

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6907227号  
(P6907227)

(45) 発行日 令和3年7月21日 (2021.7.21)

(24) 登録日 令和3年7月2日 (2021.7.2)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	J
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	1 7 1
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
請求項の数 15 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-549447 (P2018-549447)	(73) 特許権者	510000976
(86) (22) 出願日	平成29年3月22日 (2017.3.22)		インターベット インターナショナル ベー. フェー.
(65) 公表番号	特表2019-509300 (P2019-509300A)		オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35
(43) 公表日	平成31年4月4日 (2019.4.4)	(74) 代理人	100114188
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/056831		弁理士 小野 誠
(87) 国際公開番号	W02017/162741	(74) 代理人	100119253
(87) 国際公開日	平成29年9月28日 (2017.9.28)		弁理士 金山 賢教
審査請求日	令和2年1月30日 (2020.1.30)	(74) 代理人	100124855
(31) 優先権主張番号	16161997.8		弁理士 坪倉 道明
(32) 優先日	平成28年3月23日 (2016.3.23)	(74) 代理人	100129713
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 重森 一輝
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 PCV2ウイルス及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症に対する混合ワクチン

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

動物の真皮へのワクチンの投与によるブタサーコウイルス2型 (PCV2) による感染症及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエによる感染症に対する動物の予防的治療における使用のための、ブタサーコウイルス2型の非複製的免疫原と、マイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原と、水中鉱油ナノエマルジョンを含むアジュバントと、を組み合わせる含むワクチンであって、  
ナノエマルジョンが、体積平均粒径が300nm未満である粒子のエマルジョンである、  
ワクチン。

## 【請求項 2】

単一用量によって投与されることを特徴とする、請求項1に記載の使用のためのワクチン。

## 【請求項 3】

無針ワクチン接種装置で投与されることを特徴とする、請求項1又は2に記載の使用のためのワクチン。

## 【請求項 4】

PCV2の前記非複製的免疫原がPCV2の組換え発現ORF2タンパク質であることを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載の使用のためのワクチン。

## 【請求項 5】

PCV2の前記非複製的免疫原がPCV2のバキュロウイルス発現ORF2タンパク質

であることを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 6】

マイコプラズマ・ハイオニューモニエの前記非複製的免疫原がバクテリンであることを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 7】

弱毒生 P R R S ウイルスをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 8】

前記弱毒生 P R R S ウイルスが、投与前 2 4 時間以内に P C V 2 及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの前記免疫原と組み合わせられることを特徴とする、請求項 7 に記載の使用のためのワクチン。

10

【請求項 9】

前記弱毒生 P R R S ウイルスが、投与前 6 時間以内に P C V 2 及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの前記免疫原と組み合わせられることを特徴とする、請求項 8 に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 10】

ローソニア・イントラセルラリスの非複製的免疫原をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 11】

20

ローソニア・イントラセルラリスの前記免疫原が、投与前 2 4 時間以内に P C V 2 及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの前記免疫原と組み合わせられることを特徴とする、請求項 10 に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 12】

ローソニア・イントラセルラリスの前記免疫原が、投与前 6 時間以内に P C V 2 及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの前記免疫原と組み合わせられることを特徴とする、請求項 11 に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 13】

ローソニア・イントラセルラリスの前記免疫原が、ローソニア・イントラセルラリスバクテリンの凍結乾燥組成物の形態でワクチンに添加されることを特徴とする、請求項 10 から 12 のいずれか一項に記載の使用のためのワクチン。

30

【請求項 14】

ブタサーコウイルス 2 型 ( P C V 2 ) の非複製的免疫原と、マイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原と、水中鉍油ナノエマルジョンを含むアジュバントと、を組み合わせる含むワクチンを非ヒト動物に皮内投与することによって、P C V 2 による感染症及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエによる感染症に対して非ヒト動物を予防的に治療する方法であって、  
ナノエマルジョンが、体積平均粒径が 3 0 0 n m 未満である粒子のエマルジョンである、方法。

【請求項 15】

40

ブタサーコウイルス 2 型 ( P C V 2 ) による感染症及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエによる感染症に対して動物を予防的に治療するための前記動物に皮内投与用の、P C V 2 の非複製的免疫原とマイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原と水中鉍油ナノエマルジョンを含むアジュバントとを組み合わせる含むワクチンを製造するための、P C V 2 の非複製的免疫原及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原の使用であって、  
ナノエマルジョンが、体積平均粒径が 3 0 0 n m 未満である粒子のエマルジョンである、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【0001】

本発明は、概して、ブタの健康の分野に関する。ブタは多くの病原性微生物にかかりやすい。感染の制御は、一般的に、安定した飼料管理、抗ウイルス薬及び抗生物質などの医薬品による治療、又はワクチンを用いた予防的治療によって行われる。特に、本発明は、ブタサーコウイルス2型(PCV-2)及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエ(*Mycoplasma hyopneumoniae*)感染症に対するワクチン、並びにワクチンを用いて動物をこのような感染症から保護する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

養豚業において重大な経済的損失をもたらす最も重要な病原体は、PCV2(ブタサーコウイルス2型)、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ、PRRS(ブタ生殖器呼吸器症候群)ウイルス及びローソニア・イントラセルラリス(*Lawsonia intracellularis*)である。

10

## 【0003】

PCV-2は、子ブタで観察される離乳後多臓器性発育不良症候群(PMWS)と関連している。この病気は1991年にカナダで初めて生じた。臨床徴候及び病理学が1996年に公開され、進行性の衰弱、呼吸困難、頻呼吸、時には黄疸(icterus)及び黄疸(jaundice)が含まれる。

## 【0004】

Nayar et al., Can. Vet. J. Volume 38, June 1997は、PMWSの臨床症状を有するブタでブタサーコウイルスを検出し、PK-15細胞の自然の存在として認識される公知のPCV以外のPCVがPMWSと関連し得ると結論づけた。後の刊行物(Hamel et al., J. Virol., 72(6), 5262-5267, 1998; Meehan et al., J. gen. Virol., 79, 2171-2179, 1998)がこれらの知見を裏付け、新たな病原性PCVをPCV-2と呼び(Meehanら、上記)、元のPK-15細胞培養物単離物(Tischer et al., Nature 295, 64-66, 1982)をPCV-1と呼ぶべきであることが提案された。

20

## 【0005】

PCV-2は、環状一本鎖DNAゲノムを含む小型(17~22nm)正二十面体非エンベロープウイルスである。PCV-2ゲノムの長さは約1768bpである。世界中の異なる領域に由来するPCV-2単離株は互いに密接に関連しており、95~99%のヌクレオチド配列同一性を示す(Fenaux et al., J. Clin. Microbiol., 38(7), 2494-2503, 2000)。PCVのORF-2は、ウイルスのカプシドタンパク質をコードする。PCV2のORF2は約233アミノ酸のタンパク質をコードする。全てのPCV-2単離株のORF2は、91~100%のヌクレオチド配列同一性及び90~100%の推定アミノ酸配列同一性を共有する。

30

## 【0006】

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ(Mhyo)は、ブタを冒す非常に感染性の慢性疾患である疾患ブタ流行性肺炎(Porcine Enzootic Pneumonia)を引き起こすことが知られている細菌の一種である。Mhyoはサイズが小さく(400~1200nm)、小型ゲノム(893~920キロ塩基対(kb))を有し、細胞壁が欠けている。Mhyoは、ブタの肺の上皮細胞の繊毛に付着する。これらは繊毛に鼓動、凝集及び消失を停止させ、最終的に上皮細胞死をもたらす。これがブタ流行性肺炎のブタの肺に見られる病変の原因である。この損傷は、正常な繊毛クリアランスを妨げ、しばしば二次感染が発症する。これにより、動物の成長体重が著しく減少する。米国での損失が年間最大10億ドルであると以前推定された。ブタ流行性肺炎は世界中で風土病であり、Mhyoはほとんど全てのブタ群に存在する。ブタにおけるMhyoの存在によって引き起こされる免疫応答は、遅く、効果がない。そのため、この疾患の治療は最も重要であるが、抗生物質に限定され、感染を完全に除去しないので、現在は部分的にしか有効で

40

50

ない。ワクチンが病気の重症度を低下させることが分かっているが、感染したブタに病気が発生するのを完全に防ぐことはできない。

#### 【 0 0 0 7 】

PRRSウイルスは、1987年に北米及び中央ヨーロッパで初めて報告された。PRRSウイルスは、小型のエンベロープRNAウイルスである。これは、約15キロベースのサイズを有する一本鎖、プラス鎖RNAゲノムを含む。ゲノムは9個のオープンリーディングフレームを含む。ウイルスは、ニドウイルス(Nidovirales)目、アルテリウイルス(Arteriviridae)科、アルテリウイルス(Arterivirus)属のメンバーである。PRRSVの2つのプロトタイプ株は、北米株、VR-2332、及び欧州株、レリスタッドウイルス(Lelystad virus)(LV)である。欧州及び北米のPRRSV株は、同様の臨床症状を引き起こす。2000年代前半に、北米遺伝子型の高病原性株が中国で出現した。この株、HP-PRRSVは他の全ての株より毒性が強く、世界的にアジア諸国で大きな損失を引き起こしている。PRRSウイルスについては、不顕性感染が一般的であり、その臨床徴候は群れで散発的にしか起こらない。臨床徴候には、流産及び死産又はミイラ変性胎児の出産などの雌ブタの生殖障害、並びに耳及び外陰部のチアノーゼが含まれる。新生児ブタでは、この病気は呼吸困難を引き起こし、グレーサー病などの呼吸器感染症に対する感受性が高まる。

#### 【 0 0 0 8 】

ローソニア・イントラセルラリスは、世界中で離乳後ブタの一般的な腸疾患である、回腸炎としても知られる増殖性腸疾患を引き起こす。特徴的な病変は、回腸腸陰窩における未成熟腸細胞の増殖であり、これらの細胞は、通常、それらの頂端細胞質内に原因細菌を含む。剖検で、組織病変を、特に腸細胞で1.5~2.5µmの長さのビブリオ様形状の細菌の可視化によってローソニア陽性と確認することができるが、しばしば陰窩間の粘膜固有層及び腸間膜リンパ節に位置するマクロファージ内にもある。腸細胞からの細菌のクリアランスは、関連する増殖性病変の解消をもたらす、細菌の陰窩に対する直接的な局所的効果を示す。これらの病変におけるローソニア・イントラセルラリスの存在は、病気を示す動物と不顕性感染のみを示す動物の両方においてPCRを用いて実証されている。臨床症例は通常、飼育業者・仕上げ業者の期間に存在し、ある高齢仕上げブタで、急性出血性形態が記録されている。

#### 【 0 0 0 9 】

上で同定された病原体に対するワクチンは、一般的に公知である。PCV2による感染症に対して動物、特にブタを予防的に治療するための慣用的なワクチンは、(非複製的)免疫原としての全不活性化PCV-2ウイルスに基づき得る。また、当技術分野では、ORF2にコードされたカプシドタンパク質(例えば、組換え発現される場合)が、十分なワクチンに使用するためのブタサーコウイルス2型のサブユニット免疫原として適していることが示されている。DNA及び非構造タンパク質がカプシドの内側に存在しないという事実が本質的に異なるが、このサブユニットが循環系においてウイルス自体と同じ様式を示すのでこれが理解され得る。当技術分野では、PCV2に対するいくつかのワクチンが商業的に入手可能である。Porcilis(登録商標)PCV(MSD Animal Health、Boxmeer、オランダから入手可能)は、3週齢以上のブタに使用するための、ブタをブタサーコウイルス2型から保護するためのワクチンである。2回接種(2回投与)ワクチンとして投与する場合、免疫持続期間(DOI)は22週間であり、ブタの肥育期間をほぼ完全にカバーする。Ingelvac Circovax(登録商標)(Boehringer Ingelheim、Ingelheimから入手可能)は、2週齢以上のブタに使用するための、ブタをブタサーコウイルス2型から保護するためのワクチンである。これは1回接種(1回投与)ワクチンとしてのみ登録されている。Circovac(登録商標)(Merrial、Lyon、フランスから入手可能)は、3週齢以上のブタに使用するための、ブタをブタサーコウイルス2型から保護するためのワクチンである。Suvaxyn(登録商標)PCV(Zoetis、Capelle a/d IJssel、オランダから入手可能)は、3週齢以上のブタに使用する

10

20

30

40

50

るための、ブタをブタサーコウイルス2型から保護するためのワクチンである。他のPCV2ワクチンは、例えば国際公開第2007/028823号、国際公開第2007/094893号及び国際公開第2008/076915号に記載されている。

#### 【0010】

マイコプラズマ・ハイオニューモニエに関して、多くの商業的ワクチンが存在し、これらは商業的養豚業務の大部分において日常的に使用されている。一般に、これらのワクチンは、典型的には非経口注射によって投与される、サブユニットタンパク質及び/又はバクテリン(すなわち、全細胞、(部分)溶解、均質化、フレンチプレス、この組み合わせとして死細胞を含む、又は組成物が死細菌培養物から得られる限り別の形態の死細胞を含む組成物)などの非複製的免疫原を含む。いくつかの例は、RespiSure(登録商標)(Zoetis)、Ingelvac(登録商標)M.hyo及びMycofLEX(登録商標)(Boehringer Ingelheim)、Hyoresp(登録商標)(Merrial)、Stellamune(登録商標)Mycoplasma(Elanco Animal Health)、Fostera(登録商標)PCV MH(Zoetis)及びM+Pac(登録商標)(MSD Animal Health)である。

10

#### 【0011】

PRRSウイルスに関しては、不活化ウイルスワクチンが記載され商業的に入手可能であるが、弱毒生形態の欧州型(I型)又は北米型(II型)のいずれかを含む修飾生ワクチン(MLV)ワクチンが、その制御のための主要な免疫学的ツールである。いくつかのワクチンが当技術分野で商業的に入手可能である。Porcilis(登録商標)PRRS(MSD Animal Health、Boxmeer、オランダから入手可能)は、弱毒生PRRSウイルスI型を含むワクチンであり、PRRSウイルスによる感染によって引き起こされる感染症(ウイルス血症)を軽減するために登録されている。Ingelvac PRRS(登録商標)MLV(Boehringer Ingelheim、Ingelheimから入手可能)は、PRRSウイルスによって引き起こされる病気の軽減を助けるワクチンであり、このワクチンは異なる種類の株に対する交差防御を提供する。Fostera(登録商標)PRRS(Zoetis、Florham Park、New Jersey、米国から入手可能)もMLVワクチンであり、PRRSウイルスによって引き起こされる呼吸器と生殖の両方の形態の病気に対する防御のために登録されている。他のPRRSワクチンは、例えば国際公開第2006/074986号、米国特許第8728487号明細書及び国際公開第2014/048955号に記載されている。

20

30

#### 【0012】

活性保護を誘導することによりローソニア・イントラセルラリスと戦うためのワクチンは商業的に入手可能であり、当技術分野で記載されている。これらのワクチンは、弱毒生ワクチンである商品名Enterisol(登録商標)Ileitis(Boehringer Ingelheim Vetmedica、米国)、及び、バクテリンの形態のローソニア・イントラセルラリスの非複製的免疫原を含むワクチンであるPorcilis(登録商標)Ileitis(Merck Animal Health、米国)で入手可能である。

40

#### 【先行技術文献】

##### 【特許文献】

#### 【0013】

【特許文献1】国際公開第2007/028823号

【特許文献2】国際公開第2007/094893号

【特許文献3】国際公開第2008/076915号

【特許文献4】国際公開第2006/074986号

【特許文献5】米国特許第8728487号明細書

【特許文献6】国際公開第2014/048955号

50

## 【非特許文献】

## 【0014】

【非特許文献1】Nayar et al., Can. Vet. J. Volume 38, June 1997

【非特許文献2】Hamel et al., J. Virol., 72(6), 5262-5267, 1998

【非特許文献3】Meehan et al., J. gen. Virol., 79, 2171-2179, 1998

【非特許文献4】Tischer et al., Nature 295, 64-66, 1982

10

【非特許文献5】Fenaux et al., J. Clin. Microbiol., 38(7), 2494-2503, 2000。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0015】

ブタの健康管理のための、簡便で安全で効果的な手段が絶えず必要とされている。本発明の目的は、この必要性、特に新規なPCV2/Mhyo混合ワクチンの必要性を満たすワクチンを提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0016】

20

本発明の目的を達成するために、動物の真皮へのワクチンの投与によるブタサーコウイルス2型(PCV2)による感染症及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエによる感染症に対する動物の予防的治療に使用するための、ブタサーコウイルス2型の非複製的免疫原およびマイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原、および水中鉍油ナノエマルジョンを含むアジュバント、を組み合わせる含む新規なワクチンが考案された。

## 【0017】

両病原体ワクチンは公知であり商業的に入手可能であるが、若い動物で使用するのに効果的であって、同時に安全な、皮内投与に利用可能な混合ワクチンはない。一般に公知であるように、企図又は示唆された抗原の全ての組み合わせが安全で有効な混合ワクチンをもたらすことができるわけではない。実際、単一(一価)ワクチンが安全且つ効果的である場合、又は混合ワクチンが別の投与部位での使用について公知である場合でさえ、特定の投与部位での使用についての混合ワクチンの安定性、安全性及び有効性に関して高レベルの不確実性が存在する。驚くべきことに、皮内投与用の安全且つ有効な混合ワクチンに到達するために、水中鉍油ナノエマルジョンを含むアジュバント組成物を使用することができることが分かった。驚きの理由は、この種のエマルジョンは、筋肉内投与に使用する場合、典型的には安全でないとみなされるためであった。これは、ナノエマルジョンMontanide(登録商標)IMS 251を使用すると、ワクチン接種4時間後に、2

のブタの平均体温上昇(試験した他の5種の製剤のいずれについても-0.8~1.5

であるのと比較して)をもたらす有害発熱効果が存在することを表IIで示す、アジュバント開発及び製造企業SEPPICの科学者による刊行物(Deville et al. in Revue Med. Vet., 2009, 160, 11, 514-519)からとりわけ公知である。2の上昇は、Mhyoワクチンについて欧州薬局方の2448条によって許可されている1.5をはるかに上回っており、これが鉍油のナノエマルジョンがブタワクチンに商業的に使用されていない理由を説明し得るだろう。

30

40

## 【0018】

一般に、混合ワクチンに関しては、欧州医薬品審査庁(EMA)の獣医用医薬品委員会が、その刊行物「混合獣医製品の要件に関するガイダンス(Note for guidance: requirements for combined veterinary products)」(EMA, 2000, CVMP/IWP/52/97-FINAL)で、以下のように言及している(2/6頁):「混合ワクチンの開発は容易で

50

はない。各組み合わせは、品質、安全性及び有効性の点で個別に開発及び試験されるべきである」。委員会はさらに、優れた混合ワクチンの探索には、典型的には、例えば、保存剤、賦形剤及び安定剤、不活性化剤及びアジュバントを含む混合ワクチン中の個々の成分間の適合性が含まれることを示している。3頁、一番上の段落には、「混合ワクチンでは、2種以上の成分の存在がしばしば相互作用を引き起こし、（1又は複数の）特定の成分を単独で投与した場合と比較して、個々の成分に対する減少又は増加した応答をもたらし得る。このような相互作用はしばしば免疫学的な性質であるが、免疫系に対するあまり直接的でない効果を有する他の因子によっても引き起こされ得る」及び「アジュバントを使用して混合ワクチンに対する免疫応答を増大させる場合、特別な問題が生じ得る」とも述べられている。

10

#### 【0019】

アメリカ保健福祉省、食品医薬品局、生物学的製剤評価研究センターは、1997年4月に、「予防可能な疾患のための混合ワクチンを評価するための業界ガイダンス：製造、試験及び臨床研究（Guidance for Industry, for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: Production, Testing and Clinical Studies）」を公開し、このガイダンスの中で、（3頁、「成分の適合性」）「一価ワクチンを組み合わせると、望ましいものより安全性又は有効性が低い新たな組み合わせがもたらされることが経験から明らかになった。時には、不活化ワクチンの成分が、活性成分の1種又は複数に対して有害に作用することがある。」と述べられており、特に、不活化ワクチンが生ワクチンの有効性に悪影響を及ぼし得、例えば生百日咳ワクチンと不活化ポリオウイルスワクチンを組み合わせると、百日咳の効力が低下したワクチンが得られるということが起こったことを示している。個々のワクチンと比較して、ワクチン中の任意の追加の成分が最終製品の安全性及び効力を複雑にすることが示されている。

20

#### 【0020】

世界保健機関（WHO）は、「ワクチン安全性の基礎」と呼ばれるeラーニングコースを公開し、履修単位2では混合ワクチンを意図している。この履修単位は、「認可された混合ワクチンは、製品が安全で、有効で、許容可能な品質であることを保証するために、国家当局によって承認される前に広範な試験を受けている」で始まっている。「そのため、全ての組み合わせで、製造業者は各抗原成分の効力、免疫を誘導するために組み合わせた場合のワクチン成分の有効性、毒性への復帰の可能性のリスク、及び他のワクチン成分との反応を評価しなければならない」とも述べられている。

30

#### 【0021】

したがって、特定の投与部位用の新しいワクチンと言うまでもなく、新しい混合ワクチンを考案することは容易ではない。例えば、世界保健機関（WHO）は、「ワクチン安全性の基礎」と呼ばれるeラーニングコースを公開し、このコースの53頁では、「投与経路は、ワクチン（又は薬物）を身体と接触させる経路である。これは予防接種が成功するための重要な因子である。物質は、侵入部位から、その作用が起こることが望まれる身体の部分まで輸送されなければならない。しかしながら、この目的のために身体の輸送機構を使用することは単純なことではない。」と報告されている。

40

#### 【0022】

この点で、カリフォルニア州保健局の予防接種部は、正しい予防接種のためのガイドラインを公開している（[http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/d/vacc\\_admin.pdf](http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/d/vacc_admin.pdf)）。投与部位に関しては、7頁の最初の全段落に、「各ワクチンの推奨経路及び部位は、臨床試験、実際の経験及び理論的考察に基づく。この情報は各ワクチンの製造業者の製品情報に含まれている。ワクチンの投与に使用される5つの経路が存在する。推奨経路からの逸脱は、ワクチン有効性を低下させるか、又は局所的有害反応を増加させる可能性がある。」と言及されている。14頁には、唯一の米国で認可された皮内

50

ワクチンが記載されている：「Fluzone Intradermalは、皮内経路によって投与される唯一の米国で認可されたワクチンである。これは18歳～64歳の人への使用のみが承認されている。このFluzone製剤は、不活化インフルエンザワクチン（TIV）の筋肉内製剤と同じではない。他のTIV製剤は、皮内経路によって投与すべきではない。」。

#### 【0023】

概して、特定の部位での混合ワクチンのワクチン接種は言うまでもなく、特定の部位でのワクチン接種は容易ではなく、安全性及び有効性を決定するための実験を必要とすることが一般に知られている。

#### 【0024】

皮内投与に関しては、IDAL（登録商標）ワクチン接種装置（オランダのBoxmeerのMSD Animal Healthから入手可能）などの無針ワクチン接種装置を用いて皮内投与を行うことができるが、「皮内」投与自体を「無針」投与と同一視すべきではない。世界保健機関は、2009年8月27日の「ワクチンの皮内送達；低及び中所得国で使用するための開発に関する文献及び可能性の概説」と題された論文で、実際に明らかに、「無針」ワクチン接種が、必ずしも「皮内」ワクチン接種を意味するわけではないことを示している（表1、概説の3頁参照）。無針装置が「皮内ワクチン接種用に構成されている」場合にのみ、ワクチンは実際に（少なくとも部分的に）真皮内に送達され得る。そうでなければ、ワクチンは、その全体が皮下又は筋肉内に送達され得る。

#### 【0025】

本発明はまた、ブタサーコウイルス2型（PCV2）の非複製的免疫原とマイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原と水中鉱油ナノエマルジョンを含むアジュバントと、を組み合わせることで含むワクチンを動物に皮内投与することによって、PCV2による感染症及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエによる感染症に対して動物を予防的に治療する方法、並びにブタサーコウイルス2型（PCV2）による感染症及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエによる感染症に対して動物を予防的に治療するための動物への皮内投与用の、PCV2の非複製的免疫原と、マイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原と、水中鉱油ナノエマルジョンを含むアジュバントと、を組み合わせることで含むワクチンを製造するための、PCV2の非複製的免疫原及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原の使用に関する。

#### 【0026】

ワクチンにおいて、免疫原（抗原とも呼ばれる）は、典型的には、薬学的に許容される担体、すなわち生体適合性媒体、すなわち、投与後に対象動物において有意な有害反応を誘導せず、ワクチンの投与後に宿主動物の免疫系に免疫原を提示することができる媒体、例えば水を含む液体及び／又は任意の他の生体適合性溶媒、或いは凍結乾燥ワクチン（糖及び／又はタンパク質に基づく）を得るために一般的に使用されるような固体担体と組み合わせられ、場合により、野生型微生物による感染症に対して動物を治療するため、すなわちこのような感染症又はそこから生じる障害を予防、改善又は治療するのに補助するための、動物に投与すると免疫応答を誘導する免疫刺激剤（アジュバント）を含んでもよい。場合により、安定剤、粘度調整剤又は他の成分などの他の物質を、ワクチンの意図される用途又は要求される特性に応じて添加してもよい。

#### 【0027】

##### 定義

ワクチンは、対象動物に投与することが安全であり、その動物において病原性微生物に対する防御免疫を誘導する、すなわち、以下に定義される成功した予防的治療を誘導することができる医薬組成物である。

#### 【0028】

病原体の非複製的免疫原は、（弱毒形態の野生型における）全体として生きた複製病原体以外の病原体に相当する任意の物質又は化合物であり、この病原体に対して免疫学的応答が誘発され、対応する病原性病原体又はその病原性因子の1つもしくは複数、それら

10

20

30

40

50



の免疫応答の結果として宿主の免疫系によって認識され、最終的には少なくとも部分的に中和される。非複製的免疫原の典型的な例は、死滅した全病原体及びこれらの病原体のサブユニット、例えばカプシドタンパク質及び表面発現タンパク質、例えば組換え発現タンパク質である。

#### 【0029】

弱毒生病原体は、病原性が減少した病原体の生存可能、複製可能な（生存可能な）形態である。弱毒化の過程は、感染性病原体をとり、典型的には細胞系を通した病原体の複数回継代によって又は病原体を遺伝子組換えすることによって、それが無害又は弱毒性になるように変える。

#### 【0030】

病原体による感染症に対する予防的治療は、治療後の病原性病原体による曝露から生じる、病原体による感染症又はその感染症から生じる障害を予防又は改善するのを補助し、特にこのような曝露後の宿主中のその量を減少させるのを補助し、場合により病原体による感染から治療後に生じる１つ又は複数の臨床症状を予防又は改善するのを補助する。

#### 【0031】

ナノエマルジョンは、エマルジョンが、５体積％の分散油で白色（乳様）であるマイクロエマルジョンとは対照的に、５体積％の分散油の濃度で、半透明～オパール色となるように、体積平均粒径が３００nm（可視光の波長）未満である粒子のエマルジョンである。ナノエマルジョンでは、典型的には、粒子の９０％超が３００nm未満の粒径を有し、（体積）平均粒径のピーク値は典型的には２０～２００nmである。

#### 【0032】

予防的治療における使用のためのワクチンの単一用量投与は、防御免疫に到達するために、ワクチンの第２の投与でワクチン接種を追加する必要がないことを意味する。２回接種レジメンでは、第１の（プライム）ワクチン接種が、典型的には第１の投与から６週間以内、一般的には第１の投与から３週間以内又は２週間以内にさらに追加され、第２の（ブースト）投与後にのみ、防御免疫、すなわち上に定義される成功した予防的治療を得ることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0033】

【図１】PCV２血清学的応答の結果を示す図である。

【図２】PRRS血清学的応答の結果を示す図である。

【図３】ウイルス血症データを示す図である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0034】

第１の実施形態では、ワクチンが単一用量によって投与される。単一用量投与が有効なワクチンをもたらすことが分かった。これは、両病原体に対して動物を保護するための非常に簡便で経済的な方法を提供する。

#### 【0035】

次の実施形態では、ワクチンが動物の皮膚を通して真皮に到達するために、ワクチンの噴射を使用して無針ワクチン接種装置で投与される。この実施形態では、真皮へのワクチン接種は、典型的には０．０５～０．２mlの範囲の非常に低容量のワクチンを使用して、ワクチンの液体噴射（高加圧流体流）を使用する無針ワクチン接種装置によって提供される。これによって、ワクチンの安全性及び投与方法がさらに増加する。

#### 【0036】

別の実施形態では、非複製的免疫原は、例えば当技術分野で公知のようにバキュロウイルスによって発現された、プタサーコウイルス２型の組換え発現ORF２タンパク質である。この組換えタンパク質は、本発明に適用するのに適していることが判明している。特に、ORF２タンパク質は、国際公開第２００７／０２８８２３号、国際公開第２００７／０９４８９３号又は国際公開第２００８／０７６９１５号に記載されるようなバキュロウイルス発現系で発現され得る。

10

20

30

40

50

## 【0037】

さらに別の実施形態では、マイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原はバクテリンである。このようなM h y o抗原は、製造が比較的容易であり、毎日の養豚業務において優れた有効性の実績を有する。

## 【0038】

さらに別の実施形態では、ワクチンは、弱毒生P R R Sウイルスをさらに含む。この実施形態では、ワクチンは、ただ1種のワクチンを使用することによって、3つの主要なブタ病原体に対する防御を提供することができる。

## 【0039】

さらに別の実施形態では、弱毒生P R R Sウイルスは、投与前24時間以内、好ましくは6時間以内にワクチンに組み合わせられる。多くの医薬組成物について、そのように知られており、P C V 2 O R F 2抗原（例えば、M S D A n i m a l H e a l t hから入手可能なP o r c i l i s（登録商標）P C V M H y o）を含む混合ワクチンについてさえ公知であるが、長期安定性は少なくともいずれの薬学的に許容される担体組成物についても達成するのが依然として容易ではないので、投与直前に抗原を組み合わせることによって、賦形剤を選択する自由度が増す。

## 【0040】

別の実施形態では、ワクチンは、ローソニア・イントラセルラリスの非複製的免疫原をさらに含む。この実施形態では、ワクチンは、ただ1種のワクチンを使用することによって、3つの主要なブタ病原体に対する防御を提供することができる。P R R S免疫原のワクチンへの添加に関して前に述べたことに対応して、一実施形態では、ローソニア・イントラセルラリスの免疫原は、投与前24時間以内、好ましくは投与前6時間以内にP C V 2及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの免疫原と組み合わせられる。さらなる実施形態では、ローソニア・イントラセルラリスの免疫原は、ローソニア・イントラセルラリスバクテリンの凍結乾燥組成物の形態でワクチンに添加される。

## 【0041】

本発明を、以下の実施例を用いてさらに説明する。

## 【0042】

## [実施例]

## 試験1

## 目的

この試験の目的は、子ブタにおける皮内施用のための異なる実験的P C V 2 / M h y o混合ワクチンの安全性及び有効性を評価することであった。

## 【0043】

## 実験設計

この試験では約10匹の雌ブタの子孫が利用可能であった。動物は、P C V 2に対する母系由来抗体（M D A）を有していた。合計50匹の子ブタをそれぞれ10匹の子ブタからなる4つの処理群及びそれぞれ5匹の子ブタからなる2つの対照群に割り当てた。P C V 2抗原を、限外濾過（U F）を用いる第1のものと、重力（G）を用いる第2のものと2つの異なる濃縮過程によって製造した。ワクチンを、油の最終濃度が異なる、商業的に入手可能なマイクロエマルジョンアジュバントX S o l v e（0.5  $\mu$ mよりわずかに小さい平均粒径；M S D A n i m a l H e a l t h、B o x m e e r、オランダより入手可能）を使用して、2種類の異なるアジュバントを添加することによって製剤化した。X S o l v e 50は20.8%の鉱油を含み、X - s o l v e 30は12.5%の鉱油を含んでいた。

## 【0044】

1～4群の子ブタに、約3週齢の時に、I D A L（登録商標）ワクチン接種装置（M S D A n i m a l H e a l t h）により施用される単一用量0.2 mlワクチンを皮内ワクチン接種した。5群及び6群の子ブタには同様にプラセボを注射した。混合ワクチンは、1用量あたり9  $\mu$ gの最終濃度のP C V 2 O R F 2タンパク質及び1 P C V U / 用

10

20

30

40

50

量のMhyoバクテリン(MSD Animal Healthの商業的に入手可能なワクチンPorcilis(登録商標)M Hyo ID ONCEと同じ)を含んでいた。以下に、異なる群を示す：

- 1群：PCV/Mhyo、XSolve 30、UF
- 2群：PCV/Mhyo、XSolve 50、UF
- 3群：PCV/Mhyo、XSolve 30、G
- 4群：PCV/Mhyo、XSolve 50、G
- 5群：プラセボ、XSolve 30
- 6群：プラセボ、XSolve 50。

#### 【0045】

10

全ての子ブタを臨床徴候について毎日観察した。ワクチン接種の日に、ワクチン接種の1時間後及び4時間後に全ての動物において臨床徴候を監視した。-1日目から+4日目まで、及びワクチン接種4時間後に、体温を全ての動物から取った。ワクチン接種日に開始して、ワクチン接種4週間後まで又は反応の退行まで、触診によって局所反応を監視した。ワクチン接種前日、およびワクチン接種2、3、5及び10週間後に、全ての動物から血液試料を採取した。ワクチン接種前、およびその2、3、5及び10週間後に採取した各動物からの血清試料を、ブタサーコウイルス2型(PCV2)に対する抗体について試験した。

#### 【0046】

20

##### 結果

実験の開始時に、全ての動物が健康であることが分かった。

#### 【0047】

ワクチン接種時及びワクチン接種後1日後以降、全ての群が同等の温度を示した。ワクチン接種4時間後で、混合ワクチンをワクチン接種された全ての群が、対照群と比較して体温のかなりの上昇を示した。UF群とG群との間に有意な差は見られなかった。ワクチン接種群の平均体温上昇は、対照動物の平均体温よりも最大1.0 高かった。ピーク値は4.1 をはるかに上回り(最大4.1.6)、対照群の値は3.9 ~ 4.0 の範囲にあり、ピーク値は4.0.2 であった。

#### 【0048】

30

触診によって評価される局所反応に関して、対照群では、XSolve 30群の動物は局所反応を示さなかった。XSolve 50群では、動物の60%が局所反応を示したが、最大サイズは1.5 cm未満であった。ワクチン接種群については、状況は全く異なっていた。XSolve 30ワクチンを受けた動物のうち、60~90%が局所反応を示し、最大サイズは約5 cmであった。XSolve 50群では、動物の70~80%が局所反応を示し、最大サイズが約6 cmであり、局所反応は動物にとってひどく及び/又は有痛性であった。

#### 【0049】

ワクチンに対する血清学的応答は良好であったが(結果は示されていない)、ワクチンは、特に重度の局所反応のために、概して安全でないとみなされた。

#### 【0050】

40

##### 試験2

##### 目的

試験1に関して、この第2の試験の目的は、有効性を保持しながら、マイクロエマルジョンの量を減少させた場合に混合ワクチンをより安全にすることができるかどうかを評価すること、及び安全で効果的な混合ワクチンに到達することを目指して他の潜在的なアジュバントを試験することでもあった。

#### 【0051】

##### 実験設計

合計60匹の子ブタを、それぞれ15匹の子ブタからなる4つの処理群に割り当てた。子ブタに、約3週齢の特に、ワクチン接種した。1~3群の子ブタに、鉱油(XSolve

50

e 12)について5%の濃度のX Solveアジュバントを用いて、試験1で使用されるPCV2-Mhyo抗原を用いて製剤化した単一用量の0.2mlワクチン、又は代わりにX Solveマイクロエマルジョンに加えて、一般的に許容されるミョウバンアジュバントを使用した同じワクチン、又はスクアラン(水素添加サメ肝油)アジュバントに基づくアジュバントを使用したワクチン(0.2ml)を、ワクチン接種した。4群の子ブタに、単一用量のPorcilis(登録商標)Mhyo ID ONCE(0.2ml)をワクチン接種した。全ての子ブタに首の右側に皮内ワクチン接種した。以下に、異なる群を示す：

1群：PCV/Mhyo、X Solve 12

2群：PCV/Mhyo、X Solve 12 + Alum (Al(OH)3)

3群：PCV/Mhyo、スクアラン

4群：Porcilis(登録商標)Mhyo ID ONCE、陽性対照。

10

#### 【0052】

試験日(SD)29日に、全ての動物を、毒性Mhyo株10mlで連続2日間気管内曝露感染させた。SD52又は53に、全ての動物を剖検した。

#### 【0053】

全ての子ブタを臨床徴候についてワクチン接種後に毎日観察した。ワクチン接種日に開始して、ワクチン接種29日後まで又は局所反応が解消するまで、2日ごとに触診によって局所反応を監視した。ワクチン接種日並びにSD22、29及び52/53に、全ての動物から血清試料を採取した。PCV2及びMhyoに対する抗体について試料を試験し、互いに比較した。剖検時に、Mhyo特異的肺病変を採点した。

20

#### 【0054】

結果

実験の開始時に、全ての動物が健康であることが分かった。

#### 【0055】

ワクチン接種後、局所反応の重症度(平均最大サイズ、局所反応を有する動物の数)は、1群(X Solve 12)及び3群(スクアラン)で最も低かった。これらの群では、局所反応の平均最大サイズがそれぞれ1.1及び0.9cmであり、局所反応を有する動物の割合は40及び65%であった。他の群では、ほとんどの動物が局所反応を有し(子ブタの90~100%)、平均最大サイズが1.5~1.8cmであった。これらの数字は全て、実際に使用が許可されたワクチンで許容される。

30

#### 【0056】

PCV血清学に関しては、ワクチン接種時(SD0)には、全ての動物がPCV2 IgM抗体に関して陰性であった。ワクチン接種後、試験群1、2及び3の間で平均PCV2総Ig抗体応答の明らかな差異を観察することはできなかった。ワクチン接種3週間後、PCV2 IgM陽性動物の割合は、1試験群当たり80~100%であり、対照については0%であった。このことは、混合ワクチンが抗ORF2抗体価を活発に誘導することができたことを示している。

#### 【0057】

Mhyoに関しては、実験開始時、子ブタのいずれもMhyoに対する抗体について陽性ではなかった。ワクチン接種4週間後(SD29)、試験群1~3では、Mhyoに対する応答が最小であった。2群の1匹の動物のみが陽性であった。陽性対照群(Porcilis Mhyo ID Once)では、子ブタの10匹(67%)がMhyo抗体応答を示した。Mhyo曝露後、ほぼ全ての動物が陽性Mhyo血清学的応答を示した。このことは、混合ワクチンが許容される有効性を有さないことを示し、この指標を、表1に要約される肺病原スコアを評価することによって確認した。

40

## 【表 1】

表1:肺病変の中央及び平均百分率

群	中央	平均
1. PCV2/Mhyo Xsolve 12	2.20	4.69
2. PCV2/Mhyo Xsolve 12 + Al(OH) <sub>3</sub>	1.90	3.01
3. PCV2/Mhyo スクアラン	3.99	5.15
4. Porcilis Mhyo ID Once (XSolve 50)	0.90	1.97

10

## 【 0 0 5 8 】

結論として、ミョウバンアジュバントを添加してもよい鉱油の低濃縮マイクロエマルジョンを使用する、又はスクアランをアジュバントとして使用することによって、安全な PCV2/Mhyo 混合ワクチンが考案され得るが、これらのワクチンは、マイコプラズマ・ハイオニューモニエによる感染症と戦うのに十分には効果的ではないとみなされた。

## 【 0 0 5 9 】

## 試験 3

## 目的

第 3 の試験の目的は、ID 使用のための PCV2/Mhyo 混合ワクチンを安全にするために使用することができ、同時に有効性を保持し、ローソニア・イントラセルラリスの非複製的免疫原を混和するのに適していてもよい代替アジュバントを見出すことであった。

20

## 【 0 0 6 0 】

## 実験設計

合計 75 匹の子ブタを、それぞれ 15 匹の子ブタからなる 5 つの処理群に割り当てた。子ブタに、約 3 週齢の特に、ワクチン接種した。製造業者の指示にしたがって、鉱油 Montanide IMS 251 C (フランスの SEPPIC から入手可能) のナノエマルジョンを用いて、試験 1 で使用される PCV2-Mhyo 抗原を用いて製剤化した単一用量の 0.2 ml ワクチンを、1~3 群の子ブタにワクチン接種した。1 群のワクチンは、他の群と比較して半用量の Mhyo 抗原 (0.5 PCVU/用量) を含んでいた。ワクチン接種前に、凍結乾燥したローソニアバクテリア (約  $10^8$  個細胞の用量) を 3 群のワクチンに添加した。4 群の子ブタに、単一用量の Porcilis (登録商標) Mhyo ID Once (0.2 ml) をワクチン接種した。全ての子ブタに首の右側に皮内ワクチン接種した。5 群の子ブタにはワクチン接種しなかった (陰性対照群)。以下に、異なる群を示す：

30

1 群：PCV/Mhyo、0.5 PCVU Mhyo、Montanide

2 群：PCV/Mhyo、1 PCVU Mhyo、Montanide

3 群：PCV/Mhyo、1 PCVU Mhyo + ローソニア、Montanide

4 群：Porcilis (登録商標) Mhyo ID ONCE、陽性対照

5 群：ワクチン接種なし、陰性対照。

40

## 【 0 0 6 1 】

試験日 (SD) 35 日に、全ての動物を、毒性 Mhyo 株 10 ml で連続 2 日間気管内曝露感染させた。SD 59 又は 60 に、全ての動物を剖検した。

## 【 0 0 6 2 】

全ての子ブタを臨床徴候についてワクチン接種後に毎日観察した。体温並びに局所反応を監視した。ワクチン接種日に開始してワクチン接種 26 日後まで又は局所反応が解消するまで、2 日ごとに触診によって後者を監視した。ワクチン接種日並びに SD 22、29 及び 35 に、全ての動物から血清試料を採取した。PCV2、Mhyo 及びローソニア (3 群及び 5 群のみ) に対する抗体について試料を試験し、互いに比較した。剖検時に、Mhyo 特異的肺病変を採点した。

50

## 【 0 0 6 3 】

## 結果

実験の開始時に、全ての動物が健康であることが分かった。

## 【 0 0 6 4 】

ワクチン接種時（S D 0）には、全ての群が同等の平均直腸温度を有していた。ワクチン接種4時間後で、全ての処理群について平均直腸温度のごくわずかな上昇が観察された（平均上昇は0.4～0.6）。1匹の動物について1.8の最大温度上昇が2群で観察された。これらの温度上昇は、ブタワクチンに許容される。

## 【 0 0 6 5 】

ワクチン接種群では、動物のほとんどが局所反応を有していたが（子ブタの80～100%）、陽性対照を含む全てのワクチン接種群について、平均サイズは小さい、すなわち2cmであった。局所反応を有し、最も小さい平均サイズを有する動物の最も低い百分率は2群で見られ、すなわち、それぞれ80%及び1.8cmであった。これらの数字は、実際に使用が許可されたワクチンで許容される。

## 【 0 0 6 6 】

P C V血清学に関しては、ワクチン接種時（S D 0）には、全ての動物がP C V 2 I g M抗体に関して陰性であった。ワクチン接種後、試験群1、2及び3の間で平均P C V 2 総I g 抗体応答の明らかな差異を観察することはできなかった。ワクチン接種3週間後、P C V 2 I g M陽性動物の割合は、1～3群で93%であり、対照については0%であった。このことは、混合ワクチンが抗O R F 2抗体価を活発に誘導することができたことを示している。

## 【 0 0 6 7 】

M h y oに関しては、実験開始時、子ブタのいずれもM h y oに対する抗体について陽性ではなかった。ワクチン接種4週間後（S D 3 0）、試験群1、2及び3において、動物の93～100%がM h y o陽性であった。陽性対照群では、これは40%であった。肺病変スコアは、表2で以下に示されるように、M h y o感染症に対する優れた有効性を確認した。

## 【 0 0 6 8 】

ローソニア血清学に関して、試験開始時には3群及び5群の全ての動物が、ローソニアに対する抗体について陰性であった。試験の過程で、L F Dワクチン接種群における陽性動物の割合は、S D 3 0で60%から試験終了時に100%まで増加した。対照群の動物のいずれにも、試験終了までローソニア血清学的応答はなかった。

## 【表2】

表2:中央肺病変スコア及び低スコア(<5%病変)を有する動物の%

群	中央	< 5%
1. PCV/Mhyo, 0.5 PCVU Mhyo, Montanide	1.2	80%
2. PCV/Mhyo, 1 PCVU Mhyo, Montanide	1.6	80%
3. PCV/Mhyo, 1 PCVU Mhyo +ローソニア, Montanide	1.6	72%
4. Porcilis (登録商標)M Hyo ID ONCE、陽性対照	0	85%
5. ワクチン接種なし、陰性対照	10.3	20%

## 【 0 0 6 9 】

## 試験4

## 目的

第4の試験の目的は、試験3に記載されるナノエマルジョンアジュバントを使用して、弱毒生P R R Sウイルスを添加して三種混合ワクチンに到達したP C V 2 / M h y o混合ワクチンの有効性及び安全性を評価することであった。抗O R F 2血清学を評価することによって、P C V 2による感染に対する防御有効性を評価した。マイコプラズマ・ハイオ

ニューモニエによる感染に対する有効性を、血清学的応答を商業的に入手可能なMhyo ワクチンPorcilis (登録商標) Mhyo (MSD Animal Health、Boxmeer、オランダ) のそれと比較することによって評価した。PRRSウイルスによる感染に対する有効性は、ワクチン接種4週間後の病原性PRRS株での曝露時のPRRSウイルス血症を評価することによって評価される。

#### 【0070】

##### 実験設計

この試験では10匹の雌ブタの子孫が利用可能であった。合計40匹の動物をそれぞれ10匹の子ブタからなる4つの群に割り当てた。全て動物を、約4週齢の時に、動物施設に移した。1~4群に、首の右側にIDAL (登録商標) ワクチン接種装置を用いて皮内ワクチン接種した。1群及び2群それぞれに、生PRRSウイルスワクチン (Porcilis PRRS) を再構成し、さらにMhyoバクテリン (商業的に入手可能な製品Porcilis (登録商標) Mhyoと同じ抗原) を含むORF2タンパク質ベースのPCV2ワクチンを受けさせた。1群のワクチンは、3%卵アルブミンを添加したフランスのSEPPICから入手可能なMontanide IMS 251に基づいていた。2群のワクチンは同じアジュバントを含んでいたが、卵アルブミンは添加しなかった。各ワクチンは、9µg/用量のORF2タンパク質、及び商業的に入手可能なワクチンPorcilis (登録商標) Mhyo ID ONCE中のMhyo抗原の濃度の1~2倍のMhyo抗原を含んでいた。PRRSワクチンは凍結乾燥ワクチンであり、投与直前に適切なPCV2ワクチン又は希釈剤を用いて200µlの1用量当たり $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>のウイルスを含むように再構成した。3群はPRRSワクチンのみを受け、4群は未ワクチン接種のままであり対照として役立った。全ての子ブタを臨床徴候について毎日観察した。これらの動物に、約8週齢 (28日目) の時に、病原性PRRSウイルス (I型) を曝露感染させた。曝露材料は、2ml中 (計算用量)  $5.3 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>のウイルスを含んでいた。材料を、鼻孔1つ当たり1ml、鼻腔内投与した。観察期間の終了時 (曝露21日後に相当するワクチン接種49日後) に、全てのブタを屠殺した。0日目、14日目、28日目 (曝露直前)、31日目、35日目、38日目、42日目及び49日目に、血液試料 (頸静脈を介して) を全ての動物から個別に採取し、PRRSV、PCV2及びMhyoに対する抗体についてPRRSウイルスの存在について試験した。

#### 【0071】

##### 結果

いずれの動物もワクチン接種による臨床徴候を示さず、直腸温度は対照から1.5以内のままであった。したがって、ワクチンは安全とみなされる。

#### 【0072】

Mhyoに関しては、混合ワクチンの血清学的応答は、商業的に入手可能なワクチンPorcilis Mhyo (図に数値的結果は示されていない) で得られるものに匹敵するようである。したがって、ワクチンは、Mhyoによる感染から保護すると推定される。

#### 【0073】

PCV2血清学的応答の結果を図1に示す。2つの混合ワクチンは陽性抗ORF2抗体応答を誘導するようであり、これはワクチンが野生型PCV2による感染に対する防御を誘導することを意味する。

#### 【0074】

PRRS血清学的応答の結果を図2に示す。商業的に入手可能なPRRSワクチンと同様に、2つの混合ワクチンは、曝露前に陽性抗PRRS抗体応答を誘導するようである。これは、ワクチンがPRRSウイルス感染に対する防御を提供することの指標である。図3に、ウイルス血症データを示す。ウイルス血症レベルが、各時点で陽性対照動物 (4群) のレベルよりも低いので、3種全てのワクチンがPRRSウイルス感染に対する防御を提供すると思われる。

## 【 0 0 7 5 】

## 試験 5

第 5 の試験の目的は、試験 3 に記載されるナノエマルジョンアジュバントと比較した場合の、代替ナノエマルジョンアジュバントを使用する P C V 2 / M h y o 混合ワクチンの有効性及び安全性を評価することであった。P C V 2 に関して、有効性を、抗 O R F 2 血清学を評価することによって評価した。マイコプラズマ・ハイオニューモニエに関して、有効性を、血清学的応答を商業的に入手可能な M h y o ワクチン P o r c i l i s (登録商標) M H y o I D O N C E (M S D A n i m a l H e a l t h、B o x m e e r、オランダ) のそれと比較することによって評価した。

## 【 0 0 7 6 】

実験設計は、上に記載されるのとほぼ同じであった。特に、合計 5 0 匹の子ブタを 5 つの処理群：それぞれ 1 0 匹の子ブタからなる 5 つの群に割り当てた。子ブタに、約 3 週齢の特に、皮内ワクチン接種した。

## 【 0 0 7 7 】

1 ~ 3 群の子ブタに、試験 3 で使用される P C V 2 - M h y o 抗原及び水中鉱油ナノエマルジョン (エマルジョンが実際はナノエマルジョンであるという事実は顕微鏡的に確立された) に基づく 3 種類のアジュバントを用いて製剤化した単一用量のワクチン ( 0 . 2 m l ) をワクチン接種した。第 1 のアジュバント ( 1 群が受けた ) は、A m p h i g e n (登録商標) 様ナノエマルジョンとして、すなわち、A m p h i g e n (登録商標) ( Z o e t i s から入手可能 ) と同じアジュバントエマルジョンであるが、アジュバントを顕微溶液化に供することによってナノエマルジョンとしての鉱油を含むアジュバントエマルジョンとして製剤化した。第 2 のアジュバント ( 2 群が受けた ) は、酢酸ビタミン E を商業的に入手可能なアジュバントに添加し、顕微溶液化によってナノエマルジョンになるようアジュバントを乳化することによって作製した、M e t a s t i m (登録商標) ( B o e h r i n g e r I n g e l h e i m ) 様アジュバントとして製剤化した。第 3 のアジュバント ( 3 群が受けた ) は、酢酸ビタミン E を添加し、エマルジョンを得る方法が異なる、すなわち、純粋な油 / 界面活性剤中間体 (すなわち、ワクチンを製剤化するために油性濃縮物を使用する) の代わりに、水性中間体エマルジョン (すなわち、ワクチンを製剤化するために水性濃縮物を使用する) を介するという事実を別にすれば、実施例 3 で使用される I M S 2 5 1 に似ていた。4 群の子ブタには P o r c i l i s M H y o I D O N C E をワクチン接種した。5 群の子ブタにはワクチン接種しなかった。

## 【 0 0 7 8 】

結果は、代替の水中鉱油ナノエマルジョンに基づく 3 つの実験ワクチンが完全に安全であることを示し：ワクチン接種後に、体温の上昇は認められず、平均局所反応は商業的ワクチン P o r c i l i s M H y o I D O N C E で観察される平均局所反応より小さいか又はこれと同等であった。P C V 2 血清学は、混合 P C V 2 / M h y o ワクチン ( 1 ~ 3 群 ) を受けた 3 つの群全てにおいて、ワクチン接種により抗 O R F 2 力価が増加したのに対し、4 群及び 5 群では、同じ期間に連続減少が見られた。M h y o に関して、全ての動物 ( 1 ~ 5 群 ) に曝露した。曝露後の陽性動物の割合は、1 ~ 3 群で 9 0 ~ 1 0 0 % であり、陽性対照群 4 (商業的に入手可能な M H y o ワクチンを受けた) と同じであった。陰性対照群 5 では、抗体陽性動物の割合が 0 % であった。



【図 1】

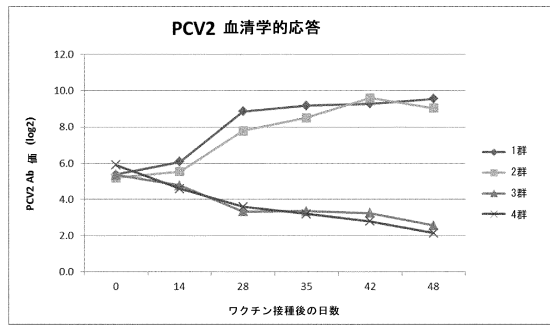


FIGURE 1

【図 2】

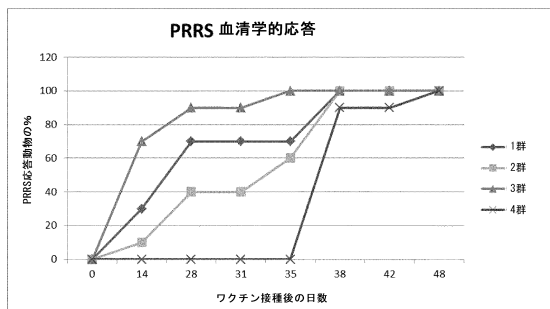


FIGURE 2

【図 3】

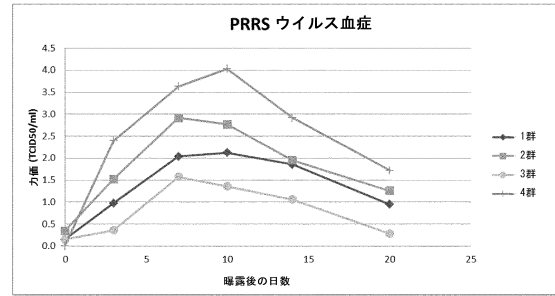


FIGURE 3

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 K 39/295 (2006.01) A 6 1 K 39/295

(74)代理人 100137213  
 弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823  
 弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448  
 弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519  
 弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483  
 弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035  
 弁理士 五味渕 琢也

(74)代理人 100185959  
 弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749  
 弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255  
 弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267  
 弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318  
 弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812  
 弁理士 城山 康文

(72)発明者 スノ, メラニエ  
 オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5

(72)発明者 ウィトフリート, マールテン・ヘンドリック  
 オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5

(72)発明者 ファヒンガー, ヴィッキー  
 オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 特表2014-526471(JP, A)  
 国際公開第2015/082457(WO, A1)  
 特表2015-512450(JP, A)  
 米国特許第6299884(US, B1)  
 Trials in Vaccinology, 2016年 1月21日, Vol.5, pp.24-31

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4  
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )