

インフルエンザ HA ワクチンの各ワクチン株のワクチン単原液について、HA 活性を 0.5%ヒチメンチョウおよび 0.75%モルモット赤血球を使用して測定し、HA 含量については HA 含量既知の標準抗原を用いて一元放射免疫拡散試験 (SRD) 法によって測定した。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

インフルエンザ HA ワクチンにはワクチンがスプリットワクチンであることを確認するために、ウイルス粒子とは異なる分画位置に HA 活性が存在していることを確認する分画試験が生物基に規定されている。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。HA の存在する分画について HA 活性に基づいて検出していたが、近年分離されるほぼ全てのインフルエンザウイルス株はニワトリ赤血球に対して HA 活性を示さず、ヒチメンチョウあるいはモルモット赤血球を用いてようやく HA 活性が検出できる程度に変異を起こしている。さらに、各ウイルス株の HA 含量当たりの HA 活性の比活性が大きく異なっている。通常の季節性インフルエンザ HA ワクチンは、A 型 2 種、B 型 1 種

の混合ワクチンであり、各ワクチン株の HA が等量含有されており、ワクチン株の組合せによっては高い比活性を有する HA と低い比活性を有する HA のワクチン株が混合した状態になっている。本研究で測定したワクチン株についても、最大で 10 倍程度の HA 比活性に違いが認められた。このようなワクチンを HA 含量に基づいて混合した小分製品について分画試験を行っても、高 HA 活性のワクチン株に隠れて、低い HA 活性のワクチン株の分画位置が識別できない。実際、本研究でワクチンとして 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、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、混合前の原液の段階では HA 活性に基づいて試験に添加する検体量を調製することができ、個別に HA 活性の存在する分画を同定することが可能である。実際に、ワクチン単原液について HA の比活性が低い 2 つのワクチン株 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。さらに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。

また、沈降インフルエンザワクチン（H5N1株）は、パンデミックワクチンとして高病原性鳥インフルエンザ（

H5N1株）を想定してリスクとベネフィットを考慮して製造承認され、その生物基が作成された。各クレードに対応したH5N1ワクチンの国家備蓄が進められている一方で、これらの備蓄ワクチンのプレパンデミックワクチンとしての利用についても検討がなされている。このように当初想定されていたワクチンの使用方法とは異なる使用方法も検討されており、仮に本ワクチンの適応範囲がプレパンデミックワクチンまでも拡大されることになると、ワクチンの品質管理に関する試験項目について見直しが必要か検討する必要がある。この点については、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, Kudo Y, Goto S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y: A prime-boost vaccination of

- mice with heterologous H5N1 strains. *Vaccine* 27: 3121-3125 (2009)
- (2) Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiwara 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)
- (3) 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)
- (4) 緒方剛, 山崎良直, 岡部信彦, 中村好一, 田代真人, 永田紀子, 板村繁之, 安井良則, 中島一敏, 土井幹雄, 泉陽子, 藤枝隆, 大和慎一, 川田諭一: 一般住民のインフルエンザ予防接種歴と H5N2 鳥インフルエンザウイルス中和抗体, 厚生指標 56: 33-38 (2009)
- (5) 影山努, 板村繁之: 新型インフルエンザウイルス. 臨床と微生物 36:193-198 (2009)
- (6) 板村繁之: インフルエンザワクチン. 化学療法の領域 25: 1453-1458 (2009)
- (7) 板村繁之: インフルエンザワクチンの現状と課題. 診断と治療 97: 2073-2077 (2009)
- (8) 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)
- (9) 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) N. Kono, Y. Harada, T. Odagiri, M. Tashiro and S. 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) K. Sato, S. Itamura, M. 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.
- (3) 板村繁之: シンポジウム II インフルエンザワクチン 3. パンデミックワクチンの現状と課題. 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009
- (4) 河野直子, 板村繁之, 小田切孝人, 田代真人: インフルエンザワクチンの力価測定に用いる一元放射免疫拡散(SRD)試験法の精度評価 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009
- (5) 原田勇一, 河野直子, 板村繁之, 小田切孝人, 城野洋一郎, 五反田亨, 多田善一, 池田富夫, 田代真人: 沈降新型インフルエンザワクチン (H5N1 株) 接種者の血清ウイルス中和抗体の交差反応性の検討. 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009
- (6) 高橋 仁, 原田勇一, 佐藤佳代子, 河野直子, 板村繁之, 田代真人: インフルエンザワクチン力価測定に使用する標準抗原の HA 含量決定に重要な HA 含有率のエンドグリコシダーゼを用いた測定法の検討. 第 13 回日本ワクチン学会, 札

- 幌, 2009
- (7) 池野大介, 来海和彦, 工藤康博, 後藤修郎, 板村繁之, 小田切孝人, 田代真人, 城野洋一郎: マウスを用いた H5N1 株インフルエンザワクチンのプライム-ブースト効果の検討. 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009
- (8) 原田勇一, 高橋 仁, 佐藤佳代子, 信澤枝里, 河野直子, 板村繁之, 田代真人, 奥野良信, 佐々木学, 庵原俊昭, 小田切孝人: 沈降 H5N1

インフルエンザワクチン接種者の野生型ウイルス株及び弱毒ワクチン株に対する抗体応答の評価. 第 57 回日本ウイルス学会, 東京, 2009

G. 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 特記事項なし

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) にあつて生物基（案）にない項目の洗い出しを行い、さらにそれらを基にした生物基（案）改訂予定箇所の確認を行った。

A. 研究目的

先進国のほとんどは、すでに不活化ポリオワクチン（IPV）（通常、4回接種）を使用している。わが国において、OPV から IPV に転換するには、高い接種率を保持することが必須の条件となる。公衆衛生審議会感染症分科会ではポリオ予防接種検討小委員会の答申をうけ（平成 15 年 3 月）、ポリオ不活化ワクチンの早期導入が必須であること、そして OPV から IPV への円滑な移行のためには、沈降精製百日せきジフテリア破傷風（DPT）ワクチンと IPV の混合ワクチンの導入が望ましいとしている。早期の 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、その改定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基（案）小委員会を発足させ、Recommendations (WHO TRS 910 2002) にあつて生物基（案）にない項目の洗い出しを行い（平成 21 年度）、さらにそれらを基にした生物基（案）改訂予定箇所の確認（平成 22 年度）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 21 年 12 月 25 日に第一回小委員会、平成 22 年 12 月 22 日に第二回小委員会を開催し、生物基（案）の全ての項目を検討した。以下、議論された項目を列記する。（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）」は本報告書の末尾に参考資料として添付した。）

C-1. 生物基（案）全体に関して

WHO recommendations (WHO TRS 910 2002)は、強毒株由来、IPV 単味ワクチンをターゲットしているのに対し、生物基（案）はセービン株由来、DPT-IPV 4 混ワクチンをターゲットとしている点に違いがある。その違いを加味した上で、生物基（案）と Recommendations で大きく異なる点は、A.3.2.5 Identity tests と A.3.4.8 Test for retroviruses の 2 項目のみであった。他の項目は工程内管理試験または社内工程内管理試験で大体網羅されており、社内工程内管理試験、工程内管理試験の項目を生物基（案）に入れるかどうかの判断を行うこととした。

C-2. 生物基（案）2.1.2.1 製造用ウイルス株

1) 『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。』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。』また、メーカーより、『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。

C-3. 生物基（案）2.2.2.2 培養及び採取

『ウイルス浮遊液』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。

C-4. 生物基（案）3.2.1 培養細胞の試験

1) 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無い、すなわち生物基案 3.2.1 に組み込む必要はないこと、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。

C-5. 生物基（案）3.2.2 ウイルス浮遊液の試験

1) 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。

2) 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。

3) 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。

C-6. 生物基 (案) 3.2.3.3 エンドトキシン試験

1) 『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、引き続き議論を重ねる。

C-7. 生物基 (案) 3.3 小分製品の試験

1) Recommendations の A.5.5 Protein content を生物基 (案) 3.3 に組み込むべきか否かに関して：

「Protein content の試験は IPV 原液で行っている。よって、生物基 (案) に組み込む必要はない。」と小委員会で結論づけた。

2) Recommendations の 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と感染研が作製し、今後検討する。

C-8. 生物基 (案) 3.3.8 マウス白血球数増加試験

マウス白血球数増加試験を生物基 (案) から除くか否かに関して：

DPT ワクチンの試験項目からマウス白血球数増加試験は外された。よって、生物基 (案) に組み込む必要はないと結論づけた。

C-9. 生物基 (案) 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。

C-10. 生物基 (案) 3.3.13.3 判定

免疫原性活性に単位を与えることに関して：

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、引き続き検討を重ねる。

D. 結 論

Recommendations (WHO TRS 910 2002) にあって生物基(案)にない項目の洗い出しを行い、さらにそれらを基にした生物基(案)改訂予定箇所の確認を行った。今後は感染研が中心となって生物基改定案を作製し、小委員会の確認を取る予定である。生物基案の骨子がある程度固まり、小委員会での内部合意が取れた段階で小委員会は終了とする。平成 23 年半ばの終了を目標とする。

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】：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 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、 $\text{O}\sim\Delta$ 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 1×10^5 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. 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 ウェル以上添加し、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、各ウェ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、各ウェルに 1×10⁴ 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、各ウェルの 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、生物学的製剤基準のいくつかの項目について検討を開始し、一部については基準改訂を行なった。加えて、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

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」(生物学的製材基準まえがき抜粋)である。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、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、Hib ワクチンおよび抗毒素について担当し、これらのワクチン・抗毒素に加えて一般試験法のいくつかについて、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、本研究班において感染研からの提案も行ないたい。

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た。

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。(3)一方、力価の定義(標準品含む)についても検討した。現在国内で用いられている DPT ワクチンはいわゆる 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) 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°C保存検体と 37°C、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°C保存検体の試験を行ない、37°C、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°C、37°C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°C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°C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、3Rs 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. 破傷風トキソイド部分の無毒化試験と特異毒性試験：EFPIA より、両試験を一本化する要望があった。

現行の生物学的製剤基準では、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* 化する要望が出された（添付資料参照）。3Rs 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及び妥当性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。*in vivo* アッセイ用の国際標準品にトレース可能な *in vitro* アッセイ用標準品の整備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。

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。

(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

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

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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日の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、溶剤は生理食塩液とされている。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