

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）  
分担研究報告書

高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究

分担研究者 東 雍 財団法人阪大微生物病研究会理事長

研究要旨

- (1)2004年にヒトから分離された A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) 株をリバースジェネティクス法（以下 RG 法とする）にて弱毒化した NIBRG-14 株（英国 NIBSC より分与）を使用し、分担研究者である4所社（(財)化学及血清療法研究所、(財)阪大微生物病研究会、(社)北里研究所、デンカ生研（株））中、3所社にて各所社共通の計画書のもとマスターシード候補を作製した。
- (2)上記のマスターシード中、(社)北里研究所のマスターシード候補が各所社共通のマスターシードとして選択された。
- (3)上記マスターシードを使用し、各所社共通の計画書のもと、試作ワクチン原液を製造した。
- (4)試作ワクチン原液の品質管理試験を行い、小分製品作製の準備を行った。
- (5)非臨床試験の試験項目を検討し、GLP 施設へ試験を委託した。

A. 研究目的

ヒトのA型インフルエンザウイルスはトリインフルエンザウイルスに由来しており、毎年流行しているインフルエンザウイルスは、トリインフルエンザウイルスに由来した過去の新型ウイルスの子孫である。

ヒトの新型インフルエンザウイルスは、トリのウイルスとヒトのウイルスがヒトやブタに同時感染することにより遺伝子の交雑が起こったり、突然変異の蓄積によって生じると考えられている。

過去に流行した新型インフルエンザはトリの弱毒型ウイルスを起源としており、ヒトに感染しても呼吸器に局限するか、または重症化しても肺炎を起こす程度の病原性であった。

これに対し、平成16年始めから東アジアを中心に流行している H5N1 型高病原性トリインフルエンザでは多くの哺乳類において致死性の全身感染を起こすことが確認されており、ヒトにおいても重症肺炎、多臓器不全、全身感染などで70%を越える致死率を示している。

このような中、ニワトリでの流行、ヒトで

の偶発的な感染例の増加等により、ヒトの間で伝播流行可能な新型インフルエンザウイルスに変化する可能性が高まり、大流行により大きな被害がでる可能性が危惧されている。

また一方で、低病原性の H9N2 型等のトリインフルエンザウイルスも広くトリ、ブタ等に伝播しており、偶発的なヒトへの感染事例も報告されている。

このように、全世界的新型インフルエンザの大流行はいつでも出現する可能性があり、これに備えて WHO はじめ各国でも新型インフルエンザ対策を最優先課題の一つとして準備を行っている。

我が国においても厚生労働省が平成16年10月に新型インフルエンザ対策に関する検討小委員会を設置し、平成16年8月に報告書をまとめた。この報告書を受けて厚生労働科学特別研究事業としての「高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究」が厚生労働省より補助を受けることになり、(財)阪大微生物病研究会では他の3所社と共に高病原性トリインフルエンザウイルス A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) を RG 法により弱毒化した NIBRG-14 株がヒト用のワクチン

株として有効かつ安全であることを調査研究することを目的とする。

## B. 研究方法

新型インフルエンザワクチンの製造においては、新型インフルエンザウイルスが流行時にそのウイルスを使用したワクチン製造を行うことが必要である。しかしながら、新型インフルエンザワクチン製造候補株等が配布された後にワクチン開発を行うことはそれに必要な開発期間、製造期間を考慮すると現実的でない。

従って、欧州医薬品庁の基準に準じ、新型インフルエンザウイルスを想定したモックアップワクチンを用いた開発を行い、薬事法に基く承認審査を行う方法が望ましい。

現実には新型インフルエンザが発生した場合には、モックアップワクチンにより承認された製造方法に従い、WHOから配布されるインフルエンザワクチン製造用候補株等を用いて迅速にワクチンを製造し供給することが必要である。

この考え方に従い、現時点で入手可能なH5N1株であるNIBRG-14株（NIBSCより国立感染症研究所が分与を受けたRG法を使用した弱毒株）を使用した全粒子ワクチンにアジュバントを用いた製剤を開発研究することとした。

使用するアジュバントに関しては、沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン、沈降B型肝炎ワクチンに現在使用されており、また安全性が確認されている水酸化アルミニウムゲルとした。

免疫原性ならびに安全性の確保、供給量の確保の観点から（アジュバント使用により免疫原性の増強および抗原量の減量を図り、より多くの人へ有効なワクチンを供給できる可能性がある）、全粒子アジュバント使用ワクチンの選択は1つの方策であり、これはWHOのガイドラインにも記載されている。

このような考え方に基き、まず、試作ワクチン製造のためのマスターシードを作製し、その後、試作ワクチンの調製および品質管理

試験を実施した。

また、この試作ワクチンを使用した非臨床試験項目を検討し、試験の実施を（株）三菱化学安全科学研究所に委託した。

## （倫理面への配慮）

動物を用いた実験が必要になる場合は、十分に動物愛護に配慮して行う。

## C. 研究結果

### （1）マスターシードウイルスの作製

2004年にベトナムでヒトから分離されたH5N1型インフルエンザウイルス株 A/Viet Nam/1194/2004 をRG法にて弱毒化したNIBRG-14株が英国NIBSCより国立感染症研究所へ分与されたことに伴い、分担研究者である4所社（（財）化学及血清療法研究所、（財）阪大微生物病研究会、（社）北里研究所、デンカ生研（株））中、3所社はこのウイルスを使用してマスターシード候補を作製した。

作製にあたっては、各所社共通のマスターシード作製計画書に基き実施し、また、バイオハザードの観点から、環境および作業への安全性の確保に十分留意した。

使用するSPF卵は $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で10-12日間孵卵し、各希釈にてウイルス接種後、 $34^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で40-72時間培養した。培養終了後、 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ で一晩冷却し、採液を行った。

試験項目としては、HA試験、感染価測定、無菌試験、マイコプラズマ否定試験を実施した。その結果、NIBRG-14株のHA価および感染価は、通常の製造株に比較してかなり低い値を示した。

### （2）マスターシードの選択

SPF卵を使用してマスターシードの作製を行った結果、各所社とも十分な感染価が得られなかったが、試作ワクチン製造用として他に選択肢がなかったため、その時点で $10^{7.5}\text{EID}_{50}$ の感染価が得られていた（社）北里研究所の作製した継代株が4所社統一のマスターシードとして国立感染症研究所に認定された。

### (3) 試作ワクチンの調製

上記に記載のマスターシードが国立感染症研究所から配布されたため、このウイルスを使用して試作ワクチンの製造を行った。

試作ワクチンは計4 Lot の製造を実施した。

それぞれの Lot の使用卵数は 28,600 個、31,900 個、30,200 個、および 31,500 個であり、そこから採取した尿膜腔液量はそれぞれ約 285、365、340、350 Litter であった。このウイルス浮遊液を濾過法、超遠心法等で精製し、その後、ホルマリンによる不活化を実施した。不活化の完了した精製ウイルス浮遊液に保存剤、安定剤を加え、原液とした。

これらの原液の抗原量を検討したところ、NIBRG-14 株においては通常の製造株と比較して収量が少なく、結果的に通常株の 1/5～1/10 の抗原量であった。

また、最終バルクは原液をリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液で希釈し、アルミニウム塩、保存剤、安定剤を加え調製することとし、アジュバントとして使用する水酸化アルミニウムは、アルミニウム含量として 0.3mg/ml を添加することとした。

使用する水酸化アルミニウムは、(財)化学及血清療法研究所および(財)阪大微生物病研究会がそれぞれ作製したものについて抗原吸着能を検討したところ、(財)阪大微生物病研究会作製の水酸化アルミニウムが優れていたため、以下、このアジュバントを各所社共通で使用するものとした。

さらに、臨床試験に使用する製剤は 30  $\mu$ gHA/ml および 10  $\mu$ gHA/ml の2種類をそれぞれ作製することとし、小分けの準備を行っている。

HA 含量の決定については、実際のパンデミック時に SRD に使用する血清が間に合わない可能性が高いため、SDS-PAGE により決定することとし、基礎試験を実施中。

### (4) 試作ワクチン原液の品質管理試験

原液の工程内管理試験として生物学的製剤基準のインフルエンザワクチンに規格されている、染色試験、無菌試験、不活化試験、発

熱試験、マウス白血球減少試験、ウイルス含量試験 (CCA)、たん白質含量試験、チメロサル含量試験、ホルムアルデヒド含量試験をそれぞれ実施した。

今回作製した4 Lot はすべて生物学的製剤基準に適合しており、また、各 Lot 最終原液の CCA は 1000～1400CCA/ml 程度であり、蛋白量は 219～290  $\mu$ g/ml であった。

### (5) 非臨床試験の試験項目の検討

臨床試験における投与経路が皮下または筋肉のいずれになるかまだ最終決定していないため、いずれでも投与可能なように局所刺激性試験 (ウサギ使用) は皮下および筋肉の両投与部位で試験することとした。

しかし、全身毒性を評価する単回投与毒性試験については、筋肉内投与では投与量に物理的な制限があり大量投与できないため、大量投与できる皮下投与の試験のみをラットおよびイヌを使用して実施することとした。

反復投与毒性試験については、投与経路は単回投与毒性試験と同様に皮下投与の試験のみとし、欧州のガイドラインの記載 (反復投与毒性試験は通常1種の動物種) を参考にして試験に使用する動物種はラット1種とした。

なお、全粒子ワクチン (アジュバントなし) については、製造承認を受けている剤型であるが、安全性を確認する目的で、単回投与毒性試験及び局所刺激性試験について、実施することとした。

生殖試験の実施は実際のパンデミック時には妊婦も使用対象となるため重要と思われるが、フェーズ I 及び II に関しては健常成人男性を対象とするため必要ないと考えられる。従って、ラット生殖 C 試験の実施は次年度以降、製造承認申請までに行うこととした。

### D. 考察

今回の NIBRG-14 を使用した試作ワクチン作製にあたっては、通常の製造株と比較して抗原の収量が 1/5～1/10 と低く、実際のパンデミックに際し、パンデミックワクチン製造株の収量が同程度であれば、必要なワクチン

量を確保できない可能性がある。

この収量が少ない原因が RG 法で作製したシード特有のものであるのか、発育鶏卵による継代により収量が増加するのかを確認する必要があると考えられる。

従って、マスターシードの SPF 卵での継代により収量（増殖性）、抗原性、遺伝的安定性がどのように変化するか調査する必要があると思われる。

また、海外においては NIBRG-14 の収量はそれほど悪くないとの情報もあり、発育鶏卵の系統による影響を受けている可能性もあるため、さらに増殖性に関する情報を収集する必要がある。

現行ワクチンと比較した場合、今回作製した試作ワクチンは、水酸化アルミニウムアジュバントを使用していることより、局所における腫脹、発赤等の副反応が増加することが推測されるが、GLP 施設における安全性試験の実施により副反応に関する評価をある程度行うことが可能であると考えられる。

また、試作ワクチンの免疫原性を確認する試験として、マウス等の動物を使用した免疫応答測定系の構築が急務であると考えられる。

#### E. 結論

高病原性トリインフルエンザウイルスを RG 法により弱毒化した NIBRG-14 がヒト用のワクチン株として有効かつ安全であることを確認するためにモックワクチン作製用マスターシードを NIBRG-14 株を用いて作製した。

さらに、このマスターシードより、試作ワクチン原液の製造を行った。

また、この試作ワクチンの各種工程内管理試験を実施し、すべての試験に適合していることを確認した。

作製した試作ワクチンの安全性を確認する目的で、非臨床試験の実施項目を検討した。

#### F. 研究発表

1. 研究発表 なし
2. 学会発表 なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特記事項なし

厚生労働科学研究補助金 (厚生労働科学特別研究事業)

分担研究者：城野洋一郎 (財) 化学及血清療法研究所

## 高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究

### 研究要旨

国立感染症研究所（感染研）を通じて、英国 NIBSC で作出された高病原性 H5N1 ウイルス (A/Vietnam/1194/2004) 由来の弱毒ウイルス株 NIBRG-14 を入手し、マスターシードの候補株を構築した。マスターシードの候補株は、SPF 卵において 1～2 代継代することで構築したが、その感染価は 6.6 EID<sub>50</sub>/0.2mL と低いものであった。化学及血清療法研究所及び北里研究所で構築したマスターシード候補株が感染研において検定され、最終的に北里研究所が構築したマスターシードが選択された。

このマスターシードを用いて、発育鶏卵 40,000 個/バッチスケールで、合計 3 バッチのワクチン原液を製造した。ウイルスの増殖性が悪く、卵 1 個あたりの抗原出来高を現行ワクチンと比較すると、1/5 程度であった。

### A. 研究目的

新型インフルエンザに対しては、ワクチンによる予防が対策の柱の一つと考えられている。しかし、ワクチンの開発には時間を要することから、現時点で入手可能なレファレンス株を用いたモックアップワクチンによる事前検討が重要であると考えられる。今回、2004 年に発症したヒトから分離され、リバーシジェネティックス法 (RG 法) によって弱毒されたリファレンスウイルス NIBRG-14 を用いて、ライセンスを取得するための試作ワクチンを製造することを、研究目的とした。

### B. 研究方法

NIBSC より入手した NIBRG-14 (Vero1/E2) を BSL2+ の制御下において SPF 卵で 2 代継代し、マスターシードを作製した。Vero1/E2/E2 の継代歴のマスターシード候補を 300 本、国立感染症研究所へ返却した。

化学及血清療法研究所及び北里研究所で構築されたマスターシードより選択された北里研究

所のマスターシードを用いて、11 日発育鶏卵で 3 バッチ (約 4 万個/バッチ) の試作ワクチンの製造を行った。試作ワクチン製造にあたっては、BSL2+ の制御下にある現行ワクチン製造設備を用いた。得られたウイルス浮遊液から、ウイルス粒子をしょ糖密度勾配遠心により精製し、0.02v/v% ホルマリンを用いて不活化処理を行い、ワクチン原液を得た。

(倫理面への配慮)

NIBRG-14 株を用いた一連の作業については、BSL2+ 設備で実施した。事前に、作業従事者に対し、本研究の目的、使用するウイルスの情報と安全性、作業時の注意点、事故発生時の処理等について、十分に説明した。また、2004/05 シーズンのワクチンの接種、月 1 回ごとの採血と医師による問診、そして毎日の健康管理を実施した。これまでのところ、すべての作業従事者において、健康面での異常及び NIBRG-14 に対する抗体は認められていない。

