

20102805/B

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 21-22 年度 総合研究報告書

研究代表者 田代真人

平成 23 年(2011)3 月

目次

平成 21-22 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	総合総括研究報告書	
	研究代表者：田代真人 国立感染症研究所	P. 1
	参考資料	
	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. 27
II	分担研究総合報告書	
1.	研究分担者：山本典生 国立感染症研究所	P. 61
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. 66
3.	研究分担者：野崎周英 (財)化学及血清療法研究所	P. 70
4.	研究分担者：五反田亨 (学)北里研究所生物製剤研究所	P. 77
5.	研究分担者：大塚浩史 デンカ生研株式会社	P. 81
6.	分担研究者：二宮康行 株式会社 UMN ファーマ	P. 89

I. 総合総括研究報告書

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）
H21-H22総合総括研究報告書

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、LLC-MK2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。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、Per.C6は増殖性に問題は無いと考えられた。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。さらに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られる。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

本研究班では、2年間の研究期間において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との同席のもとに、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、expressSF+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、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。

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、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

本研究では、2年以内にGLP試験を完了することを目標として開発を行ってきた。なお、我々は、GLP試験用試作ワクチンを、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製造すること、また、季節性インフルエンザワクチン株であるA/Brisbane/59/2007（H1N1）株（以下A/Brisbane株）の培養液を用いて精製条件を検討した後、この条件を新型インフルエンザ（H5N1）ワクチン株の精製に適用すること、の二点を開発の

方針として、本研究を進めてきた。

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. 製造用 MDCK 細胞における季節性インフルエンザウイルスの増殖性調査

当会が作製した製造用MDCK細胞について、ワクチン製造用基質としての評価を行うことを目的とし、次の実験を行った。

製造用MDCK細胞を無血清培地にて継代培養し、過去数年の季節性インフルエンザワクチンのリファレンス株を接種した。接種後、経時的にサンプリングを実施し、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細胞における増殖性と比較した。

その結果、製造用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、製造用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。その一方で、一部の株は、製造用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発育鶏卵のみで培養され、MDCK細胞に馴化していないことが原因と考えられた。

以上のことから、細胞培養インフルエンザ

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た。

3. 新型インフルエンザワクチンウイルスのMDCK細胞馴化株の作製およびシードロット作製

2.の研究結果を受け、発育鶏卵用の新型インフルエンザワクチン株（H5N1株）シードウイルスを、製造用MDCK細胞に馴化させることを目的として、以下の実験を行った。

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。その結果、ほとんどの株において、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（以下A/Indonesia株）のMDCK細胞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。

4. パイロット規模培養槽の設計および導入

本研究を開始するまでに、200L規模におけるMDCK細胞の高密度培養に関して条件検討を行ってきたが、酸素供給法に起因する培養液面での泡沫層形成や、マイクロキャリアの浮上および細胞へのダメージなどの問題があった。本研究では、パイロット規模の細胞培養槽を新規に導入するにあたり、これらの問題を解決する必要があったため、以下の実験を行った。

まず、スパージャの孔径および攪拌の条件を検討するために、5L規模での培養実験を20ケース以上実施した。その結果、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や攪拌条件等を決定することができた。これらの条件と、200L培養槽における液面 K_{La} （酸素移動速度係数）を測定して得られたデータをもとにして、コンピュータシミュレーション解析を実施した。その計算結果から、中規模培養槽における最適な攪拌翼の形状および回転数を決定することができた。

そこで、これらのパラメータをパイロットスケール培養槽の設計に反映させ、平成21年度に、パイロットスケール培養槽（500L）の設置を完了した。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。

5. パイロット規模における細胞培養法の確立

4.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、実験の間で差が認められた。このうちの1つの培養条件が、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。

6. 50L規模での精製法の確立

50L培養槽で培養した製造用MDCK細胞に、季節性インフルエンザウイルスA/Brisbane株を感染させて得られた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する方法を決定した。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。

7. パイロット規模での精製法の確立

6.の実験において、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ので、この精製法をパイロット規模へ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。

8. 製法および規格試験法の確立

5.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、7.の実験より、パイロット規模で作製したA/Brisbane株の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。

9. 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、上記の製法に基づいて、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。

10. 実生産規模製造設備の設計および導入

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を進めている。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

これまでの研究で、MDCK細胞を用いた培養法として、パーフュージョン法を用いることで高い感染価が得られることを見出している。今回の新型インフルエンザウイルス候補株ベトナム株及びインドネシア株の培養においても本法を採用した。以前の研究と同様両株とも、バッチ法よりパーフュージョン法で4倍以上のウイルスが回収できた。また、MDCK細胞を用いた培養法で得られた精製ウイルスは、発育鶏卵培養法で得られたそれと比較して、約1.3倍量であった。

これまでの研究で、各種ウイルスに不活化作用のあることが既知である不活化剤を用いて、新型インフルエンザウイルスの不活化を試みた。その結果、これまでのエーテル処理またはホルマリンによる不活化より、短時間での不活化が容易であることがわかった。即ち、検討不活化剤では24時間で新型インフルエンザウイルス株は不活化された。また、ウイルスの発熱因子の不活性化には、ホルマリン処理が有効であった。

次に、新規アジュバントを含むアジュバントのマウス免疫試験では、水酸化アルミニウムアジュバント30mg、HA抗原3mgのインフルエンザ全粒子ワ

クチン及びHAワクチンをコントロールとした。新規アジュバントは、季節性インフルエンザウイルスのスプリットHA抗原と共に免疫したときは、抗原量をコントロールの約10分の一から20分の一まで落としても、特異的なIgG抗体産生量、HI抗体価ならびに中和抗体価ともにコントロールとほぼ同等であった。しかし、新型インフルエンザウイルス株の抗原では、季節性インフルエンザウイルスと異なり、アルミアジュバントと比較しても同等以上の結果は得られなかった。

培養条件については、培養パラメーターである、温度、酸素濃度、二酸化炭素濃度、pH、回転数と、攪拌翼の形状、及び培養時に最も重要なパラメーターの一つであるK1a値の諸条件を検討した結果、200L培養規模においても50Lと同様のMDCK細胞の増殖を得ることが出来た。

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/1U 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。

デンカ生研

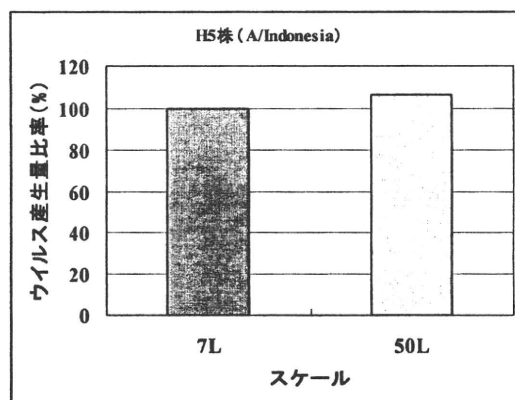
1. プロトタイプワクチンによる予備検討

1) MDCK細胞の無血清培養

7L培養槽で検討した播種細胞濃度、培養温度、溶存酸素、培養時pH、攪拌速度などのパラメーターに基づいて50L培養槽へとスケールアップし、培養を行った。50L培養槽での浮遊系MDCK細胞の細胞増殖は、7L培養槽と大差なかった。

2) ウイルス培養

インフルエンザウイルスIndo株でのウイルス産生を検討した。接種時細胞濃度、トリプシン濃度、接種ウイルス量 (MOI)、培養温度、培養時pH、培養時溶存酸素濃度 (DO)、攪拌回転数、培養日数などのパラメーターは季節性インフルエンザウイルス株で検討したものを参考に設定した。50L培養槽でのインフルエンザウイルスIndo株のウイルス産生は、7L培養槽のものとは大きな違いは見られなかった (図2)。



*7L実績値を100とした時の比率

図2. ウイルス培養 7L、50Lの比較

3) 精製工程

ウイルスを含む培養上清から全粒子ウイルスを分画した。不活化及びDNA分解処理によって不活化全粒子ウイルスを調製後、可溶化処理した。カラム等を駆使して可溶化液からHAを精製し、HAたん白質を主成分とするサブユニット抗原を得た(図3)。

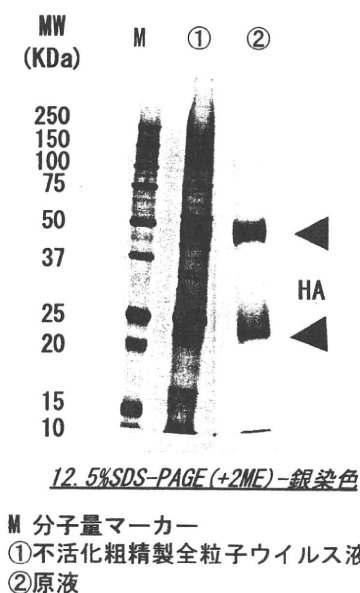


図3. サブユニットサンプル調製

4) 製剤化及び免疫原性の確認

プロトタイプワクチン、沈降全粒子ワクチンのいずれもマウスでの免疫原性が確認され、アルミアジュバントを含むサブユニット製剤はワクチンとしての可能性があると考えられた(図4)。

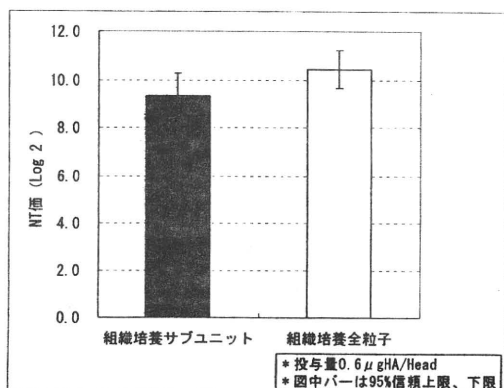


図4. プロトタイプワクチンの免疫原性

2. 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/ Oncogenicity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)。

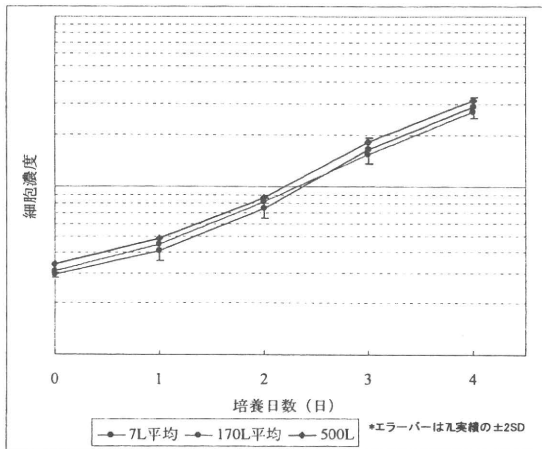
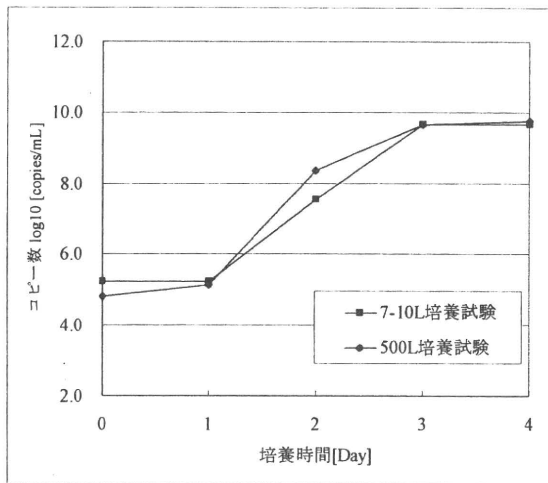


図5. 細胞培養 7, 170, 500Lの比較

③ウイルス培養のスケールアップ検討

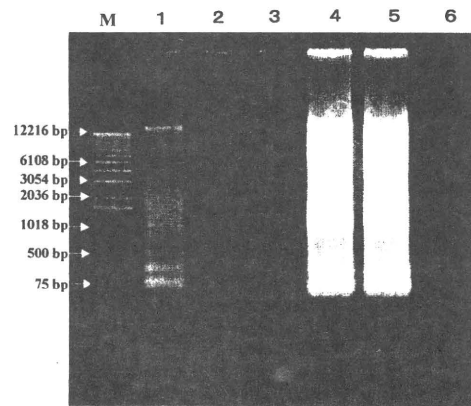
7L、50L培養槽で検討したパラメーターを参考に500L 培養槽でのインフルエンザウイルスIn do株のウイルス培養を行った。ウイルス産生は、7L培養槽と同様であった(図6)。



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)。



泳動条件: 100V 26min, 1% agarose gel, 1xTAE Buffer
 染色条件: SYBR Green (10000x), 15min
 1: 澄清ろ過液
 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吸着機構と製剤調製条件の検討

アルミアジュバントに対するたん白質の吸着には静電引力の寄与が示唆されたが、静電反発が起きる条件でも75%以上の吸着を確認した

(図8赤丸)。静電引力に加え、水素結合などの吸着因子が複合的に寄与していることが示唆された。

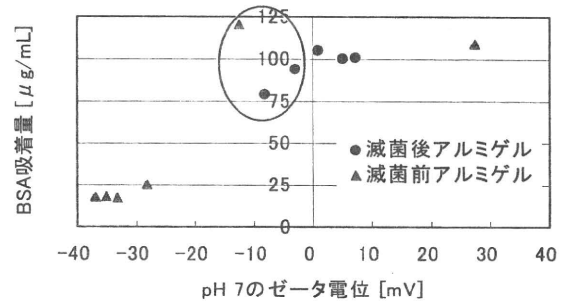


図8. pH 7のゼータ電位とBSA吸着量

上記で例示した吸着機構に関する種々の検討結果に基づき、吸着率が高い製剤を調製でき

る条件を確立した。

②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。

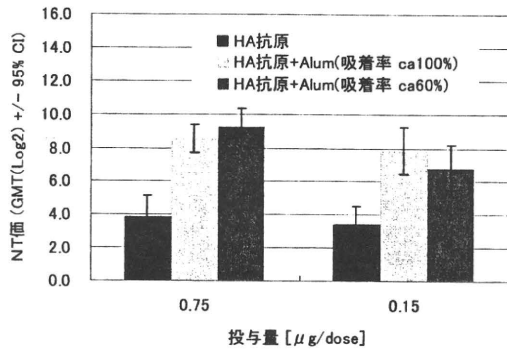


図9. 中和抗体価の比較

4) 製剤工程の稼働性能評価

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。

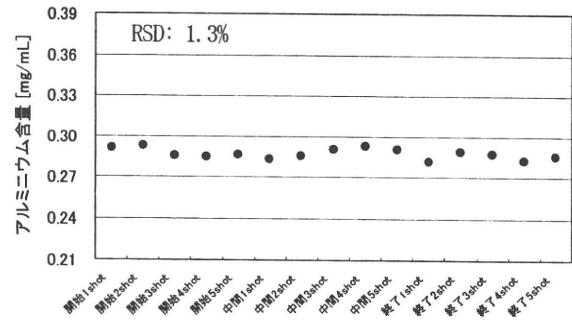


図10. 充填工程のアルミニウム含量推移

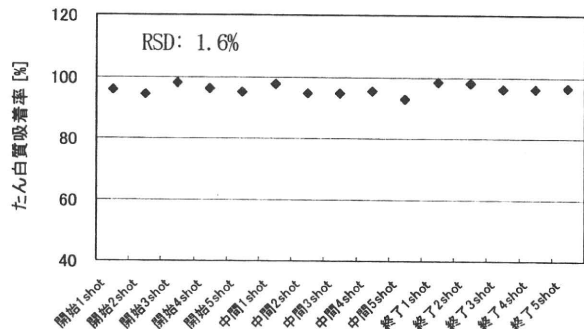


図11. 充填工程のたん白質吸着率推移

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 (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

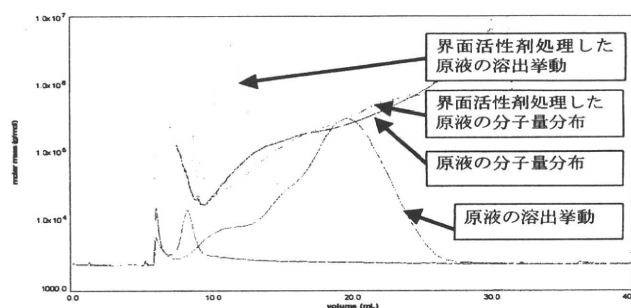


図12. 原液の凝集状態の解析

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HEPC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）。特性試験及び純度試験を行い、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) 第I相試験に向けたGMP製法の確立

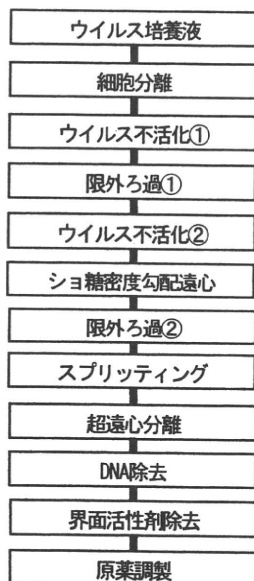
<培養>

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）の最適化、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、45Lファーメンター培養において事業化目標数値を上回る生産性を達成した。

<精製>

上記ウイルス培養液を出発材料として、以下に示す精製フローでテスト製造を行い、品質目標を

達成した。



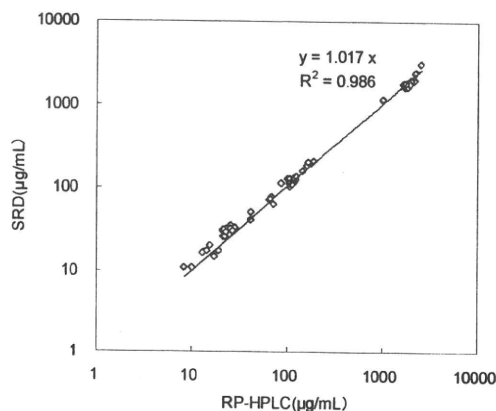
4) 処方・剤形検討

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。

5) 品質試験法・評価系の確立

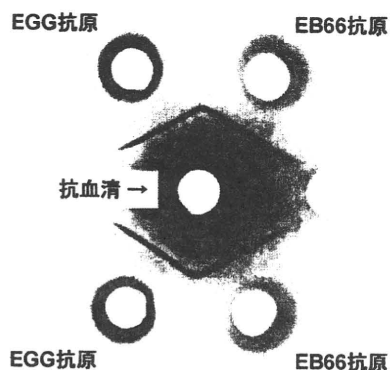
生物学的製剤基準、WHO、EMA及びFDA等の最新の海外のガイドライン、原液・製剤のロット分析及び安定性試験の結果に基づいて、原薬および製剤の規格試験項目を設定し、試験法を構築した。

規格試験以外の品質試験項目として、ELISA法による宿主由来たん白質含量定量法、PCR法による残存宿主DNAのサイズ測定法、逆相HPLC法によるHA含量定量法を構築した。逆相HPLC法によるHA含量試験は、現行法であるSRD法（一元放射免疫拡散試験法）より感度が高く（約2µg/mLまで定量可能）、SRD測定値との相関性も良好であることから、SRD法に替わるHA含量試験として引き続きデータ取得を行う予定である。



<SRD法と逆相HPLC法によるHA測定値の比較>

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>

6) 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>

試験項目	1 st バッチ	2 nd バッチ
HA含量* (μg/mL) …①	326.2	303.2
たん白質含量 (μg/mL) …②	417	395
HA含有率 (①/②)	0.78	0.77
DNA含量 (ng/dose)	<0.1	<0.1

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。

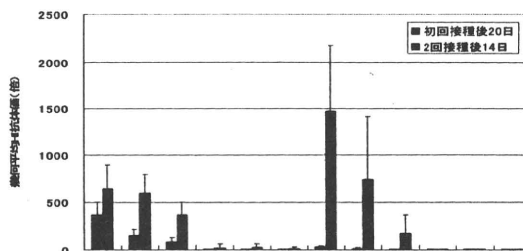
7) 非臨床試験 (効力を裏付ける試験、安全性薬理試験、毒性試験) の実施

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。

- 1薬効試験・・・マウス免疫原性試験
- 1薬理試験・・・安全性薬理試験 (心血管・呼吸系への影響)
- 1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>

8) 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)。

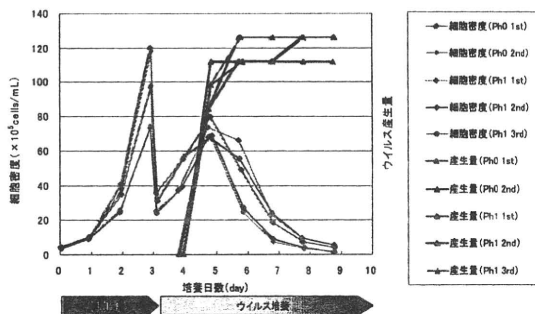
9) 分析法バリデーション

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。

10) 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スケールのファーマ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 バッチ	2 nd バッチ	3 rd 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

11) 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。

12) 治験相談・治験申請

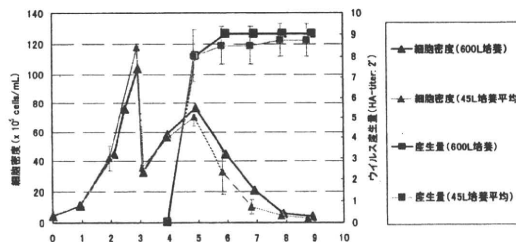
健康成人男性を対象とした第I相試験開始のために治験相談を行い、機構から特段の異論はなく、第I相試験の用量群設定が了承された。

13) 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。

14) 第II/III相試験に向けた製法改良及びスケールアップ

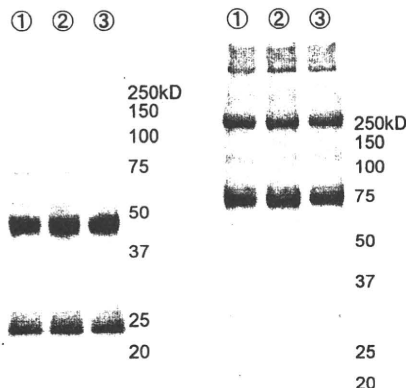
第II/III相試験薬製造および実生産に向けたスケールアップ検討として、45L培養スケールの10倍超となる既存600Lファーメンターを用いたウイルス培養、並びに同培養液を材料とした現行製法による精製評価を行った。その結果、培養に関しては、45Lスケールと同等の細胞増殖性とウイルス産生を達成し、精製収率および最終品質についてもスケールアップに伴う影響は認められなかった。以上の結果から、EB66細胞を用いた現在の培養方法は、実生産設備にも十分適用可能と考えている。



<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。

15) 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）。

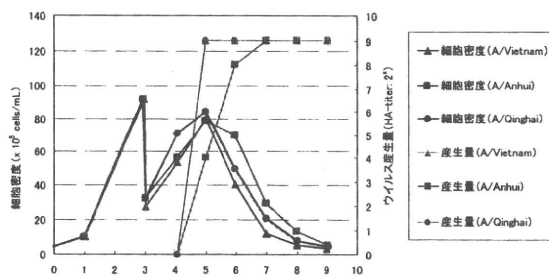
スケールアップ検討を目的とした実験用生産施設

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。

16) 他のパンデミック株での生産性評価

PR8をバックボーンとするH5N1株としてA/Vietnam、A/Anhui、A/Qinghaiの3株、並びにH1N1株(A/California/07/2009 NYMC) について生産用シードを調製し、ウイルス増殖試験を行った。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。



＜他のH5N1株の細胞増殖性とウイルス産生量＞

UMNファーマ

1. 発現細胞培養及び精製について

1.1. 製造工程の確立

A/Vietnam/1203/2004株、A/Indonesia/05/2005株及びA/California/04/2009株のrBV、宿主であるSF+細胞を用いて、複数の培養槽を用いて発現培養を行った。rBV播種後から48時間までは生細胞数の変化はほとんどなく推移し、48時間後から細胞回収時にかけて生細胞数は徐々に減少した(図1)。

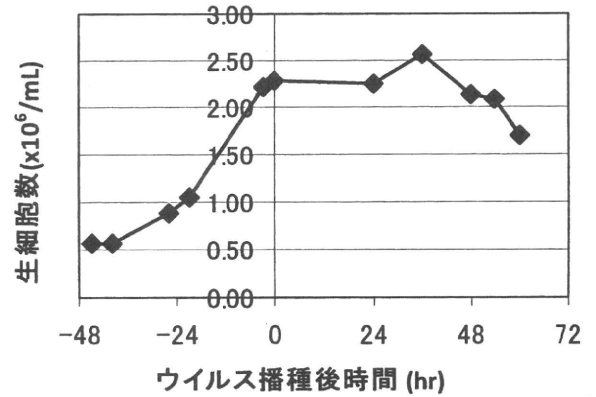


図1. ウイルス播種前後の生細胞数の変化

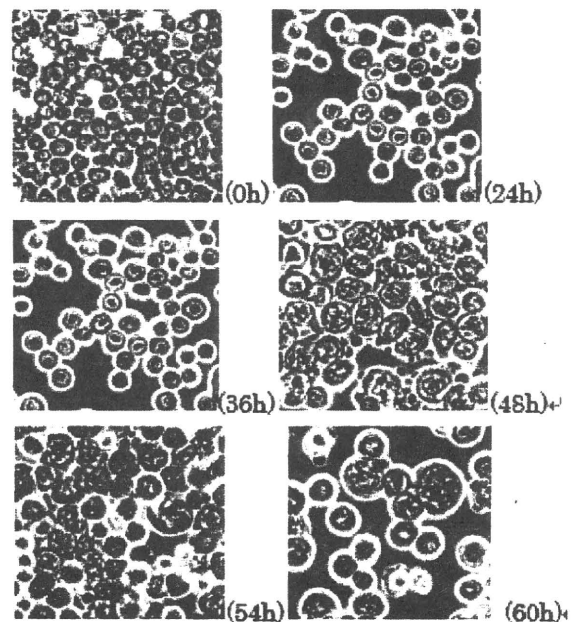


図2. 細胞形態の経時的変化

rHAを発現した細胞を遠心分離で回収し、界面活性剤で処理することにより、rHAを抽出、液層画分をカラムI及びIIで精製した。その後、DNA除去工程などを経ることで、インフルエンザワクチン原薬を製造した。精製工程及び原薬の分析はSDS-PAGE法やウエスタンブロット法によって実施した。本研究では10~100Lの培養槽を用いて70回以上の培養試験を実施し、上記3株のrHAワクチン原薬を製造した。特にパンデミックモックアップとして開発中のA/Vietnam/1203/2004株の製造が9割以上を占め、安定的な収量でワクチン原薬を製造することが可能となった。

1.2. 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3)、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。

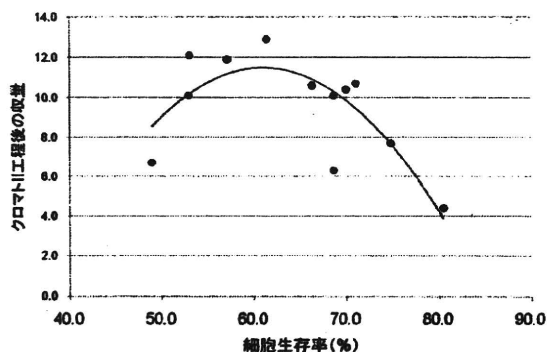


図3. 細胞回収時の細胞生存率と収量の関係

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。

1.3. 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4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。

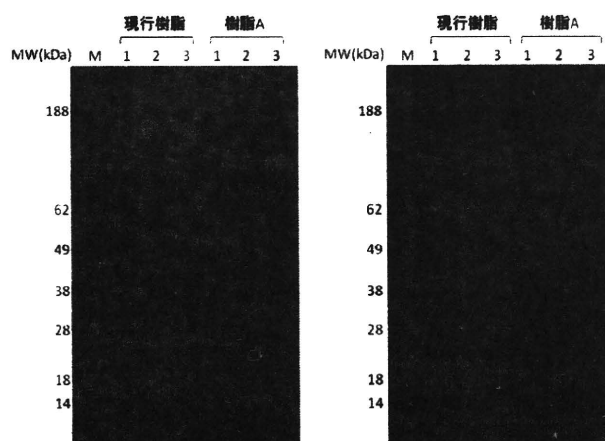


図4. 現行樹脂と樹脂Aの溶出画分の電気泳動像

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rHAの濃いバンドが認められる。

1.4. 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。

1.5. 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、ヤギ、ブタ、フェレットなどの複数の動物を免疫して得られた血清でSRD法を実施し、ヒツジ抗血清で良好な沈降輪を形成することを確認した。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 代替法の開発

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5)。

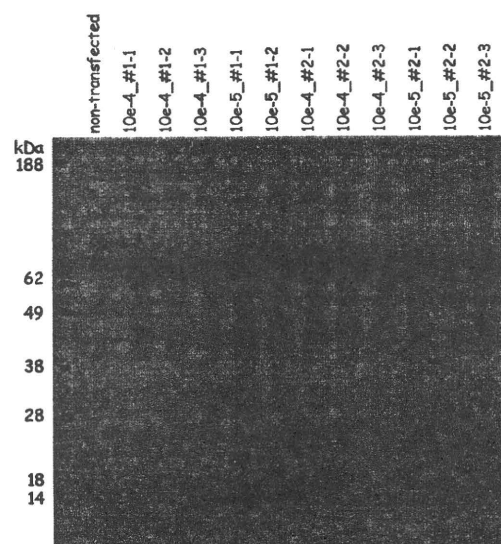


図5. プラークアッセイにより単離した11クローンのベトナム株rHAの発現確認

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/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