

200501105A

厚生労働科学研究研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保  
に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小田切孝人

平成 18 (2006) 年 3 月

## 目次

平成 17 年度

### I. 総括研究報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

主任研究者：小田切孝人 \_\_\_\_\_ P1

### II. 分担研究報告書

1. 遺伝子操作技術(リバーシ・ジェネティクス)によるインフルエンザワクチン株開発に関するリスク評価の研究

田代真人 \_\_\_\_\_ P12

2. 新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

河岡義裕 \_\_\_\_\_ P33

3. 遺伝子操作技術で作製した弱毒化 H5N1 ウイルスの性状に関する研究

今井正樹 \_\_\_\_\_ P38

4. 新型インフルエンザウイルスに対するワクチンのマウスにおける有効性の検討

二宮 愛 \_\_\_\_\_ P42

5. アジュバント併用経鼻高病原性鳥インフルエンザワクチンの有効性の解析

長谷川秀樹 \_\_\_\_\_ P49

協力研究者：尾崎泰子、一戸猛志、佐多徹太郎

6. 新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

神谷齊 \_\_\_\_\_ P56

協力研究者：中野 貴司、庵原俊昭、木下麻衣子、大熊 和行、  
矢野 拓弥、松田 正、鳥越 貞義、二井 立恵、伊佐地 真智子、  
渡辺 正博、落合 仁、梅本 正和、安田 尚樹、酒徳 浩之、  
羽根 靖之、竹村 統成、加藤 孝

7. リバーシジェネティクス法による新型インフルエンザワクチン株の作出に使用する細胞バンクの構築

城野洋一郎 \_\_\_\_\_ P69

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ P88

### IV. 研究成果の刊行物・別刷(別添)

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室 室長 小田切孝人

研究要旨

2004 年初頭から日本を含む東アジア諸国の家禽で発生した高病原性 H5N1 鳥インフルエンザの流行は、2 年が経過した現在では中国、中近東、インド、アフリカおよびヨーロッパ諸国にまで広がり、制圧することは不可能となった。この間に人への感染例も増え続け、現時点で 9ヶ国 196 人の感染例と 110 人の死亡が確認されている。このことから、当該ウイルスに起因した新型ウイルスによるパンデミックの発生が予想され、それに備えて有効なワクチンの開発と短期間に認可し実用化できる体制の事前準備が最重要課題となっている。一方、世界各地に広がっている高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスは、抗原的にも遺伝的にも異なる 3～4 種類が流行していることから、ワクチン株もそれに応じて複数の候補株を開発しなければならない。このような状況に迅速に対応できるように、本研究では、以下の研究を行った。(1)人への接種が認可される H5N1 ワクチンの種ウイルスを供給するために、GMP 施設で培養された LLCMK2 細胞バンクを構築し、ICH ガイドラインに沿って安全性を検証した。試験継続中の腫瘍原性試験を除いた全ての項目が合格であることが確認され、Vero 細胞に並ぶ第 2 のワクチン製造用細胞株を世に送り出すめどがたった。(2)リバーシジェネティクス(RG)法により製造したプロトタイプワクチンの安全性を WHO の評価指針に沿って評価し、安全であることを確認した。(3)RG 法を改良し、これまでの 12 プラスミド系よりウイルス回収効率の高い 4 プラスミド系 RG 法を確立した。(4)2005 年にベトナム患者から H5N1 ウイルス変異株が分離されたことから、この株から新たに RG 法で弱毒化試作ワクチン株(RG ワクチン株)を作製した。これによって、もしこの変異株が流行の主流を占めても対応できる体制を準備した。(5)2004 年の分離株から作製した RG ワクチンにアルムアジュバントを添加したワクチンを試作し、その効果をマウスモデルにより検証し、アジュバントの添加でより強固な免疫原性と感染防御効果を誘導できることを証明した。(6)次世代の新型インフルエンザワクチン開発として、poly(I:C)をアジュバントとした経鼻接種 H5N1 ワクチンを作製し、その免疫効果および感染防御能を検証し、粘膜免疫誘導機序を明らかにした。(7)小児における現行のインフルエンザワクチンの摂取量と抗体産生能の相関を評価し、年齢群別の有効な接種量を提言した。これによって、新型インフルエンザワクチンの適正な接種量の評価に際して有用な参考情報を提供できた。

研究組織

主任研究者

小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第  
3 部室長

分担研究者

田代真人 国立感染症研究所ウイルス第 3 部  
部長

河岡義裕 東京大学医科学研究所 教授

今井正樹 国立感染症研究所ウイルス第 3 部

主任研究官

二宮愛 国立感染症研究所ウイルス第 3 部  
研究員

長谷川秀樹 国立感染症研究所感染病理部  
室長

神谷齊 独立行政法人国立病院機構三重病  
院 名誉院長

城野洋一郎 (財) 化学及血清療法研究所  
次長

## A. 研究目的

2003年末から東アジア諸国の家禽で発生した高病原性H5N1鳥インフルエンザの大流行は、拡大の一途をたどり現在では中国、中近東、インド、アフリカおよびヨーロッパ諸国にまで広がり、もはや制圧することは不可能となった。この間に人への感染例も増え続け、現時点でベトナム、タイ、インドネシア、カンボジア、中国、イラク、アゼルバイジャン、トルコ、エジプトで総数196人の感染例と110人の死亡が報告されている。このことから、当該ウイルスに起因した新型ウイルスによるパンデミックに備えた準備が求められている。その中でも予防対策の根幹を成すワクチン開発においては、流行株の入手から弱毒化ワクチン株の作製過程および開発したワクチン株の安全性と有効性の評価の迅速化、さらには、人用ワクチン株としての品質保障については日々更新したより信頼性の高い作製系を構築しなければならない。

このような状況と必要性に応えるために、本研究班では、高病原性H5N1鳥インフルエンザ流行株から効率よく迅速に弱毒化ワクチン株を作製できる系として、ヒトのインフルエンザウイルスA/PR/8/34cDNAをバックボーンとしたリバーシジェネティクス（RG）法の導入に成功した。これによって、強毒型のH5N1流行株から弱毒化ワクチン株の作製が短期間でできるようになった。しかし、この革新的な技術によって作製されるRGワクチン株は遺伝子組み換え生物等の使用等の規制、いわゆるカルタヘナ法の規制対象に該当することから、文部科学大臣の承認が下りるまでワクチン株作製はできない。通常、承認されるまでに2ヶ月程度かかることから、新たに

変異株が出現しそれからRGワクチン株を緊急開発する事態になった場合は、わが国では迅速に対応できない。

一方、RGワクチン株を海外から供給される場合も、H5N1ウイルスであることから農林水産大臣から輸入許可を得ること、さらに遺伝子組み換え体であることから文部科学大臣への承認申請が必要であり、これらの手続きを同時進行させても2ヶ月はかかる。したがって、自国での開発にしる海外からの供給を受けるにしる、手続き上の制約から新型ワクチンのタイムリーな開発および供給は現段階では困難である。現在、これら事務手続きの迅速化のための解決策を関連省庁と頻繁に協議しているが、殆んど進展していない。

一方、ワクチン製造にRG法を採用した場合は、それに用いるプラスミドベクターにかかる知的所有権問題が障壁となる。所有権を持つ米国企業との合意としては、学術研究や第1層臨床試験までは、特許料は掛からないが、第2層臨床試験以降、ワクチン製剤には特許料が掛かる。米国やEUではこの問題は既に解決していると言われている。しかし、わが国ではワクチンメーカーがこの問題に全くに対応していないことから、最終製剤が完成した際は、大きな問題となる。国内メーカーのより積極的な対応に期待するのみである。

人に接種できるRGワクチン株の作製には、ワクチン製造用に承認された細胞（例えばVero細胞）を使用することとWHOのRGワクチン株作製指針に示されている。このような細胞はEUと米国のワクチンメーカーのみが所有しており、わが国でそれらを使用することも入手することも不可能で

ある。昨年、ATCCから安全性が確認されたワクチン製造用Vero細胞が発売されるという情報が流れたが、それはまだ実現していない。したがって、わが国ではWHOのリスク評価指針を準拠する限り、人用のRGワクチン株は作製できない。

そこで、わが国でも感染研にGMPに準拠したBSL3実験室を備えた施設が平成19年に完成することになり、ワクチン製造の施設面での問題は解決できる見通しがついた。したがって、わが国でもRG法で人用ワクチン株を作製できる細胞株を新たに開発すれば、独自にワクチン株の作製は可能となる。そこで、本研究班では海外で使用されているVero細胞に匹敵する第二のワクチン株製造用細胞株の構築を企画し、RG法に適した細胞株の検索を行ってきた。その結果、ATCCから購入したLLCMK2細胞が適していることが判明したことから、これをGMP施設でバンキングし、ICHガイドラインに沿って各種安全性試験を実施した。この細胞株の構築は今年度で完成する予定であるが、これによってわが国の新型インフルエンザ対策に大きく貢献することになる。

一方、現行のRG法は12種類のプラスミドを細胞に導入することから、RGウイルスの回収効率は必ずしも高くない。そこで、本研究では、よりウイルス回収効率の高いRG法へ改良する試みとして、複数のウイルス遺伝子を1本のプラスミドに組み込んで細胞に導入するプラスミド数を少なくした第3世代のRG法の開発を行った。この系の完成は、RGワクチン開発の進展のみならずインフルエンザウイルス学全般にも大きく貢献することになる。

1997年に香港で発生したH5N1ウイルスへの感染事例の際に試作した弱毒型H5N1ワクチンの臨床試験から、当該ワクチンは人への免疫原性がきわめて低く、適当なアジュバントの添加が不可欠であることを我々は学んだ。このことから本研究では、現在、人への使用が認可され他のワクチンで使用実績のあるアルムアジュバントを添加したH5N1ワクチンの開発を行い、その効果をマウスを用いた動物モデルで検討した。本年度は、2004年にベトナムで流行したA/Vietnam/1203/2004株からRG法で弱毒化ワクチンを作製し、アルムアジュバント添加および非添加における免疫効果、感染防御効果を検証し、ワクチンに用いる適正な抗原量やアジュバント添加法などを検討した。これらの研究成果は、プロトタイプワクチンの臨床試験へ向けての情報として有効活用されることになる。

一方、次世代のワクチンとして、H5N1経鼻接種ワクチンの開発も皮下接種用のワクチン開発と並行して行う必要がある。前年度の本研究では、経鼻接種用のアジュバントの検索を行ない、poly(I:C)とキチン微粒子の混合が免疫原性の向上に有効であることを示唆した。今年度においては、poly(I:C)をアジュバントとしたH5N1経鼻接種ワクチンの免疫反応を責任リンパ装置である鼻咽頭関連リンパ装置(NALT)でのToll-like receptorの遺伝子発現およびIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ の誘導などについて詳細に解析した。さらに、これらの免疫応答が感染防御にどのように機能しているのか解明する。

一方、新型インフルエンザワクチンの緊急摂取が必要になった事態に備えて、小児

への投与量の検討は不可欠である。本研究では、現行のインフルエンザワクチンの小児に対する有効な接種量を明確にするために、年齢群別の接種量と抗体応答の相関を詳細に検討した。これらの成績から得られる情報は、新型ワクチンの接種量を検討する際に有用な情報として活用される。

## B. 研究方法

1. 前年度に本研究も参加してまとめられたRGワクチンに対するWHOのバイオセーフティーリスク評価指針に沿って、臨床試験を行うNIBRG-14ワクチン株の安全性評価を行った。

2. RG法に用いるプラスミドの改良。これまでのRG法は12種類のプラスミドを293T細胞やVero細胞に導入していた。プラスミドの数を減少させるために、複数の遺伝子を1個のプラスミドに挿入したベクターを開発し、それらを用いたウイルス回収効率を検討した。

3. 2005年に現在開発中のワクチン株(NIBRG-14)とは抗原性の異なる高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスA/Vietnam/JPHN30321/2005が分離された。このことから、本研究では当該分離株が流行しても対応できるように、新たに弱毒化RGワクチン株(A/Vietnam/JPHN30321/2005)を作製した。このRGワクチン株の安全性試験をトリプシン依存性試験で検証した。

4. 2004年のH5N1分離株A/Vietnam/JP1203/2004からRGワクチン株を作製し、2%アルムアジュバントを添加したアジュバントワクチンをマウスに皮下接種し、免疫原性、感染防御効果について検討し

た。

5. RG法で弱毒化したA/HK/156/97(H5N1)株由来の試作ワクチン(HK9-1-1、H5N1)に経鼻接種用アジュバントとして合成二本鎖RNA(polyI:C)、コレラトキシンBサブユニットをそれぞれ混合し、マウスに経鼻接種した。これらワクチンに対する抗体価をELISA法で測定した。また、NALTでのToll-like receptor (TLR)3, TLR4, TLR7の発現を調べる為、感染後、もしくはワクチン接種後に72時間まで経時的にNALTを回収しSV-Total RNA Isolation kit (Promega, Madison, WI)を用いてRNAを分離後Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Valencia, CA)を用いてcDNA合成を行ない、定量PCRにて解析した。

6. 1999/00~2004/05年の6シーズンにわたる調査でワクチン接種群に登録された健常小児を対象として、ワクチン接種前、1回目接種4週間後および2回目接種4週間後の計3回のHI抗体測定が行い得た者6シーズン合計981人について解析した。ワクチンは1999/2000シーズンから昨シーズンまでの6シーズンについて検討した。HI抗体産生については、0歳児は0.1mL接種群(11人)と0.25mL接種群(18人)、1~5歳児は0.2mL接種群(341人)と0.25mL接種群(321人)、6~12歳児は0.3mL接種群(81人)と0.5mL接種群(209人)を対象に、年齢・接種量別に、ワクチン1回接種または2回接種によるHI抗体価の有意な(2管以上の)上昇者割合を求め、0.1~0.3mL接種群と0.25mLまたは0.5mL接種群間でイエーツの $\chi^2$ 検定によ

り比較検討した。

また、HI 抗体価の有意な上昇は 2 管以上とされていることから、ワクチン接種前 HI 抗体価 10 倍未満を対象に、1 回接種または 2 回接種で感染防御水準とされる 40 倍以上に上昇した割合を求め、前述と同様に、0.1~0.3mL 接種群と 0.25mL または 0.5mL 接種群間でイエーツの  $\chi^2$  検定により比較検討した。

副反応については、ワクチン接種後 48 時間以内に発現した 37.5°C 以上の発熱、発疹と局所反応（発赤、腫脹、硬結）に分け、ワクチン接種量を考慮し、年齢を 0 歳、1~5 歳、6~12 歳に 3 階級に区分し、1 回接種後と 2 回接種後の発現者割合に加え、1 回接種と 2 回接種を通じた発現者割合を求め、両群間でイエーツの  $\chi^2$  検定により比較検討した。

#### 7. GMP に準拠した細胞株の検討：

前年度に RG 用細胞としてバンキングしたアカゲザル腎臓由来の LLC-MK2 細胞（CCL-7、CCL-7.1）について ICH ガイドライン（Q5A、Q5D）を参考に特性解析試験、純度試験、核型分析、造腫瘍性試験等の安全性情報に関する試験を実施した。

### C. 結果と考察

#### 1 遺伝子操作技術（RG 法）によるインフルエンザワクチン株開発のリスク評価。

新型インフルエンザワクチン製造株を安全にしかも短期間で作製するためには RG 法が最適である。昨年度本研究班も参加して作成された WHO のガイドラインでは、RG 法で作製されたワクチン株の取り扱い、安全性試験等についての指針が示された。そ

の主たる内容は、(1)RG 法に用いる出発材料となるウイルスの品質に関する指針、(2)RG 法で人用ワクチン製造に用いる細胞株の品質管理に関する指針、(3)ワクチン株製造に不適である細胞株（293T 細胞、293T/MDCK 混合細胞など）の明示、(4)ワクチン株製造に用いる試薬に関する指針、(5)RG 操作でワクチン製造株を作製する施設および SOP の作成、バイオセーフティーに関する指針、である。

今回は、今年度に臨床試験を予定している NIBRG-14 ワクチン株についてリスク評価を行った。その結果、当該株を作製したバックボーンとなっている A/PR/8 株にはニワトリ、マウス、フェレットに病原性を示すような遺伝子分節の構成は持っていないこと、導入される弱毒型（解列部位にアルギニン残基を 1 つのみ持つ）の HA 遺伝子および NA 遺伝子およびその発現蛋白については、ヒトに対する毒性は通常のインフルエンザウイルスと同等である、さらに我が国のワクチン製造メーカーの製造設備（BSL2+）を考慮すると、従業員への感染のリスクおよび環境への汚染の可能性は極めて低い、などから NIBRG-14 ワクチン株はこれらの安全性指針に合致した安全な株であることが確認された。

#### 2 RG ウイルス回収効率の高い第 3 世代の RG 法への改良。

これまでインフルエンザウイルスのリバースジェネティクス法では 12 種のプラスミドを同時にトランスフェクションしなくてはならず、293T 細胞以外の細胞では効率よくウイルスを回収できなかった。そこで、複数のインフルエンザ

ウイルス遺伝子を同一のプラスミドに組み込んで、4種のプラスミドにしたRG系を開発した。これによって、遺伝子操作法がより簡便になったこと、さらに293T細胞以外の細胞でもウイルスを効率よく作出することが可能となった。

本改良RG系は、現在、米国で主に使われている8プラスミド系より細胞にとって負担の軽い少数プラスミド系であり、作業の煩雑さの回避やウイルス回収効率を上げる点で今後のRGワクチン株作製にとって大きなメリットとなる。

3 2005年のH5N1流行株から新規に作製したRGワクチン株および動物モデルによるアルムアジュバントワクチンの効果検討。

2004年のH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスのプロトタイプであるA/Vietnam/JP1203/2004からRG法により弱毒化ウイルスを作製し、アルムアジュバントを添加した全粒子ワクチンを試作した。前年度にRG-A/HK/213/2003ワクチンを用いて行った方法と同様にマウスにおいて免疫原性および感染防御効果を評価した。驚くことに、RG-A/Vietnam/JP1203ワクチンはアジュバントを添加しているにもかかわらず、マウス血清中のVNJP1203/04に対するHI抗体は全て検出限界以下であり、中和抗体も著しく低かった。このことは、これと抗原性が類似している臨床試験が予定されているNIBRG-14ワクチンも免疫原性が低いことが予想され、H5N1ワクチンとして実用化できるか慎重に検討する必要が出てきた。

マウスなど動物実験とは違って、野生株の攻撃試験ができない人においては、ワクチン接種後の抗体価上昇がワクチンの有効性の指標となることから、ワクチン抗原量の再検討およびアジュバントの再検討をする必要があると思われる。

一方、RG-A/Vietnam/JP1203ワクチン接種マウスにおける強毒株に対する防御効果を調べたところ、HI抗体はほとんど検出されなかったにもかかわらず、高濃度の抗原量群とアジュバント添加群で有効な感染防御効果が見られた。この免疫学的な防御機序は不明であり、今後詳細を検討する必要がある。

一方、2005年にベトナムで抗原性の異なるH5N1変異株A/Vietnam/JPHN30321/2005(H5N1)が人から分離された。現時点でこの変異株は少数派であり、これによる流行が拡大する兆しはない。しかし、これまで開発してきたプロトタイプワクチン株と抗原性が大きく異なることから、万が一の場合に備えてRGワクチンを開発する必要があると判断した。したがって、本研究ではRG-A/Vietnam/JPHN30321/2005ワクチン株を作製し、その安全性をトリプシン依存性試験で確認した。今後の流行状況によって、試作ワクチンを作る必要が出た場合、WHOのリスク評価指針に沿った詳細な安全性試験を行わなければならない。

4 マウスにおける経鼻接種アジュバントワクチン接種後の免疫応答。

新型インフルエンザワクチンとしては皮下接種法によるアジュバントワクチンの



開発が先行している。しかし、新型インフルエンザに対応する次世代のワクチン開発も並行して進めておく必要がある。そこで、前年度からより自然感染に近い局所免疫を誘導できる経鼻接種ワクチンとそれに用いるアジュバントについて検討した。今年度は、アジュバントとして polyI:C がある程度効果があることを見出した結果を踏まえて、ワクチン接種後に誘導される NALT でのサイトカイン遺伝子発現を調べた。その結果、NALT における IL-4 と IL-12p40 の遺伝子誘導が HA 特異的抗体応答に関与していることが示唆された。これらの成績から、polyI:C アジュバント経鼻接種ワクチンでは、接種後早い時期から IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  の誘導がみられ、更に Th1, Th2 関連サイトカインである IL-4, IL-12p40 の誘導がみられ、これらがウイルスの感染部位を担当する免疫組織 NALT で発現され自然免疫から獲得免疫への橋渡しをしている可能性を示す知見が得られた。

##### 5 ワクチン製造株作製のための GMP 基準に準拠した細胞株の開発。

RG 法を採用したワクチン株製造ガイドラインが WHO により策定され、今後は品質管理指針に沿ったワクチン株開発が求められる。わが国での RG ワクチン開発にとって、最大の障壁は WHO が推奨する海外メーカーが所有する Vero 細胞がないこと、それを使用することもできないことである。この問題を打開するために、本研究班では、新たにプラスミド DNA の取り込み効率の高い細胞株を検索し、安全性試験に合

格した人用ワクチン株作製の細胞株の確立を試みた。前年度においては LLC-MK2 (ATCC CCL-7.1) 細胞が Vero 細胞よりプラスミド DNA の取り込み効率が良いことを突き止めた。そこで、GMP 管理された施設において LLC-MK2 細胞からマスターセルバンクを作製し、さらにその一部からワーキングセルバンクを構築した。これらセルバンクの安全性試験項目を ICH ガイドラインを参考に設定し、各種安全性試験、純度試験、特性試験、腫瘍原性試験を実施した。その結果、試験委託メーカーの初歩的な実験ミスおよびその結果報告の遅延により、再試験となった腫瘍原性試験を除いた全ての試験は合格であることが確認された。また、暫定的ではあるが腫瘍原性試験も合格できる所見が得られていることから、H18 年度には品質管理されたわが国独自の細胞株が誕生する予定である。

WHO の RG ワクチン作製ガイドライン (WHO guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics, 2005) の細胞の項には、RG ワクチン株作製には、ヒト用ワクチン製造に採用できる細胞株を用いるべきと記載されている。Vero 細胞と異なり、今回本研究で構築した LLCMK2 細胞は、ワクチン製造に使用された実績はない。しかし、RG に用いる細胞株の品質は各国の authority によって承認されることになっていることから、本研究で開発した LLCMK2 細胞を承認申請し、今後わが国での人用 RG ワクチン株作製は LLCMK2 細胞で行うことを世界に発信する予定である。これによって、WHO のガイドラインを本研究で開発

した LLCMK2 細胞も加えたものに改定するよう働きかけていきたい。

6 小児におけるインフルエンザ HA ワクチンの接種量と免疫応答および副作用に関する検討。

わが国では13歳未満の小児における現行のHAワクチンの接種回数は2回であるが、年齢群別に接種量は異なっている。そこで、現行規定の接種量(0歳0.1mL、1~6歳未満0.2mL、6~13歳未満0.3mLの接種群)と、0~6歳未満の0.25mL接種、6~13歳未満の0.5mL接種群に分け、HI抗体産生状況と副反応発現状況を比較検討した。その結果、B株を除き量が多い方が抗体価が高い傾向が見られた。また副反応については、今回検討した欧米並みの接種量であっても、現行規定の接種と同等であり、問題のないことが分かった。

これらの情報は、パンデミック発生時にワクチン接種が必要になった場合には、現行ワクチンのように年齢によって接種量を細かく変更するようなことは現実的でなく、安全性を考慮した場合6歳未満0.25mL、6歳以上0.5mLの接種で対応しても安全性に問題はないとするガイドライン作りの基盤となる。

#### D 結論

- Vero 細胞に代わる RG ワクチン作製用の安全性の検証された LLCMK2 細胞バンクを作製し、わが国独自の RG 用細胞株の構築の見通しがついた。
- 臨床試験を予定している NIBRG-14 ワクチン株についてバイオセーフティーリスク評価を行い、安全であること

を確認した。

- 4 プラスミド導入法を採用した RG 法の改良を行い、第3世代 RG 法を確立した。
- RG-A/Vietnam/JP1203 ワクチンの効果をマウスで検証し、アジュバント添加でも免疫原性が低いことを証明した。しかし、感染防御効果は高濃度の高原量とアジュバント添加で獲得されることを観察した。
- 2005 年の H5N1 分離株から、抗原性の大きく異なる株 A/Vietnam/JPHN30321/2005 から RG ワクチン株を作製した。
- polyI:C アジュバント経鼻接種ワクチンの局所免疫応答を調べ、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、更に Th1、Th2 関連サイトカインである IL-4、IL-12p40 が獲得免疫として誘導されることを明らかにした。
- 現行のインフルエンザワクチンは、6歳未満0.25mL、6歳以上0.5mLの接種で対応しても安全性に問題はない。

#### A. 研究発表

##### 1. 論文発表

R. O. Donis, Jean-Thierry Aubin, Saliha Azebi, Amanda Balish, Jill Banks, Niranjan Bhat, Rick A. Bright, Ian Brown, Philippe Buchy, Ana-Maria Burguiere, Hua-lan Chen, Peter Cheng, Nancy J. Cox, Aaron Curns, Frédérique Cuvelier, Guohua Deng, Julia Desheva, Stéphanie Desvaux, Nguyen Hong Diep, Alan Douglas, Scott F. Dowell, Nguyen Tien Dung, Lindsay Edwards, Keiji Fukuda, Victoria Gregory, Elena Govorkova, Alan

Hampson, Nguyen Thi Hong Hanh, Scott Harper, Alan Hay, Erich Hoffmann, Diane Hulse, Masaki Imai, Shigeyuki Itamura, Samadhan Jadhao, Patricia Jeannin, Chun Kang, Jackie Katz, Jae-Hong Kim, Alexander Klimov, Yong-kuk Kwon, Chang-Won Lee n, Phuong Song Lien, Yi Pu Lin, Yanbing Li, Wilina Lim, Stephen Lindstrom, LaMorris Loftin, Jan Mabry, Taronna Maines, Jean-Claude Manuguerra, Masaji Mase, Yumi Matsuoka, Margaret McCarron, Marie-Jo Medina, Doan Nguyen, Ai Ninomiya, Masatsugu Obuchi, Takato Odagiri, Malik Peiris, Jean-Marc Reynes, James Robertson, Claudine Rousseaux, Takehiko Saito, Somchai Sangkitporn, Jean-Louis Sarthou, Michael Shaw, James M. Simmerman, M. Slomka, Catherine Smith, San Sorn, Erica Spackman, Klaus Stöhr, David L. Suarez, Haan Woo Sung, David E Swayne, Maryse Tardy-Panit, Masato Tashiro, Pranee Thawatsupha, Terrence Tumpey, Timothy Uyeki, Phan Van Tu, Sylvie Van der Werf, Robert Webster, John Wood Richard Webby, Xiyan Xu, Guan Yi Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia Emerging Infectious Diseases 11, 1515-1521, 2005

Subash C. B. Gopinath, Tomoko S. Misono, Kazunori Kawasaki, Takafumi Mizuno, Masaki Imai, Takato Odagiri and Penmetcha K. R. Kumar An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. J. Gen. Virol. 87, 479-487, 2006

Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Masato Tashiro and Takato Odagiri Development of H5-RT-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. Vaccine (in press)

Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminium adjuvant induces cross-protective immunity against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses Vaccine (in press)

小田切孝人 インフルエンザウイルス流行の予測は毎年どのようにして行うのか 日医雑誌 134, 1907-1910, 2006

## 2. 学会発表

Takato Odagiri Strain evolution of H5N1 avian influenza from Hong Kong 1997 to Vietnam/Thailand 2004/2005. Taiwan Influenza Study Group Symposium on Influenza Pandemic. Taiwan, August, 2005.

Takato Odagiri Selection of vaccine strain for H5N1 influenza pandemic. Taiwan Influenza Study Group Symposium on Influenza Pandemic. Taiwan, August, 2005.

Takato Odagiri, Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru

Ishizaki, Phan Van Tu, Masato Tashiro  
Development of H5-RT-LAMP  
(Loop-Mediated Isothermal Amplification)  
system for rapid diagnosis of H5 avian  
influenza virus infection. The Second  
European Influenza Conference, Malta,  
September, 2005

Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro  
and Takato Odagiri Inactivated influenza  
H5N1 whole-virus vaccine with aluminium  
adjuvant induces cross-protective immunity  
against lethal challenge with highly  
pathogenic H5N1 avian influenza viruses  
Vaccine The Second European Influenza  
Conference, Malta, September, 2005

Takato Odagiri Development of H5N1  
vaccine in Japan. US/Japan Cooperative  
Medical Science Program ARI Panel. 10<sup>th</sup>  
Annual Meeting, Galveston, USA, January  
24-25, 2006.

Takato Odagiri International responses of  
WHO influenza collaboration center in  
Tokyo on the outbreaks caused by highly  
pathogenic H5N1 avian influenza. Asian  
Research Forum on Emerging and  
Reemerging Infectious Diseases-2006. Tokyo,  
February 19-20, 2006.

小田切孝人 2004/05シーズンのインフルエ  
ンザ流行解析と次シーズンのワクチン 平成  
17年度衛生微生物技術協議会。福井市、7  
月、2005

二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人  
弱毒化 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウ  
イルスを用いたアルムアジュバント添加ワク  
チンのマウスにおける有効性の検討 第9回  
日本ワクチンワクチン学会 10月、大阪  
(2005)

板村繁之、小田切孝人、田代真人、駒瀬勝  
啓、多田善一、後藤修郎、池田富夫 インフ  
ルエンザパンデミックワクチン開発に関わる  
試作モックアップワクチンの調製およびその  
性状 第9回日本ワクチンワクチン学会 10  
月、大阪(2005)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザか  
ら新型インフルエンザへ 第5回日本バイオ  
セーフティー学会 横浜、11月(2005)

一戸猛志、田村慎一、千葉丈、小田切孝人、  
田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀  
樹 NKT細胞活性化による粘膜免疫応答の  
誘導と高病原性鳥インフルエンザウイルスに  
対するワクチンへの応用 第53回日本ウイ  
ルス学会、横浜、11月(2005)

小淵正次、今井正樹、小田切孝人 B型イ  
ンフルエンザウイルスBM2 蛋白膜貫通領域  
の機能解析 第53回日本ウイルス学会、横  
浜、11月(2005)

小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、  
今井正樹、二宮愛、西藤岳彦、田代真人  
2004/05シーズンのインフルエンザ流行株と  
平成17年度のワクチン株 第53回日本ウイ  
ルス学会、横浜、11月(2005)

二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人  
2004年 H5N1 型高病原性鳥インフルエンザ  
分離株を用いたアルムアジュバント添加弱  
毒化ワクチンのマウスにおける有効性の検  
討 第53回日本ウイルス学会、横浜、11月  
(2005)

板村繁之、小田切孝人、田代真人 新型イ  
ンフルエンザへの対応ーワクチンの開発・準  
備 第53回日本ウイルス学会、横浜、11月  
(2005)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザの

現状と新型インフルエンザ対策 第3回東海  
北陸ブロック健康危機管理連絡協議会 名  
古屋、11月(2005)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエ  
ンザと新型インフルエンザ対策 平  
成17年度希少感染症診断技術研修会  
国立感染症研究所 2月(2006)

B. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

分担研究報告書

遺伝子操作技術(リバーシ・ジェネティクス)による  
インフルエンザワクチン株開発に関するリスク評価の研究

分担研究者 田代真人 国立感染症研究所 ウイルス第3部 部長

**研究要旨** 現行の不活化インフルエンザワクチン製造株の開発は、発育鶏卵で分離された野生株から、発育鶏卵を用いた継代または高増殖性標準株(A/PR/8)との遺伝子分節再集合体の作製によって行われている。しかし、このような試行的な方法によっては、抗原的にワクチン株として望ましい野生株から、ワクチン製造用に適したウイルス株が常に短期間に開発出来るとは限らない。一方、高病原性鳥インフルエンザに対するワクチン製造株の開発においては、高病原性ウイルスをそのままワクチン製造に用いることは、従業員に対する安全確保および製造効率の面からは採用できず、ウイルスの弱毒化が必要である。最近、このような諸問題を解決し、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術(リバーシ・ジェネティクス)が開発されてきた。最近東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されている H5N1 型高病原性鳥インフルエンザに対するワクチンの緊急開発に際しては、この技術を用いたワクチン株の開発に応用・実用化する必要がある。そこで、昨年度は、WHO 世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチン株開発に関する基本的問題を検討し、安全性に関する基本指針をまとめた。本年度は、先に WHO に協力してまとめた鳥インフルエンザウイルスに由来する不活化ワクチンの試験製造に関するバイオセフティーリスク評価に基づいて、リバーシ・ジェネティクス法により製造した試験ワクチンの安全性を評価した。

#### A. 研究目的

現行の不活化インフルエンザワクチン製造株の開発は、発育鶏卵で分離された野生株から、発育鶏卵を用いた継代または高増殖性標準株(A/PR/8)との遺伝子分節再集合体の作製によって行われている。しかし、このような試行的な方法によっては、抗原的にワクチン株として望ましい野生株から、ワクチン製造用に適したウイルス株が常に短期間に開発出来るとは限らない。

一方、高病原性鳥インフルエンザに対するワクチン製造株の開発においては、高病原性ウイルスをそのままワクチン製造に用いることは、万一従業員が感染を受けた際

の危険性があり、また発育鶏卵が早期に死んでしまうためにウイルス増殖量が少なく、製造効率が極端に悪いことから、適当ではない。従って、ワクチン製造には、弱毒型もしくは弱毒化したウイルス株を使用する必要である。

最近、このような諸問題を解決し、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術(リバーシ・ジェネティクス)が開発されてきた。これを用いれば、任意の感染性ウイルスを作製することが可能である。

最近東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されている H5N1 型高病原性鳥インフルエンザに対しては、WHO はワクチン製造株の緊急開発を指示した。そ

の実施に際しては、この技術をワクチン株の開発に応用・実用化することが最短かつ確実な選択肢である。

しかし、この新技術の応用においては、世界的にも管理規定や指針はない。そこで、昨年度には、WHO 世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチン株開発に関する基本的問題を検討し、その基本指針をまとめた。

一方、WHO 世界インフルエンザ計画のメンバーとして、2003 年に「WHO 鳥インフルエンザウイルスに由来する遺伝子再集合不活化インフルエンザワクチンの試験製造におけるバイオセフティーに関するリスク評価基準」をまとめたが、今回は、これらの基準に沿って、現在開発中の H5N1 型試験ワクチンの製造株について、リスク評価を行った。

## B. 研究方法

これまで経験、蓄積されてきたリバーシ・ジェネティクスに関する技術的な問題点、遺伝子組換え操作・遺伝子組換え医薬品としての位置づけ、安全性の評価、バイオセフティー管理上の評価と対応、生物学的製剤の原材料製造過程としての位置づけと GMP との関係等に関する情報、及び国内外における議論を幅広く検討した。これらの情報から得られた合意事項をまとめるとともに、現在の施設、設備、対応能力を把握し、現実的に緊急に対応する必要性を勘案して、現時点における基本指針を作成した（昨年度報告書に素案を記載）。

さらに、WHO 基準に基づいて、現在開発中の H5N1 型試験ワクチン製造株について、リスク評価を行った（基準については、最後に添付してある。）

## C. 研究成果

現在開発中の H5N1 型ワクチン製造株（NIBRG-14）に関して、バイオセフティー上のリスク評価を行った。その結果、

1. このリバーシジェネティクスによる PR8 株とのリアソータントは、ニワトリ、マウス、フェレットに病原性を示すような遺伝子分節の構成は持っていない。
2. PR8 株自身は、長年発育鶏卵で継代されており、ヒトに対するリスクは、通常流行しているインフルエンザウイルス株よりも低い。ただし、ヒト由来のウイルス株であるので、ヒトへの感染性はある程度保持している可能性がある。以前ソ連および中国において PR8 株の伝播流行が報告されたことがあるが、それについては確実な根拠が無く、またその後、同様の報告はない。
3. 導入される弱毒型（解列部位にアルギニン残基を 1 つのみ持つ）の HA 遺伝子および NA 遺伝子およびその発現蛋白については、ヒトに対する毒性は通常のインフルエンザウイルス以上のリスクは考えにくい。
4. マウスならびに哺乳類に対する病原性を規定する PB2 および NS1 の特定変異については、いずれも PR8 株に由来するので、鳥ウイルスに由来する高いリスクは存在しない。
5. 我が国のワクチン製造メーカーの製造設備（BSL2+）を考慮すると、従業員への感染のリスクおよび環境への汚染の可能性は極めて低いと判断される。

