

至適用量である 1×10^8 PFU のマウス IL-12 遺伝子発現アデノウィルスベクター投与後、脾臓腫大以外の副作用は認められなかった (図-4)。ベクター投与後の局所および全身的免疫反応の評価であるが、マウス血清中の IL-12 レベルは投与翌日にピークとなり、投与3日後にはベクター投与前のレベルに低下し、脾細胞中の NK 細胞活性はベクター投与翌日にピークとなり投与5日間は活性の上昇が認められた。ベクター投与14日後における脾細胞を用いた CTL 活性は有意な上昇を認めていない。

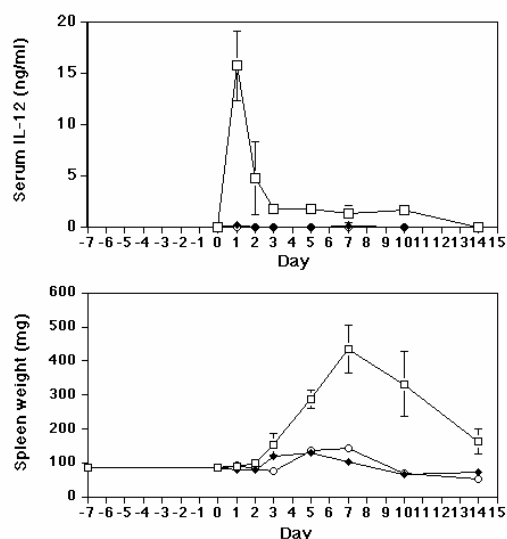


図-4 : Serum IL-12 concentration (in ng/ml, error of mean shown), and spleen size (in mg, error of mean shown) at various time points from orthotopic injection of RM-9 cells (day -7) through virus injection of the orthotopic tumor (day 0) with AdmIL-12 (□ 1×10^8 PFU, 3 animals), Adv/CMV/β-gal (◆ 1×10^8 PFU, 2 animals), or PBS (○ 1 animal).

マウス IL-12 遺伝子発現アデノウィルスベクター

一投与群の腫瘍内において F4/80 を標識としたマクロファージの浸潤がベクター投与1-2日後にコントロール群に比べて有意に増加していたが、ベクター投与7日目までには速やかに低下していた。興味深いことに iNOS を標識したマクロファージの腫瘍内への浸潤がマウス IL-12 遺伝子発現アデノウィルスベクター投与7日目に有意に増加していた。iNOS を標識したマクロファージレベルは、数値的に F4/80 を標識としたマクロファージよりも少ないため、活性化されたマクロファージは F4/80 を標識としたマクロファージのごく少数であると考えられる。

腫瘍内における CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の浸潤も、ベクター投与7日目に有意に増加していた。このような結果より我々は IL-12 局所遺伝子治療が NK 細胞、マクロファージ、そして T 細胞を介した抗腫瘍効果、転移抑制効果に関与すると結論した。

4) マウス血清中の IL-12 濃度の変化と副作用

本研究は研究分担者の那須保友・江原 伸を中心に実施されている。

マウス血清中の IL-12 レベルは投与翌日にピークとなり (15000pg/ml)、投与 3 日後にはベクター投与前のレベルに低下した。IL-12 の上昇後に脾臓の重量は増加したが IL-12 レベルの低下に伴い脾臓の重量は正常に戻った。このことはヒトにおける rhIL12 (recombinant human IL-12 protein) の静脈内投与において血清中の IL-12 の上昇にともない発現した骨髄抑制、脾臓の腫大と類似した現象である。尚、一過性の IL-12 上昇に伴うと考えられる死亡例はマウスには認められず、また体重減少等も認められなかった。本実験において投与されたマウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの量は 1×10^8 PFU であり、virus particle (vp) 換算で約 2×10^9 vp となる PFU:vp 比 1:20 として計算)。本遺伝子治療臨床研究においては 1×10^{10} vp から投与が開始される。ヒトとマウスにおける体重差 ($60\text{kg} : 30\text{g} = 2000:1$) を考慮するとマウスに投与された量はヒトでは 4×10^{12} vp に相当し、ほぼ計画における最大用量に匹敵する。(追記: 現在米国で使用中のアデノウイルスベクターの PFU:vp 比は 1:72 との報告がある。それをもとに換算すると 1.4×10^{13} vp となり計画の最大用量の約 3 倍に匹敵する)

5) 血液生化学データ (肝機能) の変化

さらにマウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター投与後の安全性に関する検討として肝機能の変化を検討した。治療効果実験と同様にマウス同所移植前立腺癌モデルを用いて、種々の濃度の (5×10^7 、 1×10^8 、 3×10^8 PFU) マウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを腫瘍内投与した。尚、治療実験における至適用量は 1×10^8 PFU である。ベクター投与 14 日後に屠殺し血液を採取し、種々の肝機能を測定した。その結果、代表的な肝機能の指標である ALT: Alanine aminotransferase AST: Aspartate aminotransferase は 5×10^7 、 1×10^8 PFU 投与群においては肝機能は正常値内に保たれていた。 3×10^8 PFU 投与群において上昇する傾向を認めたが統計学的有意差は認められなかった (表-1)。他のパラメーターである LDH、bilirubin, total protein, albumin における変化は認め

られなかった (表-2)。

表—1 (未発表データ)

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)
Normal range	84 - 143	260 - 383
β -gal 1×10^8	38.7 ± 42	372.7 ± 163
IL-12 5×10^7	40.2 ± 54	300.5 ± 443
IL-12 1×10^8	44.3 ± 49	209.5 ± 194
IL-12 3×10^8	472.4 ± 1010	593 ± 1066

表—2 : 各種パラメーターの実測値 (未発表データ)

Mouse No.	Vector	Tumor wt.(g)	T.Bil (mg/ml)	D.Bil (mg/ml)	T.Pro g/dl	ALT U/L	AST U/L	ALP U/L	LDH U/L	ALB g/dl	Comment
589	β -gal (1×10^8)	4.6052	0.6	0.9	4.9	33	418	16	4990	2.5	hemolyzed
591	β -gal (1×10^8)	2.8099	0.3	0.3	5.2	30	566	14	3730	3	
595	β -gal (1×10^8)	1.5109									hemolyzed
596	β -gal (1×10^8)	3.1287	0.4	0.4	6.3	14	260	9	3780	3.4	
598	β -gal (1×10^8)	3.2742	0.6	0.9	4.6	122	550	10	5280	2.4	hemolyzed
197	β -gal (1×10^8)	1.9453	0.4	0.6	6.5	19	181	12	928	3.4	hemolyzed
600	β -gal (1×10^8)	3.4051	0.2	0.2	6	14	261	10	2250	3.3	
Average		2.95	0.42	0.55	5.58	38.67	372.67	11.83	3493.00	3.00	
STDEV		1.02	0.16	0.30	0.79	41.61	162.96	2.71	1655.12	0.45	
101	IL-12 (5×10^7)	1.286	1	1.6	6.7	17	175	18	1216	3.4	hemolyzed
102	IL-12 (5×10^7)	1.7764	0.3	0.3	6.1	19	164	12	924	2.9	
103	IL-12 (5×10^7)	1.2887	1	1.4	5.8	149	1200	2	3560	3.1	hemolyzed
104	IL-12 (5×10^7)	1.8754	0.2	0.3	5.4	9	90	12	397	2.8	
105	IL-12 (5×10^7)	0.3206	0.4	0.5	6.5	20	45	63	220	3.6	
106	IL-12 (5×10^7)	0.8937	0.3	0.3	6.1	27	129	23	505	3.2	
Average		1.24	0.53	0.73	6.10	40.17	300.50	21.67	1137.00	3.17	
STDEV		0.58	0.37	0.60	0.47	53.63	443.28	21.44	1241.81	0.30	
107	IL-12 (1×10^8)	0.634	0.5	0.3	5.6	14	82	6	1910	2.2	
108	IL-12 (1×10^8)	0.7376	0.2	0.2	6.2	23	110	27	419	2.6	
109	IL-12 (1×10^8)	1.1288	0.5	0.4	6.5	62	361	14	3120	3	
110	IL-12 (1×10^8)	1.4241	0.3	0.5	5.3	11	88	5	311	2.4	
111	IL-12 (1×10^8)	0.4722	0.5	0.6	7	136	537	8	2380	2.7	
112	IL-12 (1×10^8)	0.2451	0.2	0.3	7.2	20	79	52	374	2.9	
Average		0.77	0.37	0.38	6.30	44.33	209.50	18.67	1419.00	2.63	
STDEV		0.43	0.15	0.15	0.75	48.57	193.99	18.24	1214.72	0.30	
113	IL-12	0.6121	0.2	0.2	5.8	22	89	30	287	2.9	

114	(3x10 ⁸) IL-12	0.6775	0.2	0.2	6.7	16	150	11	655	2.9	
115	(3x10 ⁸) IL-12	0.9136	0.3	0.2	6.5	22	128	24	459	3.4	
116	(3x10 ⁸) IL-12	0.8873	0.6	0.8	7	2280	2500	19	9230	3.7	hemolyzed
118	(3x10 ⁸) IL-12	0.9191	0.2	0.1	5.8	22	98	2	294	2.2	
Average		0.80	0.30	0.30	6.36	472.40	593.00	17.20	2185.00	3.02	
STDEV		0.15	0.17	0.28	0.54	1010.48	1066.32	10.99	3941.14	0.57	

6-3-4-3. 前立腺癌に対する IL-12 遺伝子治療臨床研究

上記の基礎研究結果を踏まえ、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床プロトコルは、2001年8月に米国国立衛生研究所(NIH)のOffice of Recombinant DNA Activities (ORDA:旧 RAC)及び米国食品医薬品庁(FDA)の認可を受けた。2004年5月18日ベイラー医科大学において第1例目の前立腺癌に対する IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療が施行された。本臨床研究とベイラー医科大学で行われている IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究とのプロトコル比較表を以下に提示する

研究名		前立腺癌に対する Interleukin-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究	前立腺癌に対する Interleukin-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究
実施施設		岡山大学	米国ベイラー医科大学
承認日/実施日		平成 15 年 11 月 27 日 (学内承認)	平成 13 年 8 月 (FDA の承認) / 平成 16 年 5 月 18 日 (実施)
実施症例		未実施	4 名(平成 19 年 6 月現在)
ベクターの種類		アデノウイルスベクター	
ベクターの生産		ベイラー医科大学遺伝子ベクター室 (同一の構造、方法にて製造)	
遺伝子		Interleukin-12	
ベクター投与量	レベル 1	1x10 ¹⁰ vp	
	レベル 2	5x10 ¹⁰ vp	
	レベル 3	1x10 ¹¹ vp	
	レベル 4	5x10 ¹¹ vp	
	レベル 5	1x10 ¹² vp	
	レベル 6	5x10 ¹² vp	

対象となる患者	年齢	上限なし	
	前治療	内分泌療法を必ず含む	内分泌療法、放射線療法、凍結療法
	病期	B,C,D	B,C,D
	転移症例	含まれる	
	術後の再発	含まれる	含まれない
	症例数	各レベル標準3人（最大6名） 標準21人（最大36名）	各レベル標準3人（最大5名） 標準21人（最大35名）
注入部位		前立腺、術後再発部位、 転移部位	前立腺
治療としての位置付け		局所および全身治療	

ベイラー医科大学では2007年6月現在までに4例に対して実施されており重篤な副作用は発生していないとの情報を得ている。（注記1,2）本臨床研究において用いるIL-12遺伝子発現アデノウイルスベクターはベイラー医科大学の臨床研究と同じく、同医科大学遺伝子ベクター室において作製されたものを用いる。

尚、ベイラー医科大学以外でも米国Mount Sinai School of Medicineで前立腺癌に対するIL-12遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療“Gene Therapy for Prostate Cancer That Returns After Radiation Therapy”が計画・承認されているがいまだ症例の登録は行われていない。

（注記1）：3年間で登録症例数が4例と少数である理由等について

ベイラー医科大学において先行して実施されたHSV-tk遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた臨床研究では放射線治療後の転移を有しない再発症例を対象とし約1年間（1996年8月28日から1997年8月14日）で18例登録され実施された。当初同様にIL-12遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究もベイラー医科大学においては放射線治療後の転移を有しない再発症例を対象とし前立腺局所投与の手法を採用し、研究を迅速に終了し、転移巣を有する症例を対象とした研究を別途計画する予定であった。しかし同時期に転移巣を有しない症例を対象とした凍結療法の研究が開始され、そちらに多くの患者がリクルートされたため、症例の登録が当初の予定通り進まなかったとの情報をトンプソン教授より得ている。

その後、臨床研究推進の対応として2006年6月22日ベイラー医科大学での前立腺癌遺伝子治療会議において表のごとく適応の拡大が認められ、有転移症例も対象となるとともに内分泌療法なら

びに凍結療法後の再発も対象となった。会議の資料を資料として添付する。(添付資料 12-9)

(注記 2)：日米における注入部位の差について（バイラー医科大学では前立腺局所投与のみとし
転移巣、術後局所再発巣への注入が計画されていない理由）

バイラー医科大学では 1996 年に遺伝子治療を実施して以来、放射線科との協力により放射線治
療後の再発、放射線治療との併用における前立腺へのベクター投与を中心に研究を進めてきた経緯
があり、内分泌療法後の再発、原発巣である前立腺が摘除された後の再発については当初より研究
対象として想定していない。われわれは当初より有効な治療法が確立されていない内分泌療法再燃
前立腺癌を遺伝子治療の対象として臨床研究ならびに基礎研究を推進しており、今回もそのような
観点から当該臨床研究を立案した。

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アデノウイルスベクターの純度

本遺伝子治療臨床研究に用いるベクターの生産には、以下のマスターセルバンク、マスターウイルス
バンクを用いた。以下のバンクは F D A のガイダンスに沿った管理試験項目の条件を満たしている。

詳細は以下に記載する。

1) 293 Master Cell Bank

293 Master Cell Bank			
TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
In vitro assay for the presence of viral Contaminants	Magenta Corp	None detected	None detected
In vivo test for the presence of inapparent viruses	Magenta Corp	None detected	None detected
Transmission electron microscopic evaluation of cultured cells	Magenta Corp	Report result	No identifiable Virus-like Particles
Detection of human immunodeficiency virus (HIV) retrovirus by inoculation of human peripheral blood lymphocytes with the test article and detection of the presence of virus by an antigen capture ELISA technique	Magenta Corp	None detected	None detected
Cell culture identification and Characterization	Magenta Corp	Human	Human
Growth of mammalian cells in soft Agarose	Magenta Corp	Report result	No growth
In vitro assay for the	Magenta Corp	None detected	None detected

detection of cytomegalovirus contamination			
Detection of hepatitis B surface antigen (HbsAg) in cell culture	Magenta Corp	None detected	None detected
In vitro assay for the detection of EBV DNA in cells	Magenta Corp	None detected	None detected
Southern blot hybridization assay for the detection of adeno associated virus (AAV) DNA in the test article	Magenta Corp	None detected	None detected
Southern blot hybridization assay for the detection of human parvovirus B19 DNA in the test article	Magenta Corp	None detected	None detected
Polymerase chain reaction assay for the detection of human parvovirus B19 DNA in the test article	Magenta Corp	None detected	None detected
Polymerase chain reaction assay for the detection of human T-Cell lymphotropic virus in biological samples	Magenta Corp	None detected	None detected
Test for the presence of bacterial and fungal contaminants; sterility test using a direct inoculation method	Magenta Corp	Pass	Pass
Test for the presence of agar-cultivable and non-cultivable mycoplasmas	Magenta Corp	Pass	Pass
Human Herpes Virus 6 Variant A by PCR	ViroMed	Negative	Negative (08/04/00)
Human Herpes Virus 6 Variant B by PCR	ViroMed	Negative	Negative (08/03/00)
Human Immunodeficiency Virus HIV-1 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)
Human Immunodeficiency Virus HIV-2 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/21/00)
HTLV 1 and 2 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)
Hepatitis C RNA by RT-PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)

2) Working Cell Bank

Working Cell Bank Lot 00400C293AMWCB (P5)			
TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
In vivo assay for viral contaminants- hen's eggs portion	ViroMed	Negative	Negative (09/08/00)
In vivo assay for viral contaminants- murine portion	ViroMed	Negative	Negative (09/07/00)
Adventitious virus in vitro	Texas Children's Hospital Pathology	Negative	Negative (04/12/00)

	Dept		
Hepatitis C RNA by RT-PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)
Human Herpes virus 6 Variant A DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (08/04/00)
Human Herpes virus 6 Variant B DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (08/03/00)
Human Immunodeficiency Virus HIV-1 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)
Human Immunodeficiency Virus HIV-2 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/21/00)
HTLV I and II DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/21/00)
Sterility-bacterial	Texas Children's Hospital Pathology Dept	Negative	Negative (03/21/00)
Sterility-fungal	Texas Children's Hospital Pathology Dept	Negative	Negative (04/07/00)
Mycoplasma by PCR	CAGT QA/QC	Negative	Negative (05/03/00)
Mouse antibody production(MAP)	ViroMed	Negative	Negative (09/27/00)

3) Seed Vector

Seed Vector Lot B1870101			
TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
Sterility testing(Vector)	The Methodist Hospital Laboratory Services	(Bactec)	
Bacterial		Negative	Negative (10/22/01)
Fungal		Negative	Negative (11/09/01)
Mycoplasma polymerase chain reaction test(cells)	CAGT QA/QC	PCR negative	PCR negative (09/12/01)
Mycoplasma Culture Assay(cells)	The Methodist Hospital Laboratory Services	Negative	Negative (09/13/01)
Replication-competent Adenovirus	CAGT QA/QC	<1RCA/3 × 10 ¹⁰ vp	<1RCA/3 × 10 ¹⁰ vp (10/26/01)
Endotoxin(LAL)	CAGT QA/QC	<5.0EU/ml	<2.0 EU/ml (10/10/01)
Identity by PCR	CAGT QA/QC	590 base pairs	600 base pairs
Adenoviral	CAGT QA/QC	Report result	3.33 × 10 ¹¹ iu/ml

titer(infectious units)			(10/15/01)
Virus concentration(viral particles by OD)	CAGT QA/QC	Report result	2.00×10^{12} vp/ml (10/03/01)
Particle to IU ratio	Calculated	≤ 30	6.06

4) Master Virus Bank

Master Virus Bank 02980101 Sublot # 5			
TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
Human Adeno-associated Virus 2 DNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (10/14/02)
Human ImmunodeficiencyVirus-1 RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/07/02)
Human ImmunodeficiencyVirus-2 RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (07/28/02)
Master Virus Bank 02980101 Sublot#5 Continued			
TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
Hepatitis-C RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (07/29/02)
Hepatitis B DNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/05/02)
HTLV-1 RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/07/02)
HTLV-2 RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/07/02)
Adventitious Virus in vivo Murine portion Embryonated egg portion	AppTec	Negative Negative	Negative (02/13/03) Negative (02/13/03)
Adventitious Virus in vitro	Baylor/TCH Virology	Negative	Negative (07/29/02)
Cytomegalovirus by PCR	AppTec	Negative	Negative (11/14/02)
Parvovirus B19 by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/01/02)
Epstein-Barr Virus DNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (10/04/02)
Sterility Bacterial Fungal	The Methodist Hospital Laboratory Services	Negative@14 days Negative@28 days	Negative (07/15/02) Negative (07/29/02)
Mycoplasma (Points to Consider)	BioReliance	Negative	Negative (08/26/02)
Endotoxin	CAGT QA/QC	<5.0EU/ml	<2.0EU/ml

(LAL)			(07/03/02)
Residual Cesium Chloride	West Coast Analytical Service	<5.0mg/ml	1.100 μ g/ml (05/02/03)
Titer(Infectious units)	CAGT QA/QC	Report result	1.33×10^{10} iu/ml (07/11/02)
Titer(Viral particles OD)	CAGT QA/QC	Report result	9.68×10^{11} vp/ml (07/31/02)
Particle to IU ratio	CAGT QA/QC	≤ 80	72.8
Replication competent adenovirus	CAGT QA/QC	<1 RCA/3 $\times 10^{10}$ vp	<1RCA/3 $\times 10^{10}$ vp (04/17/01)
Identity by sequence	Larke Technologies	Identity Confirmed	Identity Confirmed (08/08/02)
Functionality	BCM Dept. of Urology	Expression of IL-12 by transfected cells	IL-12 secretion by transfected cells detected by ELISA (05/07/03)

IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの最終製品は凍結した状態で日本へ輸送され、受け入れ機関である岡山大学遺伝子・細胞治療センターにおいて受け入れ試験を行う。具体的には、変性の有無を確認する外観試験、ウイルスの力価の測定、さらに IL-12 の生物学的活性を確かめるため培養細胞への遺伝子導入時における IL-12 の産生能を検定する。

7-1-2. 増殖性ウイルス出現の可能性

非増殖性アデノウイルスベクターや腫瘍溶解性アデノウイルスベクターの臨床使用経験の蓄積やベクター製造・分析技術の進歩等に伴って RCA に関する見解も変化している。RCA に関しては日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ; ICH) Gene Therapy Discussion Group (ICH-GTDG) において情報交換、意見交換が行われ見解・声明および活動状況が communication paper として公開されている。日本の当局代表としては国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部が参加している。

アデノウイルスベクターの大量製造過程でベクターのゲノムが 293 細胞に組み込まれている E1 遺伝子領域に近接し、相同組み換えが起きることがあり、その結果、現在のアデノウイルスベクター生産の技術では、ある程度の確率で RCA が生じてしまうことは避けられないと考えられている。現在、FDA では RCA 量の許容限度は「 3×10^{10} ウイルス粒子あたり 1 個未満」であることを推奨している。日本では、FDA の推奨値を参考としながら、RCA が混入している場合に想定されるリスクをケースバイケースの原則で評価した上で、個別に許容限度を設定している。(ICH-GTDC 会議における RCA に関する見解：2004 年 6 月 10 日)

当該遺伝子治療臨床研究で使用されるアデノウイルスベクターは現在ベイラー医科大学で作製されており、「 3×10^{10} ウイルス粒子あたり 1 個未満」であるという条件を満たしたものが使用される。尚、現在ベイラー医科大学で進行中の IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを使用した前立腺癌に対する臨床研究(平成 13 年 8 月 FDA 承認、平成 16 年 5 月治療開始)に使用されているアデノウイルスベクターは titer は 9.68×10^{11} vp/ml であり、おもに 1 バイアルあたり 1×10^{11} vp に調製して保管されており「 3×10^{10} ウイルス粒子あたり 1 個未満」であるという条件を満たしている(平成 15 年 9 月最終製品リリース)。

また 2004 年 6 月 10 日の ICH-GTDG 会議では多量の RCA を含有する非増殖性アデノウイルスベクターを高用量投与された症例に関するデータが米国研究製薬工業協会 (PhRMA) によりとりまとめられ、がん患者において、RCA に起因する重篤な副作用はみられず、RCA の対外への排出も認められなかった

ということが報告されている。さらにアデノウイルスベクター製品の各ロットに RCA が高レベルで混入することは認めないという点について、ICH 各極は合意に至っている。

(ICH-GTDG 会議の見解 日本語訳より抜粋：国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 仮訳)」

7-1-3. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

1) 動物実験の結果

アデノウイルスベクターを腫瘍内投与した場合の腫瘍周囲及び全身の他臓器への偶発的遺伝子導入の可能性を調べるために、ヒト前立腺への至適投与量 (1.0×10^{10} PFU: ベイラー医科大学での HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター臨床研究より) の 0.5 倍から 50 倍 (体重換算) に相当するベクター量をマウス前立腺に投与し、その広がりを解析する動物実験がベイラー医科大学で実施された²⁴⁾。その結果、前立腺部においては容易にベクター DNA が検出され、解剖学的に隣接する臓器である精囊、リンパ節 (骨盤部)、肝臓、腸管への広がりが認められた。尿、精囊液、精子、肺への広がりとは全く認められなかった。精巣においては高濃度注入群において 1 匹に認められた。血液においては低濃度において 1 匹にのみ認められた。マウスにおいては、アデノウイルスベクターの注入側からの広がりとは解剖学的に隣接する臓器にのみ主に認められ、全身的な広がりを示唆する所見はなかった。またアデノウイルスベクターの投与によるマウスの死亡は認めなかった。この動物実験は条件上、マウス前立腺体積の約 3 分の 1 に相当する容積のベクター液を注入する実験であり一部は周囲に漏出したと考えられるが、ヒトの場合は 30 分の 1 又は 15 分の 1 に相当する容積を注入するため (ヒト前立腺 30ml、注入ベクター量 1ml 又は 2ml) 漏出の可能性は極めて低いと考えられる。本遺伝子治療臨床研究は IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターではなく Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた実験結果であるが、ウイルス学的に同一構造を有するアデノウイルスベクターであり、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターについても同様の結果であることが予想される。岡山大学泌尿器科において実施された臨床研究 (研究課題名: 前立腺癌に対する Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現アデノウイルス

ベクター及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究) において治療直後から 7 日間において尿中ならびに血液中のアデノウイルス量を PCR 法にて確認したが、血液中へのアデノウイルスベクターの存在は 9 例中 8 例においては認めておらず、投与後 90 分まで存在し翌日には消失した症例を 1 例認めた。本臨床研究においても、治療直後からの尿中ならびに血液中のアデノウイルスベクターの存在をモニタリングし、安全性の確認を行う。

7-1-4. 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性

IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの患者以外の人への感染の可能性は極めて低いが、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療後、尿中ならびに血液中のアデノウイルスベクターの存在がないことを確認するまで個室管理とし、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。

7-1-5. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

アデノウイルス DNA は宿主細胞のゲノムに組み込まれることなく複製するため、積極的に染色体内に組み込まれる機構を持っていない。アデノウイルス DNA が染色体に取り込まれた場合でも、組み込まれた DNA が活性化されウイルス粒子として染色体上から複製を認めた報告はない。また、IL-12 によるタンパク質の発現は一過性であり、この点は安全性の観点から長所と考えられる。

7-1-6. がん原性の有無

ヒト・アデノウイルスには 41 種の亜型が存在し、6 群に分類されているが、げっ歯類におけるその腫瘍形成能は群によって異なり、2 型、5 型を含む群では発癌性は示されていない。アデノウイルス 5 型は幼児期の「かぜ」の原因ウイルスの一つであり、ヒトにおいても感染による悪性腫瘍の発生は報告がない。さらに、哺乳類の細胞をトランスフォームさせる機能をもち、げっ歯類における癌化に関与しているとされる E1 領域を IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターにおいては欠損させてあり、癌原性はないと考えられる。最近、アデノウイルス 9 型の E4 領域にコードされている蛋

白が、ヒト細胞に形質転換能を持つという報告がなされたが、アデノウイルス 5 型では形質転換能は認められなかった。

7-1-7. アデノウイルスベクターの投与によって生じた重篤な副作用について

1999 年 9 月に米国でアデノウイルスベクターを用いた OTC 欠損症に対する遺伝子治療で患者が死亡した。アデノウイルスベクターには急性毒性があり、dose と adverse event の間に直線性がなく、ある種の閾値を越えると強い adverse event が生じることが示されており、肝動脈からベクターを 3×10^{13} particle を接種された患者が死亡し、 3×10^{12} particle の接種を受けた患者に強い adverse event が認められた例も報告された。

一方、米国ベイラー医科大学で行われた試験においては 1×10^{11} PFU の投与量において 1 例ではあるが、肝機能障害が生じている²⁵⁾。この症例に関してはベクターが誤って血管内に一部投与された可能性も示唆されている。臨床的に問題となりうるのは前立腺周囲の静脈叢への直接穿刺であると考えられる。ベクター投与に際して注入針の先端が確実に前立腺組織内にある場合には大きな問題ではないかもしれない。しかし、注入されたベクターのごく一部が拡散し、血管内に溢流する可能性は否定できない。

われわれは、ベイラー医科大学での adverse event に関する結果等を考慮し、前立腺内への確実な注入を目指したリアルタイム・バイプレーン式超音波ガイド下穿刺装置（アロカ社製）ならびに専用の微量注入装置（根本杏林堂社製）を使用する。先行して実施した HSV-TK 発現アデノウイルスベクターを用いた前立腺癌遺伝子治療臨床研究においてわれわれはすでに当該注入システムを使用し安全に注入を実施した実績がある。その際、血液中へのアデノウイルスベクターの拡散について検討したが 1×10^{10} PFU 投与した 6 例中 3 例において前立腺癌注入直後に血液中への移行を認めたが翌日には検出されていない。また血液移行に起因したと想定できる副作用は生じていない。当該研究に用いられるアデノウイルスベクターの最高用量は 5×10^{12} vp であり、直接血管内に投与されると副作用が発生する可能性は否定できないものの、投与経路の相違、採用する注入システムを考慮に入れると安全性は確保されていると推察される。

7-2. 遺伝子産物の安全性

IL-12 発現アデノウイルスベクターの遺伝子産物である IL-12 タンパク (recombinant human IL12 : 以下 rhIL-12) の安全性について現在までの知見を概説する。特に、rhIL-12 の全身投与 (静脈内投与) における第 2 相試験において副作用による死亡例が出現し試験が中止されており、この事象と本臨床研究との関連性について安全性の確保という観点から詳細に述べる。

7-2-1. ヒトに対する安全性に関する従来知見について

1) rhIL-12 の静脈内投与における安全性について

種々の癌を対象に rhIL-12 の薬剤としての第 1 相試験が 1995 年米国ボストンで実施された²⁶⁾。治療スケジュールは 5 日間連続 1 日 1 回の静脈内投与を 3 週間ごとに 2 回繰り返すもので、投与量は 3 ng/kg/day から 1000ng/kg/day という dose escalating study である。被験者は連続投与開始 2 週間前にテストとして投与予定量の rhIL-12 の静脈内投与を 1 回受け、問題がない場合連続投与を実施した。評価可能症例は 32 例であり、投与制限毒性 (dose limiting toxicities: DLT) として grade 3 の血清トランスアミナーゼの上昇、grade 3 の口内炎が最高投与量である 1000ng/kg/day において出現した。そこで最大耐用量 (maximum tolerable dose: MTD) を 500 ng/kg/day とした。他の毒性としては発熱が 10ng/kg/day 投与例から出現し、以後のほとんどの症例に認められた。発熱は投与 8-12 時間後に出現し、自然軽快した。貧血、白血球減少、リンパ球減少、血小板減少、高脂血症が投与 5 日目に出現したが、特に処置を必要とせず軽快した。血清中の IL-12 の濃度は 500ng/kg/day 投与例においては 11, 136.8 +/- 3, 529.8 pg/ml、1000ng/kg/day 投与例においては 19, 575 +/- 5, 269 pg/ml であった。血清中のインターフェロン γ の濃度は用量依存的に上昇し、1000ng/kg/day 投与例においては投与 24 時間後 1000pg/ml であった。32 例中 2 例に治療効果が認められたが、最大耐用量投与群において治療効果は認められなかった。

上記試験結果を基に同一の施設において第 2 相試験が開始された⁹⁾。投与量は、第 1 相試験の最大耐用量の 500 ng/kg/day とし、5 日間連続 1 日 1 回の静脈内投与を 3 週間ごとに 2 回繰り返すスケジュールとした。しかし第 1 相試験との最大の相違点は連続投与開始前にテスト投与を実施しな

かったことである。第2相試験における毒性は第1相試験において出現した毒性と内容は同様のものではあったが、その程度はかなり重症であった。治療を受けた17例中12例の患者において入院治療が必要な毒性が発生し、そのうち1例が死亡した。死亡例の1例は大腸における潰瘍からの出血が原因であり、もう1例は多臓器不全、壊死性肺炎、瀰漫性出血性大腸炎により死亡した。血清中のインターフェロン γ の濃度は第1相試験における濃度に比しかなり高く、投与4日目でそれぞれ26,000 pg/ml（第2相試験）、6,000 pg/ml（第1相試験）であった。種々の詳細な検討の結果、5日間の連続投与の2週間前に実施されたテスト投与は連続投与による毒性の出現の予防、毒性の軽減に効果があることが示唆された⁹⁾。さらにマウスおよびサルの実験においてこのことは実証された。またマウスの実験において副腎皮質ホルモンであるデキサメサゾンの前投与によりIL-12の副作用発現が部分的に予防されることも明らかにされた²⁷⁾。

2) rhIL-12 の皮下投与における安全性について

悪性腫瘍^{10)、11)、12)}ならびにC型肝炎¹³⁾を対象に試験が実施されておりその概要を述べる。rhIL-12の皮下投与による第1相試験は進行腎細胞癌を対象に、1週間1回の3週連続投与を28日ごとに繰り返すサイクルを2サイクル行うスケジュールで実施された¹⁰⁾。投与量としては100から1000ng/kgを投与するdose escalating studyとして実施された。500ng/kgの投与群において再発性大腸炎の既往のある患者1名にgrade4の消化器系毒性が発生した。血便を伴い内視鏡的に汎大腸炎と診断されたが副腎皮質ホルモンの投与により改善した。1000ng/kg投与群（6例）においてgrade3の血清トランスアミナーゼ上昇（1/6）、grade4の肺毒性（1/6）、grade3の白血球減少が発生し、血清のIL-12、インターフェロン γ の最高濃度はそれぞれ1,092 pg/ml、250 pg/mlであった。1例に認められたGrade4の肺毒性は発熱を伴った呼吸切迫で自然軽快したが、明らかな原因は不明であった。

悪性黒色腫を対象としたrhIL-12皮下投与試験は、500ng/kgを1週間1回の3週連続投与で28日ごとに繰り返すサイクルを2サイクル行うスケジュールで実施された¹¹⁾。一過性の血清トランスアミナーゼの上昇（grade1, 10名中6名）、トリグリセライドの上昇（grade1, 10名中8名）、全例における感冒様症状が認められた。血清IL-12の平均ピーク値は250+/-122 pg/mlであり、初回投

与 8-12 時間後にピークに達し、24-30 時間後に測定感度以下に低下する。しかしそのピーク値も 3 回目の投与になると測定感度以下もしくはごくわずかに検出されるのみであり、連続投与による生体の適応化の存在が示唆された。

次に、皮膚 T 細胞性リンパ腫 10 例を対象に rhIL-12 皮下投与臨床試験が実施された¹²⁾。50-300 ng/kg を週 2 回 24 週皮下投与するスケジュールで実施された。副作用は軽度の発熱、頭痛であり限られた症例においてのみ認められた。評価可能症例 9 例中 5 例において完全もしくは部分寛解が認められた。有効例における局所の所見としては CD8 陽性リンパ球の有意な浸潤が認められた。しかし血清の IL-12、インターフェロン γ 濃度測定の結果は報告されていない。

また、慢性 C 型肝炎を対象とした rhIL-12 皮下投与の臨床試験結果が報告されている¹³⁾。投与量は 30 から 500 ng/kg を 12 週間投与するスケジュールである。一過性の好中球、リンパ球減少、血清トランスアミナーゼ、ビリルビンの上昇が認められた。もっとも頻度の高い副作用は、発熱、倦怠感、頭痛、悪寒、筋肉痛、めまい、咳、鼻炎でありその頻度は用量依存性であった。46 名

中 3 名の患者が有害事象 (ALT の上昇、口腔内潰瘍、心房細動) にて試験より脱落した。ALT 上昇例においては明らかな因果関係を認めている。高用量投与例において血清中のインターフェロン γ がわずかに検出可能であった。

3) rhIL-12 体腔内投与における安全性について

膀胱内投与²⁸⁾、腹腔内投与²⁹⁾に関する第 1 相試験の報告がある。

表在性膀胱癌を対象に 5-200 μ g を 50ml の生理食塩水に溶解し、週 1 回計 6 回膀胱内に注入した。把持時間は 2 時間とした。1 例において軽度の倦怠感が出現したのみで他の副作用は出現しなかった。血清ならびに尿中のインターフェロン γ は検出されなかった²⁸⁾。

癌性腹膜炎を対象に 3-300ng/kg を、週 1 回計 8 回腹腔内に投与した²⁹⁾。100 ng/kg 投与時点において、grade 1-2 の血球減少症が認められ、腹水中のインターフェロン γ レベルの上昇を認めた。

4) IL-12 遺伝子発現ベクターを用いた遺伝子治療における安全性について

本臨床研究に用いるアデノウイルスベクターではなく、レトロウイルスベクターを用いた第 1 相臨床研究が実施されている³⁰⁾。本研究は IL-12 遺伝子発現レトロウイルスベクターを用いて体外に

において遺伝子導入された自己の線維芽細胞を腫瘍内に投与する手法をとっている。これらの細胞は24時間当たり10～30,000 ngのrhIL-12を産生する。本試験において副作用はまったく出現せず、血清のIL-12レベルは5pg/ml以下であった。腫瘍の50%以上の縮小を6例中2例に認めた。さらに、自己の悪性黒色腫細胞にプラスミドを用いてIL-12を遺伝子導入しIL-12産生細胞を調製し、ワクチンとして皮下投与するという手法を用いた研究が実施された³¹⁾。本研究においては軽度の発熱を認めたのみで重篤な副作用は出現しなかった。2例において自己の腫瘍細胞に対する遅延型皮膚反応を認め、一例に若干の腫瘍縮小効果を認めた。しかし血清のIL-12、インターフェロン γ 濃度測定の結果は報告されていない。

本臨床研究と同様にIL-12遺伝子発現アデノウイルスベクターを腫瘍局所に直接投与する手法については進行消化器癌を対象とした第1相試験がスペインにおいて実施され、安全性が確認された。特に 2.5×10^{10} VPから 3×10^{12} VPまでの7つのコホートからなるdose escalating試験であったがdose limiting toxicityが出現する用量にまでは達しなかった。主な副作用は発熱、倦怠感、発汗、リンパ球減少であったがいずれも一過性であった。血清のIL-12、インターフェロン γ 濃度は測定されており、IL-12の有意な上昇は認めなかったが、インターフェロン γ については翌日にそのピークを用量性に認めた(40-120pg/mlであり、IL-12蛋白:rhIL-12の1000ng/kg/day静脈内投与例における投与24時間後1000pg/ml、IL-12蛋白:rhIL-12の皮下投与における最高濃度250 pg/mlより低濃度であった)。また21例中1例に部分寛解(PR:partial response)10例に病状の安定化(SD:stable disease)を認め有効症例が確認されている³²⁾。

5) まとめ

これまでの種々の臨床研究から判明したことは、rhIL-12の投与の手法が副作用発現およびその重篤度に有意に関連していることである。すなわち投与量、投与スケジュール、投与ルート(静脈内、皮下、体腔内)により大きな差がある。静脈内への5日間連続投与で、しかもテスト投与を省略した場合がもっとも毒性が強く発現し、そのことは血清中のIL-12、インターフェロン γ 濃度の著明な上昇と相関している。体腔内もしくは局所投与(皮下、IL-12産生細胞の腫瘍内投与)では

毒性が低く、血清の IL-12、インターフェロン γ 濃度も低いと結論付けられる。

7-2-2. IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター投与のヒトにおける安全性について

IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター投与におけるヒトでの安全性をさらに確認、確保する目的にて種々の動物実験が実施されている^{17) 24)}。本遺伝子治療臨床研究に用いられる IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターについては 2001 年 8 月に米国国立衛生研究所(NIH)の Office of Recombinant DNA Activities (ORDA:旧 RAC)及び米国食品医薬品庁(FDA)の認可を受け、2004 年 5 月 18 日ベイラー医科大学において第 1 例目の前立腺癌に対する IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療が施行された。2007 年 6 月現在までに 4 症例に投与が行われているが、有害事象については報告されていない(未公表データ)。

また、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた本遺伝子治療においては、経直腸的超音波を使用し、超音波によって癌病変部を直視しながらベクターを局所へ注入する手法、または転移巣病変に対しても、超音波または CT にて病変部を確認し、転移巣病変内に注入する手法を用いており、局所において導入された遺伝子より IL12 蛋白が発現し、一連の治療効果が誘導されることを企図している。したがって、投与方法としては局所投与に位置付けられるものであり、安全性に関しては rhIL-12 の局所投与と類似して検討することが妥当と考える。さらに、上述の IL-12 遺伝子発現レトロウイルスベクターおよび先行してベイラー医科大学で実施されている IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた研究の結果が参考になると考えられ、静脈内投与において認められたとき重篤な副作用発現の可能性は低いと予想される。

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

内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌ならびに内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌に対する標準治療に関するコンセンサスは得られていないのが現状である。適切な説明に基づく被検者の同意(インフォームドコンセント)が確実に確保され、使用される遺伝子その他の人に投与される物質についてその品質、有効性および安全性が確認され、当該遺伝子治療臨床研究そのものが有効かつ

安全なものであることが十分な科学的知見に基づき予測される場合に限り倫理的に許容されると考えられる。培養前立腺癌細胞ならびに動物を用いた遺伝子治療基礎実験において、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた際の抗腫瘍効果および安全性は確認されており¹⁷⁾、臨床研究プロトコールは、先行してベイラー医科大学において立案され2001年8月に米国国立衛生研究所(NIH)のOffice of Recombinant DNA Activities (ORDA:旧RAC)及び米国食品医薬品庁(FDA)の認可を受け、2004年5月18日ベイラー医科大学において第1例目の前立腺癌に対するIL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療が施行された。今回用いる予定であるIL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターは、ベイラー医科大学遺伝子ベクター室において作製され、安全性試験を通過した製品として、ベイラー医科大学より供給を受ける。すなわち本ベクターは米国の臨床試験で用いられるものと同じである。また、研究者の那須保友は、ベイラー医科大学泌尿器科にてIL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの開発から基礎実験、さらに前立腺癌に対する臨床試験に立案から直接関与し、以後継続的に岡山大学よりベイラー医科大学に研究員を派遣している。一方、岡山大学ではすでに前立腺癌・肺癌に対する遺伝子治療臨床研究が所定の審査を通過し、既に研究が実施され終了している(肺癌:非小細胞肺癌に対する正常型p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究、前立腺癌:前立腺癌に対するHerpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究)。ベクターの取り扱い場所、患者の研究を実際に行う施設(病棟の隔離室、手術室、CT室)およびそれらの運用を含めて、すでに整備され経験豊富なスタッフを擁しており、病院側の受け入れ体制は整備されている。更に審査体制を含めた学内の体制も充分確立され有機的に機能している。また平成15年度からは遺伝子治療を代表とする一連のトランスレーショナル・リサーチの推進を目的として岡山大学医学部・歯学部附属病院内に遺伝子・細胞治療センターが設置され稼動しており、本遺伝子治療臨床研究も同センターの活動の一環として実施される予定である。

こういった背景から、今回申請する遺伝子治療臨床研究を岡山大学医学部・歯学部附属病院で実施することは十分可能であると判断した。

9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

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の適応が予測される患者について、岡山大学医学部・歯学部附属病院にて患者ならびに家族（あるいは親族）に対し、文書によるインフォームド・コンセント（第1回目）を行い、同意が得られた場合に限り、本臨床研究へエンロール（患者登録）し治療前検査を開始する。治療前検査にて後述する選択基準に合致、さらに除外基準に抵触しないことが明らかになった場合、治療前検査データを基に院内の遺伝子治療臨床研究審査委員会の下に設置された安全・効果評価・適応判定部会にて適応を評価する。安全・効果評価・適応判定部会で本臨床研究の適応と判断された場合、岡山大学医学部・歯学部附属病院にて患者ならびに家族（あるいは親族）に対し、文書によるインフォームド・コンセント（第2回目）を行う。同意が得られた場合に限り、以下の方法によって本臨床研究を実施する。内分泌療法として LH-RH アゴニストが投与されている被験者の場合は投与を継続するが（注記1）、抗アンドロゲン剤の投与を受けている場合には投与を中止し抗アンドロゲン剤除去症候群を認めないことを確認したのちに患者登録を行う（注記2）。IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの局所投与による副作用の評価、治療効果、及び IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの最大耐量（定義：最大の効果を認めかつ最小の副作用を示す用量）を推定するために、投与量を 1.0×10^{10} vp (viral particle) から開始して 2 ないし 5 倍ずつ増量し 5.0×10^{10} vp, 1.0×10^{11} vp, 5.0×10^{11} vp, 1.0×10^{12} vp, 5.0×10^{12} vp に至る 6 レベルの治療群を設定する。各用量レベルでそれぞれ 3 人の被験者を評価し、有害事象が発生しなければ逐次用量レベルの上昇を行う。ただし有害事象が発生した場合はその重篤度を評価し、プロトコールにのっとり症例数を追加し同一用量で検討するか、試験を中止するかを判断する。最大耐量 (Maximum Tolerated Dose, MTD) では 3 人に投与して問題なければさらに 3 人、計 6 人の被験者で評価する。つまり、各用量レベルでの安全性の検討（最大耐量の推定）を行った後、治療効果の観察も行うことを目的とする第 I / II 相試験として計画した。遺伝子治療終了後、評価基準に従って安全性ならびに治療効果を評価する。

（注記１）内分泌療法として LH-RH アゴニストが投与されている被験者の場合、LH-RH アゴニストの投与が中止されれば血中のテストステロン濃度は去勢術前のレベルに回復する。アンドロゲンが除去された環境下においても増殖可能となった前立腺癌細胞のうち、アンドロゲンの刺激によって増殖速度が増す細胞が存在することが報告されており、このことは臨床的には LH-RH アゴニストの中断によってアンドロゲン血中濃度が再上昇し、癌細胞の増殖が刺激され病勢の悪化を生じる可能性があることを示唆している。Taylor¹⁸⁾らは内分泌療法無効例に対する次の治療を行う際に、それまでの内分泌療法を継続した場合と中止した場合の予後の差を解析した。それによると内分泌療法を継続し次の治療を施行した群と、内分泌療法を中止し次の治療を施行した群における 50%生存期間はそれぞれ 9.9 ヶ月、3.6 ヶ月と有意の差を認め、内分泌療法を継続することの有用性を報告している。以上の基礎的、臨床的な根拠により、内分泌療法再燃前立腺癌の治療に際し、前治療である内分泌療法を中止するか継続するかについては、前立腺癌の生物学的特性ならびに患者への不利益を最小限に抑える目的から、内分泌療法を継続することが妥当であると判断した。

（注記２）抗アンドロゲン剤（フルタミド、プロスターール、カゾデックス）の投与を中止すると、PSA の上昇がとまり低下する現象が認められることがある。抗アンドロゲン剤除去症候群とよばれ、抗アンドロゲン剤そのものが、前立腺癌の増殖を促進するようになる現象が近年確認されており、本症候群を呈する場合は再燃とはみなされない。したがって、抗アンドロゲン剤を併用している症例では、投薬を中止し抗アンドロゲン除去症候群でないことを確認する。

9-2. 被験者の選択基準及び除外基準

内分泌療法抵抗性再燃前立腺癌を対象とし以下のカテゴリーと合致し 9-2-1. に記載された選択基準を満たすものを被験者とする。

①. 内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌：（非転移症例）

外科的切除により根治不能な局所的に進行した前立腺癌症例で、内分泌療法（放射線療法、抗癌化学療法の併用を含む）の経過中に、PSA を用いた生化学診断上、内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌と診断され、かつ臨床的に遠隔転移を認めない患者。

②. 内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌：

②-1 前立腺全摘出手術未施行例

前立腺癌診断時、既に臨床的に遠隔転移を有する進行前立腺癌症例で内分泌療法（抗癌化学療法の併用を含む）の経過中に、PSA を用いた生化学診断上、内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌と診断された患者。

②-2 前立腺全摘出手術施行例

根治的前立腺全摘術後に局所ないし遠隔転移（軟部組織を含む）にて再発した前立腺癌症例で、内分泌療法（抗癌化学療法の併用を含む）の経過中に、PSA を用いた生化学診断上、内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌と診断され、かつ再燃時に組織学的に転移が確認された患者。

9-2-1. 選択基準

- 1) 被験者は 20 歳以上の成人としその年齢に上限を設けないが、医学的に本臨床研究を遂行するに足る十分な身体的機能を有すると判断された者。（注記 1）
- 2) 内分泌治療を施行中であること。（注記 2）
- 3) 血中テストステロンが 1 ng/ml 以下の症例。
- 4) 血清 PSA の有意な上昇（2 週間以上の間隔での 3 回の測定において連続的に上昇し、最終的に PSA 値が 4.0 ng/ml 以上）を認める生物学的に活動性の局所再燃癌。被験者登録時から 3 回前に測定した数値からの 3 回連続上昇となる。（注記 3）
- 5) 前治療の影響がないと考えられる症例。
- 6) 被験者は、効果判定のため少なくとも 12 週以上の生存が期待でき、performance status (PS) が 2 以下の者。
- 7) 被験者は正常な骨髓機能、肝機能、腎機能を保っていること。その指標としては、末梢血顆粒球数 $>2000/\text{mm}^3$ 、血小板数 $>100,000/\text{mm}^3$ 、総ビリルビン $<1.5\text{mg/dl}$ 、クレアチニン $<1.5\text{mg/dl}$ 。

（注記 1）前立腺癌における患者の年齢構成は 75 歳以上が 32% と高い割合を示すこと、米国での

臨床試験においても年齢の上限は無いことより年齢に上限は設定しない。

（注記2）内分泌療法の内容は問わない。放射線治療、抗癌化学療法の併用の有無についても問わないが症例記録用紙にその詳細を記載すること。内分泌療法を継続することの理由については 9-1 の注記1を参照。

（注記3）抗アンドロゲン剤を併用している症例では、投薬を中止し抗アンドロゲン除去症候群でないことを確認する。

5)、6)、7) については「抗悪性腫瘍薬の臨床評価方法に関するガイドライン」に従い関連した項目として設定した。

9-2-2. 除外基準

症例の選択に際し、次の項目に該当する被験者は本臨床研究の対象としない。

- 1) コントロールされていない活動性感染症など、重篤な併発疾患がある場合。
- 2) 本臨床研究参加6ヶ月以内に未承認薬の臨床試験（治験も含む）に参加している場合。
- 3) 前立腺癌以外の悪性腫瘍歴がある場合。ただし根治しており、無病期間が2年以上に達している場合はこの限りではない。
- 4) 当該臨床研究にいったん参加し何らかの理由で投与を終了した場合（重複登録の禁止）
- 5) その他、担当医が不適当と認める場合。

設定の根拠

- 1)、3)は安全性配慮のため設定した。
- 2)は安全性評価または有効性評価に影響すると考えられるため除外基準として設定した。
- 5)は一般的な除外基準

9-3. 被験者の同意の取得方法

内分泌抵抗性前立腺癌の病態と従来の治療法に対し抵抗性であること、本臨床研究の理論的背景と動物実験成績、安全性に関する成績に関して十分な説明を患者本人ならびに家族（あるいは

親族) もしくは立会人 (患者に家族ならびに親族がいない場合、患者の親しい間柄の人を同席させたいという希望が患者からあった場合) に対して行い、十分な理解を得た上で自由な意思によって本臨床研究の被験者となることについて文書に基づいて同意を得る。同意の取得は患者登録時、および全身検索が終了し、安全・効果評価・適応判定部会が適応有り と判定した後の計 2 回行う。また、同意に関連する新たな重要な情報を入手した場合は、その情報を被験者ならびに家族 (あるいは親族) に伝え、継続して参加するか否かについて被験者の意思を確認する。

9-4. 実施期間及び目標症例数

本臨床研究の実施期間は了承が得られた時点から 3 年間とする。目標症例数は原則として 21 例とするが、各用量レベルでの副作用の出現の有無によって最大 36 例とする (「9-5-1. 対象群及び治療群の設定」、「9-5-5. 予測される副作用及びその対処方法」参照)。

9-5. 遺伝子治療臨床研究の実施方法 (治療計画)

9-5-1. 対象群及び治療群の設定

- 1) IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの局所投与による副作用の評価、治療効果、及び IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの最大耐量の決定のために 1 群 6 レベルを以下に示すごとく設定する。

		IL-12 アデノウイルスベクター
レベル	1	1. 0x10 ¹⁰ vp (viral particle)
レベル	2	5. 0x10 ¹⁰ vp
レベル	3	1. 0x10 ¹¹ vp
レベル	4	5. 0x10 ¹¹ vp
レベル	5	1. 0x10 ¹² vp
レベル	6	5. 0x10 ¹² vp

- 2) それぞれの用量レベルでそれぞれ 3 人の被験者を評価し、最大耐量 (Maximum Tolerable Dose, MTD)

（「9-5-5. 副作用の判定基準」参照）では6人の被験者を評価する。各用量レベルが終了すれば、逐次用量レベルの上昇を行う。ステージアップの適応評価については各ステージ終了後に安全・効果評価・適応判定部会を開催することとし、当該ステージの最終症例における3回目投与28日以降に開催し全ての症例について3回目投与28日後までのデータを基に総合評価する。安全であると判定された後、次のステージを開始する。「安全・効果評価・適応判定部会」での判定結果については、会議毎に結果報告書ならびに参加委員全員の署名または記名捺印を受けた出席リストを添付した議事録を作成し、その写しを遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見として報告する。規定にのっとり委員長は審査または調査を行い終了後速やかにその結果を岡山大学医学部・歯学部附属病院長に報告する。岡山大学医学部・歯学部附属病院長は委員長の報告を受けて通知書を作成し、委員会の記録の写しとともに総括責任者に提出する。通知の写しは必要に応じ適宜所轄官庁に提出する。（指針第四章第四の規定に基づき）

9-5-2. 遺伝子導入方法と導入回数

9-5-2-1. 遺伝子導入方法

① 内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌（非転移症例）

岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟3階手術場無菌室内にて、原則として腰椎麻酔を施行し、経直腸的超音波を用い病変部を確認した後、その超音波に装着された穿刺用ガイド装置を用いIL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を1ないし2ヵ所（最大2ヵ所）に注入する。アデノウイルスベクター液は1ヵ所につき1mlとする。注入そのものにより前立腺部の一過性の腫大を来し、尿閉を生じることがまれにあるため、尿道カテーテルを注入直後に留置し、翌日抜去する。治療後3日間の抗生剤投与を行う。

② 内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌（有転移症例）

②-1. 前立腺全摘出手術未施行例

岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟3階手術場無菌室内にて、原則として腰椎麻酔を施行し、経直腸的超音波を用い病変部を確認した後、その超音波に装着された穿刺用ガイド装置を用い

IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を 1 ないし 2 ヵ所（最大 2 ヵ所）に注入する。アデノウイルスベクター液は 1 ヵ所につき 1 ml とする。注入そのものにより前立腺部の一過性の腫大を来し、尿閉を生じることがまれにあるため、尿道カテーテルを注入直後に留置し、翌日抜去する。治療後 3 日間の抗生剤投与を行う。

②-2. 前立腺全摘出手術施行例

局所再発腫瘍に対しては岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟 3 階手術場無菌室内にて、原則として腰椎麻酔を施行し、経直腸的超音波を用いて病変部を確認した後、その超音波に装着された穿刺用ガイド装置を用い IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を 1-2 ヵ所（最大 2 ヵ所）に注入する。アデノウイルスベクター液は 1 ヵ所につき 1 ml とする。尿道カテーテルを注入直後に留置し、翌日抜去する。治療後 3 日間の抗生剤投与を行う。

転移性腫瘍に対しては、超音波下で投与する場合は岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟 3 階手術場無菌室内にて原則として局所麻酔を施行し、その超音波に装着された穿刺用ガイド装置を用い IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を注入する。CT ガイド下で注入する場合は岡山大学医学部・歯学部附属病院中央放射線部 CT 室にて局所麻酔を施行し、CT ガイド下にアデノウイルスベクターを注入する。治療後 3 日間の抗生剤投与を行う。

9-5-2-1. 遺伝子回数

その後、プロトコルを遵守して安全性ならびに治療効果の評価を行う。重篤な副作用を認めない場合は 28 日毎に 3 回の治療を実施する。3 回目の治療を終了した 28 日後に、臨床症状、検査結果および病変部の総合評価を安全・効果評価・適応判定部会にて行う。

【追加投与について】

総合評価にて安全性が確認されるとともに悪化傾向を認めず (PD: Progressive Disease でなく)、追加投与について患者の希望があり了解が得られた場合、担当医師および総括責任者は 12 週時点の総合評価を含めた治療中、治療後に集積されたデータを含めて、追加投与申請書を安全・効果評価・適応判定部会に提出する。部会において追加投与に関する適格性を科学的、倫理的に評価し、その上部組織である遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見を提出する。投与回数の上限は設定しないが、

「治療中止の判定基準」を満たす場合には投与を中止する。また投与を継続する場合は、初回と同様に3回目毎に治療を終了した28日後に総合評価を安全・効果評価・適応判定部会にて行い投与継続の適格性を科学的、倫理的に評価する。追加投与の際には用量の変更は行わない。

また追加投与に関する説明と同意書は、本計画書に添付資料12-4（前立腺がん遺伝子治療臨床研究、継続投与のための説明と同意書）として含まれている書式である。

9-5-3. 前処置及び併用療法の有無

9-5-3-1. 前立腺癌の治療に関して

内分泌療法としてLH-RHアゴニストが投与されている被験者の場合は、LH-RHアゴニストの投与を継続する。前立腺癌に対する他の治療法については遺伝子治療実施28日以上前に中止する。

9-5-3-2. アデノウイルスベクター注入に関して

前立腺ならびに前立腺摘出部局所再発腫瘍部に注入する際は、原則として腰椎麻酔下にて実施するため、腰椎麻酔に必要な前処置を実施する。注入後はバルーンカテーテルを膀胱内に留置し感染予防のための抗生剤投与を治療後3日間実施する。バルーンカテーテルは翌日抜去する。リンパ節、骨などの転移部位に注入する場合は原則として局所麻酔下にて実施し抗生剤投与を治療後3日間実施する。

9-5-4. 臨床検査項目及び観察項目

本臨床研究における安全性の判定、有害事象の予見、効果判定のために、以下の各種検査を実施する。検査時期の概略については以下に示すが詳細は添付資料12-5に示す。

<治療効果判定に関する検査>

1) 腫瘍マーカー

PSA

2) 画像検査

経直腸の超音波検査、骨シンチ、骨転移部の MRI、前立腺部 MRI、腹部・骨盤部 CT

3) 免疫学的検査

当該臨床研究においては腫瘍免疫を中心とした免疫学的反応の検討（局所および全身反応の解析）は副次エンドポイントの一つであり以下の解析を実施する。

＊血液中リンパ球サブセット：

【項目】CD45/CD14（リンパ球領域から赤血球および単球を除外するためのゲーティングコントロール）、CD3/CD19（T 細胞 B 細胞）、CD3/CD8（T 細胞および細胞障害性 T 細胞サブセット）、CD3/CD4（T 細胞およびインデューサー/ヘルパー T 細胞サブセット）、CD8/HLA-DR（活性化細胞障害性 T 細胞）、CD4/HLA-DR（活性化インデューサー/ヘルパー T 細胞）、CD3/HLA-DR（休止期 T 細胞、B 細胞、活性化 T 細胞）、CD3/CD56+CD16（T 細胞（CD3+）および NK 細胞）、CD3/CD11b（マクロファージ）、CD25（調節性 T 細胞）

【実施時期】治療前、投与後 1 日目、2 日目、3 日目、5 日目、7 日目、14 日目、28 日目
（アデノウイルスベクターの投与は 28 日毎に実施されるので上記サイクルを繰り返し実施する）

【解析方法】

- ① ヘパリンにてコーティングされた 5ml の注射器を用いて、4.5ml の血液を採取
- ② 抗体を含まない血液のみのコントロール、および 2 種の異なる蛍光色素でラベルされた上記抗体の組み合わせを用いる。各血液検体 100 μ l とそれぞれの抗体各 20 μ l を、室温かつ遮光した状態で 30 分インキュベートする。
- ③ Coulter Q-Prep を用いて赤血球を除去し固定する。A 液 635 μ l：（ギ酸）、B 液 265 μ l：（炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム）、C 液 100 μ l：（パラホルムアルデヒド）。
- ④ FACS 解析を行う（1 アッセイにつき、10,000 細胞以上）。

＊血清サイトカイン

【項目】IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12

【実施時期】治療前、投与後 1 日目、2 日目、3 日目、5 日目、7 日目、14 日目、28 日目