

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

分担研究者 大隈邦夫 (財) 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 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部第二課 課長
協力研究者 上田謙二 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部 上級技術員
協力研究者 渡邊俊一郎 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部

研究要旨 弊所の弱毒生ウイルスワクチン（風しん、おたふくかぜ）について、シードロットシステム導入についての課題を検証し、研究班活動での協議のもと、マスターシード及びワーキングシードの定義から具体的な継代株の指定を行った。おたふくかぜワクチンについては、規定された製造方法にて新規ワーキングシードを作製し、その性状評価の一部分を終了した。今後は、おたふくかぜワクチンではシードロットシステムとしての評価の達成を行い、風しんワクチンでも同等の構築を実施する。

A. 研究目的

弱毒生ウイルスワクチンの品質保証においては、シードロットシステムが重要であることは公知である。弊所の生産する弱毒生ウイルスワクチンでは、乾燥弱毒生風しんワクチン（松葉株）、乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン（宮原株）及び乾燥細胞培養痘そうワクチン（LC16m8株）が対象である。本研究では風しん及びおたふくかぜについて、シードロットシステム導入の為の課題を検証し、マスターシード及びワーキングシードの定義及び具体的な評価を行い、シードロットシステム移行を目指す。

B. 研究方法

これまでの研究班活動（加藤篤主任研究者らとの協議を踏まえ）より、具体的な評価及び検証項目として、以下の4項目について実施した。

1) マスターシード及びワーキングシードの定義・指定、2) 新規ワーキングシードの作製、3) ウイルス継代条件、4) 安定性の評価（品質試験）

C. 研究結果

1) マスターシード及びワーキングシードの定義及び具体的指定

開発当時の成績及び資料より現在までの当該生ワクチン生産・出荷の実績を確認し、更に、研究班会議での提案を踏まえて、オリジナルワクチン、オリジナルシードウイルス、マスターシード及びワーキングシードについて指定した。製造承認事項などの機密事項にも関することから、詳細は別途に加藤主任研究者に提出した。概要は下記の通り。

(1) 風しん（松葉株）

オリジナルワクチン（治験に用いたワクチン）の継代歴はRK12代である。従って、班会議での提案（WHO基準など）に照らして、RK12代がオリジナルワクチンとなる。

オリジナルシードウイルスはRK11代、マスターシード（1次シードロット）はRK12代とし、ワーキングシード（2次シードロット、製造用シード）はRK13代、ワクチン原液はRK14代となる。

この結果は、弊所がこれまで出荷した製剤の継代数の範囲に相当し、使用実績の面でも問題はないと考える。

(2) おたふくかぜ（宮原株）

オリジナルワクチン(治験に用いたワクチン)の継代歴は CE27 代である。従って、班会議での提案 (WHO 基準など) に照らして、CE27 代がオリジナルワクチンとなる。オリジナルシードウイルスは CE26 代、マスターシード (1 次シードロット) は CE27 代とし、ワーキングシード (2 次シードロット、製造用シード) は CE28 代、ワクチン原液は CE29 代となる。この結果は、弊所がこれまで出荷した製剤の継代数から 1 代追加となるが、従前の定義で継代した場合でも 4 代となり、基準である 5 代以内も満たしている。

2) 新規ワーキングシードの作製

生ウイルスワクチン製造設備は共有施設であることから、おたふくかぜワクチンの新規ワーキングシード作製より実施した。前記 1) の具体的なワーキングシードの指定に基づき、現行の継代方法 (生産スケールでの、培養温度、培養期間、moi など明記し、GMP に準拠したワーキングシード作製：後述 3) を参照のこと) に従ったワーキングシードを作製した。

3) ウイルス継代条件

製造承認事項に基づき、従来の生産方法を確認し、moi、培養温度や培養期間の明記を実施した。恒常的な生産方法について、SOP (数値化及び文書化) の充実を図った。

4) 安定性の評価 (品質試験)

新規に作製したおたふくかぜワーキングシード及びその継代株 (今後の出荷製剤に該当する) について、生物学的製剤の規定に従った品質管理試験を実施している。その一部分についての成績 (ウイルス価など) については、適合する結果を得ている。今後は、温度感受性、プラークサイズなどの評価結果を得るとともに、塩基レベル解析を実施する予定である。

更に、加藤主任研究者より指導頂いた「新生ラット」での神経毒力試験に着手した。最初の段階として野外株を使用した試験系の確認を達成した。今後は、新規ワーキングシードでの評価に展開する予定である。(図 1、図 2 を参照のこと。)

D. 考察

開発当時の成績及び資料より現在までの当該生ワクチン生産・出荷の実績を確認し、研究班会議での加藤篤主任研究者との協議を踏まえて、以下の 4 項目について実施した。

- 1) おたふくかぜ及び風しんワクチンのマスターシード及びワーキングシードの定義及び具体的な指定、
- 2) おたふくかぜワクチンの新規ワーキングシードの作製、
- 3) ウイルス継代条件などの明確化、
- 4) おたふくかぜワクチン新規ワーキングシードの安定性の評価 (品質試験)

今後は、別途に提出した日程計画に従い、おたふくかぜワクチンの新規ワーキングシードの評価を継続するとともに、風しんワクチンの新規ワーキングシードの整備へ展開していく。

E. 結論

本研究の成果により、弊所の生ウイルスワクチン (おたふくかぜ、風しん) のシードロットシステム移行のための具体的な確認について、部分的には達成できた。今後も継続した検討を行う。

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。

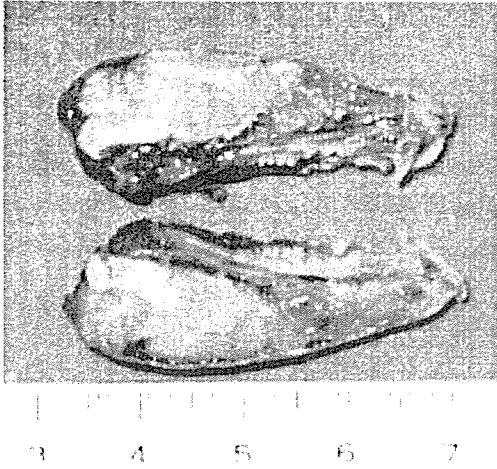


図1. MEM 培地 (ネガティブコントロール)

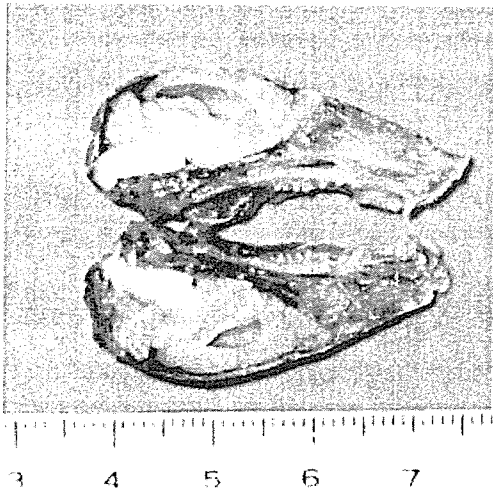


図2. 野外株(ポジティブコントロール)

乳飲みラットの脳内接種試験によるムンプスウイルスの神経病原性の評価を行った。実施にあたっては、以下の論文を参考にした。

Rubin, SA et al. J. Infect.s Dis. 2005,

191:1123-1128

Rubin SA, R, et al. J Virol 2000, 74:5382-4.

生ワクチン接種後の副反応に関するウイルス学的検討

分担研究者：岡部信彦 国立感染症研究所 感染症情報センター
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
協力研究者：荒木和子 国立感染症研究所 感染症情報センター
協力研究者：上野久美 国立感染症研究所 感染症情報センター
協力研究者：佐藤 弘 国立感染症研究所 感染症情報センター

研究要旨 シードロットシステム導入後の品質管理に関する臨床・疫学的検討方法として、本年度はワクチン接種後の副反応の識別について検討を行った。方法として、OPV 接種後のポリオウイルス排出量を血清型別に調べると共に、その他のウイルスについても検出同定および定量を行い臨床症状との関係を検討した。初回 OPV 投与を受けた1歳5ヶ月男児1名より約1ヶ月間糞便材料を採取した。この間、鼻水、38℃以上の発熱、嘔吐、軟便等の OPV 副反応と一部共通する症状がみられた。糞便材料中のウイルス量を血清型別にリアルタイム PCR で調べた結果、2型が最も優位であり、そのピークは投与後7-9日であった。調査期間中の糞便材料からポリオウイルス以外にアデノウイルス2型、ノロウイルスが検出された。これらの各々のウイルスの糞便中への排出量あるいは排出時期と臨床症状とを比較検討した結果、副反応と疑われた発熱、嘔吐、軟便等の臨床症状はアデノウイルスおよびノロウイルス感染によることが示唆された。OPV 接種後の副反応の識別において、糞便中の病原体検索および定量は有用であると考えられた。

A. 研究目的

シードロットシステム導入後の品質管理に関する臨床・疫学的検討方法について、今年度は、ポリオウイルスワクチン(OPV)接種後の臨床症状がワクチンによる副反応であるか否かの識別について検討した。

初回 OPV 接種後2日までに約4.9%に下痢症状、1-3日をピークとした発熱があることが報告されている。また、450万人に1人の頻度で接種から4-35日に弛緩性麻痺(Vaccine associated paralytic polio: VAPP)を生じている。この際、発熱、嘔吐などの症状があることが知られている。下痢、発熱、嘔吐といった症状は、OPV 定期接種対象年齢においてよく見られる症状であり、VAPPにいたらずとも、OPV 接種後にこれらの症状が見られた場合、臨床症状のみからでは副反応との識別は困難である。今回は OPV 接種後に糞便中に排出されたポリオウイルス量の測定、および他のウイルスの検索を行い、臨床症状の病因解明を試みた。

B. 研究方法

対象：初回 OPV 投与を受けた1歳5ヶ月男児1名より、投与前日より投与後35日まで合計24検体の糞便材料を採取し、検査対象とした。糞便材料はPBSで10%乳剤とし、その遠心上清をすべての検査に用いた。また、この期間中に見られた臨床症状を記録し、研究対象とした。

方法：リアルタイム PCR により糞便材料中の血清型別ポリオウイルスの定量を行った。リアルタイム PCR は各血清型別に Syber Green 法で行った。また同時に RD-18S 細胞を用いてプラック形成法による定量を行い、リアルタイム PCR の精度、感度の指標とした。アデノウイルスの検出はアデノウイルス検出キット（ディップスティックアデノ、栄研化学）で行った。さらに糞便検体をポリオウイルス抗体で処理後 A549 細胞を用いてウイルス分離を行った後、ヘキソン領域の PCR およびシーケンス法による血清型の同定を行った。得られた配列からリアルタイム PCR 法のためのプライマーを設計し、これを用いてアデノウイルスの定量を行っ

た。ノロウイルスの検出はRT-PCRにより行い、シーケンス法による配列決定を行った。

（倫理面での配慮）

本研究は被験者の保護者の発案と希望によって行われた。研究の実施にあたり何の強制も行われておらず、対象者への肉体的負担、個人情報への抵触等は行われておらず、倫理面における問題はないと判断される。

C. 研究結果

OPV 投与日を day 0 とすると、調査期間中に見られた臨床症状は、軟便（day 3, day 17, day 29-30）、鼻水と軽度の咳（day 10）、鼻水（day 15）、38-39℃の発熱（day 14-16）、嘔吐5回（day 25）であった。また、day 34にこの児の祖父が微熱嘔吐、day 35に父親が38℃の発熱などの症状がみられた。

糞便中のポリオウイルスをリアルタイムPCRにより検索した結果、ウイルスの排出は day 2 から day 35 まで続いていた。2型の圧倒的に優位な増殖があり、そのピークは day 7 前後（約 10^5 copies/100ml of 10% suspension）であった。1型、3型の排出は接種後初期のみであった（図1）。発熱前後の糞便についてアデノウイルス検出キットによる検出を行った結果、day 10, day 14, day 16 で陽性であった。培養細胞を用いたウイルス分離によりアデノウイルスが分離された。さらにPCRによるDNA検出およびシーケンス法による解析を行った結果、分離されたアデノウイルスは血清型2であった。リアルタイムPCRによるアデノウイルスの定量を行った結果、day 14 前後がピーク（約 10^6 copies/100ml of 10% suspension）であった。RT-PCRにより day 30-35 の便材料からノロウイルスゲノムが検出された。臨床症状およびウイルス検索結果をまとめて図2に示した。

D. 考察

ポリオウイルスの排出のピーク（day 7 前後）と発熱日（day 15 前後）には、ずれがあったが、

アデノウイルスの排出のピーク（day 14 前後）は発熱日と一致していた。アデノウイルス2型は主に上気道感染症の病因ウイルスであり、発熱を伴うことも多いことから、今回の症例における発熱および鼻水等の気道症状はポリオウイルスによるものではなく、アデノウイルス2型感染によることが示唆された。また、嘔吐後の糞便材料からノロウイルスゲノムが検出されたことから、嘔吐およびその後の軟便はノロウイルスが病因であり、父親の発熱はアデノウイルスによるものではないかと考えられた。今回は1児から採取した糞便材料のみを対象とした検索ではあったが、詳細な検体採取と臨床症状の記録、および定量的ウイルス検索により副反応の識別が可能であった。

E. 結論

シードロットシステム導入後の生ワクチンにおける副反応の識別において、検体中のワクチン株ウイルス量の検索、およびこれ以外のウイルスの検索が有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
現時点でなし
2. 学会発表
荒木和子、多屋馨子、岡部信彦「OPV 初回接種後のウイルスの排出 -Real-time PCR による経時的血清型別ポリオウイルスの検出」第10回日本ワクチン学会、大阪府泉市 2006年10月

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。

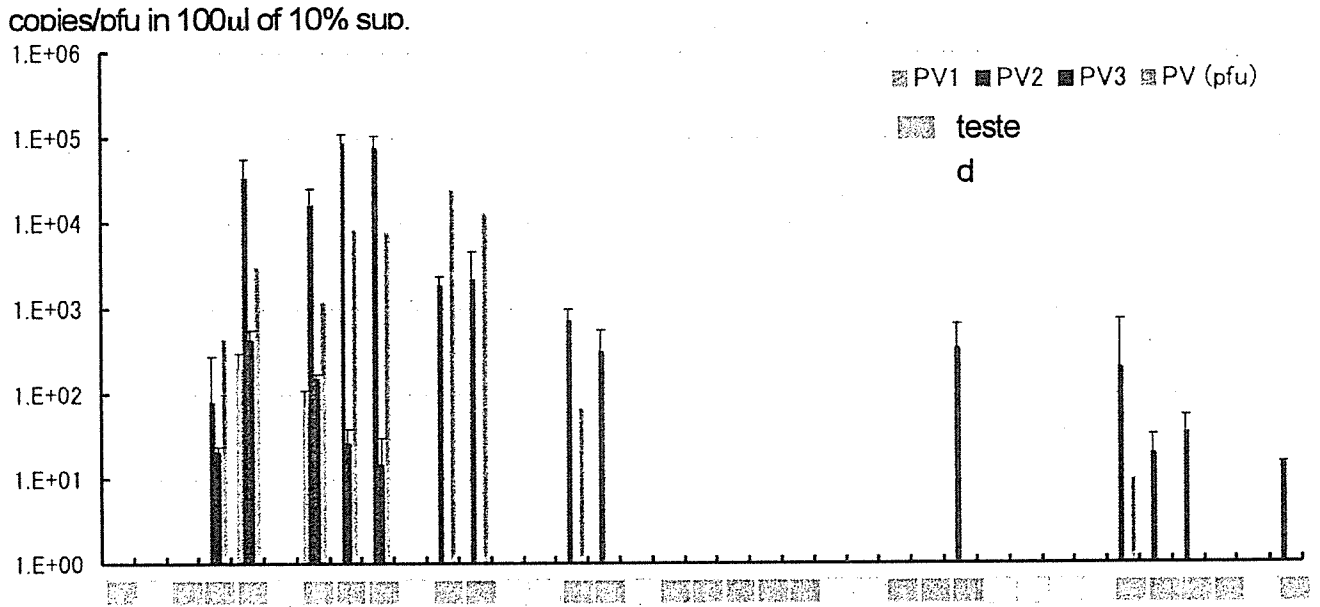


図 1. OPV 接種後の糞便材料中の血清型別ポリオウイルス量の経時的変化

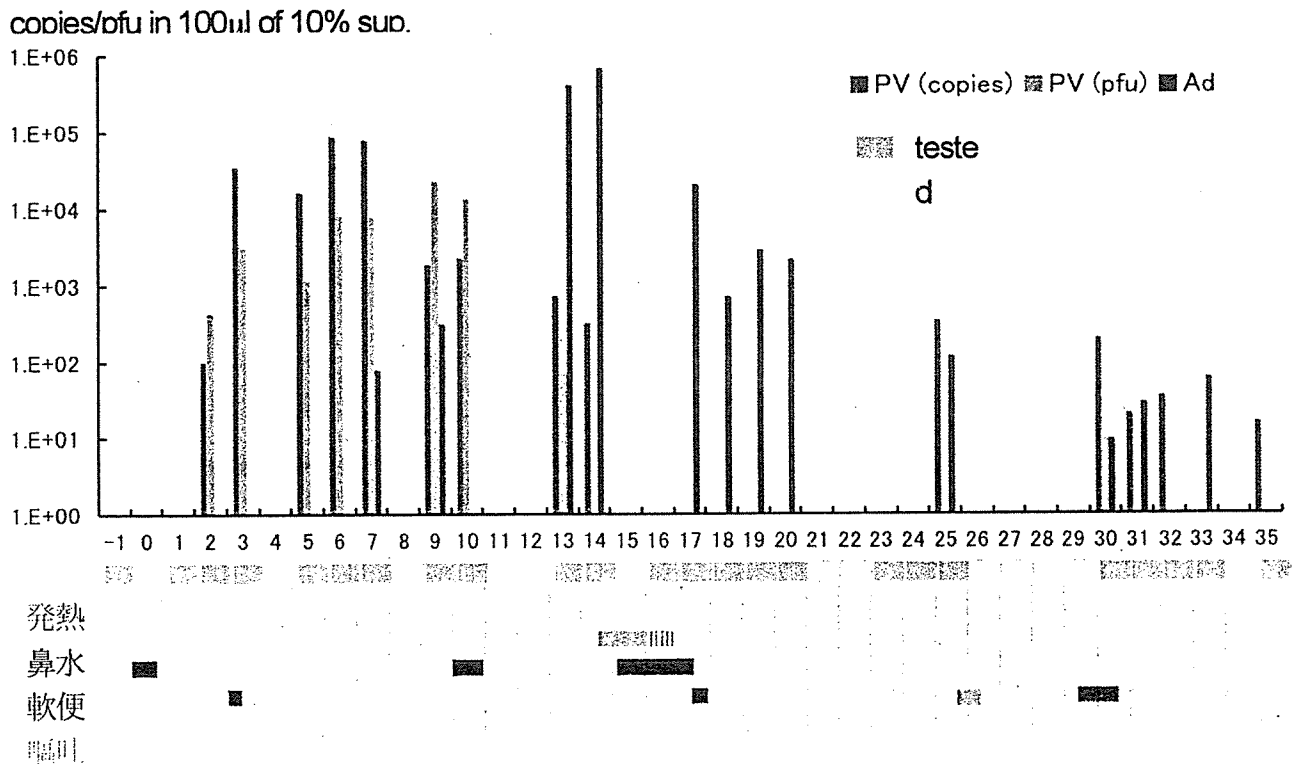


図 2. OPV 接種後の糞便材料から検出されたポリオウイルス（1-3 型総量）とアデノウイルス 2 型の経時的ウイルス量および臨床症状

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

<邦文>

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

<和文>

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 東国伸、小熊恵二 編集 pp269-272 南江堂 2006年5月1日発行