

2007/0011A

厚生労働科学研究研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業)

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小田切孝人

平成 20 (2008) 年 3 月

目 次

平成19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. 新型インフルエンザワクチンの品質に対する国際基準に関する研究

田代真人 _____ P8

2. 新型インフルエンザワクチン製造用 LLC-MK2 細胞株の有用性に関する研究 (II)

今井正樹 _____ P109

協力研究者：影山努、白倉雅之、岸田典子

3. LLC-MK2-Derivative 細胞の現行インフルエンザワクチン株に対する感受性の検討

城野洋一郎 _____ P113

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

森(二宮) 愛 _____ P118

5. アジュバントによる自然免疫を活用した高病原性鳥インフルエンザの予防法の開発

長谷川秀樹 _____ P123

協力研究者：一戸猛志、佐多徹太郎

6. ワクチン有効性評価技術の開発

高橋宜聖 _____ P130

協力研究者：阿戸学、小林和夫、小田切孝人、田代真人

7. 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 _____ P136

8. 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 _____ P138

協力研究者：中野 貴司、庵原俊昭、木下麻衣子、高橋裕明

矢野拓也、荒井祥二郎、

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業）
平成19年度総括報告書

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

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

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、地球規模で拡大し、東南アジア地域の鳥では定着しているといわれている。ヒトへの感染例も増え続けていることから、これが新型インフルエンザとなりパンデミックを引き起こすことが危惧される。このため、安全で抗原性のマッチした新型インフルエンザワクチンを適時に供給できる体制を一刻も早く完成し、それを適宜見直し、技術的改良を順次加えていくことが重要である。わが国の新型インフルエンザワクチン供給の現状は、海外のWHO協力機関が開発したワクチン株を貰い受け、それをもとにして各年度毎に1000万人分ずつワクチンを製造し、プレパンデミックワクチンとして国家備蓄している。しかし、パンデミック期になると、市中流行株からワクチン株を開発し、速やかに製造を開始する必要がある。海外協力機関からワクチン種ウイルスを分与されるまで待っている余裕はない。そのために、わが国でも独自にヒト用新型ワクチン株の供給ができるシステムを確立し、その実用化を進めなければならない。最大の障害は、ヒト用ワクチン種ウイルスを作製するためのリバースジェネティクス(RG)法に用いる細胞株をわが国が持っていないことである。それを海外から入手することも知的所有権の問題で不可能である。そこで、本研究ではこの問題を解決するために、新たにワクチン開発用のGMP準拠細胞を開発し、さらに、その製造効率や次世代ワクチンとなる培養細胞インフルエンザワクチンへの応用を見据えた研究を実施した。また、これまでRG法に採用してきたプラスミドの改良を試みた。また、新型インフルエンザワクチンの品質の国際基準の策定が進められている中で、各国の品質管理機関およびワクチン製造業者からの意見を採り入れて、国際基準の改訂に参画した。プレパンデミックワクチンの効果については、国家備蓄ワクチンに採用されたクレード2.1、および採用予定のクレード2.2ワクチンについて、それぞれの免疫効果をマウスモデルで検討し、その評価法を改良した。さらに、小児での新型ワクチンの接種量の設定に必要な基礎データを収集するために、現行の季節性ワクチンで異なる接種量による小児の免疫応答について検討した。また、経鼻接種ワクチンに用いるアジュバントのインフルエンザ感染防御機序について検討した。

研究組織		ウイルス第3部主任研究官
主任研究者		森(二宮)愛 国立感染症研究所
小田切孝人	国立感染症研究所 ウイルス第3部室長	ウイルス第3部研究員 (現:神戸市環境保健研究所)
分担研究者		高橋宜聖 国立感染症研究所
田代真人	国立感染症研究所 ウイルス第3部部长	免疫部主任研究官
河岡義裕	東京大学医科学研究所 教授	長谷川秀樹 国立感染症研究所 感染病理部室長
今井正樹	国立感染症研究所	神谷齊 (独)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

高病原性 H5N1 鳥インフルエンザの流行発生から5年目に入った現在では、家禽や野鳥における汚染地域は地球規模に拡大し、東南アジア諸国では家禽に定着し制圧は不可能となっている。ヒトへの感染事例は現時点で14ヶ国373例、死亡者236名(致死率63%)となっている。このことから、当該ウイルスに起因した新型インフルエンザによるパンデミックの発生はもはや避けられない。

従って、本研究ではパンデミック発生前に有効な新型インフルエンザワクチンの迅速供給体制の完成、ワクチン開発研究の推進、さらには次世代のインフルエンザワクチンである培養細胞ワクチンの開発と実用化を見据えた研究へと展開できるように研究を実施した。新型インフルエンザワクチン対策で、わが国が抱える最も深刻な問題は、RG法に使えるヒト用ワクチン株作製に使える培養細胞株が無いことである。これらは海外ワクチンメーカーが所有しているが、わが国は入手できない。そのため、わが国でも独自にワクチン株作製用細胞株を開発する必要がある。本研究では、昨年度にRG法に使うヒト用ワクチン株作製用細胞としてGMP-LLCMK2細胞株を樹立した(平成18年度報告書)。これと並行して感染研には、GMP準拠ワクチン株製造施設が平成20年度夏には完成することから、今後は諸外国に依存することなく、わが国でもヒトに使用できるワクチン株開発、それらの諸外国への供給が可能となる。この成果は、わが国の新型インフルエンザワクチン政策、さらには、5年後を目途に進めている培養細胞ワクチンの実用化にとって大きな貢献となる。

一方、新型インフルエンザワクチンの品質管理基準については、国際間の関連機

関、ワクチンメーカーで協議されているところである。国際品質基準がわが国に不利益をもたらさないように、さらに、わが国のワクチンの品質が国際レベルを維持できるように、わが国も積極的に基準策定の議論に参画しなければならない。このために、本研究では、WHOの2007年版改訂に参加し、品質基準のとりまとめを行った。

平成19年度には、クレード2.3からA/Anhui/1/2005(H5N1)弱毒化ウイルスを用いて、第2期目のH5N1プレパンデミックワクチンの国家備蓄が進められている。平成20年度には第3期目の備蓄ワクチン製造が予定されているが、ワクチン株選定には異なるクレード株間での交叉免疫、交叉防御効果などの基礎情報が必須である。これまで、備蓄したH5N1ワクチンが広い交叉反応性を持つなら、それを追加補充する戦略をとることが可能であるし、逆の場合は、別の株の選択が必要となる。これらの政策決定には、臨床試験の成績とともに、動物モデルで検証した成績も重要な役割を果たす。本研究では、マウスを用いてクレード2.1、2.2のH5N1ワクチンについて交叉防御効果を検討し、その情報は次期プレパンデミックワクチン株の選定に活用された。

第1期備蓄分のプレパンデミックワクチン(NIBRG-14)については、健常成人を対象にした臨床試験により、有効な抗体価を誘導する接種量が設定された。一方、現在流行しているH5N1鳥インフルエンザは小児や若年成人層が主たる標的であることから、小児に対するワクチン接種も切望されている。平成20年度には、小児を対象とした臨床試験が実施される予定であるが、これに先立って接種量の設定が必要である。本研究では、この接種量を考慮するための関連情報を提供する目的で、現行のHAワクチンを用いて小児における接種量と免疫反応との相関性を調べてきた。また、国産ワクチンと海外メーカー産ワクチンの免疫効果について、年齢別に評価し、3歳未満での接

種量0.25 mLでは、国産ワクチンでは不十分であることを報告した(平成18年度報告書)。これは、国産ワクチンの力価、製造法について見直す必要があることを示唆している。本年度も同様の調査を継続し、今後の季節性および新型ワクチン対策へ有用な情報発信をしていきたい。

インフルエンザ不活化ワクチンの経鼻接種法は、わが国発のワクチン戦略として注目されている。これには、適切なアジュバントが必須で、本研究ではその検討を行ってきた。本年度は、アジュバントのひとつであるキチン微粒子のインフルエンザ感染防御効果について評価し、それ自身に局所リンパ装置へのNK細胞遊走とTRAIL発現と活性化機能があることを見出し、致死感染からの回避に重要な役割を果たしていることを示唆した。本研究成果は次世代インフルエンザワクチンの開発にとって、重要な情報提供となる。

B. 研究方法

1. 新型インフルエンザワクチンの Regulatory pathways for licensing, Regulatory considerations for the development and evaluation, Post-Marketing Surveillanceについて、品質規格と国際基準を策定した。
2. 前年度に開発、バンキングが完了した GMP-LLCMK2細胞を用いて、RG法によるワクチン株製造効率をA/H6, A/H7, A/H9亜型ウイルスについて検討した。
3. GMP-LLCMK2細胞による現行のワクチン株A/New Caledonia/20/99 (H1N1)、A/California/7/2004, A/New York/55/2004, A/Wisconsin/67/2005, A/Hiroshima/52/2005 (H3N2)およびB/Shanghai/361/2002, B/Malaysia/2506/2004の増殖効率をワクチン製造用細胞MDCK-CCL34と比較検討した。
4. クレード2.1から弱毒化 A/Indonesia/5/2005株、クレード2.2から弱毒化A/turkey/Turkey/1/2005株を用いて、

アルミニウムアジュバント (Alum) 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンを作成した。これらを2回接種したマウスへ、接種2週目にホモウイルスおよびクレード1ウイルスの攻撃感染を行い、赤血球凝集抑制 (HI) 試験、中和試験および体重減少試験による交叉免疫効果について評価した。

5. マウスにキチン微粒子を経鼻投与し、マウス馴化A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8, H1N1) 及び野生株の高病原性鳥インフルエンザウイルスA/Vietnam/1194/04 (VN1194, H5N1) を攻撃感染し、感染防御効果を検討した。
6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による HA / NA 特異的な血中抗体価の測定系を構築するために、NIBRG-14 と RG-Indonesia/5 の組換え HA (rHA) と組換え NA (rNA) タンパクをバキュロウイルス発現系で作製した。ウイルス粒子の細胞への結合量はフローサートメトリにて定量した。
7. RG用ベクタープラスミドの改良。ベクタープラスミドのプロモーター領域をMDCK細胞由来のものに改変し、MDCK細胞を用いたRG系を開発した。
8. 2007/08シーズンの国産ワクチン (A/Solomon Islands/3/2006, A/Hiroshima/52/2005, B/Malaysia/2506/2004) およびサノフィパスツール社製ワクチン (A/Solomon Islands/3/2006, A/Wisconsin/67/2005, B/Malaysia/2506/2004) を用いて、3歳未満0.25mL, 3歳以上0.5mLの接種量における抗体誘導能、臨床症状について検討した。

C. 結果と考察

- 1 新型インフルエンザワクチンの品質に対する国際基準の策定。
現在世界各国で開発中のH5N1型ワクチン製造株および試験ワクチンの性状、試験成績、ならびに各国での臨床試験成績を比較検討し、さらに各国の現行インフルエン

ザワクチンの品質基準、WHOの品質基準等と照らし合わせ、安全性および有効性において新型インフルエンザワクチンに対して必要最小限に要求される条件に関する評価を行った。その結果、ほぼ現在の基準に沿った原案を作成することが出来た。

これに伴って、今後国際間で調整すべき課題として1) 血清抗体価の測定方法および表示方式に関する国際的な標準化と、国際参照品の整備、2) 赤血球凝集抑制 (H1) 試験に採用する血球の統一化と中和抗体価との整合性の検討、3) 血清抗体価と感染防御能力、発症阻止能との関連性の解明、4) アルミアジュバントの副反応の検討、などが浮き彫りになった。

2 RG 法によるワクチン種ウイルス作製に用いる GMP-LLCMK2 細胞の有用性の検討。

GMP-LLCMK2 細胞を用いて RG 法により A/duck/Hong Kong/716/79 (H6N1) 株、A/mallard/Netherlands/12/00 (H7N3) 株あるいは A/swine/Hong Kong/9/98 (H9N2) 株と高増殖性標準株とのリアソータントウイルスの回収効率を検討した。対照として Vero 細胞を用いた。その結果、GMP-LLCMK2 細胞では、すべての亜型で $2.5 \sim 4.3 \log_{10}$ TCID₅₀ /ml のウイルス量が回収できたが、Vero 細胞では A/H6 および A/H9 亜型の回収効率は低く、A/H7 亜型では全く回収できなかった。

諸外国では、RG-ワクチン株作製に Vero 細胞を用いており、WHO のガイドラインでもその細胞が推奨されている。しかし、本研究により、Vero 細胞は RG-ワクチン株作製には汎用性が無いことが示された。一方、本研究で樹立した GMP-LLCMK2 細胞は、H5 亜型に加え A/H6、A/H7 および A/H9 亜型株にも高い感受性があり、さらに、季節性インフルエンザウイルスにも感受性があることが示されている (平成 18 年度報告書)。よって、感染研に GMP 準拠のワクチン株製造施設が完成すれば、ヒト用の新型インフ

ルエンザワクチン株を供給できる。

3 ワクチン製造用としての GMP-LLCMK2 細胞の有用性の検討。

RG 法によるワクチン種ウイルスの作製のみならずメーカー規模でのワクチン製造にも GMP-LLCMK2 細胞が採用できれば、その有用性は大きく広がる。そこで、過去に採用された季節性インフルエンザワクチン株の増殖性について MDCK-CCL34 細胞、Vero-CCL81 細胞を対照にして検討した。GMP-LLCMK2 細胞は、MDCK-CCL34 細胞より若干ウイルス産生効率は劣るものの、Vero-CCL81 より高い感受性を示すことが明かとなった。よって、ウイルス培養条件をさらに検討することによって、GMP-LLCMK2 細胞は RG 法によるワクチン種ウイルス作製のみならずワクチン製造にも使用できる可能性が示唆された。

4 マウスにおけるクレード2-H5N1 ワクチンの有効性の評価

ワクチン株 rgIN5 (clade2.1.3) および NIBRG-23 (clade2.2) で作製した Alum 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンの効果を、マウスを用いて検討した結果、両者ともホモのウイルスに対して高い値の中和抗体を誘導できることが分かった。一方、ウイルス攻撃試験では、IN6/05 (clade2.1.3) に対しては、効果が高かったが、VNJP1203/04 (clade1) の攻撃では一部死亡するマウスもあった。現在、流行の主流は clade2 ウイルスである。しかし、clade1 のヒトへの感染事例が再発し、それによるパンデミックが起こった場合、clade2 ワクチンだけでは十分な効果が得られない可能性が示唆された。

5 経鼻接種ワクチンに用いたアジュバント (キチン微粒子) のインフルエンザ感染防御効果の検討

キチン微粒子を経鼻投与した後に H1N1 及び H5N1 インフルエンザウイルスの致死率的

感染を行いその防御効果を調べた。H1N1 ウイルスの攻撃感染では、体重減少は認められたが15日目まで60%のマウスの体重が回復しその後少なくとも40日目まで生残した。同様に、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの致死感染においても、80%の生存を示した。このことは、キチン微粒子それ自身にインフルエンザウイルスの致死感染に対して防御効果がある事を示唆している。また、頸部リンパ節でのNK細胞と Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) の発現を調べたところ、キチン微粒子投与マウスでは、NK細胞が約6倍増加していたことから、この防御効果は、局所リンパ節へのTRAIL 発現NK細胞の遊走が感染防御に関連していると思われる。

6 ワクチン接種によって誘導される血中抗体測定系の改良

RG-Indonesia/5 rHA を用いた ELISA により RG-Indonesia/5 ワクチンが惹起する抗 HA 抗体濃度を測定したところ、NIBRG-14 ワクチンよりもが 3.6 倍高いことが示された。さらに、HI 抗体価を調べたところ、NIBRG-14 ワクチンの抗血清と比べ 5.7 倍高く、免疫原性に優れていることが示された。一方、中和抗体価をより高感度に捉えるために、測定系に Clq の添加を行った。これによって、Clq を添加すると、NIBRG-14 粒子の細胞への吸着がより強く抑制されることが判明した。

一方、インフルエンザウイルスに対する防御反応において、抗 HA 抗体は感染そのものを阻害し最も効率的にウイルスを排除するが、抗 NA 抗体はウイルスの拡散を防ぎ、症状の軽減に寄与すると推察されている。そこで、rNA を用いた ELISA 法による NA 特異抗体の検出系を構築した。その結果、NIBRG-14 ワクチンの抗血清を 10,000 倍以上希釈してもシグナルが検出可能である系ができた。

7 RG 用プラスミドベクターの改良

MDCK 細胞を用いて RG 法を行うことができれば、高力価のワクチン種ウイルスを作製することが可能となる。そこで、イヌゲノム上で推定される配列をもとに、MDCK 細胞 DNA から PolI プロモーター領域を PCR クローニングした。MDCK 細胞において、そのプロモーター活性を測定したところ、ヒト PolI プロモーターよりも有意に高い値を示した。そこでイヌ PolI プロモーターを用いたリバースジェネティクス系を構築したところ、野生型 PR8 が効率よくレスキューされた。さらにワクチンシードウイルス (PR8/H5N1 6:2 reassortant) も効率よく作製された。これによって、今後、GMP-MDCK 細胞を開発または入手できた場合は、ワクチン種ウイルスの作製から製造まで一貫した流れでワクチン供給が可能となる。

8 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に関する検討。

プレパンデミックおよびパンデミックワクチンの小児に対する接種量は、まだ設定されていない。本研究は、現行の季節性ワクチンを用いて、年齢群ごとの接種量と HI 抗体応答について調査し、その知見を新型ワクチンの小児での接種量設定に役立てようとするものである。昨年度は 13 歳未満の小児に国産ワクチン 0.25mL 接種では十分な抗体誘導はできないことを示した。今年度も同様の調査を継続し、国産ワクチン、海外ワクチン(サノフィワクチン)での抗体応答の違いを検討した。現在、血清サンプルの入手手続きが進められており、次年度には解析結果が得られる予定である。

D 結論

- ・ 新型インフルエンザワクチンの品質に対する国際基準が策定された。これらは暫時更新が必要である。
- ・ ヒト用ワクチン株作製の細胞株 GMP-LLCMK2 細胞は、H5 亜型のみならず、他の亜型インフルエンザワクチンも効率よく作製可能である。

- GMP-LLC-MK2 細胞株は培養条件次第で、季節性インフルエンザワクチン製造に採用可能である。
- Clade2.1、2.2 アルム添加不活化ワクチンは、Clade1 ワクチン株に比べて、交叉免疫性が狭い。
- RG-Indonesia/5 ワクチンはNIBRG-14 ワクチンより高い免疫原性をもつ。また、rNA を用いた ELISA 法による NA 特異抗体の検出系を構築した。
- MDCK 細胞を用いて RG 法を行うために、プラスミドベクターの改良が完成した。
- 経鼻接種ワクチン用のアジュバントであるキチン微粒子は、それ自身にインフルエンザウイルスの致死感染に対して防御効果がある。
- 小児に対する現行のHAインフルエンザワクチンの接種量の増加を検討すべきである。

E. 研究発表

1. 論文発表

- Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Phan Van Tu, Nguyen Thi Kim Tien, Masato Tashiro, and Takato Odagiri Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific Loop-Mediated Isothermal Amplification method *J.Virol. Method* 141, 173-180, 2007
- Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminum adjuvant induces homologous and heterologous protective immunities against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in a mouse model. *Vaccine* 25, 3557-3560, 2007
- Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Sato Y, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Ami Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T. *Pathology*

and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *Int J Exp Pathol.*;88(6):403-14, 2007.

• Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol.* 79(6):811-819, 2007

• B. Darmma, A.Klimov, T. Odagiri, A. Burma, S. Tsatsral, N. Naranbold, D. Enkhsaikhan, P. Nymadawa. Characteristics of influenza virus epidemic strains in 2005-2006 season in Mongolia. *Mongolia J. Infect. Dis. Res.* 14, 2-6, 2007

• Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Cross-Protection against H5N1 Influenza Virus Infection Is Afforded by Intranasal Inoculation with Seasonal Trivalent Inactivated Influenza Vaccine. *J Infect Dis.* 2007 Nov 1;196(9):1313-20

• Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C(12)U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.* 2007 Sep;9(11):1333-40.

• Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura S, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1

influenza virus. J Med Virol. 79(6):811-9, 2007.

・Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri Cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles in production of infectious virus. J. Virol.82, 728-739, 2008

2 学会発表

・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 18 年度稀少感染症診断技術研修会 2 月(2007)

・Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri The cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles for the production of influenza virus. Options for the Control of Influenza VI, Tronto, June, 2007.

・CA Russell, TC Jones, IG Barr, NJ Cox, K Fukuda, V Gregory, I Gust, AW Hampson, AJ Hay, AC Hurt, JC de Jong, AI Klimov, AS Lapedes, YP Lin, A Mosterin, T Odagiri, ADME Osterhaus, GF Rimmelzwaan, MW Shaw, E Skepner, K Stohr, M Tashiro, WQ Zhang, RAM Fouchier, DJ Smith Global patterns in the evolution and epidemiology of influenza A(H3N2) virus from 2002 to 2007. Options for the Control of Influenza VI, Tronto, June, 2007.

・Takato Odagiri International support for influenza surveillance and control in Lao PDR. NIC review Meeting at Vientiane, Lao PDR. October, 2007.

・Takato Odagiri Update of influenza surveillance information and vaccine strain selection-Northern and Southern Hemisphere. NIC review Meeting at Vientiane, Lao PDR. October, 2007.

・小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人 2006/07 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 19 年度のワクチン株 第 55 回日本ウイルス

学会、札幌、10 月(2007)

・川上千春、小淵正次、七種美和子、野口有三、小田切孝人、田代真人 インフルエンザ市中流行株における NA 阻害薬耐性 A 型ウイルスの解析 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月(2007)

・高橋宣聖、阿戸学、北原玄太、二宮愛、小田切孝人、田代真人、小林和夫 H5N1 型プレパンデミックワクチンによる感染防御メカニズムの解析 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月(2007)

・今井正樹、影山努、氏家誠、納富継宣、峰川晴美、田代真人、小田切孝人 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)法による H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検出系の開発 II 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月(2007)

・影山努、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人、小田切孝人 Real-time RT-PCR 法による H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス核酸検出系の構築 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月(2007)

・池野大介、来海和彦、工藤康博、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎 マウスにおけるプレパンデミックワクチンによるプライミング効果の検討 第 11 回日本ワクチン学会 横浜 12 月、2007

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業
「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

新型インフルエンザワクチンの品質に対する国際基準に関する研究

分担研究者 田代真人 国立感染症研究所ウイルス第3部長

研究要旨 東アジアからアフリカまで広く流行しているH5N1型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、ヒト型ウイルスに変異して、新型インフルエンザとして人の間で大流行して、大きな健康被害と社会経済的な影響をもたらす可能性が危惧されている。新型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、リバーシジェネティクス技術をワクチン株の開発に応用・実用化する必要がある。WHOの勧告に基づいて、我が国をはじめとして世界各国において、この技術を駆使した新型インフルエンザワクチンの開発が進められている。その一方で、世界各地に供給される新型ワクチンに関しては、その品質、規格に関する国際的な基準を作成する必要がある。そこでWHOと協力して、新型インフルエンザワクチンの品質規格と国際基準の作成を行ってきた。さらに、H5N1ワクチンの臨床試験が各国で進み、プレパンデミックワクチンの事前備蓄が具体性を持ってきた。プレパンデミックワクチンにおいては、パンデミック開始以前に接種する可能性があるため、十分な安全性に関する試験を実施することが必要であり、また時間的にも可能である。そこで、このような経緯を踏まえ、更に各国の品質管理機関およびワクチン製造業者からの意見を採り入れて、新型インフルエンザワクチンの品質に対する国際基準の改訂を進めた。

A. 研究目的

東アジアからアフリカまで広く流行しているH5N1型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、ヒト型ウイルスに変異して、新型インフルエンザとして人の間で大流行して、大きな健康被害と社会経済的な影響をもたらす可能性が危惧されている。

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、2004年に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無かった。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。また、WHO 世界インフルエンザ計画のメンバーとして、「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、昨年度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。

この間に、我が国でも、リバースジェネティクスで弱毒化したウイルス株を用いて、発育鶏卵増殖・ホルマリン不活化・アルミアジュバント添加・全粒子の H5N1 型ワクチンが試作され、非臨床試験、第 1 相および第 2 + 3 相臨床試験が行われて、安全性と有効性において十分に評価に耐える成績が得られている。その結果、2007 年秋には H5N1 新型インフルエンザワクチンの製造承認が得られ、プレパンデミックワクチンの国家備蓄が進んでいる。特に、プレパンデミックワクチンの事前接種においては、安全性試験を十分に行っておくことが必要であり、また時間的にも可能である。

その一方で、世界各地に供給される新型ワクチンに関しては、その品質、規格に関する国際的な基準を作成する必要がある。そこで WHO と協力して、新型インフルエンザワクチンの品質規格と国際基準の作成を行った。更に各国の品質管理機関およびワクチン製造業者からの意見を採り入れて改訂を進めた。

B. 研究方法

これまで経験、蓄積されてきたリバース・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。さらに、各国の臨床試験成績を詳細に比較検討し、これらの情報から得られた新たな知見を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、現時点における新型インフルエンザワクチンに対する国際基準最終案を作成した（基準案については、最後に添付してある。）

C. 研究成果および D. 考察

現在世界各国で開発中の H5N1 型ワクチン製造株および試験ワクチンの性状、試験成績、ならびに各国での臨床試験成績を比較検討し、さらに各国の現行インフルエンザワクチンの品質基準、WHO の品質基準等と照らし合わせ、安全性および有効性において新型インフルエンザワクチンに対して必要最小限に要求される条件に関する評価を行った。その結果、ほぼ現在の基準に沿った原案を作成することが出来た。

今後の問題点としては、

1. 血清抗体価の測定方法が各施設で統一されておらず、更にその表示方法にもばらつきがあり、各施設からの成績をそのまま比較することが困難な状況にある。抗体測定方法およびその表示方式に関する国際的な標準化と、国際参照品の整備が緊急課題である。これについては、WHO が中心となって、国際基準を作成中である。
2. 赤血球凝集抑制 (HI) 試験については、用いる血球によって抗体価が大きく異なり、中和抗体価との整合性を検討する必要がある。
3. H5N1 型ウイルスについては、血清抗体価と感染防御能力、発症阻止能との関連性が不明であり、これらに関する成績を集積する必要がある。これらについては、動物実験から、現在の季節性ワクチンに対する国際基準が準用できることが示唆された。さらに、緊急事態においては、SRD の結果から直接効果を推定することも試みられている。
4. アルミアジュバントを添加することによる副反応等に関しても、十分な知見が得られて折らず、更に新規のアジュバントについては実績が無いために、評価基準の設定が困難である。しかし、これらについては、動物実験、臨床試験の進捗状況から、安全性に危惧が生じるような報告はなく、現時点では特に問題とはなっていない。
5. 抗原変異および異なる C1ade、Subc1ade のウイルスに対する交叉反応性についても、交叉 HI 試験や交叉中和試験の成績を以て、ヒトにおける交叉防御能を評価することが困難である。しかし、動物実験においては、アジュバント添加ワクチンでは、H5N1 亜型間であれば、C1ade、Sub-c1ade、

多少の抗原変異ウイルスに対しても、交差防御が期待できることが明らかにされてきた。

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(NIGRG-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つた。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、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。

今後、これらの問題について解決を進めると共に、随時基準を改定し、より安全で有効な新型インフルエンザワクチンの迅速、大量、安定供給を図る必要がある。

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。さらに、免疫原性を高め、必要な抗原量を節約するためのアジュバントの添加が必要であることが示された。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、それに基づいて、我が国で開発したH5N1型ワクチンの評価を行った。

これらを総合して、我が国で開発したH5N1型アルミアジュバント添加、全粒子ホルマリン不活化ワクチンの安全性、有効性について、十分な評価が得られ、平成19年10月には、2所社に対して製造承認が与えられた。これに基づいて、2000万人分のプレパンデミックワクチン原液が製造され、国家備蓄された。

F. 発表等

Shirato, K., Nishimura, H., Saijo, M., Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F. :Diagnosis of human respiratory syncytial virus infection using reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification

J. Virol. Methods 139; 78-84, 2007

Okada, M., Okuno, Y., Hashimoto, S., Kita, Y., Kanamaru, N., Nishida, Y., Tsunai, Y., Inoue, R., Nakatani, H., Fukamizu, R., Namie, N., Yamada, J., Takao, K., Asai, A., Asaki, R., Kase, T., Takemoto, Y., Yoshida, S., Peiris, J.S.M., Chen, P.-J., Yamamoto, N., Nomura, N., Ishida, I., Morikawa, S., Tashiro, M., Sakatani, M.

Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models Vaccine 25; 3038-3040, 2007

Ninomiya, A., Imai, M., Tashiro, M., Odagiri, T.:Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminum adjuvant induces homologous and heterologous protective immunities against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in a mouse model Vaccine 25; 3554-3560, 2007

Kato, A., Kiyotani, K., Kubota, T., Yoshida T., Tashiro, M., Nagai, Y. :Importance of anti-Interferon capacity of the Sendai virus C protein for pathogenicity in mice J. Virol. 81; 3264-3271, 2007

Imai, M., Ninomiya, A., Minekawa, H., Nomoto, T., Ishizaki, T., Tu, P.-V., Tien, N. T. K., Tashiro, M., Odagiri, T. :Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method J. Virol. Methods 141; 173-180, 2007



**World Health
Organization**

**WHO/BS/07.2074
ENGLISH ONLY**

**EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION
Geneva - 8 to 12 October 2007**

Proposed Guidelines:

Regulatory Preparedness For Human Pandemic Influenza Vaccines

NOTE:

This document has been prepared for the purpose of inviting comments and suggestions on the proposals contained therein, which will then be considered by the Expert Committee on Biological Standardization. **The text in its present form does not necessarily represent an agreed formulation of the Expert Committee. Comments proposing modifications to this text MUST be received by 24 September 2007** and should be addressed to the World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland, attention: Quality Safety and Standards (QSS). Comments may also be submitted electronically to the Responsible Officer: Dr Claudia Alfonso (alfonsoc@who.int)

The outcome of the deliberations of the Expert Committee will be published in the WHO Technical Report Series. The final agreed formulation of the document will be edited to be in conformity with the "WHO style guide" (WHO/IMD/PUB/04.1).

© World Health Organization 2007

All rights reserved. Publications of the World Health Organization can be obtained from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int). Requests for permission to reproduce or translate WHO publications – whether for sale or for noncommercial distribution – should be addressed to WHO Press, at the above address (fax: +41 22 791 4806; e-mail: permissions@who.int).

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.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either expressed or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use.

The named authors [or editors as appropriate] alone are responsible for the views expressed in this publication.

Part A. Introduction	3
A.1 General considerations	3
A.2 Objectives	3
A.3 Scope of the guidelines.....	4
A.4 Terminology	4
A.5 Background on pandemic human influenza vaccines.....	6
A.6 Background on seasonal human influenza vaccines.....	8
Part B. Regulatory pathways for licensing pandemic human influenza vaccines	9
B.1 General remarks.....	9
B.2 Establishing a regulatory pathway.....	9
B.3 Towards a harmonized regulatory pathway.....	12
B.4 Criteria for emergency use	14
Part C. Regulatory considerations for the development and evaluation of human pandemic influenza vaccines	15
C.1 Quality/Manufacturing	15
C.2 Preclinical and nonclinical evaluation of human pandemic influenza vaccines	17
C.3 Preclinical and nonclinical considerations for vaccines for novel influenza viruses.....	17
C.4 Clinical evaluation of human pandemic influenza vaccines	19
C.5 Special considerations for vaccines for novel influenza viruses	26
C.6 Quality control preparedness	31
Part D. Post- Marketing Surveillance.....	38
D.1 General remarks.....	38
D.2. Implementation of post-marketing surveillance	39
D.3. Special considerations if vaccines for novel influenza viruses are used before the pandemic is declared	41
D.4. Pharmacovigilance Activities.....	42
D.5. Immunogenicity and efficacy/effectiveness	48
D.6. Consideration of post-marketing surveillance in different target groups	50
D.7. Considerations for specific pandemic influenza vaccines	51
D.8. Risk Benefit Assessment	52
D.9. Responsibilities of key stakeholders.....	53
D.10. Principles of communication	53
Acknowledgements / Authors	54
References.....	55
Appendix IA Overview of five selected National Regulatory Authority Pathways to Pandemic Influenza Vaccine Licensure.....	60
Appendix IB Overview of five selected National Regulatory Authority pathways	78
Appendix II: Regulatory Pathways for Human Pandemic Influenza Vaccine.....	87
Appendix III: Emergency use pathways for human pandemic influenza vaccine	87
Appendix III: Emergency use pathways for human pandemic influenza vaccine	88

Appendix IV Inventory of Guidance Documents from selected National Regulatory Authorities, and the World Health Organization.....	89
Appendix V: WHO Recommendations on production and control of influenza vaccines (inactivated) – seasonal vaccines	97

Part A. Introduction

A.1 General considerations

Strategies to shorten the time between emergence of a human pandemic influenza virus and the availability of safe and effective human pandemic influenza vaccines are of the highest priority. One fundamental component of such strategy is to promote convergence between National Regulatory Authorities (NRA) on regulatory evaluations to assure the quality, safety and efficacy of human vaccines that will be used for pandemic influenza. The World Health Organization (WHO) with support from Health Canada, the United States Food and Drug Administration (US-FDA), the Government of Japan and the Government of Spain convened three technical workshops with representation of NRAs from a broad range of countries, including vaccine producing countries and also countries that have indicated an interest to explore influenza vaccine production.

The goal of these workshops was to build a global network of key regulatory authorities engaged in and responsible for pandemic influenza vaccine regulation and to develop regulatory guidelines for preparedness of human pandemic influenza vaccines. These guidelines have been prepared based on the workshop discussions. The document is submitted for input from the Expert Committee on Biological Standardization convening in October 2007.

A.2 Objectives

The guidelines are intended to provide, both NRAs and vaccine manufacturers, state-of-the art advice concerning regulatory pathways for human pandemic influenza vaccines; regulatory considerations to take into account in evaluating the quality, safety and efficacy of vaccine candidates; and requirements for effective post-marketing surveillance of human pandemic influenza vaccines. The scientific knowledge base concerning pandemic vaccines is rapidly evolving. These guidelines may be modified as new knowledge and approaches become available.

A.3 Scope of the guidelines

These guidelines are intended to cover both inactivated influenza vaccines and live attenuated influenza vaccines (LAIV) produced in either embryonated chicken eggs or in cell cultures. The principles outlined in the document will also apply to novel production systems for influenza vaccines currently under development such as vaccines comprised of influenza proteins expressed in various genetically-engineered constructs; however, there may be additional quality control and regulatory considerations that must be taken into account for such vaccine candidates.

The guidelines are written to cover a variety of scenarios for possible use of human pandemic influenza vaccines.

The first intended use is after a pandemic is declared. It is anticipated that such vaccines may be produced after a pandemic is declared and/or produced and stockpiled beforehand. The guidelines are intended to cover both situations.

Secondly, it is apparent that some countries are discussing the use of human influenza vaccines containing strain(s) with pandemic potential (vaccines for novel human influenza viruses) before a pandemic is declared. As the risk-benefit considerations are different in this situation compared to intended use after a pandemic is declared, special regulatory provisions are outlined in the document. However, it should be understood that the provision of this advice should not be interpreted as any sort of endorsement of, or recommendation for, the use of such a vaccine before a pandemic is declared. Any decisions to recommend the use of human influenza vaccines containing strain(s) with pandemic potential before a pandemic is declared should be in line with national policies and are solely the responsibility of individual Governments and their Public Health Authorities.

A.4 Terminology

A.4.1. Definitions

For clarity and consistency of the guidelines, the following human influenza vaccine terminology has been used:

Vaccines for novel influenza viruses: A monovalent vaccine containing a human influenza virus strain that is not in general circulation among human populations but the virus is considered a threat to infect people and a potential cause of a pandemic. The term "novel" refers to the human influenza virus. An H5N1 vaccine is one specific example of vaccines for novel influenza viruses but vaccines based on other influenza virus subtypes (e.g. H7 or H9) would also apply. There are several potential ways in which such vaccines might be used. These range from the vaccination of selected individuals to provide direct protection against the specific virus in non-pandemic situations to priming human populations in the prepandemic phase in the situation where the likelihood of a pandemic related to that specific virus is considered high. Vaccines for novel human influenza viruses are also referred as "pre-pandemic" and "pandemic-like" vaccines by some regulators and manufacturers.

Pandemic influenza vaccine: A monovalent vaccine containing the strain recommended by WHO in preparation for use either when a pandemic is considered by WHO to be imminent (potentially Pandemic Phases 4 or 5) or during a pandemic (Pandemic Phase 6).

Seasonal vaccine: A trivalent vaccine containing the three strains recommended annually by WHO for use in seasonal influenza vaccination.

Candidate vaccine: A prospect influenza virus vaccine which is in research and clinical development stages and has not been granted marketing licensure by a regulatory agency.

Pre-qualification: The process by which WHO assesses the acceptability of vaccines for purchase by UN agencies. Prequalification ensures that vaccines purchased by UN agencies are consistently safe and effective under conditions of use for national immunization programs. Prequalification provides a single standard against which products from manufacturers can be assessed and so provides a basis by which emerging suppliers can compete on international markets. Information on WHO prequalified vaccines can be used by countries directly procuring vaccines as an independent verification of quality.

A.4.2. Acronyms

ADR	Adverse Drug Reaction
AE	Adverse Event
AEFI	Adverse Event Following Immunization
BLA	Biologics License Application
AESI	Adverse events of special interest
BSL	Bio Safety Level
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Sciences
EMA	European Medicines Agency
EU	European Union
GBS	Guillain-Barre Syndrome
GISN	Global Influenza Surveillance Network
GMP	Good Manufacturing Practices
GMT	Geometric Mean Titre
HA	Haemagglutinin
HI	Haemagglutination Inhibition
ICH	International Conference on Harmonization
LAIV	Live Attenuated Influenza Vaccines
LAL	Limulus Amoebocyte Lysate
MAH	Market Authorization Holder
MPH	Monovalent Pooled Harvest
NA	Neuraminidase
NCL	National Control Laboratory
NRA	National Regulatory Authorities
PIC/S	Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme
PSR	Periodic Safety Reports
PMS	Post Marketing Surveillance

RCT	Randomized Clinical Trial
RSV	Respiratory Syncytial Virus
QC	Quality Control
rHA	recombinant haemagglutinin
SRID	Single Radial Immunodiffusion Assay
USA	United States of America
US-FDA	United States Food and Drug Administration
WHO	World Health Organization

A.5 Background on pandemic human influenza vaccines

A human pandemic influenza vaccine is designed to confer protection against an influenza virus that has the potential to cause an influenza pandemic. It contains viral antigens which differ from those used in current or recent seasonal influenza vaccines and to which humans are immunologically naïve. In anticipation of an influenza pandemic, a diversity of technical solutions and manufacturing options are under intensive investigation.

Current production of vaccines for novel influenza viruses depends entirely on the manufacturing facilities producing seasonal influenza vaccines. Based on a situation analysis in 2006, potential vaccine supply in case of an influenza pandemic will fall short by several billion doses that would be needed to provide protection to all the global population. In response to these shortcomings, WHO has developed a Global Action Plan for human pandemic influenza vaccines to identify and prioritize practical solutions to fill the anticipated gaps in vaccine supply. The plan aims to promote increased capacity for production of human pandemic influenza vaccines to narrow the anticipated gap between potential vaccine demand and supply during an influenza pandemic. An approach of the plan consists of increasing pandemic influenza vaccine production capacity by reaching beyond current seasonal influenza vaccine producers. Consequently, it is anticipated that influenza vaccine will be produced by new influenza vaccine manufacturers over the next few years.

Supported by laboratories of the WHO Global Influenza Surveillance Network (GISN), manufacturers who intend to produce vaccines for novel influenza viruses or pandemic influenza vaccines are expected to use vaccine strains that match circulating pre-pandemic or pandemic influenza variant viruses.

Steps to improve industrial pandemic preparedness range from the construction of new production plants meeting higher biosafety standards, through investigation of antigen sparing technologies (especially adjuvants), to the development of candidate vaccine prototype libraries. Some steps taken to develop a pandemic influenza vaccine are expected to influence seasonal influenza vaccine production. These new approaches may expedite vaccine production at a larger scale in a pandemic situation, making vaccine potentially available weeks before conventional manufacture (1).

At a WHO meeting in early 2007 (2), 16 manufacturers from 10 countries reported to be developing prototype vaccines against H5N1 avian influenza viruses. Five manufacturers were also involved in the development of vaccines against other avian viruses (H9N2, N5N2, and H5N3). Most manufacturers

reported using reference vaccine strains corresponding to viruses provided by WHO Collaborative Centres. More than 40 clinical trials, mostly focusing on healthy adults, had been completed or were ongoing. After completing safety analyses in adults, some manufacturers had initiated clinical trials in the elderly and children. All vaccines tested to date were safe and well tolerated in all age groups. Most of the data were obtained on healthy adults and further studies in children, the elderly and the immunosuppressed were considered necessary.

Most vaccine immunogenicity data have been generated from the use of egg grown influenza vaccines. Whole virus preparations appear to be more immunogenic than equivalent doses of split vaccine. Alum adjuvanted split vaccines, in striking contrast to some of the more promising alum adjuvanted whole virion vaccines, show modest increases in immunogenicity over unadjuvanted vaccines not allowing significant dose sparing. Some split vaccines formulated with newer adjuvants show encouraging immunogenicity which would likely allow dose sparing. Several manufacturers have established formulations which they believe will meet regulatory requirements and will submit applications for licensing in 2007. Some studies demonstrate that vaccination with currently available H5N1 prototype vaccines induced a potentially protective immune response against highly pathogenic strains of H5N1 virus isolated at different times and geographical locations. Because of the inherent variability in the assay systems used to measure immune responses, it is unwise to directly compare results from different studies.

The cell culture approach does not rely on fertilized chicken eggs for manufacture allowing for faster (but not infinite) scale-up. Provided that required biosafety levels can be guaranteed, cell cultures offer the potential to work with pandemic influenza strains that would be lethal to eggs without genetic modification. A potential limitation of the cell culture approach is that the process may still require the production of high-yield reassortants. Multiple passage in tissue culture may also introduce cell line specific mutations in the viral genes that can lead to the selection of variants characterized by antigenic and structural changes in the HA protein, potentially resulting in less-efficacious vaccines. Regulatory issues would include the presence of potential adventitious agents in mammalian cells and unknown side effects caused by residual host cell and media proteins in combination with new adjuvants (e.g. oil in water emulsions).

Some constraints could be overcome by using recombinant DNA technology to produce HA and NA viral antigens in cell culture. These purified antigens would, in turn, be used as the active ingredients in pandemic and/or vaccines for novel influenza viruses. Further information is currently needed to determine whether the recombinant DNA approach to influenza vaccine production would meet the challenge of a potential pandemic. Nevertheless, the principles outlined in this document would also apply to such novel vaccine production systems, although, additional regulatory considerations due to the recombinant nature of these vaccine candidates may arise.

Based on a WHO situation analysis, LAIV technology might be more appropriate for production of a pandemic vaccine because it requires less complex downstream processing than inactivated vaccines. Moreover, this type of vaccine has lower unit cost and production yield likely to be 10 fold higher than inactivated vaccines. In addition, the lower capital investment compared to inactivated vaccines, approximately