

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤 篤

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

平成 18 年度

I. 研究の概要	-----	2
II. 総括研究報告書		
生ワクチン製造株の品質管理に関する研究 加藤 篤	-----	5
III. 分担研究報告書		
1. おたふくかぜ生ワクチンの継代変化に関する研究 加藤 篤 他	-----	10
2. 弱毒生風しんワクチンにおけるシードロットシステム導入時における株管 理方法に関する研究 大槻紀之 他	-----	18
3. 弱毒生麻しんワクチンの評価および品質管理に関する研究 沼崎 啓 他	-----	21
4. ワクチンの製造株の品質管理に関する研究 五味康行 他	-----	25
5. ワクチン製造株の品質管理に関する研究 仁田義弘 他	-----	32
6. ワクチン製造株の品質管理に関する研究 李 富雄 他	-----	36
7. 弱毒生ウイルスワクチンのシードロットシステム移行における研究 大隈邦夫 他	-----	40
8. 生ワクチン接種後の副反応に関するウイルス学的検討 岡部信彦 他	-----	43
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	46

I. 研究概要

(1) 研究課題：ワクチン製造株の品質管理に関する研究(H16-医薬-一般-015)
3年計画の3年目

(2) 研究者：本研究は、以下の分担研究者、協力研究者によって行われた。

区分	氏名・所属・職名
主任班	加藤 篤 国立感染症研究所・ウイルス第三部 室長
協力 研究者	田代真人 国立感染症研究所・ウイルス第三部 部長
	木所 稔 国立感染症研究所・ウイルス第三部 主任研究官
	古賀大輔 厚生労働省・医薬食品局・血液対策課
	伊藤 治 動物医薬品検査所・検査第一部 部長
	嶋崎智章 動物医薬品検査所・標準品管理
岡部班	岡部信彦 国立感染症研究所・感染症情報センター センター長
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
	荒木和子 国立感染症研究所・感染症情報センター
	上野久美 国立感染症研究所・感染症情報センター
	佐藤 弘 国立感染症研究所・感染症情報センター
沼崎班	沼崎 啓 国立感染症研究所・ウイルス第三部 室長
協力 研究者	関 文緒 国立感染症研究所・ウイルス第三部 研究員
	菅井敏行 国立感染症研究所・ウイルス第三部 研究官
	堤 裕幸 札幌医科大学小児科・教授
	斉藤義弘 慈恵医科大学小児科・助手
大槻班	大槻紀之 国立感染症研究所・ウイルス第三部 研究官
協力 研究者	駒瀬勝啓 国立感染症研究所・ウイルス第三部 室長
	海野幸子 国立感染症研究所・ウイルス第三部 客員研究員
大隈班	大隈邦夫 化学及血清療法研究所・品質管理部 部長
協力 研究者	倉永雅彦 化学及血清療法研究所・第一製造部第二課 課長
	上田謙二 化学及血清療法研究所・第一製造部 上級技術員
	渡邊俊一郎 化学及血清療法研究所・第一製造部
仁田班	仁田義弘 武田薬品工業・生物製剤部 部長
協力 研究者	末原章宏 武田薬品工業・生物製剤部 生物技術グループ マネジャー
	渡辺秀夫 武田薬品工業・生物製剤部 生物第一グループ マネジャー
李班	李 富雄 北里研究所・製造第三部門 部門長
協力 研究者	佐々木学 北里研究所・品質保証部門 部門長
	服部信章 北里研究所・品質保証部門 部門長
	中山哲夫 北里生命科学研究所ウイルス感染制御学研究室1 教授
五味班	五味康行 阪大微研・研究技術部・研究グループ 課長補佐
協力 研究者	宮武克昌 阪大微研・製造部・部長
	通山哲郎 阪大微研・製造部・課長

(3) 研究要旨

生ワクチンは、多くの動物実験、ヒトでの臨床試験を経て有効且つ安全と認められた生ウイルスワクチン株(製造承認株)から製造される。しかし、ウイルスを含む微生物は、本来的に環境に適応する能力、すなわち変異し易い生き物であるためワクチン株を継代中あるいは増殖中にさへ変化を起こす可能性がある。それ故、ウイルスを増殖させて作るワクチンにはある頻度で集団内に変異ウイルスが含まれる。これは、ウイルスの特性であり回避できない。変異は増殖毎にランダムに起るためため製剤ロット間の品質的な差をまったく無くすることは厳密な意味では不可能である。しかし、それら変異ウイルスによる負の影響を無視できるくらいのレベルに抑え、ワクチンとしての有効性と安全性の確保という現実的レベルでの均一化は可能であり、それを確立しなければ医薬品としてのワクチンは成り立たない。

本研究班で扱っている風疹、麻疹、おたふくかぜ生ワクチン株はいずれも RNA ウイルスは属し、複製酵素の特性によっておよそ 1 万塩基を複製する際に 1 塩基の変異を起こすと言われている。およそ 10^4 塩基からなる RNA ウイルスは、仮定上一度複製すればすべてのウイルスはゲノムのどこかに一つは変異部分を持つ変異体の集団になることになる。言い換えれば、およそ 0.01%の頻度でゲノムのいずれかの部分に変異を持つウイルスが集団中に存在する。これら変異ウイルスは、もし己に有利な環境が整えば、いつでもワクチン中の主要成分になり得る。すなわちワクチン製造においては大切な事は第一に、“ワクチン増殖時にそれら変異ウイルスが増えやすい選択圧をかけない”ことがあげられる。そのために生物製剤 GMP があり、これにより製造工程、環境及び製造に利用する資材の管理が厳密に行われ、製造過程の再現性・均一性が図られたのである。次に大切なのが、“ワクチンの継代回数を一定にする”ことである。わずか 1 度のウイルスゲノムの複製によりゲノムのどこか 1 箇所が変異する。そして、複製回数が増えるに従い、ウイルスゲノムの他の場所に 2 箇所目、3 箇所目の変異が加わるからである。当然、複製回数の少ないウイルスの集団と複製回数の多いウイルス集団では、後者の方が多様性が大きく、均一性に欠ける。

そこで継代の回数を制限を設けたのが生物学的製剤基準の“5 継代枠”である。しかし、基準では 5 代内の運用方法については定めておらず、5 代を期限として限定する科学的根拠も必ずしも明確にはされていない。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、市場に出されるワクチンの製造方法がロットによらず恒に同じであり、克つ用いる株の継代歴が承認株から一定であることが必要である。そのために本研究班では、性状の不安定さがつきまとう生ワクチンの製造管理にシードロットシステムを導入して、品質的に同等であるワクチンを製造するための株の管理方法を製造現場に還元する道筋をたて、その品質を検証する手段を確立し、より厳密に生物製剤基準を運用することを目標とした。

(4) 研究の目的と必要性及び期待される成果

本研究班では、野外試験株、製造用保存種株の継代歴に関する制限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。製

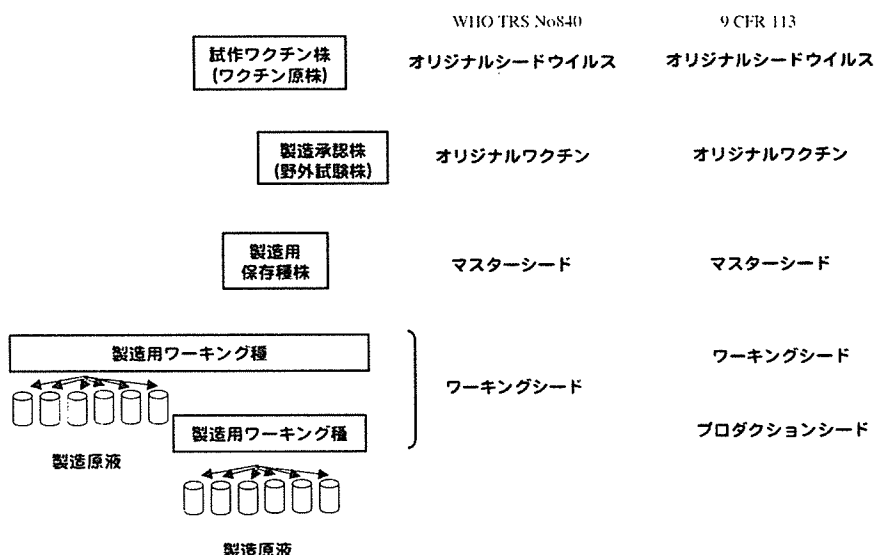
造用シードロットシステムの導入と、ワクチン構成成分であるウイルスの集団管理技法の確立をめざしている。近年の遺伝子工学的手法の進歩により、ワクチン株がどのような遺伝学的性状をもったウイルスの集団であるかを決定することが可能になった。何代以内の継代ならばよいという従来から言われてきた漠然とした制限ではなく、科学的根拠に乗っ取った制限とその検証手段を実際の生ワクチン製造の現場に導入することをめざしている。生物製剤のGMPシードロット管理手法が確立した場合には、品質の均一性が飛躍的に増大すると予想され、現在行われている国家検定制度の見直し、試験の簡略化、いずれは廃止という道筋が予想される。

(5) 動物用ワクチンの動向と協調

動物用ワクチンは、ヒト用に比べて対象動物も養殖魚、家畜からペットに至まで広く、それに応じてワクチンの品数並びにロット数が多く、これら全てのロットを検定することは困難になっている。また、おおくのワクチンが既に輸入に頼っており、欧米との協調せざるを得ない現実がある。特に現在、日米欧で進めている承認基準の調和作業(いわゆるVICH)では、先行する欧米で制度化されているシードロットシステムを日本においても同じ様に制度化することは避けて通れない課題となっている。

そのために米国の製剤の規格基準等を定めた9CFR、EUの基準であるEP等を参考として、マスターシード(製造用株として選定され、ワーキングシードの元株として保存されるウイルス株又は菌株)、ワーキングシード(マスターシードに由来し規定の範囲で継代されるウイルス株又は菌株)及びプロダクションシード(ワーキングシードに由来し、製剤の製造段階において有効成分の作製に直接使用されるウイルス株又は菌株)と定義し、全製剤に導入する事を提案している(下図)。生ワクチンに限った議論を進めている人体用生物学的製剤とは、その点で異なっている。また、国家検定制度もそれに伴い、試験を主体とした検定から書類審査を主体とした制度に変化しつつある。

シードロットシステム概念図



II. 総括研究報告書

生ウイルス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 国立感染症研究所 ウイルス第三部 室長

研究要旨 生ウイルスワクチンは、本来的に変異しやすいウイルスの性質を利用して開発された。したがって、ウイルスが複製毎にランダムに変異体が生じることは、ウイルスの特性であり回避できない。しかし、有効性と安全性といった規準を満たし製剤として認可された以上は、製品として一定の品質を保つ事が要求される。均一な製品を安定的に製造・供給する方法として考えられたのが、シードロットシステムである。本研究班では、製造各所社のワクチン株の継代履歴をもとに、生物製剤規準にある「製造承認株からの継代は5代以内」という大原則を壊さない範囲でシードロットシステムを実行する方策を検討し、その実施案を各社、各生ワクチン製剤毎に設定し、一步を踏み出した。最終年度は、株継代の影響とそれを管理する技法を中心に検討を進めた。

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ることは困難である。とは言っても、できる限り一定品質のワクチンを製造することは、医薬品としてのワクチンには必須な事である。一定の製造環境で製剤を作ることは、特定の変異ウイルスを選択しないための基本である。それが生物製剤 GMP であり、製造施設、環境、資材、製造方法が管理化され、製造過程の再現性・均一性が図る事に貢献している。それでもウイルスは複製する毎に変異を蓄積する。その度合いを制限するには、継代歴を規制する以外に手段はない。それがシードロットシステムである。本研究班では現状の製造履歴の枠内でシードロットシ

ステムを構築することをめざした。

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)から作れた野外試験株(製造承認株、オリジナルワクチン)あるいは製造用保存種株(マスターシード)が既に枯渇しており、これらを元にあらたにワーキングシード、プロダクションシードを作ることは困難であった。従ってすでに多くのヒトに使われ安全性と有効性が確認しているワクチン原液を暫定マスターシードと位置づけ、これを元にワーキングシード、プロダクションシードを作り、恒に一定継代歴のワクチンが製剤として出荷できる体制を作る事を目的とした。

B. 研究方法

(1)シードロットシステムの導入の検

討 国内ワクチン製造所社である武田薬品工業(株)、(社)北里研究所、(財)化学及び血清療法研究所、(財)阪大微生物病研究会で製造する、弱毒生麻疹、風疹、おたふくかぜワクチンの製造現場にシードロットシステムを導入することを目的に、暫定マスターシード、ワーキングシード、プロダクションシードをどの様に設定するを検討した。

(2) 導入案の具体的検討

製剤事に製造承認株から数えて何継代めのものがワーキングシード、プロダクションシードに設定でき、実際のワクチンとしてどの程度供給可能なのかを検討した(表 1)。

(3) シード管理技法の検討

実際に、書類上または製造工程上にシードロットシステムをあてはめる事が可能ならば、ほんとうに均一なウイルス集団を維持しているか否かの検証方法が必要である。そのために株の特定部位のシーケンスによる塩基置換の存在確認、遺伝子増幅技法を利用した変異を持つ遺伝子の定量的検出方法、ウイルスブラックサイズによる管理、温度感受性管理、病原性マーカー、温度感受性マーカー等の方法を検討した(表 2)。

C. 研究結果

(1) 仮想継代歴におけるシードロット導入

シードロットの導入例を仮想継代歴(図 1)を元に説明する。あるワクチン製造所では、製造承認を受けた株を素にして製造用のワクチン原液を作り、それをワクチンとして使ってきた。ところが、かなり使ってしまう残り少なくなってきたので、残った原液を種にして、再びワクチン原液を作るという工程を繰り返してきた。すなわち、

原液が無くなれば次の継代の原液を作る繰り返しによって製剤を作っている。これでは、ロットを重ねる毎に継代歴が増えた製剤が世に出される事になる。ここにシードロットシステムを構築しようにも、製造承認株のストックもほとんど残っておらず、そこから新たにワーキングシード、プロダクションシードを作る事ができない。その場合には、残っている継代歴の若いワクチン原液を暫定マスターシード(継代歴 3)と位置づけ枯渇する事が無い様に恒久的に保存する。そして、このマスターシードからワーキングシード(継代歴 4)を作って、恒にこれからワクチン原液(継代歴 5)を製造することに、シードロットを作り上げる。この場合でも製造承認株あるいはその親を起点とした5代の枠を超えてはならないので、この例ではワーキングシードがプロダクションシードも兼ねる例となっている(図 1)。

(2) 導入案の具体的検討

製造所社のそれぞれ製剤についての検討結果について、武田薬品工業(株)の麻疹、風疹、おたふくかぜワクチンについては仁田研究班、(社)北里研究所の麻疹、風疹、おたふくかぜワクチンについては李研究班、(財)化学及び血清療法研究所の風疹、おたふくかぜワクチンについては大隈研究班、(財)阪大微生物病研究会の麻疹、風疹ワクチンについては五味研究班で検討した(表 1)。いずれも製造所のいずれの製剤についても、シードロットの設定は可能であり、それによる継代歴を一定にしたワクチンが 10 年から 1000 年供給可能であることが判明した。

(3) 集団としてのウイルスが同等に含まれているかの検証方法

型だけシードロットスタイルを採用しても、実際にワクチンに含まれているワクチン継代を経ても、あるいは製造時期あるいはスケールを変えても質的に同等であるかを検証できる方法を考えておかなければ、見かけ状シードロットシステムが機能しているだけになってしまいます。そこで、いくつかの方法を候補として選び、それらがウイルスの同等性管理に使えるか否かを検討した(表 2)。

しかし、ワクチンに含まれるウイルスは、99.99%が同一で残り 0.01%の変異体を検出できるくらいの感度が要求され、今回試した限りではどれもそこまでの感度を有しておらず、不十分な成績となった。

D. 考察

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 年から行われてき、過去においても何度か研究班も組織され研究成果が公表された。本研究班で調査したころ、ワクチン製造所社は、シードロットシステムの必要性は理解しシードロットシステムの理念を導入しようつ努力している姿勢が見られた。しかし、本来恒久的に保存されるべき製造承認株＝マスターシードが存在しないか、有ってももはや継代できるほど残っていないのが現状であった。一方、生物製剤規準に規程されている「その株が適当と認められた後、定められた培養条件で継代を行い、かつ、その継代数が 5 代を超えてはならない」の"5 代以内ならば使用可"の解釈により継代の枠内で次々と異なる継代歴のワクチンが市場に出荷される状況が生まれていた。

今回の研究班で、シードロットシステムを製造現場に設定しようにも、製造承認株がすでに枯渇して無いか、あ

るいは、あってもほとんど無いに状態からどのようにシステムを立ち上げるかにあった。各製造所各製剤毎に改めてマスターシードに相当するものを設定し、システムを現場に導入することを決定した。製剤の製造量も、かなり長期間に耐えることが分かり、シードロットシステム導入に対して支障がないことがわかった。

そこで、設定したマスターシードの恒久的管理方法、ワーキングシード、プロダクションシードの品質管理方法について、文書管理並びに科学的検証方法の立場から検討したが、考えら得た方法は、必ずしも感度的に十分でないか、仮に検出できたとしても規格値の値が妥当かどうかの検証が十分に行えなかった。検討班は、今年度で終了するが、この点に関しては引き続き検討が必要である。

残った事項としてこの他に以下の事がある。現在生物製剤の GMP により各種の記載整備が進んでいる。本研究班でそれぞれの製造所のそれぞれの製剤にあったシードロットシステム案が構築できたが、これをどのように記載整備の中に盛り込んでいくのかを手続きの点から解決しなければならない。

次に、すでに整備されている GMP にシードロットシステムが加わることにより、製品のロット間の同等性はさらに向上する。一方、わが国の生物学的製剤は全ロット検定を行い、それに合格しなければ出荷できない。しかし、これらシステムにより生物学的製剤のロット間格差が無くなるとするならば、検定項目の見直し、全ロット検定システムそのものも見直しも必要である。

E. 結論

同一品質のワクチンを安定的に供

給することは、国民の健康管理上重要なことである。現状の生ワクチン製造と生物学的製剤規準の枠組みの中で、製造承認株から数えて同一継代歴のワクチンを安定的に市場に出すべくシードロットシステムを各製造所の麻疹、風疹、おたふくかぜ生ワクチン製剤に導入する案を作った。ワクチンに含まれるウイルスの集団としての同等性を検証する手段を検討したが、方法ならび規格値を設定するまでには至らなかった。これら規格試験の設定と共に、GMPでの記載整備手順、システム導入後の検定基準の見直し等が今後の検討課題として残った。

F. 健康危険情報

現段階では、ワクチンの継代歴の違いによる具体的な健康被害の報告はない。

G. 研究発表

巻末に一覧表を載せた。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

図1. 仮想製造

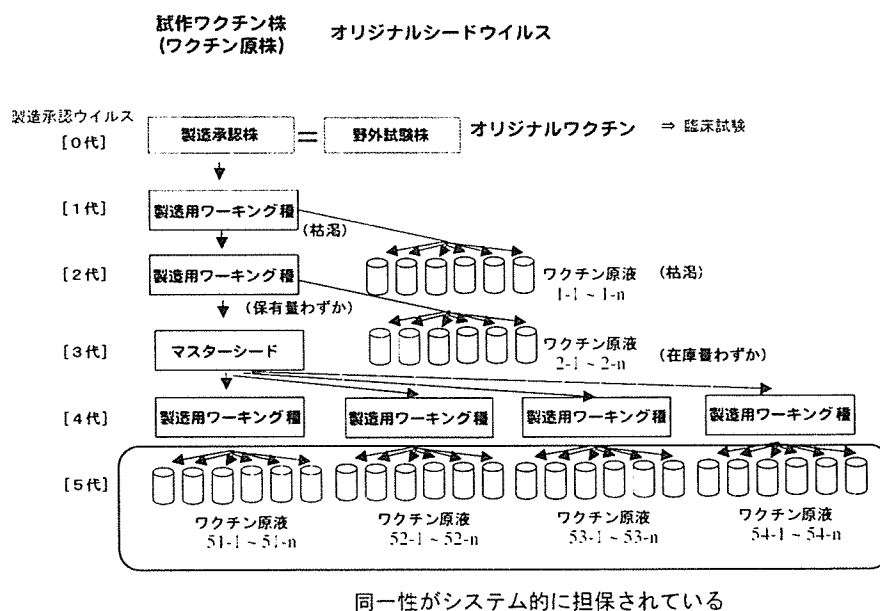


表1 シードロットシステム採用時のワクチンの継代歴と推定される供給量

製造所	製 剤 名		
	麻 疹	風 疹	おたふくかぜ
武田薬品工業	5 継代目 数十年分	4 継代目 十数年分	3 継代目 数十年分
北里研究所	3 継代目 数十年分	4 継代目 数十年分	4 継代目 百年分
阪大微生物病研究会	5 継代目 150 年分	2 継代目 1000 年分	-
化学及血清療法研究所	-	3 継代目 5 億ドーズ以上	3 継代目 10 億ドーズ以上

表2 ウイルスのポピュレーション管理技法(案)

管理技法	製 剤 名		
	麻 疹	風 疹	おたふくかぜ
ウイルスゲノムの塩基配列 を利用	特定部位の配列変 化を検出	特定部位の配列変 化を検出	特定部位の配列変 化を検出
	定量的 PCR による 変異体検出	定量的 PCR による 変異体検出	定量的 PCR による 変異体検出
ブラック形状	ブラックサイズ 変化しない	-	ブラックサイズ 変化しない
ウイルス増殖性	高温領域に 感受性	高温領域に 感受性	-
ウイルス中和抗体	エスケープ 変異体無し	-	エスケープ 変異体無し
ウサギでの免疫原生	-	抗体誘導 しない	-
ラットでの神経病原性	-	-	水頭症を 起こさない

III. 分担研究報告書

おたふくかぜ生ワクチンの継代変化に関する研究

分担研究者 加藤 篤 国立感染症研究所ウイルス第三部 室長
協力研究者 木所 稔 国立感染症研究所ウイルス第三部 主任研究官
協力研究者 田代真人 国立感染症研究所ウイルス第三部 部長

研究要旨：おたふくかぜ生ワクチンは鶏胚由来初代繊維芽細胞(CEF)にムンプスウイルスワクチン株を接種することによって製造される。生物学的製剤基準では、5代の枠内で継代することが許されているが、その間にどれほど株が安定なのかを検討した例は少ない。そこで、製造条件に近い低感染価で国産おたふくかぜワクチン3株を継代し、ウイルスに如何なる変化が現れるかを *F*、*HN* 遺伝子を含むウイルスゲノムの約 1/4 にあたる領域の塩基配列で確かめた。その結果、塩基配列を決定した範囲内ではシークエンス波形のメジャーピーク、マイナーピークに変化は観察されず、国産おたふくかぜワクチン3株は遺伝的にもウイルス集団的にも安定していることが判った。しかし、ウイルス感染価や増殖温度をそのままにして CEF の培養条件を変更するだけで、2株に継代による遺伝子変化が観察されるようになり、株の遺伝的安定性は簡単に崩されることがわかった。

A. 研究目的

弱毒生ウイルスワクチンは、有効で且つ安全と認められたワクチン株から製造される。ウイルスは元来的に変異し易い生き物であるため、ウイルスを増殖させて作るワクチンにはある頻度で集団内に変異ウイルスが含まれる。変異は増殖毎にランダムに起るためため製剤ロット間の品質的な差をまったく無くすことは困難である。しかし、できる限り一定品質の製剤を製造することは、医薬品としてのワクチンには必須な事であり、そのため生物学的製剤 GMP が導入されて製造施設、環境、資材、製造方法が管理化されて製造過程の再現性・均一性を図る事により製造される製品の同等性を確保するようになった。

生物学的製剤基準では製造承認株から5継代の枠内ならば品質的に同等

と見なして、継代ウイルスを製剤として使用する事を認めている。そのため、これまでに様々な継代歴のものが一見規則性の無いまま製剤として使われた。今の所、生ワクチンに含まれる変異ウイルスに由来すると思われるワクチン事故は起きておらず、変異ウイルスの存在を危険視しすぎかもしれない。しかし、ランダムに生じる変異ウイルスの性質を予見できない以上、今まで事故が無かったから将来に渡っても事故は無いとは言えない。生ワクチンに含まれる変異ウイルスの頻度を一定に保つ対策が必要であり、そのためにはワクチンの製造管理にシードロットシステムを導入し、恒に同一継代歴の製剤が製造されるようにすべきであると考えます。

一般的に弱毒生ワクチンは、ウイルスが変異しやすいという性質を利用

してヒトと異なる宿主、異なる培養条件で増える特定のウイルスを選別して、もはやヒトで病気を起こしにくい株を選んできた経緯をもつ。国産おたふくかぜ生ワクチン3株(トリイ、ホシノ、ミヤハラ)は初代鶏胚細胞(以下CEF)等を使って弱毒化され、製剤はCEFを使って製造される。国産おたふくかぜ生ワクチン3株について生物学的製剤基準に従い5継代した場合にどれほどの変化がウイルスに生じるのかを実測するため、製剤が製造される条件に近づけて継代を行い、継代前株と継代後株のF、SH、HN遺伝子含むゲノム全体の約1/4の領域の塩基配列を決定して比較することを目的にした。

その結果、国産おたふくかぜ生ワクチン3株を製造条件に近い条件で継代して比較した場合には、領域内にはシーケンス波形上の変化が観察されず、同一培養条件内ではシーケンスした範囲の遺伝は安定に継代されることが判明した。しかし、培養条件を変えて維持されたCEFを用いて継代したウイルスを比較すると、3株中2株に塩基置換が認められた。

B. 材料と方法

細胞の準備と感染

10日齢の発育鶏卵から胚を取り出し、常法に従って鶏胚由来初代繊維芽細胞(CEF)を作製した。遠心により集めた細胞に従来の増殖培地(GM; MEM+10%TPB, 5%BS)を加え、 5×10^4 細胞/mlになるように調整した。3.5cmシャーレに 1×10^5 細胞/シャーレになる様に加え、37°Cの炭酸ガス培養器内で2-3日間培養した。細胞がほぼ均一になった時に、国内で使われているムンプスワクチン、トリイ株(武田薬品工業、ロット008)、ホシノ株(北里研究所、ロットK05)、ミヤハラ株(化学及

血清療法研究所、ロット3)を感染価0.01で1時間吸着させ、液を除いた後にPBSで細胞を一度洗い、3mlの添加物無しのMEM液(以下MEM(-))を加えて5日間、35.5°Cで培養した。

継代試験

5日後の培養上清3mlを採取し、そのうち1mlを凍結保存し、0.2mlをウイルスRNA抽出材料とした。ウイルス液0.02mlをMEM(-)液0.08mlと混ぜ、再びCEF細胞に一時間吸着させ、PBSで細胞を一度洗った後に3mlのMEM(-)培地を加え、35.5°Cで5日間培養を行った。この操作を合計4回繰り返し、継代歴5のウイルス液を得た。

特殊条件下での継代試験

常法に従って作成したCEFを血清を含まない合成培地(Opti SFM; Opti-PRO SFM、Invitrogen Co.)を使うこと以外同一にして培養し、継代実験に使った。ムンプスワクチン、トリイ株、ホシノ株、ミヤハラ株を感染価0.01で1時間吸着させ、液を除いた後にPBSで細胞を一度洗い、3mlのMEM(-)を加えて5日間、35.5°Cで培養するというサイクルを5継代まで繰り返した。

RT-PCR

継代歴0の接種ウイルス及び継代歴5の培養上清からSH-Fプライマー: 5'-TCAAGTAG TGTCGATGATCTC-3'とSH-Rプライマー: 5'-AGGTGGCA TTGTCTGACATTG-3'を使いRT-PCRを行ってムンプスウイルスのSH遺伝子部分に対応する549塩基対のDNA断片を増幅させた。RT-PCR反応は、宝酒造のAMV RT-PCRキットを用いて説明書に従って行った。

全長15384塩基からなるムンプスウイルスゲノムのうちでM遺伝子

(3228-4481) 後半から *F* 遺伝子 (4482-6210) と *SH* 遺伝子 (6218-6533) を含む *HN* 遺伝子 (6536-8428) 前半までの約 2.5 K 塩基対 (4178-6656) と *SH* 遺伝子前半から *HN* 遺伝子を含む *L* 遺伝子 (8430-15360) の前半までの約 2.4 K 塩基対 (6238-8625) を RT-PCR 反応により増幅し、DNA シークエンサー (ABI 3130xl Genetic Analyzer) を使ったダイレクトシークエンス法によって塩基配列を決定した。得られた塩基配列データは Seq-Ed と GENE TYX-MAC を用いて解析した。塩基に複数の候補が含まれる場合には、その部分がウイルスにより異なると判断して主要構成成分だけでなく少数成分についても記録した。

C. 研究結果

細胞培養とウイルスの継代

生物学的製剤基準に記された 5 継代の枠内でムンプスウイルスに変化があるのか、もしあるならば、すべての株に当てはまるのかを検討した。発育鶏卵から胚を取り出してトリプシンで消化後に牛血清添加 MEM で培養した CEF 細胞におたふくかぜ生ワクチン トリイ株、ホシノ株、ミヤハラ株をそれぞれ細胞あたりの感染価 0.01 で接種し、35.5°C で 5 日間の培養を 5 継代まで繰り返した。トリイ株、ホシノ株、ミヤハラ株を CEF に接種しても Vero 細胞で見られる様な顕著な細胞融合を伴う変性は見られない。形が縮んだり、球状になった細胞が多くなり、それらが培養器から離れて浮遊するのが見られる程度である。そのため継代時に採取した培養上清の一部から RNA を抽出し、ムンプスウイルスの *SH* 遺伝子部分を RT-PCR 法によって増幅することでムンプスウイルスが培養液中に存在しているか否かの確認をおこなった(図 1)。今回の

培養条件では 5 継代の枠内で増幅されたバンドの濃さに継代歴並びに CEF を培養した培養液の違いは見られず、ほぼ同等にウイルスが増えていると思われた。

ウイルス遺伝子の比較

継代間にウイルスにどのような変化が生じるのを知るため、ワクチンとしての有効性に影響し細胞融合に関与する *F* と細胞接着に関与する *HN* 遺伝子領域に着目し、継代により変化が生じているか否かを調べた。*F* と *HN* を含む領域は 4000 塩基になるため、*F* を含む部分と *HN* を含む部分を 2 つの領域に分けて増幅し、その塩基配列をダイレクトシークエンス法により決定した(図 2)。塩基配列を継代前と 5 継代後の間で比較したところ トリイ、ホシノ、ミヤハラの各株でこの領域に塩基置換は生じていないことがわかった。塩基の存在を示す波形データの主要波形に加えて、異なる塩基の存在を示す小さな波形に目を向けても継代の有無による変化は認められなかった。

ウイルス遺伝子の安定性

5 継代しても変化が生じないという結果は、限られた条件の下で継代したために見られた特殊な現象であり条件によっては変りやすい物であること、それともあるいは、ムンプスウイルスワクチン株は既に遺伝的に安定状態になっている事を示している。どちらの仮説が正のかを調べるために、無血清培地で培養した CEF を使って同様の継代実験を行った。用いた無血清培地は、それを使って培養した CEF は従来の牛血清入培地で培養した CEF よりも細胞分裂速度が高く、接種したムンプスウイルスの増殖性が高いことが判っている (結果未表示)。この

CEF細胞を使って国産ワクチン3株を5継代した。ミヤハラ株には最初のし結果と同様に継代株と未継代株の間に塩基置換が見られなかった。しかし、トリイ株とホシノ株には塩基置換が認められた。トリイ株変異部位は1箇所、そのシーケンス波形は変異型と未変異型がほぼ同等の高さを示した(図3)。5継代の段階で変異株と未変異株が同程度に混在するようになったことを示した。一方、ホシノ株には5箇所塩基置換が認められた。塩基置換部位のシーケンス波形は、いずれの変異部位においても変異型のシグナルが高く、未変異のシグナルが低い状況であった(図3)。完全に変異型塩基を持つ株に置き換わったのではなく、未変異株もわずかに残って、混在した状態になっていることを示した。

国産おたふくかぜワクチン株は遺伝的に安定な状態になっているのではなく、条件を整えば変異株の出現を抑えられる状況になっていることが判明した。最も多くの変異が認められたホシノ株ではM遺伝子3'末端側のM蛋白質コード領域に3箇所、ノンコード領域に1箇所、HN遺伝子のHN蛋白質コード領域内に1箇所の合計5箇所に置換が認められた。一方、トリイ株ではM遺伝子の3'末端側のM蛋白質コード領域に1箇所の置換が認められた(図4)。

D. 考察

現行の麻疹、風疹、おたふくかぜの3ワクチン製剤の製造は「ワクチン製造承認株から5代以内の継代」ならば、その間に株に大きな変化は無く同等であると見なして使えることになっている。生ワクチンに含まれる株の同等性の確保という品質管理上の観点から5継代の段階でどの程度の変異が蓄積するのかをワクチン株毎に知る

事は重要である。ムンプスウイルスのM遺伝子の後半からL遺伝子の前半にいたるウイルスゲノム全体の1/4にあたる約4000塩基について未継代のおたふくかぜワクチンウイルスと5継代のウイルスとを比較したところ、トリイ株、ホシノ株、ミヤハラ株のいずれにも変異が見られず、生物学的製剤基準で定められた5代の継代範囲内では株は同等と認めてもよい事を実験的に裏付けた。

安定に株の継代が可能な事は重要な知見である。しかし、このことは必ずしも株の遺伝的安定性を保証するものではない。なぜなら、たとえばCEFの培養条件を変更し、このCEFを使ってワクチンウイルスを5継代すると、ホシノ株に5箇所、トリイ株に1箇所の変異が認めらるからである。一定の製造方法により製剤を製造するからこそ、一定品質の製剤を安定に作る事ができると言い換える事が出来る。近年、生物学的製剤GMPが導入されて製造施設、環境、資材、製造方法が管理化され、製造過程の再現性・均一性を図る事にかなりの力が裂かれる様になった。この結果、製造される製剤の品質的再現性が確保されつつある。定められた条件下での5継代は、ムンプスワクチン株の遺伝的変化を起こさないという結果は、今まで生物学的製剤GMPに費やした努力が間違っていない事を示す科学的結果であると言える。しかし、ダイレクトシーケンスの波形ピーク形状により株のポピュレーション管理は、おそらく検出感度がウイルス集団の10%程度にまで達しないと検出不可能だろうと予測されるため、管理手法的な甘さを含んでいる。今回扱ったおたふくかぜ生ワクチン3株(ホシノ株、トリイ株、ミヤハラ株)中でミヤハラ株は最も遺伝的に安定な性状を示した

が、塩基配列を決定しなかった残り 3/4 の部分に変異部分がある可能性があり、株として変化しなかった否かの判定はまだ早いと思われる。

ワクチンの恩恵を等しく受けるためには、ワクチンの品質が恒に一定であることが必要条件である。今回の試験結果は、5 継代中にワクチン株から変異株が生じ、それがワクチン中に混入する可能性は低く、それ故に"免疫惹起能の低い変異株による不十分な免疫"あるいは"病毒復帰変異株による危険性"の程度は低いだろう事を示した。今後、ウイルスゲノムの残された部分のダイレクトシーケンスを行うと共に、ウイルス集団中に含まれる変異ウイルスの存在比率が 10%未満の場合でも積極的に検出できる実験系の開発し、その結果を以て再評価する必要があるものと考えらる。

ウイルスが複製毎にランダムに変異体を作ること、ウイルスの特性であり回避できない。特に風疹、麻疹、おたふくかぜウイルスを含む RNA ウイルスはおよそ 1 万塩基を複製する際に 1 塩基の変異を起こすと言われている。およそ 10^4 塩基からなる RNA ウイルスは、仮定上一度複製すればすべてのウイルスはゲノムのどこかに一つは変異部分を持つ変異体の集団になる。生じた変異ウイルスがすべて生物学的に生存可能とは限らないので、ウイルス集団中に占める変異ウイルスの存在比率を推定するのは容易ではない。しかし、仮にすべての変異ウイルスが同じ様に生存可能としたときに、各塩基について $1/10^4$ の存在比(99.99%は同じ塩基)のものを一般的に検出する手段はない。今回、定められた培養方法で 5 継代しても変異ウイルスがダイレクトシーケンスの波形で検出できなかったのは、検出感度の観点から当然であるとも言え、むしろ”特定

のシーケンスを持ったウイルスが継代により選択されなかった”点が生物学的 GMP の重要性を評価するうえで重要であるかもしれない。

検出できないだけで継代すればする程に変異が蓄積するのはウイルスの宿命とするならば、継代の回数を制限するしかない。それが生物学的製剤基準の"5 継代枠"である。また、生ワクチンの品質を恒に一定であるようにするには、製造承認を受けた特定の株を出発点とした株の継代管理と、そこから得られた特定の継代歴のものだけを恒に製剤として出荷するシステムを組まざるを得ない。これが"シードロットシステム"である。本研究班では、風疹、麻疹、おたふくかぜ生ワクチンについてシードロットシステムの構築をめざしている。今回の試験結果からシードロット管理を検証する手段としてダイレクトシーケンスを用いた波形管理は、感度的に不十分であることが判った。存在比 $1/10^4$ のウイルスを検出する手段が必要である。温度感受性マーカー、ブラックサイズマーカー等があげられるかもしれない。

E. 結語

おたふくかぜ生ワクチンウイルス 3 株を CEF で生物学的製剤基準で定められている最大にあたる 5 代の継代を行い、F、HN 遺伝子を含むウイルスゲノムの約 1/4 にあたる領域の塩基配列でウイルスに如何なる変化が現れるかを確かめたところ、3 株ともまったく遺伝子変化を起こさない事が分かった。おたふくかぜ生ワクチン株は、5 代の範囲内では遺伝的に安定に継代されることが判明し、一定条件下での継代がウイルスの安定性に重要であることが再確認された。更なる、製品のロット間安定性確保のためには同

一ロットものが恒に市場にでるシステムを構築すべきである

F. 健康危害情報

無し

G. 研究発表

論文発表

(欧文)

1. Saika S., M. Kidokoro, H. Kubonoya, K. Ito, T. Ohkawa, A. Aoki, N. Nagata, and K. Suzuki., Development and biological properties of a new live attenuated mumps vaccine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 29:89-99, 2006.
2. Nakatsu Y., M. Takeda, M. Kidokoro, M. Kohara, and Y. Yanagi. Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain. *J Virol Methods.* 137:152-155, 2006.
3. Kitabatake M., S. Inoue, F. Yasui, S. Yokochi, M. Arai, K. Morita, H. Shida, M. Kidokoro, F. Murai, M.Q. Le, K. Mizuno, K. Matsushima, and M. Kohara. SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia

virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus. *Vaccine.* 25:630-637, 2007.

(和文発)

1. 加藤 篤 おたふくかぜワクチン、臨床とウイルス 34(4):261-270 (2006)
2. 加藤 篤、木所 稔 第十五改正日本薬局方解説書 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン 廣川書店 G:44-46 2006年6月20日発行
3. 加藤 篤 シンプル微生物学改訂第4版 パラミクソウイルス 東匡伸、小熊恵二 編集 pp269-272 南江堂 2006年5月1日発行

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

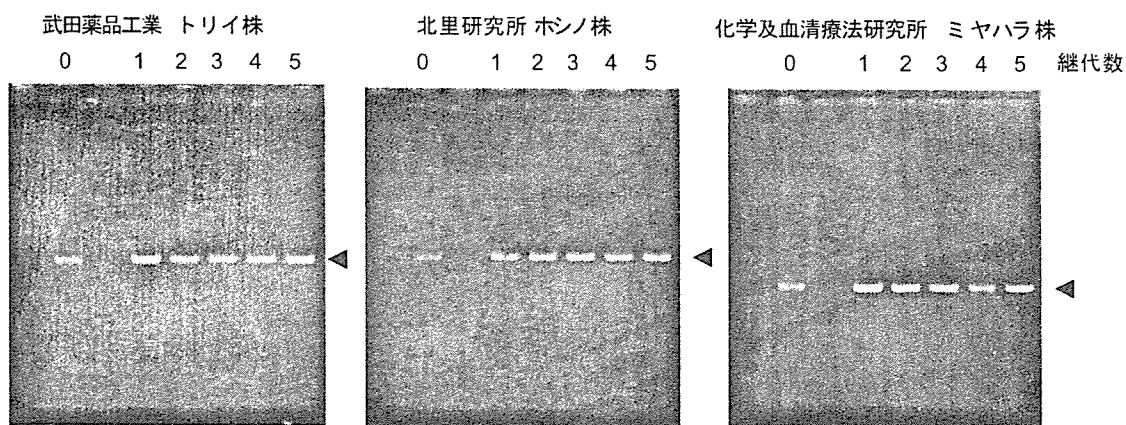


図1. 培養上清中のウイルス量で見る国産おたふく かぜ生ワクチン株継代の影響

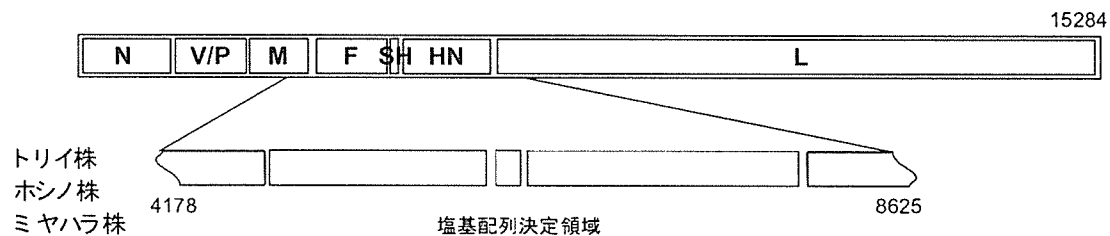


図2. ムンプスウイルスゲノム上の塩基配列比較領域

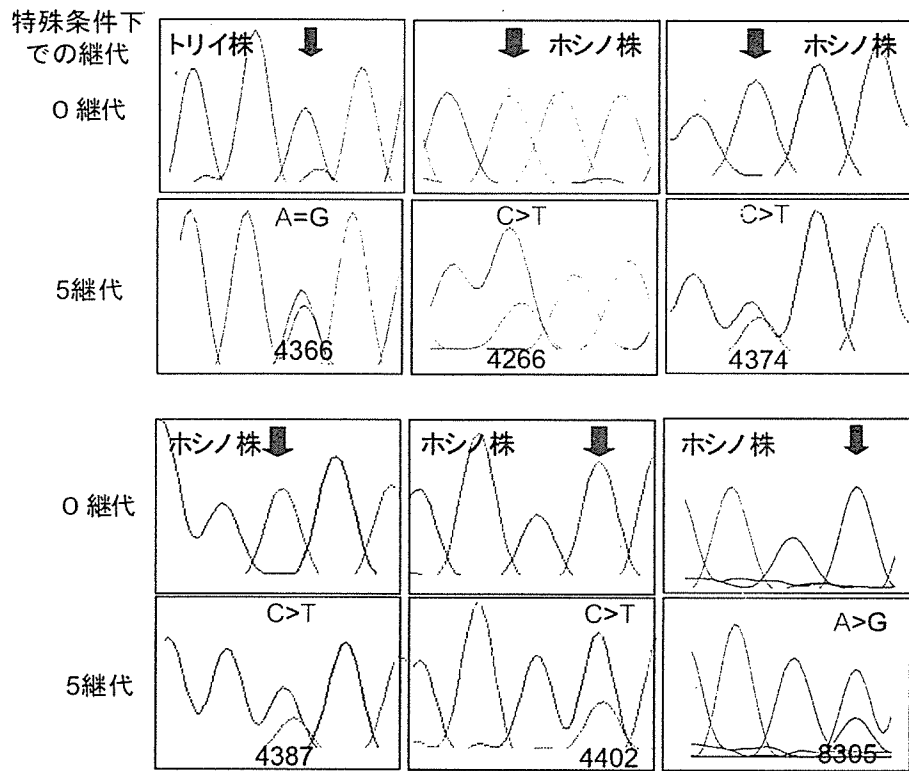


図3. 特定条件下での継代により生じた塩基置換部位とその波形

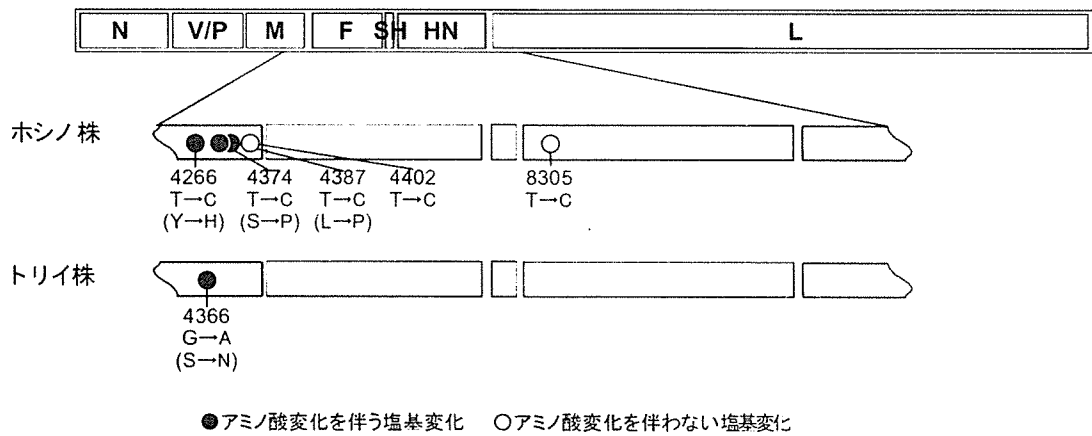


図4. 特殊条件下での5継代により変化した塩基部分のムンプスウイルスゲノム上の位置

弱毒生風しんワクチンにおけるシードロットシステム導入時における株管理方法に関する研究

分担研究者 大槻紀之 国立感染症研究所ウイルス3部 研究員
協力研究者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス3部 室長
協力研究者 海野幸子 国立感染症研究所ウイルス3部 客員研究員

研究要旨 現在国内で使用されている各製造所社の風疹ワクチンのウイルス遺伝子の安定性を確認するため、開発時に製造されたワクチン及び現在流通しているワクチンのウイルス構造タンパク遺伝子の比較を行った。その結果変異は0.1%以下の発生率であり比較的安定であることが示唆された。このことよりシードロットシステム導入後、各シードウイルスならびにワクチンでのウイルス構造タンパク遺伝子配列の解析は、ワクチン株の管理に有用な方法であることが予想された。

A. 目的

本研究班で検討を行っているシードロットシステムが導入された場合、各所社で製造されている風しんワクチンは生物学的製剤基準で定められている製造承認株から5代以内の継代歴のワクチンウイルスで製造することが可能なこと、また製造所社の一部では現在まで製造されてきたワクチンよりも1,2代継代歴が進んだウイルスがワクチンとして用いられる可能性が高いことが昨年度までの本研究班で明らかとなっている。一方で製造承認後現在に至るまでウイルス遺伝子の安定性について、製造されたワクチンを用いての検討はなされていない。

そこで本年度は、シードロット導入時にワクチンウイルスの株管理に有用な手段の一つと考えられるウイルス遺伝子配列情報について、開発時に作製されたワクチンと現在流通しているワクチン間での比較を行い、承認時から現在までのウイルス遺伝子の安定性について調査を実施した。

B. 研究方法

(材料)

現在市販されている4所社（化学及血清療法研究所（以下、化血研）、北里研究所（北研）、武田薬品工業（武田）、阪大微生物病研究会（微研）の現在流通しているワクチン及び開発初期（1980年前後）に製造されたワクチン（一部試作品を含む）それぞれの中間バルク原液を製造所社の協力のもと入手し使用した。（各ワクチンの製造時期は表1に示す。）

(RT-PCR/遺伝子配列の決定)

それぞれのワクチン原液よりウイルスRNAを抽出し、風疹ウイルス遺伝子のうち構造タンパク（C,E2,E1タンパクの3種）をコードする領域3192bp（終末コドンを含む）の遺伝子配列を決定するため、各領域がオーバーラップする様に設計した8組のプライマーペアを用い8領域に分けRT-PCRを実施した。RT-PCRで得られた遺伝子増幅産物を精製し、常法に従いダイレクトシーケンス法で構造タンパク領域全域の遺伝子配列を全ワクチンサンプルで決定した。ただし、武田のワクチンのうち新ロットのもので1

領域のみ RT-PCR で遺伝子増幅産物が得られなかったため、対象領域のセンスプライマーを 5′末側に隣接する領域のセンスプライマーに置き換え RT-PCR を実施し、得られた遺伝子増幅産物をクローニングした後に配列を決定した。なおウイルス RNA の抽出にはロシュ社、RT-PCR 及び増幅産物の精製にはキアゲン社、シーケンス反応及びシーケンサー装置はアプライドバイオシステム社の製品をそれぞれ使用した。

C. 研究結果

生ワクチンの場合その性質上、単一の遺伝子群で構成されているウイルス集団ではないと考えられており、培養条件等でその構成比率が変化したことにより、遺伝子配列上では変異が生じたと判断される事態も容易に推測できる。そこで本研究ではこのような見かけ上の変異を極力排除できる様に新旧ワクチン間で変異が認められた塩基について、ダイレクトシーケンスで得られた波形データを確認し図1に示すような単一ピークで決定された遺伝子であれば、ウイルス遺伝子の大部分が変異を起こしたと判断し、図2に示す様に2つのピークが混在したために変異が生じた場合は、ウイルスポピュレーションの比率が僅かに変化したために生じた変異と判断した。以下に各所社の遺伝子配列の比較を示す。なお塩基の位置表示は To-336 Vaccine Strain (Acc. No. AB047329) を基準に表示を行う。

（化血研）3192bp 中、2 塩基（7187nt 及び 9450nt）において変異が確認された。

波形データから見る限りいずれも塩基の変異が生じていると判断できる。

（武田）3192bp の解析の結果新旧ロット間では遺伝子の変異は認められな

かった。

（北研）3192bp 中、2 塩基（7187nt 及び 9450nt）において変異が確認された。両変異とも波形データから見る限りは、従来から Mixed population であり、新旧ロット間でその比率が変化したものと判断される。なお配列データからは、変異部位及び変異の生じ方は化血研製ワクチンと全く同様であることが確認された。

（微研）3192bp 中、3 塩基（6576nt, 7981nt, 9301nt）において変異が確認された。

波形データから見る限りいずれも塩基の変異が生じていると判断できる。

D. 考察

本研究で比較した新旧ロットのワクチンは製造時期が約 20 年離れているため旧ロットのワクチン製造の際は現在のような製造過程・操作の全てを適切な SOP に基づき管理する GMP 体制は導入されていなかったと想像できる。このため、現在流通しているワクチンと比較すると医薬品製造承認事項の範囲内で製造方法での細かい部分で違いがあると考えられる。また新旧ロット間には製造承認株からの継代数が異なるものがほとんどである。しかしながら構造タンパク領域 3192bp の遺伝子配列の比較では変異はいずれのワクチンとも 0.1% 以下の発生率であり比較的安定であることが予想された。一方、化血研及び北研製ワクチンでは変異の生じている塩基及び変異の生じ方が一致している（ただし北研製は population の変化により生じていると予想される）。このことは風疹ウイルスの当該塩基が変異し易いことを示唆している可能性も否定できない。しかし、両ワクチン株の遺伝子配列は非常に近いことが