

200401173A

厚生労働省科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

ワクチンの製造株の品質管理に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤 篤

平成 17(2004)年 3 月

## 目 次

平成 16 年度

### I. 総括研究報告書

ワクチン製造株の品質管理に関する研究

主任研究者：加藤 篤

----- 2

### II. 分担研究報告書

#### 1. ワクチン製造株のシードロット・システム導入に関する研究

田代真人：協力研究者 海野幸子 齋藤義弘 大槻紀之 棚林 清 佐藤大作

----- 8

#### 2. ワクチン製造承認株、マスターシード、製造用ワーキングシード及び5代の継代可能株の理解について

海野幸子：協力研究者 大槻紀之

----- 10

#### 3. 麻しんワクチンのシードロットシステム導入における問題点についての研究

齋藤義弘：協力研究者 沼崎 啓

----- 14

#### 4. ワクチンの製造株の品質管理に関する研究

五味康行：協力研究者 宮武克昌

----- 17

#### 5. ワクチン製造株の品質管理に関する研究

仁田義弘：協力研究者 末原章宏、渡辺秀夫

----- 21

#### 6. シードロットシステム導入のための生ワクチン製造株の品質管理について

李 富雄：協力研究者 佐々木 学、服部 信章

----- 24

#### 7. ワクチン製造株の品質管理に関する研究

大隈邦夫：協力研究者 倉永雅彦、上田謙二

----- 27

#### 8. ワクチンの製造株の品質管理に関する研究

岡部信彦：研究協力者 多屋馨子

----- 29

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 35

## ワクチン製造株の品質管理に関する研究（16241501）

主任研究者 加藤 篤 国立感染症研究所 ウイルス第三部 室長

**研究要旨** 我が国の生物製剤の品質管理方法において、シードロットシステムに関する議論は昭和 50 年から行われており、生ワクチン株の保管並びに継代を公的研究機関あるいは行政機関と製造メーカーが共に管理することにより、より均一なものにすべきであると言われて久しい。昭和 61 年に生ワクチンとして初めて水痘ワクチンがシードロットシステムを採用したワクチンとして認可され、新たな道が開かれかに見えた。しかしそれから、18 年経過しても現行の他の生ワクチンをシードロットシステムへ切替える作業は進んでおらず、未だこの方式の統一的な採用にはなっていない。何が、進行を阻んでいるのか？本研究事業は、この問いを製造メーカー毎、製剤毎に明らかにすることから開始した。製造承認株の使用記録及び保存管理が不明瞭、製造用保存株と製造用ワーキング株という概念が定着しておらず、その継代関係において単純な親子関係でなく混合されている場合がある。同様の理由で製造用ワーキングから製造用ワーキングが作られた場合があることが明らかになった。

### 分担研究者

田代真人 国立感染症研究所ウイルス第三部  
部長  
岡部信彦 同感染症情報センター  
センター長  
海野幸子 同ウイルス第三部 室長  
斉藤義弘 同上 主任研究官  
大隈邦夫 (財)化学及血清療法研究所 部長  
仁田義弘 武田薬品工業(株) 部長  
李 富雄 (社)北里研究所 部門長  
五味康行 (財)阪大微生物病研究会  
技術部 課長補佐

倉永雅彦 (財)化学及血清療法研究所第一製  
造部第2課 課長  
上田謙二 同第一製造部上級技術員  
末原章宏 武田薬品工業(株)光工場生物製剤  
部 生物技術 マネージャー  
渡辺秀夫 同光工場生物製剤部生物第一  
佐々木学 (社)北里研究所品質部門部 部門  
長  
服部信章 同品質保証部門 部門長補佐  
宮武克昌 (財)阪大微生物病研究会 製造部  
生ウイルス製剤チーム 課長  
佐藤大作 厚生労働省医薬食品局

### 協力研究者

多屋馨子 国立感染症研究所感染症情報セン  
ター 室長  
沼崎 啓 同ウイルス第三部第三 室長  
大槻紀之 同第二室 研究官

### A. 研究目的

有効で且つ安全と認められた生ウイルスワクチン原株から製造される生ワクチンといってもウイルスが本来的に変異しやすい生き物

であるために、品質間の差をまったく無くすな限り一定品質のワクチンを製造し、その品質を可能な限りの方法で担保して供給することは、医薬品としてのワクチンのためには必須である。そのため生物製剤GMPが導入されて、製造過程の再現性・均一性が図られた。ところが、過去に実用化された生ワクチン株のいくつかは、ワクチン原株（オリジナルシードウイルス、試作ワクチン株）、野外試験株（製造承認株、オリジナルワクチン）、製造用保存種株（マスターシード）の間の継代歴上の位置付け（図）が開発製造所社ごとに一定しておらず、ワクチン製造株の段階でのGMPによる品質管理ができていない。幸い、現在使われている生ワクチンで株の変異に由来すると思われる大きな事故は起きていないが、有効かつ安全と認められたワクチン原株と製造されたワクチンに含まれるワクチンが、品質的に同等であることを積極的に示す検証方法は採用されていない。性状の不安定さがつきまとう生ワクチンを有効で安全な医薬品として供給するためには、株の継代管理を厳密に行い、その品質を検証する手段を確立する

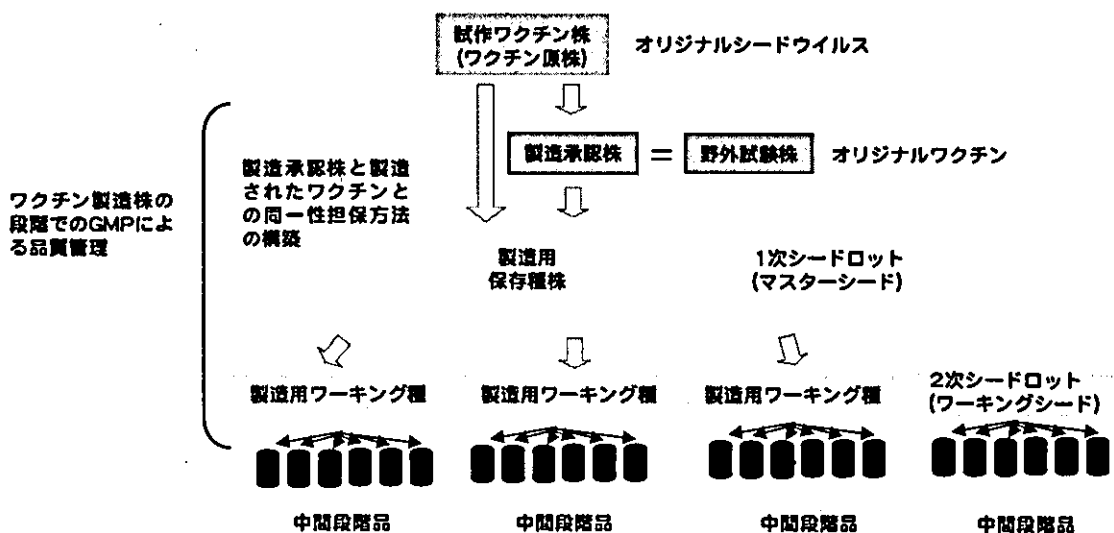
ことが重要である。そのために本研究では、ワクチンの製造管理にシードロットシステムを導入することを目的として、株の管理方法の確立とその方法を製造現場に還元する道筋をたてるものである。

## B. 研究方法

生ワクチン株は、本来のウイルスが感染する宿主とは異なる宿主で継代する事並びに、継代時の培養条件を変える事により作出されてきた。この事は、諸条件によりウイルスが変化する性質を本来的に備えている事を示している。従って、生きているウイルスを原料とする生ワクチンは、元来的に製品ロット間の品質のばらつきが生じやすい特徴を持つ。このばらつきがある許容された範囲にあり、安全性と有効性が確認された野外試験株と製品との同一性を確保することが重要である。

野外試験株と同じ性質のワクチン製品を作るには、既に欧米のワクチンメーカーで採用されているシードロットシステムが管理技法的に優れている。本システムについては昭和

### シードロットシステム



50-52 年厚生省特別研究「シードロットシステムに関する基礎的研究」（柳沢謙研究代表）、平成 6-8 年厚生科学研究補助金「弱毒生ウイルスワクチンの品質管理に関する研究」（森次保雄研究代表）で成果が出されており、シードロットシステムを速やかに導入すべきであることが提示された。その後の成果を踏まえて、最新の品質管理技術を備えたシードロットシステムの運用に進む時期に来ているものの、現在の製造各所社では直ちにシードロットシステムの導入は困難であることも明らかになっている。そこで、どのような条件を解決すれば我が国でもシードロットシステムの導入が可能であるかを提言するのが本研究の趣旨である。

昭和 61 年に生ワクチンとして初めて水痘ワクチンがシードロットシステムを採用したワクチンとして認可され、生ワクチンの管理方法に新たな道が開かれたかに見えた。しかしそれから、18 年経過しても現行の他の生ワクチンをシードロットシステムへ切替える作業は進んでおらず、未だこの方式の統一的な採用にはなっていない。

「何が、進行を阻んでいるのか？」

本研究事業は、この問いを製造メーカー毎、製剤毎に明らかにすることから開始した。

### C. 研究結果

具体例については、本報告書の分担研究者の項目にゆずるが、主に以下の様に要約できる。(1) 製造各所社で独自に開発された生ワクチンの経歴、培養方法、管理方法はそれぞれの企業の資産であり、簡単には明らかにできるものではない。製造所社と各個には議論できても、製剤毎に全体を一律に議論できない。この事は、各製造所社に所属される分担研究

者の報告書にも現れており、この課題を一括に取り扱う事を困難にしている。

(2) ワクチン原株（オリジナルシード）、製造承認株（オリジナルワクチン）の使用記録及び保存管理が不明瞭な場合がある。歴史的に開発時期が古いワクチンの場合は、過去には存在していたであろう保管管理記録が消失していたり、あるいは当時の担当者しか理解できないような書き方で記録されていたりする等、使用履歴と残量が照合できない場合がある。

(3) 製造用保存株（マスターシード、1 次シード）と製造用ワーキング株（ワーキングシード、2 次シード）という概念が定着しておらず、その継代関係において単純な親子関係でなく混合されている場合がある。また、製造用ワーキングから製造用ワーキングが作られた場合もある。

(4) 継代方法が厳密に定義されておらず、継代歴〇代と表示しても、感染価、培養温度、培養時間等が内容的に異なる可能性がある。

### D. 考察

生ワクチンの株の継代方法、継代履歴、継代管理方法は、製造所社の製造に関わるノウハウと言え部分でもあり、その公開を迫ることは、所社の市場競争力を低下させる可能性があり、困難であると思われる。そこで、初年度は WHO の Technical Report Series #840 に従って試作ワクチン株→製造承認株→一次シードロット→二次シードロットの概念の確認と、現在各所社で製造中の麻疹、風疹、おたふくかぜ生ワクチンに当てはめることが可能かを調査・検討した。

使用、保管方法の記録簿が現在の GMP 対応の書類管理形式になっていない。継代方法についても感染価、培養温度、培養時間が一律

ではないことが伺えた。その結果、たとえば低 m.o.i. で感染回数が多くなればウイルスゲノムに蓄積する変異の度合いが増え、培養温度を下げることにより低温適応変異ウイルスを選択的に増やし、また、培養時間を短くすることにより増殖速度の早い株を選択的に増やすことになる等が考えられ、継代歴、ロットを問わずどれもワクチンとして同じ物であるとは思われないことが判明した。継代する場合も、製造する場合にも同じ培養方法を採用することが必要である。5代以内の継代歴であればよいというワクチン製造の制限を、より科学的で客観的な基準により株のポピュレーション管理方法を導入すべきであると思われる。

また、株の管理方法の一つとして、株を作出した製造所のみならず、公的役割を持つ機関でも保管する事にし、必要に応じてバックアップの役割、あるいはレファレンスの役割を担わせることも必要であると考えられた。

シードロットシステムは、一定品質のワクチンを製造していくためのシステムである。したがって、仮に、既に製造され製品となって市場に出ている製造用種株が、野外試験株、ワクチン原株との継代歴取り決めた関係と合致しない場合にも、シードロットシステムの導入を断念するのではなく、如何なる形ならばシードロットシステムを導入し、一定品質のワクチン供給に貢献できるのかといった観点から検討することが大切である。この件については、本報告書岡部分担研究者の項を参考されたい。

## E. 結論

生ウイルスワクチン製造への GMP 規制とあいまって、より優れた管理システムへの移行の機運が熟している。まず、シードロット

システムについての共通理解を深め、一定のルールを確立し、長期的に実行可能なシードロットを設定することが第一歩である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### (1) 論文発表

1. Kato, A., C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, T. Kubota, N. Otsuki, M. Kohase, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation. *J Virol.* 76:7114-7124 (2004).
2. Nagai, Y., and A. Kato. Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics, in press. *In* Y. Kawaoka (ed.), *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*, Springer-Verlag GmbH and Co. KG, Curr. Topic Microbiol. Immunol 283:198-248 (2004)

### (2) 学会発表

#### (国際学会)

1. Kato, A., C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are involved in its interferon antagonism. Workshop on Replication and Cell Biology of Negative Strand RNA Viruses. Evanston, IL, USA June 12-16, 2004

#### (国内学会)

1. 加藤 篤、久保田 耐、田代真人、永井美之：センダイウイルス C 蛋白質による抗インターフェロン効果 第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
2. 久保田 耐、横沢紀子、横田伸一、藤井暢弘、田代真人、加藤 篤：ムンプスウイルスによる STAT1 分解とは異なる経路を介した宿主 IFN 情報伝達阻害 第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
3. 村木優子、真鍋貞夫、福家 巧、石川豊数、

- 加藤 篤、田代真人、山西弘一、高橋理明：ムンプスウイルスの神経病原性評価法としてのマーモセット接種試験の妥当
4. 坂口剛正、菅原文博、島津幸枝、加藤 篤、井上 誠、永井美之、吉田哲也：センダイウイルス C 蛋白質は宿主因子 AIP1 と相互作用してウイルス出芽を促進する。第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
  5. 立川(川名)愛、細谷紀彰、加藤 篤、塩田達雄、永井美之、岩本愛吉：エピトープ欠乏 b2 ミクログロブリンと TAP 阻害タンパク質を用いた HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞への効率的な抗原提示法の開発 第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
  6. Identification and functional analysis of Calpain6 as a molecule down stream to endothelin-1 signaling in branchial arch formation. : 砺波一夫、栗原由紀子、佐藤崇裕、天野朋和、油谷浩幸、加藤 篤、栗

性について 第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月

原裕 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

(3) 知的財産権の出願・登録状況  
無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## ワクチン製造株のシードロット・システム導入に関する研究

分担研究者 田代真人 国立感染症研究所 ウイルス第3部長  
協力研究者 海野幸子 国立感染症研究所 ウイルス第3部  
齋藤義弘 国立感染症研究所 ウイルス第3部  
大槻紀之 国立感染症研究所 ウイルス第3部  
棚林 清 国立感染症研究所 同獣医科学部  
佐藤大作 厚生労働省医薬食品局血液対策課

**研究要旨** ウイルスワクチンの製造における最終製品の恒常性、再現性を確保するためには、製造承認を受けたワクチン株およびその増殖に用いる細胞株のマスターシードに基づいた保存・継代に関するシードロットシステムと、製造過程・操作のすべてをSOPに基づいて管理するGMP体制の両者が不可欠である。GMPに関しては、生物学的製剤に関するGMPが導入されて、製造過程における品質管理体制は大幅に改善された。しかし、我が国で製造されている生ワクチンの多くは、このような認識が普及する以前に製造承認がなされており、その後のワクチン製造株の管理方法に関する規則もないのが現状である。昭和50年前後からシードロットシステムに関する議論がなされ、我が国においてもシードロットシステム導入の必要性が提言されてきた。その後、水痘ワクチンがシードロットシステムを採用した初めてのワクチンとして認可されたが、他の現行生ワクチンについてはシードロットシステムへの転換作業は進んでいない。そこで、我が国におけるワクチン製造株の管理の実態を把握し、果たしてシードロットシステムの導入が可能なのか否かを明らかにすること、次に、この現状を基盤として、我が国における既存の生ワクチン製造体制の中で、どの様に移行・導入すべきかの検討を目的とした。本年度は、各メーカーの各製品に使用しているワクチンウイルス株に関して、臨床試験、野外試験、製造承認株、マスターシード、製造用ワーキングシード、ワクチン製剤等の継代歴を調査した。その結果、製造承認株の使用記録及び保存管理に不備があり、製造承認株、製造用マスターシード、製造用ワーキングシード等の区別が必ずしも明確ではなく、その継代歴においてもシードロットシステム概念に合致せず、一部が混合されている場合等があった。

### A. 研究目的

生ワクチンは、動物実験や臨床試験において有効かつ安全と認められて承認されたワクチン原株から製造される。ワクチン製造に用いる製造用シードウイルスおよびこれを用いて製造した最終製品は、すべて、製造承認された原株を継代したものである。RNAウイルスは増殖過程において特に遺伝子変異を起こしやすいために、同じシードを用いても品質間の差をまったく

