

D. 考察

I. 本研究では、DNAワクチンのワクチン成分としてプラスミドDNAを使用する。そのため、治験薬GMP製造に必要な大腸菌のマスターセルバンク(MCB)を作製し、特性及び品質試験を実施した結果、治験薬GMP製造用に適合することを示すデータを取得した。今後規制当局であるPMDAの薬事戦略相談において、その妥当性について確認を行う予定である。

作製したMCBを用いてプラスミドDNAのGMP製造を実施した。培養液あたりの収量については、今後最適化を行う事で増加できることを示唆するデータを得ており、製造工程の改善により収量を増加できる可能性があると考えられた。

GMP製造を実施したプラスミドDNAの品質確認データの取得を行った。規格設定項目、暫定規格値の設定については、複数バッチの品質確認データを根拠として進める予定である。今後数バッチから10バッチ程度のデータの取得を進め、結果を取り纏めた後に暫定規格値をPMDAと相談しながら設定していく必要があると考えられた。

非臨床試験のデータパッケージについては、複数のガイドラインを参考にして改定案の策定を完了した。その妥当性については、PMDAの薬事戦略相談を利用して確認を進めることが適切であると考えられた。

II. 用法用量試験

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。したがって、当初の100 μ g DNAより少ない量でマウスで効果が認められたことより、ヒト(多剤耐性結核患者)に対しても少ないDNA量で効果が認められるかもしれない。

III. 期待される成果

1. ヒト臨床応用

新しい結核治療ワクチン

- ・本邦で毎年200人の多剤耐性結核患者を治療・救命(図10)
- ・毎年200万人の結核死亡者を治療・救命可能

・多剤耐性結核・XDR-TB(表12)を治療(世界で毎年50万人)(図10)

・スーパー・スプレッダー多剤耐性結核を治療可能(岡田、井上、露口、庄司、齋藤、朝野、松本、熊ノ郷、三上)

2. 第I相医師主導治験評価(図10)

結核ワクチン皮下投与



患者の喀痰



喀痰中の結核菌培養



多剤耐性結核菌0個となる
排菌陰性化

IV. 特色・独創的な点

1. 有効性の実証(図11、12)

①カニクイザルの結核感染モデルで、HVJ-エンベロップ/HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン投与群では、生存率の改善、血沈の改善、Tリンパ球のHSP65抗原に対する増殖反応増強、IL-2の産生増強。

世界でも類例のない独創的ワクチン

(Vaccine 2009、Human Vaccine 2013)

②マウス多剤耐性結核感染モデルで、ワクチン投与群では肺・肝臓・脾臓の結核菌数が減少、更にマウス超多剤耐性結核(XDR-TB)感染モデルで、ワクチン投与群は、生存率を改善

(図13、14)

(Vaccine 2009、Human Vaccine 2011、2013)

2. 医師主導治験の実施に向けた準備状況(表13)

①PMDA薬事戦略相談を実施。DNAワクチンで個別面談を実施済、事前面談も6月に実施。

アジュバント(HVJ-エンベロップ)については規格・安全性の対面助言を既に実施

②アジュバントについては、大阪大学が本年度よりGCP医師主導治験を実施する計画で、医師主導治験を支援する体制を確立

③HVJ-エンベロップ

(1) 不活性化センダイウイルス粒子

(2) 一本鎖RNAが強力なアジュバント作用

(RIG-I活性化: キラーT分化、NK分化、制御T抑制)

(3) 癌治療に臨床応用され、すでに治験薬GMP

製造

(4) HVJ-Eによる遺伝子導入はHVJのエンベロープと細胞膜の融合に依存している。培養細胞での実験で抗体による遺伝子発現の阻害のためには抗体とHVJ-Eとの

Pre-incubationが必要であるが、これがなければ阻害されなかったことより、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される。したがってマウス実験でも明らかなように、中和抗体存在下であっても標的組織への直接投与方法を行う限りは、遺伝子導入は阻害されないと考えられる。現在HVJ-Eはそれ自身が有する抗腫瘍作用により、癌治療のための臨床研究に用いられており、投与を受けた患者血清中には抗HVJ抗体が上昇することが分かっている。実際に、この患者ではHVJ-Eの第1サイクルの2週間で6回投与によりNK活性が上昇し、投与をやめると4週間の間にNK活性が減少した。次いで、第2サイクルの2週間6回投与でNK活性は再び上昇した。HVJに対する抗体が存在してもHVJ-Eの抗腫瘍免疫の活性化作用は影響を受けないことが臨床研究でも裏付けられている。

④民間企業と共同で開発を進める計画であり、本計画に従ってGLP試験、治験薬GMP製(AMBiS社)等を実施し、3年以内にGCP準拠の医師主導治験を実施可能

3. 明確な出口戦略(表14)

①多剤耐性結核など対応可能な病院が国立病院機構等に限定される感染症の治療用ワクチンを、PMDA、大阪大学、遺伝子治療学会、企業が新技術(DNAワクチン)で開発、ガイドライン策定に繋げる産学官共同研究

②民間企業(ジェノミディア)が参加。薬事法に基づく承認取得までの出口戦略を明確にした研究

4. 承認取得までのロードマップ

1年半程度でIRB承認取得、できれば治験届まで進め、3年目に第I相の医師主導治験を開始。その後オーファン申請を行って、第II相治験を

もって7年で承認申請に進む計画である(図15)。

5. 予定される治験の流れ

- ・対象疾患はINH及びRFPに耐性の多剤耐性結核患者。
- ・主要評価項目は、安全性・忍容性の評価で、副次的項目としてワクチン治療2ヶ月後の抗結核作用(結核排菌減少)と免疫反応を評価する。
- ・目標症例数は、用量あたり3名から6名とする計画で、2用量の予定。
- ・治験を実施する施設は、国立病院機構の病院3施設で行う計画(図16)。

6. 治験の実施体制

本研究事業は、国内開発を先行させたfirst in human治験の実施。

また、国内で初めてとなるプラスミドDNAの治療用ワクチンの開発である。

そのため、ガイドラインの策定につながるよう国立病院機構、規制当局、日本遺伝子治療学会(理事長:金田安史教授)、民間企業が連携した研究体制である(図17)。

7. 結核歴が15年以上の慢性持続排菌患者も存在しており岡田等が開発したDNAワクチンへの期待が持たれる(松本)。

8. 多剤耐性結核の治療成績は感受性結核に比べて不良であり、XDR-TBはさらに不良であった。手術を行えた例の予後は比較的良好であった(露口)。

9. 多剤耐性結核患者の調査;

INH、RFPに耐性を示す多剤耐性結核は治癒率が低く治癒したとしても再発が多いため、本人の負担だけでなく周囲への感染、医療費などを含めて長期にわたり社会に影響を与える疾患である。日本における多剤耐性結核の比率は、未治療患者では0.7%と高くはないが、既治療患者では9.8%であり、さらに多剤耐性結核中の超多剤耐性結核の比率は29%と世界の中でも特異な高さである。本検討の目的は、関東地区の郊外にあるNHO茨城東病院と都会にある複十字病院の多剤耐性結核の治療状況と予後を中心と

した状況を明らかにすることである。

感受性結核との症例対照での検討は行っていないが、複十字病院例の検討から明らかに、感受性結核より、若年者および外国人に多くみられている。若年者、外国人に耐性結核が多いことはサーベイランス上報告されており(結核、2012;87:783-787)、外国人結核の出身国としては中国が最多である。母国の薬剤耐性頻度は、中国では初回治療の6%、フィリピンでは4%、韓国では3%であり、中国からの多剤薬剤耐性結核が多いのは、十分に予測される場所である。

死亡を含む治療失敗7例、菌陽性転出が7例と排菌が停止しない例が見られており、隔離を行う場合は長期となることが予測される。新たな薬が今後登場する予定であるが、単一薬剤では治療成功へ導くことは不可能であり、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(齋藤)。

10. フェーズ I を含めた早期探索的試験を実施するために解決すべき課題の内容は非常に多岐に渡った。病院全体での取り組みが必要であるが、解決すべき課題を整理して明確にする、到達目標や期限を設定する、スケジュール調整、進捗管理を行う、などの手順を確実に進めていくこ

とが肝要であり、試験が立案された当初から試験完了に至るまで一貫してその役割を担う部署の設置が必要である。契約関連業務、また、審査プロセスなどでは治験事務局及び病院管理課のサポートが必要不可欠であった。また、有害事象発生時の緊急対応や健康人被験者の電子カルテIDの発行など、実際に運用するためには、関連部署との連携を十分に行っておくことが重要であることを経験してきた。今後の課題として、運用で改善すべき事項を反映した業務マニュアルの改訂、夜間対応看護師の継続した配置、病院からの配食などがあり、引き続き取り組んでいき、結核ワクチンの実施に向けたシミュレーションを継続し、実施に備える。このためには、今後も健常人対象臨床試験、早期探索的臨床試験に精通した人員の継続した育成が重要であり、今回関わった人員の経験を蓄積し、業務マニュアルなどに反映させて情報を共有し、今後の円滑な体制整備、試験の質や安全性の向上につなげる(朝野)。

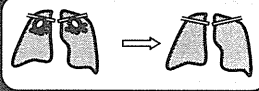
11. 多剤耐性結核は、臨床的に重要な疾患病態であるが、患者数は多くない。来年度から本研究の主眼である医師主導治験の第 I 相が開始されるが、研究を成功に導くための適格症例の確保が重要である(庄司)。

期待される成果

ヒト臨床応用

新しい結核治療ワクチン

- ・本邦で毎年200人の多剤耐性結核患者を治療・救命
- ・毎年200万人の結核死亡者を治療・救命可能
- ・多剤耐性結核・XDR-TBを治療(世界で毎年50万人)
- ・スーパー・スプレッター多剤耐性結核を治療可能
(岡田、井上、露口、庄司、齋藤、朝野、松本、熊ノ郷、三上)



第1相医師主導治験評価

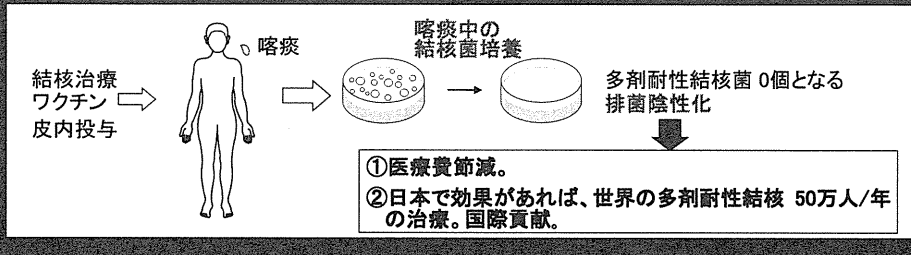


図10

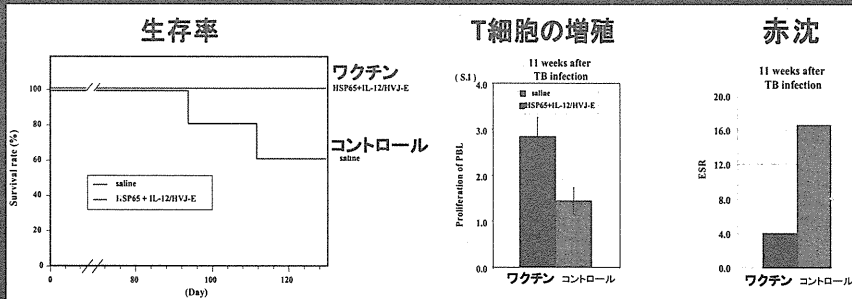
特色・独創的な点

1.有効性の実証

- ① カニクイザルの結核感染モデルで、HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン投与群では、生存率の改善、血沈の改善、Tリンパ球のHSP65抗原に対する増殖反応増強、IL-2の産生増強。

世界でも類例のない独創的ワクチン

(Vaccine 2009、Human Vaccine 2013)



岡田はWHOのWGND (Working Group of New TB Drug) 委員会委員に選ばれた(2009年から)

図11

結核感染したカニクイザルを用いた
HVJ-エンベロープ/Hsp65 +IL-12 DNAワクチンの治療効果

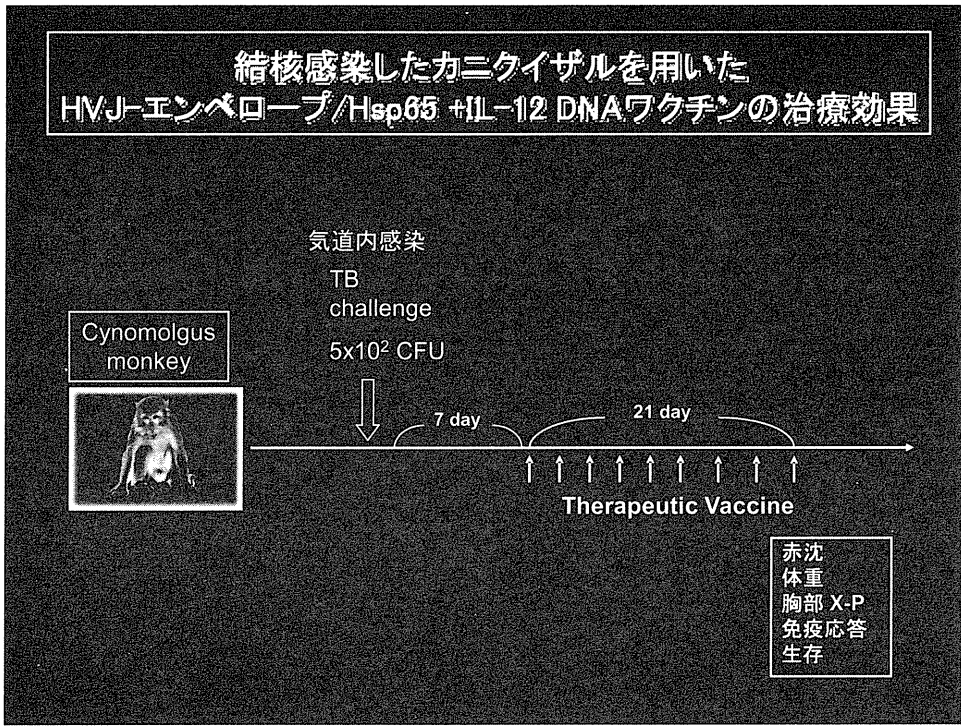


図 1 2

〔方法〕

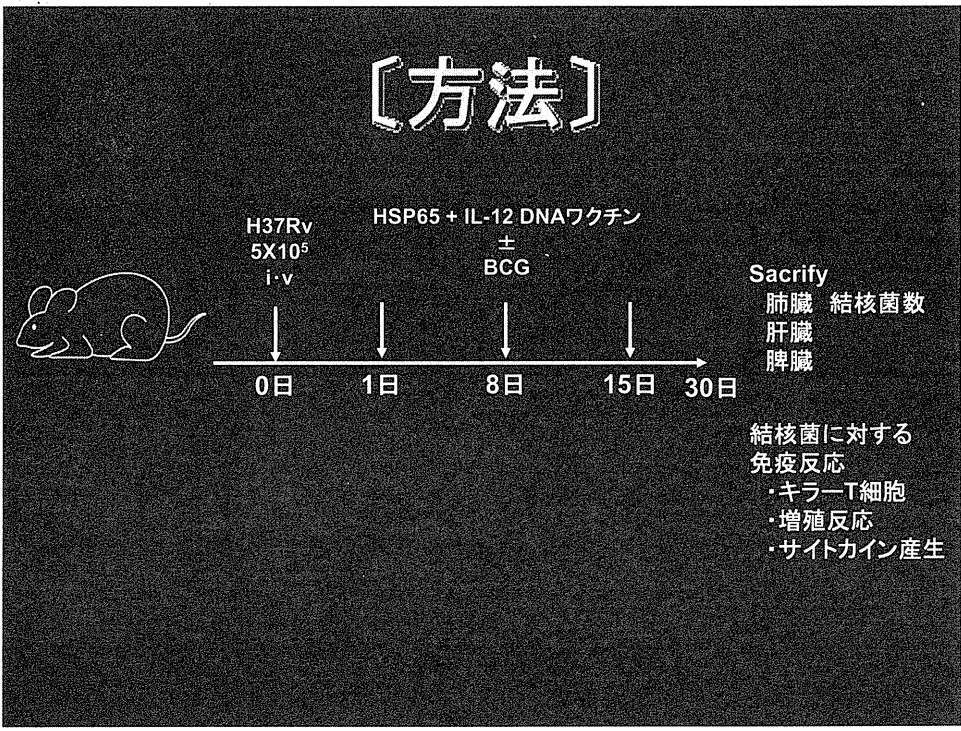


図 1 3

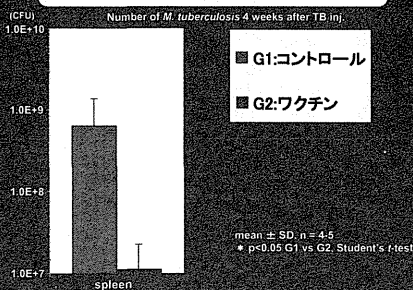
表1 2

超薬剤耐性結核 Extensively Drug Resistant (XDR-TB) Extremely Drug Resistant (XDR-TB)								
	薬剤名	濃度	判定	濃度2	判定	薬剤名	濃度	判定
SM	(簡易比率法)	10	R			SM (MGIT)	1.0	R
INH	(簡易比率法)	0.2	R	1.0	R	INH (MGIT)	0.1	R
RFP	(簡易比率法)	40	R			RFP (MGIT)	1.0	R
EB	(簡易比率法)	2.5	R			EB (MGIT)	5.0	R
KM	(簡易比率法)	20	R			PZA (MGIT)	100	R
EVM	(簡易比率法)	20	R					
TH	(簡易比率法)	20	R					
CS	(簡易比率法)	30	S					
PAS	(簡易比率法)	0.5	R					
LEFX	(簡易比率法)	1.0	R					
PZase								

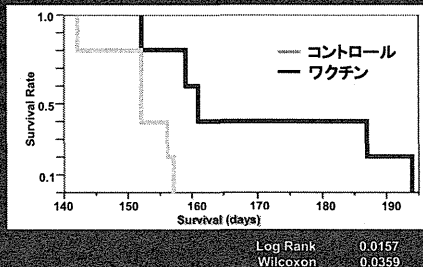
薬剤洗度単位 μg/ml
R・・・耐性
S・・・感受性
#・・・判定不能

② マウス多剤耐性結核感染モデルで、ワクチン投与群では肺・肝臓・脾臓の結核菌数が減少、更にマウス超多剤耐性結核 (XDR-TB) 感染モデルで、ワクチン投与群は、生存率を改善 (Vaccine 2009, Human Vaccine 2011,2013)

多剤耐性結核治療効果



超多剤耐性結核 (XDR-TB) 治療効果 (生存曲線)



1. 今村賞 結核病学会賞受賞(2012年)
2. 遺伝子治療学会誌賞受賞(2008年)
3. (多ヶ谷勇記念ワクチン研究) イスクラ奨励賞(2004年)

国際学会招へい特別講演(ICAAC:米国微生物学会)第50回2010年「Therapeutic vaccine」

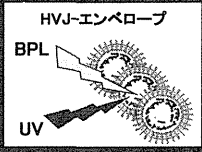
図1 4

表13

特色・独創的な点

2. 医師主導治験の実施に向けた準備状況

- ① PMDA薬事戦略相談を実施。DNAワクチンで個別面談を実施済、事前面談も6月に実施。
アジュバント(HVJ-エンベロープ)については規格・安全性の対面助言を既に実施
- ② アジュバントについては、大阪大学が本年度よりGCP医師主導治験を実施する計画で、医師主導治験を支援する体制を確立
- ③ HVJ-エンベロープ
 - (1) 不活性化センダイウイルス粒子
 - (2) 一本鎖RNAが強力なアジュバント作用
(RIG-I活性化: キラーT分化、NK分化、制御T抑制)
 - (3) 癌治療に臨床応用され、すでに治験薬GMP製造
- ④ 民間企業と共同で開発を進める計画であり、本計画に従ってGLP試験、治験薬GMP製造(AMBIS社)等を実施し、3年以内にGCP準拠の医師主導治験を実施可能



HVJ-エンベロープ
BPL
UV

表14

特色・独創的な点

3. 明確な出口戦略

- ① 多剤耐性結核など対応可能な病院が国立病院機構等に限定される感染症の治療用ワクチンを、PMDA、大阪大学、遺伝子治療学会、企業が新技術(DNAワクチン)で開発、ガイドライン策定に繋げる産学官共同研究
- ② 民間企業(ジェノメディア)が参加。薬事法に基づく承認取得までの出口戦略を明確にした研究

論文

<ol style="list-style-type: none"> 1. Okada M, et al. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2013. 2. Kita Y, et al. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2013. 3. Okada M, et al. Clin Dev Immunol. 2011. 4. Kita Y, et al. Human Vaccines. 2011. 5. Okada M, et al. Human Vaccines. 2011. 6. Okada M, et al. Human Vaccines. 2010. 7. Okada M, et al. Vaccine. 2009. 9. Yoshida S, et al. Vaccine. 2006. 	<ol style="list-style-type: none"> 8. Okada M, et al. Vaccine. 2007. 10. Kita Y, et al. Vaccine. 2005.
--	--

承認取得までのロードマップ

(☆: 確認申請、治験届、オーファン申請、承認申請、←→: 実施期間、点線の ←→: 予備検討など準備期間)

開発項目	治験開始からの年度	年度									
		平成25年度	平成26年度	平成27年度	平成28年度	平成29年度	平成30年度	平成31年度	平成32年度		
規制当局・倫理委員会対応事項	治験相談/確認申請/治験届(PI)		←☆	→☆							
	オーファン申請/治験届(PII)				←☆	→☆					
	治験審査委員会		←→		←→						
臨床試験関連事項	治験戦略策定(含薬事戦略相談)	←→	←→		←→						
	プロトコル作成	←→	←→		←→						
	治験実施(PI、国内多施設)			←→							
	治験実施(PII、国内多施設)					←→					
	承認申請と当局対応(国内)						←→				
	承認、薬価収載、海外普及								←→	←→	←→
非臨床試験関連事項	薬効・薬理試験	←→	←→	←→							
	安全性試験(含長期毒性試験)	←→	←→	←→							
	薬物動態試験	←→	←→								
品質関連事項	特性解析(含長期安定性試験)	←→	←→	←→	←→						
	治験薬GMP製造(パイロットプラント)	←→	←→	←→	←→						
	医薬品GMP製造(実製造プラント)				←→	←→	←→	←→	←→	←→	←→
事業性関連事項	特許関連	←→	←→	←→	←→	←→	←→	←→	←→	←→	←→
	企業提携	←→	←→	←→	←→	←→	←→	←→	←→	←→	←→

図15

予定される治験の流れ

多剤耐性結核患者 (INH耐性 + RFP耐性)

主要評価項目
安全性・忍容性

副次的項目
・抗結核作用(排菌減少)
・免疫反応

目標症例数
3名から6名/用量あたり
2用量

実施施設
国立病院機構 病院
3施設

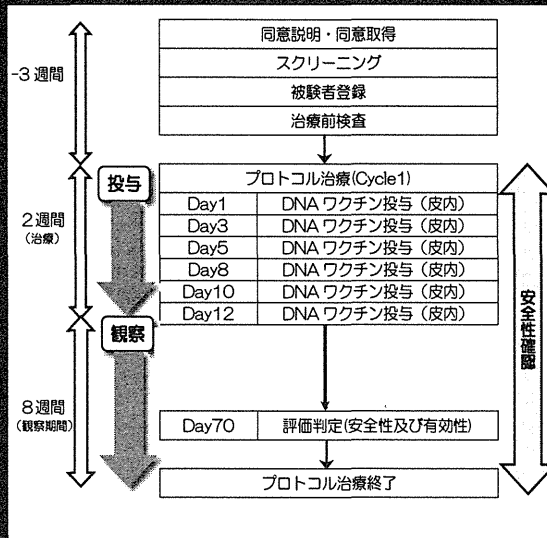


図16

治験の実施体制

本研究事業は、国内でfirst-in-human治験の実施となる上、国内初となるプラスミドDNAの治療用DNAワクチン開発となる。

そのため、薬事法上の承認取得に必要な民間企業との連携に加え、ガイドラインの策定にも繋げる事が出来るよう国立病院機構、厚労省/PMDA/医薬基盤研、日本遺伝子治療学会(理事長:金田安史教授)と連携した研究体制とする。

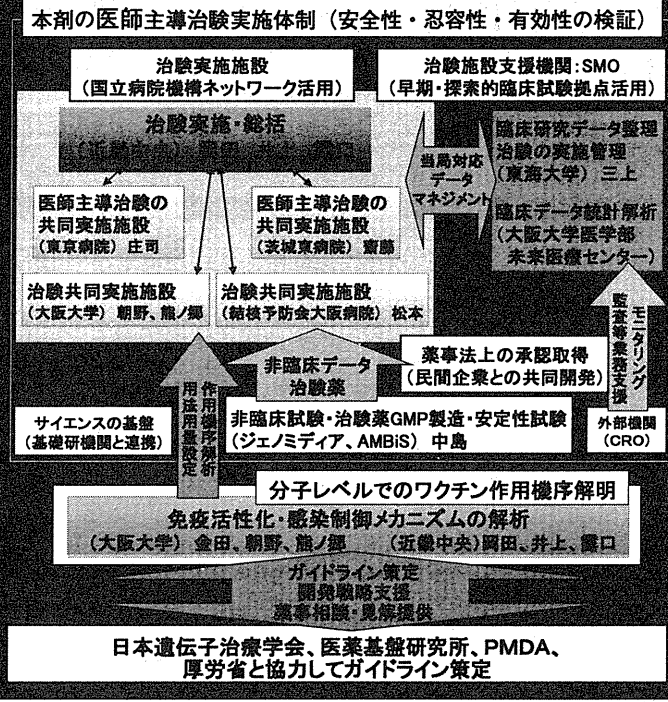


図 17

E. 結論

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を連続投与しなかった場合のルシフェラーゼ遺伝子発現と比較して、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)