

201028051A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田代真人

平成 23 年 (2011) 3 月

目次

平成 22 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
---	-----------------------------	------

掲載資料

	細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関する Points to Consider(案)	P. 21
--	---	-------

II 分担研究報告書

1.	研究分担者：山本典生 国立感染症研究所	P. 58
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. 63
3.	研究分担者：野崎周英 (財)化学及血清療法研究所	P. 67
4.	研究分担者：五反田亨 (学)北里研究所生物製剤研究所	P. 74
5.	研究分担者：大塚浩史 デンカ生研株式会社	P. 78
6.	分担研究者：二宮康行 株式会社 UMN ファーマ	P. 84

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 センター長

研究要旨 新型インフルエンザ対策の大きな柱の1つとしてワクチンがある。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、expresSF+細胞が検討され、MCBとEOPCについて特性と安全性に関する解析が進められた。その結果、特に問題は無いと判断された。またスケールアップ時における細胞培養及びウイルス増殖の方法・条件について検討した結果、小スケールでの培養と比較し遜色の無い効率で培養可能な条件を特定することが出来た。これまでに検討してきたウイルス株以外の株についても、増殖性に問題は認められなかった。ワクチンの非臨床試験については、必要な試験をほぼ終了することが出来、目標は達成できたと考える。また各班員に共通する問題点について既存の関連するガイドラインを踏まえてディスカッションを行い、研究班の見解を「細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関するPoints to Consider（案）」としてまとめた。共通の問題について情報を共有しながら議論を深めることにより、プロジェクト全体の推進を図った。シードウイルス等製造用MDCKセルバンクについては、ATCCから購入したMDCK細胞を無血清培地に馴化させ、これをGMP準拠条件下で培養し、マスターセルバンク及びワーキングセルバンクの構築を行った。

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ついては達成されたものと考えている。本研究班の成果を踏まえて、次の段階である製造施設の設計・建設並びに臨床試験の実施へ速やかに移行出来るものと思われる。5年以内に国内で組織培養インフルエンザワクチンを実用化する道筋も見えてきたと言って良いであろう。

A. 研究目的

1. 研究全体の目的

新型インフルエンザ対策の大きな柱の1つとし

てワクチンがある。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。

Per.C6細胞については、研究契約を締結するための交渉を行った。またPer.C6細胞におけるイン

フルエンザウイルスの増殖性を見るために、基準株を感染させ、HA価の測定を行った。

2. スケールアップ時における細胞培養及びウイルス増殖の方法・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、スケールアップ時における細胞及びウイルスの増殖性について検討・解析を行った。

3. 非臨床試験の実施

各班員が製造した試作ワクチンを用いて安全性薬理試験、毒性試験等の非臨床試験を実施した。

4. 細胞培養ワクチン実用化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行った。

5. シードウイルス等製造用MDCKセルバンクの構築

MDCK細胞(ATCC)を無血清培地に馴化させ、GMPに準拠した条件下でマスターセルバンク、ワーキングセルバンクの構築を行った。

上記の研究を効率よく進めるために、3か月ごとに外部専門家からなる評価委員(小林和夫(国立感染症研究所)、相崎健一(国立医薬品食品衛生研究所)、能美建彦(国立医薬品食品衛生研究所)、山口照英(国立医薬品食品衛生研究所))による研究進捗評価のためのヒアリングと、厚労省結核感染症課、血液対策課、審査管理課などの担当者の同席のもとに、全分担研究者によるWGを行い、研究推進を図った。

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、expresSF+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、昨年に引き続いて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。これらについて特に問題となる点は認められなかった。

Crucell社のPer.C6細胞については、弁護士を通して交渉を行い、研究契約を締結することができた。Per.C6細胞の取扱いにおける技術的な面についての移転を行うことが出来、Per.C6細胞の培養に必要な基盤の構築を終えることが出来た。また、Per.C6におけるウイルス増殖性について基準株で検討を行ったところ、増殖性は良好であった。

2. スケールアップ時における細胞培養及びウイルス増殖の方法・条件についての検討

各班員が保有する細胞について、スケールアップ時における細胞培養及びウイルス増殖の方法・条件が検討された。20L～600Lの条件で、細胞の増殖性やこれまでに検討してきたウイルス株以外の株も含めた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。さらに精製についても、スケールアップに伴う問題点は特に認められなかった。

3. 非臨床試験の実施

各班員が製造した試作ワクチンを用いて安全性薬理試験、毒性試験等の非臨床試験を実施し、特に問題を認めなかった。本研究班では2年の研究期間内に非臨床試験を終了することを目標としていたが、これについては達成できたと考えている。

4. 細胞培養ワクチン実用化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を「留意すべきポイント」として抽出し、それらについて既存の関連するガイドラインを踏まえてディスカッションを行った。そして研究班としての見解を「細胞培養イ

ンフルエンザワクチンの安全性に関するPoints to Consider（案）」としてまとめた。本報告書にこれを添付する。

5. シードウイルス等製造用MDCKセルバンクの構築

ATCCから購入したMDCK細胞を無血清培地に馴化させ、無血清培地でも良好な増殖性を示すMDCK細胞を得た。そこでこの細胞をセルバンク構築用細胞とし、GMPに準拠した条件下で、マスターセルバンク及びワーキングセルバンクの構築を行った。さらに、マスターセルバンクの造腫瘍性等を試験するための予備的な検討を行い、セルバンクのバリデーションを行うための基盤整備を進めることが出来た。

阪大微研

1. 製造用MDCK細胞の安全性試験

製造用MDCK細胞のマスターセルバンク、ワーキングセルバンクについて、これまでにWHOのガイドラインに準じて安全性試験を実施し、全てに適合することを確認していたが、本研究において、ICHのガイドラインも考慮した安全性試験を追加で実施した。

その結果、製造用MDCK細胞には、他の細胞株のクロスコンタミネーションが無いこと、および染色体に損傷が無いことが明らかになった。また、製造用MDCK細胞には、迷入ウイルスが存在しないこと、また、腫瘍原性およびがん原性も否定されたことから、製造用MDCK細胞の安全性に問題のないことが確認できた。

2. 新型インフルエンザワクチンのシードロット作製

発育鶏卵用の新型インフルエンザワクチン株（A/Indonesia/5/2005/PR8-IBCDC-RG2, A/Viet Nam/1194/2004 (NIBRG-14), A/Anhui/01/2005/PR8-IBCDC-RG5, A/bar-headed goose/Qinghai/1 A/ 2005, A/turkey/Turkey/1/2005）を、製造用MDCK細胞で継代培養を繰り返すことによって、MDCK細胞に馴化したウイルスの作製を試み

た。これらのうちの多くの株において、MDCK細胞馴化ウイルスの感染価は、1代継代ウイルスに比べて、0.5 ~ 1.1 Log₁₀(TCID₅₀)/ml 上昇しており、また、HA価も上昇していた。一方、表面抗原遺伝子（HA遺伝子およびNA遺伝子）にはアミノ酸配列変化は殆ど生じておらず、また、ヒツジポリクローナル抗体との反応性も、継代前のウイルスと馴化ウイルスの間で全く変化が無かったので、馴化ウイルスでも抗原性は保持されていると考えられた。

以上のことから、細胞培養新型インフルエンザワクチンのシードウイルスとして、MDCK細胞馴化株を作製し、これを製造に使用することは可能であると考えられた。

そこで、このうちA/Indonesia/5/2005/PR8-

IBCDC-RG2株の馴化ウイルスをもとにして、GMPグレードでマスターシードおよびワーキングシードを作製した。これらのシードロットについては、既承認の乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンのシードロットを参考に、各種の規格試験項目と規格値を設けた。各シードロットについて規格試験を実施した結果、いずれのロットも全ての規格に適合することが確認できた。

3. パイロット規模培養槽の設計および導入

昨年度に実施した小規模および中規模の培養槽を用いた培養実験の結果をもとに、パイロット規模（500L）の培養槽を設計し、今年度にその設置が完了した。なお、当該培養槽および付帯設備の導入にあたっては、GLP試験用試作ワクチンおよび治験薬の製造に用いることを視野に入れて、設計時適格性評価、据付時適格性評価、および運転時適格性評価を実施し、完了した。したがって、GMPグレードでのワクチン製造は、いつでも可能な状況となっている。

4. パイロット規模における細胞培養法の確立

3.において導入したパイロット規模培養槽を用いて、細胞培養実験を行った。培養条件の最適化を目的として、条件の一部を変えた実験を数回繰り返した。それぞれの培養においては、経時的に培養液を採取し、マイクロキャリアへ

の付着細胞数と培地成分（グルコース、グルタミン、乳酸、およびアンモニアなど）の濃度を測定した。

その結果、いずれの培養条件においても培養後期には、我々が目標とする細胞濃度である 2×10^6 cells/mlまで、MDCK細胞を増殖させることができた。また、パイロット規模培養槽における培地成分の経時的変動は、5L培養槽における変動とほぼ同等の推移を示すことが分かった。このことから、パイロット規模培養槽でも、5L培養槽と大きな培養条件の違いはなく、ほぼ同等の良好な環境下で細胞の培養ができていると考えられた。

一方、液面での発泡の程度や、培養槽底部でのマイクロキャリアの分布量などには、培養条件によって差が認められた。このうちの1つの条件が、最も適当であると判断されたため、これをパイロット規模培養槽での最適条件と決定した。以上の実験から、パイロット規模での細胞培養法を確立することが出来た。

5. パイロット規模での精製法の確立

昨年度の研究において、50L規模の培養液から不活化全粒子ウイルスを精製する方法を確立することができた。本年度は、この精製法をパイロット規模に、スケールアップできるかどうかについて検討した。

パイロット規模で調製したMDCK細胞に季節性インフルエンザウイルスA/Brisbane/ 59/2007株を感染させて得られたウイルス培養液を材料として精製実験を行った結果、各精製工程における精製度は、50L規模の精製時とほぼ同等であると考えられた。また、この作業は、想定通りに実施され、スケールアップに伴う大きな問題は生じなかった。最終的に得られたワクチン原液（不活化全粒子）の性状を、各種の分析試験によって解析したところ、この原液の精製度や性状は、発育鶏卵由来の全粒子ワクチンおよび上述の50L規模での原液とほぼ同等であることが分かった。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。

6. 製法および規格試験法の確立

4.の実験から、パイロット規模培養槽におけるMDCK細胞を高密度培養するための最適条件を決定することができた。また、5.の実験より、パイロット規模で作製したインフルエンザウイルス培養液からウイルス粒子を精製する条件も決定できた。これらを合わせて、最終的にパイロット規模における製法を確立することに成功した。

そこで、パイロット規模でGLP試験用試作ワクチンおよび治験薬を製造するために、この製法を文書化し、SOPとして制定した。また、原液や製品の規格試験項目および規格値は、既承認の細胞培養日本脳炎ワクチンおよび沈降インフルエンザワクチン（H5N1）に倣って設定するとともに、新たな規格試験法や規格値も設けた。

7. GLP試験用試作ワクチンの作製

2.で作製したMDCK細胞馴化LA/Indonesia株のワーキングシードウイルスを用い、また、4.および5.で確立した製法に基づき、パイロット規模でGLP試験用試作ワクチンを製造した。

製造工程のサンプル、原液、および製品について各種の規格試験を実施した結果、全てに適合していることが確認できた。この試作ワクチンの安全性を評価するため、現在、GLP適合施設下での非臨床試験を実施している。

8. 実生産規模製造設備の設計

パイロット規模における培養実験で得られたデータを解析し、現在、5トンクラスの実生産用培養槽設備の仕様設計も進めている。また

同様に、パイロット規模での精製実験で得られた結果を、実生産用精製関連設備の導入に結び付けるべく、その仕様を確定しつつある。既に、これら実生産用の製造関連設備の発注を行っており、平成23年中に実生産規模での製造実験を行う予定である。

北里研究所

インドネシア株を50Lパーフュージョン法で培養したところ、ベトナム株と同等の収量が得られた。

ホルマリン処理条件を検討したところ、ホルマリン濃度0.2 vol%では2日まで、0.1 vol%では7日まで、0.05 vol%では14日までに発熱因子を不活性化できることが確認できた。これもベトナム株、インドネシア株で違いは認められなかった。有効性を、ホルマリン濃度0.2 vol%で4日間、0.1 vol%で7日間、0.1 vol%で14日間、0.05 vol%で14日間処理した抗原を用いて比較したところ、有効性に顕著な違いは認められなかった。これらの結果から、ホルマリン濃度は0.2乃至0.1 vol%が候補となったが、0.2 vol%ホルマリンの2日目～4日目にかけてはSRD法で測定するHA含量の急速な低下が認められる時期であったことから、安定的な製造条件を確立するため、本工程は0.1 vol%ホルマリンで7日間処理することとした。

インドネシア株を用いてアジュバントの有効性を比較したところ、やはりイヌリンアジュバントとアルミニウムアジュバントで差は認められなかった。この際、エーテル処理したHA抗原とウイルス全粒子抗原を用いて有効性を比較したが、全粒子抗原の方が有効性が高かった。従って、抗原としては全粒子を選択することになるが、元来異常毒性否定試験におけるモルモットの体重減少度が大きい全粒子抗原に対し、イヌリンアジュバントを選択することは規格の設定が容易ではないことが予想されたため、同じ効果を持ち実績があるアルミニウムアジュバントを採用することとした。

インドネシア株を用いて、上記で確立した製造方法で試作ワクチン3ロットを製造した結果、試

作ワクチンは3ロット共に既に規定されている沈降インフルエンザワクチン (H5N1) の生物学的製剤基準に全て適合するものであった。

また、その試作ワクチンを用いて行った非臨床試験は、以下の通りであった。

薬効薬理試験は、HI 試験及び中和試験において、抗体価の誘導が認められた。抗体価は筋肉内投与の方が皮下投与に比べて高かった。

安全性薬理試験は、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対して何れも影響を及ぼさなかった。

単回毒性試験は、ラットにおける単回皮下投与毒性試験での概略の致死量は、10 mL/kg を超える量であった。

また、ビーグルにおける単回皮下投与毒性での概略の致死量は、5 mL/kg を超える量であった。

反復毒性試験は、ラットにおける4週間間歇皮下投与毒性試験での無毒性量は、雌雄ともに0.5 mL/kg を超える量であった。

遺伝毒性試験は、細菌を用いる復帰突然変異試験では代謝活性化系の有無にかかわらず、細菌に対して遺伝子突然変異誘発性を示さなかった。

また、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では、代謝活性化系の有無及び処理時間の長短にかかわらず、

CHL/U 細胞に対して染色体異常誘発性を示さなかった。

さらに、ラット小核試験ではラットの赤芽球に対して小核誘発性を示さなかった。

生殖毒性試験は、ラットにおける間歇皮下投与による出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験では、影響は認められなかった。

また、ラットにおける間歇皮下投与による胚・胎児発生への影響に関する試験でも胚・胎児発生への影響は認められなかった。

局所刺激試験は、ウサギにおける皮下局所刺激性試験及び筋肉局所刺激性試験ともに、DPT ワクチンの刺激性とほぼ同程度であると考えられた。

また、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では、代謝活性化系の有無及び処理時間の長短にかかわらず、

CHL/U 細胞に対して染色体異常誘発性を示さなかった。

さらに、ラット小核試験ではラットの赤芽球に対して小核誘発性を示さなかった。

生殖毒性試験は、ラットにおける間歇皮下投与による出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験では、影響は認められなかった。

また、ラットにおける間歇皮下投与による胚・胎児発生への影響に関する試験でも胚・胎児発生への影響は認められなかった。

局所刺激試験は、ウサギにおける皮下局所刺激性試験及び筋肉局所刺激性試験ともに、DPT ワクチンの刺激性とほぼ同程度であると考えられた。

また、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では、代謝活性化系の有無及び処理時間の長短にかかわらず、

試験、Tumorigenicity/ Onco genicity試験の項目を設定した。CAL細胞のウイルス安全性試験では動物への接種試験に加え、潜伏感染性 (latent infected) のDNAウイルス (ヘルペスウイルス等)、RNAウイルス (レトロウイルス等) を検出するインダクション試験も実施している。

MCB、WCBで試験する22項目すべてが終了、結果に問題は認められなかった。CALについても試験を実施中であり、現在までのところ起源細胞で報告されているものと同様の結果が得られており、問題は認められていない。

表1. MCB, WCB, CAL 試験進捗状況まとめ

	試験		
	項目総数	終了項目	未了
MCB	19	19	0
WCB	3	3	0
CAL	22	16	6
合計	44	38	6

②細胞培養のスケールアップ検討

7L、50L培養槽でのデータに基づいて170L及び500L培養槽での培養を行った。170L及び500L培養槽での浮遊系MDCK細胞の細胞増殖は、7L培養槽と大きな違いは認められなかった (図5)。

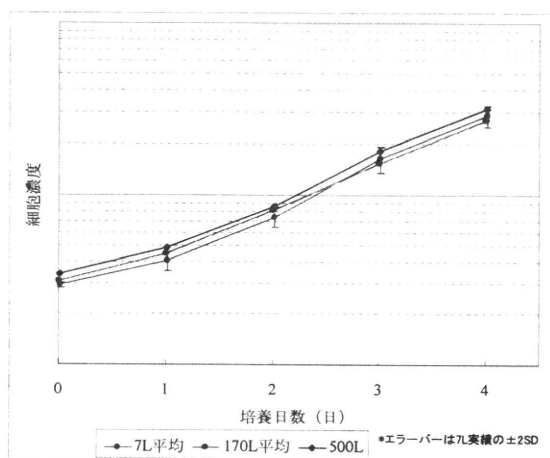
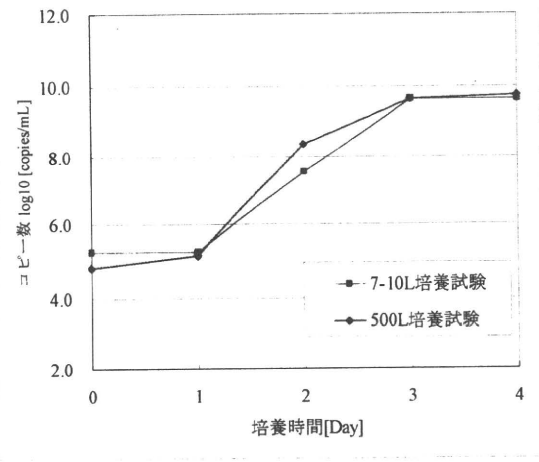


図5. 細胞培養 7, 170, 500Lの比較

③ウイルス培養のスケールアップ検討

7L、50L培養槽で検討したパラメーターを参考に500L 培養槽でのインフルエンザウイルスIn do株のウイルス培養を行った。ウイルス産生は、7L培養槽と同様であった(図6)。



2) 精製工程の検討

①不純物分解除去の検討

不活化ウイルス全粒子精製法を確立し、各工程液をアガロース電気泳動にて評価した結果、DNA分解処理で長鎖DNAバンドが減少していることを確認した(図7)。

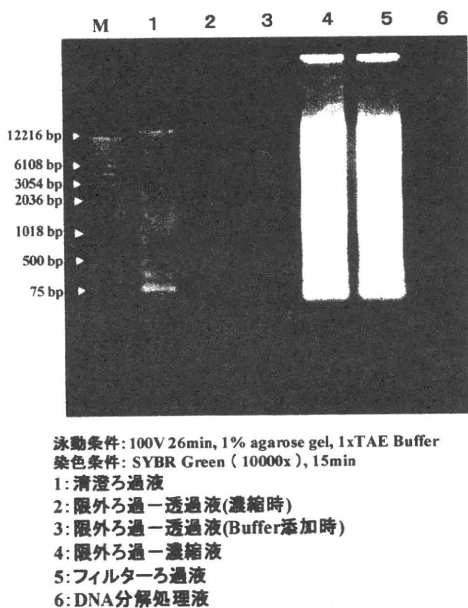


図7. アガロース電気泳動結果

② サブユニット精製のスケールアップ

精製工程をスケールアップし、得られたサブユニット抗原をSDS-PAGE法で分析した。その結果、スケールアップ品は、スケールアップ前と同様、目的のHAたん白質が精製されていることを確認した。

3) アルミアジュバントの検討

①アルミアジュバントの免疫学的特性評価

HAサブユニット抗原にアルミアジュバントを加えることによって中和抗体価が有意に上昇し、たん白質吸着率60%以上であれば免疫原性に影響を与えないことを確認した(図9)。また、「HAサブユニット抗原+アルミアジュバント」製剤の抗体価は全粒子沈降ワクチンと比較しても大差なかった。

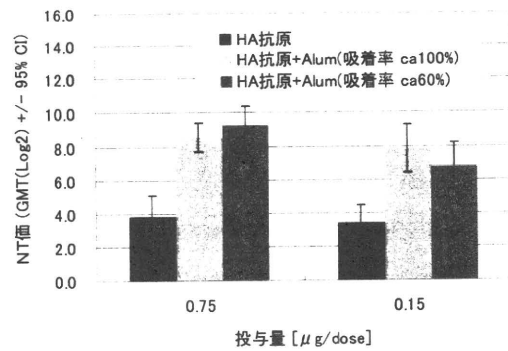


図9. 中和抗体価の比較

4) 製剤工程の稼動性能評価

本剤は、HA抗原をアルミアジュバントと混合する最終バルク工程と、調製したバルクをバイアルに充填する充填工程を経て製剤化する。最終バルク工程は、アルミアジュバントを均一化し、抗原たん白質を高度に吸着させる条件を確立した。充填工程は、前工程のたん白質吸着率を維持したまま、均一充填が可能な条件を検討した。

図10及び図11に示すように、充填品のアルミニウム含量は均一となり、たん白質吸着率も93~98%と高値を示した。

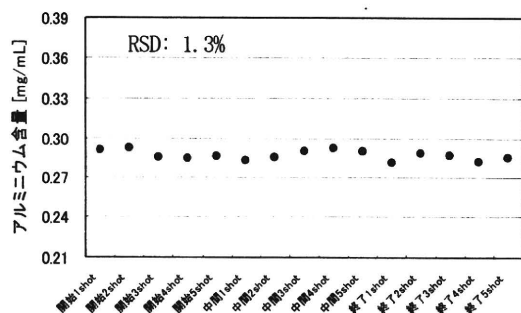


図10. 充填工程のアルミニウム含量推移

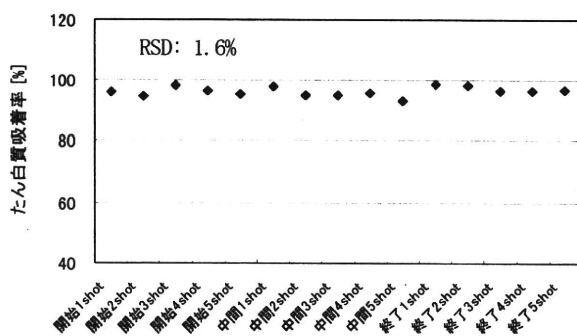


図11. 充填工程のたん白質吸着率推移

5) 試作原液及び製剤の品質評価

原液及び製剤の規格試験として沈降新型インフルエンザワクチン (H5N1) 生物学的製剤基準の項目に加え、宿主由来不純物(宿主たん白質、宿主DNA)、工程由来不純物を設定した。各試験は操作条件の検討及び信頼性評価の結果を踏まえ、適格な分析法を構築した。

構築した試験方法により、決定した製法で製造した原液及び製剤の品質を評価した。その結果、いずれも目標とした品質であることを確認した(表3、表4)。また、FFF-MALSの解析結果から原液中にHAたん白質の凝集体形成を認めた(図12)。

表3 原液の品質試験結果

項目	品質目標	試験結果
性状	無色澄明	無色澄明
pH試験	6.8~8.0	7.10
浸透圧試験	浸透圧比 1.0±0.2	浸透圧比0.98
たん白質含量試験	—	測定のみ
宿主由来たん白質含量試験	—	測定のみ
宿主DNA含量試験	200 pg/mL以下	12.5 pg/mL以下
一元放射免疫拡散試験	—	測定のみ
界面活性剤含量試験 (界面活性剤1)	限度値以下	限度値以下
界面活性剤含量試験 (界面活性剤2)	定量限界以下	定量限界以下
DNA分解酵素含量試験	定量限界以下	定量限界以下
不活化剤分解物含量試験	定量限界以下	定量限界以下
SDSポリアクリルアミド ゲル電気泳動試験	非還元条件において70 kDa付近、還元条件において45 kDa及び25 kDa付近にバンドを検出する。	非還元条件において70 kDa付近、還元条件において45 kDa及び25 kDa付近にバンドを検出した。
ウェスタンブロット試験	非還元条件において70 kDa付近、還元条件において45 kDa及び25 kDa付近でHAたん白質のバンドを検出する。	非還元条件において70 kDa付近、還元条件において45 kDa及び25 kDa付近でHAたん白質のバンドを検出した。
二次元電気泳動試験	特定のスポットを検出する。	特定のスポットを検出した。
エンドトキシン試験 (参考試験)	—	測定のみ
無菌性確認試験 (参考試験)	菌の発育を認めない。	菌の発育を認めなかった。

表4 製剤の品質試験結果

項目	品質目標	試験結果
性状	振り混ぜるとき均等に白濁	振り混ぜるとき均等に白濁
pH	6.8~8.0	7.2
浸透圧比	0.8~1.2	1.0
たん白質含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	約33	36
HA含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	約30	29
アルミニウム含量 (mg/mL)	0.25~0.35	0.27
チメロサル含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5~14	13

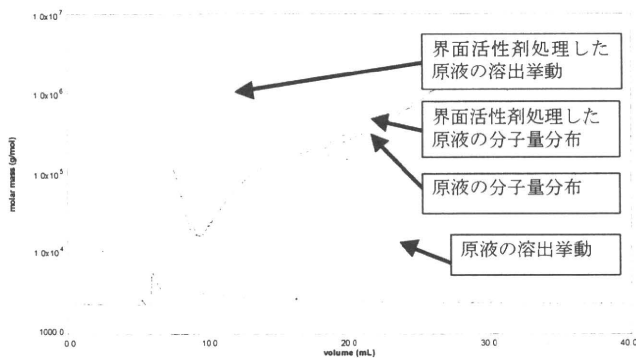


図12. 原液の凝集状態の解析

化血研

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EB66のMCB及びVPCについて、細胞特性試験、細胞安全性試験を終了した。

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、MVS及びWVSを調製した。MVSについては、EB66細胞での継代に伴うHA、NAのアミノ酸配列に変異がないことを確認した（HA遺伝子では、アミノ酸変異を伴わない変異が1箇所認められた）。特性試験および純度試験を行い、試験結果に問題となる所見は認められなかった。WVSの各試験は、現在実施中である。

3) 処方・剤形検討

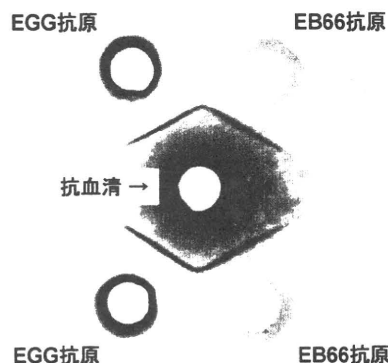
複数の安定剤を含む候補組成にて安定性評価を行い、良好な結果が得られた。本結果を踏まえて第I相試験用原薬および製剤処方を決定した。

4) 品質試験法・評価系の確立

生物学的製剤基準、WHO、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、原薬および製剤の規格試験項目を設定した。

また、発育鶏卵由来HA抗原とEB66細胞由来HA抗原の抗原性を比較するために、SRD試験に用いられるA/Indonesia株HA抗原に対するヒツジ抗血清を

用いて、二重免疫拡散試験を行ったところ、発育鶏卵由来ワクチン中のHA抗原と抗血清との間に形成される沈降線と、EB66細胞由来の原薬中のHAと抗血清との間に形成される沈降線に差がなく、両沈降線はその末端で融合した。このことから、発育鶏卵由来ワクチン中のHA抗原と、EB66細胞由来の原薬中のHA抗原は、SRD試験用抗血清に対して抗原性が等しいことが示唆された。



【抗血清】

SRD用抗Indo05 HA ヒツジ抗血清 (FDA/CBER)

【抗原】

EGG抗原: 鶏卵由来Indo05 全粒子ワクチン原液

EB66抗原: EB66由来Indo05 サブユニットワクチン原液

<二重免疫拡散試験による抗原性比較>

5) 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

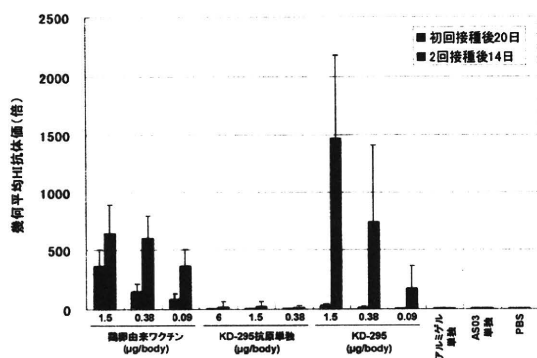
既存のパイロットプラントにて製造された製剤を用いて、以下に示す薬効試験、薬理試験および毒性試験を行い、第I相試験を行う上で必要な非臨床試験データを取得した。

- ・薬効試験・・・マウス免疫原性試験
- ・薬理試験・・・安全性薬理試験 (心血管・呼吸系への影響)
- ・毒性試験・・・反復投与毒性試験 (単回投与を含む)、局所刺激性試験

マウス免疫原性試験では、低用量の抗原でも高い抗体価を示し、国内既承認の「沈降インフルエンザワクチン(H5N1) (アルミニウムアジュバント添加鶏卵不活化全粒子ワクチン) と同等の抗体産生能を有することがわかった。また、フェレット

を用いた感染防御試験を現在実施中である。

薬理および毒性試験においては、試験結果に問題となる所見は認められなかった。当初、実施予定であった安全性薬理試験（中枢神経系への影響）については、安全性薬理試験（心血管・呼吸系への影響）および反復投与毒性試験において一般状態を評価した結果、HA抗原による影響は認められなかったことから、本剤が中枢神経系に影響を及ぼす可能性の懸念はないと判断し、独立した試験は実施しなかった。



<マウスにおける各試料接種群のHI抗体価>

6) 安定性試験（予備安定性評価）

原薬および製剤の有効期間設定を目的とした予備安定性試験を実施している。試験開始9箇月を経過し、安定性に問題がないことが確認された（15箇月まで継続予定）。

7) 分析法バリデーション

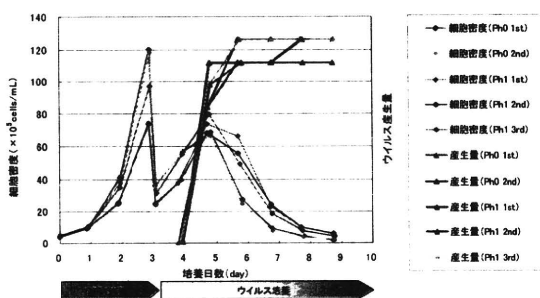
第I相試験用の原薬・製剤の規格試験について、各試験法の分析バリデーションならびに使用する機器のクオリフィケーションを完了し、試験の妥当性を確認した。

8) 第I相試験用治験薬の製造

非臨床試験薬の製造を実施した既存パイロットプラントにおいて、非臨床薬製法と同一製法にて3バッチの治験原薬製造を完了した（非臨床薬製造を含め、計5バッチの原薬製造を実施した）。

培養工程においては、45Lスケールのファーメンター培養において再現性のある細胞増殖性とウイ

ルス産生を確認した。



<45L FM培養での細胞増殖性とウイルス産生量>

精製産物の純度としては、WHOガイドライン上の宿主由来DNA含量規格（10ng/dose未満）を十分に下回っており、SDS-PAGEにおいても純度の高いHA抗原が得られることを確認した。

<第I相試験用原薬の品質試験結果>

試験項目	1st バッチ	2nd バッチ	3rd バッチ
HA含量 (μg/mL) …①	347	311	351
たん白質含量 (μg/mL) …②	423	491	437
HA含有率 (①/②)	0.82	0.63	0.80
DNA含量 (ng/dose)	<0.1	<0.1	<0.1

9) 第I相試験用原薬・製剤の安定性試験

当該ロット原薬及び製剤の長期安定性試験、加速試験を開始した。

10) 治験相談・治験申請

健康成人男性を対象とした第I相試験開始のために治験相談を行い、機構から特段の異論はなく、第I相試験の用量群設定が了承された。

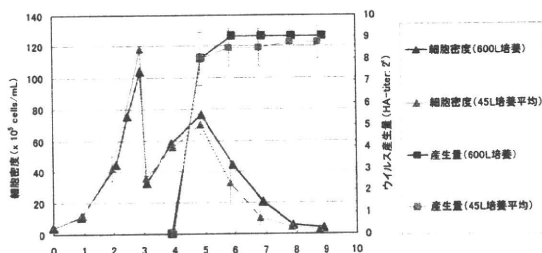
11) ワーキングセルバンク (WCB) の調製と品質試験

第II/III相試験用治験薬製造に使用するWCBを調製した。WCBの各品質試験は治験薬製造開始までに完了する予定。

12) 第II/III相試験に向けた製法改良及びスケールアップ

第II/III相試験薬製造および実生産に向けたス

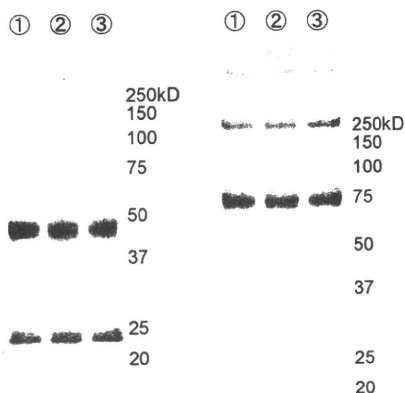
ケールアップ検討として、45L培養スケールの10倍超となる既存600Lファーメンターを用いたウイルス培養、並びに同培養液を材料とした現行製法による精製評価を行った。その結果、培養に関しては、45Lスケールと同等の細胞増殖性とウイルス産生を達成し、精製収率および最終品質についてもスケールアップに伴う影響は認められなかった。以上の結果から、EB66細胞を用いた現在の培養方法は、実生産設備にも十分適用可能と考えている。



<600L FM培養での細胞増殖性とウイルス産生量>

<600L FM培養由来産物の品質試験結果>

試験項目	試験結果
HA含量 (μg/mL) …①	259
たん白質含量 (μg/mL) …②	369
HA含有率 (①/②)	0.70
DNA含量 (ng/dose)	<0.1



還元 非還元
<45L、600Lスケール製造産物のSDS-PAGE>

(Lane①, ② 45Lスケール, Lane③ 600Lスケール)

上記と並行し、スケールアップに向けた製造条件の最適化検討を開始した。今後整備される実験

用生産施設にて、第Ⅱ/Ⅲ相試験および商業製法のスケールアップ検討を行う予定である。

11) 生産設備の整備

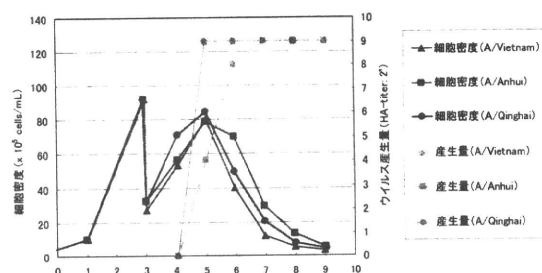
既存のパイロットプラントに関しては、600Lスケールの培養、精製が可能な治験薬製造プラント整備を開始し、現在、製造エリア内改造ならびに生産機器の発注作業を進めている（本プラントにて、H23年度には第Ⅱ/Ⅲ相試験用治験原薬の製造を行う予定）。

スケールアップ検討を目的とした実験用生産施設として、1200L培養スケールのプラント整備を開始した。本年度末までに工事を完了し、H23年度には試験製造を開始する予定である。

実生産設備に関しては、3000~6000L規模を想定し、基本設計・実施設計を開始した。H23年度に着工、H26年には本稼動する予定である。

14) 他のパンデミック株での生産性、抗原性評価

PR8をバックボーンとするH5N1パンデミック株の生産性評価として、A/Vietnam、A/Anhui、A/Qinghaiの3株について生産用シードを調製し、ウイルス増殖試験および抗原性評価を行った。いずれの株においても現在想定している実生産設備において半年で6000万人分のワクチン製造が可能な生産レベルを達成した。



UMNファーマ

1. 発現細胞培養及び精製について

1.1. 培養条件の設定

培養細胞の継代時と発現培養開始時の細胞数の検討を行い、それぞれについて実生産を想定したターゲット値を設定した。また、細胞回収時の

生細胞率とrHAの収量に一定の関連性を認め(図1)、実生産施設にて、工程管理パラメーターとしての設定を検討する予定である。

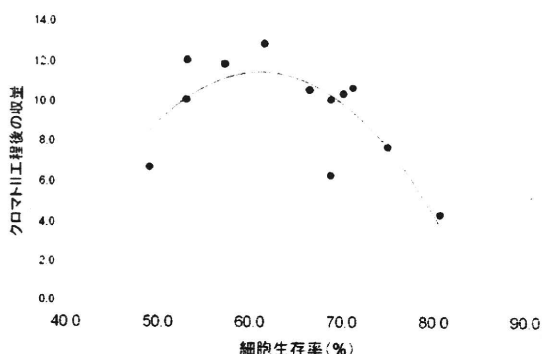


図1. 細胞回収時の細胞生存率と収量の関係
回収時の細胞生存率が60%程度のときに収量が最大となった。

1.2. クロマト樹脂の検討

クロマトI工程において、各樹脂を用いた場合の収量の比較を表1に示す。樹脂Aを使用した場合には、約1.5倍の収量であり、最終原薬でもこの比率は同様であった。これに対して、樹脂Bで精製した場合、クロマトI工程後に1.2倍ほどあったたん白質量は、クロマトII工程を経ることで、現行樹脂より低い収量となった。

表1. クロマト工程後のたん白質量の比較

	現行樹脂	樹脂A	樹脂B
クロマトI工程後	48.4	73.1	58.1
クロマトI工程後	13.7	20.1	10.9
I工程後	(100%)	(147%)	(80%)

現行樹脂と樹脂Aで精製した溶出液をSDSゲル電気泳動で分析した結果を図2に示す。いずれの電気泳動でも、クロマトI工程で目的rHAが高い割合で精製され、クロマトII工程後で、ほぼ純粋なrHAとなることが確認された。

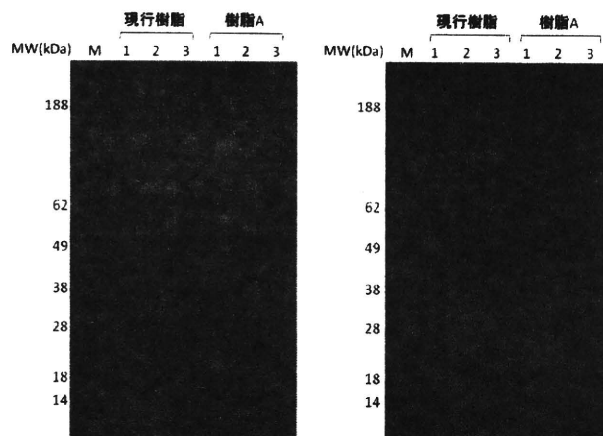


図2. 現行樹脂と樹脂Aの溶出画分の電気泳動像
それぞれの樹脂で3回ずつ精製を行い、SDS-PAGE (CBB染色)を行った。M:分子量マーカー。(左図)クロマトI工程後の溶出液。この溶出液を次のクロマトII工程で精製して電気泳動にて分析した(右図)。いずれも65kDa付近にHA0の濃いバンドが認められる。

1.3. HPLC 試験法の開発

製造工程で使用する試薬のうち、界面活性剤2種類、たん白質安定化剤とたん白質保護剤をそれぞれ1種類について、HPLCによる定量方法を確立した。20Lスケールで製造した原薬について定量したところ、いずれの試薬も検出限界以下であった。

また、SDS-PAGEによる純度試験を補完する目的で、未処理原薬をHPLCで分析した。条件検討の結果2本のピークが検出され、各ピークを分画して、SDS-PAGE (非還元、CBB染色)にて分析したところ、いずれのピークもrHA由来であることを確認した。次に、原薬をトリプシン処理後、HPLCにて分析した。処理後のサンプルを還元し、SH基を保護することにより、シャープなピークを認めた。このピークを分取して、電気泳動した結果、rHAが開裂したHA1であることが確認された。

1.4. 純度試験の設定

HCPの含量測定のために、抗HCP抗体を用いたウエスタンブロット法による測定方法を設定した。ウエスタンブロット法では、複数のHCPバンドを検出するため、最も濃いバンドで限度値を測定した。これまでに複数のサンプルでHCP含量を測定して

おり、HCP量は低いレベルであった。

また、残存DNA含量についてThreshold法による定量法の設定を検討しており、これまでに得られた結果では、投与量当たりのDNA含量は10ng以下であった。

2. 一元放射免疫拡散法

2.1. 一元放射免疫拡散法の設定

PSCにて製造した600LスケールのA/Vietnam/1203/2004株rHA原薬を一次自家標準物質として設定した。また、ヒツジ抗血清を用いて、SRDゲルへの抗血清添加量と、抗原アプライ量を設定し、安定した沈降輪を形成する条件を設定した。

SRD用の試薬について、抗血清を小分け・凍結し、ELISAによる安定性試験を開始した。

2.2. SRD 代替法の検討

A/Vietnam/1203/2004株のモノクローナル抗体を作製し、サンドイッチ法にてELISAを設定した。一次直線区間で2.5-40 ng/mL、累乗近似区間で5-1280 ng/mLにおいて直線性が確認できた。それぞれで添加回収試験を実施したところ、一次直線法で20~40 ng/mL、累乗近似法で7.5~960ng/mLの区間で良好な回収率が得られた。

3. 組換えバキュロウイルスの構築

3.1. トランスファーベクターの構築

3.1.1. 人工遺伝子を用いたトランスファーベクターの構築

人工合成したA/Vietnam/1203/2004株HA遺伝子と、別途増幅したポリヘドリン/キチナーゼシグナル配列断片の二つを鋳型にしてoverlap extension-PCR反応を行った結果、目的とするHA遺伝子配列を含むトランスファーベクターを得た。

3.1.2. インフルエンザウイルスRNAを用いたトランスファーベクターの構築

インフルエンザウイルスRNAを精製し、逆転写反応および特異的プライマーを用いたPCR法によりHA遺伝子の増幅を確認した。

これを鋳型にして、同様にoverlap

extension-PCR、トランスファーベクターpPSC12のライゲーションを行い、大腸菌にトランスフォーメーションして得られたコロニーから、目的とするサイズのインサートを確認した。

3.2. 構築済みトランスファーベクターを用いたrBVの作製

宿主細胞にトランスファーベクターとlinearized baculovirus DNA をco-transfectionして得た培養上清からrBVを得た。ベトナム株rHAの発現は、イムノプロットにより確認した(図3)。

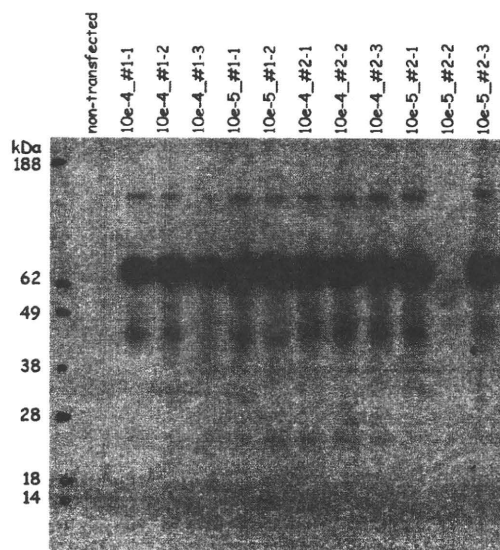


図3. プラークアッセイにより単離した11クローンのベトナム株rHAの発現確認

イムノプロット法により10株でrHAの発現を確認した

3.3. ベトナム株とクレードの異なる高病原性トリインフルエンザウイルス株HA発現用の組換えバキュロウイルスの作製

A/Indonesia/5/2005、A/Anhui/1/2005、A/barheaded gs/Qinghai/1A/05のヘムアグルチニン発現組換えバキュロウイルスの作製を試みた。

遺伝情報バンクより、いずれの株もシグナル配列を含むヘムアグルチニン全長の遺伝情報を入手し、各株のHA遺伝子の全長を人工合成した。ベトナム株発現用組換えバキュロウイルス作製時と同様に、トランスファーベクターpPSC12にクローニ

ングした。得られたクローンからプラスミドを調製し、DNA配列を決定し、遺伝情報通りであることを確認した。宿主細胞に各株のトランスファーベクターとlinearized baculovirus DNA を co-transfection して得た培養上清を使ったプラークアッセイし、プラークの純化をおこなった。プラークをランダムに選択、ウイルスを増幅させた。ウイルス培養で用いた細胞から抽出液を調製し、rHAの発現をイムノプロットで確認した(図6、A/bar headed gs/Qinghai/1A/05の例)。以上により、構築済みトランスファーベクターを用いて、H5N1株4種類のrBVを作製することに成功した。

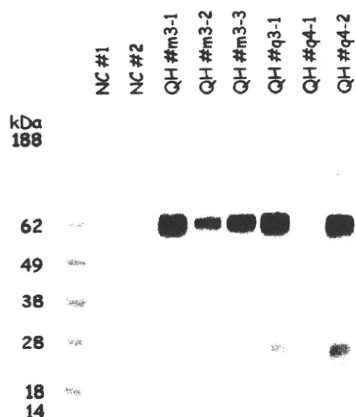


図4. プラーク純化により得られたクローンの

Qinghai株HA発現クローン

プラーク純化により6株を選び、クローニングし、各クローンの発現をイムノプロット法で確認した。

4. rHAの開裂型と非開裂型の免疫原性の比較

4.1. 開裂型rHAの調製と開裂部位の確認

非開裂rHAをトリプシンアガロースで消化し、消化後のrHAをゲル電気泳動で確認したところ、それぞれHA1とHA2に相当する二つのバンドが確認された(図5)。

なお、トリプシン消化により得られるHA2に相当するバンドのN末端アミノ酸配列は、順にグリシン、ロイシン、フェニルアラニン、グリシン、アラニンであった。これまで報告されているA/Vietnam/1203/2004株HAのオーセンティック

な開裂部位で消化されていることを確認した。

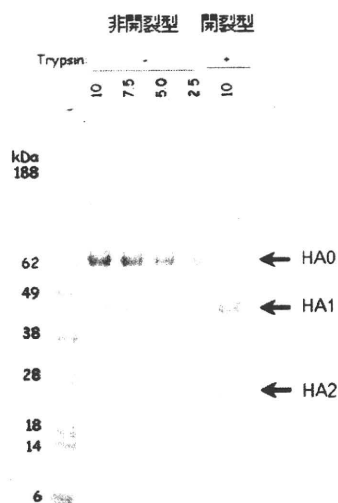


図5. トリプシン消化によるrHAの開裂

4.2. マウス免疫原性試験

rHAの非開裂型と開裂型のマウス免疫原性を比較する予備的な試験を実施した。BALB/cマウスに計2回被験物質を接種し、最終接種から2週間後に全採血し、血清画分を用いてHI試験を行い、HI抗体価誘導能を比較した。

HA抗原として開裂型と非開裂型rHAを用い、各血清サンプルのHI抗体価を測定した。いずれの抗原を使って測定した場合においても、非開裂型rHAを免疫した投与群のHI抗体価は、開裂型rHAを免疫した群に比べ、高いHI抗体価を示した(図6)。

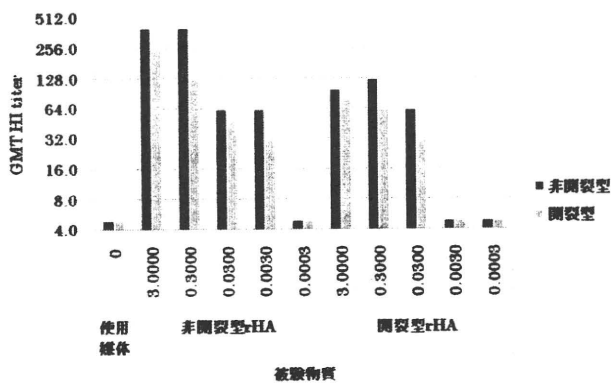


図6. 非開裂型および開裂型rHAのマウス免疫原性比較試験

各群HI抗体価の幾何平均値 (GMT) を示した。

5. rHAの免疫原性に与える糖鎖の影響の確認

5.1. 糖鎖除去抗原の調製

rHAに付加したN型糖鎖の免疫原性に与える影響を調べるために、糖鎖を除去したrHA（非修飾型rHA）を調製した。本来、PNGase F処理は、目的とするタンパクを変性させて消化するが、抗原性への影響が考えられるため、非変性条件下で反応させたが、糖鎖が除去されていない一部未消化のrHAが認められた。酵素量および反応時間を延長したが、rHAを完全に消化させることが出来なかつたため、図7に示すゲル電気泳動像に示した抗原を糖鎖除去（非修飾型）抗原として用いた。

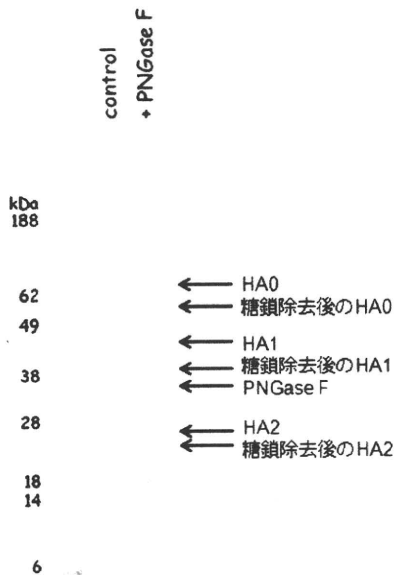


図7. PNGase F消化による糖鎖修飾の除去

右のレーンに示した+PNGase Fを糖鎖非修飾型抗原として、マウス免疫原性試験に使用した。

5.2. マウス免疫原性試験

糖鎖修飾型 rHA を HA 抗原として用いて、各投与群の血清の HI 抗体価を測定したところ、0.003ug/body 以外の用量接種群では、糖鎖修飾型の投与群と非修飾型の投与群で約 1 ウェルの違いが見られた（図 8）。0.003ug/body 接種群では、糖鎖非修飾型接種群は修飾型接種群に比べ HI 抗体価が約 2 ウェル低下した。HI 抗体価陽性率は、0.003ug/body 以外のすべての用量接種群で、同じ

陽性率を示した。0.003ug/body 接種群では、HI 抗体価陽性率が糖鎖修飾型は 80%であったが、非修飾型接種群では 40%であった。

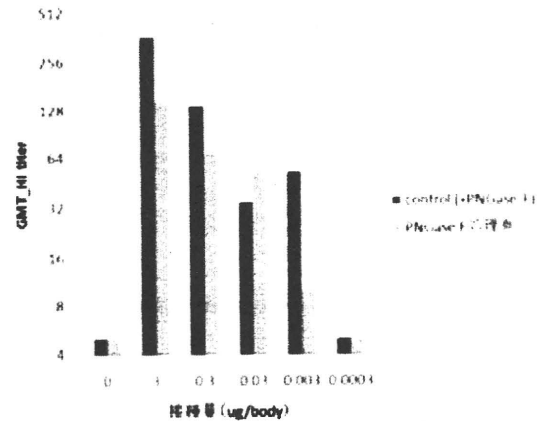


図8. 糖鎖修飾型および非修飾型 rHA のマウス免疫原性比較試験

個々のマウスの血清を用いてHI抗体価を測定し、これらの値より各群のHI抗体価の幾何平均値（GMT）を算出した。

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、問題となる点は認められないと判断された。

次にスケールアップ時における細胞培養及びウイルス増殖の方法・条件についてであるが、各班員とも中程度以上の規模で、複数のウイルス株に関して検討を行った。その結果、試験した株についてはスケールアップ時にも特に問題なく培養できることが明らかとなった。このことは、さらに別の株での検討も必要ではあるが、各班員の構築したシステムが幅広いウイルスに対応できる可能性を示唆していると思われる。

ワクチンの非臨床試験については、必要な試験をほぼ実施することが出来た。研究班として、2年間で非臨床試験を終了するという目標を掲げてきたが、これについては達成されたものと考えている。

また、本研究班では今回、細胞培養ワクチン実

用化に関する問題点についての整理を行い、研究班としての見解を「細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関するPoints to Consider (案)」としてまとめた。各班員に共通する問題点について班全体でディスカッションし、情報と認識を共有することは、プロジェクトを効率よく推進する上で非常に大きな意味があったと考える。

また、シードウイルス等製造用MDCKセルバンクの構築については、ATCCから購入したMDCK細胞を無血清培地に馴化させ、これをGMP準拠条件下で培養し、マスターセルバンク及びワーキングセルバンクの構築を行った。

現時点では、細胞培養ワクチンのシードウイルスとしては鶏卵培養法によるものしか使用できない状況であり、このままでは細胞培養ワクチンの持つ「鶏卵への馴化過程がないことから、抗原性が流行株に近く有効性のより高いワクチンを製造できる」という長所を生かすことが出来ない。そこで、細胞培養ワクチンのシードウイルスを細胞培養法で製造できる体制を構築する必要がある。今回構築したセルバンクは、臨床検体からのシードウイルスの分離、リバーシジェネティクスによるシードウイルス作製、及び海外からのリファレンス株の増殖などに使用することが出来、細胞培養法によるシードウイルスの製造において非常に有用である。これによって、鶏卵培養のステップを全く含まない細胞培養ワクチンの実用化へ向けて、大きく前進したと言って良いであろう。

阪大微研

当初から我々は、GLP試験用試作ワクチンの製造を、少量規模ではなく、実生産規模により近いパイロット規模において行うことを念頭において開発を行ってきた。したがって、本研究においては、パイロット規模における製法の確立を優先的に考えながら、製造用MDCK細胞の安全性の確認やMDCK細胞に馴化した新型インフルエンザワクチン株の作製を並行で行ってきた。最終的には、パイロット規模における製法が確立でき、この規模でGLP試験用試作ワクチンを製造できたので、本研究の

目的をほぼ達成できたと考えている。今後は、非臨床試験の結果を評価し、平成23年度中に治験を開始する計画である。

一方、実生産規模での製造実験については、平成23年中に実施する予定であるが、パイロット規模での製法を実生産規模にスケールアップするにあたっては、特に細胞培養の条件決定が最も困難な課題と予想される。培養槽の容量が大きくなるにつれて、攪拌条件や酸素供給条件の決定が、より厳しくなると考えられるが、乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンの開発実績や、コンピュータシミュレーション解析技術等を駆使して解決を図りたいと考えている。

北里研究所

H5N1 のベトナム株とインドネシア株についてワクチンの試作に成功し、別の株についても検討が必要ではあるが、我々が構築した細胞培養系は多様なH5N1株に対応できる可能性が高いことが示された。但し、発熱因子は株によってホルマリンに対する抵抗性が異なる可能性があることから、処理期間は14日間まで延長可能な設定とした。

新型インフルエンザウイルスのワクチン製造では、バイオセーフティの観点から製造工程の早い段階でウイルスを不活化する意義が大きいことから、BPLによる不活化処理を取り入れたものの、結果として発熱因子を不活性化するためホルマリン処理も必要となった。一方、新型インフルエンザワクチンは時間的な都合によりウイルス迷入否定が完全に確認できない状態での製造開始も想定できることから、ウイルス安全性も重要な課題であるが、ホルマリン処理はウイルス安全性能の向上にも寄与することが期待される。今後の確認事項ではあるが、BPL処理とホルマリン処理を併用することにより、高レベルのウイルス安全性が達成できると考えられる。

イヌリンは毒性が低く安全性が高い物質として知られており、海外ではアジュバントとしてのヒトに対する安全性の確認も進められている。全粒子抗原と混合してモルモットの腹腔内に注射した

場合に観察される重度の体重減少は、必ずしもヒトに対する安全性と関連するものではないと考えているが、イヌリンアジュバントを臨床応用するにはその原因を解析し、説明する必要があるだろう。なお、イヌリンアジュバントがH5N1抗原に対して期待される有効性を発揮できなかった理由については、現在のところわかっていない。

インドネシア株を用いた試作ワクチンは、すでに承認されている沈降インフルエンザワクチン

(H5N1) と比べて、同等或いは同等以上の品質を担保することが出来たと考えているが、その規格試験項目については今後当局との協議が必要であろう。

また、本試作ワクチンを用いた非臨床試験でも沈降インフルエンザワクチン (H5N1) と比べて、動物に対して十分な安全性が担保できた。

デンカ生研

原液製造に使用する細胞の安全性試験では、一部実施中の試験が残っているものの、問題は認められなかった。

培養工程では、浮遊系MDCK細胞を用いた無血清培養産生方法において、170L、500L培養槽での細胞及びウイルス増殖は、7L培養槽と大きな違いはなく、当該規模までのスケールアップが可能であった。

精製工程では長鎖DNAが分解され減少することを確認した。また、精製工程スケールアップ前後の精製品はいずれもHAたん白質を主成分とするサブユニット抗原であった。

製剤化工程は、昨年度は吸着機構に関する基礎検討結果に基づく吸着率が高い製剤を調製する最終バルク調製法を確立した。今年度は充填工程で高い吸着率を維持したまま、均一充填が可能な条件を設定した。

決定した製法により製造した原液及び製剤の品質は品質目標を達成した。またその過程で、性状、力価試験 (SRD試験) 及び保存安定性評価で重要な抗原の凝集に関する知見が得られ、今後活用できると考えられた。

本開発では、現時点で十分な使用実績があり、安全性が確認されているアルミアジュバントを選択した。A/H5N1型のインフルエンザサブユニットワクチンではアルミアジュバントの効果が認められないとの報告もある²⁾ が、本分担研究ではマウスを用いた試験系でアルミアジュバント添加の効果が明確に認められた。

化血研

当該研究事業はH21年度、H22年度の2ヵ年にて計画されており、昨年度同様、本年度についても当初の計画通りの進捗を達成した。今後は臨床試験と実生産設備の整備を並行して進めることとなるが、主な課題を以下に示す。

1) 治験薬製造法確立とスケールアップ

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、1200L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最適化検討を行い、実生産プラントの立ち上げ期間の短縮に繋げていく。

2) 臨床試験の実施と製造承認申請

H26年までに、半年以内に全国人分の新型インフルエンザワクチンを製造・供給できる体制を整備するためには、計画通りの臨床試験の実施、製造承認申請が必須である。また、成人での臨床試験にて安全性と有効性を確認した後、小児、妊婦、高齢者を対象とした臨床試験・申請も必要である。

3) 高増殖性シードウイルス作製法の確立

既存のパンデミック株については現在のシード調製法で目標とする生産レベルに到達していることを確認したが、今後、どのような株がパンデミック株となっても高生産性を確保できるシード調製法の確立が必要である。

UMNファーマ

1. 発現細胞培養及び精製について

発現培養において、回収時の生細胞率を調節することで収量が安定化することが示唆された。バキュロウイルス感染後の時間が短いと、rHAを十分に発現してないために収量が低くなったことが考えられる。一方、生細胞数が60%を下回ると、死細胞数の割合が増えるため、プロテアーゼなどの影響により、rHAの分解が進んでしまったものと示唆される。生細胞率は重要な製造管理パラメーターであることが示唆されたため、今後実生産設備においても、管理項目として採用が可能かどうかを検討したい。

精製については、クロマトI工程の樹脂を変更することで、約1.5倍の収量を得ることができた。樹脂Aはたん白質の吸着能が高く、収量が向上したものと考えられる。樹脂Bについては、現行樹脂とは溶出パターンが異なり、洗浄・溶出条件を変更することで収量が改善する可能性が示唆された。

また、工程由来の主要な4種類の試薬についてHPLCによる定量、HCP及びDNA含量測定法の設定を検討した。今後、継続して工程由来の不純物の定量法を設定し、より良い品質のワクチンを供給したい。HPLCを用いた純度検定についても、条件設定には至らなかったものの、rHA由来のピークを確認しており、今後も継続して検討を進めたい。

2. 一元放射免疫拡散法

設定した一次自家標準物質とヒツジ抗rHA抗血清を用いて、SRDゲルへの抗血清添加量と、抗原アプライ量を設定した。今回得られたゲルは、目視による判定以外に、スキャナーによる取り込みと自動計測を実施しており、両法で大きな差が認められないことを確認した。

またSRD代替法として、A/Vietnam/1203/2004株のELISAサンドイッチ法を設定し、良好な直線性を確認した。累乗近似法では測定範囲が広く、汎用性の高い定量法が設定できた。

3. 組換えバキュロウイルスの構築

今回、A/Vietnam/1203/2004株を含めて4株のH5N1株のrBVを構築することに成功した。株によ

ってrBV作製方法や期間に差はなく、本製造法を用いることで、パンデミック時にウイルス・バンクを問題なく構築できることが示唆された。

また、Whole virusよりRNAを精製してトランスファーベクターを構築できたことにより、人工遺伝子以外の方法でrBVを構築することが可能であることが示された。

4. 開裂型・非開裂型ヘムアグルチニンの免疫原性に与える影響

孵化鶏卵や動物細胞を用いて製造されるインフルエンザワクチンHAは、通常HA1とHA2に開裂している（開裂型HA）。これに対してBEVSで製造したインフルエンザワクチンrHAは非開裂型（HA0）が主たる構成物である。

これまで当社及びPSCで実施した臨床試験では新型（H5N1）と季節性インフルエンザrHAワクチンの有効性を検討しており、接種したrHAワクチンは非開裂型であった。また、当社が実施した臨床試験では、野生型トリインフルエンザウイルスベトナム株（whole virus）に対する中和抗体価を測定しており、rHAワクチン接種により、接種量に依存した中和抗体価を誘導していることから、非開裂型rHAのインフルエンザワクチンとしての有用性が示されている。

今回、非開裂型rHAと同じロットから調製した開裂型rHAを用いたマウス免疫原性比較試験を行い、非開裂型rHAを免疫した群は、開裂型rHAを免疫した群に比べ、高いHI価を示した。非開裂型rHAは、少なくとも開裂型rHAと十分比較できる程度のHI抗体価を誘導した。

5. rHAの免疫原性に与える糖鎖の影響の確認

低用量の0.003ug/body接種群では糖鎖修飾型が非修飾型に比べ幾分免疫原性が高い結果となったが、それ以外の用量接種群では、いずれも糖鎖修飾の違いによるHI抗体価が1ウェル（2倍）以内の差であった。これらの結果より、rHAの糖鎖修飾型と非修飾型の免疫原性には大きな違いがないことが示唆された。