

201318076A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの
開発・実用化に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 全司

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告			
多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの開発・実用化に関する研究	岡田全司	-----	1
II. 分担研究報告			
1. 多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの開発・実用化に関する研究	中島俊洋	-----	43
2. HVJエンベロープの新ワクチン・デリバリーの開発	金田安史	-----	62
3. HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの臨床応用に向けて これまでの臨床試験の経験から臨床試験に向けて	井上義一	-----	65
4. 多剤耐性結核に対する新規治療用ワクチンの開発・実用化に関する研究	露口一成	-----	67
5. 近畿地区多剤耐性結核患者の臨床試験統括。 結核ワクチンの医師主導治験の実施に向けての体制の整備	朝野和典	-----	69
6. 関東地区多剤耐性結核患者の細胞性免疫・抗体の測定に関する研究	庄司俊輔	-----	71
7. 関東地区（国立病院機構茨城東病院）の患者の臨床試験統括	齋藤武文	-----	74
8. 多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの効率的な開発計画作成と臨床開発の方策に関する研究	三上礼子	-----	77
9. 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターの多剤耐性結核患者の動向と関西地区の多剤耐性結核患者アンケート調査、 ならびに近畿中央胸部疾患センターの現入院患者の実態	松本智成	-----	79
10. 多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの開発・実用化に関する研究	熊ノ郷淳	-----	82
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----	83
IV. 研究成果の刊行物・別刷		-----	86

平成25年度

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの開発・実用化に関する研究

研究代表者 岡田全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター・臨床研究センター長

研究要旨 (図1)

I. ワクチンのGMP製造

1. 治験薬製造用のpVAX/HSP65 DNA+ ヒトIL-12 DNAの大腸菌マスターセルバンク(MCB)をAMBiS社に委託して作製した(中島、岡田)。
2. 多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの開発を進めるには、ワクチン成分であるプラスミドDNA (pVAX-IgHSP65-hIL12 DNA) を治験薬GMPに準拠して製造する必要がある。プラスミドDNAは大腸菌を用いてGMP製造を実施するため、安全性の確保と品質の安定化に必要なバンクシステムを作製した。国立遺伝研より大腸菌のDH5 α 株を入手し、動物由来成分を含まない培地で培養した後に、エレクトロポレーション法によりプラスミドDNAを導入し、形質転換を行った。導入後に大腸菌のクローニングを行って、クローン由来の大腸菌から小スケールでプラスミドDNAの確認を行って、目的のDNAと制限酵素地図が一致することを確認した。確認後に、1種類の大腸菌クローンを選択してマスターセルバンクの作製を行った。マスターセルバンクの作製のため、選択した大腸菌のクローンを動物由来成分を含まない培地で拡大培養を実施し、計300本で構成されるバンクシステムを構築した(pVAX-IgHSP65-hIL12(DH5 α))。構築したバンクシステムについての品質試験の結果、全ての品質管理項目に適合であることを確認したため、製造を行ってプラスミドDNAの暫定規格設定に必要な品質確認データの取得を行った。プラスミドDNAの治験薬GMP製造と並行して、治験届までに必要な前臨床試験パッケージ案の作成を行った。既に国内における規制当局である医薬品医療機器総合機構(PMDA)との薬事戦略相談を通じて、品質規格や試験デザインの相談を進めており、両者で合意した内容に従って治験届に必要なデータパッケージを作成した。今後、作製したバンクシステムを用いて治験薬GMPレベルで製造したプラスミドDNAを用いて、安全性試験などの非臨床試験データ、治験薬の品質規格の設定を進め、医師主導治験を実施する予定である。
3. これを元に、GMPレベルのpVAX/HSP65 DNA+ ヒトIL-12 DNAを100mg作製した(1バッチ)(岡田、中島、井上)。
4. これをサルに用いて本ワクチンの安全性試験・毒性試験を行う計画を立案中(中島、岡田)。

II. 用法用量設定

1. pVAX/HSP65 DNA+ マウスIL-12 DNAを70mg作製した(岡田)。
2. マウスで本ワクチンの平成26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と実施中(岡田)。

3. 用量検討(DNAワクチン投与量検討) C57BL/6マウスやDBA/1マウスにワクチンを25 μ g~280 μ gで投与した。4~6w後の脾細胞を抗原Hsp65蛋白でin vitro刺激しIFN- γ 、IL-2、IL-6、TNF α (T細胞免疫能) 産生をELISAで解析中。DNA量が25 μ gでもIFN- γ 産生を増強しワクチン効果有効(岡田、井上、中島)。
4. 用法検討(DNAワクチン投与回数検討)。治療ワクチン1回投与、3回投与、6回投与群で治療効果比較。

III. GLP毒性試験・安全性試験

GLP毒性試験・安全性試験：サルを用いて試験項目、試験デザインを計画(中島、岡田、井上)。

IV. HVJ-エンベロープのアジュバント効果

HVJ-Eは不活性化したセンダイウイルス粒子であるが、遺伝子や核酸を封入し膜融合作用により細胞質内への直接導入が可能である。しかし生体組織ではHVJ由来の蛋白質に対する免疫反応が惹起され、抗体による中和反応がおこることが考えられるが、遺伝子を封入しないHVJ-EとルシフェラーゼDNA封入HVJ-Eを用いたマウスへの投与実験により、HVJ-Eを連続投与しても遺伝子発現の抑制は見られず、連続投与が可能であることが明らかになった(金田)。

V. PMDA対面助言

1. PMDA対面助言を計画中。①中島、井上、岡田が打ち合わせ(会議：当臨床研究センター) 2013年10月21日 ②三上、井上、岡田が打ち合わせ(会議：当臨床研究センター) 2013年10月22日
2. PMDA対面助言：①毒性・薬効薬理試験項目設定中(中島、三上、井上、岡田)。②非臨床試験、品質関連の今後の必要事項確認。③臨床治験(第I相、first in human治験)の計画について検討中。

VI. 多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けての計画

1. 多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けての計画を行った。①近畿中央：7年間55例MDR-TBのうち20例XDR-TB(露口、松本)。②東京病院：10年間に40名の多剤耐性結核(MDR-TB) MDR-TB、死亡者多い(庄司)。③茨城東病院：多剤耐性結核の誘因は不規則治療が原因。12年間に10例(齋藤)。
2. 医師主導治験に向けて大阪大学医学部治験管理センター組織化(大阪大を中心)(朝野、熊ノ郷、金田)
3. 2006年1月から2012年12月までの期間にNHO近畿中央胸部疾患センターで入院加療を行った多剤耐性結核の治療成績について臨床的検討を行った。治療成功率は70.9%で感受性結核に比べて不良であり、超多剤耐性結核では45%とさらに不良であった。手術を行えた症例では比較的予後は良好であった。多剤耐性結核の治療成績は満足のできるものとはいえず、新薬を含め新たな治療法の開発が必要である。(露口)。
4. 2011年9月14日には世界保健機関(WHO)が、従来の薬が効かないMDR-TBや超多剤耐性結核(XDR-TB) XDR-TBの感染が欧州・中央アジア地域で急速に拡大しており、保健当局が阻止できなければ多くの死者が出ると警告した。このため新薬開発ならびに結核ワクチンの開発は重要である。特にワクチンの場合は耐性誘導の問題がなくMDR-/XDR-TB対策には重要である。岡田等はDNAワクチンを開発しin vitroならびに霊長類に対するin vivoの研究で期待のできる結果を報告している。ヒト投与への前段階として関西圏における多剤耐性結核患者の患者数調査の準備を行った(松本)。
5. 平成25年11月18日 厚労科研「多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの開発・実用化に関する研究」(岡田班)の班会議開催。

・研究代表者

- (1) 臨床試験では、HSP65遺伝子及びIL-12遺伝子をヒトに投与することにより、その発現の持続性、生体

への影響等に関して： 下記の作製した(3)(4)のpVAX/HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチンを用いて、実験動物（マウス、サル等）で発現の持続性、生体への影響を含む安全性試験・毒性試験を行う計画を立案した。

DNAワクチンについては米国で社会的・行政的コンセンサスが得られており、本邦でも、後記の金田安史が関与する遺伝子治療学会等により、遺伝子治療製品が再生医療製品などに含まれることとなった。さらに遺伝子治療の治験の確認申請が不必要となり、社会的・行政的コンセンサスが得られていると考えて良い。

- (2) 治験薬製造用のpVAX/HSP65 DNA+ ヒトIL-12 DNAの大腸菌マスターセルバンク（MCB）を分担研究者中島俊洋と共にAMBiS社に委託して作製した。
- (3) これを元に、GMPレベルのpVAX/HSP65 DNA+ ヒトIL-12 DNAを100mg作製した(1バッチ)。これをサルに用いてこのワクチンの安全性試験・毒性試験を行う計画を立案中（岡田、中島、井上）。
- (4) pVAX/HSP65 DNA+ マウスIL-12 DNAを70mg作製した（岡田、井上）。
- (5) マウスでこのワクチンの平成26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と共同研究で実施中。
- (6) 用量検討(DNAワクチン投与量検討) C57BL/6マウスやDBA/1マウスにワクチンを25 μ g~280 μ gで投与した。4~6w後の脾細胞を抗原Hsp65蛋白でin vitro刺激しIFN- γ 、IL-2、IL-6、TNF α （T細胞免疫能）産生をELISAで解析中。DNA量が25 μ gでもIFN- γ 産生を増強しワクチン効果有効。
- (7) 用法検討（DNAワクチン投与回数検討）。治療ワクチン1回投与、3回投与、6回投与群で治療効果比較。
- (8) PMDA対面助言を計画。①中島、井上、岡田が打ち合わせ（会議：当臨床研究センター）2013年10月21日 ②三上、井上、岡田が打ち合わせ（会議：当臨床研究センター）2013年10月22日

・研究分担者（中島俊洋）

- (1) GMPレベルで治験薬製造用のpVAX/HSP65 DNA+ ヒトIL-12 DNAの大腸菌マスターセルバンク（MCB）をAMBiS社に委託して作製した。
- (2) 多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの開発を進めるには、ワクチン成分であるプラスミドDNA（pVAX-IgHSP65-hIL12 DNA）を治験薬GMPに準拠して製造する必要がある。プラスミドDNAは大腸菌を用いてGMP製造を実施するため、安全性の確保と品質の安定化に必要なバンクシステムを作製した。国立遺伝研より大腸菌のDH5 α 株を入手し、動物由来成分を含まない培地で培養した後に、エレクトロポレーション法によりプラスミドDNAを導入し、形質転換を行った。導入後に大腸菌のクローニングを行って、クローン由来の大腸菌から小スケールでプラスミドDNAの確認を行って、目的のDNAと制限酵素地図が一致することを確認した。確認後に、1種類の大腸菌クローンを選択してマスターセルバンクの作製を行った。マスターセルバンクの作製のため、選択した大腸菌のクローンを動物由来成分を含まない培地で拡大培養を実施し、計300本で構成されるバンクシステムを構築した（pVAX-IgHSP65-hIL12(DH5 α))。構築したバンクシステムについての品質試験の結果、全ての品質管理項目に適合であることを確認したため、製造を行ってプラスミドDNAの暫定規格設定に必要な品質確認データの取得を行った。プラスミドDNAの治験薬GMP製造と並行して、治験届までに必要な前臨床試験パッケージ案の作成を行った。既に国内における規制当局である医薬品医療機器総合機構（PMDA）との薬事戦略相談を通じて、品質規格や試験デザインの相談を進めており、両者で合意した内容に従って治験届に必要なデータパッケージを作成した。今後、作製したバンクシステムを用いて治験薬GMPレベルで製造したプラスミドDNAを用いて、安全性試験などの非臨床試験データ、治験薬の品質規格の設定を進め、医師主導治験を実施する予定である。
- (3) これにより作製されたpVAX/HSP65 DNA+ ヒトIL-12 DNAの品質規格を評価した。ICQ/Q5Dガイドラインに従いMCBを調製、ICHのQ5B・Q5Dガイドライン準拠の特性解析、品質試験で適格性実証。
- (4) GLP毒性試験：サルを用いて試験項目、試験デザインを計画。
- (5) PMDA対面助言：毒性・薬効薬理試験項目設定中である。

・研究分担者（金田安史）

- (1) 抗体存在下でのHVJ遺伝子発現の阻害をルシフェラーゼ遺伝子発現により検証した。その結果、抗HVJ抗体が存在する個体においての遺伝子発現は全く阻害されなかった。
HVJ-Eによる細胞への遺伝子導入はHVJエンベロープと細胞膜の融合に依存している。融合反応が抗体の吸着よりも非常に迅速に起こることが原因ではないかと推測。したがって中和抗体存在下であっても標的組織への直接投与法を行う限りは、遺伝子導入は阻害されない。すなわち、HVJ-Eによる遺伝子発現は中和抗体により影響されないので連続投与が可能である。
- (2) 医師主導治験に向けての組織化（大阪大学を中心とした）（朝野、熊ノ郷、金田）。

・研究分担者（井上義一）

- (1) マウスで本ワクチンの用法・用量試験の予備試験プロトコルを調整し、実験開始（井上、岡田、中島）。
- (2) 東海大学（三上）、中島と岡田でPMDAへの対面助言の手順等考案。これまでの臨床試験の経験を活用。

・研究分担者（露口一成）

- (1) NHO近畿中央と近畿地区の多剤耐性結核の調査・検討開始。近畿中央MDR-TB 3名中2名XDR-TB。
- (2) 2006年1月から2012年12月までの期間にNHO近畿中央胸部疾患センターで入院加療を行った多剤耐性結核の治療成績について臨床的検討を行った。治療成功率は70.9%で感受性結核に比べて不良であり、超多剤耐性結核では45%とさらに不良であった。手術を行えた症例では比較的予後は良好であった。多剤耐性結核の治療成績は満足のできるものとはいえ、新薬を含め新たな治療法の開発が必要である（露口）。
- (3) 多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けての計画（露口、井上、庄司、齋藤、松本、熊ノ郷）。
- (4) マウスで本ワクチンの平成26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験。

・研究分担者（朝野和典）

- (1) 大阪大学医学部を中心として統括する、本ワクチンの臨床治験（医師主導第I相治験）に向けて大阪大学医学部治験管理センター及び大阪大学未来医療センター治験管理センターで調整中。
- (2) 医師主導治験に向けての組織化（大阪大学を中心とした）（朝野、熊ノ郷、金田）。
- (3) 平成25年度は、健常人を対象とした臨床試験およびマラリアワクチンのフェーズI医師主導治験の実施を通して、早期探索的臨床研究の体制整備を行い、結核ワクチンの医師主導治験の実施に向けての研究体制の整備を行った。

・研究分担者（庄司俊輔）

- (1) 分担班を東京病院小林信之統括診療部長、永井英明部長、山根章、鈴木純子医長とすでに組織化した。
- (2) 東京病院・関東地区の結核診療施設における多剤耐性結核患者の調査・医師主導治験に向けて検討開始。
- (3) 初年度の平成25年度の研究では、国立病院機構東京病院に受診し、多剤耐性結核と診断された患者の、患者数、それぞれの患者の年齢、性別その他のプロフィール、行った（現在行われているものも含む）治療の内容などを調査した。2004年から2013年（10月末現在）までに、国立病院機構東京病院に入院し、多剤耐性結核と診断され治療を受けた患者の総数は40名であった。
- (4) 2004年から2013年、NHO東京病院の多剤耐性結核患者は40名。男性33名、女性7名。治療完了9名、治療中断脱落1名、死亡7名、転出（帰国含む）10名、治療継続8名（3名は後に死亡）、現在入院中1名、不明4名。これにより、実際にワクチンを投与する際の患者のエントリー状況が推定できる。

・研究分担者（齋藤武文）

- (1) 茨城東病院・関東地区の結核診療施設における多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けた検討。
- (2) 関東地区（NHO茨城東病院、複十字病院）の多剤耐性結核症例状況を後ろ向きにカルテ調査した。
- (3) 関東地区の2病院の多剤耐性結核の現状をまとめた。多くは男性、東京では外国人、特に中国、韓国人が多く、若い年齢層に多い。郡部では薬剤感受性結核と同様な人種、性、年齢構成。少なくとも日本人においては最近の感染、発症であり、多くは不規則治療によると考えられた。
- (4) 2002年1月より2013年10月において、上記の病院において231例の多剤耐性結核症例が診療された。治癒した例は約半数であり、多剤耐性結核の治療は難渋していた。

多剤耐性結核の治療上、新たな抗結核薬の開発だけではなく、本研究が取り組む多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの実用化が強く待たれるところである。

・研究分担者（三上礼子）

- (1) 岡田、井上とPMDAへの対面助言の手順等考案。
- (2) 本研究課題申請前に行われたPMDAとの薬事戦略相談により、開発の方向性が明らかになった。
- (3) 第I相臨床試験の計画を検討中である。実施の薬事規制上の問題と円滑な開発の方策について検討。

・研究分担者（松本智成）

- (1) 結核予防会大阪病院・大阪府立呼吸器アレルギー医療センター・近畿地区の多剤耐性結核の調査・検討開始。
- (2) 多剤耐性結核患者の調査と医師主導試験に向けての計画（露口、庄司、齋藤、松本、熊ノ郷）。
- (3) 近畿地区における多剤耐性結核患者の動向、人数調査。

・研究分担者（熊ノ郷淳）

- (1) マウスで本ワクチンの用法・用量予備試験実施。
- (2) 近畿地区の結核診療施設を統括する立場上、これらの診療施設（近畿中央病院、刀根山病院、大阪府立呼吸器アレルギー医療センター等）での多剤耐性結核患者の調査・検討開始。
- (3) 医師主導試験に向けての組織化（大阪大学を中心とした）（朝野、熊ノ郷、金田）。
- (4) 新規ワクチン（HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA）の第I相を実施し、本ワクチンの薬事法に基づく承認取得を目指しているが、本分担研究では、近畿地区の結核診療施設の結核患者の臨床試験統括。結核ワクチンの薬効解析基盤の確立を行った。

研究分担者（表1）

中島俊洋

ジェノメディア株式会社

代表取締役CEO

金田安史

大阪大学大学院

医学系研究科分子治療学

教授(研究科長・医学部長)

井上義一

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

臨床研究センター

呼吸不全・難治性肺疾患研究部長

露口一成

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

臨床研究センター

感染症研究部長

朝野和典

大阪大学医学部附属病院

感染制御部

感染症学

教授

庄司俊輔

国立病院機構東京病院

副院長

齋藤武文

国立病院機構茨城東病院

院長

三上礼子

東海大学医学部

基盤診療学系

臨床薬理学

講師

松本智成
結核予防会大阪病院
臨床研究部
診断検査部長

熊ノ郷淳
大阪大学大学院
医学系研究科・呼吸器免疫アレルギー内科
教授

A. 研究目的 (図1) (表2、3、4、5)

- (1) 研究代表者は、本ワクチン (HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA) の有効性を、世界に先駆けてヒト結核感染に最も近いカニクイザルで明らかにした。残された課題は臨床で安全性と多剤耐性結核に対する治療効果を明らかにする事である。そのため、国立病院機構 (NHO) で多剤耐性結核に対する医師主導治験 (第I相) を実施し、本ワクチンの薬事法に基づく承認取得を目指す。
- (2) この新しい結核ワクチンの効果と毒性・安全性の前臨床試験 (マウス・サルですでに結核治療効果)
- (3) 世界に先駆け、DNAワクチンガイドラインを策定する。
- (4) first in humanの臨床治験を計画実施する。
- (5) 患者基礎データとして、NHOで加療を行った多剤耐性結核患者のプロフィールや治療内容を把握。研究の意義として：

- (1) 結核は世界の三大感染症で、アジアで拡大する多剤耐性結核は、有効な治療法がなく、本人は元より他への感染、莫大な医療費など社会への影響大。世界で毎年約50万人発症。HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン治療が実用化されるとそのインパクトは非常に大きい。BCGに代わる新ワクチンの臨床開発は欧米でも成功していない。BCGは、多剤耐性結核予防・治療には無効であり、新規多剤耐性結核治療ワクチン開発が切望されている。
- (2) ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルで本ワクチンは有効性が示されており、今後first in humanの臨床治験に進む必要がある。
- (3) 国内患者数が約200人/年と少なく、企業治験が進まないため、公費の医師主導治験で開発する必要性
- (4) 国内ではワクチンの新規技術であるDNAワクチン開発が遅れている。2013年米国で開発されたDNAワクチンの国内治験が開始されたが後期治験からで、国内開発に必要なガイドライン策定には純国産品でのfirst in human治験実施の必要性

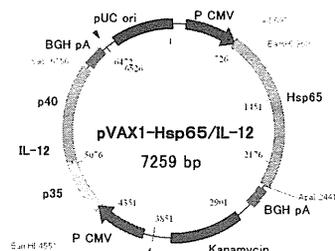
[具体的な研究目的]

1. 平成25年度の研究では、純国産の治療用DNAワクチンを用いて国内で医師主導治験を実施するために必要な治験薬GMP製造、非臨床試験データ (毒性試験、薬効薬理試験) を取得することを目的として研究開発を行った。
また、国内で製造を実施する新規の治療用DNAワクチンにより治験を実施するのは初めてのケースになるため、国内における規制当局である医薬品医療機器総合機構 (PMDA) と、薬事戦略相談を実施し、国内のガイドラインの制定に繋げる事も目的として研究開発を行った。
これらの研究成果により、国内と海外とのドラッグ・ラグの原因の一つである、欧米先行の新規ワクチンの開発の国内回帰へも目的として研究を実施した。
2. 抗体存在下でもHVJ-Eによる遺伝子導入が機能するかどうかを培養細胞とマウス骨格筋への遺伝子導入により検証することを目指した (金田)。
3. MDR-/XDR-TBに対するDNAワクチン投与前の調査として関西における多剤耐性結核の概数を調査する。
4. イソニアジドとリファンピシンの両剤に耐性である多剤耐性結核の予後は感受性結核に比べて不良であるとされている。NHO近畿中央胸部疾患センターで治療を行った多剤耐性結核症例について治療成績を臨床的に検討することを目的とする (露口)。
5. 関東地区 (NHO茨城東病院、複十字病院) の多剤耐性結核症例状況を明らかにすること (齋藤)。
6. 医師主導治験の実施に向けての体制整備とそのノウ・ハウを蓄積し、結核ワクチン医師主導治験の実施に向けた、体制整備を行う (朝野)。
7. 岡田が作製したヒト多剤耐性結核用新規ワクチンの臨床応用が、本研究班の主眼である。分担研究者および分担研究施設である東京病院での主たる研究目的は、医師主導治験 (第I相) の実施であるが、初年度の平成25年度においては、これまでおよび現在の東京病院での多剤耐性結核患者の状況を調査することであった。

多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの開発・実用化に関する研究

目的

1. 新しい結核ワクチンの効果と毒性・安全性の前臨床試験。
HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン。
(マウス・サルですでに結核治療効果)
2. 多剤耐性結核に対する結核治療ワクチンの臨床応用・実用化。
①結核は世界の三大感染症の一つ ②多剤耐性結核菌 (莫大な医療費、治療困難)の増加
③超薬剤耐性結核(XDR-TB)の出現
3. 多剤耐性結核患者に対する第 I 相臨床試験。



方法

多剤耐性結核に対する結核治療ワクチン実用化

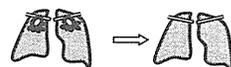
1. 結核治療ワクチン前臨床試験及び第 I 相臨床試験の組織

- (1) 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター(岡田、井上、露口)、東京病院(庄司)、茨城東病院(齋藤)
- (2) 大阪大学(金田、朝野、熊ノ郷)
- (3) PMDA との薬事戦略相談 (ジェノメディア株式会社 中島、東海大学 三上) 前臨床試験 ①すでに、2013年5月31日 医薬品医療機器総合機構(PMDA)薬事戦略相談・個別面談実施。添付資料は事前面談・対面助言のレベルの資料内容と評価され、すぐ事前面談となった。 ② 2013年6月20日 PMDA 薬事戦略相談・事前面談実施
- (6) 多剤耐性結核大阪(近畿)が最多。結核予防会大阪病院(松本)より患者紹介
- (7) 国立病院機構呼吸器ネットワーク 65 施設 グループリーダー(岡田)。日本の 50%の多剤耐性結核患者

2. 前臨床試験(薬効・毒性・安全性)(中島、金田、熊ノ郷、朝野、岡田、井上)
3. 国立病院機構病院と大阪大学を中心に、多剤耐性結核患者に対する第 I 相臨床試験
4. 評価: ①安全性。認容性。 ②多剤耐性結核菌の排菌数減少。免疫反応。

期待される効果

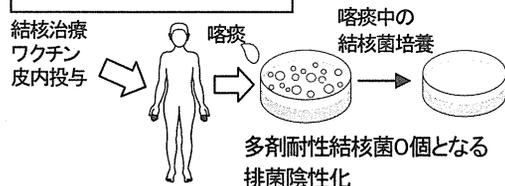
ヒト臨床応用



新しい結核治療ワクチン

- ①世界で毎年50万人、本邦で毎年約200人の多剤耐性結核患者を治療・救命
- ②毎年130万人の結核死亡者を治療・救命可能
- ③医療費節減。国際貢献。
- ④国民の医療・福祉の向上、厚生行政に寄与。

第 I 相臨床試験評価



研究成果

I. ワクチンGMP製造製

1. 治験薬製造用の pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA の大腸菌マスターセルバンク(MCB)を AMBIS 社に委託して作製した(中島、岡田)。
2. これを元に、GMP レベルの pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA を 100 mg作製した(1 バッチ)(岡田、中島、井上)。
3. これをサルに用いて本ワクチンの安全性試験・毒性試験を行う計画を立案中(中島、岡田)。
4. pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNA を 70 mg作製した。(岡田)
5. マウスで本ワクチンの平成 26 年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と実施中(岡田)。

II. 用法用量設定試

1. 用量検討(DNA ワクチン投与量検討) C57BL/6 マウスや DBA/1 マウスにワクチンを 25 μ g ~ 280 μ g で投与した。4~6w 後の脾細胞を抗原 Hsp65 蛋白で in vitro 刺激し IFN- γ 、IL-2、IL-6、TNF α (T 細胞免疫能)産生を ELISA で解析中。DNA 量が 25 μ g でも IFN- γ 産生を増強しワクチン効果有効(岡田、井上、中島)。
2. 用法検討(DNA ワクチン投回数検討)。治療ワクチン 1 回投与、3 回投与、6 回投与群で治療効果比較。

III. GLP 毒性試験・安全性試験

1. GLP 毒性試験・安全性試験: サルを用いて試験項目、試験デザインを計画(中島、岡田、井上)。

IV. PMDA 対面助言

1. PMDA 対面助言を計画中。①中島、井上、岡田が打ち合わせ(会議: 当臨床研究センター)2013年10月21日 ②三上、井上、岡田が打ち合わせ(会議: 当臨床研究センター)2013年10月22日
2. PMDA 対面助言: ①毒性・薬効薬理試験項目設定中(中島、三上、井上、岡田)。②非臨床試験、品質関連の今後の必要事項確認。③臨床試験(第 I 相、first in human 試験)の計画について検討中。

V. 多剤耐性結核患者の調査と医師主導試験に向けての計画

1. 多剤耐性結核患者の調査と医師主導試験に向けての計画を行った。①近畿中央: 3 名 MDR-TB のうち 2 名 XDR-TB (露口、松本)。②東京病院: 10 年間に 40 名 MDR-TB、死亡者多い(庄司)。③茨城東病院: 不規則治療原因(齋藤)。
2. 医師主導試験に向けて大阪大学医学部試験管理センター組織化(大阪大を中心)(朝野、熊ノ郷、金田)
3. 平成 25 年 11 月 18 日 厚労科研「多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの開発・実用化に関する研究」(岡田班)の班会議開催。

表1

厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症
研究事業(平成25年度新規申請課題)

**多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの
開発・実用化に関する研究**

研究代表者	
岡田 全司 (独)国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 研究の統括 臨床研究センター長	
研究分担者・研究項目	
中島俊洋 (ジェノメディア株式会社)	結核治療ワクチン(GMPレベル)の非臨床試験(GLP) (安全性、毒性、薬物動態試験)の実施。
金田安史 (大阪大学大学院)	HVJ-エンベロープの新ワクチン・非臨床試験の計画。
井上義一 (国立病院機構近畿中央)	全国・近畿地区多剤耐性結核患者の医師主導治験 統括。 結核ワクチンの薬効解析。
露口一成 (国立病院機構近畿中央)	近畿中央胸部疾患セの医師主導治験統括。結核治療効果。
朝野和典 (大阪大学医学部附属病院)	近畿地区多剤耐性結核の医師主導治験統括。細胞性免疫。
庄司俊輔 (国立病院機構東京病院)	関東地区多剤耐性結核患者の医師主導治験統括。
齋藤武文 (国立病院機構茨城東病院)	茨城東病院の多剤耐性結核患者の医師主導治験統括。
三上礼子 (東海大学)	PMDAとの交渉。製薬会社との交渉。プロトコール修正。
松本智成 (結核予防会大阪病院)	大阪府立病院、結核予防会大阪病院より患者の協力。
熊ノ郷 淳 (大阪大学大学院)	近畿地区の結核診療施設の結核患者の医師主導治験統括。

表2

研究目的

1. 新しい結核ワクチンの効果と毒性・安全性の前臨床試験。
HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン
(マウス・サルですでに結核治療効果)
HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan
プラスミドDNAは外国からの輸入ではなく国内のAMBIS社で治験薬GMP製造を計画
2. 多剤耐性結核に対する結核治療ワクチンの臨床応用・実用化
 - ①結核は世界の最大感染症の一つ
 - ②多剤耐性結核菌 (莫大な医療費、治療困難)の増加
 - ③超薬剤耐性結核(XDR-TB)の出現
3. 多剤耐性結核患者に対する第1相医師主導治験
4. 岡田は、新規ワクチンの有効性を、世界に先駆けてヒト結核に最も近いカニクイザルで明らかにした。

表3

**WHO 報告 2013
Global Tuberculosis (TB) Control**

1. 結核は世界の三大感染症の一つ。
2. 世界の20億人以上(32%)は、結核に感染している。
3. 860万人/年が新たに結核発症した。(2012)
4. 世界中で約130万人/年が結核によって死亡している。(2012)
5. 結核根絶は、貧困、人口過剰、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症合併などの理由で、非常に困難である。
6. 多剤耐性結核(MDR-TB)は約45万人/年(2012)が発症。17万人が死亡。

表4

1. 多剤耐性結核治療における新しい化学療法剤に対しては、薬剤耐性結核菌が出現。
2. 結核治療ワクチンに対する耐性菌は出現しないことが予想される。

表5

BCG Vaccine

- (1) BCG ワクチンは、結核予防に対して乳幼児に有効である。
- (2) BCGワクチンは、成人結核予防に対して有効ではない。(WHOの報告)
- (3) したがって、成人にも有効な新しい結核ワクチンの開発が必須である。
- (4) BCGワクチンは多剤耐性結核治療に有効でない。

表6

研究方法

多剤耐性結核に対する結核治療ワクチン実用化

1. 結核治療ワクチン前臨床試験及び第1相医師主導治験の組織
 - (1) 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター(岡田、井上、露口)、東京病院(庄司) 茨城東病院(齋藤)
 - (2) 大阪大学(金田、朝野、熊ノ郷)
 - (3) PMDAとの薬事戦略相談 (ジェノミディア株式会社 中島、東海大学 三上)

前臨床試験

① すでに、2013年5月31日 PMDA薬事戦略相談・個別面談実施。
添付資料は事前面談・対面助言のレベルの資料内容と評価、すぐ事前面談。

② 2013年6月20日 PMDA薬事戦略相談・事前面談実施

 - (4) 多剤耐性結核 近畿が最多：大阪府立病院・結核予防会大阪病院(松本)より紹介
国立病院機構 呼吸器ネットワーク65施設リーダー(岡田)。日本の50%の多剤耐性結核患者
2. 前臨床試験(薬効・毒性・安全性)(中島、金田、熊ノ郷、朝野、岡田、井上)
3. 国立病院機構病院を中心に、多剤耐性結核患者に対する第1相医師主導治験：
(近畿中央：井上、露口、東京病院：庄司、茨城東：齋藤、大阪大学：朝野、熊ノ郷)
4. 評価：
 - (1) 安全性(主要)：CTCAEを指標とする安全性の評価
 - (2) 有効性(副次)：①多剤耐性結核菌 排菌陰性化。②多剤耐性結核菌の排菌数減少。

B. 研究方法 (図1) (表6)

1. 結核治療ワクチン前臨床試験及び第I相医師主導治験の組織

- (1) 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター (岡田、井上、露口)、東京病院 (庄司)、茨城東病院 (齋藤)
- (2) 大阪大学 (金田、朝野、熊ノ郷)
- (3) PMDAとの薬事戦略相談 (ジェノミディア株式会社 中島、東海大学 三上) 前臨床試験
 - ① すでに、2013年5月31日 PMDA薬事戦略相談・個別面談実施。
添付資料は事前面談・対面助言のレベルの資料内容と評価、すぐ事前面談。
 - ② 2013年6月20日 PMDA薬事戦略相談・事前面談実施
- (4) 多剤耐性結核 近畿が最多 : 大阪府立病院・結核予防会大阪病院 (松本) より紹介。国立病院機構 呼吸器ネットワーク65施設リーダー(岡田)。日本の50%の多剤耐性結核患者

2. 研究方法 (中島)

(1) 治験薬製造用バンクシステムの構築

国立遺伝研究所から入手した大腸菌 DH5 α 株を用いて形質転換を行ってマスターセルバンク作製に必要な種細胞の調製を行った。動物由来原料の使用を最低限とするため、植物由来成分の培養液を用いて培養を行って形質転換用の大腸菌を培養し、遺伝子導入用の大腸菌のストック細胞を調製した。

大腸菌の形質転換を行うための遺伝子導入は、プラスミドDNAによる形質転換で通常使用されている薬剤添加による化学的な方法ではなく、エレクトロポレーション法による物理的な方法で実施した。その結果、目的のプラスミドDNAである pVAX1-IgHSP65-hIL12で形質転換された大腸菌のクローンを得た。

得られた大腸菌のクローンを小スケールで培養し、目的のプラスミドDNAである pVAX1-IgHSP65-hIL12の導入を確認した。培養した大腸菌より抽出したプラスミ

ドDNAを用いて制限酵素地図を作成し、理論サイズとの一致を確認した後に、マスターセルバンク作製用の大腸菌クローンを選択した。

バンクシステム作製用に選択した大腸菌クローン使用し、生物由来原料を含まない培養液で拡大培養を行った後に、グリセロールを最終濃度15%になるよう添加し、バンク作製のチューブに分注した。

分注後にマイナス80度で凍結して計300本のマスターセルバンク (pVAX1-IgHSP65-hIL12/DH5 α) の作製を完了した。

(2) 構築したバンクシステムの特性確認

作製したマスターセルバンクについては、品質試験を実施してセルバンクとして適切な品質であることを確認した。

ICHのガイドラインであるQ5D「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」(医薬審 第873号、平成12年7月14日付) に記載された内容に従って試験項目の選択を行った。

本研究で作製したマスターセルバンクは、大腸菌のバンクであるため、ICHのガイドラインであるQ5Dの微生物細胞に関する記載内容に従って、試験項目を設定した。

具体的には、宿主の同定試験、混入否定試験、プラスミド確認、生存率試験について実施し、試験としては7項目 (薬剤感受性試験、栄養要求性試験、グラム染色試験、コロニー形態試験、ファージ否定試験、制限酵素地図試験、生菌数試験) の試験を実施して、作製したセルバンクシステムの特性解析及び品質評価を行った。

(3) 構築したバンクシステムによるプラスミドDNAの製造

作製したマスターセルバンク (MCB) を用いてGMP製造を実施し、ワクチン成分となる目的のプラスミドDNA (pVAX1-IgHSP65-hIL12) を製造出来る事を確認した。

MCBを用いて種菌培養を行った後に本培

養を実施した。培養については全て生物由来原料を含まない原材料を用いて実施した。適切な細胞濃度まで培養を継続した後に、菌体を濃縮、破碎し、残渣を除去して清浄化した溶液を出発材料として精製工程を進めた。

3段階のカラムクロマトグラフィーによる精製工程と限外ろ過工程を組み合わせた精製工程により、宿主由来のRNA、DNA、たん白質、エンドトキシンなどの不純物を除去し、保護安定剤を添加した最終バッファーに溶媒を置換して原薬とした。その後、濃度調整と滅菌ろ過を行ったプラスミドDNA溶液をバイアルに分注・打栓して製剤とした。

(4) 製造したプラスミドDNAの品質確認試験

本研究で使用するDNAワクチンの成分は、プラスミドDNAと不活性化ウイルス粒子(HVJ-E)であり、それぞれ大腸菌とヒト培養細胞株を用いて製造される。そのため、バイオテクノロジー応用医薬品の範疇に分類されると考えられたため、バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品に関するガイドラインに従って品質規格項目案の設定を行った。

ICHのガイドラインQ6B「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について」(医薬審発第571号、平成13年5月1日付)の「4. 規格及び試験方法」の内容に従って、試験項目を選定した。具体的には、ICH Q6Bの「4.2 製剤の規格及び試験方法」に記載された「4.2.1 外観・性状」、「4.2.2 確認試験」、「4.2.3 純度と不純物」、「4.2.4 力価」、「4.2.5 物質質量」、「4.2.6 その他の一般的試験項目」に従って試験項目を選択し、試験項目を設定した。

それぞれの項目についての試験内容・手法については、16項目(性状試験、塩基配列、制限酵素地図試験、DNA濃度、純度試験、吸光度比(A260/A280)、宿主DNA、宿主RNA、宿主たん白質試験、たん白質含

量試験、不溶性微粒子試験、不溶性微異物試験、pH試験、浸透圧試験、無菌試験、エンドトキシン試験)とし、日本薬局方に記載のあるものはその手順に従って実施した。その他、プラスミドDNAの品質管理に特有の試験については、組み換えたん白質医薬等の情報を参考にして、適切と考えられる試験方法を選択した。

(5) DNAワクチンの非臨床試験のデータパッケージ案の作成

安全性試験の項目の選択についてはWHOのDNAワクチンの品質及び非臨床評価のガイドライン[Annex 1 Guidelines assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines (WHO Technical Report Series No 941, 2007)]及びWHOのワクチンの非臨床評価のガイドライン[Annex 1 WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines (Adopted by the 54th meeting of Expert Committee on Biological Standardization, 17-21 November 2003.)]を参考にして設定することとした。

また、開発するDNAワクチンの成分であるプラスミドDNAは大腸菌により製造されるバイオテクノロジー応用医薬品であるため、ICHガイドラインのS6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価について」(医薬審第326号、平成12年2月22日付)も参考とした。

更にプラスミドDNAを成分とするワクチンについては、同様の範疇の製品が米国で臨床開発されていることから、FDAの感染症用プラスミドDNAワクチンのガイダンス[Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, November 2007)]も一部参照にして設定を行った。

(6) PMDA薬事戦略相談

プラスミドDNAをワクチン成分とする治療用DNAワクチンの国内開発は初めてのケースとなるため、規制当局である医薬品医療機器総合機構（PMDA）と事前に相談を行い、規制当局との合意を得た上で開発を進めることが重要である。そこで、PMDA薬事戦略相談・個別面談を平成25年5月31日に、事前面談を平成25年6月20日にそれぞれ実施し、開発の方向性の妥当性について相談を行った。更に、アジュバント成分であるHVJ-Eについては、平成26年2月13日に対面助言を実施し、規格及び安全性の確保に関して相談を実施した。

具体的にはアジュバント成分であるHVJ-Eのマスターセルバンクと治験薬の品質管理項目、工程管理項目案の設定を行い、PMDAとの薬事戦略相談（事前面談）を実施し、ガイドライン策定に向けた準備を進めた。

更に、治験薬の有効期間の設定に必要な長期安定性試験に関して試験計画書の策定を行い、長期安定性試験の開始準備を進めた。

更に、非臨床試験（安全性試験、薬効薬理試験）についても、実施する試験項目、試験デザインの内容について、「「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン」について」（平成22年5月27日付、薬食審査発0527第1号、以下「ワクチンGL」）、ICHのバイオ医薬に関するガイドラインである「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について（平成24年3月23日付、薬食審査発0323第1号、以下「ICH S6 GL」）、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」（平成7年11月15日付、薬発第1062号薬務局長通知、平成14年3月29日付の医薬発第0329004号および平成16年12月28日付の薬食発第1228004号でそれぞれ一部改定、以下遺伝子治療指針）を参照して原案を策定し、PMDAとの薬事戦略相談を実施したところ、WHOのDNAワクチンのガイドラインも参考にして検討を進めるよう指摘を受けたため、それに従って変更

案の策定を行った。

3. 前臨床試験（薬効・毒性・安全性）（中島、金田、熊ノ郷、朝野、岡田、井上）
本DNAワクチンの用法・用量検討を行った。ワクチン投与DBA/1マウスの脾リンパ球を各種抗原で刺激し、2日後の培養上清中のサイトカインをELISAで測定した。3日後のリンパ球の増殖反応を³H-TdR法で調べた。
4. 国立病院機構病院を中心に、多剤耐性結核患者に対する第I相医師主導治験：
（近畿中央：井上、露口、東京病院：庄司、茨城東：齋藤、大阪大学：朝野、熊ノ郷）
5. 評価
（1）安全性（主要）：CTCAEを指標とする安全性の評価
（2）有効性（副次）：①多剤耐性結核菌 排菌陰性化。 ②多剤耐性結核菌の排菌数減少。
6. HVJ-エンベロープ
HVJ-EはATCCより購入したSendai virusのZ株(VR-105 parainfluenza 1 Sendai/52)を用い、有精鶏卵で増殖させ、紫外線(99mjoule/cm²)で不活性化しHVJ-Eとした。抗体としては研究室で作成したHVJの融合蛋白Fに対するウサギ抗血清を用いることにした。
生体組織での遺伝子発現を調べるため、マウスの骨格筋での遺伝子発現で評価することにした。まずCMV-lucを封入したHVJ-Eを前脛骨筋に注射し48時間後の骨格筋でのルシフェラーゼ活性を測定しその値を100とした。次に別のマウスに遺伝子を封入しないHVJ-Eを1週間隔で2回前脛骨筋に注射した。そのマウスではHVJに対する抗体が検出された。その1週間後にCMV-lucを封入したHVJ-Eを筋肉内に注入した（金田）。
7. 多剤耐性結核（MDR-TB）症例状況をNHO茨城東病院、複十字病院例について、2002年1月より2013年10月症例について後ろ向きにカルテより検討した（齋藤）。
8. 平成25年度、フェーズI医師主導治験を実施するために、先行的に大阪大学医学部附属病院において体制の整備を行った。治験薬GMP基準に準拠した製造施設、健康人被験者の対応や入院に使用する専用の早期探索的臨床試験実施エリアの設置、院内運用の早期探索的臨床試験実施

業務マニュアルを制定するなど、ハード面、ソフト面で様々な直面する課題を整理し、解決しながら整備を進めた（朝野）。

9. 初年度の平成25年度の研究では、国立病院機構東京病院に受診し、多剤耐性結核と診断された患者の、患者数、それぞれの患者の年齢、性別その他のプロフィール、行った（現在行われているものも含む）治療の内容などをこれまでの10年間にわたって調査し、まとめた（庄司）。
10. 関西におけるMDR-/XDR-TBの動向を調査するために、結核病棟を有する病院へのアンケート用紙を作成する。

前調査として2000年からの大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおけるMDR-TB排菌患者のべ数を調べる。

前調査として2004年からの大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおける新規MDR-TB排菌患者数を調べた。

11. NHO近畿中央胸部疾患センターにおいて2006年1月から2012年12月までの間に入院加療を行った多剤耐性結核症例55例を対象として、その背景因子、治療成績等につき臨床的に検討を行った（露口）。

C. 研究結果

(1) 臨床試験では、HSP65遺伝子及びIL-12遺伝子をヒトに投与することより、その発現の持続性、生体への影響等に関して： 下記の作製した(3)(4)のpVAX/HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチンを用いて、実験動物（マウス、サル等）で発現の持続性、生体への影響を含む安全性試験・毒性試験を行う計画を立案した。

DNAワクチンについては米国で社会的・行政的コンセンサスが得られており、本邦でも、後記の金田安史が関与する遺伝子治療学会等により、遺伝子治療製品が再生医療製品などに含まれることとなった。さらに遺伝子治療の治験の確認申請が不必要となり、社会的・行政的コンセンサスが得られていると考えて良い。

(2) 治験薬製造用のpVAX/HSP65 DNA+ ヒトIL-12 DNAの大腸菌マスターセルバンク (MCB) を分担研究者中島俊洋と共にAMBiS社に委託して作製した(表7)。

1) 治験薬製造用バンクシステムの構築

治験薬GMP製造に使用する大腸菌については、起源・由来を明確にする必要があるため、大腸菌株DH5a RDB108 (コード番号：ME9088) を国立遺伝研究所から入手した。その大腸菌株 (DH5 α 株) を生物由来成分を含まないLB培地を用いて小スケールで培養し、形質転換用使用する種菌ストックを作成した。

形質転換用の種菌ストックを生物由来成分を含まないLB培地で培養し、菌体を回収・洗浄し、生物由来成分を含まない形質転換用の培地に懸濁後にマイナス80度で凍結したストックを作成し、コンピテント細胞として使用した。

コンピテントセル化した大腸菌株DH5 α RDB108を、解凍して目的のプラスミドDNA (pVAX1-IgHSP65-hIL12) を添加し、電気パルス法 (エレクトロポレーション) により導入を行った。プラスミドDNAを導入した後に、生物由来成分を含まないLB培地で前培養を行ってから、生物由来成分を含まないLB寒天培地 (カナマイシン含有) に菌液を添加して一晚培養してからクローニングを行った。通常の形質転換では、化学物質によるプラスミドDNA導入が実施されるが、治験薬GMP製造に使用することを

考慮して物理的な導入方法である電気パルス法 (エレクトロポレーション) を選択した。

その結果、プラスミドDNAの導入により、カナマイシン耐性となった大腸菌が認められたため、導入に成功したと判断し、単一のコロニーを採取して目的のプラスミドDNAが導入されているかを確認したところ、目的のプラスミドDNA (pVAX1-IgHSP65-hIL12) と制限酵素地図が一致するプラスミドDNAの導入を認めた。そのため、採取した大腸菌のクローンを用いてマスターセルバンクの作製を行った。

マスターセルバンクを作製するため、上記のようにして採取した大腸菌クローンに由来する大腸菌を、生物由来原料を含まない植物由来成分を使用してLB培地内で拡大培養を行った。

目的の大腸菌が、適切な細胞濃度 (対数増殖期) に達するまで培養を継続した後に培養を停止し、グリセロールを最終濃度15%になるよう添加し、バンク作製用チューブ300本に無菌的に分注し、マイナス80度で凍結してのマスターセルバンク (pVAX1-IgHSP65-hIL12/DH5 α) の作製を完了した。

マスターセルバンク (pVAX1-IgHSP65-hIL12/DH5 α) については、上記のようにして作製した調製記録を全て確認し、保管・管理することとした。また、セルバンクのチューブには、プラスミドDNAの名称と使用した大腸菌の菌株、及び調製日を識別できるようにする必要があるため、名称と調製日完了を記入して、GMP製造施設内に設置されたマイナス80度の冷凍庫内で保管管理を行う事とした。

2) 構築したバンクシステムの特性確認

上記のようにして治験薬GMP製造用に大腸菌のマスターセルバンクを作製した。実際に製造用に使用するには、ガイドラインに従ってセルバンクの特性及び品質を実証するための試験を実施し、製造用に適したレベルのバンクであることを確認した上で使用する必要がある。

医薬品製造用に使用するセルバンクについては、ICHのガイドラインであるQ5D「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」 (医薬審 第873号、平成12年

7月14日付)に記載された内容に従って試験データを取得する必要があるため、先ず試験項目の選定を行った。

ガイドラインには、培養細胞株を使用した場合と、細菌株を使用した場合の両者について記載があり、それぞれに適した試験を実施することとされている。本研究において、プラスミドDNAを治験薬GMPレベルで製造するために作製したマスターセルバンクは、大腸菌のセルバンクであるため、ICHのQ5Dガイドラインに記載された微生物細胞のバンクのための試験項目を設定し、特性及び品質に関する検査を実施した。

そこで、関連するガイドラインに記載された内容に従って、宿主である大腸菌を同定するための試験、他の微生物の混入を否定する試験、導入したプラスミドDNAを確認する試験、大腸菌の生存率(生菌数)を測定する試験を、それぞれ実施することとした。

先ず、薬剤感受性試験を実施し、アンピシリン感受性、カナマイシン耐性であることを確認した。大腸菌を使用した組換え実験などでは通常アンピシリン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを使用することが多いが、臨床用を使用する場合にはアレルギー反応のリスクがあるためアンピシリンの使用は望ましくないとされている。そのため、本研究で使用するプラスミドDNAは、アンピシリン耐性遺伝子の代わりにカナマイシン耐性遺伝子を組み込んでいる。従って、試験の結果得られた薬剤耐性プロファイルは、目的の表現型を示しているものと判断された。

次に、栄養要求性試験、グラム染色試験、コロニー形態試験を実施し、使用した大腸菌株であるDH5 α のみが認められ、他の微生物の混入は認められない事を確認した。その結果、予測された栄養要求性、グラム染色パターン(グラム染色陰性)、元のDH5 α と同じ形態のコロニーのみが認められることが明らかとなり、使用した大腸菌株であるDH5 α 以外の細菌の混入は否定された。

更にプレート法によりファージ否定試験を実施したところ、ファージの混入を示すプラーク形成が認められなかったことからファージの混入についても否定できると判断された。

続いて作製したセルバンクの大腸菌の懸濁液から直接プラスミドDNAを抽出し、制限酵素地図試験を実施したところ、目的とするプラスミドDNAと同一の制限酵素切断パターンが確認されたことから、セルバンクの大腸菌は目的とするプラスミドDNAを保持していることが確認された。

最後に、治験薬GMP製造を実施するのに十分な大腸菌数を含むかを確認するため生菌数試験を実施した。その結果、作製したセルバンクシステムは1mLあたり1000万個以上の大腸菌を含むことが明らかとなり、治験薬製造には十分な菌数を含むものと判断された。

以上のようにして、作製した大腸菌のセルバンクに関して特性解析及び品質評価を行った結果、全ての試験で適合する結果を得ることが出来たため、作製したセルバンクは治験薬GMP製造に適したバンクである事が実証された。

3) 構築したバンクシステムによるプラスミドDNAの製造

上記のように作製したマスターセルバンク(MCB)の特性及び品質の解析を完了したため、実際に作製したセルバンクを用いて目的のプラスミドDNAのGMP製造を実施した。本研究で治療用ワクチンの成分となるプラスミドDNA(pVAX1-IgHSP65-hIL12)をGMPパイロットプラント内で製造を実施した。治験薬GMP製造を想定した製造であるため、生物由来原料を含まない原材料を使用して培養、菌体回収、菌体破碎、粗精製液調製、カラムクロマトグラフィーによる精製、バッファー置換、無菌ろ過、濃度調整の各工程を経て、最終的に遮光バイアルへ充填し、シリコンコートしたゴム栓を打栓した。

最終的には、冷蔵でも保存安定性が高い凍結乾燥製剤を検討する予定であるが、現時点では液剤での凍結保存とした。

GMP製造を実施した結果、大腸菌の培養条件や精製条件の最適化することで更に収量を向上できることが示唆されたため、更にGMP製造を行って、非臨床試験、安定性試験のための製剤製造を実施して最適化を進め、臨床試験用の治験薬を製造する予定である。

4) 製造したプラスミドDNAの品質確認試験

上記のようにして製造したプラスミドDNAの品質を確認し、暫定規格設定の根拠となるデータを取得するための品質確認試験を実施した。

プラスミドDNAは大腸菌で製造されるバイオテクノロジー応用医薬品であると考えられたため、適用となるガイドラインとしてICHのガイドラインQ6B「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定について」（医薬審発第571号、平成13年5月1日付）を選択して、試験項目の設定を行った。

ガイドラインの「4. 規格及び試験方法」内容に従って試験項目の設定を進めることとした。製剤の暫定規格としては、ガイドラインの「4.2.1 外観・性状」、「4.2.2 確認試験」、「4.2.3 純度と不純物」、「4.2.4 力価」、「4.2.5 物質質量」、「4.2.6 その他の一般的試験項目」の各項目の内容に準拠して設定することが妥当であると考え、暫定規格を設定する方向性で進める事とした。

不溶性微粒子試験、不溶性微異物試験、pH 試験、浸透圧試験、無菌試験、エンドトキシン試験については、それぞれ日本薬局方の記載に従って手順書を作製し試験を実施した。

一方、性状試験、塩基配列、制限酵素地図試験、DNA 濃度、純度試験、吸光度比

(A260/A280)、宿主DNA、宿主RNA、宿主たん白質試験、たん白質含量試験、の各試験については、科学的根拠に基づいて社内で試験手順書の策定を行い、試験データの取得を行った。

これらの試験データと、ガイドラインなどの記載内容に基づいて純国産の治験薬として製造するプラスミドDNAの暫定基準を設定し、治験薬の製造と品質管理試験を実施する。

5) DNAワクチンの非臨床試験のデータパッケージ案の作成

プラスミドDNAを成分とする治療用ワクチンについては、国内で初めての治験実施となるため、国内のガイドライン策定に貢献することも考慮して開発を進める必要がある。そのため、平成25年度は、治験届けまでに必要となる非臨床試験のデータパッケージ案の策定を進める事とした。

プラスミドDNAを用いた医薬品の開発は遺伝子治療の範疇になることが想定されたため、国内外のガイドラインについて調査を行った結果、WHOのDNAワクチンの品質及び非臨床評価のガイドライン[Annex 1 Guidelines assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines (WHO Technical Report Series No 941, 2007)]とFDAの感染症用プラスミドDNAワクチンのガイダンス[Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, November 2007)]の、2種類のガイドラインを参考とすることが、最も適切であると考えられた。

また、ワクチン開発におけるガイドラインについても参考にする必要があると考えられたため、ワクチンに関するガイドラインについて調査を行った結果、WHOのワクチンの非臨床評価のガイドライン[Annex 1 WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines (Adopted by the 54th meeting of Expert Committee on Biological Standardization, 17-21 November 2003.)]を参考にする事が適切であると考えられた。

更に、プラスミドDNAの製造については、上記のように大腸菌で作製したマスターセルバンクを使用して実施することから、組み換えたん白質など大腸菌により製造されるバイオテクノロジー応用医薬品を対象としたガイドラインである、ICHガイドラインのS6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価について」（医薬審第326号、平成12年2月22日付）についても、適宜参考にして非臨床試験の内容を検討する事とした。

これらのガイドラインを参考にして、治験届までに必要な安全性試験について、必要な試験項目と試験内容を検討した。その結果、一般毒性試験である反復投与毒性試験に、安全性薬理試験（中枢神経系）、免疫毒性（抗体産生）などを組み込んだ試験と、単回投与で実施する安全性薬理試験（循環器系、呼吸器系）の、2つの