

厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会研究開発及び生産・流通部会
(平成26年5月23日)

**「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
(及び結核予防ワクチン研究)」**

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
岡田全司

厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症
研究事業(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)(平成25-27年度)

多剤耐性結核に対する新規治療用DNAワクチンの 開発・実用化に関する研究

研究代表者 (独)国立病院機構近畿中央胸部疾患センター **研究の統括**
岡田 全司 臨床研究センター長

研究分担者・研究項目

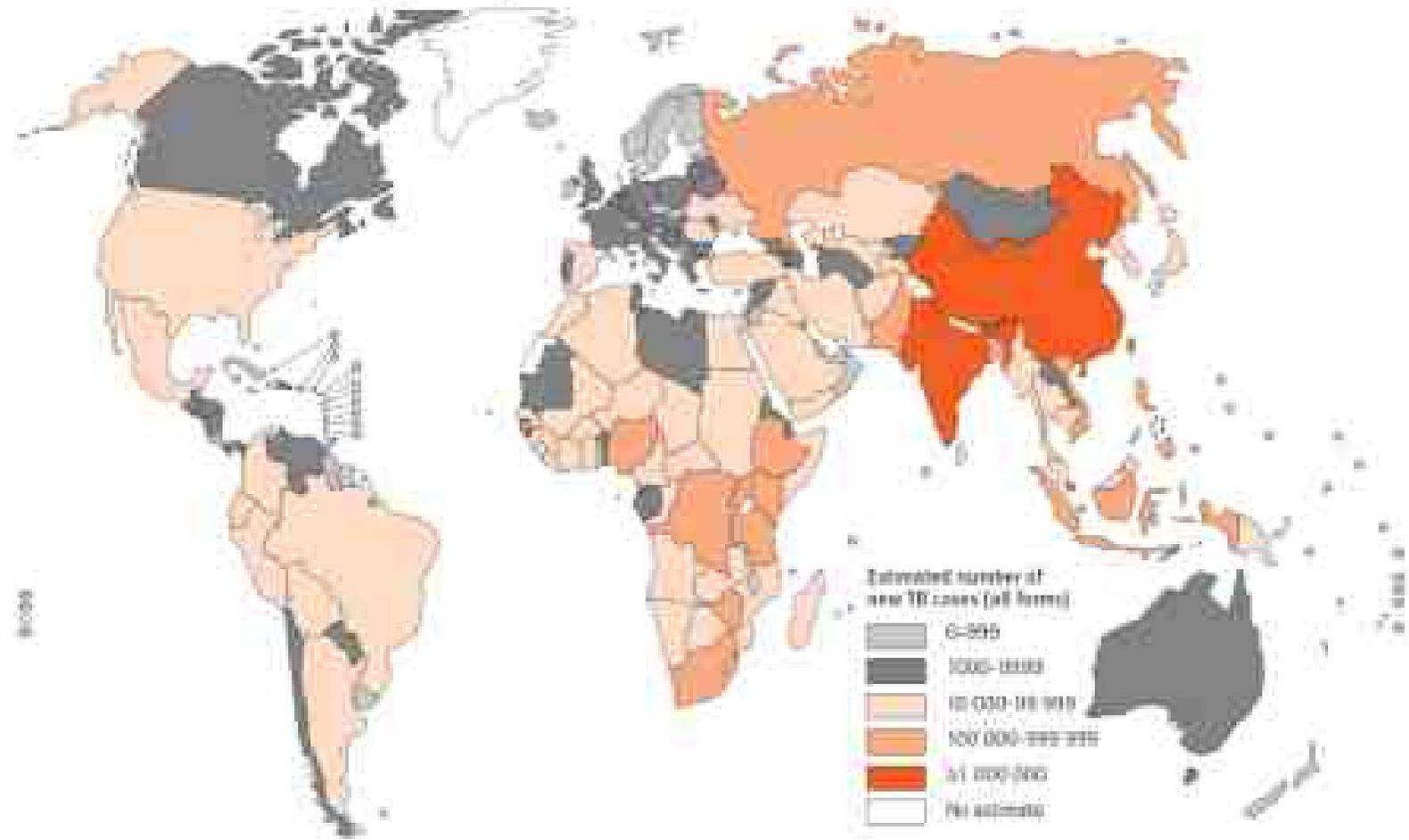
- | | |
|--------------------|---|
| 中島俊洋 (ジェノメディア株式会社) | 結核治療ワクチン(GMPレベル)の非臨床試験(GLP)
(安全性、毒性、薬物動態試験)の実施。 |
| 金田安史 (大阪大学大学院) | HVJ-エンベロープの新ワクチン・非臨床試験の計画。 |
| 井上義一 (国立病院機構近畿中央) | 全国・近畿地区多剤耐性結核患者の 医師主導治験 統括 。
結核ワクチンの薬効解析。 |
| 露口一成 (国立病院機構近畿中央) | 近畿中央胸部疾患セ の医師主導治験統括。結核治療効果。 |
| 朝野和典 (大阪大学医学部附属病院) | 近畿地区 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。プロトコール修正。 |
| 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 。 |

WHO 報告 2013

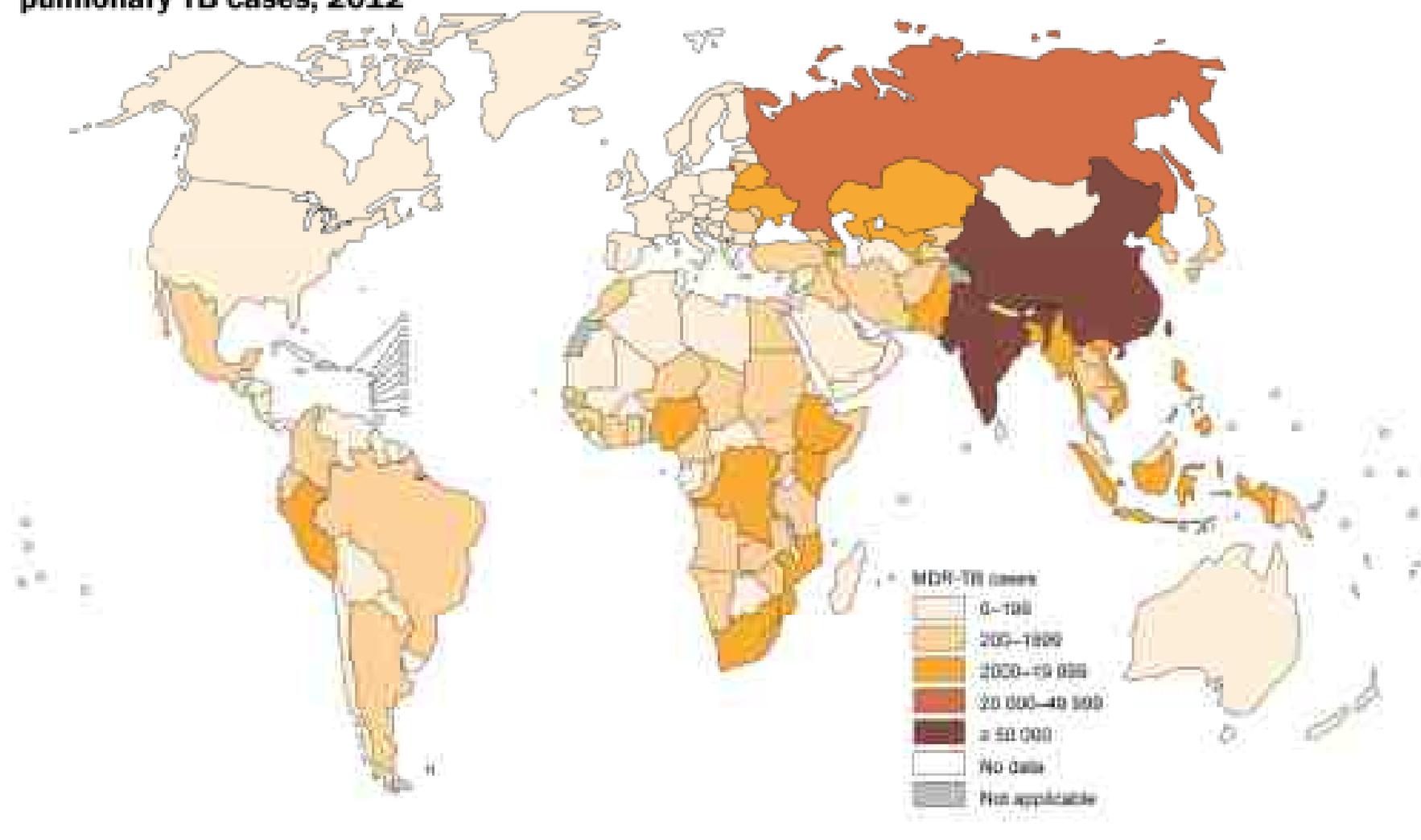
Global Tuberculosis (TB) Control

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。

FIGURE 1.1
Estimated number of new TB cases, by country, 2007



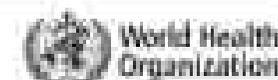
Number of multidrug-resistant tuberculosis cases estimated to occur among notified pulmonary TB cases, 2012



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: Global Tuberculosis Report 2013, WHO, 2013.

© WHO 2013. All rights reserved.



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。

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。

今までの結核ワクチンの研究概要

HVJ-Envelope/

HSP65DNA+IL-12DNAワクチン

研究成果

新しい結核ワクチンの開発

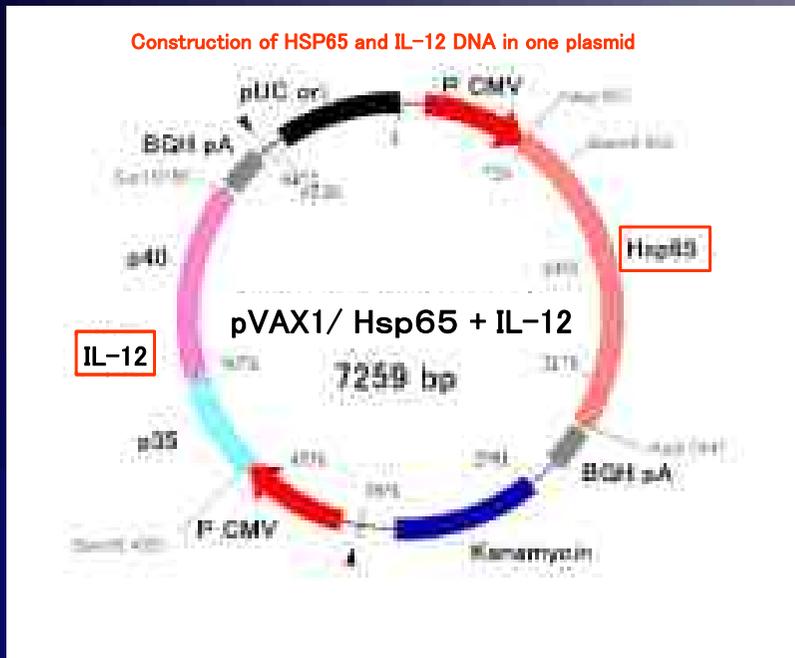
1. HVJエンベロップ/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンはBCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果。カニクイザル(ヒト結核感染に最も近い)結核予防効果。CD8キラーTが重要でこれを分化誘導。
2. 多剤耐性結核に対する世界で初めての治療ワクチンを発見した。超薬剤耐性結核菌(XDR-TB)に対しても治療効果。
3. サルで100%生存率の画期的な結核予防ワクチン効果。(BCG群は33%)
4. サルで治療ワクチン効果100%生存。キラーT分化に重要なIL-2産生を誘導。IL-2産生能とワクチン効果が相関。

我々が開発した新しい結核ワクチン(WHO推奨ワクチンの一つ)

ワクチン	マウス	モルモット	カニクイザル	ヒト
HVJ-エンベロップ/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA	有効 BCGより1万倍強力な 予防ワクチン効果	効果	効果	計画中
	結核治療ワクチン効果	計画	効果	
	強力な多剤耐性結核 XDR-TB 治療効果	計画	計画	
HVJ-リボソーム/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA	有効 (BCGの100倍)	有効	有効 (100%生存)	

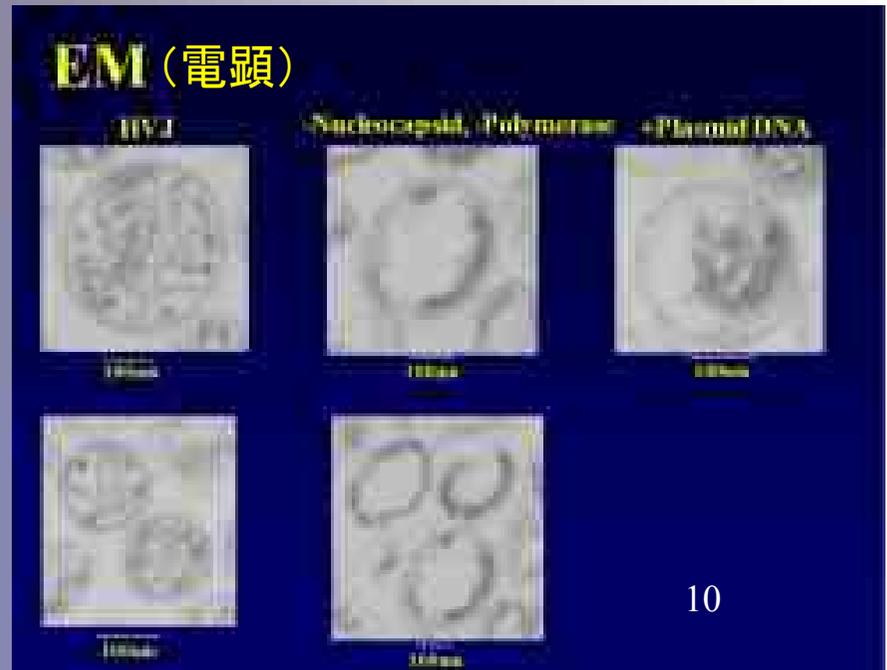
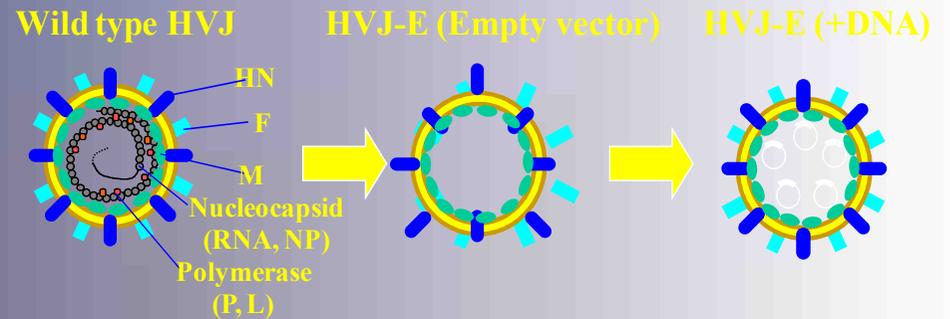
HSP65 + IL-12 DNA ワクチン

臨床応用のための DNAワクチン構築図



HVJ-エンベロープベクター： 非ウイルスベクター

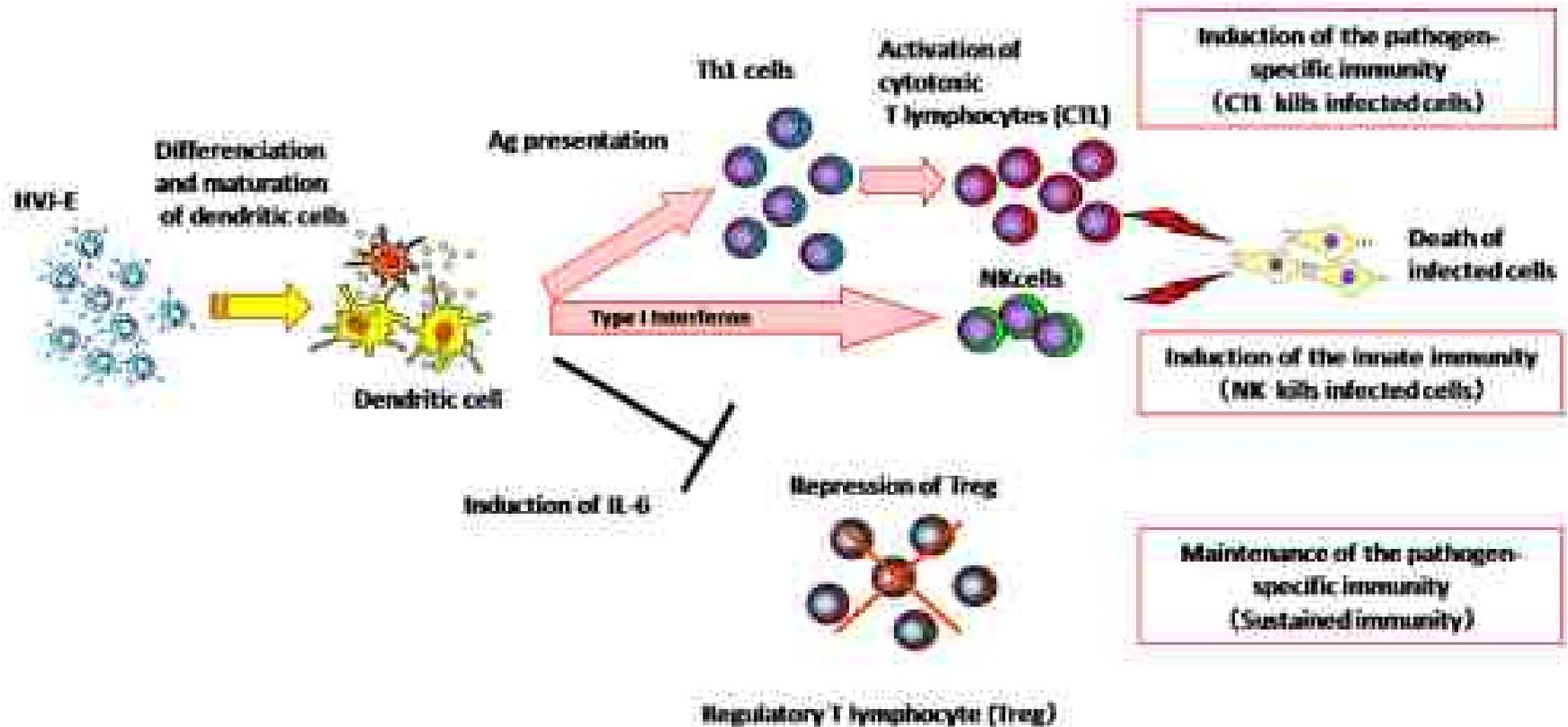
HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan



HVJ-エンベロップ: デリバリーシステム/DNAワクチン に対するアジュバント

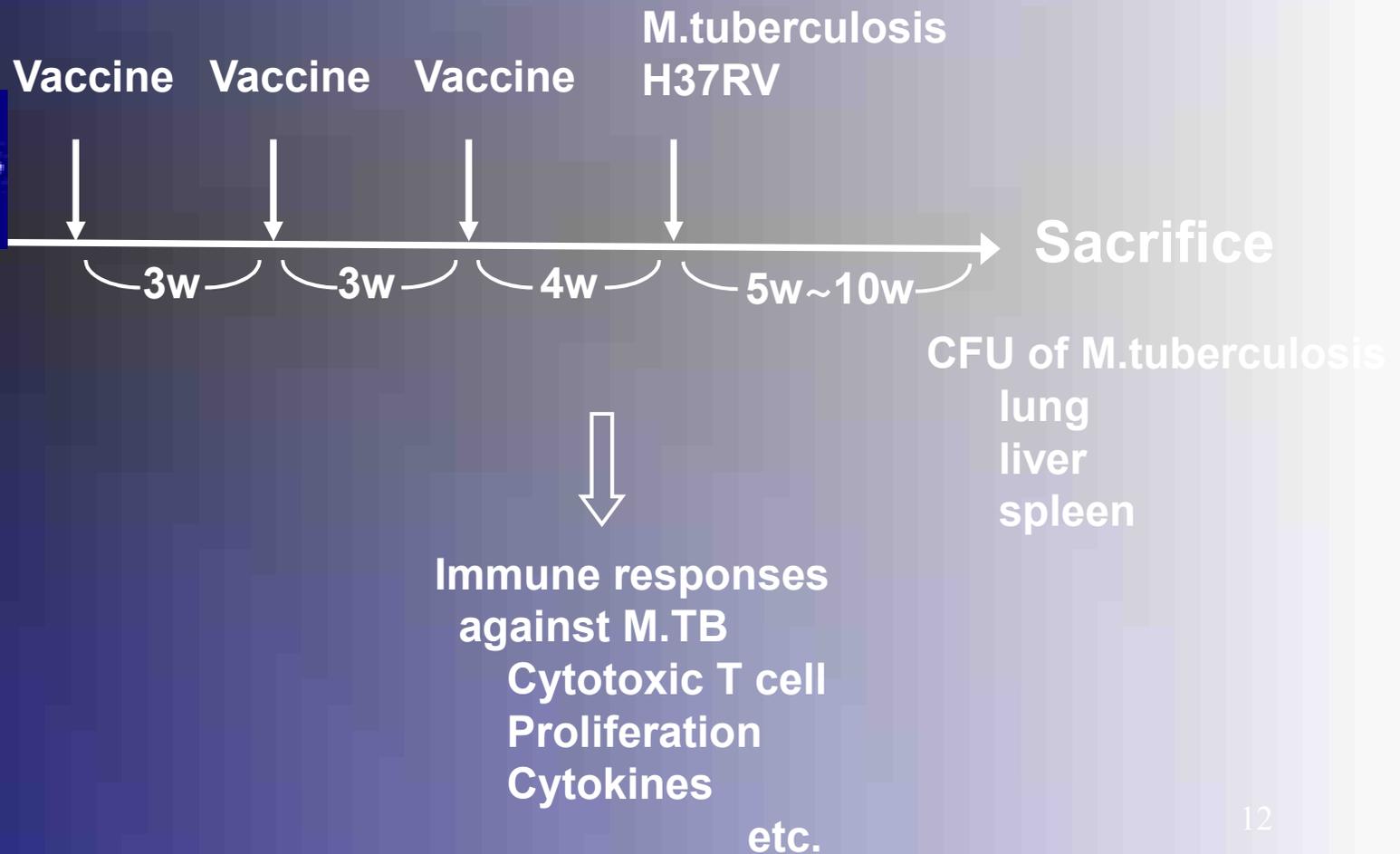
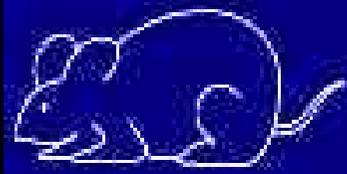
(Hemagglutinating Virus of Japan)

- Multiple functions in one delivery system (delivery + adjuvant)
- Adjuvant: induction of NK/CTL + repression of Treg via the activation of DC
- Mechanism: natural immune reactions mediated by RIG-I



[Method]

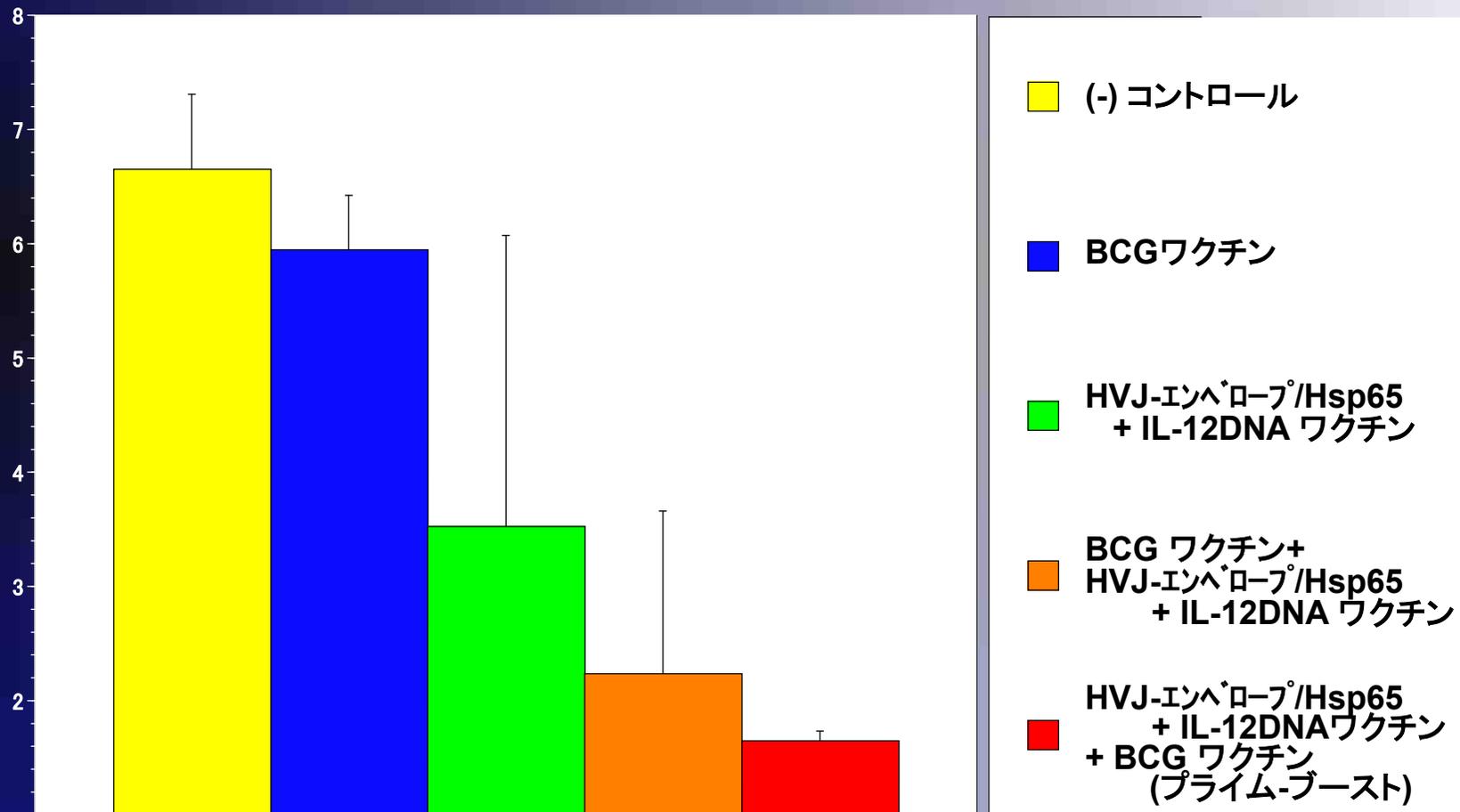
prophylactic vaccine



マウスの結核感染モデルを用いた HVJ-エンベロップ/Hsp65 + IL-12 DNAワクチン (BCGより1万倍強力な)

log₁₀
CFU M.TB

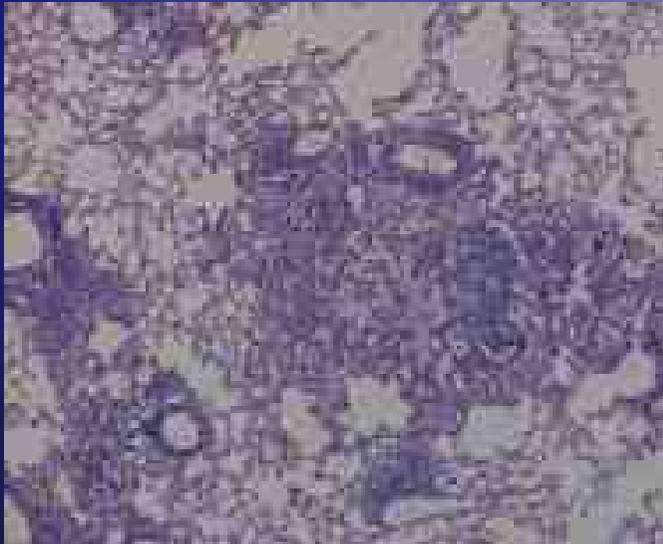
結核感染5週間後の結核菌コロニー数



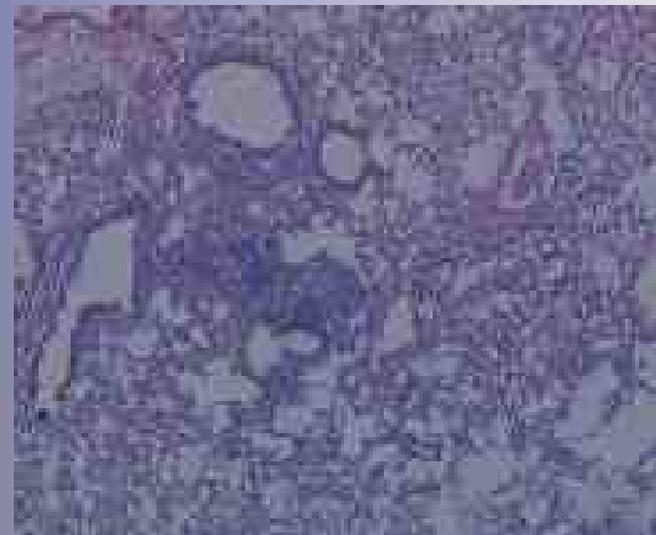
lung log

mean ± SD, n = 5

5W Lung (X5, HE)



- / - / -



- / - BCG



HSP65+IL-12 E / HSP65+IL-12 E /
HSP65+IL-12 E



BCG / HSP65+IL12 E /
HSP65+IL12 E

HVJ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンを接種されたマウス における結核菌に対するCD8陽性キラーT細胞の誘導

HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine

BCG

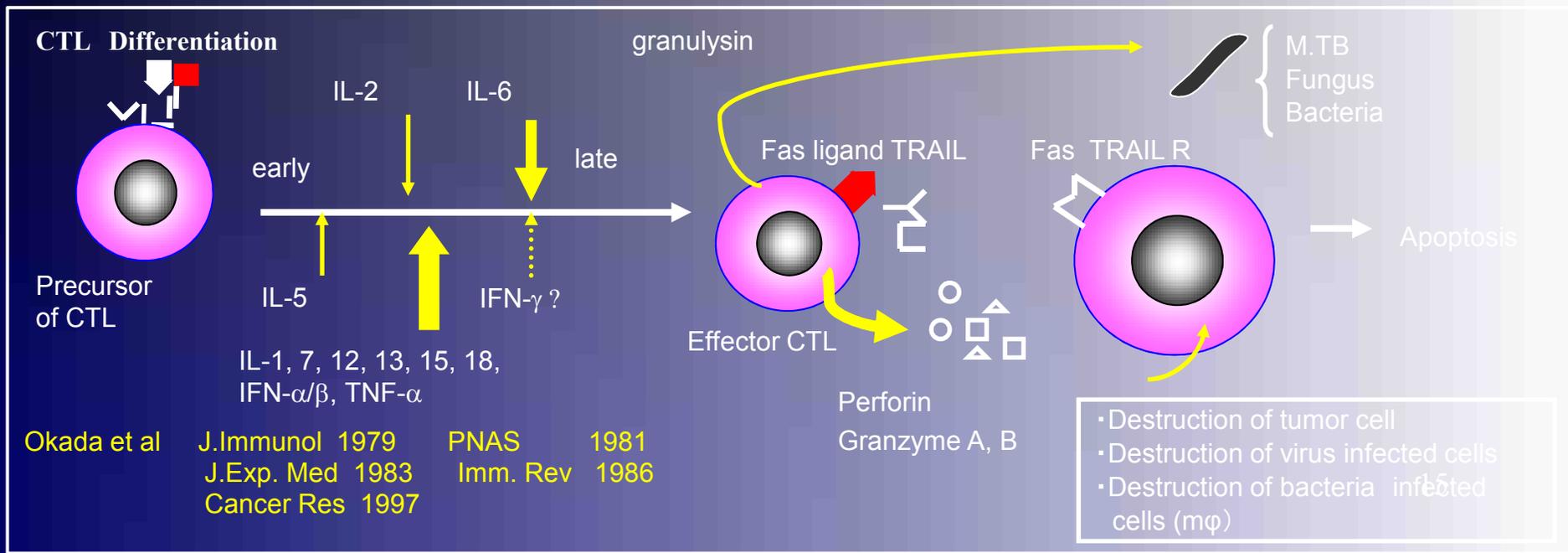
(—)

CTL activity

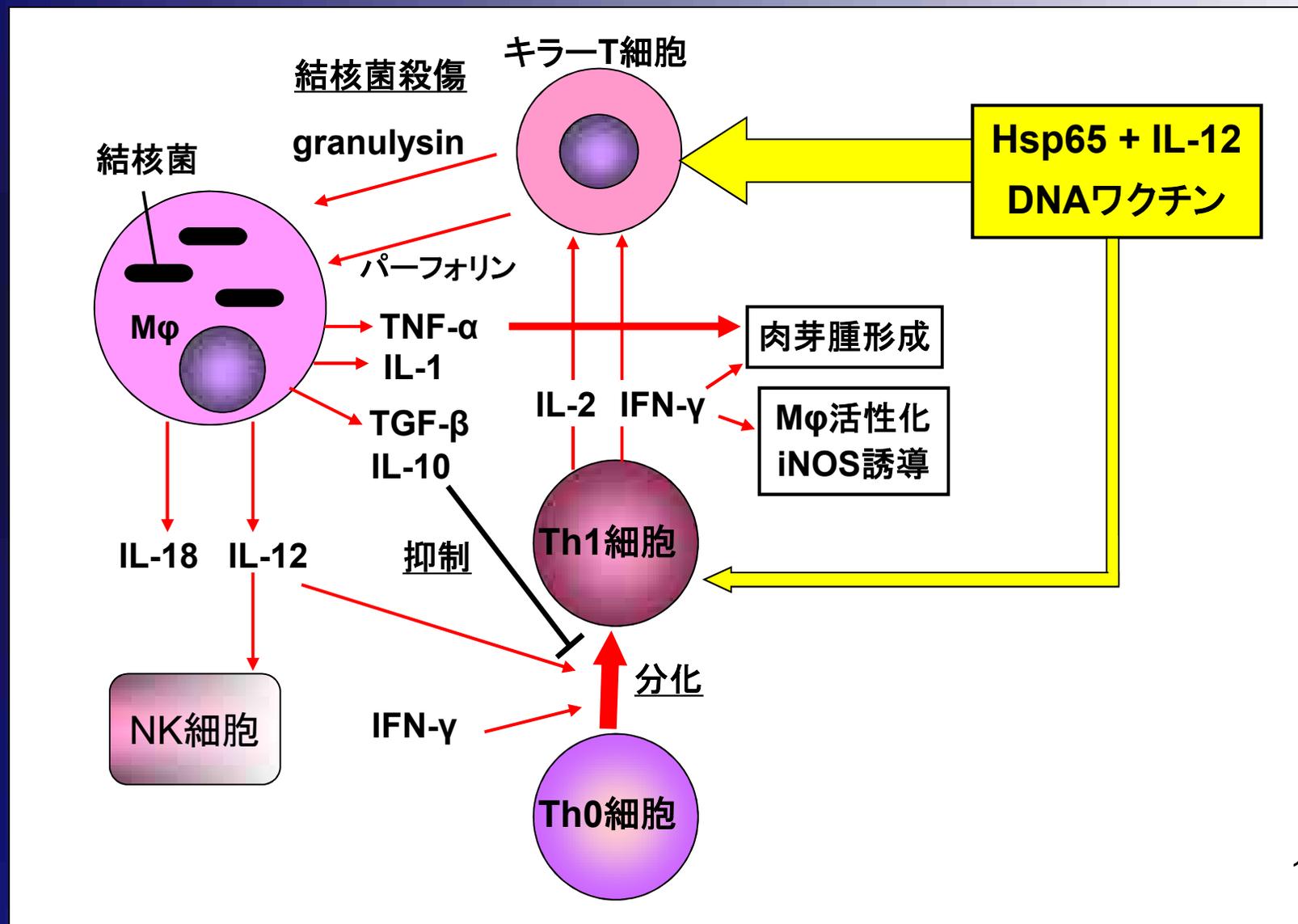
++

±

±



(Hsp65 + IL-12) DNAワクチンは キラーT細胞免疫とヘルパーT細胞免疫を増強した



カニクイザルモデル 【結核予防ワクチン効果】

1. カニクイザルは、人間の結核感染モデルで最高の動物モデルである。
(Walsh, Tan et al. Nature Medicine 1996)
2. 結核空洞はカニクイザル結核感染モデルで示される。

Co-worker

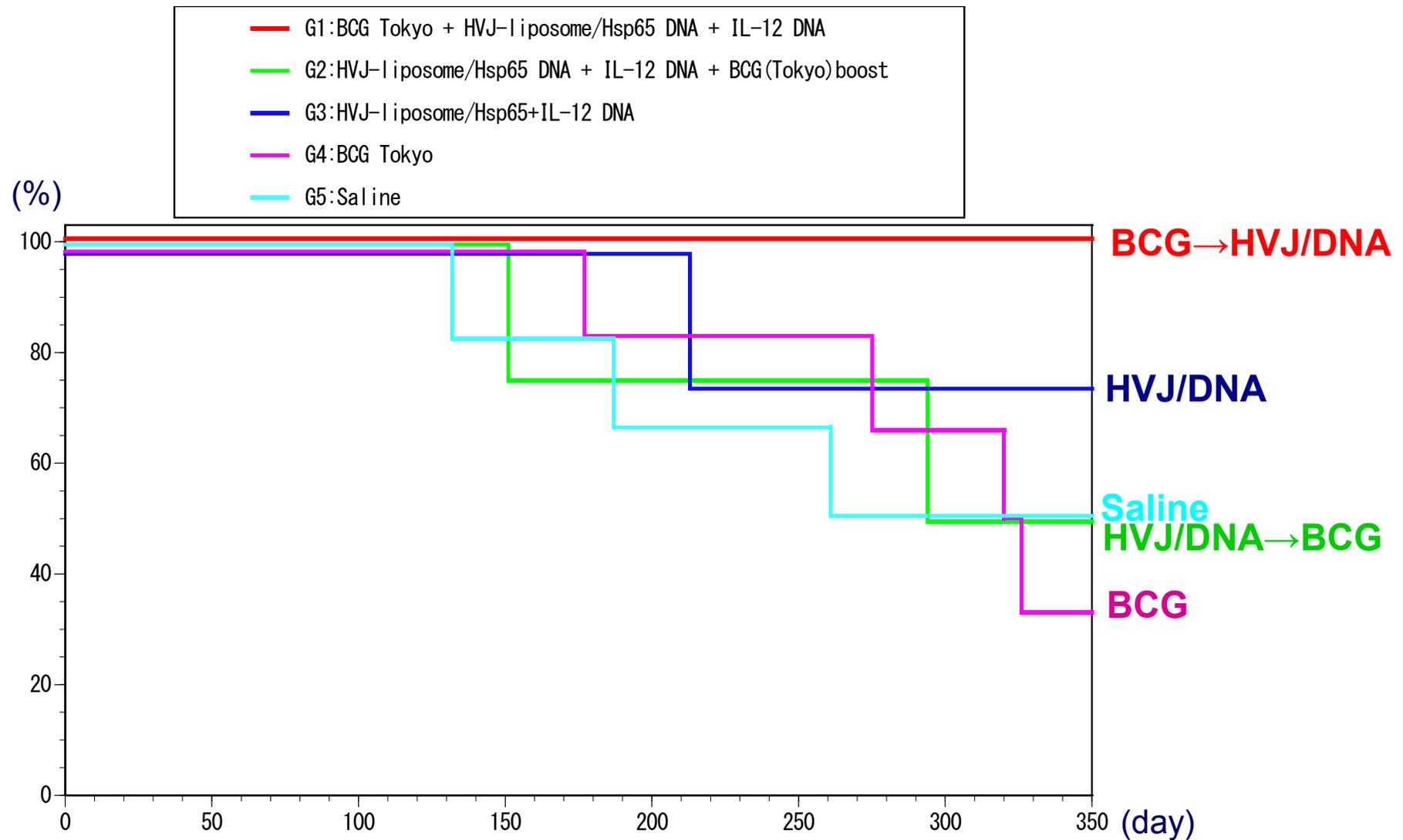
Dr. Babie Tan,

Dr. Paul Saunderson

Leonard Wood Memorial



カニクイザルを用いたHVJ/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccineとBCGを使ったプライム-ブースト法



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25-27年度)

多剤耐性結核に対する
新規治療用DNAワクチンの開発・実用化
に関する研究

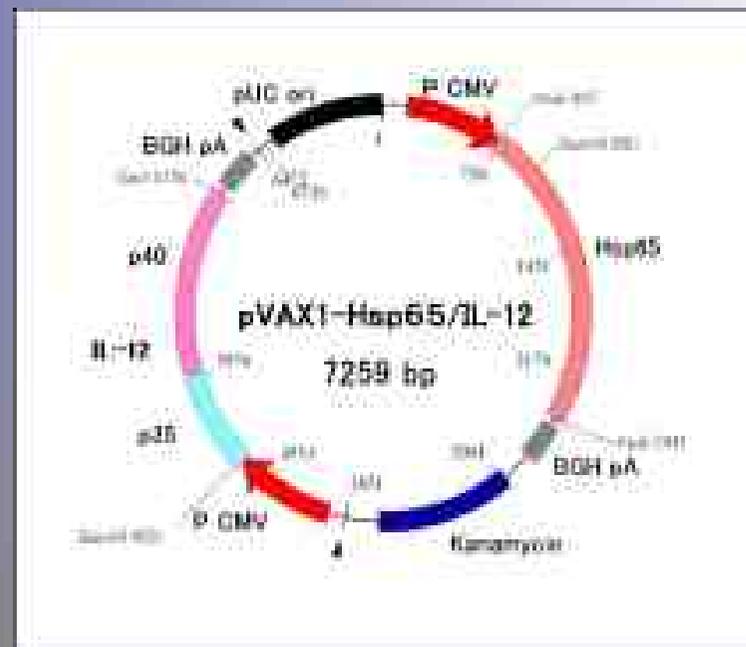
研究目的

1. **新しい結核ワクチンの効果と毒性・安全性の前臨床試験。**
HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン
(**マウス・サルですでに結核治療効果**)

HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan

プラスミドDNAは外国からの輸入ではなく国内のAMBiS社で治験薬GMP製造を計画

2. **多剤耐性結核に対する結核治療ワクチンの臨床応用・実用化**
 - ①結核は世界の最大感染症の一つ
 - ②多剤耐性結核菌 (莫大な医療費、治療困難)の増加
 - ③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。



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、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 (ジェノメディア株式会社 中島、東海大学 三上)
前臨床試験

- ① 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。**
- ② 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、露口、東京病院:庄司、茨城東:齋藤、大阪大学:朝野、熊ノ郷)

4. 評価:

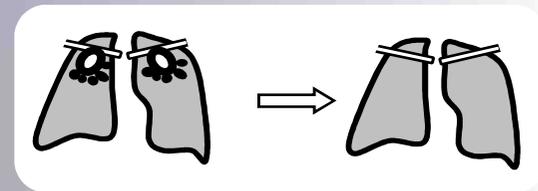
- (1) 安全性(主要): CTCAEを指標とする安全性の評価
- (2) 有効性(副次): ①**多剤耐性結核菌 排菌陰性化。** ②**多剤耐性結核菌の排菌数減少。**

期待される成果

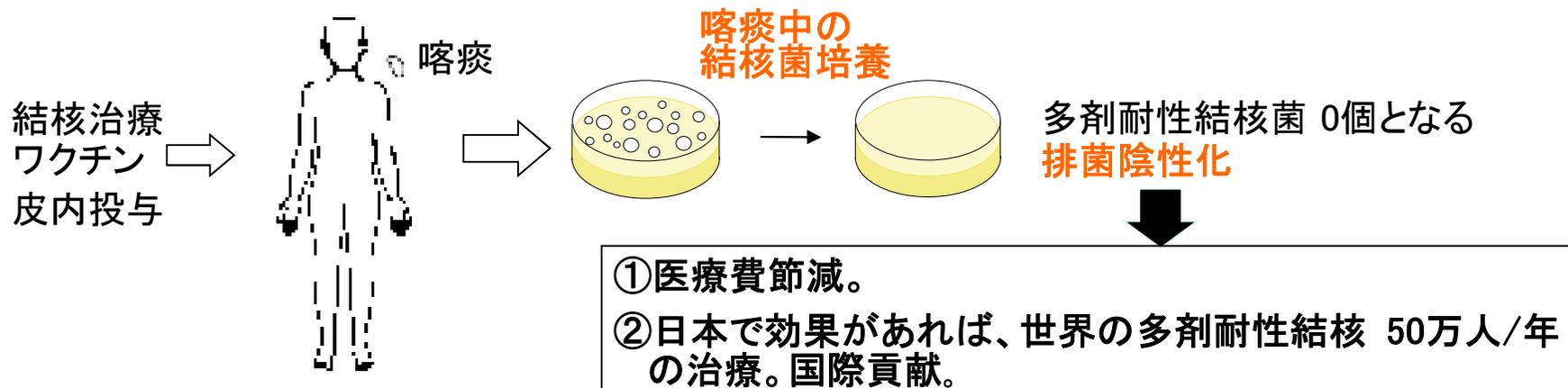
ヒト臨床応用

新しい結核治療ワクチン

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



第1相医師主導治験評価



結核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

Cynomolgus
monkey



気道内感染

TB
challenge

5×10^2 CFU



7 day

21 day



Therapeutic Vaccine

赤沈
体重
胸部 X-P
免疫応答
生存

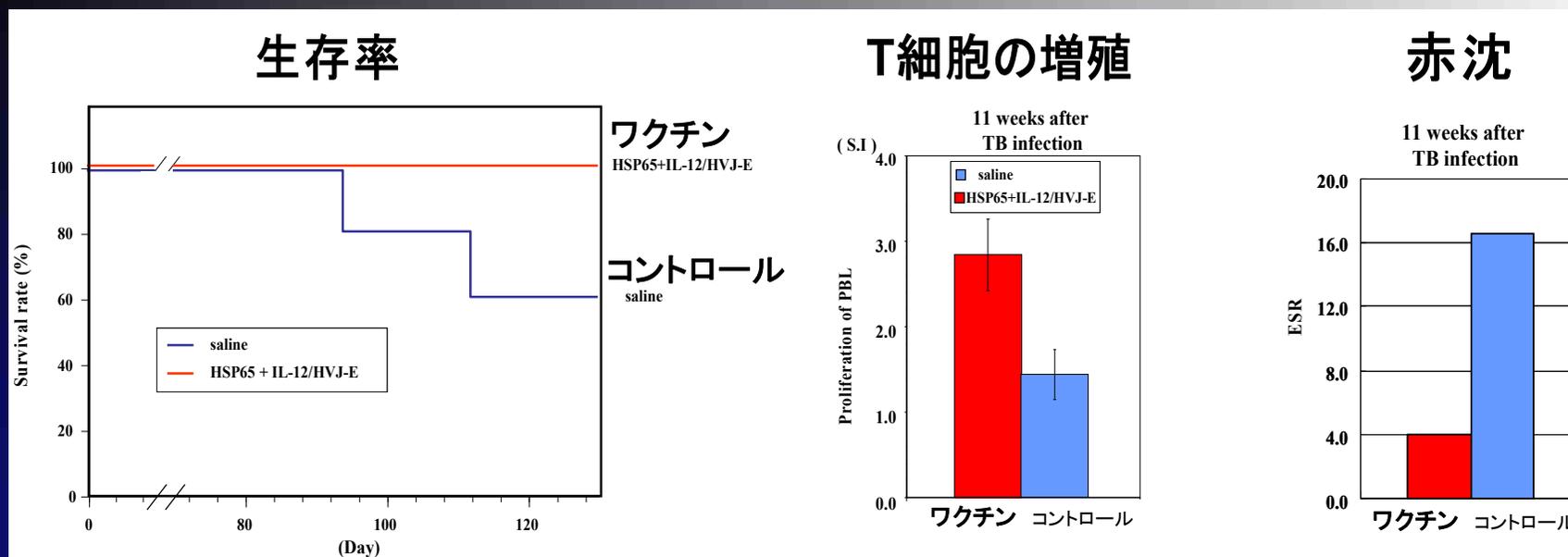
特色・独創的な点

1.有効性の実証

- ① カニクイザルの結核感染モデルで、HVJ-エンベロップ/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)

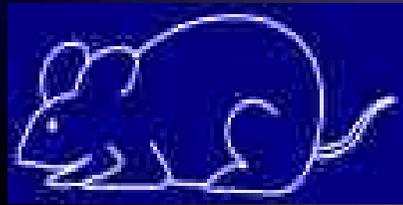


岡田はWHOのWGND (Working Group of New TB Drug) 委員会委員に選ばれた(2009年から)

HVJエンベロープ/Hsp65 DNA + IL-12 DNAワクチン (カニクイザルにおける結核治療ワクチン効果)

1. 生存率の改善
2. 体重増加
3. 赤沈(赤血球沈降速度)の改善
4. 胸部X線所見の改善
5. 免疫反応の増強
 - (1) Tリンパ球増殖反応
 - (2) IFN- γ 産生
 - (3) IL-2産生
6. IL-2の産生と生存率(結核治療効果)は相関した。

〔方法〕



H37Rv
5X10⁵
i-v

HSP65 + IL-12 DNAワクチン
±
BCG

0日

1日

8日

15日

30日

Sacrify

肺臓 結核菌数
肝臓
脾臓

結核菌に対する
免疫反応

- ・キラーT細胞
- ・増殖反応
- ・サイトカイン産生

超薬剤耐性結核

Extensively Drug Resistant TB (XDR-TB)

Extremely Drug Resistant TB (XDR-TB)

XDR-TBの新たな定義

- (1) 少なくとも RFPとINHに耐性(MDR-TB)
- (2) フルオキノロン耐性
- (3) 以下の注射可能な薬剤の1種以上耐性

アミカシン

カナマイシン

カプレオマイシン

XDR-TBの元来の定義

結核治療薬第二ラインの主要な抗生剤のうち3種類以上に耐性のMDR-TB
(アミノグリコシド系、ポリペプチド系、フルオロキノロン系、
チオアミド系、ツクロセリン系、パラアミノサリチル酸系)

超藥劑耐性結核

Extensively Drug Resistant (XDR-TB) Extremely Drug Resistant (XDR-TB)

藥劑名	濃度	判定	濃度2	判定	藥劑名	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							

藥劑洗度單位 μg/ml

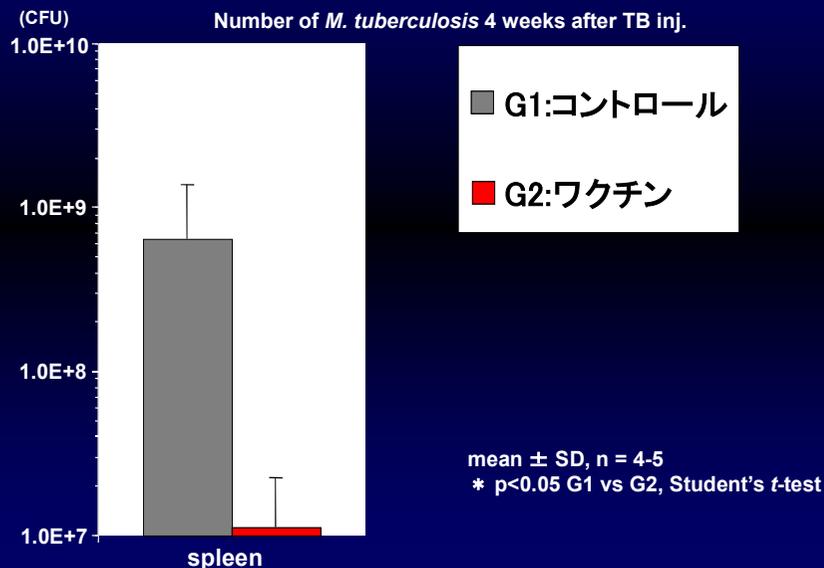
R···耐性

S···感受性

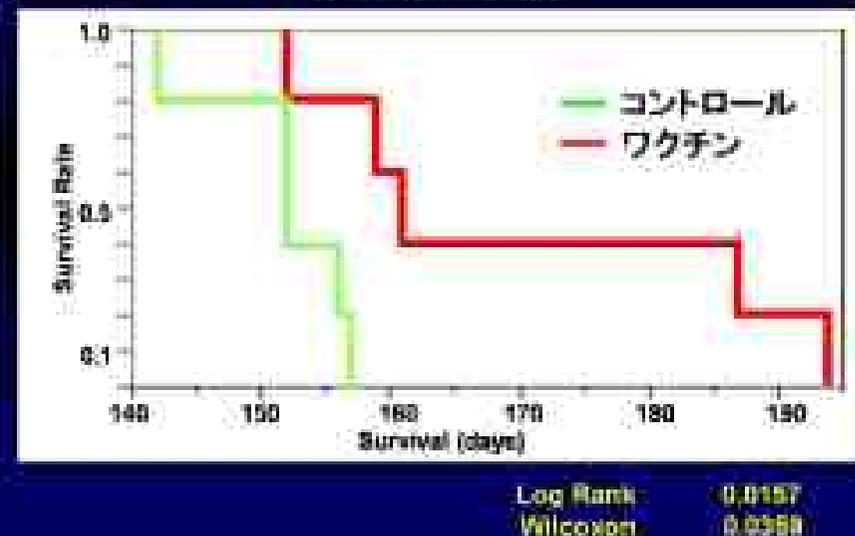
#···判定不能

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

多剤耐性結核治療効果



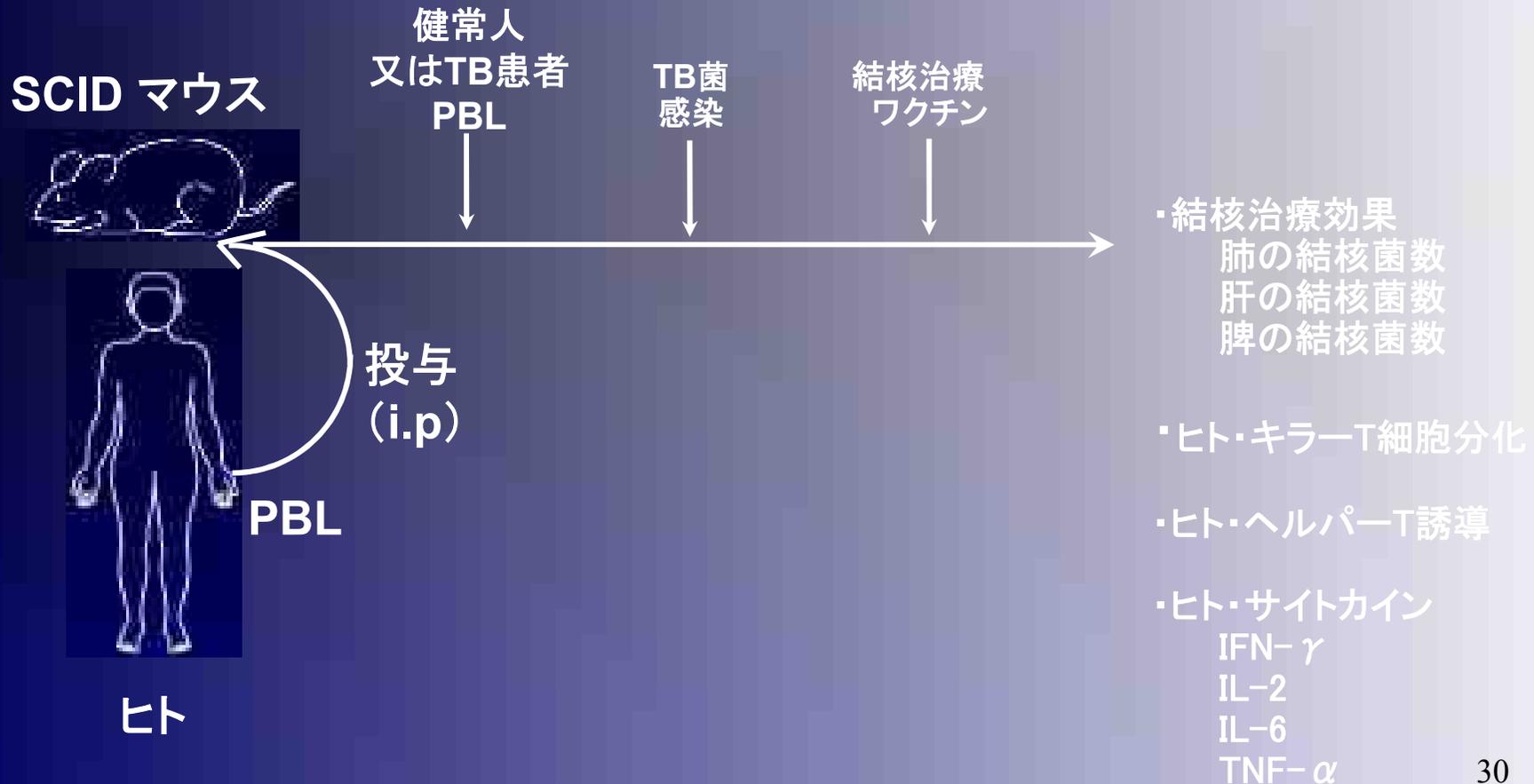
超多剤耐性結核 (XDR-TB) 治療効果 (生存曲線)



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」

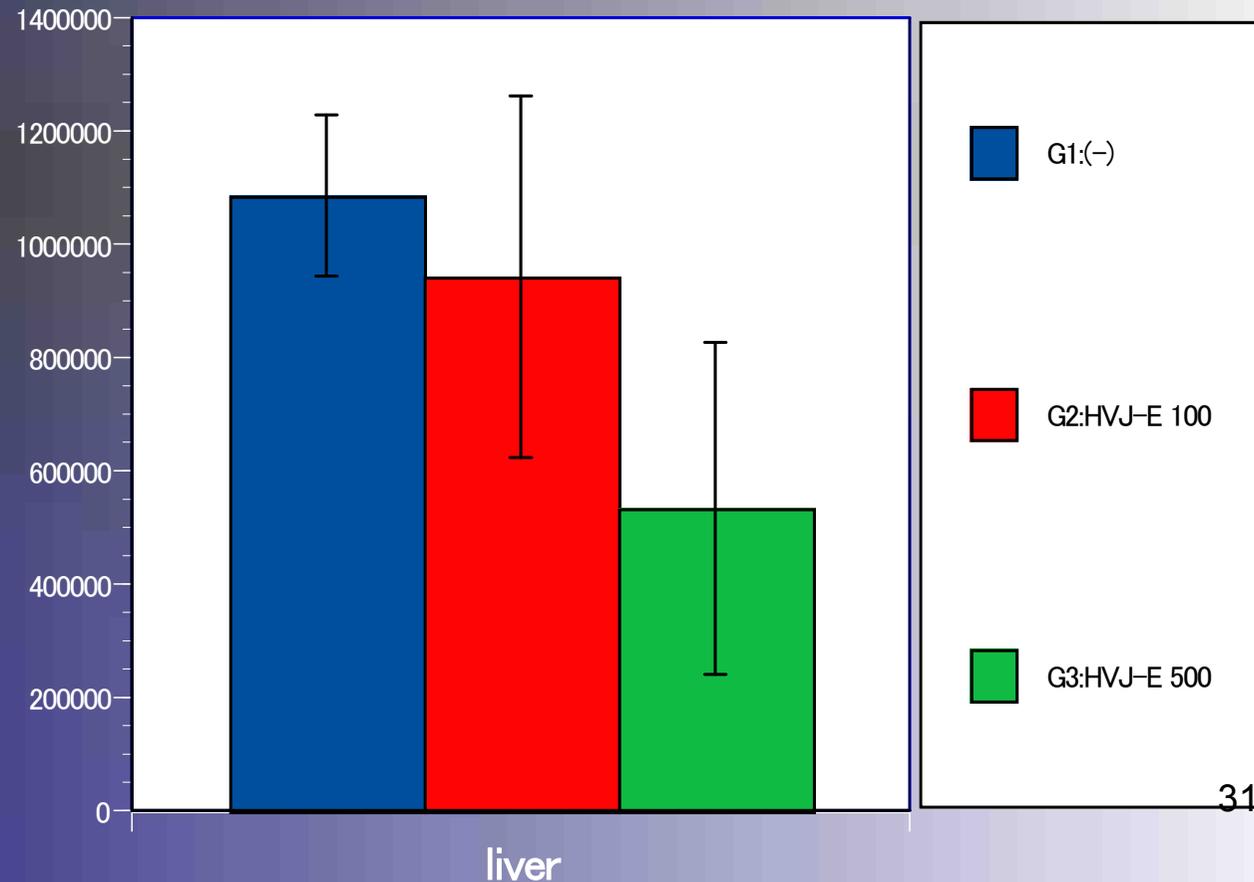
結核菌に対する治療ワクチン 生体内ヒトモデル(SCID-PBL/hu)の開発



結核に対する治療ワクチン： 世界に先駆けての開発

TBに対する治療ワクチン

IL-2レセプター γ 鎖ノックアウトSCIDマウスを
用いたSCID-PBL/huヒト免疫モデルマウス
(Okada Cancer Res 1997)



HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンと化学療法剤(RFP、INH)との結核治療相乗効果

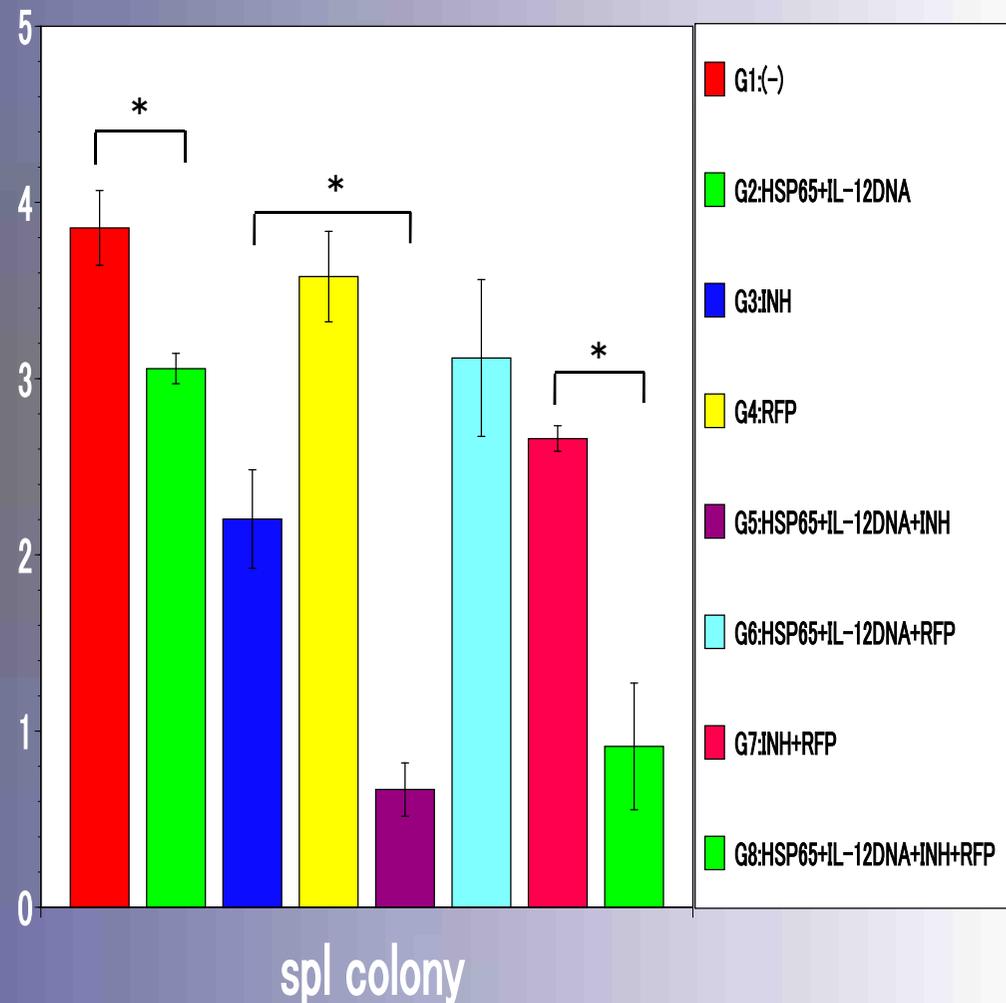
グループ	治療
G1	(-)
G2	HSP65+IL-12DNA
G3	INH
G4	RFP
G5	HSP65+IL-12DNA
	+INH
G6	HSP65+IL-12DNA
	+RFP
G7	INH
	+RFP
G8	HSP65+IL-12DNA
	+INH
	+RFP

INH 0.03mg/mouse

RFP 0.1mg/mouse

(HSP65+IL-12) DNAワクチンとINHとの結核治療相乗効果

(log₁₀ CFU)



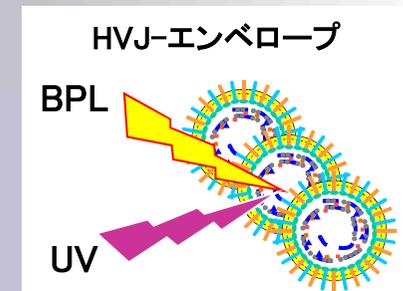
* P<0.05

Student's t test

特色・独創的な点

2. 医師主導治験の実施に向けた準備状況

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



特色・独創的な点

3.明確な出口戦略

- ① 多剤耐性結核など対応可能な病院が**国立病院機構**等に限定される感染症の治療用ワクチンを、**PMDA**、**大阪大学**、**遺伝子治療学会**、**企業**が**新技術(DNAワクチン)**で開発、ガイドライン策定に繋げる**産学官共同研究**
- ② **民間企業(ジェノミディア)**が参加。薬事法に基づく承認取得までの**出口戦略**を明確にした研究

論文

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

承認取得までのロードマップ

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

開発項目		治験開始からの年度							
		平成25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	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔

研究計画

平成25年度

1. 本DNAワクチンの用法用量設定試験(岡田、井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷)
2. 投与経路最適化(岡田、井上、露口、朝野、熊ノ郷)
3. 毒性試験(中島、金田、朝野、三上)
4. GMP製造(中島、金田、朝野)
5. PMDA薬事戦略相談・対面助言(岡田、井上、三上、中島)

平成26年度

1. 本DNAワクチンの用法用量設定試験継続
2. 投与経路最適化継続
3. 毒性試験継続
4. GMP製造: 治験薬GMP製造(試験製造を実施)、3ヶ月長期安定性データを取得
5. IRB申請: 治験計画書案作成を完了、IRB申請手続きを行い承認取得(岡田、井上、露口、庄司、齋藤、松本、朝野、熊ノ郷、三上、中島)

平成27年度

1. 毒性試験: 次相用データ取得(中島、金田、朝野、三上)
2. GMP製造: 治験薬GMP製造、6ヶ月長期安定性データ取得(中島、金田、朝野)
3. 医師主導治験: 治験届、治験(井上、露口、庄司、齋藤、松本、朝野、熊ノ郷、三上、中島)

予定される治験の流れ

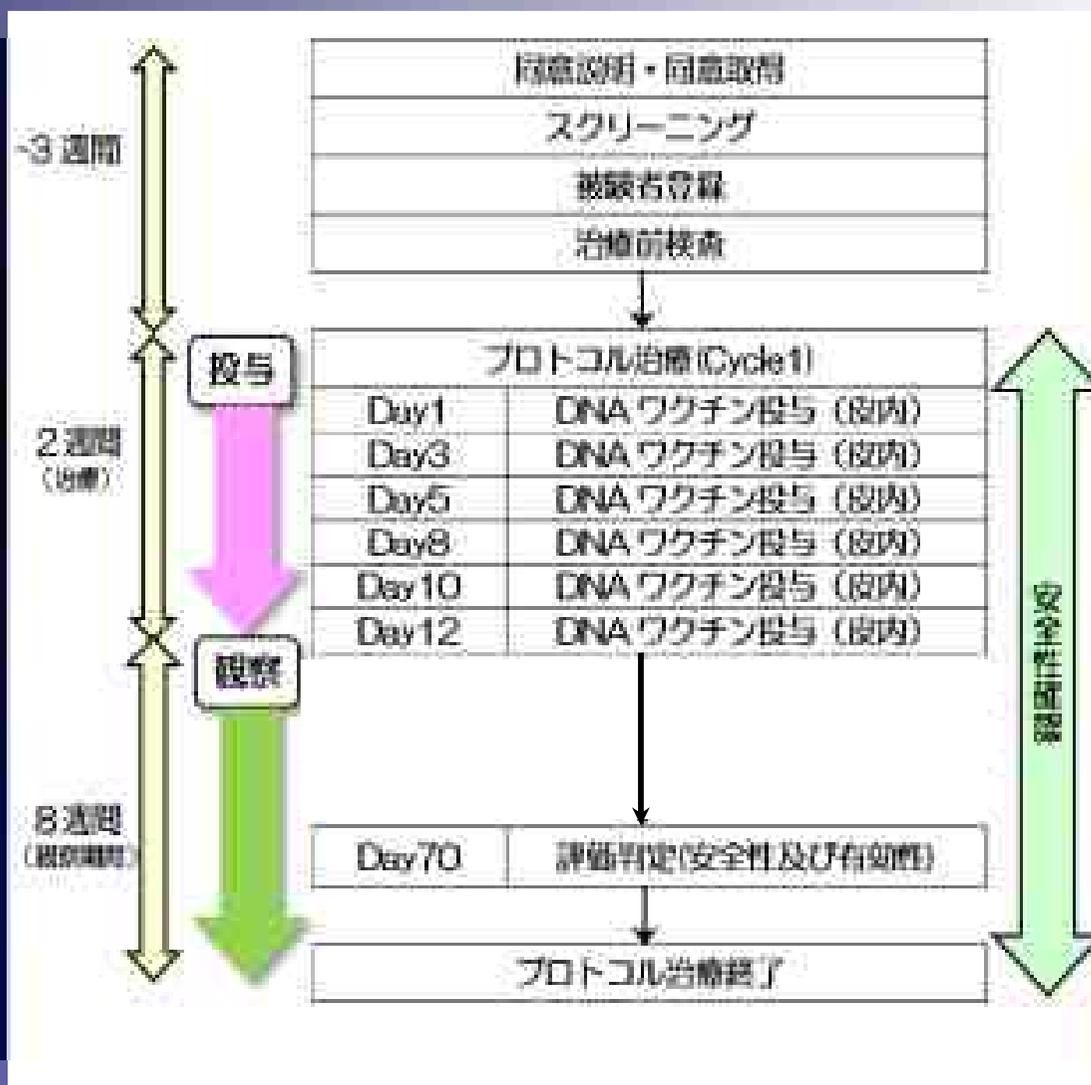
多剤耐性結核患者 (INH耐性 + RFP耐性)

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

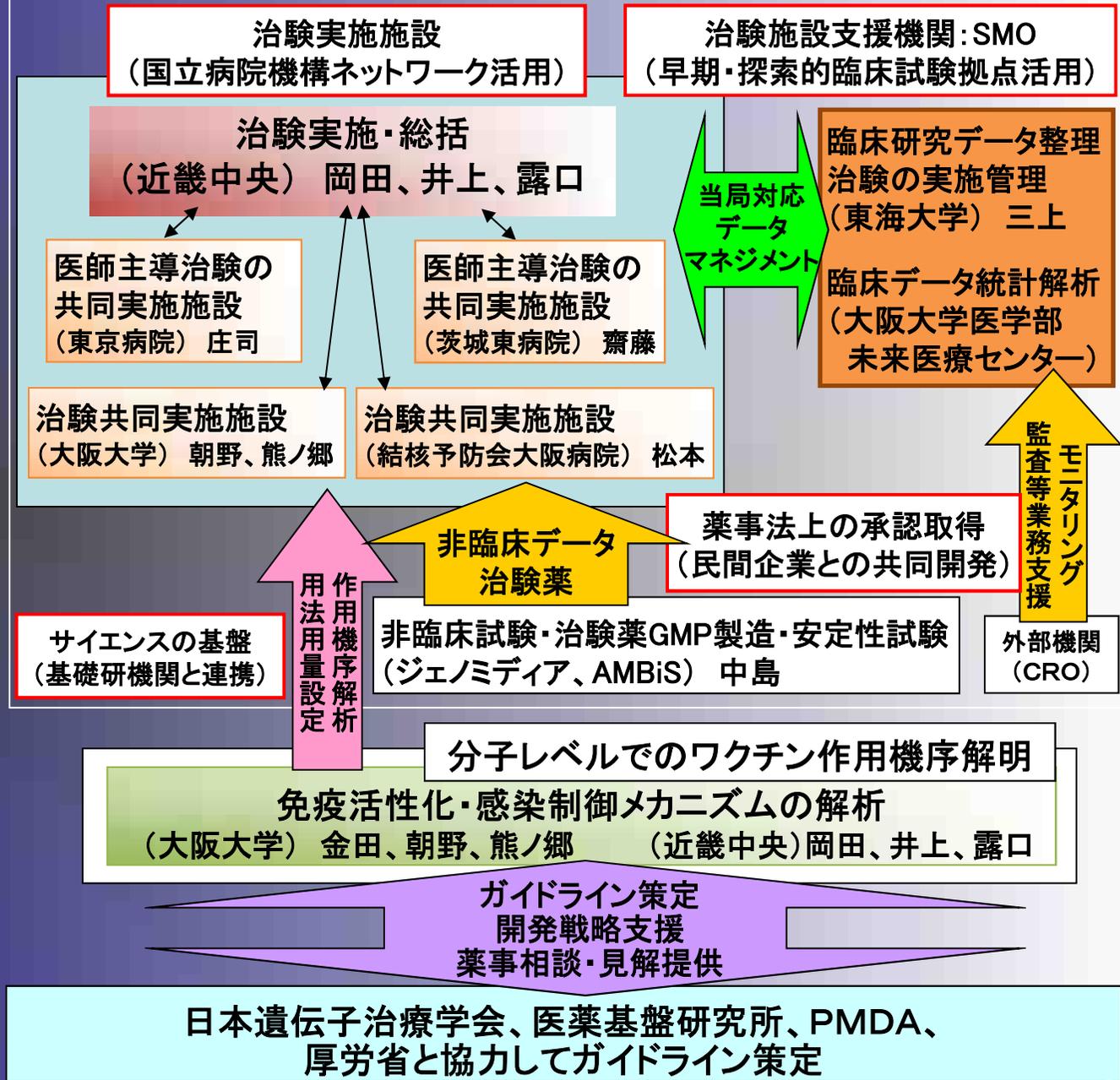


治験の実施体制

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

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

本剤の医師主導治験実施体制 (安全性・忍容性・有効性の検証)



平成25年度 研究進捗状況

1. ICQ/Q5Dガイドラインに従い治験薬製造用の本ワクチン(pVAX/HSP65 DNA+ヒトIL-12 DNA)のマスターセルバンク(MCB)を分担研究者中島と共にAMBIS社で作製(中島・岡田)

治験薬GMP製造ワクチン

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 国立遺伝研より大腸菌のDH5 α 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。
- ④ 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。
- ⑤ 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。

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。



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下記のようにラベルを貼付した。



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 α)]。

平成25年度 研究進捗状況

2. 作製された本ワクチンの品質規格を評価。ICHのQ5B・Q5Dガイドライン準拠の特性解析、品質試験。(中島)

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	①薬剤感受性試験	カナマイシン耐性
	②栄養要求性試験	栄養要求性なし
	③グラム染色試験	グラム陰性
混入否定試験	④コロニー形態試験	大腸菌以外の形態のコロニーなし
	⑤ファージ否定試験	ファージ陰性
プラスミド確認	⑥制限酵素地図試験	理論サイズと一致
生存率試験	⑦生菌数試験	10^7 大腸菌/mL以上

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。

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	①性状試験	無色透明の液体	目視
確認試験	②塩基配列	参照配列と一致	2本鎖の配列解析
	③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	④DNA濃度	規定から±10%以内	吸光度(A260)
純度試験	⑤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
	⑥吸光度比(A260/A280)	1.80-1.97	吸光度
	⑦宿主DNA	適合	電気泳動法
	⑧宿主RNA	適合	電気泳動法
	⑨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
	⑩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	⑪不溶性微粒子試験	適合	日局
不溶性微異物	⑫不溶性微異物試験	適合	日局
pH	⑬pH試験	規定から±10%以内	日局
浸透圧	⑭浸透圧試験	規定から±20%以内	日局
無菌性	⑮無菌試験	適合(菌の増殖なし)	日局
エンドトキシン	⑯エンドトキシン試験	適合(50EU/mg未満)	日局

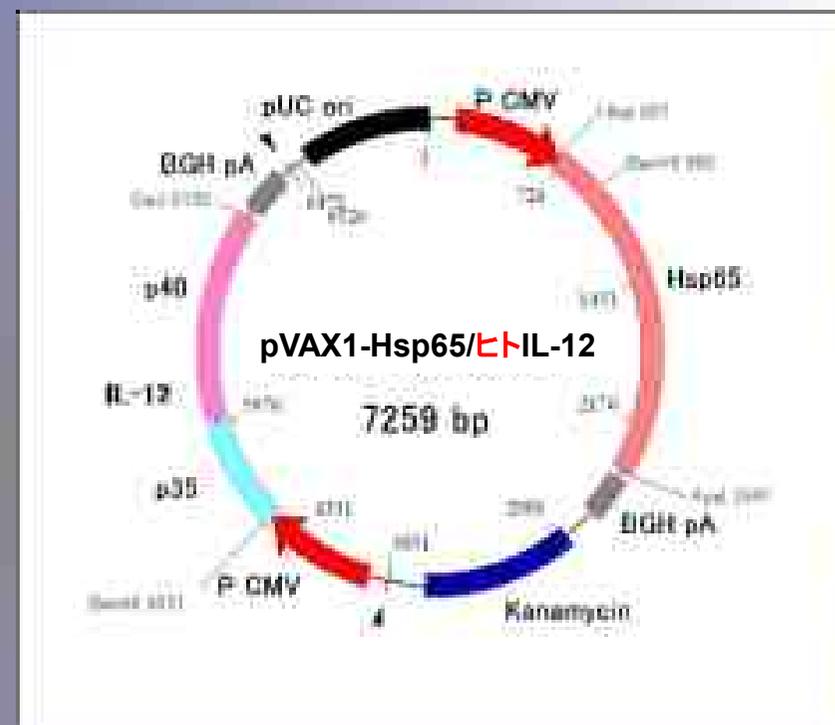
SC体: Supercoil体(スーパーコイル状のプラスミドDNA)、OC体: Open circular体(開環状のプラスミドDNA)、LN体: Linear体(直鎖状のプラスミドDNA)

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。

平成25年度 研究進捗状況

- 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



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

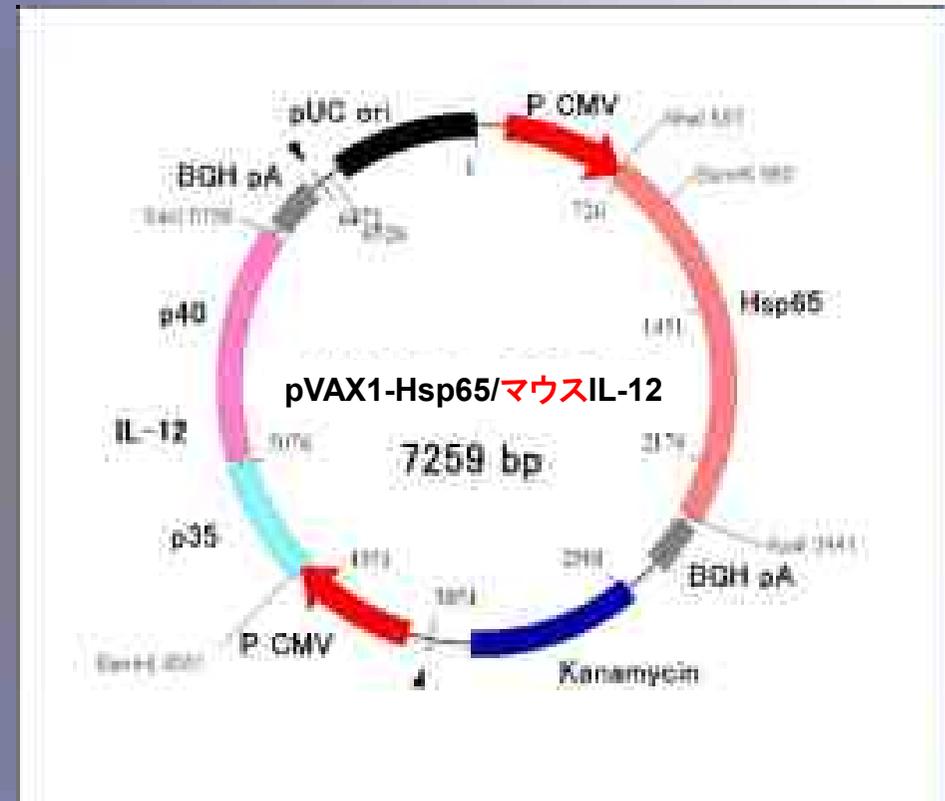
試験動物	カニクイザル♂♀
被験物質	pVAX1-IgHSP65-hIL12+ HVJ-E
投与方法 投与期間 観察期間	投与経路:皮内投与 投与期間:2週間 観察期間:投与期間2週間+回復期間2週間
群構成	投与群:♂♀で4群(対照群+3用量) 回復群:♂♀で2群(対照群+1用量)
評価項目	一般状態観察 摂餌量測定 体重測定 血液学的検査 血液生化学的検査 眼検査 尿検査 剖検 器官重量測定 病理組織標本作製及び検査
安全性薬理 (中枢神経系)	FOB(機能観察総合評価法):投与前後で実施
抗体価測定	採血を行って抗体価をELISAで測定
備考	投与液の濃度分析及び安定性分析を実施

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。

平成25年度 研究進捗状況

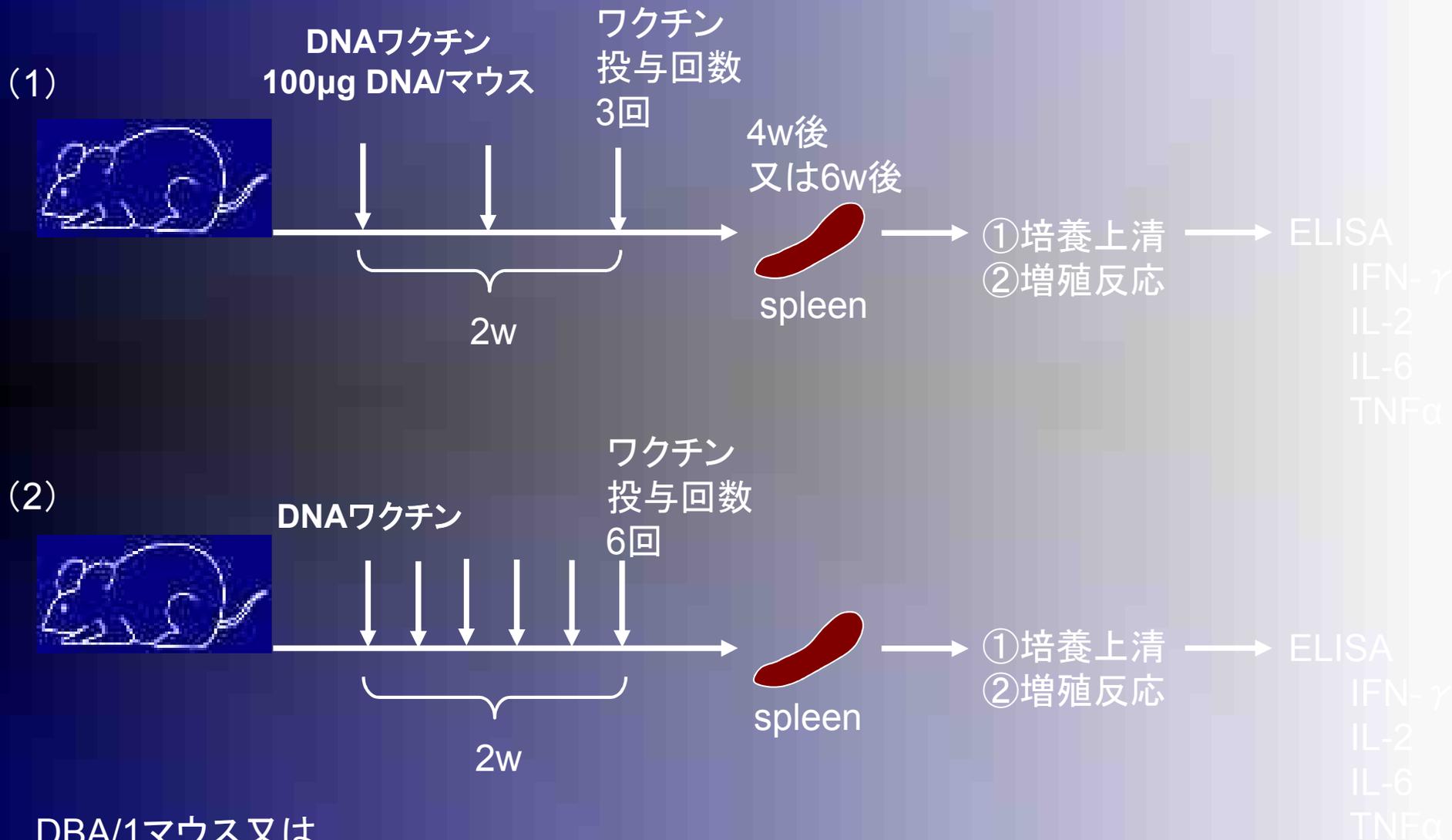
4. pVAX/HSP65 DNA+マウスIL-12 DNAを作成した。
(70mgを作成した)



平成25年度 研究進捗状況

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実施中。井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷と共同研究で実施中。

用法検討(DNAワクチン投与回数検討)



DBA/1マウス又は
C57BL/6マウス
(各群6匹)

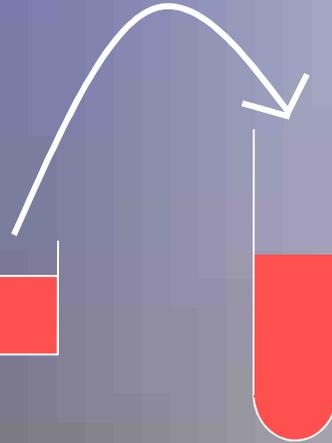
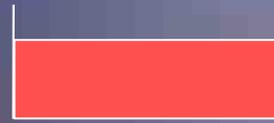
生体組織ではHVJ由来の蛋白質に対する免疫反応が惹起され、抗体による中和反応がおこることが考えられるが、遺伝子を封入しないHVJ-EとルシフェラーゼDNA封入HVJ-Eを用いたマウスへの投与実験により、HVJ-Eを連続投与しても遺伝子発現の抑制は見られず、連続投与が可能であることが明らかになった。(金田)

ELISA

培養上清



2日



ELISA

IFN- γ

IL-2

IL-6

TNF α

脾細胞

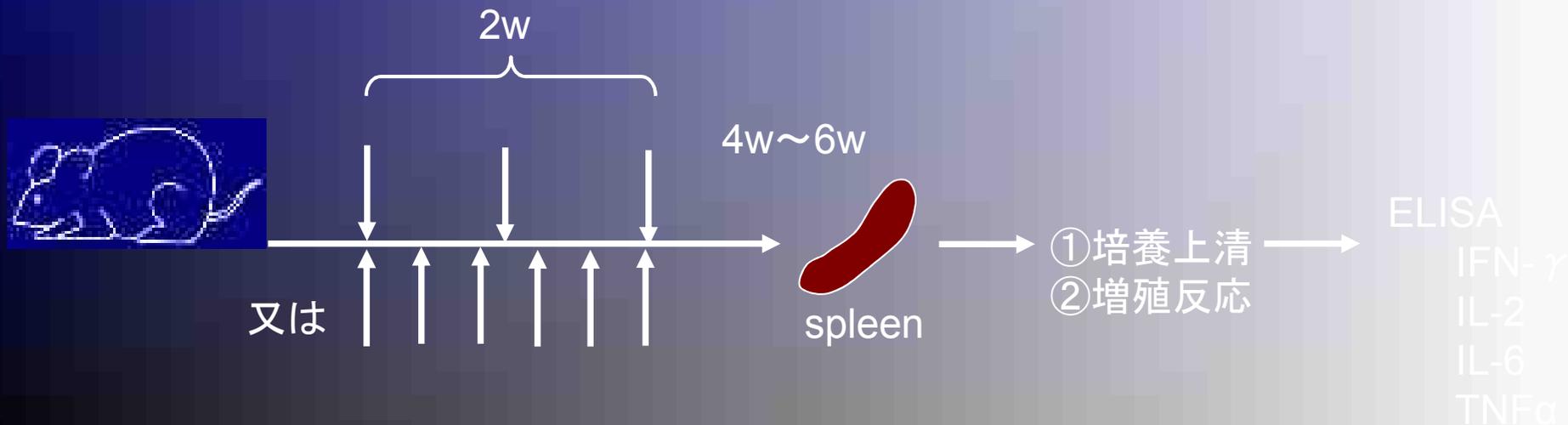
5×10^6 /well

抗原刺激

- ① HSP65 20 μ g/ml
- ② PPD 20 μ g/ml
- ③ 結核死菌 20 μ g/ml

(Linbro 24well)

用量検討 (DNAワクチン投与量検討)



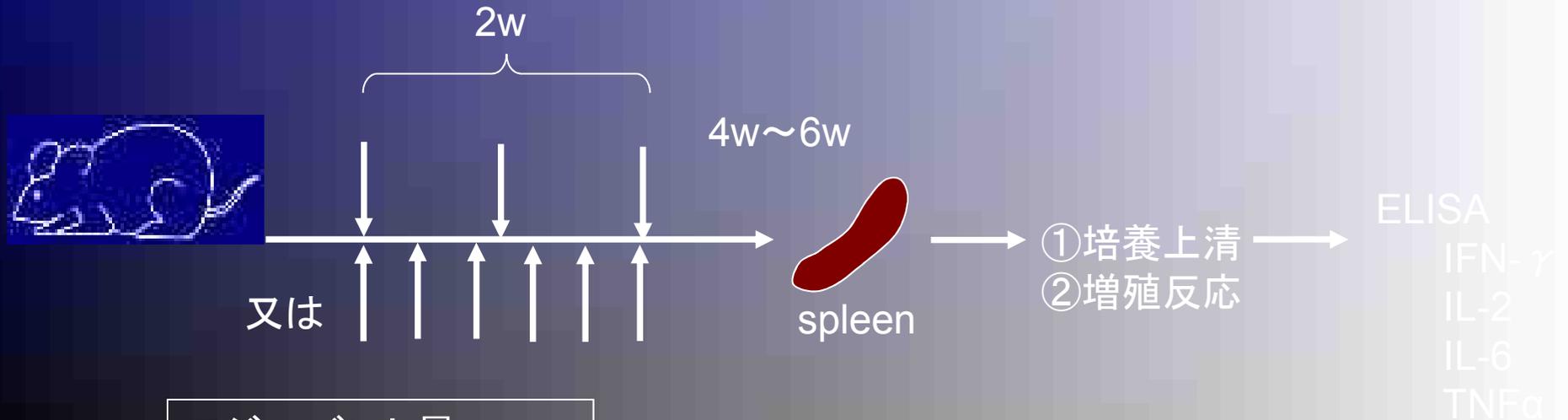
DNA投与量

- ① 0 $\mu\text{g}/\text{マウス}$
- ② 25
- ③ 100
- ④ 280

アジュバント量

- ① 0 mNAu
- ② 100
- ③ 400
- ④ 1120

用量検討(アジュバント添加量)



アジュバント量

① pDNA最適用量が280 μ gのとき:

70, 280, 1120 mNAu

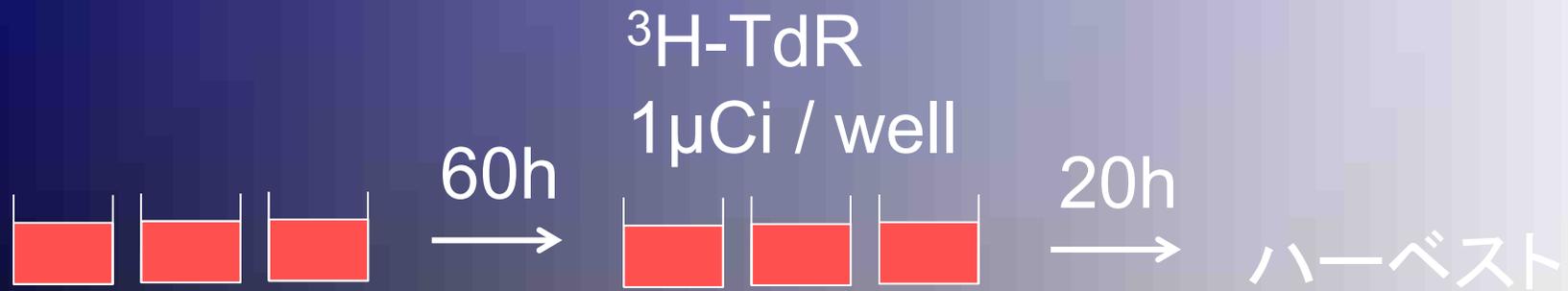
② pDNA最適用量が100 μ gのとき:

100, 400, 1600 mNAu

③ pDNA最適用量が25 μ gのとき:

100, 400, 1600 mNAu

増殖反応 Assay



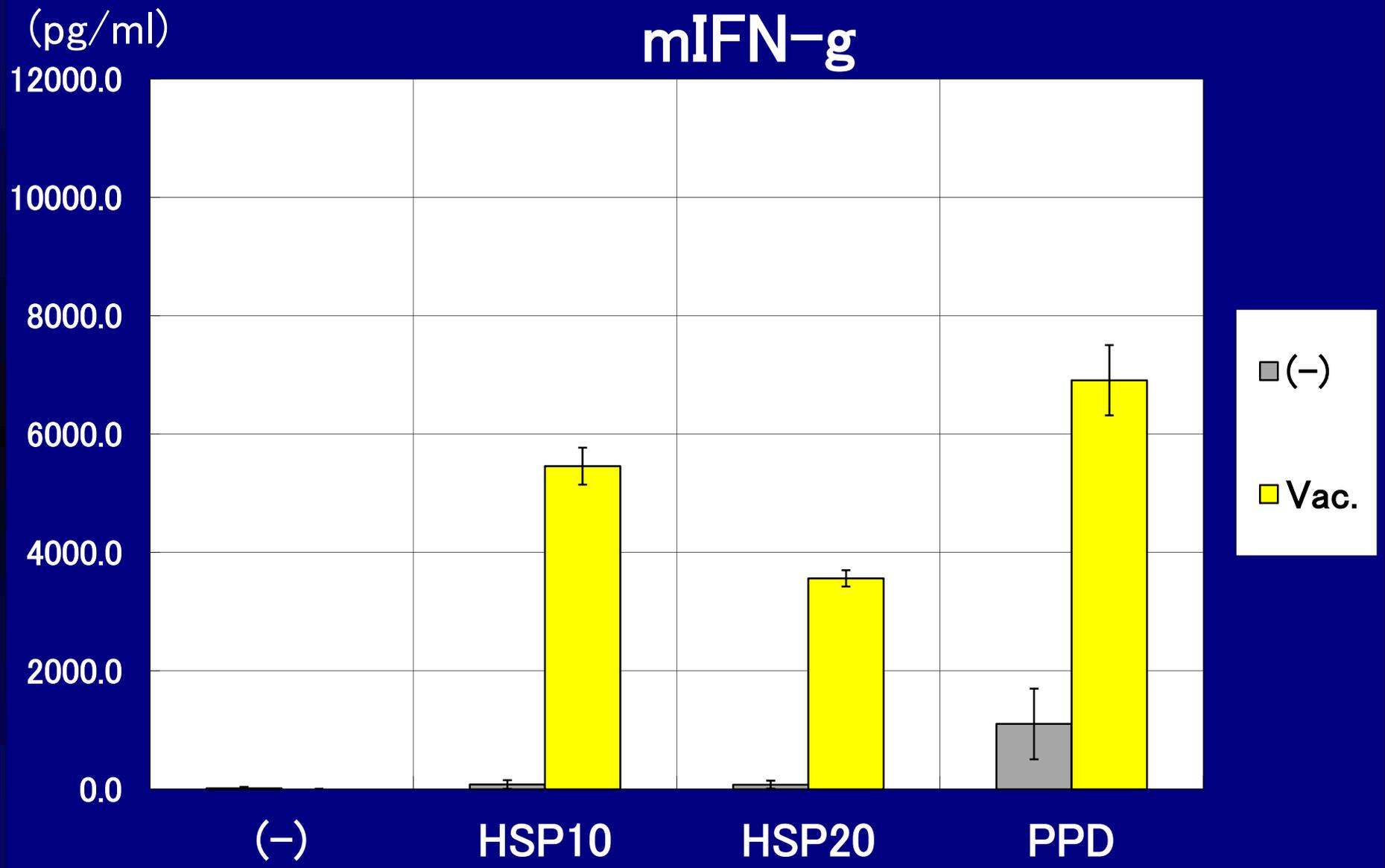
脾細胞

$1 \times 10^5/\text{well}$

抗原刺激

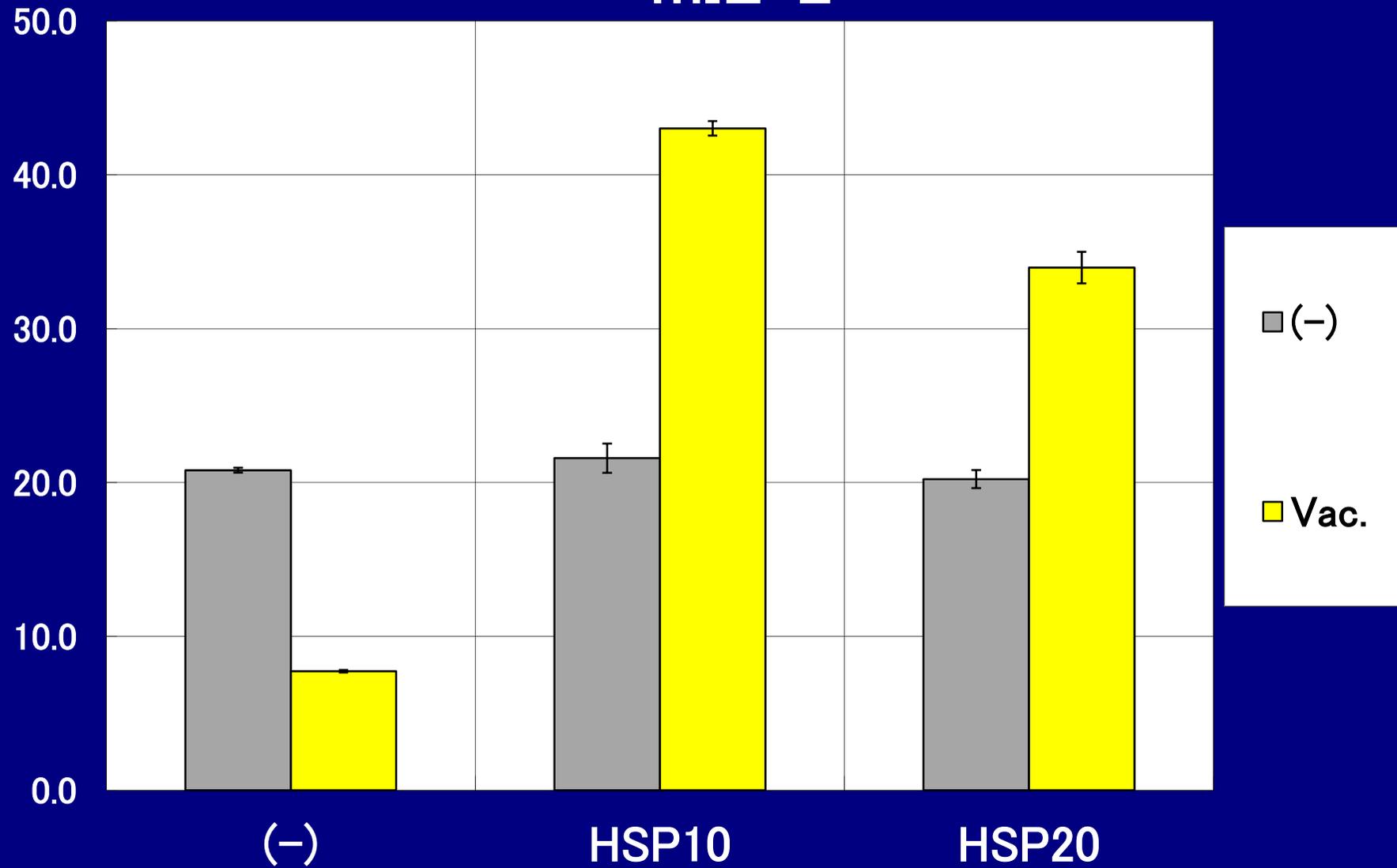
- ① HSP65 10 $\mu\text{g/ml}$
- ② PPD 20 $\mu\text{g/ml}$
- ③ 結核死菌 20 $\mu\text{g/ml}$

(Linbro 96well)



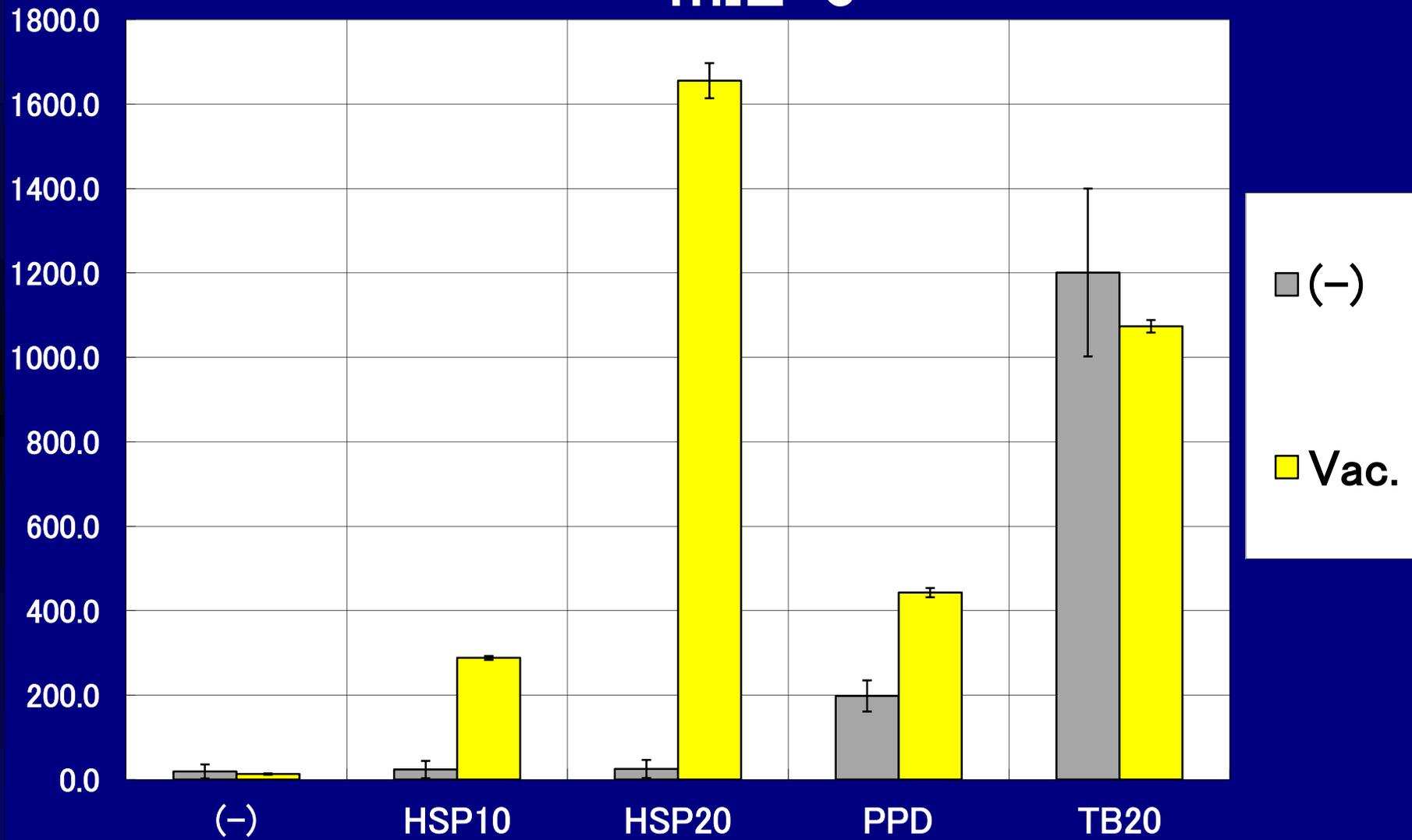
(pg/ml)

mIL-2



(pg/ml)

mIL-6



結果

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投与し、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 α (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確認。(岡田・井上・露口・中島・朝野・熊ノ郷)

平成25年度 研究進捗状況

6. 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）

- 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
- 東京病院
- 茨城東病院
- 結核予防会大阪病院

多剤耐性結核患者の調査

病院施設名	多剤耐性結核患者数 (MDR-TB)	特徴
国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター	55例(7年間)	超多剤耐性結核 20例(7年間)
東京病院	40例(10年間)	死亡 7名 治療完了 9 治療脱落 1 転出 10 治療継続 8 (3名は後に死亡) 入院中 1 不明 4
茨城東病院	10例(12年間)	男性多し。 不規則治療が誘因

平成25年度 研究進捗状況

7. 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 研究進捗状況

- ① 大阪大学医学部を中心として統括する、本ワクチンの臨床治験（医師主導第Ⅰ相治験）に向けて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。
- ② 医師主導治験に向けての組織化（大阪大学を中心とした）（朝野、熊ノ郷、金田）。
- ③ 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。

本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1. Okada M, Nakajima T, Kaneda Y, Tan E.V, McMurray D, Inoue Y, Tomono K, Kumanogo A, Tuyuguchi K, Shoji S, Mikami A, 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. Oct. 27-29, 2013. Barcelona, Spain (Oral), Japanese Society of Vaccine (JSV) joint session
2. Okada M(1番目/9人中), Nakajima T(7/9), Kaneda Y(8/9).: Novel therapeutic vaccines against tuberculosis and their synergistic efficacy. p.156. 44th Union World Conf. Paris. Nov. 3, 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.
10. 岡田全司 新しい結核治療ワクチンの開発研究“慈恵医科大学”特別講演 東京 2013年9月29日
11. 岡田全司 新規結核治療ワクチンの開発研究“金沢大学薬学シンポジウム” 金沢 2013年11月26日

本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

12. Kaneda Y. RIG-I/MAVS signaling pathway in cancer cell-selective apoptosis. J. Oncoimm. (in press)
13. Saga K, Kaneda Y. Virosome therapy for cancer. Biomed Research International (in press)
14. Kaneda Y(4/4). Recent advance and development in antitumor effect of HVJ envelope vector in malignant melanoma; from bench to clinical application. Cancer Gene Therapy. 20,599–605, 2013
15. 日本遺伝子治療学会理事長として以下の規制改革に貢献した。①再生医療製品を対象にした薬事法の改正につき、遺伝子治療製品も盛り込むよう、日本遺伝子治療学会より厚労省に依頼し、再生医療製品等、という形で盛り込まれた。②遺伝子治療の治験を始めるにあたって必要であった確認申請の見直し案を日本遺伝子治療学会より内閣府の規制改革委員会に提出し、2013年8月に厚労省から確認申請の廃止が通知された。

平成25年度 研究進捗状況

8. PMDA対面助言を計画中。
 - ①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
 - ②三上礼子、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

研究計画の具体的内容と研究担当項目

【H26年度】

1. **PMDA対面助言**(岡田、井上、三上、中島、朝野)
2013年9月より遺伝子治療薬の確認申請廃止、PMDA薬事戦略相談で合意する事となった。

非臨床試験項目設定、治験薬品質・安全性、治験実施計画等の、各項目で合意を得る。

ガイドライン制定に繋げるため、本年度は毒性・薬効薬理試験項目設定を完了、治験薬の品質と安全性に関する相談も開始

研究計画の具体的内容と研究担当項目

【H26年度】

- 2. 信頼性基準適合用法用量設定試験**(岡田、井上、露口、中島、朝野、熊ノ郷)
動物モデルで用法用量を最終化、用法用量ともに予備データを基に2週間の投与を目途に最適化を完了
- 3. 信頼性基準適合投与経路最適化試験**
治験に使用予定のデバイスで投与、筋内と皮内の比較で最適投与経路決定
- 4. GLP毒性試験**(中島、金田、朝野、三上)
PMDAとの合意内容でGLP試験実施、治験届に必要なデータをカニクイザル、ラット等で取得
- 5. GMP製造:試験製造、長期安定性試験**(中島、金田、朝野)
治験薬と同様の工程で製造、3バッチ程度で暫定規格設定、ICH Q5Cガイドラインに従って3ヶ月安定性データ取得
- 6. IRB申請:治験実施計画書作成完了、IRB申請**(岡田、井上、露口、庄司、齋藤、松本、朝野、熊ノ郷、三上、中島)
非臨床試験データを基に治験実施計画書作成、IRBへの申請完了

研究計画の具体的内容と研究担当項目

【H27年度】

- 1. 医師主導治験：治験届、治験**（井上、露口、庄司、齋藤、松本、朝野、熊ノ郷、三上、中島）
IRB承認で治験実施計画書最終化、PMDAへ治験届、受理後に医師主導治験開始、患者への投与は国立病院機構の3病院で実施、患者リクルート支援とデータマネジメントは大阪大学医学部附属病院が実施
- 2. 毒性試験：次相用データ取得**（中島、金田、朝野、三上）
第2相での承認申請を可能とする長期毒性データ取得、PMDAの薬事戦略相談に応じて1ヶ月～6ヶ月で設定
- 3. GMP製造：治験薬GMP製造、安定性試験**（中島、金田、朝野）
治験薬GMP製造で治験薬供給、6ヶ月の長期安定性データ取得

予定される治験の流れ

多剤耐性結核患者 (INH耐性 + RFP耐性)

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



行政施策への貢献の可能性

1. DNAワクチンという新規範疇の医薬ガイドライン策定に繋がり、医薬行政に貢献
2. 迅速対応可能なワクチンの基盤技術開発で新興・再興感染症対策に対して貢献
3. 国立病院機構でワクチンの医師主導治験体制を確立、国保有施設の新たな活用で民間企業のみでは難しい感染症ワクチン開発体制を強化し、対感染症ワクチン行政に貢献
4. 治療用DNAワクチン開発ガイドラインを世界に先駆け策定できる
5. 多剤耐性結核菌の他者への感染、医療費削減、国際的な保健衛生に貢献

