

201447026A

厚生労働科学研究委託費

新興・再興感染症に対する革新的医薬品開発推進研究事業

エボラ出血熱に対する治療薬、診断薬の開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 竹内 勤

平成 27(2015)年 3 月

本報告書は、厚生労働省の委託事業による委託業務として、学校法人聖路加国際大学が実施した平成26年度「エボラ出血熱に対する治療薬、診断薬の開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費
新興・再興感染症に対する革新的医薬品開発推進研究事業

エボラ出血熱に対する治療薬、診断薬の開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 竹内 勤
研究分担者 古田 要介 富山化学工業株式会社総合研究所 薬理研究部副部長
高田 礼人 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 教授
山下 武美 協和発酵キリン株式会社 研究開発本部研究機能ユニット
創薬基盤研究所長
安田 二郎 長崎大学熱帯医学研究所 新興感染症分野 教授
後藤 浩朗 東芝ヘルスケア社 ヘルスケア医療推進部部長
研究協力者 齋藤 智也 国立保健医療科学院 健康危機管理研究部 上席研究員
山田 光一 富山化学工業株式会社 理事・感染症PJリーダー
前平 由紀 聖路加国際大学 専任コンサルタント
樽井 正義 慶應義塾大学 名誉教授
Alan L. Jakimo Special Professor of Law, Hofstra University
天野 修司 聖路加国際大学 公衆衛生大学院設置準備室

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
エボラ出血熱に対する治療薬、診断薬の開発に関する研究 竹内 勤	1
II. 委託業務成果報告（業務項目別）	
1. ファビピラビル(T-705) のエボラ出血熱ウイルスに対する有効性および安全性の評価 （業務項目①）竹内 勤、古田 要介	9
(資料1) 麻酔下サル薬物動態、安全性・忍容性試験（2週間観察）（結果抜粋）	23
(資料2) 非麻酔サル薬物動態、安全性・忍容性試験（1週間観察）（結果抜粋）	27
(資料3) 幼若サル予備症状観察（結果抜粋）	33
(資料4) 注射製剤の作成：各種試験（結果抜粋）	39
(資料5) 1) HPLCを用いたラット血漿中T-705濃度測定法バリデーション 2) T-705調整液の濃度測定バリデーション（結果抜粋）	49
(資料6) エボラ出血熱対策EC研究コンソーシアムおよびフランスInserm（国立保健医療研 究所）の活動計画概要	59
(資料7) フランスInserm（国立保健医療研究所）2014年度研究実施課題概要	69
(資料8) 2014年の未曾有のエボラ出血熱感染禍への対応と取組みにおける学びと課題	83
2. モノクローナル抗体を用いた治療薬の開発 （業務項目②）高田 礼人、山下 武美	135
3. 迅速かつ高感度なエボラ出血熱の診断法の開発 （業務項目③）安田 二郎、後藤 浩朗	145
III. 学会等発表実績	155
IV. 研究成果の刊行物・別刷	159

I. 委託業務成果報告（総括）

エボラ出血熱に対する治療薬、診断薬の開発に関する研究

業務主任者 竹内 勤 聖路加国際大学 公衆衛生大学院設置準備室 特任教授

研究分担者 古田 要介 富山化学工業株式会社 総合研究所 薬理研究部副部長
高田 礼人 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 教授
山下 武美 協和発酵キリン株式会社 研究開発本部研究機能ユニット
創薬基盤研究所長
安田 二郎 長崎大学熱帯医学研究所 教授
後藤 浩朗 東芝ヘルスケア社 ヘルスケア医療推進部部長

研究協力者 齋藤 智也 国立保健医療科学院 健康危機管理研究部 上席研究員
前平 由紀 聖路加国際大学 専任コンサルタント
山田 光一 富山化学工業株式会社 理事・感染症PJリーダー
樽井 正義 慶應義塾大学 名誉教授
Alan L. Jakimo Special Professor of Law, Hofstra University
天野 修司 聖路加国際大学 公衆衛生大学院設置準備室

研究要旨

背景：今般のエボラ出血熱感染アウトブレイク拡大と国際的な研究連携対策推進を求める背景には、(i) 西アフリカにおけるエボラ出血熱の流行は、今日に至り1年以上の長期化・感染拡大を憂慮する危機的な状況にある、(ii) グローバリゼーションを背景にした感染拡大に対する迅速な診断および治療の提供が世界的な課題となっている、(iii) エボラ出血熱に対しては、有効な医薬品・ワクチンが存在せず、感染禍にある現地で簡便かつ迅速に実施可能な診断薬が無い、という現状にある。

方法：以上に基づき、(1) 抗インフルエンザウイルス薬として開発されたファビピラビルのエボラ出血熱ウイルスに対する有効性および安全性の評価のため、関係国研究機関および既存の研究連携ネットワーク等と協力し、非ヒト霊長類(non-human primate: NHP)での各種薬物動態試験、安全性・忍容性試験を実施し、BSL-4実験施設でのエボラウイルス・チャレンジ試験計画およびその実施、並行して実施されているギニア等流行地での臨床研究の促進を支援する。

また(2) モノクローナル抗体を用いた治療薬の開発に向けて、科学的に品質が担保された製剤を生産するとともに、複数のエボラ出血熱ウイルスに対して中和活性を示すモノクローナル抗体の作出を試みる。さらに(3) エボラ出血熱ウイルスに対して迅速・高感度に診断できる診断法の開発を目指す。

結果：(1) 抗インフルエンザウイルス薬として開発されたファビピラビルのエボラ出血熱ウイルスに対する有効性および安全性の評価のため、非ヒト霊長類(non-human primate: NHP)での各種薬物動態試験、安全性・忍容性試験（非感染実験）を実施した。また、Inserm Jean- Mérieux BSL-4実験施設でのエボラウイルス・チャレンジ試験計画への情報提供およびその実施、並行して実施されているギニア等流行地での臨床研究を支援した。エボラ出血熱の効果的な治療と製剤の合理化を検討し、小児投与の最適化を目指すための薬物動態・安全性試験に向けた幼若動物の予備症状観察、さらに静脈注射製剤の開発に着手した。さらに、Insermによる動物感染実験モデルの検証、ファビピラビル治療検体によるウイルスの遺伝的特徴および変異の検証、ヒトおよびNHP検体（感染・非感染）の治療・無治療サンプルの生物統計学的解析によるデータ補強実験実施を支援した。

（次頁につづく）

(2) ザイールエボラウイルスに対してこれまでに効果が認められている2種類のヒト・マウスキメラモノクローナル中和抗体を産生する CHO 細胞を大量に培養し、上清に含まれる抗体を高度に精製することによって、抗体医薬に求められる純度が確保された製剤を生産した。ザイールエボラウイルス以外の異なる複数のエボラウイルス種に対して中和活性を示すマウスモノクローナル抗体を作出し、水疱性口炎ウイルスシュードタイプシステムを活用したエスケープミュータントの選択と変異アミノ酸の同定によって抗体の認識するエピトープを推定した。

(3) 迅速・簡便かつ高感度なエボラ出血熱診断法として全5種類のエボラウイルスに対する各種エボラウイルス特異的な RT-LAMP (Reverse Transcription - Loop - mediated Isothermal Amplification) 法を開発した。ザイールエボラウイルスに対する RT-LAMP 法に関しては、ギニア共和国で採取された臨床検体を用いた実証試験も行い、現行の RT-PCR 法と比較して、検出感度、特異性が同等以上であることを確認した。検査時間の大幅な短縮、小型・軽量・低価格な検査機器の採用などにおいて、現行の診断システムより明確に優位性をもつことが示された。

A. 研究目的

ファビピラビルのエボラ出血熱ウイルスに対する有効性及び安全性の評価に関する基盤データの戦略的収集を行い、各国関係研究機関とのエボラ出血熱対策にむけた候補医薬資源の探索連携に寄与する。またその国際研究連携の枠組みにおいて日本の研究開発外交のプレゼンスおよび国際的な感染症対策への具体的なかつ実質的な貢献を以下の分担業務項目に沿って実施し、結果を提示する。

抗インフルエンザウイルス薬として開発されたファビピラビルのエボラ出血熱ウイルスに対する有効性及び安全性の評価のため、関係国等と協力し、非ヒト霊長類での各種薬物動態・安全性試験を実施し、高度感染管理実験施設 (Biosafety Level-4:BSL-4) でのエボラウイルス・チャレンジ試験計画の実施支援、およびギニア等流行地での臨床研究を促進する。あわせてより詳細かつ包括的なPK実験・不活化試験、ファビピラビル治療を受けたエボラ感染患者の検体におけるウイルスの遺伝学的変異研究準備調査、サル実験モデルの検証、各種併用療法の探索 (いずれもBSL-4感染実験含む)、非感染および感染検体から得られた Pharmacokinetics (PK) データの詳細解析・モデリングに向け、フランス Inserm を支援する。(竹内・古田)

モノクローナル抗体を用いた治療薬の開発に向けて、科学的に品質が担保された製剤を生産する

とともに、複数のエボラ出血熱ウイルスに対して中和活性を示すモノクローナル抗体の作出を試みる。エボラウイルスに対して中和活性を示すマウスモノクローナル抗体を利用して、ヒト・マウスキメラ抗体を作出することによって、エボラ出血熱に対する抗体医薬品候補を創出し、実用化を目指す。(高田・山下)

臨床症状のみからエボラ出血熱の診断を行うことは不可能であり、患者の救命、感染拡大阻止のため、エボラ出血熱ウイルスに対して迅速・高感度かつ精確に診断できる診断法を開発する。(安田・後藤)

B. 研究方法

富山化学が製造するファビピラビルのエボラ出血熱ウイルスに対する有効性及び安全性の評価のため、非ヒト霊長類 (NHP) での薬物動態および安全性・忍容性試験と注射製剤開発に向けた検討をおこなう。またフランス Inserm (国立保健医学研究所) と協力し、関係実験データを補強蓄積することにより、ギニア等感染禍にある地域でのエボラ出血熱に対する当該医薬品の臨床研究実施を支援する。合わせてアメリカ USAMRIID (陸軍感染症医学研究所) にて検討されているファビピラビル安全性・薬効試験に関し、NHP を用いた基本データの収集を行う。研究目的で稼働可能な高度感染管理実験施設 (BSL-4) が国内に存在しないことから、本邦での NHP 試験はウイルス感染実験計画に向けた基礎および補強データの

蓄積を目的として実施される。

また、ギニア等感染流行地域でのエボラ患者に対する医療活動の実際、薬剤の保管およびロジスティクスシステムの現状について現地視察を行い、医薬品の効果・服薬状況に影響する疫学的要因を理解する。その状況下にて、現地ギニアおよびフランス側から要望されているファビピラビル注射剤開発の緊急性を分析理解し、試作製造および治験剤開発に向けて必須とされる予備試験各種を実施推進する。（竹内・古田）

他のエボラ出血熱ウイルスおよび異なる複数のエボラ出血熱ウイルスに対して中和活性を示すマウスおよびヒト-マウスモノクローナル抗体の作出を試みる。水疱性口炎ウイルス（VSV）シュードタイプシステムを活用し、中和活性のスクリーニングおよびエスケープミュータントの選択によるエピトープの推定を行う。（高田・山下）

既に、ザイールエボラウイルス種については現在、西アフリカでアウトブレイクを起こしているウイルス株を含む、これまで分離されたすべての株を検出することができる高感度・迅速診断法としてRT-LAMP法を開発しているため、他の4種類のエボラ出血熱ウイルスに対しても迅速・高感度に診断できるRT-LAMP法を開発する。さらに、エボラ出血熱との類症鑑別が必要なラッサ熱についても西アフリカで蔓延しているラッサウイルス株を検出できるRT-LAMP法を開発する。また、遺伝子検出とは原理の異なる新規診断法を開発するために各種エボラウイルス抗原に対するモノクローナル抗体の作製にも着手した。（安田・後藤）

（倫理面への配慮）

非ヒト霊長類試験の動物愛護上の配慮は、各担当試験プロトコルにより、日本、フランスそれぞれの研究実施機関において必要とされる研究倫理審査に基づいて実施された。ギニアにて実施されている臨床研究における人権および倫理擁護上の配慮は、実施機関であるフランスInsermの規定

に沿い、EC研究コンソーシアムの活動として、フランス、ギニア政府関係機関およびMedicins Sans Frontière (MSF)の承認に基づき対応調整された。本邦関係研究機関におけるギニア臨床試験に関わるヒト検体等へのアクセスは、診断法確立（安田・後藤）に際して、長崎大学熱帯医学研究所倫理審査委員会およびギニア共和国保健省倫理委員会における審査承認を経て実施されたものである。

C. 研究結果

エボラ出血熱感染症例への治療レジメンに加え、動物実験系の評価方法を考慮した設定基準について、更なる薬物動態・安全性・忍容性試験を検討し、国内にて非感染NHP実験による2つの実験系を実施し、BSL-4施設での感染実験系構築の基礎情報整備およびデータの補強蓄積を行った。その結果、薬物動態に係わるばらつきは、投与方法には大きく影響されず、むしろ代謝酵素活性などに関係する個体差による影響が大きいと判断された。

関係各国機関との研究連携にむけた詳細な協議に基づき、今般のエボラ出血熱アウトブレイク鎮静化にむけフランスInsermおよびEC研究コンソーシアムで実施される研究内容が包括的に理解・概観でき、日本側研究リソースが担うべき役割が明確となった。またファビピラビルの医薬品としての安全性等に関し、今後さらに補強すべきデータ・情報のマッピングが可能となった。

フランスInsermにて実施予定のBSL-4感染実験によるファビピラビル薬物動態・安全性試験計画に対し、最適投与量、投与スケジュールおよび血液学的サンプリング計画等の詳細を議論するための相互補完的データの共有が可能となり、エボラ出血熱に対する当該医薬品の毒性・忍容性・安全性に関するデータ、治療効果に関する具体的な知見がえられた。また、それら基盤情報を相互に解析することにより、当該疾患に対する基準治療方法設定の基準を提案し、さらに詳細な適正容量・用法等の検討に向けた実験モデルが立案可能となった。

研究課題のマッピングに基づき、早急に取り組むべき課題として、ファビピラビルの小児投与条件としての忍容性・安全性試験実施が必要であり、注射製剤開発による服薬アドヒアランスの確立が急務である現実が提示され、系統的な優先性判断に基づく予備試験が実施された。(竹内・古田)

ザイールおよびスーダンエボラウイルス抗原を用いてマウスを免疫し、定法に従ってモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作出した。エボラウイルス表面糖蛋白質を認識し中和活性を示すモノクローナル抗体を複数作出した。異なる複数のエボラウイルス種に対する交差反応性を指標に抗体をさらにスクリーニングし、全てのエボラウイルスに対して中和活性を示す交差反応性モノクローナル抗体を1クローン得た。エスケープミュータントの解析によって、交差反応性マウスモノクローナル抗体のエピトープを推定した。(高田・山下)

当初の計画通り、ザイール、スーダン、ブンディブギョ、タイフォレスト、レストンエボラウイルスをそれぞれ特異的に検出できる高感度・迅速診断法として、RT-LAMP法の開発に成功した。さらに、モノクローナル抗体作製用の免疫抗原としてウイルスタンパク質VP40のリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させ、調整した。(安田・後藤)

D. 考察

今般のエボラ出血熱という高病原性・高感染性病原体のアウトブレイクの予期せぬ発生に対し、感染管理対策の遅れを指摘される状況にあつて、有望な医薬資源が本邦にて具体的に確保されている状況がもたらす課題と国際的な公衆衛生対策上果たすべき責任が示された。これまでの感染症対策において例をみない革新的着想と迅速かつ論理的な意思決定・判断が必要とされる。

本邦においては、エボラ出血熱に対しては未承認用途であるファビピラビルの開発をきっかけに、可及的対応が求められる医薬資源の確保を目的

とした研究開発スキームについて、その責任範疇、臨床治験を含む研究推進上の倫理的制限と許容性、ポスト・アウトブレイクの医薬品管理のあり方等、今後多くの課題が連鎖的に提示されていくと予想される。これらは、多方面から様々な基準に照らし合わせて批評される事例対象となることは必至であろう。今般のエボラ出血熱感染対策にむけた国際研究の事例として、社会科学的な視座を含め、包括的かつ系統立てた情報解析・状況分析が不可欠である。(竹内・古田)

我が国で十分な経験がなく、知見が収集解析できない状況にあるBSL-4施設での動物実験のために、海外研究機関との研究協力連携を構築することと並行し、データ収集解析を同時進行でおこなう状況であったことにより、体系的で合理的な情報やエビデンスの検証をじっくり丁寧に行う環境にあつたとはいえない。しかしながら、国際的な研究連携上の技術的ハーモナイゼーションの課題について学ぶ機会となった。また関係する法規制上の縛り、通関業務、物品・検体移送の取り決め等の基準、それらの調整プロセスにおいて得られた経験は貴重である。

また、多様な実験内容を協議検討し、専門的研究の内容議論のみならず、かかる実務調整を通じて、BSL-4実験施設をもつ国ともたない国の保健医療開発にかかわる貢献の違い、その運営上の特殊性、人的リソースを含めた施設管理能力開発と連携関係維持等の課題について、今後の我が国の対策検討の方向性の提案を可能となるよう、系統的な情報整理ができる環境が整備されたと考えている。

国外の研究機関および開発支援ネットワークを含め、従来実施例の少ない本邦研究機関、企業および行政機関の間の調整、それら相互の段階的成果の共有、続く事業展開の方向性検討といった、非常に繊細な連携調整上の課題が、国ごとに管理運営制度の異なる研究開発スキームの縛りを超えて非常に円滑かつ効果的に実施された。これは、本研究実施プロセスを通じ、積極的な相互協調を

図るハブ・メカニズムを明確に据えたこと、大学研究機関を省庁間および産業界との連携に機能させることのポテンシャルを示した事例である。

(図1に平成26年度実施連携の概念図を示す)

そのような国内でのいわゆる産官学連携 (Academic-Public-Private Partnership) の事例提示に加え、国際的な緊急・人道支援のための保健医療資源開発要請に応える各関係組織の高い社会貢献意識に支えられたことを強調したい。

E. 結論

今後フランスInsermをはじめ、関係各国研究機関において、併用療法の開発、治療方法最適化、診断法、予防法の開発にむけてより詳細な解析と検証が進められる。

そのためのNHP動物実験モデルの検証実験結果はこれまでの研究成果を裏付けるものであった。また、途上国の医療現場での活用を考慮し、静脈注射製剤の開発検討を行った結果、治験薬製造に向けた適正な製造工程・品質管理体制の構築が進められた。

ザイールエボラウイルスに対してこれまでに効果が認められている2種類のヒト-マウスキメラモノクローナル中和抗体を産生する CHO 細胞を大量に培養し、上清に含まれる抗体を高度に精製することによって、抗体医薬に求められる純度が確保された製剤を生産した。ザイールエボラウイルス以外の異なる複数のエボラウイルス種に対して中和活性を示すマウスモノクローナル抗体を作出し、水疱性口炎ウイルスシュードタイプシステムを活用したエスケープミュータントの選択と変異アミノ酸の同定によって抗体の認識するエピトープを推定した。

迅速・簡便かつ高感度なエボラ出血熱診断法として全5種類のエボラウイルスに対する各種エボラウイルス特異的な RT-LAMP 法を開発した。ザイールエボラウイルスに対する RT-LAMP 法に関しては、ギニア共和国で採取された臨床検体を用いた実証試験も行い、現行の RT-PCR (Real

Time- Polymerase Chain Reaction) 法と比較して、検出感度、特異性が同等以上であることを確認した。検査時間の大幅な短縮、小型・軽量・低価格な検査機器の採用などにおいて、現行の診断システムより明確に優位性をもつことが示され、現地ギニア政府保健省によるエボラ出血熱鎮圧キャンペーンにあわせた国家的な対策ツールのひとつとして高い評価を得るに至った。

以上の結果、エボラ出血熱に対するT-705の動物実験モデルに基づくデータおよびヒトでの治療効果について具体的な知見が得られ、今後は予防・診断法開発との連携も視野に、さらに継続的かつ分野横断的な研究開発が望まれる状況が明らかとなった。

国内での医薬品研究開発管理の枠組みを超えた国際的な対応の枠組みに参加し、具体的な事例に基づいて今後の国内外関係政策・研究連携のしくみに積極的に関与し、取り組んでいくことの重要性が提示され、世界的な感染症治療にむけ実施される臨床研究・動物実験への本邦国家レベルでの関与のあり方、産官学連携について有益な事例が提示できたと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogawa H, Miyamoto H, Nakayama E, Yoshida R, Nakamura I, Sawa H, Ishii A, Thomas Y, Nakagawa E, Matsuno K, Kajihara M, Maruyama J, Nao N, Muramatsu M, Kuroda M, Simulundu E, Changula K, Hang'ombe B, Namangala B, Nambota A, Katampi J, Igarashi M, Ito K, Feldmann H, Sugimoto C, Moonga L, Mweene A, Takada A. Seroepidemiological Prevalence of Multiple Species of Filoviruses in Fruit Bats (*Eidolon helvum*) Migrating in Africa. *J Infect Dis* (in press).
- 2) Kajihara M, Takada A. Host Cell Factors Involved in Filovirus Infection. *Curr Trop Med Rep* 2:30-40, 2015.

2. 学会発表

- 1) Yohei Kurosaki, Olande Oloninyi, Saori Sakabe, Ayato Takada, Jiro Yasuda, Establishment of a rapid diagnosis of Ebola virus with a portable device, 7th International Symposium on Filovirus, WDC, USA (25-29 Mar. 2015)
- 2) Jiro Yasuda, Rapid and Simple Detection of Ebola Virus, US-Japan Annual Medical Biodefense Research Symposium, WDC, USA (12-13 Feb.2015)
- 3) Tomoya Saito, Challenges in Medical Countermeasures and Preparedness for An Ebola Outbreak in Japan, US-Japan Annual Medical Biodefense Research Symposium, WDC, USA (12-13 Feb.2015).
- 4) Yuki Maehira, Overview of Current International Collaborative Research Framework of Japan on Ebola Virus Diseases, US-Japan Annual Medical Biodefense Research Symposium, WDC, USA (12-13 Feb.2015)
- 5) Koichi Yamada, Development of T-705(favipiravir) in Japan and Current Agenda for the Treatment of Ebola Virus Diseases, US-Japan Annual Medical Biodefense Research Symposium, WDC, USA (12-13 Feb. 2015)
- 6) Takeyoshi Yamashita and Ayato Takada. R&D Effort with Antibodies for Ebola Virus Disease.

U.S.-JAPAN Medical Biodefense Research Symposium, Rockville, Maryland, USA, (12-13 Feb. 2015).

- 7) Masayoshi Takahashi, Hiroaki Goto, R&D Efforts on Diagnostic Tools for Ebola, U.S.-JAPAN Medical Biodefense Research Symposium, Rockville, Maryland, USA, (12-13 Feb. 2015).

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

- 1) 「ザイールエボラウイルス検出用プライマーセット、アッセイキットおよび増幅方法」、特願2014-258074（2014.12.19出願）
- 2) 「全てのエボラウイルス種の感染性を中和するモノクローナル抗体」（出願予定）

2. 実用新案登録

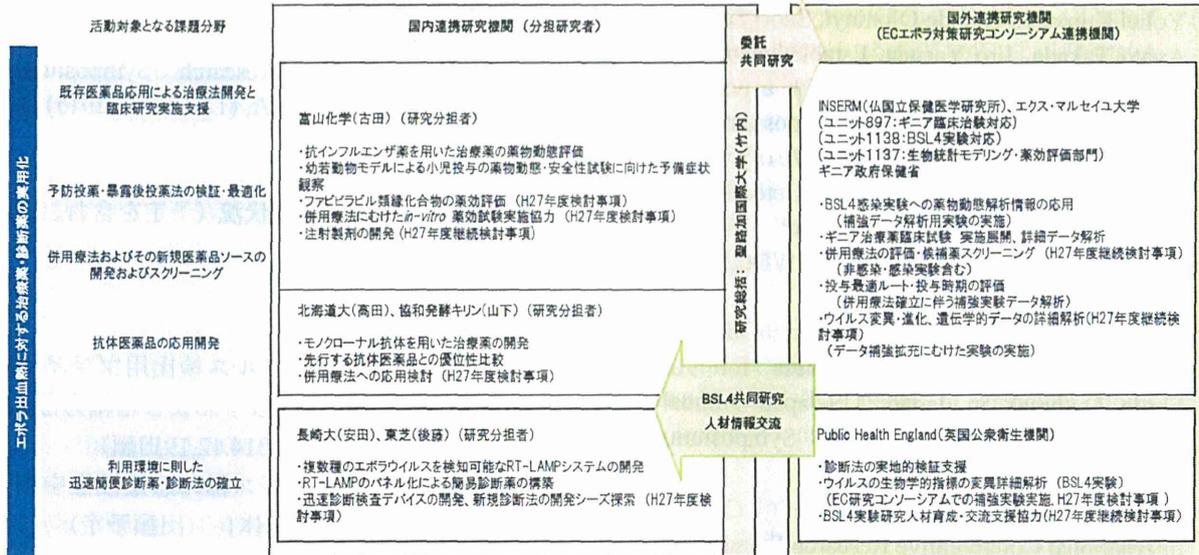
なし

3. その他

特記事項なし

図1. 国内関係機関と国外連携研究機関との協働の枠組み
(H26年度実施内容およびH27年度実施検討を視野に入れた概念図)

【研究活動実施の枠組み】



II. 委託業務成果報告（業務項目別）

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品開発推進研究事業）

「エボラ出血熱に対する治療薬、診断薬の開発に関する研究」

委託業務成果報告（業務項目①）

ファビピラビルのエボラ出血熱ウイルスに対する有効性および安全性の評価

担当責任者 竹内 勤 聖路加国際大学 公衆衛生大学院設置準備室 特任教授
古田 要介 富山化学工業株式会社総合研究所 薬理研究部副部長

研究協力者 齋藤 智也 国立保健医療科学院 上席研究員
前平 由紀 聖路加国際大学 専任コンサルタント
山田 光一 富山化学工業株式会社 理事・感染症PJリーダー
樽井 正義 慶應義塾大学 名誉教授
Alan L. Jakimo Special Professor of Law, Hofstra University
天野 修司 聖路加国際大学 公衆衛生大学院設置準備室

研究要旨

抗インフルエンザウイルス薬として開発されたファビピラビル(T-705)のエボラ出血熱ウイルスに対する有効性および安全性の評価のため、フランス Inserm（国立保健医療研究所）主導の EC 研究連携コンソーシアム関係研究機関と協力し、非ヒト霊長類(non-human primate: NHP)での各種薬物動態試験、安全性・忍容性試験（国内は非感染実験を担当）を実施した。また、小児投与の詳細検討を視野に入れ、薬物動態・安全性試験に向けた幼若動物の実験系検証、状態観察に着手した。同時に、エボラ出血熱の効果的な治療と製剤の合理化を検討するため、静脈注射製剤の開発に向け、規格試験法の設定、バリデーション試験、試作製造およびその工程検査を実施した。また、Inserm による動物感染実験モデルの検証、併用療法開発研究、T-705 投与治療によるウイルスの遺伝的特徴および変異の検証、生物統計学的解析によるデータ補強実験の実施を支援する上で、相補的な実験分担を調整し、関係技術情報の効果的共有を図り、2014 年 12 月よりギニアで段階的に実施継続されている臨床研究と合わせて、Inserm での T-705 に関するエボラウイルス感染症(EVDs)治療法開発に向けた取り組みを支援した。

A. 研究目的

抗インフルエンザウイルス薬として開発されたファビピラビル（以降T-705と記載する）のエボラ出血熱ウイルスに対する有効性および安全性の評価のため、その基盤データの戦略的収集を行い、各国関係研究機関とのエボラ出血熱対策にむけた候補医薬資源の探索と、係る研究連携に寄与する。

国内関係研究機関と協力し、非ヒト霊長類での各種薬物動態・安全性試験を実施し、当該医薬品

の最適用法およびその選択基準となる基盤的情報収集、および注射製剤等、適正な製剤化を検討する。

また、フランスInsermおよびアメリカUSAMRIIDと協力し、BSL-4実験施設でのエボラウイルス感染試験計画の合理的実施を支援し、またギニア等流行地での臨床研究を促進する。

さらに、国際研究連携の枠組みにおいて日本の研究開発外交のプレゼンスおよび国際的な感染症

対策への具体的かつ実際的な貢献を目指す。

B. 研究方法

ギニア等での臨床治験実施、およびフランス、アメリカBSL-4実験施設でのエボラウイルス感染実験にむけた研究連携のため、各試験プロトコル作成に協力し、以下の課題を精査解析するため、非ヒト霊長類（NHP）でのT-705投与観察実験（非感染）を実施した。

- ◆ BSL-4感染実験に際して必要とされる麻酔の影響
- ◆ 最適用量の段階的検討
- ◆ 投与量・方法による薬物動態（PK）、安全性・忍容性の検証(小児投与を含む)
- ◆ 感染実験に向けた不活化条件の検討、動物実験系の予備的な検証議論など

加えて、エボラ出血熱感染患者の病態を考慮し、嘔吐・下痢等発症時には適正血中濃度達成に必要な服薬アドヒアランス確保が非常に困難なため、注射製剤開発を推進する。そのため、今年度は主に規格・試験法の設定および試作製造とその工程検査を行った。

小児のエボラ出血熱感染症例へのT-705投与基準等についても、これまで十分な科学的検証が行われていない。よって幼若サルモデルを用いた毒性評価検討に着手することとした。

以上に述べる実験項目実施計画を立てるにあたり、T-705によるエボラ出血熱治療を検証するためのギニア臨床研究および関係動物実験が、EC研究コンソーシアム（Inserm）、アメリカUSAMRIID等異なる機関において、その課題の優先性がどのように認識され、研究計画に反映されているか、関係各機関との迅速かつ詳細な相互調整が必要とされている。したがって、我が国で実施分担すべき研究内容との整合性と合理的資源配分を検討することが重要であり、機関ごとの実施担当者・管理責任者等との継続協議を図ることで、研究技術的側面および業務管理面を含め、包括的な調整が行われた。

特にフランスInsermとは、より綿密な研究協力強化を図ることとなり、相互の情報共有による動物実験実施分担とそのスケジュール上の調整、研究成果に基づく協議を行うための連携プラットフォームの構築が必須である。

（倫理面への配慮）

非ヒト霊長類試験の動物愛護上の配慮は、各担当試験プロトコルにより、日本、フランスそれぞれの研究実施機関において必要とされる研究倫理審査に基づいて実施された。ギニアにて実施されている臨床研究における人権および倫理擁護上の配慮は、実施機関であるフランスInsermの規定に基づき、EC研究コンソーシアムの活動として、フランス、ギニア政府関係機関、およびMédicins Sans Frontières (MSF)との承認によって対応調整されたが、本年度実施の当研究班分担実施研究では、ヒト臨床検体等倫理面で配慮すべきサンプルの活用はなかった。

C. 研究結果（表1-1：実施項目一覧を参照）

1. 麻酔下/注射投与によるサル薬物動態（2週間投与）（資料1）

NHPにおけるT-705のエボラウイルス感染実験にむけた研究連携の一環として、感染実験における投与条件でのT-705血漿中薬物動態（Pharmacokinetics: PK）、安全性・忍容性を確認した（試験方法は資料1に詳細）。

感染実験で使用される麻酔（Zoletil: tiletamine hydrochloride とzorazepam hydrochlorideの合剤）を非感染サルに筋肉内投与し、麻酔下でファビピラビルを1日2回14日間静脈内投与した結果、感染実験の用法・用量（1日目200 mg/kg BID, 以降100 mg/kg BID）で重篤な有害症状を認めず、忍容性が確認された。

また、同用法・用量でのT-705のPKは、マウスにおけるエボラウイルス感染実験および*in vitro*での抗ウイルス活性から設定したターゲット値を概ね満たすことを確認した。

また、Insermが行う感染実験を考慮し、関係する試料調製工程で重要なエボラウイルス不活化条件（60℃、60分間処理）について、血漿中薬物濃度

測定を検討したところ、血漿中T-705は安定で測定可能であった。

2. 無麻酔非感染サルでの経口/静脈内/皮下投与PK試験（1週間投与）（資料2）

非麻酔下での感染実験の実現可能性の検討として、BSL-4施設での感染実験で実施可能な低侵襲性の投与経路を選択するため、各種投与経路でのT-705の忍容性およびPKを確認した。150 mg/kgを1日2回7日間、経口、静脈内および皮下投与を比較検討した結果、いずれにおいても安全性・忍容性が確認された。また、いずれの投与経路においても同等の全身曝露が得られ、経口以外の投与経路としていずれも選択可能であると考えられた。

3. 幼若サルモデル(18-20M齢)の海外調達・入荷・検疫プロセスにおける耐用性および健康状態、および個体情報の変異・変動に関する確認試験（資料3）

小児感染症例に対するT-705投与の科学的検証として幼若サルを用いた安全性試験の実施を計画しているが、使用する動物の特殊性から実験系に影響する因子の検討として、動物の海外調達および入手時の健康状態評価（症状観察、体重測定）を行った。その結果、動物の健康状態は良好で、試験への使用には問題ないことを確認した。

本試験においては、中国産カニクイザル雄・雌各26匹の合計52匹の入荷動物に対し、結核菌、サルモネラ菌、土壌伝播蠕虫、体外・体内寄生虫、サルBウイルス、STLV：サルT細胞白血病ウイルス、SIV：サルエイズウイルス、SRV：サルレトロウイルスについて感染の有無を確認し、T-705投与の安全性試験に合わせて、臨床症状観察および、体重測定を実施し、その幼若モデルとしての安全性試験に影響を及ぼす可能性のある不確定因子や交絡因子について、検証の必要性に応じて参照できる基礎情報の収集を行った。

本結果をふまえ、来年度は小児感染症例の年齢分布等の疫学的データや推定される用量等を考慮し、ヒト臨床への外挿性が高い試験計画を立案し、試験を実施する。

4. 注射剤の作製（資料4）

感染流行地および退避感染患者に対する治療使用の緊急的措置として、0.6g用量バイアルの凍結乾燥注射剤の製造にむけ、各種試験を実施した。まずは途上国医療現場での使用を想定した製剤化を目指す方向で検討し、以下の結果を得た。

(a) T-705原薬の分析技術移転

原薬の受け入れ試験を行うため確認試験（IR, UV）の技術移転を実施した。技術移転元（富山化学）より開示された以下T-705試験方法に関する技術移転資料を、移転先（東洋紡株式会社）で詳細確認し、実施可否の評価の結果、実施可能との判断が得られた。

- ・ 確認試験（赤外吸収スペクトル: IR）
- ・ 確認試験（紫外可視吸収スペクトル: UV）

(b) T-705における各種試験法設定

<残留薬物試験法設定>

T-705注射剤製造を実施するにあたり、使用機器等が正しく洗浄できているかを確認するため薬物残留性確認試験法について以下の項目を検討した。

- ・ システム適合性の確認

HPLCによるT-705分析時の妨害の有無、および標準溶液理論段数、シンメトリ係数および再現性を確認した結果、妨害ピークがないこと、システム性能および再現性を満たす結果が得られ、試験法設定条件として適合性が確認された。

- ・ 特異性の確認

特異性用試験試料溶液に対し、上記システム適合性の確認で設定された測定条件に基づくT-705の保持時間付近妨害ピークがないことを確認した。また、エタノール（99.5）を溶媒に用いたふき取り操作についてはふき取り材を2回折り（4つ折り）で実施することとした。

- ・ 直線性の確認

本残留薬物試験法における測定方法について、直

線性が得られるか、また定量限界値が薬物残留量許容値である100 $\mu\text{g}/\text{swab}$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当) を満たすものであるかを確認した。

試験に供した各検量線用 T-705 溶液濃度 1.019-20.370 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における直線性については、相関係数1.00となり、視覚的にも直線性には問題ない結果がえられ、定量限界は0.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となり、富山化学第三製剤棟注射剤2における薬物残留量許容値を満たす値が示された。しかし95%信頼区間に原点が含まれなかったこと、残差に一定の傾向が認められたことから、分析法バリデーションにおいて試験ごとに回帰直線式によるT-705残留濃度および定量限界を算出することとした。

・スワブ法の確認

T-705残留薬物試験法における測定方法において、スワブ法の回収率を確認した。その結果、添加回収溶液の調製が標準溶液の調製とは異なる点に着目検証し、抽出溶媒に移動相を用いることで測定を行うこととした。

・ふきとり溶媒の調査

ふきとり溶媒にエタノール (99.5) を選択しており、一方イソプロパノールが含まれていると検出ピーク形状がブロードになるという知見が得られていたため、エタノール (99.5) のT-705の検出ピーク形状への影響の有無を検証した。ステンレス板をふきとった後のふき取り材を検体として、移動相を加えて調製後、2種の試料溶液 (エタノールふきとり、水ふきとり) について、システムの適合性の確認における測定条件でT-705のピーク面積値を測定した結果、水ふきとりで回収率が比較的高い値となり (エタノールふきとり68.5%に対し83.6%)、ふきとり溶媒は水を選択することとした。

・分析パラメータの確認

ステンレス板各種の特異性結果を比較し、標準物質を用いた試料溶液の回収率を比較検討したところ、回収率 (真度) および併行精度において、問題のない結果となり、またT-705標準物質および調製液で回収率に差は認められなかった。

以上の結果より、想定するT-705残留薬物試験法

として、標準液の調製、検体採取方法、試料溶液の調製、測定方法が設定された。これらはシステムの適合性 (性能および再現性) に関する条件基準を付与するものとする。

・分析法バリデーション

これまでの検討結果にもとづくT-705残留薬物試験法について、分析バリデーションによる試験法の妥当性を確認した。その結果、分析法設定時のバリデーションとして、特異性、直線性、真度 (添加回収試験)、併行精度、定量限界について適合性を認める結果が得られた。また、スワブ材変更のための分析法変更時の再バリデーションとして、特異性、真度、併行精度において判定基準を満たし、適合性が示された。

更に、製剤の品質を保証するため、水分、エンドトキシン、生菌数、類縁物質の4試験法を検討した。

・T-705注射剤製造における水分試験法の設定

試料の溶解確認では、注射剤一本に対し、水分測定用メタノール、DMF (dimethyl formamide)、DMSO(dimethyl sulfoxide)、アクアミクロンAXを各々10、15、20mL加えて比較した。

結果、目視で最も溶解度が高く、溶解後の残渣が最少であったDMSOを選択し測定法を設定することとした。

水分値の確認では、水分の多いDMSOでは空試験と試料溶液における水分比較に有意な差が認められなかったため、超脱水DMSO (グレード:有機合成用、水分含量0.001%以下) を用いることとし、水分測定装置への試料溶液投入は5mLとして、溶解液中に含まれる水分を測定した。

直線性を確認したところ、本T-705注射剤の水分値の検討結果から試験結果に大きな変異は認められなかった。

回収率の結果は、平均値83.3% (77.0-94.5%) で変動が見られたが、すべての水添加結果において投入した水分量よりも低い回収率を示した。これは製剤に含まれる成分による測定系への妨害等いくつかの要因が考えられるが、今後の検討となった。分析パラメータを確認するため、上記の真度 (添

加回収率)の確認結果83.3%(77.0-94.5%)に加え、併行精度を求めた結果、8.5%であった。

以上をふまえて想定される水分試験法は、電量測定的水分測定範囲(0.2-5mg)を満たしていることから、T-705注射剤600mgの水分測定は可能であると考えられる。ただし、真度(添加回収率)が低く変異が認められたことから、製剤に含まれる成分の測定系への影響、操作手順、あるいは添加回収方法の改善が必要であると考えられる。

・エンドトキシン試験(ゲル化法)試験法設定

T-705注射剤600mgの製造実施するにあたり、そのエンドトキシン試験について、試験法の検討を以下のように行った。

ライセート試薬の表示感度確認試験により、0.25 λ エンドトキシン標準溶液ではすべて陰性で有効性を示し、また幾何平均エンドポイント濃度が1 λ となり、0.5-2 λ の範囲内であることから、ライセート試薬の表示感度が確認された。

希釈倍率の検討確認のため、T-705注射剤で想定される規格「0.02EU/mg未満」、試料溶液濃度60mg/mLおよびライセート試薬表示感度0.03EU/mLから検討し、最大有効希釈倍率を40倍とした。そこで、本注射剤5-40倍希釈液において、希釈倍率別4種(5、10、20、40倍)、同希釈倍率別での2 λ エンドトキシン添加試料、2 λ エンドトキシン標準液を比較検討したところ、エンドトキシンの混入、ライセート試薬に対する非特異的反応に関与する因子、および反応を阻害する因子はないと判断した。

分析パラメータの確認では、T-705注射剤を40倍希釈した液の反応干渉因子を確認したところ、ライセート試薬の表示感度が確認され、反応干渉因子は試料溶液中に存在しないと判定し、試験は適合するものと判断された。

希釈倍率の検討の結果、T-705注射剤を5-40倍希釈した試料溶液において、エンドトキシンの混入、ライセート試薬と非特異的に反応する因子、および反応を阻害する因子はないものと判断された。また試料溶液の反応干渉因子試験の結果は適合と判断された。以上により、T-705注射剤の試作製造時工程検査、および品質試験におけるエンドトキシン試験法(ゲル化法)として設定すること

ができた。

(c) フィルター適合性試験(除菌性能評価試験)

0.22 μ m試験フィルターを用い、T-705薬液をろ過後、薬液主成分を除き、粘度を薬液と同等値となるよう、またpHを6.8 \pm 0.2に調整した薬液に、*Brevundimonas diminuta* NBRC No.14213(ATCC19146由来株)を指標菌として懸濁し、その完全補足が確認された。

(d) ライン搬送性評価(水充填)

T-705注射剤の試作製造を東洋紡大津医薬場第三製剤棟にて実施するに当たり、富山化学からの情報をもとに製造ラインの搬送性確認、水充填による充填精度確認ならびに実薬使用による凍結乾燥を行い、凍結乾燥品の状態確認を行った。その結果、

- ・ 製造ラインの搬送性確認：水充填から凍結乾燥仕込み、さらに打栓の工程について搬送可能であることが検証された。
- ・ 水充填による充填精度確認：目標充填量 \pm 3%で充填可能であった。
- ・ 薬液の凍結乾燥：溶融や収縮のない凍結乾燥製剤が得られた。

(e) 試作製造

T-705注射剤600mgの治験薬製造に向け、製造条件の設定および製剤の品質確認のため、試作製造を実施した。

試作製造は、富山化学より開示された技術情報を基に、製剤処方試作製造を65Lスケールにて行った。

結果、洗浄滅菌(凍結乾燥機腹圧フィルター、器具類、ゴム栓、キャップ、凍結乾燥機、バイアルについて)の結果は判定基準に適合と判断された。調製工程において、攪拌機での攪拌では、調製バッグ下部チューブ内液が混合できていなかったため、溶解混合時はチューブ内の洗いこみを行うこととした。

無菌ろ過-充填工程において、作業上の大きな問題は認められなかった。

充填工程において、充填後半の凍結乾燥機への搬

入時、凍結乾燥機棚の結露により、凍結乾燥機への搬入時間を要し、また搬入位置が通常位置からずれたことによる倒瓶が発生した。凍結乾燥機への搬入温度については、今回試行した条件以外にも検討する必要性について継続して協議することとした。

凍結乾燥工程において、凍結乾燥ケーキが形成されていないバイアルが認められた。下部棚端のサンプルに多く認められる傾向があるが、その原因追究を含め、凍結乾燥条件について継続的に協議していくこととする。

(f) 試作製造の工程検査

T-705注射剤の試作製造工程検査を以下のように実施した。

・調製液の均一性検査項目：pH測定および含量定量の結果、攪拌15、20、30分後におけるサンプリング試料について、pH値においてサンプリング箇所による変動なし、定量値98.7%以上(98.7-100.3%)でサンプリング箇所による大きな変動は認められなかった。

・調製液の安定性については、pH、定量法(含量)、類縁物質の含量、エンドトキシン検出量、生菌数の検証を、保存開始時、保存6時間後、24時間後で測定比較した。その結果、比較した3サンプルにおいて、pH値、含量、類縁物質、エンドトキシン検出量いずれも適正範囲内の値を示し、生菌数(総好気性微生物数および総真菌数)は検出限界以下であった。

・無菌ろ過初流のT-705定量は99.6%であり、3サンプルによる無菌ろ過液の安定性については、pH、含量定量、類縁物質総量、エンドトキシン検出量いずれも適正範囲内の値を示し、生菌数は検出限界以下であった。

・充填品のばらつき検査結果は、充填開始時、充填1,500本目、3,000本目、4,500本目および終了時を比較したところ、pH、含量定量、類縁物質総量、エンドトキシン検出量いずれも適正範囲内の値を示し、生菌数は検出限界以下であった。さらに、充填品の不溶性微粒子については、充填開始時、100本目ごとにサンプリングを行った結果、25 μ m以上の微粒子は検出されず、10 μ m以上では0-11個(800本目)という結果が得られた。

・巻締品の不溶性微粒子は、巻締開始から1,500本目、3,000本目、4,500本目および終了時にサンプリングをして検査したところ、25 μ m以上の微粒子はサンプルを通じて検出されず、10 μ m以上では4-17個であった。同様のサンプリングによる巻締品の生菌数検査結果は、いずれも検出限界以下であった。さらに、サンプリングポイント別の巻締品のpH、含量定量、類縁物質総量、エンドトキシン検出量いずれも適正範囲内の値を示した。巻締品については、その再溶解性および水分含量を測定し、品質のばらつきを検証した結果、手振りによる溶解により、いずれも黄色澄明な液体となり、一定程度の時間で溶解した。

5. T-705注射剤 濃度測定法バリデーション

(資料5)

注射剤開発推進の一環としてヒトに対する安全性評価を目的とした動物実験の実施を計画しており、これに先立って信頼性の高いデータ取得に向けた以下試験法の検討を実施した。

- 1) 動物に投与する注射剤中のT-705濃度測定法バリデーション試験
- 2) 動物血漿中のT-705濃度測定法バリデーション試験

結果、注射剤、動物血漿ともにT-705濃度測定可能な適切な試験法が確立された。実験動物での安全性試験を実施するための試験法検討が終了したことから、本内容を試験計画に反映させ、試験を実施する。

6. フランスInsermとの研究連携調整

(表1-2および資料6、資料7)

本年度実施分担調整を行ったフランス側担当について、特に優先課題として選定した非ヒト霊長類NHP実験項目を表1-2に示す。

これらの優先実施課題は、本研究班とInsermが、REACTION PROJECTの連携基盤プラットフォーム(EC研究コンソーシアム)において、2014年秋以降から域内研究連携の枠組みでT-705に関する実験が計画されており、これについて本研究班と

Insermがその実施内容について分析協議し、ECでの研究実施リソース配分、優先度、合理性等を考慮して、その中で特に補足データ収集が望まれるもの、および予算等配分リソース上実施が困難あるいは不十分であると考えられる実験項目の中からこれら優先実施課題を選定した。

これらは、EC研究連携コンソーシアムとして実施されているREACTION PROJECT、その主たる治療手段として評価すべき対象をT-705に絞って計画されたものであり、研究活動としては、大きく6つのワークパッケージにわかれて科学的な実証を追求し、情報を蓄積しつつ、相互に関連付けて包括的な治療手段の開発の糸口をつかむ計画となっている。

WP #	Objective
1	To provide rapid evidence of Favipiravir anti-Ebola efficacy in reducing mortality and Ebola viral load in humans with EVD
2	To build trust in on-going efforts to respond to the epidemic by ensuring that research and interventions aimed at containing the EVD epidemic are grounded in an in-depth understanding of the social and historical context.
3	Favipiravir PK and tolerance study in non-human primates to determine the optimal Favipiravir dose (the highest well-tolerated doses) and evaluate the efficacy of different administration timings vs. exposure to Ebola.
4	Analysis of the data from WP1 (humans) and WP3 (non-human primates) to provide a better quantitative understanding of the determinants of the virologic response to treatment.
5	Ensure efficient and effective dissemination of the results to stakeholders and promote further uptake of the results via education activities.
6	Ensure that the project's main objectives are realized on schedule and within budgetary limits

このEC研究連携コンソーシアムの推進する、今回のエボラ出血熱緊急対応における人道的医療支援は、感染患者の治療手段の開発を第一義とし、以下に示すような基本理念に基づく。

- ・ 現状有効な治療手段および予防手段がないこと
- ・ 当該疾患の感染拡大を効果的に制圧する上で障害となる社会経済的な地域事情に対する深い理解が必要であること

そのための具体的な対策方針として、EC研究連携コンソーシアムとしては、地域の社会文化的背景への配慮、性差に基づく配慮、そして寛容な対応が求められることが提案されてきた。

エボラ出血熱の治療と感染管理対策を、先進国主導で諸外国からの人的・技術的リソースを導入することになる中、地域住民やコミュニティからの信頼をえた感染対策の実施が必要であり、そのためには、研究や支援介入のあり方が問われる。

人道支援状況での、研究実施と科学的実証性の追求という課題は、これまでにいずれの国においても経験のない取り組みである。（「エボラ出血熱：治療薬の初の臨床試験がMSFの活動地で始まる」プレスリリース、2014年11月13日、国境なき医師団MSF）

Support for clinical trial (EC-WP1) and PK/safety study (EC-WP3)

Element
Safety favipiravir in humans
Efficacy favipiravir for Ebola treatment in humans
Optimal dose and administration timing of favipiravir in Ebola infected non-human primates

- > Material Transfer and Clinical Supply Agreement
- > Basic information sharing
- > non-infected NHP PK-Safety studies
- +
- > IV formulation development



Insermでは本年度は実施計画を含め、設定した優先課題の内容に沿って、必要な予備調査および各種段階的に必要とされる実験系の検証に着手した。

Inserm 優先課題(1): T-705投与によるエボラウイルスの遺伝学的特徴とその変異の検証

本研究は、NHP治療暴露実験およびヒト感染症例に対する治療によるエボラウイルス亜種の出現に対する系統的分析を目指すものであり、エボラ出血熱に対する抗ウイルス活性に関する *in vivo* の分子生物学的メカニズムの解析アプローチとしては最初の取り組みとなる。

Inserm 優先課題(2): T-705による治療・無治療および感染・非感染各種検体の包括的な生物統計学的解析研究

本研究の実施を通じて、今後治療検討される静脈注射製剤および経口投与群(まずはNHP)に加え、治療群および無治療群のエボラウイルスにおけるウイルス動態モデルについて、より詳細なデータ解析に向け、予備検討を行った。

さらに、各種検体サンプルを活用し投与方法のシ