

201337004A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(国際水準臨床研究分野)

標準的治療の確立が望まれる難治性疾患に対する  
新規治療法の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中西 洋一

平成26(2014)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
標準的治療の確立が望まれる難治性疾患に対する新規治療法の開発	----- 1
中西 洋一	
II. 分担研究報告	
1. 難治性全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植の臨床研究	----- 5
赤司 浩一	
2. がんワクチンOCV-C01による標準療法不応進行再発 胆道がんに対する第Ⅱ相医師主導治験に関する研究	----- 9
谷 憲三朗	
3. 低用量BCG膀胱腔内注入維持療法の再発予防効果ならびに 安全性に関するランダム化比較試験	-----11
内藤 誠二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----15

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)  
総括研究報告書

標準的治療の確立が望まれる難治性疾患に対する新規治療法の開発

研究代表者 中西 洋一  
九州大学病院 ARO 次世代医療センター長

研究要旨

有効な治療法のない難治性疾患に対し、企業の開発戦略に含まれないものの医療における必要性の高い以下3つの治療法について、医師主導治験・臨床試験の実施によりヒトでの有効性・安全性の評価を行い将来の実用化につなげる。本年度は以下のように、3課題それぞれ、先進医療試験の準備、医師主導治験届け、臨床試験開始に至った。

課題1: 難治性全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植の臨床試験

5年生存率が50-60%と予後不良な高度の皮膚硬化と内臓病変を有する重症全身性硬化症(SSc)において自己造血幹細胞移植(自己HSCT)の実用化を目指し、先進医療として臨床第II相試験を実施する。本年度は1)既移植難治性SSc19例で、移植片をCD34陽性細胞に純化した11例と(純化群)、純化を行わなかった8例を比較した(非純化群)。純化群では合併症としてウイルス感染をより高頻度に認めたがHSCT後4年間の皮膚硬化や間質性肺炎の改善において優れていた。2)先進医療申請のため、昨年度作成した臨床第II相試験のプロトコールを基にPMDAと薬事戦略相談事前面談、厚生労働省と事前相談を行った。PMDAから助言を受け、主要評価項目をHSCT5年後のイベント無し生存から24ヶ月後のスキンスコア改善比へと変更した。

課題2: がんワクチンOCV-C01による標準療法不応進行再発胆道がんに対する第II相医師主導治験

2011年には18,186人が胆道癌(肝外胆道癌, 胆嚢癌, 乳頭部癌)で死亡しており, 男女合わせたがん死亡原因において, 肺癌, 胃癌, 肝臓癌(肝内胆管癌を含む), 結腸癌, 膵癌について第6位となっている。また, 乳頭部癌では約10%, 肝内外胆管癌では約25%, 胆嚢癌では約30%が診断時に切除不能な進行癌であることに加え, 5年相対生存率も20~25%であることから予後不良/難治性の悪性腫瘍の一つである。本研究ではVEGFR-1, 2およびKIF20Aを標的としたHLA-A\*24:02拘束性カクテルペプチドがんワクチンOCV-C01を用いた第II相医師主導治験を行う。本治験は既治療不応進行胆道癌患者を対象として, OCV-C01皮下投与療法の有効性と安全性を検討し, 主要評価項目は全生存期間(OS)である。被験者登録期間は平成26年3月~平成27年12月を予定しており, 平成25年12月18日に治験届を行い, 平成26年4月より被験者募集開始予定である。

課題3: 低用量BCG膀胱腔内注入維持療法の再発予防効果ならびに安全性に関するランダム化比較試験中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱がん(Ta, T1)に対するTURBT後の標準量BCG導入療法+低用量BCG維持療法が, 標準的レジメである標準量BCG導入療法より再発・進展予防効果において優れ, かつ安全に, 高い完遂率をもって実施できかどうかを, 前向き無作為化比較試験によって検証する。参加施設の選定と研究体制の整備を行い, 平成25年1月に班会議を開催し, 同月プロトコール, 患者同意説明文書を完成した。現在, 研究分担者施設19施設において症例登録を行っている。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

赤司 浩一 九州大学 教授  
谷 憲三郎 九州大学 教授  
内藤 誠二 九州大学 教授

必要性の高い以下3つの治療法について、医師主導治験・臨床試験の実施によりヒトでの有効性・安全性の評価を行い将来の実用化につなげる。

課題1:

全身性硬化症のうち高度のびまん性皮膚硬化と内臓病変を有する重症例の5年生存率は50-60%と予後不良であり、また皮膚硬化や間質性肺炎による呼吸困難などのため日常生活の質は

A. 研究目的

有効な治療法のない難治性疾患に対し、企業の開発戦略に含まれないものの医療における

著しく低下する。九大では2002年より難治性自己免疫疾患に対する自己末梢血幹細胞移植の安全性と有効性を検討する臨床第I/II相試験を行った。対象は難治性SSc19例で治療関連死は1例も認めなかった事より、本療法は安全に施行可能であることが示された。本年度は1)既移植例におけるCD34陽性細胞純化移植と非純化移植の比較、2)先進医療申請のため、昨年度作成した臨床第II相試験のプロトコルを基に医薬品医療機器総合機構、厚生労働省と事前相談を行うことを目的とした。

#### 課題2:

既治療不応胆道癌患者を対象として、OCV-C01の皮下投与療法の有効性と安全性を検討する医師主導治験を実施する。

##### 1. 主要目的(主評価項目)

既治療不応胆道癌と診断された患者を対象として、OCV-C01の皮下投与の全生存期間(OS)を検討する。

##### 2. 副次目的(副評価項目)

1) 主要目的に準じて、無増悪生存期間 (PFS)について検討する。

2) 固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン(RECIST v1.1日本語訳JCOG版)に基づき、測定可能病変を有する場合は腫瘍縮小効果を求め、奏効率、病勢コントロール率について検討する。

3) 有害事象の発現頻度、臨床検査値およびバイタルサインの変化から本剤の安全性を検討する。

4) 治療効果のバイオマーカーの探索を目的として、エルパモチド、OCV-101、OCV-105特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の変化等を比較検討する。

#### 課題3:

中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱癌 (Ta、T1) に対するTURBT後の標準量BCG導入療法+低用量BCG維持療法が、標準的レジメである標準量BCG導入療法より再発・進展予防効果において優れ、かつ安全に、高い完遂率をもって実施できかどうかを、前向き無作為比較試験によって検証する。

## B. 研究方法

#### 課題1:

対象の既移植例は難治性SSc19例である。末梢

血幹細胞の動員はCY 4g/m<sup>2</sup>に引き続きG-CSFを投与し、アフエレーシスによって末梢血幹細胞採取した。11例では末梢血幹細胞採取後、CliniMAGSを用いてCD34陽性細胞に純化した(純化群)。移植前治療としてはCY 200mg/kgを投与し、移植当日に2×10<sup>6</sup>/kg以上のCD34陽性細胞を輸注した。8例ではCD34陽性細胞への純化を行わなかった(非純化群)。純化群と非純化群につき自己HSCT後4年間の有効性と安全性を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得ている。本療法の施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

#### 課題2:

##### 1. 目標症例数

HLA-A\*24:02 保持者13例 (HLA適合不明患者40例)

##### 2. 試験物の概要

OCV-C01はOCV-105(KIF20A由来ペプチド)、エルパモチド (VEGFR-2由来ペプチド)、OCV-101(VEGFR-1由来ペプチド)のカクテル剤であり、同一の効能を有する市販薬はない。

調達法: 治験薬提供者(オンコセラピー・サイエンス社)にて原薬を海外から輸入し製造

##### 3. 投与方法

治験薬を1.0 mL/bodyで、週1回、4週間投与を1コースとして可能な限り腋窩部あるいは鼠径部に皮下投与する。腋窩部あるいは鼠径部に投与できない場合は上腕、大腿あるいは腹部に皮下投与する。治験薬投与と中止基準に該当するまで上記コースを繰り返す。最終投与日は最長で投与開始日から365日目までとする。

##### 4. 対象疾患、適格基準

1) 肝内外胆管癌、胆嚢癌および乳頭部癌と診断されている。

2) 肝外胆管癌、胆嚢癌、乳頭部癌の場合は、腺癌、腺扁平上皮癌、肝内胆管癌の場合は腺癌と組織学的に診断が得られている。

3) Stage II-IV 胆道癌で切除不能胆道癌である。測定可能病変の有無は問わない。

4) ゲムシタピンを含むレジメンに対して不応もしくはシスプラチンの投与が出来ないと判断されている。

5) 放射線療法により生存期間の延長が期待できない。

他

## 5. 除外基準

- 1) 過去に、いわゆる癌免疫療法(活性化リンパ球療法、樹状細胞療法、がんワクチン療法など)の受療歴を有する。
- 2) 過去1年未満に重複癌を有する。ただし、上皮内癌および粘膜内癌病変は登録可とする。
- 3) 原疾患が消化管等に浸潤しておりかつ出血が強く危惧される。

他

6. 治験実施予定期間:36ヶ月
7. 被験者登録予定期間:21ヶ月
8. 倫理面への配慮

本治験は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則に則って実施する。また、治験実施計画書、薬事法第14条第3項及び第80条の2、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(GCP省令)」を遵守して実施する。

### 課題3:

中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱癌(Ta、T1)患者を以下の2群にランダム化する。A群:標準量 BCG 導入療法(80 mg/週×6回)、B群:標準量 BCG 導入療法(80 mg/週×6回)+低用量 BCG 維持療法(40 mg/週×3回×4コース)。主要評価項目は、無再発生存期間、副次評価項目は、無増悪生存期間、生存期間、プロトコル治療の完遂率、有害事象発現状況とした。登録予定患者は合計180例、登録期間は1.5年、追跡期間は最短3年とし、総研究期間は5年である。

### (倫理面への配慮)

参加患者の安全性確保については、適格条件やプロトコル治療の中止変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化されている。また、「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言などの国際的倫理原則に従っている。

## C. 研究結果

以下の3課題とも、九州大学病院ARO次世代医療センターの主要メンバーから構成されるARO推進室会議において知財関連事項、薬事関連事項、当局対応、臨床試験や治験の実施に際して具体的な問題点や課題抽出など実務的な戦略策定を行った。課題1、2においてはPMDA薬事戦略相談をAROとともにいった。その結果、課題によっては薬事戦略方針の修正、試験デザインの変更などが必要となり試験遂行上多いに進展した。

### 課題1:

対象は純化群が11例、非純化群が8例で、スキンスコアはそれぞれ21.5±9.0、22.9±14.0であった。

純化群ではアデノウイルス膀胱炎を2例、帯状疱疹を5例、サイトメガロウイルス(CMV)抗原血症を6例とウイルス感染を高頻度に認めたのに対し、非純化群ではCMV抗原血症を2例で認めたのみであった。移植関連死は2群とも認めなかった。

純化群ではHSCT後4年間皮膚硬化の改善において有意に優れていた。純化群では原疾患の進行により20ヶ月後に1例が死亡、36ヶ月後に1例が肺高血圧症を合併した。非純化群では、12、24ヶ月後にそれぞれ1例再発し、38ヶ月後には1例が腎クリーゼ、間質性肺炎増悪による再発後死亡した。

昨年度作成プロトコルを基に医薬品医療機器総合機構(PMDA)と薬事戦略相談事前面談、厚生労働省と事前相談を行った。主要評価項目を5年後のイベント無し生存としていたが、PMDAより代替マーカーを用いて試験期間の短縮を図ってはと助言を受けた。これを受け、生存率と相関する代替マーカーとしてスキンスコアの改善比を選択し、主要評価項目は24ヶ月後のスキンスコアの改善比とした。これにより試験期間が9年間から6年間に短縮した。その他、いくつかの点につき、PMDA、厚生労働省より助言を受け、プロトコルを修正した。

### 課題2:

#### 1. 治験の準備状況

- ・2013年3月14日 医薬品医療機器総合機構(PMDA) 事前面談(第1回) 治験の概要の戦略相談
- ・2013年7月17日 同事前面談(第2回) 医師主導治験計画書等、詳細な内容に関する戦略相談
- ・2013年9月6日 薬事戦略相談(対面助言)
- ・2013年11月28日 九州大学病院臨床研究倫理審査委員会
- ・2013年12月18日 治験届け提出
- ・2014年3月 治験クリティカル・パス完成
- ・2014年4月 スタートアップミーティング、被験者募集開始、登録開始予定

### 課題3:

平成25年1月8日に第1回班会議を開催して、プロトコル作成の最終協議を行い、平成25年1月末にプロトコル及び患者同意説明文書を完成した。現在、20施設の研究分担者施設のうち19施設においてIRBの承認を得ており、症例登録を開始している。平成25年7月に最初の被験者を組み入れ、現在(平成26年3月6日時点)の登録症例数は14例である。

#### D. 考察

##### 課題1:

SScに対する自己 HSCT において移植片を CD34 陽性細胞に純化する事の是非についてはまだ結論が出ていない。純化した場合、治療強度が強くなる事に加え、自己反応性リンパ球を移植片から除去出来るという長所がある。今回の我々の検討では、純化群では非純化群に比し、合併症としてウイルス感染をより高頻度に認めたが、有効性においては優れていた。

PMDA から助言を受け、主要評価項目を5年後のイベント無し生存から24ヶ月後のスキンスコアの改善比へと変更したことにより、試験期間の短縮が可能となった。

##### 課題2:

化学療法不応となった胆道がん患者において倫理性を保ちながら本治療薬の有用性を示すために HLA-A\*2402 保有の有無で群間比較を行う医師主導治験計画を届け済みであり、症例エントリー予定である。

##### 課題3:

登録症例数が伸び悩んでおり、研究参加施設に症例登録数の見込みとプロトコールの問題点についてアンケート調査を行い、全体班会議を開催して症例登録を促進する対策を講じる。そして目標症例数の登録完了と、プロトコール治療並びにフォローアップを継続して、研究遂行に邁進したい。

#### E. 結論

以下のように3課題ともそれぞれプロトコール確定、治験届け、多施設臨床試験実施と当初の目標を達成している。PMDA との薬事戦略相談も終了し順調に進捗している。

##### 課題1:

臨床第Ⅱ相試験において純化 HSCT を選択する事は妥当と考えられた。主要評価項目を HSCT5 年後のイベント無し生存から24ヶ月後のスキンスコアの改善比へと変更した。

##### 課題2:

胆道癌に対する新たながんワクチン療法を開発する目的で、第Ⅱ相医師主導治験を計画し、治験届を行い、被験者募集開始、登録開始に向けた準備が整った。

##### 課題3:

平成24年度の試験準備期間後、平成25年5月17日に IRB 承認を得て、試験を開始した。また同年度

中に20施設ある研究分担者施設のうち19施設での IRB の承認を得て、症例登録を開始した。

当初の計画(平成24年度)では、症例登録期間は平成25年1月から平成26年6月までとしていたが、症例登録開始は計画より約4ヶ月遅れており、また登録症例数も伸び悩んでいる。引き続き、登録症例数を伸ばす方策を取り、症例登録の推進を図ってきたい。症例登録の締め切りは4ヶ月スライドして平成26年9月となるが、その後の観察期間(最低3年)、症例集積、解析期間(2ヶ月)は当初の計画通りとするため、総研究期間は平成25年度報告時と同様の5年4ヶ月となる。

#### F. 健康危険情報

本年度症例登録に至ったのは課題3のみである。特に被験者に関して安全性の懸念を生じるような事象は生じていない。

#### G. 研究発表

1. 論文発表 特になし

2. 学会発表 特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)  
分担研究報告書

難治性全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植の臨床研究

研究者分担者 赤司浩一  
九州大学病院 血液腫瘍内科 教授

研究要旨

全身性硬化症(SSc)において、高度の皮膚硬化と内臓病変を有する重症例は5年生存率が50-60%と予後不良である。本研究では難治性SScに対する自己造血幹細胞移植(自己HSCT)の実用化を目指し、先進医療として臨床第II相試験を実施する事が目的である。本年度は1)既移植例におけるCD34陽性細胞純化移植と非純化移植の比較、2)先進医療申請のため、昨年度作成した臨床第II相試験のプロトコールを基に医薬品医療機器総合機構(PMDA)、厚生労働省と事前相談を行うことを目的とした。対象の既移植例は難治性SSc19例で、移植片をCD34陽性細胞に純化した11例と(純化群)、純化を行わなかった8例を比較した(非純化群)。純化群では合併症としてウイルス感染をより高頻度に認めたが、HSCT後4年間の皮膚硬化や間質性肺炎の改善において優れていた。ウイルス感染は全て抗ウイルス薬にてコントロール可能であったことより、移植の方法として、有効性に優れる純化HSCTを選択する事は妥当と考えられた。臨床第II相試験のプロトコールを基にPMDAと薬事戦略相談事前面談、厚生労働省と事前相談を行った。PMDAから助言を受け、主要評価項目をHSCT5年後のイベント無し生存から24ヶ月後のスキンスコア改善比へと変更した。

A. 研究目的

全身性硬化症(SSc)は皮膚硬化と血管病変を特徴とする全身性結合組織疾患で、病変は皮膚、肺、心臓、腎臓、消化管、関節等、広範囲に及ぶ。トポイソメラーゼIやセントロメアに対する自己抗体を認め、またこれらが病型とも関連している事より、その発症や病態形成に自己免疫学的機序が関与すると考えられている。SScは確立された有効な治療法がなく、高度の皮膚硬化と内臓病変を有する重症例は5年生存率が50-60%と予後不良であり、生存例においても日常生活の質は著しく低下する。

難治性SScへの新規治療法として、欧米で

は自己造血幹細胞移植(自己HSCT)が臨床応用されており、欧米では現在臨床第III相試験が進行中で、試験終了後には本疾患における標準治療となることが予想される。当施設でも2002年より、臨床第I/II相試験として難治性SSc19例に対し、自己HSCTを施行し、高い治療効果を得た。

本研究では難治性SScに対する自己HSCTの実用化を目指し、先進医療として臨床第II相試験を実施する事が目的である。本年度は1)既移植例におけるCD34陽性細胞純化移植と非純化移植の比較、2)先進医療申請のため、昨年度作成した臨床第II相試験のプロトコールを基に医薬品医療機器総合機構、厚生労働省と事前相談を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

対象の既移植例は難治性SSc19例である。末梢血幹細胞の動員はCY4g/m<sup>2</sup>に引き続きG-CSFを投与し、アフエレーシスによって末梢血幹細胞採取した。11例では末梢血幹細胞採取後、CliniMACSを用いてCD34陽性細胞に純化した(純化群)。移植前治療としてはCY200mg/kgを投与し、移植当日に2x10<sup>6</sup>/kg以上のCD34陽性細胞を輸注した。8例ではCD34陽性細胞への純化を行わなかった(非純化群)。純化群と非純化群につき自己HSCT後4年間の有効性と安全性を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得ている。本療法の施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

## C. 研究結果

対象は純化群が11例(男3女8)、非純化群が8例(男1女7)で、年齢はそれぞれ52.3±7.5歳、55.1±5.5歳、スキンスコアはそれぞれ21.5±9.0、22.9±14.0であった。

純化群ではアデノウイルス膀胱炎を2例、帯状疱疹を5例、サイトメガロウイルス(CMV)抗原血症を6例とウイルス感染を高頻度に認めたのに対し、非純化群ではCMV抗原血症を2例で認めたのみであった。移植関連死は2群とも認めなかった。

純化群ではHSCT後4年間皮膚硬化の改善において有意に優れていた。間質性肺炎に対する効果について、純化群ではHSCT後4年間継続して%VCは増加したが、非純化群では最初1年間増加したものの2年後以降%VCは減少した。抗Scl-70抗体の低下率には有意差を

認めなかった。純化群では原疾患の進行により20ヶ月後に1例が死亡、36ヶ月後に1例が肺高血圧症を合併した。非純化群では、12、24ヶ月後にそれぞれ1例再発し、38ヶ月後には1例が腎クリーゼ、間質性肺炎増悪による再発後死亡した。

当施設の臨床第I/II相試験の成績より難治性SScに対する自己HSCTは安全かつ有効な治療法であると考えられたため、先進医療での実施を目指し、臨床第II相試験のプロトコールを作成した。このプロトコールを基に医薬品医療機器総合機構(PMDA)と薬事戦略相談事前面談、厚生労働省と事前相談を行った。主要評価項目を5年後のイベント無し生存とされていたが、PMDAより代替マーカーを用いて試験期間の短縮を図ってはと助言を受けた。これを受け、生存率と相関する代替マーカーとしてスキンスコアの改善比を選択し、主要評価項目は24ヶ月後のスキンスコアの改善比とした。これにより試験期間が9年間に短縮した。その他、いくつかの点につき、PMDA、厚生労働省より助言を受け、プロトコールを修正した。

## D. 考察

HSCTにおいて治療強度と有効性には正の相関、治療強度と治療関連死を含む安全性の間には負の相関がある。一方、SScに対する自己HSCTにおいて移植片をCD34陽性細胞に純化する事の是非についてはまだ結論が出ていない。純化した場合、治療強度が強くなる事に加え、自己反応性リンパ球を移植片から除去出来るという長所がある。今回の我々の検討では、純化群では非純化群に比し、合併症としてウイルス感染をより高頻度に認めたが、有効性においては優れていた。経



験したウイルス感染は全て抗ウイルス薬にてコントロール可能であったことより、移植の方法として、有効性に優れる純化 HSCT を選択する事は妥当と考えられた。

PMDAから助言を受け、主要評価項目を5年後のイベント無し生存から24ヶ月後のスキンスコアの改善比へと変更したことにより、試験期間の短縮が可能となった。

#### E. 結論

臨床第II相試験において純化HSCTを選択する事は妥当と考えられた。主要評価項目をHSCT5年後のイベント無し生存から24ヶ月後のスキンスコアの改善比へと変更した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Aoki T, Miyamoto T, Kamimura T, Shimono N, and Akashi K. Clinical Impact of Fluoroquinolone-Resistant Escherichia coli in the Fecal Flora of Hematological Patients with Neutropenia and Levofloxacin Prophylaxis. PLoS One 9: e85210, 2014.
2. Suzuki M, Yamagata K, Shino M, Aikawa Y, Akashi K, Watanabe T, and Kitabayashi I. Nuclear export signal within CALM is necessary for CALM-AF10-induced leukemia. Cancer Sci 105: 315-323, 2014
3. Fukata M, Ishikawa F, Najima Y, Yamauchi T, Saito Y, Takenaka K, Miyawaki K, Shimazu H, Shimoda K, Kanemaru T, Nakamura K, Odashiro K, Nagafuji K, Harada M, Akashi K. Contribution of bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells to the generation of donor-marker(+)

cardiomyocytes in vivo. PLoS One 8:e62506, 2013

4. Welner RS, Bararia D, Amabile G, Czibere A, Benoukraf T, Bach C, Wansa KD, Ye M, Zhang H, Iino T, Hetherington CJ, Akashi K, Tenen DG. C/ebpalpha is required for development of dendritic cell progenitors. Blood 121:4073-4081, 2013
  5. Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, Ayano M, Tanaka A, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Niiro H, Akashi K, Horiuchi T. The cytotoxic effects of certolizumab pegol and golimumab mediated by transmembrane tumor necrosis factor alpha. Inflamm Bowel Diseases 19:1224-1231, 2013
  6. Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Kamimura T, Shimono N, Akashi K. Antibiotic rotation for febrile neutropenic patients with hematological malignancies: Clinical significance of antibiotic heterogeneity. PLoS One 8:e54190, 2013
- ##### 2. 学会発表
1. 赤司浩一：「造血幹細胞と造血器癌幹細胞」第110回日本内科学会、2013年4月、東京
  2. Akashi K：「Epigenetic Landscape of Hematopoietic Lineage Commitment Can Be Visualized by Analysis of Incorporated H3.3 Variant」ISEH 42<sup>nd</sup> Annual Scientific Meeting 2013年5月、Vienna, Austria
  3. 赤司浩一：「Cancer Stem Cells in Human Hematological Malignancies」第72回日本癌学会学術総会 2013年10月、横浜
- #### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

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(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)  
分担研究報告書

がんワクチン OCV-C01 による標準療法不応進行再発

胆道がんに対する第Ⅱ相医師主導治験に関する研究

研究分担者 谷 憲三朗

**研究要旨:**

悪性新生物(がん)は、1981年以降日本人の死亡原因の第1位となり、2011年にはがんによる死亡数は357,305人、死亡率は人口10万対283.2にのぼり、2011年のがん死亡者数は、1975年の約2.5倍にも増加している。その中で、2011年には18,186人が胆道癌(肝外胆道癌、胆嚢癌、乳頭部癌)で死亡しており、男女合わせたがん死亡原因において、肺癌、胃癌、肝臓癌(肝内胆管癌を含む)、結腸癌、膵癌について第6位となっている。また、乳頭部癌では約10%、肝内外胆管癌では約25%、胆嚢癌では約30%が診断時に切除不能な進行癌であることに加え、5年相対生存率も20~25%であることから予後不良/難治性の悪性腫瘍の一つである。本研究ではVEGFR-1、2およびKIF20Aを標的としたHLA-A\*24:02拘束性カクテルペプチドがんワクチンOCV-C01を用いた第Ⅱ相医師主導治験を行う。本治験は既治療不応進行胆道癌患者を対象として、OCV-C01皮下投与療法の有効性と安全性を検討し、主要評価項目は全生存期間(OS)である。被験者登録期間は平成26年3月~平成27年12月を予定しており、平成25年12月18日に治験届を行い、平成26年4月より被験者募集開始予定である。

**A. 研究目的:**

既治療不応胆道癌患者を対象として、OCV-C01の皮下投与療法の有効性と安全性を検討する。

1. 主要目的(主評価項目)

既治療不応胆道癌と診断された患者を対象として、OCV-C01の皮下投与の全生存期間(overall survival, OS)を検討する。

2. 副次目的(副評価項目)

1) 主要目的に準じて、無増悪生存期間(progression free survival, PFS)について検討する。

2) 固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン(RECISTガイドライン)改訂版 version 1.1—日本語訳JCOG版 ver.1.0(略称:RECIST v1.1日本語訳JCOG版)に基づき、測定可能病変を有する場合は腫瘍縮小効果を求め、奏効率、病勢コントロール率について検討する。

3) 有害事象の発現頻度、臨床検査値およびバイタルサインの変化から本剤の安全性を検討する。

4) 治療効果のバイオマーカーの探索を目的として、エルパモチド、OCV-101、OCV-105特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の変化等を比較検討する。

**B. 研究方法:**

1. 目標症例数

HLA-A\*24:02 保持者13例 (HLA適合不明患者40例)

2. 試験物の概要

OCV-C01はOCV-105(KIF20A由来ペプチド)、エルパモチド(VEGFR-2由来ペプチド)、OCV-101(VEGFR-1由来ペプチド)のカクテル剤であり、同一の効能を有する市販薬はない。

調達法: 治験薬提供者にて原薬を海外から輸入し製造  
治験薬提供者: オンコセラピー・サイエンス社

品質: GMP

規格: 2007年6月、改良を加えた製造工程にて製造された治験薬は日本薬局法15改正の注射剤の不溶性微粒子試験の基準を満たすことが確認されている。

3. 投与方法

治験薬を1.0 mL/bodyで、週1回、4週間投与を1コースとして可能な限り腋窩部あるいは鼠径部に皮下投与する。腋窩部あるいは鼠径部に投与できない場合は上腕、大腿あるいは腹部に皮下投与する。治験薬投与中止基準に該当するまで上記コースを繰り返す。最終投与日は最長で投与開始日から365日目までとする。

4. 対象疾患、適格基準

1) 肝内外胆管癌、胆嚢癌および乳頭部癌と診断されている。

2) 肝外胆管癌、胆嚢癌、乳頭部癌の場合は、腺癌、腺扁平上皮癌、肝内胆管癌の場合は腺癌と組織学的に診断が得られている。

3) Stage II-IV 胆道癌で切除不能胆道癌である。測定可能病変の有無は問わない。

4) ゲムシタピンを含むレジメンに対して不応もしくはシスプラチンの投与が出来ないと判断されている。

5) 放射線療法により生存期間の延長が期待できない。

6) 中枢神経への転移がない。

7) 中等度以上の腹水、胸水を認めない。

8) Performance Status (ECOG) 0, 1のいずれかである。

9) 登録時の年齢が20歳以上である。

10) 主要な臓器機能が保持され、以下のすべての基準を満たしている。

11) その他治験責任(分担)医師の判断により、治験薬投与が困難となるような事象の発現がない。

12) 本試験の参加に関して、患者本人からの文書による同意が得られている。

5. 除外基準

1) 過去に、いわゆる癌免疫療法(活性化リンパ球療法、樹状細胞療法、がんワクチン療法など)の受療歴を有する。

2) 過去1年未満に重複癌を有する。ただし、上皮内癌および粘膜内癌病変は登録可とする。

3) 原疾患が消化管等に浸潤しておりかつ出血が強く危惧される。

4) 間質性肺炎または肺線維症の既往または合併を有する。

5) コントロール困難な中等度以上の腹水、胸水を認める(中等度以上の腹水とは、骨盤腔を越える場合を目安とし、中等度以上の胸水とは立位単純胸部X線における胸水量が左右いずれかの肺野の3分の1を越える場合を目安とする)。また、ピンパニールを用いた胸膜癒着術を行っている場合は抗悪性腫瘍薬使用として扱う。

6) 穿刺排液処置を要する心嚢水を有する。

7) 重症感染症を有する、または疑われる。

8) 脳転移が判明している、または臨床症状により脳転移が疑われる。

9) 重度の精神障害または重度の神経障害を有する。

10) コントロール不良の心疾患、肺疾患、腎疾患、肝疾患を有する。

11) grade 4 の事象(臨床検査値異常も含む)を有するまたはその他コントロール不良の併存疾患を有する。

12) 治験薬投与開始前 12 ヶ月以内の心筋梗塞、重度不安定狭心症、冠動脈・末梢動脈バイパス術、うっ血性心不全、脳血管障害、肺塞栓症、深部静脈血栓症、その他重大な血栓塞栓症の既往を有する。

13) 治癒に至っていない外傷性病変(骨折を含む)を有する。

14) 出血素因(破裂により致死になる可能性がある動脈瘤を含む)または過度の凝固障害を有する、若しくはそれらの既往を有する。

15) アスピリン以外の抗血栓薬の継続投与を要する。

16) 適切な治療を受けているにもかかわらずコントロール不良な高血圧を有する。

17) 治療を要する心不全を有する。

18) 治験薬投与期間中に以下の薬剤の全身投与を必要とする。①副腎皮質ステロイド剤(2週間に1回以上の継続的な投与)②免疫抑制剤、免疫賦活剤 ③G-CSF(M-CSF)製剤 ④EPO製剤

19) 他の治験や臨床研究に参加中である(介入を伴わない試験は除く)。

20) 予め HLA-A\*24:02 の結果が判明している。

21) 妊娠中または治験薬投与開始日から治験薬最終投与後 120 日まで授乳を中止できない。また、本人またはパートナーに避妊の意志(男性は同意取得日から治験薬最終投与日後 180 日まで、女性は同意取得日から治験薬最終投与日後 120 日までの期間)がない。

22) その他、治験責任(分担)医師が不適格と判断した患者。

6. 治験実施予定期間:2014年1月~2016年12月(24ヶ月)

7. 被験者登録予定期間:2014年4月~2015年12月(21ヶ月)

8. 倫理面への配慮

本治験は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則に則って実施する。また、治験実施計画書、薬事法第14条第3項及び第80条の2、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(GCP省令)」を遵守して実施する。

## C. 研究の結果

### 1. 治験の準備状況

・2013年3月14日 医薬品医療機器総合機構(PMDA)事前面談(第1回) 治験の概要の戦略相談

・2013年7月17日 同事前面談(第2回) 医師主導治験計画書等、詳細な内容に関する戦略相談

・2013年9月6日 薬事戦略相談(対面助言)

・2013年11月28日 九州大学病院臨床研究倫理審査委員会

・2013年12月18日 治験届け提出

・2014年3月 治験クリティカル・パス完成

・2014年4月 スタートアップミーティング、被験者募集開始、登録開始予定

## D. 考察:特になし

## E. 結論:

胆道癌に対する新たながんワクチン療法を開発する目的で、第Ⅱ相医師主導治験を計画し、治験届けを行い、被験者募集開始、登録開始に向けた準備が整った。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表:

### 2. 学会発表等:

1) 土方康基、鶴田敏久、谷憲三朗他、進行固形腫瘍患者に対する化学療法併用新規免疫細胞療法第1相臨床研究、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、横浜

2) 土方康基、谷憲三朗他、RNF43ペプチドパルス樹状細胞ならびにRNF43ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第1相臨床試験、第5回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、2013年8月24日、名古屋

3) 土方康基、当科における難治性悪性腫瘍に対する免疫療法臨床試験の現状、第11回日本免疫治療学研究会学術集会、2014年2月22日、東京

4) 鶴田敏久、谷憲三朗他、既治療不応進行胆道癌患者を対象としたカクテルペプチド癌ワクチンOCV-C01療法:第Ⅱ相医師主導治験文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラム、厚生労働省早期・探索的臨床試験拠点整備事業・臨床研究中核病院整備事業 平成25年度成果報告会 2014年3月1日、東京

5) 鶴田敏久、谷憲三朗他、医師主導治験へのクリティカル・パス導入の試み:第16回日本医療マネジメント学会 2014年6月13-14日 岡山

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:特になし、

2. 実用新案登録:特になし

3. その他:特になし

分担研究報告書

低用量BCG膀胱腔内注入維持療法の再発予防効果ならびに安全性に関するランダム化比較試験

研究分担者 内藤 誠二

研究要旨

平成25年5月にIRB承認を得て試験を開始し、現在、研究分担者施設19施設において症例登録を行っている。

研究分担者氏名： 内藤 誠二  
所属機関名、職名：九州大学大学院医学研究院  
泌尿器科学分野、教授

発、増悪、死亡)の発現状況ならびに有害事象の発現状況を評価し、研究全体の継続に及ぼす影響を評価し、科学性と倫理性の確保に努める。

A. 研究目的

中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱癌（Ta, T1）に対する TURBT 後の標準量 BCG 導入療法＋低用量 BCG 維持療法が、標準的レジメである標準量 BCG 導入療法より再発・進展予防効果において優れ、かつ安全に、高い完遂率をもって実施できかどうかを、前向き無作為化比較試験によって検証する。

B. 研究方法

中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱癌（Ta, T1）患者を以下の2群にランダム化する。A群：標準量 BCG 導入療法（80 mg/週×6回）、B群：標準量 BCG 導入療法（80 mg/週×6回）＋低用量 BCG 維持療法（40 mg/週×3回 ×4コース）。主要評価項目は、無再発生存期間、副次評価項目は、無増悪生存期間、生存期間、プロトコル治療の完遂率、有害事象発現状況とした。登録予定患者は合計180例、登録期間は1.5年、追跡期間は最短3年とし、総研究期間は5年である。

（倫理面への配慮）

参加患者の安全性確保については、適格条件やプロトコル治療の中止変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化されている。また、「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言などの国際的倫理原則に従い以下を遵守している。

- 1) 研究実施計画書の IRB 承認が得られた施設のみから患者登録を行う。
- 2) すべての患者について登録前に十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得る。
- 3) データの取り扱い上、患者氏名等直接個人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保し、個人情報（プライバシー）保護を厳守する。
- 4) 研究の第三者的監視として、効果・安全性評価委員会を設置する。この委員会は中間解析として二次登録が100例に達した時点でイベント(再

C. 研究結果

平成25年1月8日に第1回班会議を開催して、プロトコル作成の最終協議を行い、平成25年1月末にプロトコル及び患者同意説明文書を完成した。現在、20施設の研究分担者施設のうち19施設においてIRBの承認を得ており、症例登録を開始している。平成25年7月に最初の被験者を組み入れ、現在（平成26年3月6日時点）の登録症例数は14例である。

D. 考察

登録症例数が伸び悩んでおり、研究参加施設に症例登録数の見込みとプロトコルの問題点についてアンケート調査を行い、全体班会議を開催して症例登録を促進する対策を講じる。そして目標症例数の登録完了と、プロトコル治療並びにフォローアップを継続して、研究遂行に邁進したい。

E. 結論

平成24年度の試験準備期間後、平成25年5月17日にIRB承認を得て、試験を開始した。また同年度中に20施設ある研究分担者施設のうち19施設でのIRBの承認を得て、症例登録を開始した。当初の計画（平成24年度）では、症例登録期間は平成25年1月から平成26年6月までとしていたが、症例登録開始は計画より約4ヵ月遅れており、また登録症例数も伸び悩んでいる。引き続き、登録症例数を伸ばす方策を取り、症例登録の推進を図っていきたい。症例登録の締め切りは4ヵ月スライドして平成26年9月となるが、その後の観察期間（最低3年）、症例集積、解析期間（2ヵ月）は当初の計画通りとするため、総研究期間は平成25年度報告時と同様の5年4ヵ月となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Aoki T, Miyamoto T, Kamimura T, Shimono N, and <u>Akashi K.</u>	Clinical Impact of Fluoroquinolone- Resistant Escherichia coli in the Fecal Flora of Hematological Patients with Neutropenia and Levofloxacin Prophylaxis.	PloS One	9	e85210	2014
Suzuki M, Yamagata K, Shino M, Aikawa Y, <u>Akashi K.</u> , Watanabe T, and Kitabayashi I.	Nuclear export signal within CALM is necessary for CALM-AF10-induced leukemia.	Cancer Sci	105	315-323	2014
Fukata M, Ishikawa F, Najima Y, Yamauchi T, Saito Y, Takenaka K, Miyawaki K, Shimazu H, Shimoda K, Kanemaru T, Nakamura K, Odashiro K, Nagafuji K, Harada M, and <u>Akashi K.</u>	Contribution of bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells to the generation of donor-marker(+) cardiomyocytes in vivo.	PloS One	8	e62506	2013

氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Welner RS, Bararia D, Amabile G, Czibere A, Benoukraf T, Bach C, Wansa KD, Ye M, Zhang H, Iino T, Hetherington CJ, <u>Akashi K</u> , Tenen DG.	C/ebpalpha is required for development of dendritic cell progenitors.	Blood	121	4073-4081	2013
Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, Ayano M, Tanaka A, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Niino H, <u>Akashi K</u> , Horiuchi T.	The cytotoxic effects of certolizumab pegol and golimumab mediated by transmembrane tumor necrosis factor alpha.	Inflamm Bowel Dis	19	1224-1231	2013
Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Kamimura T, Shimono N, <u>Akashi K</u> .	Antibiotic rotation for febrile neutropenic patients with hematological malignancies: Clinical significance of antibiotic heterogeneity.	PloS One	8	e54190	2013



# Clinical Impact of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in the Fecal Flora of Hematological Patients with Neutropenia and Levofloxacin Prophylaxis

Yong Chong<sup>1\*</sup>, Shinji Shimoda<sup>1</sup>, Hiroko Yakushiji<sup>2</sup>, Yoshikiyo Ito<sup>3</sup>, Takatoshi Aoki<sup>3</sup>, Toshihiro Miyamoto<sup>1</sup>, Tomohiko Kamimura<sup>3</sup>, Nobuyuki Shimono<sup>4</sup>, Koichi Akashi<sup>1</sup>

**1** Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan, **2** Department of Clinical Laboratory, Hara-Sanshin Hospital, Fukuoka, Japan, **3** Department of Blood and Marrow Transplantation, Hara-Sanshin Hospital, Fukuoka, Japan, **4** Center for the Study of Global Infection, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan

## Abstract

**Background:** Fluoroquinolone prophylaxis in patients with neutropenia and hematological malignancies is said to be effective on febrile neutropenia (FN)-related infection and mortality; however, the emergence of antibiotic resistance has become a concern. Ciprofloxacin and levofloxacin prophylaxis are most commonly recommended. A significant increase in the rate of quinolone-resistant *Escherichia coli* in fecal flora has been reported following ciprofloxacin prophylaxis. The acquisition of quinolone-resistant *E. coli* after levofloxacin use has not been evaluated.

**Methods:** We prospectively examined the incidence of quinolone-resistant *E. coli* isolates recovered from stool cultures before and after levofloxacin prophylaxis in patients with neutropenia from August 2011 to May 2013. Some patients received chemotherapy multiple times.

**Results:** In this trial, 68 patients were registered. Levofloxacin-resistant *E. coli* isolates were detected from 11 and 13 of all patients before and after the prophylaxis, respectively. However, this was not statistically significant ( $P=0.65$ ). Multiple prophylaxis for sequential chemotherapy did not induce additional quinolone resistance among *E. coli* isolates. Interestingly, quinolone-resistant *E. coli*, most of which were extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producers, were already detected in approximately 20% of all patients before the initiation of prophylaxis. FN-related bacteremia developed in 2 patients, accompanied by a good prognosis.

**Conclusions:** Levofloxacin prophylaxis for neutropenia did not result in a significant acquisition of quinolone-resistant *E. coli*. However, we detected previous colonization of quinolone-resistant *E. coli* before prophylaxis, which possibly reflects the spread of ESBL. The epidemic spread of resistant *E. coli* as a local factor may influence strategies toward the use of quinolone prophylaxis.

**Citation:** Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Aoki T, et al. (2014) Clinical Impact of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in the Fecal Flora of Hematological Patients with Neutropenia and Levofloxacin Prophylaxis. PLoS ONE 9(1): e85210. doi:10.1371/journal.pone.0085210

**Editor:** Mark Alexander Webber, University of Birmingham, United Kingdom

**Received:** July 27, 2013; **Accepted:** November 20, 2013; **Published:** January 22, 2014

**Copyright:** © 2014 Chong et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The authors did not receive any funding.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: ychong@gj9.so-net.ne.jp

## Introduction

Febrile neutropenia is a serious adverse event in patients with hematological malignancies, and is a common side effect of chemotherapy [1]. The presence of bacteremia related to febrile neutropenia (FN) often increases infection-related morbidity and mortality. The use of antibiotic prophylaxis, particularly fluoroquinolones (quinolones), has been known to positively affect the prevalence of febrile episodes, bacteremia, and even infection-related mortality [2–4]. However, the emergence of bacterial resistance to antibiotics, especially quinolones, has become a concern, and routine prophylactic use remains controversial [5–6]. Particularly, the prevalence of a breakthrough infection of quinolone-resistant gram-negative bacteremia, predominantly related to *Escherichia coli*, has been reported in neutropenic patients

receiving quinolone prophylaxis [2,7–12]. Bacteremia is presumed to develop from these quinolone-resistant *E. coli* strains after gut colonization, which is the result of antibiotic prophylaxis. In fact, quinolone-resistant *E. coli* were significantly detected in the fecal flora after ciprofloxacin or norfloxacin prophylaxis [13,14]. According to the guidelines of the Infectious Diseases Society of America, ciprofloxacin and levofloxacin, both quinolones, are recommended candidates for antibiotic prophylaxis; however, levofloxacin is the most preferred quinolone because of its activity against gram-positive bacteria [15]. Despite these previous efforts, the effect of quinolone-resistant *E. coli* present in the fecal flora on patients receiving levofloxacin prophylaxis for neutropenia has not been examined. According to the findings of previous studies, we assumed that a significant acquisition of levofloxacin-resistant *E. coli* would be present in the fecal flora after prophylaxis in patients

with neutropenia. In this study, we prospectively compared the detection rates of levofloxacin-resistant *E. coli* isolates recovered from stool cultures before and after quinolone prophylaxis for hematological patients with neutropenia.

## Methods

### Patients and Ethics Statement

From August 2011 to May 2013, 68 patients were recruited from a single hematological unit with 37 beds at Hara-Sanshin Hospital. The protocol was approved, through the ethics review process, by the Institutional Review Board of the Hara-Sanshin Hospital. Written informed consent was obtained from all registered patients before the study protocol was implemented, in order to publish these case details. Infection control measures including hand-washing promotion and isolation procedures were maintained throughout the study.

### Enrollment

Inpatients with neutropenia were enrolled in the study. Neutropenia was defined as an absolute neutrophil count of  $<1,000$  cells/mm<sup>3</sup> or a neutrophil count with a predicted decrease to  $<1,000$  cells/mm<sup>3</sup> during the following 48 h. Patients were excluded if they reported a history of antibiotic use within 90 days of the baseline measurement, were treated for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, presented with evidence of hepatic and/or renal dysfunctions (defined as a serum transaminase level of more than 3 times the upper limit of the normal range or as a serum creatinine level of more than 1.5 times the upper limit of the normal range), or had a history of hypersensitivity to fluoroquinolones. Patients treated for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation were excluded from the trial because a confirmative diagnosis of febrile neutropenia is often difficult owing to the presence of other causative factors such as graft-versus-host disease and engraftment syndrome. Antimycotic agents were administered for most of the registered neutropenic patients.

### Treatment protocol

Antibiotic prophylaxis with levofloxacin at a dosage of 500 mg/day was administered to all patients for the duration of the study. Levofloxacin was administered to patients without febrile neutropenia until their neutrophil counts recovered. However, levofloxacin prophylactic treatment was discontinued when the empirical antibiotic therapy for febrile neutropenia was initiated. Febrile neutropenia was defined as: (1) fever, a single axillary temperature of  $>38.0^{\circ}\text{C}$  or an axillary temperature  $>37.5^{\circ}\text{C}$  lasting 1 hour, and (2) neutropenia, defined according to the aforementioned guidelines.

### Microbiology

For each patient, 2 stool samples were examined. The first sample was collected before levofloxacin administration, and the second sample after prophylaxis was discontinued. If a fever at the level suggesting febrile neutropenia was found, blood samples were also collected. If multiple organisms were detected from a single sample, they were counted and analyzed as independent isolates. An automated blood culture system (BACTEC) was used for each test. Stool samples were cultured, chiefly using 5% Sheep Blood Agar medium (BD) and CHROMagar Candida medium (BD). The species were identified using the Vitek system (bioMerieux Japan Ltd., Tokyo, Japan). Antibiotic susceptibilities were determined by the breakpoints standardized by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly the NCCLS) [16].

The screening and confirmation tests for ESBL and metallo- $\beta$ -lactamase were conducted according to the recommendation of the CLSI [16]. In addition,  $\beta$ -lactamase producers were confirmed using a Cica  $\beta$  test I/MBL kit (Kanto Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan). *Clostridium difficile* toxin A and B were examined in stool samples using a TOX A/B QUIK CHEK kit (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan).

### Study Outcomes

The primary outcome was the rates of levofloxacin-resistant *E. coli* detected in the fecal flora before and after quinolone prophylaxis for all patients. We also analyzed the association between multiple prophylaxis and the additional acquisition of levofloxacin-resistant *E. coli*.

### Statistical analysis

We powered the trial on the basis of the secondary outcome, the rates of levofloxacin-resistant *E. coli* detected in the fecal flora before and after prophylaxis for patients with the second registration for cycle 2 of chemotherapy. Previous studies investigating the use of fluoroquinolones (ciprofloxacin and norfloxacin) for the prophylaxis of febrile neutropenia showed that the rate of the newly acquired quinolone-resistant *E. coli* in the fecal flora was approximately 30% [13,14]. Sample size calculations indicated that enrollment of at least 21 patients was required to achieve 80% power for the detection of at least a 30% acquisition rate, with a 2-sided alpha of 0.05. Data were analyzed after the study period ended. The recruitment of study participants stopped once the target sample size was achieved. Outcomes were assessed using chi-square tests. A  $P<0.05$  was considered to be statistically significant. All statistical calculations were performed using SAS software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

## Results

### Characteristics of patients registered for levofloxacin prophylaxis

The characteristics of all 68 patients enrolled in this study were shown in Table 1. Antibiotic prophylaxis was conducted for chemotherapy-induced neutropenia in almost all cases. A portion of patients were registered multiple times for sequential chemotherapy. Thirty three of all the 68 enrolls were applied for more than cycle 2 of chemotherapy. Precisely, within the first 35 enrolls, 21 patients were registered for cycle 2 of sequential chemotherapy. Within the second 21 enrolls, 12 patients were registered for more than cycle 3 of chemotherapy (Table 1).

### Fluoroquinolone-resistant *E. coli* in the fecal flora of patients with levofloxacin prophylaxis

The etiology of bacterial isolates in the fecal flora was compared before and after prophylaxis. The incidence of gram-negative isolates decreased from 92 of 254 (36.2%) to 17 of 169 (10.1%) before and after prophylaxis, respectively. In contrast, the detection rate of gram-positive isolates significantly increased (63.8%,  $n = 162$  vs. 89.9%,  $n = 152$ ) before and after prophylaxis. The prevalence of levofloxacin-resistant *E. coli* isolates recovered from stool cultures both before and after antibiotic prophylaxis are shown in Table 2. Quinolone-resistant *E. coli* strains were detected in 11 of the 68 total samples collected before antibiotic prophylaxis. After prophylaxis, 13 of the 68 samples recovered the quinolone-resistant *E. coli*. The rates of levofloxacin-resistant *E. coli* stool isolates before and after prophylaxis were not significantly different ( $P=0.65$ ). ESBL producers were detected

**Table 1.** Characteristics of patients registered for levofloxacin prophylaxis.

Characteristic	Value for group
No. of patients	68
Age, mean years±SD (range)	68.0±6.4 (53–91)
Male sex	33 (48.5)
Malignant disease	
Leukemia	32 (47.0)
Lymphoma	24 (35.3)
MDS	3 (4.4)
Multiple myeloma	8 (11.8)
Other	1 (1.5)
Therapy for hematological disorders	
Chemotherapy	67 (98.5)
Autologous HSCT	2 (2.9)
No. of cycles	
cycle 1	35
cycle 2	21
cycle >3	12
mean days of prophylaxis, mean days±SD (range)	12.2±14.8 (4–96)
episodes of bacteremia	
gram-negative	1 (1.5)
gram-positive	1 (1.5)
prognosis: death	
Total	1 (1.5)
Infection-related death	0 (0.0)

Cycle 1, 2, and >3 indicate first, second, and more than third registration, respectively.

Episodes of bacteremia indicates febrile neutropenia-related bacteremia during levofloxacin prophylaxis.

Prognosis indicates death during prophylaxis and within 7 days after prophylaxis.

MDS, myelodysplastic syndromes; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

doi:10.1371/journal.pone.0085210.t001

in 7 of 11 and 7 of 13 *E. coli* isolates resistant to levofloxacin before and after prophylaxis, respectively. Thus, none of ESBL-producing *E. coli* was newly acquired in the fecal flora after quinolone prophylaxis. Newly acquired quinolone-resistant *E. coli* were detected in 2 cases during the first prophylaxis (Table 2). There were no newly detected quinolone-resistant *E. coli* for patients who underwent more than 2 cycles of chemotherapy. Among other gram-negative bacteria besides *E. coli*, levofloxacin resistance was detected in 1 sample before prophylaxis and 2 samples after.

### Mortality

In this study, febrile neutropenia-related bacteremia isolates including levofloxacin-resistant *E. coli* and *Staphylococcus epidermidis* were detected in 2 patients (Table 1). The detected bacteria were eliminated after appropriate antibiotic treatment. There were no deaths related to febrile neutropenia during prophylaxis. In addition, The levofloxacin agent adopted in this study was well tolerated. Although elevation of serum transaminase levels was observed in 4 patients, the observed levels were not considered severe. Moreover, no cases of diarrhea associated with *C. difficile* were observed for the duration of the study.

### Discussion

According to previous studies, we assumed that a significant acquisition of levofloxacin-resistant *E. coli* would be present in the fecal flora after prophylaxis in neutropenic patients. However, we did not find a significant acquisition of resistant *E. coli*. Moreover, repeated prophylaxis for more than 2 cycles of chemotherapy did not affect the acquisition of quinolone-resistant *E. coli*. The methods by which quinolone prophylaxis in neutropenic patients possibly affects bacterial antibiotic resistance and patient's prognosis is controversial. Our findings would be suggestive of the benefits and difficulties of quinolone prophylaxis for neutropenia.

In this study, the etiology of bacterial isolates in the fecal flora changed dramatically after quinolone prophylaxis. This etiological change of the fecal flora after the use of quinolone is similar to that of bacteremic isolates in patients who underwent quinolone prophylaxis [17–19]; therefore, this suggests that the etiology of bacteremia isolates in patients with febrile neutropenia is mostly attributable to the species of the fecal flora in these patients.

All *E. coli* isolates detected after the quinolone prophylaxis were resistant to levofloxacin in this study, and most of them were found to have already existed before initiation of prophylaxis. The frequency of levofloxacin-resistant *E. coli* was 16.2% (11/68), of which 7 samples contained ESBL producers (Table 2). ESBL-producing bacteria have been reported resistant to quinolones [20–21]. All ESBL-producing *E. coli* isolates detected in this study were also shown to be quinolone-resistant. As previous reports indicate, quinolone-resistant *E. coli* have caused breakthrough bacteremia during prophylaxis with quinolones. Here, it should be stressed that the detection of quinolone-resistant *E. coli* during the prophylaxis is not followed by the increase of mortality at this time [2–4]. As suggested by our findings including this data [19], the significant decrease in *E. coli* after quinolone prophylaxis may be related to the lack of increase found in mortality.

Recently, other papers reported interesting findings regarding the field of quinolone prophylaxis for patients with neutropenia [22,23]. Ng et al. showed that gram-negative isolates, which were all resistant to quinolones, were more frequently recovered from the blood of patients after quinolone prophylaxis than those who had never had prophylaxis. This finding is in contrast with previous observations mentioned above. Ng et al. have implicated that the local prevalence of quinolone-resistant gram-negative bacteria, particularly *E. coli*, may be associated with their results [22]. Thus, a high prevalence of quinolone-resistance among gram-negative bacteria has been suggested to have a strong impact on the selection of those resistant bacteria under quinolone prophylaxis; however, the etiology of the fecal flora was not examined in their study.

This study did not consider the frequency of quinolone-resistant *E. coli* in the fecal flora before initiating prophylaxis. This is a limitation of our study. However, we followed strict inclusion criteria. Patients have a history of antibiotic use within 90 days of first registration for the study were excluded in order to obtain accurate data regarding the etiology of the fecal flora. Yet, our strict criteria created difficulties in recruiting patients for this study. Future studies using larger sample sizes are needed.

In this study, levofloxacin-resistant *E. coli* in the fecal flora were not newly acquired at a significant level after prophylactic administration. Interestingly, nearly 20% of all patients in this study already presented with quinolone-resistant *E. coli* before the initiation of prophylaxis. Based on these findings, the development of bacteremia due to quinolone-resistant *E. coli* in patients with quinolone prophylaxis may be not only caused by the newly

**Table 2.** Fluoroquinolone-resistance of *E. coli* isolates in fecal sample before and after levofloxacin prophylaxis.

Sample	Before prophylaxis		After	
	No. (%) of samples with quinolone-resistant <i>E. coli</i>	No. (%) of samples with ESBL-producing <i>E. coli</i>	No. (%) of samples with quinolone-resistant <i>E. coli</i>	No. (%) of samples with ESBL-producing <i>E. coli</i>
Total, n = 68	11 (16.1) <sup>a</sup>	7 (10.3)	13 (19.1) <sup>a</sup>	7 (10.3)
Each cycle				
cycle 1, n = 35	5 (14.3)	2 (5.7)	7 (20.0)	2 (5.7)
cycle 2, n = 21	4 (19.0)	3 (14.3)	4 (19.0)	3 (14.3)
cycle >3, n = 12	2 (16.7)	2 (16.7)	2 (16.7)	2 (16.7)

<sup>a</sup>P-value shows statistical comparison for each variable.

<sup>a</sup>p = 0.65.

Cycle 1, 2, and >3 indicate first, second, and more than third registration, respectively.

ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase.

doi:10.1371/journal.pone.0085210.t002

acquired quinolone-resistant *E. coli* strains after prophylaxis, but also the resistant strains which already exist before the initiation of prophylaxis. The previous colonization of quinolone-resistant *E. coli* before prophylaxis is likely attributed to the epidemic spread of the resistant strains. Currently, quinolone-resistant *E. coli*, including ESBL producers, have been rapidly spreading worldwide [21,24]. In our hospital, ~20% of *E. coli* isolates detected in inpatients and outpatients were ESBL-producers [25]. Therefore, no conclusion can be made as to whether quinolone prophylaxis should be administered for all patients with neutropenia. The high prevalence of quinolone-resistant *E. coli* as a local factor may be a more serious concern for the introduction of the prophylactic use; therefore, continued accumulation of data on both of blood and stool cultures is warranted.

## References

- Viscoli C, Castagnola E. (2002) Treatment of febrile neutropenia: what is new? *Curr Opin Infect Dis* 15: 377–82.
- Bucaneve G, Micozzi A, Menichetti F, Martino P, Dionisi MS, et al. (2005) Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. *N Engl J Med* 353: 977–87.
- Gafter-Gvili A, Fraser A, Paul M, Leibovici L. (2005) Meta-analysis: antibiotic prophylaxis reduces mortality in neutropenic patients. *Ann Intern Med* 142: 979–95.
- Leibovici L, Paul M, Cullen M, Bucaneve G, Gafter-Gvili A, et al. (2006) Antibiotic prophylaxis in neutropenic patients: new evidence, practical decisions. *Cancer* 107: 1743–51.
- Pascoe J, Steven N (2009) Antibiotics for the prevention of febrile neutropenia. *Curr Opin Hematol* 16: 48–52.
- Cullen M, Bajjal S (2009) Prevention of febrile neutropenia: use of prophylactic antibiotics. (2009) *Br J Cancer* 101 Suppl 1: S11–4.
- Cometta A, Calandra T, Bille J, Glauser MP. (1994) Escherichia coli resistant to fluoroquinolones in patients with cancer and neutropenia. *N Engl J Med* 330: 1240–1.
- Carratala J, Fernandez-Sevilla A, Tubau F, Callis M, Gudiol F. (1995) Emergence of quinolone-resistant Escherichia coli bacteremia in neutropenic patients with cancer who have received prophylactic norfloxacin. *Clin Infect Dis* 20: 557–60; discussion 61–3.
- Gomez L, Garau J, Estrada C, Marquez M, Dalmau D, et al. (2003) Ciprofloxacin prophylaxis in patients with acute leukemia and granulocytopenia in an area with a high prevalence of ciprofloxacin-resistant Escherichia coli. *Cancer* 97: 419–24.
- Reuter S, Kern WV, Sigge A, Dohner H, Marre R, et al. (2005) Impact of fluoroquinolone prophylaxis on reduced infection-related mortality among patients with neutropenia and hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 40: 1087–93.
- Saito T, Yoshioka S, Inuma Y, Takakura S, Fujihara N, et al. (2008) Effects on spectrum and susceptibility patterns of isolates causing bloodstream infection by restriction of fluoroquinolone prophylaxis in a hematology-oncology unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 209–16.
- Sohn BS, Yoon DH, Kim S, Lee K, Kang EH, et al. (2012) The role of prophylactic antimicrobials during autologous stem cell transplantation: a single-center experience. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 1653–61.
- Carratala J, Fernandez-Sevilla A, Tubau F, Dominguez MA, Gudiol F. (1996) Emergence of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli in fecal flora of cancer patients receiving norfloxacin prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 503–5.
- Perea S, Hidalgo M, Arcediano A, Ramos MJ, Gomez C, et al. (1999) Incidence and clinical impact of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli in the faecal flora of cancer patients treated with high dose chemotherapy and ciprofloxacin prophylaxis. *J Antimicrob Chemother* 44: 117–20.
- Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, et al. (2011) Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* 52: e56–93.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2004) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 14th Informational Supplement. Wayne, Pennsylvania: NCCLS
- Ramphal R. (2004) Changes in the etiology of bacteremia in febrile neutropenic patients and the susceptibilities of the currently isolated pathogens. *Clin Infect Dis* 39 Suppl 1: S25–31.
- Craig M, Cumpston AD, Hobbs GR, Devetten MP, Sarwari AR, et al. (2007) The clinical impact of antibacterial prophylaxis and cycling antibiotics for febrile neutropenia in a hematological malignancy and transplantation unit. *Bone Marrow Transplant* 39: 477–82.
- Chong Y, Yakushiji H, Ito Y, Kamimura T. (2011) Clinical impact of fluoroquinolone prophylaxis in neutropenic patients with hematological malignancies. *Int J Infect Dis* 15: e277–81.
- Canton R, Coque TM. (2006) The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9: 466–75.
- Chong Y, Ito Y, Kamimura T. (2011) Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Infect Genet Evol* 11: 1499–504.
- Ng ES, Liew Y, Earnest A, Koh LP, Lim SW, et al. (2011) Audit of fluoroquinolone prophylaxis against chemotherapy-induced febrile neutropenia

## Acknowledgments

We thank the 38 staff members of the hematological unit who collected samples for blood and stool cultures and the laboratory technicians who facilitated the biochemical and microbiological tests.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: YC. Performed the experiments: YC YI TA TK. Analyzed the data: YC YI TA TK. Contributed reagents/materials/analysis tools: YC HY. Wrote the paper: YC. Edited the manuscript: SS TM NS KA.