

200501105B

厚生労働科学研究費補助金

(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 15-17 年度 総合研究報告書

主任研究者 小田切孝人

平成 18 (2006) 年 3 月

目次

平成 15～17 年度

総合研究報告書

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

分担研究報告書

1 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

田代真人 _____ P17

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 _____ P21

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 _____ P28

協力研究者：喜田 宏

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 _____ P33

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 _____ P38

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 _____ P44

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 リバースジェネティッ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 _____ P52

研究協力：水野喬介

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 15-17 年度総合報告書

主任研究者 小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室 室長

研究要旨

2003 年末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、中近東、インド、アフリカおよびヨーロッパ諸国へと地球規模で広がり、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、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の可能性が高まってきたことから、それに備えた事前準備が最重要課題となっている。新型インフルエンザ対策の根幹は、有効なワクチンをいかに早く安全供給できるかにかかっている。リバーズジェネティクス（RG）法という新技術が開発されたことにより、目的とするワクチン製造株の開発は短期間で可能になった。しかし、RG 法に付随した新たな諸問題が浮上してきた。第 1 は遺伝子組み換えに用いるプラスミドベクターの知的所有権の問題、第 2 はワクチン製造の元株となる弱毒化ウイルス開発に必要な GMP 基準に対応した特殊な細胞の入手の問題、第 3 は培養細胞によるワクチン製造および安全性に関する諸々の国際基準の策定の問題、第 4 は新型インフルエンザワクチンのヒトへの免疫効果の検証とアジュバントワクチンの検索および実用化の問題、第 5 は次世代を見据えた経鼻ワクチンの開発と実用化の問題など、早急に解決または開発に着手しなければならない問題が山積みである。

本研究期間においては、これら諸問題を解決し新型インフルエンザワクチンの有効性を検証し安全供給を実現するために以下の研究を実施した。①発育鶏卵で高増殖する A/PR8 ウイルス株遺伝子をバックボーンとした RG 系を構築し、弱毒化 H5N1 ワクチン製造株の開発を可能にした。また、ベクタープラスミドを改良し、ワクチン種ウイルスの回収効率の向上を図った。②ヒト用ワクチン株製造には、GMP 管理されたセルバンクから由来した細胞が必要である。このような細胞は海外ワクチンメーカーで開発されているが、知的所有権により入手は不可能であることから、わが国独自に新規に開発する必要がある。本研究では LLC-MK2 細胞を GMP 管理下でセルバンキングし、人用ワクチン製造に使用可能か ICH ガイドラインに沿って検証し、実用化可能であることを確認した。③RG 法によるプロトタイプワクチン製造の安全基準、品質管理基準、リスク評価基準について、WHO と連携して国際基準策定に参画した。④H5N1 強毒型野生株から RG 法により作製された弱毒化ワクチン株を採用したアルムアジュバント添加全粒子試作ワクチンを作製した。これをマウスモデルで免疫原生、交叉反応性、感染防御効果などを評価した。⑤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) およびその誘導体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。⑥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した。

これらの研究成果は、新型インフルエンザワクチン開発と安全供給および接種体制構築の基礎となり、培養細胞を製造媒体としたインフルエンザワクチン製造へ向けた研究開発に貢献する。

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

研究協力

鈴木宏 新潟大学教育研究院医歯薬系
教授

柏木征三郎 福岡県赤十字血液センター
所長

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スジェネティクス (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施設でパンキングし、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- α 、IFN- β 、IFN- γ 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。

具体的には、以下の項目について、分担研究者間で連携しながら研究を進めた。

- (1) A/PR8 ウイルス株遺伝子をバックボーンとしたRG系を構築し、弱毒化H5N1ワクチン製造

株の開発。

- (2) GMP管理下でセルバンキングした LLC-MK2 細胞の安全性を ICH ガイドラインに沿って検証し、実用化する。
- (3) RG 法によるプロトタイプワクチン製造の安全基準、品質管理基準、リスク評価など国際基準の策定。
- (4) アルムアジュバント添加弱毒化 H5N1 全粒子ワクチンのマウスモデルによる免疫原生、交叉反応性、感染防御効果の評価。
- (5) poly(I:C)およびその誘導体をアジュバントとした経鼻接種 H5N1 ワクチンの開発と動物モデルによる評価。
- (6) 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。

B. 研究方法

1. 新型インフルエンザワクチン開発・製造・安全性評価のガイドラインの作成。

世界各国のワクチン開発技術の実体を検討し、各国のインフルエンザワクチンに関する製剤基準、組み換え生物・組み換え医薬品としての評価の現状、またそれらの考え方の基盤を整理・検討した。また、WHO における多くの新型インフルエンザ対策会議に参加し、ガイドラインに関する資料の作成・提出を行った。

RG法を用いて作製されるワクチン製造株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、バイオセー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 との関係等に関して、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検討した。

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. リバースジェネティクス法による新型ワクチン候補株作製系の確立。

リバースジェネティクス法により HA 遺伝子改変ウイルスを作製するために、孵化鶏卵で高増殖する A/PR/8/34 (H1N1) ウイルス遺伝子をバックボーンとする 12 プラスミド系を構築した。

RG法により、A/Vietnam/JP1203/04 (VNJP1203, H5N1) 株、A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) 株由来の弱毒化ワクチン株を試作した。さらに、試作ワクチン株の病原性を発育鶏卵での増殖性により評価した。

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. 不活化試作ワクチンの免疫原生の検討。弱毒化 H5N1 および H7N3 をホルマリンで不活化した試作ワクチンを作製した。これにアルムアジュバント添加または非添加したものを BALB/c マウスに皮下接種し、異なる抗原量における免疫応答について検討した。

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コレラトキシン B サブユニット (CTB; Sigma-Aldrich)、合成二本鎖 RNA

(polyI:C)、キチン微粒子 (chitin micro-particles : CMP, Sigma-Aldrich) を種々の組み合わせで混合し、マウスに経鼻接種し、抗体応答、感染防御効果、病理学的所見について解析した。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. 現行のインフルエンザワクチンの乳幼児における有効性・安全性の検討。

13 歳未満の小児における至適ワクチン接種量と安全性を検討するために、6 歳未満には 0.25CC、6 歳以上-13 歳未満には 0.5CC をそれぞれ 2 回接種し、接種後の副反応について調査した。

A/ニューカドニア/20/99(H1N1) (以下「A/ニューカドニア」)、A/パナマ/2007/99(H3N2) (以下「A/パナマ」)、B/山東/7/97 (以下「B/山東」) の 3 種混合ワクチン (抗原含有量 : 各株 HA 蛋白 30 μ g/mL) を 0~5 歳児に対しては 0.25mL、6~12 歳児に対しては 0.5mL を 4 週間間隔で 2 回皮下接種した。ワクチン接種前、1 回接種 4 週間後、2 回接種 4 週間後の 3 回採血を行い、赤血球凝集抑制 (HI) 抗体を測定した。さらに、ワクチンの副反応は、接種後 48 時間以内の全身副反応 (37.5°C 以上の発熱、発疹) と局所副反応 (発赤、腫脹、硬結) について保護者からの返信用はがきにより調査した。

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 週後および 2 回目接種 4 週後の計 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 接種群間でイェーツの χ^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 接種群間でイェーツの χ^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、両群間でイェーツの χ^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 :

既存のワクチン製造用 Vero 細胞から限界希釈法によって血清含有培地及び無血清培地で増殖する Vero 細胞クローンを作成した。さらに、ATCC より 4 種類のサル由来細胞株 (アフリカミドリザル腎臓由来の CV-1 細胞 (CCL-70)、アフリカミドリザル腎臓由来の BS-C-1 細胞 (CCL-26)、アカゲザル腎臓由来の LLC-MK2 細胞 (CCL-7、CCL-7.1)) を購入し、RG 法に最適な細胞株の検討を行った。

LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンク作製と安全性試験 :

上記細胞株から RG 法に適した株として LLC-MK2 Derivative 細胞が特定された。そこで、LLC-MK2 Derivative 細胞について 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 RG法によるプロトタイプワクチン製造の安全基準、品質管理基準、リスク評価の国際基準の策定。

a) RG法による新型インフルエンザワクチンの開発・製造・安全性評価のガイドライン作成。

本研究の一環としてWHOのガイドライン作成に参画した。現在、WHOがまとめたガイドライン原案を要約すると、1) 新型ワクチン株はヒトにとって病原性が低く、孵化鶏卵で高増殖するA/PR/8/34株遺伝子をバックボーンとする8または12プラスミドを用いたリバースジェネティクスで作製される。2) 回収したウイルスはニワトリ及びフェレットにおいて病原性が確認されるまでは、BSL3にて取り扱う。3) 安全性の確認された株を用いたワクチン製造は、BSL2+の条件で行う。

弱毒化組み換えワクチンのバックボーンとしてPR8株が採用されたのは、ヒトに対する病原性が極めて低いことや、現行の不活化ワクチンの製造株となる高増殖株作製のバックボーンとして用いられているという実績による。この選択は、現時点では、妥当なものであるが、PR8株を用いた組み換えウイルスがヒトに感染伝播することは否定できない。従って、新型ワクチンの製造に際しては、製造従事者への感染さらには製造施設からの流行拡大が起こらないような細心の注意が必要である。わが国では、このような観点から新型インフルエンザワクチンの製造に対応できるように、平成10年に国の補助により各ワクチン製造メーカーの施設をBSL2+に整備した。しかし、より安全性を重視するならば、トリ由来の弱毒ウイルスをバックボーンに用いることも考慮すべきかもしれない。一方、トリインフルエンザウイルスは人に対して免疫原性が弱く、現行のスプリットワクチンという形態では使用できない。このことから、アジュバントワクチンの開発とその安全性の検証、ライセンス化に向けた研究や臨床試

験などが課題となる。

b) 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基本指針。

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。しかし、遺伝子組み換え操作やバイオセーフティーの問題、生物学的製剤としての品質管理の問題などについては世界的な管理規定や指針がない。このため、一定の国際基準を作成する必要があり、本研究ではWHO世界インフルエンザ計画と協力して以下の基本指針案をまとめた。

- * 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。
- * 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。加えて、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。
- * ワクチン株製造に用いる試薬に関する指針。
- * 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。

これらの指針は現在稼働している海外での現状を基盤として作成されていることから、実際の運用にあたっては、この指針をわが国の施設の現状に合うガイドラインに一部修正した最終版を作成する必要がある。

C) 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 A/PR8 ウイルス株遺伝子をバックボーンとしたRG系の構築、改良およびそれらを用いた弱毒化 H5N1 ワクチン製造株の開発。

a) A/PR/8/34 ウイルス株遺伝子をバックボーンとしたリバーシジェネティクス系の構築とそれによって作製された弱毒化 H5N1 組み換えウイルスの病原性の検証。

WHO のガイドラインに従って、本研究では、A/PR/8/34 をリバーシジェネティクスのバックボーンに採用し、組み換えプラスミドベクターの構築を行った。この系を用いて元株の A/PR/8/34 の回収を行ったところ、 10^{10} PFU/ml とひじょうに高いウイルス産生が得られることが分かり、高病原性トリインフルエンザウイルスから弱毒型のワクチン試験株の作製に有用なリバーシジェネティクス系が完成した。

本研究では、2003 年にヒトに感染し、それによって死亡したヒトから分離した高病原性トリインフルエンザウイルス A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)の NA 遺伝子と弱毒型

に改変した HA を A/PR8 バックボーンに組み換えた H5N1 弱毒株を作製し、その安全性をニワトリへの接種実験および培養細胞におけるトリプシン依存性試験で検証し、作製された組み換えウイルスが弱毒化されていることを確認した。

リバーシジェネティクス系および安全性評価系が構築されたことにより、技術的には国内外いずれの地域で高病原性トリインフルエンザウイルスの流行が起こっても、その流行株を用いて速やかにワクチン株開発は可能である。しかし、ワクチン製剤としてのライセンス化には、プラスミドベクターにかかる知的所有権などの問題解決が必要である。

b) わが国の家禽で流行した高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスを用いた試作ワクチンの作製。

