

過去の研究でも報告されている。また本研究結果においても変異の生じている塩基以外は両株とも完全に一致していることから、両ワクチン株は塩基配列のみならず遺伝子変異の生じ方の性質も近いことが予想されることから、当該ウイルス遺伝子の変異が必ずしも風疹ウイルス全体において変異し易いことを示唆するものではないことも考えられる。

シードロットシステム導入時には、各シードウイルスならびに初期ロットの遺伝子配列を確認し大きな変異が生じていないことを確認することがシード管理及びワクチンの品質確保に寄与できるものと考えられた。ただし1塩基の違いであってもワクチン株の性質を大きく変化させる可能性もあるため、塩基配列のみをもって株管理ができる訳ではない事も認識する必要がある。

E. 結論

国内で流通している風疹ワクチンの構造タンパク遺伝子は比較的安定であることが推測された。このことよりシードロットシステム導入後ワクチンウイルスの管理方法の一つとして遺伝子配列の確認が有用であることが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願、登録情報

なし

	旧ロット	新ロット
化血研	1980.3	1998.8
武田	1978.1	2005.11
北研	1979.2	2005.3
微研	1979.1	2004.4

表1 使用ワクチンの製造年月

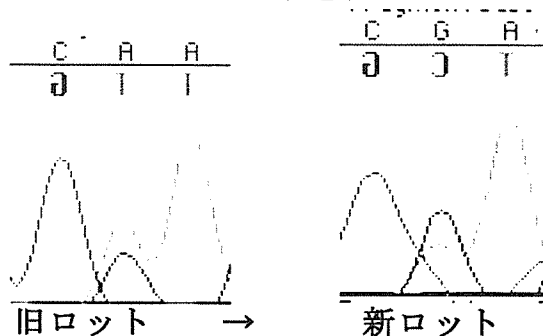


図1 ウイルス遺伝子に変異と判断する波形データ

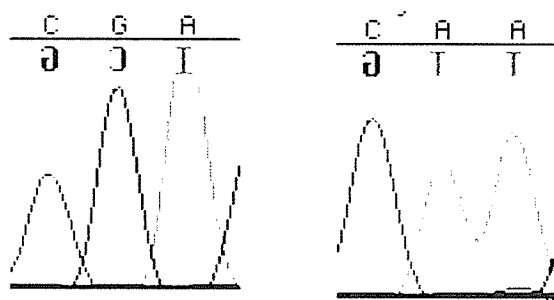


図2 比率が変化したと判断する波形データ

弱毒生麻疹ワクチンの評価および品質管理に関する研究

分担研究者	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
協力研究者	菅井敏行	国立感染症研究所ウイルス第三部 研究員
協力研究者	堤 裕幸	札幌医科大学小児科 教授
協力研究者	斉藤義弘	慈恵医科大学小児科 助手

研究要旨 本研究は、弱毒生麻疹ワクチンの評価に関する、実験室の手技の開発、確立を目的とする。本年度は、ワクチンウイルスの H 及び N 遺伝子配列の変化について検討を行った。H 遺伝子より N 遺伝子に多く変化が認められたことから、N 遺伝子配列が遺伝子学的診断に有用であると考えられた。また、3 社ワクチン株による違いを明らかにすることで、ワクチン株品質管理における問題点が明らかとなった。

A. 研究目的

現在我が国で市販されている麻疹ワクチンは AIK-C 株、Schwarz-FF8 株、CAM 株由来であり、ニワトリ胎児胚細胞(CEF)で増殖させた麻疹ウイルスを含む培養上清を元に製造されている。ワクチンの製造においては、株の継代歴による変異を避けるためにシードロットシステムの導入が求められている。一方、ワクチンの評価および品質管理に関しても多くの課題が指摘され早急な対応が求められている。

今年度、本研究では麻疹ウイルスワクチンの遺伝子解析を行い、シードロットシステム導入の科学的根拠の提示及び弱毒生麻疹ワクチンの評価方法について検討した。

B. 研究方法

現行ワクチン製造方法における、麻疹ウイルスワクチン株の遺伝子変異について検索するため、3 社の中間段階品において製造時期、経代数の異なる 4 つをそれぞれ選択し検索を行った。これら中間段階品より RNA を抽出し、cDNA 合成を行った。ウイルス

ゲノム検索を行う目的で、cDNA 合成は、F 遺伝子配列内にあたる forward primer を H 遺伝子の解析に用い、P 遺伝子配列内にあたる reverse primer を N 遺伝子の解析に用いた。その後、目的とする遺伝子を増幅する primer による PCR 産物で、Direct Sequencing を行い、これらの麻疹ウイルス H 及び N 遺伝子配列を決定した。

また、経代数による遺伝子変化について検討を行うために、CEF によるウイルス経代を行った。麻疹ワクチンウイルス中間段階品を用いて、3 経代(30 日間)の培養を行ったのちに、ウイルス培養液中のウイルス遺伝子配列を同様の方法で決定し、元の中間段階品と比較した。

(倫理面への配慮)

実験室内診断に関する手技が主体であり、倫理面での配慮は必要としなかった。

C. 研究結果

用いた中間段階品の経代歴の模式図を図 1 に示している。0 代は、今回検索した中間段階品の元にあたるウ

イルスを指す。遺伝子配列の検索に用いた中間段階品は、太い黒枠で示している。これらについて、比較的変異がおきやすいと考えられる、H 遺伝子および N 遺伝子の蛋白翻訳領域について調べた。

H 遺伝子については、検索した A 社中間段階品 4 本間で違いは認められず、また B 社中間段階品 4 本間についても違いを認めなかった。一方、C 社中間段階品については、C②及び C③-1、C③-2 間においては、違いが認められなかったが、C①については他の 3 本由来の配列と 5ヶ所の違いが認められた。

次いで、N 遺伝子について検索した。A 社中間段階品においては、A①-1,2 及び A②-2 間において違いを認めなかった。A②-1 は、その他 3 本との間で 1 カ所において遺伝子配列の変化(A→G)をみとめた。この遺伝子変化は Sequence 波形より、A→G 変化をもつ population が A のまま population に混在していることが推測された。また、B 社中間段階品については、検索した 4 本間で配列の違いを認めなかった。

一方で、C 社中間段階品については、C③-1 と C③-2 間では、違いを認めなかったが、これら C③と C②間で 1 カ所、C③と C①および C②と C①で 3ヶ所の違いを認めた。また、CEF によるウイルス経代数の影響は A 社 A②-2 を用いて行い、H 遺伝子、N 遺伝子について検索を行ったところ A②-2 と CEF3 代経代後の遺伝子配列に相違はなかった。

D. 考察

Edmonston 株は CD46 をレセプターとして用いるが、Vero/hSLAM 細胞は CD46 のみならず CD150(SLAM) を発現する。Edmonston 株は野生株と

同様に CD150 もレセプターとする。Vero/hSLAM 細胞はワクチン株の力価試験などへの応用が可能である。ワクチン株に関しても変異に関する解析が必要と思われる。

E. 結論

麻疹ウイルスにおいて H 遺伝子、N 遺伝子は、他の遺伝子と比較して変化が生じやすいと考えられている。今回、同じウイルス株で経代歴の異なる中間段階品を用いて検索したところ、H 遺伝子に変化が認められたのは、3 社中間段階品計 12 本のうち、1 組のみであった。一方で、N 遺伝子において配列の変化が認められ配列の変化が認められたものは、4 組であった。

N 遺伝子より産生する N 蛋白質は直接麻疹ウイルスの強毒化に関係しないと考えられる為、今回認められた変異がすぐにワクチンの安全性への問題につながるとは考えにくい。しかし結果より、ワクチン株においても N 遺伝子に変化が生じやすく、ワクチン株の品質保証における遺伝子学的評価に、N 遺伝子が有用であると考えられる。

次いで、5 代以内を有効とする科学的根拠については、CEF で A②-2 をさらに 3 代経代したところ、H 遺伝子、N 遺伝子において変異は、認められなかった

A 社株では、経代列の異なる A①と A②-2 間に変異は認められていない。偶然同一部位に変異が生じている可能性が存在するが、これがないと仮定すると 0 代から 2 代は同一であると考えられる。この後、今回研究による CEF3 代の経代で変異が認められなかったことから、H 及び N 遺伝子の 5 代経代による変異への影響は少ないと推測される。B 社株についても、同様に仮

定すると、2代の経代数で変異が生じないと考えられる。

一方で、C社製品については、現行ワクチンにおいてすでに1代の間で変異が生じているものが存在する(C①とC②)。この遺伝子配列の変化の理由として2つの可能性が考えられる。ワクチン経代中に変化が生じた可能性および、承認株に存在していた少数の変化を持ったウイルスが経代中に増殖してきた可能性である。これらのどちらの可能性からも、遺伝子配列変化の多少には、ワクチンウイルス株自身の性質、およびワクチンウイルス経代方法が影響すると推測される。

E. 結論

麻疹ウイルスワクチン株のH遺伝子およびN遺伝子の解析から、遺伝学的手法をもちいた品質管理におけるN遺伝子の有用性が示された。

また、今回3社の中間段階品を用いて検索を行ったが、3社ワクチン株間において、遺伝子配列変化の多少が認められた。ワクチン株経代方法やワク

チン株の違いが、ウイルス遺伝子配列の変化に影響する可能性が示唆される。このウイルス株についての遺伝的安定性の相違については更なる検討が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

無し

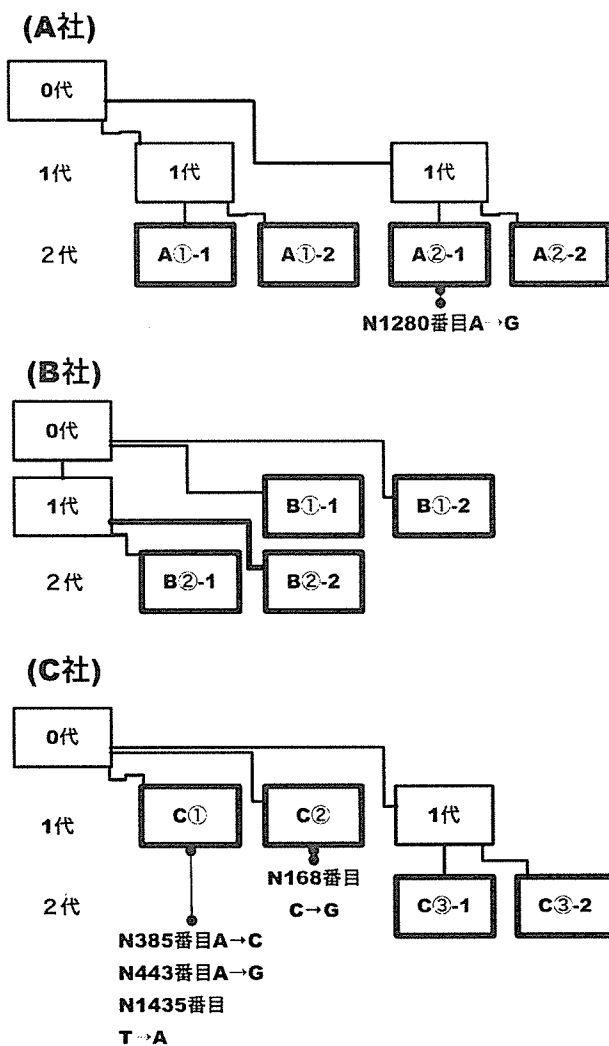
G. 研究発表

1. 論文発表
(英文)

Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. Vaccine 2007, 25 (in press).

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



(図 1) 国産麻疹ワクチン各株の継代と塩基配列の変化以下

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 部長
協力研究者 通山哲郎 財団法人阪大微生物病研究会 製造部 課長

研究要旨 弱毒生麻しんウイルス田辺株、及び弱毒生風しんウイルス松浦株のシードロットシステムの運用にあたり、ワクチンの品質を担保する方法について検討した。麻しんウイルスのワーキングシードと原液については、生物学的性状（プラークサイズ、増殖性、温度感受性）に差が無いことが確かめられた。現在、塩基配列を利用した品質管理方法を確立しているところである。また、風しんワクチンのワーキングシードと原液については、構造蛋白質（C/E2/E1）遺伝子の塩基配列を比較した結果、変異の無いことが確かめられた。

A. 研究目的

弱毒生麻しんウイルス田辺株、及び弱毒生風しんウイルス松浦株のシードロットシステムの運用にあたり、ワクチン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

弱毒生麻しんワクチン田辺株、及び弱毒生風しんウイルス松浦株について、GMPによる品質の同一性の管理方法の確認と、科学的な品質の同一性の検証を行った。

（倫理面への配慮）

特に記載事項無し。

C. 研究結果

(1) 弱毒生麻しんウイルス田辺株：
GMPによる品質の同一性の管理方法
cGMPに則り、以下に示す事項の手順書を作成し、記録を残すことで厳重な管理を行っている。

■ワーキングシードの作製に関する事項

- ・製造用種ウイルス作製作業手順書（培地組成細胞濃度、マスターシード希釈率、ウイルス培養温度・時間、精製方法・条件、保存条件等）
- ・製造用シードの再小分けに関する手順書

■各シードの保管に関する事項

- ・製造用種ウイルス保存容器へのラベリング方法、使用後の容器の保存に関する手順書
- ・製造用シード保管庫の鍵管理に関する手順書

・管理温度確認手順書

■各シードの使用に関する事項

- ・製造用シードの出納記録に関する手順書（保管管理責任者指定書、使用指示／承認書、保管出納記録、等）

以上のように培養温度や時間、シードウイルスの接種時の希釈率等が製造承認書や作業手順書によって詳細に

定められているため、培養条件は極めて同等であると考えられる。また、シードの保管管理や使用についても各種手順書によってミスが起こらないように厳格に管理されている。

(2) 弱毒生麻しんウイルス田辺株: 科学的な品質の同一性の検証・プラークサイズの測定結果

適度に希釈したワーキングシード、及び原液を Vero 細胞に感染させ、一次重層寒天培地を添加し 37°C で 7 日間培養した後、二次重層寒天培地を添加して 1 日培養した。無作為に選んだ 100 個以上のプラークについて直径を測定した。

その結果、平均プラークサイズはどちらのウイルス液も約 1.6 mm でほぼ同じであった。また、プラークサイズ分布も 1.4-1.6 mm を頂点とする単峰性のピークで、非常によく似ており

(図 1)、t 検定で有意差は認められなかった。現在、製造と同じ条件で培養することによって高継代株を作製中である。今後、この高継代株についてもプラークサイズを測定する予定である。

(3) 弱毒生麻しんウイルス田辺株: 品質の同一性の科学的検証・増殖性の調査結果

ワーキングシード、及び原液を Vero 細胞に感染させた後、32°C で培養し、経時的に感染価を測定した。その結果、両ウイルス液の増殖曲線は相似していることが分かった (図 2)。今後、

高継代株についても、増殖性の解析を行う予定にしている。

(4) 弱毒生麻しんウイルス田辺株: 品質の同一性の科学的検証・温度感受性の調査結果

ワーキングシード、及び原液を Vero 細胞に感染させた後、32°C と 39°C で培養し、それぞれ経時的に感染価を測定した。ワーキングシードの感染価の比 (39°C/32°C) は、3 日目と 4 日目でそれぞれ 0.83、0.72 であった。同様に原液ではそれぞれ 0.87 と 0.80 であり、ワーキングシードとほぼ同等であった。

(5) 弱毒生麻しんウイルス田辺株: 品質の同一性の科学的検証・塩基配列の解析結果

弱毒生麻しんウイルス田辺株原液から RNA を抽出し、麻しんウイルスゲノムの両末端を除く領域をカバーする 8 種類の cDNA 断片を RT-PCR 法にて増幅した。次いで、これらの RT-PCR 産物から未反応プライマーを除去した。塩基配列の決定方法は、精製 RT-PCR 産物を直接鋳型とするダイレクトシーケンシング法により行い、センス鎖とアンチセンス鎖について完全な塩基配列を決定した後、最終的にコンセンサスシーケンスを求めた。

ゲノム RNA の 3' 末端については、poly(A) polymerase でウイルスゲノム RNA の 3' 末端に ATP を重合させた後、オリゴ(dT)プライマーで逆転写反応を

行い、さらにオリゴ(dT)プライマーと特異的プライマーを用いて得られた RT-PCR 産物をクローニングした。ゲノム RNA の 5' 末端については、SMART RACE cDNA Amplification Kit (タカラバイオ) を用いて得られた RT-PCR 産物をクローニングした。それぞれの末端につき、5 クローン以上の塩基配列を決定した。

弱毒生麻しんウイルス田辺株の全塩基配列(15894b)を、Edmonston 株 (Accession No. K01711) 及び AIK-C ワクチン株 (Accession No. AF266286) の全塩基配列と比較したところ、田辺株と Edmonston 株の間には 82 の塩基置換 (51 アミノ酸置換) が、田辺株と AIK-C 株の間には 88 の塩基置換 (55 アミノ酸置換) が検出された。Edmonston 株と比較して塩基置換が最も多かったのは N 遺伝子 (1.00%) で、アミノ酸置換が多かったのは N 遺伝子 (1.91%) と P 遺伝子 (1.97%) であった。同様に AIK-C 株と比較した場合、塩基置換、アミノ酸置換ともに P 遺伝子 (それぞれ 1.20%、2.76%) が最も多かったが、N 遺伝子にはさほど置換は集中していなかった。なお、置換が最も少なかったのは L 遺伝子であった。また、田辺株とこれらの 2 株の間には、塩基の欠損や挿入が認められたが、全ての挿入と欠損は非翻訳領域に存在していたので、アミノ酸のフレームシフトをおこすものではなかった。これら 3 株とも挿入塩基と欠損塩基の数が同じであったので、ゲノムの全塩基数も同じ 15894b であり、”

Rule of Six” にも当てはまっていた。

また、この解析において塩基の混在している部位が検出された。このことから、弱毒生麻しんウイルス田辺株は mixed population であると考えられた。この塩基混在部位は、Edmonston 株の cDNA の塩基番号で 8798 番目 (H タンパクの C 末側) に位置しており、A と C の塩基が混在するものであった (それぞれイソロイシンとロイシンをコードしていた)。

(6) 弱毒生麻しんウイルス田辺株：品質の同一性の科学的検証・Mixed population 部位の SNP 解析結果

弱毒生麻しんウイルス田辺株原液から抽出した RNA を鋳型として、H 遺伝子の 8798 番塩基を含む領域を RT-PCR 法で増幅した。この RT-PCR 産物を TA クローニング法により pCR2.1 ベクターに挿入し、8798 番塩基が A のプラスミド pCR2.1/8798-A と C のプラスミド pCR2.1/8798-C を得た。次いで、pCR2.1/ 8798-A と pCR2.1/ 8798-C をそれぞれコピー数の比で 0 : 10 (0%)、2 : 8 (20%)、4 : 6 (40%)、5 : 5 (50%)、6 : 4 (60%)、8 : 2 (80%)、10 : 0 (100%) に混合した 7 種類の標準 DNA 溶液を調製した。これら 7 種類の標準 DNA 溶液を鋳型とし、8798 番塩基が A の場合に完全にマッチする FAM 標識 TaqMan® MGB プローブ (プローブ 8798-A) と C の場合に完全にマッチする VIC 標識 TaqMan® MGB プローブ (プローブ 8798-C) を用いて、Allelic Discrimination Assay を

リアルタイムPCR装置で行った。

FAMとVICの蛍光強度をそれぞれ縦軸と横軸にプロットした結果、0%から100%の標準DNA溶液の座標はNTC(non template control)を中心として、時計回りに順序通りに位置していた(図3)。

次いで、NTCを基点としてそれぞれの標準溶液の座標のアークサインを求め、標準溶液の濃度とともにグラフにプロットしたところ、0%から60%までは非常によく相関したので、この範囲では一定の定量性が期待できると考えられた(図4)。しかしながら、標準DNA溶液が直線性を示す範囲が一部に偏っている、また、シグナル値に対してバックグラウンド値がやや高いという欠点が認められた。今後、この系の信頼性を確認するために、さらなる解析が必要であると思われた。原液についてもAllelic Discrimination Assayを行い、図3をもとにして塩基混在比を算出したところ、約50%程度の値になった。この値が真の値なのか、実験の機会によってどの程度変動するのか、あるいは、鋳型DNAの分子数によってどの程度変動するのかについて検証を行うとともに、高継代株についても解析を行い、品質管理のための規格値を導き出したい。

(7) 弱毒生風しんウイルス松浦株：GMPによる品質の同一性の確保

上述の麻しんワクチンの場合と同様の記録を行っている。培養温度や時間、シードウイルスの接種時の希釈率

等が製造承認書や作業手順書によって詳細に定められているため、培養条件は極めて同等であると考えられる。また、シードの保管管理や使用についても各種手順書によってミスが起こらないように厳格に管理されている。

(8) 弱毒生風しんウイルス松浦株：品質の同一性の科学的検証・生物学的性状の解析

現在、製造と同じ条件で培養することによって高継代株を作製中である。今後、高継代株、ワーキングシード、原液についてプラークサイズ、増殖性、温度感受性について調査する予定である。

(8) 弱毒生風しんウイルス松浦株：品質の同一性の科学的検証・塩基配列の解析結果

弱毒生風しんウイルス松浦株原液からRNAを抽出し、風しんウイルスゲノムの両末端を除く領域をカバーする12種類のcDNA断片をRT-PCR法にて増幅した。次いで、これらのRT-PCR産物から未反応プライマーを除去した。塩基配列の決定方法は、精製RT-PCR産物を直接鋳型とするダイレクトシーケンシング法により行い、センス鎖とアンチセンス鎖について完全な塩基配列を決定した後、最終的にコンセンサスシーケンスを求めた。

ゲノムRNAの3'末端については、オリゴ(dT)プライマーで逆転写反応を行い、さらにオリゴ(dT)プライマーと

特異的プライマーを用いて得られた RT-PCR 産物をクローニングした。ゲノム RNA の 5' 末端については、SMART RACE cDNA Amplification Kit (タカラバイオ)を用いて得られた RT-PCR 産物をクローニングした。それぞれの末端につき、5 クローン以上の塩基配列を決定した。

原液の全塩基配列(9751b)を決定し、TO-336 ワクチン株 (Accession No. AB047329) の全塩基配列、アミノ酸配列と比較したところ、80 の塩基置換が検出された。アミノ酸置換は、非構造蛋白遺伝子に 18 箇所、構造蛋白遺伝子に 11 箇所存在した。また、TO-336 ワクチン株の progenitor (TO-336 野外株) の全塩基配列、アミノ酸配列との比較を行ったが、松浦株と TO-336 ワクチン株だけに共通な塩基置換 (ワクチン株特異的変異) は全く検出されず、弱毒性に関与している塩基を推測することはできなかった。

同じ方法により、松浦株ワーキングシードの構造蛋白質 (C/E2/ E1) 遺伝子の塩基配列も決定した。原液の塩基配列と比較した結果、塩基置換は全く認められなかったもので、継代による抗原性の変化はないものと思われる。

E. 結論

品質の安定した製品を、長期間市場に供給可能である。

F. 健康危険情報

特に無し

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

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
特記事項なし。

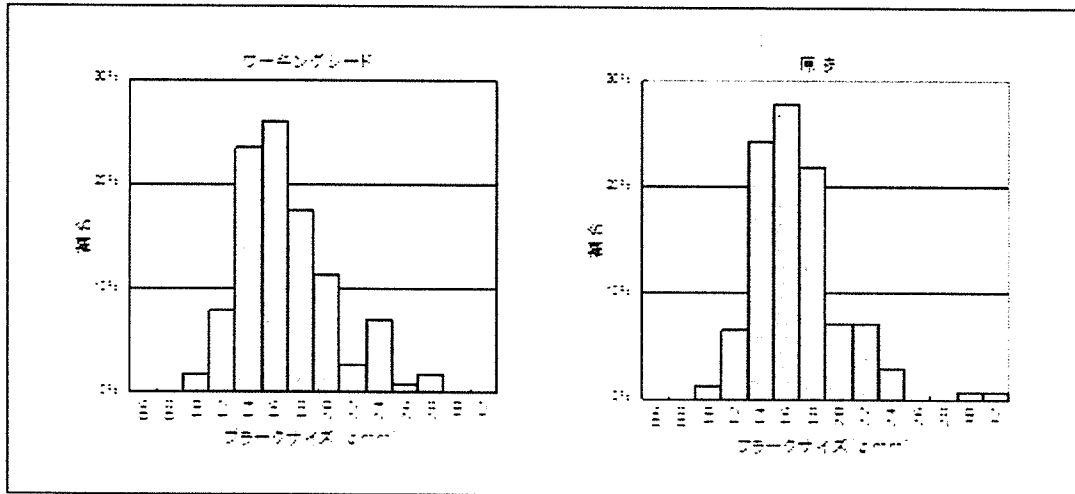


図 1. ワーキングシード及び原液のプラークサイズ

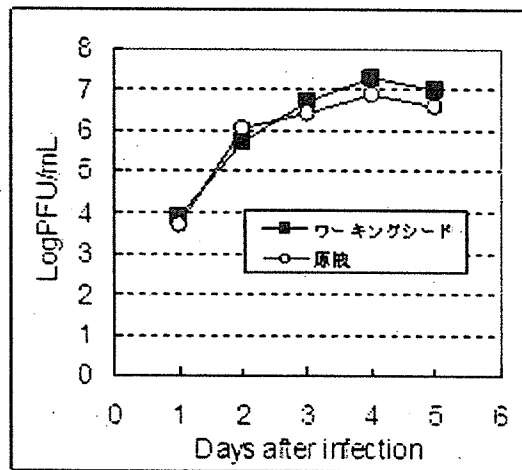


図 2. ワーキングシード及び原液のウイルス増殖曲線

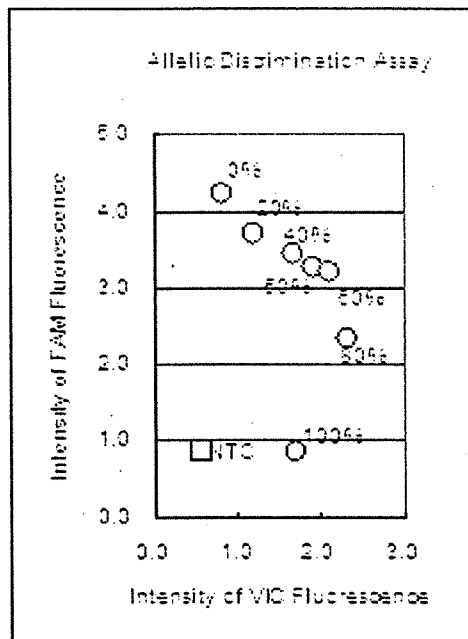


図 3. Mixed population 部位の SNP 解析

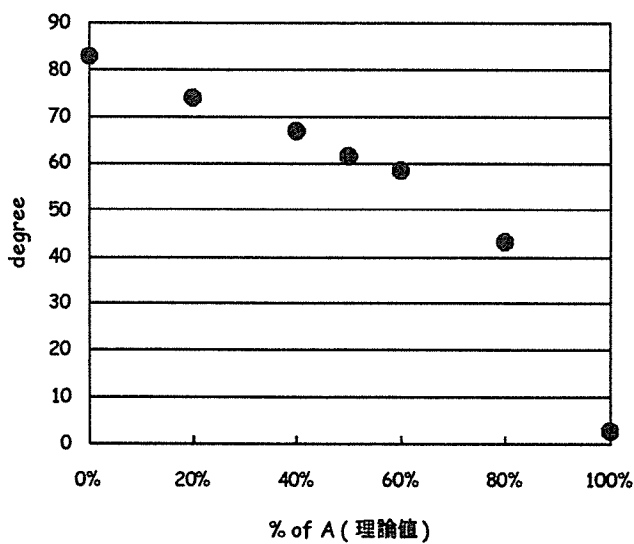


図 4. 標準 DNA 溶液の濃度とアークサインの関係

ワクチン製造株の品質管理に関する研究

分担研究者 仁田義弘 武田薬品工業(株)生物製剤部

協力研究者 末原章宏 武田薬品工業(株)生物製剤部 生物技術グループ

協力研究者 渡辺秀夫 武田薬品工業(株)生物製剤部 生物第一グループ

研究要旨 麻しんワクチン、風しんワクチン及びおたふくかぜワクチン製造用ウイルス株の「シードロットシステム」導入のための品質管理方法の検討として、風しんワクチン株のマスターシード（オリジナルワクチンから2代）、ワーキングシード（3代）、ワクチン原液（4代）及び過継代原液（5代）を実生産設備・製造条件で作製した。これら継代の異なる試料のウイルス含量はいずれも $10^{5.5\sim 5.8}$ PFU/mLであり増殖性に差異は認められなかった。また、遺伝子解析として構造遺伝子の1つであるE1遺伝子領域のシーケンスを解析したところ、マスターシードから過継代原液まで安定であることが確認された。生風しんワクチン製造用種ウイルスのプロセスバリデーションとして、現在検討中である温度感受性、増殖性、ブラックサイズ及びマーカータ試験と併せて評価する予定である。なお、麻しんワクチン製造用ウイルス株については2007年6月、おたふくかぜワクチン製造用ウイルス株については2007年10月を目処にウイルス試料の作製および品質管理方法の検討を実施する予定である。。

A. 研究目的

現在、生ワクチンの製造に用いる種ウイルスは、生物学的製剤基準に準じて、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よう管理しているが、「シードロット導入」を実現するため、長期的に実行可能なマスターシードロットを設定したことを昨年度報告した。今年度は、シードロットシステム導入に必要な品質管理方法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 風しんワクチン株（TO-336株）

試料の作製

風しんオリジナルワクチンを風し

んワクチン原液製造方法で継代して得られたマスターシード(2代)から、1代継代して得られたワーキングシード(3代)、更に1代継代したワクチン原液(4代)、これを更に1代継代した過継代原液(5代)を、各々、風しんワクチン実生産と同じ設備・製造条件で作製した。

2. 麻しんワクチン株(シュワルツ FF-8株)試料の作製

麻しんオリジナルワクチンを麻しんワクチン原液製造方法で継代して得られたマスターシード(3代)から、1代継代して得られたワーキングシード(4代)をこれまでに作製している。今後、1代継代したワクチン原液(5代)、これを更に1代継代した過継代

株（6代）を、各々、麻しんワクチン実生産と同じ設備・製造条件で 2007 年度に作製予定である。

3. 品質管理方法の検討項目の設定

製造用種ウイルスのプロセスバリデーションとして、マスターシード、ワーキングシード、ワクチン原液及び過継代原液の継代株間の品質的安定性評価項目として、次に示す項目を設定した。

風しんワクチン(TO-336 株)

- ・温度感受性
- ・増殖性
- ・ブラックサイズ
- ・マーカー試験
- ・E1 遺伝子配列

麻しんワクチン(シュワルツ FF-8 株)

- ・温度感受性
- ・増殖性
- ・ブラックサイズ

おたふくかぜワクチン（鳥居株）

- ・温度感受性
- ・増殖性
- ・ブラックサイズ
- ・マーカー試験

C. 研究結果

1. 風しんワクチン(TO-336 株)試料の作製

風しんオリジナルワクチンより風しんワクチン製造方法で作製したマスターシード（2代）から、初代ウサ

ギ腎細胞及び牛血清を使用して、ワーキングシード（3代）、ワクチン原液（4代）そして過継代原液（5代）を実生産設備にて作製した。

安定剤を加えた試料のウイルス含量を、RK 細胞を用いたプラーク法により測定した。算出されたウイルス含量は表 1 のとおりであり、マスターシードのウイルス含量が 5.8 logPFU/mL、ワーキングシードが 5.6 logPFU/mL、ワクチン原液が 5.5 logPFU/mL そして過継代原液が 5.6 logPFU/mL であり、各継代株間で差異を認めなかった。

表 1 ウイルス含量

試料	代数	ウイルス含量 (logPFU/mL)
マスターシード	2	5.8
ワーキングシード	3	5.6
ワクチン原液	4	5.5
過継代原液	5	5.6

2. 風しんワクチン(TO-336 株) の品質管理方法の検討・E1 遺伝子配列

構造遺伝子の一つである E1 遺伝子配列の継代株間の同等性検討を行うために、ウイルス液を超遠心によりペレット状とし、RNAiso で RNA を抽出した。続いて、タカラバイオ㈱にて、RNA を鋳型として Prime Script High Fidelity RT-PCR Kit を用いて RT 反応により cDNA を作製した。この cDNA を鋳型として表 2 に示す PCR プライマー及び LATAq を用いて、表 3 に示す条件で PCR (TAKARA Thermal Cycler DICE) を行った。次に、2 w/v% Lo3 アガロースゲル電気泳動及び

ExoSAP-IT (GE ヘルスケアバイオサイエンス社)により PCR 産物を精製し、ダイターミネーター法によりシーケンス解析を行った。その結果、**図 1** に示したシーケンス結果が得られ、E1 遺伝子領域のシーケンスには継代株間における差異は認められなかった。

3. 風しんワクチン(TO-336 株) の品質管理方法の検討・温度感受性、増殖性、ブラックサイズ

温度感受性、増殖性、ブラックサイズは RK 細胞を使用して、現在実施中である。

4. 風しんワクチン(TO-336 株) の品質管理方法の検討・マーカー試験

マーカー試験は、生物学的製剤基準・乾燥弱毒生風しんワクチンの 3.3.6 マーカー試験に準じ、モルモットを使用して実施中である。

D. 考察

シードロット導入のため、風しんワクチン(TO-336 株)の製造用種ウイルスのプロセスバリデーションとして、マスターシード、ワーキングシード、ワクチン原液及び過継代原液を製造スケールで作製し、品質管理方法の検討を行った。風しんワクチン株の構造遺伝子である E1 遺伝子のシーケンスは、マスターシード、ワーキングシード、ワクチン原液及び過継代原液で安定であったことから、継代株間の遺伝的安定性の品質管理項目の1つとすることの可能性が示唆された。しかし

ながら、PCR 産物のシーケンス解析ではミックスポピュレーション中のマイナーポピュレーションの検出は困難であることから、遺伝子配列を含めた複数の品質管理項目の設定が妥当であると考えられた。

E. 結論

風しんワクチン株の E1 遺伝子のシーケンスは、マスターシード、ワーキングシード、ワクチン原液及び過継代原液で安定であることを確認した。

麻しんワクチン株については、製造用種ウイルスのプロセスバリデーションとして 2007 年 6 月を目処に、ウイルス試料の作製および品質管理方法の検討を実施する予定である。

おたふくかぜワクチン株については、製造用種ウイルスのプロセスバリデーションとして 2007 年 10 月を目処に、ウイルス試料の作製および品質管理方法の検討を実施する予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

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。

表 2 PCR プライマー

方向	配列	PCR 産物 (bp)
Sense	GTCCCGTGGGTCCTGATA	620
Antisense	GAGAGTTGCCAGACGGTCCT	
Sense	AGCGACGCGGCTGCTGGGG	506
Antisense	CCAGCGCGTATGTGGAGTCC	
Sense	TTGTGGGGGCCACGCCAGAG	550
Antisense	TGTGTGCCATACACCACGCC	
Sense	CTCACCTCAATGGCGAGGA	398
Antisense	CTATGCAGCAACGGGTGCGG	

表 3 PCR 反応

試料調製法		PCR 反応条件
c DNA	10ng	94℃、4分
Primer sense	5pmol	↓
Primer Anti	5pmol	94℃、30秒
2*LATaq GCbuffer I	10.0 μL	62℃、30秒
dNTP mixture	3.2 μL	72℃、1分
LATaq	0.2 μL	35 サイクル
H ₂ O	up to 20 μL	↓
		72℃、2分

図 1 E1 領域のシーケンス結果

1	GAGGAGGCCTTCACCTACCTCTGCACTGCACCGGGGTGCGCCACTCAAAC	50
51	ACCTGTCCCGTGGCGCTCGCTGGCGTCCGCTTTGAGTCCAAGATTGTGG	100
101	ACGGCGGCTGCTTTGCCCC ATGGGACCTCGAGGCCACTGGAGCCTGCATT	150
151	TGCGAGATCCCCACTGATGTCTCGTGCAGGGCTTGGGGGCTGGGTACC	200
201	CACAGCCCCTTGC GCGCGCATCTGGAATGGCACACAGCGCGCGTGCACCT	250
251	TCTGGGCTGTCAACGCCTACTCCTCTGGCGGGTACGCGCAGCTGGCCTCT	300
301	TACTTCAACCCTGGCGGCAGCTACTACAAGCAGTACCACCCTACCGCGTG	350
351	CGAGGTTGAACCTGCCTTCGGACACAGCGACGCGGCCCTGCTGGGGCTTCC	400
401	CCACCGACACCGTGATGAGCGTGTTCGCCCTTGCTAGCTACGTCCAGCAC	450
451	CCTCACAAGACCGTCCGGGTCAAGTTCC ATACAGAGACCAGGACCGTCTG	500
501	GCAACTCTCCGTTGCCGGCGCGTCTGCAACGTCACCACAGAACACCCGT	550
551	TCTGCAACACGCCGCACGGACA ACTGGAGGTCCAGGTCCC GCCCGACCCC	600
601	GGGGACCTGGTTGAGTACATTATGAATTACACCGGCAATCAGCAATCCCG	650
651	GTGGGGCCTCGGGAGCCC GAATTGTCATGGCCCCGATTGGGCCTCCCCGG	700
701	TTTGCCAACGCCATTCCCCTGACTGCTCGCGGCTTGTGGGGGCCACGCCA	750
751	GAGCGTCCCCGGCTGCGCCTGGTCGACGCCGACACCCCCTGCTGCGCAC	800
801	TGCCCTGGGCCCGGCGAGGTGTGGGTCACGCCCGTTATAGGCTCTCAGG	850
851	CGCGCAAGTGC GGACTCCACATACGCGCTGGACCGTACGGCCATGCTACC	900
901	GTCGAAATGCCCCGAGTGGATTGCGGCCACACCACCAGCGACCCCTGGCA	950
951	CCCACCGGGCCCCCTTGGGGCTGAAGTTCAAGACAGTTCGCCCGGTGGCCC	1000
1001	TGCCACGCGCGTTAGCGCCACCCC GCAATGTGCGTGTGACCGGGTGTACT	1050
1051	CAGTGCGGTACCCCCGCGCTGGTGGAAGGCTTGGCCCCGGGGGAGGGAA	1100
1101	TTGCCATCTCACCTCAATGGCGAGGACGTCGCGCCTTCCCCCTGGGA	1150
1151	AGTTCGTCACCGCCGCCCTCCTCAACACCCCCCGCCCTACCAGGTCAGC	1200
1201	TGCGGGGGCGAGAGCGATCGCGCGAGCGCGGGGTCATTGACCCCGCCG	1250
1251	GCAATCGTTTACCGGCGTGGTGTATGGCACACACACCACTGCTGTGTCGG	1300
1301	AGACCCGGCAGACCTGGGCGGAGTGGGCTGCTGCCATTGGTGGCAGCTC	1350
1351	ACTCTGGGCGCCATTTGCGCCCTCTACTCGCTGGCTTACTCGCTTGCTG	1400
1401	TGCCAAATGCTTGTACTACTTGC GCGGGCGCTATAGCGCCGCGCTAG	1450

ワクチン製造株の品質管理に関する研究

分担研究者 李 富雄 北里研究所 生物製剤研究所 部門長
協力研究者 佐々木 学 北里研究所 生物製剤研究所 部門長
協力研究者 服部信章 北里研究所 生物製剤研究所 部門長
協力研究者 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

研究要旨 シードロットシステムを導入するために新たに設定したマスターシード、マスターシードより1代継代、及び2代継代の保有ワクチン原液について、ウイルス性状の安定性を確認する。今年度は麻しんワクチン（AIK-C株）について実施した。その結果、ウイルス遺伝子の温度感受性マーカーの遺伝子 P439 Pro は安定していた。プラックサイズはほぼ均一な small plaque を形成した。プラックサイズに関与するF蛋白遺伝子はF278 Phe (large plaque type) を示し、遺伝子レベルの結果は Bioassay によるプラックサイズと相関しなかった。今後、麻しんワクチン（AIK-C株）、風しんワクチン（高橋株）及びおたふくかぜワクチン（星野株）のワーキングシードを作製し、品質確認を実施する

A. 研究目的

シードロットシステム導入に向けて、継代におけるウイルス性状の安定性に関して品質を確認することが必要となる。今年度は継代におけるウイルス性状の品質評価について、また、シードロットシステム導入のスケジュールを検討した。

B. 研究方法

1. ウイルスの品質評価に使用する試料

試料は、今回設定したマスターシード、マスターシードより1代継代及び2代継代の保有ワクチン原液を用いる。各保有ワクチン原液は、今回のシードロットシステム導入におけるワーキングシード及びワクチン原液の継代数に相当する。ただし、おたふくかぜワクチン（星野株）は

マスターシードから1代継代のワクチン原液しか製造していないため、2代継代のものを作製する。

1) 麻しんワクチン（AIK-C株）

- ・マスターシード、Seed Lot #0-1（オリジナルワクチンより1代）
- ・Bulk #M22（マスターシードより1代）
- ・Bulk #M17（マスターシードより2代）

2) 風しんワクチン（高橋株）

- ・マスターシード、Seed Lot #0-2（オリジナルワクチンより2代）
- ・Bulk #059（マスターシードより1代）
- ・Bulk #926（マスターシードより2代）

3) おたふくかぜワクチン（星野株）

- ・マスターシード、Seed Lot #0-2（オリジナルワクチンより2代）
- ・Bulk #KO6（マスターシードより1代）
- ・マスターシードより2代で製造と同一条件で作製するもの。

2. ウイルスの品質評価

ウイルスの品質評価は、以下の確認試験を実施する予定である。

・麻しんワクチン（AIK-C 株）は、温度感受性、ブラックサイズ、ウイルス遺伝子（P 領域、F 領域）。

・風しんワクチン（高橋株）は、温度感受性、ブラックサイズ、ウイルス遺伝子（NS の P150 領域）。

・おたふくかぜワクチン（星野株）は、温度感受性、ブラックサイズ、ウイルス遺伝子（F 領域）。

これらの試験項目のうち、今年度は麻しんワクチン（AIK-C 株）のブラックサイズ及びウイルス遺伝子を解析した。以下にその方法を述べる。
ブラックサイズ試験：試料ウイルスを Vero 細胞（6 well plate）に接種し、35°C で 90 分吸着後、1 次重層寒天培地を添加後 35°C で培養した。6 日目に 2 次重層寒天培地を添加し、10 日目に 0.1% ニュートラルレッド[®] を添加染色後、無作為に 60 個のブラックサイズを計測した。

ウイルス遺伝子解析：マスターシード Seed Lot #0-1 と Bulk #M22 ウイルス液から RNA を抽出し P 領域、F 領域で cDNA を合成し、P、F 蛋白領域を RT-PCR を行い増幅した。各領域内に存在する BamHI, EcoRV 制限酵素部位を利用し pBluescript SKII の multicloning sites に ligation し cloning した（図 1）。各ウイルス液の P、F のクローン 5 個について塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1. ウイルスの品質評価

1) 麻しんワクチン（AIK-C 株）

ブラックサイズ：培養温度 35°C でのブラックサイズは small plaque がほぼ均一にみられた。継代した M22 と M17 のブラックサイズは、マスターシードよりやや小さかった（図 2）。

ウイルス遺伝子：温度感受性の性状は主として P 蛋白 439 のアミノ酸が Pro で規定されていることを報告した（Komase K. et al. Vaccine 24:826-834, 2006）。マスターシード、M22 ウイルスから作成した 5 個のクローンはすべて P439Pro であった。

Plaque size に関与する F 蛋白に関して、組み換えウイルスは F278 Leu が small plaque type, F278Phe が large plaque type を作り、ワクチンシードはその mixed population であることを報告した（Nakayama T. et al. J. Gen. Virol. 82:2143-2150, 2001）。今回解析したマスターシード、M22 ウイルス液から作成した 5 個のクローンはすべて F278Phe であった。

2) 風しんワクチン（高橋株）

風しんワクチン（高橋株）の RK13 細胞での温度感受性／ウイルス増殖性試験は、35°C と 39°C で大きな差が認められ、この差は継代ウイルスでも同じ程度であった、また、35°C におけるブラックサイズは継代による変化が認められなかったことを報告した（李他、第三回ワクチン学会、1999）。今回は、その確認試験を実施する。

また、ウイルス遺伝子の NS 領域

p150 が温度感受性に関与していることが研究されていることから、この領域の塩基配列を確認する予定である。

3) おたふくかぜワクチン（星野株）

マーカー試験におけるブラックサイズの比較は、製造ロット間で差がないことを確かめることに利用している。Bulk #KO6 のマーカー試験結果は、同継代数の参照ウイルスと有意差がなかったことが確認されている。今回、継代におけるブラックサイズの安定性について確認する。

また、ウイルス遺伝子 F 領域の F383 Gln はブラックサイズに関与することが調べられており、この領域の塩基配列を確認する予定である。

2. ワーキングシード作製及び品質評価のスケジュール

ワーキングシード作製及び品質評価のスケジュールを次のとおり計画し、シードロットシステム導入によるワクチン製造の準備を行う。

1) 麻しんワクチン(AIK-C 株)

・ワーキングシード作製：

2007 年 2~3 月

・品質評価：

2007 年度前半

2) 風しんワクチン(高橋株)

・ワーキングシード作製：

2007 年 6~7 月

・品質評価：

2007 年度後半

3) おたふくかぜワクチン(星野株)

・ワーキングシード作製：

2008 年前半

・品質評価：

2008 年度前半

D. 考察

麻しんワクチン（AIK-C 株）の P 及び F 遺伝子の解析より、温度感受性の ts マーカーの遺伝子は安定していることがあきらかとなった。温度感受性試験は実施中である。Vero 細胞で形成されるブラックサイズはほぼ均一な small plaque であった。一方、遺伝子レベルでは F278 Phe (large plaque type) を示し、相関しない結果となった。ブラックサイズの大小は、F 蛋白遺伝子のだけの関与ではないことが考えられる。

D. 結論

麻しんワクチン（AIK-C 株）の温度感受性 ts マーカーの遺伝子は安定していた。その他の品質評価の確認試験を継続して実施する。また、シードロットシステム導入に向けて、ワーキングシードを作製し、ワーキングシードの品質評価を実施する。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

G. 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。

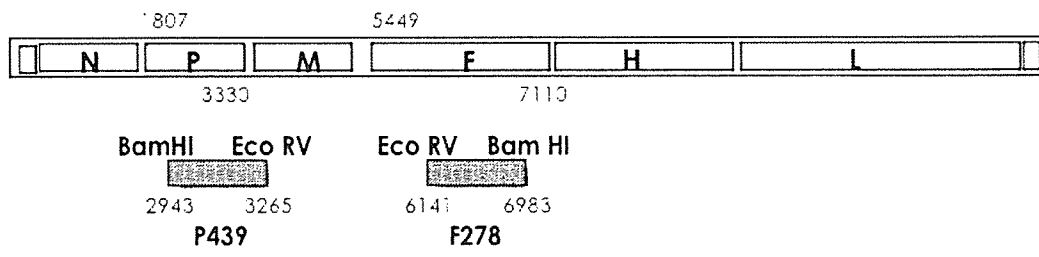


図1 麻疹ウイルスのクローニング領域

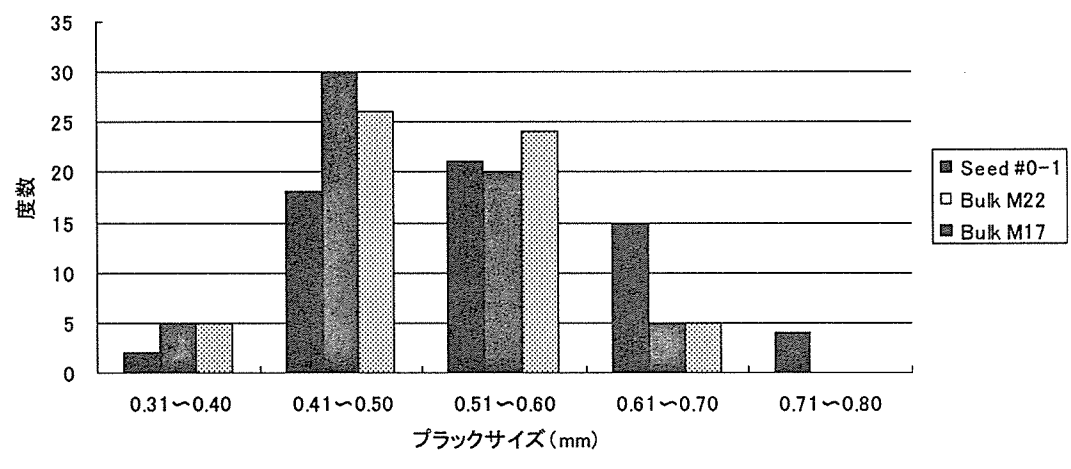


図2 麻しんワクチン (AIK-C 株) のプラックサイズ分布