

接種群の比較検討は、本来、同一シーズン内で両群の年齢ごとの調査件数が概ね揃っていることが望ましいが、2002/03年のように全年齢で現行接種群のみのデータであったり、2003/04年のように全年齢で欧米並み接種群のみのデータであったことが影響した可能性があること、②抗体測定に用いるワクチン抗原の力価がシーズンによって異なっていた可能性のあることも考えられたが、臨床治験であり患者さんの意向も考慮しながら検討を行うため、変更が難しいこともありいずれについても現状では明確にすることはできなかった。

一方、副反応発現状況は、全身副反応（37.5℃以上の発熱、発疹）、局所副反応（発赤、腫脹、硬結）のいずれについても、現行接種群と欧米並み接種群の間で、発現率に有意な差異はみられず、接種量の増加が副反応に影響することはなかった。

新型インフルエンザパンデミックに際してワクチン接種はかなりの混乱が予想され、1日に何千人もの接種をするような事態が発生した場合には小児についても現行のように接種量を細かく分けることは現実的でなく、欧米の接種のように0.25ml接種群と0.5ml接種群の2段階で安全に接種できるとがこの検討でも証明され、効果にも差がないと考えられることから利用できる結果と考える。

E. 結論

本研究では、現行規定の接種群と0～5歳0.25mL、6～12歳0.5mLの欧米並み接種群を対象にHI抗体産生状況と副反応発現状況を比較検討したが、HI抗体産生状況については、考察でも述べたように、同一シーズン内で両群の年齢ごとの調査件数が揃っていないこと、シーズンによる抗体測定用ワクチン抗原の力

価の違い等が影響したためか、用量反応関係が明らかにみられたのはA(H1N1)株とA(H3N2)株の0～3歳であったが、全体を見るとB株を除き量が多い方が抗体価が高い傾向が見られた。さらに調査をするには前者の要因については新たな調査をしなければならないが、後者については現在残っている冷凍保存血清を用いて一括同時にHI抗体測定を行うことにより解決できる可能性が期待できるので、検討してみる所存である。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、問題のない結果であった。

今後予想される新型ウイルスによるパンデミックが起こった場合には、成人はもとより小児にも大量の人数に接種する必要性が考えられる。その際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ものと考えられる。この成績はもし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考慮する余地があるものとする。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 大熊 和行、松村 義晴、神谷 齊
：2002/2003年の三重県における乳幼児に対するインフルエンザHAワクチンの有効性と安全性。小児感染免疫 17 (1) 3-16,2005
2. 神谷 齊：わが国の予防接種の現状と問題点。臨床と微生物 32 (5) 431-435,2005
3. Akihisa Okumura, Takashi Nakano, Yukiko Fukumoto, Kazuo Higuchi, Hitoshi Kamiya,

Kazuyoshi Watanabe, Tsuneo Morishima :
Delirious behavior in children with influenza :its
clinical features and EEG findings. Brain &
Development 27,271-274.2005

4.神谷 齊：これからの予防接種. 小児感
染免疫 17 (4) 335-340. 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1. 解析対象者のワクチン接種量と年齢構成

シーズン	接種量 (mL)	年齢												合計	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
1999/00年	0.1	2													2
	0.2		9	8	10	13	4								44
	計	2	9	8	10	13	4								46
2000/01年	0.1	5													5
	0.2		15	18	24	20	20								97
	0.25	2	5	2	2	5	4								20
	計	7	20	20	26	25	24								122
2001/02年	0.1	4													4
	0.2		16	14	13	27	18								88
	0.25			5	4	7	7								23
	計	4	16	19	17	34	25								115
2002/03年	0.2		20	12	29	21	30								112
2003/04年	0.25	16	38	44	30	41	43								212
	0.5							37	23	21	12	8	9	4	114
	計	16	38	44	30	41	43	37	23	21	12	8	9	4	326
2004/05年	0.25			19	23	15	27								84
	0.3							20	18	12	16	8	4	3	81
	0.5							17	15	23	14	12	4	10	95
	計			35	47	31	43	37	33	35	30	20	8	13	332
合計		29	103	122	135	149	153	74	56	56	42	28	17	17	981

表2. 各シーズンのワクチン株

シーズン	A(H1N1)	A(H3N2)	B
1999/00年	A/北京/262/95(H1N1)	A/シドニー/5/97(H3N2)	B/山東/7/97
2000/01年	A/ニューカドニア/20/99(H1N1)	A/パナマ/2007/99(H3N2)	B/山梨/166/98
2001/02年	A/ニューカドニア/20/99(H1N1)	A/パナマ/2007/99(H3N2)	B/ヨハネスバーグ/5/99
2002/03年	A/ニューカドニア/20/99(H1N1)	A/パナマ/2007/99(H3N2)	B/山東/7/97
2003/04年	A/ニューカドニア/20/99(H1N2)	A/パナマ/2007/99(H3N3)	B/山東/7/98
2004/05年	A/ニューカドニア/20/99(H1N2)	A/ワイオミング/3/2003(H3N2)	B/上海/361/20

表3. A(H1N1)接種によるHI抗体価2管以上上昇状況

年齢区分	ワクチン接種量 (mL)	対象者数	1回目の接種で2管以上上昇した者		2回目の接種で2管以上上昇した者		1,2回の接種を通じて2管以上上昇した者	
			人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※
0歳	0.1	11	2 (18)	1.000	5 (45)	1.000	6 (55)	0.796
	0.25	18	7 (39)		9 (50)		12 (67)	
1歳	0.2	60	31 (52)	0.752	20 (33)	0.038	47 (78)	0.289
	0.25	43	20 (47)		24 (56)		38 (88)	
2歳	0.2	52	32 (62)	0.538	11 (21)	0.900	42 (81)	0.953
	0.25	70	48 (69)		13 (19)		58 (83)	
3歳	0.2	76	43 (57)	1.000	9 (12)	0.288	48 (63)	0.863
	0.25	59	34 (58)		3 (5)		39 (66)	
4歳	0.2	81	48 (59)	0.668	13 (16)	0.171	59 (73)	0.103
	0.25	68	37 (54)		5 (7)		40 (59)	
5歳	0.2	72	28 (39)	0.706	8 (11)	0.145	44 (61)	0.595
	0.25	81	35 (43)		3 (4)		45 (56)	
6-12歳	0.3	81	16 (20)	0.119	3 (4)	1.000	25 (31)	0.089
	0.5	209	62 (30)		7 (3)		89 (43)	
合計		981	443 (45)		133 (14)		592 (60)	

※p値: イエーツの χ^2 検定による接種量間比較

表4. A(H3N2)ワクチン接種によるHI抗体価2管以上上昇状況

年齢区分	ワクチン接種量 (mL)	対象者数	1回目の接種で2管以上上昇した者		2回目の接種で2管以上上昇した者		1,2回の接種を通じて2管以上上昇した者	
			人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※
0歳	0.1	11	1 (9)	0.984	4 (36)	1.000	5 (45)	1.000
	0.25	18	3 (17)		7 (39)		9 (50)	
1歳	0.2	60	19 (32)	0.708	19 (32)	0.897	36 (60)	0.289
	0.25	43	16 (37)		15 (35)		31 (72)	
2歳	0.2	52	24 (46)	0.240	6 (12)	0.813	31 (60)	0.405
	0.25	70	41 (59)		6 (9)		48 (69)	
3歳	0.2	76	30 (39)	0.252	6 (8)	0.222	41 (54)	1.000
	0.25	59	30 (51)		1 (2)		31 (53)	
4歳	0.2	81	35 (43)	0.791	3 (4)	0.309	36 (44)	0.490
	0.25	68	27 (40)		0 (0)		35 (51)	
5歳	0.2	72	20 (28)	0.803	2 (3)	1.000	24 (33)	0.641
	0.25	81	20 (25)		2 (2)		31 (38)	
6-12歳	0.3	81	20 (25)	0.960	1 (1)	0.622	30 (37)	0.902
	0.5	209	54 (26)		0 (0)		74 (35)	
合計		981	340 (35)		72 (7)		462 (47)	

※p値: イエーツの χ^2 検定による接種量間比較

表5. Bワクチン接種によるHI抗体価2管以上上昇状況

年齢区分	ワクチン接種量 (mL)	対象者数	1回目の接種で2管以上上昇した者		2回目の接種で2管以上上昇した者		1,2回の接種を通じて2管以上上昇した者	
			人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※
0歳	0.1	11	2 (18)	0.649	5 (45)	0.369	7 (64)	0.130
	0.25	18	1 (6)		4 (22)		5 (28)	
1歳	0.2	60	17 (28)	0.726	19 (32)	0.847	33 (55)	0.377
	0.25	43	10 (23)		12 (28)		19 (44)	
2歳	0.2	52	14 (27)	0.248	10 (19)	0.790	23 (44)	0.166
	0.25	70	27 (39)		11 (16)		41 (59)	
3歳	0.2	76	36 (47)	0.004	7 (9)	0.319	41 (54)	0.002
	0.25	59	13 (22)		2 (3)		15 (25)	
4歳	0.2	81	38 (47)	0.017	15 (19)	0.145	51 (63)	0.004
	0.25	68	18 (26)		6 (9)		26 (38)	
5歳	0.2	72	23 (32)	0.123	13 (18)	0.043	36 (50)	0.016
	0.25	81	16 (20)		5 (6)		24 (30)	
6-12歳	0.3	81	19 (23)	0.984	1 (1)	0.354	26 (32)	0.981
	0.5	209	47 (22)		9 (4)		65 (31)	
合計		981	281 (29)		119 (12)		412 (42)	

※p値: イエーツの χ^2 検定による接種量間比較

表6. A(H1N1)ワクチン1回接種前HI抗体価10倍以下対象者が1回/2回接種で40倍以上に上昇した人数と割合

年齢区分	ワクチン接種量 (mL)	1回接種前抗体価10倍以下対象者数	①1回接種後40倍以上		②2回接種後40倍以上		2回目の接種で40倍以上に上昇した者 (=②-①)	
			人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※
0歳	0.1	11	0 (0)	0.696	2 (18)	0.187	2 (18)	0.450
	0.25	18	2 (11)		9 (50)		7 (39)	
1歳	0.2	50	16 (32)	0.940	31 (62)	0.278	15 (30)	0.442
	0.25	40	14 (35)		30 (75)		16 (40)	
2歳	0.2	41	17 (41)	0.212	24 (59)	0.188	7 (17)	1.000
	0.25	53	30 (57)		39 (74)		9 (17)	
3歳	0.2	45	22 (49)	1.000	27 (60)	0.977	5 (11)	0.654
	0.25	35	18 (51)		20 (57)		2 (6)	
4歳	0.2	48	20 (42)	0.086	30 (63)	0.472	10 (21)	0.268
	0.25	33	21 (64)		24 (73)		3 (9)	
5歳	0.2	33	11 (33)	0.135	19 (58)	0.844	8 (24)	0.154
	0.25	35	19 (54)		22 (63)		3 (9)	
6-12歳	0.3	25	10 (40)	0.835	15 (60)	0.717	5 (20)	1.000
	0.5	46	21 (46)		31 (67)		10 (22)	
合計		513	221 (43)		323 (63)		102 (20)	

※p値: イエーツの χ^2 検定による接種量間比較

表7. A(H3N2)ワクチン1回接種前HI抗体価10倍以下対象者が1回/2回接種で40倍以上に上昇した人数と割合

年齢区分	ワクチン接種量 (mL)	1回接種前抗体価10倍以下対象者数	①1回接種後40倍以上		②2回接種後40倍以上		2回目の接種で40倍以上に上昇した者 (=②-①)	
			人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※
0歳	0.1	11	0 (0)	1.000	1 (9)	0.419	1 (9)	0.639
	0.25	17	1 (6)		5 (29)		4 (24)	
1歳	0.2	48	10 (21)	1.000	23 (48)	0.726	13 (27)	0.852
	0.25	35	8 (23)		19 (54)		11 (31)	
2歳	0.2	33	9 (27)	0.160	11 (33)	0.032	2 (6)	0.380
	0.25	39	18 (46)		24 (62)		6 (15)	
3歳	0.2	32	9 (28)	0.160	14 (44)	0.481	5 (16)	0.594
	0.25	17	9 (53)		10 (59)		1 (6)	
4歳	0.2	22	8 (36)	0.814	11 (50)	0.694	3 (14)	0.190
	0.25	25	11 (44)		10 (40)		0 (0)	
5歳	0.2	17	7 (41)	0.214	8 (47)	0.496	1 (6)	0.859
	0.25	14	2 (14)		4 (29)		2 (14)	
6-12歳	0.3	9	3 (33)	0.666	5 (56)	1.000	2 (22)	0.453
	0.5	20	10 (50)		11 (55)		1 (5)	
合計		339	105 (31)		156 (46)		52 (15)	

※p値: イエーツの χ^2 検定による接種量間比較

(注)②-①が負となる場合(4歳0.25mL接種群)はゼロとみなした。

表8. Bワクチン1回接種前HI抗体価10倍以下対象者が1回/2回接種で40倍以上に上昇した人数と割合

年齢区分	ワクチン接種量 (mL)	1回接種前抗体価10倍以下対象者数	①1回接種後40倍以上		②2回接種後40倍以上		2回目の接種で40倍以上に上昇した者 (=②-①)	
			人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※	人数 (%)	p値※
0歳	0.1	11	0 (0)	1.000	6 (55)	0.169	6 (55)	0.084
	0.25	18	1 (6)		4 (22)		3 (17)	
1歳	0.2	55	8 (15)	0.792	20 (36)	0.504	12 (22)	0.165
	0.25	43	8 (19)		12 (28)		4 (9)	
2歳	0.2	46	10 (22)	0.859	17 (37)	0.637	7 (15)	0.183
	0.25	68	17 (25)		21 (31)		4 (6)	
3歳	0.2	60	18 (30)	0.055	25 (42)	0.008	7 (12)	0.231
	0.25	53	7 (13)		9 (17)		2 (4)	
4歳	0.2	61	20 (33)	0.006	24 (39)	0.009	4 (7)	1.000
	0.25	52	5 (10)		8 (15)		3 (6)	
5歳	0.2	43	11 (26)	0.062	16 (37)	0.049	5 (12)	0.805
	0.25	61	6 (10)		11 (18)		5 (8)	
6-12歳	0.3	43	10 (23)	1.000	16 (37)	0.191	6 (14)	0.030
	0.5	123	27 (22)		31 (25)		4 (3)	
合計		737	148 (20)		220 (30)		72 (10)	

※p値: イエーツの χ^2 検定による接種量間比較

表9. ワクチン接種後の副反応発現状況

接種回数	年齢区分	ワクチン接種量 (mL)	対象者数 (%)	全身副反応			局所副反応			
				① 37.5°C 以上発熱	② 発疹	①、②のいずれか	③ 発赤	④ 腫脹	⑤ 硬結	③~⑤のいずれか
1回目	0歳	0.1	11 (100)	1 (9)	1 (9)	2 (18)	2 (18)	0 (0)	0 (0)	2 (18)
		0.25	18 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (11)	2 (11)
	1-5歳	0.2	341 (100)	6 (2)	6 (2)	12 (4)	24 (7)	16 (5)	15 (4)	31 (9)
		0.25	321 (100)	8 (2)	1 (0)	9 (3)	36 (11)	24 (7)	26 (8)	48 (15)
	6-12歳	0.3	81 (100)	2 (2)	0 (0)	2 (2)	11 (14)	13 (16)	12 (15)	15 (19)
		0.5	209 (100)	1 (0)	2 (1)	3 (1)	27 (13)	28 (13)	24 (11)	39 (19)
2回目	0歳	0.1	11 (100)	0 (0)	1 (9)	1 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		0.25	18 (100)	0 (0)	1 (6)	1 (6)	2 (11)	2 (11)	3 (17)	3 (17)
	1-5歳	0.2	341 (100)	8 (2)	6 (2)	14 (4)	19 (6)	11 (3)	12 (4)	28 (8)
		0.25	321 (100)	7 (2)	2 (1)	9 (3)	22 (7)	21 (7)	23 (7)	33 (10)
	6-12歳	0.3	81 (100)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	4 (5)	4 (5)	3 (4)	5 (6)
		0.5	209 (100)	2 (1)	0 (0)	2 (1)	23 (11)	24 (11)	13 (6)	30 (14)
1,2回を通じて	0歳	0.1	11 (100)	1 (9)	1 (9)	2 (18)	2 (18)	0 (0)	0 (0)	2 (18)
		0.25	18 (100)	0 (0)	1 (6)	1 (6)	2 (11)	2 (11)	4 (22)	4 (22)
	1-5歳	0.2	341 (100)	13 (4)	10 (3)	23 (7)	31 (9)	23 (7)	22 (6)	43 (13)
		0.25	321 (100)	14 (4)	2 (1)	16 (5)	45 (14)	35 (11)	40 (12)	61 (19)
	6-12歳	0.3	81 (100)	3 (4)	0 (0)	3 (4)	11 (14)	13 (16)	12 (15)	15 (19)
		0.5	209 (100)	3 (1)	2 (1)	5 (2)	35 (17)	37 (18)	29 (14)	45 (22)

※各接種回数の各年齢区分で、イエーツの χ^2 検定による接種量間比較を行ったところ、いずれも有意差は認められなかった。

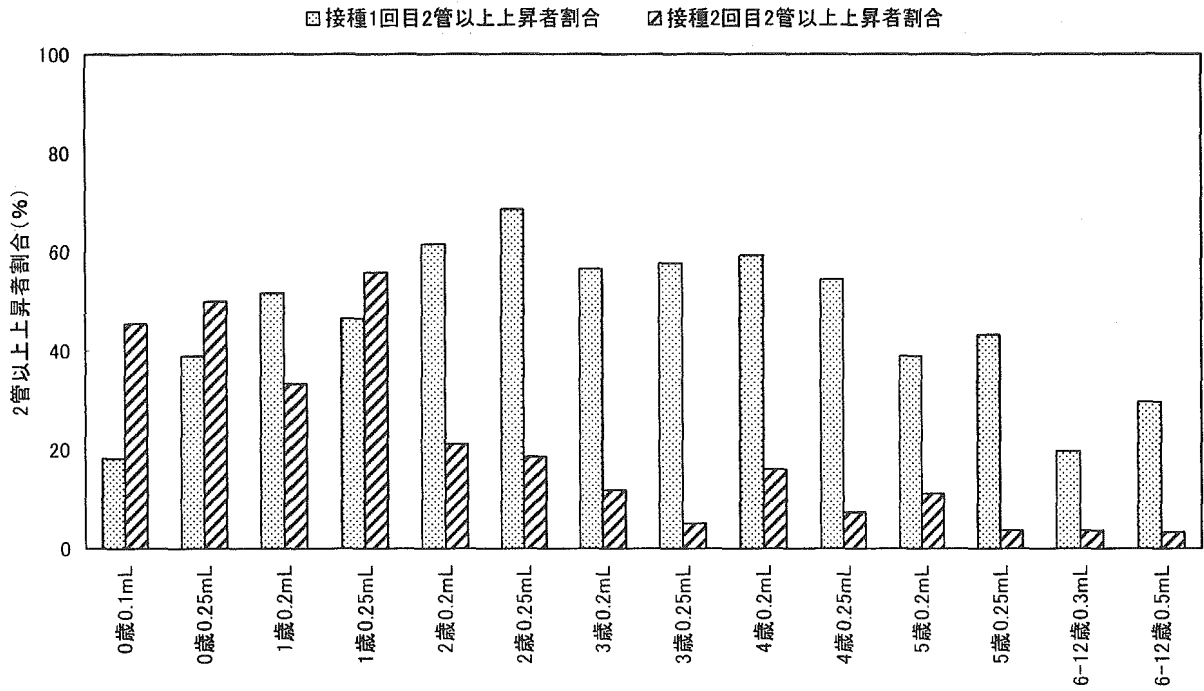


図1. A(H1N1)接種によるHI抗体価2管以上上昇者割合

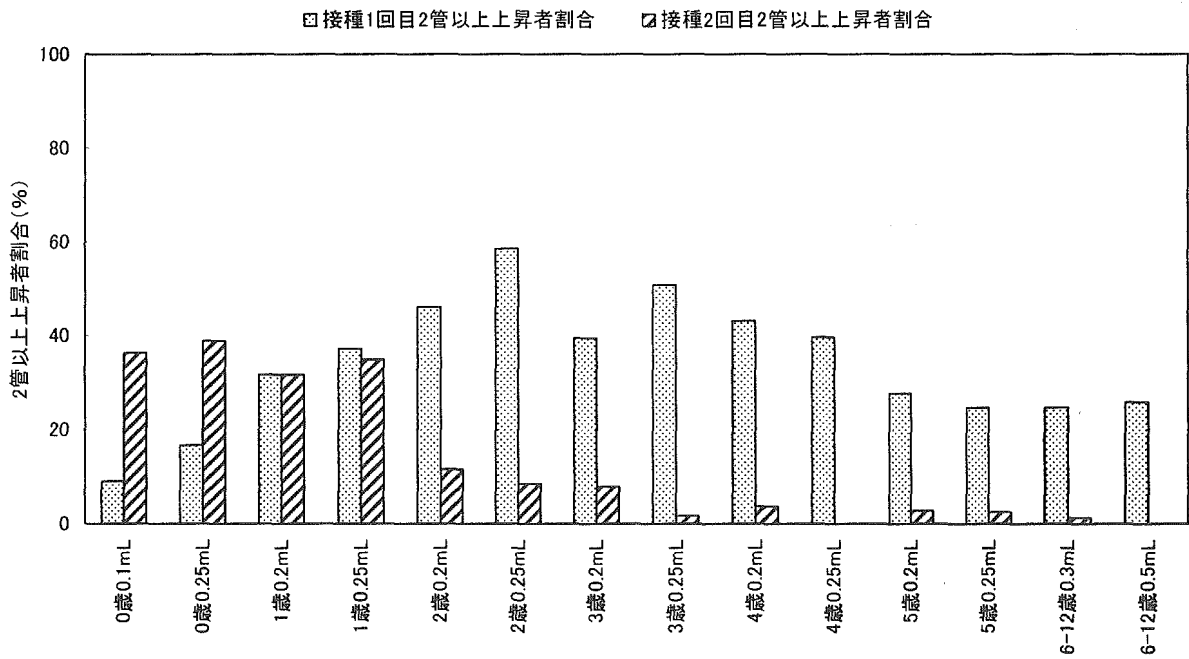


図2. A(H3N2)接種によるHI抗体価2管以上上昇者割合

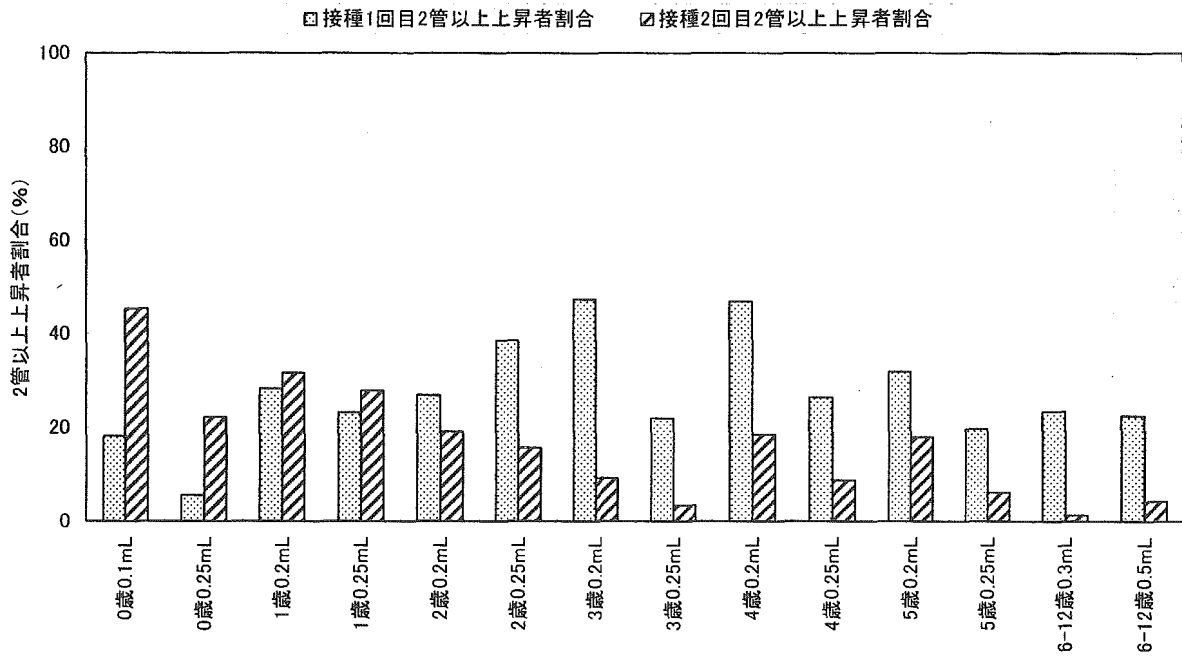


図3. Bワクチン接種によるHI抗体価2倍以上上昇者割合

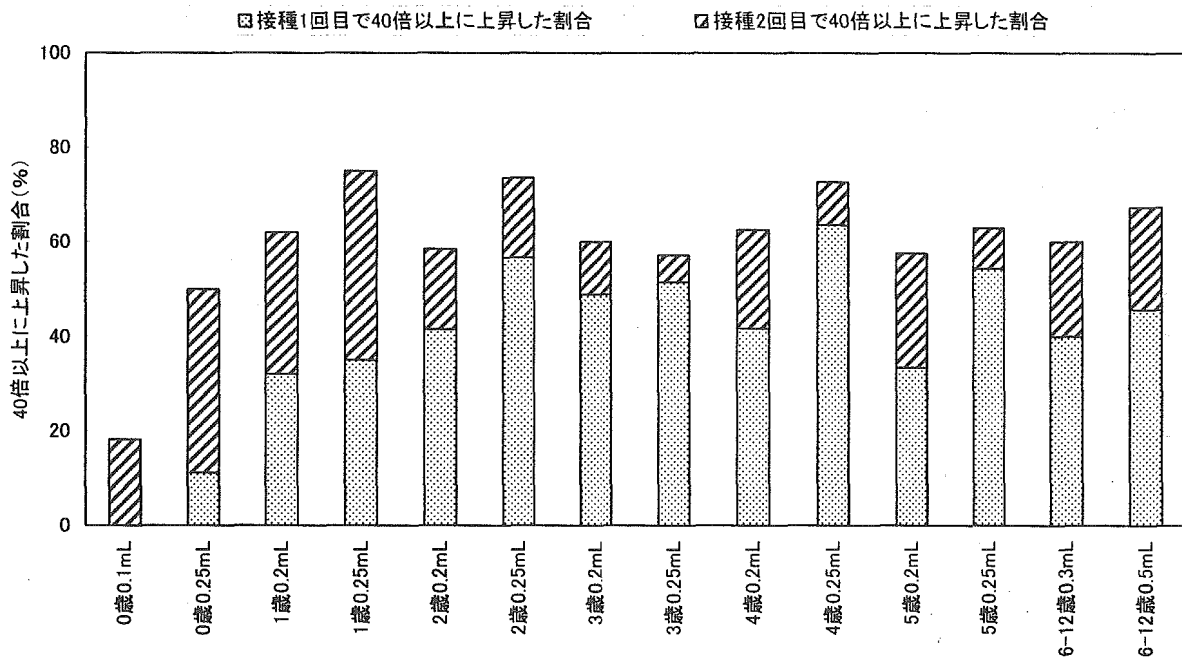


図4. A(H1N1)ワクチン1回接種前HI抗体価10倍以下が1回/2回接種で40倍以上に上昇した割合

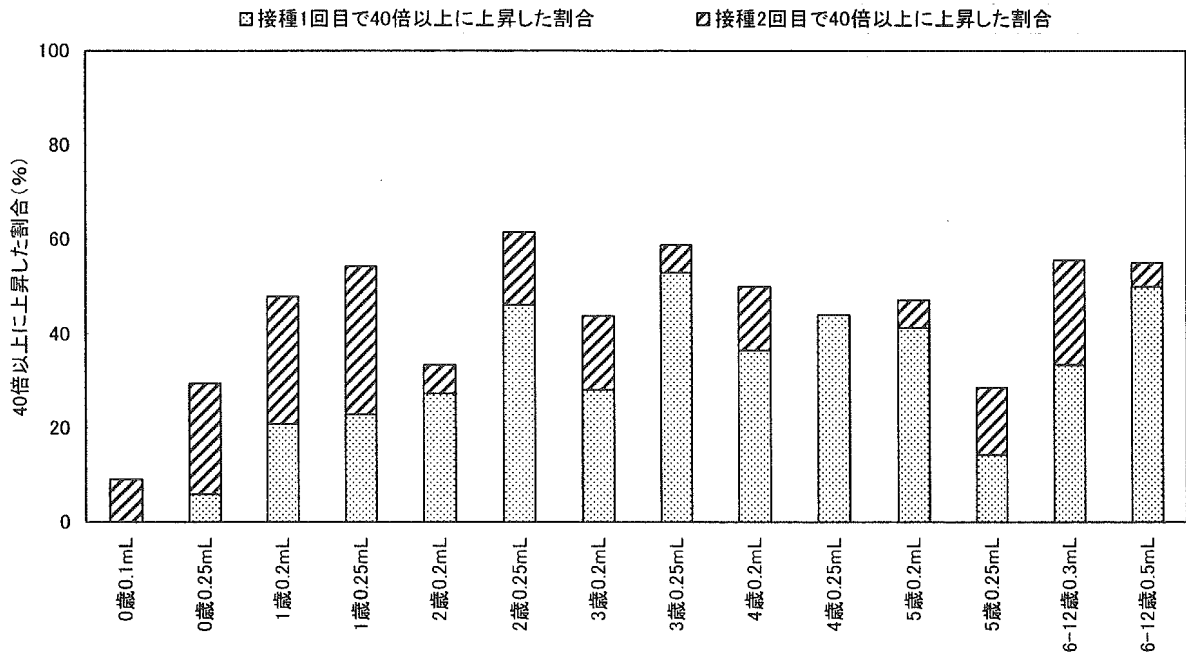


図5. A(H3N2)ワクチン1回接種前HI抗体価10倍以下が1回/2回接種で40倍以上に上昇した割合

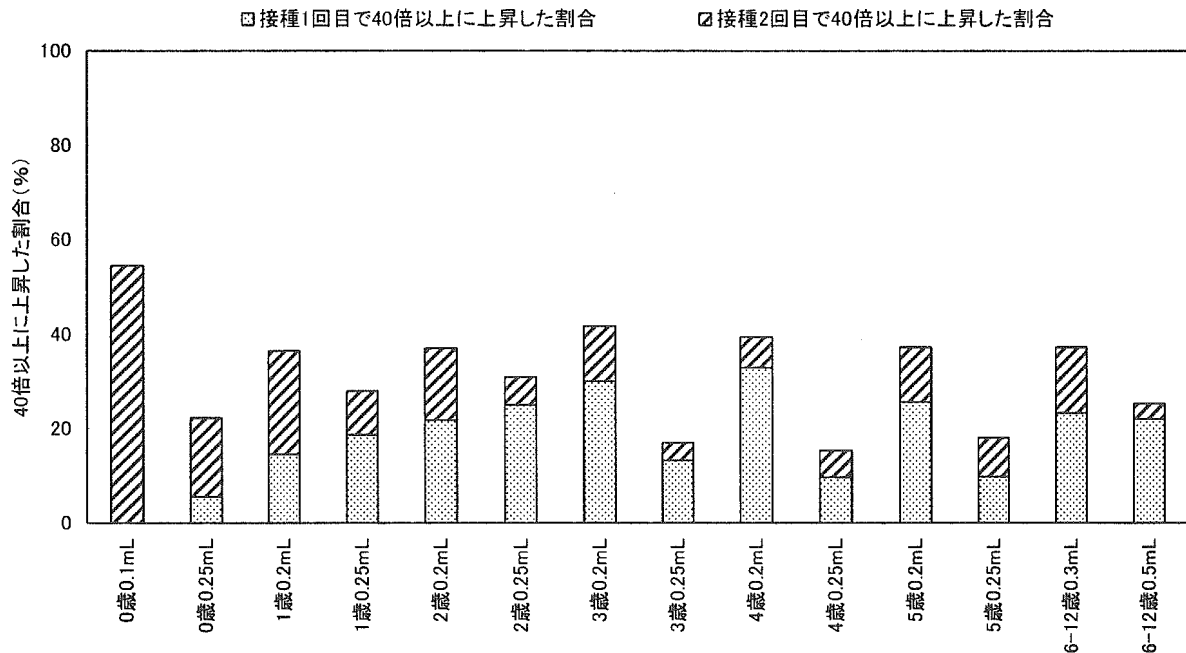


図6. Bワクチン1回接種前HI抗体価10倍以下が1回/2回接種で40倍以上に上昇した割合

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」
分担研究報告書

リバース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

分担研究者：城野洋一郎（財）化学及血清療法研究所

研究要旨 新型インフルエンザの汎流行に際するワクチン製造にあたっては、リバースジェネティクス（RG）法によってワクチン製造用の弱毒化種ウイルスを作出することが効率的である。本研究は、①国立感染症研究所（感染研）が実施する RG 法の確立に当たり、化学及血清療法研究所（化血研）が所有する Vero 細胞から派生したクローンの樹立・供給と、その他の候補細胞あるいは新たに ATCC(the American Type Culture Collection)より入手する細胞株を感染研へ供給する、②上記細胞株のうち、満足のいく効率を示した細胞株について、マスター及びワーキングセルバンクを調製する、③調製したバンクに関して、感染研と共同で安全性試験を立案し試験を実施する、ことを目的とした。

昨年度までの検討において、RG によるウイルスレスキュー効率が高かった LLC-MK2 Derivative 細胞のマスター及びワーキングセルバンクの作製を行い、細胞バンクの安全性試験、特性試験を実施した。一部試験が未終了であるが、本細胞は安全性が高く RG 用細胞としての実用化の可能性が高いと考えられる。

A. 研究目的

新型インフルエンザの汎流行が起こった場合、従来のインフルエンザワクチンの製造手順では迅速な対応は困難である。リバースジェネティクス（RG）法を用いたワクチン用株の作出が最も効率的であり、国立感染症研究所（感染研）において RG 法の確立が行われている。本研究は、この RG 法に適した細胞株の検討とその細胞のバンク作製及び、安全性試験を実施することである。

新型インフルエンザ用ワクチンの作製に RG 法を用いる場合、Vero 細胞より RG 効率が高い LLC-MK2-Derivative 細胞について、

化学及血清療法研究所（化血研）でセルバンクの作製を行い、セルバンクの安全性試験を実施することを目的とした。

B. 研究方法

1. 感染研において検討された RG によるウイルスレスキュー効率検討の結果、LLC-MK2 Derivative、でもっとも高率に組み換えウイルスが産生されることが明らかとなった。現在 RG によるインフルエンザウイルスの作出は Vero 細胞が至適とされているが、Vero 細胞のみで技術を確立することは危険であり、Vero 細胞のバ

ックアップの位置付けとして、LLC-MK2 Derivative 細胞も RG 用細胞としてセルバンクを作製した。事実、Vero 細胞における H7N2 ウイルスの RG 法による弱毒化は非常に困難であることが報告されており、Vero 細胞に代わる細胞バンクの構築は大きな意義がある。

5. LLC-MK2 Derivative 細胞の安全性試験
- ATCC では RG 用細胞として各種安全性を実施した Vero 細胞を準備中との情報が得られたが、我々の検討では Vero 細胞では満足いくレスキュー効率が得られなかったことから、Vero 細胞のバックアップの位置付けとする LLC-MK2 Derivative 細胞も 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することとした。

(倫理面への配慮)

本研究の研究対象はすべて既に樹立されている細胞株を出発材料としており、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

1. LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクの調製
- ①治験薬製造の構造設備を使用して、GMP 基準に準じたセルバンクを調製し、マスターセルバンク 162 本を調製した。マスターセルバンクは、気相式液体窒素保存容器にて保管・管理した。
- ②同様の方法で、ワーキングセルバンク 162 本を調製した。ワーキングセルバンクは、気相式液体窒素保存容器にて保管・管理した。
2. LLC-MK2 Derivative 細胞の安全性試験
- ①調製したマスター及びワーキングセルバ

ンクについて、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、造腫瘍性試験等試験を英国 BioReliance 社に依頼した。試験項目は以下の通りである。

1) マスターセルバンク

• **Qualification of test article material for sterility by direct inoculation method**
無菌試験を実施するにあたり、検体である細胞自体が無菌試験へ影響を及ぼさないことを検証する試験。試験の結果、細胞が無菌試験へ影響を与えることは認められなかった。

• **Sterility testing by direct inoculation method**

チオグリコール酸培地および SCD 培地の各 100mL にサンプル (被験細胞の培養液) 10mL ずつを接種し、それぞれ 30-35°C および 20-25°C で 14 日間培養し、菌の増殖の有無を確認する試験。いずれの培地でも菌の混入は認められなかった。

• **Mycoplasma Detection EP**

サンプル (被験細胞の培養液) を寒天培地に接種後、好気的および嫌気的条件下、37°C で 14 日間培養し、マイコプラズマの存在の有無を確認する試験。マイコプラズマの混入は認められなかった。

• **Test for Mycobacterium spp by culture medium method**

培養法による結核菌否定試験。
菌の増殖は認められなかった。

• **Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Culture (200 cell profiles)**

細胞をグルタルアルデヒドで固定後、超薄切片を作成し、ネガティブ染色を行って透過電子顕微鏡により 200 個の細胞

について観察。

いずれのタイプのウイルス様粒子も認められなかった。

- **Flourescent Product Enhanced Reverse Transcriptase (FPERT) assay**
検体を破壊し逆転写酵素の抽出操作を行い、テンプレート RNA と混和し、逆転写反応が行われるか否かを判定する。逆転写酵素活性は認められなかった。
- **28Day In Vitro assay for the Detection Viral Contaminants – 3 detector cell lines (MRC-5, Vero, BCS)**
サンプル(被験細胞の培養液)を MRC-5、Vero および BCS 細胞に接種後、14 日間培養し、検鏡により細胞変性の有無を確認。いずれのインジケータ細胞も細胞変性を認めなかった。
- **In Vivo assay for cell substrates according to EP requirements**

(1)動物接種試験

検体(凍結融解による細胞破碎液)を乳のみマウスの頭蓋内、腹腔内および経口接種を行い、14 日間観察する。生存マウスをホモジネート後、その上清を同様に別の乳のみマウスに接種し、更に 14 日間観察する。

検体を離乳マウスおよびモルモットの頭蓋内、腹腔内に、更に離乳マウスには鼻内および経口接種を行い、28 日間観察する。

試験結果は陰性であった。

(2)発育鶏卵接種試験

サンプルを尿膜液内に接種し、3 日間保育後、尿膜液について鶏、モルモットおよび O 型ヒト血球での血球凝集反応を確認。また、この尿膜液を同様に別の発育鶏卵

の尿膜液内に接種し、3 日間保育後、血球凝集反応を確認。

試験結果は陰性であった。

- **Q-PCR detection of a range of human viruses (CBER PTC and CPMP)**
HBV, HCV, HIV-1,2, HTLV, HHV-6,7,8, EBV, hCMV, SV40 を定量 PCR により検出する試験。
いずれのウイルス由来核酸も検出されなかった。
- **Q-PCR detection of Bovine polyomavirus (BPyV)**
定量 PCR による検出系。
BPyV 特異核酸は検出されなかった。
- **Q-PCR detection of Bovine/porcine circovirus**
定量 PCR によるサーコウイルス核酸検出系。ウイルス由来核酸は認められなかった。
- **PCR detection of Simian Immunodeficiency Virus (SIV)**
SIV 検出 PCR。SIV 由来核酸は検出されなかった。
- **Detection of viral contaminants in Bovine serum according to CPMP and US 9CFR requirements**
検体(被験細胞の培養液)をウシ睾丸細胞、ウシ鼻甲介細胞および Vero 細胞に接種し、21 日間の培養中に細胞変性の出現の有無を確認する。
細胞の変性は確認されなかった。
- **In vitro assay for the detection of Porcine viruses according to 9CFR**
検体(凍結融解による細胞破碎液)をブタ睾丸細胞に接種し、21 日間培養(7 日目、14 日目に継代)する。培養 7 日目、14 日目および 21 日目に蛍光抗体法

により PPV (ブタパルボウイルス) の検出をおこなう。

ウイルスは検出されなかった。

• Karyology

核分析：細胞をスライドガラス上に固定後、100 個の細胞について染色体数を測定。50 個の細胞について染色体異常の有無を観察。また 3 個の細胞について、核型を分析。

染色体数はアカゲサル細胞の 63~72 であり、オリジナルの LLC-MK2 細胞と同じであり、染色体異常は認められなかった。

• Identification and Characterisation of Cultured Cells By Analysis of 4 Isoenzymes

アイソエンザイム分析

被験細胞抽出液をサンプルとして、オーセンティキットを用いて G6PD、MD、LD、NP 及び AST の各酵素について電気泳動易動度をコントロールと比較。対照とするアカゲサル細胞のものと同様であった。

• In vivo tumourigenicity (FDA points to Consider 1993)

ヌードマウス 10 匹の皮下に約 10^7 個の被験細胞を接種後、84 日間観察。陰性対照からは腫瘍は観察されなかった。

検体を接種したマウスからも腫瘍は観察されなかった。

組織病理学的観察の結果、細胞を接種した 10 匹のマウス中、1 匹において、細胞接種部位と肺で脈管周囲炎が認められたが、これはこの種のマウスで自然発生する病巣と診断された。

しかし、陽性対照接種マウスは 10 匹中、8 匹からしか腫瘍が観察されなかった。試験成立要件は、陽性対照では 10 匹中 9 匹以上で腫瘍が発見されることが必須であり、再試験を計画中である。

2) ワーキングセルバンク

• Qualification of test article material for sterility by direct inoculation method

マスターセルバンクと同様に試験に影響を与えることはなかった。

• Sterility testing by direct inoculation method

マスターセルバンクと同様に菌の混入は認められなかった。

• Mycoplasma Detection EP

マスターセルバンクと同様にマイコプラズマの混入は認められなかった。

• Identification and Characterisation of Cultured Cells By Analysis of 4 Isoenzymes

マスターセルバンクと同様に、対照とするアカゲサル細胞のものと同様であった。

3) 試験の監査

試験を実施した BioReliance 社を訪問し、適格性確認(audit)を行った。

(1)適格性確認の結果、試験を実施する上で必要なシステムが構築されており、実際の試験記録も確実に保管されていることを確認した。またイギリス公的機関(MHRA)の査察により GLP 適合施設の認証と GMP 設備としての認証を取得していること、2005 年 9 月に FDA の査察を受け、問題なく成功していることより、試験委託機関先として問題ないと判断した。

(2)造腫瘍性試験について、試験の詳細を確認した。その結果、①試験に用いられた細胞

は 20 代も継代されていた。②陽性対照試験区が基準を満たしていなかったが、試験実施者は脱落例としての処理により試験が成立すると誤解していた。試験の品質保証部門のチェックにより、試験が不成立となることが判明したが、チェックまでに期間を要してしまい、結果的に今年度内に再試験結果をえることが不可能となった、ことが判明した。

試験対象の LLC-MK2-Derivative 細胞、陰性対照接種区では、腫瘍の形成は認められなかった。

D. 考察

WHO は RG 技術による新型インフルエンザワクチンの開発には Vero 細胞を推奨しているが、プラスミドの取り込み効率のより高い細胞株を検索し、それを用いたセルバンクの構築ができれば、RG 法に用いる細胞株の選択肢を広げることが可能となる。実際に、H7N2 ウイルスなど Vero 細胞では、ほとんどレスキューされない場合場あることが報告されており、Vero 細胞に代わる細胞バンクを構築することは大きな意義がある。また、本研究において LLC-MK2 Derivative 細胞のウイルスレスキュー効率が Vero 細胞より数十倍高いことを確認した。そこで、LLC-MK2 Derivative 細胞についてマスター及びワーキングセルバンクを治験薬製造設備内にて作製した。

マスターおよびワーキングセルバンクの安全性を確認するため、各種のウイルス、細菌、マイコプラズマの迷入否定試験を実施した。その結果、細胞バンクにウイルス他の因子が迷入しているデータは得られなかった。

LLC-MK2 細胞はアカゲサルの腎由来細胞を 195 代継代して樹立された細胞である。さらに、Eagle-MEM 培地に馴化させるため 8 代継代して得られた細胞が

LLC-MK2-Derivative 細胞である。長期間の継代により細胞の性状が大きくことなっていることが懸念されたが、核型分析、アイソザイム分析の結果、LLC-MK2-Derivative 細胞はサル由来細胞の特長を有しており、異常な染色体は検出されなかった。

造腫瘍性試験は再試験を計画中である。

再試験を実施するに当たっては、試験の計画の提出、細胞はなるだけ少ない継代歴で接種することと、接種前に細胞の継代歴等を事前に知らせることとした。バイオリライアンス社側は、上記条件以外に、試験の進捗管理システム等を改善し、試験に異常が発生した場合の速やかな対応策を構築している。再試験は 2006 年 4 月に開始され、2006 年 8 月に報告書が提出される予定である。

最終的な結論は出ていないが、腫瘍原性に問題がなければ LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクシステムは、新型インフルエンザワクチンの種ウイルス作出の際に使用される Vero 細胞のバックアップとして、Vero 細胞における RG 法の効率が悪いウイルスに対するリスク分散の意味からも重要な位置付けとなり得る。

E. 結論

本研究において、RG 用細胞として Vero 細胞以外に LLC-MK2 Derivative 細胞を用いることができる可能性が明らかとなった。

LLC-MK2 Derivative 細胞についてマスター及びワーキングセルバンクを作製した。

このセルバンクについて細胞特性、安全性試験は腫瘍原性試験を除き終了し、全て陰性であった。

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

Audited Interim Report

In vivo tumorigenicity (FDA Points to Consider 1993).

Protocol # 37138

SPONSOR : National Institute of Infectious Diseases

CONTACT : Dr Takato Odagiri
Laboratory of Influenza Viruses
Gakuen 4-7-1
Musahi-Murayama
Tokyo 208-0011
Japan

1.0 RECEIPT DETAILS

Sponsor sample designation	LLC-MK2-Derivative MCB
Type of sample	monkey, rhesus
Accession numbers	1054155

2.0 EXPERIMENTAL DATES

Experimental start date	27 July 2005
Experimental completion date	19 October 2005

Protocol : 37138
Accession : 1054155
Report date : Audited Interim Report
Page : 2

3.0 SPONSOR SAMPLE DETAILS

Sample ID	Date received	Volume	Arrival condition	Storage condition	Sponsor label
1054155	14 Apr 05	1 vial	Dry Ice	liquid nitrogen	LLC-MK2-D MCB MCB-01 (#008)

Protocol : 37138
Accession : 1054155
Report Date : Audited Interim Report
Page : 3

4.0 RESULTS SUMMARY

During the course of this in vivo study no evidence was found to suggest that the test article cells had tumorigenic potential. However a definitive negative result cannot yet be provided because only 8 rather than a minimum of 9 of the 10 mice inoculated with the positive control (HeLa) cells showed evidence of tumor formation. As a consequence this audited interim report has been generated pending a successful repeat assay being performed in which the required number of mice inoculated with positive control cells show tumor formation.

5.0 PURPOSE AND METHOD OF STUDY

The purpose of this study was to determine the ability of the sponsor's cell line to form tumours in athymic (*nu/nu*) mice.

One of the criteria for the acceptability of continuous cell lines for use in the production of vaccines is the lack of tumorigenicity. Adult nude mice have been used for tumorigenicity testing for years. The successful transplantation into nude mice of many different type of cultured cancer cell (human and non-human), as well as continuous cell lines that have been transformed *in vitro*, have been transplanted into nude mice and their tumorigenic potential demonstrated.

Ten, 5-6 week old nude mice (strain: *nu/nu*) were inoculated subcutaneously with 10^7 viable test article cells per 0.2 ml of tissue culture medium. HeLa human cervical carcinoma cells (10^7 cells/0.2 ml) were inoculated by the same route into ten 5-6 week old nude mice and served as the positive control. Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) was injected into two nude mice and served as the negative control. All groups were observed daily for a period of 84 days for evidence of nodule formation at site of injection.

The methodology used in this assay is presented in Client Protocol # 37138.08

6.0 STUDY SPECIFIC DETAILS

Client Protocol #	37138.08
Study Protocol #	37138.02

Protocol : 37138
Accession : 1054155
Report Date : Audited Interim Report
Page : 4

7.0 DEVIATIONS

The following deviation was reported during the study. Only eight out of ten positive control inoculated mice developed growing nodules, three confirmed by histopathology. Due to this finding the assay is to be repeated. This is fully documented in deviation number 030370.

8.0 COMMENT

- a) Ten vials of test article were received at BioReliance (Glasgow) on 14 April 2005 and assigned accession number 1054155. Two vials were shipped from BioReliance (Glasgow) on 09 May 2005 and received at BioReliance (Stirling) on 10 May 2005 for cell growth and assigned site identifier 05YD51. During cultivation of the cell line (cell growth report J05YD51.020000), samples were prepared for the assays requested by the Sponsor and were submitted to BioReliance (Pentlands) for testing.

1 x 3 ml aliquot was shipped from BioReliance (Stirling) on 27 July 2005 and received at BioReliance (Pentlands) on 27 July 2005 for testing in the *In vivo* tumorigenicity (FDA Points to Consider 1993) assay, protocol # 37138.

- b) BioReliance, on 23 September 2003, acquired facilities in Glasgow and Edinburgh formerly known as Q-One Biotech Limited (Q-One). The facilities have and will continue to operate in compliance to the relevant regulatory guidelines.

Due to the acquisition and transfer of ownership all reference to Q-One in any documentation, record or Final Report will now refer to the company known as BioReliance.

9.0 VALIDITY

Only eight out of ten (80%) of positive control mice developed tumours. Three positive control mice were confirmed to have tumours by histopathology and there was no evidence of neoplastic growth in the negative control mice.