

動物用ワクチンの品質検査の変遷

平山紀夫¹

はじめに

感染症を防ぐにはワクチン接種による予防が最も有効な手段であり、1980年の天然痘、2011年の牛疫の根絶に果たしたワクチンの役割が如実に物語っている。ユーザーが求める動物用ワクチンとしては、良く効くこと、安全であること、使いやすいこと、安価であること等と思われる。このうち有効で安全なワクチンを担保するのが品質検査である。日本における動物用ワクチンの品質検査は、製造所での自家検査と動物医薬品検査所での国家検定で実施されてきた。この二重検査制度は、度々問題視されてきたが、国が品質検査法の改良・改善に貢献したのも事実である。本稿では、動物用ワクチンの品質検査に大きな影響を与えた国家検定の変遷についてとりまとめた。

1. 初期の品質検査

旧薬事法は、1948年に制定され、その第32条で「生物学的製剤等は大臣の定める基準に適合しなければならない」、更に、第33条で「大臣の指定した者の検査を受けて合格したものでなければ販売等をしてはならない」と規定された。動物用ワクチンについては、同時期に施行された動物用医薬品等取締規則¹⁾で詳細が定められ、動物用ワクチンの国家検定は、1948年に家畜衛生試験場検定部で開始された。

検定対象となるワクチンは動物用医薬品等取締規則の別表第一にリストアップされた19種類であった(表1)。品質検査は、同規則の別表第二に検定合格基準表として記載され、6種類のワクチン(炭疽、狂犬病、豚コレラ、豚丹毒、ブルセラ病及び破傷風ワクチン)に個別に適用される基準と上記6種類を含めた全てのワクチンに適用される一般的な基準が定められていた。

個別基準として豚丹毒生ワクチンを例にあげれば、①弱毒豚丹毒菌が5～6億個/mL含むもの、②マウスの皮下にワクチン0.1mLを注射し、1週間後に最少致死量の1万倍の菌を皮下に接種しても10日以上死なないものと規定されていた。現在

HIRAYAMA Norio : History of the Quality Control on Veterinary Vaccines

1. 麻布大学客員教授 連絡先: 〒183-0004 東京都府中市紅葉丘2-9-8-301 TEL. 042-361-0443
(2014年3月10日受付・2014年5月20日受理)

表1. 国家検定開始時の対象ワクチン

動物種	ワクチン*			
牛	炭疽第一(生)	破傷風	ブルセラ	トリコモナス
	炭疽第二(生)	気腫疽	子牛パラチフス	
馬	腺疫	馬流行性脳炎	馬パラチフス	
豚	豚疫	豚丹毒(生)	豚コレラ	
鶏	家きんコレラ	家きんジフテリア	家きんベスト	鶏痘(生)
犬	狂犬病(減毒)	ジステンパー		

* (生): 生ワクチン, (減毒): 減毒ワクチン, 他は不活化ワクチン

の基準に当てはめると、①は生菌数試験、②は力価試験に相当する。力価試験を実施していたワクチンは、わずか4種類にすぎなかった(豚コレラ、豚丹毒、ブルセラ病及び破傷風ワクチン)。

一般的な基準としては、以下の5項目が規定されていた。①異物・臭気がない、②無菌であること、③ホルマリンは0.4%以下、④生ワクチンの毒力が明確かつ一定、⑤規定使用量より若干多量に使用しても動物の機能又は生命に大なる影響がないこと。これらの試験項目は、それぞれ現在の①特性試験、②無菌試験、③防腐剤定量試験、④マーカー試験、⑤安全試験に相当するものである。

1951年の薬事法一部改正の際に、規則で動物用生物学的製剤の定義を広く読めるように変更し、全ての生物学的製剤を検定すべき医薬品として定めた。同時に、検定合格基準表は廃止され、動物用生物学的製剤検定一般基準及び検定特殊基準が定められた。

2. 動物医薬品検査所設立後の品質検査

(1) 動物医薬品検査所設立直後

動物用ワクチン等の国家検定を実施する動物医薬品検査所は、1956年に設立され、1959年に現在の国分寺市に移転され、品質検査業務が拡大・充実されるようになった。1959年当時の検定¹⁾では、特性、無菌(細菌性生ワクチンでは生菌数)、純粋及び安全試験が全てのワクチン(18種類)で実施されていたが、力価試験は一部のワクチン(狂犬病、豚コレラ、豚丹毒、破傷風、流行性脳炎及びニューカッスル病)でのみ実施されていた(表2)。

(2) 動物用生物学的製剤基準の制定

1972年、これまで検定特殊基準の定められていた主なワクチン(29種類)が新た

表2. 1959年の検定基準試験項目

ワクチン	特性	無菌	純粋	含湿度	真空度	安全	力価	その他
炭疽第二	○		○			○		生菌数
気腫疽	○	○	○			○		
流行性脳炎	○	○	○			○	○	
牛流行性感冒	○	○	○			○		
破傷風	○	○	○			○	○	
線疫	○	○	○			○		
馬パラチフス	○	○	○			○		
豚コレラ	○	○	○			○	○	
豚丹毒	○		○	○	○	○	○	生菌数
豚疫	○	○	○			○		
家きんコレラ	○	○	○			○		
鶏痘(生)	○	○*	○			○		発痘
鶏痘乾燥	○	○*		○	○	○		発痘
家きんジフテリア	○	○	○			○		
ニューカッスル病	○	○	○			○	○	
狂犬病	○	○	○			○	○	
ジステンパー	○	○	○			○		
ジステンパー乾燥	○	○	○	○	○	○		

○：検定実施項目

○*：生菌数限度試験

に制定された動物用生物学的製剤基準²⁾(以下「製剤基準」という)に収載され、それぞれの検査法を定めていた検定特殊基準及び検定一般基準も製剤基準に取り込まれた。同時に制定された動物用生物学的製剤検定基準(以下「検定基準」という)は、「製剤基準のそれぞれの製剤に規定する試験法によるものとする」との一文で、ただし書きで除外する試験項目が記載されたものであった。³⁾ 犬用ワクチンでは狂犬病ワクチンを除き力価試験は除外されたので、29種類のワクチンのうち力価試験を実施したのは19種類であった。

製剤基準に収載されなかったワクチンは、これまでの検定特殊基準で、その後新規に承認されたワクチンについてはその都度制定された特殊検定基準で検定が実施された。

(3) 製剤基準・検定基準の充実化

その後、製剤基準は、1987年に全面改正され、⁴⁾ 同時に特殊検定基準は全て廃止され、全面改定された検定基準に一本化された。⁵⁾ 全面改定された検定基準は、製剤ごとの記載となり、試験項目の分割・追加等がなされ、力価試験も一部の例外を除き多くのワクチンで実施されるようになった。表3に代表例としてニューカッスル病生ワクチンと狂犬病不活化ワクチンの試験項目を示した。ニューカッスル病生ワクチンでは含湿度及び染色試験の追加、更には溶解用液についての特性及び水素イオン濃度試験が追加された。狂犬病不活化ワクチンでは水素イオン濃度及び蛋白窒素定量試験が追加され、安全試験として実施されていた試験項目を不活化及び異常毒性試験に分割し、異常毒性試験に使用する動物種もマウスが追加された。1980年代後半から1990年代前半にかけて検定での試験項目が最も多く、規制強化の時代であった。

表3. 検定基準試験項目の変遷

(1) ニューカッスル病生ワクチン

	特 性	真 空 度	含 湿 度	染 色	マイ コ プラ ズ マ 否 定	サ ル モ ネ ラ 否 定	生 菌 数 限 度	否 定 迷 入 ウ イ ル ス	含 有 量 ウ イ ル ス	マ ー カ ー	安 全	力 価	溶 解 用 液 特 性	溶 解 用 p H
1972年基準	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○		
1987年基準	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

(2) 狂犬病不活化ワクチン

	特 性	p H	無 菌	染 色	蛋 白 窒 素	安 全	不 活 化	異 常 毒 性	力 価
1972年基準	○		○	○		○			○
1987年基準	○	○	○	○	○		○	○	○

○：検定実施項目

(4) 検定での試験項目の削減

1985年以降、経済の国際化や農畜産物の自由化に伴い、各種規制の見直しが進められ、動物用医薬品もその対象とされた。動物用ワクチンの検定項目のうち試験成績が安定している理化学検査から見直しが始められた。1985年には防腐剤定量試験が削除、⁶⁾ 1992年には特性、真空度、含湿度、染色試験及び溶解用液の試験

が削除,⁷⁾ 1995年には水素イオン濃度試験及び対象動物での安全試験を実施しているワクチンについて異常毒性試験が削除された。⁸⁾ 一方、生ワクチンについては、製造用株の維持・管理が厳密に行えるようになったことから、2000年から順次、検定では力価試験が削除された。2002年、検定基準の全面改正で計36種類の生ワクチンについて力価試験が廃止された。^{9,10)}

(5) シードロットシステムの導入

生ワクチンの品質検査から力価試験を削除するという考え方を更に一歩進めて、欧米で既に採用されていたシードロットシステムが2008年に導入された。まず、製剤基準にシードに関する定義・試験法・規格を追加し、¹¹⁾ それらに合致するワクチンを個別に承認する方法で進められた。2009年7月に6品目が承認され、2013年8月現在169品目にのぼっている。シードロットシステムを採用していないワクチンと区別するため、ワクチンの一般的名称の末尾に「(シード)」を記載することとなっている。

シードロットの定義は、「単一培養で得られた特定のウイルス、細菌、細胞等の均一な浮遊液であって、その遺伝的性質が十分に安定した条件で保存されているもの」と規定されている。シードロットシステムの利点は、ワクチン製造の上流、即ち、シードを適切に維持管理することにより、ワクチン製造の下流、即ち最終製品の品質検査を省略しても良いことである。そこでシードロット製剤は、原則国家検定の対象から除外された。ただし、①再審査中のワクチン、②法定家畜伝染病を対象とするワクチン及び③狂犬病ワクチンは、当分国家検定が実施される。

3. ワクチンの力価試験法の変遷

(1) 攻撃試験

ワクチンの有効性を証明する方法としては、ワクチンを開発した Jenner や Pasteur が行ったように免疫した個体に強毒株で攻撃し防御するか否かをみる攻撃試験が一般的である。特に動物用ワクチンでは試験に対象動物を使用できることから、攻撃により再現良く発症・死亡する場合には極めて簡単かつ優れた方法である。

一方、攻撃試験の短所として、強毒株を取り扱う危険性や抗体フリーで均質な対象動物が必要となることが挙げられる。現在においても比較的簡単に入手できる対象動物は鶏のみである。

なお、牛及び豚用の細菌性ワクチンや日本脳炎不活化ワクチンでは対象動物の代わりにマウスやモルモットを用いた攻撃試験が実施されている。

(2) 抗体測定試験

攻撃試験は、強毒株や人獣共通感染症の病原体を使用することから、病原体を

封じ込める試験施設が必要であり、取扱者もその感染を防御する必要がある。そこでワクチン接種動物の抗体レベルと攻撃後の感染防御との相関性を調べ、感染防御に必要な抗体価を測定することで攻撃試験の代替とした。抗体測定試験は、牛及び豚のウイルス性生ワクチンで採用された。始めは対象動物を使用した。抗体フリーの動物の入手が困難なことや高価であること等からマウス、モルモット、ラット、ハムスター、ウサギ等の実験小動物へと変遷した。また、抗体測定法も凝集試験、赤血球凝集抑制試験、中和試験が主に行われていたが、近年ではELSA法が多用されている。

(3) 抗原定量試験

攻撃試験や抗体測定試験は、試験期間が4～7週間と長いこと、動物愛護の関連で動物が使用しにくくなったこと、生きた微生物を取り扱い危険なこと等からワクチン中に含有する感染防御抗原量を直接測定する方法が検討された。この試験法の開発に成功した最初のもは、1996年の狂犬病組織培養不活化ワクチンである。狂犬病ウイルスの感染防御抗原であるG蛋白をサンドイッチ・エライザ法で測定するもので、攻撃試験や抗体測定試験の短所を全てクリアーし、2日間という短時間で終了する極めて画期的な力価試験法である。本法の開発により、検査が簡便になっただけでなく、製造工程で頻繁に力価が測定でき、その結果を直ちに製造に反映させることができるようになった。

2000年代に入り抗原定量試験を採用するワクチンが承認されるようになり、今後とも増加するものと思われる。なお、抗原定量試験は不活化ワクチンの力価試験法として採用されたが、ワクチン中の抗原量を定量するという考え方は生ワクチンにも当てはめることが可能である。2の(4)で述べたように、多くの生ワクチンで生菌数試験あるいはウイルス含有量試験が力価試験の代替として行われている。

4. 狂犬病ワクチンの力価試験法の変遷

上述したように狂犬病組織培養不活化ワクチンの力価試験法に抗原定量試験が採用されているが、狂犬病ワクチンの力価試験法の変遷を紹介する。

日本で使用された狂犬病ワクチンは、1950年までは減毒ワクチンであったが、1951年からは不活化ワクチンが使用されている。¹²⁾ 不活化ワクチンの概要を表4に示した。

(1) Habel法

Habel法¹³⁾は、狂犬病不活化ワクチンが承認された1951年度から力価試験法として採用され、1977年度まで実施された。図1に示したように、3～4週齢のマウス

90匹を用いた攻撃試験法である。免疫群50匹のマウスに40倍に希釈したワクチン0.25mLを腹腔内に隔日に6回注射する。初回免疫から14日後に免疫マウスを10匹ずつ5群に分け、各群のマウスに 10^{-1} から 10^{-5} に希釈したCVS株を0.03mLずつ脳内に接種する。同時に、対照群40匹を10匹ずつ4群に分け、各群のマウスに 10^{-5} から 10^{-8} に希釈したCVS株を0.03mLずつ脳内に接種する。攻撃後14日間観察し

表4. 狂犬病不活化ワクチンの概要

ワクチン名	狂犬病不活化ワクチン	狂犬病精製不活化ワクチン	狂犬病組織培養不活化ワクチン
使用年代	1951～1977	1978～1983	1984～
製造用株	西ヶ原株	西ヶ原株	RC・HL株
製造材料	山羊脳	山羊又はマウス脳	HmLu細胞
不活化剤	ホルマリン	β -プロピオラクトン 又は紫外線	β -プロピオラクトン
蛋白窒素量	規定なし	200 μ /mL以下	100 μ /mL以下
注射回数	年2回	年2回	年1回
注射量	体重7Kg以下：3mL, 7～18Kg：5mL, 18Kg以上：7～10mL	2mL	1mL
適用動物	犬	犬	犬及び猫

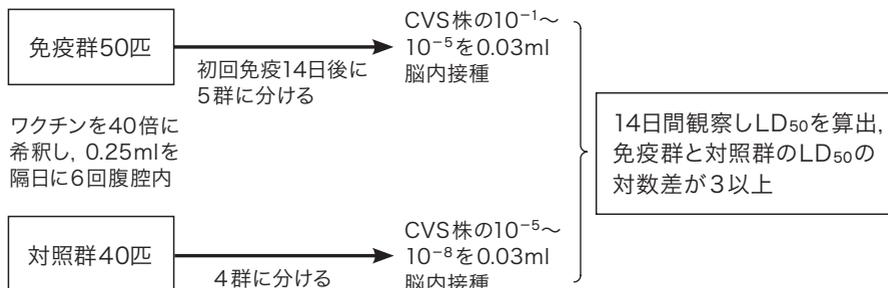
図1. 狂犬病ワクチンの力価試験

(1) Habel法

実施年度と対象ワクチン：1951～1977年度不活化ワクチン

試験動物：3～4週齢のマウス90匹

試験期間：4週間



LD₅₀を算出する。免疫群と対照群のLD₅₀の対数差が3以上あれば合格と判定する。

本法は、多数のマウスを使用すること、免疫注射が隔日で6回も行うこと、攻撃方法が0.03mLずつの脳内接種と煩雑であること等の試験実施上のデメリットが指摘されていた。また、試験成績に矛盾現象(攻撃ウイルス量が多い群で生存するマウスがでる)が認められることもあり、試験法の改良が求められた。

(2) モルモット法

源が開発したモルモット法^{14, 15, 16)}は、1978年度から1995年度まで実施された。図2に示したように400gのモルモット20匹を用いた攻撃試験法である。希釈したワクチン(組織培養不活化ワクチンは20倍に希釈)0.5mLを10匹の免疫群の皮下に1回注射する。免疫3週間後に、対照群とともにCVS株0.2mLずつ頬筋内に接種し、14日間観察する。対照群の死亡率が80%以上で、免疫群の生存率が70%以上の場合、合格と判定する。

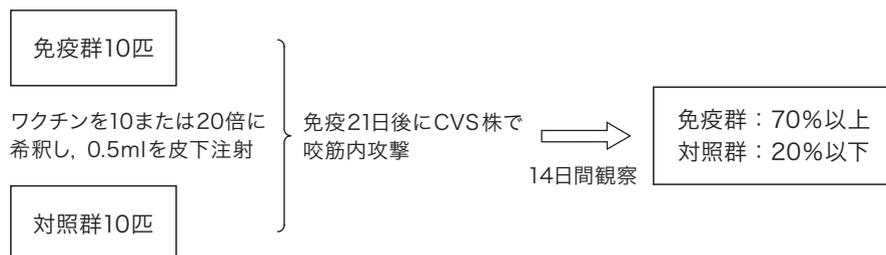
図2. 狂犬病ワクチンの力価試験

(2) モルモット法

実施年度と対象ワクチン：1978～1983年度 精製不活化ワクチン、
1984～1995年度 組織培養不活化ワクチン

試験動物：400gのモルモット20匹

試験期間：5週間



モルモット法は、使用動物数が少なく、免疫注射が1回で、攻撃方法も0.2mLずつの頬筋内注射であり、Habel法と比べると多くの点で改良された。なお、モルモット法の合格基準である70%という数値は、開発時に行った多くの試験成績を統計学的に解析した結果、本法では30%の誤差が生じることがわかったためである。すなわち、100%防御するワクチンを製造しても、試験によっては70%を示す場合があり得るといことである。このため仮に、70%防御するようなワクチンを製造してしまうと、試験によっては40%を示し、不合格となることも起き、しばしば問題と

なった。

(3) ELISA法による抗原定量法

蒲生らが開発したELISA法による抗原定量法^{17,18)}は、1996年度以降採用されている。図3に示したように本法は、動物や攻撃ウイルスを用いることなく、試験期間も2日間で終了するという極めて画期的な試験法である。狂犬病ウイルスの感染防御抗原は、G蛋白であるが、ウイルスを培養すると可溶性のG蛋白(Gs蛋白)が溶出する。このGs蛋白は、中和活性のあるモノクローナル抗体(MAb)と結合するが、動物に防御能を付与することができない。そこで、ワクチンを高速液体クロマトグラフでゲルろ過し、ウイルス粒子のみを抽出するステップを加え、感染防御能を持つG蛋白のみを定量する方法が考案された。G蛋白の定量法としては、1985年にLafonら¹⁹⁾が報告したMAbを用いるサンドイッチELISA法を準用している。

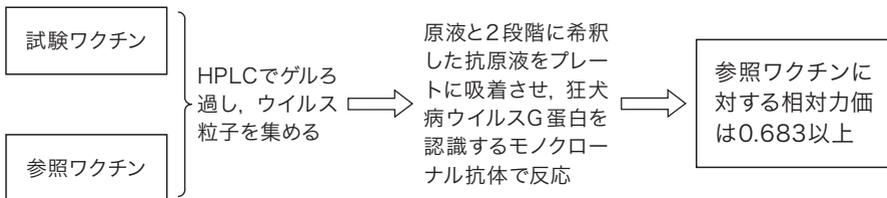
図3. 狂犬病ワクチンの力価試験

(3) ELISA法による抗原定量法

実施年度と対象ワクチン：1996年度～組織培養不活化ワクチン

試験の特徴：*In vitro*の試験，動物や狂犬病ウイルスを使用しない

試験期間：2日間



蒲生らの開発した試験法は、参照ワクチンとの相対力価を求めるものであり、参照ワクチンの品質が極めて重要となる。試験に用いる参照ワクチンは、市販ワクチンと同様に製造し、凍結乾燥したものである。当該ワクチンの力価を3種類の方法で測定したところ、①当時の力価試験法であったモルモット法で3倍希釈まで合格、②国際的に使用されている力価試験法であるNIH法で3.71国際単位/doseを示し、③犬に4倍希釈したものを注射しても1年間感染防御抗体を持続するという成績が得られた²⁰⁾ これらの成績から、当該ワクチンを3倍に希釈したものを参照ワクチンとして使用している。

なお、日本の組織培養不活化ワクチンにはアジュバントが添加されていないため本試験法が導入し易かったが、海外で使用されている狂犬病ワクチンの多くに

はアジュバントが添加されているので、アジュバント添加ワクチンにも応用できる抗原定量法の開発が待たれる。

おわりに

ワクチンの品質管理部門は、裏方的な存在であるが、安全・有効なワクチンを製造するためには適切な品質検査法が必須である。検査法は、旧態依然としたものではなく、最新の科学・技術レベルに合わせてより効率的な検査法に改良していく必要があり、この分野の更なる発展を期待するものである。

参考文献

- 1) 蒲池五四郎ほか：薬事行政，家畜衛生史 666-678 日本獣医師会 東京(1982)
- 2) 動物用生物学的製剤基準，昭和47年(1972)2月5日付け 農林省告示第47号
- 3) 動物用生物学的製剤検定基準，昭和47年(1972)2月5日付け 農林省告示第48号
- 4) 動物用生物学的製剤基準，昭和62年(1987)5月12日付け 農林水産省告示第599号
- 5) 動物用生物学的製剤検定基準，昭和62年(1987)5月12日付け 農林水産省告示第600号
- 6) 動物用生物学的製剤検定基準(一部改正)，昭和60年(1985)12月19日付け 農林水産省告示第1806号
- 7) 動物用生物学的製剤検定基準，平成4年(1992)6月16日付け 農林水産省告示第721号
- 8) 動物用生物学的製剤検定基準，平成7年(1995)9月25日付け 農林水産省告示第1542号
- 9) 動物用生物学的製剤検定基準，平成14年(2002)10月3日付け 農林水産省告示第1568号
- 10) 農林水産省動物医薬品検査所：動物用生物学製剤検定基準の全部改正について，動物医薬品検査所年報，第40号，96-99(2003)
- 11) 動物用生物学的製剤基準，平成20年(2008)3月21日付け 農林水産省告示第425号
- 12) 倉田一明：動物用ワクチンの概要とその正しい使い方 30.狂犬病ワクチン，日本獣医誌会雑誌，35，251-254(1982)
- 13) Habel, K. : Evaluation of a mouse test for the standardization of the immunizing power of anti-rabies vaccine, Public Health Rep. 55, 1473-1487(1940)
- 14) 源 宣之ほか：モルモットを用いた狂犬病ワクチンの力価試験法について，第75回日本獣医学会講演要旨，295(1973)
- 15) 源 宣之ほか：モルモットを用いた狂犬病ワクチンの力価試験法について(第2報)，第76回日本獣医学会講演要旨，45(1973)
- 16) 源 宣之ほか：モルモットを用いた狂犬病ワクチンの力価試験法について(第3報)，第81回日本獣医学会講演要旨，138(1976)
- 17) Gamoh, K. et al. : Use of ELISA for in vitro potency test of rabies vaccines for animal use, Biological 24, 95-101(1996)
- 18) 蒲生恒一郎ほか：動物用狂犬病組織培養不活化ワクチンのELISA法による相対力価

定量法の標準化, 獣医情報科学雑誌 No.34, 15-23(1995)

- 19) Lafon, P. et al.: Use a monoclonal antibody for quantitation of rabies vaccine glycoprotein by enzyme immunoassay, J. Biol. Stand. 13, 295-301(1985)
- 20) Gamoh, K. et al: Establishment of a potency test by ELISA for a rabies vaccine for animal use, J. Vet Med. Sci. 65, 685-688(2003)

Summary

History of the Quality Control on Veterinary Vaccines

HIRAYAMA Norio¹

Smallpox and Rinderpest are two infectious diseases which have been eradicated from the earth. Vaccines had a very important role for these eradications.

The safety and efficacy of vaccines are ensured by a quality control. The quality control of veterinary vaccines in Japan has been conducted both by the National Veterinary Assay Laboratory and the licensed manufacturers. This document outlines the national assay of veterinary vaccines.

The national assay of veterinary vaccines commenced in 1948 in the National Institute of Animal Health. At that time 19 vaccines were come under the assay. The property, sterility, formaldehyde concentration and safety tests were carried out in all vaccines, but the potency test was done in only 4 vaccines.

The National Veterinary Assay Laboratory was established in 1959 as an official assay organization. When Minimum requirements for veterinary biological products (MR) and national assay standard of biological products (NAS) were enacted in 1972, the potency test was carried out in 19 of 29 vaccines listed in the NAS. In completely revised MR and NAS in 1987, a kind of tests increased and the potency tests were done in many vaccines.

Until the beginning of the 1990s it was tightened enforcement of the national assay. After that a relaxation of controls has started. Some of tests were gradually deleted from the national assay. For example, these tests were physicochemical tests such as the humidity and vacuum tests in 1992, the pH and abnormal toxicity tests in 1995, and the potency test of live vaccines in 2000. Since 2008, the national assay of vaccines produced under the seed lot system has not been carried out in principles.

Three methods have been used as the potency test which is very important to ensure the efficacy of vaccine. The most standard method is so-called

challenge test, in which vaccinated animals were challenged with a virulent strain and then the survival rate was calculated. The second and third methods are to measure the antibody level of vaccinated animals and quantity of the protective antigen in vaccine. These potency tests are also outlined.

1. HIRAYAMA Norio

Visiting professor, Azabu University 2-9-8-301, Momijigaoka, Fuchu, Tokyo 183-0004. Japan