

される。

② マウス移植腎細胞癌での検討

SCID マウス 皮下移植 NC65 腫瘍に対し IAB-1(pSV2IFN β)によるヒト β 型インターフェロン遺伝子導入を試みたところ、治療開始後 30 日目で有意な増殖抑制効果を認めた。ヒト β 型インターフェロン蛋白投与では一時的に増殖は抑制されるものの、治療終了後比較的早期から再増殖を開始し、治療開始後 30 日の時点では empty liposome 投与と同様に、有意な増殖抑制効果は認められなかった¹⁹⁾。

8. 安全性についての評価

(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(資料 1)。動物に投与した際の生体内分布とその時間的推移については、IAB-1(pDRSV-IFN β)をマウスの脳内に投与した後に、各臓器への移行について検討を行っている(資料 2)。本臨床研究で腫瘍内に投与する約 1-10 倍のプラスミドが投与されているが、1週間後には、脳以外の臓器では、脾臓、血液、肝臓、精巣、肺の順にプラスミドが検出されており、1ヶ月後の結果からは、通常の臨床用量の投与であれば脳以外の臓器では検出感度以下と考えられる。精巣においても、1ヶ月以降では、プラスミドは検出されておらず、長期間の残存の可能性はないと推測される。さらに、上記の 50 倍の IAB-1(pDRSV-IFN β)をマウスに静脈投与した際の体内分布について検討を行っている(資料 2-2)。 $6\mu\text{g}$ (約 3×10^{10} 個プラスミド/ μl)の pDRSV-IFN β を $50\mu\text{l}$ の pDRSV-IFN β をマウスに静脈内投与した 1週間後には、脾臓、精巣、肺、心臓、肝臓、腎臓、血液の順にプラスミド DNA 各組織内に検出されているが、その組織内濃度は、約 6×10^2 - 9×10^4 個プラスミド/mg(組織)となっていた。体重あたりの投与量で比較すると、マウスに静脈内投与したプラスミドは本臨床研究で腫瘍内に投与するプラスミドの約 50-400 倍であることより、本臨床研究の使用量に相当するプラスミドをマウスに静脈内投与すれば、1週間後の各組織内のプラスミド濃度は約 1.2×10 - 1.8×10^3 個プラスミド/mg(組織)もしくはそれ以下と推測されるが、これは上述のマウス脳内投与の場合の 1週間後の脳以外の組織内のプラスミド濃度と同等もしくはより少ないことになる。さらに、1ヶ月以降では、脳内投与の場合と同様にさらに減少することが推測される。以上より、万が一、腫瘍内に局所注入した IAB-1 の一部が、血管内に入ったとしても、各臓器にプラスミドが持続的に残存する可能性は低いと考えられる。また、本臨床研究で用いる IAB-1(pDRSV-IFN β)と同じ遺伝子治療製剤を用いた臨床研究が、すでに名古屋大学においてグリオーマに対して、信州大学において悪性黒色腫に対して行なわれ、ともに腫瘍内に局所注入されている。名古屋大学のグリオーマ患者 5 名の血中、尿中には遺伝子製剤投与後にプラスミド DNA を検出しなかった。信州大学の悪性黒色腫患者 5 名の内、1 名

のみで遺伝子製剤投与後 2 日目に一過性にプラスミド DNA が血中で確認されたが、その後速やかに消失している。残りの 4 名では、遺伝子製剤投与後血中にプラスミド DNA を検出しなかった。また、この 5 名の尿中には、遺伝子製剤投与後にプラスミド DNA を検出しなかった。本臨床研究に用いる遺伝子治療製剤 IAB-1(pDRSV-IFN β) は無菌性で、エンドトキシン量は 10EU/mg 以下であることが確認されている。後述のようにラット、カニクイザルでの静脈内投与毒性試験も実施しており、実際の臨床研究において、腎癌病巣内に投与された本製剤が血中に入ったとしても、また、周囲組織へ漏出したとしても、その投与量から考えて、副作用の懸念は低い。また、正常腎上皮細胞に対する *in vitro* 実験¹⁹⁾から考えても、正常細胞にはほとんど影響を及ぼさないとと思われる。さらに、実際の投与においては、転移巣に対し、超音波あるいは CT ガイド下に、腎細胞癌の腫瘍病巣内に IAB-1(pDRSV-IFN β)の局所注入を行うが、その手技は日常診療においてすでに確立されており、厳重な清潔操作で行うので、重篤な合併症や細菌感染の可能性は低いと考えられる。

実際、上記の名古屋大学および信州大学における遺伝子治療製剤 IAB-1 を用いた臨床研究においても、特に問題となる副作用は認められていない。

IAB-1(pDRSV-IFN β)の安全性については、「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ヵ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(pDRSV-IFN β)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 μ g/kg の IAB-1 の投与にて投与翌日にのみ 300 μ g/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 μ g/kg 以上投与の群で白血球増加が、1000 μ g/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 μ g/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 μ g/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 μ g/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 μ g/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つ

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 の無毒性量については、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。なお、ラット静脈内投与試験では、100 μ g/kg 投与群の 6 匹中 1 匹の精巣で軽度の精子形成低下を認めたが、1000 μ g/kg 投与群では、精巣に異常所見を認めず、精巣および卵巣の病理組織学的検査では、両者ともに特記すべき所見を認めなかった。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 250 μ g であり、3 コース施行した場合でも総投与量は 4.5mg 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 14%、女性で 9%以下)、総投与量に関しては問題ないものと考えられる。1 回の投与量上限もラットの実験結果より換算すると 60kg のヒトで 600 μ g となり、本臨床研究の 1 回投与量上限(250 μ g)は、その約 40%に相当することより、無毒性量の算出根拠とした。さらに、本遺伝子治療で規定する最大量(250 μ g/回)を 1 コース(合計 6 回)使用すると計 1.5mg 使用することになるが、これは、上述 2)の IAB-1 のカニクイザルにおける単回静脈内投与毒性試験の結果(IAB-1 の致死量:pDRSV-IFN β 300 μ g/kg 以上)より推測される 60kg のヒトの致死量 18mg の 10%未満にすぎないことより、反復投与のデータではないものの無毒性量の算出の根拠として用いられると推測される。

4) 本臨床研究では腎細胞癌のリンパ節あるいは他臓器転移巣に最大 1 回使用総 DNA 量 250 μ g を上限として、週 1 回、6 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 回投与の絶対安全量とすると、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)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。最近、1 回最大使用量を 1,500 μ g および 4,000 μ g としたプロトコールも実施されたが、重篤な副作用は確認されなかった^{24) 29)}。3)同型の IAB-1 を使用する信州大学での悪性黒色腫に対する遺伝子治療のプロトコールでは、週 3 回、2 週間、計 6 回注入する方法をとっており、名古屋大学でのグリオーマに対する遺伝子治療のプロトコールでは、週 2 回、最大 6 回注入する方法をとっていることなどが挙げられる。一般に腎細胞癌は悪性黒色腫に比し、発育が緩徐な場合がほとんどであり、かつ悪性黒色腫に比し、手技的に IAB-1 の注入が比較的困難な部位が多いと考えられる。また、我々の検討によりヒト腎細胞

癌株に対する *in vivo* 実験で週 3 回 2 週投与と、週 2 回 3 週投与では、治療効果に有意差が認められないことも確認できている²⁵⁾。さらに、最近米国で、類似の方法で腎細胞癌の転移巣に非ウィルスベクターを用いて、インターロイキン 2 遺伝子を導入する臨床研究が実施され、この研究では週 1 回、6 週間、計 6 回注入する方法をとっている。さらに、この方法の効果と安全性は論文として報告されている^{24, 26)}。これらのことから遺伝子治療の実施回数は週 1 回 6 週投与とし、1 コースの治療回数を 6 回とした。本臨床研究では、1 回最大投与量を腫瘍体積と同容積もしくは、最大 1 回使用総 DNA 量 250 μg を上限としたが、これは、信州大学の 1 回あたり最大投与量 150 μg DNA、最大総投与量 2.7 mg DNA および名古屋大学の 1 回あたり最大投与量 30 μg DNA、最大総投与量 180 μg DNA を上回る投与量である。マウス皮下腫瘍モデルを用いて我々が行った実験では、腫瘍(長さ 7mm、幅 5mm[腫瘍体積は約 87.5 μl])内に、30 μg の DNA を注入(0.34 μg DNA/ μl 腫瘍)することにより、腫瘍の増殖の抑制が認められた。本遺伝子治療臨床研究で同様の割合で、IAB-1 を用いると、腫瘍体積の約 2 倍の容積の製剤の投与が必要となるため、投与の上限を物理的に投与可能と思われる腫瘍体積と同容積までとした。また、上述のとおり名古屋大学および信州大学においては、腫瘍の種類は異なるものの本遺伝子治療と同じ製剤を用いて同様に腫瘍内投与を行い安全性が確認されている。この実績にもとづき、本臨床研究ではより多い用量の製剤を用いた安全性と有効性を検討することとした。

今回の臨床研究では、腫瘍結節内へ製剤を局注するため、腫瘍周囲の正常組織が本製剤に曝露される可能性は低く、よって正常細胞において本遺伝子が発現される可能性は極めて低いと考えられる。また、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ことより、腫瘍周囲の正常組織が本製剤に曝露されたとしても、正常細胞に遺伝子発現がみられる可能性は極めて低いと推察される。実際我々は、ヒト腎近位尿細管細胞(RPTEC5899)に対し IAB-1(pSV2IFN β)処理を行い正常細胞に対する影響を検討したが、有意なヒト β 型インターフェロンの分泌は認められなかった¹⁹⁾。以上より、非分裂期の正常細胞に遺伝子導入が起こったとしても、有意な遺伝子発現にまではいたらないものと推察される。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短 24 日間、最長 6 ヶ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、通常の観血的処置の際にとる感染予防を行う限りでは、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ないと考えられる。

(2) 遺伝子産物の安全性

本邦においては、ヒト β 型インターフェロン蛋白は腎細胞癌に対して保険適用がなく、したがって使用実績もほとんどない。しかし、保険適用のある悪性黒色腫の患者に対しては、一日量 300x10⁴IU 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数多く行われてきている。この治療法では有害反応として、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、重篤なものはほとんどないことが明らかにされている。しかも、培養細胞株の実験結果より、本遺伝子治療におけるヒト β 型インターフェロンは腫瘍細胞で発現し、正常細胞ではほとんど発現しないと推定されることから、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した理由

前項で記載したように、遺伝子治療製剤 IAB-1(pDRSV-IFN β)は我々が共同研究者と共に名古屋大学医学部附属病院遺伝子・再生医療センターにおいて作製し、当施設へ運搬し、使用するまで安全に保管、管理する予定であるが、その設備および技術は名古屋大学、京都府立医科大学共に十分備わっている。

京都府立医科大学附属病院は大学等における遺伝子治療臨床研究に関するガイドラインの要項を満たし、京都府立医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会も置かれている。総括責任者の三木および共同研究者(河内、沖原、高羽、三神、中村)は京都府立医科大学附属病院泌尿器科を中心にこれまでに過去 5 年間に限定しても 200 例以上の腎細胞癌の治療に携わってきており、十分な臨床経験を有するとともに、腎細胞癌の新しい治療法の開発研究のための臨床的研究(転移性腎癌に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植、腎細胞癌に対する助手補助下腹腔鏡下根治的腎摘除術など)ならびに基礎的研究(腎細胞癌に対する遺伝子治療・新規免疫療法・分子標的治療などの基礎的検討、腎細胞癌の遺伝子解析やバイオマーカーの検討など)を行い、多方面にわたって成果を挙げている。三木は厚生科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)固形癌に対する同種細胞免疫療法を用いた標準的治療法の確立に関する研究の班員であり、日本泌尿器科学会評議員、日本癌治療学会理事、日本癌学会評議員、日本泌尿器科学会ゲノム委員会委員などを現在務めている。さらに京都府立医科大学泌尿器科学教室には、泌尿器科疾患ゲノム解析研究会、医師主導型の多施設共同臨床研究である難治性精巣腫瘍に対する Irinotecan、Nedaplatin 併用化学療法の事務局が置かれている。このように京都府立医科大学附属病院泌尿器科は日本における泌尿器癌の遺伝子解析、治療の面で中心的施設として高く評価されている。また、共同研究者の吉田、若林、水野は IAB-1 を用いた遺伝子治療につき基礎的研究から臨床研究に到るまで、これまで多くの研究成果を上げ、旧文部省、旧厚生省の認可を受けた上で、2000 年 4 月より名古屋大学医学部附属病院にて本製剤を用いた悪性グリオーマの遺伝子治療臨床研究を開始している。今回の腎細胞癌に対する遺伝子治療に関しては、名古屋大学医学部脳神経外科と京都府立医科大学泌尿器科は 1999 年より共同研究を開始し、*in vitro*、*in vivo* の基礎実験において本遺伝子治療製剤が腎癌細胞にも有効であることを見出している。以上のように、本臨床研究チームは、研究遂行に必要な十分な能力を備えており、万全の体制を整えているといえる。

10. 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

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、共同研究者である名古屋大学医学部附属病院の医師と京都府立医科大学附属病院の医師が、名古屋大学医学部附属病院遺伝子・再生医療センターにて行い、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には京都府立医科大学附属病院へ輸送し、同院の薬剤部の管理のもとに専用の冷蔵庫(4℃)内に保管し、施錠する。薬剤部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、名古屋大学から京都府立医科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)と腎細胞癌細胞株(NC65等)に作用させ、2日後、4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法にて定量する。2日後のヒトグリオーマ細胞株(U251SP)の細胞上清を採取し、上清中に産出されるヒトβ型インターフェロンが150国際単位/ml以上である場合、適合と判断する。このようにして運搬後のIAB-1凍結乾燥製剤が、ヒトβ型インターフェロン産生能を維持していることを検証し、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。上記は、名古屋大学脳神経外科において開発され、悪性グリオーマの遺伝子治療臨床研究に用いられた遺伝子製剤と同等の凍結乾燥製剤を京都府立医科大学へ輸送して本臨床研究に用いるものであり、この輸送および使用方法は既に厚生労働省の認可の上、信州大学において悪性黒色腫に対して実施されたものと同一方式である。

(2) 被験者の選択基準及び除外基準

選択基準

- ① 原発腫瘍病巣を手術で摘除し、病理組織学的に腎細胞癌の診断が確定している転移を有する患者(臨床病期IV期[資料3]もしくは術後に転移を認めた場合)。
- ② 臨床研究への参加について、十分な同意(インフォームド・コンセント)が得られている患者。
- ③ 治療前に肉眼的あるいは胸部X線写真、超音波、CT、MRIなどの画像検査で、腫瘍径などの評価可能な病変を有する患者。
- ④ 転移巣に対して、これまで有効性が確認されているインターフェロン、インターロイキン2を含む免疫療法およびスニチニブ、ソラフェニブなどによる分子標的治療を施行したにもかかわらず、無効であった患者、あるいはこれらの治療の適応がないと判定された患者。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患者。
- ⑤ 生命予後が6ヶ月以上と考えられる患者。
- ⑥ 超音波あるいはCTガイド下にIAB-1の注入が安全に施行可能と判断される患者。
- ⑦ 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

る患者。

白血球数 $>3000/\mu\text{l}$
血小板数 $>100,000/\mu\text{l}$
ヘモグロビン $>8.5\text{ g/dl}$
出血・凝固時間: 正常値範囲内
血清ビリルビン $<2.5\text{ mg/dl}$
sGOT・sGPT $<50\text{ U/l}$
血清クレアチニン $<1.5\text{ mg/dl}$

- ⑧ 40歳以上75歳未満の患者。
- ⑨ ECOG performance status(資料4)がGrade 0または1の患者。
- ⑩ 導入遺伝子の生殖腺への分布の可能性が完全には否定できないことから、最終の遺伝子治療後、最低1年間は確実なバリア型避妊法を行うことができる患者。

除外基準

- ① Sarcomatoid RCC、collecting duct carcinoma
- ② 中枢神経系の転移を有する患者。
- ③ 狭心症、心不全の患者。梗塞後1年以上経過していない心筋梗塞の患者。
- ④ コントロール不可能な糖尿病や高血圧のある患者。
- ⑤ 活動性のウイルス性肝炎のある患者。
- ⑥ HIV抗体が陽性の患者。
- ⑦ 精神病、または精神症状を有しており、臨床研究への参加が困難と判断された患者。
- ⑧ 妊娠中の女性、妊娠の可能性のある女性、授乳中の女性。
- ⑨ 活動性の重複癌を有する患者。
- ⑩ 活動性の感染症を有する患者。
- ⑪ 前処置を含む本臨床研究に用いる薬剤に対して、過敏症の既往を持つ患者。
- ⑫ 本臨床研究参加前4週間以内に他の治験または臨床研究に参加している場合、もしくはその影響が認められると考えられる場合。
- ⑬ その他、担当医の判断で不相当と見なされた患者。

(3) 被験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(自署)又は捺印を得る。なお、この説明には患者親族もしくは理解補助者の同席を必要とし、その署名(自署)又は捺印を得る。ただし、患者親族もしくは理解補助者の同席が得られない場合は、これに準じる立会人の同席をもって替えることとし、その署名(自署)又は捺印を得る。その説明をした担当医師は説明書の所定の欄に署名(自署)又は捺印し、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て、対象者に手渡す。

(4) 遺伝子治療臨床研究審査委員会および安全・効果評価・適応判定部会

当施設において行う遺伝子治療臨床研究について、遺伝子治療臨床研究に関する指針に

基づき審査を行うことを目的として京都府立医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会(以下「審査委員会」という。)(資料 5-1)が設置されている。さらに、被験者の適応性の判断、治療の有効性及び安全性の判定を目的に、審査委員会の下に、遺伝子治療臨床研究ごとに安全・効果評価・適応判定部会(以下「判定部会」という。)(資料 5-2)が設置される。本遺伝子治療臨床研究についても、判定および判断を客観的に行うため、学外より腎細胞癌の専門医 2 名が入る判定部会(資料 5-3)が設置されている。審査委員会の諮問に応じて、判定部会では主に以下の 3 点が検討され、その結果が審査委員会に報告される。

- 1) 登録時および治療追加時の被験者の適格性の判断
 - 2) 治療1コースごとの有効性、安全性の判定と本遺伝子治療追加の可否に関する意見
 - 3) 有害事象と本遺伝子治療の因果関係の判定と本遺伝子治療継続の可否に関する意見
- 審査委員会では、判定部会の判断、判定につき審議し、これらに関する最終決定を行う。この決定に基づき、本遺伝子治療の開始、および治療追加または継続の可否についても最終決定する。これらの決定は委員長の責任のもとに行い、審議結果は病院長へ報告される。

(5) 実施期間及び目標症例数

本研究の実施期間は病院長の了承を得られてからすべての患者の臨床研究に関する登録が終了するまで 2 年間を予定する。前述の選択基準、除外基準に照らした上で適格症例であると判定部会が判定し、審査委員会で評価・承認された後に、文書による同意が得られた時点で本臨床研究に登録されるものとする。本治療法の臨床研究は 5 症例を予定する。さらに個々の症例については、治療開始後、原則 1 年間の経過観察期間を置く。本研究の実施期間は厚生労働省の承認が得られた時点から 3 年間とする。

(6) 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 IAB-1 の凍結乾燥製剤を用いる。肺、肝、リンパ節の転移病巣を主な対象病変とするが、複数回の穿刺が安全にできる部位であれば、深部の病変も治療対象とする。遺伝子治療製剤注入針の穿刺は、1%キシロカイン®による穿刺部の浸潤麻酔を施行した後、超音波あるいは CT ガイド下にて行う。リン酸緩衝液 1ml 中に 30 μ gDNA を含有する製剤を注入する。腫瘍あたりの製剤注入量は、腫瘍体積[長径cm \times (短径cm)² \times 0.5(ml)]と同容積とし、1回当たりの注入最大 DNA 総量は 250 μ g (8.3ml) とする。なお、治療対象とする総腫瘍体積の上限を 8.3ml とする。超音波あるいは CT ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて穿刺し、微量注入ポンプを用いて注入する。注入は週 1 回、合計 6 回を予定する。ただし、第1例目の 1 回目治療では投与量を 30 μ gDNA までとして安全性を確認する。第 1 例目の 2 回目の治療以降は上述の投与

量まで dose escalation する。各症例について投与開始から 7 週後と 11 週後に安全性と有効性を主治医が評価し、さらに投与開始から 13 週後に安全性(有害事象と治療の因果関係を含む)と有効性を判定部会が判定し、審査委員会が最終的に評価・承認する。1 コースは遺伝子治療 6 週間、経過観察期間 5 週間の計 11 週間とする。その結果、開始より 11 週間の期間に Grade 3 以上の有害反応が認められず、かつ 11 週目の画像的評価において IAB-1 を注入した病巣の一つ以上で SD(安定)もしくは PR(有効)以上の反応が認められた場合は、開始より 13 週間目の判定部会により安全性が確認され、追加治療可能と判定後に審査委員会でも評価・承認されれば、患者が追加治療を希望した場合にのみ、総括責任者の判断で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。ただし、その追加コースごとに判定部会により適格性があると判定され審査委員会でも評価・承認された後に、患者より同意書を得ることとする。また、第 1 例目の治療開始 13 週目の判定部会の判定後に審査委員会の評価において、安全性が確認された場合に限り、第 2 例目の遺伝子治療を開始する。第 2 例目の 1 回目以降の投与量は、上述の通り、腫瘍体積と同容積とし、1 回当たりに注入する DNA 総量の上限を 250 μ g とする。以降の(第 n+1 例)に対する遺伝子治療の開始も、同様に第 n 例の 13 週目の判定部会の判定後に審査委員会の評価において、安全性が確認された場合に限り、実施する。

なお、本遺伝子治療を実施中に中枢神経系への転移が確認された場合は、速やかに脳神経外科および放射線科などと協議し、ガンマナイフおよびサイバーナイフなどの放射線治療もしくは手術などの中枢神経系転移に対する治療を検討する。中枢神経系転移の状態および全身状態より判断し、可能であれば本遺伝子治療を継続するが、継続困難な場合には本遺伝子治療を中止し、中枢神経系転移の治療を開始する。いずれの場合も、患者に病状を説明し了承を得ることとする。また、本遺伝子治療完了後、経過観察中にいくつかの病変が進行した場合には、患者に説明し了承を得た上で他の治療へ変更する。

いずれの時点においても、Grade 3 以上の有害反応を認めた場合には、主治医は速やかに総括責任者および遺伝子治療審査委員会審査委員長に報告することとし、総括責任者の判断のもとで継続の可否を決定できるものとする。Grade 4 の有害反応がみられたら、直ちに全症例の遺伝子治療を中止する。

③ 前処置及び併用療法の有無

遺伝子導入用の穿刺針による皮膚穿刺の際の疼痛軽減のために、1%キシロカイン® 溶液を使用する。1 穿刺部位に対し最大 10ml を使用し、穿刺部位が複数箇所になる場合も、1 回の治療における総使用量が 20ml を超えないようにする。その他の特別な前処置は実施しない。また、併用療法は実施しない。

④ 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) 超音波、CT あるいは MRI などにて治療開始後 6 週間は週 1 回、それ以降 11 週目

までは原則的に週 1 回、腫瘍径およびその状態(壊死の混在の比率など)を評価する。安全性を含めた総合的な評価は治療開始後 7 週目と 11 週目に実施する。

- 3) 遺伝子治療実施の際には、治療実施 1 週間前に、遺伝子治療製剤の皮膚テストを実施する。また、1 回目および6回目の遺伝子治療製剤注入時に、病巣の生検を行い、病理組織学的観察を施行し、④-5) で示す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可能な限り検討する。
- 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。
- 5) 免疫学的検討事項

免疫学的検討事項を以下に示す。

(1) 摘出組織

- ・ HE: 治療前後の病巣の組織学的変化と病巣への免疫担当細胞の浸潤をヘマトキシリン・エオジン染色で評価する。
- ・ 免疫染色: 免疫細胞(リンパ球、マクロファージ、NK 細胞)を各表面抗原の免疫染色で同定し、腫瘍局所への誘導について評価する。また、腫瘍細胞のアポトーシスについて TUNEL 法で評価する。
- ・ 遺伝子発現: RT-PCR を用いて組織内における IFN- β , TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 の mRNA の発現につき測定する。

(2) 血液

- ・ PCR(plasmid DNA): 病巣に注入した IAB-1 に含まれているプラスミド pDRSV-IFN β の有無を PCR で評価する。
- ・ CD4/8: 血中リンパ球サブセットをフローサイトメトリーで測定する。
- ・ 抗プラスミド抗体: 病巣に注入した IAB-1 に含まれているプラスミド pDRSV-IFN β に対する抗体を EIA(enzymeimmunoassay)で測定
- ・ サイトカインアッセイ: IFN- β , TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 の血中レベルを EIA(enzymeimmunoassay)で測定

(3) 尿

- ・ PCR(plasmid DNA): 病巣に注入した IAB-1 に含まれているプラスミド pDRSV-IFN β の有無を PCR で評価する。

組織採取は 1 回目および 6 回目の遺伝子治療製剤注入前に、注入予定部位の針生検によって行う。同手技では十分な組織量が得られない可能性もあるので、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に重点を置いて検討する。検体は適宜 4°C、-20°C、-80°C の冷蔵庫あるいは冷凍庫、超低温槽に保存する。解析は京都府立医科大学附属病院泌尿器科、

名古屋大学医学部附属病院遺伝子・再生医療センターにて実施する。なお、遺伝子解析については説明書、承諾書を用いてインフォームド・コンセントを行い、病院内の関係委員会の承認を得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。

(別表) 治療および観察項目のスケジュール

項目	投与前 週 以内	1回目		2回目		3回目		4回目		5回目		6回目	
		第1週 Day1 治療前	Day1 治療後	第2週 Day8 治療前	Day8 治療後	第3週 Day15 治療前	Day15 治療後	第4週 Day22 治療前	Day22 治療後	第5週 Day29 治療前	Day29 治療後	第6週 Day36 治療前	Day36 治療後
同意取得	○												
皮膚テスト	○												
腫瘍標の測定	○	○		○		○		○		○		○	
血液検査	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
尿検査	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
安全性の評価			○		○		○		○		○		○
腫瘍生検 (病理検査、 免疫染色、遺伝子発現)		○										○	
プラスミドDNAのPCR (血液、尿)		○						○					
血中抗プラスミド抗体		○						○					
血中サイトカイン		○						○					
血中CD4/8		○						○					

項目	第7週 Day43	第8週 Day50	第9週 Day57	第10週 Day64	第11週 Day71
同意取得					
皮膚テスト					
腫瘍標の測定	○	○	○	○	○
血液検査	○	○	○	○	○
尿検査	○	○	○	○	○
安全性の評価	○	○	○	○	○
腫瘍生検 (病理検査、 免疫染色、遺伝子発現)					
プラスミドDNAのPCR (血液、尿)	○				○
血中抗プラスミド抗体	○				○
血中サイトカイン	○				○
血中CD4/8	○				○

(上記のように1コースを1週とする)
(入院は原則として1週間必要)

項目	第15~55週 第(4n+3)週 (n=3~13) (1回/4週)
腫瘍標の測定	○
血液検査	○
尿検査	○
安全性の評価	○

⑤ 予想される副作用及びその対処方法

腎細胞癌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。局所麻酔薬としてキシロカイン[®]を使用することから、本薬剤に対するアレルギー反応等の発生する可能性も否定できない。この場合もそれぞれの症状に対して最善と考えられる治療を実施する。

⑥ 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

原則的に有効性は治療開始から 11 週後の時点で局注を行った腫瘍の縮小率、非局注病巣の変化などの所見によって判定する。判定は、資料 6 の RECIST guideline に沿って判定し、資料 7 の腎癌取り扱い規約 第 3 版の評価基準も併記する。また、その後も原則として 4 週毎の有効性と安全性の評価を治療開始後少なくとも 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。とくに遺伝子治療実施中は血液、尿検査は週 2 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。Grade 3 の有害反応が出現した際は、主治医は速やかに総括責任者および遺伝子治療審査委員会審査委員長に報告するものとし、総括責任者の判断のもとで中止可能とする。審査委員長は個々の Grade 3 以上の有害反応の報告を受けた後、独自の判断で、緊急審査委員会を開き、本臨床研究の継続の可否について審議できる。有害反応と本遺伝子治療の因果関係の判定を判定部会に諮問した場合は、判定部会の判定を審査委員会で審議し、最終的な判断を行う。また、安全性の評価は治療開始後 7 週以降も 11 週まで毎週定期的に実施し、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。評価基準は日本泌尿器科学会・日本病理学会・日本医学放射線学会/編の「腎癌取り扱い規約 第 3 版、第 1 部 臨床的事項、E. 治療効果判定基準」(資料 7)および米国の National Cancer Institute (NCI) が提示している RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; 資料 6) に準じて、著効、有効、安定、進行に区分する。遺伝子治療施行部位以外に病変を認める場合には、

原則的に治療効果を併記する。病変部の測定を行い、腎癌取り扱い規約に基づき1方向測定および2方向測定による効果判定を行い、さらに RECIST に基づき病変部の最長径の和により効果判定を行う。両方の基準による効果判定を記録することとする。なお、11 週間目の効果判定の際には、いずれかの判定で SD (安定)もしくは PR(有効)以上であった場合は、13 週間目の判定部会により安全性が確認され、追加治療可能と判定後に審査委員会でも評価・承認されれば、患者が追加治療を希望した場合にのみ、総括責任者の判断で本遺伝子治療をさらに2コース追加できるものとする。

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) PS(資料4)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、CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) version 3.0(資料8)に基づいて判定、記載する。

4) 中止判定基準

- 1. 重篤な有害事象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

なお重篤な有害事象(副作用に関しては Grade 4 以上)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、その重篤さの程度の検討と中止すべきか否かの審査を依頼する。

- 2. 治療開始後7週目と11週目の主治医による評価と13週目の判定部会の判定後に審査委員会でも無効と評価され、総括責任者がこれ以上の本臨床研究の継続が、患者の不利益となる可能性が高いと判断した場合には、当該患者に対する本臨床研究を中止する。
- 3. 患者が拒否した場合。

⑦ 症例記録に関する記録用紙等の様式(別添資料)

⑧ 記録の保存及び成績の公表の方法

本臨床研究に関する記載のすべては、治療中においては、総括責任者が病院内にて管理し、終了後は症例毎に、総括責任者が保存する。保存期間に関しては、本臨床研究の特殊性に鑑み、10年間とする。1コース終了の4週間後に、病院長及び遺伝子治療審査委員会審査委員長にその結果を報告し、遺伝子治療審査委員会審査委員長が必要性を認めた場合には、随時遺伝子治療審査委員会にて審議する。また、本臨床研究実施期間中は本臨床研究に対する遺伝子治療審査委員会を6ヶ月毎に実施し、その継続の可否についても検討する。3年間の遺伝子治療実施期間終了後あるいは、期間中であっても審査委員会にて本臨床研究の中止が決定された場合には、速やかに病院長より、厚生労働省及び文部科学省に報告する。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。

(7) 本臨床研究における個人情報保護

① 個人情報保護における責務

京都府立医科大学附属病院は、京都府個人情報保護条例に基づき、京都府立医科大学附属病院が保有する個人情報についての保護・管理を行っている。病院長は京都府立医科大学附属病院の個人情報保護体制の最高責任者であり、個人情報保護管理の徹底を行っている。よって本臨床研究に関する個人情報保護に関する措置に関し、適正な実施を確保するために必要があると認めるときは、本臨床研究の総括責任者に対して、適宜必要な措置をとることができる。

② 個人情報の取得と利用に関する制限

1) 診療・教育機関としての京都府立医科大学附属病院における個人情報の一般的な取り扱い

京都府立医科大学附属病院は診療・教育機関として、臨床医学の発展と次世代を担う医療人の育成という社会的な使命の実現に向けて、一般的な診療行為・教育に関する以下に挙げる目的に限り、患者様の個人情報を使用する。この使用に関しては、京都府個人情報保護条例と倫理指針等を遵守した上で取り扱われる。また、京都府立医科大学附属病院を受診する患者様には「患者様の個人情報の保護に関するお知らせ」を用いて京都府立医科大学附属病院で使用する個人情報の使用目的について理解と協力を求めている。

(1) 京都府立医科大学附属病院での利用

- ・ 被験者が受ける医療サービス
- ・ 医療保険事務
- ・ 被験者に関する管理運營業務

(入退院等の病棟管理、会計・経理、医療事故の報告、医療サービスの向上)

- ・ 医療サービスや業務の維持・改善のための基礎資料
- (2) 京都府立医科大学附属病院および京都府立医科大学での医学教育における利用
 - ・ 医学・歯学・薬学・保健学系等の教育(ベッドサイドティーチングなど病院内での診療等に関わる医学教育に限る)
 - ・ 教職員の研修(研修医や新任看護師等への病院内研修、および医療サービス等、前項(1)に関わる病院事務系職員の研修等に限る)
 - ・ 研究活動(遺伝子治療臨床研究を含め、実施に関する法令や倫理指針、関係団体等のガイドライン等が定められている場合には、それを遵守する)
- (3) 他の事業者等への情報提供
 - ・ 他の病院、診療所、助産所、薬局、訪問看護ステーション、介護サービス事業者等との医療サービス等に関する連携
 - ・ 他の医療機関等からの医療サービスに関しての照会への回答
 - ・ 被験者の診療等にあたり外部の医師等の意見・助言を求める場合
 - ・ 検体検査業務の委託その他の業務委託
 - ・ 被験者の家族等への診療に関わる説明
 - ・ 医療保険事務(保険事務の委託、審査支払機関への提出)
 - ・ 審査支払機関または保険者からの照会への回答
 - ・ 関係法令等に基づく届出および報告書
 - ・ 関係法令に基づいて事業者等からの委託を受けて健康診断を行った場合の事業者等へのその結果の通知
 - ・ 医師賠償責任保険等に関わる医療に関する専門の団体、保険会社等への相談または届出等
 - ・ 医療上の安全に関わる行政機関または医療に関する専門の団体等への届出簿
 - ・ 医学・歯学・薬学・保健学等の教育機関への提出
 - ・ 他の医療機関等との医学の発展を目的とした共同研究活動
 - ・ 外部監査機関への情報提供

2) その他の本臨床研究の遂行に必要な被験者の個人情報の利用・取り扱い

上記の診療・教育機関としての京都府立医科大学附属病院における個人情報の一般的な取り扱いに加え、本臨床研究の遂行における個人情報の利用・取り扱いについては、総括責任者はあらかじめ被験者の個人情報の利用目的を公表している場合を除き、速やかに、その利用目的を被験者に通知し、または公表しなければならない。

本臨床研究で扱う被験者の診療記録をはじめとする個人情報は、主として病状経過観察、本臨床研究の緊急事態発生のための連絡など、被験者の生命を守るために用いる。その他の特別の目的で使用する場合は、事前に被験者および家族(あるいは親族)に再度説明し了承を得てから使用する。

また、本臨床研究の成果検討時や医療向上のためなどを目的に試験成績などを公表・公開する場合は、個人を特定できない形すなわち個人情報保護して公開する。これらのことは、被験者及び家族(あるいは親族)への同意説明文書中に記載し、被験者の個人情報の保護及び使用目的について通知し同意を得る。

被験者及び家族(あるいは親族)の同意取得は、自由意志によるものであり、臨床研究に参加しない場合であっても被験者に不利益はない。このことは医学研究を行ううえで大切な倫理であるため、本臨床研究では、これらのことを同意説明文書中に記載し、被験者及び家族(あるいは親族)へ通知している。

総括責任者は利用目的の達成に必要な範囲内において、個人情報を正確かつ最新の内容に保つよう努めなければならない。

③ 個人情報保護に関する安全管理措置

京都府立医科大学附属病院病院長は京都府個人情報保護条例に従い、個人情報の保護に関して、組織的に安全管理措置を実施し、個人情報の漏洩、滅失または棄損の防止に対する措置を講じている。一方で個人情報の漏洩等に関わる新しい犯罪手法などが急速な勢いで多様化していることを鑑み、本臨床研究では規程等の柔軟な運用をもって、個別に適切な対応を行う。

さらに本臨床研究では、死者に関する個人情報が死者の人としての尊厳や遺族の感情および遺伝情報が血縁者と共通していることを鑑み、生存する個人と同様に死者に関する個人情報に関しても同様の管理下で取り扱うものとする。

④ 第三者提供の制限

総括責任者は、遺伝子治療臨床研究の指針第六章第九で掲げる内容に従い、あらかじめ被験者等の同意を得ないで個人情報を第三者に提供してはならない。本遺伝子治療に対する病院内の遺伝子治療審査委員会、厚生労働省・文部科学省審査委員会および同省の担当者への情報開示に関しては、あらかじめ患者向けの説明文書の中で説明を実施し、同意を取得しておく。他の第三者への個人情報の提供を行う場合には、適切な目的であることを確認し、遺伝子治療臨床研究の指針第六章第九に従い、その旨を被験者等へ通知する。

⑤ 個人情報の開示、訂正、利用停止等

総括責任者は、保有する個人情報に関し、次に掲げる事項について、被験者等の知りうる状態にしなければならない。

- 1) 臨床研究実施機関の名称
- 2) 個人情報の利用目的
- 3) 個人情報の開示、訂正、利用停止等に関する手続き
- 4) 苦情の申し出先

本臨床研究に関しては 1)、2)、4)について、同意説明文書に明記した。また、3)について

は、それらの手続きができることを同意説明文書に明記し、その申し出に応じて、手続きの詳細を京都府個人情報保護条例に従い被験者および家族(あるいは親族)に説明する。

総括責任者は被験者等から当該被験者が識別されうる保有する個人情報についての開示、訂正、利用停止等について、京都府個人情報保護条例に従い求めがあった場合には、遅滞なく必要な対応を行うほか、対応結果について被験者等に通知しなければならない。

さらに京都府立医科大学附属病院では個人情報に関する苦情などの窓口を設置し、被験者からの苦情や問い合わせに対して迅速に対応できるような体制を整えている。

【個人情報に関する苦情等の窓口】

京都府立医科大学附属病院総務調整係 患者様相談窓口

TEL: 075-251-5233

(8) 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の書式等は資料9～11に記載>

(9) 本遺伝子治療臨床研究の責任の所在

本臨床研究に関する最終的な責任は、総括責任者が負うものとする。