

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：本研究では、細菌製剤ならびに抗毒素製剤への製造試験記録等要約書（SLP）審査導入についての検討を継続して行なっている。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、破傷風トキソイドの力価試験においては、3R 対応の観点から動物の苦痛軽減に関する検討を進めた。その結果、人道的エンドポイントの適用による動物福祉への効果は限定的であると考えられた。一方で、ELISA キットを用いることによって、高感度なマウス破傷風抗体価測定系が構築できる可能性が示された。

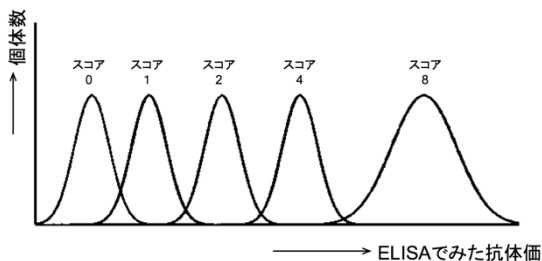
A. 研究目的

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 日から施行されたが、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。そこで本研究では、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これらの細菌製剤ならびに抗毒素製剤への SLP 審査の導入を検討す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いる。力価試験においては、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している。この試験では、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、力価を算出する。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 対応の観点から試験法の改良が急務となっている。そこで本研究では、人道的エンドポイント（毒素攻撃により重症となったマウスを安

楽死させる)の設定による苦痛軽減が可能かどうかについて検討を行なった。また、代替法の開発についても検討を開始した。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。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てきたが、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」を用いることによって代替法を開発することをめざした。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 (図 1)、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できる系を構築することを目的とした。

・攻撃の数日前にマウスから部分採血してELISAで抗体価測定
 ・抗体価測定後のマウスを攻撃し、生死と症状からスコアを付与、抗体価と比較
 →下図のようになれば代替法として成立する可能性



(図 1)

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 (日本ビーシー製造株式会社) のみであることから、日本ビーシ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、またヘビ毒の抗毒素製剤 (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、ヘビ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

a. 人道的エンドポイントの設定による苦痛軽減

30 回の破傷風トキソイド力価試験におけるマウス (2748 匹) の症状と死亡日を集計し、(1) 観察最終日まで無症状または軽症、(2) 重症を示した翌日以降も生残、(3) 重症を示した翌日に死亡、(4) 毒素攻撃翌日までに死亡、の 4 カテゴリーに分類し、(2) と (3) のカテゴリーに属する動物に対して人道的エンドポイントを適用 (重症を示した日に安楽殺) した場合に、苦痛の程度を減らすことができる動物の割合を算出した。

b. 代替法の開発

デンカ生研 (株) により試作された破傷風抗体測定キット (ヒト用) を利用して、

二次抗体に標識抗ヒト IgG ではなく西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体を用いることで、マウス血清中の破傷風抗体価の測定系の構築を試みた。マウス血清は H30 年度にマウスを標準破傷風抗毒素で免疫し、毒素攻撃により症状を示さなかった (高い抗体価を保持していた) マウスのうち 6 匹分の血清をプールしたものをを用いた。血清を 2 倍階段希釈し、キットの添付文書に従って反応、発色を行った。

(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。本研究は、動物に苦痛を与える現行の試験法を動物福祉にかなう試験法へと改良することを目指した研究であるため、現行試験法によるデータを用いることは避けられない。現行試験法は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得た試験法である。

C. 研究結果

1. 細菌製剤・抗毒素製剤への SLP 導入

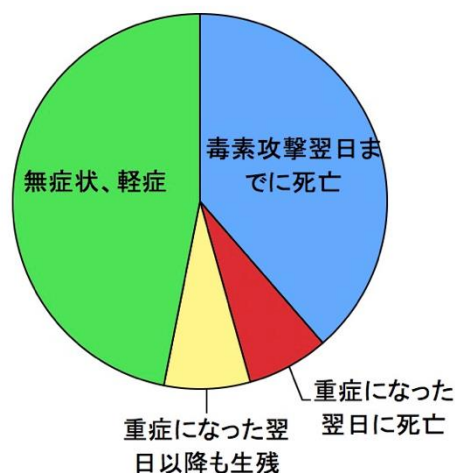
本年度は引き続き、各製剤の SLP 様式案を作成するとともに、SLP 試行などの今後の予定について検討を行った。

2. 破傷風トキソイド力価試験法の代替法の開発

a. 人道的エンドポイントの設定による苦痛軽減

30 回 (マウス数 2748 匹) の破傷風トキ

ソイド力価試験におけるマウスの症状と死亡日を集計したものを図 2 に示す。

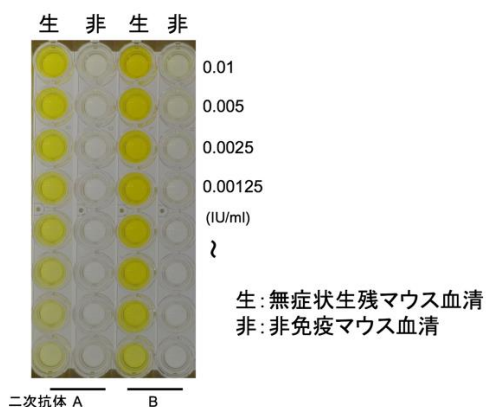


(図 2)

(1) 観察最終日まで無症状または軽症、(2) 重症を示した翌日以降も生残、(3) 重症を示した翌日に死亡、(4) 毒素攻撃翌日までに死亡、の 4 カテゴリーのうち、人道的エンドポイント (重症を示した日に安楽殺) 適用の対象となりうる (2) と (3) のカテゴリーに属するマウスの数は全体の 14.5% であった。それに対して、攻撃翌日に死亡したマウスの数は全体の 38.6% であった。

b. 代替法の開発

破傷風抗体価測定キットを用いて得られた抗体陽性および陰性 (非免疫) マウス血清の発色パターン (定性的) を図 3 に示す。陽性血清においては 0.001IU 以下まで十分に発色が見られた一方、陰性 (非免疫) マウス血清では発色がみられなかった。



(図3)

D. 考察

細菌製剤や抗毒素製剤における SLP 審査の導入を進めた。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。

今回の集計により、破傷風トキソイド力価試験において人道的エンドポイント適用可能なマウスの割合は全体の 14.5%であることが判明した。一方で、攻撃翌日に死亡したマウス (38.6%) は死亡したマウスの大部分を占めるが、これらのマウスに人道的エンドポイントを適用しようとする、攻撃当日と翌日の間の短い期間に症状の見極めと安楽殺を行う必要が生じるため、エ

ンドポイントの適用は事実上不可能であることが判明した。破傷風トキソイドの力価試験において、人道的エンドポイントの適用による動物福祉への効果は限定的であると考えられた。代替法の開発では、ELISA キットを用いて高感度のマウス破傷風抗体価測定系が構築できる可能性が示された。今後はこの測定系を用いて、プール血清ではなく個々のマウスの抗体価の測定を試みることによって試験系への応用を目指す。さらに、複数の試験間の結果の整合性を担保するため、この測定系の定量的標準化に用いる参照血清を調製する予定である。

E. 結論

細菌製剤や抗毒素製剤における SLP 審査の導入をすすめた。破傷風トキソイド力価試験においては、毒素攻撃法に人道的エンドポイントを適用することの効果に限定的であることが判明した。動物福祉のためには、毒素攻撃法に対する代替法を開発してゆくことがより効果的と考えられた。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし