

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。

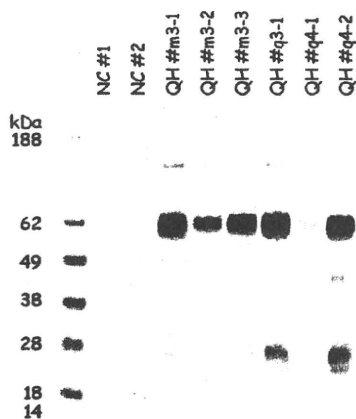


図6. プラーク純化により得られたクローンのQinghai株HA発現クローン

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7)。

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。

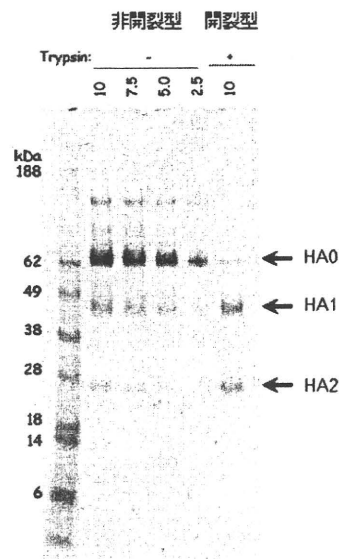


図7. トリプシン消化によるrHAの開裂

##### 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8)。

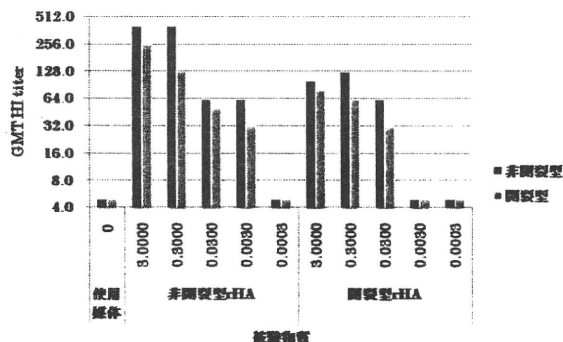


図8. 非開裂型および開裂型rHAのマウス免疫原性比較試験 各群HI抗体価の幾何平均値(GMT)を示した。

## 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9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。

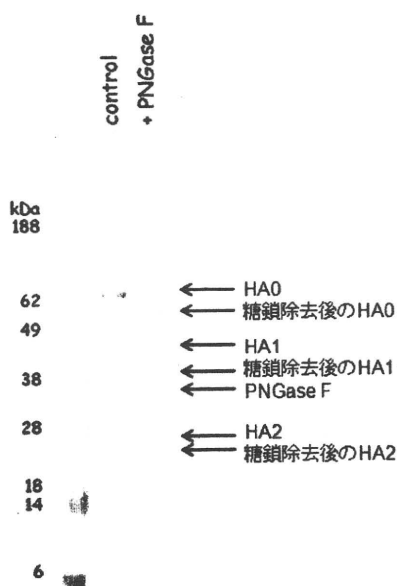


図9. PNGase F消化による糖鎖修飾の除去

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10）。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。

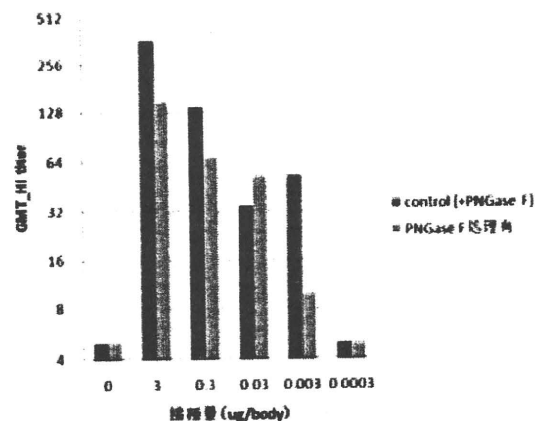


図10. 糖鎖修飾型および非修飾型 rHA のマウス免疫原性比較試験

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。これについては、達成することが出来たと考える。

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、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

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。しかしながら、現実的には、パンデミックが発生してから、馴化株を作製していたのでは、時間的に不利である。シードウイルスの選定については、今後も検討していく必要がある。

上述のように、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

これまでの研究結果と同様に、新型インフルエンザウイルスの培養には、MDCK細胞を基質としたパーフュージョン法での細胞培養法が応用できることが判明した。それは発育鶏卵培養法よりウイルスの増殖に優れていた。また、新規不活化剤及びホルマリン処理を併用することで、短期間でのウイルス不活化が可能となった。これは新型インフルエンザワクチンを早期にリリースするために重要なことと考える。次に、新規アジュバントは、季節性インフルエンザワクチンに極めて高い免疫賦活効果を示したが、新型インフルエンザウイルスNIBRG-14株ワクチンではアルミアジュバント以上の免疫賦活効果は得られなかった。新規アジュバントは、元々ある程度の免疫原性のある抗原には、きわめて有効であるが、免疫原性の弱い抗原にはあまり有効ではないことが考えられた。培養規模のスケールアップについては、検討条件の制御によって200L培養においてもMDCK細胞の増殖が

小スケールと同程度に可能であった。今後、更なるスケールアップにおいても、同様の項目を検討することで可能であると考ええる。

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。

培養工程は、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無血清培養産生方法が、インフルエンザウイルス(H5N1株)にも適用できることを確認した。また、50L、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。

精製工程は全粒子ウイルスの分画、不活化、DNA分解及び可溶化法を設定し、カラム等を駆使したHAたん白質の精製法を構築した。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。

製剤化工程は吸着機構に関する基礎検討結果から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。また充填工程では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になるが、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

SF+細胞を用いて発現培養を行い、得られた培養液からrHAの精製を行った。BEVSは再現性の高いrHA生産系であり、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100Lまでの

スケールでrHAたん白の原薬製造方法が確立できた。A/Vietnam/1203/2004以外の株についても製造法が設定できたことで、BEVSによるパンデミック時のワクチン製造への適応性の高さが示された。

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することで、より良い品質のワクチンを供給することが可能になると考えられる。HPLCを用いた純度検定は、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

性の高い定量法であることが示唆された。

## 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

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kawakami, C., Obuchi, M., Saikusa, M., Noguchi, Y., Ujike, M., Odagiri, T., Tashiro, M.: Outbreaks of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus in an elementary school and a family in Yokohama City, Japan during the 2007-2008 season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 83-86, 2009.
2. Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, N., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M.: Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) – inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* 199; 1629-1637, 2009
3. Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro, M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y.: Differences in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy by age. *Microbiol. Immunol.* 53: 83-88, 2009
4. Ikeno, D., Kimachi, K., Kudo, Y., Goto, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y.: The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous strains in a mouse model. *Vaccine* 27, 3121-3125, 2009.
5. Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Tashiro, M., Okada, H., Kato, K., Suzuki, Y.: Determination of N-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Open Glycoscience*, 2:28-36, 2009.
6. Ichinohe, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H.: PolyI:PolyC<sub>12</sub>U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 27; 6276-6279, 2009
7. Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J., Saito, T., Klimov, A., Macken, C., Zambon, M., Hayden, F.: Surveillance for neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007. *Antiviral Therapy* 14: 751-761, 2009
8. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group; Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M., Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R.: Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *J. Influenza. Resp. Viral Infect.* 3: 59-62, 2009.
9. Sriwilaijaroen, N., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., Ito, M., Ito, Y., Tashiro, M., Suzuki, Y.: Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology Journal*. 6:124, 2009
10. Bertozzi, S., Kelso, A., Tashiro, M., Savy, V., Farrar, J., Osterholm, M., Jameel, S., Muller, C. P.: Pandemic flu: from front lines. *Nature* 461; 20-21, 2009
11. Ichinohe, T., Aina, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H.,

- Sawa, H., Tamura, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J. Med. Virol.* 82: 128-137, 2010.
12. Barr, I. G., McCauley, J., Cox, N., Daniel, R., Engelhardt, O. G., Fukuda, K., Grohmann, G., Hay, A., Kelso, A., Klimov, A., Odagiri, T., Smith, D., Russell, C., Tashiro, M., Webby, R., Wood, J., Ye, Z., Zhang, W., Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009–2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: Basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 northern hemisphere season. *Vaccine* 28: 1156–1167, 2010.
  13. Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Aina, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T. First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 67-71, 2010.
  14. Matsuzaki, Y., Mizuta, K., Aoki, Y., Suto, A., Abiko, C., Sanjoh, K., Sugawara, K., Takashita, E., Itagaki, T., Katsushima, Y., Ujike, M., Obuchi, M., Odagiri, T., Tashiro, M. A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. *Virology J.* 7:53, 2010.
  15. Ichinohe, T., Aina, A., Ami, Y., Nagata, N., Iwata, N., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Odagiri, Tashiro, M., Takahashi, H., Strayer, D. R., Carter, W. A., Chiba, J., Tamura, S., Sata, T., Kurata, T., Hasegawa, H., Ichinohe, T. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J. Med. Virol.* Volume 82; 1754–1761, 2010.
  16. Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, J., Tashiro, M., Odagiri, T., The working group of influenza virus surveillance in Japan. Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses A(H1N1) during the 2007-2009 Influenza Seasons, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 16; 926-935, 2010.
  17. Oakley, A. J., Barrett, S., Peat, T.S., Newman, J., Victor A., Streltsov, V. A., Waddington, L., Saito, T., Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J. L. Structural and functional basis of resistance to neuraminidase Inhibitors of Influenza B viruses. *Med. Chem.* 2010. DOI: 10.1021/jm.100621s
  18. Kuroda, M., Katano, H., Nakajima, N., Tobiume, M., Aina, A., Sekizuka, T., Hasegawa, H., Tashiro, M., Sasaki, Y., Arakawa, Y., Hata, S., Watanabe, M., Sata, T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by *de novo* sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS ONE* 5(4): e10256, 2010. (doi:10.1371/journal.pone.0010256)
  19. Shiino, T., Okabe, N., Yasui, Y., Sunagawa, A., Ujike, M., Obuchi, M., Kishida, N., Xu, H., Takashita, E., Anraku, A., Ito, R., Doi, T., Ejima, M., Sugawara, H., Horikawa, H., Yamazaki, S., Kato, Y., Fujita, N., Odagiri, T., Tashiro, M., Watanabe, H. Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm viruses, May–September, 2009: Temporal and spatial spreading profile of viral isolates in Japan. *PLoS ONE* 5(6): e11057. doi:10.1371/journal.pone.0011057
  20. Ikeno, D., Kimachi, K., Kino, Y., Harada, S., Yoshida, K., Tochiwara, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Okada, K., Miyazaki, C., Ueda, K.

- Immunogenicity of an inactivated, adjuvanted whole-virion influenza A(H5N1,NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. *Microbiol. Immunol.* 54: 81-88, 2010
21. Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, H., Tashiro, M., Kageyama, T. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. *J. Med. Virol.* 83:10-15 2011
  22. Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Nakauchi, M., Obuchi, M., Ujike, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M. Establishment of a diagnostic system for the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in Japan using conventional and real-time RT-PCR assays. *Jpn. J. Infect. Dis.* (in press, 2011)
  23. Shindo, N., Brown, C., Ciancio, B., Cox, N., Daniel, R., Fasce, R., Fukuda, K., Hay, A., Hayden, F., Hungnes, O., Kelso, A., Klimov, A., Kramarz, P., Lina, B., Meijer, A., Nicoll, A., Phin, N., Opp, M., Schmaltz, C., Schweiger, B., Tashiro, M., Van der Sande, M., Van der Velden, K., Weber, T., Zambon, M., Public Health Implications of Oseltamivir Resistance: Emergence in Pre-pandemic Influenza A(H1N1) Viruses during the 2007 - 2009 Seasons. *Influenza and other respiratory viruses* *Resp. Viral. Infect.* (in press, 2011)
2. 学会発表
    1. 白倉雅之、信澤枝里、田代眞人：リバースジェネティクス(RG)法による新型インフルエンザワクチン製造株の作成 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
    2. 原田勇一、高橋仁、佐藤佳代子、信澤枝里、河野直子、板村繁之、田代眞人、奥野良信、佐々木学、庵原俊昭、小田切孝人：沈降H5N1インフルエンザワクチン接種者の野生型ウイルス株及び弱毒ワクチン株に対する抗体応答の評価 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
    3. 長谷川秀樹、相内章、永田典代、岩田奈緒子、網康至、小渕正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代眞人：新型インフルエンザH1N1のフェレットにおける病原性の検討 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
    4. 相内章、伊藤良、岸田典子、小渕正次、高下恵美、小田切孝人、千葉丈、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、田代眞人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンの新型インフルエンザウイルスに対する交叉防御能の検討 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
    5. 岸田典子、小渕正次、高下恵美、徐 紅、氏家誠、永田典代、岩田奈緒子、相内章、長谷川秀樹、田代眞人、齋藤玲子、鈴木宏、池松秀之、小田切孝人：季節性インフルエンザワクチンにより誘導される中和抗体の新型インフルエンザウイルスに対する交差反応性および新型インフルエンザウイルスの性状 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
    6. 影山努、中内美名、田代眞人：新型インフルエンザウイルス(H1N1)核酸検出法の構築 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
    7. 小渕正次、氏家誠、岸田典子、徐 紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、安樂茜、江島美穂、田代眞人、小田切孝人：2008/09シーズンの季節性インフルエンザウイルス流行株と平成21年度のワクチン株 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
    8. 氏家誠、島袋梢、安樂茜、江島美穂、小渕正次、岸田典子、徐 紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、田代眞人、堀川博司、加藤裕美子、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、小田切孝人：2008/09シーズンにおけるインフルエンザ(A/H1N1)オセルタミビル耐性株(H275Y\*)の国内発生状況 第57回日本ウイ



- |  |                 |
|--|-----------------|
| ルス学会学術集会、東京、2009年10月   | なし              |
| 9. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎：経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの剤形と効果検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月    | 2. 実用新案登録<br>なし |
| 10. 河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代真人：インフルエンザワクチンの力価測定に用いる一元放射免疫拡散(SRD)試験法の精度評価 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月                               | 3. その他<br>なし    |
| 11. 高橋仁、原田勇一、佐藤佳代子、河野直子、板村繁之、田代真人：インフルエンザワクチン力価測定に使用する標準抗原のHA含量決定に重要なHA含有率のエンドグリコシダーゼを用いた測定法の検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月  |                 |
| 12. 池野大介、来海和彦、工藤康博、後藤修朗、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎：マウスを用いたH5N1株インフルエンザワクチンのプライム-ブースト効果の検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月             |                 |
| 13. 原田勇一、河野直子、板村繁之、小田切孝人、城野洋一郎、五反田亨、多田善一、池田富夫、田代真人：沈降新型インフルエンザワクチン(H5N1株)接種者の血清ウイルス中和抗体の交差反応性の検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月 |                 |
| 14. 高橋宜聖、小野寺大志、阿戸学、小田切孝人、田代真人、小林和夫：ヒト血清移入マウスを用いたインフルエンザウイルス感染防御能の解析 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月                              |                 |

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

## 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）

### 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。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。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。

### 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っておくことは、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。

#### 6) HA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。

## 付録 1

各項目に関連する既存のガイドラインでの記載と、それらを踏まえた各項目についてのディスカッション

### 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

#### 【関連する既存のガイドライン等での規定】

CBER Guidance for Industryには以下の通りに記載されている。

P8: A description of the tumorigenic property of cells is required for all diploid and non-diploid cells, including continuous cell lines (21 CFR 610.18(c)(1)(ii)).

Because previous experience has consistently demonstrated the non-tumorigenic phenotype of the well-characterized diploid cell strains MRC-5, WI-38, and FRhL-2 (if they are not genetically or phenotypically modified), further tumorigenicity testing of banks consisting of these cell strains is not considered necessary to satisfy this requirement (please also see Section III.C.4). A description of the tumorigenic property is not required for primary primary cell cultures that are not subcultivated or that are subsequently subcultivated for only a very limited number of population doublings (21CFR 610.18(c)(3)).

P13: Under 21 CFR 610.18(c)(1)(ii), you must describe cell lines with respect to tumorigenicity. Cell lines could acquire tumorigenic properties with increasing passage levels. It is therefore important that you limit the passage level of the cells used in production and that you characterize cells at or beyond this end-of-production limit. The maximum end-of-production passage level should be based on data derived from production cells expanded under comparable or analogous conditions to the production conditions. Cells from either the MCB or the WCB may be expanded for this evaluation. Tumorigenicity testing should be performed at or beyond this level.

P33: Tumorigenicity is defined as the process by which cells form tumors when inoculated into animals (generally a syngeneic, an immunosuppressed allogeneic or an immunosuppressed xenogeneic host) (see Section V. Glossary). Tumorigenicity is a characteristic of the immortalized cells themselves, rather than of the agents or components present in them. We recommend you contact CBER for advice as to the need for tumorigenicity testing.

Tumorigenic cells have not traditionally been used for the production of prophylactic viral vaccines, primarily because of theoretical concerns that components within tumorigenic cells could induce tumors in vaccine recipients. These concerns include the potential presence of exogenous agents, such as oncogenic viruses, and the potential risk from endogenous materials, such as endogenous viruses or oncogenic nucleic acids. In addition, intact human cells derived from human tumors have been shown to form tumors in allogeneic humans.

The goal in tumorigenicity testing is to determine whether your cell substrate is capable of forming tumors after inoculation into animals. The TPD50 (tumor-producing dose in 50% of animals) and capacity to form metastases are characteristic properties of a cell line, and these characteristics might be used to further define the tumorigenic phenotype of a cell line. Considerations associated with tumorigenicity testing include: 1) choice of appropriate animal models; 2) definition of a positive result; 3) determination of the appropriate duration of testing; 4) determination of appropriate numbers of cells to be tested; and 5) selection of appropriate controls.

P34: You should use an animal model that is known to be susceptible to tumor formation by tumorigenic cells. Because immunocompromised adult and newborn rodents are relatively sensitive for revealing a tumorigenic

phenotype, you should consider these animal models. Thus, the most commonly used animals for tumorigenicity testing are nude (nu/nu) mice because they are T-cell deficient. Newborn nude mice appear to be more susceptible to tumor formation than adult nude mice (Ref. 24), suggesting that newborn nude mice might be the best choice to use when identification of a weakly tumorigenic phenotype is important. You might choose to use another animal model if it has been shown to have comparable sensitivity to the nude mouse model.

Regardless of the test system you use, the animals should be observed and palpated at regular and frequent intervals for the formation of nodules at the site of injection. Any nodules formed should be measured in two dimensions. We consider progressive tumor formation at the site of injection a positive result. Some cell types might cause tumors at distant sites as well (Ref. 24), and these also should be reported. Animals with nodules that begin to regress during the period of observation should not be sacrificed, as nodules that spontaneously regress do not represent progressively growing tumors and are not indicative of a tumorigenic phenotype. You may euthanize any animals with tumors before the end of the study if the tumor interferes with the comfort of the animal. Intercurrent infections, including subclinical infections, have the potential to alter the incidence of tumors, affecting the quality of the data and interfering with the purpose of the study (Ref. 25).

You should perform a necropsy on each animal when it dies, when it is euthanized, or at the end of the observation period. The necropsy should include examination for gross evidence of tumor formation at the site of inoculation and in all major organ systems such as lymph nodes, lungs, brain, spleen, kidneys, and liver. All lesions, detectable regional lymph nodes, the site of inoculation, and the lungs are to be examined histologically. In some cases (for example, tumors distant from the site of inoculation), it might be necessary for you to use molecular or immunological methods to distinguish cell-substrate-related from spontaneous tumors.

The inoculum per animal should consist of  $10^7$  test cells or positive control tumor cells suspended in 0.2 mL (0.1 mL for newborn animals) volume of serum-free medium administered by the subcutaneous route. You should inoculate at least ten animals, each with  $10^7$  test cells that are at or beyond the end-of-production passage level and at least ten animals with your positive control tumor cells. At least 9 out of 10 animals injected with positive control cells (e.g., HeLa cells or other cells with comparable tumorigenicity) should show progressively growing tumors in order for your test to be valid.

Selection of the appropriate duration of testing requires that you balance the increased sensitivity that might be obtained using a longer test, against the likelihood of false-positive results due to spontaneous tumor formation. Weakly tumorigenic cells might require between 4 and 7 months to form tumors in nude mice. Thus, extended observation periods might be necessary in some cases. CBER can provide you with further information on tumorigenicity testing and the appropriate observation periods.

P35: Oncogenicity testing (see Section V. Glossary) is designed to assure that agents that could immortalize cells and endow them with the capacity to form tumors are not present in a cell substrate. If your vaccine is manufactured in a cell substrate that was derived from a tumor, or that has a tumorigenic phenotype through an unknown mechanism, it might carry a higher theoretical risk of containing oncogenic substances.

If the presence of an oncogenic virus is suspected because of the cell phenotype or the origin of your cell substrate, we recommend that you perform oncogenicity testing in animals using lysates of the cell substrate. For cell substrates with a tumorigenic phenotype, we recommend that you perform oncogenicity testing in animals using DNA from the cell substrate in order to provide assurance that residual DNA is non-oncogenic (also see Section III.C.6).

P37: The risks of oncogenicity and infectivity of your cell-substrate DNA can be lessened by decreasing its biological activity. This can be accomplished by decreasing the amount of residual DNA and reducing the size of the DNA (e.g., by DNase treatment or other methods) to below the size of a functional gene (based on current evidence, approximately 200 base pairs). Chemical inactivation can decrease both the size and biological activity of DNA. If DNA removal, digestion, or inactivation is undertaken, you should validate your methods.

P46: Table 1 Example of a Biosafety Testing Scheme for Manufacture of a Viral Vaccine.

要点は、「特性がよく把握されている二倍体細胞（遺伝的および形質的に修飾されていない

MRC-5, WI-38, FRhL-2）や過継代を行わない初代培養細胞を除き、どの細胞においても造腫瘍性については記述が必要」「造腫瘍性試験に関連する考慮点としては以下のものがある。（1）適切な動物モデルの選択（2）結果が陽性であることの定義（3）適切な試験期間の決定（4）適切な細胞数の決定（5）適切なコントロールの選択」「造腫瘍性試験で最も一般的に使用されるのはヌードマウスである」「動物一匹当りの接種細胞数は $10^7$ 個で、少なくとも10匹に接種する必要がある。」「造腫瘍性試験は、EOPC(End-of-Production-Cell)で行う」「がんウイルスの存在が疑われる場合はライセートによるがん原性試験を行うのが良い。造腫瘍性が認められる場合は細胞のDNAによるがん原性試験を行うのが良い」「残存する細胞DNAの量を減らすこと、及びサイズを小さくする（200 bp以下）ことによって、がん原性を減少させることが出来る。」「（Table 1より）造腫瘍性試験・がん原性試験はEOPCに対して行う」である。

WHO TRS 878には以下の通りに記載されている。

P34: Continuous cell lines may have biochemical, biological and genetic characteristics that differ from primary or diploid cells. In particular, they may produce transforming proteins and may contain potentially oncogenic DNA.

P34: Procedures that extensively degrade or denature DNA might be appropriate for some products.

P35: The data required for the characterization of any continuous cell line to be used for the production of biologicals include: a history of the cell line and a detailed description of the production of the cell banks, including methods and reagents used during culture, in vitro culture age, and storage condition; the results of tests for infectious agents; distinguishing features of the cells, such as biochemical, immunological or cytogenetic patterns which allow them to be clearly distinguished from other cell lines; and the results of tests for tumorigenicity, including data from the scientific literature.

P26: The current state of knowledge suggests that continuous-cell-line DNA can be considered as a cellular contaminant, rather than as a significant risk factor requiring removal to extremely low levels. On the basis of this reassessment, the Expert Committee concluded that levels of up to 10 ng per purified dose can now be considered acceptable.

P27: The new upper limit of 10 ng of residual DNA per dose does not apply to products derived from microbial, diploid or primary-cell-culture system.

要点は、「transforming proteinとoncogenic DNA に配慮すべき」「精製過程にDNA除去工程を入れるのが適切」「生物薬剤生産用に使用される不死化細胞については、求められるデータの中に造腫瘍性試験の結果が含まれる」「DNA量は10ng/doseまで許容できる」「10ng/doseまでという上限は、微生物や二倍体又は初代培養細胞からの産物には適用されない」である。がん原性試験については特に記載はない。

WHO/BS/10.2132 (draft)では、造腫瘍性試験の要否について以下のとおり記載している。

P42: A new diploid cell line (*i.e.*, other than WI-38, MRC-5, and FRhL-2) should be tested for tumourigenicity as part of the characterization of the cell line, but should not be required on a routine basis.

The tumourigenicity tests currently available are in mammalian species whose body temperatures and other physiologic factors are different from those of avian and insect species. Therefore, when the test is performed on avian or insect cells, the validity of the data is open to question unless a tumourigenic cell line of the species being tested is included as a positive control. The NRA/NCL may accept the results of an *in vitro* test such as growth in soft agar as a substitute for the *in vivo* test for avian and insect cell lines. However, as mentioned above, correlations of *in vitro* tests with *in vivo* tests are imperfect. This should be discussed with the NRA/NCL.

Many CCLs (e.g., BHK-21, CHO, HeLa) are classified as tumourigenic because they possess the capacity to form tumors in immunosuppressed animals such as rodents. Some CCLs become tumourigenic at high PDLs (e.g., Vero), even though they do not possess this capacity at lower PDLs at which vaccine manufacture occurs. A critical feature regarding the pluripotency of embryonic SCLs, even though they display a diploid karyotype, is that they form tumours in immunocompromised mice.

The expression of a tumourigenic phenotype can be quite variable from one CCL to another, and even within different sub-lines of the same CCL. This range of variability, from non-tumourigenic, to weakly tumourigenic, to highly tumourigenic, has been viewed by some as indicating different degrees of risk when they are used as substrates for the manufacture of biological products [10,11].

If the CCL has already been demonstrated to be tumourigenic (e.g., BHK-21, CHO, HEK293, CI27), or if the class of cells to which it belongs is tumourigenic (e.g., hybridomas, SCLs), it may not be necessary to perform additional tumourigenicity tests on cells used for the manufacture of therapeutic products. Such cell lines may be used as cell substrates for the production of biological products if the NRA/NCL has determined, based on characterization data as well as manufacturing data, that issues of purity, safety, and consistency have been addressed. A new cell line (DCL, SCL, or CCL) should be presumed to be tumourigenic unless data demonstrate that it is not. If a manufacturer proposes to characterize the cell line as non-tumourigenic, the following tests should be undertaken.

要点は「新規の二倍体細胞の造腫瘍性については細胞特性評価の一環として試験されることが望ましい。」「造腫瘍性が明らかになっている細胞については、さらに造腫瘍性を試験する必要はなく、製造過程や細胞の特性試験で得た精製度、安全性、再現性に言及したデータに基づき治療用製剤の製造に供することも可能。」「新規の細胞株については、造腫瘍性を否定するデータが示されない限り、造腫瘍性があるものと見なされる。」

がん原性については、以下のように記載される。

P48: Oncogenic activity from cell substrates could be due to either the cell substrate DNA (and perhaps other cellular components) or an oncogenic agent present in the cells. Although there might be a perception that the cellular DNA from highly tumourigenic cells would have more oncogenic activity than the DNA of weakly or nontumourigenic cells, at this time, it is not known if there is a relationship between the tumourigenicity of a cell and the oncogenicity of its DNA. Nevertheless, the NRA/NCL might require oncogenicity testing of the DNA and cell lysate from a new cell line (*i.e.*, other than those such as CHO, NSO, Sp2/0, and low passage Vero, for which there is considerable experience) that is tumourigenic in animal model systems (see below) because of the perception that a vaccine manufactured in such a cell line poses a neoplastic risk to vaccine recipients.

要点は「細胞の造腫瘍性とその細胞由来のDNAその他成分によるがん原性の関連性は明らかとはいえない

いが、別に記載する動物モデルで造腫瘍性を示す細胞株については、その細胞で製造されたワクチン被接種者のリスクを鑑みた場合に、がん原性評価が求められるであろう。」

WHO/BS/10.2132 (draft)には、造腫瘍性とがん原性を評価するための動物実験用モデルプロトコルとして Appendix 3 (造腫瘍性) と Appendix 4 (がん原性) が添付されており、推奨される供試動物や接種細胞数、経過観察期間および評価法についての記載がある。

さらにWHO/BS/10.2132 (draft)のGeneral consideration中には細胞由来miRNAのがん原性について言及した記述がある。

While protein-coding RNA has not been considered to be a risk factor for biological products due to the unstable nature of RNA and the lack of mechanisms for self-replication, the recent description of small non-coding RNA molecules – microRNA (miRNA) – that are more stable and have the capacity to modulate gene expression might necessitate a reassessment. Whether these miRNA molecules can be taken up by cells *in vivo* is unknown. However, as stated above, because certain miRNA genes can be oncogenic, DNA containing such sequences may need to be considered along with oncogenes when assessing the risk of rcDNA (see B.9 Oncogenicity). However, because this is an evolving area of research, no conclusions can be made regarding the risk of miRNA, and no recommendations are made to control miRNA.

EMA/CHMP/BWP/68803/2010 (draft)には細胞基材の造腫瘍性に関して次の記述がある。

P4: Tumourigenicity testing would not be required for cell lines for which relevant information is available such as MDCK, Vero, PerC.6 or for primary cells of chick origin.

「MDCK, Vero, Per.C6, ニワトリ由来初代培養細胞など有用な情報が存在している細胞株については、造腫瘍性試験を行わないことも可能。」

次に参考としてICH Q5Dから引用したい。ワクチンは通常、高純度精製品ではないことが多いが、抗原をリコンビナント蛋白質として発現させ、高純度精製品として作製される場合も考えられる。

ICH Q5Dには以下の通りに記載されている。

P12: 目的タンパク質が高純度に精製されており、かつ細胞を含まない場合、工程バリデーション又は規格試験のいずれかで、宿主細胞に由来する残存DNAが一貫して適正限度内であることが明らかにされていれば、通常、核型分析や造腫瘍性試験を実施する必要はないと考えられる。

製品中に生細胞の残存が否定できない場合、又は培養後に精製操作をほとんど行わない（例えば、従来の生ウイルスワクチン）場合には、通常、細胞基材について、核型分析や造腫瘍性試験を行う必要がある。精製操作をほとんど行わない医薬品の製造に用いられる新規細胞基材についての造腫瘍性試験や染色体解析の有用性は、ケースバイケースで評価すべきである。

次に参考としてICH S6から引用したい。ICH S6の適応対象には従来のウイルスワクチンは含まれない（組換えDNA由来の蛋白質ワクチンは含まれる）とされているが、参考になる視点が含まれている。

ICH S6には以下の通りに記載されている。

P9: バイオ医薬品においては、標準的ながん原性試験は一般的に不適當である。しかし、バイオ医薬品の



臨床での投与期間、患者群、その生物学的活性（例えば、増殖因子、免疫抑制剤等）によっては個別にがん原性の評価を行う必要がありうる。更に、がん原性に対する懸念がある場合は、リスク評価のために種々の試験方法を検討することとなる。

ICH S1Aには以下の通りに記載されている。

P1: 臨床での使用が少なくとも6カ月以上継続されるような医薬品においてはがん原性試験が実施されるべきである。ある種の化合物では6カ月を越えて連続的に用いられることはないかも知れないが、間欠的な方法で繰り返し用いられることがある。特に非連続的な処置の場合のがん原性の可能性に関しては、それが頻繁に用いられる場合、臨床的な処置期間をどのくらいとみなし、科学的に正当化することは困難なことが多い。慢性あるいは再発性の病態の治療において、間欠的な方法で頻繁に用いられる医薬品についてはがん原性試験が一般に必要となる。

製剤中に存在し得る細胞由来成分以外のがん原性物質として、WHO TRS927に次の記載がある。

P51: Carcinogenicity studies are not required for vaccine antigens. However, they may be required for particular vaccine components such as novel adjuvants and additives.

要点は、「ワクチン抗原については、がん原性試験は必要でない。しかし新規アジュバントや新規添加物などの特定のワクチン構成物についてはがん原性試験が必要になるであろう。」である。

#### 【ディスカッション】

ICH Q5Dには「高純度に精製されているタンパク製剤の場合かつ細胞を含まない場合、宿主細胞に由来する残存DNAが一貫して適正限度内であることが明らかにされていれば、通常、核型分析や造腫瘍性試験を実施する必要はないと考えられる」（ただし高純度に精製されており、かつ細胞を含まない場合という前提がつく）とあり、WHO TRS 927には「製剤中のワクチン抗原については、がん原性試験は必要でない」とある。これらは、「一定の条件を満たしている場合、造腫瘍性試験やがん原性試験は省略可能」という立場である。

WHO TRS 878は「細胞については造腫瘍性試験を行う必要がある」としているが、がん原性試験については特に記載はない。

一方、CBER Guidance for Industryには「特性がよく把握されている二倍体細胞（遺伝的および形質的に修飾されていないMRC-5, WI-38, FRhL-2）や過継代を行わない初代培養細胞を除き、どの細胞においても造腫瘍性については記述が必要」（ただし、「記述が必要」ということは、必ずしも「試験の実施が必要」ということを意味しないことに留意）「造腫瘍性試験に関連する考慮点としては以下のものがある。（1）適切な動物モデルの選択（2）結果が陽性であることの定義（3）適切な試験期間の決定（4）適切な細胞数の決定（5）適切なコントロールの選択」「造腫瘍性試験で最も一般的に使用されるのはヌードマウスである」「動物一匹当りの接種細胞数は $10^7$ 個で、少なくとも10匹に接種する必要がある。」「造腫瘍性試験は、EOPC(End-of-Production-Cell)で行う」「がんウイルスの存在が疑われる場合はライセートによるがん原性試験を行うのが良い。造腫瘍性が認められる場合は細胞のDNAによるがん原性試験を行うのが良い」「残存する細胞DNAの量を減らすこと、及びサイズを小さくする（200 bp以下）ことによって、がん原性を減少させることが出来る。」「（Table 1より）造腫瘍性試験・がん原性試験はEOPCに対して行う」とあり、「造腫瘍性について記述することは必須で、造腫瘍性が陽性の場合にはがん原性試験も必須」という立場である。

またWHO/BS/10.2132 (draft)においては、新規の細胞基材については、造腫瘍性試験、がん原性試験の実施を推奨している。将来においては、細胞由来miRNAあるいはその相同配列をコードしているDNA断片の残存にも留意すべき可能性を示唆しているが、現時点では、これらの検証の可否については保留している。

ワクチンの製造過程で、生きた製造用細胞は完全に除去できる（ただし、このことを担保する検証結果や、実際の工程中において除去できていることの確認も必要と思われる）ことから、問題になるのは造腫瘍性よりもがん原性であろう。残存DNAの長さや量を減少させることで、がん原性を減少させることは確かにできると思われるが、安全性の観点から造腫瘍性試験とがん原性試験は行うべきであるとのディスカッションが研究班内でなされた。

また、ICH S6には「バイオ医薬品においては、標準的ながん原性試験は一般的に不適當である。しかし、バイオ医薬品の臨床での投与期間、患者群、その生物学的活性（例えば、増殖因子、免疫抑制剤等）によっては個別にがん原性の評価を行う必要がありうる。更に、がん原性に対する懸念がある場合は、リスク評価のために種々の試験方法を検討することとなる」とあり、ICH S1Aには「慢性あるいは再発性の病態の治療において、間欠的な方法で頻繁に用いられる医薬品についてはがん原性試験が一般に必要となる」とある。将来、細胞培養法によって季節性インフルエンザワクチンが製造されることも視野に入れるとすれば、一生の間にはある程度の回数を打つことになるので、安全性についてもその分の配慮が必要と思われる。

以上を踏まえて、研究班としては以下のように考える。

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。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に対して行い、がん原性試験はEOPC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

### 【関連する既存のガイドライン等での規定】

ICH Q5Dには腫瘍原性の視点からの記述はあるが、他の視点からの記載はない。

次に参考としてICH Q6Bから引用したい。ICH Q6Bは従来型ワクチンを適応対象としていないが、参考となる視点が含まれている。

ICH Q6Bには以下の通りに記載されている。

P9: 目的物質及び複数の目的物質関連物質から構成される原薬及び製剤の純度面からみた評価に加えて、含有する可能性のある不純物に関しても評価を行う必要がある。不純物として想定されるものには、製造工程に由来するものもあれば目的物質に由来するものもある。これら不純物には、構造が明らかでできるもの、部分的に特性解析できるもの、同定できないものなどがある。不純物がそれなりの量、生成

する場合、可能な範囲でそれらの特性解析を行う必要がある。できれば、生物活性についても評価する必要がある。

P22: 6.2.1 製造工程由来不純物及び混入汚染物質製造工程に由来する不純物（2.1.4項参照）は、細胞基材に由来するもの、細胞培養液に由来するもの、及び細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するものの3つの範疇に大別される。

a) 細胞基材に由来する不純物には、例えば、宿主細胞由来タンパク質、核酸（宿主ゲノム由来、ベクター由来、総DNA）などがある。宿主細胞由来タンパク質に対しては、広範なタンパク質性不純物を検出することができる高感度な分析法、例えばイムノアッセイが一般に用いられる。イムノアッセイの場合、試験に用いるポリクローナル抗体は、産生細胞から目的物質をコードする遺伝子を除いた細胞から調製した標品、細胞融合の相手となる細胞から調製した標品、又は他の適当な細胞株から調製した標品などを免疫することにより得られる。宿主細胞由来のDNAは、（ハイブリダイゼーション法などにより）製品を直接測定することにより検出される。実験室スケールでの添加回収実験などによる不純物クリアランス試験は、核酸や宿主細胞由来タンパク質のような細胞基材に由来する不純物が除去されていることを示すためのものであるが、クリアランス試験をこれらの不純物について規格値を設定しない根拠にできることもある。

要点は、「不純物がそれなりの量、生成する場合には、可能な範囲でそれらの特性解析を行う必要がある。できれば、生物活性についても評価する必要がある」「製造工程由来不純物として宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来DNAなどの細胞基材に由来する不純物がある。タンパク質性不純物の検出には、細胞を免疫して得られたポリクローナル抗体によるイムノアッセイが用いられる。不純物クリアランス試験によって、不純物の除去が適切に実証されている場合、不純物について規格値を設定しない根拠に出来ることもある」である。

次に参考としてICH S6から引用したい。ICH S6の適応対象には従来のウイルスワクチンは含まれない（組換えDNA 由来の蛋白質ワクチンは含まれる）とされているが、参考になる視点が含まれている。

ICH S6には以下の通りに記載されている。

P4: バイオ医薬品には、細菌、酵母、昆虫、植物及び哺乳動物細胞由来の宿主細胞成分の混入に起因するリスクが伴う可能性がある。このような宿主細胞成分の混入によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起される可能性がある。核酸の混入に起因する有害作用は理論上ありうることであり、宿主のゲノムに組み込まれる可能性もある。昆虫、植物及び哺乳動物細胞、又はトランスジェニック植物及びトランスジェニック動物由来の医薬品の場合にはさらにウイルス感染の危険性もある。

要点は、「宿主細胞成分の混入によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起される可能性がある」「核酸や感染性因子混入の問題もある」である。

WHO TRS 927 には以下の通りに記載されている。

P33: Potential safety concerns for a vaccine product include those due to inherent toxicities of the product, toxicities of impurities and contaminants, and toxicities due to interactions of the vaccine components present in the vaccine formulation.

P48: In certain cases, the results from evaluations of immune response from nonclinical and clinical studies, or from data on natural disease, may indicate immunological aspects of toxicity, e.g. precipitation of immune complexes,

humoral or cell-mediated immune response against antigenic determinants of the host itself as a consequence of molecular mimicry or exacerbation of the disease (e.g. inactivated measles vaccine). In such cases, additional studies to investigate the mechanism of the effect observed might be necessary.

Great similarity of vaccine determinants and host molecules could cause autoimmune reactions induced by molecular mimicry (26). Therefore, any vaccine antigen whose characteristics might mimic those of a host antigen should be treated with caution, even though it is recognized that molecular mimicry does not necessarily predispose to autoimmunity.

Because considerable efforts may be required in selecting and developing relevant animal models to address the above issues, caution should be exercised and a strong rationale provided when developing vaccines for diseases associated with autoimmune pathology.

If data suggest that the pathogen against which the vaccine is directed may cause autoimmune pathology, studies may be needed to address this concern on a case-by-case basis, if an appropriate animal model exists.

It should be noted that observations of biological markers for autoimmune reactions are not necessarily linked to pathogenic consequences. For instance, the presence of autoimmune antibodies does not necessarily indicate the induction of autoimmune disease (25).

When hypersensitivity reactions induced by the antigen(s), adjuvants, excipients or preservatives are of concern, additional investigations may be warranted.

要点は、「ワクチンそのものや不純物、混入物による毒性の発現、およびワクチンを構成する要素の相互作用による毒性の発現が、安全上の問題点としてある」「非臨床試験や臨床試験等の結果から免疫に関連する毒性（例えば免疫複合体の沈降、分子類似性による自己抗原との液性・細胞性免疫反応、または病気の悪化）が現れる場合がある」「抗原、アジュバント、添加物や防腐剤による過敏反応に懸念がある場合は、更なる調査が必要となるであろう」である。

WHO TRS 878には細胞溶解物（ライセート・DNA）の安全性についてがん原性の視点からの記述はあるが、他の視点、例えばアレルギーからの視点については記載がない。

CBER Guidance for Industryには細胞特性や迷入病原体の試験に加えて、他の試験項目について以下のとおり記載がある。

#### P36: 1. Testing for the Presence of Residual Cells

You should assure that your final vaccine product does not contain residual cells. Processes, such as filtration, should be implemented and validated to ensure that intact cells are not present in the final product. Validation that residual cell removal processes are robust is important for immortalized cells. Determining the extent to which intact cells (or other materials known to be smaller than intact cells) are cleared by these processes is an important part of this validation.

#### 2. Testing for Residual Cellular DNA

Residual DNA might be a risk to your final product because of oncogenic and/or infectivity potential. There are several potential mechanisms by which residual DNA could be oncogenic, including the integration and expression of encoded oncogenes or insertional mutagenesis following DNA integration. Residual DNA also might be capable of transmitting viral infections if retroviral proviruses, integrated copies of DNA viruses, or extrachromosomal genomes are present.