

本研究では pDRSV-IFN β 以外の DNA 及びパッケージング細胞は使用しない。

(3) 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的とした理由

本研究は正電荷リポソームに包埋した遺伝子を悪性黒色腫の転移巣内へ直接注入して遺伝子導入するものであり、特に取り出した細胞を標的とするものではない。

(4) 遺伝子導入方法の概略及び本導入法を選択した理由

悪性黒色腫細胞への遺伝子導入はヒト β 型インターフェロンの cDNA を組み込んだ遺伝子発現プラスミドを正電荷多重膜リポソームに包埋して行う。これらは共同研究者の吉田らが開発、製造したもので、主としてエンドサイトーシスの機序で内容物が細胞内へ取り込まれる。本リポソームによる遺伝子導入効率は細胞の種類にもよるが 10-20%程度であり、それほど高いものではない。しかし、細胞毒性は低く、ウィルスベクターに比べ安全性において優れている。この方法では主として分裂中の細胞に遺伝子発現が認められることが示されており、分裂細胞が多数含まれている悪性黒色腫の転移巣への局注は、腫瘍細胞への選択的発現という点からも利点を有する。

(5) 遺伝子導入に用いるプラスミドの調製

ヒト β 型インターフェロン cDNA は Taniguchi ら²³⁾がクローニングしたものを吉田らが正式な恵受を受けて使用した。プラスミドの調製方法については吉田らの悪性グリオーマに対する「遺伝子治療臨床研究実施計画申請書」に詳述されているが、制限酵素 SmaI 及び HindIII で消化してえられたヒト β 型インターフェロン構造遺伝子を含む断片を動物細胞発現ベクター pRc/RSV (Invitrogen 社) の制限酵素 XbaI 及び HindIII 部位に挿入することによりヒト β 型インターフェロン発現ベクター pRSV-IFN β を構築した(図4)。さらに、制限酵素 BamHI で消化して約 2kb の不要な断片(大腸菌でのプラスミドの生産のための塩基配列や治療目的以外の塩基配列である F1 ori, PSV40, Neomycin, SV40pA) を欠失させ、ライゲーションにより遺伝子治療臨床研究用プラスミド pDRSV-IFN β (3,674bp) をえた。

Transformant の調製と導入プラスミドの大量調製および純度検定については吉田らの申請書に詳述されているとおりであり、臨床応用に十分に耐えうる純度の導入プラスミドであることが確認されている。

(6) LAB-1 (ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤)

本遺伝子製剤の調製法についても吉田らの申請書に詳述されている。正電荷リポソームは、規格設定され、品質試験を経た3成分 N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタメイト クロライド(TMAG)、ジラウロイル-ホスファチジルコリン(DLPC)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)から作製され、これに 1mg/ml の濃度の pDRSV-IFN β を含む等張リン酸緩衝液を加えてホモジナイズし、得られた懸濁液を孔径 2 μ m のメンブランフィルターを装着したリポナイザーを用いて加圧濾過する。その濾液の遠沈沈殿画分に等張リン酸塩緩衝液を加えて再分散させ、容器に充填し、密封することにより 40ml の LAB-1 が調製される。このようにして正電荷多重膜

リボソームに包埋されたヒト β 型インターフェロンが得られる。リボソームの粒子径は0.5–2.0 μm である。この製剤は凍結乾燥製剤化されており、1年以上にわたり保存可能であり、随時、使用に供することができる。

以上のようにして作製された LAB-1（以下製剤という）の規格を表2に示す。LAB-1の均一性、安定性及び品質の維持保証のため、名古屋大学医学部附属病院では製剤調製に関するガイドラインと諸規約が作成され、遵守されている。製剤の調製は名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室において、同調製室管理内規で定められた製剤調製作業員が行う。製剤の適合承認は安定性分析の結果に基づいて製剤検証部会が行っている。プラスミドの規格については米国の遺伝子治療臨床研究に用いられている2社（VICAL社、QIAGEN社）の基準を参考に作成されたきびしい規格基準によっている。リボソーム製剤の規格は米国などのリポフェクション型リボソームの規格を参考にし、薬発第1062号「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」（平成7年11月15日付）に則して規定した。本製剤は非ウィルス性遺伝子導入ベクターであり、増殖性ウィルス出現の可能性はない。遺伝子は染色体には組み込まれず、エピゾーマルに発現し、細胞の分裂回数に伴って細胞当たりのプラスミド数は減少するので、遺伝子の発現は一過性である。遺伝子発現は導入後4日ないし6日でピークに達し、その後減弱して、2～3週間後には検出限界以下となる。変異原性試験は陰性で、がん原性、免疫原性も認められていない。後述するように、本製剤の安全性はマウス、ラット、ウサギ、カニクイザルなどにおいて十分に検討され、確認されている。

7. これまでの研究成果と文献的考察

(1) ヒト β 型インターフェロンとその悪性黒色腫への効果

ヒト β 型インターフェロンは主として線維芽細胞より産生されるサイトカインであり、分子量20,000、166個のアミノ酸からなるタンパク質である。本インターフェロンは抗ウィルス作用のほか、抗腫瘍細胞増殖抑制作用、免疫賦活作用、抗血管増生作用など多彩な生理活性を有する。ヒト β 型インターフェロンは悪性黒色腫に対し、 α 型、 γ 型インターフェロンに比べ、有意に強い増殖抑制作用を有することが複数の研究によって明らかにされている¹³⁾¹⁶⁾。ヒト β 型インターフェロンが *in vitro* において α 型よりもはるかに強い増殖抑制効果を示すことは Horikoshi ら¹³⁾、Kopf ら²⁴⁾が報告しており、いずれも50～100 IU/ml程度の濃度から効果がみられている。Chawla-Sarkar らはこのヒト β 型インターフェロンの抑制効果にアポトーシスにかかわる TRAIL/apo2L の誘導が関与していることを報じている¹⁶⁾。橋爪はヌードマウス移植ヒト悪性黒色腫結節内への局注実験でヒト β 型インターフェロンは1回投与量 1×10^5 IU、 6×10^5 IU のいずれの場合でも α 型インターフェロンに比べ、強い増殖抑制を示すことを明らかにしている²⁵⁾。本邦で行われた悪性黒色腫に対するヒト β 型インターフェロンの臨床試験では、皮膚転移巣内への局注（1病巣に1回 $4 \sim 8 \times 10^5$ IU）により個別効果として50%の奏効率がえられている²⁶⁾。以上のデータなどに基づき、本邦では現在、グリオーマとともに悪性黒色腫が β 型インターフェロンの保険適用疾患となっている。これまでのところ、このヒト β 型インターフェロン投与による大きな有害事象は報告されていない。しかし、このヒト β 型インターフェロン局注療法に反応しない病巣も稀ならず経験されるうえに、他臓器転移巣の縮小などの

全身的効果はほとんど期待できない。そのような意味で限界のある治療法である。Hansonらは悪性黒色腫細胞におけるインターフェロン遺伝子の発現量が外来性のインターフェロンに対する感受性と相関し、遺伝子発現量が低い悪性黒色腫細胞ではインターフェロンによる増殖抑制効果が低いことを見出している¹⁹⁾。既述したように、 α 型、 β 型インターフェロン遺伝子は染色体 9p21 に座位するが、この座位は悪性黒色腫細胞では高率に欠失することが知られている²⁷⁾。この欠失に起因するインターフェロン遺伝子発現の消失が悪性黒色腫細胞のインターフェロンへの感受性低下をもたらす可能性が強く疑われる。したがって、ヒト β 型インターフェロン遺伝子の導入は、インターフェロンへの感受性回復をもたらすものと期待される。後述するわれわれの基礎研究はこの仮説を支持するものである。Qinらもヌードマウス移植悪性黒色腫の系で、アデノウィルスベクターとしてヒト β 型インターフェロン遺伝子を *ex vivo* で導入すると 1%の導入効率でもマウスでの腫瘍形成が阻害されること、移植された腫瘍結節内へ同遺伝子を局注すると結節の完全消退が観察されることを報告している²⁸⁾。以上のデータより、ヒト β 型インターフェロン蛋白の投与ではなく、その遺伝子を導入する本臨床研究施行の意義と妥当性が強く支持されるものと考えられる。

(2) 遺伝子導入に必要なリポソームの開発とその特性

本臨床研究に用いるリポソームの開発の経緯とその特性については、直接その開発に携わった吉田らの悪性グリオーマに対する「遺伝子治療臨床研究実施計画申請書」に詳述されている。本リポソームは、膜表面が正に荷電している多重膜構造のリポソームであることが最大の特徴であり¹¹⁾、この点で従来のリポフェクチン法などに用いられるものとは大きく異なる。これによって表面が負に荷電している遺伝子及び細胞との親和性が増し、導入効率の向上と毒性の低下が達成された。なお、本リポソームが細胞表面に接触するとエンドサイトーシスの機序で細胞内へ取り込まれること、リソソームによる破壊は受けにくいこと、遺伝子は主として増殖期の細胞において核内へ移行し、エピゾマルに発現すること、などが明らかにされている²⁹⁾³⁰⁾。また、今回用いる多重膜リポソームは一枚膜リポソームに比べ細胞毒性が低く、血清添加下での導入効率の低下も少ないことが示されている¹¹⁾。リポソームはウィルスベクターに比べ、毒性と安全性において優れているのみでなく、経済性においても勝っている。本臨床研究は、上述のように本邦の研究者によって開発、改良されたオリジナルなリポソーム製剤を用いるものであり、その点からも価値ある研究とみなされる。

(3) 遺伝子導入によるヒト β 型インターフェロンの発現

グリオーマ細胞におけるデータは吉田らの「遺伝子治療臨床研究実施計画申請書」に記述されているので、ここでは悪性黒色腫細胞に関する知見を中心に記す。

SV40 由来発現ベクターにヒト β 型インターフェロン遺伝子を挿入した遺伝子発現ベクター pSV2IFN β を正電荷多重膜リポソームに包埋してヒト悪性黒色腫培養細胞と作用させ、一定時間後の培養液中のヒト β 型インターフェロン量を ELISA 法で測定した。5株の培養ヒト悪性黒色腫細胞につきそれぞれ 5×10^4 個の細胞を各ウェルに入れ、24 時間培養後、pSV2IFN β (15nmol/ml lipid, 0.6 μ g/ml DNA) を添加し、3日後、6日後の培

養液中のヒト β 型インターフェロン量を検討したところ、表3のような結果がえられた。3日後には既に明らかなヒト β 型インターフェロン産生が認められ、6日後の産生量は6細胞株中5株で10IU/ml以上、最大はRPM-EP株で67.3IU/mlであった²²⁾。産生量がもっとも低かった1株(Colo38)での産生量は3.8IU/mlであった。

SV40 発現ベクターによる遺伝子導入効率については、ヒトグリオーマの primary culture の系で数%から10%強であることが確認されており、培養 B16 マウスメラノーマの系での実験では約30%というデータをえている。本臨床研究で用いる RSV 発現ベクターによる発現効率は SV40 発現ベクターよりも高いことが示されている。なお、この遺伝子発現が一過性であることはヒトグリオーマ培養細胞の系で確認されている。ヌードマウスの脳内移植ヒトグリオーマの系を用いた実験では、正電荷リポソーム包埋 pDRSV-IFN β (0.6 μ gDNA/30nmol lipid/2 μ l) の注入3日後、腫瘍組織内にはヒト β 型インターフェロン mRNA の明らかな発現増強が認められたが、正常組織内への注入では無処置対照組織と同程度の発現しか認められなかった。B16 マウスメラノーマの腫瘍内への pSV2muIFN β 包埋リポソームの注入実験でも 19kD マウス β 型インターフェロンの明瞭な発現がウェスタンブロットにて確認された。

本臨床研究では遺伝子製剤を複数回腫瘍結節内へ注入する計画である。吉田らはグリオーマの系で複数回投与により遺伝子導入効率が高まることを確認しており、悪性黒色腫細胞においても繰り返し投与による同様の導入効率の向上が確認されている(Nobayashi M, et al: Repeated cationic liposome-mediated gene transfer enhanced transduction efficiency against murine melanoma cell lines. J Dermatol Sci 29: 206-213, 2002)。腫瘍結節の大きさと必要とみなされる DNA 量、および局注回数との関係については、これまでの in vivo 実験のデータから、グリオーマにおいても悪性黒色腫においても100mm³の腫瘍結節に3 μ gのDNAを投与すると80%以上の確率で消失することが明らかにされているので、体積比から直径1cmの結節(523 mm³)には15.7 μ g、直径2cmの結節(4187 mm³)には125.6 μ gのDNAを要することになる。1病巣に計6回の局注を行うとすると、1回当たり21 μ gのDNAを投与することにより直径2cmの病巣をほぼ消失させることができる計算になる。今回の臨床研究では、結節内への注入可能量などを考慮し、直径2cm程度の結節には1回30 μ gのDNAを、直径1cm程度までの結節には1回10 μ gのDNAを、それぞれ結節内とその周囲に注入する予定である。

(4) 遺伝子導入により産生されるヒト β 型インターフェロンの抗腫瘍効果

①培養細胞による検討

5株の培養ヒト悪性黒色腫細胞につきそれぞれ5 $\times 10^4$ 個の細胞を各ウェルに入れ、24時間培養後、pSV2IFN β 包埋リポソーム(15nmol/ml lipid, 0.6 μ g/ml DNA)を添加し、3日後、6日後の生細胞数を trypan-blue 法で計測した結果を表4に示した。すべての細胞株において増殖抑制効果がみられ、その抑制率は3日後で34%(RPM-MC)から56%(G631)、6日後では71%(Colo38)から92%(RPM-EP)であった。また、培養 B16 マウスメラノーマの系でもマウス型の遺伝子製剤 pSV2muIFN β 包埋リポソームがマウス β 型インターフェロン蛋白(100IU)添加群に比べ、有意に強い増殖抑制効果を示すことを確認している。この際、形態学的に約30%の細胞がアポトーシスの所見を示すことが観

察されており、本遺伝子治療が静細胞性にのみでなく殺細胞性にも作用することが確認された。さらにまた、このリポソーム包埋遺伝子製剤の繰り返し投与によって、遺伝子導入細胞の数が有意に増加することを確認している (Nobayashi M, et al: Repeated cationic liposome-mediated gene transfer enhanced transduction efficiency against murine melanoma cell lines, *J Dermatol Sci*, 29: 206-213, 2002)。

ヒトβ型インターフェロンは増殖期の腫瘍細胞の増殖を抑制するとともに、静止期の細胞が増殖期へ入るのを抑制しているものと考えられる。腫瘍内の増殖期細胞のポピュレーションは腫瘍毎にかなり異なるが、たとえばグリオーマでは増殖期細胞が約 30%、静止期細胞が 70%程度と見積もられており、悪性黒色腫についてもこの程度の分布と考えられる。したがって、cytostatic な効果が主体であるヒトβ型インターフェロン蛋白のみの投与による治療の効果には限界があるといえる。既述したように、培養マウスメラノーマの系においてβ型インターフェロン遺伝子導入により約 30%の腫瘍細胞にアポトーシスに特徴的な形態学的変化が認められ、殺細胞効果がみられることをわれわれは確認している。また、本遺伝子治療によってヒトβ型インターフェロンが一定期間持続的に高濃度に腫瘍結節局所に産生されるので、これが病巣内の腫瘍細胞に作用するために、非導入細胞にも増殖抑制効果が及ぶものと考えられる (Horikoshi ら¹³⁾の培養ヒト悪性黒色腫細胞を用いた研究ではヒトβ型インターフェロン蛋白濃度を 100IU/ml から 10000IU/ml に上げると増殖抑制率が 64%から 91%に上昇している)。以上のような実験結果より、本遺伝子治療によって、ヒトβ型インターフェロン蛋白の投与と比べて量的にも、また質的にも優れた強い抗腫瘍効果が期待できるので、高い臨床効果を望めるものと予想される。

②マウス移植悪性黒色腫での検討

ヌードマウスの皮下へヒト悪性黒色腫細胞を移植し、約 7 mm 径の結節に増大した時点で腫瘍結節内へ pSV2IFNβ 包埋リポソーム製剤 (3 μgDNA and 150nmol lipid in 15 μl) を局注し、腫瘍結節の増大を PBS 及び empty liposome 局注を対照群として比較、検討した (各群 6 匹)。pSV2IFNβ 包埋リポソーム製剤局注群には 1 回投与群、隔日 6 回投与群を設けた。対照群では腫瘍結節は増大を続け、60 日後には 3 倍の体積に達し、マウスは腫瘍死する。これに対し、pSV2IFNβ 包埋リポソーム製剤 1 回局注群では 40 日後まで明らかな腫瘍結節増大抑制がみられ、60 日後の時点で 44%の増大抑制効果が認められた。6 回局注群では腫瘍結節は縮小し、40 日後にはすべて完全に消退した (図 5)²²⁾。なお、ヒトβ型インターフェロン蛋白 (5x10⁴IU) の 6 回局注でもある程度は腫瘍結節の増大抑制がみられたが、完全消退例は認められなかった。この pSV2IFNβ 包埋リポソーム製剤局注の効果を組織学的に検討したところ、対照群に比べ壊死巣の増大とアポトーシスに陥った細胞の有意な増加が認められた。

B16 マウスメラノーマの同系マウス(C57BL/6)皮下への移植実験系では、マウスβ型インターフェロン遺伝子 pSV2muIFNβ 包埋リポソーム製剤の局注がマウスβ型インターフェロン蛋白 (1x10³IU) 局注に比べ、腫瘍結節の増大を有意に抑制することが示された。この in vivo 実験系では NK 細胞が腫瘍抑制に大きな役割を果たしており、抗 asialoGM1 抗体にて NK 細胞活性を抑制すると増殖抑制効果が減弱することが明らかにされた (Ryuke Y, et al: Growth inhibition of subcutaneous mouse melanoma and induction of natural killer cells by liposome-mediated interferon-β gene therapy,

Melanoma Res, in press)。また、マウスの皮下2カ所に B16 メラノーマを移植しておき、一方の腫瘍結節にのみマウス β 型インターフェロン遺伝子 pSV2muIFN β 包埋リポソームを局注したところ、非局注の他方の腫瘍結節にも増大抑制効果が認められた。局注部位で賦活化された NK 細胞が全身性に広がり、非局注の腫瘍結節にも抗腫瘍効果をもたらしたものと考えられた（水野正明、他：第 39 回日本癌治療学会総会、インテグレイテッドシンポジウム2「メラノーマ」、2001 年 11 月、広島市）。なお、可移植性マウスグリオーマの実験系では β 型インターフェロン遺伝子の局注により特異的 CTL が誘導されることが確認されている²¹⁾³¹⁾。以上の事実より、本臨床研究におけるヒト β 型インターフェロン遺伝子の局所投与によって、投与局所における効果のみでなく、全身的抗腫瘍効果の誘導、増強も期待しうる可能性が強く示唆される。

