

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政策研究事業  
ワクチンの品質確保のための国家検定に関する研究

分担研究報告書

狂犬病ワクチン力価試験法における動物福祉倫理を考慮した改善

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：国家検定はワクチンの品質，有効性および安全性を確保する上で欠かせないものである。ワクチンの検定試験にはその性質上実験動物を用いる場合がある，しかしながら，近年動物愛護に考慮した試験法に変更していくことが求められている。乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの検定試験のうち，有効性を確認する力価試験では動物に大きな苦痛を与えることが問題となっている。そこで，我々は動物の苦痛の軽減を目的として，人道的エンドポイントの国家検定試験および自家試験への導入について検討を行った。さらに，動物数削減を目的として，群数の削減についての検討を行った。その結果，狂犬病ワクチンの検定試験および自家試験について，科学的な解析に基づき，動物福祉倫理に考慮した改善を行うことが出来た。

A. 研究目的

狂犬病ワクチンの検定試験では，力価試験，不活化試験，異常毒性否定試験において実験動物が使用されている。ワクチンの有効性を担保する力価試験は，NIH法と呼ばれる免疫変量法によって行われており，マウスに5倍段階希釈したワクチンを2回腹腔内接種した後に攻撃用狂犬病ウイルスを脳内接種し，その防御能をマウスの生死により確認する試験である。この方法は使用動物に著しい苦痛を数日（平均4日，最長9日）にわたり与えることが問題となっている。近年，検定試験においても3Rs（Reduction：使用動物数の削減、Refinement：動物が受ける苦痛の軽減、

Replacement：動物を使用しない代替法への置き換え）への対応が望まれている。我々はこれまで本試験法に死亡に替わる試験終了の指標（人道的エンドポイント）を導入し，早期に安楽殺を行うことで，動物の苦痛を軽減するための検討を行ってきた。そこで，人道的エンドポイントを国家検定試験および製造販売業者の行う自家試験に導入することを目的としてさらなる検討を行った。また，国家検定試験の現行SOPでは力価試験および攻撃ウイルス力価測定の2つの試験において5段階の希釈段階を用いることとなっている。しかしながら，生物学的製剤基準（生物基準）およびWHOでは4段階以上としている。このことから，こ

これらの試験について希釈段階の削減が可能であるかについて検討を行った。本報告書では、これらの動物福祉倫理を考慮した改善の取組みについて記載する。

## B. 研究方法

1) ウイルス：強毒の固定毒株である Challenge Virus Standard (CVS) 株を哺乳マウス脳で増殖させたストックウイルスを用いた。CVS 株を成熟マウスへの脳内接種した場合、マウスは神経症状を示して死亡する。

2) ワクチン：乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン（化学及血清療法研究所）を使用した。添付の説明書に従い注射用水 1 ml にて溶解してワクチン原液とした。

3) マウス：3 週齢の ddY マウス（メス）270 匹を日本エスエルシーより導入し、動物管理施設において 1 週間の馴化を行った後、試験に供した。

4) 力価試験：5 倍段階希釈した狂犬病ワクチン（5 倍、25 倍、125 倍、625 倍および 3125 倍）を 1 週間間隔で 2 回免疫し、さらに 1 週間後に脳内接種法によりマウスに攻撃用狂犬病ウイルス（25 LD<sub>50</sub>）を脳内接種した。各群 10 匹 - 20 匹のマウスを使用した。脳内接種後のマウスの症状をスコア表（表 1）に基づいて 2 週間記録した。また、毎日体重を測定し、接種当日の体重を 100% とした体重比を記録した。

5) 攻撃ウイルス力価測定（バックタイトルレーション）：力価試験において、攻撃ウイルスが適量であったかを確認するためのウイルス力価測定は以下の様に行った。攻撃ウイルスストックの 10<sup>-5</sup> から 10<sup>-9</sup> までの 10 倍段階希釈液を作製し、各段階 12 匹の

マウスに脳内接種し、ウイルス力価（LD<sub>50</sub>）を Reed and Muench 法により算出した。

6) 希釈段階削減の解析：力価試験 3 回、攻撃ウイルスの力価測定 5 回について、以下の様に解析を行った。各試験について 3, 4, または 5 群を用いた場合の参照ワクチン力価 (ED<sub>50</sub>) およびウイルス力価 (LD<sub>50</sub>) の結果について、Reed and Muench 法を用いて算出した。

（倫理面への配慮）本実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を受けて行った。また、所属機関の動物管理施設において適切な飼育管理を行った。

## C. 研究結果

1) 人道的エンドポイントの設定：力価試験および攻撃ウイルス力価測定におけるマウスの症状および体重の変化を図 1 に示した。マウスは 4 - 5 日後に被毛粗剛などの一般症状を示し、その後 6 - 7 日目より麻痺を示した後、死に至っていた。また、スコア 1 を示した後に回復する個体が 270 匹中 1 匹確認された。しかしながら、スコア 2 を示した個体は全てが死亡した。体重は通常 4 日目から減少を始め、6 - 7 日目には通常安楽殺の対象とされる 20% の体重減少に達することが分かった。体重について 10% 以上、15% 以上および 20% 以上の指標において解析したところ、10% 以上では 270 匹中 1 匹が回復したのに対し、15% および 20% 以上の体重減少を示した個体は全てが死亡した。死亡を指標とした場合と結果の一致する症状スコア 2 および 15% 以上の体重減少について、その苦痛軽減効果を比較した場合、死亡を指標とした場合に比べ優位に差がある一方、症状スコア 2 および 15% 以上の体

重減少の両者間に優位な差は見られなかった(図2)。

2) 製造販売業者との協議：上記の結果を踏まえ、製造販売業者(化学及血液製剤研究所)とワーキンググループを立ち上げて検討を行った。スコア2の症状について、ビデオ等も使用して判断基準について確認した。その結果表2に示すように、スコア2を指標とした場合と死亡を指標とした場合の結果は全て一致した。

3) 希釈段階削減の解析：表3および4に結果を示した。参照品の力価測定において3段階で力価を算出した場合、3回中1回の実験において5段階を用いた場合との結果の相違が見られた。しかしながら、4段階を用いた場合には参照品力価および攻撃ウイルス力価のどちらにおいても、結果に差は見られなかった。

#### D. 考察

狂犬病ワクチンの力価試験における人道的エンドポイントの指標について、症状および体重を指標として解析したところ、症状スコア2(麻痺)または15%以上の体重減少を用いた場合、従来の死亡を指標とする方法と比較して、試験結果に齟齬を生じることなく、大きな苦痛軽減効果を得られることが分かった。指標に体重を用いる場合には試験に用いる180匹のマウスを個体識別し、毎日体重を記録するという作業が必要となることから、現実的ではないと判断した。また、スコア2についての判断は比較的容易であるとの共通認識も得られた。そこで、スコア2を指標の候補として、製造販売業者とのワーキンググループで検討したところ、試験の結果が現行法と一致

することが示された。そこで、本検討結果について、検定協議会において報告したところ、生物基準を改定することが了承された。さらに、生物基準の通則35項(生物学的な試験法の規定は、試験の本質に影響のない限り試験方法の細部については変更することができる。)を適用し、生物基準の改定を待たずに導入を行うことが検定業務委員会において了承された。

希釈数削減については、4段階を用いた場合にも現行法と差が認められなかったことから、今後SOPを改定し、希釈段階を5段階から4段階に減らすこととした。

これらの動物福祉倫理を考慮した改善は検定試験の国際協調を図る上でも非常に重要な課題である。また、動物数の削減や代替法の導入は検定試験の合理化にも資することから、今後も科学的なエビデンスに基づいてこれらの試験法を改善していくことが重要であると考えられる。

#### E. 結論

狂犬病ワクチンの検定試験および自家試験について、科学的な解析に基づき、動物福祉倫理に考慮した改善を行うことが出来た。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takayama-Ito M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posadas-Herrera G, Kurane I, Saijo M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. *Biologicals*.2016:S1045-1056(16)301

- |         |    |           |    |
|---------|----|-----------|----|
| 67-1.   |    | 1. 特許取得   | なし |
| 2. 学会発表 | なし | 2. 実用新案登録 | なし |
|         |    | 3. その他    | なし |

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

表 1 : 症状のスコアリング

スコア	
0	無症状
1	被毛粗剛, 動作緩慢
2	麻痺
3	死亡

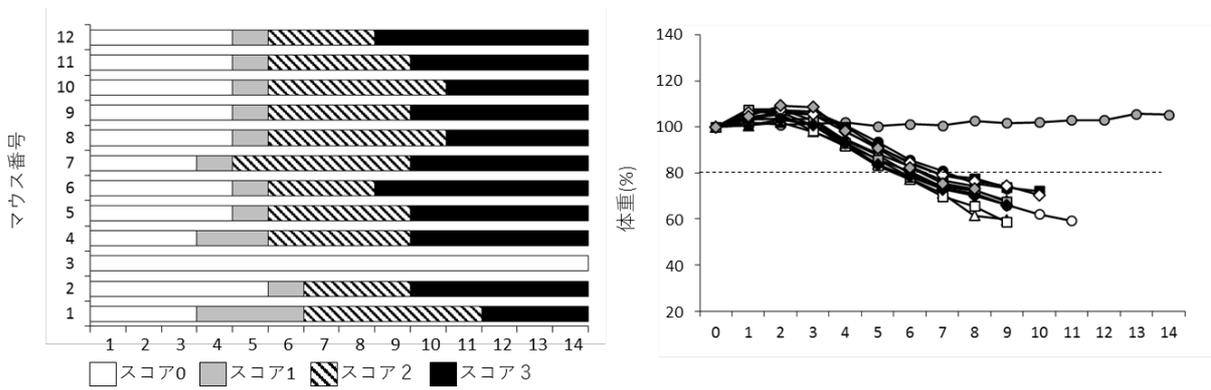


図 1 : 典型的な攻撃ウイルス接種後のマウスの症状(左)および体重(右)の推移

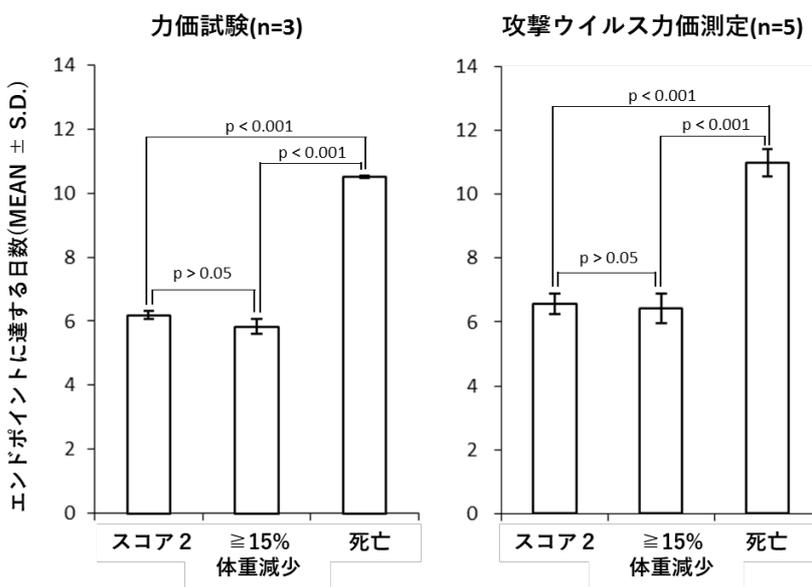


図 2 : 力価試験(左)および攻撃ウイルス力価測定(左)における症状および体重を指標とした場合のエンドポイントに達する日数の比較

表 2 : 両施設における人道的エンドポイント導入シミュレーション

両施設における人道的エンドポイント導入シミュレーション

国立感染症研究所

エンドポイント	実験1	実験2	実験3	実験4	実験5	実験6	実験7	実験8
死亡	29	32	29	30	34	26	25	29
スコア 2	29	32	29	30	34	26	25	29

各実験におけるマウス使用数：実験1-5 80匹，実験6-8 40匹

化学及血清療法研究所

エンドポイント	実験1	実験2	実験3	実験4	実験5	実験6	実験7	実験8
死亡	49	44	47	34	50	40	44	34
スコア 2	49	44	47	34	50	40	44	34

各実験におけるマウス使用数：80匹

表 3 : 動物使用数を削減した場合の参照品力価の変化

参照品力価測定(ED<sub>50</sub>)

希釈段階	実験1	実験2	実験3
5 (5,25,125,625,3125倍希釈)	25	19	25
4 (5,25,125,625倍希釈)	25	19	25
3 (5,25,125倍希釈)	20	19	25

表 4 : 動物使用数を削減した場合の攻撃ウイルス力価の変化

攻撃ウイルス力価測定(LD<sub>50</sub>)

希釈段階	実験1	実験2	実験3	実験4	実験5
5 (10 <sup>-5~9</sup> )	10 <sup>-7.2</sup>	10 <sup>-7.0</sup>	10 <sup>-7.4</sup>	10 <sup>-7.0</sup>	10 <sup>-7.4</sup>
4 (10 <sup>-5~8</sup> )	10 <sup>-7.2</sup>	10 <sup>-7.0</sup>	10 <sup>-7.4</sup>	10 <sup>-7.0</sup>	10 <sup>-7.4</sup>
3 (10 <sup>-6~8</sup> )	10 <sup>-7.2</sup>	10 <sup>-7.0</sup>	10 <sup>-7.4</sup>	10 <sup>-7.0</sup>	10 <sup>-7.4</sup>