

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、EOPC に対して、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。その他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 PCR-based RT 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妥当であると考え。試験実施に当たっては、試験方法の原理や感度等を考慮して、多面的な解析が必要であると考え。

5) 製造の過程で混入する可能性のある外来性ウイルス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、外来性ウイルスとしては、ヒト由来だけでなく、細胞株の動物種由来のものや、血清、トリプシン等の動物由来原材料に混入するもの、ウイルスシード中に混入し得る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

ワクチン承認にあたり、現段階では HA の量は SRD 試験によって測定する。緊急的な承認を必要とし、SRD 法に必要な標準抗原または参照抗血清が入手出来ない場合には、代替法で HA 量を測定しても良いが、代替法を利用する場合でも、標準抗原および参照抗血清が得られた後には SRD 試験を行う必要がある。

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作業部会における議論

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. You should measure the amount and size distribution of residual DNA in your final product.

“Safety of MDCK cell culture-based influenza vaccines” *Future Microbiol.* (2011) 6(2),
には以下の通り記載されている。

P148: lane31; Residual DNA fragments were on average less than 300 base pairs. Typical oncogenes have greater than 1000 base pairs and the average size of human oncogenes is 1025 base pairs.

”A probabilistic model for risk assessment of residual host cell DNA in biological products” *Vaccine* 28 (2010) 3308-3311 には以下の通り記載されている。

P3309: 2.2. oncogenicity assessment; The average size of human oncogenes is 1925 bp with a standard deviation of 87 bp.

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。残存 DNA の量とサイズ分布を確認する必要がある。」「(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。

Proposed replacement of TRS 878, Annex 1, WHO/BS/10.2132, WHO ECBS 2010 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。

P43: A new diploid cell line (*i.e.*, other than WI-38, MRC-5, and FRhL-2) should be tested for tumorigenicity as part of the characterization of the cell line, but should not be required on a routine basis.

The tumorigenicity 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 tumorigenic 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 tumorigenic because they possess the capacity to form tumors in immunosuppressed animals such as rodents. Some CCLs become tumorigenic 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 tumorigenic 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-tumorigenic, to weakly tumorigenic, to highly tumorigenic, 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 tumorigenic (e.g., BHK-21, CHO, HEK293, CI27), or if the class of cells to which it belongs is tumorigenic (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腫瘍原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

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。」

Proposed replacement of TRS 878, Annex 1, WHO/BS/10.2132, WHO ECBS 2010 には、腫瘍原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 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 Proposed replacement of TRS 878, Annex 1, WHO/BS/10.2132, WHO ECBS 2010 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。

P21: 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/368186/2011 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、ワクチン抗原の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 Proposed replacement of TRS 878, Annex 1, WHO/BS/10.2132, WHO ECBS 2010 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る。ただし造腫瘍性が明らかになっている細胞については、さらに造腫瘍性試験を行う必要はない。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。造腫瘍性試験はワクチン製造使用に許容される最大継代数の細胞（End-of-production cell, 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。ただし 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。DNA は鎖長が短いほど機能性を失うと考えられるため、残存 DNA の長さについては 200bp よりも短い方がよく、可能であればさらに短い方が望ましい。

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つい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、例えば免疫アッセイが一般に用いられる。免疫アッセイの場合、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 EMEA/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るべきであろう」である。

EMA/CHMP/BWP/368186/2011 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. The use of animal-free components is recommended.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