

# バイオロジクスフォーラム 第7回 学術集会

---



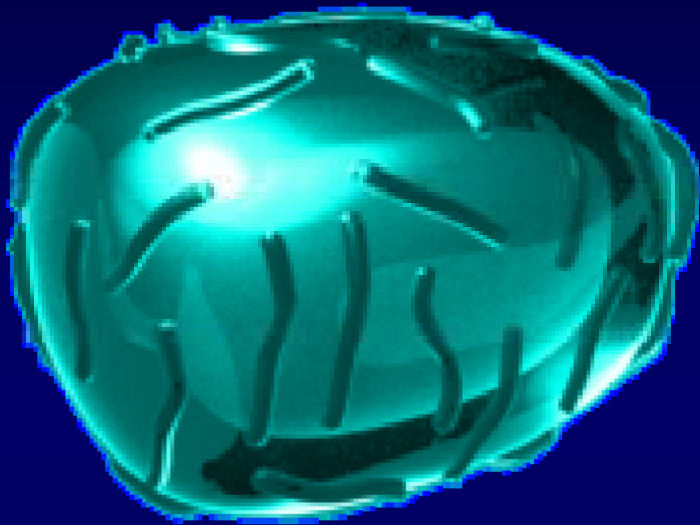
「ワクチンをめぐる話題：予防用ワクチンと治療用ワクチン」

## 細胞培養によるワクチン製造について

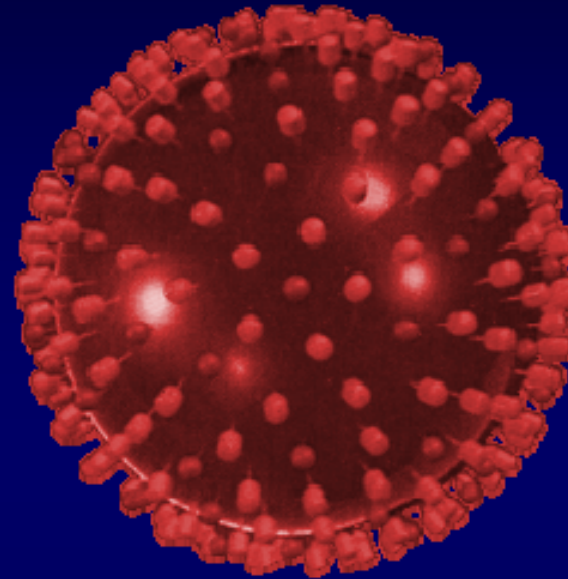
2010年3月 2日(火)

横手公幸  
財団法人 化学及血清療法研究所

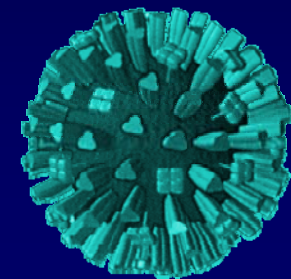
# ウイルス性病原体



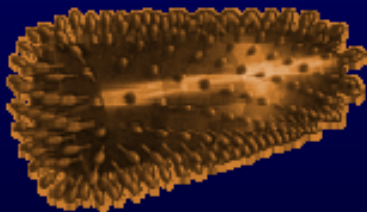
**Poxviruses**  
(smallpox, vaccinia)  
230x300 nm



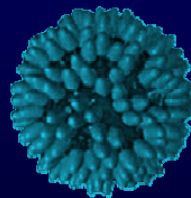
**Paramyxovirus**  
(Measles, Mumps)  
150-300 nm



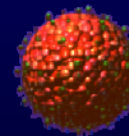
**Orthomyxoviruses**  
(Influenza A, B, C)  
80-120 nm



**Rhabdoviruses**  
(Rabies)  
60x180 nm



**Togaviruses**  
(Rubella)  
≈70 nm



**Hepadnaviruses**  
(HBV)  
40-50 nm



**Picornaviruses**  
(Poliovirus, HAV)  
24-30 nm

# ウイルスワクチン



## ➤ 生ワクチン

痘そうワクチン(痘苗)  
経口生ポリオワクチン  
乾燥弱毒生風しんワクチン  
乾燥弱毒生麻しんワクチン  
乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン  
乾燥弱毒水痘ワクチン

## ➤ 不活化ワクチン

インフルエンザワクチン  
乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン  
不活化狂犬病ワクチン  
日本脳炎ワクチン  
沈降B型肝炎ワクチン  
組換え沈降2価ヒトパピローマウイルス様粒子ワクチン

# ウイルスワクチンの細胞培養



## ➤ 動物個体培養

孵化鶏卵、乳のみマウス、  
成熟マウス、ウシ、ヒツジ

## ➤ 細胞培養／組織培養

### 初代細胞

ニワトリ胚細胞、ウサギ腎細胞、アフリカミドリザル腎細胞

### 継代細胞・株化細胞

MRC-5、GL37、Vero, CHO, huGK-14、  
イラクサギンウワバ由来細胞

# 細胞培養ワクチン



| ワクチン | 乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン         | 乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン | 乾燥組織培養不活化日本脳炎ワクチン               | 乾燥細胞培養痘そうワクチン | 沈降B型肝炎ワクチン<br>(huGK-14細胞由来) | 組換え沈降B型肝炎ワクチン<br>(チャイニーズハムスター<br>卵巣細胞由来) | 組換え沈降2価<br>ヒトパピローマ<br>ウイルス様粒子ワクチン<br>(イラクサギンウワ<br>バ細胞由来) |
|------|---------------------------|------------------|---------------------------------|---------------|-----------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| シード  | KRM003株                   | HEP Flury株       | Beijin株                         | LC16m8        | HBs抗原<br>発現<br>組換え体         | HBs抗原<br>発現<br>組換え体                      | L1たん白質発<br>現組換え体                                         |
| 細胞   | アフリカミドリザル腎臓由来<br>(GL37細胞) | ニワトリ胚<br>初代細胞    | アフリカミドリザル腎臓<br>由来細胞<br>(Vero細胞) | ウサギ腎<br>初代細胞  | ヒト培養細胞<br>huGK-14細胞         | チャイニーズ<br>ハムスター卵<br>巣由来細胞                | イラクサギンウ<br>ワバ細胞由来                                        |

# 細胞培養ワクチン



## ➤ 痘そうワクチン

痘そうワクチン(痘苗)

乾燥細胞培養痘そうワクチン

## ➤ 日本脳炎ワクチン

日本脳炎ワクチン

乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン

# 初代細胞培養ワクチン



| ワクチン              | 痘そうワクチン<br>(痘苗)                                                   | 乾燥細胞培養痘そうワクチン                                                                        |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| シード               | 池田株、大連1株                                                          | LC16m8                                                                               |
| 細胞                | ウシまたはヒツジ                                                          | ウサギ腎<br>初代培養細胞                                                                       |
| 品質試験<br>(細胞基材による) | 大腸菌否定試験<br>溶血レンサ球菌否定試験<br>ブドウ球菌否定試験<br>炭疽菌否定試験<br>病原性クロストリジウム否定試験 | 動物接種試験(成熟マウス接種試験、乳のみマウス接種試験、モルモット接種試験、モルモット脳内接種試験、ウサギ接種試験)<br>培養細胞接種試験(ウサギ腎培養細胞接種試験) |

# 天然痘ウイルス

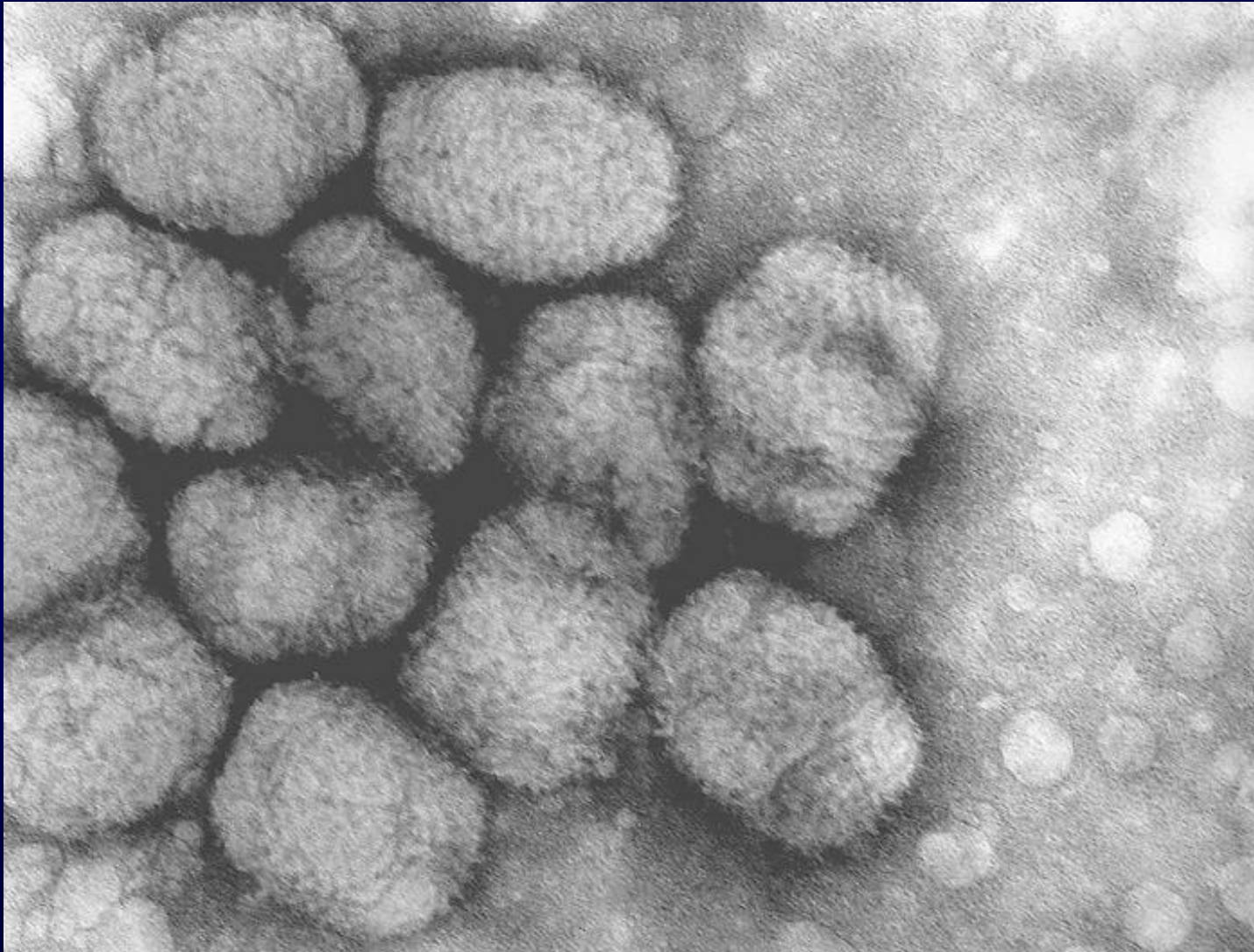


Photo: courtesy of CDC-PHIL

**Poxviridae**

# ポックスウイルス科



## Orthopoxvirus (Genus)

➡ **Variola major, minor**

➡ **Vaccinia**

- Monkeypox

➡ **Cowpox**

- Raccoon pox
- Tatera pox
- Buffalopox
- Carnel pox

## Avipoxvirus (Genus)

- Fowlpox
- Canary pox

## Parapoxvirus (Genus)

- Orf (milker's nodule)
- Pseudocowpox

## Yatapox Virus (Genus)

- Tanapox, Yaba

## Others

# ワクチンの誕生



ジェンナー 種痘像  
(ジェノア博物館)

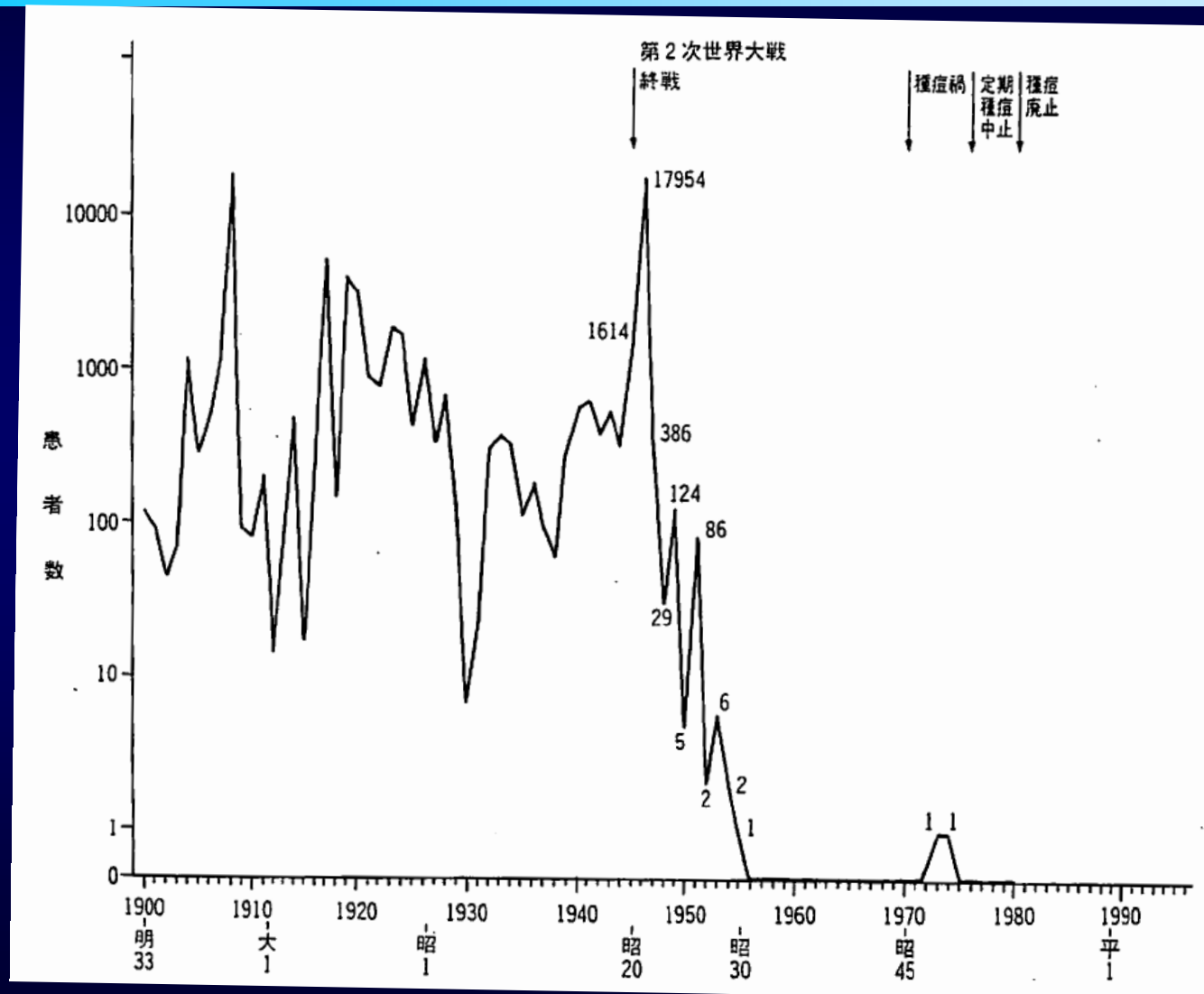
最初の天然痘予防接種  
1796年

**Vaccine**

Vacca(雌牛)  
ine(薬剤)

パスツールによる命名

# 国内の天然痘発生状況



引用：臨床とウイルスVol.24 1996 木村三生夫 他

# 痘そうワクチン(痘苗)の製造法



# LC16m8株の経過・継代歴



リスター株 (LO)



ウサギ腎 (RK) 細胞 36代継代 (30°C)



RK細胞でプラーククローニング (LC16株)



RK細胞6代継代 (30°C)



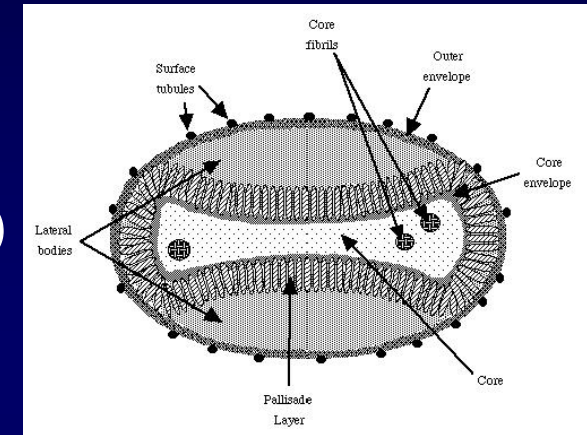
RK細胞でプラーククローニング (LC16m0株)



RK細胞3代継代 (30°C)



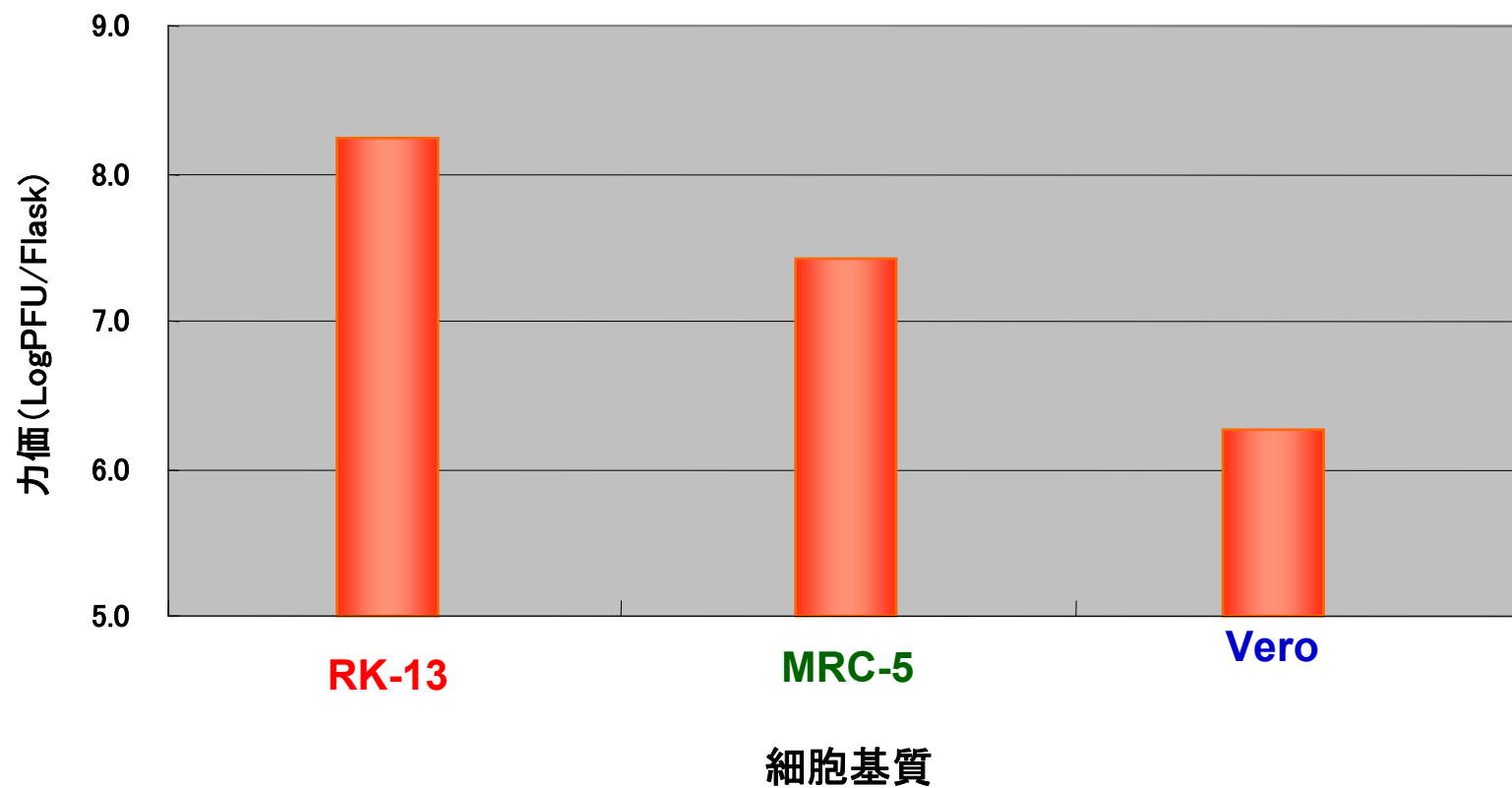
RK細胞でプラーククローニング (LC16m8株)



# 細胞増殖性

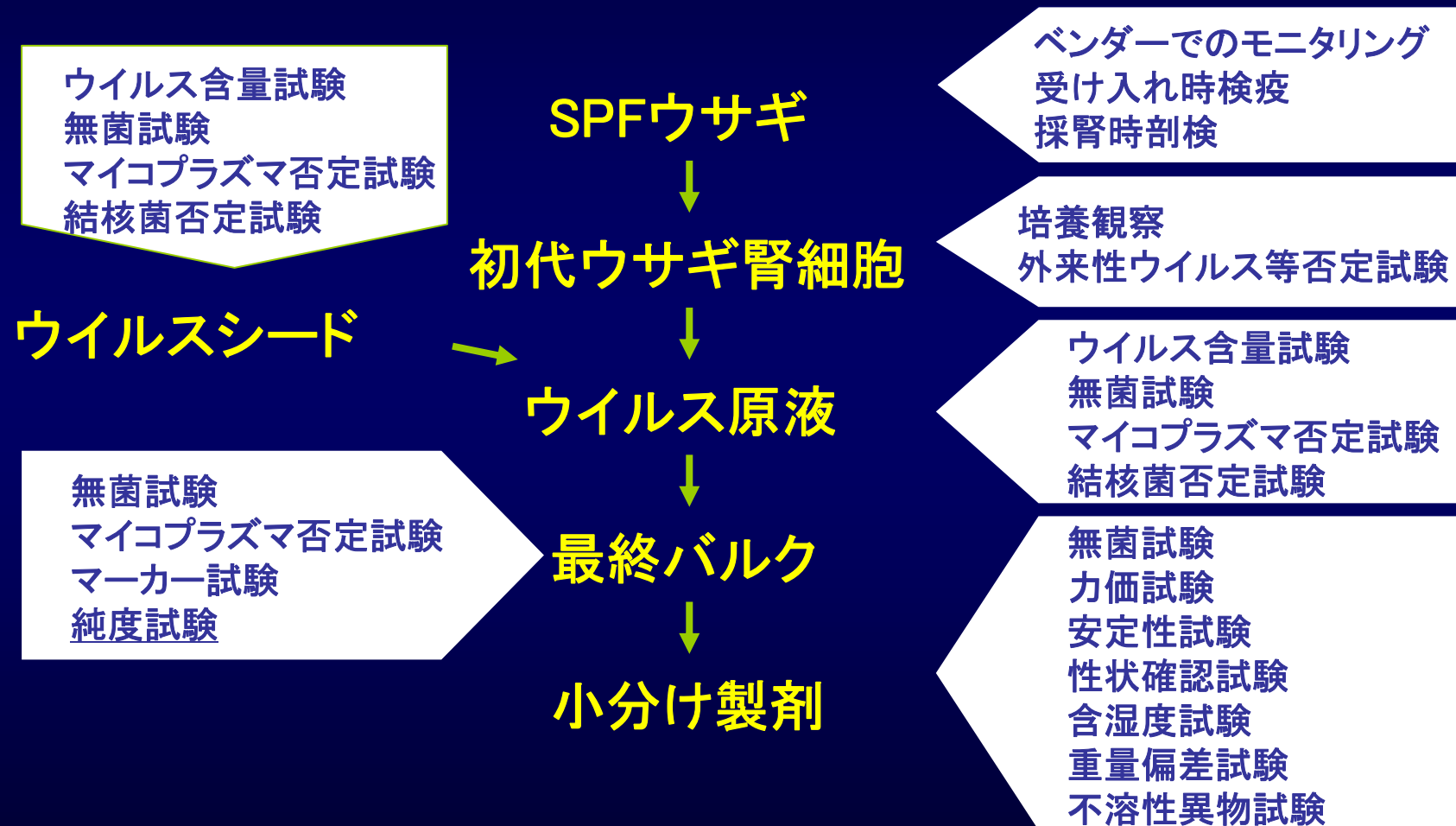


細胞増殖性(37°C、4日間培養)



(単位: Log PFU/Flask)

# 乾燥細胞培養痘そうワクチン 製造方法と試験項目



生物学的製剤基準 通則及び医薬品各条「乾燥細胞培養痘そうワクチン」



**Dryvax®**



**LC16m8**

# ウサギコロニーの試験



- ・ ベンダーでの管理
  - 1ヵ月毎:10種類(リタイアウサギ)
  - 6ヶ月毎:21種類ウイルス・細菌
  - 出荷時健康チェック

- ・ 化血研での管理
  - 受け入れ時検疫
  - 剖検



- ・ 追加試験: EMEA推奨ウサギウイルスの試験  
EMEA: European Medicines Evaluation Agency (欧州医薬品審査庁)

# 医薬品製造を用いる動物ドナーで確認されるべきウイルス

CPMP/BWP/3354/99 : Note for guidance on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use、24 July 2002.



| Rabbit                                   | Horse                                                     | Sheep & Goat                         |                                      |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Rabbit rotavirus                         | Eastern, Western & Venezuelan Equine encephalitis viruses | Food and mouth disease virus (FMDV)  | Caprine arthritis encephalitis virus |
| Reovirus type 3                          | St Louis encephalitis virus (SLEV)                        | Wesselbron virus                     | Maedi-Visna virus                    |
| Rabbitpox virus (RPXV)                   | Japanese B encephalitis virus                             | Louping ill virus (LIV)              | Jaagsiekte virus                     |
| Myxomatosis virus (MYXV)                 | Vesicular stomatitis virus                                | Rift valley fever complex            | Bovine Leukemia virus                |
| Shope fibroma virus                      | Equine morbilli virus                                     | Tick-brone encephalitis virus (TBEV) | Epizootic haemorrhagic disease virus |
| Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) | Equine herpesvirus type 1-4                               | Bluetongue virus (BTV)               | Pest de petits ruminants             |
| Rabbit papillomaviruses                  | West Nile fever virus                                     | Vesicular stomatitis virus(VSV)      | Adenovirus                           |
| Lapine parvovirus (LPV)                  | Borna disease virus                                       | Parapoxvirus(Orf)                    | Nairobi sheep disease                |
| Rabbit kidney vacuolating virus          | Reovirus type 1-3                                         | Capripox virus                       | Ross river virus                     |
| Herpes cuniculi                          | Equine influenza virus                                    | Cowpox virus                         | Caprine arthritis encephalitis virus |
| Adenovirus                               | Equine rotavirus                                          | Parainfluenza virus type 3           | Ovine herpes virus 2                 |
| Encephalomyocarditis virus               | Equine and bovine papillomaviruses (EqPV1-2 and BPV 1-2)  | Borna disease virus                  | Bovine herpes virus type 1,2,4       |
| Borna disease virus                      | Equine infectious anaemia virus (EIAV)                    | Reovirus 1-3                         | Border disease virus (BDV)           |
| Sendai virus                             | Equine arteritis virus                                    | Respiratory syncytial virus          | Ovine/bovine papillomavirus(OPV)     |
| Simain Parainfluenza (SV-5)              | African Horse Sickness (Orbi)                             | Rotavirus                            | Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)  |
| Pnuemoia virus of mouse (PVM)            | Equine parvovirus                                         | Akabane virus                        | Border disease virus (BDV)           |
|                                          |                                                           | Ovine herpes virus 2                 | Ovine/bovine papillomavirus(OPV)     |
|                                          |                                                           | Bovine herpes virus type 1,2,4       | Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)  |

# EMEA推奨ウサギウイルスの試験



|                                           |           |
|-------------------------------------------|-----------|
| ✓ Rabbit rotavirus                        | ELISA     |
| ✓ Reovirus                                | ELISA     |
| ✓ Rabbit hemorrhagic disease virus        | ELISA     |
| ✓ Rabbit pox virus                        | ELISA     |
| ✓ Encephalomyocarditis                    | ELISA     |
| ✓ Sendai virus                            | ELISA     |
| ✓ Parainfluenza Type 2                    | HI        |
| ✓ Pneumonia virus mice                    | ELISA     |
| ✓ Adenovirus                              | PCR,ELISA |
| ✓ Rabbit papillomavirus                   | qPCR      |
| ✓ Herpes sylvilagus                       | qPCR      |
| ✓ Herpes cuniculi                         | qPCR      |
| ✓ Borna disease virus                     | qPCR      |
| ✓ Rabbit kidney vacuolating disease virus | PCR       |

血清結果：全て陰性(一)

# 初代ウサギ腎細胞の特性試験



- 造腫瘍試験
- オンコウイルス試験
- 対照細胞の培養観察・継代培養
- TEM
- Induction PERT
- Co-cultivation試験



# 生物学的製剤基準の医薬品各条に示された 外来性ウイルス等否定試験



| ワクチン種類            | 製造用細胞      | 動物接種試験    |            |           |       | ニワトリ卵<br>接種試験 | 培養細胞<br>接種試験                     |
|-------------------|------------|-----------|------------|-----------|-------|---------------|----------------------------------|
|                   |            | 成熟<br>マウス | 乳のみ<br>マウス | モルモ<br>ット | ウサギ   |               |                                  |
| 弱毒生おたふく<br>かぜワクチン | ニワトリ胚細胞    | ip、ic     | ip、ic      | ic        | -     | CAM、AC、YS     | ヒト培養細胞<br>CE、CK                  |
| 弱毒生水痘ワクチン         | ヒト二倍体細胞    | ip、ic     | ip、ic      | ic        | im    | AC            | ヒト培養細胞<br>アフリカミドリザル腎細胞           |
| 細胞培養痘そう<br>ワクチン   | 初代ウサギ腎細胞   | ip、ic     | ip、ic      | ip、ic     | sc、id | -             | ウサギ腎細胞                           |
| 沈降 B 型肝炎ワクチン      | 血漿         | ip、ic     | ip、ic      | -         | -     | AC、YS         | ヒト培養細胞<br>サル培養細胞                 |
|                   | HuGK-14 細胞 | -         | -          | -         | -     | -             | -                                |
|                   | 酵母         | -         | -          | -         | -     | -             | -                                |
|                   | CHO 細胞     | -         | -          | -         | -     | -             | -                                |
| 弱毒生風しんワクチン        | 初代ウサギ腎細胞   | ip、ic     | ip、ic      | ic        | sc、id | -             | ヒト培養細胞<br>ウサギ腎細胞                 |
|                   | ウズラ胚細胞     | ip、ic     | ip、ic      | ic        | -     | CAM、AC、YS     | ヒト培養細胞<br>ウズラ胚細胞<br>CE、CK        |
| 経口生ポリオワクチン        | 初代サル腎細胞    | ip、ic     | ip、ic      | ip、ic     | im    | -             | ヒト培養細胞<br>アフリカミドリザル腎細胞<br>ウサギ腎細胞 |
| 弱毒生麻しんワクチン        | ニワトリ胚細胞    | ip、ic     | ip、ic      | ic        | -     | CAM、AC、YS     | ヒト培養細胞<br>CE、CK                  |

ip:腹腔内、ic:脳内、im:筋肉内、sc:皮内、id:皮下

CAM:漿尿膜上、AC:尿膜腔、YS:卵黄囊

CE:ニワトリ胚初代細胞、CK:ニワトリ腎初代細胞

# 動物接種試験の比較



|                  | MRBP<br>Smallpox                         | EP5.0<br>(2.6.16)                       | FDA<br>Draft Guidance<br>9.28.2006               | WHO<br>(polio;1962)                     |
|------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Adult<br>mice    | At least 10 mice/inoculate               | At least 10 mice/inoculate              | At least 20 mice/inoculate                       | At least 20 mice/inoculate              |
|                  | 4-5 weeks-old /mouse                     | 15g~20 g /mouse                         | 15g~20 g /mouse                                  | 15g~25 g /mouse                         |
|                  | inoculate;<br>I.C. 0.03mL<br>I.P. 0.5mL  | inoculate;<br>I.C. 0.03mL<br>I.P. 0.5mL | inoculate;<br>I.C. 0.03mL<br>I.P. 0.5mL          | inoculate;<br>I.C. 0.03mL<br>I.P. 0.5mL |
|                  | Observation 21days                       | Observation 21days<br>Subinnoculation*  | Observation 21days<br>Subinnoculation*           | Observation<br>21days                   |
| Suckling<br>mice | At least 20 mice/inoculate               | At least 20 mice/inoculate              | At least 20 mice/inoculate                       | At least 10mice/inoculate               |
|                  | Less than 24 hr-old/mouse                | Less than 24 hr-old/mouse               | Less than 24 hr-old/mouse                        | Less than 24 hr-old/mouse               |
|                  | inoculate;<br>I.C. 0.01mL<br>I.P. 0.1mL  | inoculate;<br>I.C. 0.01mL<br>I.P. 0.1mL | inoculate;<br>I.C. 0.01mL<br>I.P. 0.1mL          | inoculate;<br>I.C. 0.01mL<br>I.P. 0.1mL |
|                  | Observation 14 days                      | Observation 14 days<br>Subinnoculation* | Observation 14 days<br>Blind passage             | Observation 42days                      |
| Gunia-pig        | At least 5 guinea-pigs/inoculate         | At least 5 guinea-pigs/inoculate        | At least 5 guinea-pigs/inoculate                 | At least 5 guinea-pigs/inoculate        |
|                  | 300g~400g/guinea-pig                     | 350g~450g/guinea-pig                    | 350g~450g/guinea-pig                             | 300g~500g/guinea-pig                    |
|                  | Inoculate;<br>I.P. 5mL<br>I.C. 0.1mL.    | Inoculate;<br>I.P. 5mL                  | Inoculate;<br>I.P. 5mL<br>I.C. 0.1mL.            | Inoculate;<br>I.P. 5mL                  |
|                  | Observation<br>I.C. 14days<br>I.P.42days | Observation 42days                      | Observation 42days<br>Subinnoculation*, Necropsy | Observation 42days                      |
| Rabbit           | At least 5 rabbits/inoculate             |                                         | At least 5 rabbits/inoculate                     | At least 10rabbits/inoculate            |
|                  | 1500-2500g/rabbit                        |                                         | 1500-2500g/rabbit                                | 1500-2500g/rabbit                       |
|                  | Inoculate;<br>I.D. 1m L<br>S.C. 9mL      |                                         | Inoculate;<br>I.P. 1m L<br>S.C.2mL               | Inoculate;<br>I.D. 1m L<br>S.C. 2mL     |
|                  | Observation 35days                       |                                         | Observation 30days                               | Observation 28days                      |

\*for the animal that die after the first 24hr of the test or that show signs of illness

# ニワトリ卵接種試験の比較



| Guideline        | MRBP<br>Measles<br>(for CE)                                | EP5.0<br>2.6.16<br>(for Avian tissue)           | FDA<br>Draft Guidance<br>9.28.2006                                                                     | WHO<br>Smallpox 2003<br>(for chick cell) |
|------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Sample<br>volume | At least 20eggs /inoculate<br>Inoculate; 0.25mL/egg        | 100dose or 10mL (<br>Inoculate; 0.5mL/egg       | 100dose or 10mL<br>Inoculate; 0.5mL/egg                                                                | 100dose or 10mL<br>Inoculate; 0.5mL/egg  |
| AC               | 10-11 day-old egg<br>3 days<br>Subpass*<br>(Hemagglutinin) | 9-11 day-old egg<br>7 days<br><br>Hemagglutinin | 10-11 day-old egg<br>35°C, 72hours<br>Subpass<br>Hemagglutinin<br>(1 <sup>st</sup> & 2 <sup>nd</sup> ) | 3 days<br>Subpass*                       |
| YS               | 6-7 day-old egg<br>12 days<br>Subpass*                     | 5-7 day-old egg<br>7 days<br><br>Hemagglutinin  | 6-7 day-old egg<br>35°C, at least 9 days<br>Subpass (10%)                                              | 7 day<br>Subpass*                        |
| CAM              | 10-11day-old egg<br>3days                                  | -                                               | -                                                                                                      | -                                        |

\*for the egg that die after the first 24hr

# in vivo試験で分離・検出されるウイルス



| 動物種           | 検出可能なウイルス                                                                                                                               |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Suckling mice | Arboviruses、Coxsackie A and B、Herpes simplex (type 1 and 2)、Rhabdviruses<br>Togaviruses、LCM、Lassa、Junin、Hantaan、Ebola、Herpes B、Vaccinia |
| Adult mice    | Arboviruses、Herpes simplex (type 1 and 2)、Rhabdviruses<br>Togaviruses、LCM、Lassa、Vaccinia                                                |
| Gunia-pigs    | Arboviruses、、Rhabdviruses<br>LCM、Lassa、Junin、Marburg、Ebola、Vaccinia                                                                     |
| Eggs          | Arboviruses、Herpes simplex (type 1 and 2)、Rhabdviruses<br>Mumps、Influenza、Parainfluenza (type 1,2 and 3)、Vaccinia                       |

# 培養細胞接種試験の比較



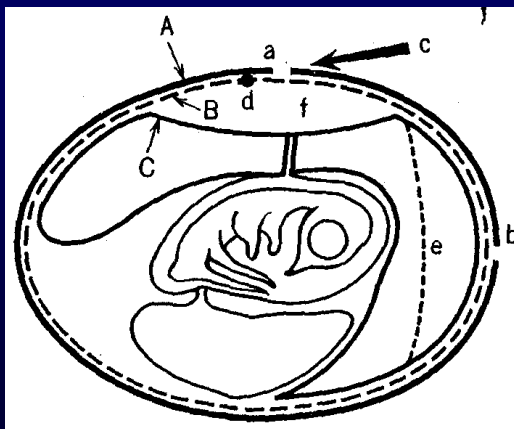
| Guideline                                      | MRBP<br>Smallpox                                             | EP5.0<br>2.6.16                                                                                                                     | FDA<br>Draft Guidance<br>9.28.2006 | WHO<br>Smallpox 2003                                |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Detector Cell                                  | PRK                                                          | Human<br>Monkey<br>Production cell                                                                                                  | Human<br>Monkey<br>Production cell | Human<br>Monkey<br>Production cell                  |
| Ratio of vol.<br>(Sample:Medium)               | 1:1-1:3                                                      | -                                                                                                                                   | -                                  | >1:4                                                |
| Area of cell<br>sheet<br>(area/sample<br>vol.) | > 3 cm <sup>2</sup> /mL                                      | -                                                                                                                                   | -                                  | > 3 cm <sup>2</sup> /mL                             |
| Incubation                                     | 35±1℃<br>14days×2                                            | 35±1℃&<br>Production Tmp.<br>>14days                                                                                                | >14days                            | 35±1℃<br>>2weeks×2                                  |
| Criterion                                      | No CPE<br><20% discarded                                     | -                                                                                                                                   | No CPE<br><20% discarded           | No CPE<br><20% discarded                            |
| Sample                                         | Culture Medium                                               | Culture Medium                                                                                                                      | Culture Medium                     | Culture Medium &<br>Cell homogenate                 |
| Hemadsorption                                  | RBC:Guinea pig<br>& Chicken<br><br>Incubation : RT,<br>30min | RBC:Guinea pig<br>(Chicken, Monkey<br>, Human-0)<br>Incubation : 2-8<br>oC, 30min &<br>20-25 oC, 30min<br>No of Vessel :<br>1/3-1/4 | -                                  | RBC:Guinea pig<br><br><br>No of Vessel :<br>1/3-1/4 |
| Other                                          | -                                                            | Avian Leucosis<br>viruses                                                                                                           | -                                  | -                                                   |

MRBP: 生物学的製剤基準

# 力価試験法の変更

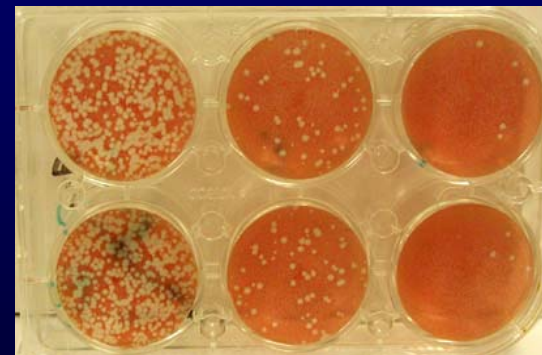
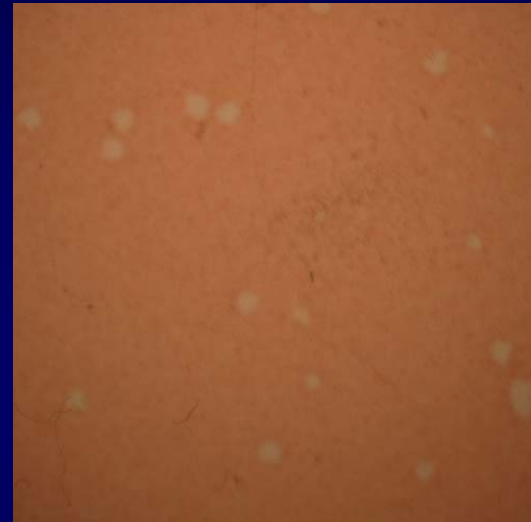


## ・ ポック法



ふ化鶏卵  
漿尿膜  
(CAM)

## ・ プラック法



培養細胞  
RK13

# 分析法バリデーション

## 評価パラメータ

- ・ 真度

- 精度

- ・ 併行精度
- ・ 室内再現精度

- 直線性

- ・ 希釈直線性
- ・ ウェルあたりプラック数

- ・ 範囲

- ・ 定量限界

- ・ 特異性

- 頑健性

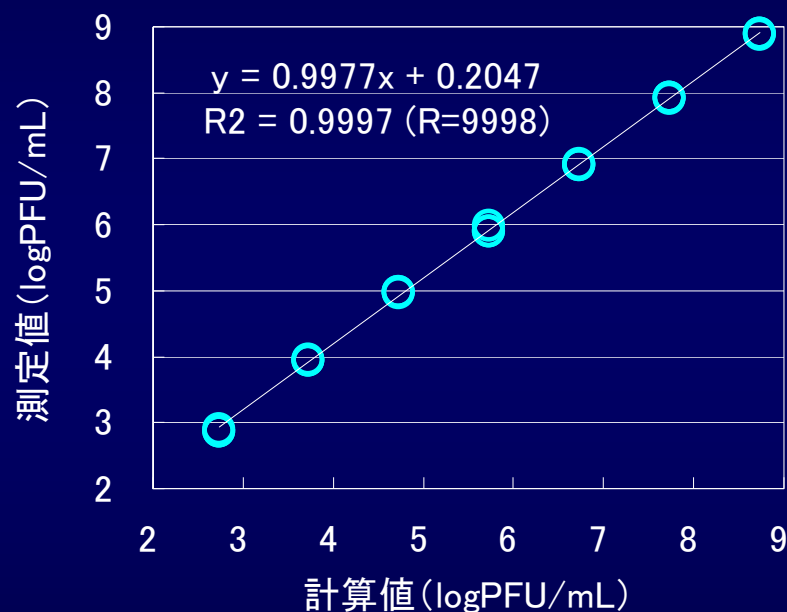
- ・ 培養温度・時間
- ・ 細胞数・継代数
- ・ 血清ロット
- ・ マトリクス 他

薬審第755号審査課長通知

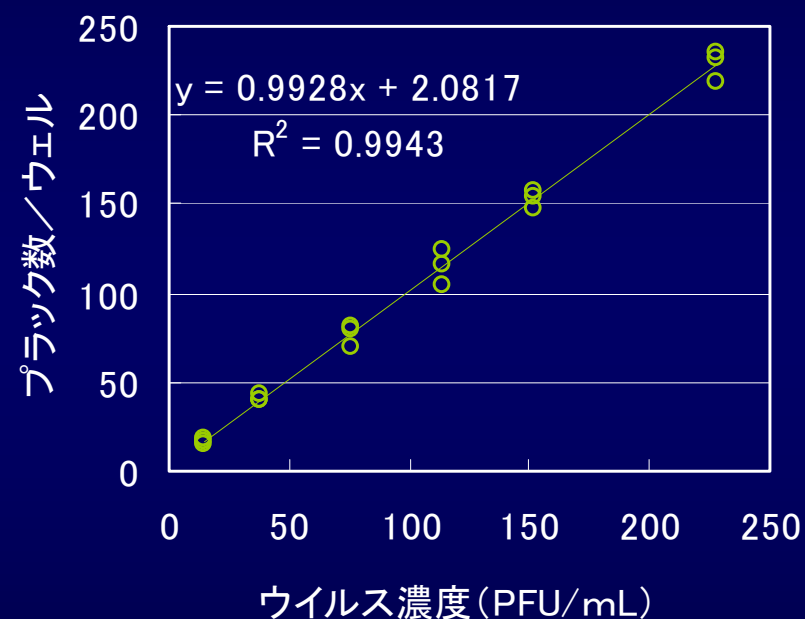
「分析法バリデーションに関するテキスト」に従いパラメータ選択

# 直線性

理論値と測定値の直線性



添加ウイルス量とプラック数の直線性



**結論：2 LogPFU/mL以上の濃度において、適切な真度・精度を有した直線性が認められた**

# 異常毒性否定試験 GENERAL SAFTY TEST



|               | 日本                                                               | 米国                                                    | 欧州                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| GL            | 生物学的製剤基準<br>異常毒性否定試験法                                            | 21CFR<br>610.11 General Safety Test                   | 欧州薬局方<br>2.6.9 Abnormal toxicity                        |
| 使用動物<br>(使用数) | モルモット<br>(総計処理に必要な数)                                             | マウス(2 匹以上)<br>モルモット(2 匹以上)                            | マウス(5 匹)<br>モルモット(2 匹)                                  |
| 投与経路          | 腹腔内                                                              | 腹腔内※                                                  | 腹腔内                                                     |
| 投与量           | 別に規定する場合を除き、<br>5mL                                              | マウス: 0.5mL<br>モルモット: 5mL                              | マウス: ヒト1 回投与量<br>(1mL以内)<br>モルモット: ヒト1 回投与量<br>(5mL 以内) |
| 観察期間          | 7日間以上                                                            | 7日間                                                   | 7 日間                                                    |
| 観察項目          | 死亡及び体重変動を含む異常を認めない。                                              | 死亡及び体重変動を含む異常を認めない。                                   | 死亡あるいは病気の兆候を認めない。                                       |
| 備考            | 体重減少は母集団との統計的優位差(P=0.01)を認めない。<br>統計的優位差(P=0.01)を認めた場合は再測定(2回まで) | 再測定についての詳細規定あり。<br>※不活化インフルエンザワクチンについては、腹腔内投与あるいは皮下投与 | 死亡個体がいた場合不適合。<br>病気の兆候を認めた場合、再測定。                       |

# 初代細胞培養ワクチン



- 生きたウイルスを有効性成分とするワクチン・医薬品の場合、有効成分含有液の不活化処理が出来ないことから、その生産には、より安全な細胞基材の使用が望まれる。
- 初代細胞は、感染性因子、腫瘍性のリスクが低いものの、生産における外来性混入因子否定の管理の困難性があった。
- しかしながら、最新のハード生産技術により、外来性因子混入のリスクを低減出来る。
- また、動物コロニー、個体、細胞の各段階での適切な外来性因子否定試験を行うことにより、安定した生産が可能である。

# 継代(株化)細胞培養ワクチン

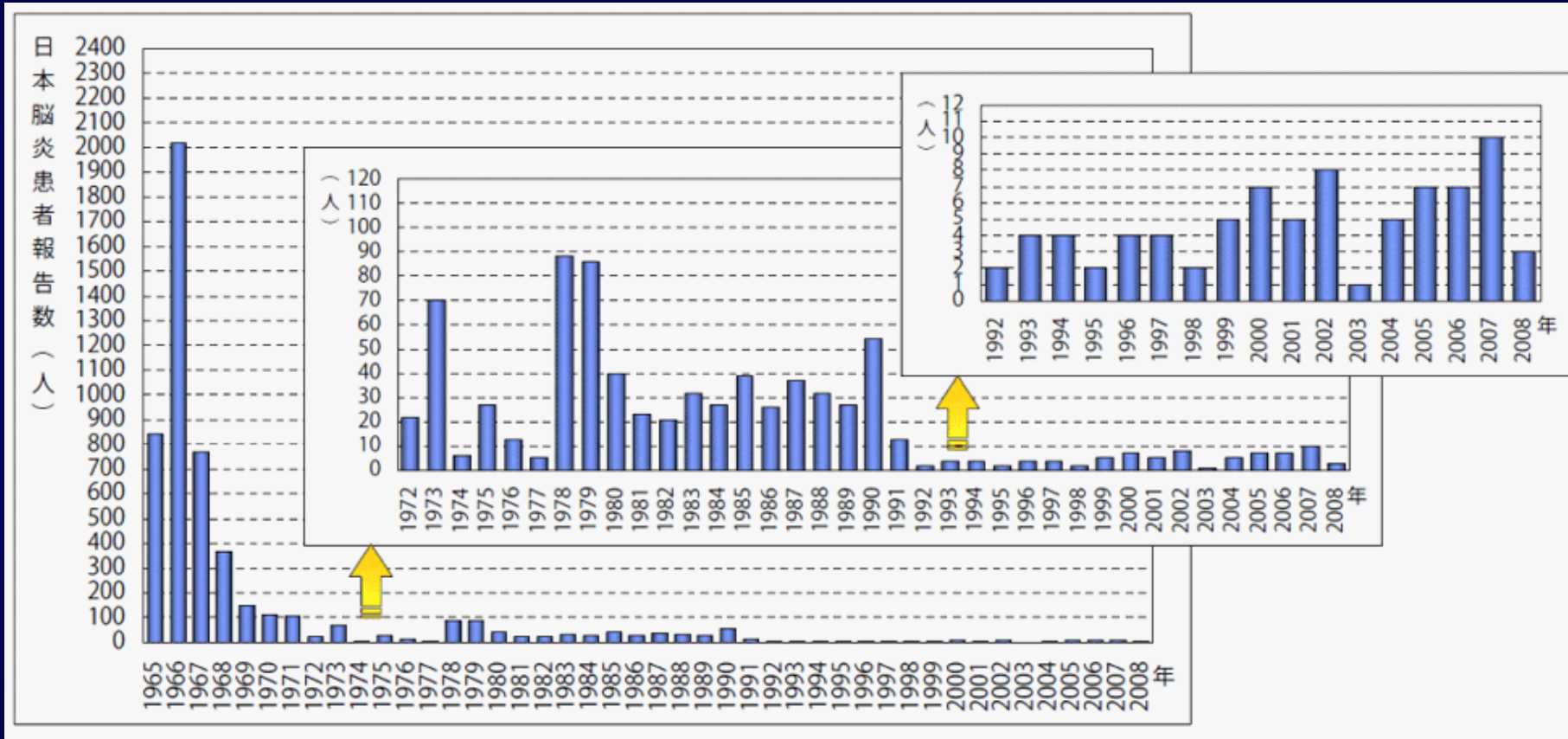


| ワクチン              | 日本脳炎ワクチン     | 乾燥細胞培養<br>日本脳炎ワクチン   |
|-------------------|--------------|----------------------|
| シード               | 北京株または別に定める株 | 北京株                  |
| 細胞                | 3～5週齢マウス     | Vero細胞               |
| 品質試験<br>(細胞基材による) |              | 個体別培養細胞の試験<br>(培養観察) |

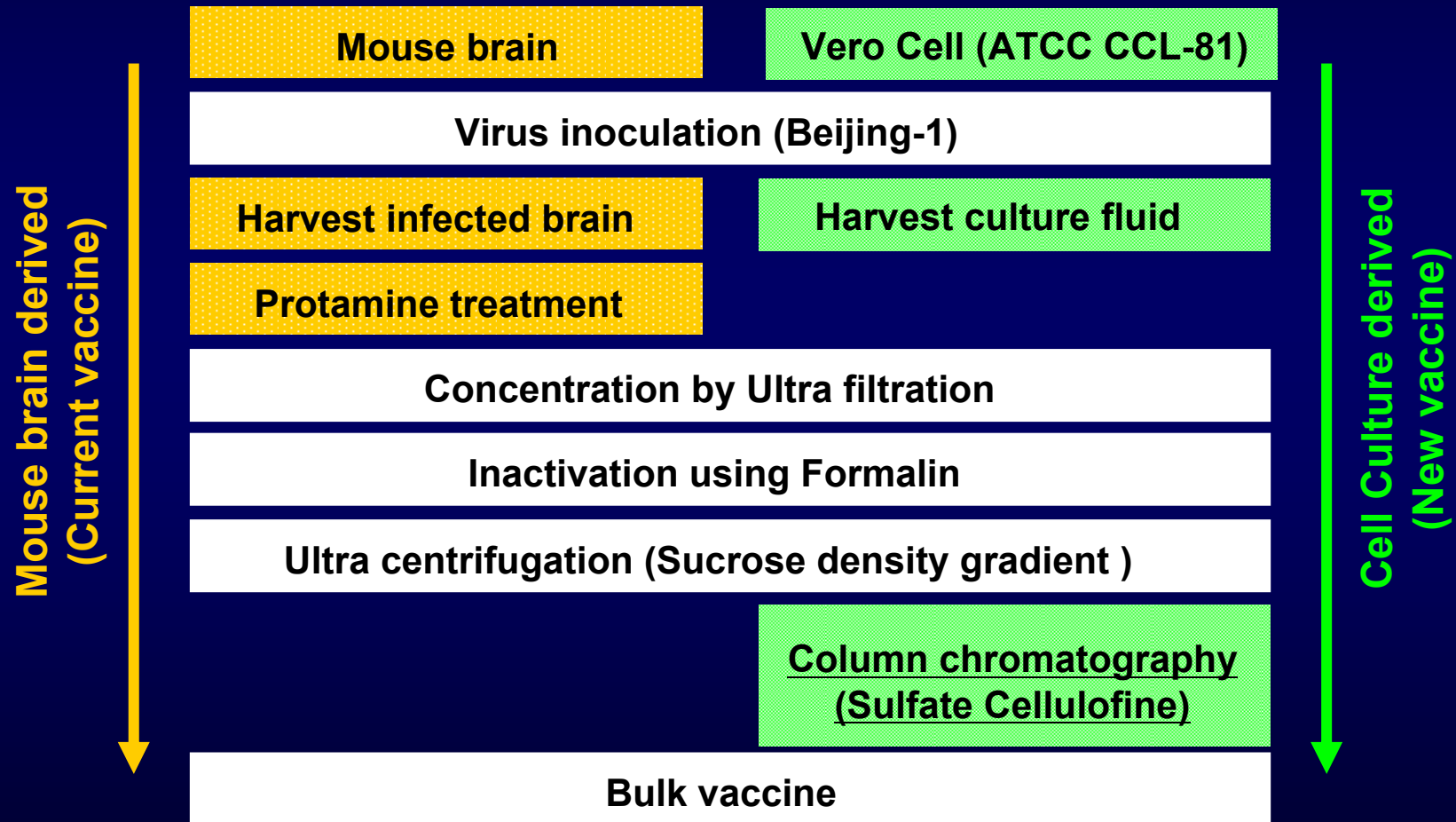
# 日本脳炎患者報告数

感染症発生動向調査

(国立感染症研究所感染症情報センターHPより)



# Production Processes



# ウイルスバンクの試験



DRAFT GUIDANCE : Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases : September, 2006

- Identity
- Bacterial and fungal sterility
- Mycoplasmas
- *Mycobacterium tuberculosis* (if appropriate),
- Adventitious viruses (in vitro and in vivo tests),
- Phenotype (e.g., tissue tropism, attenuation properties, temperature sensitivity),
- Genetic stability
- Additional tests (e.g., PCR, Antibody Production assays )

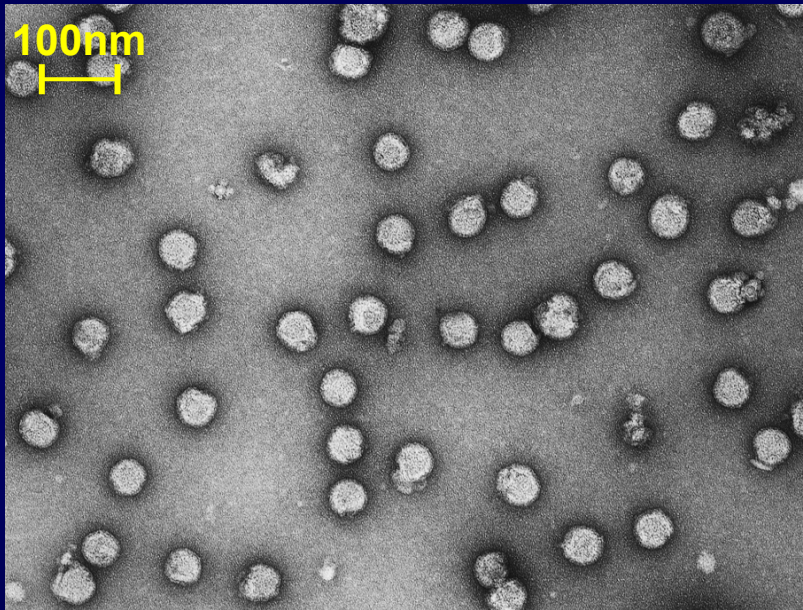
# 細胞基材の管理

---

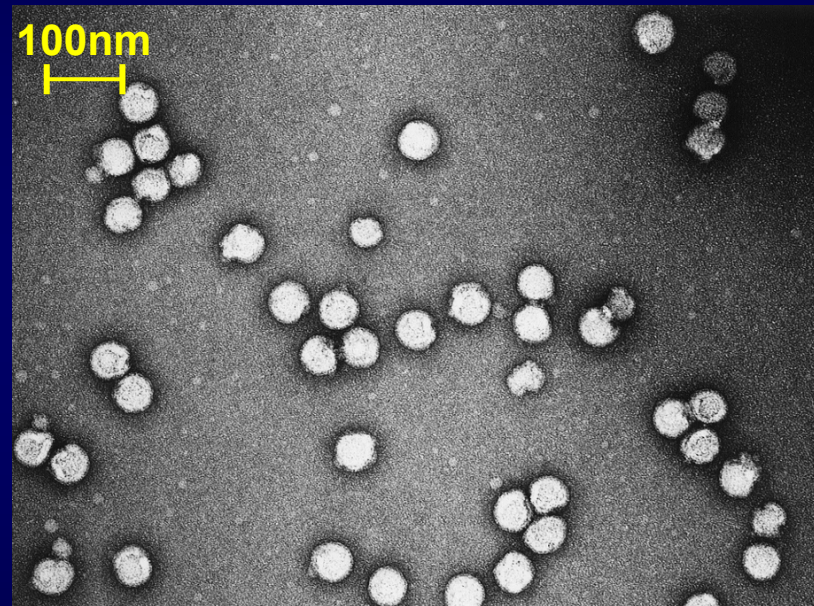


- ICH－GLに従う。
  - ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products
  - ICH Guidance, Q5A: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin,

# Electron Microscope

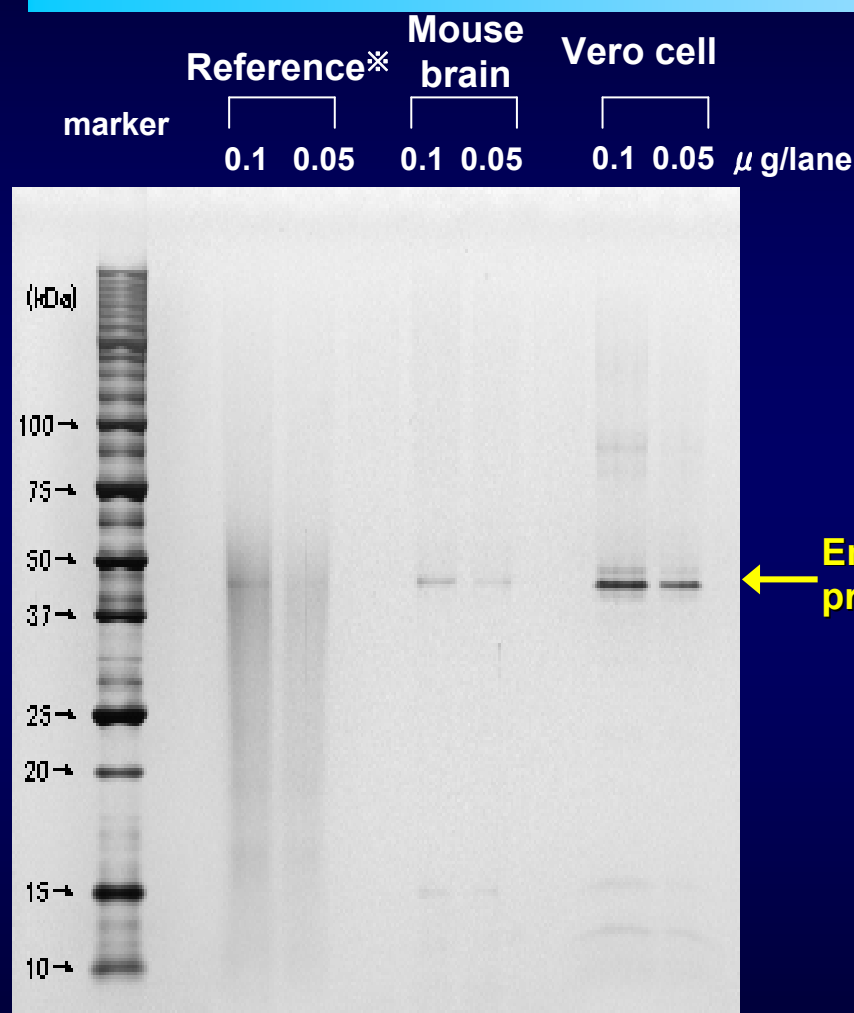


**Mouse brain derived JEV**



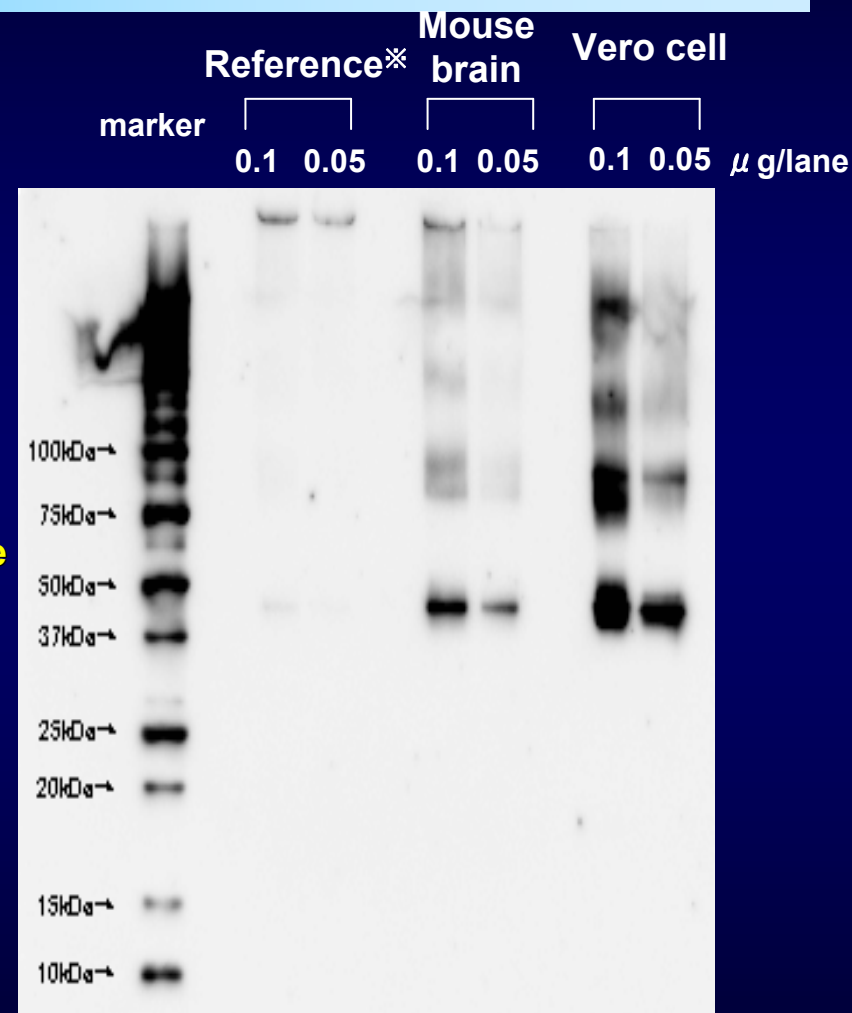
**Vero cell derived JEV**

# SDS-PAGE and Western blot



**SDS-PAGE Ag staining**  
5~20%gel non-reduced

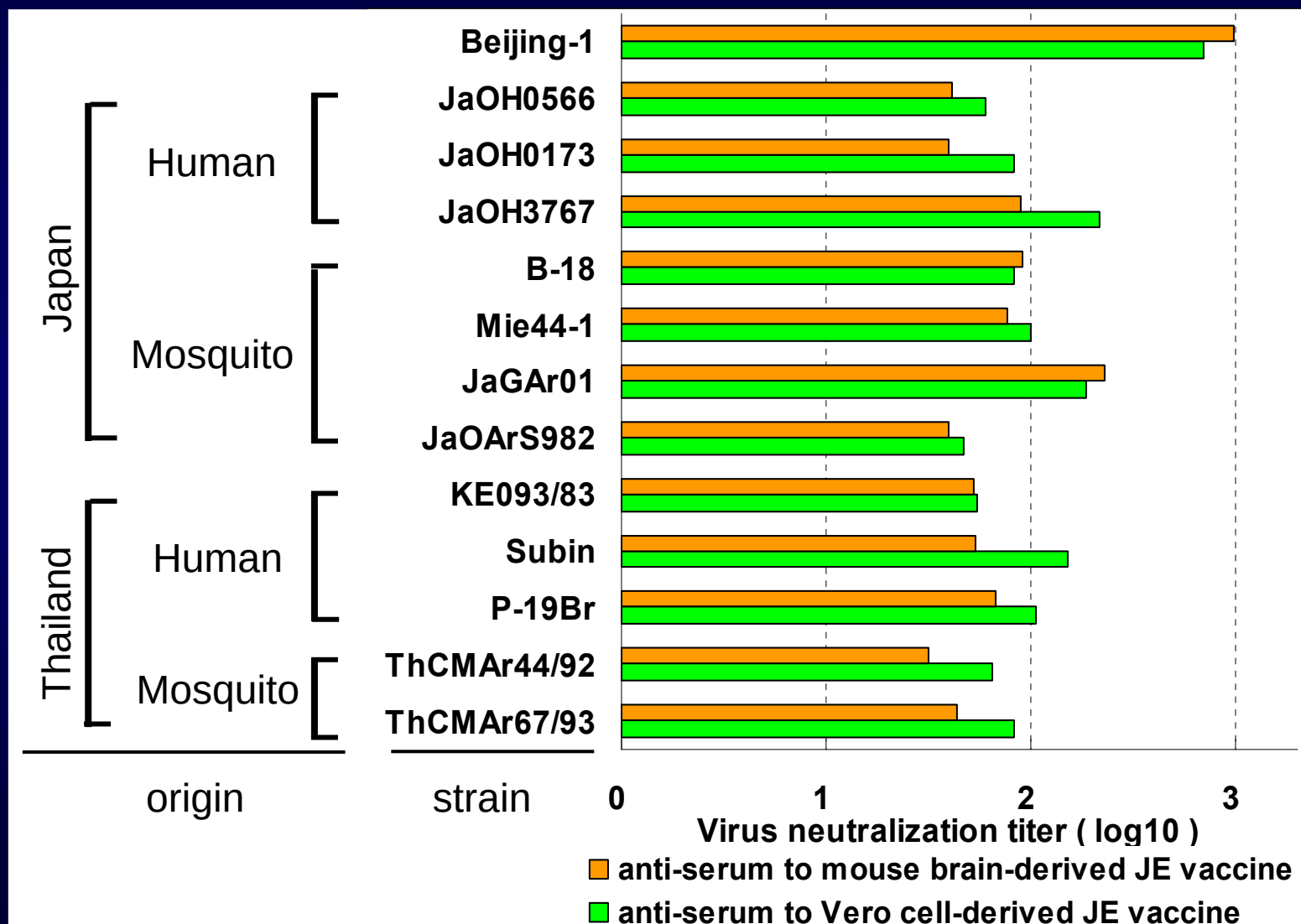
※: for Potency assay, Lot.#105-2006



**Western blot**  
(N.04 antibody against envelope protein)  
5~20%gel non-reduced

# Virus neutralization spectrum

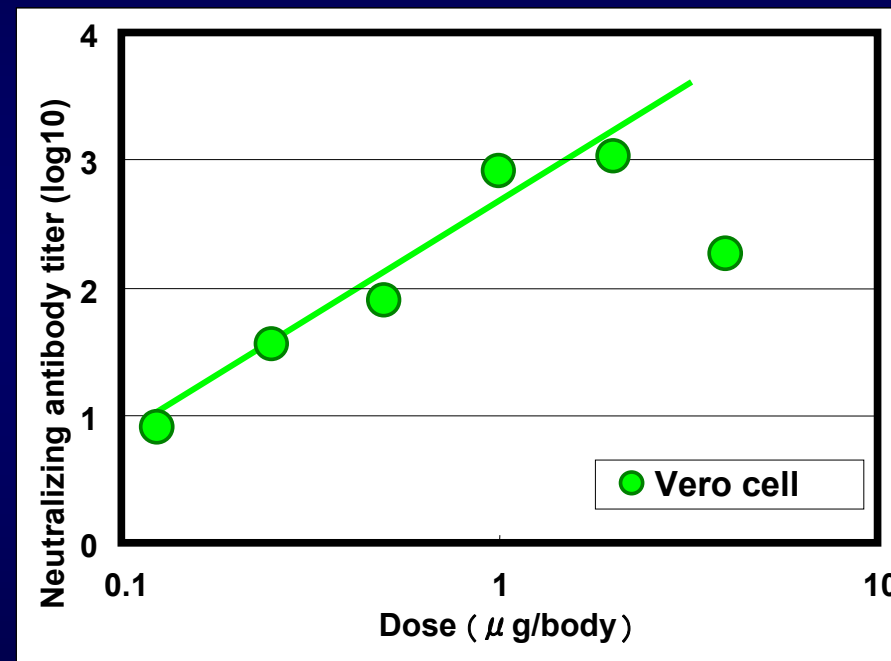
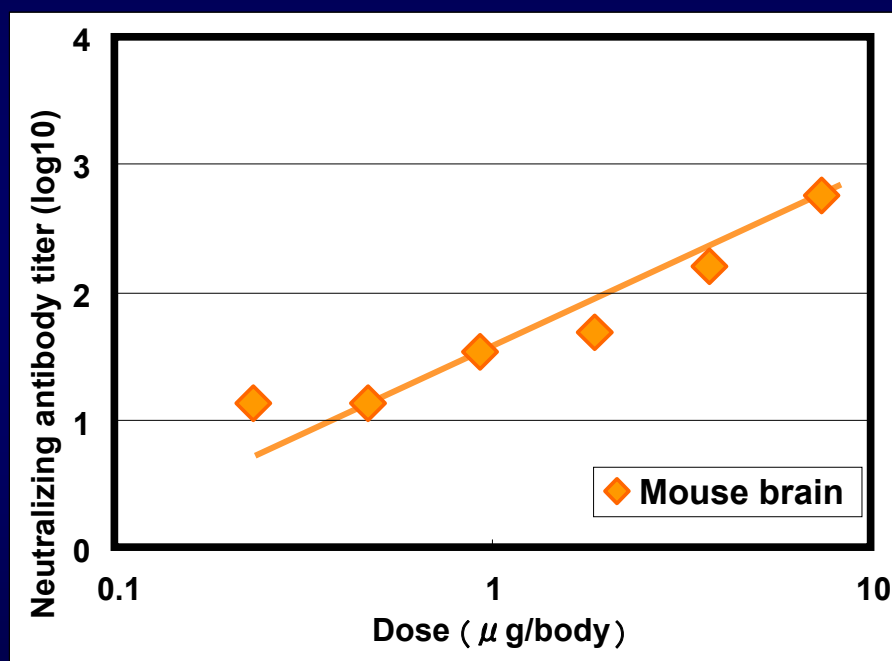
Sugawara et.al. Biologicals. 2002 Dec;30(4):303-14.



# Mouse immunological study

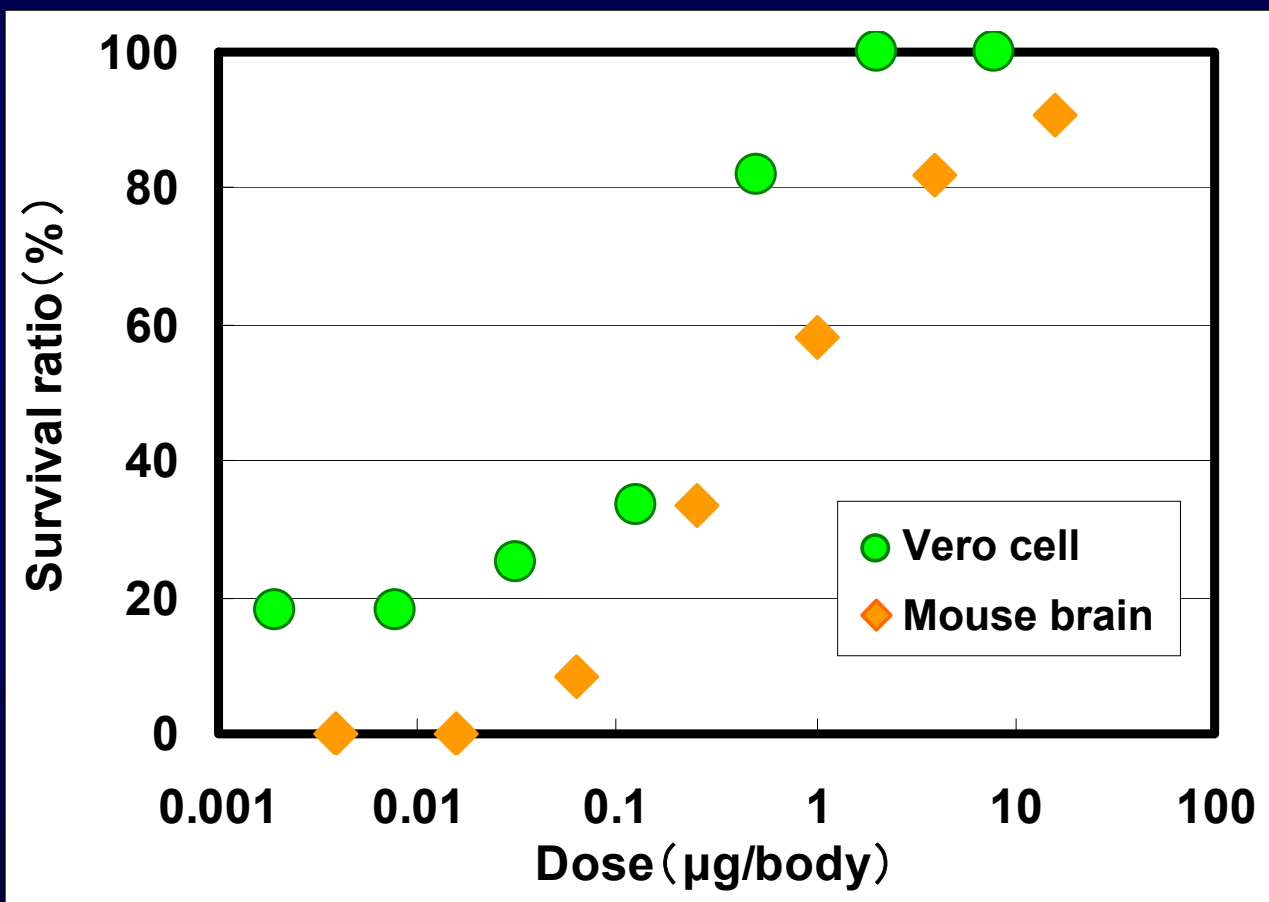


## Dose-responsive range



# Evaluation of protective efficacy

## Dose response curve



# Manufacturing Process



Vero Cell (ATCC CCL-81)



## Manufacturing process (Vero cell derived)

Vero Cell  
(ATCC CCL-81)

Virus inoculation  
(Beijing-1)

Harvest culture  
fluid

Concentration by  
Ultra filtration

Inactivation using  
Formalin

Ultra centrifugation  
(Sucrose density gradient )

Column chromatography  
(Sulfate Cellulofine)

Bulk vaccine

Vero Cell (ATCC CCL-81)



Virus inoculation  
(Beijing-1)



Ultra centrifugation  
(Sucrose density gradient )



# 継代(株化)細胞培養ワクチン



- 不活化されたウイルス又は成分を有効性成分とするワクチン・医薬品の場合、有効成分液の不活化が可能なことから、その生産には、継代(株化)細胞基材の使用できる。
- 継代(株化)細胞は、感染性因子、腫瘍性のリスク確認が必要であるが、生産における外来性混入因子否定の管理が容易である。
- 継代(株化)細胞培養技術を用いたワクチンにおいては、バイオ医薬品の観点からの製造管理、品質管理を行うことが出来る。

# まとめ



- 細胞培養技術を用いて生産されるウイルスワクチンは、その有効性成分の特性（生ウイルス、不活化ウイルス、ウイルス成分）に合わせて、細胞基材及び生産システムが選択される。
- 初代細胞を用いた生産では、過去外来性混入否定の管理が困難であったが、生産技術の進展、検査技術の進展により、そのリスクは大幅に低減された。
- 継代（株化）細胞培養技術を用いたワクチンにおいては、バイオ医薬品の観点からの製造管理、品質管理を行うことが可能である。

# 課題



- 感染症の原因である病原体を増殖させて予防用ワクチンを生産する場合、その病原体に依存した個々の製造法や品質管理の確立が求められる。
- ウイルス否定試験、異常毒性否定試験など、細胞培養由来のワクチンに用いられる試験法及び判定基準のハーモナイズが期待される。
- ワクチン開発において、細胞基材のプラトホーム技術として活用が期待される。