

Bibliography

WHO requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-third report. Geneva, World Health Organization, 1994 (WHO Technical Report Series, No. 840, Annex 2).

WHO guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-second report. Geneva, World Health Organization, 2004 (WHO Technical Report Series, No. 924, Annex 4).

WHO recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-sixth report. Geneva, World Health Organization, 2007 (WHO Technical Report Series, No. 941, Annex 4).

Recommendations of the 14th International Conference of Drug Regulatory Authorities (ICDRA), Singapore, 30 November–3 December 2010. WHO Drug Information Vol. 25, No. 1, 2011 (<http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/en/index.html>).

Resolution WHA63.12. Availability, safety and quality of blood products. In: Sixty-third World Health Assembly, Geneva, 17-21 May 2010, Volume 1, Resolutions. Geneva, World Health Organization, 2010 (WHA63/2010/REC/1).

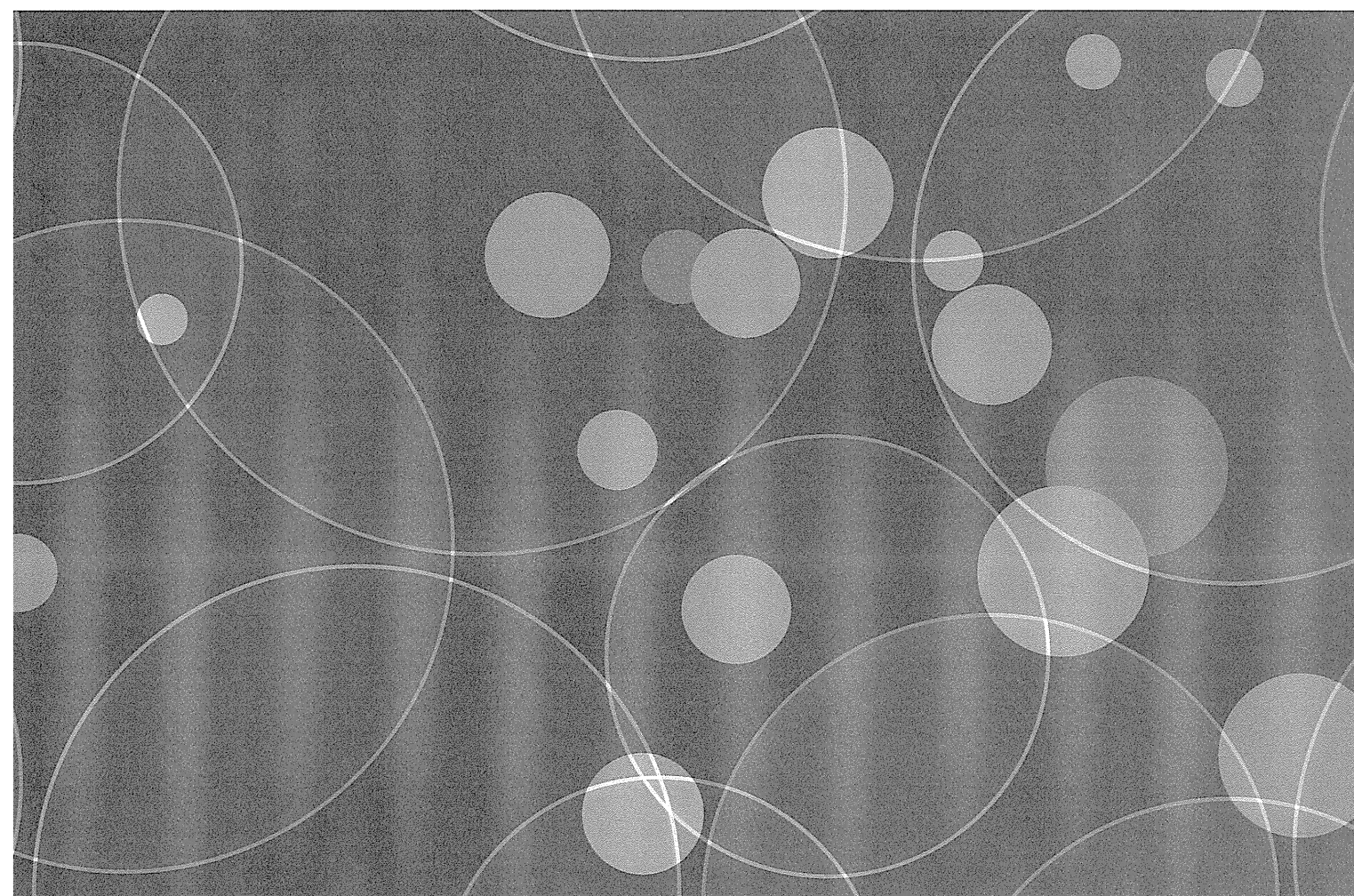
WHO good manufacturing practices for blood establishments. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-fifth report. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO Technical Report Series, No. 961, Annex 4).

WHO good manufacturing practices: main principles for pharmaceutical products. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-Fifth Report Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO Technical Report Series, No. 961, Annex 3).

Supplementary guidelines on good manufacturing practices: validation. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fortieth Report. Geneva, World Health Organization, 2006 (WHO Technical Report Series, No. 937, Annex 4).

WHO good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-Fifth Report Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO Technical Report Series, No. 961, Annex 6).

Catalogue of the WHO International Biological Reference Preparations: blood products and related substances (<http://www.who.int/entity/bloodproducts/catalogue/en/index.html>).



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制度の抜本的改正に関する研究

分担研究報告書

国家検定の見直し－細菌製剤の観点から DPT-sIPV における百日せきワクチンのマウスヒスタミン増感試験の 規格値についての検討

研究分担者	柴山 恵吾	(国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
研究協力者	久保田 眞由美	(国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官)
研究協力者	蒲地 一成	(国立感染症研究所・細菌第二部・室長)

研究要旨

我が国における百日せきワクチンは、1949年に百日せき全菌体ワクチン(wP)として導入され、その後、ジフテリアトキソイドを混和した2種混合ワクチン(DP)、さらに破傷風トキソイドワクチンを混合した3種混合ワクチン(DPT)が使用されてきた。これらのワクチンにおいては「マウスヒスタミン増感試験」は設定されていなかった。1981年になり、百日せき菌の防御抗原を含む「沈降精製百日せきワクチン(aP)」および「沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン(DaPT)」承認され、その際に百日せきワクチンの主要な防御抗原である Pertussis Toxin (百日咳毒素) が完全に不活化されていることを確認する「マウスヒスタミン増感試験」が導入され、規格は 0.8 HSU/mL 以下とされた。1991年には、より高感度に毒性を評価するため加温した検体についても同試験を実施することとされ、生物学的製剤基準(生物基)におけるマウスヒスタミン増感試験の規格値は 0.4 HSU/mL 以下とされた。2012年に4種混合ワクチン「沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ(セービン株)混合ワクチン(DPT-sIPV)」が承認された。承認前検査のマウスヒスタミン増感試験では、DPT-sIPVの加温検体が現行のDPTに比較して高い値を示す傾向があった。メーカーの試験成績も合わせて検討が行われ、生物基において加温検体及び非加温検体いずれも規格値は 0.8 HSU/mL 以下と設定された。規格値の上限を引き

上げる形となったため、その値の妥当性については科学的な見地からの検討を続けることになった。今般、ワクチンの承認は迅速性が要求されるようになり、承認前検査を実施する期間が今後ますます短くなると予想される。ワクチンのより適切な規格値の設定のために、承認後であっても科学的な検証を行い、必要に応じて規格値の改定を行うことが柔軟に実施されるべきと考えられる。

A. 研究目的

DPT-sIPV (沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ (セービン株)) の承認前検査で、マウスヒスタミン増感試験の結果が従来の DPT 製剤に比べて高い傾向にあることが分かった。この研究では、マウスヒスタミン増感活性を上昇させる要因を探るとともに、DPT-sIPV で設定された規格値 0.8HSU/ml の妥当性を再度検討することを目的とした。製剤の構成成分である DPT および sIPV の原液組み合わせ液を作製し、マウスヒスタミン増感試験を行って、混合による試験結果への影響があるのかどうか確認することとした。

B. 研究方法

マウスヒスタミン増感試験の検体となる DPT-sIPV の原液を下記に記す：

一般財団法人 阪大微生物病研究会

濃厚沈降精製百日せきワクチン原液

濃厚沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド原液

濃厚沈降不活化ポリオワクチン原液

一般財団法人 化学及血清療法研究所

精製百日せきワクチン原液

沈降ジフテリアトキソイド単味原液

沈降破傷風トキソイド単味原液

3 価混合不活化ポリオワクチン原液

方法：

1. 混合による影響の解析：小分け製品濃度に調整したワクチン原液を各種組み合わせ (IPV, DPT, DPT+IPV 等)、マウスヒスタミン増感試験を行い、混合による試験結果への影響の有無を調べる。この結果において各接種群に統計学的有意差が認められなかった場合は追試を行うこととする。
2. 容量依存性の試験：上記 1. でマウスヒスタミン増感活性が高く出た場合、混合したことが実際にマウスヒスタミン増感活性を上昇させる要因となったのかどうかを明らかにするため、各試験液を 2 濃度に設定し容量依存性を確認する。この結果において各接種群に統計学的有意差が認められなかった場合は追試を行うこととする。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所動物実験実施規程にしたがって、国立感染症研究所動物実験委員会の承認のもと、動物福祉に

配慮して行った。

C. 研究結果

現在までにメーカーから検体の提供を受けた。今後試験を順次実施して行く予定である。

D. 考察

【マウスヒスタミン増感試験のこれまでの経緯】

全菌体ワクチン導入期：我が国における百日せきワクチンは、1949年に百日せき全菌体ワクチン（wP）として導入されたが、マウスヒスタミン増感試験は設定されなかった。別途測定によりマウスヒスタミン増感活性は5 HSU/mlであることを確認している。

混合ワクチン導入期：その後、全菌体ワクチンにジフテリアトキソイドを混和した2種混合ワクチン（DP）、破傷風トキソイドワクチンを混合した3種混合ワクチン（DPT）が導入されたがマウスヒスタミン増感試験は設定されていなかった。

精製ワクチン導入期(1)：1981年、菌体成分を精製した「沈降精製百日せきワクチン（aP）」および「沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン（DaPT）」へと移行した。百日咳毒素の毒性復帰を評価するため

にマウスヒスタミン増感試験が導入された。試験はまず非加温検体で実施された。精製百日せきワクチンのマウスヒスタミン増感活性の規格値は0.8 HSU/mLと規定された。

精製ワクチン導入期(2)：精製百日せきワクチンの導入当初は、マウスヒスタミン増感活性が全菌体ワクチンの1/10とすることを目標とした。しかし導入時に設定された規格0.8 HSU/mLは、1/10を超えていた。そこで、国立予防衛生研究所が精製百日せきワクチンの過去10年の検定成績を解析し、規格値を0.4 HSU/mLに引き下げても当時の製品で問題とならないことを確認した（第4回DPTワクチンによる副反応軽減に関する研究会、1989年）。その結果をもとに、1991年にはマウスヒスタミン増感試験の規格値が0.8 HSU/mLから0.4 HSU/mLに引き下げられた。同時により高感度に毒性復帰を評価するために加温検体についても試験を行うこととされた。

4種混合ワクチン導入期：生物基の一部改正（平成24年7月27日付）により、「沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ（セービン株）混合ワクチン」の一条が加えられ、臨床試験と承認前試験の結果から、加温検体及び非加温検体いずれも「マウスヒスタミン増感活性は0.8 HSU/mL以下でなければならない」とされ規格値の上限が引き上げられた。

【マウスヒスタミン増感試験の現状】

2011年度申請された「沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ（セービン株）混合ワクチン（DPT-sIPV）」の承認前試験では、参照百日せきワクチン（毒性試験用 Lot 3）に対する相対活性としてマウスヒスタミン増感活性を求めた。参照品の希釈 2.5 倍間隔でのマウスヒスタミン増感活性は、加温検体の全 5 ロットで現行 DPT の規格値 0.4 HSU/ml を超えていた。参照品の希釈 3 倍間隔の場合は、加温検体の 1 ロットのみが規格値 0.4 HSU/ml を超え、加温検体の 2 ロットが 0.32 HSU/ml であった。このように、DPT-sIPV 承認前検査の加温検体では、非加温検体に比較して高いヒスタミン増感活性が確認されている。

感染研では DPT のマウスヒスタミン増感試験における参照品の希釈は 2.5 倍間隔で行ってきたが、製造所が実施している当該試験の希釈倍率との整合性に鑑み、DPT-sIPV のマウスヒスタミン増感試験では参照品の希釈を 4 倍間隔に変更した。現在までに DPT-sIPV の 10 ロットについて国家検定を実施し、全てが DPT-sIPV の規格値 0.8HSU/ml に適合し、しかも DPT の規格値 0.4 HSU/mL を超える値を示したものはない。

【マウスヒスタミン増感試験の今後解決すべき課題】

承認前検査の DPT-sIPV の加温検体は、現行の DPT に比較して高いヒスタミン増感活性を示す傾向が認められた。この結果の再現性およびそれが混合による影響なの

かどうかを明らかにする必要がある。そのために、DPT-sIPV の 2 製造所（化血研、阪大微研）から分与された DPT-sIPV の原液を用い、単独あるいは組み合わせ液の非加温、加温の両方についてマウスヒスタミン増感試験を行う必要がある。これより、各原液のマウスヒスタミン増感活性に及ぼす影響の有無を知ることが出来る。

承認前検査の DPT-sIPV 製剤では、加温検体のマウスヒスタミン増感活性が規格値 0.8 HSU/mL は超えなかったものの現行 DPT の規格値 0.4 HSU/ml を超えた。一方、国家検定として出検された DPT-sIPV ではこれまで 0.4 HSU/mL を超えたものはない。生物基の規格値 0.8 HSU/mL が妥当であるかを検討するには、上記で述べたような混合の影響の有無、試験における希釈の方法の影響に加え、これから製造されるロットの試験結果のトレンドを解析する必要がある。

E. 結論

マウスヒスタミン増感試験は、百日せきワクチンの品質管理を担う特異的安全性試験として、防御抗原である百日咳毒素(PT)の不活化が完全であるか否かを確認する試験である。生物基における当該試験の規格値は、現行の 3 種混合ワクチン「沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン(DaPT)」が 0.4 HSU/mL 以下であるのに対し、2012 年より接種が開始された 4 種混合ワクチン「沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ（セービン株）混合ワクチン(DPT-sIPV)」では 0.8 HSU/mL 以下に

引き上げられた。この規格値の妥当性について科学的に再検証して、今後より適切な規格値を提示していく予定である。

今般、ワクチンの承認は迅速性が要求されるようになり、承認前検査を実施する期間が今後ますます短くなると予想される。より適切な規格値の設定のために、承認後であっても科学的な検証を行い、必要に応じて規格値の改定を行うことが柔軟に行われるべきと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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 なし

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制度の抜本的改正に関する研究

分担研究報告書

国家検定と製造販売後調査の連携

研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部・部長）

研究協力者：伊藤睦代（国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官）

林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部・室長）

研究要旨：ワクチンの製造販売後調査において国立感染症研究所として今後どのような協力・連携が可能であるのかについて検討を行った。現在、医薬品・医療機器等安全性情報報告制度により集積されるワクチン等の副作用情報は医薬品医療機器総合機構によって、ワクチンの製造および試験結果に関する情報は国立感染症研究所によって別々に収集・解析が行われているが、両方の情報を統合的に解析することにより、副作用症状の原因究明および製剤の品質保証の面において有益な情報が得られる可能性がある。また、感染症における専門性を生かして、感染症の関与が疑われる事例の調査・解析に協力することも重要な役割であると考えられた。今後、様々な問題にも配慮しながら国立感染症研究所としての特性を生かした連携を可能とする制度設計が必要と考えられた。

A.研究目的

現在、副作用情報の情報収集・および解析は独立行政法人医薬品医療機器総合機構（以下総合機構とする）が行っており、特に重大な事例において検定試験の結果の検証が必要な場合のみ総合機構からの求めに応じて国立感染症研究所（以下感染研とする）からの情報提供が行われている。サマリーロットプロトコル（SLP）審査制度の実施に伴い、感染研にはワクチンの製造に関するより詳しい情報が集積されることとなり、ワクチンの副作用情報の解析結果と各製剤の製造および試験情報とを統合的に

解析することは、製剤の品質管理において有益であると考えられる。また、感染研はワクチン等の国家検定実施機関であるとともに感染症に関する専門集団でもある。これらのことから、ワクチンの製造販売後調査において感染研として今後どのような協力・連携が可能であるのかについて検討を行った。

B.研究方法

各種文献およびウェブサイト等を通じて、(1)日本の有害事象報告制度 (2) 諸外国の有害事象報告制度の現状について調査を行

った。次に(3) SLP 情報および副作用情報の相互利用の利点および問題点について整理した。これらの結果を踏まえ、ワクチンの製造販売後調査において今後どのような協力・連携が可能であるのかについて考察した。

(倫理面への配慮)

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意を必要とする研究、実験動物を用いる研究等、倫理面への配慮が必要な研究は行わない。

C.研究結果

(1) 日本の副作用情報報告制度の現状

日本では、企業による報告制度が昭和55年に薬事法制化されたのに続き平成15年に「医薬品・医療機器等安全性情報報告制度」として、医療品による副作用、感染症及び医療機器の不具合の情報を医療関係者等が直接厚生労働大臣に報告する制度が法制化された。これにより、ワクチンによる副反応の報告は一元化して厚生労働省に行うこととなった。さらに、患者からの直接報告については総合機構のウェブサイトにおいて現在試行中である。報告された副作用情報は総合機構が整理・解析を行い、必要に応じて詳細調査が行われる。また、平成17年からは、感染症に関する報告については、重篤度にかかわらずすべての症例を報告対象とすることに改められている。

(2) 諸外国の副作用等報告制度の現状

日本および諸外国の有害事象および副作用*報告制度について参考資料2にまとめた。

*有害事象：医薬品が投与された患者または被験者に生じたあらゆる好ましくない医療上のできごと。副作用は有害事象のうち当該医薬品との因果関係が否定できないものをいう。

1. 米国 (USA)

市販後安全性監視プログラムとしてはワクチン有害事象報告システム the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS)がある。これは、疾病管理予防センター (CDC) と食品医薬品局 (FDA) によって1990年に設立されており、ワクチン関連のみの有害事象の報告制度であるが、毎年約30,000件が報告されている。これらの有害事象のうち13%が特に深刻な副作用である。患者からの直接報告制度もあり、サイトは分かりやすく整備されている。

2. ヨーロッパ連合(EU)

EUでは2001年から各国の担当局をとおしてEU内の市販後副作用報告をEudraVigilanceというウェブベースの副作用情報システムに統合してきました。これは欧州医薬品庁(EMA)によって運用されており、今後直接報告制度の導入等、その役割が強化される予定である。現在は医療関係者からの報告のみを受け付けているが、患者からの報告制度の導入も検討されている。

3. 英国(UK)

英国ではYellow Card Schemeという制度が1964年から英国医薬品庁(MHRA)によって運用され、年間約25,000件の副作用情報が報告されている。多患者からの直接報告制度も2008年から始まっており、VAERS同様にサ

イトは分かりやすく整備されている。

(3) SLP 製造情報および副反応情報の相互利用の利点および問題点

1. 利点

平成24年10月1日より SLP 審査制度が施行された。このことにより感染研にはこれまでの自己試験記録と比較してより詳細な製造に関する情報が集積することとなった。製剤の均質性の変化や一部変更および軽微変更に伴い、その製剤による副作用の頻度に変化していないかについて、副作用情報と SLP の情報を統合的に解析することは副作用の原因究明だけではなく、製品の品質管理においても重要な情報が得られることが期待された。

2. 問題点

副作用情報には患者の個人情報、SLP には製造販売業者の機密情報が含まれることから両情報の相互利用には高度なセキュリティ上の配慮が必要となるであろう。また、人員の削減によって職員の負担が増加するなかで、誰がこれらの情報の解析を担当するのも問題であろう。担当者には各製剤の知識に加え、疫学および統計解析の知識も必要となるであろう。

D. 考察

近年、副反応報告制度の見直し等により、副作用報告の一元化や総合機構による情報の整理・調査が行われることになった。また、今後患者からの報告制度の導入により、報告数および情報量の大幅な増加が見込まれる。このように、日本の副作用報告制度

は米国や英国のシステムと同等になりつつある。一方、SLP 審査制度の導入により感染研には各製剤・ロットの詳細な製造情報が集積することになった。これらの情報を統合的に解析・評価することは、製剤の品質保証においても有益となると考えられる。具体的には特定のロット等に副作用が集積している場合に、SLP に記載された当該ロットの各種パラメーターのトレンド解析を行うことで、特に品質管理に重要な評価パラメーターを見つけることが出来ると予想される。

また、感染研の研究機関としての特性を生かし、感染症の疑いのある事例について総合機構が調査を行う際に専門家を派遣し、原因の究明に協力することも可能と思われる。しかしながら、実現に向けては情報セキュリティおよび人員の不足等も含めた問題を考慮した上での制度設計が必要と考えられる。米国では CDC と FDA が共同で VAERS を運営しており、これまでに多くの成果を上げていることから、VAERS における FDA と CDC の連携の方法は参考となると思われる。

今後、総合機構および厚生労働省と協議しながら、適当な連携のありかたを検討していく必要があると考えられる。

E. 結論

SLP 製造情報および副作用情報の統合的な解析・評価によって、副作用症状の原因究明および製剤の品質保証の面において利点があると考えられる。また、感染症および製剤の専門家として、個別事例の解析に関与することも重要な役割であると考えられる。実現に向けては米国 VAERS 等を参

考に、様々な問題点にも配慮しながら国立感染症研究所としての特性を生かした連携を可能とする制度設計が必要と考えられた。

年 11 月

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Fukushi, S., Nakauchi, M., Mizutani, T., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods* 180:68-74, 2012
2. Yoshikawa, T., Morikawa, S., Saijo, M.: Emergence of zoonotic orthopoxvirus infections. In “Viral Infections and Global Changes” edited by Singh, SK, John Wiley & Sons, in press

2) 学会発表

1. 吉河智城, 飯塚愛恵, 谷英樹, 福士秀悦, 倉根一郎, 西條政幸, 森川茂. 細胞培養痘そうワクチンの製造株であるワクチニアウイルス LC16m8 の親株 LC16m0 の遺伝子安定性. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会, 横浜, 2012 年 11 月
2. 伊藤 (高山) 睦代, 中道 一生, 林 昌宏, 山口 (木下) 一美, 垣内 五月, 王 麗欣, 倉根 一郎, 西條 政幸: 乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン国家検定法における 3Rs の導入, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012

参考資料 1

	日本	USA	EU	UK
制度	医薬品・医療機器等安全性情報報告制度	the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS)	EudraVigilance	Yellow Card Scheme
報告対象者	医療関係者 *	医療関係者, 患者および患者の家族	医療関係者	医療関係者, 患者および患者の家族
URL	http://www.info.pmda.go.jp/info/houkoku.html または http://www.info.pmda.go.jp/ippan.html	http://vaers.hhs.gov/index	http://eudravigilance.ema.europa.eu/human/index.asp	http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/Howwemonitorthesafetyofproducts/Medicines/TheYellowCardScheme/index.htm
報告方法	電子申請 FAX 郵送	電子申請 FAX 電子メール 郵送	電子申請	電子申請 郵送 電話
対応部署	PMDA	FDA/ CDC	EMA	MHRA
その他	現在患者からの副作用報告制度の試行を行っている。 (http://www.info.pmda.go.jp/fukusayou_houkoku/fukusayou_houkoku_attention.html)		2012 年から EU 全土の情報を一元化して管理。 将来的には患者からの報告制度を運用予定。	

(略語)

PMDA : Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

FDA: the Food and Drug Administration

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

EMA: European Medicines Agency

MHRA: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency

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制度の抜本的改正に関する研究

分担研究報告書

国家検定の意義

－ B型肝炎ワクチンの *in vivo* 試験から *in vitro* 試験への移行について－

研究分担者：脇田隆宇（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究協力者：石井孝司、清原知子（国立感染症研究所ウイルス第二部第五室）

研究要旨： B型肝炎ワクチンの力価検定は、検定対象ワクチンと、臨床的に有効と評価された承認ワクチンとの Consistency を保証するものである。

日本の国家検定及びワクチンメーカーの自社検定は *in vivo* 試験を実施しているが、海外では *in vitro* 試験も承認されている。*in vivo* 試験は多数のマウスを必要とし、動物の馴化期間・免疫期間を含めて6週間以上かかるが、全メーカー共通の参照ワクチンを用いて一律に力価を測定・評価できる。一方の *in vitro* 試験はワクチンに含まれる抗原量を測定する方法で、短期間で実施できる反面、抗原の特性（遺伝子型、製造法等）の影響が大きく、メーカー別の参照ワクチンを設定する必要がある。本研究では、*in vitro* 試験の確立と *in vivo* 試験と *in vitro* 試験の相関の検討を行った。*in vitro* 試験は2法（Binding ELISA と Inhibition ELISA）を行い、いずれも適用可能と判断した。*in vivo* 試験と *in vitro* 試験の相関については、メーカーによる違いが認められたが、まだ例数が少なく、さらに検討を進める必要がある。

A. 研究目的

現在、我が国ではB型肝炎ワクチンの国家検定として力価試験と異常毒性否定試験が定められている。このうち力価試験は動物 (*in vivo*) 試験を行っている。これはマウスにワクチンを接種し、産生された抗HBs抗体をELISA法などで測定する方法

である。一方、欧米では *in vivo* 試験に替わって試験管内 (*in vitro*) 試験が採用、または併用されている。*in vitro* 試験はワクチンに含まれるHBs抗原量をELISA法などで測定するものである。B型肝炎ワクチンの需要増加に対応した検定の効率化、動物愛護の観点からも可及的速やかな *in vitro* 試験

の導入が臨まれる。

これまで国内流通ワクチンに適した *in vitro* 試験法について検討を重ね、*in-house* 試験法を確立した。本研究では *in vivo* 試験と *in vitro* 試験の相関の検討を目的とする。また、本研究に伴う問題点や改善方法等についても検証していきたい。

B. 研究方法

材料：メーカー別は無処理の市販ワクチン、60°C 10 日間加温処理した低力価ワクチンを作成した。

<検体>

P3：参照沈降B型肝炎ワクチン。*in vivo* 試験のリファレンスワクチン。

AR：メーカーAの市販ワクチン。*in vitro* 試験のリファレンスワクチン。

AS：メーカーAの市販ワクチン。ARとは別ロット。

AL：ASを加温処理した低力価ワクチン。

BR：メーカーBの市販ワクチン。*in vitro* 試験のリファレンスワクチン。

BS：メーカーBの市販ワクチン。BRとは別ロット。

BL：BSを加温処理した低力価ワクチン。

方法：各検体について *in vivo* 試験、*in vitro* 試験を実施し、リファレンスワクチンに対する相対力価を算出した。

<*in vivo* 試験>

国家検定法と同様に行った。2 倍階段希釈した検体を 5 週令の Balb/c マウスに接種した。マウスは一群 16 匹で各検体 4 希釈群

を用いた。5 週間後採血し、抗体陽性数をプロビット法で処理して P3 に対する AS、AL、BS、BL の *in vivo* 相対力価を算出した。

<*in vitro* 試験>

Binding ELISA：検体にアジュバント除去処理を加え遊離した HBs 抗原を回収した。これを階段希釈して抗 HBs ポリクローナル抗体を固相化したプレートに吸着させ、抗 HBs モノクローナル抗体(2種類混和)、抗マウス IgG 標識抗体で検出した。OD 値をもとに、平行線定量法でARに対するAS、AL、BRに対するBS、BLのBinding ELISA相対力価を算出した。

Inhibition ELISA：検体を階段希釈して中和抗体(抗HBsヒト抗体。市販の抗HBs人免疫グロブリン製剤を使用)と混和した。余剰の中和抗体を回収し、これをHBs抗原固相化プレートに吸着させ抗ヒトIgG標識抗体で検出した。OD値をもとに、平行線定量法でARに対するAS、AL、BRに対するBS、BLのInhibition ELISA相対力価を算出した。

プロビット法、平行線定量法は生物統計ソフト「バイオアッセイアシスト」を用いた。

<Binding ELISA と Inhibition ELISA の比較>

各測定法を複数回繰り返し、標準偏差を比較した。

<*in vivo* 試験と *in vitro* 試験の比較>

AS、BSの相対力価を100%としたそれぞれの低力価ワクチンAL、BLの相対力価減少率で比較した。

(倫理面への配慮)

本実験で実施した動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

<Binding ELISA と Inhibition ELISA の比較>

Binding ELISA の方が Inhibition ELISA よりばらつきが少なかった (図 1)。

A シリーズは Binding ELISA も Inhibition ELISA も近似した結果が出たが、B シリーズは Binding ELISA よりも Inhibition ELISA の方が高い値になった。この傾向は低力価ワクチンでより顕著であった。

<*in vivo* 試験と *in vitro* 試験の比較>

A シリーズの相対力価減少率は *in vivo*、Binding ELISA、Inhibition ELISA の順に 7.6%、58.3%、64.6%であった。B シリーズは 52.9%、74.8%、54.2%であった (図 2)。

D. 考察

Binding ELISA も Inhibition ELISA も *in vivo* 試験として適用可能である。B シリーズで Binding ELISA 相対力価が Inhibition ELISA に比較して低く出る傾向については検体数を増やして詳細に検討する必要がある。

in vivo 試験と *in vitro* 試験の相関はメーカーによる違いが見られた。AL は Binding ELISA と Inhibition ELISA による相対力価減少率はどちらも約 60%で抗原量の半減が示唆されたが、*in vivo* 試験では 7.6%

で、ほぼ失活が認められなかった。*in vivo* 相対力価が高いにも関わらず *in vitro* 試験では低く評価されるおそれがある。一方の BL は *in vivo* 相対力価減少率は 52.9%、Inhibition ELISA による相対力価減少率は 54.2%で相関が認められた。しかしながら Binding ELISA による相対力価減少率が 74.8%と解離していた。今回は各メーカー1ロットずつの市販ワクチンとその低力価ワクチンを用いたテストトリアルである。今後それぞれのメーカーについて複数ロットで試験を行い、メーカーの特性に応じた試験法の選択、*in vivo* 試験の合格範囲の設定、*in vitro* 試験ではカバーできない免疫原性の検証を補う試験の追加、リファレンスの条件設定につなげていきたい。

国家検定における力価試験は個々のワクチンの評価ではなく、臨床的に有効と評価された承認時のワクチンとの Consistency を保証することを目的としている。新たに製造されたワクチンが承認時ワクチンと同じ条件で作られていることはサマリーロットプロトコール及びGMP査察で確認する。*in vivo* 試験は抗体産生能を、*in vitro* 試験は抗原量を Consistency のモニタリングパラメータとするものである。この2つのパラメータが相関しているか、抗体産生能が高いものは抗原量も高く、低いものは低く出ることを確認することは、試験法の移行に於いて重要である。しかしながら、複数ロットの試験を行う場合、*in vivo* 試験に多くのマウスを必要とする。P3をリファレンスとした *in vivo* 相対力価は国家検定で行

っており（検体 AS、BS に相当が、本研究では検定とは独立して試験を実施した）この結果を利用すると使用動物数を減らすことができる。しかし、現行ではレギュレーション分野も含めて検定結果の研究への応用は原則認められていない。B型肝炎ワクチンに限らず、多くのワクチンにおいて科学技術や環境の変化に応じて国家検定試験法の再検討が必要となる中、既存のデータを再利用することは有用である。

E. 結論

1) *in vivo* 試験法として Binding ELISA と Inhibition ELISA を検討した結果、いずれも適用可能であった。

2) メーカーによって *in vivo* 試験と *in vitro* 試験の相関に違いが認められた。

3) 今回は各メーカー1 ロットずつを用いたテストトライアルである。この検証方法でさらに複数のロットについて検討を続ける。

4) B型肝炎ワクチンはアジュバント製剤である。*in vivo* 試験は力価とともにアジュバントによる免疫賦活化効果も見ることができたが、*in vitro* 試験は抗原量の確認のみなので、この点をカバーする試験方法についても考慮する。

5) Recommendation to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines. (WHO, 2010)ではモニタリングパラメータとして *in vivo* 試験による力価試験が認められており、同時に、新しいB型肝炎ワクチンが承認された場合や製造工程の変更があった場合は *in vivo* 試験によるバリデーション実施が明記されている。*in vivo* 試験から *in vitro* 試験への移行とともに両試験の併用条件、技術維持等も検討が必要である。

チンが承認された場合や製造工程の変更があった場合は *in vivo* 試験によるバリデーション実施が明記されている。*in vivo* 試験から *in vitro* 試験への移行とともに両試験の併用条件、技術維持等も検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：清原知子, 脇田隆宇, 石井孝司. B型肝炎ワクチン力価測定法の比較. 第16回日本ワクチン学会, 横浜, 2012.11.

図 1 : Binding ELISA と Inhibition ELISA の比較

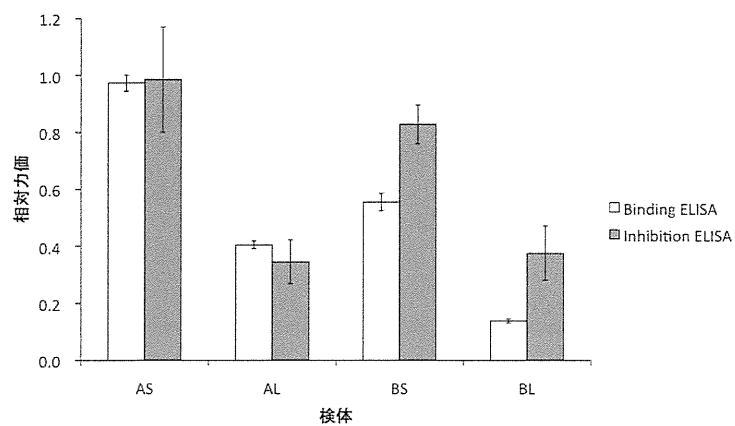
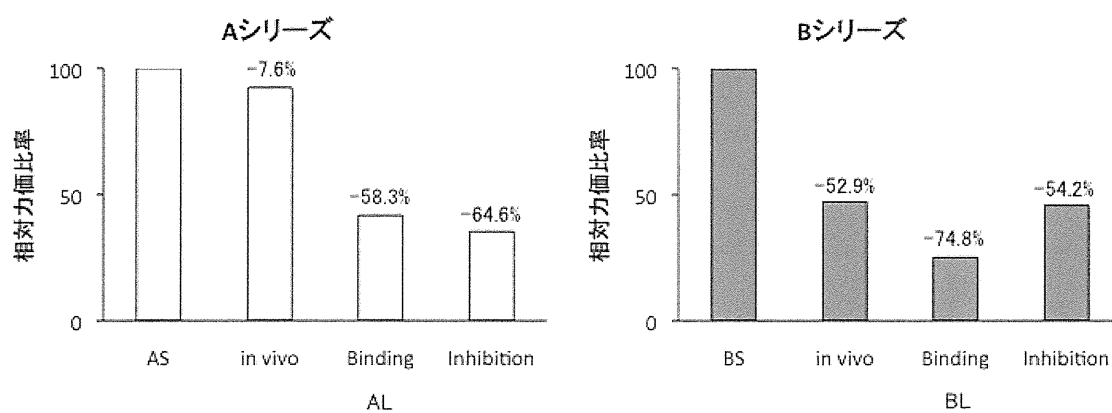


図 2 : *in vivo* 試験と *in vitro* 試験の比較



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制度の抜本的改正に関する研究

分担研究報告

国家検定の見直し - ウイルス製剤の観点から

研究分担者	竹田 誠	国立感染症研究所	ウイルス第三部
研究協力者	駒瀬勝啓	国立感染症研究所	ウイルス第三部
	森 嘉生	国立感染症研究所	ウイルス第三部
	木所 稔	国立感染症研究所	ウイルス第三部

研究要旨：平成24年10月1日からSLPを審査する制度が、わが国のワクチン製剤の国家検定制度に導入された。従来の全ロットに対する国家検定試験に加えて、本SLP審査制度が導入されたことによって、ワクチン製剤の品質がより一層保証されるものと考えられる。しかしながら、大幅な業務量の増大に対して感染研が充分に対応できない可能性が危惧される。また、近年、新規ワクチンの承認が進んでおり、現在のヒューマンリソースの不足下において、SLP審査の導入を、真に品質管理の向上につなげるためには、国家検定の各試験の意義、重要性、必要性を再検証し、合理的且つ抜本的な見直しが必要であると考えられた。本分担研究では、麻しん含有ワクチン製剤、風しん含有ワクチン製剤、ムンプス含有ワクチン製剤の国家検定試験に関して全ロット試験制度の見直しや、必須試験項目の再検討を行った。結果として、平成23年9月30日業務運営委員会にて承認された「国家検定試験項目の廃止に関する考え方」によると、今回詳細に検討した外来性ウイルス等否定試験の動物接種試験のみならず、他の試験項目でも検定試験を廃止することは難しいと考えられた。しかしながら、今後、SLP審査を実際に実施し、その効果を十分に評価し、加えて、今後、生物学的製剤基準が改訂され、麻しん含有ワクチン製剤、風しん含有ワクチン製剤、ムンプス含有ワクチン製剤の製造が、シードロットシステム化されることが保証されるのであれば、製剤に含まれるワクチン株の性質を確認する試験の国家検定からの試験項目の廃止も積極的に検討すべきであると考えられた。特に、ヒューマンリソースの不足下では、過重な業務が課された場合、全ての業務をとにかく期限内に完了させることだけに忙殺され、本来、十分な時間をかけて、慎重且つ徹底的に検討しなければならない、重要度の特に高い検討事項についても、従来ほどの注意を払うことが困難になることが懸念された。すなわち、自家試験ならびにSLPの精査で十分に品質が保証されると考えられ、科学的にも実績的にも国家検定によるダブルチェックの必要性が非常に低いと考えられる試験項目については、業務内容の合理化を進めることは、品質管理の質を向上させるためには、積極的に実施しなければならないことであると考えられた。

A. 研究目的

国家検定は、薬事法第43条に基づき実施され、わが国のワクチン製剤の品質を管理する上で、極めて重要な制度のひとつである。平成23年7月4日薬事法施行規則改正等が公布され（平成24年10月1日施行）、国際的には広く実施されているSummary Lot Protocol（以下、SLP）（製造・試験記録等要約書）を審査する制度が、わが国のワクチン製剤の国家検定制度に導入された。各ワクチン製剤の製造承認書とともに、各ロットの原材料や製造工程に関する詳細な情報、ならびに製造試験記録の情報が、National Control Laboratory（医薬品の規制に関わる試験等を行う国立の又はそれに相当する機関）としての機能を持つ国立感染症研究所（以下、感染研）に集積されることになった。従来の全ロットに対する国家検定試験の実施に加えて、SLP審査制度が導入されることによって、わが国のワクチン製剤の品質がより一層保証されるものと考えられる。しかしながら、一方、現実的な問題として、業務量の増大に対して感染研が充分に対応できない可能性が危惧される。また、わが国は現在、欧米先進国と比べて、定期接種とされたワクチンが少ないというワクチンギャップを抱えている。この問題の解消に向けて、近年、新規ワクチンの承認が進んでおり、感染研におけるヒューマンリソースの不足に拍車をかけている。ヒューマンリソースの不足下において、SLP審査の導入を、真に品質管理の向上につなげるためには、SLP審査導入下における、国家検定の各試験の意義、重要性、必要性を再検証し、国家検定における全ロット検定試験の合理的且つ抜本的な見直しが必要であると考えられる。本分担研究では、生ワクチン製

剤である、麻しん含有ワクチン製剤、風しん含有ワクチン製剤、ムンプス含有ワクチン製剤の国家検定試験の現状を分析し、これらワクチン製剤が開発された数十年前より画一的に実施されてきた全製剤・全ロット試験の制度の見直しや、必須試験項目の再検討を行う。

B. 研究方法

1. 必須国家検定試験項目の再検討（試験項目削減の検討）

SLPレビュー導入による国家検定試験のあり方についての諮問委員会（品質保証運営委員会、検定検査品質保証室）ならびに「国家検定試験項目の廃止に関する考え方」作成委員会で検討され、平成23年9月30日の生物製剤試験研究センター業務運営委員会にて承認された「国家検定試験項目の廃止に関する考え方」（参考資料1）を元に、現在、麻しん含有ワクチン製剤、風しん含有ワクチン製剤、ムンプス含有ワクチン製剤に実施されている試験項目の廃止に関する適合性の可否について検討する。

2. 全ロットに対する国家検定試験の実施見直しに関する検討

SLP審査の導入による製造過程や自家試験成績の精査が可能となったこと、ならびに各製剤のこれまでの国家検定試験成績の検討に基づき、リスク評価を行い、全ロットに対して試験を実施するのではなく、一定の頻度、あるいは、一定の基準をもとに試験頻度を設定することは、合理的であると考えられる。特に動物を用いる試験においては、自家試験で充分であると考えられる場合には、国家検定の試験項目から削減

することが、国際的な動物愛護の観点からも重要であると考えられる。SLP 審査を実施することにより、ロットの品質が担保され、全ロット試験ではなく、一定の頻度での国家検定試験の実施が適当と考えられる試験項目について検討する。

(倫理面への配慮)

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意を必要とする研究、実験動物を用いる研究等、倫理面への配慮が必要な研究は行わない。

C. 研究結果

1. 外来性ウイルス等否定試験の動物接種試験の「国家検定試験項目の廃止に関する考え方」の試験廃止への適合性について

麻しん含有ワクチン製剤、風しん含有ワクチン製剤、ムンプス含有ワクチン製剤の中間段階における検定試験項目を表1に示した。外来性ウイルス等否定試験のうち動物接種試験に関して、「国家検定試験項目の廃止に関する考え方」(参考資料1)に適合しうるかを検討した。

5.1. 試験結果の再現性

- 過去から現在における当該試験項目の検定成績と自家試験成績に高い相関性が認められる場合

製剤が販売されてから数十年、本動物接種試験による不合格例はない。数値として表せる試験ではないため、数値的な相関を示す事は困難。適合性△。

- 過去から現在における当該試験項目の試験合格率が高く、再試験率が低い場合

合格率は 100%である。ただし、手技が

難しい事、製剤によっては製剤にそもそも含まれる原材料によって致死の頻度が高く、試験成立に必要な個体数の確保のため再試験を行う場合がある。適合性○。

- 長期間、多数ロットにおいて連続して合格している場合

全て合格しているが、ロット数が多数とは言えない。適合性△。

5.2. 試験結果の安定性

- 過去から現在における当該試験項目の試験成績のばらつきが統計学的に極めて小さい場合

試験結果の判定基準が、「外来性の病原体による感染を示さない」「80%以上の個体が生き残る」など、統計処理に不相当であるため、統計処理にはそぐわない。適合性△。

- 製造シードの更新前後で、当該試験成績が統計学的に同等である

統計学的解析に十分な製造シードの更新回数が少ない上、試験結果の判定基準が、統計処理に不相当であるため、統計処理にはそぐわない。適合性△。

5.3. 製剤の性質

- 製剤に含まれる有効成分が科学的に同定されているか、あるいは含まれる不純物の組成が明確であり、常に安定して製造されている場合

有効成分は、科学的に同定されている。しかしながら、不純物の組成は基材となる培養細胞の成分を多く含んでおり、明確とは言えない。また、極めて微量の不純物(迷入ウイルス)を検出するための試験であり、合致しない。適合性×。