無くすることは不可能であり、さらに継代歴が異なるシードを用いた場合には、最終製品の恒常性、再現性は保証されない可能性がある。このような宿命的条件下においても、最終製品の恒常性を保ち、安全性と有効性を確保することは必須である。

生物学的製剤における再現性・恒常性は、理論的には、原材料の恒常性と製造方法の恒常性の両者によって担保出来る。生ウイルスワクチンにおいては、前者



についてはシードロットシステムにより、後者についてはGMPによって、極力その再現性・恒常性が図ることが国際的に合意されているが、我が国においてはシードロットシステムの導入は、水痘ワクチン以外には実施されていない。

昭和50年以来我が国においても、シードロットシステムの導入の必要性が強く指摘されてきたが、それが実現出来なかった背景を明らかにし、また現段階において、各メーカーの各製品について、シードロットシステムへの移行が可能であるのか否かを明らかにする必要がある。そのために、まず国内各メーカーの各製品のワクチン製造用ウイルス株について、その継代歴と管理方法の実態について調査した。

## B. 研究方法

国内において生ウイルスワクチンを製造している5社に対して、麻疹、風疹、おたふくかぜ弱毒生ワクチンに関して、開発からの継代歴、臨床試験に用いたワクチンの由来、製造承認株、マスターシード、ワクチン製造用ワーキングシード等について、この継代歴、製造ロット、管理方法、管理実態等に関する記録の調査をアンケート形式で行った。更にこの調査結果に基づいて、各社に対して疑問点に関する質問を文書で行ない、回答を得た。

## C. 研究結果

各社の製造記録等は、企業秘密に属する次項であるので、各ワクチン株の継代・管理に関する具体的な調査結果については今回公表出来ない。

(5) 製造各所社で独自に開発された生ワクチンの継歴、培養方法、管理方法は、それぞれの企業で異なっていた。同じメーカーで開発された異なるワクチンの間でも、臨床試験に用いたワクチンや製造承認株の継代歴は一貫していない場合が多かった。

(6) 製造承認株の継代歴やその位置づけについても統一性はなく、当時の厚生省審査当局においても、ウイルス株の継代、管理に関する厳しい認識が欠如していたことが推測された。

(7) ワクチン原株(オリジナルシード)、製造承認株(オリジナルワクチン株)の使用記録及び保存管理が不明瞭な場合があった。開発時期が古いワクチンの場合、

過去には存在していたであろう保管管理記録が消失していたり、あるいは当時の担当者しか理解できないような書き方で記録されていたりする等、使用履歴と残量が照合できない場合があった。また当時の担当者が退職しており、その内容についての引継が確実に行われていない場合が多かった。

(8) 製造用保存株(マスターシード、1次シード)と製造用ワーキング株(ワーキングシード、2次シード)という概念が定着しておらず、その継代関係において単純な親子関係でなく、複数のロットが混合されている場合があった。また、製造用ワーキングシードから次の製造用ワーキングシードが作られた場合もあった。

(9) 継代方法が厳密に定義されておらず、同じ継代歴で表示しても、接種条件、培養条件、感染価、培養温度、培養時間等が内容的に異なる可能性がある。

(10) 今回調査した限り、生物学的製剤基準に抵触するものは無かった。

## D. 考察

今回の調査から、近代的な品質管理の概念が導入される以前に製造承認された多くの生ワクチン製剤については、製造原料であるワクチン製造用シードの管理、継代における品質管理が不十分であったことは否めない。これは、各メーカーのみならず、当時の審査当局においても、ワクチン株の継代・管理の意義に対する認識が十分では無かったことが背景にあると考えられる。当時の生物学的製剤に対する国際的な学問的レベルを勘案すると、許容せざるを得ないものと考えられる。

生物学的製剤の品質管理に関しては、我が国でもGMPが導入されて、製造過程の再現性・恒常性を確保する努力がなされている。しかし、原材料の恒常性・その由来が曖昧であれば、GMPに基づいていくら製造過程の再現性を厳密に管理しても、出発材料における不均一性・非再現性が、そのまま最終製品にも反映される可能性がある。すなわち、GMPの導入が行われたものの、シードロットシステムの導入が無ければ、ワクチンにおける品質管理は片手落ちと言わざるを得ない。

従って、我が国においても、早急にシードロットシステムの導入を実施する必要がある。新規のワクチンの場合には新たな体制の導入は比較的容易であることは、水痘ワクチンの例を挙げるまでもない。

しかし、既に長期間にわたって製造が行われ、従来

の概念の中で継代・管理されてきた既存のワクチン株については、今回の調査結果からも、直ちにシードロットシステムへの移行は困難であることが示唆された。これらの問題点を解決して、科学的、法的、及びメーカーおける経済的問題のいずれをも満足させるような方法を検討する必要がある。具体的には、個々の製剤について、現在使用している製造用シードから、どの段階に戻ってシードロットを構築するのか、その場合の製造承認株との継代関係に関する根拠は何か、科学的に許容されるのか、今後の継代に関して、生物学的製剤基準の規定を満足させるか、等の問題を解決する必要がある。

### E. 結論

既に承認済みの生ワクチン株については、ウイルス株の継代歴、管理方法について調査した結果、直ちにシードロットシステムへの移行は困難であることが示唆された。今後、この現状に経って、科学的、法的、及びメーカーの経済的問題のいずれをも満足させるよ

うな移行方法を早急に検討する必要がある。

### I. 健康危険情報

なし

### J. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### K. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## ワクチン製造承認株、マスターシード、製造用ワーキングシード 及び5代の継代可能株の理解について

分担研究者 海野幸子 国立感染症研究所ウイルス第三部 室長

協力研究者 大槻紀之 国立感染症研究所ウイルス第三部 研究官

**研究要旨** WHO 生物製剤基準におけるシードロットシステムの考え方と我国のワクチン原液製造の実態を比較して、システム導入の要件を考察した。臨床試験で安全性と有効性が確認されたワクチンを製造承認株として、同質のワクチンを連続的に再現性をもって製造するために、マスターシードロット及びワーキングシードロットの定義や、ワクチン製造において製造承認株を作製した時の培養条件を再現することの重要性について共通理解が必要だった。

### A. 研究目的

1975 年の厚生省特別研究班「シードロットシステムの導入に関する基礎的研究」に始まり、これまで幾度かシードロットシステムに関する研究がなされ、安全性と有効性が確認された承認ワクチンウイルスと同等な性質の生ウイルスワクチンを製造するためには、シードロットシステムが優れていることは論を俟たない。しかし、未だ麻しん、おたふくかぜ及び風しん各ワクチン製造工程へのシードロットシステム導入には到っていない。その障害となっている要素を明らかにして、シードロットシステム導入の実現をはかることを最終目的とする。

### B. 研究方法

我国のワクチン製造及びその品質管理の方法は、既にシードロットシステムを導入していた欧米や WHO の生物学的製剤基準の内容を参考にして構築されてきた。そこで、WHO

の提起している麻しんワクチンと風しんワクチンの生物学的製剤基準[Requirement for measles vaccine (Live) Technical Report Series, No. 771, 1988 (TRS 771), Requirement for rubella vaccine (Live) Technical Report Series, No. 610, 1977 (TRS 610), Requirement for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccine (Live) Technical Report Series, No. 840, 1994 (TRS 840)]におけるシードロットシステムと我国のワクチン製造方法の実態とを比較することから問題点を明らかにして、システム導入のための具体的な要件を検討した。

### C. 研究結果

#### 1) WHO 生物学的製剤基準に定義されるワクチン製造承認株とマスターシード及び製造用ワーキングシードの関係

TRS における製造承認ワクチンとワクチン製造に用いるシードロット（マスターシード、ワーキングシード）の定義を比較した。

TRS 610 では、臨床試験で人への免疫原性と安全性が確認されたワクチンをオリジナルワクチン、そのワクチンを作製するために用いたウイルスをオリジナルシードウイルスとした。ワクチン製造に用いるシードロットはオリジナルワクチンに由来し、NCA により承認された継代数を越えてはならないと規定された。

TRS 771 では、シードロットはマスターシードとワーキングシードに分けて定義された。マスターシードウイルスロットは臨床試験に用いられたワクチンを作るために使われたシードウイルスに由来するとあり、TRS 610 のシードロットよりも 1 代遡るウイルス液から作られた。マスターシードの継代数は NCA の承認範囲に、ワーキングシードはマスターシードから 1 代に、最終のワクチンウイルスはオリジナルワクチンから 5 代以上細胞継代されてはならないと規定された。

TRS 840 では、マスターシードはオリジナルワクチンそのものか、或いは、オリジナルワクチン作製に用いられたシードウイルスに由来するとなり、TRS 610 と TRS 771 を包括する内容に変更された。マスターシードはワーキングシードの作製に、ワーキングシードはワクチンの製造に使われ、これらの継代は 1 代と考えられた。

このように TRS のウイルス液の定義には変更が見られた。臨床試験に用いられたワクチンを製造承認株と捉え、シードロットについては TRS 840 に準拠するのが妥当であった。

## 2) WHO 生物学的製剤基準におけるシードロットシステムに関する指摘

マスターシードは一様な構成を確保するために単一ロットとして工程処理され、性質が

十分に調べられていること、ワーキングシードは大量に調製され、単一な構成で、性質が十分に調べられていることが条件とされた。また、ワクチンのシングルハーベストの製造は臨床試験に用いられたワクチン製造と同じ方法でなくてはならないことや、m.o.i.や細胞培養の期間や温度を一貫して維持する必要があることに特に注意を払うよう言及していた。これらはあくまで最小限の規定として WHO 生物学的製剤基準に書かれたものであった。

## 3) 我が国のワクチン製造における承認株とマスターシード及び製造用ワーキングシードの実態

ワクチン原液製造に関するアンケート調査（弱毒ウイルスワクチンの安全性確保に関する研究、1998 年度）の結果、臨床試験に用いた試作ワクチンのシードウイルスを製造承認株と考えて、そのシードウイルスのシードである試作ワクチンの 2 代前のウイルス液からマスターシードを作製している事例や、次々と細胞継代を重ねたワーキングシードが作られ、更に、継代数の異なるワーキングシードを混合してワクチン製造に用いていた事例が見出された。製造所間で製造承認株、マスターシードやワーキングシードの定義が不統一で、シードロットシステムとは異なる実態が明らかになった。また、初めの製造承認申請書にワクチン製造の詳しい条件が必ずしも記載されていないことが多く、製造承認を受けた時の製造方法から m.o.i.や感染細胞の培養条件、ウイルス収穫の時期などに変更が加えられていた。

## 4) 5 代の継代可能株の理解

現行の生物学的製剤基準に製造承認株からワクチンまでの継代数は5代と規定されているが、その数値の科学的根拠は弱い。弱毒生ウイルスワクチンの品質管理に関する研究（1994～1996年）において、各社が、ワクチンウイルスの継代による遺伝子への影響を調べた結果、5代までウイルス遺伝子の変異は見られないが、8代、10代と継代が進むと遺伝子及びウイルスの生物学的性質に変化が認められた。また、ワクチンウイルスに異なる遺伝子を持つ複数のウイルスが混在していたことも報告され、今後、遺伝子の変異を検出し、混在比を把握する方法が開発される必要があった。

#### D. 考察

我国の麻しん、おたふくかぜ、風しん各ワクチン原液製造の実態は、現行の生物学的製剤基準の規定を大きく外れるものではないが、シードロットシステムで要求される内容を満たすものではなかった。ワクチン製造では一般に m.o.i. は低く、一回の培養工程においてマルチサイクルの複製が起きていると考えられる。そこで、この間のウイルス遺伝子の変異をできるだけ少なく制御するために考えられたのがシードロットシステムである。ウイルスの性質を考えると現行の製造方法においてもウイルスの変異に対する配慮が必要だったはずである。しかし、製造が認可された後、一方でシードロットシステムの研究が始められたにも拘わらず製造の実際はシードロットシステム概念から次第に離れていったように見受けられた。そこで、今回、シードロットシステムへ移行するための要件として以下のことが考えられた。

1. ウイルス液の名称と内容を定義し、理解

を共通にする。

**オリジナルシードウイルス**：試作ワクチンを作製するために用いたウイルス液。

**オリジナルワクチン**：臨床試験で有効性と安全性を確認した試作ワクチンで、ワクチン製造承認株

**マスターシード**：オリジナルワクチンから、或いはオリジナルシードウイルスから作製される。

**ワーキングシード**：マスターシードウイルスから1代で作製される。

**ワクチン原液**：ワーキングシードウイルスから1代で作製され、オリジナルワクチンからの継代は5代以内とする。

2. ワクチン製造までの各段階の培養は、製造承認株を製造した条件で行う。

初めの製造承認書に詳細が記載されていない場合は、製造方法の詳細が明記された製造手順書をNCAに届け出る。又、製造承認書あるいは製造手順書の一部変更が許される範囲は吟味される必要がある。

3. メーカー（製造責任者から製造現場まで）、感染研、NCA の意思の疎通をはかる。

#### E. 結論

シードロットシステム導入の為には、シードロットシステムの観点から、新たに自社の製造現場を見直すことが求められる。生ウイルスワクチン製造への GMP 規制とあいまって、より優れた管理システムへの移行の機運が熟している。まず、シードロットシステムについての共通理解を深め、一定のルールを確立し、長期的に実行可能なシードロットを設定することが第一歩である。

#### L. 健康危険情報

なし

## M. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 日本の風疹流行の現状 第4回国際ワクチン免疫学会、2004年9月、茨城県つくば市
- 2) 抗体検査から見た2003年の風疹 日本ウイルス学会第52回学術総会、2004年11月、横浜

- 3) 麻疹ウイルスの分離及び中和抗体価測定におけるVero/hSLAM細胞の有用性 日本ウイルス学会第52回学術総会、2004年11月、横浜

## N. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 麻しんワクチンのシードロットシステム導入における 問題点についての研究

分担研究者 齋藤義弘 国立感染症研究所ウイルス3部 主任研究官  
協力研究者 沼崎 啓 国立感染症研究所ウイルス3部 室長

**研究要旨** ワクチンの製造において、株の継代による抗原性や病原性の変異をさけるためシードロットシステムの導入は不可欠である。わが国の生物学的製剤基準のもとで、シードロットシステムを導入するには、各メーカーがその実情にあわせて十分な量のワクチンシードを設定し、そのシードウイルスの性状が弱毒確認試験に合格したウイルスと同等であることをサル以外の試験法で証明しておく必要がある。

### A. 研究目的

ワクチンの製造にはその製造に相当と認められたウイルス株の性質をできるだけ維持させることが重要である。そのためには定められた継代歴のウイルスをほぼ一定の条件下（ウイルス接種量、培養温度、培養液の種類等）で培養することが要求される。WHO や欧米諸国においては、株の継代による抗原性や病原性の変異をさけるためシードロットシステムを採用している。わが国でも早急にシードロットシステムを導入する必要がある。そこで本研究の目的は、わが国の麻しんワクチン製造の現状をふまえたシードロットシステムへの移行である。

### B. 研究方法

わが国の麻しんワクチンメーカーのシード管理について実情を調査した。また WHO や米国では、麻しんウイルスシードの試験として神経毒力試験を実施することになっているが、それに相当する試験としてわが国では弱毒確認試験が行なわれている。この試験は、麻しんに感受性のあるサルにワクチンを接種し、

神経病原性がないことを確認するもので、安全性の評価に重要な試験といえる。日本の現在の規定は、WHO の勧告を取り入れ、かつ米国の制度を参考にして定められたものであるが、その両者を比較検討した。

### C. 研究結果

#### 1) シードウイルスの管理について

わが国の麻しんワクチンメーカー3社ともシードウイルスをマスターシードおよびワーキングシードとして管理していた。製造に相当と認められた製造承認ウイルス株そのものをマスターシードとしているメーカーもあればそれから1代継代したウイルス液をマスターシードとしているメーカーもあった。またマスターシードから、1代継代したものをワーキングシードにしているメーカーもあれば複数代継代したものをワーキングシードとしているメーカーもあった。WHO の勧告では、ワーキングシードは同一工程でつくられ均一な構成で同一の培養細胞上でマスターシードから1回限りの継代でつくられるものとされている。わが国の生物学的製剤基準によ

れば、製剤に含まれるウイルスは、その株が適当と認められた後、定められた培養条件の下で継代を行ない、かつ、その継代数が5代を超えてはならないとある。したがって製造承認ウイルスから4代までをワーキングシードウイルスとして使用することを日本では認めている。

2) 麻しんウイルスの神経毒力試験について WHO の基準によれば、麻しんワクチンの製造の源となるシードウイルスが神経病原性を持たないことを確認する必要があるが、同じシードウイルスに由来する個々のワクチン製剤についてはこの試験を行なう必要はないことを勧告している（WHO Technical Report Series No. 673, 1982）。また米国においては同じシードウイルスに由来する連続5ロットのワクチン（ろ過前ウイルス浮遊液）について神経毒力試験を実施し、その安全性を確認することになっている（Code of Federal Regulation, 1994）。いずれもシードロットシステムを前提としている。

一方、日本では、麻しんワクチンの神経毒力試験は、弱毒確認試験と呼ばれ、神経病原性がないことを確認する以外に、弱毒を確認するために用いられてきた。基準には承認ウイルスから由来した製剤の連続した5回の製品において弱毒が確認された場合に、当該ウイルス株由来の以後の製品については弱毒確認試験を省くことができると記載されている。製造承認ウイルスから4代までのワーキングシードを使用できる日本の基準では、弱毒確認試験に合格したワーキングシードよりさらに継代数の進んだワーキングシードがワクチンの製造に追加の弱毒確認試験を行なうことなしに使用できる。

## D. 考察

WHO の勧告によれば、マスターシードはワクチン原株（定められた方法で製造され、安全性と免疫原性においてヒトに使用しても差し支えないことが示されたワクチン）に由来し、同一工程でつくられ均一な構成と十分な性状が調べられた相当量のウイルス液のことで、これを分注してワーキングシードをつくる。ワーキングシードは、同一工程、同一の培養細胞上でマスターシードから1回限りの継代でつくられるウイルス液で、ワクチン製造のときの接種ウイルスとなる。わが国の生物学的製剤基準では、製造承認ウイルスから4代までをワーキングシードウイルスとして使用することを認めているため、日本の基準は厳密な意味でシードロットシステムとはいえない。

また WHO や米国の神経毒力試験の考え方は、同一のシードウイルスから同一の方法を用いて製造を行なえば同一の遺伝的性質の製品が得られるはずであり、シードウイルスの性質が十分に調べられていれば個々の製品について毒力の試験を行なう必要はないというものである。ワーキングシードがマスターシードから1代限りのものでなくてよい日本の基準では、安全性の担保が充分とはいえない。この試験以外に麻しんワクチンの安全性を担保する試験は現在の生物学的基準にはない。したがって今後シードロットシステムを本格的に導入するには、現在ワクチンの製造に用いているウイルスシードが神経毒力試験（弱毒確認試験）を合格する必要がある。しかし新たにサルを用いて弱毒確認試験を実施するのは難しい。そこで5回の弱毒確認試験に合格したワーキングシードを更新したあるいは更新せざるを得ない場合には、そのウイルス



の性状が少なくとも弱毒確認試験を合格したウイルスと同等であること証明する必要があり、その試験法の開発が急がれる。

#### E. 結論

わが国の麻疹ワクチン製造にシードロットシステムを導入するには、現在使用しているワーキングシードウイルスの性状が弱毒確認試験に合格したシードウイルスのそれと同等であることを証明しておく必要がある。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

麻疹ウイルスの分離および中和抗体価測定における Vero/hSLAM 細胞の有用性、齋藤義弘、海野幸子、柳雄介、田代真人  
第 52 回日本ウイルス学会、東京 11 月 2004

#### H. 知的財産権の出願、登録情報

##### 1. 特許取得

無し

##### 2. 実用新案登録

無し

##### 3. その他

無し

## ワクチンの製造株の品質管理に関する研究

分担研究者 五味康行 財団法人阪大微生物病研究会 研究・技術部 課長補佐  
協力研究者 宮武克昌 財団法人阪大微生物病研究会 製造部 生ウイルス製剤チーム 課長

### 研究要旨

- (1)弱毒生麻疹ウイルス田辺株および弱毒生風しんウイルス松浦株および弱毒生水痘ウイルス岡株についてはシードロットシステムが既に運用されており、これらいずれの製品の現状も WHO の生物学的製剤基準を満たしていることが確認された。
- (2)ワクチン株のバンキングの意義は高い。また、バンキングを行う機関は国立感染症研究所が妥当であると考えられるが、その管理方法は十分に検討されるべきである。
- (3)各ワクチン株の継代条件の現状を確認した。
- (4)シードの作成、保管、使用に関する文書の項目を抽出した。
- (5)ワクチン株が mixed population である場合の株の管理方法については、今後本研究班で詳細に検討して行く必要がある。

### A. 研究目的

本研究では、臨床試験株、製造用保存種株の継代歴に関する基準を設定するとともに、その品質を担保する方法について検討することを目的とする。

### B. 研究方法

当会の弱毒生麻疹ウイルス田辺株、弱毒生ウイルス松浦株、弱毒生水痘ウイルスについては既にシードロットシステムが導入されている。本研究では、(1) 各ワクチンの臨床試験株、マスターシード、ワーキングシード、原液の間の関係が妥当であるか、(2) 各ワクチンのバンキングについて、(3) 各ワクチンの継代条件について、(4) 文書整備のための記載必要事項について、(5) ワクチン株の管理方法について、現状調査および考察を行なう。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験が必要になる場合は、十分に動物愛護に配慮して行う。

### C. 研究結果

#### (1) 各ワクチンの分類

弱毒生麻疹ウイルス田辺株については、既にシードロットシステムが導入されている。このマスターシードはオリジナルシードに由来し、臨床試験に用いられたもの（オリジナルワクチン）である。ワーキングシードはマスターシードに由来し、原液の製造に使用されている。以上のように弱毒生麻疹ウイルス田辺株の現状は WHO の生物学的製剤基準（Requirements for measles, mumps, and rubella vaccines and combined vaccine [live], WHO Technical Report Series No.840, 1994）を満たしていることが確認された。また、現在製造

されている原液はマスターシードから 5 代以内の継代である。

弱毒生風しんウイルス松浦株についても、既にシードロットシステムが導入されている。このマスターシードはオリジナルシードに由来し、臨床試験に用いられたもの（オリジナルワクチン）と同じ継代数である。ワーキングシードはマスターシードに由来し、原液の製造に使用されている。以上のように弱毒生風しんウイルス松浦株の現状も上記 WHO 基準を満たしていることが確認された。また、現在製造されている原液はマスターシードから 5 代以内の継代である。

弱毒生水痘ウイルス岡株についても、既にシードロットシステムが導入されている。マスターシードは、オリジナルシードに由来する。臨床試験に用いられたもの（オリジナルワクチン）はマスターシードに由来する。ワーキングシードはマスターシードに由来し、原液の製造に使用されている。以上のように弱毒生水痘ウイルス岡株の現状は WHO 基準（Requirements for varicella vaccine [live], WHO Technical Report Series No.848, 1994）を満たしていることが確認された。なお、現在製造されている原液はマスターシードから 10 代以内の継代である。

## (2) バンキングについて

生ワクチンの安全性と有効性は主にそのウイルスの性状に依存するため、ワクチン製造に相当と認められた株（製造承認株）の性状を、ワクチン原液まで維持させることが必要である。そのためにシードロットシステムを導入し、シードロットおよびワクチンの製造には定められた継代歴のウイルスを用い、常に一定の条件下で培養することが重要である。

しかし、何らかの原因でワクチン原液に含まれるウイルスの population がロット間で著しく変動したり、或いは新たな変異体の出現によってワクチンの性状が変化するという可能性は極めて低いながらも考えられることである。そのために、ワクチン株のバンキングは必要である。また、火災、地震、水害などの自然災害や人災によってワクチン株が滅失してしまう可能性があることから、バンキングを行う意義は高いと考えられる。

バンキングを行う機関としては、国立感染症研究所が妥当ではないかと考える。しかしながら、液体窒素凍結保存容器内の温度管理、その容器内の液体窒素量の管理、温度計の校正、異常時の対応、管理体制の整備（管理組織の構築、各ウイルス液の混在防止措置、使用するときの条件の定義、所有権等）、これに関わる費用などを考慮する必要があるため、今後本研究班で十分に検討して行かなければならない。

バンキングされるウイルスとしては製造承認株が本来妥当であると考えられるが、貴重な製造承認株を凍結融解することに伴うリスク（コンタミネーション、ウイルス含量の低下等）や、量的な問題等を考慮すると困難が生じる。従って、製造承認株からワーキングシードの間の継代で、かつ、量的に十分確保されるという条件を満たすウイルス液が現実的には適当である。以上のことから、弱毒生風しんウイルス田辺株については、ワーキングシードがバンキングに最も適当であると考えられる。これは、このワーキングシードが大量に調製、保管されているため、(i)一部をバンキングに用いることが量的に容易である、(ii)当面の間このワーキングシードから直接ワクチン原液を作ることが可能であるため、この

ワーキングシードより前の継代株に遡る必要がない、という理由による。

弱毒生風しんウイルス松浦株については、ワーキングシードがバンキングに相当であると考え。その理由はワーキングシードが大量に調製、保管されており、当面はワーキングシードより前の継代株に遡る必要がないためである。また、弱毒生水痘ウイルス岡株については、ワーキングシードが相当である。これは、量的な理由と、製造承認株に最も継代数が近いウイルスであるという理由による。

### (3) 継代方法の条件案について

弱毒生麻しんウイルス田辺株、弱毒生風しんウイルス松浦株、および弱毒生水痘ウイルス岡株は、それぞれの製造承認申請書に記載されている培養温度、培養日数、培地で継代されている。また、ウイルス接種時の感染条件は m.o.i.としては規定していないが、現在使用しているシードの希釈率及び接種量を各 SOP(標準作業手順書)で規定し管理している。なお、現在調製されている原液は、弱毒生麻しんウイルス田辺株および弱毒生風しんウイルス松浦株ではマスターシードより 5 代以内の継代、弱毒生水痘ウイルス岡株ではマスターシードより 10 代以内の継代である。

### (4) 文書整備に伴う原案提示

文書整備に伴う文書の原案として、cGMP に則り、以下に示す各事項が必要と考える。

- 各シードの作製記録に記載する事項  
作製年月日、作業場所、作製作業従事者、培養条件に関する事項（使用する細胞のロット番号、シード作製に使用したウイルス液のロット番号及び接種時の希釈率、使用した培養液等原料関連のロット番号、培養温度、培養

期間)、作製量、小分け量、表示ラベル

- 各シードの保管記録に記載する事項  
保管年月日、保管作業従事者、シードの凍結保管に関する事項（シードの保管方法（凍結方法）、分注量）、保管場所、保管されたシードの管理に関する事項（温度管理など）

- 各シードの使用記録に記載する事項（出納記録）  
使用年月日、作業場所、作業従事者、使用目的、使用シードの量およびロット番号、管理者の確認

### (5) ワクチン株の管理方法について

ワクチン株が mixed population である場合、継代によってウイルスの population が変動する可能性があるため、ワクチン原液に含まれるウイルスの population についての管理は注意深く行われなければならない。

継代とウイルスの population の変化を管理するための方法は、現状では幾つか考えられる。まず、核酸レベルで管理を行う方法が挙げられる。具体的には mixed population の部位の塩基混在比をシーケンシング、SNP 解析（MAPREC 法、RT-PCR-RFLP 法、インベータ法、定量的 RT-PCR 法、Lamp 法など）で求めることによって、複数のウイルスの核酸の混在比を確認することが可能なので、継代に伴うウイルスの population の変化を知ることができる。次に、培養細胞を用いて管理する方法が挙げられる。具体的には、プラークサイズ分布、増殖曲線、温度感受性について調べることにより、population の変化を検出できる可能性がある。しかしながら、前者はウイルス核酸の混在比が確認されるものであって、感染性ウイルスの混在比が直接確認されるものではない。また、後者は実験の機