

クチンウイルスを不活化する工程では、存在しうる全ての迷入病原体を不活化することができない可能性がある。したがって、他のモデルウイルスを使って不活化工程の評価を行うべきである」とある。非特異的モデルウイルスの選定に関しては、複数ウイルス種を用いた広範な検討が必要であるが、非エンベロープ型ウイルスは不活化工程に対する抵抗性が高いことから、これを非特異的モデルウイルスに含めてウイルスクリアランスに関する評価を行うことは妥当であると研究班としても考える。

また、WHO TRS 878, WHO/BS/10.2132には「細胞株が由来する動物種に感染するウイルスについては特に配慮が必要である」とあり、CBER Guidance for Industryには「迷入病原体が存在しないことを確認するための方法を選択する際、細胞の由来、ウイルスシードの由来、材料の由来を考慮すべきである」とある。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。

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

【関連する既存のガイドライン等での規定】

EMA/CPMP/VEG/4717/03-Rev.1(draft)には以下のように記載されている。

P6: The haemagglutinin and neuraminidase antigens of each seed lot are identified as originating from the correct strain of influenza by suitable methods. Usually, specific antisera obtained from a WHO Collaborating Centre for Influenza are used for determination of HA and NA identity. It is possible that reagents may not be available for the chosen mock-up vaccine, so alternative tests to identify the seed virus (e.g. PCR) should be developed for the mock-up vaccine.

(Core pandemic dossierの項にある、Vaccine seed lotsの項から引用)

P7: Normally, influenza vaccine HA content is measured by the immunochemical single radial immunodiffusion (SRD) assay. It is possible that SRD reagents may not be available for the pandemic vaccine, so alternative tests to standardise the vaccine (e.g. protein content, immunogenicity studies in small animals) should be developed and their use validated for the mock-up vaccine. In any case, special emphasis should be placed on accurate determination of low quantities of HA.

(Core pandemic dossierの項にある、Vaccine Productionの項から引用)

P8: Alternative tests to identify the seed virus (e.g. PCR), developed for the mock-up vaccine, shall be used as long as specific antisera obtained from a WHO Collaborating Centre for Influenza, are not available. When such reagents become available, SRD tests should be used for identity testing.

(Pandemic variationの項にある、Vaccine seed lotsの項から引用)

P9: The alternative tests for vaccine potency, validated for the mock up vaccine, should be used as long as SRD reagents are not available. When SRD reagents become available, they shall be used for potency testing.

(Pandemic variationの項にある、Vaccine Productionの項から引用)

要点は、「パンデミックワクチンのコア部分及びパンデミックワクチンバリエーションにおける、シードロット及びワクチン製剤に対する試験については、HAの量はSRD試験によって測定する。SRD試薬が入手できるまでは別の方法でHA量を測定しても良い。SRD試薬入手後は、SRD試験を行う」である。

European Pharmacopoeia 6.4には以下のように記載されている。

The hemagglutinin and neuraminidase antigens of each master and working seed lot are identified as originating from the correct strain of influenza virus by suitable methods.

要点は、「マスターシードとワーキングシードのHA抗原とNA抗原が正しい株由来であることを適切な方法で確認する」である。

【ディスカッション】

今後SRD試験に変わる方法が導入される可能性もあるが、今のところSRD試験は外せない状況である。新規法を導入するにしても、従来行われてきたSRD試験との相関を見る必要があるため、やはりSRD試験は必須である。緊急時対応として代替法による定量を行った場合でも、後からSRD試験は必要と考える。

付録2 参照したガイドライン等のリスト

WHO TRS 927

WHO TRS 878

WHO/BS/10.2132 (draft)

WHO TRS 745

ICH Q5A

ICH Q5B

ICH Q5C

ICH Q5D

ICH Q5E

ICH Q6A

ICH Q6B

ICH S6

ICH S1A

ICH S1B

CBER Guidance for Industry

EMA/CPMP/VEG/17/03/2004v5

EMA/CPMP/SWP/465/95

EMA/CPMP/VEG/4717/03-Rev.1 (draft)

EMA/CHMP/VEG/134716/2004

EMA/CHMP/BWP/68803/2010 (draft)

Ⅱ. 分担研究総合報告書

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

分担研究者 山本典生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 第5室 室長

研究要旨 現在インフルエンザワクチンは主に鶏卵培養法によって製造されているが、この方法では全国民分のワクチンを製造するのに1年半を要すると予測されている。

一方、細胞培養法によるワクチン製造では、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、ワクチンを短期間に製造できるものと考えられる。

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、(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、(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)シードウイルス等製造用MDCKセルバンクの構築を行った。

(1)については、細胞培養ワクチン実用化へ向け、各班員に共通する一般的問題点の抽出を行った。特に、細胞培養ワクチンに特異的な事項と非臨床試験に焦点を絞ってポイントをあげ、議論を深めた。抽出された問題点について関連する既存の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。全体に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思われる。

(2)については、LLC-MK2細胞に関し、ウイルス増殖性について検討を行ったところ、LLC-MK2細胞におけるウイルス増殖性はMDCK細胞のそれよりも低いことが明らかとなった。また、Crucell社のPer.C6細胞については研究契約を締結することができ、技術面の移転を行うことが出来た。Per.C6細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖性は良好と考えられた。

(3)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、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。これらは臨床検体からのシードウイルスの分離、リバーズ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を行う上で有用である。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ための基盤整備が大きく進んだと言って良いであろう。

本研究班において上記の(1)(2)(3)を進めてきたが、これらによって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と考える。本研究班の成果によって、細胞培養ワクチンの早期実用化に貢献できたと思われる。

A. 研究目的

1. 研究全体の目的

新型インフルエンザが発生した場合には短期間

に大量のワクチンを製造する必要があるが、現行の鶏卵培養法では全国民分のワクチンを製造するのに最悪で1年半を要すると推定されている。

一方、細胞培養法によるワクチン製造においては、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、ワクチンを短期間に製造できるものと考えられる。さらに、細胞培養ワクチンでは発育鶏卵への馴化過程が不要なため、こ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した。

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

国立感染症研究所にてリバーシジェネティクス用細胞として開発してきたLLC-MK2細胞に関し、ウイルスの増殖性についての検討を行った。コントロールとしてはMDCK細胞を用いた。

また、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。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

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。

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られる。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・抗原的変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PBR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。

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、EMA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、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、リバーシジェネティクスによるシードウイルス作製、及び海外からのリファレンス株の増殖などに使用することが出来る。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。本研究班の成果によって、細胞培養ワクチンの早期実用化に貢献できたと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

山本典生、田代真人：総論 インフルエンザー研究から臨床までー 細胞 Vol.41, No. 14, 2009

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、小淵正次、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. Yamamoto, K. Nakamura, I. Hamamoto, T. Odagiri, S. Itamura, H. Trusheim, S. Blayer, T. Tsai, K. Mizuta, A. Hirata and M. Tashiro. An evaluation of candidate cell lines to isolate influenza virus for cell based influenza vaccine Options for the Control of Influenza 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

分担研究総合報告書

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

分担研究者 奥野良信 （財）阪大微生物病研究会

研究要旨 本研究では、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か月間で製造可能な施設を5年以内に稼働させることを目標とし、開発を行った結果、以下の成果を得た。

- 1) 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、WHOやICH等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た。
- 2) 少量規模でワクチンの製法を確立し、これをパイロット規模にまでスケールアップすることができた。
- 3) パイロット規模においてGLP試験用の試作ワクチンを製造した。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年中に治験を開始する計画である。
- 4) パイロット規模での実験結果をもとに、実生産用の製造関連設備の仕様設計を行い、当該設備を発注した。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。

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か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

本研究では、2年以内にGLP試験を完了することを目指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ワ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、 $0.5 \sim 1.1 \text{ Log}_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ 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 (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Kla (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。

C. 考察

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。

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13回日本ワクチン学会学術集会（札幌）
- 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) 第 I 相試験に向けた GMP 製法の確立

細胞培養から得られるインフルエンザウイルス粒子は、宿主細胞由来タンパク質を取り込んでいるため、従来の鶏卵由来インフルエンザワクチンの製法では十分な純度が確保できなかったが、これまでの製法開発で十分な純度及び収量が得られる製法を見出している。

治験薬製造設備でのテスト製造にて恒常性を検証し、GMP に準拠した製法の構築を完了する。また、インフルエンザウイルスの不活化及び迷入ウイルスのクリアランス等の安全性データの取得に着手する。

4) 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。

5) 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。

6) 非臨床試験原薬・製剤の製造

化血研が現在所有する細胞培養設備等の製造設備(既存の 45L スケールのパイロットプラント)

を用いて毒性試験等の GLP 試験を含む非臨床試験用原薬・製剤を製造する。

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

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。

8) 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。

9) 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。

10) 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。

11) 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。

12) 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。

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。

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。

15) 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。

16) 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。

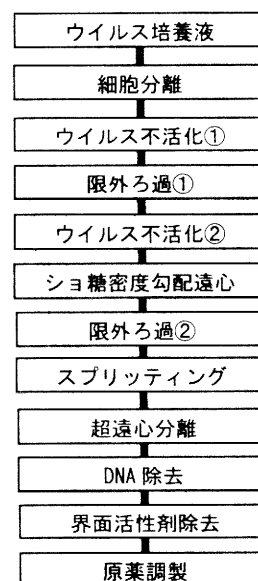
3) 第Ⅰ相試験に向けた GMP 製法の確立

<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) の至適化、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 フェル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

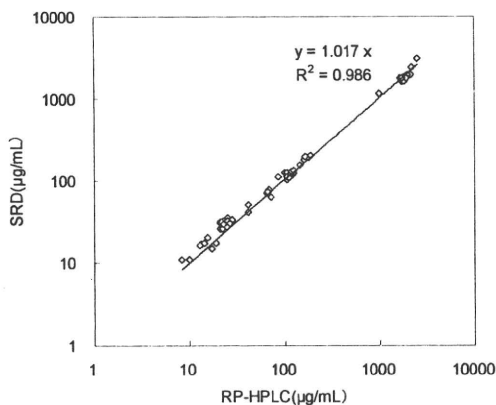
複数の安定剤を含む候補組成にて安定性評価を行い、良好な結果が得られた。本結果を踏まえて第Ⅰ相試験用原薬および製剤処方を決定した。

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

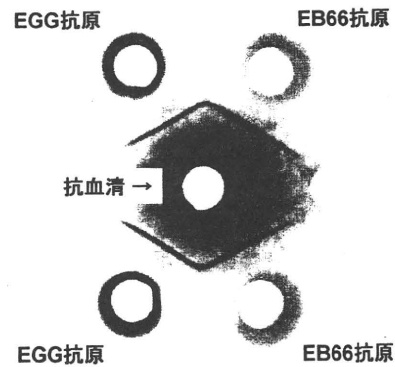
の海外のガイドライン、原液・製剤のロット分析及び安定性試験の結果に基づいて、原薬および製剤の規格試験項目を設定し、試験法を構築した。

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

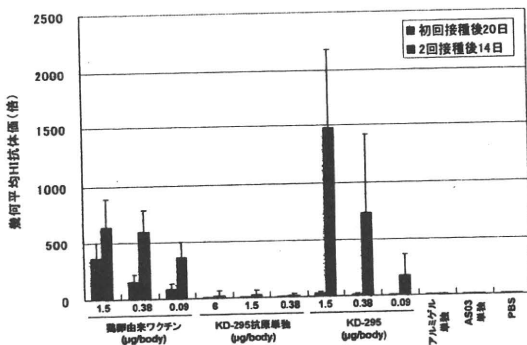
既存のパイロットプラントにて製造された製剤を用いて、以下に示す薬効試験、薬理試験および毒性試験を行い、第 I 相試験を行う上で必要な非臨床試験データを取得した。

- ・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>

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）。

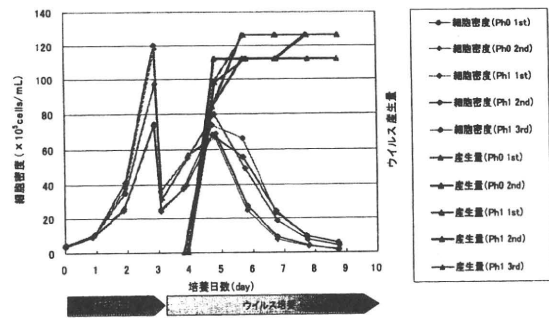
9) 分析法バリデーション

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	1st 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

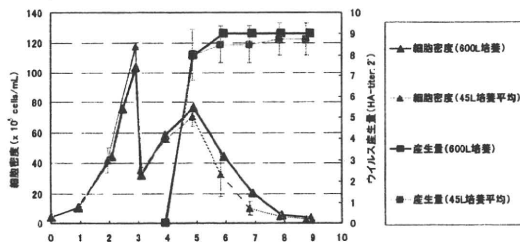
健康成人男性を対象とした第 I 相試験開始のために治験相談を行い、機構から特段の異論はなく、第 I 相試験の用量群設定が了承された。

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

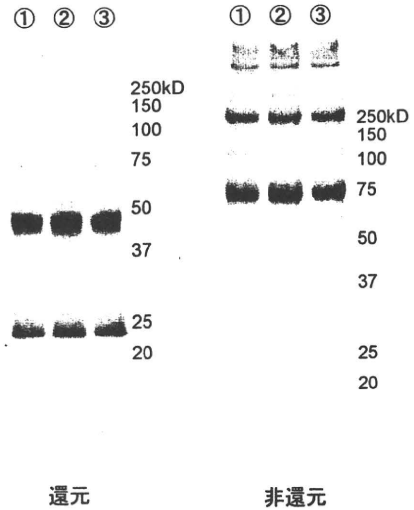
第Ⅱ/Ⅲ相試験薬製造および実生産に向けたスケールアップ検討として、45L 培養スケールの 10 倍超となる既存 600L フェルメンターを用いたウイルス培養、並びに同培養液を材料とした現行製法による精製評価を行った。その結果、培養に関しては、45L スケールと同等の細胞増殖性とウイルス産生を達成し、精製収率および最終品質についてもスケールアップに伴う影響は認められなかった。以上の結果から、EB66 細胞を用いた現在の培養方法は、実生産設備にも十分適用可能と考えている。



<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



<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）。

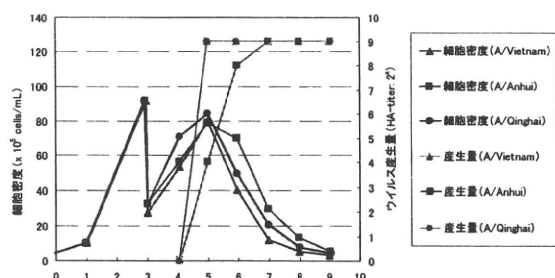
スケールアップ検討を目的とした実験用生産施設として、1200L 培養スケールのプラント整備を開始した。本年度末までに工事を完了し、H23 年度には試験製造を開始する予定である。

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＞

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。

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