

③ ウイルス培養のスケールアップ検討

インフルエンザウイルス Indo/05/2005 (H5N1)/PR8-IBCDC-RG2 株（以下 Indo 株、リバーシジェネティックス法による弱毒株）を浮遊系 MDCK 細胞に感染させ、500L 培養槽でのウイルス産生を検討した。

2) 精製工程の検討

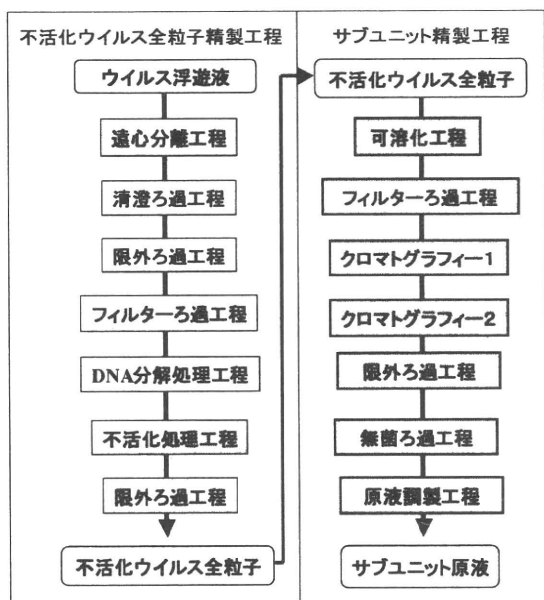


図 1. 精製法の工程フロー

① 不純物分解除去の検討

図 1 に示すフローで不活化ウイルス全粒子精製工程における長鎖長 DNA の分解除去を検討した。

② サブユニット精製工程のスケールアップ

サブユニット精製工程のスケールアップを検討し、スケールアップ後に製造したサブユニット抗原のスケールアップ前のものとの同等性を検討した

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 (HA 抗原)、及びそれにアルミアジュバントを添加したワクチンをそれぞれ調製した。同時に、アルミアジュバントの

表面電位を変えて抗原たん白質の吸着率を低下させたワクチンを調製した。B 項 1. 4) と同様の方法によって、これらのワクチンをマウスに 2 回免疫 (筋注) し、血清中の中和抗体価を測定した。

4) 製剤化工程の検討

製剤化の工程である最終バルク工程及び充填工程の稼動性能を評価し、決定した製造法により試作ワクチンを製造した。

5) 試作原液及び製剤の品質評価

確立した製法により試作製造した原液及び製剤を確認し、目標とした品質であるか否かを評価した。

(倫理面への配慮)

問題なし

C. 研究結果

・ 製法の確立

1) 培養工程の検討

① 細胞株の安全性確認

細胞 (MCB, WCB, CAL) の特性、ウイルス安全性試験、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)。

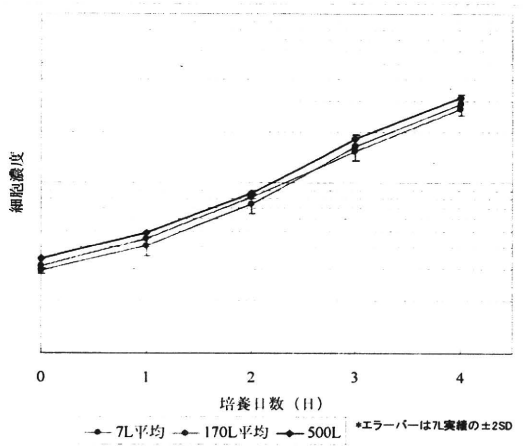


図 5. 細胞培養 7, 170, 500L の比較

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 Indo 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)。

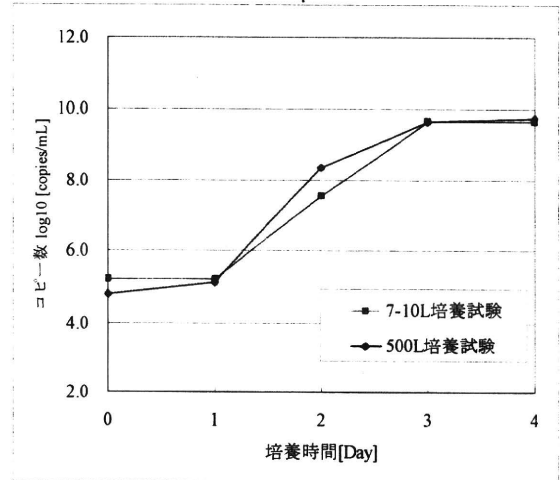
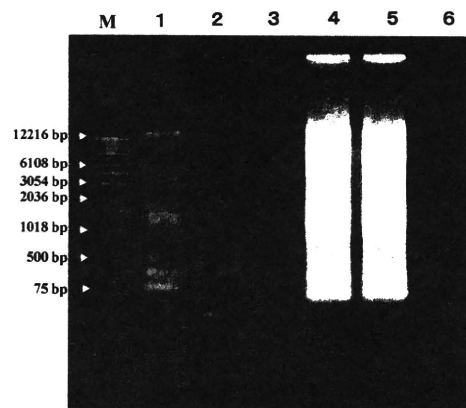


図 6. ウイルス培養 7L、500L の比較

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)。



泳動条件: 100V 26min, 1% agarose gel, 1xTAE Buffer
 染色条件: SYBR Green (10000x), 15min
 1: 清澄ろ過液
 2: 限外ろ過-透過液(濃縮時)
 3: 限外ろ過-透過液(Buffer添加時)
 4: 限外ろ過-濃縮液
 5: フィルターろ過液
 6: DNA分解処理液

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。

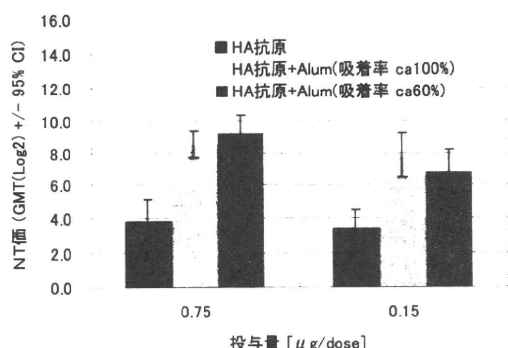


図 9. 中和抗体価の比較

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。

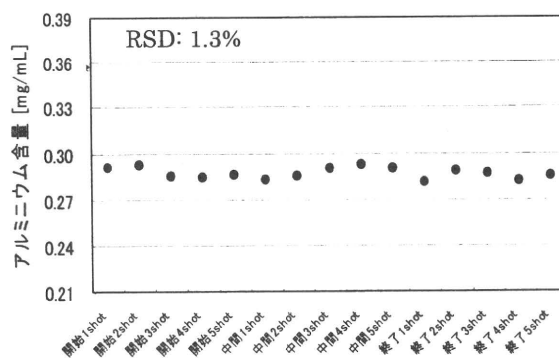


図 10. 充填工程のアルミニウム含量推移

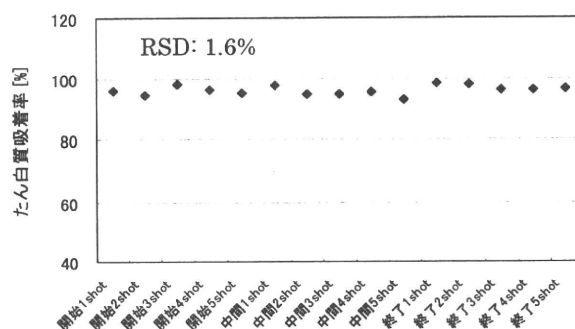


図 11. 充填工程のたん白質吸着率推移

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頑健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 (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 25kDa 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 (µg / mL)	約33	36
HA 含量 (µg / 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 (µg / mL)	5~14	13

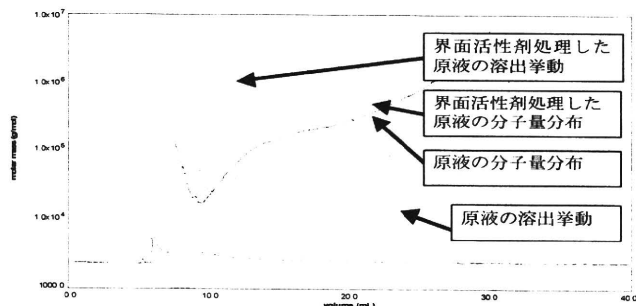


図12. 原液の凝集状態の解析

D. 考察

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。

E. 結論

培養、精製及び製剤化工程について非臨床試験用製剤の調製までに必要な一連の基礎検討を行い、製造工程のプロトタイプを設定した。プロトタイプの製法で製造した試験ワクチンはマウスにおいて免疫原性を有することを確認した。

スケールアップ検討を実施し、製造した原液及び製剤は目標品質に適合した。今後製造工程の更なるスケールアップも可能であると考えられた。

参考文献

1) 細井和夫「組織培養インフルエンザワクチンの試作及び免疫原性試験における鶏卵ワクチンとの比較検討」

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「動物由来物質を排除したワクチン及び組織培養インフルエンザワクチン製造方法の開発研究」分担研究

2) Bernstein, D. I. et al, Effect of Adjuvants on the Safety and Immunogenicity of an Avian Influenza H5N1 Adults. The Journal of Infectious Disease. 197, 667-675 (2008)

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

精製法につき特許出願中

特願 2008-253742（出願日 2008 年 9 月 30 日）

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 上村謙吾 株式会社UMNファーマ 製造開発部

研究要旨 本研究の目的は、パンデミック発生の早期より、短期間で大量のワクチン製造・供給を可能とするため、組換えインフルエンザヘマグルチニン抗原たん白（以下rHA）製造系を確立することである。本製造系は株化昆虫細胞（expresSF+細胞：以下SF+細胞）を宿主としたBaculovirus Expression Vector System（以下BEVS）を用いることが特徴である。

昨年度の手担研究報告書で挙げた、3つの課題（発現細胞培養及び精製のパラメーター設定、一元放射免疫拡散法の標準物質設定、組換えバキュロウイルスの構築）に関する研究成果は以下の通りである。また、昨年の研究班会議にて検討課題となった、組換えヘマグルチニン（rHA）開裂型・非開裂型の免疫原性の予備検討結果及び免疫原性に与える組換えヘマグルチニン（rHA）への糖鎖修飾の影響を検討した。A/Vietnam/1203/2004(H5N1)株インフルエンザワクチンの前臨床試験、PI試験を終了し、PII試験を実施中である。

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。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による定量法及びHCP測定法を確立した。DNA含量はThreshold法による定量法設定を検討した。

2. 一元放射免疫拡散法

複数の免疫方法により rHA を免疫したヒツジから得られた抗血清を用い、一元放射免疫拡散（SRD）法の自家抗血清を設定し、ELISA による抗血清の安定性評価を開始した。また、SRD 代替法として、サンドイッチ ELISA 法を設定した。

3. 組換えバキュロウイルスの構築

組換えバキュロウイルス（rBV）の作製に関して、構築済みのトランスファーベクターを用い、A/Vietnam/1203/2004株rHA発現用のrBVの構築に成功した。また、人工合成した遺伝子を用いて、クレードの異なるA/Indonesia/05/2005株、A/Anhui/1/2005株、A/bar-headed goose/Qinghai/1A/2005株のrBVを構築した。さらにHA遺伝子入手方法の多様化の検討として、インフルエンザウイルスRNAを鋳型にして調製したHA遺伝子をクローニングしたトランスファーベクターの構築に成功した。

4. 開裂型と非開裂型 rHA の免疫原性の比較

開裂型 rHA と、これまで免疫原性試験の抗原として用いてきた非開裂型 rHA を用いて、マウス免疫原性試験による比較試験を行った。開裂型・非開裂型 rHA のいずれもマウスに HI 抗体を誘導し、非開裂型 rHA を接種して得られたマウス抗血清は、開裂型 rHA を HA 抗原とした場合と同程度の HI 抗体価を示した。非開裂型 rHA を接種したマウス群では、開裂型 rHA 接種群に比べて同等以上の HI 抗体価を誘導し、ワクチンとしての非開裂型 rHA は開裂型に劣らないことが確認できた。

5. 免疫原性に与える糖鎖の影響

rHA の糖鎖修飾が免疫原性にどのような影響を与えるかを調べる目的で、rHA から糖鎖を除去した抗原を調製し、マウスを用いた免疫原性試験にて糖鎖が修飾された抗原との免疫原性を比較した。

糖鎖修飾の違いによる HI 抗体価の誘導には大きな差は認められず、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。

A. 研究目的

1. 発現細胞培養及び精製について

GMP 製造をバックアップするデータとして、発現細胞培養及び精製の各種規格幅設定を検討する。また、クロマト I 工程及び II 工程における精製条件を最適化し、rHA の収量向上を目指す。

医薬品としての品質を担保するため、製造工程で使用される試薬の残存や宿主由来の夾雑物の定量を検討する。

2. 一元放射免疫拡散法

一元放射免疫拡散 (SRD) 法において、現行の社内標準物質に代えて、最適化した処方及び保存法による組換えヘムアグルチニン (rHA) を社内標準物質として新たに設定する。新規標準物質を設定するにあたり、長期保存が可能な状態で力価の安定性を評価する。

また、SRD 代替法として、ELISA による力価測定を検討する。

3. 組換えバキュロウイルスの構築

パンデミック発生時の国内での迅速な対応を可能とするために、組換えバキュロウイルス (rBV) を自社で作製する。

また、インフルエンザウイルスの HA 遺伝子情報を収集し、遺伝子ライブラリを構築するとともに、A/Vietnam/1203/2004 株以外の株についても HA 遺伝子を人工的に合成し、ワーキング・ウイルス・バンクとなる rBV の構築を行う。

4. rHA の開裂型と非開裂型の免疫原性の比較

弊社が製造する rHA は、非開裂型が主たる構成成分であるが、既存のインフルエンザワクチンが開裂型を主成分としており、開裂型・非開裂型 rHA のマウスを用いた免疫原性試験の予備検討を実施する。

5. rHA の免疫原性に与える糖鎖の影響の確認

我々が開発している rHA は糖鎖修飾を受けている。rHA の糖鎖修飾が免疫原性にどのような影響を与えるかを調べる目的で、マウスを用いた免疫原性試験にて、rHA から糖鎖を除去した抗原を調製し、糖鎖が修飾された抗原との免疫原性を比較する。

B. 研究方法

1. 発現細胞培養及び精製について

1.1. 発現培養の検討

細胞培養・発現培養の工程パラメーターを予備的に設定した。最大 20L スケールで培養を行い、培養及び発現培養時の細胞数、生細胞率、培地成分の変化と細胞の増殖性との関連性を調査するとともに、ウイルス感染から発現までの条件設定最

適化を検討した。

1.2. クロマト樹脂の検討

A/Vietnam/1203/2004 株 rHA 発現培養の細胞画分用い、1L スケールの培養液を精製用サンプルとした。クロマト樹脂は工業生産スケールに対応できることを条件に、クロマト I 工程で、たん白質吸着能力の異なる 2 種類の樹脂を選択し、溶出ピークのパターン、得られた溶出液のたん白質含量を比較した。また、続くクロマト II 工程にて精製し、溶出ピークパターン、溶出液のたん白質含量、得られた rHA 粗精製液の SDS-PAGE 法による純度を比較した。現行樹脂と評価した樹脂二種について、それぞれ精製を 3 回実施して比較を行った。

1.3. HPLC 試験法の開発

製造工程で使用される試薬に関して、HPLC による残存量の測定法を確立し、UMN で製造した原薬について、各試薬の残存量を測定した。

また、rHA の純度検定として、既に設定している SDS-PAGE 法を補完するため、HPLC による試験法設定を検討した。

1.4. 純度試験の設定

宿主由来たん白質 (HCP) については、ウエスタンブロットによる限度試験を設定し、原薬中の HCP 量を測定した。抗 HCP 抗体は、Protein Sciences Corporation が作製したものを使用した。

また、残存 DNA 含量については Threshold 法による定量法の設定を検討した。

2. 一元放射免疫拡散法

2.1. 標準物質の設定

自家一次標準物質を選定し、ヒツジで抗血清を作製し、得られた抗 rHA 抗血清を用いて SRD 法の最適化を行った。アガロースゲルに添加する抗血清量と抗原量を調整して、安定した測定値が得られる条件を設定した。

2.2. SRD 代替法の検討

SRD 代替法として、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 ELISA 法による定量法の確立を検討した。

3. 組換えバキュロウイルスの構築

A/Vietnam/1203/2004 株およびクレードの異なる A/Indonesia/5/2005 株、A/Anhui/1/2005 株、A/bar headed gs/Qinghai/1A/05 株のヘムアグルチニン遺伝子の人工合成遺伝子を外部委託にて合成し、定法に従いバキュロウイルスへの組換えを実施し、rHA の発現と精製を検討した。

4. 開裂型と非開裂型rHAの免疫原性の比較

BEVSで製造したA/Vietnam/1203/2004 rHAを非開裂型として用いた。開裂型は、非開裂型と同じロットのrHAをトリプシンで消化して調製した。

rHAの開裂型あるいは非開裂型を、BALB/cマウスの左大腿部筋肉内に接種し、3週間後に2回目の接種を行った。2回目の接種から2週間後に、各個体の心臓より血清サンプルを採取し、ウマ赤血球に対するHI抗体価を測定した。

5. rHAの免疫原性に与える糖鎖の影響の確認

rHAをPNGase F処理し糖鎖非修飾型サンプルとした。糖鎖の消化はSDS-PAGEにより確認した。また、対照群の糖鎖付加型もPNGase Fを添加せず、同様に処理した。

糖鎖修飾型あるいは非修飾型rHAを、BALB/cマウスの右大腿部筋肉内に接種し、3週間後に2回目の接種を行った。血清サンプルは、各個体の心臓より採血した。2回目の接種から2週間後に、各個体の心臓より血清サンプルを採取し、ウマ赤血球に対するHI抗体価を測定した。

C. 研究結果

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。

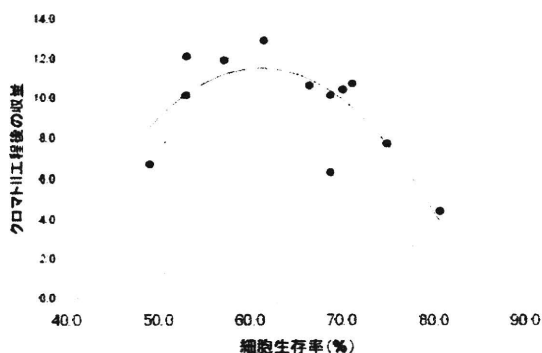


図1. 細胞回収時の細胞生存率と収量の関係
回収時の細胞生存率が60%程度のときに収量が最大となった。

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II工程後	13.7 (100%)	20.1 (147%)	10.9 (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。

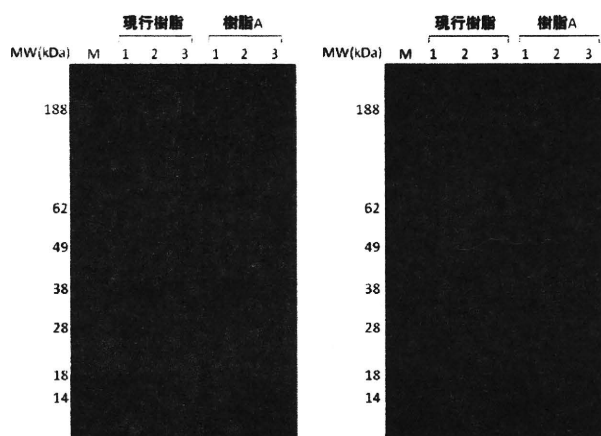


図2. 現行樹脂と樹脂Aの溶出画分の電気泳動像
それぞれの樹脂で3回ずつ精製を行い、SDS-PAGE (CBB染色)を行った。M: 分子量マーカー。(左図)クロマトI工程後の溶出液。この溶出液を次のクロマトII工程で精製して電気泳動にて分析した(右図)。いずれも65kDa付近にHA0の濃いバンドが認められる。

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 抗体を用いたウェスタンブロット法による測定方法を設定した。ウェ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、イムノブロットにより確認した (図3)。

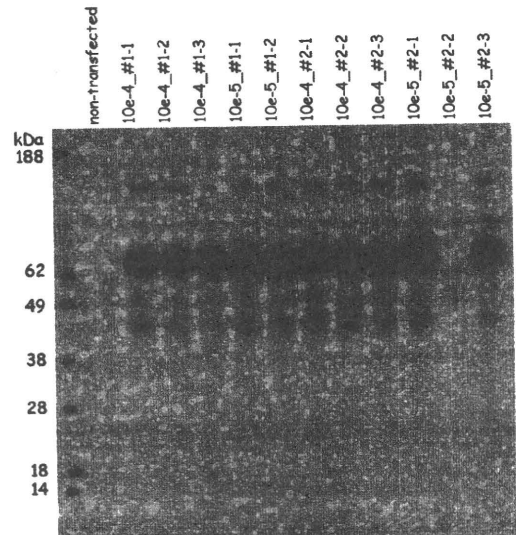


図3. プラークアッセイにより単離した11クローンのベトナム株rHAの発現確認
イムノブロット法により10株でrHAの発現を確認した

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/bar headed 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の発現をイムノブロットで確認した (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。

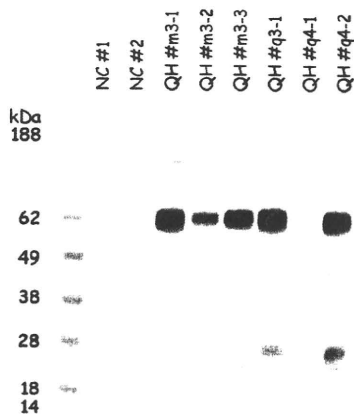


図4. プラーク純化により得られたクローンのQinghai株HA発現クローン

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ブ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。

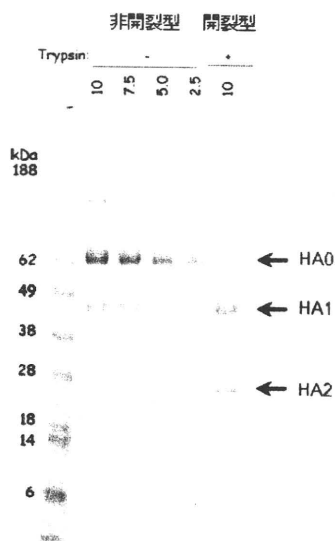


図5. トリプシン消化によるrHAの開裂

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)。

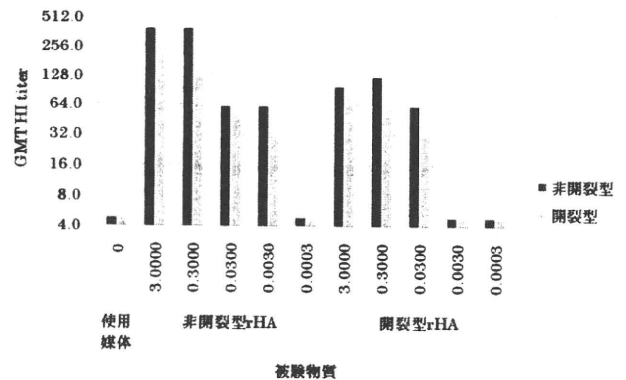


図6. 非開裂型および開裂型rHAのマウス免疫原性比較試験

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ったため、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。

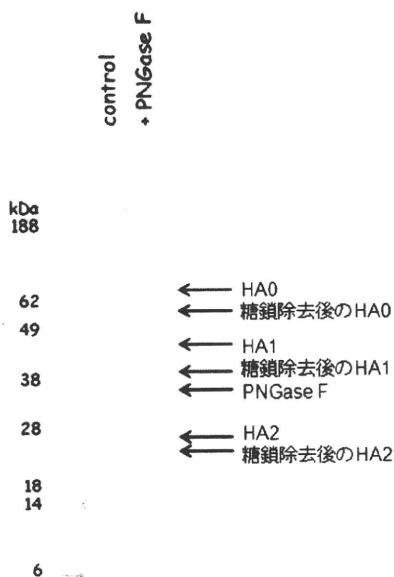


図7. PNGase F消化による糖鎖修飾の除去

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。

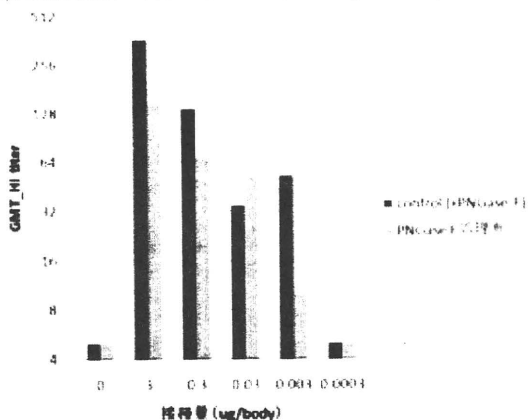


図 8. 糖鎖修飾型および非修飾型 rHA のマウス免疫原性比較試験

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

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。

E. 結論

培養の管理パラメーター設定や精製工程の更なる検討で、ワクチン原薬の安定的な製造と収量向上が期待される。また、工程由来の試薬残存や、HCPの測定法、SRD法を開発し、ワクチンとしての品質を担保するための準備を着実に進めている。

複数株のrBVを、同様の方法・期間で作製することに成功し、遺伝子配列が明らかになれば、合成遺伝子を用いてパンデミック株rBVを構築可能であることが示された。さらに、インフルエンザウイルスRNAを入手することによっても、ウイルス・バンクを構築可能であることが示された。以上により、新型インフルエンザワクチン製造用のワーキング・ウイルス・バンクの自社調製が可能となった。

非開裂型rHAは開裂型rHAと十分比較できる程度のHI抗体価を誘導することを確認した。また、糖鎖修飾型と非修飾型rHAの免疫原性には大きな違いがないことが示唆された。

当社は、A/Vietnam/1203/2004(H5N1)株インフルエンザワクチンの前臨床試験、PI試験を終了し、PII試験を実施中である。

F. 健康危険情報

特に記載すべき情報はない

G. 研究発表

該当するものはない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在、該当するものはない。

