

重症皮膚創傷患者を対象とした補中益気湯の有効性の検討 ～補中益気湯投与によるパイロット研究及び 並行群間比較試験について～

研究分担者 並木 隆雄 千葉大学大学院医学研究院和漢診療学 准教授

研究協力者 力久 直昭 千葉大学医学部附属病院 形成外科

秋田 新介 千葉大学医学部附属病院 形成外科

徳元 秀樹 千葉大学医学部附属病院 形成外科

植田 圭吾 千葉大学大学院医学研究院 和漢診療学

研究要旨

創傷治癒過程が進まず、治療しても2～3週間以上改善しない場合難治性創傷と呼ぶ事が多い。補中益気湯は、臨床においてもMRSA皮膚感染の治癒やアトピー性皮膚炎の改善に有用との報告がある。皮膚創傷が遅延した患者では、複合的な要因があるため、通常の治療に加え複合した作用のある補中益気湯が有用な場合があると考えられる。また、平成22～23年にかけて千葉大学医学部附属病院形成外科で難治性皮膚創傷患者6例補中益気湯を使用したところ治癒などの臨床的な有用性を3例（50％）に認めた。そこで3週間以上改善しない難治性重症皮膚創傷患者を対象とした補中益気湯の有効性を単施設無作為化比較試験により検討することとし、現在進行中である。この無作為比較試験の結果が、重症皮膚創傷患者において、創傷の治癒やその期間の短縮などの漢方治療の有効性が確認されれば、新たな治療方法として患者のみならず医療経済的にも有用性が高いと考える。

A. 研究目的

皮膚は生体の表面にあり、体内の水分の保持や病原体の侵入に対するバリアの役割を果たす重要な臓器である。何らかの原因で創傷治癒過程が進まず、治療しても2～3週間以上改善しない場合難治性創傷と呼ぶ事が多い。このような重症の難治性創傷には以下のように様々なものが含まれる。すなわち、褥瘡、糖尿病性（神経原性）創傷、

静脈うっ滞性創傷、動脈性（虚血性）創傷、膠原病に伴う創傷、放射線創傷、薬剤漏出性創傷などである。褥瘡や創傷はこのバリアが破綻した状態であり、特に高齢者や糖尿病患者が免疫能の低下した患者においては、致死的な感染症や脱水・出血の原因となる危険性がある。また、褥瘡や創傷からの滲み出しの管理は患者にとって大きなストレスとなり、日常生活の質を大きく低下

させる原因ともなる。そのため、重症の創傷の基礎疾患の治療に加え、栄養状態の不良、関節変形、運動能力の低下といった様々な悪化要因に対する多方面からのアプローチが必要とされる。皮膚創傷が遅延した患者では、複合的な要因があるため、通常の治療に加え上記のような複合した作用のある補中益気湯が有用な場合があると考えられる。

そこで、まず平成 22 年～23 年にかけて補中益気湯の自然免疫ならびに栄養状態に及ぼす影響に関する研究での予備検討として、症例数などの決定のため、パイロット研究目的に感染などで創傷治癒の遅延した患者少数例での補中益気湯の効果を検討した。

上記検討を踏まえ、次に平成 24 年度からは重症皮膚創傷患者に対する補中益気湯の効果について、複数施設において無作為比較試験を開始した。治癒までに要する期間、再発の有無および日本褥瘡学会の重症度評価分類（DESIGN-R）を用いて経過を半定量化し判定することで臨床的効果を検証する。

この無作為比較試験より、重症皮膚創傷患者において、創傷の治癒やその期間の短縮などの漢方治療の有効性が確認されれば、新たな治療方法として、患者のみならず医療経済的にも有用性が高いと考える。

B. 研究方法

平成 22 年～平成 23 年度

対象は感染などで創傷治癒の遅延した形成外科患者 6 名（男女各 3 名、平均年齢 60 歳±21 歳）である。方法は補中益気湯一日量 7.5g/日分 2～3 で投与した。内服期間は主治医が必要するまでとし制限は設けなかった。また補中益気湯の投与期間が短期間のため、症例において創部の感染の有無は問わなかった。

平成 24 年度

1) 対象は皮膚創傷治療中の成人患者で通常

治療後 3 週間以上改善しないもので、以下の基準を全て満たす患者を対象とする。

（1）選択基準

- 1) 体力の衰えた者
- 2) 補中益気湯が内服可能な者
- 3) 他の漢方薬を定期内服していない者
- 4) 当研究に参加同意が本人または代理権者により参加の承諾を得られる者

（2）除外基準

- 1) 補中益気湯が内服不可能な者
- 2) 他の漢方薬を定期内服し、中止不可能な者
- 3) 間質性肺炎・偽性アルドステロン・ミオパシーを有する者
- 4) そのほか、試験責任(分担)医師が被験者として不適当と判断した者

2) 症例登録

対象となる被験者に対し被験薬投与前に試験内容について、別に定める同意説明文書に基づいて十分に説明し、被験者が内容をよく理解したことを確認したうえで本試験への参加について、同意文章で得ることとする。

症例登録・割付方法

症例登録：試験責任医師あるいは試験分担医師は、1) 文書による同意を取得する。2) 試験責任医師が保管する被験者識別コードリストに、同意取得日および被験者と被験者識別コードを対応させるために必要な事項を記載する。3) 被験者識別コードを用いた症例登録書を、研究事務局（和漢診療学医局）に提出する。4) 適格性の確認を受け、被験者登録番号と割付けられた薬剤名等が記載された登録確認書を受領する。5) 同意撤回、中止、脱落等が生じた時は、速やかに報告する。

被験者の割付方法は無作為割付とする。被験者の各治療群への割付は、中央登録方式にて行う。なお、年齢、性別、各群間で可能なかぎり均一とするため、動的割付を行う。

主要評価項目

- (1) プライマリーエンドポイント
創傷治癒の有無
- (2) セカンダリーエンドポイント
- 1) DESIGN-R スコアー
- 2) 観察期間内の再治療開始の有無
- 3) 合併感染症がある場合はその消失

検査・観察項目および時期

(1) 患者背景：カルテ番号、ID 番号、患者イニシャル、性別、生年月日、入院・外来の別、身長、体重、合併症、既往歴、原病歴、前治療

(2) 試験薬投与 服薬指導情報
服薬時刻は原則食前 30 分、内服とする。
ただし、飲み忘れた場合は食後または次の内服時間までに内服

(3) 試験薬および併用薬の服薬状況の確認：当該調査期間における服薬状況をパーセンテージで評価し、症例報告書に記載する。

(4) 自他覚症状の確認：問診等により確認する。症状日誌がある場合は参考にする。

(5) 有害事象と副作用の確認：有害事象には、各種検査値異常も含める。内容、発現時期・消失時期、程度、処置、転帰、重篤性評価、試験薬との関連性等をカルテおよび症例報告書 (case report form, CRF) に記載する。必要があれば追跡調査する。

(6) 採血：補中益気湯開始前、開始後 4, 8, 12 週後に各調査項目を測定する。感染がある場合は培養も行う。採血量は 1 回につき最大 15 ml の静脈血を採取する。

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, γ GTP, BUN, Cr, UA, Na, K, Cl, CRP)

(7) 特殊検査：IgE-RIST および各種サイトカインの測定：TGF β , IL-10, IL-6

(8) 他覚的な創傷判定：日本褥瘡学会の DESIGN-R (2008 年改訂版褥瘡経過評価用)

DESIGN-R では、深さの数値は重み値には関係しない。また、深さ以外の 6 項目 (滲出液, 大きさ, 炎症/感染, 肉芽組織, 壊死組織, ポケット) の合計点の 0 点から 66 点までの総点はその創の重症度を表す。

① Depth (深さ)

創内の一番深い部分で評価, また, 改善に伴い創底が浅くなった場合はこれに相応する深さとして評価し, DU を加えた 7 段階に区分する。なお, U は判定不能 (unstageable) の頭文字。

d 0: 皮膚損傷・発赤なし

d 1: 持続する発赤

d 2: 真皮までの損傷

D 3: 皮下組織までの損傷

D 4: 皮下組織を越える損傷

D 5: 関節腔, 体腔に至る損傷

D U: 深さ判定が不能の場合

② Exudate (滲出液)

e 0: なし

e 1: 少量: 毎日のドレッシング交換を要しない

e 3: 中等量: 1 日 1 回のドレッシング交換を要する

E 6: 多量: 1 日 2 回以上のドレッシング交換を要する

③ Size (大きさ)

皮膚損傷範囲の, 長径と短径 (長径と直交する最大径) を測定し (cm), おのおのを掛け合わせた数値から 7 段階に分類した。なお, 大きさの目安として, 円形の創をイメージし, s3 は直径 2 cm 未満, s6 は 4 cm, s8 は 6 cm, s9 は 8 cm, s12 は 10 cm 以内, S15 は 10 cm 以上と考えると理解しやすい。

s 0: 皮膚損傷なし

s 3: 4 未満

s 6 : 4 以上 16 未満
s 8 : 16 以上 36 未満
s 9 : 36 以上 64 未満
s 12 : 64 以上 100 未満
S 15 : 100 以上

④ Inflammation/Infection (炎症／感染)
創周辺の炎症あるいは創自体の感染につ
き、4 段階に分類した。

i 0 : 局所の炎症徴候なし

i 1 : 局所の炎症徴候あり (創周囲の発赤、
腫脹、熱感、疼痛)

I 3 : 局所の明らかな感染徴候あり (炎症
徴候、膿、悪臭など)

I 9 : 全身的影響あり (発熱など)

⑤ Granulation tissue (肉芽組織)

創面の肉芽組織の量により 6 段階に分類
した。

g 0 : 治癒あるいは創が浅いため肉芽形成
の評価ができない

g 1 : 良性肉芽が創面の 90%以上を占める

g 3 : 良性肉芽が創面の 50%以上 90%未満
を占める

G 4 : 良性肉芽が、創面の 10%以上 50%未満
を占める

G 5 : 良性肉芽が、創面の 10%未満を占め
る

G 6 : 良性肉芽が全く形成されていない

⑥ Necrotic tissue (壊死組織)

壊死組織の病態が混在している場合は全
体的に多い像をもって表現し、3 段階に分
類した。

n 0 : 壊死組織なし

N 3 : 柔らかい壊死組織あり

N 6 : 硬く厚い密着した壊死組織あり

⑦ Pocket (ポケット)

ポケットの広さの計測は、褥瘡潰瘍面と
ポケットを含めた外形を描き、その長径と
短径 (長径と直交する最大径) を測定し (cm),
おのおのを掛け合わせた数値から「褥瘡の
大きさで測定した数値」を差し引いたもの
を、5 段階に分類した。

p 0 : ポケットなし

P 6 : 4 未満

P 9 : 4 以上 16 未満

P 12 : 16 以上 36 未満

P 24 : 36 以上

9) 調査項目は、mean±S. D. で表し、有意
差検定は開始時と 12 週後の比較には
paired t-test、

群間の比較には repeated measure ANOVA を
用いておこない P<0.05 を有意と判定とす
る。

(倫理面への配慮)

本研究は千葉大学医学部附属病院治験審査
委員会の承認を得て実施している。

C. 研究結果

平成 22 年～平成 23 年度
補中益気湯を 6 名に投与したところ、3 名
で内服後気分不快があり中止した。残り 3
名は継続可能で、2 名が創部の閉鎖するこ
とができた。さらに 1 名 MRSA 陰性化し、2
名では感染兆候は起こらなかった。
栄養状態は、継続可能症例のうち 2 名のアル
ブミンは正常範囲であった。1 例は軽度
低下していたが、創部の治癒後は正常化し
た。

投与継続例を紹介する。

1) 88 歳女性 MRSA 感染例。
X 年 1 月 14 日第 8, 第 9 肋軟骨移植。感染
なし。鼻背再建目的に頭頂骨を胸にバンキ
ング中。鼻前頭縫合部に術後感染し、1 月

19 日より補中益気湯内服（7.5 g 分 2）。MRSA 検出され VCM、MEPM 併用。画像では膿瘍腔など明らかではない。1 月 24 日には感染した骨とプレートのみ摘出し、感染していない骨はそのまま留置しておいた。その後感染の再燃なく 2 月 5 日退院。外来においても引き続き内服し、2011 年 10 月 5 日に 30 日分処方終了した。その後転移性肝癌の疑いで当科追加手術は立ち消えとなっていたが、精査の末転移性肝癌の可能性は低いとのことで、X+1 年 4 月に修正手術予定。

2) 44 歳女性：瘻孔形成

全外鼻再建用 expanded forehead flap 作成のため、額部にエキスパンダーを入れて膨らませている最中に、X 年 11 月 24 日より、皮膚の菲薄化のため瘻孔形成したため、X 年 11 月 26 日から、次の手術の X 年 12 月 21 日まで、抗生物質（フロモックス）内服と併用で補中益気湯（7.5 g 分 2）を内服した。培養は MSSA であったが、速やかに膿は漿液性となり、その後感染兆候は出なかった。瘻孔は閉鎖には至らなかった。

3) 53 歳男性：瘻孔が自然閉鎖した耳介欠損に対し肋軟骨移植手術した例。

主訴は右耳介後部の皮下腫瘍。既往歴は特になし。

X-2 年 1 月頃より右耳介後部の皮下腫瘍を自覚した。近医受診し、徐々に増大したため、X-2 年 9 月精査加療目的で近医師より紹介受診となった。X-2 年 10 月腫瘍より生検施行。悪性腫瘍のため同月腫瘍切除を行った。切除後に耳介の一部残した。病理組織で断端が陰性であることを確認後、僧帽筋皮弁で再建術を施行。術後経過は良好で 11 月末に退院となった。X-1 年 4 月（2 回目入院）耳鼻科で耳介切除された。再建後瘢痕拘縮があり形成外科で、耳介再建のため数回の手術施行。しかし X 年 4 月感染を生じた。小指頭大の皮下硬結で圧痛や熱感なし。全身の発熱なし。その後の耳起こし手術を X 年 2 月 18 日に施行後、5 月 11 日に瘻孔

を形成した。培養は MSSA。X 年 5 月補中益気湯 7.5 g 分 3 と感受性のあるクラビットの内服開始。1 週間後排膿は著減した。2 週後滲出少なくなっているが傷口はふさがりきってはいない。1 か月後の 6 月 8 日には瘻孔閉鎖した。6 月 22 日から補中益気湯のみ継続した。再建後の軟骨が残されている場合再発が考えられ、さらに 1 か月内服した。その後患者の強い要望で内服中止したが、その後の瘻孔再発を認めなかった。栄養状態は、アルブミン 4.2 g/dl と良好な方であった。このような症例では難治の場合が多く、移植軟骨の摘出になることが多い。軟骨の摘出せずに傷が治癒した珍しい症例であったとの形成外科専門医の指摘もあった。

平成 24 年度

平成 24 年度末での登録患者は 7 名（男性 2 名、女性 5 名、平均年齢 45 歳）である。補中益気湯投与群 4 名、観察群 3 名である。現在進行中である。

D. 考察

今回我々は、平成 22 年～23 年の検討で「形成外科手術後の患者での皮膚創傷治癒に及ぼす補中益気湯の効果（予備的検討）」を行い 6 名中 3 名に何らかの効果を認めた。皮膚の創傷治癒は皮膚の損傷部位の生体の防御と修復反応である。これは圧力のかかることで生じる褥瘡、代謝の異常を生じさせる糖尿病、後天的な末梢動脈疾患や静脈還流不全などにより慢性化するといわれる。このような慢性創傷は高齢化、生活習慣病の蔓延に起因し、増加しており、外科的手技がいかに優れていても、それだけでは治癒に導くことができない。それに対して、手術後の創傷遅延は全身状態の評価・改善、基礎疾患の治療・ケアは、手術の検討時点で良好な状態になっているため、生じにくいはずである。しかし、実際は感染・遺物の残存などの急性な要因で創傷治癒が遅延する。また皮膚関連での創傷治癒が生じや

すいのは、高齢であるので年齢が高い患者ほど危険は高い。3名のうち、1名は80歳台の高齢者であったが、その方でも、補中益気湯内服で改善した。また、最後の症例の移植軟骨の例も経過として、軟骨の摘出を免れ、補中益気湯内服での治療効果をもっとも高かった印象であると専門医が述べている。

高齢者などにはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）や緑膿菌などの多剤耐性菌や弱毒菌の保菌者が散見される。これらの保菌者は新たな抗生剤使用時に常に多剤耐性菌や弱毒菌の内因性感染発症のリスクを有している。しかし、保菌者の段階での抗菌剤による除菌は、その副作用や耐性菌の増加から、一律的に推奨されていない。一方、近年補中益気湯にこれら多剤耐性菌や弱毒菌保菌者の除菌効果に関する報告が散見されている¹⁾。

重症の創傷の基礎疾患の治療に加え、栄養状態の不良、関節変形、運動能力の低下といった様々な悪化要因に対する多方面からのアプローチが必要とされる。近年、今回検討する補中益気湯において、基礎研究では（1）白血球減少の改善（2）IgE 抗体産生抑制作用、（3）抗ウイルス作用（NK細胞）、さらには（4）細菌感染防御作用（マクロファージ）が報告されている²⁾。臨床においても MRSA 皮膚感染の治癒³⁾やアトピー性皮膚炎の改善⁴⁾に有用との報告がある。皮膚創傷が遅延した患者では、複合的な要因があるため、通常の治療に加え上記のような複合した作用のある補中益気湯が有用な場合があると考えられる。

そこで平成 24 年度からこれまでの成果を踏まえ「重症皮膚創傷患者を対象とした補中益気湯の有効性を検討するための並行群間比較試験」を開始した。症例数の追加（目標症例数合計 20 名）と関連するサイトカインの測定により作用機序の一部検討を実施している。

E. 結論

平成 22～23 年度にかけて千葉大学医学部附属病院形成外科で難治性皮膚創傷患者 6 例中 3 例に補中益気湯を使用したところ治癒などの臨床的な有用性があった。

そこで平成 24 年度から 3 週間以上改善しない難治性重症皮膚創傷患者を対象とした補中益気湯の有効性を単施設無作為化比較試験により検討を実施している。

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

なし

2. 学会発表

なし

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

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

研究分担者 齋藤 滋 中島 彰俊 島 友子

富山大学大学院医学薬学研究部 産科婦人科学講座

研究要旨

HPV ワクチン接種を行う女性を対象に、漢方薬が副作用軽減作用および抗体産生のアジュバント効果を持つかを検討中である。対象は20代の一般女性であり、無作為に十全大補湯エキスを投与群と非投与群を割り付けし、ワクチン接種を行っている。調査項目は、症状日記を用いて副反応の軽減の有無：局所（注射部位）の特定した症状（疼痛、発赤、腫脹）および全身性の特定した症状（疲労、筋肉痛、頭痛、胃腸症状、関節痛、発疹、発熱、蕁麻疹）を調査し、血液検体を用いて生化学検査（BUN、Cre、GOT、GPT、 γ -GTP）および免疫学的検査（HPV 抗体価）の測定を行う。これまで38名が2群に分かれ投与を開始し、副作用の差につき解析を行った。両群ともに副作用発現に有意な差を認めなかった。また、重篤な副作用も一例も認めなかった。今後は、漢方薬による抗体産生へのアジュバント効果の評価を行う予定である。

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、HPV ワクチン接種を行う女性を対象に、漢方薬が副作用軽減作用および抗体産生のアジュバント効果を持つかを検討する。HPV ワクチン（サーバリックス）は子宮頸癌の多くみられるHPV16, 18型の2種類の感染予防に用いられ、子宮頸癌撲滅のため自治体等により HPV 接種費用の助成も行われている。しかし、10%以上の接種者に注射部位の発赤・痛みや、筋肉痛・関節痛を起こし、発疹・じんましん等を起こすことも知られている。そこで、HPV ワクチン接種を行う女性を対象に漢方薬を投与し、その副作用の軽減効果と抗体産生のアジュバント効果を検討する。

B. 研究方法

- 1) 対象は富山大学附属病院に關係する20代の一般女性とし、接種後の妊娠例は除外した。
- 2) 対象を無作為に十全大補湯エキスを投与群（一日量7.5g/日）と非投与群の2群に分け、図1の如く実施した。
- 3) 調査項目は、副反応の軽減の有無：局所（注射部位）の特定した症状（疼痛、発赤、腫脹）および全身性の特定した症状（疲労、筋肉痛、頭痛、胃腸症状、関節痛、発疹、発熱、蕁麻疹）に関して症状日記（別紙参照）を被験者に記載してもらう形で調査する。血液検体は生化学検査（BUN、Cre、GOT、GPT、 γ -GTP）および免疫学的検査（HPV 抗体価）の測定に用いた。
- 4) 調査項目は、 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ で表し、有意差

検定は投与群と非投与群間で repeated measure ANOVA を用いておこない $P < 0.05$ を有意と判定した。

（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) 十全大補湯と非投与群の比較

参加者は十全大補湯エキス投与群（以下 J 群）20 名（平均年齢 25.4 ± 2.2 才）、非投与群（以下 N 群）18 名（平均年齢 24.6 ± 2.0 才）にワクチン接種を行った。J 群は 2 名脱落、N 群は 1 名が妊娠のため脱落した。J 群は内服開始後 2～13 か月が経過しているが、先述の脱落者を除いて、内服中止例は出なかった。

ワクチン第 1 回接種時の J 群収縮期/拡張期血圧（ $109.1 \pm 11.9/67.7 \pm 9.1$ ）であり、3 回目接種時の収縮期/拡張期血圧（ $108.8 \pm 11.7/69.5 \pm 7.9$ ）と変化を認めなかった。N 群においても第 1 回および第 3 回接種時の収縮期/拡張期血圧（1 回： $105.6 \pm 11.8/66.5 \pm 8.2$ 、3 回： $112.1 \pm 7.6/75.1 \pm 6.4$ ）において有意な差を認めなかった。体温は接種後 1-6 日まで計測したが、 38°C 以上の発熱を認めず、平均体温にも有意差はなかった（注射後の平均体温 J： 36.5 ± 0.4 N： 36.5 ± 0.35 ）。注射部位の発赤は 10 段階（10 が強い）で評価し、J 群の平均値は 0.625 ± 1.38 N 群は 0.378 ± 1.13 と有意な差を認めなかった。接種部位の疼痛（5 段階評価で、5 が最も強い）は、J 群の平均値は 0.837 ± 0.898 N 群は 0.833 ± 0.908 と有意な差を認めなかった。さらに注射後の 6 日間での疲労感・頭痛・胃腸症状・関節痛・関節痛にも有意な差を認めなかった。発疹・蕁麻疹は現在のところ両群とも 1 例も認めていない。生化学検査においても、BUN の J 群の平均値は 12.7 ± 3.5 、N 群は 10.8

± 2.2 、Cre は J 群 0.45 ± 0.05 、N 群 0.45 ± 0.05 、GOT で J 群 19.1 ± 5.6 、N 群 22.0 ± 4.5 、GPT で J 群 19.5 ± 3.6 、N 群 19.3 ± 4.3 、 γ -GTP で J 群 21.5 ± 5.4 、N 群 22.3 ± 6.8 であり、生化学検査上も 2 群間に有意な差を認めなかった。

2) 抗体産生のアジュバント効果について

抗体投与前後で血清のストックを行っている。抗体測定キットはコマーシャルベースには販売されていないため、国内で HPV 抗体価測定系が利用可能になった段階で、ストックした血清にて HPV 抗体価を測定し、J 群と N 群で比較検討する予定である。

D. 考察

HPV ワクチン接種は 2013 年 4 月 1 日より定期接種となり、今後多くの健常人女性に行うこととなるが、副作用軽減作用は早期の評価項目として最も重要であると考え検討を行った。現時点では、多く認められる局所症状（発熱・発赤・疼痛）においても、全身症状においても漢方薬投与による軽減作用は認めなかった。これは、一部の症例の結果がまだ出ておらず、全例の結果を待つ必要がある。しかしながら、もう一方の重要な効用としてワクチンの増強効果を期待している。ワクチン増強効果は免疫反応の増強を意味しているため、今回の結果は、漢方内服によって副作用が悪化しないことを意味している。そのため、抗体産生におけるアジュバント効果の確認が重要であると考えられた。さらに、本研究はその後の長期的なフォローアップを行うことも可能であり、抗体価の追跡が可能と考えられる。

E. 結論

HPV ワクチン接種を行う健常人女性への漢方内服は、ワクチン接種による副作用悪化効果はなく、今後はワクチン効果の増強・効果の持続を検討していく予定である

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

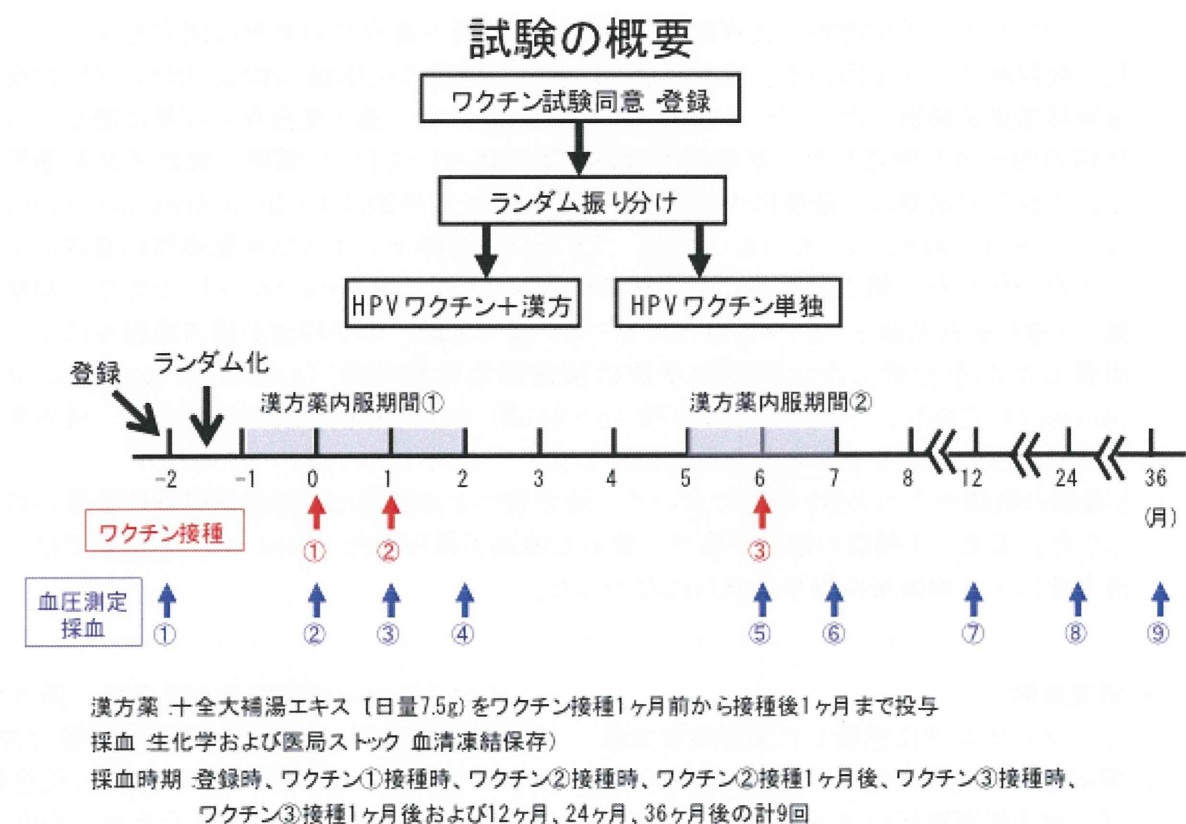


図1：ワクチンおよび漢方薬投与スケジュール

インフルエンザ高齢者に対する漢方薬治療の有効性 —統計解析手法の違いによる結果の一致性検討—

研究分担者 折笠秀樹 富山大学大学院医学薬学研究部 教授

研究要旨

インフルエンザに感染した高齢者を対象にした漢方薬投与の有無に関するランダム化比較試験データを用いて、漢方薬投与に伴う3種類の抗体価（H3N2, H1N1, B）の増強維持効果を解析した。ベースライン（0週）において、漢方薬投与の有無に関し、抗体価の均一性を確認した。抗体価増強維持効果については3種類の統計手法を適用し、それらの結果の一致性について検討した。第一の手法はCochran-Armitage trend testであり、時点（4, 8, 12, 24週）ごとに漢方薬投与による抗体価増強の傾向があるかを分析した。第二の手法は共分散分析（analysis of covariance）であり、初期値（0週）を共変量とし、フォローアップ時（4～24週）の平均値が漢方薬投与により増強したかを分析した。第三の手法は反復測定分散分析（repeated analysis of variance）であり、フォローアップ時（4～24週）における抗体価の推移から、漢方薬投与が抗体価増強をもたらしたかを分析した。3種類の抗体のうちH3N2のみにおいて、漢方薬による有意な抗体価増強維持効果が得られた。また、3種類の統計手法で一致した結論が得られた。H1N1及びB抗体では、漢方薬による増強維持効果は見られなかった。

A. 研究目的

インフルエンザに感染した高齢者を対象に実施された漢方薬投与の有無に関するランダム化比較試験データを用いて、漢方薬投与に伴うインフルエンザ抗体価増強・維持効果について評価する。抗体価は3種類（H3N2, H1N1, B）が測定され、測定時期は6時点（-4週、0週、4週、8週、12週、24週）であった。このような反復測定データを用いた統計解析手法にはいくつか考えられるが、それらの手法を適用した解析結果を評価し、得られた結果の一致性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

インフルエンザ高齢者100名は、漢方薬投与群に44例、対照群（漢方薬非投与群）に46例がランダム割り付けされた。同意撤回あるいは服薬拒否があったため、今回の解析対象症例は漢方薬投与群42例、対照群45例であった。

測定された3種類（H3N2, H1N1, B）の抗体価について有効性を検討した。測定時点は6時点（-4週、0週、4週、8週、12週、24週）であった。漢方薬投与前のベースライン値は0週時の抗体価データとした。また、フォローアップ値は4～24週の抗体価の平均値及び各時点での値と定義した。

抗体価が得られた数値は、<10（検出限界以下）、10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280

以上というように等比級数的になっていたため、統計解析の基本として、抗体価の数値そのものではなく順序データとして解析することとした。すなわち、<10 を 1, 10 を 2, 20 を 3, 40 を 4, 80 を 5, 160 を 6, 320 を 7, 640 を 8, 1280 以上を 9 と変換した。第一の手法は Cochran-Armitage trend test であり、フォローアップ時点ごとに (4, 8, 12, 24 週)、漢方薬投与群のほうが抗体価の高い傾向が見られるかを分析した。ここでは多重性の調整は行わなかった。第二の手法はフォローアップ時 (4, 8, 12, 24 週) の平均値に関し、ベースライン (0 週) 時を共変量とした共分散分析 (analysis of covariance) である。第 3 の手法は反復測定分散分析 (Repeated ANOVA) である。ここではフォローアップ時 (4~24 週) の抗体価推移が 2 群間で異なるかどうかの分析となり、こうした反復測定データにおいては標準的とされる手法である。これらの手法の適用は、統計ソフト JMP9.0™を用いて実行した。

(倫理面への配慮)
本研究はいずれも人及び動物等の倫理面を考慮すべき研究材料を使用しない。

C. 研究結果

投与前のベースライン (0 週) 時において、2 群の抗体価は表 1 に見られるように類似していた。

表 1. ベースライン時の群間比較

A) H3N2

	<10	10	20	40	80	160	
D	4	14	16	6	4	1	45
C	6	11	9	4	4	3	37

D: 漢方薬投与群、C: 対照群 P=0.64

B) H1N1

	<10	10	20	40	80	160	
D	13	12	5	11	4	0	45
C	12	10	9	2	3	1	37

D: 漢方薬投与群、C: 対照群 P=0.15

C) B

	<10	10	20	40	80	160	
D	10	23	4	7	0	1	45
C	12	17	5	6	2	0	42

D: 漢方薬投与群、C: 対照群 P=0.53

フォローアップの時点ごとに、漢方薬投与群での抗体価の増強維持に関する傾向を Cochran-Armitage trend test で調べた結果は表 2 の通りであった。抗体価 H3N2 においては、4 週~24 週にかけて、漢方薬投与に伴う抗体価の増強維持効果が見られた。多重性調整はしていないが、8 週時では 2 群間で有意差が見られた (P=0.023)。その他の時点では統計的有意差は見られないものの、漢方薬による抗体価増強維持効果は等しく認められた。付録 A-1, A-2 を見れば、視覚的にもそれは明らかである。一方、H1N1 及び B 抗体価については、2 群間で統計的に有意な違いは見られなかった。

表 2. フォローアップ時の群間比較
—傾向検定の P 値—

抗 体 価	4 週	8 週	12 週	24 週
H3N2	0.074	0.023*	0.085	0.090
H1N1	0.82	0.35	0.40	0.28
B	0.26	0.44	0.26	0.67

第二に、0 週時の抗体価を初期値とし、それを共変量とした共分散分析を実施した。フォローアップ 4~24 週時の平均値を目的変数と設定した。その結果を表 3 に示した。

表 3. 共分散分析の結果

抗体価	群間比較の P 値
H3N2	0.031*
H1N1	0.14
B	0.015*

抗体 H3N2 に関しては表 2 の結果と同様に、漢方薬投与に伴う抗体価増強維持効果が認められた (P=0.031)。スプライン曲線という技法を用いた結果を図 1 に示した。横軸をベースライン抗体価、縦軸をフォローアップ平均値とした。この図 1 から、ベースラインの H3N2 抗体価が<10, 10 という低値の人、及び H3N2 抗体価 80, 160 という高値の人で、漢方薬投与に伴う H3N2 抗体価の増強維持効果が顕著に見られることが分かった (Drug 群が Control 群より高くなっていた)。

一方、抗体 B については結果が異なっていた。Cochran-Armitage trend test では非有意であったが、共分散分析では有意な結果となっていた。この原因を追究するために、横軸をベースラインの B 抗体価、縦軸をフォローアップの B 抗体価の平均値 (箱ひげ図) を示したのが図 2 である。抗体 B のベースライン値 80 では Drug 群しかデータがなく、そこで大変高値を示していることから、この関係の傾き値を押し上げることに伴い、Drug 群が Control 群に対して有意な差に導いたと考えられた。すなわち、データの特異性によるバイアス (虚の結果) と思われる。

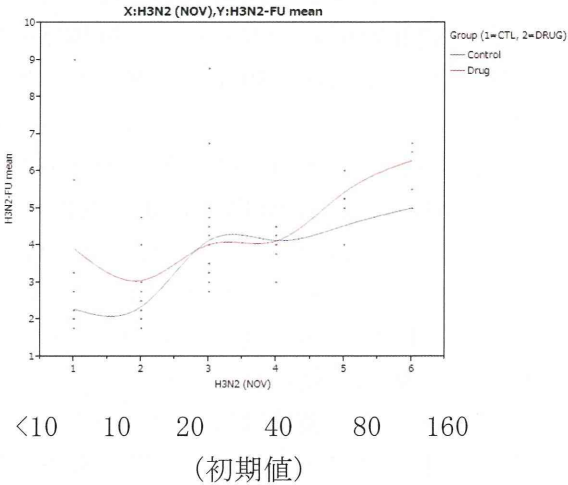


図 1. 抗体価 H3N2 に関する初期値とフォローアップ平均値の関係
(縦軸はフォローアップ 4~24 週の平均値;
1: <10, 2: 10, 3: 20, 4: 40, 5: 80, 6: 160,
7: 320 抗体価)

図 1. 抗体価 H3N2 に関する初期値とフォローアップ平均値の関係

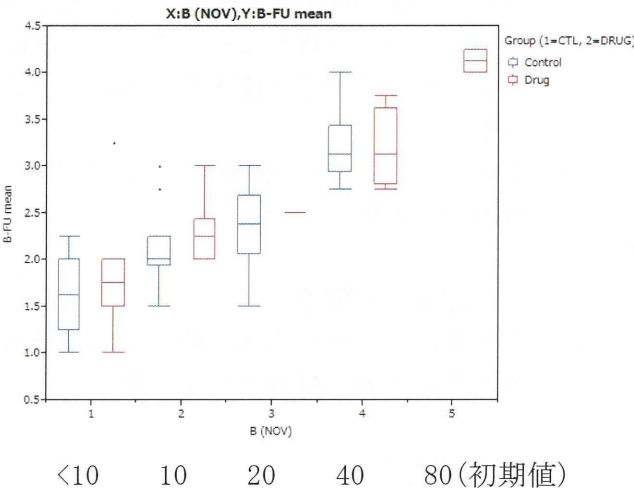
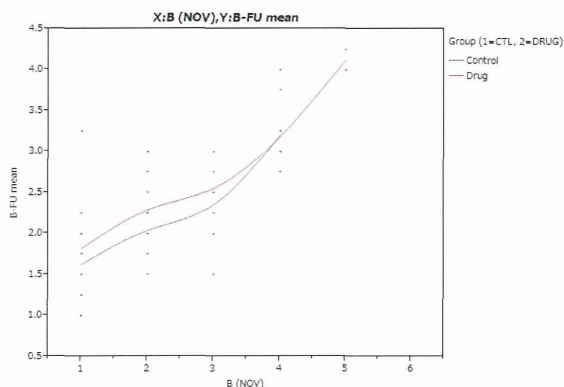


図 2. 抗体価 B に関する初期値とフォローアップ平均値の関係 (箱ひげ図)
(縦軸はフォローアップ 4~24 週の平均値; 1: <10, 2: 10, 3: 20, 4: 40 抗体価)

図 2. 抗体価 B に関する初期値とフォローアップ平均値の関係 (箱ひげ図)

図 3 はスプライン曲線で描いた結果だが、抗体 B のベースライン値 80 における Drug 群の上昇傾向に引っ張られ、有意性が強調されたためと思われる。



＜10 10 20 40 80（初期値）
（縦軸はフォローアップ 4～24 週の平均値；1:＜10，：2: 10，3: 20，4: 40 抗体価）
図 3. 抗体価 B に関する初期値とフォローアップ平均値の関係（スプライン）

第三に、反復測定分散分析を用いた結果を表 4 に示した。抗体 H3N2 のみ統計的に有意な結果が示された。これは表 2、表 3 の結果と一致していた。すなわち、漢方薬による抗体価増強維持効果は、H3N2 抗体のみにおいて示された。時点別 95%信頼区間の推移を付録 D に示したように、H3N2 抗体でのみ漢方薬の有意性が示された。

表 4. 反復測定分散分析の結果

抗体価	群間比較の P 値
H3N2	0.047*
H1N1	0.49
B	0.16

D. 考察

漢方薬投与により H3N2 抗体価の増強維持効果が示された。時点ごとの解析では 8 週時のみ統計的に有意 ($P=0.023$) であったが、その他の時点でもその傾向は同様であった。共分散分析及び反復測定分散分析では、H3N2 の抗体価増強維持効果は有意であった ($P=0.031$ ，及び $P=0.047$)。このよう

にして、3 種類の統計手法で一致した結果が示された。抗体 H1N1 についても一致した結果であり、2 群間に有意差を認めなかった。抗体 B については共分散分析のみで有意差を認めたが、これはベースライン値 80 というデータが Drug 群にしかないという特殊な状況のためのバイアスと思われた。むしろ、時点ごとの分析や反復測定分散分析で示された非有意の結果のほうが正しい結果と思われた。

E. 結論

年齢のインフルエンザ患者を対象とし、漢方薬投与の有無に関するランダム化比較試験において、H3N2 抗体価のみ、漢方薬による 24 週にかけての抗体価増強維持効果が示された。この結果は、比較検討した 3 種類の手法の間で一致していた。

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

- 1-1. 許鳳浩、上馬場和夫、小川弘子、御影雅幸、折笠秀樹：漢方薬の代謝への作用の個人差：防風通聖散の二重盲検ランダム比較試験. *東方医学*, 28(1): 37-59, 2012Jun.
- 1-2. Kamouchi M, Kumagai N, Okada Y, Origasa H, Yamaguchi T, Kitazono T, for the FSR Investigators. A risk score for predicting recurrence in patients with ischemic stroke: The Fukuoka stroke risk score for Japanese. *Cerebrovascular Diseases*, 34: 351-357, 2012Dec.
- 1-3. Yamamoto H, Origasa H, Hori M, on behalf of the J-DHF Investigators. Effects of carvedilol on heart failure with preserved ejection fraction - The Japanese Diastolic Heart Failure Study (J-DHF). *European Journal of Heart*

Failure, 15: 110-118, 2013Jan.

1-4. 折笠秀樹: サンプルサイズの決め方.

分子脳血管病, 12(1): 93-96, 2013Jan.

1-5. 折笠秀樹: アダプティブデザインとデータモニタリング委員会. 医学のあゆみ, 244(13): 1243-1246, 2013Mar.

2. 学会発表

1-1. 折笠秀樹: 生物学的同等性判定の統計学. 日本製剤学会第 27 年会・ラウンドテーブルセッション 3 (生物学的同等性試験の科学的評価)、招聘講演、神戸、May 25, 2012.

1-2. Origasa H, Hashimoto M, Miyajima M, Arai H: Quality of life assessment in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. ISOQOL (International SOciety for Quality Of Life research) 19th Annual Conference, Budapest, October 24-27, 2012.

1-3. 李淳馨、折笠秀樹、熊谷直子、城川美佳、中川肇、戸辺一之、布施秀樹: 2 型糖尿病治療薬ピオグリタゾンと膀胱がん発症との関係について—病院診療データベースを用いた実証研究—第 33 回日本臨床薬理学会、那覇、November 30-December 2, 2012. 2.

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

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

研究分担者 川名 敬 東京大学大学院医学系研究科・

生殖発達加齢医学専攻・産科婦人科学講座・生殖内分泌学分野 准教授

研究要旨

我々は、子宮頸癌前癌病変を有する症例に対し HPV16E7 発現乳酸菌ワクチン（GLBL101c）を経口投与し、腸管免疫を介して子宮頸部への抗 E7 粘膜免疫誘導する癌ワクチン開発をめざしている。本研究では、漢方アジュバント（補中益気湯）を GLBL101c に併用して経口投与することによって GLBL101c による細胞性免疫誘導能を増強させることを証明した。全身性免疫の増強効果は漢方アジュバントのみで確認されたが、粘膜免疫の増強効果は漢方アジュバントのみでは乏しく、漢方薬に粘膜アジュバントを併用することで良好な免疫誘導能の増強が示された。これまで報告されてきた漢方薬のアジュバント効果は、主として液性免疫（抗体産生）の増強効果であったが、本研究では、細胞性免疫（E7 特異的 IFN γ 産生細胞）の増強効果が示された。本研究の成果に加え、GLBL101c による子宮頸癌前癌病変に対する臨床的有効性が証明されていることから、アジュバントによる薬理効果を増強することで初期子宮頸癌に対する治療等の臨床応用が十分に期待される。漢方薬と粘膜アジュバントの経口投与を GLBL101c 経口投与に加えることによって、より効果的な子宮頸癌に対する癌ワクチン療法を構築することができると考えられた。

A. 研究目的

子宮頸癌は、本邦で年間 10000 万人が罹患し、年間 3500 人が死亡している。減少傾向にあった本邦の子宮頸癌の年齢調整死亡率はこの 20 年間は下げ止まっている。しかも 20～30 才代で罹患率・死亡率ともに増加している。子宮頸癌のほぼ 100%が発癌性ヒトパピローマウイルス（HPV）に因る。発癌性 HPV には 15 タイプあり、現行の HPV 予防ワクチンは、そのうち 2 タイプを予防するだけである。HPV 予防ワクチンでは子宮頸癌の 40%は予防できない。HPV ウイルス蛋白

質のうち E7 は、癌形質の維持に必須で、子宮頸癌細胞で恒常的に強発現している癌抗原である。そこで抗 E7 細胞性免疫を利用した免疫療法が期待される。これまで世界で 7 つの臨床試験が実施されたが実用化に至ったものはない。E7 の筋注・皮下注による全身性免疫誘導では子宮頸部粘膜の抗 E7 細胞性免疫が不十分であったと考えられる。一方、子宮頸癌に対する既存の治療法として挙げられる子宮摘出では、妊孕能は断たれ、また前癌病変（CIN3）に対する既存治療法である子宮頸部円錐切除術では、その

後の早産リスクが3倍近く高まり、術後の周産期予後が問題となる。しかも子宮頸部円錐切除術の対象となるCIN3の罹患年齢のピークは30才前半であり、妊娠・出産を控えている女性が大部分である。そのため、子宮頸部円錐切除術に代わる治療薬の開発は少子化を抱える本邦において急務である。本研究では、HPV分子を標的にした子宮頸癌と前駆病変(CIN)に対する新規の分子標的治療薬を開発することをめざしている。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。従来の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。モニターも粘膜リンパ球、特にCIN3が発生する子宮頸部粘膜のリンパ球(cervical lymphocytes)を用いた。これにより、粘膜病変であるCIN3に作動している粘膜リンパ球を直接測定できると考えられる。

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製剤化しやすいキャリアーであることに着目し、HPV E7癌蛋白質を発現している乳酸菌をワクチン抗原としたE7発現乳酸菌製剤(GLBL101c)をすでに開発しているが、本研究では、GLBL101cの有効性・安全性を第I/IIa相臨床試験によって評価するとともに、GLBL101cの薬理効果の増強を目的としたアジュバントを探索することを目的とした。我々の戦略は、粘膜免疫を誘導して治療効果を得る世界初の粘膜免疫を介した癌ワクチンであることから、そのアジュバント効果は、粘膜免疫機構に作用させる必要がある。また、癌ワクチンの刺激は腸管粘膜が誘導組織となることから、部位特異的なアジュバント効果を得るためには、アジュバントも経口投与が望ましい。そこで

漢方アジュバントに注目した。

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)は、全身性免疫に対するアジュバント効果が多く報告されているが、粘膜免疫に対する効果は不明である。さらに、多くの先行研究ではこれらの漢方薬のTh2誘導(抗体産生)のアジュバント効果が調べられ、細胞性免疫(CTL活性)に関する報告はほとんどない。本研究では、粘膜免疫におけるE7特異的細胞性免疫を検討し、GLBL101cのヒトへの投与に併用することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 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 γ 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。さらに、至適用量と考えられた 4cap/日について 7 例を追加し、全 10 例で有効性を検討した。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。

CIN1 への退縮は CR、CIN2 への退縮は PR、CIN3 の不変は SD、浸潤癌への増悪は PD とした。

(2) E7 発現乳酸菌ワクチンの有効性を高めるために、粘膜免疫誘導能の増強を図る目的でアジュバント併用による相乗効果をマウスモデルで検討した。臨床応用されているアジュバントとして、漢方薬と粘膜アジュバントの併用を考えた。

始めに、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ン

(LTB) は GLBL101c 投与の週に週 1 回投与した。さらに LTB が毒性の関係からヒトへの投与が難しいことを考慮して、GLBL101c に加え漢方薬（補中益気湯）と粘膜アジュバントである alpha-GalCer を併用した経口投与をマウス実験により行った。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。

(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「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」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、個人情報に厳格に管理・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 17 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 γ 産生細胞) の誘導は、明らかに PBMC 中よりも子宮頸部リンパ球中の方が優位であった。粘膜免疫誘導によって、粘膜リンパ球が多く存在する子宮頸部リンパ球で濃縮されていることを示している。

1~6 cap/日への dose-escalation の検討では、4cap/日投与例の 3 例が E7-CMI を最も高いレベルで誘導された。興味深いことに、用量を高めた 6cap/日投与例では、3 例中 2 例はむしろ E7-CMI の誘導が低かった。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。

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 (SD) し、円錐切除術を必要とした。E7-CMI が最も高いレベルであった 4cap/日投与例では、3 例全例が CIN1-2 (CR1 例、PR2 例) 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、介入せずに経過観察中であるが 2-2.5 年経過しても全症例とも CIN3 の再発を認めていない。

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 (PR) 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 (SD)、後療法を必要とした。

これらの結果を効果安全性評価委員会で検討し、至適用量を 4 cap/日と設定し、その用量で更に 7 例の症例を追加した。4 cap/日の全 10 例の有効性を検討したところ、10 例中 7 例がエンドポイントの投与開始後 9 週で、CIN1-2 (CR4 例、PR3 例) に退縮した。さらに 13 週目にさらに 1 例が CIN2 (PR) に退縮した。エンドポイント (9 週) における奏効率 (CR+PR) は 70% となり、投与後 6 か月時点での奏効率は 80% となった。

全 17 例における薬理効果として、子宮頸部リンパ球中の E7-CMI 誘導能を臨床効果別にまとめたところ (CR+PR vs. SD)、SD (n=8) では E7-CMI が中央値 16.1 cells/10⁵cells であったのに対し、CR+PR (n=9) では、33.6 cells/10⁵cells となり、有意に E7-CMI が高くなっていることがわかった (Mann-Whitney 検定, p=0.001)。子宮頸部リンパ球中の E7-CMI が臨床効果を反映するバイオマーカーになりうることが示された。

2) 漢方アジュバント併用の検討：

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。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すると考えられたが、LTB は毒性の問題からヒトへの

投与が難しい。

そこで、本年度は、LTB に代わって、ヒトでの使用経験のある alpha-GalCer を粘膜アジュバントとして用い、同様の検討を行った。

マウスに 1mg/head の GLBL101c を経口投与する際に、alpha-GalCer と HET を併用することにより、GLBL101c 単独と比べて約 2 倍の E7-CMI 上昇が観察された。(図 2)

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、癌ワクチン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 (E7-CMI) が高い症例では、CIN3 に対する治療効果が示された。この薬理効果と臨床効果の間に相関性あることが本年度初めて示され、CIN3 の病変退縮が GLBL101c によるものである可能性が高い。特に、4cap/日 (1g/日) の 10 例では、投与開始から 6 か月後に CR4 例、PR4 例となり、奏効率 (CR+PR) が 80% となった。海外で行われた非介入観察研究の報告では、CIN3→CIN2 への 6 か月観察後の自然退縮率は 15% と言われている。本臨床試験では、プラセボ群を設定していないが、GLBL101c による退縮率 80% は明らかに薬剤依存的であると考えられた。

癌ワクチン療法では、安全性が高いものの、免疫寛容が問題となる。特に、経口投与では oral tolerance が危惧される。本研究では検討していないが、本治療薬の長期投与、大量投与はかえって E7 に対する特異的免疫寛容を誘導する可能性もある。そこで、E7-CMI 誘導を増強する戦略として、アジュバントを導入することを検討した。漢方薬は実地臨床で日常的に使われている薬であり、かつ多くのアジュバント効果が報告されている。中でも補中益気湯 (HET) は、昨年度までの検討から最も有望であった。全

身性免疫の誘導には HET のみでも相乗効果が示されたが、粘膜免疫誘導には、HET だけでは効果は乏しく、粘膜アジュバントが必要であることがわかった。そこで、今回の検討では、合成セラミドである alpha-GalCer を LTB の代わりに用いた。Alpha-GalCer は、抗原提示分子である CD1d によって提示され、NKT 細胞の特異的リガンドである。この併用によって、NKT 細胞が活性化され、NK 細胞、Th1 細胞、CTL が IFN γ によって活性化される。NKT 細胞系による腸管粘膜免疫が賦活化され、E7 に対する獲得免疫誘導が増強したと考えられた。Alpha-GalCer は、樹状細胞療法の活性化剤としてヒトでの投与経験も報告されていることから、今後のアジュバントとして漢方薬とともに実用化が期待される。

E. 結論

HPVE7 発現型乳酸菌 GLBL101c の経口投与は、粘膜免疫を介した世界初の癌ワクチンである。ヒトの子宮頸部における E7 特異的細胞性免疫誘導を伴い、病理学的有効性が得られていることから、薬理効果に伴った臨床効果と考えられた。GLBL101c の 4 cap/日投与における奏効率 80%は、明らかな臨床効果を考えられた。

漢方や粘膜アジュバントの併用によって GLBL101c の投与量を減らすことができる可能性があり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) Nagasaka K, Seiki T, Yamashita A, Massimi P, Subbaiah VK, Thomas M, Kranjec C, Kawana K, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Kozuma S, Banks

L, A novel interaction between hScrib and PP1 γ downregulates ERK signaling and suppresses oncogene-induced cell transformation, *PLOS One*, in-press, 2013

- 2) Todokoro T, Furniss D, Oda K, Kawana K, Narushima M, Mihara M, Kikuchi K, Hara H, Yano T, Koshima I, Effective treatment of pelvic lymphocele by lymphaticovenular anastomosis, *Gynecol Oncol*, E-pub, 2013
- 3) Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsushashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H, Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study, *Int J Clin Oncol*, E-pub, 2013
- 4) Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S, The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN, *Am J Reprod Immunol*, 69: 134-141, 2013
- 5) Arimoto T, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Tsukazaki T, Adachi K, Matsumoto Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Retreatment with nedaplatin in patients with recurrent gynecological cancer after the development of hypersensitivity reaction to carboplatin. *J Obstet Gynaecol Res*. 39: 336-340, 2013