

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（表33、34、35）。

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（マヒドン大学）、韓国San Nae Cho教授（Yonsei大学）、中国X. Heping教授（上海医科大学）、フィリピン熱帯医学研究所等）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）（表7～9）。

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。

(3) これを元に、GMPレベルのpVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAを1000mg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、井上）（表7～9）。

(4) pVAX/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNAを

180mg作製した（岡田、井上）（表10、11）。

(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）（表11～表21）。BALB/cマウスにワクチンを2週間に1～6回100 $\mu$ 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- $\gamma$ 及びIL-2産生（T細胞免疫）を増強し、ワクチン効果確認（表19）。（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下投与より4倍T細胞免疫を増強させた（表13）。

①投与経路最適化試験をまず行った。本ワクチンを皮下投与による結核免疫増強効果と筋肉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（表14）。

③pDNA（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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生やIL-2産生が一般的に強い（表12）。その結果、BALB/cマウスがIL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 産生を強く誘導した。

⑤DNA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- $\gamma$ 、IL-2、IL-6、TNF $\alpha$ を測定した（表11、表15）。

IL-6産生はrHSP65刺激やPPD刺激で1日培養上清中及び2日培養上清中ともワクチン投与群（3回、6回投与）でコントロール群よりも増強を示した（表42）。

一方、TNF $\alpha$ 産生はワクチン投与マウス群の脾細胞培養上清で産生増強が認められた。しかし、値がそれほど高くないことより、ワクチンの種々の条件設定には主としてIL-2とIFN- $\gamma$ を指標とした。

一方、結核免疫に関与するリンパ球増殖反応は $^3\text{H}$ -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- $\gamma$ 産生増強と平行に働き、ワクチンの良い結核免疫指標となった(表16、表20)。⑥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- $\gamma$ 産生(2日間培養上清)を増強した(表17)。rHSP65 10 $\mu\text{g}$ ~20 $\mu\text{g}$ 刺激、PPD 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激、結核死菌 2 $\mu\text{g}$ ~20 $\mu\text{g}$ 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- $\gamma$ 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(表19)。この実験の投与回数の検討はpDNA(HSP65 DNA+マウスIL-12 DNA) 100 $\mu\text{g}$ :HVJ-E 400mNAUで行っており、後述のpDNA 100 $\mu\text{g}$ :HVJ-E 100mNAUで1回、3回、6回投与を比較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 $\mu\text{g}$ 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- $\gamma$ 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)。

(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。

(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 $\mu\text{g}/\text{マウス}$ 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- $\gamma$ (1日)産生においても同様のIFN- $\gamma$ 産生傾向を示した(表23)。すなわち、pDNA100 $\mu\text{g}$ :HVJ-E 100mNAUでワクチンマウスの脾細胞から最も強いIFN- $\gamma$ 産生が認められた。

抗原刺激はIL-2、IFN- $\gamma$ 産生ともHSP65 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、HSP65 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、PPD 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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- $\gamma$ 産生も同様であった(表24)。

すなわち、HSP65 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激、HSP65 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激、PPD 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激で2日培養上清中のIFN- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生が認められた。

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 $\mu\text{g}$ :HVJ 100mNAU(1:1)及びワクチンpDNA 100 $\mu\text{g}$ :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- $\gamma$ 産生(ELISA)の測定の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)。

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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 及びIL-2の産生は混合比1:4及び混合比1:8投与群と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- $\gamma$ 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。

(7) PMDA事前面談を平成26年12月5日に行った(表32)。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) (表36)。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)]

サルを用いた、反復投与毒性試験ではサル2週間間歇筋内投与毒性試験 (GLP適用) [急性毒性評価、局所刺激性の評価、TK測定及び中枢神経系に関する安全性薬理試験組み込み]

投与方法、期間は①筋内投与 (大腿部) ②0.5 mL/site ③2箇所 ④6回/2週間 ⑤観察: 2週間 (回復期間2週間)

群構成は投与群: ♂♀各3例×2群 (対照群, 投与群) 回復群: ♂♀2例×2群

評価項目は①一般状態 ②投与部位の外観 ③摂餌量 ④体重 ⑤血液 ⑥血液生化学 ⑦眼 ⑧尿 ⑨剖検 ⑩器官重量 ⑪病理組織 (卵巣・精巣含む)

安全性薬理はFOB: 機能観察総合評価法

TK測定は採血: ヒトIL-12 測定

サルを用いた安全性薬理試験は安全性薬理試験 (サルの心血管系、体温及び呼吸器系に及ぼす影響) (GLP適用)

投与方法、期間は①筋内単回投与 (大腿部) ②投与容量: 0.5 mL/site ③投与箇所数: 2箇所 ④評価時点: 投与前、投与後1~48時間

群構成は対照群、投与群 ♂6 (各群3例)

評価項目は血圧 (収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧)、心拍数、心電図 (PR、QRS、QT、

QTc)、呼吸機能 (呼吸数、1回換気量、分時換気量)、体温

一般状態はビデオ撮影

血圧等は予めテレメトリー送信機留置手術を行う

(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を行った (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) (表33~35)。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。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。

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)。

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。

(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した (表37)。

①測定対象: ヒトIL-12タンパク質 (p35及びp40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、保存安定性を確認した。

(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中した (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（表38）。

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、特異性を確定した。



表 7

### 研究進捗状況

1. 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)を分担研究者中島と共に作製(中島・岡田)
2. 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。

表 8

### 研究進捗状況

3. これを元に、GMPレベルのpVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAを1000mg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。

表 9

**[ I ] ワクチンGMP製造：マスターセルバンクの作製**  
(HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAワクチンの)

治験薬GMP製造に必要なバンクシステムを構築。治験薬GMP製造用大腸菌について計 300本で構成されるマスターセルバンクシステムを作製した。(中島、岡田)



大腸菌にエレクトロポレーション法で遺伝子導入。

(岡田 厚生科学審議会 2014, Kekaku 2014)

**pVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAワクチンのGMP製造**

1. 3バッチ1,000バイアル(1mg/バイアル、総量1g)の製造。(岡田、中島)
2. ICHガイドライン準拠の品質管理試験、信頼性検討で適格性を実証。高精度のデータを取得した。
3. これをサルに用いて非臨床試験(安全性試験・毒性試験) (Okada 9<sup>th</sup> WCVII 2014)



表 1 0

**研究進捗状況**

4. pVAX/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNAを作成した。  
(180mgを作成した)

表 1 1

**〔II〕用法・配合比(pDNAとHVJ-E)薬効試験**

pVAX/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNAを180mg作成した。

(1) 投与経路最適化試験 (岡田)

1. 皮内
2. 筋内

(2) ワクチン投与回数

(3) pDNAとHVJ-E 配合比設定試験

(HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan)  
HVJ-E連続投与可能。

**ワクチン投与経路と回数**

BALB/c マウス  
C57BL/6  
DBA/1

DNAワクチン 投与回数1~6回

2w

4w後

spleen

①培養上清  
②増殖反応

ELISA  
IFN- $\gamma$   
IL-2  
IL-6  
TNF?  
 $^3\text{H-TdR}$

表 1 2

マウスで、

1. 本DNAワクチンの用法設定試験
2. 本DNAワクチン用量設定試験
3. 本DNAワクチンとHVJの配合比設定試験

信頼性基準適合試験(外注)のために必要

試験に用いたマウスの種類

1. BALB/c マウス
2. C57BL/6 NCr マウス
3. DBA/1 マウス

投与経路最適化試験

1. 皮内ワクチン投与方法
2. 筋内ワクチン投与方法



表 1 3

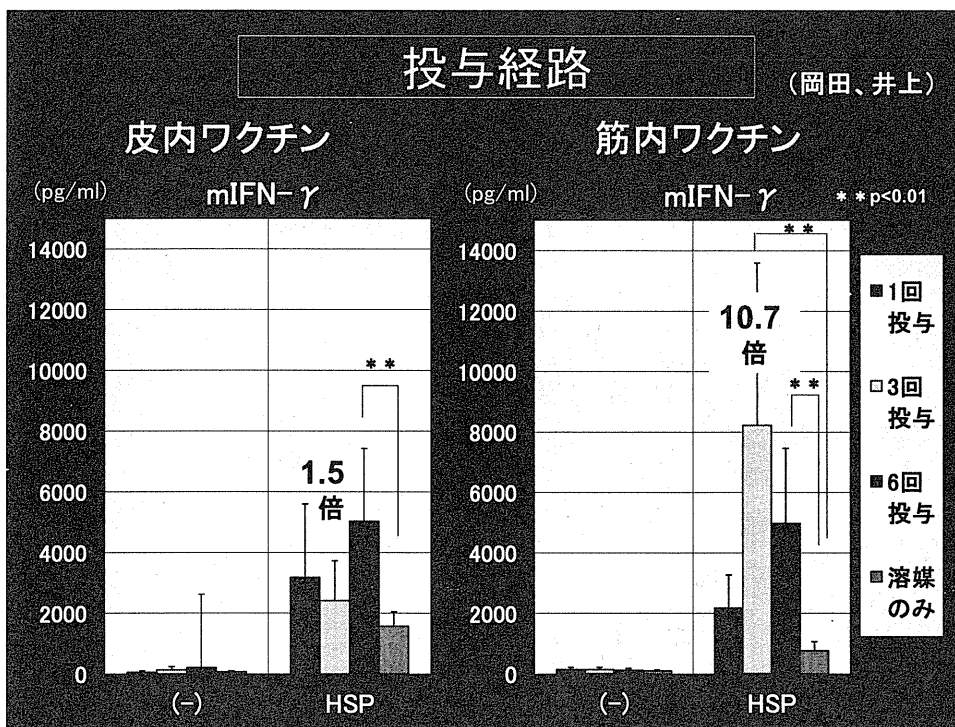


表 1 4

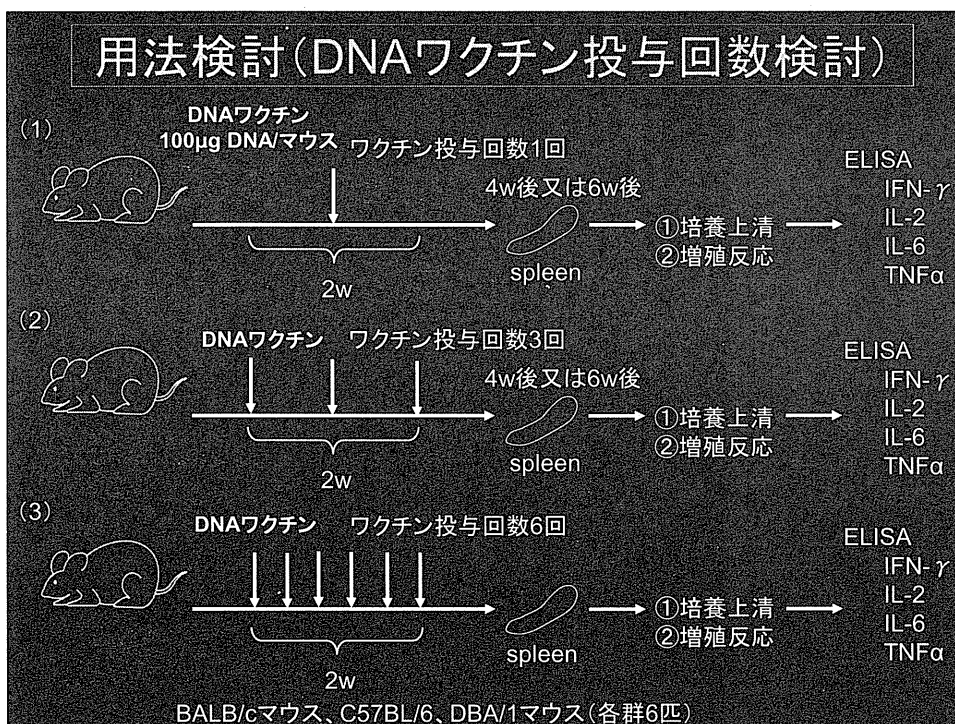


表 1 5

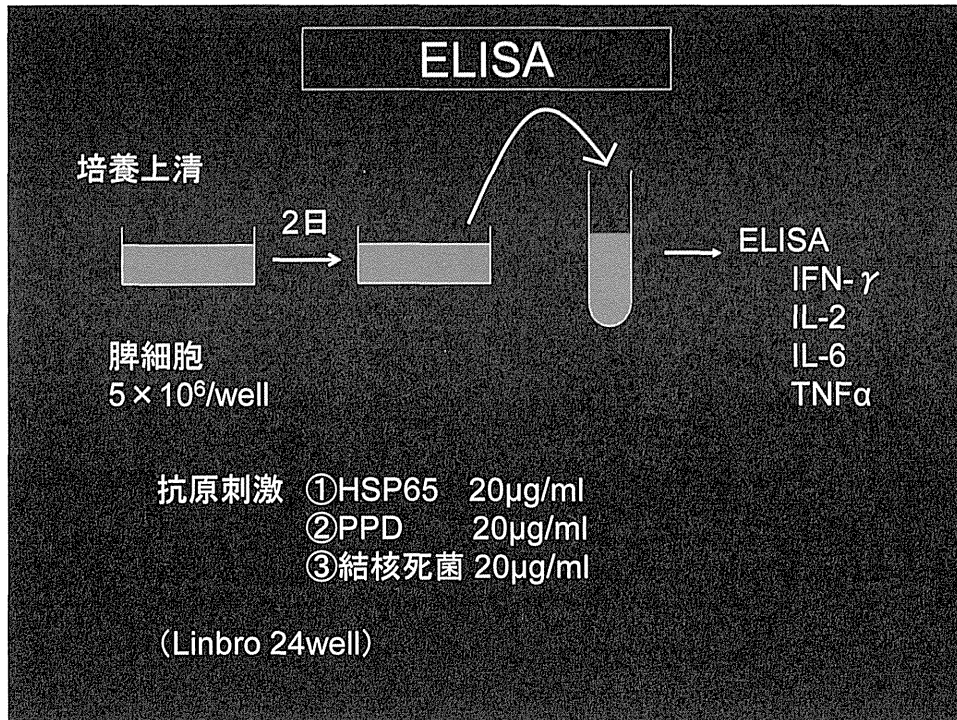


表 1 6

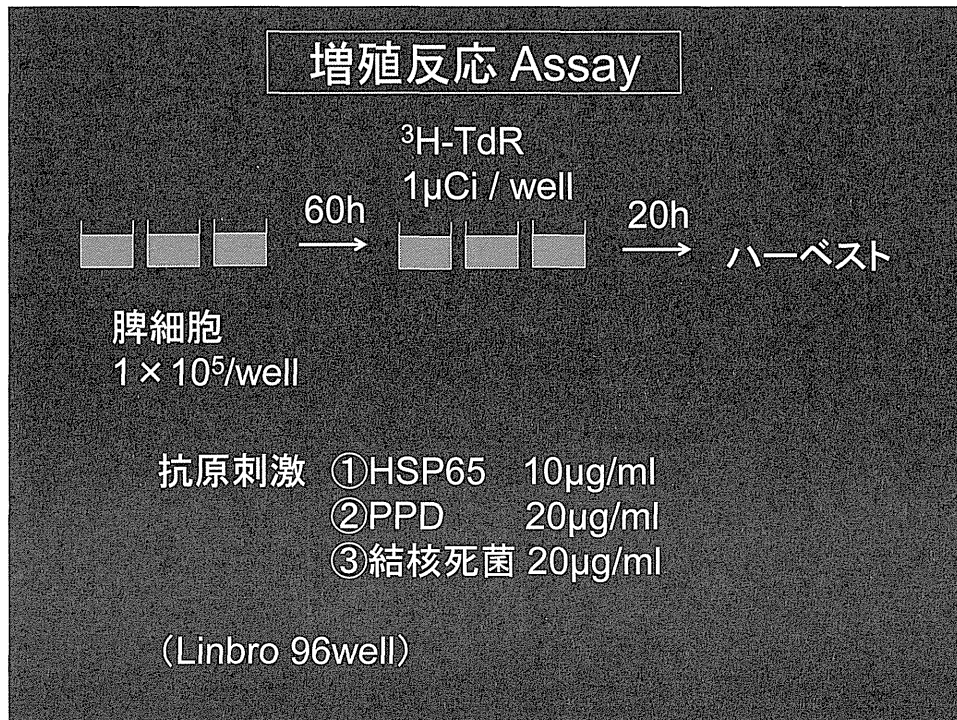


表 17

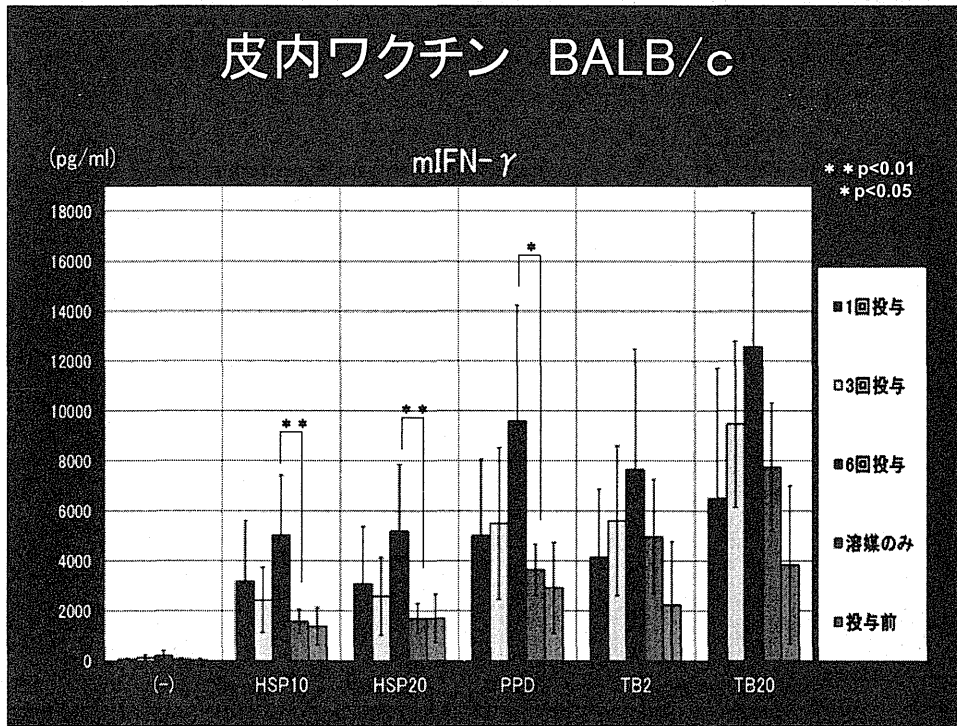


表 18

