

## 議 事：

1. 渡邊研究代表者より、本研究班の最大の課題であった SLP の導入については、制度化され本年の 10 月から施行されることから、目的は達成できたとの挨拶があった。
2. WHO アセスメントにおいて感染研が担っている機能である Lot release の達成率が 98%、Laboratory access の達成率が 99%と高い評価が得られたことが報告された。しかし、WHO の評価官から以下の Recommendation があった。
  - 1) 監査システムの改善
    - 内部監査の頻度を上げ、監査チームにラボスタッフを含めるべき
    - 内部監査構成員の増員と監査のための教育訓練が必要
    - ISO 17025 による認定が望ましい。認定を受けないにしても ISO に準拠した外部監査を受けることが適切
  - 2) 部門レベルにおける QA 活動の強化
    - QA 部門は SOP の承認プロセスに関与すべき
    - 各部門に QA 部門との連携を図るための QA コーディネーターを設置するとともに、当該コーディネーターに対して十分な教育訓練を実施すべき。
  - 3) SLP 審査のためのチェックリストの確定
    - SLP 審査のためのチェックリストを早急に確定させる必要がある。
  - 4) ロットリリーステストの実施頻度及び試験項目の必要性の検討並びにリスク分析に基づく規制制度への変更の検討

また、すべての NRA 機能について QMS (品質マネジメントシステム) の機能の強化、それぞれのファンクションは十分に機能しているが、組織間のコミュニケーションを高めることが推奨された。

今後の対応として、

- 1) 監査システムの改善
  - ・内部監査を検定業務評価委員会の任務に位置づける
  - ・評価頻度の適切化、委員の変更、追加等を行う
  - ・外部監査として PIC/S 要件に対する適合性調査が適用可能か検討  
(医薬品等の試験検査を実施する公的認定試験検査機関に求められる要件)
- 2) QA 活動の強化
  - ・品質保証室の強化 (保証室長の専任化、増員の要求)
  - ・品質保証室の役割の明確化
  - ・品質保証運営委員会との役割分担
  - ・各部に QA コーディネーターの設置の検討
- 3) ロットリリーステストの実施頻度及び試験項目の必要性の検討並びにリスク分析に基づく規制制度への変更の検討

- ・法令の改正を伴う問題：  
現在は全ロット試験であるが、その変更が可能か？  
国家検定の制度・あり方に関してはH24年度からのRS研究事業で検討（後述）
  - ・検定項目の削減：「国家検定における試験項目の廃止に関する考え方」に基づいて行う  
ことが検討される旨、説明があった。
3. 渡邊研究代表者より、ワクチン行政に求められている感染研のミッションについて、以下の説明がなされた。
- I) 「予防接種施策に関する総合的かつ恒常的な評価」（米国版 ACIP 様組織）への貢献：（健康局）
    - 1) 科学的評価；ワクチンの意義・接種法・防御効果・経済効果等
    - 2) 流行予測事業（ワクチン接種後の抗体調査）
    - 3) 副反応調査：市販後調査
    - 4) その他
  - II) ワクチンの科学的エビデンスに基づく品質管理業務：（医薬食品局）
    - 1) ワクチンの承認時：  
品質専門協議：委員としての参加  
試験項目追加、試験方法又は判定基準変更の必要性の検討  
承認前検査：製造販売承認申請書に記載された「規格及び試験方法」のうち試験方法の適否について試験を実施し、検討
    - 2) 国家検定：  
SLP（製造・試験記録等要約書）のレビュー：2012.10月から本格施行 testing（中間、最終製品の品質試験の実施）
    - 3) GMP査察への同行（科学的見地からのコメント）
    - 4) 副反応調査・市販後調査の品質管理へのフィードバック
4. 今後の班研究のあり方として、平成24年度からの新規研究計画書を提出しており、申請が採択されれば引き続き国家検定のあり方（現在の国家検定制度の問題点の整理、諸外国を参考にした比較等）、副反応・市販後調査との連携等について検討する。  
血液製剤を含めワクチン以外の検定医薬品へのSLP導入の必要性についても検討することが提案された。
5. その他、承認規格と検定基準の不一致、検定合格証紙の廃止、SLPの電子ファイルによる提出、一変情報の提供等について意見交換を行った。

以上

## II. 分担研究報告

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  
「ワクチンの品質確保のための国家検定手法の国際協調に関する研究」  
平成 23 年度分担研究報告書

ワクチンの品質管理における動物実験に関する国際協調

研究分担者

倉根一郎（国立感染症研究所・副所長）

研究協力者

伊藤（高山）睦代（国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官）

西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部・部長）

研究要旨：ワクチンのロットリリースの際に行われる国家検定試験の一部では、動物を使用した試験が必要不可欠となっている。しかしながら、近年動物愛護の観点からこれらの試験を見直す動きが世界的に広がっている。今回米国で開催された「ヒトおよび動物用狂犬病ワクチン国家検定試験の代替法に関する国際研究集会（URL：<http://iccvam.niehs.nih.gov/meetinme/RabiesVaccWksp-2011/RabiesVaccWksR.htm>）」に参加し、狂犬病ワクチン力価試験における各国の取り組みや見解について意見交換した。その結果、①血清学的試験法は動物用ワクチンではすでに国際的なバリデーションも済んでおり、ヒト用ワクチンでも今後国際的な共同研究およびバリデーションがなされるべきである。②抗原測定法については、アジュバントの有無、使用株の違い、モノクローナル抗体の管理、標準品の選定、抗原として有効な構造を持った蛋白質だけを測定する方法の確立など課題も多く、今後もしサーチベースの努力が必要である。③血清学的試験のバリデーションおよび試験法改定までの移行期には現行のマウスへの攻撃試験による方法を継続することが必要であるが、その際適切な麻酔の使用および苦痛の軽減を行うこと。などの提言がまとめられた。国際協調においてワクチンにおける実験動物愛護は避けては通れない問題であると思われた。

A. 研究目的

国立感染症研究所ではワクチンの有効性と安全性及び均質性を保証するため、生物学的製剤基準に基づいた国家検定を行っている。ワクチンの国家検定の試験法はその特性から生物学的方法が用いられ、動物を使用した試験も多い。しかしながら、近年世界的に動物愛護の観点か

らこれらの試験は、動物を使用しないで検定を実施する方向に見直されつつある。特に狂犬病ワクチン、破傷風トキソイド等の検定試験では動物に著しい苦痛を与えるとされる致死的な攻撃試験がおこなわれており問題となっている。そこで、今回世界各国の狂犬病ワクチン力価試験法について調査比較するとともに、今後

の日本のワクチン検定における実験動物愛護の問題について考察した。

## B. 研究方法

狂犬病ワクチン力価試験に関する世界の状況および代替法について情報収集を行うため、平成23年10月に米国アイオワ州エイムズ市で開催された「International Workshop on Alternative Methods for Human and Veterinary Rabies Vaccine Potency Testing: State of the Science and Planning the Way Forward -ヒトおよび動物用狂犬病ワクチン国家検定試験の代替法に関する国際研究集会」に参加した。本研究集会には14カ国の政府機関、製造所および大学から計70名以上の科学者が参加し、現行の狂犬病ワクチン力価試験法に替わる試験方法の検討とその国際的な承認および実行に向けて必要な取り組みについて意見交換した。

この研究集会で得られた情報を整理し、我が国の今後のワクチン験手試験における動物愛護のあり方について考察した。

なお、この研究集会は代替法検証における省庁間調整委員会(ICCVAM)、代替毒性の試験法の評価に関する国際毒性プログラム省庁間センター(NICEATM)、欧州動物実験代替法検証センター(ECVAM)、日本動物実験代替法検証センター(JaCVAM)およびカナダ保健省との共同で開催された。

## C. 結果

現在の狂犬病ワクチン力価試験法は一般にワクチンで免疫したマウスに攻撃用狂犬病ウイルスを脳内接種し、その生死

数から50%有効量を算出する方法である(図1)。この方法は使用動物に著しい苦痛を与えることが問題となっているが、日本でもほぼ同じ方法が使用されている(表1)。研究集会では世界各国の現状、代替法に対する取り組み、代替法の導入に関する問題点等について報告された。動物を使用した実験および試験を行う際には3R'sに配慮する事が求められている。動物実験の3R'sとは①Refinement: 動物への苦痛を減らしたり有効な情報をより多く得られるようにしたりすること、②Reduction: 動物使用数の削減すること、③Replacement: 動物を使用する医学研究を使用しない方法に置き換えることである。以下に3R'sの各項目について今回の研究集会でまとめられた提言を以下に紹介する(参考資料1)。

### 1. Refinement

最終的には攻撃試験を行わず、3.に述べるような代替法に移行することが望ましいが、しばらくは現行法を続ける必要がある。しかしながら、その場合には麻酔を使用するなど出来るだけ苦痛を除くべきである。また、人道的エンドポイントを経常的に取り入れるべきである。

### 2. Reduction

ワクチン希釈段階の削減や希釈あたりのマウス使用数の削減について検討すべきである。複数バッチの同時試験や不必要な重複試験の廃止によって動物数の削減を図るべきである。

### 3. Replacement

NIH試験法の代替法としては血清学的試験法および*in vitro*抗原測定法の二通りの方法が検討されている。*In vitro*抗

原測定法はウイルス抗原量を ELISA 法などにより直接測定する方法であり、動物を全く使用しないことから最も好ましい方法であると考えられる。しかしながら、抗原捕捉抗体を含む試薬の適切な選定やアジュバントの影響を考慮しなければならないなど、問題も多い。

一方、血清学的試験法は動物用ワクチンでは既に国際的なバリデーションも行われており、今後実行に向けて製造所と検定機関との連携によるバリデーションをさらに推進すべきである。

#### D. 考察

狂犬病ワクチンの国家検定試験では異常毒性否定試験、力価試験、不活化試験の各試験項目において動物が使用されている。特に力価試験では、致死的な感染実験が含まれる NIH 法がゴールドスタンダードとなっており、3R's に基づいた見直しが求められている。

日本の動物用ワクチンでは世界に先駆けて 1996 年から ELISA 法により製品中の抗原を測定する事により評価され、ロットリリースされており、世界から注目されている。しかしながら、日本の動物用ワクチンはアジュバントが含まれていない、複数社が同一の製品を製造しているといった条件下で可能となっており、直ちにこの試験を世界的な様々な製剤に採用することは難しい。

動物用ワクチンについては、攻撃試験を行わず、免疫動物の血清中の中和抗体価を測定する血清学的試験法の国際的共同研究 (BSP105 collaborative study) が 10 カ国、13 研究所が参加して行われて

おり、ドイツなど EU の一部の国では実際にロットリリースに使用されはじめている。しかしながらヒト用ワクチンではこれらの代替法の検討が進んでいない。この一因は動物用ワクチンの目的が集団免疫により狂犬病のまん延やヒトへの感染を防止する事であるのに対し、ヒト用ワクチンの目的が感染の疑いのあるヒトの発症を予防する事であるためと考えられる。FDA などは代替法の導入には賛成しているが、その際にはある程度の規模の臨床試験が必要であるとの見解を示している。研究集会ではヒト用ワクチンでも今後国際的なバリデーションの共同研究を経た後に、この方法へ移行することが望まれると提言された。

日本のヒト用ワクチンでは製造数が少ないこと (年間 7~8 万本)、国民の安全性に対する要求が他国と比べて高いことなどから *in vitro* 代替法の導入は難しいと言わざるを得ない。しかしながら、血清学的試験法については国際的なバリデーションがなされ、日本でも十分なデータを示すことが出来れば、いずれは導入が可能であると考えられる。

また、現行法については出来る限り使用動物の苦痛を軽減するために、麻酔や二段針の使用、人道的エンドポイントの導入などを行う必要があるとの提言がなされた。麻酔はほぼ全ての国で行われており、さらなるバリデーションを実施することなしに導入がなされていない国でも導入すべきであるとされた。また、日本で使用されている二段針 (ストップのついている針) について、諸外国でもぜひ導入すべきであるとされた。EU や

米国では2009年から人道的エンドポイントが導入されており，他国でも経常的に使用するべきとの提言がなされた。

感染研の国家検定試験では，すでに麻酔(イソフルラン)が使用されているが，人道的エンドポイントについては導入されていない。私たちはこれまでに人道的エンドポイントについて検討した結果，症状または体重による人道的エンドポイントの導入により，動物が苦痛を感じる期間を約4日間短縮できることを明らかにしている。また，270匹の結果では人道的エンドポイントの導入による誤判定は1例もなかった。このことから，人道的エンドポイントについては日本でも導入を検討すべきであると考えられた。

#### E. 結論

国際社会の実験動物愛護に対する考え方は，日本より厳しい傾向にある。化粧品やサプリメント等にくらべワクチン等の医薬品における動物実験については理解が比較的得られているとはいえ，出来る限り配慮すべきであるとされている。日本においても2012年10月から国家検

定にSLP制度が導入される。つまり製品の均質性については書類上でもある程度のチェックが出来るようになる。また，試験技術の進歩により，より良い試験法の開発も進んでいる。これらの事から，日本でも，動物愛護により配慮した試験項目の整理や見直しが議論されるべきであると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

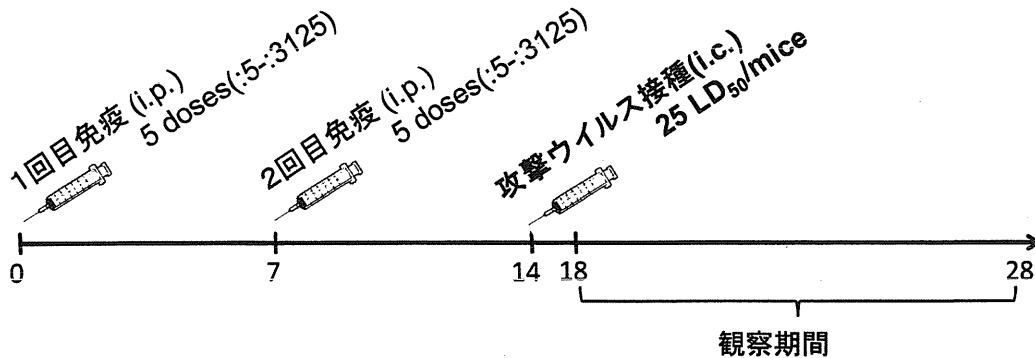
#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

該当なし

##### 2) 学会発表

伊藤(高山)睦代，中道一生，山口(木下)一美，王麗欣，林昌宏，倉根一郎，西條政幸：乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの国家検定試験における不活化試験法についての検討：第15回日本ワクチン学会学術集会，東京平成23年10月



段階希釈したワクチンを2回腹腔内に接種し、攻撃ウイルスを脳内接種してその生死数から防御効果を判定する。

図1: 現行の力価試験法(NIH法)

表 1. NIH法と日本の国家検定法との比較

	日本(国家検定)	NIH法*
動物種	マウス(4週齢)	Mice(13-16g)
1群あたりの匹数	12	16<
ロットあたりの匹数*	180	120<
免疫回数	2回(0, 7日目)	2回(0, 7日目)
ワクチンの希釈率	1:5-1:3125(5段階)	1:5-1:3125(3段階以上)
免疫の接種法	腹腔内接種	腹腔内接種
攻撃	14日目	14日目
攻撃ウイルス株	CVS	CVS
攻撃ウイルス量(LD <sub>50</sub> /0.03mL)	25(10-200)	12-50
攻撃の接種法	脳内接種	脳内接種
脳内接種時の麻酔処置	有	推奨
観察期間	接種後4-14日	接種後6-14日
判定方法	死亡 (最終日に麻痺を示したものを含める。)	死亡 (最終日に麻痺を示したものを含める。)
LD <sub>50</sub> およびED <sub>50</sub> 算出方法	Reed and Muench	Spearman Karber等

\*Laboratory techniques in rabies 4<sup>th</sup> Ed.

\*\*This number included mice used for challenge control test.



## Rabies Vaccine Workshop Summary

### International Workshop on Alternative Methods for Human and Veterinary Rabies Vaccine Potency Testing: State of the Science and Planning the Way Forward

The international workshop on rabies vaccine potency testing was held on October 11-13, 2011 to review the current state of the science of rabies vaccine potency testing methods and to define efforts necessary to achieve global acceptance and implementation of those methods that might reduce, refine, and replace the use of animals. The National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) and the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) convened the workshop in partnership with the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), and Health Canada. The USDA Center for Veterinary Biologics hosted the meeting at the National Centers for Animal Health in Ames, Iowa and the International Alliance for Biological Standardization (IABS) was a co-sponsor. More than 90 human and veterinary rabies vaccine experts from government, industry, and academia participated in the workshop.

Rabies is a deadly disease that kills over 70,000 people worldwide each year, and rabies vaccines are the most important resource available for prevention of rabies infections and treatment of exposed individuals. However, the current method used to test new production lots of veterinary and human rabies vaccines involves vaccinating animals and then challenging them with live rabies virus. This approach requires large numbers of laboratory animals and causes significant pain and distress. At the NICEATM-ICCVAM workshop on alternative methods for vaccine potency and safety testing<sup>1</sup> held last year, rabies vaccines was considered one of the three highest priorities for future efforts that might further refine, reduce, and ultimately replace animal use for potency and safety testing.

The workshop included sixteen plenary lectures and three breakout sessions focused on 1) near-term refinement and reduction opportunities for the currently required mouse rabies vaccine challenge test; 2) validation status, data gaps and implementation strategy for antibody quantification (serological) methods; and 3) validation status, data gaps and implementation strategies for *in vitro* antigen quantification methods. Final speaker presentations and highlights from the workshop are available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/RabiesVaccWksp-2011/RabiesVaccWksp.htm>.

Selected highlights from workshop discussions are provided below. A complete workshop report will be published in early 2012 in the journal *Biologicals*.

#### Highlights from Workshop Discussions

##### *Mouse Rabies Vaccine Potency Challenge Test*

###### *Refinement*

- 1) While and where it is still necessary to use the mouse rabies vaccine potency challenge test, the following guidelines are recommended:

---

<sup>1</sup> International Workshop on Alternative Methods to Reduce, Refine and Replace the Use of Animals in Vaccine Potency and Safety Testing: State of the Science and Future Directions. September 14-16, 2010. Information available at <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/BiologicsWksp-2010/BiologicsWksp.htm>

- The routine use of anesthetics and appropriate techniques to reduce the pain and distress associated with the intracerebral administration of live rabies virus challenge procedure should be stipulated in all regulatory guidelines.
- Analgesics should be provided to avoid or minimize pain and distress associated with the rabies mouse challenge test. Procedures should be evaluated to determine that they do not interfere with the testing objectives.
- The routine use of humane endpoints should be incorporated in all national and international testing regulations and guidelines for rabies mouse vaccine challenge testing where they do not already exist.

***Reduction***

- 1) Additional validation efforts for the alternative single dilution assay for rabies vaccines should not be pursued. However, manufacturers should consider reducing the number of dilutions, provided that this does not increase the rate of vaccine potency test failures and the subsequent need for retesting.
- 2) Manufacturers and regulatory authorities are encouraged to investigate ways that might be used to support reducing the number of mice used per vaccine dilution.
- 3) Human rabies vaccine manufacturers should review historical testing data to determine if this supports eliminating the need for duplicate mouse potency testing on each vaccine lot.
- 4) To further reduce animal use, manufacturers should, where feasible, test multiple batches at the same time, using a single reference test vaccine and a single back-titration of challenge virus.

***Replacement of the Mouse Rabies Vaccine Potency Challenge Test***

**1) Serological Methods for Rabies Vaccine Potency Testing**

- Using serological methods (a single-injection vaccination and measurement of neutralizing antibodies) for potency testing instead of the challenge test will avoid significant pain and distress and worker safety issues associated with using live rabies virus in animals. It will also use fewer animals compared to a challenge test.
- Based on results achieved in the interlaboratory validation study and acceptance of the described method in the European Pharmacopoeia Monograph 0451 for veterinary rabies vaccines, the serum neutralization test (SNT) is considered sufficiently standardized to provide the framework to substitute for the mouse challenge test. Therefore, the following is recommended:
  - Veterinary rabies vaccine manufacturers in collaboration and consultation with appropriate regulatory authorities should initiate product specific validation using the SNT serological method. Validation should include determining whether the SNT can identify sub-potent lots and the extent that the serological test results correlate to the current *in vivo* test method.

**2) *In Vitro* Antigen Quantification Methods for Rabies Vaccine Potency Testing**

- As human rabies vaccines in some regions (e.g., U.S. and EU) are simpler products (non-adjuvanted, monovalent), manufacturers are encouraged to develop and implement an *in vitro* antigen quantification method to replace the mouse challenge test. *In vitro* antigen quantification methods currently used by rabies vaccine manufacturers as in-process tests include ELISA and SRID (Single Radial Immunodiffusion Test).

參考資料

November 30, 2011

- Final product *in vitro* methods will require identification and use of appropriate reagents (e.g. monoclonal antibody) with specificity for the neutralizing epitope of the virus-associated trimeric form of glycoprotein G.
- Validation of *in vitro* replacement tests will need to include identification of sub-potent lots. For validating *in vitro* methods for potency testing of human rabies vaccines, it may be necessary to compare *in vitro* results to adequate serological titers in humans.

## H23 年度 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（渡邊班）

「ワクチンの品質確保のための国家検定手法の国際協調に関する研究」

### 国際調和に向けた異常毒性否定試験法改良の試み

分担研究者	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	浜口 功
協力研究者	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	水上 拓郎
	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	益見 厚子
	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	倉光 球

#### 研究要旨

ワクチンの安全性と製剤の均一性の確認に関し、生物学的製剤基準に準じて異常毒性否定試験が小分製品で実施されている。生物学的製剤基準によると、体重 300～400g のモルモットを用い、検体の量は、別に規定する場合を除き、動物 1 匹あたり 5 mL を接種することとなっている。国立感染症研究所で各製剤の母集団を作成したところ、ほとんどのワクチンでは 5mL の接種量において苦痛を示す個体は認められなかったが、肺炎球菌ワクチンの接種個体に関しては、10%前後の体重減少が認められた。一般的に 20～30%以上の体重減少が認められた場合は「苦痛」であると考えられ、安楽死をすることが求められているので、10%の体重減少率は直ちに問題とならないが、軽減する方向で検討することが 3R の観点から望ましい。そこで本研究課題において、肺炎球菌ワクチンの接種量の検討を実施した。その結果、接種量を 2.5mL、1mL と減量しても体重減少率に有意な差は認められなかった。一方、0.5mL 接種量では、数%の体重減少率の改善が認められたが、接種量依存的な体重減少率は認められなかったことから、肺炎球菌ワクチン接種後の体重減少は、製剤それ自体の有する特性によるものである事が明らかとなった。異常毒性否定試験は同種製剤の母集団と比較する事で、製剤の均一性を確認することが可能であるが、一方で 5mL を接種する事で、外因物質の検出等も目的としている。そのため、製剤接種量は動物に苦痛を与えない範囲で可能な限り多い方が良いと考えられる。以上の結果から、本製剤に関しては 5mL の接種量で実施する事が望ましいと考えられた。

## A. 研究目的

ワクチンの安全性と製剤の均一性の確認に関し、生物学的製剤基準に準じて異常毒性試験が小分製品で実施されている。生物学的製剤基準によると、体重 300~400g のモルモットを用い、検体の量は、別に規定する場合を除き、動物 1 匹あたり 5 mL を接種することとなっている。試験の判定法として、いずれの動物も異常を示さないとき、この試験に適合とするが、その異常には体重減少が含まれており、同種製剤接種動物母集団と比較して  $P=0.01$  のレベルにおいて、統計学的に優位の差を認めてはならないこととなっている。その為、各製剤に関し 50~100 ロット程度で母集団を作成することが必要となってくる。国立感染症研究所でこれらの母集団を作成した結果、ほとんどのワクチンは 5%前後の体重減少率で精度管理が可能であることが明らかとなり、当該試験法が動物実験の 3R に抵触するとは考えられなかった (図 1)。しかし、肺炎球菌ワクチンでは体重減少率が接種後 2 日目に 10%を超えることが明らかとなり、3R の観点から何らかの対策を講じる必要があると考えられた (図 2)。

一般に検体は 5mL を接種する

こととなっているが、特別な場合はその接種量を変更することが可能である。その特別な場合としては、動物実験の 3R に準じ、苦痛の軽減が必要な場合が含まれる。接種後の個体の苦痛が認められる場合や、致命的な体重減少や生体反応を惹起する場合、あるいは 15-20%を超える体重減少が認められる場合がそれに含まれると考えられる。そこで本試験では肺炎球菌ワクチンの体重減少率を軽減することを目的に接種量変更の検討を試みた。

## B. 方法

肺炎球菌ワクチン 3 ロットを、生物学的製剤基準の一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して実施した。即ちモルモットは試験前 1 週間で入荷し、正常な体重増加の認められた個体を用いた。製剤は最終小分け製品の状態で 5mL, 2.5mL, 1mL, 0.5mL を準備し、最終接種量 5mL になるように生理食塩水 (日本薬局方) で希釈して各ロットにつき 2 匹 (計 3 ロット) のモルモットに接種した。接種後 1 日、2 日、3 日、7 日目の体重を測定し、7 日目に病理解剖および血液検査を実施した。

### C. 結果

我々の作成した母集団が示す通り、5mLのワクチン接種では、接種後1日目で-10%、2日目で-12%、3日目で-8%、7日目で+6%の体重増減率を認めた（図3及び4）。我々の母集団と同様に、本試験で実施した5mL接種群も同様の傾向を示し、-9.9%（接種後1日目）、-11.7%（接種後2日目）、-6.9%（接種後3日目）、6.3%（接種後7日目）と母集団と有為な差は認められなかった。一方、接種量を半分に減らした2.5mL接種群においても、-9.2%（接種後1日目）、-10.6%（接種後2日目）、-3.8%（接種後3日目）、8.7%（接種後7日目）と母集団と有為な差は認められなかった一方で標準偏差は大きくなった。さらに接種量を減らした1mL投与群においても、-8.9%（接種後1日目）、-8.5%（接種後2日目）、-4.0%（接種後3日目）、8.7%（接種後7日目）と母集団と有為な差は認められなかったが、2.5mLと同様に標準偏差が大きくなり、接種個体のばらつきが大きくなった事が明らかとなった。0.5mL投与群では、-7.7%（接種後1日目）、-7.6%（接種後2日目）、-2.6%（接種後3日目）、11.1%（接種後7日目）となり、一部体重減少率の改善が認められた。すべて

