

【原著・臨床】

日本人成人を対象とした *Clostridium difficile* トキソイドワクチンの
安全性と免疫原性

松岡 治¹⁾・Dhaval M. Patel²⁾・佐々木 津³⁾・岡 勇人³⁾
佐々木 亨⁴⁾・Patricia J. Pietrobon²⁾・Thelma Laot⁵⁾・Alain Bouckenoghe⁶⁾
Josemund Menezes⁶⁾・Guy de Bruyn²⁾

¹⁾ 医療法人平心会 ToCROM クリニック

²⁾ Sanofi Pasteur, PA, USA

³⁾ サノフィ株式会社サノフィパツールメディカル部*

⁴⁾ 同 メディカルオペレーション部

⁵⁾ Sanofi Pasteur, Manila, Philippines

⁶⁾ Sanofi Pasteur, Singapore

(平成 28 年 8 月 8 日受付・平成 28 年 11 月 29 日受理)

新規クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) ワクチンの免疫原性と安全性を検討した。この第 I/II 相試験では 40~75 歳の日本人成人を対象とし、*C. difficile* ワクチン群 (N = 67; 進行中の第 III 相試験と同一製剤) とプラセボ群 (N = 34) に無作為に割り付け、0, 7, 30 日目に筋肉内接種した。

免疫原性について、トキシン A とトキシン B に対する IgG を酵素免疫測定法 (ELISA) と毒素中和試験 (TNA) にて測定した。トキシン A (ELISA, TNA) およびトキシン B (ELISA) の抗体陽転率 (抗体価がベースラインから 4 倍以上上昇した被験者の割合) は、60 日目までにほぼ 100% であった。しかし、トキシン B (TNA) の抗体陽転率は 14 日目 (42.9%) まで上昇した後、60 日目 (44.4%) まで上昇がみられなかった。ベースラインで血清反応陰性群では血清反応陽性群より免疫反応が遅かったが、トキシン B (TNA; 14~60 日目に 16~18%) を除いて、60 日目にはほぼ 100% が抗体陽転した。

副反応の発現率は、特定注射部位反応 67.6%、特定全身性反応 19.1%、非特定反応 20.6% であった。副反応のほとんどは軽度~中等度であり、接種後 3 日以内に発現し、接種後 3~6 日以内に消失した。有害事象による試験中止や重篤な有害事象はみられなかった。

以上から、*C. difficile* ワクチンは日本人成人に対し高い免疫原性を有し、安全性に大きな問題はないことが確認された。

Key words: *Clostridium difficile*, vaccine, safety, immunogenicity

クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) は、グラム陽性の芽胞形成性偏性嫌気性菌で、抗菌薬関連腸炎の原因としてその増加が注目されている¹⁾。クロストリジウム・ディフィシル感染症 (*C. difficile* infection: CDI) の発症には、トキシン A とトキシン B という毒素が重要である。CDI の病型は、軽い下痢から偽膜性腸炎を合併する致死的な重症例までさまざまである^{2,3)}。

CDI の発症率は国・地域により大きく異なっており、欧州では 4.1 症例/1 万人患者・日であると報告されている⁴⁾。日本では、CDI に対する意識が低く、検査が適切に行われていない可能性があり⁵⁾、単施設からのものではあるが 0.8~6.8 症例/1 万入院患者・日という報告がある⁶⁻⁸⁾。

CDI のリスクファクターとして、抗菌薬使用、加齢、基礎疾患などが知られている。抗菌薬が高頻度に処方される高齢化社会の日本では、高齢者は CDI のリスクにさらされている。CDI は大きな経済的負担をもたらしているため^{9,10)}、ワクチン接種による予防が大切であると考えられる。

C. difficile ワクチンは、サノフィパツール社により開発されている新規トキソイドワクチンであり、現在、第 III 相国際共同治験中である。この *C. difficile* ワクチンは、米国の第 I 相および第 II 相試験では成人における良好な免疫原性および安全性が示された¹¹⁻¹³⁾。第 III 相国際共同治験に日本が参加する前に、日本人成人に対する *C. difficile* ワクチンの免疫原性および安全性を検討することを目的として、第 I/II 相試験

を実施した。

本試験は、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 (GCP)、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドライン、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、ならびに関連する法律・規制を遵守して実施された。

I. 対象と方法

本試験の治験実施依頼者はサノフィ株式会社 (東京都、日本) であり、2013 年 7~10 月に単施設で実施した。試験実施計画書は医薬品医療機器総合機構 (PMDA) に相談し、試験前に倫理委員会にて承認を得た (ClinicalTrials.gov 登録番号 NCT01896830)。

1. 対象

組み入れ条件として、40~75 歳の健康成人を対象とした。

安全性ならびに免疫原性の評価に影響を及ぼす可能性がある以下のいずれかの基準に該当する被験者を除外した。すなわち、妊娠または効果的な避妊法を行っていない者；本試験登録前 4 週間以内に別の臨床試験に参加した者；本試験期間中に別の臨床試験への参加が予定されている者；試験ワクチンの接種前 4 週間以内に何らかのワクチン接種を受けている者 (インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンを除く)；CDI に対して、試験ワクチンまたは他のワクチンの接種歴がある者；CDI の既往を有する者；過去 3 カ月以内に血液製剤の投与を受けている者；先天性または後天性免疫不全である、過去 6 カ月以内に免疫抑制療法を受けている、または過去 3 カ月以内に 2 週間を超えて副腎皮質ステロイド療法を受けた者；B 型肝炎、C 型肝炎、または HIV 陽性である者；試験ワクチンの成分に対する既知の過敏症を有する者；過去 3 カ月以内に痙攣、血小板減少、腸管出血、消化管悪性腫瘍に対する手術を受けた者；試験の実施または完了を妨げる可能性がある慢性または急性疾患を有する者を除外した。

2. 被験者の同意

各被験者からの同意は、試験登録前に文書にて取得された。

3. 治験薬

C. difficile ワクチン (バッチ番号 UD16108) は凍結乾燥製剤であり、接種前にアジュバントを含む溶液で再溶解した。ワクチン接種 1 回分 (0.5 mL) に、100 μ g のトキシソイド A およびトキシソイド B、そしてアジュバントとしてアルミニウムを含有していた。*C. difficile* ワクチンは、*C. difficile* の嫌気培養から単離されたトキシソイド A およびトキシソイド B を透析濾過ならびにクロマトグラフィーで精製し、ホルムアルデヒドで不活化している。*C. difficile* ワクチンは、製造管理および品質管理に関する基準 (Good Manufacturing Practice : GMP) ならびに EU 臨床試験指令 (European Union Clinical Trial Directive) に準じて、サノフィパスツール社 (ペンシルベニア

州、米国) で製造した。また、*C. difficile* ワクチンの製造株は、American Type Culture Collection (ATCC) 43255 を使用した。

プラセボ (0.5 mL) には、0.9% 生理食塩液 (バッチ番号 UD16109) を使用した。このプラセボは、黄熱ワクチン (Stamaril[®]) 開発以来 30 年間の実績がある。

4. 試験デザイン

ワクチン群またはプラセボ群のいずれかに 2 : 1 の割合で無作為に被験者を割り付け、0, 7, 30 日目に上腕に筋肉内接種した。

5. 評価の項目・方法・基準

1) 免疫原性

0, 14, 30, 60 日目に採血した検体を用いて、トキシソイド A およびトキシソイド B に対する (i) 血清抗体濃度 (酵素免疫測定法 [ELISA] による免疫グロブリン G [IgG] の測定)、および (ii) 血清抗体価 (毒素中和試験 [TNA] による中和能の測定) を、Global Clinical Immunology (ペンシルベニア州、米国) で測定した¹³⁾。ELISA 測定では、トキシソイド A およびトキシソイド B でコーティングしたプレートにサンプルを添加後に 37°C でインキュベートし、さらに HRP 標識抗ヒト IgG とインキュベートした。基質添加後、SoftMax Pro ソフトウェアを用いてプレートを解析した。

TNA 測定では、段階希釈した血清を *C. difficile* トキシソイドと 60~75 分間、37°C で混合した。トキシソイド感受性 Vero 細胞を、トキシソイド・血清混合溶液に加え、6 日間培養した。光学密度 (optical density : OD) は 562 nm を用いた。中和抗体価は、SoftMax Pro ソフトウェアを用いてコントロールと比較して OD 値が 50% となる希釈率の逆数として補間した。

免疫原性は、ELISA による抗体陽転率 (seroconversion rate) および幾何平均抗体濃度 (GMC)、ならびに TNA による抗体陽転率および幾何平均抗体価 (GMT) を評価した。抗体陽転率は、接種後の抗体価がベースラインと比較して 4 倍以上に上昇した被験者の割合とした。

2) 安全性

すべての被験者は、即時性の有害事象に対応するため接種後 30 分間注視された。有害事象は、治験薬との関連性の有無にかかわらず、治験薬を接種された被験者に生じたあらゆる好ましくない医療上の出来事とし、医師によりワクチン接種との因果関係を否定できない事象を副反応と定義した。また、有害事象のうち、接種 6 日後までに発現した治験薬接種に伴う事前に定義した事象を、特定注射部位反応 (疼痛、紅斑、腫脹) および特定全身性反応 (発熱、頭痛、倦怠感、筋肉痛、関節痛) とした。特定注射部位反応および特定全身性反応は被験者日誌を用いて調査し、被験者日誌の情報をもとに医師が評価した。

特定注射部位反応の重症度を次のように評価した。疼

痛：グレード1(日常生活に支障がない)；グレード2(日常生活に一部支障あり)；グレード3(日常生活が妨げられる)。紅斑および腫脹：グレード1(25 mm 以上 50 mm 以下)；グレード2 (51 mm 以上 100 mm 以下)；グレード3(100 mm より大きい)。また、特定全身性反応を以下のように評価した。発熱：グレード1(38.0℃ 以上 38.4℃ 以下)；グレード2 (38.5℃ 以上 38.9℃ 以下)；グレード3(39.0℃ 以上)。頭痛、倦怠感、および筋肉痛：グレード1(日常生活に支障なし)；グレード2(日常生活に一部支障あり)；グレード3(日常生活が妨げられる)。関節痛：グレード1(可動域に制限はないが、痛み又は不快感を訴える)；グレード2(痛み又は不快感により可動域に制限がある)；グレード3(痛みにより動かすことを嫌がる)。

6. 統計解析

治験薬を1回以上投与された被験者を安全性解析対象集団、治験実施計画書に適合した集団(per protocol set)を免疫原性の解析対象とした。免疫原性について、正規近似ならびに二項分布により、点推定値および両側95%信頼区間を算出した¹⁴⁾。安全性においては、有害事象ならびに副反応の発現割合の両側95%信頼区間を算出した。

免疫原性への影響を検討するために、年齢(40~64歳、65~75歳)、性別、ベースラインでの血清反応陽性(ELISAではトキシンAに対して1.5 EU/mL以上、トキシンBに対して0.8 EU/mL以上、TNAではトキシンAおよびトキシンBに対して16 [1/dil]以上と定義)に基づいたサブグループ解析も行った。

II. 結 果

1. 症例構成

本試験では102名が2:1の割合で無作為化され(C. difficile ワクチン群68名、プラセボ群34名)、治験薬が接種された。治験薬接種後に、C. difficile ワクチン群の1名が3回目の接種前に参加を撤回したため、101名が試験を完了した。したがって、102名を安全性解析に、101名を免疫原性解析に組み入れた(Fig. 1)。

2. 人口統計学的特性

性別は、男性が女性よりもわずかに多く(55.9%対44.1%)、40~64歳の被験者が多くを占めた(C. difficile ワクチン群77.9%、プラセボ群67.6%)。年齢中央値は、C. difficile ワクチン群50.2歳、プラセボ群57.8歳であった(Table 1)。

3. 安全性

特定注射部位反応の発現割合は、C. difficile ワクチン群およびプラセボ群でそれぞれ67.6%、14.7%、特定全身性反応の発現割合はそれぞれ19.1%、11.8%であった(Table 2)。また、接種後30分以内の即時性の有害事象、試験中止にいたった有害事象、試験期間中に重篤な有害事象、死亡はいずれもみられなかった。

C. difficile ワクチン群で最も発現割合の高かった特定注射部位反応および特定全身性反応は、疼痛(67.6%)、

倦怠感(11.8%)であった(Table 2)。ほとんどの特定注射部位反応および特定全身性反応はグレード1またはグレード2であった。グレード3の特定注射部位反応は、C. difficile ワクチン群の8.8%に発現し(プラセボ群では0%)、グレード3の特定全身性反応はみられなかった。大半の特定注射部位反応および特定全身性反応は治験薬接種日から接種3日後までに発現し、接種後6日以内に消失した。

治験薬接種後30日間に、C. difficile ワクチン群の25.0%(プラセボ群の5.9%)で非特定有害事象が発現し、そのうち20.6%(プラセボ群では2.9%)が治験薬に関連すると判断された(Table 2)。

4. 免疫原性

1) 幾何平均抗体濃度

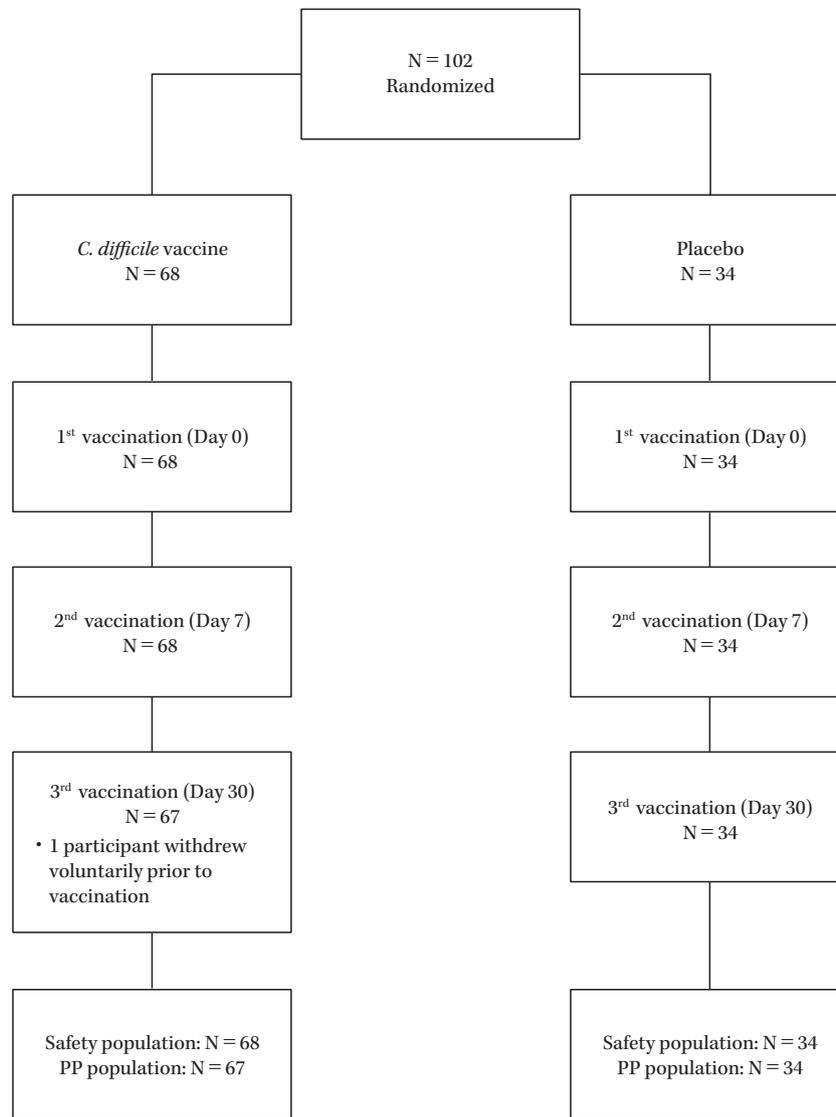
治験薬接種前(Day 0)および接種60日後(Day 60)の幾何平均抗体濃度(GMC)は、C. difficile ワクチン群全体で見るとトキシンAで0.91 EU/mL、96.06 EU/mL、トキシンBで1.36 EU/mL、94.04 EU/mLであった(Table 3)。トキシンAおよびトキシンBの最高GMCは接種60日後にみられた。ベースラインで血清反応陽性であった被験者の割合は、トキシンA(1.5 EU/mL以上)で16.4%、トキシンB(0.8 EU/mL以上)で52.2%であった。血清反応陽性グループでは、最高GMCがトキシンAでは接種14日後(600.22 EU/mL)、トキシンBでは接種60日後(219.12 EU/mL)にみられた(Table 3)。一方、血清反応陰性グループでは、最高GMCは接種60日後にみられ(トキシンAで75.00 EU/mL、トキシンBで37.28 EU/mL)、血清反応陽性グループの反応のほうが大きかった。GMCに関して、年齢差と性差はみられなかった。

2) 幾何平均抗体価

幾何平均抗体価(GMT)は、C. difficile ワクチン群全体で見るとトキシンAに対してはGMCと同様な傾向がみられ、最高GMTは接種60日後(834.77 [1/dil])であった(Table 4)。しかし、トキシンBに対しては、接種14日後に最高GMTになり(139.59 [1/dil])、接種60日目(126.58 [1/dil])までにそれ以上の変化はなかった。ベースラインで血清反応陽性であった被験者の割合は、トキシンA(16 [1/dil]以上)で26.9%、トキシンB(16 [1/dil]以上)で31.7%であった。血清反応陽性グループでは、トキシンAに対するTNAは、GMCの反応と同様に早期(接種14日後)に最高値を示した(Table 4)。一方で、血清反応陰性グループでは、トキシンAおよびトキシンBに対して、接種60日後に最高値となった。GMTについて、年齢差と性差はみられなかった。

3) 抗体陽転率

ELISAで測定した各トキシンに対する抗体陽転率(接種後の抗体価がベースラインと比較して4倍以上に上昇した被験者の割合)は、C. difficile ワクチン群全体で見ると



PP = per protocol

Fig. 1. Participant flow chart.

Table 1. Demographic characteristics at baseline

	<i>C. difficile</i> toxoid vaccine (N = 68)	Placebo (N = 34)	All (N = 102)
Sex ^a			
Male	38 (55.9%)	19 (55.9%)	57 (55.9%)
Female	30 (44.1%)	15 (44.1%)	45 (44.1%)
Age (years)			
Mean (SD)	53.8 (9.5)	57.3 (9.5)	54.9 (9.6)
Median	50.2	57.8	51.5
Min-Max	41.4-73.8	42.6-73.2	41.4-73.8
Age group (years) ^a			
≥40-64	53 (77.9%)	23 (67.6%)	76 (74.5%)
≥65-75	15 (22.1%)	11 (32.4%)	26 (25.5%)

^aValues represent the number (percentage) of participants

Table 2. Solicited injection-site and systemic adverse reactions occurring within 7 days and unsolicited adverse events (by system organ class) occurring within 30 days after any dose of vaccine or placebo (safety analysis set)

Adverse event	<i>C. difficile</i> toxoid vaccine (N = 68)		Placebo (N = 34)	
	n (%)	95% CI	n (%)	95% CI
<i>Solicited adverse reactions</i>				
Any solicited reaction	46 (67.6%)	55.2; 78.5	7 (20.6%)	8.7; 37.9
Injection-site reactions	46 (67.6%)	55.2; 78.5	5 (14.7%)	5.0; 31.1
Pain	46 (67.6%)	55.2; 78.5	5 (14.7%)	5.0; 31.1
Erythema	11 (16.2%)	8.4; 27.1	0	0.0; 10.3
Swelling	8 (11.8%)	5.2; 21.9	0	0.0; 10.3
Systemic reactions	13 (19.1%)	10.6; 30.5	4 (11.8%)	3.3; 27.5
Fever	2 (2.9%)	0.4; 10.2	0	0.0; 10.3
Headache	6 (8.8%)	3.3; 18.2	1 (2.9%)	0.1; 15.3
Malaise	8 (11.8%)	5.2; 21.9	2 (5.9%)	0.7; 19.7
Myalgia	7 (10.3%)	4.2; 20.1	3 (8.8%)	1.9; 23.7
Arthralgia	2 (2.9%)	0.4; 10.2	0	0.0; 10.3
<i>Unsolicited adverse events*</i>				
Any unsolicited adverse event	17 (25.0%)	15.3; 37.0	2 (5.9%)	0.7; 19.7
Infections and infestations	1 (1.5%)	0.0; 7.9	1 (2.9%)	0.1; 15.3
Musculoskeletal and connective tissue disorders	2 (2.9%)	0.4; 10.2	0	—
General disorders and administration-site conditions	14 (20.6%)	11.7; 32.1	1 (2.9%)	0.1; 15.3
Injury, poisoning, and procedural complications	1 (1.5%)	0; 7.9	0	—

N = number of participants in the safety analysis set

n = number of participants with available data for the event

95% CI = 95% confidence interval

* Adverse events are presented by System Organ Class (SOC). SOCs follow the structural hierarchy of the MedDRA (Medical Dictionary for Regulatory Activities) terminology, developed by the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). In this study, the coding of adverse events and reactions was in accordance with MedDRA, version 16.0.

Table 3. Summary of the ELISA GMCs for toxin A and toxin B on Days 0, 14, 30, and 60 (PP set)

Parameter	<i>C. difficile</i> toxoid vaccine (N = 67)						Placebo (N = 34)	
	Overall		Seropositive ^a		Seronegative ^a		GMC	95% CI
	GMC	95% CI	GMC	95% CI	GMC	95% CI		
Toxin A IgG (EU/mL)								
Day 0	0.91	0.81; 1.01	2.37	1.88; 3.00	0.75	NC	0.90	0.76; 1.06
Day 14	15.53	8.73; 27.63	600.22	226.41; 1,591.19	7.58	4.73; 12.15	0.91	0.76; 1.08
Day 30	48.10	33.05; 70.00	472.18	238.53; 934.70	30.71	22.36; 42.17	0.88	0.76; 1.02
Day 60	96.06	78.79; 117.11	338.66	226.79; 505.72	75.00	64.04; 87.82	0.87	0.75; 1.02
Toxin B IgG (EU/mL)								
Day 0	1.36	0.97; 1.93	4.19	2.90; 6.07	0.40	NC	1.06	0.72; 1.55
Day 14	11.70	5.28; 25.92	144.90	66.20; 317.16	0.75	0.45; 1.24	1.03	0.71; 1.49
Day 30	38.64	21.88; 68.25	194.12	110.80; 340.09	6.61	3.74; 11.69	1.05	0.72; 1.53
Day 60	94.04	66.81; 132.38	219.12	150.27; 319.52	37.28	25.24; 55.06	1.10	0.75; 1.61

^aParticipants who were seropositive by ELISA (N = 11 and 35 for toxins A and B, respectively) or seronegative by ELISA (N = 56 and 32 for toxins A and B, respectively) at baseline

NC = not calculated

と GMC と同じ傾向がみられ、接種 60 日後が最も高かった (Table 5)。複合抗体陽転率 (両トキシンに対して接種後の抗体価がベースラインと比較して 4 倍以上に上昇し

た被験者の割合) も同様に接種 60 日後がピークであった。ベースラインで血清反応陽性グループは血清反応陰性グループと比較して、各トキシンおよび両トキシンに

Table 4. Summary of the TNA GMTs for toxin A and toxin B on Days 0, 14, 30, and 60 (PP set)

Parameter Visit	<i>C. difficile</i> toxoid vaccine (N = 67 ^a)						Placebo (N = 34 ^c)	
	Overall		Seropositive ^b		Seronegative ^b		GMC	95% CI
	GMC	95% CI	GMC	95% CI	GMC	95% CI		
Toxin A								
Day 0	14.86	11.31; 19.53	80.29	52.26; 123.34	8.00	NC	12.83	8.99; 13.83
Day 14	251.19	113.33; 556.73	12,932.65	3,362.61; 49,739.12	59.05	33.07; 105.45	13.07	9.19; 18.59
Day 30	361.67	185.97; 703.33	9,068.94	2,888.30; 28,475.47	110.74	67.19; 182.51	13.25	9.24; 19.01
Day 60	834.77	536.46; 1,298.94	7,839.07	3,375.77; 18,203.53	366.65	277.96; 483.62	13.89	9.78; 19.73
Toxin B								
Day 0	17.12	12.57; 23.33	87.92	57.98; 133.34	8.00	NC	15.91	10.94; 23.13
Day 14	139.59	59.87; 325.46	11,104.54	6,315.81; 19,524.13	18.47	10.50; 32.46	15.00	10.42; 21.58
Day 30	135.84	59.26; 311.38	9,817.25	5,878.55; 16,394.93	18.88	10.69; 33.32	15.50	10.61; 22.64
Day 60	126.58	58.15; 275.51	7,619.48	4,583.79; 12,665.60	22.82	12.92; 40.29	16.24	11.24; 23.46

^aN = 63 for Toxin A (Day 0) and N = 66 for Toxin B (Days 14, 30, 60)

^bParticipants who were seropositive by TNA (N = 18 and 20 for toxins A and B, respectively) or seronegative by TNA (N = 49 and 43 for toxins A and B, respectively) at baseline

^cN = 33 for Toxin B (Days 0 and 30)

NC = not calculated

Table 5. Summary of the ELISA seroconversion rates for toxin A, toxin B, and the composite responses on Days 14, 30 and 60 (PP set)

Parameter Visit	<i>C. difficile</i> toxoid vaccine (N = 67)						Placebo (N = 34)	
	Overall		Seropositive ^a		Seronegative ^a		%	95% CI
	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI		
Toxin A IgG								
Day 14	49.3	36.8; 61.8	90.9	58.7; 99.8	41.1	28.1; 55.0	0	0.0; 10.3
Day 30	94.0	85.4; 98.3	100	71.5; 100.0	92.9	82.7; 98.0	0	0.0; 10.3
Day 60	100	94.6; 100.0	100	71.5; 100.0	100	93.6; 100.0	0	0.0; 10.3
Toxin B IgG								
Day 14	46.3	34.0; 58.9	82.9	66.4; 93.4	6.3	0.8; 20.8	0	0.0; 10.3
Day 30	83.6	72.5; 91.5	97.1	85.1; 99.9	68.8	50.0; 83.9	0	0.0; 10.3
Day 60	97.0	89.6; 99.6	97.1	85.1; 99.9	96.9	83.8; 99.9	0	0.0; 10.3
Composite response^b								
Day 14	37.3	25.8; 50.0	90.9	58.7; 99.8	3.1	0.1; 16.2	0	0.0; 10.3
Day 30	80.6	69.1; 89.2	100	71.5; 100.0	65.6	46.8; 81.4	0	0.0; 10.3
Day 60	97.0	89.6; 99.6	100	71.5; 100.0	96.9	83.8; 99.9	0	0.0; 10.3

^aParticipants who were seropositive by ELISA (N = 11 and 35 for toxins A and B, respectively) or seronegative by ELISA (N = 56 and 32 for toxins A and B, respectively) at baseline

^bComposite response indicates a ≥ 4 -fold increase for both toxins

対して早期に抗体陽転したが、接種 60 日後の抗体陽転率にはベースラインの血清反応に基づく差はみられず、ほぼ 100% であった (Table 5)。

TNA で測定した抗体陽転率は、*C. difficile* ワクチン群全体で見ると、トキシン A に対しては接種 60 日後が最も高く (94.0%)、トキシン B に対しては接種 14 日後 (42.9%) 以降にほとんど変化がみられず、接種 60 日後は 44.4% であった (Table 6)。また、複合抗体陽転率は接種 14 日後の 33.3% から、接種 60 日後には 42.9% に上昇した。ベースラインで血清反応陽性グループは血清反応陰性グループと比較して、抗体陽転が早期にみられ、トキ

シン A に対しては接種 60 日後にはほぼ 100% であった (Table 6)。しかし、トキシン B に対しては、血清反応陽性グループの 100% が接種 14 日後に抗体陽転したが、血清反応陰性グループでは接種 60 日後までに抗体陽転したのは 18.6% のみであった。抗体陽転率において、年齢差と性差はみられなかった。

III. 考 察

現在、CDI 予防を目的としたワクチンの臨床試験が行われている^{15, 16)}。本試験で用いられた *C. difficile* ワクチンは、*C. difficile* ATCC 43255 株の嫌気培養から精製されたトキシノイドをホルムアルデヒドで不活化したワクチンで

Table 6. Summary of TNA seroconversion rates for toxin A, toxin B, and composite responses on Days 14, 30 and 60 (PP set)

Parameter	<i>C. difficile</i> toxoid vaccine (N = 67 ^a)						Placebo (N = 34 ^b)	
	Overall		Seropositive ^b		Seronegative ^b		%	95% CI
	Visit	%	95% CI	%	95% CI	%		
Toxin A								
Day 14	49.3	36.8; 61.8	83.3	58.6; 96.4	36.7	23.4; 51.7	0	0.0; 10.3
Day 30	62.7	50.0; 74.2	88.9	65.3; 98.6	53.1	38.3; 67.5	0	0.0; 10.3
Day 60	94.0	85.4; 98.3	94.4	72.7; 99.9	93.9	83.1; 98.7	0	0.0; 10.3
Toxin B								
Day 14	42.9	30.5; 56.0	100	83.2; 100.0	16.3	6.8; 30.7	0	0.0; 10.6
Day 30	42.9	30.5; 56.0	100	83.2; 100.0	16.3	6.8; 30.7	0	0.0; 10.6
Day 60	44.4	31.9; 57.5	100	83.2; 100.0	18.6	8.4; 33.4	0	0.0; 10.6
Composite response^d								
Day 14	33.3	22.0; 46.3	91.7	61.5; 99.8	13.2	4.4; 28.1	0	0.0; 10.6
Day 30	33.3	22.0; 46.3	100	73.5; 100.0	10.5	2.9; 24.8	0	0.0; 10.6
Day 60	42.9	30.5; 56.0	100	73.5; 100.0	15.8	6.0; 31.3	0	0.0; 10.6

^aN = 63 for Toxin B and composite response

^bParticipants who were seropositive by TNA (N = 18 and 20 for toxins A and B, respectively) or seronegative by TNA (N = 49 and 43 for toxins A and B, respectively) at baseline

^cN = 33 for Toxin B and composite response

^dComposite response indicates a ≥ 4 -fold increase for both toxins

ある。

C. difficile ワクチンは、サノフィパスツール社が米国において、臨床推奨用量や接種スケジュールを確認する試験等を実施した¹¹⁻¹³⁾。これらの試験で良好な成績が得られたため、国内でも開発を進めることとした。

本試験は *C. difficile* トキソイドワクチンとして、初めて日本人に接種された試験であり、健康成人を対象に *C. difficile* ワクチンの安全性および免疫原性を検討した。本試験は、海外で実施された *C. difficile* ワクチンの臨床試験の臨床推奨用量 (0.5 mL)、接種経路 (筋肉内接種)、接種スケジュール (0, 7, 30 日) に基づいて実施した。

免疫原性について、GMC は、*C. difficile* ワクチン群で見るといずれのトキシンに対しても接種 60 日後が最大であった。ベースラインでの血清反応別に見ると、血清反応陰性グループに比べ血清反応陽性グループで高く、いずれのグループでも接種 60 日後がピークであった。

GMT は、*C. difficile* ワクチン群で見るとトキシン A に対しては接種 60 日後、トキシン B に対しては接種 14 日後が最大であった。ベースラインで血清反応陽性グループでは接種 14 日後、血清反応陰性グループでは接種 60 日後がピークであった。

ELISA で測定した抗体陽転率は、*C. difficile* ワクチン群で見ると、各トキシンならびに両トキシン (複合抗体陽転率) とともに、接種 60 日後にはほぼ 100% であった。特筆すべきことに、ベースラインで血清反応陰性グループは血清反応陽性グループと比べて抗体反応は遅かったが、各トキシンおよび両トキシンともに接種 60 日後にはほぼ 100% であった。

一方、TNA で測定した抗体陽転率は、ベースラインで血清反応陽性グループでは各トキシンならびに両トキシン (複合抗体陽転率) とともに接種 60 日後にはほぼ 100% となった。しかし、血清反応陰性グループではトキシン A に対しては接種 60 日後に抗体陽転率が 90% を超えたものの、トキシン B ならびに両トキシンとともに最大抗体陽転率は 20% 未満であった。その結果、ワクチン群全体としてトキシン B および両トキシンの抗体陽転率は 50% 未満となった。

免疫原性について、ベースラインでの血清反応はいずれのトキシンに対しても血清反応陰性グループのほうが血清反応陽性グループと比較して抗体応答が低く、遅かった。ワクチン製造株は ATCC 43255 株 (tcdA + tcdB + ; Toxinotype 0 ; Ribotype 087) であり、*C. difficile* ワクチンは、日本の流行株 ATCC 43598 株 (tcdA - tcdB + ; Toxinotype VIII ; Ribotype 017)¹⁷⁾ に対する交差防御免疫が *in vitro* および *in vivo* (ハムスターチャレンジ試験) で確認されている (投稿準備中)。ベースラインで血清反応陰性グループにおいてもトキシン A に対する抗体陽転率は高かったことから、ワクチン株と流行株の違いで免疫応答の違いを説明するのは難しいと思われる。一つの可能性として、本来備わっている免疫応答の結果としてトキシン A はトキシン B よりも抗体反応が高かったと考えられる。米国での第 II 相臨床試験においても、トキシン B はトキシン A と比較して抗体反応が低く¹³⁾、本試験においても同様の傾向がみられたと思われる。ワクチンで誘導された抗体価について、ELISA および TNA の測定値と臨床転帰との関係を報告した文

献はない。有効性試験を実施して初めて、抗体価と予防効果の関係を知ることができる。しかし、本試験では、トキシシン A およびトキシシン B に対して、全被験者において ELISA で検出可能な抗体応答がみられたことは重要な知見である。本試験は少数例を用いた第 I/II 相試験であることから、*C. difficile* ワクチンのトキシシン B に対する免疫原性については、多数例を用いた第 III 相試験での課題の一つと考えられる。

安全性に関して、本試験で被験者の 10% 以上で発現した特定注射部位反応および特定全身性反応は、疼痛、紅斑、腫脹、倦怠感、筋肉痛であった。大半の特定注射部位反応および特定全身性反応はグレード 1 またはグレード 2 であり、グレード 3 は少なかった。ほとんどの特定注射部位反応および特定全身性反応は接種 3 日後までに発現し、接種後 4 日以降での発現は少なかった。特定注射部位反応および特定全身性反応の持続期間は大半が 1~5 日間であり、接種後 6 日以内に回復した。安全性について、年齢差と性差は認められなかった。全体的に、本試験の安全性の結果は、米国での第 II 相試験結果と類似していた¹³⁾。

本試験の結果から、40~75 歳の日本人成人における *C. difficile* ワクチンを 3 回 (0, 7, 30 日) 筋肉内接種した場合の安全性および免疫原性が確認された。

謝 辞

本研究の実施に際し、ご参加いただいた被験者ならび試験スタッフに深謝いたします。本試験をサポートくださった加藤久美子、石川多鶴子、江守利博、畑中雄介、Ginamarie Foglia に感謝いたします。免疫原性を測定してくださった Global Clinical Immunology (ペンシルベニア州, 米国)、ならびに本論文の執筆を補佐してくださった Lane Medical Writing (フランス) の Dr Andrew Lane に御礼申し上げます。

利益相反自己申告：本研究はサノフィパスツール社 (ペンシルベニア州, 米国) から支援を受けた。松岡治は本研究の治験責任医師である。佐々木津、岡勇人、佐々木亨はサノフィ株式会社の、Dhaval M. Patel, Patricia J. Pietrobon, Thelma Laot, Alain Bouckenoghe, Josemund Menezes, Guy de Bruyn はサノフィパスツール社の社員である。

文 献

- 1) Lessa F C, Mu Y, Bamberg W M, Beldavs Z G, Dumyati G K, Dunn J R, et al: Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med* 2015; 372: 825-34
- 2) Kyne L, Farrell F J, Kelly C P: *Clostridium difficile*. *Gastroenterol Clin North Am* 2001; 30: 753-77, ix-x
- 3) Vaishnavi C: Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *Indian J Med Res* 2010; 131: 487-99
- 4) Bauer M P, Notermans D W, van Benthem B H, Brazier J S, Wilcox M H, Rupnik M, et al: *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 2011; 377: 63-73
- 5) Mori N, Yoshizawa S, Saga T, Ishii Y, Murakami H, Iwata M, et al: Incorrect diagnosis of *Clostridium difficile* infection in a university hospital in Japan. *J Infect Chemother* 2015; 21: 718-22
- 6) Hikone M, Ainoda Y, Tago S, Fujita T, Hirai Y, Takeuchi K, et al: Risk factors for recurrent hospital-acquired *Clostridium difficile* infection in a Japanese university hospital. *Clin Exp Gastroenterol* 2015; 8: 191-6
- 7) Honda H, Yamazaki A, Sato Y, Dubberke E R: Incidence and mortality associated with *Clostridium difficile* infection at a Japanese tertiary care center. *Anaerobe* 2014; 25: 5-10
- 8) Yoshida J, Kikuchi T, Asano I, Ueno T: *Clostridium difficile* infection relationship to ward-monthly antimicrobial use density and days of treatment: a three-year study. *Jpn J Infect Prev Control* 2016; 31: 92-9
- 9) Dubberke E R, Olsen M A: Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. *Clin Infect Dis* 2012; 55 (Suppl 2): S88-92
- 10) Yasunaga H, Horiguchi H, Hashimoto H, Matsuda S, Fushimi K: The burden of *Clostridium difficile*-associated disease following digestive tract surgery in Japan. *J Hosp Infect* 2012; 82: 175-80
- 11) Greenberg R N, Marbury T C, Foglia G, Warny M: Phase I dose finding studies of an adjuvanted *Clostridium difficile* toxoid vaccine. *Vaccine* 2012; 30: 2245-9
- 12) Foglia G, Shah S, Luxemburger C, Pietrobon P J: *Clostridium difficile*: development of a novel candidate vaccine. *Vaccine* 2012; 30: 4307-9
- 13) de Bruyn G, Saleh J, Workman D, Pollak R, Elinoff V, Fraser N J, et al: Defining the optimal formulation and schedule of a candidate toxoid vaccine against *Clostridium difficile* infection: A randomized Phase 2 clinical trial. *Vaccine* 2016; 34: 2170-8
- 14) Newcombe R G: Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat Med* 1998; 17: 857-72
- 15) Sheldon E, Kitchin N, Peng Y, Eiden J, Gruber W, Johnson E, et al: A phase 1, placebo-controlled, randomized study of the safety, tolerability, and immunogenicity of a *Clostridium difficile* vaccine administered with or without aluminum hydroxide in healthy adults. *Vaccine* 2016; 34: 2082-91
- 16) Bezay N, Ayad A, Dubischar K, Firbas C, Hochreiter R, Kiermayr S, et al: Safety, immunogenicity and dose response of VLA 84, a new vaccine candidate against *Clostridium difficile*, in healthy volunteers. *Vaccine* 2016; 34: 2585-92
- 17) Burke K E, Lamont J T: *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease. *Gut Liver* 2014; 8: 1-6

Safety and immunogenicity of *Clostridium difficile* toxoid vaccine in Japanese adults

Osamu Matsuoka¹⁾, Dhaval M. Patel²⁾, Shin Sasaki³⁾, Hayato Oka³⁾,
Toru Sasaki⁴⁾, Patricia J. Pietrobon²⁾, Thelma Laot⁵⁾, Alain Bouckenooghe⁶⁾,
Josemund Menezes⁶⁾ and Guy de Bruyn²⁾

¹⁾ ToCROM Clinic

²⁾ Sanofi Pasteur, PA, USA

³⁾ Sanofi Pasteur Medical, Sanofi K.K., Tokyo Opera City Tower, 3-20-2 Nishi Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

⁴⁾ Medical Operation, Sanofi K.K., Tokyo, Japan

⁵⁾ Sanofi Pasteur, Manila, Philippines

⁶⁾ Sanofi Pasteur, Singapore

This was a randomized, placebo-controlled, Phase I/II study conducted in a Japanese cohort to assess the safety and immunogenicity of *Clostridium difficile* vaccine (same formulation as that used in the ongoing global Phase III study). Healthy Japanese adults aged 40–75 years were randomized to receive either *C. difficile* vaccine (N = 67) or placebo (N = 34) by intramuscular injection on Days 0, 7 and 30.

Serum IgG specific for toxins A and B was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and *in vitro* functional activity by toxin neutralizing assay (TNA). The seroconversion rate (percentage of participants with a ≥ 4 -fold rise in the antibody levels from baseline) was high for both toxin A (ELISA and TNA) and toxin B (ELISA), approaching 100% for each by Day 60. For toxin B assessed by TNA, however, the response rate was lower, with the seroconversion rate not rising significantly beyond the value of 42.9% seen on Day 14 (44.4% at Day 60). Although the response in the participants who were seronegative at baseline was slower than that in those who were seropositive, seroconversion was seen in nearly all (100%) subjects by Day 60, with the exception of the response to toxin B evaluated using TNA (16–18% on Days 14–60).

The proportion of participants with solicited local reactions, solicited systemic reactions, and vaccine-related unsolicited reactions were 67.6%, 19.1%, and 20.6%, respectively. Most of the adverse reactions were mild to moderate in severity, occurring within 3 days post-vaccination, and resolving by 3–6 days post-vaccination. There were no withdrawals due to adverse events, and no serious adverse events.

These data confirm the safety and immunogenicity of *C. difficile* vaccine in Japanese adults.