

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国家検定の最適化と国際整合化のための研究

分担研究報告書

「細菌ワクチンの国家検定の見直し」
ジフテリアトキソイド無毒化試験の 3Rs 対応試験法の開発

研究分担者

妹尾 充敏 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 細菌第二部

研究協力者

金 玄 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 細菌第二部

嶋崎 典子 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 インフルエンザ研究センター

岩城 正昭 国立健康危機管理研究機構 検定部

研究要旨：ジフテリアトキソイド無毒化試験は、モルモットおよびウサギを使用する方法で実施されており、国家検定ではウサギを用いた試験を行なっている。本研究では、この試験法の代替法として、動物実験の 3Rs に対応した試験法を開発することを目的としている。これまでの研究において、培養細胞を用いた試験法の検討を進めたところ、本法はウサギを用いた試験法の代替法となり得ることが示された。今年度は、国内ワクチン製造メーカー2 社において、それぞれトキソイド化が不完全な検体（毒性が残存している検体）を調製し、本法で検出可能かを調べた。これにより、国内で製造されている全てのジフテリアトキソイドについて、アジュバントであるアルミニウムゲルに吸着もしくは内包された状態においても毒性を検出できるかを調べることができる。また、毒性復帰試験（37℃、20 日間保温）についても同様に検出可能かを調べた。

A. 研究目的

ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドは、有効性を確認するための力価試験、安全性を確認するための無毒化試験が国家検定として実施されている。力価試験では、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド共にマウス、無毒化試験では、ジフテリアトキソイドはウサギ、破傷風トキソイドはモルモットを使用することから、動物実験の 3Rs に対応した試験法の開発が必要とされている。本研究はジフテリアトキソイド無毒化試験の代替法の開発を目的とし、これまでの研究において、

培養細胞を用いた試験法の検討を進めており、最終的に本法をジフテリアトキソイド無毒化試験に代わる国家検定の試験項目とすることを目標としている。そのため、本法を生物学的製剤基準に収載することを目指し、国内ワクチン製造メーカー2 社に協力を依頼して昨年度に共同研究を開始した。共同研究では、各メーカーでの本法の評価、およびワクチン製造時のアクシデントを想定した残存毒性試験を行うこととしており、残存毒性試験では、人為的にトキソイド化が不完全な検体（毒性が残存している検体）を調製し、

本法で毒性の検出が可能かを調べることにしている。今年度は両社のトキシソイド化が不完全な検体について毒性復帰試験も含めて検討を行った。

B. 研究方法

国内でジフテリアトキシソイドを製造しているメーカー2社において、トキシソイド化が不完全な検体を調製した。残存毒性試験について、 α 社が調製した検体については昨年度に検討が終了していることから、今年度は β 社が調製した検体について検討を行った。実際のワクチン製造と同じ方法で調製し、トキシソイド化のステップのみ、ホルマリン処理期間を短縮した検体を調製し、アルミニウムアジュバントを含む沈降検体とした後、細胞培養法にて評価した。昨年度の結果から、Vero細胞の生死判定には、画像解析法は採用せず、生細胞の代謝能を利用する方法であるMTT法（細胞増殖/細胞毒性アッセイキット Cell Counting Kit-8: 同仁科学研究所）を用いた。また、毒性復帰（37℃、20日間保温）の調査は、2社が調製した全てのトキシソイド化が不完全な検体について検討した。

（倫理面への配慮）本研究における動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会で承認された後、実施した。（承認番号 124148）

C. 研究結果

・トキシソイド化が不完全な検体の残存毒性の測定

β 社の調製した検体（検体 β ）を2倍段階希釈し、培地に加えたものを用いて、4日間、37℃、5% CO₂の条件下でVero細胞を培養した。その結果、無希釈の検体においても毒

性は検出されなかった。そこで、通常の2倍量の検体について検討を行ったところ、毒性が検出された（図1）。

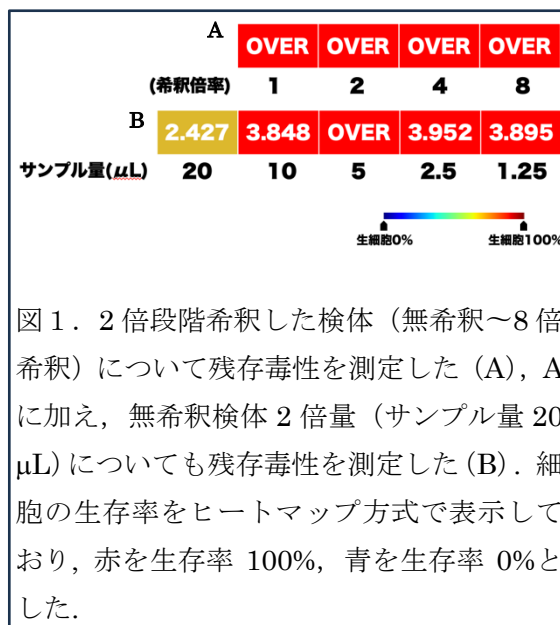


図1. 2倍段階希釈した検体（無希釈～8倍希釈）について残存毒性を測定した（A），Aに加え、無希釈検体2倍量（サンプル量20μL）についても残存毒性を測定した（B）．細胞の生存率をヒートマップ方式で表示しており、赤を生存率100%，青を生存率0%とした。

・トキシソイド化が不完全な検体の毒性復帰の調査

α 社の調製した3種類のトキシソイド化が不完全な検体（実際のワクチン製造と同じ濃度のホルマリンで処理した検体：検体A、濃度をある程度下げたホルマリンで処理した検体：検体B、濃度を大幅に下げたホルマリンで処理した検体：検体C）および検体 β を生物学的製剤基準に従い、37℃で20日間保温した後、それぞれ2倍段階希釈し、培地に加えたものを用いて4日間、37℃、5% CO₂の条件下でVero細胞を培養した。その結果、検体Aは毒性が検出されなかった。検体Bは無希釈、検体Cは無希釈～8倍希釈の全てで毒性が検出された。また、検体 β は無希釈2倍量および無希釈で毒性が検出された（図2）。

検体 A	OVER	OVER	OVER	OVER
検体 B	2.482	3.819	OVER	OVER
検体 C	0.360	0.362	0.355	0.349
(希釈倍率)	1	2	4	8

検体 β	0.671	2.580	OVER	OVER	3.997
サンプル量(μL)	20	10	5	2.5	1.25

図 2. 検体 A, B, C および β について 2 倍段階希釈した検体（無希釈～8 倍希釈）について毒性復帰を調査した。検体 β については上記に加え、無希釈 2 倍量（サンプル量 20 μL ）についても調査した。図 1 と同様、細胞の生存率をヒートマップ方式で表示した。

D. 考察

国内ワクチン製造メーカー2 社において、トキソイド化が不完全な検体を実際のワクチン製造と同じ方法で調製し、アルミニウムゲルにトキソイドが吸着・内包されている状態での毒性検出が細胞培養法で可能か調べた。昨年度に α 社の検体について検討を行い、アジュバントであるアルミニウムゲルにトキソイドが吸着・内包された状態でも毒性を検出可能であることが示されている。本年度は引き続き β 社の検体について検討を行い、どちらのメーカーが調製した検体も細胞培養法で毒性を検出することが可能であることが示された。これらの検体を 37℃で 20 日間保温し、毒性復帰について調べたところ、残存毒性と同様に検出可能であった。また、残

存毒性試験でわずかに毒性が検出された検体である検体 B および β については、その毒性が増強されるという結果が得られた。この点については更なる調査が必要と考えられる。

E. 結論

ジフテリアトキソイド無毒化試験のウサギ法の代替法として検討した細胞培養法は、国内ワクチン製造メーカー2 社それぞれが調製したトキソイド化が不完全な検体について、アジュバントであるアルミニウムゲルにトキソイドが吸着・内包された状態でも毒性を検出可能であることが示された。また、この検体を 37℃で 20 日間保温した後に毒性を調査する毒性復帰試験についても細胞培養法で検出することが可能であることが示された。残存毒性試験でわずかに毒性が検出された検体については、37℃で 20 日間保温するとその毒性が増強される傾向が示された。この点についてはより詳細に調べる必要があると考えている。今後、本結果を国内ワクチン製造メーカー2 社と共有し、他施設での細胞培養法の評価を行い、最終的に生物学的製剤基準の改訂に進む予定である。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし