

## 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

ワクチン等の品質確保を目的とした新たな国家検定システムの構築のための研究

#### 分担研究報告書

### BCG 膀胱内用・ツベルクリン・抗毒素製剤の国家検定の見直しに関する研究

研究分担者 森 茂太郎 国立感染症研究所 細菌第二部 室長  
研究協力者 柴山 恵吾 国立感染症研究所 細菌第二部 部長  
加藤 はる 国立感染症研究所 細菌第二部 室長  
岩城 正昭 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

研究要旨：ワクチンのロットリリースにおいて製造試験記録等要約書（SLP）の審査制度が平成 24 年に導入されたが、ワクチンと同じく生物学的製剤である細菌製剤（BCG 膀胱内用やツベルクリン等）や抗毒素製剤には SLP 審査制度は導入されてこなかった。そこで本研究では品質をより確保することを目的として、これらの細菌製剤ならびに抗毒素製剤への SLP 審査導入についての検討を継続して行っている。これまでに製剤メーカーと製剤担当室が協議を重ねた結果、細菌製剤や抗毒素製剤においても SLP 審査の導入を進めることとなっている。本年度は、各製剤の SLP 様式案を作成するとともに、SLP 試行などの今後の予定について検討を行った。細菌製剤や抗毒素製剤にも SLP 審査が導入されることによって、これらの製剤の品質がより確保され、国民の健康や福祉に貢献することが期待される。また、破傷風トキソイドワクチンの品質管理において実施されている力価試験の現行法は動物に多大な非常な苦痛を強いるため、3R 対応の観点から代替法の開発を進めている。本研究で開発する代替法は、現行の攻撃法における「判定」の指標である「症状による数値化」を「ELISA による測定」に置き換えるだけの「部分的な変更」であるため、現行法との高い整合性が期待できる。

#### A. 研究目的

ワクチンのロットリリースにおける「製造試験記録等要約書（SLP）」の審査制度が平成 24 年 10 月 1 日に施行されたが、細菌第二部が製剤担当となっている生物学的製剤のうち、予防ワクチン以外の細菌製剤（乾燥 BCG 膀胱内用ならびに精製ツベルクリン）や抗毒素製剤〔乾燥ジフテリアウマ抗毒素、乾燥ガスエソウマ毒素、および乾燥ボツリヌスウマ抗毒素（多価、E 型）〕には SLP 審査制度は導入されてこなかった。これらの製剤においても品質を

より確保するためには、SLP 審査の導入が必要であると考えられた。そこで本研究班では、ワクチンにおける SLP 審査制度を踏まえて、細菌第二部が担当としている細菌製剤ならびに抗毒素製剤への SLP 審査の導入を進めることを目的とした。

一方、破傷風トキソイドワクチンの品質管理において力価試験は重要な試験であり、市販されるすべてのロットについてメーカー（自家試験）と感染研（国家検定）で力価試験の実施が義務づけられており、実験動物にワクチンを接種して付与され

た免疫の程度を定量化することでワクチンの力価を算出する。この試験では、破傷風毒素に対する中和能を知る必要があるため、結合抗体価を測定する ELISA 等の方法は適用されず、免疫した動物（通常はマウス）を破傷風毒素で攻撃し生死と症状を観察することで *in vivo* での中和能を見積り、抗体価の測定によらずに力価を算出する方法が使われている。この方法は、毒素攻撃により発症した動物に非常な苦痛を強いるため、3R 対応の観点から代替法の開発は急務である。破傷風毒素は神経毒であり細胞毒性がないため、培養細胞の障害を指標とした中和抗体価定量試験は不可能である。また、破傷風毒素の活性（標的蛋白質の切断）の阻害などを指標とした *in vitro* 中和抗体価測定法の開発も繰り返し試みられているが、実用には至っていない。一方、ELISA 法で結合抗体価を測定して力価を算出する試みも繰り返し行われたが、攻撃法で測定した力価と ELISA 抗体価の間に厳密な相関が得られないため、実用化は困難であった。そこで本研究では、ELISA 法を用いるが、あえて厳密な相関を求めることをせず、値の「レンジ」を用いることにより代替法を開発することをめざす。現行の毒素攻撃法では、症状の重篤さを「レンジ分け」してスコアに換算し力価を算出している。そこで症状の「レンジ」と ELISA 抗体価の「レンジ」の対応を探り、適切な換算法を設定することによって、ELISA 法でも毒素攻撃と同等の情報を得ることが出来る系を構築することを本研究課題の目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 細菌製剤・抗毒素製剤への SLP 導入

細菌製剤（乾燥 BCG 膀胱内用ならびに精製ツベルクリン）については製剤メーカーが 1 社（日本ビーシージー製造株式会社）のみであることから、日本ビーシージー製造株式会社と製剤担当室（細菌第二部第四室）が SLP 導入について協議を行った。抗毒素製剤については、製剤メーカーが 1 社（KM バイオロジクス株式会社：KMB）のみであり、またへび毒の抗毒素製剤（乾燥まむしウマ抗毒素ならびに乾燥はぶウマ抗毒素）も KMB が製造していることから、へび毒の抗毒素製剤と合わせて KMB と製剤担当室（細菌第二部第三室ならびに免疫部第二室）が SLP 導入について協議を行った。

### 2. 破傷風トキソイド力価試験法の代替法の開発

ワクチンで誘導される ELISA 抗体価を詳細に把握するため、ワクチン標準品（国内標準沈降破傷風トキソイド）を用いて、国家検定（3段階）よりも広い範囲の用量（5段階）で動物を免疫した。国家検定の方法に準じ、ddY マウス♀5 週齢、1 群 10 匹を用いた。今後は、免疫開始 4 週後に個々のマウスの尾より部分採血（0.2-0.5ml）を行い、採取した血液から血清を分取し、ELISA で抗体価を測定する予定である。また、部分採血の 4 日後に個々の動物に対して破傷風毒素（国家検定の方法に準じて 100LD<sub>50</sub>/マウス）で攻撃し、4 日間観察して引き起こされた症状の程度（死亡までの日数および生残個体の 4 日目の症状）を記録する。国家検定の方法に準じ個々のマウスの観察結果をスコアに変換する。血清の ELISA 抗体価をス

コアと比較し、両者の間の対応を統計学的に検討する。これを数回繰り返し、得られた結果を総合して、症状のスコアと対応する抗体価レンジを決定する。

(倫理面への配慮) 動物実験については、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して行った。

## C. 研究結果

### 1. 細菌製剤・抗毒素製剤への SLP 導入

これまでに製剤メーカーと製剤担当室が協議を重ねた結果、細菌製剤や抗毒素製剤においても SLP 審査の導入を進めることとなっている。本年度は、各製剤の SLP 様式案を作成するとともに、SLP 試行などの今後の予定について検討を行った。

### 2. 破傷風トキソイド力価試験法の代替法の開発

現在、1 回目の免疫を行っている。今後、症状のスコアと対応する抗体価レンジの決定を進める。その後、市販ワクチン (5 社) と標準ワクチンを用いた検討を行い、国家検定および各社における自家試験の方法を代替法に移行することを目指す。

## D. 考察

細菌製剤や抗毒素製剤における SLP 審

査の導入において、様式案の作成や試行時期の決定などの進展が見られた。今後、細菌製剤や抗毒素製剤にも SLP 審査が導入されることによって、これらの製剤の品質がより確保され、国民の健康や福祉に貢献することが期待される。

また、攻撃法に代わる新たな破傷風トキソイド力価試験法を開発することにより、動物に与える苦痛を軽減することができる。本研究で開発する代替法は、現行の攻撃法における「判定」の指標である「症状による数値化」を「ELISA による測定」に置き換えるだけの「部分的な変更」であるため、現行法との高い整合性が期待できる。

## E. 結論

細菌製剤や抗毒素製剤における SLP 審査の導入について試行時期などについて進展が見られた。3R に基づいた破傷風トキソイド力価試験の改良法について検討を開始した。

## F. 研究発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし