

## 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)

### ・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。

### ・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- $\gamma$  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)。

### ・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）。

#### . 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。

#### . 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。 近畿中央：55名MDR-TB（7年間）のうち20名XDR-TB（露口、松本）。 東京病院：10年間に40名MDR-TB、死亡者多い（庄司）。 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) 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。  
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。  
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 µg 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。[ . 反復投与毒性試験 (GLP 適用)。 薬物動態 (TK) 測定。 中枢神経系安全性薬理試験。 . 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 M 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。

#### ・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 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 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 ）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

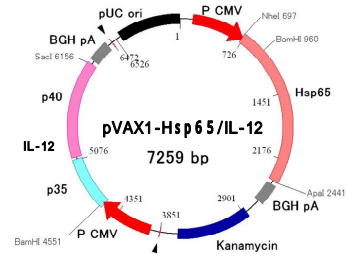
松本智成  
結核予防会大阪病院  
臨床研究部  
診断検査部長

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。  
結核は世界の三大感染症の一つ 多剤耐性結核(莫大な医療費、治療困難)の増加  
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 相臨床試験。



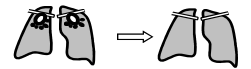
## 方法

### 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 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)  
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。  
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 相臨床試験
4. 評価: 安全性、認容性、多剤耐性結核菌の排菌数減少、免疫反応

## 期待される効果

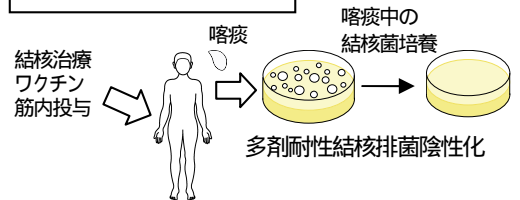
### ヒト臨床応用



### 新しい結核治療ワクチン

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

### 第 相臨床試験評価



## 研究成果

### 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。

### 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- $\gamma$  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関係なく連続投与可能。HVJ-E に 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)。

### 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)。

### 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。

### 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。近畿中央: 55 名 MDR-TB(7 年間)のうち 20 名 XDR-TB(露口、松本)。東京病院: 10 年間に 43 名 MDR-TB、死亡者多い(庄司)。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- $\gamma$ 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**

<p><b>中島俊洋</b> (ジェノメディア株式会社)</p> <p><b>金田安史</b> (大阪大学大学院)</p> <p><b>井上義一</b> (国立病院機構近畿中央)</p> <p><b>露口一成</b> (国立病院機構近畿中央)</p> <p><b>朝野和典</b> (大阪大学大学院)</p> <p><b>庄司俊輔</b> (国立病院機構東京病院)</p> <p><b>齋藤武文</b> (国立病院機構茨城東病院)</p> <p><b>三上礼子</b> (東海大学)</p> <p><b>松本智成</b> (結核予防会大阪病院)</p> <p><b>熊ノ郷 淳</b> (大阪大学大学院)</p>	<p>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、</p> <p>HVJ-エンベロープの新ワクチン・非臨床試験の計画、</p> <p>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、</p> <p>近畿中央胸部疾患セの医師主導治験統括、結核治療効果、</p> <p>近畿地区多剤耐性結核の医師主導治験統括、細胞性免疫、</p> <p>関東地区多剤耐性結核患者の医師主導治験統括、</p> <p>茨城東病院の多剤耐性結核患者の医師主導治験統括、</p> <p>PMDAとの交渉、製薬会社との交渉、プロトコル修正、</p> <p>大阪府立病院、結核予防会大阪病院より患者の協力、</p> <p>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、</p>
--	--

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**  
 結核は世界の最大感染症の一つ  
 多剤耐性結核菌 (莫大な医療費、治療困難)の増加  
 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

すでに、2013年5月31日 PMDA薬事戦略相談・個別面談実施。

2013年6月20日 PMDA事前面談実施

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): 有害事象共通用語規準を指標とする安全性の評価
- (2) 有効性(副次): 多剤耐性結核菌 排菌陰性化。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 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

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。

2013年6月20日 PMDA薬事戦略相談・事前面談実施

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施設前リーダー(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- $\gamma$ 、IL-2、IL-6及びTNF $\alpha$ の産生を検討した。

pDNAの投与量は100 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml)、PPD抗原(20 $\mu$ g/ml)又は結核死菌(20~100 $\mu$ 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 $\times$ 10<sup>6</sup>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 $\mu$ g/100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ gDNAを背部皮内投与4箇所専用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( $\mu$ g)とHVJ-Envelope(mNAU)との配合比を100 $\mu$ g DNA:100 mNAU(1:1)、100 $\mu$ gDNA:400

mNAU (1:4) 及び100 µgDNA : 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- $\gamma$ 、IL-2、IL-6、TNF $\alpha$ )を増強するか解析した。

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

Linbro 96well(平底プレート)に $1 \times 10^5$  脾細胞を加えた。2日後及び3日後に $^3\text{H-TdR}$  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 $^3\text{H-TdR}$ 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疫を実施後、試験施設にて検疫・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。  
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)  
サルの血漿、血清  
ELISA法  
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エンベロープ (HVJ-E) の2剤からなる混合製剤。  
(2) 本剤の投与液に含まれる上記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iHVJも作成した。いずれのHVJも紫外線(99 mjoule/cm<sup>2</sup>)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- $\kappa$ Bの阻害剤としては、NF- $\kappa$ 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

### 1. 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)。

・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。

(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- $\gamma$ 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)。

(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- $\gamma$ 、IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$ 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 $^3\text{H}$ -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。

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肉投与を比較した(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、筋肉ワクチン投与では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)。筋肉ワクチン投与で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  $\mu\text{g}$ 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倍強くIFN- $\gamma$ 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 $\mu$ g/マウスの時 HVJ-E100 mNAU(100:100 すなわち 1:1)、HVJ-E400 mNAU(100:400 すなわち 1:4)、HVJ-E800 mNAU(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  $\mu$ 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 $\mu$ g/ml、HSP65 20 $\mu$ g/ml、PPD 20 $\mu$ 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- $\gamma$  産生も同様であった(表24)。

すなわち、HSP65 10  $\mu$ g/ml刺激、HSP65 20  $\mu$ g/ml刺激、PPD 20  $\mu$ g/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(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、ワクチンpDNA 100  $\mu$ g : HVJ 100mNAU (1 : 1) 及びワクチンpDNA 100  $\mu$ g : HVJ 400mNAU (1 : 4) で強力なワクチン効果。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。Assay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)。

BALB/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)。

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)。

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のIL-18を介しIFN- $\gamma$  (結核免疫)誘導(金田)。

. 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)。

サルを用いた反復投与毒性試験。サルを用いた安全性薬理試験。サルを用いた単回投与毒性試験。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)。HVJ-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、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(表37)。

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)

サルの血漿、血清

ELISA法

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)

測定対象：pDNA及びHVJ-E

pDNAは吸光度(A<sub>260</sub>)

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、添加回収

を測定して解析し、信頼性基準を担保した。

・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)

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。

PMDA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なった。(平成26年12月5日)

非臨床試験パッケージ案を策定して、平成26年12月5日に事前面談を行なったところ、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年度から実際にカニクイザルを用いた安全性試験を開始した。

・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。近畿中央：55名MDR-TB(7年間)のうち20名XDR-TB(露口、松本)。東京病院：10年間に43名MDR-TB、死亡者多い(庄司)。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 相臨床治験案(表41)を目指す。

研究代表者(岡田)

(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（表33、34、35）。

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。

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医薬品規制調和国际会議）/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 µg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内投与より4倍T細胞免疫を増強させた（表13）。

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肉投与による結核免疫増強効果を比較検討した。

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）。

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

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。

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- $\gamma$ 、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 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- $\gamma$ 産生増強とパラレルに働き、ワクチンの良い結核免疫指標となった(表16、表20)。

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 $\mu\text{g}$ /マウスの時 HVJ-E100mNAU (100 :

100 すなわち 1:1)、HVJ-E400mNAU (100 : 400 すなわち 1:4)、HVJ-E800 mNAU (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1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、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。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。Assay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)。

BALB/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)。

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)。

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。[ . 反復投与毒性試験 (GLP適用) (表36)。 薬物動態 (TK) 測定。 中枢神経系安全性薬理試験。 . 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 筋内投与 (大腿部) 0.5 mL / site 2箇所 6回/2週間 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 一般状態 投与部位の外観  
摂餌量 体重 血液 血液生化学 眼  
尿 剖検 器官重量 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 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1~48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)。

測定対象: ヒトIL-12タンパク質 (p35及びp40ヘテロダイマー)

サルの血漿、血清

ELISA法

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

**( ) 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)



大腸菌に電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> WC VII 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

**( ) 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

培養上清  
増殖反応

ELISA  
IFN-  
IL-2  
IL-6  
TNF?  
<sup>3</sup>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

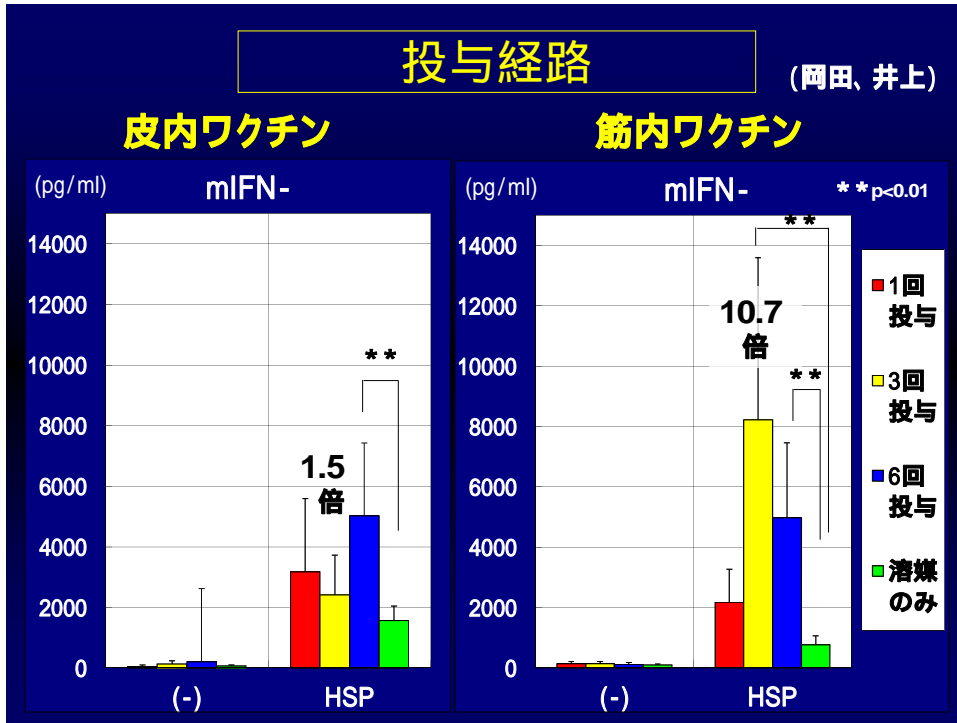


表 1 4

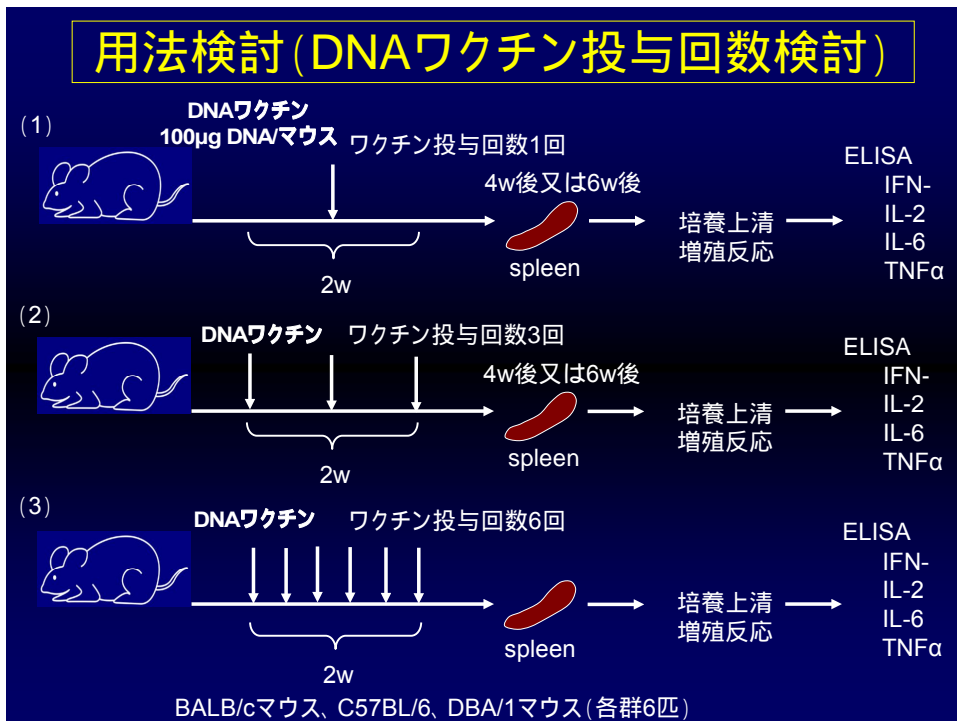


表 1 5

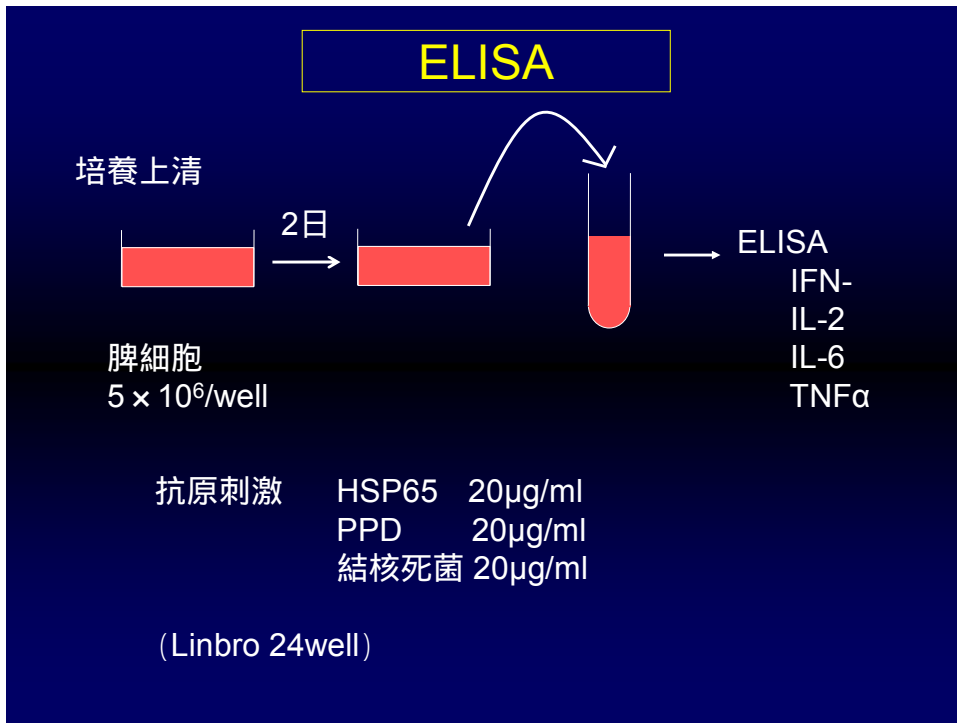


表 1 6

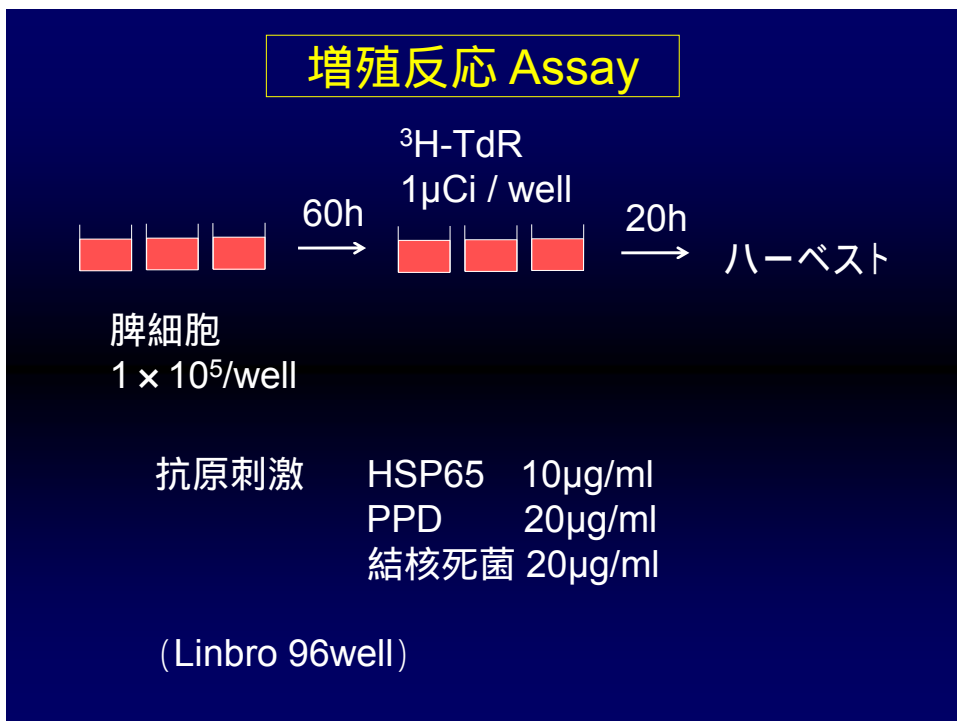


表 17

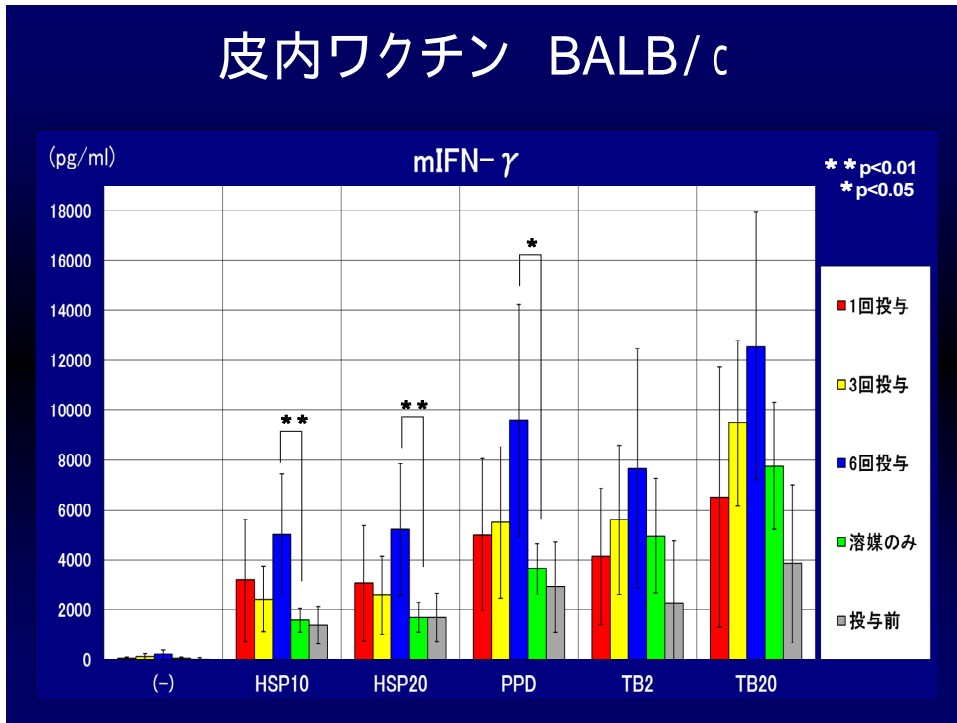


表 18

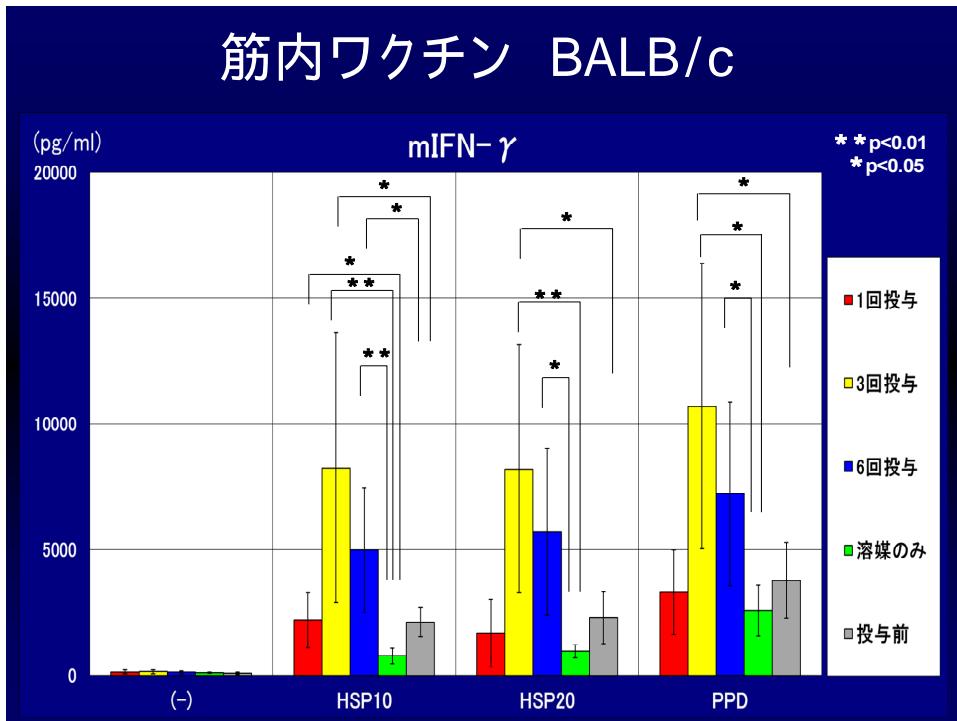


表 1 9

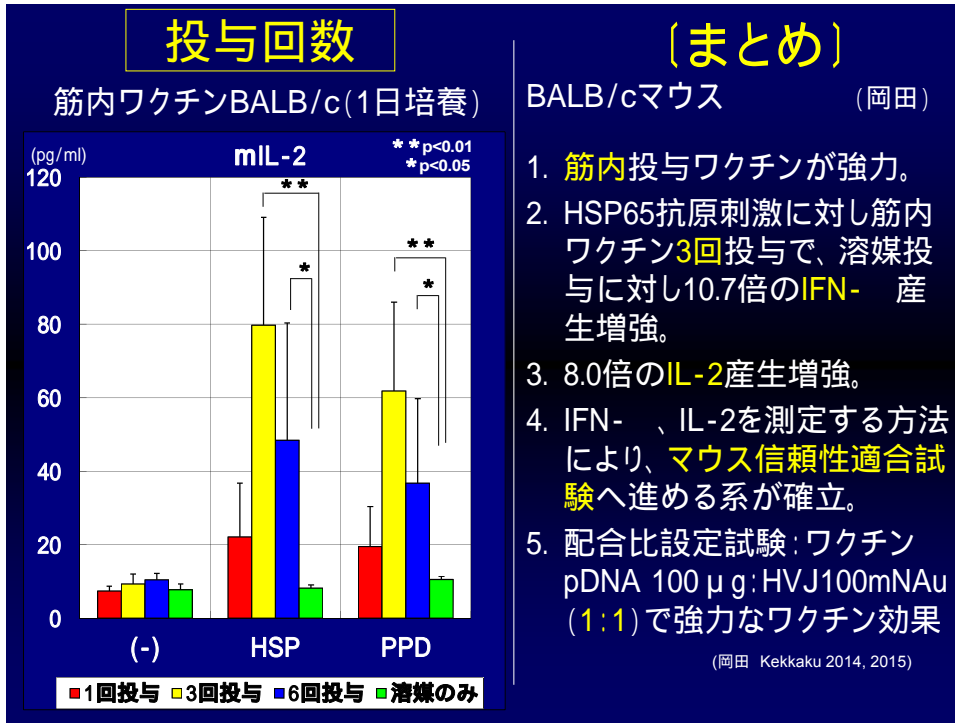


表 2 0

## 筋肉ワクチン BALB/c

増殖反応(S·I) 2日培養

rHSP65 10 $\mu$ 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 $\mu$ 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

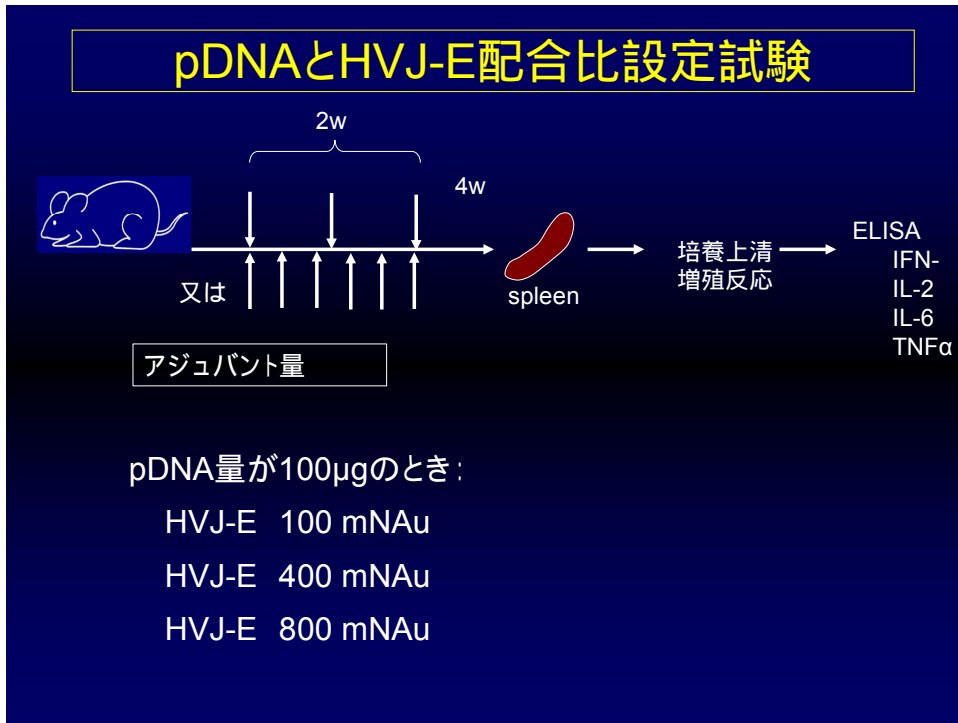


表 2 2

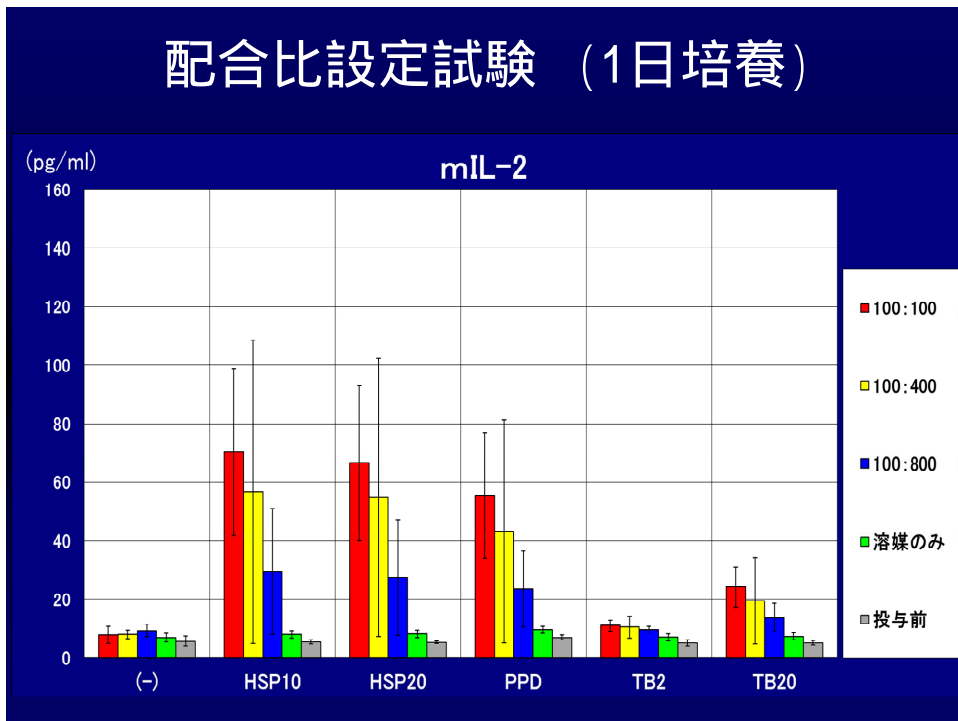


表 2 3

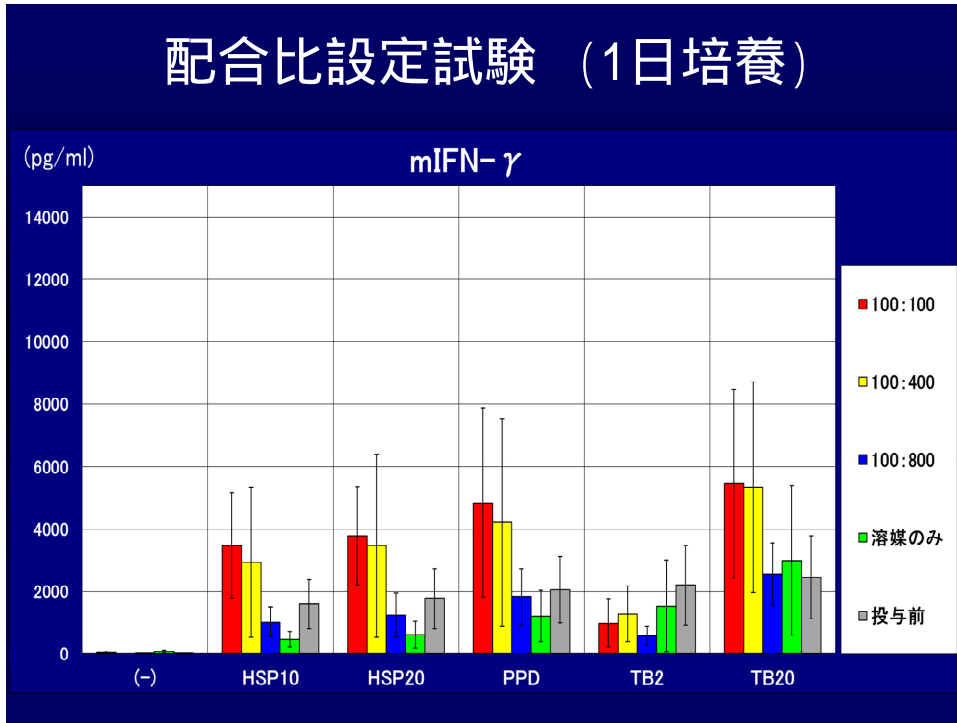


表 2 4

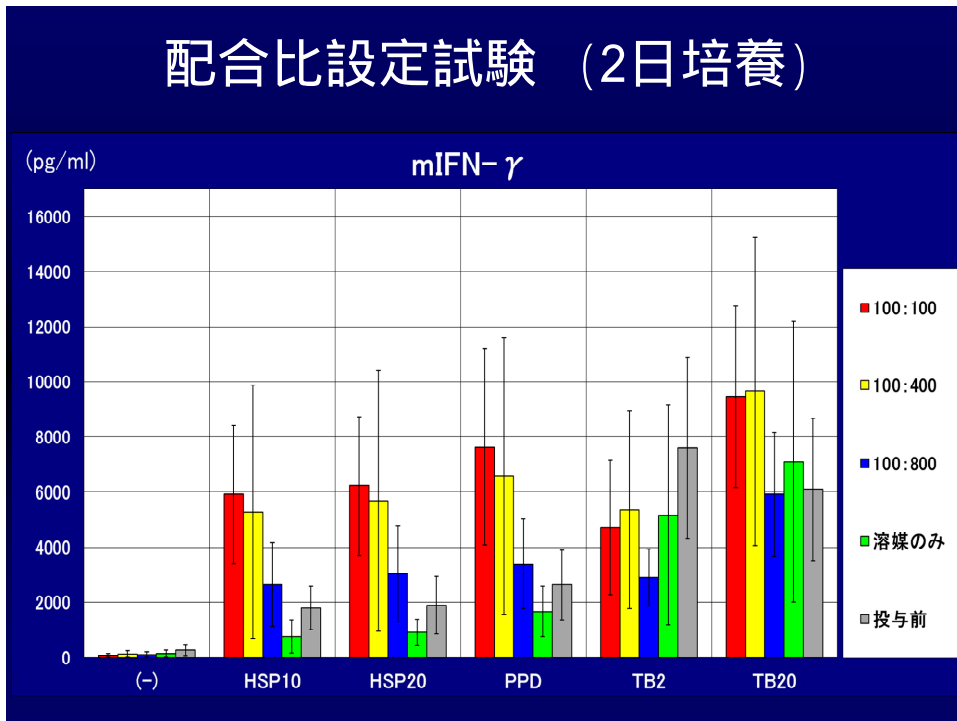


表 2 5

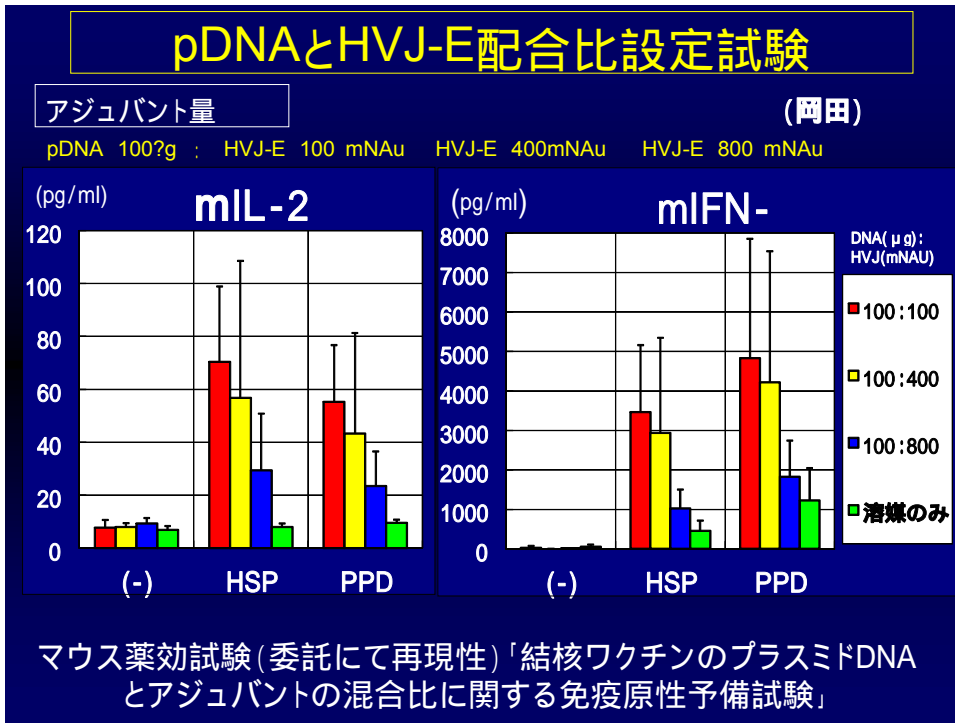


表 2 6

- 〔まとめ〕
- 配合比設定試験**
1. ワクチンpDNA 100  $\mu$ g:HVJ 100mNAu (1:1)及び  
ワクチンpDNA 100  $\mu$ 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- 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

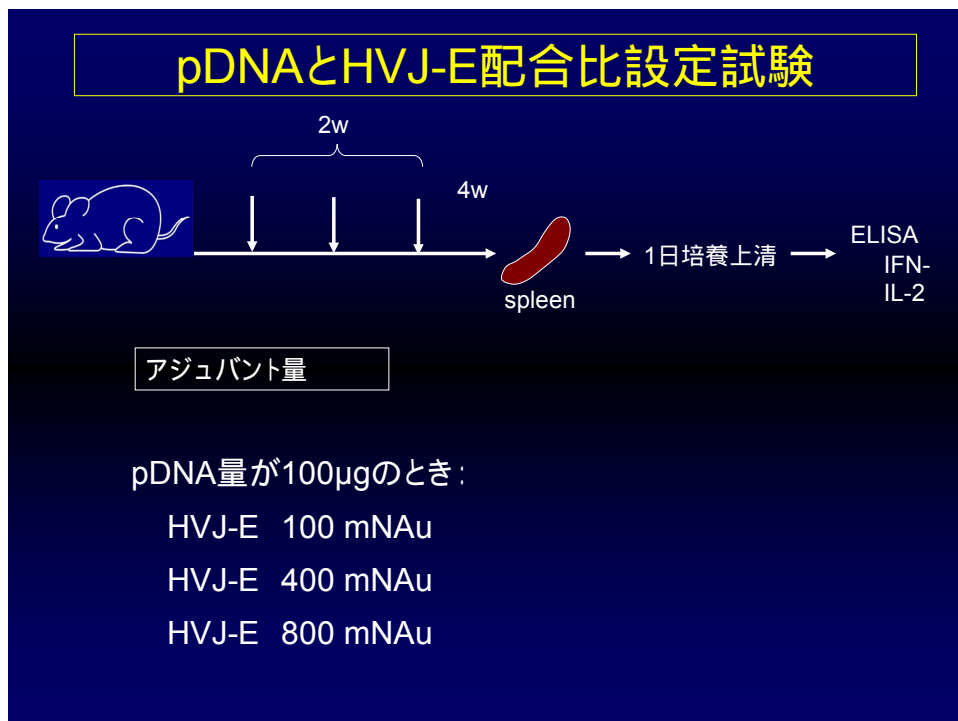
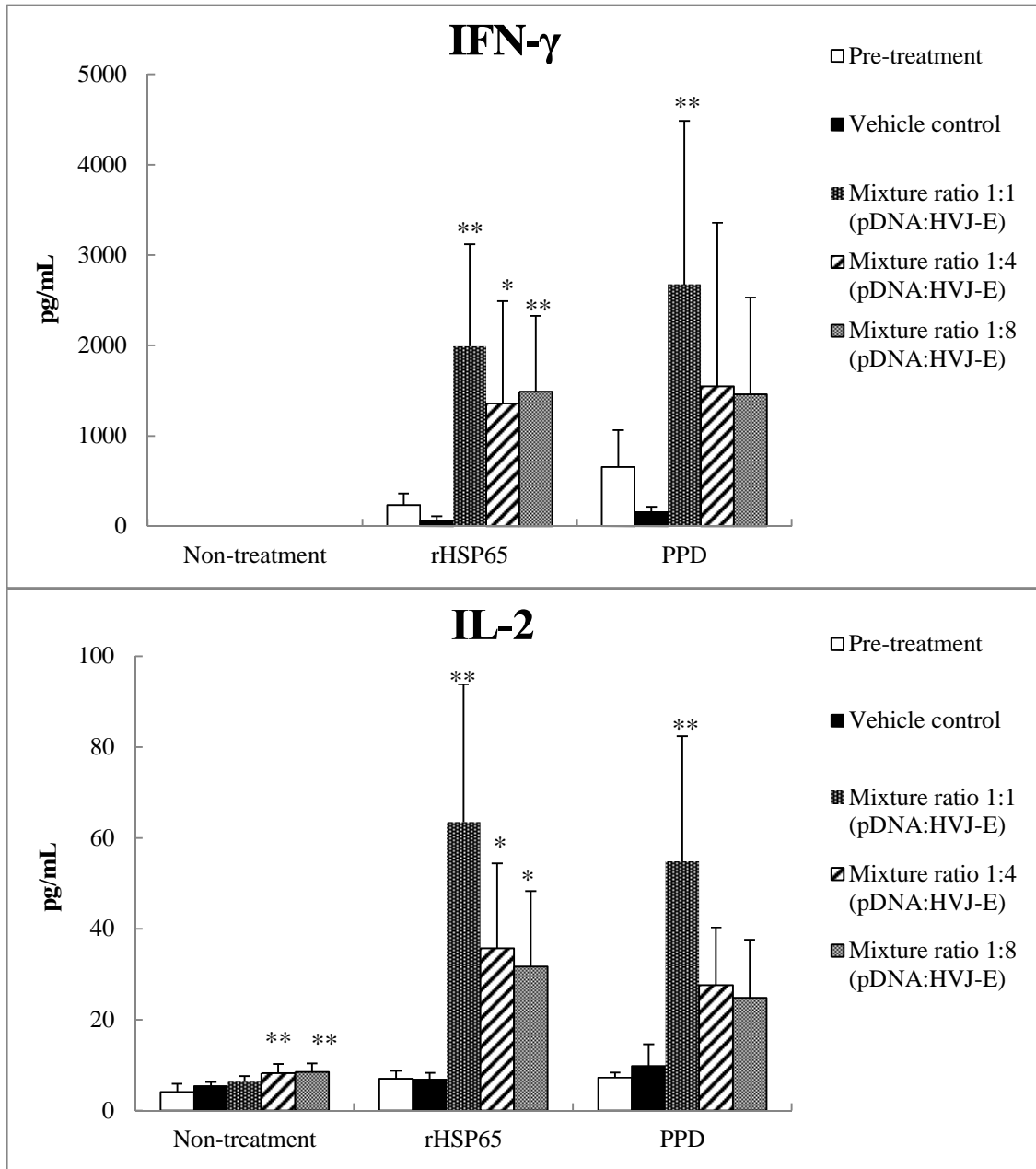


表 2 9



\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ; 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

### 用量検討(DNAワクチン投与量検討)

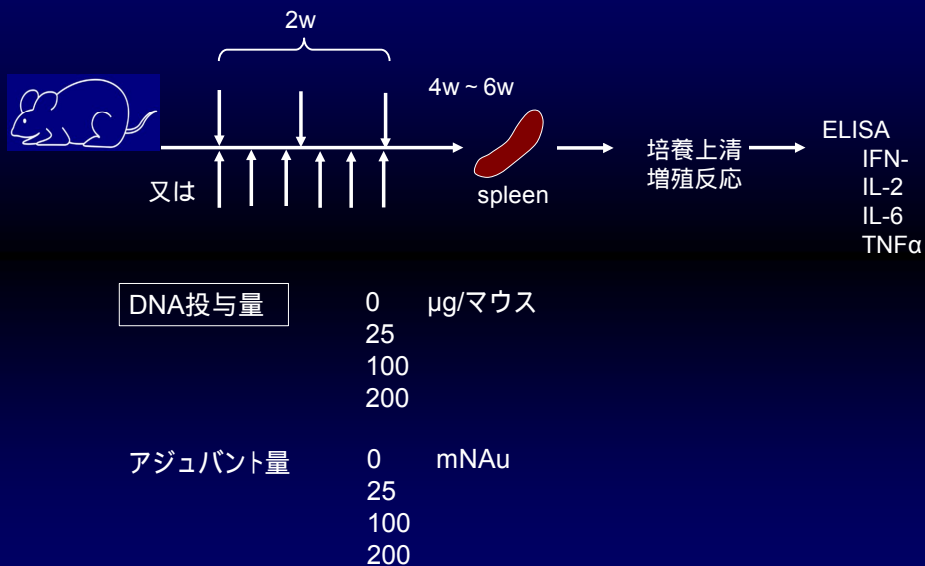


表 3 2

( ) **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:  
反復投与毒性試験:カニクイザル筋内投与。  
薬物動態試験(TK)はDNAワクチンヒトIL-12蛋白の血中動態、  
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)

表 3 3

( ) **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

( ) 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

( ) 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	"	"
GT	"	"	-Globulin	"	"
ALP	"	"	Ca	"	"
CK	"	"	P	"	"
Total Bilirubin	"	"	Na	"	"
BUN	"	"	K	"	"
Creatinine	"	"	Cl	"	"
Glucose	"	"			
Total Cholesterol	"	"			
Phospholipid	"	"			
Triglyceride	"	"			

表36-1

## 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歳を擬定
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(回復期間は休業1~3, 7, 14日) 換気量測定: 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 眼科検査: 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 臓器重量測定 病理組織標本作製及び検査(脾臓/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24h, 最終投与後0.5, 1, 2, 6及び24h 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36-2

## 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。

表37

(岡田、中島)

### 委託(信頼性基準)

## 1. 「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」

HVJ-E/HSP65 DNA + 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。

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)

サルの血漿、血清

ELISA法

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

表38

### 委託(信頼性基準)

## 2. 「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」

- (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エンベロープ (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 ( $A_{260}$ )

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、添加回収

表3 9

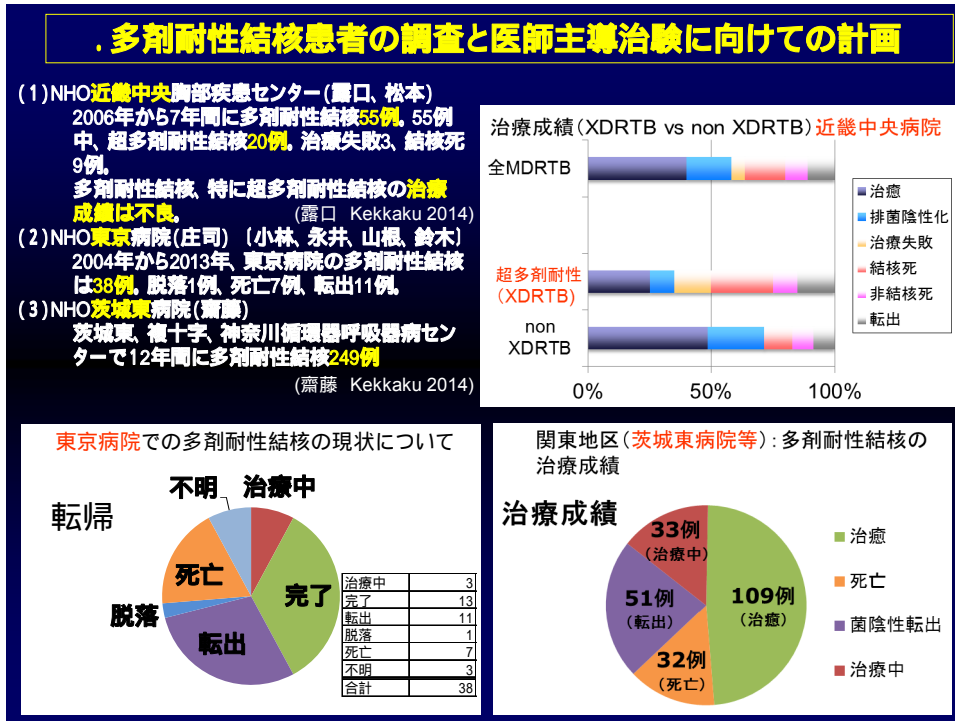


表4 0

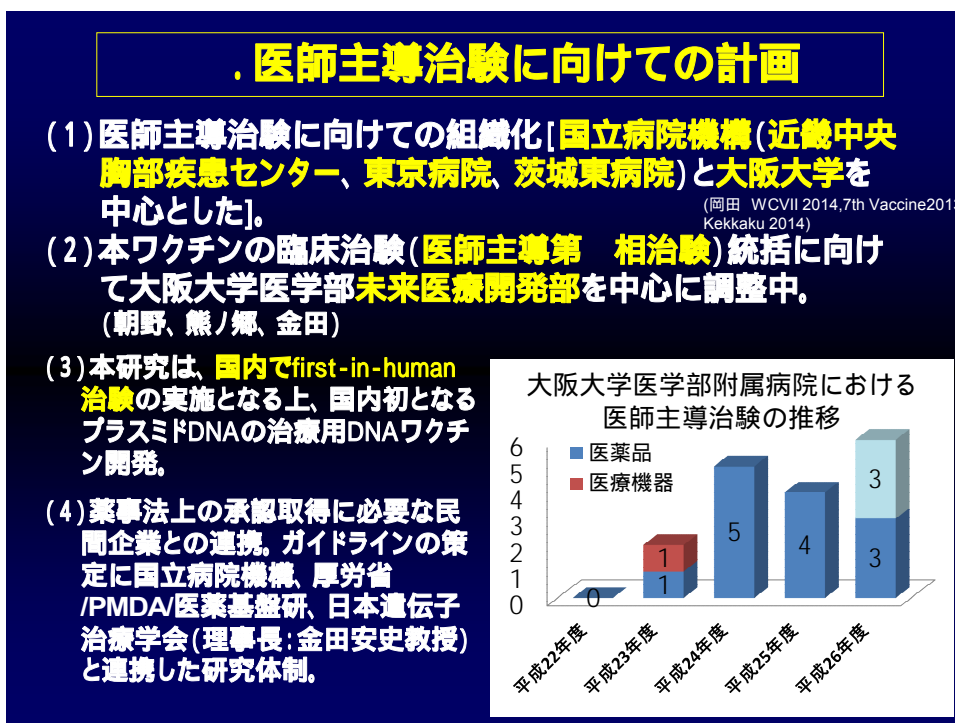
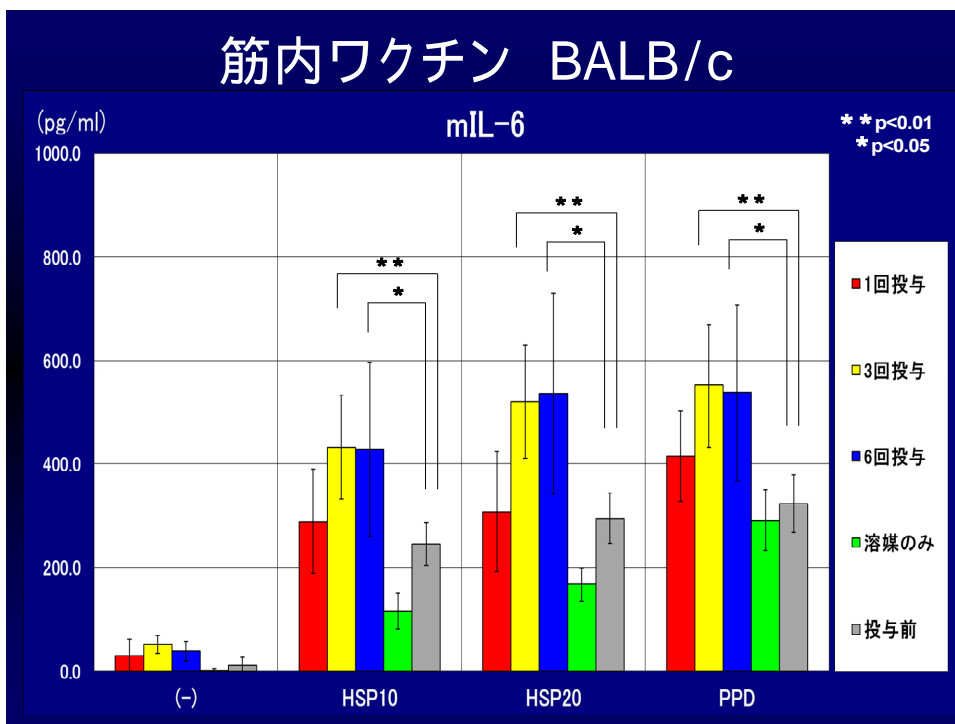




表4 1



表4 2



(11) 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(MCB)を分担研究者中島俊洋と共にAMBiS社に委託して作製した(表7、表9)。

#### 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

- 昨年度作成した大腸菌のマスターセルバンク(MCB)を用いて、本DNAワクチンのワクチン成分であるプラスミドDNA〔pVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNA〕(pVAX1-IgHSP65-hIL12と同じ)のGMP製造を実施した。
- 製造はGMPパイロットプラント内で50Lスケールのステンレスタンク培養により実施した。
- 臨床試験用や安全性試験に使用する事を想定し、生物由来原料を含まない原材料を使用して培養を行い、菌体回収、菌体破碎を行なって原料となる粗精製液を調製した。
- 医薬品製造で実績のあるカラムクロマトグラフィシステム、精製用樹脂を用いて精製、バッファー置換、濃縮を行なって原薬となるプラスミド溶液を調製した。
- その後、無菌ろ過、濃度調整の工程により無菌製剤化を進め、最終製剤化として遮光バイアルへの充填、シリコンコートしたゴム栓の打栓を実施した。
- 製剤化したプラスミドDNA〔pVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNA〕(pVAX1-IgHSP65-hIL12と同じ)溶液は、液剤として冷凍庫で凍結保存した。
- 現在のところ1回あたりのGMP製造スケールはバイアル数で200本から400本程度(品質管理試験用バイアルも含む)を想定してGMP製造を実施している。
- 製造したプラスミドDNAについては、品質試験を実施し、暫定規格を設定するための根拠とな

るデータを数バッチ分取得している。

- 暫定規格項目については、プラスミドDNAは大腸菌で製造されるバイオテクノロジー応用医薬であると考えられたため、適用となるガイドラインとして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)を参考にして、規格項目の設定を行った。
- 具体的にはガイドラインの「4. 規格及び試験方法」内容に従って試験項目の設定を進めることとした。製剤の暫定規格としては、ガイドラインの「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 物質量」、「4.2.6 その他の一般的試験項目」の各項目の内容に準拠して設定することが妥当であると考えた。
- 品質試験については、その試験目的によりバリデーション試験の評価項目を設定し、試験としての適格性を適宜確認している。
- 性状試験、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については、それぞれ日本薬局方の記載に従って手順書を作成し、試験を実施している。
- 一方、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、たん白質含量試験などの試験については、科学的根拠に基づいて社内で試験手順書の策定、バリデーション試験による妥当性の検証を行っている。試験製造を実施した数バッチの品質試験データ、及びガイドラインなどの記載内容に基づいて暫定的に設定した規格値を適宜調整し、治験薬としての規格設定を進める計画である。
- このように試験製造のデータを蓄積して規格設定を進める事で、純国産の革新的な治療薬の国内での製造体制を構築する計画である。

## 2) DNAワクチンの非臨床試験のデータパッケージ案の作成

- ・ プラスミドDNAをワクチン成分とし、アジュバント成分としてHVJ-Eを添加するワクチンについては、国内で初めての治験を実施する事となる。また、計画している治験は、first in humanの治験であるため、国内でプラスミドDNAをワクチン成分とする医薬品開発に必要なガイドライン策定にも貢献することも考慮して開発を進める事としている。
- ・ そのため、平成26年度は、昨年度に引き続き治験届けまでに必要となる非臨床試験のデータパッケージ案の策定を進める事とした。
- ・ 平成25年度にプラスミドDNAを用いた医薬品の開発について、国内外のガイドラインについて調査を行った結果、

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)]と、

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)]

の、2種類のガイドラインを参考とすることが、最も適切であると考えられた。また、ワクチン開発におけるガイドラインについても参考にする必要があると考えられたため、ワクチンに関するガイドラインについて調査した結果、

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 (Adopted by the 54th meeting of Expert Committee on Biological Standardization, 17-21 November 2003.)]

を、参考にする事が適切であると考えられた。

- ・ 平成26年度に更に確認を進めた結果、 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、参考とする事が適切であると考えられた。そこで、 、 のガイドラインを参考にして非臨床試験パッケージ案の策定を行った。

(12) F0を持つ融合能のないHVJ-EやF1/F2をもつ融合能のあるHVJ-E、またHN欠損のHVJ-Eを初代培養マクロファージやP388D1にかけてもIL-18の発現は増強された。この発現はNF-κBの阻害剤で激減した。F、HNを欠損したHVJ-EではIL-18の発現は起こらなかった。F1/F2をもつHVJ-Eをp388D1細胞にかけると、IL-18、Caspase 11、Caspase1の発現が増強された。なおマクロファージ以外の細胞 (T cell, B cell, NK cell) からは、HVJ-EによりIL-18の賛成は誘導されなかった (金田)。

(13) 本分担研究では、近畿地区の結核診療施設の結核患者の臨床試験統括。結核ワクチンの薬効解析基盤の確立に着手した。結核ワクチンの薬効解析のためのマクロファージ機能解析を行った (熊ノ郷)。

(14) 茨城東病院、複十字病院、神奈川循環器呼吸器病センターで1年間に診療したMDR-TB患者数は18例で、性別は男性11例、女性7例で、一般の結核症例と男女差は見られなかった。平均年齢は50歳 (range

17歳～85歳)であった。国籍は、日本人13例、中国人2例、その他のアジア2例、その他の地域1例であった。多剤耐性結核のうち、XDR-TBは2例でXDR以外は15例であり、昨年の報告とほぼ同様であった。治療について新規抗結核薬であるデラマニドが使用開始となった症例は判明しているだけで2例あった。

2002年1月～2014年10月に経験したMDR-TBの治療成績の現状について  
患者背景：性別：男性170例、女性79例、平均年齢：50歳(17歳～99歳)、日本人186例、中国人27例、韓国人11例、その他アジア18例、その他の地域7例、XDR-TB：39例 XDR以外：210例に対し、その治療成績は治癒は109例(48.4%)、死亡32例(14.2%)、菌陰性転出51例(22.7%)、治療中33例(14.7%)であった(齋藤)。

(15) 平成26年度の実績として、医師主導治験4件を開始し、新薬シーズとしての治験外臨床研究5件を開始した。ワクチン関連ではマラリアワクチンの健康人を対象とする第 相試験が終了し、その過程において、諸種の問題を解決しながら、より精度の高い相試験の実施が可能となってきている(朝野)。

(16) 男性が37人(平均年齢62.1歳)、女性が18人(平均年齢52.3歳)であった。基礎疾患は糖尿病11人、悪性腫瘍8人、慢性腎不全3人、間質性肺炎2人などであった。結核の治療歴に関しては、初回治療例が26人、既治療例が29人であった。55人中、超多剤耐性結核(XDR-TB、INHとRFPに加えて、アミカシン・カナマイシン・カプレオマイシンの少なくとも1つといずれかのフルオロキノロン剤に対して耐性を示す結核)は20人(36.4%)であった。治癒と排菌陰性化を合わせて治療成功とすると、全症例での治療成功率は58.2%であり、要因ごとの治療成功率は以下のとおりであった。

- ・初回治療例 69.2%、既治療例 51.7%
- ・XDR-TB例 35.0%、non XDR-TB例 71.4%
- ・手術を行った例 85.7%、手術を行わなかった例 51.2%(露口)

(17) 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は以下の通りであった。

SM耐性結核、RFP耐性結核患者数は減少傾向であるが、INH耐性結核患者数は2010年以降上昇傾向にあった。超多剤耐性結核患者数は0であった(松本)。

(18) 2004年から2015年(3月現在)までに、国立病院機構東京病院に入院し、多剤耐性結核と診断され治療を受けた患者の総数は43名であった。性別は、男性35名、女性8名であった。多剤耐性結核治療後の退院時の転帰別にみると、治療完了7名、治療中断脱落1名、死亡8名(退院後の死亡は含まず)、転出(帰国含む)10名、治療継続6名(内3名は後に死亡、他の3名は東京病院で治療中あるいは観察中)、不明11名(計43名)であった(庄司)。

(19) 当研究課題の厚生労働科学研究費補助金採択に先立って行われた医薬品医療機器総合機構(PMDA)との薬事戦略相談および事前面談において、国内でのDNAワクチン開発のガイドライン策定を目標として、当ワクチンの国内開発計画が行われるべきことが確認されている。

治療用ワクチン開発については、非臨床・臨床ともに国内での評価ガイドラインの整備の必要性は認識されている。現行ではWHOによる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ガイドラインが提示されており、これらを参考として開発計画が進められている。

国内での治療用ワクチンの開発にあたっては、再生医療等の安全性確保等に関する法律が近年整備されつつあり、研究開発段階では再生医療等安全性確保法の対象とされ、また製造販売許可申請にあたっては医薬品、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の適応対象として明示された。さらに具体的評価内容について、今後この多剤耐性結核に対するDNAワクチン開発という具体例をもとに整備される必要がある。

非臨床評価とともに、臨床評価方法についても具体的計画策定の段階に近づいている。治療対象としての多剤耐性結核患者数は国内で年間200名程度と推測されるが、その希少性や感染症としての管理の困難性などから、当面は医師主導治験として計画実行されることになる見通しである。研究班としては国立病院機構近畿中央胸部疾患センター、国立病院機構東京病院をはじめとした呼吸器感染症専門部門を有する病院のネットワークを利用して多剤耐性結核患者の被験者を確保できる予定である。

臨床研究の有効性評価指標についても、重篤感染症である多剤耐性結核患者を対象とすることの倫理性も踏まえ、今後さらに検討していく必要がある（三上）。

(20) 岡田全司と三上博士とのPMDA薬事戦略相談に向けての打ち合わせ。  
平成27年3月24日に研究打ち合わせを行った。

PMDAの先生方には、何回も事前面談で当班のことを相談できる。

少なくとも5～6回までは相談できる。

電話での相談でも可能なので、その方向性も考えたら良いのではとの三上（PMDA委員）博士の suggestionあり。

アカデミアからの対面助言は費用面で考慮される。

## D. 考察

### ・用法用量試験

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。

表30に記載した如く、(a)マウスワクチン用量予備試験。(b)マウス薬効試験（結核菌抑制）。(c)マウス薬効用法・用量試験（外注）（信頼性基準適合試験）を行う必要があり、これらの計画を立案中である。すなわち、表31に記載した如く、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンのpDNAとHVJ-Eの比率を全て1：1としてpDNA 25 µg/マウスとアジュバントHVJ-E 25mNAU、pDNA 100 µg/マウスとアジュバントHVJ-E 100mNAU、pDNA 200 µg/マウスとアジュバントHVJ-E 200mNAUとして、これら三種の用量検討を行う計画である。

さらに、ワクチン投与回数検討を、マウスの系でHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン：HVJ-Eを1：1の比率で1回、3回、6回/2週間以内で投与して、何回投与が最も強力なワクチン効果（IFN- $\gamma$ 、IL-2等）を得るか検討する必要があり、これらの実験を計画中である。

安全性試験に用いる被験物質を確定するには、ワクチン成分であるプラスミドDNAと、アジュバント成分であるHVJ-Eの混合比を決定する必要があり、マウスに対する免疫原性を指標として岡田らは研究を行った。免疫原性に関する強い条件はpDNA：HVJ-Eは1：1であった。今後、同定した混合比で薬効薬理試験（用法用量設定試験、感染防御試験など）、安全性試験（一般毒性試験、安全性薬理試験など）を実施する必要がある。

混合比1：1でHVJ-E/HSP65 DNA + ヒトIL-12 DNAワクチンを被験物質として単回皮下投与一般毒性試験をサルで行った。種差を考慮してカニクイザルへの投与により本剤の毒性について確認した結果、血液学的・血液生化学的毒性変化は認められないことが明らかとなった。

臨床投与経路である筋内投与で、一般毒性試験と安全性薬理試験を行い、HVJ-E/HSP65 DNA + ヒトIL-12 DNAワクチンの毒性について確認する計画である。

・治験までに必要な書類等

治験計画書

治験届

IRB申請

GLP毒性試験（サル）

信頼性基準適合の薬効薬理試験完了（マウス）

抗結核作用試験（マウスの結核感染モデルでの治療効果）

6ヶ月安定性試験（6ヶ月長期安定性データ取得）

IRB承認取得

PMDA対面助言

反復投与毒性試験

一般毒性と局所刺激性試験を含む

動態試験（TK）はワクチンの投与で発現するヒトIL-12蛋白の血中動態を測定

中枢神経系に関する安全性薬理試験組み込み（GLP）

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））

用量設定試験（マウス）本試験

投与回数設定試験（マウス）本試験

臨床治験（第 相、first in human試験）

同意説明文書

治験薬GMP製造

今後、医師主導治験の実施計画書、治験薬概要書、同意説明文書、治験薬の規格及び安全性など、新規医薬品としての開発に必要な項目について、PMDAと事前相談、対面助言を実施し、開発を進める。

PMDAの薬事戦略相談を行い、国内で初めてとなる治験の実施に必要な項目に関して打ち合わせ・相談を行った。規制当局との合意形成を進めた。さらに、治験を行うとともに国内のガイドライン策定に向けた準備を行いたい。

・昨年度構築した治験薬GMP製造に使用する大腸菌のセルバンクシステム（マスターセルバンク：MCB）を用いて、本DNAワクチンのワクチン成分であるプラスミドDNA（HVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNA）のGMP製造を実施した。

製造したプラスミドDNAの品質確認データを取得し、暫定的に設定した規格設定項目と暫定規格値の調整を検討した。一部試験法などについては検出感度

などの課題がある事も明らかとなったため、今後複数の製造バッチの品質試験データを取得し、取り纏めた結果に基づいて品質規格の調整を進める必要があると考えられた。また、暫定規格の調整結果を取り纏めた後に、その妥当性についてPMDAと相談し、治験薬の規格設定を進める必要があると考えられた。

非臨床試験のデータパッケージについては、3種類のガイドラインを参考にして改定案を策定し、その内容についてPMDAの薬事戦略相談を利用して確認を進めた。その結果、一部デザインの変更を行う方が適切である事が明らかとなったため、相談内容を反映して非臨床試験を進める事となった。今後も適宜PMDAの薬事戦略相談を利用し、着実に開発を進めていく事が適切であると考えられた。

## 期待される成果

### 1. 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（表43）
- ・毎年150万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）（表43）
- ・スーパー・スプレッタ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）

### 2. 第 相医師主導治験評価

結核ワクチン筋内投与

患者の喀痰

喀痰中の結核菌培養

多剤耐性結核菌 0 個となる  
排菌陰性化

## 特色・独創的な点

### 1. 有効性の実証（表44、表45）

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）

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（表46、47、48）

（Vaccine 2009、Human Vaccine 2011、2013）

### 2. 医師主導治験の実施に向けた準備状況（表49）

PMDA薬事戦略相談を実施。DNAワクチンで個別面談を実施済、事前面談も平成25年6月及び平成26年12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

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

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）HVJ-EのF蛋白質がマクロファージの膜蛋白質に作用してNF- $\kappa$ Bのシグナルを活性化してIL-18の転写を増強する。一方、Caspase 11、Caspase 1も同じようにしてHVJ-Eによって発現増強される。Caspase 11はCaspase 1を活性化し、Caspase 11はIL-18のmaturationを促進してIL-18を分泌させることが分かっており、HVJ-Eはいずれのステップにも関わって、IL-18の産生を促進していると推察される。IL-18のELISAが可能な抗体が入手できなかったため、培養液中に分泌されたIL-18を直接測定はできなかった。しかし、IL-12蛋白質とHVJ-EをマクロファージとT cellを含む脾臓細胞に作用させ、産生されるIFN- $\gamma$ を測定する系を用い、IL-18の抗体やIL-18受容体の抗体の共存により、IFN- $\gamma$ の産生が劇的に抑制されることが明らかにな

った。このことより間接的にHVJ-EによりマクロファージからIL-18が産生、分泌されていることが示唆された。マクロファージの膜表面にF受容体があることが示唆されるが、今まで報告がない。F蛋白質とP388D1の膜分画を作用させて、免疫沈降させた中から、複数の受容体候補が見つかり、今後さらに解析を進める。

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

3. 明確な出口戦略（表50）  
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  
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
4. 承認取得までのロードマップ  
IRB承認取得、できれば治験届まで進め、第1相の医師主導治験を開始。  
その後オーファン申請を行って、第2相治験をもって7年で承認申請に進む計画である（表51）。
5. 予定される治験の流れ  
・対象疾患はINH及びRFPに耐性の多剤耐性結核患者。  
・主要評価項目は、安全性・忍容性の評価で、副次的項目としてワクチン治療2ヶ月後の抗結核作用（結核排菌減少）と免疫反応を評価する。  
・目標症例数は、用量あたり3名から6名とする計画で、2用量の予定。  
・治験を実施する施設は、国立病院機構の病院3施設で行う計画（表41）。
6. 治験の実施体制  
本研究事業は、国内開発を先行させた first-in-human 治験の実施。  
また、国内で初めてとなるプラスミドDNAの治療用ワクチンの開発である。

そのため、ガイドラインの策定につながるよう国立病院機構、規制当局、日本遺伝子治療学会（理事長：金田安史教授）、民間企業が連携した研究体制である（表52）。

7. SM耐性結核、RFP耐性結核患者数は減少傾向であるが、INH耐性結核患者数は2010年以降上昇傾向にありINH耐性結核患者数の上昇に注意を要する。少なくとも我々が今回調べた新規MDR-/XDR-TB患者数は過去約10年前と比較すると減少傾向にありDOTSの普及および結核感染対策が功をなしたと考えられる。しかしながら昨年我々の調査では結核歴が15年以上の慢性持続排菌患者も存在しており岡田等が開発したDNAワクチンへの期待が持たれる（松本）。
8. 結核療法研究協議会（療研）によるわが国の全国調査のデータによれば、2002年にはわが国でのMDR-TBに占めるXDR-TBの割合は、全MDR-TBでは30.9%、初回治療MDR-TBでは31.3%、既治療MDR-TBでは30.8%と報告されており、諸外国と比べてその高い割合が指摘されていた。今回の当院での検討でもMDR-TB全体に占めるXDR-TBの割合は36.4%と高く、わが国での問題と考えられた。  
MDR-TBの治療成功率は、一般的に60%前後とする報告が多い。今回の検討でも治療成功率は58.2%とほぼ同等の成績であった。初回治療例のほうが基地両例に比べてやや成績は良好であった。  
XDR-TBでは治療成功率は35.0%ときわめて不良であり、XDR-TBの治療成績の向上が今後の大きな課題であると考えられた。手術を行えた症例では、治療成功率は85.7%と比較的良好であった（露口）。
9. 多剤耐性結核患者の調査；  
薬剤感受性結核は高齢者、免疫抑制宿主等の一部を除くと問題なく治癒することが出来るが、INH、RFPに耐性を示すMDR-TBの薬物治療成績は外科手術を駆使しても治癒率50%と低い状態にある。結核専門病院である神奈川循環器呼吸器病センター、複十字病院、茨城東病院であっても2人に1人しか治癒出来ていない。多剤耐性結核は、現在の薬物治療では治癒が困難な結核であり、本人は元より他への感染、医療費な



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、IRBにおける審査体制が不十分である。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、補償の体制が不十分である、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、医師主導治験立案時の支援体制が不十分である。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1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1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)

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。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。

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。

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)

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。

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。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**

結核治療ワクチン 皮内投与 → 咳痰 → 培養中の結核菌培養 → 多剤耐性結核菌 0個となる 排菌陰性化

**医療費節減、**  
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

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 (HSP65+IL-12/HVJ-E)	コントロール (saline)
0	100	100
80	100	100
100	100	80
110	100	60
120	100	40

#### T細胞の増殖

Group	Proliferation of PHL (SI)
ワクチン	~3.0
コントロール	~1.5

#### 赤沈

Group	ESR
ワクチン	~4.0
コントロール	~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

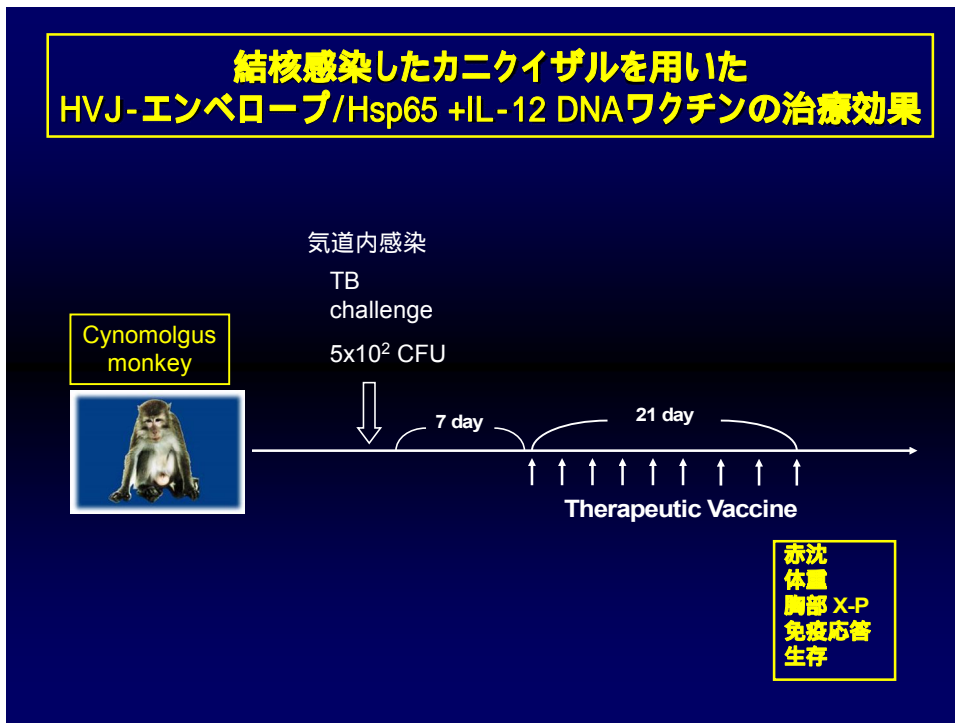


表 4 6

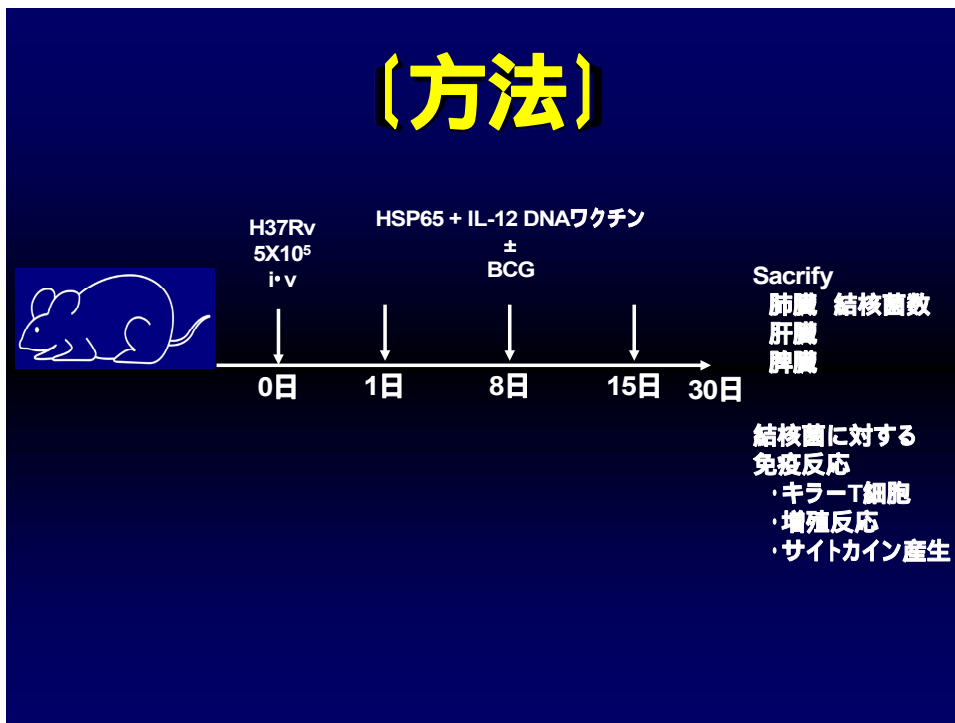


表4 7

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    µg/ml  
R・・・耐性  
S・・・感受性  
#・・・判定不能

表4 8

**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 inj.

■ G1:コントロール  
■ G2:ワクチン

mean ± SD, n = 4-5  
\* 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)**

— 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

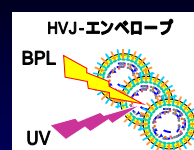
### 2. 医師主導治験の実施に向けた準備状況

**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**

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

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



**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

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**

**民間企業(ジェノミディア)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

## 承認取得までのロードマップ

( : 確認申請、治験届、オーファン申請、承認申請、 ↔ : 実施期間、点線の ↔ : 予備検討など準備期間)

開発項目	治験開始からの年度	平成25	平成26	平成27	平成28	平成29	平成30	平成31	平成32
		年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度
規制当局・倫理委員会対応事項	治験相談 / 確認申請 / 治験届 (PI)		↔	↔					
	オーファン申請 / 治験届 (PII)				↔	↔			
	治験審査委員会		↔		↔				
臨床試験関連事項	治験戦略策定 (含薬事戦略相談)	↔	↔						
	プロトコル作成	↔	↔						
	治験実施 (PI, 国内多施設)			↔					
	治験実施 (PII, 国内多施設)					↔	↔		
	承認申請と当局対応 (国内)							↔	
	承認、薬価収載、海外普及								↔
非臨床試験関連事項	薬効・薬理試験	↔	↔						
	安全性試験 (含長期毒性試験)	↔	↔						
	薬物動態試験	↔	↔						
品質関連事項	特性解析 (含長期安定性試験)	↔	↔						
	治験薬 GMP 製造 (パイロットプラント)	↔	↔						
	医薬品 GMP 製造 (実製造プラント)								
事業性関連事項	特許関連	↔	↔						
	企業提携	↔	↔						

表 5 2

## 治験の実施体制

本研究事業は、国内でfirst-in-human治験の実施となる上、国内初となるプラスミドDNAの治療用DNAワクチン開発となる。

そのため、薬事法上の承認取得に必要な民間企業との連携に加え、ガイドラインの策定にも繋げる事が出来るよう国立病院機構、厚労省/PMDA/医薬基盤研、日本遺伝子治療学会 (理事長: 金田安史教授) と連携した研究体制とする。

### 本剤の医師主導治験実施体制 (安全性・忍容性・有効性の検証)

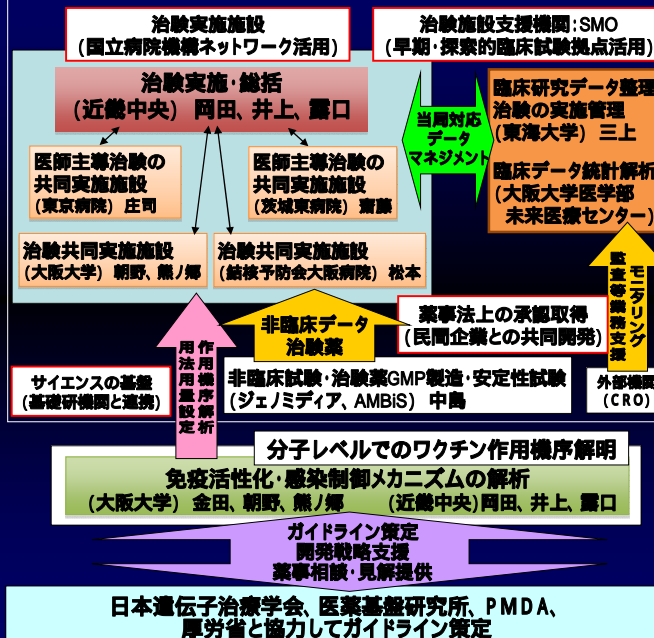


表5 3

### 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ワクチンの新規薬事法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

### . 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。

### . 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- $\gamma$  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)。

### . 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)。

### . 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。

### . 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。近畿中央：55名MDR-TB (7年間)のうち20名XDR-TB(露口、松本)。東京病院：10年間に43名MDR-TB、死亡者多い(庄司)。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) 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。

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療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。

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 µg 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。[ . 反復投与毒性試験（GLP 適用）。

薬物動態（TK）測定。中枢神経系安全性薬理試験。 . 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 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 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 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 ) の誘導系を確立した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 岡田全司: グローバル感染症 1. 結核におけるワクチンへの期待: 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. 最新医学 2014;69(4):795-803.
- 2) Yoshida S, Tsuyuguchi K, Suzuki K, Tomita M, Okada M, Shimada R, Hayashi S.: Rapid identification of strains belonging to the Mycobacterium abscessus group through erm(41) gene pyrosequencing.. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(3):331-6.
- 3) 岡田全司: 結核の現状とワクチン. 成人病と生活習慣病 2014; 44(12): 1484-1487.

### 2. 学会発表

- 1) Okada M, Kita Y.: Novel therapeutic vaccine against multi-drug resistant tuberculosis and clinical trial. NINTH WORLD CONGRESS ON VACCINES, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY. Genova 29-30 April 2014.
- 2) Kita Y, Hashimoto S, Nakatani S, Nishimatsu S, Kioka Y, Okada M.: The study of novel vaccines against tuberculosis and differentiation of CIL using monkey and mice. NINTH WORLD CONGRESS ON VACCINES, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY. Genova 29 -30 April 2014.
- 3) 喜多洋子, 橋元里実, 仲谷均, 西松志保, 木岡由美子, 井上義一, 露口一成, 鈴木克洋, 林清二, 高見泰子, 中島俊洋, 金田安史, 朝野和典, 熊ノ郷淳, 庄司俊輔, 齋藤武文, 松本智成, 三上礼子, E.V.Tan, P. Saunderson, M.L.Cang, 岡田全司.: 新しい結核治療ワクチンの開発と臨床応用に向けた試み. 第 85 回実験結核研究会. 平成 27 年 3 月 長崎.
- 4) 岡田全司.: 新しい結核治療ワクチンの開発. 第 90 回日本結核病学会総会. 平成 27 年 3 月 長崎.
- 5) 岡田全司, 橋元里実, 井上義一, 露口一成, 林清二, 喜多洋子: 新しい結核治療ワクチンの開発と臨床応用に向けた前臨床試験の計画. 第 90 回日本結核病学会総会. 平成 27 年 3 月 長崎.
- 6) 岡田全司, 喜多洋子, 橋元里実, 仲谷均, 西松志保, 木岡由美子, 井上義一, 露口一成, 林清二, 西田泰子, 中島俊洋, 金田安史: 新しい結核治療ワクチンの開発 (Hsp65+IL-12 DNA ワクチン) と他の薬剤・ワクチンとの相乗効果. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 平成 26 年 4 月 大阪.
- 7) 西松志保, 喜多洋子, 橋元里実, 仲谷均, 木岡由美子, 西田泰子, 林清二, 井上義一, 露口一成, 岡田全司, 高森靖: 患者血清中の Granulysin や Ksp37 等による難治性結核や再発の予後診断法開発. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 平成 26 年 4 月 大阪.
- 8) 岡田全司, 喜多洋子, 橋元里実, 仲谷均, 西松志保, 木岡由美子, 井上義一, 露口一成, 鈴木克洋, 林清二, 高見泰子, 中島俊洋, 金田安史, 朝野和典, 熊ノ郷淳, 庄司俊輔, 齋藤武文, 松本智成, 三上礼子, E.V.Tan, P. Saunderson, M.L.Cang.: 新しい結核治療ワクチンの開発 (Hsp65+IL-12 DNA ワクチン) と臨床応用に向けた試み. 第 84 回実験結核研究会. 平成 26 年 5 月 岐阜.
- 9) 喜多洋子, 岡田全司, 橋元里実, 林清二, 鈴木克洋, 露口一成, 小林信之, 切替照夫, 豊田恵美子, 藤田明, 下内昭, 加藤誠也, 小向潤, 松本健二: 海外から輸入される多剤耐性結核の調査 (本邦における外国人結核に対する調査研究). 第 89 回日本結核病学会総会. 平成 26 年 5 月 岐阜.
- 10) 岡田全司, 橋元里実, 井上義一, 露口一成, 鈴木克洋, 林清二, 喜多洋子: 新しい結核治療ワクチンの開発 (Hsp65+IL-12 DNA ワクチン) と臨床応用に向けた試み. 第 89 回日本結核病学会総会. 平成 26 年 5 月 岐阜.
- 11) 喜多洋子, 橋元里実, 露口一成, 鈴木克洋, 井上義一, 林清二, 岡田全司.: 結核患者血清中及び末梢血リンパ球から産生される Granulysin や Ksp37 等による結核慢性排菌や再発の予後診断法開発. 第 89 回日本結核病学会総会. 平成 26 年 5 月 岐阜.
- 12) 岡田全司.: 教育講演「新しい結核ワクチンについて」. 第 89 回日本結核病学会総会. 平成 26 年 5 月 岐阜.
- 13) Kita Y, Hashimoto S, Nishimatsu S, Okada M.: Immune responses of a novel therapeutic vaccine against tuberculosis in the monkey model and clinical trial. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 平成 26 年 12 月, 京都.

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

- 1) 岡田全司、高森靖、安井正文、「感染症治療剤」  
特許取得登録日：2014年8月15日、  
登録番号：（日本特許5596318）
- 2) 岡田全司、高森靖、安井正文、「感染症治療剤」  
特許取得登録日：2014年1月8日、  
登録番号：（欧州特許2532358、ドイツ特許  
2532358、フランス特許2532358、スイス特許  
2532358）
- 3) 岡田全司、高森靖、安井正文、「感染症治療剤」  
特許取得登録日：2014年1月8日、  
登録番号：（インド特許258421）
- 4) 岡田全司、高森靖、安井正文、「感染症治療剤」  
特許取得登録日：2013年1月8日、  
登録番号：（カナダ特許2485882号）
- 5) 岡田全司、高森靖、安井正文、「感染症治療剤」  
特許取得登録日：2012年11月21日、  
登録番号：（欧州特許1484066号）

- 6) 岡田全司、高森靖、安井正文、「感染症治療剤」  
特許取得登録日：2012年10月31日、  
登録番号：（欧州特許2243489号）
- 7) 岡田全司、五十嵐雅之、高橋良昭、「CPZEN-45。  
抗XDR-TB薬、抗MDR-TB薬、及び併用抗結核  
薬」、出願番号：PCT2010-038874、2010年4  
月8日
- 8) 岡田全司、高森靖、安井正文、「感染症治療剤 15K  
granulysin」WO 03/070268 A1、2002年。2008  
年特許取得。特許4149713号
- 9) 岡田全司、大杉義征等、「キラーT細胞の誘導抑  
制剤」、出願番号：PCT-JP2006/322726、2006  
年11月15日
- 10) 岡田全司、吉田栄人、中島俊洋、松本真、特許番  
号：特願2005-280379、提出日：2005年9月27  
日、発明の名称：DNAワクチン組成物

### 2. 実用新案登録

### 3. その他