［プロジェクト研究終了報告］

動物用生物学的製剤用標準品の確保（フェーズ２）

木島まゆみ、相原尚之、曳地七星、落合絢子、中島奈緒、臼井優、飯田将行、
今村彩貴、平野文哉、牧　雅大、小佐々隆志、中村成幸、鈴木祥子、関口秀人、
永井英貴、大石弘司

（受付：平成 28 年 7 月 15 日、受理：平成 28 年 10 月 5 日）

［FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY］

PREPARATION OF NATIONAL STANDARDS FOR VETERINARY BIOLOGICALS (PHASE 2)

Mayumi KIJIMA, Naoyuki AIHARA, Nanase HIKICHI, Mariko OCHIAI, Nao NAKAJIMA,
Masaru USUI, Masayuki IIDA, Saiki IMAMURA, Fumiya HIRANO, Masahiro MAKI,
Takashi KOZASA, Shigeyuki NAKAMURA, Shoko SUZUKI, Hideto SEKIGUCHI,
Hidetaka NAGAI, Koji OISHI

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan

（Received: 15th Jul 2016, Accepted: 5th Oct 2016）

Abstract

For the quality control of veterinary medicinal products（VMPs）, standard biological agents such as standard antigens, sera, bacteria, and viruses are essential materials for challenge tests. The National Veterinary Assay Laboratory（NVAL） therefore, provides the standard biological agents under the Notice of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. From 2011 to 2015, we newly established 11 National Biological Standards including tetanus toxoid adsorbed, anti-classical swine fever virus serum, lymphocytic choriomeningitis virus-positive slides, and standard influenza vaccine for chicken cell agglutination. In addition, 227 strains of bacteria and viruses were introduced to the NVAL databese as reference strains. During the course of our projects, 64 sets of newly established standards and 198 reference strains were distributed to VMP manufactures, livestock hygiene service centers, and other laboratories.

要旨

標準抗原・血清、攻撃用微生物株等の標準品は、医薬品の品質管理のために重要な資材であり、動物医薬品検査所では、動物医薬品検査所標準製剤等配布規程（配布規程）に基づき、動物用医薬品の製造業者等に対して配布を行っている。今回、業務プロジェクト研究において、標準沈降破傷風トキソイドほか 11 品目

の標準品について作製・評定等を行った後、配布規程への新規収載又は更新を行った。この結果、生物学的製剤関連の標準品数は 35 品目となった。また、家畜衛生微生物株 227 株を導入し、配布規程の別表リストに収載するとともに、必要に応じて保管ロットの更新を行った。本プロジェクトにおいて作製・導入した標準品に対する外部機関からの配布依頼は、5 年間で標準品 64 本（組）、家畜衛生微生物株 198 本であり、動物用医薬品の製造販売業者を始め、広く利用されている。

緒言

本報告は、平成 23 年度から平成 27 年度までの 5 年間に実施した業務プロジェクト研究「動物用生物学的製剤用標準品の確保（フェーズ 2)」について、その成果概要をまとめたものである。

目的

動物医薬品検査所（動薬検）は、動物用医薬品の品質確保等の観点から、動物医薬品検査所標準製剤等配布規程（配布規程；農林省 1970）に基づき、動物用医薬品の製造業者等に対して標準品等を配布している。このうち、生物学的製剤用の標準品としては、抗原、血清、参照ワクチン、攻撃用微生物株等があり、ワクチンの標準化や力価試験の評価等に用いられている。

標準品については、動薬検が作製・管理を実施しているが、これまで国立感染症研究所（感染研）から供給されていた標準品の一部が情勢の変化により入手困難になったこと、及びシードロットシステムの外来性ウイルス否定試験に必要な抗体等、新規の標準品を迅速に作製する必要が出てきたことから、平成 23 年度から 27 年度までの業務プロジェクトとして、①標準品の作製・評定、②評定結果の公表、③配布規程への収載、及び④動物用生物学的製剤基準（製剤基準；農林水産省 2002）等の関連基準の改定を行った。

また、動薬検では、家畜伝染病の診断における参照株、生物学的製剤の製造用株の作出過程における性状確認の参照株等に供する目的で家畜衛生微生物株を配布しており、家畜衛生菌株収集事業対象株を導入することにより標準微生物の充実を図った。