8. 安全性についての評価

本遺伝子製剤の安全性に関しては、これを開発した吉田らが悪性グリオーマに関する「遺伝子治療臨床研究実施計画申請書」において詳述しているので、ここではその要点のみを記述する。

(1) 遺伝子導入方法の安全性

本臨床研究に用いる正電荷リポソームの毒性については、各種の細胞において $10\mu\text{M}$ 以下では毒性はほとんど認められず、細胞増殖も抑制されない。本臨床研究に用いる遺伝子製剤 IAB-1 は無菌性で、エンドトキシン量は $10\text{EU}/\text{mg}$ 以下であることが確認されている。IAB-1 の安全性については、吉田らが悪性グリオーマに関する「遺伝子治療臨床研究実施計画申請書」(30~35 頁)において詳細に記載している。「医薬品の安全性試験に関する非臨床試験の実施に関する基準」(平成9年3月26日、厚生省令第21号)、及び「単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について」(平成5年8月10日、薬新薬第88号)等に準拠して、ラット及びカニクイザルの単回脳内及び静脈内投与毒性試験、ラット及びカニクイザルの1カ月間反復脳内投与毒性試験、変異原性試験(復帰突然変異、染色体異常、小核)、ラットの生殖・発生毒性試験、発熱性物質試験及びエンドトキシン試験を行い、安全性が確認されている。特に静脈内投与および脳内投与による IAB-1 および正電荷リポソームの実験動物における有害反応、毒性試験はラットとカニクイザルを用いて検討されている。このうち静脈内投与の実験結果を以下に記す。

1) IAB-1 のラットにおける単回静脈内投与毒性試験では pDRSV-IFN β 100、300、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の IAB-1 の投与にて投与翌日にのみ 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与の群で摂食減少、体重増加抑制が認められたが、2日目以後は対照群との間に差異はみられなかった。血液検査にて 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与の群で白血球増加が、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の群で分葉核好中球の増加と血小板減少が認められたが、一過性であった。臓器重量については 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で脾臓の重量増加がみられたが、組織学的には異常を認めなかった。正電荷リポソームのみの投与群では何らの変化も認められなかった。以上より、IAB-1 のラットにおける概略致死量は DNA 量として 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上であると推定される。

2) IAB-1 のカニクイザルにおける単回静脈内投与毒性試験では pDRSV-IFN β 30、100、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の IAB-1 を投与し、2週間観察後に剖検し、各臓器の変化を検索した。300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の2匹中1匹でリンパ節腫大と脾臓の重量増加が認められたが、組織学的には

異常は観察されなかった。その他、IAB-1 投与によるとみなされる異常は認められなかった。また、正電荷リポソーム投与群には何らの異常所見も見出されなかった。これから、カニクイザルにおける IAB-1 の致死量は pDRSV-IFN β 300 μ g/kg 以上であると推定された。

3) IAB-1 の無毒量については、カニクイザルへの静脈内投与及びラットでの着床障害 (雄には8週間、雌には4週間投与) 等の試験結果より、DNA 量として雄で10 μ g/kg、雌で100 μ g/kg と判断された。これを基準に体重 60kg のヒトに換算すると、男性で1回につき600 μ g までは安全であり、女性ではそれ以上の量の pDRSV-IFN β を反復投与しても安全性に問題がないものとみなされる。また、DNA の累積総投与量の安全限界については、同じくラットでの静脈内投与試験の結果 (雄では10 μ g/kg を連日8週間投与までの、雌で100 μ g/kg を連日11日間投与までの安全性が確認されている) から換算し、体重 60kg の男性で33.6mg となり、50kg の女性で55mg と算出される。本臨床研究における1回投与量は最大150 μ g であり、3コース施行した場合でも総投与量は2.7mg 以下であり、いずれも上記限界量よりはるかに低く (男性で限界量の8%、女性でその5%以下)、総投与量に関しては問題ないものと考えられる。

今回のようなリポソームによる遺伝子導入では分裂細胞にのみ遺伝子が導入、発現されることが明らかにされている。したがって、腫瘍結節内へ製剤を局注する今回の臨床研究において正常細胞に遺伝子発現がみられる可能性はきわめて低い。本リポソームおよび pDRSV-IFN β の免疫原性についてはラット、ウサギ、サル等で検討され、きわめて低いことが確認されている。また、癌原性については、50匹のマウスを用いて最長6カ月間以上の観察が行われたが、発癌はまったく認められなかった。なお、本臨床研究において患者以外の人に遺伝子が導入される危険性はまったくない。

(2) 遺伝子産物の安全性

本邦においては、これまでに多数の悪性黒色腫患者に対し、一日量 300×10^4 IU のヒト β 型インターフェロンを5~10日間の皮内ないし皮下投与を数週から数ヶ月間隔で長期間にわたって繰り返す術後補助療法が行われてきた。有害反応として、ときに発熱、頭痛・倦怠感、骨髄抑制、肝機能障害などがみられるものの、重篤なことはほとんどないことが明らかにされている。しかも、本遺伝子治療におけるヒト β 型インターフェロンの発現は一過性であることから、遺伝子産物による有害反応が問題になる可能性は低く、安全性が問題になることはないと考えられる。

9. 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

本臨床研究では悪性黒色腫の皮膚・皮下・リンパ節転移巣に1回量、直径1cm程度までのものには1回10 μ g の、直径2cm程度までのものには30 μ g のDNAを週3回、2週間、計6回注入する予定である。この投与量の根拠は、1) カニクイザルなどでのデータから体重当たりで IAB-1 の無毒性量をヒトに換算すると1回当たり10 μ g/kg となるので、その1/2の5 μ g/kg を1回投与の安全量とした。これにより、50kg の患者では1回当たりの投与可能DNA総量は250 μ g となる。2) IAB-1 の調製工程において、最終生成物の濃度が30 μ gDNA/ml となった。また、この濃度がもっとも効率よく抗腫瘍効果を発揮することが確認された。3) 米国を中心に実施されている liposome-DNA

complex を用いた臨床研究のプロトコールのほとんどが 10~250 μ g の DNA を用いている。4) ノードマウス移植ヒト悪性黒色腫での実験データから、直径 7mm の腫瘍結節に 1 回量 3 μ g の DNA を 1 回局注することで腫瘍の増殖抑制がはっきりと認められ、同 6 回投与にて完全消退をきたしたことから体積比で換算すると、径 1.5—2 cm の結節に 1 回当たり 30 μ g 程度の DNA を 6 回局注 (DNA 総量 180 μ g) することで効果が得られることになる。なお、複数個の転移巣が存在する場合には、上記 1) で述べたように 1 回安全量が 250 μ g であることより、1 箇所 30 μ g として計 8 病巣までは局注可能とみなされる。今回の臨床研究では 1 回に局注する転移巣の数は最大 5 個までであるので (最大量 150 μ g)、1 回安全量の点でも問題はないと判断される。

10. 遺伝子治療臨床研究の計画

(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

本臨床研究に用いるプラスミドとリポソームの生産、調製は名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室にて行い、その凍結乾燥製剤をドライアイス入り発泡スチロール箱に入れて翌日までは信州大学医学部附属病院へ輸送し、同院の治験管理センターの管理のもとに専用の冷蔵庫 (4℃) 内に保管し、施錠する。治験管理センターの担当者はその鍵を管理し、薬剤の出入量を記帳、確認する。また、名古屋大学から信州大学へ運搬する毎に薬剤の外観と輸送中の温度記録をチェックする。さらに運搬後、製剤の一部を用いて *in vitro* で培養ヒトグリオーマ細胞株 (U251SP) と悪性黒色腫細胞株 (RPM-EP 等) に作用させ、3 日後、6 日後の培養上清を採取し、上清中に産出されるヒト β 型インターフェロン量を株式会社 BML において EIA 法にて定量してもらう。このようにして運搬後の IAB-1 凍結乾燥製剤の品質が保持されていることを確認した上で臨床研究に用いる。

(2) 本臨床研究の対象者の選択基準及び除外基準

① 組織学的に悪性黒色腫の診断が確定されている第 IV 期の患者、または他の治療法が不可能と判定された他病期の患者で皮膚、皮下あるいはリンパ節に転移がある症例から選択する。ただし脳転移のある患者及び生命予後が 6 カ月以内と予想される患者は除外する。

② 治療前に肉眼的あるいは超音波、CT、MRI などの画像検査で、腫瘍径などの評価可能病変を有する症例から選択する。

③ 手術療法あるいはこれまで有効性が確認されている化学療法などの療法を施行したにもかかわらず無効な症例、あるいはこれらの治療法の適応がないと判定された症例から選択する。ただし、前治療が行われた患者については、治療終了から 4 週間以上経過し、その影響が認められない症例から選択する。

