mu\text{g}$ の顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF、グランキリンファーマ株式会社、 $10\mu\text{g}/\text{kg}$) を 5~6 日間、一日一回皮下投与する。投与終了日に血球分離装置にて末梢血単核球分画を採取する。得られた末梢血単核球より CD34 陽性細胞を CliniMACS (Miltenyi Biotec 社) を用いて分離し、純度ならびに細胞数を確認した後に生理食塩水にて洗浄して遺伝子導入の標的細胞とする。一部は検査用として保存する。

9-6-2-4. 標的細胞への遺伝子導入

分離した末梢血由来 CD34 陽性細胞を用いて遺伝子導入操作を行う。これら操作に使用する培地は、1%ヒト血清アルブミン添加 X-VIVO 10 (Lonza 社) に 2.5 μ g/ml アンホテリシン B (ファンギゾン、ブリストル)、100U/ml ペニシリン G、100mg/ml ストレプトマイシンを添加したもので、サイトカインとして stem cell factor (SCF、100ng/ml)、thrombopoietin (TPO、100ng/ml)、FLT3-L (100ng/ml)、interleukin-3 (IL-3、10ng/ml) をこれら培地に加える。遺伝子導入の詳細は別途、「被験者末梢血由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入のための手順書」に示されるが、概略は以下の通りである。

分離した CD34 陽性細胞を、上記培地を用いて 1.0~5.0 $\times 10^5$ /ml に調製し、炭酸ガス透過性バック (CultiLife Spin™、タカラバイオ) にて、37°C、5% CO₂ の条件で 24 時間培養する。その後、細胞を 37°C で迅速に融解したレトロウイルスベクター上清 MFGSgp91 に浮遊させ、組換えヒトフィブロネクチン CH-296 RetroNectin® (タカラバイオ) を固相化した RetroNectin® 固相化培養バッグに移し、2 時間遠心操作にて CYBB 遺伝子を CD34 陽性細胞に導入する。感染操作終了後、再び、細胞を培地に浮遊させ、22 時間培養する。その後、同様の感染操作を、感染効率を確認しながら 2~3 回行う。

遺伝子導入操作終了後、遺伝子導入細胞を生理食塩水などにて十分に洗浄し、回収する。その際、検体の一部を用いて無菌性検査ならびに遺伝子導入効率を確認する。検査項目は、無菌性検査 (グラム染色、BACTEC™ NR16A、NR17A)、エンドトキシン検査、マイコプラズマ検査、遺伝子導入効率 (gp91^{phox} 遺伝子の PCR、7D5 抗体を用いた FACS 解析)、RCR の検出 (envPCR)、細胞表面マーカーの解析などである。

9-6-2-5. 遺伝子導入細胞の患者への投与

上記、検査にて安全性が確認された遺伝子導入細胞のうち、5%は検査用として保存し、残り 95%の細胞を 1% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩水にて再浮遊して、注射器あるいは輸血バッグを用いて患者へ投与する。なお、投与数の上限は定めがないが、最低投与数は体重あたり 5 $\times 10^6$ 個 (5 $\times 10^6$ /kg) とし、不足分はあらかじめ保存していた自己 CD34 陽性細胞にて補充する。また、細胞濃度を 2~10 $\times 10^7$ /ml とし、総投与量が 25~50ml 程度になるように調整する。投与方法は静脈内投与であるが、最初に総投与量の 2~5%の量をゆっくりと投与し、その後、5~10 分間被験者の全身状態を観察して、異常所見が観察されなかった場合には、残りの細胞をさらに 20 分

かけて投与する。投与中ならびに終了後 2 時間にわたって被験者の状態を、循環系（血圧、脈拍、体温、呼吸）を指標にモニターなどで管理する。

9-6-3. 前処置及び併用療法の有無

遺伝子導入細胞の骨髄生着を促すため、細胞投与前に造血能抑制作用を有するブスルファン静注用ブスルフェクス[®]（キリンファーマ株式会社）を被験者に投与する。総投与量は体重 1kg あたり 10mg（10mg/kg）とし、一回の投与量ならびに投与回数は下記のように体重によって定められる。

体重 (kg)	体重あたりの一回の投与量	体重あたりの総投与量(回数)
10 ≤ 体重 ≤ 23	1.00mg	10.0mg (10回)
23 < 体重 ≤ 34	0.95mg	9.5mg (10回)
34 < 体重	0.80mg	9.6mg (12回)

一回の点滴時間は 2 時間とし、これを最大で一日 4 回行う。また、ブスルファンの投与開始時期は、ブスルファンの最終投与から遺伝子導入細胞投与までの時間が 24～36 時間となるように決定する。ブスルファン投与中は、十分な排尿の確保と電解質平衡化のため輸液による水分補給を十分に行い、抗けいれん薬のクロナゼパムと必要に応じて制吐剤（グラニセトロン、商品名 カイトリル）の投与を行う。治療期間中は、幹細胞移植における無菌室に準じた管理を行う。ブスルファンによる骨髄抑制の程度を血液検査にて評価し、必要な際には輸血なども考慮する。

なお、本遺伝子治療臨床研究においては、X-CGD 患者に対して日常的に使用されている IFN- γ は、遺伝子治療開始の 2 ヶ月前までに中止する。また、トリメトプリン/スルファメトキサゾール（ST 合剤）は細胞投与日の前日まで内服し、その後 2 週間にわたり内服を中止する。

9-6-4. 治療中の観察項目及び臨床検査項目

被験者は、治療前 21 日目から国立成育医療センター病院に入院する。被験者は、別途定める検査一覧に従い、定期的な観察ならびに臨床検査を受ける。主な診察項目、検査項目は以下の通りである。

診察項目

身体測定：身長、体重

バイタルサイン：体温、収縮期血圧、拡張期血圧、脈拍、呼吸数

内科診察：頭頸部、口腔内、胸腹部（視診、聴診、触診）、皮膚所見、四肢、リンパ節（頸部、腋窩、鼠頸部、その他）、外陰部（肛門周囲、その他）

一般検査項目

血液一般検査：血液細胞数、白血球分画、網状赤血球数

尿一般検査：蛋白、潜血、糖、沈渣

生化学検査：尿酸、血清電解質（Na、K、Cl、Ca、P）、AST、ALT、 γ -GTP、LDH、ALP、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、総蛋白質、アルブミン、血糖

免疫学検査：IgG、IgA、IgM、IgE、CH50、リンパ球表面マーカー（CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD56）

血液凝固能検査：PT、APTT、fibrinogen、FDP

骨髄穿刺検査（骨髄細胞染色検査）

感染症関連検査：CRP、 β -D-グルカン、アスペルギルス抗原、カンジダ抗原

画像検査：頭部、胸腹部 CT 検査、必要に応じて上下部消化管内視鏡検査、超音波検査、PET-CT 検査

遺伝子治療関連検査項目

末梢血細胞の gp91^{phox} の発現：7D5 抗体を用いた FACS 解析

末梢血好中球活性酸素産生能：DHR 検査、NBT 検査、ケミルミネッセンス

導入遺伝子 gp91^{phox} の定量 PCR（末梢血ならびに骨髄細胞）

RCR 出現の検査：Env 遺伝子 PCR

9-6-5. 有害事象ならびにその対処方法

9-6-5-1. 有害事象の定義

有害事象とは、本遺伝子治療臨床研究との因果関係の有無に関わらず、治療中及びその後の観察期間中に被験者に生ずるあらゆる好ましくない医療上の症状、徴候、疾患を指す。程度の分類は、「医薬品などの副作用の重篤度分類基準について」（平成4年6月29日付厚生省薬務局安全課長通知薬安第80号）を参考に、かつ被験者の

全身状態、原疾患、合併症の状況も勘案して総合的に評価する。

また、以下のような事象は、重篤な有害事象として評価する（「治験中に得られる安全性情報の取り扱いについて」平成7年3月20日付厚生省薬務局安全課長通知薬審第227号）。

1. 死に至るもの
2. 生命を脅かすもの
3. 治療のため入院または入院期間の延長が必要となるもの
4. 永続的または顕著な障害、機能不全に陥るもの
5. 先天異常をきたすもの
6. その他の状況でも、被験者が危機に瀕したり、1～5のような結果に至らぬよう処置を必要とする重大な事象

9-6-5-2. 有害事象発生時の対応

被験者に有害事象が発生した場合、総括責任者は速やかに実施施設長に報告し、実施施設長は「評価委員会」に報告する。「評価委員会」は、報告を受けた有害事象の詳細な内容（症状、発症日、程度、処置の有無、経過）を十分な審議し、有害事象と本遺伝子治療臨床研究との関連性、総括責任者より提案された有害事象に対する医療処置ならびに研究継続の可否を含めた意見書を実施施設長に速やかに提出する。なお、被験者の状態により、「評価委員会」の開催が待てない場合は、総括責任者の判断のもと有害事象に対する処置を開始することとする。ただし、全ての医療処置は、総括責任者あるいはその代理人となる医師が、被験者に対してその旨を十分に説明し、同意を得た後に開始するものとする。同時に原因の究明に努める。

実施施設長は、「評価委員会」の意見書を基に「審査委員会」の開催を審査委員長に要求する。「審査委員会」では「評価委員会」の意見書を基に本遺伝子治療臨床研究の安全性・有効性を評価し、継続の可否を含めて最終的な意見を実施施設長に報告する。実施施設長は、これら意見書を速やかに厚生労働省などの関係各省に文書をもって報告する。なお、重篤な有害事象の場合には、たとえ本遺伝子治療臨床研究が終了後であっても、発生時から48時間以内に厚生労働大臣に報告する。また、本遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の事象に関しても、速やかに厚生労働大臣に報告する。

9-6-5-3. 予想される有害事象とその対処法

治療中及びその後の観察期間中に発症する有害事象としては下記のようなものがあげられ、各々の有害事象に対しては現行の医療行為のなかで最良と考えられるものを速やかに行うことで対処する。

1. 末梢血由来 CD34 陽性細胞の採取に伴う有害事象

骨髄から末梢血中に CD34 陽性細胞を誘導するための G-CSF 投与に関する有害事象と血液分離装置による CD34 陽性細胞の採取に関する有害事象がある。

1) G-CSF 投与に関連する有害事象

軽微なもの

臨床症状：腰痛、胸痛、骨痛、背部痛、関節痛、筋肉痛、発疹、紅斑、悪心、嘔吐、発熱、倦怠感、頭痛、食思不振、動悸、など

血液検査：白血球増加、血小板減少、肝機能異常、尿酸値の上昇、腎機能異常（血清クレアチニン値の上昇）、など

上記、症状は一過性の反応であり、G-CSF 投与後 2、3 日で正常に回復するが、必要に応じて鎮痛解熱剤等を使用し、また、過度な白血球増加や血小板の減少に関しては G-CSF の減量や中止も検討する。

重大なもの

G-CSF に対するアレルギー性ショック、間質性肺炎、血圧低下などがあり、稀な有害事象として、心筋梗塞、脳血管障害、脾臓破裂などがある。なお、投与後の長期的な観察期間において、G-CSF 投与を受けたドナー 2 例（移植症例）に骨髄増殖性疾患と急性骨髄性白血病が発症したとの報告があるため、本遺伝子治療臨床研究においても、慎重に観察を行う。

2) 血液分離装置による CD34 陽性細胞の採取に関連する有害事象

CD34 陽性細胞の採取に際しては、血管確保の際に出血、感染症の危険性がある。また、採取中に全身倦怠、手足のしびれ、血管迷走神経反射に伴うめまい、嘔気、嘔吐などがみられることがあり、また、終了時に血小板減少による出血傾向を示す場合もある。

2. ブスルファン投与に関連する有害事象