

ど社会への影響は大きいと言える。本研究が取り組む多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチン治療が実用化されるとそのインパクトは非常に大きく、臨床応用のために薬事法に基づく承認取得へ向けた第1相試験の意義は大きいと考える。

今後考えられる新たな課題として本研究で新規治療用DNAワクチンの効能、安全性が確認できた後に人種を越えたMDR-TB症例、標準治療が副作用のため出来ない結核症例に対する本ワクチンの有用性を検討する必要がある。また抗結核薬だけでは治癒出来ない症例に対する抗結核薬併用治療の有用性を検討する必要もある。

行政施策への貢献の可能性として今後、人口減少が確実な我が国では労働人口増加のため海外からの移民を積極的に受け入れるという方向で移民政策が行われている。その影響からMDR-TBが多い国からの移民を受け入れることが想定され、我が国のMDR-TB症例が増えることが懸念され、そうした場合、MDR-TB用新規抗結核薬だけではなく、本ワクチンも有用となる(齋藤)。

10. 朝野らの経験を踏まえて、医師主導治験を実施上の今後の改善点としては、①IRBにおける審査体制が不十分である。②モニターが医師に近い存在であるために、モニターとしての役割が困難な例がある、③補償の体制が不十分である、④希少疾患を扱う場合が多く、試験期間が長期に渡る場合がある、⑤医師主導治験立案時の支援体制が不十分である。⑥責任医師のGCP教育が不十分である、などの点が抽出されており、本研究の臨床試験の実施に当たっては、このような点のうち施設で解決可能なものを速やかに改善し、協力して実施を遂行したい(朝野)。
11. 多剤耐性結核は、臨床的に重要な疾患病態であるが、患者数は多くない。本研究の主眼である医師主導治験の第I相が開始されるが、研究を成功に導くためには適格症例の確保が重要である(庄司)。
12. 被検薬製造、品質確保について、ワクチン開発の新規技術であるDNAワクチンの国内開発という分野には未だ国内ガイドラインの検討段階にあり、研究班ではPMDAとのコミュニケーションをはかりながら進められる予定である。さ

らに非臨床試験の実施と、この結果を踏まえた臨床試験(第I相試験、いわゆるfirst in human試験)の計画と実現にむけて、各研究機関での成果と方針について検討しながら進めていきたい(三上)。

13. 実用化(ワクチン、治療薬の開発等)への貢献の可能性(表53)
  - ① 多剤耐性結核に対する初めての治療ワクチン開発・実用化の可能性が極めて強い。
  - ② エボラ出血熱等の新興感染症ウイルスの遺伝子情報を我々のDNAワクチン開発技術に応用し、新たな感染症予防・治療ワクチンが迅速に開発・実用化され、大きな貢献の可能性。
  - ③ 迅速対応可能なワクチンの基盤技術開発で新興・再興感染症ワクチン実用化に貢献の可能性。
  - ④ 結核予防ワクチン実用化の可能性
14. 行政施策への貢献の可能性(表54)
  - ① DNAワクチンの新規範疇医薬ガイドライン及び治療用DNAワクチン開発ガイドライン策定の医薬行政に貢献。
  - ② 国立病院機構でワクチンの医師主導治験体制を確立。対感染症ワクチン行政に貢献。
  - ③ 多剤耐性結核菌の感染、医療費削減、国際的な保健衛生に貢献。

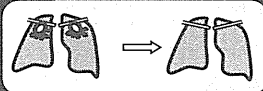
表 4 3

## 期待される成果

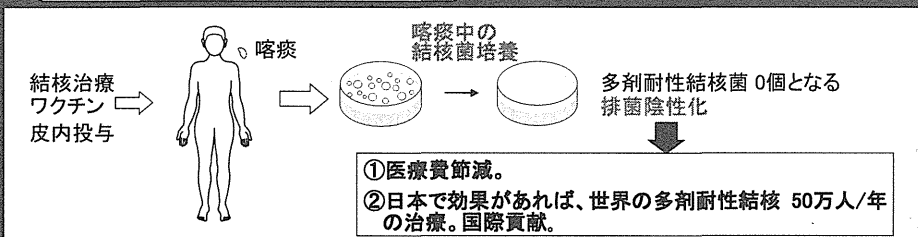
### ヒト臨床応用

#### 新しい結核治療ワクチン

- ・本邦で毎年200人の多剤耐性結核患者を治療・救命
- ・毎年200万人の結核死亡者を治療・救命可能
- ・多剤耐性結核・XDR-TBを治療(世界で毎年50万人)
- ・スーパー・スプレッダー多剤耐性結核を治療可能  
(岡田、井上、露口、庄司、齋藤、朝野、松本、熊ノ郷、三上)



### 第1相医師主導治験評価



① 医療費節減。  
② 日本で効果があれば、世界の多剤耐性結核 50万人/年の治療。国際貢献。

表 4 4

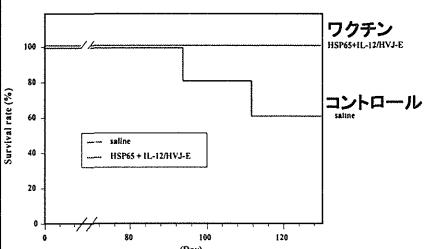
## 特色・独創的な点

### 1.有効性の実証

① カニクイザルの結核感染モデルで、HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン投与群では、生存率の改善、血沈の改善、Tリンパ球のHSP65抗原に対する増殖反応増強、IL-2の産生増強。

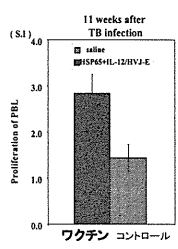
世界でも類例のない独創的ワクチン  
(Vaccine 2009、Human Vaccine 2013)

#### 生存率



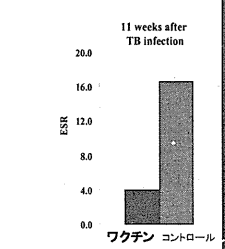
Day	ワクチン (Vaccine)	コントロール (Control)
0	100%	100%
80	100%	100%
100	100%	~80%
120	100%	~60%

#### T細胞の増殖



Group	Proliferation of PBL (S.I.)
ワクチン (Vaccine)	~3.0
コントロール (Control)	~1.5

#### 赤沈



Group	ESR
ワクチン (Vaccine)	~4.0
コントロール (Control)	~16.0

岡田はWHOのWGND (Working Group of New TB Drug) 委員会委員に選ばれた(2009年から)

表 4 5

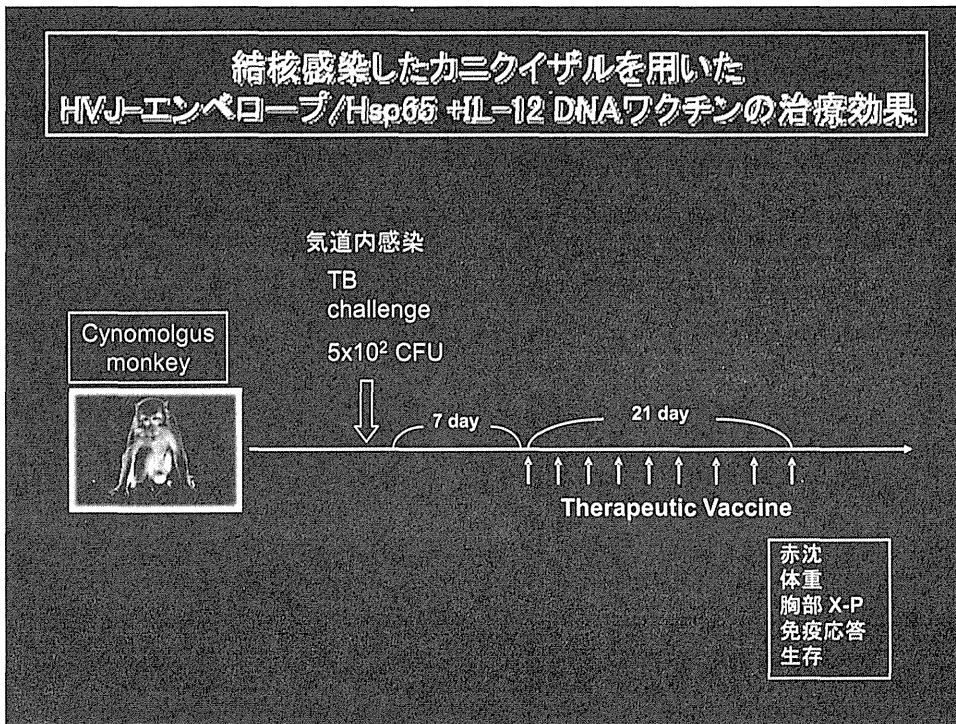


表 4 6

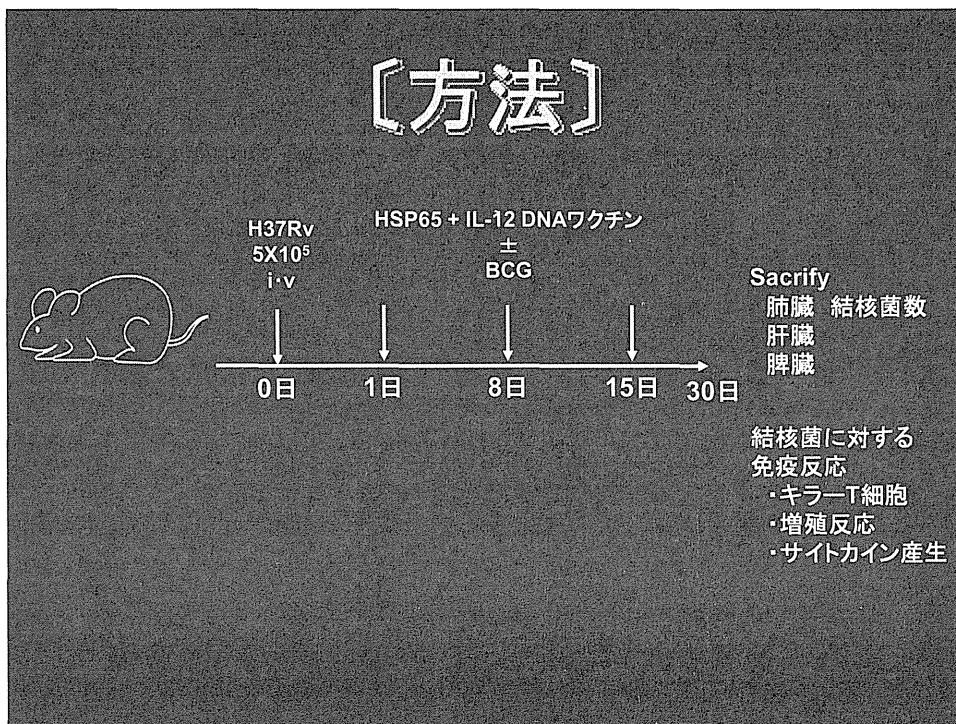


表47

超薬剤耐性結核 Extensively Drug Resistant (XDR-TB) Extremely Drug Resistant (XDR-TB)									
薬剤名	濃度	判定	濃度2	判定	薬剤名	濃度	判定		
SM (簡易比率法)	10	R			SM (MGIT)	1.0	R		
INH (簡易比率法)	0.2	R	1.0	R	INH (MGIT)	0.1	R		
RFP (簡易比率法)	40	R			RFP (MGIT)	1.0	R		
EB (簡易比率法)	2.5	R			EB (MGIT)	5.0	R		
KM (簡易比率法)	20	R			PZA (MGIT)	100	R		
EVM (簡易比率法)	20	R							
TH (簡易比率法)	20	R							
CS (簡易比率法)	30	S							
PAS (簡易比率法)	0.5	R							
LEFX (簡易比率法)	1.0	R							
PZase									

薬剤洗度単位  $\mu\text{g/ml}$   
 R・・・耐性  
 S・・・感受性  
 #・・・判定不能

表48

② マウス多剤耐性結核感染モデルで、ワクチン投与群では肺・肝臓・脾臓の結核菌数が減少、更にマウス超多剤耐性結核 (XDR-TB) 感染モデルで、ワクチン投与群は、生存率を改善 (Vaccine 2009, Human Vaccine 2011, 2013)

**多剤耐性結核治療効果**

Number of *M. tuberculosis* 4 weeks after TB inf.

Legend: G1:コントロール, G2:ワクチン

mean  $\pm$  SD, n = 4-3  
 \* p<0.05 G1 vs G2, Student's t-test

**超多剤耐性結核 (XDR-TB) 治療効果 (生存曲線)**

Legend: コントロール, ワクチン

Log Rank 0.0157  
 Wilcoxon 0.0359

1. 今村賞 結核病学会賞受賞(2012年)
2. 遺伝子治療学会誌賞受賞(2008年)
3. (多ヶ谷勇記念ワクチン研究) イスクラ奨励賞(2004年)

国際学会招へい特別講演(ICAAC: 米国微生物学会) 第50回2010年「Therapeutic vaccine」

表 4 9

特色・独創的な点	
2. 医師主導治験の実施に向けた準備状況	
①	PMDA薬事戦略相談を実施。DNAワクチンで個別面談を実施済、事前面談も6月に実施。 アジュバント(HVJ-エンベロープ)については規格・安全性の対面助言を既に実施
②	アジュバントについては、大阪大学が本年度よりGCP医師主導治験を実施する計画で、医師主導治験を支援する体制を確立
③	HVJ-エンベロープ (1) 不活性化センダイウイルス粒子 (2) 一本鎖RNAが強力なアジュバント作用 (RIG-I活性化:キラーT分化、NK分化、制御T抑制) (3) 癌治療に臨床応用され、すでに治験薬GMP製造
④	民間企業と共同で開発を進める計画であり、本計画に従ってGLP試験、治験薬GMP製造(AMBIS社)等を実施し、3年以内にGCP準拠の医師主導治験を実施可能

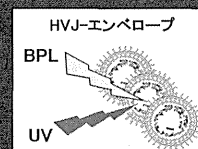


表 5 0

特色・独創的な点	
3. 明確な出口戦略	
①	多剤耐性結核など対応可能な病院が国立病院機構等に限定される感染症の治療用ワクチンを、PMDA、大阪大学、遺伝子治療学会、企業が新技術(DNAワクチン)で開発、ガイドライン策定に繋げる産学官共同研究
②	民間企業(ジェノメディア)が参加。薬事法に基づく承認取得までの出口戦略を明確にした研究
論文	
1. Okada M, et al. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2013	
2. Kita Y, et al. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2013.	
3. Okada M, et al. Clin Dev Immunol. 2011	
4. Kita Y, et al. Human Vaccines. 2011.	
5. Okada M, et al. Human Vaccines. 2011.	
6. Okada M, et al. Human Vaccines. 2010.	
7. Okada M, et al. Vaccine. 2009.	
8. Okada M, et al. Vaccine. 2007.	
9. Yoshida S, et al. Vaccine. 2006.	
10. Kita Y, et al. Vaccine. 2005.	

表 5 1

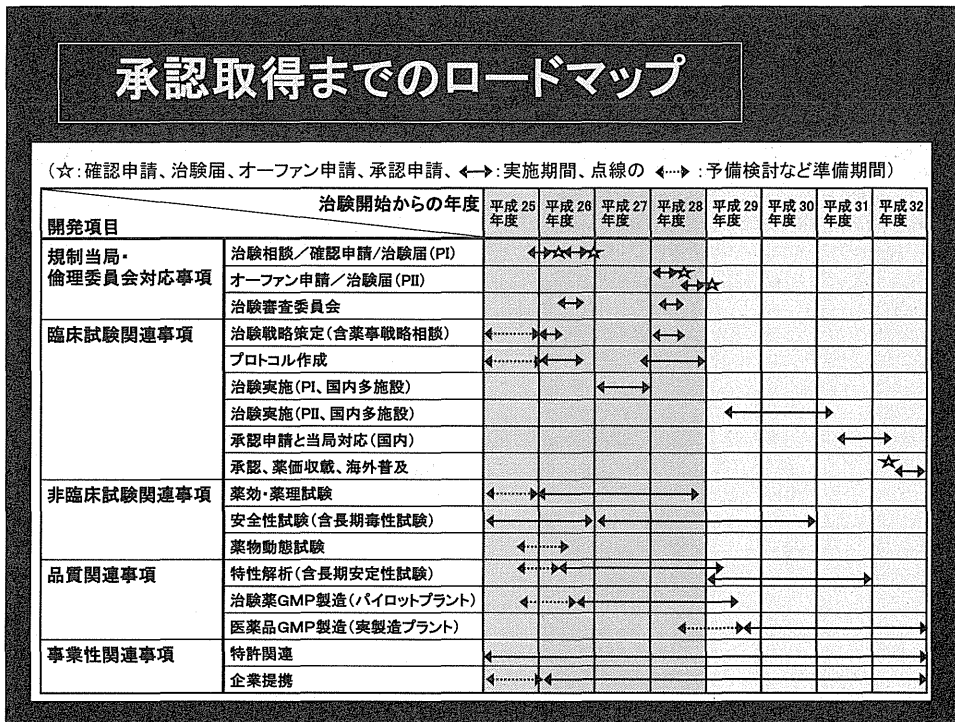


表 5 2

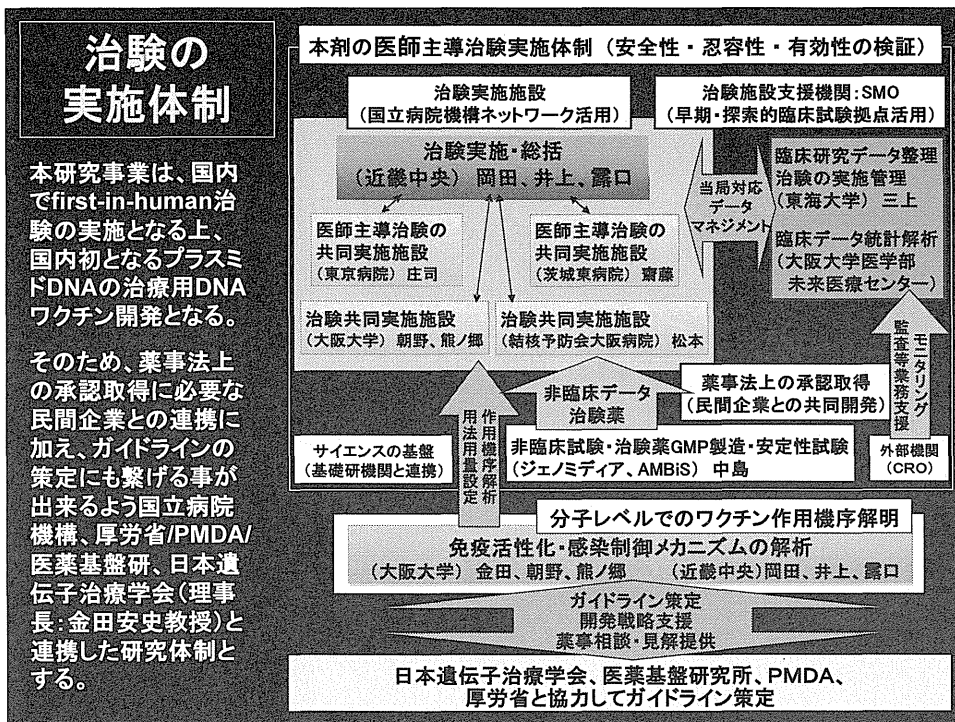


表5 3

### 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)への貢献の可能性

1. 多剤耐性結核に対する初めての治療ワクチン開発・実用化の可能性が極めて強い。
2. エボラ出血熱等の新興感染症ウイルスの遺伝子情報を我々のDNAワクチン開発技術に応用し、新たな感染症予防・治療ワクチンが迅速に開発・実用化され、大きな貢献の可能性。結核予防ワクチン実用化の可能性。
3. 迅速対応可能なワクチンの基盤技術開発で新興・再興感染症ワクチン実用化に貢献の可能性。

表5 4

### 行政施策への貢献の可能性

1. DNAワクチンの新規範疇医薬ガイドライン及び治療用DNAワクチン開発ガイドライン策定の医薬行政に貢献。
2. 国立病院機構でワクチンの医師主導治験体制を確立。対感染症ワクチン行政に貢献。
3. 多剤耐性結核菌の感染、医療費削減、国際的な保健衛生に貢献。

## E. 結論

### 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 $\mu$ 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)。
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 $\phi$ のIL-18を介しIFN- $\gamma$  (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)。

### ・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かどうか。：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  $\mu$ 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。（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、投与経路を皮内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、測定法の妥当性を確認した。

#### ・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  $M\phi$  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- $\gamma$  の産生を誘導。この IFN- $\gamma$  が T cell に作用し IL-12 受容体の発現増強。IFN- $\gamma$  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。
- (3) HVJ-E の F 蛋白質によりマクロファージからの IL-18 の発現が増強され、その経路には NF- $\kappa$ B が関与している。また Caspase 11, Caspase 1 の発現も HVJ-E により増強され、IL-18 の分泌も促進している (金田)。

#### ・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  $M\phi$ ) の誘導系を確立した。