

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、(2)細胞培養ワクチン製造用候補細胞株についての検討、(3)シードウイルス及び各種試薬製造用MDCKセルバンクの構築である。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抽出し、それらに関連する既存のガイドラインを参照して、研究班としての見解をまとめた。参照するガイドラインには、WHO/BS/10.2132等のガイドラインのドラフトも含め、新しいポイントについても把握するように努めた。

(2)細胞培養ワクチン製造用の候補細胞株についての検討

Crucell社のPer.C6細胞について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。

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。

(3)シードウイルス及び各種試薬製造用MDCKセルバンクの構築

世界的に急速に進む細胞培養ワクチン実用化の流れに対応するため、シードウイルス及び各種試

薬製造用MDCKセルバンクの構築を行った。

MDCK細胞としてはATCC MDCKを用い、これを無血清培地に馴化させてセルバンク構築用細胞とした。この細胞を用い、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。

C. 結果

(1)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

班会議における幅広いディスカッションの中から、各班員に共通する問題点を「留意すべきポイント」として抽出した(6点)。それらについて既存の関連するガイドラインを参照した上でディスカッションを行い、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。

以下にそのまとめを示す。

①ウイルス増殖に使用する細胞株の造腫瘍性とがん原性について

安全性の観点から、ワクチン製造に用いる細胞の造腫瘍性試験は必要であると考ええる。造腫瘍性試験が陽性である場合はがん原性試験も必要である。造腫瘍性試験はEOPC(CAL)に対して行い、がん原性試験はEOPC(CAL)のライセートとDNAに対して行う。製剤中の残存DNA量は10 ng/dose以下が必要条件で、できるだけ低いレベルであることが望ましい。また、残存DNAの長さはより短い方が望ましい。

②細胞溶解物(ライセート・DNA)の安全性について

ワクチンに混入してくる細胞由来成分によって有害事象、副反応(例えばアレルギー反応等)が生じる可能性があることから、細胞由来成分については可能な限り混入しないよう管理することが必要であろう。細胞由来DNAの量については、10 ng/dose 以下が必要条件である。他の細胞由来成分については、非臨床試験(反復投与毒性試験等)

や臨床試験を通じて個別のワクチンごとに設定されるべきであろう。

③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

ワクチンの有効性を確保するという観点から、ワクチン株が細胞での継代で安定であることを確認する必要があると考える。具体的には、特異的抗血清を用いた試験とシーケンス解析の結果を総合的に判断して、HA・NAの同等性を確認する。シーケンス解析で塩基配列の変化が確認された場合は、免疫学的な反応における同等性を確認すると共に、ウイルスの形質（弱毒性等）に問題がないことの確認を適切な方法を用いて行う。

④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）の試験の範囲について

安全性の観点から、MCBまたはMCBとEOPC(CAL)の両方に対して、誘導剤も組み合わせ、内在性レトロウイルス、外来性レトロウイルス、宿主細胞が感染しうるウイルスの試験を行うことは妥当であると考えられる。試験方法については、感染性試験、TEM、従来のRTase試験、高い感度を持つPBRT法、感受性細胞を用いたin vitro試験、乳飲みマウス・成熟マウス・発育鶏卵等を用いたin vivo試験、抗体産生試験などがあり、これらによる試験は妥当であると考えられる。

⑤製造の過程で混入する可能性のある病原体の試験の範囲について

安全性を確保する観点から、非特異的モデルウイルスをスパイクし、製造工程のもつクリアランス能力の特性を解析する必要がある。非特異的モデルウイルスに関しては、非エンベロープ型ウイルスも含めた広範囲な物理的・化学的構造を示すモデルウイルスの使用を考慮すべきである。ウイルスクリアランス試験を行う際には、2つ以上の製造工程について、それらがどのようなウイルス不活化/除去能力を有するかを評価することが望ま

しい。ウイルスクリアランスに関する評価を行うておくことは、未知の、あるいは不測の有害ウイルスを除去できることへの一定限の保証になると考える。また、病原体の種類としては、ヒト由来だけでなく、細胞株の動物種由来のものにも注意を払う必要があるだろう。

⑥HA量を定量するための方法について

現段階ではHAの量はSRD試験によって測定する。代替法でHA量を測定しても良いが、その場合でもSRD試験との相関を見る必要があるため、やはりSRD試験を行う必要があると考える。

(2)細胞培養ワクチン製造用の候補細胞株についての検討

Crucell社のPer.C6細胞について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、HA価で256以上を示し、増殖性は良好であった。

(3)シードウイルス及び各種試薬製造用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たところ、無血清培地でも良好な増殖性を示すMDCK細胞を得ることが出来た。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。

D. 考察

本研究班では細胞培養ワクチン実用化において各班員に共通する一般的問題点を抽出し、それを

「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。このように各班員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と考えられる。

細胞培養ワクチンに関しては、FDA、WHO、EMEAから新しいガイドライン（現段階でドラフトのものも含む）が出されるなど、大きく状況が変化してきている。今後も最新の情報に注意しながら実用化を進めていくことが必要であろう。

また、現在本研究班で検討されている細胞はMDCK細胞、EB66細胞、expressSF+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。Per.C6細胞の培養に関して技術移転を行い、基準株でのウイルス増殖性の検討を行ったところ、増殖性は良好であった。今後は多様なウイルス株の増殖性を検討することが必要と思われる。

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、まず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。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。

細胞培養ワクチンの主な長所は(1)ワクチンを短期間に大量に製造することが出来る、(2)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の2点である。しかし現時点では、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2番目の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、リバース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る。これによって、鶏卵培養によらない細胞培養ワクチンシードウイルス製造の基盤確立へ大きく前進したと言って良いであろう。

E. 結論

(1)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、(2)細胞培養ワクチン製造用の候補細胞株についての検討、(3)シードウイルス及び各種試薬製造用MDCKセルバンクの構築を行い、国内における細胞培養ワクチン実用化に必要な基盤の整備を進めることが出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

山本典生, 中村一哉, 浜本いつき, 田代真人
パンデミックインフルエンザ(H1N1)2009に対するワクチンの評価と新ワクチン開発に向けた展望
公衆衛生, 74(8):681-686, 2010

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についての紹介
医学のあゆみ, 232(13): 1230-1232, 2010

2. 学会発表

山本典生, 柳田浩志, 原崎一浩, 佐藤人美, 山本陽子, 高久 洋, 高橋 仁, 原田勇一, 中村一哉, 浜本いつき, 田代真人, 星野忠次
新規インフルエンザウイルス感染阻害化合物の計算機探索
Identification of novel anti-influenza virus compounds by computational screening 第33回日本分子生物学会 2010年12月7日 神戸

浅沼秀樹, 中内美名, 許斐奈美, 相内章, 長谷川秀樹, 白倉雅之, 山本典生, 網康至, 高下恵美, 小沢正次, 岸田典子, 小田切孝人, 信澤枝里, 田代真人
新型インフルエンザウイルス (H1N1pdm)

の増殖性に関する検討 第58回日本ウイルス学会
学術集会 2010年11月7-9日 徳島

Y. Harada, H. Takahashi, B. Roth, K. Schwarz, V.
Horn, B. Grafelmann, R. Wipraechtger, N. Yama
moto, K. Nakamura, I. Hamamoto, T. Odagiri, S. It
amura, H. Trusheim, S. Blayer, T. Tsai, K. Mizuta,
A. Hirata and M. Tashiro. An evaluation of candida
te cell lines to isolate influenza virus for cell base
influenza vaccine Options for the Control of Influe
enza VII.6 September 2010 Hong Kong SAR,
China

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

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ヵ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。本年度は主にパイロット規模での製法の確立に関する検討、およびGLP試験を実施した。

今年度に導入したパイロット規模培養槽を用い、細胞培養条件の最適化を目的とする実験を実施した。その結果、高密度細胞培養が可能な最適の条件（酸素供給法および攪拌条件等）を見出すことができた。一方、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することができ、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。

また、この製法に基づいて、パイロット規模においてGLP試験用試作ワクチンを製造し、現在、GLP適合施設下での非臨床試験を実施している。今後、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。

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規模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

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/1A/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 $\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ 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ため、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たと考えられた。

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A/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。

C. 考察

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。

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14回日本ワクチン学会学術集会（東京）

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

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 一般財団法人 化学及血清療法研究所 野崎 周英

研究要旨

- ・ 治験薬製造設備を用いて、45L 培養スケールで第 I 相治験薬製造を複数回行い、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得た。
- ・ 治験薬製法で製造された製剤を用いて、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。その結果、問題となる所見は認められなかった。
- ・ 第 II/III 相治験薬製造用に既存プラントの改造、並びにスケールアップ用の 1200L 培養スケールのパイロットプラント工事を開始した。
- ・ 実生産設備に関しては、基本計画策定を完了し、H23 年からの建築工事に向け、基本設計を開始した

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、細胞培養による新型インフルエンザ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、H26 年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 年間に相当する。

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) 処方・剤形検討

本剤はスプリット、または、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デミックワクチン「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。

4) 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。

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

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。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。

6) 安定性試験 (予備安定性評価)

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。

7) 分析法バリデーション

第 I 相試験用の原液・製剤の品質試験方法のバリデーションを実施する。

8) 第 I 相試験用治験薬の製造

既存のパイロットプラントを用いて、治験薬 GMP 管理下、GLP 試験用製造と同一の製法 (45L スケール) で製造する。

9) 第 I 相試験用原薬・製剤の安定性試験

当該ロットの長期安定性試験、加速試験を実施する。

10) 治験相談・治験申請

非臨床試験で本剤の安全性及び有効性 (免疫原性及び感染防御) に問題がないことを確認し、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、治験届を行う。

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のため MCB から WCB を調製する。調製した WCB の特性試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、外来性ウイルス否定試験を実施する。

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 I 相試験用治験薬の製造を 45L スケールで行うのに対し、Ⅱ/Ⅲ相試験用治験薬の製造は 600L 規模で行う予定。スケールアップ、収量及び品質向上に向けた製法改良を検討し、第 I 相試験用治験薬との同等性/同質性を評価する。

13) 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。

14) 他のパンデミック株での生産性評価

開発株以外のパンデミック株について生産性評価を実施する。

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EB66のMCB及びEPC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。

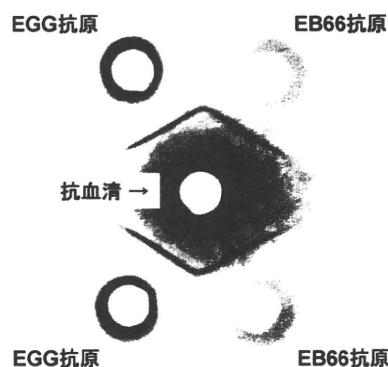
3) 処方・剤形検討

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

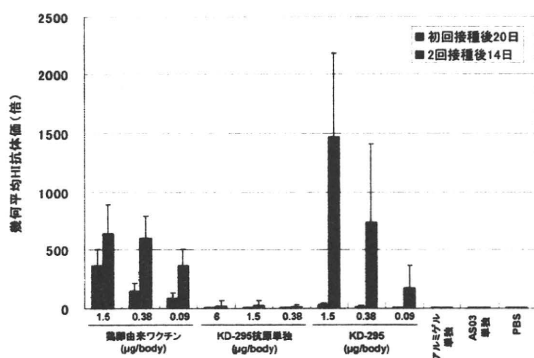
既存のパイロットプラントにて製造され

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)。

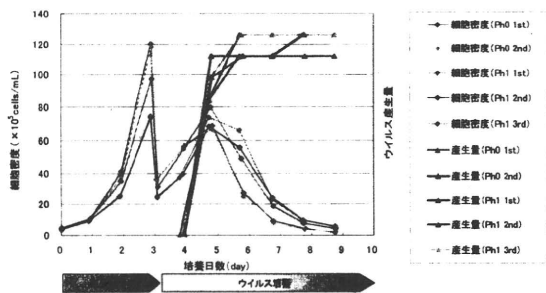
7) 分析法バリデーション

第 I 相試験用の原液・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 スケールのフア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	1 st	2 nd	3 rd
	バッチ	バッチ	バッチ
HA 含量 (μg/mL) …①	347	311	351
たんぱく質含量 (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

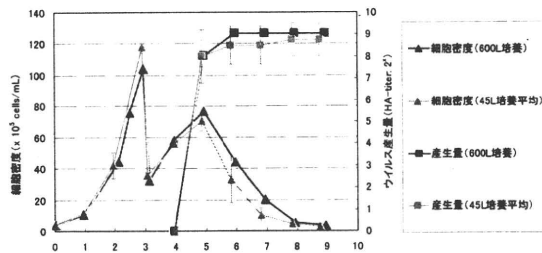
健康成人男性を対象とした第 I 相試験開始のために治験相談を行い、機構から特段の異論はなく、第 I 相試験の用量群設定が了承された。

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

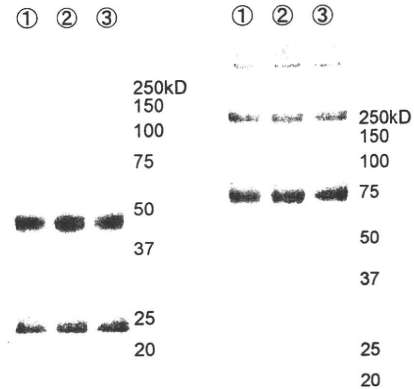
第 II/III 相試験薬製造および実生産に向けたスケールアップ検討として、45L 培養スケールの 10 倍超となる既存 600L フェルメンターを用いたウイルス培養、並びに同培養液を材料とした現行製法による精製評価を行った。その結果、培養に関しては、45L スケールと同等の細胞増殖性とウイルス産生を達成し、精製収率および最終品質についてもスケールアップに伴う影響は認められなかった。以上の結果から、EB66 細胞を用いた現在の培養方法は、実生産設備にも十分適用可能と考えている。



< 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)。

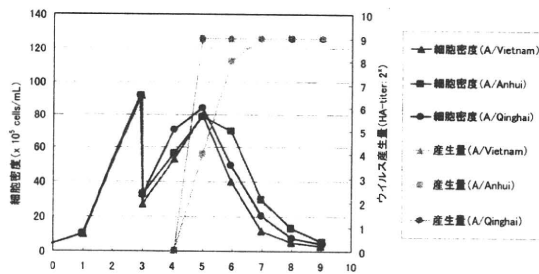
スケールアップ検討を目的とした実験用生産施設として、1200L 培養スケールのプラント整備を開始した。本年度末までに工事を完了し、H23 年度には試験製造を開始

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。



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、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。

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。

E. 結論

治験薬製造設備を用いて、45L 培養スケールで第 I 相試験治験薬製造を複数回行い、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得た。

治験薬製法で製造された製剤を用いて、第 I 相試験を行う上で必要な非臨床試験のデータを取得した。その結果、問題となる所見は認められなかった。また、アジュバント AS03 を添加した EB66 細胞由来抗原 (H5N1/Indonesia 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、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。

第 II/III 相試験治験薬製造のための既存プラント改造、並びにスケールアップを目的とした 1200L 培養スケールのパイロットプラント工事を開始した。実生産設備に関しては、基本計画策定を完了し、H23 年からの建築工事に向け、基本設計を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

分担研究者 五反田亨 学校法人北里研究所 生物製剤研究所

研究要旨：MDCK 細胞をマイクロキャリアと無血清培地を用いて培養する細胞培養系により、新型インフルエンザワクチンの開発を進めており、これまでに NIBRG-14 (A/VietNam/1194/ 2004) 株の試作ワクチンを作製して、諸条件を検討してきた。今回、Indo/05/2005/PR8-IBCDC-RG2 株についても本法が応用可能であることを確認し、ホルマリン処理による発熱因子の不活性化条件も決定して、50L パーフュージョン培養スケールにおける製造方法を確立することができた。最終的なワクチンの構成は、ウイルス全粒子抗原+アルミニウムアジュバントという、実績がある組み合わせとなった。確定した製造方法に基づいて治験薬 GMP でインドネシア株を用い非臨床用試作ワクチンを製造し、非臨床試験を実施した。その結果、安全性薬理試験および毒性試験ともに問題となる所見および影響は見られなかった。また、薬効薬理試験はマウスで十分な抗体産生が認められた。

A. 研究目的

我々は、MDCK 細胞をマイクロキャリアと無血清培地を用いて培養し、パーフュージョン培養法で効率的にウイルスを産生させる細胞培養系により、新型インフルエンザワクチンの開発を進めている。

前報告までに、この方法で新型インフルエンザウイルス NIBRG-14 (A/VietNam/1194/ 2004) 株（以下、ベトナム株）の培養が可能であることを示し、ベトナム株の試作ワクチンを作製して製造方法及び規格の検討を行った。その結果、ウイルス全粒子を抗原として用いる場合、BPL によるウイルス不活化のみではウサギに対する発熱性が残存するため、発熱因子の不活性化工程の検討が必要になった。アジュバントに関しては、これまで新規アジュバントであるイヌリンの使用を試みてきたが、全粒子抗原と組み合わせた場合、異常毒性否定試験におけるモルモットの体重減少度が

大きく、現・生剤基準における規格の設定が難しいことが明らかになった。一方、季節性インフルエンザでは高い効果を示したイヌリンアジュバントは、ベトナム株に対しては既存のアルミニウムアジュバントと同程度の効果しか発揮できないことも明らかになった。

今回は、これらの現象がインフルエンザウイルス H5N1 の別の株でも再現されるのか確認するために、新型インフルエンザウイルス Indo/05/2005/PR8-IBCDC-RG2 株（以下、インドネシア株）の試作ワクチンを作製し、製造方法及び規格の検討を進めた。

更に、製造方法及び規格を設定して治験薬 GMP 下で細胞培養新型インフルエンザワクチンを製造し、非臨床試験を実施する。

B. 研究方法

インドネシア株を培養し、試作ワクチンを作製

した。

発熱因子の不活性化にはホルマリンを用いることとし、その処理条件を検討した。新型インフルエンザワクチンは短期間での製造が求められるため、ホルマリン処理期間が短くて済むよう、ホルマリン濃度は0.2/0.1/0.05 vol%、処理期間は2/4/7/14日間で、発熱因子不活性化能（発熱試験）、抗原性（SRD）、及び有効性（マウス免疫原性）を比較した。

インドネシア株の抗原にイヌリンアジュバント又は水酸化アルミニウムアジュバントを添加して試作ワクチンを作製し、有効性を比較した。

また、確定した製造方法に基づいて試作ワクチンを3ロット作製し、そのうちの1ロットを用いて非臨床試験を以下のように実施した。

薬理試験：薬効薬理試験としてマウスを用いて免疫原性及び水酸化アルミニウムゲルの免疫増強効果について HI 抗体価測定試験及び中和抗体価測定試験を実施した。安全性薬理試験としてラットを用いて中枢神経系、イヌを用いて心血管系及びラットを用いて呼吸器系に及ぼす影響を評価した。

毒性試験：ラット及びイヌを用いた単回皮下投与毒性試験、ラットを用いた反復皮下投与毒性試験、ラットを用いた生殖毒性試験（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及び胚・胎児発生に関する試験）、ウサギを用いた局所刺激性試験（皮下刺激、筋肉刺激）及び遺伝毒性試験（復帰突然変異試験、染色体異常試験及び小核試験）、ラットを用いた13週間間歇皮下投与毒性試験を実施した。全ての毒性試験は、GLP 下で実施した。

（倫理面への配慮）

動物実験倫理規定を深く理解し、動物実験委員会の承認を得た後動物実験指針等を遵守して実施した。そのうえで「動物の愛護および管理に関する法律」（昭和48年法律第105号）、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和55年3月27日総理府告示第6号）の基本原則を適用した。

C. 研究結果

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/IU 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。

D. 考察

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。

E. 結論

ホルマリンによる発熱因子の不活性化条件及びアジュバントを決定し、50L パーフュージョン培養スケールにおける製造方法を確立することができた。最終的なワクチンの構成は、ウイルス全粒子抗原+アルミニウムアジュバントという、実績がある組み合わせとなった。確定した製造方法に基づいて治験薬 GMP でインドネシア株を用い非

臨床治験薬を製造し、非臨床試験を実施し、施策ワクチンの安全性が確認できた。

[以下F～Hについては、2011年2月28日時点で特になし。]

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

以上

MDCK細胞を用いたワクチン開発

研究分担者 大塚 浩史 デンカ生研株式会社ワクチン研究部長

研究要旨 無血清培養の浮遊系 MDCK 細胞を用いた季節性インフルエンザウイルスの培養方法が H5N1 株にも適用でき、アルミアジュバントを用い調製したサブユニットプロトタイプワクチンが免疫原性を示すことを確認した。

ウイルス安全性試験、Tumorigenicity/ Oncogenicity 試験によって細胞の安全性を示す結果を得た。細胞培養およびウイルス培養のスケールアップによって 500L 規模での製造を可能とし、HA を高純度に精製できる精製工程を確立した。アルミアジュバントへとウイルスたん白質を高度に吸着させる製剤の調製条件を設定し、均一な製剤の製造方法を構築した。免疫原性を指標として、アルミアジュバントの免疫賦活化効果、及び許容される吸着率の範囲を確認した。

確立した製法により製造した原液及び製剤の品質は、いずれも目標を達成していた。

A. 研究目的

本研究は、①平成 18 年度厚生労働科学研究¹⁾で得られた無血清培養の浮遊系 MDCK 細胞で製造した季節性インフルエンザウイルスの培養方法を発展させ、新型インフルエンザウイルス (H5N1) に適用可能か検討し、スケールアップを行う。②不活化後のウイルス抗原に、アジュバントを添加し、有効性が高いプロトタイプワクチンを製造する。

③使用する細胞株を十分に試験、解析し、安全性が担保された恒常的なワクチン製造方法を確立し、試験用検体を製造する。

平成 21 年度は培養工程、精製工程、および製剤化工程についてプロトタイプワクチンによる予備検討を行い、製剤の調製までに必要な一連の工程に関する基礎検討を終了した。今年度は 500L 培養槽を用いた培養スケールアップ検

討、製剤化工程の稼働性確認と、試作製造した検体の品質評価を実施した。

B. 研究方法

1. 製法の確立

1) 培養工程の検討

① 細胞株の安全性確認

浮遊系 MDCK 細胞の MCB, WCB を調製し、MCB, WCB, CAL のそれぞれにつき設定した項目で試験を行った。

② 細胞培養のスケールアップ検討

浮遊系 MDCK 細胞を無血清培地で培養し、170L、及び 500L 培養槽での増殖性を検討した。