

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）
分担研究報告書

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

研究分担者 中島俊洋 ジェノメディア株式会社・代表取締役社長

研究要旨

多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの臨床開発及び非臨床試験を進めるには、ワクチン（HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチン）成分であるプラスミド DNA の pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA（pVAX1-IgHsp65+hIL12と同じ）を治験薬 GMP に準拠して製造し、それを使用して治験届に必要な非臨床試験データ（有効性試験と安全性試験）を取得する必要がある。これまでに、治験薬 GMP に準拠して製造するために必要なバンクシステムを構築し、数バッチの試験製造を実施して暫定規格を設定していた。そこで、本年度は治験薬 GMP 製造を実施して、暫定規格の確認を進めると共に、治験届までに必要な非臨床試験項目の設定後に非臨床試験を実施した。

昨年度までに構築したバンクシステム（pVAX1-IgHsp65+hIL12(DH5)）を利用して、複数バッチの製造を実施し、品質試験を実施した結果、実施した試験項目についてはいずれも暫定規格に適合の結果を得た。そのため、治験届までに必要な非臨床試験パッケージ案を作成し、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）との薬事戦略相談での相談結果を反映して、治験届までに必要と考えられる試験項目と試験デザインを設定した。その内容に従って非臨床試験を開始した。まず、安全性試験の実施に必要なワクチン成分とアジュバント成分との混合比の検討試験を実施した結果、混合比により免疫原性の増強が観察され、免疫原性を指標とした最適化条件を見出す事が出来た。取得した結果に基づいて最適化した混合比で調製したワクチンとアジュバントとの混合物を被験物質とし、カニクイザルを用いた安全性試験（一般毒性試験）を実施した。その結果、毒性学的に意義のある有害事象は認められず、本剤の安全性を確認するデータを取得出来た。本ワクチンについては、ワクチンとバイオ医薬品のガイドラインなどを参考にして PMDA との薬事戦略相談を進め、今後治験届までに暫定規格の再設定を進めると共に、安全性薬理試験（コアパッケージ試験）等の非臨床試験についてデータの取得を進める計画である。

A . 研究目的

近畿中央胸部疾患センター・臨床研究センターでは、細胞性免疫を高める

HVJ-E をアジュバントとして利用し、純国産で革新的な多剤耐性結核に対する治療用 DNA ワクチン〔HVJ-E/

HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチン (pVAX1- IgHsp65+ hIL12 DNA /HVJ-Eと同じ) 以下「本 DNA ワクチン」という) の開発を進めている。これまでに、ヒト結核の病態に最も近いとされるカニクイザルを用いた結核感染モデルにおいて、本 DNA ワクチンの治療効果と予防効果を確認している。その結果、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こと、プラスミド DNA と HVJ-E を混合した製剤の開発例がないことなどから、治験薬としての品質規格と安全性確保のための試験項目の設定、治験届に必要な非臨床試験項目の設定、非臨床試験の詳細なデザインの設定などを進めるために参照するガイドラインの内容については、本 DNA ワクチンの特性に従って個別に規制当局との十分に事前確認を進める必要があると考えられた。

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。

これらの研究成果を国内における革新的医薬品の開発推進に繋げ、欧米先行の新規ワクチンの開発の国内回帰へ繋げることも本研究の重要な目的とした。

B . 研究方法

- 1) 構築したバンクシステムによるプラスミド DNA の試験製造
 - ・ 昨年度構築したマスターセルバンク (MCB) を用いて、ワクチン成分となるプラスミド DNA [pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA] (pVAX1- IgHSP65-hIL12 と同じ) の試験製造を実施した。
 - ・ MCB を用いて種菌培養を行った後に本培養を実施した。培養については全て生物由来原料を含まない原材料を用いて実施した。適切な細胞濃度まで培養を継続した後に、菌体を濃縮、破碎し、残渣を除去して清浄化した溶液を出発材料として精製工程を進めた。
 - ・ 3段階のカラムクロマトグラフィーによる精製工程と限外ろ過工程を組み合わせた精製工程により、宿主由来の RNA、DNA、たん白質、エンドトキシンなどの不純物を除去し、保護安定剤を添加した最終バッファーに溶媒を置換して原薬とした。その後、目的とする濃度 (1mg/mL) への濃度調整、滅菌ろ過、バイアル充填を行ったプラスミド DNA 溶液を製剤として凍結保存した。

