

## インフルエンザ HA ワクチン及び沈降インフルエンザワクチン(H5N1 株)の 生物学的製剤基準に関する研究

分担研究者 板村繁之 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 室長  
研究協力者 佐藤佳代子 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター  
嶋崎典子 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター  
河野直子 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター

**研究要旨：**インフルエンザ HA ワクチンの生物学的製剤基準には、ウイルス粒子から主要なワクチン有効成分であるヘマグルチニン（HA）蛋白がウイルス膜から遊離してスプリットワクチン化されてワクチンが製造されているのか検証するために分画試験が導入されているが、インフルエンザ HA ワクチンの小分製剤について、ワクチン単原液において分画試験に適合していれば、改めて試験を実施する必要性は低いと考えられ、現行の生物学的製剤基準に定められている小分製品での分画試験は削除可能であろう。沈降インフルエンザワクチン（H5N1 株）の小分製品での力価試験も技術的には可能になってきているので、方法の検討を行った上で、小分製品での力価試験の導入を検討するべきである。現行の試験項目で充分であるのかどうかについては、ワクチンの使用目的を考慮してさらにワクチン製造所、関係規制当局を含めて議論する必要がある。

### A. 研究目的

インフルエンザ HA ワクチンの生物学的製剤基準（生物基）には、ウイルス粒子から主要なワクチン有効成分であるヘマグルチニン（HA）蛋白がウイルス膜から遊離してスプリットワクチン化されてワクチンが製造されているのか検証するために分画試験が導入されている。現在、HA 蛋白の検出には HA 蛋白の生物活性である赤血球凝集（HA）活性を利用しているが、インフルエンザウイルスは抗原変異だけでなく、ウイルスレセプターへの結合力や特異性に変異が見られ、近年の流行ウイルス株は従来ニワトリ赤血球を凝集できたものが、ほとん

ど凝集できないように変異しており、ヒチメンチョウやモルモットなどの赤血球でようやく HA 活性が検出できる。そのため、近年ワクチンに使用されているウイルス株の HA 蛋白は、ウイルス株によって HA 含量当たりの HA 活性に大きな差がある。インフルエンザ HA ワクチンの最終の小分製品は 3 種類のウイルス株の原液が HA 蛋白量として等濃度になるように混合されて製造されているが、HA の比活性がワクチン株ごとによって大きく異なるために 3 種類すべてのスプリット化を分画試験によって検証することが困難になっている。このようなウイルスの変異に伴って、インフルエ

ンザHA ワクチンの生物基に規定されている分画試験について見直しが必要となっている。

一方、1997年の香港に始まる高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ウイルスの鳥からヒトへの感染事例は、現在までのところ幸い本ウイルスによるパンデミックは発生していないが、2003年末以降アジア地域から中央アジア、中近東、欧州、アフリカへと本ウイルスは家禽や野鳥の世界で常在化し、ヒトへの感染を繰り返している。現在（3/3/2011）に至るまで526名の感染者が報告され、その内311名が死亡しており、致死率は約60%に及ぶ。このような高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ウイルスによるインフルエンザ・パンデミックに対応するためのワクチンとして沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1株）が開発され、2007年に製造承認された。本ワクチンは開発と並行して高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ウイルスによるパンデミックに対応するために国家備蓄も実施された。2008年には本ワクチン接種によって得られるプライミングとブースター効果、抗原性の異なるウイルス株に対する抗体応答や持続期間についての臨床研究が実施され、本ワクチンが同亜型のウイルスについて比較的良好なプライミング効果を賦与することが明らかになった。そのために、医療従事者等を対象としたプレパンデミックワクチンとしての使用についても検討されるようになった。その後、本ワクチンは2009年に沈降インフルエンザワクチン（H5N1株）と改定された。しかしながら、本ワクチンはパンデミックを対象として、リスク・ベネフィットの観点から製造承認がなされていることから、プレパンデミック時での使用

を考えるには生物基の項目等の見直しが必要であるのか検討する必要性がある。

このような観点から、インフルエンザHA ワクチン及び沈降インフルエンザワクチン（H5N1株）の生物基に関連する問題点について検討を行うことを本研究の目的とした。

## B. 研究方法

インフルエンザHA ワクチンの小分製品での分画試験の結果をワクチン株ごとに分別して判定するためにキャプチャーELISA法を開発した。開発した方法を用いて各ワクチン株のワクチン単原液での分画試験の成績と小分製品での成績について比較し、小分製品での分画試験の必要性について検討した。

沈降インフルエンザワクチン（H5N1株）の生物基については、試験項目の検討を実施した。

## C. 研究結果・考察

分画試験では蔗糖密度勾配遠心法によってワクチンの有効成分であるHAが存在する分画が蔗糖密度勾配の上層にある事を確認している。ワクチンとしてA/California/7/2009(X-179A) (H1N1) pdm、A/Uruguay/716/2007(X-175C) (H3N2)、B/Brisbane/60/2008のウイルス株のものを使用して、分画試験について従来法であるHA活性に基づく方法とキャプチャーELISA法に基づく方法によってHA蛋白の分画パターンについて検討した。HA活性に基づく方法では、ワクチン株ごとのHA活性を区別することができないことに加えて、各ワクチンのHA含量当たりのHA活性の比活性が異なるため、各ワクチン株のHAが等量含有されている小分製品では、HAの比活性の高

い B/Brisbane/60/2008 の分画パターンと近似することが判った。一方、ワクチン単原液についてはHAの比活性が低い A/California/7/2009(X-179A) (H1N1) pdm、A/Uruguay/716/2007 (X-175C) (H3N2) についても、検体量を増加させることでHA活性による分画パターンの検出が可能になった。各ワクチン株のワクチン単原液について、HA活性に基づく方法とキャプチャーELISA法に基づく方法によってHA蛋白の分画パターンについて調べたところ、両方法で検出されたHAの分画パターンに大きな違いは認められなかった。そこで、HA活性ではワクチン株ごとに区別して検出できなかった小分製品について、キャプチャーELISA法を用いて各ワクチン株のHAの分画パターンを検討したところ、それぞれワクチン単原液の分画パターンと類似の成績を得ることができた。以上のことから、ワクチン単原液を混合した小分製品について、ワクチン単原液において分画試験に適合していれば、改めて試験を実施する必要性は低いと考えられた。現行の生物基に定められている小分製品での分画試験は削除可能であろう。

沈降インフルエンザワクチン(H5N1株)の生物基について見直しを行い、試験項目を検討した。その結果、現行の基準では力価試験が原液の試験として位置付けられているが、小分製品で力価を保証するには不適正であると考えられる。生物基が制定された時点では、小分製品に対して力価試験を実施するための方法が技術的に充分検討されていないということで、小分製品の試験として規定することが見送られた経緯がある。しかしながら、制定の際に原液での力価試験成績で小分製品での力価を担保しよう

と意図していたものが、現行の基準では製造販売承認書に規定された値として判定されることになって、本来の意図を実現できていない。また、小分製品での力価試験も技術的には可能になってきているので、方法の検討を行った上で、小分製品での力価試験の導入を検討するべきである。現行の試験項目で充分であるのかどうかについては、さらにワクチン製造所、関係規制当局を含めて議論する必要がある。

#### D. 結論

インフルエンザHAワクチンの小分製剤について、ワクチン単原液において分画試験に適合していれば、改めて試験を実施する必要性は低いと考えられ、現行の生物基に定められている小分製品での分画試験は削除可能であろう。

沈降インフルエンザワクチン(H5N1株)の小分製品での力価試験も技術的には可能になってきているので、方法の検討を行った上で、小分製品での力価試験の導入を検討するべきである。現行の試験項目で充分であるのかどうかについては、ワクチンの使用目的を考慮してさらにワクチン製造所、関係規制当局を含めて議論する必要がある。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiyama S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Okada K, Miyazaki C, Ueda K: Immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. Microbiol

- Immunol 54: 81-88 (2010)
- (2) Y. Iwai, H. Takahashi, D. Hatakeyama, K. Motoshima, M. Ishikawa, K. Sugita, Y. Hashimoto, Y. Harada, S. Itamura, T. Odagiri, M. Tashiro, Y. Sei, K. Yamaguchi, T. Kuzuhara: Anti-influenza activity of phenethylphenylphthalimide analogs derived from Thalidomide. *Bioorg Med Chem* 18: 5379-5390 (2010)
  - (3) 信澤枝里、板村繁之：新型インフルエンザに対するワクチン開発. *呼吸器内科* 17:51-57 (2010)
  - (4) 佐藤佳代子、板村繁之：インフルエンザワクチンの開発動向と今後の展望. *日本臨床* (2010)
2. 学会発表
- (1) Naoko Kono, Yuichi Harada, Takato Odagiri, Masato Tashiro and Shigeyuki Itamura. Inter-laboratory reproducibility of single-radial-immunodiffusion assay for measuring HA content in the influenza vaccine during 9 year seasons from 2001 to 2009 in Japan. Options for the control of influenza VII, Hong Kong, Sept.3-7,2010.
  - (2) Kayoko Sato, Shigeyuki Itamura, Masato Tashiro. Development of quantitative ELISA for influenza virus haemagglutinin for the use of quality control test of inactivated influenza split-virus vaccine. Options for the control of influenza VII, Hong Kong, Sept.3-7,2010.
- F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン 生物学的製剤基準（案）の作成

分担研究者 白土東子 国立感染症研究所 ウイルス第二部

**研究要旨** 生物学的製剤基準（案）（生物基（案））小委員会を発足させ、Recommendations (WHO TRS 910 2002)を基に、生物基(案)の改訂予定箇所の確認を行った。

### A. 研究目的

早期の沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（DPT-IPV ワクチン）の導入には、ワクチンの製剤化のみでなく、生物基(案)の作成を早急に行う必要がある。本研究では、平成 15-17 年度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「混合ワクチンの品質確保に関する研究」班において作製された生物基(案)が WHO の規制に比較して安全性と有効性を損なわないか否かを検討し、その改訂案に反映させることを目的とする。

### B. 研究方法

平成 15-17 年度「混合ワクチンの品質確保に関する研究」班において、作製された「沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン生物学的製剤基準（案）」について、以下のメンバーから成る生物学的製剤基準（案）小委員会を発足させ、Recommendations (WHO TRS 910 2002)を基に、生物基(案)の改訂予定箇所の確認を行った。

### 生物学的製剤基準（案）小委員会

塩先巧一(財)化学及血清療法研究所  
尾山誠一郎 武田薬品工業(株)  
住田丈 武田薬品工業(株)  
白井宏樹 (財)阪大微生物病研究会  
田野良夫 (財)ポリオ研究所  
高橋元秀 国立感染症研究所  
落合雅樹 国立感染症研究所  
脇田隆宇 国立感染症研究所  
片山和彦 国立感染症研究所  
染谷雄一 国立感染症研究所  
白土東子 国立感染症研究所

### C. 研究結果、及び考察

平成 22 年 12 月 22 日に小委員会を開催した。以下、議論された項目を列記する。

#### 審議事項 1

生物基案 2.1.2.1 製造用ウイルス株  
『I 型ウイルス LS-c, 2ab 株、II 型ウイルス P712, Ch, 2ab 株、III 型ウイルス Leon, 12a1b 株で本剤の製造に相当と認められたウイルス株を用いる。本剤の含むウイルスは、製造株として相当と認められた後、5 代以上継代されたものであってはならない。』の代数について：

各メーカーでの審議結果を踏まえ、代数を明記せず、下記の表記とすること

を小委員会において決定した。『I型ウイルス LS-c, 2ab株、II型ウイルス P712, Ch, 2ab株、III型ウイルス Leon, 12a1b株で本剤の製造に相当と認められたウイルス株を用いる。本剤の含むウイルスは、科学的に問題ないと証明された代数以上継代されたものであってはならない。』

### 審議事項 2

#### 3.2.1 培養細胞の試験

Recommendations の A.3.2.1 Tests for haemadsorbing viruses、A.3.2.2 Tests for other adventitious agents、A.3.2.5 Identity tests を生物基案 3.2.1 に組み込むべきか否かに関して：

各メーカーでの審議結果を踏まえ、小委員会において「Master Cell Bank、Working Cell Bank を作成・更新する際に Identity tests を実施することが規定されているため、ロット毎に A.3.2.5 に相当する試験を実施する必要はない、すなわち生物基案 3.2.1 に組み込む必要はない。A.3.2.1、A.3.2.2 に関しては、相当する試験が製造工程内管理試験として含まれているため、生物基に盛り込む。」ことを確認した。

### 審議事項 3

#### 3.2.2 ウイルス浮遊液の試験

Recommendations A.3.4.4 Purification of monovalent pools に記載されている cellular DNA に関しても生物基案 3.2.2 に組み込むべきか否かに関して：

各メーカーでの審議および小委員会での審議を踏まえ、「生物基案『2.2 原液』の前に新たに『精製ウイルス浮遊液』の項を設け、細胞由来 DNA に関する記述を加えること」を決定した。

### 審議事項 4

#### 3.2.2 ウイルス浮遊液の試験

Recommendations A.3.4.7 Virus titration を生物基案 3.2.2 に組み込むべきか否かに関して：

各メーカーでの審議結果を踏まえ、小委員会において「精製工程において、単味 IPV の力価を確認している。よって、生物基案に入れる必要はない。」ことを確認した。

### 審議事項 5

#### 3.2.2 ウイルス浮遊液の試験

Recommendations A.3.4.10 Test for effective inactivation を生物基案 3.2.2 に組み込むべきか否かに関して：

各メーカーでの審議結果を踏まえ、小委員会において「ポリオ研において現在すべてのバッチについてデータ取りを行い、96 時間以内に不活化されることを確認しており、不活化にはその 3 倍の時間を費やしている。実生産規模による製造において不活化の効率をモニターし、現在の不活化方法・不活化時間で問題ないことを確認しておく必要はあるが、問題なければ今後すべてのバッチについて不活化の効率をモニターする必要はない、すなわち生物基案 3.2.2 に組み込む必要はない。」ことを確認した。

### 審議事項 6

2.2.2.3 濃縮・精製及び不活化 (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。』のエンドトキシン濃度に関して：

小委員会において『0.25 EU/mL』を『0.4 EU/mL』と変更して欲しいとの要望が出た。『0.4 EU/mL』で問題がないか、各メーカーにて再度、審議し、次回小委員会にて審議内容の確認を行う。

### 審議希望事項 1 (メーカー 1)

#### 2.1.2.1 製造用ウイルス株

「シードロットシステムで用いる」と

いう文言の追加に関して：

メーカー1より、「シードロットシステムで用いる」という文言を追加すべきか否かについて審議の希望が出た。追加する文言の案を感染研が作製し、次回小委員会で検討する。

#### **審議希望事項 2 (感染研)**

##### **3.3.13. ラット免疫原性試験**

項目番号、試験名称の変更に関して：

『3.3.13. ラット免疫原性試験』を『3.3.12.4 不活化ポリオワクチンの力価試験』に変更してはどうかとの提案を感染研が行った。変更案を感染研が作製し、次回小委員会で検討する。

#### **審議希望事項 3 (メーカー4)**

3.3 小分製品の試験に Recommendations A.5.6 Preservative content を生物基案 3.3 に組み込むべきか否かに関して：

メーカー4より「施設によっては保存剤（フェノキシエタノール）が含まれているため協議が必要だ。」と審議の希望が出た。追加する文言の案をメーカー4と感染研が作製し、次回小委員会で検討する。

#### **審議希望事項 4 (感染研)**

3.3.13.3 判定に関して：

不活化ポリオワクチンは I、II、III 型の3つの力価を評価する必要があることから、国内標準品に単位を与え、力価判定基準に関する生物基案の文言を『同等以上』から『○単位/mL以上』に変更してはどうかとの提案を本小委員会において感染研が行った。変更案を感染研が作製し、次回小委員会で検討する。

#### **追加審議事項 1**

2.2.2.2 培養及び採取に関して：

『ウイルス浮遊液』という用語が、異なる意味で2回用いられている。どち

らかを変更すべきではとの指摘があった。変更案を感染研が作製し、次回小委員会で検討する。

#### **次回の検討事項**

1. 審議事項 1、2、3、及び追加審議事項 1 での決定に基づき、感染研が生物基案に文言を追加し、次回小委員会にて確認を取る。
2. 審議事項 6 に関して各メーカーにて再度、審議する。次回小委員会にて審議を行う。
3. 審議希望事項 1、2、3、4 に関して、感染研が修正案を作製し、次回小委員会にて再度、審議する。

#### **D. 結論**

Recommendations (WHO TRS 910 2002) Recommendations (WHO TRS 910 2002) を基に、生物基(案)の改訂予定箇所の確認を行った。感染研中心となって生物基案改定案を作製し、次回小委員会にて確認を取る。

#### **E. 健康危害情報**

無し

#### **F. 研究発表**

論文発表

(欧文)

無し

(和文)

無し

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

## 【参考資料】：生物学的製剤基準

### 「沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（案）」

#### 1 本質及び性状

本剤は、百日せき菌の防御抗原を含む液及び「ジフテリアトキソイド」、「破傷風トキソイド」並びに「不活化したI型、II型及びIII型弱毒ポリオウイルス（以下「不活化ポリオウイルス」という。）」を含む液にアルミニウム塩を加えて、不溶性とした液剤である。振り混ぜるとき均等に白濁する。

#### 2 製法

##### 2. 1 原材料

##### 2. 1. 1 百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド

沈降精製百日せきワクチン2. 1、ジフテリアトキソイド2. 1、破傷風トキソイド2. 1をそれぞれ準用する。

##### 2. 1. 2 不活化ポリオウイルス

##### 2. 1. 2. 1 製造用ウイルス株

I型ウイルス LS-c, 2ab 株、II型ウイルス P712, Ch, 2ab 株、III型ウイルス Leon, 12a1b 株で本剤の製造に相当と認められたウイルス株を用いる。本剤の含むウイルスは、製造株として相当と認められた後、5代以上継代されたものであってはならない。

##### 製造用細胞株

本剤の製造には相当と認められたアフリカミドリザル腎臓細胞由来の Vero 細胞を用いる。細胞株は一定の培養条件下で定められた継代数だけ培養を行い、シードロットシステムで用いる。

##### 2. 1. 2. 3 培養液

細胞培養には、適当な細胞増殖因子、0.002 % (w/v) 以下のフェノールレッド及び必要最少量の抗生物質を加えることができる。ただし、ペニシリンは加えてはならない。

##### 2. 2 原液

##### 2. 2. 1 百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド



沈降精製百日せきワクチン2. 2、ジフテリアトキソイド2. 2、破傷風トキソイド2. 2をそれぞれ準用する。

#### 2. 2. 2 不活化ポリオウイルス

##### 2. 2. 2. 1 細胞培養

細胞培養は、凍結保存された製造用細胞バンクから行い、継代数が所定の継代数を超えてはならない。

培養細胞について、3. 2. 1の試験を行う。

##### 2. 2. 2. 2 培養及び採取

型別に培養細胞で培養したウイルス浮遊液を適当な方法で採取、処理したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について3. 2. 2の試験を行う。

##### 2. 2. 2. 3 濃縮、精製及び不活化

同一株のウイルス浮遊液の適当量を集めて、適当な方法で濃縮、精製及び不活化し、これを原液とする。

原液について、3. 2. 3の試験を行う。

#### 2. 3 最終バルク

百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド及び不活化ポリオウイルスの各原液を生理食塩液等で希釈し、アルミニウム塩を加えて作る。ただし、百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイドは、沈降精製百日せきワクチン2. 3及び沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド2. 3にそれぞれ適合するようにして作る。また、不活化ポリオウイルスは、3. 3. 13のラット免疫原性試験に適合するようにして作る。ただし、不活化ポリオウイルスの含量は、たん白質量として20 µg/mL以下でなければならない。適当な保存剤及び安定剤等を用いることができる。

### 3 試験

百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイドについて3. 1の試験を行う。不活化ポリオウイルスについては3. 2の試験を行う。

#### 3. 1 百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド

沈降精製百日せきワクチン3. 1、ジフテリアトキソイド3. 1、破傷風トキソイド3. 1をそれぞれ準用する。

#### 3. 2 不活化ポリオウイルス

### 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  $3\text{ cm}^2$  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. 13 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. 13. 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  $1 \times 10^5$  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 CCID<sub>50</sub> 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. 13. 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 CCID<sub>50</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^4$  cells となるように細胞浮遊液を添加し、36±1°C の CO<sub>2</sub> 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 CCID<sub>50</sub>/0.05 mL でなければならない。

#### 3. 3. 13. 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. 14 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. 14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：**昨年度に引き続き、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昨年度から検討している項目について、一部については基準改訂を行なった。また新たにいくつかの項目について検討を開始した。

### A. 研究の目的

昨年度に引き続き研究を行なっている。生物学的製材基準の基本方針は、「まえがき」(抜粋)によれば、「従来、その規定が不統一であった製造工程間の試験を基準全般に盛り込み、製造業者自身の段階における試験を基準に明確に規定し、義務づけることにより、よりよい品質のワクチンの供給を図ること」とある。従って、製造業者間の規定の統一を図ることを趣旨として生物学的製剤基準がつけられたと考えることができる。

本研究班全体の目的は、ワクチンに関しては(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、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、である。

分担研究者として、DPT 関連の細菌ワクチン、Hib ワクチンおよび抗毒素について上記の視点から検討した。

### 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 EP との調和を図るよう要望が出されている。昨年度に引き続き、力価の基準について検討を行なった。本年度は力価の定義（標準品含む）について検討した。現在国内で用いられている DPT ワクチンはいわゆる

る DTaP（沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン）であり、百日せき有効成分としていわゆる acellular vaccine を用いている。本混合ワクチンの D および T トキソイドの力価については現在「参照トキソイド」をものさしとして、「U/mL」で力価を与えている。これは過去の百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン（いわゆる whole cell pertussis vaccine を成分として含むもの）の時代に、whole cell 成分の影響で D あるいは T 単味と DTwP で用量反応が異なったために、国際単位を与えられた単味用の「標準トキソイド」を物差しとして使用することができず、DPT 用のものさしとして「参照トキソイド」を設定したものが引き継がれているためである。

現在 DTwP が DTaP に置き換えられ、さらに近年の DTaP の品質向上もあり用量反応曲線に P 成分の顕著な影響はみられなくなりつつある。そこで将来的には DTaP も「標準トキソイド」で管理する方向が望ましいと考えられる。その際には基準を改定し「IU/mL」で管理することになる。

## （2）Hib ワクチンについて

1. EDAC 含量試験およびフェノール含量試験：EFPIA より両試験について、基準を変更してほしい旨要望があった。ともに、海外製造元での試験法の変更が予定されているための要望である。要望の内容としては、EDAC 試験は現行の「比色法を使用」から、「キャピラリー電気泳動法による方法も追加、規格値の変更はない」に、フェ

ノール含量試験については現行の「検量線により含量を求める」から、「限度試験に変更したい。規格値は変更なし。」への変更を求めるというものであった。製剤担当室を含め検討を行ない、EDAC 試験については試験法の追加であり、かつ規格値変更がないことから改訂を予定するものとし、フェノール含量試験についても、規格値変更がないことから、改訂を予定するものとした。

2. 分子サイズ分布試験：EFPIA より本試験について、現行の「Kd 0.20 より前に溶出する多糖の割合は 60%以上」から「Kd、分子量、流体力学的半径を HPSEC より求める：Kd $\leq$ 0.37、Mw $\geq$ 4.2 x 1,000,000、Rh $\geq$ 30nm」に変更するよう要望があった。海外製造元での試験法の変更が予定されていることが理由とされている。本件に関しては、使用カラム、充填剤など試験方法の変更になるため、改訂案の試験法と現行法との比較による規格値の妥当性について判断材料となる資料の提示（例：結果のクロマトグラム）を要請しつつ、継続検討としたいと考える。

## （3）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

本試験は現行では動物（マウス）を用いる試験である。（社）日本血液製剤協会より、EP の「HUMAN TETANUS IMMUNOGLOBULIN」の「POTENCY」において「immunoassay」が認められていること、また、国際標準抗毒素に続いて、国内標準抗毒素についてもウ

マ血清由来からヒト血清由来に変更され、酵素免疫測定法導入の下地ができてきていることから、酵素免疫測定法を追加していただきたいとの理由で *in vitro* 試験への移行が要望されている。また本試験は、3Rs の観点からも、*in vitro* 試験への移行が将来的には望ましいと考えられる。そこで昨年度は EILSA による測定系の検討を行なったが、標準品の設定、標準的な試験法の設定など未解決の問題が多く、本研究班の期限内での *in vitro* 移行は次期尚早と結論された。しかし動物実験の 3Rs は早急に対処すべき問題と考え、現行基準の破傷風抗毒素価測定法で 5 日間と設定されている攻撃後の観察期間について短縮が可能かどうかを、国内に製剤を供給している 4 所社と共同で詳細に検討した。感染研および 4 所社に、過去の詳細な試験記録が残されていることを利用して、観察期間を 3 日間にした場合と 5 日間の場合で判定結果に有意な差が生じるかどうかを統計的に解析した。感染研における過去 23 回の試験記録と 4 所社のそれぞれ 5、8、14、4 回の試験記録について検討した。これら合計 54 回の試験記録について検討した結果、観察期間を 5 日間から 3 日間に短縮しても判定結果に有意な差が生じないことが判明した。この結果を受けて、生物製剤基準一般試験法の破傷風抗毒素価測定法をそのように変更した。

(4) 一般試験法の無菌試験法について

(社) 細菌製剤協会より、「①日本薬

局方改正に伴う培地名の変更、②日本薬局方の規定では、直接法において現在接種本数の規定はない。試料の接種量は培地の 10% を超えてはならない規定があるのみである。接種本数を規定することは、アイソレーター等を用いる場合、作業が繁雑になるので、日本薬局方の規定の範囲内で使用する培地の本数を選択できるよう改定を要望する。」との趣旨の要望があった。担当室を含め検討の結果は以下の通りとなった。①培地名については、改訂予定。②直接法のチオグリコール酸培地において 1 mL および 0.5 mL を接種しているのは、試料の抗菌活性除去目的とされていた。その記述を削除するにあたっては、「試料が抗菌活性を持たないこと、あるいは、抗菌活性が十分に除去されていること」を確認する適合性試験を行なうことを文言に盛り込むことが必要と考えられる。また、培地あたりの採取量変更にもなるため文言の改訂も含めて検討・協議したい。

(5) 一般試験法マイコプラズマ否定試験について

本分担研究において、感染研側より提案があった。マイコプラズマ否定試験の「培養及び観察」の項目において、「直接塗抹培養法及び増菌培養法による」との記載について整備を行なうという趣旨である。具体的な内容については、1. 直接法とメンブランフィルター法の記載整備を行なう、2. 遺伝子検出法等、他の方法の追加記載についての検討を開始する、の 2 点である。



今後基準案の検討を行なってゆきたい。

(6) 規格値や方法変更を伴う生物基改訂にあたってのシステムについて本分担研究班から、次のことが提案された。

ワクチンの有効性・安全性にクリティカルに関わると考えられる項目の規格値や方法の改訂プロセスのシステム作りについても言及していただきたい。感染研と PMDA での役割分担も含めて班として討議し、研究班成果として提案していただきたい。承認前試験ならびに生物基策定時には、感染研において、試験法や規格値の科学的検証を実施し、その結果を PMDA と討議の上、生物基策定に反映させている。従って、新たな方法や規格値が妥当であるかの判断に感染研が関与し、判断材料の提示や場合によっては提出を求められるシステムとすることもお考えいただきたい。

#### (倫理面への配慮)

特に倫理面に配慮すべき活動は今回行っていない。

#### 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

1. 特許出願  
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 H22 年度自家試験成績の解析

分担研究者 和田昭仁 国立感染症研究所細菌第一部

**研究要旨** H22 年度に出検された肺炎球菌ワクチンでは、安定した異常毒性否定試験結果が得られている。今後、条件が整えば、試験の削除を検討することが可能であると考えられる。

### A. 研究背景

肺炎球菌ワクチンに対する異常毒性否定試験は、2006 年に新製法製剤承認にともない、承認書記載事項に沿い、国内自家試験および国家検定として実施されている（承認書記載事項は、生物学的製剤基準記載内容とは一部が異なっている）。一方、海外ではこの製剤に対する General Safety Test は、すでに削除されており、異常毒性否定試験は、国内だけで実施されている規格試験となっている。

昨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 40 ロットの解析を行い、統計解析が可能であることを確認した。

本年度の解析では H22 年度に出検された 13 ロットの異常毒性否定試験のトレンド解析を行った。

### B. 対象

2010 年 4 月 2011 年 2 月までに出検された肺炎球菌ワクチン 13 ロットの自家試験による異常毒性否定試験を対

象とした。これらのロットは全て SPF モルモットに投与されている。

### C. 結果

13 ロットにもちいられたモルモット個体の体重減少率の推移を図 1 に示す。当該 13 ロットの体重減少率のトレンドに変化はなく、ほとんどの個体の体重減少率は  $\sigma \pm 2SD$  の範囲内に分布した。

### D. 考察

今回の解析により、肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定試験は、H22 年度においても安定な結果が得られていることが確認できた。H21 年以前の解析では途中モルモットが Clean から SPF に変わり、両方で体重減少率に約 1% の差が見られたが、H22 年度は、観察期間中有意な変動は見られなかった。現在、異常毒性否定試験は、製剤のロットごとの均一性を見るための試験としての意義付けがされている。しかし、体重減少などの差が見られた場合、製剤中の成分の何が異なるかを知る

ことは困難であり、また、人に投与された場合、製剤の有効性、安全性にどれくらいの影響があるのかを知ることができない。現在のように、CIP, SIPによる管理が行われている製造現場では、製造工程中になんからの毒性物質、毒性物質を産生する要因が入る可能性はきわめて低く、最終製品のロットごとの均一性は、製造工程管理で担保されるべきものである。

H21-H22 総括報告書では、製造工程管理の確認を行うための要件と異常毒性否定試験を削除するための要件につき、考察を行う。

#### E. 結論

H22 年度においても、肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定試験は安定した結果が得られており、条件が整えば、試験の削除が検討されるべきであると考えられる。

#### F. 危機管理情報

なし

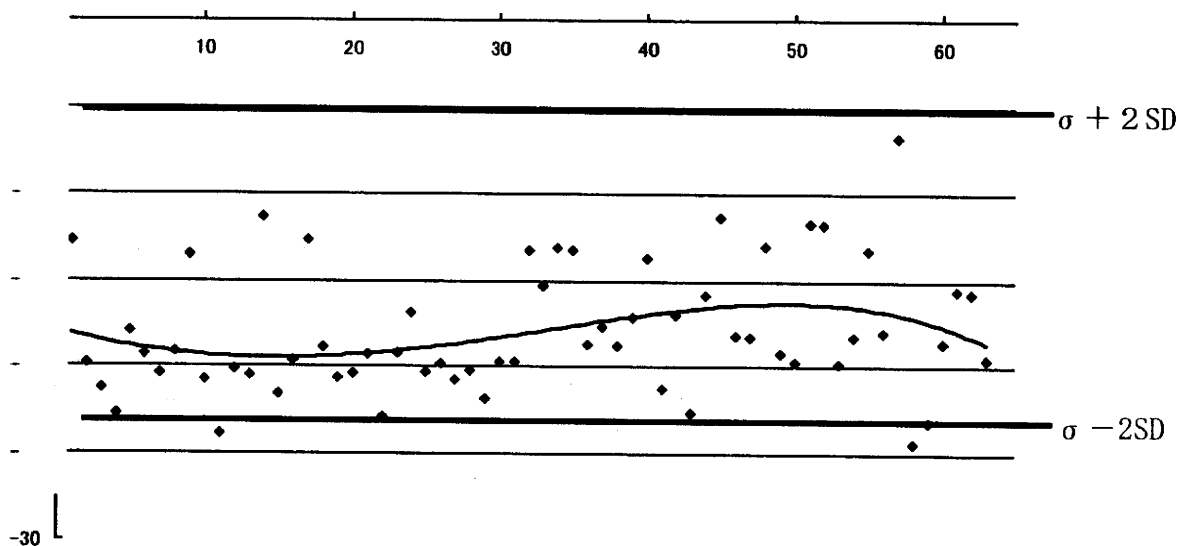
#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

【図1】 モルモットの体重減少率



## 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・安全性研究部第一室長  
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  
上村晃一朗 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  
大根田 守 CSL ベーリング株式会社 八潮工場品質管理部  
内山 進 大阪大学大学院工学研究科

**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% を超えることが判明した。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能を有することが分かった。これらのことから、