前年度に A/PR/8/34 ウイルスの cDNA を骨格とした RG 法が構築できたことから、当該年度では 2004 年にわが国の家禽で流行した高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス (A/山口/7/2004) を用いた弱毒化 H5N1 試作ワクチンを作製した。同様にベトナムの感染者から分離した株 (A/Vietnam/JP1203/2004) についても、この系を用いた弱毒化試作ワクチンを作製した。これら試作ワクチン株は、孵化鶏卵での増殖性、ニワトリに対する病原性試験などで、弱毒化と高増殖性が確認された。これによって、今後、抗原性の変化した高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離された場合でも RG 法により速やかに弱毒化ワクチン候補株を供給できるようになった。

c) 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シ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 アルムアジュバント添加弱毒化 H5N1 全粒子ワクチンのマウスモデルによる免疫原性、交叉反応性、感染防御効果の評価。

a) トリインフルエンザウイルスを用いたアルムアジュバントワクチンの検討。

1997年のH5N1の流行の際に、我々は弱毒化ウイルスを作製し、現行のワクチンと同様のスプリットワクチン、全粒子ワクチンをそれぞれ試作して、ヒトに対するワクチン効果について検討した。その結果、トリインフルエンザウイルスの表面抗原を持つワクチンはヒトに対して免疫原性が殆どないことが判明した。そこで免疫原性をあげるためにヒトでの使用が認可されているアルムアジュバントの添加による免疫効果について検討し、さらに、アジュバントの添加により抗原量を減少させることができるかなどについてマウスを用いて検討した。その結果、アジュバント添加により抗原量を1/10に減少させても非添加群に比べて有意の抗体上昇が得られることが確認された。さらに、免疫応答は、H5N1ウイルスの方がH7N3より高いことが示された。このことから、トリインフルエンザウイルスを用いた新型ワクチンとして、アルムアジュバントワクチンの開発が有効であることが示唆される。これらの成績は、ヒトにおけるアルムアジュバント開発やライセンス化に有用な情報となる。

b) 皮下接種法によるアルムアジュバントH5N1ワクチン効果の検討。

1997年のH5N1の流行の際に、我々は弱毒化ウイルスを作製し、現行のワクチンと同様のスプリットワクチン、全粒子ワクチンをそれぞれ試作して、ヒトに対するワクチン効果について検討した。その結果、鳥インフルエンザウイルスの表面抗原を持つワクチンは

ヒトに対して免疫原性が殆どないことが判明した。そこで、ヒトでの使用が認可されているアルムアジュバントを添加したワクチンの開発が試みられ、前臨床試験が開始されている。本研究班では、ヒトでの臨床試験に先駆けて前年度からマウスモデルを用いてアジュバントワクチンの免疫原性や感染防御効果を検討してきた。2003年のH5N1ヒト分離株をRG法で弱毒化したワクチンにおいては、アジュバント添加でワクチン抗原量を1/10に減少させることができた。さらに、ホモの強毒型野生株の攻撃感染に対しても抗原量が1/10でも感染防御効果があることを確認できた。

このことは、鳥インフルエンザに由来する新型インフルエンザの大流行の際には、アルムアジュバントワクチンを採用することで有効なワクチン供給ができること、さらに、抗原量を減量できることから、現行の国内ワクチン製造能力(2000万人分)で全国民が接種できるワクチン量を供給できる可能性が出てきた。

一方、本研究からは、2003年のH5N1分離株(A/Hong Kong/213/2003)で作製したアジュバントワクチンは2004年の抗原変異したヒト分離株(A/Vietnam/JP1203/2004)に対しても、交叉防御効果を持つことが示された。ワクチン株は毎年の流行株と抗原性の一致した最新の分離株で開発することが望ましいが、もし、2004年のH5N1ヒト分離株から有効なワクチンが開発できなかった場合でも、2003年分離株から作製したワクチンでバックアップ可能であることが示唆された。

c) 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 poly(I:C)およびその誘導体をアジュバントとした経鼻接種 H5N1 ワクチンの開発と動物モデルによる評価。

a) 経鼻接種アジュバントワクチンの開発。

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。本研究班においては、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。その結果、不活化ワクチンのみの経鼻接種では免疫効果は得られないが、コレラトキシンBサブユニット(CTB)を添加することで免疫原性が格段に上がることが確認された。しかし、人用のワクチンを念頭においた場合、このアジュバントは使用できない。そこで、これに変わるアジュバントとしてpolyI:Cおよびキチン微粒子の混合物をアジュバントとして採用したところ、CTBに変わり得る程のアジュバント効果が得られることが分かった。この新しい経鼻接種用アジュバントが最近のH5N1ヒト分離株を用いたワクチンにおいても同様の効果を発揮するのか今後の研究成果が期待される。

b) 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- α 、IFN- β 、IFN- γ 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 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。

a) 現行の HA ワクチンの接種基準の見直しと安全性に関する検討。

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、この接種回数における接種量を米国の場合と比較すると少ない。そこで小児における至適接種量の検討と接種量の増加に伴う副作用について検討した。次年度においてこれらの分析結果が明らかになり、この情報は、新型インフルエンザワクチンの接種体制の検討にとって有用な情報を提供することになる。

b) 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、現行の接種量で十分なワクチン効果を誘導できるのか科学的根拠に基づいて検証する必要がある。さらに、ワクチン接種回数と局所副反応との相関についても明らかにしておく必要がある。本研究では、これらについて検証し、以下の結論を得た。

- * ワクチン接種前抗体価 20 倍以下については 0～1 歳児の抗体応答は悪く、感染防御が期待される 4 倍以上の抗体応答を得るためには 2 回接種が必要である。
- * 2～12 歳児では一回接種で 4 倍以上の抗体上昇が見られ、2 回接種しても追加免疫効果は見られない。
- * 2～12 歳児では、ワクチン接種量の違いによる抗体応答の優位差は見られない。
- * 副反応については、1 回接種後に副反応が見られないものは、追加接種しても副反応は出ない。しかし、1 回接種後に副反応が出るものは、2 回接種後にはさらに顕著になり、注意深い経過観察が必要である。

以上の成績は、抗体非保有者はワクチンの 1 回接種によりプライムされ、2 回目の接種でブースターがかかる、一方、抗体保有者は 1 回接種でブースターがかかるというこれまでの報告を支持している。これらの情報は、新型ワクチンの接種量を検討する上で、重要な参考資料として活用されることとなる。

c) 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。

6 GMP 管理下でセルバンキングした LLC-MK2 細胞の安全性を ICH ガイドラインに沿って検証し、実用化。

a) 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検索と開発。

RG 法の完成により、流行株を弱毒化したワクチン製造株の開発は数週間で可能になった。しかし、ワクチン製剤としてヒトに使用するためには、種ウイルスの作製過程は全て GMP に準拠し安全性の担保された細胞で行われなければならない。このことから、欧米のワクチンメーカーでは WHO が推奨した Vero 細胞 (CCL 8 1) からワクチン製造用の細胞株を

独自に開発した。これらは特許により所有権が保護されていることから、入手は不可能である。そこで、わが国でも GMP 対応の細胞株の構築が必要である。本研究では、国内の各ワクチンメーカーがワクチン製造用に開発した Vero 細胞を提供してもらい、リバースジェネティクス法に使用できるかウイルス回収量を指標にして感度を検討した。その結果、既存の細胞を採用することは難しいことが明らかになった。このことは、わが国においてはワクチン用の弱毒株を作製できてもヒトに用いるワクチン製造株を作製ではできないことを示している。

新型インフルエンザ対策においてワクチン株開発は根幹をなす重要な部分であることから、リバースジェネティクス法に採用できる GMP-細胞株の開発を緊急に実施しなければならない。

b) 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策定され、今後はGMP管理のもとでワクチン株開発をしなければならない。しかし、現行ではRG法に採用できるGMP管理下で作製された細胞株は国内には存在しない。そこで、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、GMP基準を満たした細胞株の確立を試みた。現在、WHOでは海外メーカーが使用している Vero 細胞をワクチン製造用に推奨しているが、本研究では 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、各種試験を開始した。これら試験が完了するのは2005年の10月頃が見込まれている。ヒト用ワクチン製造に採用できる細胞株は各国の authority によって承認されることになっていることから、全項目の試験終了後

は、国の承認審査を経ることになる。これによって承認後は、わが国にもヒト用のインフルエンザワクチン製造用の細胞株が初めて誕生する。これによって、わが国が抱えている RG法による新型ワクチン株作製上の障害のひとつがやっ取り除かれることになり、この成果が大いに期待される。

c) 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。

D 結論

・ 新型インフルエンザ対策の根幹の一つは、流行株から弱毒化ウイルスを可能な限り迅速に作製し、ワクチン開発を行うことである。本研究ではこの目標を達成するために、ヒトに対して病原性が低く、孵化鶏卵で高増殖性する A/PR/8/34 株をバックボーンとするリバーズジェネティクス系を構築した。この手法を用いたワクチンの開発には国際的基準の策定が必要であり、本研究も WHO のガイドライン作成に貢献した。また、トリインフルエンザウイルスを用いたワクチンにはアルムアジュバントの添加が有効であり、これによって抗原量を 1/10 に減少させることが可能であることが示唆された。また、リバーズジェネティクス法でワクチン製造用の種ウイルスを作製するための GMP-細胞の開発をわが国においても早急に進める必要があることが示された。

・ RG 法で作製されるワクチン株の取り扱い、安全性試験、遺伝子組み換え操作やバイオセーフティーの問題、生物学的製剤としての品質管理に関する国際的な指針がまとめられた。RG 法により国内外で流行した最近の高病原性 H5N1 鳥インフルエンザ分離株から弱毒化ワクチンの試作に成功した。また、マウス動物モデルによる試作ワクチンの有効性を検討したところ、アジュバント添加により抗原量の節約が可能であること、さらに経鼻接種用の適当なアジュバント候補も特定された。一方、RG 法でヒト用のワクチン製造株を作製するための細胞株 LLC-MK2 が

特定され、GMP 管理下でセルバンクを作製し、ワクチン製造用の承認を得るための安全性試験が開始された。

・ 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- α , IFN- β , IFN- γ , 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 0.25 mL、6 歳以上 0.5 mL の接種で対応しても安全性に問題はない。

E 研究発表

1. 論文発表

Masaki Imai, Shinji Watanabe and Takato Odagiri (2003) Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex. Arch. Virol. 148, 1873-1884

Shinji Watanabe, Masaki Imai, Yoshiro Ohara and Takato Odagiri (2003) The influenza B virus BM2 protein is transported through the *trans* Golgi network as an integral membrane protein. J. Virol. 77, 10630-10637

Noriko Nakajima, Yasuko Asahi-Ozaki, Noriyo Nagata, Yuko Sato, Florencio Dizon, Fem J.

- Paladin, Remigo M. Olveda, Takato Odagiri, Masato Tashiro and Tetsutaro Sata (2003) SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 56, 139-141
- Chiharu Kawakami, Takehiko Saito, Yoko Nakaya, Setsuko Nakajima, Tsuya Munemura, Miwako Saikusa, Yozo Noguchi, Kikushige Fujii, Mikio Takaoka, Reiko Ito, Toshinori Saito, Takato Odagiri and Masato Tashiro (2003) Isolation of influenza AH1N2 viruses from an outbreak in Yokohama city during the 2001-2002 influenza season in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 56, 110-1131.
- 二宮愛、小田切孝人 (2003) SARS の診断。臨床医 29、1922-1929
- 小田切孝人 (2003) 近年のインフルエンザの流行状況。Pharma Medica 21, 23-28.
- 小田切孝人、二宮愛、板村繁之、西藤岳彦、宮嶋直子、森川茂、西條政幸、田代真人 SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果。インフルエンザ、5、35-24、2004
- Takahiko Saito, Yoko Nakaya, Takashi Suzuki, Reiko Ito, Toshinori Saito, Hiroyuki Saito, Shinichi Takao, Keiji Sahara, Takato Odagiri, Takeomi Murata, Taiichi Usui, Yasuo Suzuki and Masato Tashiro Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation. *J. Med. Virol.* 74, 336-343 (2004).
- Masaki Imai, Shinji Watanabe, Ai Ninomiya, Masatsugu Obuchi and Takato Odagiri Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly. *J. Virol.* 78, 11007-11015 (2004).
- Naomi Takasuka, Hideki Fujii, Yoshimasa Takahashi, Masataka Kasai, Shigeru Morikawa, Shigeyuki Itamura, Koji Ishii, Msahiro Sakaguchi, Kazuo Ohnishi, Masamichi Ohshima, Shu-ichi Hashimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Hiroshi Yoshikura, Toshinori Takemori, Tasuko Tsunetsugu- Yokota A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *International Immunol.* 16, 1423-1430 (2004).
- 小田切孝人、二宮愛、板村繁之、西藤岳彦、宮嶋直子、森川茂、西條政幸、田代真人 SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果。インフルエンザ、5、35-24、(2004)
- 小田切孝人 東アジア諸国で大流行している高病原性トリインフルエンザウイルス。小児科、45、434-439 (2004)
- 小田切孝人 SARS の検出 からだの科学 [増刊] 9-14 (2004)
- R. O. Donis, Jean-Thierry Aubin, Saliha Azebi, Amanda Balish, Jill Banks, Niranjana 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 Thawatupha, 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

T. Odagiri Detecting human and novel influenza viruses for vaccine preparation and pandemic preparedness. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute Respiratory Infections Panel, Yokohama, January 8-10, 2003.

S Watanabe, M Imai and T Odagiri The influenza b virus BM2 protein is transported in cytoplasm through the trans-golgi network as an integral membrane protein. 12th International Conference on Negative Strand Viruses, Pisa, Italy, June (2003)

小田切孝人、西藤岳彦、斉藤利憲、板村繁之、

今井正樹、二宮愛、山下和予、岡部信彦、田代真人。2002/2003 シーズンのインフルエンザウイルス流行株について。第 24 回衛生微生物技術協議会研究会。福岡市、7 月、2003

小田切孝人 SARS の実験室診断 第 24 回衛生微生物技術協議会。福岡市、7 月、2003

小田切孝人 SARS のウイルス学的診断とワクチン開発の展望 第 7 回日本ワクチン学会名古屋、10 月 2003

今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小田切孝人。リバーズジェネティクス法による B 型インフルエンザウイルス BM2 変異株の作製と BM2 蛋白質の機能解析。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10 月 (2003)。

森川茂、板村繁之、西藤岳彦、西條政幸、小田切孝人、倉根一郎、田代真人。重症急性呼吸器症候群 (SARS) の血清診断。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10 月 (2003)。

板村繁之、二宮愛、西藤岳彦、森川茂、西條政幸、小田切孝人、倉根一郎、田代真人。RT-PCR 法による重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスの検出感度の検定。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10 月 (2003)。

小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代真人。2002/2003 シーズンのインフルエンザ流行株の解析と次シーズンのワクチン株。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10 月 (2003)。

中島典子、尾崎康子、永田典代、佐藤由子、樋口好美、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎。ホルマリン固定パラフィン法米剖検肺組織標本における SARS コロナウイルス感染細胞の同定。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10 月 (2003)。

M Imai, S Watanabe and T Odagiri Integral membrane protein BM2 of influenza B virus is a necessary component for generation of infectious virus. *Options for the Control of Influenza V*, Okinawa, October, 2003.

小田切孝人 SARS コロナウイルスの鑑別診断とワクチン開発 第 8 回日米医学急性呼吸器感染症専門部会 国立感染症研究所 1 月 (2004)

Takato Odagiri. Development of new diagnostic tools for severe acute respiratory syndrome (SARS) and for highly pathogenic avian influenza. WHO consultation on a coordinated response for the fast-track development of diagnostic tools for new and re-emerging infectious diseases. Kobe, September, 2004.

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザ:わが国および世界における現状、検体体制 平成15年度希少感染症診断技術研修会 国立感染症研究所 2月 (2004)

小田切孝人、西藤岳彦、小淵正次、斉藤利憲、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代真人。2003/2004シーズンのインフルエンザウイルス流行株と2004/05シーズンワクチン株。平成16年度衛生微生物技術協議会。埼玉市、7月、2004 二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人 弱毒化鳥インフルエンザウイルス H5N1 を用いたアルムアジュバントワクチンのマウスにおける有効性の検討 第8回日本ワクチンワクチン学会 10月、札幌 (2004) 小田切孝人、今井正樹、二宮愛、納富継宣、峰川晴美、石崎徹、田代真人 LAMP法による高病原性鳥インフルエンザウイルス感染診断系の開発 第52回日本ウイルス学会学術集会・総会、横浜、11月 (2004)。

小田切孝人、西藤岳彦、小淵正次、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代真人。2003/2004シーズンのインフルエンザ流行株の解析と次シーズンのワクチン株。第52回日本ウイルス学会学術集会・総会、横浜、11月 (2004)。

Takato Odagiri, Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Masato Tashiro. Development of H5-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system as a new diagnostic tool for detection of H5N1 avian influenza viruses. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto December, 2004.

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザの疫学と防疫:人への感染性と対策 平成16年度秋季全国鶏病技術研修会 佐賀市、12月

(2004)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザ:鳥インフルエンザの問題点と対策 平成16年度希少感染症診断技術研修会 国立感染症研究所 2月 (2005)

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. 10th 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)

F 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 15-17 年度厚生労働科学研究費補助金 (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)
分担研究報告書

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

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 新型インフルエンザに対しては、緊急にワクチンを開発・製造する必要がある、安全性・有効性に関しては、通常のワクチンに対する対応では対処できない。そこで、現在緊急事項となっている鳥高病原性 H5N1 型インフルエンザに対するワクチン開発・製造について、安全性を最大限に確認した上で、迅速に供給に結びつけるためのガイドライン作成を、WHO に協力して行った。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 (リバース・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。さらに、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、リバース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 (リバース・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、さらに、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

・WHO世界インフルエンザ計画の内部で検討を繰り返し、ワクチン開発および製造に関する安全性評価のガイドラインをまとめた。

・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、バイオセー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検討した。素案をまとめた段階で、WHOを通してパブリックコメントを求め、これらを考慮した最終案をまとめた。

・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、バイオセー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。

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

(I) 人に使用するインフルエンザワクチンの製造株の開発におけるRG法の実施条件、管理規定が要求される。

1. [野生株ウイルス]

従来のワクチン製造では、分離ウイルス由来のウイルスを原料としていたために、外来性微生物等の迷入の否定された発育鶏卵由来のウイルスが要求された。しかし、クローン化された遺伝子DNAを出発材料とするリバーシ・ジェネティクスにおいては、分離ウイルスの由来、細胞および発育鶏卵等の無菌性等

は特に問題とならない。但し、適切な製造環境と操作条件が要求され、また作製された候補株については、WHOインフルエンザ協力センターにおいて、抗原性の検証がなされなければならない。

2. [細胞株]

・使用する細胞は、国家品質管理当局により微生物迷入が否定されたものを使用せねばならない。人用ワクチン製造用に承認された細胞が最も適当である。

・細胞は、細胞バンク由来で、ワクチン製造用に認可された継代数以内で、なるべく継代数を経ないように管理すべきである。

・トランスフォーム細胞における腫瘍原性DNAは、希釈されるので危険性は少ない。承認された細胞を用いていない研究室で作製された遺伝子再集合体はワクチン製造株としては推奨出来ない。当初からリバーシ・ジェネティクスに使用されている239T細胞または239T/MDCK細胞は人用ワクチン用に検証されておらず、ワクチン株開発用には使用すべきではない。現時点では、承認されたVero細胞が使用できる。他の細胞の開発も必要である。

3. [試薬類]

すべての操作に使用する試薬類は高品質のものを用いる。動物由来のものについては、WHOのBSEに関する勧告に従う。

4. [実験室の設備と操作]

・リバーシ・ジェネティクス操作は、他のインフルエンザウイルスを取り扱う場所から隔別しているか、事前に消毒された実験室内の、セフティーキャビネット内で行う。トランスフェクション後には、適切なバイオセーフティーレベルに応じた封じ込め対応が要求される。細胞培養は微生物等を用いた操作とは別の実験室で行う。

・可能であれば、操作はSOPに従って行う。すべての操作は、操作記録に残す。使用したすべての材料の製品番号を記録する。実験室記録には、交叉汚染を防ぐために、他のインフルエンザや遺伝子材料を同時に取り扱っていないことの証明を銘記する。

(II) 現在開発中のH5N1型ワクチン製造株(NIBRG-14)に関して、バイオセーフティー上のリスク評価。

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。