

審議結果報告書

平成 19 年 9 月 18 日
医薬食品局審査管理課

[販 売 名] 沈降新型インフルエンザワクチン「ビケン」
[一 般 名] 沈降新型インフルエンザワクチン
[申 請 者] 財団法人 阪大微生物病研究会
[申請年月日] 平成 19 年 1 月 30 日

[審 議 結 果]

平成 19 年 8 月 31 日に開催された医薬品第二部会において、本品目を承認して差し支えないとされ、薬事・食品衛生審議会薬事分科会に報告することとされた。

なお、本品目は生物由来製品に該当し、再審査期間 10 年とし、原体及び製剤ともに劇薬に該当するとされた。

審査報告書

平成19年8月15日

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

承認申請のあった下記の医薬品にかかる医薬品医療機器総合機構での審査結果は、以下の通りである。

記

- [販 売 名] 沈降新型インフルエンザワクチン「ビケン」
- [一 般 名] 沈降新型インフルエンザワクチン
- [申 請 者] 財団法人阪大微生物病研究会
- [申請年月日] 平成19年1月30日
- [申請区分] 1- (1) 新有効成分含有医薬品
- [剤型・含量] 1mL 中に、有効成分として不活化新型インフルエンザウイルスを 30 μ g (HA 含量)、免疫補助剤として水酸化アルミニウムゲル 0.3mg (アルミニウム換算)、保存剤としてチメロサール 0.008mg を含有する懸濁性注射剤である。
- [特記事項]
 - ・生物学的製剤基準 (案)
 - 「沈降新型インフルエンザワクチン」が提出されている。
 - ・希少疾病用医薬品 (指定日: 平成18年6月9日)
- [審査担当部] 生物系審査部

審査結果

平成19年8月15日

[販売名] 沈降新型インフルエンザワクチン「ビケン」

[一般名] 沈降新型インフルエンザワクチン

[申請者] 財団法人阪大微生物病研究会

[申請年月日] 平成19年1月30日（製造販売承認申請）

[審査結果]

提出された資料から、本剤は新型インフルエンザ（H5N1）の感染防御あるいは重症化予防に対する有効性が期待でき、また、安全性に重大な問題はないと判断する。

有効性については、国内臨床試験の成績から本剤接種により抗体の産生誘導が認められ、免疫原性を有することが示されており、また、マウス攻撃試験においてH5N1型インフルエンザ強毒株による発症防御が確認されていることから、本剤接種により新型インフルエンザ（H5N1）感染防御あるいは重症化予防が期待されると考える。安全性について重篤な副反応は認められず、対象疾患が重篤であることを鑑み、承認を不可とする特段の問題はないものとする。ただし、本剤の使用にあたっては十分な情報提供がなされる必要があると考える。

以上、医薬品医療機器総合機構における審査の結果、本品目については、以下の効能・効果、用法・用量で承認して差し支えないと判断した。

[効能・効果] 新型インフルエンザ（H5N1）の予防

[用法・用量] 通常、0.5mLをおよそ3週間の間隔をおいて筋肉内もしくは皮下に2回注射する。

審査報告 (1)

平成 19 年 6 月 29 日

I. 申請品目

[販売名]	沈降新型インフルエンザワクチン「ビケン」
[一般名]	沈降新型インフルエンザワクチン
[申請者]	財団法人阪大微生物病研究会
[申請年月日]	平成 19 年 1 月 30 日 (製造販売承認申請)
[剤型・含量]	1mL 中に、有効成分として不活化新型インフルエンザウイルスを 10 μ g 又は 30 μ g (HA 含量)、免疫補助剤として水酸化アルミニウム 0.3mg (アルミニウム換算)、保存剤としてチメロサル 0.008mg を含有する懸濁性注射剤である。
[申請時効能・効果]	新型インフルエンザの予防
[申請時用法・用量]	通常、HA 含量 (相当値) として 15 μ g を 2 回皮下あるいは筋肉内に接種する。必要に応じて、5~15 μ g を 1 回又は 2 回、皮下あるいは筋肉内に接種することもできる。
[特記事項]	<ul style="list-style-type: none">・生物学的製剤基準 (案)「沈降新型インフルエンザワクチン」が提出されている。・希少疾病用医薬品 (指定日：平成 18 年 6 月 9 日)

II. 提出された資料の概略及び医薬品医療機器総合機構における審査の概略

本申請において、申請者が提出した資料及び独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (以下、機構) からの照会事項に対する申請者の回答の概略は、下記のようなものであった。

1. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

インフルエンザは、オルソミクソウイルス科に属するインフルエンザウイルスの感染によって起こる急性呼吸器疾患である。インフルエンザウイルスは、血清型により、A、B 及び C 型に分類される。このうち A 型インフルエンザウイルスは、ウイルス表面に存在する赤血球凝集素 (ヘムアグルチニン Hemagglutinin : HA) とノイラミニダーゼ (Neuraminidase : NA) の抗原性の違いにより亜型 (H1 から H16 及び N1 から N9) に分類される。A 型ウイルスはヒトの他、鳥類、ブタ、ウマ等、多様な動物を宿主としており、全ての亜型が分離されている鳥類以外は、亜型により宿主となる動物種が異なる。現在ヒト社会で流行を繰り返している A 型ウイルスは H1N1 型と H3N2 型であるが、同じ亜型の中でも抗原連続変異 (抗原ドリフト) により抗原性が毎年少しずつ変化するために、ヒトが持っているインフルエンザ特異的抗体によって完全に中和できず、流行を繰り返すとされている。また、抗原不連続変異 (抗原シフト) により、抗原性及び種特異性が異なる新たな亜型の A 型ウイルスが出現することがあるが、それがヒトへの感染性を有する場合、現在の人類が獲得してい

る免疫では感染防御ができなくなり、ウイルスが次々にヒトに感染して世界的な大流行（パンデミック）を起こす可能性が懸念されている。実際に、20世紀には、1918年のスペインインフルエンザ（H1N1型）、1957年のアジアインフルエンザ（H2N2型）、1968年の香港インフルエンザ（H3N2型）と、新型のインフルエンザウイルスによる3回のパンデミックが発生しており、多大な健康被害とそれに伴う社会機能や経済活動の低下が記録されている。

新型インフルエンザとは、後述の「新型インフルエンザ対策報告書」（平成16年8月）においては、「過去数十年間にヒトが経験したことがないHAまたはNA亜型のウイルスがヒトの間で伝播して、インフルエンザの流行を起こした時、これを新型インフルエンザと呼ぶ。」と定義されている。理論的にはH1N1型及びH3N2型以外の全ての亜型のA型ウイルスが新型インフルエンザを引き起こす可能性があるが、1997年の香港におけるH5N1型高病原性鳥インフルエンザのヒトへの感染の報告以降、H5N1型高病原性鳥インフルエンザのヒトへの感染の報告が世界各地で相次いでおり（2007年6月25日時点で感染315例、うち死亡191例 www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en/index.html）、これまで確認された当該ウイルスのヒトへの感染例では、高死亡率に加え、全身感染、出血傾向、多臓器不全、サイトカインストームなど、インフルエンザの概念を超えた病態を示す極めて重篤な疾病である。したがって、このウイルスに由来する新型インフルエンザの発生は、かつて経験したことの無い大きな脅威となる。現在、H5N1型は新型インフルエンザを引き起こす可能性が高い亜型として、各国の協力の下、世界保健機関（WHO）によりその発生動向が監視され、国際的な新型インフルエンザ対策の取り組みが進められている。

国内においては、平成9年5月に厚生省（当時）に設置された「新型インフルエンザ対策検討会」により、同年10月24日に「新型インフルエンザ対策検討会報告書」がまとめられ、新型インフルエンザ対策の土台となる通年型のインフルエンザ対策整備の必要性、パンデミック時の緊急増産を見据えたワクチン製造体制の整備や製造技術の改良・開発の必要性が示された。また、「健康危機管理基本指針」の策定、「健康危機管理調整会議」の設置等、体制整備が進められた。平成11年には「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下、「感染症法」という。）」が施行され、同法に基づく「インフルエンザに関する特定感染症予防指針」が策定されるとともに、「インフルエンザ総合対策連絡会議」が「健康危機管理調整会議」の下に設置された。さらに平成15年10月に厚生科学審議会感染症部会に設置された「新型インフルエンザ対策に関する検討小委員会」により平成16年8月に作成された「新型インフルエンザ対策報告書」の中において、新型インフルエンザワクチンに関しては、後述の田代らの検討に基づいたアジュバント（免疫補助剤）添加製剤開発の必要性とともに、モックアップワクチンによる開発^{※1}を行い、薬事法に基づく承認取得を目標とすること等、新たな新型インフルエンザワクチン開発の方向性が示された。

※1 モックアップワクチンによる開発

新型インフルエンザの流行発生時に、実際に流行している新型インフルエンザウイルス株を用いてワクチン開発を行うことは、開発期間、製造期間を考慮すると現実的ではない。従って、新型インフルエンザウイルスを想定したモデルウイルスを用いて作製されたモックアップワクチンのデータに基づき製造販売承認を取得し、新型インフルエンザが発生した場合には、新型インフルエンザワクチン製造用株等を用い、承認された製造方法に従ってワクチンを迅速に製造し供給する。

さらに2005年5月にWHOが公表した「WHO Global Influenza Preparedness Plan」を基準として、各国で新型インフルエンザ発生時の行動計画が策定され、国内では同年11月に、「新型インフルエンザ対策行動計画」（以下「行動計画」という。）が厚生労働省を中心に取りまとめられ、関係府省庁が連携・協力することが確認された。新型インフルエンザワクチンについても、基本的にこの行動計画に即して使用される。

平成16年8月に作成された「新型インフルエンザ対策報告書」を受け、本剤の開発に先立ち、同年8月、厚生労働省、機構、国立感染症研究所及び社団法人細菌製剤協会のインフルエンザワクチン製造4社所の会議において、新型インフルエンザワクチンの開発方針が確認された。田代らによる平成13～14年度厚生労働科学研究において、1997年に香港で発生した高病原性鳥インフルエンザHong Kong156/97(H5N1)から分離された株をリバーシジェネティクス法により弱毒化し、既承認の製造方法で試作されたHAワクチン及び全粒子ワクチン（いずれもアジュバント非添加）は、臨床薬理試験において、有意な抗体価上昇は観察されなかったが、全粒子ワクチンはHAワクチンよりやや高い中和抗体価を示した（<http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIST00.do>、H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究、研究年度；平成14年度）。そこで、より免疫原性が高い全粒子ワクチンに、ワクチンで使用実績があるアルミニウムアジュバントを添加した製剤を開発することとされた。モックアップワクチンの製造株としては、英国国立生物学的製剤研究所（NIBSC）において2004年にベトナムで分離されたA/Viet Nam/1194/2004(H5N1)をリバーシジェネティクス法により弱毒化して得られたNIBRG-14株を用いることとされた。

なお、本剤は、平成18年3月31日付薬食審査発第0331007号課長通知により希少疾病用医薬品の指定対象とされた「感染性の疾病の予防の用途に用いる医薬品」のうち、「遺伝子の突然変異等により新たに発生する又は再興する可能性が否定できない感染性の疾病であって、一旦発生すれば国民の生命、健康に重大な影響を与えるおそれがあるものの、その発生時期、流行規模等が不明であり、指定申請時点では発生していないものの予防の用途に用いるワクチン」に該当するとして平成18年4月14日付で厚生労働省に指定申請され、同年6月9日付で、予定される効能・効果「インフルエンザ（H5N1）の予防」として希少疾病用医薬品の指定（指定番号：第186号）を受けている。

2. 品質に関する資料

平成16年8月の「新型インフルエンザ対策報告書」に記されているように、新型インフルエンザ対策として本剤の開発が急がれていた。そのため申請時点では十分なデータが取得されていなかったことから、多数の照会を繰り返して得られた情報及び申請後に取得された追加データを踏まえて、平成19年5月に提出された修正版資料に基づき、以下に資料の概略を記す。現在、さらなる追加データ、情報の提出を求めているところである。

<提出された資料の概略>

本剤は、シードとなる新型インフルエンザウイルスを発育鶏卵で増殖させ、精製したウイルス粒子をホルマリンにより不活化し、免疫補助剤として水酸化アルミニウムを添加したワクチンである。

(1) 原薬

1) 製造方法

不活化開始から●●●日後に検体を採取し、工程内管理試験として不活化試験を実施する。不活化期間は“不活化開始日から試験に適合した不活化試験の開始日までの期間”の●倍以上とする。不活化試験が不適合となった場合は不活化反応を継続し、適合するまで不活化試験を実施する。

<透析・最終ろ過工程>

遠心により不活化ウイルス浮遊液の夾雑物を除き、限外ろ過膜（分画分子量●●●）を用いて濃縮・透析後、リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液（PBS）を用いて液量を●gに調整する。さらに、安定剤としてホルマリン及びピメロサルを最終濃度●●●vol%及び●●●w/v%となるように添加する。これを●●●フィルター（孔径●●●μm）でろ過し、緩衝液で希釈して●kgとした原薬（原液）を●Cで保管する。

③重要工程・重要中間体及びプロセス・バリデーション

不活化工程は、精製した不活化前精製ウイルス浮遊液を不活化する工程であるため重要工程とし、工程内管理試験として不活化試験が設定されている。●●●μg/mLでは不活化開始後から●週間後、●●●μg/mLでは不活化開始後から●週間後で不活化されていることが、バリデーションにより確認されている。

最終ろ過工程は、無菌性の確保と不要な微粒子の除去を目的とする原薬調製の最終工程であるため重要工程とされている。

なお重要中間体は設定されていない。

④ヒト又は動物由来の原材料の管理

シードの調製に使用する SPF 発育鶏卵については、動物用生物学的製剤基準 SPF 鶏群の 23 の検査項目を確認し全ての病原体を否定した鶏が産卵したものをを用いる。製造時の培養に用いる発育鶏卵を採取するニワトリについては、ニューカッスル病、鶏伝染性気管支炎、鶏痘、鶏伝染性ファブリキウス嚢病、マレック病、鶏脳脊髄炎のワクチンが接種され、流行状況に応じて鶏伝染性喉頭気管炎、産卵低下症候群-1976、鶏伝染性コリーザ（A・C型）、マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症のワクチンも接種される。また、毎日の目視による健康管理及び産卵数確認、●●●及び以後●ヶ月毎に接種されたワクチンの感染症（鶏伝染性ファブリキウス嚢病を除く）に対する抗体調査等が行われる。

2) 特性解析

NIBRG-14 株を用いて製造されたモックアップワクチン原液について、シヨ糖密度勾配遠心、HA 含有率（SDS-PAGE）、各種動物の赤血球を用いた HA 試験による赤血球凝集性の比較、電子顕微鏡観察、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）解析、リン脂質含量（Folch 抽出後、リンモリブデン発色で定量）等の解析が実施されている。シヨ糖密度勾配遠心及び HPLC 解析により、それぞれ HA 価及びたん白質（OD₂₈₀）が単峰性のピークであり、原薬が均一であるとしている。また、不活化前精製ウイルス浮遊液について、還元条件、非還元条件で SDS-PAGE を行い、インフルエンザウイルス構造たん白質である HA、NP、M1 たん白質の各分子量位置にバンドが観察された。以上の特性解析から原薬がインフルエンザウイルス粒子であることを確認したとしている。

3) 不純物

主要な製造工程由来の不純物として、発育鶏卵に由来する卵アルブミン及びエンドトキシンが考えられる。卵アルブミン含量については、ロットで粗精製工程及び精製工程で除去効率が約 $10^7 \sim 10^6$ 倍になることがバリデーションにより確認されている他、原薬の規格試験として管理されており、ロットの実測値は 2.16~3.55ng/mL である。

エンドトキシンについては、表 1 に示すように、発育鶏卵の状態が原因と考えられる尿膜腔液のエンドトキシン含量のバッチ間差が観察されたが、製造工程により 1.63% 以下（尿膜腔液比残存率）に除去され、原薬での実測値は 49.3~0.18EU/mL である。原薬の規格試験としても管理されている。

表 1：主な製造工程におけるエンドトキシン含量 (EU/mL) と残存率

原液 ロット番号*	バッチ 番号*	項目	培養工程	粗精製工程		精製工程	最終ろ過
			尿膜腔液	清澄化 ウイルス液		不活化前 精製ウイルス浮遊液	原液
A	G	エンドトキシン含量	1700	370	→	230	23.3
		残存率 (%)	100	3.19		0.14	0.02
B	H	エンドトキシン含量	3100	240	→	73	15.7
		残存率 (%)	100	1.11		0.03	0.01
C	I	エンドトキシン含量	6800	680	→	260	49.3
		残存率 (%)	100	1.56		0.04	0.01
D	J	エンドトキシン含量	7300	11	→	0.63	0.33
		残存率 (%)	100	0.02		0.00	0.00
E	K	エンドトキシン含量	0.26*	0.48	→	0.52	0.52
		残存率 (%)	100	16.6		1.89	1.63
F	L	エンドトキシン含量	0.30*	1.0	→		
		残存率 (%)	100	31.4			
F	M	エンドトキシン含量	0.25*	0.68	→	<0.25	0.18
		残存率 (%)	100	24.7		<1.00	0.57
F	N	エンドトキシン含量	0.25*	0.69	→		
		残存率 (%)	100	24.4			

*：1バッチが複数タンクで構成されているため実測値ではなく、各タンクの測定値を各液量に応じて加重平均した値

* 新薬承認情報提供時に置き換え

4) 規格及び試験方法

原薬について、染色試験（グラム染色）、無菌試験、不活化試験（発育鶏卵で3代継代し増幅されるウイルスが無いことを確認）、たん白質含量試験、HA 含量試験（SRD 試験；一元放射免疫拡散）、発熱試験、エンドトキシン試験、卵アルブミン含量試験（ELISA 法）が規格試験として設定されている。

なお、HA 含量試験（SRD 試験）については、SRD 試験用の試薬（標準抗原及び抗血清、「5）標準品又は標準物質」参照）が利用できない場合においては、たん白質含量に HA 含有率を乗じることにより HA 含量を求める。HA 含有率は不活化前精製ウイルス浮遊液において、工程内管理試験として SDS-PAGE 法により実施し算出される。

試験を実施したが規格試験として設定しなかった試験項目は、ウイルス含量試験（Chicken red cell agglutination (CCA) 価測定試験）ホルムアルデヒド含量試験、チメロサル含量試験、pH 試験及びマウス白血球数減少試験である。ウイルス含量試験（CCA 法）は、製造工程における回収率確認のために所内工程内管理試験として実施するが、製造用株により CCA 価が異なること、室間再現性に乏しいことに加え、規格試験の HA 含量試験（SRD 試験）がウイルス含量の指標となることから、当該試験は規格試験に設定しないとしている。ホルムアルデヒド含量試験、チメロサル含量試験、pH 試験等は、製剤の規格試験として管理するため、原薬の規格試験には設定されていない。マウス白血球数減少試験については、白血球減少を引き起こす原因物質が不明であり、ヒトにおける副反応との関連性が明らかになっておらず、安全性を評価する試験としての根拠に乏しいとして、規格試験には設定されていない。

5) 標準品又は標準物質

原薬の規格試験において使用する標準品として、標準インフルエンザ HA 抗原 (SRD 試験用) 及び参照抗インフルエンザ HA 抗血清及びたん白質定量用標準アルブミンがあり、いずれも国立感染症研究所より配布される。標準インフルエンザ HA 抗原 (SRD 試験用) については、遮光 10℃以下保存とされた初期ロットを除き、遮光して-20~-30℃に保存される。参照抗インフルエンザ HA 抗血清及びたん白質定量用標準アルブミンについては、それぞれ 10℃以下及び遮光して 4℃以下に保存される。なお、標準物質は使用されていない。

6) 安定性

長期保存試験は \pm ℃の条件下で実施され、申請時には 月まで、審査中に 月及び 月の成績が提出された。規格試験の 8 項目に加え、CCA 価測定試験、pH 試験、チメロサル含量試験、ホルムアルデヒド含量試験の計 12 項目について検討されたが、全て判定基準に適合しており大きな変動は見られなかった。なお、本試験は 月まで継続予定である。

加速試験は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $60 \pm 5\% \text{RH}$ の条件下で 6 ヶ月まで評価された。長期保存試験と同じ項目の試験に加え、分画試験 (シヨ糖密度勾配遠心法) 及び電子顕微鏡試験を実施したところ、無菌性及び pH 試験等の化学的性状、分画試験、電子顕微鏡による観察に変化は認められなかったが、たん白質含量及び HA 含量試験 (SRD 試験) は保存期間に伴い減少傾向が認められ、 月目でたん白質含量は約 %、HA 含量は約 % に減少していた。一方、CCA 価は増加傾向が認められた。

(2) 製剤

1) 製剤処方及び製造方法

本剤は、1mL 中に不活化新型インフルエンザウイルスを HA 含量として 10 μg 又は 30 μg を含有し、免疫補助剤である水酸化アルミニウムをアルミニウムとして 0.3mg 含む懸濁性注射剤である。他の添加剤として、1mL 中に、リン酸二水素カリウム 0.4mg、リン酸水素ナトリウム水和物 2.5mg、塩化ナトリウム 8.03mg 以下の他、保存剤としてチメロサル 0.008mg を含む。10 及び 30 $\mu\text{gHA/mL}$ の濃度について、それぞれ 1mL あるいは 10mL をガラスバイアルに充てんした計 種類の製剤が申請されている。

原薬の HA 含量 (SRD 試験、もしくは SRD 試験用試薬が準備できていない場合は、たん白質含量に、SDS-PAGE による HA 含有率測定試験で求めた HA 含有率を乗じて求める) に基づき秤量、PBS で希釈し、チメロサル及び以下のように調製された水酸化アルミニウム等を順次添加する。水酸化アルミニウムは、 溶液及び 溶液を混合して攪拌し、得られた 調製される。水酸化アルミニウムの規格試験として、確認試験、pH 試験、アルミニウム含量試験、純度試験 (重金属、ヒ素、硫酸塩)、異常毒性否定試験、エンドトキシン試験、無菌試験、粒度分布試験、たん白質吸着能確認試験が設定されている。

原薬に添加剤を混合した最終バルクを攪拌しながら送液し、ガラスバイアルに充てんして製剤を調製する。

2) 規格及び試験方法

製剤の規格試験として、pH 試験、アルミニウム含量試験、たん白質含量試験、チメロサル含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、無菌試験、不活化試験、異常毒性否定試験、力価試験 (SRD 試験)、採取容量試験、性状確認試験、不溶性異物検査、浸透圧試験、表示確認試験が設定されている。

なお、力価試験 (SRD 試験) については、SRD 試験用の試薬が準備できていない場合は、HA 含有率測定試験により HA 含量を求める。

これらの規格試験項目は、既承認のアジュバントを含まない全粒子インフルエンザワクチンの生物学的製剤基準「インフルエンザワクチン」の試験項目を参考に設定されたが、下記の 4 つの試験は以下の理由により削除された。マウス白血球数減少試験については、この現象を惹起する原因物質が特定されておらず、人での副反応との関連性が不明であり、安全性を評価する試験項目としての根拠に乏しい。ウイルス含量試験については、アジュバントの水酸化アルミニウム存在下では CCA 価を測定できず、ウイルス含量を測定する試験としては別に SRD 試験による力価試験が規格に設定されている。マウス体重減少試験は、規格試験のモルモットを用いる異常毒性否定試験に比べて感度が低い。力価試験 (卵中和試験) は試験に長期間を要し、SRD 試験による力価試験が規格に設定されるため必要性は低い。

3) 標準品及び標準物質

本剤の規格及び試験方法に用いる標準品は、原薬の規格試験で使用した標準品と同じである。

4) 安定性

製剤には 2 種類の剤型があるため、経時的変動の大きい試験項目とそうでない項目に分け、剤型及び測定時期を適切に組み合わせて 15 ヶ月の長期保存試験計画を立て成績を得た。10±2℃の条件下、表示確認試験を除く 13 項目の規格試験に加え、エンドトキシン試験、マウス白血球数減少試験、CCA 価測定試験、マウス体重減少試験、卵アルブミン含量試験、沈降製剤になっていることを確認するたん白質含量試験 (遠心上清)、マウス免疫原性試験の計 20 項目の試験を、HA 含量 30µg (30µgHA) /1mL/バイアルの製剤 3 ロットにて実施し、これから無菌試験、実容量試験、及び不溶性異物検査を除く 17 項目の試験を 10µgHA/1mL/バイアルの製剤 3 ロットにて実施した。30µgHA/mL の 10mL/バイアル製剤 3 ロットについては、pH 試験、たん白質含量試験、無菌試験、力価試験 (SRD 試験)、性状確認試験、エンドトキシン試験、たん白質含量試験 (遠心上清)、マウス免疫原性試験の 8 項目について、これから無菌試験を除いた 7 項目を 10µgHA/mL の 10mL/バイアル製剤 3 ロットで実施された。その結果、12 ヶ月の時点で全ての試験項目で適合し、大きな変動も認められていない。なお、現時点で 12 ヶ月目の成績を取得中である。

加速試験は、25±2℃、相対湿度 60±5%RH の条件下、6 ヶ月間検討された。長期保存試験と同じ 20 項目の試験を 30µgHA/1mL/バイアルの製剤 3 ロットで実施し、異常毒性否定試験、実容量試験、不溶性異物検査、マウス白血球数減少試験、マウス体重減少試験の 5 項目の試験を除く 15 項目の試験を 10µgHA/10mL/バイアル製剤 3 ロットで実施した。30µgHA/mL の 10mL/バイアル製剤については、アルミニウム含量試験、チメロサル含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、不活化試験、マウス白血球数減少試験、マウス体重減少試験を除いた 14 試験項目を実施し、10µgHA/mL の 10mL/バイアル製剤では、さらに異常毒性否定試験を削除した 13 項目について評価した。試験の結果、全ての

試験項目で適合していた。

光安定性試験は、無包装、密封されたバイアルを紙箱に包装した市販包装及びアルミ箔で遮光した3種類の製剤を照度 5000±200lx、25±2℃、相対湿度 60±5%RH の条件下、で 0、1、5、10 及び 15 日間照射した試料について解析された。pH や性状、浸透圧及びたん白質含量については、無包装でも暴光による値の変化が認められなかったが、力価試験（SRD 試験）は、無包装の試料は 5 日目で検出されなくなった。なお、市販包装及び遮光条件では、15 日間まで SRD 試験による HA 含量に変化はなかった。以上より、力価試験（SRD 試験）によって測定される HA 含量は光照射により影響を受けることから、臨床現場においては遮光等の注意が必要であることが示唆された。

<機構における審査の概略>

追加情報が十分提示されていない事項及び審査が終了していない製剤及び原薬の規格及び試験方法については審査報告（2）においてまとめて記載する。

（1）シードロットシステムについて

機構は、提出された資料の試験に用いられたロットの製造用株である NIBRG-14 株については、シードロットシステムを作製せず国立感染症研究所から配布されたシードが製造に用いられたことから、他の株での取り扱い及びシードロットシステムの構築に必要な期間について説明を求めたところ、申請者は以下のように回答した。別途、製造に使用された A/Indo/05/2005（H5N1）PR8-IBCDC-RG2 株（以下、インドネシア株）については、国立感染症研究所より配布されたオリジナルシードからマスターシード兼ワーキングシードを作製した。マスターシード及びワーキングシードから成るシードロットシステムの構築には、SPF 卵を発注してからワーキングシードが使用可能になるまで単純計算で●日、あらかじめ SPF 卵が準備できる場合は●日、マスターシード兼ワーキングシードについては、SPF 卵発注からシードが製造に使用できるようになるまで●日かかる。

機構は、パンデミック発生時等の緊急時には、シード（マスターシード）が作製された時点で、すぐに製造を開始する可能性があることは理解するが、プレパンデミック時等の緊急性が低い状況では、シードロットシステムを構築することが原則と考え、シードロットの作製を求めた。これに対し申請者は、以下のように回答した。今後、パンデミック発生時等、早急に製造を開始する必要がある場合には、マスターシードをワーキングシードとして兼用する場合もあるが、原則としてシードロットシステムを構築する予定である。

今回のモックアップワクチンである NIBRG-14 株は、国立感染症研究所が社団法人細菌製剤協会に依頼し作製したマスターシードについて、国立感染症研究所が一部のシード管理試験を実施し、HA 遺伝子配列等がオリジナルシードと同じであること等を確認の上、申請者らに配布された。機構は、緊急時には国立感染症研究所と申請者を含むワクチン製造業者との間で試料をやりとりできない可能性もあることから、今後は、申請者がシードロット作製及びシードの管理試験を行うように求めたところ、申請者は、国立感染症研究所からの技術移管を経て自社でシードの管理試験を含めたシードロット構築の体制を整えると回答した。

また機構は、NIBRG-14 株のシードについて●年以上の安定性は確認されていないこと及び異なる株では安定性が異なる可能性があることから、シードの融解時にウイルス含量等を確認するように求めたところ、申請者は、ワーキングシードを新たに調製するためにマスターシードを融解する時、及び連続した製造の最初のバッチでワーキングシードを使用する時に、HA 試験（赤血球凝集反応）

菌スペクトルを有する注射用ピペラシリンナトリウム、及び β -lactamase 産生菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、プロテウス・ミラビリス等に対し高い抗菌力を有する注射用セフメタゾールナトリウムを恒常的に添加している。しかし、NIBRG-14 株での製造では、短期間に大量に製造する必要がある場合、季節等を考慮した場合、エンドトキシン含量が高いロットの発生がみられた場合等、HA ワクチン製造時に検出された菌に応じて緑膿菌に対して高い抗菌力を有する硫酸ゲンタマイシン注射液、マルトフィリアに対して高い抗菌力を有する注射用塩酸ミノサイクリンを追加して使用した場合もあった。このように、常時使用する 2 種類以外の抗生物質の使用の要否及びその種類は一律に規定できない。また、プレドニゾロンについては、[redacted]での経験から、[redacted]のために添加したが、今後の新しい株については、製造開始前にプレドニゾロンの添加及び非添加条件下で培養し、[redacted]であれば添加することとする。

機構は、これらの抗生物質及びプレドニゾロンが以降の工程で適切に除去できるか説明を求め、申請者は、以下のように回答した。インフルエンザ HA ワクチンは、本剤と清澄化ウイルス浮遊液まで同じ精製工程で製造されるが、セフメタゾールナトリウム [redacted] ng/mL、ピペラシリンナトリウム [redacted] ng/mL、硫酸ゲンタマイシン [redacted] μ g/mL を製造用シードにおいて使用した場合、HPLC で清澄化ウイルス液中に検出される濃度は、それぞれ検出限界である [redacted] μ g/mL、[redacted] μ g/mL、[redacted] μ g/mL 未満であった。この後、製剤化までに [redacted] x10 [redacted] 倍以上希釈され、製剤での理論的な残留濃度は [redacted] [redacted] pg/mL 未満となる。ミノサイクリンについても、同様に残留量を解析中である。プレドニゾロンについては、製造用シード中の濃度は [redacted] μ g/mL であるが、採取した尿膜腔液中の残存濃度は検出限界未満 [redacted] ng/mL) であり、製剤化までには [redacted] x10 [redacted] 倍以上の希釈がなされるため、製剤での理論的残留濃度は [redacted] ng/mL 未満となる。以上から、抗生物質及びプレドニゾロンについては適切に除去できている。

機構は、発育鶏卵は、既承認のインフルエンザ HA ワクチンの製造に用いられるものと同様に管理されているが、その品質確保には現実的に限界があり、発育鶏卵の状態によって抗生物質の必要性が異なる場合があるため、一律に規定できないことは致し方ないと考える。また機構は、今後審査中に提出される塩酸ミノサイクリンの残留濃度が確認されれば、抗生物質の除去状況に関しては了承するものの、常時使用されているセフメタゾールナトリウム及びピペラシリンナトリウムは、WHO の不活化インフルエンザワクチンのガイドライン (WHO TRS No.927, 2005) において、使用しないよう推奨されている β -lactam 系抗生物質であることから、今後は使用しないように求めた。申請者は、今後これらを使用しないこと、及び、過去に発育鶏卵から分離されたエンドトキシン産生量の多い菌に対して高い抗菌作用を有する抗生物質を検索して用いること、及びこれらの製剤への残留量も検討することを回答し、機構はこれを了承した。

3) 不活化工程について

不活化工程はインフルエンザウイルスを不活化する唯一の工程であり、安全性にかかわる重要な工程と考えられる。工程内管理試験として不活化試験が設定されており、当該試験に合格した時点の不活化処理期間の [redacted] 倍以上を不活化期間として設定しているが、上限が定められてないことから、機構は、品質恒常性確保の観点から上限を規定する必要はないか尋ねたところ、申請者は次のよう

* ag はアトグラム。アト (a) はナノ、フェムトの下位の単位。

時点で適切に判定規準を見直すと回答した。

機構は以上の回答を了承した。

4) 精製工程について

機構は、精製工程の妥当性について、精製率及び回収率の観点から評価した。

精製率については、中間体と原薬とでは有効成分の測定法が異なり、有効成分の純度向上に基づく評価には限界があることから、工程を通して定量性にすぐれた試験法が採用されている不純物含量に基づいて、以下に精製工程を評価した。

エンドトキシンについては、「<提出された資料の概略> (1) 原薬 3) 不純物 表1」に示すように、尿膜腔液の●バッチのうち、ロット●●●は●●● EU/mL ●●●は●●● EU/mL と ●●● 倍近く異なることについて申請者に説明を求めたところ、●●●は、緊急に製造計画が立案されてから数ヶ月で製造開始することになり (20●●年●●月)、市場に流通している余剰卵から受け入れ基準に適合したものをを用いたため、エンドトキシン含量が高い発育鶏卵が含まれていた可能性が高いと回答した。機構はエンドトキシンについて以下のように考える。緊急時には、エンドトキシン量の高い卵しか入手できない可能性はあるが、製造用シードに添加する抗生物質を適切に選択すること、エンドトキシン値は各精製工程に設定されている所内工程内管理試験等によりモニターされ、原薬の規格試験で管理されていることから、卵由来のエンドトキシンは適切に管理可能であると考え。実際、エンドトキシン含量が高い尿膜腔液から精製された原液では残存率は●●●%以下であり、尿膜腔液でエンドトキシン値が低値であったロット●●● (残存率は●●●%) と比べ、同等以上の除去率で除去されていた。

また、卵アルブミンの除去状況について、申請者は、「<提出された資料の概略> (1) 原薬 3) 不純物」に示すように、恒常的に除去され不純物の除去は適切に行われていると評価できると述べている。原薬の比活性 (CCA 価/たん白質含量) は、●●● (平均: ●●●、標準偏差: ●●●) と、ロット間に顕著な差が認められない。以上から、機構は、示された精製工程により不純物は適切に除去可能であると判断する。

次に回収率について申請者に説明を求め、回答で示された情報から機構は以下のように考察した。これまでの NIBRG-14 株の●●●ロットの実製造スケールの製造実績から、卵 1 個あたりから得られる原液のたん白質含量は、●●●±●●● μg/egg、変動係数は ●●●%未満であることから、たん白回収率は安定していると評価できる。HA 含有率は、●●●±●●●% (NIBRG-14 株 ●●●ロットの成績) であったことから、卵 1 個に由来する原液 HA 量は NIBRG-14 株で約 ●●● μgHA であり、臨床用量が 15 μgHA/dose の場合には、卵 1 個から約 ●●● 用量分が得られることになる。インドネシア株での ●●●ロットの製造実績からは、卵 1 個に由来する原液 HA 量は約 ●●● μgHA/egg と、●●● 用量分であった。この株による差は、発育鶏卵での増殖性に由来するとされている。以上から、機構は、示された製造工程により、同一株については安定した回収率で有効成分が得られると判断するが、生産計画の立案にあたっては、使用する株の発育鶏卵での増殖性等を考慮する必要があると考える。

(3) 原薬の特性解析について

機構は、リバースジェネティクス法による H5N1 亜型のインフルエンザ HA ワクチンは、通年型のインフルエンザ HA ワクチンより抗原性が低く (*Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 2001; 356: 1953-1960)、

HA ワクチンよりも抗原性が高いとされている全粒子構造 (*Virus Res.*, 2004; 103: 163-171、*Lancet*, 2003; 362: 1959-1966) を保持していることを確認することが必要と考える。HPLC 解析において、カラムの分画可能分子量の範囲外にウイルス粒子のピークが観察されることから、機構は、この解析で検出できる不純物について説明を求めた。申請者は、原薬に尿膜腔液を添加した試料を用いた解析結果により卵由来の不純物が検出できることを示し、使用する HPLC カラムで分画可能な分子量幅にある不純物は検出可能であると述べた。機構は、ウイルス粒子のサイズを考慮すると HPLC カラムによるウイルス粒子の分解を感度良く検出することは難しいと考える。実際、原液にインフルエンザ HA ワクチン原液を添加して解析した場合、ウイルス粒子と非常に近い位置に HA のピークが認められた。ウイルス粒子の分解を検出するためには、ショ糖密度勾配による分画試験等、他の手法での結果も併せて総合的に評価する必要があると考える。なお、ショ糖密度勾配については、次項「(4)原薬の安定性について」に記載した。

機構は、申請者は SDS-PAGE で観察されたバンドについて、分子量のみに基づいてインフルエンザウイルスの HA、HA1 及び HA2 たん白質であるとしていることから、アミノ酸配列分析や特異的抗体を用いた検出等によりこれらのバンドが HA1、HA2 たん白質であることを確認するか、あるいは原薬について、インフルエンザウイルスを含有することを確認する必要はないか申請者に尋ねた。申請者は追加の解析を実施し、以下のように説明した。還元条件下における SDS-PAGE で観察される HA1 及び HA2 と推定したバンドを膜に転写し、N 末端アミノ酸を 5 残基まで解析したところ、HA2 の分子量を有するバンドからは NIBRG-14 株の HA のアミノ酸 (343~347 番目) のみが検出された。HA1 の分子量を有するバンドからは複数のアミノ酸のシグナルが観察されたが、一番大きいピークについては、この解析法で同定できないシステインを除いて HA たん白質のアミノ酸配列 (17~21 番目) と一致した。さらに SRD 試験用のヒツジ抗 HA 血清を用いて非還元及び還元下で泳動した SDS-PAGE についてウェスタンブロッティングを行ったところ、分子量約 76kDa、53kDa、23kDa にバンドが検出された。以上から SDS-PAGE で観察されたバンドは、HA、HA1 及び HA2 たん白質であることが強く示唆された。機構は以上の申請者の説明を了承した。

(4) 原薬の安定性について

原薬の長期安定性について、●ヶ月目の成績が追加提出されたが、実施された試験項目については大きな問題は認められなかった。有効成分含量の指標である HA 含量試験 (SRD 試験) 及び CCA 価測定試験についても減少傾向はみられず、むしろ CCA 価については増加が認められた。これについて説明を求めたところ、申請者は以下のように回答した。CCA 価は HA 抗原 (ウイルス) 量を示す測定値であるが、保存により増加する可能性は考えにくく、異なる原理の SRD 試験で評価した HA 含量には増加傾向が認められないことから、HA 抗原は変動していないと考える。CCA 価測定試験に何らかの影響を及ぼす因子があると考えられることから、今後、それについて検討して結果を提出する。機構は申請者の回答を了承し、今後提出される結果を確認することとした。

機構は、長期保存試験の成績から、有効成分含量は安定と評価できるものの、ウイルス全粒子の高次構造の保持も有効性に重要な要素であることから、高次構造の安定性を示す成績を求めた。申請者は、長期保存●ヶ月目の試料について、電子顕微鏡観察及びショ糖密度勾配遠心による分画試験 (HA 価の分画パターンにより評価) 試験を追加実施した結果を提出し、●ヶ月と比較して●ヶ月保存後でも変化がないと説明した。機構は、ショ糖密度勾配遠心による分画試験成績について、

保存●ヶ月ではウイルス粒子ピークより低密度側に観察されるショルダーが、●ヶ月に比べ明らかに大きくなっていることから、この変化が有効性・安全性に及ぼす影響を尋ねたところ、申請者は、以下のように説明した。ショ糖密度が低い側での HA 価の検出は、ウイルスの沈降速度にかかわる性状の変化、特にウイルス粒子の分解が危惧されるが、電子顕微鏡観察で分解物等はほとんど観察されなかったこと及びロットによっては●ヶ月にも分画試験で同様のショルダーが観察されること等から、試験方法もしくは原液の特性に由来したものと考えており、有効性・安全性に影響を及ぼすことはないとする。

機構は以下のように考える。加速試験においては、保存●ヶ月で HA 含量が●～●%に減少しているにもかかわらず、ショ糖密度勾配遠心分画試験の HA 価積分値には変化がみられなかったことから、この分析法では●～●%程度の HA 含量減少に相当するウイルス粒子の分解は検出できない可能性がある。しかし、HPLC 解析等でウイルス粒子の分解を感度良く検出することも困難（前項「(3)原薬の特性解析について」参照）であり、また、H5N1 インフルエンザウイルスは抗原性が低く、アジュバントを含まない原薬では高次構造を反映した免疫原性（有効性）等を動物を用いて適切に確認することも難しいため、ショ糖密度勾配遠心による分画試験、電子顕微鏡での観察及び HA 含量試験（SRD 試験）の成績等に基づいて、総合的に評価せざるを得ない。しかしながら、品質試験成績、安定性試験成績等を評価する際には、ウイルス粒子の高次構造の検出には限界があることに十分留意する必要がある。

機構は、申請時には原薬の有効期間が設定されていなかったため、申請者にこれを設定するように求めたところ、追加提出された成績に基づき有効期間を●ヶ月と設定し、機構はこれについて了承した。なお、継続中の長期保存試験において●ヶ月目の安定性が確認できれば、有効期間を●ヶ月に延長する承認事項一部変更申請がなされる予定である。

また機構は、異なる株では安定性も異なる可能性があることから、株間での差異に関する十分な情報が蓄積されるまでの間は、新たな株を用いて製造した原薬について、少なくとも有効成分を評価する試験（たん白質含量試験、HA 含量試験（SRD 試験）及びショ糖密度勾配遠心による分画試験等）については安定性を検討するように求めた。申請者は了解し、製造していたインドネシア株についても、●年まで長期保存試験を実施すると回答した。

(5) 製剤の製造工程について

製剤の製造工程には工程内管理試験が設定されておらず、また重要工程は充てん工程のみであったが、機構の求めに応じ、製剤の無菌性確保の観点から最終バルク調整工程も重要工程に追加された。充てん工程については、機構は、充てん量の確認及び密封性の確認を工程内管理試験に追加するように求め、申請者は適切に対応すると回答した。

また、プロセスバリデーションとして充てん工程の無菌性及び充てん容量が評価されていたが、本剤は懸濁性であるため、充てん時等の攪拌条件や有効成分充てん量の均一性、アジュバントの吸着等も重要と考えられることから、機構は、これらの条件を適切に規定するように求め、必要であれば工程バリデーションを行うよう求めた。申請者は、本剤の製造で使用するものと同じ充てん機を用いて、他の沈降製剤及び模擬液により均一に充てんできること確認した成績を追加提出し、さらに、パンデミックが発生して国から製剤製造の指示が出るまでは製剤の実製造は行われなことから、今後、実製造の際にはコンカレントバリデーションとして充てん条件の妥当性を確認する予

定であると説明した。機構はこれを了承した。

(6) 製剤の安定性について

製剤の長期保存試験について、15ヶ月目の試験成績が追加提出され、特段の品質の変動は見られなかった。

機構は、マウス免疫原性試験は有効性を直接確認できる有用な試験であると考えているが、加速試験6ヶ月の成績では、たん白質含量や力価試験（SRD試験）成績が約10～20%減少してもマウス免疫原性試験での免疫原性の低下は全く観察されないことから、定量性は高くないと考える。一方、マウス免疫原性試験成績はED₅₀で表されているが、この試験で得られる抗体価は定量的な数値として得られるため、同時に評価する参照品のデータを踏まえてより定量的な数値として評価することは可能と考え、機構は、マウス免疫原性試験成績を定量的な数値で示すこと、及び、抗体価測定の日間差やマウスの固体差を補正するため参照品との相対抗体価でも評価することを求めた。

申請者は、平行線定量法に基づきマウス免疫原性試験成績を参照品に対する相対抗体価として示したが、以下のように説明した。平行線定量法は、回帰直線の平行性及び直線性が成立している場合に適用可能な解析方法であるが、今回の試験成績では平行性及び直線性が不十分で適切ではないが、一応、相対価も算出したところ、ばらつきが大きいものの保存期間による変動は観察されなかった。また、申請資料に示しているED₅₀で表すマウス免疫原性試験法の精度を検討したところ変動係数は■%であり、たん白質含量や力価試験（SRD試験）でみられた10～20%程度の減少は検出されない可能性がある。

機構は、以下のように考える。申請者が説明するように、参照品に対する相対値で評価することは困難であり、ED₅₀で評価する方法もマウスの固体差等の影響が大きいと考えられ、試験の精度も考慮するとマウス免疫原性試験の定量性は十分とは考えがたい。一方、有効性を評価する試験としては、力価試験として実施されているSRD試験は定量性が高いが、ウイルス粒子を可溶化して免疫泳動する試験系のため、高次構造あるいは免疫原性を直接評価する方法ではない。また10～20%程度のSRD試験での力価低下がマウスの免疫原性試験成績では見られなかったことは、この程度の力価低下はマウスの免疫原性に影響を及ぼさないと考察することも可能であるが、マウス免疫原性試験の定量性を考慮すれば検出できなかったと考えるのが妥当である。すなわち、有効性に関する安定性を十分に評価できる試験法はないものの、SRD試験等のHA抗原含量の評価法も含め、多様な原理を用いた試験成績により品質の変化がないことを確認し、製剤の安定性を担保することで致し方ないとする。

申請者は、長期保存試験成績から製剤の有効期間として15ヶ月が担保できるとしており、機構はこれを了承するが、異なる株では製剤の安定性も異なる可能性があることから、新たな株を用いて本剤を製造する際には長期保存試験を実施し、安定性が担保されることを確認するように求め、申請者は適切に対応すると回答した。

(7) 試験の分析バリデーションについて

申請時に示された原薬及び製剤の各規格試験の分析バリデーションは、検討不十分もしくは未実施のものが多く、試験成績の評価の際、数値のばらつきが試験法によるものか、試料によるものかが判断できず、公定書収載の試験についても、特異性や共存する物質の影響等の評価が必要と考え

られたものもあった。機構は、重要な工程内管理試験も含め、原薬及び製剤の規格試験について試験法の評価が十分であるか確認するよう申請者に求めたところ、約 20 項目の試験について追加実施した試験成績が提出された。なお、実施中の試験については、今後成績を取得し、提出すると申請者は述べ、機構はそれを確認することとした。

3. 非臨床に関する資料

(i) 薬理試験成績の概要

<提出された資料の概略>

(1) 効力を裏付ける試験

1) 抗体価測定試験

30 μ gHA/mL の不活化全粒子新型インフルエンザウイルス（原薬）に水酸化アルミニウムゲルをアルミニウムとして 0.3mg/mL 添加（A；申請製剤と同じ組成）又は 0.9mg/mL 添加（B）したもの、及び非添加（C）の 3 種類の被験液を調製した。各液について、5 週齢の雌 BALB/c マウス（1 群 10 匹）に、1 匹あたり HA 抗原量として 0.024 μ gHA/100 μ L、0.12 μ gHA/100 μ L、0.6 μ gHA/100 μ L 又は 3 μ gHA/100 μ L を大腿部筋肉内又は背部皮下に 100 μ L ずつ 3 週間隔で 2 回投与した。対照群として PBS 100 μ L を同様に投与した。2 回目の投与から 2 週間後に採血し、HI 抗体価及び中和抗体価を測定し、HA 抗原量の用量依存性、水酸化アルミニウム添加の有無及び添加量、投与経路の違い等について検討した。

・ HI 抗体価及び中和抗体価

検討された投与抗原量 0.024~3 μ gHA の範囲において、平均 HI 抗体価（幾何平均値）及び平均中和抗体価（幾何平均値）はともに、用量依存的な上昇を示すことが確認された。HI 抗体価については、0.6 μ gHA 投与群では、HI 抗体価 1:40 以上を示すマウスの割合が、水酸化アルミニウム非添加群で 50~60%であったのに対して、水酸化アルミニウム添加群では 90%以上であった。また、中和抗体価については、0.6 μ gHA 投与群において、中和抗体価 1:160 以上を示すマウスの割合は水酸化アルミニウム非添加群では 50%であったのに対して、水酸化アルミニウム添加の場合は 80%以上であった。

以上の様に、HI 抗体価及び中和抗体価ともに、水酸化アルミニウム添加群は非添加群に比べて有意に高い抗体価を示した。一方、水酸化アルミニウム添加量の異なるワクチン（A）と（B）の HI 抗体価及び中和抗体価の上昇の程度については、大きな差は認められなかった。また、投与経路の違いについては、HI 抗体価及び中和抗体価ともに皮下投与に比べて筋肉内投与の方が有意に高い抗体価を示した。

2) 攻撃試験

8 週齢の雌 BALB/c マウス 20 匹（/群）に、本剤（30 μ gHA/mL の不活化全粒子新型インフルエンザウイルスに水酸化アルミニウムをアルミニウムとして 0.3mg/mL 添加した製剤）100 μ L、又は対照薬として水酸化アルミニウム溶液（アルミニウムとして 0.3mg/mL）100 μ L を 3 週間隔で 2 回皮下投与した。2 回目の投与から 2 週間後に、各群 10 匹より HI 抗体価、中和抗体価を測定するために全採血を行い、残りの各群 10 匹に 20MLD₅₀（マウス 50%致死量）の強毒 H5N1 型インフルエンザウイルス（A/Viet Nam/JP1203/04）を経鼻感染させ、2 週間経過観察し、生存率を調べた。

本剤投与群では、感染後数日目から 10 日目頃まで、軽度の立毛はあるものの重篤な症状は観察されず、10 匹全てが回復した。一方、対照群では、感染後数日目から軽度の立毛があり、日数の経過とともに、自発運動減少、食欲不振、被毛粗剛、消瘦、神経症状（後肢麻痺、一方向旋回等）等の重篤な症状を示し、経鼻感染後 7 日目に 1 匹、8 日目に 2 匹、11 日目までに 5 匹（9、10 日目に死亡した数を含む）、14 日目にさらに 1 匹死亡した。また、HI 抗体価は対照群では全て 10 以下（検出限界以下）であったのに対して、本剤投与群では 10~40（幾何平均値：16.2）であり、中和抗体価は対照群では全て 20 以下（検出限界以下）であったのに対して、本剤投与群では 20~640（幾何平均値：149.3）であった。

このことから、本剤は、強毒株の攻撃による症状の重篤化や死亡に対して防御効果を示すことが確認された。

(2) 安全性薬理試験成績の概要

1) 中枢神経系に及ぼす影響

5 週齢の雄 Crl:CD (SD) 系ラット 6 匹（/群）を用いて、本剤 0.25mL/kg 又は 0.5mL/kg（臨床最大投与量の 25 及び 50 倍量に相当）を背部皮下に単回投与した。本剤の臨床投与量の 25 倍量及び 50 倍量に相当する 0.25mL/kg 及び 0.5mL/kg のいずれを投与した場合でも、ラットの一般症状及び行動に影響を及ぼさなかった。

2) 心血管系及び呼吸器系に及ぼす影響（テレメトリー法）

8 ヶ月齢の雄ビーグル犬 4 匹（/群）を用いて、本剤 0.25mL/kg 及び 0.5mL/kg（臨床最大投与量の 25 及び 50 倍量に相当）をイヌの背部皮下に 2 週間隔で 2 回投与した。心血管系の評価項目として、血圧（収縮期血圧、拡張期血圧及び平均血圧）、心拍数、PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc が評価された。また、呼吸器系の評価項目として呼吸数、動脈血中 pO₂、pCO₂、pH 及びヘモグロビン O₂ saturation（%）が評価された。

・心血管系

0.25mL/kg の 2 回目投与において、投与後 4 時間では、QTc に有意な延長が認められ、0.5mL/kg の 2 回目投与において、投与後 2 時間では、QT 間隔及び QTc に有意な短縮及び延長が認められた。しかしながら、0.5mL/kg 投与では、QT 間隔に影響が認められた時点で心拍数が増加したことから心拍数の変化による影響と考えられること、また、QTc はいずれも投与前値と比較して相違がないことからこれらの変化は本剤による影響ではないと考えられる。その他の評価項目についても、本剤は影響を及ぼさなかった。

・呼吸器系

0.25mL/kg 又は 0.5mL/kg の 1 回目又は 2 回目の投与前後において、pO₂、pCO₂、pH 及びヘモグロビン O₂ saturation（%）等に有意な高値あるいは低値が観察された場合があるが、これらの変化は全て正常動物の生理的範囲内の変動であると考えられる。また、0.25mL/kg 又は 0.5mL/kg の 1 回目又は 2 回目の投与のいずれの観察時点においても、イヌの一般状態に影響は及ぼさなかった。

以上のことから、本剤は中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対して影響を及ぼさないとされた。