

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、培養細胞を用いた試験法の検討を行い、その結果、感度はウサギを用いた試験法の約 10 倍、アジュバントである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ことから、本法は 3Rs に対応したジフテリアトキソイド無毒化試験として、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。次に、本法の生物学的製剤基準への収載を目指し、ワクチン製造所に協力を依頼し、共同研究契約を締結した。共同研究では、各メーカーでの本法の評価、ワクチン製造時のアクシデントを想定し、人為的にトキソイド化が不完全なトキソイド（毒性残存している検体）を調製し、本法で検出可能かを調べる予定にしている。また、ジフテリアトキソイド力価試験における培養細胞の生死判定について、客観性の高い方法に変更するため、2 種類の方法について現行法と比較検討した。

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。また、ジフテリアトキソイド力価試験では、培養細胞の生死を判定する必要があるが、現在は主観性の高い方法で行っていることから、客観性の高い方法へ変更する必要があるため、複数の方法を用いて比較検討した。

B. 研究方法

1. <ジフテリアトキソイド無毒化試験>

-ワクチン製造所との共同研究契約締結-
2022年9月8日に国内でジフテリアトキソイドを製造しているメーカーと会議を開催し、今後の品質管理における動物実験の3Rs対応について、また、Vero細胞を用いた無毒化試験のin vitro法について説明し、共同研究への参加の可否についてアンケート形式で回答を得た。2023年2月16日に再度会議を開催し、Vero細胞法の詳細説明、評価方法、トキソイド化が不完全なトキソイドの調製について説明し、共同研究の中で実施可能かについて回答を得た。

2. <ジフテリアトキソイド力価試験>

-Vero細胞生死判定法の比較-
生物学的製剤基準、ジフテリアトキソイド、3.2.5力価試験、マウスを用いる血中抗毒素価測定法に準じて行った。血中抗体価の測定には、培養細胞法を用いた。Vero細胞の生死判定には、現行法である顕微鏡での目視の他、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)、および細胞増殖/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。

(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122201)

C. 研究結果

1. <ジフテリアトキソイド無毒化試験>

共同研究を行うに際し、ワクチン製造所の意向を確認するため、アンケートでは、参加の可否に加え、トキソイド化が不完全なトキソイドの調製やVero細胞を用いた試験の実施の可否などについても実施可能との回答を得た。また、その後の会議において、トキソイド化が不完全なトキソイドの調製方法などについて詳細に議論した。

2. <ジフテリアトキソイド力価試験>

血中抗体価の算出に用いるVero細胞の生死判定について、現行法である顕微鏡での目視、イメージング装置 Cell3iMager duos、細胞毒性アッセイキット Cell Counting Kit-8の3種類の方法を用いて実施し、結果を比較した。まず、標準沈降ジフテリアトキソイドを用いて、各希釈濃度について、値を比較したところ、目視とイメージング装置の結果はほぼ同一であったのに対し、細胞毒性アッセイキットでは、高希釈倍率では他の2法と変わらない値であったが、低希釈倍率では、差が明確であった(図1)。

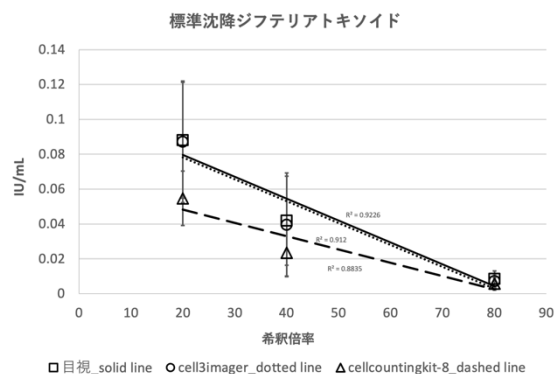


図1. 20, 40, 80倍希釈した標準沈降ジフテリアトキソイドで免疫したマウスの血中抗体価を目視(□)、イメージング装置(○)、

細胞毒性アッセイキット (△) でそれぞれ算出。ddY マウス、SPF、メス、5 週齢、一群 10 匹。

次に、実際の製剤である 2 種混合トキソイド (DT) と 4 種混合ワクチン (DPT-IPV) を購入し、3 種類の方法を用いて力価算出し、比較した。その結果、いずれの製剤においても、3 種類の方法全てで有意差はないことが示された (図 2)。

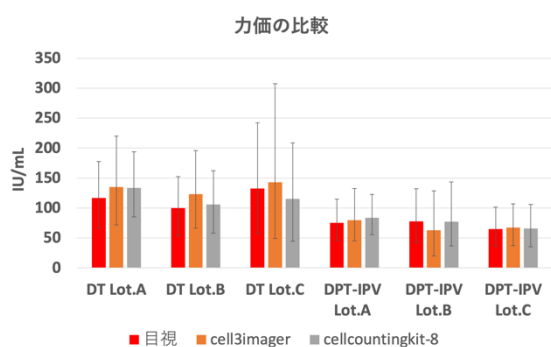


図 2. 2 種混合トキソイド (DT) および 4 種混合ワクチン (DPT-IPV) に含まれるジフテリアトキソイドの力価を目視 (赤)、イメージング装置 (橙)、細胞毒性アッセイキット (灰) で算出。各 3 ロットで実施。

D. 考察

ワクチン製造所との共同研究を行うため、契約書案の検討から締結まで 1 年という長時間を要したが、少なくとも共同研究が開始できる状態になり、次の段階に進むことが可能となった。

ジフテリアトキソイド力価試験では、Vero 細胞の生存率を用いて免疫したマウスの血中抗体価を算出している。本法は数十年前に方法が確立されているため、今でも当時の方法が用いられていることが多く、本試験においても Vero 細胞の生死判定は、顕微鏡を用いた目視で行っている。様々な方法が開発されている現在の状況において、目視で判定するという主観性の高い方法を継続することは好ましいとは言えないため、客観性の高い方法と比較したところ、現行法から客観性の高い方法へ移行することは可能であることが示された。

E. 結論

ジフテリアトキソイド無毒化試験の *in vitro* 法の開発について、共同研究を開始できる環境になったため、今後さらなる展開を望むことができる。

ジフテリアトキソイド力価試験について、現行法は主観性が高く、それゆえ、手技の習得に時間を要していたが、客観性の高い方法へ移行することが可能であることが示されたため、今後、これらの方法を国家検定などで使用できる環境を整える予定である。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし