

肺炎球菌ワクチン異常毒性否定試験の検定からの削除要件について

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：新製法肺炎球菌ワクチンは2006年からリリースされ、2011年2月までの53ロットにおいて、安定した異常毒性否定試験結果が得られている。今後、定期的GMP査察、SLPレビューの体制が整えば、検定から試験の削除は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。

H22年度に出検されたロットの異常毒性否定試験の検討は、H22実績報告書報告書の対象とし、本報告書ではH21-H22年度の検討結果に基づく論点の整理を行った。

B. 対象

2006年から2011年2月までに検出された肺炎球菌ワクチン53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。

C. 結果

肺炎球菌ワクチンは他の製剤よりもより高い体重減少を示すものの、当該53ロットの異常毒性否定試験自家試験では体重減少率はガウス分布に従い、正規化が可能であった。このことより、パラメトリックな検定が可能となり、生物学的製剤基準に定められた $p=0.01$ の判定に、 z 検定を用いることの妥当性が再確認できた。

当該53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 $\pm 2SD$ の範囲内に分布した。

D. 考察

今回の解析により、異常毒性否定試験の視点では、肺炎球菌ワクチンは、4年間53ロットにわたり均質な製剤が出検されていることが確認できた。この製剤は、原薬ポリサッカライドの製造工程においても、バルク製造から小分けの段階においても製造工程に重大な問題は見られていない。原薬および小分製品の規格試験に関しても

適切に設定されている。ロットごとの製剤の均一性を確認するためには、異常毒性否定試験ではおのずと限界があり、SLP レビューが不可欠である。それに加え、製造工程の頑健性を知るためには、逸脱とその処理の確認、バッチレコードの確認が必須である。SLP レビューは感染研内で実施可能であるが、逸脱の処理に関する細部にわたる照会、バッチレコードの確認は実地 GMP 調査にて行われる必要がある。このワクチンの異常毒性否定試験を廃止するためには、機構による定期的な実地 GMP 査察、感染研担当者の GMP に対する理解と経験の蓄積が必要である。これらのことを満たした上で、ロット毎の SLP レビューが可能になれば、異常毒性否定試験の廃止が可能であると考えられる。SLP レビューの正式開始が H24 年 10 月に予定されているため、1 年半で感染研が職員

のトレーニングを行い、体制を整えることが必要である。

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結果が得られており、その意義を考慮すると SLP レビュー開始にあわせ削除可能であると考えられる。定期的な実地 GMP 査察、SLP レビューを行う体制の確立が必要である。

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

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・株式会社ベネシス
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ィー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オ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、各フラクシオ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) フラクション解析

凝集体、三量体、二量体、単量体のフラクションを分画し、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ものであった。

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、重合体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体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体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

- (1) Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J-I, Furuhata 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
- (2) 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

抗 HBs ヒト免疫グロブリン一般試験法の見直しについて*

研究分担者： 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部長
研究協力者： 水落利明* 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第2室長
植木英敏 日本赤十字社血漿分画センター 品質管理部
竹内次雄 日本赤十字社血漿分画センター 品質管理部

研究要旨：生物学的製剤基準「一般試験法」の抗 HBs 抗体価測定法は抗 HBs ヒト免疫グロブリンの抗体力価を測定する方法を定めたものである。現行では RIA(放射免疫測定法)と EIA(酵素免疫測定法)が記載されているが、これに CLIA(化学発光免疫測定法)を追加することの正当性を検討した。信頼性、特異性、再現性、測定感度等を現行 EIA 法と比較したところ、同等の性能が確認された。生物学的製剤基準の通則 34 において「生物学的製剤基準に規定する試験法に代わる方法で、それが規定の方法以上の正確さと精密さがある場合は、その方法を用いることができる。ただし、その結果についての疑いのある場合は、規定の方法で最終の判定を行う」と記載されており、現行の記載のままでも代替法の使用が認められている。従って、生物学的製剤基準改正を待たずに CLIA 法を追加適用することは可能であると結論した。

A. 研究目的

抗 HBs 抗体価測定法として生物学的製剤基準「一般試験法」に定められている現行の EIA 法と、今回試験法への追加を希望する CLIA 法（Architect：アボット・ジャパン社）との性能比較を行った。

B. 研究方法

1. 検量線の検証

CLIA 法（Architect）の測定値（RLU）において、どの範囲で直線性が得られるかを検証する。また、その範囲での同時再現性を検証した。

2. 分析法バリデーション

日本薬局方第十五改正 25.分析法バリデーション 項目に従い、CLIA 法

（Architect）の真度・併行精度・室内再現精度・直線性・特異性・範囲のパラメーターについてバリデーションを行った。

3.EIA 法との比較試験

HBIG 等のサンプルを用いて CLIA 法と EIA 法（AxSYM：アボット・ジャパン）との比較試験を行った。

C. 研究結果

1. 検量線の検証

測定値（RLU）の範囲 150,000～5,000 で直線性が得られることが分かった。その時の抗体価は約 0.2 IU/mL 以下である。同時再現性の結果は CV 値が抗体価の高い部分では 3.9%、また低い部分では 6.5% と比較的良好な値であった。以上の結果

から、CLIA 法ではスタンダードを RLU の範囲 150,000～5,000 の間の 5 ポイントにより作成することにした。

2. 分析法バリデーション

- ① 真度：95%信頼区間が 0 を含む
- ② 併行精度：変動係数が各濃度で 5%以内であった。
- ③ 室内再現精度：変動係数が各濃度で 5%以内であった。
- ④ 特異性：添加回収試験の結果がすべて 80%～120%の範囲内であった。
- ⑤ 直線性：5 ポイントにおける相関係数が $r=0.9992$ であった。
- ⑥ 範囲：50%～150%以上より CLIA 法のバリデーションがなされた。

3. EIA 法との比較試験

現行法 (EIA 法) で HBIG 製剤を測定したときの抗体価と新試験法 (CLIA 法) で測定したときの抗体価を比較した。測定回数は 1 ポイント 3 重測定で 5 ポイント行い、4 ロットの製剤を 3 人で 1 回測定 計 3 回の平均値で求めた。表の結果から明ら

かなように CLIA 法は現行の EIA 法と同等の測定値を示した。

表：EIA 法と CLIA 法の比較試験

D. 考察

抗 HBs 抗体価測定において、CLIA 法は EIA 法と同等の性能を有すると考えられた。

E. 結論

生物学的製剤基準の通則 34 を適用することにより、基準改正を待たずに CLIA 法を追加適用することは可能であると結論した。

F. 研究発表

- 1. 論文発表
なし
- 2. 学会発表
なし
- 3. 知的所有権の取得状況
なし

製剤	ロット	AxSYM (EIA法)	ARCHITECT (CLIA法)
抗HBs人免疫グロブリン 筋注用製剤「日赤」	2B019	262.1	291.0
	2B020	256.9	250.3
	2B021	284.6	272.6
	2B022	375.5	354.8

グロブリン製剤の麻疹抗体価測定の見直しについて

分担研究者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所 ウイルス第3部 室長
研究協力者 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)
竹田 誠 国立感染症研究所 ウイルス第三部 部長

研究要旨：生物学的製剤基準（生物基）では、免疫グロブリン製剤に含有される麻疹抗体価が規定されており、その測定法としては生物基の一般試験法で中和法等3つの方法が定められている。現在、WHO を中心に麻疹の排除を進めており、将来麻疹抗体の保有状況が変化し、グロブリン製剤が現在の規格を満たさない可能性が危惧されている事もあり、今後も麻疹抗体価を生物基に設定する意味が有るかを免疫グロブリン製剤の用途等から検討した。一方、麻疹抗体価測定法に関しては、現行の方法は将来実施が困難になる可能性が高く、ELISA 法等の客観的に結果の判定ができる新規の麻疹抗体価測定法の導入について検討した。生物基での麻疹抗体価測定の記載については、筋注用グロブリン製剤については用法に麻疹の予防の記載がある事から、当面は麻疹抗体価を測定する事が妥当であることと確認された。また静注用グロブリンについては用途上特に麻疹抗体価を測定する意味はないが、当面は生物基に記載を継続し、将来は EP に倣って原料に規定を設ける等の、最終製品の品質管理ではなく GMP に従った製造工程における品質管理法が提案された。また、測定法に関しては、WHO 標準品を用いて各製剤の相対中和抗体価を測定し、ELISA 法、PA 法との結果と比較したところ、製剤によっては中和抗体価と乖離する傾向が示され、ELISA 法、PA 法を一般試験法として生物基に記載するにはより詳細な検討が必要だと思われた。

A. 研究目的

人免疫グロブリン製剤には筋注用グロブリン製剤、静注用免疫グロブリン製剤と特殊グロブリン製剤がある。このうち筋中用と静注用は、抗麻疹ウイルス抗体価を免疫グロブリン 150mg(ペプシン処理免疫グロブリンは100mg)あたり5単位以上含まなければならないと生物基に定め

られている。筋注用は適応内容に麻疹予防が掲載されているが、静注用においては麻疹の適応はない。一方、現在、世界で麻疹排除計画が進行しており、将来においては、免疫グロブリン製剤中の麻疹抗体価が低下すると予想され、免疫グロブリン製剤が生物基の基準値を満たせなくなる可能性が懸念されている。このよ

うな背景の中で、生物基に人免疫グロブリン製剤の麻疹抗体価の基準を設定する事に合理性があるのかも考える必要がある。他方、現在、抗麻疹ウイルス抗体価測定法にはHI(赤血球凝集抑制)試験が含まれているが、アフリカミドリザルの赤血球を用いるため、将来的には実施が不可能になる。また、より利便性が期待されるELISA等の新たな試験法の生物基への掲載の希望もある。本研究は将来における人免疫グロブリン製剤における麻疹抗体価測定法のあり方、並びに新規麻疹抗体測定法の導入について検討する事を目的としている。

B. 方法

感染研内で免疫グロブリン製剤における麻疹抗体測定の意義を確認し、今後の生物基、並びに検定のあり方を検討した。また、血液製剤協会に欧州局方、米国局方、WHOガイドライン等における免疫グロブリン製剤の品質管理に関する規定の調査を依頼し、血液製剤協会の意見を聞いた。麻疹抗体価測定法の検討に関してはWHO標準麻疹抗体(WHO International standard, 3rd International standard for anti-Measles; 3IU)、並びに数種のコブリン製剤を入手し、プラーク減少法によって麻疹中和抗体力価を測定し、各コブリン製剤の標準品に対する相対中和力価を算出した。また標準品、ならびにコブリン製剤の麻疹抗体価を麻疹IgG ELISA kit (デンカ生研)、またはPA kit (セロディア麻疹、富士レビオ)を用いて測定し、標準品に対する各製剤のELISA法またはPA法による相対力価を測定し、相対中和力価と比較する事で麻疹抗体価測定法としての妥当性を検討

した。

C. 研究結果

1) コブリン製剤の麻疹抗体価測定の要否について

筋注用コブリンについては麻疹予防、症状の軽減化が製剤の適応となっているので、麻疹抗体価の測定は製剤の効能を確認する意味で必要であり、生物基での記載は妥当であるとされた。一方、静注用コブリン製剤の適応には麻疹治療、予防のための使用が記載されておらず、また、広範囲に一定の抗病原体活性を有する事を特徴としているので、必ずしも麻疹抗体価を測定する必要はなく、他の抗体-抗原結合反応が観察できる方法ならば代用が可能であるとされた。また、最終製品の麻疹抗体力価のみで品質を保証するよりも、EPのように1000人以上のプール血漿を用いて調整し、最終製品において2種(細菌とウイルス)の抗体価がプール血漿の3倍以上と規定するような方法の方が合理的である上、麻疹力価の低下に左右されないとの製造所側からの意見もあり、製造工程全体から麻疹抗体価試験のあり方を見直す事も将来は必要であるとされた。

2) コブリン製剤の麻疹抗体価測定法としてELISA法、PA法の導入の可能性について

WHO標準品と4種のコブリン製剤の中和抗体価を測定し、平均値より各コブリン製剤のWHO標準品に対する相対中和力価を算出した。また、ELISA法を用いてそれぞれの製剤、ならびにWHO標準品の抗体価(EIA 価)を測定し、平行線定量法で標準品に対する相対

ELISA 力価を算出し、相対中和抗体価と比較したところ、製剤によっては相対中和抗体価と乖離した結果が得られた。同様にPA法を用いて各製剤のPA麻疹抗体価を測定し、標準品に対する相対PA抗体価を算出して相対中和抗体価との比較を行ったところ、中和抗体価との乖離を示す製剤があった。以上より、現状ではELISA法、PA法の導入にはさらに検討する必要があると思われた。

D. 考察

筋注用グロブリンは、その用途から現時点では生物基の試験項目としての麻疹抗体価が規定されているのは適切であるとされた。一方、静注用グロブリン製剤における麻疹抗体価測定は、他抗体が抗原と結合能をしめす他の方法で代用する事が可能であるとの結論であった。しかし、昨今のGMPでは最終製品の抗体価で製品の品質の担保を行うより、製造工程の中で品質を管理していく方が合理的であると考えられており、グロブリン製剤の最終製品において生物基で麻疹抗体価を規定する事に意義があるかは検討を続けていくべきである。新規の麻疹抗体価の測定に関しては、現在の生物基、一般試験法の麻疹抗体価測定法には、中和試験法、赤血球凝集抑制試験(HI)法、受身赤血球凝集試験(PHA)法が記載されているが、HI法、PHA法では血球やkitの供給が将来的に困難になる事が予想されている。また、中和法は生きたウイルスを使用する事から施設面での制約があり一部の製造所では実施が困難である。グロブリン製剤の麻疹抗体価の測定は当面の間は生物基から削除されない事が決められた事から、将来にむけてELISA法、PA

法等の新規の麻疹抗体価測定法の採用を検討していく必要がある。ELISA法、PA法ともに血清における抗体測定では実績のある方法であるが、グロブリン製剤によっては中和抗体価と異なる傾向を示したため、生物基の一般試験法として導入するにはさらに検討が必要であると考えられた。また将来、麻疹が日本から排除される可能性があることから、他の抗体による抗原への結合能を確認する方法等の検討も必要であると考えられた。

E. 結論

生物基にある免疫グロブリン製剤の麻疹抗体価測定試験は当面、削除しない。近い将来、血液中の麻疹抗体価が低減する可能性があることから、グロブリン製剤の品質を管理できる合理的な方法があれば常に検討すべきでありそれに応じて生物基の改訂も必要になるかもしれない。今後しばらくは麻疹抗体価測定が生物基に記載される事から、現行の方法が近い将来実施できなくなる可能性がある事から、ELISA等の新規の麻疹抗体価測定法を一般試験法として掲載していく事を検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. その他

なし

動物を用いた安全性試験について

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
研究協力者 益見厚子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
 倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
検討グループ：GSK、サノフィ・パスツール、武田薬品、MSD、北里研、
化血研、デンカ生研、阪大微研、ノバルティスファーマ

研究要旨：ワクチン製剤の異常毒性否定試験の検定実施に関連して、日本における当該試験の意義や設定の考え方やについての理解を、製造者とともに深めるとともに、現状に即した検定の実施を目指す。本研究課題では、B型肝炎ワクチンおよび肺炎球菌ワクチンに関する試験廃止や変更等についての議論を行った。加えて異常毒性否定試験の今後のあり方について検討した。

A. 研究背景と目的

日本における異常毒性否定試験は、製剤をモルモットに5ml接種し、接種後の体重変動と健康状態を7日間記録し、これまで同一製剤で得られた母集団データとの間の体重変動の隔たりを統計学的に解析することにより、試験品固有の均質性を確認し品質を担保する目的で実施されている。

また近年、海外で安全性・有効性が高く評価された様々なワクチンが国内で承認され、販売が開始されつつある。これらのワクチンについて海外での実績から日本国内での異常毒性否定試験の実施の廃止を求める要望が出されており、試験の設定あるいは廃止について、異常毒性否定試験の試験実施機関である国立感染症研究所での検討が求められている。

しかしながら、これまで異常毒性否定試験をどのような条件のもと国家検定として設定し、どのような条件が整えば廃止するかについての基準が確立されていなかった。そこで当研

究班において、異常毒性否定試験を今後はどのように実施して行くかについて、国内外のワクチンメーカーと国立感染症研究所で意見交換を行い、これからの試験のあり方について双方が一定の共通見解を持つための議論を進める。

B. 研究結果

① B型肝炎ワクチンの異常毒性否定試験廃止の検討について

B型肝炎ワクチンは、化血研（ビームゲン®：組換え沈降B型肝炎ワクチン）および万有製薬（メルク）（ヘプタバックス®-II：組換え沈降B型肝炎ワクチン）より出検されているが、本製剤は、平成3年の試験開始以来、不合格となった試験品はなく、日本における異常毒性否定試験の考え方の観点からも均質性は担保されていると考えられる。現在、廃止に向けた検討を行っている。

② 肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定

試験廃止の検討について

肺炎球菌ワクチンは、平成17年に異常毒性否定試験において均質性に問題があるとして試験不合格になった経緯があるため、今後も注意深く製品を観察しなければならないと考えられる。ただし、肺炎球菌ワクチン接種によるモルモットの体重減少は、他の製剤と比べても著しく、近年はある一定の割合以上の体重減少を示す場合は動物愛護の観点から試験続行は望ましくないとの考え方があることから、現行投与量の見直しを検討する。

③ 異常毒性否定試験設定と廃止の考え方について

今後の日本における異常毒性否定試験について、以下の点が国立感染症研究所の試験担当者と製造者間で確認された。

1. 製剤の安定した均一性を把握するための異常毒性否定試験の評価項目は、サマリーロットプロトコールでの確認が可能になると思われる。安定した均一性の確保が確認できたところで、異常毒性否定試験の国家検定項目から削除可能と考える。

2. しかしながら、特に新規製剤の均一性の確認は重要な項目であるので、特殊な事情を除き、製造販売承認後一定の期間、母集団作成の上異常毒性否定試験を国家試験として実施する。

3. 異常毒性否定試験に用いる接種サンプル量は3Rの考え方に基づき、動物への負担を考慮し設定することを検討する。

4. 異常毒性否定試験に取って代わる、より効果的な安全性試験法が確立され、導入が可能ならば検討する。

5. SLP導入一定期間後、上記の考え方について検討を行う。

D. 考察・結論

本研究課題では、B型肝炎ワクチンの異常毒性否定試験廃止および試験で動物に接種する用量の見直し、加えて異常毒性否定試験の今後のあり方について検討した。海外メーカーの異常毒性否定試験の考え方は、製造工程の間に混入する毒性物質を検出する試験であるというGST(General Safety Test)との位置付けである。当研究班において本邦の異常毒性否定試験に対するメーカーからの要望と現在の異常毒性否定試験の問題点を相互に意見交換する中で、本邦の異常毒性否定試験についての理解が深まり、今後の異常毒性否定試験のあり方について、一定の考え方に合意を持てた意義は大きい。

E. 研究発表

1) 論文発表

- (1) 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
- (2) Momose H, Mizukami T, Ochiai M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A new method for the evaluation of vaccine safety based on comprehensive gene expression analysis. *J Biomed Biotechnol.*, 2010:361841., 2010
- (3) 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

2) 学会発表

- (1) 百瀬暖佳、水上拓郎、内藤誠之郎、前山順一、益見厚子、倉光球、滝澤和也、浜口功：遺伝子発現解析を用いた新たなワクチン安全性評価法構築への試み. 第13回日本ワクチン学会学術集会. 札幌、平成20年9月

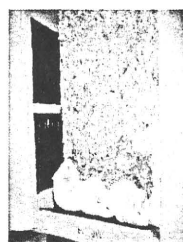
- (2) 百瀬暖佳、水上拓郎、倉光球、益見厚子、滝澤和也、前山順一、浜口功、遺伝子発現解析を応用したインフルエンザ HA ワクチンの新たな安全性評価法構築へ向けた試み、第14回日本ワクチン学会学術集会、東京、平成21年12月

F. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得なし。

「医薬品を巡る環境の変化等に対応した生物学的製剤基準の改正のための研究」

動物を用いた安全性試験について： 異常毒性否定試験

国立感染症研究所 血液・安全性研究部



浜口 功

Quality control test 中での 異常毒性否定試験の位置づけ

potency test

physicochemical test

safety test

Safety test using animals

- 1) test for freedom from abnormal toxicity
- 2) pyrogen test

Criteria of test for freedom from abnormal toxicity

Evaluates the consistency of
products

In some cases, histo-pathological
examination is introduced.

異常毒性否定試験法とは

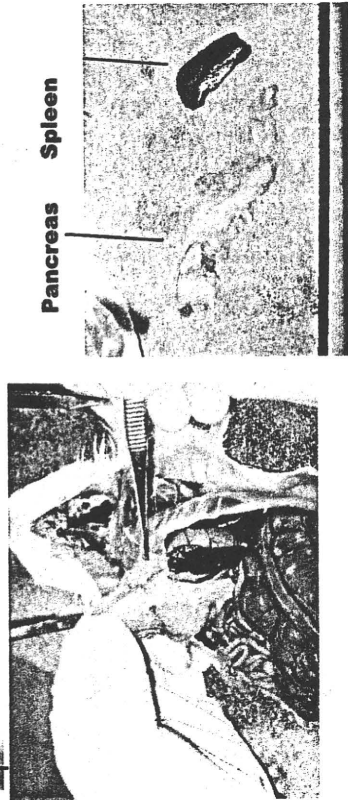
一定量の試験検体をモルモットの腹腔内に投与し、その後の体重変動を指標に製剤の同質性および異常性を検出する試験である（生物製剤基準解説より）。

試験検体量 5ml

モルモット：320-380g

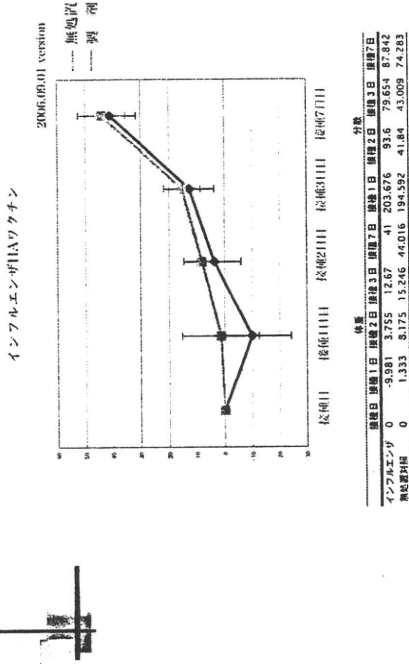
解剖学的所見

接種後 7日 (最終判定日)

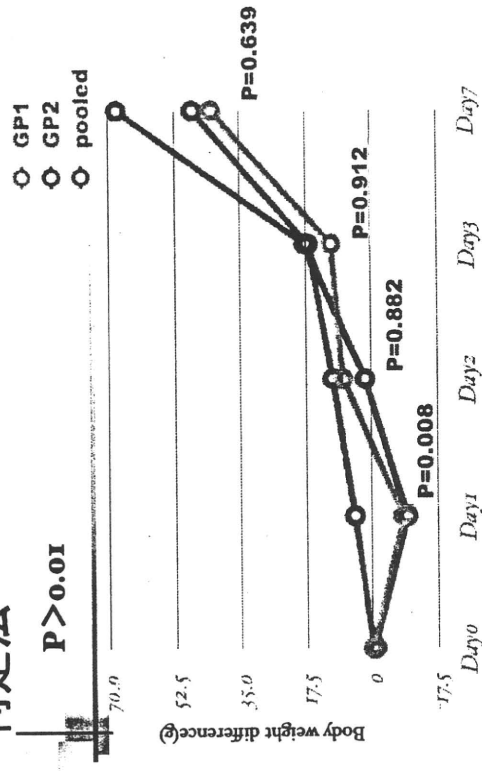


各ワクチン10ロットについて、病理学的データの集積を実施

母集団(例) n=30-50



判定法



血液採取



- ワクチンによっては白血球数、血小板数に影響を与えるものがあり、血液採取を行わない、血算を行う。

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.

European pharmacoia

- 5 mice (17-24g)
Inject intraperitoneally 1 human dose but not more than 1.0 ml
 - 2 guinea-pig (250-400g)
Inject intraperitoneally 1 human dose but not more than 5 ml
- Observe the animals for 7 days to check signs of ill health.
- The preparation passes the test if none the animals shows signs of ill health in the time interval specified.

異常毒性否定試験製剤一覧

ワクチン

製剤名称	ロット数
1)インフルエンザHAワクチン	140
2)乾燥腸炎不活化人型肝系ワクチン	2
3)乾燥腸炎不活化狂犬病ワクチン	1
4)乾燥ジフテリア毒素(乾燥ジフテリア抗原)	1
5)乾燥ジフテリア毒素混合トキソイド	5
6)乾燥破傷風トキソイド	10
7)肺炎球菌9価肝系ワクチン(肺炎由来)	4
8)肺炎球菌12価肝系ワクチン(肺炎由来)	24
9)乾燥ヘモフィルス菌ワクチン(乾燥黒トキソイド混合体)	12
10)乾燥腸炎不活化日本製ワクチン	37
11)乾燥腸炎不活化「HONI」化毒管「一分製品」	1
12)乾燥腸炎不活化「HONI」化毒管「一分製品」	0
13)乾燥腸炎不活化「HONI」化毒管「一分製品」	78
14)乾燥腸炎不活化「HONI」化毒管「一分製品」	17
15)「化毒管」シエムゲン	1
16)肺炎球菌ワクチン	20
合計	385

自家試験記録様式の充実 新様式

これまでの様式

【表1】 自家試験記録様式(旧様式)

製剤名
製造番号
試験年月日
試験者氏名

試験年月日 試験者氏名

試験日	試験者氏名	試験結果	試験者氏名
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63			
64			
65			
66			
67			
68			
69			
70			
71			
72			
73			
74			
75			
76			
77			
78			
79			
80			
81			
82			
83			
84			
85			
86			
87			
88			
89			
90			
91			
92			
93			
94			
95			
96			
97			
98			
99			
100			

試験結果: 1. 試験結果が「1」の場合、試験は合格と見做す。2. 試験結果が「2」の場合、試験は不合格と見做す。

【表2】 自家試験記録様式(新様式)

製剤名
製造番号
試験年月日
試験者氏名

試験年月日 試験者氏名

試験日	試験者氏名	試験結果	試験者氏名
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63			
64			
65			
66			
67			
68			
69			
70			
71			
72			
73			
74			
75			
76			
77			
78			
79			
80			
81			
82			
83			
84			
85			
86			
87			
88			
89			
90			
91			
92			
93			
94			
95			
96			
97			
98			
99			
100			

試験結果: 1. 試験結果が「1」の場合、試験は合格と見做す。2. 試験結果が「2」の場合、試験は不合格と見做す。

異常毒性否定試験とGSTの比較

WHO	EU	EMA
7日間の観察期間に おける死亡もしくは重 篤な症状の子エック	7日間の観察期間に おける死亡もしくは重 篤な症状の子エック	7日間の体重の推移 を母集団のデータと比 較することにより、ロッ トの均一性を確認

異常毒性否定試験の検定廃止

- 製剤の均一性の確認がとれた時点で、国家検定を廃止することは可能である。
- これまでに、ほとんどの血液製剤での検定を廃止した(~2006)。ワクチンにおいても、B型肝炎ワクチンでの廃止を検討している。

厚生労働科学研究 (加藤班)

第1回異常毒性否定試験のあり方に関する会議 (2/23/10)

- 国家検定における異常毒性否定試験の設定の考え方について
どのような場合に試験を設定し、どのような条件が整った場合に試験を設定しないか。
- 国家検定における異常毒性否定試験の廃止の考え方について
どのような条件が整えば、試験を廃止するか。
- 参加者からの意見
 - 1) 新規のワクチンに関しては最初の20ロットなどを行なってその後は検討する。
 - 2) 海外ワクチンに関しては海外ですでに実績のあるものは国内での試験は不要であり、また現行のGMPはかき進んでいるので試験は不要。
 - 3) 国内メーカーのワクチンに関して、過去10年以上不合格の出していない製剤に関しては血液製剤と同様に基準から削除できる。

新規ワクチンの導入と異常毒性否定試験

- 小分け製剤の均一性確認のため、新規製剤への異常毒性否定試験の設定は原則必須である。

第2回異常毒性否定試験のあり方に関する会議(6/9/10)

製造所	検査設定に関する意見	検査項目に関する意見
A社	規格試験として設定すべき	10年間不合格がない場合は検定基準から削除
B社	海外と同じ設定の必要なし	海外での実績が乏しいものには2年間(または2ロット以上)実施
C社	工程開発中に収集されたデータにより同質性が確認された場合には設定の必要なし	試験に連続20ロット以上合格し、母集団が安定している場合は検定基準から削除
D社	初期3ロット3回の試験結果をもつて試験を設定しない	
E社	本来、毒性物質抽出の試験で、適切に製造された製品には設定不要	

今後の異常毒性否定試験のあり方

1. 製剤の安定した均一性を把握するための異常毒性否定試験の評価項目は、サマリローットプロトコルでの確認が可能になると思われる。安定した均一性の確保が確認できたところで、異常毒性否定試験の国家検定項目から削除可能と考える。
2. しかしながら、特に新規製剤の均一性の確認は重要な項目であるので、特殊な事情を除き、製造販売承認後一定の期間、母集団作成の上異常毒性否定試験を国家試験として実施する。
3. 異常毒性否定試験に用いる接種サンプル量は3Rの考え方に基づき、動物への負担を考慮し設定することを検討する。
4. 異常毒性否定試験に取って代わる、より効果的な安全性試験法が確立され、導入が可能ならば検討したい。
5. SLP導入一定期間後、上記の考え方について検討を行う。

V. 研究成果の刊行に関する一覧表