

- Ball R, Wang J, Cichutek K, Pflleiderer M, Kato A, Cavaleri M, Southern J, Jivapaisarnpong T, Minor P, Griffiths E, and Sohn Y. A Global Regulatory Science Agenda for Vaccines. *Vaccine*, 31:163-175 (2013)
- 9) 多屋馨子：【予防接種】副反応報告と救済制度．公衆衛生 78 巻 2 号 Page86-92(2014.02)
2. 学会発表
- 1) 山口幸恵, 林 昌宏, 伊藤 (高山) 睦代, 垣内五月, 田島茂, 高崎智彦, 倉根一郎, 渡邊治雄, 西條政幸：日本脳炎ウイルスの神経侵襲性を決定する宿主側因子の解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 2) 田島茂, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 林 昌宏, 西條政幸, 高崎智彦：製造株と異なる遺伝子型のウイルスに対する日本脳炎ワクチンの中和能の解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 3) 伊藤 (高山) 睦代, 林 昌宏, 森本金次郎, 垣内 五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 西條政幸：ラッサウイルスなどのアレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの開発, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 4) 垣内五月, 王麗欣, 伊藤 (高山) 睦代, 林 昌宏, 西村秀一, 辻 正徳, 谷口修一, 水口 雅, 岡 明, 西條政幸：造血幹細胞移植におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型感染症の臨床的意義に関する研究, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 5) 佐藤正明, 垣内五月, 木下 (山口) 一美, 伊藤 (高山) 睦代, 林 昌宏, 西條政幸：ウイルス分離が不可能なヘルペス脳炎病原ウイルスの薬剤感受性試験法の開発と臨床応用, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 6) 中道 一生, 田島茂, 林 昌宏, 西條政幸：JCウイルスゲノムの転写調節領域に生じるランダムな変異をスキャンするための高解像度融解曲線分析法の確立, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 7) 齋藤悠香, モイ メンリン, 林 昌宏, 司馬肇, 細野邦昭, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦：日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する免疫反応の検討, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 8) 水上 拓郎, ワクチンの安全性について第 139 回レギュラトリーサイエンスエキスパート研修会：ワクチン接種後のデータ収集とその活用についてー現状と期待ー 2013 年 7 月 9 日 日本薬学会長井記念館
- 9) K Nojima, T Mizukami, R Sobata, C Matsumoto, M Kuramitsu, K Okuma, M Satake, K Tadokoro, K Yamaguchi, I Hamaguchi. Development of an Effective Prevention Method for T-cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-1) Infection Using HTLV-1 Sero- Positive Serum *in vitro*, The AABB Annual Meeting & CTTXPO 2013, Colorado, 12-15 October, 2013 (米国輸血学会)

10) 伊藤（高山）睦代：狂犬病ワクチン検
定における試験管内不活化試験法の開発.
第 23 回感染研シンポジウム,2013 年 5 月

11) 多屋馨子：シンポジウム 2 ワクチン
有害事象の発症メカニズムと報告システ
ム「予防接種後副反応報告システム」第
17 回日本ワクチン学会学術集会平成 25
年 11 月 30 日. 三重県

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金

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

「ワクチンの品質確保のための国家検定制度の抜本的改正に関する研究」

分担研究報告書

組織培養不活化狂犬病ワクチン不活化試験法におけるマウス脳圧ペン標本固定法の検討

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所副所長）

協力研究者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長）

伊藤（高山）睦代（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）

西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

研究要旨：ワクチンの国家検定は我が国に流通するワクチンの品質確保において重要である。現在も狂犬病は世界 150 カ国以上の国と地域で年間 55,000 人以上発生している。我が国では狂犬病ワクチンは流行地域への渡航者用曝露前ワクチン、あるいは狂犬病ウイルス暴露者の狂犬病発症抑制のための曝露後ワクチンとして重要である。現在我が国では乳飲みマウスを用いた狂犬病ワクチンの不活化試験が全ロットに対して実施されている。ところで不活化試験法では死亡マウス脳における狂犬病ウイルス抗原の有無の検討をマウス脳の圧ペン標本を作製して行う事例が散発するが、圧ペン標本の作製においては実験従事者の安全性の確保が重要である。そこで狂犬病ウイルスを実験的に感染させたマウス脳の圧ペン標本の固定法の検討を行った。その結果、脳圧ペン標本をアセトン・メタノール混合溶液で処理後紫外線照射を行った場合でも狂犬病ウイルスの抗原性は維持され、特異的抗体で検出できることが示された。したがって狂犬病発症マウス脳の圧ペン標本の固定法としてより厳しい条件であるアセトン・メタノール・紫外線照射処理を行うことにより、ウイルスの抗原性を失わずにウイルスの不活化が行えることが示唆された。

A. 研究目的

ワクチンの国家検定は我が国に流通するワクチンの品質確保において重要である。人獣共通感染症である狂犬病は現在も世界 150 カ国以上の国と地域で年間 55,000 人以上発生している。我が国では 1950 年に狂犬病予防法が施行されて以来、狂犬病患者数は減少し、1956 年以来ヒト狂犬病の患者は輸入症例を除き報告されていない。したがって、我が国では狂犬病ワクチンは流行地域への渡航者用曝露前ワクチンとして、あるいは渡航時等に何らかの理由で狂犬病ウイルスに

曝露された疑いのあるヒトに対する狂犬病発症抑制のための曝露後ワクチンとして重要である。現在我が国で承認されている乾燥組織培養不活化狂犬病（乾組狂犬）ワクチンは SFP 鶏から採取した発育鶏卵のニワトリ胚初代培養細胞を用いて培養された狂犬病ウイルスを 0.02% (v/v) β プロピオラクトンで不活化した凍結乾燥製剤である。乾組狂犬ワクチンの製造に用いられている狂犬病ウイルス株はヒト患者由来の狂犬病ウイルスをニワトリ胚初代培養細胞に馴化した HEP-Flury 株である。乾組狂犬ワクチンの国

家検定においては物理的性状, たん白窒素含量試験, 含湿度試験, 異常毒性否定試験, 不活化試験, 力価試験が全ロットに対して実施されている。

乾組狂犬ワクチンの不活化試験は被検品を乳飲みマウスに脳内接種し、被検品中の不活化狂犬病ウイルスの乳飲みマウスの脳内での増殖を否定することにより、被検品中の感染性ウイルスの混入の有無を調べる試験である。乳飲みマウスを用いた不活化試験法の問題点として動物を大量に使用すること、親マウスの自然死あるいは授乳不足等による仔マウスの自然死が散発すること、試験期間が比較的長期に渡ることなどが挙げられる。不活化試験において乳のみマウスは狂犬病固定毒の感染死又は感染症状を認めてはならないため、乳のみマウスが死亡した場合、感染死と自然死を判別するため死亡マウスの脳を採取し、脳の圧ぺん標本を作製し、狂犬病ウイルス抗原の有無を免疫染色法によって確認する。このとき免疫染色法には陽性対照として狂犬病感染乳のみマウス脳より作製した圧ぺん標本が用いられる。

ところでエンベロープウイルスである狂犬病ウイルスの固定法はアセトン固定が一般的に用いられている。しかしながらアセトン固定法は脱脂によりウイルスを不活化する方法であり、ウイルス蛋白質の変性を伴う固定法ではない。したがって狂犬病ウイルスの固定が温度条件等によっては十分に行われない可能性がこれまでに指摘されている(JCV, 1982:16(2)253-56)。しかしながらタンパク質変性をともなうメタノール処理や紫外線照射がウイルスタンパク質の抗原性に影響を及ぼす可能性も否定できない。そこで蛍光抗体法の陽性対照を作製する過程にお

いてアセトンを用いた固定法に加えて、アセトン・メタノール処理および紫外線照射による狂犬病ウイルスの活性と抗原性について検討したので報告する。

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞: 感染実験にはワクチン株である HEP-Flury 株を供試した。ウイルスの検出にはマウス神経細胞由来 NA 細胞を用いた。

動物: DDY マウス乳飲みマウス (1 腹 8 匹) を用いた。

感染実験: マウス 1 腹に対して HEP-flury 株 (20ul ; 10² ffu/animal) を脳内接種した。感染 5 日後に安楽殺を行い大脳を採取した。採取した脳により圧ぺん標本を作成し供試した。

固定法の検討: 作製した圧ぺん標本はアセトン固定, アセトン・メタノール固定 (4:1), 紫外線照射, のいずれかまたはその組み合わせによりそれぞれ固定した。アセトン固定およびアセトン・メタノール固定は室温で 20 分間行った。紫外線照射は 2 時間行った。対照として未固定のサンプルを用意した。固定されたサンプルを PBS に懸濁し, その上清を NA 細胞に接種して狂犬病ウイルスの増殖を蛍光抗体法により観察した。

蛍光抗体法による狂犬病ウイルス抗原の検出: 作製した圧ぺん標本を PBS で洗浄し, FITC ラベル抗狂犬病ウイルス N タンパク質抗体 (フジレビオ) を用いて狂犬病ウイルス抗原を検出した。

C. 研究結果

乳のみマウスに対する HEP-Flury 株の感染実験: 乳飲みマウス 1 腹 8 頭に狂犬病ウイル

スを脳内接種した。その結果接種5日後には発育不良、動作緩慢等の狂犬病症状が観察された。

固定法の検討:狂犬病ウイルス接種乳飲みマウスより採脳し、圧ぺん標本を作製した。作製した圧ぺん標本をアセトン処理、アセトン・メタノール処理、紫外線処理あるいはその組み合わせによりそれぞれ標本を作製した。作製した圧ぺん標本をPBSで洗浄し、FITCラベル抗狂犬病Nタンパク質抗原で染色したところアセトン・メタノール・紫外線照射固定を含むすべての固定法でウイルス抗原が検出された(図1)。

固定サンプル中の狂犬病ウイルスの感染性の検討:次に固定サンプル中の狂犬病ウイルスの感染性を検討するために作製した圧ぺん標本にPBSを添加しそれぞれ標本を懸濁、その上清を回収しNA細胞に接種した。接種3日後に細胞を固定し、狂犬病ウイルス抗原を蛍光抗体法により観察した。その結果いずれの固定法で固定したサンプルからも狂犬病ウイルスは検出されなかった。また陽性対照である未処理のサンプルから抽出した狂犬病ウイルスを接種したNA細胞では狂犬病ウイルスの増殖が観察され、狂犬病ウイルスが未固定であることが確認された(図2)。

D. 考察

これまで狂犬病ウイルスの固定法にはアセトンによる固定が一般的に行われてきた。しかしながらアセトン単独での固定法では脱脂作用が少なく、タンパク質の変性が伴わないため、特に低温下で狂犬病ウイルスをアセトン処理した場合は十分に固定されないことが狂犬病ウイルスCVS株を用いた研究において報告されている

(JCV, 1982:16(2)253-56)。今回の調査では①アセトン、②アセトン・メタノール、③アセトン・紫外線、④アセトン・メタノール・紫外線のいずれの固定法においても未固定の狂犬病ウイルスは検出されなかった(図2)。これは室温下で固定を行った点、および弱毒株であるHEP-flury株を用いた点がこれまでの報告と異なる。今後CVS株との比較検討の必要性が考えられた。

一般的にアセトン固定にはタンパク質変性が伴わないため、狂犬病ウイルス抗原を検出する場合はその抗原性の維持を目的として低温下でアセトン固定を行う。しかしながら低温下のアセトン固定には未固定のウイルスが残余する可能性があるため安全性に問題がある。したがってタンパク質変性の伴うアセトン・メタノール固定および紫外線照射による固定法を検討したところ①アセトン、②アセトン・メタノール、③アセトン・紫外線、④アセトン・メタノール・紫外線のいずれの固定サンプルにおいてもその目的抗原は蛍光抗体法により検出された(図1)。したがって狂犬病のNタンパク質を標的とする場合はアセトン・メタノール・紫外線による固定が最も厳しい条件の固定法であり、検定作業においては、その作業環境の安全性を確保できることが期待される。

E. 結論

本研究においては乾組狂犬ワクチン不活化試験を例にとり、現行の検定作業法の改善について検討した。その結果狂犬病ワクチンの不活化試験における圧ぺん標本の作製においては現行法よりもより厳しい条件で固定した標本も使用できることが示された。

F. 研究発表

- 1) Takayama-Ito M, Nakamichi K, Kinoshita H, Kakiuchi S, Kurane I, Saijo M, Lim CK. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals* 42:42-7, 2014

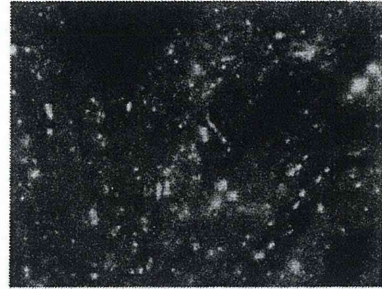
G. 学会発表

- 1) 山口幸恵, 林 昌宏, 伊藤 (高山) 睦代, 垣内五月, 田島茂, 高崎智彦, 倉根一郎, 渡邊治雄, 西條政幸: 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性を決定する宿主側因子の解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 2) 田島茂, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 林 昌宏, 西條政幸, 高崎智彦: 製造株と異なる遺伝子型のウイルスに対する日本脳炎ワクチンの中和能の解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 3) 伊藤 (高山) 睦代, 林 昌宏, 森本金次郎, 垣内 五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 西條政幸: ラッサウイルスなどのアレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの開発, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 4) 垣内五月, 王麗欣, 伊藤 (高山) 睦代, 林 昌宏, 西村秀一, 辻 正徳, 谷口修一, 水口 雅, 岡 明, 西條政幸: 造血幹細胞

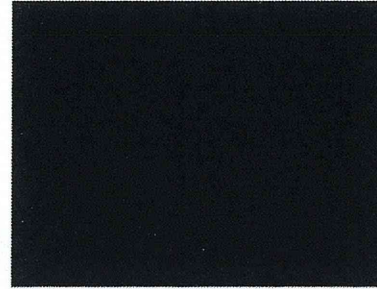
移植におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型感染症の臨床的意義に関する研究, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.

- 5) 佐藤正明, 垣内五月, 木下 (山口) 一美, 伊藤 (高山) 睦代, 林 昌宏, 西條政幸: ウイルス分離が不可能なヘルペス脳炎病原ウイルスの薬剤感受性試験法の開発と臨床応用, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 6) 中道 一生, 田島茂, 林 昌宏, 西條政幸: JC ウイルスゲノムの転写調節領域に生じるランダムな変異をスキャンするための高解像度融解曲線分析法の確立, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.
- 7) 齋藤悠香, モイ メンリン, 林 昌宏, 司馬肇, 細野邦昭, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦: 日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する免疫反応の検討, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市) 2013 年 11 月 10-12 日.

- H. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

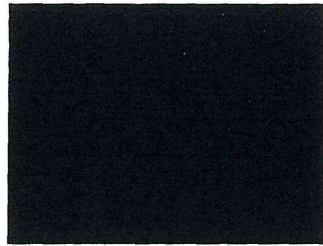


HEP-flury
(Aceton/MeOH/UV)

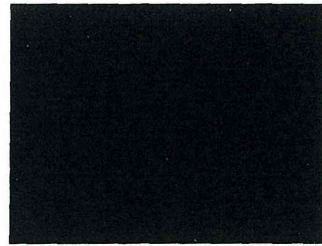


Mock
(Aceton/MeOH/UV)

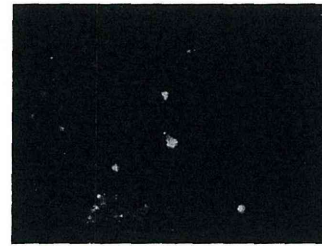
図 1. 圧ぺん標本作製における固定法の検討：狂犬病 HEP-flury 株感染乳のみマウス脳圧ぺん標本の固定をアセトン・メタノール・紫外線照射にて行い，抗狂犬病ウイルス N タンパク質抗体を用いて行ったところ，狂犬病ウイルスの特異的抗原が検出された。



