

# 第7回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(金)  
10:00～12:30  
厚生労働省専用第22会議室(18階)

## 議事次第

### 1. 開会

### 2. 議題

#### (1) 開発優先度の高いワクチン等の開発状況について

○武田薬品工業株式会社

○一般財団法人化学及血清療法研究所

#### (2) 厚生労働科学研究 研究班発表

○長谷川秀樹参考人(国立感染症研究所病理部)

新興再興感染症に対する経鼻ワクチンの開発・実用化に関する研究

○保富康宏参考人(医薬基盤研究所霊長類医科研究センター)

粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

○岡田全司参考人(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)

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

### 3. 報告事項

(1) 2014/15シーズンのインフルエンザワクチン株について

(2) 新型インフルエンザワクチン細胞培養事業の公募結果について

### 4. 閉会

## 配付資料

- 資料 1 武田薬品工業株式会社 提出資料
- 資料 2 一般財団法人化学及血清療法研究所 提出資料
- 資料 3 長谷川参考人 提出資料
- 資料 4 - 1 保富参考人 提出資料 1
- 資料 4 - 2 保富参考人 提出資料 2
- 資料 5 岡田参考人 提出資料
- 資料 6 2014/15 シーズンのインフルエンザワクチン株
- 資料 7 2013/14 シーズンの国内外のインフルエンザの流行状況報告
- 資料 8 新型インフルエンザワクチン細胞培養事業の公募結果

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・流通部会委員

平成26年5月23日

(委員)

- |        |                              |
|--------|------------------------------|
| 伊藤 澄信  | 独立行政法人国立病院機構本部研究センター臨床研究統括部長 |
| ◎庵原 俊昭 | 独立行政法人国立病院機構三重病院院長           |
| 小森 貴   | 公益社団法人日本医師会感染症危機管理対策担当常任理事   |
| 坂元 昇   | 全国衛生部長会副会長（川崎市健康福祉局医務監）      |
| ○西島 正弘 | 昭和薬科大学学長                     |
| 福島 若葉  | 大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学准教授       |
| 細矢 光亮  | 福島県立医科大学小児科学講座教授             |
| 三村 優美子 | 青山学院大学経営学部教授                 |
| 森 康子   | 神戸大学大学院医学研究科臨床ウイルス学分野教授      |
| 山口 照英  | 国立医薬品食品衛生研究所客員研究員            |

◎：部会長      ○：部会長代理

(50音順・敬称略)

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・流通部会参考人

平成26年5月23日

(参考人)

小河原 修 武田薬品工業株式会社ワクチンビジネス部臨床開発グループ  
グループマネジャー

城野 洋一郎 一般財団法人化学及血清療法研究所理事

長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部長

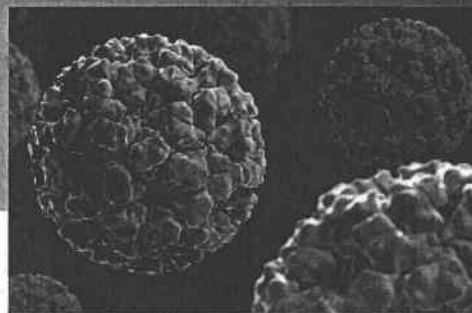
保富 康宏 独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター長

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

小田切 孝人 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター長

## 武田薬品におけるワクチンパイプラインの現況 - ノロウイルスワクチン及び開発中のワクチン -

2014年5月23日  
ワクチンビジネス部 小河原 修



The norovirus Photo: ALAMY

Takeda Pharmaceutical Company Limited

### 本日の内容



1. ノロウイルスワクチン開発
  - 予防接種・ワクチン分科会研究開発及び生産・流通部会において選定された、開発優先度の高いワクチン
2. 日本における開発中のワクチン
  - ✓ TAK-816(ヒブワクチン)
  - ✓ TAK-850(細胞培養季節性インフルエンザワクチン)

# ノロウイルスワクチン開発

## 背景 - ノロウイルス -

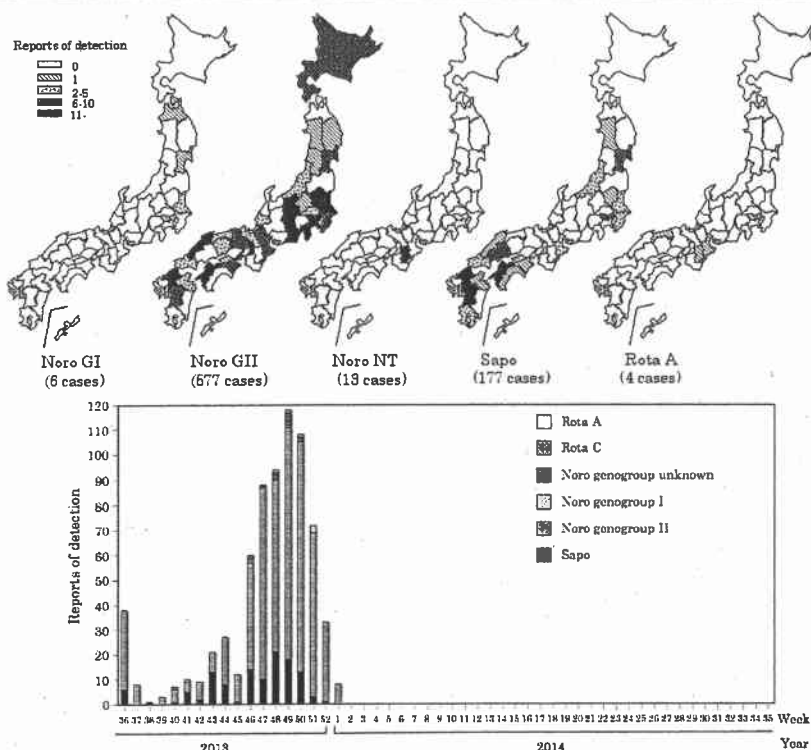


### ノロウイルスは、急性胃腸炎(AGE: acute gastroenteritis)の原因ウイルスとして全世界で認識されている

- ノロウイルス急性胃腸炎は、急性胃腸炎全体の約半数を占めている。
  - 青少年や成人を含め、全ての年齢層における原因ウイルスである。
- 5歳未満の小児では、ロタウイルスに続いて2番目の急性胃腸炎の原因ウイルスとなっている。
  - 有効なロタウイルスワクチンは存在するため、ノロウイルスが、全世界の小児に対し最も重要な胃腸系疾患の原因ウイルスとなりつつある。
- 嘔吐や下痢などの症状は、非常に重篤な場合がある。
  - 世界的に、若年小児や高齢者の入院率が高い。
  - 5歳未満の小児では、年間に71,000人から200,000人が死亡する(主に発展途上国)。
  - 先進国では、年間に20,000人以上の高齢者が死亡する。

# ノロウイルスワクチン開発

## 背景 - 日本において検出された胃腸炎ウイルス 2013/14 -



# ノロウイルスワクチン開発

## 背景 - ワクチン開発の目的 -



### 本ワクチンの目的は、ノロウイルスに関連する疾患を予防することである

- 重篤な疾患や合併症を誘発しやすい乳幼児及び高齢者
- 感染しやすい、あるいは感染拡大の懸念がある、以下のような集団
  - 医療従事者／養護施設勤務者
  - 食物取扱者
  - 船舶渡航者／スタッフ
  - 海外渡航者
  - 軍隊
  - 入院患者
  - 免疫不全者



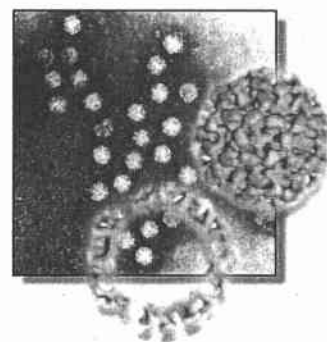
5

Takeda Pharmaceutical Company Limited

## 開発中のノロウイルスワクチン



- 2種類のノロウイルス抗原から構成される2価ワクチン(筋肉内接種)
  - ノロウイルス抗原(GI.1、GII.4:ヒトで発症する主要抗原)
  - VLPs(Virus-Like Particles:ウイルス様粒子)
    - アジュバントとして、水酸化アルミニウム及びMPL(GSK)を含む
- Virus-Like Particles:
  - ウイルスカプシド構造を正確に構成する
  - ウイルス遺伝子を含まない(感染/発症しない)
  - 大規模な細胞培養で容易に製造できる
  - 他のワクチンですでに使用されている(例:HPVワクチン)



6

Takeda Pharmaceutical Company Limited

### 試験デザイン

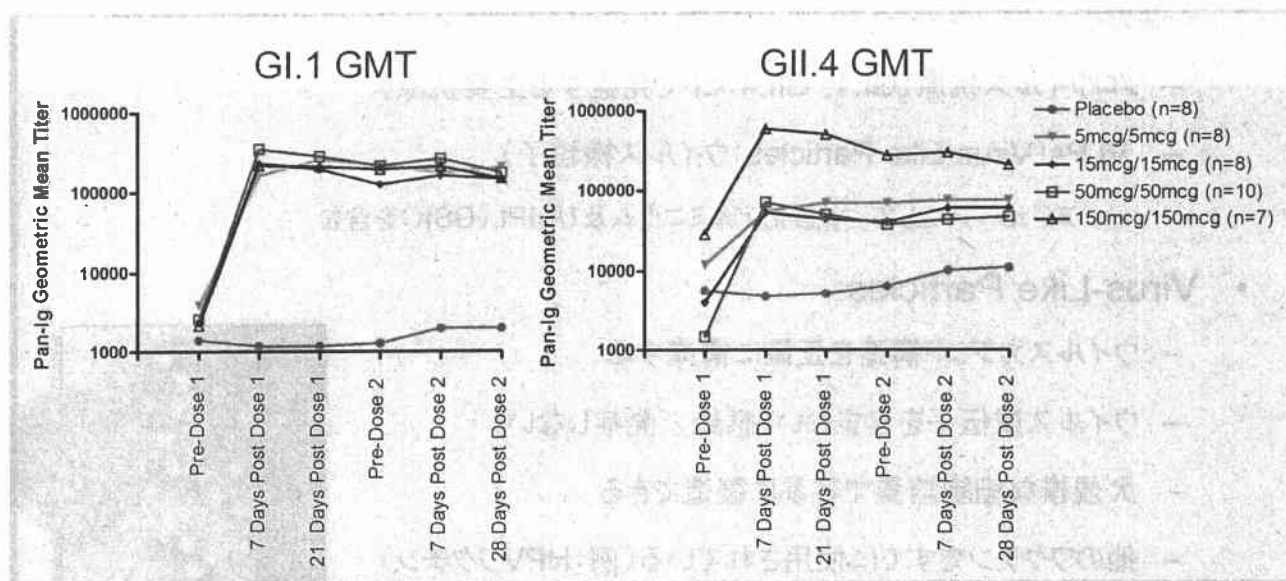
- 評価項目:安全性、免疫原性
- 第 I 相試験、無作為プラセボ対象二重盲検比較試験(用量漸増)
  - 用量: 5/5、15/15、50/50、150/150  $\mu\text{g}$ (1回目/2回目接種)
  - アジュバント:MPL 50  $\mu\text{g}$ +水酸化アルミニウム 500  $\mu\text{g}$
  - 健康成人(102名:18-49歳、50-64歳、65-85歳)
- 2回接種(28日間間隔)

### 試験結果

- すべての用量で、忍容性が確認された
- GI.1に対する抗体価は、GII.4より高い免疫原性を示した
- 102例中、5例に重篤な有害事象が発現したが、全ての症例でワクチンとの因果関係は否定された

# 開発中のノロウイルスワクチン

## LV03-104:血清中抗体価(用量別)



対象集団: 18~49歳の成人  
 ワクチン接種: Day 0(1回目)とDay 28(2回目)  
 Pan-Ig: すべての抗ノロウイルス抗体

Frey et al., IDSA, 2011

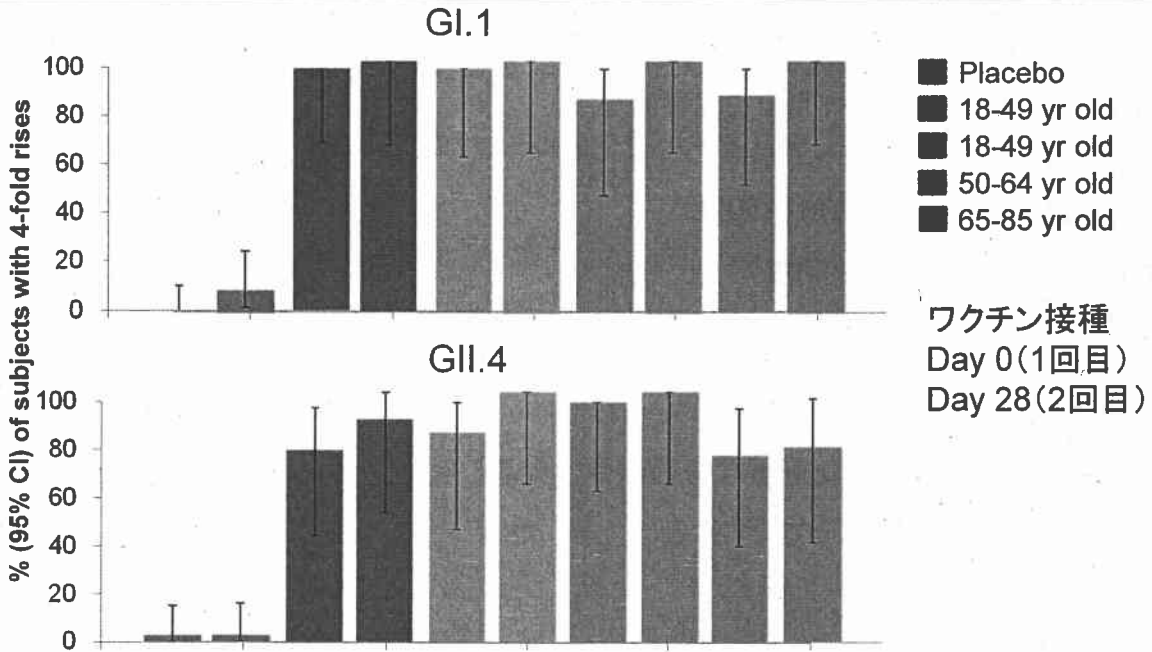


# 開発中のノロウイルスワクチン

LV03-104: 免疫原性(1回目及び2回目接種28日後)



年齢に関係なく、各集団の大部分が本ワクチン1回接種後に免疫反応(接種前と比較してGMTが4倍以上の上昇を示す)を示した

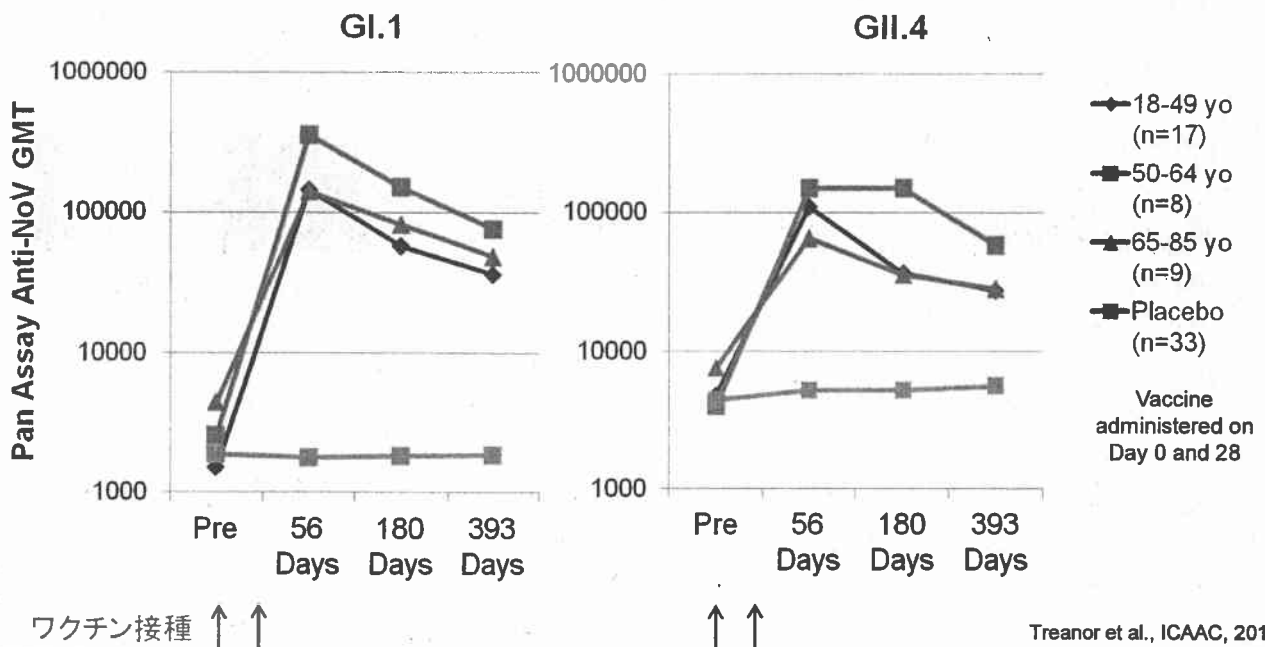


# 開発中のノロウイルスワクチン

LV03-104: 血清中抗体価(長期免疫原性)



成人(85歳まで)では、本ワクチン接種後1年間、血清中抗体価が持続した



# 開発中のノロウイルスワクチン



## 第 I / II 相試験 (LV03-105: ノロウイルスチャレンジ試験)

### 試験デザイン

- 評価項目: 安全性、免疫原性、有効性
- 第 I / II 相試験、無作為プラセボ対象二重盲検比較試験  
用量: 50/50 µg (1回目/2回目)  
アジュバント: MPL 50 µg + 水酸化アルミニウム 500 µg
- 健康成人 (132名: 18-50歳)
- 2回接種 (28日間間隔)
- GII.4ウイルスチャレンジ (56日後)

### 試験結果

- ワクチンに関連した重篤な有害事象は発現しなかった
- ワクチン接種によって、抗体価は上昇した

# 開発中のノロウイルスワクチン



## LV03-105: 胃腸炎症状の発症抑制

- 良好な安全性と前述の試験と同様の免疫原性を示した。
- プラセボ群と比較して、嘔吐症状かつ/または下痢症状の発症を抑制した。
  - ロタウイルスワクチンと同程度の発症抑制効果
- プラセボ群と比較して、ワクチン接種群ではノロウイルスの検出が低かった。
  - 感染拡大の制御に期待できる

Gastroenteritis Symptoms in Norovirus PCR-Positive Subjects	Vaccine (%) n=50	Placebo (%) n=48	% Reduction (95% CI)	p Value (Fisher's Exact)
Severe vomiting AND/OR diarrhea	0 (0.0%)	4 (8.3%)	100% (-, -)	0.054
Moderate or severe vomiting AND/OR diarrhea	3 (6.0%)	9 (18.8%)	68% (-11.2, 90.8)	0.068
Mild, moderate or severe vomiting AND/OR diarrhea	10 (20.0%)	20 (41.7%)	52% (8.3, 74.9)	0.028

Bernstein et al., ID Week 2013, October 2014

# 開発中のノロウイルスワクチン

## - 総括 -



- ノロウイルスワクチン(VLP)は、ウイルスチャレンジ試験において、嘔吐や下痢症状などの発症を抑制した。
- 本ワクチンは、全ての年齢層を対象者とした開発を考慮している。
  - 5歳未満の小児
  - 高齢者
  - 海外渡航者、軍隊、医療従事者
- 有効性試験(発症予防試験)の実施を計画している段階である。
- 本ワクチンの開発によって、ノロウイルスによる疾病負担やノロウイルスに関連した経済的インパクトを示す良い機会となる。



# 日本における開発中のワクチン



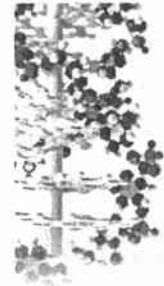
1. TAK-816(ヒブワクチン)
  - 審査中(2013年9月申請)
2. TAK-850(細胞培養季節性インフルエンザワクチン)
  - phase 1/2 試験進行中

### 参考:

BLB-750(H5N1/プロトタイプ パンデミックインフルエンザワクチン)

- 2014年3月承認取得

その先に見える  
あなたの笑顔のために。



DPT-IPVを含む混合ワクチンの研究開発  
細胞培養インフルエンザワクチンの開発  
MRを含む混合ワクチンの開発

2014.5.23 予防接種・ワクチン分科会研究開発及び生産流通部会



1

## DPT-IPVを含む混合ワクチンについて



大切な人のために  
私たちが出来ること

### 【混合ワクチンの社会的ニーズ】

- 乳児期の過密な接種スケジュールにおいて、接種スケジュールの単純化、被接種者の負担軽減、医療過誤防止、接種もれ防止に寄与する混合ワクチン
- 医療経済学的に受け入れやすいワクチン
- 安全性に十分配慮し、利便性の高いワクチン

2



# 混合ワクチン開発接種スケジュール



大切な人のために  
私たちが出来ること

## ● DPT-IPV-Hib5混ワクチン接種スケジュール

- 第6回研究開発及び生産流通部会において、DPT-IPVを含む混合ワクチンの開発に当たっての留意事項として、初回接種時期を現在のHibワクチン(生後2ヵ月)に合わせる形で検討すべきとの方針が示された。
- 接種スケジュールについては上記を参考にPMDAと相談しながら開発実施予定。

種別	ワクチン	0ヶ月	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	5-8ヶ月	7,8ヶ月-	12ヶ月-
定期接種	DPT-IPV				1回目	2回目	3回目		4回目
	DPT				1回目	2回目	3回目		4回目
	IPV				1回目	2回目	3回目		4回目
任意接種	インフルエンザ菌b型 ( Hib )			1回目	2回目	3回目			4回目
	肺炎球菌 ( PCV )			1回目	2回目	3回目			
	B型肝炎 ( HBV )	1回目	2回目				3回目(5-6M以降)		
	部会案			1回目	2回目			3回目(7-8以降)	
開発品	DPT-IPV-Hib (5混)			1回目	2回目	3回目			4回目

5

## 細胞培養インフルエンザワクチンの利点

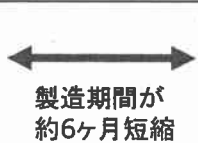


大切な人のために  
私たちが出来ること

### 発育鶏卵での生産



### 細胞培養での生産



製造期間が  
約6ヶ月短縮

細胞バンク

細胞・ウイルス培養

ウイルスの精製

ウイルスの  
不活化・精製

ワクチン

#### 製造期間の短縮・生産量アップにも柔軟に対応可能

発育鶏卵による生産では、生産開始前に鶏を育成し有精卵を準備する必要がある(約6ヶ月)。そのため、緊急の生産量アップには対応が困難。細胞培養による生産では、凍結してある細胞バンクを融解するだけで製造がスタートでき、生産量アップにも柔軟に対応できる。パンデミックウイルスは鶏に高病原性を示す可能性が高く、パンデミック発生時には卵の供給が困難となることが予想されるが、細胞による生産は卵に依存しないため、パンデミック発生時でも安定生産が可能である。

発育鶏卵では全国民人分のパンデミックワクチンを製造するのに1年半から2年半かかるが、細胞培養は半年以内の製造を目指している。

#### 流行株にマッチしたワクチン生産

ウイルス分離から全て細胞を用いてワクチンを製造可能となった場合、鶏卵を通した時に比べて抗原変異が少ないと期待される。

#### 安全性向上

適格性と安全性が確認された細胞バンクを用い、滅菌処理された密閉環境下で厳密に管理・製造されるので、外来性因子の混入を排除できる。卵由来の成分を含まないため、卵アレルギーの方へも安全に使用できる。

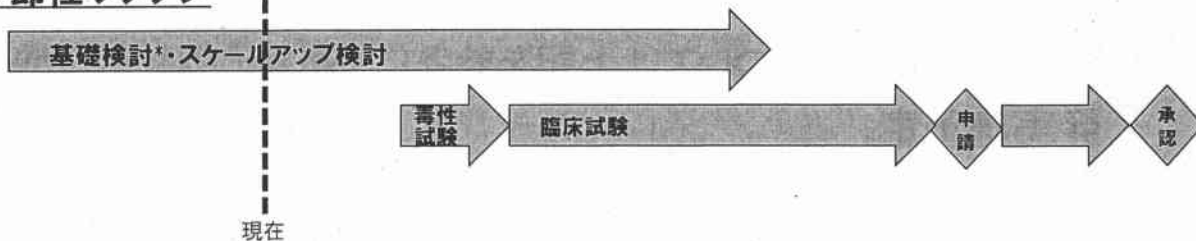
6



## パンデミックワクチン



## 季節性ワクチン



### \*基礎検討

- ・パンデミック製法をベースに季節性株に合わせて製法検討 (抗原性変異、生産性評価)
- ・剤型変更: 1価スプリット抗原(3.75 $\mu$ gHA/dose)+AS03アジュバント  $\Rightarrow$  4価スプリット抗原(15 $\mu$ gHA/株/dose)

7

# 細胞培養インフルエンザワクチンの課題



- 製造実績と製造コスト
- 季節性ワクチンの早期開発とパンデミックワクチンとのシナジー
  - パンデミックへの即応体制を確実に維持していくための原材料の備蓄、製造設備・製造要員の維持・管理を可能とする。
- 細胞株毎のワクチン製造株の選定、SRD試験等の国家検定整備

8

# MRを含む混合ワクチンの開発



大切な人のために  
私たちが出来ること

## M-M-R® II (メルク社)

Measles, Mumps, and Rubella Virus Vaccine Live

### ● ワクチン株

- 弱毒生麻疹ウイルス (Edmonston B株)
- 弱毒生ムンプスウイルス (Jeryl Lynn™株)
- 弱毒生風疹ウイルス (Wistar RA 27/3株)

● オリジナル開発国: 米国1978年

● 市販国: 67か国



## 化血研開発

名称: 乾燥弱毒麻疹おたふくかぜ風疹混合ワクチン

状況: 医薬品申請を行い、現在審査中

9



ご静聴ありがとうございました。



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



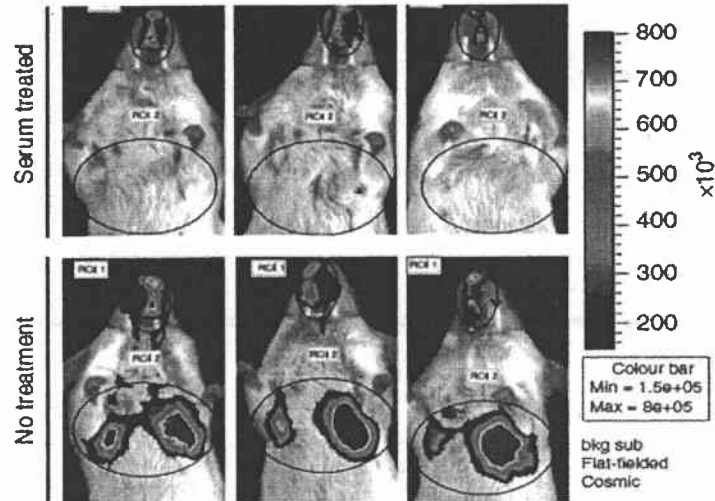
## 次世代ワクチンとしての 経鼻インフルエンザワクチン

長谷川秀樹  
国立感染症研究所  
感染病理部

何故インフルエンザには次世代ワクチンが必要か？

- ・インフルエンザウイルス感染後の発症、重症化を  
予防できるが感染防御するものではない。
- ・ワクチン株と流行株が一致したときには有効であるが、  
株が一致しない場合には効果が低い。
- ・ワクチン株と流行株の抗原性がかい離しており(特にH3)  
流行株に対するHI抗体価が上がりにくい。
- ・新型インフルエンザウイルスのパンデミックにおいては  
流行株を予測することは不可能である。
- ・H5N1 沈降全粒子不活化ワクチン(アルミニウムアジュバント)は  
発熱問題で小児に対し使用できない。

血清の中和抗体は上気道のインフルエンザ感染を抑えない



Pan et.al. *Nature communications* 11Sep2013

良く効くインフルエンザワクチンとは！

感染阻止！！

流行株がワクチン株一致しない変異株場合にも  
交叉防御能 (cross-protection) がある。



予測不能な新型インフルエンザに対応できる！

局所及び全身の副反応の少ないワクチン！

## 良く効くワクチンへのヒント！

自然感染によって誘導される免疫は、不活化ワクチンの注射によるものよりも、変異ウイルス感染に対する交叉防御能が高い。  
(1960年代から知られていた事実)

自然感染によって誘導されるIgA抗体が交叉防御の原因

### IgA抗体を誘導する経鼻ワクチンの開発研究

#### 1) 弱毒生ウイルスワクチン

2003年、米国使用認可 (\* 2~49歳の世代に限定して使用)。

#### 2) 経鼻不活化ワクチン

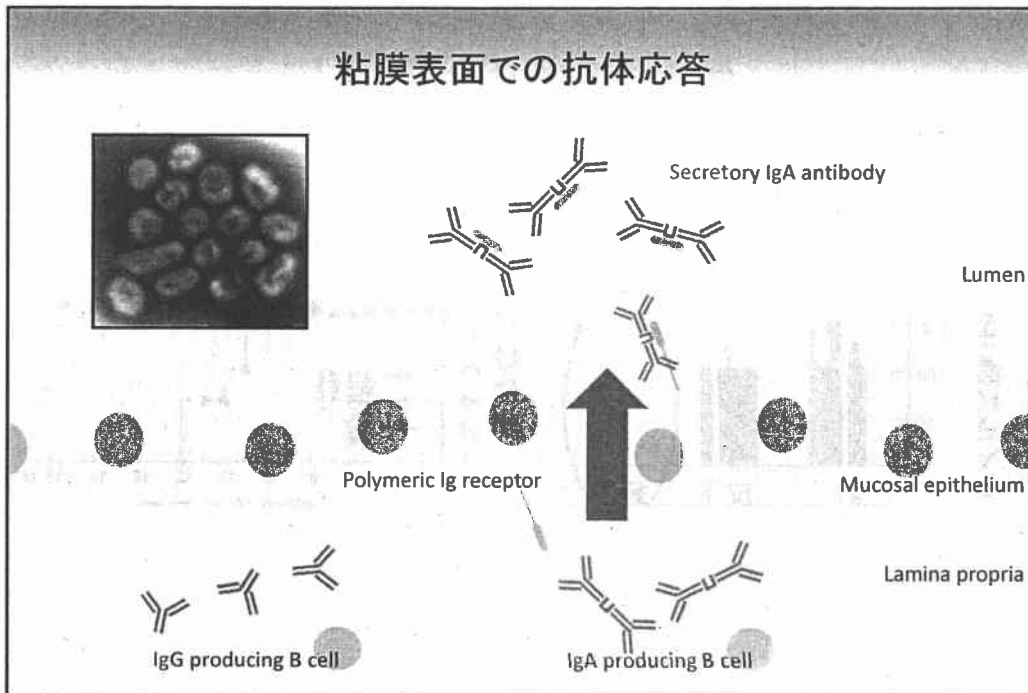
経鼻不活化ワクチンの試み開始

●不活化ワクチンのみの経鼻投与ではIgA抗体の誘導効率が低い。



アジュバント併用経鼻不活化ワクチンの研究開始

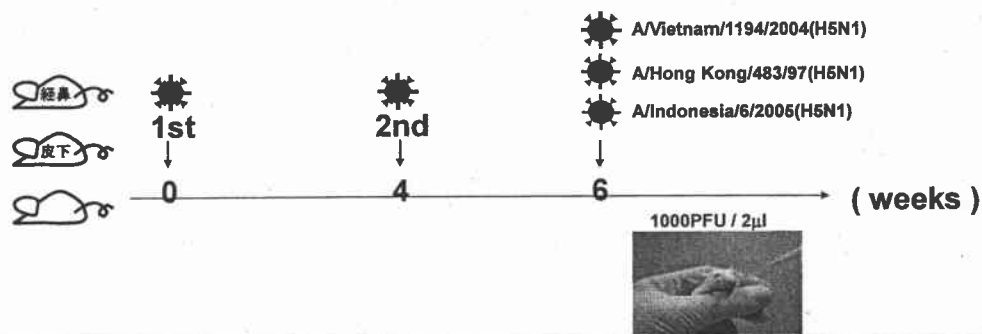
## 粘膜表面での抗体応答



## マウスでのH5N1 経鼻ワクチン

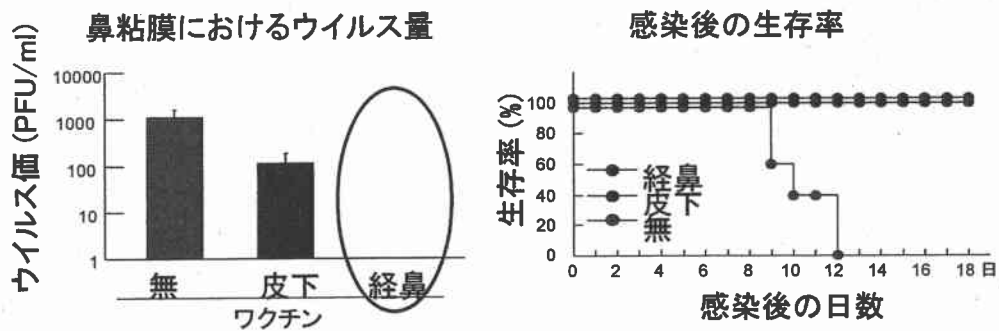
全粒子不活化ワクチン 1 $\mu$ g : NIBRG14 A/Vietnam/1194/2004(H5N1)

アジュバント 10 $\mu$ g : PolyI:PolyC<sub>12</sub>U (Ampligen<sup>®</sup>)



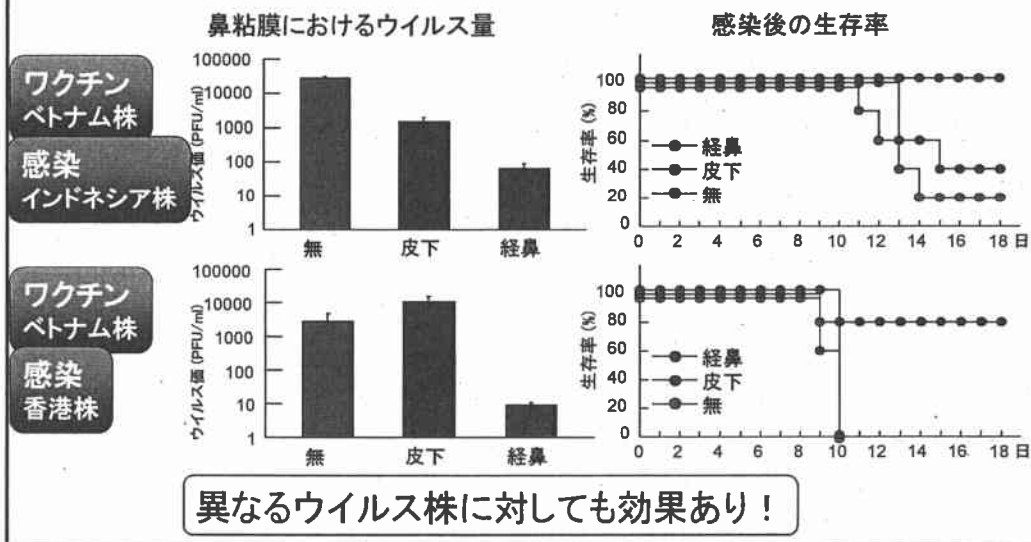
## 感染そのものを予防！

ワクチン株と相同H5N1ウイルスによる攻撃感染



鼻からウイルスが見つからない → 感染していない

## 流行するウイルス株の予測が外れても効く！



## マウス・カニクイザルの次は！

### マウス、サルを用いた実験において

経鼻インフルエンザワクチンにより、

1. 上気道にてウイルスの感染を阻止する。→分泌型IgA
2. 肺にウイルスが侵入してもウイルス性肺炎にならない。→IgG
3. 流行株と異なる変異ウイルスに対する交叉防御。→分泌型IgA

では、ヒトではどうなのか？

鼻腔の粘液中の抗体はインフルエンザウイルスを中和できるのか？

ヒトの鼻腔洗浄液中の機能的な抗体を測定することで、  
経鼻インフルエンザワクチンの有効性を評価する。

## 鼻腔洗浄液の標準化

  
Nasal wash  
in 100 ml saline

Removal of any  
nasal contaminants

Concentration  
(1 mg/ml of total protein)

	unit	Total protein	IgA	IgG
Nasal mucus* (n=57)	mg/ml	15.33±9.1	0.24±0.11 [monomeric] 1.97±1.49 [polymeric] (Total; 2.21)	0.79±0.84
Standardized concentration of NW (n=10)	mg/ml	1mg/ml	0.217mg/ml	0.06mg/ml

\* Kurono Y, and Mogi G. Ann Otol Rhinol Laryngol 1987, 96:419-24

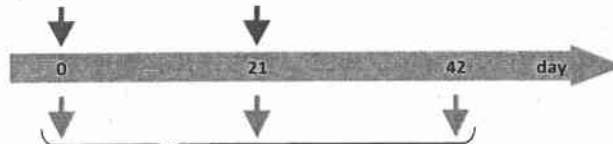
## Experimental design & schedule - I

**Vaccine:** Inactivated whole virion vaccine  
A/Victoria/210/2009 (H3N2) [2010/11season]  
X-187 (45 µg HA/dose)  
250 µl / nostril

**Subjects:** 50 healthy adults

**Schedule:**

Intranasal administration  
(250 µl in each nostril, 45 µg HA/500 µl)

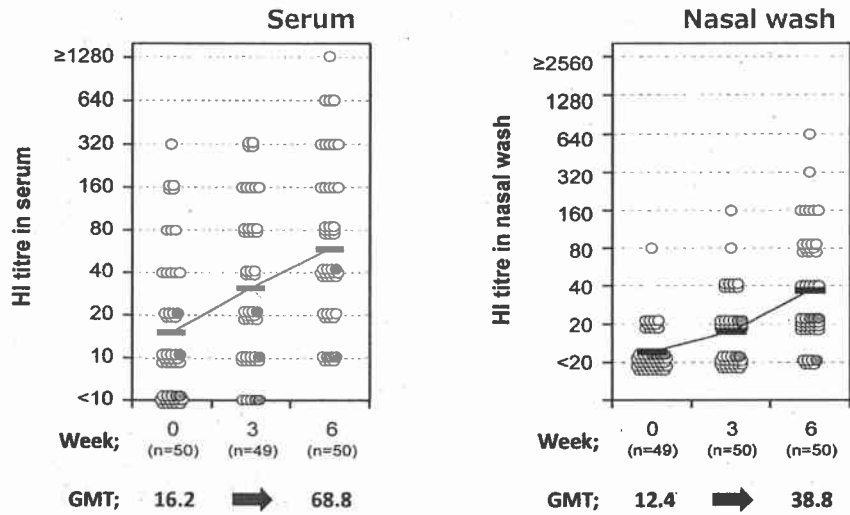


Serum, Nasal wash

Neutralization (NT) titer  
Hemagglutination Inhibition (HI) titer  
HA-specific IgG and IgA ELISA antibody titer

With permission of the Ethical Committee of NIID

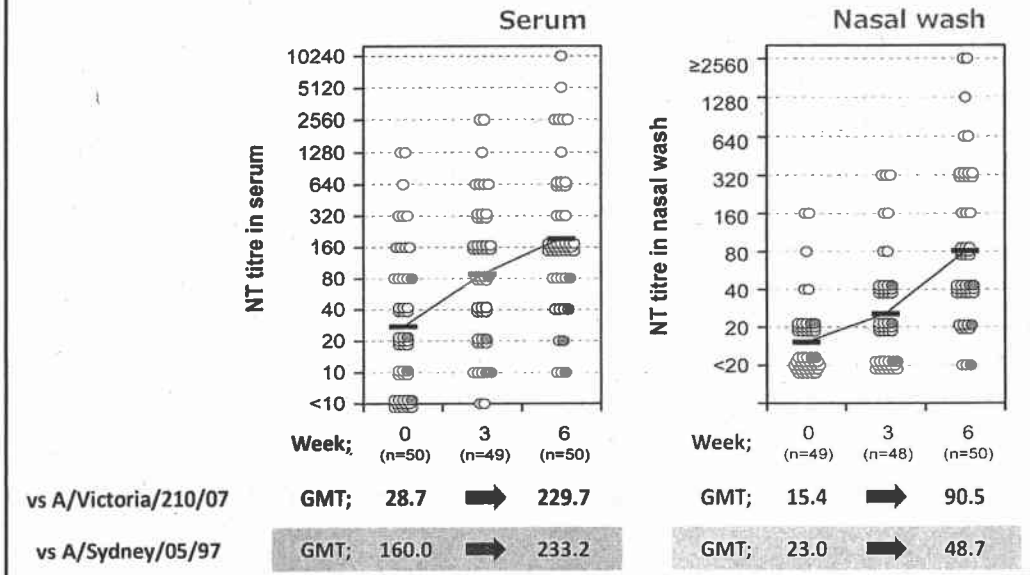
## Hemagglutination Inhibition titers



## Volunteer study for A/H3N2 intranasal vaccination Summary of HI titers

	Criteria for serum HI antibody in EMA	HI Ab responses			
		Serum		Nasal wash	
		(Day 0)	(Day 42)	(Day 0)	(Day 42)
Geometric mean titer (GMT)	No std	16.2	68.8	12.4	38.8
Mean geometric increase (post-GMT/pre-GMT)	> 2.5		4.25		3.13
Conversion rate or Significant increase (≥ 4-fold increase)	> 40%		20/46 43.5% (28.5 - 58.4)		—
Protection rate (titer; ≥ 1:40)	> 70%	13/46 28.3% (14.7 - 41.8)	35/46 76.1% (63.2 - 88.9)	—	—

## Neutralization titers



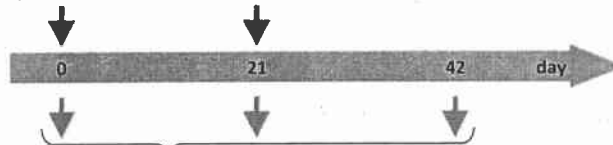
## Experimental design & schedule - II

**Vaccine:** Inactivated whole virion vaccine  
Highly Pathogenic Avian Influenza A/Indonesia/5/05 (H5N1)  
IBCDC-RG2 (45 µg HA/dose) with or without CVP  
250 µl /nostril

**Subjects:** 63 healthy adults

**Schedule;**

Intranasal administration  
(250 µl in each nostril, 45 µg HA/500 µl)



Serum, Nasal wash

Neutralization (NT) titer  
Hemagglutination Inhibition (HI) titer  
HA-specific IgG and IgA ELISA antibody titer

With permission of the Ethical Committee of NIID



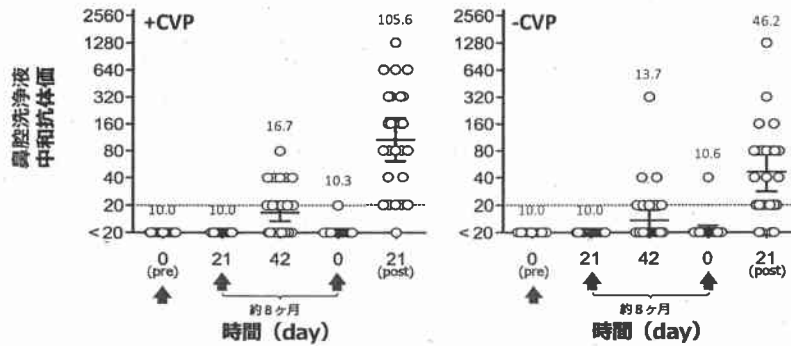
### 臨床研究③

目的：免疫学的にnaïveな状態での全粒子不活化ワクチン経鼻接種による抗体応答の評価、CVP添加の有無による比較

ワクチン：A(H5N1)単身全粒子不活化ワクチン (45μg HA/dose)  
IBCDC-RG2 (A/Indonesia/5/05)

用法：3週間隔2回の経鼻接種

被験者数：63名



### A/Indonesia/5/05 (H5N1), 全粒子不活化ワクチンの経鼻接種臨床研究 血清 中和抗体価のまとめ

	Neutralizing Ab responses			
	with CVP		without CVP	
	pre	post	pre	post
Geometric mean titer (GMT)	5.0 (< 10)	164.5	5.0 (< 10)	84.8
Mean geometric increase (post-GMT/pre-GMT)		32.9		17.0
Conversion rate or Significant increase (≥ 4-fold increase)		<b>22/25</b> <b>88.0%</b> (74.3 – 101.7)		<b>20/24</b> <b>83.3%</b> (67.3 – 99.4)
Neutralizing Ab titer; ≥ 1:40		<b>22/25</b> <b>88.0%</b> (74.3 – 101.7)		<b>20/24</b> <b>83.3%</b> (67.3 – 99.4)

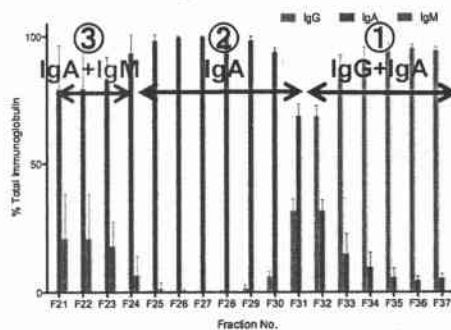
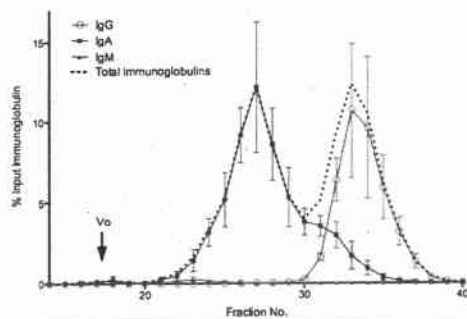
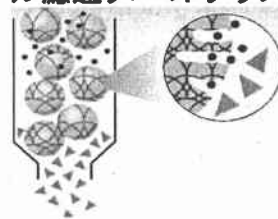
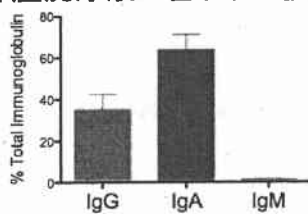
同ワクチンのアラム併用皮下接種、第II/III相試験での抗体陽転率(40倍以上かつ前比4倍以上):70.9%

# ヒト生体内に存在する多量体IgAの高次構造と ウイルス感染防御における意義は不明

## 経鼻ワクチンによって鼻腔内に誘導される抗体

鼻腔洗浄液に含まれる抗体

ゲル濾過クロマトグラフィー

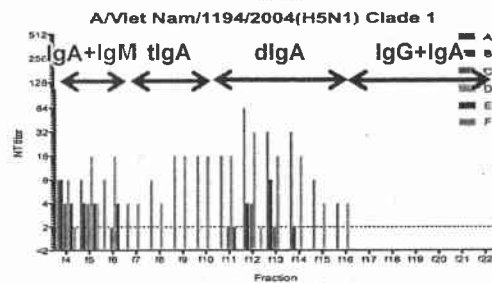
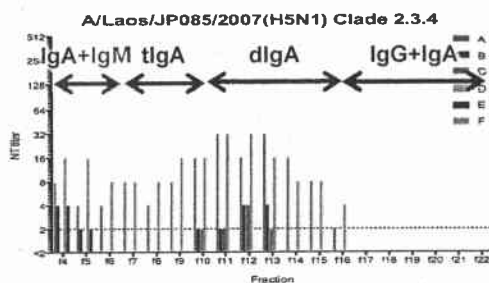
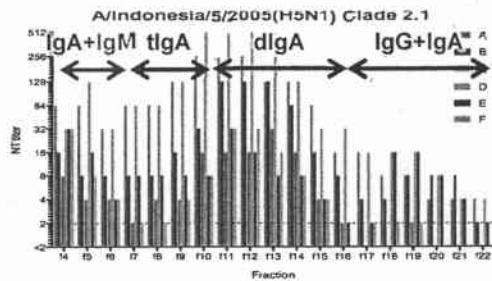




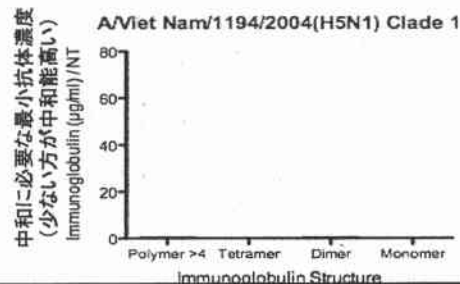
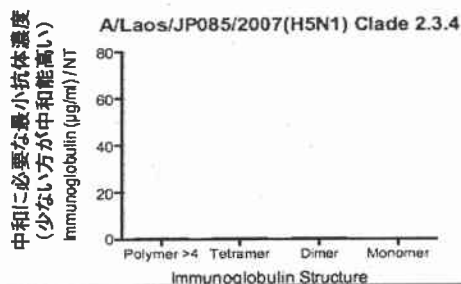
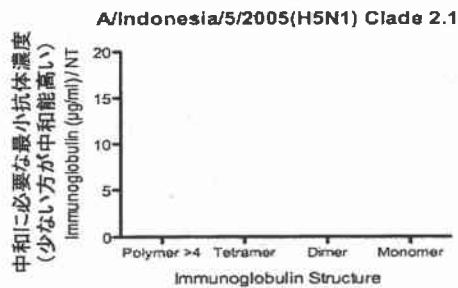
## H5N1経鼻ワクチンによって鼻腔内に誘導される抗体

ワクチン: 全粒子不活化ワクチン  
 A/Indonesia/05/2005 PR8-IBCDC-RG2 (H5N1)  
 45µg HA, CVP含有。3週間隔、5回噴霧投与

被験者: 健康成人男性 6名  
 採取サンプル: 鼻腔洗浄液 1L

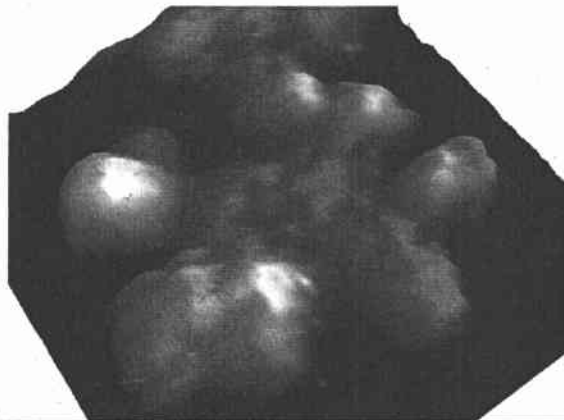


## 鼻腔内抗体(H5N1)中和能の高次構造別比較



多量体化した抗体の方が単量体、  
二量体抗体より中和能が高い

良く効くワクチンとは！



このような抗体を粘膜上に準備できる  
ワクチンである。

## 結語

- ◇経鼻インフルエンザワクチンは粘膜上に分泌型IgA抗体を誘導し感染を阻止する。
- ◇鼻腔粘膜上に誘導される分泌型IgA抗体は交叉防御効果があり血中のIgG抗体と比較し変異ウイルスに対しても有効である。
- ◇不活化全粒子ワクチンの経鼻接種によりヒトにおいて血中に加え鼻腔粘膜上にインフルエンザウイルスを中和する抗体が誘導される。
- ◇経鼻ワクチンにより誘導される分泌型IgA抗体は二量体、四量体、更に多量体化しインフルエンザウイルスの中和に寄与している。

経鼻インフルエンザワクチンは鼻粘膜上に分泌型多量体IgA抗体を誘導する事によりインフルエンザウイルスに対する感染防御、交叉防御に寄与する。

## 謝辞

国立感染症研究所  
(感染病理部、インフルエンザウイルス研究センター)

相内 章  
鈴木 忠樹  
Elly van Riet  
伊藤 良  
泉地 恭輔  
池田 千将  
中島典子  
田村 慎一  
佐多徹太郎  
倉田 毅  
浅沼 秀樹  
小田切 孝人  
田代 真人

東興薬品工業株式会社  
上下 泰造  
宮崎 隆

東京大学医科学研究所  
一戸 猛志

被験者のボランティアとして参加  
していただいた皆さん。

一般財団法人 阪大微生物病研究会

奥野 良信  
石川 豊数  
真鍋 貞夫  
五味 康行  
谷本 武史

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

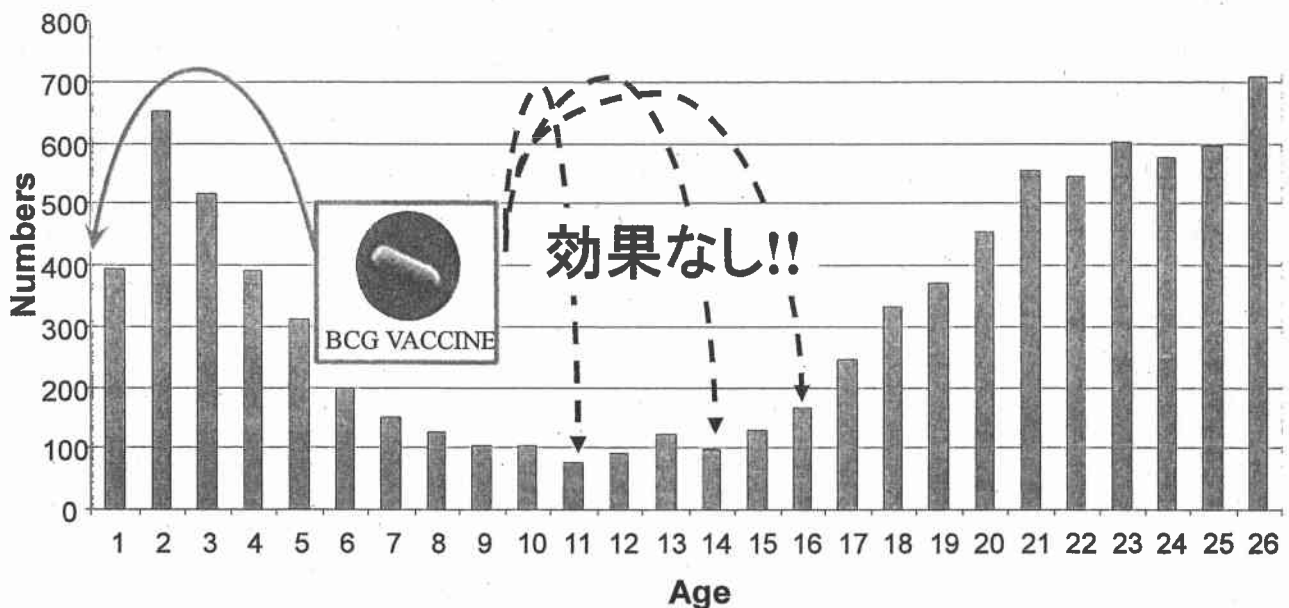
平成26年5月23日

# 新規結核ワクチンの研究開発

保富 康宏

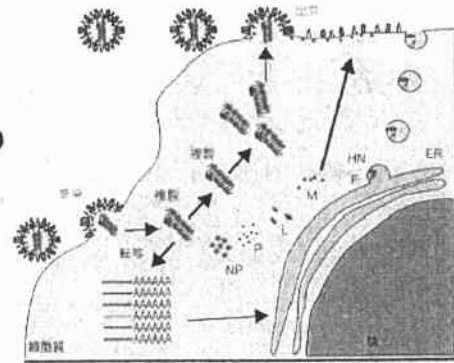
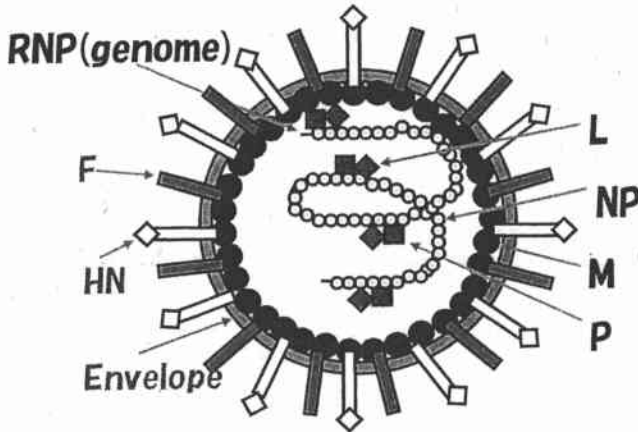
独立行政法人医薬基盤研究所 薬長類医科学研究センター  
三重大学大学院医学系研究科 病態解明医学講座 免疫制御

結核は世界中で発生している感染症であり、その被害は甚大である。我が国でも毎年、多くの発症者が確認されており、先進国中では中等度発症国である。結核病変で重要であるのは肺を中心とした呼吸器における病態である。そのために結核予防には全身の免疫反応と同時に、呼吸器粘膜における結核菌特異的免疫反応の誘導が重要である。



# ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(HPIV2)

- ヒト呼吸器感染ウイルス
- パラミクソウイルスの *Rubulavirus*
- negative strand RNA ウイルス ~ 15.6 kb
- 病原性は殆ど認められない
- 感受性はヒト、マカク属のサル、乳のみハムスター



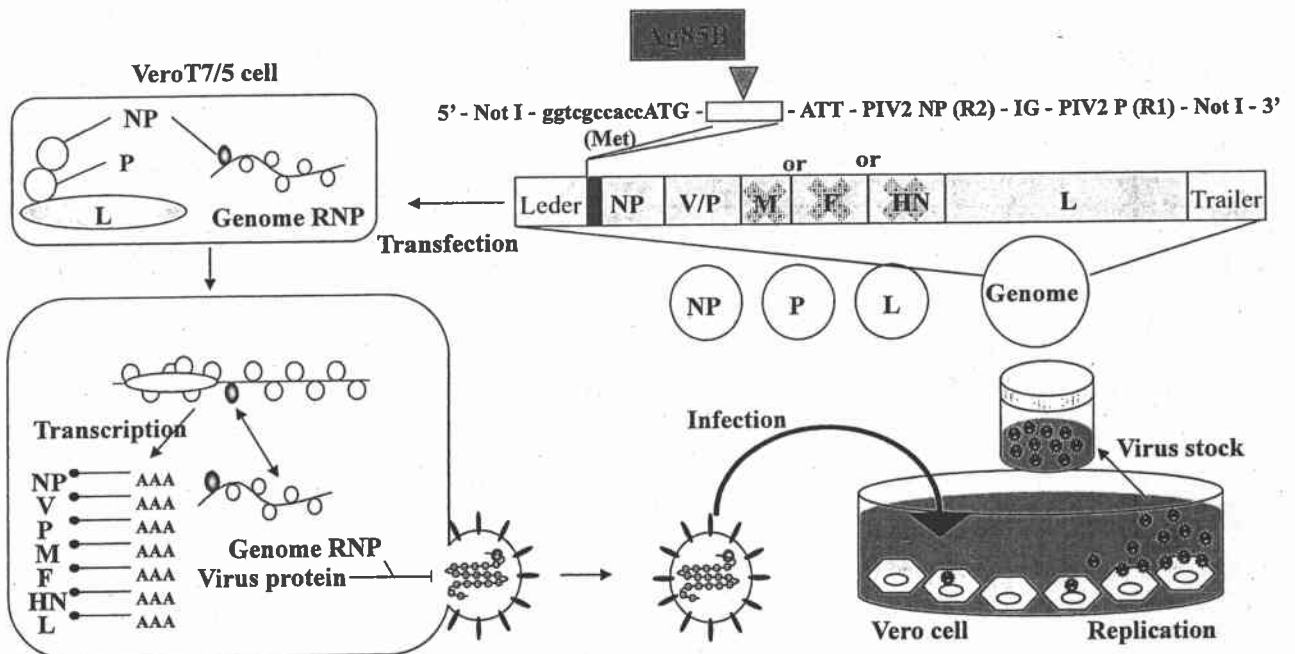
PIV2 genome [非分節型(-)鎖RNA]

病原性(-)



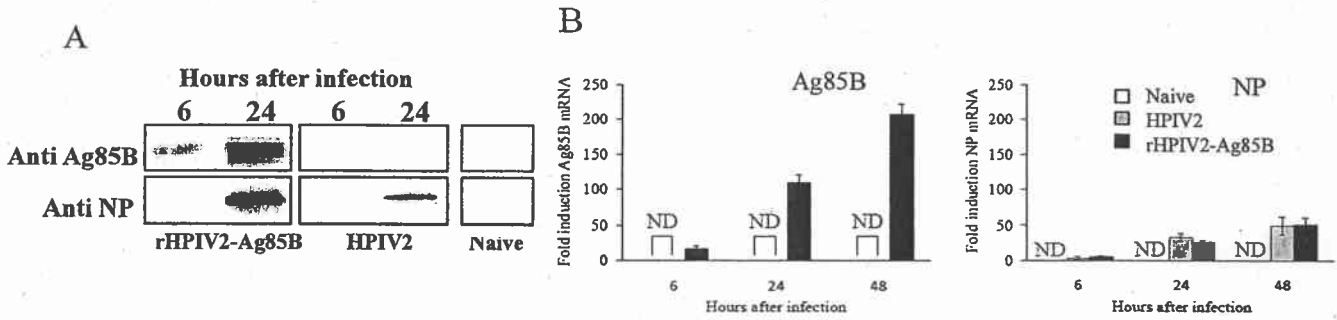
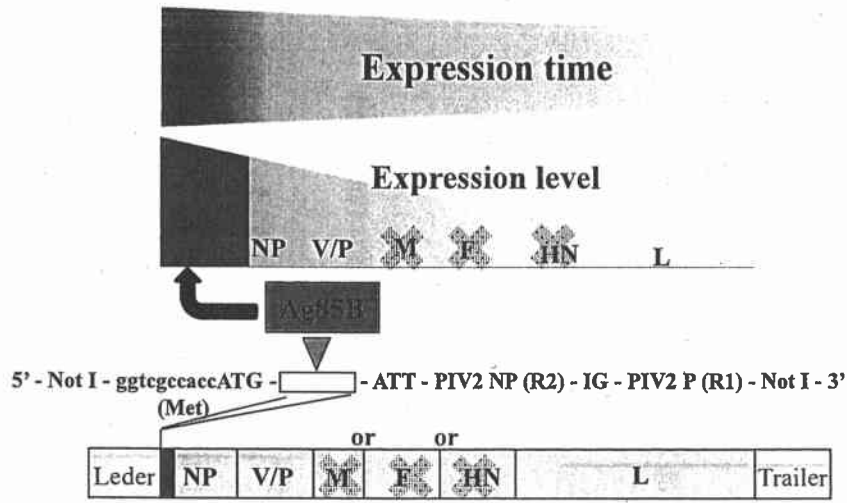
## HPIV2ベクター

- リバースジェネティックス法にて作製
- 挿入遺伝子産物を非常に効率よく発現
- M、F or HN遺伝子欠損で非増殖性

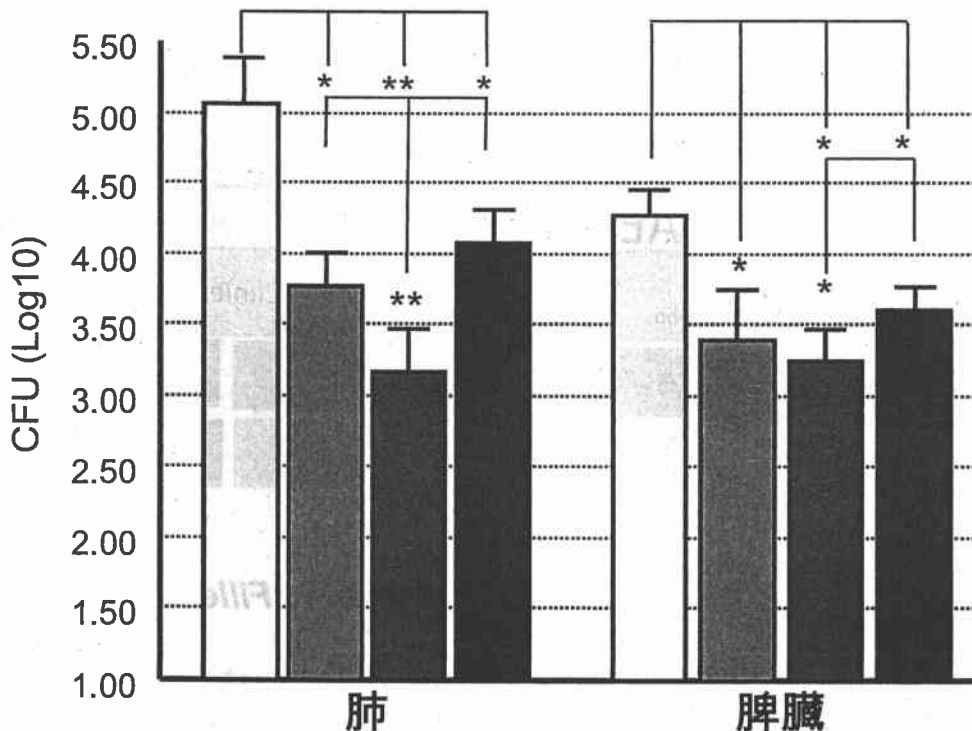




# Ag85Bの発現時間と発現量

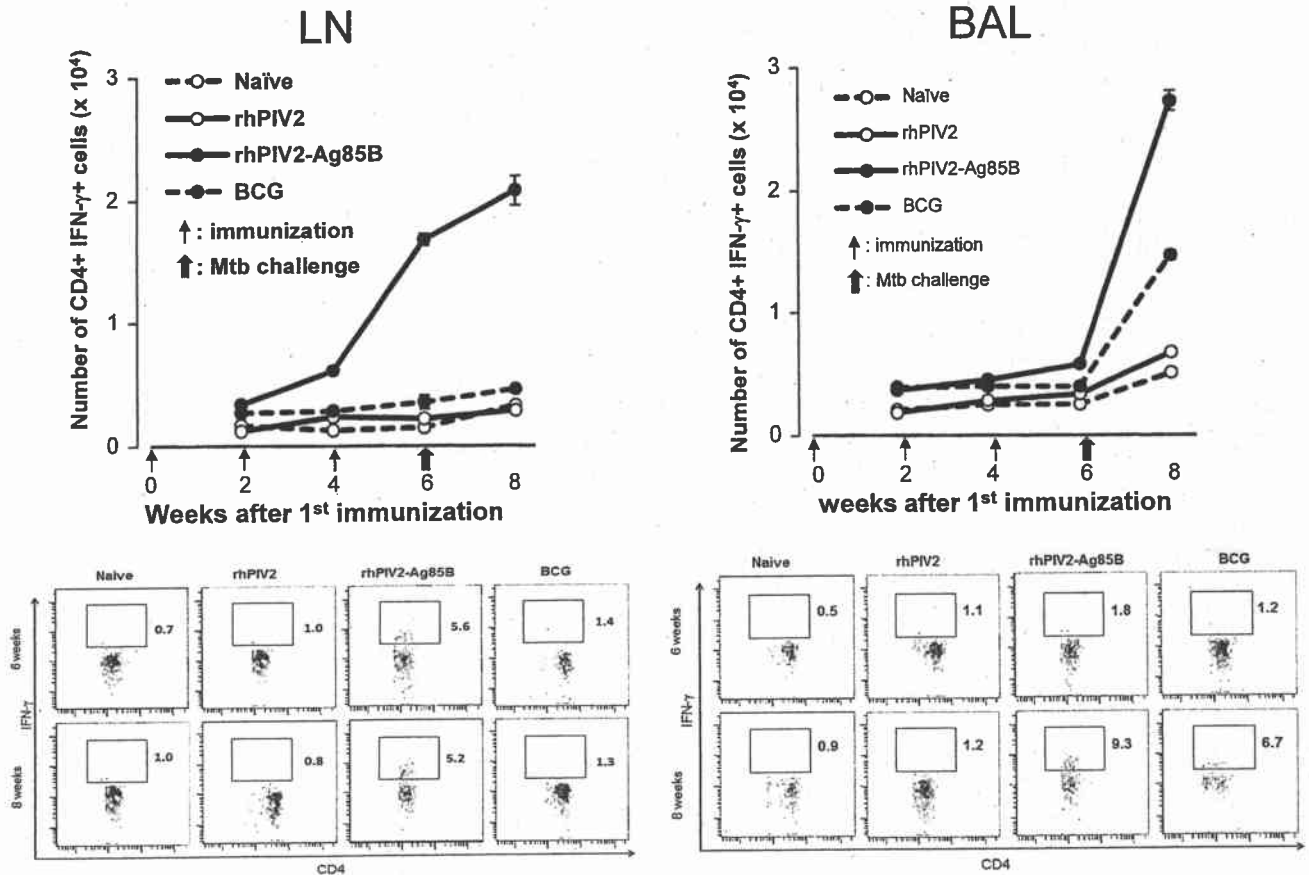


## rHPIV2-Ag85B の抗結核ワクチン効果



□: Control    ■: Ag85B DNA(x2)+rHPIV2-Ag85B(x2)    ■: rHPIV2-Ag85B(x4)    ■: BCG

# Induction of effector cells in pulmonary lymph node and lung.



## AERAS

- 2003年に設立 (MD, USA Cape Town, South Africa)
- Mission: 全ての年齢に対し効果のある結核ワクチンの開発およびこれら知識から広く公衆衛生上の問題の解決に寄与する。
- Bill Gates財団、各国政府 (米国、英国、EU、中国、オーストラリア等)の支援により運営
- South Africa TB Vaccine Initiative (SATBVI: University of Cape Town)を設立、運営しており、世界中の結核ワクチンの治験の全てに関与している。

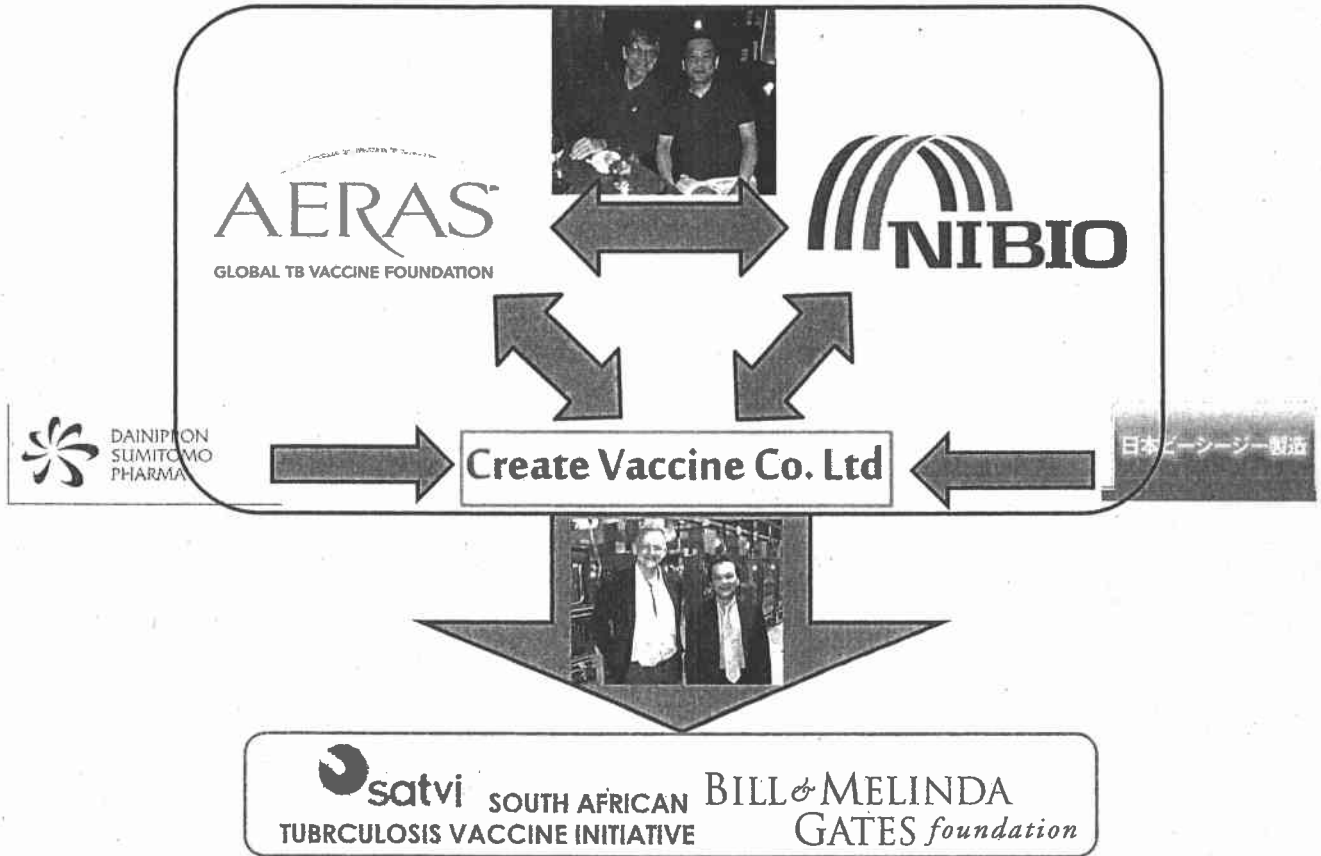
## AERAS Portfolio

Evaluation	Discovery		Preclinical Development	Clinical Development		
	Lead	Optimization		Phase I	Phase IIa	Phase IIb
PIV-Japan	CMV	rBCG	HBHA	AERAS-456 (H56)	CSR M72	MVA85A
DNA China/ U.Penn	CNBG-MVA			ID93	AERAS-404 (H4)	AERAS-402
RNA	Chimp Ad					
Novel BCG (TBVI, AECOM, Harvard)	Oral Ad					
Alternate delivery	Protein-adjuvant CNBG					
M smeg likePlus	BCG enhancement					

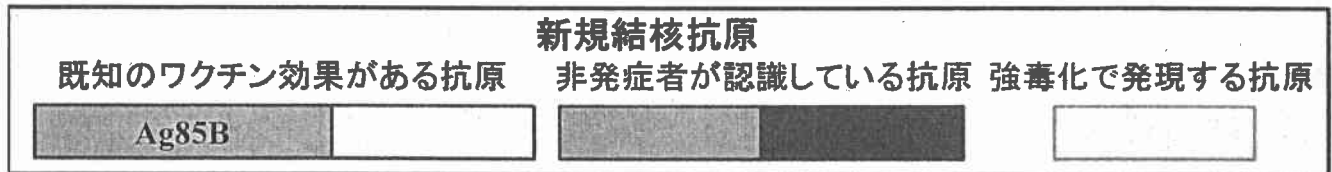
**Keep the Pipeline Filled**

**Also, Extended Portfolio w  
TuBerculosis Vaccine Initiative  
[TBVI]**

# Consortium on New TB Vaccine Development



## 新規結核ワクチン



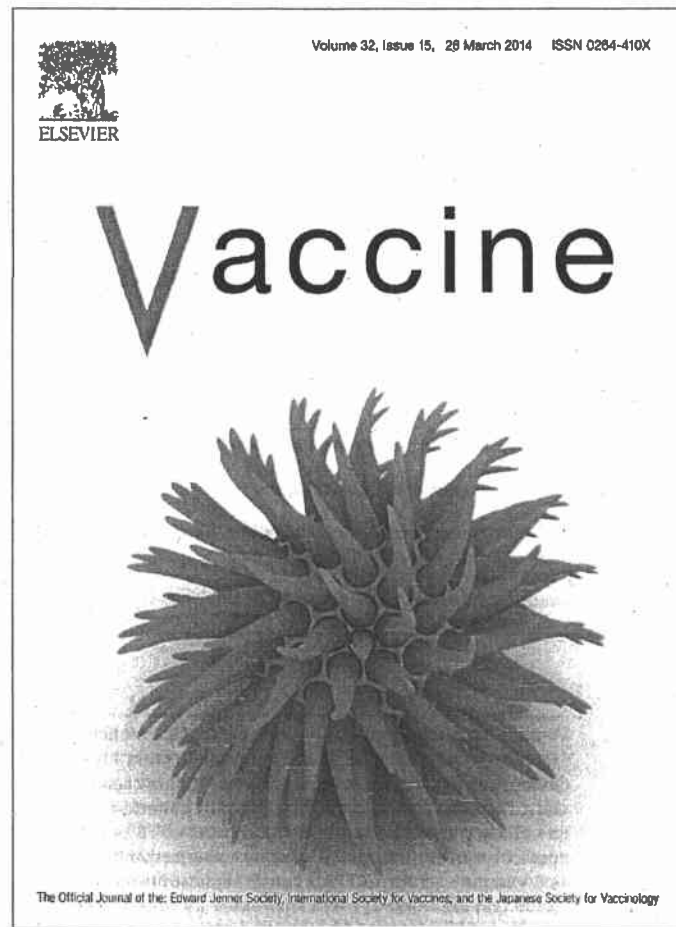
rHPIV2-Ag85B



rHPIV2-CRL2



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



**This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.**

**Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.**

**In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:**

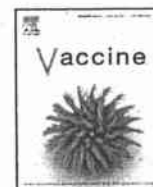
**<http://www.elsevier.com/authorsrights>**



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)

# Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization

Kenta Watanabe<sup>a,1</sup>, Akihiro Matsubara<sup>a,b,1</sup>, Mitsuo Kawano<sup>c</sup>, Satoru Mizuno<sup>d,e</sup>,  
Tomotaka Okamura<sup>a</sup>, Yusuke Tsujimura<sup>a</sup>, Hiroyasu Inada<sup>f</sup>, Tetsuya Nosaka<sup>c</sup>,  
Kazuhiro Matsuo<sup>d</sup>, Yasuhiro Yasutomi<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Immunoregulation and Vaccine Research, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan

<sup>b</sup> Division of Immunoregulation, Department of Molecular and Experimental Medicine, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Mie 514-8507, Japan

<sup>c</sup> Department of Microbiology and Molecular Genetics, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Mie 514-8507, Japan

<sup>d</sup> Research and Development Department, Japan BCG Laboratory, Kiyose, Tokyo 204-0022, Japan

<sup>e</sup> The Research Institute of Tuberculosis, Kiyose, Tokyo 204-8533, Japan

<sup>f</sup> Department of Pathology, Faculty of Pharmaceutical Science, Suzuka University of Medical Science, Suzuka, Mie 513-8670, Japan

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 24 May 2013

Received in revised form

25 November 2013

Accepted 29 November 2013

Available online 29 January 2014

### Keywords:

Human parainfluenza virus

Ag85B

Tuberculosis

Mucosal immunity

## ABSTRACT

Viral vectors are promising vaccine candidates for eliciting suitable Ag-specific immune response. Since *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) normally enters hosts via the mucosal surface of the lung, the best defense against Mtb is mucosal vaccines that are capable of inducing both systemic and mucosal immunity. Although *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin is the only licensed tuberculosis (TB) vaccine, its efficacy against adult pulmonary forms of TB is variable. In this study, we assessed the effectiveness of a novel mucosal TB vaccine using recombinant human parainfluenza type 2 virus (rhPIV2) as a vaccine vector in BALB/c mice. Replication-incompetent rhPIV2 (M gene-eliminated) expressing Ag85B (rhPIV2–Ag85B) was constructed by reverse genetics technology. Intranasal administration of rhPIV2–Ag85B induced Mtb-specific immune responses, and the vaccinated mice showed a substantial reduction in the number of CFU of Mtb in lungs and spleens. Unlike other viral vaccine vectors, the immune responses against Ag85B induced by rhPIV2–Ag85B immunization had an advantage over that against the viral vector. In addition, it was revealed that rhPIV2–Ag85B in itself has an adjuvant activity through the retinoic acid-inducible gene 1 receptor. These findings provide further evidence for the possibility of rhPIV2–Ag85B as a novel TB vaccine.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** BAL, bronchoalveolar lavage; BCG, *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin; BEAS cells, bronchial epithelial cells; hPIV2, human parainfluenza type 2 virus; pLN, pulmonary lymph node; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; NHBE, normal human bronchial epithelial; rhPIV2–Ag85B, recombinant hPIV2 expressing Ag85B; TB, tuberculosis.

\* Corresponding author at: Laboratory of Immunoregulation and Vaccine Research, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, 1-1 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan. Tel.: +81 29 837 2053; fax: +81 29 837 2053.

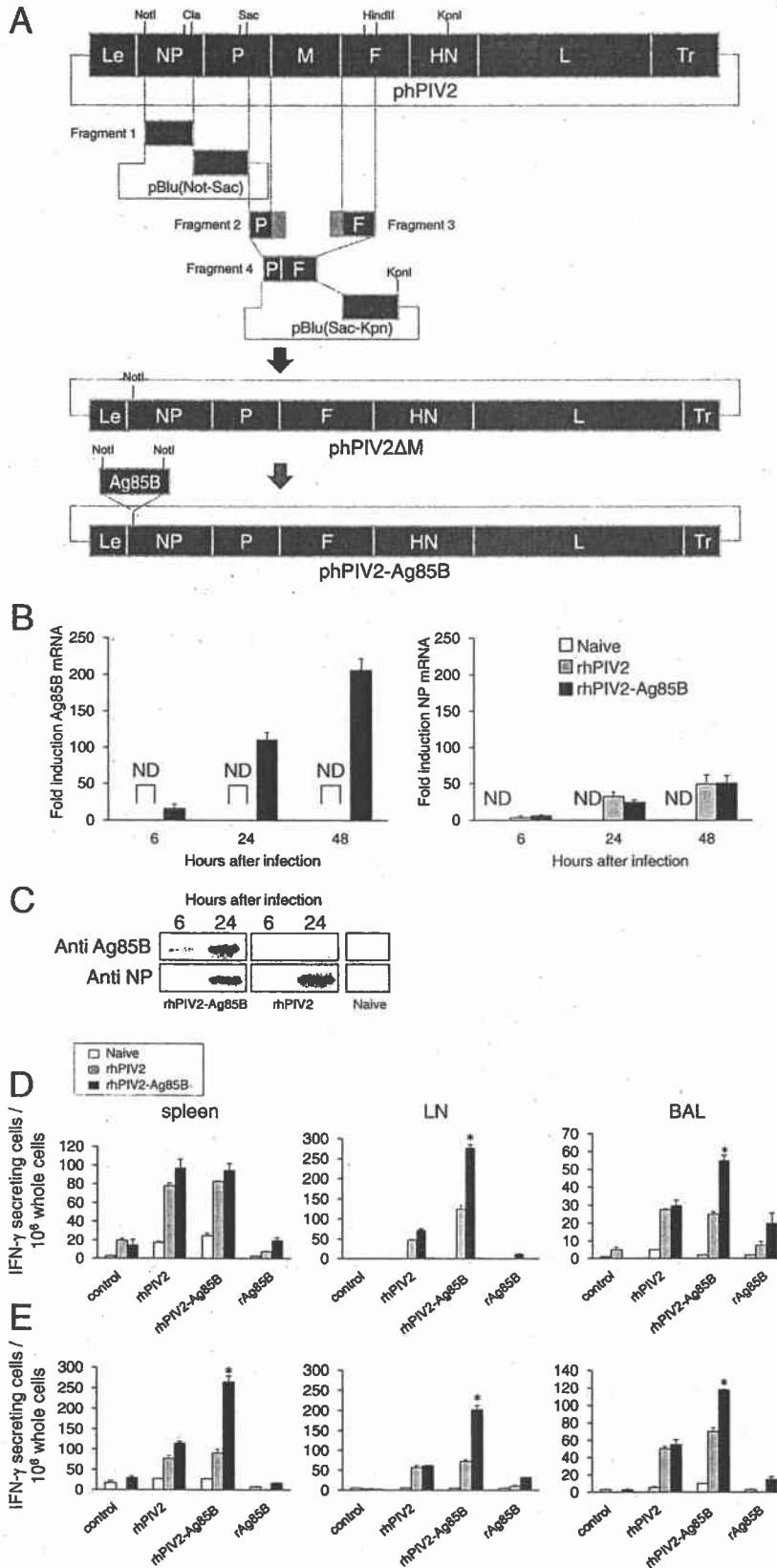
E-mail addresses: [yasutomi@nibio.go.jp](mailto:yasutomi@nibio.go.jp), [yasutomi@doc.medic.mie-u.ac.jp](mailto:yasutomi@doc.medic.mie-u.ac.jp) (Y. Yasutomi).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

0264-410X/\$ – see front matter © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.108>

## 1. Introduction

Recombinant viral vector vaccines have several advantages for preventing infection with pathogens [1]. The vaccines induce a full spectrum of immune responses including humoral and cellular immune responses. These immune responses can be initially induced at the viral vector infection site such as mucosal immune responses [2]. Moreover, the viral vector itself has adjuvant activities through the innate immune systems [3]. Pre-existing or post-priming immune responses against the vaccine vector itself, however, could be an obstacle to effective immune responses to recombinant Ag [4]. Negligible immune responses against vector viruses compared with recombinant vaccine Ags after immunization is considered most desirable for recombinant viral vaccines.



**Fig. 1.** Expression of Ag85B and advantageous effects in cellular immune response against Ag85B versus virus vector in immunized mice. (A) Construction of rhPIV2–Ag85B. (B) Expression of Ag85B (left panel) and NP (right panel) gene in BEAS cells infected with rhPIV2 or rhPIV2–Ag85B at each time point was determined by real-time PCR. Total RNA was extracted at 6, 24, and 48 h after infection. Fold increase of each target gene was normalized to  $\beta$ -actin, and the expression levels are represented as relative values to naïve cells. Error bars represent standard deviation. ND indicates non-detected. (C) Expression of Ag85B and NP proteins was detected by anti-Ag85B and anti-NP antibodies at 6 and 24 h after infection, respectively. (D and E) Mice were immunized 1 (D) or 2 (E) times with rhPIV2 or rhPIV2–Ag85B at a 2-week interval by intranasal

*Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) has substantially contributed to the control of tuberculosis (TB) for more than 80 years and affords about 80% protection against tuberculosis meningitis and miliary tuberculosis in infant and young children. However, it is well known that the protective efficacy of BCG against pulmonary TB in adults is variable and partial [5,6]. Therefore, development of new vaccines is urgently needed for the elimination of TB as a public health threat and should be a major global public health priority.

Many infectious diseases, including TB, initially establish infection on mucosal surfaces. Therefore, the best defense against these predominantly mucosal pathogens is mucosal vaccines that are capable of inducing both systemic and mucosal immunity. However, the mucosal immune system is quite unique and is different from systemic immune responses [7,8]. Mucosal immunization provides mucosal immune responses in all mucosal effector tissues in the concept of a common mucosal immune system [9].

Human parainfluenza type 2 virus (hPIV2) is a member of the genus *Rubulavirus* of the family *Paramyxoviridae* and possesses a single-stranded, nonsegmented and negative-stranded RNA genome. This virus does not have a DNA phase during its life cycle and can avoid genetic modifications. Additionally, this virus becomes replication-incompetent by elimination of some viral genes [10]. Moreover, it is likely to lead to elicit stronger inserted antigen-specific immune responses than vector-specific responses unlike other viral vaccine vectors using inserted antigen expression mechanisms of hPIV2. In the present study, we evaluated the effectiveness of intranasal administration of Ag85B-expressed non-replicating human parainfluenza type 2 virus (rhPIV2–Ag85B), which induces weak immune responses against a viral vector, as a novel mucosal TB vaccine.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Immunization

Six-week-old BALB/c female mice were immunized with rhPIV2–Ag85B or rhPIV2 control vector 3 or 4 times at 2-week intervals by intranasal inoculation of  $1 \times 10^8$  TCID50 virus in 20  $\mu$ l PBS. Another group of mice was intramuscularly immunized twice with Ag85B DNA vaccine [11] and intranasally immunized twice with rhPIV2–Ag85B. As a control group, a group of mice was vaccinated using  $1 \times 10^7$  CFU of BCG Tokyo by subcutaneous injection.

### 2.2. Infection assay

Two weeks (rhPIV2–Ag85B-immunized mice) or 6 weeks (BCG-immunized mice) after the final immunization, mice were challenged with *M. tuberculosis* (Mtb) Kurono strain by inhalation. This bacterial preparation and infection assay were performed as previously described [12]. In brief, the mice were infected via the airborne route by placing them into the exposure chamber of a Glas-Col aerosol generator. The nebulizer compartment was filled with 5 ml of a suspension containing  $10^6$  CFU of Kurono strain so that approximately 50 bacteria would be deposited in the lungs of each animal. Eight weeks after Mtb infection, mice were sacrificed and the preventive effects of the vaccine were assessed.

inoculation ( $n = 5$  per group). Spleen, pLN, and BAL cells were collected from immunized mice ( $n = 5$  per group) 2 weeks after the final immunization for examination by an ELISPOT assay. These isolated cells were stimulated *in vitro* with syngeneic spleen cells infected with control rhPIV2, rhPIV2–Ag85B, or recombinant Ag85B protein (rAg85B) (10  $\mu$ g/ml final concentration) for 24 h. Error bars represent standard deviations. Statistically significant differences are indicated by asterisks (\*,  $P < 0.05$  compared to the group stimulated with rhPIV2).

### 2.3. Cell culture

Human bronchial epithelial cells (BEAS cells) and primary cultured normal human bronchial epithelial (NHBE) cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and Lonza (Walkersville, MD). These cells were grown in bronchial epithelial growth medium containing supplements (Lonza). These cells were infected with rhPIV2 or rhPIV2–Ag85B (MOI of 10) or treated with recombinant Ag85B (10  $\mu$ g/ml) for 6–48 h in a 37 °C incubator with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### 2.4. FACS analysis

Spleen, pulmonary lymph node (pLN), and bronchoalveolar lavage (BAL) cells were obtained from immunized mice, and single-cell suspensions were prepared. The cells were incubated with recombinant Ag85B protein (10  $\mu$ g/ml final concentration) for 4 h in the presence of Brefeldin A at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The cells were stained for surface markers with anti-CD3 and anti-CD4 (BD Biosciences, San Jose, CA) for 30 min at 4 °C, followed by fixation for 30 min at 4 °C in 2% paraformaldehyde. IFN- $\gamma$  was detected by staining with anti-IFN- $\gamma$  (BD Biosciences) for 30 min at 4 °C. Flow cytometry data collection was performed on a FACS Canto II (BD Biosciences). Files were analyzed using FACSDiva Software (BD Biosciences). BEAS cells infected with rhPIV2–Ag85B were stained with anti-ICAM-1 (BioLegend, San Diego, CA) and analyzed as described above.

### 2.5. Evaluation of Ag85B-specific immune responses by ELISPOT assay

The number of Ag85B-specific, IFN- $\gamma$ -secreting cells was determined by the ELISPOT assay according to the method reported previously [11]. Triplicate samples of whole, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T cells (separated by a MACS system) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) collected from the spleen, pLN, and BAL were plated at  $1 \times 10^5$  cells/well. These cells were stimulated by addition of  $2 \times 10^5$  mitomycin C (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO)-treated syngeneic spleen cells infected with recombinant vaccinia virus expressing Ag85B or rhPIV2–Ag85B.

### 2.6. Statistical analysis

Data are presented as means  $\pm$  SD. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney *U* test. Statistically significant differences compared with the control are indicated by asterisks.

## 3. Results

### 3.1. Characteristics of rhPIV2–Ag85B

A construction of rhPIV2–Ag85B is shown in Fig. 1A. To examine gene expression levels of the inserted Ag85B, BEAS cells were infected with rhPIV2–Ag85B. Abundant and rapid expression of mRNA of Ag85B was observed in BEAS cells infected with rhPIV2–Ag85B compared with the expression of NP mRNA (Fig. 1B). These results were also confirmed by analysis of protein expression (Fig. 1C). The production of Ag85B was earlier than that of NP, which is usually the earliest synthesized protein in hPIV2 infection.

These responses were considered to be advantageous effects in cellular immune response to inserted Ag85B versus rhPIV2 vector. To confirm this advantageous response, cells from immunized mice were re-stimulated *in vitro* with syngeneic spleen cells infected with rhPIV2 or rhPIV2–Ag85B. Although responses to both Ag85B and rhPIV2 vector were observed, Ag85B-specific responses were clearly seen, especially in pLN and BAL cells after single immunization (Fig. 1D). After performing immunization twice, Ag85B-specific responses were also seen in spleen cells as booster effects more than responses to the vector virus (Fig. 1E). These results indicated that rhPIV2–Ag85B immunization elicited inserted Ag85B-specific immune responses without being hidden by vector responses.

**3.2. Intranasal administration of rhPIV2–Ag85B prevents infection with Mtb in mice**

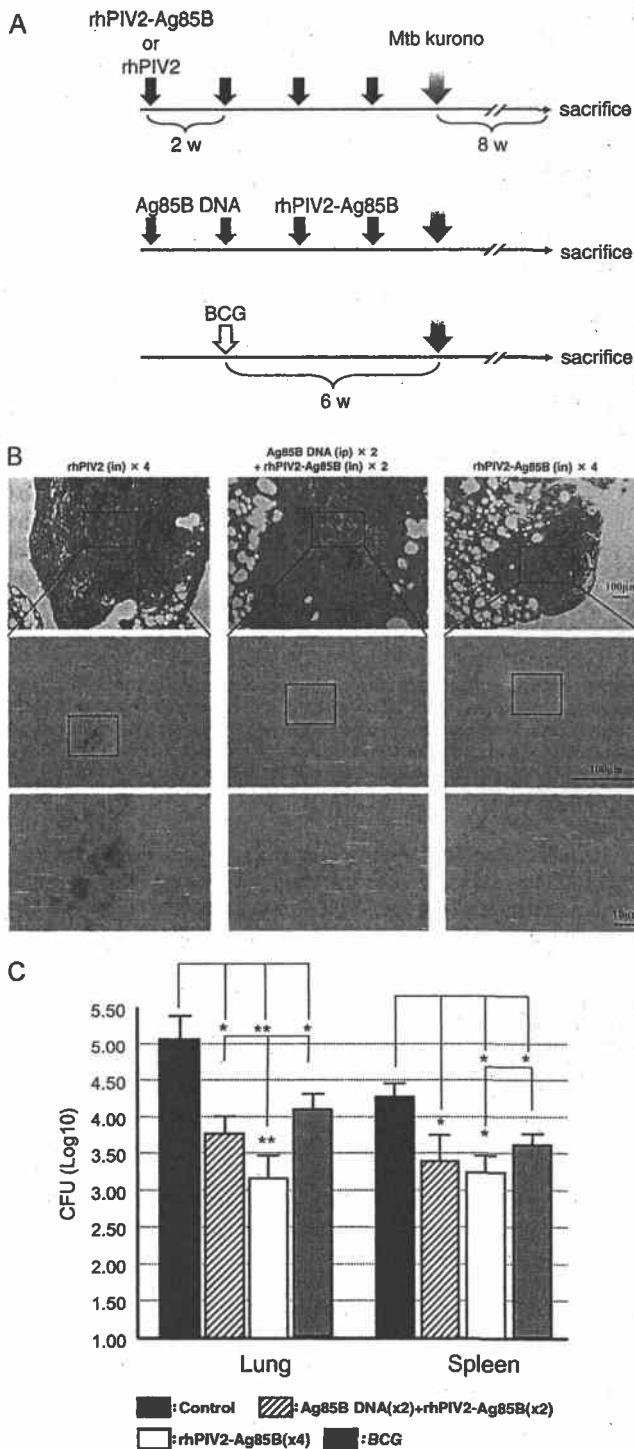
To investigate the ability of intranasal administration of rhPIV2–Ag85B to elicit a protective effect against pulmonary TB, rhPIV2–Ag85B-immunized mice were aerosol-infected with highly pathogenic Mtb kurono strain [13]. One group of mice were intranasally immunized with rhPIV2–Ag85B 4 times at 2-week intervals, and another group of mice were intranasally immunized with rhPIV2–Ag85B twice following intramuscular immunization with Ag85B DNA twice (Fig. 2A). Intranasal administration of rhPIV2–Ag85B resulted in a decreases in granulomatous lesions and inflammatory area. However, there were no apparent histopathological differences, such as infiltrating cell types, between the each group of mice, and these results are similar to the results of another study focusing on TB vaccine [14]. On the other hand, these vaccine effects were clearly seen by staining for acid-fast bacillus. Mice immunized with rhPIV2–Ag85B showed a substantial reduction in the infiltration of bacteria, and this inhibitory effect on bacterial expansion was correlated with the number of rhPIV2–Ag85B intranasal administrations (Fig. 2B). CFU of Mtb in spleens from both groups of immunized mice was also significantly lower than those in mice immunized with the control vector (Fig. 2C). As for a preventive effect on Mtb infection in the lung, the mice immunized with rhPIV2–Ag85B clearly showed a substantial reduction in CFU.

**3.3. Ag85B-specific immune response is elicited by rhPIV2–Ag85B administration**

The capacity of rhPIV2–Ag85B intranasal immunization to elicit effector cells that recognize endogenously expressed Ag85B was assessed. Spleen, pLN, and BAL cells obtained from immunized mice were re-stimulated *in vitro* with syngeneic spleen cells infected with the recombinant vaccinia virus expressing Ag85B, and endogenously expressed Ag85B-specific cellular immune response was examined by ELISPOT assays. Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> splenocytes exhibited Ag85B-specific responses, and CD8<sup>+</sup> T cells showed much stronger responses than those of CD4<sup>+</sup> T cells in splenocytes from mice immunized with rhPIV2–Ag85B (Fig. 3A). Ag85B-specific responses were also seen in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells at almost the same levels in pLN and BAL cells (Fig. 3B and C).

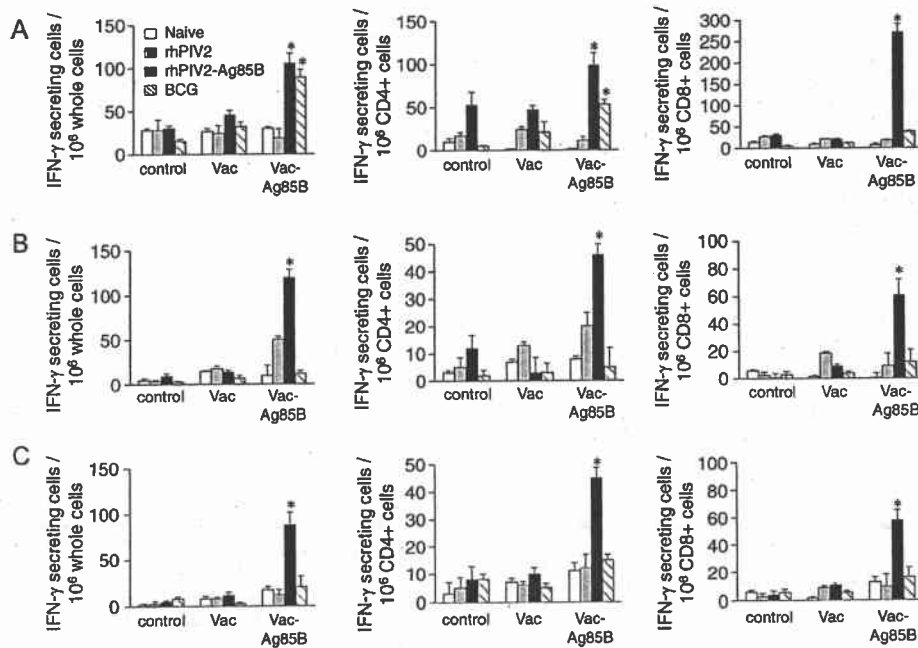
**3.4. Analysis of Ag-specific effector cells and immune responses in pLN cells and the lung**

Delayed initial activation of effector cells in lungs has been reported in the case of Mtb infection [15]. To control bacterial expansion in the early phase of infection, rapid Mtb Ag-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses are required. Thus, we next analyzed recruitment of Ag85B-specific IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in pLN and BAL cells in mice immunized with rhPIV2–Ag85B. Mice were intranasally immunized with rhPIV2–Ag85B or the control vector virus 3 times



**Fig. 2.** Repeated immunization with rhPIV2–Ag85B results in protection from TB. (A) Groups of mice were vaccinated in this schedule. (B) Histological images of the lungs of Mtb-infected mice. Groups of mice ( $n = 10$ ) immunized 4 times with rhPIV2 (left panel), 2 times with Ag85B DNA vaccine and 2 times with rhPIV2–Ag85B (middle panel) or 4 times with rhPIV2–Ag85B (right panel) were challenged by Mtb infection. Arrows point to tubercles. Lower panels in (B) show magnified images of images in the middle panels. (C) Inhibition of bacterial growth by immunization with rhPIV2–Ag85B in the lung and spleen. Groups of mice immunized 2 times with Ag85B DNA vaccine and 2 times with rhPIV2–Ag85B or immunized 4 times with rhPIV2–Ag85B or BCG were challenged by Mtb infection. The numbers of Mtb CFU in the lung and spleen were determined by a colony enumeration assay. The bacterial load is represented as mean log<sub>10</sub> CFU per organ. Error bars represent standard deviations. Statistically significant differences are indicated by asterisks (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.005$ ).





**Fig. 3.** Induction of Ag85B-specific cellular immune responses in rhPIV2–Ag85B-immunized mice. Mice were immunized with rhPIV2, rhPIV2–Ag85B, or BCG ( $n=5$  per group) according to the schedule shown in Fig. 2A. Two (rhPIV2 or rhPIV2–Ag85B) or 4 weeks (BCG) after the final immunization, the spleen, pLN, and BAL were collected. Isolated cells from the spleen (A), pLN (B), or BAL (C) were separated into whole (left panels), CD4<sup>+</sup> (middle panels), and CD8<sup>+</sup> (right panels) T cells and examined for IFN- $\gamma$  production in an ELISPOT assay. These cells were stimulated *in vitro* with syngeneic spleen cells infected with control vaccinia virus (Vac) or recombinant vaccinia virus carrying the Ag85B gene (Vac–Ag85B) for 24 h. Error bars represent standard deviations. Statistically significant differences are indicated by asterisks (\*,  $P < 0.01$  compared to the group stimulated with Vac).

at 2-week intervals. Another group of mice were immunized with BCG by subcutaneous injection: Two weeks (rhPIV2–Ag85B-immunized mice) or 6 weeks (BCG-immunized mice) after the final immunization, all mice were challenged with Mtb Kurono strain by inhalation (Fig. 4A). At each time point after immunization or Mtb challenge, the percentage and absolute number of Ag85B-specific IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells were determined by flow cytometry. Before Mtb challenge, the percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells in pLN cells was increased by immunization with rhPIV2–Ag85B but not by BCG immunization (Fig. 4B and C, top). However, a significant increase in IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells was not detected in BAL cells (Fig. 4B and C, bottom). Interestingly, expansion of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells occurred after Mtb challenge in BAL cells more dramatically than that in pLN cells in terms of absolute number (Fig. 4C). These responses induced by rhPIV2–Ag85B immunization were much stronger than those induced by BCG immunization.

Similarly, an increase in Ag85B-specific responses was observed by the ELISPOT assay (Fig. 4D). The number of Ag85B-specific IFN- $\gamma$  secreting cells increased in pLN cells from mice immunized with rhPIV2–Ag85B in a number of immunizations-dependent manner. Furthermore, strong Ag85B-specific responses were detected after Mtb challenge in pLN and BAL cells, and the responses were much stronger than those in BCG immunized mice.

### 3.5. rhPIV2–Ag85B induces innate immune responses

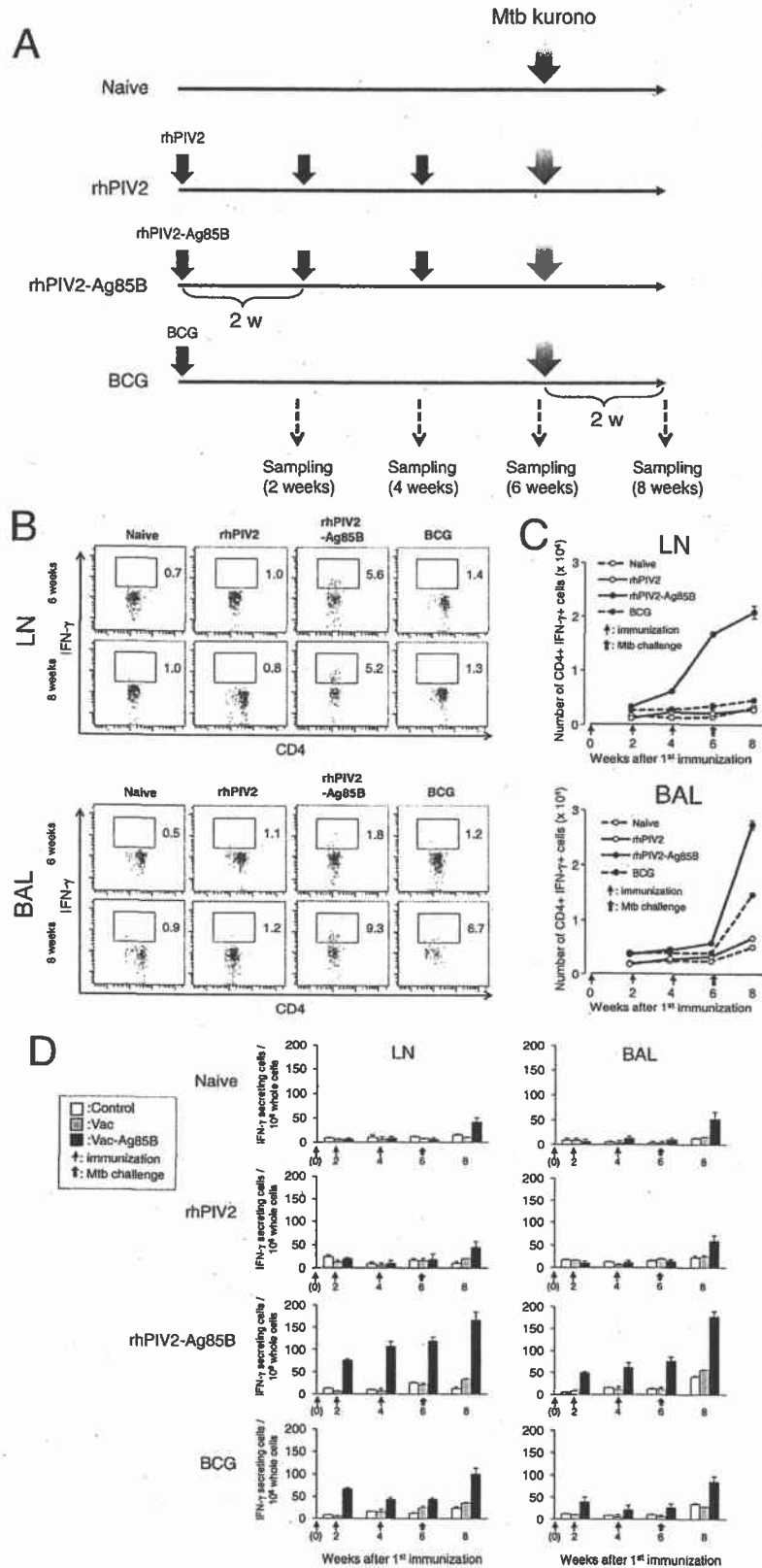
We explored innate immune responses induced by rhPIV2–Ag85B infection. We confirmed that Ag85B did not affect the viability of rhPIV2–Ag85B infected cells (Supplemental Fig. 1) [44–46]. Type I IFNs were assessed after infection with rhPIV2–Ag85B in NHBE and BEAS cells as an indication of innate immune responses. Both types of cells showed mRNA expression of type I IFNs after infection with rhPIV2–Ag85B but not after addition of recombinant Ag85B protein (Fig. 5A). Production of IFN- $\beta$  was also detected in the culture supernatant by ELISA

(Fig. 5B). The mRNA expression of intracellular receptors, RIG-I, MDA5, and TLR3, and the induction of cytokines, IL-6 and IL-15 were also enhanced by infection with rhPIV2–Ag85B, whereas these effects were not observed with the addition of recombinant Ag85B protein (Fig. 5C and D). Furthermore, the expression of ICAM-1 was induced by infection with rhPIV2–Ag85B (Fig. 5E). Similar results were obtained after infection with rhPIV2 vector alone or rhPIV2-GFP (Supplemental Fig. 2). Other co-stimulation molecules, CD80, CD86, ICAM-2 and selectin, were not detected (data not shown).

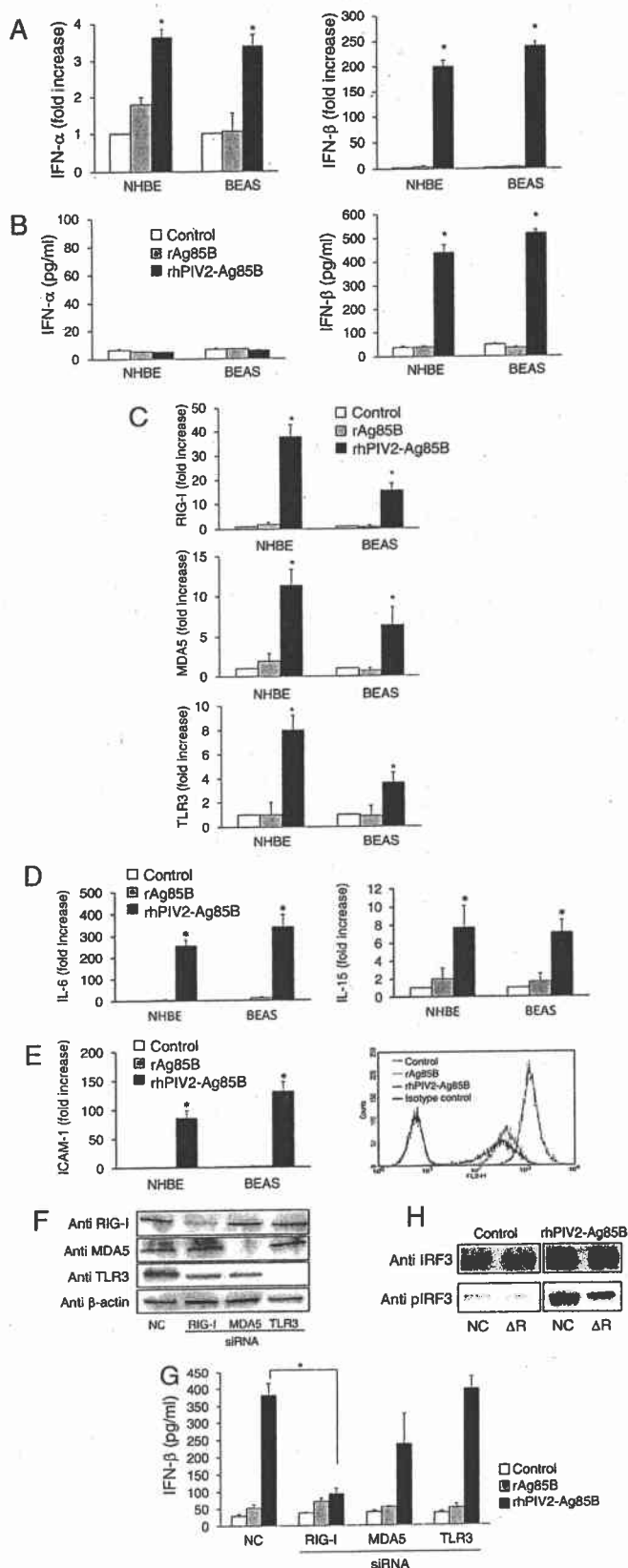
To further investigate the participation of these receptors in innate immune activation induced by rhPIV2–Ag85B infection, expression of these receptors was knocked down by transfecting siRNA. At 48 h after transfection with siRNA, expression levels of these receptors were reduced by approximately 90% or expression was no longer detectable (Fig. 5F). IFN- $\beta$  production induced by rhPIV2–Ag85B infection was inhibited when the cells were treated with RIG-I siRNA. For other receptors, MDA5 and TLR3, siRNA treatment did not result in inhibition of IFN- $\beta$  production induced by rhPIV2–Ag85B infection (Fig. 5G). This result was confirmed by phosphorylation of IRF3, which is a downstream molecule of RIG-I in epithelial cells. The phosphorylation of IRF3 induced by rhPIV2–Ag85B infection was inhibited when epithelial cells were treated with siRNA of RIG-I (Fig. 5H).

## 4. Discussion

In the present study, we demonstrated the effectiveness of hPIV2 vectors for TB vaccines to induce systemic and mucosal immune responses. The rhPIV2 vector is a weak immunogenic; however, intranasal immunization with rhPIV2–Ag85B showed more potent protection against pulmonary TB in BALB/c mice than did conventional BCG vaccination. The rhPIV2–Ag85B shows a vaccine effect by itself alone, and this effect is more useful than the effects of other vectors for TB vaccines.



**Fig. 4.** Analysis of Ag-specific effector cells and these immune responses in pLN and BAL. (A) Groups of mice were immunized with rhPIV2, rhPIV2-Ag85B, or BCG ( $n = 10$  per group) and challenged by Mtb infection in this schedule. (B) Representative flow cytometry plots of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells on gated CD4<sup>+</sup> cells from pLN (top panels) and BAL (bottom panels) are shown. Numbers shown beside the gates represent the percentages within CD4<sup>+</sup> T cells. (C) Kinetics of recruitment of Ag85B-specific IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells in pLN (top panel) and BAL (bottom panel). Absolute numbers of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cell populations at each time points are shown. Error bars represent standard deviations. (D) Isolated cells from the pLN and BAL at each time point were examined for IFN- $\gamma$  production in an ELISPOT assay. These cells were stimulated *in vitro* with syngeneic spleen cells infected with control vaccinia virus (Vac) or recombinant vaccinia virus carrying the Ag85B gene (Vac-Ag85B) for 24 h. Error bars represent standard deviations.



**Fig. 5.** Evaluation of adjuvant activity of rhPIV2-Ag85B *in vitro*. NHBE and BEAS cells were treated with rAg85B protein (10 μg/ml) or infected with rhPIV2-Ag85B (MOI of 10) for 24 h, and the increases in mRNA levels of IFN-α, IFN-β (A), RIG-I, MDA5, TLR3 (C), IL-6, IL-15 (D), and ICAM-1 (E, left panel) were determined by real-time PCR. Fold increase of each target gene was normalized to β-actin, and the

Viral vectors are promising vaccine candidates for eliciting Ag-specific immune responses [16,17]. Pre-existing anti-vector antibodies, however, constitute an obstacle for use in humans [18–20]. Although antibodies against hPIV are known to cross-react with Sendai virus, Sendai virus vector is considered to be effective for human use by intranasal administration [21]. Additionally, Sendai virus vector is not affected by antibodies against Sendai virus for induction of T cell responses, especially when it is administered intranasally [4]. From these findings, intranasal administration of the hPIV2 vector is also considered to be effective for human use. In fact, multiple administrations with rhPIV2-Ag85B also showed preventive effects more clearly than did immunization 2 times with rhPIV2-Ag85B (Fig. 2).

Many viral vectors have been tested as recombinant viral vaccines eliciting suitable recombinant Ag-specific immune responses, and many of these vaccine vectors are not vaccine viruses such as vaccinia virus Ankara (MVA), adenovirus, Sendai virus, and CMV. These viral vectors have also been used in several vaccine trials in TB or HIV vaccine [22–24]. Experience in the HIV vaccine field has emphasized the importance of avoiding anti-vector immune responses when developing a vectored vaccine [25]. Immune responses to vaccine vectors prevent the induction of aimed immune responses against recombinant Ag. From these findings, elimination of the immunogenicity of a vaccine vector is critical for a recombinant viral vaccine. The immunogenicity of viral vectors depends on the amount of vector viral proteins. Approximately 80 poxvirus proteins are encoded by its over 130–300 kbp and the adenovirus genome sizes are 26–45 kbp. The genome sizes of these two viral vectors are much larger than that of hPIV2 (15.65 kbp), and induction of immune responses to hPIV2 vector might be lower than other viral vectors. In TB vaccines, recombinant vaccinia virus and adenovirus, which are immunogenic viruses, did not show clear vaccine effects against TB infection by immunization with themselves alone. These two recombinant TB vaccines, adenovirus and MVA, were utilized as boost immunization after BCG priming [26,27]. These heterologous prime-boost strategies diminish immune responses to the vector virus and indicate the possibility of a practical and efficient strategy for prevention of TB [28,29]. On the other hand, the most common method for obtaining an attenuated virus is gene elimination of the viral construct protein to make a replication-deficient virus *in vivo*. The rhPIV2 vector is a weak immunogenicity by elimination of structural protein (M) gene; however, the rhPIV2-Ag85B shows a vaccine effect by immunization with itself alone, and this effect is more useful than the effects of other vectors for a recombinant TB vaccine.

The hPIV2 vector has an additional advantage over other viral vectors. The inserted Ag85B gene, which is only 978 bp, is a minor component of rhPIV2-Ag85B. Despite that, the cellular immune response against Ag85B had an advantage over that against the virus vector in mice. This advantageous effect is thought to depend

expression levels are represented as relative values to the control. Culture supernatants were also collected, and amounts of secreted IFN-α and IFN-β were measured by ELISA (B). Expression of ICAM-1 was also confirmed by FACS analysis in BEAS cells (E, right panel). Data are averages of triplicate samples from three identical experiments, and error bars represent standard deviations. Statistically significant differences between control cells and rhPIV2-Ag85B-infected cells are indicated by asterisks (\*,  $P < 0.01$ ). BEAS cells were treated with siRNA targeting RIG-I, MDA5, TLR3, or the negative control siRNA (NC) for 48 h. Depletion of them was examined by immunoblotting (F). Those cells were stimulated by rAg85B protein (10 μg/ml) or infected with rhPIV2-Ag85B (MOI of 10) and then production of IFN-β was measured by ELISA (G). Data are averages of triplicate samples from three identical experiments, and error bars represent standard deviations. Statistically significant differences are indicated by asterisks (\*,  $P < 0.01$  compared to NC). The effects of depletion of RIG-I on IRF3 phosphorylation were tested. BEAS cells treated with NC or siRNA targeting RIG-I (ΔR) for 48 h were infected with rhPIV2-Ag85B or not infected (control). Whole IRF3 and phosphorylated IRF3 (pIRF3) were detected by immunoblotting 6 h after infection (H).

on Ag85B expression mechanisms. The frequency with which viral RNA polymerase reinitiates the next mRNA at gene junctions is imperfect, and this leads to a gradient of mRNA abundance that decreases according to distance from the genome 3' end [30]. Insertion of the Ag85B gene into the 3' proximal first locus between the leader sequence and the NP gene results in the highest level of gene expression. Ag85B is transcribed earlier and more abundantly than other viral products (Fig. 1B and C). This property of rhPIV2–Ag85B leads to elicit stronger Ag85B-specific immune responses than vector-specific responses in our system (Fig. 1D and E), although recombinant virus vaccine immunization usually induces overwhelming viral-specific immune responses compared with an inserted gene product [31,32]. We also demonstrated that intranasal administration of the rhPIV2 vector had no adverse effects and provided sufficient immunogenicity and a sufficient vaccine effect against Mtb in mice. These results suggest that intranasal administration of rhPIV2–Ag85B does not cause functional failure as a vaccine by multiple administrations, and these features of the rhPIV2 vector are definitely advantages for clinical use.

Another major feature of rhPIV2–Ag85B is effective prevention of TB by intranasal administration. Vaccination in the respiratory tract may enhance protection against Mtb infection, since Mtb initially establishes infection on mucosal surfaces of the respiratory tract. Indeed, a number of recombinant TB vaccines have been developed and evaluated for respiratory mucosal immunization [33–35]. It is important to note that lack of Ag-specific effector cells persists even up to about 21 days after pulmonary Mtb infection caused by a bacterial component [15,36]. In the present study, the arrival of Ag-specific T cells was detected in lung and pLN by rhPIV2–Ag85B immunization, and this arrival of effector cells was recognized faster than BCG immunization after Mtb challenge (Fig. 4B and C). We were able to establish a novel intranasal vaccine, rhPIV2–Ag85B, against TB by utilizing various advantages of intranasal administration. Nasal administration of a vaccine to induce mucosal and systemic immune responses has several advantages other than the induction of effective immune responses. It is even possible that intranasal administration of replication-incompetent rhPIV2–Ag85B limits the areas of infection in respiratory organs and induces a respiratory tract mucosal immune response in addition to a systemic immune response against TB. Our study suggested that intranasal administration of rhPIV2–Ag85B, which can induce both mucosal and systemic immune responses against Mtb, has a great advantage as a TB vaccine.

Attempts have been made to use various types of adjuvants for enhancing an immune responses to vaccines, including vaccines against TB [37]. In fact, a protein-based TB vaccine required the addition of an adjuvant to induce effective immune responses [38–41]. For the generation of adaptive immune responses, induction of innate immunity is crucial for vaccines to elicit potent Ag-specific immune responses. Pattern recognition receptors have been studied as potential targets for an adjuvant. dsRNA is a dominant activator of innate immunity because viral dsRNA is recognized by TLR3, RIG-I, and MDA5 [42,43]. As a result, it was demonstrated that the rhPIV2 vector had a potent adjuvant activity as dsRNA recognized by the RIG-I receptor and enhanced not only local innate immunity but also systemic adaptive immunity. It is possible that no extra addition of an adjuvant is required to prevent TB by vaccination with rhPIV2–Ag85B. Furthermore, the inhibitory effects on the growth of rhPIV2–Ag85B *in vivo* by IFN through the innate receptor are not required to consider since the rhPIV2 vector is replication-incompetent *in vivo* by elimination of the M gene (Fig. 1A).

In summary, our results provide evidence for the possibility of rhPIV2–Ag85B as a novel intranasal vaccine for eliciting

Mtb-specific mucosal immunity. Immunization with rhPIV2–Ag85B showed significant protection against TB without any prime vaccine or addition of an adjuvant in mice. Further studies will contribute to the ultimate goal of establishing a new vaccine strategy that can definitely prevent Mtb infection.

### Acknowledgements

We thank members of AERAS for helpful advice and Dr. Yasuhiko Ito (Chubu University, Japan) and Dr. Isamu Sugawara (The Research Institute of Tuberculosis) for useful suggestion. This work was supported by Health Science Research Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. This work was also supported by a grant from the Cooperative Link of Unique Science and Technology for Economy Revitalization (CLUSTER) promoted by the Ministry of Education, Culture, Sports and Technology, Japan.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.108>.

### References

- [1] Small JC, Ertl HC. Viruses – from pathogens to vaccine carriers. *Curr Opin Virol* 2011;1(October (4)):241–5.
- [2] Halle S, Dujardin HC, Bakocevic N, Fleige H, Danzer H, Willenzon S, et al. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J Exp Med* 2009;206(November (12)):2593–601.
- [3] Okano S, Yonemitsu Y, Shirabe K, Kakeji Y, Maehara Y, Harada M, et al. Provision of continuous maturation signaling to dendritic cells by RIG-I-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus. *J Immunol* 2011;186(February (3)):1828–39.
- [4] Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, et al. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 2011;29(November (47)):8557–63.
- [5] Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. Karonga Prevention Trial Group. *Lancet* 1996;348(July (9019)):17–24.
- [6] Rodrigues LC, Pereira SM, Cunha SS, Genser B, Ichihara MY, de Brito SC, et al. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Lancet* 2005;366(October (9493)):1290–5.
- [7] Zinselmeyer BH, Dempster J, Gurney AM, Wokosin D, Miller M, Ho H, et al. In situ characterization of CD4+ T cell behavior in mucosal and systemic lymphoid tissues during the induction of oral priming and tolerance. *J Exp Med* 2005;201(June (11)):1815–23.
- [8] Dwivedy A, Aich P. Importance of innate mucosal immunity and the promises it holds. *Int J Gen Med* 2011;4:299–311.
- [9] Kiyono H, Kweon MN, Hiroi T, Takahashi I. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol Scand* 2001;59(June (3)):145–53.
- [10] Kawano M, Kaito M, Kozuka Y, Komada H, Noda N, Nanba K, et al. Recovery of infectious human parainfluenza type 2 virus from cDNA clones and properties of the defective virus without V-specific cysteine-rich domain. *Virology* 2001;284(May (1)):99–112.
- [11] Takamura S, Matsuo K, Takebe Y, Yasutomi Y. Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J Immunol* 2005;175(August (4)):2541–7.
- [12] Sugawara I, Mizuno S, Yamada H, Matsumoto M, Akira S. Disruption of nuclear factor-interleukin-6, a transcription factor, results in severe mycobacterial infection. *Am J Pathol* 2001;158(February (2)):361–6.
- [13] Sugawara I, Yamada H, Kazumi Y, Doi N, Otomo K, Aoki T, et al. Induction of granulomas in interferon-gamma gene-disrupted mice by avirulent but not by virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 1998;47(October (10)):871–7.
- [14] Sweeney KA, Dao DN, Goldberg MF, Hsu T, Venkataswamy MM, Henaio-Tamayo M, et al. A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* 2011;17(October (10)):1261–8.

- [15] Shafiani S, Tucker-Heard G, Kariyone A, Takatsu K, Urdahl KB. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J Exp Med* 2010;207(July (7)):1409–20.
- [16] Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(January (1)):62–73.
- [17] Clark KR, Johnson PR. Gene delivery of vaccines for infectious disease. *Curr Opin Mol Ther* 2001;3(August (4)):375–84.
- [18] Sumida SM, Truitt DM, Lemckert AA, Vogels R, Custers JH, Addo MM, et al. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J Immunol* 2005;174(June (11)):7179–85.
- [19] Catanzaro AT, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, et al. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *J Infect Dis* 2006;194(December (12)):1638–49.
- [20] Priddy FH, Brown D, Kublin J, Monahan K, Wright DP, Lalezari J, et al. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis* 2008;46(June (11)):1769–81.
- [21] Hara H, Hironaka T, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, et al. Prevalence of specific neutralizing antibodies against Sendai virus in populations from different geographic areas: implications for AIDS vaccine development using Sendai virus vectors. *Hum Vaccin* 2011;7(June (6)):639–45.
- [22] McShane H, Brookes R, Gilbert SC, Hill AV. Enhanced immunogenicity of CD4(+) t-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect Immun* 2001;69(February (2)):681–6.
- [23] Radošević K, Wieland CW, Rodriguez A, Weverling GJ, Mintardjo R, Gillissen G, et al. Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of gamma interferon. *Infect Immun* 2007;75(August (8)):4105–15.
- [24] Munier CM, Andersen CR, Kelleher AD. HIV vaccines: progress to date. *Drugs* 2011;71(March (4)):387–414.
- [25] Cheng C, Wang L, Gall JG, Nason M, Schwartz RM, McElrath MJ, et al. Decreased pre-existing Ad5 capsid and Ad35 neutralizing antibodies increase HIV-1 infection risk in the Step trial independent of vaccination. *PLoS ONE* 2012;7(4):e33969.
- [26] Abel B, Tameris M, Mansoor N, Gelderbloem S, Hughes J, Abrahams D, et al. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(June (12)):1407–17.
- [27] McShane H, Pathan AA, Sander CR, Keating SM, Gilbert SC, Huygen K, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 2004;10(November (11)):1240–4.
- [28] Rahman S, Magalhães I, Rahman J, Ahmed RK, Sizemore DR, Scanga CA, et al. Prime-boost vaccination with rBCG/rAd35 enhances CD8(+) cytolytic T-cell responses in lesions from *Mycobacterium tuberculosis*-infected primates. *Mol Med* 2012;18:647–58.
- [29] Pathan AA, Minassian AM, Sander CR, Rowland R, Porter DW, Poulton ID, et al. Effect of vaccine dose on the safety and immunogenicity of a candidate TB vaccine, MVA85A, in BCG vaccinated UK adults. *Vaccine* 2012;30(August (38)):5616–24.
- [30] Tokusumi T, Iida A, Hirata T, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M. Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus Res* 2002;86(June (1–2)):33–8.
- [31] Sakurai H, Kawabata K, Sakurai F, Nakagawa S, Mizuguchi H. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int J Pharm* 2008;354(April (1–2)):9–15.
- [32] Chen D, Murphy B, Sung R, Bromberg JS. Adaptive and innate immune responses to gene transfer vectors: role of cytokines and chemokines in vector function. *Gene Ther* 2003;10(June (11)):991–8.
- [33] Wang J, Thorson L, Stokes RW, Santosuosso M, Huygen K, Zganiacz A, et al. Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 2004;173(November (10)):6357–65.
- [34] Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, Doherty TM, Jensen CG, Andersen P. Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guérin immunity. *J Immunol* 2006;177(November (9)):6353–60.
- [35] Ballester M, Nembrini C, Dhar N, de Titta A, de Piano C, Pasquier M, et al. Nanoparticle conjugation and pulmonary delivery enhance the protective efficacy of Ag85B and CpG against tuberculosis. *Vaccine* 2011;29(September (40)):6959–66.
- [36] Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, et al. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med* 2008;205(January (1)):105–15.
- [37] Moreno-Mendieta SA, Rocha-Zavaleta L, Rodriguez-Sanoja R. Adjuvants in tuberculosis vaccine development. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;58(February (1)):75–84.
- [38] Lin PL, Dietrich J, Tan E, Abalos RM, Burgos J, Bigbee C, et al. The multistage vaccine H56 boosts the effects of BCG to protect cynomolgus macaques against active tuberculosis and reactivation of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Invest* 2012;122(January (1)):303–14.
- [39] Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, Cardona PJ, Izzo A, Dolganov G, et al. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med* 2011;17(February (2)):189–94.
- [40] Bertholet S, Ireton GC, Ordway DJ, Windish HP, Pine SO, Kahn M, et al. A defined tuberculosis vaccine candidate boosts BCG and protects against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med* 2010;2(October (53)):53ra74.
- [41] Von Eschen K, Morrison R, Braun M, Ofori-Anyaniam O, De Kock E, Pavithran P, et al. The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A: tolerability and immunogenicity in humans. *Hum Vaccin* 2009;5(July (7)):475–82.
- [42] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(October (6857)):732–8.
- [43] Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441(May (7089)):101–5.
- [44] Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 1999;73(January (1)):251–9.
- [45] Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, et al. Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J Immunol* 2008;181(November (9)):6337–48.
- [46] Falkner FG, Moss B. *Escherichia coli* gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol* 1988;62(June (6)):1849–54.

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)<br>(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。<br>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。                         |

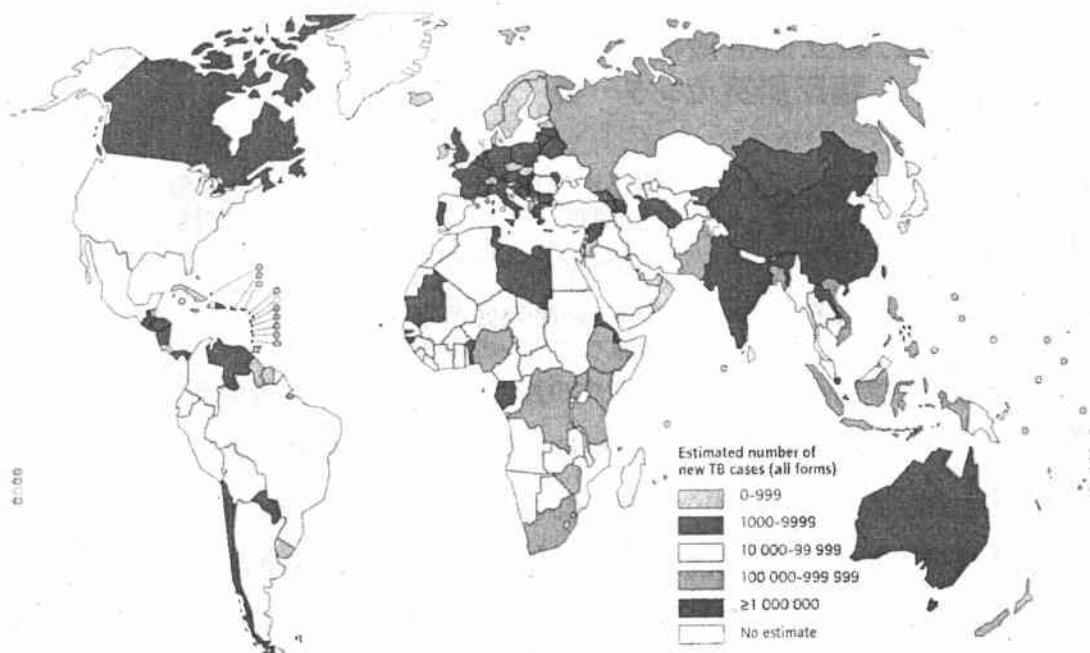
# WHO 報告 2013

## 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。

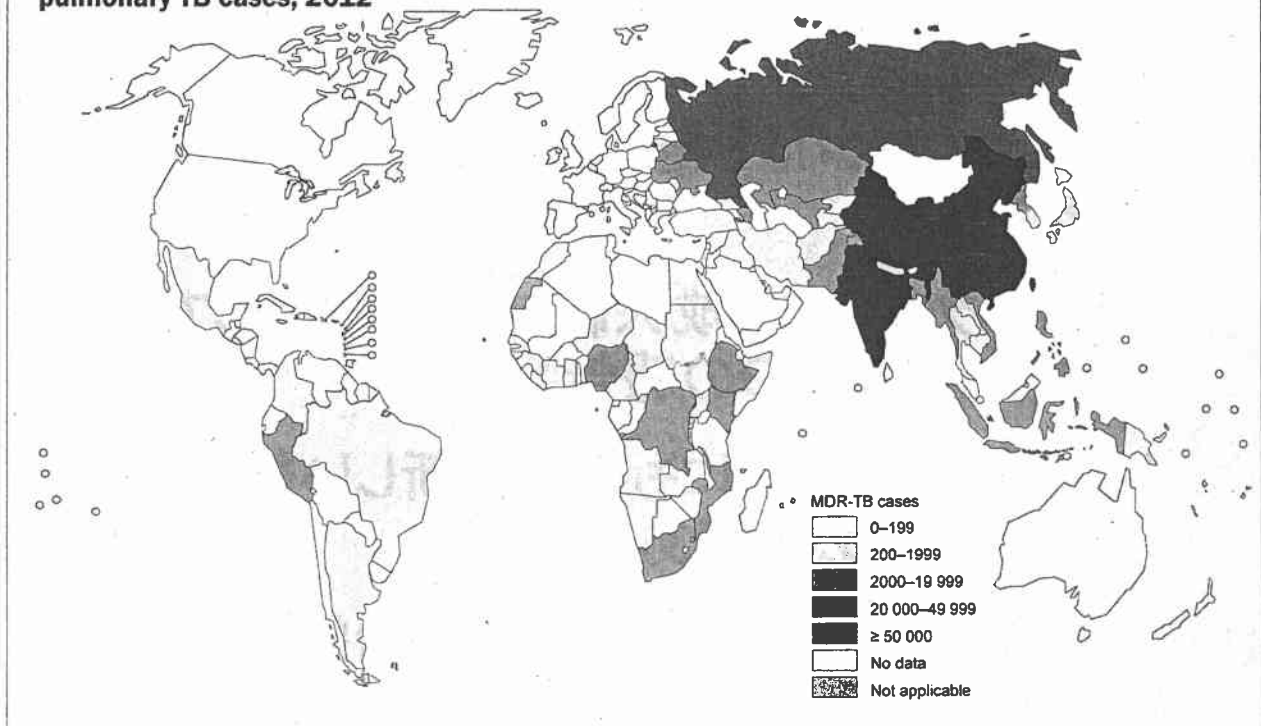
3

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



4

**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.

5

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。

7

## 今までの結核ワクチンの研究概要

HVJ-Envelope/

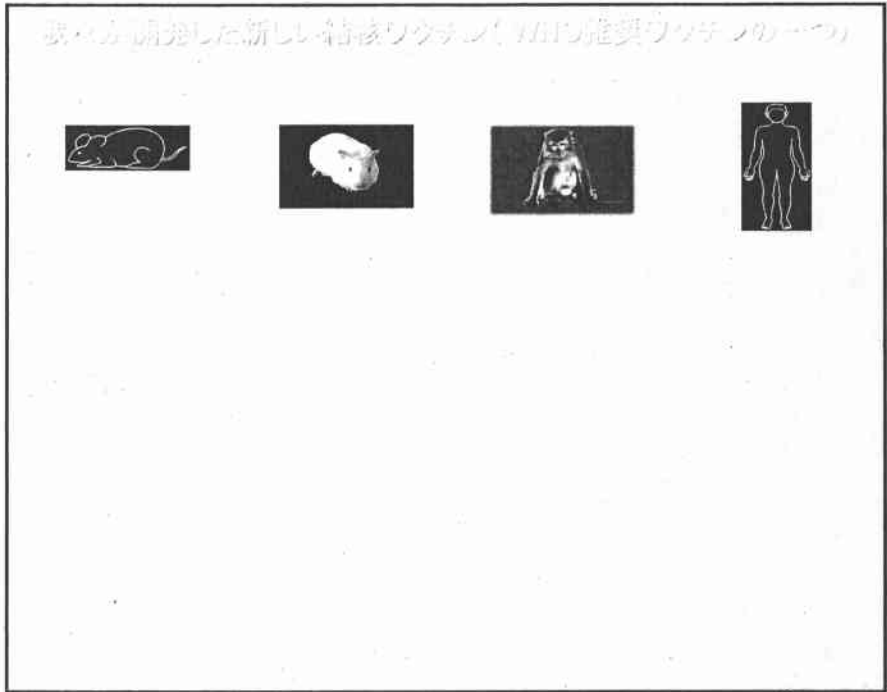
HSP65DNA+IL-12DNAワクチン

8

# 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。



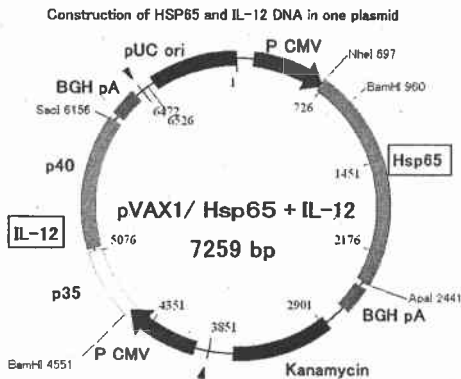
9

## HSP65 + IL-12 DNA ワクチン

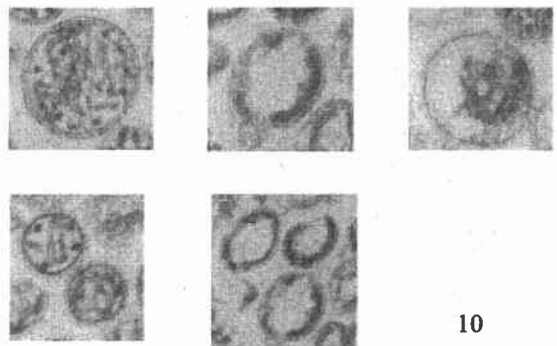
## HVJ-エンベロップベクター： 非ウイルスベクター

HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan

## 臨床応用のための DNAワクチン構築図



(電顕)

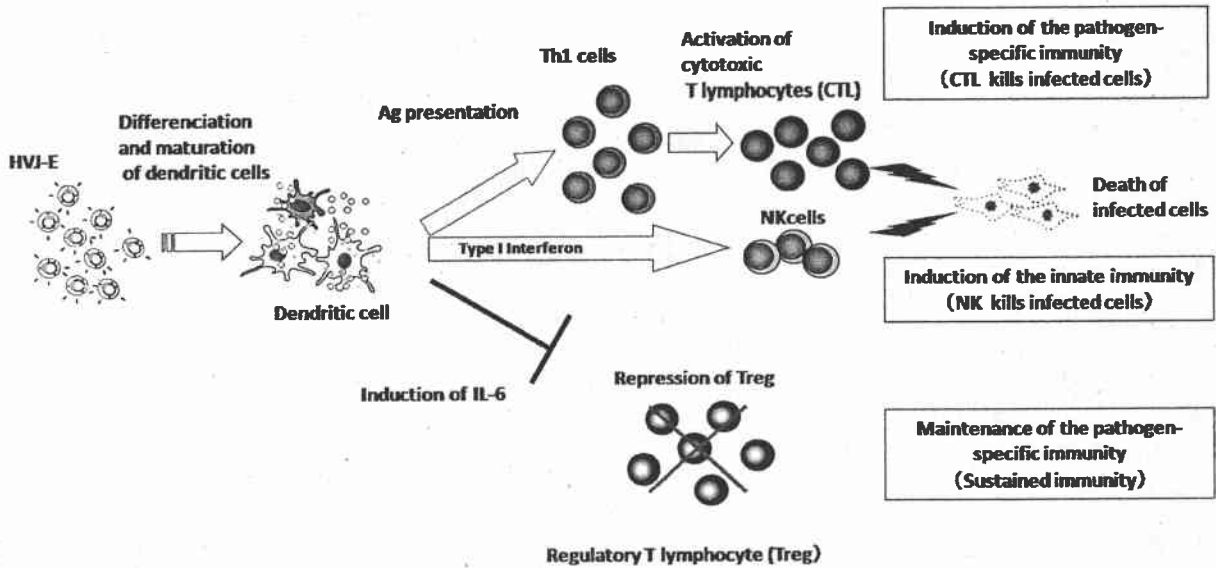


10

# 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

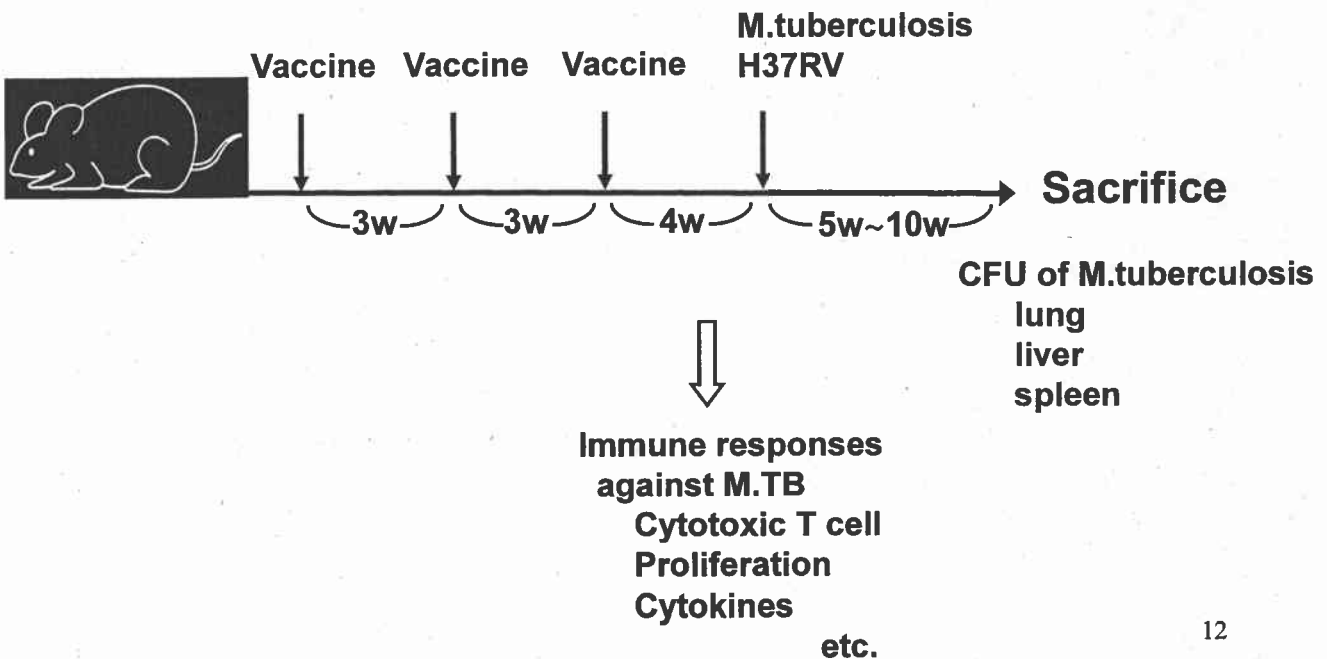
## (Hemagglutinating Virus of Japan)

- 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



11

## [Method] prophylactic vaccine

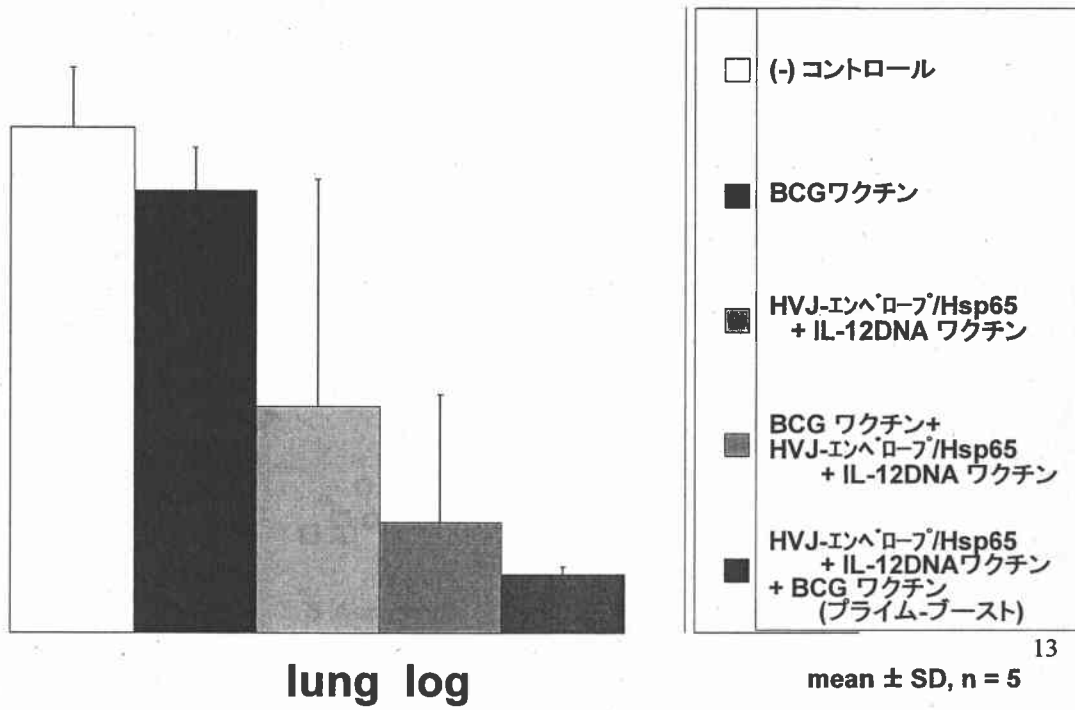


12

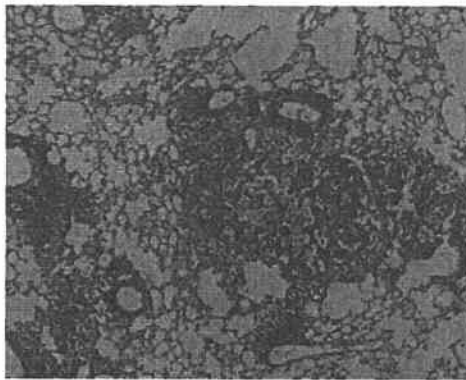
マウスの結核感染モデルを用いた  
 HVJ-エンベロープ/Hsp65 + IL-12 DNAワクチン  
 (BCGより1万倍強力な)

log<sub>10</sub>  
 CFU M.TB

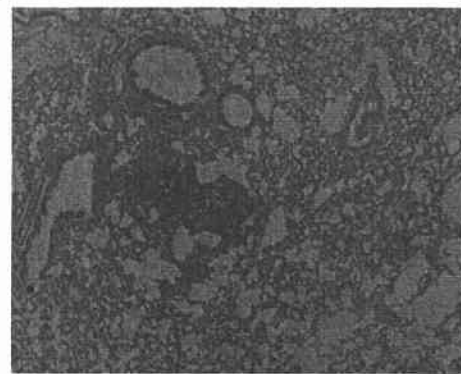
結核感染5週間後の結核菌コロニー数



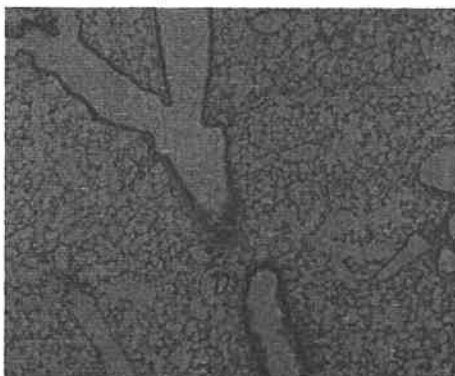
5W Lung (X5, HE)



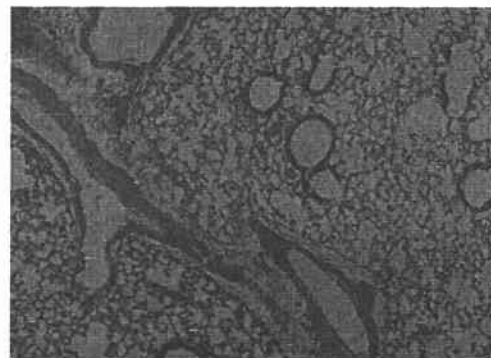
-/-



-/- BCG



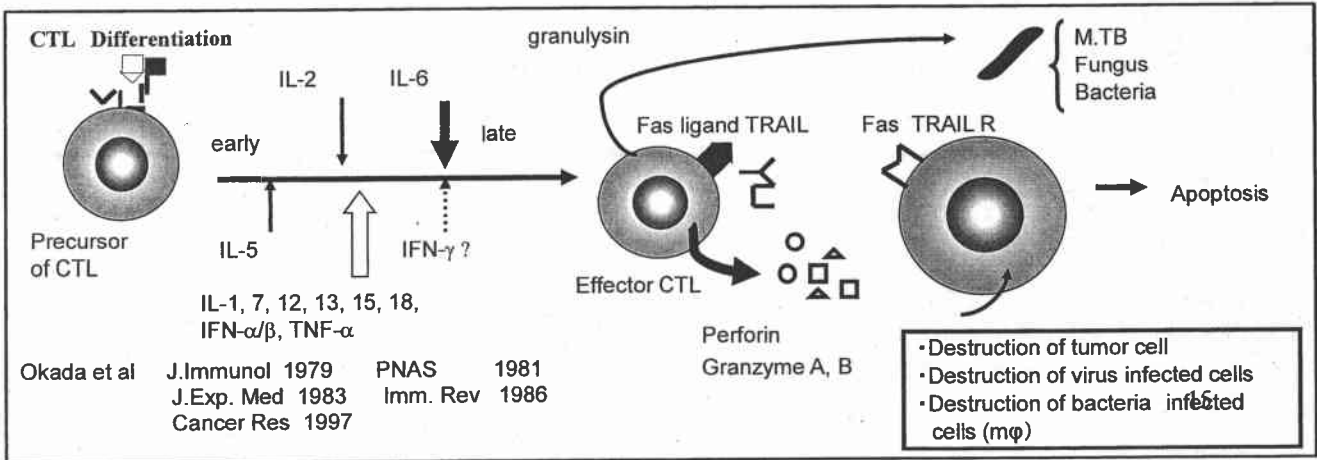
HSP65+IL-12 E / HSP65+IL-12 E /  
 HSP65+IL-12 E



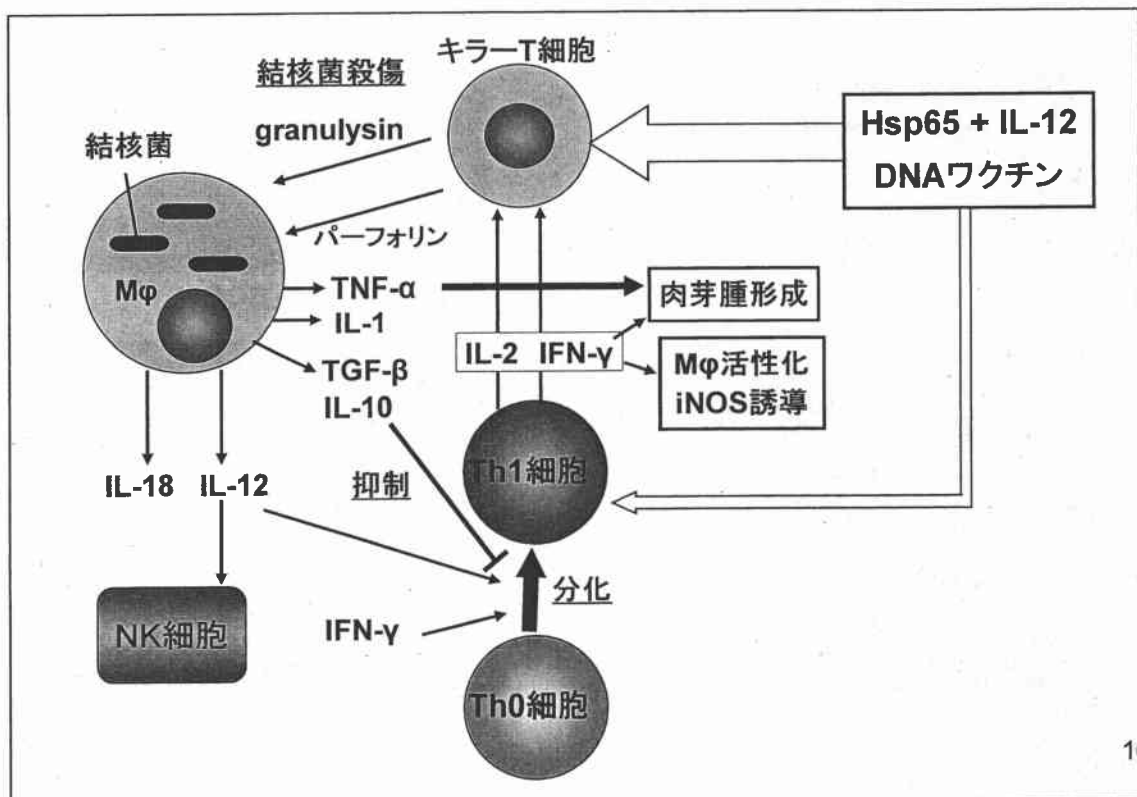
BCG / HSP65+IL12 E /  
 HSP65+IL12 E

# 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

	CTL activity
HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine	++
BCG	±
(-) (control)	±



## (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】

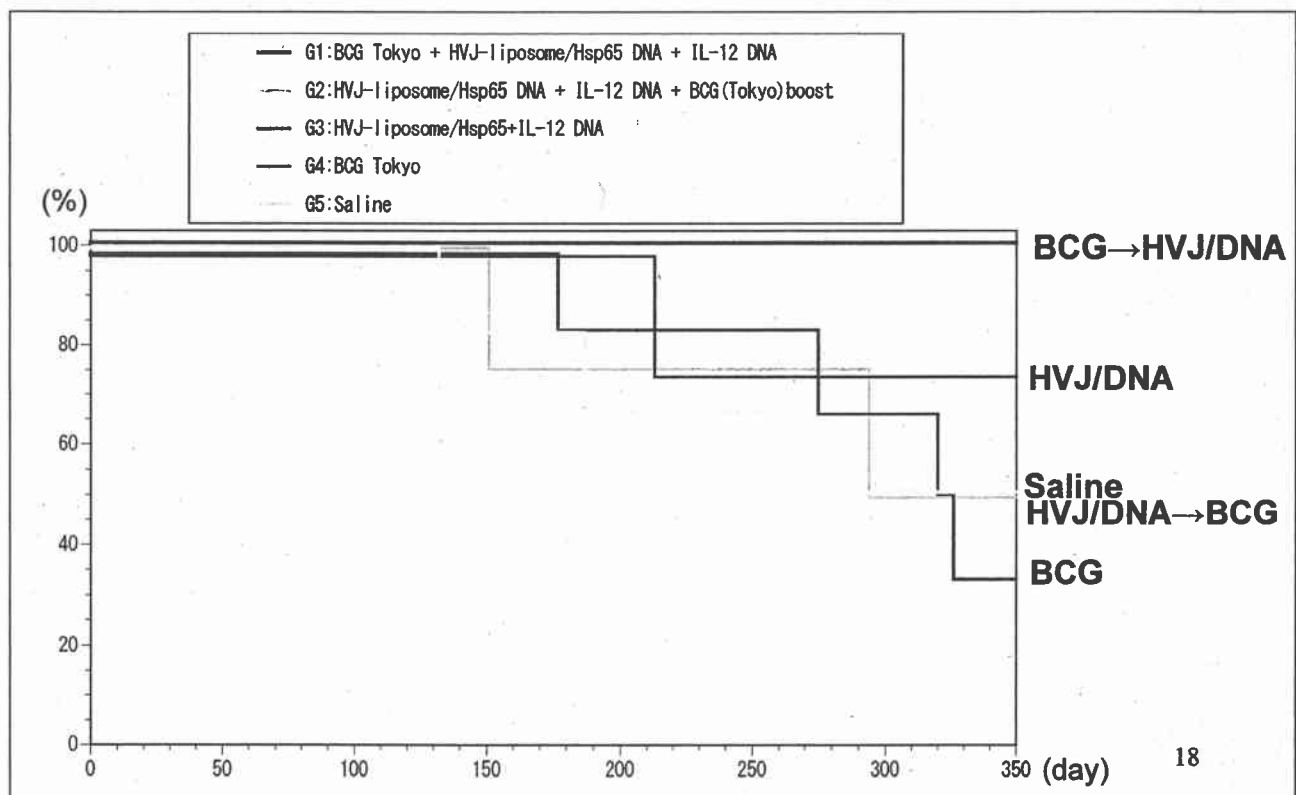
1. カニクイザルは、人間の結核感染モデルで最高の動物モデルである。  
(Walsh, Tan et al. Nature Medicine 1996)
2. 結核空洞はカニクイザル結核感染モデルで示される。

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

19

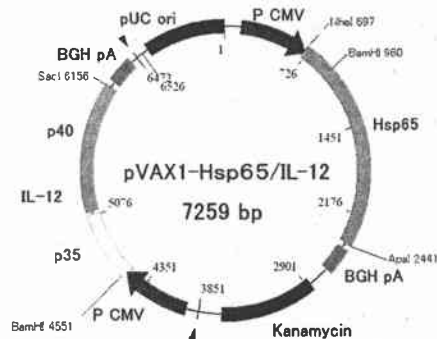
研究目的

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-エンベロップ/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。



20

# 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。

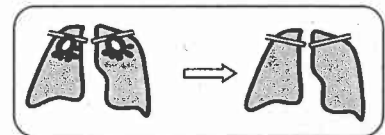
21

# 期待される成果

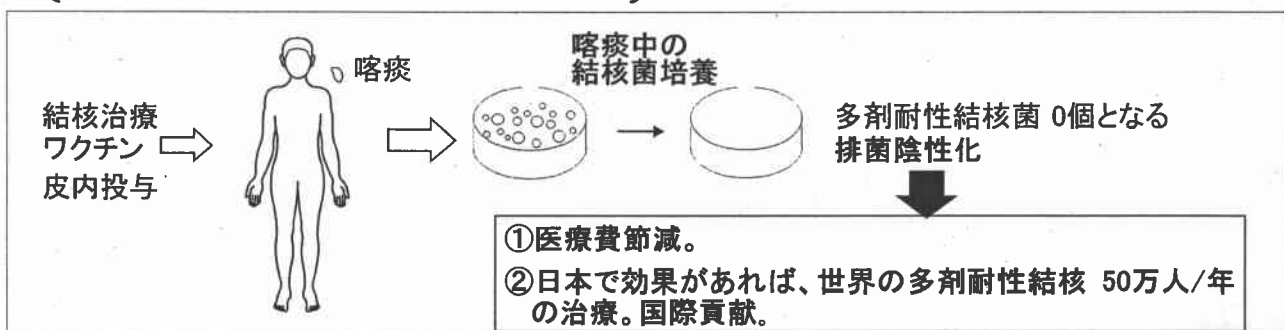
## 〔 ヒト臨床応用 〕

### 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)



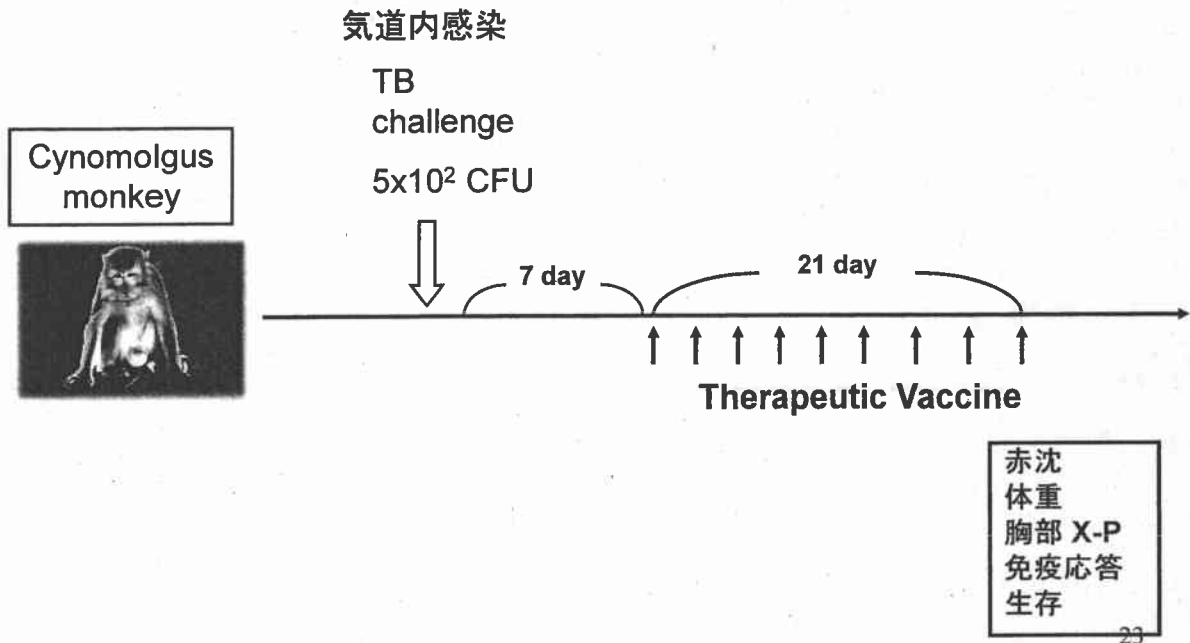
## 〔 第1相医師主導治験評価 〕



22



# 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



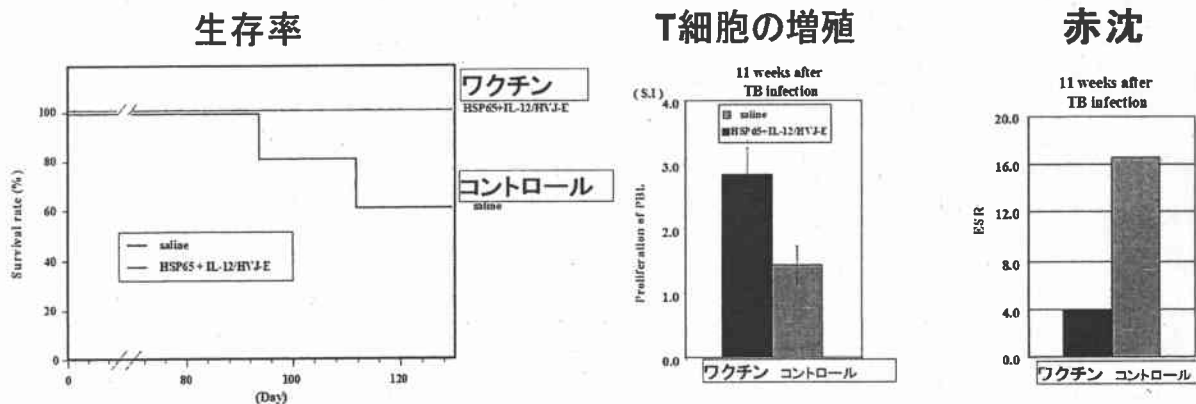
## 特色・独創的な点

### 〔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)



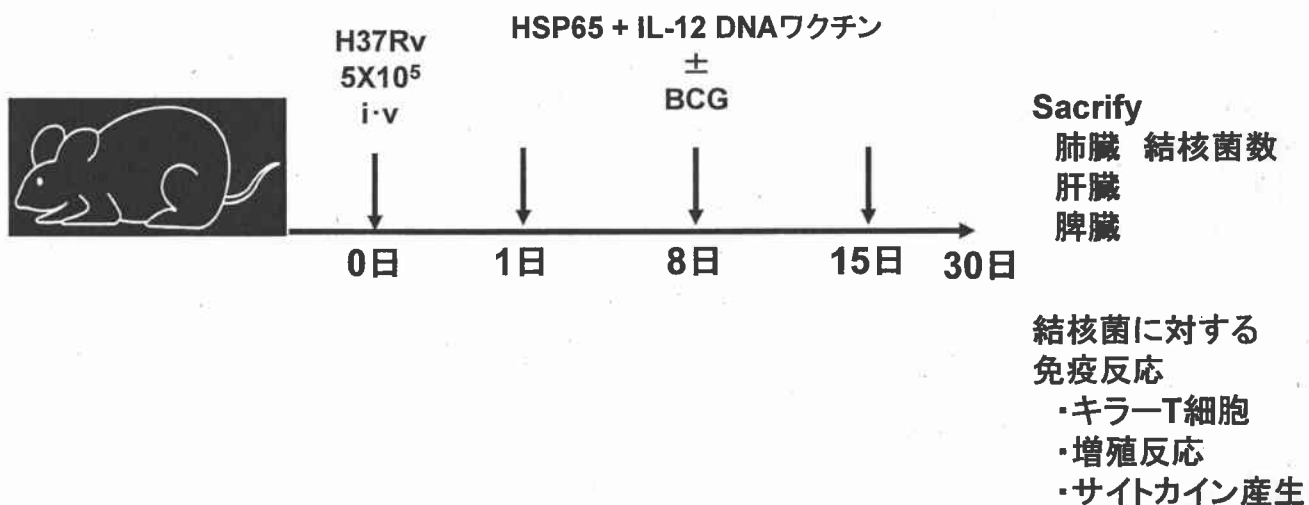
岡田はWHOのWGND(Working Group of New TB Drug)委員会委員に選ばれた(2009年から)

## 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- $\gamma$  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。

25

## 〔方法〕



26

## 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) フルオノキノロン耐性
- (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)

27

## 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

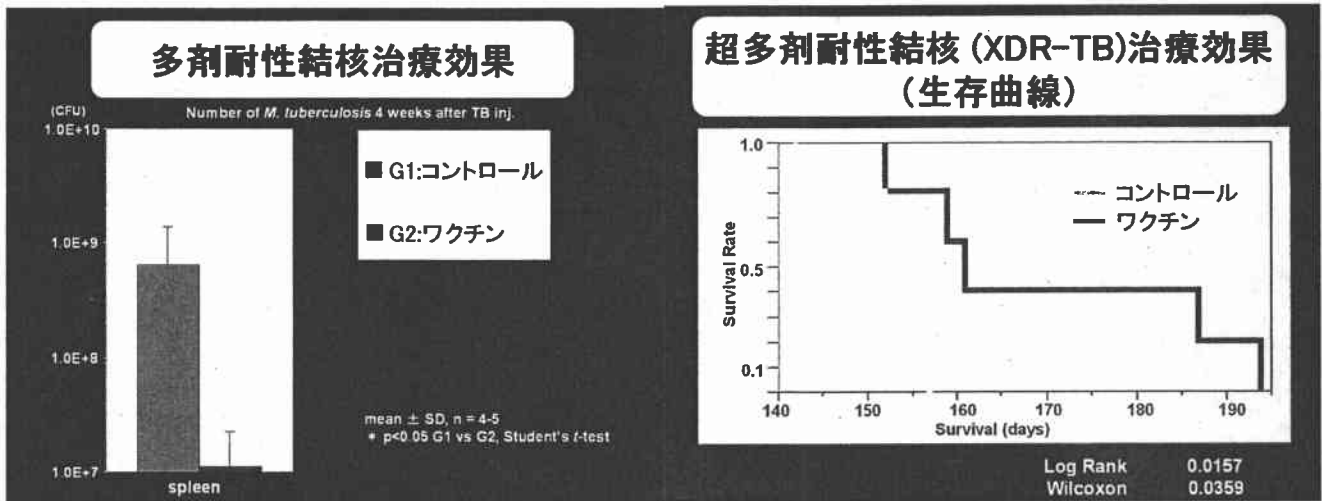
R…耐性

S…感受性

#…判定不能

28

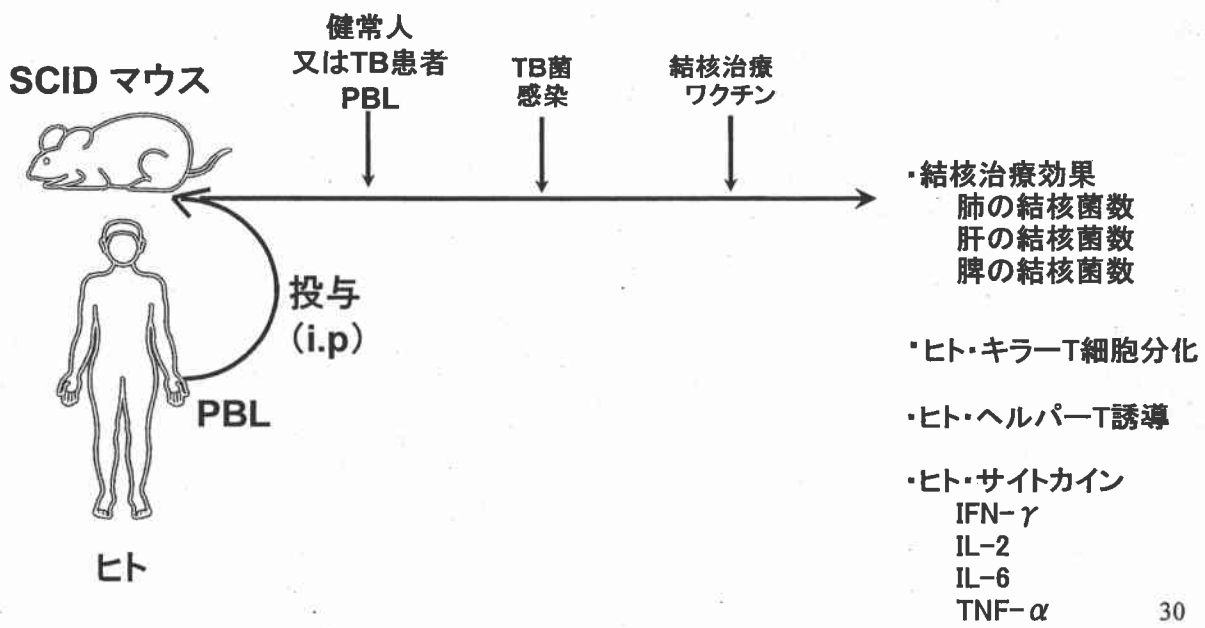
- ② マウス多剤耐性結核感染モデルで、ワクチン投与群では肺・肝臓・脾臓の結核菌数が減少、更にマウス超多剤耐性結核 (XDR-TB) 感染モデルで、ワクチン投与群は、生存率を改善 (Vaccine 2009, Human Vaccine 2011,2013)



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」

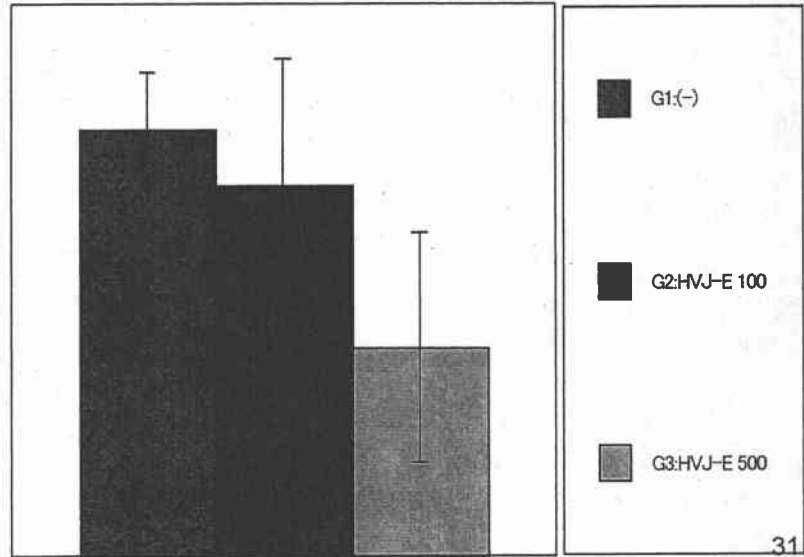
## 結核菌に対する治療ワクチン 生体内ヒトモデル(SCID-PBL/hu)の開発



# 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

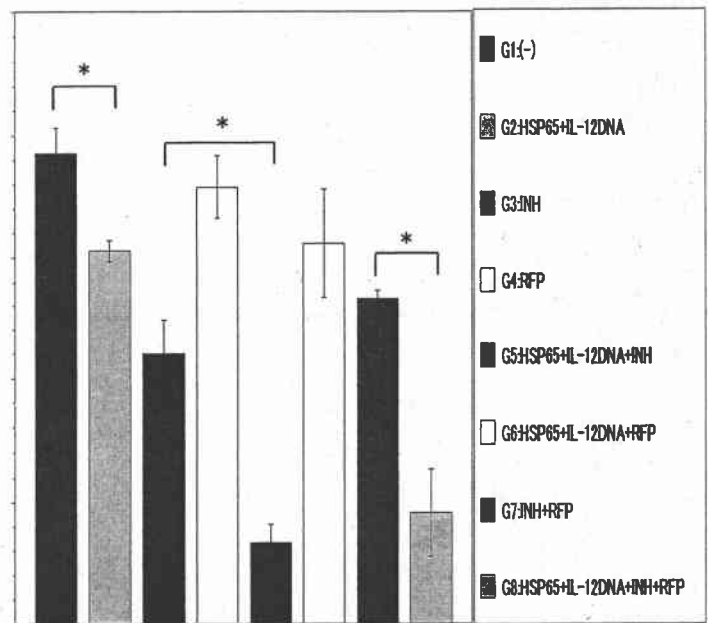
グループ	治療
G1	(-)
G2	HSP65+IL-12DNA
G3	INH
G4	RFP
G5	HSP65+IL-12DNA
	+INH
G6	HSP65+IL-12DNA
	+RFP
G7	INH
	+RFP
G8	HSP65+IL-12DNA
	+INH
	+RFP

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

(log<sub>10</sub> CFU)

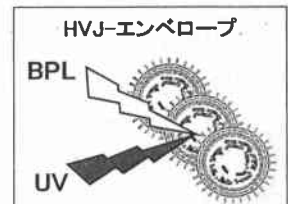


\* P<0.05  
Student's t test

## 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



33

## 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.

34

# 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	平成26	平成27	平成28	平成29	平成30	平成31	平成32
		年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度	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								☆☆↔
	承認後対応								☆☆↔
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	←→	↔						↔

35

## 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)

36

# 予定される治験の流れ

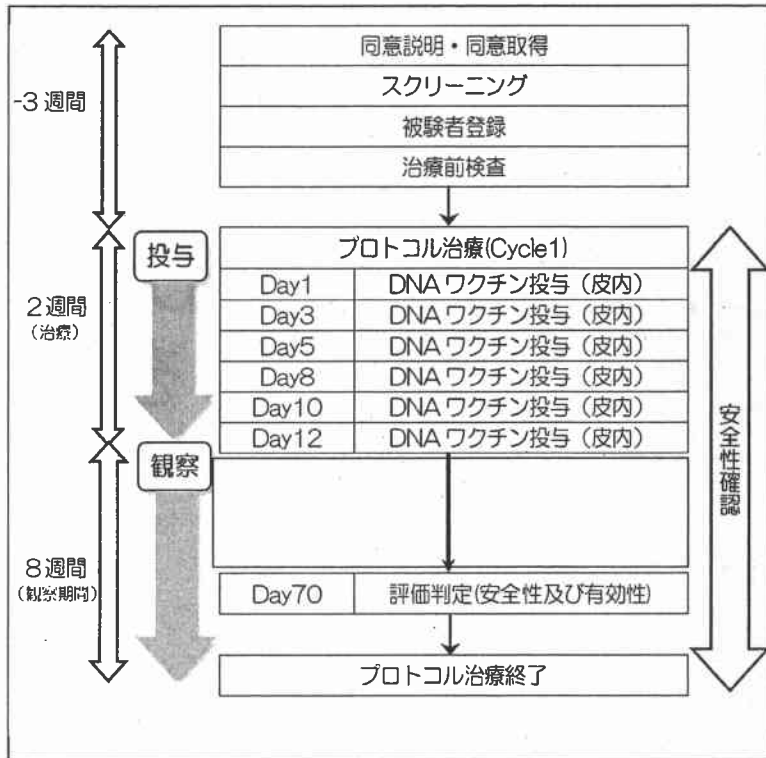
〔多剤耐性結核患者 (INH耐性 + RFP耐性)〕

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

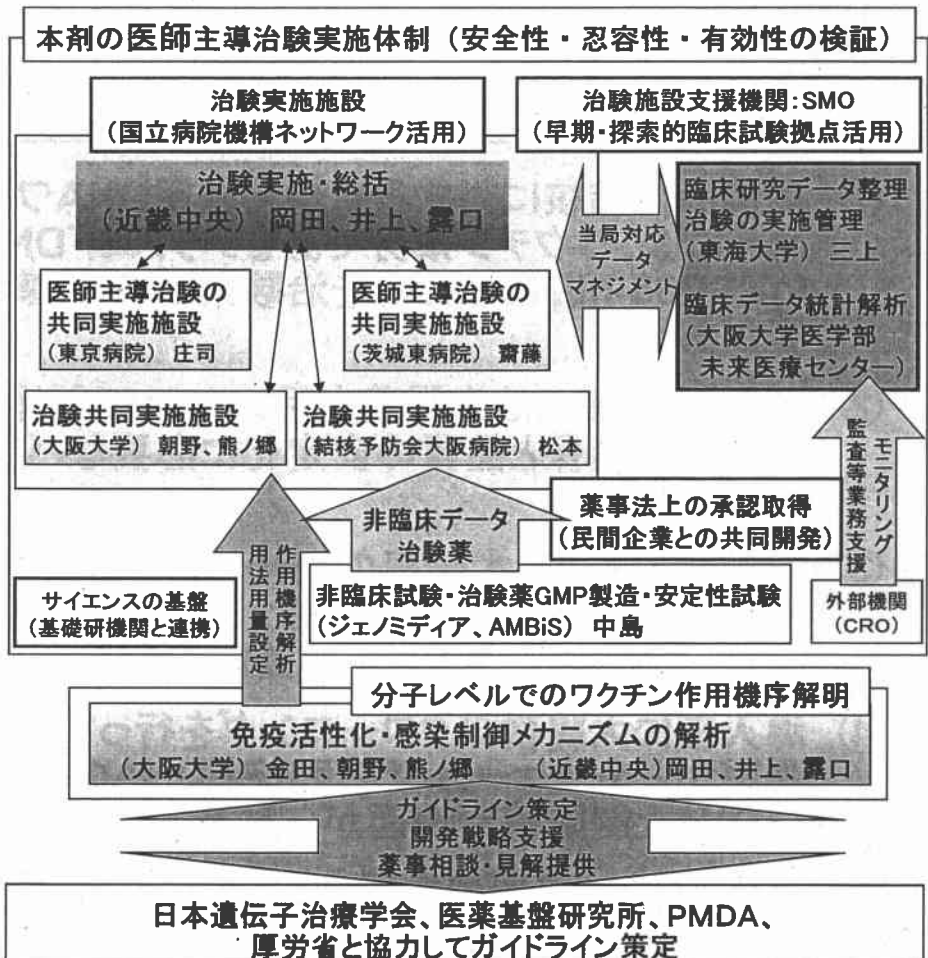
実施施設  
国立病院機構 病院  
3施設



# 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。





## 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)

39

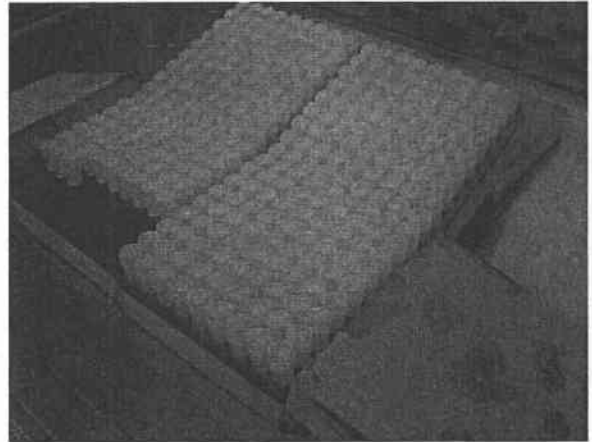
## 治験薬GMP製造ワクチン

- 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 $\alpha$ 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。

40

# 作成したマスターセルバンク

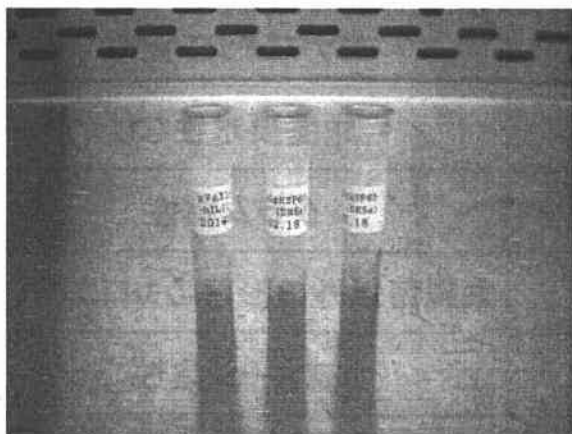
治験薬GMP製造に必要なバンクシステムを構築するため、治験薬GMP製造用大腸菌について計300本で構成されるマスターセルバンクシステムを作成した。



41

## 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 $\alpha$ )]。

42

## 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)

43

### 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 <sup>7</sup> 大腸菌/mL以上

44

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)

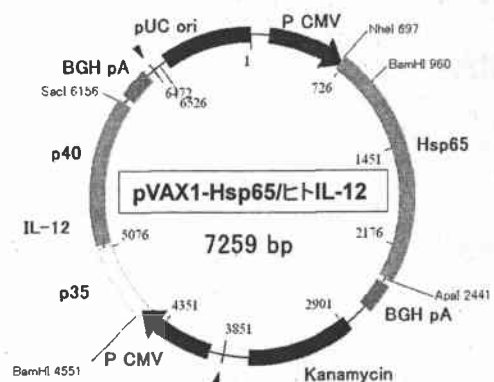
既に国内における規制当局である医薬品医療機器総合機構(PMDA)との薬事戦略相談を通じて、品質規格や試験デザインの相談を進めており、両者で合意した内容に従って治験届に必要なデータパッケージを作成した。

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。

47

## 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



48

## 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

49

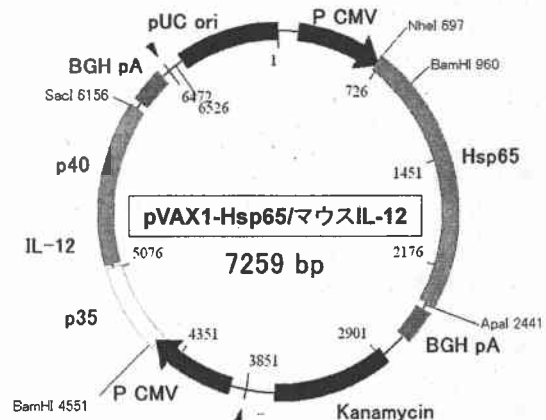
## カニクイザルを用いた毒性試験2(案) について: 安全性薬理試験

試験動物	カニクイザル♂
被験物質	pVAX1-IgHSP65-hIL12+ HVJ-E
投与方法 評価	投与経路: 皮内 投与回数: 単回 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-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。

50

## 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)



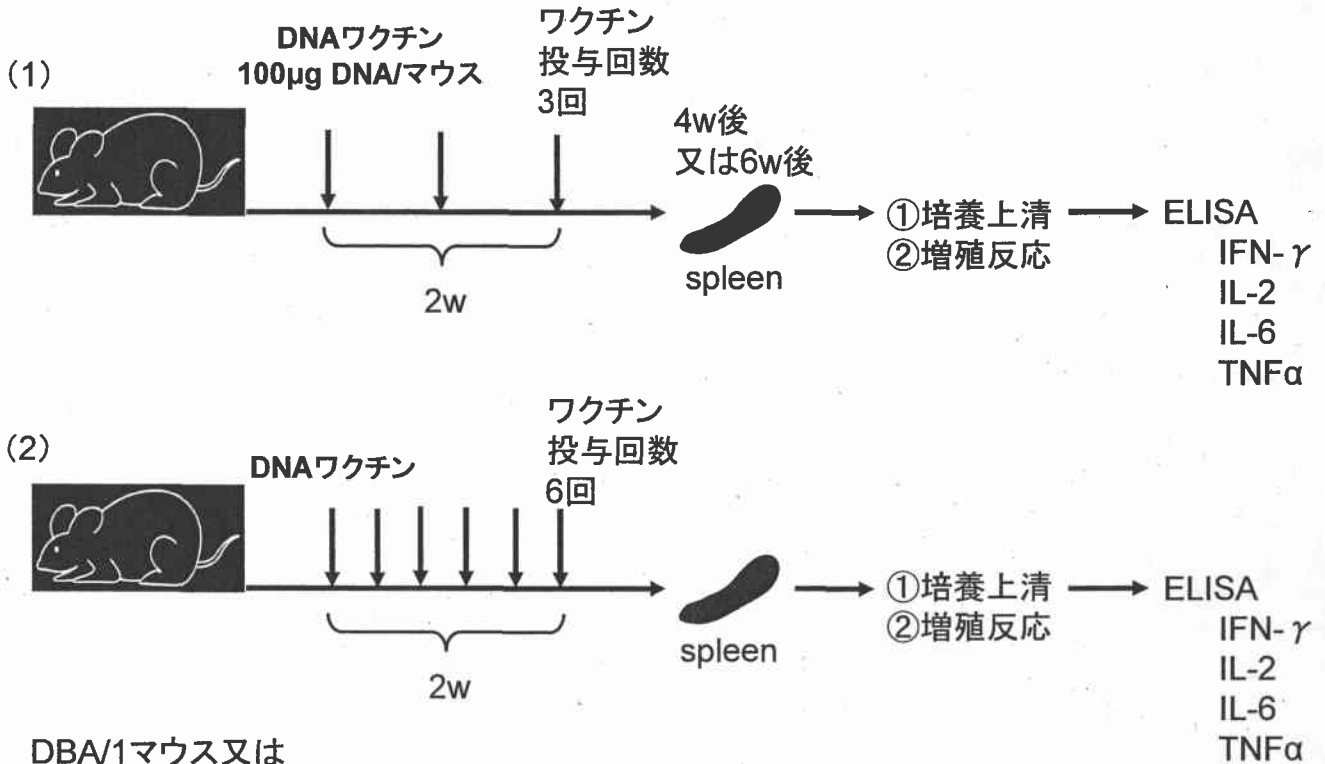
51

## 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。

52

# 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)

53

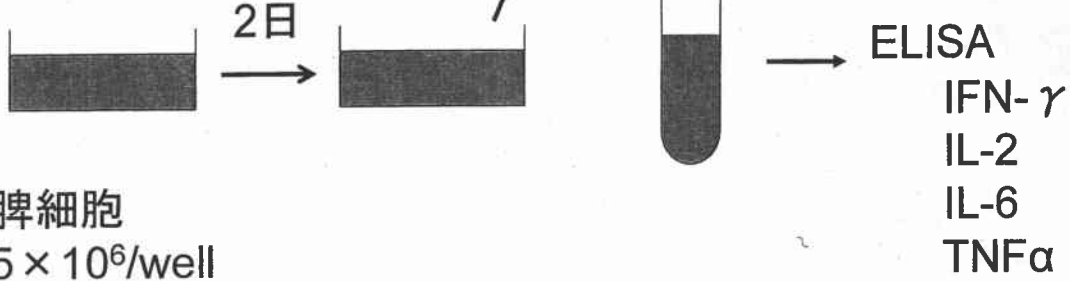
生体組織ではHVJ由来の蛋白質に対する免疫反応が惹起され、抗体による中和反応がおこることが考えられるが、遺伝子を封入しないHVJ-EとルシフェラーゼDNA封入HVJ-Eを用いたマウスへの投与実験により、HVJ-Eを連続投与しても遺伝子発現の抑制は見られず、連続投与が可能であることが明らかになった。(金田)

54



# ELISA

培養上清

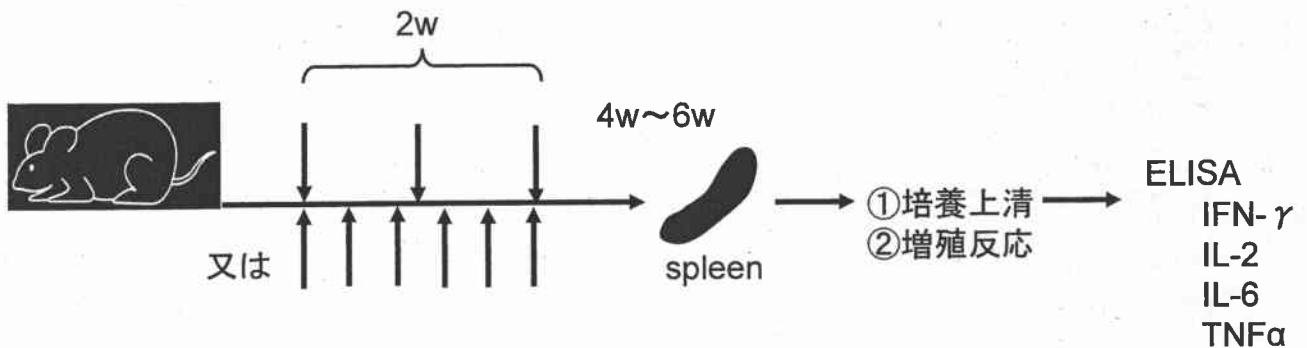


- 抗原刺激
- ① HSP65 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
  - ② PPD 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
  - ③ 結核死菌 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$

(Linbro 24well)

55

## 用量検討 (DNAワクチン投与量検討)



DNA投与量

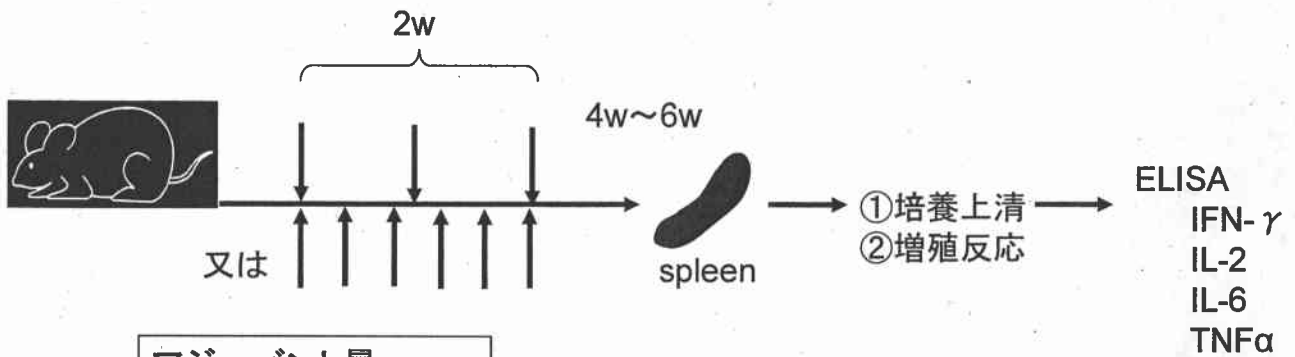
- ① 0  $\mu\text{g}/\text{マウス}$
- ② 25
- ③ 100
- ④ 280

アジュバント量

- ① 0 mNAu
- ② 100
- ③ 400
- ④ 1120

56

# 用量検討(アジュバント添加量)

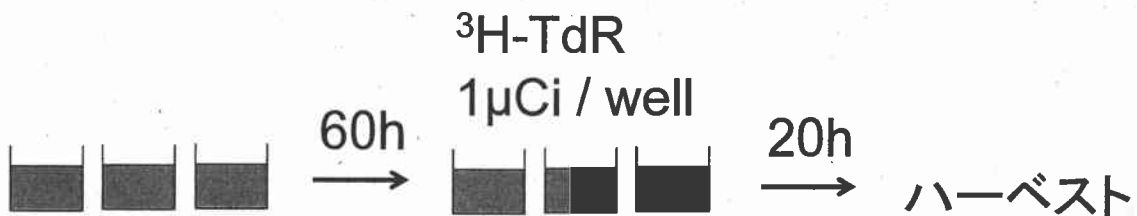


## アジュバント量

- ① pDNA最適用量が280 $\mu$ gのとき:  
70, 280, 1120 mNAu
- ② pDNA最適用量が100 $\mu$ gのとき:  
100, 400, 1600 mNAu
- ③ pDNA最適用量が25 $\mu$ gのとき:  
100, 400, 1600 mNAu

57

## 増殖反応 Assay



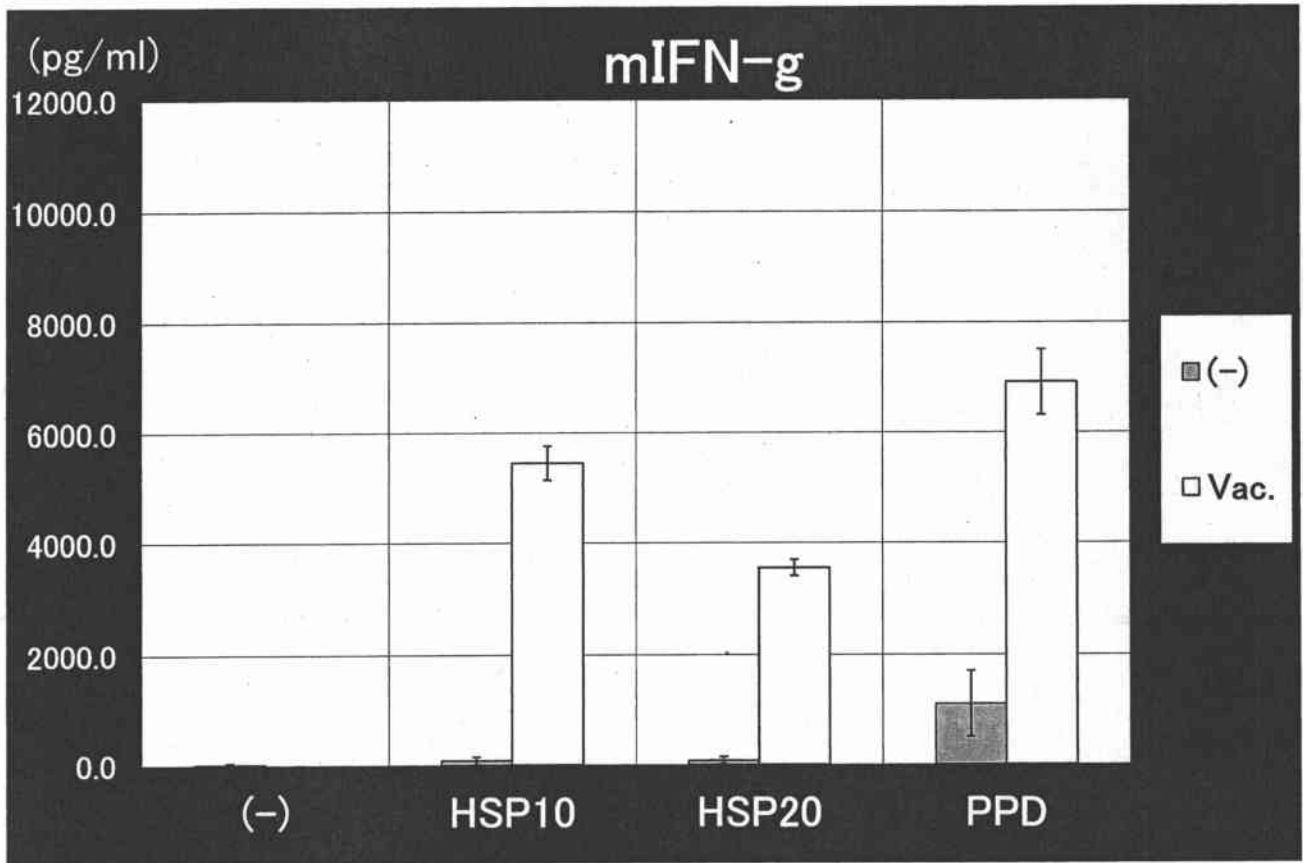
脾細胞

$1 \times 10^5$ /well

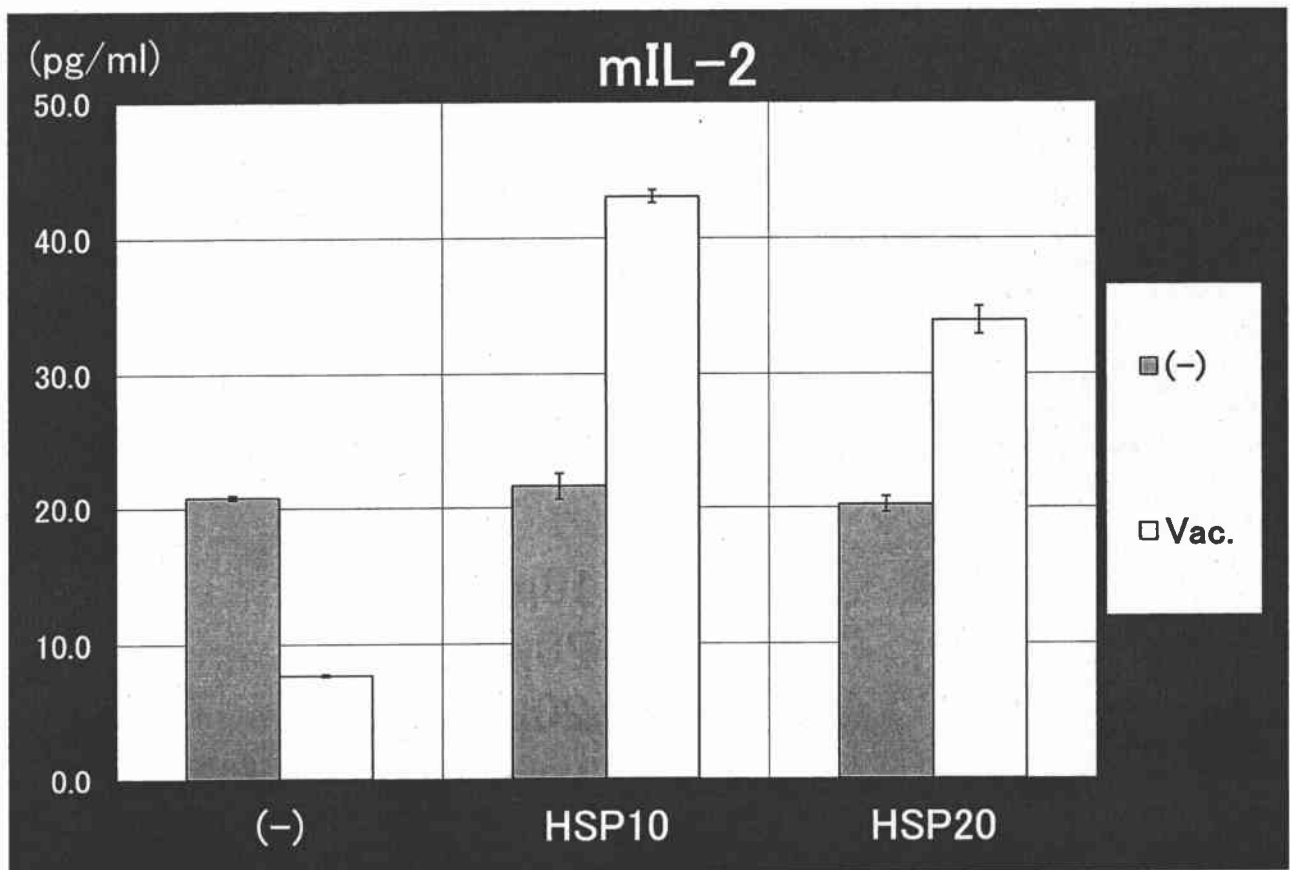
- 抗原刺激
- ① HSP65 10 $\mu$ g/ml
  - ② PPD 20 $\mu$ g/ml
  - ③ 結核死菌 20 $\mu$ g/ml

(Linbro 96well)

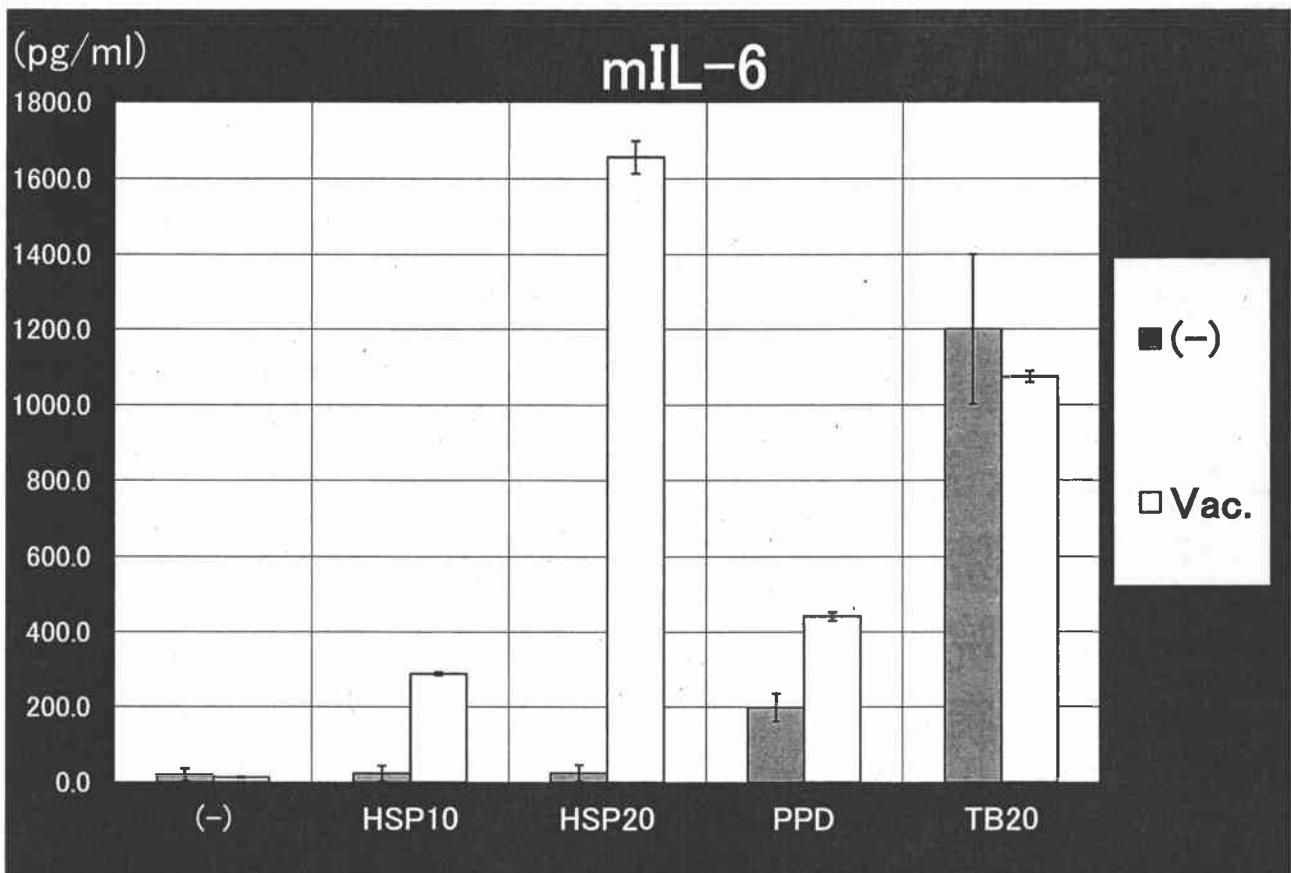
58



59



60



61

## 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 $\mu$ g ~280 $\mu$ g投与し、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 $\alpha$ (T細胞免疫能)産生をELISAで解析中。DNA量が25 $\mu$ gでもIFN- $\gamma$ 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)

62

## 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

63

### 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

64

## 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)

65

## 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。

66

## 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

67

## 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。

68

## 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

69

## 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

70



## 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、筋肉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

71

## 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

72

# 予定される治験の流れ

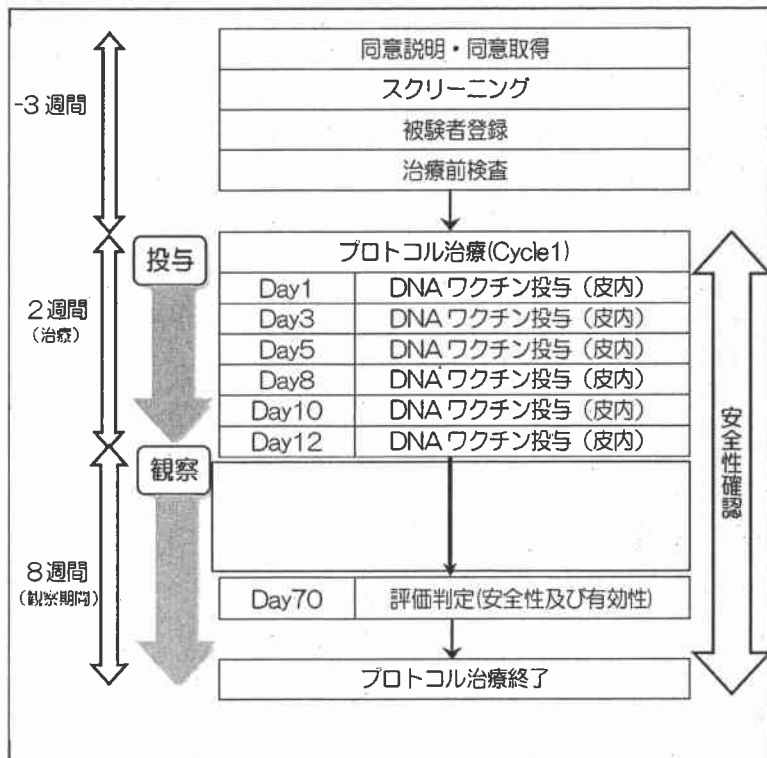
〔多剤耐性結核患者 (INH耐性 + RFP耐性) 〕

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



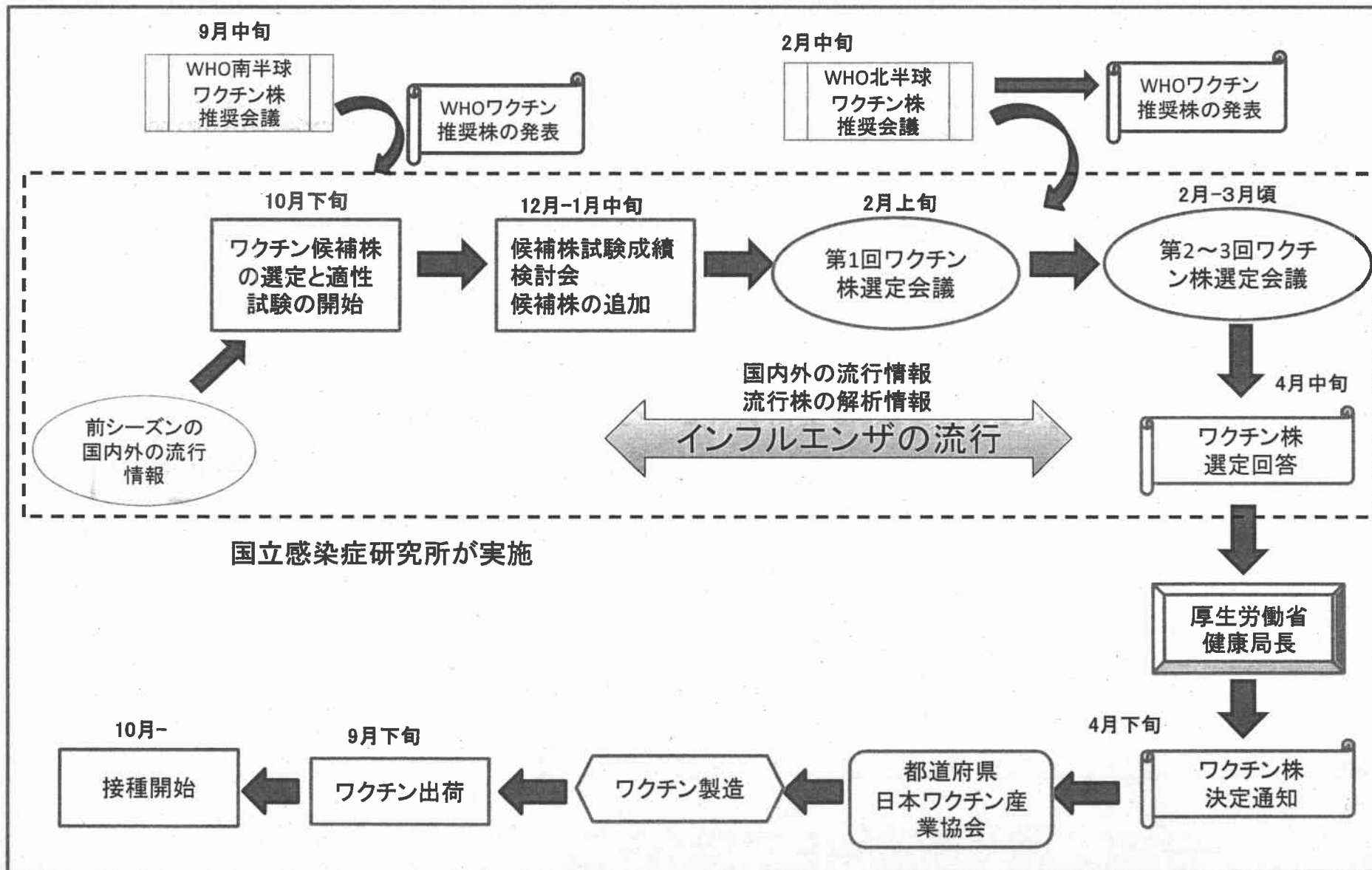
73

## 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

74

インフルエンザワクチン株とその選定プロセス



# 2014/15シーズンインフルエンザHAワクチン製造株について

## 1. WHOが推薦するワクチン製造株の構成

WHOは以下のインフルエンザウイルス株の流行を予測しており、ワクチン製造株として推奨している。

- (1) A/カリフォルニア/7/2009 (H1N1)pdm09類似株
- (2) A/テキサス/50/2012株 (H3N2) 類似株
- (3) B/マサチューセッツ/2/2012類似株

## 2. 我が国のワクチン製造株について

上記WHO勧告等を踏まえ、2014/15シーズンは以下の3株をワクチン製造株として選定した。

- (1) A/カリフォルニア/7/2009 (X-179A) (H1N1)pdm09
- (2) A/ニューヨーク/39/2012 (X-223A) (H3N2)
- (3) B/マサチューセッツ/2/2012(BX-51B)

※国立感染症研究所における検討の結果、

○A/H1N1 pdm09ウイルスの殆どは、ワクチン株A/カリフォルニア/7/2009類似株で、2009年以来抗原性が殆ど変化していない。また、A/カリフォルニア/7/2009ワクチン接種後のヒト血清は、最近の流行株とよく反応することなどから、A/カリフォルニア/7/2009(X-179A) (H1N1) pdm09 (2013/14シーズンと同じ)を選定した。

○A/H3N2の型については、卵馴化によりウイルスの抗原性が流行株に比べて、著しく異なる傾向を示してゐる。2013/14シーズンのワクチン株であるA/テキサス/50/2012(X-223) (H3N2)の卵馴化による抗原性の変化は、幾分軽減されたものの期待したほどの改善は見られなかった。2014/15シーズンのワクチン株は、A/テキサス/50/2012株(H3N2)類似株であるワクチン製造候補株のうち、卵馴化しても抗原性の変化の程度が比較的小さいことや増殖性、タンパク収量などの製造効率を踏まえ、A/ニューヨーク/39/2012 (X-223A) (H3N2)が総合的に最も適切であると判断し、製造株として選定した。

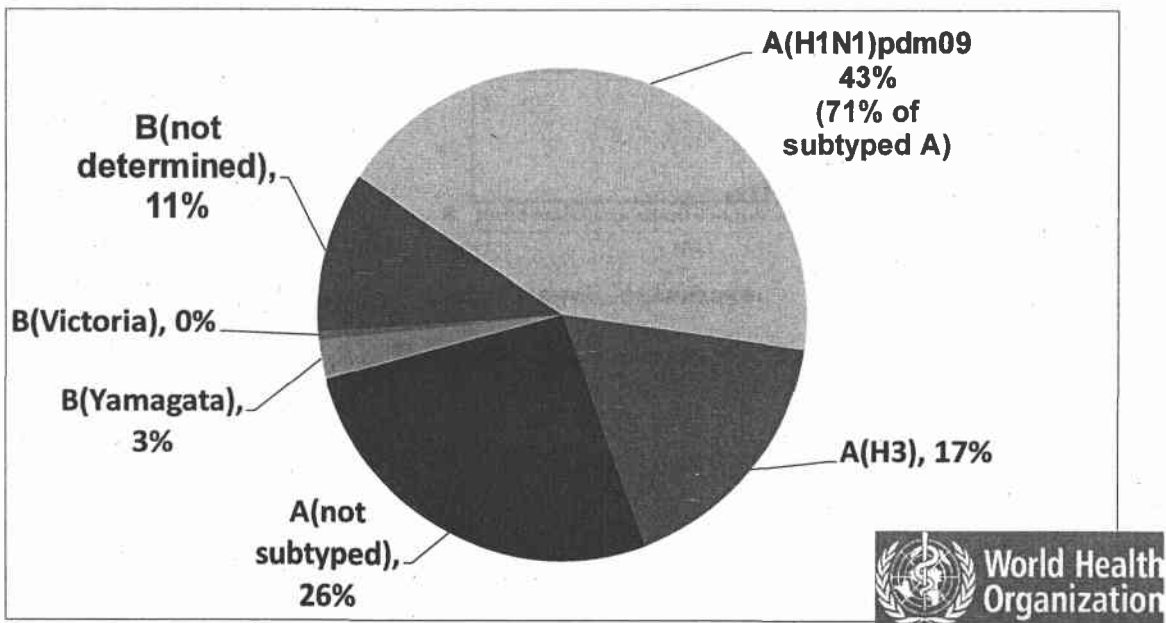
○B型については、①国内外で山形系統が流行の主流であること、②国民の抗体保有状況調査では、山形系統に対する抗体保有レベルは、ビクトリア系統に対する抗体保有レベルより低いこと、③2013/14シーズンのB/マサチューセッツ/2/2012ワクチン(BX-51B)接種後のヒト血清抗体は2013/14シーズンの流行株反応が良かったことなどから、山形系統のB/マサチューセッツ/2/2012(BX-51B)(2013/14シーズンと同じ)を製造株として選定した。

## 2013/14シーズンの国内外のインフルエンザの 流行状況報告

国立感染症研究所  
インフルエンザウイルス研究センター  
センター長 小田切孝人

1

全世界における2013/14シーズンのインフルエンザウイルス  
検出状況 (From 1 September 2013 – 1 February 2014)



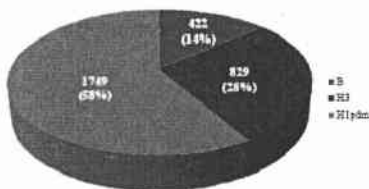
Data source: FluNet, ([www.who.int/flunet](http://www.who.int/flunet)), Global Influenza Surveillance and Response System (11 February 2014)

Summary of clinical samples and isolates received, with collection dates since 2013-09-01

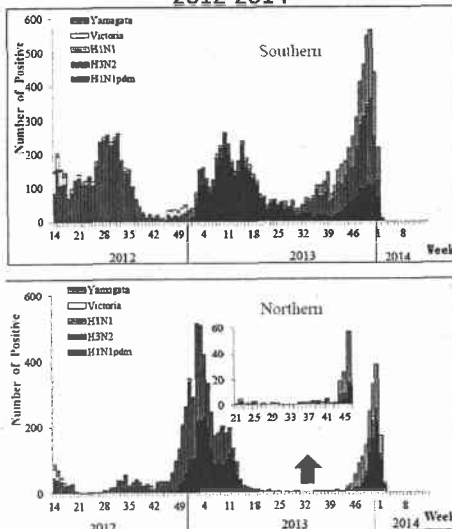
H1N1pdm09		H3N2		B Victoria lineage		B Yamagata lineage	
Number received	Number propagated <sup>1</sup>	Number received	Number propagated <sup>2</sup>	Number received	Number propagated <sup>1</sup>	Number received	Number propagated <sup>1</sup>
69	23	108	42	5	2	16	4
86.0%				14.0%			



Specimens Received by CDC Since August 2013



China Virus Isolation of Network Labs, 2012-2014

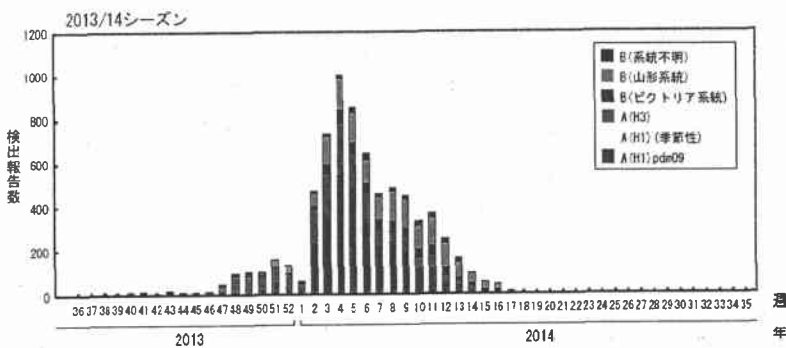


Southern Hem (AU, NZ)

1 September 2013 – 22 January 2014

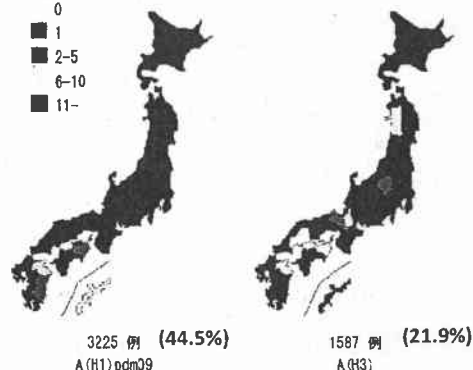
H1N1 (pdm)	38.2	%
H3	20.3	
B Vc	0.4	
B Yam	41.0	

国内のインフルエンザウイルス分離・検出状況(2013/14シーズン)

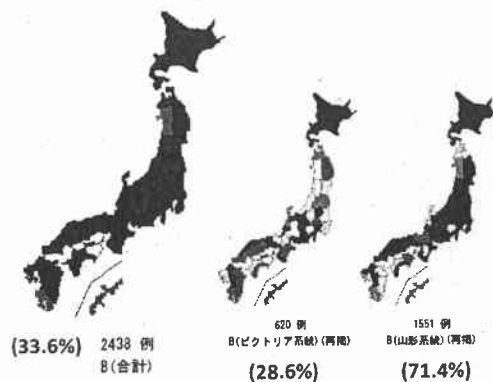
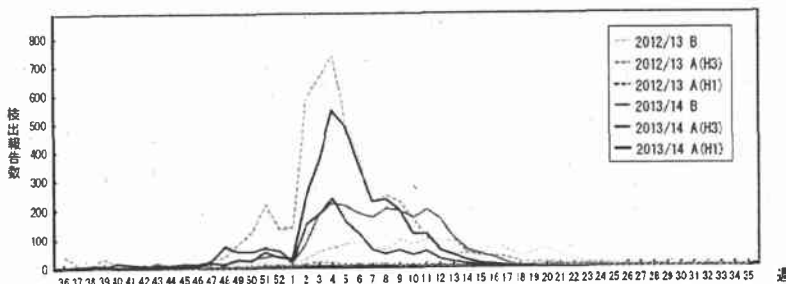


(病原微生物検出情報：2014年5月9日 作成)

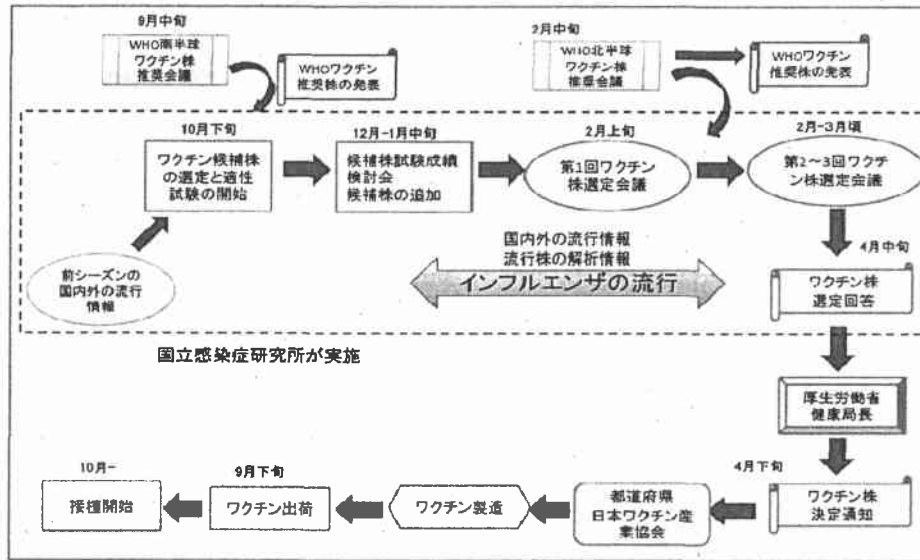
検出報告数



週別型別インフルエンザウイルス分離・検出報告数の推移、2012/13&2013/14シーズン



## インフルエンザワクチン株とその選定プロセス



厚生労働省: [www.mhlw.go.jp/stf/shingi/...att/2r985200000330dw\\_2.pdf](http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/...att/2r985200000330dw_2.pdf)

### 2013/14シーズン

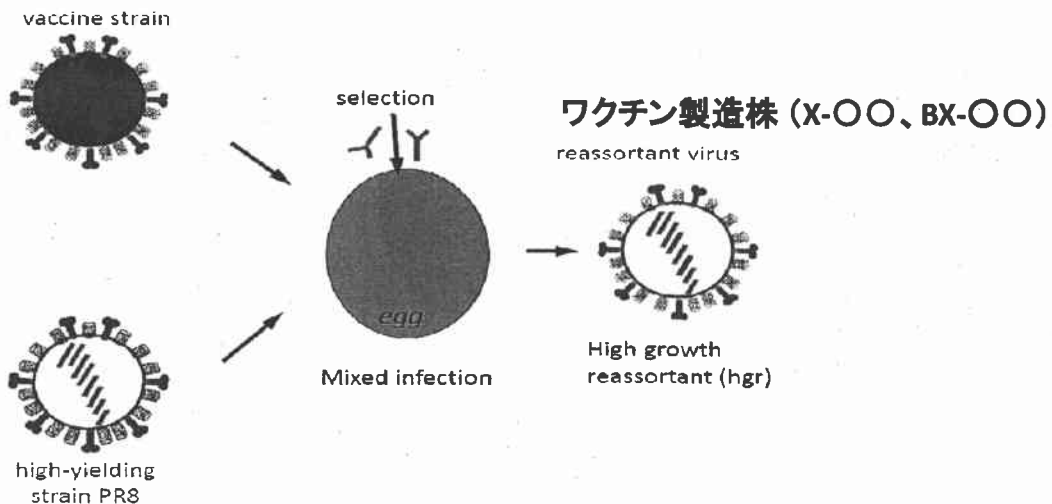
- WHOが推奨するワクチン株の構成
  1. A/カリフォルニア/7/2009 (H1N1)pdm09類似株
  2. 細胞で分離増殖したA/ビクトリア/361/2011 (H3N2)類似株
  3. B/マサチューセッツ/2/2012類似株
- わが国のワクチン製造株の構成
  1. A/カリフォルニア/7/2009 (X-179A) (H1N1)pdm09
  2. A/テキサス/50/2012 (X-223)(H3N2)
  3. B/マサチューセッツ/2/2012 (BX-51B)

### 2012/13シーズン

- WHOが推奨するワクチン株の構成
  1. A/カリフォルニア/7/2009 (H1N1)pdm09類似株
  2. A/ビクトリア/361/2011 (H3N2)類似株
  3. B/ウイスコンシン/1/2011類似株
- わが国のワクチン製造株の構成
  1. A/カリフォルニア/7/2009 (H1N1)pdm09
  2. A/ビクトリア/361/2011 (H3N2)
  3. B/ウイスコンシン/1/2011

5

## ワクチン製造株(卵高増殖株)の作製法



- 卵でのワクチン製造効率を上げるために、ワクチンウイルスと卵高増殖株(PR8)との間で遺伝子再集合ウイルス(HGR)が作製される
- ワクチン製造所では、HGRを用いてワクチン製造を行なう

6



Candidate vaccine viruses

Parent virus	Wild type virus		Developing institute	WHO CCs
	Candidate vaccine virus	Type of virus or reassortant		
A/California/7/2009(H1N1)	X-179A	Classical	New York Medical College, USA	CDC, USA NYMC, USA NIBSC, UK NIID, Japan VIDRL, Australia NIBSC, UK NIID, Japan
	IVR-153			
	X-181			
	X-181A	Reverse Genetics	New York Medical College, USA	CDC, USA NYMC, USA NIBSC, UK NIID, Japan
	NIBRG-121			
	NIBRG-121kb			
NIBRG-5		NIBSC, UK	NIBSC, UK	
		NIID, Japan	NIID, Japan	

Candidate vaccine viruses

Parent virus	Candidate vaccine virus	Type of virus or reassortant	Developing institute	Available from
A/Texas/50/2012	Wild type virus			WHO CCs
	X-223A	Classical	New York Medical College, USA	CDC, USA NYMC, USA NIBSC, UK
	X-223	Classical	New York Medical College, USA	CDC, USA NYMC, USA NIBSC, UK

Candidate vaccine viruses

Parent virus	Candidate vaccine virus	Type of virus or reassortant	Developing institute	Available from
B/Massachusetts/2/2012	Wild type virus			CDC, USA
	NYMC BX-51B#	Classical	NYMC, USA	CDC, USA NYMC, USA
	NYMC BX-51C##	Classical	NYMC, USA	CDC, USA NYMC, USA

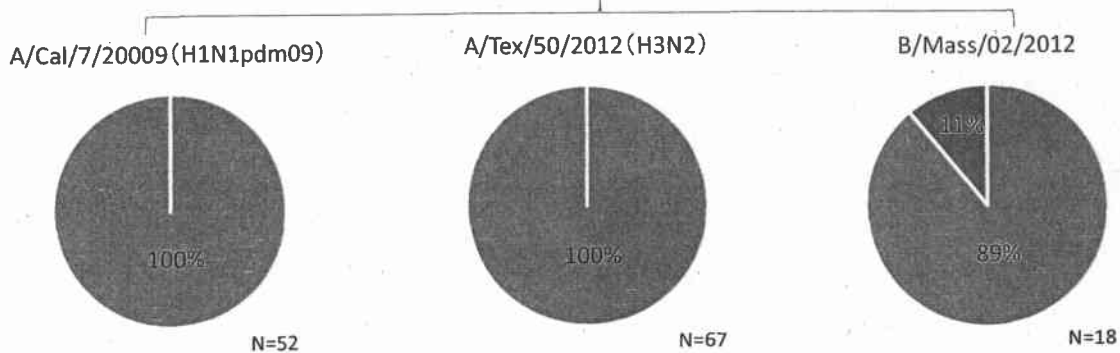
\* B/Panama/45/90 backbone parent

\*\* B/Lee/40 and B/Panama/45/90 backbone parents

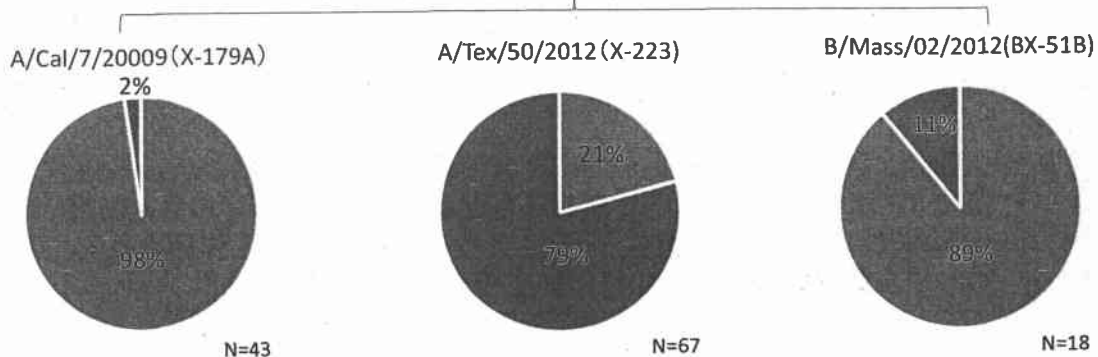
7

2013/14シーズンのワクチン株と流行株との抗原性の一一致率の比較

ワクチン原株



ワクチン製造株(卵高増殖株)



■ 類似株 ■ 変異株

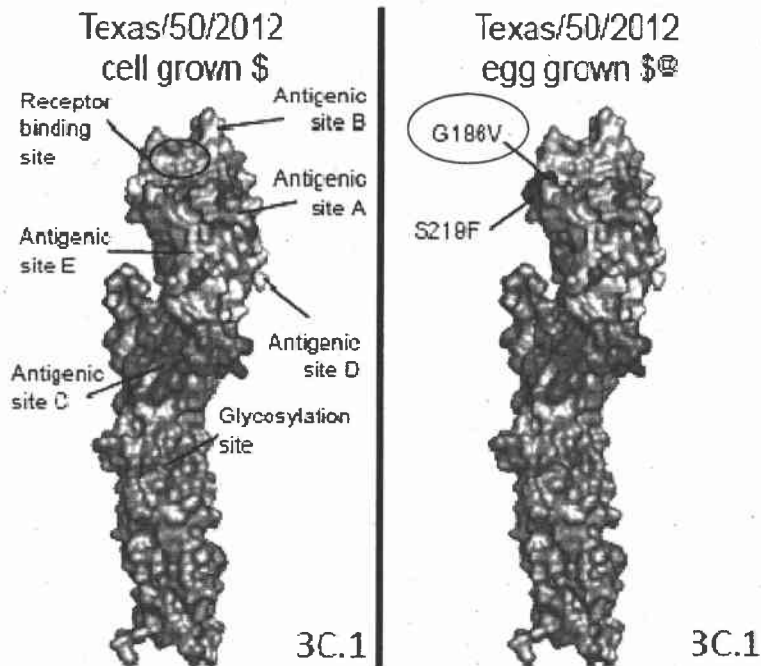
8



# インフルエンザウイルスHA蛋白の抗原領域のアミノ酸変化

Texas/50/2012  
細胞分離ワクチン原株

Texas/50/2012  
卵分離・ワクチン製造株

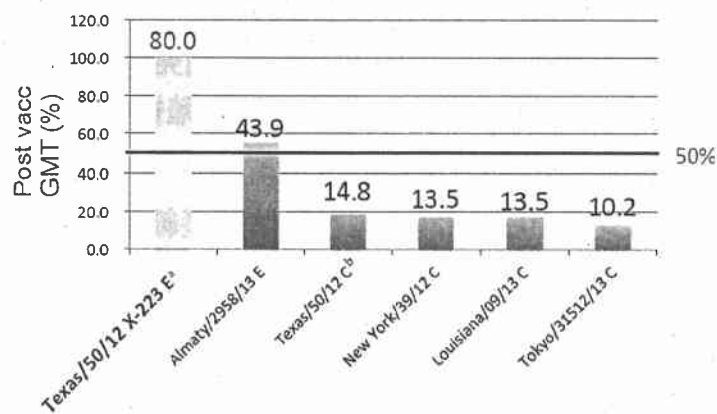


作図: US-CDC

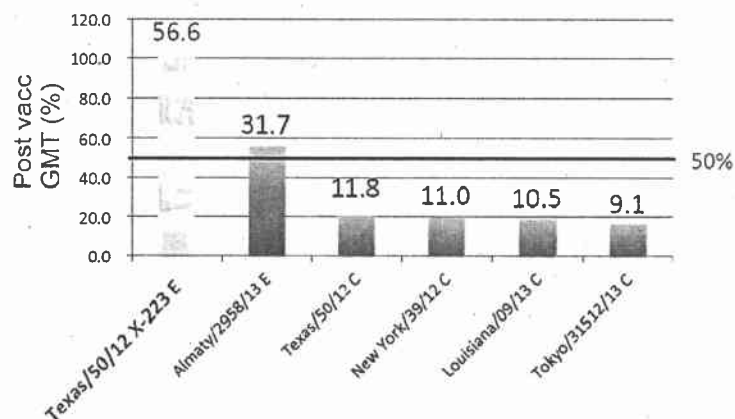
9

## A/Texas/50/2012 (X-223:H3N2) ワクチンで誘導されるヒト血清抗体と流行株との交叉反応性の評価

Adult



Elderly



10

## 海外でのVaccine effectiveness (VE) studyから

- Skowronski DM et al. Low 2012-13 Influenza Vaccine Effectiveness Associated with Mutations in the Egg-adapted H3N2 Vaccine Strain not Antigenic Drift in Circulating Viruses PLOS One 2014  
End-of-season 2012-13 VE for  
H3N2: 41% (95%CI 17-59%).VE for the  
A(H1N1)pdm09: 59% (95%CI: 16-80%)  
B(Yamagata): 67% (95%CI: 30-85%), B(Victoria): 75% (95%CI: 29-91%)
- Declan Butler Mutations explain poor showing of 2012 flu vaccine. Study raises questions over production of flu vaccines in chicken eggs. Nature News & Comment 27 March 2014 (US-CDC data)  
H3N2: 46% in adults aged 18-49, 50% in those aged 50-64, a dismal 9% in people aged over 65
- SE Ohmit, MG Thompson, JG Petrie et al. Influenza vaccine effectiveness in the 2011-2012 season: protection against each circulating virus and the effect of prior vaccination on estimates. Clinical Infectious Diseases Advance Access published November 13, 2013  
Vaccine used in the 2011-2012 season;  
A (H1N1) pdm09: 65% (95% CI, 44 to 79).  
A (H3N2): 39% (95% CI, 23 to 52).  
B : 58% (95% CI, 35 to 73).
- CDC Interim adjusted estimates of seasonal influenza vaccine effectiveness-United States, Feb 2013 MMWR 62(07); 119-123, Feb 22, 2013  
A (H3N2): 47% (95% CI, 35 to 58)  
B : 67% (95% CI, 51%-78%).
- E Klisling et al. Influenza vaccine effectiveness estimates in Europe in a season with three influenza type/subtypes circulating: the I-MOVE multicentre case-control study, influenza season 2012/13 Eurosurveillance Feb 13; 19(6) 2014  
A(H1N1)pdm09: 50.4% (95% CI: 28.4 to 65.6)  
A(H3N2) : 42.2% (95% CI: 14.9 to 60.7).  
B : 49.3% (95% CI: 32.4 to 62.0).

11

## 発育鶏卵(卵)で製造されるインフルエンザワクチンの問題点

- ワクチンの緊急製造への対応は困難(事前の卵生産調整が必要)
- ワクチン野生株(原株)は卵での増殖性が低い
  - 製造効率を上げるために卵での高増殖株の開発が必要
  - 卵での複数継代による馴化(adaptation)で増殖性を改善
- 卵で分離したA(H3N2)ワクチン株の確保は困難
  - 2008/09シーズン頃からA(H3N2)流行株は培養細胞では分離できるが、ウイルスの性状変化から卵で分離することが極めて難しくなっている。
  - ワクチンには卵分離株を使うことになっているため、ワクチンに採用できるA(H3N2)株は、限定的で選択肢が少ない
- 最近のA(H3N2)ワクチン株は卵馴化による抗原変異が顕著
  - ヒトのA(H3N2)流行株を卵で分離すると重要な抗原サイトにアミノ酸置換が起こり、細胞で分離したヒト流行株から抗原性が変化する
  - この変異株を用いて作製した卵高増殖株は、抗原変異の程度がさらに強くなる傾向がある
    - #) B/ビクトリア系統ワクチン株も同様に卵馴化による抗原変異が起こる
    - #) B/山形系統ワクチンでは、株によって抗原変異しないものがある
- 卵馴化による抗原変異はワクチンの有効性の低下に影響
- 卵馴化によるワクチン株の抗原変異の問題は、卵で製造する限り毎年起こる(世界共通の深刻な問題)

12

## 卵製造ワクチンの問題点の改善への試み

### ● 季節性インフルエンザワクチンへの細胞培養ワクチンの導入、 実用化は一つの考え方

- ワクチン製造用種ウイルスの準備、開発（高増殖株の作製など）からワクチン製造所での大規模製造まで、一貫して培養細胞を用いることが必要



- 卵で分離した種ウイルスを使用した細胞培養ワクチンでは、  
卵馴化変異の問題を改善できない  
(一度起こった馴化変異は元に戻らない)

13

## 細胞培養ワクチンの利点

### ● 製造調整の柔軟性

- パンデミック時の緊急製造、供給に対応可能

### ● 卵馴化の抗原変異を回避または軽減可能

- 小規模な事前検討では、A(H3N2)ウイルスで起こる卵馴化-抗原変異の問題は回避できている
- A(H3N2)ワクチン候補株の確保が容易になる。これにより、候補株の選択肢が広がる
- ヒトの流行株に抗原性が近いワクチン供給が期待される  
↳ 製造過程で起こるワクチン株の変化によるワクチン効果の低下が軽減される可能性がある

14

## 季節性インフルエンザワクチンへの細胞培養ワクチン導入へ向けての検討課題

- ワクチン製造株を各ワクチン製造所の培養細胞へ馴化させる必要あり
  - 製造効率を上げるためには、それぞれの培養細胞で継代馴化が必要
- 継代馴化によって、抗原変異が起こるウイルスが確認されている
  - A(H1N1)pdm09ウイルスでは、MDCK細胞での継代で抗原変異する
    - ↳ 別の培養細胞でも同様の問題が起こるか、要検討
  - 継代回数が増すにつれて、遺伝子変異の頻度が高まる
- ワクチン製造株の品質の担保をどのような仕組みで実施するのか
  - 迷入ウイルス否定試験の実施の仕組みが未定
  - ワクチン製造候補株の遺伝子解析、抗原解析
    - ↳ ワクチン製造株を感染研に提出させて解析を実施して担保？
- ワクチン株選定法の見直しが必要
  - 単一の株指定では、培養細胞によっては、増殖しない可能性がある
  - ワクチン製造株の供給の仕組みについて検討が必要
    - ↳ 現時点では、細胞分離のワクチン候補株の供給体制が未整備

15

## 季節性インフルエンザワクチンへの細胞培養ワクチン導入のリスク

- 細胞培養法による季節性インフルエンザワクチンの製造および実用化には、多くの解決すべき課題がある
- 提供されるワクチン種ウイルスによっては、ワクチン製造できない製造所が出てくる
  - ワクチン種ウイルスと製造用細胞との相性の問題
- 製造効率の問題
  - 現行の卵製造ワクチンを超える製造効率を担保できるか不明
  - 国内全体のワクチン供給量に影響する
- 製造コスト、ワクチン価格の問題
  - 卵製造では不要だった項目の品質保証試験コストが必要
  - 現行の卵製造ワクチンと同等のコストで供給できるか

細胞培養ワクチンの導入に際しては、課題の検討結果、導入体制の整備状況に応じて、慎重な判断が必要

16

# 新型インフルエンザワクチン生産体制整備事業 第2次事業の追加公募分の採択結果について

資料8

## <事業概要>

・鶏卵培養法では1年半～2年を要する全国民分の新型インフルエンザワクチン生産期間を約半年に短縮するため、細胞培養法による新型インフルエンザワクチンを日本国内において生産・供給できる体制構築を図るための事業

## <追加公募の実施について>

・昨年開催した研究開発及び生産・流通部会での意見を踏まえ、新型インフルエンザ発生に備え、国民の安心確保と危機管理の観点から、新型インフルエンザ等対策政府行動計画に記載されている『6か月以内に全国民分のパンデミックワクチンを製造』できる体制をより確実に確保するため、不足の2,500万人分について、再度、広く公募を実施することとした。

## <評価委員会の開催状況>

平成25年12月25日 追加公募実施(〆切:平成26年2月10日)

平成26年 3月6日 第8回評価委員会

3月27日 第9回評価委員会

## <採択事業者の基準額及びワクチン生産量>

採択事業者名	基準額	ワクチン生産量 (製造後半年の量)
一般財団法人 化学及血清療法研究所	18,198,653,963円	1,700万人分以上
武田薬品工業株式会社	7,166,880,000円	800万人分以上