

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1相、first in human試験）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：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. 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

・研究分担者（中島俊洋）

- (1) ICHのガイドラインQ5Dに従ってGMPレベルで治験薬製造用の大腸菌マスターセルバンク（MCB、pVAX-IgHSP65-hIL12(DH5a)）システムを構築した。
- (2) 構築したマスターセルバンク（MCB）についてはICHのガイドラインQ5BとQ5Dに従って特性解析を実施し、適格性を実証した。
- (3) MCBを使用してプラスミドDNA（pVAX-IgHSP65-hIL12）のGMP製造を実施し、暫定規格の設定に必要な品質確認データを取得した。
- (4) ICHのバイオ医薬のガイドラインや、WHOのDNAワクチンに関するガイドライン等を参考に、カニクイザルを用いた毒性試験のデザイン案を策定し、試験項目、試験デザイン等、試験骨子を設定した。
- (5) 治験薬の規格及び安全性、長期安定性試験、毒性・薬効薬理試験に関してPMDAの薬事戦略相談（個別相談、事前面談、対面助言）での相談結果

に基づいて、必要な変更を行い、次回相談用の書類作成を実施した。

(6) 医薬品製造企業との提携相談実施中

・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。

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方法を行う限りは、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。

・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) 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）。
- (3) 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年度中に健常人を対象とするPETマイクロドーズ臨床試験を完了し、現在マラリアワクチンに関するフェーズI医師主導治験を継続し

て実施している。さらなる実施環境の整備として、来年度試験実施エリアを現行2床から10床に増床し新たな場所に設置予定である。残る課題の整備や次試験の円滑な実施に向けて取り組みながら結核ワクチンの医師主導治験の実施につなげる準備を継続する（朝野）。

・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。
- (3) 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。
- (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

多剤耐性結核の治療上、新たな抗結核薬の開発だけでなく、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。

・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)。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masaji Okada, Yoko Kita, Toshihiro Nakajima, Satomi Hashimoto, Hitoshi Nakatani, Shiho Nishimatsu, Yasuko Nishida, Noriko Kanamaru, Yasuhumi Kaneda, Yasushi Takamori, David McMurray, Esterlina V.Tan, Marjorie L Cang, Paul Saunderson, E.C.Dela Cruz.: The study of novel DNA vaccines against tuberculosis: Induction of pathogen-specific CTL in the mouse and monkey models of tuberculosis. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 9(3):515-25. 2013.
2. Yoko Kita, Satomi Hashimoto, Toshihiro

Nakajima, Hitoshi Nakatani, Shiho Nishimatsu, Yasuko Nishida, Noriko Kanamaru, Yasuhumi Kaneda, Yasushi Takamori, David McMurray, Esterlina V.Tan, Marjorie L Cang, Paul Saunderson, E.C.Dela Cruz, Masaji Okada.: Novel therapeutic vaccines [(HSP65 + IL-12) DNA-, granulysin- and Ksp37- vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 9(3):526-33. 2013.

3. 岡田全司:結核におけるワクチンへの期待“次世代型感染症ワクチン”. 最新医学 出版中
4. 岡田全司(1/6):結核予防 (DNA) ワクチンの開発状況 予防接種 Q&A 改訂3版。「小児内科」「小児外科」編集委員会共編、東京医学社。小児内科 45 巻増刊号:281-283. 2013.
5. 岡田全司: 結核の免疫反応「免疫学的機序からみた呼吸器疾患」日本胸部臨床 72(12): 1336-45. 2013.
6. 岡田全司: はじめに (序論) 「結核-古くて新しい感染症-」最新医学. 68(11):2437-2438. 2013.
7. 岡田全司(1/3): 座談会: 結核の現状・問題点と最新の知見. 最新医学. 68(11):2439-2450. 2013.
8. 喜多洋子、岡田全司: ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた新規結核予防ワクチン開発及び臨床応用に向けて「結核-古くて新しい感染症-」最新医学. 68(11):2479-2487. 2013.
9. 岡田全司(3/3). 多剤耐性結核治療ワクチンと T 細胞免疫 最新医学. 68(11):2488-2495. 2013.

2. 学会発表

1. Okada M, Nakajima T, Kaneda Y, Tan E.V, McMurray D, Inoue Y, Tomono K, Kumanogo A, Tuyuguchi K, Shoji S, Mikami R, Matsumoto T, Saito T.: A novel therapeutic vaccine against tuberculosis in the cynomolgus monkey model and clinical trial. 7th Vaccine & ISV Congress. p.40-41.

Sitges, Barcelona, Spain. October 27-29, 2013. Oral presentation in Breakout Session, Japanese Society of Vaccine (JSV) joint session.

2. Okada M, Kita Y, Hashimoto S, Nishimatsu S, Nakatani H, Kioka Y, Nakajima T, Kaneda Y, Tan E.V.: Novel therapeutic vaccines against tuberculosis and their synergistic efficacy. p.156. 44th Union World Conference on Lung Health. Paris, France. October 30- November 3, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

- ① 岡田全司、高森靖、小川一行、永田欽也
「感染症治療剤 15K granulysin」 WO
03/070268 A1
2002年

- ② 岡田全司、吉田栄人、中島俊洋、松本真
「結核ワクチン HVJ-liposome/Hsp65
DNA+ IL-12 DNA」
整理番号：MED-A0504
受付番号：50501768464
特許番号：特願2005-280379
提出日：2005年9月27日
発明の名称：DNAワクチン組成物
2005年
- ③ 岡田全司、高森靖、安井正文
「感染症治療剤15K granulysin」
特許取得2008年7月4日
特許4149713号
2008年
- ④ 岡田全司、高森靖、安井正文
「感染症治療剤」
特許取得登録日：2012年10月31日
登録番号：(欧州特許2243489号)
2012年

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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) 分担研究報告書

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

研究分担者 中島俊洋 ジェノメディア株式会社・代表取締役社長

研究要旨

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成した。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成を行った。マスターセルバンクの作成のため、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、作成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。

A. 研究目的

近畿中央胸部疾患センター・臨床研究センターでは、純国産で革新的な多剤耐性結核に対する治療用ワクチン (pVAX-IgHSP65-hIL12 DNA/HVJ-E) の開発を進めており、ヒト結核に最も近いとされているカニクイザルを用いた動物モデルで治療効果と予

防効果を評価した。その結果、平成 24 年度までに投与を行ったカニクイザルにおいて新規治療用 DNA ワクチンによる治療効果、及び予防効果を確認したため、薬事法上の承認申請を目的とする医師主導治験を国内優先で実施することとなった。

そこで平成 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。

B. 研究方法

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 DH5α 株を用いて形質転換を行ってマスターセルバンク作成に必要な種細胞の調製を行った。生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成用の大腸菌クローンを選択した。

・バンクシステム作成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、バンク作成用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 /DH5α）の作成を完了した。

2) 構築したバンクシステムの特性確認

・作成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。

表 1. 構築したマスターセルバンク(MCB)システムの品質検査項目について

試験	項目	規格
宿主の同定試験	①薬剤感受性試験	カナマイシン耐性
	②栄養要求性試験	栄養要求性なし
	③グラム染色試験	グラム陰性
混入否定試験	④コロニー形態試験	大腸菌以外の形態のコロニーなし
	⑤ファージ否定試験	ファージ陰性
プラスミド確認	⑥制限酵素地図試験	理論サイズと一致
生存率試験	⑦生菌数試験	10 ⁷ 大腸菌/mL 以上

・本研究で作成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、表 1 に示す宿主の同定試験、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、試験としては表 1 に示す 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、作成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

・作成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、表 2 に記載の通り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、**表 2**に記載した 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。

表2. プラスミドDNAの暫定規格(案)について

試験	項目	規格	試験法
性状	①性状試験	無色透明の液体	目視
確認試験	②塩基配列	参照配列と一致	2本鎖の配列解析
	③制限酵素地図試験	理論サイズと一致	電気泳動法
定量試験	④DNA濃度	規定から±10%以内	吸光度(A260)
純度試験	⑤純度試験	既知異性体として含量を95%以上 OC+LN体を分解物とし、SC体の含量を90%以上	HPLC法
	⑥吸光度比(A260/A280)	1.80-1.97	吸光度
	⑦宿主DNA	適合	電気泳動法
	⑧宿主RNA	適合	電気泳動法
	⑨宿主たん白質試験	プラスミドDNAの重量あたり一定量以下	ELISA法
	⑩たん白質含量試験	プラスミドDNAの重量あたり一定量以下	BCA法
不溶性微粒子	⑪不溶性微粒子試験	適合	日局
不溶性異物	⑫不溶性異物試験	適合	日局
pH	⑬pH試験	規定から±10%以内	日局
浸透圧	⑭浸透圧試験	規定から±20%以内	日局
無菌性	⑮無菌試験	適合(菌の増殖なし)	日局
エンドトキシン	⑯エンドトキシン試験	適合(50EU/mg未満)	日局

SC体: Supercoil体(スーパーコイル状のプラスミドDNA)、OC体: Open circular体(開環状のプラスミドDNA)、LN体: Linear体(直鎖状のプラスミドDNA)

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

25年5月31日に、事前面談を平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。
- ・治験薬 GMP 製造を実施するジェノミディア株式会社については、池田ラボラトリーの所在地である独立行政法人産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行う。
- ・また、臨床治験のための治験薬 GMP 製造については、薬事法に基づいて製造を実施すると共に、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（対面助言）を実施すると共に、治験届を提出して規格及び安全性について確認する。
- ・更に、所在地である産業技術総合研究所・関西センターの医工学応用実験倫理委員会、社外委員をメンバーとする社内倫理委員会へ報告する。

C. 研究結果

- 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 DH5 α 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

（倫理面への配慮）

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成を行った。
- ・マスターセルバンクを作成するため、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、バンク作成用チューブ 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)の作成を完了した(図 1、図 2)
 - ・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成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、図 2 に示すように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成した。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

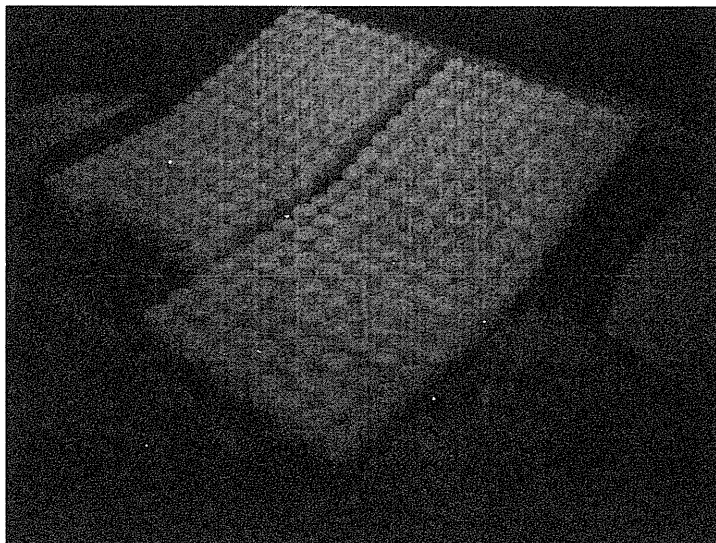


図1. 作成したマスターセルバンク

治験薬 GMP 製造に必要なバンクシステムを構築するため、治験薬 GMP 製造用大腸菌について計 300 本で構成されるマスターセルバンクシステムを作成した。

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成したマスターセルバンクは、大腸菌のセルバン

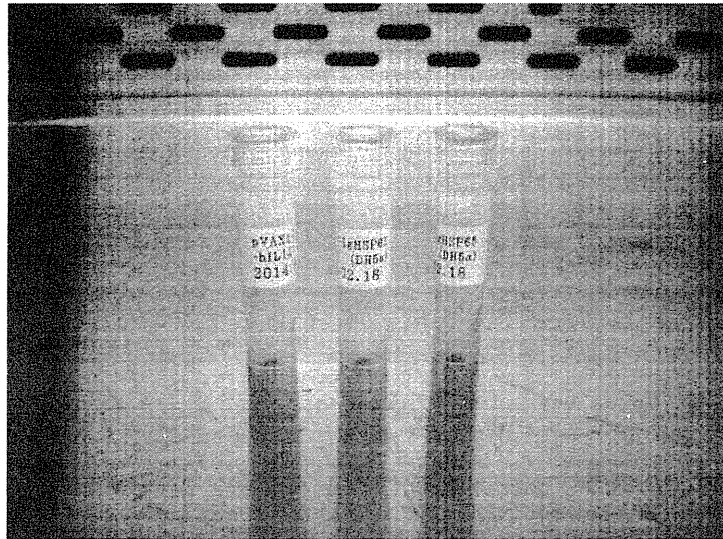


図2 マスターセルバンクの外観とラベル

マスターセルバンクの各チューブに上記ようにラベルを貼付した。

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 (表 1)。

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 (表 1)。

・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

・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、臨床用に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。

続いて作成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、作成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、作成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、作成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

上記のように作成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、実際に作成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、表 2 に記載の通り試験項目、試験方法で暫定規格を設定する方向性で進める事とした。

- ・表 2 に記載した試験のうち、不溶性微粒子試験、不溶性異物試験、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成し手試験を実施した。

- ・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成したマスターセルバンクを使用することから、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 つの試験を実施することが最低限必要であると考えられた。その概要を表 3 と表 4 に示す。今後策定したデザイン案の妥当性について、規制当局である PMDA の薬事戦略相談で相談を行って、最終的に実施する非臨床試験の内容を最終化する予定である。

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。また、アジュバントとして使用する HVJ-E についても、アジュバントとしての臨床応用は国内で初めてとなるため、適切に医師主導治験を

表3. カニクイザルを用いた毒性試験1(案)について:一般毒性+安全性薬理

試験動物	カニクイザル ♂♀
被験物質	pVAX1-IgHSP65-hIL12+ HVJ-E
投与方法 投与期間 観察期間	投与経路：皮内投与 投与期間：2週間 観察期間：投与期間2週間+回復期間2週間
群構成	投与群：♂♀で4群（対照群+3用量） 回復群：♂♀で2群（対照群+1用量）
評価項目	一般状態観察 摂餌量測定 体重測定 血液学的検査 血液生化学的検査 眼検査 尿検査 剖検 器官重量測定 病理組織標本作製及び検査
安全性薬理 （中枢神経系）	FOB：投与前後で実施
抗体価測定	採血を行って抗体価をELISAで測定
備考	投与液の濃度分析及び安定性分析を実施

実施するには規制当局であるPMDAと、治験開始前に密接に相談を行い、開発内容や方向性について合意形成を進める必要がある。

- ・PMDAでは薬事戦略相談の制度があり、医師主導治験の実施内容や、新規医薬品開発に関する個別面談、事前相談、対面助言を実施している。本研究で開発するプラスミドDNAをワクチン成分とする治療用DNAワクチンについては、新規性が高いため、薬事戦略相談の制度を利用し、規制当局と開発内容に関して密接に事前相談しながら医師主導治験の準備を進めることが重要である

と考えられた。

- ・そこで、プラスミドDNAの規格及び安全性と、治験デザインの骨子、非臨床試験のデータパッケージ案について、PMDAの薬事戦略相談・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。当初は、「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」（薬食審査発0527第1号、平成22年5月27日付）、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

表4. カニクイザルを用いた毒性試験2(案)について:安全性薬理試験

試験動物	カニクイザル♂
被験物質	pVAX1-IgHSP65-hIL12+ HVJ-E
投与方法	投与経路：皮内 投与回数：単回
評価	評価時点：投与前と投与後の適切なタイムポイントで評価を実施
群構成	3群（対照群＋2用量）
評価項目 （呼吸器系、 循環器系）	血圧（収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧） 心拍数 心電図（PR間隔、QRS時間、QT間隔、QTc間隔） 呼吸機能（呼吸数、1回換気量、分時換気量） 体温
一般状態	ビデオ撮影により投与前から投与後に、動物の状態を観察し、各評価時点の動物の状態を観察する。
血圧	予めテレメトリー送信機留置手術を行い、術後2週間以上経過後、安定した循環パラメータが得られる個体を選抜する。

おける安全性評価」について（薬食審査発 0323 第1号、平成24年3月23日付）、「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」（薬発第1062号薬務局長通知、平成7年11月15日付、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）を参考にして試験デザイン案を策定していたが、薬事戦略相談の結果、参考となるガイドラインの選定（WHOのガイドラインなども参考にすること）、治験前に実施が必要な動物試験のレベル（GLP、信頼性基準適合）、プラスミドDNAの規格及び安全性と製造レベル（GMP）などについて、適切なコメントを得ることが出来た。そのため、

実施した事前面談でのコメントに従って、非臨床試験デザイン案の改定を行い、より適切な非臨床試験のデータパッケージ案の策定を完了した（表3、表4）。改定した内容については、再度PMDA相談を実施して最終化した上、試験を実施する予定である。

- ・ 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について治験薬GMP製造を行う際に必要な、品質管理項目、工程管理項目の設定に関して、一部追加データの取得を進めることで合意した。これにより、治験届けまでに必要なデータがより

明確になったため、現在追加データの取得を進めている状況である。

- ・ 以上のようにして PMDA の薬事戦略相談を活用し、国内で初めてとなる治験の実施に必要な項目に関して相談を行い、規制当局との合意形成を進めた。これらの成果を活用し、実際に治験を実施することで、引き続き国内のガイドライン策定に向けた準備を進める事とした。

D. 考察

- ・ 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) を作成し、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。
- ・ 作成した 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。

E. 結論

- ・ 開発に関する概要については **図 3** に示すとおりである。治療用の DNA ワクチンの開発は国内で初めてとなるため、規制当局である PMDA の薬事戦略相談を活用して着実に進める計画である。
- ・ また、ICH、米国、WHO のガイドラインを参考にして開発を進めることで、国内の実態に適したガイドラインの策定に繋がりたいと考えている。
- ・ 平成 25 年度の研究結果のまとめと結論は以下の通りである。
 - 1) ICH のガイドライン Q5D に従って GMP レベルで治験薬製造用の大腸菌マスターセルバンク (MCB、pVAX-IgHSP65-hIL12(DH5 α)) システムを構築した。
 - 2) 構築したマスターセルバンク (MCB) については ICH のガイドライン Q5B と Q5D に従って特性解析を実施し、適格性を実証した。
 - 3) MCB を使用してプラスミド DNA (pVAX-IgHSP65-hIL12) の GMP

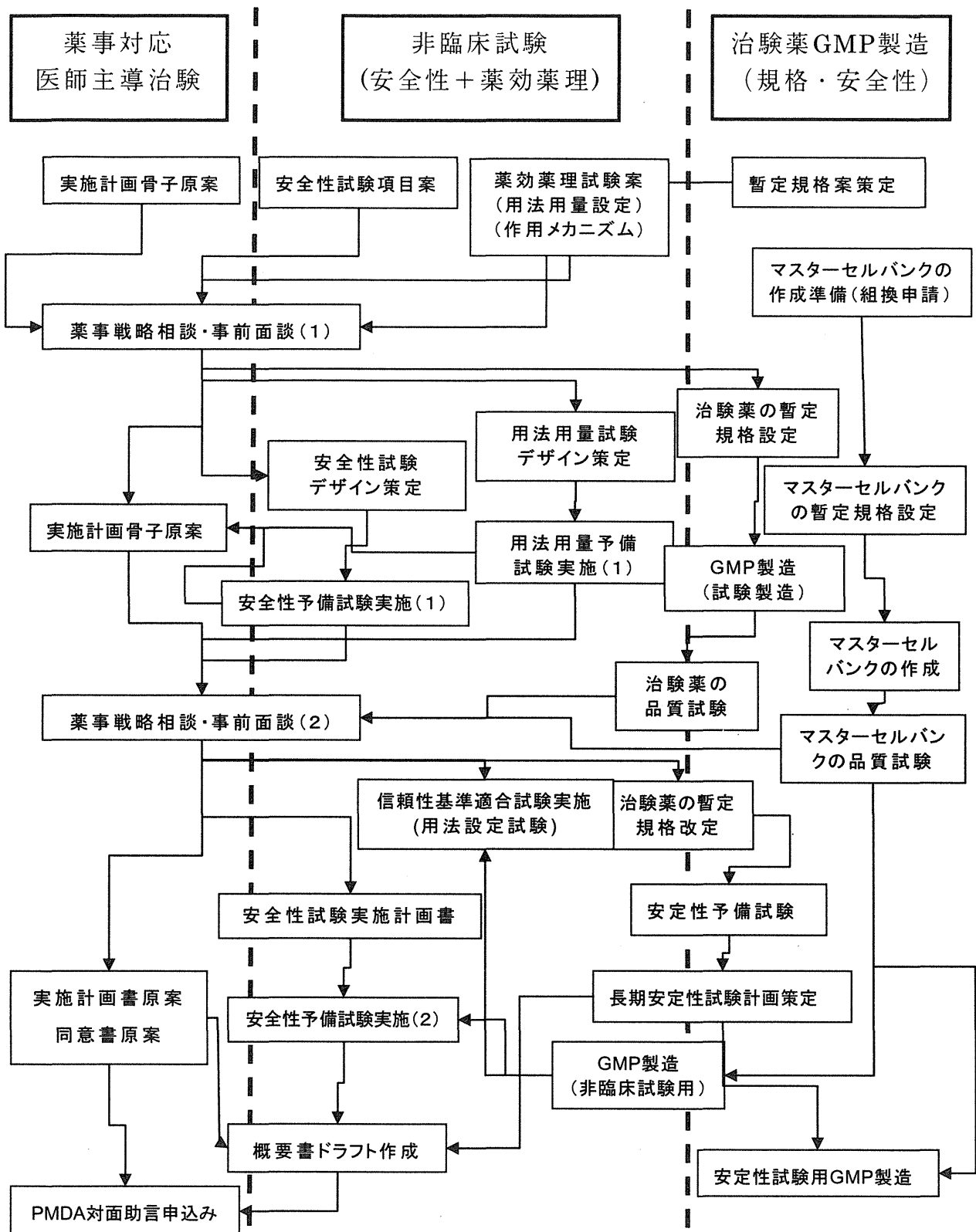


図3. 研究開発内容の概要について