

3. 2. 1 培養細胞の試験

培養細胞の 500 mL 以上に相当する量を対照培養細胞とし、ウイルスを接種することなく、ウイルス培養と同じ培養条件で観察するとき、細胞変性を認めてはならない。また、観察期間中、その 20 %以上が非特異的又は偶発的事由により観察できなくなってはならない。

3. 2. 2 ウイルス浮遊液の試験

3. 2. 2. 1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3. 2. 2. 2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3. 2. 2. 3 ウイルス同定試験

それぞれの型特異ポリオウイルス免疫血清を用い、検体中のウイルスの型を同定する。

3. 2. 3 原液の試験

3. 2. 3. 1 ウイルス生残否定試験

原液の全量の 1 %もしくは 1,500 ドース以上に相当する量の検体を用いる。この検体に適当な中和剤を加え、適当な緩衝剤等の十分な量を用いて透析し、混在する不活化剤等の培養細胞に対する変性効果を除いたものを試料とする。

試料をアフリカミドリザル腎臓細胞又はこれと同等以上の感受性をもつ培養細胞に接種し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 21 日間培養観察する。この際、試料 1 mL につき培養細胞 3 cm^2 以上を用いる。観察の間、細胞変性の出現を認めてはならない。

3. 2. 3. 2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3. 2. 3. 3 エンドトキシン試験

最終バルクと等濃度以上にしたものを試料とする。検体を希釈する場合は、エンドトキシン試験用水を用いる。一般試験法のエンドトキシン試験を準用して試験するとき、0.25 EU/mL 以下でなければならない。

3. 2. 3. 4 比抗原量試験 (たん白質含量/D 抗原量)

酵素免疫測定法等、適当な免疫学的方法により D 抗原量を各型毎に測定する。一般試験法のたん白質定量法を準用してたん白質含量を測定するとき、D 抗原量 1Du につき、たん白質含量が $0.1\ \mu\text{g}$ 以下でなければならない。

3. 3 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3. 3. 1 pH 試験

一般試験法の pH 測定法を準用して試験するとき、□～□でなければならない。

3. 3. 2 アルミニウム含量試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 3. 2. 2 を準用する。

3. 3. 3 ホルムアルデヒド含量試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 3. 2. 4 を準用する。

3. 3. 4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3. 3. 5 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3. 3. 6 エンドトキシン試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 3. 2. 7 を準用する。

3. 3. 7 マウス体重減少試験

沈降精製百日せきワクチン 3. 2. 9 を準用する。

3. 3. 8 マウス白血球数増加試験

沈降精製百日せきワクチン 3. 2. 10 を準用する。

3. 3. 9 マウスヒスタミン増感試験

沈降精製百日せきワクチン 3. 2. 11 を準用する。

3. 3. 10 ジフテリア毒素無毒化試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 3. 2. 11 を準用する。

3. 3. 11 破傷風毒素無毒化試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 3. 2. 12 を準用する。

3. 3. 12 力価試験

3. 3. 12. 1 沈降精製百日せきワクチンの力価試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 3. 2. 13. 1 を準用する。

3. 3. 12. 2 沈降ジフテリアトキソイドの力価試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 3. 2. 13. 2 を準用する。

3. 3. 12. 3 沈降破傷風トキソイドの力価試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 3. 2. 13. 3 を準用する。

3. 3. 1 3 ラット免疫原性試験

ラットを免疫し、得られた血清中の中和抗体価を型別に測定する。

3. 3. 1 3. 1 材料

検体、IPV 力価試験用参照品（以下「参照品」という。）、各型の標準血清及び中和試験攻撃用セービン株ポリオウイルス（I, II, III 型）（以下「中和用ウイルス」という。）を用いる。

指標細胞として、HEp2 細胞又は Vero 細胞を用いる。MEM 培地（適量の炭酸水素ナトリウム、抗生物質及びウシ血清を含む）で 1×10^5 cells/mL となるようにしたもの（以下「細胞浮遊液」という。）を調製する。

検体及び参照品の希釈は、MEM 培地（適量の炭酸水素ナトリウムを含む）による。

中和用ウイルスは、MEM 培地（適量の炭酸水素ナトリウム、抗生物質及びウシ血清を含む）で希釈して、0.05 mL 中に約 100 CCID₅₀ のウイルスを含むようにしたもの（以下「中和用ウイルス浮遊液」という。）を調製する。

3. 3. 1 3. 2 試験

検体及び参照品をそれぞれ希釈し、対数的等間隔の希釈を作る。

Wistar 系 8 週齢、雌ラット 10 匹以上を 1 群とし、各希釈に 1 群ずつ用いる。1 匹当たり 0.5 mL を後肢大腿部に筋肉内接種する。接種の 21 日後に、個体別に全ての動物から採血し、血清を採り 56 °C、30 分間加熱する。個体別血清及び標準血清を各血清につき 2 ウエル以上添加し、MEM 培地（適量の炭酸水素ナトリウム、抗生物質及びウシ血清を含む）で 2 倍階段希釈する。さらに、各ウエルに各型の中和用ウイルス浮遊液を約 100 CCID₅₀ となるように接種する。その後、すべてのプレートを 36±1 °C の CO₂ インキュベータに 3 時間置いた後、約 4 °C で一晩反応させる。翌日、各ウエルに 1×10^4 cells となるように細胞浮遊液を添加し、36±1 °C の CO₂ インキュベータで 7 日間培養する。培養終了後、各ウエルの CPE を観察し、50 % 中和点の血清希釈倍数を算出し、その逆数を中和抗体価とする。このとき、各型の標準血清の中和抗体価は適正範囲内でなければならない。

また、中和用ウイルス浮遊液の感染価を測定するとき、その値は 32～320 CCID₅₀/0.05 mL でなければならない。

3. 3. 1 3. 3 判定

試験の成績を統計学的に処理して比較するとき、検体の力価は参照品と同等以上でなければならない。

3. 3. 1 4 表示確認試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン3. 2. 1 4及び3. 2. 3. 4のD抗原量測定法をそれぞれ準用して行う。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、□年とする。

5 その他

5. 1 添付文書等記載事項

1. 使用した菌株名並びにウイルス株名
2. 使用時振り混ぜて均等とする旨
3. 次の用法及び用量

初回免疫には、通常、1回0.5 mLずつを3回、いずれも3～8週間の間隔で皮下に注射する。

追加免疫には、通常、初回免疫後6箇月以上の間隔をおいて、(標準として初回免疫終了後12箇月から18箇月までの間に) 0.5 mLを1回皮下に注射する。

細菌ワクチン、抗毒素に関する調査・研究

分担研究者 岩城正昭 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨：本研究では、細菌ワクチン（DPT および関連ワクチン）および抗毒素について分担する。細菌製剤協会、EFPIA（欧州製薬団体連合会）および血液製剤協会からの要望を受けて、生物学的製材基準のいくつかの項目について検討を開始した。また、感染研の製剤担当室からの、生物学的製剤基準改定について検討すべき課題についての提案も行なった。

A. 研究の目的

本研究班全体の目的は、(1)製造販売業者の GMP 整備等に対応した生物基及び国家検定項目の在り方を検討し、必要に応じて見直し案を作成すること。また、そもそも生物基は我国の国民を健康被害から守るために作られ、独自性の許されるものであったが、医薬品のグローバル化に対応して(2)国産同等品の無い新規製剤に関しては諸外国の規制と我が国の規制と比較して安全性と有効性を損なわないか否かを検討し、新製剤の合理的な案を作成すること。もし同等の既存製剤がある場合には、(3)既存製剤の規制を海外の規制に合わせる事により安全性と有効性が損なわないかを検討し、既存製剤の合理的な案を作成すること。これらに加えて、(4)特に安全性が必要とされる血液製剤については WHO の基準などを参考に新たな規格試験法

の検討を行い、安全性を高める案を作成することである。

分担研究者として、DPT 関連の細菌ワクチンおよび抗毒素について担当し、製造所団体からの要望について上記の視点から検討すると同時に、感染研の製剤担当室からの提案についても検討する。

B. 研究方法、研究結果と考察

(1) DPT ワクチンについて

アルミニウム含量、D（ジフテリアトキソイド）およびT（破傷風トキソイド）の力価について、EFPIA（欧州製薬団体連合会）より要望が出された（添付資料参照）。

試験担当室との協議も行ない検討を行なった。日本の現行基準を変える強い理由があるかどうか慎重に判断すべきと現時点では判断される。その理由は(1)性急な変更を行なった場合、過

去のトレンドおよび血清疫学との整合性が失われることが懸念されること、(2)現行の基準に沿った製剤を用いて、国内の DPT 関連疾患は十分抑えられていること、がある。また欧州と国内では DPT ワクチンの投与方法が完全に一致しているわけではなく、副反応を考慮すると、例えばアルミニウム含量の基準変更は慎重な対応が必要と思われる。一方ジフテリア(D)および破傷風(T)の力価に関しては、EP との調和に関する要望が出されているが、国内基準で要求される力価は EP で要求される力価より低いので、ことさらに変更の必要があるかどうかこれも慎重な検討を要する。

(2) D および T 関連ワクチンの無毒化試験について

無毒化試験は、D、T トキソイドの原料であるジフテリア毒素、破傷風毒素がトキソイド化にともなってその毒性を失っていることを示し、この面での安全性を担保するための試験である。現行の生物学的製剤基準では、沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド(沈降 DT)、沈降破傷風トキソイド(沈降 T)、成人用沈降ジフテリアトキソイド(成人用沈降 D)の無毒化試験は、最終小分け製品について、5℃保存検体と 37℃、20 日保温検体の両方について行なうと規定されている。一方で、沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン(沈降 DTaP)に関しては、最終小分け製品について 5℃保存検体の試験を行ない、37℃、20 日保温

検体については中間段階原液で行なうと規定されている。これらの製剤すべてについて、5℃、37℃のいずれも、無毒化試験を中間段階原液で行なう方向で検討を開始することを提案した。検討すべき問題点としては、沈降 DT、成人用沈降 D、沈降 T について沈降 DTaP 同様に 37℃の試験を原液で行なうことが妥当であるかどうかの根拠を科学的に示すこと、すべての 5℃保存検体試験を原液に移行することが妥当であるかどうかの根拠を科学的に示すことが挙げられる。さらに将来的な検討課題としては、動物実験の 3R(数の削減、苦痛の軽減、置き換え)対応を視野に入れ、現在ウサギおよびモルモットで *in vivo* 試験として行なわれている無毒化試験を、動物を使わない *in vitro* 試験に移行することが挙げられる。

(3) Hib ワクチンの破傷風トキソイド部分の無毒化試験と特異毒性試験について

EFPIA(欧州製薬団体連合会)より、両試験を一本化することに関する要望があった(添付資料参照)。現行の生物学的製材基準では、Hib ワクチンの破傷風トキソイド部分について、原液の試験として無毒化試験と特異毒性試験の両方を行なうと規定されている。要望では、変更後の試験は、現行の各種製剤の破傷風トキソイド無毒化試験と異なる試験法をとることが提案されている。そこで感染研の試験担当室との協議も行ない検討

した。国内では現行の各種製剤の破傷風トキソイド無毒化試験により、無毒化に関する健康被害は抑えられている。この実績をふまえて、Hib ワクチンの無毒化試験法について検討すべきと思われる。また、Hib ワクチンの破傷風トキソイド部分は、破傷風トキソイドとしての力価を（少なくとも現行の力価試験に用いられているマウス、モルモットの系では）有することが判明している。しかし現行の生物学的製剤基準にはHib ワクチンの破傷風力価に関する項目がないため破傷風力価は管理されていない。このことについても検討すべきと思われる。

（４）抗破傷風人免疫グロブリンの力価試験の *in vitro* 化について

現行の生物学的製剤基準では、抗破傷風人免疫グロブリンの力価試験は標準試験法の破傷風抗毒素価測定法に従いマウスを用いて試験することが規定されている。血液製剤協会より、この試験を *in vitro* 化することに関する要望が出された（資料参照）。動物実験の3R対応を考え、試験の *in vitro* 化は一般的に望ましいことであると考えられるが、現行の試験と同等以上のパフォーマンスが示されることが必要である。提案者と感染研試験担当室のミーティングも行ない、検討を行なったところ、現段階では *in vitro* への移行をすぐに行なうには根拠となる科学的データが不足しており、今

後さらにデータを蓄積する必要があると考えられた。また、WHO から供給されている国際標準品は、*in vivo* アッセイの標準品として位置づけられており *in vitro* アッセイについては標準品として用いることができない。このことへの対応も今後の検討課題である。さらに、抗破傷風人免疫グロブリン製剤は国内では4製造所で製造されているため、*in vitro* 化への移行には、これらの全製造所の参加による共同試験を行なうことが必須である。

（倫理面への配慮）

特に倫理面に配慮すべき活動は今回行なっていない。

C. 健康危機情報

特になし

D. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金事業
「医薬品を巡る環境の変化に対応した生物学的製剤基準改正について」第2回班会議

2010.2.10
国立感染症研究所 細菌第二部
岩城正昭

- DPTワクチン
 - アルミニウム含量、DおよびTカ価について
- DPT、DT、T、D各ワクチン
 - D、T無毒化試験について
- 抗破傷風人免疫グロブリン
 - カ価試験について
- Hibワクチン
 - 無毒化試験、特異毒性試験について

DPTワクチンについて

欧州製薬団体連合会からの要望

EPPIA (欧州製薬団体連合会)	医薬品各案	沈降精製百日せき菌フテリア破傷風混合ワクチン	規格値の緩和	EP規格値 (1.25mg/1回投与) より大幅に低しく、今後の混合ワクチンの開発の妨げとなる。
		3.2.2アルミニウム含量 1mL中 0.3mg以下でなければならぬ。	規格値の緩和	EP規格値 (1.25mg/1回投与) より大幅に低しく、今後の混合ワクチンの開発の妨げとなる。
		3.2.13.2沈降ジフテリアトキソイドのカ価試験 規格: 47単位/mL以上	EPとの調和	EPでは、30単位/ヒトでの1回投与量
		3.2.13.3沈降破傷風トキソイドの方面試験 規格: 27単位/mL以上	EPとの調和	EPでは、40単位/ヒトでの1回投与量

- DPTワクチンについて
- カ価とアルミニウム含量についてEPとの調和のため
の基準変更の要望があった。
- 日本の現行基準を変える強い理由があるかどうか慎重に判断すべき(試験担当者の意見)。
 - 理由(1): 過去のトレンドおよび血清疫学との整合性が失われることが懸念される
 - 理由(2): 現行の基準に沿った製剤を用いて、国内のDPT関連疾患は十分抑えられている。
 - 22年度は個別の項目について国内外製造所のご意見を頂きたい。

DPT、DT、D、Tワクチンについて

- 無毒化試験について(提案)
 - D、T無毒化試験のうち最終小分け製品について行なわれているものを(DPT用原液37°C以外)、原液(中間段階)の無毒化試験で置き換えることはできないか
 - 22年度は国内外製造所などからご意見を頂き検討を始めたい。
 - DT、D、Tについても37°Cの試験はDPT同様原液で行なえるか?
 - 最終小分け5°C保存検体の試験を原液に移行するためにはどのような科学的根拠が必要か?
 - 将来的にはin vitro試験への移行も視野に入れる

Hibワクチン(破傷風トキソイド)について

欧州製薬団体連合会からの要望

EFPIA(欧州製薬団体連合会)	医薬品各条	乾燥ヘモフィリスb型ワクチン(破傷風トキソイド結合体)	3.2.1無毒化試験 3.2.2特異毒性試験 両試験が設定されている	両試験を1試験とする	欧州局方0452破傷風ワクチンの変更に合わせて
------------------	-------	-----------------------------	--	------------	-------------------------

- 要望案についての科学的根拠を確認しつつ、製剤担当室と連携しながら検討していきたい
- (試験担当室の意見)今まで行なわれてきた国内の破傷風トキソイド無毒化試験の実績をふまえて検討すべき
- (試験担当室の意見)Hibのキャリアー蛋白(破傷風トキソイド)のTカ価についても検討すべき。

抗破傷風人免疫グロブリンについて

日本血液製剤協会からの要望

(社)日本血液製剤協会	破傷風トキソイド測定法	破傷風抗毒素測定法 は、別に規定する場合を除き、検体中の破傷風トキソイドを、毒液を次いで2倍希釈して測定する方法である。適合の判定は、各条の規定による。	破傷風抗毒素測定法は、別に規定する場合を除き、検体中の破傷風トキソイドを、毒液を次いで2倍希釈して測定する方法である。適合の判定は、各条の規定による。	EPO (HUMAN TETANUS IMMUNOGLOBULIN) の「Immunoassay」が認められていること、また、国際標準抗毒素に準じて、国内標準抗毒素にかかわらず、血清由来に変置され、血清由来測定法によることから、血清免疫測定法を追加していただきたい。
	破傷風トキソイド測定法	破傷風抗毒素測定法は、別に規定する場合を除き、検体中の破傷風トキソイドを、毒液を次いで2倍希釈して測定する方法である。適合の判定は、各条の規定による。	破傷風抗毒素測定法は、別に規定する場合を除き、検体中の破傷風トキソイドを、毒液を次いで2倍希釈して測定する方法である。適合の判定は、各条の規定による。	破傷風抗毒素測定法は、別に規定する場合を除き、検体中の破傷風トキソイドを、毒液を次いで2倍希釈して測定する方法である。適合の判定は、各条の規定による。

抗破傷風人免疫グロブリンについて

- 力価測定法について。マウスアッセイに加えてELISAをとの要望を受けている。
 - 提案者と感染研担当者のミーティングを行なった。
 - 3Rsを考えると、将来的な移行を視野に入れるべき
 - しかし移行に十分なデータがまだ揃っていない
 - 適切な標準品があるか(ELISA用/中和試験用)
 - 標準アッセイ法の構築のためにクリアすべき事項は何か
 - 製造所間の製法の違いに対応できるような方法の構築
 - 全製造所参加の共同試験が必須

乾燥 BCG 膀胱内用(コンノート株)の基準改定について

研究協力者 柴山恵吾（国立感染症研究所 細菌第二部 室長）
（岩城正昭分担研究班）

研究要旨 本研究では、欧州製薬団体連合会(EFPIA)から提出された乾燥 BCG 膀胱内用(コンノート株)の基準改定の要望について検討した。要望は、菌の培養日数、有毒結核菌否定試験の動物の匹数と観察期間、及び溶剤の組成の変更に関するものであった。培養日数については、現行の7日から10日までを、製造の都合上6日から10日までに変更するという要望だった。メーカーにおいて力価その他について Validation が行われており、またシードからの培養期間が現行と同等または短くなることから、問題はないと考えられた。有毒結核菌否定試験の改定の要望は、シードの試験において用いるモルモットを現行の12匹以上から10匹以上に減らし、観察期間を6ヶ月以上から42日以上に短縮するというもので、これはEPとの整合性を図るものだった。これについては仮に有毒な結核菌が含まれていてもこの試験では1ヶ月で検出が可能なことや、そもそもBCGの安全性はすでに十分に確立されていることから、問題はないと考えられた。溶剤については、現行のポリソルベート80を含む専用溶剤に加えて欧米で承認されている生理食塩水も使用出来ることとする要望だったが、メーカーにおいて効果に影響を及ぼすパラメータについて Validation が行われており、データを検討した結果特に問題はないと考えられた。

A. 研究目的

欧州製薬団体連合会(EFPIA)より提出された乾燥 BCG 膀胱内用(コンノート株)の基準改定の要望について検討した。

B. 研究方法

EFPIA より要望された、菌の培養日数、有毒結核菌否定試験の動物の匹数と観察期間、及び溶剤を変更することについて、感染研の製剤担当室(細菌第二部第四室)とメーカーとで協議を行い、その妥当性を検討した。EP、USP、及びWHOのBCGワクチンの基準の記載との比較を行い、また基準の変更の妥当性についての根拠をメーカーに示してもらい、検討した。

倫理面への配慮
該当なし。

C. 研究結果

2.2.2 菌の培養と採取の培養日数

現行「 $\cdot\cdot\cdot 37 \pm 1^\circ\text{C}$ で7日から10日までの間培養する。この培養を3回繰り返す。」を「 $\cdot\cdot\cdot 37 \pm 1^\circ\text{C}$ で6日から10日までの間培養する。この培養を3回繰り返す。」に改定する要望について。

培養日数を6日からとすることについて、EP、USPに記載はない。メーカーに照会したところ、改定を要望する理由は、製造工程上6日から8日間の状態で継代を行うのが菌の生育がよいということだった。また、欧米ではこの内容で承認されているとのことだった。メーカーにおいて、Identity test、Viability、O.D.、pH、Potencyについて Validation を行い、影響がないことを確認した。実質的には、シードからの培養日数が現行と同じまたはより短くなることになる。

これらのことから、製造される製品の生物学的性状に特に有意な影響はないと考えられた。

3.1.1 有毒結核菌否定試験

シードの有毒結核菌否定試験で、現行「・・・モルモットは12匹以上とし、6ヶ月以上観察する。」を「・・・モルモットは10匹以上とし、少なくとも42日間観察する。」に改定する要望について。

USPには該当する記載がない。EPは改定案のとおり記載がある。BCGワクチンのWHOの基準も、EPの記載の通りに近年改定される予定である。モルモットに有毒な結核菌を投与すると、通常30日目には異常が観察される。毎ロットに実施する有毒結核菌否定試験は、7匹を用い、42日間観察している。また、BCGの安全性は既に十分に確立されており、培養によって有毒な結核菌が生じる可能性は極めて低い。現実的には、本試験で有毒な結核菌が検出される可能性は極めて低い。以上のことから、この改定を実施しても問題ないと考えられる。

5.2 溶剤の添付

現行「専用の溶剤を添付する」を、添付剤の他に生理食塩水も溶剤として使用出来ることを記載する要望について。

専用の溶剤には、界面活性剤のPolysorbate 80が含まれている。BCGは凝集しやすい性質があるため、この製剤には1960年代よりPolysorbate 80が溶剤に添加されてきた。しかし、実用においてPolysorbate 80がBCGの凝集を抑制する効果については科学的なデータがなかった。メーカーにおいて、抗がん剤の効果に関係するViability、Particle size Distribution、pH、Osmolarity、fibronectin bindingについて、Polysorbate 80の有無による違いを調べたところ、有意な差が見られなかった。(メーカーより資料の提供あり)抗がん剤の効果に関係するパラメータに影響がないため、有意な影響はないと考えられた。

BCGは、溶解後長時間震盪を続けると凝集がおこるが、実際の製剤の使用にあって

は、そのような状況がおこる可能性は極めて低い。そのため、この基準の改定を実施しても問題ないと考えられる。なお、本件については、承認書の変更状況と連動する問題であるので、今後本研究班では検討しないこととした。

D. 考察

菌の培養日数、添付溶剤の改定の要望は、メーカーよりこれらは欧米での承認内容との整合性をとるものと説明された。有毒結核菌否定試験の改定については、EPとの整合性をとるものだった。

なお、この製剤と同様のもの国内で承認されている製剤では、乾燥BCG膀胱内用(日本株)がある。BCGの株が異なるため、基準は別に設定されている。乾燥BCG膀胱内用(日本株)では、培養日数は7日から10日、溶剤は生理食塩水とされている。これらの項目については、BCGの株による特質が大きく影響してくるので、あえて異なる株の製剤間で基準を調和させる必要はないと考えられる。EP、WHOの基準で具体的な記載がないのも同様の理由と思われる。有毒結核菌否定試験は、全てのBCG株について共通する試験であるため、EP、WHOの基準等との調和は意味があると考えられる。なお、乾燥BCG膀胱内用(日本株)では、この製剤が承認された1996年から現在までシードが更新されておらず、また現行のシードが今後数十年分あるという背景から、基準にシードの有毒結核菌否定試験に関する記載がない。

E. 結論

検討の結果、EFPIAから提出された乾燥BCG膀胱内用(コンノート株)の基準改定の要望については、いずれも感染研製剤担当室として問題ないと判断した。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

肺炎球菌ワクチン異常毒性否定試験の解析

分担研究者：和田昭仁 国立感染症研究所 細菌第一部 室長

研究要旨：肺炎球菌ワクチンは 1988 年に日本で承認され、2006 年からは新製法による製品がリリースされている。製造販売会社から異常毒性否定試験削除の要望が出されたことを受け、本分担研究では、新製法製品に対して行われたモルモット異常毒性否定試験の解析を行った。他製剤に比べ高い体重減少率が観察されるものの、母集団の体重減少率は正規分布を示し、生物学的製剤基準に記載された統計解析が可能であった。また、途中でモルモットが Clean から SPF に切り替わったが、母集団の体重減少率に大きな変化は見られなかった。試験の信頼性は確認されたが、試験そのものの必要性については、別の観点からの議論が必要であると考えられた。

A. 研究背景

本班研究の目的のひとつとして、異常毒性否定試験の意義確認とその非設定および削除条件の明確化がある。この試験に関する全般的な議論は、血液・安全性研究部が中心となり、複数の製造販売会社担当者が参加する会議の場で行われている。

肺炎球菌ワクチンに対する異常毒性否定試験では、2005 年に旧製法製品において不合格が見られたため、2006 年に新製法への切り替えが行われた後も、接種匹数を増加させた異常毒性否定試験が国家検定として継続実施

されている。この製剤は、他製剤に比べ、モルモットに対し高い体重減少率を示すことから、試験にあたっては、生物学的製剤基準の一般試験法に書かれている内容に加え、様々な観察が行われている。

本年度の分担研究では、肺炎球菌ワクチン新製法製品に対する異常毒性否定試験データの解析を行い、生物学的製剤基準に記載されている統計解析が可能であることを確認した。今後、試験削除の議論を行う上で、試験の信頼性を問題にする必要はなく、論点を絞ることが可能になった。

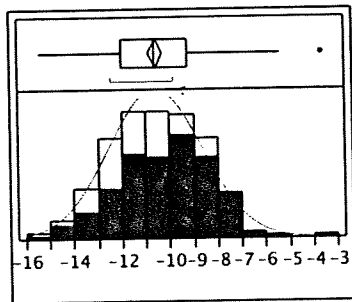
B. 研究対象と方法

肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定試験では、試験実施以前に検定に合格したロットを投与した個体のデータを正常母集団として用いている。今回の研究では、新製法肺炎球菌ワクチンの自家試験記録よりモルモットの体重減少率を計算し、その正規性を検証した。また、途中で、モルモットが Clean から SPF に替わったことにより、体重減少率に何らかの影響が見られないかどうかを検証するために、切り替わり前後の2群の体重減少率を比べた。

C. 結果

接種第1日目の体重減少率を図1に示す。

図1 モルモット体重減少率

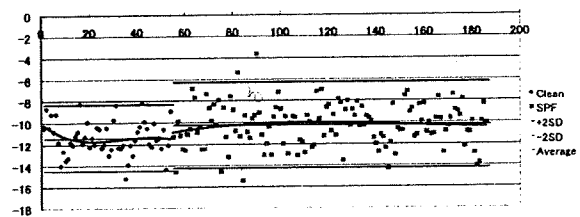


正規分布曲線に沿った体重減少率のヒストグラムが確認された。正規性検定法である Shapiro-Wilk 検定でも、 $p=0.5807$ となり、この分布が正規分布に従っているという帰無仮定は棄却されなかった。接種第2日、接種第3

日は、正規性はやや崩れるが、接種第7日には再び正規性が見られた(data not shown)。

接種第1日目の各個体の体重減少率を図2に示す。

図2 個体別体重減少率



前半は Clean、後半は SPF の個体である。2群の平均体重減少率の差は約1%であるが、統計的に有意な差ではなかった。また、体重減少率のトレンドも経時的変化は見られなかった。

D. 考察

今回の解析により、肺炎球菌ワクチンに対する異常毒性否定試験では、正規分布を示す母集団に対する試験群の統計的な比較が可能であることが確認された。また、検定に合格した個体のデータを母集団に加えて行っても、経時的な体重減少の変化は見られず、安定した正常母集団が形成されていることが確認できた。

正常ロット肺炎球菌ワクチン投与モルモットに観察される高い体重減

少率は、製剤に含まれるポリサッカライド自体の性質によるものであり、製剤に含まれる毒性物質により体重減少が起こっているわけではない。今年度の分担研究により、このような高い体重減少率を示す製剤においても、試験そのものの信頼性を確認することができた。しかし、今後の議論では、動物愛護の観点、試験の性質上その感度と特異性が不明確な点を考慮することが必要である。次年度より、SLPレビュー/GMP査察によるロット均一性の確認ができることを前提に、異常毒性否定試験削除が可能であるかどうかの議論を進める必要性があると考えられた。

E. 結論

肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定

試験は安定した正常母集団に対して実施されており、試験そのものには信頼性があると考えられる。しかし、今後、試験非設定・削除可能となるための具体的条件につき、多くの議論が必要である。

F. 危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

グロブリン製剤の重合体否定試験について

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： 野島清子* 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員
岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長
長谷 紳一郎 血液製剤協会 技術委員会座長・株式会社ベネシス・保証本部
上村晃一郎 化学及血清療法研究所 品質管理部
武宮 陽子 日本製薬株式会社 品質管理部
木村 成明 日本赤十字社血漿分画センター 品質管理部
渡辺 嘉治 バクスター株式会社 品質管理部
森 堅志 株式会社ベネシス 品質管理部
三上 貢一 CSL ペーリング株式会社 八潮工場品質管理部

研究要旨： 静注グロブリンにおける重合体否定試験は、アナフィラキシーショック等の副反応の原因となるグロブリン重合体（生物学的製剤基準では二量体より大きいものを重合体と定義している）含量が 1.0 % 以下であることを確認する試験であり、現在は高速液体クロマトグラフィー法により分析が行われている。現在の規格値である 1.0 % は 25 年以上前に規定されたものであり、カラムゲルクロマトグラフ法で品質管理が行われていた当時と比較して分析技術は格段と進歩し、以前は分離できなかったグロブリン三量体およびオリゴマーが分離できるようになっている。現在の分析技術に見合った至適分析法でグロブリン製剤中の重合体含量を測定すると、複数の製剤において三量体およびオリゴマーが検出され、重合体含量は現在の規格値 1.0 % を超える可能性が示唆された。そこで本研究班では、各製造メーカーの品質管理部と共同で本試験の試験法および規格値の見直しを行い、現在の分析技術に見合った分析方法で品質管理を実施して製剤の安全性を担保することを目指す。

A. 研究目的

グロブリン重合体は補体を活性化し副作用を引き起こす可能性がある。重合体否定

試験は製剤中に含まれる重合体の含量が 1.0 % 以下であることを高速液体クロマトグラフィー法により確認する試験であり、

この規格値は25年以上前に定められたものである。筋注用および静注用グロブリン製剤をゲルろ過カラムを用いて高速液体クロマトグラフ法により分析すると、凝集体、二量体、単量体の3つのピークが分離できる。しかし、使用カラム、塩濃度、pH、緩衝液濃度等の分析条件を至適化することにより二量体ピークより前にオリゴマーが分離され、これらのピークは補体活性を有することが分かった。これらのことから、副作用を引き起こす可能性があるオリゴマーの性状を明らかにし、グロブリン製剤の重合体否定試験法および規格値を見直す必要があると考えられる。製造メーカーが行う自家試験、および国立感染症研究所が行う国家検定における重合体否定試験法を標準化し、オリゴマーが分離出来る条件で重合体否定試験を実施して重合体含量を管理することにより、現在の分析技術レベルに見合った品質管理を実施する。

B. 研究方法

1) 分析条件の検討

高速液体クロマトグラフィーとして日立-2000 シリーズ (Column Oven L-2350, Diode Array Detector L-2455, Autosampler L-2200, Pump L-2130) を用いて分析を実施した。ゲルろ過カラムとしては東ソー G3000SWXL、G4000SWXL、および G3000SW を用いた。流速は 0.3 mL/min ~ 1.0 mL/min で行った。

2) 各メーカーにおける至適分析条件の検討

筋注用グロブリン製剤を分析用参照品として整備し、国立感染症研究所での分析条件、分析結果を示し、グロブリン製造メーカー6社に配布した。各製造メーカーにおける至適分析条件の検討を行い、結果データを比較した。また以下の製剤中の重合体含量を測定した。

- 抗破傷風人免疫グロブリン
- 乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン
- 乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン
- 乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン
- pH4 処理人免疫グロブリン
- ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン

3) 同一検体 (筋注用グロブリン、静注用グロブリン) を用いた複数施設間での分析結果の比較

各メーカーが製造した筋注用グロブリン 1 種類および静注用グロブリン製剤 5 種類、分析参照品 1 種類、全 7 種類を 6 社に配布し、感染研を含む 7 カ所で同一検体を分析し、結果データを比較した。この時の分析条件は、各社における至適条件とした。

4) フラクシオン解析

分析参照品を 流速 0.5 mL/min、溶離液組成 0.1M Na₂SO₄, 0.05 % NaN₃ in 1/7.5M Phosphate buffer pH 6.4 条件下で分析した。

カラムはG3000SWXLカラム2本とガードカラムを用いた。凝集体、三量体（オリゴマー）、二量体、単量体の4つの画分に分離し、それぞれのフラクションのリクロマトグラフを行い、解離会合の有無を検討した。さらに、各フラクションの抗補体価をマイヤーの抗補体価測定法の改変法により測定した。

C. 研究結果

1) 至適条件検討とグロブリン製剤中の重合体含量の測定（国立感染症研究所実施）

感染研の至適条件として以下の条件を定めた。

カラム：G3000SWXLx2本、ガードカラム
流速：0.5 mL/min

溶離液組成：0.1M Na₂SO₄, 0.05 % NaN₃ in 1/7.5M Phosphate buffer pH 6.4

上記条件で市販されている静注用グロブリン製剤中の重合体含量を測定した結果、調べた5種類のグロブリン製剤中の3種類において、三量体を含むオリゴマーが分離され、そのうち2種類においてオリゴマーを含む重合体含量が1.0%を超えていた（3.3%、2.6%）。

2) 各メーカーにおける至適分析条件検討

分析参照品を感染研と同等に測定出来、かつ、自社製品を至適に分析できる分析条件を至適分析条件とした。全6社の至適分析条件検討により、以下の点が確認できた。

・ G3000SW カラムを用いる場合、いかな

る条件を設定しても三量体は分離できない（粒子径 10 μm）。

- ・ G3000SWXL（粒子径 5 μm）カラムを用い、塩を添加して、緩衝液濃度を上げると三量体を含むオリゴマーが分離可能となる。塩を添加せず、緩衝液濃度が低い場合は、三量体が分離できない。
- ・ 溶離液の pH は pH 6.4~7.0 付近が至適であるが、pH 高い方がオリゴマーが分離能が高い傾向がある。

3) 同一検体を用いた複数施設間での分析結果の比較

各メーカーが製造した筋注用グロブリン1種、静注用グロブリン5種および分析用参照品を7施設で測定した。その結果、3種類の静注用グロブリンにおいて三量体が分離され、そのうち2種類において、オリゴマーを含む重合体含量は測定した7施設において1.0%を超えていた。

4) フラクシオン解析

凝集体、三量体、二量体、単量体のフラクションを分離し、同じ分析条件でリクロマトを実施した。単量体画分はリクロマトを実施しても同じ位置に溶出され、時間が経過しても安定であった。二量体画分はリクロマトを実施すると二量体と単量体が分離された。時間が経過する程、単量体含量の増加が認められた。三量体、凝集体画分は共にリクロマトを実施しても同じ溶出位置に溶出され、時間が経過しても比較的安定であった。

それぞれの画分の抗補体価を測定した

結果、それぞれの画分のタンパク量当たりの抗補体価は以下のようであった。

凝集体 116.7 CH50/mg

三量体 22.6 CH50/mg

二量体 6.5 CH50/mg

単量体 2.6 CH50/mg

D. 考察

静注用グロブリン製剤中に三量体を含むオリゴマーが存在することを、感染研を含む全7施設において確認した。また、なかには現在の規格値1.0%を超える製剤があることを7施設において確認した。また一方で、グロブリン製剤はこれまでに広く使用されてきており、重合由来と考えられる副作用の報告はなく、これまでの方法においても製剤の安全性は担保されていたと考える。これらのことから、現在の分析技術レベルに見合った方法で品質管理を行うには、これまでに使用されてきた製剤の重合物含量の真値を把握して生物学的製剤基準を見直す必要があると考えられる。

また、フラクション解析の結果から、グロブリン二量体は単量体へ解離する傾向があること、三量体、凝集体は一度産生されると比較的安定であり、これらは補体を活性化する副作用を持つ可能性が高いことが示唆された。よって、三量体を含むオリゴマーおよび凝集体が確実に分離できる分析条件で自家試験、および国家検定を行うべきである。

7施設において、7種類の同一検体を測定した結果、各施設における至適条件で分析した測定値のばらつきが観察され、また条件によって二量体は解離する傾向があり、その含量は溶離液のpHにより変動する可能性があることから、分析条件をある程度統一することを目指すのが相応しいと考えられた。今後は高速液体クロマトグラフだけでなく、超遠心分析法、多角度光散乱法など他の分析法により検討したグロブリン重合物含量と比較しながら、統一分析条件を決定していくことを予定している。

E 結論

現在の分析技術レベルで品質管理を実施するためには、生物学的製剤基準の見直しが必要である。今後はグロブリン製剤には三量体含まれることを前提に規格値を見直し、試験法を統一化/標準化して品質管理を実施し、製剤の安全性を担保していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J-I, Furuhashi K, Tsuruhara M, Hamaguchi I, Yamaguchi K An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan. *Biologicals*, 37,

8-17, 2009

Momose H, Imai J-I, Hamaguchi I, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Masumi A, Maeyama J-I, Takizawa K, Kuramitsu M, Nomura N, Watanabe S, Kazunari Yamaguchi K Induction of indistinguishable gene expression patterns in rats by Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines. Jpn J Infect Dis, 63, 25-30, 2010

2.学会発表

1) 野島清子、影山努、中内美名、魚住利樹、藤間昭勝、岡田清美、和山行正、田代真人、浜口功 第57回日本ウイルス学会 2010年 非対称PCR-核酸クロマト法による新型インフルエンザ(H1N1)pdm 簡便診断法の開発

3. 知的所有権の取得状況
なし