研究成果の概要

１．感染研が配布する標準品の代替品

(1) 標準沈降破傷風トキソイド、標準破傷風抗毒素及び破傷風試験毒素の評定

家畜における破傷風の予防には動物用の破傷風トキソイドが、予防及び治療には動物用の破傷風抗毒素が用いられている。これらの製剤の力価試験は、これまで「感染研が配布する標準品」を用いて行われていたが、情勢の変化により安定的な入手が困難になったため、これらと同等の力価を有する動物用の標準品を作製することとした。

標準沈降破傷風トキソイドについては、新標準品の候補品を（一財）化学及血

清療法研究所（化血研）に委託して製造し、製剤基準の破傷風（アジュバント加）トキソイドのマウスを用いた力価試験に準拠して感染研、化血研、日生研㈱及び動薬検の 4 機関で力価評定を行った。すなわち、試験品又は標準品をマウスに注射し、一定期間経過後に攻撃用毒素（動物用破傷風試験毒素；4.2 × $10^6 LD_{50}$ ／バイアル）を注射して、7 日間の症状を個体ごとにスコア化し、平行線検定により力価を算出した。合計 11 回の成績を平行線検定により統計処理した結果、評定された力価が 160 国際単位（IU）／バイアルと十分な力価であったことから、破傷風試験毒素とともに、新標準品として配布規程に収載した（臼井ら 2013）。

標準破傷風抗毒素についても同様に、北里第一三共ワクチン㈱（北研）に製造委託した候補品について、感染研、北研及び動薬検の 3 機関で合計 13 回の試験を実施し、得られた成績を統計処理して力価を 39.9IU/mL と評定し、配布規程に収載した（Hirano et al. 2016）。また、製剤基準の一部改正を行い、「国立感染症研究所から配布される標準品」を「動物医薬品検査所から配布される標準品」に変更した。

(2) 標準インフルエンザワクチン（CCA 用）の作製（落合ら 2014）

Chicken Cell Agglutination（CCA）価測定試験は、馬及び豚インフルエンザ不活化ワクチンの原液の力価試験法の一つであり、ワクチンの主要有効成分であるヘマグルチニン含量を鶏赤血球の沈降速度の変化から測定するものである。測定には、1,000CCA 単位/mL の標準品が必要とされる。CCA 価はワクチンの剤型によって大きく変動することが知られており、スプリットワクチンが主流であるヒト用インフルエンザワクチンでは別の測定法（一元放射免疫拡散法）が採用されていることから、今後、感染研からの標準品の入手が困難になることが想定された。

このため、日生研（株）に製造委託した濃縮不活化ウイルス原液を希釈して CCA 価を測定したのち、希釈液及び 10%アジ化ナトリウムを加えて力価等を調整した。また、調整後、力価が 1,000 ± 5%CCA/mL であることを再度確認し、標準品として配布規程に収載した。

２．シードロットシステムの外来性ウイルス否定試験に必要な標準品

(1) リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（Lymphocytic Choriomeningitis Virus; LCMV）否定試験に用いる抗体検出用スライド及び参照陽性抗血清の作製（相原ら 2012）

LCMV はアレナウイルス科の一本鎖 RNA ウイルスで、げっ歯類を主な宿主とするがヒトにも感染する。動物用生物学的製剤のシードロットシステムの外来性ウイルス否定試験の中で、LCMV は「混入していないことを確認すべき外来性因子」として定められているものの、公的機関による標準品の配布は行われていない。このため、参照用抗血清及び検出用抗体の作製を行うとともに、試験法の感度についても比較試験を行った。

まず、LCMV 核たん白を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、Tn5 細胞に感染させて発現たん白を得た。これを粗精製後、ウサギに免疫して高力価の抗 LCMV ウサギ血清を得、凍結乾燥したものを標準抗血清とした。

次に、LCMV を感染させた VeroE6 細胞を LCMV 非感染細胞と混合して濃度調整

したものをスライドグラスに載せ、紫外線で LCMV を不活化後にアセトン固定したものを LCMV 抗体検出用スライドグラスとした。作成した LCMV 抗体検出用スライドグラスを用いて、抗 LCMV ウサギ免疫標準抗血清で蛍光抗体法による免疫染色を行ったところ、標準抗血清は、LCMV 感染細胞のみに特異的に反応した。抗血清は、1,000 ～ 2,000 倍希釈して使用することで十分な感度が得られることが確認された。

(2) 猫白血病ウイルス（FeLV）感受性細胞（Clone81）の性状確認

従来、FeLV の外来性ウイルス否定試験には CC81 細胞が用いられてきたが、所有権上の問題から一般に配布することができないため、代替細胞について検討を行った。公的機関からの入手が可能な細胞のなかに CRFK 細胞をマウス肉腫ウイルスで形質転換させた Clone81 細胞という細胞があったことから、FeLV に対する感受性の比較を行った。その結果、両細胞でおおむね同等の成績が得られたことから、Clone81 細胞を FeLV の外来性ウイルス否定試験に用いることができると考えられた。これについては、今後、その成績を紹介することにより、代替標準品としたい。

３．その他の標準品

(1) ぶりビブリオ病不活化ワクチンの有効性評価における凝集抗体価測定法の標準化（中島ら 2014）

ぶりビブリオ病不活化ワクチン（混合製剤を含む。）の多くは凝集抗体価の測定によってワクチン力価試験を実施しているが、参照陽性血清の力価、凝集抗原用株等が製造販売業者によって異なっていたことから、試験系の標準化を行った。

まず、*Vibrio anguillarum* 血清型 J-O-3 型株の死菌をブリに接種して抗血清を作製し、凝集抗体価が 256 ～ 512 倍となるように濃度を調整して凍結乾燥したものを参照陽性血清とした。また、家畜衛生微生物株である PT-213 株を凝集反応用抗原用株として選定するとともに、凝集抗原作出方法をプロトコールとして公表した。

さらに、これらの試験系の標準化が既存の市販ワクチンの力価判定に影響がないことを確認した後、前述の参照陽性血清を「参照ビブリオ病力価試験用陽性血清」として配布規程に収載した。

(2) 参照抗豚コレラウイルス（CSFV）豚血清の作製（飯田ら 2012）

オーエスキー病（AD）診断用体外診断薬の特異性試験において、対照血清として抗 CSFV 参照血清が必要なことから、これを作製した。

まず、豚 CSFV GPE株を豚の頸部筋肉内に接種し、4 か月後に採血を行って凍結乾燥したものを抗 CSFV 血清とした。抗 CSFV 血清は、CSFV に対する中和抗体価が 1,024 倍であり、「オーエスキー病ウイルス糖たん白 gI 抗体識別用酵素抗体反応キット（ 抗原吸着・ペルオキシダーゼ標識抗体）」の検定基準における抗豚コレラウイルス血清の「64 倍以上」という規格を満たしていた。また、AD 診断用エライザキットの特異性試験の規格にも適合したことから、AD 診断薬の特異性試験における対照血清として配布規程に収載した。

なお、抗 CSFV 参照血清については、第 1 ロットとして 105 本作製したが、配

布依頼及び国家検定における使用本数が多かったことから、2016 年 3 月に 2 ロット目を作製し、-80 ℃での保管を開始した。

(3) 産卵低下症候群－ 1976（EDS-76）不活化ワクチン用赤血球凝集（HA）抗原及び参照陽性血清の作製（曳地ら 2014）

EDS76 不活化ワクチンの力価試験は、ワクチンを注射した鶏の血清を用いた赤血球凝集抑制試験（HI 試験）により行われており、この試験に用いる HA 抗原については、製剤基準においてその規格が設定されていることから、HA 抗原及び２種類の参照陽性血清を作製した。

まず、EDS-76 ウイルス JPA-1 株を鶏胚肝初代細胞で増殖させ、高 HA 価の培養上清をホルマリンで不活化後、乳糖を 5w/v %となるように添加してバイアルに分注し、凍結乾燥を行ったものを力価試験用 HA 抗原とした。また、ウイルス不活化抗原にアジュバントを加えて鶏に免疫して得た抗血清を陰性血清で希釈し、高及び中力価となるように調製後、保存剤を加えて凍結乾燥したものを参照陽性血清とした。HA 抗原の HA 価は 640 倍、高及び中力価の参照陽性血清の HI 抗体価はそれぞれ 256 倍及び 64 倍であり、測定値の再現性も確認されたことから、EDS-76 不活化ワクチンの力価試験の標準品として、配布規程に収載した。

(4) 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス（BVDV）陰性の牛精巣継代細胞（BT 細胞）及び BVDV 参照血清の作製

動薬検で樹立した BT 細胞を増殖させ、小分けして液体窒素に保存した。保存後の細胞について迷入ウイルス否定試験を行い、BVDV 陰性であることを確認した。また、BVDV の新しいタイプ（BVDV3 型；HoBi-like ペスチウイルス）についても、Nose 干渉法により本細胞で検出が可能であることを確認した。

さらに、抗 BVDV 参照血清について、BVDV 抗体陰性血清を用いて参照陽性血清（抗 Nose 株牛血清）を高・中・低力価となるように調製して凍結乾燥した。

(5) 標準ツベルクリンのロット更新

動物用標準ツベルクリンは、平成 18 年に 1 ロット目（バイアル品）が作製され、動薬検の標準品として配布されることとなった（高橋ら 2006）。このロットについて、平成 23 年に保存安定性を確認したところ、力価が若干低下していたことからロットの更新を行うこととした。新ロットはアンプル充填品とし、委託製造者の化血研と動薬検で原液段階で 2 回、小分け段階で 1 回の力価試験を行い、最終的に WHO の国際標準品（Old）に対する相対力価 1.05 と評定した。また、窒素充填アンプル及びバイアル品についても数本ずつ作製し、保存安定性の比較材料とした。動物用ツベルクリンの力価は、標準ツベルクリンに対する相対力価として算定されることから、標準ツベルクリンの力価評定は非常に重要であり、今後も必要に応じたロット更新を行う予定である。

４．家畜衛生微生物株の導入

家畜衛生微生物株には、平成 19 年度から平成 21 年度に実施された家畜衛生菌株ライブラリー化事業及び平成 22 年度から平成 27 年度に実施された家畜衛生菌株収集事業により収集された微生物株の２種類があり、家畜の伝染病の診断にお

ける参照株等として供するために、地方公共団体、動物用医薬品の製造販売業者等に配布されている。毎年、多くの株の導入・保管・配布作業が必要なことから、動物用生物学的製剤用標準品の確保（フェーズ 2）の一環として位置づけて作業を行った。

家畜衛生微生物株については、5 年間で 227 株を導入し、配布規程の別表リストに収載するとともに、必要に応じて保管ロットの更新を行った。

５．標準品の配布

以上、配布規程に収載された動物用生物学的製剤関連の標準品数は、本プロジェクトの 5 年間で 9 品目増え、26 品目から 35 品目となった（表）。これらの標準品等の配布実績は 5 年間で 64 本（組）、家畜衛生微生物株は 198 本であり、家畜衛生微生物株の配布先について過去 4 年分を集計したところ、①動物用医薬品の製造販売業者が 80 本、②家畜保健衛生所が 36 本、③その他の研究機関等が 53 本で、動物用医薬品の製造販売業者以外にも、大学やその他の研究機関、家畜保健衛生所等で利用されている。

まとめ

生物学的製剤用標準品の確保（フェーズ 2）おいて、11 品目の標準品について、配布規程への新規収載又は更新を行った。特に、優先順位の高い「情勢の変化により入手困難になった標準品」については、製剤基準、配布規程等の関連基準の改正を含めた全ての作業を完了した。また、本プロジェクトで作製・導入した標準品に対して、外部機関からの配布依頼が 5 年間に標準品 64 本（組）、家畜衛生微生物株 198 本あり、本プロジェクトの成果は大きいと考えられた。

標準品は、動物用医薬品の品質管理上、非常に重要なものであることから、配布規程への収載後も保存安定性の確認を含めた継続的な管理、及び必要に応じたロット更新が必要である。このため、今後、標準品の作製方法に関する標準作業手順書（SOP）を作成し、継続的な管理を行うための体制の強化を図ることとしたい。

また、家畜衛生微生物株については、動薬検で分離・培養等を実施した経験のない微生物が含まれていることを考慮すると、技術の継承に加え、新たな技術の修得も必要と考えられた。

学術雑誌への投稿

1. 相原尚之、堀内雅之、落合絢子、森川茂、中村成幸、大石弘司（2012）リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス否定試験に用いる抗体検出用スライド及び参照陽性抗血清の作製 動物医薬品検査所年報 50, 121-130.
2. 曳地七星、嶋﨑洋子、石川容子、鈴木祥子、蒲生恒一郎、中溝万里、中村成幸、大石弘司（2014）　産卵低下症候群－ 1976 不活化ワクチン力価試験用赤血球凝集抗原及び参照血清の作製と評価　動物医薬品検査所年報 52, 137-142.

3. 飯田将行、石丸雅敏、大石弘司（2012）　オーエスキー病体外診断用医薬品の特異性試験に用いる抗豚コレラウイルス豚血清の作製及び評定　動物医薬品検査所年報 50, 141-145.
4. 中島奈緒、川西路子、平野文哉、今村彩貴、内山万利子、山本欣也、永井英貴、木島まゆみ（2014）　ぶりビブリオ病不活化ワクチンの有効性評価における凝集抗体価測定法の標準化について　魚病研究（Fish Pathology）49, 31-34.
5. 落合絢子、長坂孝雄、成嶋理恵、荒尾恵、石丸雅敏、関口秀人、大石弘司（2014）　標準インフルエンザワクチン（CCA 用）の製造　動物医薬品検査所年報 52, 133-136.
6. 臼井優、川西路子、森山毅、草薙公一、山本明彦、永井英貴（2013）　動物用標準沈降破傷風トキソイドの評定　動物医薬品検査所年報 51, 127-132.
7. Fumiya Hirano, Saiki Imamura, Yoshimasa Sasaki, Noriyasu Takikawa, Akira Sawata, Akihiko Yamamoto, Mariko Uchiyama, Yoko Shimazaki, Akemi Kojima, Hidetaka Nagai（2016）. Establishment of an equine tetanus antitoxin reference standard for veterinary use in Japan. Biologicals 1-4.

謝辞

本プロジェクト研究の実施に当たり、多大な尽力を頂いた動物用医薬品の製造販売業者の関係者各位、動物医薬品検査所検査第一部の職員、及び配布規程等の改定作業に携わった関係者各位に深謝します。

引用文献

1. 動物の感染症（2011）、明石博臣他編　第三版 166、近代出版、東京
2. 農林省（1970）　動物医薬品検査所標準製剤等配布規程 昭和 45 年 5 月 1 日 農林省告示第 637 号
3. 農林水産省（2002）　動物用生物学的製剤基準 平成 14 年 10 月 3 日 農林水産省告示第 1567 号
4. 高橋敏雄、新田早人、守岡綾子、山本欣也（2006）　動物用標準ツベルクリンの評定と更新　動物医薬品検査所年報 43, 53-55.

表　動物医薬品検査所標準製剤等配布一覧（生物学的製剤関連）

平成28年3月31日改正時点

No.	種類	本プロジェクトにおける成果
1	イバラキ病ウイルス№2株	
2	牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルスNo.12株	
3	牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルスNose株	
4	牛伝染性鼻気管炎ウイルスNo.758株	
5	牛流行熱ウイルスYHL株	
6	動物用破傷風試験毒素	新規追加
7	動物用標準破傷風抗毒素	新規追加
8	動物用標準沈降破傷風トキソイド	新規追加
9	動物用標準ツベルクリン	ロット更新
10	標準インフルエンザワクチン（CCA用）	新規追加
11	豚コレラウイルスALD株	
12	日本脳炎ウイルス中山株薬検系	
13	豚伝染性胃腸炎ウイルス静岡株	
14	豚丹毒菌県株	
15	豚丹毒菌NVAL82-875株	
16	豚丹毒菌藤沢株	
17	抗豚コレラウイルスGPE－ モノクローナル抗体	
18	参照抗豚コレラウイルス豚血清	新規追加
19	ジステンパーウイルススナイダー・ヒル株	
20	犬パルボウイルスY-1株	
21	狂犬病ウイルスCVS株	
22	狂犬病ウイルス西ヶ原株	
23	参照狂犬病組織培養不活化ワクチン	
24	鶏痘ウイルス中野株	
25	ニューカッスル病ウイルス佐藤株	
26	鶏伝染性喉頭気管炎ウイルスNS175株	
27	参照ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原用抗原及び陽性血清	
28	参照鶏伝染性コリーザ（A型）赤血球凝集抗原用陽性血清	
29	参照鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抗原用陽性血清	
30	産卵低下症候群-1976赤血球凝集抗原・参照陽性血清	新規追加
31	ラクトコッカス・ガルビエKG9502株	
32	参照ビブリオ病力価試験用陽性血清	新規追加
33	抗リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス兎血清	新規追加
34	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染細胞固定スライド	新規追加
35	家畜衛生微生物株	227株追加