

「第 3 世代ワクチン」開発等推進事業実施計画

~~進捗・変更・終了報告書~~

会社名：一般財団法人 阪大微生物病研究会

担当者：■■■■■

公募課題番号： 210301

研究課題：経鼻投与式細胞培養新型インフルエンザワクチンの開発

研究開発計画：

【目的】

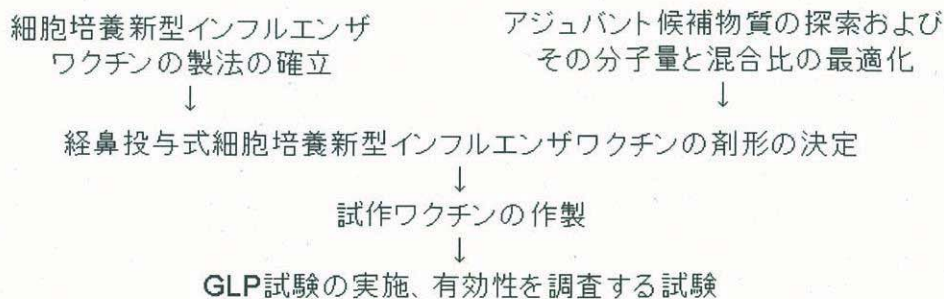
昨今の高病原性鳥型インフルエンザ（H5N1株）の流行により、ヒトでの新型インフルエンザウイルスの発生および大流行が危惧されている。新型インフルエンザの流行前にプレパンデミックワクチンを、また、新型インフルエンザの流行が発生した後にパンデミックワクチンを接種することにより、この流行を阻止することが防疫上重要であると考えられる。しかし、現行のプレパンデミックワクチンおよびパンデミックワクチンの製造においては、新型インフルエンザウイルスの培養基質として発育鶏卵を使用するため、これらのワクチンの製造量は発育鶏卵の供給量に依存するという問題がある。したがって、新型インフルエンザの流行が発生し、パンデミックワクチンを製造する必要がある場合には、発育鶏卵の確保が問題となって、迅速に対応することが困難になると予想される。また、これらのワクチンは筋肉内又は皮下に注射することによって、血清中に中和活性を持つIgG抗体を誘導させるため、肺炎などの重症化の予防には有効性が高い。しかし、感染箇所である上気道粘膜においては、IgAが感染防御の主体であり、これは注射法では誘導されないため、感染防御効果は十分とは言えない。

これまでに我々は、■■■■■MDCK細胞を培養基質とした新型インフルエンザワクチンの開発を行ってきた。培養細胞を用いたワクチン製造法は、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準備できるため、ヒトにおける新型インフルエンザの流行が発生した時でも、パンデミックインフルエンザワクチンを短期間で製造できる。一方、経鼻投与型インフルエンザワクチンについても、我々はこれまでに研究を行ってきており、皮下接種と同程度の抗原量を■■■■■アジュバントとともに経鼻に免疫することで、血清と粘膜に感染防御レベルの免疫応答を引き出すことに成功している。またこの時に、誘導される鼻粘膜IgAは、同じ亜型の他のウイルス株に対して広い交叉反応性を持つことを、我々はこれまでの実験から示している。

そこで、本研究では、これらの実験結果を利用して、経鼻投与式の細胞培養新型インフルエンザワクチンを実用化することを目的とした。そのための手段として、以下の手順で開発を実施した。

- 1) 細胞培養インフルエンザワクチンの製法を確立する（パイロット規模、および実生産規模での製法確立）。
- 2) これまでの研究から、XXXXXXXXXX アジュバントは経鼻投与において安全で有用であることが示されているので、これをアジュバント開発の優先的候補としながら、これと同等以上のアジュバント活性をもつ他の候補物質についても動物試験で評価を行う。
- 3) 新型インフルエンザワクチンと混合した時にアジュバント活性が最大となるアジュバント候補物質の分子量及びその添加比率について調査する。
- 4) 以上の実験結果をもとに、抗原の低減効果について評価するとともに、ワクチンの剤形を決定する。
- 5) 試作ワクチンを作製し、非臨床試験（各種動物を用いた効力を裏づける試験、安全性薬理試験および各種毒性試験）から得られたデータをもとに安全性と有効性を評価し、第1相臨床試験を実施するための根拠となるデータを蓄積する。

(流れ図)



【方法および結果】

1) 細胞培養インフルエンザワクチンの製法の確立

これまでの実験から、XXXXL 培養槽において MDCK 細胞を高密度培養できる条件、及び XXXXL 培養槽で培養したインフルエンザウイルス浮遊液からワクチンを精製する条件が確立できていた。そこで、パイロット規模 XXXXL 培養槽を用いた培養実験を行い、これらの条件を XXXXL 規模にスケールアップすることについて検討した。その結果、XXXXL 培養槽の各種制御条件を至適化することにより、MDCK 細胞をパイロット規模で高密度培養することが可能になった。また、XXXXL 培養規模での精製工程のスケールアップにも成功し、現行の発育鶏卵由来インフルエンザワクチンと同等の精製度を持つワクチンの作製が可能になった。

以上のようにワクチンの製法を確立することができたので、この製法を文書化し、SOP として制定するとともに、原液の規格試験項目および規格値を設けた。その後、この SOP に基づいてパイロット規模

で細胞培養新型インフルエンザワクチン原液 (A/Indonesia/5/2005(H5N1)/PR8-IBCDC-RG2 株) を製造した。製造工程のサンプルおよび原液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。この原液について、光安定性試験、加速試験、および長期保存試験を実施し、現行の発育鶏卵由来インフルエンザワクチンの原液と同等の安定性を有していることが確かめられた。長期保存試験については、 カ月までデータを継続的に取得している。

また、パイロット規模での細胞培養条件および精製条件を実生産規模 (L) へとスケールアップするため、 億円の し、平成 23 年に実生産規模のプラントの整備を完了した。現在、本プラントを用いた実験を実施しており、実生産規模でのワクチンの製法を確立するためにデータを取得している。

2) 経鼻投与型アジュバント候補物質の検索、およびその分子量と混合比の最適化

当初の計画通りワクチンと混合する アジュバントの分子量と免疫原性の関係について調査した。季節性インフルエンザウイルスの不活化全粒子ワクチンを、それぞれ分子量の異なる数種類の アジュバントと混合してマウスに経鼻投与し、これによって誘導される血中の IgG 抗体価と鼻腔洗浄液における粘膜 IgA 抗体価を指標として免疫原性を評価した。その結果、ある分子量の範囲の の免疫原性が高いことが明らかになった。

また、この実験とは別に鶏卵由来新型インフルエンザワクチン原液 (A/bar-headed goose/Qinghai/1A/2005(H5N1)株の不活化全粒子) に、 アジュバントおよび粘稠剤 (粘性を高め、鼻腔での滞留性を向上させることにより、免疫担当細胞に接触するワクチンの割合を増やす作用を持つ) を加えることによる免疫増強効果について調査を行った。 μgHA のワクチン原液に アジュバントと粘稠剤を添加・非添加の組合せで調製したワクチンを、 マウス (♀、6 週齢) に 週間間隔で 回経鼻投与した。最終接種から 日後に鼻腔洗浄液および血清を採取して、鼻粘膜の特異的 IgA 抗体価および血清中の特異的 IgG 抗体価 (ELISA・HI・中和) を測定した。その結果、鼻粘膜の特異的 IgA 抗体価に関しては、 や粘稠剤を添加しなくとも、ワクチン単独で感染防御レベル (ELISA 抗体価 32 倍以上) の抗体誘導を達成できることが分かった。一方、血清中の特異的 IgG 抗体価については、 の添加によって免疫応答は有意に亢進が認められたが、その効果は粘稠剤を添加する場合の効果に劣るものであった。また、 と粘稠剤の併用による相加的・相乗的な免疫応答の亢進は認められなかった

3) 経鼻投与式新型インフルエンザワクチンの剤形決定

2) の結果から、経鼻投与式細胞培養新型インフルエンザワクチンを開発する場合、 アジュバントは、感染防御レベルを達成する上で実用的に不可欠な要素ではないと考えられた。これに対して、粘稠剤については、有用な要素と見なすことができたため、経鼻投与式細胞培養新型インフルエンザワクチンの剤形を、「粘稠剤を添加した不活化全粒子」と決定した。なお、粘稠剤の添加によって、同量の抗原を皮下投与した場合と、同等の血清 IgG 抗体を誘導することができたが、皮下接種に比べて抗原を低減させることはできなかった。

4) 試作ワクチンの作製

1) の実験において製造した細胞培養新型インフルエンザワクチン原液 (A/Indonesia/5/2005(H5N1)/PR8-IBCDC-RG2 株) と粘稠剤を混合し、GLP 試験に用いる試作ワクチンを作製した。また、この試作ワクチンについて、各種の規格試験を実施し、全てに適合していることを確認した。

5) 経鼻投与式細胞培養新型インフルエンザワクチンの GLP 試験、および有効性を裏付ける試験

GLP 適合施設下で、4) で作製した試作ワクチンについて以下の毒性試験、及び安全性薬理試験を実施した。

- ・ 単回経鼻投与毒性試験 (██████、雌雄)
- ・ 反復経鼻投与毒性試験 (██████、雌雄、約 █████ 週間間隔で █████ 回投与)
- ・ 生殖発生毒性試験 (ICH-1; █████ を用いた受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験)
- ・ 生殖発生毒性試験 (ICH-2; █████ を用いた出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験)
- ・ 生殖発生毒性試験 (ICH-3; █████ を用いた胚・胎児発生に関する試験)
- ・ 安全性薬理試験 (██████ を用いた中枢神経系に及ぼす影響)
- ・ 安全性薬理試験 (██████ を用いた心血管系、呼吸系に及ぼす影響)

毒性試験については、動物への 1 回あたりの投与量はヒト成人 (50 kg) の臨床投与予定量の約 █████ 倍とした。また、安全性薬理試験については、動物への 1 回あたりの投与量はヒト成人 (50 kg) の臨床投与予定量の約 █████ 倍とした。いずれの試験でも被験物質である試作ワクチンに起因する毒性または影響は認められず、本試作ワクチンの安全性が確認された。

また、有効性を裏付ける試験として、次の 2 つの動物試験を実施した。

- (1) まず、██████ マウス (♀、6 週齢) を用いた免疫試験を実施した。本試作ワクチンを抗原量が █████、██████、██████ μgHA になるよう調製して、マウスに █████ 週間間隔で █████ 回経鼻投与した。最終接種から █████ 日後に鼻腔洗浄液および血清を採取して、鼻粘膜の特異的 IgA 抗体価および血清中の特異的 IgG 抗体価を測定した。なお、対照として発育鶏卵由来のワクチン原液 (A/Indonesia 株) に粘稠剤を添加した経鼻ワクチンも調製し、免疫原性を比較した。その結果、細胞培養由来である本試作ワクチンは、発育鶏卵由来ワクチンと同程度以上の免疫原性を有しており、感染防御レベルの抗体誘導を達成できることが明らかになった。
- (2) 次にカニクイザルを用いた免疫試験を実施した。カニクイザルに本試作ワクチンを █████ 週間間隔で █████ 回投与し、接種直前又は 2 回目の接種から 2 週間おきに鼻腔拭い液および血清を採取して免疫応答を確認したところ、鼻粘膜上では、高用量 (██████ μg 投与) 群において 2 回目の接種から █████ 週間後から █████ 週間以上にわたって感染防御レベルの抗体産生が持続し、血清でもこれと連動した免疫応答が認められたことから、用量・用法を最適化することによりパンデミック発生時に想定される流行期間をカバーできる免疫応答が得られると期待される。

以上の通り、経鼻投与式細胞培養新型インフルエンザワクチンが、十分な免疫原性をもつこと、また

誘導された免疫の持続性が確認されたことから、本ワクチンの有効性が認められた。今後、臨床試験を実施するまでに、これらの動物試験の鼻腔拭い液および血清を用いて、ワクチン株とは異なるクレードに属する株に対する交叉反応性も調査したい。

なお、本事業の事業計画書においては、
[redacted] を行い、感染防御能について調査することを計画していた。結果として、
[redacted] が、ヒトに近い動物であるカニクイザルで中和抗体が誘導できることが認められたので、有効性について一定の評価はできたと考えられる。

【結論】

全ての研究はほぼ計画通りに進行（別紙・研究工程表を参照）し、最終目標であった経鼻投与式細胞培養新型インフルエンザワクチンの製法の安全性および有効性に関する調査を完了することが出来た。経鼻投与における1ドーズあたりの抗原量は注射法と同じであり、抗原量の低減効果はなかったが、注射法では誘導できない鼻粘膜IgAを誘導することが出来た。また、本研究においては、細胞培養インフルエンザワクチンの製法を確立できたことも大きな成果の1つである。

以上のように本ワクチンは、有用かつ実用性の高いものであるとの最終評価が得られたことから、今後は経鼻投与式インフルエンザワクチンの臨床試験に
[redacted] と考えている。

注1) 「第3世代ワクチン」開発等推進事業実施計画書（PDSC-D4様式2-第三）に基づいて記載してください。

注2) 「第3世代ワクチン」開発等推進事業実施計画書（PDSC-D4様式2-第三）を添付してください。

付属資料 研究行程表

研究計画
研究進捗

大項目	中項目	小項目	平成22年度				平成23年度				平成24年度							
			第1Q	第2Q	第3Q	第4Q	第1Q	第2Q	第3Q	第4Q	第1Q	第2Q	第3Q	第4Q				
細胞培養インフルエンザワクチンの製法の確立	培養方法の確立(パイロットスケール)	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
			[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
	培養方法の確立(実生産スケール)	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
		[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
		[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
経鼻投与型アジュバントの検索および剤形の決定	精製方法の確立	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
	アジュバントの検索	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
	剤形の確立	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
	試作ワクチンの作製(パイロットスケール)	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
	試作ワクチンの品質試験	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
試作ワクチンの非臨床試験	安全性試験	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]
	薬効試験	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]	[Red arrow]

平成24年5月31日

