

學術研究報告編

標準インフルエンザワクチン（CCA 用）の安定性について

落合絢子, 長坂孝雄, 榊基, 山本欣也

(令和3年7月30日受付、令和3年9月27日受理)

Stability of standard influenza vaccine for chicken cell agglutination (CCA)

Mariko OCHIAI, Takao NAGASAKA, Hajime SAKAKI, and Kinya YAMAMOTO

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-15-1 Tokura,

Kokubunji-Shi, Tokyo, 185-8511 Japan

(Received: 30th Jul 2021, Accepted: 27th Sep 2021)

Abstract

The standard influenza vaccine for CCA (chicken cell agglutination) is listed and distributed in the National Veterinary Assay Laboratory Standard biological agents under the Notice of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. As a reference standard, we used it to test for the potency of the inactivated virus stock solution of the horse and swine influenza vaccines. We measured the CCA titer of the two lots to evaluate the stability for five years post-manufacture. Lot No. 1 and lot No. 2 had titers of 1,035 and 1,000 CCA/mL, respectively, which were within the acceptable range of $1,000 \pm 5\%$ CCA/mL. We confirmed that these products had sufficient stability for five years as the reference standard.

要旨

標準インフルエンザワクチン（CCA 用）は、馬及び豚インフルエンザワクチンの不活化ウイルス原液の力価試験に使用する標準品として、動物医薬品検査所標準製剤配布規程に収載され、配布されている。今般、製造した標準品の製造5年後の安定性を確認するために CCA 価を測定した結果、ロット1とロット2の力価はそれぞれ 1,035、1,000 CCA/mL と、 $1,000 \pm 5\%$ CCA/mL の有効値範囲内であり、5年保管後も標準品としての品質が維持されていた。

緒言

CCA（Chicken Cell Agglutination）価測定試験は、馬及び豚インフルエンザワクチンの製造中間工程における不活化ウイルス原液の力価試験の一つで、鶏赤血球を用いてワクチンの主要有効成分であるヘマグルチニンの含量を測定し、その力価（CCA 価）を算出する方法である。「標準インフルエンザワクチン（CCA 用）」（以下「CCA 標準品」という。）は CCA 価測定試験法において対照試験材料として用いられる標準品で、従来国立感染症研究所（以下「感染研」という。）から配布されていた。しかし、ヒト用のインフルエンザワクチンではスプリットワクチンが主流となり、剤型によって値の変動が大きい CCA 価測定法から一元放射免疫拡散法による力価測定に移行したことから、感染研から CCA 標準品の入手が困難になることが予想されたため、動物用生物学的製剤の品質確保のために、平成23年度から平成27年度に実施された動物医薬品検査所の業務プロジェクト「動物用生物学的製剤用標準品の確保」の中でその製造に取り組んだものである。製造用株であるインフルエンザウイルス B/ 大阪 /2/70 株は北里第一三共ワクチン株式会社から分与を受け、

その濃縮不活化ウイルス原液は日生研株式会社へ製造委託した。平成 27 年 2 月に、この原液から最初の製造品となるロット No.1 を製造（落合ら 2015）、続けて同年 8 月にはロット No.2 が製造され、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配布されている。製造した CCA 標準品は 4℃にて保管されており、今般製造 5 年後の安定性試験を実施し、その評価を行った。

材料及び方法

1. CCA 標準品

4℃にて保管されていたロット No.1（平成 27 年 2 月製造）及びロット No.2（平成 27 年 8 月製造）をそれぞれ 1 バイアル使用した。

2. 鶏赤血球浮遊液

測定に用いた鶏赤血球浮遊液は、試験の当日に SPF 鶏（65 日齢）4 羽から 3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液（富士フィルム和光純薬工業株式会社、大阪）を抗凝固剤として採血し、Dulbecco's Phosphate-buffered saline（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）で洗浄及び濃度調製した。

3. 測定法

測定は製造時の方法（落合ら 2015）に準じ、ミラー・スタンレイ変法を改変した方法により実施した。

成績

製造 5 年後の CCA 標準品の CCA 価はロット No.1 とロット No.2 でそれぞれ 1,035、1,000 CCA/mL で、製造時に設定した有効値範囲である $1,000 \pm 5\%$ CCA/mL の範囲内であった（表 1,2）。

考察

平成 27 年に製造された CCA 標準品の製造時のロット No.1 とロット No.2 の CCA 価はそれぞれ 1,000、1,050 CCA 価/mL であった。製造後ロット No.1 では 9 か月目、ロット No.2 では 6 か月目まで 3 か月毎に測定し、有効値範囲内であることをもって安定性を確認した。今般、4℃で保管中の標準品の製造後 5 年の安定性を CCA 価測定試験により確認したところ、ロット No.1 とロット No.2 の値はいずれも有効値範囲内であったことから、その安定性が確認でき、標準品としての有効性が担保された。

今後も引き続き CCA 価測定試験により安定性を確認するとともに、配布状況に応じて新規ロットを製造し、安定的な標準品の供給に取り組むこととしている。

引用文献

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（2015）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

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

Table1 : Stability test of CCA standard Lot No.1

Post production	date of test	CCA titers* (CCA/mL)
0 month	19-Feb-2015	1,000
3 months	20-May-2015	1,020
6 months	06-Aug-2015	1,050
9 months	02-Dec-2015	973
5 years	04-Nov-2020	1,035

* Acceptable range : $1,000 \pm 5\%$ (950-1,050)

Table2 : Stability test of CCA standard Lot No.2

Post production	date of test	CCA titers* (CCA/mL)
0 month	06-Aug-2015	1,050
3 months	02-Dec-2015	1,010
6 months	16-Mar-2016	1,026
5 years	04-Nov-2020	1,000

* Acceptable range : $1,000 \pm 5\%$ (950-1,050)

[プロジェクト研究終了報告]

次世代シーケンサーを用いた家畜衛生分野における細菌 及びウイルスのゲノム解析技術に関する研究

五藤秀男、赤間亮子、一色ゆかり、小澤真名緒、落合絢子、川西路子、
木島まゆみ、齋藤明人、嶋崎洋子、白川崇大、須藤加澄、松田真理、松本幸子、
光田智裕、永井英貴、成嶋理恵、原田咲、古谷ゆかり、山下麻依子

(令和3年8月24日受付、令和3年10月21日受理)

Study on bacterial and viral genome analysis techniques in the field of animal hygiene using next-generation sequencing.

Hideo GOTO, Ryoko AKAMA, Yukari ISSHIKI, Manao OZAWA, Mariko OCHIAI, Michiko KAWANISHI,
Mayumi KIJIMA, Akito SAITO, Yoko SHIMAZAKI, Takahiro SHIRAKAWA, Kasumi SUDO, Mari MATSUDA,
Sachiko MATSUOMOTO, Tomohiro MITSUDA, Hidetaka NAGAI, Rie NARUSHIMA,
Saki HARADA, Yukari FURUYA, Maiko YAMASHITA

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

(Received: 24th Aug 2021, Accepted: 21th Oct 2021)

Abstract

The application of next-generation sequencing (NGS) technology to investigate pathogenic microorganisms of livestock origin at the whole genome level is expected to enhance livestock hygiene and public health. In this research, we explored various subjects using NGS technology. Antimicrobial resistance is a global concern for human and animal health, making it essential to understand the mechanisms underlying the emergence and transmission of antimicrobial-resistant bacteria to develop and implement effective countermeasures. We conducted a detailed molecular epidemiological survey of antimicrobial-resistant genes of the bacteria isolated from livestock and companion animals by NGS analysis. In the case of swine erysipelas (SE), we detected *Erysipelothrix rhusiopathiae*, a major disease in pigs with characteristics comparable to those used in producing live vaccines in the field. We compared the genome sequences of a live attenuated vaccine against SE with those of swine erysipelas field isolates and investigated the relationship between them. Classical swine fever (CSF), characterized by high contagion and mortality rates, occurred in Japan in 2018 for the first time in 26 years, prompting the implementation of vaccine-based quarantine measures. NGS analysis revealed the RNA genome of the virus isolated from the CSF outbreak, which was then used to assess the vaccine efficacy.

要旨

次世代シーケンサー (NGS) 技術を用いて家畜由来病原微生物を全ゲノムレベルで調べることは、家畜衛生及び公衆衛生の向上に貢献すると期待できる。本プロジェクト研究では、様々な課題に NGS 技術を用いて取り組んだ。薬剤耐性は人及び動物の健康に対する世界的な懸念であり、効果的な対策を検討・実施す

るために薬剤耐性菌の発生・伝播機序を解明することが重要である。そのため、家畜や愛玩動物に由来する薬剤耐性菌が持つ薬剤耐性遺伝子について、NGS解析により詳細な分子疫学的調査を推進した。豚の重要な疾病である豚丹毒では、生ワクチン製造用株と同様な性状を持つ豚丹毒菌が野外で検出されているため、豚丹毒弱毒生ワクチンと野外分離豚丹毒菌のゲノム配列を比較して関連性について検討した。強い感染力と致死率を特徴とする豚熱は平成30年に26年ぶりに国内で発生し、ワクチンによる防疫対策が実施されている。発生した豚熱から分離したウイルスのRNAゲノムをNGS解析で明らかにしてワクチン有効性の評価に役立てた。

緒言

ゲノムは家畜由来病原微生物の性状を決定する基本的な情報である。したがって、ゲノムレベルで解析した知見の蓄積は、家畜由来病原微生物の比較、進化、疫学など、多様な解析に活用できることから、今後の家畜衛生及び公衆衛生の向上にますます貢献すると期待できる。そのため、次世代シーケンサー（NGS）を用いた全ゲノム解析技術を家畜衛生分野において普及させ、その技術を細菌及びウイルスの性状解析及び疫学解析へ積極的に活用する意義は多大である。

目的

本プロジェクト研究では、①家畜衛生分野における細菌及びウイルスのNGSを用いた解析技術を確立し、②薬剤耐性遺伝子、病原遺伝子の検出、各種分子疫学的解析を行うことにより薬剤耐性菌、病原細菌やウイルスの発生・伝播機序を推定し、③根拠に基づいたリスク管理措置策定のための基礎資料を提供することを目的とした。

研究成果

NGS解析の方法

本プロジェクト研究で実施したNGSは、イルミナ社のMiSeq Systemを用いた。細菌の解析には、DNA抽出用キットにより作製したサンプルから、Nextera XT DNA Library Prep Kit (illumina)を用い、試薬のプロトコールに準じた方法でライブラリを作製した。RNAウイルスの解析には、RNA抽出用キットにより作製したサンプルから、NEB Next Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina 及び Index Primers Set (Biolabs)を用い、試薬のプロトコールに準じた方法でライブラリを作製した。

サルモネラ属菌におけるコリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1* ~ *mcr-5*) の保有状況とゲノム解析

コリスチンのリスク評価の基礎資料作成のため、平成13～平成27年に分離された病畜由来のサルモネラのうち、コリスチンのMICが2 μ g/mL以上の330株について、コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1* ~ *mcr-5*) の保有状況を酪農学園大学との共同研究により鈴木らの multiplex PCR (未公表) によって調べた。牛及び豚由来のサルモネラでは、*mcr-1*(4株)、*mcr-3*(4株)及び*mcr-5*(18株)遺伝子が検出された。*mcr-1*は全ての株でIncI2プラスミド上に検出されが、検出頻度は全ての年で4%以下であり、特定の遺伝子の増加は認められなかった。また、*mcr* 遺伝子を保有するプラスミドについて、遺伝子配列を取得し比較解析を行ったところ、IncI2プラスミドは、既報の大腸菌が保有するプラスミドと由来が近いと考えられ、他の薬剤耐性遺伝子を保有していなかった(図1-1)。一方、*mcr-3*及び*mcr-5*は、複数のプラスミドサイズ及びInc型のプラスミド上に検出され、一部のプラスミドは他の薬剤耐性遺伝子を複数保有していた(図1-1、1-2)。

以上の結果から、コリスチン耐性遺伝子の伝播には明らかな拡大傾向は認められないが、*mcr-1*は同じ型のプラスミドにより、*mcr-3*及び*mcr-5*は様々な型のプラスミドにより、株から株に伝達されている可能性

が示唆された。

Salmonella Dublin の薬剤感受性及び分子疫学的解析

Salmonella Dublin は、牛で分離頻度が高い届出伝染病の病原体で、平成 25 年及び平成 27 年にセファロスポリン系薬剤を含む多剤耐性菌（病性鑑定牛由来）が 4 株認められた。これらの株はセフォタキシム（CTX）を含む多剤（8～10 剤）耐性の *S. Dublin* であり、遺伝子配列を取得し解析を行ったところ、カナダで報告されている *S. Dublin* 由来ハイブリッドプラスミド（pN13-01125）と同様の大きなプラスミドを有していた。これらのプラスミドの Inc type は、IncA/C2, IncX1, (IncFII(S)) で、プラスミド上に多くの耐性遺伝子が存在した（表 1）。平成 27 年に分離された 3 株由来のプラスミドには、pN13-01125 と同じ耐性遺伝子（*bla*_{CMY-2}, *bla*_{TEM-1B}, *strA*, *strB*, *aadB*, *floR*, *cmlA*, *sul2* 及び *tet* (A)) が認められた。

他の 6 株では、いずれも、*S. Dublin* に特異的な病原性プラスミドである約 75Kb の IncX1, IncFII(S) プラスミドを確認したが、プラスミド上に耐性遺伝子は認められなかった。58～61Kb の IncN プラスミドを保有する株では、当該プラスミド上に *bla*_{TEM-1B}, *strA*, *strB*, *tet* (A) 等の耐性遺伝子が認められた。

近年、これまでとは異なる多剤耐性 *S. Dublin* の散発が認められ、それらが抗菌剤による治療を困難にする可能性があることから、衛生管理の徹底、ワクチン接種等による予防の励行が重要である。

輸入ひなと国内ブロイラー由来第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌の比較解析

平成 24 年以降第 3 世代セファロスポリン（3GC）の適応外使用が中止されたあとも、健康ブロイラー由来大腸菌の 3GC 耐性率が低率に維持されている。海外でもワクチン投与時に 3GC を卵内接種していた報告があることから（Dutil ら 2010）、輸入初生ひな由来の 3GC 耐性大腸菌による影響の可能性は否定できない。鶏由来 3GC 耐性株のほとんどがプラスミドに *bla*_{CMY-2} を保有している。そこで、平成 23～平成 29 年に分離された輸入ヒナ由来セフォタキシム（CTX）耐性大腸菌 86 株のうち、*bla*_{CMY-2} を保有していた 65 株（A 国：47 株、B 国：13 株、C 国：5 株）のプラスミドと JVARM で収集した平成 16～平成 27 年における国内の健康なブロイラー由来の 3GC 耐性大腸菌のうち *bla*_{CMY-2} を保有する株（65 株）の染色体及びプラスミドについて、遺伝子配列を取得し比較解析を行った。

輸入ヒナ由来株のうち、1 株は *bla*_{CMY-2} を染色体に保有し、45 株は IncB/O/K/Z プラスミドに、11 株は IncI1-I γ プラスミドに、2 株が IncC プラスミドに保有していた。残り 6 株は解析ができなかった。この結果より、輸入ヒナ由来大腸菌では、*bla*_{CMY-2} の多くが IncB/O/K/Z プラスミドに保有されていることが分かった（図 2）。

さらに、IncB/O/K/Z プラスミド及び IncI1-I γ プラスミドについて、国内由来のプラスミドと比較した結果、国内の IncB/O/K/Z プラスミドは、平成 23～平成 24 年における A 国由来の一部、B 国及び C 国由来の IncB/O/K/Z プラスミドと近い関係性を示した。IncI1-I γ プラスミドは、平成 23～平成 24 年における B 国由来プラスミドが国内由来プラスミドと近い関係性を示した。

以上より、これらのプラスミドが国内のブロイラー由来の大腸菌株と海外由来株との間で伝播している可能性が示唆された。引き続き 3GC 耐性大腸菌の動向調査の継続、抗菌剤の慎重使用の徹底が必要である。

国内で報告された豚からのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の解析

人医療上問題となる MRSA は、欧州における豚農場での広がりや豚から人への伝播が問題となっている。国内では病豚や輸入検疫期間中の繁殖用豚（輸入豚）などから MRSA が分離され、平成 30 年からは農林水産省がと畜場での調査を開始した。今回、国内及び輸入豚から分離した MRSA の性状等について解析した。

平成 28 年から平成 30 年にかけて病豚から分離した 6 株、平成 30 年にと畜場において分離した 8 株、平

成 29 年に豚農場のダストから分離した 2 株及び平成 28 年及び平成 29 年に輸入豚から分離した 25 株の MRSA について遺伝子配列を取得し、耐性遺伝子等の検出、*spa* 型別、Multi Locus Sequencing Typing (MLST)、core genome MLST (cgMLST) 等を行った。

と畜場での調査では 10.4% の農場から MRSA が分離され、豚農場のダストにおける分離率は 0.06% であった。多くの株は、欧州で分離されている ST 型が同じ ST398 であり、テトラサイクリン耐性遺伝子、亜鉛耐性遺伝子を保有していたが、市中感染型 MRSA の指標である PVL 遺伝子を保有していなかった。と畜場株と輸入豚株とでは、cgMLST による性状が異なる株があったが、耐性遺伝子は異なるものの ST 型や *spa* 型が一致することから関連性を否定できない株もあった (表 2、図 3)。

以上の結果から、と畜場株と輸入豚株の関連性は否定できなかったが、国内の豚農場の MRSA 検出率は検出率が 70% を超える国がいくつか存在する欧州のように高くないことが確認された。また、食品安全委員会では食品を通じた人へのリスクは低いと評価されている (食品安全委員会 2019)。しかし、国内の豚農場において MRSA が拡大しないよう、引き続きその動向の監視、衛生管理の向上による抗菌剤の使用機会の低減や慎重使用の徹底等の取組の強化が重要と考えられた。

病気及び健康な犬猫由来セフトキシム耐性大腸菌の比較解析

平成 29 年に開始した全国的な薬剤耐性モニタリングでは、犬猫由来大腸菌は牛、豚及び鶏に比べて、医療及び獣医療上重要性の高い抗菌剤である第 3 世代セファロsporin (セフトキシム (CTX)) に対する耐性率が高いことが確認された。そこで、平成 29 年に分離した病気の犬猫由来 CTX 耐性大腸菌 (犬由来 30 株及び猫由来 25 株) 及び平成 30 年に分離した健康な犬猫由来 CTX 耐性大腸菌 (犬由来 20 株及び猫由来 17 株) について遺伝子配列を取得し、耐性遺伝子の検出、MLST 系統発生群及び血清型の特定制を行った。

ST 型、血清型、系統発生群については、病気及び健康な犬猫由来株で共に ST131-O25:H4-B2 が最も多く (17.6% ~ 43.3%)、 β -ラクタマーゼ遺伝子では人由来株で優勢な CTX-M 型が多くの分離株で確認された (64.7% ~ 76.0%) (表 3)。また、多剤排出ポンプをコードする *mdf(A)*(100%) や、アミノグリコシド系 (29.4% ~ 66.7%)、サルファ剤 (47.1% ~ 56.7%)、マクロライド系 (23.5% ~ 46.7%) 抗菌剤の耐性遺伝子も確認された。

病気及び健康な犬猫由来株は同様の性状を示したが、CTX 耐性率は病気に比べて健康な犬猫で低かったことから、抗菌剤による治療が耐性率に影響している可能性が示唆された。一方、健康な犬猫でも病気由来株と同様な CTX 耐性や多剤耐性を示す株が認められたことから、抗菌剤投与前の薬剤感受性の確認等、抗菌剤慎重使用の一層の徹底が重要と考えられた。

病気の犬由来 *Staphylococcus pseudintermedius* の遺伝子解析

Staphylococcus pseudintermedius (SP) は犬の皮膚や粘膜の常在菌で、日和見感染の原因菌でもある。特にメチシリン耐性 SP (MRSP) は多剤耐性が多く、動物病院内感染の可能性や人との間の伝播の可能性からも注目されている。そこで、日本における犬由来 SP について遺伝子配列を取得し、耐性遺伝子の検出、SCCmec 型別、MLST を行った。

平成 29 年度に、全国の動物病院数に基づいて割り当てた 6 ブロックから病気の犬由来コアグラマーゼ陽性ブドウ球菌 133 株を収集した。そのうち 122 株 (91.7%) が SP であった。MLST では 69 の型に分類され、63 株がそれぞれ異なる ST 型、49 株が今回新たに発見された型であった (表 4)。ST 型のブロックによる偏りはなかったが、主要な ST45、71 及び 121 の分布は、これまでの報告とは異なった。ST71 は MRSP として欧州を始めとして世界的に多く、ST45 も特にアジアで多いことが報告されている (Pires dos Santos ら 2016)。ST121 は世界的にも報告が少なく、平成 27 年の日本では MRSP43 株中 1 株が報告されたが、本調査では 2 番目に多い 17 株を認め、全て MRSP であった。また、720 の耐性遺伝子が検出された。アミノグリ

コシド系薬剤に対する耐性遺伝子が257で最も多く、次いで β -ラクタム系薬剤耐性遺伝子が185、以下マクロライド系、テトラサイクリン系、アンフェニコール系、トリメトプリムの順であった。ホスホマイシン、リンコマイシン系及びフシジン酸に対する耐性遺伝子は4以下と少数であった。メチシリン耐性遺伝子(*mecA*)を有するMRSPは72株(59.0%)であった。MRSPとメチシリン感受性SP(MSSP)が1株当たり保有する平均耐性遺伝子数を比較すると、MRSPは7.8、MSSPは3.2であった。さらに、フルオロキノロン耐性となる遺伝子変異(*gyrA* S48L及び*grlA* S82I)を保有する株は、MRSPで72株中68株、MSSPで50株中11株に認められ、MRSPの多剤耐性化を裏付けた。*mecA*遺伝子を運ぶカセット(SCC*mec*)型では、V型が最も多く、ST45及びST71を除くST121を含むすべてのMRSPがこの型であった。ST71はⅢ型、ST45は、*pseud* SCC elementとして報告されている Ψ SCC*mec* 57395と呼ばれる型であった。

今回の調査では、ST121が全国から、これまでの報告より多く分離された。また、MRSPがSPの50%を超え、その多くは複数の耐性遺伝子をMSSPより多く保有していた。さらに、フルオロキノロン耐性を獲得する遺伝子変異を持つ株も多く、SPが起因菌となる疾患では治療薬剤の選択において、薬剤感受性の確認が重要であることが確認されたとともに、慎重使用のさらなる徹底が必要と考えられた。

家畜及び水産動物由来病原菌の解析

野外分離豚丹毒菌のゲノム解析：豚丹毒弱毒生ワクチン株との関連

慢性関節炎罹患豚(主にと畜豚)から、豚丹毒生ワクチンの製造用株(Koganei株)の性状であるアクリフラビン耐性の豚丹毒菌が分離されたことから(Imadaら2004)、豚丹毒生ワクチン株と野外株の関連を明らかにする必要がある。

平成28年度から30年度に分離された豚丹毒菌PL事業収集株(PL株)5株及び平成18年にワクチン株由来の疑いとして入手した野外分離株23株(疑い株)をNGS解析し、既にゲノム配列を取得済みの5株、Koganei株及びDDBJのデータベースから取得した急性症例由来株とともに、Fujisawa株を参照株として比較した。

ワクチン株を識別するSNP-based PCR(Shiraiwaら2015)で陽性を示した慢性症例由来野外分離株は、Koganei株と類似度が高く、識別が困難であった。一方、急性症例由来株とPCR陰性株については、Koganei株と識別が可能と考えられた(図4)。疑い株23株は1株を除いてSNP-based PCR陽性で、新田ら(2007)の方法によりワクチン株との識別が可能な13株と不能な10株に分けられたが、系統樹解析では識別できなかった(図5)。識別可能6株と識別不能6株についてSNPの詳細な比較を行った結果、Koganei株が持つ変異(108か所)は1か所を除いてすべての野外株に認められた。一方、Koganei株が持たない変異は株ごとに34か所~120か所あり、野外株のみが共通で持っている変異は14か所で認められた。以上の結果から、野外株がワクチン株と近縁である可能性は否定できないが、ワクチン株由来であると断定することは困難と考えられた。また、SNP-based PCRは、Koganei株の108か所の変異のうち、ランダムに選んだ5か所のみを検出することから、SNP-based PCRのみでワクチン株由来であると断定することは難しいと考えられた。

今回、NGSで取得したデータによるSNP解析と系統樹解析では、野外分離株とワクチン株を明確に識別できなかった。しかしながら、SNP-based PCRと比較して、NGSはより詳細な解析を可能とし、また、野外株のみに認められた変異は、ワクチン株との識別マーカーの候補になると考えられた。今後、完全ゲノム解読による全遺伝子比較などの詳細な解析により、より確実な識別マーカーが確立できると考えられた。

養殖魚の連鎖球菌症起因菌の薬剤耐性

国内で生産される養殖魚では*Lactococcus garvieae*による連鎖球菌症の発生が多く、治療に抗菌剤が使用

される。平成 14 年に分離したエリスロマイシン、リンコマイシン及びテトラサイクリンの 3 剤に耐性の *L. garviea* 2 株について解析した結果、マクロライド及びリンコマイシン耐性遺伝子の *erm(B)*、テトラサイクリン耐性遺伝子の *tet(S)* が検出された (表 5)。*L. garvieae* のマクロライド系抗生物質に対する耐性率は低く維持されているが (農林水産省 2021)、近年、水産分野におけるマクロライド系抗生物質の使用量が増加していることから (薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会 2020)、特に *erm(B)* の保有状況に引き続き注意する必要が考えられた。

豚熱発生農場の豚から当所で分離されたウイルス株のゲノム解析

平成 30 年岐阜県で発生した豚熱の原因ウイルス (CSFV) (以下「国内流行株」という。) に対するワクチンの有効性を評価するための攻撃試験の攻撃用ウイルスとして、岐阜県の豚熱発生農場の豚から当所で分離した CSFV (以下「当所分離株」という。) を用いた。

今回、攻撃ウイルスの妥当性を確認するために、当所分離株について、NGS を用いたゲノム解析を行い、過去の流行株との配列の相同性を検索した。

その結果、当所分離株と国内流行株 (CSFV/JAPAN/1/2018, Accession No.LC425854) (Nishi ら 2019) との相同性は 99.8% 以上で、最も近縁であったことから、当所分離株は、当時の国内流行株とほとんど同じ性状を示すものと判断できた。この結果は、ワクチンの有効性を評価するための攻撃試験において当所分離株を攻撃用ウイルスとして用いたことの妥当性を NGS 解析で得られたデータから示すことができた点で重要な成果であった。

鶏伝染性気管支炎の発生が疑われた鶏由来サンプルからの同ウイルス遺伝子の検出

当所で飼養していた鶏群から採取した血清を用いて実施した、鶏伝染性気管支炎ウイルス (IBV) に対する中和試験において、ワクチンを接種していない鶏でわずかに高い抗体価を検出する事例が発生したことから、鶏伝染性気管支炎の発生が疑われた。そこで同鶏群に由来するサンプルを用いて NGS による病原体遺伝子の検出を試みた。

同鶏群の腎臓及び盲腸の乳剤を発育鶏卵で 4 代継代した漿尿液から市販のキットを用いて RNA を抽出し、NGS 解析に供した。取得できた配列について BLAST で検索したところ、IBV 及び IBV に類似する抗原性を有することが示唆されるウイルスの遺伝子配列は検出されなかった。このことから、少なくとも同鶏群に IBV 感染があったことは確認できなかった。

公表した研究成果

川西路子、阿保均、白川崇大、内山万利子、三矢太亮、成嶋理恵、松田真理、小澤真名緒、木島まゆみ「サルモネラ属菌におけるコリスチン耐性遺伝子の保有状況について」第 161 回日本獣医学会学術集会 (2018 年 9 月、つくば)

木島まゆみ、阿保均、白川崇大、三矢太亮、永尾暢子、成嶋理恵、松田真理、小澤真名緒、川西路子「国内で分離された *Salmonella* Dublin の薬剤感受性及び分子疫学的解析」第 161 回日本獣医学会学術集会 (2018 年 9 月、つくば)

白川崇大、関塚剛史、黒田誠、小澤真名緒、阿保均、古谷ゆかり、赤間亮子、松田真理、木島まゆみ、嶋崎洋子、川西路子「ブロイラー由来第 3 世代セファロsporin 耐性大腸菌が保有する *blaCMY-2* 保有 *Inc1*、*IncB/O/K/Z* 及び *IncA/C2* の海外由来株との比較解析」第 162 回日本獣医学会学術集会 (2019 年、つくば)

古谷ゆかり、松田真理、白川崇大、赤間亮子、原田咲、阿保均、永尾暢子、小澤真名緒、嶋崎洋子「健康な

犬猫由来セフトキシム耐性大腸菌のゲノム解析」第 163 回日本獣医学会学術集会（2020 年 9 月 ウェブ開催）

白川崇大、久保顕志、阿保均、古谷ゆかり、赤間亮子、松田真理、川西路子、小澤真名緒、福原久江、嶋崎洋子「輸入初生ひな由来第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌の性状解析」第 163 回日本獣医学会学術集会（2020 年 9 月 ウェブ開催）

小澤真名緒、阿保均、白川崇大、赤間亮子、松田真理、古谷ゆかり、原田咲、川西路子、古野美南子、福原久江、嶋崎洋子「国内で報告された豚からのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の分離」第 163 回日本獣医学会学術集会（2020 年 9 月 ウェブ開催）

引用文献

Dutil, L., Irwin, R. J., Finley, R., Ng, L. K., Avery, B. P., Boerlin, P & Pillai, D. R. (2010). Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 48-54.

Imada, Y., Takase, A., Kikuma, R., Iwamaru, Y., Akachi, S., & Hayakawa, Y. (2004). Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 2121-2126.

Nishi, T., Kameyama, K.I., Kato, T. & Fukai, K. (2019) Genome Sequence of a Classical Swine Fever Virus of Subgenotype 2.1, Isolated from a Pig in Japan in 2018. *Microbiology Resource Announcements* 8, e01362-18.

新田早人, 山本欣也, 守岡綾子, 浅井鉄夫, 鮫島俊哉, 高橋敏雄 (2007) 豚丹毒生ワクチン由来を疑われた豚丹毒菌野外分離株の性状解析. 獣医畜産新報 60, 831-837.

農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課, 動物医薬品検査所 (2021) 2019 年度養殖場における病魚由来細菌の薬剤耐性モニタリング結果.

https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/pdf/R1suisan_jvarm.pdf

Pires dos Santos T., Damborg P., Moodley A. & Guardabassi L. (2016). Systematic Review on global epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of population structure from multilocus sequence typing data. *Frontiers in Microbiology*. 7. 1559-1610.

Shiraiwa, K., Ogawa, Y., Eguchi, M., Hikono, H., Kusumoto, M. & Shimoji, Y. (2015). Development of an SNP-based PCR assay for rapid differentiation of a Japanese live vaccine strain from field isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Journal of microbiological methods* 117, 11-13.

食品安全委員会 (2019) 家畜に使用するテトラサイクリン系抗生物質に係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価.

<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20031208029&fileId=201>

薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会 (2020) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2020.

https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000715546.pdf

表1 Antimicrobial resistance and molecular epidemiological analysis of *Salmonella* Dublin

年度	菌株番号	耐性薬剤数	耐性パターン	プラスミド数	Plasmid size (kb)	Inc Type	耐性遺伝子(プラスミド由来)
平成11	11-PLS-21	3	SM,TC,ABPC	2	75	IncX1, IncFII(S)	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>tet(A)</i> ,
					58	IncN	<i>bla</i> _{TEM-1B}
	11-PLS-169	5	SM,KM,TC,ABPC,NA	2	75	IncX1, IncFII(S)	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sph</i> , <i>aph(3')-Ila</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>tet(A)</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{TEM-169}
平成13	13-PLS-48	5	SM,KM,TC,ABPC,NA	3	61	IncN	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sph</i> , <i>aph(3')-Ila</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>tet(A)</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B}
					75	IncX1, IncFII(S)	-
					40	-	-
平成17	17-PLS-119	4	SM,KM,NA,CL	1	75	IncX1, IncFII(S)	-
	17-PLS-128	4	SM,KM,NA,CL	2	75	IncX1, IncFII(S)	-
平成25	25-PLS-130	8	SM,KM,TC,CP,ABPC,CEZ,CTX,CL	1	175	IncA/C2, IncX1, IncFII(S)	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>tet(A)</i> , <i>bla</i> _{TEM-199} , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>floR</i> , <i>sul2</i>
							<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadB</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>tet(A)</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>floR</i> , <i>cmlA1</i> , <i>sul2</i>
平成27	27-PLS-147	10	SM,KM,GM,TC,CP,ABPC,CEZ,CTX,NA,CL	1	167	IncA/C2, IncX1	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>floR</i> , <i>cmlA1</i> , <i>sul2</i>
	27-PLS-163	10	SM,KM,GM,TC,CP,ABPC,CEZ,CTX,NA,CL	3	210	IncA/C2, IncX1	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} ,
					185	IncA/C2, IncX1	<i>bla</i> _{CMY-2} , <i>floR</i> , <i>cmlA1</i> , <i>sul2</i>
					165	IncA/C2, IncX1	<i>bla</i> _{CMY-2} , <i>floR</i> , <i>cmlA1</i> , <i>sul2</i>
27-PLS-167	10	SM,KM,GM,TC,CP,ABPC,CEZ,CTX,NA,CL	1	165	IncA/C2, IncX1	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>floR</i> , <i>cmlA1</i> , <i>sul2</i>	
27-PLS-131	4	SM,KM,NA,CL	1	75	IncX1, IncFII(S)	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph</i>	

*NA, CL及び一部のアミノグリコシド以外は、耐性パターンに対応する耐性遺伝子がプラスミド上に存在。
 *平成27年の3株由来のプラスミド上には、カナダのハイブリッドプラスミド(pN13-01125)と同じ耐性遺伝子が認められた。

表2 Comparison of the properties of MRSA derived from imported breeding pigs and slaughtered pigs

ST	spa型	アミノグリコシド	β-ラクタム	マクロライド	テトラサイクリン	トリメプリム	czrC
398	t034	<i>ant(9)-Ia</i> または、 <i>ant(9)-Ia</i> 及び <i>str</i>	<i>mecA</i> <i>bla(Z)</i>	<i>lnu(B)</i> <i>lsa(E)</i>	<i>tet(K)</i> <i>tet(M)</i>	<i>dfrG</i>	+

輸入豚由来株では、上記の性状を示した株が最も多かった(25株中9株)。

ST	spa型	アミノグリコシド	β-ラクタム	マクロライド	テトラサイクリン	トリメプリム	czrC
398	t034	なし	<i>mecA</i> <i>bla(Z)</i> (2株) 又は <i>bla(Z)</i> (1株)	<i>ermC</i> (1株) 又はなし(2株)	<i>tet(M)</i>	なし	+

と畜場由来株では8株中3株がST398であり、その性状は上記のとおりであった。

表3 β-lactamase genes in CTX resistance *E.coli* derived from dogs and cats

Ambler 分子分類	βラクタマーゼ遺伝子	2018年健康犬		2017年病気犬		2018年健康猫		2017年病気猫	
		保有株数	保有率(%)	保有株数	保有率(%)	保有株数	保有率(%)	保有株数	保有率(%)
A	CTX-M-3	0	0.0	1	3.3	0	0.0	0	0.0
	CTX-M-8	0	0.0	0	0.0	1	5.9	0	0.0
	CTX-M-14	4	20.0	7	23.3	4	23.5	5	20.0
	CTX-M-15	3	15.0	9	30.0	1	5.9	5	20.0
	CTX-M-27	3	15.0	3	10.0	5	29.4	4	16.0
	CTX-M-44	1	5.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	CTX-M-55	1	5.0	1	3.3	0	0.0	5	20.0
	CTX-M-65	1	5.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	CTX-M-101	1	5.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	CTX-M-156	1	5.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	小計(CTX-M型)	15	75.0	21	70.0	11	64.7	19	76.0
	TEM-1	7	35.0	18	60.0	5	29.4	11	44.0
C	CMY-2	4	20.0	8	26.7	4	23.5	4	16.0
	DHA-1	3	15.0	4	13.3	2	11.8	2	8.0
D	OXA-1	1	5.0	3	10.0	0	0.0	1	4.0
	全株数	20株		30株		17株		25株	

表4 Genetic analysis of *Staphylococcus pseudintermedius* from diseased dogs

MLST Type	Isolate numbers	MRSP numbers	MSSP* numbers	Isolate numbers with fluoroquinolone resistance mutation
ST45	18	17	1	18
ST121	17	17	0	17
ST71	16	13	3	16
ST1631	4	2	2	4
ST631	2	0	2	0
ST1635	2	1	1	1
Other MLST strain/1 MLST type) (1	63	22	41	23
Total	122	72	50	79

*MSSP: メチシリン感受性SP

表5 Genetic analysis of *Lactococcus garvieae*

株名	MIC (μg/mL)			保有する耐性遺伝子
	エリスロマイシン	リンコマイシン	オキシテトラサイクリン	
Lg28	2	256	16	<i>erm(B)</i> , <i>tet(S)</i>
Lg93	256	>512	4	<i>erm(B)</i> , <i>tet(S)</i>
30-Lg-Aq-128	<0.125	0.25	1	なし

材料:連鎖球菌症由来*Lactococcus garvieae* 3株
 2株(Lg28及びLg93)は当所収集株(平成14年分離、血清型不明)
 (Kawanishi et. al. Letters in Applied Microbiology 2005)
 1株(30-Lg-Aq-128)は平成30年のモニタリング分離株(血清型II型)

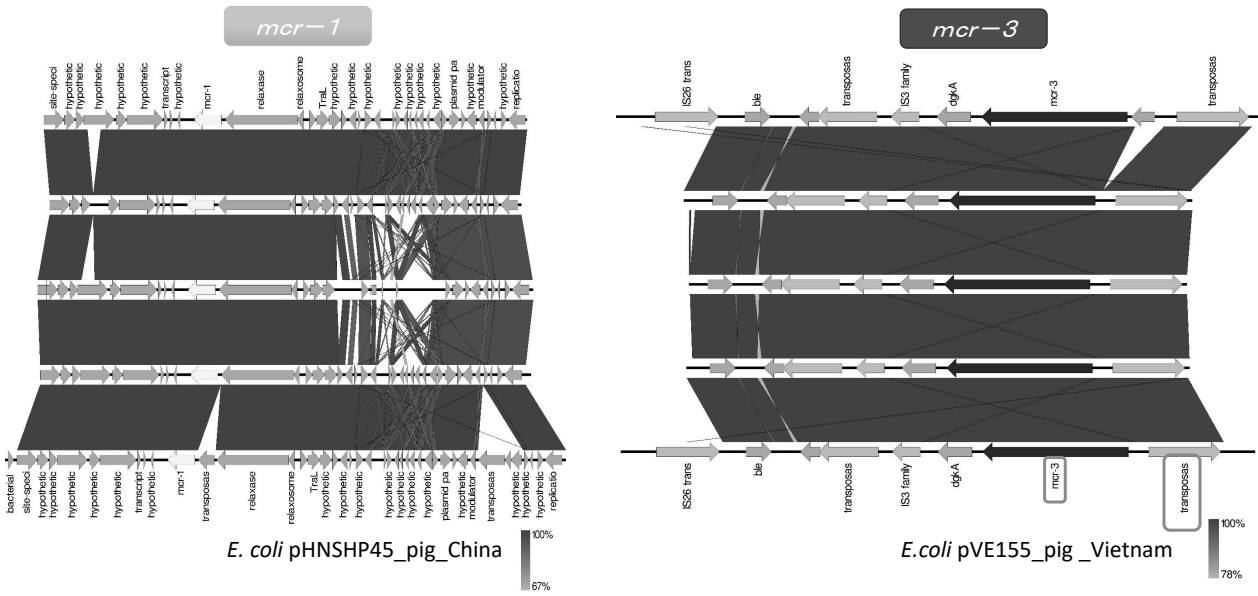


図1-1 Colistin resistance genes in *Salmonella* spp. Comparison of plasmid gene sequence

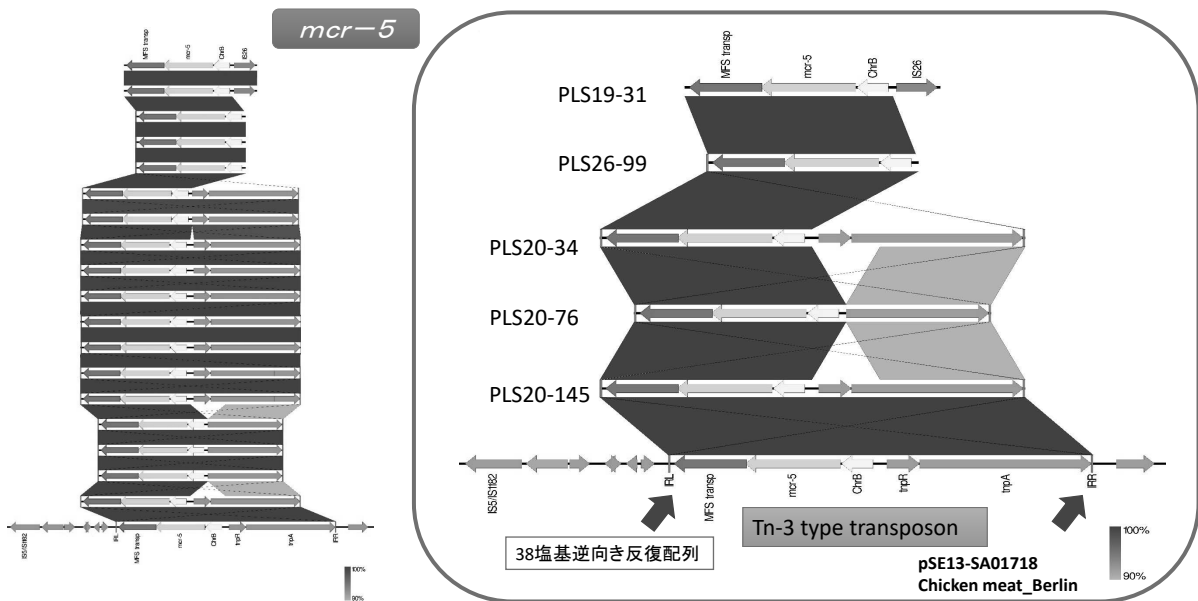


図1-2 Colistin resistance genes in *Salmonella* spp. Comparison of plasmid gene sequence

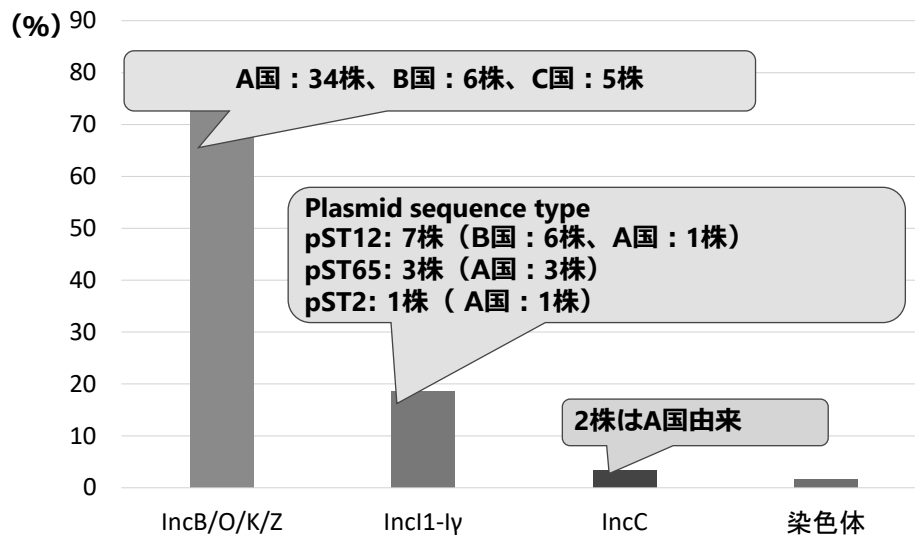


図2 Status of plasmids carrying *bla*_{CMY-2} among imported firstborn chicks

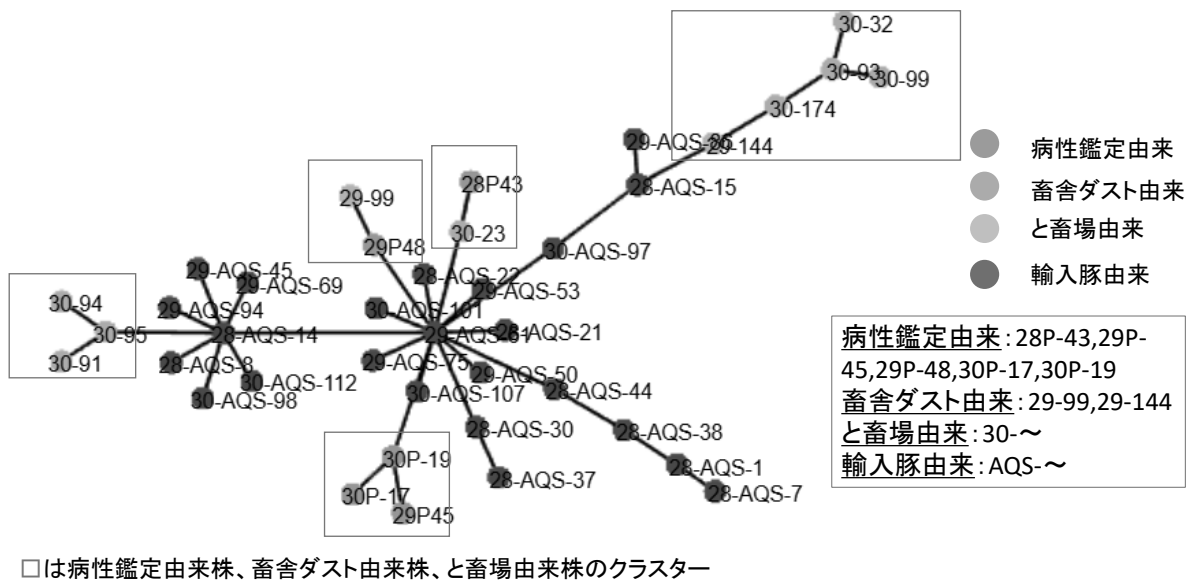


図3 Minimum spanning tree built from the core genome MLST allelic profiles of MRSA isolated from pigs in Japan

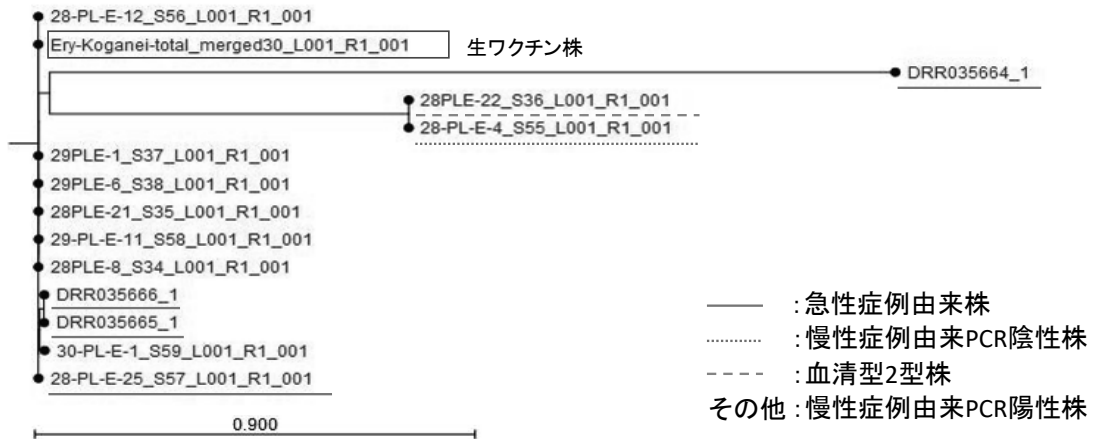


図4 Phylogenetic tree based on SNP analysis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* PL isolates and live vaccine strain (Koganei)

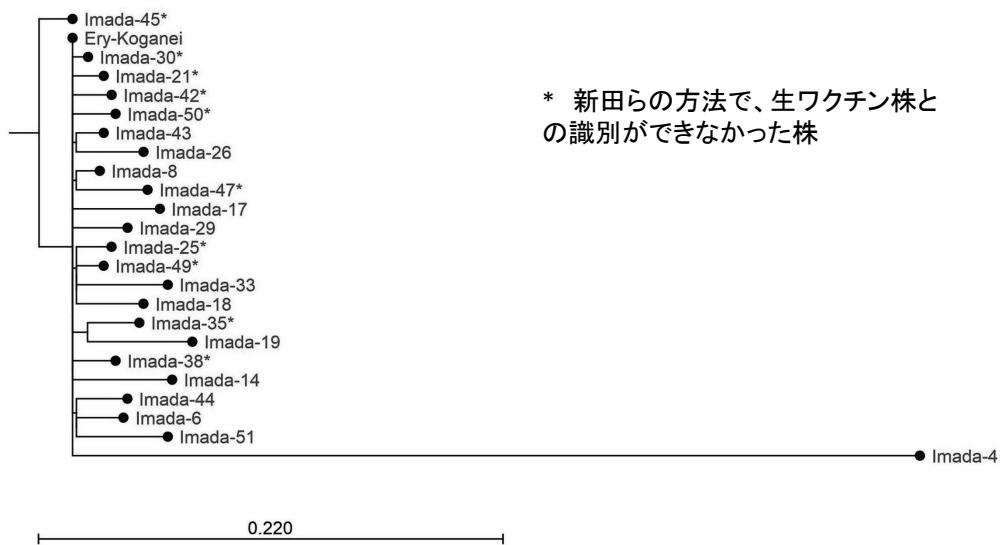


図5 Phylogenetic tree based on SNP analysis of suspected live vaccine-derived *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and live vaccine strain (Koganei)

犬及び猫用ワクチンの総蛋白質量と副作用情報の相関調査

落合絢子, 山下麻依子, 成嶋理恵, 岩本聖子, 須藤加澄, 長坂孝雄, 江口郁, 齋藤明人

(令和3年7月30日受付、令和3年9月30日受理)

A correlative study on the total protein content of dog and cat vaccines and adverse drug reaction (ADR) reports

Mariko OCHIAI, Maiko YAMASHITA, Rie NARUSHIMA, Shoko IWAMOTO,
Kasumi SUDO, Takao NAGASAKA, Kaoru EGUCHI, and Akito SAITO

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

(Received: 30th Jul 2021, Accepted: 30th Sep 2021)

Abstract

We statistically analyzed the relationship between the total protein content of commercial dog and cat vaccines in Japan and the adverse drug reaction (ADR) reports collected at the National Veterinary Assay Laboratory. As a result, no clear relationship was discovered between the total protein content in the vaccines and the ADR in dogs and cats. However, when vaccines for dogs were separated into monovalent and combination vaccines, the total protein content was significantly higher in the combination vaccine group, and the number of ADR was significantly higher in younger and lighter animals.

要旨

国内で流通している犬及び猫用ワクチンの総蛋白質量と動物医薬品検査所で収集された副作用情報とを統計学的に解析した。その結果、犬用でも猫用でもワクチン中の総蛋白質量と副反応発現の明らかな相関はみられなかった。しかし、犬用ワクチンを単味ワクチンと混合ワクチンに分けた場合、混合ワクチンの方が総蛋白質量は有意に多く、若齢の個体及び体重の軽い個体での副反応の報告数も有意に多かった。

緒言

犬及び猫用のワクチンについては、世界小動物獣医師会 (World Small Animal Veterinary Association : WSAVA) によってワクチン接種に関するガイドライン (世界小動物獣医師会ワクチネーションガイドライングループ 2015) が策定されており、それによると、全ての犬及び猫が接種すべきコアワクチンと地理的要因、その地域の環境又はライフスタイルによって特定の感染症のリスクが生じる動物のみ必要なノンコアワクチンに分類される。犬用のコアワクチンは、ジステンパーウイルス、犬アデノウイルス及び犬パルボウイルス2型による感染症から犬を予防するワクチンであり、猫用のコアワクチンは猫ヘルペスウイルスI型 (猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス)、猫カリシウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルスによる感染症から猫を予防するワクチンである。近年の犬及び猫用のワクチンは、それぞれのコアワクチンに加え、ノンコアワクチンを含む混合ワクチンが主流となっており、現在国内で流通しているワクチンの中で、多いものでは9種

の抗原を含むものがある。各ワクチン中のウイルス及び細菌の含有量又は力価は規格値が定められているが、これらの規格値は多くのもので下限値のみが設定され、上限が定められているものはほとんどない。このため、多種混合ワクチンになればなるほど、1用量中に含まれる抗原由来蛋白質量が多くなることが考えられる。また、人用ワクチン（不活化）では、1用量中に含まれる蛋白質含有量（又は蛋白窒素含有量）の上限が生物学的製剤基準（平成16年3月30日 厚生労働省告示 第155号）によって定められている（例；インフルエンザワクチンでは240 μ g/mL以下）が、動物用ワクチンでは一部を除いて上限が定められていないため、ワクチン中の総蛋白質量が大きく変わり、副反応発生頻度に関連する可能性が考えられた。動物医薬品検査所（以下「動薬検」という。）では動物用医薬品の副作用情報を収集・公開しているが、これまでワクチンによる副作用（副反応）として収集した情報とワクチンの総蛋白質量の相関について網羅的に調査した報告はない。そこで、本研究ではこれらの蓄積されている副作用情報とワクチンの総蛋白質量の関連について調査するとともに、得られた結果から犬及び猫用ワクチンの副反応による健康被害低減に向けて考察した。

目的

本研究では、犬及び猫用ワクチンの総蛋白質量と当所に蓄積されている副作用情報とを統計的に解析し、両者の関係性について調査することで、情報を有効活用し、ワクチンの安全性及び品質確保に資することを目的とした。

研究成果

1. 材料及び方法

1.1 ワクチン中の総蛋白質量定量法の検討

動物用生物学的製剤基準（農林水産省2002）の一般試験法には蛋白質定量法が定められているが、より簡便で迅速に定量するため、市販の蛋白質測定キットを利用した測定法について検討した。ワクチンは、生ワクチンのみのものやアジュバントを含むものなど構成が多様であるため、主な蛋白質定量法のうちBCA法、Bradford法等のいずれが適しているかを検討するために、犬用ワクチンと猫用ワクチンから生ワクチンとアジュバント含有ワクチンをそれぞれ1種類ずつ選択し、測定キット（BCA法（Takara Bio Inc., Shiga, Japan）、Bradford法（Takara Bio Inc., Shiga, Japan）及び試薬メーカー独自開発の界面活性剤存在下等でも測定可能な蛋白質測定キット（Protein Quantification Assay（PQA）（MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany））を使用してそれぞれの総蛋白質量を測定した。その結果、Bradford法による測定法が最も再現性が高く、非蛋白質成分による測定への影響も少なかったことから以降の試験にはBradford法の測定キットを使用した（表1）。

1.2 ワクチン総蛋白質量の測定

平成28年度から平成30年度の3年間に動薬検に副作用報告のあった犬及び猫用ワクチンのうち、犬用7製剤及び猫用4製剤について、その総蛋白質量を2併行で2回測定し、平均値をその製剤の総蛋白質量とした。総蛋白質量のロット間変動については、犬用2製剤及び猫用1製剤で、異なる2ロットを測定したところ、CV値はそれぞれ0.02、0.03、0.15で、製剤間の差（CV値0.56）と比較して十分に小さかったため無視できると判断し、複数ロットを測定した製剤は、その平均値を製剤の総蛋白質量とした。

1.3 副作用情報

副作用情報は平成28年度から平成30年度の3年間に動薬検に報告のあった犬及び猫用ワクチンのうち、用法・用量に従って使用されたデータ、犬86件及び猫40件を使用した。副反応発現率は副作用報告件数を販売高年報から抽出した販売量（dose）で除して算出した。また、副反応の中でアナフィラキシー等の重篤な症状の多い接種後1時間以内の発生が観察されている件数から1時間以内副反応発現率を算出した。

1.4 ワクチン総蛋白質量と副作用情報との統計学的解析

ワクチン別の副反応の報告件数について、性別で比較した (t 検定。有意水準 5%)。また、ワクチン別の副反応が発現した月齢及び体重の分布を比較した (分散分析。有意水準 5%)。ワクチンの総蛋白質量と副反応発現率及び 1 時間以内副反応発現率との相関分析を Spearman の相関係数 ρ を求め行った。さらに、犬用ワクチンについては、単味ワクチンと混合ワクチンの 2 群に分け、副反応発現率、1 時間以内副反応発現率、副反応が発現した月齢及び体重について比較を行った (t 検定。有意水準 5%)。ただし、体重は、四分位範囲の 1.5 倍を超えるデータは除いて解析した。

2. 成績

2.1 猫用ワクチン

4 種の猫用ワクチン (CAT-A,B,C 及び D) について調査した。各ワクチンの総蛋白質量は表 2 の通りであった。各ワクチンの副反応の報告件数に性別による差はなかった (t 検定。有意水準 5%)。また、副反応が発現した月齢及び体重の分布についていずれのワクチン間にも差はみられなかった (分散分析。有意水準 5%) (図 1, 図 2)。また、総蛋白質量と副反応発現率及び 1 時間以内副反応発現率とに有意な正の相関はみられなかった (それぞれ $\rho = 0.4$ ($p=0.75$), $\rho = -0.8$ ($p=0.33$)) (図 3)。

2.2 犬用ワクチン

7 種の犬用ワクチン (DOG-A,B,C,D,E,F 及び G) について調査した。各ワクチンの総蛋白質量は表 1 の通りであった。各ワクチンの副反応の報告件数に性別による差はなかった。各ワクチンの副反応が発現した月齢及び体重の分布にも差はみられなかった (分散分析。有意水準 5%) (図 4, 図 5)。また、総蛋白質量と副反応発現率及び 1 時間以内副反応発現率では正の相関の傾向がみられた (それぞれ $\rho = 0.57$ ($p=0.20$), $\rho = 0.54$ ($p=0.23$)) が有意な差は得られなかった (図 6)。

犬用の 7 種のワクチンのうち、総蛋白質量で低値を示した 3 種 (DOG-A,B 及び C) は単味ワクチンであり、それ以外は混合ワクチンであった。これら 3 種の総蛋白質量は 7 種のワクチンの平均値 $-0.5 \times$ 標準偏差以下であり、単味ワクチンと混合ワクチンに群分けした場合、混合ワクチン群の方が有意に総蛋白質量が多かった (t 検定。有意水準 5%)。副反応発現率及び 1 時間以内副反応発現率に群間で有意な差はみられなかったが、副反応が発現した月齢及び体重では、群間で有意差があり (t 検定。有意水準 5%)、混合ワクチン群の方が月齢の低い個体、体重の軽い個体での副反応の報告件数が多かった (図 4, 図 5)。

3. 考察

ワクチンには、生ワクチン・不活化ワクチンの別や、アジュバントの有無などがあり、主剤や主剤以外の成分で多様な構成となっている。本研究に供したワクチンは、Bradford 法のキットにより簡便・迅速に総蛋白質量を測定することができたことから他のワクチンの総蛋白質量測定への応用も期待できる。

副作用情報とワクチンの総蛋白質量の相関について調べた結果、犬用でも猫用でもワクチンの総蛋白質量と性別、月齢、体重、副反応発現率及び 1 時間以内副反応発現率に明らかな相関は示されなかった。しかし、犬用ワクチンを単味ワクチンと混合ワクチンに分けた場合、混合ワクチンの方が、単味ワクチンよりも有意に総蛋白質量が多く、また、若齢の個体、体重の軽い個体での副反応の報告件数が有意に多かった ($p<0.05$)。犬は犬種によって体格や体重が大きく異なる。犬用ワクチンの 1 頭あたりの用量は週齢により定められており、体重によって定められてはいないため、同じ週齢でも小型犬や体重の軽い個体は、蛋白質含有量の多いワクチンの接種による副反応が観察されやすいことが示唆された。そのため、若齢の犬や体重の軽い犬へ蛋白質含有量の高いワクチンを接種する際には副反応による健康被害について十分に注意する必要があると考えられた。さらに犬では、ワクチン中の牛胎子血清や安定剤として添加されているゼラチン、カゼインが即

時型アレルギーの原因物質となっている報告もあり（Ohmori ら 2005）、副反応の発現にはワクチン中の主剤以外の物質の関与も考えられるため、ワクチン接種の際には、動物の週齢や体重以外にも健康状態や既往歴などを考慮し注意することが、副反応による健康被害の低減につながると思われる。

今回の研究は限られた製剤の情報でのみの解析で、全ての副作用情報を網羅しているわけではない。今後、今回取り組めなかった製剤に係る情報の解析とともに、副反応を惹き起こす可能性のある主剤以外の成分にも着目し、より詳細な解析を進めることが必要と考えられる。動物用医薬品の副作用情報は、製造販売業者や獣医師に義務付けられているが、より詳しい解析のためにはより多くの正しい情報が必要である。一連の研究により副作用報告制度の周知や、副作用の少ない、より安全で安心できるワクチンの開発の一助となることが望まれる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なご協力をいただきました動物医薬品検査所企画連絡室技術指導課並びに企画調整課各位に深謝いたします。

引用文献

Ohmori K., Masuda K., Maeda S., Kaburagi Y., Kurata K., Ohno K., Deboer J.D., Tsujimoto H. & Sakaguchi M. (2005) IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic reactions after vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 104, 249 - 256

厚生労働省（2004）生物学的製剤基準．平成 16 年 3 月 30 日 厚生労働省告示 第 155 号

世界小動物獣医師会ワクチネーションガイドライングループ（2015）犬と猫のワクチネーションガイドライン．

農林水産省（2002）動物用生物学的製剤基準 一般試験法．平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号

Table1 Comparison of three protein quantification assays for determination of protein amount in vaccines.

Assay ^a	Protein amount of vaccine (µg/mL)				
	Dog		Cat		
	Live ^b	Adjuvant ^c	Live ^b	Adjuvant ^c	
BCA	1st	3008.5	3022.3	3017.3	1548.5
	2nd	873.8	977.5	872.2	1298.5
Bradford	1st	575.8	284.2	247.2	977.3
	2nd	644.7	328.3	235.1	989.0
PQA	1st	1685.5	2652.2	2015.7	1824.3
	2nd	3852.4	5088.4	5285.2	1519.1

Mean values for duplicate measurements are presented.

^a Three protein quantification assays are BCA assay, Bradford assay and Protein Quantification Assay (PQA).

^b Live; a live attenuated vaccine.

^c Adjuvant; a vaccine contains adjuvants.

Table2 Total protein content in cat and dog vaccines.

Vaccine	Total protein content (µg/dose)
	CAT-A
CAT-B	245.91
CAT-C	721.97
CAT-D	1813.79
DOG-A	30.18
DOG-B	73.05
DOG-C	101.30
DOG-D	257.64
DOG-E	367.40
DOG-F	651.52
DOG-G	708.66

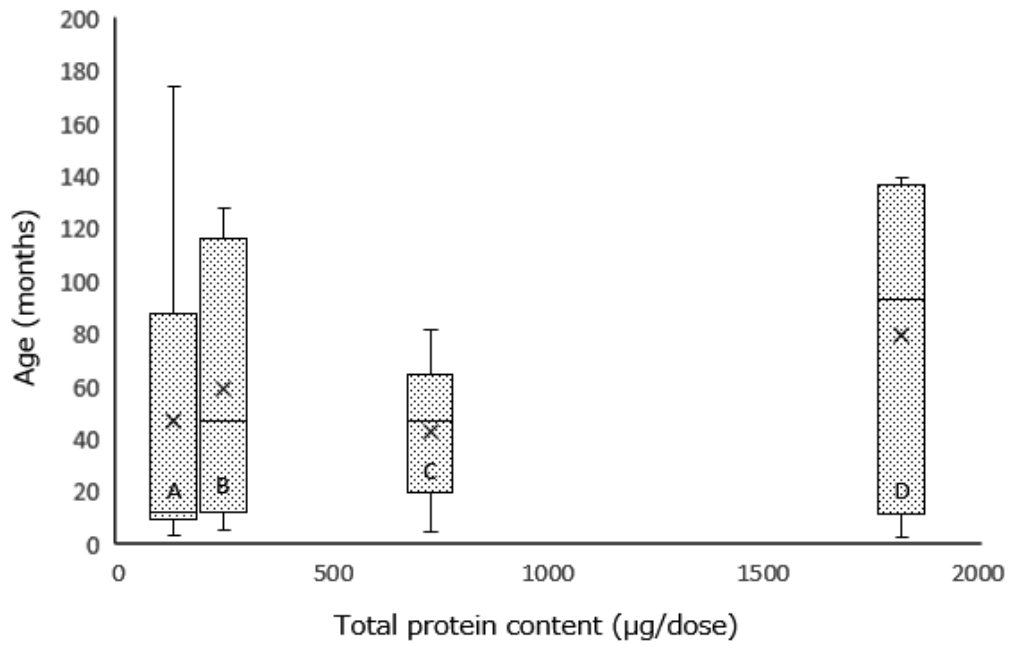


Fig.1 Distribution of cats' age that was reported ADR in each vaccine. A mark A to D in each box denotes CAT-A to CAT-D vaccine in table2. A mark (×) denotes the mean value.

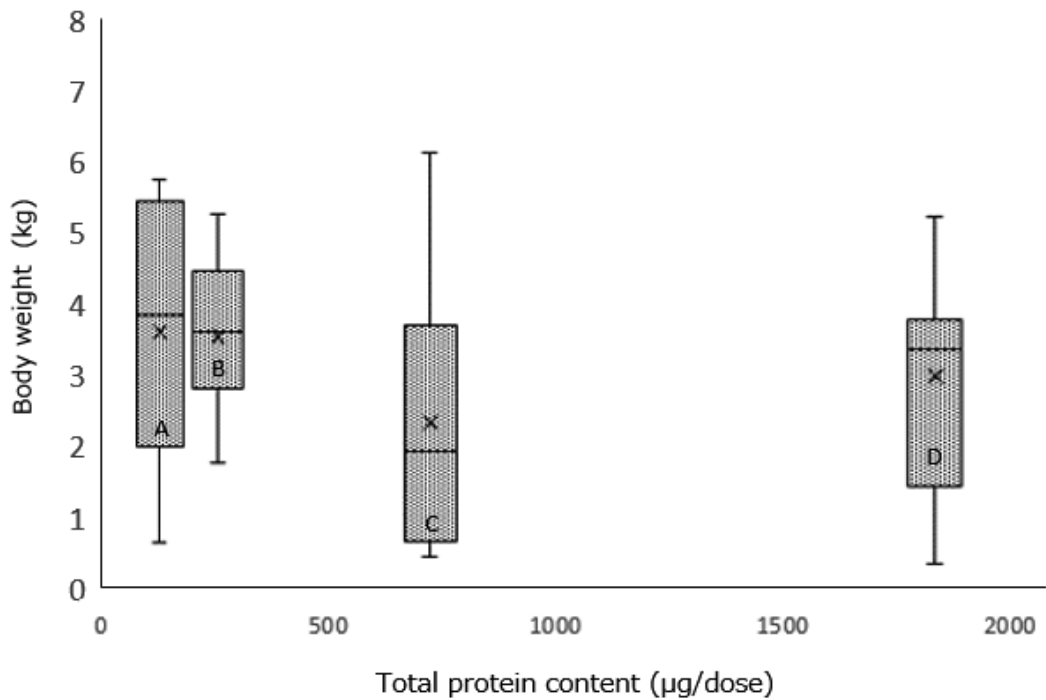


Fig.2 Distribution of cats' body weight that was reported ADR in each vaccine. A mark A to D in each box denotes CAT-A to CAT-D vaccine in table2. A mark (×) denotes the mean value.

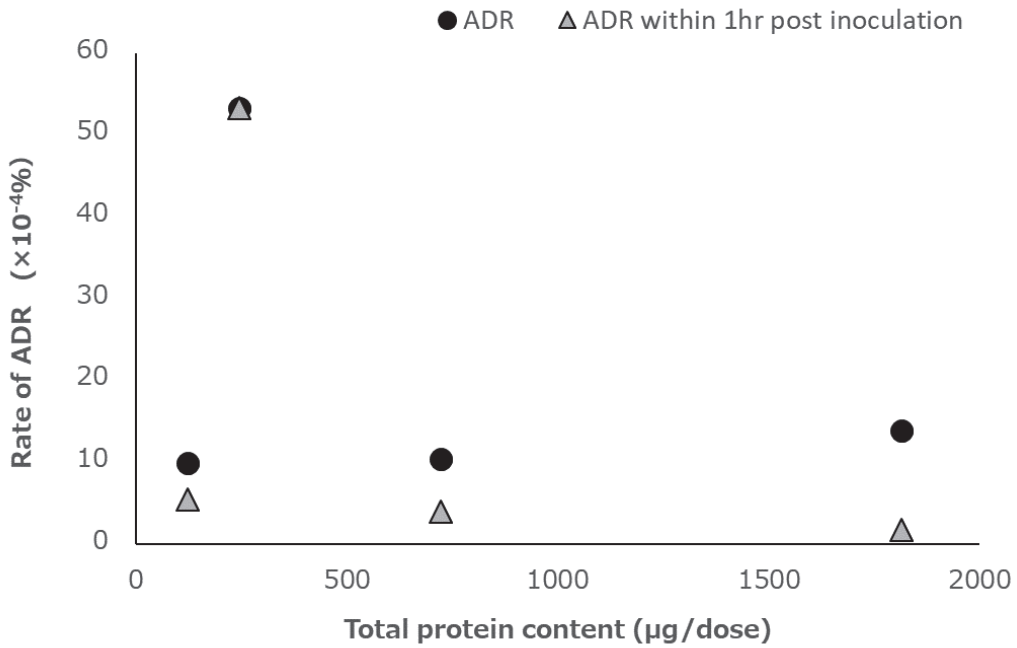


Fig.3 Correlation between the total protein content and the rate of ADR in cat vaccines.

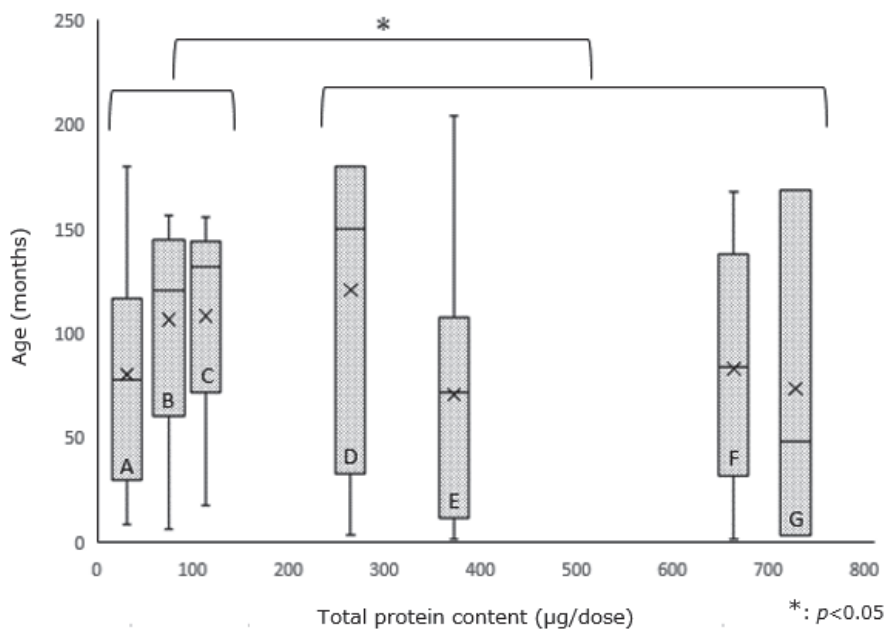


Fig.4 Distribution of dogs' age that was reported ADR in each vaccine. A mark A to G in each box denotes DOG-A to DOG-G vaccine in table2. A mark (×) denotes the mean value. DOG-A to C vaccines are monovalent vaccine group and others are combination vaccine group. An asterisk (*) denotes statistical significance between conditions ($p < 0.05$).