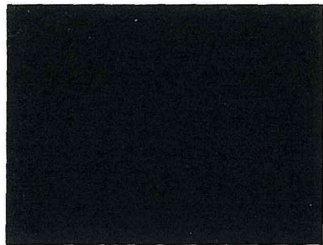
**HEP-flury
(Aceton)**



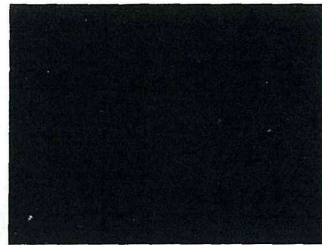
**HEP-flury
(Aceton/MeOH)**



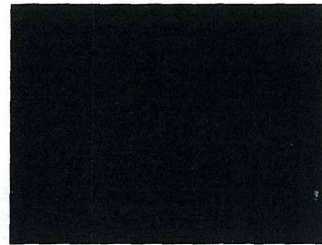
**HEP-flury
(non-treat)**



**HEP-flury
(Aceton/UV)**



**HEP-flury
(Aceton/MeOH/UV)**



**Mock
(non-treat)**

図 2. 圧ぺん標本固定法の違いによる残余ウイルスの検討：狂犬病 HEP-flury 株感染乳のみマウス脳圧ぺん標本の固定をアセトン、アセトン・メタノール、アセトン・紫外線照射、アセトン・メタノール・紫外線照射にてそれぞれ行い、圧ぺん標本をそれぞれ PBS に再懸濁、その上清を NA 細胞に接種したところ、いずれの固定方法においても残余ウイルスは観察されなかった。

厚生労働科学研究費補助金

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

「ワクチンの品質確保のための国家検定制度の抜本的改正に関する研究」

分担研究報告書

分担研究課題：国家検定の意義「ロタリックス最終小分け製品に含まれる
quasispecies」

研究分担者：脇田隆字（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究協力者：片山和彦、戸高玲子（国立感染症研究所ウイルス第二部第一室）

研究要旨：経口弱毒生単価ロタウイルスワクチン（製品名：ロタリックス）の品質は、国家検定において最終小分け製品中に含まれる感染性ウイルスのタイターを MA104 細胞を用いて測定することで確認している。しかし、生ワクチンは、ワクチン生産工程における細胞を用いた増殖工程において、quasispecies が発生し、品質の変化が起きる可能性がある。本研究では、次世代シーケンサー（NGS）を用いて最終小分け製品のゲノム全長塩基配列解析を行い、quasispecies の検出を試みた。その結果、NSP1 に 1 箇所と同義置換、NSP5 に 1 箇所の非同義置換、VP2 に 1 箇所と同義置換、VP3 に 3 箇所の非同義置換、VP4 に 1 箇所と同義置換、2 箇所の非同義置換、VP7 に 1 箇所非同義置換が認められた。遺伝子座位当たり変異率は 0.09% - 54.93%であった。しかし、今後、NGS を用いたディープシーケンスによる生ワクチンの品質管試験が可能であるか否かについては、NGS システムの評価を含めた、さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

経口弱毒生単価ロタウイルスワクチン（製品名：ロタリックス）の品質は、国家検定において最終小分け製品中に含まれる感染性ウイルスの感染力価を MA104 細胞によって測定することで確認している。生ワクチンは、ワクチン生産における細胞を用いた増殖工程において、quasispecies が発生し、品質の変化が起きる可能性がある。

しかし、ロタリックスの品質管理試験、国家検定においては、11 セグメントのゲノムに点在するポイントミューテーションの確認は行われていない。本研究では、次世代シーケンサー（NGS）を用いて最終小分け製品のゲノム全長塩基配列解析を行い、quasispecies の検出を試みた。

B. 研究方法

材料:国家検定に合格した市販ワクチン“ロタリックス”を購入して用いた。

方法:

<サンプル調製>

ロタリックスより、超遠心によりロタウイルスワクチン株を沈降させて得たペレットより、RNA を抽出精製した。精製した RNA は、NEB Next Ultra によって cDNA ライブラリーを調整し、メーカーのプロトコールに従って次世代シーケンサー (NGS) 用サンプル調製を行った。

<NGS>

イルミナ社 MiSeq のシーケンスキット version 2 300cycles を用いて片側 150 サイクルの双方向シーケンスを行った。

<データ解析>

MiSeq から出力されたデータは、CLC 社 Genomics Workbench にて解析した。ロタリックスワクチン株のスタンダード配列は、データベース上に公開されていない。そこで、基準配列には典型的な G1P[8] 遺伝子型である Wa 株を用いた。MiSeq のリードは、Wa 株の VP1, 2, 3, 4, 6, 7, NSP1, 2, 3, 4, 5(6) の基準配列に Mapping した。Mapping data より、probabilistic Variant detection によって遺伝子座位あたり変異を算出した。

C. 研究結果

<NGS sequence>

総リード数は全ゲノムセグメントに対し、100 万リード以上であった (quality 90% 以上)。probabilistic Variant detection

の結果を表 1 に示した。以下に遺伝子セグメント別に結果を示した。

VP1: Variant を認めなかった。

VP2: 2659nt に C to T の同義置換が 53.9%

VP3: 324nt (C-T) 0.22%, 942nt (T-C) 0.12%, 1843nt (C-T) 0.36% の非同義置換

VP4 : 1103nt (A-G) 54.93%, 1153nt (T-G) 15.65% の非同義置換、1515 (C-T) 0.30% の同義置換

VP6: Variant を認めなかった。

VP7: 620nt (T-C) 0.19% の非同義置換

NSP1: 17nt (A-G) 1.91% の同義置換

NSP2: Variant を認めなかった。

NSP3: Variant を認めなかった。

NSP4: Variant を認めなかった。

NSP5 (6): 278nt (G-T) 0.08% の非同義置換

これらの内、1%以上の非同義置換は、VP4 に認められた 1103nt (A-G) 54.93%, 1153nt (T-G) 15.65% の 2 箇所のみであった。これらの変異は同一リード上に存在しておらず、それぞれが異なるリードから検出された。その他の 1%以下の塩基置換についても、独立したリードから検出されており、互いに関連性は無く独立した変異であった。

D. 考察

近年、次世代シーケンス法の登場により、1%以下の点突然変異を有する quasispecies が検出できるようになり、弱毒化生ポリオ

ウイルスワクチンシードに含まれるわずかな変異株のポピュレーションが、ワクチンメーカーのシードウイルスによって異なることが報告された。NGS を用いて行うこのような quasispecies の検査をディープシーケンスといい、生ワクチンの新規品質管理手法として注目されている。

ロタリックスは、弱毒化生ワクチンで有り、マスターシードより Vero 細胞で増幅されたワーキングシードがワクチン製造に用いられている。シードロットシステムによって厳格に管理されたワクチン製造は、その製造工程において生じる遺伝子変異によってウイルスの弱毒性が変化することは無いとされている。さらに、マスターシードに含まれるウイルスがどのような遺伝子配列を有するか否かについては、従来より用いられている方法で確認されている。本研究では、市販のロタリックスに NGS を用いたディープシーケンスを行い、ワクチンに含まれる quasispecies の検出を試みた。ディープシーケンスで得られたリードを、Wa 株のゲノム塩基配列にアライメントし、Wa 株との違いを調べたところ、ゲノムの 10 箇所の変異のうち、同義置換は 3 箇所であり、残り 7 箇所はアミノ酸置換を伴う非同義置換であった。特に VP4 に検出された 1% 以上の非同義置換は、同一リード上に存在しておらず、それぞれが異なる粒子から放出された VP4 セグメント上に存在していると考えられた。その他の 1% 以下の塩基置換についても、同様に、互いに関連性の無い

独立した変異であり、別々のウイルス粒子に由来する遺伝子セグメントであることが示唆された。以上のことから、市販ワクチンには、quasispecies が含まれていることが示唆された。これらの変異箇所は、ロタリックスワクチン株固有の弱毒化に関するアミノ酸変異とは異なっており、ワクチン株の強毒化リバータント出現は認めなかった。しかし、VP4 蛋白質コード領域に 1103nt (A-G) 54.93%, 1153nt (T-G) 15.65% の非同義置換が認められたことは、興味深い結果である。今後、幾つかの市販ロットを購入し、NGS を用いたディープシーケンスによって調べることで、最終製品の品質の安定性をモニターすることが可能となるかもしれない。一方、NGS は、通常のサンガーシーケンスと比較して、シーケンスシステムのエラー率が高いことが知られている。現在のシステムは、この不安定さをリードの数によってカバーするようにデザインされているが、その評価にあたっては、十分な検討が必要である。

E. 結論

次世代シーケンサー (NGS) を用いて最終小分け製品のゲノム全長塩基配列解析を行い、quasispecies の検出を試みた。その結果、NSP1 に 1 箇所の同義置換、NSP5 に 1 箇所の非同義置換、VP2 に 1 箇所の同義置換、VP3 に 3 箇所の非同義置換、VP4 に 1 箇所の同義置換、2 箇所の非同義置換、VP7 に 1 箇所の非同義置換が認められた。遺伝子座位当たり変異率は 0.09% - 54.93% であった。し

かし、今後、NGS を用いたディープシーケ
ンスによる生ワクチンの品質管試験が可能
であるか否かについては、NGS システムの
評価を含めた、さらなる検討が必要である。

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 研究発表

表 1 . Rotarix MiSeq sequence ; probabilistic variant detection

Mapping	Reference Position	Type	Reference	Allele	Frequency	Forward/reverse balance	S or NS*
VP2	2659	SNV	C	T	53.90693591	0.171428571	S
VP3	324	SNV	C	T	0.217391304	0.47567175	NS
VP3	942	SNV	T	C	0.12195122	0.474969475	NS
VP3	1843	SNV	C	T	0.36101083	0.467391304	NS
VP4	1103	SNV	A	G	54.92957746	0.44375	NS
VP4	1153	SNV	T	G	15.65217391	0.412371134	NS
VP4	1515	SNV	C	T	0.304878049	0.412844037	S
VP7	620	SNV	T	C	0.194741967	0.451707317	NS
NSP1	17	SNV	A	G	1.914580265	0.174174174	S
NSP5	278	SNV	G	T	0.087412587	0.427821522	NS

* Synonymous; S, Non synonymous; NS

厚生労働科学研究費補助金
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
「ワクチンの品質確保のための国家検定制度の抜本的改正に関する研究」

分担研究報告書

血液製剤における SLP 導入に向けた国際調査結果
ドイツ Paul Ehrlich Institut (PEI) 調査報告

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長
研究協力者 水上拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

生物学的製剤のロットリリースに関しては、指定された検定機関（国立感染症研究所）において検定基準に従って国家検定がなされた後、ロットリリースされることが薬事法第 43 条で規定されている。平成 23 年 7 月 4 日に薬事法施行規則の一部が改正され、ワクチンのロットリリースにおける SLP（サマリーロットプロトコール）審査制度の導入が開始されたが、血液製剤は本改正の対象とはなっていない。そこで、本研究課題では、欧州、特にドイツの Paul Ehrlich Institut (PEI)における血液製剤の SLP 審査について調査し、ドイツにおける血液製剤の安全性確保に関するシステムを比較し、日本の取るべき道について考察することを目的とした。

調査の結果、欧州において実施されている血液製剤の SLP 審査は OCABR の Guideline に記載されている程度で非常に簡略に作成されており、本邦においても十分に運用可能なレベルであると考えられた。試験結果に関しても、本邦では試験条件や材料などの詳細な記載を求めているが、欧州では試験結果の可否のみのものも少なくなく、簡素化されている。

ただし、ドイツでは SLP 審査は 2014 年 1 月より完全電子申請・判定に移行するという事になっており、事務作業の軽減・簡易ミス軽減も含めて、SLP 審査と検定試験に集中できる環境が整っている事は注目に値する。本邦において SLP を導入する場合も、出来るだけシステム化し、製造販売業社・国家検定機関の単純な事務作業が増えないような努力をするべきであると考えられる。

A. 研究目的

生物学的製剤のロットリリースに関しては、指定された検定機関（国立感染症研究所）において検定基準に従って国家検定がなされた後、ロットリリースされることが薬事法第 43 条で規定されている。平成 23 年 7 月 4 日に薬事法施行規則の一部が改正され、ワクチンのロットリリースにおける SLP（サマリーロットプロトコール）審査制度の導入が開始された。本改正はワクチンについてのみ適用され、同じく生物学的製剤に分類されている血液製剤は本改正の対象とはなっていない。そこで、本研究課題では、欧州、特にドイツの Paul Ehrlich Institut (PEI)における血液製剤の

SLP 審査について調査し、ドイツにおける血液製剤の安全性確保に関するシステムを比較し、日本の取るべき道について考察することを目的とした。

B. 研究方法

2013 年 11 月 20 日にドイツ連邦共和国ヘッセン州オッフエンバッハ郡ランゲン（ヘッセン）(Langen (Hessen))にある Paul-Ehrlich-Institut (PEI)に訪問し、血液製剤の担当部署である Division of Hematology/ Transfusion, Batch Release Blood Products, Logistics の Dr. Uwe Unkelbach を訪問し、ドイツにおける血液製剤の

ロットリリース制度について聞き取り調査を行うと共に、実際の SLP や検査施設の見学を行った。調査に関しては、欧米におけるロットリリースの現状調査班に付随して行い、事前に当該分野における質問事項を郵送し、回答してもらうと共に、いくつかの点について聞き取り調査を実施した。

倫理面への配慮

制度に関する聞き取り調査であることもあり、倫理面での配慮は特に必要が無いと考えられる。

C. 研究結果

1. ドイツにおける血液製剤の安全性確保

ドイツでは血液製剤による HIV 感染の発生を社会問題として重要視し、Paul Ehrlich Institut (PEI) が血液製剤のロットリリースについて大きな責任を負う事となった。特に大きな特徴は、原料血漿に関し、すべてのロットに対して核酸増幅検査 (NAT: Nucleic acid-amplification testing) や抗体スクリーニングを実施している点と言える。本邦では国家検定機関である国立感染症研究所では品質管理試験は行っているが、原料血漿の抗体スクリーニング・NAT は行っていない。一方、ロットリリースに関わる品質管理試験に関しては、日本と同様に OCABR (Official Control Authority Batch Release Procedure) の Guideline に従って厳密に実施されていた。年間平均 1,500 件 (免疫グロブリンを除く) が SLP 審査されている。また原料血漿の抗体スクリーニング・NAT に関しては年間平均 2,000 件が実施されている。

また、ドイツでは製造から市場までの流通の時間が非常に重要視されていることもあり、血液製剤に関してはほとんどのロットで併行検定が実施されている。つまり、Batch Release の申請の段階では製造販売業社の自家試験結果は一部しか添付されていない。その為、検定による不合格あるいは、取り下げの件数は非常に多く、過去の 10 年間でみると、年平均 11 件 (0.6%) の不合格・

取り下げがあった。ただし、殆どのものは力価不足等に起因するもので、品質に関する問題は殆どない。また、SLP 審査による不合格・取り下げも殆どなかった。一方、併行検定を実施していることもあり、申請から合格判定に至る期間は非常に短く、実際の事務処理期間は 60 日であるにも関わらず、殆どの製剤では 5~8 日で判定がなされていた。

2. OCABR (Official Control Authority Batch Release Procedure) の仕組み

欧州ではワクチン・血液製剤の Batch release に関し、定められた検定試験を OMCL (Network of Official Medicines Control Laboratories) ネットワークの何れかの一機関が実施すれば欧州圏内での製造・販売が可能となる OCABR (Official Control Authority Batch Release Procedure) システムを運用している。OCABR は現在、28 の EU メンバー、EEA に加え、特別に合意をした国 (Switzerland や Israel) に限定されているが、近年、Canada や Singapore がオブザーバー参加するなど、ネットワークに入る国が増加している。OMCL ネットワーク内では試験成績が Test report という形で共有されており、すべてのロットの合格・不合格・取り下げの結果が共有されている。リクエストすれば、詳細な試験データを共有することも可能である。また、不合格・取り下げがあった場合、その国で GMP 査察が実施されるが、それらの情報も共有され、特に不合格となったロットに関しては、廃棄・破壊されたことが相互に確認され、欧州内で流通しないようなシステムが徹底されている。OMCL で実施する試験項目や SLP の書式については、OCABR の Guideline (www.edqm.eu/en/Human-OCABR-Guidelines-1530.html) に示されているが、新規製剤や特殊な場合は、MA (Marketing Authorization) 申請の段階で協議しながら SLP の書式についても検討する事となっている。

3. 血液製剤に関する SLP

現在、血液製剤の中で、OCABR で書式が決まっている製剤は、Clotting Factor Concentrates, Plasma Inhibitor Concentrates and Fibrin Sealants, Human Albumin, Human Immunoglobulin, Human Plasma (pooled and treated for virus inactivation) formerly Solvent-Detergent (SD) Plasma, Protocol for Approval of Plasma Pools である。これらの SLP は書式だけでは A4 4 枚程度のものであるが、実際に審査されている SLP も試験結果を含めても 10 ページ前後と、非常に簡素化されたものとなっている。また、製造工程に関する記録等は殆ど含まれておらず、基本的には各段階の製剤の保存温度程度に限られている。その他には原料血漿・中間段階・最終段階におけるいくつかの規格試験結果等で構成されている。本邦では、各試験成績書に関し、試験条件や試薬のロット、有効期限など、非常に詳細な報告を自家試験に求めているが、OCABR の Guideline では試験に適合か否か程度の確認のみがなされており、非常にシンプルな構成となっている。SLP だけでは単純には比較できないが、本邦で行っている自家試験の審査は欧州で行っている SLP 審査と比べても引けを取らない所か、それ以上に試験内容に踏み込んで審査していると考えられる。よって、本邦で SLP を導入する際は、承認規格書を精査した上で、必要な製造工程の情報に加え、現状の自家試験に若干の追加記載を要求する程度で実現が可能であると考えられる。

ただし、SLP の審査はドイツでは既に電子媒体でなされており、調査時の 2013 年 11 月の時点では入力専門スタッフが PDF・紙媒体の申請書を入力し、システム上で判定できるようになっていた。2014 年 1 月より完全電子申請・判定に変わることになっており、誤字脱字の訂正や転記ミス、単純な計算ミスなどが起こらないような体制が構築されているのは注目に値する。

D. 考察

本研究課題では、欧州の SLP 審査の現状を鑑みて本邦における血液製剤の SLP 導入に関しての提言を行うものである。調査の結果、欧州において実施されている血液製剤の SLP 審査は OCABR の Guideline に規定されているもの程度で非常に簡略に作成されており、本邦においても十分に運用可能なレベルであると考えられる。

試験結果に関しても、本邦では試験条件や材料について詳細な記載を求めているが、欧州では試験結果の可否のみのものが少なくない。ただし、ドイツでは SLP の審査は 2014 年 1 月より完全電子申請・判定に移行するというようになっており、事務作業の軽減・簡易ミスの軽減も含めて、SLP 審査と検定試験に集中できる環境が整っている事は注目に値する。

本邦において SLP を導入する場合も、出来るだけシステム化し、製造販売会社・国家検定機関の単純な事務作業が増えないような努力をするべきであると考えられる。

E. 結論

血液製剤の SLP に関しては、欧州と同等か、それ以上の審査が本邦においてもなされており、製造工程に関する情報を加える事で、十分に運用可能なレベルであると考えられる。ただし、その際は、電子申請を可能にする等、誤字脱字や計算ミスなど、単純なミスや事務作業の増加を防ぎ、審査官が製剤の内容に関して詳細に検討できるような体制を構築する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takizawa K*, Nakashima T*, Mizukami T*,

Kuramitsu M, Endoh D, Kawauchi S, Sasaki K, Momose H, Kiba Y, Mizutani T, Furuta RA, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Degenerate polymerase chain reaction strategy with DNA microarray for detection of multiple and various subtypes of virus during blood screening. *Transfusion*. 2013; 53: 2545-55. *Equally contributed

2. Odaka C, Kato H, Otsubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneichi M, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H, Momose SY, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan: a pilot study. *Transfus Apher Sci*. 2013; 48: 95-102.

3. Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, Fukui K. Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. *J Biosci Bioeng*. 2013;115:104-10.

2. 学会発表

水上 拓郎, ワクチンの安全性について 第139回レギュラトリーサイエンスエキスパート研修会：ワクチン接種後のデータ収集とその活用についてー現状と期待ー 2013年7月9日 日本薬学会会長井記念館

K Nojima, T Mizukami, R Sobata, C Matsumoto, M Kuramitsu, K Okuma, M Satake, K Tadokoro, K Yamaguchi, I Hamaguchi. Development of an

Effective Prevention Method for T-cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-1) Infection Using HTLV-1 Sero- Positive Serum *in vitro*, **The AABB Annual Meeting & CTTXPO 2013**, Colorado, 12-15 October, 2013 (米国輸血学会)

G. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 実用新案登録
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金
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
「ワクチンの品質確保のための国家検定制度の抜本的改正に関する研究」

分担研究報告書

狂犬病ワクチン国家検定制度における動物愛護および
検定合理化の観点からの試験方法の見直し

研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部・部長）

研究協力者：伊藤睦代（国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官）

林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部・室長）

研究要旨：ワクチンの品質、有効性および安全性を確保する上で国家検定試験は必要不可欠である。生物製剤であるワクチンの検定試験には実験動物が用いられる試験が多い。しかしながら、近年国際的には動物愛護の観点からこれらの試験についても見直しが必要とされている。また、製造・試験記録等要約書（SLP）導入に伴い、国家検定の合理化が検討されている。私たちはこれまで乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの安全性を確認するための不活化試験において、動物を使用しない *in vitro* 試験法を開発してきた。この *in vitro* 試験法は現行法に比べ、約 5 倍の感度を持つことが明らかにされている。そこで、本年度はこの *in vitro* 試験法についてさらに解析し、本試験は製品 1 本あたり 1 個以上の感染性ウイルスの混入を検出できることが明らかにされた。また、コスト面でも利点があり検定試験の合理化が期待できることが示唆された。狂犬病ワクチンの *in vitro* 不活化試験法についての詳細な報告はこれまでになく、この方法が各国で取り入れられることも期待される。今後さらに実用化に向けた取り組みが必要である。

A. 研究目的

国立感染症研究所ではワクチンの有効性と安全性及び均質性を保証するため、生物学的製剤基準に基づいた国家検定を全ロットに対して実施している。その試験法はワクチンの特性から、動物が使用される試験が多い。しかしながら、近年世界的に動物愛護の観点からこれらの試験は、動物を使用しない検定を実施する方向に見直されつつある。日本において

も平成 18 年に「実験動物の使用及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」が告示されており、この基準の適用は国家検定などの生物学的製剤に関する利用においても例外ではない。

乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの国家検定においては、異常毒性否定試験、不活化試験および力価試験に動物（マウス）が使用されている。このうち狂犬病ウイルスが不活化されていることを確認

する不活化試験では、1ロットにつき30匹以上の哺乳マウスを用いることとされており、試験ワクチン原液を哺乳マウス脳内接種し、3週間狂犬病ウイルス固定毒株による感染死または感染症状を示さなければ合格と判定される。実際には輸送ストレス、哺乳不足および食殺による死亡が起こることを考慮して、通常40～50匹の哺乳マウスを一回の試験に供する必要がある。製造所では、小分け製品に加え各不活化ウイルス浮遊液においても試験を行うため、1ロットに使用する哺乳マウス数は500匹に達する。

世界保健機構（WHO）のガイドラインおよび欧州薬局方（EP）では、狂犬病ワクチンの不活化試験として培養細胞を用いた代替試験法を使用しても良いとなっているものの、具体的な試験法については1報（ドイツ語）を除いて報告がなく、世界的に哺乳マウスによる試験法が採用されているのが現状である。

私たちはこれまで、哺乳マウスに替えて培養細胞を使用した *in vitro* 試験法を開発してきた。その結果、現行の哺乳マウスを用いる試験法に比べ、約5倍の感度を持つ *in vitro* 試験法を開発した（H21-医薬・一般-01・平成22年度報告書参照）。この方法は試験期間および簡便性においても従来法より優れている。そこで今回バリデーション指針に基づいて、*in vitro* 試験法の検出限界について10回の試験を行って算出した。また、試験実施にかかるコストについても検討を行った。

B. 研究方法

1) ウイルス：日本のヒト用狂犬病ワクチ

ン製造株である HEP-Flury 株を mouse neuroblastoma 由来の Neuro-2a 細胞で増殖させたストックウイルスを用いた。

2) ワクチン：乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン（化学及血清療法研究所）を使用した。添付の説明書に従い注射用水 1 ml にて溶解してワクチン原液とした。

3) 細胞：Neuro-2a 細胞を用いた。培養には 10%FBS を含む D-MEM を使用した。ウイルス接種時の培養には 2%FBS 含有 D-MEM を使用した。

4) 直接蛍光抗体法（DIFA）：培養後の細胞の上清を除き、紫外線点灯下で 80% のアセトンを用いて 20 分間固定した。固定後の細胞は使用まで -20°C に保存した。狂犬病ウイルス感染細胞の検出は蛍光抗体法によった。200 倍希釈された FITC 標識 Anti Rabies monoclonal globulin

（FUJIREBIO）により染色し、蛍光顕微鏡（OLYMPUS）を用いて観察した。

5) *in vitro* 試験法における検出限界の算定：10 ml の培養液にそれぞれ 0.008、0.016、0.031、0.063、および 0.125 フォーカス形成単位（ffu）/well になるように 2 倍段階希釈したウイルスをスパイクしたワクチン原液 2 ml を加えた。96 well 培養プレートに播種した Neuro-2a 細胞の上清を除き、上記混合液を各 well につき 120 μ l ずつ分注した。72 時間 35°C で培養し、その後上清 50 μ l を新しく Neuro-2a 細胞を播種した 96 well プレートに移し、さらに 72 時間 35°C で培養した。DIFA によりウイルス抗原を検出した。上記試験を 10 回繰り返して行い、International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal