

## E. 結論

全体として、2年間で非臨床試験を終了するという目標については達成されたものと考えている。本研究班の成果を踏まえて、次の段階である製造施設の設計・建設並びに臨床試験の実施へ速やかに移行出来るものと思われる。5年以内に国内で組織培養インフルエンザワクチンを実用化する道筋も見えてきたと言って良いであろう。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ichinohe, T., Ainai, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Tamura, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J. Med. Virol.* 82: 128-137, 2010.

Barr, I. G., McCauley, J., Cox, N., Daniel, R., Engelhardt, O. G., Fukuda, K., Grohmann, G., Hay, A., Kelso, A., Klimov, A., Odagiri, T., Smith, D., Russell, C., Tashiro, M., Webby, R., Wood, J., Ye, Z., Zhang, W., Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009–2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: Basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 northern hemisphere season. *Vaccine* 28: 1156–1167, 2010.

Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Ainai, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T. First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveola

r epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63; 67-71, 2010.

Matsuzaki, Y., Mizuta, K., Aoki, Y., Suto, A., Abiko, C., Sanjoh, K., Sugawara, K., Takashita, E., Itagaki, T., Katsushima, Y., Ujike, M., Obuchi, M., Odagiri, T., Tashiro, M. A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. *Virology J.* 7:53, 2010.

Ichinohe, T., Ainai, A., Ami, Y., Nagata, N., Iwata, N., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Odagiri, Tashiro, M., Takahashi, H., Strayer, D. R., Carter, W. A., Chiba, J., Tamura, S., Sata, T., Kurata, T., Hasegawa, H., Ichinohe, T. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J. Med. Virol.* Volume 82; 1754–1761, 2010

Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, J., Tashiro, M., Odagiri, T., The working group of influenza virus surveillance in Japan. Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses A(H1N1) during the 2007-2009 Influenza Seasons, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 16; 926-935, 2010

Oakley, A. J., Barrett, S., Peat, T.S., Newman, J., Victor, A., Streltsov, V. A., Waddington, L., Saito, T., Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J. L. Structural and functional basis of resistance to neuraminidase inhibitors of Influenza B viruses. *Med. Chem.* 2010. DOI: 10.1021/jm100621s

Kuroda, M., Katano, H., Nakajima, N., Tobiume, M., Ainai, A., Sekizuka, T., Hasegawa, H., Tashiro, M., Sasaki, Y., Arakawa, Y., Hata, S., Watanabe, M., et al. First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63; 67-71, 2010.

be, M., Sata, T.

Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by *de novo* sequencing using a next-generation DNA sequencer. PLoS ONE PLoS ONE 5(4): e10256. 2010. (doi:10.1371/journal.pone.0010256)

Shiino, T., Okabe, N., Yasui, Y., Sunagawa, A., Ujike, M., Obuchi, M., Kishida, N., Xu, H., Takashita, E., Anraku, A., Ito, R., Doi, T., Ejima, M., Sugawara, H., Horikawa, H., Yamazaki, S., Kato, Y., Fujita, N., Odagiri, T., Tashiro, M., Watanabe, H. Molecular evolutionary analysis of the influenza A (H1N1)pdm viruses, May–September, 2009: Temporal and spatial spreading profile of viral isolates in Japan PLoS ONE 5(6): e11057. doi:10.1371/journal.pone.0011057

Ikeno, D., Kimachi, K., Kino, Y., Harada, S., Yoshida, K., Tochiwara, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Okada, K., Miyazaki, C., Ueda, K. Immunogenicity of an inactivated, adjuvanted whole-virion influenza A(H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. Microbiol. Immunol. 54: 81-88, 2010

Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, H., Tashiro, M., Kageyama, T. Evaluation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. J. Med. Virol. 83:10-15 2011

Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Nakauchi, M., Obuchi, M., Ujike, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M. Establishment of a diagnostic system for the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in Japan using conventional and real-time RT-PCR assays. Jpn. J. Infect. Dis. (in press, 2011)

Shindo, N., Brown, C., Ciancio, B., Cox, N., Daniels, R., Fasce, R., Fukuda, K., Hay, A., Hayden, F., Hungnes, O., Kelso, A., Klimov, A., Kramarz, P., Lina, B., Meijer, A., Nicoll, A., Phin, N., Popp, M., Schmaltz, C., Schweiger, B., Tashiro, M., Van der Sande, M., Van der Velden, K., Weber, T., Zambon, M., Public Health Implications of Oseltamivir Resistance: Emergence in Pre-pandemic Influenza A(H1N1) Viruses during the 2007 - 2009 Seasons. Influenza and other respiratory viruses Resp. Viral. Infect. (in press, 2011)

## 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

## 細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関するPoints to Consider（案）

### 1) ウイルス増殖に使用する細胞株の造腫瘍性とがん原性について

安全性の観点から、ワクチン製造に用いる細胞の造腫瘍性試験は必要であると考え。造腫瘍性試験が陽性である場合はがん原性試験も必要である。造腫瘍性試験はEOPC(CAL)に対して行い、がん原性試験はEOPC(CAL)のライセートとDNAに対して行う。製剤中の残存DNA量は10 ng/dose以下が必要条件で、できるだけ低いレベルであることが望ましい。また、残存DNAの長さはより短い方が望ましい。

### 2) 細胞溶解物（ライセート・DNA）の安全性について

ワクチンに混入してくる細胞由来成分によって有害事象、副反応（例えばアレルギー反応等）が生じる可能性があることから、細胞由来成分については可能な限り混入しないよう管理することが必要であろう。細胞由来DNAの量については、10 ng/dose 以下が必要条件である。他の細胞由来成分については、非臨床試験（反復投与毒性試験等）や臨床試験を通じて個別のワクチンごとに設定されるべきであろう。

### 3) ウイルス増殖に使用する細胞の、ウイルスの遺伝学的・抗原的变化への影響の検討方法と認められる変化の許容範囲について

ワクチンの有効性を確保するという観点から、ワクチン株が細胞での継代で安定であることを確認する必要があると考える。具体的には、特異的抗血清を用いた試験とシーケンス解析の結果を総合的に判断して、HA・NAの同等性を確認する。シーケンス解析で塩基配列の変化が確認された場合は、免疫学的な反応における同等性を確認すると共に、ウイルスの形質（弱毒性等）に問題がないことの確認を適切な方法を用いて行う。

### 4) ウイルス増殖用細胞株の内因性感染性因子（内在性レトロウイルス等）の試験の範囲について

安全性の観点から、MCBまたはMCBとEOPC(CAL)の両方に対して、誘導剤も組み合わせ、内在性レトロウイルス、外来性レトロウイルス、宿主細胞が感染しうるウイルスの試験を行うことは妥当であると考え。試験方法については、感染性試験、TEM、従来のRTase試験、高い感度を持つPBRT法、感受性細胞を用いたin vitro試験、乳飲みマウス・成熟マウス・発育鶏卵等を用いたin vivo試験、抗体産生試験などがあり、これらによる試験は妥当であると考え。

### 5) 製造の過程で混入する可能性のある病原体の試験の範囲について

安全性を確保する観点から、非特異的モデルウイルスをスパイクし、製造工程のもつクリアランス能力

の特性を解析する必要がある。非特異的モデルウイルスに関しては、非エンベロープ型ウイルスも含めた広範囲な物理的・化学的構造を示すモデルウイルスの使用を考慮すべきである。ウイルスクリアランス試験を行う際には、2つ以上の製造工程について、それらがどのようなウイルス不活化／除去能力を有するかを評価することが望ましい。ウイルスクリアランスに関する評価を行っておくことは、未知の、あるいは不測の有害ウイルスを除去できることへの一定限の保証になると考える。また、病原体の種類としては、ヒト由来だけでなく、細胞株の動物種由来のものにも注意を払う必要があるだろう。

#### 6) HA量を定量するための方法について

現段階ではHAの量はSRD試験によって測定する。代替法でHA量を測定しても良いが、その場合でもSRD試験との相関を見る必要があるため、やはりSRD試験を行う必要があると考える。

## 付録 1

各項目に関連する既存のガイドラインでの記載と、それらを踏まえた各項目についてのディスカッション

### 1) ウイルス増殖に使用する細胞株の造腫瘍性とがん原性について

#### 【関連する既存のガイドライン等での規定】

CBER Guidance for Industryには以下の通りに記載されている。

P8: A description of the tumorigenic property of cells is required for all diploid and non-diploid cells, including continuous cell lines (21 CFR 610.18(c)(1)(ii)).

Because previous experience has consistently demonstrated the non-tumorigenic phenotype of the well-characterized diploid cell strains MRC-5, WI-38, and FRhL-2 (if they are not genetically or phenotypically modified), further tumorigenicity testing of banks consisting of these cell strains is not considered necessary to satisfy this requirement (please also see Section III.C.4). A description of the tumorigenic property is not required for primary primary cell cultures that are not subcultivated or that are subsequently subcultivated for only a very limited number of population doublings (21CFR 610.18(c)(3)).

P13: Under 21 CFR 610.18(c)(1)(ii), you must describe cell lines with respect to tumorigenicity. Cell lines could acquire tumorigenic properties with increasing passage levels. It is therefore important that you limit the passage level of the cells used in production and that you characterize cells at or beyond this end-of-production limit. The maximum end-of-production passage level should be based on data derived from production cells expanded under comparable or analogous conditions to the production conditions. Cells from either the MCB or the WCB may be expanded for this evaluation. Tumorigenicity testing should be performed at or beyond this level.

P33: Tumorigenicity is defined as the process by which cells form tumors when inoculated into animals (generally a syngeneic, an immunosuppressed allogeneic or an immunosuppressed xenogeneic host) (see Section V. Glossary). Tumorigenicity is a characteristic of the immortalized cells themselves, rather than of the agents or components present in them. We recommend you contact CBER for advice as to the need for tumorigenicity testing.

Tumorigenic cells have not traditionally been used for the production of prophylactic viral vaccines, primarily because of theoretical concerns that components within tumorigenic cells could induce tumors in vaccine recipients. These concerns include the potential presence of exogenous agents, such as oncogenic viruses, and the potential risk from endogenous materials, such as endogenous viruses or oncogenic nucleic acids. In addition, intact human cells derived from human tumors have been shown to form tumors in allogeneic humans.

The goal in tumorigenicity testing is to determine whether your cell substrate is capable of forming tumors after inoculation into animals. The TPD50 (tumor-producing dose in 50% of animals) and capacity to form metastases are characteristic properties of a cell line, and these characteristics might be used to further define the tumorigenic phenotype of a cell line. Considerations associated with tumorigenicity testing include: 1) choice of appropriate

animal models; 2) definition of a positive result; 3) determination of the appropriate duration of testing; 4) determination of appropriate numbers of cells to be tested; and 5) selection of appropriate controls.

P34: You should use an animal model that is known to be susceptible to tumor formation by tumorigenic cells. Because immunocompromised adult and newborn rodents are relatively sensitive for revealing a tumorigenic phenotype, you should consider these animal models. Thus, the most commonly used animals for tumorigenicity testing are nude (nu/nu) mice because they are T-cell deficient. Newborn nude mice appear to be more susceptible to tumor formation than adult nude mice (Ref. 24), suggesting that newborn nude mice might be the best choice to use when identification of a weakly tumorigenic phenotype is important. You might choose to use another animal model if it has been shown to have comparable sensitivity to the nude mouse model.

Regardless of the test system you use, the animals should be observed and palpated at regular and frequent intervals for the formation of nodules at the site of injection. Any nodules formed should be measured in two dimensions. We consider progressive tumor formation at the site of injection a positive result. Some cell types might cause tumors at distant sites as well (Ref. 24), and these also should be reported. Animals with nodules that begin to regress during the period of observation should not be sacrificed, as nodules that spontaneously regress do not represent progressively growing tumors and are not indicative of a tumorigenic phenotype. You may euthanize any animals with tumors before the end of the study if the tumor interferes with the comfort of the animal. Intercurrent infections, including subclinical infections, have the potential to alter the incidence of tumors, affecting the quality of the data and interfering with the purpose of the study (Ref. 25).

You should perform a necropsy on each animal when it dies, when it is euthanized, or at the end of the observation period. The necropsy should include examination for gross evidence of tumor formation at the site of inoculation and in all major organ systems such as lymph nodes, lungs, brain, spleen, kidneys, and liver. All lesions, detectable regional lymph nodes, the site of inoculation, and the lungs are to be examined histologically. In some cases (for example, tumors distant from the site of inoculation), it might be necessary for you to use molecular or immunological methods to distinguish cell-substrate-related from spontaneous tumors.

The inoculum per animal should consist of  $10^7$  test cells or positive control tumor cells suspended in 0.2 mL (0.1 mL for newborn animals) volume of serum-free medium administered by the subcutaneous route. You should inoculate at least ten animals, each with  $10^7$  test cells that are at or beyond the end-of-production passage level and at least ten animals with your positive control tumor cells. At least 9 out of 10 animals injected with positive control cells (e.g., HeLa cells or other cells with comparable tumorigenicity) should show progressively growing tumors in order for your test to be valid.

Selection of the appropriate duration of testing requires that you balance the increased sensitivity that might be obtained using a longer test, against the likelihood of false-positive results due to spontaneous tumor formation. Weakly tumorigenic cells might require between 4 and 7 months to form tumors in nude mice. Thus, extended observation periods might be necessary in some cases. CBER can provide you with further information on tumorigenicity testing and the appropriate observation periods.

P35: Oncogenicity testing (see Section V. Glossary) is designed to assure that agents that could immortalize cells and endow them with the capacity to form tumors are not present in a cell substrate. If your vaccine is manufactured in a cell substrate that was derived from a tumor, or that has a tumorigenic phenotype through an unknown mechanism, it might carry a higher theoretical risk of containing oncogenic substances.

If the presence of an oncogenic virus is suspected because of the cell phenotype or the origin of your cell substrate, we recommend that you perform oncogenicity testing in animals using lysates of the cell substrate. For cell substrates with a tumorigenic phenotype, we recommend that you perform oncogenicity testing in animals using DNA from the cell substrate in order to provide assurance that residual DNA is non-oncogenic (also see Section III.C.6).

P37: The risks of oncogenicity and infectivity of your cell-substrate DNA can be lessened by decreasing its biological activity. This can be accomplished by decreasing the amount of residual DNA and reducing the size of the DNA (e.g., by DNase treatment or other methods) to below the size of a functional gene (based on current evidence, approximately 200 base pairs). Chemical inactivation can decrease both the size and biological activity of DNA. If DNA removal, digestion, or inactivation is undertaken, you should validate your methods.

P46: Table 1 Example of a Biosafety Testing Scheme for Manufacture of a Viral Vaccine.

要点は、「特性がよく把握されている二倍体細胞（遺伝的および形質的に修飾されていない MRC-5, WI-38, FRhL-2）や過継代を行わない初代培養細胞を除き、どの細胞においても造腫瘍性については記述が必要」「造腫瘍性試験に関連する考慮点としては以下のものがある。(1)適切な動物モデルの選択 (2)結果が陽性であることの定義 (3)適切な試験期間の決定 (4)適切な細胞数の決定 (5)適切なコントロールの選択」「造腫瘍性試験で最も一般的に使用されるのはヌードマウスである」「動物一匹当りの接種細胞数は $10^7$ 個で、少なくとも10匹に接種する必要がある。」「造腫瘍性試験は、EOPC(End-of-Production-Cell)で行う」「がんウイルスの存在が疑われる場合はライセートによるがん原性試験を行うのが良い。造腫瘍性が認められる場合は細胞のDNAによるがん原性試験を行うのが良い」「残存する細胞DNAの量を減らすこと、及びサイズを小さくする（200 bp以下）ことによって、がん原性を減少させることが出来る。」「（Table 1より）造腫瘍性試験・がん原性試験はEOPCに対して行う」である。

WHO TRS 878には以下の通りに記載されている。

P34: Continuous cell lines may have biochemical, biological and genetic characteristics that differ from primary or diploid cells. In particular, they may produce transforming proteins and may contain potentially oncogenic DNA.

P34: Procedures that extensively degrade or denature DNA might be appropriate for some products.

P35: The data required for the characterization of any continuous cell line to be used for the production of biologicals include: a history of the cell line and a detailed description of the production of the cell banks, including methods and reagents used during culture, in vitro culture age, and storage condition; the results of tests for infectious agents; distinguishing features of the cells, such as biochemical, immunological or cytogenetic

patterns which allow them to be clearly distinguished from other cell lines; and the results of tests for tumorigenicity, including data from the scientific literature.

P26: The current state of knowledge suggests that continuous-cell-line DNA can be considered as a cellular contaminant, rather than as a significant risk factor requiring removal to extremely low levels. On the basis of this reassessment, the Expert Committee concluded that levels of up to 10 ng per purified dose can now be considered acceptable.

P27: The new upper limit of 10 ng of residual DNA per dose does not apply to products derived from microbial, diploid or primary-cell-culture system.

要点は、「transforming proteinとoncogenic DNA に配慮すべき」「精製過程にDNA除去工程を入れるのが適切」「生物薬剤生産用に使用される不死化細胞については、求められるデータの中に造腫瘍性試験の結果が含まれる」「DNA量は10ng/doseまで許容できる」「10ng/doseまでという上限は、微生物や二倍体又は初代培養細胞からの産物には適用されない」である。がん原性試験については特に記載はない。

WHO/BS/10.2132 (draft)では、造腫瘍性試験の要否について以下のとおり記載している。

P42: A new diploid cell line (*i.e.*, other than WI-38, MRC-5, and FRhL-2) should be tested for tumourigenicity as part of the characterization of the cell line, but should not be required on a routine basis.

The tumourigenicity tests currently available are in mammalian species whose body temperatures and other physiologic factors are different from those of avian and insect species. Therefore, when the test is performed on avian or insect cells, the validity of the data is open to question unless a tumourigenic cell line of the species being tested is included as a positive control. The NRA/NCL may accept the results of an *in vitro* test such as growth in soft agar as a substitute for the *in vivo* test for avian and insect cell lines. However, as mentioned above, correlations of *in vitro* tests with *in vivo* tests are imperfect. This should be discussed with the NRA/NCL.

Many CCLs (*e.g.*, BHK-21, CHO, HeLa) are classified as tumourigenic because they possess the capacity to form tumors in immunosuppressed animals such as rodents. Some CCLs become tumourigenic at high PDLs (*e.g.*, Vero), even though they do not possess this capacity at lower PDLs at which vaccine manufacture occurs. A critical feature regarding the pluripotency of embryonic SCLs, even though they display a diploid karyotype, is that they form tumours in immunocompromised mice.

The expression of a tumourigenic phenotype can be quite variable from one CCL to another, and even within different sub-lines of the same CCL. This range of variability, from non-tumourigenic, to weakly tumourigenic, to highly tumourigenic, has been viewed by some as indicating different degrees of risk when they are used as substrates for the manufacture of biological products [10,11].

If the CCL has already been demonstrated to be tumourigenic (*e.g.*, BHK-21, CHO, HEK293, C127), or if the class of cells to which it belongs is tumourigenic (*e.g.*, hybridomas, SCLs), it may not be necessary to perform additional tumourigenicity tests on cells used for the manufacture of therapeutic products. Such cell lines may be used as cell substrates for the production of biological products if the NRA/NCL has determined, based on



characterization data as well as manufacturing data, that issues of purity, safety, and consistency have been addressed. A new cell line (DCL, SCL, or CCL) should be presumed to be tumourigenic unless data demonstrate that it is not. If a manufacturer proposes to characterize the cell line as non-tumourigenic, the following tests should be undertaken.

要点は「新規の二倍体細胞の造腫瘍性については細胞特性評価の一環として試験されることが望ましい。」「造腫瘍性が明らかになっている細胞については、さらに造腫瘍性を試験する必要はなく、製造過程や細胞の特性試験で得た精製度、安全性、再現性に言及したデータに基づき治療用製剤の製造に供することも可能。」「新規の細胞株については、造腫瘍性を否定するデータが示されない限り、造腫瘍性があるものと見なされる。」

がん原性については、以下のように記載される。

P48: Oncogenic activity from cell substrates could be due to either the cell substrate DNA (and perhaps other cellular components) or an oncogenic agent present in the cells. Although there might be a perception that the cellular DNA from highly tumourigenic cells would have more oncogenic activity than the DNA of weakly or nontumourigenic cells, at this time, it is not known if there is a relationship between the tumourigenicity of a cell and the oncogenicity of its DNA. Nevertheless, the NRA/NCL might require oncogenicity testing of the DNA and cell lysate from a new cell line (*i.e.*, other than those such as CHO, NSO, Sp2/0, and low passage Vero, for which there is considerable experience) that is tumourigenic in animal model systems (see below) because of the perception that a vaccine manufactured in such a cell line poses a neoplastic risk to vaccine recipients.

要点は「細胞の造腫瘍性とその細胞由来のDNAその他成分によるがん原性の関連性は明らかとはいえないが、別に記載する動物モデルで造腫瘍性を示す細胞株については、その細胞で製造されたワクチン被接種者のリスクを鑑みた場合に、がん原性評価が求められるであろう。」

WHO/BS/10.2132 (draft)には、造腫瘍性とがん原性を評価するための動物実験用モデルプロトコルとして Appendix 3 (造腫瘍性) と Appendix 4 (がん原性) が添付されており、推奨される供試動物や接種細胞数、経過観察期間および評価法についての記載がある。

さらにWHO/BS/10.2132 (draft)のGeneral consideration中には細胞由来miRNAのがん原性について言及した記述がある。

While protein-coding RNA has not been considered to be a risk factor for biological products due to the unstable nature of RNA and the lack of mechanisms for self-replication, the recent description of small non-coding RNA molecules – microRNA (miRNA) – that are more stable and have the capacity to modulate gene expression might necessitate a reassessment. Whether these miRNA molecules can be taken up by cells *in vivo* is unknown. However, as stated above, because certain miRNA genes can be oncogenic, DNA containing such sequences may need to be considered along with oncogenes when assessing the risk of rcDNA (see B.9 Oncogenicity). However, because this

is an evolving area of research, no conclusions can be made regarding the risk of miRNA, and no recommendations are made to control miRNA.

EMA/CHMP/BWP/68803/2010 (draft)には細胞基材の造腫瘍性に関して次の記述がある。

P4: Tumourigenicity testing would not be required for cell lines for which relevant information is available such as MDCK, Vero, PerC.6 or for primary cells of chick origin.

「MDCK, Vero, Per.C6, ニワトリ由来初代培養細胞など有用な情報が存在している細胞株については、造腫瘍性試験を行わないことも可能。」

次に参考としてICH Q5Dから引用したい。ワクチンは通常、高純度精製品ではないことが多いが、抗原をリコンビナント蛋白質として発現させ、高純度精製品として作製される場合も考えられる。

ICH Q5Dには以下の通りに記載されている。

P12: 目的タンパク質が高純度に精製されており、かつ細胞を含まない場合、工程バリデーション又は規格試験のいずれかで、宿主細胞に由来する残存DNAが一貫して適正限度内であることが明らかにされていれば、通常、核型分析や造腫瘍性試験を実施する必要はないと考えられる。

製品中に生細胞の残存が否定できない場合、又は培養後に精製操作をほとんど行わない（例えば、従来の生ウイルスワクチン）場合には、通常、細胞基材について、核型分析や造腫瘍性試験を行う必要がある。精製操作をほとんど行わない医薬品の製造に用いられる新規細胞基材についての造腫瘍性試験や染色体解析の有用性は、ケースバイケースで評価すべきである。

次に参考としてICH S6から引用したい。ICH S6の適応対象には従来のウイルスワクチンは含まれない（組換えDNA 由来の蛋白質ワクチンは含まれる）とされているが、参考になる視点が含まれている。

ICH S6には以下の通りに記載されている。

P9: バイオ医薬品においては、標準的ながん原性試験は一般的に不適當である。しかし、バイオ医薬品の臨床での投与期間、患者群、その生物学的活性（例えば、増殖因子、免疫抑制剤等）によっては個別にがん原性の評価を行う必要がありうる。更に、がん原性に対する懸念がある場合は、リスク評価のために種々の試験方法を検討することとなる。

ICH S1Aには以下の通りに記載されている。

P1: 臨床での使用が少なくとも6カ月以上継続されるような医薬品においてはがん原性試験が実施されるべきである。ある種の化合物では6カ月を越えて連続的に用いられることはないかも知れないが、間欠的な方法で繰り返し用いられることがある。特に非連続的な処置の場合のがん原性の可能性に関しては、それが頻繁に用いられる場合、臨床的な処置期間をどのくらいとみなし、科学的に正当化することは困難なことが多い。慢性あるいは再発性の病態の治療において、間欠的な方法で頻繁に用いられる医薬品についてはがん原性試験が一般に必要となる。

製剤中に存在し得る細胞由来成分以外のがん原性物質として、WHO TRS927に次の記載がある。

P51: Carcinogenicity studies are not required for vaccine antigens. However, they may be required for particular vaccine components such as novel adjuvants and additives.

要点は、「ワクチン抗原については、がん原性試験は必要でない。しかし新規アジュバントや新規添加物などの特定のワクチン構成物についてはがん原性試験が必要になるであろう。」である。

#### 【ディスカッション】

ICH Q5Dには「高純度に精製されているタンパク製剤の場合かつ細胞を含まない場合、宿主細胞に由来する残存DNAが一貫して適正限度内であることが明らかにされていれば、通常、核型分析や造腫瘍性試験を実施する必要はないと考えられる」（ただし高純度に精製されており、かつ細胞を含まない場合という前提がつく）とあり、WHO TRS 927には「製剤中のワクチン抗原については、がん原性試験は必要でない」とある。これらは、「一定の条件を満たしている場合、造腫瘍性試験やがん原性試験は省略可能」という立場である。

WHO TRS 878は「細胞については造腫瘍性試験を行う必要がある」としているが、がん原性試験については特に記載はない。

一方、CBER Guidance for Industryには「特性がよく把握されている二倍体細胞（遺伝的および形質的に修飾されていないMRC-5,WI-38,FRhL-2）や過継代を行わない初代培養細胞を除き、どの細胞においても造腫瘍性については記述が必要」（ただし、「記述が必要」ということは、必ずしも「試験の実施が必要」ということを意味しないことに留意）「造腫瘍性試験に関連する考慮点としては以下のものがある。(1)適切な動物モデルの選択 (2)結果が陽性であることの定義 (3)適切な試験期間の決定 (4)適切な細胞数の決定 (5)適切なコントロールの選択」 「造腫瘍性試験で最も一般的に使用されるのはヌードマウスである」「動物一匹当たりの接種細胞数は $10^7$ 個で、少なくとも10匹に接種する必要がある。」「造腫瘍性試験は、EOPC(End-of-Production-Cell)で行う」「がんウイルスの存在が疑われる場合はライセートによるがん原性試験を行うのが良い。造腫瘍性が認められる場合は細胞のDNAによるがん原性試験を行うのが良い」「残存する細胞DNAの量を減らすこと、及びサイズを小さくする(200 bp以下)ことによって、がん原性を減少させることが出来る。」「(Table 1より)造腫瘍性試験・がん原性試験はEOPCに対して行う」とあり、「造腫瘍性について記述することは必須で、造腫瘍性が陽性の場合にはがん原性試験も必須」という立場である。

またWHO/BS/10.2132 (draft)においては、新規の細胞基材については、造腫瘍性試験、がん原性試験の実施を推奨している。将来においては、細胞由来miRNAあるいはその相同配列をコードしているDNA断片の残存にも留意すべき可能性を示唆しているが、現時点では、これらの検証の要否については保留している。

ワクチンの製造過程で、生きた製造用細胞は完全に除去できる（ただし、このことを担保する検証結果や、実際の工程中において除去できていることの確認も必要と思われる）ことから、問題になるのは造腫瘍性よりもがん原性であろう。残存DNAの長さや量を減少させることで、がん原性を減少させることは確かにできると思われるが、安全性の観点から造腫瘍性試験とがん原性試験は行うべきであるとの

ディスカッションが研究班内でなされた。

また、ICH S6には「バイオ医薬品においては、標準的ながん原性試験は一般的に不適當である。しかし、バイオ医薬品の臨床での投与期間、患者群、その生物学的活性（例えば、増殖因子、免疫抑制剤等）によっては個別にがん原性の評価を行う必要がある。更に、がん原性に対する懸念がある場合は、リスク評価のために種々の試験方法を検討することとなる」とあり、ICH S1Aには「慢性あるいは再発性の病態の治療において、間欠的な方法で頻繁に用いられる医薬品についてはがん原性試験が一般に必要となる」とある。将来、細胞培養法によって季節性インフルエンザワクチンが製造されることも視野に入れるとすれば、一生の間にはある程度の回数を打つことになるので、安全性についてもその分の配慮が必要と思われる。

以上を踏まえて、研究班としては以下のように考える。

安全性の観点から、ワクチン製造に用いる細胞の造腫瘍性試験は必要であると考え。造腫瘍性試験が陽性である場合はがん原性試験も必要である。造腫瘍性試験はEOPCに対して行い、がん原性試験はEOPCのライセートとDNAに対して行う。製剤中の残存DNA量は10 ng/dose以下が必要条件で、できるだけ低いレベルであることが望ましい。また、残存DNAの長さはより短い方が望ましい。

## 2) 細胞溶解物（ライセート・DNA）の安全性について

### 【関連する既存のガイドライン等での規定】

ICH Q5Dには腫瘍原性の視点からの記述はあるが、他の視点からの記載はない。

次に参考としてICH Q6Bから引用したい。ICH Q6Bは従来型ワクチンを適応対象としていないが、参考となる視点が含まれている。

ICH Q6Bには以下の通りに記載されている。

P9: 目的物質及び複数の目的物質関連物質から構成される原薬及び製剤の純度面からみた評価に加えて、含有する可能性のある不純物に関しても評価を行う必要がある。不純物として想定されるものには、製造工程に由来するものもあれば目的物質に由来するものもある。これら不純物には、構造が明らかにできるもの、部分的に特性解析できるもの、同定できないものなどがある。不純物がそれなりの量、生成する場合には、可能な範囲でそれらの特性解析を行う必要がある。できれば、生物活性についても評価する必要がある。

P22: 6.2.1 製造工程由来不純物及び混入汚染物質製造工程に由来する不純物（2.1.4項参照）は、細胞基材に由来するもの、細胞培養液に由来するもの、及び細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するものの3つの範疇に大別される。

a) 細胞基材に由来する不純物には、例えば、宿主細胞由来タンパク質、核酸（宿主ゲノム由来、ベクター由来、総DNA）などがある。宿主細胞由来タンパク質に対しては、広範なタンパク質性不純物を検出

することができる高感度な分析法、例えばイムノアッセイが一般に用いられる。イムノアッセイの場合、試験に用いるポリクローナル抗体は、産生細胞から目的物質をコードする遺伝子を除いた細胞から調製した標品、細胞融合の相手となる細胞から調製した標品、又は他の適当な細胞株から調製した標品などを免疫することにより得られる。宿主細胞由来のDNAは、(ハイブリダイゼーション法などにより)製品を直接測定することにより検出される。実験室スケールでの添加回収実験などによる不純物クリアランス試験は、核酸や宿主細胞由来タンパク質のような細胞基材に由来する不純物が除去されていることを示すためのものであるが、クリアランス試験をこれらの不純物について規格値を設定しない根拠にできることもある。

要点は、「不純物がそれなりの量、生成する場合には、可能な範囲でそれらの特性解析を行う必要がある。できれば、生物活性についても評価する必要がある」「製造工程由来不純物として宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来DNAなどの細胞基材に由来する不純物がある。タンパク質性不純物の検出には、細胞を免疫して得られたポリクローナル抗体によるイムノアッセイが用いられる。不純物クリアランス試験によって、不純物の除去が適切に実証されている場合、不純物について規格値を設定しない根拠に出来ることもある」である。

次に参考としてICH S6から引用したい。ICH S6の適応対象には従来のウイルスワクチンは含まれない(組換えDNA由来の蛋白質ワクチンは含まれる)とされているが、参考になる視点が含まれている。ICH S6には以下の通りに記載されている。

P4: バイオ医薬品には、細菌、酵母、昆虫、植物及び哺乳動物細胞由来の宿主細胞成分の混入に起因するリスクが伴う可能性がある。このような宿主細胞成分の混入によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起される可能性がある。核酸の混入に起因する有害作用は理論上ありうることではあり、宿主のゲノムに組み込まれる可能性もある。昆虫、植物及び哺乳動物細胞、又はトランスジェニック植物及びトランスジェニック動物由来の医薬品の場合にはさらにウイルス感染の危険性もある。

要点は、「宿主細胞成分の混入によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起される可能性がある」「核酸や感染性因子混入の問題もある」である。

WHO TRS 927 には以下の通りに記載されている。

P33: Potential safety concerns for a vaccine product include those due to inherent toxicities of the product, toxicities of impurities and contaminants, and toxicities due to interactions of the vaccine components present in the vaccine formulation.

P48: In certain cases, the results from evaluations of immune response from nonclinical and clinical studies, or from data on natural disease, may indicate immunological aspects of toxicity, e.g. precipitation of immune complexes, humoral or cell-mediated immune response against antigenic determinants of the host itself as a consequence of molecular mimicry or exacerbation of the disease (e.g. inactivated measles vaccine). In such cases, additional studies to investigate the mechanism of the effect observed might be necessary.

Great similarity of vaccine determinants and host molecules could cause autoimmune reactions induced by molecular mimicry (26). Therefore, any vaccine antigen whose characteristics might mimic those of a host antigen should be treated with caution, even though it is recognized that molecular mimicry does not necessarily predispose to autoimmunity.

Because considerable efforts may be required in selecting and developing relevant animal models to address the above issues, caution should be exercised and a strong rationale provided when developing vaccines for diseases associated with autoimmune pathology.

If data suggest that the pathogen against which the vaccine is directed may cause autoimmune pathology, studies may be needed to address this concern on a case-by-case basis, if an appropriate animal model exists.

It should be noted that observations of biological markers for autoimmune reactions are not necessarily linked to pathogenic consequences. For instance, the presence of autoimmune antibodies does not necessarily indicate the induction of autoimmune disease (25).

When hypersensitivity reactions induced by the antigen(s), adjuvants, excipients or preservatives are of concern, additional investigations may be warranted.

要点は、「ワクチンそのものや不純物、混入物による毒性の発現、およびワクチンを構成する要素の相互作用による毒性の発現が、安全上の問題点としてある」「非臨床試験や臨床試験等の結果から免疫に関連する毒性（例えば免疫複合体の沈降、分子類似性による自己抗原との液性・細胞性免疫反応、または病気の悪化）が現れる場合がある」「抗原、アジュバント、添加物や防腐剤による過敏反応に懸念がある場合は、更なる調査が必要となるであろう」である。

WHO TRS 878には細胞溶解物（ライセート・DNA）の安全性についてがん原性の視点からの記述はあるが、他の視点、例えばアレルギーからの視点については記載がない。

CBER Guidance for Industryには細胞特性や迷入病原体の試験に加えて、他の試験項目について以下のとおり記載がある。

#### P36: 1. Testing for the Presence of Residual Cells

You should assure that your final vaccine product does not contain residual cells. Processes, such as filtration, should be implemented and validated to ensure that intact cells are not present in the final product. Validation that residual cell removal processes are robust is important for immortalized cells. Determining the extent to which intact cells (or other materials known to be smaller than intact cells) are cleared by these processes is an important part of this validation.

#### 2. Testing for Residual Cellular DNA

Residual DNA might be a risk to your final product because of oncogenic and/or infectivity potential. There are several potential mechanisms by which residual DNA could be oncogenic, including the integration and

expression of encoded oncogenes or insertional mutagenesis following DNA integration. Residual DNA also might be capable of transmitting viral infections if retroviral proviruses, integrated copies of DNA viruses, or extrachromosomal genomes are present.

(残存DNAのがん原性についての記述、略)

You should measure the amount and size distribution of residual DNA in your final product. For widely used human diploid cell strains, such as MRC-5 and WI-38 cells, measurement of residual DNA might be unnecessary because we do not consider residual DNA from these human diploid cells to be a safety issue. We might require limitation of the amount of residual DNA, depending on the potential risks associated with that DNA, for human diploid or primary cell types for which there is less experience. You should limit residual DNA for continuous non-tumorigenic cells, such as low-passage Vero cells, to less than 10 ng/dose for parenteral inoculation as recommended by WHO. Because orally administered DNA is taken up approximately 10,000-fold less efficiently than parenterally administered DNA, we recommend limiting DNA to less than 100 µg/dose for oral vaccines. If you are using cells with tumorigenic phenotypes or other characteristics that give rise to special concerns, more stringent limitation of residual DNA quantities might be needed to assure product safety.

### 3. General Safety Test (GST)

The requirements for, and the exceptions and criteria for exception from, the GST are set forth in 21 CFR 610.11. 要点は「残存細胞や残存DNAの否定試験やプロセスコントロール、その他21 CFR610.11に定められた一般的な安全性試験が要求される」「残存DNAの許容量は細胞基材の腫瘍原性の有無や、作製した製剤を注射用に供するか、経口投与に供するか、あるいは特段の状況を勘案して安全性に資するよう決定されるべき」である。

EMA/CPMP/SWP/465/95には以下の通りに記載されている。

P3: Potential safety concerns associated with vaccines include general systemic toxicity, (paradoxical) enhancement of the intended disease, induction of local toxicity, pyrogenicity, adverse immunologic effects such as autoimmunity or sensitisation, and in some cases teratogenic/reproductive effects. Historically, serious neurological events have been associated with the use of some vaccines. The availability of animal models to address these issues should be considered in the development of a new vaccine.

P4: The applicant should consider the following points on a case by case basis:

- Where appropriate, specific consideration should be given to immunological aspects of toxicity, such as production of complexes with host immunoglobulins (e.g. antibody-dependent enhancement of disease) or release of immunofunctional molecules, (e.g. cytokines) affecting functions of the immune system.
- Hypersensitivity reactions, induced by the antigen itself, by antigens (toxins) modified in new ways (new detoxification procedure, by antigen-carrier complex or presence of minute amounts of impurities) or by additives (adjuvants/excipients/preservatives) may be increased (especially for vaccines proposed to be injected more than once).
- In some rare cases, antigenic substances can induce antibodies that can cross-react with human tissue resulting in

possible adverse effects and the availability of an animal model to address these issues should be considered.

要点は、「ワクチン使用における安全性の問題として、全身毒性、病気の悪化、局所的毒性、発熱、自己免疫や感作、催奇形性や生殖系への影響などの副作用がある」「過去には重篤な神経系への有害事象を引き起こした事例もある」「安全性については、免疫複合体形成等の免疫毒性、過敏反応、自己組織への交叉反応などの点に注意すべきである」である。

参考として、ヒトで使用するワクチンのアジュバントについてのガイドラインである

EMA/CHMP/VEG/134716/2004から引用したい。DNAやライセートに対する反応等は記載されていないが、アジュバントに関連する副反応について記載されている。アジュバントの存在がDNAやライセートに対する反応等を増強する可能性にも注意が必要であろう。なお以下の文章は、アジュバント単体の毒性に関する大項目中の、過敏症・アナフィラキシーに関する1小項目の文章であるが、他に局所忍容性、発熱性、全身毒性、生殖毒性、遺伝毒性、がん原性、混合アジュバントについての小項目が同じ大項目中にある。

P11:Adjuvants themselves might be immunogenic and testing should be considered with respect to the induction of hypersensitivity in appropriate models (e.g. passive cutaneous anaphylaxis assay [PCA], and the active systemic anaphylaxis assay [ASA]). An adjuvant-induced increase of IgE against the antigen should be considered as a possible concern for induction of hypersensitivity and anaphylaxis.

要点は、「アジュバントはそれ自体免疫原性があり、適切なモデルによって過敏症についての試験を考慮すべきである。アジュバントによるIgE上昇は過敏症・アナフィラキシーと関連があると考えられるべきであろう」である。

EMA/CHMP/BWP/68803/2010中の次の記述は、不純物混入回避の観点から一考すべきものと思われる。

P4: The composition and source of media used for all cell culture manipulations including cell passaging, virus isolation and virus propagation should be recorded in detail. If substances of human or animal origin are used they should be free from extraneous agents. Bovine serum used for the preparation and maintenance of cell cultures should be irradiated and should comply, in principal, with the Note for guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products. Animal-derived materials used in cell culture manipulations must be compliant with the current version of the Transmissible Spongiform Encephalopathy Note for Guidance.

要点は「細胞取扱時に用いた培地の組成や原料は詳細に記録されるべき」「ヒトや動物由来の物質を材料には、外来物質が存在しないものを使用する」「培養維持に牛血清を使う場合、放射線照射したものを用いる等、牛血清使用に関する規定を遵守する。動物由来原料の使用に関してもTSEに関する現行の規定を遵守すること」

#### 【ディスカッション】

ICH S6には「宿主細胞成分の混入によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起される可



能性がある」とあり、WHO TRS 927には「ワクチンそのものや不純物、混入物による毒性の発現、およびワクチンを構成する要素の相互作用による毒性の発現が、安全上の問題点としてある」とある。

また、EMA/CPMP/SWP/465/95には「ワクチン使用における安全性の問題として、全身毒性、病気の悪化、局所的毒性、発熱、自己免疫や感作、催奇形性や生殖系への影響などの副作用がある」「過去には重篤な神経系への有害事象を引き起こした事例もある」「安全性については、免疫複合体形成等の免疫毒性、過敏反応、自己組織への交叉反応などの点に注意すべきである」とある。

これらのことから、研究班の中でも、ワクチンに混入してくる細胞由来成分によってアレルギー反応等が起こる可能性があり、注意する必要があるとのディスカッションがなされた。

アジュバントが入ることでこのような反応が増強されると推測されることや、将来季節性インフルエンザワクチンも細胞培養法で製造されるようになった場合のことを考えると、この点は重要であろう。

ICH Q6Bには「不純物がそれなりの量、生成する場合には、可能な範囲でそれらの特性解析を行う必要がある。できれば、生物活性についても評価する必要がある」「不純物クリアランス試験を、不純物について規格値を設定しない根拠に出来ることもある」とあり、いずれにしても不純物の量の評価が必要と考えられる。そのための方法としては、ICH Q6Bにある通り、細胞を免疫して得られたポリクローナル抗体によるイムノアッセイをあげることができる。

既存のガイドライン等では、細胞由来DNA量については10 ng/doseという上限が出されている。一方、細胞由来タンパク質量については特に値は定められていない。（ただしICH Q6Bについては、高純度精製生物薬品を念頭においており、通常のワクチンとは議論の前提が異なることに留意すべきである。）しかしワクチンに混入してくる細胞由来成分によって有害事象、副反応が生じる可能性があることから、これらの混入については可能な限り少なくなるように管理することが必要と思われる。

以上を踏まえて、研究班としては以下のように考える。

ワクチンに混入してくる細胞由来成分によって有害事象、副反応（例えばアレルギー反応等）が生じる可能性があることから、細胞由来成分については可能な限り混入しないよう管理することが必要であろう。細胞由来DNAの量については、10 ng/dose 以下が必要条件である。他の細胞由来成分については、非臨床試験（反復投与毒性試験等）や臨床試験を通じて個別のワクチンごとに設定されるべきであろう。

3) ウイルス増殖に使用する細胞の、ウイルスの遺伝学的・抗原的变化への影響の検討方法と認められる変化の許容範囲について

#### 【関連する既存のガイドライン等での規定】

参考としてICH Q5Bを以下に引用する。ICH Q5Bは組換えDNA技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析に関するガイドラインである。本来は従来型のワクチンを対象とはしていないが、参考になる視点が含まれている。ワクチン製造においてICH Q5Bでの遺伝子発現構成体（組換え蛋白質をコードする配列を含む発現ベクター）に相当するものは、シードウイルスであろう。シードウイルスの持つ遺伝子配列を元としてワクチンウイルスが大量に産生され、それが不活化や精製の工程を経てワクチンとなるが、これには組換えDNA技術を応用した蛋白質生産と類似する点もあると思わ

れる。以下Q5Bは、ワクチン製造にあてはめる形で読むこととしたい。

ICH Q5Bには次のように記載されている。

P1: 遺伝子発現構成体の解析の目的は、宿主細胞に導入された目的産物をコードする遺伝子の塩基配列が正しいことを立証すること及びこの塩基配列が医薬品製造条件下で製造終了時まで安定に維持されていることを立証することにある。生きた細胞中では、組換えタンパク質の遺伝子配列が変異を起こし、これがタンパク質の特性を変化させ、ひいては患者にとって安全性上問題になるような事態につながる可能性がある。

P3: 組換えDNA応用医薬品の生産の恒常性を図るには、遺伝子発現構成体と最終精製タンパク質の解析いずれもが重要である。これまで述べてきたように、核酸分析データと最終精製タンパク質の解析データの両方を組換えタンパク質医薬品の品質を確保する上での評価資料とすべきであると考えられる。

要点は、「遺伝子発現構成体の塩基配列とタンパク質を解析し、両者が製造終了時まで安定に維持されていることを示す必要がある」である。

ICH Q5Dには以下の通りに記載されている。

P10: 細胞の特性に関しては、もう1つ別の次元からの見方がある。すなわち、医薬品製造に使用するとき、意図した目的を果たすのに適切であるかどうかについての特性を解析することである。細胞基材の安定性に関して、考慮すべき点が2つある。すなわち、目的タンパク質を恒常的に生産できるかという観点での安定性、及び定められた条件下での保存期間中も生産能力を保持しているかという観点での安定性の2つである。

医薬品製造のための培養期間中の安定性評価では、少なくとも2つの時点の細胞を材料に試験を実施する必要がある。その2つの時点の細胞とは、最小継代培養細胞、及び承認事項として申請書に記載された実製造に使用する際の*in vitro*細胞齢の上限又はそれを超えて培養された細胞である。医薬品製造のための*in vitro*細胞齢の上限は、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで、医薬品製造条件として提案された*in vitro*細胞齢まで、又はそれ以上に培養させた製造用細胞から得られたデータに基づいて決定される必要がある。この製造用細胞は一般的にはWCBから増殖されるが、適切な理由がある場合はMCBから増殖させた細胞を用いてもよい。このような医薬品製造用細胞基材の安定性の検証は、各医薬品の承認申請ごとに、通常、1回実施する必要がある。

ここで、第一義的な課題は、目的タンパク質が恒常的に生産されるかどうかという点に関して細胞基材を評価することである。そのような評価に使われる試験の種類及び試験検体は、細胞基材の種類、培養方法、及び目的タンパク質の種類に応じて変わる。組換えDNA技術により作製された遺伝子発現構成体を導入した細胞株の場合、「組換えDNA技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析」(ICH Q5Bガイドライン:前出)に記載されているように、実製造での*in vitro*細胞齢の上限まで、又はそれを超えて培養した細胞について、遺伝子発現構成体中の目的タンパク質をコードする塩基配列が安定であることを、核酸解析又は最終的に得たタンパク質の解析のいずれかの方法によって立証すべきである。目的タンパク質をコードする配列が既にMCB又はWCBのレベルで解析されている非組

換え体の細胞株では、実製造で予定されている*in vitro*細胞齢の上限まで、又はそれを超えて培養した細胞を検体として、目的タンパク質をコードする塩基配列が培養期間中に変化しないことを、核酸解析又は精製タンパク質の解析のいずれかによって立証すべきである。

目的タンパク質が前記のように解析できないとき、例えば、形態学的特徴、増殖特性、生化学的指標、免疫学的指標、目的タンパク質の生産性、あるいはその他の適切な遺伝型又は表現型の指標を含む他の特性が、細胞基材の安定性を評価するために有用なものとなり得る。

要点は、「目的タンパク質をコードする配列が、実製造に使用する際の*in vitro*細胞齢の上限又はそれを超えて培養された細胞で培養期間中に変化しないこと、及び定められた条件下での保存期間中も生産能力を保持していることを、核酸解析又は精製タンパク質の解析のいずれかによって立証すべきである」

「いずれかの方法で目的タンパク質の解析ができないときは、生化学的指標や免疫学的指標など種々の方法によって、細胞基材の安定性を示すことが有用な場合がある」である。

CBER Guidance for Industryには以下の通りに記載されている。

P6: Assuring that the vaccine virus strain remains stable during passage in cell culture is an important component of cell substrate selection. Different cell lines may apply different selective pressures on the vaccine virus, which could alter its sequence and possibly its phenotype. For example, when Sabin poliovirus strains are grown in different cells, their likelihood of reversion to neurovirulence is different (Ref. 8). If attenuating mutations or other genetic markers (including expression of antigens relevant to immune response) of the vaccine virus are known, data regarding the influence of serial passage in the cell substrate on retention of these markers can be useful in characterizing the genetic stability of the vaccine virus.

Whatever starting materials are used for the generation of the cell substrate (e.g., parent cells or plasmids used for genetically engineered cells), any available information about those starting materials and their characterization (e.g., sequence of the plasmid) should be provided. If a sponsor starts with a primary cell to generate a novel cell substrate, complete information on donor screening and testing should be provided.

P15: We recommend that you extensively characterize your MVS, as this characterization also provides assurance regarding the characteristics of subsequent passages, including the WVS. In addition, you should demonstrate the stability of the genotype and phenotype following viral passages beyond the level used in your production.

Genotypic characterization of a viral seed includes its sequence, and may include analysis of viral subpopulations and its genetic stability, including susceptibility to reversion. Phenotypic characterization of a viral seed may include assessment of tissue tropism, attenuation properties, and temperature sensitivity, if applicable.

P36: You should demonstrate the genetic stability of your cell substrate from the establishment of the MCB through and perhaps beyond the end of production.

要点は、「ワクチン株が細胞での継代で安定であることは、細胞基材を選択する上で大切な要件である」

「MVSの特性については、幅広く解析することが推奨される。それによって、WVSも含めた継代ウイルスの特性に保証を与えることが出来るからである」「MVSが製造過程での継代数を越えて継代されても、遺伝的および形質的に安定であることを示す必要がある」「MVSの遺伝学的解析にはシーケンス解析が含まれ、非主流群の解析やそれらの遺伝的安定性の解析も含まれる」「MVSの形質的解析には、組織指向性、弱毒性、温度感受性が含まれる」「細胞の遺伝子がMCBからEOPより先まで培養しても安定であることを示す必要がある」である。

EMEA/CPMP/VEG/4717/03-Rev.1(draft guideline)には以下の通りに記載されている。

P6: Qualification i) The haemagglutinin and neuraminidase antigens of each seed lot are identified as originating from the correct strain of influenza by suitable methods. Usually, specific antisera obtained from a WHO Collaborating Centre for Influenza are used for determination of HA and NA identity. It is possible that reagents may not be available for the chosen mock-up vaccine, so alternative tests to identify the seed virus (e.g. PCR) should be developed for the mock-up vaccine.

P6: iii) Where the influenza seed virus is prepared using reverse genetics, the sequence of the HA and NA genome segment of the influenza virus should be verified and compared to the genome segments of reference virus to confirm the genetic stability of the production influenza virus. This should preferably be done at the level of the Working Seed Virus, and at least up to one passage beyond the level representing the final vaccine.

要点は「シードロットのHAとNAが正しい株由来であることを適切な方法によって確認する。通常はWHO CCから入手した特異的抗血清を使用してHAとNAの同等性を確認する」「シードウイルスがリバーシジェネティクスで作製された場合には、HAとNAの配列が最終製品より1代後まで安定であることを示す必要がある」である。

次にWHO/BS/10.2132を引用する。以下の文章はワクチンを主な対象としては想定していないが、参考になる視点が含まれている。

P40: Any form of genetic stability could potentially affect the quality of the final product and it will be important to know if the cells in culture are changing in a way that could affect the nature or safety of the product. Any features of the cell lines that might affect quality should be discussed with the NRA/NCL to ensure that tests used by the manufacturer to monitor genetic stability are adequate. The specific tests will vary according to the nature of the product, but the aim is to show consistency in the amount and characteristics of the product derived from cells within a few passages of the MCB or WCB with those derived from an ECB or EOPC.

要点は、「遺伝子の安定性は最終製品の品質に影響する可能性があるため、培養過程の細胞が製品の安全性に影響を及ぼす可能性があるかどうかを確認することが重要である。製造工程における生産性という点から細胞機能の安定性について評価する必要があるかもしれない」である。

P40: For cell lines containing DNA expression constructs, the stability of these constructs between the