④ 対象病変は注射針にて刺入可能な病変で、腫瘍の直径が 2 cm 程度までの病変を選択する。

⑤ 尿・血液検査などの結果、重篤な合併症が無く、原則として血液データが下記を満足する症例を選択する。

白血球数 > 3000/mm³

血小板数 > 100000/mm³

ヘモグロビン > 8.5 g/dl

出血・凝固時間：正常

血清ビリルビン<2.5 mg/dl

sGOT・sGPT<50 U/l

血清クレアチニン<1.5 mg/dl

⑥ 18歳以上の男女を対象とする。ただし、妊娠している可能性のある場合や母乳育児中の者、75歳以上の患者、及び担当医が本臨床研究の対象として不適切であると判断した症例は除外する。

(3) 本臨床研究の対象者の同意の取得方法

担当医師は本臨床研究の実施に際し、臨床研究開始前に対象者に対し口頭と文書にて十分説明し、臨床研究に参加することについて、本人の自由意志による同意であることを確認し、同意書に本人の署名・捺印を得る。説明をした担当医師は説明書の所定の欄に署名・捺印し、同意取得年月日を症例記録用紙に記載し、その書類の原本を保管する。さらにその書類を複写し、対象者に手渡す。

(4) 実施期間及び目標症例数

本研究の実施期間は厚生労働省の了解を得られてからすべての患者の臨床研究が終了するまで約2年間を予定し、さらに約1年間の経過観察期間を設ける。本治療法の臨床研究は5症例を予定する。

(5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法

① 対照群の設定方法

本学における historical control を用いる。

② 遺伝子導入方法

本臨床研究では pDRSV-IFN β 包埋リポソーム製剤 IAB-1 の凍結乾燥製剤を用いる。皮膚、皮下、リンパ節の転移巣内とその周囲に注射針を刺入し、リン酸緩衝液 1ml 中に 30 μ g DNA を含有する同製剤を注入する。1 転移巣への 1 回当たりの注入 DNA 量は直径 1cm 程度までのものには 10 μ g、直径 2cm 程度までのものには 30 μ g とする。注入は週 3 回、合計 6 回を予定する。第 1 例目では 1 回投与量を 30 μ gDNA までとして安全性を確認する。転移巣が多発している場合には、第 2 例目以降は dose escalation し、2 個以上の転移巣にそれぞれ 30 μ gDNA 量までの同製剤を注入する。ただし、1 回当たりの DNA 注入総量は 150 μ g までとする。各症例について投与終了から 4 週後に安全性と有効性を評価する。その結果、安全性が確認され、かつ注入転移巣の一つ以上で PR (有効) 以上の反応が認められ、病理組織学的にも抗腫瘍効果が確認され、かつ患者が追加治療を希望した場合は、上述と同様の遺伝子治療をさらに 2 コース追加できるものとする。

③ 臨床検査項目及び観察項目

1) 臨床症状を十分に観察する。

2) 肉眼的に計測可能な皮膚、皮下、リンパ節病変については原則として週 3 回、計測用ノギスを用いて腫瘍径を計測する。画像診断が必要な病変は適時に超音波、CT あ

るいはMRIなどにて腫瘍径を計測する。

3) 必要があれば病巣の細胞診あるいは摘出を行い、顕微鏡的および電顕的観察を施行し、腫瘍細胞の変性やアポトーシス、炎症反応などについて解析する。また、ヒトβ型インターフェロン遺伝子の発現（蛋白量、mRNA）の有無とその程度についても検討する。

4) 入院中は週1～3回、尿および末梢血を採取し、各種血液・生化学検査を施行する。悪性黒色腫の血中腫瘍マーカーである5-S-cysteinyldopa値も経時的に測定する。

5) 免疫学的検討事項

免疫学的検討項目を以下に示す。

(1) 摘出組織

- ・ HE、免疫染色（CD3, 4, 8, macrophage, NK, apoptosis）
- ・ 遺伝子発現（RT-PCR, in situ hybridization: IFN-β, TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6）
- ・ HSP(heat shock protein)

(2) 血液

- ・ PCR (plasmid DNA), RT-PCR
- ・ CD4/8
- ・ 抗プラスミド抗体
- ・ ELISA（サイトカインアッセイ：IFN-β, TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6）

(3) 尿

- ・ PCR (plasmid DNA)
- ・ 細胞診

この中でも特に、①ヒトβ型インターフェロン遺伝子の腫瘍内での発現の有無、②ヒトβ型インターフェロン遺伝子の導入により腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されているか否か、③腫瘍局所へNK細胞や細胞障害性Tリンパ球が誘導されるか否か、を検討する。検体は適宜に4℃、-30℃、-80℃、-130℃の冷蔵庫あるいは冷凍庫、超低温槽に保存する。解析は信州大学医学部皮膚科、名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療支援研究室、熊本大学医学部皮膚科ならびに慶應大学先端医科学研究所細胞情報伝達部門（河上裕教授）にて実施する。なお、遺伝子解析については別に説明書、承諾書を用いてインフォームドコンセントを取り、各施設の関係委員会の承認をえた上で施行するものとする。

治療および観察項目のスケジュール表を次に示す。

表1 プロトコール（案）

日程	手技	検査
投与前1週以内	事前の評価	腫瘍径の測定、血液・尿検査
第1週 (月) (火) (水)	第1回目リボソーム製剤の投与	腫瘍径の測定、血液・尿検査、安全性
	第2回目リボソーム製剤の投与	腫瘍径の測定、血液・尿検査、安全性

	(木)		
	(金)	第3回目リポソーム製剤の投与	腫瘍径の測定、血液・尿検査、安全性
	(土)		
	(日)		
第2週	(月)	第4回目リポソーム製剤の投与	腫瘍径の測定、血液・尿検査、安全性
	(火)		
	(水)	第5回目リポソーム製剤の投与	腫瘍径の測定、血液・尿検査、安全性
	(木)		
	(金)	第6回目リポソーム製剤の投与	腫瘍径の測定、血液・尿検査、安全性
	(土)		
	(日)		
第3週	(月)		腫瘍径の測定、血液・尿検査、安全性
	(火)		
	(水)		腫瘍径の測定
	(木)		
	(金)		腫瘍径の測定
	(土)		
	(日)		
第4~7週	(月)		腫瘍径の測定、血液・尿検査、安全性
	(火)		
	(水)		腫瘍径の測定
	(木)		
	(金)		腫瘍径の測定
	(土)		
	(日)		

④予想される合併症と副作用並びにその対処方法

悪性黒色腫は血管に富み腫瘍内穿刺に際し出血を来すことがあるので、止血処置などにて適切に対処する。発熱、感染、肝機能障害などが起こった場合にはそれぞれの症状に対してインドメサシン坐薬、抗生物質、肝庇護剤などを投与することで対応する。

⑤遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準

有効性は治療終了から4週後の時点で局注腫瘍の縮小率、非局注病巣の変化などの所見によって判定する。また、その後も原則として4週毎に有効性と安全性の評価を少なくとも1年間は継続する。

本臨床研究は第I/II相試験として実施し、エンドポイントを以下のように定める。

(1)安全性の評価と実行計画

理学的所見、血液、尿の検査所見、免疫学的検査、遺伝子発現などの検索により行う。とくに血液、尿検査は週3回定期的に施行し、異常値が出現したら慎重に評価し、とくにgrade 4の有害反応がみられたら、直ちに治療を中止し、適切な処置を施す。安全性の評価は治療終了4週以降も7週まで毎週、定期的を実施し、さらにその後も原則と

して4週毎に評価する。

(2)治療効果の評価

1) primary endpoint

本剤を局注した病巣の大きさの変化に基づき、縮小率にて判定する（病巣別効果）。また、非局注病巣の大きさの変化についても評価し、個別別評価を行う。評価基準には、日本皮膚悪性腫瘍学会の規定する「皮膚悪性腫瘍における固形がん薬物療法効果判定基準（改訂版）」（資料1）を用い、著効、有効、不変、進行に区分する。可能であれば評価可能病変を治療終了後に生検して組織学的に検索する。

2) second endpoint

- a) 遺伝子治療製剤が最初に投与された日からの生存期間
- b) performance status（資料1）の変化

(3)有害反応の判定

毒性の種類、程度、出現時期、持続期間などにつき、日本癌治療学会薬物有害反応判定基準（資料2）に基づいて判定、記載する。

(4)中止判定基準

- 1. 重篤な副作用とは以下に示すような生命に直接危機を及ぼす可能性のあるものと定義し、これが発生し、かつ今後治療の継続が困難と判断された場合、中止する。

- 1) 外科的治療が必要とされる出血
- 2) アナフィラキシーショック
- 3) その他、重篤な臓器障害

なお副作用が発生した場合、臨床研究担当者はそれを詳細にカルテに記載すると同時に本院に設置されている遺伝子治療臨床研究審査委員会に報告し、その重篤さの程度を検討してもらい、中止すべきか否かの審査を依頼する。

- 2. 患者が拒否した場合、または主治医が無効例と認めた場合には本臨床研究を中止する。

⑥症例記録に関する記録用紙（追加資料）

⑦記録の保存及び成績の公表

審査委員長に報告し、審査委員会にて研究成果について総合的に審議する。その後、病院長より、文部科学省及び厚生労働省に報告する。なお、その間の患者やその家族のプライバシーに関してはこれを厳守する。

(6) インフォームド・コンセントと患者及びその家族からの同意

遺伝子治療臨床研究のための説明と同意書

（資料1、2の後に示す。）

(7) 本遺伝子治療臨床研究の責任の所在

本研究に関連して万一、何らかの事故が発生した場合には、その責任は総括責任者が負うものとする。