### C. 研究結果

### 1. マスターシード候補の構築

NIBSC で作出された NIBRG-14 (Vero1/E2)を、SPAFAS 社の SPF 卵を用いて、2代継代した。そのウイルス力価は、表1に示すとおりで、予想に反して、その値は低いものであった。Vero1/E2/E2について、無菌試験とマイコプラズマ否定試験を行い、陰性であることを確認した上で、候補株として感染研に返却した。

表1 マスターシード候補の構築

|                               | 継代歴          |                 |                 |
|-------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|
|                               | Vero1/<br>E2 | Vero1/E2<br>/E1 | Vero1/E2<br>/E2 |
| 感 染 価<br>(EID <sub>50</sub> ) | 6.4          | 6.6             | 6.4             |
| HA 価                          | —            | 320             | 320             |

### 2. 試作ワクチンの製造

北里研究所作製のマスターシードを用いて、発育鶏卵 40,000 個/バッチスケールで、合計 3 バッチのワクチン原液を製造した。3 バッチの成績は表2に示す通りで、ウイルスの増殖性が悪く、卵 1 個あたりの抗原出来高を現行ワクチンと比較すると、1/5 程度であった。

表2 試作製造の結果

| 項目  | A/VN0401 | A/VN0402 | A/VN0403 |
|-----|----------|----------|----------|
| 原液量 | 3.0L     | 4.0L     | 4.0L     |
| 蛋白量 | 159.4*   | 264.8    | 245.5    |
| CCA | 1031**   | 1404     | 1238     |

\*:  $\mu\text{g/mL}$ , \*\*: CCA/mL

### 3. ワクチン製剤化の検討

ワクチンの有効性を増すとともに、使用するワクチンタンパク量を低減することで、より多くのワクチンを製造できるようにすることは、非常に重要である。今回アルミアジュバントの選択を行

った。インフルエンザウイルスは低 pH で構造変化を起こすため、調製時酸性となるインゲルは使用できない。アウトゲルの製造経験のある化血研および阪大微研会が B 型肝炎ワクチン用のアルミゲルを予備試験サンプルとし提出し、各所社比較検討を行うことになった。不活化 NIBRG-14 は、二つのゲルにほぼ 100%吸着した（やや、微研会製への吸着性が強かった）。マウスを用いた免疫実験では、いずれのゲルでもアジュバント効果が確認されたが、微研会製ゲル投与群の抗体価が若干高かった（図1）。

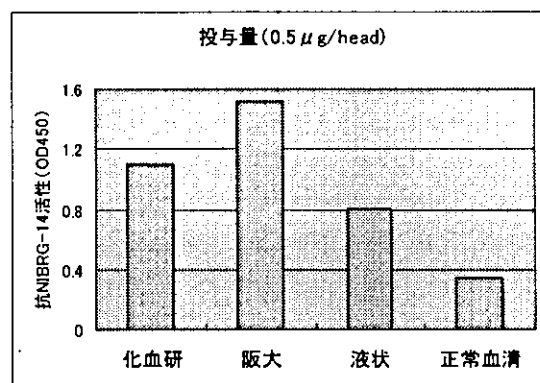


図1 不活化 NIBRG-14 免疫におけるアルミゲルのアジュバント効果 (ELISA 法により、免疫マウスの抗 NIBRG-14 抗体を検出)

### D. 考察

NIBRG-14 株を用いたワクチン原液製造を行った。今回ウイルスの増殖が悪く、通常期のワクチンに比較すると、その抗原生産高は約 1/5 程度であった。今回ウイルスの増殖が悪かった理由は明らかではないが、欧州やオーストラリアのワクチンメーカーにおける検討では、良い増殖が確認されている場合もある。

増殖が悪かった点以外では、作製した原液に問題は認められず、今回製造した原液を用いて製造したワクチンで、非臨床試験、臨床試験、安定性

試験等の製造販売承認に必要な試験を行うことは問題ないと考えられた。

#### E. 結論

NIBIRG-14 の SPF 卵での増殖性は低く、構築したマスターシードを用いて製造したワクチン原液は、通常期のワクチン原液に比較して 1/5 程度の出来高であった。しかし、できあがったワクチン原液を、今後の試験に用いることは問題ないと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)  
分担研究報告書

高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究

分担研究者 駒瀬 勝啓(社)北里研究所、生物製剤研究所副所長

研究要旨 英国のNIBSCから感染研を経て供与された、リバーシジェネテックス法で作製されたH5N1型弱毒インフルエンザウイルスNIBRG-14株を用いて、製造承認を取得するためのモックアップワクチンの作製に着手した。SPF卵を用いてマスターシード(MS)を作製したが、MSのウイルス力価は通常期待される力価の約 $1/5 \sim 1/20$ であった。次にこのシードを用いて試作ワクチンを実生産レベルの約 $1/5 \sim 1/8$ のスケールで3ロット製造した。回収されたウイルス量は期待された収量より悪く $1/10$ 程度であった。種株の選択、あるいはMSの作製法等に検討が必要と考えられた。このワクチン原液を用いて、今後、基礎試験、安定性試験、非臨床試験、臨床試験等を行う予定である。

A. 研究目的

1997年、香港において高病原性H5N1型インフルエンザウイルスが家禽間で大流行し、ヒトへの感染例、死亡例が確認されて以来、新型インフルエンザウイルスによるパンデミックの可能性が世界的に強く懸念されている。インフルエンザウイルスの流行に対する有効な対策の一つにワクチンがあげられているが、現在、日本で製造されているHAワクチンでは、免疫的にナイーブなウイルスに対してはでも十分な抗体価を誘導出来ない可能性が指摘されており、特に最も流行が危惧されているH5N1型では全粒子ワクチンでも十分な免疫が誘導されない事が報告されている。また、パンデミック時のような緊急時に十分な供給量を確保するためには抗原量を節約したワクチンの必要性も考えられている。本研究は、新型インフルエンザウイルスに対する有効かつ安全なワクチンを開発し、製造承認を獲得し、パンデミックに対応するワクチンを供給できる態勢をつくる事を最終的な目的としている。

B. 研究方法

- 1) 材料: ワクチン候補株; NIBRG-14 (H5N1 型), A/Viet Nam/1194/2004 より reverse genetics (RG) 法で弱毒された遺伝子改変ウイルス、NIBSC より供与された。
- 2) マスターシード(MS)ウイルスの作製: パンデミックインフルエンザワクチン開発に関する試作ワクチンの製造、マスターシード作製計画書(案)に基づいて作製した。SPF 卵を使用した。
- 3) ワクチン原液の作製: パンデミックインフルエンザワクチン開発に関する試作ワクチンの製造、試作ワクチン製造計画書(案)に基づいて作製した。3ロット作製した。
- 4) HA 含量の測定: SDS-PAGE で電気泳動後、CBB で染色、デンストメーターで HA のバンドの濃度と他のバンドの濃度を比較し、総蛋白量から換算した。

C. 研究結果

- 1) MSウイルスの作製: NIBRG-14 株を SPF 卵で一代継代し、ウイルス感染価、HA 価を測定した。感染価は  $10^{7.5} \text{EID}_{50}/0.2\text{mL}$ 、HA 価は 512 であり、MS作製計画書の規格値を超えた力価を示したが、予想よりもかなり低い値であった。また無菌試験、マイコプラズマ否定試験にも合格した。これらの結果を、MSを作製した他社と比較したところ、その時点ではやや良好な結果だったので、製造4社で共通に使用するMSとした。
- 2) ワクチン原液の作製: 上記の MS を使用して、ワクチン原液を作製した。約 3,5000, 4,6000, 3,7000 の卵を使用し、3ロット作製した(実生産量の約 $1/8 \sim 1/5$ )。300L~400Lの漿尿液が採取され、45~54 CCA/mL の抗原量を保持していた。これらの症尿液は精製、不活化工程を経て、抗原量 1,000~1,400 CCA/mL のワクチン原液、約3~4L となった。通常期のワクチンと比較して収量は約 $1/10$ 程度であった。
- 3) HA 抗原含量の測定: SDS-PAGE で泳動、染色後測定した HA 蛋白量は蛋白量の約35~37%であった。

D. 考察

パンデミックインフルエンザ用ワクチンの製造承認を取得し、予想されるパンデミックに対応できる態勢を作る事は急務である。トリに対して高病原性を持つインフルエンザウイルスを使用して鶏卵でワクチンを製造する事は困難であるが、今回はRG法で作製した、現在流行している高病原性H5N1型ウイルスに抗原的にクロスする弱毒ウイルス NIBRG-14 をモックアップワクチン製造株として選択した。NIBRG-14 はHA, NA 蛋白遺伝子以外のウイルスの増殖に関連する遺伝子は鶏卵での増殖がすぐれているPR8株由来であるにも関わらず、ウイルス産生量は通常ワクチンのそれよりかなり低く( $1/10$ 程度)、現実にはワクチンを製造するには適当ではない可能性も考えられた。一方、海外では NIBRG-14 のウイルス産生量が通常のも

のと同等であったとの情報もあり、MS の作製法等の検討も必要であろう。現在、有効性ならびに抗原量の節約の意味から、安全性を確認しつつアルミアジュバントを含む全粒子ワクチンの開発を最優先に行う事が厚労省、専門家のなかで確認されつつある。今後は、今回作製したワクチン原液を用いてアルミアジュバントを含んだ最終バルクを作製し、基礎試験、非臨床試験、安定性試験等を行い、臨床試験を行う予定である。迅速な製造承認取得には関係省庁、有識者等からの理解、支援が今後必要であると考えている。

#### E. 結論

NIBSC 由来の NIBRG-14 株で承認取得用の試作ワクチン用の原液を作製したが、ウイルス収量が通常ワクチンのウイルス収量より低かった。今後はこの原液を用いて最終バルクを作製し、有効性試験、安定性試験、非臨床試験、臨床試験等を行う予定である。

F. 健康危険情報; 北里研究所病原体等安全管理規定に従って行った。MS、ワクチン製造時にはパンデミックインフルエンザワクチン開発に関する試作ワクチンの製造、マスターシード作製計画書(案)及び、試作ワクチン製造計画書(案)に基づいて作業従事者の安全を図った。

#### G. 研究発表

1. 論文; なし
2. 学会発表; なし

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得; なし
2. 実用新案登録; なし
3. その他; なし

研究協力者: 五反田亨、渡辺隆夫

## 新型インフルエンザワクチンの品質管理に係わる調査研究

分担研究者 板村繁之 国立感染症研究所 主任研究官

分担研究者 篠原克明 国立感染症研究所 主任研究官

### 研究要旨

新型インフルエンザワクチン製造株の作製に係わる品質管理方法は、現状では厳格に GMP 管理下で実施するものと一定の品質管理方法を導入して実施している2つの形態が存在している。新型インフルエンザワクチン製造株を作製する GMP 対応の施設としては BSL3 の製造ルームが清浄度管理のなされた環境下であれば適切であると考えられる。GMP 対応には施設・建物などのハード面よりもソフト面での負担が大きく、どちらの方式を適正と考えるかは経費面とその品質確保に及ぼす影響を勘案して選択する必要がある。新型インフルエンザワクチン開発や製造に係わる品質管理方法、検定基準等については関係機関と協力して国際的にも整合性を維持しながら進めていく必要がある。

### A. 研究目的

高病原性トリインフルエンザウイルスが 2003 年末以降アジアで家禽に大流行を引き起こすとともにヒトへの直接接触によると考えられる感染事例が相次いでいる。新型インフルエンザの出現がますます現実味を帯びてきている。このような状況の下に、新型インフルエンザワクチンの開発研究が進められている。実際のワクチンを供給可能にするにはワクチン開発とともに、ワクチンの品質管理方法、検定基準、標準品の供給等についても整備する必要がある。またこれらについて国際的な整合性を確保することも重要である。そこで本調査研究は、具体的には以下のことを目的として新型インフルエンザワクチンの製造、ワクチン株の供給や検定基準の策定に係わる海外研究施設やワクチン製造施設を訪問し実施した。

- 1) 新型インフルエンザワクチン製造株の作製に係わる品質管理やワクチン株供給の現状について情

報を収集し、わが国での対応に資する。

- 2) 新型インフルエンザワクチン製造株の作製を実施する予定の国立感染症研究所村山分室 9 号棟建設に必要な基本的設計の考え方及び施設構造について参考となる情報を収集する。
- 3) 新型インフルエンザワクチン製造に係わる品質管理方法、検定基準、標準品の供給等についての情報交換を行い、国際的な整合性を確保する。
- 4) 海外での新型インフルエンザワクチン開発の現状についての情報を収集し、わが国でのワクチン開発について国際的な整合性を確保するための参考とする。

### B. 研究方法

新型インフルエンザワクチン製造株を現時点で供給している施設として米国の St. Jude Children's Research Hospital、英国の National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) を選ん

で訪問し施設見学及び各施設の担当責任者と議論して情報交換を行った。ここでは主にワクチン製造株の作製施設について基本的設計の考え方や構造設備また、ワクチン製造株の品質管理について情報を収集した。NIBSC では WHO や EU におけるワクチンの検定基準の策定や標準品の供給等についても中心的な役割を果たしており、これらの問題についても議論した。ワクチン製造施設として Baxter Vaccine Aktiengesellschaft を訪問して製造所施設の見学及びワクチン製造株の取扱いや新型インフルエンザワクチン開発への取り組みについて情報を集めた。

#### 訪問先住所・対応責任者

##### 1) Baxter Vaccine Aktiengesellschaft

Biomedical Research Center

A-2304 Orth/Donau, Uferster. 15, Austria

対応責任者

Otfried Kistner (Senior Director Virology, Vaccines)

##### 2) St. Jude Children's Research Hospital

332 N. Lauderdale St., Memphis, TN38105-2794, USA

対応責任者

John Coleman (Vice President, Therapeutics Production and Quality)

##### 3) National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)

Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG, UK

対応責任者

John Wood (Principal Scientist, Division of Virology)

#### C. 研究結果

##### 1) Baxter Vaccine Aktiengesellschaft のワクチン

#### 製造施設の見学訪問

##### 訪問者リスト

Otfried Kistner, Ph. D. : Senior Director Virology, Vaccines

Martin Schuller : Safety & Environmental Services, Manager, Safety Engineer

Noel Barrett, Ph. D. : Vice President R&D Global

##### 訪問予定表

平成17年3月18日(金)

9:00 - 10:00 Otfried Kistner: General Overview of Baxter Vaccine Aktiengesellschaft

10:00 - 12:00 Otfried Kistner, Martin Schuller: Biosafety, Quality Assurance Program

12:00 - 1:00 Lunch

1:00 - 1:30 Noel Barrett, Otfried Kistner: General Discussions

1:30 - 3:00 Otfried Kistner: Influenza Vaccine Production System

3:00 - 4:30 Tour of GMP facility

Baxter Vaccine 社で開発しているインフルエンザワクチンは Vero 細胞をマイクロキャリアで懸濁液として利用した培養細胞由来のワクチンである。ワクチンとしては精製ウイルス粒子を不活化した全粒子ワクチンである。当社では、BSL3 レベルの封じ込めを行った細胞培養装置を利用して、インフルエンザワクチンだけでなく SARS や種痘ワクチンなどいくつかのワクチン開発を手がけている。新型インフルエンザワクチンについても開発研究を実施しており従来用いられている発育鶏卵とは異なり BSL3 レベルでの封じ込めを実現した培養細胞のシステムを利用するため、シードウイルスを弱毒化することなく利用できることからシードウイルス入手から約 9 週間でワクチンを出荷できるとしている。その生産能力についても 4,000 万から 4,500 万ドーズを 6

から7ヶ月の生産期間で供給可能であるという。この生産量は平成16年度のわが国のインフルエンザワクチンの全製造量に匹敵する。実際の臨床試験の実施については公的な研究資金を期待しているとのことであった。

ワクチン製造施設の基本的構造は、直接人が製造所内に立ち入ることなく製造できるように外部からのリモート操作で可能となるような構造である。細胞培養装置は、密閉系のファーメンターを複数台設置、密閉パイプにて接続し、反応は全て外部からモニタリングと制御を行なう。滅菌・消毒は配管内を高圧蒸気を通すことで行なう。ファーメンター室内の清浄度は、未使用時でクラス10,000であり、特殊な室はクラス1,000である。清浄度評価は浮遊粒子数と浮遊菌数を計測して行なっている。ヒトや物品の搬出入は一方向の動線で管理がなされている。室内除染は、ガス滅菌も行なえるが、次亜塩素酸のふき取りが主である。機械室は十分なスペースがあり、自動モニター制御に加え、常に手動制御が行なえるように二重システムとなっている。排水処理に特殊性が認められ、加熱処理装置（オートクレーブ）であるが、作業時、メンテナンス時には陽圧防護服を装着するとのことであった。

一方、この製造に使用するシードウイルスの増殖、管理には通常のBSL3レベルの実験室を使用している。管理としてはその施設内でGMPに従って運用している。この施設では、シードウイルスとしては従来通り発育鶏卵からの分離ウイルス株を使用して行っているため、新しく開発されたリバースジェネティクスの手法を利用したシードウイルスの管理については知見を得られなかった。しかしながら、通常のインフルエンザワクチン製造株にも適応されているように製造者責任として外来性ウイルスの混入否定などのシードウイルスの管理は厳格に行われているようである。

## 2) St. Jude Children's Research Hospital の GMP 製造施設の見学訪問

### 訪問者リスト

James Allay, Ph. D. : Production Manager Influenza Seed Bank production

John Coleman: Vice President, Therapeutics Production & Quality Department

James Knight: Director Quality Assurance

Richard Webby, Ph. D: Infectious Diseases Dept.

### 訪問予定表

平成17年3月21日(月)

9:00 - 10:15 John Coleman : General Overview of St. Jude's GMP facility (PowerPoint Overview)

10:15 - 10:30 Break (coffee)

10:30 - 11:30 Jim Knight - St. Jude Quality Assurance Program (PowerPoint Overview)

11:30 - 1:00 Lunch

1:00 - 2:15 Jim Allay - Seed bank production by Reverse Genetics (PowerPoint Overview)

2:15 - 2:45 Seed Bank Production Discussions

2:45 - 3:00 Break

3:00 - 3:45 Jim Knight - Documentation System Review

3:45 - 4:30 Tour of GMP Production Area

4:30 - 5:00 General Discussion

米国メンフィスの St. Jude Children's Research Hospital は小児ガンの研究治療施設として有名である。基礎研究を実際の治療方法に結びつけるまでには多くの段階があるが、商業ベースに乗らないプロジェクトについてはいくら基礎研究が有望であっても臨床応用される機会が少なかった。当研究病院では、この問題を解決する方策のひとつとして自前のGMP適応施設で臨床試験に使用するワクチン、抗体、遺伝子治療ベクターなどを試験研究レベルで製

造することによって臨床試験のより高い安全性を確保し、基礎から治療への迅速な展開を目指している。また、当研究病院にはインフルエンザウイルスの研究で世界的に著名な Webster 博士が研究拠点を置き、新型インフルエンザワクチンのシードウイルス開発の基礎研究についても行われている。今回訪問した GMP 適応施設では、実際にリバーシジェネティクスの手法を利用したシードウイルスが GMP 管理の下で作製されている。

当施設は 2002 年の 5 月に建設され、施設全体では 64,000SF (約 6,400m<sup>2</sup>) になる。建設計画を実施するに当たって当研究病院では外部より GMP 施設建設や GMP 管理下での生物製剤開発に従事してきた専門家をリクルートしてきている。それらの専門家が責任者となり建設に当たっては GMP を管轄する FDA と相談して建設計画を実行している。全体の常勤スタッフ 25 名程度であるが、施設の維持管理などは外部の委託業者を利用しているため、サポートのスタッフは除外された人員数である。製造エリアは約 21,000SF (約 2,100m<sup>2</sup>) で 2 つの BSL3 の製造ルームを含む 15 の独立した製造ルームがある。製造エリア全体は無菌エリアとして設計されており、新型インフルエンザワクチンの製造ウイルス株の作製はその中の BSL3 の製造ルームで実施されていた。製造ルームは入室と退出が別で動線は 1 方向になっており清浄域と汚染域が明瞭に区別されている (図 1)。交叉汚染防止については、特殊な構造であった。即ち、作業室を真ん中に配置し、入室側と退室側の両側に前室を設ける。その両前室の外側が共通廊下である。両前室を作業室に対して陰圧とし、作業室内の空気が廊下に漏れないようにしてある。これにより、各室の独立性が高まり、各室で内容の異なる作業が可能となる。また、ヒト、物品の移動は 1 方向であるため、清浄域と汚染域が明確に区別できる。作業着は不織布素材のシングルユースであり、オーバーシューズの併用により、ヒト由来の汚染と交叉汚染を

防いでいる。作業は基本的にドライで行うシステムである

当施設では、GMP 管理のため実際の製造に係わる製造部門と独立した品質保証部門を置いている (図 2)。実際の施設が建設される 3 年前より品質保証部門の責任者を製薬メーカーよりリクルートして、その準備に当たっている。当該責任者は GMP 管理での実際の運用はソフト面での役割が極めて重要であることを強調していた。また、作業用上着などの着替えなどに要する運用費用も高額になるとのことであった。

新型インフルエンザワクチン株の作製においては、ウイルス株の作製から GMP 管理施設で行い、図 3 に示した作製工程の模式図にあるインフルエンザウイルスのクローン化したプラスミドは資材として扱っている。また、作製したワクチン株の病原性試験については当施設外の動物実験施設において実施されている。その他のワクチン製造株の性能試験は外部委託業者や当研究病院内の一般実験室にて実施されている。製造の資材としてのウイルスの回収に使用する細胞バンクについて当施設では独自のバンクを既に確立していることは特筆しておく必要がある。現在わが国においてもこのための細胞バンクの開発が行われているところだが、まだ確立されていない。

当施設で作製したワクチン製造株については、極めて厳格な外来性ウイルスの否定試験が実施されていることは、後述する EU とは対照的である。その理由は、当施設でのワクチン製造株の作製は NIAID (米国国立アレルギー感染症研究所) との研究契約のため、直ちにワクチン製造に使用することを前提にしていることによる。一方、英国 NIBSC ではワクチン製造株そのものとしての適性については製造者責任とするために、そこまでの厳格さを必要と考えていないが、後述する理由によりそれでも製造に適している品質は保持できていると考えている。議論は、そこまでの品質保証を行うかという点にある。米国

は訴訟社会であるため St. Jude の弁護士はそこまでの要求をクリアする必要があると考えているとのことであった。また、この要求は NIAID からの要請でもあるとのことであった。このような背景が、St. Jude で作製されたワクチン製造株を米国以外の国に提供できない理由であるようだ。すなわち、米国以外の国ではこの NIAID との契約が有効ではないため、もし訴訟された場合、免責できないという理由らしい。全世界規模でワクチン製造株を迅速に供給することを計画していた Webster 博士にとって、このことは遺憾であるとのことであった。

### 3) National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) のワクチン製造株の作製施設の見学訪問

#### 訪問者リスト

John Wood, Ph.D. : Principal Scientist, Division of Virology

Anna Sasiak, Ph.D.

Carolyn Nicolson, Division of Virology

Una Dunleavy, Division of Virology

Bob Newman, Division of Virology

Jim Robertson, Ph.D. : Principal Scientist, Division of Virology

Phil Minor, Ph.D. : Director, Division of Virology

#### 訪問予定表

平成17年3月23日(水)

10:00 - 10:30 John Wood : Discussion of visit

10:30 - 11:00 Coffee

11:00 - 11:45 Anna Sasiak : Tour of NIBSC

11:45 - 1:00 John Wood, Carolyn Nicolson : Reverse Genetics and Quality Control

1:00 - 2:00 Lunch

2:00 - 3:30 John Wood, Una Dunleavy : Influenza Vaccines in EU and Japan

Vaccine supply

Type of vaccine

Regulatory issues

3:30 - 4:30 Bob Newman, Una Dunleavy, John Wood :  
Tour of Influenza Lab

平成17年3月24日(木)

9:15 - 9:30 Meet Phil Minor (Director, Division of Virology)

9:30 - 11:00 Sally Franklin, John Wood: Category 4 Lab SOP's and Engineering

11:00 - 11:30 Coffee

11:30 - 12:30 Diane Major: Tour of Category 4 Lab

12:30 - 1:30 Lunch

1:30 - 3:00 Jim Robertson, Diane Major, John Wood: Viruses and Reagents for Pandemic Influenza

Roles of NIBSC and NIID

3:00 - 4:30 Jim Robertson, Diane Major, John Wood: Development of Pandemic Vaccines in EU and Japan

英国 NIBSC はロンドン郊外に位置し、英国のワクチンなどの生物製剤の National Control Laboratory としての機能だけでなく広く EU、WHO での生物製剤に係わる基準や標準品の作製、供給に大きな役割を果たしている。インフルエンザワクチンに関しては、現在ワクチンの力価試験として行われている SRD 試験の標準品の製造、供給、キャリブレーションなどを全世界規模で実施する中心となって活動している。またワクチン株の選択にも貢献している。NIBSC では BSL4 施設を使用して GMP 管理ではないが一定の製造管理システムを導入してリバースジェネティクスの手法を利用したシードウイルスの作製を行っている。わが国でもここで開発されたワクチン製造株を利用して新型インフルエンザワクチン開発が行われている。

英国では高病原性鳥インフルエンザウイルスは BSL4 実験室で取り扱うことが義務付けられているので NIBSC では BSL4 実験室を使用してワクチン製造

株の作製が行われている。本施設の BSL4 実験室はもともグローブボックスタイプ（クラス III 安全キャビネット）であるものを、一部グローブボックスを撤去して使用している。二つのユニットがあり、空調機などのシステムは完全に独立している。ウイルス作製に使用される実験室には、クラス I の安全キャビネット（室外排気）と樹脂製のグローブボックス（室外排気）が設置されている。樹脂製のグローブボックス（排気を室の排気口に接続）を設置した実験室でニワトリやマウスを使用して病原性を調べるための感染実験を行う。フェレットの感染実験は開放型ケージ（W60×D30×H60cm）で行うために、ハーフスーツ（電動 HEPA 付きファン）の陽圧防護服を着用している。陽圧防護服の下は織物のシングルユースの作業着と耐薬品性のブーツを着用する。陽圧防護服は薬液を防護服に噴霧することで除染している。陽圧防護服は廊下にて保管し、退室に際しては、身体を温水シャワーにて洗浄する。

新型インフルエンザワクチン株の作製においては、ウイルス株の作製工程から本 BSL3 施設で行われている。ウイルス株の回収に使用するプラスミド DNA 等は St. Jude と同様に資材としての取扱いをしている。使用する細胞についてはワクチン製造に使用できる細胞バンクを有する製造メーカーより契約によって入手しており、NIBSC では独自の細胞バンクを持たない。従って、比較的少数のバイアルを有するのみであり、将来的には独自の細胞バンクが必要になるだろうとのことであった。さらに、契約上この細胞の使用は新型インフルエンザワクチン株の作製に限定されたものであり、通常のワクチン株作製には使用できないとのことであった。

当施設で作製されたワクチン製造株は、厳密な GMP 管理の下で製造されたものではないが、一定の管理システムが導入されている。品質保証については独立した部門によるものではないが、主に実験記録の作成・保存、標準手順書 (SOP) の整備、実施施設

の設定、TSE（伝染性海綿状脳症）汚染のリスク評価などによって実施されている。作製されたワクチン製造株の品質管理についても、St. Jude と同様の項目について検査されているが、前述したように St. Jude ほどの厳格な外来性ウイルス混入否定試験などの検査は実施されていない。その理由は、St. Jude で実施されている外来性ウイルス混入否定試験の主なものがウイルス株作製に使用している資材からの混入の可能性が極めて低いことにある。細胞バンクではすでにそれらの混入が否定されているのに、同様の試験が作製されたシードウイルスの各ロットに適応するのに合理性がないと考えるからである。通常のインフルエンザワクチン株の作製とリバーシジェネティクスを使用した場合との相違は Vero 細胞とプラスミド DNA を使用するかどうかであり、それ以外については通常検査している方法で充分安全性を確保できるとする点が、St. Jude との考え方の相違である。

NIBSC はインフルエンザワクチンの標準品の提供などを通してワクチンの品質管理にも大きな役割を果たしている。新型インフルエンザワクチンに係わる品質管理、検定基準、標準品の供給等に関しても NIBSC は WHO, EU で中心的な役割を演じている。NIBSC では現在ワクチンの力価試験として実施されている SRD 試験に使用する参照抗血清について、H1 から H15 までの 15 種類の全亜型に対する抗血清を出現リスクが高いと考えられる順序で作製を進めている。一方で、標準抗原についてはワクチン株と同一のもので作製する必要があり、また現時点でウイルス株を大量に増やして製造を委託できる事業所もないことから、あらかじめ準備する合理性が乏しいとしている。ワクチン株についても、現在までに H5N1 ウイルスの 2 株、H7N1 ウイルス 1 株についてリバーシジェネティクスを用いた手法で作製しており、今後その他の亜型についてもワクチン株の作製を計画しているとのことであった。

EU における新型インフルエンザワクチン開発の状況とわが国の開発状況について情報交換を行った。わが国ではアルムをアジュバントとして加えた不活化全粒子ワクチンとして開発が進められているが、EU の製造所では基本的に現在市販しているワクチンの形状にアジュバントを添加する方向で開発が進められているようである。そのため、全粒子ワクチンのライセンスを有するワクチン製造所がないために、そのワクチンはスプリット（わが国の現行ワクチン）もしくはサブユニットワクチンにアジュバントを加えていく方向で進行しているとのことであった。また、その開発経費については基本的に公的な補助で行うという姿勢であるようだ。個別には、各製造所ごとに開発経費、GMO（遺伝子組換え生物）、MTA などの問題などで進行状況はまちまちのようである。

#### D. 考察

新型インフルエンザワクチン製造株の作製に係わる品質管理のあり方としては St. Jude で見られたような厳格に GMP 管理下で実施するものと NIBSC で行われているような一定の品質管理方法を導入して実施している2つの形態が存在しており、どちらの方式を適当と考えるかは経費面とその品質確保に及ぼす影響によって選択する必要があるだろう。新型インフルエンザワクチン製造株を作製する GMP 対応の施設としては BSL3 の製造ルームが清浄度管理のなされた環境下であれば適切であると考えられる。施設としては既存 BSL3 実験室のゾーニング管理で対応できると思われる。ただし、今回の施設は製品製造施設であるため、バイオセーフティを考慮し作業の安全性を確保すると同時に、作業効率、品質保証と交叉汚染防止も重要である。そのためには、手順等によるソフト管理によるものでは限界があるのでヒト、物品の移動が一方向になるような施設構造が必要であろう。GMP 対応するには施設・建物などのハー

ド面よりもソフト面での負担が大きい。

新型インフルエンザワクチン開発については各国の事情によって進展状況や全粒子ワクチンかスプリットワクチンであるかの差異はあるが、現在認可されているワクチンをベースにアジュバント添加ワクチンの開発が進められている。わが国の新型ワクチンの開発もこれと同様の方針で進んでいると評価できる。新型インフルエンザワクチンの品質管理については全世界的に統一された基準でワクチンの検定等が実施されるようにわが国も NIBSC 等の機関と協力していく必要がある。

#### E. 結論

新型インフルエンザワクチン製造株の作製に係わる品質管理方法は St. Jude で見られたような厳格に GMP 管理下で実施するものと NIBSC で行われているような一定の品質管理方法を導入して実施している2つの形態が存在している。どちらの方式を適当と考えるかは経費面とその品質確保に及ぼす影響を勘案して選択する必要がある。新型インフルエンザワクチン製造株を作製する GMP 対応の施設としては BSL3 の製造ルームが清浄度管理のなされた環境下であれば適切であると考えられる。GMP 対応には施設・建物などのハード面よりもソフト面での負担が大きい。新型インフルエンザワクチン開発や製造に係わる品質管理方法、検定基準等については関係機関と協力して国際的にも整合性を維持しながら進めていく必要がある。

#### F. 研究発表

論文発表

1) Tran Tinh Hien, Nguyen Thanh Liem, Nguyen Thi Dung, Luong Thi San, Pham Phuong Mai, Nguyen van Vinh Chau, Pham Thi Suu, Vo Cong Dong, Le Thi Quynh Mai, Ngo Thi Thi, Dao Bach Khoa, Le Phuc Phat, Nguyen Thanh Truong, Hoang Thuy Long, Le Truong

Giang, Nguyen Dac Tho, Nguyen Thi Kim Tien, Le Hoang San, Le Van Tuan, Christiane Dolecek, Tran Tan Thanh, Menno de Jong, Constance Schultsz, Peter Cheng, Wilina Lim, Peter Horby, the World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team (N. Bhat, P. Brudon, P. Calain, A. Curns, R. Doran, K. Fukuda, T. Grein, P. Horby, S. Itamura, N. Miranda, T. Uyeki), and Jeremy Farrar. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N. Engl. J. Med. 350: 1179-1188 (2004)

2) Iwasaki T, Itamura S, Nishimura H, Sato Y, Tashiro M, Hashikawa T, Kurata T. Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation. Acta Neuropathol. 108: 485-492 (2004)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

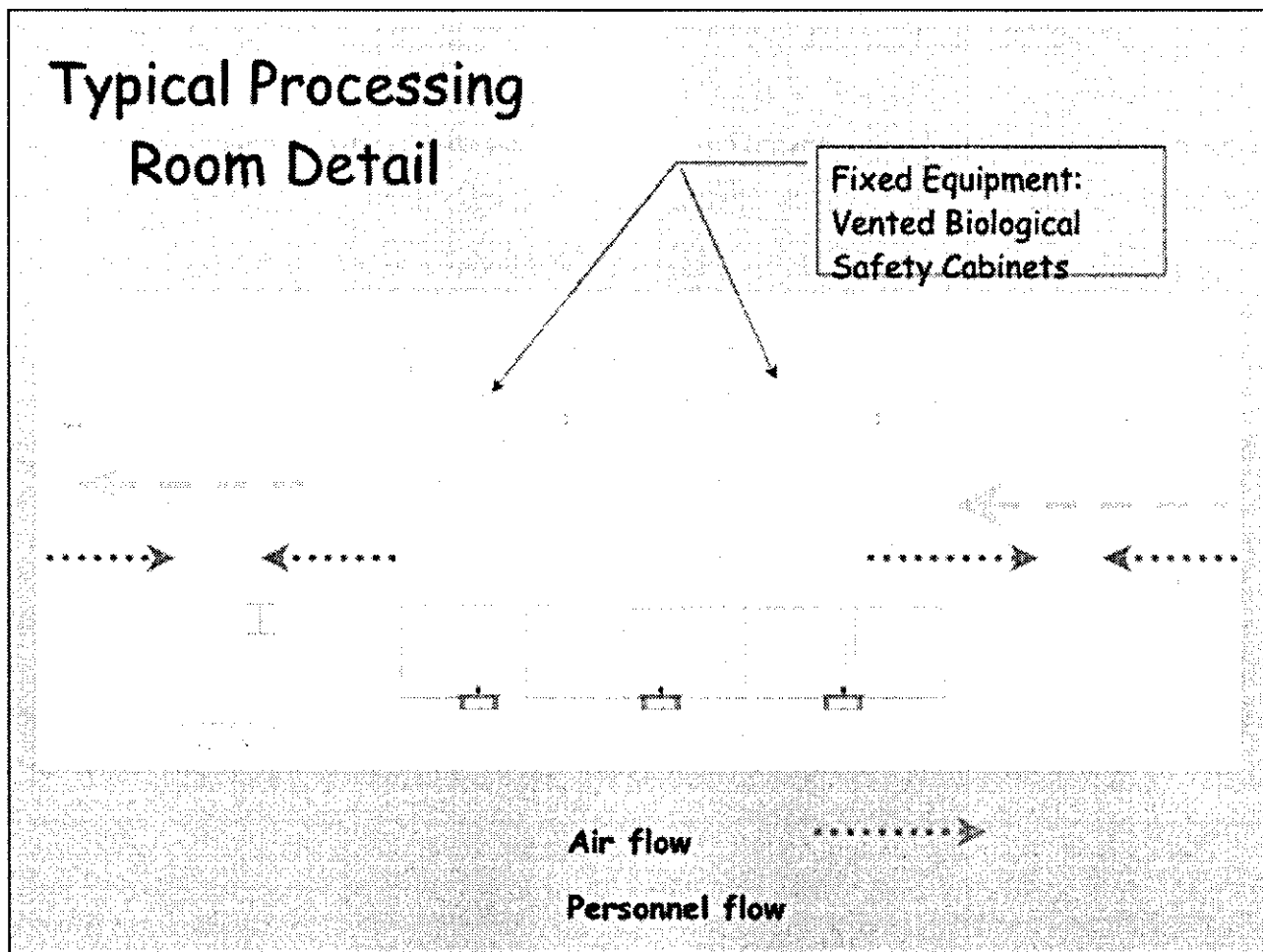


図1 製造ルームの模式図

# TPQ Organization

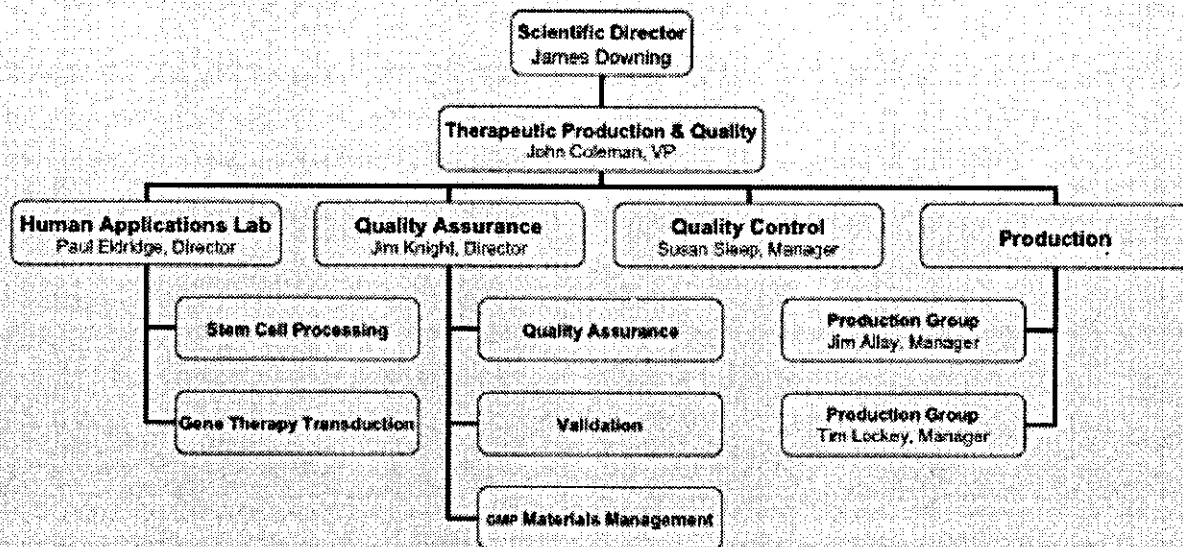


図2 St. Jude Children's Research Hospital の TPQ (Therapeutics Production & Quality) [GMP 適応施設] の組織図

# リバースジェネティクスを使用した新型インフルエンザワクチン製造株の作製工程

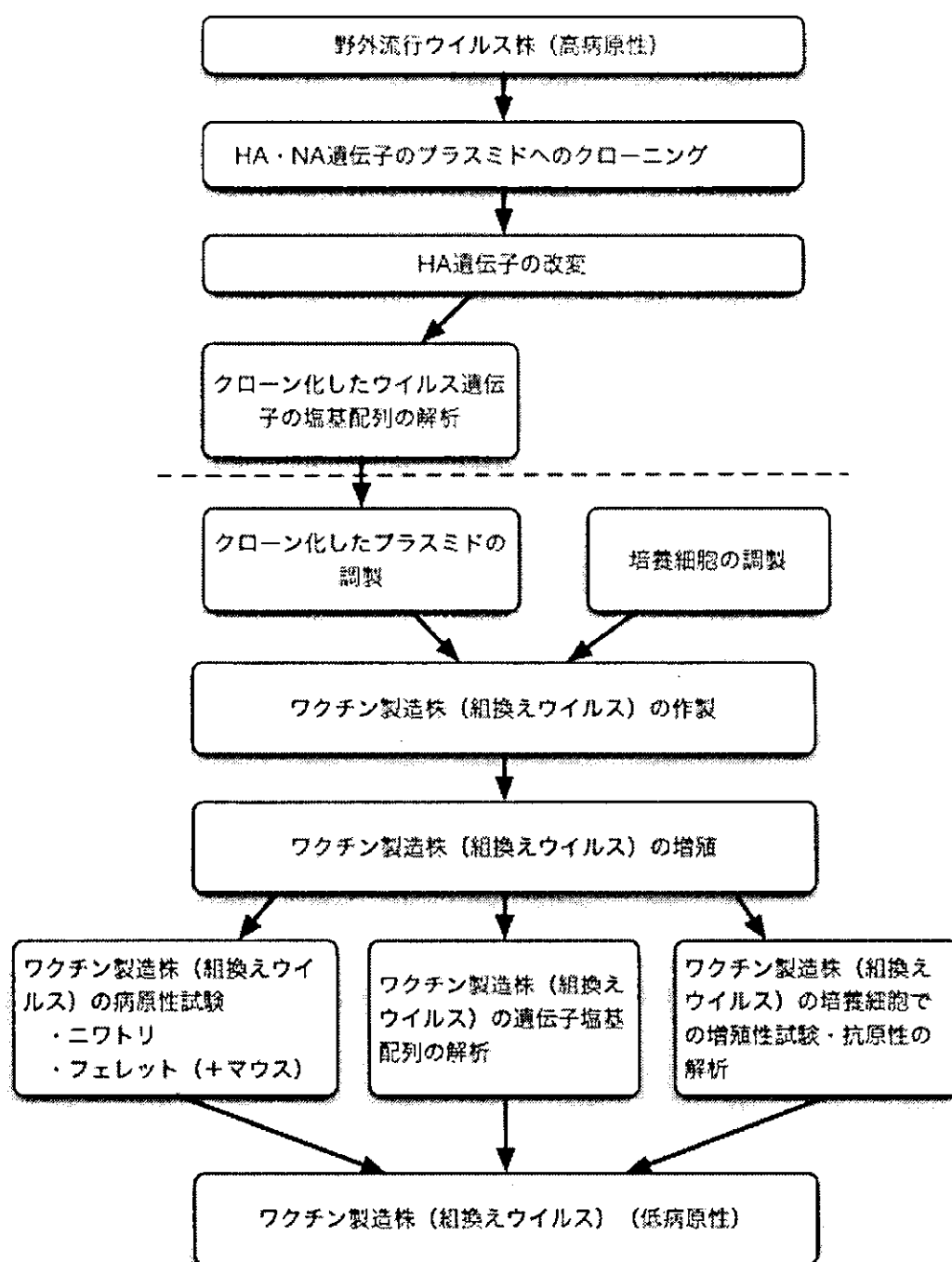


図3