## D. 考察

WHO のガイドライン（2003）に沿って、現在開発中の H5N1 型試験ワクチン製造に関してリスク評価を行ったところ、製造株（NIBRG-14）に関して特にバイオセフティー上で問題となる点は指摘できなかった。我が国のワクチンメーカーの製造設備を考慮すると、極めて安全性の高い製造株であると判断された。

今後は、昨年度にまとめた最終案に沿って、我が国におけるインフルエンザワクチン製造株

の開発に関するガイドラインを作製する必要がある。

特に、BSL3 の H5N1 ウイルスにおけるリバーシ・ジェネティクス操作は、外部への汚染防止というバイオセフティーの規制と、外部からの混入汚染の防止という品質保証の規制の、お互いに矛盾する条件を満足させねばならず、この解決は技術的にも容易ではない。前者については BSL3 実験室が要求され、後者については GMP に準じた構造施設と運用が要求される。

この両者を満足させる施設は、我が国には存在しない。そこで、来年度において、感染研にこのような施設の建設が予定されており、これによって、安全性と品質確保という両条件を満たす、インフルエンザワクチン製造株の開発が可能となろう。

## E. 結論

最近、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術（リバーシ・ジェネティクス）が開発されてきた。最近東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されている H5N1 型高病原性鳥インフルエンザに対するワクチンの緊急開発に際しては、この技術をワクチン株の開発に応用・実用化する必要がある。そこで、WHO 世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチン株開発に関する基本的問題を検討し、その基本指針をまとめた。

今回は、この指針に沿って、現在開発中の H5N1 型ワクチン製造株(NIBRG-14)のバイオセフティー上のリスク評価を行い、WHO 基準を満たした安全性の高い物であると評価された。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 論文発表

Kidokoro, M., Tashiro, M., Shida, H. :Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102; 4152-4157, 2005

Kubota, T., Yokosawa, N., Yokota, S., Fujii, N., Tashiro, M., Kato, A.: The mumps virus V protein antagonizes interferon without accompanying the complete degradation of STAT1. J.Virol.79; 4451-4459, 2005.

Horimoto T, Takada A, Fujii K, Goto H, Hatta M, Watanabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Yamada S, Ito H, Ito T, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kawaoka Y.:The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. Vaccine (in press)

Members of the World Health Organization's Global Influenza Program and collaborating laboratories;

Amanda Balish (6), Niranjan Bhat (6), Rick A. Bright (6), Hua-lan Chen (9), Nancy J. Cox (6), Aaron Curns (6), Julia Desheva (6), Nguyen Hong Diep (19), Ruben O. Donis (6), Scott F. Dowell (14), Nguyen Tien Dung (17), Lindsay Edwards (6), Keiji Fukuda (6), Alan Hampson (2), Nguyen Thi Hong Hanh (18), Scott Harper (6), Alan Hay (5), Masaki Imai (4), Samadhan Jadhao (6), Chun Kang (12), Jackie Katz (6), Alexander Klimov (6), Phuong Song Lien (19), Wilina Lim, et al (8), Stephen Lindstrom (6), Jan Mabry (6), Taronna Maines (6), Masaje Mase (11), Marie-Jo Medina (6), Yumi Matsuoka (6), Doan Nguyen (6), Ai Ninomiya (4), Masatsugu



Obuchi (4), Takato Odagiri (4), Malik Peiris (10), Takehiko Saito (4), Somchai Sangkitporn (13), Michael Shaw (6), James M. Simmerman (14), Catherine Smith (6), Erica Spackman (7), Klaus Stohr (1), David Suarez (16), David E Swayne (16), Masato Tashiro (4), Pranee Thawatsupha (13), Terrence Tumpey (6), Timothy Uyeki (6), Sylvie Van der Werf (3), Robert Webster (7), John Wood, et al (15), Richard Webby (7), Xiyan Xu (6), Guan Yi (10): Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia: antigenicity, antiviral drug sensitivity and vaccine development. *Emerg. Infect. Dis.* 2005 (in press)

学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

GLOBAL  
HEALTH  
SECURITY

EPIDEMIC  
ALERT &  
RESPONSE

**Production of pilot lots of  
inactivated influenza vaccines  
from reassortants derived from  
avian influenza viruses**

*Interim biosafety risk assessment*



World Health  
Organization

DEPARTMENT OF COMMUNICABLE DISEASE  
SURVEILLANCE AND RESPONSE



**Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortant derived from avian influenza viruses**

*Interim biosafety risk assessment*



WORLD HEALTH ORGANIZATION  
DEPARTMENT OF COMMUNICABLE DISEASE  
SURVEILLANCE AND RESPONSE

© World Health Organization 2003

All rights reserved.

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

The World Health Organization does not warrant that the information contained in this publication is complete and correct and shall not be liable for any damages incurred as a result of its use.