

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

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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 全司

平成26(2014)年5月

目 次

・ 総括研究報告			
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	岡田全司	-----	1
・ 分担研究報告			
1. 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	中島俊洋	-----	43
2. HVJエンベロープの新ワクチン・デリバリーの開発	金田安史	-----	62
3. HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの臨床応用に向けて これまでの臨床試験の経験から臨床試験に向けて	井上義一	-----	65
4. 多剤耐性結核に対する新規治療用ワクチンの開発・実用化に関する研究	露口一成	-----	67
5. 近畿地区多剤耐性結核患者の臨床試験統括。 結核ワクチンの医師主導試験の実施に向けての体制の整備	朝野和典	-----	69
6. 関東地区多剤耐性結核患者の細胞性免疫・抗体の測定に関する研究	庄司俊輔	-----	71
7. 関東地区(国立病院機構茨城東病院)の患者の臨床試験統括	齋藤武文	-----	74
8. 多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの効率的な開発計画作成と臨床開発の方策に関する研究	三上礼子	-----	77
9. 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターの多剤耐性結核患者の動向と関西地区の多剤耐性結核患者アンケート調査、 ならびに近畿中央胸部疾患センターの現入院患者の実態	松本智成	-----	79
10. 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	熊ノ郷淳	-----	82
・ 研究成果の刊行に関する一覧表		-----	83

平成 25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）

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・
臨床研究センター長

研究要旨（図1）

・ワクチンの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(MCB)を AMBS 社に委託して作製した(中島、岡田)
2. 多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの開発を進めるには、ワクチン成分であるプラスミド DNA (pVAX- IgHSP65-hIL12 DNA) を治験薬GMPに準拠して製造する必要がある。プラスミドDNAは大腸菌を用いてGMP製造を実施するため、安全性の確保と品質の安定化に必要なバンクシステムを作製した。国立遺伝研より大腸菌のDH5 株を入手し、動物由来成分を含まない培地で培養した後に、エレクトロポレーション法によりプラスミドDNAを導入し、形質転換を行った。導入後に大腸菌のクローニングを行って、クローン由来の大腸菌から小スケールでプラスミドDNAの確認を行って、目的のDNAと制限酵素地図が一致することを確認した。確認後に、1種類の大腸菌クローンを選択してマスターセルバンクの作製を行った。マスターセルバンクの作製のため、選択した大腸菌のクローンを動物由来成分を含まない培地で拡大培養を実施し、計 300本で構成されるバンクシステムを構築した (pVAX- IgHSP65-hIL12(DH5))。構築したバンクシステムについての品質試験の結果、全ての品質管理項目に適合であることを確認したため、製造を行ってプラスミドDNAの暫定規格設定に必要な品質確認データの取得を行った。プラスミドDNAの治験薬GMP製造と並行して、治験届までに必要な前臨床試験パッケージ案の作成を行った。既に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て、品質規格や試験デザインの相談を進めており、両者で合意した内容に従って治験届に必要なデータパッケージを作成した。今後、作製したバンクシステムを用いて治験薬GMPレベルで製造したプラスミドDNAを用いて、安全性試験などの非臨床試験データ、治験薬の品質規格の設定を進め、医師主導治験を実施する予定である。
3. これを元に、GMPレベルの pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNAを 100mg作製した(1バッチ)(岡田、中島、井上)。
4. これをサルに用いて本ワクチンの安全性試験・毒性試験を行う計画を立案中(中島、岡田)。

・用法用量設定

1. pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNAを 70mg作製した(岡田)。
2. マウスで本ワクチンの平成 26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と実施中(岡田)。

3. 用量検討 (DNAワクチン投与量検討) C57BL/6マウスやDBA/1マウスにワクチンを 25 μ g ~ 280 μ g で投与した。4~6w後の脾細胞を抗原Hsp65蛋白で *in vitro*刺激し IFN- γ 、IL-2、IL-6、TNF (T細胞免疫能)産生をELISAで解析中。DNA量が 25 μ gでも IFN- γ 産生を増強しワクチン効果有効(岡田、井上、中島)。
4. 用法検討 (DNAワクチン投与回数検討)。治療ワクチン 1回投与、3回投与、6回投与群で治療効果比較。

・ GLP毒性試験・安全性試験

GLP毒性試験・安全性試験：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)。

・ HVJ-エンベロープのアジュバント効果

HVJ-Eは不活性化したセンダイウイルス粒子であるが、遺伝子や核酸を封入し膜融合作用により細胞質内への直接導入が可能である。しかし生体組織ではHVJ由来の蛋白質に対する免疫反応が惹起され、抗体による中和反応がおこることが考えられるが、遺伝子を封入しないHVJ-EとルシフェラーゼDNA封入HVJ-Eを用いたマウスへの投与実験により、HVJ-Eを連続投与しても遺伝子発現の抑制は見られず、連続投与が可能であることが明らかになった(金田)。

・ PMDA対面助言

1. PMDA対面助言を計画中。中島、井上、岡田が打ち合わせ(会議：当臨床研究センター) 2013年 10月 21日 三上、井上、岡田が打ち合わせ(会議：当臨床研究センター) 2013年 10月 22日
2. PMDA対面助言： 毒性・薬効薬理試験項目設定中(中島、三上、井上、岡田)。非臨床試験、品質関連の今後の必要事項確認。臨床治験(第相、first in human治験)の計画について検討中。

・ 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医師主導治験に向けての計画を行った。近畿中央：7年間 55例 MDR-TBのうち 20例 XDR-TB(露口、松本)。東京病院：10年間に 40名の多剤耐性結核 (MDR-TB) MDR-TB 死亡者多い(庄司)。茨城東病院：多剤耐性結核の誘因は不規則治療が原因。12年間に 10例(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)
3. 2006年 1月から 2012年 12月までの期間にNHO近畿中央胸部疾患センターで入院加療を行った多剤耐性結核の治療成績について臨床的検討を行った。治療成功率は 70.9%で感受性結核に比べて不良であり、超多剤耐性結核では 49%とさらに不良であった。手術を行えた症例では比較的予後は良好であった。多剤耐性結核の治療成績は満足のできるものとはいえず、新薬を含め新たな治療法の開発が必要である。露口)。
4. 2011年 9月 14日には世界保健機関 (WHO) が、従来の薬が効かない MDR-TBや超多剤耐性結核 (XDR-TB) XDR-TBの感染が欧州・中央アジア地域で急速に拡大しており、保健当局が阻止できなければ多くの死者が出ると警告した。このため新薬開発ならびに結核ワクチンの開発は重要である。特にワクチンの場合は耐性誘導の問題がなく MDR-/XDR-TB対策には重要である。岡田等はDNAワクチンを開発し *in vitro*ならびに霊長類に対する *in vivo*の研究で期待のできる結果を報告している。ヒト投与への前段階として関西圏における多剤耐性結核患者の患者数調査の準備を行った(松本)。
5. 平成 25年 11月 18日 厚労科研「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」(岡田班)の班会議開催。

・ 研究代表者

臨床試験では、HSP65遺伝子及び IL-12遺伝子をヒトに投与することにより、その発現の持続性、生体

への影響等に関して： 下記の作製した (3)(4) の pVAX HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンを用いて、実験動物(マウス、サル等)で発現の持続性、生体への影響を含む安全性試験・毒性試験を行う計画を立案した。

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。

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 AMB 社に委託して作製した。

これを元に、GMPLレベルの pVAX HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA を 100mg 作製した (1バッチ) これをサルに用いてこのワクチンの安全性試験・毒性試験を行う計画を立案中 (岡田、中島、井上)。

pVAX HSP65 DNA+マウス IL-12 DNA を 70mg 作製した (岡田、井上)。

マウスでこのワクチンの平成 26 年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と共同研究で実施中。

用量検討 (DNA ワクチン投与量検討) C57BL/6 マウスや DBA/1 マウスにワクチンを 25 μ g ~ 280 μ g で投与した。4~6w 後の脾細胞を抗原 Hsp65 蛋白で *in vitro* 刺激し FN-、IL-2、IL-6、TNF (T 細胞免疫能) 産生を ELISA で解析中。DNA 量が 25 μ g でも FN- 産生を増強しワクチン効果有効。

用法検討 (DNA ワクチン投与回数検討)。治療ワクチン 1 回投与、3 回投与、6 回投与群で治療効果比較。PMDA 対面助言を計画中。中島、井上、岡田が打ち合わせ (会議：当臨床研究センター) 2013 年 10 月 21 日 三上、井上、岡田が打ち合わせ (会議：当臨床研究センター) 2013 年 10 月 22 日

・研究分担者 (中島俊洋)

GMPLレベルで治験薬製造用の pVAX HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA の大腸菌マスターセルバンク (MCB) を AMB 社に委託して作製した。

多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの開発を進めるには、ワクチン成分であるプラスミド DNA (pVAX-IgHSP65-hIL12 DNA) を治験薬 GMPL に準拠して製造する必要がある。プラスミド DNA は大腸菌を用いて GMPL 製造を実施するため、安全性の確保と品質の安定化に必要なバンクシステムを作製した。国立遺伝研より大腸菌の DH5 株を入手し、動物由来成分を含まない培地で培養した後に、エレクトロポレーション法によりプラスミド DNA を導入し、形質転換を行った。導入後に大腸菌のクローニングを行って、クローン由来の大腸菌から小スケールでプラスミド DNA の確認を行って、目的の DNA と制限酵素地図が一致することを確認した。確認後に、1 種類の大腸菌クローンを選択してマスターセルバンクの作製を行った。マスターセルバンクの作製のため、選択した大腸菌のクローンを動物由来成分を含まない培地で拡大培養を実施し、計 300 本で構成されるバンクシステムを構築した (pVAX-IgHSP65-hIL12(DH5))。構築したバンクシステムについての品質試験の結果、全ての品質管理項目に適合であることを確認したため、製造を行ってプラスミド DNA の暫定規格設定に必要な品質確認データの取得を行った。プラスミド DNA の治験薬 GMPL 製造と並行して、治験届までに必要な前臨床試験パッケージ案の作成を行った。既に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て、品質規格や試験デザインの相談を進めており、両方で合意した内容に従って治験届に必要なデータパッケージを作成した。今後、作製したバンクシステムを用いて治験薬 GMPL レベルで製造したプラスミド DNA を用いて、安全性試験などの非臨床試験データ、治験薬の品質規格の設定を進め、医師主導治験を実施する予定である。

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。ICQ/Q5D ガイドラインに従い MCB を調製、ICH の Q5B・Q5D ガイドライン準拠の特性解析、品質試験で適格性実証。

GLP 毒性試験：サルを用いて試験項目、試験デザインを計画。

PMDA 対面助言：毒性・薬効薬理試験項目設定中である。

・研究分担者 金田安史)

抗体存在下でのHVJ遺伝子発現の阻害をルシフェラーゼ遺伝子発現により検証した。その結果、抗HVJ抗体が存在する個体においての遺伝子発現は全く阻害されなかった。

HVJ-Eによる細胞への遺伝子導入はHVJエンベロープと細胞膜の融合に依存している。融合反応が抗体の吸着よりも非常に迅速に起こることが原因ではないかと推測。したがって中和抗体存在下であっても標的組織への直接投与法を行う限りは、遺伝子導入は阻害されない。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ないので連続投与が可能である。

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)。

・研究分担者(井上義一)

マウスで本ワクチンの用法・用量試験の予備試験プロトコルを調整し、実験開始(井上、岡田、中島)。東海大学(三上)、中島と岡田でPMDAへの対面助言の手順等考案。これまでの臨床試験の経験を活用。

・研究分担者(露口一成)

NHO近畿中央と近畿地区の多剤耐性結核の調査・検討開始。近畿中央MDR-TB 3名中2名XDR-TB。2006年1月から2012年12月までの期間にNHO近畿中央胸部疾患センターで入院加療を行った多剤耐性結核の治療成績について臨床的検討を行った。治療成功率は70.9%で感受性結核に比べて不良であり、超多剤耐性結核では49%とさらに不良であった。手術を行えた症例では比較的予後は良好であった。多剤耐性結核の治療成績は満足のできるものとはいえず、新薬を含め新たな治療法の開発が必要である(露口)。

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)。

マウスで本ワクチンの平成26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験。

・研究分担者(朝野和典)

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)に向けて大阪大学医学部治験管理センター及び大阪大学未来医療センター治験管理センターで調整中。

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)。

平成25年度は、健康人を対象とした臨床試験およびマラリアワクチンのフェーズ 医師主導治験の実施を通して、早期探索的臨床研究の体制整備を行い、結核ワクチンの医師主導治験の実施に向けての研究体制の整備を行った。

・研究分担者(庄司俊輔)

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。

東京病院・関東地区の結核診療施設における多剤耐性結核患者の調査・医師主導治験に向けて検討開始。初年度の平成25年度の研究では、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)治療の内容などを調査した。2004年から2013年(10月末現在)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40名であった。

2004年から2013年、NHO東京病院の多剤耐性結核患者は40名。男性33名、女性7名。治療完了9名、治療中断脱落1名、死亡7名、転出(帰国含む)10名、治療継続8名(3名は後に死亡)、現在入院中1名、不明4名。これにより、実際にワクチンを投与する際の患者のエントリー状況が推定できる。

・研究分担者(齋藤武文)

茨城東病院・関東地区の結核診療施設における多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けた検討。

関東地区(NHO茨城東病院、複十字病院)の多剤耐性結核症例状況を後ろ向きにカルテ調査した。

関東地区の2病院の多剤耐性結核の現状をまとめた。多くは男性、東京では外国人、特に中国、韓国人が多く、若い年齢層に多い。郡部では薬剤感受性結核と同様な人種、性、年齢構成。少なくとも日本人においては最近の感染、発症であり、多くは不規則治療によると考えられた。

2002年1月より2013年10月において、上記の病院において231例の多剤耐性結核症例が診療された。治癒した例は約半数であり、多剤耐性結核の治療は難渋していた。

多剤耐性結核の治療上、新たな抗結核薬の開発だけでなく、本研究が取り組む多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの実用化が強く待たれるところである。

• **研究分担者（三上礼子）**

岡田、井上とPMDAへの対面助言の手順等考案。

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。

第 相臨床治験の計画を検討中である。実施の薬事規制上の問題と円滑な開発の方策について検討。

• **研究分担者（松本智成）**

結核予防会大阪病院・大阪府立呼吸器アレルギー医療セ・近畿地区の多剤耐性結核の調査・検討開始。

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、庄司、齋藤、松本、熊ノ郷）。

近畿地区における多剤耐性結核患者の動向、人数調査。

• **研究分担者（熊ノ郷淳）**

マウスで本ワクチンの用法・用量予備試験実施。

近畿地区の結核診療施設を統括する立場上、これらの診療施設（近畿中央病院、刀根山病院、大阪府立呼吸器アレルギー医療センター等）での多剤耐性結核患者の調査・検討開始。

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）。

新規ワクチン（HVJ-エンベロープ HSP65 DNA + IL-12 DNA）の第 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しているが、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を行った。

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

呼吸不全・難治性肺疾患研究部長

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

大阪大学医学部附属病院

感染制御部

感染症学

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

A. 研究目的 (図1) (表2、3、4、5)

- (1) 研究代表者は、本ワクチン(HVJ-エンベロープ HSP65 DNA + IL-12 DNA)の有効性を、世界に先駆けてヒト結核感染に最も近いカニクイザルで明らかにした。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(NHO)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(マウス・サルですでに結核治療効果)
- (3) 世界に先駆け、DNAワクチンガイドラインを策定する。
- (4) first in humanの臨床治験を計画実施する。
- (5) 患者基礎データとして、NHOで加療を行った多剤耐性結核患者のプロフィールや治療内容を把握。

研究の意義として：

- (1) 結核は世界の三大感染症で、アジアで拡大する多剤耐性結核は、有効な治療法がなく、本人は元より他への感染、莫大な医療費など社会への影響大。**世界で毎年約50万人発症。**HVJ-エンベロープ HSP65 DNA+ IL-12 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・治療には無効であり、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ワクチンは有効性が示されており、今後 first in humanの臨床治験に進む必要がある。
- (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) 国内ではワクチンの新規技術であるDNAワクチン開発が遅れている。2013年米国で開発されたDNAワクチンの国内治験が開始されたが後期治験からで、国内開発に必要なガイドライン策定には純国産品での first in human治験実施の必要性

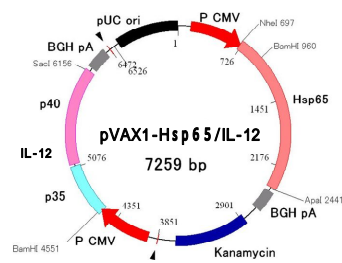
[具体的な研究目的]

1. 平成25年度の研究では、純国産の治療用DNAワクチンを用いて国内で医師主導治験を実施するために必要な治験薬GMP製造、非臨床試験データ(毒性試験、薬効薬理試験)を取得することを目的として研究開発を行った。
また、国内で製造を実施する新規の治療用DNAワクチンにより治験を実施するのは初めてのケースになるため、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、薬事戦略相談を実施し、国内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。
これらの研究成果により、国内と海外とのドラッグ・ラグの原因の一つである、欧米先行の新規ワクチンの開発の国内回帰へも目的として研究を実施した。
2. 抗体存在下でもHVJ-Eによる遺伝子導入が機能するかどうかを培養細胞とマウス骨格筋への遺伝子導入により検証することを目指した(金田)。
3. MDR-/XDR-TBに対するDNAワクチン投与前の調査として関西における多剤耐性結核の概数を調査する。
4. イソニアジドとリファンピシンの両剤に耐性である多剤耐性結核の予後は感受性結核に比べて不良であるとされている。NHO近畿中央胸部疾患センターで治療を行った多剤耐性結核症例について治療成績を臨床的に検討することを目的とする(露口)。
5. 関東地区(NHO茨城東病院、複十字病院)の多剤耐性結核症例状況を明らかにすること(齋藤)。
6. 医師主導治験の実施に向けての体制整備とそのノウ・ハウを蓄積し、結核ワクチン医師主導治験の実施に向けた、体制整備を行う(朝野)。
7. 岡田が作製し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することであった。

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)
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 相臨床治験。



方法

多剤耐性結核に対する結核治療ワクチン実用化

1. 結核治療ワクチン前臨床試験及び第 相臨床治験の組織
 - (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 (ジェノミディア株式会社 中島、東海大学 三上) 前臨床試験
すでに、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・対面助言のレベルの資料内容と評価され、すぐ事前面談となった。 2013年6月20日 PMDA 薬事戦略相談・事前面談実施
 - (6) 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
 - (7) 国立病院機構呼吸器ネットワーク 65 施設 グルーリーダー(岡田)、日本の 50%の多剤耐性結核患者
2. 前臨床試験 (薬効・毒性・安全性) (中島、金田、熊ノ郷、朝野、岡田、井上)
3. 国立病院機構病院と大阪大学を中心に、多剤耐性結核患者に対する第 相臨床治験
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130万人の結核死亡者を治療・救命可能
 医療費節減、国際貢献。
 国民の医療・福祉の向上、厚生行政に寄与。

第 相臨床治験評価

結核治療ワクチン 皮下投与 → 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

研究成果

ワクチンGMP製造製

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 (MCB) を AMBIS 社に委託して作製した(中島、岡田)。
2. これを元に、GMP レベルの pVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNA を 100 mg 作製した(1 バッチ)(岡田、中島、井上)。
3. これをサルに用いて本ワクチンの安全性試験・毒性試験を行う計画を立案中(中島、岡田)。
4. pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNA を 70 mg 作製した。(岡田)
5. マウスで本ワクチンの平成 26 年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と実施中(岡田)。

GLP毒性試験・安全性試験

1. GLP 毒性試験・安全性試験: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)。

PMDA対面助言

1. PMDA 対面助言を計画中。 中島、井上、岡田が打ち合わせ(会議:当臨床研究センター)2013年10月21日 三上、井上、岡田が打ち合わせ(会議:当臨床研究センター)2013年10月22日
2. PMDA 対面助言: 毒性・薬効薬理試験項目設定中(中島、三上、井上、岡田)。 非臨床試験、品質関連の今後の必要事項確認。 臨床治験(第1相、first in human 治験)の計画について検討中。

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

用法用量設定試

1. 用量検討(DNA ワクチン投与量検討) C57BL/6 マウスや DBA/1 マウスにワクチンを 25 µg ~ 280 µg で投与した。 4 ~ 6w 後の脾細胞を抗原 Hsp65 蛋白で in vitro 刺激し IFN- γ 、IL-2、IL-6、TNF (T細胞免疫能)産生を ELISA で解析中。 DNA 量が 25 µg でも IFN- γ 産生を増強しワクチン効果有効(岡田、井上、中島)。
2. 用法検討(DNA ワクチン投与回数検討)。 治療ワクチン 1 回投与、3 回投与、6 回投与群で治療効果比較。

1. 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を行った。 近畿中央:3 名 MDR-TB のうち 2 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:不規則治療原因(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)
3. 平成 25 年 11 月 18 日 厚労科研「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」(岡田班)の班会議開催。

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(平成25年度新規申請課題)

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

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 2013
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. 860万人/年が新たに結核発症した。(2012)
4. 世界中で約130万人/年が結核によって死亡している。(2012)
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45万人/年(2012)が発症。17万人が死亡。

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

多剤耐性結核に対する結核治療ワクチン実用化

1. 結核治療ワクチン前臨床試験及び第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、齋口)、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 (ジェノメディア株式会社 中島、東海大学 三上)
前臨床試験

すでに、2013年5月31日 PMDA薬事戦略相談・個別面談実施。
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

- (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(岡田)、日本の50%の多剤耐性結核患者

2. 前臨床試験(薬効・毒性・安全性)(中島、金田、熊ノ郷、朝野、岡田、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、齋口、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)：CTCAE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. 結核治療ワクチン前臨床試験及び第 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 (ジェノミディア株式会社 中島、東海大学 三上)

前臨床試験

すでに、2013年5月31日 PMDA薬事戦略相談・個別面談実施。

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

- (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 (岡田) 日本50%の多剤耐性結核患者

2. 研究方法 (中島)

(1) 治験薬製造用バンクシステムの構築

国立遺伝研究所から入手した大腸菌 DH5 株を用いて形質転換を行ってマスターセルバンク作製に必要な種細胞の調製を行った。動物由来原料の使用を最低限とするため、植物由来成分の培養液を用いて培養を行って形質転換用の大腸菌を培養し、遺伝子導入用の大腸菌のストック細胞を調製した。

大腸菌の形質転換を行うための遺伝子導入は、プラスミドDNAによる形質転換で通常使用されている薬剤添加による化学的な方法ではなく、エレクトロポレーション法による物理的な方法で実施した。その結果、目的のプラスミドDNAである

pVAX1-IgHSP65-hIL12で形質転換された大腸菌のクローンを得た。

得られた大腸菌のクローンを小スケールで培養し、目的のプラスミドDNAである pVAX1-IgHSP65-hIL12の導入を確認した。培養した大腸菌より抽出したプラスミ

ドDNAを用いて制限酵素地図を作成し、理論サイズとの一致を確認した後に、マスターセルバンク作製用の大腸菌クローンを選択した。

バンクシステム作製用に選択した大腸菌クローン使用し、生物由来原料を含まない培養液で拡大培養を行った後に、グリセロールを最終濃度15%になるよう添加し、バンク作製のチューブに分注した。

分注後にマイナス80度で凍結して計300本のマスターセルバンク (pVAX1-IgHSP65-hIL12/DH5) の作製を完了した。

(2) 構築したバンクシステムの特性確認

作製したマスターセルバンクについては、品質試験を実施してセルバンクとして適切な品質であることを確認した。

CHのガイドラインであるQ5D「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」(医薬審 第873号、平成12年7月14日付) に記載された内容に従って試験項目の選択を行った。

本研究で作製したマスターセルバンクは、大腸菌のバンクであるため、CHのガイドラインであるQ5Dの微生物細胞に関する記載内容に従って、試験項目を設定した。

具体的には、宿主の同定試験、混入否定試験、プラスミド確認、生存率試験について実施し、試験としては7項目 (薬剤感受性試験、栄養要求性試験、グラム染色試験、コロニー形態試験、ファージ否定試験、制限酵素地図試験、生菌数試験) の試験を実施して、作製したセルバンクシステムの特性解析及び品質評価を行った。

(3) 構築したバンクシステムによるプラスミドDNAの製造

作製したマスターセルバンク (MCB) を用いてGMP製造を実施し、ワクチン成分となる目的のプラスミドDNA (pVAX1-IgHSP65-hIL12) を製造出来る事を確認した。

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、破砕し、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、濃度調整と滅菌ろ過を行ったプラスミドDNA溶液をバイアルに分注・打栓して製剤とした。

(4) 製造したプラスミドDNAの品質確認試験

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」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、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選択した。

(5) DNAワクチンの非臨床試験のデータパッケージ案の作成

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)] 及び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)]に一部参照にして設定を行った。

(6) 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日にそれぞれ実施し、開発の方向性の妥当性について相談を行った。更に、アジュバント成分であるHVJ-Eについては、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相談を実施した。

具体的にはアジュバント成分であるHVJ-Eのマスターセルバンクと治験薬の品質管理項目、工程管理項目案の設定を行い、PMDAとの薬事戦略相談（事前面談）を実施し、ガイドライン策定に向けた準備を進めた。

更に、治験薬の有効期間の設定に必要な長期安定性試験に関して試験計画書の策定を行い、長期安定性試験の開始準備を進めた。

更に、非臨床試験（安全性試験、薬効薬理試験）についても、実施する試験項目、試験デザインの内容について、「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）を参照して原案を策定し、PMDAとの薬事戦略相談を実施したところ、WHOのDNAワクチンのガイドラインも参考にして検討を進めるよう指摘を受けたため、それに従って変更

案の策定を行った。

3. 前臨床試験（薬効・毒性・安全性）（中島、金田、熊ノ郷、朝野、岡田、井上）
本DNAワクチンの用法・用量検討を行った。ワクチン投与DBA/1マウスの脾リンパ球を各種抗原で刺激し、2日後の培養上清中のサイトカインをELISAで測定した。3日後のリンパ球の増殖反応を³H-TdR法で調べた。
4. 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 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）
5. 評価
（1）安全性（主要）：CTCAE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。
6. HVJ-エンベロープ
HVJ-EはATCCより購入した Sendai virus の 2 株（VR-105 para influenza 1 Sendai/52）を用い、有精鶏卵で増殖させ、紫外線（9mJ/cm²）で不活性化しHVJ-Eとした。抗体としては研究室で作成したHVJ-Eの融合蛋白Fに対するウサギ抗血清を用いることにした。
生体組織での遺伝子発現を調べるため、マウスの骨格筋での遺伝子発現で評価することにした。まずCMV-lucを封入したHVJ-Eを前脛骨筋に注射し48時間後の骨格筋でのルシフェラーゼ活性を測定しその値を100とした。次に別のマウスに遺伝子を封入しないHVJ-Eを1週間隔で2回前脛骨筋に注射した。そのマウスではHVJ-Eに対する抗体が検出された。その1週間後にCMV-lucを封入したHVJ-Eを筋肉内に注入した（金田）。
7. 多剤耐性結核（MDR-TB）症例状況をNHO茨城東病院、複十字病院例について、2002年1月より2013年10月症例について後ろ向きにカルテより検討した（齋藤）。
8. 平成25年度、フェーズ 医師主導治験を実施するために、先行的に大阪大学医学部附属病院において体制の整備を行った。治験薬GMP基準に準拠した製造施設、健康人被験者の対応や入院に使用する専用の早期探索的臨床試験実施エリアの設置、院内運用の早期探索的臨床試験実施

業務マニュアルを制定するなど、ハード面、ソフト面で様々に直面する課題を整理し、解決しながら整備を進めた（朝野）。

9. 初年度の平成 25年度の研究では、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10年間にわたって調査し、まとめた（庄司）。
10. 関西におけるMDR- /XDR-TBの動向を調査するために、結核病棟を有する病院へのアンケート用紙を作成する。

前調査として2000年からの大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおけるMDR-TB排菌患者のべ数を調べる。

前調査として2004年からの大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおける新規MDR-TB排菌患者数を調べた。

11. 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月までの間に入院加療を行った多剤耐性結核症例55列を対象として、その背景因子、治療成績等につき臨床的に検討を行った（露口）。

C. 研究結果

(1) 臨床試験では、HSP65遺伝子及びIL-12遺伝子をヒトに投与することより、その発現の持続性、生体への影響等に関して：下記の作製した(3)(4)のpVAX HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチンを用いて、実験動物(マウス、サル等)で発現の持続性、生体への影響を含む安全性試験・毒性試験を行う計画を立案した。

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。

(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(MCB)を分担研究者中島俊洋と共にAMB 6社に委託して作製した(表7)。

1) 治験薬製造用バンクシステムの構築

治験薬GMP製造に使用する大腸菌については、起源・由来を明確にする必要があるため、大腸菌株DH5 RDB108(コード番号：ME9088)を国立遺伝研究所から入手した。その大腸菌株(DH5 株)を生物由来成分を含まないLB培地を用いて小スケールで培養し、形質転換用に使用する種菌ストックを作成した。

形質転換用の種菌ストックを生物由来成分を含まないLB培地で培養し、菌体を回収・洗浄し、生物由来成分を含まない形質転換用の培地に懸濁後にマイナス80度で凍結したストックを作成し、コンピテント細胞として使用した。

コンピテントセル化した大腸菌株DH5 RDB108を、解凍して目的のプラスミドDNA(pVAX1-IgHSP65-hIL12)を添加し、電気パルス法(エレクトロポレーション)により導入を行った。プラスミドDNAを導入した後に、生物由来成分を含まないLB培地で前培養を行ってから、生物由来成分を含まないLB寒天培地(カナマイシン含有)に菌液を添加して一晚培養してからクローニングを行った。通常の形質転換では、化学物質によるプラスミドDNA導入が実施されるが、治験薬GMP製造に使用することを

考慮して物理的な導入方法である電気パルス法(エレクトロポレーション)を選択した。

その結果、プラスミドDNAの導入により、カナマイシン耐性となった大腸菌が認められたため、導入に成功したと判断し、単一のコロニーを採取して目的のプラスミドDNAが導入されているかを確認したところ、目的のプラスミドDNA(pVAX1-IgHSP65-hIL12)と制限酵素地図が一致するプラスミドDNAの導入を認めた。そのため、採取した大腸菌のクローンを用いてマスターセルバンクの作製を行った。

マスターセルバンクを作製するため、上記のようにして採取した大腸菌クローンに由来する大腸菌を、生物由来原料を含まない植物由来成分を使用してLB培地内で拡大培養を行った。

目的の大腸菌が、適切な細胞濃度(対数増殖期)に達するまで培養を継続した後に培養を停止し、グリセロールを最終濃度15%になるよう添加し、バンク作製用チューブ300本に無菌的に分注し、マイナス80度で凍結してのマスターセルバンク(pVAX1-IgHSP65-hIL12/DH5)の作製を完了した。

マスターセルバンク(pVAX1-IgHSP65-hIL12/DH5)については、上記のようにして作製した調製記録を全て確認し、保管・管理することとした。また、セルバンクのチューブには、プラスミドDNAの名称と使用した大腸菌の菌株、及び調製日を識別できるようにする必要があるため、名称と調製日完了を記入して、GMP製造施設内に設置されたマイナス80度の冷凍庫内で保管管理を行う事とした。

2) 構築したバンクシステムの特性確認

上記のようにして治験薬GMP製造用に大腸菌のマスターセルバンクを作製した。実際に製造用に使用するには、ガイドラインに従ってセルバンクの特性及び品質を実証するための試験を実施し、製造用に適したレベルのバンクであることを確認した上で使用する必要がある。

医薬品製造用に使用するセルバンクについては、CHのガイドラインであるQ5D「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」(医薬審 第873号、平成12年

7月14日付)に記載された内容に従って試験データを取得する必要があるため、まず試験項目の選定を行った。

ガイドラインには、培養細胞株を使用した場合と、細菌株を使用した場合の両者について記載があり、それぞれに適した試験を実施することとされている。本研究において、プラスミドDNAを治験薬GMPレベルで製造するために作製したマスターセルバンクは、大腸菌のセルバンクであるため、ICHのQ5Dガイドラインに記載された微生物細胞のバンクのための試験項目を設定し、特性及び品質に関する検査を実施した。

そこで、関連するガイドラインに記載された内容に従って、宿主である大腸菌を同定するための試験、他の微生物の混入を否定する試験、導入したプラスミドDNAを確認する試験、大腸菌の生存率(生菌数)を測定する試験を、それぞれ実施することとした。

まず、薬剤感受性試験を実施し、アンピシリン感受性、カナマイシン耐性であることを確認した。大腸菌を使用した組換え実験などでは通常アンピシリン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを使用することが多いが、臨床用を使用する場合にはアレルギー反応のリスクがあるためアンピシリンの使用は望ましくないとされている。そのため、本研究で使用するプラスミドDNAは、アンピシリン耐性遺伝子の代わりにカナマイシン耐性遺伝子を組み込んでいる。従って、試験の結果得られた薬剤耐性プロファイルは、目的の表現型を示しているものと判断された。

次に、栄養要求性試験、グラム染色試験、コロニー形態試験を実施し、使用した大腸菌株であるDH5のみが認められ、他の微生物の混入は認められない事を確認した。その結果、予測された栄養要求性、グラム染色パターン(グラム染色陰性)、元のDH5と同じ形態のコロニーのみが認められることが明らかとなり、使用した大腸菌株であるDH5以外の細菌の混入は否定された。

更にプレート法によりファージ否定試験を実施したところ、ファージの混入を示すプラーク形成が認められなかったことからファージの混入についても否定できると判断された。

続いて作製したセルバンクの大腸菌の懸濁液から直接プラスミドDNAを抽出し、制限酵素地図試験を実施したところ、目的とするプラスミドDNAと同一の制限酵素切断パターンが確認されたことから、セルバンクの大腸菌は目的とするプラスミドDNAを保持していることが確認された。

最後に、治験薬GMP製造を実施するのに十分な大腸菌数を含むかを確認するため生菌数試験を実施した。その結果、作製したセルバンクシステムは1mLあたり100万個以上の大腸菌を含むことが明らかとなり、治験薬製造には十分な菌数を含むものと判断された。

以上のようにして、作製した大腸菌のセルバンクに関して特性解析及び品質評価を行った結果、全ての試験で適合する結果を得ることが出来たため、作製したセルバンクは治験薬GMP製造に適したバンクである事が実証された。

3) 構築したバンクシステムによるプラスミドDNAの製造

上記のように作製したマスターセルバンク(MCB)の特性及び品質の解析を完了したため、実際に作製したセルバンクを用いて目的のプラスミドDNAのGMP製造を実施した。本研究で治療用ワクチンの成分となるプラスミドDNA(pVAX1-IgHSP65-hIL12)をGMPパイロットプラント内で製造を実施した。治験薬GMP製造を想定した製造であるため、生物由来原料を含まない原材料を使用して培養、菌体回収、菌体破碎、粗精製液調製、カラムクロマトグラフィーによる精製、バッファー置換、無菌ろ過、濃度調整の各工程を経て、最終的に遮光バイアルへ充填し、シリコンコートしたゴム栓を打栓した。

最終的には、冷蔵でも保存安定性が高い凍結乾燥製剤を検討する予定であるが、現時点では液剤での凍結保存とした。

GMP製造を実施した結果、大腸菌の培養条件や精製条件の最適化することで更に収量を向上できることが示唆されたため、更にGMP製造を行って、非臨床試験、安定性試験のための製剤製造を実施して最適化を進め、臨床試験用の治験薬を製造する予定である。

4) 製造したプラスミドDNAの品質確認試験

上記のようにして製造したプラスミドDNAの品質を確認し、暫定規格設定の根拠となるデータを取得するための品質確認試験を実施した。

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）を選択して、試験項目の設定を行った。

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、暫定規格を設定する方向性で進める事とした。

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製し試験を実施した。

一方、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、の各試験については、科学的根拠に基づいて社内で試験手順書の策定を行い、試験データの取得を行った。

これらの試験データと、ガイドラインなどの記載内容に基づいて純国産の治験薬として製造するプラスミドDNAの暫定基準を設定し、治験薬の製造と品質管理試験を実施する。

5) 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を成分とする治療用ワクチンについては、国内で初めての治験実施となるため、国内のガイドライン策定に貢献することも考慮して開発を進める必要がある。そのため、平成25年度は、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。

プラスミドDNAを用いた医薬品の開発は遺伝子治療の範疇になることが想定されたため、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を行った結果、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。

更に、プラスミドDNAの製造については、上記のように大腸菌で作製したマスターセルバンクを使用して実施することから、組み換えたん白質など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を対象としたガイドラインである、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）についても、適宜参考にして非臨床試験の内容を検討する事とした。

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、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と、単回投与で実施する安全性薬理試験（循環器系、呼吸器系）の、2つの

試験を実施することが最低限必要であると考えられた。今後策定したデザイン案の妥当性について、規制当局であるPMDAの薬事戦略相談で相談を行って、最終的に実施する非臨床試験の内容を最終化する予定である。

6) 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。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必要がある。

PMDAでは薬事戦略相談の制度があり、医師主導治験の実施内容や、新規医薬品開発に関する個別面談、事前相談、対面助言を実施している。本研究で開発するプラスミドDNAをワクチン成分とする治療用DNAワクチンについては、新規性が高いため、薬事戦略相談の制度を利用し、規制当局と開発内容に関して密接に事前相談しながら医師主導治験の準備を進めることが重要であると考えられた。

そこで、プラスミドDNAの規格及び安全性と、治験デザインの骨子、非臨床試験のデータパッケージ案について、PMDAの薬事戦略相談・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日にそれぞれ実施し、開発の方向性の妥当性について相談を行った。当初は、「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（薬食審査発0527第1号、平成22年5月27日付）、ICHのバイオ医薬品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（薬食審査発0323第1号、平成24年3月23日付）、「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」（薬発第1062号薬務局長通知、平成7年11月15日付、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）を参考にして試験デザイン案を策定していたが、薬事戦略相談の結果、参考となるガイドラインの選定（WHOのガイド

ラインなども参考にすること）、治験前に実施が必要な動物試験のレベル（GLP、信頼性基準適合）、プラスミドDNAの規格及び安全性と製造レベル（GMP）などについて、適切なコメントを得ることが出来た。そのため、実施した事前面談でのコメントに従って、非臨床試験デザイン案の改定を行い、より適切な非臨床試験のデータパッケージ案の策定を完了した。改定した内容については、再度PMDA相談を実施して最終化した上、試験を実施する予定である。

更に、アジュバント成分であるHVJ-Eについては、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相談を実施した。具体的にはアジュバント成分であるHVJ-Eについて治験薬GMP製造を行う際に必要な、品質管理項目、工程管理項目の設定に関して、一部追加データの取得を進めることで合意した。これにより、治験届けまでに必要なデータがより明確になったため、現在追加データの取得を進めている状況である。

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。

(3) GMPLレベルのpVAX/HSP65 DNA+ヒト IL-12 DNAを100mg作製した(1バッチ) これをサルに用いてこのワクチンの安全性試験・毒性試験を行う計画を立案中(岡田、中島、井上)(表8)。

(4) pVAX/HSP65 DNA+マウス IL-12 DNAを70mg作製した(岡田、井上)(表9)。

(5) マウスでこのワクチンの平成26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と共同研究で実施中(表10)(図2、3、4、5、6、7、8、9)。

(6) 用量検討(DNAワクチン投与量検討) C57BL/6マウスやDBA/1マウスにワクチンを25µg~280µgで投与した。4~6w後の脾細胞を抗原Hsp65蛋白でin vitro刺激しFN-、IL-2、IL-6、TNF(T細

胞免疫能)産生をELISAで解析中。DNA量が25μgでもIFN-産生を増強しワクチン効果有効(図5、7、8、9)。

(7)用法検討(DNAワクチン投与回数検討)。治療ワクチン1回投与、3回投与、6回投与群で治療効果比較(図2、5、6)。

(8)PMDA対面助言を計画中。中島、井上、岡田が打ち合わせ(会議:当臨床研究センター)2013年10月21日 三上、井上、岡田が打ち合わせ(会議:当臨床研究センター)2013年10月22日(表11)

(9)HVJ-Eへの遺伝子封入効率は15%程度であった。希釈しないF抗血清とHVJ-Eを混合し、37度で30分インキュベートして、HEK293細胞にかけルシフェラーゼ遺伝子発現を調べた。コントロールとしてPreimmune serumを用いた。Preimmune serumを用いた場合の遺伝子発現は約90%であったが、F抗血清の場合は、0になった。抗血清を4倍希釈すると約10%の遺伝子発現であった。次に、F抗血清とHVJ-Eを混合し、インキュベートなしに直接HEK293細胞に作用させた。ルシフェラーゼ遺伝子発現は全く阻害されなかった。マウスの骨格筋での遺伝子発現については、遺伝子を封入しないHVJ-Eを1週間隔で2回前脛骨筋に注射し48時間後の遺伝子発現は、遺伝子未封入のHVJ-Eの連続投与した場合の遺伝子発現と比較して、有意差のない同じ値が得られ、抗HV抗体が存在する個体においての遺伝子発現は全く阻害されなかった(金田)。

(10)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。マウスを用いた細胞性免疫、液性免疫双方の測定基盤の立ち上げ。関連施設連携を行った(熊ノ郷)。

(11)NHO茨城東病院MDR-TB症例は男性9例、女性1例の10例、平均年齢57.2歳(34歳~86歳)、日本人9例(1例、インドネシア在住30年)、韓国人1例であった。それらの予後は、生存2例(1例肺切除、1例内服加療)、死亡5例(全例、切除できず)、不明3例であった。MDR-TBは6例で超多剤耐性結核(以下、XDR-TB)は4例であった。

複十字病院例については、22例で、性別は男性

150例、女性71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47.8歳(range18歳~99歳)であった。国籍は、日本人164例、中国人25例、韓国人10例、その他のアジア16例、その他の地域6例であった。多剤耐性結核のうち、XDR-TBは32例でXDR以外は189例であった。2013年11月現在の予後は、治癒107例(うち3例は治癒後再発再治療治癒、1例は転出-母国帰国後再入国時再発有再治療治癒)、死亡27例(うち10例は菌陰性化ののち死亡)、治療失敗入院中2例、菌陽性転出7例、菌陰性転出51例、治療中断10例、順調に治療中15例、不明2例であった(齋藤)。

(12)平成25年度の実施状況としては、大阪大学医学部府附属病院内に、健常人に対する臨床試験専用病棟を設置し、健常人を対象とするPETマイクロドーズ臨床試験及びマラリアワクチンのフェーズI医師主導試験の経験を結核ワクチン開発に応用する(朝野)。

(13)近畿中央胸部疾患センター(2006年1月~2012年12月)の多剤耐性結核症例55例の平均年齢は58.9歳で、男性37例、女性18例であった。初回治療例が26例、既治療例が29例であった。55例中、超多剤耐性結核(XDR-TB)例は20例であった。治癒は22例、排菌陰性化は17例、治療失敗は3例、結核死は9例、非結核死は2例、脱落は2例であった。治癒+排菌陰性化を治療成功とすると、全体の治療成功率は70.9%であったが、XDR-TB例での治療成功率は45%にとどまった。手術を行った例は14例あり治療成功率は92.9%であった(露口)。

(14)アンケートを作成(年齢、性別、罹病期間、薬剤感受性、手術歴、排菌陰性化の有無、入院年数)を行い関西圏の結核病棟を有する病院に依頼する。初年度は、近畿中央胸部疾患センター、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、結核予防会大阪病院に関して行った。

2000~2001年には45人を上回っていた大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターの多剤耐性結核排菌の患者数は徐々に減少し2011年には15人になった。

2004年から2009年まで大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターの新規MDR-TB患者数をみると13名から5名へ減少。XDR-TB患者数は、2004年が7名で、2008年は1名、2009年は0と減少した。

また、DNAワクチン投与対象患者は、大阪府結核予防会大阪病院では0であったが、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおいては結核診断から15年以上たったADL良好なXDR-TB患者を少なくとも1名確認出来た（松本）。

(15) 2004年～2013年（10月末現在）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40名であった。性別は、男性33名、女性7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9名、治療中断脱落1名、死亡7名（退院後の死亡は含まず）、転出（帰国含む）10名、治療継続8名（内3名は後に死亡、他の5名は東京病院で治療中あるいは観察中）、現在東京病院入院中1名、不明4名（計40名）であった（庄司）。

表7

平成25年度 研究進捗状況

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 (MCB) を分担研究者中島俊洋と共にAMBiS社に委託して作成した。

表8

平成25年度 研究進捗状況

2. これを元に、GMPレベルのpVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAを100mg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・毒性試験を行う計画を立案中。

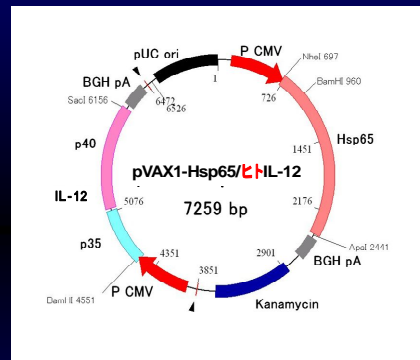


表9

平成25年度 研究進捗状況

3. pVAX/HSP65 DNA+ **マウス**IL-12 DNAを作成した。(70mgを作成した)

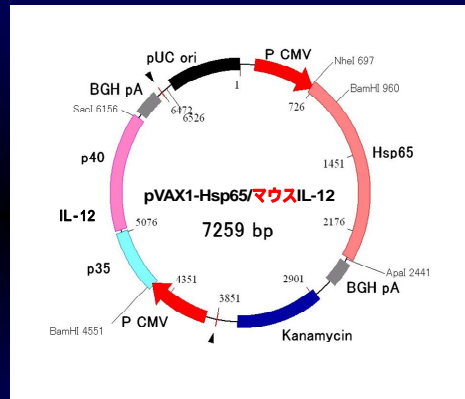


表10

平成25年度 研究進捗状況

4. マウスでこのワクチンの平成26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を実施中。井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と共同研究で実施中。

平成25年度 研究進捗状況

5. PMDA対面助言を計画中。
 中島俊洋、井上義一、岡田全司
 が打ち合わせ
 (会議:当臨床研究センター)
 2013年10月21日
 三上礼子、井上義一、岡田全司
 が打ち合わせ
 (会議:当臨床研究センター)
 2013年10月22日

用法検討 (DNAワクチン投与回数検討)

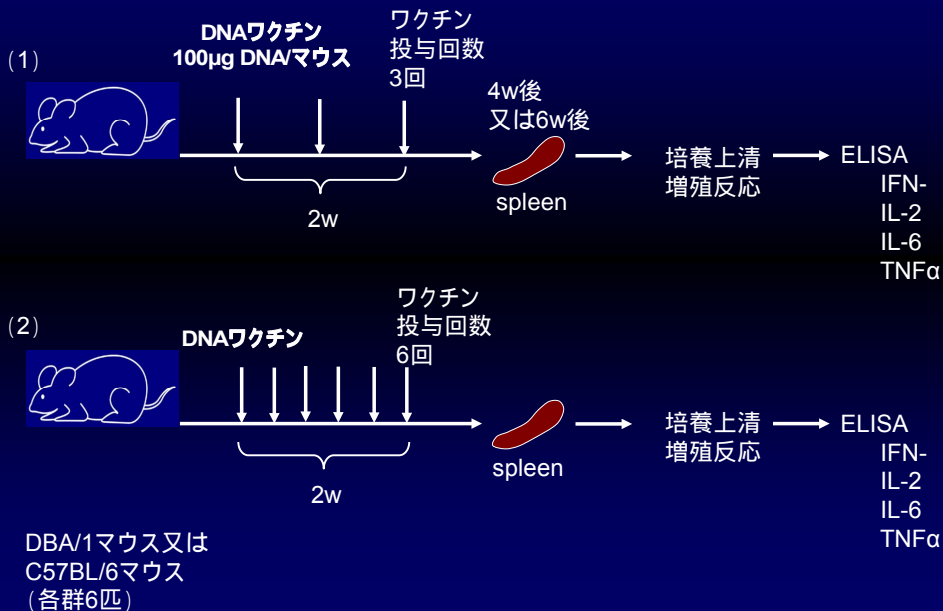
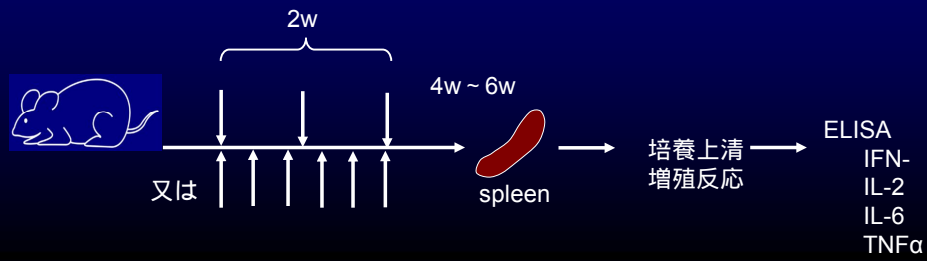


図2

用量検討(DNAワクチン投与量検討)

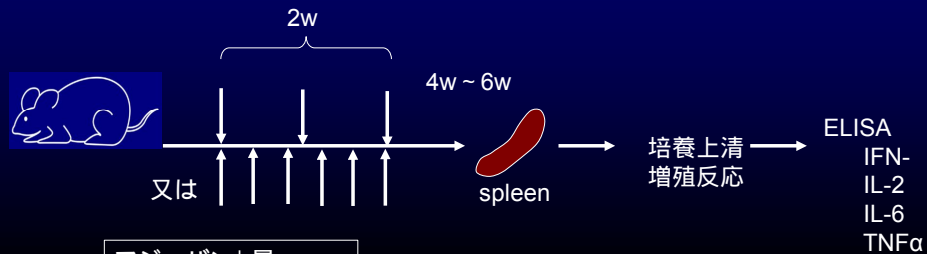


DNA投与量	0	μg/マウス
	25	
	100	
	280	

アジュバント量	0	mNAu
	100	
	400	
	1120	

図3

用量検討(アジュバント添加量)



アジュバント量

pDNA最適用量が280μgのとき:

70, 280, 1120 mNAu

pDNA最適用量が100μgのとき:

100, 400, 1600 mNAu

pDNA最適用量が25μgのとき:

100, 400, 1600 mNAu

図4

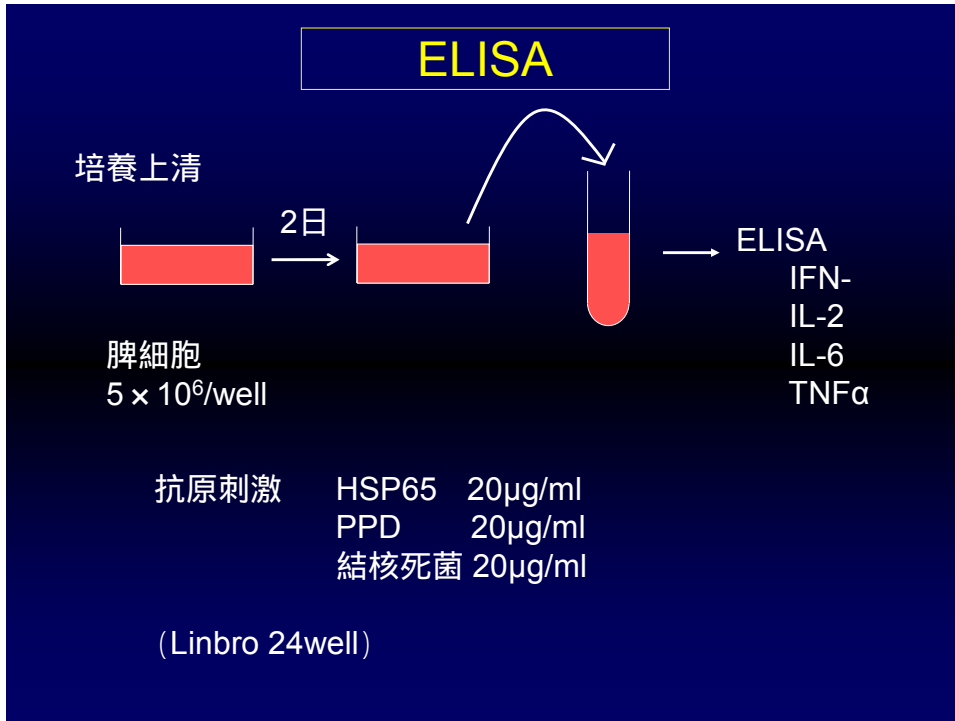


図5

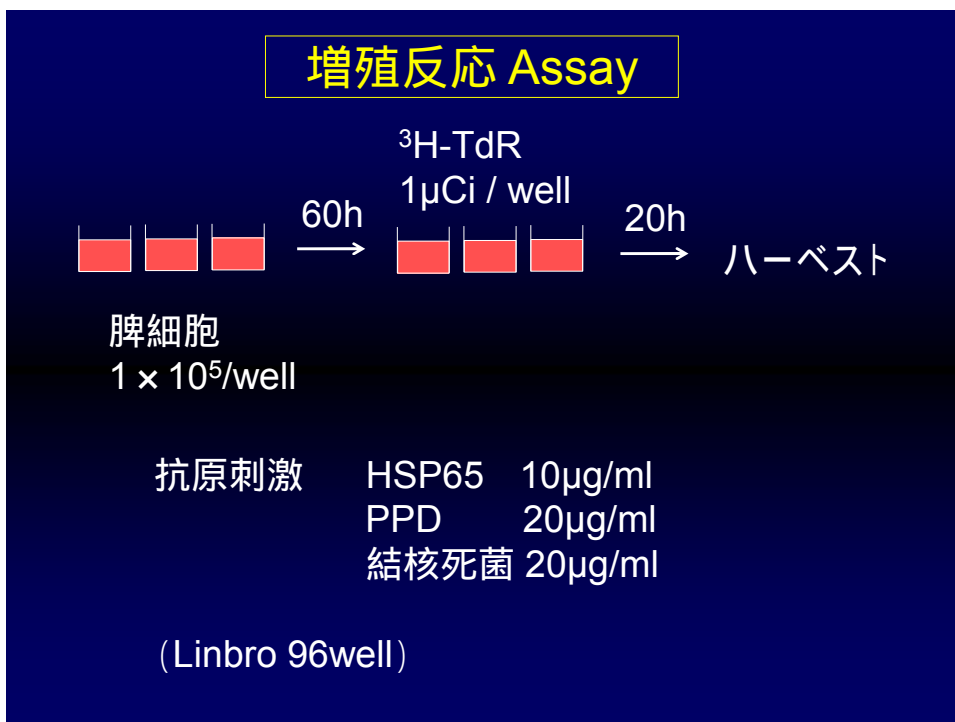


図6

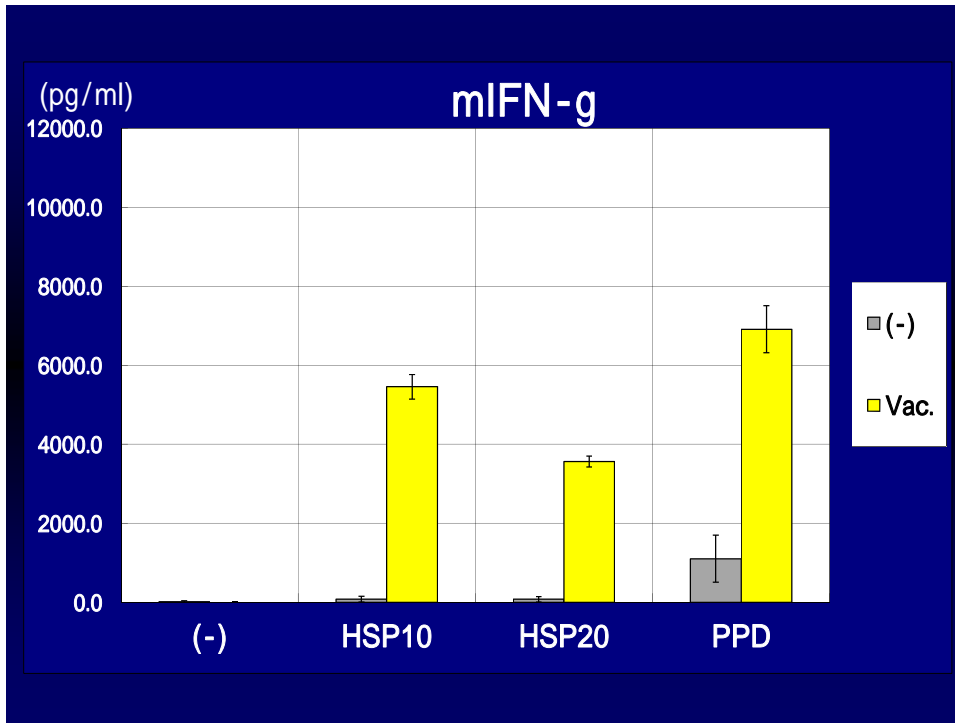


図 7

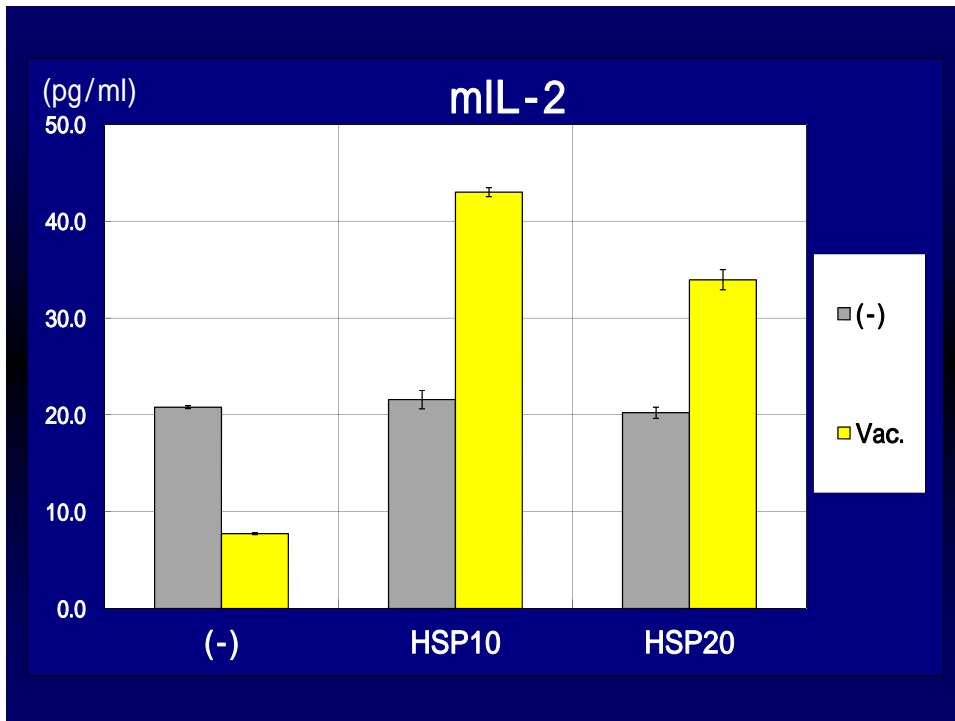


図 8

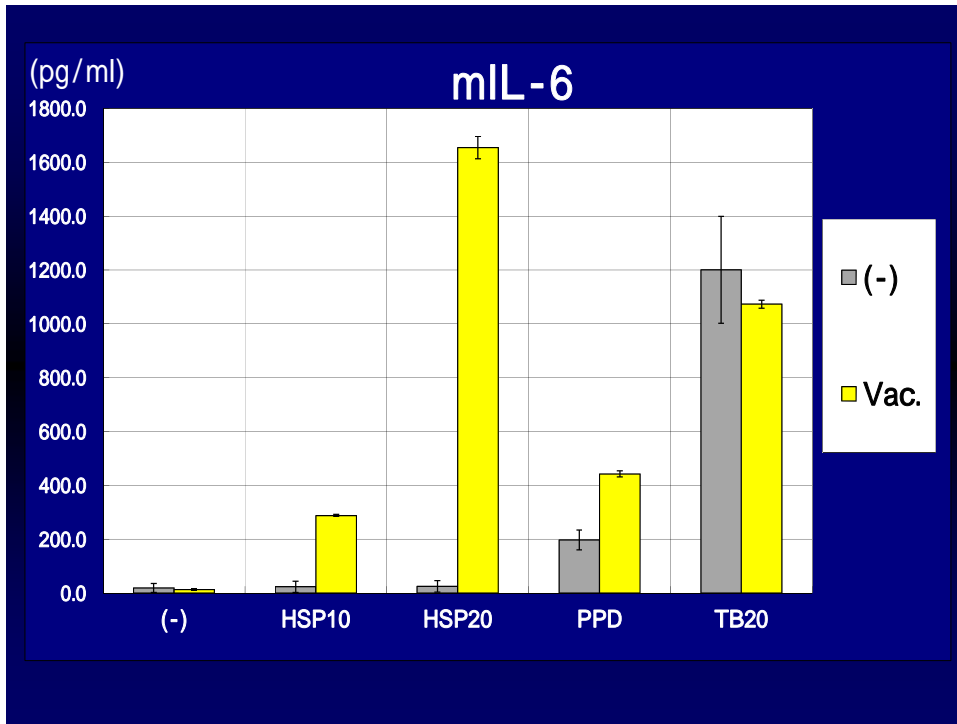


図 9

D. 考察

本研究では、DNAワクチンのワクチン成分としてプラスミドDNAを使用する。そのため、治験薬GMP製造に必要な大腸菌のマスターセルバンク(MCB)を作製し、特性及び品質試験を実施した結果、治験薬GMP製造用に適合することを示すデータを取得した。今後規制当局であるPMDAの薬事戦略相談において、その妥当性について確認を行う予定である。

作製したMCBを用いてプラスミドDNAのGMP製造を実施した。培養液あたりの収量については、今後最適化を行う事で増加できることを示唆するデータを得ており、製造工程の改善により収量を増加できる可能性があると考えられた。

GMP製造を実施したプラスミドDNAの品質確認データの取得を行った。規格設定項目、暫定規格値の設定については、複数バッチの品質確認データを根拠として進める予定である。今後数バッチから10バッチ程度のデータの取得を進め、結果を取り纏めた後に暫定規格値をPMDAと相談しながら設定していく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、複数のガイドラインを参考にして改定案の策定を完了した。その妥当性については、PMDAの薬事戦略相談を利用して確認を進めることが適切であると考えられた。

・用法用量試験

4~6w後の脾細胞を抗原Hsp65蛋白で *in vitro* 刺激し $IFN-\gamma$ 、IL-2、IL-6、TNF (T細胞免疫能) 産生をELISAで解析中。DNA量が25 μ gでも $IFN-\gamma$ 産生を増強しワクチン効果有効。したがって、当初の100 μ g DNAより少ない量でマウスで効果が認められたことより、ヒト(多剤耐性結核患者)に対しても少ないDNA量で効果が認められるかもしれない。

・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(図10)
- ・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(表12)を治療(世界で毎年50万人)(図10)

・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)

2. 第 相医師主導治験評価(図10)

結核ワクチン皮内投与

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(図11、12)

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、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

(図13、14)

(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13)

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

(RG-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による遺伝子導入はHVJのエンベロープと細胞膜の融合に依存している。培養細胞での実験で抗体による遺伝子発現の阻害のためには抗体とHVJ-EとのPre-incubationが必要であるが、これがなければ阻害されなかったことより、融合反応が抗体の吸着よりも非常に迅速に起こることが原因ではないかと推測される。したがってマウス実験でも明らかのように、中和抗体存在下であっても標的組織への直接投与法を行う限りは、遺伝子導入は阻害されないと考えられる。現在HVJ-Eはそれ自身が有する抗腫瘍作用により、癌治療のための臨床研究に用いられており、投与を受けた患者血清中には抗HV抗体が上昇することが分かっている。実際に、この患者ではHVJ-Eの第1サイクルの2週間で6回投与によりNK活性が上昇し、投与をやめると4週間以内にNK活性が減少した。次いで、第2サイクルの2週間6回投与でNK活性は再び上昇した。HVJ-Eに対する抗体が存在してもHVJ-Eの抗腫瘍免疫の活性化作用は影響を受けないことが臨床研究でも裏付けられている。

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(AMB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14)

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

1年半程度でRB承認取得、できれば治験届まで進め、3年目に第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1相治験を

もって7年で承認申請に進む計画である(図15)。

5. 予定される治験の流れ

- ・対象疾患はNH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(図16)。

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(図17)。

7. 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. 多剤耐性結核の治療成績は感受性結核に比べて不良であり、XDR-TBはさらに不良であった。手術を行えた例の予後は比較的良好であった(露口)。

9. 多剤耐性結核患者の調査;

NH、RFPに耐性を示す多剤耐性結核は治癒率が低く治癒したとしても再発が多いため、本人の負担だけでなく周囲への感染、医療費などを含めて長期にわたり社会に影響を与える疾患である。日本における多剤耐性結核の比率は、未治療患者では0.7%と高くはないが、既治療患者では9.8%であり、さらに多剤耐性結核中の超多剤耐性結核の比率は29%と世界の中でも特異な高さである。本検討の目的は、関東地区の郊外にあるNHO茨城東病院と都会にある複十字病院の多剤耐性結核の治療状況と予後を中心と

した状況を明らかにすることである。

感受性結核との症例対照での検討は行っていないが、複十字病院例の検討から明らかに、感受性結核より、若年者および外国人に多くみられている。若年者、外国人に耐性結核が多いことはサーベイランス上報告されており（結核、2012;87:783-787）、外国人結核の出身国としては中国が最多である。母国の薬剤耐性頻度は、中国では初回治療の6%、フィリピンでは4%、韓国では3%であり、中国からの多剤耐性結核が多いのは、十分に予測されるところである。

死亡を含む治療失敗7例、菌陽性転出が7例と排菌が停止しない例が見られており、隔離を行う場合は長期となることが予測される。新たな薬が今後登場する予定であるが、単一薬剤では治療成功へ導くことは不可能であり、新たな抗結核薬の開発だけではなく、本研究が取り組む多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの実用化が強く待たれるところである（齋藤）。

10. フェーズⅠを含めた早期探索的試験を実施するために解決すべき課題の内容は非常に多岐に渡った。病院全体での取り組みが必要であるが、解決すべき課題を整理して明確にする、到達目標や期限を設定する、スケジュール調整、進捗管理を行う、などの手順を確実に進めていくこ

とが肝要であり、試験が立案された当初から試験完了に至るまで一貫してその役割を担う部署の設置が必要である。契約関連業務、また、審査プロセスなどでは治験事務局及び病院管理課のサポートが必要不可欠であった。また、有害事象発生時の緊急対応や健康人被験者の電子カルテDの発行など、実際に運用するためには、関連部署との連携を十分に行っておくことが重要であることを経験してきた。今後の課題として、運用で改善すべき事項を反映した業務マニュアルの改訂、夜間対応看護師の継続した配置、病院からの配食などがあり、引き続き取り組んでいき、結核ワクチンの実施に向けたシミュレーションを継続し、実施に備える。このためには、今後も健常人対象臨床試験、早期探索的臨床試験に精通した人員の継続した育成が重要であり、今回関わった人員の経験を蓄積し、業務マニュアルなどに反映させて情報を共有し、今後の円滑な体制整備、試験の質や安全性の向上につなげる（朝野）。

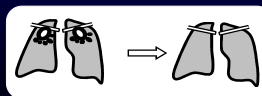
11. 多剤耐性結核は、臨床的に重要な疾患病態であるが、患者数は多くない。来年度から本研究の主眼である医師主導治験の第Ⅰ相が開始されるが、研究を成功に導くための適格症例の確保が重要である（庄司）。

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)



第1相医師主導治験評価

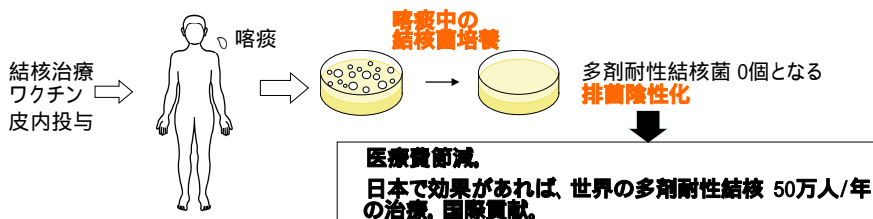


図10

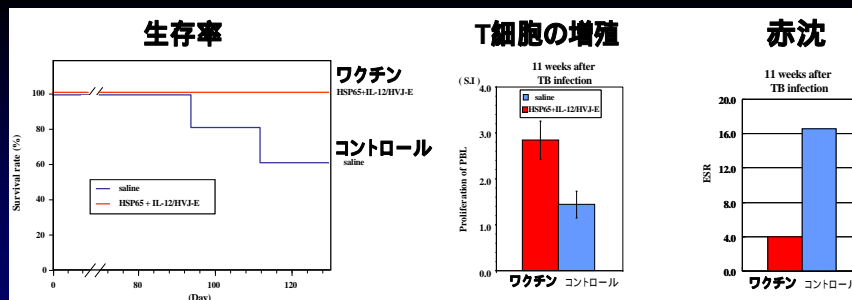
特色・独創的な点

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)



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)

図11

**結核感染したカニクイザルを用いた
HVJ-エンベロップ/Hsp65 +IL-12 DNAワクチンの治療効果**

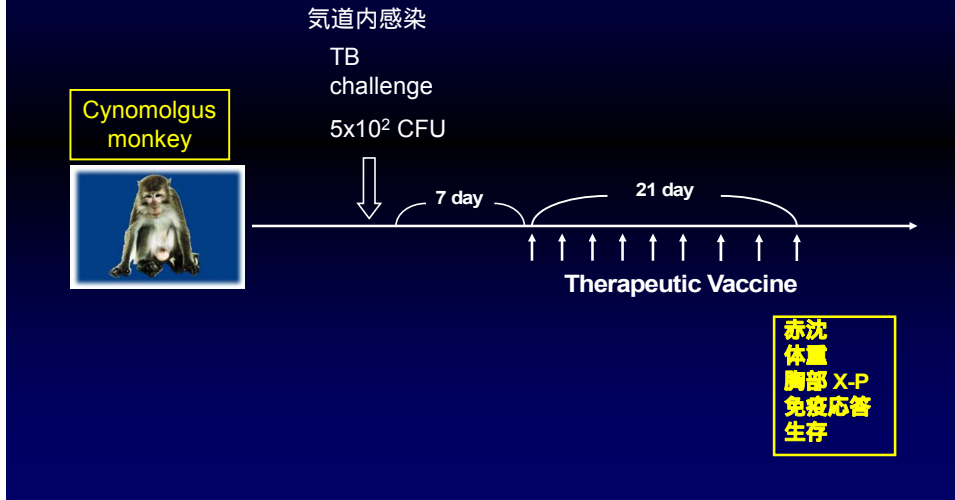


図 1 2

(方法)

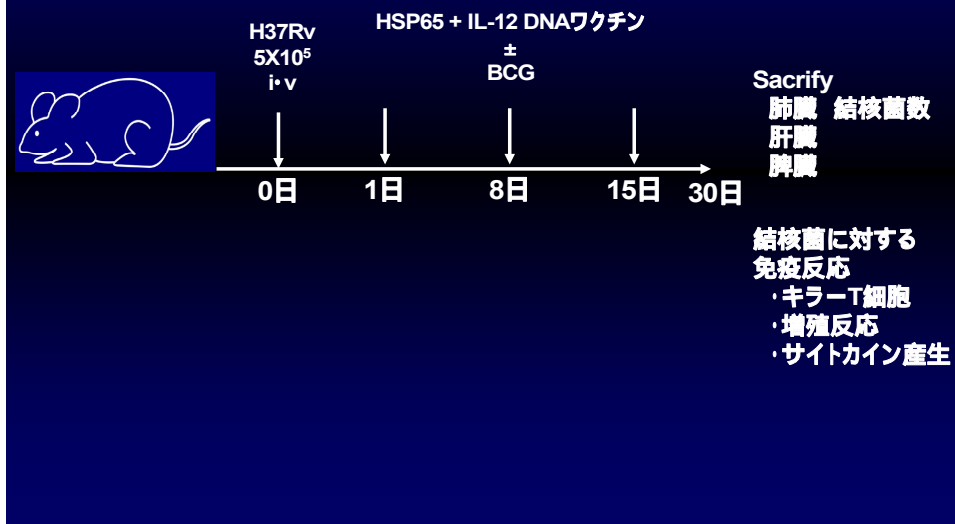


図 1 3

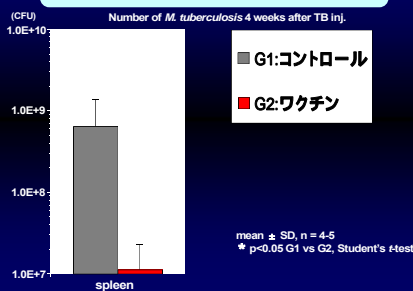
表1 2

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							

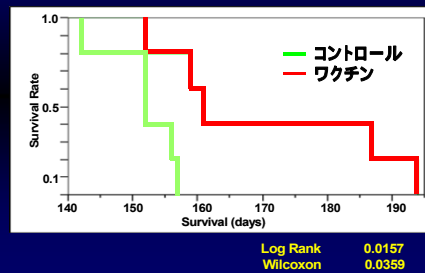
薬剤洗度単位 μg/ml
R・・・耐性
S・・・感受性
#・・・判定不能

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



超多剤耐性結核 (XDR-TB) 治療効果 (生存曲線)



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」

図 1 4

表 1 3

特色・独創的な点

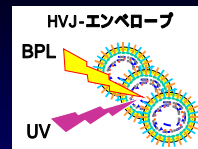
2. 医師主導治験の実施に向けた準備状況

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 1 4

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(ジェノメディア)が参加。薬事法に基づく承認取得までの**出口戦略**を明確にした研究

論文

1. Okada M, et al. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2013
2. Kita Y, et al. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2013.
3. Okada M, et al. Clin Dev Immunol. 2011
4. Kita Y, et al. Human Vaccines. 2011.
5. Okada M, et al. Human Vaccines. 2011.
6. Okada M, et al. Human Vaccines. 2010.
7. Okada M, et al. Vaccine. 2009.
8. Okada M, et al. Vaccine. 2007.
9. Yoshida S, et al. Vaccine. 2006.
10. Kita Y, et al. Vaccine. 2005.

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)

治験開始からの年度		平成25年度	平成26年度	平成27年度	平成28年度	平成29年度	平成30年度	平成31年度	平成32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	↔	↔						

図 15

予定される治験の流れ

- 主要評価項目**
安全性・忍容性
- 副次的項目**
・抗結核作用 (排菌減少)
・免疫反応
- 目標症例数**
3名から6名 / 用量あたり
2用量
- 実施施設**
国立病院機構 病院
3施設

多剤耐性結核患者 (INH耐性 + RFP耐性)

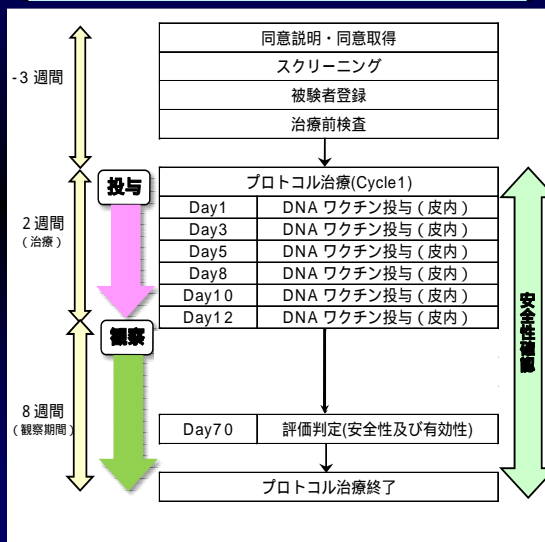


図 16

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。

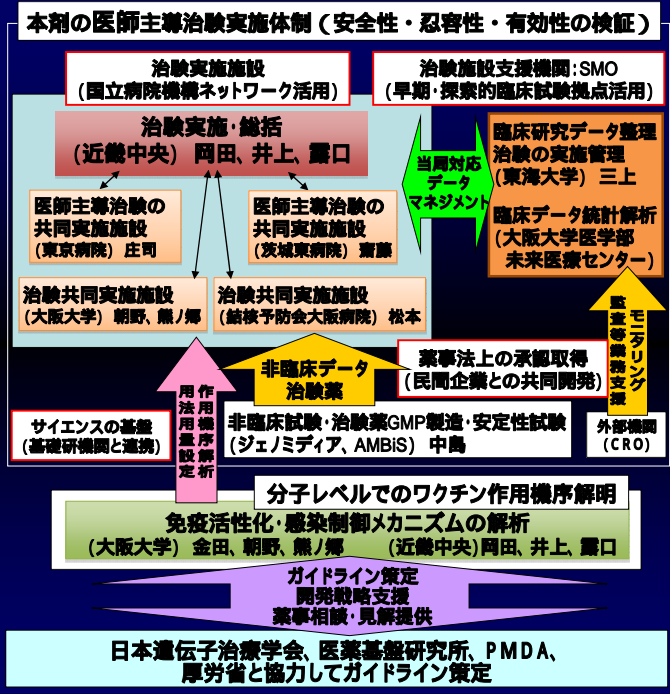


図 17

E. 結論

．ワクチンの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(MCB)をAMB 6社に委託して作製した(中島、岡田)
2. 多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの開発を進めるには、ワクチン成分であるプラスミドDNA(pVAX-IgHSP65-hIL12 DNA)を治験薬GMPに準拠して製造する必要がある。プラスミドDNAは大腸菌を用いてGMP製造を実施するため、安全性の確保と品質の安定化に必要なバンクシステムを作製した。国立遺伝研より大腸菌のDH5 株を入手し、動物由来成分を含まない培地で培養した後に、エレクトロポレーション法によりプラスミドDNAを導入し、形質転換を行った。導入後に大腸菌のクローニングを行って、クローン由来の大腸菌から小スケールでプラスミドDNAの確認を行って、目的のDNAと制限酵素地図が一致することを確認した。確認後に、種類の大腸菌クローンを選択してマスターセルバンクの作製を行った。マスターセルバンクの作製のため、選択した大腸菌のクローンを動物由来成分を含まない培地で拡大培養を実施し、計300本で構成されるバンクシステムを構築した(pVAX-IgHSP65-hIL12(DH5))。構築したバンクシステムについての品質試験の結果、全ての品質管理項目に適合であることを確認したため、製造を行ってプラスミドDNAの暫定規格設定に必要な品質確認データの取得を行った。プラスミドDNAの治験薬GMP製造と並行して、治験届までに必要な前臨床試験パッケージ案の作成を行った。既に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て、品質規格や試験デザインの相談を進めており、両者で合意した内容に従って治験届に必要なデータパッケージを作成した。今後、作製したバンクシステムを用いて治験薬GMPレベルで製造したプラスミドDNAを用いて、安全性試験などの非臨床試験データ、治験薬の品質規格の設定を進め、医師主導治験を実施する予定である。

3. これを元に、GMPレベルのpVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNAを100mg作製した(1バッチ)(岡田、中島、井上)。
4. これをサルに用いて本ワクチンの安全性試験・毒性試験を行う計画を立案中(中島、岡田)。

．用法用量設定

1. pVAX/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNAを70mg作製した(岡田)。
2. マウスで本ワクチンの平成26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と実施中(岡田)。
3. 用量検討(DNAワクチン投与量検討) C57BL/6マウスやDBA/1マウスにワクチンを25μg~280μgで投与した。4~6w後の脾細胞を抗原Hsp65蛋白でin vitro刺激しIFN-、IL-2 IL-6 TNF(T細胞免疫能)産生をELISAで解析中。DNA量が25μgでもIFN-産生を増強しワクチン効果有効(岡田、井上、中島)。
4. 用法検討(DNAワクチン投与回数検討)。治療ワクチン1回投与、3回投与、6回投与群で治療効果比較。

．GLP毒性試験・安全性試験

GLP毒性試験・安全性試験：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)。

．HVJ-エンベロープのアジュバント効果

HVJ-日是不活性化したセンダイウイルス粒子であるが、遺伝子や核酸を封入し膜融合作用により細胞質内への直接導入が可能である。しかし生体組織ではHVJ由来の蛋白質に対する免疫反応が惹起され、抗体による中和反応がおこることが考えられるが、遺伝子を封入しないHVJ-Eを連続投与しなかった場合のルシフェラーゼ遺伝子発現と比較して、遺伝子発現の抑制は見られず、連続投与が可能であることが明らかになった(金田)。

．PMDA対面助言

1. PMDA対面助言を計画中。中島、井上、岡田が打ち合わせ(会議：当臨床研究センター)

2013年10月21日 三上、井上、岡田が打ち合わせ(会議:当臨床研究センター) 2013年10月22日

2. PMDA対面助言: 毒性・薬効薬理試験項目設定中(中島、三上、井上、岡田)。非臨床試験、品質関連の今後の必要事項確認。臨床試験(第相、first in human試験)の計画について検討中。

・多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けた計画

1. 多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けた計画を行った。近畿中央: 3名 MDR-TBのうち2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: 不規則治療原因(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)
3. 平成25年11月18日 厚労科研「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」(岡田班)の班会議開催。

・研究代表者

臨床試験では、HSP65遺伝子及びIL-12遺伝子をヒトに投与することより、その発現の持続性、生体への影響等に関して: 下記の作製した(3)(4)のpVAX/HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチンを用いて、実験動物(マウス、サル等)で発現の持続性、生体への影響を含む安全性試験・毒性試験を行う計画を立案した。

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。

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AMB 社に委託して作製した。これを元に、GMPLレベルのpVAX/HSP65

DNA+ヒトIL-12 DNAを100ng作製した(1バッチ)これをサルに用いてこのワクチンの安全性試験・毒性試験を行う計画を立案中(岡田、中島、井上)。

pVAX/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNAを70ng作製した(岡田、井上)。

マウスでこのワクチンの平成26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験を井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と共同研究で実施中。

用量検討(DNAワクチン投与量検討) C57BL/6マウスやDBA/1マウスにワクチンを25 μ g~280 μ gで投与した。4~6w後の脾細胞を抗原Hsp65蛋白でin vitro刺激しFN-、IL-2、IL-6、TNF(T細胞免疫能)産生をELISAで解析中。DNA量が25 μ gでもFN-産生を増強しワクチン効果有効。

用法検討(DNAワクチン投与回数検討)。治療ワクチン1回投与、3回投与、6回投与群で治療効果比較。

PMDA対面助言を計画中。中島、井上、岡田が打ち合わせ(会議:当臨床研究センター) 2013年10月21日 三上、井上、岡田が打ち合わせ(会議:当臨床研究センター) 2013年10月22日

・研究分担者(中島俊洋)

ICHのガイドラインQ5Dに従ってGMPLレベルで治験薬製造用の大腸菌マスターセルバンク(MCB、pVAX-IgHSP65-hIL12(DH5))システムを構築した。

構築したマスターセルバンク(MCB)についてはICHのガイドラインQ5BとQ5Dに従って特性解析を実施し、適格性を実証した。

MCBを使用してプラスミドDNA(pVAX-IgHSP65-hIL12)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を取得した。

ICHのバイオ医薬のガイドラインや、WHOのDNAワクチンに関する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、試験骨子を設定した。

治験薬の規格及び安全性、長期安定性試験、毒性・薬効薬理試験に関してPMDAの薬事戦略相談

(個別相談、事前面談、対面助言)での相談結果に基づいて、必要な変更を行い、次回相談用の書類作成を実施した。

医薬品製造企業との提携相談実施中

・**研究分担者 金田安史**

抗体存在下でのHV 遺伝子発現の阻害をルシフェラーゼ遺伝子発現により検証した。その結果、抗HV 抗体が存在する個体においての遺伝子発現は全く阻害されなかった。

HVJ-Eによる遺伝子発現は中和抗体により影響されないため連続投与が可能である。

HVJ-Eによる細胞への遺伝子導入はHVエンベロープと細胞膜の融合に依存している。融合反応が抗体の吸着よりも非常に迅速に起こることが原因ではないかと推測。したがって中和抗体存在下であっても標的組織への直接投与を行う限りは、遺伝子導入は阻害されない。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ないため連続投与が可能である。

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)。

・**研究分担者(井上義一)**

マウスで本ワクチンの用法・用量試験の予備試験プロトコルを調整し、実験開始(井上、岡田、中島)。

東海大学(三上)、中島と岡田でPMDAへの対面助言の手順等考案。

・**研究分担者(露口一成)**

NHO近畿中央と近畿地区の多剤耐性結核の調査・検討開始。近畿中央MDR-TB 3名中2名XDR-TB。

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)。マウスで本ワクチンの平成26年度信頼性基準適合用試験のための用法用量試験の予備試験。

・**研究分担者(朝野和典)**

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)に向けて大阪大学医学部治験管理センター及び大阪大学未来医療センター治験管理センターで調整中。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)。

平成25年度中に健常人を対象とするPETマイクロドーズ臨床試験を完了し、現在マリアワク

チンに関するフェーズ 医師主導治験を継続して実施している。さらなる実施環境の整備として、来年度試験実施エリアを現行2床から10床に増床し新たな場所に設置予定である。残る課題の整備や次試験の円滑な実施に向けて取り組みながら結核ワクチンの医師主導治験の実施につなげる準備を継続する(朝野)。

・**研究分担者(庄司俊輔)**

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。

東京病院・関東地区の結核診療施設における多剤耐性結核患者の調査・医師主導治験に向けて検討開始。

初年度の平成25年度の研究では、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)治療の内容などを調査した。

2004年から2013年(10月末現在)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40名であった。

2004年から2013年、NHO東京病院の多剤耐性結核患者は40名。男性33名、女性7名。治療完了9名、治療中断脱落1名、死亡7名、転出(帰国含む)10名、治療継続8名(3名は後に死亡)、現在入院中1名、不明4名。これにより、実際にワクチンを投与する際の患者のエントリー状況が推定できる。

・**研究分担者(齋藤武文)**

茨城東病院・関東地区の結核診療施設における多剤耐性結核患者の調査と医師主導治験に向けた検討。

関東地区の2病院の多剤耐性結核の現状をまとめた。多くは男性、東京では外国人、特に中国、韓国人が多く、若い年齢層に多い。郡部では薬剤感受性結核と同様な人種、性、年齢構成。少なくとも日本人においては最近の感染、発症であり、多くは不規則治療によると考えられた。

関東地区(NHO茨城東病院、複十字病院)の多剤耐性結核症例状況を後ろ向きにカルテ調査した。2002年1月より2013年10月において、上記の病院において231例の多剤耐性結核症例が診療された。治癒した例は約半数であり、多剤耐性結

核の治療は難渋していた。

多剤耐性結核の治療上、新たな抗結核薬の開発だけでなく、本研究が取り組む多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの実用化が強く待たれるところである。

・研究分担者（三上礼子）

岡田、井上とPMDAへの対面助言の手順等考案。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。第 相臨床治験の計画を検討中である。

・研究分担者（松本智成）

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・検討開始。

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、庄司、齋藤、松本、熊ノ郷）。近畿地区における多剤耐性結核患者の動向、人数調査。

・研究分担者（熊ノ郷博）

マウスで本ワクチンの用法・用量予備試験実施。近畿地区の結核診療施設を統括する立場上、これらの診療施設（近畿中央病院、刀根山病院、大阪府立呼吸器アレルギー医療センター等）での多剤耐性結核患者の調査・検討開始。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）。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masaji Okada, Yoko Kita, Toshihiro Nakajima, Satoshi Hashimoto, Hitoshi Nakatani, Shino Nishimatsu, Yasuko Nishida, Noriko Kanamaru, Yasuhumi Kaneda, Yasushi Takamori, David Murray, Esterlina V. Tan, Marjorie L. Cang, Paul Saunderson, E. C. De la Cruz.: The study of novel DNA vaccines against tuberculosis: Induction of pathogen-specific CTL in the mouse and monkey models of tuberculosis. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 9(3):515-25. 2013.

2. Yoko Kita, Satoshi Hashimoto, Toshihiro Nakajima, Hitoshi Nakatani, Shino Nishimatsu, Yasuko Nishida, Noriko Kanamaru, Yasuhumi Kaneda, Yasushi Takamori, David Murray, Esterlina V. Tan, Marjorie L. Cang, Paul Saunderson, E. C. De la Cruz, Masaji Okada.: Novel therapeutic vaccines [HSP65 + IL-12) DNA-, granulysin- and Ksp37- vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 9(3):526-33. 2013.
3. 岡田全司 結核におけるワクチンへの期待 “次世代型感染症ワクチン”. 最新医学 出版中
4. 岡田全司 (1/6) 結核予防 (DNA) ワクチンの開発状況 予防接種 Q&A 改訂 3版. 「小児内科」「小児外科」編集委員会共編、東京医学社。小児内科 45巻増刊号 281-283. 2013.
5. 岡田全司: 結核の免疫反応「免疫学的機序からみた呼吸器疾患」日本胸部臨床 72(12): 1336-45. 2013.
6. 岡田全司: はじめに (序論) 「結核 -古くて新しい感染症 -」最新医学 .68(11):2437-2438. 2013.
7. 岡田全司 (1/3): 座談会: 結核の現状・問題点と最新の知見。最新医学 . 68(11):2439-2450. 2013.
8. 喜多洋子、岡田全司.: ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた新規結核予防ワクチン開発及び臨床応用に向けて「結核 -古くて新しい感染症 -」最新医学 . 68(11):2479-2487. 2013.
9. 岡田全司 (3/3). 多剤耐性結核治療ワクチンと T 細胞免疫 最新医学 . 68(11):2488-2495. 2013.

2. 学会発表

1. Okada M, Nakajima T, Kaneda Y, Tan E.V, Murray D, Inoue Y, Tomono K, Kumano A, Tuyuguchi K, Shoji S, Mikami R, Matsumoto T, Saito T.: A novel therapeutic vaccine against tuberculosis in the cynomolgus monkey model and clinical trial.

7th Vaccine & ISV Congress. p.40-41.
Sitges, Barcelona, Spain. October 27-29,
2013. Oral presentation in Breakout Session,
Japanese Society of Vaccine (JSV) joint
session.

2. Okada M, Kita Y, Hashimoto S, Nishimatsu S,
Nakatani H, Kioka Y, Nakajima T, Kaneda Y,
Tan E V.: Novel therapeutic vaccines against
tuberculosis and their synergistic efficacy.
p.156. 44th Union World Conference on Lung
Health. Paris, France. October 30-
November 3, 2013.

岡田全司、吉田栄人、中島俊洋、松本真
「結核ワクチン HVJ-liposome/Hsp65
DNA+ IL-12 DNA」

整理番号：MED-A0504

受付番号：50501768464

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
2005年

岡田全司、高森靖、安井正文

「感染症治療剤 15K granulysin」

特許取得 2008年 7月 4日

特許 4149713号

2008年

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)

2012年

H. 知的財産権の出願・登録状 況 (予定を含む)

1. 特許取得

岡田全司、高森靖、小川一行、永田欽也

「感染症治療剤 15K granulysin」 WO

03/070268 A1

2002年

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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) 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 ワクチンの開発を進めるには、ワクチン成分であるプラスミド DNA (pVAX-IgHSP65-hIL12 DNA) を治験薬 GMP に準拠して製造する必要がある。プラスミド DNA は大腸菌を用いて GMP 製造を実施するため、安全性の確保と品質の安定化に必要なバンクシステムを作成した。国立遺伝研より大腸菌の DH5 株を入手し、動物由来成分を含まない培地で培養した後に、エレクトロポレーション法によりプラスミド DNA を導入し、形質転換を行った。導入後に大腸菌のクローニングを行って、クローン由来の大腸菌から小規模でプラスミド DNA の確認を行って、目的の DNA と制限酵素地図が一致することを確認した。確認後に、1種類の大腸菌クローンを選択してマスターセルバンクの作成を行った。マスターセルバンクの作成のため、選択した大腸菌のクローンを動物由来成分を含まない培地で拡大培養を実施し、計 300 本で構成されるバンクシステムを構築した (pVAX-IgHSP65-hIL12(DH5))。構築したバンクシステムについての品質試験の結果、全ての品質管理項目に適合であることを確認したため、製造を行ってプラスミド DNA の暫定規格設定に必要な品質確認データの取得を行った。プラスミド DNA の治験薬 GMP 製造と並行して、治験届までに必要な前臨床試験パッケージ案の作成を行った。既に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て、品質規格や試験デザインの相談を進めており、両者で合意した内容に従って治験届に必要なデータパッケージを作成した。今後、作成したバンクシステムを用いて治験薬 GMP レベルで製造したプラスミド DNA を用いて、安全性試験などの非臨床試験データ、治験薬の品質規格の設定を進め、医師主導治験を実施する予定である。

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、純国産で革新的な多剤耐性結核に対する治療用ワクチン (pVAX-IgHSP65-hIL12 DNA /HVJ-E) の開発を進めており、ヒト結核に最も近いとされているカニクイザルを用いた動物モデルで治療効果と予

防効果を評価した。その結果、平成 24 年度までに投与を行ったカニクイザルにおいて新規治療用 DNA ワクチンによる治療効果、及び予防効果を確認したため、薬事法上の承認申請を目的とする医師主導治験を国内優先で実施することとなった。

そこで平成 25 年度の研究では、純国産の治療用 DNA ワクチンを用いて国内で医師主導治験を実施するために必要な治験薬 GMP 製造、非臨床試験データ（毒性試験、薬効薬理試験）を取得することを目的として研究開発を行った。

また、国内で製造を実施する新規の治療用 DNA ワクチンにより治験を実施するのは初めてのケースになるため、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、薬事戦略相談を実施し、国内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。

これらの研究成果により、国内と海外とのドラッグ・ラグの原因の一つである、欧米先行の新規ワクチンの開発の国内回帰へも目的として研究を実施した。

B . 研究方法

- 1) 治験薬製造用バンクシステムの構築
 - ・ 国立遺伝研究所から入手した大腸菌 DH5 株を用いて形質転換を行ってマスターセルバンク作成に必要な種細胞の調製を行った。生物由来原料の使用を最低限とするため、植物由来成分の培養液を用いて培養を行って形質転換用の大腸菌を培養し、遺伝子導入用の大腸菌のストック細胞を調製した。
 - ・ 大腸菌の形質転換を行うための遺伝子導入は、プラスミド DNA による形質転換で通常使用されている薬剤添加による化学的な方法ではなく、エレクトロポレーション法によ

る物理的な方法で実施した。その結果、目的のプラスミド DNA である pVAX1-IgHSP65-hIL12 で形質転換された大腸菌のクローンを得た。

- ・ 得られた大腸菌のクローンを小スケールで培養し、目的のプラスミド DNA である pVAX1-IgHSP65-hIL12 の導入を確認した。培養した大腸菌より抽出したプラスミド DNA を用いて制限酵素地図を作成し、理論サイズとの一致を確認した後に、マスターセルバンク作成用の大腸菌クローンを選択した。
 - ・ バンクシステム作成用に選択した大腸菌クローン使用し、生物由来原料を含まない培養液で拡大培養を行った後に、グリセロールを最終濃度 15% になるよう添加し、バンク作成用のチューブに分注した。
 - ・ 分注後にマイナス 80 度で凍結して計 300 本のマスターセルバンク（pVAX1-IgHSP65-hIL12 /DH5）の作成を完了した。
- 2) 構築したバンクシステムの特性確認
 - ・ 作成したマスターセルバンクについては、品質試験を実施してセルバンクとして適切な品質であることを確認した。
 - ・ ICH のガイドラインである Q5D「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」(医薬審 第 873 号、平成 12 年 7 月 14 日付) に記載された内容に従って試験項目の選択を行った。

表 1. 構築したマスターセルバンク(MCB)システムの品質検査項目について

試験	項目	規格
宿主の同定試験	薬剤感受性試験	カナマイシン耐性
	栄養要求性試験	栄養要求性なし
	グラム染色試験	グラム陰性
混入否定試験	コロニー形態試験	大腸菌以外の形態のコロニーなし
	ファージ否定試験	ファージ陰性
プラスミド確認	制限酵素地図試験	理論サイズと一致
生存率試験	生菌数試験	10 ⁷ 大腸菌 /mL以上

・本研究で作成したマスターセルバンクは、大腸菌のバンクであるため、ICHのガイドラインであるQ5Dの微生物細胞に関する記載内容に従って、試験項目を設定した。

・具体的には、**表 1** に示す宿主の同定試験、混入否定試験、プラスミド確認、生存率試験について実施し、試験としては**表 1** に示す7項目(薬剤感受性試験、栄養要求性試験、グラム染色試験、コロニー形態試験、ファージ否定試験、制限酵素地図試験、生菌数試験)の試験を実施して、作成したセルバンクシステムの特性解析及び品質評価を行った。

3) 構築したバンクシステムによるプラスミド DNA の製造

・作成したマスターセルバンク(MCB)を用いて GMP 製造を実施し、ワクチン成分となる目的のプラスミド DNA (pVAX1- IgHSP65-hIL12) を製造出来る事を確認した。

・ 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、濃度調整と滅菌ろ過を行ったプラスミド DNA 溶液をバイアルに分注・打栓して製剤とした。

4) 製造したプラスミド DNA の品質確認試験

・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」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 2 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 2**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選択した。

5) DNA ワクチンの非臨床試験のデータパッケージ案の作成

- ・ 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)]及び 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。

表2. 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
	宿主RNA	適合	電気泳動法
	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
不溶性異物	不溶性異物試験	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)

6) 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

25年5月31日に、事前面談を平25年6月20日にそれぞれ実施し、開発の方向性の妥当性について相談を行った。更に、アジュバント成分であるHVJ-Eについては、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相談を実施した。

- ・具体的にはアジュバント成分である HVJ-E のマスターセルバンクと治験薬の品質管理項目、工程管理項目案の設定を行い、PMDA との薬事戦略相談（事前面談）を実施し、ガイドライン策定に向けた準備を進めた。
- ・更に、治験薬の有効期間の設定に必要な長期安定性試験に関して試験計画書の策定を行い、長期安定性試験の開始準備を進めた。
- ・更に、非臨床試験（安全性試験、薬効薬理試験）についても、実施する試験項目、試験デザインの内容について、「「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）を参照して原案を策定し、PMDA との薬事戦略相談を実施したところ、WHO の DNA ワクチンのガイドラインも参考にして検討を進めるよう指摘を受けたため、それに従って変更案の策定を行った。
- ・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、薬事法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。
- ・更に、所在地である産業技術総合研究所・関西センターの医工学応用実験倫理委員会、社外委員をメンバーとする社内倫理委員会へ報告する。

C . 研究結果

- 1) 治験薬製造用バンクシステムの構築
 - ・治験薬 GMP 製造に使用する大腸菌については、起源・由来を明確にする必要があるため、大腸菌株 DH5 RDB108（コード番号：ME9088）を国立遺伝研究所から入手した。その大腸菌株（DH5 株）を生物由来成分を含まない LB 培地を用いて小スケールで培養し、形質転換用使用する種菌ストックを作成した。
 - ・形質転換用の種菌ストックを生物由来成分を含まない LB 培地で培養し、菌体を回収・洗浄し、生物由来成分を含まない形質転換用の培地に懸

（倫理面への配慮）

濁後にマイナス 80 度で凍結したストックを作成し、コンピテント細胞として使用した。

- ・コンピテントセル化した大腸菌株 DH5 RDB108 を、解凍して目的のプラスミド DNA (pVAX1- IgHSP65-hIL12) を添加し、電気パルス法 (エレクトロポレーション) により導入を行った。プラスミド DNA を導入した後に、生物由来成分を含まない LB 培地で前培養を行ってから、生物由来成分を含まない LB 寒天培地 (カナマイシン含有) に菌液を添加して一晩培養してからクローニングを行った。通常の形質転換では、化学物質によるプラスミド DNA 導入が実施されるが、治験薬 GMP 製造に使用することを考慮して物理的な導入方法である電気パルス法 (エレクトロポレーション) を選択した。
- ・その結果、プラスミド DNA の導入により、カナマイシン耐性となった大腸菌が認められたため、導入に成功したと判断し、単一のコロニーを採取して目的のプラスミド DNA が導入されているかを確認したところ、目的のプラスミド DNA (pVAX1- IgHSP65-hIL12) と制限酵素地図が一致するプラスミド DNA の導入を認めた。そのため、採取した大腸菌のクローンを用いてマスターセルバンクの作成を行った。
- ・マスターセルバンクを作成するため、上記のようにして採取した大腸菌クローンに由来する大腸菌を、生物

由来原料を含まない植物由来成分を使用して LB 培地内で拡大培養を行った。

- ・目的の大腸菌が、適切な細胞濃度 (対数増殖期) に達するまで培養を継続した後に培養を停止し、グリセロールを最終濃度 15% になるよう添加し、バンク作成用チューブ 300 本に無菌的に分注し、マイナス 80 度で凍結してのマスターセルバンク (pVAX1- IgHSP65-hIL12/DH5) の作成を完了した (図 1、図 2)
 - ・マスターセルバンク (pVAX1- IgHSP65-hIL12 / DH5) については、上記のようにして作成した調製記録を全て確認し、保管・管理することとした。また、セルバンクのチューブには、プラスミド DNA の名称と使用した大腸菌の菌株、及び調製日を識別できるようにする必要があるので、図 2 に示すように名称と調製日完了を記入して、GMP 製造施設内に設置されたマイナス 80 度の冷凍庫内で保管管理を行う事とした。
- 2) 構築したバンクシステムの特性確認
- ・上記のようにして治験薬 GMP 製造用に大腸菌のマスターセルバンクを作成した。実際に製造用に使用するには、ガイドラインに従ってセルバンクの特性及び品質を実証するための試験を実施し、製造用に適したレベルのバンクであることを確認した上で使用する必要がある。
 - ・医薬品製造用に使用するセルバンクについては、ICH のガイドラインで

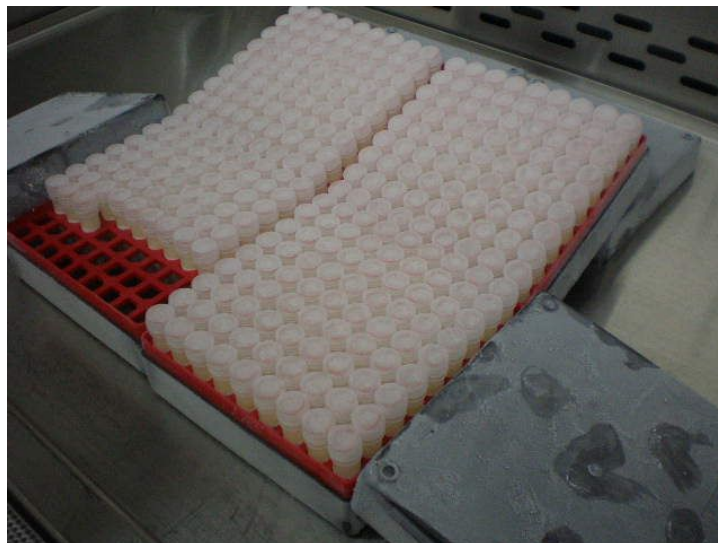
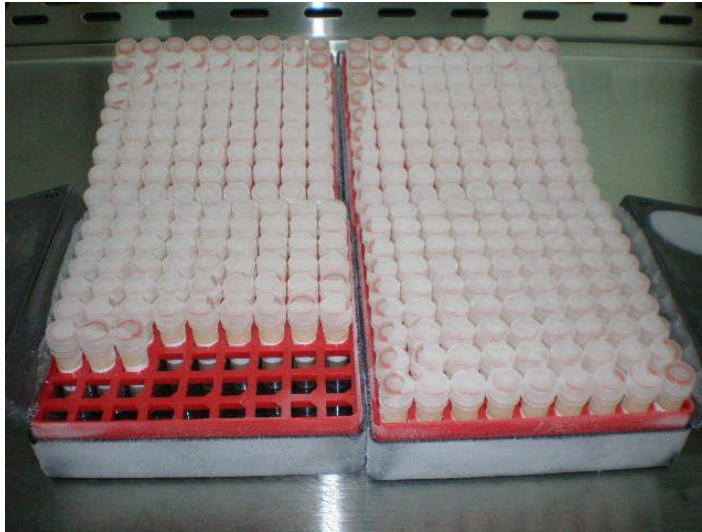


図1. 作成したマスターセルバンク

治験薬 GMP 製造に必要なバンクシステムを構築するため、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成した。

ある Q5D「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」（医薬審第 873号、平成 12年 7月 14日付）に記載された内容に従って試験データを取得する必要があるため、先ず試験項目の選定を行った。

- ・ガイドラインには、培養細胞株を使用した場合と、細菌株を使用した場合の両者について記載があり、それぞれに適した試験を実施することとされている。本研究において、プラスミド DNAを治験薬 GMPレベルで製造するために作成したマスターセルバンクは、大腸菌のセルバン

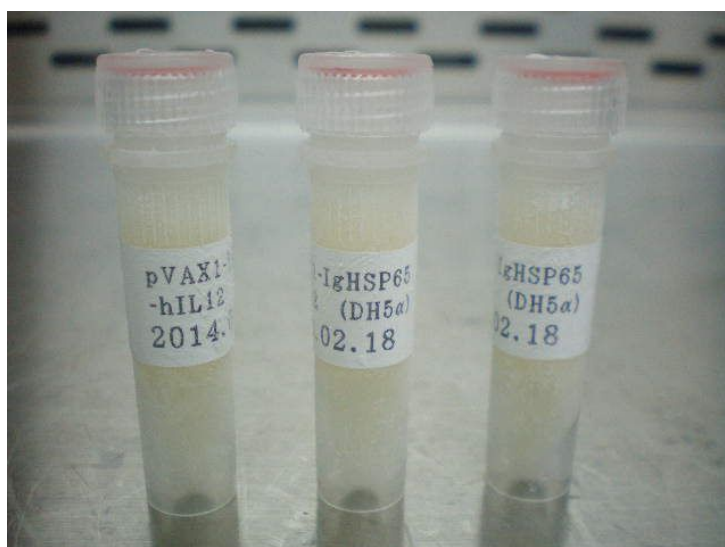
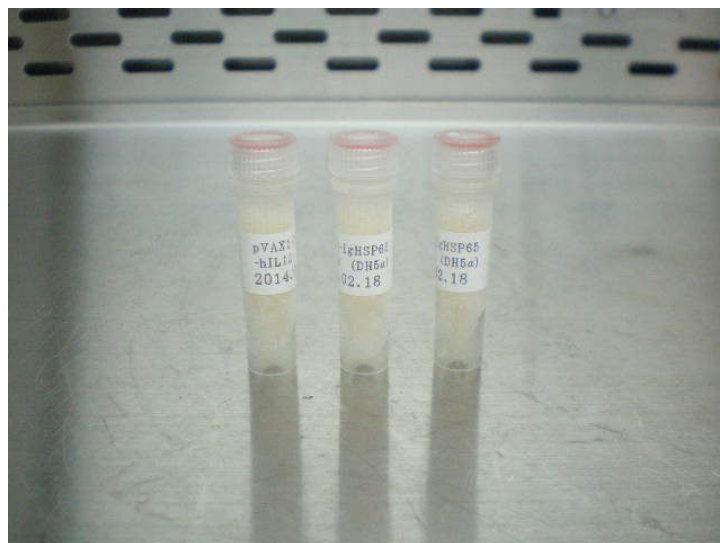


図2 マスターセルバンクの外観とラベル

マスターセルバンクの各チューブに上記ようにラベルを貼付した。

クであるため、ICHのQ5Dガイドラインに記載された微生物細胞のバンクのための試験項目を設定し、特性及び品質に関する検査を実施した(表1)。

- ・そこで、関連するガイドラインに記載された内容に従って、宿主である大腸菌を同定するための試験、他の

微生物の混入を否定する試験、導入したプラスミドDNAを確認する試験、大腸菌の生存率(生菌数)を測定する試験を、それぞれ実施することとした(表1)。

- ・先ず、薬剤感受性試験を実施し、アンピシリン感受性、カナマイシン耐性であることを確認した。大腸菌を

使用した組換え実験などでは通常アンピシリン耐性遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を使用することが多いが、臨床用に使用するにはアレルギー反応のリスクがあるためアンピシリンの使用は望ましくないとされている。そのため、本研究で使用するプラスミド DNA は、アンピシリン耐性遺伝子の代わりにカナマイシン耐性遺伝子を組み込んでいる。従って、試験の結果得られた薬剤耐性プロファイルは、目的の表現型を示しているものと判断された。

- ・次に、栄養要求性試験、グラム染色試験、コロニー形態試験を実施し、使用した大腸菌株である DH5 のみが認められ、他の微生物の混入は認められない事を確認した。その結果、予測された栄養要求性、グラム染色パターン（グラム染色陰性）元の DH5 と同じ形態のコロニーのみが認められることが明らかとなり、使用した大腸菌株である DH5 以外の細菌の混入は否定された。
- ・更にプレート法によりファージ否定試験を実施したところ、ファージの混入を示すプラーク形成が認められなかったことからファージの混入についても否定できると判断された。
- ・続いて作成したセルバンクの大腸菌の懸濁液から直接プラスミド DNA を抽出し、制限酵素地図試験を実施したところ、目的とするプラスミド DNA と同一の制限酵素切断パター

ンが確認されたことから、セルバンクの大腸菌は目的とするプラスミド DNA を保持していることが確認された。

- ・最後に、治験薬 GMP 製造を実施するのに十分な大腸菌数を含むかを確認するため生菌数試験を実施した。その結果、作成したセルバンクシステムは 1mLあたり 1000万個以上の大腸菌を含むことが明らかとなり、治験薬製造には十分な菌数を含むものと判断された。
- ・以上のようにして、作成した大腸菌のセルバンクに関して特性解析及び品質評価を行った結果、全ての試験で適合する結果を得ることが出来たため、作成したセルバンクは治験薬 GMP 製造に適したバンクである事が実証された。

3) 構築したバンクシステムによるプラスミド DNA の製造

- ・上記のように作成したマスターセルバンク (MCB) の特性及び品質の解析を完了したため、実際に作成したセルバンクを用いて目的のプラスミド DNA の GMP 製造を実施した。本研究で治療用ワクチンの成分となるプラスミド DNA (pVAX1-IgHSP65-hIL12) を GMPパイロットプラント内で製造を実施した。治験薬 GMP 製造を想定した製造であるため、生物由来原料を含まない原材料を使用して培養、菌体回収、菌体破碎、粗精製液調製、カラムクロマトグラフィーによる精製、バッファ置換、無菌ろ過、濃度調整の各工程を経て、最終的に遮光バイアル

へ充填し、シリコンコートしたゴム栓を打栓した。

- ・最終的には、冷蔵でも保存安定性が高い凍結乾燥製剤を検討する予定であるが、現時点では液剤での凍結保存とした。

- ・GMP 製造を実施した結果、大腸菌の培養条件や精製条件の最適化することで更に収量を向上できることが示唆されたため、更に GMP 製造を行って、非臨床試験、安定性試験のための製剤製造を実施して最適化を進め、臨床試験用の治験薬を製造する予定である。

4) 製造したプラスミド DNA の品質確認試験

- ・上記のようにして製造したプラスミド DNA の品質を確認し、暫定規格設定の根拠となるデータを取得するための品質確認試験を実施した。
- ・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)を選択して、試験項目の設定を行った。
- ・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 2**に記載の通り試験項目、試験方法で暫定規格を設定する方向性で進める事とした。

- ・**表 2**に記載した試験のうち、不溶性微粒子試験、不溶性異物試験、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手試験を実施した。

- ・一方、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、の各試験については、科学的根拠に基づいて社内で試験手順書の策定を行い、試験データの取得を行った。

- ・これらの試験データと、ガイドラインなどの記載内容に基づいて純国産の治験薬として製造するプラスミド DNA の暫定基準を設定し、治験薬の製造と品質管理試験を実施する。

5) 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 を成分とする治療用ワクチンについては、国内で初めての治験実施となるため、国内のガイドライン策定に貢献することも考慮して開発を進める必要がある。そのため、平成 25年度は、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。
- ・ プラスミド DNA を用いた医薬品の開発は遺伝子治療の範疇になることが想定されたため、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を行った結果、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。
 - ・ 更に、プラスミド DNA の製造については、上記のように大腸菌で作成したマスターセルバンクを使用することから、組み換えたん白質など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を対象としたガイドラインである、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)についても、適宜参考にして非臨床試験の内容を検討する事とした。
 - ・ 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、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と、単回投与で実施する安全性薬理試験(循環器系、呼吸器系)の、2つの試験を実施することが最低限必要であると考えられた。その概要を表 3 と表 4 に示す。今後策定したデザイン案の妥当性について、規制当局である PMDA の薬事戦略相談で相談を行って、最終的に実施する非臨床試験の内容を最終化する予定である。
- 6) 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。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

表3. カニクイザルを用いた毒性試験1(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	pVAX1 - IgHSP65 - hIL12+ HVJ-E
投与方法 投与期間 観察期間	投与経路: 皮内投与 投与期間: 2週間 観察期間: 投与期間 2週間 + 回復期間 2週間
群構成	投与群: で 4群 (対照群 + 3用量) 回復群: で 2群 (対照群 + 1用量)
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

実施するには規制当局である PMDA と、治験開始前に密接に相談を行い、開発内容や方向性について合意形成を進める必要がある。

- ・ PMDA では薬事戦略相談の制度があり、医師主導治験の実施内容や、新規医薬品開発に関する個別面談、事前相談、対面助言を実施している。本研究で開発するプラスミド DNA をワクチン成分とする治療用 DNA ワクチンについては、新規性が高いため、薬事戦略相談の制度を利用し、規制当局と開発内容に関して密接に事前相談しながら医師主導治験の準備を進めることが重要である

と考えられた。

- ・ そこで、プラスミド DNA の規格及び安全性と、治験デザインの骨子、非臨床試験のデータパッケージ案について、PMDA の薬事戦略相談・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 日にそれぞれ実施し、開発の方向性の妥当性について相談を行った。当初は、「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 (薬食審査発 0527 第 1 号、平成 22 年 5 月 27 日付)、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

表4. カニクイザルを用いた毒性試験2(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	pVAX1-IgHSP65-hIL12+ HVJ-E
投与方法	投与経路：皮内 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	3群（対照群 + 2用量）
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。

おける安全性評価」について（薬食審査発 0323 第 1号、平成 24年 3月 23日付）「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」（薬発第 1062号薬務局長通知、平成 7年 11月 15日付、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）を参考にして試験デザイン案を策定していたが、薬事戦略相談の結果、参考となるガイドラインの選定（WHO のガイドラインなども参考にすること）、治験前に実施が必要な動物試験のレベル（GLP、信頼性基準適合）、プラスミド DNA の規格及び安全性と製造レベル（GMP）などについて、適切なコメントを得ることが出来た。そのため、

実施した事前面談でのコメントに従って、非臨床試験デザイン案の改定を行い、より適切な非臨床試験のデータパッケージ案の策定を完了した（表3、表4）。改定した内容については、再度 PMDA 相談を実施して最終化した上、試験を実施する予定である。

- ・更に、アジュバント成分である HVJ-E については、平 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相談を実施した。具体的にはアジュバント成分である HVJ-E について治験薬 GMP 製造を行う際に必要な、品質管理項目、工程管理項目の設定に関して、一部追加データの取得を進めることで合意した。これにより、治験届けまでに必要なデータがより

明確になったため、現在追加データの取得を進めている状況である。

- ・ 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。

D . 考察

- ・ 本研究では、DNA ワクチンのワクチン成分としてプラスミド DNA を使用する。そのため、治験薬 GMP 製造に必要な大腸菌のマスターセルバンク (MCB) を作成し、特性及び品質試験を実施した結果、治験薬 GMP 製造用に適合することを示すデータを取得した。今後規制当局である PMDA の薬事戦略相談において、その妥当性について確認を行う予定である。
- ・ 作成した MCB を用いてプラスミド DNA の GMP 製造を実施した。培養液あたりの収量については、今後最適化を行う事で増加できることを示唆するデータを得ており、製造工程の改善により収量を増加できる可能性があると考えられた。
- ・ GMP 製造を実施したプラスミド DNA の品質確認データの取得を行った。規格設定項目、暫定規格値の設定については、複数バッチの品質確認データを根拠として進める予定である。今後数バッチから 10バッチ程度のデータの取得を進め、結果を取

り纏めた後に暫定規格値を PMDA と相談しながら設定していく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、複数のガイドラインを参考にして改定案の策定を完了した。その妥当性については、PMDA の薬事戦略相談を利用して確認を進めることが適切であると考えられた。

E . 結論

- ・ 開発に関する概要については **図 3** に示すとおりである。治療用の DNA ワクチンの開発は国内で初めてとなるため、規制当局である PMDA の薬事戦略相談を活用して着実に進める計画である。
- ・ また、ICH、米国、WHO のガイドラインを参考にして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がりたいと考えている。
- ・ 平成 25 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、pVAX - IgHSP65 - hIL12 (DH5)) システムを構築した。
 - 2) 構築したマスターセルバンク (MCB) については ICH のガイドライン Q5B と Q5D に従って特性解析を実施し、適格性を実証した。
 - 3) MCB を使用してプラスミド DNA (pVAX - IgHSP65 - hIL12) の GMP

薬事対応
医師主導治験

非臨床試験
(安全性 + 薬効薬理)

治験薬GMP製造
(規格・安全性)

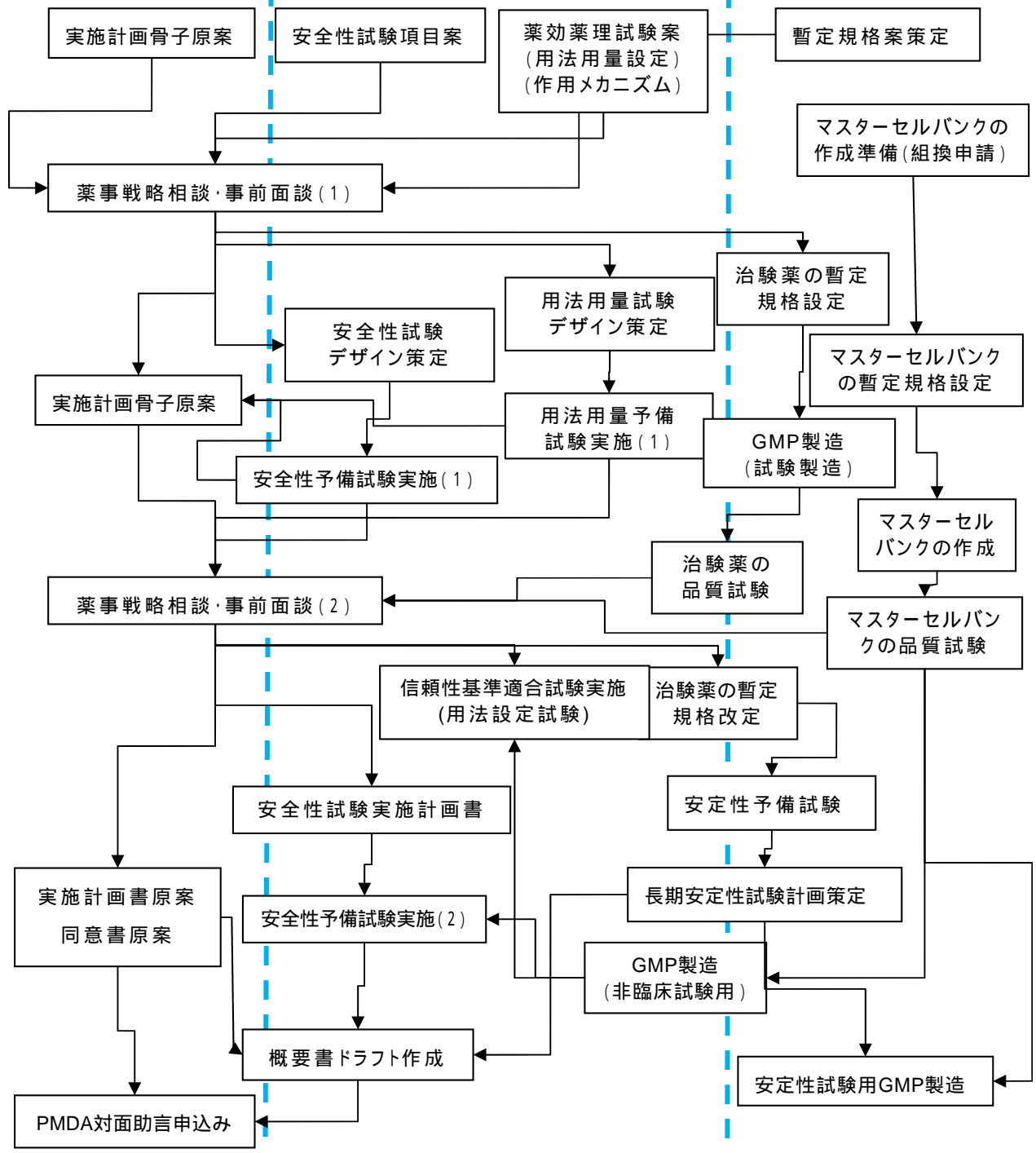


図3. 研究開発内容の概要について

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	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
5		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

製造を実施し、暫定規格の設定に必要な品質確認データを取得した。

- 4) ICHのバイオ医薬のガイドラインや、WHOのDNAワクチンに関する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、試験骨子を設定した。
- 5) 治験薬の規格及び安全性、長期安定性試験、毒性・薬効薬理試験に関して PMDAの薬事戦略相談(個別相談、事前面談、対面助言)での相談結果に基づいて、必要な変更を行い、次回相談用の書類作成を実施した。
- 6) 医薬品製造企業との提携相談実施中

F. 健康危険情報

なし

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 に関する国内特許については、基本特許、用途特許、製造特許を国内および海外で登録している(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5件を成立させ、それぞれ登録と維持管理を行っている(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4件を海外で登録している(表6)。

欧州での製造特許については、欧州特許庁へ適切な対応を進めた結果、本年度成立(特許番号: EP1950285)したため、英国、ドイツ、フランス、イタリア、スペイン・スイスの計6カ国に移行手続きを行い、移行した各国におけ

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	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)

本年度は欧州において製造特許(特許4、特許番号:EP1950285)が成立した。

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	高機能化 + 薬効向上	高機能化 HVJ-E	特願 2009-201114	出願中
2		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

る登録を全て完了した(表6)。

2) 出願中の特許

現在出願中の国内特許は、全身投与のための高機能化、薬効向上のための修飾などの特許など計2件であり、それぞれ出願中、ま

たは審査中の状況である(表7)。これらの特許を成立させ、医薬品として実用化した後の特許の有効期間を最長にするための対策を進める必要がある。未成立の特許のうち、用途特許(特願 2010-529778)については、審査請求

を実施し、請求項の修正など、登録に向けて国内の特許庁への対応を進めている（表7）。

出願中の特許については、順次成立に向けた特許庁への対応（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。

HVJエンベロープの新ワクチン・デリバリーの開発

研究分担者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

HVJ-Eは不活性化したセンダイウイルス粒子であるが、遺伝子や核酸を封入し膜融合作用により細胞質内への直接導入が可能である。しかし生体組織ではHVJ由来の蛋白質に対する免疫反応が惹起され、抗体による中和反応がおこることが考えられる。培養細胞での実験で抗体による遺伝子発現の阻害のためには抗体とHVJ-EとのPre-incubationが必要であるが、Pre-incubationしなければ阻害されなかった。またマウス骨格筋へ遺伝子を封入しないHVJ-Eを連続投与し、その2週間後にルシフェラーゼ遺伝子封入HVJ-Eを投与しても、遺伝子を封入しないHVJ-Eを連続投与しなかった場合のルシフェラーゼ遺伝子発現と比較して、遺伝子発現の抑制は見られず、連続投与が可能であることが明らかになった。

A. 研究目的

抗体存在下でもHVJ-Eによる遺伝子導入が機能するかどうかを培養細胞とマウス骨格筋への遺伝子導入により検証することを目指した。

B. 研究方法

HVJ-E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、紫外線(99 m joule/cm²)で不活性化しHVJ-Eとした。

抗体としては研究室で作成したHVJの融合蛋白Fに対するウサギ抗血清を用いることにした。CMV promoterでドライブされるluciferase geneを載せたプラスミド(CMV-luc)200 μ gをHVJ-E(10000 HAU)と混合(100 μ l TE buffer)し、on iceで0.5% Triton-X100により5分間処理後、18500 \times gで15分の遠心

をしてHVJ-Eに封入した。これを血清入りの培地中でHEK293細胞(前日に5 \times 10⁵個で培養したもの)と1時間接触させた。このとき300 μ g/mlの濃度になるように硫酸プロタミンを培地中に加えた。その後培地効果を行い、24時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。これを100%として抗体を作用させたときのルシフェラーゼ遺伝子発現を評価した。生体組織での遺伝子発現を調べるため、マウスの骨格筋での遺伝子発現で評価することにした。まずCMV-lucを封入したHVJ-Eを前脛骨筋に注射し48時間後の骨格筋でのルシフェラーゼ活性を測定しその値を100とした。次に別のマウスに遺伝子を封入しないHVJ-Eを1週間隔で2回前脛骨筋に注射した。そのマウスではHVJに対する抗体が検出された。その1週間後にCMV-lucを封入したHVJ-Eを筋肉内に注入した。

倫理面への配慮)

動物実験についてはすでに大阪大学医学系研究科での審査を受けており、その安全委員会の指針に従って施行された。また組換え DNA の実験については、組換え DNA 実験計画の機関承認が得られており、大学等における組換え DNA 実験指針に従って行った。本計画においては、臨床研究データの使用や患者資料の使用、ヒト遺伝子解析などは含まれなかった。

C. 研究結果

HVJ-E への遺伝子封入効率は 15% 程度であった。希釈しない F 抗血清と HVJ-E を混合し、37 度で 30 分インキュベートして、HEK293 細胞にかけルシフェラーゼ遺伝子発現を調べた。コントロールとして Preimmune serum を用いた。Preimmune serum を用いた場合の遺伝子発現は約 90% であったが、F 抗血清の場合は、0 になった。抗血清を 4 倍希釈すると約 10% の遺伝子発現であった。次に、F 抗血清と HVJ-E を混合し、インキュベートなしに直接 HEK293 細胞に作用させた。ルシフェラーゼ遺伝子発現は全く阻害されなかった。マウスの骨格筋での遺伝子発現については、遺伝子を封入しない HVJ-E を 1 週間隔で 2 回前脛骨筋に注射し 48 時間後の遺伝子発現は、遺伝子未封入の HVJ-E の連続投与した場合の遺伝子発現と比較して、有意差のない同じ値が得られ、抗 HVJ 抗体が存在する個体についての遺伝子発現は全く阻害されなかった。

D. 考察

HVJ-E による遺伝子導入は HVJ の

エンベロープと細胞膜の融合に依存している。培養細胞での実験で抗体による遺伝子発現の阻害のためには抗体と HVJ-E との Pre-incubation が必要であるが、これがないと阻害されなかったことより、融合反応が抗体の吸着よりも非常に迅速に起こることが原因ではないかと推測される。したがってマウス実験でも明らかのように、中和抗体存在下であっても標的組織への直接投与方法を行う限りは、遺伝子導入は阻害されないと考えられる。現在 HVJ-E はそれ自身が有する抗腫瘍作用により、癌治療のための臨床研究に用いられており、投与を受けた患者血清中には抗 HVJ 抗体が上昇することが分かっている。実際に、この患者では HVJ-E の第 1 サイクルの 2 週間で 6 回投与により NK 活性が上昇し、投与をやめると 4 週間の間に NK 活性が減少した。次いで、第 2 サイクルの 2 週間 6 回投与で NK 活性は再び上昇した。HVJ に対する抗体が存在しても HVJ-E の抗腫瘍免疫の活性化作用は影響を受けないことが臨床研究でも裏付けられている。

E. 結論

HVJ-E による遺伝子発現は中和抗体により影響されないので連続投与が可能である。

F. 健康危険情報

異常なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanemura A, Kiyohara E, Katayama I, Kaneda Y. Recent advances and developments in

the antitumor effect of the HVJ envelope vector on malignant melanoma: from the bench to clinical application. *Cancer Gene Ther.* 20:599-605, 2013.

- 2 . Takehara, Y ., Satoh, T ., Nishizawa, A ., Saeki, K ., Nakamura, M ., Masuzawa, M ., Kaneda, Y ., Katayama, I., and Yokozeki, H . Anti-tumor effects of inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene on angiosarcoma. *Clinical Immunology*, 149: 1-10, 2013.

2 . 学会発表

- 1 . Yasufumi Kaneda : 第 19 回日本遺伝子治療学会理事長講演 , “What will be needed for gene therapy in Japan?” 2013/07/04 岡山
- 2 . Yasufumi Kaneda : 日本薬理学会 (予定) シンポジウム , “Development of virosome-mediated cancer therapy” 平成 26 年 3 月 21 日 , 仙台

H 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

HVJ-エンベロープ /HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンの臨床応用に向けて これまでの臨床試験の経験から臨床試験に向けて

研究分担者 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 呼吸不全・難治性肺疾患研究部長

研究要旨

HVJ-エンベロープ /HSP65DNA+ IL12DNA ワクチンの臨床応用に向けて：これまでのリンパ脈管筋腫症（LAM）臨床試験の経験から多剤耐性結核患者に対する当治療 DNA ワクチン臨床試験に向けて参考になることが多いことより、この経験をまとめた。

A．研究目的

Heat shock protein 65 と IL-12 の結核に対する治療効果は、霊長類とげっ歯類の 2 種類の動物モデルで明らかにされてきた。つまり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 の産生増強を認めた。

今回、本ワクチンの実用化、臨床応用に向けて、前臨床試験が開始される。”First in human”となる第 Ⅰ 相試験とその後の臨床試験への取り組みについて、国立病院機構内の組織、大阪大学との連携についてこれまでの分担研究者の経験を示し説明する。

B．研究方法

これまでに分担研究者が実施した臨床試験を示し本臨床試験の参考とする。

（倫理面への配慮）

現在実施中の試験は前臨床試験であり該当無し。

C．研究結果と考察

【リンパ脈管筋腫症（LAM）臨床試験から学ぶべき事】

ラパマイシン（シロリムス）を用いた、LAM に対する臨床試験は 2003 年から準備を始め、米国、カナダ日本で実施した。米国では NIH 予算による医師主導治験、我が国では臨床試験（MILES 試験）として実施した。その結果シロリムスの有効性と安全性が確認され 2011 年出版された。この結果を受けて、我々は PMDA と相談し、薬事承認に向けて、第 Ⅱ 相試験を実施中である（MLSTS）。MILES 試験及び MLSTS 試験では、米国と我が国の患者会の協力があり、稀少疾患での国際共同試験が可能となった。

多剤耐性結核患者の患者数は現在少なくなり、稀少な存在になりつつあるが、今後の感染拡大の可能性とその対策を見据えてワクチン開発をする事は必要であろう（図 1）。

【肺胞蛋白症（PAP）臨床試験から学ぶべき事】

分担研究者は、特発性 PAP に対して GM-CSF 吸入療法を実施し 2004

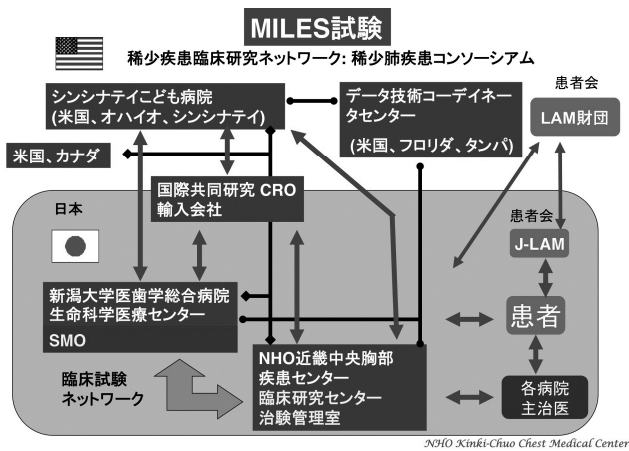


図 1 MILES 試験における組織協力体制
患者会の役割が重要であった

年症例を発表した。その後、我が国で GM-CSF 吸入療法の前臨床試験を実施し 2010 年発表した。その結果を踏まえて現在、前臨床試験を実施しているが、患者数が少なく、協力を得るべき製薬企業の変遷があった。PMDA とも相談しつつ我が国での承認目指している。薬剤開発における製薬企業の役割は必須であるが、患者数の少ない場合問題点は多い。

【本ワクチン試験の臨床応用に向けて】

多剤耐性結核患者数は少なく稀少感染症と言えるが、今後増加の可能性は十分にある。患者会はないが多くの患者は国立病院機構、結核予防会等、保健所等で把握されている。前臨床試験が終了後、稀少疾患で学んだノウハウも生かしながら医師主導治験の実施の予定である (図 2)。

E . 結論

多剤耐性結核を対象とした、DNA ワクチンによる前臨床試験、臨床試験の実施には問題点は少ないが、将来に向けて問題点を克服し、開発継続

が必要である。

組織図とNHO近畿中央胸部疾患センター、臨床研究センターの役割

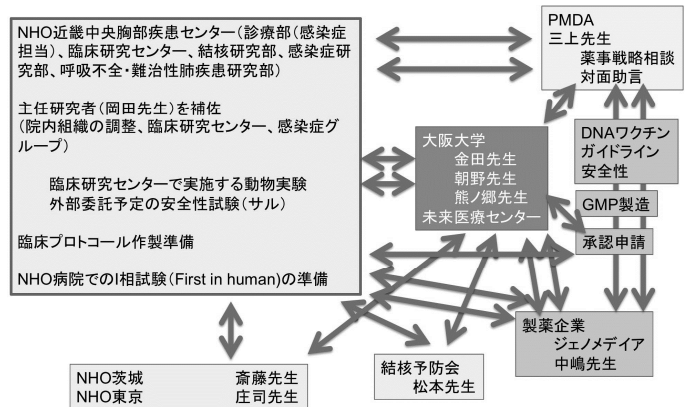


図 2 本研究での組織図案

F . 健康危険情報

特記事項なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

特記事項なし

2 . 学会発表

特記事項なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

1 . 特許取得

特記事項なし

2 . 実用新案登録

特記事項なし

3 . その他

特記事項なし

多剤耐性結核に対する新規治療用ワクチンの開発・実用化に関する研究

研究分担者 露口一成 NHO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

研究要旨

2006年 1月から 2012年 12月までの期間に NHO近畿中央胸部疾患センターで入院加療を行った多剤耐性結核の治療成績について臨床的検討を行った。治療成功率は 70.9%で感受性結核に比べて不良であり、超多剤耐性結核では 45%とさらに不良であった。手術を行えた症例では比較的予後は良好であった。

A. 研究目的

イソニアジドとリファンピシンの両剤に耐性である多剤耐性結核の予後は感受性結核に比べて不良であるとされている。NHO 近畿中央胸部疾患センターで治療を行った多剤耐性結核症例について治療成績を臨床的に検討することを目的とする。

B. 研究方法

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月までの間に入院加療を行った多剤耐性結核症例 55例を対象として、その背景因子、治療成績等につき臨床的に検討を行った。

(倫理面への配慮)

カルテをもとにした後ろ向きを検討であり倫理面における障害はないものと考えられる。

C. 研究結果

55例の平均年齢は 58.9歳で、男性 37例、女性 18例であった。初回治療

例が 26例、既治療例が 29例であった。55例中、超多剤耐性結核 (XDR-TB) 例は 20例であった。治癒は 22例、排菌陰性化は 17例、治療失敗は 3例、結核死は 9例、非結核死は 2例、脱落は 2例であった。治癒 + 排菌陰性化を治療成功とすると、全体の治療成功率は 70.9%であったが、XDR-TB 例での治療成功率は 45%にとどまった。手術を行った例は 14例あり治療成功率は 92.9%であった。

D. 考察

多剤耐性結核の治療成績は感受性結核に比べて不良であり、XDR-TBはさらに不良であった。手術を行えた例の予後は比較的良好であった。

E. 結論

多剤耐性結核の治療成績は満足のできるものとはいえず、新薬を含め新たな治療法の開発が必要である。

F. 健康危険情報

異常なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 露口一成：新規抗結核薬．第 88 回日本結核病学会総会、教育講演 2013年 3月 29日、千葉市

2. 露口一成：日常の呼吸器診療に紛れ込む結核を見落とさないために 間質性肺炎に合併した結核．第 53 回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム、2013年 4月 20 日、東京

3. 露口一成：リスク要因集団における結核 -より積極的な潜在性結核感染治療を含めて-．第 67 回国立病院総合医学会シンポジウム 28 結核発症のリスク要因とその対策、2013 年 11 月 9 日、金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

近畿地区多剤耐性結核患者の臨床試験統括。 結核ワクチンの医師主導治験の実施に向けての体制の整備

研究分担者 朝野和典 大阪大学医学部附属病院感染制御部 教授

研究要旨

平成 25年度は、健常人を対象とした臨床試験およびマラリアワクチンのフェーズ Ⅰ 医師主導治験の実施を通して、早期探索的臨床研究の体制整備を行い、結核ワクチンの医師主導治験の実施に向けての研究体制の整備を行った。

A. 研究目的

医師主導治験の実施に向けての体制整備とそのノウハウを蓄積し、結核ワクチン医師主導治験の実施に向けた、体制整備を行う

B. 研究方法

平成 25年度、フェーズ Ⅰ 医師主導治験を実施するために、先行的に大阪大学医学部附属病院において体制の整備を行った。治験薬 GMP 基準に準拠した製造施設、健康人被験者の対応や入院に使用する専用の早期探索的臨床試験実施エリアの設置、院内運用の早期探索的臨床試験実施業務マニュアルを制定するなど、ハード面、ソフト面で様々に直面する課題を整理し、解決しながら整備を進めた。

C. 研究結果

平成 25年度の実施状況としては、大阪大学医学部附属病院内に、健常人に対する臨床試験専用病棟を設置し、健常人を対象とする PET マイクロドーズ臨床試験及びマラリアワクチンのフェーズ Ⅰ 医師主導治験を開始した。

D. 考察

フェーズ Ⅰ を含めた早期探索的試験を実施するために解決すべき課題の内容は非常に多岐に渡った。病院全体での取り組みが必要であるが、解決すべき課題を整理して明確にする、到達目標や期限を設定する、スケジュール調整、進捗管理を行う、などの手順を確実に進めていくことが肝要であり、試験が立案された当初から試験完了に至るまで一貫してその役割を担う部署の設置が必要である。契約関連業務、また、審査プロセスなどでは治験事務局及び病院管理課のサポートが必要不可欠であった。また、有害事象発生時の緊急対応や健康人被験者の電子カルテ ID の発行など、実際に運用するためには、関連部署との連携を十分に行っておくことが重要であることを経験してきた。今後の課題として、運用で改善すべき事項を反映した業務マニュアルの改訂、夜間対応看護師の継続した配置、病院からの配食などがあり、引き続き取り組んでいき、結核ワクチンの実施に向けたシミュレーションを継続し、実施に備える。このためには、今後も健常人対象臨床

試験、早期探索的臨床試験に精通した人員の継続した育成が重要であり、今回関わった人員の経験を蓄積し、業務マニュアルなどに反映させて情報を共有し、今後の円滑な体制整備、試験の質や安全性の向上につなげる。

E. 結論

平成 25 年度中に健常人を対象とする PET マイクロドーズ臨床試験を完了し、現在マラリアワクチンに関するフェーズ Ⅱ 医師主導治験を継続して実施している。さらなる実施環境の整備として、来年度試験実施エリアを現行 2 床から 10 床に増床し新たな場所に設置予定である。残る課題の整備や次試験の円滑な実施に向けて取り組みながら結核ワクチンの医師主導治験の実施につなげる準備を継続する。

F. 健康危険情報

異常なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Hamaguchi S, Akeda Y, Tomono K, Oishi K. Serological survey of infants against Streptococcus pneumoniae. The International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD) Hyderabad, India 2014.
2. Yamamoto N, Hamaguchi S, Akeda Y, Tomono K, Oishi K. The pathophysiological

Comparison of Secondary Pneumococcal Pneumonia After H1N1 Pandemic 2009 or H1N1 New Caledonia influenza Virus infection. The International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD), 2014

3. Yamamoto N, Hamaguchi S, Akeda Y, Seki F, Tomono K, Oishi K. Rapid and simple Detection of Resistant Carbapenem Acinetobacter baumannii by Loop- Isothermal Amplification Method. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Denver, USA, 2014
4. 重松弘子、梅染絃美、一條佐希子、小林久子、山本洋一、朝野和典、阿部浩司、仲定宏、畑澤順国内初の PET-マイクロドーズ臨床試験の治験での実施とその実施体制の整備、第 5 回日本臨床試験研究会、2014、東京

関東地区多剤耐性結核患者の細胞性免疫・抗体の測定に関する研究

研究分担者 庄司俊輔 独立行政法人国立病院機構東京病院 副院長

研究要旨

初年度の平成 25年度の研究では、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）治療の内容などを調査した。2004年から 2013年（10月末現在）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 40名であった。

A. 研究目的

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長により作成された、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 Ⅰ相）の実施であるが、初年度の平成 25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することであった。

B. 研究方法

初年度の平成 25年度の研究では、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 10年間にわたって調査し、まとめた。（表を参照）

（倫理面への配慮）

診療録などからの診療情報の収集が主たる手法であるため、直接的に個人への負担は無い。ただし、匿名化など個人情報に対しては留意した。

C. 研究結果

2004年から 2014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 41名であった。性別は、男性 34名、女性 7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 9名、治療中断脱落 1名、死亡 7名（退院後の死亡は含まず）、転出（帰国含む）10名、治療継続 9名（内 3名は後に死亡、他の 6名は東京病院で治療中あるいは観察中）、現在東京病院入院中 1名、不明 4名（計 41名）であった。

D. 考察

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。来年度から本研究の主眼である医師主導治

表

入院年	ID	氏名	性別	入院日	退院日	治療薬	転帰	完了時期
2004	770284	R. K.	M	2003/12/10	2004/4/15		?	?
2004	253387	K. H.	M	2004/3/31	?		?	?
2004	785235	H. E.	F	2004/3/23	2004/10/1	HREL?	完了	05・9・6完了(保健所) 年4回完了
2004	828185	W. S.	M	2004/12/10	2005/8/31	HEZ + カチゾロ+EVM	完了	07/10/6 完了
2004	781725	S. Y.	M	2004/2/27	2004/8/4	HEZTKG	完了	06・11・10 完了扱い
2004	825841	E. M.	M	2004/12/7	2005/1/4	TH カチゾロ PAS	完了	07/1/31 服薬終了 (08/5 月保健所情報)
2004	56595	S. K.	M	2004/12/21	2005/1/4		死亡	2005/01/04 死亡
2004	400086	K. S.	M	2004/7/5	2004/11/5		治療継続	後に死亡
2004	794914	S. N.	M	2004/5/25	2004/8/12		中断脱落	
2004	389929	K. K.	M	2004/2/10	2004/2/11	HEPCSp	転出	川崎市麻生区に転出(保)
2004	827935	K. S.	M	2004/12/14	2005/1/4	HEPASZLVFX	完了	08/3/31 服薬終了
2005	845234	H. T.	M	2005/4/14	2005/7/19	HRESZ+LVFX	完了	07/4/30 完了
2005	848998	K. R.	F	2005/4/26	2006/2/28	? TH, GM, KMHRZE(前医)	完了	06・6・7
2005	778015	K. Y.	M	2005/7/29	2005/11/9	ZKPaSp	死亡	
2005	400086	K. S.	M	2005/9/26	?	PAS OFL	死亡	
2005	881252	N. H.	M	2005/11/25	2006/11/6	HRZE	?	
2005	743639	Y. T.	M	2005/12/26	2006/2/27	EZPK+SPFX	?	
2006	924274	S. K.	M	2006/9/11	2007/3/13	ZT+CS+K+P	転出	
2007	948917	T. Y.	M	2007/2/24	2007/7/24	HRZE	?	
2007	955977	M. T.	M	2007/4/9	2007/12/21	TKZPG	?	
2007	993311	Y. H.	M	2007/12/14	2009/8/4	RHZ+CS+PAS	?	
2007	924030	M. K.	M	2007/8/8	2007/12/26	TH, PAS, PZA, KM, MOFX	転出	
2008	400086	K. S.	M	2008/5/16	2008/5/20	なし	死亡退院	
2008	1008786	A. T.	M	2008/3/23	2008/3/28	HREZ	死亡退院	
2008	1034426	O. K.	M	2008/8/18	2008/8/18	HRE	死亡退院	
2008	1021657	S. T.	M	2008/6/5	2008/9/12	KEZQ	?	
2008	1053089	S. K.	F	2008/12/3	2009/5/8	HREZSL+PAS+TH	?	
2008	1023060	C. Y.	F	2008/6/18	2008/9/17	S,Z,L,PAS,TH	帰国	
2008	1000072	S. S.	M	2008/9/3	2008/11/11	PAS,PZA,TH,INH, CS,	転出	
2008	1048126	W. H.	M	2008/11/6	2009/7/1	HREZ	転出	
2009	1087361	S. H.	M	2009/7/22	2009/12/18		死亡退院	
2009	1097971	T. U.	F	2009/9/30	2009/10/30	TH, E, Z, SM, LVFX	?	
2010	1018761	H. K.	M	2010/6/1	2011/2/26	HEC s PAS、MFLX、 RBT	転出	
2011	765015	N. K.	M	2011/8/1	?	EVM, EB, TH, PZA	治療継続	
2012	765015	N. K.	M	2012/1/19	2012/2/3	EVM, EB, TH, PZA, PAS	治療継続	2013/4/8 死亡
2012	32126	I. N.	M	2012/3/8	2012/7/24	EVM,CS, MFLX, LZD	?	
2013	1328354	K. T.	M	2013/2/26	2013/6/22	EB, SM, PAS, LZD, MFLZ	転出	
2013	1329722	S. R.	F	2013/3/4	2013/4/28	EZLS + TH	転出	
2013	1336115	U. R.	F	2013/4/10	2013/6/6	LVFX, LZD, EB, KM	転出	
2013	137153	H. T.	M	2013/10/24	入院中	?		

験の第 相が開始されるが、研究を成功に導くための適格症例の確保が重要である。

E. 結論

これまでの10年間に東京病院に入院し、多剤耐性結核と診断され治療を受けた患者の総数は40名であった。医師主導治験における多剤耐性結核ワクチンの接種に対する適格患者は少ないと考えられるため、適格症例の確保が重要である。

F. 健康危険情報

異常なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Kobayashi K, Kawashima M, Ohshima N, Koyama K, Oshitani Y, Nagai H, Tamura A, Akagawa S, Shoji S, Ohta K: Detection of pulmonary embolism by optimized plain CT scan. American Thoracic Society 2013 annual conference, San Francisco, 2013.

2. Sato R, Ohshima N, Masuda K, Suzuki J, Higaki N, Inoue E, Suzuki J, Matsui H, Nagai H, Akagawa S, Hebisawa A, Shoji S: Investigation of pneumonia cases with psoriasis vulgaris. American Thoracic Society 2013 annual conference, San Francisco, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

関東地区（国立病院機構茨城東病院）の患者の臨床試験統括

研究分担者 齋藤武文 国立病院機構茨城東病院 院長

研究要旨

関東地区（NHO茨城東病院、複十字病院）の多剤耐性結核症例状況を後ろ向きにカルテ調査した。

2002年1月より2013年10月において、上記の病院において231例の多剤耐性結核症例が診療された。治癒した例は約半数であり、多剤耐性結核の治療は難渋していた。

多剤耐性結核の治療上、新たな抗結核薬の開発だけでなく、本研究が取り組む多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの実用化が強く待たれるところである。

A. 研究目的

関東地区（NHO茨城東病院、複十字病院）の多剤耐性結核症例状況を明らかにすること。

B. 研究方法

多剤耐性結核（以下、MDR-TB）症例状況をNHO茨城東病院、複十字病院例について、2002年1月より2013年10月症例について後ろ向きにカルテより検討した。

倫理面への配慮）

本研究は後ろ向きカルテ調査から関東地区（NHO茨城東病院、複十字病院）の多剤耐性結核症例状況を検討しただけであり、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

NHO茨城東病院MDR-TB症例は男性9例、女性1例の10例、平均年齢57.2歳（34歳～86歳）、日本人9例（1例、インドネシア在住30年）、韓国人1例であった。それらの予後は、生存2例（1例肺切除、1例内服加療）、

死亡5例（全例、切除できず）、不明3例であった。MDR-TBは6例で超多剤耐性結核（以下、XDR-TB）は4例であった。昭和40年発症、昭和57年発症以外は平成以後に肺結核を初発していた。

複十字病院例については、221例で、性別は男性150例、女性71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47.8歳（range 18歳～99歳）であった。国籍は、日本人164例、中国人25例、韓国人10例、その他のアジア16例、その他の地域6例であった。多剤耐性結核のうち、XDR-TBは32例でXDR以外は189例であった。2013年11月現在の予後は、治癒107例（うち3例は治癒後再発再治療治癒、1例は転出=母国帰国後再入国時再発有再治療治癒）、死亡27例（うち10例は菌陰性化ののち死亡）、治療失敗入院中2例、菌陽性転出7例、菌陰性転出51例、治療中断10例、順調に治療中15例、不明2例であった。

D. 考察

INH、RFPに耐性を示す多剤耐性結核は治癒率が低く治癒したとしても再発が多いため、本人の負担だけでなく周囲への感染、医療費などを含めて長期にわたり社会に影響を与える疾患である。日本における多剤耐性結核の比率は、未治療患者では0.7%と高くはないが、既治療患者では9.8%であり、さらに多剤耐性結核中の超多剤耐性結核の比率は29%と世界の中でも特異な高さである。本検討の目的は、関東地区の郊外にあるNHO茨城東病院と都会にある複十字病院の多剤耐性結核の治療状況と予後を中心とした状況を明らかにすることである。

感受性結核との症例対照での検討は行っていないが、複十字病院例の検討から明らかに、感受性結核より、若年者および外国人に多くみられている。若年者、外国人に耐性結核が多いことはサーベイランス上報告されており(結核、2012;87:783-787)、外国人結核の出身国としては中国が最多である。母国の薬剤耐性頻度は、中国では初回治療の6%、フィリピンでは4%、韓国では3%であり、中国からの多剤薬剤耐性結核が多いのは、十分に予測されるところである。

死亡を含む治療失敗7例、菌陽性転出が7例と排菌が停止しない例が見られており、隔離を行う場合は長期となることが予測される。新たな薬が今後登場する予定であるが、単一薬剤では治療成功へ導くことは不可能であり、新たな抗結核薬の開発だけではなく、本研究が取り組む多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの実用化が強く待たれるところである。

E. 結論

関東地区(NHO茨城東病院、複十字病院)の多剤耐性結核症例状況を後ろ向きにカルテ調査した。

2002年1月より2013年10月において、上記の病院において231例の多剤耐性結核症例が診療された。治癒した例は約半数であり、多剤耐性結核の治療は難渋していた。

多剤耐性結核の治療上、新たな抗結核薬の開発だけではなく、本研究が取り組む多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの実用化が強く待たれるところである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

A. 国際発表

1. T. Saito, PhD, S. Tsurusaki, MD, N. Onda, MD, K. Fujita, MD, J. Kanazawa, MD, Y. Tsunoda, MD, H. Takoi, MD, S. Rin, MD, K. Hayashihara, MD, Ph.D, K. Koike, MT, M. Kobayashi, MT, S. Fukai, MD, Ph.D [Poster Board # 511] : Investigation Of Usefulness Of LAMP-Based Loopamp Tuberculosis Complex Detection Reagent Kit, [Publication Page: A5343] AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS), May 22, 2013 (Philadelphia)

B. 国内発表

1. 林原賢治，恩田直美，鶴崎聡俊，藤田一喬，金澤潤，角田義弥，蛸井浩行 林士元，齋藤武文：結核感染リスクの少ない若年者検診における QFT の意義 . 第 53 回呼吸器学会学術講演会，2013 年 4 月 20 日，東京都
2. 鶴崎聡俊，恩田直美，藤田一喬，金澤潤，角田義弥，林士元，林原賢治，齋藤武文，御手洗聡：PZA に対し未治療単独耐性を示した肺結核の 1 例，第 204 回日本呼吸器学会関東地方会，2013 年 5 月 25 日，東京都
3. 中澤真理子，重政理恵，藤田一喬，金澤潤，角田義弥，根本健司，林士元，高久多希朗，林原賢治，齋藤武文：当院における肺結核症に対するリファブチン使用例の検討 . 第 198 回茨城県内科学会，2013 年 6 月 8 日，水戸市
4. 金澤潤，中澤真理子，藤田一喬，角田義弥，根本健司，林士元，高久多希朗，林原賢治，齋藤武文，梅津泰洋：陰影が遊走した肺結核の 1 例，第 199 回茨城県内科学会，2013 年 10 月 27 日，水戸市

多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの 効率的な開発計画作成と臨床開発の方策に関する研究

研究分担者 三上礼子 東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学 講師

研究要旨

新型インフルエンザ等新興・再興感染症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ワクチンの開発計画および実施の薬事規制上の問題と円滑な開発の方策について検討する。

A．研究目的

新型インフルエンザ等新興・再興感染症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 ワクチンの開発計画および実施の薬事規制上の問題と円滑な開発の方策について検討する。

B．研究方法

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。

(倫理面への配慮)

当施設では直接実験動物での検討や臨床試験への被験者の組み入れは行わないため、倫理審査等は行っていない。被験者個人情報等については直

接扱わないが、副作用報告などの情報については漏洩等のないよう十分配慮している。

C．研究結果

当研究課題の厚生労働科学研究補助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は行われるべきことが確認されている。

本剤の治験開始については大腸菌のマスターセルバンク整備、品質試験、プラスミド DNA の治験薬 GMP 製造、長期安定性試験を経て薬効・毒性・安全性の非臨床試験が必要と想定される。

また、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を勘案すると医師主導試験として遂行せざるを得ないことが予測される。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。

臨床研究の安全性評価として有害事象を注視し、また有効性評価項目としては多剤耐性結核菌の挿菌陰性化や挿菌数減少などを想定しているが、具体的な計画については未だ検討段階である。

D . 考察

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は、未だその道筋がついておらずガイドライン策定が必要な段階である。米国での開発品については臨床試験段階からの参加（国内治験）が可能であるが、今後待望される国産 DNA ワクチンの開発については実質的な第 Ⅰ 相試験、いわゆる first in human 試験の実現とそれに至る非臨床試験の充実が必須である。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、各研究機関での成果と方針について検討していきたい。

E . 結論

初年度として、本剤の規格・製造、非臨床および臨床の開発方針についてはいまだ検討中であるが、今後も研究者相互および規制当局とのコミュニケーションを図り開発の予定である。

F . 健康危険情報

本施設からは特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表 (0 件)

2 . 学会発表

A . 国際学会 (0 件)

B . 国内学会 (0 件)

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターの多剤耐性結核患者の動向と 関西地区の多剤耐性結核患者アンケート調査、ならびに 近畿中央胸部疾患センターの現入院患者の実態

研究分担者 松本智成 大阪府結核予防会大阪病院診断検査部 部長
研究協力者 永井崇之 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター感染症内科 部長
研究協力者 露口一成 近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター 部長

研究要旨

2011年 9月 14日には世界保健機関(WHO)が、従来の薬が効かない MDR-TB や XDR-TB の感染が欧州・中央アジア地域で急速に拡大しており、保健当局が阻止できなければ多くの死者が出ると警告した。このため新薬開発ならびに結核ワクチンの開発は重要である。特にワクチンの場合は耐性誘導の問題がなく MDR-/XDR-TB 対策には重要である。岡田等は DNA ワクチンを開発し *in vitro* ならびに霊長類にたいする *in vivo* の研究で期待のできる結果を報告している。ヒト投与への前段階として関西圏における多剤耐性結核患者の患者数調査の準備を行った。

多剤耐性結核 (MultiDrug Resistant-Tuberculosis: MDR-TB) は、結核治療の要であるイスコチンとリファンピシンの少なくとも 2 剤の抗結核薬に耐性の結核菌の総称である。そして超多剤耐性結核 (XDR-TB) とは、さらにニューキノロン系の薬剤とアミノグリコシド系の薬剤に耐性の結核菌であると定義される。米国の医学雑誌 *New England Journal of Medicine* (NEJM) によると現在、世界における感染症による死因の一位は、呼吸器感染症。二位、消化器感染症、三位 HIV 感染症。四位結核となっている。

2009年の WHO の推計では、世界中で年間 940 万人が新規に結核を発病し、そのうち 130 万人が死亡している。最近は減少傾向に転じたが、かつては人類史上減った事が無い病気といわれていた。特にアジア、アフリカでの増加が大きな要因であり、HIV/AIDS、多剤耐性結核 (MDR-TB) と超耐性結核 (XDR-TB) がその増加の一躍を担っている。HIV 合併結核、ならびに MDR-/XDR-TB はさらに結核の治療を質的にも難しくしている。にぶりながらも減少している日本での結核罹患率は、再び上昇するという不安材料もみられる。それは合衆国で 1980 年代半ばから 1990 年代初頭にみられた結核の再流行時と、現在の日本の状況が酷似しているからである。

当時の米国の状況は、

- 結核コントロールの主要機関への投資の減少
- HIV/AIDS の流行
- 国際化による結核蔓延地からの米国への流入増加
- ホームレスシェルターや老人ホーム等での集団感染

- ・不況による受診の遅れ
- ・多剤耐性結核の出現

以上のとおりであったが、現在の日本の状況に非常に良く似ている。アジア、アフリカ、ヨーロッパで増加し、治療難易度が高い HIV 合併結核 MDR-/XDR-TB が日本では減っていくのであろうか？未だかつて減少した事が無い感染症であること、海外の状況、前述した日本の状況も加味して考えると結核は再び増加する可能性があるといえる。

また、2011年9月14日には世界保健機関（WHO）が、従来の薬が効かない MDR-TB や XDR-TB の感染が欧州・中央アジア地域で急速に拡大しており、保健当局が阻止できなければ多くの死者が出ると警告した。WHO は多剤耐性結核菌患者の死亡率が 50%に達すると指摘、患者数は欧州 27 カ国のうち上位 15 カ国が東欧に集中しアジアでも患者数が増加していると報告した。新たに結核と診断された患者の約 12%が多剤耐性結核菌の感染者であるのに対し、結核再発と診断された患者の場合は 37%に達したという。その一方で、ロンドンに限定すれば毎年 3500 人が多剤耐性結核菌に感染し、西欧の都市では最多という。

主軸の薬である INH と RFP に同時に効かない MDR-/XDR-TB の治療はとても困難になる。治療には副作用の強い薬を何種類も、長期にわたって服用し、可能であれば手術をも行うが成績はあまりよくなく、図に見られるように、治癒が確認されたのは 62%であり、残りは死亡するか排菌要陽性が続いたままである。

このため MDR-/XDR-TB の治療に対して岡田等が作成した DNA ワクチンが期待されている。

A. 研究目的

MDR-/XDR-TB に対する DNA ワクチン投与前の調査として関西における多剤耐性結核の概数を調査する。

B. 研究方法

関西における MDR-/XDR-TB の動向を結核病棟を有する病院へのアンケート調査をする為のアンケート用紙を作成する。

前調査として 2000 年からの大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおける MDR-TB 排菌患者のべ数を調べる。

前調査として 2004 年からの大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおける新規 MDR-TB 排菌患者数を調

べた。

C. 研究結果

アンケートを作成（年齢、性別、罹病期間、薬剤感受性、手術歴、排菌陰性化の有無、入院年数）を行い関西圏の結核病棟を有する病院に依頼する。初年度は、近畿中央胸部疾患センター、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、結核予防会大阪病院に関して行った。

2000-2001 年には 45 人を上回っていた大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターの多剤耐性結核排菌のべ患者数は徐々に減少し 2011 年には 15 人になった。

2004 年から 2009 年まで大阪府立

呼吸器・アレルギー医療センターの新規 MDR-TB 患者数をみると 13 名から 5 名へ減少。XDR-TB 患者数は、2004 年が 7 名で、2008 年は 1 名、2009 年は 0 と減少した。

また、DNA ワクチン投与対象患者は、大阪府結核予防会大阪病院では 0 であったが、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおいては結核診断から 15 年以上たった ADL 良好な XDR-TB 患者を少なくとも 1 名確認出来た。

D. 考察

少なくとも我々が今回調べた新規 MDR-/XDR-TB 患者数は 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。

E. 結論

少なくとも我々が今回調べた新規 MDR-/XDR-TB 患者数は 10 年前と比較すると減少傾向にある。しかしながら結核歴が 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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomoshige Matsumoto, Hideo Ogata, Emiko Toyota, Katsuhiko Suzuki, Takefumi Saito, Akira Fujita, Toshinori

Suetake, Kinuyo Chikamatsu, Kazue Mizuno, Satoshi Mitarai : Clinical evaluation of a line probe assay kit for the identification of mycobacterium species and detection of drug-resistant mycobacterium tuberculosis Kekkaku: [Tuberculosis] 03/2013; 88:291-296.

2. 松本智成 : IGRA による結核診断. 日本内科学会雑誌 11 月号 in press
3. 松本智成 : 結核 - 古くて新しい感染症 - 結核菌の分子疫学の展開. 最新医学, 68 巻 11 月, p2496-2502, 2013
4. 松本智成 : 多剤耐性結核の現状呼吸. 32(8): 697-702, 2013

2. 学会発表

1. 松本智成, 永井崇之, 田村嘉孝, 黒川雅史, 川瀬一郎, 藤井隆, 相良憲幸 : QIAxcelTM Advanced System を使用した結核菌 Supply's 15-MIRU VNTR 解析. 第 89 回日本結核病学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

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 熊ノ郷 淳 大阪大学 教授

研究要旨

本研究は、新規ワクチン（HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+ IL-12 DNA）の第1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しているが、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を行った。

A. 研究目的

新規ワクチン（HVJ-エンベロープ/HSP6DNA+ IL-12 DNA）の有効性。安全性を確認するため、多剤耐性結核に対する医師主導治験（第1相）を実施し、本ワクチンの薬事法に基づく承認取得を目的としている。

neuropilins and plexins as receptors for semaphorin. Nature Review Immunology. Nature Reviews Immunology 13:802. 2013.

B. 研究方法と C. 研究結果

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。マウスを用いた細胞性免疫、液性免疫双方の測定基盤の立ち上げ。関連施設連携を行った。

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

D. 考察

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumanogoh A and Kikutani H.: Immunological functions of the

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
岡田全司	結核予防（DNA） ワクチンの開発 状況 予防接種 Q&A 改訂 3 版	「小児内科」 「小児外科」 編集委員会 共編	小児内科	東京医学社		2013	45 (増刊号) 281-283

雑誌

発表者 氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡田全司	The study of novel DNA vaccines against tuberculosis: Induction of pathogen-specific CTL in the mouse and monkey models of tuberculosis.	Human Vaccines and Immunotherapeutics	9(3)	515-525	2013
岡田全司	Novel therapeutic vaccines [(HSP65+IL-12)DNA-, granulysin-and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy.	Human Vaccines and Immunotherapeutics	9(3)	526-533	2013
金田安史	Recent advances and developments in the antitumor effect of the HVJ envelope vector on malignant melanoma: from the bench to clinical application.	Cancer Gene Ther	20	599-605	2013
金田安史	Anti-tumor effects of inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene on angiosarcoma.	Clinical Immunology	149	1-10	2013
松本智成	Clinical evaluation of a line probe assay kit for the identification of mycobacterium species and detection of drug-resistant mycobacterium tuberculosis.	Kekkaku [Tuberculosis]	88	291-296	2013
熊ノ郷淳	Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorin. Nature Review Immunology.	Nature Reviews Immunolog	13	802	2013
岡田全司	結核におけるワクチンへの期待“次世代型感染症ワクチン”	最新医学		出版中	
岡田全司	結核の免疫反応「免疫学的機序からみた呼吸器疾患」	日本胸部臨床	72(12)	1336-1345	2013

岡田全司	はじめに（序論）「結核—古くて新しい感染症—」	最新医学	68(11)	2437-2438	2013
岡田全司	座談会：結核の現状・問題点と最新の知見	最新医学	68(11)	2439-2450	2013
岡田全司	ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた新規結核予防ワクチン開発及び臨床応用に向けて 「結核—古くて新しい感染症—」	最新医学	68(11)	2479-2487	2013
岡田全司	多剤耐性結核治療ワクチンとT細胞免疫	最新医学	68(11)	2488-2495	2013
松本智成	IGRA による結核診断	日本内科学会雑誌			2014 in press
松本智成	結核 - 古くて新しい感染症 - 結核菌の分子疫学の展開	最新医学	68	2496-2502	2013
松本智成	多剤耐性結核の現状呼吸		32(8)	697-702	2013