

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

国家検定システムに関する研究

研究分担者 倉根 一郎 国立感染症研究所 所長
研究協力者 林 昌宏 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長
伊藤 睦代 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長

研究要旨：我々はこれまでに狂犬病ワクチン検定における動物の苦痛軽減の措置として、人道的エンドポイントの導入について検討してきた。今年度、検定試験において人道的エンドポイントを導入し、動物の苦痛軽減効果だけでなく、労力の軽減および時間の短縮にも役立った。新規試験法の導入により、様々な効果が期待される。

A. 研究目的

近年、検定試験においても動物実験の国際原則である 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。狂犬病ワクチンの検定試験のうち、ワクチンの有効性を確認する力価試験は、マウスを試験ワクチンにより免疫した後に致死量の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。この試験では狂犬病を発症したマウスは麻痺症状を呈したまま数日間 (平均 4 日, 最長 9 日) 生存する。これまでに我々は、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。その結果、麻痺症状が発現したマウスは全て死亡することから、人

道的エンドポイントとして麻痺を指標とすることによって 試験結果に影響を与えることなく、動物の苦痛を軽減できることが分かった(Takayama-Ito M. et al., Biologicals, 2016)。これらの結果を踏まえ、次回の生物学的製剤基準 (生物基) 改定の際には、「これらの観察の最終日に麻ひを示す動物は死亡に算入する。」の部分で「これらの観察期間中に麻ひを示す動物は死亡に算入する」との改訂が行われる予定である。また、平成 29 年 2 月の業務委員会において、生物基の通則 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、ウイルス第一部では生物基の改定を待たずに導入を行うことが業務委員会において了承された。これを受けて本年度 2 回の検定試験において人道的エンドポイントを適用したので、その結果について報告す

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：1 試験あたり 3 週齢の ddY マウス（メス）172 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 倍および 625 倍）を 1 週間間隔で 2 回腹腔内に免疫し、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 LD₅₀）を脳内接種した。各群 16 匹のマウスを使用した。脳内接種後のマウスの症状を 2 週間記録した。症状は正常，一般症状の低下，麻痺，死亡の 4 段階で記録した。症状の判定は 2 名以上で行った。麻痺と判断された時点でイソフルランによる安楽殺を行った。ワクチンの有効性(ED₅₀)は Bioassay Assist を用いてプロビット法により解析した。
- 5) 攻撃ウイルス力価測定（バックタイトレーション）：力価試験において，攻撃ウイルスが適正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 10⁻⁵ から 10⁻⁸ までの 10

倍段階希釈液を作製し，各段階 11 匹のマウスに脳内接種し，ウイルス力価（LD₅₀）を Reed and Muench 法により算出した。

（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) 試験結果に与える影響：多くのマウスは攻撃ウイルス脳内接種後 5 日から被毛粗剛などの一般症状を示し，6-8 日目より麻痺を示した。3 匹では 5 日目より麻痺が確認された。また，観察の最終日に麻痺を呈した個体が 1 匹あった。試験ワクチンおよび参照品の ED₅₀ の値はこれまでの検定の結果から大きく外れることはなかった(検定結果のため詳細は公開しない)。
- 2) 苦痛軽減効果：図 1 に示すように，攻撃ウイルス脳内接種後に人道的エンドポイントである神経症状を示すまでの日数は約 7 日であり，死亡するまでの日数 10-11 日と比較して 3-4 日程度の差が見られた。また，一般症状の低下は神経症状発現の 1-2 日前から見られた。

D. 考察

今年度 2 回の検定試験において実際に人道的エンドポイントを導入することができた。その結果，予想されていたように 3-4 日の苦痛軽減効果を得ることができた。また，試験結果への影響もみられなかった。

このことから、今回設定した指標が適切であったことが確認された。

また、麻痺した個体数を数えたり、麻痺か死亡かの判定をしたりといった作業がなくなったことにより、毎日の観察にかかる時間が短縮された。症状の判断について、あまり動かなかったり、動作が緩慢だったりして麻痺との判断が難しい場合もあったが、さらに一日観察することにより明確な判断ができた。また、必ず2名以上で判断を行い、できるだけ主観的な判断を除くよう努力した。

現在のところ生物基の改定が完了していないため、製造者では未だ人道的エンドポイントの導入はされていないが、今後生物基改定に伴い、自家試験においても人道的エンドポイントが導入される予定である。

E. 結論

検定試験において人道的エンドポイン

トを導入し、動物の苦痛軽減効果だけではなく、労力の軽減および時間の短縮にも役立った。新規試験法の導入により、動物愛護だけではなく、試験の効率化等様々な効果が期待される。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

	一般症状の低下	神経症状
試験 1	6.0(±1.2)	7.1(±1.0)
試験 2	6.4(±2.2)	8.0(±2.0)
試験 3	5.9(±1.3)	6.7(±1.6)
試験 4	6.2(±1.6)	7.1(±2.2)

攻撃ウイルス接種後日数

図 1：症状発現までの日数