

III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1 使用等の内容

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

2 使用等の方法

所在地: 東京都世田谷区大蔵 2-10-1

名称: 国立成育医療センター (治療実施場所・保管場所は別紙 8)

1) 本遺伝子組換え生物 MFGSgp91 (以下、「本遺伝子組換え生物」と記す) は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送され、施設内の施設可能な保存室内の冷凍庫にて保管する。

2) 凍結状態の本遺伝子組換え生物の融解、希釈及び分注操作は P2 レベルの拡散防止措置を執ることができる細胞調製室 (以下、「細胞調製室」と記す) の安全キャビネット内または細胞調製室内での閉鎖系バッグにて行う。患者由来末梢血 CD34 陽性細胞 (以下、「造血幹細胞」と記す) への本遺伝子組換え生物の導入操作、それら細胞の培養、その他、本遺伝子組換え生物の希釈溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取り扱いもすべて同様に細胞調製室の安全キャビネット内または細胞調製室内での閉鎖系バッグにて行う。本遺伝子組換え生物の希釈液及び遺伝子導入細胞の保管は、細胞調製室内の冷凍庫及び冷蔵庫または培養器にて行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈液もしくはその冷凍品または本遺伝子組換え生物を開放系区間を通して他の P2 レベル区域に運搬する場合には、二重に密封した容器に入れて運搬する。

3) 本遺伝子組換え生物液 (希釈液を含む) または本遺伝子組換え生物導入細胞を廃棄する際には、滅菌操作を行った後、本施設で定められた感染性廃棄物処理規程 (以下、「感染性廃棄物処理規程」と記す) に従い、廃棄する。

4) 被験者に対する本遺伝子組換え生物導入細胞の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室 (以下「細胞治療室」と記す) 内にて輸注により行う。なお、投与時に本遺伝子組換え生物導入細胞に直接接触した注射針、注射器、チューブ等の器具類は使い捨てとし、細胞治療室内で適切に滅菌操作を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。

5) 投与後 3 日まで、被験者を細胞治療室内の個室で管理し、検査等の理由で被験者が一時的に細胞治療室外の開放区内に出る場合には、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。また、投与後 3 日目の被験者細胞治療室管理解除は、被験者血液細胞ならびに血漿中の RCR が陰性であることを確認してから行う。なお、RCR が確認されたときは細胞治療室における管理を継続する。

6) 細胞治療室における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に滅菌操作し、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。また、被験者の尿及び糞便等の排泄物は、投与翌日以降に行われる被験者の血液を用いた PCR にて自己増殖能を獲得した野性型レトロウイルス (以下、「RCR」と記す) の存在が否定されるまで、細胞治療室内で適切に滅菌操作を行い、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物取り扱いは、本

遺伝子組換え生物溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取り扱いに準ずる。

7) 細胞治療室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具は、細胞治療室内で適切に滅菌操作を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄するかまたは細胞治療室内で十分に洗浄する。

8) 細胞治療室における管理解除後に被験者の血液細胞または血漿から RCR が検出された場合は、直ちに被験者を細胞治療室における管理下に移し、上記、(5)から(7)までと同様の措置を執る。

3 承認をうけようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

被験者への投与後、被験者体内で増殖能を獲得した遺伝子組換えウイルス (RCR) の有無は、投与後 3 日間及び 1、3 週目、それ以降は半年までは月に 1 回、それ以降は年に 1 回の 4070A env を標的とした PCR にて確認する。RCR 出現の際には、患者を入院管理とし、リンパ腫等の発症を注意深く観察する。

4 生物多様性影響が生ずるおそれがある場合における生物多様性影響を防止するための措置

本遺伝子組換え生物を用いた遺伝子導入細胞は、P2 レベルの拡散防止措置を執ることができ細胞調製室において、第一種使用規程に従い調製される。本遺伝子組換え生物が細胞調製室の床等に漏出した場合は、ただちにペーパータオル、布等で拭き取る。拭き取った後は、消毒用エタノールを該当箇所が完全に覆われるまで噴霧し、1 分以上放置する。使用したペーパータオルや布等は 121°C、20 分間以上のオートクレーブにより滅菌した後に廃棄する。

細胞治療室における管理解除後の被験者血液に RCR が検出された場合には、第一種使用規程に従い、被験者を直ちに細胞治療室における管理下に移すとともに、次亜塩素酸を用いて血液及び体液の滅菌操作等、第一種使用規程に定められた措置を執る。

