

平成 21-22 年度厚生労働科学研究補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
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 五反田亨（学）北里研究所生物製剤研究所

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

#### A. 研究目的

我々はこれまでの研究により、無血清培地とマイクロキャリアーを用い MDCK 細胞を基質として、季節性インフルエンザウイルスを感染させてウイルス培養した場合、発育鶏卵を用いた場合とほぼ同等の高い感染価が得られることを確認している。

また、新規アジュバント候補として植物由来のアジュバントがマウスに十分な免疫効果を示すことを確認している。

本研究では MDCK 細胞の培養規模の増大、新型インフルエンザ候補ウイルスの培養・精製検討及び新規アジュバントを用いた剤型を確立すると共に、MDCK 細胞培養を用いた新型インフルエンザワクチンの規格試験法を確立する。更に、試作新型インフルエンザワクチンを作製し、非臨床試験を実施する。

#### B. 研究方法

季節性インフルエンザウイルス培養条件と同様に、新型インフルエンザ候補ウイルスの一つである NIBRG-14 (A/VietNam/ 1194/ 2004) 株（以下、ベトナム株）を MDCK 細胞に感染・培養し、鶏卵培養のそれと比較した。また、MDCK 細胞にベトナム株を感染・培養後、新規不活化剤を加えた後に精製し、これまでの不活化法と比較した。さらに、ウイルスの発熱因子の不活化工程も検討した。際し意的に確立された培養法及び精製法で作製されたワクチン原液を、現行発育鶏卵培養インフルエンザワクチン原液の各規格試験項目を含むたん白質含量試験、無菌試験、異常毒性否定試験、マウス白血球数減少試験、力価試験、不活化試験、マウス体重減少試験、ウサギ発熱試験について測定し現行発育鶏卵培養のそれと比較した。

さらに、新規アジュバントを含めアジュバントの免疫効果をマウスで検討した。MDCK 細胞で培養した季節性インフルエンザ HA 抗原、及び新型インフルエンザウイルスベトナム株及び Indo/05/2005/ PR8-IBCDC-RG2 株（以下、インドネシア株）の抗原を、それぞれアジュバントの投与量及び抗原量を変えて BALB/c マウスに 3 週間間隔で 2 回投与し、最終投与から 2 週後に血清を採取し、抗原特異的な IgG 抗体産生量を ELISA 法で、HI 抗体価ならびに中和抗体価を測定し検討した。

次に、培養規模のスケールアップについては、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  $K_{La}$  値の諸条件について 50L 培養で得られた値を基に、200L 培養タンクでの検討を行った。

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

（倫理面への配慮）

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

### C. 研究結果

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 30 $\mu$ g、HA 抗原 3 $\mu$ g 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  $K_{La}$  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質量は、雌雄ともに0.5 mL/kg を超える量であった。遺伝毒性試験は、細菌を用いる復帰突然変異試験では代謝活性化系の有無にかかわらず、細菌に対して遺伝子突然変異誘発性を示さなかった。また、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では、代謝活性化系の有無及び処理時間の長短にかかわらず、CHL/IU 細胞に対して染色体異常誘発性を示さなかった。さらに、ラット小核試験ではラットの赤芽球に対して小核誘発性を示さなかった。生殖毒性試験は、ラットにおける間歇皮下投与による出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験では、影響は認められなかった。また、ラットにおける間歇皮下投与による胚・胎児発生への影響に関する試験でも胚・胎児発生への影響は認められなかった。局所刺激試験は、ウサギにおける皮下局所刺激性試験及び筋肉局所刺激性試験ともに、DPT ワクチンの刺激性とほぼ同程度であると考えられた。

#### D. 考察

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られる。

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。

#### E. 結論

MDCK 細胞を基質とした細胞培養法として、パーフュージョン法が新型インフルエンザウイルス培養でも有効であった。また、50L 規模では発育鶏卵法の1.3倍量のウイルス増殖を示した。新規不活化剤での新型インフルエンザウイルスの不活化は、製造期間の短縮に極めて有効であった。ホルマリンによる発熱因子の不活性化条件及びアジュバントを決定し、50L パーフュージョン培養スケールにおける製造方法を確立することができた。確定した製造方法に基づいて治験薬 GMP でインドネシア株を用いた非臨床治験薬を製造し、非臨床試験を実施し、施策ワクチンの安全性が確認できた。

## F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記入)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 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

## MDCK細胞を用いたワクチン開発

研究分担者 大塚浩史 デンカ生研株式会社 ワクチン研究部長

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

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

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

### A. 研究目的

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

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

## B. 研究方法

### 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

浮遊系 MDCK 細胞を無血清培地で培養し、50L 培養槽での増殖性を検討した。

#### 2) ウイルス培養

インフルエンザウイルス Indo/05/2005 (H5N1)/PR8-IBCDC-RG2 株 (以下 Indo 株, リバースジェネティクス法による弱毒株) を浮遊系 MDCK 細胞に感染させ、50L 培養槽でのウイルス産生を検討した。

#### 3) 精製工程

不活化全粒子ウイルスの調製法とその可溶化法、及び HA 精製法を検討し、品質を指標としてサブユニット抗原の調製法を検討した。

#### 4) 製剤化及び免疫原性の確認

サブユニット抗原にアルミアジュバントを加えたプロトタイプワクチンを調製し、マウスを用いた試験系で免疫原性を評価した。その結果を、不活化全粒子ウイルスにアルミアジュバントを加えた沈降全粒子ワクチン (組織培養法) と比較した。

プロトタイプワクチン又は沈降全粒子ワクチンは BALB/c マウス (雌性)、10 匹/群に 0.1mL/Head、3 週間隔 2 回で筋肉内投与し、35 日 (2 回目投与から 2 週後) に採血後、血清の中和抗体価を測定した。

## 2. 製法の確立

### 1) 培養工程の検討

#### ① 細胞株の安全性確認

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

#### ② 細胞培養のスケールアップ検討

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

#### ③ ウイルス培養のスケールアップ検討

インフルエンザウイルス Indo 株を浮遊系 MDCK 細胞に感染させ、500L 培養槽でのウイルス産生を検討した。

### 2) 精製工程の検討

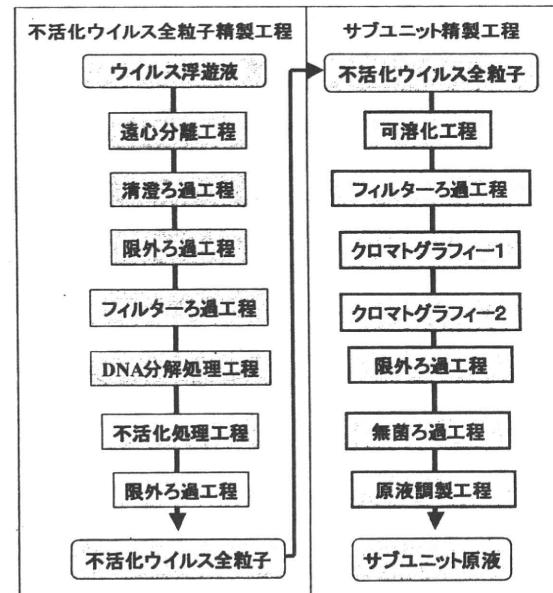


図 1. 精製法の工程フロー

#### ① 不純物分解除去の検討

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

## ②サブユニット精製工程のスケールアップ

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

## 3) アルミアジュバントの検討

### ①吸着機構と製剤調製条件の検討

モデルたん白質及びウイルスたん白質を用いてアルミアジュバントに対する吸着機構を検討した。その結果を踏まえ、ウイルスたん白質がアルミアジュバントに高吸着する製剤の調製条件を設定した。

### 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 (HA 抗原)、及びそれにアルミアジュバントを添加したワクチンをそれぞれ調製した。同時に、アルミアジュバントの表面電位を変えて抗原たん白質の吸着率を低下させたワクチンを調製した。B 項 1. 4) と同様の方法によって、これらのワクチンをマウスに 2 回免疫 (筋注) し、血清中の中和抗体価を測定した。

## 4) 製剤化工程の検討

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

## 5) 試作原液及び製剤の品質評価

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

## (倫理面への配慮)

問題なし

## C. 研究結果

### 1. プロトタイプワクチンによる予備検討

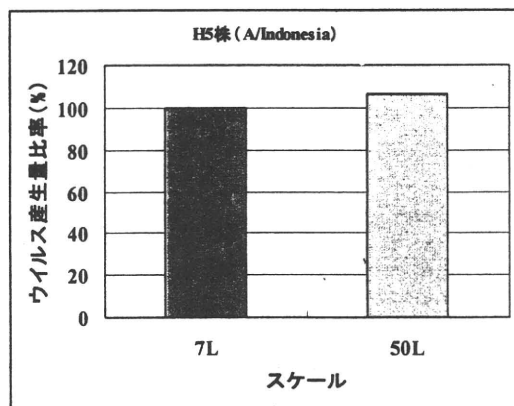
#### 1) MDCK 細胞の無血清培養

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)。

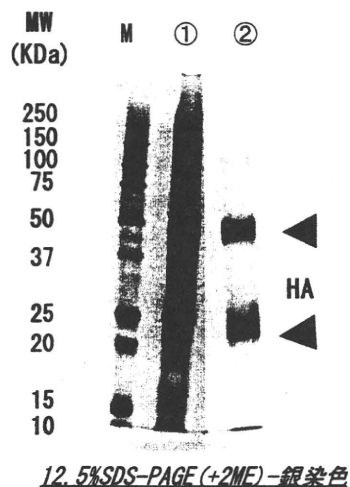


\*7L 実績値を 100 とした時の比率

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)。



M 分子量マーカー  
①不活化粗精製全粒子ウイルス液  
②原液

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)。

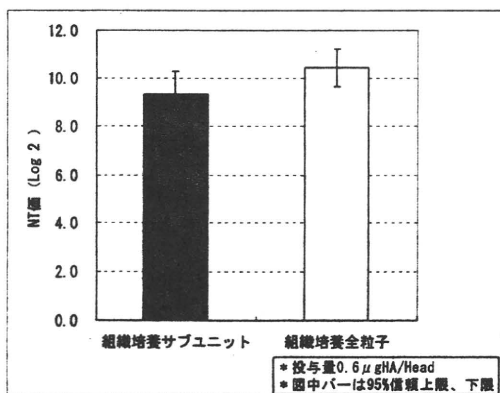


図4. プロトタイプワクチンの免疫原性

## 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)。



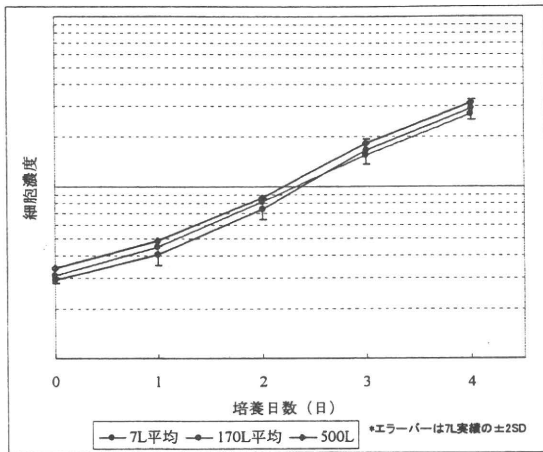


図5. 細胞培養 7, 170, 500L の比較

### 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 Indo 株のウイルス培養を行った。ウイルス産生は、7L 培養槽と同様であった (図6)。

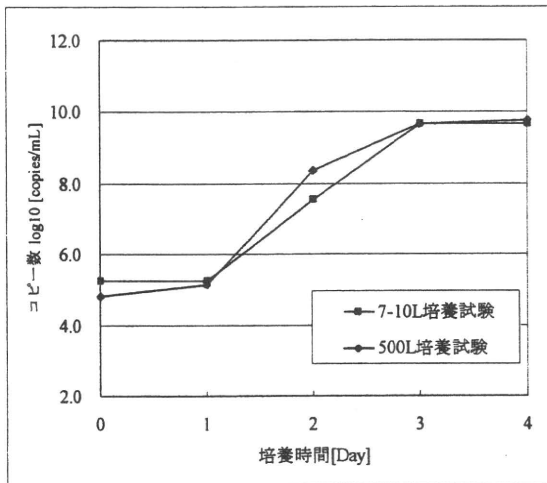
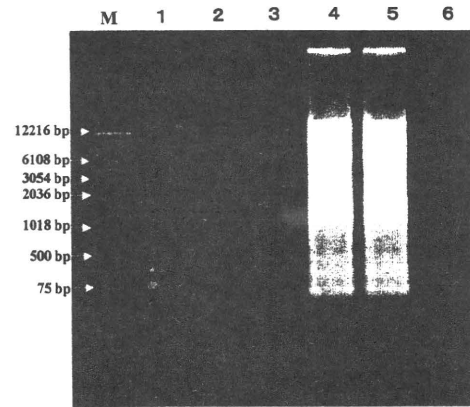


図6. ウイルス培養 7L、500L の比較

## 2) 精製工程の検討

### ①不純物分解除去の検討

不活化ウイルス全粒子精製法を確立し、各工程液をアガロース電気泳動にて評価した結果、DNA 分解処理で長鎖 DNA バンドが減少していることを確認した (図7)。



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

図7. アガロース電気泳動結果

### ② サブユニット精製のスケールアップ

精製工程をスケールアップし、得られたサブユニット抗原を SDS-PAGE 法で分析した。その結果、スケールアップ品は、スケールアップ前と同様、目的の HA たん白質が精製されていることを確認した。

### 3) アルミアジュバントの検討

#### ①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。

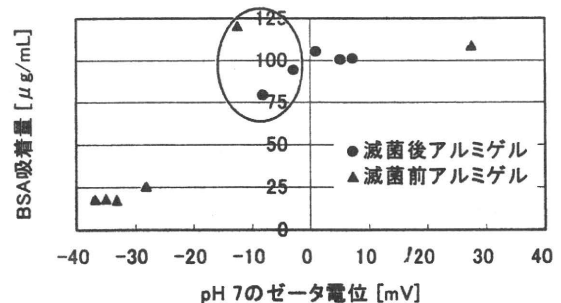


図8. pH 7 のゼータ電位と BSA 吸着量

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。

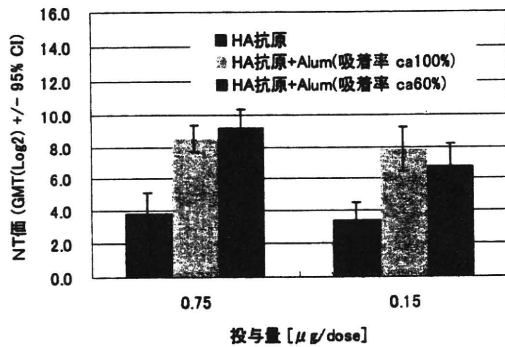


図9. 中和抗体価の比較

## 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。

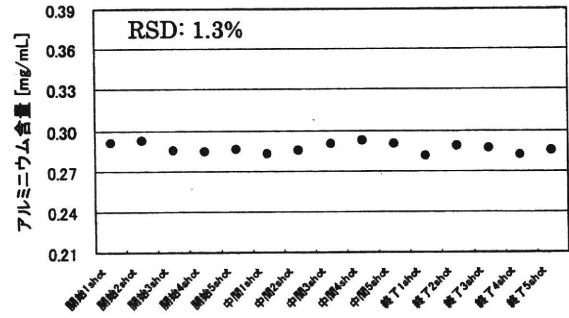


図10. 充填工程のアルミニウム含量推移

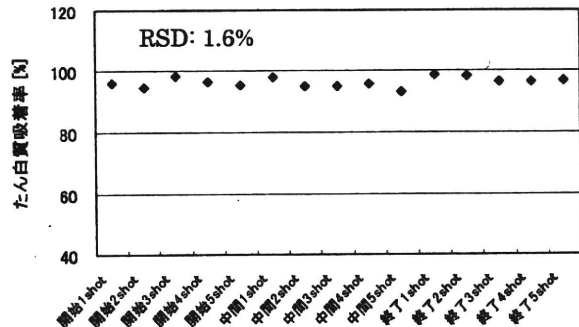


図11. 充填工程のたん白質吸着率推移

## 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製剤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	無色透明	無色透明
pH 試験	6.8~8.0	7.10
浸透圧試験	浸透圧比 1.0±0.2	浸透圧比 0.98
たん白質含量試験	—	測定のみ
宿主由来たん白質含量試験	—	測定のみ
宿主 DNA 含量試験	200 pg/mL 以下	12.5 pg/mL 以下
一元放射免疫拡散試験	—	測定のみ
界面活性剤含量試験 (界面活性剤 1)	限度値以下	限度値以下
界面活性剤含量試験 (界面活性剤 2)	定量限界以下	定量限界以下
DNA 分解酵素含量試験	定量限界以下	定量限界以下
不活化剤分解物含量試験	定量限界以下	定量限界以下
SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動試験	非還元条件において 70 kDa 付近、還元条件において 45 kDa 及び 25kDa 付近にバンドを検出する。	非還元条件において 70 kDa 付近、還元条件において 45 kDa 及び 25 kDa 付近にバンドを検出した。
ウェスタンブロット試験	非還元条件において 70 kDa 付近、還元条件において 45 kDa 及び 25 kDa 付近で HA たん白質のバンドを検出する。	非還元条件において 70 kDa 付近、還元条件において 45 kDa 及び 25 kDa 付近で HA たん白質のバンドを検出した。
二次元電気泳動試験	特定のスポットを検出する。	特定のスポットを検出した。
エンドトキシン試験 (参考試験)	—	測定のみ
無菌性確認試験 (参考試験)	菌の発育を認めない。	菌の発育を認めなかった。

表4 製剤の品質試験結果

項目	品質目標	試験結果
性状	振り混ぜるとき 均等に白濁	振り混ぜるとき 均等に白濁
pH	6.8~8.0	7.2
浸透圧比	0.8~1.2	1.0
たん白質含量 (µg/mL)	約33	36
HA 含量 (µg/mL)	約30	29
アルミニウム含量 (mg/mL)	0.25~0.35	0.27
チメロサル含量 (µg/mL)	5~14	13

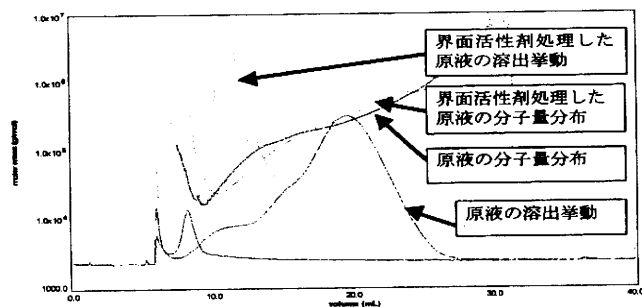


図12. 原液の凝集状態の解析

#### D. 考察

原液製造に使用する細胞の安全性試験では、一部実施中の試験が残っているものの、問題は認められなかった。

培養工程は、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<sup>2)</sup>が、本分担研究ではマウスを用いた試験系でアルミアジュバント添加の効果が明確に認められた。

#### E. 結論

培養、精製及び製剤化工程について非臨床試験用製剤の調製までに必要な一連の基礎検討を行い、製造工程のプロトタイプを設定した。プロトタイプの製法で製造した試験ワクチンはマウスにおいて免疫原性を有することを確認した。スケールアップ検討を実施し、製造した原液及び製剤は目標品質に適合した。今後製造工程の更なるスケールアップも可能であると考えられた。

#### 参考文献

1) 細井和夫「組織培養インフルエンザワクチンの試作及び免疫原性試験における鶏卵ワクチンとの比較検討」  
平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「動物由来物質を排除したワクチン及び組織培養インフルエンザワクチン製造方法の開発研究」  
分担研究

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

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

**精製法につき特許出願中**

**特願 2008 -253742**

**(出願日 2008 年 9 月 30 日)**

細胞培養系を用いた新型インフルエンザワクチンの開発研究

研究分担者 上村謙吾 株式会社UMNファーマ 製造開発部

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

平成21年度、平成22年度の研究にて、以下の成果を得たので報告する。

- 1 BEVSによるパンデミックインフルエンザワクチン原薬の製造について、以下を達成した。
  - 1.1 H5N1株2種（A/Vietnam/1203/2004株、A/Indonesia/05/2005株）及び新型H1N1株1種（A/California/04/2009株）のrHA発現培養に成功した。また、それぞれのrHAの精製工程を確立した。
  - 1.2 実生産に向け、培養工程での細胞培養・発現培養の工程パラメーターを予備的に設定し、細胞回収時の細胞生存率とrHA収量との相関を見出した。また、製造工程に使用される試薬や宿主由来の夾雑物の定量法を設定した。
  - 1.3 精製工程のクロマト樹脂を変更することで、従来法比約150%のrHA収量を達成した。
  - 1.4 HPLC法により、製造工程で使用する試薬の定量方法を設定した。
  - 1.5 宿主由来たん白質量の試験法を設定し、残存DNA量の測定を検討した。
- 2 力価測定のための一元放射免疫拡散試験法（Single Radial ImmunoDiffusion Assay, SRD法）をA/Vietnam/1203/2004株で確立した。また、SRD代替法の検討を行った。
- 3 H5N1株であるA/Vietnam/1203/2004株に加え、クレードの異なるA/Indonesia/5/2005株、A/Anhui/1/2005株、A/bar headed gs/Qinghai/1A/05株の組換えバキュロウイルスを構築することに成功した。
- 4 マウスを用いて開裂型と非開裂型rHAの免疫原性を比較し、ワクチンとしての非開裂型rHAが開裂型に劣らないことが確認できた。
- 5 マウスを用いてHAの糖鎖修飾型と非修飾型の免疫原性を比較し、糖鎖修飾により大きな違いがないことが確認できた。

## A. 研究目的

### 1 発現細胞培養及び精製について

Baculovirus Expression Vector System (以下 BEVS) を用いて、**expresSF+**細胞 (以下 **SF+**細胞) を宿主とした細胞培養法による組換えヘマグルチニン (以下 **rHA**) たん白の製造法を検討する。

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

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

### 2 一元放射免疫拡散法

リバーシジェネティックス法で弱毒化したウイルス抗原と **rHA** では、それぞれで作製した抗血清との反応性が異なる。このため、**rHA** の一元放射免疫拡散 (SRD) 法設定が可能となる抗血清を作成する。また、**rHA** を社内一次標準物質として設定する。更に、SRD 代替法の設定を検討する。

### 3 組換えバキュロウイルスの構築

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

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

### 4 **rHA** の開裂型と非開裂型の免疫原性の比較

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

### 5 **rHA** の免疫原性に与える糖鎖の影響の確認

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

## B. 研究方法

### 1. 発現細胞培養及び精製について

#### 1.1. 製造工程の確立

**rHA** 発現培養用宿主細胞の **SF+**細胞は、米国 Protein Sciences Corporation (以下 **PSC**) より入手した。**SF+**細胞は、ハスモンヨトウガ近似種 *Spodoptera frugiperda* 由来の **Sf9** 細胞から樹立され、無血清培地での培養及びたん白生産用に最適化

された細胞である。**A/Vietnam/1203/2004** 株、**A/Indonesia/05/2005** 株及び **A/California/04/2009** 株の **rHA** 組換えバキュロウイルス (**rBV**) を **SF+**細胞に播種することで発現培養を行った。発現した **rHA** を細胞より回収し、精製工程を構築することでインフルエンザワクチン原薬製造工程を確立した。

#### 1.2. 実生産に向けたパラメーターの設定

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

#### 1.3. クロマト樹脂の検討

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

#### 1.4. HPLC 試験法の開発

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

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

#### 1.5. 純度試験の設定

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

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

### 2. 一元放射免疫拡散法

#### 2.1. 一元放射免疫拡散法の設定

**A/Vietnam/1203/2004** 株の **rHA** に対する抗血清を複数の動物種で作製し、自社の抗原を自家一次標準物質として、SRD 法による力価測定法を設定した。得られた抗血清のうち、ヒツジ抗血清を用いて SRD 法の最適化を行った。アガロースゲルに添加する抗血清量と抗原量を調整して、安定した測定値が得ら

れる条件を設定した。

## 2.2. SRD 代替法の検討

SRD 代替法として、A/Vietnam/1203/2004 株のモノクローナル抗体を作製し、サンドイッチ法による ELISA 試験法構築を検討した。

## 3. 組換えバキュロウイルスの構築

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

## 4. 開裂型と非開裂型rHAの免疫原性の比較

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

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

## 5. rHAの免疫原性に与える糖鎖の影響の確認

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

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

## C. 研究結果

### 1. 発現細胞培養及び精製について

#### 1.1. 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)。

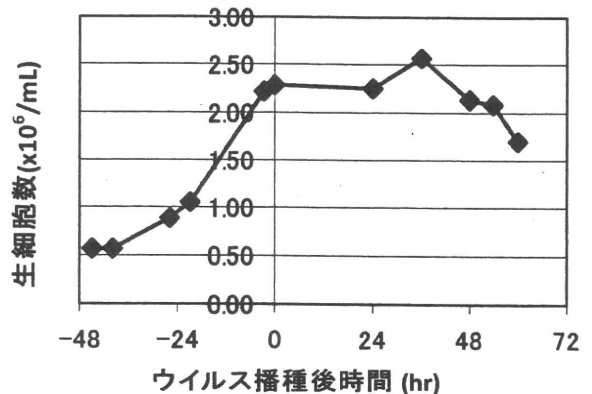


図1. ウイルス播種前後の生細胞数の変化

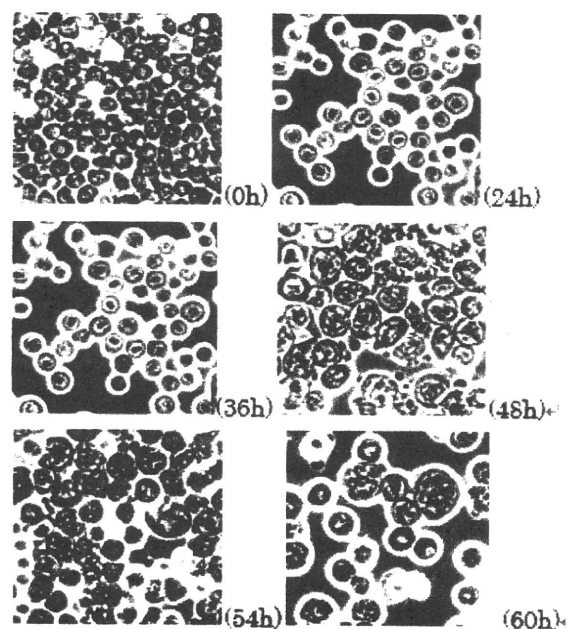


図 2. 細胞形態の経時的変化

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。

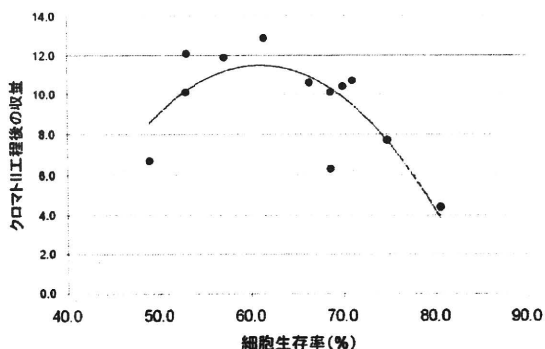


図3. 細胞回収時の細胞生存率と収量の関係  
回収時の細胞生存率が60%程度のときに収量が最大となった。

### 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。

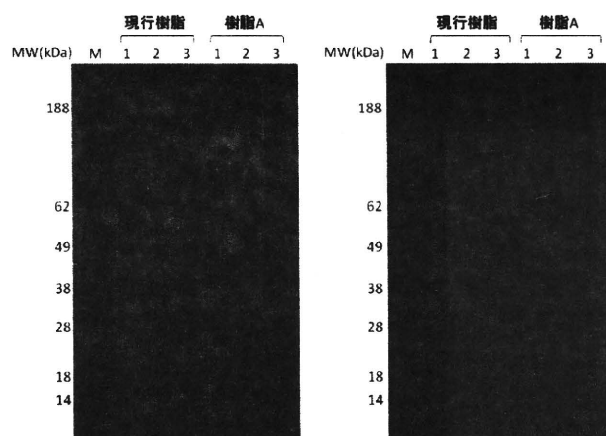


図4. 現行樹脂と樹脂Aの溶出画分の電気泳動像  
それぞれの樹脂で3回ずつ精製を行い、SDS-PAGE (CBB 染色) を行った。M: 分子量マーカー。(左図) クロマト I 工程後の溶出液。この溶出液を次のクロマト II 工程で精製して電気泳動にて分析した (右図)。いずれも 65kDa 付近に HA0 の濃いバンドが認められる。

### 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7.5~960 ng/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)。

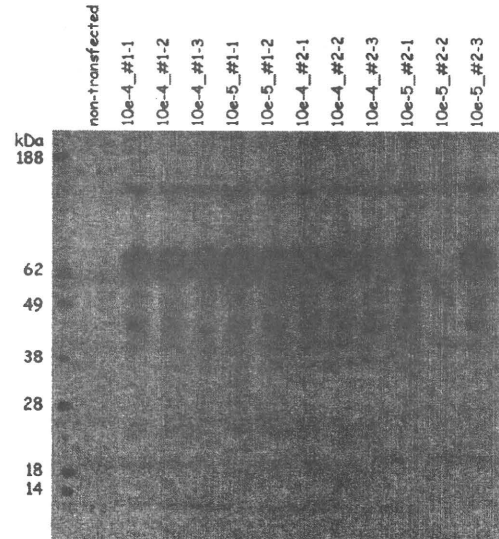


図5. プラークアッセイにより単離した11クローンのベトナム株rHAの発現確認

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/bar headed gs/Qinghai/1A/05のヘムアグルチニン発現組換えバキュロウイルスの作製を試みた。

遺伝情報バンクより、いずれの株もシグナル配列を含むヘムアグルチニン全長の遺伝情報を入手し、各株のHA遺伝子の全長を人工合成した。ベトナム株発現用組換えバキュロウイルス作製時と同様に、トランスファーベクターpPSC12にクローニングした。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の発現をイムノブロットで確認した(図6、A/bar headed gs/Qinghai/1A/05の例)。以上により、構築済みトランスファーベクターを用いて、H5N1株4種類のrBVを作製することに成功した。

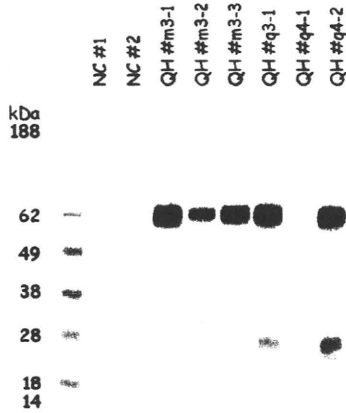


図6. プラーク純化により得られたクローンのQinghai株HA発現クローン  
 プラーク純化により6株を選び、クローニングし、各クローンの発現をイムノプロット法で確認した。

#### 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。

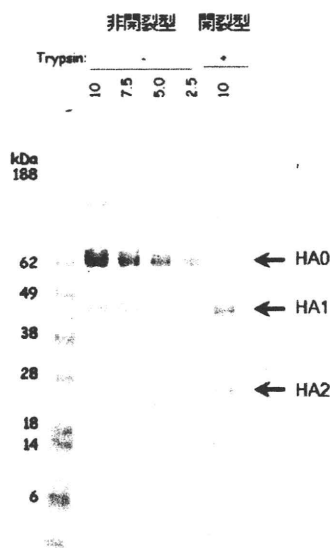


図7. トリプシン消化によるrHAの開裂

##### 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)。

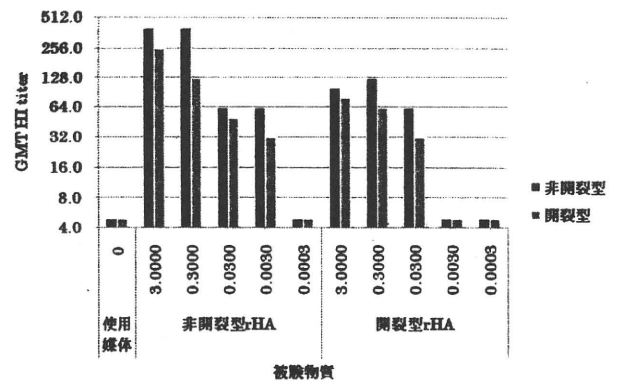


図8. 非開裂型および開裂型rHAのマウス免疫原性比較試験

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。

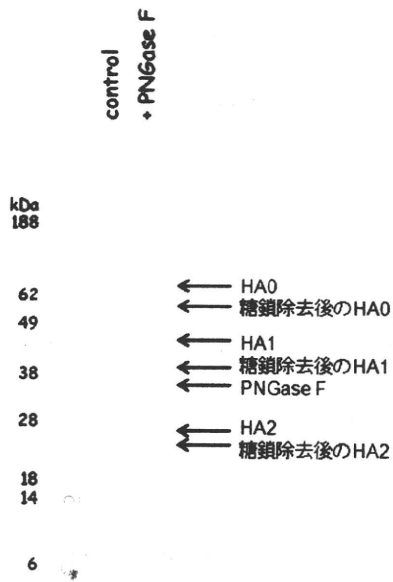


図9. PNGase F消化による糖鎖修飾の除去  
右のレーンに示した+PNGase Fを糖鎖非修飾型抗原として、マウス免疫原性試験に使用した。

### 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。

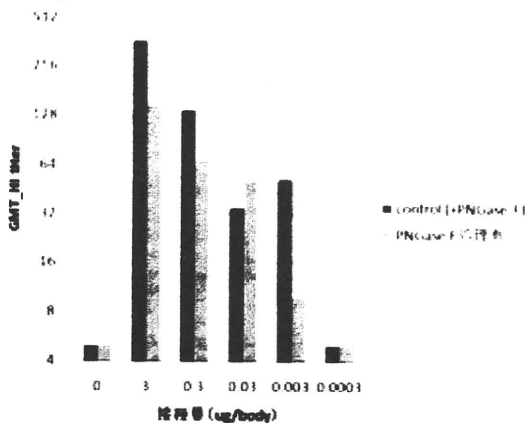


図 10. 糖鎖修飾型および非修飾型 rHA のマウス免疫原性比較試験

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

### 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

BEVSによるパンデミックワクチン原薬の製造法を確立した。当初設定した方法に比し、約150%の収量を達成することが示唆され、培養の管理パラメーター設定や精製工程の更なる検討により、パンデミ

ックワクチン原薬の安定的な製造と収量向上が期待される。また、工程由来の試薬残存や、HCPの測定法、SRD法を開発し、ワクチンとしての品質を担保するための準備を着実に進めている。

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

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

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

#### F. 健康危険情報

特に記載すべき情報はない

#### G. 研究発表

該当するものはない。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現在、該当するものはない。