

- 先端バイオ医薬品規制に関する研究 -

研究分担者：内田恵理子（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第一室長）

研究要旨

先端バイオ医薬品規制に関する研究として、今年度はプラスミドDNAワクチンの開発と規制の国際動向について調査を行った。臨床開発動向としてClinicalTrials.govに登録されている臨床試験を分析した結果、プラスミドDNAワクチンは感染症の予防・治療用製品と、がん治療用製品に大別され、治療用と予防用の比率はほぼ1:1であった。規制の現状としては、欧米では感染症用のプラスミドDNAのみワクチンとして規制し、その他の治療用プラスミドDNAは遺伝子治療製品として区別されているが、両者に本質的な違いはない。日本ではプラスミドDNA製品は感染症用の製品でも遺伝子治療製品としている。FDAの感染症に対するプラスミドDNAワクチンのガイダンスを基に、製造で明らかにすべき点や実施すべき試験、非臨床試験としての安全性や免疫原性の評価法、生体内分布と持続性試験、染色体組込試験を実施すべき要件等、感染症に限らず免疫誘導を目的とするプラスミドDNAワクチンの品質、安全性確保の観点で考慮すべき事項を考察した。

キーワード：プラスミドDNAワクチン、がんワクチン、遺伝子治療製品

A．研究目的

本研究は、遺伝子治療製品や細胞治療製品等の先端バイオ医薬品の品質、有効性、安全性確保のための規制の国際調和の推進に関わる研究を行うことを目的としている。これら先端バイオ医薬品は、従来の化学薬品やバイオ医薬品とは異なる構造・特性・生物活性・作用機序を持つものであり、品質、有効性、安全性確保には従来の医薬品とは異なる視点が必要である。またこれら医薬品の開発・実用化の促進には規制の国際調和が必要である。

昨年度は、遺伝子工学技術を用いたがん免疫療法用製品、特にがん免疫療法に用いられる遺伝子改変細胞製品を中心に、国内外の開発動向と規制状況を調査した。今年度は、がん免疫療法にも用いられるプラスミドDNAワクチンの開発と規制の国際動向について調査を行った。なお、「ワクチン」という用語は、本来は感染症の予防用の製品に用いられるが、

ここでは広く免疫誘導を目的とする製品としての広義の「ワクチン」を対象とした。

B．研究方法

プラスミドDNAワクチン製品の開発動向は米国国立衛生研究所（NIH）の治験データバンクClinicalTrials.govに登録されている治験プロトコルを中心に、関連する書籍や論文等を調査・分析した。規制動向は、米国食品医薬品局（FDA）および欧州医薬品庁（EMA）のHP情報を中心に調査した。

（倫理面への配慮）

本研究は調査研究であり、倫理面への配慮が必要な試料・資料の取り扱いはない。

C. 研究結果及び考察

1. プラスミドDNAワクチンの開発動向

1.1 プラスミドDNAワクチンの定義

「プラスミドDNAワクチン」とは、遺伝子組換え技術により抗原をコードするDNAを搭載したプラスミドDNAのことを指す。通常のワクチンは、抗原となる病原体、あるいは抗原となるタンパク質・ペプチドを投与して、生体内での免疫誘導を目的とするものであるが、「プラスミドDNAワクチン」は生体内に導入した遺伝子から抗原が発現されることにより免疫誘導を行うものである。抗原を一定期間発現し続けることにより、従来ワクチンよりも高い免疫応答の誘導が期待される。また、生ワクチンや不活化ワクチンと比べて安全性が高く、製法が簡単でコストがかからず、保存・備蓄も容易という利点がある。

プラスミドDNAは安全性の高い遺伝子治療製品として開発が行われているが、プラスミドDNAワクチンとプラスミドDNAを用いた遺伝子治療製品とはプラスミドの構造に違いがあるわけではない。遺伝子治療用製品は、治療用の目的遺伝子がプラスミドに組み込まれており、体内で目的遺伝子が発現することで治療を行うものである。目的遺伝子として抗原遺伝子を使用し、免疫誘導を目的としたものがプラスミドDNAワクチンであり、プラスミドDNA製

品の一形態としてプラスミドDNAワクチンが含まれると考えられる。

1.2 プラスミドDNAワクチンの臨床開発の現状

NIHの治験データバンクClinicalTrials.govに登録されている治験プロトコルを中心に開発動向を調査した。プラスミドDNAワクチンは、単に「DNAワクチン」と呼ばれることも多いが、「DNAワクチン」にはDNAウイルスベクターが含まれる場合もあることから、今回の調査対象は「plasmid DNA vaccine」に限定した。その結果、「plasmid DNA vaccine」でヒットした臨床試験の登録総数は97件であった。対象疾患の分類としては感染症の予防・治療用ワクチンが73件、がんの治療用ワクチンが20件であり、その他としてスギ花粉アレルギーに対するワクチンが登録されていた（Fig.1）。ワクチンの主目的で分類すると、治療用ワクチンと予防用ワクチンの比率はほぼ1:1となった（Fig.2）。臨床開発段階としては大部分がPhase 1であり、Phase 3の登録はまだなく、開発は初期段階であることが明らかとなった（Fig.3）。

臨床プロトコルについてさらに詳しく分析した。感染症ワクチンではヒト免疫不全ウイルス（HIV）を対象とするものが44件と半数以上を占め、次いでインフルエンザウイルス（パンデミックインフルエンザ及び季節性インフルエンザ）の13件であり、そ

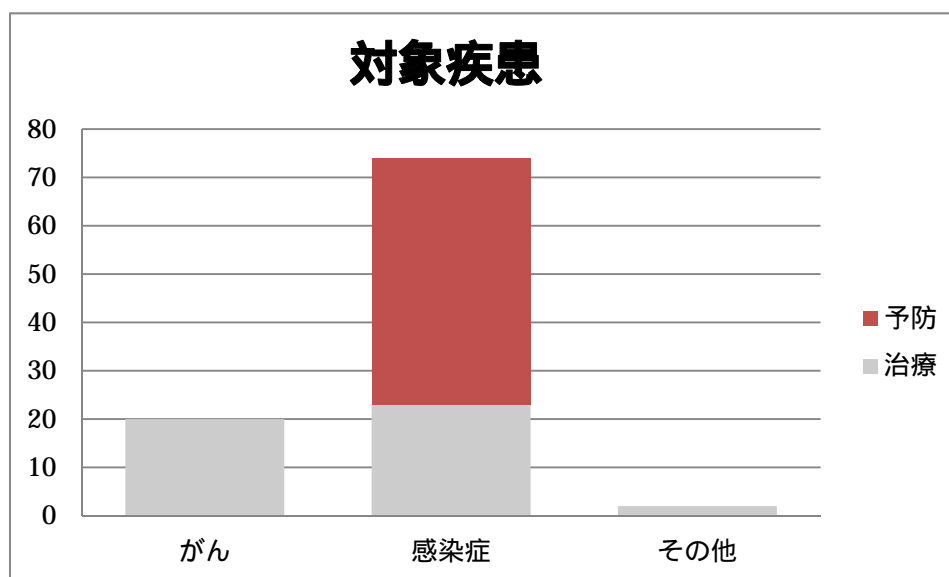


Fig.1 プラスミドDNAワクチンの対象疾患
(ClinicalTrials.gov登録数)

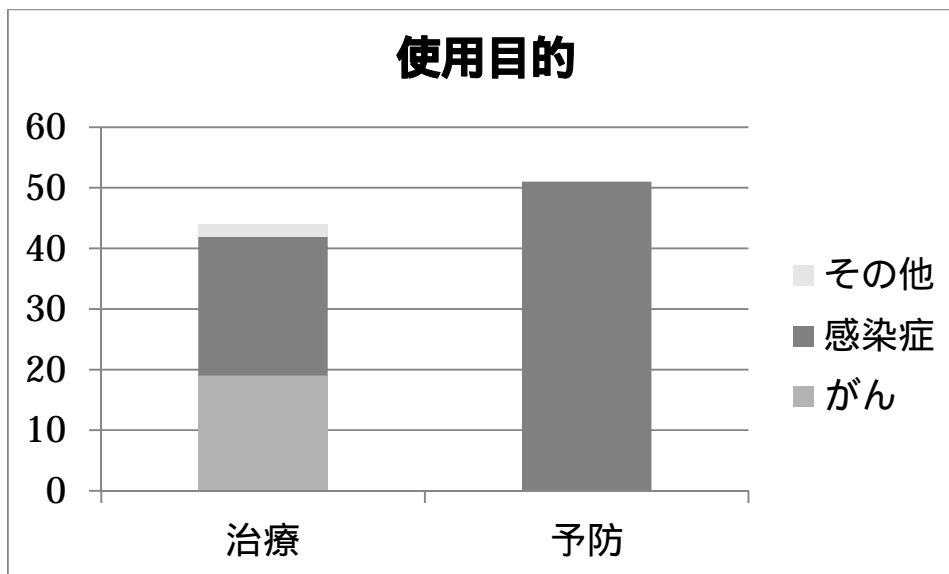


Fig.2 プラスミドDNAワクチンの使用目的
(ClinicalTrials.gov登録数)

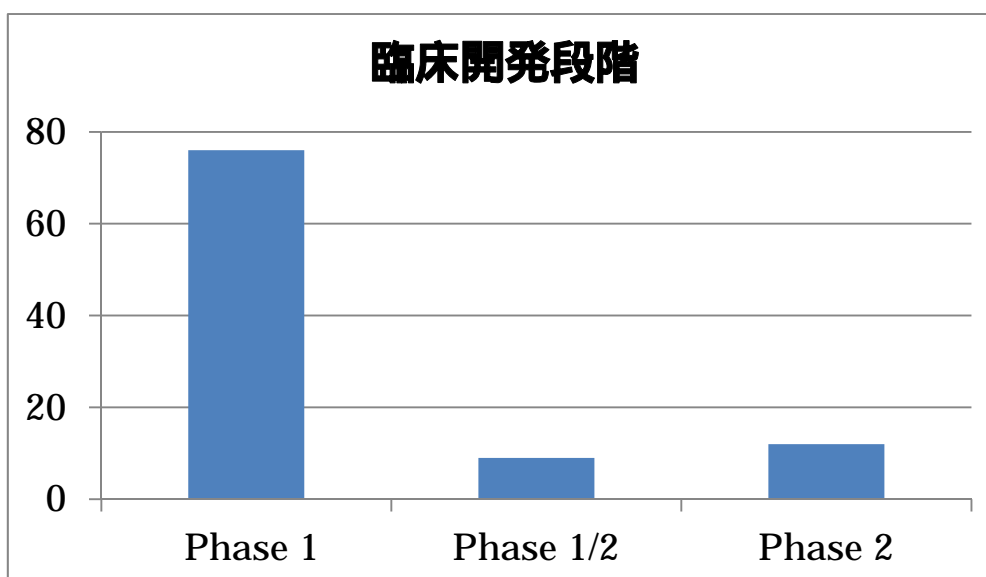


Fig.3 プラスミドDNAワクチンの臨床開発段階
(ClinicalTrials.gov登録数)

の他の感染症はいずれも5件以内だった (Fig.4)。HIVワクチンは、予防を目的とするものと治療を目的とするものの両方が含まれていた。HIV以外では、B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、ヒトパピローマウイルス (HPV) といった慢性の感染症に対する治療用ワクチンが開発されている。一方、インフルエンザやエボラなどの急性感染症には予防用ワクチンとしての開発が進められている。一方、がんの治療用ワクチンで対象とされるがん種で

は、メラノーマが6件で1 / 3近くを占めていた (Fig.5)。

登録されている臨床試験の実施地域を見ると、北米が2 / 3を占め、その大部分が米国での実施であるが、アフリカや中南米などの発展途上国でも相当数の臨床試験が行われており、先進国を中心として臨床試験が実施されている遺伝子治療とは大きな違いが見られた (Fig.6)。

プラスミドDNAワクチンに導入されている遺伝

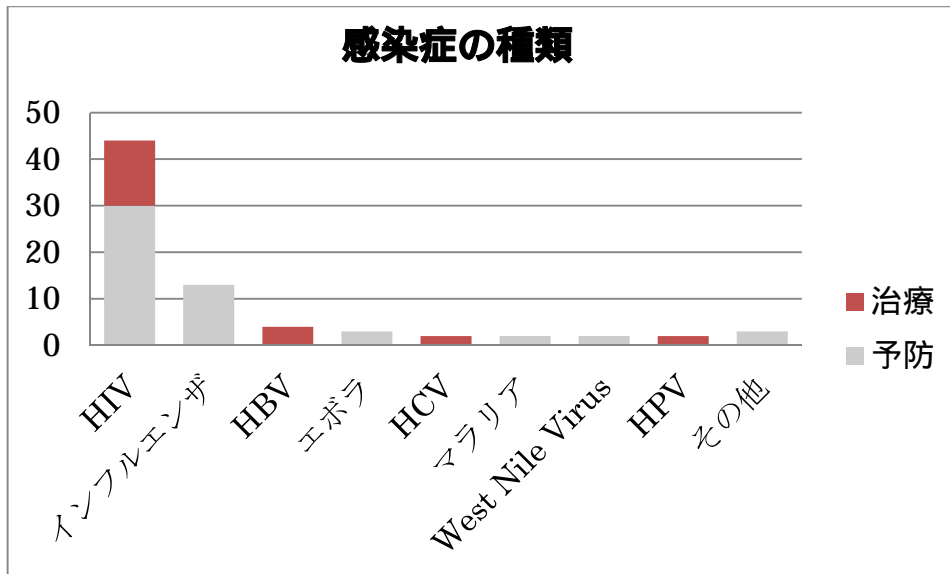


Fig.4 プラスミドDNAワクチンが対象とする感染症の種類
(ClinicalTrials.gov登録数)

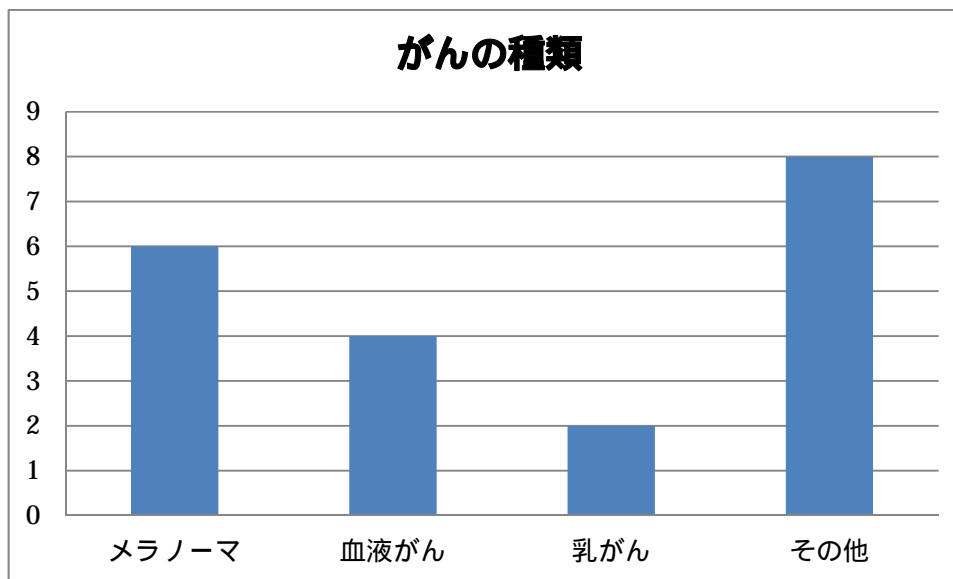


Fig.5 プラスミドDNAワクチンが対象とするがんの種類
(ClinicalTrials.gov登録数)

