

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 $3 \times 10^{13}$ particleを接種された患者が死亡し、 $3 \times 10^{12}$ 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、米国ペイラー医科大学で行われた試験においては $1 \times 10^{11}$ 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<sup>25)</sup>。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、ペ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 $1 \times 10^{10}$ 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 $5 \times 10^{12}$ 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<sup>26)</sup>。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 $\gamma$ 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<sup>9)</sup>。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 $\gamma$ 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<sup>9)</sup>。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<sup>27)</sup>。

## 2) rhIL-12 の皮下投与における安全性について

悪性腫瘍<sup>10)、11)、12)</sup>ならびにC型肝炎<sup>13)</sup>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<sup>10)</sup>。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 $\gamma$ 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<sup>14)</sup>。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<sup>12)</sup>。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、インターフェロニン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<sup>13)</sup>。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ニン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<sup>28)</sup>、腹腔内投与<sup>29)</sup>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  $\mu$ 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ニン $\gamma$ は検出されなかった<sup>28)</sup>。

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<sup>29)</sup>。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ニン $\gamma$ 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<sup>30)</sup>。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<sup>31)</sup>。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 $\gamma$ 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 $2.5 \times 10^{10}$ VPから $3 \times 10^{12}$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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<sup>32)</sup>。

## 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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<sup>17) 24)</sup>。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ご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<sup>17)</sup>、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働しており、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 $1.0 \times 10^{10}$ vp(viral particle)から開始して2ないし5倍ずつ増量し $5.0 \times 10^{10}$ vp,  $1.0 \times 10^{11}$ vp,  $5.0 \times 10^{11}$ vp,  $1.0 \times 10^{12}$ vp,  $5.0 \times 10^{12}$ 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。Taylor<sup>18)</sup>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 4.0ng/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) 被験者は正常な骨髄機能、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、抗癌化学療法と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、担当医が不相当と認める場合。

#### 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 <sup>10</sup> vp (viral particle)
レベル 2	5.0x10 <sup>10</sup> vp
レベル 3	1.0x10 <sup>11</sup> vp
レベル 4	5.0x10 <sup>11</sup> vp
レベル 5	1.0x10 <sup>12</sup> vp
レベル 6	5.0x10 <sup>12</sup> 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。規定の通りに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カ所（最大2カ所）に注入する。アデノウイルスベクター液は1ヶ所につき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 ヶ所（最大 2 ヶ所）に注入する。アデノウイルスベクター液は 1 ヶ所につき 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 ヶ所（最大 2 ヶ所）に注入する。アデノウイルスベクター液は 1 ヶ所につき 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、プロトコー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

経直腸的超音波検査、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 $\mu$ lとそれぞれの抗体各20 $\mu$ 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 $\mu$ l：（ギ酸）、B液265 $\mu$ 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 $\mu$ 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- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、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



(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 5 ml の注射器にて5ml の血液を採取
- ② 2000 x g、15分、4℃で遠心分離後、0.5ml の血清を分離し、-80℃で保存
- ③ IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12をELISA法にて測定

\* 細胞障害性試験によるNK細胞の機能解析

【実施時期】 治療前、投与後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20mlの注射器を用いて、20mlの血液を採取、室温で、400 x gで10分間遠心分離し上清の血漿を取り除き、PBSを加えてトータル20mlにする。さらに15mlのFicoll-Paque液(Pharmacia社)を加え、400 x gで30分間、室温で遠心分離する。3層に分かれた中層のPBMC分画よりPBMCを含む液を分離し、PBSで2回洗浄し、PBMCとして使用する。
- ② PBMCの細胞数を測定し、<sup>51</sup>Cr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 $\gamma$ 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1N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。

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

\*血清CTL誘導ペプチドに対する特異的IgG抗体<sup>30)</sup>

【実施時期】 治療開始前、ならびにベクター投与4週後で次回のベクター投与直前