

欧州や米国で使用している Release Protocol に記載されている以上の情報が求められて、その情報入手するために手間取った。(2) 感染研の担当室により SLP へ記載する情報の要求度が異なっていた。(3) 様式の見せ方が異なり、また、使用言語が日本語のみのため、間違いないように転記するのに多くの時間と注意を要する。(4) 自家試験を参考に出していた時代に比べて照会頻度が多くなり、かつ、SLP 審査制度導入前には無かったような照会があるようになった。(5) 照会事項が増えて合格通知までの時間が長くなった。(6) 一変承認と SLP 様式の変更、出荷判定時期の関係が難しくなっている。

#### Asian-Lab Net

平成 27 年 9 月に韓国の NIFDS が主催してインド、インドネシア、タイ、台湾、日本のワクチン国家検定機関が参加して、検定試験手法と標準品についての第一回会議が開かれた。ワクチンや血液製剤等の特性、製法、試験等を示した公開された文書として日本には生物学的製剤基準があるが、韓国、台湾にも同様の公定書があることが示された。SLP 様式について、タイとインドネシアについては英語版でも審査を受け付けていた。台湾は、海外輸入品については英語版を受け付けていた。国家検定で行う試験の設定については、国や製剤により様々であった。韓国は、製品の品質リスクにより試験の設定を代えられる様な枠組みを 2016 年 4 月から取り入れる計画であった。

#### リスク評価方法の検討:他国の事例から

韓国の様に、品質のリスクを評価し、その評価に応じて国家検定で行う試験の設定を変えるという仕組みは、米国 FDA、カナダ Health Canada でも実施されている。米国の場合、リスク評価の中身並びに試験の実施に関する情報は公開されていない。一方、Health Canada では、かなりの部分が公開されている。Health Canada を訪問したときの情報（厚生労働科学研究 医薬品・医療機器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 [渡邊治雄 代表（平成 24 年度～平成 26 年度）]」によると、カナダの製造販売承認後のロットリリースは、以下の 3 つのグループに分けられて実施されている。

グループ 2：SLP 審査+毎ロット試験

グループ 3：SLP 審査+任意頻度での試験

グループ 4：届出+定期的な試験

注(グループ 1 は臨床治験用のロットなので、ロットリリースからは省いた)

ワクチンについては、グループ 4 に属する品目はないが、一方、血液製剤の中には（恐らく組換え製剤）、グループ 4 に属するものも存在する。また、製品のグループ分類には、以下の要素が考慮される。

1. Product Indication (適応)
2. Nature of the Product (本質)
3. Production History (製造実績)
4. Inspection History (査察実績)
5. Testing History (試験実績)
6. Post-market Experience (市販後の状況)

### リスク評価方法の検討:他の医薬品から

ワクチン、血液製剤等には、原材料そのもの、あるいは規格試験を生物に委ねている部分があり、純粋に化学では評価できない部分もあるが、CMC 的考え方をそのままあてはめられる部分について、ICH-Q8~10を参考に検討した。その参考点は以下の通りである。(1) 製品の品質は、製品になってから検証するのではなく、設計段階から備わっているべきである。(2) 製品の品質と性能は、効果的で効率的な製造工程の設計を通じて保証される。(3) 製品品質の工程上の規格は、その工程に関わる要因がどう影響しているのかについてのメカニズムの理解に基づいて設定される。(4) リスクの特定、分析、評価等のアセスメントを行う。(5) リスクの低減、あるいは許容等のコントロールを行う。(6) 適正な品質は、一貫した製造工程から生まれる。

CMC 分野ではリスクの評価方法として、二つのパラメーターが使われている。一つが“影響度スコア”で、結果が引き起こすかもしれない重大性に基づいて3段階で表す。重大な危険性をもつものはスコア「25」（たとえば、毎日の活動に医療的な手助けを要する場合）、中等度の危険性をもつものはスコア「8」（たとえば、日常生活が十分思うようにいかない場合）、軽微な危険性をもつものはスコア「2」（たとえば、何かあったとしても通常起こり得る事の範囲内の場合）とする。もう一つが“曖昧性スコア”で、5段階で表す。非常に高いものはスコア「5」（たとえば、まったく情報の無い場合）とする。次に高いものはスコア「4」（論

文等による外部での知見のみある場合）とする。中程度のものはスコア「3」（自らの非臨床あるいは、臨床試験結果がある場合、あるいは似た様な製剤から外挿できそうな場合）、低程度のものはスコア「2」（論文等による外部での知見のみある場合）、最後に軽微のものは「1」（既に広く許容量の認められている場合）とした。この影響度スコア”と”曖昧性スコア”の二つを評価したい物ごとに評点し、その積を算出する。積が2~10までの場合は、危険度は低いが、16~24はやや高い、25~125は高いと判断する方式が示された(表)。

		曖昧性スコア				
		1	2	3	4	5
危険性スコア	2	2	4	6	8	10
	8	8	16	24	32	40
	25	25	50	75	100	125

【表】リスク評価

### D. 考察

#### SLP 審査導入による変化

SLP 審査の本格導入直前の平成 24 年度は 7.9% (検定件数 98/1,240 件) が”単純”に事務処理期間を超過していた<補足:c. 研究結果の欄参照、標準的事務処理期間にはいくつかカウントしない項目がある。この項目に要した日数を減じた日数が”純粋な”標準的事務処理期間となる。ここでは減じる前の日数を”単純”事務処理日数と表現した>。一方、本格導入された一年目の平成 25 年度では 10.7% (検定件数 109/1,014 件) に増加した。平成 25 年度に業界団体が行ったアンケートでも、「自家試験を参考に出していた時代に比べて照会頻度が多くなり、かつ、SLP 審査制導入前には無かったような照会

があるようになった。」「照会事項が増えて合格通知までの時間が長くなった。」という回答がなされており、自家試験記録を参照していたときに比べて、多くの時間が感染研と業界側双方で割かれるようになったことが判る。この数字は、翌平成 26 年度は 6.8% (65/957 件) と減少したことから、SLP 審査の習熟により、感染研と業界側双方で比較的スムーズに進められるようになったと解釈された。

### SLP 審査導入後の国家検定に関する検討

SLP 審査が進み、多くの製剤のロット毎の製造工程のパラメーターの蓄積が進み、製品への理解が増えてきている。これらの理解をどのように役立てるかについて考えてみた。現在、我が国は、すべてのロットに対して試験を含む検定を行っている。欧州も同様である。一方、米国、カナダ、中国、韓国は、すべてのロットではなく、製品の安定性に基いた自国のリスク判断により、国家検定で行う試験の頻度を柔軟なものにし、SLP 審査のみで検定を終える製剤も存在している。

自国に公的医薬品試験検査機関が無く、国の関与としては SLP 審査しかできないという国々も存在するが、国に試験能力があるにもかかわらず試験しないのは、どのような利点があるのかを考えてみた。(1) 検定にかかる試験期間を短縮し、市場に製品をより迅速に供給し得る。(2) 検定にかかる試験期間が短縮されると、製造販売業者の製造スケジュールの自由度があがる。(3) 検定にかかる試験費用を節約し、市場に製

品をより安価で供給し得る。(4) 国家検定を行う側の人、設備機器、時間を別の目的に使える。短所としては、長所の反対に加えて、(5) 国家検定にかかる人材を育成したのに、その能力がその場で活かさない。(6) もしもの時に仮に試験をしていたら、品質不良をみつけられていたかもしれない等がある。

わが国で SLP 審査が開始された事により、検定実施側(感染研)は今までの自家試験記録では知り得なかった製造記録の要約が見られる様になり、製造段階の工程の安定性、製剤品質の均一性の部分までロット毎に確認できるようになった。従来でも感染研は製品の均質性、安定性が優れており製造販売側と検定実施側で独立して二回の試験を行う必要が無いと判断するに至った場合には、その試験項目を国家検定から削減する取り組みをしてきた。しかし、今後は SLP 審査も活用して、より適切な試験項目のあり方について考えることが可能になった。

試験のあり方については、製品品質のリスク評価を行い、SLP 審査だけで国家検定を行うものから、試験を残すものの 0% から 100%の適当な頻度で行うといった形が考えられる。そのためには、総合的なリスク評価方法の確立が必要である。たとえば、以下のようなリスク評価項目をワクチン製品別に提案できるだろう。

1. 製剤の適用対象(対象年齢、使用期間、健康状態、定期接種か任意接種か)
2. 製剤の本質(原材料、アジュバント、抗原精製度)
3. 製剤の製造工程(工程の複雑さ、工程の頑健性、工程内試験の信頼性)

4. 製剤の製造実績（製造再現性、不良ロット出現率、再調製ロット率）
5. 製剤の品質試験（国家検定試験との一致性、再試験率、試験の再現性）
6. 製剤の市場情報（副作用報告、市場回収、有効性）
7. 製剤製造施設の GMP 調査評価（施設検査、QMS 調査、書類調査）

これらの項目について、独自のスコア付け試案を載せた（図）。このうち、4. 製剤の製造実績（製造再現性、不良ロット出現率、再調製ロット率）について少し考察しよう。国内製造、国内販売のみのワクチンであれば、たとえば SLP 審査時に欠番を見つけたとすれば、感染研は製造販売業者の自家試験で不良があったのか否かを照会することができる。国産ワクチンの品質の連続性は十分に知り得ることにある。一方、海外の輸入ワクチンは、必ずしも日本向け専用ロットがあるわけではないので、検定に出されるロット番号は必ずしも連続していない。欠番が製造不良だったために生じたのか、他国向けに使われたために生じたのかの判断ができないのである。この点で、海外の輸入ワクチンは SLP 審査だけでは、製造全体の再現性を十分に評価できない。カナダではこの点を補う為に Yearly Report（年間報告）の提出を求めており、この手法は、わが国も参考にすべきである。

また、6. 製剤の市場情報（副作用報告、市場回収、有効性）については、医薬品医療機器総合機構（以下 PMDA）に集められるワクチン接種後の副反応情報が、感染研にも提供されるようになっており、これらの副反応情報の利用方法の一つとして製品の

リスク評価方法をより具体化させることができるだろう。

最後に、7. 製剤製造施設の GMP 調査評価（施設検査、GQP 調査、書類調査）についてであるが、GMP 適合性調査は承認要件が守られているか否かを確かめる重要な QMS 上の行為である。しかし、GMP 調査は、PMDA と厚生労働省監視指導・麻薬対策課が行うものであり、GMP 調査結果が感染研と共有されることは、今の三者の枠組みの中では行われていない。今後、ワクチンの品質リスク評価を行う上では、なんらかの形で PMDA、監視指導・麻薬対策課と感染研の連携を考えていくべきだろう。

SLP 審査で製造の現場を知らない者が審査を行うことは、大事な点がどこにあるのかを理解しないで、ただ単純に数字や文字を追う作業になりがちである。SLP 審査の意義を高めるには製造現場を知り、見る目を養うことが必要であり、そういった意味では、製造現場を実際に調査する GMP 調査と SLP 審査の連携は大切であると思われる。一方、こうした考えに対して、PMDA、監視指導・麻薬対策課側では、GMP 調査を迅速かつ適切に行うためには限られた専門家に任せて任務に集中させたいという考えがある。加えて製造販売業者側にも GMP 調査中は多忙であるので、単純に製造現場を知りたいという目的での同伴よりも、別の機会を設けての訪問が望ましいとの意見もある。製造販売業者、感染研、PMDA、監視指導・麻薬対策課の連携、あるいは情報共有によって解決しなければならない。

## SLP 審査制度の拡大についての検討

予防用ワクチンについては平成 24 年 10 月より、SLP 審査が国家検定として本格導入された。これは、WHO がまとめたワクチンのロットリリースガイドラインに沿う形であったことはすでに述べた通りである。しかし、国家検定に占める予防用ワクチンの割合はおよそ半分であり、残り半分を占める血液製剤は、従来通りの自家試験記録を参照にして試験結果で判定を行う方式を続けている。ワクチンでは SLP 審査が始まることにより、本報告書にまとめた通り、製剤の製造工程のパラメーター情報をロットごとに蓄積することができ、製品に対する理解を背景に製品の品質リスクを検討しやすい状況が生まれている。

詳細は、浜口分担研究者の報告書に委ねるが、血液製剤の安心と安全を高めていくためにも、SLP 審査制度導入を目指して道筋を作っていくことが重要である。〈謝辞〉医薬品・医療機器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（渡邊治雄 代表）」（平成 24 年度～平成 26 年度）で平成 26 年と 27 年に行ったシンポジウムの企画、実行、総括に渡って一貫して絶大なるご協力をいただいた日本ワクチン産業協会、日本製薬工業協会、EFPIA Japan、PhRMA の幹事の方々に感謝申し上げます。

ます。本報告書に用いた SLP アンケートはその時に集計されたものを利用した。

## E. 結論

WHO はロットリリース手順の国際化、証明制度の共通化がワクチン価格の抑制とワクチンの品質確保並びに、ワクチンの迅速供給に重要と考えて推進している。わが国は平成 24 年 10 月から SLP 審査を運用し、3 年余が経過した。SLP 審査を通して多くの製剤の製造工程のパラメーターの蓄積が進み、製品に対する理解が増えてきている。この深まりに合わせて、ワクチンの品質リスクを評価する手法を確立し、その手法を用いて検定試験項目の必要性、全ロット試験の見直しを検討する段階になった。

## F. 研究発表

1. 論文発表 なし
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

【図】

## 日本にリスク評価システムを導入するとしたら

	1. 製剤の適応対象	2. 製剤の本質	3. 製剤の製造工程	4. 製剤の製造実績	5. 製剤の品質試験	6. 製剤の市場情報	7. 製剤製造施設のGMP調査評価
項目	対象年齢 1. 乳幼児(0-7歳) 2. 高齢者(65歳以上) 0. その他	原材料 0. 組替製剤 0. ペプチド 1. 不活化 2. 弱毒生	工程の複雑さ 0. 単純 1. 精製操作 2. ろ過操作 3. 凍結乾燥	製造再現性 0. 10/10以上 1. 9/10以下	国家検定試験との一致性 0. 高い 1. 低い	副作用報告 0. 平均5/10万dose以下 1. その他	施設検査 0. 施設に指摘事項無し 1. 施設に軽微指摘有り 2. 施設に指摘有り
	使用期間 1. 1回 2. 2-4回 3. それ以上	アジュバント 0. 非含有 1. アルミ 2. その他	工程の頑健性 0. 担保済み 1. 未担保	不良ロット出現率 0. 1/20以下 1. 2/20以上	再試験率 0. 1/20以下 1. 2/20以上	市場回収 0. 0件/30ロット 1. その他	QMS調査 0. QMSに指摘事項無し 1. QMSに軽微指摘有り 2. QMSに指摘有り
	健康状態 0. 健常人 1. その他	抗原精製度 0. 90%以上 1. その他	工程内試験の信頼性 0. 単純明快 1. 複雑明快 2. その他	再調整ロット率 0. 1/20以下 1. 2/20以上	試験の再現性 0. 高い 1. 低い	有効性 0. 常温安定 1. その他	書類調査 0. QMSに指摘事項無し 1. QMSに軽微指摘有り 2. QMSに指摘有り
	0 ~ 6	0 ~ 5	0 ~ 6	0 ~ 3	0 ~ 3	0 ~ 3	0 ~ 3

たとえば、項目1から7までのリスク評価スコアの合計が  
 0~7 SLP審査のみ、 8~x SLP審査+任意頻度試験、 x~29 SLP審査+毎ロット試験

【資料】

Asia Lab-Net Closed Meeting (Sep. 8, Tue, 2015)

	Australia	India	Indonesia	Japan	Korea	Taiwan	Thailand
Vaccine producing country	○	○	○	○	○	○	○
Vaccine procuring country	x	x	x	x	x	x	x
Biologics lot release	○	○	○	○	○	○	○
SP review	○	○	○	○	○	○	○
Lab testing	○	○	○	○	○	○	○
Risk-based lot release system	○	○	○	x	○ (From Apr. 2016)	○	x
International collaborative study (Standard)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Regional St for live chimeric JE vaccine</li> <li>EDQM - BSP129 study - establishment of a replacement batch of the bordetella pertussis mouse antiserum BRP</li> </ul>	Refer ppt	<ol style="list-style-type: none"> <li>Tetanus vaccine-NIBSC (2010)</li> <li>Oral Poliomyelitis Vaccine-NIBSC (2011-2012)</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1st WHO IS for Mycoplasma DNA for NAT - PEI</li> <li>1st WHO RR of BCG vaccine (Moreau-RJ sub-strain) - NIBSC</li> <li>5th WHO IS for HCV RNA for NAT - NIBSC</li> <li>1st WHO IRP for Hepatitis E Virus RNA Genotypes for NAT - PEI</li> <li>1st WHO IRP for anti-HTLV-I/II - NIBSC</li> <li>3rd WHO IS for HBsAg - NIBSC</li> <li>3rd WHO IS for Diphtheria Toxoid for use in Flocculation Test - NIBSC</li> <li>1st WHO IS for anti-EV71 serum (Human) - NIBSC&amp;NIFDC</li> <li>5th WHO IS/EP BRP/FDA for Blood Coagulation FIX, Concentrate - NIBSC</li> <li>1st WHO IRP for HIV-1 CRF for NAT - NIBSC</li> <li>2nd WHO IS for HAV for NAT - NIBSC</li> <li>1st WHO IS for HBeAg - PEI</li> <li>1st WHO IS for anti-HBe - PEI</li> <li>3rd WHO IS for Parvovirus B19 for NAT - NIBSC</li> <li>1st WHO IS for HCV Core Antigen - PEI</li> <li>WHO RR for anti-A and anti-B in serum and plasma - NIBSC</li> <li>1st WHO IS for Sabin IPV - NIBSC</li> <li>Regional Standard of Mamushi venom</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>IS for JE chimeric vaccine (Vero, JE YF17D-vectored vaccine) - NIBSC</li> <li>IS for JE inactivated vaccine (Vero, Beijing-1 strain)</li> <li>IS for JE live attenuated vaccine (SA14-14-2 strain)</li> </ol>		<p>pertussis done by Indian NCL, monovalent OPV done by Indonesian NC Land live chimeric JE vaccines done by Thai NCL</p>
International collaborative study (Test method)	None currently	Refer ppt	Hepatitis B vaccine - NIBSC ( <i>in vitro</i> method) (2010-2011)	<ul style="list-style-type: none"> <li>EDQM: Modified CHO cell-based assay for residual toxicity testing of aP vaccines</li> <li>WHO-NIBSC: Standardization of potency test methods of Sabin IPV</li> </ul>			Influenza for SRID by NIBSC (PQ: BCG, OPV, HepB, Rabies vaccines)

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政策研究事業  
ワクチンの品質確保のための国家検定に関する研究

分担研究報告書

バキュロウイルスを用いた狂犬病ウイルス G タンパク質の性状解析

研究分担者 倉根 一郎 国立感染症研究所 所長  
研究協力者 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  
堀谷まどか 国立感染症研究所 ウイルス第一部第三室  
西條 政幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部長

研究要旨：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。RV の G タンパク質（RV-G）は防御免疫応答を惹起する主要抗原である。RV-G タンパク質には宿主受容体との結合および宿主細胞との膜融合の働きが知られており、RV の宿主侵入において重要な働きをもつ。したがって RV-G は重要な薬剤ターゲットになりうる。しかしながらその膜融合メカニズムにおいては未だ不明な点が多い。そこで本研究においてはバキュロウイルス発現系を用いて組換え RV-G タンパク質を作出し、その性状解析を行った。その結果膜貫通領域を欠損した RV-G は細胞膜表面には発現しないにも関わらずその膜融合活性を有することが示された。

**A. 研究目的**

ヒトの狂犬病は狂犬病を発症したイヌ、ネコ、コウモリ等の野生動物による咬傷等を介した狂犬病ウイルス（RV）の感染により発症する急性進行性の神経疾患である。現在でもアジア、アフリカを中心に年間約 55,000 人が感染し、うち約 40%は子供である。狂犬病は、ひとたび発症すると急性に進行し、ほぼ 100%死亡する。日本では 1950 年頃まで年間数十例の患者が報告されていたが、1950 年に狂犬病予防法が施行され、1956 年の患者を最後に国内発生例は報告されていない。しかしながら 1970 年にはネパ

ールからの輸入症例が 1 例、2006 年にはフィリピンからの輸入症例が 2 例報告され、いずれも予後不良であった。したがって海外に渡航した場合は狂犬病の危険性を認識しイヌや野生動物との接触を避け、現地の流行状況や活動範囲などから必要があれば曝露前ワクチンの接種を受けることが勧められている。

狂犬病に対する特異的治療法はないが、狂犬病のイヌと接触した場合、速やかな傷口の石鹼による洗浄および曝露後ワクチンの接種により狂犬病の発症を予防することができる。全世界で毎年 15,000,000 人以



上が暴露後ワクチンを受けており、毎年 327,000 人の狂犬病の発症を防いでいると推定されている。

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)  $\beta$  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 RV 株はヒト患者由来の RV をニワトリ胚初代培養細胞に馴化した HEP-Flury 株である。ところで現行の不活化狂犬病ワクチンは暴露前予防および暴露後予防に有効であるが、多くの地域において暴露後接種による治療法は高コストである。RV の G タンパク質 (RV-G) は防御免疫応答を惹起する主要抗原であり、ウイルス中和抗体を誘導する唯一のタンパク質である。RV-G は三量体を形成し、RV 膜表面にスパイクを形成している。RV は RV-G と宿主細胞受容体との相互作用により結合し、クラスリン介在性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。RV-G はエンドソーム内の低 pH 条件下でフュージョン活性を示し、ウイルス RNA が細胞質内に放出される。RV-G は約 65kDa のタンパク質で N 末端側に細胞外ドメイン続いて膜貫通ドメインさらに C 末端側に細胞内ドメインがコードされている。RV-G には膜貫通領域が存在するためバキュロウイルス、大腸菌、植物発現系において可溶化タンパク質を十分量得ることは難しい。本研究では、バキュロウイルス発現系を用いて細胞外ドメインのみを持つ G タンパク質を作製し、その

細胞融合能および性状を検討した。

## B. 研究方法

**RV-G 発現コンストラクトの作製：**RV HEP-flury 株の G タンパク質の全長に His タグ及び FLAG タグを付加 (RV-GLF) した配列および G タンパク質の細胞外ドメインに His タグ及び FLAG タグを付加 (RV-GSF) した配列 (図 1 A) をトランスファープラスミド pBacPAK9 にクローニングした。

**組換えバキュロウイルスの作製：**RV-G を挿入したトランスファープラスミド (pBacPAK-GLF および-GSF) と BacPAK6 バキュロウイルスベクターを sf9 細胞に共トランスフェクトし、RV-G を発現する組換えバキュロウイルスを作製した。

**組換えタンパク質の発現確認：**組換えタンパク質の発現は抗 His 抗体および抗 RV-G 抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。

**膜融合アッセイ：**RV-GSF および RV-GLF を発現する組換えバキュロウイルスを sf9 細胞に接種し、pH5.5 および pH6.5 の条件下で 3 日間培養し、顕微鏡下で観察した。

## C. 研究結果

**RV-GLF および GSF のクローニング：**RV HEP-flury 株を鋳型として RT-PCR を行い、RV-G の遺伝子を増幅した (図 1 B)。増幅した RV-G 領域はトランスファーベクター pBacPAK9 にクローニングした (pBacPAK-GLF および pBacPAK-GSF)。pBacPAK-G と BacPAK6 バキュロウイルス DNA を sf9 細胞に共トランスフェクトした結果、RV-G を発現する組

換えバキュロウイルスが作出された。

**リコンビナントタンパク質の発現確認：**  
作製したリコンビナントバキュロウイルスを sf9 細胞に接種し、3 日後に回収した。回収後、培養上清と感染細胞を遠心分離法により分取し、それぞれ 1% NP-40 下で処理後 SDS-PAGE および抗 His 抗体 (図 1C) および抗 RV-G 抗体 (data not shown) を用いたウエスタンブロット法によりその発現を確認した。その結果 RV-GLF は約 65 kDa の位置に、RV-GSF は約 52 kDa の位置に観察された。また RV-GLF は培養上清中では観察されなかったのに対し、RV-GSF は培養上清中に分泌された (data not shown)。

**細胞融合アッセイ：**次に RV-GLF および GSF 発現細胞を低 pH 下で処理したところ感染 3 日後に細胞融合による巨細胞が観察された。細胞融合は pH5.5 条件下において RV-GLF (図 2A) 発現細胞よりも RV-GSF 発現細胞 (図 2B) において顕著に認められた。細胞融合は Mock 感染細胞および pH6.5 条件下では観察されなかった (図 2C-F)。

#### D. 考察

本研究によりバキュロウイルス発現 RV-GSF は細胞外に可溶化状態で分泌されたことが示唆された。したがって可溶化状態の RV-GSF の精製は比較的容易に行えることから大量に高純度の RV 抗原を調整可能になることが期待される。

RV-GSF および RV-GLF 発現細胞を用いて膜融合アッセイを行った結果、RV-GSF および RV-GLF 共に低 pH 下で膜融合活性を示すことが示された。RV-GSF は膜貫通領域を欠

損していることから膜表面に固定されないが、高い膜融合活性を示した。今後は膜融合活性の定量化により、さらなる性状解析を行う。また RV-G の抗原性には三量体の形成が重要であることがこれまでに報告されていることから、これら組換えタンパク質の三量体形成能等の性状解析を行う必要がある。

#### E. 結論

本研究においては RV-G のバキュロウイルスを用いた発現系を開発した。その結果バキュロウイルス発現系を用いて可溶化 RV-GSF を発現することが可能であることが示された。今後は RV-GSF および RV-GLF の精製と抗原性の検討を行う。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
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

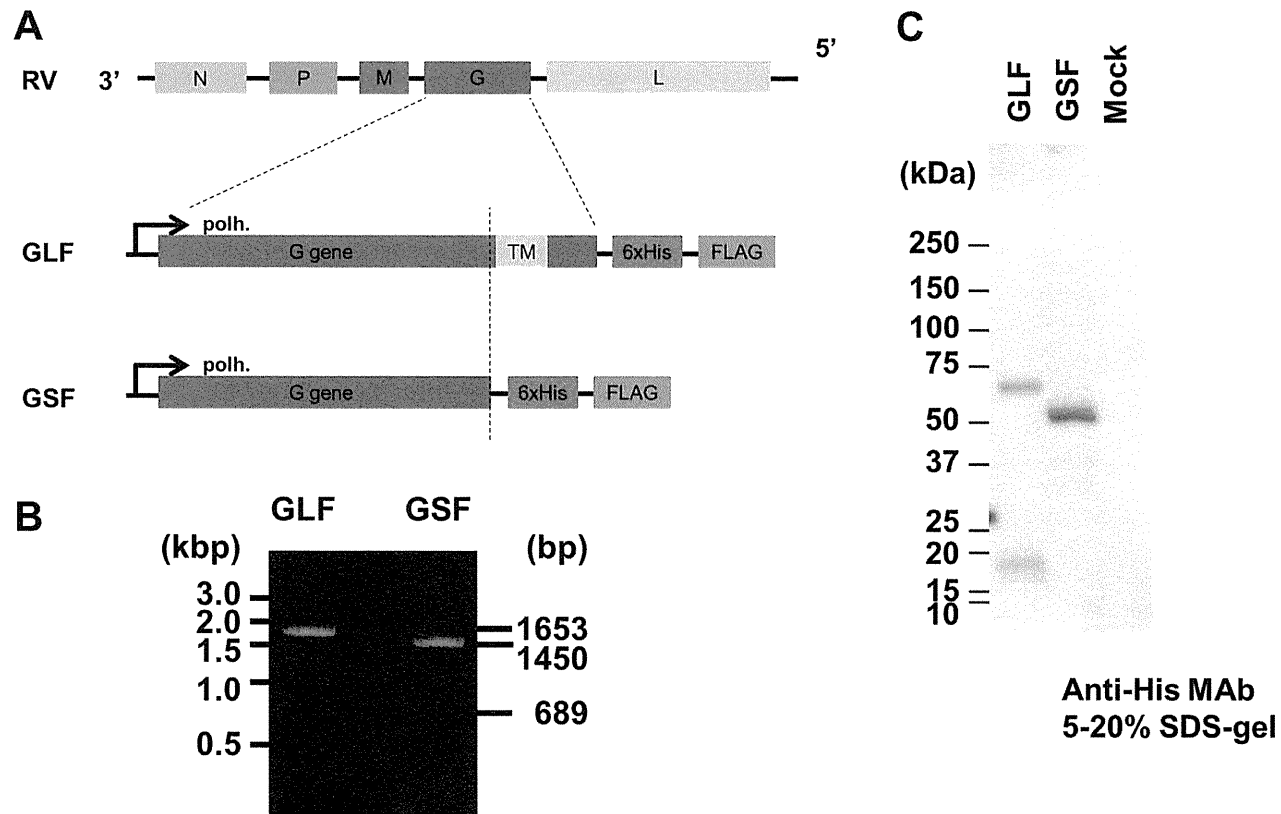


図1. 狂犬病ウイルスGタンパク質の発現組換えバキュロウイルスの作製: (A)狂犬病ウイルスGタンパク質の3' 端にHis タグおよびFLAG タグを付加したコンストラクト GLF およびGタンパク質の膜貫通領域(TM)を削除し細胞外ドメインのみのコンストラクトGSFを設計した. (B)狂犬病ウイルスHEP-flury株から目的遺伝子をRT-PCR法により増幅した. (C)RV-GSFおよびGLFタンパク質の発現を抗His-MAbを用いて確認した.

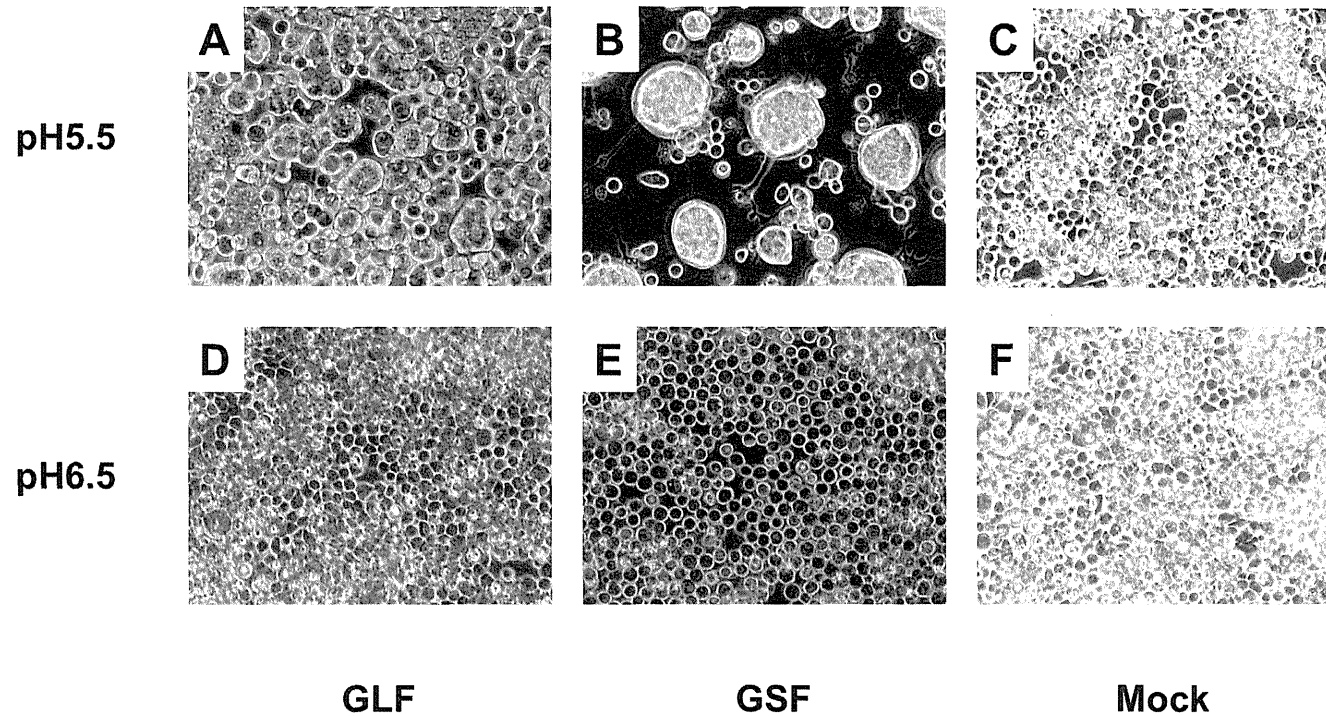


図2. 低 pH 条件下における組換え RV-G タンパク質の細胞融合の検討:低 pH 条件下で組換え RV-GLF (A), RV-GSF (B) 発現細胞及び Mock 感染細胞 (C) を示す. また, 昆虫細胞培養条件下 (pH6.5) における組換え RV-GLF (D), RV-GSF (E) 発現細胞および Mock 感染細胞 (F) を示す.

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政策研究事業  
ワクチンの品質確保のための国家検定に関する研究

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重要な役割を担っている。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ものが多いが、近年国際的には動物愛護の観点から実験だけではなく、これらの検定試験についても見直しが求められている。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 倍の感度を持ち、コスト面でも利点がある。そこで、本年度は本試験法の実用化に向けた取り組みの一つとして、試験に使用する細胞のシードストックの作成と検出感度の確認を行った。その結果新たにセルバンクから導入した細胞は本実験室で維持している細胞ストックと形態も感度も同等であることが確認された。

A. 研究目的

ワクチンの有効性と安全性及び均質性を保証するため、国家検定試験は非常に重要な役割を担っている。ワクチンはその特性から、動物を用いた試験が実施されているものも多く、狂犬病ワクチンでは、力価試験、不活化試験、異常毒性否定試験において実験動物が使用されている。動物を用いた試験系は、一般的に *in vitro* 系に比べより多くの時間や労力を要する。また、動物の個体差のため、試験結果のばらつきが大きい。加えて、国際的に各種検定試験においても 3Rs (Reduction: 使用動物数の削減、

Refinement: 動物が受ける苦痛の軽減、Replacement: 動物を使用しない代替法への置き換え) への対応が進んでいることから、我が国においても代替試験の開発および導入を進める必要がある。

乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの検定においては、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と生物基で規定されている。試験方法は試験ワクチン原液を哺乳マウス脳内に接種し、

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いことを確認するというものである。実際には哺乳マウスは輸送ストレス、哺乳不足および食殺による死亡が起こることが多いため、通常 40～50 匹の哺乳マウスが必要となる。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が、一部の製造者を除いては、未だ哺乳マウス接種法が用いられている。

私たちはこれまで、培養細胞を用いた *in vitro* 試験法を開発してきた (M, Takayama-Ito et al. Biologicals, 2014)。本試験法は、現行の哺乳マウスを用いる試験法に比べ、約 5 倍の感度を持ち、試験の安定性、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。昨年度にはメーカーとワーキンググループを発足させ、今後実用化を目指したバリデーションを行う予定である。

試験法開発のための実験で使用した細胞はマウスの神経芽腫由来の Neuro-2a 細胞である。CDC より分与されたものを本研究所の獣医科学部を通じて譲り受けたものであり、その後本研究室で継代維持・保存が行われている。培養細胞は継代数や培養条件によって大きくその形態や性質を変える可能性があることが知られており、本格的なバリデーションを行う前にバリデートさ

れた細胞をセルバンクから入手し、それをもとにシードストックの作製を行う必要があると考えられた。

そこで、本研究では実用化に向けた取り組みの一つとして、細胞のシードストック作製を行い、その細胞が開発に用いた細胞と同等の性質を有するかについて検討を行うことを目的とした。

## 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 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) シードストックの作製：JCRB より Neuro-2a 細胞 JCRB 番号 IF050081 (以下 JCRB とする) の分譲を受けた。添付の文書に従い、細胞をウォーターバスで融解、培養液を加えて 1500 rpm 5 分 10°C で遠心し、細胞沈さを 5ml の培養液に再浮遊し、37°C でセミコンフルエントになるまで培養した。その後、後述の方法で継代培養を行った。

数代継代後にシードストックとして  $10^6$ /ml 以上になるように細胞保存液（セルバンカー）に細胞を浮遊させ、25 本のストック細胞を作製し、液体窒素タンクに保存した。

また、このシードストック 1 本を融解し、2 代継代したワーキングストックを作製し、 $-80^{\circ}\text{C}$  に保存して試験に供した。

細胞：本研究室で継代維持している Neuro-2a 細胞（以下 NIID とする）および

上述の JCRB セルバンクより分譲された Neuro-2a (以下 JCRB とする) を用いた。培養には牛胎児血清 (FBS) 10% を含む D-MEM 培地を使用した。培地には抗生物質としてペニシリンとストレプトマイシンを添加した。ウイルス接種時の培養には FBS 濃度を 2% に減らした培地を使用した。培養には温度 37°C, 二酸化炭素濃度 5% に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーターを使用した。ウイルス接種後は温度を 35°C に設定下げて培養を行った。継代は以下のように行った。3 日または 4 日おきに細胞を 0.02% のトリプシンを含むリン酸緩衝液 (PBS) で 1 回洗浄後、同じトリプシン溶液を培養面 25cm<sup>2</sup> あたり 0.5ml 加えて 37°C で 3~5 分間インキュベートした。細胞培養用フラスコを軽くゆすって細胞を培養面からはがし、10%FBS を含む培地で反応を止め、細胞を 6~10 倍希釈して新しい細胞培養用フラスコに移し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。両系統の Neuro-2a 細胞 (NIID および JCRB) を倒立で観察した。

4) *in vitro* 不活化試験法：20 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 4 ml を加えた。前日に 96 well 培養プレートに播種した 2 系統の Neuro-2a 細胞 (NIID および JCRB) の上清を除き、上記混合液を各 well につき 120  $\mu$ l ずつ分注した。72 時間 35°C で培養し、その後上清 50  $\mu$ 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。

5) 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。狂犬病抗原陽性細胞が確認された well を陽性 well として数えた。

6) *in vitro* 試験法における検出限界の算定：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 Products (VICH) のガイドラインに従い、下記の様に検出限界 (Detection Limit: DL) を算出した。各試験について回帰直線の y 切片 (y-intercept) と傾きを計算し、10 回の試験の y 切片の標準偏差を求めた。各試験の DL は  $3.3 \times y$  切片の標準偏差を回帰直線の傾きで割ることで算出した。

### C. 研究結果

1) シードストックの作製：25 本のシードストックを液体窒素に保存した。また、シードストック作製のためのマスターシードストック 10 本も液体窒素に保存した。試験に使用するため、シードストックからワーキングストックを作製し、試験に用いる前に数代の継代を行った。

2) 培養における形態の比較：10 倍希釈にて継代後 37°C で 2 日間培養した両系統の細胞は増殖の程度およびその形態に違いは見

られなかった (図 1).

3) *in vitro* 不活化試験における感度の比較: 両系統の細胞を用いて行った 2 回の *in vitro* 不活化試験において, 各ウイルス量における陽性 well 数を比較したところ, 両系統間で差は見られなかった (図 2). また, 両系統の DL を計算したところ, どちらも 0.006 であった (表 1).

#### D. 考察

我々が開発した *in vitro* 試験法は現行の哺乳マウス接種法に比べ, 感度, 試験精度, 人的・経済的コストおよび再現性の面でも優れており, ロットリリースのための試験として多くのメリットがある.

しかし, 実際に実用化をするためには, さらなる施設内および施設間バリデーションが必要となる. 本研究ではこれらの準備として培養細胞のシードストックの作製とその評価を行った. その結果これまで使用していた NIID 由来の細胞と JCRB から分与された細胞では形態および狂犬病ウイルスに対する感度に違いは見られなかった. また, その DL は開発時に行った 10 回の実験の結果 (平均 0.02 ffu/well) と同等であった.

これらの結果から, 今回調整した JCRB 由来の Neuro-2a 細胞はこれまで使用していた NIID 由来の Neuro-2a 細胞と同じ性質を持っていると考えられた.

#### E. 結論

セルバンク由来の細胞を用いて, *in vitro* 試験法に使用するシードストックを作製した. また, そのストックから培養した細胞の *in vitro* 試験法に供するに十分な性質を保有していると考えられた. 今後, この細胞を使用してさらなるバリデーションを行い, 試験法の実用化につなげたい.

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
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

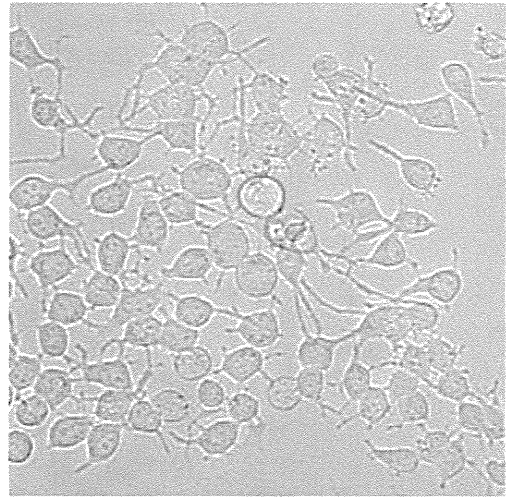
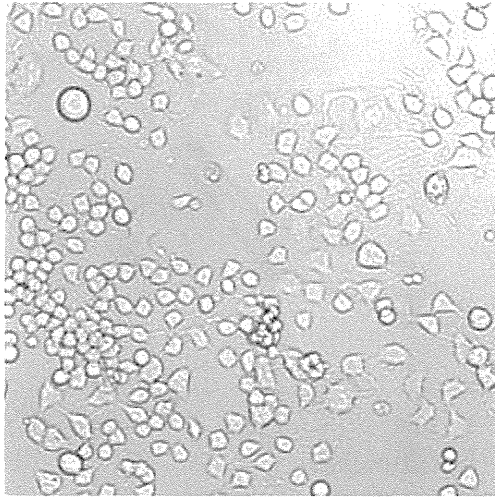


倍率

x100

x200

JCRB#IFO50081



NIID

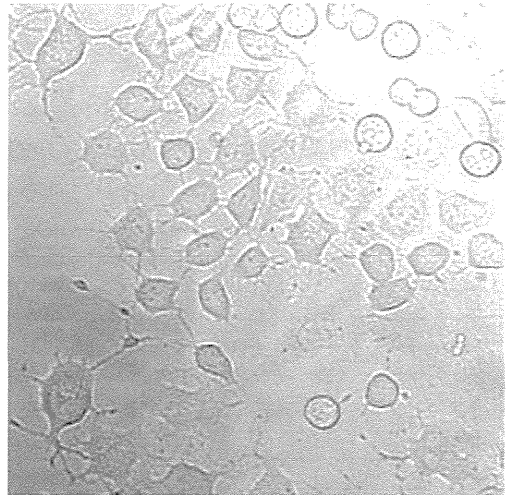
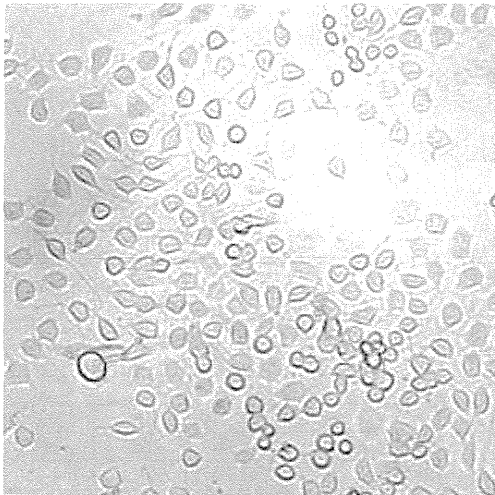


図1 JCRBおよびNIID由来Neuro-2a cellの顕微鏡像

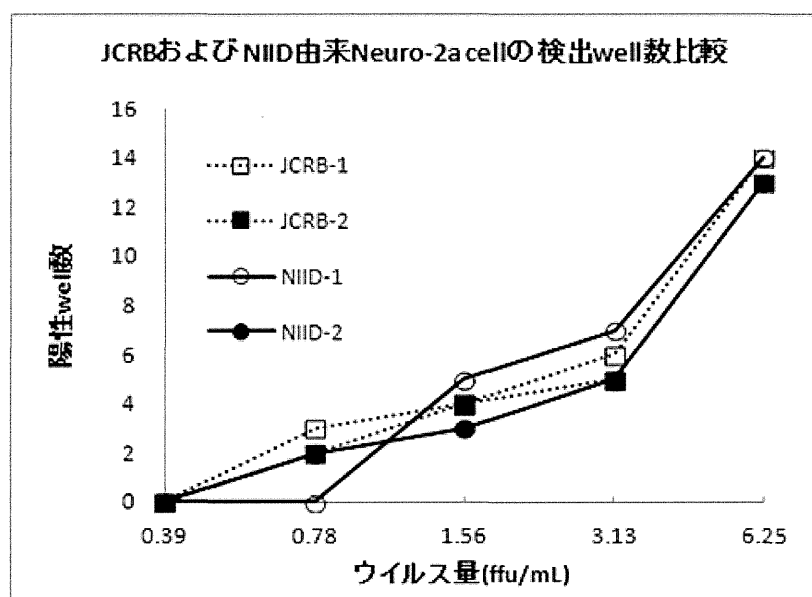


図2 JCRBおよびNIID由来Neuro-2a cellの残存ウイルス検出数の比較

表1 JCRBおよびNIID由来Neuro-2a cellの検出限界の比較

virus(ffu/0.02mL)	JCRB				NIID			
	66	68	average	SD	66	68	average	SD
0.008	0	0	0.00	0.00	0	0	0.00	0.00
0.016	3	2	2.50	0.71	0	2	1.00	1.41
0.031	4	4	4.00	0.00	5	3	4.00	1.41
0.063	6	5	5.50	0.71	7	5	6.00	1.41
0.125	14	13	13.50	0.71	14	13	13.50	0.71
INTERCEPT	0.13	-0.17	-0.02	0.21	-0.58	-0.46	-0.52	0.09
SLOPE	108.9	102.5	105.72	4.50	119.4	104.4	111.91	10.58
<b>DL=3.3σ/slope</b>	<b>0.006</b>	<b>0.007</b>	<b>0.006</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.006</b>	<b>0.007</b>	<b>0.006</b>	<b>0.0006</b>
QL=10 σ/slope	0.019	0.020	0.02	0.00	0.017	0.020	0.02	0.00
CORREL	0.984	0.983	0.98	0.00	0.980	0.989	0.98	0.01

σ=the standard deviation of y-intercepts of regression lines

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政策研究事業  
ワクチンの品質確保のための国家検定に関する研究

分担研究報告書

血液製剤へのサマリーロットプロトコール審査導入についての検討

研究分担者	浜口 功	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	
研究協力者	大隈 和	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第一室
	野島 清子	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第一室
	松岡佐保子	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第二室
	小高千加子	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第二室
	百瀬 暖佳	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第二室
	楠 英樹	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第三室
	水上 拓郎	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第四室
	佐々木永太	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第四室
	落合 雅樹	国立感染症研究所	品質保証・管理部	第二室
	内藤誠之郎	国立感染症研究所	品質保証・管理部	第二室
	藤田賢太郎	国立感染症研究所	品質保証・管理部	第二室
	近田 俊文	国立感染症研究所	品質保証・管理部	第二室

研究要旨：現在年間約 500 ロットの血漿分画製剤（血液製剤）のロットリリースにあたり、薬機法に基づいて国家検定を実施している。The World Health Organization (WHO) Blood Regulators Network (BRN)は 2006 年に設立され、血液、血液製剤、体外診断薬のレギュレーションについて国際的に先導する立場にあり、日本も 2011 年より参加している。BRN アセスメントクライテリアの中で各国の行政機関に対してロットリリースおよびロット製造のサマリー(サマリーロットプロトコール, SLP)を審査することが求めているが日本はまだ導入していない。

本研究班の中で、H27 年度は血漿分画製剤（血液製剤）への SLP 審査の導入へ向けて、品質保証・管理部と血液・安全性研究部を中心にワーキンググループを立ち上げ、SLP 審査導入の必要性の評価と確認、年間審査数概算、審査製剤の選択、審査に係る時間について検討し、導入の可否を評価した。

その結果、SLP 審査導入の必要性を確認し、モデルとなる製剤を選択して SLP 様式案を作成し 1 ロットの必要な作業時間を 4 時間と算出した。さらに、年間約 500 ロットある血液製剤のうち、まずグロブリン 200 ロットについて先行して導入し、他の血液製剤についても順次導入する方向を定め、SLP 審査導入に向けた作業計画を立て準備を開始した。

血液製剤への SLP 審査が導入されれば日本の特定生物製剤全般についての SLP の審査の実施が可能となり、我が国のロットリリースで、安全性や有効性に関する国家検定に加えて、製剤が承認書通りに製造されているかについても確認するシステムが構築され、国民に貢献出来ることが期待される。

## A. 研究目的

日本の血液製剤のロットリリースにおいて、国家検定は薬機法に基づき実施されている。血液製剤へのサマリーロットプロトコール(SLP)審査はまだ導入されていないが、WHOのBRNからは血液製剤へのSLP審査が求められている。本研究班において、血液製剤へのSLP審査の導入へ向けて、国立感染症研究所内においてワーキンググループを立ち上げ、SLP審査導入の必要性を評価し、導入へ向けて準備を開始する。

## B. 研究方法

### 1.ワーキンググループの立ち上げ

血液・安全性研究部、品質保証・管理部が中心となり血液製剤へのSLP導入に向けたワーキンググループを立ち上げ、今年度は3回の会合を持った。

### 2.SLP審査制度導入の是非についての検討

BRNのガイドラインを評価し、導入の必要性について検討した。

### 3.対象製剤の検討

全血液製剤を対象として評価し、対象製剤について検討した。

### 4.SLP様式案の作成

新しい血液製剤を例として選択し、仮SLP様式案を作成した。審査に必要時間等について検討した。当部でSLP審査が実施可能であるかを評価した。

## C. 研究結果

### 1.ワーキンググループの立ち上げ

血液・安全性研究部および品質管理部を中心に、約13名で構成されるワーキング

グループを立ち上げ、血液製剤のSLP導入に向けて活動を開始した。本年度は3回の会合を持った。

### 2.SLP審査制度導入の是非についての検討

ワーキンググループ内で、BRNのガイドラインおよびワクチンへのSLP導入状況について評価した。BRNは各国の行政機関へ血液製剤のロットリリースにおけるSLP導入を求めているが、日本はBRN加盟しているにも関わらず、まだSLP審査システムを持たないこと、また、承認申請書通りに製造をしなかった製剤が複数ある等の事例が報告され、感染研がロット毎の製造についても確認する必要がある等の考えより、血液製剤へのSLP審査の導入は必要であると結論づけた。

### 3.対象製剤の検討

年間500ロット出検される血液製剤のすべてを対象とすること。また、すべての審査が1つの部に集中することを鑑みて、まずは、ロット数および製剤数が最も多いグロブリン製剤(特殊免疫グロブリンを含む)対象として最初にSLP審査を導入し、順次全製剤へ対象を広げることとした。

### 4.SLP様式案の作成

ワクチンと血液製剤では、原料の確保、原料安全性の確認、製造方法等が異なるため、ワクチンの様式を参考にしつつ、血液製剤の様式案を作成した。これを基に、当部での審査が可能であるかについて評価した。その結果、血液製剤は500ロットあり、判定および重要項目のトレンド解析のためには全てのデータを電子媒体に入力する必要があり、それらをひとつの部で実施して