

種して 36±1°Cで 14 日間培養観察する。この間、外来性ウイルスによる細胞変性を認めてはならない。』

『3.2.3.3 血球吸着ウイルス否定試験 対照培養細胞の3.2.3.1に規定するものにモルモット血球を加えて観察するとき、血球吸着ウイルスの存在を認めてはならない。』

#### C-8. 生物基 (案) 3.2.4.3 同定試験 に関して

第四回小委員会において免疫血清の記載方法に関して指摘が出た。下記文言案が候補として上がったものの、承認は得ていない。

第四回小委員会指摘事項：「ポリオウイルス免疫血清」は「抗ポリオウイルス免疫血清」と表記すべきではないか、との指摘が出た。

文言案 (未承認)：『3.2.4.3 同定試験 それぞれの型に特異性を示す抗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。』

#### C-9. 生物基 (案) 3.2.5.1 細胞由来 DNA 含量試験 に関して

第四回小委員会において文言の記載方法に関して要望が出た。下記文言案が候補として上がったものの、承認は得ていない。

第四回小委員会指摘事項：「小分製品にしたときの」の文言を変更して欲しい、との要望が出た。

文言案 (未承認)：『3.2.5.1 細胞由来 DNA 含量試験 製造用細胞由来の DNA をプローブとして用い、小分製品と等濃度にしたときの 1 用量当たりの細胞由来 DNA が 10 ng 以下でなければならない。』

#### C-10. 生物基 (案) 3.2.5 精製ウイルス浮遊液の試験 に関して

審議事項4に関して第三回小委員会にて再審議の要望が出た。第四回小委員会での審議の結果、下記文言案とする

ことが承認された。

審議事項4：Recommendations A.3.4.7 Virus titration を生物基案「3.2.4 ウイルス浮遊液の試験」に組み込むべきか否かに関して、第二回小委員会において「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。

第三回小委員会における要望 (ポリオ研)：ポリオ研としては、Virus titration を工程内管理試験と位置づけ、生物基案の「3.2.5 精製ウイルス浮遊液」の項目に記載したほうがよい」と考えており、再審議を希望する。

ポリオ研からの要望を反映した文言案 (第四回小委員会にて承認済み)：

『3.2.5.2 ウイルス含量試験 検体を希釈して対数的等間隔の階段希釈を作る。各希釈を培養細胞にそれぞれ接種して培養観察し、ウイルス含量を測定する。』

#### C-11. 生物基 (案) 3.2.6.1 不活化試験 に関して

第四回小委員会において項目名の記載方法に関して指摘が出た。委員会終了後に感染研品質保証室より、「生物基の通則 26 に『不活化試験』として定義も記載されているので、名称としては『不活化試験』が適しているのではないか」との意見を頂き、下記文言案とした。承認は得ていない。

第四回小委員会指摘事項：「ウイルス生残否定試験」は項目名として適当なのか、との指摘が出た。

文言案 (未承認)：『3.2.6.1 不活化試験』

#### C-12. 生物基 (案) 3.3 小分製品の試験 に関して

第四回小委員会において試験の準用方法に関して指摘が出た。

第四回小委員会指摘事項：DPT 混合ワ

クチンの生物基を引用している項(3.3.2、3.3.3、3.3.6、3.3.9、3.3.11.2、3.3.11.3)と百日咳単味ワクチンの生物基を引用している項(3.3.7、3.3.8)がある。統一できないのか、との指摘が出た。

#### C-13. 生物基(案) 3.3.11.2 沈降ジフテリアトキソイドの力価試験 3.3.11.3 沈降破傷風トキソイドの力価試験 に関して

第四回小委員会において、感染研細菌第二部より、3.3.11.2、3.3.11.3の力価試験の項目の記載方法変更の提案がなされた。これに対し、感染研品質保証室より、DPT混合ワクチン生物基改訂の際に変更を行うのがよいのではないか、との意見があった。

第四回小委員会提案事項：提案事項を以下にまとめる。1)「参照沈降ジフテリアトキソイド(混合ワクチン用)(以下「参照品」という。)」を「標準沈降ジフテリアトキソイド(以下「標準品」という。)」へ変更する、2)「47単位/mL」を「28国際単位/mL」へ変更する、3)「参照沈降破傷風トキソイド(混合ワクチン用)(以下「参照品」という。)」を「標準沈降破傷風トキソイド(以下「標準品」という。)」へ変更する、4)「27単位/mL」を「18国際単位/mL」へ変更する。

#### C-14. 生物基(案) 3.3.11.4.1 材料 3.3.11.4.2 試験 に関して

第四回小委員会において下記修正案が提示され、承認を得た。

文言案(第四回小委員会にて承認済み)：『3.3.11.4.1 材料 検体、参照不活化ポリオワクチン(セービン株由来)(以下「参照品」という。)、各型の標準血清及び中和試験攻撃用ウイルス(セービン株Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型)(以下「攻撃用ウイルス」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)を用いる。攻撃用ウイルスは、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、0.05mL中に約100CCID<sub>50</sub>のウイルスを含むようにしたもの(以下「攻撃用ウイルス浮遊液」という。)を調製する。』  
『3.3.11.4.2 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0.5mL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℃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、各ウエルに各型の攻撃用ウイルス浮遊液を約100CCID<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 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ のCO<sub>2</sub>インキュベータに3時間置いた後、約4℃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、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 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あればならない。また、攻撃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>/0.05mLであればならない。』

#### C-15. 生物基(案)4貯法及び有効期限 に関して

第三回小委員会及び第四回小委員会において、有効期限の記載方法、貯法の記載に関して指摘が出た。有効期限に関しては下記文言とすることが承認された。貯法に関しては文言案を感染研が作製したものの承認は得ていない。

第三回小委員会及び第四回小委員会における指摘事項:「〇年」よりは「承認時に定められた期間」と表記する方が適当ではないか、との指摘がなされた。

第四回小委員会における指摘事項:貯法に関する記載がない、との指摘がなされた。

文言案(青字は第四回小委員会にて承認済み、下線部は未承認):『貯法は、〇℃以下とする。有効期間は、承認時に定められた期間とする。』

#### C-16. 生物基(案)5その他 5.1 添付文書等記載事項

第三回小委員会において、記載の必要があるのか、という指摘がなされた。第四回小委員会にて、記載することで合意を得た。

第三回小委員会における指摘事項:最近の生物基では記載しない例が多いようだ、との指摘がなされた。

#### D. 結論

平成21-23年度にかけて、計四回の小委員会を開催し、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、それらを基にした生物基(案)の修正を行ってきた。生物基案の骨子が固まったこと、また、各メーカーが実際の承認申請を見据えるべき時期に来ていることから、今年度第四回小委員会をもって小委員会を終了とし、未承認事項は小委員会における提案事項とし

て議事録に記載、メーカー宛に送付するに留めた。

#### 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 $\mu$ g/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500mL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1mLにつき培養細胞3cm<sup>2</sup>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、0.05mL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0.5mL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

での動物から採血し、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 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 で一晚反応させる。翌日、各ウェルに 1×10<sup>4</sup> 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 CCID<sub>50</sub>/0.05mL 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 0.5mL 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) 0.5mL 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

研究分担者	岩城正昭	国立感染症研究所細菌第二部
研究協力者	佐々木裕子	国立感染症研究所細菌第二部
	加藤はる	国立感染症研究所細菌第二部
	山本明彦	国立感染症研究所細菌第二部
	小宮貴子	国立感染症研究所細菌第二部
	妹尾充敏	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した。また、生物基、一般試験「マイコプラズマ否定試験法」の今後の改正点を検討するため、実施試験法についての実態調査ならびに将来的な生物基への試験法導入等についての意識調査を実施した。生物基の方法の実施工程や、発育阻止活性除去の実態が明らかになった。

**A. 研究の目的**

生物学的製剤基準の基本方針は、「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」(生物学的製剤基準まえがき抜粋)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)既存製剤の規制について、安全性と有効性の観点から検討し、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た。本年度は DPT ワクチンと抗破傷風人免疫グロブリン、および一般試験法のマイコプラズマ否定試験について検討した。

## 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。

本年度は、わが国の生物学的製剤基準に準拠したワクチンを用いて行なわれている DPT および DT の定期接種のもと、ジフテリアおよび破傷風の国内患者数、死者数、及び副反応がどのような変遷をたどってきたかについて検討した。

ジフテリアについては、1945 年に年間約 10 万人の患者数、約 1 万人の死者数を数えていたが、以後ワクチン導入に伴うようにして患者数、死者数とも一貫して減少を続け、最近数年はジフテリアの報告例がない (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/27/322/tpc322-j.html>)。つまり現行の定期接種のもと、ジフテリアは国内では極めて良く抑えられているといえる。厚生労働省の感染症流行予測調査では 0 歳から 60 歳以上までの被験者の血中抗体価を測定しているが、2003 年の調査データでは、1～4 歳の約 80% は、ジフテリアの発症防御レベルと考えられている 0.1IU/ml を保有しており (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/27/322/tpc322-j.html>)、血中抗体価の面からも、ワクチンの有効性が示されたといえる。

破傷風についても、1947 年以降著しい患者数、死者数の減少が認められる。ジフテリアの場合と異なり、現在でも年間 100 人前後の症例が認められるが、最近

の破傷風患者の多くを占める 40 歳以上の中高齢者は DPT 定期接種が開始される以前に出生しており、抗体陽性率が低い (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/30/349/tpc349-j.html>)。発展途上国で大きな問題となっている新生児破傷風の国内発生は非常にまれである (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/29/336/kj3363.html>)。副反応については、厚生労働省の予防接種後健康状況調査の結果 (1996-2010 年) および最近の予防接種後副反応報告集計を見る限り、副反応に関しても大きな問題は認められなかった。D および T ワクチンに関する WHO の現行の minimum requirement (Technical Report Series 800, p93 と p111) においては、"If national requirements differ from these requirements, it is recommended that the former should be shown to ensure that the vaccine is at least as safe and as potent as that prepared in accordance with the requirements formulated below." とされており、D、T 部分の力価とアルミニウム含量に関して、現行の日本の生物基は特に否定されるものではないと考えられる。これらの結果は、本研究班主催で行なわれた国際シンポジウム「国際化時代の生物学的製剤基準とワクチンの品質確保のありかた」(平成 24 年 2 月、東京) で発表された。

### (2) 抗破傷風人免疫グロブリン及び関連製剤について

昨年度は、力価試験の *in vitro* 化と、*in vivo* 試験の観察期間の短縮について検討し、*in vitro* 化については今後のさらなる検討が必要と結論し、*in vivo* 試験については、生物基一般試験法の破傷風抗毒素価測定法における観察期間を 5 日間から 3 日間

に変更した。

本年度は、生物基の抗破傷風人免疫グロブリン、乾燥抗破傷風人免疫グロブリン、ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリンおよび乾燥ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリンにおいて「単位/mL」で表記されている力価の表記法について、「国際単位/mL」での表記に置き換えるべく検討し、次回の生物基改正で変更するように提案している。

## (2) 一般試験法マイコプラズマ否定試験について

ウイルスワクチン製剤へのマイコプラズマ属細菌の混入を調べる工程管理試験である生物基一般試験法「マイコプラズマ否定試験法」について、パート1として生物基改正に向けての主な改正点を検討するにあたっての実施方法についての実態調査、パート2として将来的な生物基への試験法導入等についての意識調査を実施した。背景としては、マイコプラズマ否定試験については、国内に生物基、一般試験法に加え、法的拘束力は異なるものの、日本薬局方（以下、日局）参考情報「20 バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」があり、ウイルスワクチン製剤では製造工程により両試験法の使い分けがされていることが予想される。従って、生物基の改正を目的とする調査の中で、生物基の方法の実施工程をどのように設定するかについても実態ならびに意識調査を実施した。

一般試験法「マイコプラズマ否定試験

法」に関する実態ならびに意識調査

配布対象：当該研究班員、回答対象製剤：1) 生物基収載製剤、かつ、2) 工程管理試験としてマイコプラズマ否定試験が実施される製剤、回答対象者：回答対象製剤を取扱う製造販売業者における本試験についての知識・経験のある担当者、実施期間：平成23年9月21日～10月30日

回答製剤数：12製剤（生ウイルスワクチン6、不活化ウイルスワクチン5、リコンビナントワクチン1）、うち国内製造製剤9種類、海外輸入製剤3種類であった。

質問内容の概要：パート1：1) 生物基の方法の実施工程（日局の方法との使い分け）、2) 生物基収載のマイコプラズマ発育阻止活性の除去法と、除去後の培養方法、3) 生物基に収載されていない指標細胞を用いたDNA染色法（以下、核染色法）ならびに核酸増幅法の実施状況、パート2：4) 生物基への核染色法と核酸増幅法の導入、5) 生物基の方法の実施工程を設定する際の考え方、6) 将来的なマイコプラズマ否定試験法の国内基準書における位置づけ。

回答内容の概要：パート1、図1に各質問への回答の割合を示した。1) 生物基の方法の実施については、国内製造品においては、「全ての工程で実施」（6/14回答）、「ろ過前ウイルス浮遊液のみで実施」（3/14）、「工程により日局の方法と使い分け」（5/14）に別れ、海外輸入製剤1回答は「欧州薬局方（EP）や米国薬局方（USP）に準拠した方法」（1/14）で実施していた（図1-1）。2) マイコプラズマ発育阻止活性除去は、国内製造製剤の全回答

で実施(10/12)しており、大半は孔径 0.1  $\mu\text{m}$  メンブランを用いた方法(9/12)、1例の生ワクチンのみ PBS 洗浄法での実施であった。海外輸入製剤の2例は、「除去の必要はなく無実施」との回答であった(図1-2)。続く質問として尋ねた除去後の培養法については、国内製造製剤では、7/9回答で増菌培養だけを実施、2/9回答が直接塗抹培養法と増菌培養法を併用していた。除去を実施していない海外輸入製剤の2回答は、二つの培養法を併用していた(図1-3)。3)核染色法の実施については、国内製造製剤では1例のみ「実施している工程がある」と回答があったが、実施していない例が多かった(4/5)。海外輸入製剤3例では、「常に培養法と併用して実施」(3/3)との回答であった(図1-4)。核酸増幅法の実施については、国内製造製剤ならびに海外輸入製剤ともに「実施している工程は無い」が大半を占めた(7/9)(図1-5)。パート1の考察としては、生物基にメンブランフィルターろ過による除去法の記載があることにより国内製造製剤では除去法の実施が一般的であること、また、ろ過後のメンブランフィルターを液体培地に入れる増菌培養法だけの実施例が多い実態が明らかになった。核染色法や核酸増幅法の実施は少なかった。

パート2の意識調査結果においては、4)核染色法と核酸増幅法の導入の希望が4/6回答で、どちらか片方だけの導入が各試験法につき1回答ずつであった(図2-1)。また、導入する方法については回答が別れ、「日局と矛盾しない内容」、「現行の日局にも改訂すべき点があるの

で同じ内容でなくてよい」、「生物基が Minimum requirement であることから方法の詳細は記載しない」が、それぞれ2回答ずつであった(図2-2)。ご意見として、「生物基と日局で矛盾があれば海外の当局が奇異に感じるのではないかという懸念」や、「核酸増幅法はオプションとして実施できるような記載の希望」が寄せられた。さらに、図2-3に示した試験法の組み合わせについては、核染色法あるいは核酸増幅法だけの工程でというのが4/8回答、培養法との何らかの組み合わせが4/8回答で割合としては半々であった。「組合せや優先順位についての記載は制約になる。各製品や製造方法の特性をふまえて製造業者が試験法組み合わせの妥当性を示すことでよいのではないか?ただし、妥当性を示せない場合に選択できる組み合わせ例を示す。適切に試験がなされていれば手法や組合せを限定する必要はない」といったご意見があった。5)生物基の方法の実施工程については、「現状の通り、各条において定められた工程についてのみ実施する」が多く(4/6)、「将来的に生物基と日局の方法の統一」が2/6回答あった(図2-4)。6)図2-5に示した将来的な国内基準書における位置づけについては、「現行のまま生物基の各条で定められた工程が一般試験法とされ、他の工程は日局参考情報のまま」が回答の半分を占めた(3/6)。また、日局の方法だけに限っての間への回答としては、「一般試験法にすべき」(2/6)、「参考情報のままでよい」(1/3)であった。ご意見として、「試験法の組み合わせについて詳細に限定している現行の日局の方法であ

れば参考情報のままがよい。ただし、一般試験法とする場合は三局調和試験法を希望する」というものが寄せられた。パート2の考察としては、生物基の方法の実施工程を各条で定める現行法について、現段階では、一定の評価がなされている回答であると考えられた。また、核染色法と核酸増幅法導入の希望はあるものの、導入方法については回答が分散する傾向が見られた。

なし  
2. 実用新案登録  
なし  
3. その他  
なし

### (倫理面への配慮)

一般試験法「マイコプラズマ否定試験法」に関する実態ならびに意識調査においては、個人情報の取扱いを含まない様に配慮した。

## 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

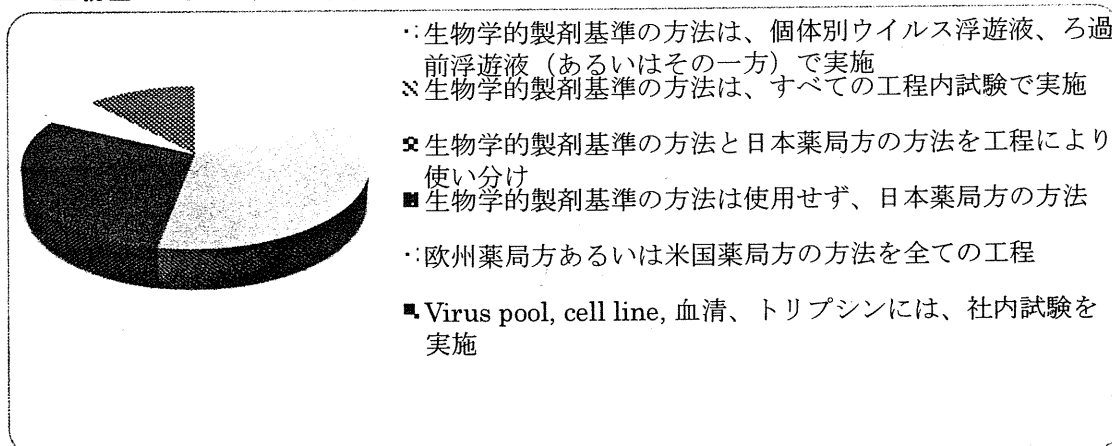
岩城正昭. わが国のDPT ワクチンの安全性と有効性. 厚生労働省科学研究費補助金レギュラーサイエンス研究事業「医薬品を巡る環境の変化と生物学的製剤基準の在り方に関する研究」シンポジウム「国際化時代の生物学的製剤基準とワクチンの品質確保のありかた」平成24年2月、東京。

## E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

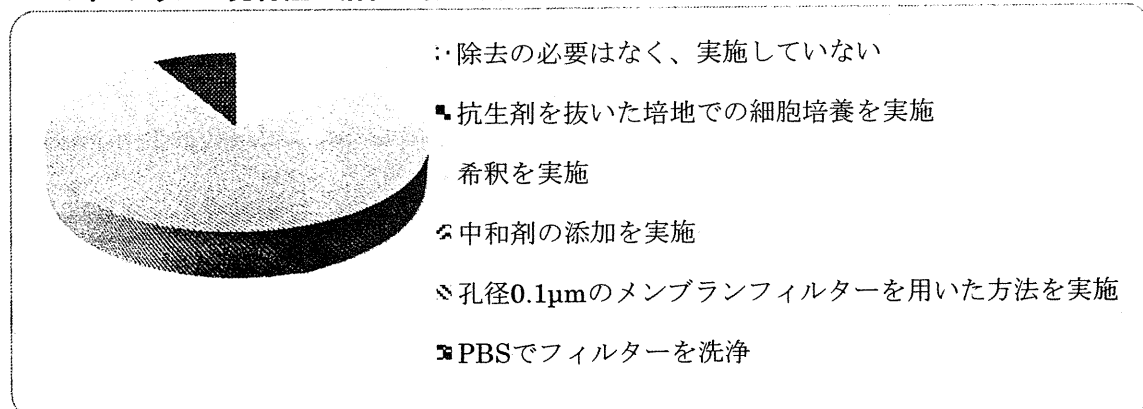
### 1. 特許出願

図1、生物基、一般試験法「マイコプラズマ否定試験法」実施の実態調査結果

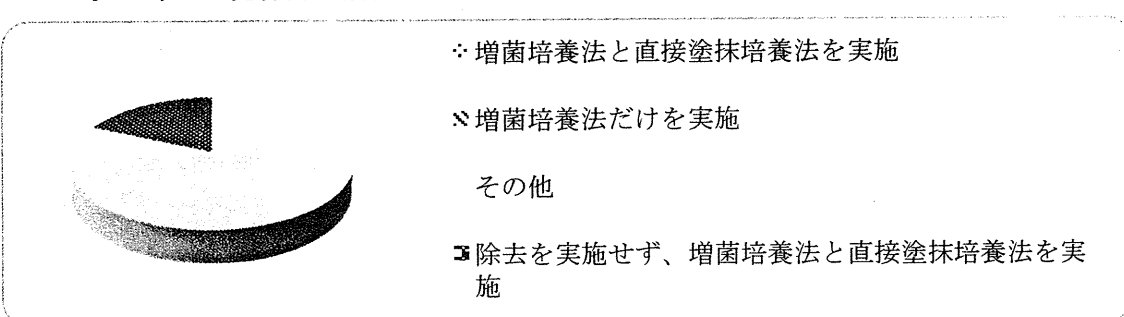
1-1 生物基「マイコプラズマ否定試験」の実施工程



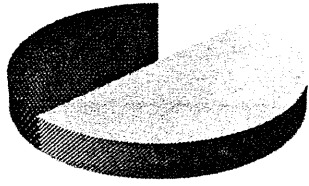
1-2 マイコプラズマ発育阻止活性の除去法



1-3 マイコプラズマ発育阻止活性の除去後の培養法

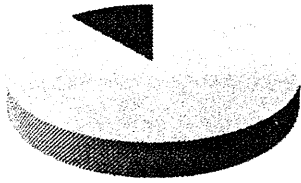


#### 1-4 指標細胞を用いた DNA 染色法(核染色法)の実施



- 核染色法を実施している工程がある
- 核染色法を実施している工程はない
- 核染色法は、常に培養法と併用して実施
- その他

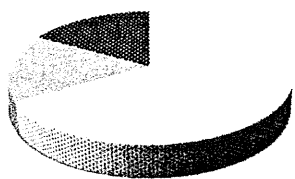
#### 1-5 PCR による検出法を含む核酸増幅法(核酸増幅法)の実施



- 核酸増幅法を実施している工程がある
- 核酸増幅法を実施している工程はない
- 核酸増幅法は、常に核染色法ならびに培養法と併用して実施
- 核酸増幅法の導入を検討中

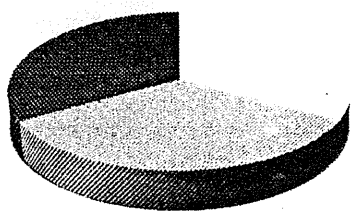
図 2、将来的な生物基、一般試験法「マイコプラズマ否定試験法」への試験法導入等への意識調査結果

### 2-1 核染色法ならびに核酸増幅法の追加記載



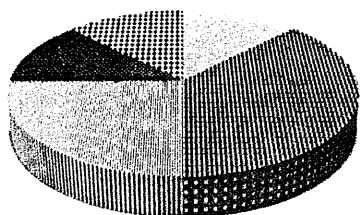
- ・核染色法と核酸増幅法を追加で記載
- ◇核染色法だけを追加で記載
- 核酸増幅法だけを追加で記載
- いずれも追加記載しない

### 2-2 生物学的製剤基準に追加する核染色法ならびに核酸増幅法の方法



- ∴日本薬局方の方法と矛盾しない内容
- ◇現行の日本薬局方にも改訂すべき点があるので、同じ内容でなくてよい
- 生物学的製剤基準がminimum requirementsであることから、方法の詳細は記載しなくてもよい

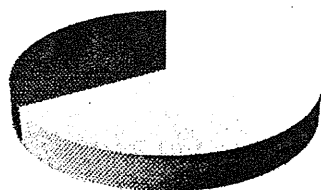
### 2-3 試験法の組み合わせ



- ∴培養法はどの工程でも必須とするべき
- ◇核染色だけの工程が将来可能になればよい
- 核酸増幅法だけの工程が将来可能になればよい
- ┆培養法と核酸増幅法だけの工程が将来可能になればよい
- 培養法と核染色を実施して、核染色のみ陽性の際に核酸増幅法を実施する
- 核酸増幅法を先に実施し、陽性のもののみ確認試験として培養法を実施する



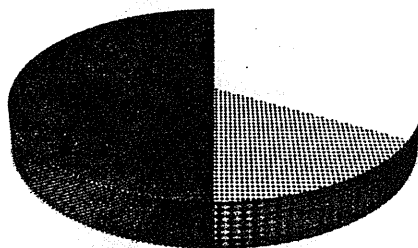
## 2-4 生物学的製剤基準の試験方法を実施する工程



※各条において定められた工程（ろ過前ウイルス浮遊液等）についてのみ、当該試験を実施する

□現状では生物学的製剤基準の方法と日本薬局方の方法を工程により使い分けているが、将来は方法を統一

## 2-5 将来的なマイコプラズマ否定試験法の国内基準書における位置づけ



※日局マイコプラズマ否定試験法は、一般試験法にするべき

▽日局マイコプラズマ否定試験法は、参考情報のままでよい

◇現行のまま、生物学的製剤基準の各条で定められた工程が一般試験法とされ、他の工程試験は日局参考情報のままでよい

## 乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンのたん白質含量試験（ローリー法）における メーカー自家試験値と感染研試験値の乖離の原因と解決に向けた研究

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 楠 英樹 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

### 研究要旨

国家検定として、乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンの全たん白質含量は生物学的製剤基準（生物基）の一般試験法に基づいたたん白質含量試験（ローリー法）によって決定されている。当該ワクチンのたん白質含量は、これまでに生物基で規定されている「一般試験法のたん白質定量法を準用して試験するとき、1 mL 中に 40  $\mu$ g 以下でなければならない」という合格基準を十分満たしているものの、メーカー自家試験値と感染研試験値の間で約 2 倍の乖離が生じていた。そこで、本研究班ではこの乖離の原因を解明し、生物基に従った試験方法でこの問題の解決策を検討した。その結果、当該ワクチンに添加剤として含まれる乳糖水和物はローリー法に影響すること、乖離の原因は当該試験で実施しているトリクロロ酢酸（TCA）煮沸沈殿と洗い後の沈殿たん白質と一緒に残る上澄み液（残存液）に乳糖水和物が残っていたためであることを明らかにした。更に、その解決方法として、この残存液量を 0.05 mL 以下にすることが有効であることを明らかにした。実際に、本研究で見出した残存液量を 0.05 mL 以下にすることで、当該ワクチンのたん白質含量をより正確に決定できるようになった。

### A. 研究目的

日本において、現在、乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンは 2 社のメーカーによって製造され、日本脳炎の予防に用いられている。当該ワクチンには、約 5 又は 8  $\mu$ g/mL のたん白質と一緒に賦形剤として約 36 又は 50 mg/mL の乳糖水和物が含まれている。国立感染症研究所（感染研）は、国家検定として当該ワクチンのたん白質含量を生物基に基づいたたん白質含量試験（ローリー法）で決定している。一方、メーカー 2 社は、生物基

のたん白質含量試験（ローリー法）を各社で一部改良した変法を用いて試験をしている。

メーカー 2 社と感染研の試験結果では、当該ワクチンの生物基で規定されているたん白質含量が 40  $\mu$ g/mL 以下という合格基準を十分満たしているものの、メーカー自家試験値と感染研試験値の間で約 2 倍の乖離が生じていた。たん白質含量を正確に決定することは最終ワクチン製品の安全性と有効性を担保し、その品質を管理する上で大変重要である。そこ

で、本研究班ではこの乖離の原因を解明し、生物基に従った試験方法でこの問題を解決することを目的とした。

## B. 研究方法

### (1) 乳糖水和物の妨害確認試験

乳糖水和物がローリー法に影響するかどうかを明らかにするため、異なる8つの濃度(0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 mg/mL)の乳糖水和物試料を調整した。次に、生物基の一般試験法に基づいたたん白質含量試験(ローリー法)(ただし、TCA処理操作は除く)に準じて測定を行った。

### (2) TCA煮沸沈殿と洗い後の残存液の影響確認試験

TCA煮沸沈殿と洗い後の残存液に乳糖水和物が存在するかどうかを明らかにするため、残存液量を約0、0.05、0.1、0.2、0.4 mLと変化させて、たん白質含量試験(ローリー法)を実施した。当該ワクチンのたん白質含量は約5又は8  $\mu\text{g/mL}$ であるので、サンプルとして、この濃度に相当する約6.2  $\mu\text{g/mL}$ のアルブミンを用いて行った。また、当該ワクチンには乳糖水和物が約36又は50 mg/mL含まれているので、50 mg/mL乳糖水和物の有無で試験を実施した。

### (3) 当該ワクチンのたん白質含量試験(ローリー法)

メーカー2社とワーキンググループを結成し、TCA煮沸沈殿と洗い後の残存液量を約0.05 mLとして、当該ワクチン(各10ロット)のたん白質含量試験(ローリー法)を実施した。

感染研と各メーカーで上記試験方法をそれぞれで実施し、当該ワクチンのたん白質含量を比較した。

## C. 研究結果

当初は、メーカー試験値と感染研試験値の乖離の原因は試験方法の違いによって生じていると考えられていた。一方で、ローリー法には多くの妨害物質が存在するという事実を考えると、当該ワクチンに含まれる添加剤等、例えば、大量に含まれている還元糖の乳糖水和物はローリー法に影響する物質候補として予想された。そこで、乳糖水和物がローリー法へ影響するかどうかを検討した。

### (1) 乳糖水和物の妨害確認試験

乳糖水和物のローリー法への影響を0.01~2 mg/mLの濃度範囲で調べた。その結果、0.5~2 mg/Lの乳糖水和物サンプルは濃度依存的に青色を示した。波長750nmでの吸光度を測定したところ、乳糖水和物の濃度に比例してこれらの吸光度値も上昇した。標準アルブミン検量線で乳糖水和物を見かけ上のたん白質として換算したところ、0.2 mg/mL以上の乳糖水和物は、2  $\mu\text{g/mL}$ 以上のたん白質含量として換算され、ローリー法に影響することが明らかになった(表1)。

### (2) TCA処理後の残存液の影響確認試験

たん白質含量試験(ローリー法)には、この測定で妨害となる物質を取り除くためTCA煮沸沈殿と洗いの操作が含まれている。そこで、TCA処理後の上澄み液に乳糖水和物が存在するかどうかを、約6.2  $\mu\text{g/mL}$ アルブミン存在下で、残存液量を約

0、0.05、0.1、0.2、0.4 mLと変化させて調べた。

乳糖水和物が存在しない時、どの残存液量(0~0.4 mL)においても決定されたたん白質含量は6.3~6.7  $\mu\text{g/mL}$ であった。この結果は最初に添加したアルブミン濃度とよく一致しており、添加回収がほぼ正確に行われていることが確認された。

一方、50 mg/mL乳糖水和物存在下で同様な試験を実施したところ、残存液量が増加すると共に、たん白質濃度も増加した。残存液量が0.1、0.2、0.4 mLの時、添加したアルブミン濃度は約6.2  $\mu\text{g/mL}$ にもかかわらず、決定されたたん白質濃度は9.5、16、30  $\mu\text{g/mL}$ であった。これは、最初に添加したアルブミン濃度の1.5、2.6、4.8倍に相当する。しかし、残存液量が0又は0.05 mLの時、これらのたん白質含量は6.1又は6.8  $\mu\text{g/mL}$ として決定され、最初に添加したアルブミン濃度とほぼ同じであった。これらの結果から、TCA処理後の残存液量を0.05 mL以下にすることにより、乳糖水和物の影響なしに当該ワクチンのたん白質含量を正確に決定できることが示唆された。

### (3) 当該ワクチンのたん白質含量試験(ローリー法)

TCA処理後の残存液量を0.05 mL以下にすることが当該ワクチンのたん白質含量を決定する上で有効であることを実際に確認するために、メーカー2社とワーキンググループを結成し、当該ワクチン各10ロットのたん白質含量試験を感染研より提案した方法を用いて実施した。ここでは、TCA処理後の残存液量を約0.05 mLとして各施設で独立に試験を実施し

た。その結果、感染研において、A社とB社の当該ワクチンのたん白質含量は4.1~4.8  $\mu\text{g/mL}$ と8.2~9.6  $\mu\text{g/mL}$ のレンジでそれぞれ決定された(表2)。また、A社のたん白質含量は4.3~5.1  $\mu\text{g/mL}$ のレンジで、B社のたん白質含量は8.6~9.8  $\mu\text{g/mL}$ のレンジでそれぞれ決定された。感染研より提案した方法による試験結果は、感染研とメーカー2社でそれぞれ良く一致していた。

## D. 考察

当初は、2社共に生物基のたん白質含量試験(ローリー法)の一部変法を用いているため、メーカー値と感染研値で約2倍の乖離が生じていると考えられていた。しかしながら、当該ワクチンの成分を確認し、更にメーカーとも協議したことにより、当該ワクチンに含まれる大量の乳糖水和物がローリー法に影響する可能性が高いと予想された。

本研究から、我々は、当該ワクチンに含まれている乳糖水和物が0.2 mg/mL以上の濃度でサンプルに存在する時、ローリー法に影響することを明らかにした。また、乖離の原因は、感染研で実施していたTCA処理後の上澄み液(残存液)(約0.1~0.2 mL)の中に乳糖水和物が残っていたためであった。これは、残存液を約0.1~0.2 mLとした時、見かけのたん白質含量が約2倍に換算されたことと良く一致している。

実際に、メーカーA社と同じ10ロットの当該ワクチンのたん白質含量を測定した。メーカーB社とは全てが同じ10ロットではなかったが、お互いに10ロットのたん白質含量試験を実施した。感染研が提案した方法で当該試験を実施したところ、感染