

Figure 2. Short-term stimulation with OK-432 is optimal to generate Th1-inducing mature DCs. (A, B) Immature 3d-DCs were cultured in the presence of OK-432 (0.1 KE/mL) for indicated time periods, then harvested and analyzed. (C, D) Immature 3d-DCs were cultured in the presence of OK-432 for indicated time periods, washed, replated, and further cultured for a total of 48 hours. Cells and supernatants harvested at 48 hours were analyzed. (A, C) Expression of CD83 and CD86 was analyzed by flow cytometry. Dead cells were excluded by staining with propidium iodide. Open histograms indicate staining with isotype controls. (B, D) IL-12p70 production in culture supernatants of DCs (5×10^5 cells/mL) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Error bars indicate the standard deviation of duplicate measurements. (E) Naive CD4⁺ T cell differentiation induced by DCs. Immature 3d-DCs were matured with OK-432 (0.1 KE/mL) for 6 or 24 hours and cocultured with allogeneic naive CD4⁺ T cells for 7 days. Cytokine profiles of T cells were analyzed by intracellular cytokine staining. Numbers indicate percentages of cells in each quadrant. Representative data from four experiments are shown.

without OK-432, and tended to produce a lower amount of IL-12p70 upon OK-432 stimulation as compared with non-cryopreserved DCs (Supplementary Figure E2A, C; online only, available at www.exphem.org), similar levels of CD83 and CD86 expression were induced by OK-432 in both DCs (Supplementary Figure E2B; online only, available at www.exphem.org). Thus, although cryopreservation of immature DCs impaired their function to some extent, cryopreserved DCs largely retained the viability and expression of immunostimulatory molecules. Considering the practical convenience to prepare a stock of DCs at one time, we decided to freeze DCs as immature DCs. Taken together, these data demonstrate that DCs generated in the present study are capable of inducing CD8⁺ T-cell responses to apoptotic cell-derived antigens, and that immature DCs can be cryopreserved without critical loss of functions.

Patients, feasibility, and safety

Thirteen patients were recruited to the study for the leukemic cell harvest at the onset of AML. After chemotherapy, four patients were eligible for DC vaccination (Table 1). In these patients, $>5 \times 10^7$ DCs for five vaccinations could be generated from a single apheresis. Autologous apoptotic

leukemic cells were added to DCs as antigens at leukemic cell-to-DC ratios of 1:3.3 to 1:6.5, depending on the numbers of collected leukemic cells (Supplementary Table E1; online only, available at www.exphem.org). Status of PB and BM at the time of apheresis are shown in Supplementary Table E1 (online only, available at www.exphem.org). Representative data of surface molecule expressions on DCs are shown in Supplementary Figure E3 (online only, available at www.exphem.org).

All of the patients completed the five vaccinations safely (Table 1). In all the patients, grade 1 to 2 fever and grade 2 skin reactions at the injection sites were observed. The fever was resolved within 2 days after vaccination and most likely related to administration of OK-432. The skin reactions at the injection sites were transient and characterized by erythema, pruritus, and tenderness. No significant toxicities to vital organs or signs of autoimmunity were observed.

Induction of antigen-specific immune responses to KLH and leukemic cells

Induction of an immune response to KLH was detected by skin delayed-type hypersensitivity tests and/or IFN- γ ELISPOT assays in three patients, with the exception of patient no. 4

Table 1. Patient characteristics and results of the DC vaccination

Patient no.	Age/Sex	Diagnosis	DC vaccination was started		LC in BM at the first vaccination ^a (%)	Adverse effects ^b	Immune response		Clinical response	Died at (days after the last vaccination)
			After the last CT (d)	After diagnosis (d)			KLH	LC		
1	76/F	AML-MRC	82	93	1.8	Fever (1) Injection site reaction (2)	Yes	No	PD Died of sepsis with leukemia	186
2	75/M	AML-MRC	40	155	0.6	Fever (1) Injection site reaction (2)	Yes	Yes	Transient disease stabilization Died of leukemia	391
3	70/M	AML-MRC	44	344	2.9	Fever (2) Injection site reaction (2)	Yes	Yes	Transient disease stabilization Died of sepsis with leukemia	192
4	66/M	AML M2	67	144	0.2	Fever (1) Injection site reaction (2)	No	No	PD Died of leukemia	66

AML-MRC = acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes; CT = chemotherapy; F = female; LC = leukemic cells; M = male; PD = progressive disease.

^aPercentages of leukemic cells in bone marrow were determined by flow cytometry.

^bNumbers in parentheses indicate grade of toxicity according to the National Cancer Institute-Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0.

(Table 1 and data not shown). Two patients (patient nos. 2 and 3) showed induction of immune responses to leukemia-associated antigens. In patient no. 2, who was HLA-A*2402-negative, IFN- γ ELISPOT assays using autologous leukemic cell-pulsed DCs revealed the induction of antileukemic immunity in PBMCs and BMDCs without in vitro stimulation after the fourth vaccination (Fig. 3A). The antileukemic immune response was still detected 1 month after the fifth vaccination in in vitro-stimulated PBMCs and BMDCs (Fig. 3B), but was no longer detected without in vitro stimulation (Fig. 3A). We could not test antileukemic immunity at subsequent time points in this patient because the patient developed leukocytopenia, probably owing to progression of myelodysplastic syndrome.

In patient no. 3, who was HLA-A*2402-positive, HLA-A*2402-restricted peptides from WT1 and hTERT were used in immunological monitoring. CMVpp65₃₂₈₋₃₃₆ peptide was used as a positive control in ELISPOT assays (Fig. 4B). No responses to the leukemia-associated antigens were observed until the fourth vaccination. However, 2 months after the fifth vaccination, positive responses to the modified WT1₂₃₅₋₂₄₃ and the hTERT₄₆₁₋₄₆₉ peptides were detected in in vitro-stimulated PBMCs by HLA tetramer staining (Fig. 4A) and an IFN- γ ELISPOT assay (Fig. 4B), respectively. The PBMCs binding to the modified WT1₂₃₅₋₂₄₃ peptide/HLA-A*2402 tetramer also bound to the natural WT1₂₃₅₋₂₄₃ peptide/HLA-A*2402 tetramer (Fig. 4A), indicating that these cells were capable of recognizing the natural WT1 peptide presented on leukemic cells. These responses were short-lived and almost completely disappeared 3 months after the fifth vaccination. No responses were detected in PBMCs or BMDCs without in vitro stimulation (data not shown). Thus, the vaccinations induced HLA class I-restricted, antileukemic immunity, indicating that the DCs cross-presented leukemia-associated antigens in vivo. In addition, in patient no. 2, leukemic cell-reactive T cells were detected in BM (Fig. 3), the main tumor site in leukemia.

Clinical outcomes

The two patients with antileukemic immunity had longer periods of disease stabilization than the other two patients without antileukemic immunity (Fig. 5A). Notably, in patient no. 3, the percentages of leukemic cells in BM dropped from 11% to 5.2% during the second month after the fifth vaccination, when a positive antileukemic immunity was observed (Fig. 5B). Thus, these observations suggest that induction of antileukemic immunity was associated with extended the periods of disease stabilization in these patients.

Discussion

Novel therapies with less toxicity are necessary for intractable AML in elderly patients. In this study, we conducted a phase I clinical trial of immunotherapy for such patients using DCs pulsed with autologous apoptotic leukemic cells.

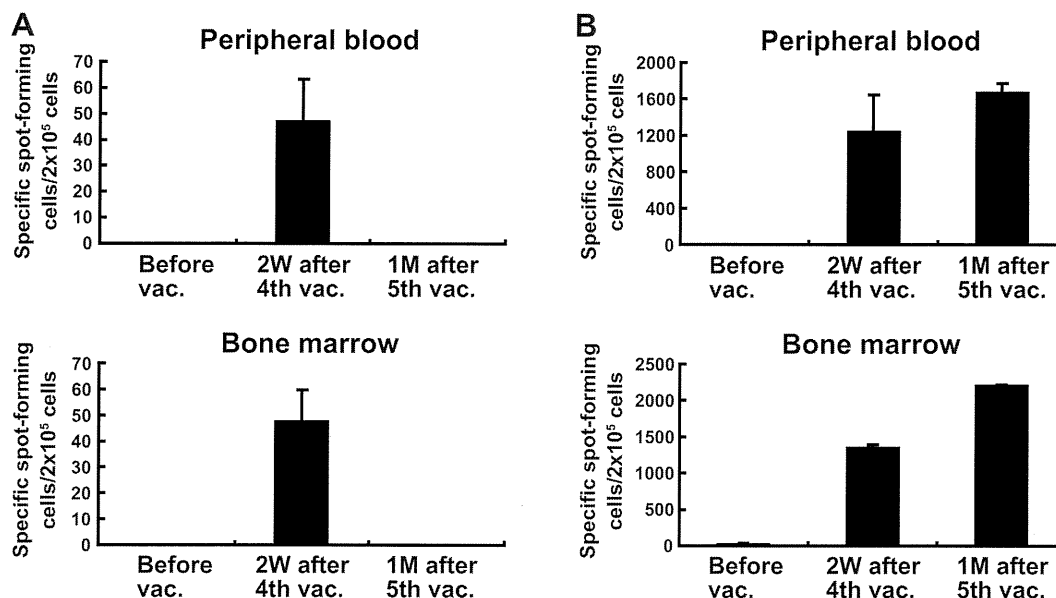


Figure 3. IFN- γ ELISPOT assay in patient no. 2. MNCs from PB and BM were obtained at indicated time points and subjected to IFN- γ ELISPOT assays directly after isolation (A) or after 1 week of stimulation with antigen-pulsed DCs (B). In IFN- γ ELISPOT assays, 2×10^5 MNCs (A) and 1×10^4 MNCs (B) were incubated with 1×10^4 leukemic cell-pulsed or unpulsed DCs. Numbers of specific spot-forming cells per 2×10^5 MNCs, calculated by subtracting numbers of spots with unpulsed DCs from numbers of spots with leukemic cell-pulsed DCs. Error bars indicate the standard deviation of duplicate measurements.

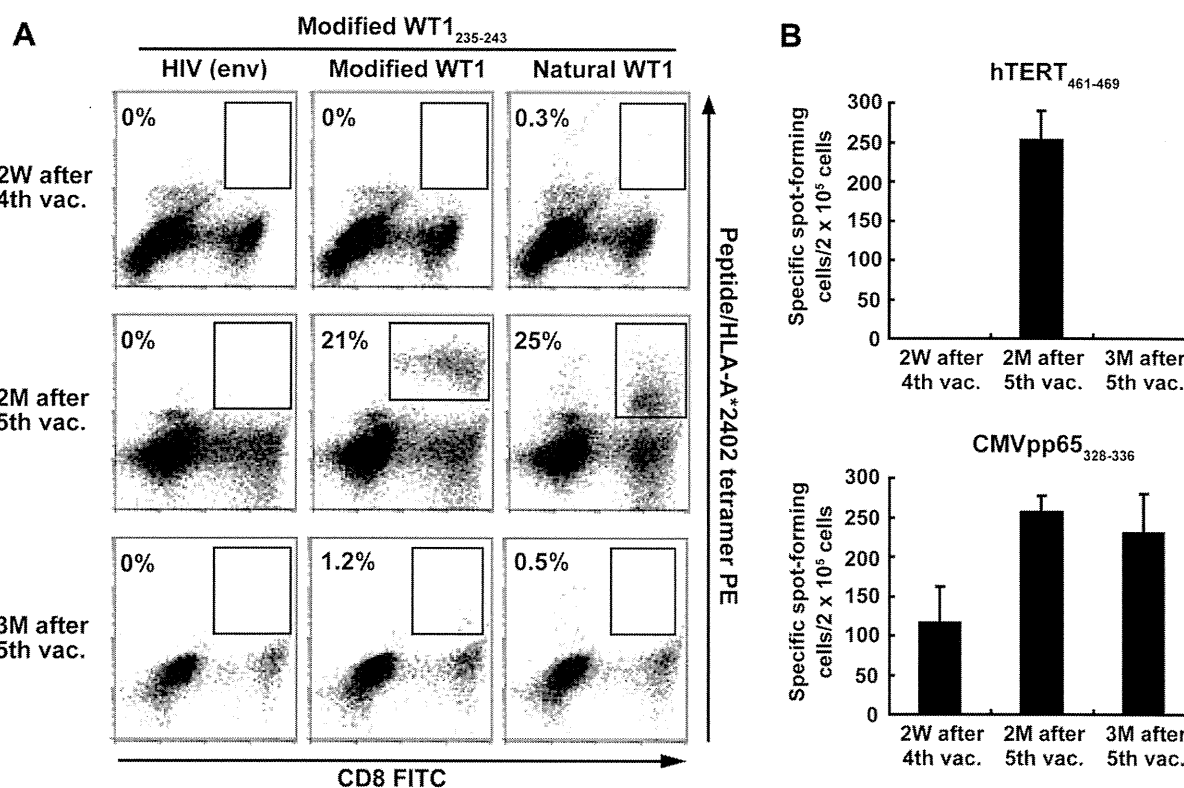


Figure 4. Immune responses in patient no. 3. (A) HLA tetramer staining. MNCs from PB were obtained at indicated time points, stimulated for 1 week with DCs pulsed with the modified WT1_{235–243} peptide, stained with phycoerythrin-labeled peptide/HLA-A*2402 tetramers and fluorescein isothiocyanate-labeled anti-CD8 monoclonal antibody, and analyzed by flow cytometry. Dead cells were excluded by staining with propidium iodide. Numbers indicate percentages of tetramer-positive cells among CD8⁺ cells. (B) IFN- γ ELISPOT assay. MNCs were stimulated for 1 week with DCs pulsed with the hTERT_{461–469} or CMVpp65_{328–336} peptide, and subjected to IFN- γ ELISPOT assays. In the assays, 2×10^4 MNCs were incubated with 2×10^4 CIR-A*2402 pulsed with or without the hTERT_{461–469} or CMVpp65_{328–336} peptide. Before vaccination, the assay was performed using DCs as a stimulator, which induced many nonspecific spots. Thus, the data before vaccination are not shown. Numbers of specific spot-forming cells per 2×10^5 MNCs, calculated by subtracting numbers of spots with unpulsed CIR-A*2402 from numbers of spots with antigen-pulsed CIR-A*2402, were depicted. Error bars indicate the standard deviation of duplicate measurements.

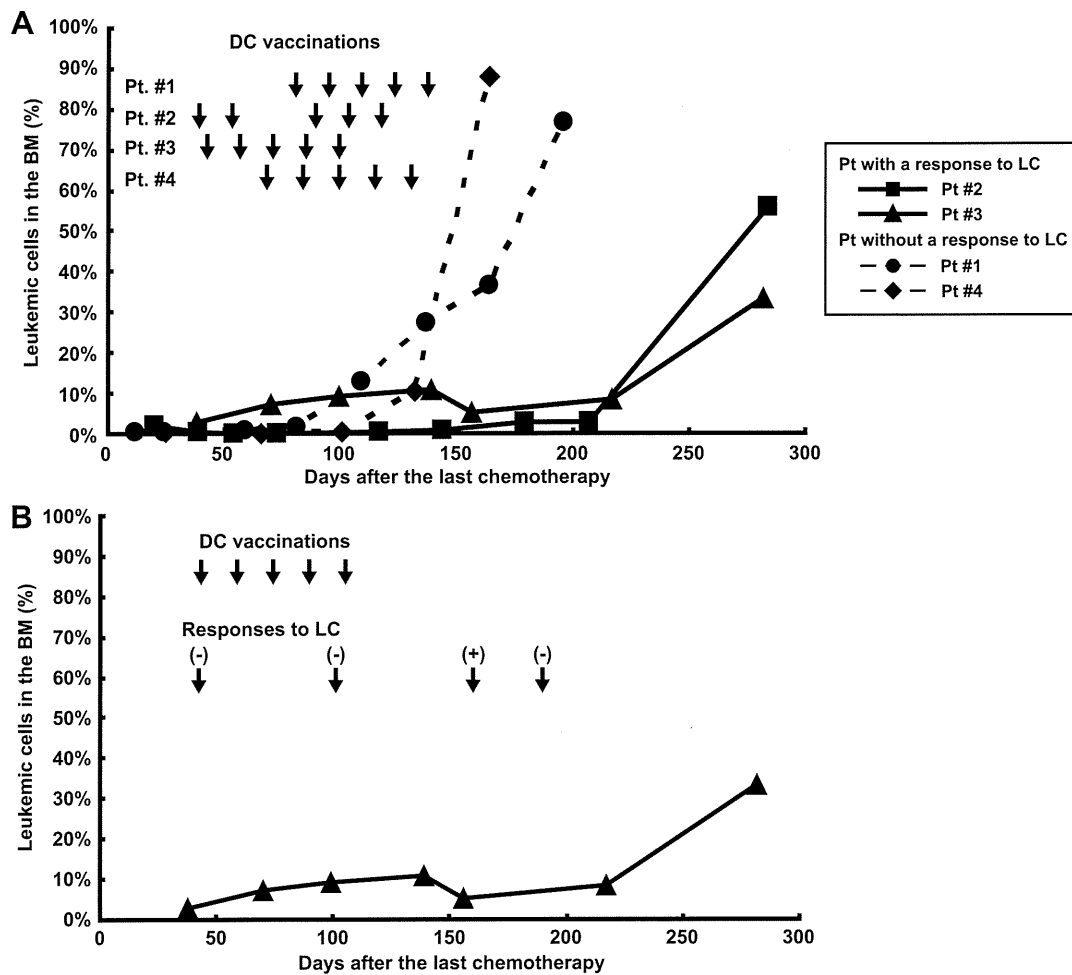


Figure 5. Clinical courses during the DC vaccination. (A) Percentages of leukemic cells in BM as determined by flow cytometry in four vaccinated patients are shown. Solid lines indicate patients with immune responses to leukemic cells (LCs) (patients 2 [■] and 3 [▲]). Dashed lines indicate patients without immune responses to LCs (patients 1 [●] and 4 [◆]). Arrows indicate time points when DC vaccines were administered to each patient. (B) The clinical course of patient no. 3. Arrows indicate time points when immunological monitoring was performed. Plus (+) or minus (–) signs indicates that immune responses to leukemic cells were detected or not detected at that time point, respectively.

Induction of antileukemic immunity was observed in two of four vaccinated patients. This is the first study that demonstrates cross-priming of CD8⁺ T cells by DCs pulsed with apoptotic leukemic cells in vivo in humans, thus providing a proof of principle of this approach. The limited number of patients prevented us from drawing any definitive conclusion regarding clinical efficacy from the present trial. However, longer periods of disease stabilization observed in the two patients with antileukemic immunity compared to the other two patients without antileukemic immunity implied that induction of antileukemic immunity might have impacted on the clinical course of these patients.

There are several features in the method of DC vaccination in this trial: short-term 3-day culture to generate DCs in an attempt to reduce labor, cost, and time; use of whole leukemic cells as antigens to induce multivalent immune responses; use of the microbial adjuvant OK-432 as a maturation-inducing factor to generate Th1-inducing DCs; in

vivo maturation of DCs to avoid DC exhaustion by extended stimulation in vitro with OK-432; and prior induction of inflammation at the injection sites to facilitate DC migration to draining lymph nodes.

We used autologous apoptotic leukemic cells as antigens because several studies have shown that apoptotic cells are more efficiently cross-presented by DCs to CD8⁺ T cells than soluble antigens such as tumor lysate [31–34]. Furthermore, MoDCs has been shown to cross-present apoptotic leukemic cells to CD8⁺ T cells in vitro [35]. Apoptotic cells as antigens also have advantages over peptides, in that the DCs have the ability to process multiple antigens from the apoptotic cells and present those antigens on their own HLA molecules. In this study, we clearly showed that MoDCs cross-presented leukemia-associated antigens WT1 and hTERT from apoptotic leukemic cells. Furthermore, T cells reactive to leukemic cells were detected in BM.

A murine study has shown that DC maturation not by inflammatory cytokines but by pathogen-derived components is crucial for DCs to acquire the capacity to differentiate naïve CD4⁺ T cells into effector T cells [16]. We used OK-432, a preparation of killed *Streptococcus pyogenes* [21], which strongly triggers DC maturation through Toll-like receptor 4 [36–39]. We showed that, like lipopolysaccharide [17], longer stimulation with OK-432 induces DC exhaustion, resulting in the reduced capacity of DCs to induce Th1 responses. Several preclinical studies have shown that DCs briefly exposed to Toll-like receptor ligands are better inducers of Th1-type and cytotoxic T-cell responses [17,40,41]. Moreover, a clinical trial suggests superiority of briefly matured DCs in pediatric patients with cancer [42]. In this trial, we administered immature DCs together with OK-432 to avoid DC exhaustion before administration. The induction of IFN- γ detected by the ELISPOT assay implied IL-12 production by DCs in vivo.

Only a small proportion of intradermally administered DCs reach draining lymph nodes [43,44]. In a mouse model, pretreatment of administration sites with inflammatory cytokines enhance DC migration to regional lymph nodes [18]. Based on this finding, we pretreated administration sites with a low dose of OK-432. Because of unavailability of a cell-processing facility for cells labeled with indium-111 oxyquinoline [43,44], we could not evaluate the efficiency of DC migration to lymph nodes. Whether this administration procedure is superior to others should be evaluated in future studies.

In this study, multiple vaccinations were required to elicit antileukemic immunity, which rapidly declined after cessation of vaccination. Maintenance of antileukemic immunity might lead to improvement of clinical efficacy, and might be fulfilled by increasing the number of vaccinations, which was, however, impossible in this study because of the limited availability of autologous leukemic cells. Thus, if a peptide is available for the induced antileukemic CD8⁺ T-cell response, peptide vaccination may be added after DC vaccination. Furthermore, blockade of immunosuppressive mechanisms may be combined.

In conclusion, we demonstrated the feasibility, safety, and immunogenicity of DC-based immunotherapy for elderly patients with AML. Cross-priming of CD8⁺ T cells by DCs pulsed with autologous apoptotic leukemic cells was provoked in vivo. The results were promising, yet further intensification of vaccine potency is clearly required. This novel therapeutic approach may lead to improvement of clinical outcomes in elderly patients with AML, which has been difficult to achieve with other therapeutic approaches.

Acknowledgments

We thank Satoshi Teramukai, Harue Tada, and Masanori Fukushima (Department of Clinical Trial Design and Management, Translational Research Center, Kyoto University Hospital) for patient enrollment, Maki Utsumi for her excellent technical assistance, and physicians for referral of patients. This study was

supported by Coordination, Support and Training Program for Translational Research from Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and The Third Term Comprehensive Control Research for Cancer from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan.

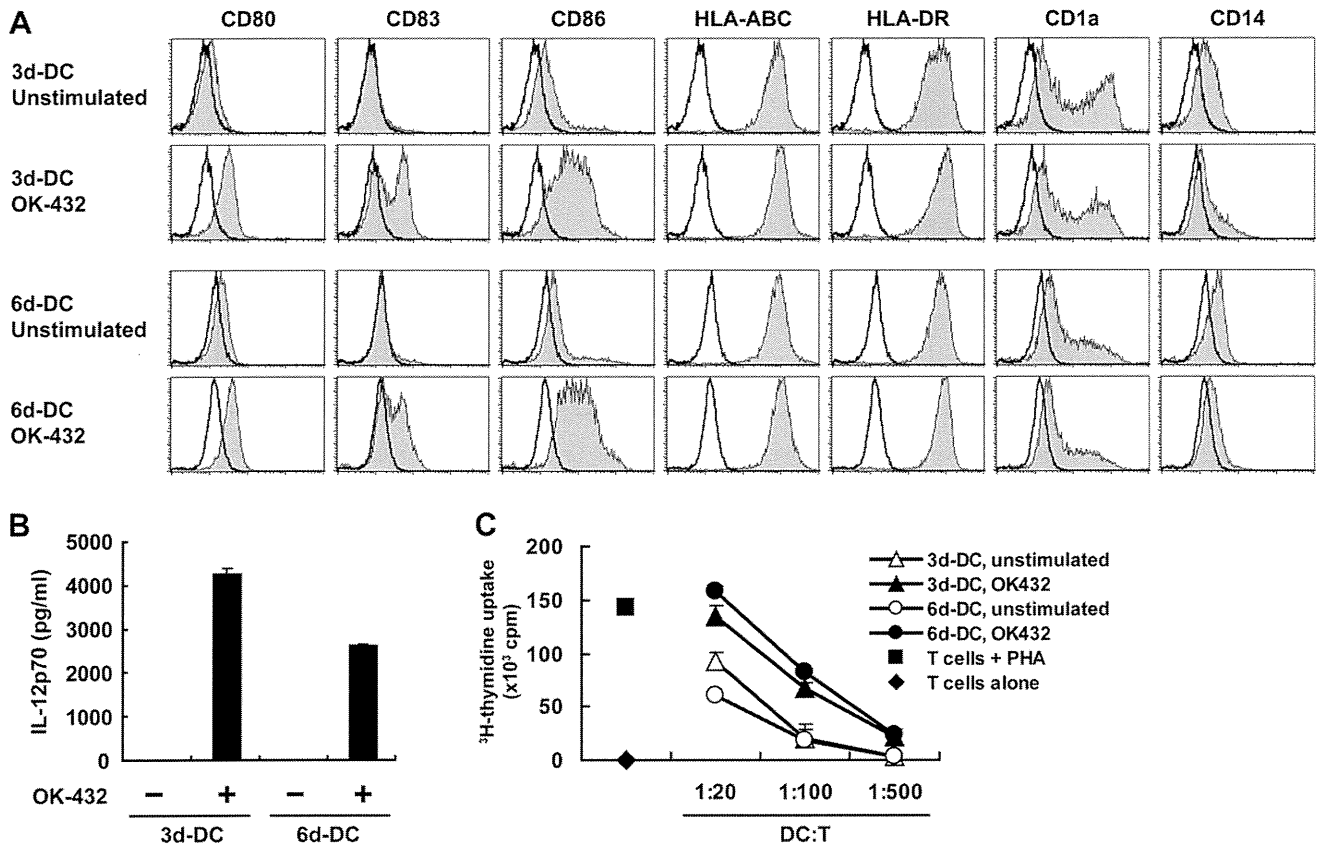
Conflict of interest disclosure

No financial interest/relationships with financial interest relating to the topic of this article have been declared.

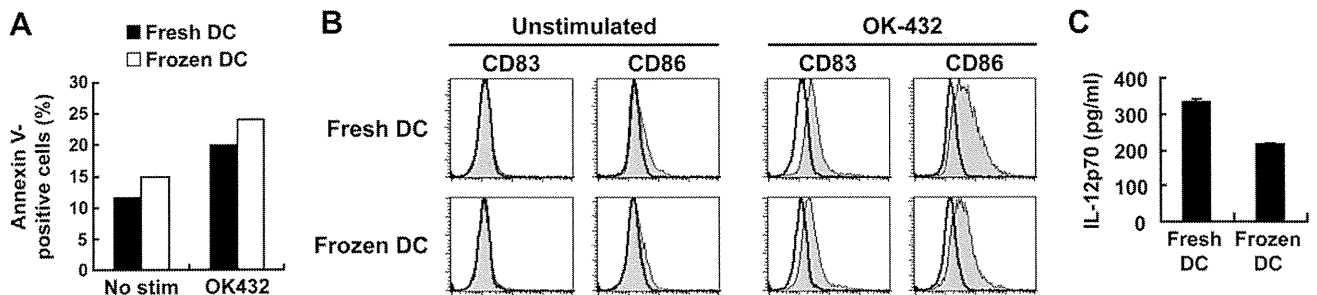
References

1. Erba HP. Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment. *Hematology*. 2007;2007:420–428.
2. Smits ELJM, Berneman ZN, Van Tendeloo VFI. Immunotherapy of acute myeloid leukemia: current approaches. *Oncologist*. 2009;14:240–252.
3. Schmitt M, Schmitt A, Rojewski MT, et al. RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses. *Blood*. 2008;111:1357–1365.
4. Rezvani K, Yong ASM, Mielke S, et al. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood*. 2008;111:236–242.
5. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13885–13890.
6. Keilholz U, Letsch A, Busse A, et al. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood*. 2009;113:6541–6548.
7. Fujii S, Shimizu K, Fujimoto K, et al. Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma*. 2001;42:357–369.
8. Li L, Giannopoulos K, Reinhardt P, et al. Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *Int J Oncol*. 2006;28:855–861.
9. Roddie H, Klammer M, Thomas C, et al. Phase I/II study of vaccination with dendritic-like leukaemia cells for the immunotherapy of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2006;133:152–157.
10. Kitawaki T, Kadowaki N, Kondo T, et al. Potential of dendritic cell immunotherapy for relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, shown by WT1 peptide- and keyhole limpet hemocyanin-pulsed, donor-derived dendritic cell vaccine for acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2008;83:315–317.
11. Lee J-J, Kook H, Park M-S, et al. Immunotherapy using autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with leukemic cell lysates for acute myeloid leukemia relapse after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Apher*. 2004;19:66–70.
12. Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van Driessche A, et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13824–13829.
13. Draube A, Beyer M, Wolf J. Activation of autologous leukemia-specific T cells in acute myeloid leukemia: monocyte-derived dendritic cells cocultured with leukemic blasts compared with leukemia-derived dendritic cells. *Eur J Haematol*. 2008;81:281–288.
14. Royer PJ, Bougras G, Ebstein F, et al. Efficient monocyte-derived dendritic cell generation in patients with acute myeloid leukemia after chemotherapy treatment: application to active immunotherapy. *Exp Hematol*. 2008;36:329–339.

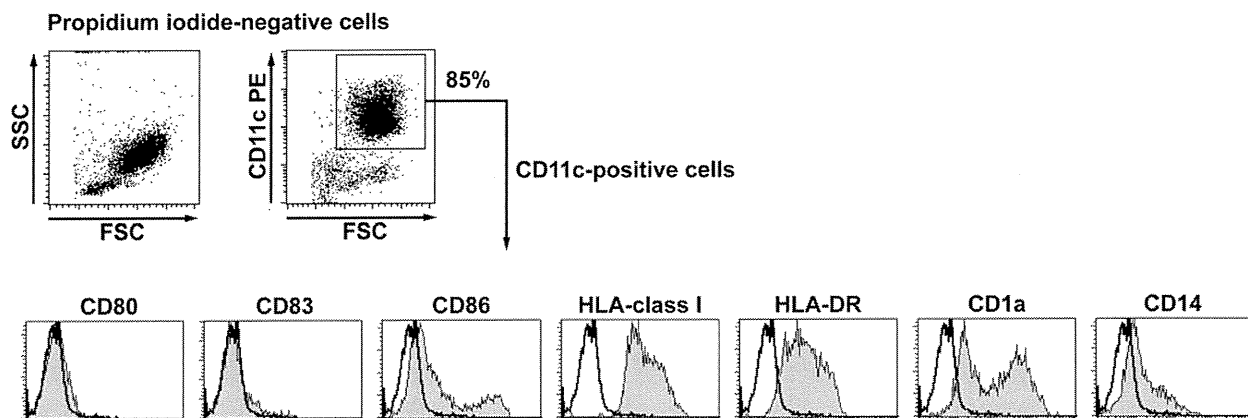
15. Dauer M, Obermaier B, Herten J, et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol.* 2003;170:4069–4076.
16. Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol.* 2005;6:163–170.
17. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.* 2000;1:311–316.
18. Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med.* 2003;198:615–621.
19. Nair S, McLaughlin C, Weizer A, et al. Injection of immature dendritic cells into adjuvant-treated skin obviates the need for *ex vivo* maturation. *J Immunol.* 2003;171:6275–6282.
20. Berard F, Blanco P, Davoust J, et al. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med.* 2000;192:1535–1544.
21. Fujimoto T, Duda RB, Szilvasi A, Chen X, Mai M, O'Donnell MA. Streptococcal preparation OK-432 is a potent inducer of IL-12 and a T helper cell 1 dominant state. *J Immunol.* 1997;158:5619–5626.
22. Kitawaki T, Kadowaki N, Sugimoto N, et al. IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *Int Immunol.* 2006;18:1789–1799.
23. Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, et al. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol.* 2000;165:3797–3803.
24. Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood.* 2000;95:286–293.
25. Kuzushima K, Hayashi N, Kudoh A, et al. Tetramer-assisted identification and characterization of epitopes recognized by HLA A*2402-restricted Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells. *Blood.* 2003;101:1460–1468.
26. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002;100:2292–2302.
27. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114:937–951.
28. Tsuboi A, Oka Y, Udaka K, et al. Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer Immunol Immunother.* 2002;51:614–620.
29. Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S. Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood.* 2001;97:2903–2907.
30. Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, Tsurumi T. Efficient identification of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD4⁺ T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay. *Blood.* 2001;98:1872–1881.
31. Kokhaei P, Choudhury A, Mahdian R, et al. Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate, and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. *Leukemia.* 2004;18:1810–1815.
32. Ferlazzo G, Semino C, Spaggiari GM, Meta M, Mingari MC, Melioli G. Dendritic cells efficiently cross-prime HLA class I-restricted cytolytic T lymphocytes when pulsed with both apoptotic and necrotic cells but not with soluble cell-derived lysates. *Int Immunol.* 2000;12:1741–1747.
33. Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL. Generation of tumor-specific T lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res.* 2000;60:3542–3549.
34. Galea-Lauri J, Wells JW, Darling D, Harrison P, Farzaneh F. Strategies for antigen choice and priming of dendritic cells influence the polarization and efficacy of antitumor T-cell responses in dendritic cell-based cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:963–977.
35. Spisek R, Chevallier P, Morineau N, et al. Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Res.* 2002;62:2861–2868.
36. Itoh T, Ueda Y, Okugawa K, et al. Streptococcal preparation OK432 promotes functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52:207–214.
37. Kuroki H, Morisaki T, Matsumoto K, et al. Streptococcal preparation OK-432: a new maturation factor of monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52:561–568.
38. Okamoto M, Furuichi S, Nishioka Y, et al. Expression of Toll-like receptor 4 on Dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Res.* 2004;64:5461–5470.
39. Nakahara S, Tsunoda T, Baba T, Asabe S, Tahara H. Dendritic cells stimulated with a bacterial product, OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes specific to tumor rejection peptide. *Cancer Res.* 2003;63:4112–4118.
40. Dohnal AM, Graffi S, Witt V, et al. Comparative evaluation of techniques for the manufacturing of dendritic cell-based cancer vaccines. *J Cell Mol Med.* 2009;13:125–135.
41. Felzmann T, Huttner KG, Breuer SK, et al. Semi-mature IL-12 secreting dendritic cells present exogenous antigen to trigger cytolytic immune responses. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54:769–780.
42. Dohnal A, Witt V, Hügel H, Holter W, Gadner H, Felzmann T. Phase I study of tumor Ag-loaded IL-12 secreting semi-mature DC for the treatment of pediatric cancer. *Cytotherapy.* 2007;9:755–770.
43. de Vries IJM, Krooshoop DJEB, Scharenborg NM, et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res.* 2003;63:12–17.
44. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lyerly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res.* 1999;59:56–58.



Supplementary Figure E1. 3d-DCs and 6d-DCs have comparable T-cell stimulatory capacity. (A) Expressions of surface molecules on DCs. Unstimulated or OK-432-stimulated DCs were analyzed by flow cytometry. Dead cells were excluded by staining with propidium iodide. Open histograms indicate staining with isotype controls. (B) IL-12p70 production by DCs (5×10^5 cells/mL) stimulated with OK-432 (0.1 KE/mL) for 24 hours was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Error bars indicate the standard deviation of duplicate measurements. (C) Proliferation of naive CD4⁺ T cells stimulated with DCs. Allogeneic naive CD4⁺ T cells were cocultured with DCs at indicated DC to T-cell ratios. On day 4, 1 Ci of [³H]-thymidine was added. After 16 hours of further incubation, thymidine uptake was counted. Naive CD4⁺ T cells were stimulated with 10 μ g/mL phytohemagglutinin as a positive control. Representative data from three experiments are shown.



Supplementary Figure E2. Effects of cryopreservation on immature 3d-DCs. (A) Viability of fresh and frozen 3d-DCs after 24 hours of incubation with or without OK-432 (0.1 KE/mL) were evaluated by staining with Annexin-V. Percentages of Annexin-V-positive cells are indicated. (B) Expression of surface molecules on fresh and frozen DCs after 24 hours of incubation with or without OK-432. (C) IL-12p70 production by fresh and frozen DCs (5×10^5 cells/mL) induced by 24-hour stimulation with OK-432 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Error bars indicate the standard deviation of duplicate measurements. Representative data from four experiments are shown.



Supplementary Figure E3. Expression of surface molecules on DCs for vaccination. Cryopreserved DCs from patients were thawed, stained, and analyzed by flow cytometry. Dead cells were excluded by staining with propidium iodide. Numbers indicate percentages of cells in each quadrant. Representative data from patient no. 1 are shown.

Supplementary Table E1. DC vaccine generation

Patient no.	At the time of apheresis				Antigen dose (LC:DC)
	Days after the last CT	PB WBC (/L)	PB Mo (%)	BM LC ^a (%)	
1	74	4700	7	0.9	1:5
2	31	3000	9	2.0	1:6.5
3	43	3900	15	0 ^b	1:6
4	46	4800	16	0.3	1:3.3

CT = chemotherapy; LC = leukemic cells; Mo = monocytes.

^aPercentages of leukemic cells in bone marrow were determined by flow cytometry.

^bPatient 3 was in complete remission at the time of apheresis. The patient subsequently relapsed and became eligible for DC vaccination.

〈記録〉第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都
シンポジウム6：これからのCRC：臨床試験を支援するスタッフの教育

2. 未承認薬・未承認機器の臨床試験を支援するために

新美 三由紀* 多田 春江* 伊藤 達也*

1. はじめに

アカデミアで行う研究者主導臨床試験（臨床研究）は、市販薬を用いてエビデンスを創成する、いわゆる育薬を目的としたものが多い。しかし当学では、産学連携のもとに、基礎医学研究の成果を臨床応用まで一貫して行う、いわゆるトランスレーショナルリサーチを実行する大学病院における先端医療開発拠点として探索医療センターを設置し、未承認薬・未承認機器の臨床試験を多く手がけている。

今回、CRCの専門性やスキルアップを考えるにあたり、企業治験以外の未承認薬・未承認機器を用いた臨床試験における支援という観点から、CRCとしての役割や業務の広がり、さらにはCRCに限らず広く臨床試験専門職（Clinical Research Professionals：CRP）としての役割や業務の広がりを紹介する。とくに、当センターで行っている医師主導治験、高度医療の臨床試験、通常の臨床研究という3つのタイプの違う臨床試験の支援体制を比較しながら、臨床試験支援スタッフそれぞれのミッションと業務内容、CRCがキャリアアップ、キャリアチェンジとしてそれらの業務を行うために必要なトレーニングについて紹介する。

2. トランスレーショナルリサーチのプロジェクト支援の特徴

当院は全国に7つある橋渡し研究拠点の1つである。これは、医療としての実用化が見込まれる有望な基礎研究の成果を開発している研究機関を対象に、シーズの開発戦略策定や、薬事法を目指した試験物製造のような橋渡し研究の試験を行うアカデミアの機関である。当センターでは、おもに流動プロジェクト¹⁾、橋渡し研究プロジェクト¹⁾、スーパー特区（難病創薬スーパー特区、医療機器開発スーパー特区、iPS細胞スーパー特区）²⁾という研究プロジェクトの特徴から、医師主導治験、高度医療評価制度下での臨床試験、臨

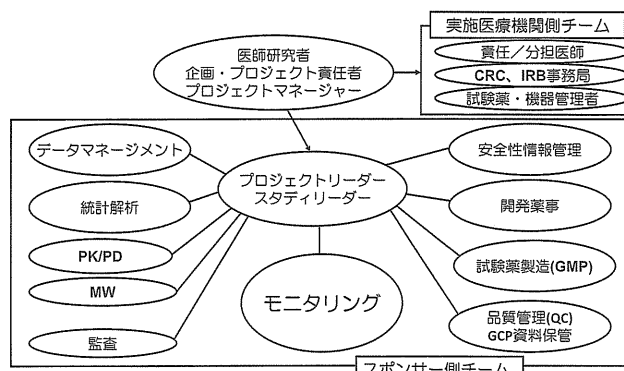


Fig. シーズ・革新的技術開発試験の支援スタッフ

床研究というさまざまな方法で、未承認薬・未承認機器を用いた試験を計画・運営しなければならない。

最も大きな特徴は、企業治験では明確に分かれているスポンサー（製薬・医療機器企業側）と実施医療機関が、1つの大学内に存在するという点である。Fig.のように、プロジェクトおよび企画の責任者である医師研究者や、プロジェクトマネージャーから、実施医療機関側のチームと、スポンサー側のチームに指示が出される。しかし、この2つのチームは1つの臨床試験において業務上は明確に役割が分けられており、たとえばモニタリングやデータマネジメントのスタッフがCRCを兼任することは決してない。これは、臨床試験における品質を保証するための前提条件であり、リスクの高い試験であるほど、重要となる。仮に、医師やCRCがモニタリング担当者を兼任した場合、実施者がモニタリングという品質チェックをすることになり、公平・公正な第三者的視点が欠如するため、重要な問題点を看過する可能性が高くなるだろう。また、医師やCRCがデータマネジメント担当者を兼任した場合、解析データセットを作成するまでのデータバリデーションの過程で、無意識にバイアスを生じさせているかもしれない。

したがって、これらの役割を明確に分離することが品質保証に繋がるが、大学・医療機関という1つの組

* 京都大学医学部附属病院探索医療センター
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54

織の中でこれらすべての業務を行うためには、人材(人財)を育成して、その人を適切な役割として効果的に使う必要がある。このため、試験によって実施医療機関側のスタッフからスポンサー側のスタッフへ、つまりCRCから別の役割へ変わることもあるだろう。

3. CRCとしての役割・業務の広がり

当センターのスタッフの中にはCRC経験者は多い。しかし、わが国のCRCはもともと企業治験から臨床試験領域に入る者が多いため、CRCが役割や業務を広げるには、大学内でスポンサー(データセンター・運営管理)機能と、実施医療機関機能の両者を同時に担うという特殊な環境を理解することからはじめる必要がある。また、その基本となるのが、創薬育薬医療チームと創薬育薬医療スタッフ³⁾という試験組織全体の理解である。とくに、普段見ることのないスポンサー側にはどのような専門家がいて、どのような役割分担をしているのかを詳細に知ろうと努力しなければならない。

CRCの中には、それまでCRC業務には含まれないと思ってきた役割を積極的に担い、場合によっては同じ病院所属で変更はないものの、データマネジャーやモニター等、他の業種にキャリアチェンジしていく人もいるかもしれない。一方、CRC業務をそのまま担う場合でも、企業治験とはアプローチを変えていく必要がある。

説明同意文書の作成を例にとってみよう。企業治験と異なり、トランスレーショナルリサーチをアカデミアで行う場合は、見本として提供される説明同意文書はない。また、すでに海外で販売されている医薬品の国内導入や、適応外使用の場合は、ある程度参考になるものがあるかもしれないが、全く初めてのシーズの場合は、ゼロからの作成となる。また、試験実施計画書と平行作業で作成し、同時完成を目指さなければならないが、もし説明同意文書作成中に試験実施計画書や試験薬概要書に問題があれば修正することも可能である。また、未承認薬・未承認機器の試験であるという点から、補償や医療費の支払いについても交渉しながら説明同意文書を作成していくことになる。

試験薬・試験機器の管理という点では、必ずしもできあがった試験薬を受領するだけとは限らない。院内GMP施設で試験薬を製造する場合もあり、その場合は、トラブルによる追加製造の必要性を判断する情報伝達が重要である。取扱い手順書の策定もゼロからと

なるだろう。

できることが広がる分、責任も重くなり、同時にやり甲斐も増え、キャリアアップにも繋がる可能性がある。

4. CRPとしての役割・業務の広がり

次にCRPとしての役割や業務の広がりを考えてみよう。未承認薬・未承認機器を用いたアカデミアベースの臨床試験の場合、スポンサー機能と、実施医療機関機能の両者を院内で同時に担うため、さまざまな役割が生まれる。このような環境では、ゼネラリスト(オールラウンドプレイヤー)は重宝されるだろう。しかし、何でも屋は責任の分散化というリスクに繋がる恐れがある。常に、スポンサー側と医療機関側を明確に分けたうえで、自分の役割の明確化が必要になる。

データマネジメント、モニタリング、プロジェクトマネジメント、メディカルライティング、薬事、品質管理、文書管理、安全性情報管理等々の専門領域で活動することは、役割の明確化としては重要である。しかし、これらのスペシャリストは、その領域に特化した教育とトレーニングを受ける必要がある。これらの専門領域は、CRCの経験は活かせるが、それだけでは足りない。必ず専門家としてのトレーニングが必要である。

5. まとめ

これからのCRCは何を目指すべきだろう。CRCとして極めるのも選択肢の1つである。その場合は、企業治験だけでなく、さまざまな試験を担当することがキャリアアップに繋がるはずである。たとえアカデミア発の臨床応用を目指す未承認薬・未承認機器の臨床試験を担当しなくても、研究者主導臨床試験には自分たちでゼロから作り出す「可能性」が秘められている。

また、CRCからCRPとして展開することも1つの「可能性」である。この場合、より広い概念の臨床試験・研究チームとしてのプレイヤーを意識するだろう。

文 献

- 1) 京都大学医学部附属病院探索医療センター：
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~trc/project/index.html>
- 2) 内閣府、文部科学省、厚生労働省、経済産業省：「先端医療開発特区(スーパー特区)の創設について。平成20年5月23日。
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/05/h0526-1.html>
- 3) 中野重行。創薬育薬医療チームと創薬育薬医療スタッフというコンセプトの重要性。臨床薬理。2008;39(4):75S-76S。

特集：臨床研究実施の現状と課題

第1部 医師主導臨床試験の推進：各大学の臨床試験支援体制

京都大学病院探索医療センターにおける臨床試験サポート体制

京都大学医学部附属病院探索医療センター探索医療開発部¹⁾ 同探索医療検証部²⁾

伊藤達也¹⁾ 新美三由紀²⁾

はじめに

わが国では、基礎研究から臨床応用への橋渡し（以下、トランスレーショナルリサーチ）は新規医薬品や適応外医薬品を用いてヒトへ使用するため、臨床応用研究（以下、臨床試験）の実施の際には守るべき指針や準備必要項目などの規制に従う必要がある。一方で、再生医療のなかで代表される細胞製剤などは技術開発のスピードが速く、技術と並行してガイドラインや法律も整備中であり、臨床試験を実施する環境はこれまでになく複雑である。また、質の高い臨床試験を実施するためにはデータマネジメントや統計解析などで質を担保する必要があり、診療業務を抱える医師を中心とした少人数のグループで質の高い臨床試験を実施することは簡単なことではない。近年、大学や医療機関内などに臨床試験を支援する拠点が設立され、質の高い臨床試験やトランスレーショナルリサーチの実施のための支援体制整備が進められている。本稿では、京都大医学部附属病院探索医療センターにおけるトランスレーショナルリサーチのサポート体制について紹介する。

1 京都大学病院探索医療センターのミッション

京都大学医学部附属病院探索医療センター（以下、当センター）は、わが国初のトランスレーショナルリサーチ（TR）を支援する基盤組織のひとつとして2001年に設立された。当センターは、出口を見据え

た開発研究と、科学的にも倫理的にも正当性が高く、質の高い臨床試験、Proof of Concept（POC：概念実証）取得研究の円滑な実施を支援しており、2007年より文部科学省橋渡し研究支援推進プログラムに採択されている。これまで学内外の多くの臨床試験を支援し、特に国内外未承認医薬品や医療機器の医師主導治験を4つ実施した実績がある。

特に探索型研究を進めることを掲げ、基礎研究で発見されたものを早く臨床応用することが目標である。そのため、当センターでは既存の枠を越えた横断的に研究を進めるため、研究者の基礎研究も支援を行い、臨床支援スタッフとの連携により臨床応用も可能とする。若手研究者のオリジナリティや発想を育成し、新たなシーズを発掘する全国拠点を目指している。われわれのねらう臨床開発は、フェーズの浅い段階における探索的治験、厚生労働省の制度下で行う先進的な臨床試験など、POCを取得することや次に臨床展開できるためのエビデンスを立証することである。

2 京都大学病院探索医療センターの体制

支援組織は、探索医療開発部、探索医療検証部、探索医療臨床部の3部より構成され（図1）、「探索医療開発部」では試験計画書や概要書の作成、規制当局との折衝、臨床試験文書の管理・保管、および試験の進捗管理などを、「探索医療検証部」では試験

Management and Support of Investigator-Initiated Clinical Trials in Translational Research Center, Kyoto University Hospital
Tatsuya Ito : Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital ; Miyuki Niimi : Department of Clinical Trial Design & Management, Translational Research Center, Kyoto University Hospital

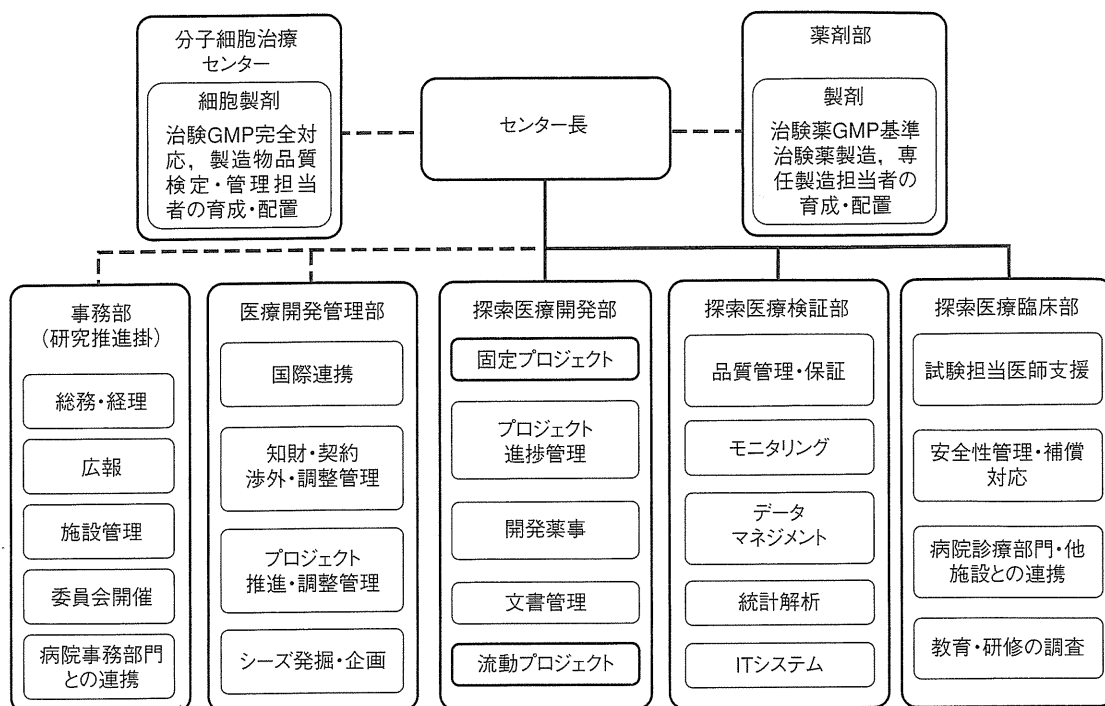


図 1 トランスレーショナルリサーチ (TR) の組織

計画策定時からの統計学的支援，試験データの品質保証とデータ解析を，「探索医療臨床部」では診療科や研究者との連携・調整，被験者の保護，安全性情報などを担当している。さらに TR を推進する3つの病院部門，すなわち，知的財産・契約・渉外の調整管理などを担当する「医療開発管理部」，GMP 基準の細胞製剤の調製や品質管理を担当する「分子細胞治療センター」，治験薬管理や治験薬（治験薬 GMP 基準）製造を担当する「薬剤部」とも連携している。

当センターは，支援施設基盤の整備だけでなく，これまでに医師主導治験の手引きおよび当センターにおける業務標準手順書やマニュアルの作成など，円滑な業務遂行をするためのシステム整備が推し進めている。また，研究者の種（シーズ）の採択の際には，当センターは厳選な審査を経て支援を決定する。すなわち，研究者が探索医療センターの要領に従った申請書類を作成し，支援申請の窓口である医療開発部管理部へ提出する。探索医療センター内で協議し，センター長が最終的な採否を決定する。決定後は，3部により形成した支援チームが研究者側と一体となり臨床試験を進める。また，当センターの3部と連携部門を合わせた機能は，単なる「臨床

試験調整支援機関」ではなく，実務担当者を設置し育成する「院内完結型支援機関」の位置づけである。

以上のような支援体制により，当センターはハード面とソフト面から研究者（医師）側をサポートし，それぞれのシーズを推進している。

3 質の高い臨床試験実施に必要なもの

当センターは，質の高い臨床試験を実施するために，心がけていることが2つある。1つ目は研究者側とのコミュニケーションである。臨床試験自体は決して短いものではなく，年単位での事業であるため，研究者の熱を冷まさせないようにプロセスとゴールを確認することを常に意識している。2つ目はチームとしての役割の明確化である。試験の開始から終了までは，多くの業務が発生するため，チームの一人一人が業務に責任をもち，チーム内で連携する。当センターは，これら2つのことがうまく機能することを通じて，臨床試験の準備段階から試験スタート，試験の進捗に至るまで円滑な連携を行っている。

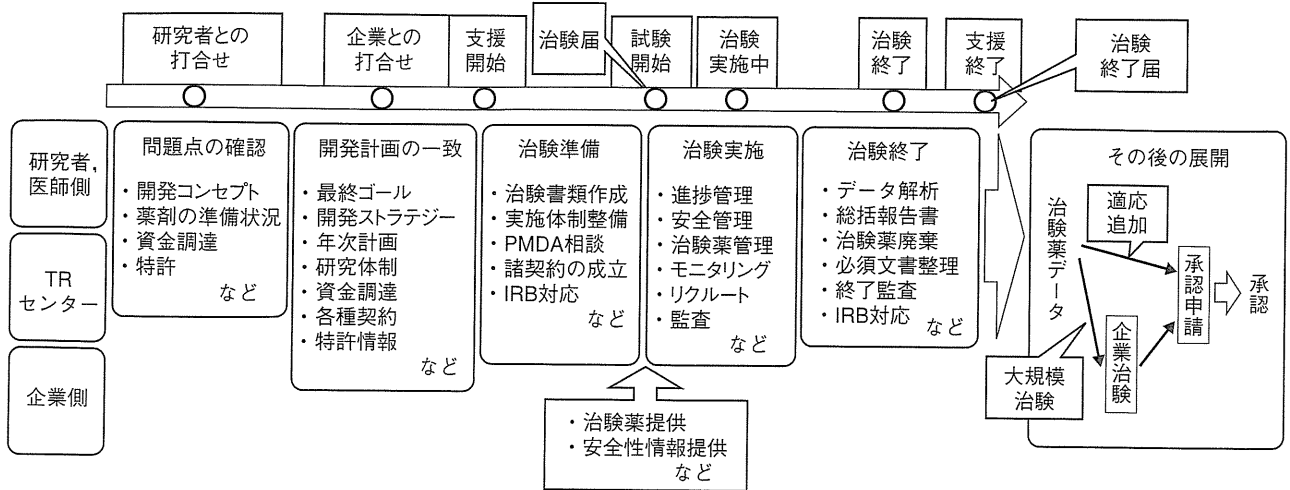


図 2 治験の主な流れ

4 支援の流れ (図2)

①研究者側との調整

研究者からのシーズ支援の相談があった場合には、探索医療開発部がまず研究者とテーマについて十分な時間をかけて議論する。開発内容が現治療の問題点や競合する医療技術との差別化など、開発根拠を双方が理解したうえで開発を進める。そして、研究の位置づけに基づき、治験、先進医療、高度医療などのいずれのトラックを用いてゴールをめざすのか議論し、ゴールへ向かうために最短ルートを模索する。なお、臨床試験を実施する場合には、探索医療開発部が中心となり、年単位でのスケジュールやプロジェクト経費、そして試験の準備～実施～終了までの実施項目を考えるものすべてをあげ、その実施時期と作業時間を考慮して、およそのスケジュール表など試験規模を捻出する。また、将来的な開発ロードマップは、臨床研究後の開発方針を企業とも打合せ、一般医療化までの全体の開発ストラテジーのなかで、臨床試験の位置づけを明確にしていく必要がある。また、研究者側が公的資金への申請を検討している場合に、臨床が目標であれば、当センターは積極的に申請計画に加わり共同申請となるようにする。

②企業との折衝

企業とあらかじめ連携している場合には、探索医療開発部が企業側と研究者を交えて早急に折衝をしてプロジェクトとしてのゴールを議論する。企業と

の共同研究が可能となれば、医療開発管理部が中心となり契約をまとめる。最終的な開発する物が医薬品や医療機器であれば、企業側が臨床研究を引き継ぐこととなるため、企業側がどのような研究成果を期待し、どのように活用するかを最初の時点で製品化までのルートを議論しておくことは非常に重要である。契約内容で特に注意が必要なのは、共同研究のなかで得られた成果の取扱いであり、事前に十分な議論をしたうえで共同研究契約をまとめる。なお、当センターにかかる研究費や成果報酬についても議論が重要である。

③臨床研究のチーム形成と進捗管理

ゴールや目標が決まれば、次に支援組織と研究者側を交えて、具体的な今後のスケジュールや実行項目などを議論し、担当者を決定する。チームによる支援が本格的に開始となる。研究者側を中心に当センターの3部とともに試験実施計画書、説明文書・同意文書、概要書の作成などを行う。試験計画書は、臨床試験中で計画の根幹をなすものであり十分な熟慮が必要である。この試験計画書の良し悪しが試験の質を決める。当センターでは、探索医療検証部が統計学的な思考やデータマネジメントなどを中心に担当し、試験計画書の質を担保している。一方では医学部附属病院の各診療科および各部門との協力関係は重要であり、探索医療臨床部が中心となり、準備段階からの綿密な打合せをして臨床試験の効率的な遂行に支援をしている。さらに、臨床研究用製剤

(院内製剤)が必要な場合には、研究者側と相談のうえ、薬剤部が治験薬 GMP 製剤を、分子細胞治療センターが細胞製剤 (GMP 基準) を調製・出荷をする。

試験デザインが決定し、実施計画書もほぼ固定できる段階になれば、対象患者も明確になる。実際に試験が始まると被験者リクルートに苦労することが多いため、実施計画書作成段階から組み入れられそうな被験者を調査する。試験の成功のカギは被験者リクルートを進捗にかかっている。

④規制当局との折衝

「治験」であれば、医薬品や医療機器の承認申請をめざすものであり、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(以下、PMDA)との折衝は必要不可欠である。PMDA との対面助言でどのようなことを相談するのか、相談資料の準備も別途必要となるため、当センターは資料作成から対面助言への参加なども支援する。

⑤院内における審査

試験実施計画書、説明文書・同意文書、概要書などが完成できた場合には、研究者側が倫理委員会や治験実施審査委員会などの審査委員会へ申請を行う。当センターは審査委員会からの意見に対する対応も支援する。承認が得られれば開始可能となる。治験の場合には、院内の治験審査委員会にて承認が得られれば、研究者は PMDA へ治験計画届書を提出し、治験が開始となる。

⑥試験期間中～試験終了時の進捗管理

臨床試験がいったん開始となれば、被験者リクルートの進捗管理が重要となる。探索医療臨床部が中心となり、試験期間と被験者リクルート状況について研究者側と定期的に打合せ、今後の対応などを協議している。

臨床試験が順調な進捗をたどり、目標症例数に達成し観察期間など試験期間が終了した場合、あるいは中止した場合には、研究のまとめ作業となる。データマネジメント、統計解析、報告書作成など、研究

者側と当センターと今後のスケジュールを立てて、開始段階と同様にチームを形成し作業を打ち合わせる。また、審査委員会などへの報告を行う。さらに、院内関係部署への終了報告を行う。

⑦企業への継承

臨床試験の開発段階で企業とあらかじめ契約された内容を達成可能な場合には、試験終了前に企業を折衝し、今後の動きを具体的に議論する。研究のまとめ作業と並行し、企業へ円滑な移管を行う。

5 課題

当センターはこれまでの実績から、臨床試験の実施のノウハウは積み上げ、研究者のニーズにあった支援体制を整備してきた。しかし、実際に一般医療まで到達したシーズはなく、企業への継承を含め、最終結果が判明するまでに時間を要する。また、臨床試験の実施に際してのマンパワーが現在不足している。今後当センターの支援体制の質を保つには人材育成が急務の課題である。今後は、これまでの当センターの経験から、今後は他の医療機関とも連携を模索し、さらなる臨床研究のネットワークと人材育成の場を広げ、質の高い臨床試験を次々と実施していくことである。

おわりに

当センターは、学内の有望シーズの臨床開発を通じて、現有の優れた支援機能を増強・拡充・整備し、人材の実地教育による育成をすることによって、学内はもとより外部からのプロジェクトを受け入れて支援する体制を確立すること、さらに、より円滑かつ効率的な橋渡し研究・臨床開発を可能にし、創薬・新規医療開発の国内におけるアカデミア拠点となることを目標としている。また、これらの目標を達成することで、欧米に比し遅れているわが国の臨床試験・治験を推進し、国際競争力の強化に貢献できるものとする。

はじめての 臨床応用研究

【編集】川上浩司(京都大学大学院医学研究科教授)

本邦初!!
よくわかる
アカデミアのための
臨床応用研究
実施マニュアル

4. 臨床応用にかかる薬事相談制度、 試験薬の準備と GMP

伊藤 達也

医薬品や医療機器が患者に使用されるためには、国からのお墨付き（承認）が必要である。この承認を得るためには GCP に則った「治験」を実施し、厳しい審査を越えなくてはならない。医薬品医療機器総合機構（PMDA）では、その治験や承認申請に関する薬事相談制度が設けられている。また、治験を実施する前には試験物の準備が必要であり、ヒトを対象としたものであることから十分な品質と安全性が担保されたものでなければならない。試験物の製造には国が定めた基準があり、それを GMP と呼ぶ。本稿では治験にかかるルールの概要について触れたい。

Key words

GCP, 医薬品医療機器総合機構, 治験相談, 対面助言, GMP

はじめに

医薬品や医療機器が患者に使用されるためには、国からのお墨付き（承認）が必要である。この承認を得るためには GCP に則った「治験」を実施し、厳しい審査を越えなくてはならない。医薬品医療機器総合機構（PMDA）では、その治験を開始する前に薬事相談制度がいくつかある。もう 1 つ重要なことは医薬品や医療機器はヒトを対象としたものであることから十分な品質と安全性が担保されたものが必要になる。本稿では、このように薬事相談制度および試験薬準備にかかる GMP についてわかりやすく説明したい。

I. 薬事相談制度について

1. 治験と臨床研究

治験は臨床研究とは異なり、医薬品や医療機器の薬事承認、つまり製品化を求める（商業化）ためであると薬事法第 2 条第 16 項の中で定義されている。米国や欧州では、治験は商業目的と臨床研究目的のいずれも国への届出制度となっているが、日本では商業目的のみである。厚生労働省や PMDA も治験の目的が商業化であることから、

治験に関する相談の際にも、承認審査を踏まえての助言や意見を示している。日本では、臨床研究の目的では治験はできない。臨床研究の実施に関しては「臨床研究に関する倫理指針」に従うことになっている。臨床研究は治験ではないため、臨床研究で素晴らしい成果をあげたとしても、医薬品や医療機器の承認までには現時点では結びつかない。原則、治験をせずに承認を得ることはできない。このことは研究者に十分理解されていない部分であり、理解を求めたい。これまでのところ、研究者が発見や作製したものを一般医療にするためには治験の実施が必須であり、開発初期段階から企業などと十分な交渉や折衝をし、企業のノウハウを活用しながら早期承認をめざして協力することがとても重要である。もし臨床研究を実施することで承認を得ようとしている研究者がいれば、臨床研究を早く切り上げて、治験を実施することを勧める。ここでは、臨床研究からは少し離れて、「治験」というものの話を進めたい。

2. GCP と治験

治験は GCP により実施内容が詳細に規定されている。臨床研究との大きな違いはデータの品質を担保することである。治験の場合には、医師個人がデータを管理するのではなく、第三者がデータを管理して直接的に関与できないようにしている。これは有効性や安全性データの質を担保することに基づいている。残念ながら国内の臨床研究ではそこまで実施不可能なので、臨床研究ではデータ管理が十分でなく実際には評価できないのが現状である。

医薬品や医療機器の承認審査に関しては、PMDA が厚生労働省より委嘱を受けて審査し、厚生労働省がその審査結果をもって承認をしている。

3. 治験相談制度

PMDA には治験相談制度があり、これは治験を進めるにあたって、規制側と当初より相談することで、開発を進めていく相談制度である（詳細は PMDA のホームページを参照）。1997 年より新 GCP となり、治験の枠組みが大幅に変わった。以前の臨床開発には相談制度はなく、臨床開発が終了し承認申請の段階で規制当局との直接的な議論となっていた。その際にデータの不足や不備を指摘され治験のやり直しなどが指示されれば、企業にとっては大きな負担であった。一方、規制側も承認審査の段階でデータ不足の発覚により軌道修正を行うことで承認までの時間が大きく遅れることには問題視していた。開発段階からの早期の治験相談は企業側と規制側の双方が望むものであった。そのような経緯から、治験の相談制度が導入された。

現在では相談制度の設置当初より区分などが増え、バリエーションある相談体制になっている。これは双方にとって非常にいい制度である。治験相談制度の中でプロトコルなどの資料に基づく評価に関する相談を「対面助言」といい、有料となっている（表 1）。企業側にすれば、対面助言により協議のうえで PMDA より的確な助言を得て（お

表① 治験相談の手数料（抜粋）

医薬品		医療機器	
手続相談	139,800	開発前相談	135,200
安全性相談	1,782,800	品質相談（生物系を除く）	775,400
品質相談	1,478,300	安全性確認相談（生物系を除く）	882,100
第Ⅰ相試験開始前相談	4,239,400	性能試験相談	845,900
前期第Ⅱ相試験開始前相談	1,623,000	臨床評価相談	1,026,600
後期第Ⅱ相試験開始前相談	3,028,400	探索的治験相談	1,105,300
第Ⅱ相試験終了後相談	6,011,500	医療機器治験相談	2,413,000
申請前相談	6,011,400	申請前相談	2,413,000
追加相談	2,675,600	申請手続相談	135,200
		追加相談	1,130,100

(単位：円)

墨付きを得て）治験を実施することで無駄な治験を回避できることになると思う。ただ、この相談手数料は、医師主導治験でも企業治験でも差はないため、研究者が医師主導治験の目的で相談する場合に、相談費用は決して安価ではないため支払いに関して非常にハードルが高い。なお、治験相談制度では「事前面談」という無料相談があるものの、事前面談は資料の評価に関する議論ではなく、対面助言の際に必要な資料などを打ち合わせするという位置づけである。とは言うものの、研究者はどのようなことを対面助言で確認したらよいかかわからないことが多いため、事前面談を活用し治験の全般的な理解や対面助言での必要な資料などの説明や助言をあらかじめ受けてから、対面助言を申し込むことが推奨されている。

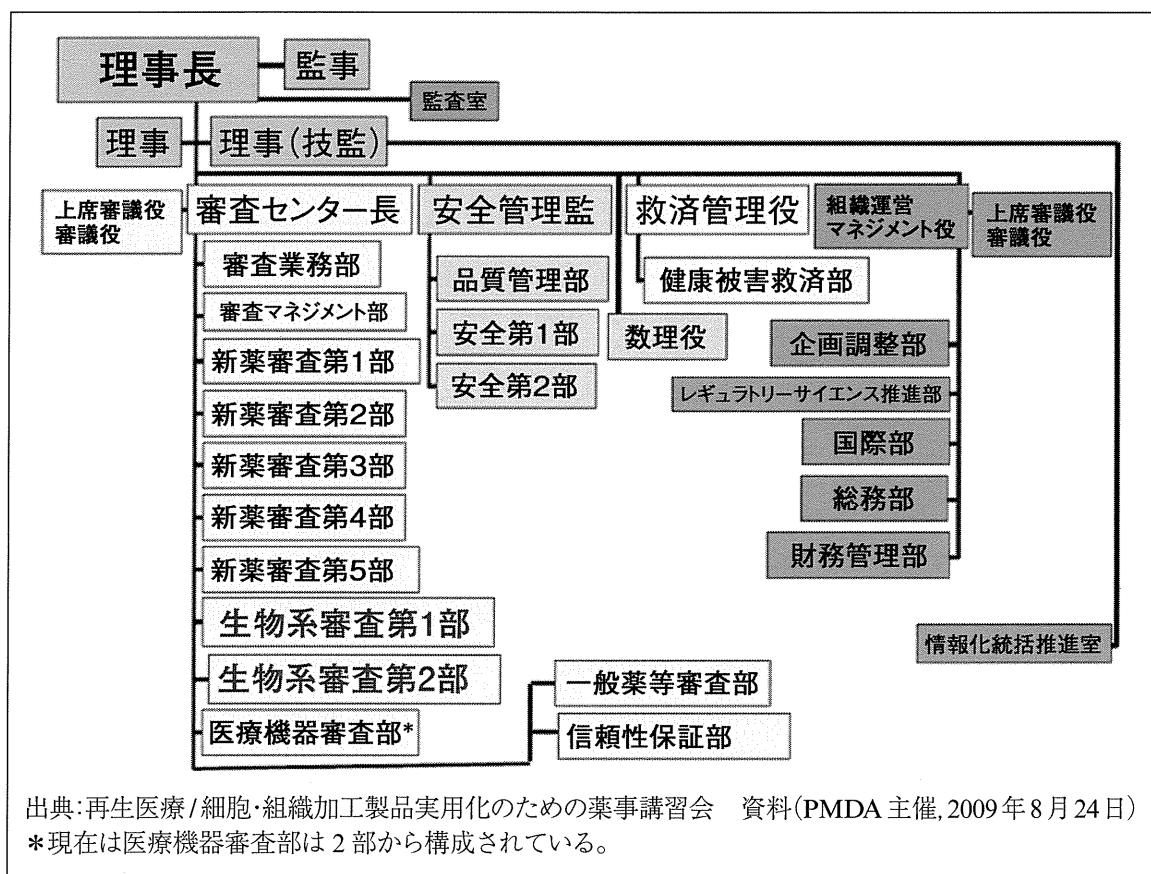
4. 相談体制

PMDA の審査部は、医薬品は 5 部、生物系審査部は 2 部、医療機器は 2 部から構成されている（図①）。それぞれの審査部は品目ごとの分野に分かれており、相談体制は分野ごとの審査チームが担当する。対面助言では正式な議事録が残るため、何年か経過後でもその議事録が生きている。医薬品や医療機器の臨床開発は時間を要する長期戦であることから、PMDA では人事異動などで担当者が代わったとしても、その議事録により開発方針を大きく転換をすること防ぐことができる。PMDA での対面助言の際には、最後の承認審査を見据えての意見や助言が述べられる。なお、無料の事前面談では議事録は作成しないことになっており、PMDA の意見を確認するのであれば対面助言にて議事録を残すことがよい。このように、対面助言では開発段階から審査チームとの間で議論されるため、研究者を含めた開発者は効率よく開発ができると考えられている。なお、治験相談制度に関しては、日本だけでなく、同様に米国規制当局（FDA）や欧州規制当局（EMA）においても存在する。

5. 企業治験と医師主導治験

2002 年薬事法改正により、医師が主導となって行う治験が法的に可能となった。

図① PMDA の組織

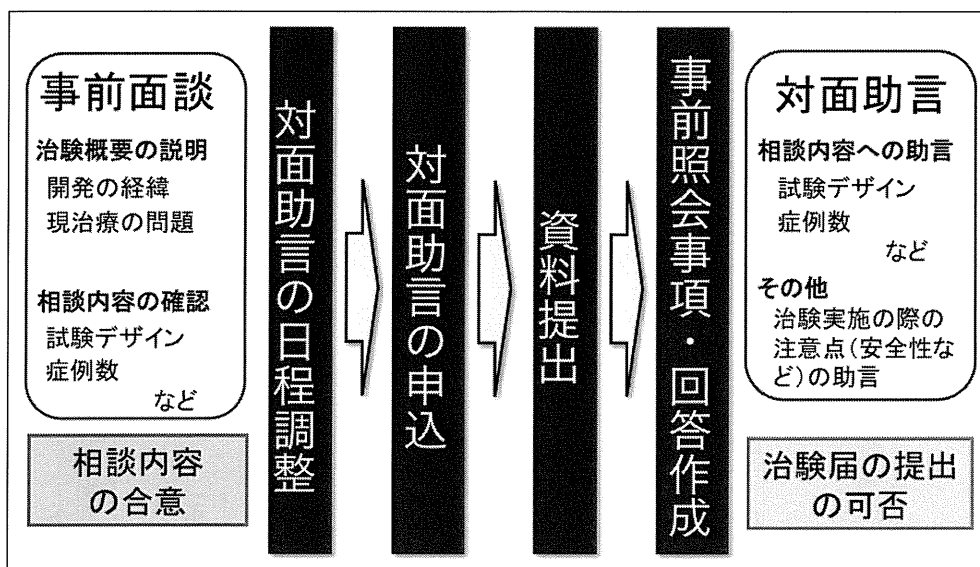


それ以前は治験は企業のみが実施可能であった。それは薬事法第2条第16項にも規定されているように、治験の目的が医薬品等の承認（商業化）のためである。しかし、実際の医療現場で必要となる医薬品などは企業が開発してきたものだけではなく、特に希少疾患などはその市場規模から企業が開発しない場合が多い。国内では新しい治療法を開発していく目的で、医師による治験が制度化されたことは実に画期的なことであった。医師主導治験といっても GCP 基準に従うことは同じであり、企業治験と差はなく、その煩雑さは変わらない。医師が主体となって治験を実施することは現在でもなおハードルが高い。また、薬事法の中では先にも述べたように治験の目的が商業化であるため、現在も最終段階で承認申請できるのは医師ではなく、企業となっている。いずれにしても医師は治験が実施可能であっても、医師や医療機関が承認申請をすることはできない。

6. 対面助言について

対面助言自体は約2時間の議論である。対面助言の際にはあらかじめ資料を PMDA 側へ提出する必要がある（図②）。提出資料は相談区分によって必要な資料は異なるが、2時間の中で十分な議論ができる内容に資料を作成する必要がある。その

図② PMDA との対面助言



際に、特に対面助言とはいえ相談であることから、PMDA にどうしたらよいかを聞くことは推奨できない。対面助言の資料作成段階から、相談したいポイントをしっかりと組み立てて、治験のこういった部分の相談内容なのか熟慮し、またその根拠や考えを示すことが重要である。もしそうでなければ PMDA より厳しい条件が指示されると考えてよい。資料の完成度が相談の結果の良し悪しを左右することは間違いないため、企業治験であれ医師主導治験であれ、相談をする側が主体となって資料作成など準備をしっかりと行う。また、資料を提出後に PMDA 側から照会事項が何回か送付されてくるので、その際に PMDA 側の求めている事項を読み取ることができる。研究者側の意見を十分に練ったうえで対面助言に臨むことが当日の議論を有意義なものとするができる。なお、対面助言では議論の内容が議事録として作成されるので、十分な議論を議事録として残したい。企業治験の場合には、企業は対面助言に対するノウハウをもっているが、医師主導治験の場合には連携企業の協力を得ながら進めることになる。

7. TR 拠点との協力

2007 年度より開始された文部科学省「橋渡し研究支援推進プログラム」は、煩雑な臨床研究や治験などを支援する基盤組織の整備を目的に全国公募され、6つの拠点（トランスレーショナルリサーチ拠点：TR 拠点）と1つのサポート機関が選定された（現在は拠点が1つ追加され7つの拠点である）。それらの拠点は医薬品、医療機器、再生医療などそれぞれの支援経験上で得意分野があり、治験を実施する際の必要な書類作成や実施手続などの多様なニーズに答えている。治験を考慮したら TR 拠点の力を借りて治験の準備から実施までを行うことも一案であるので、まず TR 拠点に相談