

## 子宮頸癌前癌病変に対するヒトパピローマウイルス（HPV）治療ワクチン開発における漢方薬アジュバントの有効性に関する研究

分担研究者 川名 敬 東京大学医学部附属病院・産科婦人科学 講師

### 研究要旨

本研究では、HPV16型陽性の子宮頸癌前癌病変を有する症例に対して、HPV16E7発現乳酸菌ワクチンを経口投与し、腸管免疫を介して子宮頸部への抗E7粘膜免疫誘導を行う戦略で探索的Ⅰ/Ⅱa相臨床試験を施行してきた。投与量を10例の登録症例のうち4例は前癌病変が退縮し手術を回避された。最も有効な用量は1g/日であることが判明した。臨床的有効性が証明された。さらに、治療効果を高めるためにアジュバントを組み合わせることが有効であることがわかった。

### A. 研究目的

子宮頸癌は近年、20-40才代を中心に増加傾向にある。それに対して、HPV感染を予防するHPV（予防）ワクチンが開発され、本邦でも接種が開始している。しかし、現行のHPVワクチンは、HPV16/18型のみのもので感染予防であるために、仮に学童女児に100%接種されたとしても子宮頸癌の30-40%は発生する。また、既に病変を有する患者に対する治療効果はない。

そこで本研究では、子宮頸癌前癌病変（以下CIN3）の患者に対する新規の経口抗癌剤として、HPV癌蛋白質E7を標的としたHPV治療ワクチンを開発することを目的とした。

現在、CIN3に対する治療法は手術療法（子宮頸部切除術）である。しかしこの手術を施行された女性は妊娠時に早産率が3-4倍、低出生体重児率が3倍と周産期予後が有意に悪化することがわかっている。

一方でCIN3の平均罹患年齢は30歳前後であり、現代社会においては未婚、未産婦が圧倒的に多い。そのため手術療法に変わる新規の治療戦略、特に薬物療法、が急務となっている。しかしCIN3に対する治療薬は皆無である。

CIN3では、HPV癌蛋白質E7が恒常的に発現していることかHPVのE7を標的にしたHPV治療ワクチンは有望な治療薬になりうる。すなわちE7に対する細胞傷害性T細胞（CTL）を誘導する免疫療法である。HPV治療ワクチンとして、海外で8つの臨床試験が施行されているが、いずれも実用化されていない。子宮頸部へのHPV特異的CTLの誘導が不十分であるためと考察されている。我々は、これまでのHPV治療ワクチンとは全く違う戦略を考えた。従来HPV治療ワクチンは全身性免疫を誘導する皮下注か筋注であり、末梢血（PBMC）中のCTLでモニターしていた。しかし、我々は粘膜免疫を

誘導することに主眼を置いた。免疫誘導は粘膜リンパ球、特に CIN3 が発生する子宮頸部粘膜のリンパ球 (cervical lymphocytes) を用いることにより、粘膜病変に作用する粘膜リンパ球の活性を直接見ることができる。子宮頸部の粘膜免疫を誘導するためには、そのメモリー・誘導組織である腸管粘膜リンパ組織 (GALT) を刺激する経口投与が効率的であると考えた。安全性が高い乳酸菌は経口投与の際に製剤化しやすいキャリアーとなることに着目し、HPVE7 癌蛋白質を発現している乳酸菌をワクチン抗原とした乳酸菌ワクチンを開発した。我々は既に E7 発現乳酸菌ワクチン (GLBL101c) の有効性・安全性を調べるための CIN3 患者を対象とする第 I/IIa 相臨床試験を行っており、子宮頸部リンパ球における抗 E7 type1 cellular immune response (E7-CMI) を測定しつつ、病理学的退縮を見ている。

本研究では、E7 発現乳酸菌ワクチンの E7-CMI を高める方法として、アジュバントして漢方薬を併用する効果を検証し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

## B. 研究方法

HPV16 型 E7 が細胞表面に提示された乳酸菌 *Lactobacillus casei* (E7 発現乳酸菌ワクチン: GLBL101c) を GMP 製造した製剤を作成した。施設研究倫理委員会の承認を得て、第 I/IIa 相探索的臨床試験を計画し、平成 21 年から、臨床試験が開始している。GLBL101c は、最少量の 1cap/d から数例コホートを組みながら 6cap/d まで増量した。1 日 1 回 5 日間を 1 クールとして、1, 2, 4, 8 週の 4 クール内服した。安全性と HPV16E7 に対する細胞性免疫誘導能 (末梢血リンパ球と子宮頸部リンパ球) を解析した。ここで CIN3 病変が粘膜病変であることから、粘膜免疫を優位に誘導できる経腸管投与を選択し、子宮頸部粘膜内の粘膜リンパ球における細胞性免疫誘導能を ELISPOT 法によ

り検討した。

内服治療による臨床的有効性を検討するために、5、9 週で細胞診を施行し、9 週のエンドポイントで組織診、細胞診による病理学的評価を行った。また PBMC、cervical lymphocyte を採取して E7 特異的 IFN  $\gamma$  産生細胞、GranzymeB 産生細胞 (E7-CMI) 数を調べた。

これまでに 1cap/日 1 例、2cap/日 3 例、4cap/日 3 例、6cap/日 3 例の計 10 例 (4 コホート) に対して試験を行った。各コホート終了後に安全性、有効性について外部評価委員会の承認を得て、次のコホートで用量を増量していった。外部データセンターを設置し管理集計を行った。

臨床試験の結果をうけて、本年度からは E7 発現乳酸菌ワクチンの有効性を高めるための研究を行っている。臨床試験では有効例を認めたが、高用量では有効性が低下する傾向が示された (後述) ことから、用量依存性ではなく、アジュバントによる効果の増強を考え、安全性が担保されている漢方薬に注目した。

マウス実験により、GLBL101c と漢方薬の併用経口投与を行った。1, 2, 4, 6 週の 4 クールで経口投与し、7 週で腸管リンパ球と脾臓リンパ球を採取し、E7-CMI を調べた。さらに粘膜アジュバントとして大腸菌リンホトキシン (LTB) を併用することも行った。

### (倫理面への配慮)

本研究にあたっては、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り、東京大学医学部の医学部研究倫理審査委員会の承認を得て、インフォームドコンセントのうえで、文書で同意を得た症例に対して研究を実施する。また、提供試料、個人情報厳格に管理・保存する。

## C. 研究結果

### 1) 第 I/IIa 相探索的臨床試験：

#### (i) 安全性

全 10 例において、GLBL101c 内服に関連した有害事象は 1 つも認めなかった。血液生化学データでも内服に伴った変動は認めなかった。外部評価委員会の審査の結果、GLBL101c は極めて安全性の高い薬剤であることが示された。

#### (ii) 有効性

子宮頸部粘膜に E7-CMI (E7 特異的 IFN $\gamma$  産生、GranzymeB 産生細胞) の誘導が 2cap/日投与のコホート 2 から明らかに確認されてきた。興味深いことに PBMC よりも cervical lymphocyte の方が E7-CMI が有意に高いことがわかった。4cap/日が E7-CMI を最も高いレベルで誘導された。また、5週と比べ9週では2倍近い誘導が確認され、8週の内服によりブースター効果が発揮されていることが確認された。しかし、6cap/日投与のコホート 4 では、3 例中 2 例はむしろ E7-CMI の誘導が低かった。

病理学的評価としては、1cap/日もしくは 2cap/日投与の 4 例は、CIN3 病変が残存し、円錐切除術を必要とした。4cap/日投与のコホート 3 では、3 例全例が CIN1-2 に退縮し、臨床的有效性が示され、手術を回避できた。これらの 3 例は試験終了後、投薬はなく経過観察中 (1.5-2 年経過) であるが全症例とも CIN3 の再発を認めない。

6cap/日投与のコホート 4 のうち、高い E7-CMI が cervical lymphocyte に誘導された 1 例は CIN2 に退縮した。E7-CMI の誘導が弱かった 2 例では CIN3 が消失せず後療法を必要とした。以上のことから E7 発現乳酸菌ワクチンは、ある程度の増強によって E7-CMI が量依存的に上昇したが、それ以上の高用量になると E7-CMI が減少し臨床効果も乏しくなることがわかった。このことより、E7-CMI をさらに増強し臨床効果を高めるためには、増量ではなく、アジュバン

ト併用が必要であると考えられた。

### 2) 漢方アジュバント併用の検討：

免疫賦活作用が知られている十全大補湯 (JTT) と補中益気湯 (HET) を用いた。漢方薬は食餌に混ぜて GLBL101c のマウス投与期間中連日内服投与した。粘膜アジュバントである大腸菌トキシシン (LTB) は GLBL101c 投与の週に週 1 回投与した。JTT も HET を GLBL101c に併用した場合は、脾臓細胞では E7-CMI が GLBL101c のみと比して上昇したことから全身性免疫へのアジュバント効果が示された。しかし腸管粘膜リンパ球では明らかな上昇とは言えなかった。

そこで、GLBL101c に LTB を添加した状態で JTT、HET を併用したところ、腸管粘膜リンパ球に GLBL101c 単独よりも 4-5 倍高い E7-CMI が誘導された (図 1)。また抗 E7 抗体も血清中、腸管洗浄液中に誘導された。とくに HET の誘導能が高いことがわかった。乳酸菌と漢方薬、粘膜アジュバントを併用することによって E7-CMI を粘膜リンパ球に誘導する作用が相乗的に増強された。

## D. 考察

乳酸菌をベースに HPV16E7 癌蛋白質を発現させた抗 HPV 治療ワクチン (GLBL101c 内服) は、癌免疫療法として新規の抗癌剤になりうる。子宮頸部における免疫学的有効性と CIN3 治療効果 (奏効率) が相関していることから本治療薬による効果を見ていると考えられる。特に、4cap/日 (1g/日) のコホート 3 では全例 CIN1-2 に退縮したことはインパクトが大きい。

乳酸菌ワクチンを高用量 (6cap/日) にすると、むしろ E7-CMI の誘導が低下したことは E7 特異的抑制性 T 細胞 (Treg) が誘導され始めた可能性がある。腸管では高用量の抗原に曝露されると Treg が誘導されることが知られている。GLBL101c の limiting dose は 4cap/日程度であるかもしれない。

以上から、本臨床試験は来年度から 4cap/日 で用量を固定し残り、7 例を追加する予定である。

乳酸菌経口投与では、免疫寛容が問題となる。今回の臨床試験の結果から高用量では E7 に対する免疫寛容が誘導されている可能性もある。そこで、E7-CMI 誘導を増強するためにはアジュバントを導入することが肝要であると考えている。乳酸菌はもとも腸管免疫においてアジュバント効果が乏しいことも予想される。

漢方薬は実地臨床で日常的に使われている薬であり副作用もほとんどない。GLBL101c と同じ内服薬であるため併用しやすい。

マウス実験の結果から補中益気湯 (HET) が最も有望である。今回の検討では大腸菌トキシンLTBを添加しないとE7-CMI粘膜免疫は誘導されなかったことから、漢方薬だけでは粘膜免疫の細胞性免疫誘導は不十分であると考えられる。LTB はヒトでの応用は難しいため、我々はヒトでの使用経験のある $\alpha$ GalCer (合成セラミド) をLTBの代わりに用いる検討を来年度に行うことにしている。

#### E. 結論

本研究で証明された GLBL101c の有効性は、ヒトの子宮頸部における E7 特異的細胞性免疫誘導を伴った病理学的有効性であることから、臨床応用への実用化が近いと考えられる。至適用量が設定されたことから、今後用量を固定し、症例を蓄積したうえで、企業治験を検討する。

薬剤の効果をさらに増強するアジュバントとして漢方薬 (補中益気湯、十全大補湯) が見出され、E7 発現乳酸菌ワクチンの低コスト化や臨床的効果の増強が期待される。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsunashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H; Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J Med Virol*, in-press, 2012
- 2) Matsumoto K, Hirai Y, Furuta R, Takatsuka N, Oki A, Yasugi T, Maeda H, Mitsunashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H; Subsequent risks for cervical precancer and cancer in women with low-grade squamous intraepithelial lesions unconfirmed by colposcopy-directed biopsy: Results from a multicenter, prospective, cohort study, *Int J Clin Oncol*, E-pub, 2011
- 3) Iwasawa Y, Kawana K, Fujii T, Schust DJ, Nagamatsu T, Kawana Y, Sayama S, Miura S, Matsumoto J, Adachi K, Hyodo H, Yamashita T, Kozuma S, Taketani Y: A possible coagulation-independent mechanism for pregnancy 1 loss involving  $\beta$  2glycoprotein 1-dependent antiphospholipid antibodies and CD1d. *Am J Reprod Immunol*, 67: 54-65, 2012
- 4) Yamamoto N, Mori R, Jacklin P, Osuga Y, Kawana K, Shibuya K, Taketani Y; Introducing HPV vaccine and scaling up screening procedures to prevent

- deaths from cervical cancer in Japan: A cost-effectiveness analysis. *Br J Obstet and Gynecol*, 119: 177-186, 2012
- 5) Kojima S, Kawana K, Fujii T, Yokoyama T, Miura S, Tomio K, Tomio A, Yamashita A, Adachi K, Sato H, Nagamatsu T, Schust DJ, Kozuma S, Taketani Y; Characterization of intraepithelial lymphocytes (IELs) residing in the cervical mucosa of patients with human papillomavirus (HPV)-infected intraepithelial neoplastic lesions. *Am J Reprod Immunol*, 66: 435-443, 2011
- 6) Inaba K, Arimoto T, Hoya M, Kawana K, Nakagawa S, Kozuma S, Taketani Y; Interstitial pneumonitis induced by pegylated liposomal doxorubicin in a patient with recurrent ovarian cancer. *Med Oncol*, Mar 10. [Epub ahead of print], 2011
- 7) Arimoto T, Nakagawa S, Oda K, Kawana K, Yasugi T, Taketani Y; Second-line chemotherapy with docetaxel and carboplatin in paclitaxel and platinum-pretreated ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. *Med Oncol*. Mar 6. [Epub ahead of print], 2011

## 2. 学会発表

- 1) Kawana K, Development of novel HPV vaccines: broad-spectrum prophylactic and therapeutic、第63回日本産科婦人科学会、日韓シンポジウム、8月、大阪
- 2) Kawana K, et al, Novel immunotherapy and the clinical trial for cervical cancer via mucosal immunity to human papillomavirus E7.、第70回日本癌学会、10月、名古屋
- 3) 川名敬、日本エイズ学会日本性感染症学会合同シンポジウム：婦人科領域におけ

る性感染症～HPV ワクチンによる予防を含めて、第24回日本性感染症学会、12月、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

「乳酸菌 HPV ワクチンと漢方アジュバント併用投与による粘膜免疫誘導を介した子宮頸部前癌病変に相乗的治療効果」特許申請中

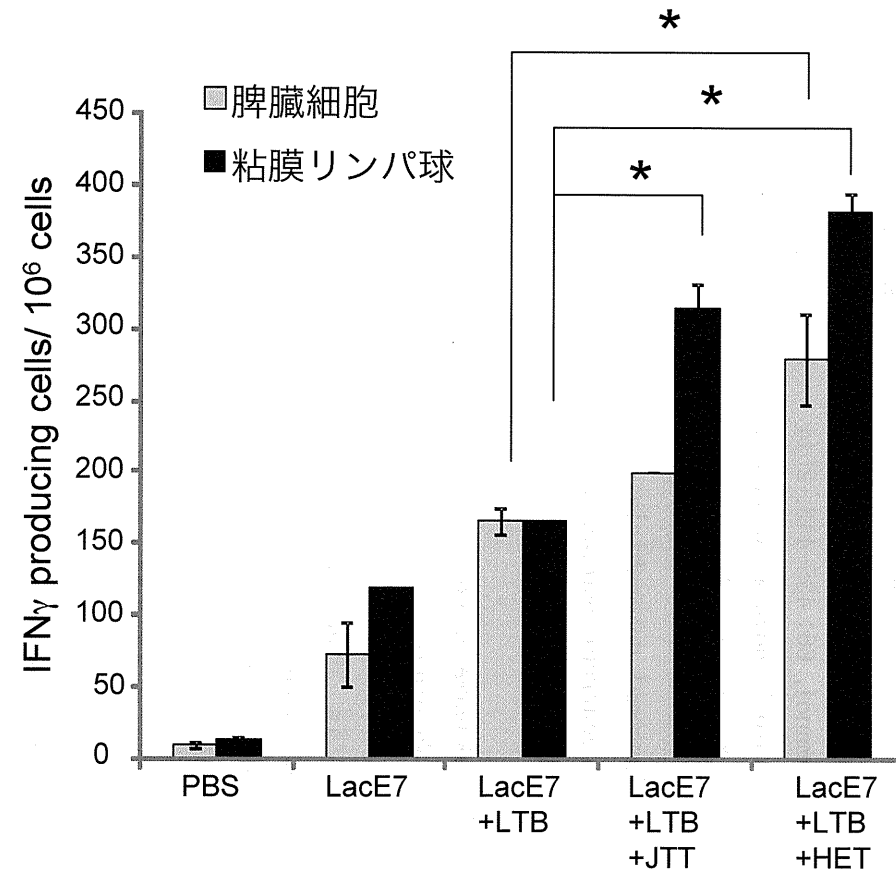
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

図 1



## 高齢者におけるインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント作用の短期効果の検討

研究分担者 後藤 博三 富山大学大学院医学薬学研究部和漢診療学 准教授  
 済木育夫 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 教授  
 小泉桂一 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授

### 研究要旨

今回我々は、高齢者などのインフルエンザのハイリスクグループに対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバントとしての可能性を多面的に解析し、多施設において漢方薬非投与症例と比較検討する。本年度は、使用する漢方薬の検討と測定項目を確認するため、短期効果の検討を実施した。対象は富山県の長期療養型病床 3 施設に入院中の患者でインフルエンザワクチン接種予定者 S 病院 26 名、T 病院 13 名、Y 病院 7 名。S 病院、T 病院において高齢者を無作為に十全大補湯投与群と非投与群、補中益気湯投与群と非投与群の 2 群に分け、Y 病院では、漢方薬非投与による対象者のみを 12 週間経過観察した。インフルエンザワクチン接種前、接種後 4 週、8 週、12 週に HI 価 A (H1N1)、A (H3N2)、B (ビクトリア系統) を測定した。また、副反応に及ぼす影響の検討のため血中 IgE-RIST、血液生化学検査を実施し、漢方薬投与群と非投与群を比較検討した。その結果、十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、漢方薬非投与群のワクチン接種前と接種後 4 週、8 週、12 週の HI 価と GMT 値を比較検討したところ、3 群間で各々差を認めなかった。しかし、接種前抗体価 10 以下で接種後抗体価 40 以上または接種前抗体価に比べて抗体価の上昇率が 4 倍以上を陽転と定義して、陽転率の推移を検討したところ、接種後 4 週の A (H3N2) の陽転率は十全大補湯投与群で非投与群に比較して上昇傾向 ( $P < 0.1$ ) が認められた。このことから、十全大補湯は、抗体価の低い高齢者のインフルエンザワクチン接種後の抗体価上昇に好影響を及ぼしている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

インフルエンザワクチンは、インフルエンザ予防の重要な手段である。現在、これらワクチン療法の効果を増強するために、接種したワクチン抗原に対する特異的な免疫系を誘導する、いわゆるワクチンアジュバントの開発が国家プロジェクトとして遂

行されている。これらワクチンアジュバントに付与すべき機能としては、(1) 抗体産生の一過的な増加効果のみが着目されがちだが、将来的には(2) 抗体産生の持続効果および(3) 副反応の軽減を付与した次世代型のワクチンアジュバントの開発が望まれている。さらに、新型インフルエンザ対策とし

て行われるプレパンデミックワクチンの有用性を高めるためには、接種したワクチン抗原と近似構造の抗原をも認識する(4)交差性抗体群の誘導可能なワクチンアジュバントの開発が必須である。

近年、幾つかの漢方薬にワクチンアジュバントとしての効果が示唆される報告が散見されている。しかしながら、これらの報告は上記(1)に関する検討にとどまることが多く、包括的にワクチンアジュバントの付与すべき機能を検討してはいない。

そこで、本検討では、高齢者などのインフルエンザのハイリスクグループに対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバントとしての可能性を(1)から(4)の項目を中心として多面的に解析し、多施設において漢方薬非投与症例と比較検討する。本年度は、使用する漢方薬の検討と測定項目の確認を確認するため、短期効果の検討を実施した。

## B. 研究方法

1) 対象は富山県の長期療養型病床3施設(S病院、T病院、Y病院)に入院中の患者でインフルエンザワクチン接種予定者S病院26名、T病院13名、Y病院7名。対象者は65才以上で、重篤な担癌患者・感染症患者、全身状態の著しく悪化している患者は除外した。

2) S病院、T病院において高齢者を無作為に十全大補湯投与群(一日量7.5g/日)と非投与群、補中益気湯投与群(一日量7.5g/日)と非投与群の2群に分け、Y病院では、漢方薬非投与による対象者のみを12週間経過観察した。インフルエンザワクチン接種前、接種後4週、8週、12週に各調査項目を測定し、漢方薬投与群と非投与者を比較検討する。

3) 調査項目は、年齢、身長、体重、主要疾患、主な合併症、介護度、寝たきり度、日常生活自立度の参加者の状況。抗体産生の

増加効果の検討のためHI価(A/カリフォルニア/7/2009(H1N1)、A/ビクトリア/210/2009(H3N2)、B/ブリスベン/60/2008(ビクトリア系統)の抗体価)を測定した。また、副反応に及ぼす影響の検討のため血中IgE-RIST、血液生化学検査(WBC、RBC、Hb、Ht、血小板数、血液分画、TP、Alb、AST、ALT、LDH、ALP、 $\gamma$ GTP、BUN、Cr、UA、Na、K、Cl、CRP)を実施した。

4) 調査項目は、mean $\pm$ S.D.で表し、有意差検定は各週の群間の比較にはpaired t-testを用いておこない $P<0.05$ を有意と判定した。HI価は40倍以上を陽性と判定し、幾何学的平均(geometric mean titer: GMT)により表示し解析に用いた。

## (倫理面への配慮)

本研究は富山大学倫理委員会の承認を得て実施した。

## C. 研究結果

1) 十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、漢方薬非投与群のHI価とGMT値の変動参加者は十全大補湯投与群13名(男性5名、女性8名、平均年齢 $84.6\pm 8.1$ 才)、補中益気湯投与群6名(男性1名、女性5名、平均年齢 $82.3\pm 6.3$ 才)、漢方薬非投与群27名(男性12名、女性15名、平均年齢 $87.0\pm 7.3$ 才)であった。経過中に漢方薬非投与群の4名が原疾患の増悪により経過観察が中止となった。各群の背景因子を表1に示した。

開始時から12週間経過後の各群のHI価を表2に示す。HI価が40倍以上を陽性と判定した際の各群間の比較では、有意な差を認めなかった。さらに、HI価から算出したGMTの経過を表3に示す。各群間の比較では、有意な差を認めなかった。副作用として十全大補湯投与群で軽度血清K値の低下を認めた。



2) 十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、漢方薬非投与群の陽転率の推移

S 病院、T 病院において十全大補湯投与群（一日量 7.5g/日）と非投与群、補中益気湯投与群（一日量 7.5g/日）と非投与群の 2 群に分けた参加者を対象に陽転率の推移を検討した。接種前抗体価 10 以下で接種後抗体価 40 以上または接種前抗体価に比べて抗体価の上昇率が 4 倍以上を陽転と定義して、各群の陽転率の経過を図 1 : A (H1N1)、図 2 : A (H3N2)、図 3 : B (ビクトリア系統) に示す。S 病院で実施した十全大補湯の無作為化比較試験において、A (H3N2) の陽転率は十全大補湯投与群 13 例中 6 例 (46%) と非投与群 13 例中 2 例 (15%) に比較して  $p=0.089$  で陽転率の上昇傾向が認められた。

#### D. 考察

今回我々は、高齢者などのインフルエンザのハイリスクグループに対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバントとしての可能性を (1) 抗体産生の一過的な増加効果 (2) 抗体産生の持続効果 (3) 副反応の軽減 (4) 交差性抗体群の産生増強効果の項目を中心として多面的に解析し、多施設において漢方薬非投与症例と比較検討した。本年度は、使用する漢方薬の検討と測定項目の確認を確認するため、短期効果の検討を実施した。

これまでの若年者と高齢者を比較した臨床研究では、4 週後の抗体陽転率 (HI 価 40 倍以上) は、A (H1N1) で若年者 (平均年齢 38.2 歳) 74.7%、高齢者 (平均年齢 67.1 歳) 80.1%、A (H3N2) で若年者 91.4%、高齢者 94.3%、B (ビクトリア系統) で若年者 91.4%、高齢者 94.3% (加地正英他、感染症学雑誌 76, 263-268, 2002) の報告に比べて低値であった。この理由として今回の参加者の平均年齢が 82.3-87.0 歳と高齢であったことが考えられる。

十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、

漢方薬非投与群のワクチン接種前と接種後 4 週、8 週、12 週の HI 価と GMT 値を比較検討したところ、3 群間で各々差を認めなかった。しかし、接種前抗体価 10 以下で接種後抗体価 40 以上または接種前抗体価に比べて抗体価の上昇率が 4 倍以上を陽転と定義して、十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、漢方薬非投与群の陽転率の推移を検討したところ、十全大補湯の無作為化比較試験において、A (H3N2) の陽転率は十全大補湯投与群 46% と非投与群 15% に比較して陽転率の上昇傾向が認められた。このことから、十全大補湯は、抗体価の低い高齢者のインフルエンザワクチン接種後の抗体価上昇に好影響を及ぼしている可能性が示唆された。

本臨床研究の結果から、さらに症例数を追加し、十全大補湯を用いたインフルエンザワクチンに対するアジュバント作用の長期効果を検討する予定である。

#### E. 結論

長期療養型病床群に入院中の高齢者に対して、インフルエンザワクチンに対する十全大補湯と補中益気湯のアジュバント作用を検討した。その結果、十全大補湯は、インフルエンザ A (H3N2) に対して、抗体価の低い高齢者の陽転率改善に好影響を及ぼす可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 後藤博三, 小泉桂一, 酒井伸也, 井上博喜, 山本 樹, 藤本 誠, 引網宏彰, 柴原直利, 済木育夫, 嶋田 豊: 十全大補湯・補中益気湯の自然免疫に及ぼす

影響に関する予備的検討. 第 28 回和漢  
医薬学会学術大会, 2011, 8, 27-28, 富  
山.

表1 十全大補湯投与群（J群）、補中益気湯投与群（H群）、漢方薬非投与群（N群）の背景因子

群	性別		平均年齢 (才)	主要原疾患			介護度		
	男	女		脳血管障害	認知症	骨関節疾患	3	4	5
J	5	8	84.6±8.1	9	11	3	0	2	11
H	1	5	82.3±6.3	5	3	0	0	2	4
N	12	15	87.0±7.3	17	18	6	3	6	18

(mean±S. D.)

表2 十全大補湯投与群（J群）、補中益気湯投与群（H群）、漢方薬非投与群（N群）のインフルエンザワクチン接種後のHI価の変動

Influenza virus strain and patients group vaccinated	% of patients with HI titers of $\geq 40$ at			
	0 W	4 W	8 W	12 W
A/ California/7/2009(H1N1)				
Group J (n=13)	2 (15.4 %)	8 (61.5 %)	7 (53.9 %)	6 (46.2 %)
Group H (n=6)	2 (33.3 %)	4 (66.7 %)	4 (66.7 %)	3 (50.0 %)
Group N (n=23-27)	5 (18.5 %)	17 (65.4 %)	12 (50.0 %)	11 (56.5 %)
<i>p</i> value <sup>a</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A/ Victoria /210/2009(H3N2)				
Group J (n=13)	3 (23.1 %)	6 (53.9 %)	8 (61.5 %)	6 (46.2 %)
Group H (n=6)	1 (16.7 %)	4 (66.7 %)	4 (66.7 %)	4 (66.7 %)
Group N (n=23-27)	7 (25.9 %)	16 (61.5 %)	11 (45.8 %)	8 (34.8 %)
<i>p</i> value <sup>a</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
B/ Brisbane /60/2008				
Group J (n=13)	4 (30.8 %)	5 (38.5 %)	4 (30.8 %)	5 (38.5 %)
Group H (n=6)	3 (50.0 %)	3 (50.0 %)	3 (50.0 %)	3 (50.0 %)
Group N (n=23-27)	5 (18.5 %)	7 (26.9 %)	7 (29.2 %)	5 (21.7 %)
<i>p</i> value <sup>a</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

a. The comparison among three groups.

表3 十全大補湯投与群 (J群)、補中益気湯投与群 (H群)、漢方薬非投与群 (N群) のインフルエンザワクチン接種後の GMT の変動

Influenza virus strain and patients group vaccinated	GMT at			
	0 W	4 W	8 W	12 W
A/ California/7/2009(H1N1)				
Group J (n=13)	10.0	31.8	23.9	26.1
Group H (n=6)	10.8	35.6	21.6	19.3
Group N (n=23-27)	7.3	50.8	29.1	29.6
<i>p</i> value <sup>a</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A/ Victoria /210/2009(H3N2)				
Group J (n=13)	9.0	25.7	21.1	17.4
Group H (n=6)	9.6	31.7	28.3	28.3
Group N (n=23-27)	6.6	33.2	27.5	20.4
<i>p</i> value <sup>a</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
B/ Brisbane /60/2008				
Group J (n=13)	14.0	27.1	14.0	20.7
Group H (n=6)	17.2	35.6	21.6	21.6
Group N (n=23-27)	6.8	17.7	15.4	11.4
<i>p</i> value <sup>a</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

a. The comparison among three groups.

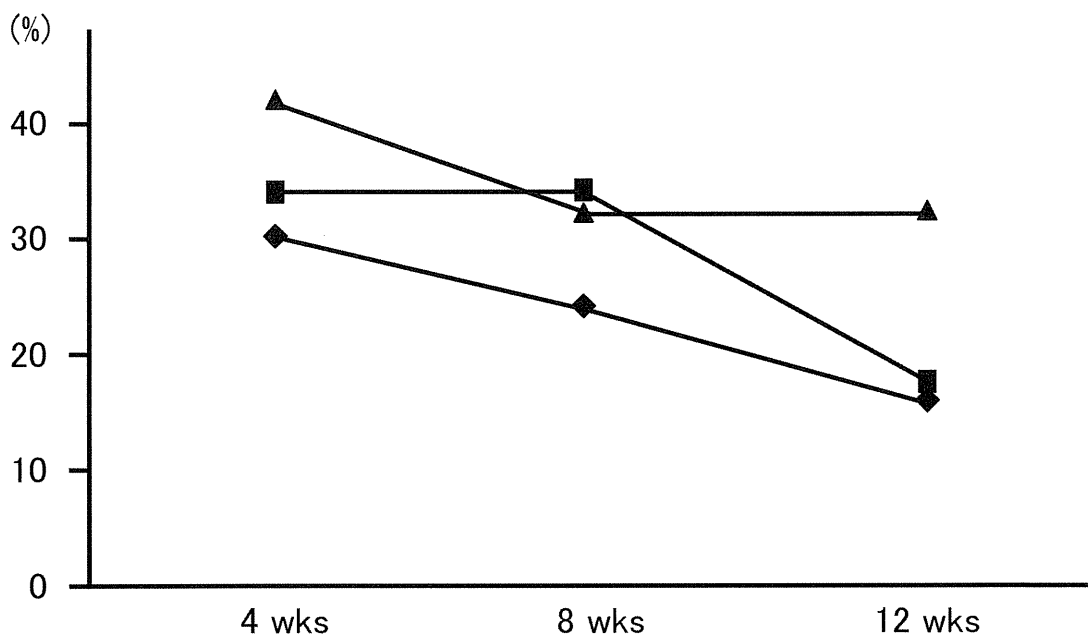


図1 十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、漢方薬非投与群のA (H1N1) 抗体価の陽転率の推移：十全大補湯投与群 (◆)、補中益気湯投与群 (■)、漢方薬非投与群 (▲)

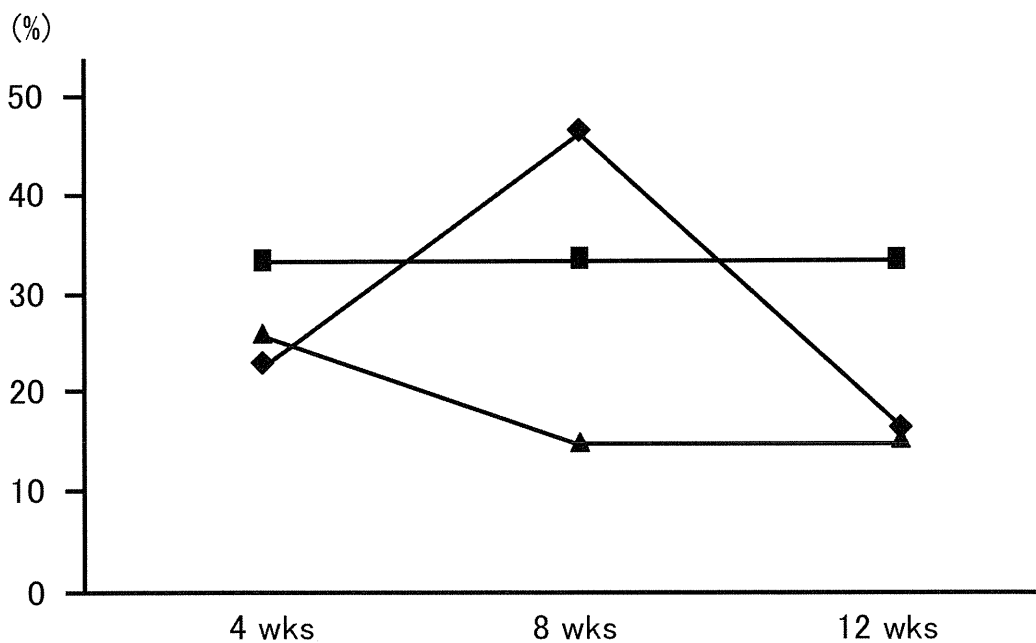


図2 十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、漢方薬非投与群のA (H3N2) 抗体価の陽転率の推移：十全大補湯投与群 (◆)、補中益気湯投与群 (■)、漢方薬非投与群 (▲)

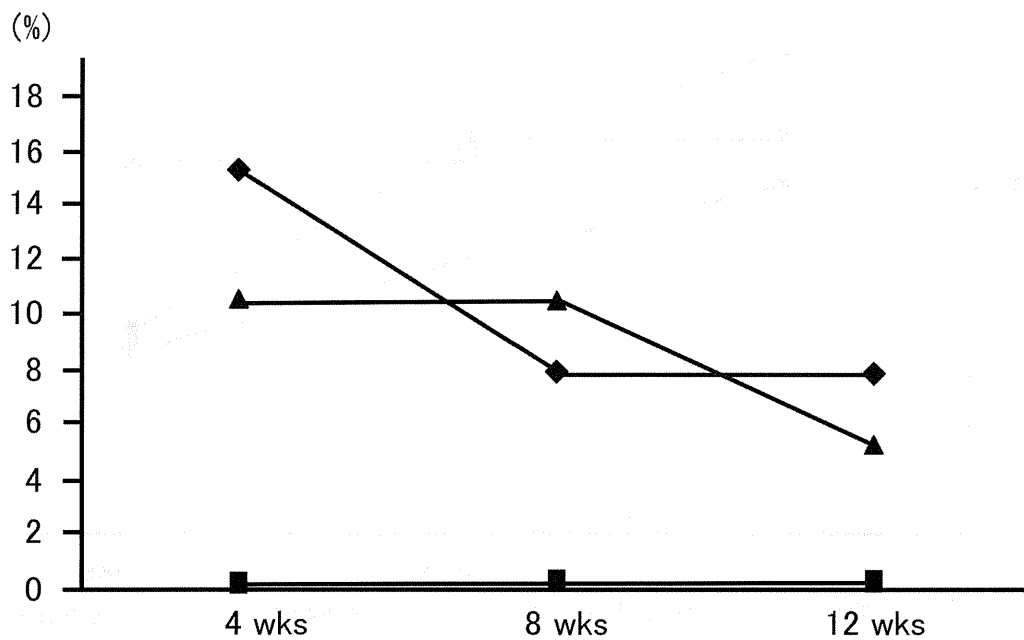


図3 十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、漢方薬非投与群のB（ビクトリア系統）抗体価の陽転率の推移：十全大補湯投与群（◆）、補中益気湯投与群（■）、漢方薬非投与群（▲）

## 漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用： 漢方薬を投与された RA 患者におけるインフルエンザワクチン接種 後の免疫応答

研究分担者 小暮 敏明 社会保険群馬中央総合病院和漢診療科 部長

### 研究要旨

関節リウマチ（以下 RA）は免疫異常を背景とした滑膜関節を病変の主座とする全身性の慢性炎症性疾患である。RA のコントロールは現在でも困難であるが、近年の生物学的製剤（以下 Bio. 製剤）の臨床応用に伴いその治療戦略は大きく変化している。しかしながら RA 自体の免疫異常ならびに種々の抗リウマチ薬による易感染性は臨床上的の問題となっている。現在、RA 患者ではインフルエンザワクチン接種が推奨されているが、インフルエンザワクチン予防接種の疾患活動性に及ぼす影響ならびに感染症予防効果の意義が、なお議論されている。そこで漢方薬を服用している RA 患者においてインフルエンザワクチン免疫応答がいかなる Profile を呈しているかを明らかにすることを目的として、45 例（平成 22 年度）・56 例（平成 23 年度）の漢方薬を投与されている RA を対象として 3 種類の Subunit について観察研究を実施した。その結果、漢方薬が投与されている RA 患者は、1) 血清変換（Seroconversion）において健常人とほぼ同様であった、2) MTX 投与群/非投与群で血清変換に差異は見られなかった、3) 臨床的に有意な抗体価以上を呈する患者（Seroprotection）が多かった、4) インフルエンザワクチン接種前後で RA の疾患活動性の増悪は見られなかった、等の結果が得られた。以上から RA 患者において漢方薬は RA の疾患活動性の抑制が期待されている一方で、インフルエンザワクチン免疫応答に Positive に作用することが示唆された。平成 24 年度には長期的な抗体価の推移ならびに Bio. 製剤が投与されている RA 患者に特化して免疫応答を明らかにする予定である。

### A. 研究目的

「漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用」において、今回我々は、漢方薬を投与された RA 患者におけるインフルエンザワクチン接種後の免疫応答を明らかにすることを目的とした。RA は、近年の生物学的製剤（以下 Bio. 製剤）の臨床応用に伴いその治療戦略は大きく変化している。しかしながら RA 患者の易感染

性は臨床上的の大きな問題となっている。この現状から RA 患者ではインフルエンザワクチン接種が推奨されているが、インフルエンザワクチン予防接種の RA 疾患活動性に及ぼす影響ならびに感染症予防効果の臨床的意義は、なお議論されている。そこで、本院和漢診療科で加療されている RA 患者（RA に対する漢方治療が行われている）を対象としてインフルエンザワクチン

接種前後の免疫応答の観察研究を行うこととした。

## B. 研究方法

1) 対象は本院和漢診療科を受診中の RA 患者で RA に対する漢方治療を行っている者とした。西洋医学的な治療については特に症例の選択は行わなかった。

2) 西洋医学的な治療 (メソトレキサート : MTX、タクロリムス : TAC、生物学的製剤など) については観察期間中に特に介入に制限は加えなかった。

3) 調査項目は、赤沈・CRP・DAS28-CRP・インフルエンザウイルス抗体価 (各 Subunit) とした。

4) 臨床研究デザイン : 観察研究 インフルエンザワクチン (A/California/7/2009 (H1N1)-like strain (A/H1N1 strain), A/Victoria/210/2009 (H3N2)-like strain (A/H3N2 strain), and B/Brisbane/60/2008-like strain (B strain)) を接種前ならびに接種 4 週後に調査項目を評価した。

5) エンドポイントは、Seroconversion・Seroprotection (インフルエンザ抗体価 40 <) とした。

(倫理面への配慮)

本研究は社会保険群馬中央総合病院治験審査委員会の承認を得て実施した。

## C. 研究結果

1) 対象患者の臨床的な特徴を (表 1) に示す。MTX 投与群/非投与群で PSL 投与量ならびに DAS28 に有意差は見られなかった。なお MTX 非投与群では Bio. 製剤ならびに TAC 投与患者を除外した。

2) インフルエンザ抗体価の変化

全症例でのインフルエンザ抗体価の変化は、A/H1N1 strain :  $12.1 \pm 14.0 \rightarrow 78.8 \pm 119.7$ 、

A/H3N2 strain :  $13.5 \pm 13.9 \rightarrow 35.7 \pm 33.6$ 、B strain :  $12.8 \pm 10.3 \rightarrow 27.3 \pm 27.8$  と有意な増加が認められた。これらの結果は一般の健常人とほぼ同様の結果であった。MTX 投与群/非投与群の比較では有意差は認められなかった。また MTX 投与群に限定してみると過去の MTX 投与 RA 患者の抗体価の結果よりも高い抗体価を呈していた (表 2 参照)。

3) インフルエンザワクチン接種の臨床的意義について

インフルエンザ抗体価が 40 以上で感染防御として臨床的に有意義とされていることから抗体価が 40 < となった症例の割合をインフルエンザワクチン接種前後で比較した。その結果、全症例では健常人とほぼ同等、MTX 投与群では過去の報告と比べて高い傾向にあった (図 1 参照)。

## D. 考察

今回我々は、漢方薬を投与された RA 患者におけるインフルエンザワクチン接種後の免疫応答

の経過観察を本院和漢診療科で加療中の RA 患者を対象に実施した。その結果から RA 患者において漢方薬は RA の疾患活動性の抑制が期待されている一方で、インフルエンザワクチン免疫応答に Positive に作用する可能性が示唆された。特に MTX を投与されている患者においてその効果は顕著であった。一般に MTX 投与群ではインフルエンザワクチン接種による Seroconversion については、とくに影響を与えないとする論文と低下するという論文が散見されていることから、観察研究である本研究の結果から MTX 投与群において漢方薬投与はワクチン接種に際してのアジュバント効果を有すると結論するには時期尚早と考えられる。しかしながら、十分な Seroconversion / Seroprotection が見られたことから今後



さらに詳細な検討を加えることは極めて有意義と考えている。

漢方薬の RA 患者における免疫調節作用のその詳細については明らかになっていない。抗リウマチ効果に関してはこれまでの RA 患者における臨床研究、関節炎マウス等の基礎研究から、概して T 細胞への影響が明らかになりつつあり、その結果 B 細胞の活性化が抑制されることが示唆されている。今回観察された抗リウマチ効果と広義のワクチンアジュバント効果は漢方薬の免疫調節作用を検討するうえで興味深い結果と考えられる。

来年度には漢方薬のアジュバント効果を明確にするために長期的な抗体価の推移ならびに Bio. 製剤が投与されている RA 患者に特化して免疫応答を明らかにする予定である。

#### E. 結論

漢方薬を投与された RA 患者におけるインフルエンザワクチン接種後の免疫応答の経過観察を本院和漢診療科で加療中の RA 患者を対象に実施した。その結果、臨床的に有意な Seroconversion を認め、インフルエンザワクチン免疫応答に Positive に作用する可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kogure T, Harada N, Oku Y, Tatsumi T, Niizawa A. The Observation of Humoral Responses after Influenza Vaccination in Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Japanese Oriental (Kampo) Medicine: An Observational

Study. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012 (2012), 320542:10 E-pub.

#### 2. 学会発表

- 1) 小暮敏明：シンポジウム 3 和漢薬臨床研究の最前線 関節リウマチに対する漢方治療戦略-最近の話題-. 第 28 回和漢医薬学会学術大会 8 月 富山
- 2) 第 2 回群馬臨床漢方懇話会を主催 (H24. 3. 16 前橋) 基調講演：インフルエンザワクチンと漢方アジュバント効果、巽 武司 二之沢病院副院長、特別講演：吉益東洞の医論とその形成プロセス、寺澤捷年、千葉大学名誉教授

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1. 対象となったRA患者の臨床的な背景

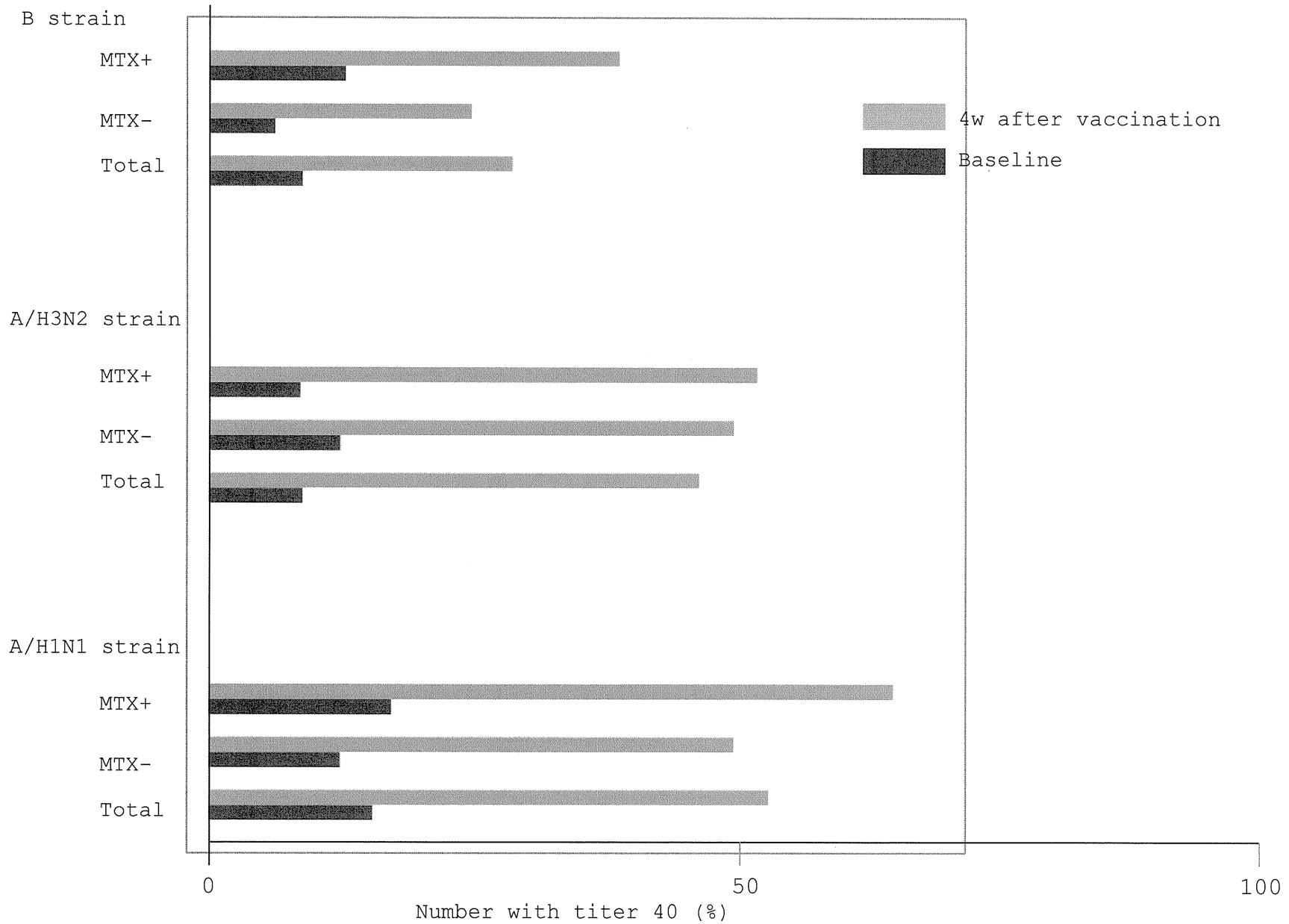
	Total	without MTX group*	With MTX group**
Age, mean+/-SD years	56.2+/-13.5	58.6+/-10.5	54.1+/-12.6
No. (%) female/No. (%) male	42 (93) / 3 (7)	15 (94) / 1 (6)	22 (92) / 2 (8)
Duration of RA mean+/-SD years	12.2+/-14.1	13.5+/-15.6	10.9+/-11.6
MTX dosage, mean+/-SD mg/week	5.1+/-3.8	0	7.6+/-2.5
PSL dosage, mean+/-SD mg/day	2.1+/-2.0	1.6+/-1.5	2.4+/-1.9
Taking DMARDs, No.			
Bucillamine	1	1	0
Sulfasalazine	11	8	2
Tacllolumus	4	0	4
DAS28 CRP	3.2+/-1.1	2.9+/-1.0	3.3+/-1.4

\*without MTX group: Patients treated with classical DMARDs alone. Patients treated with tacllolumus were excluded. \*\*with MTX group: Patients treated with MTX, but not biologics.

表2. GMTs and fold increase in GMT for influenza A/H3N2, A/H1N1, and B strains in RA patients treated with Kampo formulae before and after administration of influenza vaccines.

	Total	without MTX group	With MTX group
GMT, mean+/-SD			
A/H1N1 strain			
Baseline	12.1+/-14.0	11.0+/-12.1	14.1+/-15.0
4 weeks later	78.8+/-119.7	39.6+/-39.3	115.9+/-148.8
A/H3N2 strain			
Baseline	13.5+/-13.9	16.0+/-19.7	11.7+/-10.2
4 weeks later	35.7+/-33.6	33.1+/-21.8	39.1+/-40.2
B strain			
Baseline	12.8+/-10.3	13.9+/-9.2	11.4+/-11.5
4 weeks later	27.3+/-27.8	22.8+/-19.2	31.4+/-34.0
Fold increase, mean(range)			
A/H1N1 strain	6.5(1 to 64)	3.6(1 to 16)	8.2(1 to 64)
A/H3N2 strain	2.6(1 to 16)	2.1(1 to 8)	3.3(1 to 16)
B strain	2.1(1 to 16)	1.6(1 to 4)	2.7(1 to 16)

\*without MTX group: Patients treated with classical DMARDs alone. Patients treated with tacrolimus were excluded. \*\*with MTX group: Patients treated with MTX, but not biologics.



**Figure 1:** Percentage of patients with anti-influenza titers  $\geq 40$ , as determined by a hemagglutination inhibition assay for each strain after vaccination with a trivalent influenza subunit vaccine, in total RA patients, RA patients treated with MTX, and RA patients treated without MTX. Solid bars represent prevaccination titer  $\geq 40$ ; open bars represent post vaccination titer  $\geq 40$ .