

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 安全実験管理部 主任研究官
妹尾 充敏 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、乾燥 BCG 膀胱内用と精製ツベルクリンの SLP 相当様式を作成するとともに、乾燥 BCG 膀胱内用については SLP 審査の試行を行った。抗毒素製剤については、ヘビ毒の抗毒素製剤と合わせて SLP 審査導入について引き続き検討を行った。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、ELISA キットを用いて「吸光度スコア」を定義することによって、マウス攻撃法による破傷風トキソイド力価試験の代替法が構築できる可能性が示された。

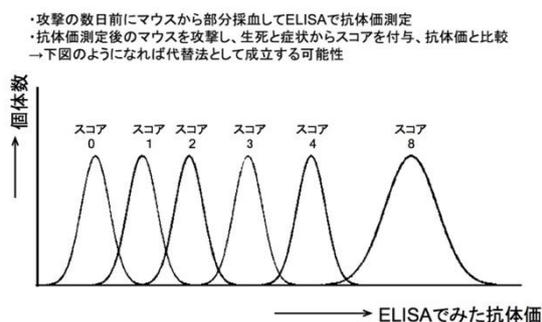
A. 研究目的

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。今後、これらの製剤については血液製剤と合わせて令和 3 年 7 月 1 日から SLP 審査が導入される予定であることから、SLP 審査導入

に向けた検討を行うことを目的とした。

一方、動物実験における 3Rs が最近重要な検討課題となっている。WHO においても「生物学的製剤の品質管理における 3Rs 対応」を主題にしたワーキンググループが発足しており、WHO の生物学的製剤の品質管理に関する recommendation (Technical Report Series: TRS) に記載された試験方法に記載されている動物実験を抽出し、その妥当性について検討する作業が始まっている。破傷風トキソイドの力価試験は、検討の対象として典型的な例と思われる。破傷風トキソイドワクチンの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。令和元年度の本研究では、人道的エンドポイント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い、適用可能性が限定的であることを示した。一方で、令和元年度に引き続き、代替法の開発についての検討を継続した。令和元年度の報告書にも記述したように、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。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。



（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

マウスを破傷風トキソイドで免疫し、4 週後にマウス尾部から部分採血（上限 200 μ L）し、血清を分取した。分取した血清中の破傷風抗体価は、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 HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いることで測定した。

採血の翌週に、マウスの大腿部皮下に破傷

風毒素を注射することにより毒素攻撃を行った。攻撃後のマウスは4日間観察し、生死および症状（図2）を記録した。

死亡までの日数または 攻撃4日目の症状	スコア
攻撃翌日に死亡	0
攻撃2日目に死亡	1
攻撃3日目に死亡	2
攻撃4日目に死亡または 重篤な症状	3
攻撃4日目に軽度の症状	4
攻撃4日目に無症状	8

（図2）

（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。本研究の実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認（No. 118170-II）を得て行なわれた。

C. 研究結果

1. 細菌製剤・抗毒素製剤への SLP 導入

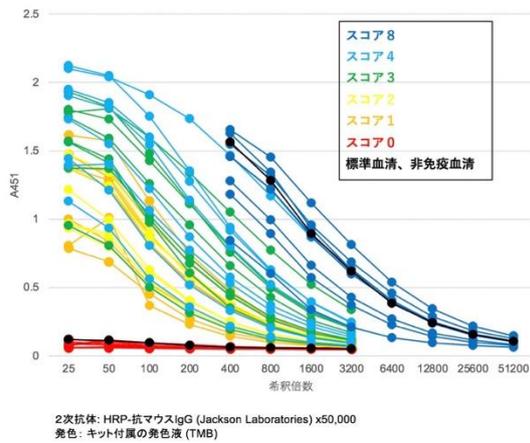
本年度は、乾燥 BCG 膀胱内用と精製ツベルクリンの SLP 相当様式を作成するとともに、乾燥 BCG 膀胱内用については SLP 審査の試行を行った。抗毒素製剤については、へ

び毒の抗毒素製剤と合わせて SLP 審査導入について引き続き検討を行った。

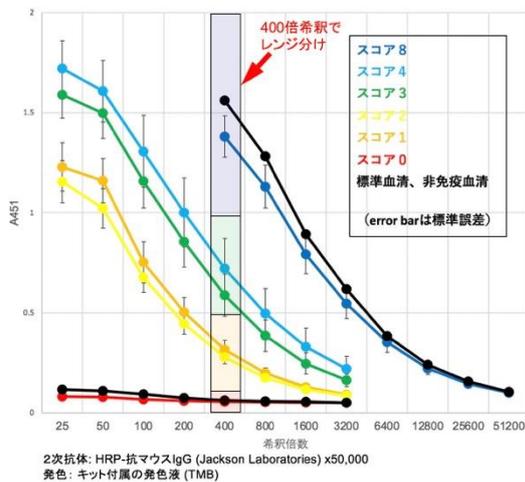
2. 破傷風トキソイド力価試験法の代替法の開発

46 匹の免疫マウスを攻撃後のスコア（症状スコア）ごとに分類し、それぞれの個体における血中抗体価を階段希釈倍数ごとの EILSA 吸光度としてプロットしたものを図3に示した。また、同じ症状スコアを示したマウス集団の血中抗体価プロットを平均したものを図4に示した。症状スコアごとに、相互に区別可能な血中抗体価の分布が示された（図4）。

次に、血中抗体価をもとに、吸光度に基づく「吸光度スコア」を定義した。400 倍希釈した血清の吸光度 0.1 未満を吸光度スコア 0、0.1-0.5 を吸光度スコア 2、0.5-1 を吸光度スコア 4、1 以上を吸光度スコア 8 と定義した（図4）。46 個体の症状スコアから導かれた用量反応曲線を標準曲線とし、同じ 46 個体から得られた吸光度スコアを「検体」として扱って、吸光度スコアから得られる「相対力価」を計算したところ 1.02 となった。このことは、吸光度スコアを用いて、症状スコアを用いたのと極めて近い計算結果が得られるということを意味している。吸光度スコア体系が症状スコアの代替として利用できる可能性が示された。



(図 3)



(図 4)

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。

代替法の開発では、ELISA キットを用いて「吸光度スコア」を定義することにより、症状スコアを用いたのと極めて近い計算結果が得られ、吸光度スコア体系が症状スコアの代替として利用できる可能性が示された。今後、さらにデータを集積し、代替法としての可能性を詳細に検討する予定である。

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、ELISA による吸光度スコアの定義と利用による代替法が開発できる可能性が示された。

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 なし