

厚生省
平成11年度

平成11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
第一相臨床試験と管理に関する研究

平成12年3月

主任研究者 田代真人
(国立感染症研究所ウイルス製剤部)

厚生省
平成11年度

平成11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
第一相臨床試験と管理に関する研究

平成12年3月

主任研究者 田代真人
(国立感染症研究所ウイルス製剤部)

新型H5インフルエンザワクチン第一相臨床試験と管理に関する研究

平成11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

神谷 齋	国立療養所三重病院	院長
------	-----------	----

板村繁之	国立感染症研究所ウイルス第一部	主任研究官
------	-----------------	-------

西藤岳彦	国立感染症研究所ウイルス第一部	主任研究官
------	-----------------	-------

堀内 清	(社)細菌製剤協会	理事
------	-----------	----

目 次

1. 新型H5インフルエンザワクチン第一相臨床試験と管理に関する研究
総括研究報告書（平成11年度） 1頁
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）

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

新型インフルエンザワクチンの第1相臨床試験と品質管理に関する研究

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

研究要旨 A型インフルエンザは数10年周期で新型ウイルスが出現して大流行を起こし、大きな健康被害と社会的損失をもたらす。1997年に香港でトリ強毒型のH5インフルエンザウイルスがヒトに感染し、18名の患者中6名が死亡するという事態が発生して汎流行への進展が危惧された。そこで、WHOに協力してワクチンの開発が進められ、国立感染研においてウイルスの弱毒化に成公した。このワクチン候補株を用いて試験ワクチンを製造し、昨年度は動物を用いた前臨床試験において安全性が確認された。そこで、ヒトにおける安全性と免疫原性を確かめるために、第1相臨床試験のデザインを検討し実施した。また、トリ由来のワクチン製造株の開発方法および免疫原性の評価方法を検討した。

分担研究者

神谷 斉（国立療養所三重病院長）

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主任研究官）

堀内 清（社. 細菌製剤協会理事）

WHOに協力してワクチンの開発が進められ、国立感染研においてウイルスの弱毒化に成公した。このワクチン候補株を用いて試験ワクチンを製造し、昨年度は動物を用いた前臨床試験において安全性が確認された。そこで、ヒトにおける安全性と免疫原性を確かめるために、第1相臨床試験のデザインを検討し実施した。また、トリ由来のワクチン製造株の開発方法および免疫原性の評価方法を検討した。

A. 研究目的

A型インフルエンザは数10年周期で新型ウイルスが出現して大流行を起こし、大きな健康被害と社会的損失をもたらす。1997年に香港でトリ強毒型のH5インフルエンザウイルスがヒトに感染し、18名の患者中6名が死亡するという事態が発生して汎流行への進展が危惧された。そこで、

【研究の背景】

A型インフルエンザは10～40年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し、大きな健康被害と社会的損失をもたらす。1997年に香港でトリ強毒型のH5インフルエンザウイルスがヒトに感染し、18名の患者中6名が死亡す

るという事態が発生した。この新型インフルエンザウイルスがヒトからヒトへの伝播性を獲得すれば、甚大な被害をもたらす汎流行となる可能性がある。そのため、世界保健機構（WHO）ではワクチン株の開発を勧告した。そこで国立感染症研究所では、厚生省科学研究費補助金による研究事業の一環として、国際協力のものでワクチン製造に向けた新型ワクチン開発研究に着手した。

しかし、トリ強毒型ウイルスをワクチン製造株に用いた場合には、製造従事者が感染を受けた場合の健康被害、外部への汚染から世界的大流行へ拡がる危険性、またウイルスの増殖に用いる発育鶏卵が早期に死亡するためにワクチン製造効率が極端に悪い等の点が指摘され、まず原材料のウイルスの弱毒化が課題となった。これに対しては、国立感染症研究所において遺伝子組換えによるウイルスの弱毒化が進められた結果、世界で初めて成功し、安全性の高いワクチン製造候補株が作製された。具体的には、香港で患者から分離されたトリ強毒型H5N1型ウイルスA/香港/164/97（H5N1）株のHA遺伝子をクローニングし、このcDNAに対して、HA蛋白上の宿主プロテアーゼによる開裂活性化部位のアミノ酸配列（強毒株の特徴である塩基性アミノ酸が多数連続している）を、弱毒型の単一アルギニン残基をコードするように改変を加えて弱毒型の構造にした。この更に他の弱毒型トリインフルエンザウイルスA/シンガポール株を導入して弱毒型ウイルス9-1-1株を作製した。更に、このワクチン製造株の弱毒性、安全性および免疫原性を確認した後に、社団法人細菌製剤協会に委託して、株式会社デンカ生研において、現行の生物学的製剤基準および一般医薬品及び生物学的製剤GMPの基準

に合致した現行ワクチンの製造方法に準じて、この弱毒ウイルスを用いて不活化HAワクチンの試験製造を行った。

本ワクチンに対しては、厚生省医薬安全局から

①製剤としては、現行のインフルエンザHAワクチンと同一である。トリインフルエンザウイルス由来の9-1-1株を原材料としている点のみが、ヒトインフルエンザウイルスを原材料としている従来からのワクチンと異なる。しかし、トリインフルエンザウイルスもヒトインフルエンザウイルスもウイルスとしては区別しうるものではなく、また現行のインフルエンザワクチンの製造株には、特別の製造承認または一部変更することなく毎年異なるウイルス株が用いられている。従って、今回のウイルス株を製造株として用いた場合には、原材料に関しては製造承認の一部変更は必要ない。

②新型H5N1インフルエンザHAワクチンは、現行の生物製剤基準ならびにGMP基準を満たしているために、改めて製剤としての製造承認を求める必要はない。

③組換えDNA技術応用医薬品調査会に相談した結果、本ワクチンのワクチン製造株である弱毒ウイルスの作製には遺伝子組換え技術を用いているが、これは自然界に存在するものと同一と見なされるので、組換えDNA医薬品とは見なされない、との見解を得ている。従って、本ワクチンに関しては、製造承認申請を目的とした臨床試験を行う必要はない。

しかし、これまでにトリインフルエンザウイルスを原材料としたワクチンをヒトに接種した経験は乏しいので、緊急事態発生時に多くのヒトに接種をする場合を想定して、その安全性を確認しておくことが適当であろうと判断された。

そこで、前臨床試験を行った結果、安全性が確認されたので、健康成人男性志願者を対象とした臨床第1相試験を計画した。本試験の目的は、本試験ワクチンを現行の接種方法に基づいて健康成人に接種した場合の、健康面での安全性とH5N1型インフルエンザウイルスに対する免疫反応を検証することにある。

そこで、前臨床試験として、ラットを用いる単回投与毒性試験、同4週間反復投与毒性試験、ラット及びウサギを用いる生殖発生毒性試験、ウサギを用いる局所刺激性試験および変異原性試験（Ame s試験、染色体異常試験、マウスを用いる小核試験）を行った。染色体異常試験において一部陽性の成績が出たため、確認のためにラット肝不定期DNA合成（UDS）試験を行った結果、変異原性は否定された。以上のように前臨床試験において安全性が確認されたので、健康成人男性志願者を対象とした臨床第1相試験を計画した。本試験の目的は、本試験ワクチンを現行の接種方法に基づいて健康成人に接種した場合の、健康面での安全性とH5N1型インフルエンザウイルスに対する免疫反応を検証することにある。

B. 研究方法

遺伝子操作技術により弱毒化したH5N1型インフルエンザウイルス株から、現行の製造方法に準じてGMP基準ならびに生物学的製剤基準を満たす試験ワクチンを製造して用いた。

本試験ワクチンの製造過程は以下の通りである。まず香港で患者から分離されたトリ強毒型H5N1型ウイルスのHA遺伝子をクローニングし、このcDNAに改変を加えて弱毒型の構造にしたものを、更に他の弱毒型トリインフルエンザウイルスA／

シンガポール株に導入して弱毒型ウイルスを作製した。このワクチン製造株の弱毒性および安全性を確認した後に、この製造株を材料として、GMP基準のもとで現行のワクチン製造方法に則って試験ワクチンを製造した。すなわち、発育鶏卵の奨尿膜腔にウイルスを接種して増殖させ、奨尿液を採取して分別遠心によりウイルスを精製した。これをエーテル処理によりウイルス粒子を分解してウイルス蛋白を集め、更にホルマリン処理により感染性を完全に不活化させたスプリットワクチンである。最終製品は、蛋白含量80、ホルムアルデヒド0.01%未満、保存剤としてチメロサル0.01%を含む無色透明の生理食塩液剤である。

まず動物を用いた前臨床試験を行って、安全性を確かめた。次に、GCP基準に準じて、健康成人男子の被験者10名、対照者5名に対して、試験ワクチンまたは対照薬（生理食塩水）0.5mlを3週間間隔で2回皮下接種し、経時的に臨床上への影響、臨床検査所見および血清抗体価を測定し、安全性および有効性を検討した。

【物理的・化学的および薬剂的性質並びに製剤組成】

新型H5N1インフルエンザHAワクチンの本試験ワクチン（製造番号A-H-98-1）の製造過程は以下の通りである。弱毒化トリインフルエンザウイルス株9-1-1株を製造株として、GMP基準のもとで現行のワクチン製造方法に則って試験ワクチンを製造した。すなわち、発育鶏卵の奨尿膜腔にウイルス製造株を接種して3日間増殖させ、奨尿液を採取して分別遠心によりウイルスを精製した。これをエーテル処理によりウイルス粒子を分解して、ウイルス膜（エンベロープ）に由来する脂

質成分の大部分を除去するとともに、水相にウイルス構成蛋白（HA、NA、PA、PB1、PB2、NP、M）およびRNAを集め、更にホルマリン処理により感染性を完全に不活化させたスプリットワクチンである。最終製品は、H5型インフルエンザHA蛋白を750 CCA/mlを含むものであり、蛋白含量240 ug、ホルムアルデヒド0.01%未満、保存剤としてチメロサル0.01%を含む無色透明の生理食塩液剤である。本ワクチンは、現行の3価ワクチンとは異なって、H5型のみの単価ワクチンであるので、実際にヒトに接種する場合には、生理食塩液で2.5倍に希釈して300 CCA相当量/mlとしたものを使用することとなる。

なお、発育鶏卵で増殖させたウイルスを材料としているので、微量ではあるが鶏卵成分が残存していることが予想される。

【薬理、毒性、薬物動態及び薬物代謝】

本試験ワクチンは、成人には0.5mlづつ1～4週間隔で2回上腕外側部に皮下接種する。接種されたウイルス抗原は、血液、リンパ液を介して局所リンパ節などの免疫担当細胞を刺激して、主に血液中のH5N1型インフルエンザウイルスに対する抗体を産生させる。この血中抗体が呼吸器におけるインフルエンザウイルスの感染を防御し、また遠隔臓器への伝播を阻止することによって、肺炎等の合併症への進展を阻止する。

本製剤は基本的には、以前に安全性試験、毒性、薬物動態、薬物代謝に関する試験がなされ、既に製造承認をうけているインフルエンザHAワクチンそのものである。従って、これらに関する試験を繰り返す必要はないと判断された。実際の医師の管理下での1回の摂取量と接種回数を考えた場合、

本試験ワクチンを大量投与したり、頻回接種することは無いので、本項目では、限られた安全性試験を行った。また、薬物動態試験及び薬物代謝に関しても同様に考え、試験実施項目には入れなかった。

C. 結果と考察

1. 前臨床試験における新型H5N1インフルエンザHAワクチンの毒性試験

本試験はすべて下記のGLPに従って、株式会社三菱化学安全科学研究所において実施したものである。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（厚生省令第21号、1977）

①ラットを用いる単回投与毒性試験

H5N1型インフルエンザHAワクチンをDrj:CD(SD)IGSラットに1回皮下投与した時の毒性を検討した。

被験物質の毒性は低いと考えられたので、臨床量（300 CCA相当量/ml）の100倍である1.0ml/kgの1用量投与する群を設け、生理食塩液のみを投与した対照群と比較した。

1.0ml/kgの用量を投与されたラットには、死亡、異常行動、歩行異常、痙攣などの毒性症状をはじめとした一般状態の変化は認められなかった。体重は生理食塩液を投与した対照群と同様に増加し、14日間の観察期間終了時の剖検結果に異常は認められなかった。

これらのことより、本試験条件下においては、H5N1インフルエンザHAワクチンの単回投与毒性は低い（陰性）と判断された。

②ラットを用いる4週間反復投与毒性試験

H5N1型インフルエンザHAワクチンをDrj:CD(SD)IGSラットに4週間反復皮下投与した時の毒性を検討した。

被験物質の毒性は低いと考えられたので、臨床量(300CCA相当量/ml)の100倍である1.0ml/kgの1用量投与する群を設け、生理食塩液のみを投与した対照群と比較した。

1.0ml/kgの用量を投与されたラットには、接種局所の発赤、硬結以外には、死亡、異常行動、歩行異常、痙攣などの毒性症状をはじめとした一般状態の変化は認められなかった。皮膚局所の変化は生理食塩液を投与した対照群においても同様の変化が生じたことから、非特異的反応であると判断される。体重は生理食塩液を投与した対照群と同様に増加し、血液学的検査および生化学的検査においても28日間の観察期間に有意の変化は生じなかった。また観察期間終了時の剖検観察では、1.0ml/kgの用量を投与されたラットでは脾臓の重量増加が認められたが、これはワクチン投与に反応した免疫担当細胞の増殖によるものと考えられる。その他の臓器における肉眼的観察および病理組織学的検査においては、異常は認められなかった。

これらのことより、本試験条件下においては、H5N1型インフルエンザHAワクチンの4週間反復投与毒性は低い(陰性)と判断された。

③ラット及びウサギを用いる生殖発生毒性試験

H5N1型インフルエンザHAワクチンを妊娠ラットの着床から硬口蓋の閉鎖までの期間に皮下投与し、母動物および胚・胎児の発生に及ぼす影響を検討した。投与用量は臨床量の100倍である1.0ml/kgおよび臨床量にあたる0.01ml/kg

とした。

母動物への影響として、H5N1型インフルエンザHAワクチンの0.01および1.0ml/kgを投与された群のラットには、一般状態の変化は認められなかった。また、体重および接種量とも対照群と同様に推移し変化は認められなかった。剖検では投与部位(皮下)の出血が1.0ml/kg群でみられたが、反復投与試験でも認められており、同質の刺激性変化と考えられる。

胚・胎児への影響については、HAワクチンの0.01および1.0ml/kgを投与された群で、黄体数、着床数、死亡胚数、胚死亡率、生存胎児数、性比および生存胎児体重のいずれにも変化は認められず、対照群と同様な数値を示した。外表、内臓および骨格検査において認められた種々の変化は、いずれも自然発生的に認められる所見であり、対照群と比べて有意な増加を示す所見は認められなかったことから、H5N1型インフルエンザHAワクチン投与に起因した変化ではないと判断した。また、骨化進行については、いずれの指標にも順調な骨化が認められた。従って本試験条件下においては、H5N1型インフルエンザHAワクチン投与による胚・胎児への致死作用、発育抑制および催奇形性作用は無いと判断される。

④ウサギを用いる局所刺激性試験

日本白色種の雌性ウサギ12匹を用いて、H5N1型インフルエンザHAワクチンの筋肉内投与による局所刺激試験を行った。

H5N1型インフルエンザHAワクチンをウサギの後肢大腿部外側広筋に投与し、投与後2日および7日に筋肉の障害の程度を観察した。また陽性対照物として0.425%および1.7%酢酸を、陰性対照物

として生理食塩液を用いた。

被験物質投与部位では、肉眼的観察において軽度の変化（充血）が認められた。また、肉眼的観察後に行った病理組織学的検査においても、筋繊維の壊死、出血および炎症性細胞浸潤が認められたが、どの変化も軽度のものであった。これらの変化は生理食塩液投与部位においても同様に認められ、変化の程度も同等なものであった。一方、0.425%酢酸、0.17%酢酸の各投与部位では、肉眼的観察および病理組織学的検査ともに中程度から重度の変化が認められ変化の程度は被験物質投与部位と比べて明らかに強いものであった。

肉眼的観察および病理組織学的検査の結果から、H5N1型インフルエンザHAワクチンの筋肉への局所障害性に対する総合判定は”グレード1”に分類された。

異常の結果から、本試験条件下でH5N1型インフルエンザHAワクチンの筋肉組織に対する障害性は生理食塩液と同等（陰性）であると結論した。

⑤変異原性試験

1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

H5N1型インフルエンザHAワクチンについて、5菌株を指標とする復帰突然変異試験を実施した。

用量設定試験を被験物質原体（750 CCA相当量/ml）を最高用量として、以下1/4, 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024, 1/4096希釈液の7用量で実施した結果、S9mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示す復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9mix非存在下の全ての菌株で抗菌性が認められた。これらの結果を基に本試験の用量を設定した。

本試験の結果、S9mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示す復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、H5N1型インフルエンザHAワクチンは、細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を示さない（陰性）と結論した。

2) 染色体異常試験

H5N1型インフルエンザHAワクチンの染色体異常誘発性を検討するために、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

連続処理法24時間処理の染色体構造異常細胞誘発が擬陽性の範囲で認められ、再現性および用量依存性が認められた。また、48時間処理の染色体数的異常細胞誘発は10%異常となり、再現性および用量依存性が認められた。これらの結果から、連続処理法における染色体異常誘発性は陽性と判定した。

一方、短時間処理法の染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は5%未満であった。

連続処理法および短時間処理用+S9mixの陽性対照群において染色体構造異常細胞の出現頻度が10%以上であったこと、さらに短時間処理-S9mixの陽性対照群における染色体構造異常出現頻度が5%未満であったことは、本試験が適切に行われていたことを示す。

従って、H5N1型インフルエンザHAワクチンは、本試験条件下においてCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性を有する（陽性）と結論した。しかしながら、本結果をもって、この被験物質が変異原性を持つと判断することは困難である。更にENA損傷性を指標とする不定期DNA合

成（UDS）試験、プロモーター活性検出試験の実施等によって、総合的に判断することが必要であると考えられる。

3) マウスを用いる小核試験

ICR系雄性マウス（Crj：CD-1，8週齢）を用いてH5N1型インフルエンザHAワクチンの骨髓細胞に対する小核試験を行った。被験物質の臨床量の100倍である1.0ml/kgを高用量とし、以下公比2で0.5および0.25mg/kgの2用量を設定した。被験物質を24時間間隔で2回皮下投与し、最終投与後24時間に骨髓塗抹標本を作製し、小核をもつ多染色赤血球の出現数を検索した。その結果、小核を持つ多染色赤血球の有意な増加は認められず、本試験条件下におけるH5N1型インフルエンザHAワクチンの小核誘発性は陰性と結論された。

4) ラットを用いる肝・不定期DNA合成（UDS）試験

染色体異常試験において連続処理法の一部に陽性の成績が出たので、その成績がDNAの損傷に基づく染色体異常を反映しているのか否かの確認と、更にDNA損傷性の確認のために、ラットを用いる肝・不定期DNA合成（UDS）試験を行った。

H5N1型インフルエンザHAワクチンのDNA損傷性（イニシエーター活性）の有無を調べるために、8週齢（F344/DCrj、SPF）の雄性ラットにH5N1型インフルエンザHAワクチンを投与し、定法に従って肝細胞を分離後、オートラジオグラフィ法により不定期DNA合成（UDS）試験を実施した。

UDS試験は、0.2および1.0ml/kgの2用量を設定し、単回皮下投与2時間および16時間後の肝細胞におけるU

DS誘発作用の有無を調べた。その結果、すべての被験物質投与群においてUDSの誘発は認められなかった。

異常の結果から、本実験条件下ではH5N1型インフルエンザHAワクチンは、肝発がんイニシエーター活性を有しないものと判断した。このことから、上記の染色体異常試験の陽性結果は、DNA損傷性を反映したものと考えられず、非特異的なものであり、ヒトに投与した場合にも変異原性をしめして特に問題となることはない判断された。

以上のように前臨床試験において安全性が確認された。

2. 第1相臨床試験

次に、GCP基準に準じて、健康成人男子の被験者10名、対照者5名に対して、試験ワクチンまたは対照薬（生理食塩水）0.5mlを3週間間隔で2回皮下接種し、経時的に臨床上への影響、臨床検査所見および血清抗体価を測定し、安全性および有効性を検討した。

試験ワクチン接種者および対照薬接種者のいずれにおいても、異常反応、異常臨床所見、異常臨床検査所見は認められなかった。このことから、第1相臨床試験においては、安全性上問題は無いものと判断された。また、血清抗体価の推移については近く結果が出る予定である。

なお、最終的な成績については現在検討中であり、平成12年5月下旬に正式に提出予定である。

E. 結論

1997年にホンコンで流行したトリ強毒株から、遺伝子操作技術により弱毒化したH5N1型インフルエンザウイルス株を

用いて現行ワクチンに準じて作製した試験ワクチンは、生物学的製剤基準を満たしており、更に動物を用いた前臨床試験において安全性が確認された。今回の第1相臨床試験の結果、ヒトにおける安全性も問題がないことが示唆された。このことにより、今後新型インフルエンザが出現した場合にトリインフルエンザウイルスを用いた緊急ワクチン開発が現実的となり、新型インフルエンザ危機管理体制の構築に大きく寄与したものと評価できる。