

研の値はA社とB社がそれぞれ実施した試験値とほぼ同じであった。それ故、この乖離の問題を解決する方法として、TCA煮沸沈殿と洗い後の残存液量を0.05 mL以下にすることは重要であり、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より正確に決定できると考えられる。

A社において、感染研が提案した試験方法とA社独自の試験方法での試験結果には大きな差が見られなかったとの報告があった。一方、B社においては、感染研が提案した方法での試験結果は、B社独自の方法で得られるたん白質含量より約18%高値を示したとの報告があった。B社とはまだわずかな乖離があるものの、これまで約2倍の乖離が生じていたことを考えると、我々は、この違いをほとんど無視できるものではないかと考えている。

ローリー法において、その測定を妨害する物質が多数存在することが知られている。現在、多くのワクチンには添加剤としてローリー法に影響する可能性がある物質が含まれている。本研究で提案したTCA処理後の上澄み液を0.05 mL以下にする方法は、生物基一般試験法のたん白質含量試験（ローリー法）を準用した方法であり、ローリー法の妨害物質を含む新規ワクチン等にも今後応用できるものと期待される。

E. 結論

本研究より、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）において、メーカー値と感染研値の間で約2倍の乖離が生じていた原因とその解決方法を解明した。ローリー法でのたん白質含量を決定する際は、多くの化学物質がローリ

ー法を妨害するという事実を考慮する必要がある。メーカーの自家試験値と感染研値で乖離が生じている場合には、本研究で実施したような検討及びメーカーとの協議等を実施し、早急に対応することが重要であると考えられる。A社とB社の当該ワクチンに関して、上記方法を用いることにより乖離の問題は解決できると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 乳糖水和物のローリー法への影響

乳糖水和物の濃度 (mg/mL)	換算されたたん白質濃度 (μ g/mL)
0.2	2.0 ± 0.6
0.5	7.5 ± 0.5
1	16 ± 0.6
2	28 ± 0.6

乳糖水和物が 0.1 mg/mL 以下の時、換算された見かけ上のたん白質濃度は $< 1 \mu$ g/mL であったので、0.01~0.1mg/mL 乳糖水和物の結果を省いた。

表 2 本研究より改善した試験方法によって決定した乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンのたん白質含量

	A 社検体の 感染研値 (mg/mL)	B 社検体の 感染研値 (mg/mL)
Lot 1	4.5 ± 0.17	8.0 ± 0.88
Lot 2	4.6 ± 0.09	8.6 ± 0.19
Lot 3	4.7 ± 0.23	9.6 ± 0.11
Lot 4	4.1 ± 0.04	8.4 ± 0.33
Lot 5	4.2 ± 0.04	9.0 ± 1.12
Lot 6	4.1 ± 0.06	8.2 ± 0.37
Lot 7	4.2 ± 0.17	8.8 ± 0.32
Lot 8	4.1 ± 0.08	8.3 ± 0.25
Lot 9	4.8 ± 0.13	9.2 ± 0.45
Lot 10	4.3 ± 0.11	9.3 ± 0.64

試験は 1 ロットにつき、3 回の試験を実施し、750nm の吸光度値と標準アルブミンの検量線からたん白質濃度を求め、3 回のたん白質濃度の平均値と標準偏差値を示した。TCA 処理後の残存液量を約 0.05 mL とした。

静注用グロブリン製剤の重合体否定試験および抗補体性否定試験
の標準化について

研究分担者： 野島清子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員
研究協力者： 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)
上村晃一郎 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

グロブリン製剤中にはグロブリン凝集体が含まれる可能性があり、これらはアナフィラキシーショック等の副反応の原因になる。これらは製造工程中の物理的、化学的刺激などにより産生するが、静注用グロブリン製剤はこれら凝集体の産生を抑制する処理、除去する処理を経て製造される。重合体否定試験は、これらの含量が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、抗補体性否定試験は、これらの活性が一定以下であることをバイオアッセイにより確認する試験である。これら二つの試験より最終製品の安全性が確保されている。抗補体性否定試験は生物由来の試薬を複数使用するバイオアッセイであるために試験の併行精度、室間精度が悪く、国立感染症研究所を含む血液製剤製造所7施設における試験成績にバラツキがあることが問題となっている。そこで、抗補体性否定試験参照品を作製し、本研究班において、参照品の値付けを実施し、試験法の標準化を行なった。

重合体否定試験の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。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することが必要である。製造所間での分析感度を統一化する目的で分析参照品を作製し、超遠心分析法と高速液体クロマトグラフ法で重合体含量を測定して比較検討を行なった。

A.研究目的

グロブリン凝集体／重合物は補体を活性化し副作用を引き起こす可能性がある。品質管理試験のうち、凝集体／重合物が一定以下であることをバイオアッセイで確認するのが抗補体性否定試験であり、高速液体クロマトグラフィー法により含量を測定するのが重合物否定試験である。これらの試験は、製剤が承認された当時から同じ方法で実施されてきた。

抗補体性否定試験は、ヒツジ赤血球、抗ヒツジ赤血球抗体(ヘモリジン／溶血素)、モルモット補体の3種類の生物由来試薬を用いる点、イオン強度、pHの影響を受け易い点などが原因で試験精度を一定に保つ事が非常に難しい試験である。試験精度を一定に管理するためには、抗補体価を定めた参照品の整備が必須である。そこで参照品を作製し、感染研を含む7施設で抗補体価を測定し、値付けを行なった。

重合物否定試験は、製剤中に含まれる重合物の含量が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高速液体クロマトグラフ法によるサイズ排除クロマトグラフで分析すると、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、グロブリン製剤の重合物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。本研究では、真値に近い解析結果が得られるとされる超遠心分析により分析し、サイズ排除クロマトグラフの分析結果と比較し、新しい基準値案を定める際の基礎データを獲得した。また、各製造所と感染研の分析感度を統一し試験

法を標準化する目的で参照品の整備を行なった。

抗補体性否定試験、および重合物否定試験の2つの試験法の標準化により、グロブリン製剤の品質管理の向上が期待される。

B.研究方法

抗補体性否定試験

1)抗補体価の測定

Mayer法 (Mayer, M.M. :Experimental Immunochemistry, 2nd ed., Springfield, Ill.1961) に準じた1/2.5法を用いた。

ヒツジ保存血液を生理食塩水、およびペロナル緩衝液で洗浄し、抗ヒツジ赤血球抗体を作用させて感作血球を作製し、細胞濃度を 5×10^8 cells/mLに調整した。グロブリン検体0.2mLにモルモット補体100単位を含む液0.2mLを加え、更にゼラチンペロナル緩衝液0.6mLを加えた後、37°Cで1時間加温した。この反応液をゼラチンペロナル緩衝液で数段階希釈し、 5×10^8 cells/mLに調整したヒツジ赤血球0.5mLを加えて37°Cで1時間加温した後、遠心分離し、上清の吸光度(A541nm)を測定し、溶血度(y)を求めた。補体量の対数値を横軸、 $1/(1-y)$ の対数値縦を軸にとり溶血直線を書き、対照と検体との関係性で平行性が確認でき、かつ溶血度が10%-90%のプロット3点以上を用いて、直性回帰を行なった。

50%の感作血球が溶血する時の補体価(溶血 $y=0.5$)を求めて、検体(a)および対照(b)の補体価CH50/mLとした。b-aの値を抗補体価とした。

2)抗補体性否定試験参照品候補品の決定
現在市販されている静注用グロブリンのうち、最終製品の抗補体価測定が生物学的製剤基準によって規定づけられている製剤4種類、乾燥スルホ化人免疫グロブリン、乾燥ポリエチレングリコール人免疫グロブリン、乾燥pH4処理人免疫グロブリン、乾燥イオン交換樹脂人免疫グロブリン製剤の抗補体価を7施設で測定

した。

3) 抗補体性否定試験参照品の製造候補品4製剤の中から乾燥スルホ化人免疫グロブリン製剤を参照品候補品とし、製造所に製造を依頼した。

4) 参照品の抗補体価の値付け
異なる日に感作した感作ヒツジ血球を用いて、参照品の抗補体を3回測定した。

1回の測定における測定回数は2回とした。7施設で抗補体価を測定した際の、吸光度の生データを集め、それを元に溶血度10-90%の範囲の最低3点を用いて、データ解析を行い、統計計算により抗補体価を算出し、値付けを行なった。

4) サイズ排除クロマトグラフ
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。サイズ排除クロマトカラム (ゲルろ過カラム) としては

東ソー G3000SWXL (2本) を用いた。流速は0.5 mL/minで行った。溶離液組成は0.1M Na₂SO₄, 0.05% Na₃N in 1/7.5M Phosphate buffer pH7.0とした。

5) 超遠心分析法による解析

超遠心分析は、ベックマン・コールター社製XL-1を用いて超遠心沈降速度法により実施し、各成分の分布状態および形状の解析を実施した。測定温度は20°C、回転数は40000回転で行った。また、統計的にピーク強度を評価した。グロブリン製剤はPBS (生理条件を反映) およびサイズ排除クロマトグラフ溶離液で希釈して1mg/mLに調整し、超遠心分析を行った。

3) 重合物否定試験分析参照品の作製
日本で市販されているグロブリン製剤の中で、一番安定にグロブリンオリゴマーを含有する製剤を分析参照品として選択した。当該製剤は、予め製造所7施設で分析を行い、分析参照品として使用可能

NID		1st	2nd	3rd	幾何平均	GCV(%)
		control	98.422	97.123		
ACA 01.11	83.404	83.702	85.517			
抗補体価	15.018	13.421	18.092			
A		1st	2nd	3rd	幾何平均	GCV(%)
	control	107.838	100.48	103.032	17.787	6.7
	ACA 01.11	88.735	82.888	86.287		
	ACA	19.103	17.592	16.745		
B		1st	2nd	3rd	幾何平均	GCV(%)
	control	99.873	91.435	92.18	18.033	2.8
	ACA 01.11	81.302	73.87	74.804		
	ACA	18.571	17.565	17.976		
C		1st	2nd	3rd	幾何平均	GCV(%)
	control	94.201	94.06	98.618	9.450	29.7
	ACA 01.11	82.629	87.284	88.057		
	ACA	11.572	6.776	10.761		
D		1st	2nd	3rd	幾何平均	GCV(%)
	control	86.302	101.031	92.042	15.259	12.4
	ACA 01.11	68.824	87.32	77.216		
	ACA	17.478	13.711	14.826		
E		1st	2nd	3rd	幾何平均	GCV(%)
	control	87.875	93.928	93.91	9.420	41.7
	ACA 01.11	81.74	83.889	80.337		
	ACA	6.135	10.039	13.573		

