

厚生省
平成10年度

平成10年度厚生科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業)

研究報告書

新型インフルエンザワクチンの
開発・製造・品質管理に関する研究

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)

厚生省
平成10年度

平成10年度厚生科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業)

研究報告書

新型インフルエンザワクチンの
開発・製造・品質管理に関する研究

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)

新型インフルエンザワクチンの開発・製造・品質管理に関する研究

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

根路銘国昭 国立感染症研究所 ウイルス第1部 呼吸器系ウイルス室長

堺 春美 東海大学医学部 助教授

五條堀 孝 国立遺伝学研究所 教授

豊田 哲也 久留米大学医学部 教授

協力研究者

板村 繁之 国立感染症研究所 主任研究官

西村 秀一 国立感染症研究所 主任研究官

西籐 岳彦 国立感染症研究所 主任研究官

榎並 正芳 金沢大学医学部 助教授

喜田 宏 北海道大学大学院獣医学部 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	主任研究者	田代真人	1-3 頁
2. 分担研究報告書			
(1) 遺伝子組換えワクチンの安全性試験法の開発		田代真人	4-14 頁
(2) インフルエンザワクチン検定のための一元放射免疫拡散試験法の評価			
		根路銘国昭	15-16 頁
(3) 噴霧型不活化インフルエンザHAワクチンに関する研究			
		堺 春美	17-18 頁
(4) インフルエンザウイルスの分子系統解析の自動化システムの開発			
		五條堀 孝	19-20 頁
(5) インフルエンザウイルス合併症（脳炎、脳症）の研究			
		豊田 哲也	21-27 頁
3. 関連研究の学会報告および論文掲載			28-30 頁

遺伝子組換えワクチンの安全性試験法の開発

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

新型インフルエンザを含むインフルエンザ対策の中心は、ワクチン接種体制の確立である。その為には、流行ウイルスの的確な予測とこれに対応したワクチン開発、および緊急時のワクチン生産、供給、品質管理を如何に効率よく短時間で行うかという準備体制を確立しておく必要がある。本研究では、これらの問題解決のために以下の研究を行った。

- 1) 過去の分離ウイルスの遺伝子解析成績を基にウイルスの系統樹を作製して、これを公開のデータベースとして整理し、新たな分離株のデータを入れると直ちにその位置づけと今後の流行株の傾向が示されるような自動化システムの開発を進めた。
- 2) 新型インフルエンザに対するワクチンを速やかに開発するための遺伝子操作技術及びワクチンの安全性試験方法を検討し、H5N1型インフルエンザワクチンについて実施した。
- 3) ワクチンの品質管理として、1ヶ月を要する現行の卵内中和法の変えて、国際的な一次元放射免疫拡散法による迅速なワクチン力価測定法を検討した。
- 4) インフルエンザ脳炎・脳症等の合併症症例について、対策検討のためにウイルス側および宿主側要因を解析した。
- 5) 現行HAワクチンを経鼻接種することにより局所粘膜免疫を付与する新しいワクチン投与方法を開発・検討した。

分担研究者

根路銘国昭 国立感染症研究所ウイルス
第1部呼吸器系ウイルス室長
堺 春美 東海大学医学部
小児科学講座助教授
五条堀 孝 国立遺伝学研究所教授
生命情報センター長
豊田 哲也 久留米大学医学部
ウイルス学講座教授

A. 研究目的

A型インフルエンザは数十年に一度の周期で新型ウイルスが出現して、地球レベルでの大流行を起こすが、近年における地球レベルでの生活環境の大きな変化から、次の大流行の際には未曾有の健康被害と社会的混乱・損失を引き起こすことが懸念されている。また、毎年流行するインフルエンザについては、高齢者における健康被害と小児におけるインフルエンザ脳炎・脳症の問題が浮き彫りにされてきた。これらにつ

いて健康危機管理の面からの対応としては、ワクチン接種体制の確立が中心となる。そのためには、サーベイランスの成績に基づいた流行ウイルスの的確な予測と、これに対応したワクチン開発、および緊急時のワクチン生産、供給、品質管理を如何に効率良く短時間で行うかという準備体制を確立しておく必要がある。本研究は、これらの問題解決の為の基礎研究を行い、より有効で安全なワクチンを効率良く生産するための方法を開発して、新しいインフルエンザワクチン政策の構築に資するものである。流行予測の為には、新たな分離株の遺伝子塩基配列データを入れると直ちにその位置づけと今後の流行株の傾向が予測できるデータベース自動化システムの開発、新型ウイルスに対するワクチンを速やかに開発するための遺伝子操作技術およびワクチンの安全性試験方法の確立、ワクチン品質管理のための一次元放射免疫拡散法による迅速なワクチン力価測定法の確立、脳炎・脳症等の合併症対策検討のためのウイルス側および宿主側要因の解明、および現行HAワクチンの経鼻接種による局所粘膜免疫賦活方法を開発する。

B・研究方法

1) インフルエンザウイルスデータベースの設計と構築

インフルエンザウイルスデータベースからの塩基配列・アミノ酸配列を基礎にして系統樹を作製し、これと単離年、単離地、亜型等を加味したデータベースと検索ソフトを作製した。

2) リバースジェネティクスによるインフルエンザウイルス変異株作製方法の開発および遺伝子組換えワクチンの安全性試験法の開発

ウイルスRNAからcDNAを作製し、これ

に遺伝子変異を加えて、更にヘルパーウイルスに取り込ませた変異ウイルスを回収する技術を、様々な亜型ウイルスについても応用しうる技術を開発・検討した。また、試験製造したワクチンについて、一般検定試験における安全性・品質管理検査を行い、さらに動物を用いた全臨床試験を行った。

3) 1次元免疫拡散法 (SRID法) によるワクチン抗原量、力価測定法の確立

SRID法によるワクチン抗原量測定条件を確立し、これによる成績を従来からの卵内中和法と比較した。

4) インフルエンザ合併症の背景因子の解析

脳炎・脳症患者からの分離ウイルスを分子レベルで解析し、また患者のデータと比較して、その背景となるウイルス側および宿主側の要因を検討した。

5) 経鼻噴霧型不活化ワクチンの開発

不活化HAワクチンについて、安全性確保の面から、製剤の精製度を検定した。また、経鼻接種用の器具、接種条件、免疫反応等を検討した。

C. 研究結果と考察

1) インフルエンザウイルスデータベースの設計と構築

インフルエンザウイルスデータベースからの塩基配列・アミノ酸配列を基礎にして系統樹を作製し、これと単離年、単離地、亜型等を加味したデータベースと検索ソフトを作製した。新規インフルエンザウイルスの遺伝子塩基配列を与えると、データベース中の配列と比較して、マルチプルアライメントの作製から分子系統樹の作製まで自動的に行い表示するシステムの設計と構築を行った。

2) リバースジェネティクスによるインフルエンザウイルス変異株作製方法の開発及

び遺伝子組換えワクチンの安全性試験法の開発

遺伝子組換え技術による組換え弱毒型ウイルスを用いた新型インフルエンザに対する現行不活化HAワクチンを速やかに開発し、その有効性を安全性を迅速に評価するための試験法の開発を、1997年に香港で出現したH5N1型インフルエンザに対するワクチンについて検討した。特に、試作ワクチンを製造し、それについて一般検定の試験項目および動物を用いた全臨床試験を行った。

3) 1次元免疫拡散法 (SRID法) によるワクチン抗原量、力価測定法の検討

SRID法によるワクチン抗原量測定条件を検討し、これによる成績を従来からの卵内中和法と比較した。また、1998-99シーズンのH1N1、H3N2、BおよびH5N1型ワクチンをSRD法で評価できる免疫血清と標準抗原のキットも用意できた。

4) インフルエンザ脳炎・脳症における背景因子の解明

患者からの分離ウイルスを分子レベルで解析し、また患者のデータと比較して、その背景となるウイルス側および宿主側の要因を検討した。

5) 経鼻噴霧型不活化ワクチンの開発。現行HAワクチンの経鼻接種による局所粘膜免疫賦活方法の検討

安全性確保の面から製剤の精製度、経鼻接種用の器具、接種条件、免疫反応等を検討した。

D. 研究発表

1) H.Okada, J.T.Seto, N.L.Mcqueen, H.-D.Klenk, R.Rott and M.Tashiro Determinants of pantropism of the FI-R mutant of Sendai virus: specific mutations involved are in the F

and M genes, Arch. Virol.143(12); 2343-2352, 1998

2) 板村繁之、田代真人：感染症に対するDNAワクチンの開発、Pharma Medica 16(2), 77-82, 1998

3) 田代真人：インフルエンザウイルスの生態学とサーベイランス体制、日本医師会雑誌、120(7), 1030-1033, 1998

4) 田代真人：口腔咽頭細菌のプロテアーゼとインフルエンザウイルスの活性化、日本医師会雑誌、120(7), 1029, 1998

5) 田代真人：インフルエンザはなぜ、今、問題となるか：新型出現のメカニズム、医薬ジャーナル、34(9), 109-116, 1998

6) 田代真人：新型インフルエンザの大流行にそなえて：ワクチン開発・製造・問題点、臨床と研究、75(12), 2534-2537, 1998

7) 田代真人：インフルエンザワクチン開発の現状と問題点、治療学、32(12), 1492-1496, 1998

8) 田代真人：香港におけるH5N1型インフルエンザの流行、ウイルス、48(2), 211-221, 1998

9) 木戸博、田代真人：インフルエンザをめぐるトピックス, Pharma Medica 16(11), 91-99, 1998

10) 田代真人：A型インフルエンザウイルスの分離と命名、日本医事新報、3896, 108-109, 1998

遺伝子組換えワクチンの安全性試験法の開発

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

遺伝子組換え技術による組換え弱毒型ウイルスを用いた新型インフルエンザに対する現行不活化HAワクチンを速やかに開発し、その有効性と安全性を迅速に評価するための試験法の開発を、1997年に香港で出現したH5N1型インフルエンザに対するワクチンについて検討した。特に、試験ワクチンを製造し、前臨床試験を実施した。

研究協力者

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
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
西藤 岳彦 国立感染症研究所ウイルス第1部呼吸器系ウイルス室
榎並 正芳 金沢大学医学部第1生化学
喜田 宏 北海道大学大学院獣医学部家畜微生物学講座

細菌製剤協会

三菱安全科学研究所

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、6名の患者が死亡した。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、通常の新規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った。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的転帰をもたらす強毒株が存在する。現在のところ、この様な強毒株は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がとなり、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。

5. 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。このようなリバース・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。

6. 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。

7. 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PQRRRRKKR/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PQ-----RETR/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。

8. 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マウスおよびウサギ免疫血清を作製し、免疫原性を確認した。

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る。またニワトリにおける病原性の判定を北海道大学獣医学部で行い、回収されたウイルスはニワトリに対して弱毒型であることを確認した。

9. 試験ワクチンの製造と安全試験

今回作製したワクチン候補株を発育鶏卵2万個に接種して増殖させ、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。これは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。

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、MDCK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、MDCK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。

10. 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。

11. 今後の展望

以上の成績が出そろった段階で、中央薬事審議会での審議を経て、ワクチン製造メーカーにウイルス株を渡して、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、安全性等を検討し、この成績を基に、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。1976年の米国におけるH1ブ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る。

一方、H5N1ウイルスワクチンはWHOが中心となって、国際協力の下にワクチン候補株の開発を進めることが合意されている。英国においては弱毒型H5トリウイルスを母胎としたワクチンの開発が、一方、米国においては、我々と同じ方法により弱毒化したHAを持つヒト由来の低温馴化生ワクチン原株を不活化したワクチンの開発が進められており、第1相臨床試験が検討されている。5月13日に米国ベセスダでこれらの不活化ワクチンの選択に関する会議があり、この場においてこれらのワクチン候補株についての検討が行われることになっており、今後の方針が討議される。

1.1. 反省点および今後の課題

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、トリのウイルスに由来するワクチンはこれまでヒトに対して投与された経験が無いので、安全性試験を慎重に行っておく必要がある。全臨床試験が合格すれば、第1相の臨床試験を行っておく必要がある。

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必要がある。

資料2-2

RT-PCR法によるHA遺伝子のcDNA作製の手順

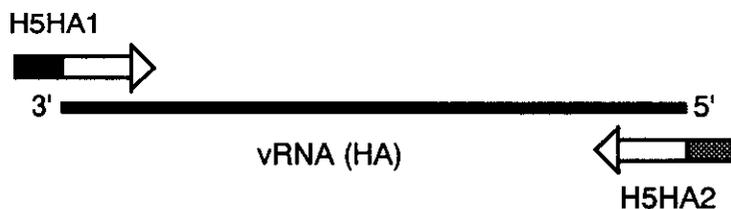
A/HK/156/97(H5N1)のウイルス粒子よりRNAの分離・精製



プライマーH5HA1を用いて精製したRNAを鋳型にトリ逆転写酵素によりcDNAを合成



cDNAをH5HA1及びH5HA2のプライマーでPCRを行い増幅



H5HA1及びH5HA2の塩基配列

H5HA1 (40MER)

ATA TAT GGA TCC CTC TTC GAG CAA AAG CAG GGG TCT AAT C

H5HA2 (52MER)

GCG CGC GGA TCC TTA TTA ACC CTC ACT AAA AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT A

RT-PCRによるcDNAの増幅の結果得られたcDNAはウイルスHA遺伝子に由来する部分以外に、合成オリゴDNAに由来するT3ファージプロモーター及びBamHI、Ksp632Iの制限酵素切断部位を両末端に有するようになる。(塩基配列については資料2-3を参照)

資料2-4

cDNAクローニングの手順

得られたRT-PCR産物をBamHIで切断後、pUC19のBamHI部位にクローニングした。

(a)

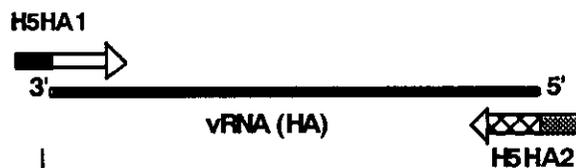
A/HK/156/97 (H5N1)



vRNA



RT-PCR

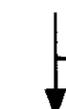


↓
Cloning into pUC19



Transient expression assay

Sequencing



Site-directed mutagenesis
at the cleavage site of HA



mutant HA gene

wild-type HA gene



Rescue into infectious viruses
by RNP transfection

A/dk/HK/836/80(H3N1)
(helper virus)

HK/9-1-1

HK156(dk/HK)

(b)

wild-type	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	/G
mutant	CCT	CAA	AGA	GAG	AGA	AGA	AGA	AAA	AAG	AGA	GGA
	---	---	---	---	...	G..	.CC
	P	Q					R	E	T	R	/G

TABLE 2. Pathogenicity of transfectant HK/9-1-1 in chickens and mice

Virus	Gene derivation		Pathogenicity in chickens			Pathogenicity in mice	
	HA	Others	MDT ^a	ICPI ^b	IVPI ^c	LD50 ^d (Log10 PFU)	Pulmonary virus titer ^e (Log10 PFU/ml)
HK156	HK156	Hk156	55.2	1.89 (10/10) ^f	1.33 (6/10)	2.3	4.6±0.6
HK156(dk/HK)	HK156	dk/HK	ND	2.00 (9/9)	2.64 (6/7)	4.0	1.9±2.3
HK/9-1-1	HK156av	dk/HK	75.6	0 (0/10)	0 (0/10)	>6.5	0±0
dk/HK	dk/HK	dk/HK	73.5	0 (0/10)	0 (0/10)	>6.5	0.3±0.6

^a MDT: mean death time; MDT (h) of chicken embryos inoculated with the minimum lethal dose of each virus.

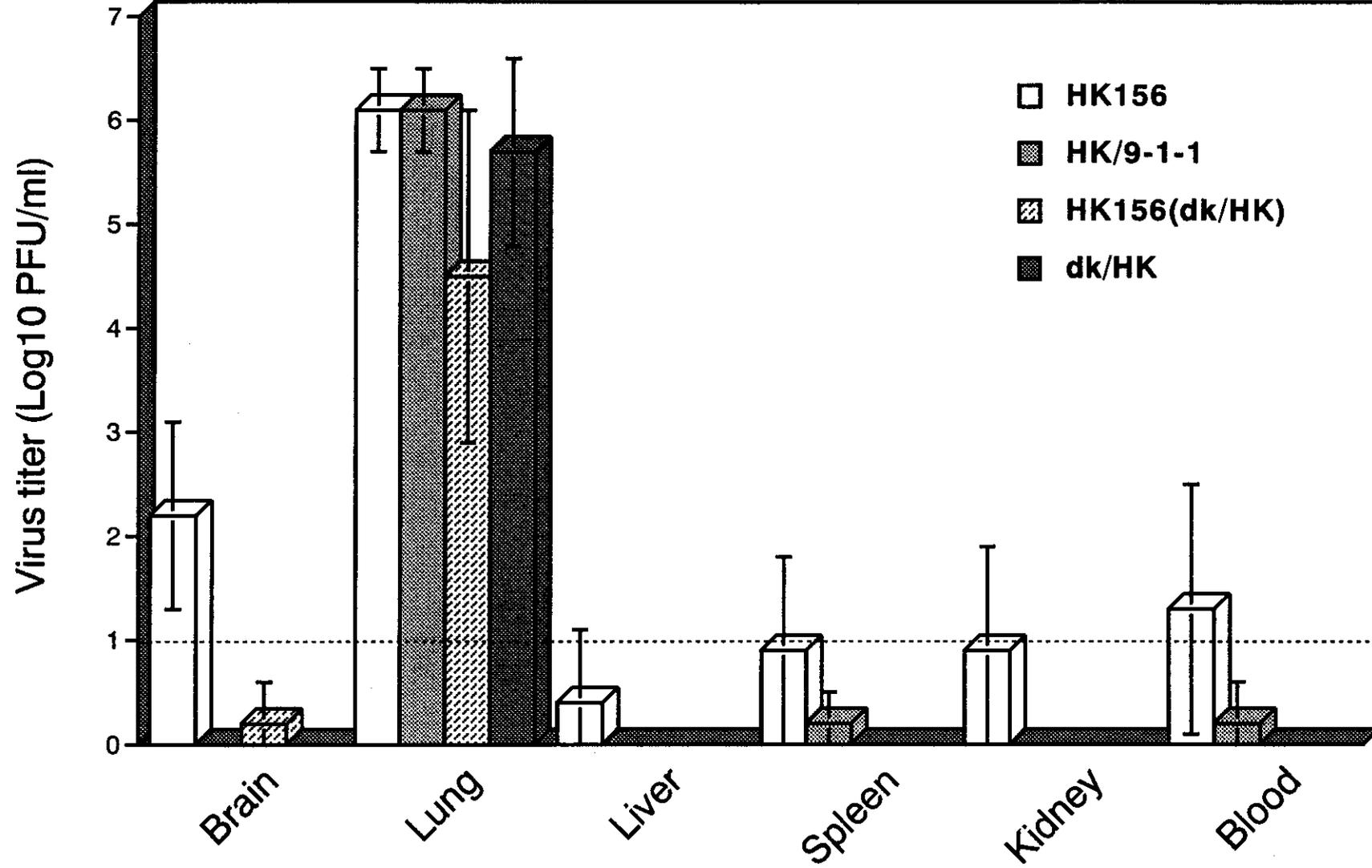
^b ICPI: intracerebral pathogenicity index; the mean score of 1-day-old chicks for 8 days after intracerebral injection with 10^{5.7} EID₅₀ of each virus. 2: dead, 1: sick, 0: no clinical signs.

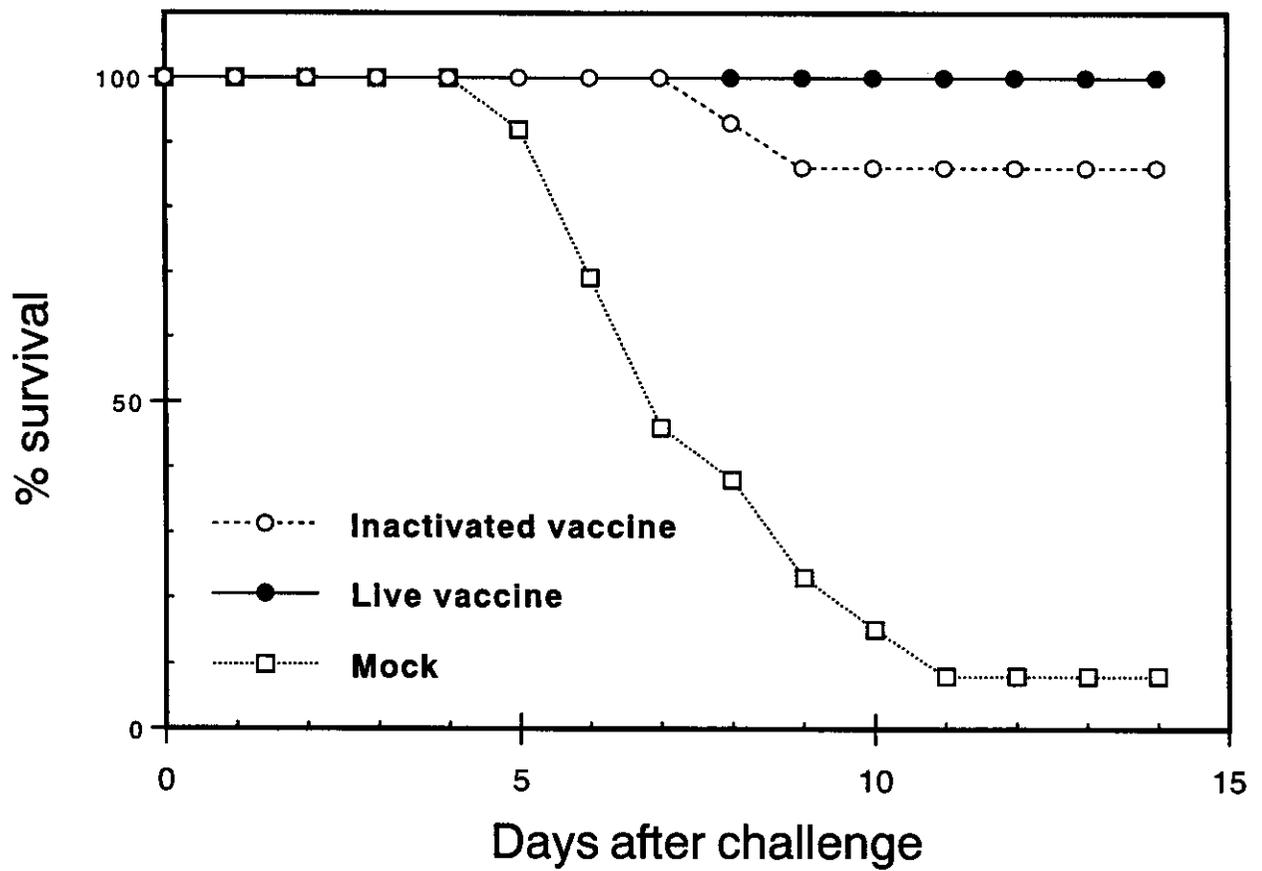
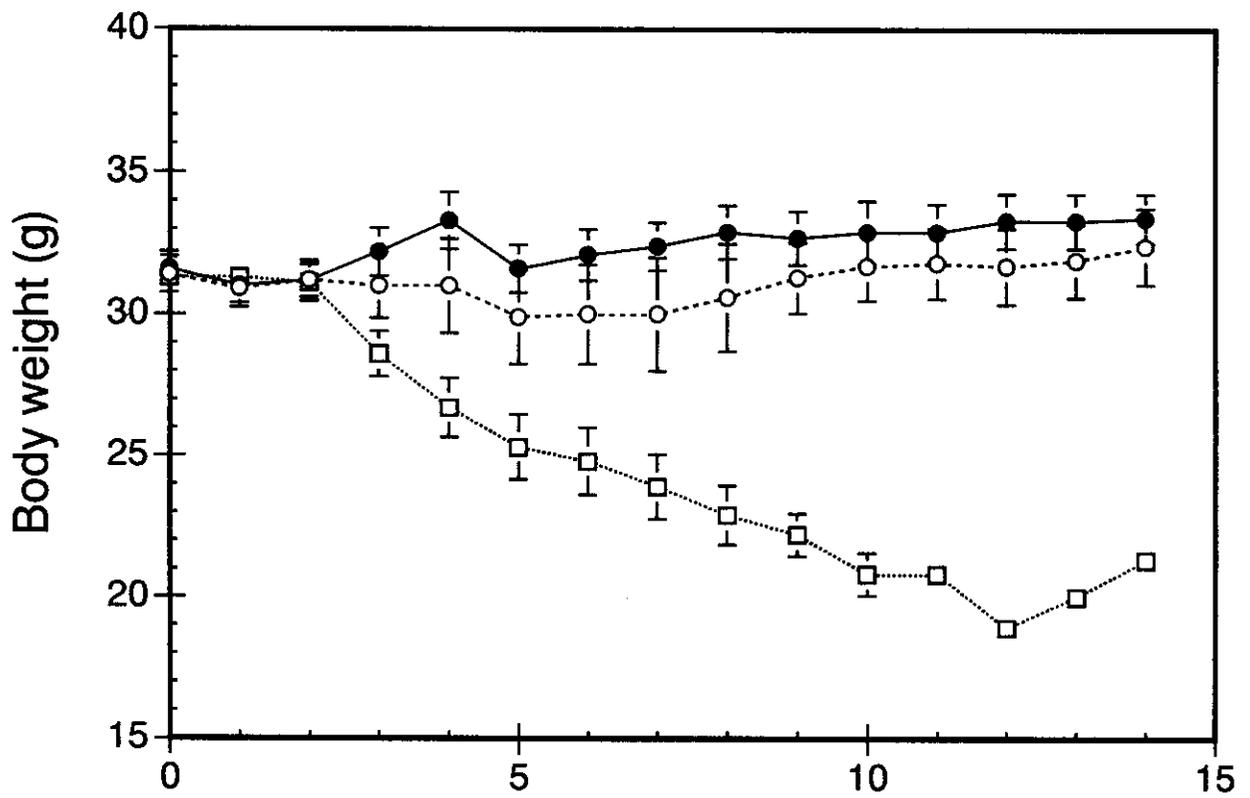
^c IVPI: intravenous pathogenicity index; the mean score of 6-week-old chickens for 10 days after intravenous injection with 10^{6.0} EID₅₀ of each virus. 3: dead, 2: paralysis, 1: sick, 0: no clinical signs.

^d

^e Virus titers in the lungs are expressed as the mean titers ± standard deviations obtained from three mice. Virus titers less than 10 PFU/ml (the detection limit of the assay) are assigned 0 PFU/ml for calculation of the mean titer.

^f Number of chickens which died during observation.





(分担) 研究報告書

インフルエンザワクチン検定のための一元放射免疫拡散試験法の評価

(分担) 研究者 根路銘 国昭 国立感染症研究所呼吸器系ウイルス室室長

研究要旨

1998-99シーズンに利用したH1N1、H3N2およびBインフルエンザウイルスを含むワクチンをSRD検定法で評価する検査用検定キットを用意することができた。同時に新型のH5N1インフルエンザワクチンをSRD検定法で評価する免疫血清と標準抗原のキットも用意でき、以上の研究は英国のNational Institute for Biological Standards and Control との共同研究の下で実施した。

A. 研究目的

インフルエンザワクチンの力価検定は、日本以外の欧米等ではワクチンの中に含まれる有効抗原のHA含有量を直接測定するSRD検定法が採用されている。この方法の利点と特徴は、ワクチンの中の有効抗原量を直接定量できることに加え、検定期間を1週間以内の短期間で実施できるという点につきる。さらに、ワクチンの力価を国際間で比較できるということも、本試験法の特徴といえよう。これに対し、わが国で採用している発育鶏卵内中和法による力価検定は、国際間でのワクチンの力価を比較することは困難である上に、マウスの免疫に3週間、発育鶏卵内中和に1週間で要し、全体で1ヶ月以上の検定期間を必要とする。このため、間パンデミー時代の緊急なワクチンの検定、あるいはパンデミーウイルス到来時の可及的短期間のワクチン検定で大きな問題となるのは明らかである。以上のことから、わが国でのSRD試験法の確立が急がれる状況が来ている。本研究の目的は、すでに本試験法が採用されているEUのシステムをわが国の検定法として導入し、これの実施に際しての問題点を解決することである。

B. 研究方法

1) ウイルス：SRD検査用キットの作製したウイルスは以下の通り

- ・ A/Sydney/5/97(H3N2)
- ・ A/Beijing/262/95(H1N1)
- ・ B/Harbin/7/94
- ・ A/duck/Singapore/97(H5N2)

2) 血球凝集素 (HA) タンパクの精製

11日発育鶏卵内で大量培養した上記のウイルスを30,000rpm 60分の高速遠心で濃縮し、これをさらに蔗糖密度遠心法で精製した。このウイルスにプロメライン (1mg/ml) を加え、37℃で120分反応させてHAタンパクを切断遊離させた。この混合

物を100,000g、60分で遠心してウイルス粒子を分別、残りのHAタンパクを20-60%の蔗糖密度分配遠心法 (100,000g, 16時間) でさらに精製して免疫に使用した。

3) 免疫血清の作製

およそ50 γ のHAタンパク溶液をFreund's complete adjuvantと混合して、羊の筋肉内に接種、さらに3週と5週後に10 γ のHAタンパクをアジュバントと混合して追加免疫した。そして、最初の免疫から6週後に全採血し、これをPBS希釈0.5%の窒化ソーダを含むPBSで3倍に希釈して2mlづつバイアル瓶に分注した。作製したSRD用の免疫血清は以下の通り

- ・ A/Sydney/5/97(H3N2)
- ・ A/Beijing/262/95(H1N1)
- ・ B/Harbin/7/94
- ・ A/duck/Singapore/97(H5N3)

4) SRD検定用抗原の作製

以下のウイルス抗原は、 β -プロピオラクトンで不活化した精製ウイルス液を1%の蔗糖を含むPBSに懸濁し、これを凍結乾燥した。

- ・ A/Sydney/5/97(H3N2)
- ・ A/Beijing/262/95(H1N1)
- ・ B/Harbin/7/94
- ・ A/duck/Singapore/97(H5N3)

・ A/duck/Singapore/97(H5N3)

1アンプル中36 μ gのHAタンパクを含む精製ウイルスを β -プロピオラクトンで不活化し、これを凍結乾燥した。

・ A/Hong Kong/156/97

1アンプル中18 μ gのHAタンパクを含む精製ウイルスを β -プロピオラクトンで不活化し、抗原として作製した。

(分担) 研究報告書

5) 検査手順

実際のワクチンの検定には、標準ワクチン1検体、被検ワクチン3検体をSRD試験で検査していくことになるので、SRDプレートは次に手順に沿って作製していく。

- i. ガラスプレートを2枚用意し、これをA,Bとする。
- ii. 試薬の調整の所で作っておいたアガロース液を煮沸水中で溶解し、中試験管に14mlずつ分注する。
- iii. それぞれの試験管から12mlのアガロース液をとり、これを先に60℃に温めておいた中試験管に移す。
- iv. 残りのアガロース液を薄用紙に浸して、これでガラス板を素早く拭き、乾燥させる。
- v. アガロースコートしたガラス板の中央部に径9cmの鑄型をおき(図1)、円形状の鑄型内面に軽くシリコン油を塗る。
- vi. 熱いアガロース液を先の細いピペット液でとって、これを円形状の鑄型のふちに、プレートを回転させながらぬりつけるように広げる。これによって、ガラス版と鑄型の接点が封入されるが、5分間くらいたったら次の操作に移って良い。
- vii. 今度は、先に12mlずつ分注しておいたアガロース液に250 μ lの抗HA血清を加え、泡がでないように素早く混ぜる。
- viii. 抗血清を含むアガロース液をガラス板上の鑄型の中に流し込む。この操作で大切なことは泡が発生しないようにすることであるが、それでもなお泡がでたような場合には、パスツールピペットで泡を丹念に除かなければならない。
- ix. アガロースを広げた板は10分間静置し、ガラス板を上から軽く押すような感じで、鑄型をはずす。そして、次の操作まで少し時間がかかる場合には、アガロースゲルの破損と乾燥を防ぐためにシャーレ等でふたをしておく。

5) SRD反応の実施

必要ならば、標準及び被検ワクチンともにA,B一対の前希釈サンプルを取る。この方法は検査時におけるワクチンの力価を均等に評価するという意味である。

Step 1.

必要な場合には前希釈サンプルを抜き取る。

Step 2.

界面活性剤処理

Step 3.

一連の希釈列を作る。(1:1, 3:4, 1:2, 1:4)

Step 4.

SRDプレートに各希釈抗原を分注。

Step 5.

SRDゲルを室温で湿った箱の中に積み重ねて18時間反応させる。

Step 6.

反応後水洗し、プレートを乾燥させ、クーマシーブリリアント青で染色後、脱色する。

C. 研究結果

このSRD検定用キットを用いたインフルエンザワクチンの力価検定は、A/Sydney/5/97、A/Beijing/262/95およびB/Harbin/7/94のワクチン株についてEUと英国で実施されており、その高い有用性がすでに認められている。今度は、日本のインフルエンザはワクチンに含まれているA/Sydney/5/97、A/Beijing/262/95およびB/Mie/1/93についてのSRD検定を実施し、本方法が日本でも使用できるか否かを検討する。また、英国ではH5N1の新型ワクチンとしてA/duck/Singapore/97(H5N3)がすでに開発されていて、この力価検定にもSRDが採用されている。

D. 考察

以上のように、英国 National Institute for Biological Standards and Control との密接な共同研究によってSRD検定用のキットを用意することができたが、日本のワクチンにこのキットが利用できるか否か、あるいは問題があるとすれば、どの点を解決すればよいのかを具体的に示していきたい。ただ、過去2回にわたって実験した同キットの利用によるSRD検定で、我が国の製造会社で利用されているホルマリン濃度がそれぞれに異なることが明らかになっている。これを反映して、限られたメーカーのワクチンはSRD検定で評価し難いという点が浮かび上がってきており、同メーカーへの積極的な指導・助言によってこの問題点を解決し一日も早いSRD検定実施への道を拓きたいと考えている。