

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。昨年度、発育鶏卵でジフテリア毒素の毒性検出が可能であることが示唆されたため、引き続き検討を行なったが、試験結果が不安定であることが明確になったため、発育鶏卵を用いた試験法の開発は困難であると判断した。次に、培養細胞を用いた試験法の検討を開始した。培養細胞でジフテリア毒素の毒性を検出できることはジフテリアトキソイド力価試験からも既知であるが、無毒化試験で使用する場合、感度とアジュバントであるアルミニウムの影響を調べる必要があるため、これらについて検討を行った。その結果、感度はウサギを用いた試験法のおよそ 10 倍、アルミニウムが培養細胞に大きな影響を及ぼすことはなく、判定においても一定の希釈で対応できることが明らかになった。今後、トキソイド化が不完全なトキソイドを用いた検討を行い、現行法の代替法になり得るかを判断する。

A. 研究目的

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。本研究では、ジフテリアトキソイド無毒化試験について、ウサギの代替として発育鶏卵もしくは培養細胞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の毒性を検出する方法を開発すること、もしくは培養細胞を用いた方法を開発することで無毒化試験法を 3Rs に対応した方法で実施できるようになると考えている。

B. 研究方法

1. 発育鶏卵への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。国家検定で用いる濃度 (8, 4, 2, 1 MRD(minimal reacting dose; ウサギ皮内最小発赤毒素量)/0.1

mL) のジフテリア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。昨年度の検討結果からサンプルは気室の反対側から注射針 25 G x 1½”を使用して接種した。

2. Vero 細胞でのジフテリア毒素活性測定
Vero 細胞 (3 x 10⁴ cell/well) と濃度の異なるジフテリア毒素 (細胞培養用培地で懸濁および希釈) を混和し、96 ウェルプレートに添加し、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 4 日間培養した。その後、3 次元培養細胞イメージング装置 Cell3iMager duos (SCREEN ホールディングス) を用いて、生細胞率を測定した。アルミニウムアジュバントの影響を調べる際は、Vero 細胞とジフテリア毒素に、沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド (DT) もしくは沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ (セービン株) 混合ワクチン (DPT-IPV) を追加し、混和した。

(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. 発育鶏卵へのジフテリア毒素の接種
発育鶏卵は 10 日卵を使用し、気室と反対側の外殻にドリルで 0.5 mm 程度の穴を開け、25 G x 1½”の注射針を挿入し、濃度の異なるジフテリア毒素、および陰性コントロールとして生理食塩水を投

与した。孵卵器にて 10 日間保温し、20 日卵を割卵し、胎仔の状態を観察した。その結果、高濃度 (400 MRD/0.1 mL) のジフテリア毒素で観察されると考えていた (昨年度の結果より) サンプル接種後まもなく成長が止まる状態 (図 1) がジフテリア毒素の濃度や有無に関わらず一定の割合 (約 20%程度) で見られた。



図 1. サンプル接種後、成長が止まった胎仔 (20 日卵)

2. Vero 細胞でのジフテリア毒素活性測定
1.の結果より、発育鶏卵の結果が不安定であることが示されたため、Vero 細胞を用いた試験法の開発に切り替え、検討を始めた。ウサギ試験法で使用している濃度のジフテリア毒素が Vero 細胞法で検出可能かを調べたところ、ウサギ試験法で使用している濃度以下でも検出可能であることが示された (図 2)。そこで、検出限界を確認した。その結果、ウサギ試験法の 10 倍から 20 倍程度感度が良いことが示された (図 3)。次に、アジュバントであるアルミニウムの影響を調べるため、市販されている DT および DPT-IPV を試験系に添加した。その結

果、アルミニウムが Vero 細胞の生死や増殖などに影響することはないが、濃度が高いとイメージング装置の判定に多少の影響を及ぼすことが分かった。しかし、DT で 2 倍、DPT-IPV で 4 倍希釈するとその影響は検出されないレベルまで低下した (図 4)。

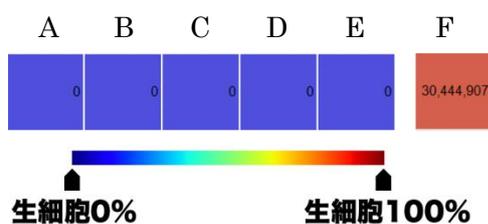


図 2. ジフテリア毒素 (A. 40 MRD/well, B. 4 MRD/well, C. 2 MRD/well, D. 1 MRD/well, E. 0.5 MRD/well, F. 細胞培養用培地のみ) と Vero 細胞 (3×10^4 cell/well) を混和し、96 ウェルプレートに添加した後、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 4 日間培養し、イメージング装置で生細胞率を測定

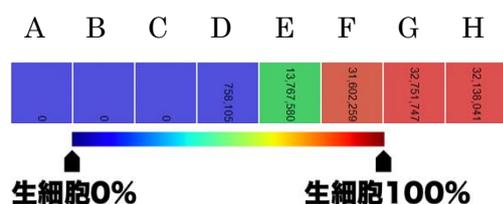


図 3. ジフテリア毒素 (A. 4 MRD/well, B. 0.4 MRD/well, C. 0.2 MRD/well, D. 0.1 MRD/well, E. 0.05 MRD/well, F. 0.025 MRD/well, G. 0.0125 MRD/well, H. 0.00625 MRD/well) と Vero 細胞 (3×10^4 cell/well) を混和し、96 ウェルプレートに添加した後、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 4 日間培養し、イメージング装置で生細胞率を測定

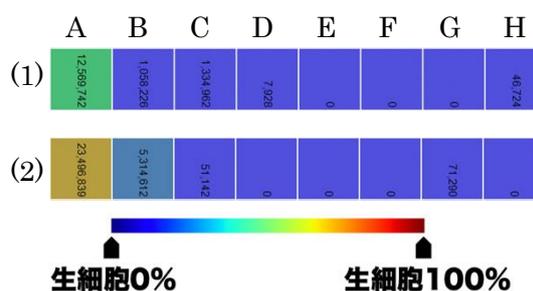


図 4. ジフテリア毒素 (1 MRD/well)、Vero 細胞 (3×10^4 cell/well)、および DT (1) もしくは DPT-IPV (2) を細胞培養用培地で段階希釈 (A. 原液, B. 2 倍希釈, C. 4 倍希釈, D. 8 倍希釈, E. 16 倍希釈, F. 32 倍希釈, G. 64 倍希釈, H. 128 倍希釈) したものを混和し、96 ウェルプレートに添加した後、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 4 日間培養し、イメージング装置で生細胞率を測定

D. 考察

ジフテリア毒素の検出を発育鶏卵で試みたが、毒素の濃度や有無に関わらず接種後まもなく成長が止まる鶏卵が一定の割合 (約 20%程度) で認められることが明らかになったため、ジフテリアトキソイド無毒化試験で使用しているウサギの代わりに発育鶏卵を用いる試験法を開発することは困難であると判断した。

Vero 細胞を用いた実験では、感度とアジュバントであるアルミニウムの影響を調べた。その結果、ウサギ試験法に比べ、感度は 10 倍から 20 倍高かった。アルミニウムの影響については、製剤によって多少異なるが、2 倍から 4 倍希釈することによって、その影響は検出されないレベルまで下がること示された。

E. 結論

本研究において、現在ウサギを用いて実施しているジフテリアトキソイド無毒化試験の 3Rs に対応した試験法として、Vero 細胞を用いた方法が代替法として可能性があることが示された。今後、トキソイド化が不完全であり、残存毒性のあるトキソイドを人工的に調製した後、アルミニウムに吸着させ、沈降ジフテリアトキソイドを作製し、ウサギ試験法と Vero 細胞法を比較することで、現行法の代替法になり得るかを判断する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Iwaki M, Kenri T and Senoh M. An ELISA System for Tetanus Toxoid Potency Test: An Alternative to Lethal Challenge. *Biologicals in press.*

2. 学会発表

1) 妹尾充敏, 岩城正昭, 山本明彦, 嶋崎典子, 見理剛. ジフテリアトキソイド無毒化試験の *in vitro* 法の開発. 第 96 回日本細菌学会総会. 2023 年 3 月. 姫路.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし