

患者末梢血由来 CD34 陽性細胞への CYBB 遺伝子の導入は、レトロウイルスベクターを含むウイルス産生細胞の培養上清中で CD34 陽性細胞を培養することで行う。遺伝子導入法の詳細は 9-6-2 の「遺伝子導入方法」の項で示す。

CD34 陽性細胞へ遺伝子を導入するためにレトロウイルスベクターを選択した理由は、レトロウイルスベクターが、感染後に宿主染色体に挿入される性質を有し、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現するためである。また、他のベクターシステムと比較して CD34 陽性細胞に対して高い遺伝子導入効率を示すことによる^{38,39}。

下記にレトロウイルスベクターと他のベクターシステムとの比較を示す。

特徴	Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	AAV
最大許容量	5kb 以下	7~7.5kb	30kb 以上	4kb 以下
導入法	ex vivo	ex/in vivo	ex/in vivo	ex/in vivo
染色体組込み	あり	あり	なし	あり/なし
安定性	良い	良い	良い	良い
調製の容易さ	容易	困難	容易	困難
免疫学的問題	なし	なし	あり	あり
安全性	挿入変異	挿入変異	炎症・毒性	炎症・毒性
血液細胞導入	良い	良い	不良	不良

6-4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

6-4-1. 野生型ウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響

使用するウイルスベクターはモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney Murine Leukemia Virus: MoMLV) 由来のレトロウイルスベクターである。この MoMLV は sarcoma 37 細胞より分離され、マウスの週令及び系統に関わらず感染するが、ヒトには感染しない。また、発癌遺伝子を持たないが、感染後、長期を経て、感染マウスにリンパ性白血病を発症する^{40,41}。

MoMLV のゲノムは 5' LTR (long terminal repeat) - パッケージング(Ψ) シグナル - gag - pol - env - 3' LTR より構成されている。ウイルス LTR にはエンハンサー/プロモーター活性があり、ウイルスゲノムは 5' LTR より転写、翻訳される。gag はウイルスのコア構造タンパク質をコードする遺伝子で、pol は逆転写酵素ならびにインテグラーゼをコードする遺伝子、env はウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子である。 Ψ シグナルはウイルスゲノム RNA がコア構造タンパク質や pol

遺伝子産物により構成される正二十面体の複合体に取り込まれるのに必須な配列であり、ゲノム RNA がこれら複合体に取り込まれることでウイルス粒子が形成され、細胞膜表面より萌芽する。この際、宿主細胞膜の一部を自らの外被として持ち込む。

レトロウイルスの生活環は、ウイルス粒子の外被表面に存在する外被タンパク質 (Env) が標的細胞の細胞膜表面上に存在する Env に対する受容体に結合することにより始まる。ウイルス粒子が受容体を介して細胞膜表面に結合した後、ウイルスはエンドサイトーシスにて細胞質内へと取り込まれる。その後、自らが持ち込んだ逆転写酵素によりウイルスゲノム RNA を 2 本鎖 DNA へと変換し、核へと移行した後にウイルスが持つインテグラーゼにて宿主染色体へと組込まれる。この状態のウイルスゲノムをプロウイルスとよぶ。染色体に組込まれたプロウイルスはあたかも宿主の遺伝子であるかのように振る舞い、宿主の転写機構を利用してウイルスゲノム (RNA) を転写する。ウイルスゲノムの一部は Gag、Pol、Env を転写するためのメッセンジャー RNA (mRNA) として働き、ウイルスの構成タンパク質を産生する。このようにして新たに生成されたウイルス粒子は細胞外へと萌芽し、周囲の細胞に感染していく⁴²。

6-4-2. ウイルスベクターの作製方法

レトロウイルスベクター DNA は野生型ウイルスゲノムの 5' -LTR、primer binding site、 Ψ シグナル、ポリプリン領域および 3' -LTR を保存し、ウイルス粒子の構造タンパク質遺伝子 (gag、pol、env) を削除して作製され、ウイルスベクター DNA のみではウイルスベクター粒子にはなり得ない。

レトロウイルスベクター粒子産生のためには、後で述べられるパッケージング細胞株が必要となるが、さらに安全性を高めるために、種々の工夫がレトロウイルスベクター DNA 自体になされている。本遺伝子治療臨床研究で用いられるウイルスベクターのプラスミド DNA は、レトロウイルスベクター MFGS に CYBB 遺伝子を挿入した MFGSgp91 であり、米国国立衛生研究所 (NIH) の Harry L. Malech 博士らによって作製されたものである。以下にその作製過程を示す。

1) MFG の作製

MFGSgp91 の基となるベクターは MFG である。MFG は MoMLV ゲノム断片を pBR322 プラスミドベクターに挿入して作製された (全配列を別紙 5 で示す)。すなわち、MoMLV ゲノムの 5' LTR から 1038 塩基対 (bp) 番目の *NarI* 部位までの DNA 配列 (ただし、*NarI* 配列は MFG では *NdeI* 配列に変換されている)、splice acceptor を含む 5401bp 番目の *NdeI* 配列から 5674 番目の *XbaI* 配列の DNA 配列、合成 DNA 配列

CTAGACTTGCCATGGCGCGATC (二重鎖) 及び 7672bp 番目の *ClaI* (*BamHI* 配列に変換) から 3' LTR までの DNA 配列まで含んでいる。

MFG が宿主染色体に挿入された後、プロウイルス (宿主染色体に挿入された MFG) は 5' LTR から 396bp 番目の転写開始点より転写が開始され、3' LTR から 696bp 番目まで転写される。MFG では、gag、pol、env のウイルスゲノムはほぼ全て欠失しているが、gag の一部 (5' 側) の約 400bp、env 5' 側のスプライスアクセプター領域の約 400bp、env の一部 (3' 側) の約 90bp は残されている。

MFG のパッケージングシグナル Ψ は gag の一部を含んでおり、この gag 配列の一部を含むパッケージングシグナルを拡張型パッケージングシグナル (Ψ') とよび、ウイルスゲノムのパッケージング効率を著しく向上させている。また、MFG は MoMLV 由来の splice donor/ acceptor 配列を有し、さらに導入遺伝子の開始コドン MoMLV の env 開始コドンに合わせることで、導入遺伝子の転写効率を高めている。なお、MFG は薬剤耐性の選択マーカー遺伝子を有してはいない。

2) MFGS の作製

MFG は Ψ' としてパッケージングシグナル内に gag の一部を有している。この部分はウイルス粒子膜表面や粒子内にある 2 つの重複した Gag-Pol ポリペプチドのアミノ酸末端側をコードするもので、これがパッケージング細胞株にある gag-pol と相同組換えを起こし、複製可能なレトロウイルス (replication competent retrovirus; RCR) を産生する危険性がある。同時に、このポリペプチドがウイルス由来のタンパク質であるため、宿主の免疫反応を惹起する可能性もあり、MFG の gag 配列に以下のような変異を挿入し、遺伝子組換え率の低下と免疫原性の軽減を図ったものが MFGS である。

- 5' LTR より 1256bp 番目の A を T に、1478bp 番目の C を T に変換することで、Gag-Pol の重複翻訳フレームを 84bp と 15bp に短縮させた。
 - 5' LTR より 1273bp 番目の T を A に変換することで、重複翻訳フレームには影響を与えず、パッケージング機能のためのステムループの形成能力を保持させた。
- 以上の変異により、導入遺伝子の発現は低下させず、p15Gag の発現は消失した。

3) MFGSgp91 の作製

MFGSgp91 は、MFGS 内の *NcoI*-*BamHI* の配列とその両端に相当する配列を有するヒト由来 CYBB 遺伝子を挿入して作製された。

4) パッケージング細胞の作製

MFGSgp91 はウイルス粒子形成に必須の遺伝子 gag、pol、env を有していないため、それ自体で完全なウイルス粒子を形成することはない。このため、MFGSgp91 に相当する遺伝子組換え生物を作製するためには、パッケージング細胞株が必要となる。本遺伝子治療臨床研究において、遺伝子組換え生物の作製のために使用されるパッケージング細胞株は 293-SPA であり^{44,45}、以下にその作製方法を示す。

- MoMLV ゲノム DNA よりパッケージングシグナル、env 及び 3' LTR のゲノム配列を取り除いた 5' LTR と gag-pol 配列を含む pCRIPenv-ベクター、ならびに SV40 early promoter より大腸菌由来 gpt 遺伝子を発現する pSV2gpt ベクターを、リポフェクション法にてヒト由来胎児腎細胞 293 細胞 (ATCC CRL 1573) に導入し、薬剤 (mycophenolic acid) にて Gag-Pol 発現細胞を選択した。
- これら Gag-Pol 発現細胞に、マウス両種性 (amphotropic) ウイルス由来 4070A env を発現する pCRIPAMgag-と大腸菌由来ハイグロマイシン耐性遺伝子 (hyg) を発現する pSV2hyg を導入し、薬剤 (hygromycin) にて Env 発現細胞を選択した。
- 最終的に、Gag-Pol 及び Env を高発現し、レトロウイルスベクターを導入することで高力価のウイルスを産生する細胞株をパッケージング細胞株 293-SPA として樹立した。

この 293-SPA はパッケージングシグナルを有していないため、パッケージングシグナルを有するレトロウイルスベクターを導入しない限り、遺伝子組換え生物 (レトロウイルス) は生じない。

4) パッケージング細胞の作製

作製された MFGSgp91 を、上記 293-SPA にリポフェクション法にて導入し、クローニング後に NIH3T3 を用いたウイルス力価測定にて高力価を示した株が最終的に選択された。このウイルス産生細胞株 293-SPA-gp91-155 は、患者末梢血由来の CD34 陽性細胞に対して、70%を越える感染効率を示す。

6-4-3. ウイルスベクターDNA の構造

MFGSgp91 の概略図を「CYBB 遺伝子の末端配列と MFGgp91 の構造」(21 頁)に、また全塩基配列を別添 5 に示す。なお、CYBB 遺伝子は 5' LTR より転写が誘導される。

6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴

293-SPA はアンフォトロピック系のパッケージング細胞株であり、このパッケージング細胞株より産生されるレトロウイルスは、マウス、ラット、サル、ヒトなどの細胞に感染し、感染宿主域は広範囲である。ただし、本遺伝子治療臨床研究で使用されるレトロウイルスは、前述のように Gag、Pol、Env をコードする遺伝子が削除されているため、感染細胞で新たなウイルス粒子を形成することはなく、感染細胞から周囲の細胞に再感染することはない。

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、そこから産生したベクター上清を使用する。

Working Cell Bank からのレトロ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、国立成育医療研究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、大量産生によるベクター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 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 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 ウイルス力価	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)

ベクター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

国立成育医療研究センター研究所におけるベクター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・エンドトキシンに有無に関しては、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、野生型レトロウイルス (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は以下の通りである。

検査項目	基準値
1. 無菌性 (細菌、真菌、マイコプラズマ)	陰性
2. エンドトキシン	陰性
3. 遺伝子導入細胞の RCR 検出試験 (PCR による Env 遺伝子の検出)	陰性
4. 培養上清中の RCR 検出試験 (PCR による Env 遺伝子の検出)	陰性
5. FACS を用いた遺伝子導入細胞における gp91 ^{phox} の発現	5%以上
6. コロニーアッセイによる遺伝子導入効率の測定	5%以上
7. サイトカイン非存在下での増殖能試験	陰性
8. PCR 法によるプロウイルスコピー数	0.01 以上

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 MFGSgp91 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、レトロウイルスベクター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、レトロウイルス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。また、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS) においても同様に、治療ベクターが *LMO-2* 遺伝子近傍に挿入されたことによる白血病の発症が報告されている。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も推測される。

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マウスにおいて急性白血病を発症し、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^{33 52}(別添 15)。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} と会合し、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、国立成育医療研究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、これら検査は遺伝子治療の安全性検査に関して実績のある国内企業（SRL社、タカラバイオ社等）に委託して実施する。

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；2004 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）、現在までこれら研究において遺伝子治療に関わる有害事象を発症していないこと。
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、その安全性が確認されていること。
4. 上記、Malech 博士が NIH にて本遺伝子治療臨床研究と同一のプロトコールで行った遺伝子治療臨床研究において、3 名中 2 名で肝膿瘍や肺膿瘍が治癒したこと。
5. 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。
6. 実施施設である国立成育医療研究センターが、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。

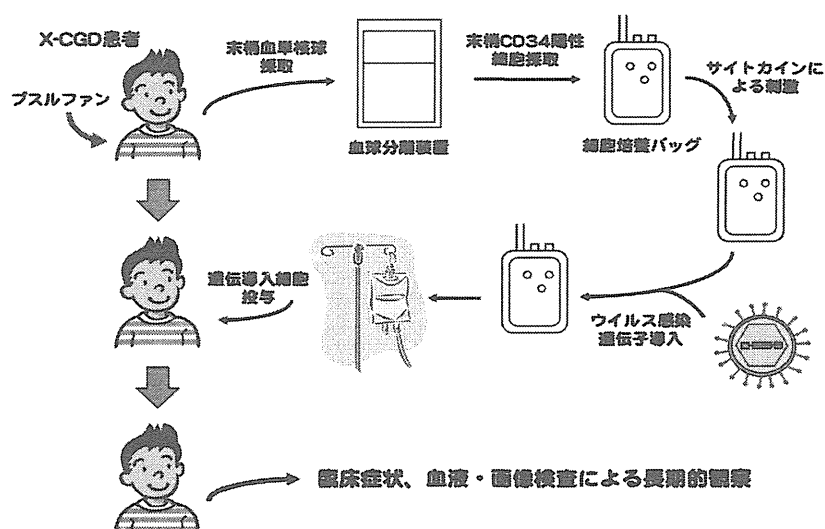
なお、本遺伝子治療臨床研究には、本研究の主旨に賛同し、その実施に尽力を惜し

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 1-8 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・評価判定委員会 (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 以上の症例
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. 2 ヶ月以上の対処治療によっても、臨床症状や検査所見 (CRP、b-グルカン、画像など) に改善がみられず、今後も十分な治療効果が得られないと推測される症例
5. 造血幹細胞に際し、DNA typing で 5/6 以上の HLA 一致で、有核細胞数として体重あたり 2×10^7 個 (CD34 陽性細胞として 1.5×10^5 個) 以上の移植ドナーが見つからない症例
6. 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
7. 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 $\leq 100\text{IU/L}$
体表面積 (1.73m^2) 補正クレアチニン・クリアランス (Ccr) $\geq 70\text{ml/min}$
随時または食後 2 時間後の血糖値 $\leq 200\text{mg/dl}$ 、HbA1c $\leq 9\%$
8. 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. 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)
4. 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
5. 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
6. 長期 (3 ヶ月程度) の生命予後が見込まれない症例
7. 同意に影響を及ぼす精神障害を有する症例

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

研究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・評価判定委員会

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、国立成育医療研究センター内に遺伝子治療臨床研究適応・評価判定委員会（以下、「適応・評価判定委員会」）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・評価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。本審査委員会は、「(独)国立成育医療研究センター遺伝子治療臨床研究審査委員会規定」(平成22年4月)に基づき国立成育医療研究センター内に設置され、当審査委員会は、本遺伝子治療臨床研究の実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

遺伝子治療が適当と考えられる被験者（患者）は、国立成育医療研究センター病院免疫科を受診し、そこで問診や必要な検査を受け、選定基準ならびに除外基準に照らし合わせ実施可能であるかが検討される。実施が適当と判断された被験者は、研究代表者より実施施設長（総長）に必要書類を添えて審査を申請し、実施施設長（総長）は遺伝子治療臨床研究適応・評価判定委員会に当該患者が遺伝子治療臨床研究に適しているかの判断を諮問する。当適応・評価判定委員会によって実施可能であること判定された被験者は、再度、本遺伝子治療臨床研究について詳細な説明を受け、自由意思に基づき文書による同意書に署名する。

同意書の取得に関しては、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」および遺伝子治療用パンフレットを基に、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。ただし、別添1で示す年齢別の説明書を用いて、本遺伝子治療の概要を理解してもらう（アセントの取得）。

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

なお、本遺伝子治療臨床研究において起こりうる危険性を十分に理解した上での同意取得を目指すため、特に、以下の3点を厳守する。

1. 有害事象など本遺伝子治療臨床研究における危険性の説明
説明医師が、同意説明書ならびに遺伝子治療用のパンフレットを使用して、詳細に説明する。
2. 臨床研究コーディネータなど第三者の介在
担当医師以外の第三者（臨床コーディネータ）を配置し、被験者が本遺伝子治療臨床研究に関する疑問点などを気兼ねなく質問できるような状況を用意する。
3. 同意を取得するまでの時間
同意は、説明医師が説明した際に取り得るのではなく、被験者が熟考の上、自由意思で決定できるよう説明後1週間程度の期間をあけてから取得する。

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し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