

ている。

ヒト用ワクチン等の検定にもちいられる異常毒性否定試験では、体重300〜400gのモルモットを用いる。使用前5日以上観察して、異常を示さず、かつその体重が順調に推移したものを試験に用いる。試験はモルモット1匹に対し5mLの製剤を腹腔内に投与し、7日以上観察する。観察期間中、いずれの動物も異常をしめさないとき、この試験に適合とする。異常の一つである体重減少については、コントロール群と比較して $P=0.01$ のレベルにおいて、統計学的に有意の差が認められたときには再試験としている。

対象ワクチン

異常毒性否定試験の対象製剤は、インフルエンザワクチン、インフルエンザHAワクチン、乾燥組織培養不活化A型ワクチン、ガスエソウマ抗毒素、乾燥ガスエソウマ抗毒素、不活化狂犬病ワクチン、乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン、コレラワクチン、乾燥ジフテリアウマ抗毒素、ジフテリアトキソイド、沈降ジフテリアトキソイド、成人用沈降ジフテリアトキソイド、ジフテリア破傷風混合トキソイド、沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド、腸チフスパラチフス混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、乾燥日本脳炎ワクチン、破傷風トキソイド、沈降破傷風トキソイド、乾燥はぶウマ抗毒素、沈降はぶトキソイド、沈降B型肝炎ワクチン、沈降B型肝炎ワクチン(huGK-14細胞由来)、組換え沈降B型肝炎ワクチン(酵母由来)、

組換え沈降B型肝炎ワクチン(チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞由来)、組換え沈降pre-S2抗原・Hbs抗原含有B型肝炎ワクチン、百日せきワクチン、沈降精製百日せきワクチン、百日せきジフテリア混合ワクチン、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン、沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン、発しんチフスワクチン、乾燥ボツリヌスウマ抗毒素、乾燥まむしウマ抗毒素、ワイル病秋やみ混合ワクチン、肺炎球菌ワクチンに対して異常毒性否定試験を実施している。

このうち国家検定試験において乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン、沈降B型肝炎ワクチン、肺炎球菌ワクチンに関しては安全性試験として、異常毒性否定試験が唯一行なわれている。

B. 研究方法

ジフテリア・百日せき・破傷風混合(DPTワクチン)に対する異常毒性否定試験による国家試験不合格の件数を年度毎に解析する。また不合格件数と製剤の改良などとの関連から、有効性について考察する。さらに近年の肺炎球菌ワクチン不合格ロットの結果より、異常毒性否定試験の有効性および問題点を考察する。

C. 研究結果

DPTワクチンにおける異常毒性否定試験の試験実績

わが国の百日せきワクチンは1948年から接種が始まっている。当時は百日咳単味ワ

クチンで1958年から百日咳ジフテリア混合ワクチンとして接種された。1968年から破傷風トキソイドを加えた百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチンとして全国的に接種された。このワクチンには百日咳菌体が使われたため、発熱などの副反応が頻発し、1974年12月および1975年1月に接種後の死亡例がみられた。国立予防衛生研究所（現在の国立感染症研究所）において百日咳菌体を含まない精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンが開発され1981年秋より接種が開始された。

国立感染症研究所に保存されている資料によると、1964年から2006年までの百日せきワクチンの検定結果が保存されている。年代別のうちわけは1960年代が123ロット、1970年代が325ロット、1980年代が183ロット、1990年代が216ロット、2000年代が162ロットである。異常毒性否定試験において不合格になったものは、1960年代が9ロット、1970年代が13ロットで1980年代以降不合格となったロットは存在しない。1960年および70年代における全菌体ワクチンの副反応の発生率の高い時期に異常毒性否定試験での不合格率は極めて高いことがわかる。臨床における副反応とモルモットにおける異常所見の相関についての詳しい解析結果はなく、試験の実効性を論じるのは困難であるが、この時期に毒性検知のための安全性試験として大いに機能していた可能性は高い。1981年に国立予防衛生研究所で開発された無細胞の精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン接種開始後、ワクチン後副

反応の発生率は激減した。異常毒性否定試験による不合格ロットも検出してない。

異常毒性否定試験の改良

DPTワクチンの例から想定できることは、精製百日せきワクチンの接種以降、副反応の発生率が激減していることから、製剤自体が極めて安全になったことに加えて、製剤の製造法を含めた品質管理の改善がはかられていると考えられる。異常毒性否定試験を毒性の定量的な検出試験としてとらえるのであれば、DPTワクチンに関して、製剤の汚染度は試験の検出限界を下回っていると考えられる。

ワクチン接種動物における異常を客観的に評価できる方法として、1993年より、われわれは体重測定値をトレンド解析している。検体接種後のモルモットの体重増減は、多数例解析すると正規分布することが明らかである。そこで試験で用いたモルモットの体重減少率が母集団のものの1%未満の場合異常とすることとした。このことにより、かつて合格ロットと同じ品質であるかどうかをチェックできるようになった。すなわち「死亡を含めて異常値を示すかどうかの検査」から「これまでの合格ロットとの品質の均一性が保たれているか」という観点で試験を行なわれている。トレンド解析はヒト用ワクチンのすべての製剤において個別に合格ロットの母集団を作製し、3年を目安に漸次母集団のデータのアップデートを図っている。

近年の異常毒性否定試験の現状

2005年に肺炎球菌ワクチンに対する異常毒性否定試験において不合格ロットを検出した。第一回の試験において一匹の死亡個体が認められ、生存個体も体重減少率が統計学的に有意差を認めた。このため生物学的製剤基準及び標準手順書に従い「再試」とした。第二回の再試験でも同様の体重減少、肝臓組織の病理検査および血液検査に異常を認め「再試」となった。最終試験においても同様な所見を認めたため、「不合格」と判定した。体重の減少率は直近のロットと比べても明らかに減少しており、白血球数においても有意に減少していた。肺炎球菌ワクチンについては直近のロットにおいて体重減少率のトレンド解析において低下傾向がみられていたが、当該ロットについては明らかな基準値割れ、および精査による血液毒性が判明した。不合格判定後に行なわれた現地査察において、「製造タンクと充填機をつなぐチューブからリークが見られたことが明らかになっていたが、製造所側が報告を怠っていた」という報告がなされている。

問題となったロット以外でも肺炎球菌ワクチンに関しては、製造バルクの違いと異常毒性否定試験でのトレンド解析の結果がほぼ相関しており、均一性を検出するのに有効な試験法といえる。

D. 考察

異常毒性否定試験の今後

異常毒性否定試験の基準値については、

日本とそれ以外では若干異なっている。たとえばヨーロッパ薬局方(EP)では「接種後24時間以内もしくはモノグラフで規定されている時間内に死亡の場合、異常」とされているし、アメリカ薬局方(USP)では「接種後48時間観察し、死亡がない場合もしくは異常所見を示さない場合正常」と規定している。先にも述べたごとく、現在日本における異常毒性否定試験の主眼が品質の均一性にあるため、異常の観察のみならず、接種後7日間の体重変化率のトレンド解析を行なっている。

肺炎球菌ワクチンの異常はまさに、トレンド解析で検出できたもので、安全性試験として有効であるといえる。一方でヨーロッパは異常毒性否定試験の重要性に関して懐疑的であるところは確かである。ワクチンが今なお生物由来の材料を用いていることを考慮すると、GMPに基づく製品であっても有効な安全性試験はロットリリース前に必須であるとする。今後安全性試験法の国際的調和をさらに図る必要があると考える。

われわれの安全性試験設定の基本方針は

- 1) 毒性を検出するためにできるだけ感度の高い方法を採用する。
- 2) 試験はなるべく簡便な方法を選ぶ。In vivo試験のin vitro試験への代替を積極的に検討する。
- 3) 定性的な方法よりも定量的な方法を選択する。
- 4) 再現性の高い試験法を選択する。

このような基本方針に従って、今後異常毒性否定試験にかわる新しい安全性試験の開発および導入が望まれる。

E. 結論

ワクチン等の安全性試験として、異常毒性否定試験が行なわれているが、日本とそれ以外で基準値が若干異なる。日本の基準では「死亡」をはじめとした異常所見以外に、体重減少率をトレンド解析することにより、製剤の均一性を検討することができる。この点も含めて、安全性試験法の国際調和をさらに図る必要がある。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguch K: Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control, *Vaccine, In press*.

異常毒性否定試験の有効性と国際調和

分担研究者：国立感染症研究所・血液・安全性研究部
浜口 功
水上拓郎

試験実施

使用動物選出
ランダム化
接種
測定
判定

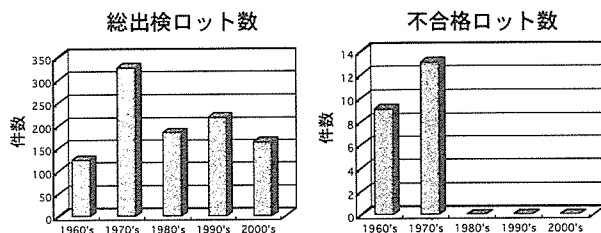


「体重約350gのモルモットを用いる。」
「統計処理に必要な匹数の動物を用い、検体を一回腹腔内に接種し、7日間以上観察する。」
「検体の量は、（中略）動物一匹当たり5mLとする。」

判定

観察期間中、いずれの動物も異常を示さないとき、この試験に合格する。
「異常には、体重減少が含まれる。接種動物の体重減少が、同種製剤接種動物母集団と比較して、 $P=0.01$ のレベルにおいて、統計学的に有意な差を認めてはならない。」

DPTワクチンの異常毒性否定試験件数



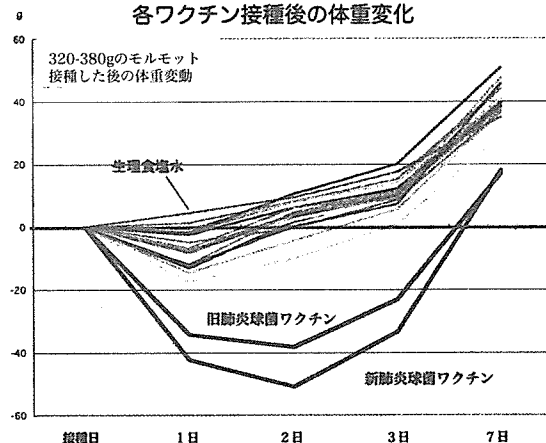
異常毒性否定試験法

- 1: 動物
体重300～400gのモルモットを用いる。動物は使用前5日以上観察して、異常を示さず、かつその体重が順調に推移したものでなければならない。
- 2: 検体の量
検体の量は、別に規定する場合を除き、動物1匹あたり5mLとする。
- 3: 操作
統計処理に必要な匹数の動物を用い、検体を一回腹腔内に接種し、7日以上観察する。原則として、生理食塩水を接種した動物を同数コントロール群としておくが、統計学的に十分な同種製剤の接種動物母集団がある場合には、この母集団を利用することもできる。
- 4: 判定
観察期間中、いずれの動物も異常を示さないとき、この試験に適合とする。異常には、体重減少が含まれる。接種動物の体重減少が、観察期間中、コントロール群と比較して $P=0.01$ のレベルにおいて、統計学的に有意な差を認めてはならない。同種製剤接種動物母集団をコントロールとして利用する場合には、この母集団と比較して、 $P=0.01$ のレベルにおいて、統計学的に有意な差を認めてはならない。統計学的に有意な差が認められたときには再試験する。再試験の繰り返しは2回までとし、2回目以降の再試験で有意な体重減少を認めた場合には病理学的所見を考慮して判定するものとする。ただし、製剤の有効成分の特性として接種動物の体重減少がコントロール群以下になる製剤は、この限りではない。

→ワクチンに関しては病理を評価基準として加えた（2006年）
→肺炎球菌ワクチンに関しては病理・血液毒性を評価基準として加えた（2006年）

（生物関連製剤ハンドブック2004より）

各ワクチン接種後の体重変化



世界の一般毒性試験と日本の異常毒性否定試験

Criteria of Innocuity test (WHO)

The final product shall be considered innocuous if the animals survive for at least seven days without showing significant signs of toxicity.

→異常に対するCriteriaが明記されていない

USP: Safety Test

Observe the animals over 48 hours following the injection. If, at the end of 48 hours, all of the animals survive and not more than one of the animals shows outward symptoms of reaction not normally expected of the level of toxicity related to the article, the requirements of this test are met.

→生死のみを判定基準とする事になってしまっている

EP: Abnormal Toxicity

The substance passes the test if none of the mice die within 24h or within such time as is specified in the individual monograph.

→生死のみを判定基準とする事になってしまっている

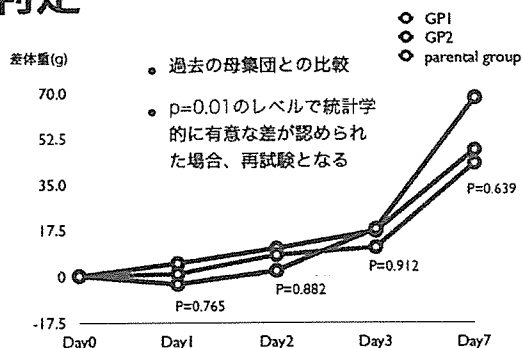
生物学的製剤基準：異常毒性否定試験

観察期間の再定義、製剤の特異性の考慮、過去の製剤との同一性を考慮。特定の検出対象を持たない。

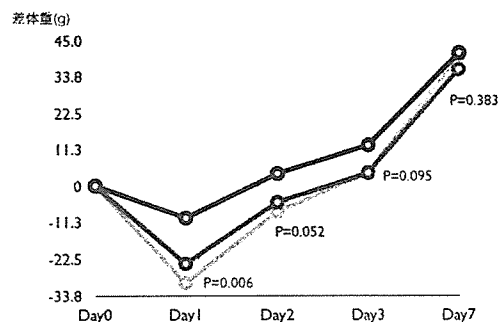
過去の製剤との間の同一性を評価する。

製剤固有の反応を逸脱する反応が観察された場合、これを異常とする。

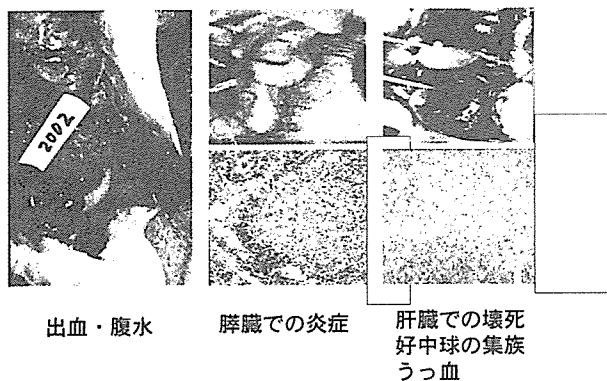
判定



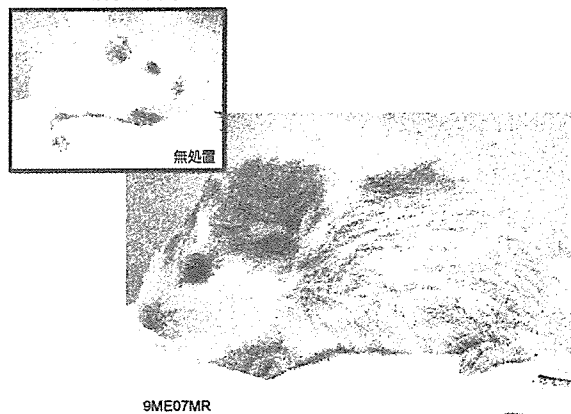
再試験×2回



生死だけでは見えてこない様々な病理変化
一体重トレンドを逸脱した製剤で認められる主な病理所見ー



肺炎球菌ワクチン9ME07Rの皮毛に与える影響



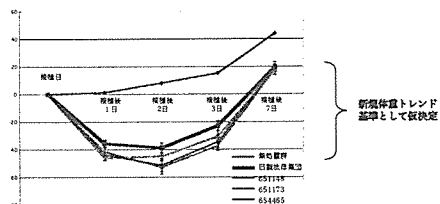
肺炎球菌ワクチン 異常毒性否定試験 特別審査報告書

方 法：肺炎球菌ワクチンの特別審査を計3ロット（651148, 651173, 654465）について各10匹のモルモットを用い、一般試験法（異常毒性否定試験）に準拠して実施した。

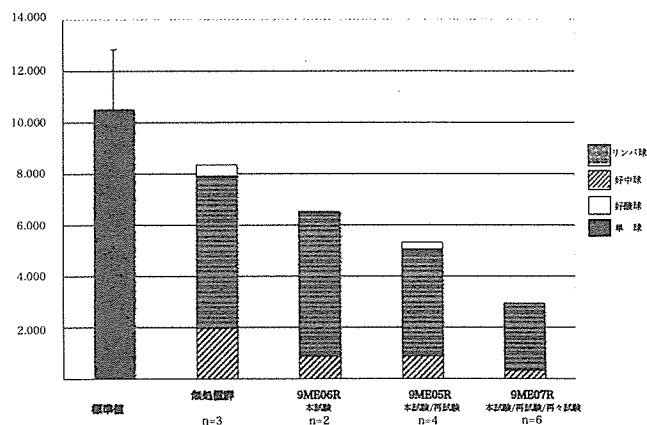
結 果：10匹のモルモットの体重推移を統計学的に解析し、生物学的製剤基準に準じて判定した結果、「適合」と判定された。しかし、旧製法による肺炎球菌ワクチン（旧肺炎球菌ワクチン）接種母集団と比較すると下記に示す様に、全てのロットにおいて「不適」となり、旧肺炎球菌ワクチン母集団を用いた検定・検査は難しいと考えられる。今後、これらの3ロットに加え、少なくとも2ロットのデータを同製剤の新規母集団とし、今後の検定の判定感度とする事が必要である。

ロット番号	H	試験日	検査結果			
			1日	2日	3日	7日
651148	10	7B	○	×	×	○
651173	10	14B	×	○	○	○
654465	10	7B	×	×	×	○

○：P=0.01レベルで有意差なし ×：P=0.01レベルで有意差あり



末梢白血球数の変化

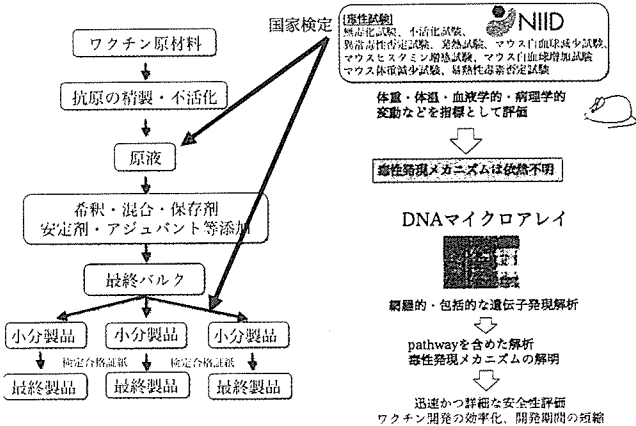


肺炎球菌ワクチンの新異常毒性否定試験法の確立

- (1) 体重のトレンドを作成する
特別審査で3ロット、追加で2ロットを検査
各ロットに対し10匹のモルモットでトレンドを作成
- (2) 血液データの採取
上記のトレンド作成に用いたモルモットの血液・生化学検査
- (3) 病理データの採取
上記のトレンド作成に用いたモルモットの病理検査

仮の異常毒性否定試験の判定基準を策定し
検定 4 ロットを並行検定として基準のチェックを行う

ワクチンの新しい安全性システム



異常毒性否定試験の現状

現行法の長所

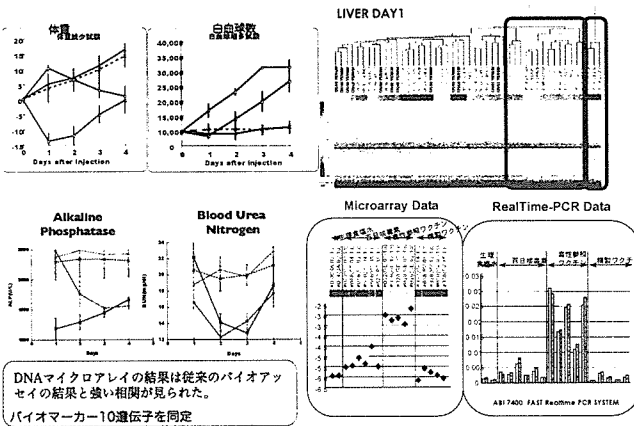
- 1 ; 簡便
- 2 ; 単一の手法で、幅広い製剤に対応
- 3 ; 数値化等、客観的評価が可能
- 4 ; 再現性が高い

現行法の短所

- 1 ; 感度、再現性（病理・血液データを加味）
- 2 ; 原因の予測が困難
- 3 ; 病理学的手法には、高い熟練度が要求される
（感染病理部の協力による教育訓練を強化）

日本における異常毒性否定試験の実効性を世界に発信する

百日咳ワクチンのトランスクリプトーム解析



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, et al.	Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control	Vaccine			In press

IV. 研究成果の刊行物・別冊

V. 参考資料、その他