

201420038A

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

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

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 全司

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告			
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	岡田全司	-----	1
II. 分担研究報告			
1. 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	中島俊洋	-----	61
2. HVJ-EによるマクロファージからのIL-18産生増強機構、及びIL-18とIL-12の協調的なT細胞からのIFN- γ 産生増強機構の解析	金田安史	-----	80
3. HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンの臨床応用：前臨床試験、非臨床試験について他の医師主導試験の経験との比較	井上義一	-----	83
4. 多剤耐性結核についての臨床的検討	露口一成	-----	88
5. 近畿地区多剤耐性結核患者の臨床試験統括。非臨床試験の計画。結核ワクチン薬効解析。患者細胞性免疫測定。	朝野和典	-----	92
6. 関東地区多剤耐性結核患者の細胞性免疫・抗体の測定に関する研究	庄司俊輔	-----	96
7. 関東地区（国立病院機構茨城東病院）の患者の臨床試験統括	齋藤武文	-----	98
8. 多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの実用化を可能にする効率的な臨床開発計画とその一般化に関する研究	三上礼子	-----	102
9. 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患者の動向と関西地区の多剤耐性結核患者アンケート調査、ならびに近畿中央胸部疾患センターの現入院患者の実態	松本智成	-----	104
10. 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	熊ノ郷淳	-----	109
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----	111
IV. 研究成果の刊行物・別刷		-----	113

平成26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〕

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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・
客員研究員

研究要旨 (図1)

I. ワクチン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を作製 (中島、岡田)。
2. これを元に、GMP レベルの pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA を 1000 mg作製した (岡田、中島、井上)。
3. これを本年度中にサルに用いて本ワクチンの安全性試験・毒性試験 (中島、岡田)。
4. pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNA を 180 mg作製した (岡田)。マウスで本ワクチンの信頼性基準適合試験のための用法配合比予備試験 (岡田)。
5. 治験薬 GMP 製造：暫定規格設定に必要な複数ロットの治験薬製造を完了。品質管理試験：信頼性検証バリデーションを実施。高精度のデータを取得した。

II. 用法・配合比 (pDNAとHVJ-E) 薬効試験

1. ワクチン用法検討が進展 (平26岡田)。用法検討 (DNAワクチン投与回数及び投与方法検討)。BALB/c マウスにワクチンを2週間に3回100 μ g筋肉内投与し、4w後の脾細胞を抗原HSP65蛋白、PPDで1日培養。コントロールより約10倍強いIFN- γ 及びIL-2産生 (結核免疫能) を増強した。ワクチン効果確認。(岡田、井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷)。
2. マウスでワクチンDNAとHVJ-E配合比検討 (岡田)。pDNA:HVJ-E=1:1が強力な結核免疫を誘導。
3. HVJ-Eによる遺伝子発現性は中和抗体に阻害されず、HVJ-Eの連続投与可能。HVJ-EへのIL-12遺伝子封入により、M ϕ のIL-18を介しIFN- γ (結核免疫) 誘導 (金田)。

III. GLP毒性試験・安全性試験

1. GLP毒性試験・安全性試験 (非臨床試験)：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)。
2. カニクイザルに本ワクチンを皮下大量投与して毒性試験を行った。摂餌量、体重、血液検査。より高い用量の被験物質投与可能な皮下投与。

3. サル血中ヒトIL-12濃度測定法の検討及びバリデーション： 本ワクチンをカニクイザルに投与した時の血中ヒトIL-12濃度を測定するための分析系を確立。
4. 本ワクチンの投与液測定法バリデーション： 安全性試験で使用した被験物質の投与量確認試験（岡田）。

IV. PMDA事前面談

1. PMDA事前面談を平成26年12月5日に実施。治験届に必要なサル安全性試験パッケージ案を策定。投与経路の最適な筋肉内投与で毒性・安全性試験項目を策定。また、薬物動態（トキシコキネティクス）は、プラスミドDNAの投与により発現するIL-12を測定（岡田、中島、井上、三上）。
2. 毒性・薬効試験項目、品質関連事項の非臨床試験。

V. 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治験に向けての計画を行った。①近畿中央：55名MDR-TB（7年間）のうち20名XDR-TB（露口、松本）。②東京病院：10年間に40名MDR-TB、死亡者多い（庄司）。③茨城東病院：複十字病院を含め1年間でMDR-TB 18名（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）。

・研究代表者

- (1) ① コメント：臨床試験では、IL-12 遺伝子をヒトに投与することによる、その発現の持続性、生体への影響等： 対応：下記の作製した(3)の pVAX/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンを用いて、実験動物（サル等）で発現の持続性、生体への影響を含む安全性試験・毒性試験を本年度（平成26年度）開始した。
 - ② 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。
 - ③ コメント：多剤耐性結核患者の多いアジア諸国と国際協力研究をすすめたらどうか。：対応：岡田が厚労省支援ですでに確立したアジア諸国との結核ネットワーク（タイKhusmith教授、韓国等）を活用して進める計画。
- (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を作製した。（岡田・中島）
 - (3) これを元に、GMP レベルの pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA を 1000 mg作製した。これをサルに用いてこのワクチンの非臨床試験（安全性試験・毒性試験）を行う計画を立案した（岡田、中島、井上）。
 - (4) pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNA を 180 mg作製した（岡田、井上）。
 - (5) マウスでこのワクチンの信頼性基準適合試験のための用法・配合比予備試験を実施した。用法検討（ワクチン投与回数及び投与方法検討）。BALB/c マウスにワクチンを 2 週間に 1~6 回 100 μ g 筋肉内投与し、4w 後の脾細胞を結核菌由来 HSP65 蛋白、PPD で *in vitro* 刺激した。3 回投与がコントロール（溶媒）より最も強く（約 10 倍）IFN- γ 及び IL-2 産生（T 細胞免疫）を増強し、ワクチン効果確認（岡田、井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷）。投与方法は筋肉投与の方が皮内投与より 4 倍 T 細胞免疫を増強させた。
 - (6) マウスで、ワクチン DNA とアジュバント HVJ（Hemagglutinating Virus of Japan）-E の配合比を検討した。
pDNA：HVJ-E=1：1 及び 1：4 が強力な結核免疫を誘導した。さらに、外部委託の免疫原性予備試験で pDNA：HVJ-E が 1：1 で強力な結核免疫を誘導した。
 - (7) PMDA 事前面談を平成 26 年 12 月 5 日に行った。治験届に必要な安全性試験パッケージ案を策定した。

投与経路の最適化検討の結果、投与経路を皮下投与から筋肉内投与に変更してサル毒性・安全性試験項目、試験デザインを策定した。〔I. ①反復投与毒性試験 (GLP 適用)。②薬物動態 (TK) 測定。③中枢神経系安全性薬理試験。 II. 安全性薬理試験 (サル心血管系、呼吸器系) (GLP 適用)〕

- (8) カニクイザルに本ワクチンを大量皮下投与し毒性試験 (本年度すでに実施: PMDA 事前面談で承認済み)。サル雌雄各 2 匹×2 群 (対照群+投薬群)、計 8 匹で高用量のワクチン投与の毒性兆候発現を評価。投与後 14 日間の摂餌量、体重、血液学的検査、血液生化学的検査 (岡田、中島、井上、露口、朝野、熊ノ郷)。
- (9) サル薬物動態 (TK) 測定法確定試験とバリデーション研究を実施した (信頼性基準)。サル血中のヒト IL-12 の濃度測定法を検討し、その測定法の妥当性を確認。
- (10) 本ワクチンの投与液測定法バリデーション研究を実施した (信頼性基準)。pDNA と HVJ-E 混合物の濃度測定法を検討し、測定法の妥当性確認。

・研究分担者 (中島俊洋)

- (1) GMP レベル治験薬製造用本ワクチンの大腸菌マスターセルバンク (MCB) を作製。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。ICH/Q5D ガイドラインに従い MCB を調製、ICH の Q6B・Q5D ガイドライン準拠の特性解析、品質試験で適格性を実証した。
- (2) PMDA 事前面談 (平成 26 年 12 月 5 日): 毒性・薬効薬理試験項目について: ワクチン成分のプラスミド DNA を HVJ-E と配合し被験物質とし、治験届に必要なサル安全性試験パッケージ案策定を行った (GLP 毒性試験: サルを用いて試験項目、試験デザイン)。また、薬物動態 (TK: トキシコキネティクス) は、プラスミド DNA 投与により発現するヒト IL-12 を測定。治験薬 GMP 製造は、暫定規格の設定に必要な複数ロットの治験薬製造を完了。品質管理試験は信頼性を検証するバリデーションを実施し、高精度のデータを取得した。

・研究分担者 (金田安史)

- (1) 抗 HVJ 抗体が存在しても遺伝子発現の阻害なし。HVJ-E による細胞への遺伝子導入融合反応が抗体の吸着より迅速に起こる。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ず連続投与が可能である。
- (2) HVJ-E に HSP65 遺伝子と IL-12 遺伝子を封入すると結核に対する免疫反応を強く誘導。HVJ-E が Mφ に作用して IL-18 誘導。この IL-18 と IL-12 が協調して T cell に作用し、IFN-γ の産生を誘導。この IFN-γ が T cell に作用し IL-12 受容体の発現増強。IFN-γ 産生増強サイクルによる Th1 優位の免疫反応を明らかにした。

・研究分担者 (井上義一)

- (1) マウスで本ワクチンの用法・配合比試験の非臨床試験を行った (井上、岡田、中島)。
- (2) 三上、中島と岡田で PMDA への対面助言の手順等考案。
- (3) サルによる単回投与毒性試験も進展した (岡田、井上)。

・研究分担者 (露口一成)

- (1) NHO 近畿中央胸部疾患センターの多剤耐性結核の調査・検討と、結核ワクチンの必要性評価。2006 年から 7 年間に 55 例。55 例中、初回治療 26、既治療 29 例。超多剤耐性結核 20 例。治癒 22、排菌陰性化 17、治療失敗 3、結核死 9 例。多剤耐性結核、特に超多剤耐性結核の治療成績は不良。結核治療ワクチン開発が必要。
- (2) 多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けての計画 (露口、井上、庄司、齋藤、松本、熊ノ郷)。

・研究分担者 (朝野和典)

- (1) 大阪大学医学部を中心として統括する、本ワクチンの臨床治験 (医師主導第 I 相治験) に向けて阪大医学部治験管理センターで調整中。
- (2) 医師主導治験に向けての組織化 (大阪大学を中心とした) (朝野、熊ノ郷、金田)。2011 年より阪大未来医療開発部の医師主導治験を開始し、2014 年 1 月現在で 7 件、他施設が調整している医師主導治験で

阪大が参加3件。2014年度から治験第I相試験用に、10床の治験専用病棟を設置。

・研究分担者（庄司俊輔）

- (1) 分担班を東京病院小林信之統括診療部長、永井英明部長、山根章、鈴木純子医長とすでに組織化した。
- (2) 2004年から2013年、東京病院の多剤耐性結核は43名。男性35名、女性8名。治癒7名、脱落1名、死亡8名、転出10名、治療継続6名。これにより、実際にワクチン投与する患者エントリー状況が推定できる。

・研究分担者（齋藤武文）

- (1) 茨城東病院・関東地区結核診療施設の多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けた検討。東京は男性、外国人若年層多い。郡部は日本人高齢者（2013年）。
- (2) 茨城東、複十字、神奈川循環器呼吸器病センターで1年間に多剤耐性結核18例、男性11、女性7例。日本人13、中国人2例。超多剤耐性結核2例（2014年）。

・研究分担者（三上礼子）

- (1) 岡田、井上とPMDAへの対面助言の手順等考案。
- (2) 本研究課題申請前に行われたPMDAとの薬事戦略相談により、開発の方向性が明らかになった。
- (3) 第I相臨床治験の計画を検討中である。

・研究分担者（松本智成）

- (1) 結核予防会大阪病院、大阪府立呼吸器アレルギー医療センター、近畿地区の多剤耐性結核の調査・人数調査検討。
- (2) 医師主導治験に向けての計画（露口、庄司、齋藤、松本、熊ノ郷）。

・研究分担者（熊ノ郷淳）

- (1) 近畿地区の結核診療施設を統括した。近畿中央胸部疾患、刀根山、大阪府立呼吸器アレルギーセンター等での多剤耐性結核の調査・検討開始。
- (2) 結核ワクチンの薬効解析基盤（M1、M2 M ϕ ）の誘導系を確立した。

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

臨床研究センター長

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

大阪大学大学院医学系研究科

感染制御医学講座

感染制御学

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

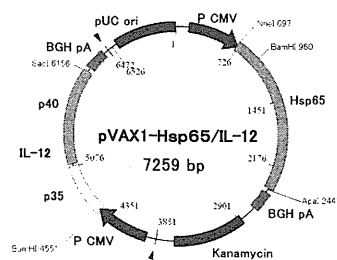
医学系研究科・呼吸器免疫アレルギー内科

教授

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・安全性の非臨床試験。
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。
①結核は世界の三大感染症の一つ ②多剤耐性結核(莫大な医療費、治療困難)の増加
③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 I 相臨床試験。



方法

多剤耐性結核に対する結核治療ワクチン実用化

1. 結核治療ワクチン非臨床試験及び第 I 相臨床試験の組織

- (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) NHO 呼吸器ネットワーク 65 施設グループリーダー(岡田、井上) (日本の 50% の多剤耐性結核患者)
- (2) 大阪大学(金田、朝野、熊ノ郷)
- (3) PMDA 薬事戦略相談 (岡田、ジェノメディア中島、井上、東海大学 三上)
 - ① 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・対面助言レベルの内容と評価され、すぐ事前面談となった。
 - ② 2013 年 6 月 20 日、2014 年 12 月 5 日 PMDA 事前面談実施

(4) 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

2. 非臨床試験(薬効・毒性・安全性)(岡田、中島、金田、熊ノ郷、朝野、井上)
3. 国立病院機構病院と大阪大学を中心に、第 I 相臨床試験
4. 評価: ①安全性。認容性。 ②多剤耐性結核菌の排菌数減少。免疫反応。

期待される効果

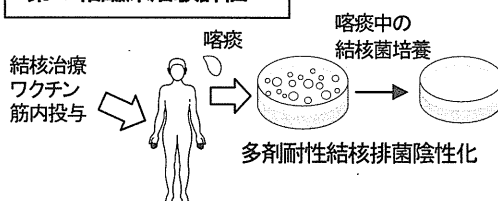
ヒト臨床応用



新しい結核治療ワクチン

- ①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
- ②毎年150万人の結核死亡者を治療・救命可能
- ③医療費節減。国際貢献。

第 I 相臨床試験評価



研究成果

I. ワクチン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を作製(中島、岡田)。
2. これを元に、GMPレベルの pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA を 1000 mg 作製した(岡田、中島、井上)。
3. これを本年度中にサルに用いて本ワクチンの安全性試験・毒性試験(中島、岡田)。
4. pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNA を 180 mg 作製した(岡田)。マウスで本ワクチンの信頼性基準適合試験のための用法配合比予備試験(岡田)。
5. 治験薬 GMP 製造: 暫定規格設定に必要な複数ロットの治験薬製造を完了。品質管理試験: 信頼性検証バリデーションを実施。高精度のデータを取得した。

II. 用法・配合比(pDNAとHVJ-E)薬効試験

1. ワクチン用法検討が進展(平 26 岡田)。用法検討(DNA ワクチン投与回数及び投与方法検討)。BALB/c マウスにワクチンを 2 週間に 3 回 100 μg 筋肉内投与し、4w 後の脾細胞を抗原 HSP65 蛋白、PPD で 1 日培養。コントロールより約 10 倍強い IFN-γ 及び IL-2 産生(結核免疫能)を増強した。ワクチン効果確認。(岡田、井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷)。
2. マウスでワクチン DNA と HVJ-E 配合比検討(岡田)。pDNA:HVJ-E=1:1 が強力な結核免疫を誘導。
3. HVJ-E による遺伝子発現性は中和抗体に関係なく連続投与可能。HVJ-E に IL-12 遺伝子封入により、Mφ の IL-18 を介し IFN-γ (結核免疫)誘導(金田)。

III. GLP 毒性試験・安全性試験

1. GLP 毒性試験・安全性試験(非臨床試験): 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)。
2. カニクイザルに本ワクチンを皮下大量投与して毒性試験を行った。摂餌量、体重、血液検査。より高い用量の被験物質投与可能な皮下投与。
3. サル血中ヒト IL-12 濃度測定法の検討及びバリデーション: 本ワクチンをカニクイザルに投与した時に血中のヒト IL-12 濃度を測定するための分析系を確立。
4. 本ワクチンの投与液測定法バリデーション: 安全性試験で使用した被験物質の投与量確認試験(岡田)。

IV. PMDA 事前面談

1. PMDA 事前面談を平成 26 年 12 月 5 日に実施。治験届に必要なサル安全性試験パッケージ案を策定。投与経路の最適な筋肉内投与で毒性・安全性試験項目を策定。また、薬物動態(トキシコキネティクス)は、プラスミド DNA の投与により発現する IL-12 を測定(岡田、中島、井上、三上)。
2. 毒性・薬効試験項目、品質関連事項の非臨床試験。

V. 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治験に向けての計画を行った。①近畿中央: 55 名 MDR-TB(7 年間)のうち 20 名 XDR-TB(露口、松本)。②東京病院: 10 年間に 43 名 MDR-TB、死亡者多い(庄司)。③茨城東病院: 複十字病院を含め 1 年間で MDR-TB 18 名。(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)

A. 研究目的 (図1) (表2、3、4、5)

- (1) 研究代表者(岡田全司)は本ワクチンの有効性を世界に先駆けて、マウスとヒト結核感染に最も近いサルで示した。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、国立病院機構で多剤耐性結核に対する医師主導治験(第I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(非臨床試験)。
- (3) 世界に先駆け、DNAワクチンガイドラインを策定する。first in humanの臨床治験を計画実施する。
- (4) 患者基礎データとして、国立病院機構(NHO)で加療の多剤耐性結核患者のプロフィールや治療内容把握。

研究の意義として：

- (1) 結核は世界の三大感染症で、特に多剤耐性結核は、有効な治療法がなく、感染や莫大な医療費等社会への影響大。世界で毎年約50万人発症。HVJ-エンベロープ(E)/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン(本ワクチン)治療が実用化されると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。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治療ワクチン有効。今後first in humanの臨床治験に進む必要。
- (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) 国内では新規技術DNAワクチン開発遅れ。国内開発ガイドライン策定に純国産品first in human治験が必要。

[具体的な研究目的]

1. カニクイザルの結核感染モデルにおいて、本DNAワクチンは治療効果と予防効果を認めることを確認できたため、多剤耐性結核に対する新規DNAワクチンとして、国内優先で医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律上の承認申請のために必要な医師主導治験を実施することを目的に研究開発を実施した。
国内では、治療用DNAワクチンを初期段階から開発している例がない。プラスミドDNAとHVJ-Eを

混合した製剤の開発例がない。

特に、本DNAワクチンについては、すべて国内製造所で治験薬GMP製造を実施する純国産の製剤であり、かつ国内優先で世界初となるfirst in human治験を実施する計画であるため、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)との薬事戦略相談を通じ、治験届に至る過程で国内の治療用DNAワクチン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。

2. IL-12とHVJ-Eを併用すると、マクロファージからのIL-18産生を介してT cellからの、IFN- γ の産生が誘導され、これによって免疫反応が増強される。HVJ-EによってIL-18産生増強が起こる分子機構を明らかにする(金田)。
3. MDR/XDR-TBの治療に対して岡田等が作成したDNAワクチン投与候補患者数を見積もるために大阪府結核予防会大阪病院における薬剤耐性結核ならびに多剤耐性結核の概数を調査する(松本)。
4. イソニアジド(INH)とリファンピシン(RFP)の両薬剤に耐性を示す結核は多剤耐性結核(MDR-TB)と定義される。MDR-TBの治療はきわめて困難であり、ワクチンや新規抗結核薬などを含め、新たな治療法の開発が望まれている。今回の研究では、現時点におけるMDR-TBの治療成績、予後などについて評価を行うために、NHO近畿中央胸部疾患センターでの臨床的検討を行った(露口)。
5. 関東地区(NHO茨城東病院、複十字病院、神奈川県立循環器呼吸器病センター)の多剤耐性結核症例状況を明らかにすること(齋藤)。
6. 結核ワクチン薬の医師主導治験実施のための体制整備(朝野)。
7. 本研究の主任研究者である、岡田全司独立行政法人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客員研究員により作成された、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独立行政法人国立病院機構東京病院(以下東京病院)での主たる研究目的は、医師主導治験(第I相)の実施であるが、初年度の平成25年度および次年度の平成26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した
(庄司)。

8. 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進
研究事業の研究課題として行われる多剤耐性結核

に対する新規治療用DNAワクチンの実用化に向け
た開発計画と今後の製剤開発における一般化の可
能性について検討する(三上)。

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(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)(平成25-27年度)

**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	
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 (大阪大学大学院)	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。プロトコール修正。
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
 - ①結核は世界の最大感染症の一つ
 - ②多剤耐性結核菌 (莫大な医療費、治療困難)の増加
 - ③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 2014
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. 900万人/年が新たに結核発症した。(2013)
4. 世界中で約150万人/年が結核によって死亡している。(2013)
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48万人/年(2013)が発症。21万人が死亡。

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
1. 結核治療ワクチン非臨床試験及び第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、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(岡田、ジェノメディア株式会社 中島、井上、東海大学 三上)
非臨床試験
① すでに、2013年5月31日 PMDA薬事戦略相談・個別面談実施。
② 2013年6月20日 PMDA事前面談実施
③ 2014年12月5日 PMDA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。日本の50%の多剤耐性結核患者
2. 非臨床試験(薬効・毒性・安全性)(岡田、中島、金田、熊ノ郷、朝野、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、露口、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)：有害事象共通語規準を指標とする安全性の評価
(2) 有効性(副次)：①多剤耐性結核菌 排菌陰性化。 ②多剤耐性結核菌の排菌数減少。

B. 研究方法 (図1) (表6)

1. 結核治療ワクチン非臨床試験及び第I相医師主導試験の組織と方法

- (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 (岡田、井上、ジェノメディア株式会社 中島、東海大学 三上) 非臨床試験

① 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。

② 2013年6月20日 PMDA薬事戦略相談・事前面談実施

③ 2014年12月5日 PMDA薬事戦略相談・事前面談実施

(a) プラスミドDNAとHVJ-Eを混合した製剤を成分とする治療用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。

(b) 非臨床試験 (安全性試験、薬効薬理試験) について、実施する試験項目、試験デザインの詳細について、「「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)、WHOのDNAワクチンのガイドラインなどを参照して原案を策定した。PMDAとの薬事戦略相談を2014年12月5日に実施したとこ

ろ、試験群の構成などについてコメントを受けたため、それに従って非臨床試験のデザインを変更した上で試験を開始した。

(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. マウスを用いた非臨床試験 (用法、配合比試験) (岡田)

マウスを用いたワクチン (HVJ-E/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNA) 用法、用量、配合比最適化試験。(岡田)

マウスはBALB/Cマウス♀ (8w~12w)、DBA/1マウス♀ (8w~12w) 及びC57BL/6マウス♀ (8w~12w) を用いた。

本ワクチンにより結核免疫を誘導したマウスの脾臓細胞 (リンパ球) をH37RV結核菌由来HSP65抗原、PPD及び結核死菌 (H37Ra) で抗原刺激し、培養上清のIFN- γ 、IL-2、IL-6及びTNF α の産生を検討した。

pDNAの投与量は100 μ g/1回/マウスで、筋内又は皮内投与し、2週間に1~6回投与することで免疫を誘導した。

本DNAワクチンを投与後、30日目で摘出したマウス脾細胞をリコンビナントHSP65 (10~20 μ g/ml)、PPD抗原 (20 μ g/ml) 又は結核死菌 (20~100 μ g/ml) を用いてリンパ球を刺激した。Linbro 24wellプレート (total 2ml) で培養した。5 \times 10⁶個の脾細胞を加えた。

刺激を開始してから約22時間後及び42時間後に培養上清を回収した。

筋内投与、皮内投与の方法: ワクチンの筋内投与は、100 μ g/100 μ l溶媒 (5%トレハロース) のHVJ-E/HSP65DNA+マウスIL-12DNAワクチンをanterior tibia muscleに左と右に50 μ gDNAずつ筋注した (1回/マウスを1~6回/2w) ワクチンの皮内投与は、100 μ gDNAを背部皮内投与4箇所専用の皮内注射針を用いて投与した。

pDNAとHVJ-Eの配合比試験: ワクチンの主成分のplasmid DNAで作るpVAX/HSP65DNA+マウスIL-12DNAワクチン (μ g) とHVJ-Envelope (mNAU) との配合比を100 μ g DNA : 100 mNAU (1 : 1)、100 μ gDNA : 400

mNAU (1:4) 及び100 μ gDNA:800 mNAU (1:8) の割合で投与し、どの配合比が最も強く結核ワクチン免疫 (IFN- γ 、IL-2、IL-6、TNF α) を増強するか解析した。

リンパ球増殖反応 (3 H-TdR) : ワクチン免疫した脾細胞の増殖反応をrHSP65 10 μ g/ml刺激、PPD20 μ g/ml刺激、又は結核死菌H37Ra 20 μ g/ml刺激で検討した。

Linbro 96well (平底プレート) に1 \times 10⁵ 脾細胞を加えた。2日後及び3日後に 3 H-TdR

0.037MBq/wellを各wellに加え16時間後~20時間後にセルハーベスターを用いてリンパ球への 3 H-TdR取り込みを測定した。

3. カニクイザルによる安全性試験

PMDAとの薬事戦略相談を行い毒性安全性試験のデザインを設定して単回投与毒性試験を実施した。治験届に使用できる品質レベルのデータとするために、試験はGLP試験施設で実施し、信頼性基準に適合する試験データを取得した。

(医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則 第43条)

HVJ-E/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAワクチンを投与可能な最大量である5 mL/kgの投与容量でカニクイザルに単回皮下投与し、投与後14日間観察して認められる毒性について検討した。本DNAワクチンを構成する2種類の成分であるプラスミドDNA (pVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNA) 及びHVJ-Eの投与用量は、それぞれ最大投与用量から計算される用量とした

(「HVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンのカニクイザルにおける単回皮下投与毒性試験」)。

カニクイザル (*Macaca fascicularis*) は、雌雄を使用し、投与時の年齢は雄雌でそれぞれ3歳齢と3~5歳齢とし、投与時の体重は雌雄でそれぞれ、2.9~3.3 kg、2.4~2.7 kgとした。

指定動物 (サル) の検査場所指定施設で輸入検査を実施後、試験施設にて検査・馴化を4週間以上行った動物を使用した。群分け日の体重に基づいて、体重層別化無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ均一になるように動物を振り分け、雌雄各4頭を試験に使用した。

検査項目としては、一般状態観察、体重測定、

摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査とした。

投与用量は、本DNAワクチンのプラスミドDNAとアジュバント (HVJ-E) の混合比に関する試験結果 (前述) を参考に設定した。当該試験では、マウスを強力に免疫するための混合比が1:1であったことから、被験物質の投与用量は、混合比を1:1として被験物質を調製し、カニクイザルの皮下に投与可能な最大容量である5mL/kgを投与した場合に得られる投与量の近似値を設定した。

4. サルの血中ヒトIL-12濃度測定法の検討及びバリデーション委託 (信頼性基準) (岡田)
HVJ-E/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAワクチンをカニクイザルに投与した時の、サル血中のヒトIL-12濃度を測定するための分析系を確立。
①測定対象:ヒトIL-12タンパク質 (p35及びp40のヘテロダイマー)
②サルの血漿、血清
③ELISA法
④バリデーション項目:特異性、添加回収、希釈直線性、日内再現性、日間再現性、凍結融解安定性、保存安定性
5. HVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンの投与液測定法バリデーション委託(信頼性基準) (岡田)
(1) 本ワクチンは、ワクチン本体であるプラスミドDNA (pDNA) 及びアジュバントであるHVJエンベロップ (HVJ-E) の2剤からなる混合製剤。
(2) 本剤の投与液中に含まれる上記2成分の濃度を測定する分析系を確立。
測定対象:pDNA及びHVJ-E
pDNAは吸光度 (A260)
HVJ-Eはノイラミニダーゼ活性 (合成蛍光基質を用いた酵素活性測定法)
検討項目:検量線、同時再現性、特異性
6. プラスミドDNA (中島、岡田)
1) 構築したバンクシステムによるプラスミドDNAの試験製造
・ 昨年度構築したマスターセルバンク (MCB) を用いて、ワクチン成分となるプラスミドDNA

[pVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNA]

(pVAX1-IgHSP65-hIL12と同じ)の試験製造を実施した。

- ・ MCBを用いて種菌培養を行った後に本培養を実施した。培養については全て生物由来原料を含まない原材料を用いて実施した。適切な細胞濃度まで培養を継続した後に、菌体を濃縮、破碎し、残渣を除去して清浄化した溶液を出発材料として精製工程を進めた。
- ・ 3段階のカラムクロマトグラフィーによる精製工程と限外ろ過工程を組み合わせた精製工程により、宿主由来のRNA、DNA、たん白質、エンドトキシンなどの不純物を除去し、保護安定剤を添加した最終バッファーに溶媒を置換して原薬とした。その後、目的とする濃度(1mg/mL)への濃度調整、滅菌ろ過、バイアル充填を行ったプラスミドDNA溶液を製剤として凍結保存した。

2) プラスミドDNAの暫定品質規格設定

- ・ 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」などの内容に従って、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することとした。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設定した。

3) DNAワクチンの規格及び安全性確保と、非臨床試験のデータパッケージ案作成

- ・ 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)]、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 (WHO Technical Report Series No. 927, 2005)]、WHOのワクチンアジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床評価のガイドライン [Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccines adjuvants and adjuvanted vaccines (Adopted by the 64th meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardization, 21-25 October 2013)] を参考にして設定することとした。
- ・ また、開発するDNAワクチンの成分であるプラスミドDNAは大腸菌により製造されるバイオテクノロジー応用医薬品であるため、ICHガイドラインのS6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価について」(医薬審第326号、平成12年2月22日付)も参考とした。
- ・ 更にプラスミドDNAを成分とするワクチンについては、同様の範疇の製品が米国で臨床開発されていることから、FDAの感染症用プラスミドDNAワクチンのガイダンス [Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, November 2007)] も一部参照にして設定を行った。

7. HVJ-エンベロープ
 マウス脾臓由来の初代培養マクロファージをCD11bの抗体を用いた磁気ビーズ法を用いて分離した。株化細胞としては、マウス腹腔リンパ節由来のマクロファージ細胞株であるP388D1を用いた。HVJはATCCより購入したSendai virusのZ株(VR-105 parainfluenza 1 Sendai/52)を用い、有精鶏卵で増殖させ、遠心法により生成した。LLCMK2細胞にHVJを感染させて24時間以降に培養液中に産生されるHVJは不活性型F蛋白質 (F0) を有し融合能を持たない。このHVJを低濃度 (0.0004 %) のトリプシンで処理するとF1、F2に開裂し融合能を持つようになる。またLLCMK2細胞中にHVJのHN遺伝子に対するsiRNAを導入しておいて、24時間後にHVJを感染させると産生されるHVJはHN蛋白質をほとんど有しないため、HVJ受容体であるガングリオシドに結合できず融合能を欠失したウイルスとなる。また高濃度のトリプシンをHVJに処理し膜蛋白質のF、HNを分解した融合能のないHVJも作成した。いずれのHVJも紫外線(99 mjoule/cm²)で不活性化しHVJ-Eとした。IL-18、caspase 1、Caspase 11の発現はq-PCRで行った。NF- κ Bの阻害剤としては、NF- κ B activation inhibitorである6-amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino)quinaxolineを用いた (金田)。
8. 多剤耐性結核 (以下、MDR-TB) 症例状況をNHO茨城東病院、複十字病院例、神奈川県立循環器呼吸器病センターについて、過去1年間に診療したMDR-TB患者及び2002年1月より2014年10月までの症例について後ろ向きにカルテより検討した (齋藤)。
9. 医師主導治験の実施のための体制面では、2012年に大阪大学医学部附属病院未来医療開発部が発足し、早期探索的臨床研究拠点として創薬から医師主導治験を実施する体制整備を行ってきた。2014年度には、フェーズ1病棟10床が開設され、健常人を対象とする第I相試験や早期探索的臨床試験が入院の上安全に院内で実施可能となった (朝野)。
10. 平成26年度の研究では、平成25年度の研究に追加する形で、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11年間にわたって調査し、まとめた (庄司)。
11. 2006年から2013年までの大阪府結核予防会大阪病院にて得られたストレプトマイシン(SM)、イソニアジド(INH)、リファンピシン(RFP)に対する薬剤耐性結核菌株数を求めた。また2007年から2014年までの大阪府結核予防会大阪病院における多剤耐性結核患者数の調査を行った (松本)。
12. 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月までの間に入院して加療を行ったMDR-TB症例55例を対象とし、背景因子、治療成績等について後ろ向きに検討した。当院での治療方針としては、感受性と考えられる薬剤を少なくとも4剤以上使用し、可能であれば外科的手術も行ったうえで、排菌陰性化後2年間化学療法を行うことを原則としている。治療成績は次のように定義した。治癒：化学療法を行って2年間培養陰性が持続した例、排菌陰性化：確認できた最後の1年間培養陰性が持続した例、治療失敗：確認できた最後の1年間に2回以上培養が陽性であった例、結核死：治療中に結核で死亡した例、非結核死：治療中に結核以外の疾患で死亡した例、転出：上記を満たさず転院あるいは来院しなくなった例。なお、喀痰を出せなくなった例では、自覚症状、画像所見が安定していれば排菌陰性化とみなした (露口)。
13. ワクチン開発の新規技術であるDNAワクチンの国内開発について、非臨床段階としてワクチン成分およびアジュバント成分それぞれの開発管理が必要であり、薬効薬理試験・安全性試験および製造関連の規格設定のためにクリアすべき項目を整理する。また、臨床段階、**first in human**試験を実現するための臨床試験計画についても検討し、いずれも規制当局との面談、コミュニケーションを適宜実行し開発の具体的な方法を明らかにする。さらに、治療用DNAワクチンの開発に際し、今後の開発ガイダンス策定を目指すために必要な項目について随時検討する (三上)。

C. 研究結果

I. ワクチン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を作製(中島、岡田)(表7、8、9)。

ICH(日米EU医薬品規制調和国際会議)/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、調整及び特性解析について)」ガイドラインに従い治験薬製造用の本ワクチン(pVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNA)のマスターセルバンク(MCB)を作製(表7)。また作製された本ワクチンの品質規格を評価。ICHの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]・Q5Dガイドライン準拠の特性解析、品質試験を行った。

治験薬GMP製造: 暫定規格設定に必要な複数ロットの治験薬製造を完了。品質管理試験: 信頼性検証バリデーションを実施。高精度のデータを取得した。

2. これを元に、GMPレベルのpVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAを1000mg作製した(岡田、中島、井上)(表7、8、9)。

3. これを本年度中にサルに用いて本ワクチンの安全性試験・毒性試験を行った(中島、岡田)。

II. 用法・配合比(pDNAとHVJ-E)薬効試験(表10~31)

1. pVAX/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNAを180mg作製した(岡田)。マウスで本ワクチンの信頼性基準適合試験のための用法配合比予備試験(岡田)(表10、11)。

pVAXは図1に示したベクターで、カナマイシン(KM)セレクションベクターである。

(1)投与経路最適化試験をまず行った。本ワクチンを皮内投与による結核免疫増強効果と筋内投与による結核免疫増強効果を比較検討した。

(2)ワクチン投与回数を2週間に1~6回(実際は1回、3回と6回)と変え結核免疫増強効果を比較検討した。

(3)pDNA(HSP65 DNA+IL-12 DNA)とHVJ-Eの免疫増強が強い比率を検討した。

(4)これらは、BALB/cマウス、DBA/1マウス、C57BL/6マウスを用いて行った。BALB/cマウス

はTh2優位のマウスで、IL-2やIFN- γ 産生の増強がよく認められる可能性がある。DBA/1マウスはBALB/cよりも結核免疫がさらに低い(岡田、結核2009年)。C57BL/6はTh1優位で、結核抗原刺激でIFN- γ 産生やIL-2産生が一般的に強い(表12)。

(5)DNAワクチンは1日目に1回目を投与し、4週間後の29日目にspleenを採取しsingle cellを得た(岡田 PNAS 1981、岡田 J.Exp.Med 1983)。この脾リンパ球にrHSP65蛋白抗原、PPD抗原及び結核死菌を加えて1日~2日間培養した。培養上清中の結核免疫に関与するサイトカイン(岡田 Human Vaccine 2011)であるIFN- γ 、IL-2、IL-6、TNF α を測定した(表11)。一方、結核免疫に関与するリンパ球増殖反応は ^3H -サイミジンuptakeで測定した。この反応は後述の如く、3回ワクチン投与で強く増殖反応を示し、IFN- γ 産生増強とパラレルに働き、ワクチンの良い結核免疫指標となった。

2. ワクチン用法検討が進展(平26岡田)(表11~20)。用法検討(DNAワクチン投与回数及び投与方法検討)。

まず、ワクチン皮内投与とワクチン筋内投与を比較した(表13、表17、表18)。皮内投与のワクチンでは、BALB/cマウスにおいて、6回投与が最も強くIFN- γ 産生(2日間培養上清)を増強した(表17)。rHSP65 10 μg ~20 μg 刺激、PPD 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激、結核死菌 2 μg ~20 μg 刺激にて、6回投与が最も強い効果を示した。

一方、筋内ワクチン投与ではBALB/cマウスにおいて、3回投与が最も強くIFN- γ 産生を増強した(表18)。筋内ワクチン投与で3回投与ワクチンと6回投与ワクチンでは、IL-2産生も3回投与群が強く認められたが、有意差検定では差が認められず、この実験はもう一度くり返し、再現性を検討する必要がある。

BALB/cマウスにワクチンを2週間に3回100 μg 筋肉内投与し、4w後の脾細胞を抗原HSP65蛋白、PPDで1日培養。コントロールより約10倍強くIFN- γ 及びIL-2産生(結核免疫能)を増強し、ワクチン効果を確認した(岡田、井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷)。

3. マウスでワクチンDNAとHVJ-E配合比検討(岡田)。pDNA:HVJ-E=1:1が強力な結

核免疫を誘導（表21～29）。pDNAとHVJ-E配合比において三種の配合比を用いて比較検討した。pDNA量が100 μ g/マウスの時①HVJ-E100mNAU（100:100 すなわち 1:1）、②HVJ-E400mNAU（100:400 すなわち 1:4）、③HVJ-E800mNAU（100:800 すなわち 1:8）で比較検討した（表21）。

その結果、4週間後のワクチンマウス脾細胞の一日培養上清中のIL-2産生は100:100の配合比のワクチンマウスが最も強く、次いで100:400の配合比のワクチンマウスが強く、100:800配合比のワクチンマウスが低い数値を示した（表22）。IFN- γ （1日）産生においても同様のIFN- γ 産生傾向を示した（表23）。すなわち、pDNA100 μ g:HVJ-E100mNAUでワクチンマウスの脾細胞から最も強いIFN- γ 産生が認められた。抗原刺激はIL-2、IFN- γ 産生ともHSP65 10 μ g/ml、HSP65 20 μ g/ml、PPD 20 μ g/ml 刺激で同様の100:100配合比で強く認められた。2日培養上清中のIFN- γ 産生も同様であった（表24）。

すなわち、HSP65 10 μ g/ml刺激、HSP65 20 μ g/ml刺激、PPD 20 μ g/ml刺激で2日培養上清中のIFN- γ 産生は、コントロールの5%トレハロース群の上清中に比較して、約11倍強いIFN- γ 産生が認められた（表25）。

以上の結果を表26にまとめた（表26）。

すなわち、配合比設定試験等において、①ワクチンpDNA 100 μ g:HVJ 100mNAU（1:1）及びワクチンpDNA 100 μ g:HVJ 400mNAU（1:4）で強力なワクチン効果。②ワクチン投与は筋内（i.m）投与が良く、3回投与/2週間が良い。③Assay系は脾細胞1日培養上清中のIL-2産生（ELISA）及びIFN- γ 産生（ELISA）の測定が感度が良いことを明らかにした。

したがって、次にこの方法を用いて、外部委託してマウス薬効試験「HSP65 DNA+IL-12 DNAの免疫原性予備試験」を行った（表27）。

4. マウス薬効試験「結核ワクチンのプラスミドDNAとアジュバントの混合比に関する免疫原性予備試験」（表28、表29）

ワクチン成分（プラスミドDNA:pVAX/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNA）とアジュバント（HVJ-E）との混合比を検討した（表28）。

①BALB/cマウスを上記2.と同様に用いた試験の結果、ワクチン投与群の脾臓リンパ球は、rHSP65及びPPD抗原刺激に対するIFN- γ 及びIL-2の産生が増強した。pDNAとアジュバントの混合比1:1の投与群におけるIFN- γ 及びIL-2の産生は混合比1:4及び混合比1:8投与群に比較して強く認められた。媒体対照群との差も有意であった（表29）。

②同混合比が1:4及び1:8の投与群では、PPD刺激後IFN- γ とIL-2産生はコントロール群と有意差は認められなかった（表29）。

③以上のことから、混合比1:1のワクチン免疫が強力であることが示唆された。

5. 用量試験等（表30、31）

現在マウスワクチン用量予備試験が進行している。マウス薬効試験（結核菌抑制）を行うとともに、マウス免疫原性本試験のプロトコールを計画中である。

6. HVJ-Eによる遺伝子発現性は中和抗体に関係なく連続投与可能。HVJ-EにIL-12遺伝子封入により、M ϕ のIL-18を介しIFN- γ （結核免疫）誘導（金田）。

Ⅲ. GLP毒性試験・安全性試験（表32～38）

PMDA薬事戦略相談、事前面談を平成25年6月、平成26年12月に行い、サルを用いたGLP毒性試験・安全性試験（非臨床試験）の試験デザインを計画した。又、non-GLP（信頼性基準）でサルの単回投与毒性試験を行った。また、投与液測定法のバリデーションやサル血中IL-12濃度測定法のバリデーションを行った。

1. GLP毒性試験・安全性試験（非臨床試験）：サルを用いて試験項目、試験デザインを計画（岡田、井上、中島）（表32）。

①サルを用いた反復投与毒性試験。②サルを用いた安全性薬理試験。③サルを用いた単回投与毒性試験。④サルの血中ヒトIL-12濃度測定法の検討及びバリデーション（信頼性基準）。⑤HVJ-E/HSP65 DNA+IL-12DNAワクチンの投与液測定法バリデーション（信頼性基準）を行った。

2. カニクイザルに本ワクチンを皮下大量投与して毒性試験を行った。より高い用量の被験物質投与可能な皮下投与（表33～35）。

PMDAとの薬事戦略相談を行い毒性安全性試験のデザインを設定して単回投与毒性試験を実施した。治験届に使用できる品質レベルのデータとするために、試験はGLP試験施設で実施し、信頼性基準に適合する試験データを取得した。

HVJ-E/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAワクチンを投与可能な最大量である5 mL/kgの投与容量でカンクイザルに単回皮下投与し、投与後14日間観察して認められる毒性について検討した。検査項目として、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査を行った(表32~35)。

その結果、投与翌日の血液学的検査において軽微な影響が認められたが、投与後14日には消失した。その間、異常は認められず本変化は毒性学的意義のないものと判断された(表34)。

その他、雌雄いずれの動物においても、観察期間を通して投与部位皮膚の変化を含む一般状態の変化は認められず、体重、摂餌量、血液学的検査値(上記の変化を除く)、あるいは血液生化学的検査値に被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験の投与条件下では、HVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンの単回皮下投与により軽微かつ一過性の影響がみられたが、毒性変化は認められないと判断された。

3. サル血中ヒトIL-12濃度測定法の検討及びバリデーション：本ワクチンをカンクイザルに投与した時に血中のヒトIL-12濃度を測定するための分析系を確立(表37)。

①測定対象：ヒトIL-12タンパク質(p35及びp40のヘテロダイマー)

②サルの血漿、血清

③ELISA法

④バリデーション項目：特異性、添加回収、希釈直線性、日内再現性、日間再現性、凍結融解安定性、保存安定性

を測定して解析し、信頼性基準を担保した。

4. 本ワクチンの投与液測定法バリデーション：安全性試験で使用した被験物質の投与量確認試験。(岡田)(表38)

①測定対象：pDNA及びHVJ-E

②pDNAは吸光度(A₂₆₀)

HVJ-Eはノイラミニダーゼ活性(合成蛍光基質

を用いた酵素活性測定法)

③検討項目：検量線、同時再現性、特異性、添加回収

を測定して解析し、信頼性基準を担保した。

IV. PMDA事前面談

PMDA事前面談を平成26年12月5日に実施。治験届に必要なサル安全性試験パッケージ案を策定。投与経路の最適な筋肉内投与で毒性・安全性試験項目を策定。また、薬物動態(トキシコキネティクス)は、プラスミドDNAの投与により発現するIL-12を測定。(岡田、井上、中島、三上)(表32~36)

①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。適切に医師主導治験を実施するにはPMDAと密接に事前相談を行い、開発内容や方向性について検討を進める事が重要と考えられる。

②PMDAの薬事戦略相談制度を利用し、非臨床試験パッケージ案について事前面談の相談を行った。(平成26年12月5日)

③非臨床試験パッケージ案を策定して、平成26年12月5日に事前面談を行ったところ、投与回数、試験群の構成などについて適切なアドバイスを受けたため、その内容を反映して試験デザインの変更を行い、平成26年度から実際にカンクイザルを用いた安全性試験を開始した。

V. 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(表39、40、41)

1. 多剤耐性結核患者の調査と治験に向けての計画を行った。①近畿中央：55名MDR-TB(7年間)のうち20名XDR-TB(露口、松本)。②東京病院：10年間に43名MDR-TB、死亡者多い(庄司)。③茨城東病院：複十字病院を含め1年間でMDR-TB 18名。(齋藤)(表39)。

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)(表40)

3. 第I相臨床治験案(表41)を目指す。

研究代表者(岡田)

(1) ① コメント：臨床試験では、IL-12遺伝子