

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や国際整合化を目指すための研究

分担研究報告書

「細菌ワクチンの国家検定の見直し」

—ジフテリア毒素、破傷風毒素、ボツリヌス毒素の 3Rs に対応した検出法の開発—

研究分担者 妹尾 充敏 国立感染症研究所 細菌第二部第三室 室長
研究協力者 岩城 正昭 国立感染症研究所 安全実験管理部 主任研究官
嶋崎 典子 国立感染症研究所 ウイルス第三部 主任研究官

研究要旨：ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドの無毒化試験およびボツリヌス抗毒素製剤の力価試験について、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、発育鶏卵で毒性の検出が可能かを調べたところ、程度の差はあるものの、3種全ての毒素の毒性が発育鶏卵で検出できることが示された。今後、詳細な検討を行い、現行法の代替法になり得るかを判断する。

A. 研究目的

現在、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドでは、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。本研究では、無毒化試験に着目し、ウサギおよびモルモットの代替として発育鶏卵を用いることを考えた。孵化前の発育鶏卵は動物個体ではないと考えられていることから、発育鶏卵を用いてジフテリア毒素および破傷風毒素の毒性を検出する方法が開発できれば、3Rs に対応した無毒化試験法になると考えている。また、国家検定は実施してい

ないが、ボツリヌス抗毒素製剤の力価試験についてもマウスを用いるため、ボツリヌス毒素についても発育鶏卵で毒性を検出できるかを検討した。

B. 研究方法

1. 接種方法の検討

各毒素の毒性を発育鶏卵（10 日卵）で検出するための接種法を確立するため、長さの異なる注射針（ $1/2$ "、 $3/4$ "、1"、 $1 1/4$ "、 $1 1/2$ "）を用い、墨汁を投与することで検討した。また、接種箇所の検討も併せて行った。

2. ジフテリア毒素の接種

ジフテリア毒素としてシック試験毒素 Lot.59-2 を用いた。異なる濃度（400, 40, 4 MRD(minimal reacting dose;ウサギ

皮内最小発赤毒素量)/0.1 mL) のシック試験毒素を接種することによって、発育鶏卵での毒性の現れ方を確認した。

3. 破傷風毒素の接種

破傷風毒素として破傷風試験毒素 Lot. 5 を用いた。異なる濃度 (30000, 3000, 300 LD₅₀/0.1 mL) の破傷風試験毒素を接種することによって、発育鶏卵での毒性の現れ方を確認した。

4. ボツリヌス毒素の接種

ボツリヌス毒素として、A 型ボツリヌス試験毒素 Lot. 5 を用いた。異なる濃度 (590, 59 LD₅₀/0.1 mL) の A 型ボツリヌス試験毒素を接種することによって、発育鶏卵での毒性の現れ方を確認した。

(倫理面への配慮) 発育鶏卵を用いることは動物実験に該当しないが、それは孵化前であり、孵化を伴う場合は該当するため、実験は全て孵化を伴わない条件で行った。

C. 研究結果

1. 接種方法の検討

発育鶏卵は 10 日卵を使用し、気室側もしくは気室と反対側の外殻にドリルで 0.5 mm 程度の穴を開け、異なる長さの注射針を挿入し、墨汁を接種した。その後、割卵し、墨汁が接種された箇所を確認した。結果は表 1 に示した。また、図 1 に接種された箇所別の画像を示した。

表 1. 接種条件と接種箇所

注射針長さ	気室側から接種	気室と反対側から接種
1/2"	尿膜腔	尿膜腔
3/4"	尿膜腔	卵白
1"	尿膜腔	卵白と卵黄
1 1/4"	尿膜腔	卵黄*
1 1/2"	卵黄*	卵黄

*卵黄に入ることが多いが再現性が低い

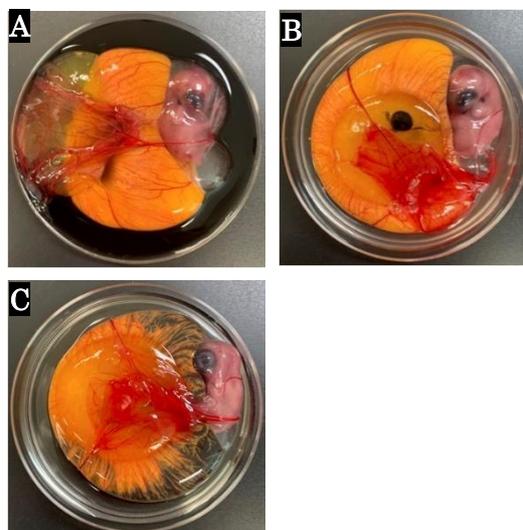


図 1. 墨汁が尿膜腔(A)、卵白(B)、卵黄(C)に接種された卵割後の状態

2. ジフテリア毒素

1. の検討から、「気室側から注射針 1/2" を用いて接種」し、尿膜腔へ接種した場合と「気室の反対側から注射針 1 1/2" を用いて接種」し、卵黄へ接種した場合について検討した。その結果、尿膜腔に接種した場合、ジフテリア毒素の胎仔への影響は認められなかった。一方で、卵黄へ接種した場合、胎仔へ影響が現れた。孵化前の 20 日卵を割卵し、胎仔の状態を観察すると、高濃度 (400 MRD/0.1 mL)

の場合は、接種後まもなく成長が止まったことが確認された（図 2B-1）。また、中濃度（40 MRD/0.1 mL；図 2B-2）および低濃度（4 MRD/0.1 mL；図 2B-3）では、コントロール（緩衝液接種；図 2A）では、コントロール（緩衝液接種；図 2A）に比べ、卵黄の回収が遅れていた。

3. 破傷風毒素

破傷風毒素についてもジフテリア毒素と同様の検討を行った。その結果、尿膜腔に接種した場合、破傷風毒素においても胎仔への影響は認められなかったが、卵黄へ接種した場合は胎仔へ影響が現れた。20 日卵の胎仔の状態を観察すると、高濃度（30000 LD₅₀/0.1 mL；図 2C-1）の場合であっても成長が止まることなく、中濃度（3000 LD₅₀/0.1 mL；図 2C-2）と同様に卵黄の回収が遅れるに留まった。さらに、低濃度（300 LD₅₀/0.1 mL；図 2C-3）では卵黄の回収の遅れは観察されなかった。

4. ボツリヌス毒素

ボツリヌス毒素については「気室の反対側から注射針 1½”を用いて接種」し、卵黄へ接種した場合についてのみ検討した。その結果、高濃度（590 LD₅₀/0.1 mL）の場合は高濃度のジフテリア毒素を接種した場合と同様に接種後まもなく成長が止まったことが確認された（図 2D-1）。低濃度（59 LD₅₀/0.1 mL）では、卵黄の回収が遅れた上、一部の卵黄が漏れている状態が観察された。

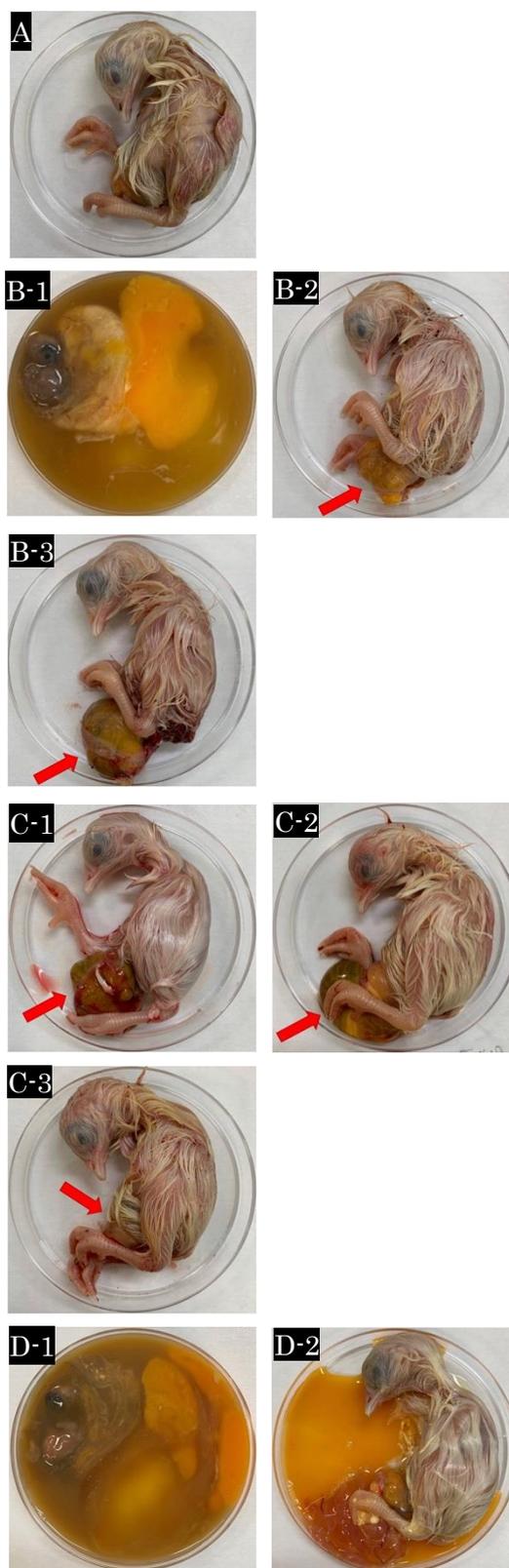


図 2. (A)緩衝液を接種した胎仔、(B)ジフテリア毒素を接種した胎仔（1: 400 MRD/0.1

mL, 2: 40 MRD/0.1 mL, 3: 4 MRD/0.1 mL)、(C)破傷風毒素を接種した胎仔 (1: 30000 LD₅₀/0.1 mL, 2: 3000 LD₅₀/0.1 mL, 3: 300 LD₅₀/0.1 mL)、(D)ボツリヌス毒素を接種した胎仔 (1: 590 LD₅₀/0.1 mL, 2: 59 LD₅₀/0.1 mL)

D. 考察

発育鶏卵 (10 日卵) の尿膜腔および卵黄に毒素を接種する方法を確立し、それに従い、ジフテリア毒素、破傷風毒素を接種すると、どちらの毒素においても尿膜腔では胎仔に影響がなく、卵黄に入った場合に胎仔に影響が現れた。これは毒素が胎仔の体内に入るか否かが影響を左右するのだと考えられる。ジフテリア毒素およびボツリヌス毒素では、高濃度において胎仔の成長が止まったが、破傷風毒素では高濃度であってもそのような影響は観察されず、卵黄回収の遅れに留まっ

た。これは破傷風毒素が神経細胞を逆行性に移動し、シナプス前終末に移行し、抑制性伝達物質の放出を抑制する、という作用機序を持つため、神経系が未発達の胎仔では、ジフテリア毒素やボツリヌス毒素ほど影響がなかったと推測される。

E. 結論

本研究において、ジフテリア毒素、破傷風毒素、A 型ボツリヌス毒素の毒性を発育鶏卵で検出することが可能であることが明らかになった。今後、さらに詳細な検討を行い、ジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドの無毒化試験、ボツリヌス抗毒素製剤の力価試験で用いられている現行法の代替法となり得るかを判断する予定である。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし