

クターを使って、まず 18 人の前立腺がんの患者さんに遺伝子治療が行われました。ベクターの投与量は 4 段階に分けられ (10^8 から 10^{11} PFU)、それぞれ 1 回の投与を行い、その安全性を確認したところ、副作用については、17 人目までの患者さんで発熱 (3 名)、肝機能障害 (3 名)、静脈注射をした場所が痛くなって腫れること (蜂窩織炎) (1 名) がありました。いずれも軽い症状で、経過観察を含めた、お薬などの投与の治療でよくなりました。

しかし 10^{11} PFU の投与量のベクターが投与された 18 人目の患者さんで、軽度の発熱、高度の血小板減少と肝機能障害が出現したため、その時点でその人に対するガンシクロピルの投与は中止されました。なお、この患者さんの血小板減少と肝機能障害は、ガンシクロピルの投与をやめてから 14 日目に正常値に回復しました。治療効果については、18 名中 3 名で PSA の 50% 以上の低下が認められています (それぞれ 56%、51%、62% の低下)。そのうちの 1 名では治療後の前立腺生検でがん細胞の消失が確認されています。また、18 名中 14 名では PSA の上昇がとまり、平均 25% の PSA 値の低下を認めましたが、残り 4 名では PSA 値の改善は認められませんでした。これらの 18 名の患者さんのうち、その後 2 名は外科的手術による摘出術を受けられ、2 名は超音波による前立腺の加療 (HIFU) を、1 名は精巣を摘出する手術を受けられております。

その後、上記 18 人の内、7 人を含む 36 人の前立腺がん患者さん (同じく放射線治療後の局所再発がん) に対して、 10^{11} PFU のアデノウイルスベクターを 2 回投与する追加の検討が行われました。その結果、この遺伝子治療の安全性や、ベクターを投与した場所のがん細胞が死んでいく可能性があること、がんに対する患者さんの免疫が強まる可能性があることがわかりました。全体の 77.8% の患者さんで PSA が平均 28% 低下し、また、患者さん全体では、PSA の値が遺伝子治療を実施する前に比べて 2 倍に上昇するまでの時間が、平均

15.9 か月から 42.5 か月へ延長することも確認されました。

現在も、放射線治療の後にアデノウイルスベクターを 2 週間空けて連続投与する併用する療法がベイラー医科大学で引き続き行われております。これは予後の良い（ローリスク）前立腺がんや、予後の悪い（ハイリスク）前立腺がん、およびリンパ節に転移を認める前立腺がんを対象として、遺伝子治療と同時に放射線治療を行い、その安全性と効果を確認するものです。ベクターの用量を 5×10^{11} v.p.（およそ $2.5 \sim 5 \times 10^{10}$ PFU に相当）ずつ、2 週の間隔で 2 回投与して遺伝子治療を行い、同時に放射線治療を併用する方法となります。この遺伝子治療を受けた 30 名の患者さんのうち、重い副作用がみられた患者さんは 2 名で、その内訳は頻尿（1 名）と肝機能の悪化（1 名）でした。いずれも薬による治療で改善しています。治療効果については、遺伝子治療を受けてからの時間がまだ経っていないので、何ともいえません。

米国ベイラー医科大学では、現在までに約 130 人の前立腺がんの患者さんが、今回の臨床研究と同じベクターを用いているこれら一連の遺伝子治療を受けていますが、上に述べた以外の重い副作用は、今のところ認められていません。

また、国内におきましても、前立腺の摘出手術を受けた後に再発した（または手術を受けられなかった）ホルモン抵抗性の局所前立腺がんや、前立腺がんの骨転移巣等に対する遺伝子治療臨床研究が、それぞれ岡山大学病院では 2001 年から 8 人に、神戸大学病院では 2003 年から 6 人に行われております。どちらもヘルペスウイルスのチミジンキナーゼの遺伝子をもったアデノウイルスベクターを使ったもので、このうち岡山大学病院では今回の臨床研究で用いるものと完全に同じベクターを用いました。これらの治療成績は、現在その効果を観察しているところですが、岡山大学病院では、全体の 66.7% の患者さんで PSA が平均 24.1% 低下する効果が確認されています。また、重い副作用は、国内においては報告されていません。

10. 遺伝子治療臨床研究で副作用が生じた場合について

この臨床研究の期間中（最初の遺伝子治療を実施してから2年間）および終了後に、からだの異常に気づかれた場合には、担当医師、または、看護師にすぐに連絡してください。直ちに適切な処置を行ないます。副作用や異常が生じたときには、あなたに自覚症状がない場合でも、こちらから速やかにお知らせし、医学的対応をいたします。

11. 医療費について

臨床研究には、健康保険等の公的な医療保険は適用されません。その代わりに、この臨床研究にかかわる費用（入院治療や検査にかかる費用）、たとえばアデノウイルスベクターやガンシクロピルの薬代やそれらの注射料、前立腺を摘出する手術にかかる費用、入院中の個室の室料、検査にかかわる費用（本臨床研究への参加に同意なしてから、最初の遺伝子治療を受けた2年後まで）などは、当院がすべて負担します。この臨床研究に参加することによって、今まで以上に余分なお金を負担していただくことはありません。

ただし、この臨床研究の期間内であっても、この研究と関係のない病気に要する医療費には、これまでどおり公的医療保険が適用され、その医療費にかかる一部負担金等は負担していただきます。

この臨床研究との関連が否定できない副作用が生じた場合、この副作用に対する検査や治療にかかる医療費についても当院が負担いたしますので、患者さんの医療費負担はありません。ただし、あなたの健康被害がこの臨床研究と関係があるかどうかの判定は、私たちとは利害関係のない、この遺伝子治療臨床研究のために当院が独立して設置する「安全・効果評価・適応判定専門小委員会」で検討し、判断させていただきます。

また、臨床研究期間中に起こった副作用以外の健康被害は、

症状が固定するまで（健康被害が発生してから最長1年まで）の医療費を当院が負担します。ただし、副作用以外の健康被害が生じた場合の医療費以外の実費や、症状が固定した後の治療費や療養費については補償されません。上記の補償の条件は他の医療機関で検査・治療した場合にも同様に適応します。

12. 個人情報の保護について

(1) あなたの診療記録および同意書など、この遺伝子治療臨床研究に伴う診療記録や臨床データは、以下の法律等の規定に基づき北里大学病院事務部管理課で厳重に保管・管理します。得られた臨床データはこの臨床研究に利用する他、この研究の結果を医学雑誌や学会、厚生労働省およびその審議会に報告することがありますが、あなたの個人情報は保護されます。なお、利用目的に変更が生じた場合には、改めてご連絡させていただきます。

- ① 個人情報の保護に関する法律（平成15年法律第57号）
- ② 医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」（平成16年12月24日厚生労働省）
- ③ 遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日文部科学省・厚生労働省告示第1号）
- ④ 北里大学病院における患者の個人情報保護に関する基本規程（平成17年4月1日施行）

(2) あなたは、この臨床研究により得られた「あなた自身が識別できる個人情報」の開示をもとめることができます。その際には、上記の指針・規程および「北里大学病院における診療情報の提供等に関する指針」に照らし開示の妥当性を判断します。開示できない場合

には、必要に応じてその旨を説明します。開示にかかわる費用については別途請求させていただきます。

○料 金 コピー料金 1枚につき45円

×線フィルム 北里大学病院の規定料金

- (3) あなたは、この臨床研究により得られた「あなた自身が識別できる個人情報の内容が事実ではないと判断した場合」には、訂正・追加または削除を求めることができます。その際には、総括責任医師が内容を調査し訂正・追加または削除の必要性を判断します。訂正・追加または削除できない場合には、必要に応じてその旨を説明します。
- (4) あなたは、この臨床研究により得られた「あなた自身が識別できる個人情報の取り扱いに違反があると判断した場合」には、利用の停止または消去を求めることができます。その際には、総括責任医師が内容を調査し、違反が判明した場合には必要な措置を講じるとともに、必要に応じてその旨を説明します。なお、利用の停止または消去ができない場合にも、必要に応じてその旨を説明します。
- (5) その他、北里大学病院で遺伝子治療臨床研究が行われることは、公開されております。臨床研究を実施している間は、研究がきちんと行なわれているかどうか、「安全・効果評価・適応判定専門小委員会」があなたの治療経過や診療記録を閲覧することがあります。
- (6) 遺伝子治療開始後に治療の中止、あるいは、同意の撤回があった場合には、それまでのあなたの治療経過や診療記録は、貴重な記録になりますので、研究に使用させていただきたいと思っております。このことについて、

ご了承くださいませようお願いします。

なお、この臨床研究における個人情報の取扱いに関するお問合せは、以下の窓口までお願いいたします。

○北里大学病院事務部管理課：

若林 良雄（わかばやし よしお）

電話 042-778-8111（内線 8440）

1 3. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について

緊急時、また、この研究について問題や質問が生じたときは、下記にご連絡ください。

○北里大学病院泌尿器科：

医師 佐藤 威文（さとう たけふみ）

電話 042-778-8111（内線 9091）

1 4. 遺伝子治療臨床研究の正式名称と実施組織体制

(1) 研究の名称

前立腺がんに対する 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ピルを用いた遺伝子治療臨床研究（前立腺がんに対する単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子発現アデノウイルスベクター及びガンシクロピルを用いた遺伝子治療臨床研究）

(2) 実施施設

北里大学病院

(3) 総括責任医師

ばばしろう
馬場志郎（北里大学医学部泌尿器科学教授・北里大学病院泌尿器科長）

(4) 試験担当医師

さとうたけふみ
佐藤威文（北里大学医学部泌尿器科学講師・北里大学病院泌尿器科医師）

いわむらまさつぐ
岩村正嗣（北里大学医学部泌尿器科学助教授・北里大学病院泌尿器科主任）

そう しげひろ
宋成浩（北里大学医学部泌尿器科学講師・北里大学病院泌尿器科医師）

ふじたてつお
藤田哲夫（北里大学医学部泌尿器科学助手・北里大学病院泌尿器科医師）

まつもとかずまさ
松本和将（北里大学医学部泌尿器科学助手・北里大学病院泌尿器科医師）

おかやす いさお
岡安 勲（北里大学医学部病理学教授）

おぼたふみや
小幡文弥（北里大学医療衛生学部免疫学教授）

15. その他

（1）本臨床研究に参加している期間中のお願い

今回使用するアデノウイルスベクターがあなたの精液に一時的に混ざる可能性は極めて低いものと思われませんが、完全に否定はできません。そのため、本臨床研究に参加している期間中は、担当医師の許可があるまでは、必ずコンドームを使った避妊を行ってください。

また、本臨床研究の参加期間中に、他の診療科や他の病院にかかったり、他の治療を受ける場合、また、そこでもらった薬や薬局で買われた薬がありましたら、担当医師にお知らせください。

（2）遺伝子治療臨床研究実施を開始するために必要な手続き

日本の遺伝子治療臨床研究は、厚生労働省が定めた指針（遺伝子治療臨床研究に関する指針）により、北里大学病院の審査委員会と厚生労働省の厚生科学審議会で審議されます。そこで研究の科学性と倫理性が了承されて初めて、臨床研究を開始することができます。

（3）関係法令等

① 個人情報の保護に関する法律

<http://www5.cao.go.jp/seikatsu/kojin/houritsu/index.html>

② 医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン（厚生労働省）

<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/12/dl/h1227-6a.pdf>

③ 遺伝子治療臨床研究に関する指針

<http://www.mhlw.go.jp//general/seido/kousei/i-kenkyu/idenshi/0504sisin.html>

④ 北里大学病院における患者の個人情報保護に関する基本規程

<http://www.khp.kitasato-u.ac.jp/kojinj>

前立腺がん遺伝子治療臨床研究に関する同意書

北里大学病院

病院長 藤井 清孝 殿

私は、前立腺がん遺伝子治療臨床研究について、口頭および文書により説明を受け、下記の内容を理解しました。遺伝子治療臨床研究に参加することに同意します。また、上記臨床研究を行う上で必要な処置、及び上記臨床研究において予測されない状況が発生した場合、それに対処するための緊急処置を受けることも併せて同意します。

- あなたの病気と治療法について
- 遺伝子治療臨床研究の目的について
- 遺伝子治療臨床研究は開発途上の治療法であることについて
- 遺伝子治療臨床研究の方法とスケジュール
- 期待される治療効果について
- 遺伝子治療のあとに手術治療を必ず実施すること（遺伝子治療単独では実施しないこと）について
- 他の治療法について
- 遺伝子治療の安全性と危険性（リスク）について
- これまでに行なわれた遺伝子治療について（海外・国内の状況）
- 遺伝子治療臨床研究で副作用が生じた場合について
- 医療費について
- 個人情報保護について
- 緊急連絡先および問い合わせ先について
- 遺伝子治療臨床研究の正式名称と実施組織体制
- その他

平成 年 月 日

患者氏名（署名又は記名捺印）（印）

連絡先

親族又は理解補助者（署名又は記名捺印）（印）

連絡先

患者さんとの関係

説明医師（署名又は記名捺印）（印）

所 属

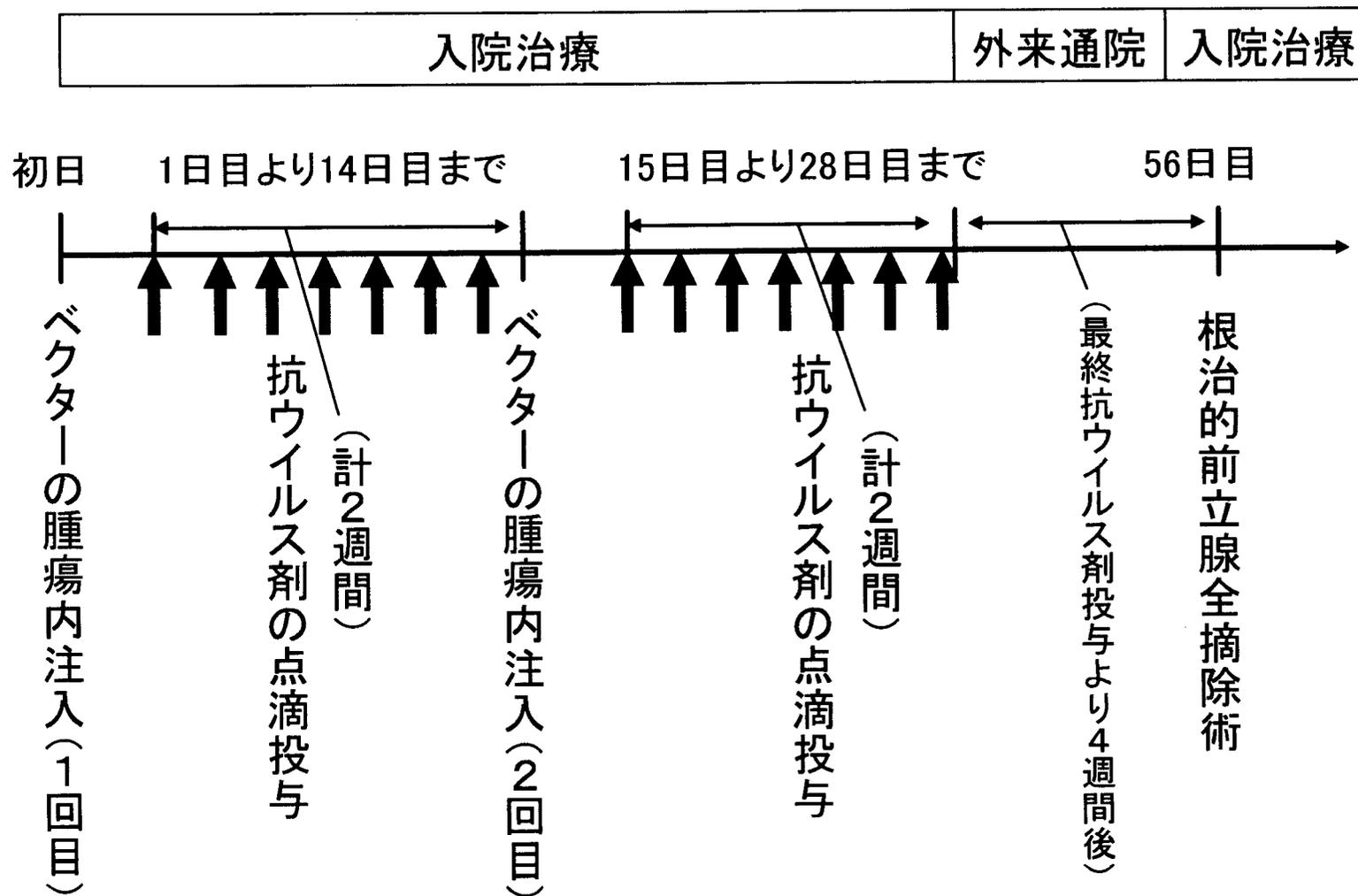
立会人（署名又は記名捺印）（印）

連絡先あるいは所属

患者さんとの関係

患者様説明用

【治療スケジュール】



【検査・観察項目とそのスケジュール】

項目	治療前	Day1 (1回目投与翌日)	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7	Day14 (2回目投与)	Day15	Day16	Day17	Day18	Day19	Day20	Day21	Day28
診察	X		毎日														
排尿の確認	X								X								X
血液の検査	X		2日毎														
血液の検査 (肝臓、腎臓)	X		X					X	X		X					X	X
血液の検査 (動脈血の採血)	X																
尿の検査	X		X					X	X		X					X	X
尿の培養 (細菌の検査)	X								X								X
PSA	X							X	X							X	X
心電図	X																
胸部レントゲン	X																
経直腸的超音波検査	X								X								X
前立腺生検	X										(X)*						
骨シンチ	X																
(骨転移の疑われる 部位のMRI)	X																
(骨の単純撮影)	X																
腹部、骨盤部CT	X																
リンパ球の検査	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
免疫の検査	X							X	X							X	X

注記: *ベクター投与48~72時間後に担当医が可能と判断し、患者さんから同意が得られた場合に行います。

【検査・観察項目とそのスケジュール（続）】

項目	Day42	Day56 (術前)	Day56 (術後)	Day57 (術後1日目)	Day59 (術後3日目)	Day63 (術後7日目)	Day84	以後 3ヶ月毎	1年後	以後 3ヶ月毎	2年後
診察	X	毎日観察する					X	X	X	X	X
排尿の確認	X	X									
血液の検査	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
血液の検査 (肝臓、腎臓)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
血液の検査 (動脈血の採血)			X								
尿の検査	X	X				X	X	X	X	X	X
尿の培養 (細菌の検査)						X					
PSA	X	X				X	X	X	X	X	X
心電図									X		X
胸部レントゲン									X		X
経直腸的超音波検査	X	X									
前立腺生検											
骨シンチ									X		X
(骨転移の疑われる 部位のMRI)									X		X
(骨の単純撮影)									X		X
腹部、骨盤部CT									X		X
リンパ球の検査	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
免疫の検査		X					X	X	X	X	X

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

資料13

免疫学的ならびに病理組織学的
解析方法に関する資料

免疫学的ならびに病理組織学的解析方法

1. 腫瘍組織の解析

- ① 摘出前立腺の4 mm スライスホルマウントスライドを作成し、腫瘍のマッピングを行い、全前立腺体積、全腫瘍体積、殺細胞効果範囲 (affected tumor volume) を計測する。
- ② パラフィン包埋した組織を脱パラフィン処理し、Mol Ther 13: 727-728, 2006 に記載された方法に則って、Tunnel 染色によるアポトーシスの検定、CAR に対する抗体を用いた CAR 発現細胞の検出を行う。
- ③ ホルマリン固定パラフィン包埋ホルマウント標本で抗 CD20 抗体 (B cells) (Dako)、抗 CD8 抗体 (killer T cells) (Neomarkers)、抗 CD68 抗体 (macrophages) (Dako)、抗 CD3 抗体 (T cells) (Dako) および抗 CD4 抗体 (helper T cells) (Dako) を用い、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法で免疫染色を行う。
- ④ Pathological stage、Gleason grade がマッチしたもの*をコントロールとし、局所免疫反応を評価する。
- ⑤ 上の②、③、④は、コンピューターイメージ解析 (Optimas 6.1) を用いた定量評価で行う。

* 当院で過去に診断された前立腺癌病理標本を対象とし、書面による同意取得を行う。

2. リンパ節の免疫組織学的解析

- ① 前立腺全摘除術の施行時に、同じく郭清したリンパ節検体を用いる。
- ② パラホルムアルデヒドで固定後、抗 CD20 抗体 (B cells) (Dako)、抗 CD8 抗体 (killer T cells) (Neomarkers)、抗 CD68 抗体 (macrophages) (Dako)、抗 CD3 抗体 (T cells) (Dako) および抗 CD4 抗体 (helper T cells) (Dako) を用い免疫染色を行う。
- ③ 上記はコンピューターイメージ解析 (Optimas 6.1) を用いた定量評価で行う。

3. リンパ節由来リンパ球の機能解析

- ① 前立腺全摘除術の施行時に、同じく郭清したリンパ節検体を用いる。
- ② 培養液を満たしたシャーレ内で、細かく切片化し、スライドガラスを用いてさらに細かく粉碎する。
- ③ 粉碎したリンパ節を含む培養液をメッシュに通し、細胞分画のみを分離する。
- ④ 前立腺全摘除術で得られた前立腺検体より、癌病巣部を punched out して採取する。なお採取病巣部の同定に関しては、当該検討の共同研究者である岡安 勲が確認、同定するものとする。
- ⑤ 同癌病巣から得られた腫瘍組織を、液体窒素での急速凍結ならびに解凍を繰り返し、腫瘍ペプチドの抽出を行う。
- ⑥ 上記③で分離したリンパ球と、腫瘍ペプチドとを共培養する。コントロール群として、上記③で分離したリンパ球のみを培養した群と、fibroblast と共培養した群も設定する。
- ⑦ ⑥から回収したリンパ球を ELISPOT アッセイ用のプレートに移し、IFN- γ を分泌している細胞のスポット数をそれぞれカウントする。

4. 末梢血リンパ球の解析（調節性 T 細胞についての解析を含む）

- ① 投与前、投与後 1~7 日目、14~21 日目、28 日目、42 日目、56 日目、57 日目、59 日目、63 日目、84 日目、以後 3 か月毎（術後 2 年まで）にヘパリンにてコーティングされた 5 ml の注射器を用いて、4.5 ml の血液を採取する。
- 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各種交代の組み合わせ（CD45/CD14、CD3/CD19、CD3/CD8、CD3/CD4、CD8/HLA-DR、CD4/HLA-DR、CD3/HLA-DR、CD3/CD56+CD16、CD3/CD11b、CD4/CD25）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）。

5. 血清中サイトカインの測定

- ① 投与前、投与後 1～7 日目、14～21 日目、28 日目、42 日目、56 日目、57 日目、59 日目、63 日目、84 日目、以後 3 か月毎（術後 2 年まで）に 5 ml の注射器にて 5 ml の血液を採取する。
- ② 2,000×g、15 分、4°C で遠心分離後、0.5 ml の血清を分離し、-80°C で保存する。
- ③ IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12 を ELISA 法にて測定する。

6. 細胞障害性試験による NK 細胞の機能解析

- ① 投与前、投与後 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目、56 日目、84 日目、以後 3 か月毎（術後 2 年まで）に採取された PBMC を解析に用いる。
- ② PBMC の細胞数を測定し、⁵¹Cr で標識された標的細胞（K562）とエフェクター細胞/標的細胞（E/T）比、100 : 1、50 : 1、25 : 1、12.5 : 1 で混合培養する。
- ③ 4 時間後、上清に放出される放射活性を γ 線カウンターで測定する。ポジティブコントロールである最大放出は target cell 浮遊液に 1 N 塩酸を加えたものとし、ネガティブコントロールである自然放出は target cell だけの浮遊液の測定をするものとする。また下記の計算式により、細胞傷害活性を算出する。

$$(\text{共培養での放出} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出}) = \text{細胞傷害活性 (\% lysis)}$$

7. 生検組織及び摘出病理組織による導入遺伝子の解析

- ① 投与後 16～17 日目（2 回目のベクター投与後 48～72 時間後）、および投与後 56 日目の摘出病理組織において検討を行う。
- ② 生検組織ならびに摘出病理組織の凍結標本に DNAzol（Invitrogen）を加えてホモジナイズする。
- ③ エタノールを加えて DNA を沈殿後、遠心分離により DNA を回収する。
- ④ アプライドバイオシステムズの Assays-by-Design サービスにより、HVS-tk gene の遺伝子配列から、TaqMan MGB プローブ、プライマーを設計、合成する。
- ⑤ TaqMan Universal PCR Master Mix を加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（Applied

Biosystems) を用いてリアルタイム PCR をおこない、導入遺伝子のコピー数を確認する。

8. 免疫学的反応のフォローアップ

前述の内容を含めて、末梢血リンパ球の解析、ならびに血清中サイトカインの測定に関して、同じく投与前、投与後 1～7 日目、14～21 日目、28 日目、42 日目、56 日目、57 日目、59 日目、63 日目、84 日目、以後 3 か月毎（術後 2 年まで）と、より長期的な術後フォローアップ期間を行う。また NK 細胞の機能解析に関しても、投与前、投与後 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目、56 日目、84 日目、以後 3 か月毎（術後 2 年まで）と長期のフォローを実施する。

