

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	国立感染症研究所	細菌第二部第三室	室長
研究協力者	金 玄	国立感染症研究所	細菌第二部	主任研究官
	岩城 正昭	国立感染症研究所	安全管理研究センター	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。これまでの研究において、培養細胞を用いた試験法を開発・検討したところ、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、ワクチン製造メーカーにおいて、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、本法で検出可能か調べた。これにより、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調べることができる。

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を対象としており、これまでの研究において、培養細胞を用いた試験法を開発したことから、本法の生物学的製剤基準への収載を目指し、ワクチン製造メーカーに

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、および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検体（毒性が残存している検体）を調製し、検出可能か調べることが目的となっている。本年度はトキソイド化が不完全な検体について検討を行った。

B. 研究方法

国内でジフテリアトキソイドを製造しているメーカーにおいて、トキソイド化が不完全な検体を調製した。実際のワクチン製造と同一の方法で調製し、トキソイド化のステップのみ、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）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、細胞培養法およびウサギ法にて評価した。Vero 細胞の生死判定には、画像解析法として、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）、および生細胞の代謝能を利用する方法である MTT 法として、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 124148）

C. 研究結果

・トキシイド化が不完全な検体の細胞培養法による毒性検出

検体 A、B、C をそれぞれ 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、画像解析法では、検体 A および B では毒性は検出されず、検体 C のみ 2¹⁵ 倍希釈まで毒性が検出された。一方、MTT 法では、毒性が検出されなかったのは検体 A のみで、検体 B は原液、検体 C は 2¹⁵ 倍希釈まで毒性が検出された。検体 B の原液および検体 C の原液での画像解析法と MTT 法の結果の相違について、アルミニウムゲルが一定の濃度を超えると画像解析法では結果に影響を与えたと考えられた（図 1）。

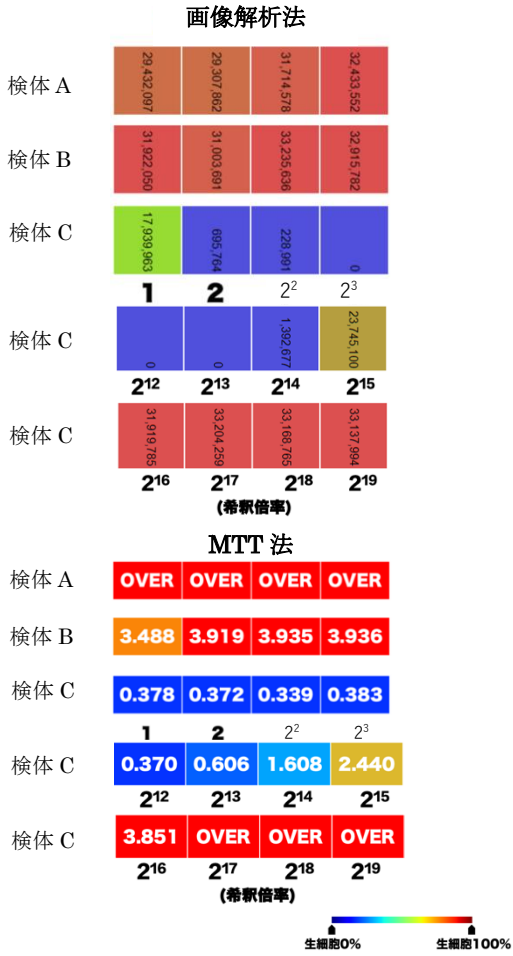


図 1. トキシイド化が不完全な検体の細胞培養法による毒性検出。細胞の生存率をヒートマップ方式で表示しており、赤を生存率 100%、青を生存率 0%とした。

・トキシイド化が不完全な検体のウサギ法による毒性検出

培養細胞法の結果を元に、検体 A および B の原液、2³ 倍希釈、検体 C の原液、2³、2⁷、2¹⁰、2¹³、2¹⁴、2¹⁵、2¹⁶ 倍希釈したものをウサギ皮内に接種し、2 日後に皮膚の状態を観察した。また、コントロールとして、4、1、0.1、0.01 MRD（最小反応投与量）のシック試験毒素を用いた。その結果、コントロールでは 4 および 1 MRD で発赤が認めら

れたが、0.1 および 0.01MRD では、発赤は認められなかった。検体 A および B では原液および 2^3 倍希釈のどちらも発赤は認められなかった。検体 C では、原液から 2^{13} 倍希釈まで発赤が認められた。 2^{14} 倍希釈においても小さい発赤が認められるが、本法において頻回に認められる接種痕と同程度のサイズであることから陰性とした（図 2）。

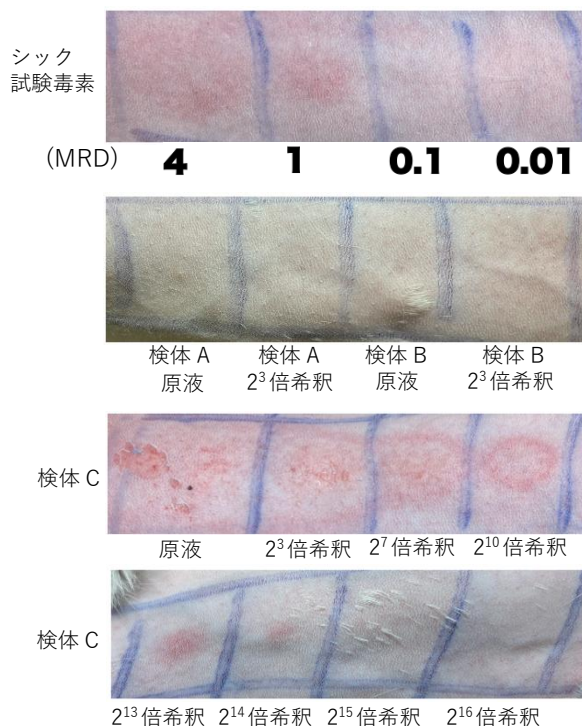


図 2. トキソイド化が不完全な検体のウサギ法による毒性検出。

D. 考察

トキソイド化が不完全な検体をワクチン製造メーカーにおいて実際のワクチン製造と同一の方法で調製し、アルミニウムゲルに吸着・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。その結果、細胞培養法で毒素検出することが可能であり、その感度はウサギ法の 4 倍程度であることが示された。また、細胞生存率の判定につい

て、画像解析法ではアルミニウムゲルが一定の濃度以上であると影響を受けるが、MTT 法では濃度に関係なく影響を受けないことが明らかとなった。

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開発した細胞培養法は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、細胞生存率の判定方法として、画像解析法は簡便であるが濃度が高いとアルミニウムゲルの影響を受けること、MTT 法はアルミニウムゲルの影響を受けないが手間と時間がかかることを考慮し、状況に応じて使い分けが必要であることが示された。今後、トキソイド化が不完全な検体について、ホルマリン濃度を変化させる方法以外で調製した検体を用いて検討すること、また、モルモット法との比較を行うことで、追加評価を実施することを考えている。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし