

Decentralized Procedure、または Mutual Procedure、一国内で行う National Procedure の方法がある。開発されたワクチン製剤の難易性、および見込まれる市場の汎用性を考慮にいれたヨーロッパのシステムは規制当局およびメーカー側にもメリットのある手法といえる。新しいワクチンの審査については、既存のガイダンスに従ってワクチンの有効性や安全性に関するエンデポイントや基準値の妥当性を検討する。また審査には多くの専門家の意見を参考にしている。

### 2. 3 GMP 査察

査察を実際に行うのは、各国の NRA の査察官が行っている。NRA から EMEA に委員が派遣されており、両者の間では密接に連絡が取られている。EMEA は国間で行われる対象製剤について査察のポイントを各 NRA に示したり、国間での査察の質の差を減らすべくハーモナイズを図っている。とはいえ、査察のポイントの強弱はあるようで、製造所を持つ国が査察を行い、通常、EU の他の国は査察を行わない。また GMP 査察については、EU は EU 以外の国の NRA 間で相互認承システム (MRA: Mutual Recognition Agreement) の拡大を行っている。異なる国間の査察官の技能のハーモナイズや、情報の共有を行っている。このことにより、査察結果の情報をパートナー間で共有することができ、企業も受ける査察の数が少なくてすむ。またこのシステムにより、輸入の際の査察、および輸入における規格試験を省略することができる。この MRA を EMEA はオーストラリア、ニュージーランド、カナダ、スイスと結んでいる。日本とは生物学的製剤、免疫学的医薬品、無菌医薬品が除外された形で協定の運用が開始されている。ちなみに EU は米国とは MRA の協定を結んでいない。

### 3. ヨーロッパにおける Batch release

EU における Batch release は、EDQM と OMCL ネットワークで行われる中央審査・検定のほかに、各国の NCL で個別に行われている。ただし、共通の検定基準(OCABR)を設け OMCL 内で同一の作業が行われているとともに、ガイドラインや試験に関する手引書が作成されている。加盟国の NCL は OCABR に従って試験を行うことにより、加盟国内で通用する(合格)証明書を発行できる。相互承認を行うにあたって、各国の品質管理システムを高いレベルで均一化するために各試験機関の認証資格として 2003 年より ISO/IEC17025 を相互承認規格としている。またすべての国の国家検定においては、試験と Protocol Evaluation (製造工程の要約と自家試験記録の審査)で行われている。

NIBSC はイギリスの NCL として OCABR に従って全ロットで Batch release を行

っている。NIBSC の DPT ワクチンの担当者によると、総勢6名で Testing (試験) と Protocol evaluation (書類審査) を行っており、1冊の Protocol evaluation を平均半日で行うとのことであった。また検定を行ったサンプルについては、一定量を一定期間保管し、必要に応じて再度試験および解析を行うことができるシステムになっている。

#### 4. ヨーロッパにおける市販後のチェック

ヨーロッパ各国からワクチンの副反応に関する情報が EMEA における pharmacovigilance 活動において集計されている。訪問したイギリスでは MHRA の VRMM がイギリス国内の集計を行っている。方法は、ワクチンメーカーからの情報と臨床医が発行するイエローカード (予防接種証明書) 制度を用いて収集している。ドイツでは PEI の pharmacovigilance 部門が全国の臨床医および、ワクチンメーカーからの情報をオンラインで収集している。メーカーからのものがほとんどで、現在全体の 10~15% の臨床医からも情報を得られ始めた。これらの情報は各国から EMEA に集められ互いに把握できる状態になっている。また一部の集計データおよびサマリーはインターネット上でオープンにされている。例えば HPV ワクチンについても 2008 年においてはこれまでに (2008 年 9 月上旬) 265 例の報告がなされている。日本においてはメーカーからの情報が総合機構に、また臨床医からの情報が厚労省に報告されており、情報の整理が必要であろう。ワクチンの市販後調査の強化の観点からも、日本における pharmacovigilance の確立が望まれる。

#### 5. 新型インフルエンザワクチンに関する動向

新型インフルエンザに関するワクチンは EMEA の CHMP のワクチンワーキングパーティー (VWP) で Centralized Procedure として市販承認審査が行われる。パンデミックワクチンは限られた期間に素早く供給されるべきであるのにもかかわらず、ターゲットとなるウイルス株が未定のため、モックアップワクチンであらかじめ限られた数の臨床試験で製造販売承認審査をしておき、実際のパンデミック用株でワクチンの製造販売承認が申請された場合には、core dossier approach といわれる審査によって、迅速に承認される事になっている (最短 3 日)。一方、プレパンデミックワクチンはモックアップワクチンと同様のコンセプトで臨床試験をより大規模におこなったもので、Centralized Procedure において決められたプロセスで承認を行っている。なおパンデミックおよびプレパンデミックワクチンに関するガイドラインがすでに EMEA から出されている。EMEA で承認をうけているパンデミックワクチン (現在はモックアップワクチン) は Daronrix、Focetria、Pandemrix があり、プレパンデミックワクチンは

Pre-Pandemrix がある。EMEA の承認に基づき、各国の責任で供給体制および供給契約をメーカーとの間で確立することになっている。

イギリスでは現在プレパンデミックワクチンの供給契約を止めている。コストが莫大なため、いまや抗ウイルス剤での対応を重視している。コストベネフィットを考慮し、現在は他国の動向を注視している。これまでに英国ではわずかなストックパイルをおこなっているが、プレパンデミックワクチンの接種は考慮していない。

ドイツは H5N1 ワクチンの備蓄の計画を止めた。その理由はパンデミックの際に流行する株が H5N1 とは限らないためである。いかに迅速に流行株の情報をつかみ、確保するかを重視しており、わずかなストックパイルをおこなっているのみである。



厚生労働科学研究費補助金  
 (医薬品・医療機器等レギュレータリーサイエンス総合研究事業)  
 国家検定の国際調和に関する研究(H19-医薬一般-012)

分担研究報告書

ワクチンの国際化とアジアのワクチン国家検定の現状と課題

研究分担者 堀内善信 国立医療機器総合機構

研究要旨:アジア各国の国家検定の現状調査を行った。欧米を中心に開発された新たなワクチンの実用化が相次ぐ中で、アジア各国が、国家検定による製造所と独立のワクチン品質管理体制を維持していく上での問題点を検討した。こうした状況に対応するため、欧州でも各国の国家検定機関の技術連携が行われており、アジアにおいても、今後各国の技術及び情報の交流なしには、国家検定自体が形骸化していく可能性があると考えられる。

国家検定の役割

- ・ ワクチンは生物由来材料による複雑な医薬品であり、精製抗原の場合も減毒やコンジュゲーション過程での変動を含み、副反応原性や有効性のロット間変動は避けられない。
- ・ 毒性や力価等の品質管理試験も、それ自体結果に一定の変動を含む。
- ・ ワクチンの品質に欠陥があっても、臨床的に明らかになるには長年月を要する
- ・ ワクチン一般健康人が投与対象であり、問題があった場合の影響は大きすぎる。
- ・ 国家検定は製造所とは独立した品質確認試験であり、製品に問題が見いだされなくても、試験成績の蓄積自体が様々な問題の改善、解決に有用である

ワクチン禍事件

- Cutter 社 IPV 事件 (1955 年) :

臨床試験ロットにポリオウイルスが

生残し、7万人の感染被害と 200 人の麻痺を起こした。

- 京都ジフテリア事件 (昭和 23 年)  
 トキソイド化工程とロット構成の不適切な扱いによりワクチンに毒素が残存し、69 人が死亡

教訓: ワクチンの問題はロット単位で起き、その影響は甚大である。

そこで、製造所とは独立の品質試験としての国家検定が重要と考えられている。

アジア各国のワクチン国家検定の現状

表 1. アジア各国の検定実施状況

	国家検定実施状況			
	検定機関	検体	試験	SLP確認 (成績書含)
中国	NICBPB	全ロット	選択したロット	全ロット
韓国	KFDA	全ロット	全ロット	全ロット
台湾	BFDA	全ロット	全ロット	全ロット
タイ	NIH	全ロット	全ロット	全ロット
インドネシア	BPOM	全ロット	選択したロット	全ロット
日本	NIID	全ロット	全ロット	全ロット

我が国を含めて調査した中国、韓国、台湾、

タイ、インドネシアはいずれも前ロットについて国家検定をおこなっているが、試験は、選択したロットのみのところもあり、また従来からの項目はよくやられているが、欧米から輸入している新しいワクチンについては、十分対応し切れているとはいえない。

新しいワクチン開発の現状と国家検定のあり方

2005年現在で、世界で約200のワクチン開発プロジェクトが進行しており、新しい技術に基づくものも多い。こうした状況に対して欧州でも国家検定機関の技術的協力関係の強化による検定制度の維持を図っている。製造者と独立の品質管理制度としての国家検定の維持のためにはアジアにおいても同様の取り組みが必要となっている。

表 2. 新しいワクチン開発の現状

	Live attenuated	Live recombinant	DNA	Inactivated	Component	Recombinant Ag	Conjugate	Proteosome	VLP	Virosome
Cholera	3		(1)	1			(1)			
ETEC	1(2)			1	2					
Shigellosis	4			1(1)	(1)		1		(1)	
Typhoid Fever	2(1)									
Rotavirus	5			2	1		(1)	1	(1)	(1)
Influenza virus	1(3)		1	2	1		(1)	1	(1)	(1)
Parainfluenza virus	1(1)				2					(1)
Respiratory		1(1)		1(1)	(1)					
SARS		(2)								
Streptococcus			(1)		(1)	1	1	3		
TB	(2)	2(3)			2	2	1(1)			
Anthrax		1			1					
Neisseria					2		2			
Neisseria					2		2			
Plaque		1				1				
Group A					1(4)	2	(1)			
Group B					(1)			2		
Chlamidia tracomatis					1(1)					
HSV-2	2				1					
HIV/AIDS		5(2)	2	(1)	4(5)	(1)	(1)			
Dengue fever	3(2)		(1)	(1)		(2)				
JE		1(1)		2						
West Nile		1(1)	(1)	(1)	(1)				(1)	
Hookworm Disease					1					
Leishmaniasis	(1)		(1)	1	1(1)					
Malaria					1					
Pre-erythrocyte		3(1)	1		1	2(1)	1			
Blood-stage		(1)			1	5(3)				
Sexual stage						1(1)				
Schistosomiasis					1(2)					
<i>Helicobacter pylori</i>				1						
Hepatitis B			2		1	1	1		1	
Hepatitis C	(1)	(2)	(1)		1	2(1)			(2)	
Hepatitis E			(1)						1	
Human		(1)	1(1)		(1)	(1)			3(1)	
Epstein Barr Virus		(1)			2					
Poliovirus	1					1(1)				

(WHO, 2005現在): 太字:臨床開発段階, (基礎開発段階)



厚生労働科学研究費補助金

(厚生労働省医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担研究報告書

国際規格及び局方試験法の国内導入に関して

研究分担者 佐々木次雄 (医薬品医療機器総合機構)

研究要旨

ISO/TC198 で作成した「ヘルスケア製品の滅菌及び滅菌保証」に関する国際規格は、ISO 13485 を受け、医療機器の滅菌規格として使用されている。日本ではこれらの ISO 規格の重要部分を滅菌バリデーション基準やガイドラインとして活用してきたが、5年ごとに改正される ISO 規格との間に齟齬が生じ、業界から困惑の声が上がっていた。そこで、ISO/TC198 関係者協力の下、医療機器の滅菌に使用されている EOG 滅菌、照射滅菌、湿熱滅菌、包装材の ISO 規格の JIS 化作業を行った。また、日米欧薬局方の代表者からなる薬局方検討会議 (PDG) で 1995 年より国際調和作業を行ってきた「無菌試験法」の最終結果について考察した。

A. 研究目的

3年間にわたった本研究事業において、第1年度は「ワクチンの品質保証システムに関する研究」として、国民に信頼のおける高品質の生物学的製剤を供給することを目的に「生物学的製剤の国家検定における品質マネジメント指針」を作成し、更にその英訳版を作成した。第2年度は「生物学的製剤に対する国家検定のあり方に関して」として、諸外国における国家検定制度の調査に併せて、日本における国家検定実績を整理し、諸先輩の発言等を参考にしながら国家検定制度のあるべき姿を提言した。第3年度は国家検定機関を退職したこともあり、新しい職場である医薬品医療機器総合機構で行ってきた「国際規格及び局方試験法の国内導入」に関して整理した。

B. 研究方法

ヘルスケア製品の滅菌及び滅菌保証に関

する国際規格を作成する ISO/TC198 (Sterilization of health care products)が発足したのは1990年であり、以来今日まで40種類以上の ISO 規格を作成してきた。TC198 発足当時、欧州では1992年末の欧州統合市場の実現を目標に各種欧州規格の策定が進められていた。一方、米国は医療機器の欧州規格作成に危機感を募らせ、医療機器の滅菌に関して国際標準化の必要性を提案し、ISO に 198 番目の技術委員会 (TC198) が発足した。1990年に第1回会議が開催され (WG1~WG6)、1991年に第2回会議 (WG7が追加) が開催された。分担研究者 (佐々木) は1992年に開催された第3回全体会議 (WG8~WG9が追加) より、2008年に開催された第18回全体会議まで毎回参加してきた。現在は、ISO/TC198 国内対策委員長として ISO/TC198 で制定した国際規格の JIS 化作業を推進している。

そこで、ISO/TC198 で作成した ISO 規格の JIS 化作業を行った。

1991 年に始まった日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議 (ICH) の活動とも相まって、3 局 (日局、USP、EP) の代表者からなる局方試験法の検討会議 (PDG) で局方関連試験法と医薬品各条 (添加物) の調和作業を推進してきた。「無菌試験法」も調和対象になり、1995 年より調和作業を開始した。2002 年に 11 項目の非調和部分を持ちながらも一応は調和署名された。しかし、規制当局と業界団体からなる ICH/Q4B から完全調和が求められ、その後も調和作業を続け、2007 年 10 月に再度調和署名がなされた。3 局間で調和された「無菌試験法」の現状について考察した。

### C. 研究経過

#### 1) ISO/TC198 活動と国際規格の JIS 化

2005 年 4 月から改正薬事法の施行に伴い、製造販売業者に係る「品質管理の基準に関する省令 (GQP)」及び製造業者に係る「製造管理及び品質管理の基準に関する省令 (QMS)」が制定され、医療機器についてより一層の品質確保が求められるようになった。厚生労働省は、医療機器の品質マネジメントシステムとして ISO 13485 を全面的に適用することにした。また、滅菌に関しては ISO 規格重視・準拠を打ち出しており、ISO/TC198 で作成した一連の滅菌法及び無菌性保証に関する国際規格をわが国においても滅菌関連の基準やガイドラインとして次々に反映されてきた (添付資料: 表 1)。しかし、医療機器の滅菌分野においてはこれらのガイドラインと国際規格との間に齟齬が生じていた。それを解消するために、WG1 (EOG 滅菌)、WG2 (放射線滅菌)、

WG3 (湿熱滅菌)、WG7 (包装) で作成した ISO 規格の翻訳 JIS 化作業を行ってきた (添付資料: 表 2)。翻訳 JIS は平成 21 年 3 月に発行予定である。

#### 2) 局方「無菌試験法」の国際調和

1996 年 2 月、バルセロナで "International Harmonization of Sterility Tests and Efficacy of Antimicrobial Preservation" に関する Interpharmacopoeial Open Conference が開催された。私も本会議に出席し、無菌試験法について Viewpoint of the Japanese Pharmacopoeia ということと講演した。バルセロナ会議で基本的に合意された事項を表 3 に示す。2007 年 10 月の調印では、表 3 に示した半分も国際調和テキストには反映されていない。最初から国際調和に係わってきた一人として、何故このような状態になったのかについて検証してみた。まずは「無菌試験法」は最も古い微生物試験法であるということに原因の一つがあるように思える。無菌試験法は、1932 年、英国薬局方に初めて導入され、USP には 1936 年、日局には 1951 年に導入されている。日局に本試験法が導入されたときの試験法適用製剤は注射用蒸留水と滅菌蒸留水のみであった。このように歴史のある試験法だけに調和作業においても各局の考え方に隔たりが見られた。最終的に無菌試験法の国際調和を担当した EP と日局とはお互いに譲歩しながらも完全調和したが、USP は独自の記載を確保しており、完全調和という観点からはほど遠いものであった (表 4)。調和段階で USP は一度も案を提示せず、調和作業が終了した時点で独自テキストを提出してくるようでは、今後の調和作業にも陰を落



とす可能性がある。

#### D. 考察

ISO規格のJIS化にもそれなりの制約はある。JIS化するべき国際規格については国内に3つ以上の製造所がなければ難しいと言われている。滅菌分野においては、例えば生物指標体(BI: Biological Indicator)のように国内には製造所はないが、滅菌分野では広く使用されているものもある。これらについてどのようにすべきかについては、経産省「標準化委員会」との意見交換も必要と考えている。同じようにWG9で作成している「無菌操作法によるヘルスケア製品の製造」に関する国際規格は日本薬局方とも関係が深い上に、省令GMPとも抵触するが、当局と十分話し合った上で、JIS化するべきかどうかを決めたい。

国際調和「無菌試験法」は、第15改正日本薬局方第二追補(平成21年9月)に収載されるが、USPとは異なる部分が多い。USPでは医療機器も対象にしているが、日局では対象外である(表5)。三薬局で無菌試験対象品目が異なることも三薬局方で完全調和できなかつた理由ではある。ICH/Q4B評価を待った上で再度調和作業に入る可能性はありえる。

#### E. 結論

1990年に発足したISO/TC198でこれまでに制定した国際規格は40種以上ある。ISOの行動基準に基づき、規格は5年ごとに見直すことになっている。1990年代に制定された第一世代国際規格の見直しはなされ、現在は第二世代規格の導入又は改正作業中である。国際規格の改正時期を考慮しながら、ISO/TC198で作成した国際規格については今後可能な限りJIS化する方向で

努力していきたいと考えている。

無菌医薬品製造技術の発展及び無菌性バリデーションの実施により、無菌試験自体が形骸化しつつある。形骸化(セレモニー化)した無菌試験とは言え、局方で定められている限り、実施していかざるを得ない面もある。今後、日局製剤総則第6項にあるように、製造工程のバリデーション及び適切な工程管理とその記録の照査により、高度な水準での無菌性が恒常的に保証される場合には、出荷時の試験において、無菌試験を省略することができる(パラメトリック・リリース)かも知れない。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

1. Kubota T., Matsuoka M., Chang T-H., Taylor P., Sasaki T., Tashiro M., Kato A., and Ozato K. Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type 1 infection gene expression. *J. Biol. Chem.*, 37: 2560-2570, 2008.
2. Kenri T., Okazaki N., Yamazaki T., Narita M., Izumikawa K., Matsuoka M., Suzuki S., Horino A., and Sasaki T. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. *J. Med. Microbiology*, 57:469-475, 2008.
3. Kimura N., Someya T., Yamagiwa Y., Kokubo M., and Sasaki T. Japanese

- Perspective on Biological Indicators. Biological Indicators for Sterilization Processes, DHI Publishing, LLC, p.195-210. 2009.
4. 佐々木次雄:微生物利用に関わる安全性や知財権への取組み、3.1 バイオテロリズム、微生物の辞典、朝倉書店、p.693-695、2008.
  5. 佐々木次雄:ISO関連分野の状況、医療現場の滅菌、へるす出版 p.175-195、2008.
  6. 佐々木次雄、岩田浩明、栃木公太、久保田眞由美:医薬品製造用細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験法の問題点、医薬品研究、39:299-309、2008.
  7. 佐々木次雄:病原体の輸送、新 GMP 微生物試験法、じほう p.71-77、2008.
  8. 佐々木次雄:遺伝子解析による微生物の同定法、細菌、新 GMP 微生物試験法、じほう p.128-137、2008.
  9. 佐々木次雄:無菌試験法、細菌・真菌、新 GMP 微生物試験法、じほう p.159-171、2008.
  10. 佐々木次雄:無菌試験法、マイコプラズマ試験法、新 GMP 微生物試験法、じほう p.171-186、2008.
  11. 佐々木次雄:培地充てん試験法、新 GMP 微生物試験法、じほう p.385-396、2008.
  12. 佐々木次雄:無菌製造法の留意点、Pharm Tech Japan 24:2419-2425、2008.
2. 学会発表
- A. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 実用新案登録  
なし
  2. その他  
なし

表1 ISO/TC 198 規格が反映された滅菌法関連基準及びガイドライン等

名 称	収載基準等	収載年
最終滅菌法及び滅菌指標体	日本薬局方	1997年
最終滅菌医薬品の無菌性保証	日本薬局方	1999年
滅菌バリデーション基準	監視指導課長通知	1997年
滅菌バリデーション基準(改編)	監視指導・麻薬対策課長通知	2005年
放射線滅菌バリデーションガイドライン	薬務局長通知	1998年
蒸気滅菌バリデーションガイドライン	監視指導課長通知	1998年
エチレンオキシドガス滅菌バリデーションガイドライン	監視指導課長通知	1998年
	監視指導・麻薬対策課長通知	2007年
医療機器の放射線滅菌バリデーションガイドラインの取扱いについて	長通知	
	監視指導・麻薬対策課長通知	2007年
医療機器の放射線滅菌の滅菌線量設定の根拠に関する基	長通知	

表2 ISO/TC198 で作成した国際規格の J I S 化

ヘルスケア製品の滅菌—医療機器の滅菌プロセスの開発、バリデーション、及び日常管理の要求事項

- ISO 11135-1 : エチレンオキシド
- ISO 17665-1 : 湿熱
- ISO 11137 : パート 1 : 放射線、パート 2 : 滅菌線量の確立、パート 3 : 線量測定の手引き
- ISO 11607-1 最終段階で滅菌される医療機器の包装—第 1 部 : 材料、無菌バリアシステム及び包装システムに関する要求事項
- ISO 11607-2 最終段階で滅菌される医療機器の包装—第 2 部 : 成形、シール及び組立プロセスのバリデーション

表3 パルセロナ会議で意見一致をみた事項

- 1) パラメトリックリリース : 情報として最終容器に入れて滅菌する最終滅菌製剤にパラメトリックリリースの適用が可能なことを示す。
- 2) 抗細菌又は抗真菌活性を有する固形製剤に対して阻害活性の除去法を組み入れること
- 3) メンブランフィルター (MF) 法が選択手法として使用されているが、直接法は MF 法が適用できない場合のみ使用可能とする。
- 4) 培地の培養期間を 14 日間とする。
- 5) 微生物の増殖によらない培地の混濁について記載する。
- 6) 試験の無効及び再試験について記す。
- 7) 無菌試験対象製品としては、注射剤、眼剤、及びその他の無菌製剤に適用するが手術糸や手術用衣類については盛り込まない。これらについては、一般的に触れるか、各条で規定する。

表4 USP が独自に取り込んだ内容

- 代替菌 : *Pseudomonas aeruginosa* → *Micrococcus luteus* (*Kocuria rhizophila*) ATCC 9341
- 代替菌 : *Clostridium sporogenes* → *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482
- ペニシリンやセファロsporin 製剤の無菌試験に β ラクタマーゼを用いて不活化させることを推奨している。
- 変法チオグリコール酸培地の培地性能試験菌株 : *Clostridium sporogenes* のみの使用にしている (調和テキストでは、液状チオグリコール酸培地と同じ菌株を使用)
- 表3のタイトル : USP は Minimum Number of Articles to be Tested in Relation to the Number of Articles in the Batch、調和テキストは Minimum number of items to be tested
- 表3と4の説明を詳述 : Unless otherwise specified elsewhere in this chapter or in the individual monograph, test the number of articles specified in Table 3. If the contents of each article are of sufficient quantity (see Table 2), they may be divided so that equal appropriate portions are added to each of the specified media. [NOTE Perform sterility testing employing two or more of the specified media]. If each article does not contain sufficient quantities



for each medium, use twice the number of articles indicated in *Table 3*.

- 希釈液、洗浄液：MF法適用の際の検体の希釈及び洗浄液として、Fluid A、Fluid D、Fluid Kを指定

- 製品の無菌試験：調和テキストには無い以下の項目がある。“Devices with pathways labeled sterile”は日局には関係ないが、他の項目は日局にも関係がある。

Prefilled syringes

Antibiotic solids for injection

Antibiotic solids, bulks, and blends

Sterile aerosol products

Devices with pathways labeled sterile

表5 3薬局方「無菌試験法」の試験対象製品

	試験対象製品			
	ヒト用医薬品	動物用医薬品	生物学的製剤	医療機器
USP	●			●
EP	●	●	●	
日局	●			

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

## 分担研究報告書

標準品・参照品の評価システム

—百日せきワクチン力価試験用の標準品に関して—

### 研究分担者

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部

### 研究協力者

落合雅樹 国立感染症研究所 検定検査品質保証室

蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部

山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部

徳永英治 (財)化学及血清療法研究所

大西敏之 (財)阪大微生物病研究会

Chang-Wen Chi, Bureau of Food and Drug Analysis,

Department of Health, Executive Yuan, Taiwan

### 研究要旨

台湾国内では百日せきワクチンの力価試験用の標準品を作製して標準化試験を実施しようとしたが、台湾国内で複数の研究所に於いて共同試験が実施できないために、技術と経験を有する日本へ協力を求めてきた。感染研、化血研および阪大微研で試験を実施して協力をした。同時にわが国で沈降精製百日せきワクチンの力価試験に用いられている国内標準品と全菌体百日せきワクチン用の国際標準品を、生物学的製剤基準に規定されている沈降精製百日せきワクチンの力価試験法（脳内接種法）により比較した。その結果、国内標準品の1単位当たりの力価は、国際標準品の1国際単位に比較して約50%の活性であると評価された。精製百日せきワクチンは、わが国で開発されたワクチンであり、これまで精製百日せきワクチン用の国際標準品は存在しなかった。このため精製百日せきワクチン用の国内標準品の更新（標準化）は、国際標準品に対してではなく、前ロットの国内標準品に対して実施された。また、精製百日せきワクチンに対して実施されている力価試験と全菌体百日せきワクチンの力価試験では免疫期間が異なるなどの違いがある。こうしたことが標準化の結果に影響し、現在の国内標準品と国際標準品の力価（単位）に差が認められる原因になっていると考えられた。

## A. 研究目的

ワクチン等の生物学的製剤の品質管理上、標準品は重要な役割を果たしている。また、各国の品質管理において、国際標準品に対して標準化した国内標準品を用い、国際的に統一した試験法を採用することで、考慮すべき点はあるものの国を超えた試験成績の比較・評価が可能となり、国際調和においても標準品は重要な役割を担っている。本研究では、台湾で作製した百日せきワクチン用力価試験標準品候補品の標準化の試験協力、技術的支援を行うと共に、わが国で沈降精製百日せきワクチンの力価試験に用いられている国内標準品と全菌体百日せきワクチン用の WHO 国際標準品の力価を比較した。

## B. 研究方法

全菌体百日せきワクチン用力価試験 WHO 国際標準品 (IS : International Standard) Lot 4 (94/532)、台湾百日せきワクチン用力価試験国内標準品候補品 (TS : Taiwanese candidate Standard) および沈降精製百日せきワクチン用力価試験国内標準品 (JS : Japanese Standard) (Lot 30) を、生物学的製剤基準に規定されている沈降精製百日せきワクチンの力価試験 (脳内攻撃法) に従い実施した。各標準品をそれぞれ 5 倍の対数的等間隔で 3 段階以上の希釈液を調製し、各希釈液 0.5 mL を 4 週齢のマウス 16 匹以上を 1 群とし 1 回腹腔内に接種した。免疫注

射の 21 日後に攻撃用菌浮遊液 0.025 mL を脳内に注射し 14 日間観察した。脳内注射後 3 日以内に死亡したものは成績から除外し、14 日後に麻痺または頭蓋腫大を示すものは死亡に算入した。また、別のマウス 10 匹を 1 群とし、3 群以上を用いて攻撃用菌の LD<sub>50</sub> 数を測定するとともに、血液加カンテン培地を用いて攻撃用菌液の生菌数を測定した。試験成績は、プロビット法を用い TS および JS の力価を IS の力価に対する相対活性として算出した。測定は国立感染症研究所 (感染研)、財団法人 化学及血清療法研究所 (化血研) および財団法人 阪大微生物病研究会 (阪大微研) においてそれぞれ 1 回実施した。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いに際しては、国立感染症研究所の規定に従って実験計画書を提出・申請し、実験動物委員会の審査を経て実験を行った。実験に際しても、動物愛護の精神を考慮し適正に実施した。

## C. 研究結果

表に各施設で実施した試験成績を示す。結果として、台湾の標準品候補品 (TS) の力価は、感染研で 13.57 IU/バイアル、化血研で 10.13 IU/バイアル、阪大微研で 37.73 IU/バイアルと算出され、3 施設の試験成績をあわせて解析すると、幾何平均は 17.31 IU/バイアル (95%信頼区間 : 6.33 - 30.45)、加重平均は 14.22 IU/バイアル (95%信頼区間 : 8.76 - 23.08) と評価された (図 1)。また、現在わが国で沈



降精製百日せきワクチン用の力価試験標準品として使用している JS (Lot 30) の力価 (単位: U) を、全菌体百日せきワクチン用 4<sup>th</sup>IS 国際単位 (IU) に対する力価として比較すると、感染研で 0.561 IU/U、化血研で 0.396 IU/U、阪大微研で 0.652 IU/U となり、すべての施設で JS の 1 U 当たりの力価は、IS の 1 IU 当たりの力価より低く評価された。3 施設の試験成績をあわせて解析すると、幾何平均は 0.525 IU/U (95%信頼区間: 0.321-0.858)、加重平均は 0.480 IU/U (95%信頼区間: 0.294-0.785) と算出され、JS 1 U 当たりの力価は、IS 1 IU 当たりの力価の約 50%の活性であり、単位当たりの力価には有意な差が認められた (図 2)。

#### D. 考察

本研究により、台湾の百日せきワクチン用力価試験国内標準品候補品 (TS) の標準化試験を国内 3 施設において実施した結果、TS は 17.31 IU/バイアル (幾何平均)、14.22 IU/バイアル (加重平均) の力価を有していると評価された。しかし、台湾において TS に対して表示力価を与える際には、台湾国内で使用しているマウス系統と日本で使用しているマウス系統 (ddY) による反応性の違いなどを考慮に入れた上で適切な標準化を進めることが重要であるため、引き続き標準化作業の支援を行うことが確認された。

また、現在わが国で沈降精製百日せき

ワクチン用の力価試験標準品として使用している JS (Lot 30) の力価 (U) を、全菌体百日せきワクチン用 4<sup>th</sup>IS の力価 (IU) と比較すると、JS (Lot 30) の単位当たりの力価は約 50%の活性であると評価された。

精製百日せきワクチンは、わが国で開発され昭和 56 年に導入される際には、JS (Lot 29) が沈降精製百日せきワクチン用の力価試験標準品として採用された。全菌体百日せきワクチンの力価試験における WHO 基準は、ワクチンの免疫期間が 14 ~ 17 日間 (通常は 14 日間) であるが、JS (Lot 29) が制定 (昭和 56 年 3 月 15 日) された当時のわが国の生物学的製剤基準に規定されていた免疫期間は 10 日間であったため、JS (Lot 29) は 10 日間の免疫期間により 2<sup>nd</sup>IS に対して標準化された。そして、全菌体百日せきワクチンに用いられていた表示力価と同様の力価を有する沈降精製百日せきワクチン用の力価標準品として採用された経緯がある (図 2)。しかしながら、研究方法に示したように沈降精製百日せきワクチンの力価試験における免疫期間は 21 日間であり、JS (Lot 29) の標準化に用いられた免疫期間と大きく異なる。また、国内標準品を更新する際は、原則として国際標準品に対して標準化を実施するが、沈降精製百日せきワクチン用の力価試験国際標準品は存在しなかったため、JS (Lot 30: 現在のロット) に標準品を更新する際は、JS (Lot 29) に対して標準化が行

われ、免疫期間は沈降精製百日せきワクチンに規定されている21日間で実施された。一方、全菌体百日せきワクチン用の力価標準品である4<sup>th</sup>ISは、2<sup>nd</sup>ISおよび3<sup>rd</sup>ISに対して標準化が行われているが（資料1）、全菌体百日せきワクチンの免疫期間により実施されている。こうした、ロット更新時の標準化に用いる基準となる標準品の違い、そして免疫期間の違いなどが、現在のJS（Lot 30）と4<sup>th</sup>ISの単位当たりの力価に差が認められる原因となっていることが考えられた。しかしながら、JS（Lot 30）の力価が低下した可能性も否定できないため、表示力価が保持されていることを確認する必要がある。ISが存在する場合は、ISに対して国内標準品の力価を比較することで安定性を確認することができるが、沈降精製百日せきワクチンの力価試験標準品のようにISが存在しない場合は、安定性を保証するにはED<sub>50</sub>値などを用いたトレンド解析などにより、力価の低下が認められないことを確認する必要がある。標準品の品質は、製剤の力価あるいは安全性等に影響することから、日常的にトレンド解析などにより標準品が十分な性能を有していること、試験が一定の精度で実施されていることなどを確認し、ISが存在する場合は定期的にISに対し国内標準品の活性を比較し性能を確認することは、標準品の安定性および表示力価を保証する上で重要である。

平成20年10月のWHOのECBSにお

いて、JN1H-3が精製百日せきワクチン用の力価試験国際標準品（1<sup>st</sup>IS）として制定されることが承認された。平成18-19年にWHOによるJN1H-3標準化の国際共同研究が実施され、精製百日せきワクチンの力価試験として脳内接種法が現在適用されている日本、韓国、中国の3カ国が各国の国内標準品に対してJN1H-3の力価を比較して、その成績を総合的に解析した結果として表示力価（34 IU/アンプル）が与えられた（資料2）。しかし、前述したように、これまで沈降精製百日せきワクチン用の力価試験国際標準品は存在しなかったため、各国の国内標準品は独自に制定されており、国際共同研究においても国毎に、JN1H-3と各国国内標準品の力価の関係に若干の違いが認められた（相対活性として0.57-1.22）。したがって、今後1<sup>st</sup>ISを基準として、精製百日せきワクチンに必要とされる力価について国際調和を図るためには十分な議論が必要である。

## E. 結論

標準品は、ワクチン等の生物学的製剤の品質管理上、そして国際調和においても重要な役割を担っている。本研究では、台湾で作製した百日せきワクチンの力価試験用標準品候補品の標準化を支援するため感染研を含めた国内3施設において試験を実施した。今後も、標準化作業に対する協力を継続する。

さらに、現在わが国で沈降精製百日せ

きワクチン用の力価試験標準品として使用している国内標準品について試験したところ、国内標準品の1単位当たりの力価は、全菌体百日せきワクチン用国際標準品の1国際単位と比較すると約50%の力価であると評価された。背景として、精製百日せきワクチン用の国際試験標準品がこれまで存在しなかったこと、国内標準品と国際標準品で更新（標準化）に用いられる免疫期間に違いがあることなどが考えられたが、国内標準品の力価低下も否定できないため、ED<sub>50</sub>値などを用いたトレンド解析などにより標準品の力価に変化が認められないことを確認しておく必要がある。

#### 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

なし



表. 百日せきワクチンワクチン用カ価試験標準品の成績

施設	台湾候補品カ価 (IU/バイアル)			国内標準品の相対活性 (IU/U)* <sup>1</sup>			LD <sub>50</sub> * <sup>2</sup> (菌数)
	カ価	95% 信頼区間		相対活性	95% 信頼区間		
感染研	13.57	6.33	— 30.45	0.561	0.221	— 1.284	143
化血研	10.13	4.86	— 20.76	0.396	0.197	— 0.771	143
阪大微研	37.73	12.53	— 128.72	0.652	0.172	— 1.881	236
幾何平均	17.31	10.66	— 28.10	0.525	0.321	— 0.858	
加重平均	14.22	8.76	— 23.08	0.480	0.294	— 0.785	

1. 国際標準品 (IU) に対する国内標準品 (U) の活性
2. 生物学的製剤基準 (規格: 50 ~ 500 でなければならない)

図1. 全菌体ワクチン用国際標準品に対する台湾候補品のカ価

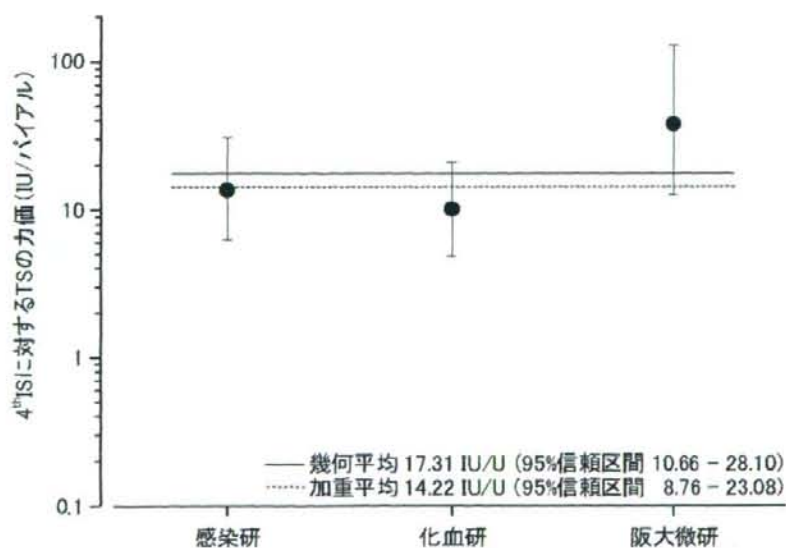


図2. 全菌体ワクチン用国際標準品に対する国内標準品の活性

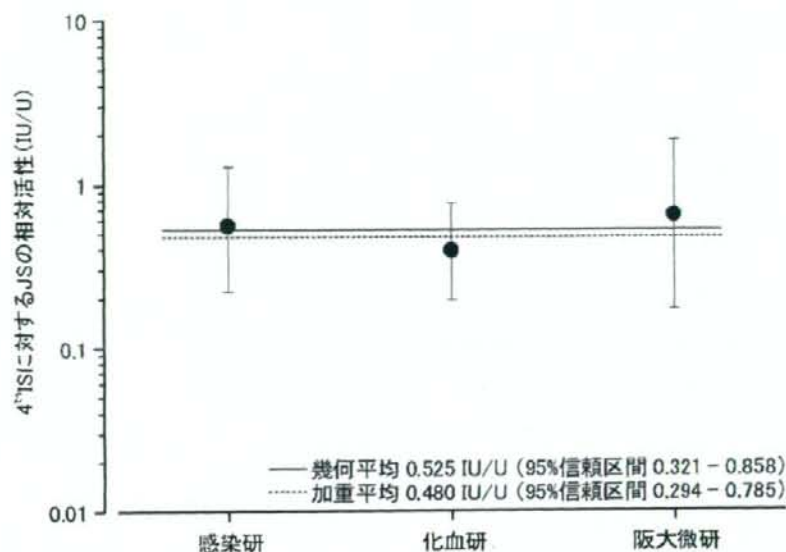
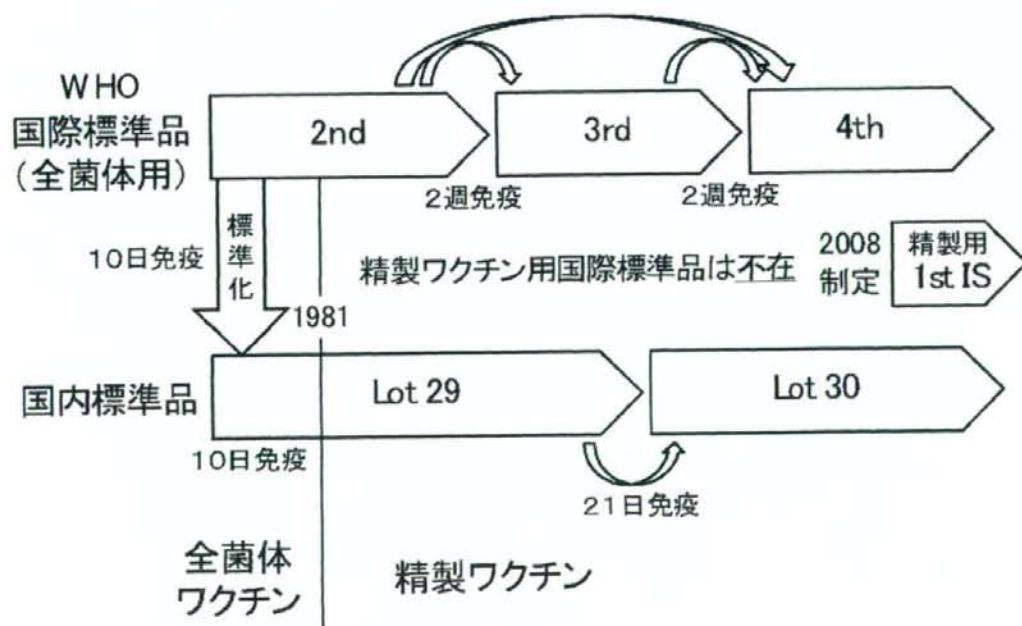


図3. 百日せきワクチン力価試験用標準品の遷移



**WHO International Standard  
Bordetella pertussis Vaccine (Whole Cell) 41S  
NIBSC code: 94/532  
Instructions for use  
(Version 2.0, Dated 10/04/2008)**

### 1. INTENDED USE

A candidate replacement standard (ampoule code 94/532) was prepared in 1994 from a bulk material kindly donated by CSL, Australia, in early 1994. A first collaborative study to compare this candidate with the Second International Standard (ampoule code 66/302) was organized by Dr Gert Albert Hansen, Statens Serum Institut (SSI), Copenhagen. This study was carried out by 15 laboratories in 1995-1996. In 1997, the remaining ampoules of this material were transferred to National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), UK. The second collaborative study launched in 2005 in which the candidate standard has been compared with the current Third International Standard for Pertussis Vaccine (IS3) by 16 laboratories in 14 countries. Analysis of data from these two studies gives a consistent calibration of 40 IU (95% limits 37 to 43 IU) per ampoule for 94/532 in terms of IS2 and IS3. On the basis of the results of the studies, it is recommended that the candidate standard be established as the Fourth International Standard for Whole Cell Pertussis Vaccine and that it be assigned an activity of 40 IU per ampoule on the basis of its calibration in terms of the Second and Third International Standards for Pertussis Vaccine (Whole Cell).

### 2. CAUTION

**This preparation is not for administration to humans.**

The material is not of human or bovine origin. As with all materials of biological origin, this preparation should be regarded as potentially hazardous to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures should include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols. Care should be exercised in opening ampoules or vials, to avoid cuts.

### 3. UNITAGE

40 International Units per ampoule.

### 4. CONTENTS

Country of origin of biological material: United Kingdom.  
Each ampoule contains the freeze-dried residue of 1.0 ml aliquots of an aqueous solution which contained: six litres of bacterial suspension in phosphate buffered saline (pH 6.8-7.4) with 8% dextran and 5% glucose. (equivalent to 150 International Opacity Units in terms of the International Opacity Standard)

### 5. STORAGE

Unopened ampoules should be stored at -20°C.

### 6. DIRECTIONS FOR OPENING

DIN ampoules have an 'easy-open' coloured stress point, where the narrow ampoule stem joins the wider ampoule body.

Tap the ampoule gently to collect the material at the bottom (labeled) end. Ensure that the disposable ampoule safety breaker provided is pushed down on the stem of the ampoule and against the shoulder of the ampoule body. Hold the body of the ampoule in one hand and the disposable ampoule breaker covering the ampoule stem between the thumb and first finger of the other hand. Apply a bending force to open the ampoule at the coloured stress point, primarily using the hand holding the plastic collar.

Care should be taken to avoid cuts and projectile glass fragments that might enter the eyes, for example, by the use of suitable gloves and an eye shield. Take care that no material is lost from the ampoule and no

glass falls into the ampoule. Within the ampoule is dry nitrogen gas at slightly less than atmospheric pressure. A new disposable ampoule breaker is provided with each DIN ampoule.

### 7. USE OF MATERIAL

Six litres of killed *B. pertussis* suspension was generously supplied by CSL Australia in 1994 (lot 0588196) and was stated by the manufacturer to have a density of 150 International Opacity Units in terms of the International Opacity Standard.

One ml aliquots of the material (in phosphate buffered saline (pH 6.8-7.4) with 8% dextran and 5% glucose) were filled into glass ampoules and then freeze dried on a five day cycle (starting shelf temperature of -40°C) followed by secondary desiccation for a further six days over phosphorus pentoxide under vacuum and the ampoules finally back filled with high purity nitrogen before sealing. The precision of fill was determined by weighing 75 ampoules taken at 2-3 minute time intervals and the results showed a mean of 1.018gs with a CV of 0.26%.

For practical purposes each ampoule contains the same quantity of *B. pertussis* organisms. The entire contents of each ampoule should be completely resuspended in an accurately measured amount of water or buffer solution. No attempt should be made to weigh out any proportion of the freeze dried powder. It is recommended that the suspension, not for immediate use, is stored at +4°C. The suspension should not be frozen. The ampoules contain no bacteriostat and the preparations should not be assumed to be sterile.

### COLLABORATIVE STUDIES

The first collaborative study launched in 1995 with the aim of assessing the suitability of the candidate standard 94/532 by comparing it with the Second International Standard for Pertussis Vaccine. The second collaborative study launched in 2005. In this study the preparation 94/532 has been compared with the current Third International Standard for Pertussis Vaccine.

The primary aim of these studies is to assess the suitability of the candidate standard 94/532 to serve as an International Standard for whole cell Pertussis Vaccine and, subject to its suitability and stability, to assign to it a unitage which as far as possible maintains continuity of the international unit assigned to pertussis vaccine. A total of 13 laboratories from 11 countries participated in the first collaborative study and 16 laboratories from 14 countries participated in the second collaborative study.

On the basis of the results of these studies indicating stability and continuity of unitage among International Standards for Pertussis Vaccine, it is recommended that preparation 94/532 be established as the Fourth International Standard for Whole Cell Pertussis Vaccine and that it be assigned an activity of 40 IU per ampoule on the basis of its calibration in terms of the Second and Third International Standards for Pertussis Vaccine (Whole Cell).

### 8. STABILITY

Reference materials are held at NIBSC within assured, temperature-controlled storage facilities. Reference Materials should be stored on receipt as indicated on the label.

NIBSC follows the policy of WHO with respect to its reference materials.

### 9. REFERENCES

1) International collaborative study to evaluate a candidate replacement International Standard for Whole Cell Pertussis Vaccine, Code 94/532 WHO/BS/06.2036

### 10. ACKNOWLEDGEMENTS

Grateful acknowledgement is made to CSL for the bacterial suspension, to