参照品抗補体価	
13.732	30.6

表1. 6施設における参照品抗補体価測定結果

であることを確認した。

C. 研究結果

1) 抗補体性否定試験参照品の候補品の決定

乾燥スルホ化人免疫グロブリン、乾燥ポリエチレングリコール人免疫グロブリン、乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン、乾燥イオン交換樹脂人免疫グロブリンの合計 4 製剤のうちで、7 施設において安定して抗補体価が測定できた製剤は乾燥スルホ化人免疫グロブリンであったため、これを参照品候補製剤として決定し、製造所に製造を依頼した。

2) 参照品抗補体価の値付け

参照品の抗補体価の値付けを行なうために、抗補体価を異なる感作ヒツジ血球を用いて 3 回測定した。表 1 にあるように、各施設で測定した抗補体価は 9.4 から 18.0 までの値を示し、各施設に置ける試験の GCV% は 2.8% から 41.7% までと大きく精度が異なっていた。測定は 7 施設で実施したが、1 施設の測定値は、他施設と比較して異なる方法を用いて抗補体価を算出していたため、値付けの際には測定値は用いずに計算を行なった。統計処理により、幾何平均値である 13.732 を参照品の抗補体価とし、小数点以下 1 位までの値「13.7」を当該参照品の抗補体価と決定した。GCV% は 30.6% であった。今後は試験毎に参照品および QC コントロールの抗補体価を合わせて測定し、試験的に運用を開始することとした。尚、試験的運用において、QC コントロールの抗補体価と参照品の抗補体価が相対的に変動するかを確認し、各製造所の対照製剤が本参照品の値付け値を元にして相対的に算出されるかを検討する。

3) 重合体否定試験の参照品の作製

各施設における検出感度を統一することおよび、試験毎のシステム適合性を確認することを目的として、重合体否定試験分析参照品を作製した。市販されている製剤の中で、最もオリゴマーと凝集体が

安定して存在する筋注用グロブリン製剤を参照品候補製剤とし、製造所に製造を依頼した。

4) サイズ排除クロマト及び超遠心分析結果

超遠心分析においては、0.6% 以下の含量の少ない物質はピークが検出されたり、されなかったりすることがあり、統計的にピーク強度を評価すると、これらのピークは有意に存在するとはいえないと結論づけた。分析参照品を超遠心分析法で分析したところ (表 2)、PBS、サイズ排除クロマト溶離液 (SEC-buffer) でいずれを用いて分析した場合でも、ほぼ同様の解析値が得られた。SECbuffer で分析すると、モノマーが若干増加する傾向を示した。オリゴマー、凝集体は若干減少する傾向を示した。高イオン強度の溶離液中で新たに凝集体が産生される可能性はないことが明らかとなった。サイズ排除クロマト (SEC) 分析結果と超遠心分析結果を比較すると、オリゴマー、凝集体は SEC 分析の方が高値に見積もられることが分かった。SEC は担体との相互作用があるために、ブロードに広がって溶出されること、ベースライン分離がされない状態で縦にピークを切って解析を行なうことにより実際よりも多く見積もられている可能性が考えられた。

D. 考察

抗補体性否定試験参照品の値付けを 7 施設で行い、抗補体価を 13.7 と定めた。本試験はバイオアッセイであるため、試験精度が悪く、施設間による測定誤差はかねてから問題となっていた。本研究班において、参照品の値付けを実施し、参照品の抗補体価が決定したことにより、参照品の抗補体価を元にして相対的に抗補体価を算出して施設間の誤差が解消することが期待される。今後は次の段階として、試験毎に参照品および QC コントロールの抗補体価を合わせて測定し、一

定期間データを蓄積行なうことを予定している。この試験的運用において、QCコントロールの抗補体価と参照品の抗補体価が相対的に変動する事を確認し、各製造所の対照製剤が本参照品の値付け値を元にして相対的に算出出来るかを検討する。抗補体性否定試験は、最終製品、工程中間品に対して、すべての製造所で実施している試験である。最終製品のpHが低い液状製剤においては、マイヤー法では抗補体価の測定は出来ないため、製造所によっては、自社製剤に適した試験法へ変更し品質管理試験を実施しているところもある。

そのような施設においても参照品の抗補体価を元に対照製剤の抗補体価が評価できるか今後検討を予定している。

重合物否定試験は、高速液体クロマトグラフ法によりサイズ排除クロマトを行い凝集体含量が一定以下であることを確認する試験であるが、静注用グロブリン製剤を至適条件下で分析すると現在の基準値1.0%を上回る製剤が複数存在する。しかし、超遠心分析法によりこれらの製剤の凝集体含量の分析をかねてから実施してきたが、分析条件等の至適化がまだ不十分で、再現性の確保に課題があった。本研究班において、血漿由来グロブリン製剤の超遠心分析法の至適化を行い、再現よく分析が実施できるようになり、また、解析結果であるピーク強度を統計的に評価することが可能となった。その結果、超遠心分析においては、0.6%以下の含量の少ない物質はピークが検出されたり、されなかつたりすることがあり、統計的にピーク強度を評価すると、これらのピークは有意に存在するとはいえないと結論づけた。生理条件を想定したPBS中、およびサイズ排除クロマトの至適溶離液中の2条件で分析参照品の分析を行った結果、この2つの条件における分析結果に大きな差異は認められなかったものの、SEC溶離液中ではモノマーが若

干増加し、オリゴマー、凝集体が若干減少する傾向が認められた。品質試験を超遠心分析法で行なうことは、現実的ではないと考えられ、サイズ排除クロマトで実施するの良いと考えられている。サイズ排除クロマトの至適条件下で超遠心分析を行なうと、凝集体の若干の減少が認められ、安全性の下方評価に繋がる可能性があると考えられるが、生理条件下

(PBS)でサイズ排除クロマトを実施してもオリゴマーは分離出来ないため、サイズ排除クロマトの至適条件は高いイオン強度とならざるを得ないのが実情である。今後の検討が必要である。

欧米では生理条件に近い条件下でサイズ排除クロマトを実施しており、溶離液組成はEPで規定されている。しかし、EPで規定されている分析条件においては、製剤に含まれているグロブリンオリゴマーは分離出来ていないと考えられる。グロブリンオリゴマーはグロブリン製剤中の主作用を引きこす主成分ではなく、副作用をひき起こす不純物であると考えられる。オリゴマーが含まれていることが明らかとなった以上、オリゴマーが入っていることを前提に管理すべきであると考え。日本においては、欧米に先立ち、オリゴマーを分離できる条件で試験法を標準化し、品質管理を行っていく予定である。そのためには、現在の生物学的製剤基準の規制値「1.0%以下」をどのように変更すべきかを血液製剤製造所と協力して慎重に検討すべきであると考え。

E 結論

抗補体性否定試験性、重合物否定試験は、グロブリン製剤の凝集体をバイオアッセイおよび物理化学的に評価する重要な試験であるが、現在はいずれの試験も施設間の測定誤差が認められ問題となっている。本研究班では、これら2つの試験法の標準化を実施することを目的として、参照品を整備した。抗補体性否定試験参照品は、抗補体価の値付けが終了した。

重合物否定試験の分析参照品は交付手続きが完了し、試験毎のシステム適合性の確認に使用し、分析感度を評価する為に運用を開始する段階である。これら2つの試験の標準化により、精度の高い品質管理の実施、製剤の安全性確保に貢献できると考える。

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

グロブリン製剤の麻疹抗体価測定について

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

研究要旨

人免疫グロブリン製剤の多くは、生物学的製剤基準（生物基）によって製剤中に含有される麻疹抗体価を測定する試験が規定されている。またその試験法は生物基の一般試験法で、中和試験法(NT法)、赤血球凝集抑制試験法(HI法)、受身赤血球凝集試験法(PHA法)とされているが、それぞれ問題があり今後も麻疹抗体価の測定を実施していくならば、代替の方法を検討する必要があるだろう。静注用グロブリン製剤には様々な種類があり、一般の血清の測定ならば、NT法、HI法と高い相関を示すELISA法はグロブリン製剤の場合、製剤の種類によってNT法でえられた抗体価と乖離があった。そこで、製剤の特徴の情報を収集するとともに、各製剤におけるELISA法での定量性を検討した。その結果、ELISA法においてもそれぞれの製剤で定量性がある事が示され、製剤毎に適当な標準品を設定すれば、ELISA法による抗体価測定も可能であると思われた。また中和抗体価と乖離が大きかった製剤の一つはpH4であったが、他にも低いpHの製剤でありながら乖離の少ないものもあり、乖離の原因は特定できなかった。

A. 研究目的

人免疫グロブリン製剤は、主に感染症の予防、治療に用いられる血液製剤である。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り、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。一方、静注用免疫グロブリン製剤では、補体を活性化する等の副作用の原因となる免疫グロブリンの凝集体を除去するために、pH

4 処理やポリエチレングリコール処理、イオン交換樹脂処理あるいはスルホ化処理等を施して、安全性を向上させている。これらの処理により免疫グロブリン製剤の性状が変化するためか、通常血清で測定すれば高い相関が得られる麻疹のHI抗体価、中和抗体価、EIA抗体価等において、製剤毎にことなる挙動を示す傾向にある。一方、生物基に記載されているHI試験はアフリカミドリザルの赤血球を用いるため、将来的に実施が困難になることが予想されている事や、PHAキットの販売が停止される可能性等を考慮すると、

今後も麻疹抗体価測定法が生物基に残るのならばなんらかの代替法が必要である。ELISA 法は比較的簡便で、診断薬として承認を受けたキットが容易に入手できるため、新たな麻疹抗体価測定法の候補である。しかし、以前の研究では静注用免疫グロブリン製剤の種類によっては中和抗体価との乖離がみられ、導入については慎重に検討していく必要があるとの結果を得た。今回は ELISA 法による抗体価と NT 法による抗体価の乖離の理由を考察するために製剤の特徴の情報を集めたこと、また各製剤の EILSA 法における定量性を検討し、標準品等で補正する事で麻疹抗体測定法として使用可能かを検討した。

B. 方法

1. 静注用の製剤の特徴の情報

血液製剤協会に依頼し、静注用の製剤の特徴の情報を収集した。

2. ELISA 法の定量性の検討

6 種類の製剤 (A: ポリエチレングリコール処理製剤、B: pH4 処理酸性製剤、C: 乾燥スルホ化処理製剤、D: 乾燥ポリエチレングリコール処理製剤、E: 乾燥イオン交換樹脂処理製剤、F: 乾燥 pH4 製剤) の EIA 抗体価を、デンカ生研のウイルス抗体 EIA「生研」麻疹 IgG キットを用いて測定した。事前に ELISA の定量の範囲に入る希釈値を求め、そこから 2 倍希釈液、4 倍希釈液を作製した。キットに付属の標準血清を用いて標準曲線を作製し、EIA 抗体価を算出した。各製剤について 3 度測定した。さらに WHO 標準麻疹抗体 (WHO International standard, 3rd International standard for anti-Measles; 3IU) の EIA 抗体価を測定した。

結果

1. 製剤の特徴

各製剤の特徴を表1に示す。

pH4 処理酸性製剤とポリエチレングリコール処理製剤は pH4 前後の酸性域であった。

2. ELISA における定量性

各製剤の ELISA 法における定量性の結果を図1に示す。すべての製剤において一定の定量性がみられた。

D. 考察

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法、受身赤血球凝集試験法が記載されているが、HI 法、PHA 法ではサル血球や kit の入手が将来、困難になる事が予想される。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製造所の一部では実施が困難である。今後も現在の生物基に従ってグロブリン製剤を安定的に供給するためには新規の麻疹抗体価測定法を検討する必要がある。以前、ELISA 法を検討した際、ELISA 法による抗体価と中和法による抗体価が pH4 処理酸性製剤では、乖離した。pH4 処理酸性製剤は製剤が pH4 前後で調整されており、pH による乖離の可能性も考えられた。しかし、同様に pH の低いポリエチレン処理製剤では大きな乖離が見られず、抗体価の乖離に原因は不明であった。一方、中和抗体価との乖離があった製剤において ELISA 法で定量性が確保されるのなら、ELISA 法が使える可能性がある。今回、すべての製剤である程度の定量性が見られたことから、今後、抗体価を補正できる標準品を用意できるのならば、EILSA 法がグロブリン

製剤の麻疹抗体測定法として使用できる可能性が考えられた。

免疫グロブリン製剤の麻疹抗体測定の難しさの一つの理由が、多様な性状をもつ製剤があることがあげられる。近年は製造における GMP が向上したことから、製品の均一性は高まった。製品となったグロブリン製剤は製造の過程で、様々な処理をうけており、統一された測定結果をだしにくい。処理が行われる前の原材料の段階において抗体価を規定し、GMP によって均一性の高い品質を担保し、製品での麻疹抗体価測定を省略するという方向性も検討する必要もあろう。

E. 結果

複数の静注用製剤を用いて、ELISA 法の定量性を検討したところ、すべての製剤において定量性を示したことから、適切な標準品等で補正が可能ならば、ELISA 法も麻疹抗体測定法として用いる事が可能と考えられた。

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

表1 静注用グロブリン製剤の特徴

	A	B	C	D	E	F
【静注用】	ポリエチレングリコール処理	pH4処理酸性	乾燥スルホ化処理	乾燥ポリエチレングリコール処理	乾燥イオン交換樹脂処理	乾燥pH4処理
性状	無色ないし淡黄色の澄明な液剤	無色の澄明な液剤	溶剤を加えるとき微黄色の澄明又はわずかに白濁した液剤	溶剤を加えるとき無色ないし淡黄色の澄明又はわずかに混濁した液剤	溶剤を加えるとき無色ないし淡黄色の澄明又はわずかに混濁した液剤	溶剤を加えるとき無色の澄明又はわずかに白濁した液剤
pH試験	3.9~4.4	3.2~4.2	6.4~7.2	6.4~7.2	6.4~7.2	6.2~7.0
免疫グロブリンG含量試験	90%以上	98%以上	90%以上	90%以上	90%以上	90%以上
含量	5w/v%以上	5w/v%以上	5w/v%以上	5w/v%以上	5w/v%以上	5w/v%以上
重合物	1.0%以下	1.0%以下	—	1.0%以下	1.0%以下	1.0%以下
同定試験	適合	適合	適合	適合	適合	適合
抗補体否定試験	—	—	適合	適合	適合	適合
無菌試験	適合	適合	適合	適合	適合	適合
(異常)毒性試験	適合	適合	適合	適合	適合	適合
発熱試験	適合	適合	適合	適合	適合	適合
麻疹抗体価	5単位/150mg以上	5単位/150mg以上	5単位/150mg以上	5単位/150mg以上	5単位/150mg以上	5単位/150mg以上
含湿度	—	—	3%以下	3%以下	3%以下	3%以下
スルホ化確認試験	—	—	適合	—	—	—

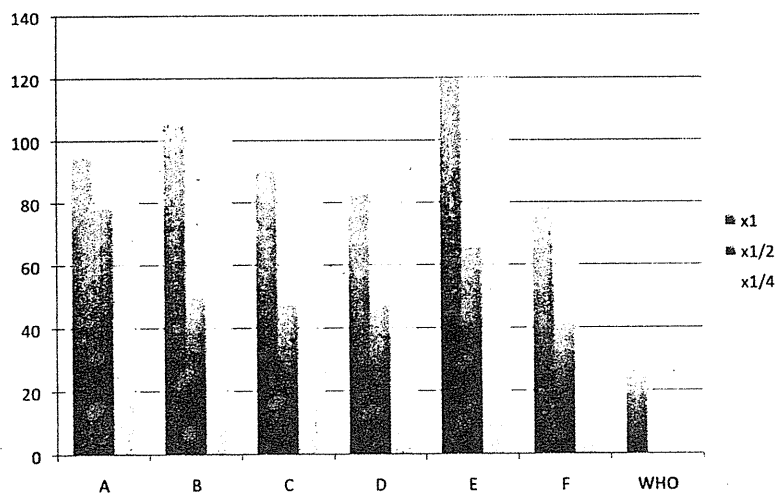


図1 ELISA法による定量性の検討

A: ポリエチレングリコール処理製剤、B: pH4処理酸性製剤、C: 乾燥スルホ化処理製剤、
D: 乾燥ポリエチレングリコール処理製剤、E: 乾燥イオン交換樹脂処理製剤、F: 乾燥pH4製剤、WHO: WHO標準血清

IV. わが国と欧州の生物学的製剤基準上の規格の違い

日欧ワクチンのロットリリース

	日本	欧州
生物製剤の基準	生物学的製剤基準	欧州薬局方(EP)
ロットリリースの基準	検定基準	Official Control Authority Batch Release (OCABR) Guideline
検定期間	国立感染症研究所	Official Medical Control Laboratory (OMCL)*
製造と試験記録の要約(SLP)の審査	全ロット	全ロット
試験の頻度	全ロット	全ロット

生物基とEPIにおける試験法に関する相違

試験方法の相違

品目	日本	欧州	
沈降ジフテリアトキソイドの無毒化試験	モルモット及びウサギを用いる試験	Vero細胞を用いる試験	<p>無毒化試験は、トキソイドにおいて毒素の作用が十分失われているかどうかをみる試験です。毒素の作用を培養細胞でみることは、ときに鋭敏でもあり、また一般的には簡便で再現性の良い系が構築できると考えられています(現に日本では、ジフテリアトキソイドの力価試験は、モルモットチャレンジ法ではなく、バリデーションを経て、Vero細胞を用いた血中抗体価測定法で行なわれています)。</p> <p>しかし、細胞に対する毒性をみることは、生体に対する毒素の作用のすべてをみることと同一ではなく、あくまで一部をみているにすぎないということです。例えば、Vero細胞では、毒素の体内での(臓器間などの)移行をみることは不可能です。</p> <p>その意味で、動物実験は(臓器間移行をみるわけではありませんが)Vero細胞よりまだ人間に近いといえます。また、日本では京都事件の百日咳毒素の例では、トキソイド化した百日咳毒素の残存毒素活性をみるのに、CHO細胞とマウスのヒスタミン増感(HS)活性を比較した報告があります(Biologicals. 2002 Dec;30(4):297-302)。HSで見ると高い活性が検出されるサンプルでも、CHOでは活性を検出できないことがあるというのがこの論文の要旨です。このように、毒素の作用には「わかった気になってしまうと危ない」面があり、動物を使うことで、検出できる活性の幅を広げることができます。日本の生物基がモルモットとウサギを使う設定になっていることで、そのような利点があると思います。なお、細胞でみることでわかることは限られるという条件付きですが、Vero細胞法には、動物法より感度が高いという利点があります。</p>

要求される試験項目の相違

品目	日本	欧州	
季節性インフルエンザワクチン	pH、マウス体重減少試験、マウス白血球減少試験、異常毒性否定試験	不要	わが国のワクチン使用者は、ワクチン接種後の発熱に対して非常に敏感であり、多くのワクチンが接種後の発熱率を下げることを目標に開発されてきた経緯がある。わが国のインフルエンザワクチンがウイルス全体かHAワクチンへと代わったのもそのような理由である。マウス体重減少試験、マウス白血球減少試験、異常毒性否定試験は、いずれもワクチンの安全性をできる範囲で担保した試験であり、極めて高い安全性が、他の試験により担保されているのでなければ、早計に除ける試験ではない。
乾燥ヘモフィルスb型ワクチン(破傷風トキソイド結合体)	異常毒性否定試験	不要	いわゆるGeneral Safety Testと日本で実施されている異常毒性否定試験は大きく異なる。特に、日本においては製剤毎の母集団を作成し、これと比較することにより、試験が行われる検体が過去の製剤と均一であるかが確認できていること。体重のみならず、接種動物における病理学的解析、血液学的解析がなされていること。さらに、日本においては、過去15年にわたってシステム化された異常毒性否定試験がじっしとされており、ロットリリースにおいて非常に重要な役割を果たしている。

生物基とEPIにおける規格値に関する相違

品目	項目	日本	欧州	
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン	アルミニウム含量	≤0.3mg/mL	≤1.25mg/1回投与量	アルミ(錳物)は生体にとっては基本的に「異物」であり、アルミゲルは生体に投与したときに組織学的に神経細胞変性を起こすことが公知である。そのため、極力少なくすることが望まれる。
沈降破傷風トキソイド	バルク純度試験	≥1500Lf/蛋白質窒素mg	≥1000Lf/蛋白質窒素mg	100%の純度と考えられる結晶化した毒素の値は3300Lf/mgpNであることから、欧州の1000という値は30%以下の純度ということになり、日本の基準でさえ50%以下の純度になる。製造所が十分に純度の高い製品を作れるならば、基準をある程度高く設定すべきである(実際国内メーカーは基準を十分満たしている)。
沈降ジフテリアトキソイド	トキソイド濃度	≥70IU/mL	≥30IU/1回投与量	ジフテリアトキソイド(D)の70という力価設定は、現行の製剤で言えば沈降DTにかかってくる基準で、これは、日本では11-12歳のII期接種に主に使われる。欧米のように抗原量を少なくした「d」や「t」でも、わが国の使用で十分なのかについては、根拠が無いので判断できない。国産品と海外品の互換性についても判断できない。

VI. 国際会議「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」

「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」

主 催：厚生労働省科学研究費補助金レギュラトリーサイエンス研究
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」代表 国立感染症研究所 加藤篤

協 力：(社)日本ワクチン産業協会、日本製薬工業協会、PhRMA、EFPIA Japan

わが国においては、ワクチン等生物学的製剤の品質に係る基準が生物学的製剤基準（生物基）に記載され、品目ごとにワクチンの品質を確保するための試験法が規定されてきた。また生物基は、科学技術の進歩などにあわせ幾度となく改正され、わが国における品質の高いワクチンの供給に重要な役割を果たしてきた。しかし、医薬品産業がグローバル化していく中、ワクチン等生物学的製剤の品質確保の考え方についてもグローバル基準で考える時期にきたのではないかとの意見もある。2005年厚生労働省血液対策課により発行されたワクチン産業ビジョンでも、「ワクチンに係わる生物学的製剤基準等を国際的に調和することによるメリットがあるものは、一層整合の取れたものとする努力を継続する」と謳われている。生物基の国際調和は、日本の国民に必要なワクチンを迅速に提供する、また、日本の優れたワクチンによる国際的な感染症対策への貢献を更に推進するという両方の観点から、重要な課題であると考えられる。そこで、ワクチンの品質基準の調和の可能性を探るために、国内外の専門家及びワクチンメーカーが参加し科学的な議論、意見交換を行なう国際的な講演会及びパネルディスカッションの開催を計画し、日本ワクチン産業協会、EFPIA Japan、PhRMA、製薬工業協会の代表の方とワーキンググループを作り、検討を開始した。

【資料 1】

研究会議準備打ち合わせ WG 会議議事録

開催日：11月18日

国立感染症研究所：村山庁舎 集会室 14:00-16:00

【議事要旨】

<出席者>長谷川(GSK)、椎名(アステラス)、福家(阪大微研)、加藤(感染研)

<欠席者>杉山(MSD)、池田(Baxter)敬称略

<日ワク協代理ご出席者の紹介>

通山さんの代理で同じ阪大微研会の福家さんが日ワク協会の代表として出席され自己紹介された。これまでの経緯を加藤から簡単に説明し、他のメンバーも自己紹介を行った。

<プログラムについて>

開催日が月曜日であることを考慮して、開始時間を 30 分繰り下げるという杉山さんの意見を採用することになった。第一部は座長 長谷川さん(GSK)、4名の演者 2時間(30分 x 4)を 10:00~12:30の枠でやりくりする。余った時間は昼食時間に加える。第二部は座長 杉山さん(MSD)、4名の演者 2時間を 13:30~16:00の枠でやりくりする。余った時間を休憩時間とする。第三部は座長 加藤(感染研)で、16:00~17:30の枠でやりくりする。というように以降の時間配分は変更せず、全体に 30分遅れて進行させることにした。通訳さんの分担を 12:00で区切ると、午後が長くなるのでどこで区切るかは長谷川さんに調整していただくことになった。

通訳と発表者との連絡について、当日の朝だけでは足りないことが指摘された。発表者には 2月2日の木曜日までに発表原稿を送ってもらい、それをあらかじめ通訳さんにお見せしておき、当日の朝は顔合わせ、注意事項の伝達、原稿の変更点があった場所の確認のみに使うことが申し合わされた。プレゼンテーションにおいては上映するのは日本人は日本語、外国人は英語(つまりオリジナル)だけで良い。日本人はスライドの英語を見て理解はできるが、その逆は難しい。そこで日本語で講演する演者のプレゼンテーションハンドアウトを英文にして海外演者の方にお渡しする。

第三部の内容について、時間が長過ぎ世話役が話題投入、隠し球など議論が冷えないように苦慮することも想定され、一時間半枠を一時間にすることも提案されたが、今回の会議では第三部が重要であるとの認識から、当初案通りの時間枠となった。

生物学的製剤基準の検討する切り口の資料が長谷川さんから出され、それについて説明された。前回

の会議でも生物学的製剤基準の位置づけを議題に上げてはどうかとの案があったが、登壇者の中に、規制当局側の人がないので、議論がかみ合うかどうか不明であるため、現在のプログラム案になったことが加藤より説明された。

生物学的製剤基準の在り方に関する議論は関係者以外の聴衆、あるいは海外からの参加者には理解されにくいことが危惧されるので、現状の説明が必要あるとの意見が出された。

登壇者については、感染研から3名(渡邊所長、浜口部長、加藤)、医薬品総合機構から1名(三宅さん)、William M. Egan、Cecile Ponsar、PhRMA から古屋さん(MSD)、EFPIA から池田さん(Baxter)あるいは長谷川さん(GSK)の8名を考えた。日ワク協さんは、今回は登壇しないが、会場から聴衆として参加することが確認された。

<ポスター等周知方法について>

日薬協さんの”プレイズネット”については、加藤が椎名さんを引き合いに出して、掲載の許可を申し出る事になった。ポスターについてはワクチン学会の住所録を中心に発送する案に反対意見はなかった。ポスター最終案をWG内のメール連絡で確認の後、印刷に出すことになった。

周知に関して、単純に申し込み順にせず、「会場の広さが限られておりますので、同一事業所から多数のお申し込みがある場合にはお断りする場合があります」の但し書きをつけることが提案された。日刊薬業WEBについては杉山さんが調べてみることになった。

Post Meeting Note: 日刊薬業よりお返事頂きました。「「開催」欄への告知掲載ですが、日刊薬業編集部あてにリリースをお送りください。他社様からも毎日、同様の依頼を多数いただいております。料金は頂いておりませんがデスク判断で掲載しております。」→ PRAISE-NET への掲載文書を日刊薬業にも送付することで、掲載して頂ける可能性あり。(杉山)

<次回の会議>

12月9日金曜日 18:00 から 感染研戸山庁舎第一会議室にて開催

以上

【資料2】

研究会議準備打ち合わせ WG 会議

開催日 12月09日

国立感染症研究所 戸山庁舎 共用第2会議室

18:00～20:30

出席者：長谷川(GSK)、椎名(アステラス)、通山(阪大微研)、
杉山(MSD)、池田(Baxter)、加藤(感染研) 敬称略

議題：

(1) 会議の周知方法について

- プレイズネットについては、椎名様さん、杉山さんのご助力によりすでに Web 上に掲載されている。同じくネット上での周知方法として、日刊薬業 Web、東薬業、ヒューマンサイエンス、薬学会ファルマシア Web に”お知らせ”という形で載せてもらうことが提案された。その際に、感染研の HP に公開講演等としてアップされていると、リンク先を示すだけなのでやりやすい。感染研の該当部署に加藤から問い合わせているが、簡単にはいかないかもしれない。EFPIA Japan あるいは、日ワク協さんの HP では、どうかという話も出たが、詳細は不明のため結論は出なかった。
- ポスターについては7日(水曜日)に印刷会社さんに加藤から依頼した。13日にはゲラ刷りができあがる予定である。ワクチン学会の会員配布用に100部頼んだが、これに加えて協力団体内でも100部(1団体あたり20部)を掲示していただくことにし、200部にすることした。
- メール受付方法について、申し込み者の立場にたってみればメールを受け取ってもらえたかどうか心配になるので「申し込みありがとうございます」の仮受付返信メールをすることになった。
- 仮受付後は一覧表を作成して人数把握を行い、追加のアナウンスの必要性、あるいは、申し込み完了の通知のタイミングを探ることにした。これに関しては、杉山さんに事務局から応募状況をお知らせすることで対応していただくことにした。

(2) テーブルディスカッションのテーマについて

- 前回までに話し合った内容では、一方的に日本のシステムはこうだから理解してくださいで終わることが懸念され、協力団体の本意が伝わらない可能性がある。そこで、前回の WG 会議では生物学的製剤基準の問題点と改善方法について提案し、テーブルディスカッションでの話題の膨らまし方を提案した。
- EFPIA Japan から改めてテーブルディスカッションのテーマを提案してもらった。
 - 欧米の NRA と NCL の立場とわが国の厚生労働省と感染研の立場
 - 10月20日 WG 会議で決定した1番目テーマ名と同じであるが、話の進め方について提案があった。