

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 16～18 年度 総合総括・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 16～18 年度

I. 研究の概要	1
II. 総合総括研究報告書	
生ウイルスワクチン製造株の品質管理に関する研究 加藤 篤	5
III. 分担研究者総合報告書	
1. 麻疹、風疹及びおたふくかぜ弱度生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 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への移行に伴う品質管理に関する研究 大槻紀之 他	14
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	17
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	21
5. ワクチン製造株の品質管理に関する研究 仁田義弘 他	25
6. ワクチン製造株の品質管理に関する研究 李 富雄 他	32
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	35
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	38
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	43

## I. 研究概要

(1) 研究課題：ワクチンの製造株の品質管理に関する研究(H16-医薬-一般-015)

(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。研究遂行のために協力くださった以下の分担研究者並びに協力研究者の方々に感謝いたします。

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
	棚林 清	国立感染症研究所・獣医科学部 室長
	佐藤大作	厚生労働省・医政局・研究開発振興課
	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
	中村成幸	動物医薬品検査所・ウイルス製剤第二検査室 室長
	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 研究官
	菅井敏行	国立感染症研究所・ウイルス第三部 研究官
	染谷健二	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
	石川豊数	阪大微研 副理事
	合田英雄	阪大微研 理事

\*平成 19 年 3 月現在の職を示す

### (3) 研究費

3年間に以下の研究経費を補助金として受け取った。

平成16年度	10,000,000円	
平成17年度	7,000,000円	
平成18年度	5,670,000円	総額 22,670,000円

### (4) 研究集会

3年間に以下の研究集会を行った。

平成17年01月11日(日)	10:00 - 14:00	
全体班会議		
国立感染症研究所 村山庁舎 6号館 6階	講義室	
平成17年09月27日(日)	13:30 - 17:00	
全体班会議		
国立感染症研究所 戸山庁舎	供用第二会議室	
平成18年01月25日(水)		
個別班会議		
仁田分担研究班	13:00 - 15:00	
李分担研究班	15:00 - 17:00	
国立感染症研究所 村山庁舎	管理棟 1階	集会室
平成18年01月26日(木)		
個別班会議		
大隈分担研究者	13:00 - 15:00	
五味分担研究者	15:00 - 17:00	
国立感染症研究所 村山庁舎	管理棟 1階	集会室
平成18年10月13日(金)	09:00 - 14:00	
全体班会議		
国立感染症研究所 戸山庁舎	供用第一会議室	
平成18年12月05日(火)	14:00 - 16:00	
ワーキンググループ会議		
国立感染症研究所 村山庁舎 6号棟 6階	講義室	

### (5) 研究要旨

医薬品であるウイルス生ワクチン製剤を品質的に均一にすることはワクチンを使った誰もが等しく恩恵を受けられる為にも大切なことである。ところが、ウイルスは遺伝的に変り易い性質を持っており、ワクチンもウイルスのその性質を利用して弱毒された歴史を持つ。従って、生物学的製剤であるワクチンの品質を一定にすることは一般医薬品よりも難しい。それ故、ワクチンには国家検定が設けられ、ロット毎に定められた試験を行い、それに合格したものでなければ展示及び販売することができないと定められている。本研究班では、麻

疹、風疹、おたふくかぜの 3 製剤について、品質的な安定をめざしてシードロットシステムの導入を検討した。

わが国では 1974 年に厚生省薬務局通知「医薬品の製造および品質管理に関する基準」により医薬品 GMP (Good Manufacturing Practice: 適正製造規範) が導入されて、製造設備 (ハード) 及びその品質管理・製造管理 (ソフト) について製造業者が守らなければならない基準が打ち出された。当初、この通知は製造業者の自主管理項目だったが、1994~95 年の厚生省令で「製造所の GMP 整備」が医薬品などの製造許可の要件とされ、さらに 2005 年度の改正薬事法によって製造販売承認の要件とされた。ここに至って GMP 整備は必須要件になり、「一定の環境」で「一定の手順に従って製造」することにより、ワクチンは「一定の品質」のワクチンが製造される土壌が整った。

しかし、我が国で製造されている生ワクチンの多くは、この様な認識が普及する以前に製造承認がなされており、ワクチン製造株の管理方法に関する規則もないまま継代増殖されて使われてきた。そもそもワクチンはウイルスが変異し易い性質を利用して開発された。ウイルスの変異は、専らウイルスゲノムの複製時に生じる複製ミスによって起き、ウイルス増殖の過程で少ないながらも必ず起ることである。麻疹、風疹、おたふくかぜウイルスは RNA ウイルスに属し、これらの複製酵素は  $10^4$  塩基に 1 塩基のミスを起こす。約  $10^4$  塩基のゲノムからなるこれらのウイルスは、従って一度自己複製すれば必ずゲノムのどこかに 1 塩基の変異があることになる。すなわち、継代歴の異なるウイルスから作られたワクチンは変異ウイルスを含む度合いが異なり質的に同等とは言えないのである。ワクチンの種を継代をきちんと管理して製造方針を建てる必要があり、それがシードロットシステムと呼ばれている。

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、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、どのようなシードロットシステムを構築し、移行・導入すべきかの具体的な検討し、最後に、ウイルスが集団として均一性を維持しているか否かを検証する手段を品質管理項目として設定することを本研究班の目的とした。

#### (6) 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。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。医薬品 GMP の実施に加え、シードロット管理手法が確立した場合には、製剤の品質的均一性が飛躍的に増大すると予想され、現在行わ

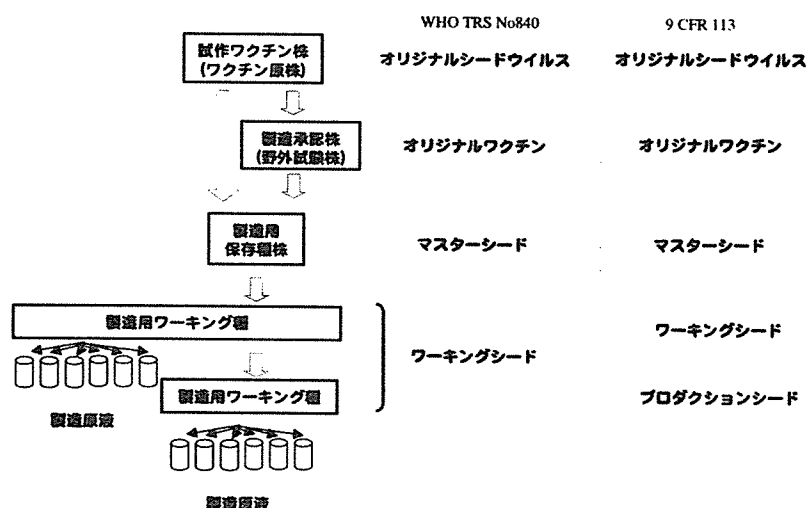
れている国家検定制度の見直し、試験の簡略化、全ロット検定の廃止といった道筋が予想される。品質的向上に加え、国家検定作業に費やす経費並びに時間を節約でき、製剤の国際的競争力が増すと予想される。

### (7) 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、医薬品として認可された以上は製品として一定の有効性と安全性規準を満たす事が要求される。均一な製品を安定的に製造・供給するための製造システムが「医薬品 GMP」であり、株の継代管理システムが「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、「製造承認株からの継代は5代以内」という生物製剤規準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各社、各生ワクチン製剤毎に設定した。シードロットシステムが実際に機能しているかを検証するための品質管理手法についても検討し、規格値の設定を試みた。

#### 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。しかしながら、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「医薬品 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。

ウイルスは専らゲノムの複製時に変異を起こし、それが複製毎に蓄積する。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。

#### B. 研究方法

##### (1) シードロットシステム導入の検討

武田薬品工業(株)、(社)北里研究所、(財)化学及血清療法研究所、(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。

##### (3) シード管理技法の検討

実際に、製造工程上にシードロットシステムを当てはめる事が可能ならば、そのシステムを運用することによ

り均一なウイルス集団を維持しているか否かの検証方法を設定し、その規格値を定める必要が有る。そのためにワクチン株の特定部位のシークエ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、ウイルスプ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。

### C. 研究結果

#### (1) 仮想継代歴におけるシードロット導入

シードロットシステムの導入例を仮想継代歴(図 1)を元に説明する。ある仮想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(プロダクションシード、1継代目)を作り、そこからワクチンを作ってきた。ところが、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(2継代目)を作った。同様にして以降も無くなれば次の原液(3継代目)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の方法では、一つのプロダクションシードあたりの製品のロットサイズが小さくなるばかりでなく、継代歴の異なる製剤が同じワクチンとして扱われることになる。

この仮想製造所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がほとんど残っておらず、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。従って、本研究班では加藤主任班、田代班、海野(大槻)班、斉藤(沼崎)班で検討し、量的にある程度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(図 1 では継代歴 3)と、それが枯渇する事が無い様に恒久的に保存することを考えた。そして、このマスターシードからワーキングシード(図 1 では継代歴 4)を作って、恒にこれからワクチン原液(図 1 では継代歴 5)を製造することにして、シードロットを作り上げることにした。生物学的製剤基準で定められた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 年間供給可能であることが判明した。

シードロットシステムを構築するにあたって、現在よりも継代が 1 代進む製剤があることがわかり、それらが従来の継代歴の若い原液由来ワクチンと同等であることを検証するための市販後調査方法について岡部班の検討課題とした。

#### (3) ウイルスが同等に含まれているかを検証する方法の検討

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は、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る必要がある。さもなければシードロットシステムが見かけ状のものになるからである。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、継代歴の異なる今までに製造されたワクチンを試料として、各試験を行った所、いずれも低継代のものと高継代歴ワクチンに差が有意な差が認められない結果となった。製品ロット間の同等性を確認できた事は評価できる。しかし、今回試した試験法は、99.99%が同一のウイルスで残りの0.01%が変異体で構成さえる製剤から変異体成分を検出する程の感度がないことを示したものである。0.01%の変異体を検出できるくらいの感度無しには規格値は設定できないだろう。その点で、今回の試験結果では見かけ上品質的同等性が示されたが、不満足な成績であった。

#### 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、過去において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、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であった。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(表 1)。

ウイルスの株管理方法としてのシードロットシステムが正しく機能しているかを知るために、ワクチンに含まれるウイルス集団が一定範囲内に収まっているか否かを科学的に検証する手段及びその規格値を設定することを試みた。しかし、低継代歴のものと高継代歴のワクチンに有意差が認められず、微量成分を検出するには感度的に十分でないことが判明した。そのため規格値の設定もできなかった。本研究班は、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。

2005 年の局方改正に伴い、医薬品 GMP によるハード、ソフトの整備無くして医薬品の製造、販売ができなくなった。この整備により、生物学製剤の製造の再現性は大幅に向上したと思われる。その証拠に、国家検定品の不合格になる数は激減している。本研究班では、それぞれの製造所の麻疹、風疹、おたふくかぜ生ワクチン製剤にあったシードロットシステム案を作った。この案を実施に移すにあたっては、GMP の枠組みの中で行うことは

必須であり、今後それをどのように手続き行的に行ったらいいのかを医薬品総合機構の生物系審査部並びに厚生労働省の審査管理課と相談して解決する必要がある。

医薬品 GMP にシードロットシステムが加わることにより、製品のロット間の品質的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展示、販売できない。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、方法ならば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

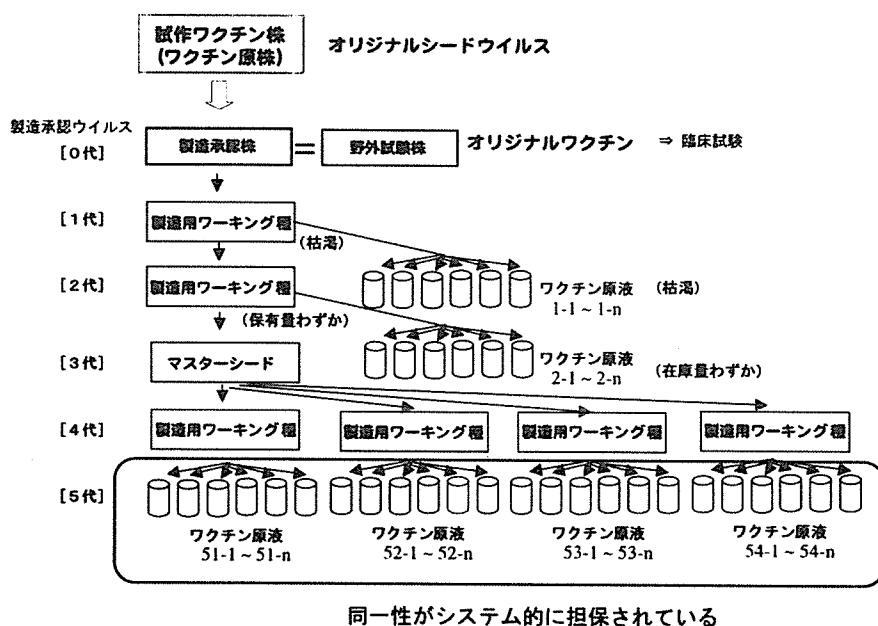


表 1 シードロットシステム採用時のワクチンの継代歴と推定される供給量

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
ウサギでの免疫原性	-	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. 分担研究総合報告書

#### 麻疹、風疹及びおたふくかぜ弱度生ワクチン製造株の 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	ウイルス第三部
研究協力者	海野幸子	国立感染症研究所	ウイルス第三部
研究協力者	加藤 篤	国立感染症研究所	ウイルス第三部
研究協力者	大槻紀之	国立感染症研究所	ウイルス第三部
研究協力者	木所 稔	国立感染症研究所	ウイルス第三部
研究協力者	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部
研究協力者	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・操作のすべてを適切な SOP に基づいて管理する GMP 体制の両者が不可欠である。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、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、どの様なシードロットシステムを構築し、移行・導入すべきか、その際に将来にわたって安全性・有効性に関する再現性が保証されたワクチン製造と安定供給が保証されるのかを検討した。

#### A. 研究目的

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・操作のすべてを適切な 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、この様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、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、どの様なシードロットシステムを構築し、移行・導入すべきかの具体的な検討を目的とした。

昨年度は、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のご概念に合致せず、一部が混合されている場合等があった。

本年度は、この結果に基づき、各所社において、生物学的製剤基準の範囲内で、実際にどの継代ウイルスを新たなマスターシードとして認定して、今後のシードロットシステムをどの様に構築するのか、その際に、将来にわたって安全性・有効性に関する再現性が保証されたワクチン製造と安定供給が保証されるのかを検討した。

生ワクチンは、動物実験や臨床試験において有効且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 年以來我が国においても、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、昨年度は、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。その結果、麻疹、風疹、おたふくかぜワクチンでは、各メーカーとも当初からシードロットシステムは導入されておらず、既に継代歴の若いウイルス株が枯渇しているものもあった。従って、直ちに承認された原株からの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。そこで、この現状に沿って、生物学的製剤基準および科学的、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、これを検討した。

## 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 4 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および面談で行ない、継代歴、現在保存されているウイルス量に関する情報を得た。

### 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。

- (1) 製造各所社で、製造承認取得後に、ワクチン製造の用いたウイルス株の継代歴、原液製造量、小分け製品製造量、種ウイルスの使用量、残存量を詳細に調べた。
- (2) その結果に基づいて、今後、生物学的製剤基準に定められた5代以内の継代数において、将来にわたって安定したワクチン製造・供給が可能な製造用ウイルスシードロットの作製が可能なウイルス株ロットの候補を特定した。
- (3) これに基づいて、今後シードロットシステムを構築した際のモデルを作成し、継代数、製造量、供給量、製造株および最終製品のウイルス学的な均一性、製品の再現性および法的適合性を検証した。その結果、いずれもの条件をも満たすようなシードロットシステムの構築が可能であると判断された。
- (4) しかし、中には、新たな原株とするウイルスの継代歴が3代を経過しているものもあり、新たなシードロットシステムを構築した場合に、最終製品が5代目となるものも存在した。これらを含めて、市販後の安全性、有効性の継続的調査が必要であると考えられ、その方法に関する検討を進めた。
- (5) 新たなシードロットシステムの管理、運営に関する SOP 案の作成と、その実用性、可能性等を検討した。まず、継代方法、接種条件、培養条件、

感染価、培養温度、培養時間等に関する定義を定め、これに基づいた共通認識をもとに、SOP とその運用を図ることが必要である。

### D. 考察

昨年の調査から、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。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、直ちにシードロットシステムへの移行は困難である。

しかし、本年度の調査研究から、これらの問題点を解決して、科学的、法

的、及びメーカーに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した結果、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、等の問題を具体的に検討した。

その結果、各製造所社の各製品について、どの継代歴のウイルス株を今後の製造原株とするか、その管理、製造、維持等に関する計画とその妥当性、将来の安定したワクチン製造・供給に対する保証等において、いずれもほぼ満足の見込みを得ることが出来た。

今後は、この具体的な導入方法と、その際に保証されるべき臨床試験等の製造承認時の成績の再現性の検証、市販後調査の在り方等の検討を経て、来年度には、すべての製剤でシードロットシステムの導入を図ることを可能としたい。

なお問題点として、来年度から MR ワクチンの 2 回接種が導入されるが、これに伴い、ワクチン製造量が 2 倍に増加することが予想される。更に、経過阻止として、当面は各々の単味ワクチンの製造も抵抗して継続される。そのため、製造用シードロットの数量を

従来の算定よりも 2 倍以上余裕を持って準備しておく必要が生じており、この検討も来年度の課題となっている。

## 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、製造承認株から直ちにシードロットシステムへの移行は困難であるが、この現状に沿って、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検討し、その可能性を明確にした。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
無し

## 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

## 弱毒生風しんワクチンにおけるシードロットシステムへの 移行に伴う品質管理に関する研究

分担研究者 大槻紀之 国立感染症研究所ウイルス第3部（平成18年度）  
分担研究者 海野幸子 国立感染症研究所ウイルス第3部（平成16, 17年度）  
協力研究者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第3部

**研究要旨** 本研究により、現行の弱毒生風しんワクチンの原液製造はシードロットシステムとはかけ離れていたものであったことが判明したが、適切なマスターシード及びワーキングシードウイルスを設定することによりシードロットシステムの導入が可能ながことが判明した。一方で現在まで流通することのなかった継代歴をもつワクチンウイルスでワクチンが製造されることも判明し、品質管理法やシードの管理方法に関しては遺伝子配列情報を利用する手法等、生物学的製剤基準で規定される方法以外の管理法も必要であることが示唆された。

### 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」から現在に至るまでロット間での品質のばらつきを極力低減させるためにシードロットシステムの導入は優れていると認識されてきている。しかしながら、未だ風しんワクチンをはじめとし種々のワクチン製造工程へのシードロットシステム導入には至っていない。そこで本研究では、研究1年目では主に我が国の風しんワクチン原液製造の実態とWHO基準におけるシードロットシステムを比較し導入の要件を考察し、2年目には各製造所社の具体的なシードロット設定案、現在までのワクチン製造の変遷を調査した。そのうえで設定案の問題点を明らかにすると共にシードロットシステム導入によって発生すると予想される問題と対処法につき検討を行った。研究最終年度にはシードウイルスの管理及びワクチンの品質管理にウイルス遺伝子情報が有用であるか否かを検討した。

### B. 研究方法

（1年目）我が国における風しんワクチン原液の製造とWHOの提起している基準におけるシードロットシステムを比較して我が国での導入における問題点ならびに要件を検討した。

（2年目）各所社が設定したシードロットシステム導入案から設定する各シードの製造時における位置付けを明確にしたうえで、設定案の問題点について製造者と十分な意見交換を行うとともに、今までの製造方法の変遷につきその状況を把握した。

（3年目）ワクチン開発時期である1980年前後に製造されたワクチンと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塩基配列を比較し、その安定性を調査し、シードロット導入後のシード管理に遺伝子配列の解析が有用であるか否かを検討した。

### C. 研究結果

1年目及び2年目の研究により、現在規定されている生物学的製剤基準（以下、生物基）をもとに製造されて



いる生風しんワクチン原液の製造実態は、導入を検討しているシードロットシステムで要求される内容を十分に満たすものではなかった事が判明した。このことは生物基において製造承認株から5代以内のウイルスをワクチンとして使用できると規定されているため、リリースされるワクチンは様々な継代歴をもつウイルス、場合によっては異なる継代歴を持つウイルスの混合液を使用していることなどに起因している。また、シードロットシステムを導入した場合、マスターシードやワーキングシードウイルスを長期の製造を可能とするために必要な量を確保するためには、リリースされるワクチンが現在まで市場に出たことのない継代歴を持つウイルスにより構成される場合も想定された。このため設定した各シード及びシステム導入後の初期ロットについては生物基で規定される試験だけではなく、塩基配列やブラックサイズやその形態等を調べ管理することが、ワクチンの安全性・有効性を担保するために有効な手段となると思われた。

また3年目の研究成果により、風疹ワクチンウイルスの構造タンパク遺伝子の塩基配列は比較的安定的であることが示唆され、シードの管理やワクチンの品質管理に利用可能と判断された。このため、各製造所社と試験方法につき意見交換を行い各所社ともウイルスの株管理の一手段として利用することとなった。

#### D. 考察

3年間の本研究により現在までの風疹ワクチンの製法ではシードロットシステムに十分対応できるものでないことが判明したが、本研究により感染研ならびにワクチン製造所社間で、各シードの定義やシードロットシス

テム導入に関する問題点が共有できたことは、今後具体的にシードロットシステムを導入する際に有用であったと考えられる。また現在までのワクチン製造により製造承認株の枯渇が各所社で認められたものの製造承認株から5代以内でワクチンを製造することを目的とした場合、マスターシード、ワーキングシードを適切に設定した場合は長期に渡りワクチンの供給が可能であることがわかりシードロットシステムの導入に関しワクチンの供給という点では大きな問題はないことが判明した。しかしながら、シードの設定により継代歴の進んだワクチンが市場に流通することも判明しワクチンの品質管理には多少の問題が残った。また、シードロットシステムでは設定したシードの品質も重要であるため品質管理法も検討すべきと考えられた。これらの品質管理の手段として塩基配列の確認はその手段の一助となることは示されたものの、遺伝子配列のみを持って株管理をすることは危険であり現行の生物基で規定される試験の実施や、各所社ごとに品質確保のための手段を検討すべきである。

#### E. 結論

現行の生物基のみをよりどころとした場合は同一品質のワクチンを長期にかつ安定的に供給することは難しいと考えられる。しかしながら現在のように製造工程の全てを適切なSOPにより管理するGMPシステムと本研究班で検討しているシードロットシステムを導入することにより、生物基の基準を満たした上で同一品質のワクチンを長期にわたり安定的に供給が可能となることが判明した。一方でシードロット導入時にはシードの管理法等について、更なる検討が必

要であると思われた。

日本ウイルス学会第 52 回学術総  
会、2004 年 11 月、横浜市

#### F. 健康被害情報

特になし

#### G. 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、つくば市
2. 抗体検査からみた 2003 年の風疹、

#### H. 知的財産の出願・登録情報

(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

## 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** 麻疹排除対策戦略計画の実行には有効性の高いワクチン接種が不可欠である。またウイルス学的及び遺伝子学的特性に基づいたワクチン株の評価および品質管理と科学的監視体制の充実も必要とされる。本研究で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、標準化について検討するために、弱毒生麻疹ワクチンのH及びN遺伝子配列を比較したところ、H遺伝子よりN遺伝子に多く変化が認められた。このことから、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。

### A. 研究目的

現在我が国で市販されているワクチンにはEndersの分離したEdmonston株由来のAIK-C株、Schwarz-FF8株、田辺株由来のCAM株であり、最終製品はニワトリ胎児胚細胞で増殖したウイルスを含む培養上清を精製して作られている。ワクチンの製造においては株の継代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。

本研究では、ウイルスの経代数による影響を麻疹ワクチンの遺伝子解析を行うことにより検討し、ワクチン評価方法への応用を目指す。また、シードロットシステム導入の為の科学的根拠の提示および弱毒生麻疹ワクチンの品質管理について検討を行った。

### B. 研究方法（倫理面への配慮）

(1) Vero/hSLAM細胞を用いた経代の影響

Vero/hSLAM細胞で生ワクチン株を5代経代し、その後H遺伝子の変異に

ついて解析を行った。

(2) ワクチン中間段階品を用いた遺伝子解析

3社のワクチン中間段階品において製造時期、経代歴のことなる4本を選び、検索を行った。これら中間段階品よりRNAを抽出し、cDNAを合成、これを鋳型としてPCRを行い、Direct Sequenceにより遺伝子配列を決定した。ウイルスゲノムを解析するため、cDNA合成は、H遺伝子の解析にF遺伝子配列内にあたるforward primerを、N遺伝子の解析にはP遺伝子配列内にあたるreverse primerを用いた。

(3) CEF細胞を用いた経代の影響

CEF細胞を用いて生ワクチン株を3代経代（合計30日間）し、その後培養上清からRNAを抽出、H遺伝子、N遺伝子の変異について解析を②と同様の方法で行った。

（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なかった。

### C. 研究結果

#### (1) Vero/hSLAM を用いた経代の影響

Vero/hSLAM において 5 代経代後のワクチンウイルス株の H 遺伝子に変化は認められなかった。

#### (2) ワクチン中間段階品を用いた遺伝子解析

H 遺伝子に変異が認められたのは、検索した 12 本中で、1 本に認められた。一方で、N 遺伝子の変異は、2 社の中間段階品において認められた。N 遺伝子の変化の程度は 3 社ワクチン株間において差が認められた。

#### (3) CEF 細胞を用いた経代の影響

CEF でさらに 3 代を経代したワクチンウイルス株において H 遺伝子、N 遺伝子に変化は認められなかった。

### D. 考察

Vero/hSLAM において 5 代経代後のワクチンウイルス株の H 遺伝子に変化は認められず、また中間段階品でも H 遺伝子に変化が認められたのは、検索した 12 本中で、1 社 1 本のみであったことから、これらワクチン株において H 遺伝子は、経代の影響を受けにくいと推測された。

一方で、N 遺伝子の変化は、2 社の中間段階品において認められた。N 遺伝子は、その性質として変化しやすく、また N 遺伝子より産生される N 蛋白質は、直接強毒化に関与しないと考えられるため、この遺伝子に認められたわずかな変異がすぐにワクチンの有用性に影響するとは考えにくい。

しかし、ワクチン株においても N 遺伝子に変化しやすいことから、遺伝学的手法をもちいた品質管理に N 遺伝子は適当であると考えられる。

また、N 遺伝子の変化の多少に 3 社間でばらつきがみとめられた。これは、そのワクチン株自身の性質、および経代方法の違いがあるためと考えられる。

### E. 結論

本研究の結果から、麻疹ウイルスワクチン株においても N 遺伝子に変化しやすく、N 遺伝子の配列比較は、遺伝子学的手法を用いた品質管理へ応用できることが示せた。また、5 代経代による変化は、3 社ワクチン株間においてばらつきがある。このことは、ウイルスワクチン株自身性質および経代方法による影響が考えられるが、現在わずかにウイルス配列の変化が存在することから、さらにウイルスが変化しにくい製造方法への十分な検討が必要であると思われる。

### F. 健康危険情報

特に関連性は認められない

### G. 研究発表

#### (1) 論文発表

1. Tanaka K, Numazaki K, Tsutsumi H. Human cytomegalovirus genetic variability in strains isolated from Japanese children during 1983-2003. *J Med Virol* 2005, 76: 356-360.
2. Numazaki K. Human cytomegalovirus infections in premature infants by breastfeeding. *Afr J Biotechnol* 2005, 4: 867-872.
3. Numazaki K, Asanuma H, Niida Y. Respiratory tract infections due to *Chlamydia trachomatis* in early neonatal period. In: Kishimoto, T., Yamazaki, T., Kuo, C-C., eds. *Symposium on Chlamydial Infections, Proceedings of The Third Joint Auspices of Japan Society for Chlamydia Research and Department of Pathobiology, University of Washington*, pp. 16-21, Life Science Co. Ltd., Tokyo, 2005.
4. Tanaka K, Yamada H, Minami M, Kataoka S, Numazaki K, Minakami H, Tsutsumi H. Screening for vaginal