

2009/3/048 A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

細胞培養系を用いた新型インフルエンザワクチンの開発研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田代真人
平成 22 年(2010)3 月

目 次

平成 21 年度 細胞培養系を用いた新型インフルエンザワクチンの開発研究

I	総括研究報告書 研究代表者：田代真人 国立感染症研究所	P. 1
II	分担研究報告書	P. 7
1.	研究分担者：山本典生 国立感染症研究所	
2.	研究分担者：奥野良信 (財)阪大微生物病研究会観音寺研究所	P. 10
3.	研究分担者：野崎周英 (財)化学及血清療法研究所	P. 13
4.	研究分担者：五反田亨 (学)北里研究所生物製剤研究所	P. 20
5.	研究分担者：大塚浩史 デンカ生研株式会社	P. 24
6.	分担研究者：二宮康行 株式会社 UMN ファーマ	P. 29

細胞培養系を用いた新型インフルエンザワクチンの開発研究

研究代表者 田代真人 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター長

研究要旨 新型インフルエンザに対応するために、有効かつ安全な新型ワクチンの緊急開発・大量増産の体制を整えておくことは非常に重要である。国内での組織培養ワクチン製造体制を確立し、新型インフルエンザ出現に際して6か月以内に国民全員への新型ワクチン供給を確保することを目的として、1) 我が国における細胞培養系（無血清培地、高密度浮遊培養系）を確立、2) 細胞培養系を用いたワクチン製造技術を開発、3) ワクチン抗原の大量製造および新規アジュバント等を用いた新しいワクチン製剤の開発を行う。その結果を以って、製造施設の設計、建設並びに臨床試験の実施を進め、5年以内に国内での組織培養インフルエンザワクチン製造・供給および実用化を目指す。

細胞株としては、MDCK細胞（付着性）、MDCK細胞（浮遊性）、EB66細胞、express S F+細胞、LLC-MK2細胞が検討され、MCBとEnd of Production Cell (EPC) について特性と安全性に関する解析が進められた。細胞培養の方法・条件と精製工程については、各班員とも中規模での培養を既に行い、大規模培養へ向けての基盤は着実に整いつつある。精製工程を含めた一連の製造工程についてもそれぞれ検討が進んでおり、非臨床試験へ向けて準備が整ってきている。また、本研究班では今回、各班員に共通する問題点を抽出し、整理を行った。このように共通の問題について班員全体でディスカッションし、情報を共有することで、プロジェクト全体の推進を図った。全体としては、2年間で非臨床試験を終了するという目標へ向けて、着実に前進しているといつて良いであろう。

A. 研究目的

1. 研究全体の目的

新型インフルエンザに対応するため、有効かつ安全な新型ワクチンの緊急開発・大量増産の体制を整えておくことは大変重要である。

しかし、現行のインフルエンザワクチンの製造は、発育鶏卵を用いるために、国民全員分のワクチン供給には1年半程度を要する。また、ヒト流行株から発育鶏卵に馴化した高増殖性ワクチン製造株は、抗原性が変異してワクチン効果が劣る可能性がある。

これに対して、ウイルス増殖に株化組織培養細胞を用いた場合には、何時でも短期間に大量の細

胞を準備できるため、設備規模に応じて、何時でも安定してワクチンウイルスを大量に増殖させることができる。また、ヒト分離株由来のワクチン株は、発育鶏卵への馴化過程が不要なので、これに伴う遺伝子変異が起こらず、ヒト流行株の抗原性が維持されて有効性が高い等の利点がある。

そこで、国内での組織培養ワクチン製造体制を確立し、新型インフルエンザ出現に際して6か月以内に国民全員への新型ワクチン供給を確保することを目的として、国内外ワクチン製造業者等と共同で、1) 我が国における細胞培養系（無血清培地、高密度浮遊培養系）を確立、2) 細胞培養系を用いたワクチン製造技術を開発、3) ワクチン抗原の大

量製造および新規アジュバント等を用いた新しいワクチン製剤の開発を行う。その結果を以って、製造施設の設計、建設並びに臨床試験の実施を進め、5年以内に国内での組織培養インフルエンザワクチン製造・供給および実用化を達成する。この開発研究全体は5年以内の実用化を目指すものである。

B. 研究方法

2年以内に非臨床試験を終了することを前提に、本年度は以下の研究を行った。

1. ウイルス増殖に用いる細胞についての検討

各班員がそれぞれ保有する製造用細胞株および候補細胞株について、ウイルスの増殖性の検討や、細胞の特性試験・安全性試験等を行った。

また、Per.C6については、研究契約の締結へ向けて弁護士を通じた交渉を進めた。

2. 細胞培養の方法・条件についての検討

各班員がそれぞれ保有する細胞に関し、培養の方法や条件について検討を行った。特に、スケールによる細胞の増殖性の変化や、ウイルス増殖性の変化について解析を行った。

3. 精製工程についての検討

精製工程の確立へ向けて、精製方法に関する条件検討を進めた。

4. 非臨床試験に関する共通の問題点についての整理

各班員が共通して直面する問題点を抽出し、留意すべきポイントの整理を試みた。

C. 結果

1. ウイルス増殖に用いる細胞についての検討

各班員がそれぞれ保有する細胞に関して、ウイルスの増殖性の検討や細胞の特性試験・安全性試験等を行った。

細胞株としては、MDCK細胞（付着性）、MDCK

細胞（浮遊性）、EB66細胞、express SF+細胞、LLC-MK2細胞が用いられた。これらの細胞株についてはマスターセルバンク（MCB）、ワーキングセルバンク（WCB）が作製され、MCBとEnd of Production Cell（EPC）について特性と安全性に関する解析が進められた。現在までに得られている結果の中には、特に問題となる点は認められなかった。

ウイルスの増殖性に関しては、LLC-MK2がMDCK細胞と比較して低いという結果であったが、各所社のMDCK細胞、EB66細胞は増殖性に問題はないと考えられた。express SF+細胞については、Baculovirus Expression Vector Systemであるので、組換えHA蛋白質の発現について検討を行ったが、発現量について問題はないと考えられた。

Crucell社のPer.C6細胞については、研究契約の締結へ向け、弁護士を通して交渉を進めた。大きな問題点については合意に至ることが出来、交渉に大きな進展が見られた。できるだけ早く研究契約を締結し、ウイルス増殖性等の検討を行って参りたい。

2. 細胞培養の方法・条件についての検討

各班員が保有する細胞について、無血清培地による培養条件が検討された。20L～600Lの条件で細胞の増殖性やウイルスの増殖性について検討を行ったところ、小スケールでの培養と比較し遜色の無い効率で培養が可能であることが明らかとなった。

3. 精製工程についての検討

細胞培養から得られるインフルエンザウイルス粒子及び組換え蛋白質は、細胞由来の蛋白質や核酸を含むため、これらの夾雑物を除くための工程について検討がなされた。

混入してくる細胞由来の蛋白質および核酸の量については、各班員の条件検討によって、非臨床試験に進むことが可能なレベルまで改善することが出来た。

4. 非臨床試験に関する共通の問題点についての整理

各班員に共通する問題点について、幅広くディスカッションする中で抽出したところ、留意すべきポイントとして少なくとも以下の点が挙げられた。

- ・ウイルス増殖に使用する細胞株の腫瘍原性とがん原性について
- ・細胞溶解物（ライセート・DNA）の安全性について
- ・ウイルス増殖に使用する細胞の、ウイルスの遺伝学的・抗原的变化への影響の検討方法と認められる変化の許容範囲について
- ・ウイルス増殖用細胞株の内因性感染性因子（内在性レトロウイルス等）の試験について
- ・試薬を作製する過程で混入する可能性のある病原体の試験について
- ・HA量を定量するための方法について
- ・効力を確認するための試験について

これらの点については班会議にて、各班員の共通問題として意見の交換がなされた。今後、さらに情報収集し、問題点を整理していくこととなった。

D. 考察

5年以内に国内での組織培養インフルエンザワクチン製造・供給および実用化を達成するため、本研究班では2年間で非臨床試験を終了することを目標としている。

まずウイルス増殖に用いる細胞については、各班員とも細胞株の特性試験や安全性試験等を進めている。現在まで得られているデータについては、問題となる点はなく、順調に進んでいると言って良いであろう。ウイルス増殖に使用する細胞株の腫瘍原性とがん原性については、留意すべきポイントとしてもあげられており、特に注意を喚起したい。

次に細胞培養の方法・条件と精製工程についてであるが、各班員とも中規模での培養を既に行い、

大規模培養へ向けての基盤は着実に整いつつある。精製工程を含めた一連の製造工程についても、各班員で検討が進んでおり、非臨床試験へ向けて準備が整ってきている。

また、本研究班では今回、各班員に共通する問題点を抽出し、整理を行った。このように共通の問題点について班員全体でディスカッションし、情報を共有することは、プロジェクト全体を推進する上で、非常に大きな意味があると考えられる。さらに議論を深め、整理していく予定である。

E. 結論

全体として、2年間で非臨床試験を終了するという目標に向けて着実に前進しているという点が良いであろう。しかし、5年以内の実用化を達成するには、さまざまなハードルがある。最終的な目標の達成へ向け、一丸となって進んで参りたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawakami, C., Obuchi, M., Saikusa, M., Noguchi, Y., Ujike, M., Odagiri, T., Tashiro, M.: Isolation of Oseltamivir-Resistant Influenza A/H1N1 virus of Different Origins in Yokohama City, during the 2007-2008 Influenza season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 83-86, 2009.

Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, N., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M.: Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) – inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* 199: 1629-1637, 2009

Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro, M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y.: Differences in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy by age. *Microbiol. Immunol.* 53: 83-88, 2009

- Ikeno, D., Kimachi, K., Kudo, Y., Goto, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y.: The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous strains in a mouse model. *Vaccine*: 27, 3121-3125, 2009.
- Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Tashiro, M., Okada, H., Kato, K., Suzuki, Y.: Determination of N-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Open Glycobiology*, 2:28-36, 2009.
- Ichinohe, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H.: Poly(I:C)₁₂U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 27; 6276-6279, 2009
- Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J., Saito, T., Klimov, A., Macken, C., Zambon, M., Hayden, F.: Surveillance for neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses in Japan, 1996-2007. *Antiviral Therapy* 14: 751-761, 2009 WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group; Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M., Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R.: Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *J. Influenza. Resp. Viral Infect.* 3: 59-62, 2009.
- Sriwilajaroen, N., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., Ito, M., Ito, Y., Tashiro, M., Suzuki, Y.: Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology Journal.* 6:124, 2009
- Bertozi, S., Kelso, A., Tashiro, M., Savy, V., Farrar, J., Osterholm, M., Jameel, S., Muller, C.P.: Pandemic flu: from front lines. *Nature* 461; 20-21, 2009
- Ichinohe, T., Aina, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Tamura, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H.: Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J. Med. Virol.* 82: 128-137, 2010.
- Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, J., Tashiro, M., Odagiri, T., the working group of influenza virus surveillance in Japan.: Detection of Oseltamivir-resistant influenza viruses in Japan during the 2007-2009 influenza seasons *Emerging Infectious Dis.* (submitted)
- Aina, A., Ichinohe, T., Tamura, S., Kurata, T., Sata, T., Tashiro, M., Hasegawa, H.: Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. *J. Med. Virol.* 82:476-484.2010
- Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Aina, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T.: First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63;67-71.2010

Barr, I. G., McCauley, J., Cox, N., Daniel, R., Engelhardt, O. G., Fukuda, K., Grohmann, G., Hay, A., Kelso, A., Klimov, A., Odagiri, T., Smith, D., Russell, C., Tashiro, M., Webby, R., Wood, J., et al., Zhang, W., Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009–2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: Basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine* 28: 1156–1167, 2010.

2. 学会発表

1. 白倉雅之、信澤枝里、田代真人：リバーシジェネティクス(RG)法による新型インフルエンザワクチン製造株の作成 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月

2. 原田勇一、高橋仁、佐藤佳代子、信澤枝里、河野直子、板村繁之、田代真人、奥野良信、佐々木学、庵原俊昭、小田切孝人：沈降H5N1インフルエンザワクチン接種者の野生型ウイルス株及び弱毒ワクチン株に対する抗体応答の評価 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月

3. 長谷川秀樹、相内章、永田典代、岩田奈緒子、網康至、小淵正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人：新型インフルエンザH1N1のフェレットにおける病原性の検討 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月

4. 相内章、伊藤良、岸田典子、小淵正次、高下恵美、小田切孝人、千葉丈、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンの新型インフルエンザウイルスに対する交叉防御能の検討 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月

5. 岸田典子、小淵正次、高下恵美、徐 紅、氏家誠、永田典代、岩田奈緒子、相内章、長谷川秀樹、田代真人、齋藤玲子、鈴木宏、池松秀之、小田切孝人：季節性インフルエンザワクチンにより誘導される中和抗体の新型インフルエンザウイルスに対する交差反応性および新型インフルエンザウイルスの性状 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月

6. 影山努、中内美名、田代真人：新型インフルエンザウイルス(H1N1)核酸検出法の構築 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月

7. 小淵正次、氏家誠、岸田典子、徐 紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、安樂茜、江島美穂、田代真人、小田切孝人：2008/09シーズンの季節性インフルエンザウイルス流行株と平成21年度のワクチン株 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月

8. 氏家誠、島袋梢、安樂茜、江島美穂、小淵正次、岸田典子、徐 紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、田代真人、堀川博司、加藤裕美子、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、小田切孝人：2008/09シーズンにおけるインフルエンザ(A/H1N1)オセルタミビル耐性株(H275Y*)の国内発生状況 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月

9. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎：経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの剤形と効果検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月

10. 河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代真人：インフルエンザワクチンの力価測定に用いる一元放射免疫拡散(SRD)試験法の精度評価 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月

11. 高橋仁、原田勇一、佐藤佳代子、河野直子、板村繁之、田代真人：インフルエンザワクチ力価測定に使用する標準抗原のHA含量決定に重要なHA含有率のエンドグリコシダーゼを用いた測定法の検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月

12. 池野大介、来海和彦、工藤康博、後藤修朗、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎：マウスを用いたH5N1株インフルエンザワクチンのプライム-ブースト効果の検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月

13. 原田勇一、河野直子、板村繁之、小田切孝人、城野洋一郎、五反田亨、多田善一、池田富夫、田代真人：沈降新型インフルエンザワクチン(H5N1株)接種者の血清ウイルス中和抗体の交差反応性の検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月

14. 高橋宜聖、小野寺大志、阿戸学、小田切孝人、田代真人、小林和夫：ヒト血清移入マウスを用いたインフルエンザウイルス感染防御能の解析 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書（平成21年度）

細胞培養系を用いた新型インフルエンザワクチンの開発研究

研究分担者 山本典生 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター第5室長

研究要旨 新型インフルエンザが発生した場合には、短期間に大量のワクチンを製造する必要がある。インフルエンザワクチンは現在、鶏卵培養法を用いて製造されているが、この方法では全国民分のワクチンを製造するのに1年半を要すると予測されている。

一方、細胞培養法によるワクチン製造では、ウイルスの基質となる培養細胞を容易にかつ安定的に短期間の内に調製できるため、新型インフルエンザ発生時でも、ワクチンを短期間に製造できるものと考えられる。

そこで本研究班では、細胞培養ワクチンを5年以内に実用化することを目標として、(1)細胞培養ワクチン製造用の候補細胞株についての検討、(2)細胞培養ワクチン実用化へ向けて各班員に共通する一般的問題点の抽出を行った。

LLC-MK2細胞に関し、ウイルス増殖性について検討を行ったところ、LLC-MK2細胞におけるウイルス増殖性はMDCK細胞のそれよりも低いことが明らかとなった。

また、Crucell社のPer.C6細胞については、研究契約を締結するために弁護士を通して交渉を行い、大きな進展が見られた。できるだけ早く研究契約を締結し、ウイルス増殖性等の検討を行っていく予定である。

さらに、細胞培養ワクチン実用化へ向け、各班員に共通する一般的問題点の抽出を行った。特に非臨床試験に焦点を絞ってポイントをあげ、議論を深めた。全体に共通の問題について班全体で議論し情報を共有することは、プロジェクト全体を推進する上で大きな意味がある。これらによって実用化へのプロセスを促進し、出来るだけ早く国内での組織培養インフルエンザワクチン製造・供給および実用化を達成したいと考えている。

A. 研究目的

1. 研究全体の目的

インフルエンザワクチンは現在、鶏卵培養法を用いて製造されている。新型インフルエンザが発生した場合には短期間に大量のワクチンを製造する必要があるが、鶏卵培養法では全国民分のワクチンを製造するのに1年半を要すると推定されている。一方、細胞培養法によるワクチン製造においては、ウイルスの基質となる培養細胞を容易に

かつ安定的に短期間の内に調製できるため、新型インフルエンザ発生時でも、ワクチンを短期間に製造できるものと考えられる。さらに、細胞培養ワクチンでは発育鶏卵への馴化過程が不要なため、これに伴う遺伝子変異が起こらず、抗原性が維持されて有効性が高いと考えられる。また、閉鎖密閉系での培養操作により、ワクチン製剤への細菌汚染が排除でき、作業員への感染リスクを最小に出来る、等の利点がある。

そこで本研究では、細胞培養ワクチンを5年以内
に実用化することを目標として、研究代表者及び
他の班員と協力して研究を遂行する。

分担する研究内容としては、(1)細胞培養ワクチ
ン製造用の候補細胞株についての検討、(2)細胞培
養ワクチン実用化へ向けて各班員に共通する一般
的問題点の抽出・整理 である。これらによって
実用化へのプロセスを促進し、出来るだけ早く国
内での組織培養インフルエンザワクチン製造・供
給および実用化を達成したいと考えている。

B. 研究方法

(1)細胞培養ワクチン製造用の候補細胞株につい
ての検討

国立感染症研究所にてリバーズジェネティクス
用細胞として開発してきたLLC-MK2細胞に関し、
ウイルスの増殖性についての検討を行った。コン
トロールとしてはMDCK細胞を用いた。

また、Crucell社のPer.C6細胞については、研究契
約を締結するために弁護士を通して交渉を行った。

(2)細胞培養ワクチン実用化へ向けて各班員に共
通する一般的問題点の抽出・整理

各班員が共通して直面する問題点を、班会議に
おける幅広いディスカッションから抽出し、留意
すべきポイントの整理を試みた。

C. 結果

(1)細胞培養ワクチン製造用の候補細胞株につい
ての検討

これまで我々がリバーズジェネティクス用細胞
として開発してきたLLC-MK2細胞について、製造
用細胞株としての可能性について探るために、ウ
イルスの増殖性について検討を行った。その結果、
ウイルスの増殖性についてLLC-MK2細胞は
MDCK細胞より低いことが明らかとなった。

また、Crucell社のPer.C6細胞については、研究契
約を締結するために弁護士を通して交渉を行った。
大きな問題点については合意に至ることが出来、
交渉に大きな進展が見られた。できるだけ早く研

究契約を締結し、ウイルス増殖性等の検討を行っ
ていく予定である。

(2)細胞培養ワクチン実用化へ向けて各班員に共
通する一般的問題点の抽出・整理

各班員に共通する問題点について、班会議にお
ける幅広いディスカッションの中から抽出したと
ころ、留意すべきポイントとして少なくとも以下
の点が挙げられた。

- ・ウイルス増殖に使用する細胞株の腫瘍原性とが
ん原性について
- ・細胞溶解物（ライセート・DNA）の安全性につい
て
- ・ウイルス増殖に使用する細胞の、ウイルスの遺
伝学的・抗原的変化への影響の検討方法と認めら
れる変化の許容範囲について
- ・ウイルス増殖用細胞株の内因性感染性因子（内
在性レトロウイルス等）の試験について
- ・試薬を作製する過程で混入する可能性のある病
原体の試験について
- ・HA量を定量するための方法について
- ・効力を確認するための試験について

これらの点については班会議にて、各班員の共通
問題として意見の交換がなされた。今後、さらに
情報収集し、問題点を整理していくこととなった。

D. 考察

細胞培養ワクチン製造用の候補細胞株として
LLC-MK2細胞について検討したが、現状では
LLC-MK2細胞でのウイルス増殖効率はMDCK細
胞に比べて低いことから、ワクチン製造用にはあ
まり適さないと考えられた。

現在、本研究班で検討されている細胞はMDCK
細胞、EB66細胞、express SF+細胞であり、ヒト由
来の細胞は含まれていない。そうした中でCrucell
社のPer.C6細胞はヒト由来の細胞であり、選択肢
として検討しておく価値はある。この細胞につい

ては、できるだけ早く研究契約を締結し、ウイルス増殖性等の検討を行いたいと考えている。

また、細胞培養ワクチン実用化へ向けて各班員に共通する一般的問題点として、上記の通りいくつかのポイントが挙げられた。

ワクチン製造用の細胞として無限増殖能を獲得した株化細胞が使用されていることから、腫瘍原性およびがん原性に関する試験は重要と考えられる。その他のポイントも大事な論点を含んでおり、今後さらに情報収集をして、これらの問題の考え方について深めていく必要がある。

本研究班では今回、各班員に共通する問題点を抽出し、整理を試みたが、共通の問題について班全体で議論し情報を共有することは、プロジェクト全体を推進する上で大きな意味がある。これについては今後も継続していく予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

山本典生、田代真人：総論 インフルエンザー研究から臨床まで～ 細胞 Vol.41, No. 14, 2009

山本典生、田代真人：国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターの紹介 医学のあゆみ, 2010, in press

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究者 奥野良信 （財）阪大微生物病研究会

細胞培養系を用いた新型インフルエンザワクチンの開発研究

研究要旨 6,000万人分の細胞培養由来新型インフルエンザワクチンを6か月間で製造することが可能な施設を、5年以内に稼働させることを目指している。本研究では、2年以内にGLP試験を完了することを目指し、本年度は無血清培地馴化MDCK細胞の性状解析、およびその大量培養方法についての検討、並びにインフルエンザウイルスの培養、精製方法についての検討を実施した。

まず、当会が作製した無血清培地馴化MDCK細胞のワクチン製造用細胞としての評価を行うため、無血清培地馴化MDCK細胞および市販のMDCK細胞3株に、過去数年のインフルエンザワクチンのリファレンス株を接種し、それぞれの細胞におけるウイルスの増殖性について調査を行った。その結果、リファレンス株の多くは、無血清培地馴化MDCK細胞において良く増殖し、細胞培養ワクチン製造を想定した場合でも十分な量の抗原が得られることが確認できた。

また、中規模培養槽において、マイクロキャリアを用いたMDCK細胞の至適細胞培養条件について検討した。その結果、再現性よく高密度細胞培養ができる条件（酸素供給法および攪拌条件等）を決定することができた。

現行の発育鶏卵を用いたインフルエンザワクチン（H5N1株）の精製工程を参考にして、ウイルス粒子の精製条件についても検討した結果、精製方法を確立することができた。得られた原液（不活化全粒子ウイルス）の性状は、現行の発育鶏卵由来ワクチン原液と同等の精製度であることが分かった。

A. 研究目的

1. 研究全体の目的

現行の季節性インフルエンザワクチンの製造量は、発育鶏卵の供給に依存している。従って、新型インフルエンザが発生した時には、発育鶏卵の確保が問題となり、パンデミックインフルエンザワクチンの迅速な製造が困難になると予想される。一方、培養細胞を用いたワクチン製造法においては、ウイルスの基質となる培養細胞を、容易にかつ安定的に短期間の内に調製できるため、新型インフルエンザ発生時でも、パンデミックインフルエンザワクチンを早期に製造できるものと考えられる。また、ウイルスの培養は、完全に密閉した

状態で行うため、バイオハザード対策が容易である。

これまでに我々は、インフルエンザウイルスを増殖させる基質として、浮遊性ではなく、より造腫瘍原性が低い付着性のMDCK細胞（Madin-Darby Canine Kidney; イヌ腎臓由来）を使用するワクチンの開発を行ってきた。MDCK細胞を無血清培地に馴化させ、マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクを作製し、この細胞を用いて季節性インフルエンザウイルスをパイロットスケールの培養槽で培養することに成功した。今回の研究では、これまでに我々が開発を行ってきたMDCK細胞培養インフルエンザワクチンの製法を、5トンレ

ベルの大規模培養槽へスケールアップすることにより6,000万人分の細胞培養由来新型インフルエンザワクチンを6ヵ月間で製造できる施設を、5年以内に稼働させることを目的とする。

B. 研究方法と結果

2年以内にGLP試験を完了することを前提に、本年度は以下の試験を実施した。

1. 無血清培地馴化MDCK細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖性検討試験

ワーキングセルバンクに由来する無血清培地馴化MDCK細胞を継代培養し、過去数年のインフルエンザワクチンリファレンス株（国立感染症研究所より分与）を接種した後、経時的にサンプリングを実施し、CCID₅₀感染価およびHA価を測定した。また、これらのウイルスを市販のMDCK細胞3株（MDCK-I、MDCK-II、MDCK（NBL-2）；いずれもウシ血清含培地で培養）にも接種し、無血清培地馴化MDCK細胞での増殖性と比較した。

その結果、当会が作製した無血清培地馴化MDCK細胞のインフルエンザウイルスに対する感受性は、市販のMDCK細胞に劣らないことが分かった。また、リファレンス株の多くは、無血清培地馴化MDCK細胞において良く増殖し、細胞培養ワクチン製造を想定した場合でも十分な量の抗原が得られることも確認できた。

2. 細胞培養の条件検討

細胞培養における最適条件を検討するため、小規模スケールでの培養実験を20ケース以上実施した。その結果から、発泡およびマイクロキャリアの液面浮上が少なく、かつ、高密度で細胞を培養できる酸素供給条件および攪拌条件等を決定することができた。

次に、この実験から得られた各種のパラメータを中規模培養槽での培養条件に反映させ、細胞培養実験を実施した。その結果、連続した3回の実験において、培養6日目に細胞濃度 2×10^6 cells/mLにほぼ達することが明らかとなり（図1）、中規模培養槽での至適細胞培養条件を決定することができた。

3. 精製方法の検討

MDCK細胞由来インフルエンザウイルス培養液を材料として、現行の発育鶏卵由来インフルエンザワクチン（H5N1株）の精製工程を参考にした精製条件の検討を行った。

様々な実験の結果、この精製工程の一部を改変し、不活化全粒子ウイルスを精製できる方法が確立された。この方法で作製された原液（不活化全粒子ウイルス）の性状を解析したところ、タンパク質重量あたりのHA価は、現行の発育鶏卵由来ワクチン原液と同程度であったことから、精製度はほぼ同等であると考えられた。また、不活化前の精製ウイルス浮遊液のSDS-PAGE像には、発育鶏卵由来ワクチンと同様に夾雑タンパク質は認められず、原液の電子顕微鏡像（図2）にも、発育鶏卵由来ワクチンと同様に夾雑物は観察されなかった。さらに、原液に含まれるMDCK細胞由来DNA濃度を測定し、1ドースあたりに換算したところ、WHOのガイドライン（WHO Technical Report Series, No. 878, 1998）で定められた10ng/doseという限度値を、大きく下回っていることが分かった。

C. 考察

リファレンス株の多くは、無血清培地馴化MDCK細胞において良く増殖したが、一部の株は、無血清培地馴化MDCK細胞だけでなく市販MDCK細胞においてもやや増殖性が悪かった。この理由は、これらのウイルス株がMDCK細胞に馴化していないことが原因と考えられた。今後、細胞培養インフルエンザワクチンのシードウイルスを選定する際には、基質として使用する細胞における増殖性を確認し、増殖性が悪い場合には細胞に馴化させる必要があると考えられる。

中規模培養槽スケールにおける細胞培養実験においては、再現性よくMDCK細胞を高密度培養できる条件を決定することができた。今後、5トンレベルの実製造用培養槽にスケールアップすることを目指し、設計のためのデータ収集を行う予定である。

また、精製に関する実験から、MDCK細胞由来

ウイルス培養液の精製条件を決定することができた。この精製方法は、MDCK細胞由来DNAの残存量を極めて低く抑えることが可能である。そのうえ、マイクロキャリアを用いた付着培養法は、MDCK細胞が本来持つ性質を保持しており、造腫瘍性を低く維持した状態で培養できる方法である。今後も、さらに安全性を高めるために、精製における各種の条件検討を行いたいと考えている。

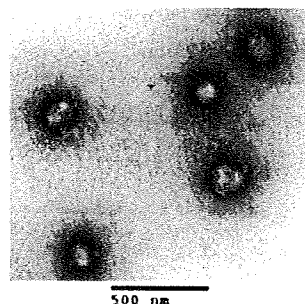


図2. MDCK細胞由来インフルエンザワクチン原液
(精製不活化全粒子)の電子顕微鏡像

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第13回日本ワクチン学会学術集会（札幌）

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

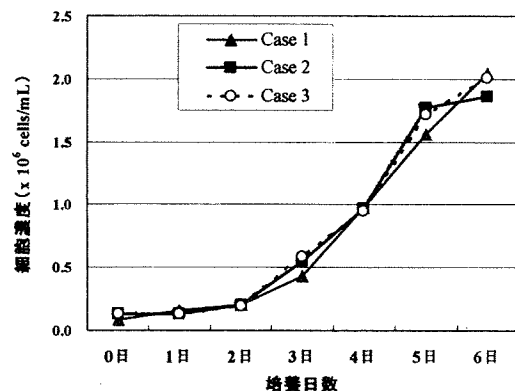


図1. 中規模培養槽での細胞培養実験結果
(連続した3回の実験)

細胞培養新型インフルエンザワクチン開発に関する研究

研究分担者 野崎 周英 （財）化学及血清療法研究所

研究要旨

第 I / II 相臨床試験薬の製造開始に向け、治験薬製造設備でテスト製造を複数回行い、事業化目標数値を上回る生産性と再現性の高い品質成績が得られた。

アジュバント AS03 を添加した EB66 細胞由来抗原（H5N1/インドネシア株）のマウスでの免疫原性を評価した結果、低用量の抗原でも高い抗体価を示し、同じアジュバントを添加した発育鶏卵由来スプリット抗原と同程度の抗体産生能を有することを確認した。

本年 3 月より開始する非臨床試験に向けて、上記治験薬製法にて 2 バッチの原薬製造を行い、必要量の被験物質を確保した。

A. 研究目的

我々は、新型インフルエンザワクチンの生産用シード受領後 6 か月以内に 6000 万人分のワクチン供給を確保することを目的として、GSK 社と共同で、細胞培養によるパンデミックワクチン製造技術の確立、製造施設の設計、建設並びに臨床試験の実施を進め、H25 年度末までに国内での細胞培養インフルエンザワクチン製造・供給体制を整備する。本研究はこのうちの最初の 2 年間で担当する。

B. 研究方法

本剤の高品質、高生産性の製造方法（培養・精製方法）を検討する。非臨床試験を開始し、安全性及び有効性を評価する。また、生産設備設計の基本計画の策定を開始する。

1) 細胞特性試験・細胞安全性試験

ワクチン製造に用いる細胞基材のマスターセルバンク（MCB）、及び、End of production cell（EPC）について、最新のガイドラインに従い、細胞特性試験、細胞安全性試験を実施する。

2) ウイルスバンクの調製・品質試験

ワクチン製造に用いる種ウイルスとして、A/H5N1/Indonesia/05/2005-PR8-IBCDC-RG2 株を使用し、この株を EB66 細胞で継代することにより、マスターウイルスシード（MVS）、及びワーキングウイルスシード（WVS）を調製する。

これらのウイルスシードについて、以下の試験を実施する。

【特性解析試験】

- (1) HA 試験
- (2) ウイルス含量試験（TCID50）
- (3) HA 遺伝子の塩基配列確認試験

(4) 赤血球凝集抑制試験

【純度試験】

- (1) 無菌試験
- (2) マイコプラズマ否定試験
- (3) 外来性ウイルス否定試験

3) 第 I / II 相臨床試験に向けた GMP 製法の確立

細胞培養から得られるインフルエンザウイルス粒子は、宿主細胞由来タンパク質を取り込んでいるため、従来の鶏卵由来インフルエンザワクチンの製法では十分な純度が確保できなかったが、これまでの製法開発で十分な純度及び収量が得られる製法を見出している。

今年度は、治験薬製造設備でのテスト製造にて恒常性を検証し、GMP に準拠した製法の構築を完了する。また、インフルエンザウイルスの不活化及び迷入ウイルスのクリアランス等の安全性データの取得に着手する。

4) 処方・剤形検討

本剤はスプリット、又はサブユニットワクチンとしての開発を検討中である。アジュバントは欧州で承認されているプレパンドミックワクチン「Prepandrix」で実績のある GSK 社の AS03 を使用し、更に複数の添加剤を加えることにより、製剤学的に安定な処方を検討する。

5) 品質試験法・評価系の確立

日本薬局方、生物学的製剤基準、世界保健機関 (WHO) の不活化インフルエンザワクチンのガイドライン、EMA 及び FDA 等の最新の海外のガイドライン、原液・製剤のロット分析及び安定性試験の結果に基づいて本剤の品質試験法・評価系を確立する。

6) 品質評価

GSK 社の発育鶏卵由来 HA 抗原 (スプリット抗原) を対照として、マウスを用いて、EB66 細胞由来 HA 抗原の免疫原性を評価する。

7) 安定性評価

非臨床原薬を用いて、長期安定性試験及び加速試験等を実施し、予備安定性評価を行う。

8) 非臨床試験原薬・製剤の製造

化血研が現在所有する細胞培養設備等の製造設備 (既存の 45L スケールのパイロットプラント) を用いて毒性試験等の GLP 試験を含む非臨床試験用原薬・製剤を製造する。

培養、精製等の一連の製造を 3 回実施することにより、製造の恒常性の確認を行う。

9) 非臨床試験 (効力を裏付ける試験、安全性薬理試験、毒性試験) の実施

効力を裏付ける試験として、マウスの免疫原性試験及びフェレットの感染防御試験を実施する。両試験では、異なるウイルス株に対する交差性応答についても評価する。

安全性薬理試験として、ラットにおける中枢神経系への影響、及びイヌにおける心血管・呼吸器系への影響を検討する。

毒性試験として、ウサギを用いた単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、局所刺激性試験を実施する。これらの試験の被験物質には 8) で製造した製剤を用いる。生殖発生毒性試験は、女性を組入れる第 III 相試験開始までに終了する。

10) GMP 製造体制の整備

製造管理・品質管理の組織・責任体制の整備、製造・試験検査手順の文書・記録の整備等を行い、GMP に準拠した製造管理・

品質管理体制を構築する。

11) 生産設備の整備

生産用ウイルスシード受領から6ヶ月以内に国民の半数6000万人分(1億2000万ドーズ)のワクチンを製造することを前提条件とし、既存設備(45Lおよび600Lスケール)の製造成績をもとに、実験用生産設備の整備及び実生産設備の基本計画の策定を開始する。

C. 研究結果

1) 細胞特性試験・細胞安全性試験

ワクチン製造に用いる細胞基材のMCB及びEPCについて、細胞特性試験、細胞安全性試験を実施中。既にほとんどの試験を完了しており、2010年3月までに全試験を終了する予定。

2) ウイルスバンクの調製・品質試験

ワクチン製造に用いる種ウイルスとして、A/H5N1/Indonesia/05/2005-PR8-IBCDC-RG2株を使用し、マスターウイルスバンクを調製し、EB66細胞での継代に伴うHA、NAの変異がないことを確認した。

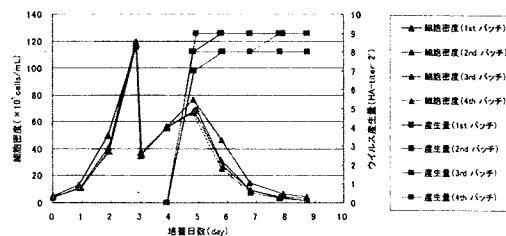
研究方法に記載した特性解析試験および純度試験については、治験薬製造開始までに終了する予定である。

3) 第I/II相臨床試験に向けたGMP製法の確立

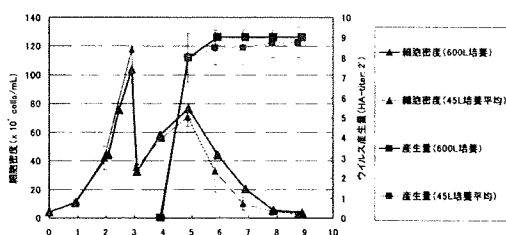
<培養>

各種培地(細胞増殖培地、フィード培地、ウイルス生産培地、培地添加剤等)の改良、培養条件(pH制御、培養温度、溶存酸素、攪拌速度等)の至適化、MOI、温度等ウイルス感染及びウイルス培養方法の検討によって、事業化目標数値を上回る生産性を達成した。現在、45Lファーマンターで4バッチのウイルス培養を実施しており(2バツ

チは非臨床薬製造)、安定した細胞増殖性、ウイルス産生量が得られている。



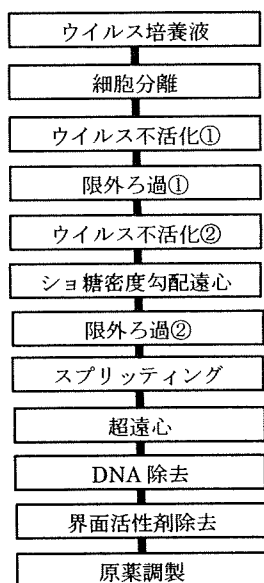
スケールアップ検討として、600Lファーマンターを用いたウイルス培養を実施した。その結果、45Lスケールと同等の細胞増殖性とウイルス産生を達成した。



また、他のパンデミック株として、GSKにて、H1N1株(A/California/07/2009 NYMC)のウイルス感染実験を行い、良好なウイルス産生を確認した。

<精製>

45Lファーマンターを用いたウイルス培養液を出発材料として、以下に示す治験薬製法フローで2バッチの精製を実施した(非臨床薬製造として実施)。



4) 処方・剤形検討

処方に関しては、複数の安定剤を含む候補組成にて、実保存および加速条件での安定性評価を実施中である。

5) 品質試験法・評価系の確立

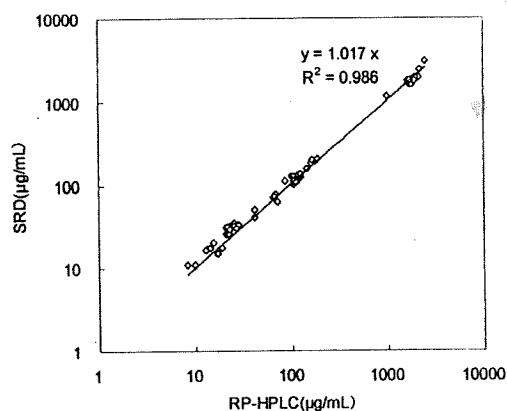
生物学的製剤基準「インフルエンザ HA ワクチン」および「沈降新型インフルエンザ ワクチン (H5N1 株)」、世界保健機関 (WHO) の不活化インフルエンザワクチンのガイドライン、EMA 及び FDA 等の最新の海外のガイドライン、原液・製剤のロット分析及び安定性試験の結果に基づいて、本剤の品質試験法・評価系を検討中である。

宿主由来たん白質に関しては ELISA 法にて定量法を構築した。現在、精製品にわずかに残存する宿主由来たん白質についてマススペクトル法などの手法を用いて同定を試みている。

宿主 DNA については Threshold 法による定量に加え、PCR 法により残存宿主 DNA のサイズ測定系を構築中である。安定剤として添加する界面活性剤等のアッセイ系構築もほぼ完了している。今後は構築した測定系のバリデーションを進めるとともに、公定書記載の試験を適用するものについて、

その妥当性を証明するデータを取得する。

また、工程試験として逆相 HPLC 法による HA 含量定量法を構築した。スタンダードとして、SRD 法により値付けされた EB66 由来精製 HA を用い、約 2 μ g/mL まで定量可能となった。45L ファーマンター由来 3 バッチの工程検体(培養上清～精製 HA)について、SRD 測定値と逆相 HPLC 測定値の相関を見たところ、下図のとおり良好な相関関係を認められた。本法はアジュバント存在下の HA 定量にも有効と考えられることから、現在検討を進めている。



6) 品質評価

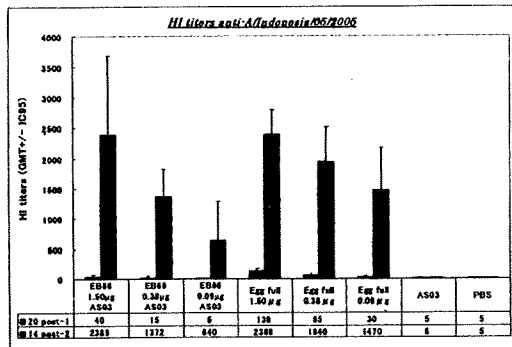
欧州で承認されている GSK 社のプレパンドミックス ワクチン Prepandrix の抗原成分である発育鶏卵由来 HA 抗原 (スプリット抗原) を対照として、マウスを用いて EB66 細胞由来 HA 抗原の免疫原性を予備的に評価した。

抗原単独及び GSK 社のアジュバント AS03 を添加した抗原を 3 週間間隔で 2 回免疫した。2 回目の免疫前 (20 post-1) 及び 2 回目の免疫から 2 週間後 (14 post-2) に採血して、EB66 細胞由来の精製ウイルス (A/Indonesia/05/2005 (H5N1) PR8-IBCDC-R G2) を血球凝集抗原として、ウマ血球に対する HI 抗体価を測定した。

抗原単独での免疫では、いずれの抗原でも誘導される HI 抗体価は低く、両者の免疫原性を評価することはできなかった。

一方、AS03 を添加した EB66 細胞由来 HA 抗原と発育鶏卵由来 HA 抗原（スプリット抗原）の免疫試験では、評価した用量範囲（1.5、0.38 及び 0.09 μg ）ではどちらの抗原でも高い HI 抗体価を示し、用量依存性も認められた。

この用量範囲において、AS03 添加 EB66 細胞由来 HA 抗原免疫群と対照群（AS03 添加発育鶏卵由来 HA 抗原免疫群）の HI 抗体価に有意な差は認められなかったことから、AS03 を添加した EB66 細胞由来 HA 抗原は、AS03 を添加した発育鶏卵由来 HA 抗原（既承認の Prepandrix に相当）と同程度の抗体誘導能を有すると考えられた。



7) 安定性評価

非臨床原薬を用いて製剤を調製し、第 I 相臨床試験製剤の有効期間設定を目的とした長期安定性試験及び加速試験を開始した。

8) 非臨床試験原薬・製剤の製造

既存のパイロットプラントを用いて、非臨床原薬製造 2 バッチを含む 3 バッチの再現性検証製造を行い、抗原収量、品質ともに安定した成績が得られた。

<非臨床原薬の品質試験結果抜粋>

試験項目	1st バッチ	2nd バッチ
HA 含量* ($\mu\text{g}/\text{mL}$) …①	326.2	303.2
蛋白含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) …②	417	395
HA 含有率 (①/②)	0.78	0.77
DNA 含量 (ng/dose)	<10	<10

また、2nd バッチ非臨床原薬を用いて、

毒性試験等の GLP 試験を含む非臨床試験用製剤を製造した。

9) 非臨床試験（効力を裏付ける試験、安全性薬理試験、毒性試験）の実施

8) で製造した製剤を用いて、本年 3 月より以下の計画にて非臨床試験を開始した。

効力を裏付ける試験として、マウスの免疫原性試験及びフェレットの感染防御試験を実施する。両試験では、異なるウイルス株に対する交差性応答についても評価する。

安全性薬理試験として、ラットにおける中枢神経系への影響及びイヌにおける心血管・呼吸器系への影響を検討する。

毒性試験として、ウサギを用いた反復投与毒性試験（単回投与毒性の評価を含む）、局所刺激性試験を第 I / II 相臨床試験開始までに実施する。ラットを用いた生殖発生毒性試験は、女性を組入れる第 III 相試験開始までに実施する。

10) GMP 製造体制の整備

所内 GMP 組織を確立し、製造管理・品質管理の組織・責任体制を整備した。現在、第 I 相臨床試験治験薬製造開始に向けて、製造・試験検査手順の文書・記録の整備等を実施している。

11) 生産設備の整備

既存のパイロットプラントに関しては、第 I / II 相臨床試験原薬の製造を実施後、部分的な改造を行い、600L スケールの培養、精製が可能な治験薬製造プラントを整備し、H23 年度には第 III 相試験用治験原薬の製造を行う予定である。

並行して、実生産に向けたスケールアップ検討、各種運転条件の至適化を目的とした 2000L スケールの培養、精製が可能な実験用生産施設を整備する。

実生産設備に関しては、3000～6000L 規

模を想定し、現在基本計画を策定している。来年度中に基本設計・実施設計を行い、翌 H23 年度に着工、H25 年度には本稼動する予定である。

D. 考察

当該研究事業は H21 年度、H22 年度の 2 カ年にて計画されており、本年度については当初の計画通りの進捗を達成した。来年度は、非臨床試験を実施後、第 I / II 相臨床試験を開始するとともに、スケールアップに向けた実験プラント整備および実生産プラント設計まで完了する予定である。

来年度の研究事業計画における主な課題と対応策を以下に示す。

1) 他のパンデミック株での HA 配列・抗原性変異の確認

生産用シードの調製において、EB66 細胞で継代を伴うため、オリジナルシード（鶏卵分離株）と HA 配列及び抗原性に違いがないかどうかの確認が必須である。

本開発にて使用するウイルス株（A/H5N1/Indonesia/05/2005-PR8-IBCDC-R G2 株）においては、調製したマスターウイルスシードに HA, NA 遺伝子に変異がないことを確認したが、他のパンデミック株（ベトナム、アンヒ、チンハイ等）についても同様の評価を行う予定である。

2) 治験薬製造法確立とスケールアップ

45L 培養スケールでの非臨床原薬製造において、安定したウイルス産生量、精製収率、品質が確認されていることから、本製法を第 I / II 相治験薬製造に適用可能と考えている。

また、45L 培養スケールの 10 倍超となる既存 600L ファーメンターでのウイルス培養実験において、45L スケールと同等のウイルス産生量が得られたことから、EB66 細胞

を用いた現在の培養方法は、実生産設備にも十分適用可能と考えている。

今後は、スケールアップによる精製産物の品質への影響について評価するとともに、2000L スケールの実験用生産設備を用いて更なるスケールアップ検討、及び各種運転条件の至適化検討を行い、実生産プラントの立ち上げ期間の短縮に繋げていく。

3) パンデミックワクチン用の HA 含量試験法の検討

我々が開発する新型ワクチンは、GSK 社が開発したアジュバント AS03 の添加により、少ない抗原量で高い免疫原性が得られることが期待されるが、1 ドーズあたりの抗原量が極めて少量となるため、高感度化に向けた SRD 法の改良が必要である。

また、現在 HA 含量試験として採用されている SRD 法の場合、試薬（抗血清と標準抗原）調製に時間がかかるため、パンデミックワクチン発生時においては、SRD 試薬の準備ができるまで間、SRD 法を代替する HA 定量法が必要となることが考えられる。

以上の状況を踏まえ、我々は、SRD 法の高感度化と、SRD 法のバックアップとして逆相 HPLC 法による HA 含量定量法の検討を並行して行っている。

E. 結論

EB66 細胞を培養基材とする新型インフルエンザワクチンの製造法を構築し、治験薬製造設備で H5N1/インドネシア株を用いたテスト製造を複数回行い、事業化目標数値を上回る生産性と再現性の高い品質成績を達成した。

アジュバント AS03 を添加した EB66 細胞由来抗原（H5N1/インドネシア株）のマウスでの免疫原性を評価した結果、低用量の抗原でも高い抗体価を示し、同じアジュバントを添加した発育鶏卵由来スプリット抗原