の接種群で病理解剖および血液検査を実施したが、病理学的な異常ならびに血液検査結果の異常は認められなかった。白血球数に関しても接種量変更に伴う有意な変化は認められなかった。

### D. 考察

異常毒性否定試験において最も体重減少率が高い肺炎球菌ワクチンについて接種量の検討を実施した。接種量を約半量の2.5mL、1/5量の1mLに変えた場合でも、体重減少率には大きな変化は認められず、逆に標準偏差が大きくなり、接種個体の体重増減率のばらつきが大きくなった。0.5mL接種群では体重減少率の改善が認められ、-10%を超えることは認められなかった。

以上の結果より、肺炎球菌ワクチンはその特性として体重減少活性が非常に高いということが明らかとなった。接種量を1/2、1/5に減らしても大きく変化せず、むしろ接種個体の体重に大きなばらつきが認められることから、接種量は5mLか0.5mLが好ましいと考えられる。

異常毒性否定試験は製剤の均一性を見ることを目的としているが、一方で外因性物質等の検出もその

目的にある。そのため、ヒトでの接種量である0.5mLで試験を実施する場合はそのような外因性物質を検出できる頻度は低くなると考えられる。また0.5mLに変更した場合は、上記の理由により5mL相当分の試験を実施することが試験の同等性を担保する為には必要となり、20匹のモルモットが必要となってくる。

これは3Rの観点から望ましいとは考えら得ない。以上の結果より、肺炎球菌ワクチンの接種量は5mLが妥当であると考えられる。

本研究課題では1ロットにつき2匹、3ロット(計6匹)で検討しているので、1mL及び2.5mLで認められた接種個体のばらつきが、個体差によるものなのか、製剤との特性によるものなのかは不明である。今後、動物数および対象ロット数を増やして検討する必要があると考える。

#### E. 結論

肺炎球菌ワクチンの接種量の検討を実施した。その結果、接種量を2.5mL、1mLと減量しても体重減少率に有意な差は認められなかった。一方、0.5mL接種量では、数%の体重減少率の改善が認められたが、接種量依存的な体重減少

率は認められなかったことから、肺炎球菌ワクチン接種後の体重減少は、製剤それ自体の有する特性によるものである事が明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. 水上 拓郎、倉光 球、百瀬 暖佳、滝沢 和也、益見 厚子、石井 健、浜口 功. 網羅的遺伝子発現法を用いた経鼻インフルエンザワクチンの安全性試験法の開発. 第15回日本ワクチン学会 2011年度

#### 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

肺炎球菌ワクチン接種後のモルモットの体重減少

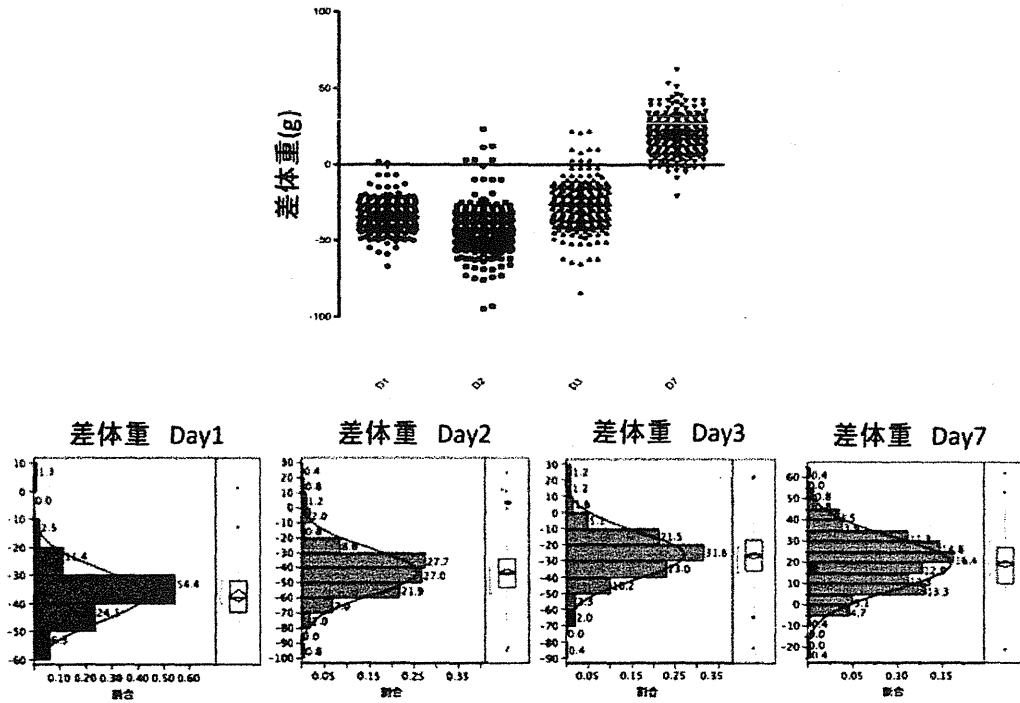
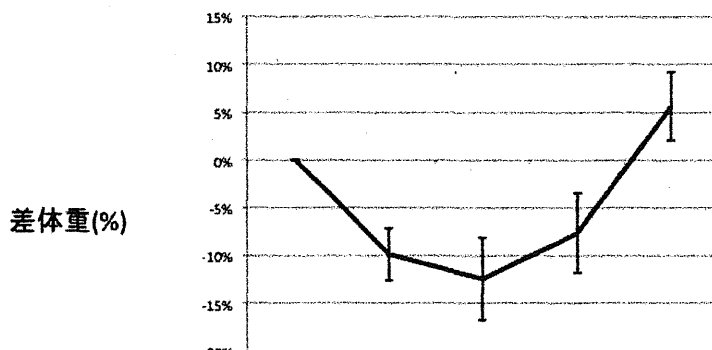


図1：肺炎球菌ワクチンの母集団 国立感染症研究所で実施された肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定試験結果。接種後1日、2日、3日、7日共に正規分布を示し、母集団として用いる事が可能である。



接種後2日目の体重減少率のトレンド解析



接種2日目

接種日		差1	差2	差3	差7
差体重/接種時体重	Ave	-10%	-12%	-8%	6%
	SD	3%	4%	4%	4%

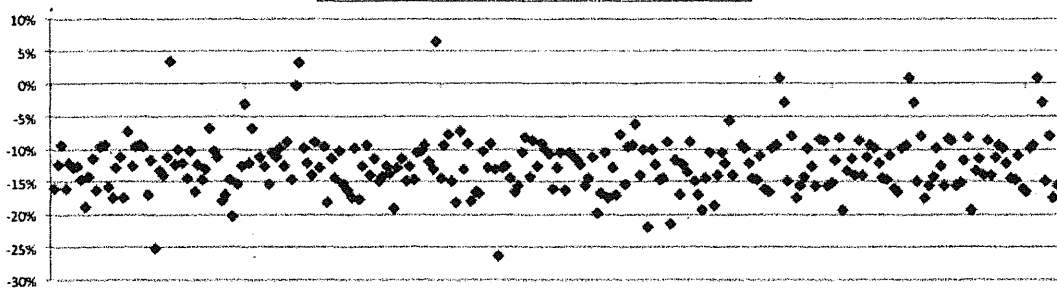


図2：肺炎球菌ワクチン接種の体重増加率 国立感染症研究所で実施された肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定試験結果。接種後1日、2日、3日、7日目の体重増減率(%)を示す。接種後2日目は-10%を超える。

肺炎球菌ワクチンの接種量検討

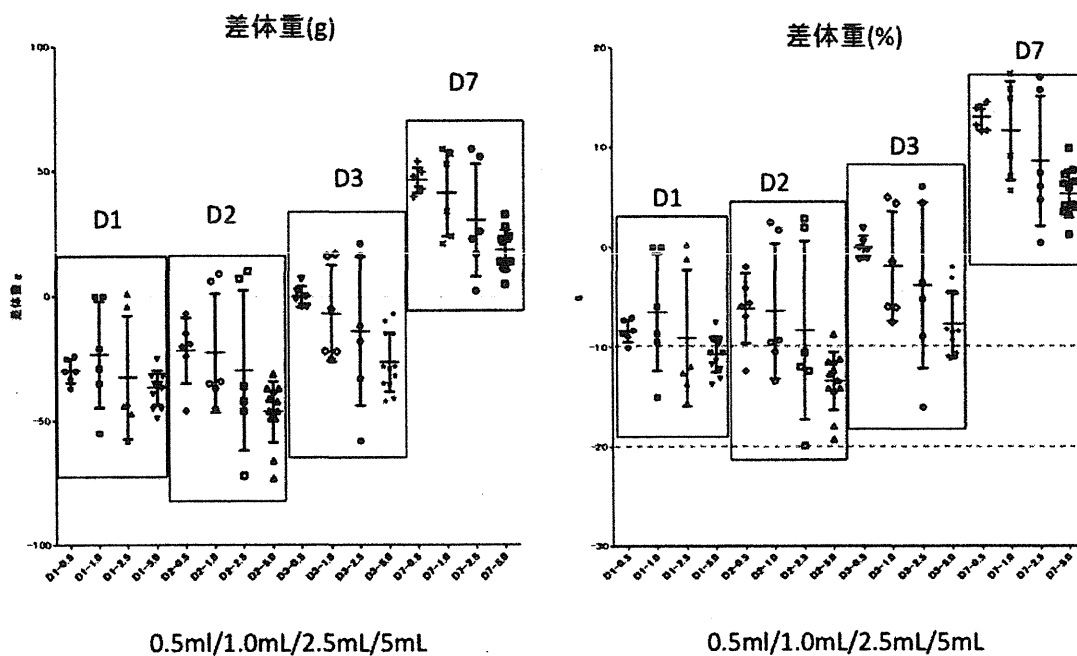
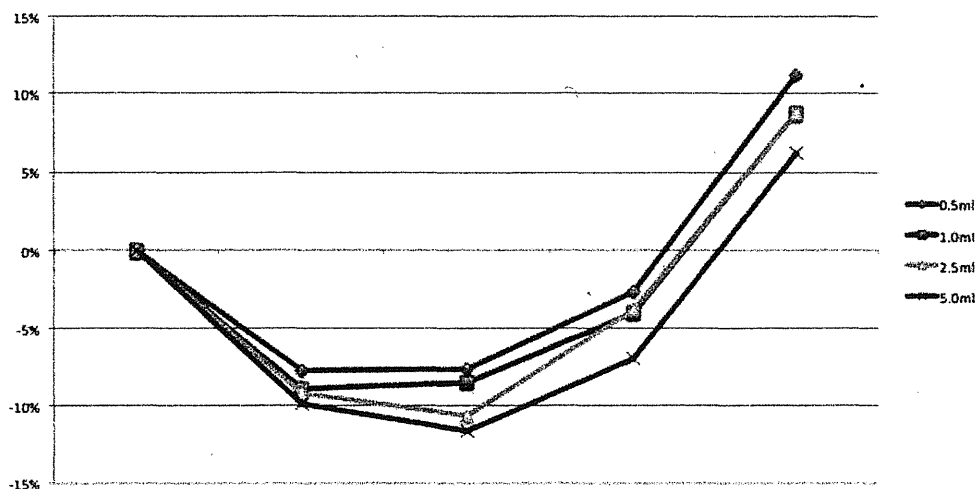


図3：肺炎球菌ワクチン（0.5mL, 1mL, 2.5mL, 5mL）接種後の体重増加数と率  
 接種後1日、2日、3日、7日目の体重増減数（g）及び率（%）で示す。各カ  
 ラムの左から0.5mL, 1mL, 2.5mL, 5mL接種を示す。D1: 接種後1日、D2: 接  
 種後2日、D3: 接種後3日、D7: 接種後7日

### 肺炎球菌ワクチンの接種量検討



	差体重(%)				SD(%)			
	D1	D2	D3	D7	D1	D2	D3	D7
0.5ml	-7.7%	-7.6%	-2.6%	11.1%	4.9%	5.5%	4.6%	4.3%
1.0ml	-8.9%	-8.5%	-4.0%	8.7%	7.1%	8.7%	8.1%	6.6%
2.5ml	-9.2%	-10.6%	-3.8%	8.7%	4.3%	7.5%	5.9%	4.6%
5.0ml	-9.9%	-11.7%	-6.9%	6.3%	2.0%	3.6%	3.8%	3.6%

図4：肺炎球菌ワクチン(0.5mL, 1mL, 2.5mL, 5mL)接種後の体重増加率 接種後1日、2日、3日、7日目の体重増減数率(%)で示す。

ワクチンの品質確保のための国家検定手法の国際協調に関する研究  
WHO の求める生物学的製剤の品質保証／管理体制に関する検討

－ 細菌製剤について －

ユニセフ向け輸出用 BCG ワクチンのロットリリース方式について

研究分担者 柴山恵吾

（国立感染症研究所 細菌第二部）

**研究要旨**

WHO は国連機関が買い上げるワクチンについては製造/リリース国が証明書 (Certificate) を発行することを求めている。そして、この証明書は、少なくとも Summary Lot Protocol (SLP) の審査によることが明記されている。日本からは、BCG ワクチンがユニセフ向けに輸出されている。輸出用製剤のロットリリースは薬事法で定められていないため、国家検定は実施出来ない。輸出にあたっては、感染研においてロット毎に SLP を審査し、感染研所長名で証明書を発行して国としてのロット・リリースとしている。また 10 ロットに 1 ロット程度の割合で依頼試験の形で感染研で力価試験を実施している。依頼試験の際には、バッチレコードを審査している。特にバッチレコードには、製造工程、試験に関する全ての情報が詳細に記載されている。SLP、バッチレコードの審査で、規格値、製造方法、工程管理を確認しているが、これまで審査に提出されたロットでは特段の逸脱はなかった。実際、依頼試験の力価試験で不適合になったロットもなかった。現在 WHO から国家検定について全ロット検定の廃止が提案されているところであるが、書類審査で品質が同等/同質であることが担保出来れば、国家検定の試験の頻度を減らすことは可能と考えられる。しかしながら、承認書にどの程度まで記載されているかについては、その製剤の特質や製造所の状況により異なると考えられるため、実際に全ロット検定を廃止する為には、SLP にどのような情報が必要かを慎重に検討する必要があると考えられる。

**研究協力者**

**A. 研究目的**

WHO はユニセフ等の国連機関が買い上げるワクチンについて、製造/リリース国の NRA/NCL (品質保証管理当局/国が定めた試験評価機関) によってロット・リリースされることと、証明書 (Certificate) が発行されることを求めている (Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities, Page 18-19, WHO/BS/10.2128)。その証明書の発行は少なくとも、全てのバッチ (ロット) において、Summary Lot Protocol (SLP) の審査によることとされている。これに従い日本からは BCG ワクチンがユニセフ向けに輸出されている。このユニセフ向け BCG ワクチンは、全ロット検定を実施しておらず、主に書類審査でロットリリースを行っている。この研究では、ユニセフ向け BCG ワクチンのロットリリースにあたり感染研で審査がどのようにされているのかを整理した。

**B. 研究方法**

書類審査細菌第二部第四室で実施しているユニセフ向け輸出用 BCG ワクチンの審査についてまとめた。

倫理面への配慮

該当するものなし。

**C. 研究結果**

日本国内メーカー 1 社がユニセフ向けに BCG ワクチンを製造、輸出している。ユニセフ向け BCG ワクチンは、輸出に際して感染研が SLP を審査し、感染研の所長が証明書を発行してロット・リリースを行っている。SLP 書式は、WHO の様式が用いられている。また 10 ロットに 1 ロット程度の割合で依頼試験の形で感染研で力価試験を実施している。ユニセフ向けの BCG ワクチンは、現在年間数 50 ロットが製造されている。全ロットについて SLP の審査を実施している。例年 5 ロット程度、依頼試験の形で力価試験を実施し、同時にバッチレコードの審査を行っている。バッチレコードには、製造工程、試験に関する全ての