

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）

・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 AMBS 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 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))。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)。

・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 (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。

・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)。

・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)。

・PMDA対面助言

1. PMDA対面助言を計画中。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 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： 毒性・薬効薬理試験項目設定中(中島、三上、井上、岡田)。非臨床試験、品質関連の今後の必要事項確認。臨床治験(第相、first in human治験)の計画について検討中。

・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。近畿中央：7年間55例MDR-TBのうち20例XDR-TB(露口、松本)。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)。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49%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

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。

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 AMB 社に委託して作製した。

これを元に、GMPL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)。

pVAX HSP65 DNA+マウス IL-12 DNA を 70mg 作製した (岡田、井上)。

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。

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 25µg ~ 280µg で投与した。4~6w 後の脾細胞を抗原 Hsp65 蛋白で *in vitro* 刺激し FN-、IL-2、IL-6、TNF (T 細胞免疫能) 産生を ELISA で解析中。DNA 量が 25µg でも FN- 産生を増強しワクチン効果有効。

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。PMDA 対面助言を計画中。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 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)

GMPL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 AMB 社に委託して作製した。

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 GMPL 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 GMPL 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 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))。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 GMPL 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、両方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 GMPL 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。

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。

GLP 毒性試験：サルを用いて試験項目、試験デザインを計画。

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)

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HV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。

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)

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)。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)

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。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49%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)。

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)。

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)

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 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。

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)。

平成25年度は、健康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 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)

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。

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。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。

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)

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。

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。

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。

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）**

岡田、井上とPMDAへの対面助言の手順等考案。

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。

第 相臨床治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）**

結核予防会大阪病院・大阪府立呼吸器アレルギー医療セ・近畿地区の多剤耐性結核の調査・検討開始。

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、庄司、齋藤、松本、熊ノ郷）。

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）**

マウスで本ワクチンの用法・用量予備試験実施。

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。

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）。

新規ワクチン（HVJ-エンベロープ HSP65 DNA + IL-12 DNA）の第 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

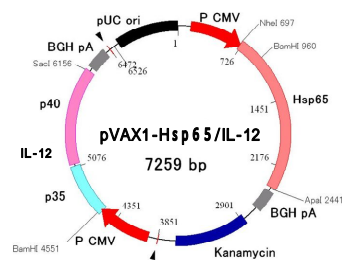
[具体的な研究目的]

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。
結核は世界の三大感染症の一つ 多剤耐性結核菌 (莫大な医療費、治療困難)の増加
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 相臨床治験。



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 相臨床治験の組織
 - (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
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。 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 相臨床治験
4. 評価: 安全性、認容性、 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
 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
 毎年130万人の結核死亡者を治療・救命可能
 医療費節減、国際貢献。
 国民の医療・福祉の向上、厚生行政に寄与。

第 相臨床治験評価

結核治療ワクチン 皮内投与 → 咳痰中の結核菌培養 → 多剤耐性結核菌0個となる 排菌陰性化

研究成果

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)。

.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)。

.PMDA対面助言

1. PMDA 対面助言を計画中。 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
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: 毒性・薬効薬理試験項目設定中(中島、三上、井上、岡田)。 非臨床試験、品質関連の今後の必要事項確認。 臨床治験(第1相、first in human 治験)の計画について検討中。

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

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 µg~280 µg 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 (T細胞免疫能)産生を ELISA で解析中。DNA 量が 25 µg 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。

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。 近畿中央:3 名 MDR-TB のうち 2 名 XDR-TB(露口、松本)。 東京病院:10 年間に 40 名 MDR-TB、死亡者多い(庄司)。 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。

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**
結核は世界の最大感染症の一つ
多剤耐性結核菌 (莫大な医療費、治療困難)の増加
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。

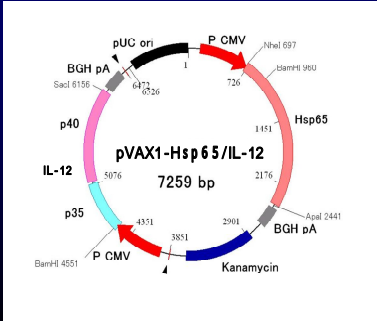


表3

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、齋口)、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

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。
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、齋口、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)：多剤耐性結核菌 排菌陰性化、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 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

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。

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) 日本での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 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) 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。

CH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、CH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、破砕し、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)]に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 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）：多剤耐性結核菌 排菌陰性化。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 2 株（VR-105 para influenza 1 Sendai/52）を用い、有精鶏卵で増殖させ、紫外線（9mJ/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-E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-E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 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、ソフト面で様々に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列を対象として、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AMB 6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DH5 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 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30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)の作製を完了した。

マスターセルバンク(pVAX1-IgHSP65-hIL12/DH5)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、CH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GMPL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GMF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GMF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GMF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GMFパイロットプラント内で製造を実施した。治験薬GMF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。

GMF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GMF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

試験を実施することが最低限必要であると考えられた。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のバイオ医薬品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（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。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。

(3) GMPL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)(表8)。

(4) pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNAを70mg作製した(岡田、井上)(表9)。

(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(表10)(図2、3、4、5、6、7、8、9)。

(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25µg~280µgで投与した。4~6w後の脾細胞を抗原Hsp65蛋白でin vitro刺激しFN-、IL-2、IL-6、TNF(T細

胞免疫能)産生をELISAで解析中。DNA量が25μgでもIFN-産生を増強しワクチン効果有効(図5、7、8、9)。

(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(図2、5、6)。

(8)PMDA対面助言を計画中。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 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(表11)

(9)HVJ-Eへの遺伝子封入効率は15%程度であった。希釈しないF抗血清とHVJ-Eを混合し、37度で30分インキュベートして、HEK293細胞にかけルシフェラーゼ遺伝子発現を調べた。コントロールとしてPreimmune serumを用いた。Preimmune serumを用いた場合の遺伝子発現は約90%であったが、F抗血清の場合は、0になった。抗血清を4倍希釈すると約10%の遺伝子発現であった。次に、F抗血清とHVJ-Eを混合し、インキュベートなしに直接HEK293細胞に作用させた。ルシフェラーゼ遺伝子発現は全く阻害されなかった。マウスの骨格筋での遺伝子発現については、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48時間後の遺伝子発現は、遺伝子未封入のHVJ-Eの連続投与した場合の遺伝子発現と比較して、有意差のない同じ値が得られ、抗HV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(金田)。

(10)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に着手した。マウスを用いた細胞性免疫、液性免疫双方の測定基盤の立ち上げ。関連施設連携を行った(熊ノ郷)。

(11)NHO茨城東病院MDR-TB症例は男性9例、女性1例の10例、平均年齢57.2歳(34歳~86歳)、日本人9例(1例、インドネシア在住30年)、韓国人1例であった。それらの予後は、生存2例(1例肺切除、1例内服加療)、死亡5例(全例、切除できず)、不明3例であった。MDR-TBは6例で超多剤耐性結核(以下、XDR-TB)は4例であった。

複十字病院例については、221例で、性別は男性

150例、女性71例で、一般の結核症例と男女差は見られなかった。平均年齢は47.8歳(range18歳~99歳)であった。国籍は、日本人164例、中国人25例、韓国人10例、その他のアジア16例、その他の地域6例であった。多剤耐性結核のうち、XDR-TBは32例でXDR以外は189例であった。2013年11月現在の予後は、治癒107例(うち3例は治癒後再発再治療治癒、1例は転出-母国帰国後再入国時再発有再治療治癒)、死亡27例(うち10例は菌陰性化ののち死亡)、治療失敗入院中2例、菌陽性転出7例、菌陰性転出51例、治療中断10例、順調に治療中15例、不明2例であった(齋藤)。

(12)平成25年度の実施状況としては、大阪大学医学部府附属病院内に、健常人に対する臨床試験専用病棟を設置し、健常人を対象とするPETマイクロドーズ臨床試験及びマラリアワクチンのフェーズI医師主導試験の経験を結核ワクチン開発に応用する(朝野)。

(13)近畿中央胸部疾患センター(2006年1月~2012年12月)の多剤耐性結核症例55例の平均年齢は58.9歳で、男性37例、女性18例であった。初回治療例が26例、既治療例が29例であった。55例中、超多剤耐性結核(XDR-TB)例は20例であった。治癒は22例、排菌陰性化は17例、治療失敗は3例、結核死は9例、非結核死は2例、脱落は2例であった。治癒+排菌陰性化を治療成功とすると、全体の治療成功率は70.9%であったが、XDR-TB例での治療成功率は45%にとどまった。手術を行った例は14例あり治療成功率は92.9%であった(露口)。

(14)アンケートを作成(年齢、性別、罹病期間、薬剤感受性、手術歴、排菌陰性化の有無、入院年数)を行い関西圏の結核病棟を有する病院に依頼する。初年度は、近畿中央胸部疾患センター、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、結核予防会大阪病院に関して行った。

2000~2001年には45人を上回っていた大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターの多剤耐性結核排菌の患者数は徐々に減少し2011年には15人になった。

2004年から2009年まで大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターの新規MDR-TB患者数をみると13名から5名へ減少。XDR-TB患者数は、2004年が7名で、2008年は1名、2009年は0と減少した。

また、DNAワクチン投与対象患者は、大阪府結核予防会大阪病院では0であったが、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおいては結核診断から15年以上たったADL良好なXDR-TB患者を少なくとも1名確認出来た（松本）。

(15) 2004年～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。性別は、男性33名、女性7名であった。多剤耐性結核治療後の退院時の転帰別にみると、治療完了9名、治療中断脱落1名、死亡7名（退院後の死亡は含まず）、転出（帰国含む）10名、治療継続8名（内3名は後に死亡、他の5名は東京病院で治療中あるいは観察中）、現在東京病院入院中1名、不明4名（計40名）であった（庄司）。

表7

平成25年度 研究進捗状況

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) を分担研究者中島俊洋と共にAMBiS社に委託して作成した。

表8

平成25年度 研究進捗状況

2. これを元に、GMPレベルのpVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAを100mg作成(バッチで)。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。

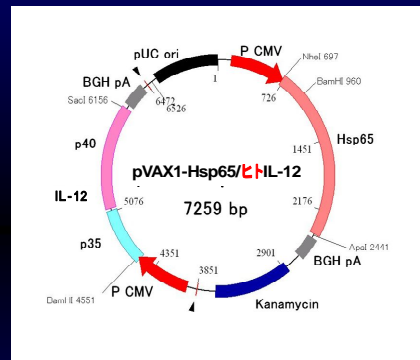


表9

平成25年度 研究進捗状況

3. pVAX/HSP65 DNA+ **マウス**IL-12 DNAを作成した。
(70mgを作成した)

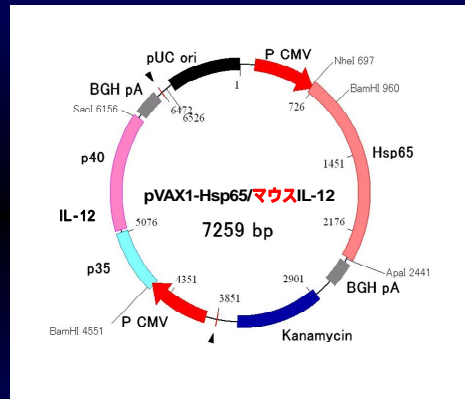


表10

平成25年度 研究進捗状況

4. 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実施中。
井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と共同研究で実施中。

平成25年度 研究進捗状況

5. PMDA対面助言を計画中。
中島俊洋、井上義一、岡田全司
が打ち合わせ
(会議:当臨床研究センター)
2013年10月21日
三上礼子、井上義一、岡田全司
が打ち合わせ
(会議:当臨床研究センター)
2013年10月22日

用法検討 (DNAワクチン投与回数検討)

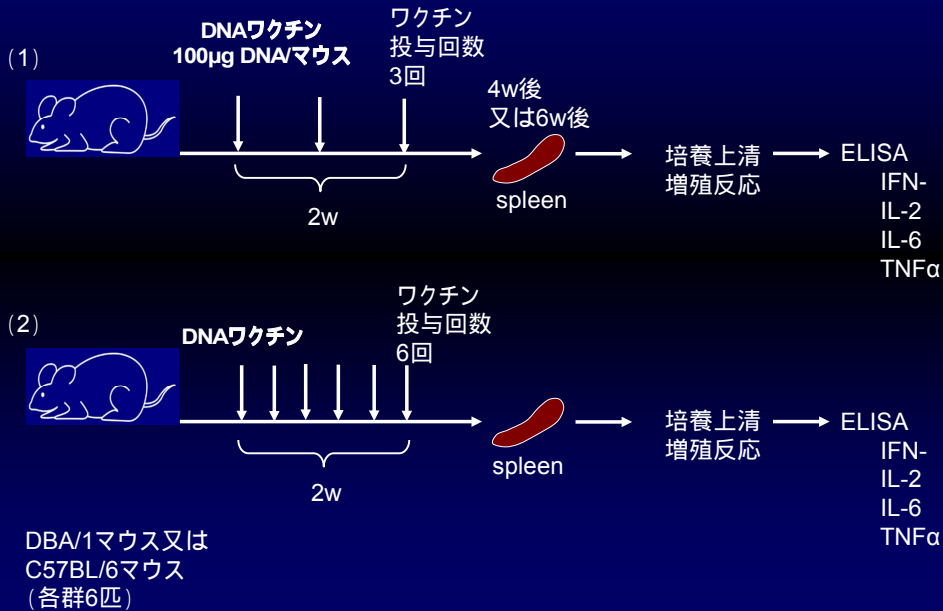
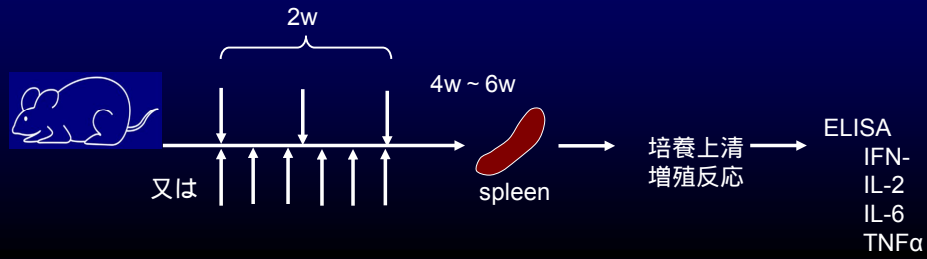


図2

用量検討(DNAワクチン投与量検討)

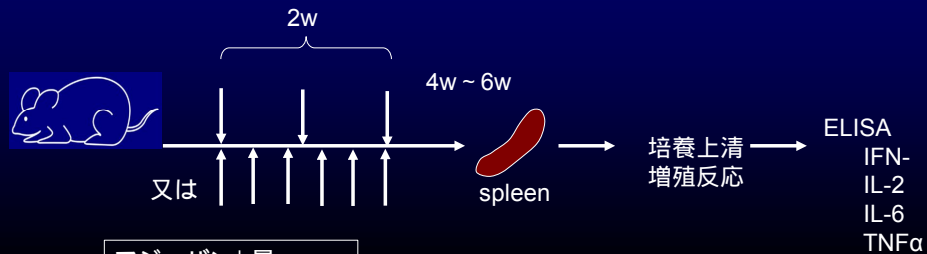


DNA投与量	0	μg/マウス
	25	
	100	
	280	

アジュバント量	0	mNAu
	100	
	400	
	1120	

図3

用量検討(アジュバント添加量)



アジュバント量

pDNA最適用量が280μgのとき:

70, 280, 1120 mNAu

pDNA最適用量が100μgのとき:

100, 400, 1600 mNAu

pDNA最適用量が25μgのとき:

100, 400, 1600 mNAu

図4

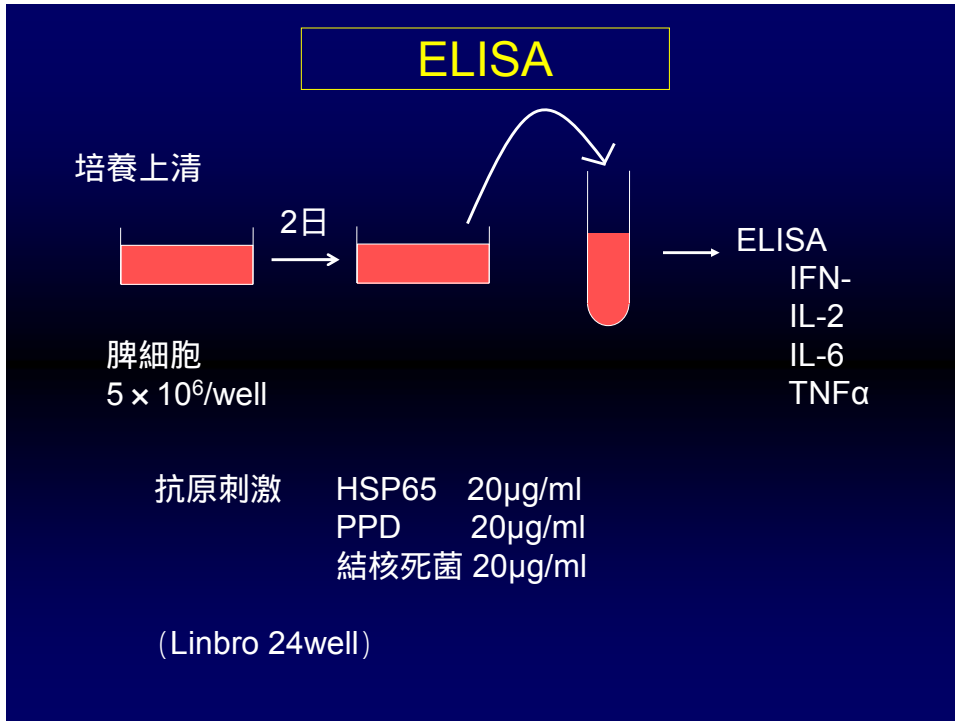


図5

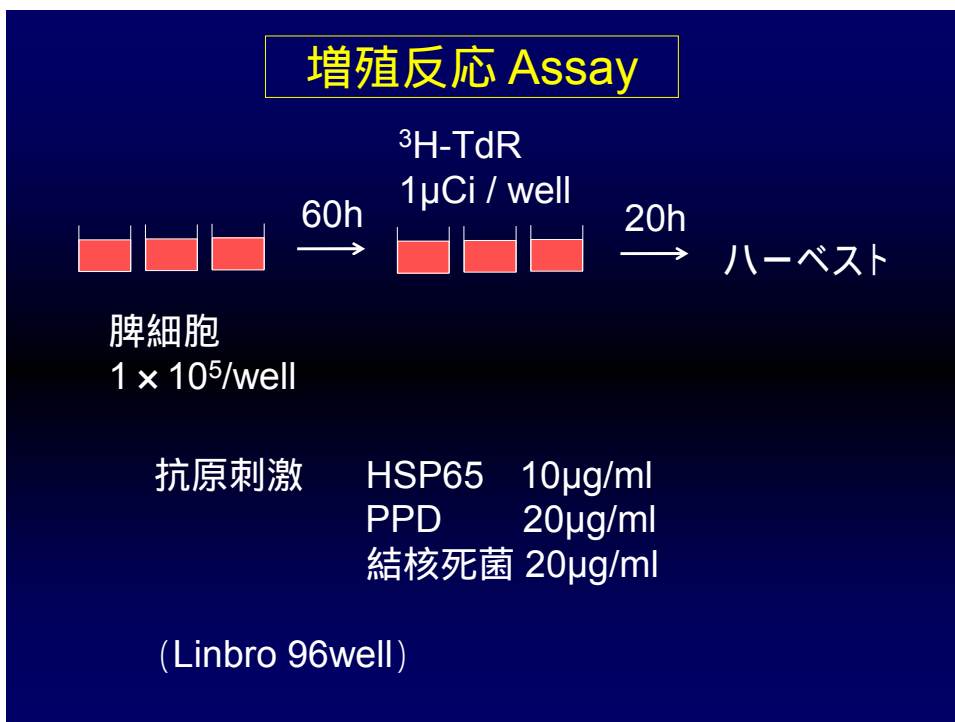


図6

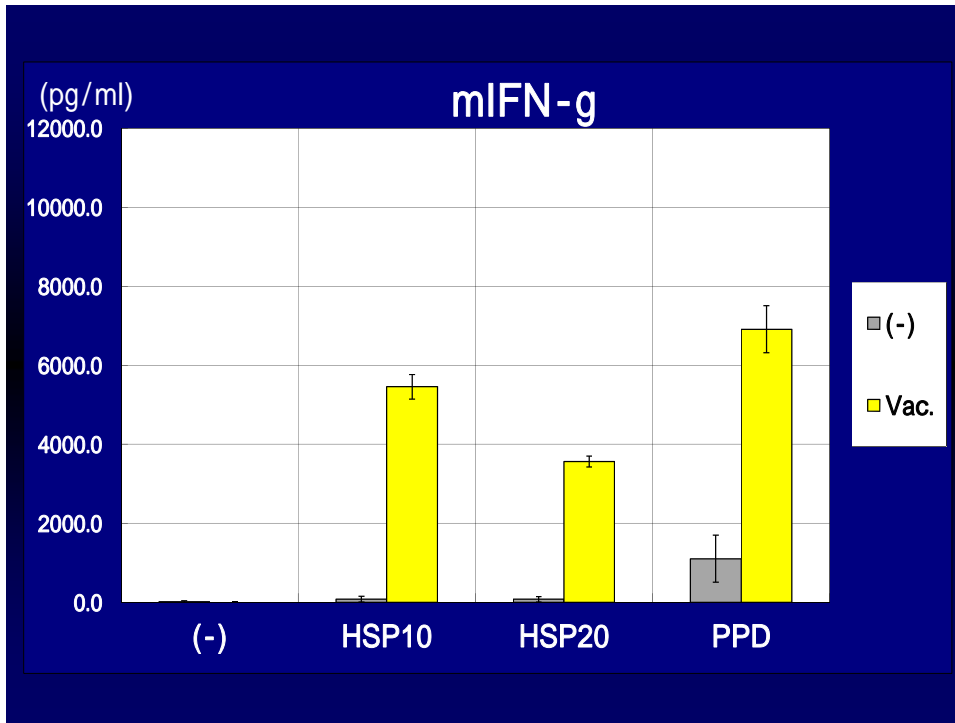


図 7

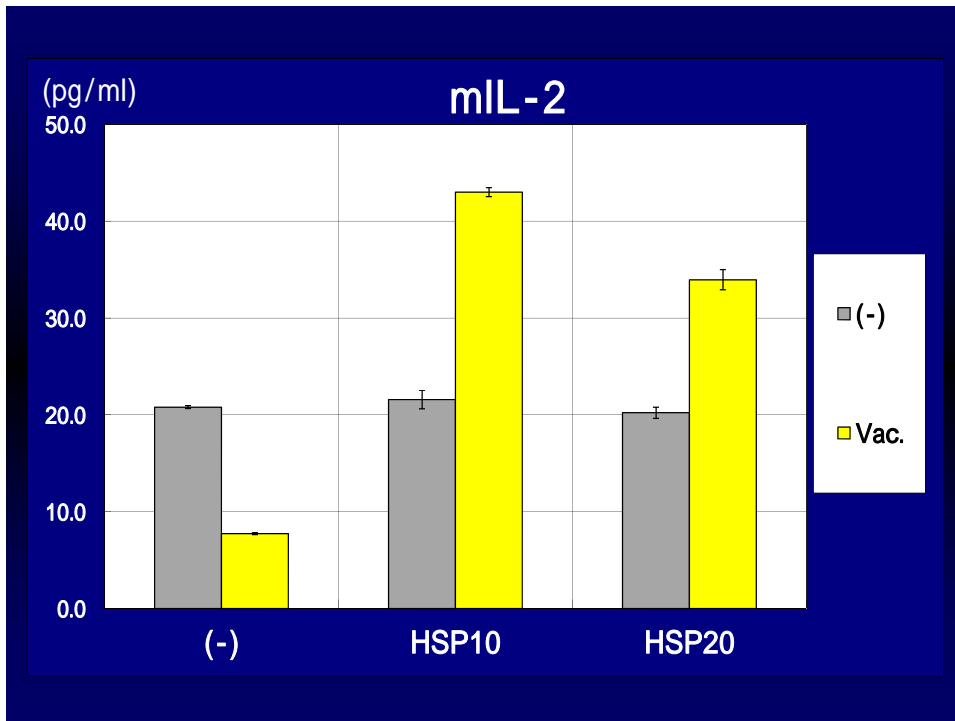


図 8

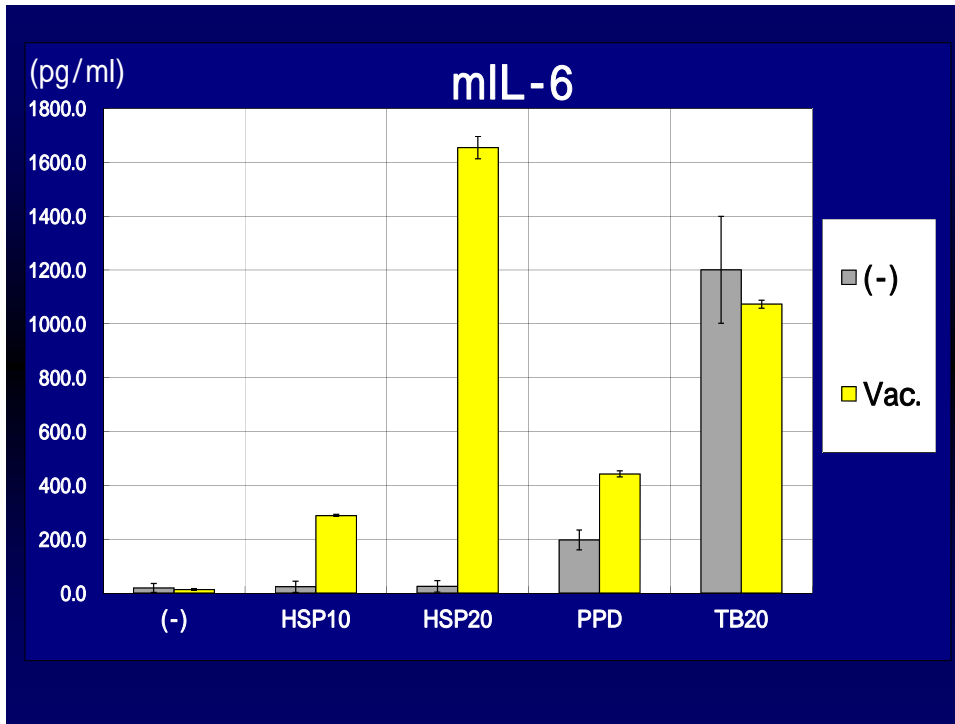


図 9

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。

・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 (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。

・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 相医師主導治験評価(図10) 結核ワクチン皮内投与

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

・特色・独創的な点

1. 有効性の実証(図11、12)

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、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)

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)

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

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

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
(RG-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のように、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HV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-E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。

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(AMB 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)

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

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

4. 承認取得までのロードマップ

1年半程度でRB承認取得、できれば治験届まで進め、3年目に第1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1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NH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;

NH、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、中国からの多剤耐性結核が多いのは、十分に予測されることである。

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D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）。

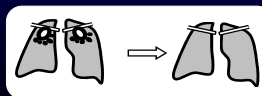
11. 多剤耐性結核は、臨床的に重要な疾患病態であるが、患者数は多くない。来年度から本研究の主眼である医師主導治験の第Ⅰ相が開始されるが、研究を成功に導くための適格症例の確保が重要である（庄司）。

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)



第1相医師主導治験評価

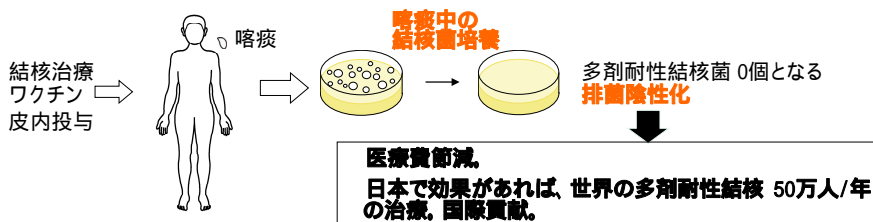


図10

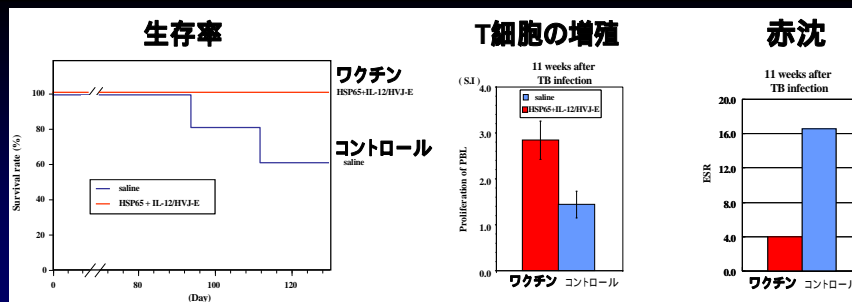
特色・独創的な点

1.有効性の実証

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-エンベロップ/Hsp65 +IL-12 DNAワクチンの治療効果

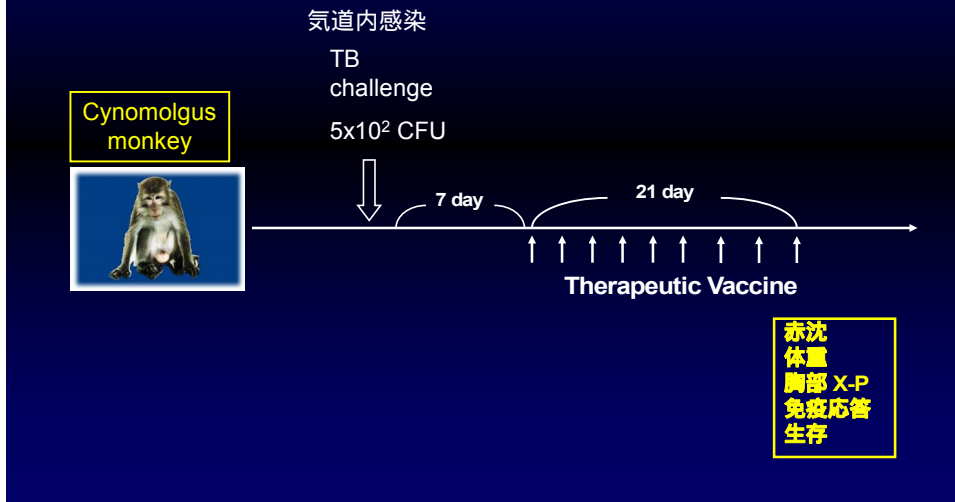


図 1 2

〔方法〕

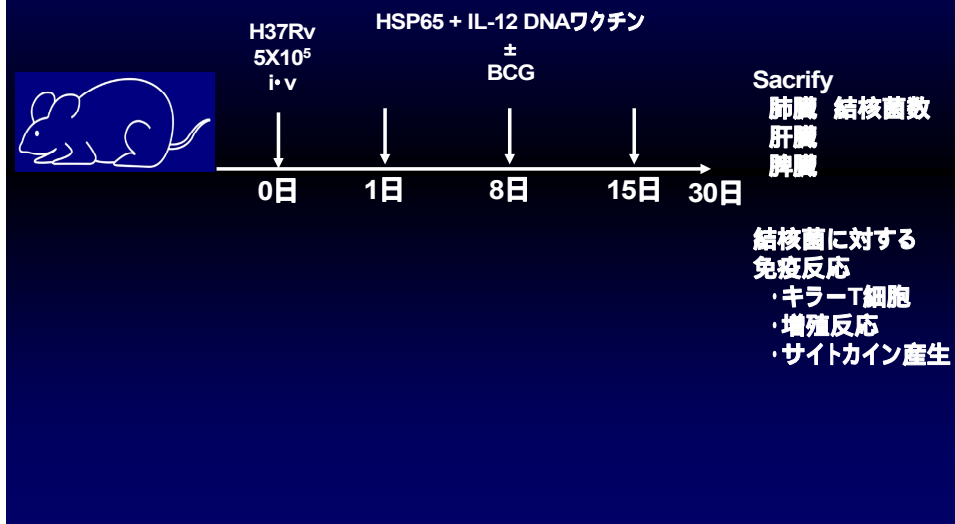


図 1 3

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

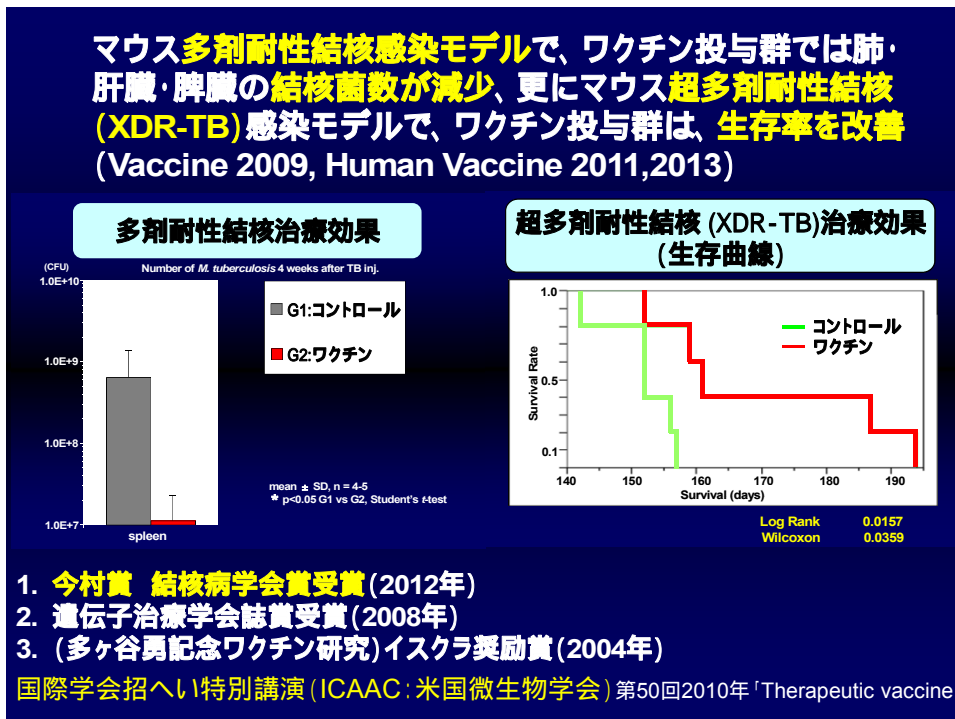


図 1 4

表 1 3

特色・独創的な点

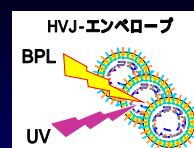
2. 医師主導治験の実施に向けた準備状況

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

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

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



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

表 1 4

特色・独創的な点

3. 明確な出口戦略

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**

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

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.
8. Okada M, et al. Vaccine. 2007.
9. Yoshida S, et al. Vaccine. 2006.
10. Kita Y, et al. Vaccine. 2005.

承認取得までのロードマップ



図 15

予定される治験の流れ

- 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

多剤耐性結核患者 (INH耐性 + RFP耐性)

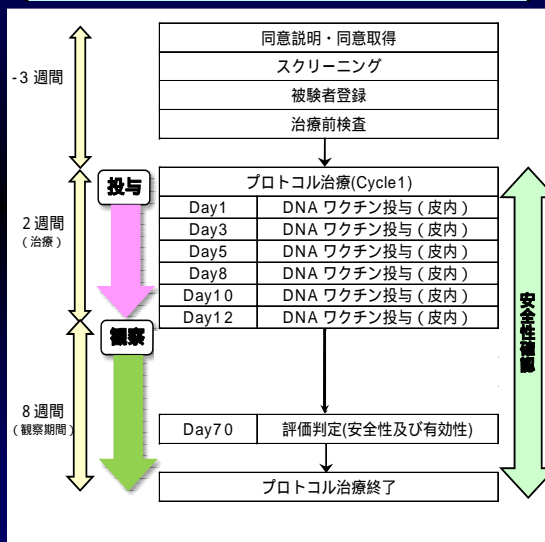


図 16

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。

本剤の医師主導治験実施体制(安全性・忍容性・有効性の検証)

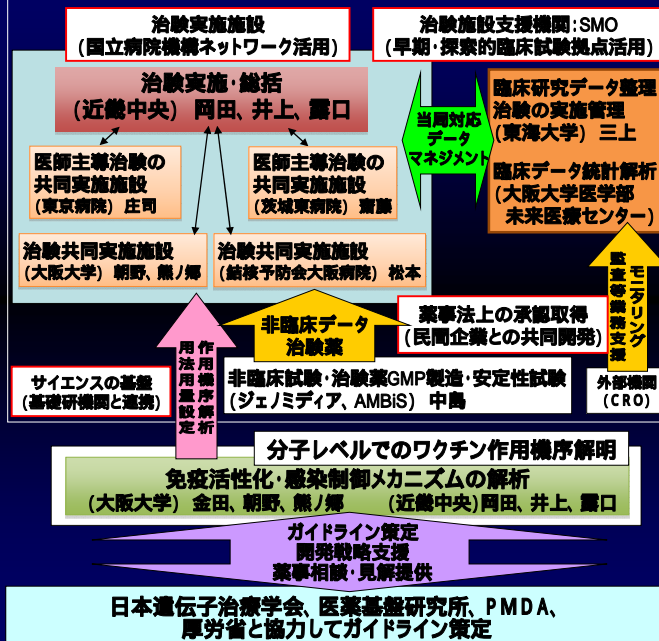


図 17

E. 結論

．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AMB 6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 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、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))。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)。

．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25μg~280μg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-、IL-2 IL-6 TNF(T細胞免疫能)産生をELISAで解析中。DNA量が25μgでもIFN-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。

．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)。

．HVJ-エンベロープのアジュバント効果

HVJ-日是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)。

．PMDA対面助言

1. PMDA対面助言を計画中。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 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: 毒性・薬効薬理試験項目設定中(中島、三上、井上、岡田)。非臨床試験、品質関連の今後の必要事項確認。臨床試験(第相、first in human試験)の計画について検討中。

・多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けた計画

1. 多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けた計画を行った。近畿中央: 3名 MDR-TBのうち2名XDR-TB(露口、松本)。東京病院: 10年間に40名MDR-TB 死亡者多い(庄司)。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

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。

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AMB 社に委託して作製した。これを元に、GMPLレベルのpVAX/HSP65

DNA+ヒトIL-12 DNAを100ng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)。

pVAX/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNAを70ng作製した(岡田、井上)。

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。

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25μg~280μgで投与した。4~6w後の脾細胞を抗原Hsp65蛋白でin vitro刺激しFN-、IL-2、IL-6、TNF(T細胞免疫能)産生をELISAで解析中。DNA量が25μgでもFN-産生を増強しワクチン効果有効。

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。

PMDA対面助言を計画中。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 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)

ICHのガイドラインQ5Dに従ってGMPL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))システムを構築した。

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。

MCBを使用してプラスミドDNA(pVAX-IgHSP65-hIL12)のGMF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。

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して、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。

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。

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**

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ため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ため連続投与が可能である。

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)**

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)。

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)**

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。

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)。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)**

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 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。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)。

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、現在マリアワク

チンに関するフェーズ 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)**

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。

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。

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。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)**

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。

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。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。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）

岡田、井上とPMDAへの対面助言の手順等考案。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。第 相臨床治験の計画を検討中である。

・研究分担者（松本智成）

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。

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、庄司、齋藤、松本、熊ノ郷）。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（熊ノ郷博）

マウスで本ワクチンの用法・用量予備試験実施。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。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）。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masaji Okada, Yoko Kita, Toshihiro Nakajima, Satoshi Hashimoto, Hitoshi Nakatani, Shino Nishimatsu, Yasuko Nishida, Noriko Kanamaru, Yasuhumi Kaneda, Yasushi Takamori, David Murray, Esterlina V. Tan, Marjorie L. Cang, Paul Saunderson, E. C. De la 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, Satoshi Hashimoto, Toshihiro Nakajima, Hitoshi Nakatani, Shino Nishimatsu, Yasuko Nishida, Noriko Kanamaru, Yasuhumi Kaneda, Yasushi Takamori, David Murray, Esterlina V. Tan, Marjorie L. Cang, Paul Saunderson, E. C. De la 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, Murray D, Inoue Y, Tomono K, Kumano 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.

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状 況 (予定を含む)

1. 特許取得

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. 実用新案登録

なし

3. その他

なし