2) プラスミド DNA の暫定品質規格設定

- ・ 本研究で使用する DNA ワクチンの成分は、プラスミド DNA と不活性化ウイルス粒子 (HVJ-E) であり、それぞれ大腸菌とヒト培養細胞株を用いて製造される。そのため、バイオテクノロジー応用医薬の範疇に分類されると考えられたため、バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品に関するガイドラインに従って品質規格項目案の設定を行った。
- ・ ICH のガイドライン Q6B「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品) の規格及び試験方法の設定について」(医薬審発第 571 号、平成 13 年 5 月 1 日付) の「4. 規格及び試験方法」などの内容に従って、試験項目を選定した。
- ・ 具体的には、ICH Q6B の「4.2 製剤の規格及び試験方法」に記載された「4.2.1 外観・性状」、「4.2.2 確認試験」、「4.2.3 純度と不純物」、「4.2.4 力価」、「4.2.5 物質質量」、「4.2.6 その他の一般的試験項目」に従って試験項目を選択し、**表 1** に記載の通り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、**表 1** に記載した 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。

表1. プラスミドDNAの暫定規格(案)について

試験	項目	規格	試験法
性状	性状試験	無色透明の液体	目視
確認試験	塩基配列	参照配列と一致	2本鎖の配列解析
	制限酵素地図試験	理論サイズと一致	電気泳動法
定量試験	DNA濃度	規定から±10%以内	吸光度 (A260)
純度試験	純度試験	既知異性体として含量を95%以上 OC+LN体を分解物とし、SC体の含量を 90%以上	HPLC法
	吸光度比(A260/A280)	1.80-1.97	吸光度
	宿主DNA	適合	電気泳動法 又はPCR法
	宿主RNA	適合	電気泳動法 又はPCR法
	宿主たん白質試験	プラスミドDNAの重量あたり一定量以下	ELISA法
	たん白質含量試験	プラスミドDNAの重量あたり一定量以下	BCA法
不溶性 微粒子	不溶性微粒子試験	適合	日局
不溶性 微異物	不溶性微異物試験	適合	日局
pH	pH試験	規定から±10%以内	日局
浸透圧	浸透圧試験	規定から±20%以内	日局
無菌性	無菌試験	適合(菌の増殖なし)	日局
エンド トキシン	エンドトキシン試験	適合(50EU/mg未満)	日局

SC体: Supercoil体(スーパーコイル状のプラスミドDNA)、

OC体: Open circular体(開環状のプラスミドDNA)、LN体: Linear体(直鎖状のプラスミドDNA)

- 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。
- 4) PMDA 薬事戦略相談
- 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ことが重要である。
 - そこで、PMDA 薬事戦略相談・個別面談を平成 25 年 5 月 31 日に、事前面談を平成 25 年 6 月 20 日と平成 26 年 12 月 5 日にそれぞれ実施し、参考とするガイドラインの種類等も含めた開発の方向性の妥当性について相談を行った。
 - アジュバント成分である HVJ-E については、平成 24 年 2 月 12 日と平成 26 年 2 月 13 日に対面助言を実施し、規格及び安全性の確保に関して治験届までに必要な要件を確認した。その結果、HVJ-E 単剤での治験届 (抗癌剤としての適用) については平成 26 年 8 月と平成 27 年 3 月に提出し、共に受理されている状況である。
 - 具体的には、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、PMDA との薬事戦略相

談を平成 26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。

- 5) ワクチン成分(プラスミド DNA: pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNA)とアジュバント成分(HVJ-E)との混合比の最適化
- PMDA との薬事戦略相談の結果に基づいて非臨床試験を実施するため、先ず本 DNA ワクチンの成分であるプラスミド DNA 成分とアジュバント成分(HVJ-E)との混合比を最適化するための試験を実施した。本 DNA ワクチンにより免疫を誘導したマウスの脾臓由来リンパ球を抗原刺激し、培養上清の IFN- γ 及び IL-2の産生量を指標として検討を実施した。
 - 本 DNA ワクチンは HSP65及びマウス IL-12をコードする DNA を組み込んだプラスミド DNA (pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNA, 以下「pDNA」と記載)をワクチン成分とし、それにアジュバント成分として hemagglutinating virus of Japan envelope(HVJ-E)を添加したものである。2種類の成分の混合比を最適化する事が本試験の目的であるため、2種類の成分の混合比を変えたものを被験物質として投与に使用した。
 - マウスあたりの pDNA の投与量は一定用量に固定し、アジュバント成分(HVJ-E)の添加量を3用

量設定した3種類の被験物質をマウスに2週間に3回投与することで免疫を誘導した。投与経路は、筋肉内投与とした。

- 本 DNA ワクチンを投与後、摘出したマウス脾臓よりリンパ球を分離し、2種類の抗原(リコンビナント HSP65: rHSP65、又は PPD 抗原)を用いてリンパ球を刺激した。
 - 刺激を開始してから約 22時間後に培養上清を回収し、上清中に分泌された IFN- γ 及び IL-2の濃度を測定することで抗原刺激に対する反応性を評価した。
- 6) カニクイザルによる安全性試験
- PMDA との薬事戦略相談の結果に基づいて安全性試験のデザインを設定して試験を実施した。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)
 - 具体的には、HVJ-E/HSP65 DNA + 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、マウスを免疫するための至適混合比が 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 5 mL/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。

(倫理面への配慮)

- ・ 治験薬 GMP 製造を実施するジェノメディア株式会社については、池田ラボラトリーの所在地である独立行政法人産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行う。
- ・ また、臨床治験のための治験薬 GMP 製造については、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に基づいて製造を実施すると共に、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(対面助言)を実施すると共に、治験届を提出して規格及び安全性について確認する。

C . 研究結果

- 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( 1)。

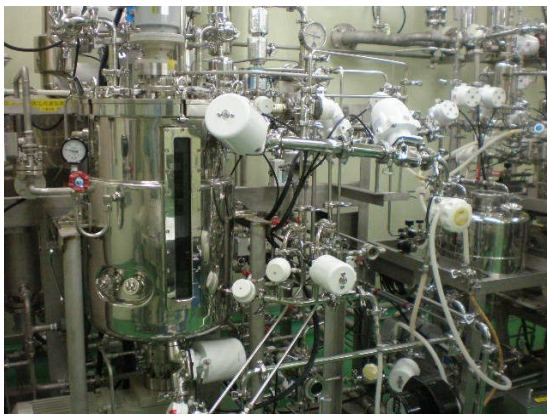


図1 . GMP 製造を実施したプラスミド DNA (pVAX1-IgHsp65+hIL12 DNA)

治験薬 GMP 製造に必要な大腸菌のバンクシステムを構築したため、それを使用して本 DNA ワクチンの試験製造を実施した。

- ・ 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ーシステム、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(表 1)。

- ・ 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、表 1 に示す内容で設定を進めている。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品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、表 1 に記載した試験項目、試験方法で暫定規格を設定する

方向性で進めている。

- ・ 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。
 - ・ 表 1 に記載した試験のうち、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 onclinical 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

表2. カニクイザルを用いた毒性試験1について:一般毒性

試験動物	カニクイザル
被験物質	HVJ-E/ HSP65 DNA+IL12 DNA ワクチン
投与方法 投与回数 観察期間 投与量	投与経路：皮下投与（背部） 投与回数：単回 観察期間：投与後 14 日間 投与容量：5 mL/kg
群構成	投与群： 4 匹/群、各 2 群（対照群 + 投与群の 2 群構成）
評価項目	一般状態：毎日 *初回投与時は投与後 8 時間まで 6 回観察 摂餌量測定：毎日 体重測定：投与開始前 + 投与日 + 投与後 1, 3, 7 及び 14 日 血液学的検査：投与開始前 + 投与後 1 及び 14 日, 12 項目 血液生化学的検査：投与開始前 + 投与後 1 及び 14 日, 21 項目
備考	対照群は媒体を投与する。

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 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、 、 、 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。

- これら 、 、 のガイドラインを参考にして、治験届までに必要な安全性試験について、必要な試験項目と試験内容を検討した。そ

の結果、単回投与の一般毒性試験（表2）、一般毒性試験である反復投与毒性試験に、安全性薬理試験（中枢神経系）、免疫毒性（抗体産生）などを組み込んだ試験（表3）、単回投与で実施する安全性薬理試験（循環器系、呼吸器系、表4）の、3種類の試験を実施することが適切であると考えられた。その概要を規制当局である PMDA の薬事戦略相談で相談を行った結果を反映して、試験デザインや群構成について一部変更を行った後に、非臨床試験を開始する事とした。

- 3) PMDA 薬事戦略相談
 - 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。

表3. カニクイザルを用いた毒性試験2(案)について:一般毒性+安全性薬理

試験動物	カニクイザル
被験物質	HVJ-E/ HSP65 DNA+IL12 DNA ワクチン
投与方法	投与経路：筋肉内投与
投与期間	投与期間：2週間
観察期間	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	一般状態観察 摂餌量測定 体重測定 血液学的検査 血液生化学的検査 眼検査 尿検査 剖検 器官重量測定 病理組織標本作製及び検査
安全性薬理 (中枢神経系)	FOB：投与前後で実施
抗体価測定	採血を行って抗体価をELISAで測定
備考	投与液の濃度分析及び安定性分析を実施

また、アジュバントとして使用するHVJ-Eについても、アジュバントとしての臨床応用は国内で初めてとなるため、適切に医師主導治験を実施するには規制当局であるPMDAと、治験開始前に密接に事前相談を行い、開発内容や方向性について合意形成を進める事が重要と考えられた。

- そこで、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相談を行なった。

- 上記の 、 、 のガイドラインを参考にして、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することができた。

- 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

表4. カニクイザルを用いた毒性試験3(案)について:安全性薬理試験

試験動物	カニクイザル
被験物質	HVJ-E/ HSP65 DNA+IL12 DNA ワクチン
投与方法	投与経路：筋肉内投与 投与回数：単回
評価	評価時点：投与前と投与後の適切なタイムポイントで評価を実施
群構成	2群（対照群 + 投与群）
評価項目 （呼吸器系、循環器系）	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に、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個体を選抜する。

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、適宜個別面談、事前相談、対面助言を実施し、適切に開発を進める計画である。

- ・ 以上のようにして PMDA の薬事戦略相談を活用し、国内で初めてとなる治験の実施に必要な項目に関して相談を行い、規制当局との合意形成を進めた。これらの成果を活用し、実際に治験を実施することで、引き続き国内のガイドライン策定に向けた準備を進める事とした。

4) ワクチン成分(プラスミド DNA: pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA)とアジュバント成分

(HVJ-E)との混合比の最適化

- ・ マウスを用いた試験の結果、媒体対照群と比較して、ワクチン投与群の脾臓リンパ球は、rHSP65 及び PPD 抗原刺激に対する IFN- γ 及び IL-2 の産生応答が上昇した。pDNA とアジュバントの混合比 1:1 の投与群における IFN- γ 及び IL-2 の産生は 3 投与群中最大で、媒体対照群との差も有意であった(図 2)。
- ・ 一方、同混合比が 1:4 及び 1:8 の投与群では、PPD 刺激後の IFN- γ 及び IL-2 産生の媒体対照群との差は有意ではなかった(図 2)。

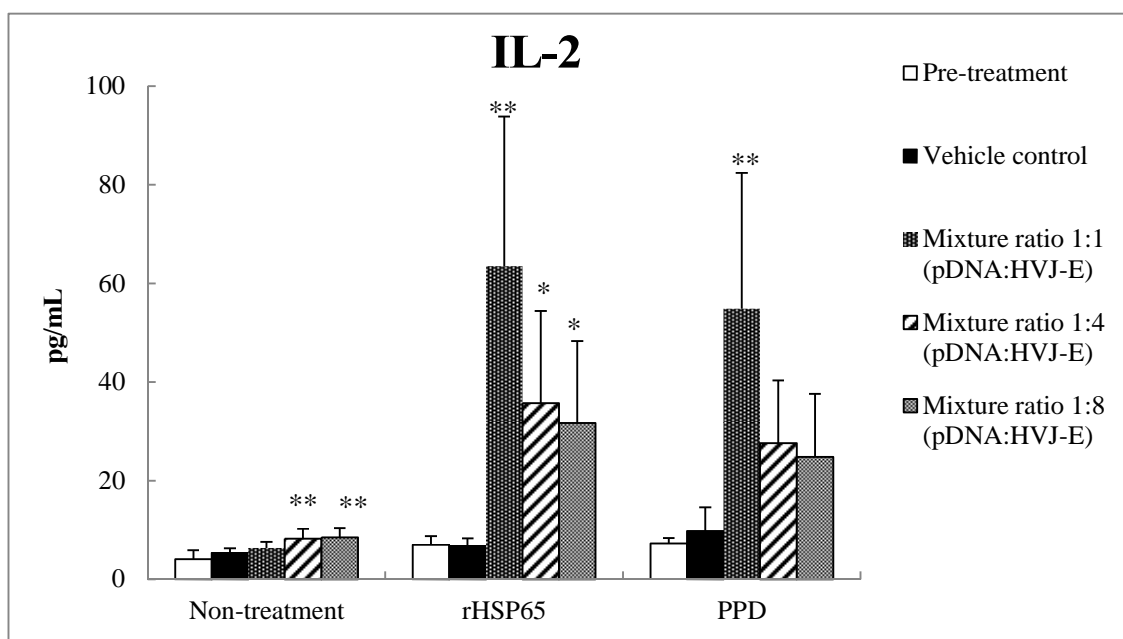
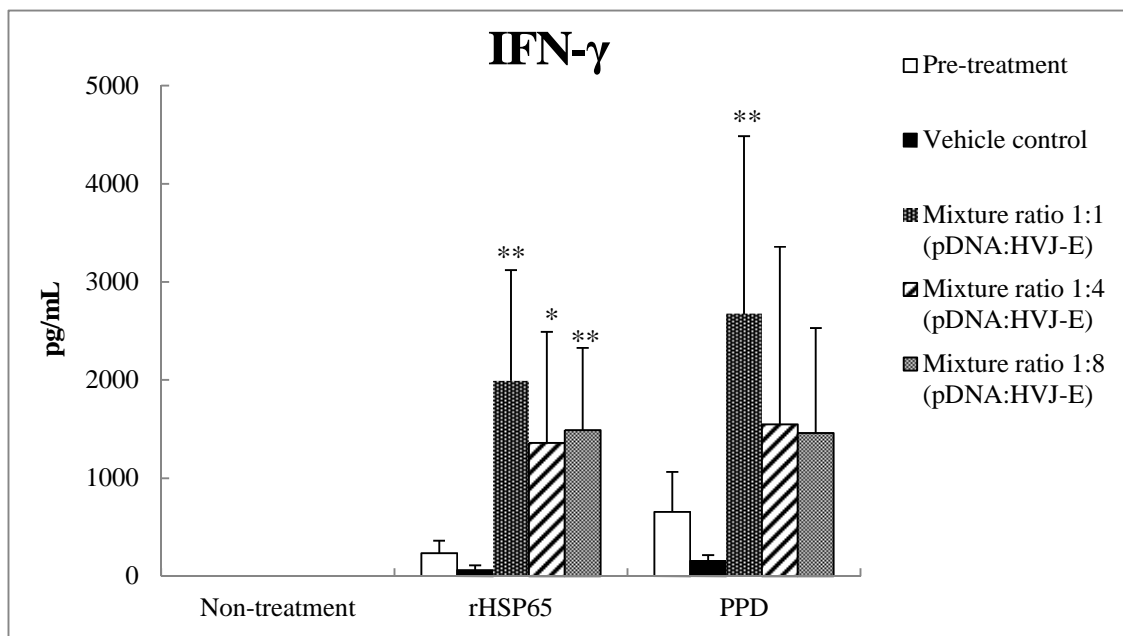


図2. プラスミド DNA とアジュバントの混合比に関する検討結果

本 DNA ワクチンのワクチン成分 (プラスミド DNA:pDNA) とそのアジュバント成分 (HVJ-E) の至適混合比を、免疫した後のマウスから調製した脾臓リンパ球の抗原刺激応答を指標に検証した。

- ・以上のことから、結核ワクチンの pDNA とアジュバントの各混合比にて免疫したマウスの脾臓リンパ球の抗原刺激応答は混合比 1:1 が最大と考えられた。

5) カニクイザルによる安全性試験

- ・ PMDA の薬事戦略相談での相談内容を参考にして、first in human 治験（これまでに臨床での投与がなく、初めてとなる治験のこと）の実施に必要な項目に関して相談を進め、その結果に基づいてカニクイザルを用いた安全性試験を実施した。
- ・ 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。
- ・ 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。

D. 考察

- ・ 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（pVAX/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。
- ・ 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 の混合比を最適化する必要があった。そのため、マウスに

対する免疫原性を指標として至適混合条件の検討を行った結果、混合条件により反応性が変化する現象が認められ、免疫原性に関する最適条件を見出すことが出来た。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と考えられた。

- ・ 同定した混合比で本DNAワクチンの調整を実施し、それを被験物質として単回皮下投与一般毒性試験を実施し、本DNAワクチンの基本的な毒性プロファイルの確認を実施した。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、毒性学的意義のある変化は認められないことが明らかとなった。今後臨床投与経路である筋肉内投与で、一般毒性試験と安全性薬理試験を実施し、本剤の毒性について確認する計画である。

E . 結論

- ・ 本DNAワクチン開発の方向性は**図3**に示すとおりである。プラスミドDNAをワクチン成分とし、不活性化ウイルス粒子(HVJ-E)をアジュバント成分とする治療用のDNAワクチンの開発は、国内初となるため、規制当局であるPMDAとの薬事戦略相談を通じた事前相談を充分実施し、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に基づく承認申請に向けた臨床開発を着実に進める。
- ・ また、ICH、米国、WHOのガイドラ

インを参考にPMDAの指摘を受けながら開発を進めることで、国内の実態に適したガイドラインの策定に繋げる。

- ・ 平成26年度の研究結果のまとめと結論は以下の通りである。
 - 1) ICHのガイドラインQ5Dに従ってGMPレベルで治験薬製造用の大腸菌マスターセルバンク(MCB、pVAX1-IgHsp65+hIL12(DH5))システムを構築したため、そのバンクシステムを使用してプラスミドDNA[pVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNA](pVAX1-IgHsp65+hIL12と同じ)のGMP製造を実施し、暫定規格の設定に必要な品質確認データの取得を進めた。
 - 2) WHOの3種類のガイドライン等を参考にして、カニクイザルを用いた毒性試験のデザイン案を策定し、試験項目、試験デザイン等、試験骨子案を策定した。その内容については、PMDAとの事前面談の結果に基づいて変更した。
 - 3) ワクチン成分とアジュバント成分の混合比について最適化を実施し、マウスに対する免疫原性を指標として至適混合比を同定した。これにより非臨床試験等の被験物質の成分比を確定した。
 - 4) 確定した成分比で調製した本DNAワクチンを被験物質として、カニクイザルを用いた安全性試験をGLP試験施設で実施した(「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」

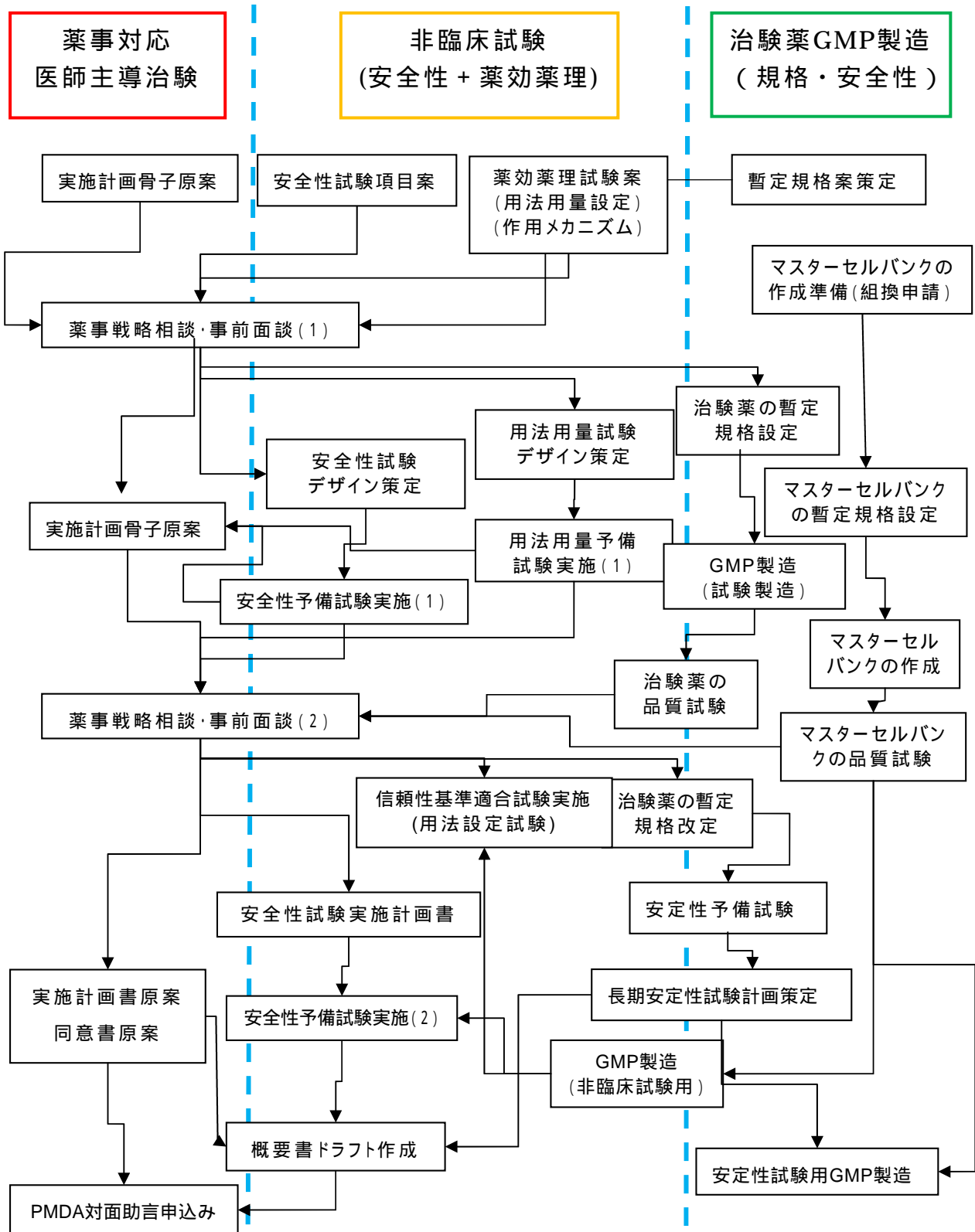


図3. 研究開発内容の概要について

表5. 登録済み特許の一覧(国内特許)

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	基本特許	遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター	特許 3942362 特許 4219957	登録 登録
2	用途特許	抗腫瘍作用を有する組成物	特許 4855250	登録
3		化学療法剤を封入した医薬製剤	特許 4746877	登録
4		前立腺癌の治療・予防剤	特許 5547640	登録
5	製造特許	単離されたヒト細胞、その取得方法及び用途	特許 5134964	登録
6		改変パラミクソウイルスおよびその作製方法	特許 5102630	登録
7	高機能化	高機能化 HVJ-E	特許 5666110	登録

の申請資料の信頼性の基準に適合する試験)。その結果、本DNAワクチンの投与による毒性変化は認められなかった。

- 5) 医薬品製造企業との提携相談を実施中であり、平成26年度は計3回の商談会・展示会で提携候補先へ開発状況の紹介を行なった。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1) 登録特許

本研究で開発するDNAワクチンのアジュバント成分であるHVJ-Eに関する特許については、基本特許、用途特許、製造特許、高機能化特許

を国内および欧米で既に登録している(表5、表6)。

現在までに、国内特許については、基本特許、用途特許、製造特許について計8件が成立しており、それぞれ登録を完了している(表5)。

一方、国際特許については、欧米を中心に基本特許、用途特許、製造特許について計6件の登録を完了している(表6)。

今年度、国内特許については2件(4番と7番)の特許登録に成功し、国際特許についても同様に3件(4番と5番、5番は欧米の両方で成立したため2件とした)の特許登録に成功しており、知的財産の確保について着実に進める事ができた。欧州での用途特許(EP2345415)については、欧州特許庁へ対応で成立したため、英国、ドイツ、フランス、イタリア、スペイン・スイス、ベルギーの計7カ国で移行手続きを進めている(表6)。

表6. 登録済み特許の一覧(国際特許)

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	基本特許	遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター	EP1170363 DE60131498 US 6913923 US 7279333 US 7803621 CN01800567.5 CN200410100219.5 CA2369491 AU769385 I303663 KR 10-0776475 KR 10-0847385	登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録
2	用途特許	抗腫瘍作用を有する組成物	US7871765	登録
3	用途特許	化学療法剤を封入した医薬製剤	US7427395	登録
4	用途特許	前立腺癌の治療・予防剤	US8691212 EP2345415	登録 登録
5	用途特許	改変パラミクソウイルスおよびその作製方法	US7858356	登録
6	製造特許	ヒト細胞、その取得方法及び用途	US8012749 EP1950285	登録(米) 登録(英国、ドイツ、フランス、イタリア、スペイン・スイスの6カ国に移行)

表7. 出願中特許の一覧(国内特許)

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	薬効向上	IL-2含有HVJ-Eベクター及びそれを含む脳腫瘍治療剤	特願 2010-024286	審査請求

2) 出願中の特許

現在出願中の国内特許は、薬効向上のための修飾の特許1件であり、現在審査中である。現在成立に向けた特許庁対応(意見書の作成・提出、

請求項の修正など)を進めており、医薬品として実用化した際に必要な知的財産の権利確保を進めている状況である(表7)。