子や投与方法については、詳細な情報が入手できないものも多く、統計的に数値を示すことはできないが、明らかになった範囲では次のような傾向が認められた。使用される遺伝子としては、病原体の抗原タンパク質・ペプチド抗原をコードする遺伝子やがん抗原が用いられており、異なる抗原をコードした複数のプラスミドを混合した多価のワクチンとしての開発例が多い。また、がん治療用ワクチンでは、がん抗原としてヒトの遺伝子のかわりに異種の相同遺伝

子を用いる例、たとえばヒトのCD20のかわりにマウスのCD20を抗原とする例がいくつか認められた。これは、ヒトと相同の異種抗原を用いることで、CD8⁺ T cellが誘導されるという治験に基づいた手法である。また、免疫を増強するためのサイトカイン遺伝子を組み込んだプラスミドを単独、もしくは他のプラスミドとの併用で用いる例もある。

生体への導入方法としては、プラスミドDNAは遺伝子導入効率が低いですが、筋肉内投与ではnaked DNA

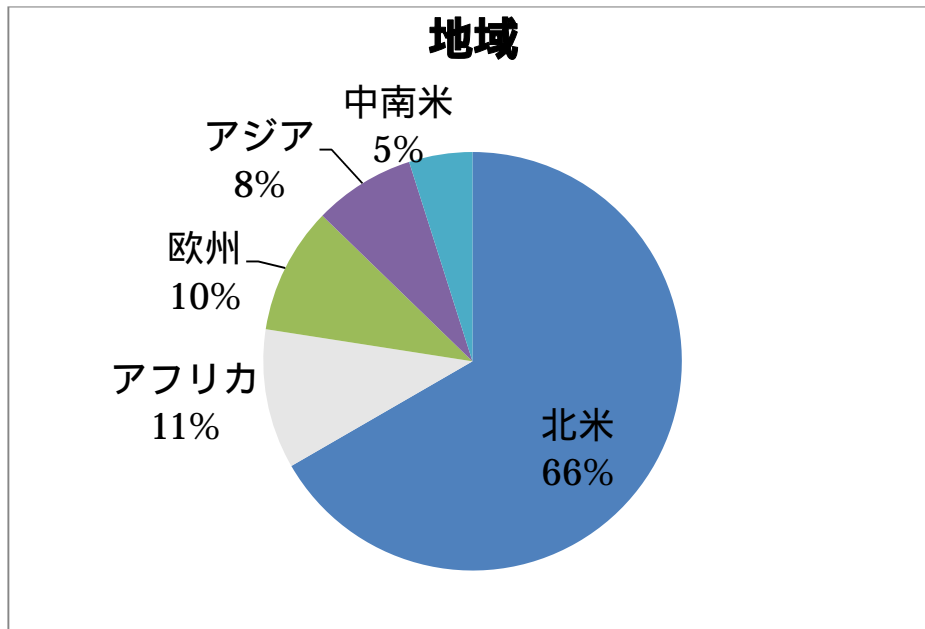


Fig.6 プラスミドDNAワクチンの臨床試験実施地域
(ClinicalTrials.gov登録数)

でも取り込まれて発現することが知られ、筋肉内の直接投与が多く用いられている。また、アジュバントを用いたり、カチオン性脂質やエレクトロポレーション、金コロイド粒子を用いたニードルフリー・インジェクション法等のドラッグデリバリーシステム(DDS)も多く利用されている。

プラスミドDNAワクチンの投与方法として、時期を変えて異なる種類のワクチンを投与することにより免疫原性の増強を行う方法であるプライム・ブースト(prime-boost)法が用いられる例も見られた。これにはDNAワクチンとワクシニアウイルスベクターやアデノウイルスベクターなどの組み合わせが用いられている。このような使用法は遺伝子治療にはないワクチン独自の方法である。

1.3 日本の現状

「plasmid DNA vaccine」でヒットした臨床試験97件には、日本で実施されている臨床試験は含まれていなかった。しかし、実際には日本で初めてのプラスミドDNAワクチン(開発コード:ASP0113)の臨床試験が実施中である。ClinicalTrials.govで検索したところ、この臨床試験は「plasmid DNA vaccine」ではなく「vaccine」として登録されていることが確認された。ASP0113はがん患者への造血細胞移植後の

サイトメガロウイルス(CMV)の感染抑制を目的としたワクチンである。日本ではワクチンとしてではなく、遺伝子治療用医薬品としての確認申請が提出され、治験前の品質及び安全性の確認が厚生労働省により行われた。2012年6月25日の薬事・食品衛生審議会生物由来技術部会議事録およびアステラス製薬のプレスリリースによると、本品目はCMV抗原であるリンタンパク質pp65と糖タンパク質gBの2種類の遺伝子をそれぞれ組み込んだ2種類のプラスミドDNAを主成分とする2価ワクチンである。組成としては2種類のプラスミドDNAとブロック共重合体であるポロキサマー、陽イオン界面活性剤である塩化ベンザルコニウムの3者からなる複合体であり、筋肉内に投与される。投与部位において、CMV抗原タンパク質が発現し、抗原特異的な免疫を獲得・増強させることで、結果としてCMVの再活性化抑制効果や再活性化後の感染症の重症化防止の効果をもたらすことを目指したものとされる。昨年より、約500例を対象とする国際共同第 相試験として実施されている。

2. プラスミドDNAワクチンに関する規制・指針の国際動向

2.1 欧米の規制との比較

プラスミドDNAワクチンに関する規制・指針について調査を行った (Table 1)。プラスミドDNAワクチンは、日本では1.3で述べたように遺伝子治療製品として規制されている。プラスミドDNAワクチンに特化した指針はなく、遺伝子治療用医薬品の指針が適用される。なお、平成22年に「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン」が発出されているが、プラスミドDNAワクチンは適用外である。

一方、米国FDAは、感染症の予防・治療用DNAワクチンはワクチン(生物製剤)として規制されるが、感染症以外の治療用プラスミドDNA製剤は遺伝子治療薬として扱われており、規制的には両者は区別されている。FDAは感染症に対するプラスミドDNAワクチンに特化したガイダンス (Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications, Nov.2007) を2007年に発出している。これはFDAが1996年に発出した「Points to Consider on

Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications (感染症予防用プラスミドDNAワクチンに関する考慮事項)」について、その後のプラスミドDNAワクチンの前臨床試験成績や臨床使用実績を反映して、ガイダンスの内容を改めたものである。感染症以外の治療を目的としたプラスミドDNA製剤は、このガイダンスの対象外とされる。がんに対するプラスミドDNAについては、遺伝子治療製品の指針の他に、昨年の報告書でも取り上げた治療用がんワクチンの臨床試験に関するガイダンス (Guidance for Industry: Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines (2011)) が適用されることになる。また、EMAでも感染症に対するプラスミドDNAワクチンは遺伝子治療薬には含めないとされ、感染症に対するDNAワクチンのガイダンス作成に関するコンセプトペーパーが発出されているが、ガイダンス本体はまだ公表されていない。

そこで、FDAのガイダンスの概要を以下に紹介するとともに、これを基に、プラスミドDNAワクチンの考慮事項を検討した。

Table 1 プラスミドDNAワクチンの品質・安全性に関する指針

対象製品	日本	米国FDA	欧州EMA
プラスミドDNA製品	遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する指針	<ul style="list-style-type: none"> Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy (1998) Guidance for FDA reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) (2008) Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products (Draft Guidance) (2012) 	<ul style="list-style-type: none"> Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Transfer Medicinal Products (2001) Non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products Non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products (2008)
プラスミドDNA ワクチン (感染症適用)	同上	<ul style="list-style-type: none"> Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications (2007) 	<ul style="list-style-type: none"> Concept paper on guidance for DNA vaccines (2012)

2.2 感染症に用いるプラスミドDNAワクチンの考慮事項 (FDA)

本ガイダンスは、感染症に対するDNAワクチンの非臨床開発および試験に関する現時点での推奨事項について説明したものであり、1996年のガイダンス文書「Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications」に優先するものである。本ガイダンスでは、DNAワクチンとは、病原体に対する免疫応答を誘導や促進する1つ以上のDNA配列を持つ精製プラスミド製剤と定義される。プラスミドは通常、細菌内での選択および複製に必要なDNA配列を持ち、ワクチン接種者における遺伝子発現を促す真核プロモーターおよびエンハンサーならびに転写終結/アデニル化配列を含んでおり、免疫調節因子を持つ場合もある。DNAワクチンは、生物製剤であり、感染症以外の治療を目的としたプラスミドDNA製剤は、本ガイダンスでは扱わない。

2.2.1 製造上の問題

INDの下で臨床試験を行う新規DNAワクチン製剤について提供すべき製造に関する情報は以下の通りである。

(1) 製剤の製造

製造工程で使用するすべての成分および最終製剤に含まれる成分を製造に関する概要に記載すべきである。使用するすべてのプラスミドの由来およびダイアグラムならびにすべての中間体となる組換えDNAのクローニング手順を含め、プラスミド構築の詳細を説明すべきである。マスターセルバンク (MCB) にあるプラスミドの全DNA配列について、予想外のものを含め、すべてのオープンリーディングフレーム (ORF) とその他の配列成分を同定して注釈をつけた配列と一緒に提示すべきである。製造工程の中間段階では、確認試験として、制限酵素マッピングやポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) などの様々な方法を用いることができる。しかし、バルクプラスミドワクチンでは完全塩基配の決定が望ましい。

細菌細胞の遺伝子型および由来ならびに製造に用

いるMCBとワーキングセルバンク (WCB) の構築の手順を説明すべきである。また、バクテリオファージやその他の外来性感染性物質の汚染がないことを保証するため、MCBとWCBの両方を検査する必要がある。WCBで、プラスミドDNAの遺伝的安定性を証明することが望ましい。

製造工程に関する説明は、製剤の安全性評価を行うことができるように十分に詳細なものにすべきである。非臨床安全性試験用として製造されたロットが臨床用ロットと異なる条件で製造される場合は、そのような製造上の変更点について明確に文書化すべきである。

(2) バルクプラスミド製剤の出荷試験

バルクと最終製剤が同じ場合を除き、バルクプラスミド製剤では、以下の特性について十分な特異性および感度を持つ標準的な試験法での実施が求められる。製品開発の初期段階では、このような試験には研究用の内部標準品を利用してもよいと認識されている。既知量の参照試料または添加試料を試験するか、あるいは他の適切な評価基準により試験法を評価し、試験法の性能を文書化したデータを提出すべきである。バルクおよび最終製剤の出荷試験に加え、製造の一貫性および製剤の安全性を保証するために工程内試験を実施することも推奨される。第1相臨床試験の開始に先立ち、計画された臨床試験期間中に製剤を使用できるよう、可能な限り早い段階で安定性試験を開始すべきである。

バルク出荷基準には通常、外観検査とプラスミド濃度検査を含めること。スーパーコイル構造のプラスミド画分を出荷基準に含め、スーパーコイル構造のプラスミドの含有率 (80%超が望ましい) の最低基準を決めることを推奨する。免疫原性または他の意図した生物活性を予測できることを証明できるデータがあれば、出荷基準および規格として別のものを選択してもよい。

バルクプラスミド製剤について、細菌宿主細胞由来のDNA、RNA、タンパク質などの高分子不純物の有無を評価し、それぞれの最大限度値を予備的に設定する (1%未満が望ましい)。製品開発が進むにつ

れ、宿主細胞由来不純物は技術的および論理的に可能な限り減少させるべきである。発熱性物質の試験を行い、その結果を最終ロット出荷文書に添付する。リムルス試験(LAL)は、エンドトキシンの有無およびエンドトキシン汚染の有無を示す感度の高い指標である。プラスミドDNAワクチン製剤中のエンドトキシンはプラスミド1mg中40 EUを超えるべきでない。

バルク製剤の同一性を証明するための試験を含めるべきである。例えば、制限酵素消化したプラスミドDNAのアガロースゲル電気泳動は、個々のプラスミドを同定・区別するために用いることのできる試験である。1ヵ所の製造所で複数のDNAワクチン製剤を製造する場合、確認試験は、その工場で製造された各プラスミドを区別して識別できるようにすべきである。

力価測定法を開発すべきである。初期臨床開発では、力価測定法の選択にかなりの柔軟性があると思われるが、遺伝子導入効率の*in vitro*測定法としてコードされた遺伝子の転写や翻訳をモニタリングする方法や、DNAワクチンの免疫原性に関する*in vivo*測定を含めることができる。製品開発が進むにつれ、適切な生物活性を評価できる定量的力価測定法を開発することが望ましい。可能であれば、選択した力価測定法が臨床試験で確認された免疫原性または防御活性と相関していることを示す証拠を提出すべきである。また、測定法の開発が進むにつれ、ロット間の比較を容易にするために各ロットのサンプルの保管が望まれる。

(3) 最終製剤の出荷試験

DNAワクチンの最終製剤について、力価試験、一般安全性試験、無菌性試験、純度試験、定量試験および同一性試験を実施すべきである。試験方法および規格は、バルク製剤出荷に用いたものと同じでもよい。凍結乾燥プラスミド製剤では、含湿度試験の実施を推奨する。また、最終製剤の各ロットについて、エンドトキシン試験を実施すべきである。最終製剤出荷試験に加え、製造の一貫性および製剤の安全性を保証するために工程内試験も実施すべきであ

る。判定基準および許容範囲を設定し、臨床試験用ワクチンの各ロットの結果を報告する。

2.2.2 DNAワクチンの変更

(1) 挿入遺伝子またはベクターの変更

DNAワクチンの挿入遺伝子やバックボーンベクターのDNA配列を変更する場合、その変更の性質や程度が追加の前臨床試験の実施や新規INDの提出を必要とするものか議論するため、規制当局に相談することが望ましい。その際、製造工程の変更内容および新規(変更後の)DNAワクチンの前臨床安全性評価の成績を説明すること。

(2) DNA配列解析

DNAワクチンと特に関係する製品同一性の問題として、第1相臨床試験開始前にプラスミドの配列をどの程度まで決定すべきかということがある。1996年のガイダンスでは、最低限、挿入したタンパク質コード遺伝子の配列を提出するように勧告した。しかし、プラスミドの骨格がワクチンの活性に影響を及ぼす可能性があるとのエビデンスがあり、また1996年以降の技術の進歩によりDNA配列決定が容易になってきたことから、現在は第1相臨床試験開始前にプラスミドの全塩基配列の提出が推奨される。塩基配列は完全に注釈が付けられるべきであり、予想外のORFその他の配列成分を識別すべきである。DNAワクチンによっては、それぞれ異なる抗原タンパク質をコードする遺伝子を搭載した複数のプラスミドの混合物からなるものがある。この場合、各プラスミドはそれぞれ別々に増幅させるべきである。ロット間の一貫性を確保するため、ワクチン製剤の各プラスミド成分の同一性および含量を決定するよう勧める。

2.2.3 非臨床における免疫原性試験および安全性試験

(1) 一般的考慮事項

DNAワクチンを含め、いかなる新規ワクチンでも、臨床試験で使用する前には非臨床安全性評価が必要となる。INDや生物学的製剤の承認申請などの申請

の根拠資料となる非臨床安全性試験の実施にはGLPが適用される。非臨床安全性試験は新規のDNAワクチンまたはDNAワクチン/アジュバントの新規の組み合わせごとに実施すること。また、すべての非臨床毒性試験および生体内分布/持続性試験では、臨床試験で予定される製剤処方および投与方法について評価すること。製剤処方や投与経路などに変更がある場合には、追加の安全性評価が必要になることがある。

(2) 免疫原性試験

ワクチンの免疫原性は、可能な場合には必ず適切な動物モデルを用いて評価することを推奨する。免疫原性試験には、抗原特異的抗体価の評価、血清抗体陽転率の評価、サイトカイン分泌細胞の活性化の評価、細胞性免疫応答の測定を含む。安全性試験を兼ねていない限り、非臨床免疫原性試験はGLPに従う必要はない。GLPは、被験物質の潜在的な有用性の有無を確認するための基本的な探索的試験には適用されないためである。複数の抗原をコードするDNAワクチンの場合、コードされる抗原のうち代表的な抗原に対する免疫応答を評価すべきである。

(3) サイトカイン

サイトカインをコードする遺伝子などの免疫調節遺伝子を含有するDNAワクチンの場合、コードされるヒトサイトカインに反応する動物種または動物の相同遺伝子を用いたモデルで前臨床試験を実施することが望ましい。そのような試験では、免疫系の細胞性成分または液性成分の変化により、全身性免疫抑制、慢性炎症、自己免疫その他の病態などの意図しない有害な影響が生じるかどうか評価すべきである。

(4) プライム・ブースト法

プライム・ブースト法を用いる場合、初回及び追加接種で使用される各成分の用量、スケジュールおよび投与経路の安全性および忍容性を裏付ける情報を提出すること。プライム・ブースト法で被験者に生じうるリスクの特性を明らかにする上で、既存デ

ータで十分と判断されれば、毒性試験を追加で実施する必要はない場合もある。

(5) 自己免疫

公表されている非臨床試験によると、DNAワクチンの接種により、抗DNA自己抗体IgGを分泌する自己反応性B細胞の活性化が示されている。しかし、この応答の程度および持続期間は、正常な動物に疾患を生じさせたり、自己免疫疾患を発症しやすいマウスの発症を促進するには不十分である。非臨床試験では、全身性の自己免疫はDNAワクチンの接種では発現しにくいことが示唆されている。また、ワクチンでコードされる抗原を発現する筋細胞や樹状細胞に対する免疫応答が発現しないことから、抗原発現細胞が存在する組織に対する自己免疫応答も発現しにくいことが示唆されている。しかし、自己と交差反応する抗原（潜在抗原を含む）をコードすることにより、DNAワクチンが臓器特異的な自己免疫を特異体質的に引き起こしたり悪化させたりする可能性は残る。ワクチン接種による自己免疫疾患の発症の有無の評価のための非臨床試験の実施は推奨しないが、非臨床の免疫原性試験および毒性試験に用いる動物の健康状態全般については注意深く監視を継続することが望ましい。

自己抗原（サイトカイン、ケモカイン、表面受容体/リガンド、潜在性自己抗原など）をコードする導入遺伝子産物により免疫応答が誘導される場合、対応する内在性タンパク質との交差反応の可能性を検討すること。内在性タンパク質に対する持続的な免疫応答が検出された場合、適切な動物モデルを用いて動物の相同遺伝子について検討することにより有害作用の可能性を評価することを推奨する。さらに、臨床試験中は自己抗原に対する免疫応答が誘導されるかどうかモニタリングし、そのような免疫応答の被験者への影響を注意深く評価すること。

(6) 局所副反応および全身毒性試験

全身毒性および局所副反応を評価する試験は、同時に行ってよい。これらの試験では、臨床での予定接種回数より少なくとも1回多く接種を行うことを

推奨する。また、臨床で予定している最高用量を使用することを推奨する。非臨床試験の実施計画書に記載する評価項目としては、造血系および免疫系をはじめとする潜在的な標的器官に対する毒性を含めること。非臨床試験には、臨床病理学的評価（血液生化学的検査、血液学的検査および凝固検査）および病理組織学的評価（組織の肉眼的および顕微鏡的評価の両方を網羅）も含めること。局所副反応および全身毒性を評価するための動物モデルおよび試験デザインの選択に関する推奨事項についてのさらなるガイダンスとして、「WHO Guidelines on Non-clinical Evaluation of Vaccines(ワクチンの非臨床評価に関するWHOガイドライン)」を参照できる。

注射部位副反応の試験については、各回のワクチン接種後の注射部位の詳細な臨床観察および生検または最終剖検検体から得た注射部位組織の病理学的評価を含めること。さらに、短期的な毒性と持続的な毒性の両方を検討すべきであり、それらの検討にあたっては、動物コホートを最終ワクチン接種後2～3日後と2～3週後に分けて検討を行うのが望ましい。

(7) 生体内分布、持続性および組み込み解析

プラスミドDNAの生体内分布、持続性および染色体組み込み試験は当初、DNAワクチンの被験者において、コードされた抗原の注射部位または異所での長期的な発現やプラスミドDNAの組み込みによりリスクが増大するかどうかを検討するために推奨されていた。DNAの組み込みに関する理論上の懸念としては、染色体への挿入によりがん抑制因子の活性が低下したり、がん遺伝子の活性が上昇することによる腫瘍形成のリスクがある。さらに、DNAの組み込みにより、染色体の切断や再編成が誘導され染色体が不安定になる可能性がある。

一般的な生体内分布/持続性試験では、接種後数日～数ヶ月の複数の時点において採取した種々の組織でプラスミドDNAが検出されるかどうかを評価する。採取する組織は通常、血液、心臓、脳、肝臓、腎臓、骨髄、卵巣/精巣、肺、流入領域リンパ節、脾臓、注射部位の筋肉および注射部位の皮下組織な

どである。プラスミドの濃度の評価には通常、感度、特異性および阻害物質の不在が確認済みの定量PCRを用いる。この分析法の感度として、宿主DNA 1 µgあたり100コピー未満のプラスミドを十分に定量できることを推奨する。「非持続性」と判断するには、各部位のプラスミドDNAの量がこの定量限界を下回る必要がある。

プラスミドDNAの生体内分布/持続性試験により、共通のプラスミドベクターから調製された異なる抗原をコードするDNAワクチンは、同じような挙動を示すことが明らかになっている。プラスミドDNAを従来の筋肉内、皮下、皮内投与や粒子を用いたDDSで導入した場合、ベクターDNAが異所で長期的に持続することは極めて稀である。しかし、投与部位やその近傍の組織では、宿主DNA 1 µgあたり数千コピーのプラスミドDNAが60日以上持続することも多い。このようなDNAを調べても、プラスミドの大部分は組み込まれていないことが示されている。

以上の知見に基づき、生体内分布/染色体組み込みのプロファイルが許容できることが確認済みのプラスミドベクターに新規遺伝子を挿入して製造されるDNAワクチンでは、生体内分布試験が必要ない場合もある。しかし新規のベクターや剤形、導入方法、投与経路を用いたり、細胞への取込みや生体内分布に重大な影響を及ぼす変更を行った場合は、生体内分布試験が必要である。

プラスミドDNAの持続性および組み込みの頻度を解析した公表論文により、組み込み試験が必要となるのはどの動物のどの組織でもよいが、試験終了時まで宿主DNA 1 µgあたり30,000コピーを超える量でプラスミドの持続性が確認された場合のみと考えられる。プラスミドDNAがこの閾値を超えて持続する場合は、ワクチンを接種した動物のゲノムにDNAが組み込まれたかどうかを評価すべきである。通常の組み込み試験では、プラスミドDNAの持続性が確認されたすべての組織について評価する。少なくとも4つの独立したDNA試料を分析することを推奨する。各試料には、異なるドナー動物からプールしたDNAが含まれる場合がある。各ゲノムDNA試料に存在するプラスミドDNAを検出し、定量するには、通常、

Q-PCRが用いられる。染色体に組み込まれていないプラスミドDNAは、ゲル精製法により高分子量ゲノムDNAから分離できる。またコンカテマーは、プラスミドDNAのレアモチーフを標的とする制限酵素消化により除去できる。ゲノムへの組込みを確認し、組込み部位を特定するには、特別に設計されたPCRプライマーが用いられる。

D. 考 察

プラスミドDNAワクチンの開発と規制について検討した。臨床開発中の製品は、感染症の予防・治療用ワクチンとがん治療用ワクチンに大別された。欧米では、感染症に用いるプラスミドDNAはワクチン、それ以外に適用されるプラスミドDNAは遺伝子治療製品として区別して規制されているが、両方とも免疫誘導を目的としたプラスミドDNAであり、両者に本質的な違いがあるわけではなく、行政的な区分によるものと考えられる。また、治療用プラスミドDNAワクチンと遺伝子治療用プラスミドDNAにも本質的な違いはない。ワクチンとして用いる場合にはアジュバントを用いたり複数のプラスミドを組み合わせたり、複数回の投与を行うことなど、ワクチン独自の適用法があるが、プラスミドDNAワクチンは遺伝子治療製品の一形態と考えることに問題はないと考えられる。

プラスミドDNAに関するガイダンスは現時点ではFDAのガイダンスのみであるが、このガイダンスは感染症に用いるプラスミドDNAワクチン以外の治療用プラスミドDNA製剤には適用されないとされる。しかし内容を確認すると、出荷試験に関する事項として、安全性・有効性に影響するプラスミドの全塩基配列の決定と配列成分の特定、MCB・WCBの作製、エンドトキシン含量、有効性に影響するスーパーコイル構造の含有率の規格など、感染症ワクチンに限らず、プラスミドDNA製品に共通する品質管理項目が示されていると考えられる。FDAの遺伝子治療製品に関するガイダンス（1998年）よりも作成時期が新しく、また遺伝子治療のガイダンスにプラスミドDNAに関する記載は少ないこともあり、プ

ラスミド製品の品質に関する考慮事項としては、この間の知見を踏まえたより詳細なものとなっている。一方、非臨床試験については、免疫原性試験、自己免疫の評価に対する考え方など、免疫誘導を目的とした製品に関する基本的な考え方が示されている。これも感染症ワクチンに限定される内容ではなく、他の治療用プラスミドDNAワクチンにも当てはまる内容である。また、生体内分布試験と持続性、組込試験は一般的なワクチンにはない遺伝子治療製品に特有の試験となるが、具体的な試験法が示されているほか、ベクターバックボーンが同一で遺伝子だけ異なる場合には生体内分布試験が必要ないことや、組込試験が必要となる条件は「宿主DNA 1 µgあたり30,000コピーを超える量で持続性が確認された場合」というこれまでのプラスミドDNA製品での経験に基づいた考え方や具体的な数値が示されているなど、FDAのガイダンスは、感染症にとどまらず、プラスミドDNAワクチンやプラスミドDNA製品の品質・安全性確保の方策を考える上でも参考になるものと考えられる。

E. 結 論

プラスミドDNAワクチンの開発と規制の国際動向を調査した。開発品目は感染症の予防・治療用ワクチンと、がんの治療用ワクチンに大別された。海外では感染症を対象とする製品はワクチンとして、その他の治療に用いる製品は遺伝子治療製品として規制されているが、免疫誘導を目的とする製品としての本質に違いはないと考えられる。FDAのガイダンスを基に、製造工程で明らかにすべき事項や製剤の出荷試験として設定すべき事項、非臨床試験の考え方など、プラスミドDNAワクチンの品質・安全性確保で考慮すべき事項を考察した。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし