

**厚生省
平成10年度**

**平成10年度厚生科学研究費補助金
(厚生科学特別研究事業)**

研究報告書

**新型H5インフルエンザワクチン製造株の
開発・前臨床試験・抗原量測定に関する研究**

平成11年3月

主任研究者 田代真人
(国立感染症研究所ウィルス製剤部)

新型H5インフルエンザワクチン製造株の開発・前臨床試験・抗原量測定に関する研究

平成10年度 研究組織

主任研究者

田代 真人 国立感染症研究所 ウイルス製剤部 部長

分担研究者

板村 繁之 国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官

西村 秀一 国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官

堀内 清 千葉県血清研究所 副所長

協力研究者

榎並 正芳 金沢大学医学部 助教授

喜田 宏 北海道大学大学院 教授

細菌製剤協会

三菱安全科学研究所

目 次

1.総括研究報告書

新型H5インフルエンザワクチン製造株の
開発・前臨床試験・抗原量測定に関する研究

主任研究者 田代 真人 1-14 頁

厚生科学研究費補助金（厚生特別研究事業）

総括研究報告書

新型H5インフルエンザワクチン製造株の開発・前臨床試験・抗原量測定
に関する研究

主任研究者 田代 真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部長

1997年に香港で出現し、18名の確定患者と6名の死亡例を出したトリ強毒株であるH5N1型トリインフルエンザウイルスに対するワクチン開発を進めた。ワクチン製造株としては、安全性および製造効率の上から弱毒型のウイルスが必要であるので、リバーシ・ジェネティクスを用いた遺伝子組換え技術により、HA遺伝子のプロテアーゼ解裂部位に変異を導入し、弱毒型の変異ウイルスの回収に成功した。このウイルスの病原性、抗原性について元の強毒株と比較した結果、ニワトリおよびマウスに対しては十分に弱毒化されており、また元のウイルスの抗原性を保持していることが確認された。

外来性のウイルスの迷入等は否定され、増殖性、安全性等でもワクチン製造株としての適格性を持つことが明らかにされた。

このワクチン候補株を用いて、現行製造方法に準じてHAワクチンおよび全粒子ワクチンである試作ワクチンを製造した。その抗原解析を行うとともに、免疫原性およびマウスとニワトリに対する感染防御免疫誘導能を検討し、従来のワクチンと同等の性状を持つことを確認した。さらに、生物製剤基準に準じた検定検査を行い、すべての項目において満足の行く結果を得た。更に、マウス、ラット、ウサギ等の動物を用いた前臨床試験による安全性の確認試験を進めている。

分担研究者

板村 繁之 国立感染症研究所ウイルス
第1部呼吸器系ウイルス室主任研究官
西村 秀一 国立感染症研究所ウイルス
第1部呼吸器系ウイルス室主任研究官
堀内 清 千葉県血清研究所副所長
財団法人細菌製剤協会理事

協力研究者

榎並 正芳 金沢大学医学部
第1生化学講座助教授

喜田 宏 北海道大学大学院
獣医微生物学教授

財団法人細菌製剤協会
三菱安全科学研究所

A. 研究の背景および目的

1. 香港におけるH5型インフルエンザの
出現とワクチンの必要性

A型インフルエンザウイルスには現在の
ところ15種類のHA亜型が見つかってお

り、これが様々な鳥類に分布しているが、過去100年間にヒトの間で流行を起こしたものは、H1、H2及びH3の3種類の亜型のみであった。A型インフルエンザは数十年に1度の割合で、これまで流行をしていなかった亜型のウイルスがヒトの世界に登場する。この場合に、殆どのヒトはこの新型ウイルスに対して全く免疫を持たないので、多くのヒトが感染を受け、世界的な大流行となる。

平成9年に香港において、H5N1型の強毒株トリインフルエンザウイルスによる流行があり、18名の患者と6名の死亡例が報告された。この新型ウイルスはニワトリに全身感染を起こす強毒株であり、もしヒトの間で感染伝播が起これば、かつて人類が経験をしたことのない大きな健康被害と社会的混乱を引き起こすことが危惧された。今回の香港におけるH5型ウイルスの流行は、平成9年12月末に、感染源であるニワトリを全て殺処分することで一応終息を見ている。しかし、ウイルスの起源や感染経路は依然不明であるので、同じウイルスが再出現する可能性は消えておらず、引き続き流行動向に対する監視を強化すると共に、有効且つ安全なワクチンの製造候補株を開発準備しておく必要性は消えていない。

2. H5ウイルスに対するワクチン開発の問題点

新型インフルエンザ対策の中心課題は、有効なワクチンを大量且つ可及的速やかに生産し、多くのヒトに広く接種して、被害を最小に止めることにある。従って、今回の新型ウイルスに対しても、安全なワクチンの開発を各国が協力して進め、ワクチン株を準備しておくことが、平成9年12月にWHOを中心とした電話会議で合意され、

WHOからも勧告された。特に今回のウイルスはヒトが過去に経験したことのない強毒株であるために、通常の新型ウイルスに対するワクチンの開発の問題に加えて、生産過程における製造従事者に対する安全確保、万一外部環境へ漏出した場合の安全性の確保やワクチン生産のためにウイルスを接種した発育鶏卵が死んでしまうことによる生産効率の低下などの問題を解決する必要がある。更に、今回のウイルスがトリのウイルスであったために、これを材料としたワクチンの安全性に対する問題点、また一部で遺伝子組換え操作を行ったために、組換え医薬品としての検討等についても解決を計らねばならなかった。いずれにしてもこれらの問題は、従来の新型インフルエンザ出現の際には経験されなかったことであり、今後のワクチン開発に多くの教訓を残している。

3. H5インフルエンザワクチンの開発方針

新型インフルエンザに対するワクチンとしては、DNAワクチンや遺伝子組換え蛋白などの利用が技術的には短時間で大量に生産出来る利点がある。しかし、これらの新規ワクチンは未だ実験段階であり、ワクチンとしての有効性、安全性に関しては殆ど未知である。この様な製剤の実用化にはまだまだ距離があり、現段階での緊急時に選択すべき優先度は低いと判断された。そこで、発育鶏卵漿尿膜腔にウイルスを接種して大量に増殖させ、このウイルスを精製して、エーテル処理により分解する現行のHAワクチン製造技術に基づいたワクチン生産を選択するのが、実績、安全面等から現実的には一番妥当であると判断された。

しかし、香港で分離された強毒型のH5N1型インフルエンザウイルスを材料とし

て、これを発育鶏卵に接種して増殖させ、従来の方法で不活化ワクチンを作製することは、上記の理由により、安全性の面および効率の面から採用できない。安全面のみを考慮するならば、病原対に対する物理的封じ込めレベルP3のワクチン生産施設で強毒株ウイルスの増殖を行えば、ある程度問題の解決が可能であるが、わが国におけるインフルエンザワクチン生産設備は、到底この安全基準を満足してはいない。そこで、万一、ワクチン生産従事者に感染しても重篤な全身感染を起こす危険性を減らし、環境へ漏れ出ても被害を最少に止め、また発育鶏卵で効率よくウイルスが増殖できるようにするためには、H5型の弱毒株ウイルスをワクチン生産株に用いる必要がある。この際に、NAの抗原性も同一であることが最良ではあるが、NAは感染防御抗原としてはHAに比べて重要性が低いので、必ずしもN1である必要は無いと判断された。

4. トリインフルエンザウイルスの病原性決定機構

トリのインフルエンザウイルスには、ニワトリ、七面鳥、鳩、ウズラ等において気道及び腸管上皮に限局した局所感染を起こして殆ど不顕性感染に留まる弱毒型ウイルスと、全身感染を起こして、トリペストと呼ばれる全身出血や脳炎症状を呈して致死性的転帰をもたらす強毒株が存在する。現在のところ、このような強毒株はH5とH7の2つの亜型にのみ認められている。ニワトリに対して強毒株であっても、カモ、アヒル、ガチョウ等には不顕性感染であり、その理由はわかっていない。全身感染か局所感染かという宿主特異性を決定する要因としては、ウイルス粒子表面に存在するHA蛋白の細胞表面に存在するレセプターに対する認識の違いが想定されるが、強毒株と

弱毒株の間にはレセプター認識域に差異は認められておらず、レセプターが病原性を規定しているわけではない。

インフルエンザウイルスが感染性を獲得するためには、ウイルス表面のHA糖蛋白がプロテアーゼによって特定の部位で解裂して、HA1とHA2というサブユニット構造になり、膜融合活性を発現できるようになる必要がある。従って、HAを解裂出来る適当なプロテアーゼが存在する組織では、ウイルスは感染性を獲得して多段増殖を繰り返し、感染巣を拡大して病原性を発現できる。一方、ウイルス活性化プロテアーゼが存在しない組織では、仔ウイルスは感染性を獲得できず、ウイルス増殖は中断してしまい、病原性を発現できない。

強毒株と弱毒株ウイルスの性状を比較した結果、HA分子の解裂部位の構造に違いがあり、これが病原性の違いを規定する第1の要因であることが証明されている。弱毒型ウイルスのHAでは、解裂部位は単一のアルギニン残基で構成されているが、強毒株ではアルギニン、リジンという塩基性アミノ酸が多数連続した構造を持っている。これまでヒトの間で流行してきたウイルスは全て弱毒型の構造である。単一アルギニン残基を解裂するプロテアーゼは、気道、消化管などの限られた臓器でのみ分泌されているので、ウイルスの解裂活性化はこのような臓器でのみ起こる。従って、弱毒株はこれらの臓器の局所感染に留まる。一方、多数の塩基性アミノ酸の連続構造は、全ての細胞に普遍的に分布している細胞内のプロテアーゼに対して感受性を持つので、全ての臓器で感染性ウイルスが産生されることとなり、その結果全身感染を起こすことが出来る。このように、インフルエンザウイルスの臓器特異性と病原性は、HA蛋白の解裂部位の構造の違いというウイルス側

の要因と、それぞれのHAを解裂するプロテアーゼの生体内分布の違いという宿主側要因との組み合わせによって主に規定されている。

B. 研究方法および研究結果

1. 弱毒型H5ウイルスを用いたワクチン開発戦略

強毒型ウイルスに対するワクチンを生産するためには、弱毒型ウイルスを用いる必要があるが、上記の病原性規定機序を考慮するとは、大きく2つの戦略が考えられた。

第1の方法は、過去にトリから分離された弱毒型H5ウイルスの中から、今回の香港H5型ウイルスと抗原的に類似のものを探し出し、これを用いてワクチンとする戦略である。A/カモ/シンガポール/F119-3/97 (H5N3) 株が抗原的に香港のウイルスと近いことがわかり、このウイルスを用いたワクチンの開発がイギリスにおいて進められている。最近、北海道大学獣医学部の喜田教授らとの共同研究により、国内に保存されているトリ弱毒型H5ウイルスを調べた結果、A/カモ/香港/698/79 (H5N3) とA/カモ/北海道/67/96 (H5N4) が抗原的に香港のウイルスと近縁であることがわかった。現在これをワクチンに応用するべく検討を進めている。

この方法では、抗原的に同じウイルスが見つからない場合にはワクチン開発が出来ないので、確実に新型ウイルスに対するワクチンを作るためには問題がある。しかし、適当なウイルスさえ見つければ、その後の作業は比較的容易で、短時間にワクチンを開発することが期待できるので、将来の新型インフルエンザ対策としては、数多くのトリの弱毒型ウイルスを採取してライブラリーとして保存しておく必要がある。

第2の方法は、遺伝子組み換え操作を用

いて、強毒型ウイルスを弱毒型に改変することである。まず強毒型ウイルスからHA蛋白をコードする遺伝子RNAを取り出し、RT-PCR法で相補的なcDNAを作製する。これに試験管内突然変異技術によって、解裂部位に相当する塩基配列に改変を加え、弱毒型の解裂部位の構造に変える。この遺伝子組換え技術で改変した弱毒型HA遺伝子DNAを再びRNAに転写し、核蛋白NP等を結合させて複製・転写活性を持つRNPを作製する。次に、HA遺伝子のみを除いたヘルパーウイルスを感染させた細胞に、このHA遺伝子のRNPをトランスフェクトして、感染性のウイルスとして回収する。このようなりバース・ジェネティクス技術を応用して、弱毒ウイルスを作製し、これをワクチン製造用に用いる戦略である。我々は、日本人が開発・改良したこの技術を駆使して、新型ウイルスに対するワクチン開発を進める方針を決定した。

2. H5インフルエンザウイルスの抗原性
香港において16人の患者から16株のH5N1ウイルスが分離された。これらのウイルスの遺伝子の塩基配列の解析から、このウイルスの遺伝子分節は全てトリのウイルス由来であり、同時期に香港のニワトリの間で流行したウイルスと同じであることが解明されている。しかし、これらのウイルスの抗原性を調べたところ、抗原性を異にする2種類のH5N1ウイルス「A/香港/156/97 (H5N1) とA/香港/483/97 (H5N1)」が同時に流行していたことが示唆されており、どちらの株をワクチンとして選択すべきかが問題となった。そこで、両者に対するワクチンを開発することとした。両株ともHAの解裂部位のアミノ酸配列は共通であり、技術的には同じ方法を用いることが可能である。

3. リバース・ジェネティクスを利用した H5N1 インフルエンザウイルスの弱毒化

香港で分離された強毒株ウイルス HA 蛋白の解裂部位は P Q R E R R R K K R / G であったので、これから 4 アミノ酸を除去し、更に解裂部位の構造をトリの弱毒株に共通な配列 P Q - - - R E T R / G に改変した。この変異弱毒型 HA 遺伝子をもつウイルスを回収する際に用いるヘルパーウイルスとしては、ヒト由来のウイルスを用いるとヒトに対して感染性が出現してしまう可能性が考えられるので、トリ由来のウイルスをヘルパーとして用いてトリ型を保持させて、ヒトへの感染の危険を減らす方針で作業を進めた。ヘルパーウイルスは、ヒト H3 香港型ウイルスに対する抗体で簡単に選択出来ることを考慮して、A/カモ/香港/836/80 (H3N1) を用い、NA の亜型を元のウイルスと一致させた。実際の作業は、HA 遺伝子 cDNA のクローニング、変異 DNA 作製は感染研で行い、感染性ウイルスの回収は金沢大学医学部の榎並正芳博士がおこなった。またヘルパーウイルスの増殖は北海道大学獣医学部の喜田博教授のもとで行われた。

その結果、MDC K 細胞における多段増殖に外来性のトリプシンを必要とするウイルスが回収された。

3. 弱毒化 H5 ウイルスの抗原性と弱毒性の確認

回収されたウイルス HK/9-1-1 の抗原性を調べたところ、ヘルパーに用いた H3 ウイルスに対する抗体では中和されなかったが、抗 H5 抗体で完全に中和されたことから、目的としたウイルスが回収されたことが確認された。HI 試験で抗原解析を行った結果、香港 H5 ウイルスの両株に対する

抗体の何れとも反応した。現在、回収されたウイルスに対する免疫血清を作製中であり、免疫原性を検討する予定である。

弱毒化の指標としては、HA の解裂活性化にトリプシンが必要であること、組織培養細胞においてトリプシン非存在下では多段増殖をしないこと、マウスに経鼻感染させても全身感染を起こさないことを確認している。また、発育鶏卵の漿尿膜腔に接種した場合に、元のウイルスが早期に胎児を殺してしまうのに対して、胎児を殺さずにウイルス増殖が可能であった。以上から、ほぼ確実に弱毒化されたウイルスであると考えられた。

更に、ニワトリ及びマウスに対する病原性の検討を行った結果、このウイルスはいずれの動物においても、全身感染を起こすことはなく、弱毒型であることが確認された。

4. ワクチン製造株としての安全性に関する問題点の検討

今回作製したワクチン候補株から生産したワクチンは、トリのウイルス由来の蛋白・RNA を含むものであり、これらをヒトに接種した経験が無いので、その安全性に関しては不明である。また、遺伝子組み換え操作を行った変異ウイルスを利用しており、遺伝子組み換え医薬品としての検討が必要かもしれない。更に、MDC K 細胞 (イヌ腎由来株価細胞) を用いて分離・継代されたウイルスであり、MDC K 細胞由来の外来性ウイルスの迷入を否定する必要がある。

そこで、麻疹生ワクチン等の検定で行われている RT 試験、Rif 試験、迷入ウイルス否定試験を行った結果、今回回収したワクチン株には、外来性のウイルスの迷入は無いものと判断された。

5. 試作ワクチンの試験製造とその解析

今回作製したワクチン候補株について、細菌製剤協会に依頼して、通常のワクチン製造ラインに則って、試作ワクチンを製造した。これは今後の臨床応用を考慮して、GMPに適合した施設で、安全性を十分に配慮して行なわれた。この際に、従業員に対する健康管理については、十分に考慮を払い、また作業前後における血清抗体その他の血液検査、健康診断を行った結果、作業中に感染をうけた可能性はなかった。

発育鶏卵2万個にワクチン製造株を接種して増殖させ、現行のHAワクチンと同じ方法で試験ワクチンを製造した。

尿膜腔液192リットル(320HAU/ml, 21CCA)を出発材料として、精製し、エーテル処理によるHAワクチンを約1.0リットル(蛋白窒素含量14ug/mL, 724CCA/ml相当量)および全粒子ワクチンを約0.5リットル作製した。

生産した試験ワクチンは、トリのウイルス由来の蛋白・RNAを含むものであり、これらをヒトに接種した経験が無いので、その安全性に関しては不明である。また、遺伝子組み換え操作を行った変異ウイルスを利用しており、遺伝子組み換え医薬品としての検討が必要である。更に、MDC K細胞(イヌ腎由来株価細胞)を用いて分離・継代されたウイルスであり、MDC K細胞由来の外来性ウイルスの迷入を否定する必要がある。麻疹生ワクチン等の検定で行われているRT試験、Rif試験、迷入ウイルス否定試験を行い、すべてにおいて問題がないことを確認した。

また、通常のワクチンの品質管理に関する検定を行ったところ、HAワクチンおよび全粒子ワクチンのいずれについても、分画試験、無菌試験、発熱試験、マウス白血

球数減少試験、蛋白窒素含量測定、チメロサル含量測定、ホルムアルデヒド含量測定、マウス体重減少試験、力価試験を実施し、すべての項目において合格と判定された。

6. 試作ワクチンの前臨床試験の実施

試作ワクチンについて、1)ラットを用いる単回投与毒性試験、2)ラットを用いる4週間反復投与毒性試験、3)ラットおよびウサギを用いる胚・胎児発生への影響への試験、4)ウサギを用いる局所刺激性試験、5)変異原性試験(Ames試験、染色体異常試験および小核試験)を実施中であり、平成11年6月には試験成績が揃う予定である。

C. 考察

以上の成績が出そろった段階で、ワクチン製造メーカーに、ワクチン候補株としての改良と試験ワクチンの製造を依頼する。また、一部を米国CDCに送付し、安全性に関して試験をしてもらうことになっている。試験ワクチンについては、抗原性、免疫原性、安全性等の成績および前臨床試験の成績を基に、再び中央薬事審議会において第1相臨床試験に供すべきか否かを検討する予定である。1976年の米国におけるH1プタインフルエンザワクチン接種後のギラン・バレー症候群の発生を考慮して、第1相臨床試験は1000人規模で6ヶ月程度の観察が必要であると考えられる。第1相試験終了時をもって、ワクチン生産株として感染研で凍結保存し、必要に応じてワクチン製造メーカーに供給することになろう。

今回のH5N1インフルエンザワクチン開発に関しては、予め準備が整っておらず、全体的な開発研究体制、P3実験室を初め

とする研究施設、発育鶏卵等の材料の入手・供給体制、正月休みに重なったことによる危機管理体制の問題等、様々な予期せぬ事態の連続であった。しかし、感染研全体の主題として、多くの研究部門に亘って幅広い協力が得られ、能率良く作業が進展した。また、金沢大学、北海道大学との協力関係における緊密な連絡等は、普段からの意志の疎通と情報交換の実績に裏打ちされたものである。また、開発方針に則って様々な問題の解決が必要であったが、組み換えDNA実験の承認、動物実験、病原体移動、病原体取扱い等の手続きの問題、開発研究費用、安全性の評価、全臨床試験、臨床試験、ワクチン製造メーカーとの折衝、薬事審議会での承認審査、特許問題、マスメディア対応等に関して、厚生科学課、結核感染症課、血液対策課、審査課等との緊密な連絡を保つことが出来、多くの有益な意見交換と助言をもらうとともに、問題解決が積極的に進められたことは、今後の計画を立案する上で、非常に役に立ったと総括できよう。

また、今回検討の対象となった新型インフルエンザワクチン開発の戦略を批判的に見直し、より効率の良いものに改良を重ねていく努力が必要である。特に、弱毒型ウイルスのライブラリーを作製・準備するとともに、普段からHAの抗原解析、遺伝子解析、DNAライブラリー作製、組み換えウイルス作製等の準備を整えて、どのような新型ウイルスにも速やかに対応できるようにしておくことが現実的な課題である。

更に、新型ウイルスワクチンの開発に関する技術的、組織的な充実と並んで、臨床試験、安全管理、大量生産体制、品質管理、分配供給体制、接種体制、費用負担、副反応救済、海外への供給などの国際協力、マスメディア対応などの多くの問題を早急に

解決しておくことが必要である。

D. 参考資料

平成10年9月13日付けの国立感染症研究所長による見解

1) H5N1型インフルエンザワクチン候補株の開発の経緯

国立感染症研究所においては、平成9年12月にWHOから出された勧告に従って、平成9年11-12月に香港で発生したH5N1型インフルエンザに対するワクチン株の開発を、健康危機管理上優先度の高いものとして捉え、WHO、内外研究機関、厚生省の協力の下に、全所的に進めてきた。

12月8日に感染研呼吸器系ウイルス室長から、WHOインフルエンザ協力センター長名で細菌製剤協会に対して、香港で発生したH5N1型インフルエンザウイルスに対するワクチン製造株を作製する必要があるため、希望するワクチンメーカーには香港でのヒト分離株を分与するとの通知が出された。これに対して、ワクチンメーカーから感染研所長に対して問い合わせがあり、所内で検討した結果、生産効率および製造過程における安全確保の観点から、今回の通知は不適切であり撤回することとなった。12月15日に、所長から細菌製剤協会に対して、12月8日の通知の撤回と陳謝がなされた。

12月12日に厚生省厚生科学課が、香港H5N1型インフルエンザに対する国内対応として、新型インフルエンザに対するワクチン開発の検討を開始したと発表した。

WHOのワクチン製造株開発に関する勧告に基づいて、平成9年12月11日にWHOワクチン開発電話会議、12月16日に厚生省におけるワクチン開発説明会、12月22日に国

立感染研のワクチン開発技術検討会が開催され、H5N1型インフルエンザワクチンの開発方針が検討された。

平成9年12月11日のWHOワクチン開発電話会議（感染研田代ウイルス第1部長が対応）では、当時米国では組換えDNA技術により赤血球凝集素（HA）を大量に発現させた組換えHAワクチンを試作中であつたが、世界中で広くワクチンを製造・接種するには、発育鶏卵で増殖させたウイルスを不活化する現行の不活化ワクチンの製造が優先されるとの基本方針が選択され、この目的に沿ったワクチン製造株の開発が図られることになった。

また、香港の患者から分離されたH5N1型インフルエンザウイルスは、ニワトリ、ニワトリ胎児やマウスに致死的な全身感染を起こす強毒型ウイルスであり、P3+レベルのバイオセフティー施設での取り扱いが必要とされている。従って、本ウイルスをそのままワクチン製造株として用いることは、ニワトリ胎児が早期に死亡するために生産効率が悪く、更にワクチン製造工程における従業員に対する安全確保、環境への安全確保の面からも危険であると判断された。そこで、弱毒型ウイルスをワクチン製造株として開発する必要性が指摘された。その方法としては、

(1) 過去に分離された弱毒型のトリH5型ウイルスの中から、今回のH5N1型ウイルスと抗原性が類似したウイルス株を探索・選択して用いる方法

(2) 今回のヒトから分離された強毒型ウイルスに遺伝子操作を加えて弱毒型に改変するリバーズジェネティクス法の2つが提案された。

WHO電話会議では、なるべく多くのワクチン候補株を開発して選択肢の幅を拡げておく必要があるが、技術面での現状・限

界等から、英国では(1)を、米国と日本では主に(2)を分担することとし、互いに協力しながら進めること、開発されたワクチン候補株の中からその時の状況に応じて最適のものをWHO推奨ワクチン株とし、これを世界全体で共有することが同意された。

12月16日に血液対策課主催による厚生省関連各課、感染研、ワクチンメーカーとの間の話し合いがもたれ、前日に行なわれた12月8日文書の撤回が確認され、WHOの勧告内容および電話会談での基本方針が了承された。また、技術面およびバイオセフティー上の理由から、H5N1型ワクチン株の開発は感染研が行い、弱毒型ワクチン株が開発された段階で従来通りに全てのメーカーに分与することが了承され、これに関して細菌製剤協会および各メーカーは全面的に協力することが同意された。

これらの基本方針に基づいて12月22日に開かれた国立感染研のワクチン開発技術検討会では、弱毒型ワクチン株の緊急開発を感染研が行うことが了承された。また、ワクチン候補株の選択肢を拡げておくことが必要であるとの判断から、(1)と(2)の計画を平行して進めることを決定した。更に、香港におけるヒト分離ウイルス株には、抗原性が若干異なる2系統（グループ1とグループ2）が存在することが示されていたので、両者に対するワクチン株を同時に開発することになった。また、このワクチン開発計画は、感染研として優先度の高い研究課題であり、所長が中心となって全所的に対応すること、(1)の計画については根路銘呼吸器系ウイルス室長が、(2)については田代ウイルス第1部・ウイルス製剤部長が、それぞれ責任をもって進めることが合意された。

これらの基本方針に関しては、年末から1月初めにかけて厚生科学課、結核感染症

課、血液対策課の担当者にそれぞれ報告・説明して同意と協力の確認を得ている。

更に平成9年12月26日の新型インフルエンザ対策検討会にも報告され、同検討会の提言の中にも参照ワクチン株の緊急開発が盛り込まれた。

これらの方針は、平成10年1月5日に開催された厚生省健康危機管理調整会議でも報告・了承されて、厚生省としての基本方針となったものと理解している。

平成10年1月12-13日に米国ヒューストンで開催された日米医学「急性呼吸器感染症」部会において、米国NIH, CDC, FDA 側との情報交換が行われ、先のWHO電話会談におけるワクチン開発の基本方針が確認され、日本側のワクチン開発方針も了承された。

また、計画(1)については、昨年初頭にシンガポールで分離されたトリ弱毒株ウイルス A/duck/Singapore-Q/F119-3/97(H5N3)が香港で分離されたグループ2のウイルスに抗原的に近縁であり、英国ではこれを用いたワクチン株の開発を進めている。計画(2)については、米国Aviron社が、ヒト由来の生ワクチン株 A/Ann Arbor/2/60(H2N2)をヘルパーウイルスとして弱毒生ワクチンおよびこれを用いた不活化ワクチンの開発を進めている。また、米国NIHが緊急用としてProtein Sciences社に委託して作製したグループ2の組換えHA蛋白ワクチンの第1相臨床試験を計画している、との情報を得た。

1月26日に血液対策課の主催により、厚生省関係各課、感染研、細菌製剤協会、ワクチンメーカーとの話し合いが持たれ、インフルエンザワクチン株の選定経過・選定方法の透明化と合理化を図ること、今後正式に選定委員会等を制度化する方向で合意された。この際に、今回のH5N1型ワクチン開発に関する基本方針と国内外の進捗状況が説明され、今後も逐次情報を公開して

ワクチンメーカーとの協力関係を強めていくことが合意された。

平成10年3月8-11日に米国アトランタで開催された「国際新興再興感染症会議」においてH5N1型インフルエンザワクチン開発の必要性が討議され、確認された。ワクチン開発関係者による非公式検討会（感染研田代ウイルス第1部長出席）で、緊急大量生産の必要性は減ってきているが、ワクチン製造株の準備は速やかに進める必要があること、ワクチン候補株について多くの選択肢を持つために既定の計画を平行して進めること、1976年のブタH1N1型インフルエンザワクチンにおけるギラン・バレー症候群の問題があるので、時間的な余裕がある場合には出来る限り安全性試験をやっておくことが合意された。

平成10年5月13日に米国ベセスダで開催された「H5N1型インフルエンザワクチン開発に関する国際会議」（感染研田代ウイルス製剤部長出席）において、グループ1に対する免疫血清は両グループのウイルスにも反応するのに対して、グループ2に対する免疫血清はグループ1との反応性が弱いことが示された。従って、グループ1のウイルスをワクチン株とすれば、どちらのグループの流行にも対応できることが期待出来るので、グループ1の弱毒型ウイルスの開発を優先させるとの方針が了承された。しかし一方、グループ1とグループ2の抗原性の違いはHA蛋白上の一本の糖鎖の有無に規定されていること、これはウイルスを発育鶏卵で継代することにより容易に互に変化する不安定なものであり、抗原性をグループ1に固定させることは難しいことが示された。

米国においては、P3+施設内で発育鶏卵で増殖させたグループ2の強毒ウイルスから試験ワクチンを製造したこと、バキュロ

ウイルスベクターで発現させた組換えH A ワクチンの開発が報告されたが、いずれも大量生産用には考えていないと説明された。

同会議においては、不活化ワクチン製造用の弱毒株として、その時点までに米国で開発されたグループ1およびグループ2の弱毒化ウイルス4株、日本で開発されたグループ2の弱毒化ウイルス1株（以上計画(2)による）および英国で開発されたグループ2に属する弱毒型ウイルス由来のワクチン候補株1株（計画(1)による）について、早急に病原性、抗原性、安全性に関する諸試験、前臨床試験ないし第1相臨床試験までの検討を進めること、それらの成績が出た段階でどの株をWHO推奨のワクチン製造株とするかを再度検討することが合意された。

その後8月中旬に米国から、NIHとAviron社が開発したグループ1および2の弱毒化ウイルスに基づく不活化ワクチンの第1相臨床試験（30人程度で2カ月の小規模なもの）が終了し、現在第2相臨床試験が進んでいるとの情報が入った。

2) 国立感染研におけるワクチン候補株開発の経過

国立感染研においては、上記のとおり、平成9年12月下旬から2つの方法を平行させて、グループ1およびグループ2の弱毒型ワクチン株の開発を進めた。

(1) トリ弱毒型ウイルス分離株を用いた開発計画

H5型トリ弱毒型ウイルス分離株の中から香港H5N1型と抗原的に類似のウイルスを探し出し、これをワクチンに応用する方法による開発計画は、北海道大学の協力を得て、国内に保存されているH5型トリ弱毒型ウイルス株について、抗原性の解析が行われた。その結果、グループ1またはグ

ループ2と抗原的に近縁のウイルス株が2株見つかったが、免疫原性の面でワクチン候補株としては適当とは認められなかった。

8月末の時点で、これらを基にしたワクチン候補株の作製は成功していない。

(2) リバースジェネティックスを用いた開発計画

金沢大学および北海道大学の協力を得て、平成10年3月初めに、グループ2のウイルス[A/HK/156/97(H5N1)]についてリバースジェネティックスを用いた弱毒化ウイルスの開発に成功した。これは、このウイルスの強毒性を規定している赤血球凝集素(HA)の解裂部位のアミノ酸配列に改変を加えて弱毒型に変え、この変異HA遺伝子を他の弱毒型トリウイルス[A/duck/HK/698/80(H5N1)]に移し換えた弱毒型ウイルスである。

3月20日に厚生省健康危機管理調整会議幹事会においてこの経過が説明され、今後感染研と北海道大学において弱毒性、抗原性について検討することが了承された。試験ワクチンの製造および安全性試験に関しては、実施項目、実施責任者、費用等の問題が指摘され、厚生省側で早急に検討することとなった。

その後、このウイルスの性状を感染研と北海道大学で解析した結果、組織培養細胞、ニワトリ、ニワトリ胎児およびマウスにおいて弱毒型であること、抗原的にはグループ2のA/HK/156/97(H5N1)と同一であることが確かめられた。

5月12日に感染研所長が、今回のワクチン株開発計画の経緯、H5N1型ウイルスの弱毒化に成功したこと、ワクチン開発の見通しが出てきたことを報道発表した。

5月13日に米国ベセスダで開催された「H5N1型インフルエンザワクチン開発に

関する国際会議」(感染研ウイルス製剤部長出席)でこれらの成績が発表された。本ウイルスは、トリ型ウイルスを基盤にしているために、米国で同様の方法で開発されたヒト由来ウイルスを基盤とした弱毒化ワクチン株よりも、ヒトに対する感染性・伝播性は低く、より安全性が高いと評価されている。

その後このウイルスについて、ニワトリおよびマウスに対する病原性、遺伝学的安定性、迷入ウイルス否定試験、抗原解析、免疫原性等の検討を行い、いずれも安全性および免疫学的にワクチン製造候補株として適当であるとの成績を得た。

これらの成績をもとに、5月29日に開催された第2回厚生省組換えDNA技術応用医薬品調査会に医薬安全局審査管理課から遺伝子組換えウイルスとしての安全性を相談したところ、作製された弱毒化ウイルスは自然界に存在する弱毒型ウイルスに相当するものであり、その後のワクチン製造は従来の方法に則るので、特に組換えDNA医薬品として検討する必要はないこと、発育鶏卵継代による遺伝的安定性(病原性復帰株の否定)の確認とMDCK細胞に由来する可能性のある外来性ウイルスの否定を更に検討すれば、ワクチン製造に用いても安全であるとの評価を得た。

この調査会の結論および「H5N1型インフルエンザワクチン開発に関する国際会議」で合意された方針、並びに感染研におけるワクチン株開発の進捗状況をもとに、同日(5月29日)開催された厚生省健康危機管理調整会議幹事会で今後の方針を検討した結果、(1)グループ1の弱毒化ウイルスがワクチン株として望ましく、これの開発・作製を急ぐ必要がある、(2)今回開発された弱毒化ウイルスについては、調査会の意見に従って、更に遺伝的安定性と外来性ウ

イルス否定試験を感染研で行うこと、(3)現有のグループ2の弱毒化ウイルスまたはグループ1の弱毒株(開発された場合)については、試験ワクチンの製造、前臨床試験、第1相臨床試験までを行う方針で検討を進めることが確認された。前臨床試験、臨床試験についての実施責任者、実施方法、予算については更に厚生省側で検討することとなった。

6月11日に血液対策課主催により細菌製剤協会とワクチンメーカーに対する技術説明会が開かれ、感染研側から弱毒化ワクチン候補株開発の経過、進捗状況、今後の見通しが説明され、主に安全性に関する質疑応答が行われた。その結果、試験ワクチンの製造および通常の試験の実施に関しては、感染研による安全性の保証を条件に、細菌製剤協会および各メーカーの全面的協力が得られることになった。

7月上旬に血液対策課から、「緊急時ワクチン安定供給確保総合対策」として省内で検討した結果が電話で伝えられ、(1)現時点ではひとまず第1相臨床試験は行わない、(2)試験ワクチンの製造および前臨床試験については、感染研田代部長を主任研究者とする厚生科研費・特別研究事業として行う、(3)技術上およびGMP, GLP上の理由から、試験ワクチン製造は細菌製剤協会に委託し、前臨床試験は専門機関に委託して行う、(4)試験ワクチン抗原量の表示を現行のCCA単位からSRID法による蛋白量表示に変更し、またワクチン力価測定を現行の卵内中和法に代えてSRID法により行う方向で技術開発を行う、という方針を決定した旨の連絡を受けた。それに従って、7月7日に田代ウイルス製剤部長が特別研究に関する研究計画書、交付申請書を提出した。この時点では、グループ1の弱毒株の開発が成功しない場合に、現有のグループ2に

ついでに安全性試験を行うのか否かについては検討されていない。

8月末の現時点で、グループ1の弱毒化には成功していない。

3) 今後の方針についての感染研での検討結果

平成10年8月26日に国立感染症研究所においてH5N1型インフルエンザワクチン開発技術検討会が開催され、以下の状況が明らかになった。

(1) 計画(2)によって開発したグループ2の弱毒化ウイルス株については、試験ワクチン製造に提供出来る状況にある。試験ワクチンの製造に関しては既に細菌製剤協会の協力も得られている。

(2) グループ1のウイルスに対する弱毒化には更に時間がかかる見通しであり、今後1カ月以内にワクチン候補株が作製できる可能性は低い。

(3) 計画(1)によるトリ弱毒型ウイルス由来のワクチン株開発は、グループ1、2とも未だ進んでおらず、今後1カ月以内に成功する見通しはない。

(4) 米国においては、NIHとAviron社によるグループ1および2の弱毒化ウイルスに基づく不活化ワクチンの第1相臨床試験(30人程度の小規模なもの)が終了し、現在第2相臨床試験が進んでいる。

今後の方針としては、以下の項目が現時点での感染研の考え方として合意された。

(1) ワクチン株としては、グループ1のウイルスが第1選択であるので、グループ1の弱毒化への努力を更に強力に進める。

これに関しては、ヘルパーウイルスとの相性やNA蛋白の関与の問題などが考えられるので、これらの技術的問題の解決を図るとともに、現状の人員・研究体制では作

業能率が悪いので、他の研究機関や企業への協力要請についても検討する。

また、遺伝的に不安定であるとされるグループ1の抗原性を規定するHA蛋白上の糖鎖結合部位を、安定化する方法を開発する必要がある。

(2) 計画(1)に基づいて、グループ1に属するH5型トリ弱毒株ウイルスを用いたワクチン株の開発を進める。

これは、技術的にも問題が少なく、適当なウイルス株が見つければ実現の可能性が高いと考えられる。また、これは計画(2)による弱毒化ワクチン候補株の開発が不成功の場合にも必要である。

(3) 現有のグループ2の弱毒化ウイルスについて、試験ワクチンの製造と前臨床試験を実施するべきである。

試験ワクチンの製造の委託については、細菌製剤協会の同意を得ており、9月初旬から開始出来る状況にあるので、直ちに行うべきである。

前臨床試験については血液対策課で委託機関との調整を進めているが、実施に2カ月以上掛かるので、試験ワクチンが製造され、契約等の準備が整い次第開始すべきである。

[グループ2のワクチンで前臨床試験を行う理由]

グループ1とグループ2の弱毒化ウイルス間ではHA蛋白の一部分が異なっているので、グループ2について得られた試験成績がグループ1については100%は当てはまらないことは予想される。しかし、HA蛋白上の違いも3個のアミノ酸の置換とそれに伴う一本の糖鎖の有無のみであり、HA以外の蛋白は全て両者間で完全に一致し

ている。これらは毎年選定されるワクチン製造株間の変異の程度に比べれば非常に小さいものである。従来のワクチンについては、製造株の亜型、抗原性や生物学的性状が大幅に変わっていても、毎年新たに安全性に関する検討は行っていない。これに比較すれば、グループ1とグループ2に由来するワクチンの違いは抗原性以外にはほとんど存在しないと言っても良く、今回のH5N1型ウイルスは、両グループとも大きく同一のウイルスの範囲に含まれるものである。従って、グループ2の弱毒化ウイルス由来の試験ワクチンに関する前臨床試験の成績は、基本的にはグループ1の弱毒化ウイルスが開発された場合にもそのまま適用されると判断される。また同様に、今回のグループ2での成績は、開発計画(1)による弱毒株ウイルスを用いたワクチンが開発された場合の安全性評価にも適応されよう。

グループ1のワクチンであれば、どちらのグループが流行しても対応できることが期待されるが、グループ2が流行した場合には、当然グループ2のワクチンが使用されることになる。また、グループ1が流行した場合にも、グループ2のワクチンはある程度の交差免疫をもつので、何もしない場合に比べて効果が期待できよう。従って、グループ2がワクチンとして使用される可能性はあり、グループ2について前臨床試験をやっておく意義はある。

以上の点から、現時点では、現有のグループ2の試験ワクチンについて前臨床試験を行うことは、最善ではないにしても、十分に意味があり、必要であると判断される。

グループ1の弱毒ウイルス株が開発された場合には、状況に応じて、その試験ワクチンについて改めて前臨床試験が必要か否かを検討すればよいが、上記の理由により

その必要はほとんど無いであろう。

(4) 今回のワクチン開発計画を前臨床試験までで一時凍結するが、今後なるべく早い時期に第1相臨床試験の実施を検討する。

WHOではワクチン大量生産の事態に備えた製造株を開発・準備せよと勧告しており、これに従えば、緊急事態ならばともかく、時間的余裕が出てきた現時点では、有効性と安全性を確かめるところまで試験をしてから、大量生産に備えてワクチン株を保存しておくのが当然である。また、前述の通り、前臨床試験のみではヒトにおける安全性は確保されないので、第1相臨床試験まで終了しておくことが必要である。

しかし、2月に香港でH5N1型インフルエンザ終息宣言が出されてから既に6カ月以上経ち、この間に同ウイルスによる新たな感染例は世界中のどこからも報告されていないので、当面このウイルスによる大流行の可能性は無くなったと判断される。従って、H5N1型ワクチンの第1相臨床試験の実施に対する優先度とこれに要する多額の費用および労力等を勘案すると、現時点では第1相臨床試験を緊急に実施する必要性は低くなっている。また、血液対策課からの連絡では、本年度は第1相臨床試験に対する予算措置は行っておらず、臨床試験実施の責任者、実施方針の検討を含む準備体制も整っていないとのことであるので、現時点では、第1相臨床試験を実施することは不可能に近いものと判断される。

そこで、本年度の厚生科研費による全臨床試験を終えた段階で、今回のワクチン開発計画を一時凍結するとともに、トリウイルス由来のワクチンに対する安全性を確かめる目的で、今後早い時期に第1相臨床試験の実施できるように、実施責任部署、実施要領を含む具体的検討とそれに応じた予

算措置を進めることが現実的である。

(5) 新型インフルエンザ対策における緊急時ワクチン開発に関する提言

今回の香港におけるH5N1型インフルエンザは従来ヒトの間で経験をしたことの無いトリのウイルスによるものであり、しかも全身感染を起こす可能性のある強毒型ウイルスであった。このために、分離されたウイルスをそのままワクチン製造株に用いることが出来ず、弱毒化という困難な操作が必要となった。幸いにも大流行には至らなかったが、これは想定される新型インフルエンザの中でも最悪のシナリオに近いものであった。従って、将来の緊急時ワクチン開発においては、今回経験した以上の大きな問題が生じる可能性は少ないものと考えられるので、今回のワクチン開発に伴う諸問題を徹底的に解決しておけば、今後の新型インフルエンザ対策に対して大きな貢献をすることになる。その意味で、今回の一連のワクチン開発研究は、近く必ず出現して大きな健康被害をもたらすであろう新型インフルエンザに対するワクチン対策の準備計画・行動計画を策定・再検討する上で、格好の予行演習(dress rehearsal)であったと評価される。

昨年末に起こった香港H5N1型ウイルスに対するワクチン開発の問題は、平成9年10月24日にまとめられた「厚生省新型インフルエンザ対策検討会報告書」に基づいて、緊急時ワクチン開発に関する具体的な準備計画・行動マニュアルの作成をまさに開始しようとしていた時期に発生したものである。従って、基本的な準備不足に加えて、トリ強毒株ウイルスという難問を抱え、各方面で様々な試行錯誤を繰り返さざるを得ず、無駄に多くの時間が経過してしまった。従って、現状での緊急ワクチン開発体制に

ついては、開発に伴う技術的な問題のみならず、健康危機管理上の様々な局面における対応に関しても、多くの問題点・欠陥が明らかにされている。従って、これらを厳しく評価・反省するとともに、新型インフルエンザに対するワクチン開発計画とその実施上の問題点を抽出・鮮明にして、今回の経験・反省を生かした今後の検討のために、今回のワクチン開発の経過を記録として残すことが必要である。その上で、それらの解決方法を広く検討して、より効果的・能率的な準備計画・行動マニュアルを策定・改定し、緊急時にはそれを直ちに実行出来るように準備しておくことが必要である。

そのためには、格好の予行演習として極力当初の計画に沿って開発研究を進めるべきであり、これに掛かる費用、労力は何者にも代えがたいものと判断される。現時点では、H5N1型ワクチンの緊急性・必要性は高くなくなってきているが、米国においては、開発されたワクチン株について現在第2相臨床試験を進めつつあり、危機管理対策の1つとして、緊急事態が生じた場合には直ちにワクチンの大量生産が開始できる段階まで準備を進めておくという当初の基本方針を貫いている。我が国においても、前述の理由から、少なくとも、前臨床試験および第1相臨床試験までは実施しておく必要があるものと考えられる。