

時間作用させ (MOI 5、10、25、50、100)、その後 PBS を 72 時間作用させた場合の生細胞数をカウントした。コントロール群とした $\beta$ -gal 遺伝子発現アデノウイルスベクター感染群にも PBS を作用させた。その結果、生細胞数はコントロール群と有意な差を認めなかった。しかし PBS のかわりにガンシクロビルを作用させた場合は、コントロールに比し生細胞数は有意に減少し、殺細胞効果が発揮されることが確認された (参考文献 6 Fig. 3 参照)。

また、マウス同所移植モデルを用いた実験において、RM-1 細胞 (マウス前立腺癌細胞) を前立腺に移植し、移植 7 日目に再開腹し前立腺の腫瘍に対して HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター、またはコントロールベクターを注入した。翌日より 6 日間ガンシクロビルを腹腔内投与し、腫瘍移植後 14 日に屠殺して、その腫瘍増殖抑制効果を確認した。その結果、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを投与した群において、コントロール群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を確認した (参考文献 7 Fig. 3 参照)。

## ⑥体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

### A. 動物実験の結果

HSV-tk 遺伝子発現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およ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、ヒトの最高用量の 100 倍に相当する高用量を用いて動物実験が実施された。その結果、体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性は低いことが確認された。マウス前立腺にアデノウイルスベクターを注入し 1 週間後に PCR 法によるベクターシーケンスの発生数を解析した結果を以下に示す (参考文献 9)。

	$2.5 \times 10^6$ PFU	$2.5 \times 10^7$ PFU	$2.5 \times 10^8$ PFU
前立腺 (注入側)	9/10	8/10	8/8
前立腺 (反対側)	3/10	1/10	5/8
精囊	3/10	0/10	5/8

精囊液	0/6	0/7	0/4
膀胱	0/10	0/9	0/8
尿	0/5	0/6	0/5
精巣	0/10	0/10	1/8
精巣上体	0/10	0/10	0/8
精子	0/3	0/3	0/3
血液	1/9	0/9	0/8
リンパ節	8/10	7/10	5/8
肝臓	2/8	1/7	7/8
腸管	2/7	1/7	3/5
肺	0/10	0/10	0/10

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、腸管への広がり認められた。尿、精囊液、精子、肺への広がりはいずれも認められなかった。精巣においては高濃度注入群の1匹に認められた。血液においては低濃度群の1匹に認められた。参考文献9の結論として、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解剖学的に隣接する臓器にのみ主に認められたが、全身的な広がりを示唆する所見はなかった。

#### B. 当該ベクターを用いた臨床研究に基づく安全性の検討結果

実際に米国ベイラー医科大学における放射線治療後の局所再燃前立腺癌患者を対象とした第I相遺伝子治療臨床研究では、米国食品医薬品局（FDA）の了承のもと、本臨床研究で用いるものと同じベクターについて、 $10^8$ から $10^{11}$  PFU レベルまでの投与が行われている。

さらに、米国ベイラー医科大学での同第I相臨床研究患者に対する同アデノウイルスベクター

一の追加投与検討（2回目：9名、3回目：2名）、および複数箇所注入の検討においても（計52名、のべ76回の遺伝子治療を実施）、重篤な副作用は認められず、その安全性が確認されている。

また、米国ベイラー医科大学にて現在継続中である同遺伝子治療と放射線治療、内分泌療法との併用治療（注記1）についても、その安全性が報告され、計30名中、それぞれ1名の患者にRTOG（Radiation Therapy Oncology Group）スコアでGrade 3にあたるALTの上昇と頻尿の症状を認めたものの、薬物療法にて改善し、他の症例においてはGrade 3以上の重篤な副作用を認めなかった。

また本邦においても、内分泌療法再燃を呈した前立腺癌患者に対する同一ベクターの投与が、岡山大学において2001年3月より施行され、これまでの使用実績（ $1 \times 10^9$  PFUの投与3例、および $1 \times 10^{10}$  PFUの投与6例）で重篤な副作用の出現を認めていない。

\*注記1：次の3種の治療群にて施行中である。Arm A：HSV-tk 遺伝子治療（2回：Day 0, Day 14）とIMRT（強度変調放射線治療 76 Gy）の同時施行。Arm B：HSV-tk 遺伝子治療（1回：Day 0）と内分泌療法の同時施行、その後、遺伝子治療後（2回：Day 56, Day 70）とIMRT（強度変調放射線治療 76 Gy）の同時施行。Arm C：Arm Bに45 Gyの骨盤照射の併用。

#### C. 米国における死亡例（アデノウイルスベクター肝動注）と当該遺伝子導入法との関連性

1999年9月に米国ペンシルバニア大学における非増殖性遺伝子組換え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、死亡例は肝動脈からベクターを $3 \times 10^{13}$  viral particleを接種された患者であったが、 $3 \times 10^{12}$  viral particleの接種を受けた患者にも強いadverse eventが認められた。

北里大学病院で今回計画している当該研究に用いられるベクターのPFU/ウイルス粒子数の比は1：10から1：20であるので、この値を用いて換算すると、ペンシルバニア大学での上記

死亡例における投与量を PFU に換算すると  $3 \times 10^{12}$  から  $1.5 \times 10^{12}$  PFU に相当する。また、もう 1 例の強い adverse event が生じた症例での投与量は、 $3 \times 10^{11}$  から  $1.5 \times 10^{11}$  PFU に相当すると考えられる。

今回計画している当該研究における投与量は  $1 \times 10^{10}$  PFU であり、米国での死亡例における投与量の 150~300 分の 1 であり、また、誤って直接血管内に全量を投与すると副作用が発生する可能性は否定できないものの、投与経路の相違も考慮にいれると安全性は確保されていると推察される。一方、米国ベイラー医科大学で行われた試験においては  $1 \times 10^{11}$  PFU の投与量において 1 例ではあるが、肝機能障害を生じている。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。ベクター投与に際して注射針の先端が確実に前立腺組織内に有る場合においては、このような副作用の生じる可能性は極めて低いと推測される。

#### ⑦患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

HSV-tk 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、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。また、ベクター拡散の可能性を最小限にするために、本研究の対象患者はベクター投与後一定の方法で隔離する。また患者の血液および尿検体は、PCR 法でベクター DNA が陰性になるまで検査する。

#### ⑧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、HSV-tk によるたん白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。

## ⑨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。または、ヒトにおいてもアデノウイルス5型の感染による悪性腫瘍発生の報告はない。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かつげっ歯類における癌化に関与しているとされる E1 領域は、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターでは欠損させてあり、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターにおいて癌原性はないと考えられる。

## (2) 遺伝子産物の安全性

HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターによる HSV-tk たん白質の発現は一過性である上に、たん白質そのものの細胞毒性は認められておらず、安全性の点からも問題はないと思われる。

## 8. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由

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、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターとガンシクロビル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、臨床研究プロトコールは、1996年1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、1996年8月より米国ペイラー医科大学にて放射線治療後の局所再発前立腺癌患者を対象とした第 I 相臨床研究が実施された (試験 1)。その後、同第 I 相臨床研究患者に対する同アデノウイルスベクターの追加投与 (試験 2)、および前立腺全摘出症例に対する術前遺伝子治療との組み合わせの第 II 相臨床研究 (試験 3) がそれぞれ終了し、1999年7月からは同遺伝子治療と放射線治療、内分泌療法との併用治療が第 II 相臨床研究として現在継続中である (試験 4)。

同医科大学における、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターとガンシクロビル (またはパラシクロビル) を用いた遺伝子治療は、2002年10月の時点で計 124 名の前立腺癌患者が治療終了、継続中であり、アデノウイルスベクター投与による有害事象および、その第 I 相臨床研究効果の評

価については詳細な解析が行われ、安全性が確認されるとともに有効性が確認されたことが論文として公表された（1999年5月）。また第II相臨床研究の結果として、血清PSAの低下のみならず、細胞障害性Tリンパ球の活性化や、同Tリンパ球の腫瘍内浸潤度と腫瘍組織におけるアポトーシスの頻度とに優位な相関関係が認められたことも報告されている（2001年11月）。その後の同アデノウイルスベクターの反復追加投与に放射線治療を組み合わせた検討においては、2回目のベクター反復投与によりさらにそのCD8 Tリンパ球の活性化が増加することも認められている（2004年9月）。これらの結果より、当該遺伝子治療による殺細胞効果のみならず、抗腫瘍免疫の誘導・活性化の可能性も示唆されている。しかしながら米国ベイラー医科大学においても、術前補助療法として同アデノウイルスベクターを反復投与する検討は施行されておらず、ベイラー医科大学で対象とされていた、より大きな腫瘍体積を有するハイリスク群に対して、より効果的であると予測され、当該研究は現時点の見地より、術前補助療法としての遺伝子治療を確立する上で考える安全かつ先進的なプロトコールと思われる。また岡山大学における検討においても、術前補助療法としての検討は行われていない。

今回用いる予定であるHSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターは、米国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。本ベクターは米国ベイラー医科大学での遺伝子治療、および本邦での岡山大学の臨床研究で用いられているものと同一である。

北里大学泌尿器科学教室では、従来より、国内および海外の研究施設で、前立腺癌をはじめとする尿路性器悪性腫瘍の治療に関する基礎的・臨床的研究を積極的に行っている。

研究総括責任者である馬場志郎は、西ドイツ・マインツ大学において前立腺癌患者におけるテストステロン代謝の基礎研究や、米国ミネソタ大学において腎細胞癌の免疫学的活性に関する基礎研究を行ってきた。また佐藤威文は、米国ベイラー医科大学泌尿器科にてHSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた基礎研究とともに臨床研究に直接関与している。岩村正嗣は米国ロチェスター大学で同じく前立腺癌の基礎研究を、宋成浩は同じく米国ベイラー医科大学で前立腺癌の病理学的研究に従事した経験を有している。現在も北里大学よりベイラー医科大学に山下英之研究員、

田畑健一研究員を派遣している。一方、共同研究者が所属している岡山大学ではすでに 2001 年 3 月から前立腺癌に対する HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの臨床研究をすでに始めており、今回申請する臨床研究は、同一ベクターを用いた、ペイラー医科大学と北里大学、岡山大学との共同研究として実施するものである。

以上の背景より、今回申請する遺伝子治療臨床研究を北里大学で実施することは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

### (1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

HSV-tk 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および根治的前立腺摘除術との併用効果を確認、検証するものである。その患者選択基準、除外基準ならびに治療スケジュールを後述する。また原則として、本プロトコール以外の治療の併用は行わないとするが、経過中に前立腺癌の進行、または被験者からの申し出、希望があった場合においては、他の治療を開始、併用するものとする。

### (2) 被験者の選択基準及び除外基準

#### ① 選択基準

- 1) 被験者は 35 歳以上から 75 歳以下の成人男性を原則とし、医学的に本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。
- 2) 前立腺生検にて組織学的に前立腺癌と診断され、かつ臨床的に前立腺に局在すると判断された者。
- 3) ノモグラムにおいて、手術後再発する可能性が高いと判断されるハイリスク症例であること（注記 1）。
- 4) 画像診断上明らかな転移病巣を認めないこと（注記 2）。
- 5) 被験者は以下の骨髄機能、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 $>2,000 /\text{mm}^3$ 、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 $<1.5 \text{ mg/dl}$ 。

- 6) 出血傾向を認めない (PT・PTT の著明延長を認めない)。

注記1：手術前の血清前立腺特異抗原値 (PSA)、臨床病期、および前立腺生検での病理学的評価 (Gleason Sum) を加味したノモグラムにおいて (Kattan MW, et al. J Natl Cancer Inst 90: 766-71, 1998)、総得点 115 点以上を占めるもの。すなわち手術後 5 年以内に 35% 以上の症例が、再発すると考えられる予後不良症例を示す (参考文献 10 Figure 2 参照)。

注記2：骨シンチグラフィーにて骨転移の有無、CTにて腹部並びに骨盤部における転移の有無を検索し、骨シンチグラフィーにて疑わしい病変を認めた場合は磁気共鳴装置 (MRI) にて確認する。

## 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研究の対象としない。

- 1) ガンシクロビル、又は類似化合物 (アシクロビル等) に対する過敏症の既往歴を有する場合。
- 2) 本研究参加以前に放射線治療や内分泌療法を受けた治療歴を有する場合。
- 3) 前立腺に対し、経尿道的前立腺切除術や温熱療法等の外科的治療歴を有する場合。
- 4) 副腎皮質ホルモン製剤による加療を行っている場合。
- 5) 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。
- 6) 本研究参加前 6 ヶ月以内に未承認薬の治験/臨床研究に参加している場合。
- 7) 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。
- 8) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入療法歴がある場合。
- 9) その他、担当医が不相当と認める場合。

設定の根拠

- 1)、5)、7)は安全性配慮のため設定した。



2)、3)、4)、6) 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。

9) は一般的な除外基準。

### (3) 被験者の同意の取得方法

- 1) 被験者は、本研究について文書により説明を受け、その内容と期待される治療効果及び危険性を理解した上で、同意書に署名した者とする（資料 10「前立腺がん遺伝子治療臨床研究の説明書」参照）。
- 2) 説明と同意書は、本計画書に資料 10 として含まれている書式である。

### (4) 実施期間および目標症例数

本研究の研究実施期間は厚生労働省の承認が得られた時点から 5 年間とする。また遺伝子治療実施後の必須観察期間については、プライマリーエンドポイントである安全性の検討の目的から 2 年とする。それ以後の観察期間については、通常の術後症例と同じく可能な限り観察するものとし、その期間を問わない。

目標症例数はその安全性の検討として、当初対象症例数を 5 例ごとにその安全性を確認し、最大で 25 例までとする。

### (5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法

#### ① 対照群の設定および治療スケジュール

前述の選択基準 (9 (2) ①) を満たす局存性進行前立腺癌患者を対象とし、以下にアデノウイルスベクターの投与量設定の具体的な科学根拠を述べる。

当初米国において、FDA は  $10^8$  PFU を初回投与として推奨し、それに基づきベイラー医科大学では  $10^8$  PFU から  $10^9$  PFU、 $10^{10}$  PFU、 $10^{11}$  PFU までの 4 段階のベクター投与量の安全性を検討する臨床第 I 相研究を実施した。その結果、安全性について  $10^{11}$  PFU の 1 例を除いて問題とな

る副作用を認めず、その臨床効果よりすでに 100 例以上の症例が  $10^{10}$  PFU のベクター投与量を用いている。また同様のベクターを用いた岡山大学の臨床研究においても、 $10^9$  PFU および  $10^{10}$  PFU の安全性が確認されている。以上より、本研究に用いる HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの投与量設定を  $10^{10}$  PFU とした。

また治療スケジュールを以下に記載する。

経直腸的超音波を用いて、前立腺内にベクターを注入した日を治療開始日 (Day 0) とする。治療開始翌日 (Day 1: 遺伝子導入より 24 時間後) よりガンシクロビルの投与を開始し、計 14 日間の連日投与をする。初回ベクター投与より 2 週間後 (Day 14) に、2 回目となるベクターを前立腺内に注入し、この 2 回目ベクター投与の翌日 (Day 15: 2 回目遺伝子導入より 24 時間後) よりガンシクロビルの投与を同様に計 14 日間の連日投与をする。この最終ベクター投与日 (Day 14) を起算として、6 週間後 (Day 56) に根治的前立腺癌全摘除術を施行する。同術後加療スケジュールは、根治的前立腺癌全摘除術のクリティカルパスに準ずる。

## ②遺伝子導入方法 (安全性および有効性に関する事項を除く)

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 HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を 4 ヶ所に注入する。注入後、針を抜去する。注入する HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター液の総量は 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。

## ③ガンシクロビル (GCV) の投与

ガンシクロビルの投与は遺伝子導入 24 時間後から開始する。腎機能正常例での 1 回投与量は体重 1 kg あたり 5 mg とし、1 日 2 回 14 日間 (計 28 回) とする。薬剤は 500 mg が 1 バイアルに包装されており 10 ml の生理食塩水で溶解し 50 mg/ml に調整する。体重あたりの投与量より換算された量の溶解液を 100 ml の点滴用生理食塩水に注入し 1 時間かけて静脈内投与する。腎機能障害

例ではその障害の程度に応じて以下の表に示すごとくに減量もしくは投与間隔を変更する。

クレアチンクリアランス値 (ml/min)	用量 (mg/kg)	投与間隔 (時間)
≥ 70	5.0	12
50~69	2.5	12
25~49*	2.5	24

\* 血清クレアチニン値は 1.5mg/dl であること。

(資料 4 : 薬剤添付文書より抜粋)

#### <ガンシクロビルの体内分布について>

薬剤開発時点における薬剤の体内分布（マウスへの静脈内投与）の検討においては、前立腺への移行は検討されていない（ガンシクロビル販売元：田辺製薬 社内資料、製造元：米国ロッシュ社にて行われた体内分布の結果を訳したもの）。しかし薬剤は検討された臓器（肝臓、腎臓、肺、心臓、脳、脾臓、腸、胃、骨格筋、脂肪組織、眼球、精巣）に分布しており、24 時間以内に 79~93%が尿中に回収されていた。このことよりガンシクロビルの静脈内投与により、薬剤は血流により前立腺を含む全身臓器に分布し、腎より排泄されることが推察される。ベイラー医科大学における遺伝子治療臨床研究において、サイトメガロウイルス感染症における投与量と同一量のガンシクロビルが投与され臨床的有効症例が確認されたことから、ガンシクロビルの前立腺移行が推定される。

#### <ガンシクロビル投与量設定の具体的な科学的根拠>

当初行われた米国ベイラー医科大学の遺伝子治療臨床研究におけるガンシクロビルの投与量は、サイトメガロウイルス感染症治療での用法・用量に準じて設定された経緯がある。動物実

験においては、遺伝子の発現期間等により 6~7 日間の投与期間が設定された。ヒトにおいて 14 日間投与が他の投与期間と比較して妥当か否かは検討されていない。

最終的な投与期間は今後の臨床試験において明らかにされていくものと考えられるが、当面はサイトメガロウイルス感染症の治療において設定されている用法・用量に従うことに大きな問題は無いものと考えている。

#### ④臨床検査項目および観察項目

##### A. 治療開始前評価

- 1) 初回の治療を開始する前に、被験者の病歴及び現症について記録する。この記録には PS (performance status)、体重、最近の体重減少、他の悪性あるいは良性疾患の有無およびその治療状況などについても記録する。
- 2) 臨床検査データとしては、定量的免疫グロブリン、白血球分画、血小板数を含む CBC、電解質、ビリルビン、クレアチニン、クレアチニンクリアランス、トランスアミナーゼなどを含む生化学検査一般、および尿検査、胸部 X 線写真、腫瘍マーカーなどを記録する。
- 3) 治療開始前の臨床病期を画像診断および触診所見により評価する。臨床病期は前立腺癌取扱規約に基づいて決定する。
- 4) 治療前に血液サンプルを採取する。白血球と血清を分離し、血清を用いてアデノウイルスに対する抗体価 (ELISA 法にて確認) を測定する。また、アデノウイルス 5 型に対し感受性の高い培養細胞を用いて感染効率に対する阻害作用を確認し、アデノウイルス中和抗体価を測定する。
- 5) フローサイトメトリー法にて CD45/CD14、CD3/CD19、CD3/CD8、CD3/CD4、CD8/HLA-DR、CD4/HLA-DR、CD3/HLA-DR、CD3/CD56+CD16 を検討すると共に血液中の IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12 を ELISA 法にて検査する。また CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> を指標とした血液中の調節性 T 細胞の変化についてもフローサイトメトリー法にて検討する。

B. 治療中評価（資料 5：「評価項目およびスケジュール」参照）

以下の検査をガンシクロビル投与中の期間において実施する。

- 1) 理学所見：一般的な理学所見をチェックする。すなわち被験者の病状および PS (performance status) や体重を含む現症を記録する。
- 2) 排尿試験：アデノウイルスベクター注入直後に留置した尿道カテーテルを 24 時間後に抜去した際、その後の自然排尿の有無を確認する。自然排尿が不可能な場合は再度留置する。
- 3) 被験者の CBC、血小板数、出血・凝固時間、PT、PTT、電解質、生化学検査一般などの検査は、治療中定期的に行い記録する。特に、CBC はガンシクロビルの用法・用量に関する使用上の注意に沿って、2 日毎に測定する（資料 4：薬剤添付文書）。
- 4) 血清中、尿中、鼻腔粘膜中におけるアデノウイルスの有無の検索。
- 5) 初回アデノウイルスベクター注入後 2 週間目、および 4 週間目に血清を採取し、アデノウイルスに対する抗体およびアデノウイルス中和抗体の評価。
- 6) 末梢血における各リンパ球の解析（フローサイトメトリー解析）  
CD45/CD14、CD3/CD19、CD3/CD8、CD3/CD4、CD8/HLA-DR、CD4/HLA-DR、CD3/HLA-DR、  
CD3/CD56+CD16、CD4/CD25。
- 7) 血清中における IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12 の測定（ELISA 法）。
- 8) 細胞障害性試験による NK 細胞の機能解析、およびリンパ節由来リンパ球の機能解析（ELISPOT アッセイ）。
- 9) HSV-tk 発現アデノウイルスベクターからの HSV-tk 遺伝子の発現の程度に関する評価（RT-PCR）も含めた分子生物学的検討として、ベクター注入後、発熱など早期の副作用が認められず、患者本人の同意が得られ、かつ早期の再生検が治療の安全性を損なわないと担当医が判断した症例に対して、2 回目のベクター注入後 48 ないし 72 時間以内にベクター注入部の生検を施行して検査材料とする。

C. 治療後評価（資料 5「評価項目および評価スケジュール」参照）

- 1) 被験者の病状およびPS や体重を含む現症。
- 2) 尿沈渣および尿細菌培養ならびに感受性試験。
- 3) 血清中、尿中、鼻腔粘膜中におけるアデノウイルスの有無の検索ならびに血清中のアデノウイルス抗体価。
- 4) 血清 PSA の測定。
- 5) 末梢血における各リンパ球の解析（フローサイトメトリー解析）  
CD45/CD14、CD3/CD19、CD3/CD8、CD3/CD4、CD8/HLA-DR、CD4/HLA-DR、CD3/HLA-DR、  
CD3/CD56+CD16、CD4/CD25。
- 6) 手術摘出検体における病理学的評価（摘出リンパ節検体を含む）  
全前立腺体積、全腫瘍体積、殺細胞効果の範囲（affected tumor volumes）、免疫染色項目（CD20、CD8、CD68、CD3、CD4）、アポトーシス（TUNEL 染色）、CAR 発現（Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Expression）、Microvessel Density。  
上記について、コンピューターイメージ解析（Optimas 6.1）を用いて定量的評価。
- 7) 血清中における IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12 の測定（ELISA 法）。
- 8) 細胞障害性試験による NK 細胞の機能解析、およびリンパ節由来リンパ球の機能解析（ELISPOT アッセイ）。

上記検査の実施時期に関して、別紙添付書類（添付書類 5「評価項目スケジュール」）に記載する。また当該臨床研究に関する免疫学的、組織学的解析方法については、別紙添付資料（資料 13）に記載する。

なお、被験者が死亡した場合は剖検を依頼し、癌組織及び正常組織を採取し、生検時と同様の組織学的・分子生物学的検討を行う。

#### D. 臨床研究実施中の患者の管理

全ての被験者は個室管理とする。ベクター投与後の被験者は、尿中へのベクター排出の可能性があるため、排尿は専用の便器を使用する。被験者に接するすべての医療従事者は、被験者

の血中および尿中からのベクター排出の消失が確認されるまでは予防衣を着用する。また退院時には、必ず血中および尿中ベクター排出の消失が確認されているものとする。

#### ⑤副作用の判定基準

- 1) 本 HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた米国ベイラー医科大学にて行われた臨床研究では、放射線治療後の局所再燃前立腺癌 18 例に対して、 $10^8$  から  $10^{11}$  PFU レベルまでの投与による治療が施行された(参考文献 10)。17 例目までの症例においては発熱 3 例、肝機能異常 3 例、静脈注射部位の蜂窩織炎 1 例が認められた。いずれも grade 2 以下の軽度のものであり、経過観察を含めた保存的治療にて軽快した。しかし 18 例目の患者において  $10^{11}$  PFU のウイルスベクター投与後に grade 2 の発熱、grade 4 の血小板減少と grade 3 の肝機能障害が出現したためその時点で試験は中止され、血小板減少に対して 5 単位の血小板輸血が施行された。なお、本患者の血小板減少、肝機能障害については、遺伝子治療開始 16 日目に臨床検査値が正常値に回復した(参考文献 10 表 2)。また、現在継続中である同遺伝子治療と放射線治療、内分泌療法との併用治療(23 ページ注記 1)についても、その安全性が報告され、計 30 名中、RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) スコアで Grade 3 にあたる ALT の上昇と頻尿の症状をそれぞれ 1 名に認めたものの、薬物療法にて改善し、他の症例においては Grade 3 以上の重篤な副作用を認めなかった(参考文献 14)。

その他考えられる有害事象としては、ウイルスベクターによる感染・炎症、局所投与に伴う尿閉、出血(直腸出血、血尿)、ガンシクロビル投与に関連した副作用(資料 4: 薬剤添付文書)などがあるので、治療期間中は嚴重な症状観察を行い対処する。

- 2) 治療中及び治療後に見られるすべての有害事象のうち、治療に関する毒性・副作用は、資料 7「副作用の評価指標」に基づいて grade 0~4 で評価する(Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 日本語版)。副作用の認められた期間およびそれに対する治療についても記録する。重篤な副作用が生じた場合は、実施施設の長である北里大学病院長を通じて厚生労働大臣(および文部科学大臣)に報告する。