

表 1 9

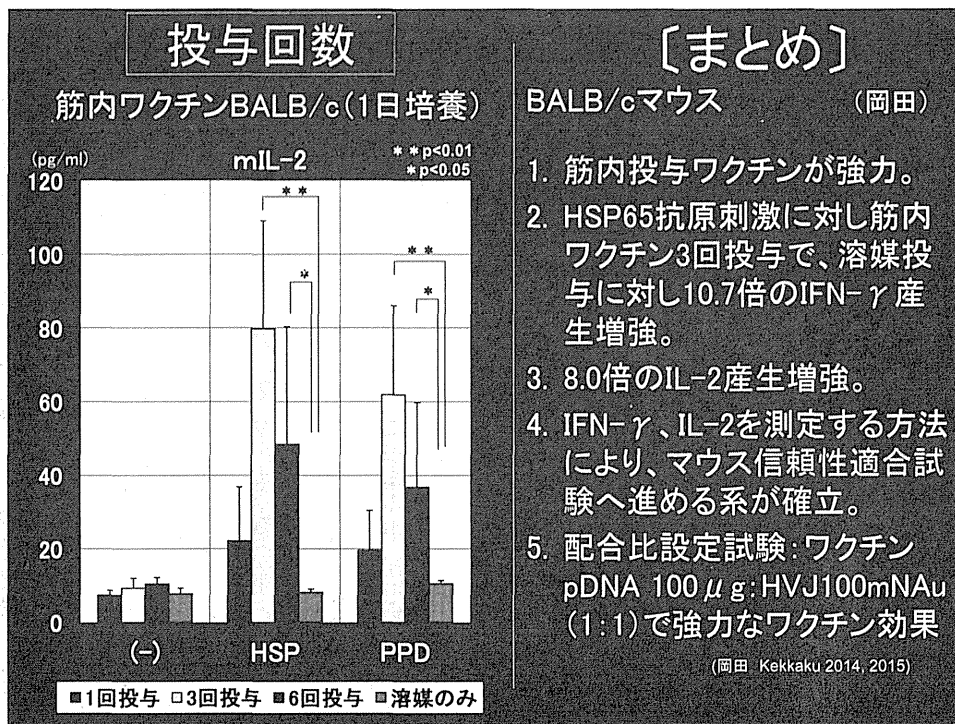


表 2 0

筋肉ワクチン BALB/c

増殖反応(S-I) 2日培養

rHSP65 10 μ g/ml								
	1	2	3	4	5	6	平均	S.D.
1回投与	3.3	4.0	3.8	2.4	2.9	3.0	3.2	0.6
3回 "	2.7	6.7	6.1	5.2	4.5	5.1	5.1	1.4
6回 "	4.5	1.7	1.9	3.4	3.4	2.7	2.9	1.0
溶媒のみ	2.2	2.0	2.0	2.2	2.7	2.3	2.2	0.3
投与前	5.5	3.2	2.6	2.3	2.3	2.2	3.0	1.3

PPD 20 μ g/ml								
	1	2	3	4	5	6	平均	S.D.
1回投与	7.0	8.6	6.9	4.0	4.7	5.1	6.1	1.7
3回 "	4.4	9.5	10.7	6.5	7.9	6.6	7.6	2.3
6回 "	6.4	1.9	2.6	6.7	6.5	5.3	4.9	2.1
溶媒のみ	4.3	3.6	3.6	4.9	5.8	6.1	4.7	1.1
投与前	11.9	7.8	4.8	4.7	5.5	4.8	6.6	2.9

* p<0.05
** p<0.01

表 2 1

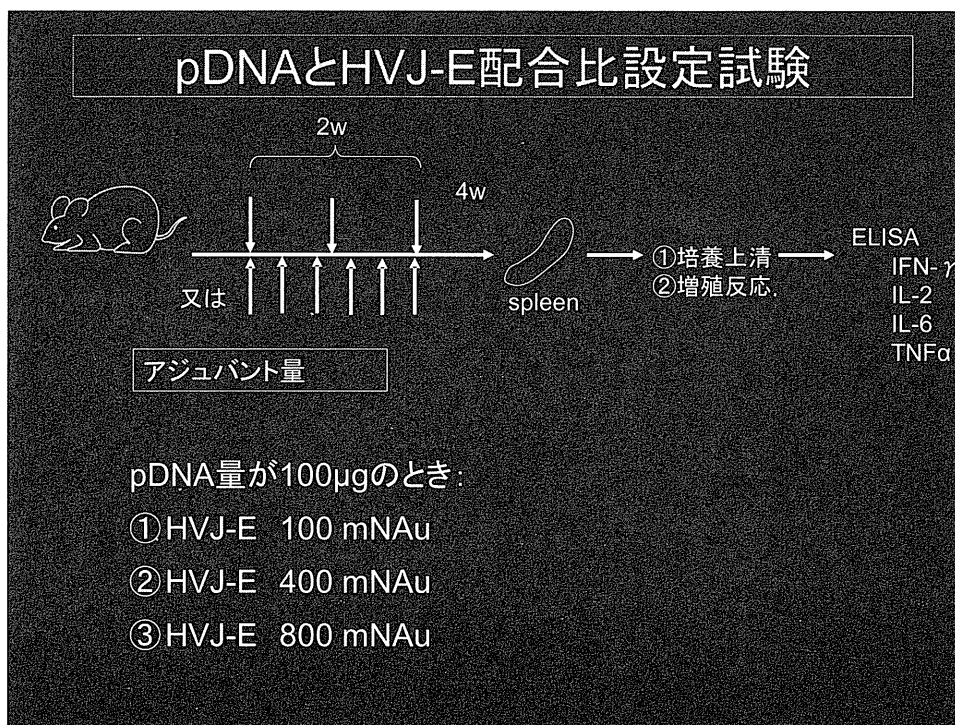


表 2 2

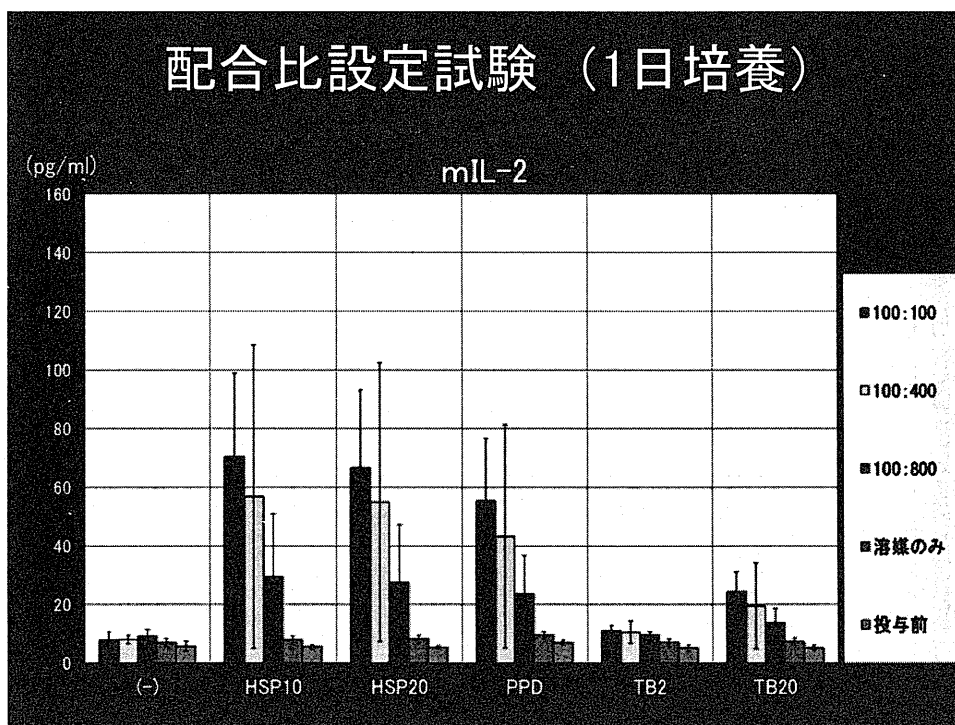


表 2 3

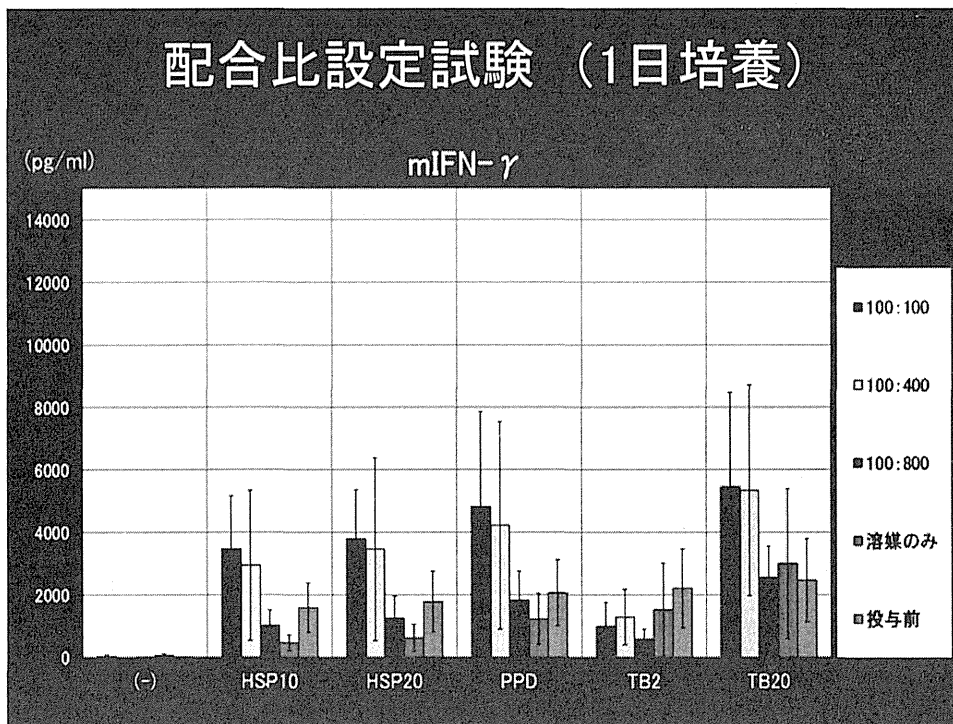


表 2 4

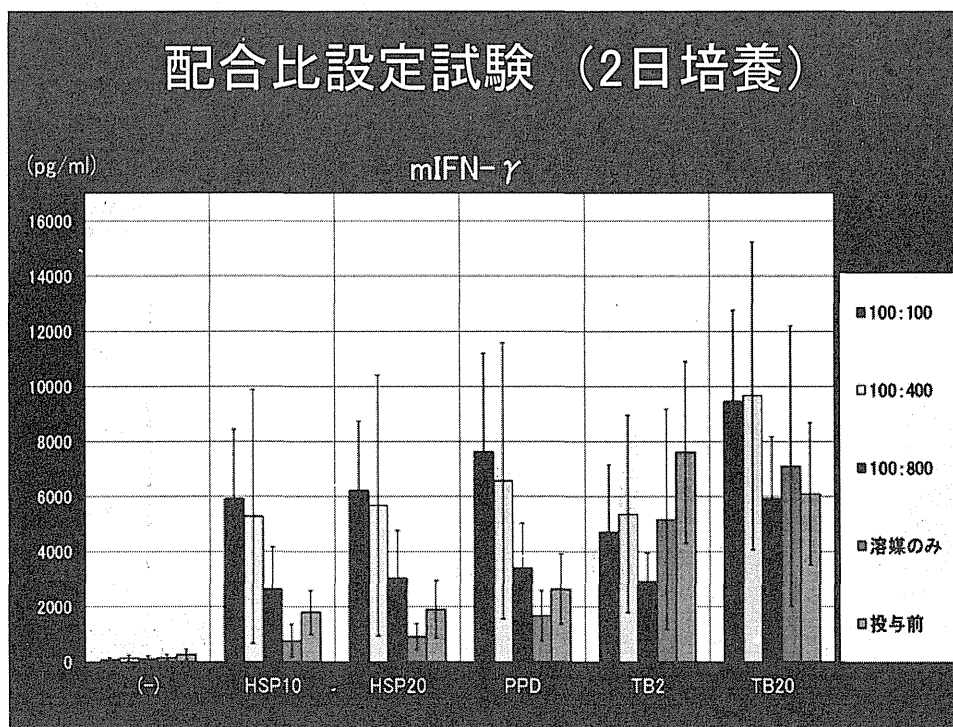


表 2 5

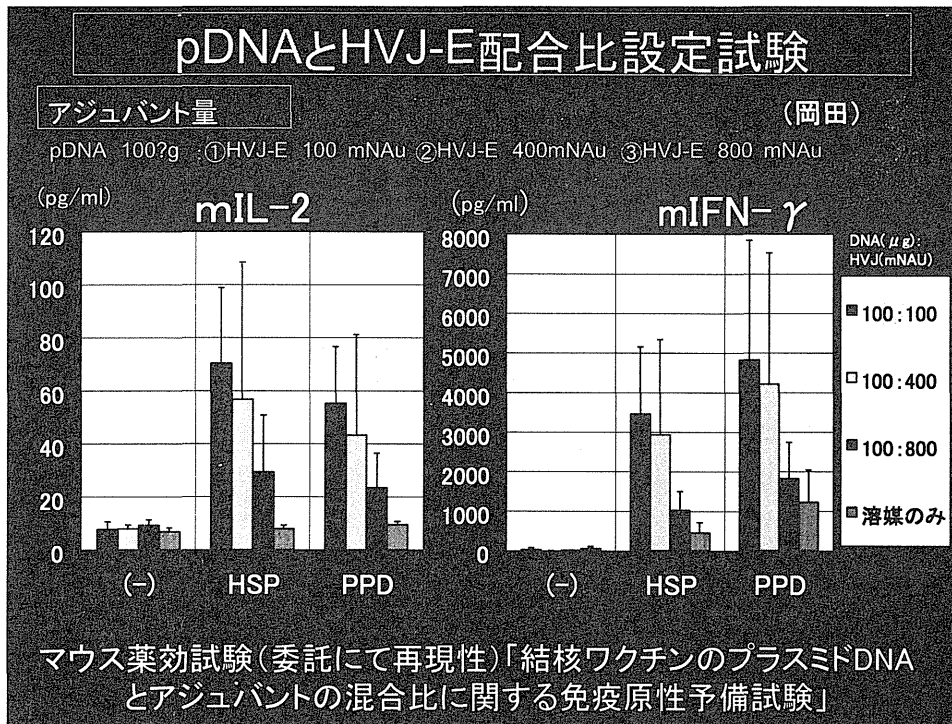


表 2 6

- ### [まとめ]
- #### 配合比設定試験
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. BALB/cマウス(♀)
 3. ワクチン筋肉内投与
 4. 3回i.m投与(2週間に)
 5. Assay系
1日培養上清中の
IL-2産生(ELISA)
IFN- γ 産生(ELISA)

表 2 7

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」

(外部委託)

表 2 8

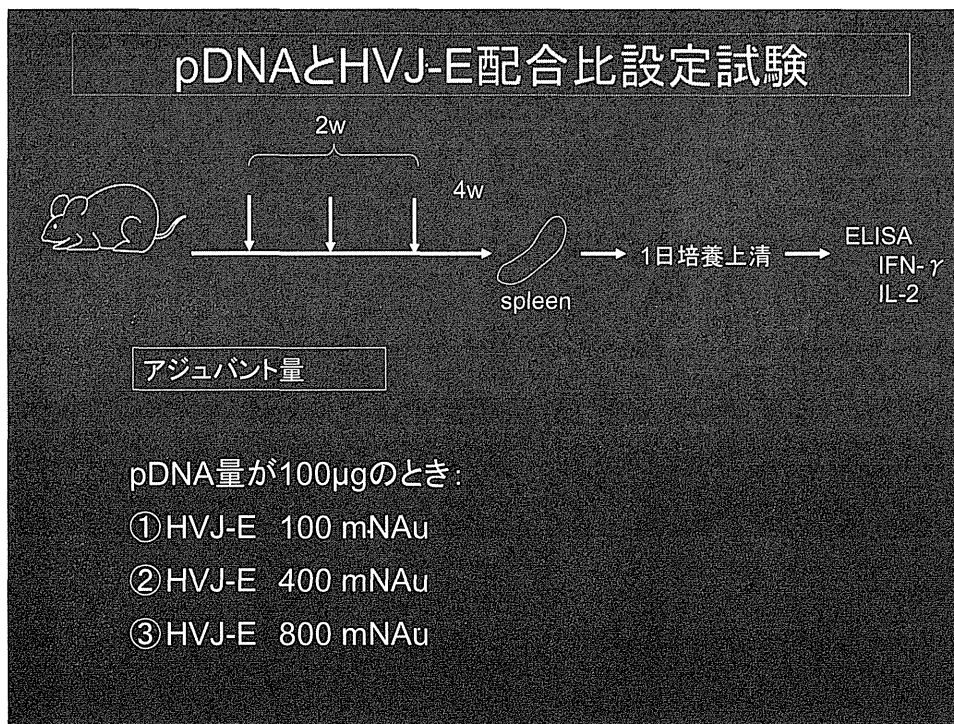
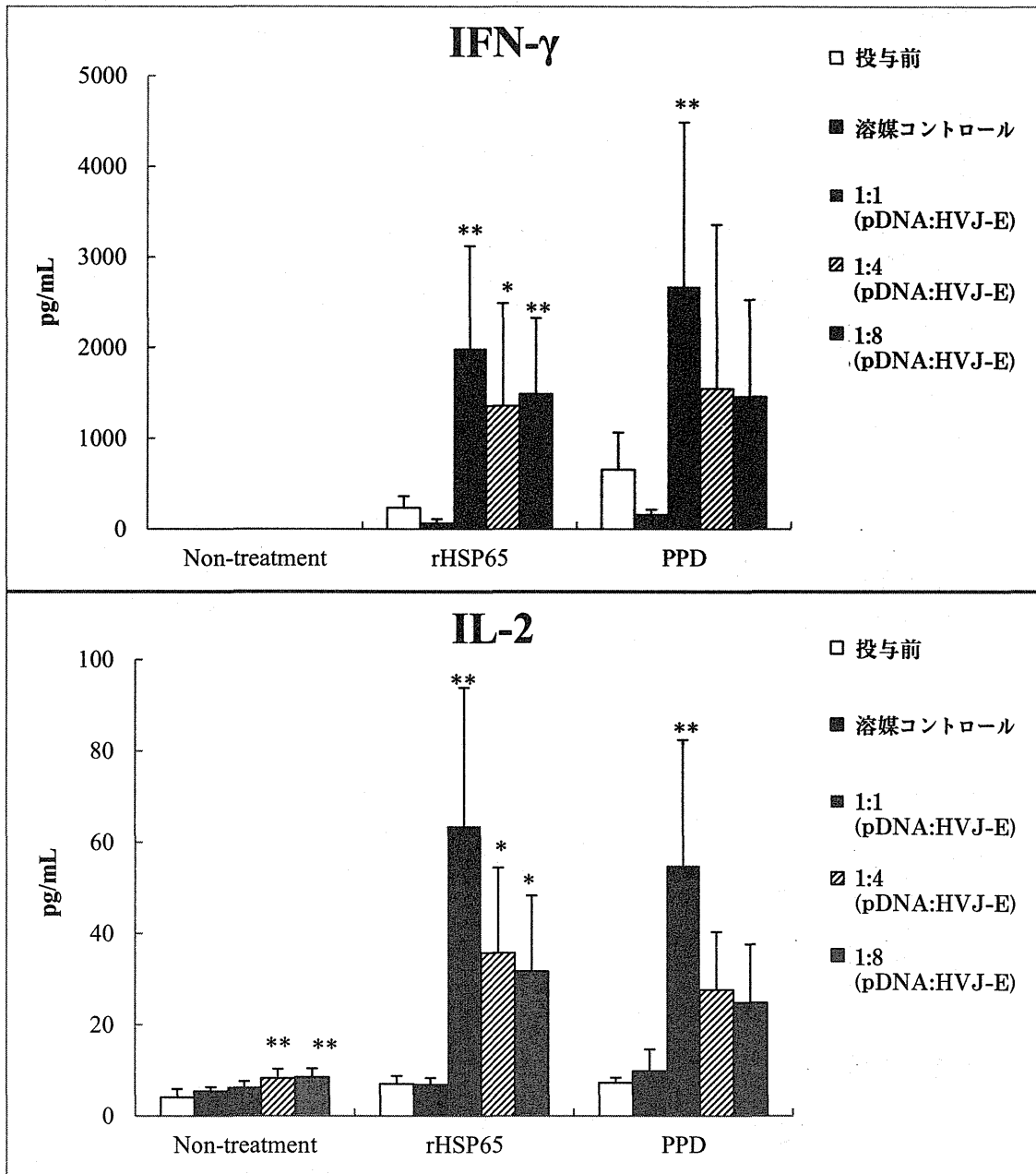


表 2 9



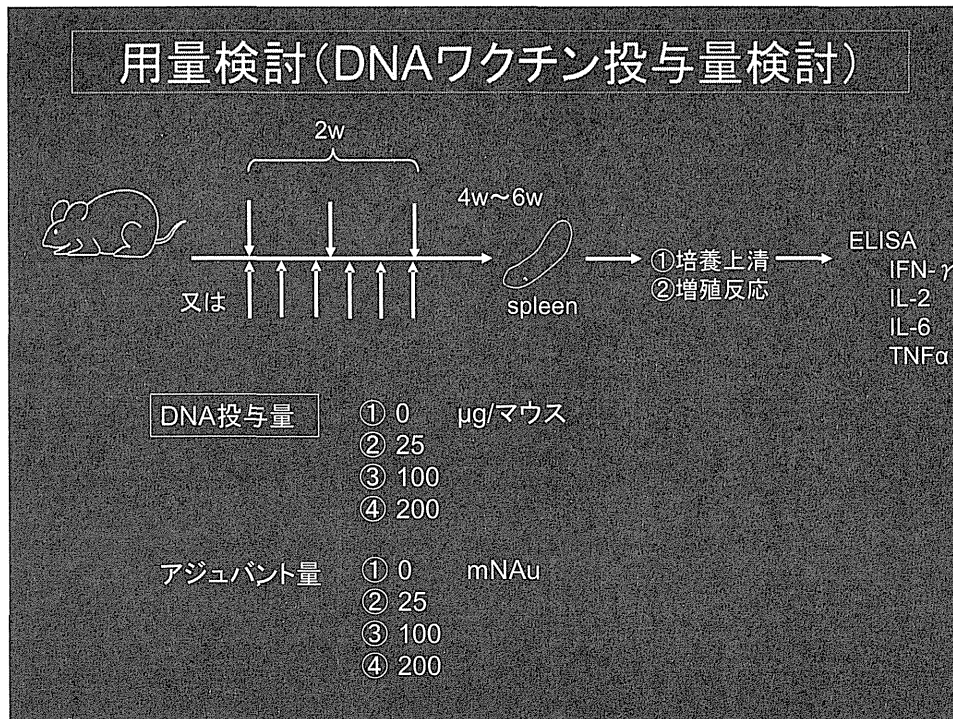
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; Dunnett's multiple comparison test

表 3 0

〔今後の方針〕

- マウスワクチン用量予備試験
- マウス薬効試験(結核菌抑制)
- マウス薬効用法・用量試験(外注)
(信頼性基準適合試験)

表 3 1



〔Ⅲ〕 **PMDA薬事戦略相談 事前面談**

【平成26年12月5日】 (岡田、井上、中島)

治験届までに必要な
サルを用いた毒性・安全性試験

1. 反復投与毒性試験:
 - ①反復投与毒性試験:カニクイザル筋内投与。
 - ②薬物動態試験(TK)はDNAワクチンヒトIL-12蛋白の血中動態。
 - ③中枢神経系に関する安全性薬理試験組み込み(GLP)。
2. 安全性薬理試験:(サル心血管系、体温及び呼吸器系に及ぼす影響)
(GLP)
3. 単回投与毒性試験:単回大量皮下投与し毒性試験(平成26年度実施:
PMDA事前面談で承認済み)。

サルを用いた毒性・安全性試験の前に必要な、

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)
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
(信頼性基準)

〔Ⅳ〕 **単回投与毒性試験**

サルにおける単回皮下投与毒性試験 (信頼性基準適用)

試験動物	カニクイザル
被験物質	pVAX-HSP65/IL-12DNA+HVJ-E
投与方法、 投与回数、 観察期間	皮下投与(背部) 投与容量: 5 mL/kg (1mg/mL) 投与回数: 1回 観察期間: 投与後14日間
群構成	投与群: ♂2例/群×2群(対照群, 投与群) ♀2例/群×2群(対照群, 投与群)
評価項目	一般状態 摂餌量測定 体重測定 血液学的検査 血液生化学的検査

表 3 4

[IV] 単回投与毒性試験

カニクイザル
HVJ-E/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNA 投与群

	♂ (2例)	♀ (2例)		♂ (2例)	♀ (2例)
体重	異常なし	異常なし	WBC	異常なし	異常なし
摂餌量	〃	〃	Lymphocyte(%)	〃	〃
RBC	〃	〃	Neutrophil(%)	〃	〃
Hb	〃	〃	Eosinophil(%)	〃	〃
Ht	〃	〃	Basophil(%)	〃	〃
MCV	〃	〃	Monocyte(%)	〃	〃
MCH	〃	〃	Lymphocyte数	〃	〃
MCHC	〃	〃	Neutrophil数	〃	〃
platelet	〃	〃	Eosinophil数	〃	〃
Reticulocyte	〃	〃	Basophil数	〃	〃
			Monocyte数	〃	〃

表 3 5

[IV] 単回投与毒性試験

カニクイザル
HVJ-E/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNA 投与群

Blood Chemistry	♂ (2例)	♀ (2例)		♂ (2例)	♀ (2例)
ASAT	異常なし	異常なし	Total Protein	異常なし	異常なし
ALAT	〃	〃	A/G Ratio	〃	〃
LDH	〃	〃	Albumin	〃	〃
γGT	〃	〃	γ-Globulin	〃	〃
ALP	〃	〃	Ca	〃	〃
CK	〃	〃	P	〃	〃
Total Bilirubin	〃	〃	Na	〃	〃
BUN	〃	〃	K	〃	〃
Creatinine	〃	〃	Cl	〃	〃
Glucose	〃	〃			
Total Cholesterol	〃	〃			
Phospholipid	〃	〃			
Triglyceride	〃	〃			

表 3 6 - 1

実施を計画している安全性試験のデザイン(案)

サル2週間間歇筋内投与毒性試験(急性毒性に関する評価、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)(GLP適用)

試験動物	カニクイザル(未使用)、満3~5歳を想定
被験物質	pVAX-HSP65/IL-12DNA+HVJ-E
投与方法、投与期間、観察期間	筋内投与(大腿部) 投与容量: 0.5 mL/site 投与箇所数: 2箇所 投与期間: 5回/2週間(1日あたり1回) 観察期間: 投与期間2週間(回復期間2週間)
群構成	投与群: ♂♀各3例で2群(対照群+投与群) 回復群: ♂♀各3例で2群(対照群+投与群)
評価項目	一般状態: 毎日 投与部位の外観: 3回/日(投与日), 1回/日(その他期間) *Draizeの皮膚反応の評価基準による(回復期間は休薬1~3, 7, 14日) 摂餌量測定: 毎日 体重測定: 週2回 血液学的検査: 群分前+投与期間1回+回復期間1回, 12項目 血液生化学的検査: 群分前+投与期間1回+回復期間1回, 21項目 眼検査: 群分前+投与期間1回+回復期間1回 尿検査: 群分前+投与期間1回+回復期間1回 剖検: 最終投与2~3日後+回復期間終了時 器官重量測定 病理組織標本作製及び検査(卵巣/精巣含む)
安全性薬理	FOB: 投与前日1回+投与日(投与後2回)+翌日1回+翌々日1回(計5回)
TK測定	採血: 投与前, 初回投与後0.5, 1, 2, 6及び24 h, 最終投与後0.5, 1, 2, 6及び24 h pDNAの発現するhIL-12 (p35+p40) 分子をELISAで測定。
備考	対照群は媒体(5%トレハロース溶液)を投与する。 被験物質の特性・安定性の分析は治験薬GMP適用下で実施。

表 3 6 - 2

実施を計画している安全性試験のデザイン(案)

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)

試験動物	雄性カニクイザル(未使用)
被験物質	pVAX-HSP65/IL-12DNA+HVJ-E
投与方法、評価時点	筋内単回投与(大腿部) 投与容量: 0.5 mL/site, 投与箇所数: 2箇所 評価時点: 投与前, 投与後1, 3, 6, 9, 12, 24, 48時間, 7日,
群構成	対照群, 投与群
動物数	♂3(投与群と媒体対照群と併用)
評価項目	血圧(収縮期血圧, 拡張期血圧, 平均血圧), 心拍数, 心電図(PR間隔, QRS時間, QT間隔, QTc間隔), 呼吸機能(呼吸数, 1回換気量, 分時換気量), 体温
一般状態	ビデオ撮影により投与前から投与後24時間まで、動物の状態を観察し、各評価時点の動物の状態を観察する。
血圧	予めテレメトリー送信機留置手術を行い、術後2週間以上経過後、安定した循環パラメータが得られる6匹を選抜する。
備考	対照群は媒体(5%トレハロース溶液)を投与する。 媒体の投与及び評価期間終了後、一定期間(2週間)経過後に、投与群として用いる。 被験物質の特性・安定性の分析は治験薬GMP適用下で実施。