

**遺伝子治療臨床研究実施計画の申請及び
遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する申請について**

【 岡山大学病院 】

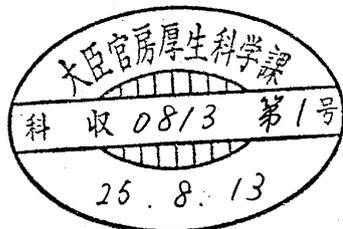
課題名 : 悪性胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in
Immortalized Cells/Dickkopf-3 遺伝子発現アデノウイル
スベクターを用いた遺伝子治療臨床研究

遺伝子治療臨床研究実施計画の申請

- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書 及び概要書 P. 1
- 同意説明文書 P. 17

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する申請

- 第一種使用規程承認申請書 P. 41
- 生物多様性影響評価書 P. 45



別紙様式第1

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 25 年 8 月 8 日

厚生労働大臣 殿

実施施設	所在地	岡山県岡山市北区鹿田町 2 丁目 5 番 1 号 (郵便番号 700-8558)
	名称	岡山大学病院 (電話番号 086-223-7151) (Fax 番号 086-235-7636)
	代表者 役職名・氏名	岡山大学病院長 榎野博史

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添のとおり実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
悪性胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 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臨床研究	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 臨床遺伝子医療学・教授 豊岡伸一

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 概 要 書

平成 25 年 8 月 8 日

研究の名称	悪性胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 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臨床研究
研究実施期間	平成 年 月 日 (承認日) から最終症例の治療終了後 5 年間

総括責任者	所属部局の所在地	岡山市北区鹿田町 2-5-1 (郵便番号 700-8558)	
	所属機関・部局・職	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科臨床遺伝子医療学・教授	
	氏 名	豊 岡 伸 一 	
実施施設	所在地	岡山市北区鹿田町 2-5-1 (郵便番号 700-8558)	
	名称	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (呼吸器・乳腺内分泌外科) 及び岡山大学病院	
	連絡先	岡山市北区鹿田町 2-5-1 (電話番号 086-235-7265) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (呼吸器・乳腺内分泌外科)	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	宗 淳 一	岡山大学病院 呼吸器外科・助教	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ベクターの調製、ベクターの投与、臨床観察、臨床効果判定
	山 根 正 修	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 医学教育リノベーションセンター・准教授	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ベクターの調製、ベクターの投与、臨床観察、基礎効果判定
	大 藤 剛 宏	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 呼吸器・乳腺内分泌外科学・准教授	患者への説明及び同意の取得、ベクターの投与、臨床観察
	三 好 新 一 郎	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 呼吸器・乳腺内分泌外科学・教授	患者の選定、臨床観察、基礎効果判定
	堀 田 勝 幸	岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科・助教	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ベクターの調製、ベクターの投与、臨床効果判定
田 端 雅 弘	岡山大学病院 腫瘍センター・准教授	患者の選定、臨床効果判定、臨床観察	

総括責任者以外の研究者	木浦 勝行	岡山大学病院 呼吸器・アレルギー内科・教授	患者の選定、臨床観察、基礎的効果判定、臨床効果判定
	谷本 光音	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 血液・腫瘍・呼吸器内科学・教授	患者の選定、臨床観察、臨床効果判定
	平木 隆夫	岡山大学病院 放射線科・講師	ベクター投与、画像効果判定
	郷原 英夫	岡山大学病院 放射線科・講師	ベクター投与、画像効果判定
	金澤 右	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 放射線医学・教授	ベクター投与、画像効果判定
	渡部 昌実	岡山大学病院 新医療研究開発センター・准教授	ベクターの調製、ベクターの管理、基礎的効果判定
	那須 保友	岡山大学病院 新医療研究開発センター・教授	総括責任者の補佐、研究全体の総合的支援、関係省庁との調整
研究協力者	公文 裕巳	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学・教授	研究の円滑な遂行のための包括的アドバイス(研究全般)
	大槻 剛巳	川崎医科大学衛生学・教授	研究の円滑な遂行のための包括的アドバイス(免疫学的事項)
	岡部 和倫	国立病院機構山口宇部医療センター・統括診療部長・呼吸器外科科長	研究の円滑な遂行のための包括的アドバイス(臨床的事項)
	岸本 卓巳	独立行政法人労働者健康福祉機構岡山労災病院・副院長	研究の円滑な遂行のための包括的アドバイス(臨床的事項)
	中野 孝司	兵庫医科大学呼吸器内科・教授	研究の円滑な遂行のための包括的アドバイス(臨床的事項)
	樋野 興夫	順天堂大学医学部病理・腫瘍学講座・教授	研究の円滑な遂行のための包括的アドバイス(臨床的事項)

	Steven Albelda 塩見均	University of Pennsylvania Medical Center, Pulmonary, Allergy & Critical Care Division, William Maul Measey Professor of Medicine 桃太郎源株式会社 代表取締役社長	研究の円滑な遂行のため の包括的アドバイス (臨床的事項) 米国における関連情報 の提供 アデノウイルスベクタ ーの供与
--	---------------------------	---	--

審査委員会が研究計画 の実施を適当と認める 理由	審査委員会では、提出された遺伝子治療臨床研究実施計画書「悪性 胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝 子治療臨床研究」を慎重に審査した結果、本遺伝子治療臨床研究実 施計画は、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年文部科学 省・厚生労働省告示第 1 号、平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示 第 2 号により全部改正、平成 20 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号により一部改正）の必要条件をすべて満たしていると認められた ため、所轄官庁に遺伝子治療臨床研究実施計画を申請することを決 定した。
--------------------------------	--

審査委員会の長の職名	氏名
岡山大学病院 遺伝子治療 臨床研究審査委員会 委員長	伊達 勲 

研究の区分	○遺伝子治療臨床研究	遺伝子治療標識研究
研究の目的	<p>本臨床研究は、悪性胸膜中皮腫に対し Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (以下、REIC/Dkk-3) 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で投与した場合、</p> <p>1) 安全性の検討 (最大耐量の推定) を行うことを本試験の主な目的とする (主要エンドポイント)。 2) 治療効果の観察 (評価可能症例) を行い、治療効果を総合的に判定する (副次エンドポイント)。 3) 当該遺伝子治療における有効性を来す可能性のある免疫学的な反応を解析するとともに、治療効果の病理学的評価を行う (副次エンドポイント)</p> <p>悪性胸膜中皮腫症例に対して、REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で胸水または局所病巣内に直接投与する。 その際の質的、量的安全性を確認し、治療効果の判定を行うとともに、腫瘍退縮や腫瘍マーカーの低下を期待する際の根拠となる、組織学的、分子生物学的効果、ベクターの感染、mRNA レベル及びたんぱく質レベルでの REIC/Dkk-3 遺伝子の発現について総合的に解析することを目的とした第 I/II 相試験とする。</p> <p>本臨床研究は岡山大学前立腺がん遺伝子治療臨床研究プロトコルを参考に、悪性胸膜中皮腫臨床プロトコル検討委員会を含む研究協力者と岡山大学の研究者間で実施される共同研究であり、製造販売承認を目的とした治験ではない。 本臨床研究に用いられる REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターは桃太郎源株式会社より供給される。</p>	
対象患者及びその選定理由	<p>1. 対象疾患 本臨床研究では悪性胸膜中皮腫と診断され、選択基準に該当し、除外基準に抵触しない患者を対象とする。</p> <p>2. 対象疾患の選定理由 (対象疾患に対する現時点での知見) 悪性胸膜中皮腫は、アスベストへの曝露を原因として発症するとされ、実際にアスベストを吸入してから悪性胸膜中皮腫を発症するまで 20 年から 40 年の潜伏期間があると言われているが、米国では早期のアスベスト規制の結果、すでに 2004 年をピークに悪性胸膜中皮腫の患者数、死亡数とも減少傾向に向かっている。 一方、規制の遅れた日本では、悪性胸膜中皮腫の患者は、1980 年代前半には年間 100 人程度であったが、95 年に 500 人、2004 年には 953 人となっている。1960 年代以降のアスベストの輸入量増加や広範な利用状況を考慮すれば、2025 年にピークに達し、今後 40 年間の死亡者は 10 万 3000 人に達すると推計されている。 さらに、欧州における患者数のピークは 2015 年から 20 年で、今後の 40 年間の死亡者は 25 万人とされ、経済成長の著しい中国やインドにおいては、アスベストの使用は未だに禁止されておらず、早晩、大量の患者が発生すると考えられている。 このように、世界的に増加が推定される悪性胸膜中皮腫患者に対する治療薬のニーズは高まると予測されるが、現時点で悪性胸膜中皮腫に対する治療薬としては顕著に有効な薬剤はない。米国で 2004 年に、日本で 2007 年に承認されたペメトレキセド (商品名：アリムタ) においても、シスプラチンとの併用で延命効果があることが示されているものの、臨床試験に参加した症例では 1 年生存期間中央値 12.1 カ月、1 年生存率 50.3%と限定的なもので、新しい薬剤の開発が強く望まれている。</p> <p>(REIC/Dickkopf-3 による遺伝子治療に関する現時点での知見) 新規がん治療遺伝子 REIC/Dickkopf-3 は、2000 年に、岡山大学での細胞の不死化の研究の過程において、ヒト正常線維芽細胞の不死化に伴って発現が減弱する遺伝子として同定された遺伝子⁴⁾で、細胞のアポトーシスを司る遺伝子と考えられている。後に、アフリカツメガエルの頭部形成に関わる Dkk (dickkopf) 遺伝子ファミリーの Dkk-3 と相同であることが明らかになった。</p>	

REIC/Dkk-3 遺伝子は正常細胞では発現しているが、種々のがん細胞（非小細胞肺癌、腎がん、前立腺がん、精巣がん、悪性胸膜中皮腫）で発現が低下しており、これらのがん細胞に REIC/Dkk-3 遺伝子を過剰発現させると、対照とした正常細胞には傷害を与えず、がん細胞選択的に小胞体ストレスによるアポトーシスが誘導された。前立腺がんでは、研究協力者・分担者である公文・那須らのグループにおける検討で、マウス前立腺がん同所移植モデルを用いた前臨床試験において、ヒト REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター（以下、Ad-REIC）の局所投与により、①局所前立腺腫瘍の発育抑制、②肺及びリンパ節転移の抑制という全身効果、③生存期間の延長効果が確認され、原発巣のみならず転移病巣の治療も目的とした REIC/Dkk-3 遺伝子の局所投与の有用性が明らかにされた。すなわち、局所への遺伝子導入 (*in situ* gene therapy) により、局所での腫瘍退縮とともに、全身への治療効果を期待するという臨床研究立案のための科学的根拠が明らかにされている。

選択的細胞死による直接的な抗腫瘍効果のみならず、REIC 遺伝子により産生される分泌型 REIC タンパクは、樹状細胞様細胞の分化誘導能を有している。このことは、Ad-REIC による局所遺伝子治療は、腫瘍局所において選択的細胞死の結果生じる‘がん細胞膜断片（がん抗原）’の樹状細胞様細胞への取込みによる特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導するという、自己がんワクチン化のための最適環境を構築する治療法として位置づけることができる。さらに、Ad-REIC の局所腫瘍内投与は、腫瘍組織内間質細胞などからの Interleukin-7 (IL-7) の産生による NK 細胞の活性化も同時に惹起されることから、これらの相乗的な抗がん免疫の賦活化作用の結果として、局所がん病巣のみならず遠隔転移病巣への顕著な治療効果が存在することが動物実験において実証されている (6-3-4-3. 前立腺がんでの基礎的研究に詳細を記載)。これらの研究を踏まえ前立腺がんを対象とした臨床研究はすでに実施承認されている (平成 23 年 1 月 25 日実施)。

悪性胸膜中皮腫に対しても臨床研究の導入を企図して同様の研究が実施された (6-3-4-1. 悪性胸膜中皮腫での基礎的研究)。Ad-REIC の局所投与により、①局所腫瘍の発育抑制、②生存期間の延長効果が確認され、③遠隔病巣の発育抑制という全身効果も確認された。これらの結果は前立腺がんを対象とした前臨床研究と同等のものであり、悪性胸膜中皮腫を対象に臨床研究を開始するための科学的根拠となり得る。

安全性という観点においても種々の検討が実施されている。Ad-REIC による各種正常細胞に対する細胞毒性について解析を行ったが明らかな細胞毒性は認められていない (6-3-4-2. 各種正常細胞における細胞毒性の解析)。また、投与におけるヒトでの安全性をさらに確認、確保する目的で、種々の動物実験が実施されているが、動物実験レベルではいずれも有害事象は生じていない。さらに、正常細胞においても REIC は強く発現しており、Ad-REIC の局所投与にともなう全身的な随伴症状 (副作用) はほとんどないものと考えられる。

以上のように、悪性胸膜中皮腫は現存の治療薬だけでは十分な有用性が得られていないこと、悪性胸膜中皮腫において REIC の発現が 90%以上の症例において抑制されていることさらに前臨床研究 (*in vitro*, *in vivo*) における安全性、有効性に関する良好な結果より、悪性胸膜中皮腫に対する REIC/Dkk-3 遺伝子治療は効果が期待されると考え、アデノウイルスベクターにより REIC/Dkk-3 遺伝子を直接がん細胞に導入する遺伝子治療臨床研究を計画した。

遺伝子の種類及びその導入方法

1. ヒトに導入する REIC/Dkk-3 遺伝子の構造、性質、活性 (遺伝子の構造)

導入を企図する遺伝子は、Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) タンパク質の全ての翻訳領域を含む遺伝子である。ヒト REIC/Dkk-3 遺伝子発現 pAxCawt (コスミドカセットであり、日本国の RIKEN BioResource Center の Recombinant Virus Database No. 1678 より情報を得た) を、E1 領域を欠き複製能力を持たないヒトアデノウイルス 5 型ベクターに組み込み、組換えアデノウイルスベクターを作製した。このアデノウイルスベクターを、E1 遺伝子導入 PerC6 細胞への感染により増殖させ、塩化セシウム (CsCl) を用いた超遠心に

て精製したロットを臨床研究に用いる。REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを腫瘍組織内に直接注射または胸腔内投与することにより REIC/Dkk-3 遺伝子を導入する。アデノウイルスベクターは高力価の濃縮ベクター液を調製することが可能であり、またアデノウイルスベクターの高い遺伝子導入効率は腫瘍内直接投与・胸腔内投与に適していると思われる。

(REIC/Dkk-3 遺伝子の生物活性)

REIC/Dkk-3 は分子量 38.3kDa の糖タンパク質で、N 末端に 1 つのシグナルペプチドとシステインドメイン、coiled-coil ドメインをそれぞれ 2 つずつ有する 350 のアミノ酸より構成される。REIC/Dkk-3 は Dkk ファミリーと呼ばれる分泌型蛋白群の一種で、Wnt 受容体を介して Wnt シグナル伝達を阻害することが知られている。

REIC/Dkk-3 は腫瘍特異的細胞アポトーシスを誘導する機能を有していると考えられており、その機序として、c-Jun-N-terminal kinase (JNK) を活性化させることでの、Bax のミトコンドリアへの移行促進作用が考えられている。一連の研究において、種々のがん腫で (非小細胞肺癌、腎がん、前立腺がん、精巣がん) で REIC/Dkk-3 の発現が低下しており、その機序として、REIC/Dkk-3 遺伝子プロモーターの過メチル化が指摘されている。これらの腫瘍細胞に REIC/Dkk-3 遺伝子を過剰発現させると、腫瘍細胞のアポトーシスが誘導された。

一方、正常細胞に REIC/Dkk-3 遺伝子を過剰発現させてもアポトーシスが生ずることはほとんどなく、REIC/Dkk-3 には腫瘍特異的なアポトーシス誘導作用がある。その機序として小胞体ストレスが関与することを我々は解明した。すなわち、本来がん細胞では REIC/Dkk-3 タンパク質発現が抑制されているため、REIC/Dkk-3 ががん細胞において強制発現され多量の REIC/Dkk-3 タンパク質が細胞内の小胞体において作られる場合、がん細胞においてより選択的に小胞体ストレスが発生すると考えられる。このことが、REIC/Dkk-3 タンパク質の強制発現による腫瘍特異的細胞アポトーシス誘導の一つの機序と考えられる。

さらに分泌型 REIC タンパクによる樹状細胞の分化誘導作用と正常細胞での IL-7 の産生に基づく NK 細胞の活性化による相乗的抗がん免疫活性化作用が確認されている。

2. 遺伝子導入方法の概略

(ベクターの生産)

本臨床研究に用いられる REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターは、(株) 桃太郎源社が製造委託した、米国のペイラー医科大学で作製され、同社より直接岡山大学に供給される。

(遺伝子導入方法)

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、岡山大学病院にて患者 (必要な場合は患者及び代諾者^{注)}) に対し、文書による説明 (第 1 回目) を行い、文書による同意が得られた場合に限り本臨床研究に患者登録し、治療前検査を開始する。

^{注)} 代諾者とは被験者の配偶者、後見人、その他これらに準じる者 (成人の子、親、成人の兄弟姉妹など) をさす。

治療前検査にて上述した選択基準に合致、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安全・効果評価・適応判定部会にて適応を評価する。同部会において本臨床研究の適応と判断された場合、岡山大学病院にて患者 (必要な場合は患者及び代諾者) に対し、文書による説明 (第 2 回目) を行う。

説明と同意書は、本計画書に添付資料 12-1 (悪性胸膜中皮腫遺伝子治療臨床研究のための説明と同意書) として含まれている。同意書は 2 部作成し、署名又は記名捺印された 1 部を被験者に手渡し、他の 1 部を診療記録とともに保存する。

文書による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。

1) 投与当日、岡山大学病院北病棟 5 階新医療研究開発センター・探索的医薬品開発室に -80℃ で凍結保管してある REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター

	<p>液を封入しているポリプロピレン製クリオチューブを同施設内安全キャビネット内へ移動、溶液を融解する。</p> <p>2) REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター液を専用のキャリアバック内に厳重に封入して、保冷下で岡山大学病院総合診療棟 IVR-CT 室に搬入する。</p> <p>3) 各症例に対し、以下の方法にてアデノウイルスベクターを注入する。</p> <p>4) 岡山大学病院総合診療棟 IVR-CT 室にて、原則として局所麻酔を施行し、CT ガイド下に、REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター液を、胸水貯留を認める胸腔中、または評価可能な 1 病変部に注入する。ウイルスベクター液の注入量は胸水中（胸腔）へは 50ml、病変部には 1-2ml とする。胸腔内注入の際は胸腔内にカテーテルチューブを挿入し、可能な限り胸水を排出したのち注入する。</p> <p>注入後の岡山大学病院総合診療棟 IVR-CT 室内の消毒、清掃は専門業者（医療関連サービスマーク認定）に依頼する。その後、プロトコルを遵守して安全性並びに治療効果の評価を行う。投与から 4 週後に臨床症状、検査及び病変部の総合評価を行う。</p> <p>ベクター投与量は、ベクター粒子数 (vp: viral particle) 漸増的に 4 段階とし、用量レベル上昇の適応評価については、それぞれのステージの投与 4 週以降に安全・効果評価・適応判定部会を開催し、全ての症例について投与 4 週間までのデータを基に総合評価する。</p> <p>安全であると判定された後、次のステージを開始する。</p>
<p>これまでの研究成果（臨床に関して）</p>	<p>1. REIC/Dkk-3 遺伝子治療に関して</p> <p>1) 国内の状況</p> <p>岡山大学は前立腺がんを対象とした臨床研究を二つの病態群を対象として実施中である。カテゴリ-A：内分泌療法抵抗性再燃前立腺がん、カテゴリ-B：外科的切除の適応のあるハイリスク初発限局性前立腺がん（ネオアジュバント投与）</p> <p>当該臨床研究は平成 22 年 12 月 22 日厚生科学審議会科学技術部会において承認（平成 23 年 1 月 6 日付け 厚生労働大臣意見書発出）されており、平成 23 年 1 月 25 日に第 1 例目を実施した。平成 25 年 7 月現在までに計 20 症例（A 群 6 例及び B 群 14 例）で治療が実施され、主要エンドポイントである Ad-REIC を用いた遺伝子治療臨床研究の安全性については、現時点での確認が為された状況にある。</p> <p>2) 国外の状況</p> <p>桃太郎源株式会社は、前立腺がんを対象に米国での臨床研究実施を計画し FDA との事前協議（平成 20 年 11 月）、Pre-preIND 会議（平成 21 年 1 月）、ワシントン DC での Pre-IND 会議（平成 21 年）を実施し、平成 22 年 3 月に Ad-REIC 製剤を、米国 FDA に IND (Investigational New Drug) 申請、NIH の RAC (Recombinant DNA Advisory Committee・平成 22 年 3 月) 公聴会を通過、平成 22 年 3 月 31 日付けで IND を通過した。ニューヨークマウントサイナイ病院での「再発高リスク限局性前立腺がんを対象とする術前治療」ネオアジュバント遺伝子治療として実施する予定である。（平成 25 年 8 月の時点では症例の組み入れは行われていない。）</p> <p>3) 使用する REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターについて</p> <p>本申請遺伝子治療臨床研究において悪性胸膜中皮腫症例に対して投与する REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターは、CMV プロモーターを搭載した Ad-CMV-REIC 製剤である（添付資料 12-3、12-4 に詳細を記載）。現在、岡山大学病院で実施されている前立腺がんに対する Ad-REIC による臨床研究において用いられているのは CAG プロモーターを搭載した Ad-CAG-REIC 製剤である。Ad-REIC の安全性・効能がプロモーター（CMV プロモーターか CAG プロモーターか）によって差が無い（同等である）ことを証明する為の実験を行った。結論として、Ad-CMV-REIC 製剤と Ad-CAG-REIC 製剤は、その効能についておおむね同等であることが証明された。</p> <p>2. 悪性胸膜中皮腫の遺伝子治療について</p> <p>1) 国内の状況</p> <p>申請書提出時点（平成 25 年 8 月）では悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療は本</p>

邦では実施されていない。

しかし千葉大学において「切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる第 I 相臨床研究」が予定されておりすでに実施に係る審査は終了し厚生科学会議科学技術部会において実施に差支えない旨の意見が出されている。

2) 海外の実施状況

世界的には米国のペンシルベニア大学、オーストラリアの西オーストラリア大学で行われている。ペンシルベニア大学での遺伝子治療は Albelda らのグループにより行われ、論文発表されているものとして、① Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk) を組み込んだアデノウイルスベクターの胸腔内投与とガンシクロピルの全身投与を組み合わせた遺伝子治療、② インターフェロンベータ (IFN-beta) を組み込んだアデノウイルスベクター胸腔内投与による遺伝子治療、がある。

① HSV-tk による遺伝子治療の臨床第 1 相試験は 1995 年 11 月から開始された。HSV-tk 遺伝子が組み込まれたアデノウイルスベクターを 1 回、胸腔内に直接投与し、その後ガンシクロピルの全身投与を行った。21 人の未治療の悪性中皮腫患者に対して投与するウイルス量を約 3 倍ずつ上げ、 5.0×10^{13} vp まで達したが、重篤な副作用は認めず、最大耐量には達しなかった [一過性リンパ球減少 (grade 4) 1 例、肝機能異常 (grade 3) 1 例、その他、軽度の一過性の発熱、低酸素血症)、低血圧)、肝機能異常、低酸素血症など]。抗腫瘍効果としては 21 例中 18 例が効果を判定するのに十分な期間を得ており、うち 3 例が 1998 年 2 月の段階で画像上腫瘍の進行を認めなかった。その後、HSV-tk 遺伝子治療はステロイドを追加した投与方法に変更し 5 名の患者に施行、また、1998 年 6 月からは単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子はそのままだウイルスの他の構造をより安全に変更したウイルスベクターを用いて (E1/E3 欠失ウイルスから E1/E4 欠失ウイルスへ変更) 8 例に治療を行った。すなわち、合計 34 名の患者に HSV-tk 遺伝子が組み込まれているアデノウイルスベクターが投与された。追加の症例においても重篤な副作用は認められなかった。この追加症例のうち 2 例において 6.5 年以上の長期生存を認めている (2005 年論文発表時)。この 2 名の Positron Emission Tomography (PET) 検査では腫瘍部における、2-deoxy-2- [F-18] fluoro-D-glucose (FDG) の取り込みの低下が確認された (2011 年 3 月の時点で生存例は 1 例、10 年以上の長期生存、もう 1 例は治療後約 8 年後死亡。Dr. Albelda, personal communication)。

② IFN-beta を組み込んだアデノウイルスベクターによる悪性胸水例に対する遺伝子治療の臨床第 1 相試験が 2003 年 8 月から開始された。投与は、胸腔内投与 1 回であり、悪性胸膜中皮腫 7 例、悪性胸水を伴う非小細胞肺癌 2 例、卵巣がん 1 例に行われた。投与開始量である 9.0×10^{11} vp では重篤な副作用は認められなかったが、1 段階投与量を上げたウイルス量の 3.0×10^{12} vp では 4 例中 2 例で重篤な低酸素血症 (grade 3)、肝機能障害 (grade 3) をそれぞれ認めた。低酸素血症を認めた症例は併存疾患として慢性心不全を伴う症例であり、肝機能障

害を認めた症例は、以前、悪性リンパ腫のため腹部に放射線治療の既往がある症例であった。この結果、最大耐量は 9.0×10^{11} vp と決定された。悪性胸膜中皮腫 7 例の治療効果に関しては、投与後 60 日の CT の評価において 4 例で腫瘍の大きさは変わらず、3 例で腫瘍の増大を認めた。また PET 検査では 3 例で不変、1 例で FDG の取り込みの低下を認めた。生存に関しては研究が発表された 2007 年時点で、生存例は 3 例 (34 ヶ月、32 ヶ月、26 ヶ月) であった (2011 年 3 月時点では 3 例とも死亡)。

また 2006 年 9 月から、同じく IFN-beta を組み込んだアデノウイルスの繰り返し投与の安全性、有効性を検討する臨床研究が行われた。対象疾患の内訳は悪性胸膜中皮腫 10 例、悪性胸水を伴う非小細胞肺癌 2 例、卵巣がん 2 例、乳がん 2 名であり、開始後 14 名は投与間隔を 2 週間、残りの 3 名は投与間隔を 1 週間と設定された。投与ウイルス量は 3.0×10^{11} vp $\sim 3.0 \times 10^{12}$ vp で行われた。安全性に関しては、ほとんどが予測可能な軽度から中等度の副作用であったが (リンパ球減少、低アルブミン血症、低血圧、低カルシウム血症、発熱と震え、吐き気、頻脈など) 2 例に予期せぬ副作用が認められた。1 例目は 1 回目の投与後、部分トロンボプラスチン時間値が上昇し、2 回目の投与基準を満たせず 1 回投与のみとなった。しかしながら、長期の経過観察期間中、出血、凝固異常も含め特に症状は出現しなかった。2 例目は、2 回目のウイルスベクター投与後 14 日の間に心タンポナーデを発症した症例である。呼吸困難の増悪、嘔吐の症状があり、心嚢ドレナージを行った。原因は 2 回目投与の際に起こった、炎症反応によるものと推測された。このため今回の REIC 遺伝子治療においても、安全性の確保のため、明らかな心嚢水を有する場合を除外基準として設定している。腫瘍の縮小効果として悪性胸膜中皮腫 10 例中病変部の大きさが評価可能であった 8 例を検討したところ、投与後 2 か月の評価において 2 例で不変、6 例で腫瘍の増大を認めた。生存に関しては論文が発表された 2010 年時点で、3 例の生存例 (42 ヶ月、39 ヶ月、18 ヶ月) を認めた (2011 年 3 月の時点でも 3 例とも生存)。

ペンシルベニア大学で現在症例集積を行っている遺伝子治療としては、2009 年 2 月から IFN-alpha を組み込んだアデノウイルスの繰り返し投与の安全性、有効性を検討する臨床研究が開始された。2011 年 2 月の時点で 9 例の登録があり重篤な副作用は発生しておらず、2 例で Partial response、4 例で Stable disease を得ている (Dr. Albelda, personal communication)。また、2010 年 4 月からは同じく IFN-alpha を用いた遺伝子治療に抗がん剤を組み合わせる治療の臨床試験が開始されている。

米国以外の状況としては、オーストラリアで遺伝子治療が行われた。西オーストラリア大学の Robinson らはインターロイキン-2 を組み込んだワクシニアウイルスベクターを、12 週間にわたって腫瘍内に直接投与する遺伝子治療を行った ($1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^7$ plaque-forming units)。2000 年に発表された論文によると、特に重篤な副作用は出現しなかった。治療効果としては臨床的、画像的效果は認められなかった。

<p>安全性についての評価</p>	<p>1. 遺伝子導入方法の安全性</p> <p>1) ウイルスベクターの純度と安全性</p> <p>本遺伝子治療臨床研究に用いるベクターの生産には、別紙記載のマスターウイルスバンクを用いた。これらのバンクはFDAのガイダンスに沿った管理試験項目の条件を満たしている。</p> <p>2) 増殖性ウイルス出現の可能性</p> <p>アデノウイルスベクターの大量製造過程でベクターのゲノムが293細胞に組み込まれているE1遺伝子領域に近接し、相同組み換えが起きることがあり、その結果、現在のアデノウイルスベクター生産の技術では、ある程度の確率でRCAが生じてしまうことは避けられないと考えられている。現在、FDAではRCA量の許容限度は「3×10^{10} ウイルス粒子あたり1個未満」であることを推奨している。本臨床研究で用いられるREIC/Dkk-3遺伝子発現アデノウイルスベクターは、(株)桃太郎源社が製造委託した、米国のベイラー医科大学で作製され、「3×10^{10} ウイルス粒子あたり1個未満」であるという条件を満たしたものが使用される。</p> <p>3) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性 (前立腺の場合)</p> <p>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及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、ヒト前立腺への至適投与量 (1.0×10^{10} PFU: ベイラー医科大学での臨床研究より) の0.5倍から50倍 (体重換算) に相当するベクター量をマウス前立腺に投与しその広がりを解析する動物実験がベイラー医科大学で実施された。その結果、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嚢、リンパ節 (骨盤部)、肝臓、腸管への広がりが認められた。尿、精嚢液、精子、肺への広がりは全く認められなかった。精巣においては高濃度注入群において1匹に認められた。血液においては低濃度において1匹にのみ認められた。</p> <p>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は解剖学的に隣接する臓器にのみ主に認められ、全身的な広がりを示唆する所見はなかった。またベクターの投与によるマウスの死亡は認めなかった。この動物実験は条件上、マウス前立腺体積の約3分の1に相当する容積のベクター液を注入する実験であり一部は周囲に漏出したと考えられるが、ヒトの場合は30分の1又は15分の1に相当する容積を注入するため (ヒト前立腺30ml、注入ベクター量1ml又は2ml) 漏出の可能性は極めて低いと考えられる。</p> <p>本研究はREIC/Dkk-3遺伝子発現アデノウイルスベクターではなく、Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた実験結果であるが、ウイルス学的に同一構造を有するREIC/Dkk-3遺伝子発現アデノウイルスベクターについても同様の結果が予測される。</p> <p>4) 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性</p> <p>REIC/Dkk-3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、治療後尿中ならびに血液中のアデノウイルスベクターの存在がないことを確認するまで個室管理とし、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。詳細な取り扱い規定等に関しては別途第一種使用規定の国への申請を行う予定である。</p> <p>5) 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点</p> <p>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。</p> <p>6) がん原性の有無</p> <p>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</p>
-------------------	--

	<p>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型を含む群では発がん性は示されていない。アデノウイルス5型は幼児期の「かぜ」の原因ウイルスの一つであり、ヒトにおいても感染による悪性腫瘍の発生は報告がない。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、げっ歯類におけるがん化に関与しているとされるE1領域をREIC/Dkk-3遺伝子発現ウイルスベクターにおいては欠損させてあり、がん原性はないと考えられる。</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p>培養悪性胸膜中皮腫細胞ならびに実験動物を用いた遺伝子治療基礎実験において、REIC/Dkk-3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、今回用いる予定であるREIC/Dkk-3遺伝子発現アデノウイルスベクターは、桃太郎源株式会社が製造委託した、米国ペイラー医科大学で作製され、同社より直接岡山大学に供給される。</p> <p>岡山大学ではすでに前立腺がん・肺がんに対する遺伝子治療臨床研究が所定の審査を通過して（肺がん：非小細胞肺がんに対する正常型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、前立腺がん：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ビルを用いた遺伝子治療臨床研究、前立腺がんに対するInterleukin-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臨床研究）、既に研究が実施されている。また前立腺がんに対するREIC/Dkk-3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臨床研究についてはすでに所定の審査を経て実施承認（平成23年1月6日付け厚生労働大臣意見書発出）を得ている（平成23年1月25日第一例目実施）。平成25年7月の段階で20例の治療が実施され主要エンドポイントであるAd-REICを用いた遺伝子治療臨床研究の安全性については、現時点での確認が為された状況にある。</p> <p>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、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、病院側の受け入れ態勢は整備されている。また、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、平成15年度からは岡山大学病院内に遺伝子・細胞治療センターが、平成22年からは、新医療研究開発センターが設置され稼動しており、当該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。また種々の先端的解析はREIC/Dkk-3の開発研究を担当したナノバイオ標的医療イノベーションセンター：ICONTE（科学技術振興調整費：平成18～平成21先端融合領域イノベーション創出拠点形成事業にて整備）において実施される体制が確立している。</p> <p>以上の背景から、今回申請する遺伝子治療臨床研究を岡山大学病院で実施することは、十分可能であると判断した。</p>
<p>実施計画</p>	<p>1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画</p> <p>悪性胸膜中皮腫に対する、本遺伝子治療前検査にて選択基準に合致し、除外基準に抵触しないことを明らかにした上で、治療計画にしたがって遺伝子治療を施行する。REIC/Dkk-3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REIC/Dkk-3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、投与量を1.0×10^{11} vpから開始し約3倍ずつ増量し、3.0×10^{12} vpに至る4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、安全・効果評価・適応判定部会における検討結果に従い、症例数を追加して同一用量で検討するか、試験を中止するかを判断する。</p> <p>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。</p> <p>2. 治療実施</p>

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、岡山大学病院にて患者（必要な場合は患者及び代諾者^{注1}）に対し、文書による説明（第1回目）を行い、文書による同意が得られた場合に限り本臨床研究に患者登録し、治療前検査を開始する。

^{注1} 代諾者とは被験者の配偶者、後見人、その他これらに準じる者（成人の子、親、成人の兄弟姉妹など）をさす。

治療前検査にて上述した選択基準に合致、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安全・効果評価・適応判定部会にて適応を評価する。同部会において本臨床研究の適応と判断された場合、岡山大学病院にて患者（必要な場合は患者及び代諾者）に対し、文書による説明（第2回目）を行う。

説明と同意書は、本計画書に添付資料 12-1（悪性胸膜中皮腫遺伝子治療臨床研究のための説明と同意書）として含まれている。同意書は2部作成し、署名又は記名捺印された1部を被験者に手渡し、他の1部を診療記録とともに保存する。

文書による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。

- 1) 投与当日、岡山大学病院北病棟5階新医療研究開発センター・探索的医薬品開発室に-80℃で凍結保管してある REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター液を封入しているポリプロピレン製クリオチューブを同施設内安全キャビネット内へ移動、溶液を融解する。
- 2) REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター液を専用のキャリアバック内に厳重に封入して、保冷下で岡山大学病院中央放射線部 CT室に搬入する。
- 3) 各症例に対し、以下の方法にてアデノウイルスベクターを注入する。
- 4) 岡山大学病院中央放射線部 CT室にて、原則として局所麻酔を施行し、CTガイド下に、REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター液を、胸水貯留を認める胸腔中、または評価可能な1病変部に注入する。ウイルスベクター液の注入量は胸水中（胸腔）へは50ml、病変部には1-2mlとする。胸腔内注入の際は胸腔内にカテーテルチューブを挿入し、可能な限り胸水を排出したのち注入する。
注入後の岡山大学病院中央放射線部 CT室内の消毒、清掃は専門業者（医療関連サービスマーク認定）に依頼する。その後、プロトコルを遵守して安全性並びに治療効果の評価を行う。投与から4週後に臨床症状、検査及び病変部の総合評価を行う。

3. 安全性および有効性の評価

以下に示すタイムスケジュールにて安全性および有効性の評価に関する検査を行う。

細胞性・体液性免疫反応に関する解析については、先行する前立腺がん遺伝子治療臨床研究の結果を反映し解析項目・スケジュールを最終的に確定する予定である。

4. 本臨床研究による治療終了（最終投与から4週後をさす）後、患者のフォローアップとして岡山大学病院において投与後60ヶ月まで追跡調査をする。

安全性の評価及び効果の判定に関する検査項目並びにタイムスケジュール

項目	登録時	投与前	投与初日	7日後	2週後	3週後	4週後	治療終了後 (4週毎)	1年後
理学所見	○	← 毎日 →				○	○		○
Vital Signs	○	○	← 毎日 →			○	○	○	○
PS	○	○	← 毎日 →			○	○	○	○
血液・生化学検査 (血液、尿、胸水)	○	○	2日毎		○	○	○		○
心電図	○			○			○		○
胸部X線	○						○	○	○
胸部CT	○	○		○	○		○	○	○
PET-CT	○						○		○
アデノウイルス中和抗体 (血液、胸水)		○	2日毎		○		○		○
アデノウイルスベクター の測定		○	2日毎		○	○	○		○
バイオマーカー		○					○		
細胞性・体液性免疫反応		○			○	○	○		
腫瘍におけるREIC/Dkk-3 発現の確認 (可能な場合)							△		

5. 選択基準

症例の選択に際し、次の項目に該当する被験者を対象とする。

- 1) 病理学的に悪性胸膜中皮腫であることが確認されている患者（組織型は問わない）
 - 2) 悪性胸膜中皮腫に対してペメトレキセドを含む全身化学療法による治療を受けたことのある患者。治療レジメンは問わない。
- 最終投与日から症例登録申請まで 3 週間以上が経過しており、その有害事象の影響を持ち越していないこと
- 3) 悪性胸膜中皮腫に対する全身化学療法に対して過敏症等があり、化学療法による治療を受けることが出来ない患者
 - 4) 悪性胸膜中皮腫に対する全身化学療法あるいは手術による治療を拒否する患者
 - 5) 症例登録申請時点で根治目的の手術の適応とならない患者
 - 6) 画像診断により同定可能な腫瘍性病変を有している患者
 - 7) 同意取得時点の年齢が 20 歳以上 75 歳未満の患者
 - 8) Performance Status (ECOG PS score を用いる) : 0~1 の患者
 - 9) 症例登録申請前に放射線療法が施行されている場合は、造血能を有する骨の 25% 以内の照射であり、放射線療法終了日から症例登録申請まで 21 日以上が経過しており、かつ当該治療の効果や有害事象の影響を持ち越していないこと
 - 10) 悪性胸膜中皮腫に対する根治手術以外の外科療法が施行された場合は、手術日から症例登録申請まで 21 日以上が経過しており、その有害事象の影響を持ち越していないこと。但し、検査のための開胸や開腹などは、手術の影響がなく安全性の確保など被験者の本試験への参加に問題がないと研究担当医師が判断した場合は、手術日から症例登録申請まで 7 日以上経過していれば登録可能とする。
 - 11) 主要臓器の機能が保持されている患者で、治療開始時の臨床検査が以下の基準を満たす症例（登録前 14 日以内のデータとする。登録日を day1 とし、2 週前の同一曜日は可とする）
 - ・ヘモグロビン量：9.0g/dL 以上
 - ・白血球数：3,000/mm³ 以上もしくは 好中球数：2,000/mm³ 以上
 - ・血小板数：10 万/mm³ 以上
 - ・AST (GOT) 及び ALT (GPT) : 各実施医療機関の基準値上限の 2.5 倍以下
 - ・総ビリルビン：各実施医療機関の基準値上限の 1.5 倍以下
 - ・血清クレアチニン：1.5mg/dL 未満
 - ・大気吸入下での SpO₂ (又は PaO₂) : 92% 以上 (PaO₂ : 60mmHg 以上)

	<p>・心電図：正常（異常所見が認められた場合については、研究担当医師が被験者の安全性に問題ないと判断した場合は登録可能とする）</p> <p>12) 症例登録日から少なくとも12週以上の生存が期待できる患者</p> <p>13) 本人から文書による同意が得られている患者</p> <p>6. 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。</p> <p>1) 重度又はコントロールが困難な全身疾患の合併を有する患者</p> <p>2) 活動性感染症を有する患者</p> <p>3) 活動性の重複がんを有する患者</p> <p>4) 有症状の脳転移がある患者又は治療を必要とする脳転移がある患者</p> <p>5) 胸部単純X線にて、明らかな間質性肺炎、肺線維症を有する患者</p> <p>6) 胸膜肺全摘手術施行後に再発した悪性胸膜中皮腫患者</p> <p>7) CT上、治療を必要とする心嚢水を有する患者</p> <p>8) Adenovirus に対する血中中和抗体価が1:1000を超える患者</p> <p>9) 同意取得前の4週以内に未承認薬又は治験薬を投与された患者</p> <p>10) 妊婦、授乳中又は妊娠している可能性のある女性、又は避妊する意思のない患者</p> <p>11) 生殖能力を有する男性又は女性の場合、同意取得日から本剤の最終投与後90日間、医学的に容認されている避妊法を使用できない患者</p> <p>12) その他、研究担当医師が本試験の対象として不適当と判断した患者</p> <p>7. 被験者の同意の取得方法 悪性胸膜中皮腫に関し、その病態、現在適用可能な治療法が限定されること、本臨床研究の理論的背景、動物実験の成績、安全性に関する成績について、患者本人（必要に応じて患者本人及び代諾者）に説明し、十分な理解を得た上で、自由な意思で本臨床研究の被験者となることについて文書による同意を得る。同意の取得は、患者登録時、及び全身検索が終了し、安全・効果評価・適応判定部会が適応可能と判定した後の計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（必要に応じて被験者及び代諾者）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。</p> <p>8. 実施期間および目標症例数 本臨床研究の実施期間は了承が得られた時点から2年間とする。目標症例数は原則として、15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24例とする。</p>
備 考	<p>被験者の同意取得について：被験者は本臨床研究について、文書に基づいて説明を受け、その内容と期待される治療効果及び危険性を十分に理解し、自主的に同意をした上で、同意書に署名するものとする。なお、同意後も被験者からの申し出により同意を撤回し、本臨床研究への参加をいつでも中止することができるものである。</p> <p>個人情報については、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」、「国立大学法人岡山大学病院の保有する個人情報の適切な管理のための措置に関する規程」に沿って適切な取り扱いを行うものとする。</p>

添付書類 12-1

悪性胸膜中皮腫遺伝子治療臨床研究のための
説明文書と同意書

目次

説明文書

1.	はじめに	2
2.	臨床研究について	2
3.	悪性胸膜中皮腫について	2
4.	遺伝子治療臨床研究の概要について	4
5.	アデノウイルスベクターについて	4
6.	臨床研究の目的について	5
7.	臨床研究の進め方について	6
8.	適応判定について	8
9.	遺伝子治療の方法とスケジュールについて	8
10.	期待される治療効果について	11
11.	安全性と副作用について	11
12.	遺伝子治療臨床研究に関わる有害事象が生じた場合について	12
13.	遺伝子治療の現状について	13
14.	患者さんの権利と義務と注意点について	16
15.	治療に関わる諸経費について	17
16.	遺伝子治療臨床研究の実施に必要な手続きについて	17
17.	同意の撤回について	18
18.	同意撤回後の資料の取り扱いについて	18
19.	個人情報の保護について	18
20.	緊急連絡先と質問の問い合わせ先について	19
21.	遺伝子治療臨床研究の正式名称と実施組織体制	19
	悪性胸膜中皮腫遺伝子治療臨床研究に関する同意書	21
	悪性胸膜中皮腫遺伝子治療臨床研究に関する同意撤回書	23

説 明 文 書

1. はじめに

私たちのからだ中の細胞は、私たちのからだ中に組み込まれている遺伝子の命令で作られ、いろいろな役割を果たしています。

現在私たちは、人の正常な細胞には存在するけれども、がん(腫瘍)の細胞には存在しない遺伝子を、からだの外から腫瘍の細胞に入れて、その遺伝子の働きで腫瘍細胞が増えることを抑えたり、腫瘍細胞を死滅させたりすることにより、腫瘍を治療するという「遺伝子治療」を考えています。しかし、この遺伝子治療はまだ研究中で、どのような患者さんに、どのくらい効き目があるか、どのような好ましくない症状が現れるかはわかっていません。

そこで今回、悪性胸膜中皮腫の患者さんのなかで、参加することに同意いただける患者さんを対象に、この遺伝子治療の研究(以下「臨床研究」と略します)を計画しました。これから、この臨床研究で行われる悪性胸膜中皮腫の遺伝子治療の仕組み、期待される効果や安全性、予想される副作用などについて説明しますので、この臨床研究に参加して遺伝子治療を受けられるかどうかをご検討ください。

この臨床研究に参加される方の人権を守るため、この臨床研究への参加は、あくまでもあなたの自主性に基づいた自由意思によるものです。この文書に基づいて担当の医師が詳しく、また、わからないことがあれば何度でも説明いたしますとともに、次の二つの事項を約束いたします。

- ① 臨床研究に参加することを私たちがお勧めして、あなたが拒否された場合も、今後の治療に不利益を受けることは一切ないこと。
- ② 臨床研究に参加することを同意した後や臨床研究が開始されてからでも、研究参加の同意を撤回することができること。

2. 臨床研究について

臨床研究とは、新しい薬や治療法などの有効性や安全性を調べるため、人間を対象として行われる試験的な研究のことです。広く患者さんに受けられるようにするためには、何段階もの臨床研究を行い、安全性に問題がないか、そして治療効果があるかについて科学的に評価することが必要になります。悪性胸膜中皮腫の遺伝子治療に限らず、遺伝子治療に関する臨床研究はまだ研究段階です。患者さんに本当に効果があるかどうか、安全かどうか、わからないところもたくさんあります。

今回、あなたに紹介する臨床研究では、安全性を調べるのが主な目的ですが、同時に、可能な範囲で治療の効果も調べる予定です。

3. 悪性胸膜中皮腫について

悪性胸膜中皮腫は、胸膜(胸腔や肺の表面を覆っている薄い組織層)から悪性の細

胞（腫瘍）が発生してくる疾患で、限局期と進行期に分類されます。

1) 限局期の悪性胸膜中皮腫（Ⅰ期）

限局期の悪性胸膜中皮腫の場合、胸壁の内側を覆う組織に腫瘍が認められ、さらに肺の表面や横隔膜の表面、または心嚢（心臓を包む袋状の組織）の表面（左右で分けて腫瘍が存在する方のみ）に腫瘍が拡がっていることもあります。

2) 進行期の悪性胸膜中皮腫（Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期）

進行期の悪性胸膜中皮腫には、Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期の悪性胸膜中皮腫が含まれます。

・Ⅱ期では、胸壁の内側を覆う組織と、胸部の同側のリンパ節に腫瘍が認められます。さらに肺の表面、横隔膜の表面、または心嚢（心臓を包む袋状の組織）の表面（左右で分けて腫瘍が存在する方のみ）に腫瘍が拡がっていることもあります。

・Ⅲ期では、腫瘍が次の部位のいずれかに拡がっています。

- 胸壁
- 縦隔
- 心臓
- 横隔膜を越えた領域
- 腹膜

さらに、腫瘍とは反対側にある胸部のリンパ節か胸部以外のリンパ節に腫瘍が転移していることもあります。

・Ⅳ期では、遠く離れた臓器または組織に腫瘍が転移しています。

この他に、治療後に再び発生（再発）した再発悪性胸膜中皮腫があり、再発は胸部や腹部に起こることもあれば、体の別の部位に起こることもあります。

悪性胸膜中皮腫を発症する人の多くは、アスベストを吸入したり飲み込んだりすることの多い環境で勤務または生活していた経験をもっています。しかし、アスベストに曝された後も、実際に悪性胸膜中皮腫を発症するまでには通常長い潜伏期間があります。

悪性胸膜中皮腫の危険因子としては、この他に次のようなものがあります。

- ・アスベストの存在する環境で勤務している人と生活をともにしていること
- ・特定のウイルスに感染していること

悪性胸膜中皮腫の徴候として考えられるものには、次の症状が見られます。

- ・呼吸障害
- ・肋骨の奥の痛み
- ・腹部の痛みや腫れ
- ・腹部のしこり
- ・原因不明の体重減少

また、次のような要因が予後（回復の見込み）や治療法の選択に影響を及ぼします。

- ・腫瘍の病期
- ・腫瘍の大きさ
- ・手術によって腫瘍を完全に摘出できるかどうか
- ・胸腔内または腹腔内に溜まった液体の量
- ・患者さんの年齢と健康状態（特に肺と心臓の状態）
- ・中皮腫細胞の種類と顕微鏡で観察したときの外観
- ・新たに診断された腫瘍か、再発した腫瘍か。

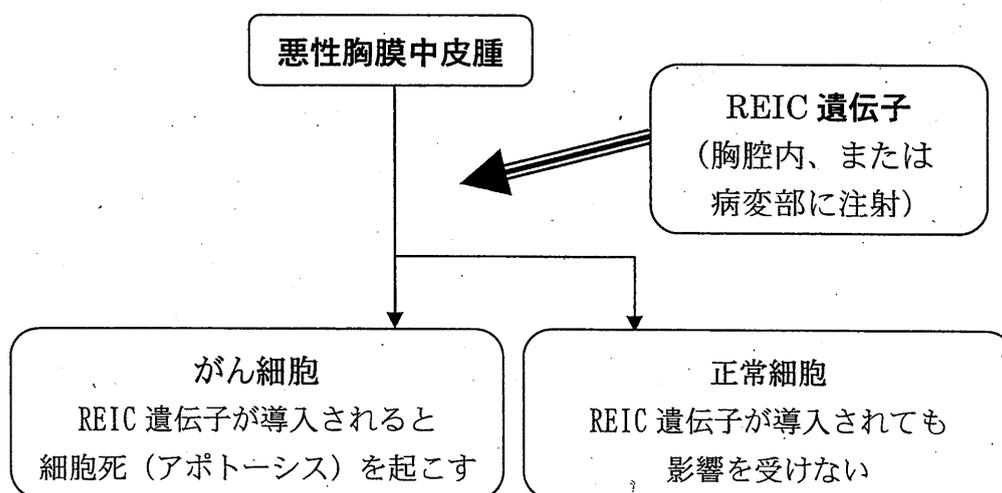
4. 遺伝子治療臨床研究の概要について

岡山大学では、2000年（平成12年）に REIC 遺伝子という新しい遺伝子を発見しました。この遺伝子を詳しく調べてゆくと、この遺伝子はがん抑制遺伝子という遺伝子の一種であり、腫瘍細胞の中で発現させる（作り出させる）と、その腫瘍細胞が死滅（アポトーシス）することがわかりました。このアポトーシスの誘導作用（導き出す作用）は、腫瘍細胞でだけ起こり、正常細胞は影響を受けないこともわかってきました。つまり、化学療法剤のような強い副作用を起こすことなく、腫瘍を治癒させることが期待されます。さらに、このような腫瘍細胞だけを死滅させる作用に加え、腫瘍に対する免疫力を高めて腫瘍を治癒に向かわせる免疫誘導能を持っていることも明らかになっています。

そこで、今回計画している遺伝子治療では、この REIC 遺伝子をアデノウイルスベクターという運び屋を使って悪性胸膜中皮腫細胞の中に運んで（入れて）、悪性胸膜中皮腫細胞だけをアポトーシスに陥れさせる（細胞死させる）ことを期待しています。

このように、病変部（今回の試験では胸腔内にも）に REIC 遺伝子を直接投与する方法は、血管内に投与する方法に比べて安全性が高いことが予想されます。

図1 REIC 遺伝子導入による抗腫瘍効果の説明



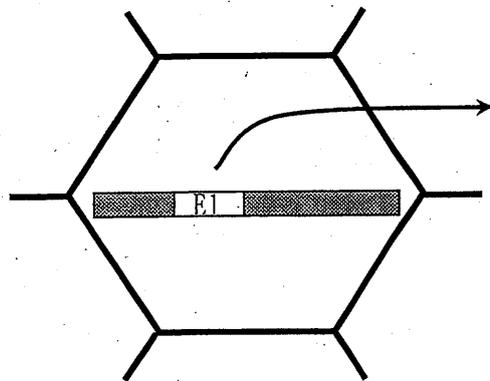
5. アデノウイルスベクターについて

遺伝子を細胞の中に入れるため、その運び屋（ベクター）としてウイルスを使いますが、今回の試験では、このベクターとしてアデノウイルスを使います。

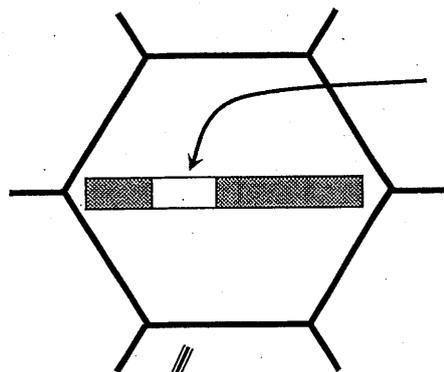
アデノウイルスは、幼児の「かぜ」を起こすウイルスの一つですが、今回の試験では、身体の中で増えることができないように処理をし、このアデノウイルスベクターに REIC 遺伝子を組み込んで注射します。すると、アデノウイルスベクターが、腫瘍細胞に感染し、腫瘍細胞の中で REIC 遺伝子が発現し、腫瘍細胞が死滅します。

一方、腫瘍細胞に感染したアデノウイルスベクターは、約 2 週間で細胞の中から消えてしまい、新しいウイルスを作り出すことはありません。

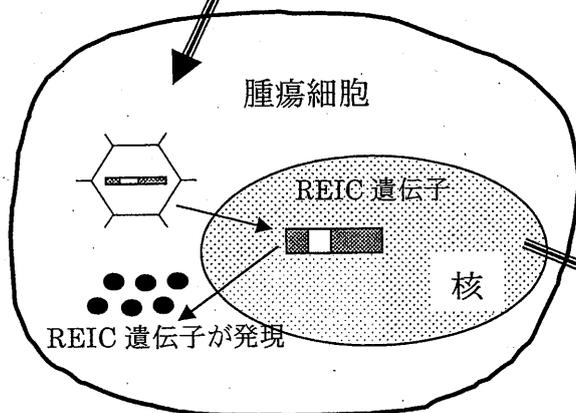
図2 アデノウイルスベクター・システムの説明



a) 自然のアデノウイルス（野生型のアデノウイルス）は、幼児の「かぜ」を起こすウイルスの一つですが、遺伝子治療に用いるアデノウイルスベクターではウイルスが身体の中で増えることができないよう、予め増殖に関する遺伝子 (E1) を取り除いておきます。この処置は、治療用のウイルス（ベクター）を作製する段階で行います。



b) この身体の中で増えることができないようにしたアデノウイルスベクターに REIC 遺伝子を組み込みます。



c) このアデノウイルスベクターが、腫瘍細胞に感染し、取り込まれた REIC 遺伝子が発現します。

腫瘍細胞が、細胞死（アポトーシス）を起こす。

6. 臨床研究の目的について

これまでの細胞や動物を使った研究によって、REIC 遺伝子による遺伝子治療は、腫瘍細胞だけが細胞死（アポトーシス）し、正常細胞は影響を受けないことが明らかになりました。マウスを使った動物実験では、胸膜に移植された悪性胸膜中皮腫に対して治療効果を示すだけでなく、肺やリンパ節への転移を抑える全身的な効果があることも明らかになっています。

また、安全性を評価するため、アデノウイルスベクターをマウス胸腔内に投与してその広がり解析した動物実験では、全身的な広がり認められず、解剖学的に隣接する臓器だけにアデノウイルスベクターが認められました。

このような実験の結果から、実際の患者さんの治療にも安全で効果があるという合理的な見通しが成り立つものと考えています。そこでいよいよ実際の患者さんについて、その効果と安全性を確かめる段階となりました。

今回の臨床研究の目的は、この REIC 遺伝子を持つアデノウイルスベクターを患者さんに投与した場合、副作用をおこすことなく投与できるかどうか、また患者さんの腫瘍が縮小したり増殖が止まったりするかどうかを明らかにすることにあります。

私たちは、この臨床研究に参加していただく患者さんの悪性胸膜中皮腫の病変部が小さくなったり、増殖が止まったりすることを期待していますが、今回の臨床試験の主な目的は、REIC 遺伝子を持つアデノウイルスベクターを患者さんに投与した場合の安全性を確認することにあります。

そのため、投与するアデノウイルスベクターは低い用量から開始しますので、治療効果を発揮するためには用量が低すぎることも予測され、腫瘍が縮小したり増殖が止まったりする臨床効果がみられないことも想定されますし、臨床効果が認められないにもかかわらず副作用が出現する可能性もあることをご理解ください。

7. 臨床研究の進め方について

この臨床研究では、REIC 遺伝子を持つアデノウイルスベクターを投与した場合の人体での安全性と治療効果を確認するため、投与量を段階的に増やしながら注進めます。

まず、3人の患者さんに 1×10^{11} vp のアデノウイルスベクターを投与して、副作用と腫瘍に対する効果の有無を調べます（レベル 1）

vp というのは、viral particle の略で、ウイルスの数を意味しています。

レベル 1 の治療で重い副作用が認められなければ、次の 3人の患者さんに約 3 倍増量したアデノウイルスベクター (3×10^{11} vp) を投与します（レベル 2）。

レベル 2 の治療でも重い副作用が認められない場合には、さらに約 3 倍増量したアデノウイルスベクター (1×10^{12} vp) を投与します（レベル 3）。

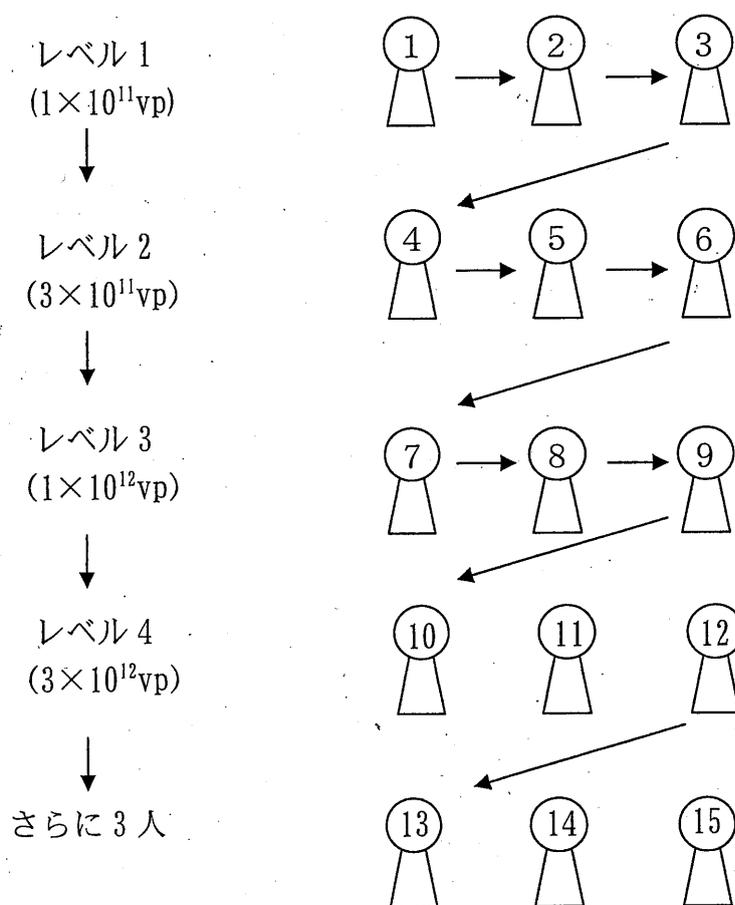
レベル 3 の治療でも重い副作用が認められない場合には、さらに約 3 倍増量したアデノウイルスベクター (3×10^{12} vp) を投与します（レベル 4）。

レベル4の投与量が今回の試験の最大投与量になります。このレベル4の治療でも重い副作用が認められなければ、同じ投与量 (3×10^{12} vp) での安全性と治療効果を確認するため、さらに3人の患者さんに投与します。

このように、研究が計画通りに進めば、合計15人の患者さんでこの臨床研究が終了します。この進め方の理解を助けるために、次の図3に計画の概要を示しました。

ただし、この臨床研究の途中で重い副作用が認められたときは投与を中止し、副作用に対する治療に努めます。その場合、安全に投与できる最大投与量を決定するために、そのレベルでの患者さんの数を増やしてさらに検討を続けます。

図3 臨床研究の進め方



あなたに予定されているペクターの投与量はレベル () であり、 () vp となります。

この臨床研究の進め方と現在の進行状況について十分に説明を受けて、納得されたうえで同意するか否かの判断をしてください。

8. 適応判定について

この臨床研究の対象となるのは、①ペメトレキセドを含む全身化学療法による治療

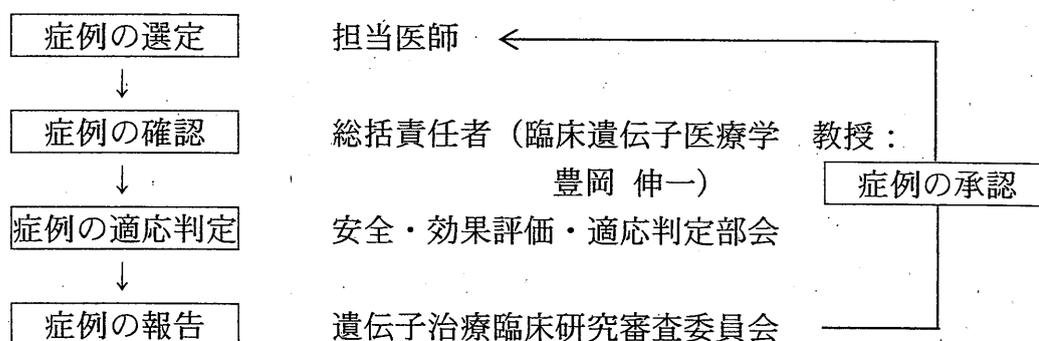
を受けたことがある悪性胸膜中皮腫の患者さん、または ②化学療法や手術による治療を受けることができないか、これらの治療を受けたくない患者さんのうち、根治目的の手術の適応とならない（手術では完全に治療することができない）と考えられる悪性胸膜中皮腫の患者さん、です。すでに前にも記載しましたように、今回の REIC 遺伝子による治療は胸水や胸膜局所だけでなく、転移巣にも効果があると考えられます。

担当医師により、あなたの病状が、この臨床研究に適している判断された場合、あなたの病歴、全身状態を含めた検査結果が岡山大学病院の遺伝子治療臨床研究審査委員会の中にある安全・効果評価・適応判定部会に提出されます（図4）。この部会で、あなたが遺伝子治療を受けるに適切であると判断され、そしてあなたが同意書に署名して遺伝子治療を受けることに同意されますと、治療が開始されます。

なお、研究に参加いただける患者さんの、その他の医学的な条件には次のようなものがあります。

- ①悪性胸膜中皮腫に対してペメトレキセドを含む全身化学療法による治療を受けたことがあり、化学療法剤の最終投与日から症例登録申請まで3週間以上が経過しており、その有害事象（この試験の前に受けていた治療による副作用など）の影響を持ち越していないこと。
- ②悪性胸膜中皮腫に対する全身化学療法に対して過敏症等があり、化学療法による治療を受けることができないこと。
- ③画像診断により測定可能な病変が観察されること。
- ④同意取得時点の年齢が20歳以上75歳未満であること。
- ⑤骨髄機能、肝機能、腎機能、心機能、肺機能に重い障害がないこと。

図4 適応判定の過程の流れ



9. 遺伝子治療の方法とスケジュールについて

1) 遺伝子の導入

アデノウイルスベクターの注入は、岡山大学病院総合診療棟コンピューター断層撮影（CT）室で局所麻酔を行い、CT ガイド下に行います。胸水が溜まっている胸腔に注入する場合は、胸腔チューブを留置し、はじめに貯留している胸水を可能な限り体外に排出します。続いて50mlのアデノウイルスベクターをチューブから胸腔内に注入します。胸膜の腫瘍部に直接注入する場合は、1つの腫瘍に対してのみアデノウイルスベクターを1-2ml注入します。なお、胸腔内注入量と腫瘍内注入量

は液体の量としては違いますが、溶けているウイルスの数は同じです。胸腔チューブは注入後、胸水が増加することが考えられるため、原則として注入後7日間は留置したままとします。その後、問題がないようでしたら抜去します。また、感染症予防のため、治療後3日間、抗生剤を投与します。

2) 遺伝子導入後の管理

遺伝子を注入したあと、原則として個室に入院していただきます。これは、遺伝子の運び屋であるウイルスベクターが尿などに混ざって体外に排出され、それが他の人に感染することを防ぐためです。血液や尿の中にベクターが混ざらなくなったことを検査によって確認した後は、自由に病室の出入りができるようになります（遺伝子を注射したあとおよそ数日間と考えています）。

3) 遺伝子導入後の総合評価

アデノウイルスベクターの注射後4週間、副作用の有無の調査と治療効果の評価を行い、治療を終了した4週後に、安全・効果評価・適応判定部会において臨床症状、検査結果および病変部の総合評価を行います。

4) アデノウイルスベクター注入後のスケジュール

アデノウイルスベクター注入後は、副作用とベクターの体内での濃度を調べる必要があります、2日毎に採血を行います。ベクター注入後、血液中にアデノウイルスベクターが検出されなくなるまで、また、胸腔内にチューブが入っている場合は排泄胸水にアデノウイルスベクターが検出されなくなるまで個室隔離とし、専用の着衣の着用が義務づけられます。また、排泄物、着衣や病室内についても消毒等を行います。

アデノウイルスベクターを注射した後に、組織検査、コンピューター断層撮影(CT)、PET-CT撮影などによって治療効果を判定します。

入院の期間については治療中の健康状態、お住まいのご住所などにより適宜相談し判断させていただきますが、遺伝子を注入して少なくとも一週間は入院していただきます。なお、担当医師が医学的に可能と判断し、同意がいただけた場合、治療効果を判定するため、治療前と治療をはじめて4週以降に胸水を、腫瘍が存在している場合には、胸水採取または投与部位の生検を行って、腫瘍細胞の有無、変化などを調べます。

以下に検査の項目とスケジュールを示しており、採血させていただく血液の量は、一回あたり概ね20~30mlです。

安全性の評価及び効果の判定に関する検査項目並びにタイムスケジュール

項目	登録時	投与前	投与初日	7日後	2週後	3週後	4週後	治療終了後 (4週毎)	1年後
理学所見	○	← 毎日 →				○	○	○	○
血液・生化学検査 (血液、尿、胸水)	○	○	2日毎		○	○	○		○
心電図	○			○			○		○
胸部X線	○						○	○	○
胸部CT	○	○		○	○		○	○	○
PET-CT	○						○		○
アデノウイルス中和抗体 (血液、胸水)		○	2日毎		○		○		○
アデノウイルスベクター の測定		○	2日毎		○	○	○		○
バイオマーカー		○					○		
細胞性・体液性免疫反応		○			○	○	○		
腫瘍におけるREIC/Dkk-3 発現の確認 (可能な場合)							△		

5) 退院後のスケジュール

この臨床研究が終了後、岡山大学病院では少なくとも投与後 60 ヶ月の追跡調査を行う予定であることをご承知ください。これは、遺伝子治療の長期にわたる安全性がまだ確立していないことから、試験終了後に問題が生じることがないかを追跡するためです。検査の内容、時期については今まで受けてこられた血液検査、画像検査、組織検査を先ほどのスケジュールに沿って行います。

6) 治療の継続について

4 週時点で治療効果によって病状の悪化が認められず、病状が改善もしくは不変と判定された場合、治療を続行することが可能です。この効果判定は、病勢の判定に役立つと考えられている腫瘍マーカーである Mesothelin と VEGF の値の変化、CT による画像検査などで判定します。Mesothelin や VEGF の値が治療前に比べて上昇していないか、あるいは画像検査によって病変部が増大しておらず、新病変も認めない場合がこれに該当します。

追加投与について患者さんの了解が得られた場合、担当医師および総括責任者は 4 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します。この部会で、追加投与について適格性を科学的、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します。追加投与回数の上限はありませんが、安全性の問題や患者さんから中止の申し出があった場合には投与を中止します。

なお、遺伝子治療継続中に、同じ患者さんに投与するアデノウイルスベクターの量を増量することはできません。遺伝子治療後、継続治療を行わず外来で経過観察されている状態で、再び本臨床研究を受ける希望がある場合も、二重登録とみなされる

ため、お受けできないことをご了承ください。

10. 期待される治療効果について

具体的な効果としては、腫瘍の退縮および増大の停止、腫瘍マーカーである Mesothelin や VEGF の値が下降したり、上昇が止まること。症状に関しては、胸水の貯留量が減少することによる呼吸困難の改善、腫瘍の退縮に伴う痛みの軽減などが考えられます。さらに、これらの効果が長期にわたって保たれ、長期の生存が得られることがあります。

11. 安全性と副作用について

1) REIC 遺伝子の安全性

REIC 遺伝子は、ヒトの正常細胞では普通に機能している遺伝子で、治療の目的では岡山大学で、前立腺がんの患者さんで試験が始まっています。現在（平成 25 年 7 月末）、20 名に投与が終わっていますが、現在のところ重篤な副作用は認められていません。

なお、マウスを用いて REIC 遺伝子を投与する実験を繰り返しましたが、いずれのマウスにも重い副作用は生じませんでした。また、REIC 遺伝子は腫瘍細胞を死滅させますが、正常細胞には REIC 遺伝子が存在しており、正常細胞に REIC 遺伝子を作用させてもほとんど影響を与えないことを確認しています。

2) アデノウイルスベクターの安全性

REIC 遺伝子を腫瘍細胞の中に入れるために、ウイルスを遺伝子の運び屋（ベクター）として用います。私たちはこの目的のためにアデノウイルスをベクターとして使います。アデノウイルスは、ありふれた「かぜ」症状を起こすウイルスの一つですが、投与された身体の中で増えることができないように、ウイルスの一部を取り除く操作を行っています。しかし、高濃度のアデノウイルスベクターを製造する場合、現在の技術では増殖する能力のあるアデノウイルスを完全に除くことは非常に難しいのが現実です。

今回の試験で使用する REIC 遺伝子を持つアデノウイルスベクターは、米国のペイラー医科大学によって製造・検査され、米国食品医薬品庁（FDA）によって、野生型アデノウイルスの混入の可能性も含めて、ヒトへの使用が許可されたものです。先にも述べたようにアデノウイルスは、ありふれた「かぜ」症状を起こすウイルスなので、たとえ増殖可能なアデノウイルスが存在しても、重い副作用には結びつかないと考えています。

しかし、1999 年 9 月に米国でアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療で患者さんが死亡しました。この原因は、肝臓の血管内に高濃度のベクターを注入したために引き起こされたと考えられています。米国ペイラー医科大学で行われた、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子（「自殺遺伝子」と呼ばれ、がん細胞自らを死に至らしめる自殺機能を有しています）が組み込まれたアデノウイルスベクターを用いた前立腺がんの遺伝子治療では、1 例で肝機能障害が認められました。

また、投与患者さんの20%に一時的な発熱などの副作用が認められています。

肝機能障害が認められた症例では、アデノウイルスベクターを注入する針が前立腺から外れて周囲の静脈に入り、血液内にベクターが流れ込んだ疑いがあります。このため、私たちは血管内に誤って投与することなく確実に胸腔内あるいは病変部への注入ができるような装置を使用します。すでに私たちは、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを使って、前立腺に直接投与する遺伝子治療臨床研究を同様の装置を使用して実施しました。この試験では、重い副作用は起こらず、アデノウイルスベクターを前立腺内に確実に投与できることを確認しています。

3) アデノウイルスベクターの投与方法による副作用

アデノウイルスベクター液は、前に述べましたように、胸腔内注入の場合は胸腔チューブを留置して注入し、胸膜の腫瘍性病変に対しては、直接一時的に針を刺して注入します。穿刺(針を刺すこと)やチューブの留置による出血、感染などの合併症が考えられますが、通常は軽度のもので一時的に起こるだけで、治療により軽快します。緊急処置を必要とするような激しい出血は非常にまれですが、万一このようなことが起こった場合には適切に処置をいたします。また、感染を予防するために抗菌薬を使用します。抗菌薬の使用によって発疹などのアレルギー反応が生じることがありますが、点滴ならびに抗アレルギー薬によって改善します。麻酔は局所麻酔で行います。局所麻酔後に、のどの違和感などの副作用が起きる可能性がありますが、多くの場合、時間とともに軽快していきます。

以上が予測される副作用ですが、遺伝子治療臨床研究はまだごく限られた患者さんにしか行われていないため、予想されない問題が起こるかも知れません。あなたの病状については、本臨床研究の担当医師以外に、安全・効果評価・適応判定部会の複数の委員が監視する仕組みになっています。もちろん、予測されなかった事態が生じた時には、私たちは全力でそれに対処しますが、治療を中止する場合もあることを、予めご理解いただきたいと思います。その際は、事前あるいは事後に十分に説明させていただきます。

12. 遺伝子治療臨床研究に関わる有害事象(副作用など)が生じた場合について

臨床研究の期間中および終了後にあなたが身体の異常に気づかれたときは、担当医師や看護師にすぐに申し出てください。専門の医師が直ちに適切な処置を行います。このような自覚症状がなくても、遺伝子治療による何らかの有害事象が発見された場合には、まずあなたにお知らせし、その上で適切な治療を行います。岡山大学病院は、本臨床研究による治療が原因で生じたどのような身体的な障害に対しても、十分な医療的処置を提供します。また本臨床研究による治療が原因で生じたどのような有害事象に対しても、その治療に対して全額負担いたします。

ただし、通院、入院、社会的問題などによる臨床研究期間中の減収や不快感などの精神的または肉体的な不利益に対する補償をすることはできません。

13. 遺伝子治療の現状について

1) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療

今回の遺伝子治療ではアデノウイルスベクターを用います。岡山大学では前立腺癌を中心にアデノウイルスベクターに関する安全性を中心とした多くの情報を有していますので説明いたします。

まず、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子が組み込まれているアデノウイルスベクターと抗ウイルス剤であるガンシクロビルを用いた前立腺がんの遺伝子治療臨床試験（臨床第1相試験）は、米国ベイラー医科大学で1996年8月から開始され、1998年4月に終了しました。放射線治療後再燃してきて臨床的に遠隔転移を認めない局所再燃前立腺がんを対象として、18人の前立腺がん患者さんに治療が行われ、安全性に関するいくつかの情報が得られています。また、内分泌治療に反応しなくなった遠隔転移を含む再燃前立腺がんを対象として、インターロイキン12（免疫機能を活性化するタンパク質の一種）遺伝子を持つアデノウイルスベクターを用いた前立腺がんに対する遺伝子治療も、同大学で2004年5月より開始されました。2007年6月までに4名の患者さんに遺伝子治療が行われ、重い副作用は認められませんでした。そこで、ここでは単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子が組み込まれているアデノウイルスベクターとガンシクロビルを用いた前立腺がんの遺伝子治療臨床試験に関する情報について述べたいと思います。

ベイラー医科大学から米国食品医薬品庁（FDA）に提出された報告ならびに公表された論文によりますと、副作用については17人目までの患者さんにおいて発熱が3名、肝機能障害が3名、静脈注射部位の痛みを伴った腫れ（蜂窩織炎）が1名に認められています。これらの副作用はいずれも軽度のものであり、経過観察を含めた保存的治療で軽快しています。しかし18人目の患者さんにおいて、最高用量である 1×10^{11} IU (infection unit) のウイルスベクターが投与された後に、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、その時点で試験は中止されました。

なお、本患者さんの血小板減少と肝機能障害は可逆的でありガンシクロビル投与開始16日目に正常値に回復しました。上記の18名の患者さんを対象とした臨床研究の結果をもとに、米国食品医薬品庁（FDA）の許可の下、さらに18名の患者さんが $1 \sim 3 \times 10^{10}$ IU のウイルスベクター量にて同様の治療を受けましたが、軽度の発熱ならびにかぜの症状を約20%に認めたものの、重篤な副作用は認められませんでした。

一方、岡山大学では、ベイラー医科大学より提供された単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子が組み込まれているアデノウイルスベクターを用い、内分泌療法中に再燃してきた臨床的に遠隔転移を認めない局所再燃前立腺がんを対象とし、アデノウイルスベクターを単独で腫瘍内に直接投与し、その後抗ウイルス剤であるガンシクロビルを全身投与する臨床研究を行いました。この研究は、2001年3月から第1例目の被験者の治療を開始し、2006年7月に最終登録例である9例目の被験者の治療を行い、6ヶ月以上観察し臨床試験を終了しています（8名のべ9症例）。この9症例すべてにおいて副作用を認めませんでした。治療効果の指標とされる腫瘍マーカーであるPSAは、9例中6例で低下し、安全性と治療効果が確認されました。さらに、岡山大学では、ベイラー医科大学より提供されたインターロイキン12

遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて、内分泌治療に反応しなくなった遠隔転移を含む再燃前立腺がんを対象として、アデノウイルスベクターを単独で前立腺がん病巣、または転移病巣内に直接投与する遺伝子治療臨床研究も 2008 年 5 月から開始しています。現在までに 10 例の治療を行いました。重篤な副作用は生じていません。

今回、私たちが計画している臨床研究では、ベイラー医科大学より提供された REIC 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを使用して治療を行う予定です。前述したように米国食品医薬品庁 (FDA) によって、野生型アデノウイルスの混入の可能性も含めて、ヒトへの使用が許可されたものです。

2) REIC 遺伝子を用いた遺伝子治療について

REIC 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療は岡山大学において前立腺がんの患者さんを対象に行われています。平成 23 年 1 月 25 日に、研究が開始されました。対象となる病状は内分泌療法抵抗性再燃前立腺がん (A 群)、ハイリスク初発限局性前立腺がん (B 群) であり、投与量の量を 4 段階に設定し、REIC 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを投与した際の安全性の確認を主要な目的とし、治療効果の観察をその次の目的とした研究です。平成 25 年 7 月末現在で、20 名に投与が行われ研究が進行中です。現時点では重篤な副作用は認められておりません。研究が終了していない段階で結論的なことは言えませんが、研究の主目的である安全性についてはほぼ確認がなされた状態といえます。また一部の症例では有効性を示す結果が得られています。今回用いる REIC 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターは、現在前立腺がん用に用いている REIC 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターと構造が一部異なったものを用いますが、事前の研究でその安全性ならびに治療効果に差はないものと予想されています。変更するのは遺伝子そのものではなくプロモーターという部分です。現在前立腺がん用に用いているアデノウイルスベクターに何らかの問題があるのではなく、アデノウイルスベクターを作成し我々に供給する施設の変更に伴うものです。

3) 悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療

悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療は、米国とオーストラリアのそれぞれ 1 施設で行われています。国内ではまだ実施されておりません。悪性胸膜中皮腫の患者さんに対して REIC 遺伝子を導入する遺伝子治療は国内外で初めてです。

世界で報告された試験は、ペンシルバニア大学のグループにより 1995 年 11 月から行われました。前立腺がんと同様、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子が組み込まれているアデノウイルスベクターを 1 回、胸腔内に直接投与し、その後抗ウイルス剤であるガンシクロビルを全身投与する方法です。悪性胸膜中皮腫患者に対して、今回の試験と同じように投与するウイルス量を約 3 倍ずつ上げていき、最大投与量を決定する臨床試験です。5.0×10¹³ viral particle (vp: ウイルスの粒子の数) まで投与ウイルス量を増量しましたが、生命を脅かすような重篤な副作用は認められませんでした (一過性のリンパ球減少、肝機能異常、その他ごく軽度の一過性の発熱、低酸素血症、低血圧など)。抗腫瘍効果は、18 例のうち 3 例で画像上

腫瘍の進行が一時抑えられたと判断されました。その後、症例を重ね、合計 34 名の患者に単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子が組み込まれているアデノウイルスベクターが投与されました。生存に関しましては、10 年以上長期生存中の患者さんを 1 名、認めています。

ペンシルベニア大学の同じグループは 2003 年 8 月からインターフェロン - ベータを組み込んだアデノウイルスを、悪性胸水を有する患者さんに 1 回、胸腔内投与を行う臨床第 1 相試験を行いました。悪性胸膜中皮腫 7 名、悪性胸水を伴う非小細胞肺癌 2 名、卵巣癌 1 名が試験に参加しました。投与開始量である 9.0×10^{11} vp では重篤な副作用は認められず、1 段階投与量を上げたウイルス量の 3.0×10^{12} vp では 4 例中 2 例で重篤な低酸素血症、肝機能障害が出現しました。低酸素血症を認めた症例は、併存疾患として慢性心不全を伴っている症例でした。また肝機能障害を伴った症例は、以前、悪性リンパ腫のため腹部に放射線治療を受けている症例でした。直接的な因果関係はあきらかになっておりませんが、このような既往歴のため、副作用が出やすい状態であった可能性があります。なお、この試験では至適ウイルス量として 9.0×10^{11} vp が採用されました。悪性胸膜中皮腫 7 例の治療効果に関しては、投与後 60 日の CT の評価において 4 例で腫瘍の大きさは変わらず、3 例で腫瘍の増大を認めています。PET 検査では 3 例で不変、1 例で明らかな効果を認めています。生存に関しては研究が発表された時点で、生存者は 3 名 (34 ヶ月、32 ヶ月、26 ヶ月) でした。

また、2006 年 9 月からは、インターフェロン - ベータを組み込んだアデノウイルスの繰り返し投与の安全性、有効性を検討する臨床研究が行われました。対象疾患の内訳は、悪性胸膜中皮腫 10 名、悪性胸水を伴う非小細胞肺癌 2 名、卵巣癌 2 名、乳癌 2 名でした。安全性に関しては、ほとんどがアデノウイルス、炎症に関連する予測可能な軽度から中等度の副作用でしたが (リンパ球減少、低アルブミン血症、低血圧、低カルシウム血症、発熱と震え、吐き気、頻脈など)、2 例に予期せぬ副作用が認められました。1 例目は、1 回目の投与後、血液の凝固能に関連する検査値が上昇し、規定上 2 回目の投与ができないう状態となりました。しかしながら、出血、凝固異常も含め、特に副作用はありませんでした。2 例目は、2 回目のウイルスベクター投与後 14 日の間に発症した心タンポナーデ (心嚢に水がたまり、心臓の動きが制限される状態) でした。呼吸困難の増悪、嘔吐の症状があり、心嚢に多量の水が溜まっていました。腫瘍の縮小効果として、悪性胸膜中皮腫 10 例中病変部の大きさが評価可能であった 8 例を検討したところ、投与後 60 日の評価において 2 例で不変、6 例で腫瘍の増大を認めています。生存に関しては、研究が発表された時点で、生存者は 3 名 (42 ヶ月、39 ヶ月、18 ヶ月) 認めています。

ペンシルベニア大学では、2009 年 2 月からインターフェロン - アルファを組み込んだアデノウイルスの繰り返し投与の安全性、有効性を検討する臨床研究が開始されています。重篤な副作用は認めておらず、9 人中 2 人に腫瘍の縮小を認め、4 人で不変、3 人で増大を認めております。また、2010 年 4 月からは同じくインターフェロン - アルファを用いた遺伝子治療に抗がん剤を組み合わせる治療の臨床試験を開始しております。

米国以外では、オーストラリアで遺伝子治療が行われています。西オーストラリア大学の Robinson 教授らは、インターロイキン-2 をワクシニアウイルスベクターに組み込み、12 週間にわたって腫瘍内に直接投与する遺伝子治療を 6 例の患者に行いました。特に重篤な副作用はみられませんでしたでしたが、治療効果としては、臨床的、画像的效果は認められませんでした。

次頁に、米国での悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療について表にまとめています。

研究名	悪性胸膜中皮腫に対する Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk) 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	悪性胸膜中皮腫、悪性胸水を伴う転移性腫瘍に対する Interferon-beta 遺伝子発現アデノウイルスベクター単回投与による遺伝子治療臨床研究	悪性胸膜中皮腫、悪性胸水を伴う転移性腫瘍に対する Interferon-beta 遺伝子発現アデノウイルスベクター反復投与による遺伝子治療臨床研究	胸膜悪性胸膜中皮腫に対する Interferon-Alpha 遺伝子発現アデノウイルスベクター反復投与による遺伝子治療臨床研究	悪性胸膜中皮腫に対する Interferon-Alpha 遺伝子発現アデノウイルスベクターと化学療法による遺伝子治療臨床研究
実施機関	米国ペンシルベニア大学	米国ペンシルベニア大学	米国ペンシルベニア大学	米国ペンシルベニア大学	米国ペンシルベニア大学
実施症例	34 例	10 例(悪性胸膜中皮腫 7 例)	17 例(悪性胸膜中皮腫 10 例)	9 例(12 例予定)	20 例予定
ベクターの種類	アデノウイルスベクター	アデノウイルスベクター	アデノウイルスベクター	アデノウイルスベクター	アデノウイルスベクター
遺伝子	ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ	インターフェロンベータ	インターフェロンベータ	インターフェロン-アルファ	インターフェロン-アルファ
年齢	75 歳未満	18 歳以上 上限なし	18 歳以上 上限なし	18 歳以上 上限なし	18 歳以上 上限なし
注入部位	胸腔	胸腔	胸腔	胸腔	胸腔
投与回数	1 回	1 回	2 回	2 回	2 回
米国での状況	1995 年 11 月に実施	2003 年 4 月に実施	2006 年 3 月に実施	2009 年 2 月から実施中	2010 年 4 月
安全性	死亡例なし	死亡例なし	死亡例なし	確認中	確認中
治療効果 (効果判定は治療後 60 日での評価です)	8 人中 3 人で腫瘍の増殖が停止	7 人中 4 人で腫瘍の増殖が停止	8 人中 2 人で腫瘍の増殖が停止	9 人中 2 人で腫瘍縮小、3 人で増殖が停止	観察中
生存(研究発表時点)	2 名の長期生存者(79, 5, 80 ヶ月)	3 名の生存者(34, 32, 26 ヶ月)	3 名の生存者(42, 39, 18 ヶ月)	観察中	観察中

14. 患者さんの権利と義務と注意点について

人権に関わる重要なことから最初には説明しましたが、念のためにもう一度以下のことを申し上げますので確認してください。

あなたがこの臨床研究に参加されるかどうかは、あなたの自由意思によって決められるもので、決して強制されるものではありません。臨床研究に参加することを断られても、あるいは一度同意した後に、その同意を撤回して治療中止の申し出をされても、その後の治療であなたが何ら不利益を受けないことを保証いたします。臨床研究の参加に同意されても、医療訴訟を提起されることや人権が制約されることはありません。

臨床研究に参加されましたら、治療終了後も経過観察のために岡山大学病院、あるいはそれと密接な関連を持つ医療施設（担当医師からお知らせします）を定期的を受診されることをお勧めします。このことは何よりも、あなたにとって不利益となる副作用を監視し、それを防止するためであり、また先に述べました遺伝子治療の効果を明らかにするためです。その際、採血やコンピューター断層撮影（CT）を行います。なお、不幸にして何らかの原因でお亡くなりになった場合には、治療の効果を確認するため、病理解剖にご協力くださいますようお願いいたします。

注意していただきたい点として、本臨床研究実施中に他院・他科の診察を受ける場合には本遺伝子治療臨床研究を受けている旨を必ず他院・他科の担当医師に報告し、本遺伝子治療臨床研究の担当医師にも必ず報告してください。また他院・他科で処方された薬や、あなた自身が薬局で購入した薬がある場合、可能な限り服用前に本遺伝子治療臨床研究担当医師に相談するとともに、服用後は必ず本遺伝子治療臨床研究担当医師に報告してください。

この臨床研究は遺伝子を用いるため、子孫への影響についてその安全性が明確ではありません。よって今後お子様をご希望されるかたは、その旨担当医にご相談ください。今回使用するアデノウイルスベクターが、あなたの生殖細胞に一時的に混入す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。そのため臨床研究実施期間中は避妊を行う必要があります。

15. 治療に関わる諸経費について

本臨床研究に関わる入院中の一切の治療・検査経費に関しては、岡山大学病院が管理する資金でまかなわれ、あなたの金銭的負担は発生しません。治療後の検査の場合、あなたの病状に関わるものについては保険適用となりますが、本臨床研究に特有の検査については、すべて岡山大学病院が管理する資金で負担いたします。したがって、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、公的医療保険が適用される場合、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。なお、公的医療保険が適用されない病気、治療に関しては自己負担となります。

16. 遺伝子治療臨床研究の実施に必要な手続きについて

日本国内で遺伝子治療臨床研究を行う場合には、国が定めた「遺伝子治療臨床研究に関する指針」の規定にしたがって、岡山大学病院の遺伝子治療臨床研究審査委員会、厚生科学審議会科学技術部会、がん遺伝子治療臨床研究作業委員会で、研究の安全性、予測される効果、倫理的な諸問題などについて慎重に審議し、臨床研究の実施に問題がないことを確認します。これらのすべての審議で了承されて、初めて臨床研究を開始することが許されています。

今回、あなたに提案した遺伝子治療臨床研究はこのような手続きを経て承認された臨床研究です。

17. 同意の撤回について

臨床研究に参加することを同意した後や臨床研究が開始されてからでも、いつでもあなたの希望にしたがって研究参加の同意を撤回することができます。同意を撤回された場合、その後の治療についてあなたが何ら不利益を受けないことを保証いたします。同意の撤回に際しては、撤回することを担当医師に口頭で伝え、その後、確認のために所定の同意撤回書を提出していただきます。

18. 同意撤回後の資料取り扱いについて

同意を撤回される以前のあなたの臨床経過や検査結果ならびに保管されている臨床検体については、貴重な資料となりますので、遺伝子治療臨床研究の資料として使用させていただきますことをご了承ください。

19. 個人情報の保護について

1) あなたの診療記録や同意書など、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いて岡山大学病院医事課で保管し、秘密を厳守します。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 5 月 30 日法律第 57 号）
- ② 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）
- ③ 国立大学法人岡山大学病院の保有する個人情報の適切な管理のための措置に関する規程（平成 17 年 3 月 24 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求めることができます。その際には、上記の指針・規定および「国立大学法人岡山大学の情報公開に関する規定」に照らし、開示の妥当性を判断します。患者さんが個人情報の開示を請求する場合は、無料といたします。ただし、実施にかか

る手数料については、当院が定めた規程により料金を納めていただきます。

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。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内容が事実ではないと判断した場合、本臨床研究の目的達成に必要な範囲を超えて利用されていると判断した場合、不正の手段により個人情報が取得されたものと判断した場合」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、また、必要に応じてその旨を説明します。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) 個人情報について、あなたの理解を深めていただくため、個人情報の保護に関する法律および当病院の個人情報に関する院内規定を当病院のホームページ上に掲載しております (<http://www.uro.jp/okayama/index.html>)。また、個人情報の開示等に関する詳細な内容の照会や疑問等については、下記担当係にお問い合わせくださいますようお願いいたします。

○担当係： 岡山大学病院医事課患者支援係
TEL 086-235-7205

20. 緊急連絡先と質問の問い合わせ先について

この臨床研究への参加者としてのあなたの権利や、研究に関連した障害などについて、何らかの問題や質問が生じたときには、岡山大学病院 呼吸器外科 (TEL 086-235-7265、FAX 086-235-7269) または岡山大学病院総務課 (TEL 086-235-7507)、夜間休日であれば、岡山大学病院東8病棟 (TEL 086-235-7862) にご連絡ください。

21. 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

悪性胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 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臨床研究

2) 実施施設

岡山大学病院

連絡先：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 呼吸器・乳腺内分泌外科学

TEL 086-235-7265

FAX 086-235-7269

悪性胸膜中皮腫遺伝子治療臨床研究に関する同意書

岡山大学病院

病 院 長 殿

私は、悪性胸膜中皮腫に対する REIC 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臨床研究について口頭および文書により説明を受けました。その結果、下記の内容を理解しましたので、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およ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、それに対応するための緊急処置を受けることについても併せて同意します。

- はじめに
- 臨床研究について
- 悪性胸膜中皮腫について
- 遺伝子治療臨床研究の概要について
- アデノウイルスベクターについて
- 臨床研究の目的について
- 臨床研究の進め方について
- 適応判定について
- 遺伝子治療の方法とスケジュールについて
- 期待される治療効果について
- 安全性と副作用について
- 遺伝子治療臨床研究に関わる有害事象が生じた場合について
- 外国での状況について
- 患者さんの権利と義務ならびに注意点について
- 治療に関わる諸経費について
- 遺伝子治療臨床研究実施に必要な手続きについて
- 同意の撤回について

- 同意撤回後の資料の取り扱いについて
- 個人情報の保護について
- 緊急連絡先および質問の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

以上の内容を証明するため、ここに署名、捺印します。

なお、私は胸水および胸膜病変部の生検の実施に

同意します 同意しません

同意年月日 平成 年 月 日

患者氏名（署名） _____ 生年月日： 年 月 日
 連絡先 _____

代諾者（署名） _____
 連絡先 _____

患者さんとの関係 _____ 生年月日： 年 月 日

立会人（署名） _____
 連絡先 _____

患者さんとの関係 _____ 生年月日： 年 月 日

説明した医師および説明日

平成 年 月 日

 (署名)

 (署名)

悪性胸膜中皮腫遺伝子治療臨床研究に関する同意撤回書

岡山大学病院

病 院 長 殿

私は、悪性胸膜中皮腫に対する REIC 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臨床研究について研究協力を依頼され、同意書に署名しましたが、その同意を撤回することを担当医師 _____ に口頭で伝えました。

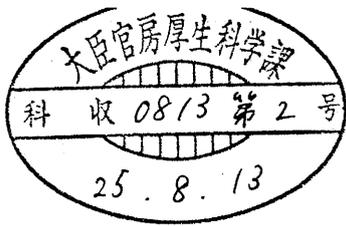
確認のため、同意撤回書を提出します。

平成 年 月 日

患者氏名（署名） _____ 生年月日： 年 月 日
連絡先 _____

代諾者（署名） _____
連絡先 _____
患者さんとの関係 _____ 生年月日： 年 月 日

立会人（署名） _____
連絡先 _____
患者さんとの関係 _____ 生年月日： 年 月 日

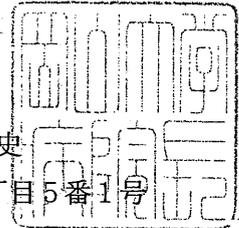


第一種使用規程承認申請書

平成 25 年 8 月 8 日

厚生労働大臣 殿
環境大臣 殿

申請者 氏名 岡山大学病院
 病院長 槇野 博史
 住所 岡山市北区鹿田町二丁目5番1号



第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) 遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス5型 (Adv/REIC)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>治療施設の所在地 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 治療施設の名称 岡山大学病院</p> <p>1) Adv/hREIC 溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。</p> <p>(2) 凍結状態の Adv/hREIC 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 実験室内の安全キャビネット内で行う。Adv/hREIC 希釈溶液の保管は、P2 実験室内の冷凍庫において行う。なお、Adv/hREIC 希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通して他の P2 レベル区域に運搬する必要がある場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。</p> <p>(3) Adv/hREIC 溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（0.18%もしくは 0.24%次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒薬（以下「消毒薬」という）または高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。）を行った後、岡山大学病院で定められている医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。</p> <p>(4) P2 実験室内の安全キャビネット内で Adv/hREIC 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整したもの（以下「Adv/hREIC 液」という。）を、二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った治療室（以下「治療室」という。）又は放射線部コンピュータ断層撮影装置室（以下「CT 室」という。）に直ちに運搬し、専用の注入用穿刺針、注射器及びチューブから成るデバイス（以下「注入セット」という。）に充填する。</p> <p>(5) 悪性胸膜中皮腫に罹患した被験者に対する Adv/hREIC の投与は、岡山大学病院治療室内又は中央放射線部 CT 室内において、局所麻酔下に Adv/hREIC 液を超音波ガイド下又は CT ガイド下に注入用穿刺針を用いて、胸水貯留を認める胸腔内、あるいは評価可能な 1 病変部に注入することにより行う。注入針の抜去</p>

は慎重に行い、Adv/hREIC 液の漏出及びエアロゾル化を防止する。注入部位の周辺には布（滅菌された不織布）を二重に敷き詰める。

- (6) 被験者への Adv/hREIC 投与終了後、被験者の創部を消毒する。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を、治療室又は CT 室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室（以下「個室」という。）に移送する。
- (7) 上記(5)及び(6)で用いた注入セット等の器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、穿刺用ガイド装置等は、ウイルス不活化を行い、再利用する。これらのウイルス不活化を治療室又は CT 室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。治療後の当該治療室は床を消毒液で掃き清掃する。なお、治療室内の空気は HEPA フィルターを用いた換気により約 5 分に 1 回（1 時間に 12 回）入れ替わる。
- (8) Adv/hREIC 溶液の投与後 24 時間まで、被験者を個室で管理する。また、Adv/hREIC 溶液を胸腔内に注入する際に胸腔内カテーテルチューブを挿入した場合はその抜去後 24 時間まで、又は、被験者より排出された胸水中の Adv/hREIC が陰性であることが確認できるまで、被験者を個室で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に個室から外の開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留め、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。
- (9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物（血液、体液、尿及び糞便等）は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、研究用検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、Adv/hREIC 溶液の取扱いに準ずる。排泄物等が床等に落下した場合は床を消毒液で掃き清掃する。
- (10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液及

	<p>び尿中の Adv/hREIC が陰性であることを確認する。Adv/hREIC が確認されたときは、個室における被験者の管理を継続する。また排泄物等の床等への落下の有無にかかわらず、個室における管理終了後は床を消毒液で掃き清掃する。</p> <p>(12) 個室における被験者の管理の解除後に、遺伝子治療臨床研究実施計画書（悪性胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 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臨床研究）に示す観察期間内に被験者の血液又は尿中から Adv/hREIC が検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(8)から(11)までと同様の措置を執る。</p>
--	--

生物多様性影響評価書

(区分：遺伝子治療臨床研究)

I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

ヒトアデノウイルスはアデノウイルス科マストアデノウイルス属に分類されている(文献 1、2)。これまでに分離されたウイルスは、中和抗体を誘導する抗原性の違いで 51 の血清型に分けられており(文献 1、2)、ヒト Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) を発現する非増殖性の遺伝子組換えアデノウイルスベクター (Adv/hREIC) はヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) を宿主として作製された。

Ad5 は 4 歳以下の乳幼児の多くに感染しており、咽頭及び糞便からウイルスが分離される(文献 2)。Ad1、2、5、6 に対する中和抗体保有率は 1~2 歳齢では 46.7~93.3%で、20 歳齢までに 100%に達している。(文献 3)。自然環境において、ヒト以外の動物での増殖は報告されていない。実験室内では、コットンラット及びニュージーランドウサギへの経鼻接種でウイルス増殖が報告されている(文献 1)。

文献 1: Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed.: Fields VIROLOGY fourth edition, pp.2265-2326, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)

文献 2: 畑中正一編: ウイルス学, pp.198-208, 朝倉書店, 東京 (1997)

文献 3: 水田克巳など: 山形県衛生研究所報, 32: 5-7 (1999)

2 使用等の歴史及び現状

ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) を生ワクチン等に使用した報告はない。Ad5 に由来するウイルスベクターが遺伝子治療で汎用されている (IV 章参照)。

3 生理・生態学的特性 (文献 1、2)

(1) 基本的特性

ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) のウイルスキャプシドは直径 80 nm の正二十面体で、エンベロープはない。ゲノムは約 36 kb の 2 本鎖 DNA である。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染し、増殖する。培養細胞でも、ヒト由来の細胞でのみ効率よく増殖する。サ

ル由来培養細胞で低レベルの増殖が起こる。経口感染することから推定されるように、室温で比較的安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

自然界では、ヒトでのみ増殖を伴う感染が起こる。

(4) 繁殖又は増殖の様式

Ad5 は、ヒトに経口感染し、増殖したウイルスは便と共に排泄される。

(5) 病原性

Ad5 の感染は不顕性に終わることが多いが、4 歳以下の乳幼児では急性熱性咽頭炎となる場合もある。いずれの場合も感染後に産生される中和抗体で再感染は阻止される。リンパ節に潜伏する例や小児の腸重積症に関わる可能性も指摘されている。

(6) 有害物質の産生性

Ad5 の感染で細胞内に産生されるたん白質等の毒性は報告されていない。

(7) その他の情報

物理的不活化法として Ad5 は 56℃、30 分の加熱で感染性を失う（文献 4）。また化学的不活化法として用いる消毒薬としては以下のものを含む：塩素系漂白剤（たとえば次亜塩素酸ナトリウム）、グルタルアルデヒドなど（文献 5）。特に次亜塩素酸ナトリウムはごく低濃度においても細菌に対して速効的な殺菌力を発揮し、またウイルスに対する効力の面でも最も信頼のおける消毒薬である。0.1%～1%の高濃度であれば結核菌を殺菌することもでき、この濃度においては高水準消毒薬に分類される（文献 6）。

文献 4 : Bardell, D.: J. Clin. Microbiol. 4: 322-325 (1976)

文献 5: APIC guidelines for infection control practice

(<http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds3e-eng.php>)

文献 6: http://www.yoshida-pharm.com/text/05/5_2_3.html

II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1 供与核酸に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

ヒト REIC/Dkk-3 をコードする DNA (REIC/Dkk-3 遺伝子; 1053bp) 及び CMV プロモーターを宿主に導入した (供与核酸の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列などは別紙 1)。

(2) 構成要素の機能

CMV プロモーターは REIC/Dkk-3 遺伝子のみを転写させることになるため、REIC/Dkk-3 遺伝子が発現される。発現する REIC/Dkk-3 タンパク質は分子量約 60kDa の糖蛋白質で、N 末端に 1 つのシグナルペプチドとシステインドメイン、coiled-coil ドメインをそれぞれ 2 つずつ有する 350 のアミノ酸より構成される。REIC/Dkk-3 は Dkk ファミリーと呼ばれる分泌型蛋白群の一種で、Dkk ファミリーには Wnt 受容体を介して Wnt シグナル伝達を阻害する作用があることが知られている。REIC/Dkk-3 は腫瘍特異的細胞アポトーシスを誘導する機能を有していると考えられており、その機序として、c-Jun-N-terminal kinase (JNK) を活性させることでの、Bax のミトコンドリアへの移行促進作用が考えられている (文献 7)。また遺伝子導入により産生された蛋白によるヒト正常細胞 (線維芽細胞、前立腺間質細胞、前立腺上皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、気道上皮細胞、肝細胞、腎近位尿管細胞) への障害性は認めていない (文献 7, 未発表データ)。これらの供与核酸の導入によって、Adv/hREIC の感染性がヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) から変わることはないと考えられる。また、Adv/hREIC にはアデノウイルスが増殖するために不可欠である E1 遺伝子及び E3 遺伝子が含まれないため、Adv/hREIC に増殖性は無いと考える。

文献 7: Abarzua F., et al.: Cancer Research 65:9617-9622, 2005

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

Adv/hREIC アデノウイルスベクターは REIC/Dkk-3 組換え Adeno-X プラスミド DNA (pAdeno-X/REIC) より作製される。この pAdeno-X/REIC は CMV プロモーターの転写制御下にあるヒト REIC 遺伝子を発現させるプラスミドである。pAdeno-X/REIC をヒト胎児腎由来 293 細胞に感染させ、最終的な遺伝子組換えアデノウイルスベクター Adv/hREIC が生成される (ベクターの構造は別紙 2)。

(2) 特性

プラスミド pAdeno-X/REIC はアンピシリン耐性遺伝子を有する。

3 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) の E1 領域を供与核酸と置換した (Adv/hREIC の構造概略図は別紙 2 参照)。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法 (別紙 2 の各図を参照)

REIC/Dkk-3発現Adeno-XプラスミドDNA (pAdeno-X/REIC) を作成するために、まず REIC/Dkk-3遺伝子をpShuttleベクター(Clontech社製)中にクローニングし、哺乳類細胞用のカセットを構築した。これを大腸菌DH5αに導入し、カナマイシン耐性クローンから抽出したプラスミドの塩基配列の解析を行い、インサートの配列に変異が入っていないことを確認した (pShuttle/REIC)。次に、pShuttle/REIC からREIC/Dkk-3発現カセットを組換え、REIC/Dkk-3発現Adeno-XプラスミドDNAを構築した。上記の段階で作製したpShuttle/REICをPI-SceI、I-CeuIにて消化し、REIC/Dkk-3発現カセットを調整し、PI-SceI、I-CeuIにて消化したBD Adeno-X viral DNA (Clontech社製)とライゲーションした。そのライゲーション産物をSwalで消化し、大腸菌Stable2 (Invitrogen社製)に導入し、アンピシリン耐性クローンから抽出したプラスミドの塩基配列の解析を行い、インサートの配列に変異が入っていないことを確認した。以上により、REIC/Dkk-3発現Adeno-XプラスミドDNA (pAdeno-X/REIC) が作成された。さらにAdv/hREICを作成するために、この構築したREIC/Dkk-3組換えAdeno-XプラスミドDNAを、ヒトHEK293細胞にトランスフェクションすることによってAdv/hREIC組換えアデノウイルスを作製した。以上の操作により、全長のヒトREIC/Dkk-3遺伝子がアデノウイルス内に移入された。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

Adv/hREIC はヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) の E1 ならびに E3 領域を欠失している。E1 領域に含まれる E1A 及び E1B 遺伝子の産物はウイルス DNA の複製に必要なので、これらの遺伝子を継続的に発現している 293 細胞を使って増殖させる。本臨床研究で用いられる Adv/hREIC の最終製品は、(株)桃太郎源社が製造委託した、米国ベイラー医科大学 細胞・遺伝子治療センター (Houston, Texas 州) で製造された製剤を使用する予定である。凍結した状態で日本へ輸送した最終製品は、岡山大学病院新医療研究開発センターの探索的医薬品開発室 (P2 レベル) において保存され、受入れ試験が実施される (受入れ試験の詳細は別紙 3)。

具体的には、最終製品は岡山大学病院中央診療棟 5 階新医療研究開発センターの探索的医薬品開発室のベクター保存室内のディープフリーザー内に保管される (当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙 4)。

4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸は Adv/hREIC の 2 本鎖 DNA ゲノムの一部として存在し、保管中は極めて安定で、感染する動植物等の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。細胞に感染すると、Adv/hREIC のゲノムは核内の染色体外に存在し、REIC/Dkk-3 遺伝子が転写される。すなわち、REIC/Dkk-3 遺伝子の発現は一過性である。

5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

Adv/hREIC は宿主のヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) に存在しない REIC/Dkk-3 遺伝子を含むので、REIC/Dkk-3 遺伝子 DNA の一部を PCR で増幅、定量する方法で Adv/hREIC を検出できる。先行した Adv/HSV-tk を用いた前立腺癌遺伝子治療臨床研究 (岡山大学実施) におけるアデノウイルスベクターの血中、尿中の検出結果 (感度 100 コピー/μg) では、アデノウイルスベクター投与後血中では翌日、尿中では 2 日目に全例測定感度以下になっている (文献 8)。なお、投与前は全例測定感度以下であった (論文未発表)。Real-time PCR 法を用いた方法であり臨床応用性を含めた信頼性も実証された。さらに、現在、岡山大学で実施をされている Adv-CAG-hREIC (CAG プロモーターを含む Adv-hREIC) を用いた前立腺癌遺伝子治療臨床研究では、Adv-CAG-hREIC の腫瘍内局所投与が行われた計 20 名の患者 (平成 25 年 7 月 31 日現在) において、Adv-CAG-hREIC の投与後血中では翌日に、尿中では 3 日目に全例測定感度以下になっている (論文未発表)。悪性胸膜中皮腫の患者を対象とした本臨床研究でも、Adv/hREIC の腫瘍内局所投与を含む同様の投与手法を採用するが、類似した結果が予測される。

文献 8 : Nasu, Y, et al.: Molecular Therapy. 15: 834-840 (2007)

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

Adv/hREIC はヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) の E1 領域の遺伝子を欠失しているため、これらの領域にコードされているウイルス蛋白質群を発現できない。E1 領域に含まれる E1A 及び E1B 遺伝子から作られる蛋白質はウイルス DNA の複製に必要なため (文献 1、2)、E1A 及び E1B 遺伝子を持続的に発現している細胞 (例えば 293 細胞) や Ad5 と共感染した細胞でなければ Adv/hREIC の増殖は起こらない。また、Adv/hREIC では外来 CMV プロモーターから転写される REIC/Dkk-3 遺伝子が発現することになる。これらの点を除くと、Adv/hREIC の感染する動植物等の種類、感染経路、伝搬様式等は野生型 Ad5 とまったく同等である。Adv/hREIC 由来の RCA は、ヒトや動植物等への感染性、感染様式、病原性など、生物多様性に影響を与える性質は野生型 Ad5 と同等であると考えられる。

III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1 使用等の内容

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

2 使用等の方法

治療施設の所在地 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号

治療施設の名称 岡山大学病院

- (1) Adv/hREIC 溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態の Adv/hREIC 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 実験室内の安全キャビネット内で行う。Adv/hREIC 希釈溶液の保管は、P2 実験室内の冷凍庫において行う。なお、Adv/hREIC 希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通して他の P2 レベル区域に運搬する必要がある場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (3) Adv/hREIC 溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（0.18%もしくは 0.24%次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒薬（以下「消毒薬」という）または高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。）を行った後、本施設で定められている医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。
- (4) P2 実験室内の安全キャビネット内で Adv/hREIC 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整（以下「Adv/hREIC 液」という）した後、二重に密閉し、治療室である総合診療棟 IVR-CT 室（以下「CT 室」という。）に直ちに運搬し、専用の注入用穿刺針、注射器及びチューブからなるデバイス（以下「注入セット」という。）に充填する。
- (5) 悪性胸膜中皮腫に罹患した被験者に対する Adv/hREIC の投与は、総合診療棟 IVR-CT 室内において、Adv/hREIC 液をあらかじめ留置している胸腔内チューブ又は CT ガイド下に注入用穿刺針を用いて、胸水貯留を認める胸腔内、あるいは評価可能な 1 病変部に注入することにより行う。注入針の抜去は慎重に行い、Adv/hREIC 液の漏出及びエアロゾル化を防止する。注入部位の周辺には敷布（滅菌された不織布）を二重に敷き詰める。
- (6) 被験者への Adv/hREIC 投与終了後、被験者の創部を消毒する。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を、CT 室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室（以下「個室」という。）に移送する。
- (7) 上記(5)及び(6)で用いた注入セット等の器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活

化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、穿利用ガイド装置等は、ウイルス不活化を行い、再利用する。これらのウイルス不活化を CT 室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。治療後の当該治療室は床を消毒液で掃き清掃する。なお、治療室内の空気は HEPA フィルターを用いた換気により約 5 分に 1 回（1 時間に 12 回）入れ替わる。

- (8) Adv/hREIC 溶液の投与後 24 時間まで、被験者を個室内で管理する。また、Adv/hREIC 溶液を胸腔内に注入する際に胸腔内カテーテルチューブを挿入した場合はその抜去後 24 時間まで、又は、被験者より排出された胸水中の Adv/hREIC が陰性であることが確認できるまで、被験者を個室内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に個室から外の開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留め、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。
- (9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物（血液、体液、尿及び糞便等）は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、研究用検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、Adv/hREIC 溶液の取扱いに準ずる。排泄物等が床等に落下した場合は床を消毒液で掃き清掃する。
- (10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液及び尿中の Adv/hREIC が陰性であることを確認する。Adv/hREIC が確認されたときは、個室における被験者の管理を継続する。また排泄物等の床等への落下の有無にかかわらず、個室における管理終了後は床を消毒液で掃き清掃する。
- (12) 個室における被験者の管理の解除後に、遺伝子治療臨床研究実施計画書（悪性胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 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臨床研究）に示す観察期間内に被験者の血液又は尿中から Adv/hREIC が検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(8)から(11)までと同様の措置を執る。

3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

被験者への Adv/hREIC 投与後、被験者体内で増殖能を獲得した遺伝子組換えウイルス（RCA）の有無については、血液及び尿を用いて PCR 法にて検査し、検出された場合は消失するまで、被験者を個室管理下に移して追跡する。

4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

Adv/hREIC 投与後の被験者については、個室管理下、PCR 法にて血液及び尿中の遺伝子組換えウイルス (Adv/hREIC) が消失するまで追跡する。管理中は排泄物が床等に落下した場合は床を消毒液で掃き清掃する。また落下の有無にかかわらず、個室における管理終了後は床を消毒液で掃き清掃する。

5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

Adv/hREIC と同様に非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型の構造をもち、マウスインターロイキン-12 (mIL-12) 遺伝子を発現する Adv/mIL-12 ベクターの溶液を前立腺癌マウスモデルに投与した動物実験では、マウス血清中の mIL-12 レベルは投与翌日にピークとなり (15000 pg/ml)、投与 3 日後にはベクター投与前のレベルに低下した。mIL-12 の上昇後に脾臓の重量は増加したが mIL-12 レベルの低下に伴い脾臓の重量は正常に戻った。一過性の mIL-12 上昇に伴うと考えられる死亡例はマウスには認められず、また体重減少等も認められなかった (文献 9)。Adv/mIL-12 の消長及び体外への排出については詳細が不明であるが、同じくヒトアデノウイルス 5 型の E1 領域を単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子に置換した非増殖性アデノウイルスベクターである Adv.RSV-TK を用いたマウスモデルの動物実験では、ベクター注入 1 週間後、ベクター DNA は尿、精液及び精子には認めず、血中にはマウス 40 匹中 1 匹のみに認めた。ベクターの広がりには前立腺、精囊、精巣、骨盤リンパ節、消化管及び肝において観察された (文献 10)。

岡山大学病院において、2001 年以後に前立腺癌に対する Adv.RSV-TK 及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究を行い、9 例 (2 例は同一症例) の前立腺がん患者に Adv.RSV-TK の投与を行った (文献 8)。また、2008 年以降に前立腺癌に対する Adv/IL-12 を用いた遺伝子治療臨床研究を行い、6 例の前立腺癌患者に Adv/IL-12 の投与を行った。投与後の被験者の血液、尿中の Adv.RSV-TK および Adv/IL-12 の有無を PCR 法により検査したところ、血液中へのアデノウイルスベクターの移行は低用量群においては認められず、中用量群において投与後 30 分をピークに認められたが翌日には消失した。尿中への移行は投与直後において認めたが多くの場合は 2 日目に消失した。さらに、現在、岡山大学で実施をされている Adv-CAG-hREIC (CAG プロモーターを含む Adv-hREIC) を用いた前立腺癌遺伝子治療臨床研究では、Adv-CAG-hREIC の腫瘍内局所投与が行われた計 20 名の患者 (平成 25 年 7 月 31 日現在) において、Adv-CAG-hREIC の投与後血中では翌日に、尿中では 3 日目に全例測定感度以下になっている (論文未発表)。被験者

の個室管理期間中の医療従事者や被験者の家族等面会者の健康状態からみて、Adv.RSV-TK、Adv/IL-12 および Adv-CAG-hREIC の環境中への放出及び医療従事者や面会者への感染は認められていない。

文献 9 : Nasu, Y., et al.: Gene Ther. 6: 338-349 (1999)

文献 10 : Timme, T. L., et al.: Cancer Gene Ther. 5: 74-82 (1998)

6 国外における使用等により得られた情報

本申請の Adv/hREIC については、国外における使用の報告はない。Adv/hREIC と同様に非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型の構造をもつ、Adv.RSV-TK 及び Adv/IL-12 については、前立腺癌における国外での使用が実施されており、以下に示す。

1996 年 8 月より、放射線治療後の局所再燃がんに対する Adv.RSV-TK 及びガンシクロビルの併用療法の第 I 相臨床試験が米国 Baylor 医科大学で実施された。当該試験において Adv.RSV-TK を前立腺巣内に局所内投与された 18 名の患者の尿を検体として、PCR 法によるアデノウイルス DNA の確認が行われた。Adv.RSV-TK 投与後、尿中にはアデノウイルス DNA が、症例により差はあるが、0~32 日間（平均 6.8 日間）検出された（文献 11）。

また、悪性胸膜中皮腫の遺伝子治療に関しては Adv/hREIC と同様に非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス 5 型の構造をもつ、Adv/TK もしくは Adv/IFN-beta の使用が実施されている。以下にその概要を示す。

- ① HSV-tk による遺伝子治療の臨床第 1 相試験は 1995 年 11 月から開始された。HSV-tk 遺伝子が組み込まれたアデノウイルスベクターを 1 回、胸腔内に直接投与し、その後ガンシクロビルの全身投与を行った。21 人の未治療の悪性中皮腫患者に対して投与するウイルス量を約 3 倍ずつ上げ、 5.0×10^{13} vp まで達したが、重篤な副作用は認めず、最大耐量には達しなかった[一過性リンパ球減少 (grade 4) 1 例、肝機能異常 (grade 3) 1 例、その他、軽度の一過性の発熱、低酸素血症)、低血圧)、肝機能異常、低酸素血症など]。抗腫瘍効果としては 21 例中 18 例が効果を判定するのに十分な期間を得ており、うち 3 例が 1998 年 2 月の段階で画像上腫瘍の進行を認めなかった。その後、HSV-tk 遺伝子治療はステロイドを追加した投与方法に変更し 5 名の患者に施行、また、1998 年 6 月からは単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子はそのままだウイルスの他の構造をより安全に変更したウイルスベクターを用いて (E1/E3 欠失ウイルスから E1/E4 欠失ウイルスへ変更) 8 例に治療を行った。すなわち、合計 34 名の患者に HSV-tk 遺伝子が組み込まれているアデノウイルスベクターが投与された。追加の症例においても重篤な副作用は認められなかった。この追加症例のうち 2 例において 6.5 年以上の長期生存を認めている (2005 年論文発表時)。(文献 12)

② IFN-beta を組み込んだアデノウイルスベクターによる悪性胸水例に対する遺伝子治療の臨床第1相試験が2003年8月から開始された。投与は、胸腔内投与1回であり、悪性胸膜中皮腫7例、悪性胸水を伴う非小細胞肺癌2例、卵巣癌1例に行われた。投与開始量である 9.0×10^{11} vpでは重篤な副作用は認められなかったが、1段階投与量を上げたウイルス量の 3.0×10^{12} vpでは4例中2例で重篤な低酸素血症 (grade 3)、肝機能障害 (grade 3) をそれぞれ認めた。低酸素血症を認めた症例は併存疾患として慢性心不全を伴う症例であり、肝機能障害を認めた症例は、以前、悪性リンパ腫のため腹部に放射線治療の既往がある症例であった。この結果、最大耐量は 9.0×10^{11} vpと決定された。悪性胸膜中皮腫7例の治療効果に関しては、投与後60日のCTの評価において4例で腫瘍の大きさは変わらず、3例で腫瘍の増大を認めた。またPET検査では3例で不変、1例でFDGの取り込みの低下を認めた。生存に関しては研究が発表された2007年時点で、生存例は3例(34ヵ月、32ヵ月、26ヵ月)であった。(文献13)

文献 11 : Herman, J. R., et al.: Human Gene Ther. 10: 1239-1249 (1999)

文献 12 : Sterman, D.H., et al.: Clin Cancer Res 11,7444-7453(2005)

文献 13 : Sterman, D.H., et al.: Clin Cancer Res. 13,4456-4466(2007)

IV 生物多様性影響評価

1 他の微生物を減少させる性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の感染性は野生型ヒトアデノウイルス 5 型(Ad5) と同一と考えられるので、微生物に感染せず、また、競合、有害物質の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。よって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず。)

(3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず。)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

2 病原性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の感染性は野生型ヒトアデノウイルス 5 型(Ad5) と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである(文献 1、2)。

(2) 影響の具体的内容の評価

Adv/hREIC が感染したヒトで一過性に REIC/Dkk-3 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによるヒトへの病原性は知られていない。Adv/hREIC 由来 RCA の病原性は、野生型 Ad5 と同等であると考えられる。

なお、Ad5 を宿主とする遺伝子治療用ウイルスベクター(遺伝子組換え生物等)は 1990 年以後、国内外で汎用されているが(文献 11)、環境への悪影響に関する報告はない。1999 年に初めて遺伝子治療薬の投与に起因する死亡例が、当該ベクターを用いた米国での遺伝子治療臨床研究において発生したが、その後の調査研究により、当該事例は、ベクター大量投与の結果、循環血中に漏れ出たベクターのウイルス蛋白により引き起こさ

れた全身的免疫反応に起因するものであることが明らかにされている。(文献 14)。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。Adv/hREIC は増殖能を失っているため、野生型アデノウイルスとの共感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。さらに、Adv/hREIC が効率よく感染する対象はヒトに限られること(文献 1、2)を踏まえると、Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA が被験者以外のヒトに対して病原性を示す可能性は極めて少ないと考えられる。実際に、現在、岡山大学で実施をされている Adv-CAG-hREIC (CAG プロモーターを含む Adv-hREIC) を用いた前立腺癌遺伝子治療臨床研究では、Adv-CAG-hREIC の腫瘍内局所投与が行われた計 20 名の患者(平成 25 年 7 月 31 日現在)において、Adv-CAG-hREIC の投与後血中では翌日に、尿中では 3 日目に全例測定感度以下になっている(論文未発表)。被験者の個室管理期間中の医療従事者や被験者の家族等面会者の健康状態からみても、Adv-CAG-hREIC 及び当該ウイルスベクター由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量であり、これらのウイルスが被験者以外のヒトに対して病原性を示す可能性は極めて少ないと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

文献 14 : Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Human Gene Therapy 13:3-13 (2002)

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Adv/hREIC の有害物質の産生性は知られておらず、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず。)

(3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず。)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

4 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の感染性は野生型ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである (文献 1、2)。

(2) 影響の具体的内容の評価

Adv/hREIC が感染したヒトで一過性に REIC/Dkk-3 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによるヒトへの核酸の水平伝達は知られていない。

また、Adv/hREIC 由来の遺伝子組換え生物に該当する RCA が出現したとしても、核酸を水平伝達する性質は野生型 Ad5 と同等である。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、Adv/hREIC 及び Adv/hREIC 由来 RCA の環境中への拡散は極めて微量である。Adv/hREIC は増殖能を失っているため、被験者に野生型アデノウイルスが共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。さらに、Adv/hREIC が効率よく感染する対象はヒトに限られること (文献 1、2) 及びヒト体内の同一細胞に Adv/hREIC 及び野生型アデノウイルスが感染する可能性は極めて低いことも踏まえると、Adv/hREIC はやがて環境中から消滅すると考えられる。

また、Adv/hREIC 由来の遺伝子組換え生物に該当する RCA が出現したとしても、核酸を水平伝達する可能性は野生型 Ad5 と同程度であると考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

5 その他の性質

なし。

V 総合的評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、Adv/hREIC の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしても、その量は検出レベル以下であると推定される。また、これまでの動物を用いた予備的実験により、Adv/hREIC による REIC/Dkk-3 遺伝子の一過性発現がヒトに強い病原性を示す可能性は極めて小さいと考えられる。Adv/hREIC が感染する動植物等の種類は野生型ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) と同等で、ヒトにのみ感染し、自然界で他のほ乳動物、植物及び微生物には感染しないと考えられる。

増殖性ウイルス (RCA) を含む遺伝子組換えアデノウイルスのウイルス増殖能に関して、臨床使用経験に基づいた知見を整理した見解・声明が、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ; ICH) および、Gene Therapy Discussion Group

(ICH-GTDG) により communication paper として公開されている (別紙5)。すなわち、2004 年 6 月 10 日の ICH-GTDG 会議において、多量の RCA を含有する非増殖性アデノウイルスベクターを高用量投与された症例に関するデータが米国研究製薬工業協会 (PhRMA) によりとりまとめられ、報告されている。それによると

- ・ がん患者において、種々の投与経路 (腫瘍内、肝臓内、腹膜内) によって投与を受けた場合でも、RCA に起因する重篤な副作用はみられなかった。
- ・ 環境へのリスクという点に関して、現在用いることのできる最も感度の高い RCA 検出法であるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によっても RCA の体外への排出は認められなかったことが、データから示唆された。

ゆえに、RCA が製剤中に仮に多量に含まれていたとしても、ウイルスが生体で増殖し副作用を引き起こすこと、および、ウイルスが体外に排出されることが考えにくく、その増殖型ウイルスの当該環境中での増殖能が極めて低いことが示唆される。今回我々が使用する Adv/hREIC における RCA ウイルス出現の頻度については、その製造元である米国ベイラー医科大学 細胞・遺伝子治療センター (Houston, Texas 州) の品質検査において、 3×10^{10} virus particle に 1 個未満であることが、2012 年 6 月 6 日に確定をされている。この 3×10^{10} virus particle に 1 個未満という数値は、前述の ICH-GTDG 会議で報告された臨床研究の RCA 含有量をはるかに下回るものであり、かつ FDA の推奨する RCA 量の許容基準でもある。すなわち、今回の Adv/hREIC 使用において、増殖型ウイルスが仮に申請使用において出現した場合でも、その環境中 (患者生体内および排出後のその周囲の環境) でウイルス増殖することはほぼ不可能であり、その環境下での増殖能は限りなく低いものと考えられる。結論として、ヒト及び他のほ乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられ、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、Adv/hREIC 使用により生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

別紙 1: REIC/Dkk-3 遺伝子の構造、REIC/Dkk-3 遺伝子のアミノ酸配列

別紙 2: REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の作製方法、
REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の構造

別紙 3: 受け入れ試験の詳細

別紙 4: 治療施設の地図及び保管場所の概略図

別紙 5: Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting, June 10, 2004
日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) 遺伝子治療専門家グループ (GTDG)
「見解」

別紙 1

1) REIC/Dkk-3 遺伝子の構造

ヒト REIC/Dkk-3 蛋白コード領域の塩基配列 (1053 base pair) を以下に示す。

```
1 atgcagcggc ttggggccac cctgctgtgc ctgctgctgg cggcggcggt ccccacggcc
61 cccgcgcccc ctccgacggc gacctcggct ccagtaagc ccggccccgc tctcagctac
121 ccgcaggagg aggccaccct caatgagatg ttccgagagg ttgaggaact gatggaggac
181 acgcagcaca aattgcgag cgcggtggaa gagatggagg cagaagaagc tgctgctaaa
241 gcatcatcag aagtgaacct ggcaactta cctcccagct atcacaatga gaccaacaca
301 gacacgaagg ttgaaataa taccatccat gtcaccgag aaattcaca gataaccaac
361 aaccagactg gacaaatggt ctttcagag acagttatca catctgtggg agacgaagaa
421 ggcaagaagg gccacgagtg catcatcgac gaggactgtg ggcccagcat gtactgccag
481 tttgccagct tccagtacac ctgccagcca tgccggggcc agaggatgct ctgacccggg
541 gacagtgagt gctgtggaga ccagctgtgt gtctggggtc actgcaccaa aatggccacc
601 aggggcagca atgggacat ctgtgacaac cagagggact gccagccggg gctgtgctgt
661 gccttcaga gaggcctgct gttccctgtg tgcacacccc tgcccgtgga gggcgagctt
721 tgccatgacc ccgccagccg gcttctggac ctcatcacct gggagctaga gcctgatgga
781 gccttgacc gatgcccttg tgccagtggc ctctctgcc agccccacag ccacagcctg
841 gtgtatgtgt gcaagccgac cttcgtgggg agccgtgacc aagatgggga gatcctgctg
901 cccagagagg tccccgatga gtatgaagtt ggcagcttca tggaggaggt gcgccaggag
961 ctggaggacc tggagaggag cctgactgaa gagatggcgc tgggggagcc tgcggctgcc

1021 gccgctgcac tgctgggagg ggaagagatt tag
```

2) REIC/Dkk-3 遺伝子のアミノ酸配列

以下に上記遺伝子により発現されたヒト REIC/Dkk-3 タンパクのアミノ酸配列を示す。

```
MQRLGATLLCLLLAAAVPTAPAPAPTATSAPVKPGPALSYPQEEATLNEMFREVEELVE
DTQHKLRSAVEEMEAEEAAAKASSEVNLANLPPSYHNETNTDTKVGNNTIHVHREIHK
ITNNQARQMVFSETVITSVGDEEGRRSHECIIDEDCGPSMYCQFASFQYTCQPCRGQRM
LCTRDSECCGDQLCVWGHCTKMATRGSNGTICDNQRDCQPGLCCAFQRGLLFPVCIPL
PVEGELCHDPASRLLDLITWELEPDGALDRPCASGLLCQPHSHSLVYVCKPTFVGSRD
QDGEILLPREVPDEYEVGSFMEEVRQELEDLERSLTEAMALGEPAAAAAALLGEEI
```

別紙 2

REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の作製方法

Adv/hREICの製造法は基本的に3段階であり、各段階の動作において配位位置の確認、挿入シーケンスにおける欠損や変異のなきを確認する。

第1段階として、REIC/Dkk-3遺伝子をpShuttleベクター(Clontech社製)中にクローニングし、哺乳類細胞用のカセットを構築した。具体的には、REIC/Dkk-3遺伝子の開始コドン前に XbaI サイトをデザインしたプライマー (XbaI-REIC-F: 5'-GCTCTAGAGCACCATGCAGCGGCTTGGGGCCACCTGC-3')と、終止コドンの後にKpnIサイトをデザインしたプライマー (KpnI-REIC-R: 5'-GGGGTACCCCCTAAATCTCTCCCCTCCCAGCAGT-3')を設計した。次に、pTracer/REIC (図1)を鋳型にして、REICのコーディング領域をPCRにより増幅した。PCR条件は、94℃ 1分、62℃ 30秒、68℃ 1分を30サイクルで行った。約1.1kbの増幅産物をゲルから回収し、XbaI、KpnI消化した後、pShuttleベクターへクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、カナマイシン耐性クローンから抽出したプラスミドの塩基配列の解析を行い、インサートの配列に変異が入っていないことを確認した (pShuttle/REIC、図2)。

第2段階として、REIC/Dkk-3 発現カセットを組換え、REIC/Dkk-3 発現 Adeno-X プラスミド DNA を構築した。第1段階で作製した pShuttle/REIC (10μg) を PI-SceI, I-CeuI にて消化し、REIC/Dkk-3 発現カセットを調整し、PI-SceI, I-CeuI にて消化した BD Adeno-X viral DNA (図3、Clontech社製)とライゲーションした。そのライゲーション産物を SwaI で消化し、大腸菌 Stable2 (Invitrogen社製)に導入し、アンピシリン耐性クローンから抽出したプラスミドの塩基配列の解析を行い、インサートの配列に変異が入っていないことを確認した (pAdeno-X/REIC、図4)。

第3段階として、この構築した REIC/Dkk-3 組換え Adeno-X プラスミド DNA を、ヒト HEK293 細胞にトランスフェクションすることによって組換えアデノウイルスを作製した。REIC/Dkk-3 組換え Adeno-X プラスミドを Pac-I 消化し、線状化した後、Profection® Mammalian Transfection Kit を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。37℃、5% CO2 条件下で 12~16 時間培養した後、アガロース培地に細胞を播種し、7~10 日間培養を続け、出現したプラークを 6~8 個分離し、-80℃にて保存した。次にプラーク溶液を凍結融解 3 回後、1000rpm、2 分遠心した上清を HEK293 細胞に感染させ、細胞の変性を確認後、細胞を回収した。細胞ペレットを 1mL の 50mM Tris-HCl (pH8.0)にて均一に懸濁し、その一部を用いてアデノウイルスを調整後、DNA を抽出し、挿入配列を確認した。残りの溶液は-80℃保存し、正しい挿入配列をもつクローンを選択後に拡大培養を開始した。凍結融解 3 回後、HEK293 細胞に感染させ、細胞の変性を確認後、1500rpm、20 分遠心して細胞を回収した。細胞ペレットは 50mM Tris-HCl (pH8.0)にて均一に懸濁し、1 次アデノウイルス感染細胞培養液として-80℃保存した。次にその培養液を用いて、同様の操作でスケールアップを行い、Tris-HCl (pH8.0)にて均一に懸濁した溶液を 2 次アデノウイルス感染細胞培養液として-80℃保存した。その培養液を凍結融解 3 回後、1500rpm、20 分遠心した上清を塩化セシウム密度勾配遠心により精製し、ウイルス液として-80℃凍結保存した。この Ad-CMV-human REIC より、臨床研究において用いられる最終的な組換えアデノウイルスベクター (Adv/hREIC) が作製される。

图 1

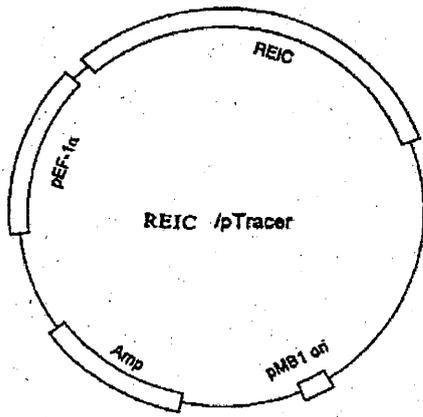


图 2

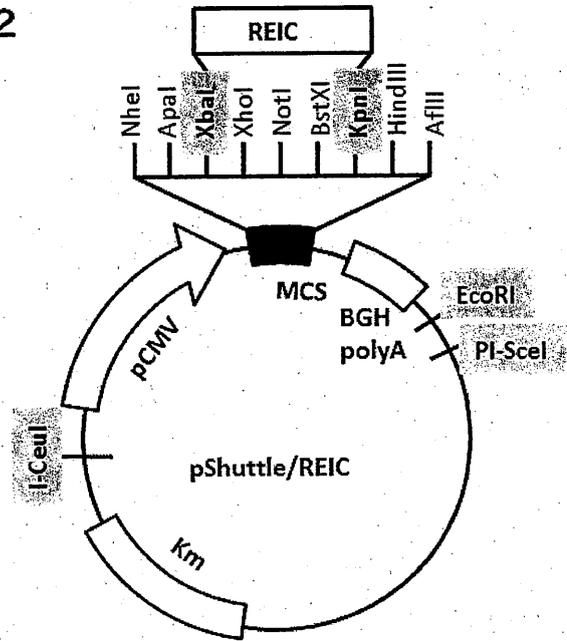


图 3

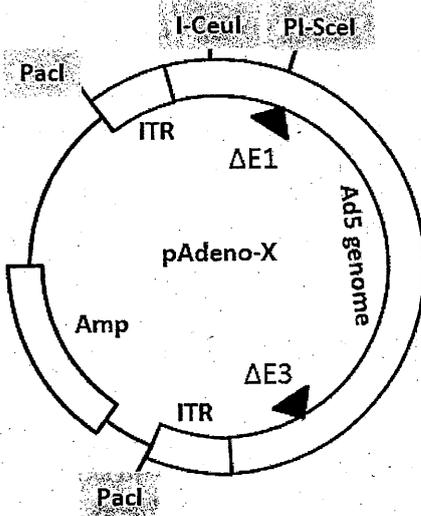
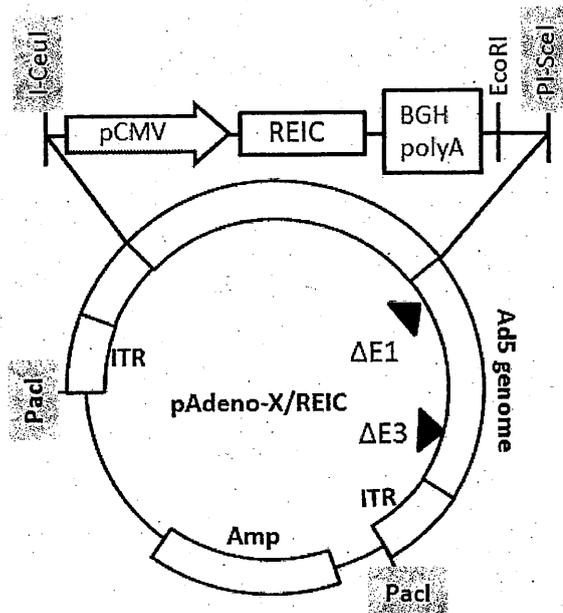
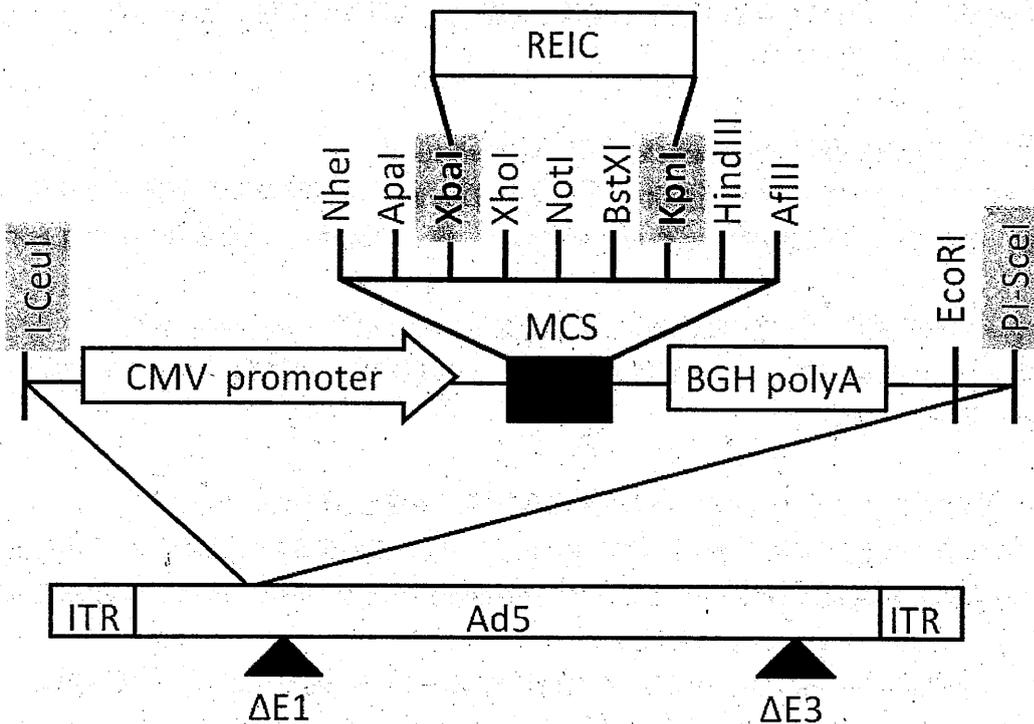


图 4



また、以下に、ヒト REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Adv/hREIC) の構造を示した。



ヒト REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターは、ヒト REIC/Dkk-3 遺伝子全長を pAdeno-X ベクターに挿入した pAdeno-X-REIC を、HEK293 細胞に感染させることにより作成された。すなわち本遺伝子治療臨床研究で用いられるベクターは、上図に示すような E1 および E3 欠損型の非増殖性アデノウイルスベクターである。逆方向反復塩基配列末端 (ITR) は、アデノウイルス DNA の複製に必要不可欠で、E1/E3 を欠損した Ad5 ゲノムを挟んでいる。REIC/Dkk-3 の cDNA は、CMV プロモーター及び BGH ポリ A シグナルとともに組み込まれている。このウイルスベクターは細胞内に侵入し、ウイルスゲノムは核内へと注入されるが、発現すべき E1 遺伝子が欠損しているため、このタンパク質により転写活性化を受ける他のすべてのアデノウイルスプロモーターは駆動することができず、ウイルスの生活環はここで停止する。そして、外来 CMV プロモーターから転写される REIC/Dkk-3 遺伝子のみが発現することになる。

別紙 3

Adv/hREIC 製剤の受入れ試験の詳細

1. 変性の有無を確認する外観試験

融解後ベクター液の混濁の有無を肉眼で確認する。混濁が存在した場合は、当該ベクターを使用せず破棄する。

2. ウイルスの力価の測定 Viral particle (VP) concentration

Sample を 2 倍希釈し分光光度計で吸光度 (OD₂₆₀ 値: 溶解液のみの吸光度で補正した値) を計測し、下記の数式より VP を求める。尚、吸光度は 6 回計測の平均値とする。

$$VP = \text{平均吸光度 (平均 OD}_{260} \text{ 値)} \times 2 \text{ (希釈率)} \times 1.1 \times 10^{12} \text{ viral particle/ml}$$

製造者により測定された既知の VP 濃度から 25% 以内に維持されていることを使用適格の条件とする。

3. REIC 発現アデノウイルスベクターの生物学的活性を確かめるための試験

培養細胞への遺伝子導入時における REIC タンパク質の産生能や細胞死 (アポトーシスを含む) 誘導能を検定するため、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞である 211H 細胞を用いた *in vitro* functionality assay を行う。

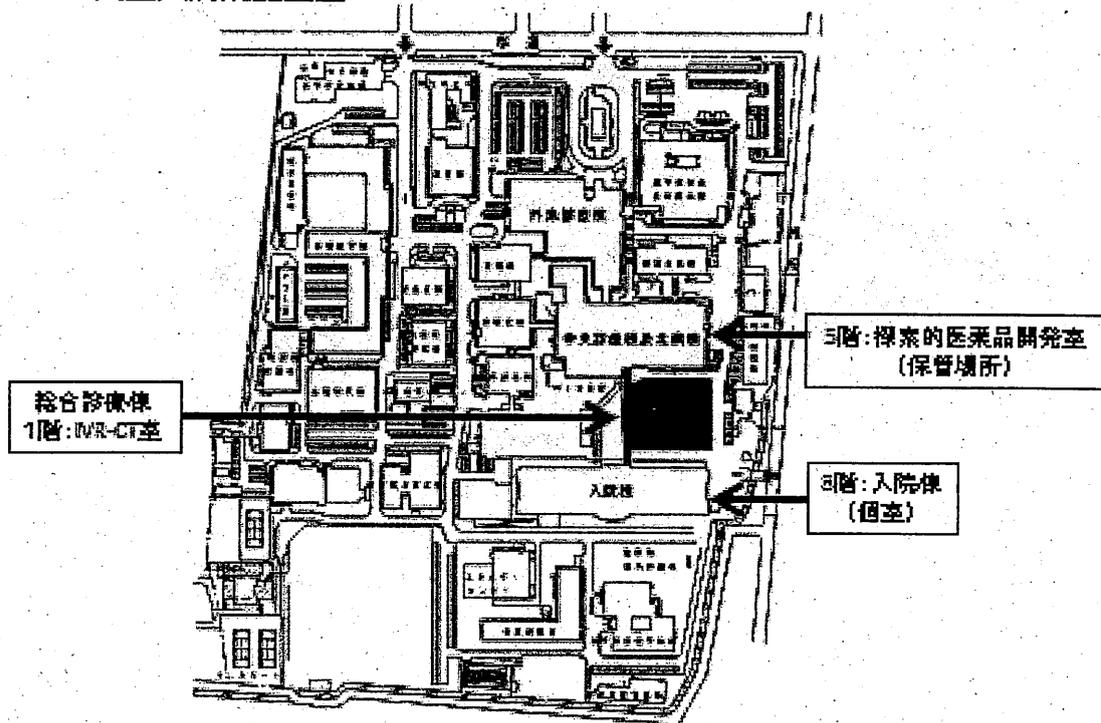
3-a. Adv/hREIC 感染 (100 MOI) 後、24 時間後に 211H 細胞を回収し、細胞内における REIC タンパク質の発現をウェスタンブロット法により確認する。

3-b. Adv/hREIC 感染 (500 MOI) 後 72 時間後に、211H 細胞の細胞死誘導率をヘキスト 33342 による細胞核の染色により測定する。岡山大学において GMP (Good Manufacturing Practice) 基準を満たす Adv/hREIC のウイルスベクターを用いた functionality assay では、感染後の細胞死誘導率は 88.6% であった。受け入れ時に実施した場合の細胞死誘導率が、上記の岡山大学における結果 (細胞死誘導率: 88.6%) から 25% 以内に維持されていることを条件とする。

別紙 4

治療施設の地図及び保管場所の概略図

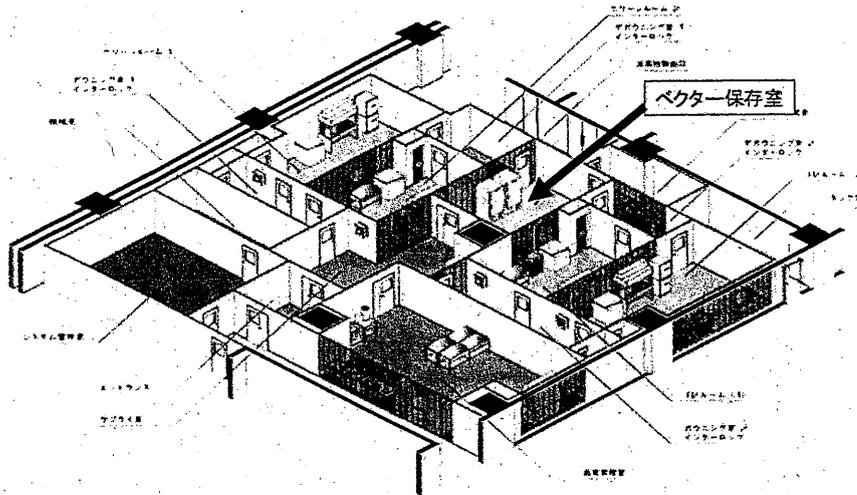
岡山大病院配置図



アデノウイルスベクターの保管・調剤の場所

岡山大学病院中央診療棟 5階 新医療研究開発センター（探索的医薬品開発室）

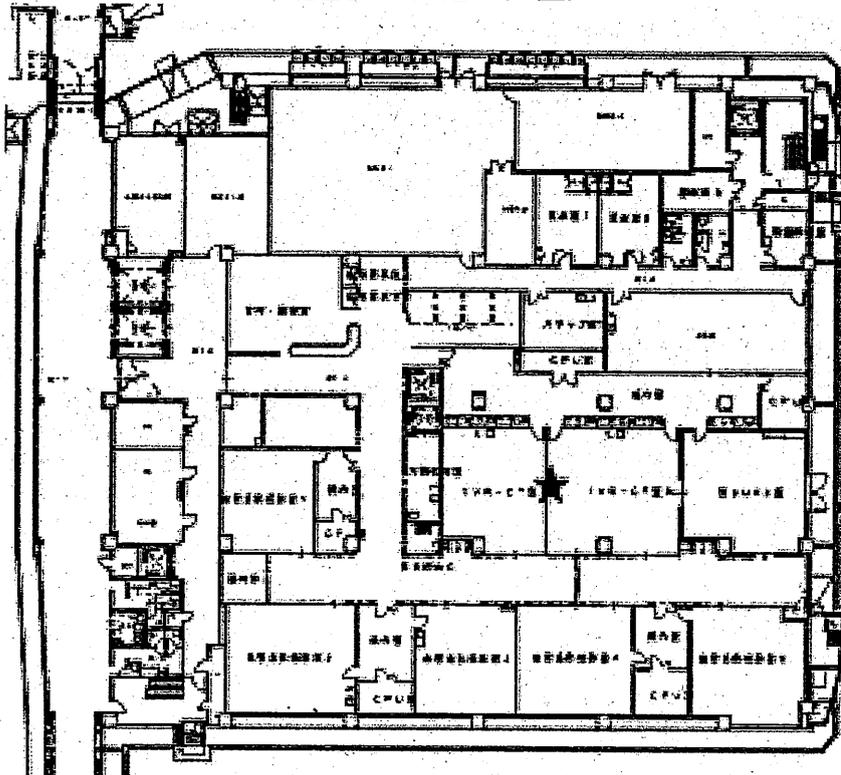
岡山大学病院 新医療研究開発センター（探索的医薬品開発室）



アデノウイルスベクター注入場所

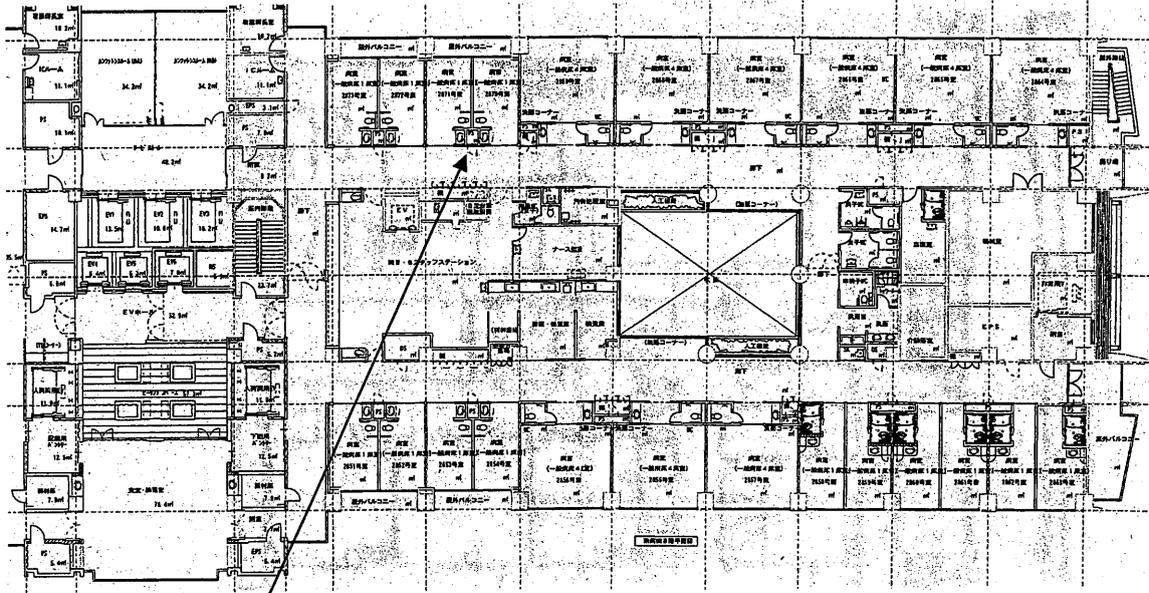
1) 岡山大学病院 総合診療棟 IVR-CT 室

総合診療棟1階 (CT室)

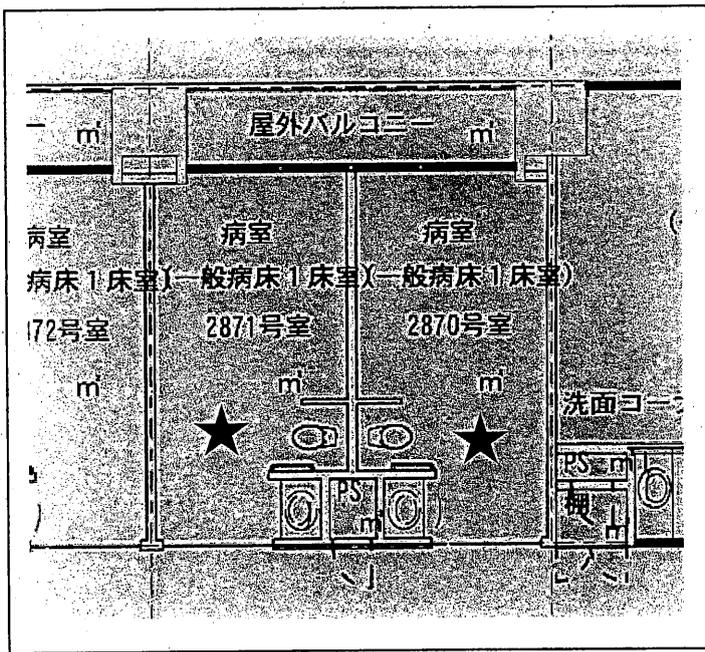


患者の管理場所 (個室)

入院棟 東 8 階 外科病棟 重症個室 2870 号、2871 号室



患者の管理場所



別紙 5 :

Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting. June 10, 2004

Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting June 10, 2004 (Revised in February 2005*)

The scope of the meeting included an update on new gene therapy developments in the regions and an exchange of information on the main topics agreed upon during the 2003 meeting of the ICH GT discussion group (GTDG). The group also discussed organisational matters relevant to future activities in 2005 and 2006. Representatives from the three ICH regions (including experts from regulatory authorities and industry), Health Canada and EFTA participated.

Update on SCID gene therapy

Updates on the experience in the regions were provided. Some documented clinical benefits are now available, such as those seen in the XI-SCID and ADA/SCID clinical trials. Encouraging preliminary results are being generated in clinical trials in Graft Versus Host Disease (GVHD) as well.

The group discussed and agreed on general risk factors:

- Subject age
- Copy number/integration events per cell >1 (on average)
- Dose (total number of transduced cells)
- Relative risk associated with transduced cell populations (most to least):
 - Stem cells with expected selective advantage
 - Stem cells
 - T cells or other differentiated cells

New technologies to assess the risks of insertional oncogenesis are being developed and appear to be useful for clinical research purposes but have not yet been validated. LAM PCR is widely used but since it is not yet validated the use of more than one test could be called for. Dominant bands vary during the disease and do not provide the basis for therapeutic decision-making. If cell clonality trend is detected with a combination of reliable traditional methods, patients should be monitored more often.

The GTDG considered scientifically justified using a combination of methods to improve surveillance for cell clonality as a tool of clinical management. The group also considered valuable the sample archiving for further scientific purposes, as new methods are still in development.

Long-term follow-up (LTFU) of participants in gene therapy clinical trials

FDA presented their current recommendations and background on long-term follow-up of participants in GT clinical trials. All GT trials should have a plan for LTFU for up to 15 years. Data collection should include

- De novo* cancer
- Neurologic disorders*
- Rheumatologic disorders
- Immunological/haematological disorders

* **Considerations** : In order to avoid confusion with the M2 ESTRI Recommendations that follow the step-wise ICH process, the ICH Steering Committee requested that the outcome of GTDG discussions should now be called "Considerations", rather than "Recommendations".

Physical examinations should be carried out for the first 5 years, followed by a questionnaire for the years 6 to 15 (questionnaire should be kept simple)

This observational information should be collected and submitted annually with the purpose of assessing long term risks for patients involved in GT clinical trials.

The group considers that GT LTFU should be included in the ICH GTDG program in view of the specific features of Gene Therapy that would complement ICH E1 and other Pharmacovigilance documents under development.

HIV vaccination in healthy volunteers: possible risks

The GTDG discussed a number of issues related to the exposure of healthy volunteers to HIV vaccines based on gene therapy products:

- Potential risks related to the manufacturing strategy of vaccinia-derived vectors (e.g., production in primary chicken embryo fibroblasts which could be a source of retroviral sequences)
- Production in non-diploid cell lines of a number of gene therapy vectors used therapeutically or in a preventive mode
- Risks posed by functional HIV genes included in the vector (such as *env*, *nef*, *tat*)
- Long-term monitoring of healthy volunteers
- Risk-benefit balance for healthy volunteers

In the USA, gene-based vaccines used as preventive medicines are not regulated as gene therapy products. In Japan, such vaccines are not regulated as gene therapy products. In the EU, gene-based vaccines are considered to be gene therapy products as defined by Annex I to Directive 2001/83/EC as amended by Directive 2003/63/EC; the EU therefore will continue to explore these aspects and will report to the GTDG on matters which might be relevant.

Replication competent adenovirus (RCA) in replication deficient adenoviral vectors

The level of RCA depends on the production strategy and the particular cells lines used. The amount detected is higher in batches produced in conventional cell lines (e.g., 293 cells) compared to that found in batches produced in recently engineered cell lines (e.g., PER.C6 cells).

PhRMA presented data obtained in conjunction with the administration of high doses of replication deficient adenovirus vectors containing high quantities of RCA

- No serious adverse events related to the RCA were observed using various routes of administration (intratumoral, intrahepatic, intraperitoneal) in cancer patients.
- With respect to environmental risk the presented data suggest that shedding of RCA has not been detected by PCR, which is the most sensitive currently available assay.

EU requires replication deficient adenoviral vectors containing a specified level of RCA to be demonstrated in pre-clinical and clinical studies as safe; at present EU does not recommend specific limits, although generally reduction of RCA presence in

vector lots is recommended. The current FDA recommendation is <1 RCA in 3×10^{10} virus particles. Japan evaluates the risks associated with the level of RCA on a case-by-case basis and refers to the FDA recommendations. Health Canada reported that most sponsors have submitted data showing no shedding. Currently Health Canada refers to the FDA RCA limit for their evaluations, but allows some exceptions if not all batches meet the limit.

Consensus was reached that the ICH regions are discouraging high levels of RCA in adenoviral vector batches.

Germline transmission studies

EU presented the discussion held at the CHMP Gene Therapy Expert Group (GTEG) meetings with the goal of developing an addendum to the current GT guideline to assist sponsors and member states. The GTEG wrote a scientific report on a risk assessment approach taking into account a number of factors such as:

- persistence of vector DNA presence
- association with germline cells or other cells (stromal, leukocytes)
- chromosomal integration in germline cells

EU submissions are expected to provide pre-clinical data to show no evidence for risk of inadvertent germline transmission via bio-distribution studies, using good analytical methods.

The regions agreed that bio-distribution studies are important and should be submitted as a part of the clinical development package. The timing for submitting such studies varies by region.

The GTDG considered that it is necessary to continue the discussion with the aim of identifying common principles to minimize the risk of germline transmission.

Future Activities

The next ICH Gene Therapy public workshop will be held in conjunction with the ICH meeting in fall 2005 in USA.

The objectives of the workshops will be to acquire information on the approaches currently being developed with Oncolytic viruses. Issues relevant both to the development of the field and public health will be identified and discussed. The workshop may cover emerging issues including models to study selectivity, attenuation modes, shedding, clinical safety.

The program of the workshop will be further elaborated at the next meeting of the GTDG scheduled to take place in spring 2005.

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) 遺伝子治療専門家グループ (GTDG) 「見解」

この日本語訳は、国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部が参考までに仮訳したものですので、必ず英語原文をご参照ください。

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) 遺伝子治療専門家グループ (GTDG) 「見解」 [仮訳]

ICH GTDG 会議
2004 年 6 月 10 日
(2005 年 2 月改正¹)

今回の会議では、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) 各極 (日本、アメリカ合衆国 (米国)、ヨーロッパ連合 (EU)) における遺伝子治療に関する最新情報の紹介、及び 2003 年の ICH 遺伝子治療専門家グループ (GTDG) で合意された主要議題に関する情報交換などが行われた。さらに、今後 2005 年及び 2006 年の活動に関連する体制についても議論された。ICH 3 極の各代表者 (規制当局及び産業界の遺伝子治療専門家を含む) 並びにカナダ保健省及び欧州自由貿易連合 (EFTA)²の各代表者が参加した。

重症複合免疫不全症 (SCID) の遺伝子治療に関する最新情報

今回の会議では、SCID の遺伝子治療に関する各極の最新情報が報告された。

X1 連鎖重症複合免疫不全症 (X1-SCID) 及びアデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA/SCID) の遺伝子治療臨床研究でも実際に示されているように、SCID に対する遺伝子治療の臨床的有用性は既に確認されている。同様に移植片対宿主病 (GVHD) の遺伝子治療臨床研究においても、将来有望な予備的結果が報告されている。

GTDG は SCID の遺伝子治療における一般的リスク要因について議論を行い、以下の点が一般的リスク要因であるという点で合意した。

- ・ 患者の年齢
- ・ 細胞に組み込まれた遺伝子治療用ベクターのコピー数/染色体挿入頻度が、細胞あたり平均 1 を超えること
- ・ 投与量 (患者に投与した遺伝子導入細胞の総数)
- ・ 遺伝子導入細胞の種類に応じた相対的リスクは以下のとおりである (リスクの高い順に)
 - 選択的優位性をもつと予想される幹細胞 (すなわち、他の幹細胞に比べて増殖能が高い幹細胞)
 - 幹細胞
 - T 細胞又は他の既に分化した細胞

染色体へのベクター挿入による発がんのリスクを評価するための新しい技術が開発中である。このような技術は、まだバリデーションはされていないものの、遺伝子治療臨床研究においても有用であるように思われる。現在、LAM PCR (linear-amplification-mediated

¹ 「見解」 ("Considerations")

GTDG 会議での結論は、ICH 内での段階的な手続きを経て定められた M2 ESTR1 (規制情報の電子的伝送の標準) 専門家作業グループの「勧告」 ("Recommendations") との用語の混乱を避けるために、現時点では「勧告」ではなく「見解」と称するよう ICH 運営委員会から求められた。

² 訳注: 現在、ノルウェー王国、スイス連邦、アイスランド共和国及びリヒテンシュタイン公国の 4 カ国が加盟。

この日本語訳は、国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部が参考までに仮訳したものですので、必ず英語原文をご参照ください。

PCR; 片方向増幅を介するポリメラーゼ連鎖反応) 法が広く用いられている。しかし、LAM PCR 法はまだバリデートされていない技術であることから、複数の試験による確認が必要となる可能性がある。LAM PCR 法において検出される主要なバンドは疾患の過程でも変化するので、このようなバンドを治療方針決定のための根拠、すなわち白血病等副作用の発現の目安として使うことはできない。遺伝子導入細胞のクローナリティ (クローン¹増殖) の傾向が、従来から用いられている信頼性の高い方法によっても認められた場合には、より頻りに被験者のモニタリングを行う必要がある。

臨床における副作用発現を未然に防ぐための管理方法として、遺伝子導入細胞のクローナリティをより高感度でかつより高い信頼性をもって監視するために複数の方法を組み合わせることは、科学的に適切であると GTDG では考えている。加えて、新しい検査方法がまだ開発途上にあることから、将来も必要に応じて科学的検査が行えるよう被験者検体等の試料を保管しておくことも意義があると GTDG では考えている。

遺伝子治療臨床研究に参加した被験者の長期フォローアップ (追跡) 調査

米国食品医薬品局 (FDA) は、遺伝子治療臨床研究に参加した被験者の長期フォローアップ調査について、現在 FDA が推奨している内容及びその背景を説明した。すなわち米国では、①すべての遺伝子治療臨床研究において、被験者の長期フォローアップ調査を遺伝子治療実施後 15 年間は実施するよう計画する必要がある。②その間に収集しなければならないデータとしては、以下の項目が含まれる。

De novo 由来がん²の発症の有無

神経疾患の発症の有無

リウマチ性疾患の発症の有無

免疫性疾患/血液疾患の発症の有無

③遺伝子治療実施後 5 年間は健康診断・検査によるフォローアップ調査を、その後 6 年目から 15 年目までは調査票によるフォローアップ調査を実施しなければならない。また、これに用いる調査票の内容は、わかりやすいものに留めておく必要がある。④このフォローアップ調査の結果は、遺伝子治療臨床研究に参加した被験者における長期リスクの評価のために、毎年とりまとめて FDA に報告しなければならない。

遺伝子治療臨床研究の長期フォローアップ調査に際しては、ICH E1 ガイドライン「致命的でない疾患に対し長期間の投与が想定される新医薬品の治験段階において安全性を評価するために必要な症例数と投与期間について」³及び現在作成中⁴の医薬品安全性監視 (ファーマコビジランス) に関連する ICH ガイドライン⁵の内容に加えて、遺伝子治療に特有の事項も考慮する必要があることから、本件については今後 ICH GTDG 内で正式な議題として議論する必要があると GTDG では考えている。

健康な被験者 (ボランティア) への HIV ワクチン投与一可能性のあるリスク

遺伝子治療用ベクターを利用した HIV ワクチンを健康なボランティアに投与することに

¹ 訳注: 単一細胞に由来する細胞集団。

² 訳注: 前がん状態 (ポリープ) を経ないで発生するがん。

³ 訳注: <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/efficacy/ela/e01a.html>。

⁴ 訳注: 2004 年 11 月に ICH 3 種合意文書 (英文) が完成。

⁵ 訳注: http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID=1195&@_MODE=GLB。

関する以下の諸問題について、GTDG では議論を行った。

- ・ ワクチニアウイルス由来ベクターについて、ベクターの製造方法に関連して生じ得るリスク（例えば、初代ニワトリ胚線維芽細胞を使用して製造を行うことにより、当該細胞からレトロウイルスの塩基配列が混入する可能性がある）
- ・ 治療目的又は予防目的で用いられる遺伝子治療用ベクター¹の製造に非二倍体細胞株を使用することによるリスク
- ・ ベクター（HIV ワクチン）に存在している何らかの機能を有する HIV 遺伝子（例えば *env*、*nef*、*tat*）によってもたらされるリスク
- ・ 健康なボランティアに対する長期のモニタリング
- ・ 健康なボランティアにとってのリスクベネフィットのバランス

米国では、遺伝子をベースとするワクチンは、それが予防目的で使用される限り、遺伝子治療用医薬品としての規制は受けない。日本においても、そのようなワクチンは遺伝子治療用医薬品としての規制は受けない。一方、EU においては、遺伝子をベースとするワクチンは、欧州議会及び理事会指令 2001/83/EC²別添 1 における定義（欧州理事会指令 2003/63/EC³により改訂）に基づき、遺伝子治療用医薬品と扱われる。したがって、EU では、健康なボランティアへの HIV ワクチン投与に関するリスクについて調査を継続し、関連する可能性のある問題が発生した際には GTDG に報告することとする。

非増殖性アデノウイルスベクター中の増殖性アデノウイルス（RCA）

非増殖性アデノウイルスベクター中の増殖性アデノウイルス（RCA）の混入量は、ベクターの製造方法及び製造に用いた細胞株の種類に依存する。非増殖性アデノウイルスベクター中に検出される RCA の量は、従来から使用されている細胞株（例えば 293 細胞）によって製造する場合に比べて、遺伝子組換え技術を使って最近開発された細胞株（例えば PER.C6 細胞）によって製造する場合の方が少ない。

多量の RCA を含有する非増殖性アデノウイルスベクターを高用量投与された症例に関するデータが米国研究製薬工業協会（PhRMA）によりとりまとめられ、今回発表された。それによると

- ・ がん患者において、種々の投与経路（腫瘍内、肝臓内、腹膜内）によって投与を受けた場合でも、RCA に起因する重篤な副作用はみられなかった。
- ・ 環境へのリスクという点に関して、現在用いることのできる最も感度の高い RCA 検出法であるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によっても RCA の体外への排出は認められなかったことが、今回のデータから示唆された。

非増殖性アデノウイルスベクターに混入する RCA 量の許容限度値に関して、EU では、非臨床試験及び臨床試験において安全性が実際に確認されている RCA 量以下であることを求めている。一般的にはベクターに混入する RCA は可能な限り少ないことが望ましいものの、EU では現在のところ公的な許容限度値として特定の数値は示していない。一方、FDA では、RCA 量の許容限度として、現在「 3×10^{10} ウイルス粒子あたり 1 未満」を推奨している。日本では、FDA の推奨値を参考としながら、RCA が混入している場合に想定

¹ 訳注：遺伝子治療用ベクターとして分類される HIV ワクチンも含む。

² 訳注：http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-1/DIR_2001_83/DIR_2001_83_EN.pdf。

³ 訳注：http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-1/DIR_2003_63/DIR_2003_63_EN.pdf。

この日本語訳は、国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部が参考までに仮訳したものですので、必ず英語原文をご参照ください。

されるリスクをケースバイケースの原則で評価した上で、個別に許容限度値を設定している。カナダ保健省は、製薬企業から提出された大部分のデータにおいて RCA の体外への排出は起きていないと報告した。現在のところカナダ保健省では FDA の推奨する RCA 量の許容限度値を基準として考えているが、実際に製造した一部のロットがそれに適合していなかった場合には、FDA の推奨値を超えた許容限度値を認める場合もあるとのことである。

アデノウイルスベクター製品の各ロットに RCA が高レベルで混入することは認めないという点について、ICH 各極は合意に至った。

生殖細胞系列への遺伝子治療用ベクターの伝達に関する研究

EU 域内で試験を実施する者及び EU 加盟国に参考となるような現行の遺伝子治療ガイドライン¹の補遺を作成することを目的として開催された医薬品委員会 (CHMP) 遺伝子治療専門家グループ (GTEG) の会議の内容が EU から発表された。遺伝子治療におけるリスク評価のアプローチ法に関して、GTEG は以下のような点を考慮に入れた科学的な見地からの報告書²を作成した。

- ・ 体内に存在するベクターDNAの持続性
- ・ 生殖細胞系列や他の細胞 (間質細胞、白血球) との関連
- ・ 生殖細胞系列の染色体へのベクターの挿入 (伝達)

この EU の提案では、適切な分析法を用いた前臨床での動物体内分布試験によって、生殖細胞系列への予期しないベクター伝達のリスクがみられないことを示すことが望ましいとされている。

ICH 各極は、体内分布試験は重要であり、臨床開発の過程で検討されたヒトにおけるベクターの体内分布に関する成績を規制当局に提出する必要がある、という点では合意した。しかしながら、そのような成績を提出すべきタイミングは ICH 各極ごとに異なる。

GTDC は、生殖細胞系列へのベクターの伝達のリスクを最小にするための一般的方策を見出すために、この件について今後も議論を継続することが必要であると考ええる。

今後の活動予定

- 2005 年秋に米国で開催される ICH 会議に併せて、次回の ICH 遺伝子治療公開ワークショップを開催する予定である。このワークショップの目的は、世界各国で開発が進められている腫瘍溶解性ウイルスについての現状に関する情報を得ることである。ワークショップでは、腫瘍溶解性ウイルス開発の進展状況及び臨床/公衆衛生上の問題の双方に関連するトピックを抽出し、それについて討論を行う予定である。また、腫瘍溶解性ウイルスの標的細胞選択性を調べるための試験系、弱毒化の様式、体内からの排出、臨床的安全性についてなど、新たに生じたトピックもワークショップで扱う予定である。ワークショップのプログラムの詳細は、2005 年の春に開催が予定されている次回の GTDC 会議において協議される予定である。

¹ 訳注: <http://www.emea.eu.int/hums/itf/itfguide.htm>.

² 訳注: <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/genetherapy/187904en.pdf>.

参考文献リスト

- 1) Kaibe, D. M., Howley, P. M. ed.: Fields VIROLOGY fourth edition, pp.2265-2326, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)
- 2) 畑中正一編: ウイルス学, pp. 198-208, 朝倉書店, 東京 (1997)
- 3) 水田克巳など: 山形県衛生研究所報, 32: 5-7 (1999)
- 4) Bardell, D.: J. Clin. Microbiol. 4: 322-325 (1976)
- 5) APIC guidelines for infection control practice (<http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds3e-eng.php>)
- 6) http://www.yoshida-pharm.com/text/05/5_2_3.html
- 7) Abarzua F., et al.: Cancer Research 65:9617-9622(2005)
- 8) Nasu, Y, et al.: Molecular Therapy. 15: 834-840 (2007)
- 9) Nasu, Y., et al.: Gene Ther. 6: 338-349 (1999)
- 10) Timme, T. L., et al.: Cancer Gene Ther. 5: 74-82 (1998)
- 11) Herman, J. R., et al.: Human Gene Ther. 10: 1239-1249 (1999)
- 12) Sterman, D.H., et al.: Clin Cancer Res 11,7444-7453(2005)
- 13) Sterman, D.H., et al.: Clin Cancer Res. 13,4456-4466(2007)
- 14) Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Human Gene Therapy 13:3-13 (2002)