5 実験室等での使用または第一種使用が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

当センターでは、前臨床研究として実際に臨床研究で使用する遺伝子組換え生物を用いて、複数回の Dry Run を行う予定であり、その過程で複数回 RCR の有無を確認する予定である。なお、基礎研究で使用した同ウイルスでの RCR は陰性であり、また、当該遺伝子治療臨床研究では、患者からの造血幹細胞の採取から投与までを全ての細胞操作を閉鎖系システムで行うため、外部へウイルスが漏出することはないと思われる。

6 国外における使用等により得られた情報

今回の遺伝子治療臨床研究は、現在までの米国国立衛生研究所の Malech 博士らが使用していた同一の遺伝子組換え生物を使用する予定であり、現時点で本遺伝子組換え体に RCR の検出はない。また、治療を受けた 3 名に患者においても患者体内に RCR を検出していない。

IV 生物多様性影響評価

1 他の微生物を減少される性質

1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR の感染性は、ウイルスがアンフォトロピック Env を持つので、ヒト細胞を含む広範囲の動物種の細胞に感染するが、微生物には感染しない。したがって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されていない。

2) 影響の具体的内容の評価

該当せず

3) 影響の生じやすさの評価

該当せず

4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

よって、他の微生物を減少される性質について、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

2 病原性

1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR の感染性は、ウイルスがアンフォトロピック Env を持つので、ヒト、サル、イヌ、ネコ等の広範囲の動物種の細胞に感染する。したがって、これら生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝播されることにより影響を受ける可能性はある。

2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物はヒト、サル、イヌ、ネコ等の細胞に感染し、染色体への挿入変異によりがん化を引き起こす可能性がある。マウス、ラットに対する病原性は宿主と同等と考えられる。本遺伝子組換え生物からの発現産物であるヒト由来 CYBB は、NADPH oxidase の構成タンパク質であり、この遺伝子が発現することでの病原性は極めて低いと考えられる。

3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等にしがって用いられる限り、本遺伝子組換え生物が施設外に放出される可能性は極めて低い。たとえ、放出されたとしてもその量はごく微量である。また、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠いているので、通常の細胞に感染してもウイルス粒子を産生することはない。一方、本遺伝子組換え生物の製造過程で出現した RCR が被験者細胞に混入して、被験者に投与された場合、被験者体内で RCR が産生される可能性がある。しかし、本遺伝子組換え生物は RCR の出現の可能性が極めて低いパッケージング細胞株を使用して製造されており、さらに使用に関しては、事前検査にて RCR が検出されないウイルス上清を使用するので、被験者体内に RCR が侵入する可能性は極めて低い。

4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

よって、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

3 有害物質の産生性

1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR の有害物質の産生性は知られていない。したがって、影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されていない。

2) 影響の具体的内容の評価

該当せず

3) 影響の生じやすさの評価

該当せず

4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

4 核酸を水平伝達する性質

1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR の感染性は、ウイルスがアンフォトロピック Env を持つので、ヒト、サル、イヌ、ネコ等の広範囲の動物種の細胞に感染する。したがって、これら生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝播されることにより影響を受ける可能性がある。

2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物または本遺伝子組換え生物に該当する RCR によって、これら遺伝子組換え生物の核酸が野生生物のゲノム中に組み込まれる可能性がある。

3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等にしがって用いられる限り、本遺伝子組換え生物が施設外に放出される可能性は極めて低い。たとえ、放出されたとしてもその量はごく微量である。このため、ごく微量の本遺伝子組換え生物によって野生生物に核酸が伝播する可能性は極めて低い。

遺伝子組換え生物に該当する RCR が多量に出現した場合には、血液、体液等を通じて他の個体に RCR が感染し、その核酸が伝播される可能性は否定できないが、RCR の出現の可能性が極めて小さいので、その可能性も極めて小さい。

4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

よって、核酸の水平伝播する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

5 その他の性質

核酸を垂直伝播する性質

本遺伝子組換え生物が感染可能な野生生物の生殖系細胞のゲノム中に組み込まれて、核酸垂直伝播する可能性は完全に否定できない。しかし、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、本遺伝子組換え生物によりその核酸が野生生物に伝播される可能性は極めて低く、さらに RCR が出現しない限り、本遺伝子組換え生物の核酸が伝播される細胞は本遺伝子組換え生物が最初に感染した細胞のみに限られているため、その細胞が生殖細胞である確率は極めて低い。また、RCR が出現する可能性は極めて低いため、本遺伝子組換え生物または RCR の核酸が生殖細胞に伝播される可能性は極めて低い。よって、核酸を垂直伝播する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

V 生物多様性の総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動植物の種類は 4070A アンフトロピック Env によつて規定されるため、齧歯類及びヒトを含む霊長類に感染するが、自然界で植物及び微生物には感染しない。

第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、本遺伝子組換え生物の環境中への拡散は極力抑えられており、たとえ拡散したとしても、その量は検出レベル以下であると推定される。本遺伝子組換え生物によるヒト由来 CYBB 遺伝子の発現はヒトには病原性はなく、ヒトに対する影響もない。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠いているため、MLV が増殖しているマウスに感染させれば、MLV が助けとなって増殖する可能性がある。しかし、その場合でも、MLV は血液を介してのみ感染し、同居等による水平感染はないので、さらなる感染が広がる可能性はほとんどない。本遺伝子組換え生物が MLV と同等に増殖するとは考えられず、やがて環境から消滅すると思われる。

環境中でマウスに感染し、MLV ゲノムとの相同組換えによつて RCR が出現する可能性や当該第一種使用によつて極めて微量の本遺伝子組換え生物由来 RCR の環境中への放出も完全に否定できないが、RCR の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝播する性質は野生型アンフトロピック・マウス白血病ウイルスと同等である。ヒトに MLV が感染しても病原性は報告されておらず、たとえ、ウイルスがヒト体内に侵入しても、血清補体により急速に失活すると考えられ、ヒト及び他の哺乳類、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

したがって、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等による限り、本遺伝子組換え生物による生物多様性影響が生ずるおそれがないと判断される。

Corporation obtaining approval, the name of its representative, and the address of its main office

Name: National Center for Child Health and Development (NCCHD)

Applicant: Tatsuo Kato

Address: 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo

Approved Type 1 Use Regulation

Name of the Type of Living Modified Organism	Nonproliferative and genetically modified Molony Murine Leukemia Virus expressing human cytochrome b-245, beta polypeptide (CYBB) that is packaged in the envelope protein derived from mous amphotropic virus, 4070A (MFGSgp91)
Content of the Type 1 Use of Living Modified Organism	Used in clinical facilities for human gene therapy, including storage, transportation, disposal and acts incidental to them
Method of the Type 1 Use of Living Modified Organism	<p>Address: 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo Name: NCCHD Hospital</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) The solution of MFGSgp91 is to be sealed in containers, transported to the clinical facility in the frozen state, and stored in a freezer in a locked storage room at the facility 2) Thawing the frozen solution of MFGSgp91, and diluting or dispensing the solution is to be performed within a safety cabinet or using a closed bag-system in a P2 laboratory. Transduction of human CD34⁺ cells with MFGSgp91 and culture of the transduced cells are also to be performed in a same manner. The diluted solution of MFGSgp91 and the transduced cells are to be stored in a refrigerator, a freezer or an incubator in the P2 laboratory. When the diluted solution, its frozen stock, or the transduced cells are transported to another P2 area through the open area, these items are to be sealed doubly in a container and transported to the area. 3) The items above are to be disposed after sterilization processing by autoclave or chemical reagents according to the disposal manual of infectious wastes ruled by NCCHD (hereafter referred to as the manual). 4) The transduced cells are to be administrated to the subject in an isolated room that is equipped with a proper nonproliferation measure of the infectious items to the environment (hereafter referred to as “cell therapy room”). Small objects such as syringes, needles, tubes, so on, which are contacted with the infectious items, are to be disposed after the sterilization processing according to the manual. 5) The subject is to remain within the cell therapy room until 72 hours after the administration of the transduced cells. When the subject needs to

	<p>move to another room through the open area to take a clinical inspection, he is to wear gown and a mask not to spread the infectious items. To free the subject from being isolated in the cell therapy room requires the result of PCR showing no RCR in the subject's blood and plasma, which is performed at 3 days after the administration. If RCR is positive, the subject is to remain in the cell therapy room until RCR is negative.</p> <p>6) Blood and fluid of the subject during the isolated period are to be disposed the sterilization processing according to the manual. Excrement such as urine and stool are to be disposed after sterilization using chemical reagents within the cell therapy room until the PCR test, which is done at the next day or subsequent ones, shows no RCR in the subject's blood. Excrement of the subject used as a clinical sample is to be disposed after the sterilization processing according to the manual.</p> <p>7) Instruments invasively used to the subject or ones in contact with excrement during the isolated period are to be sterilized properly in the cell therapy room followed by full washing or disposal according to the manual.</p> <p>8) When RCR is detected from the subject's blood or plasma after the decontrol, he is to be immediately moved under the management in the cell therapy room, and the above and the same measure as (5) to (7) are performed.</p>
--	--

慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究

～自家末梢血幹細胞採取の手順～

1. 目的

- 1.1 造血幹細胞遺伝子治療において、遺伝子導入細胞およびバックアップのために自家末梢血造血幹細胞を採取する。
- 1.2 採取した造血幹細胞を適切に凍結保存する。
- 1.3 末梢血造血幹細胞採取手順について記述する。
 - 1.3.1 患者が造血幹細胞採取について理解した上で、採取を行う。
 - 1.3.2 患者に過度の苦痛や不安を与えずに、採取を行う。
 - 1.3.3 穿刺による末梢神経障害、血腫、血管迷走神経反射、細菌感染など、副反応がおこらないように注意する。副反応がおきた際は、速やかに適切な対応を行う。
 - 1.3.4 採取者の針刺しや感染を予防する。

2. 責任者

- 2.1 総括責任者
国立成育医療研究センター成育遺伝研究部 小野寺雅史部長
- 2.2 細胞採取責任者
国立成育医療研究センター腫瘍科
- 2.3 細胞処理責任者
国立成育医療研究センター成育遺伝研究部 河合利尚室長
- 2.4 品質管理責任者
国立成育医療研究センター成育遺伝研究部

3. 採血する環境

- 3.1 病室で末梢血幹細胞を採取する。事前に採取法の説明・デモ等を行う。
- 3.2 患者がリラックスできる雰囲気（音楽、TV、ビデオ等）を心がける。必要に応じて、保護者や家族に付き添ってもらおう。
- 3.3 適切な室温や周囲の血液汚染の有無等、環境整備に配慮する。

4. 採取方法

4.1 末梢血幹細胞採取の準備

4.1.1 末梢血幹細胞の採取日を決定する。

採取日：_____年_____月_____日

4.1.2 採取日まで5日間程度、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を連日皮下接種あるいは静脈内注射を行う。

G-CSF 投与量：_____

1回目接種日：_____年_____月_____日

2回目接種日：_____月_____日

3回目接種日：_____月_____日

4回目接種日：_____月_____日

5回目接種日：_____月_____日

4.1.3 G-CSF 最終投与後に、採取前の血液検査オーダーを入力する。

4.1.4 G-CSF 最終投与後に末梢血幹細胞を採取する。

4.1.5 採取日、担当医師（_____）は問診と診察を行う。

体温：_____℃ 呼吸数：_____回/分

脈拍：_____回/分 血圧：_____mmHg

自覚症状：_____

身体所見：_____

その他：_____

4.1.6 血液検査を行う。

4.1.7 血液検査結果を確認する。 採取可能 採取不可

血算：_____

生化学：_____

その他：_____

4.1.8 ベットの周囲に血液汚染がないか確認する。

異常なし 異常あり（_____）

4.2 採取装置の準備

4.2.1 採取に必要な物品の準備

ディスポーザブルの採取回路 1セット

ACD-A 液（500ml）2袋

生理食塩水（500ml）2袋

- ノボヘパリンナトリウム
- 輸血用バッグ
- 太径エクステンションチューブ 2本
- シリンジポンプ
- 100単位ヘパフラッシュ
- 10単位ヘパフラッシュ
- カルチコール
- 三方活栓
- 加温機
- 砂袋

4.2.2 成分採血装置 (Cobe bectra, テルモ) の電源を入れ、動作確認をする。

4.2.3 ディスポーザブルの回路をセットし、マニュアルに従って ACD-A 液と生理食塩水でプライミングを行う。(体外循環のボリューム量に応じて、幼小児では赤血球プライミングを行う。その場合、輸血用血液製剤を使用する)

4.3 採取ルートの確保

ルート確保時に、安静を保てないことが予想される場合は、麻酔科へルート確保を依頼する。

4.3.1 動脈ルートを確認する 30 分前に穿刺部にペンレスを貼用する。

4.3.2 採取者は石けんで手洗いをし、擦式消毒液を用いて消毒する。

4.3.3 穿刺部を消毒し動脈ルートを確認する。必要に応じて、穿刺前に穿刺部を、0.5%塩酸プロカイン (あるいはキシロカイン) を皮下注射する。

4.3.4 穿刺部を消毒し静脈ルートを確認する。

4.3.5 小児の場合、橈骨動脈等を 22G-24G 留置針で穿刺し脱血路として使用する。成人では、正中静脈等を 18G 留置針で穿刺する。

4.3.6 ルート確保後ヘパリンロックし、シーネで固定する。

4.4 末梢血造血幹細胞の採取

4.4.1 ルートの血流を確認したら、脱血ライン、返血ラインに注意して回路に接続し、採取マニュアルに従って採取を開始する。返血ラインには加温器を装着する。採取開始後 30 分程度は嘔気や手足の痺れ等が生じることがあるので安静臥床が望ましい。静脈圧の表示を確認しながら血流を保てるようにポンプの速度を調整し、脱血ラインの角度を適正に保つ。採取開始 30 分経過後、問題がなければ経口摂取してよいが、牛乳・乳製品は避ける。

4.4.2 患児の体格に応じて採取量、サイクル数などを設定する。自動採取での分離が不良な場合は、マニュアル採取に切り替える。

4.4.3 採取終了後、回路分の返血を行う。

4.4.4 採血ライン、返血ラインを抜針し、止血をする。動脈ライン抜去部はしばらく圧迫固定をし、確実に止血されていることを確認してから圧迫固定を解除する。

4.4.6 総採取量、総処理量、ACD液消費量を記載する。

総採取量 (A) : _____ (単位)

総処理量 : _____ (単位)

ACD液消費量 : _____ (単位)

4.5 採取中の患者観察

4.5.1 採血開始後、血流を見ながら採血速度を適宜変更する。

4.5.2 成分採血装置 (Cobe bectra) 操作手順に準拠する。

4.5.3 患者 (暴れるので鎮静したりします)、バイタルを注意深く観察する。

(こんなに測定はいらないと思います。このあたりは現行の看護師さんのマニュアルにあわせて。今は、開始前と途中1-2回と、終了時ぐらいです)

[15分後] 体温 : _____ °C、呼吸数 : _____ 回/分、脈拍 : _____ 回/分、血圧 : _____ mmHg

[60分後] 体温 : _____ °C、呼吸数 : _____ 回/分、脈拍 : _____ 回/分、血圧 : _____ mmHg

[120分後] 体温 : _____ °C、呼吸数 : _____ 回/分、脈拍 : _____ 回/分、血圧 : _____ mmHg

[180分後] 体温 : _____ °C、呼吸数 : _____ 回/分、脈拍 : _____ 回/分、血圧 : _____ mmHg

[240分後] 体温 : _____ °C、呼吸数 : _____ 回/分、脈拍 : _____ 回/分、血圧 : _____ mmHg

4.6 採血バックの処理

4.6.1 採取バッグをシーラーで (クランプして) 切り離す。

4.6.2 患者氏名、日時を記載する。

4.6.3 採取バックを輸送バックにいれる。

4.7 記録

4.7.1 採取後の患者状態

終了時刻 : _____ 時 _____ 分

体温 : _____ °C、呼吸数 : _____ 回/分、脈拍 : _____ 回/分、血圧 : _____ mmHg

採血時の状態 : イベントなし

イベントあり (_____)

終了時血液チェック

問題なし 治療介入要する問題あり (詳細 : _____)

バックアップ用として、単核球を保存する (3.3 単核球の保存)。

5. 輸送

- 5.1 造血幹細胞採取バックをいれた輸送バックを、研究所5階細胞準備室へ輸送する。

6. 単核球数と CD34 陽性細胞の算定

- 6.1 採取バックから細胞浮遊液 1ml を採取し、FACS チューブへ移す

6.2 細胞総数と生細胞数の算定

- 6.2.1 自動血球計数装置 (ADAM, Digital Bio 社製) の電源を入れる。
6.2.2 マイクロチューブを2本用意し、それぞれ表面に T、N と記す。
6.2.3 マイクロチューブ T に AccuStain Solution T (Digital Bio 社製) を 20 μ l とる。
6.2.4 マイクロチューブ N に AccuStain Solution N (Digital Bio 社製) を 20 μ l とる。
6.2.5 マイクロチューブ T と N に、細胞浮遊液 (FACS チューブ中) をそれぞれ 20 μ l ずつ加える。
6.2.7 マイクロチューブ内で混和した後、AccuChip (Digital Bio 社製) の T と N の挿入口へそれぞれ 40 μ l ずつ加える。
6.2.8 AccuChip を自動血球計数装置 (ADAM) に挿入し、計測を行う。

6.2.9 細胞数の記録

全細胞数： _____ $\times 10^6$ 個/ml 生存率： _____ %

生存細胞数 (B)： _____ $\times 10^6$ 個/ml

全単核球数 (C)： _____ $\times 10^6$ 個 (総採取量(A)ml \times 生存細胞数(B)個)

6.3 CD34 陽性細胞数の算定

- 6.3.1 FACS チューブに 2×10^5 個 (_____ μ l) のサンプルをいれる。
6.3.2 PBS バッファーを 3ml 加えて、1700rpm 室温で5分間遠心する。
6.3.3 上清を除き、CD34⁻、CD38⁻抗体を 5 μ l ずつ加えて、4 $^{\circ}$ Cで30分間静置。
6.3.4 PBS バッファーを 3ml 加えて、1700rpm 室温で5分間遠心する。
6.3.5 上清を除き、PBS バッファーを 3ml 加えて、1700rpm 室温で5分間遠心する。
6.3.6 上清を除き、PBS バッファー300 μ l 加えてを FACS 解析まで、4 $^{\circ}$ Cで暗所に保存する。

CD34⁺細胞 (D)： _____ %

CD34⁺CD38⁻細胞： _____ % CD34⁺CD38⁺細胞： _____ %

全 CD34⁺幹細胞数： _____ $\times 10^6$ 個 (全単核球数(C) \times CD34⁺細胞 (D) \div 100)

7. 造血幹細胞の冷凍保存（バックアップ用の有核細胞保存）

7.1 回収した有核細胞液の処理

7.1.1 遠心分離

SPEED：200G（回転数：840rpm）

TIME：15min

TEMP：20°C (R. T)

ACCEL/DECEL：9/1

使用記録記入

7.1.2 遠心後の細胞バッグ、廃液バッグ、培地バッグ、新しい細胞用バッグを連結

7.1.3 細胞バッグを分離スタンドに設置

7.1.4 廃液バッグを開放し、細胞バッグの上清を廃液バッグに回収。

7.1.5 PBS/1%アルブミンバッグから細胞バッグに _____ ml 入れる。

7.1.6 ペレットを手で優しくもみほぐす。

7.1.7 遠心分離

SPEED：200G（回転数：840rpm）

TIME：15min

TEMP：20°C (R. T)

ACCEL/DECEL：9/1

使用記録記入

7.1.8 遠心後の細胞バッグ、廃液バッグ、培地バッグ、新しい細胞用バッグを連結。

7.1.9 細胞バッグを分離スタンドに設置

7.1.10 廃液バッグを開放し、細胞バッグの上清を廃液バッグに回収。

7.1.11 PBS/1%アルブミンバッグから細胞バッグに _____ ml 入れる。

7.1.12 ペレットを手で優しくもみほぐす。

7.1.13 遠心分離

SPEED：200G（回転数：840rpm）

TIME：15min

TEMP：20°C (R. T)

ACCEL/DECEL：9/1

使用記録記入

7.1.14 遠心後の細胞バッグ、廃液バッグ、培地バッグ、新しい細胞用バッグを連結。

7.1.15 細胞バッグを分離スタンドに設置

7.1.16 廃液バッグを開放し、細胞バッグの上清を廃液バッグに回収。

7.1.17 RPMI 培地バッグから細胞バッグに _____ ml（細胞濃度： $2-10 \times 10^7$ 個/ml）
入れる。

7.1.12 ペレットを手で優しくもみほぐす。

7.2 記録

細胞バック液量 (E) _____ ml 処理年月日 _____ 年 月 日
CP-1 Lot 番号 _____ 25%アルブミン Lot 番号 _____

7.3 保存液の調整

7.3.1 25%アルブミン (化血研) をシリンジに 32ml 吸い上げ、CP-1 (極東製薬工業) 68ml のバイアルのゴム栓をイソジンで消毒し、アルブミンを静かに加えて混和し 4°C で保管する。(有核細胞液含むアルブミン最終濃度 4%)

7.3.2 凍結バッグに患者名、採取年月日を記載する。

7.3.4 細胞バッグ、凍結バッグ、アルブミン添加 CP-1 を接続する。

7.3.5 氷温で細胞バッグ液量 (E) と同量 _____ ml のアルブミン添加 CP-1 液を添加する。

7.3.6 凍結バッグを切り離す。

7.3.7 凍結バッグを、-150°Cディープフリーザーで保存する。

8. 必要物品

8.1 機材

- 8.1.1 ジャクソンリリースセット
- 8.1.2 ジャクソンリリース接続用マスク → 麻酔用マスク
- 8.1.3 血圧計 (TERUMO, 病院用テルモ電子血圧計)
- 8.1.4 体温計 (TERUMO, 病院用テルモ電子体温計)
- 8.1.5 はさみ
- 8.1.6 コッヘル
- 8.1.7 メジャー
- 8.1.8 聴診器
- 8.1.9 点滴台
- 8.1.10 採血枕
- 8.1.11 採血運搬用ケース
- 8.1.12 FACSariaII (BD Bioscience)
- 8.1.13 自動血球計数装置 (ADAM, Digital Bio 社製)
- 8.1.14 プログラムフリーザー
- 8.1.15 ディープフリーザー

8.2 試薬、消耗品

- 8.2.1 消毒用エタノール含有浸綿 (アルコール綿) 「ワンショットプラス®P」 (白十字株式会

社)

- 8.2.2 消毒用エタノール含ウェットティッシュ「ショードック®S」250枚入りケース付き・250枚入り詰め替え(白十字株式会社)
- 8.2.3 速乾性擦式アルコール製剤「ゴージョー®」350ml (ゴージョージャパン株式会社)
- 8.2.4 ラテックスフリーストレッチ (駆血帯)「VACUTAINER®」(BECTON DICKINSON)
- 8.2.5 滅菌ガーゼ「滅菌ケーパイン®No.7165」1枚入り (川本)
- 8.2.6 未滅菌手袋「シンガープラスチック手袋」Mサイズ100枚入り (宇都宮製作株式会社)
- 8.2.7 未滅菌手袋「シンガープラスチック手袋」Sサイズ100枚入り (宇都宮製作株式会社)
- 8.2.8 処置用シート「クリニカルシートW」巾50cm×30m巻 (アトム)
- 8.2.9 ディスポーザブル注射器材廃棄容器「KEEPER2」(グツツール)
- 8.2.10 滅菌カップ入綿球「ネオ・パール綿球®」EB20-3 (オオサキメディカル株式会社)
- 8.2.11 滅菌綿球「パール綿球」TS14-10 (オオサキメディカル株式会社)
- 8.2.12 注入器「ジェイフィード®注入器」2,5ml・5ml・10ml (JMS)
- 8.2.13 心電図モニター用電極「ビトロード電極V-120SK」(日本光電工業)
- 8.2.14 心電図モニター用電極「ケンドール電極」(コヴィデエン)
- 8.2.15 ポージーラップ (フレックスプローブ用) GE 橋河メディカルシステム (MPI)
- 8.2.16 ディスポセンサー「LNOP® Inf-L・Pdt」(マシモ)
- 8.2.17 ビニール袋30×45 100枚入りひも付き (FUJINAP)
- 8.2.18 医療廃棄物用段ボール
- 8.2.19 25%アルブミン (化血研)
- 8.2.20 テルフレックス分離バッグ600ml、300ml (テルモ)
- 8.2.21 テルフュージョンY型連結管 (テルモ)【TC-Y01】
- 8.2.22 注射針21G、23G (テルモ)
- 8.2.23 操作アダプター (テルモ)【TC-MP】
- 8.2.24 サフィード延長チューブ (テルモ)【SF-ET3825】
- 8.2.25 三方活栓R型 (テルモ)【TS-TR2K】
- 8.2.26 シリンジ1、10、20、30、50ml (テルモ)
- 8.2.27 細胞凍結保護液CP-1 (100ml) 極東製薬【27200】
- 8.2.28 細胞凍結保護液CP-1 (50ml) 極東製薬【27202】
- 8.2.29 抗ヒトCD34モノクローナル抗体
- 8.2.30 抗ヒトCD38モノクローナル抗体
- 8.2.31 AccuStain Solution T/N (Digital Bio 社製)
- 8.2.32 RPMI1640 培地

8.3 ME 機器

- 8.3.1 パルスオキシメーター・センターケーブル Massimo Rainbow SET パルスCOオキシ

独立行政法人 国立成育医療研究センター
研究課題名：慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究
版番号：自家末梢血幹細胞採取 SOP 第1版
作成年月日：2013年1月28日

- メータラディカル7 (マシモジャパン株式会社)
- 8.3.2 輸液ポンプ「AS700」(アトムメディカル株式会社)
- 8.3.3 シリンジポンプ「S-1235」(アトムメディカル株式会社)
- 8.3.3 酸素流量計「8MFA」(PRECISION MEDICAL)
- 8.3.4 ECG 送信機「ZB-920P 心電図・呼吸」(日本光電工業株式会社)
- 8.3.5 医用テレメータ「WEP-5208」(日本光電株式会社)

慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究

～患者排泄物の処理手順～

1. 排泄物処理の目的

この遺伝子治療では、ウイルスを使用して治療を行う。使用するレトロウイルスベクターは安全性を確認したものであり、理論上、患者の排泄物中にウイルスが排泄される危険性はない。しかし安全を期するために、患者の身体内にウイルスがないことを確認できるまでの期間（ウイルス拡散防止期間）は、ウイルスの拡散を防止する目的で患者排泄物の消毒処理を行う。

2. 当センターにおける遺伝子治療患者の吐物や排泄物、及びそれらで広範囲に汚染されたリネン類の処理方法

- ① 看護師は、あらかじめ患者の使用する便座に、ビニール袋をかけた「安心ユーリンパン」をセットする。
- ② 個室の便器で排泄した後は、速やかに看護師へ連絡する。
- ③ 看護師は、手洗い、擦式消毒液による手指消毒後、ディスポエプロン（以下エプロン）と未滅菌手袋（以下手袋）を着用する。
- ④ 患者の排尿・排便後のケアは看護師が行い、患者は排泄物に触れないようにする。排尿・排泄後、患者は石鹼を用いて手洗いを行う。
- ⑤ ケアで使用した物品はすべてビニール袋に入れて閉じる。
- ⑥ 排尿量、排便量は計測後、次亜塩素酸ナトリウムを（キャップ1杯）加えて、速やかに便器内に破棄する。
- ⑦ 使用物品の入ったビニール袋及びエプロンや手袋、ユーリンパンにセットしたビニール袋は、前室に用意してあるオートクレーブ専用袋に入れる。
- ⑧ 次回ケア用として、次亜塩素酸ナトリウムを（キャップ1杯）便器内にあらかじめ入れておく。
- ⑨ 手洗いと擦式消毒液による手指消毒を行い退室。
- ⑩ 便器及びその周辺は次亜塩素酸ナトリウムを使用し毎日及び汚染の都度、看護師が消毒、処理する。
- ⑪ 遺伝子治療後、ウイルス拡散防止期間が終了するまで上記の処理を継続する。
- ⑫ おむつ使用時は、ウイルス感染の扱いとして感染症（接触感染）の取り扱いに準じて処理する。使用後のおむつは、ビニール袋に入れて閉じてオートクレーブ専用袋へ入れる。
- ⑬ 排泄物で汚染されたリネン類は、ビニール袋に入れて破棄する。
- ⑭ 排泄物で汚染された衣類は、次亜塩素酸ナトリウムで消毒後、洗濯する。

必要物品リスト

1.1 機材

- 1.1.1 計り
- 1.1.2 排尿用器ユーリパン

1.2 消耗品

- 1.2.1 速乾性擦式アルコール製剤「ゴージョー®」350ml（ゴージョージャパン株式会社）
- 1.2.2 未滅菌手袋（シンガープラスチック手袋パウダーフリーD-11M、D112-S）
- 1.2.3 処置用シート「アトムクリニカルシートW」巾50cm×30m巻（ライフメッド）
- 1.2.4 次亜塩素酸ナトリウム「キッチンハイター」（花王株式会社）
- 1.2.5 ビニール袋「スタンダードポリ袋」No.15 100枚入（日本サニパック株式会社）
- 1.2.6 ディスポガウン「ディスポーザブルプラスチックエプロン」50枚入ピンク（栗原医療機器）
- 1.2.7 医療廃棄物用段ボール
- 1.2.8 ビニール袋「透明ポリ袋」30L・45L（システムポリマー株式会社）
- 1.2.9 ガムテープ（ニチバン）
- 1.2.10 トイレットペーパー
- 1.2.11 トイレ用ハイター
- 1.2.12 オートクレーブ専用袋

《参考資料》

遺伝子組み換え生物等の第一種使用等の方法で、以下のように処理することが義務づけられている。

- ① 患者に対する本遺伝子組換え生物導入細胞の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「クリーンルーム」と記す）内で輸注により行う。なお、投与時に本遺伝子組換え生物導入細胞に直接接触した注射針、注射器、チューブ等の器具類は使い捨てとし、クリーンルーム内で適切に消毒を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。
- ② 投与日から3日間は、患者をクリーンルーム内の個室で管理し、検査等の理由にて患者が一時的にクリーンルーム外の開放区内に出る場合には、マスク及びガウン等の着用にてウイルス漏出の予防措置を義務付ける。クリーンルームにおける管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切に消毒し、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。また、被験者の尿及び糞便等の排泄物は、投与翌日以降に行われる被験者の血液を用いたPCRにて自己増殖能を獲得した野性型レトロウイルス（以下、「RCR」と記す）の存在が否定されるまで、クリーンルーム内で適切に消毒を行い、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物取り扱い、本遺伝子組換え生物溶液及び本遺伝子組換え生物導入細胞の取り扱いに準ずる。
- ③ クリーンルームにおける管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具及び被験者の排泄物等に接触した器具は、クリーンルーム内で適切に消毒を実施した後、感染性廃棄物処理規程に従い廃棄するかまたはクリーンルーム内で十分に洗浄する。
- ④ クリーンルームにおける被験者の管理を解除する前に、RCRが被験者の血液細胞及び血漿において陰性であることを確認する。RCRが確認されたときは、クリーンルームにおける管理を継続する。
- ⑤ クリーンルームにおける管理解除後に被験者の血液細胞または血漿からRCRが検出された場合は、直ちに被験者をクリーンルームにおける管理下に移し、上記、②から④までと同様の措置を執る。

慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究 連絡先		
総括責任者	小野寺 雅史	国立成育医療研究センター研究所・成育遺伝子研究部 部長（免疫科） PHS:7722
担当医師	河合 利尚	国立成育医療研究センター研究所・成育遺伝子研究部 室長（免疫科） PHS:7706