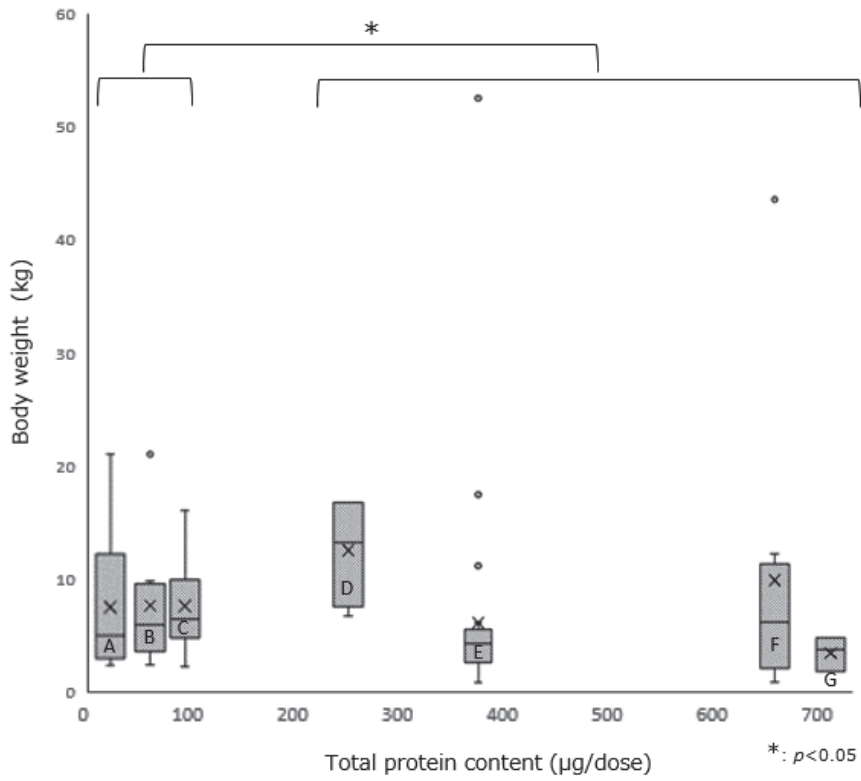


Fig.5 Distribution of dogs' body weight that was reported ADR in each dog vaccine. A mark A to G in each box denotes DOG-A to DOG-G vaccine in table2. A mark (×) denotes the mean value. DOG-A to C vaccines are monovalent vaccine group and others are combination vaccine group. An asterisk (*) denotes statistical significance between conditions ($p < 0.05$).

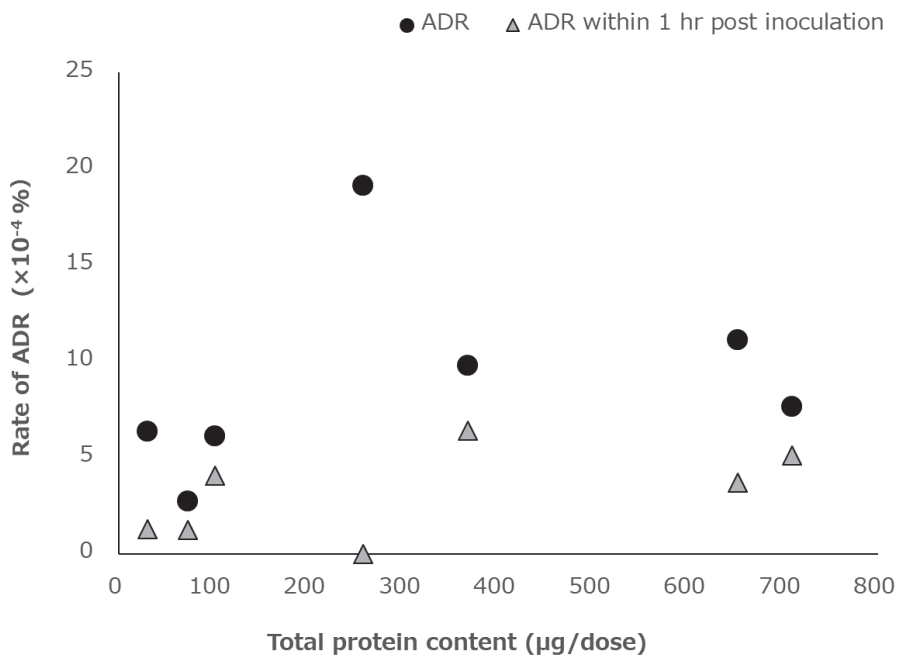


Fig.6 Correlation between the total protein content and the rate of ADR in dog vaccines.

乳房注入剤の基剤変更における
有効成分の放出性の変化に関する事前検討

大森純一、山田安里沙、細田裕子、小池良治

(令和3年6月17日受付、令和3年11月22日受理)

**Initial consideration of the evaluation method
for dissolution on intramammary infusions**

Junichi OHMORI, Arisa YAMADA, Yuko HOSODA, Ryoji KOIKE

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan

(Received: 17th Jun 2021, Accepted: 22th Nov 2021)

Abstract

The base specification of intramammary infusions is determined as a marketing approval. Moreover, dissolution of active ingredients from the base can be faster or slower, depending on when the base is changed to another one, even if it is within the specification. Additionally, it may affect the residue on milk and meat from the cows administered. However, the test procedure for evaluating the dissolution of active ingredients from the base of the intramammary infusions has not yet been established. The purpose of this study is to provide initial consideration for developing the dissolution test for intramammary infusions.

The dissolution test is based on the paddle-over-disc method, basket method (using stainless steel balls), or paddle method (using polypropylene balls), utilized in the Japanese Pharmacopoeia. The phosphate buffer solution that imitates the pH of milk or the imitated phosphate buffer solution containing polysorbate 80 served as the dissolution medium. Oil-based intramammary infusions containing cefazolin as an active ingredient were used as the test material, and the concentration of cefazolin was determined using liquid chromatography.

As a result, although measurement variability was observed, approximately 31% to 75% of cefazolin was dissolved by the paddle method using polypropylene balls in 120 min.

要旨

乳房注入剤は、乳房内に投与した後、基剤から有効成分が溶出することで効果を発揮するが、その溶出性を評価する方法は確立されていない。基剤の組成が変更された場合等、乳房注入剤の品質を担保するための方法を確立することは重要であると考え、乳房注入剤からの有効成分の溶出性を評価するための方法を確立することを最終目標とし、その事前の検討を行うこととした。

溶出試験法は、日本薬局方のパドルオーバーディスク法、回転バスケット法（ステンレス球使用）又はパドル法（ポリプロピレン球使用）に準拠し、試験液を乳のpHを模したリン酸塩緩衝液又はこの緩衝液にポリソルベート80を加えたもののいずれかとした。試験品にはセファゾリンを有効成分とする油性基剤の乳房注入剤を用い、試験液中のセファゾリン濃度は液体クロマトグラフィーで測定した。

その結果、ばらつきは認められたが、ポリプロピレン球を使用したパドル法において 120 分で概ね 31 ～ 75%が溶出した。

背景

乳房注入剤は、抗生物質を基剤に均等に混和して製した半固形の無菌製剤で、乳房内で基剤から有効成分が溶出することで効果を発揮する。しかしながら、乳房注入剤からの有効成分の溶出性を評価する方法は確立されていない。

乳房注入剤の基剤には、人用医薬品の軟膏剤に使用される、単一化合物でない基剤が用いられることがあり、製造工程の変更により組成等が変更されることが想定される。

このような場合を想定し、製品の品質等を担保するための方法として、本研究では、乳房注入剤からの有効成分の溶出性を評価するための方法を確立することを最終目標とし、その事前の検討を行うこととした。

本事前検討に当たっては、日本薬局方一般試験法である「皮膚に適用する製剤の放出試験法」及び「溶出試験法」を参考にした（第 17 改正日本薬局方）。日本薬局方における溶出試験法は経口投与剤を対象とした試験法であるが、製剤からの有効成分の溶出を評価する方法のひとつであることから検討の対象とすることとした。

目的

乳房注入剤からの有効成分の溶出性を評価する方法を確立することを最終的な目標とし、その事前検討を行うことを目的とした。この方法は、残留試験及び残留確認試験の代替又はこれらの結果の推測ではなく、基剤の変更前後での生物学的同等性を溶出性で確認するための品質試験のひとつとして位置付けることを意図している。

研究成果

【材料】

溶出試験の共通の試験条件

溶出試験器：NTR-3000（富山産業株式会社製）

試験液：

①日本薬局方溶出試験第 2 液にリン酸を加えて pH 6.6 に調整したリン酸塩緩衝液（0.05 mol/L）

設定根拠：有効成分であるセファゾリンの pKa は 2.13 であることから（ニプロ株式会社、セファゾリン Na 注射用 0.25g 「NP」のインタビューフォーム、2018）、日本薬局方溶出試験液のうち、第 1 液よりアルカリ側である第 2 液を選択した。また、牛乳の pH が 6.4 ～ 6.8 であることから（上野川修一ら 2009）、pH を 6.6 とした。

②①に 0.01 w/v% となるようにポリソルベート 80 を添加したもの

設定根拠：水系の溶出試験液に油性の基剤から有効成分を溶出させるため、界面活性剤としてポリソルベート 80 を添加した（農林水産省通知 動物用医薬品溶出試験法ガイドライン 2000）。

③①に 0.1 w/v% となるようにポリソルベート 80 を添加したもの

④①に 10 w/v% となるようにポリソルベート 80 を添加したもの

試験液の温度：37℃

回転数：毎分 100 回転

設定根拠：事前の検討から毎分 50 回転では溶出が見込めないと考え、動物用医薬品溶出試験法ガイドラインを参考に、毎分 100 回転を採用した（農林水産省通知 動物用医薬品溶出試験法ガイド

ライン 2000)。

試験品：セファゾリンを有効成分とする乳房注入剤（青色 1 号含有）

【試験方法、結果及び考察】

1 パドルオーバーディスク法の検討

日本薬局方のパドルオーバーディスク法を参考に、試験品の一定量（約 1 g）を時計皿に秤取し、その上にステンレス製のディスクを載せ、時計皿とディスクの境界をパラフィルムで覆ったものをベッセルに入れて試験した。試験液には、①、②又は③それぞれ 900mL を用いた。

その結果、試験開始後 360 分のいずれの試験液においても、製剤の有効成分とともに溶出されることが考えられる青色 1 号により試験液が青く着色しなかったことが目視で確認されたことから、試験液がディスクの網目を通過せず、試験液と試料が十分に接触していないことが示唆された。

2 回転バスケット法（ステンレス球使用）の検討

回転バスケット法に用いるバスケットの底面を覆うように紙を敷き、試験品の一定量（約 1 g）を静置した。試験品のみでは、ろ紙に付着した状態が維持されることが考えられたため、試験品を攪拌するために、比重の大きいステンレス球（直径約 8 mm）を 5 個（バスケット内に入れることのできる上限）入れることで、有効成分を溶出させることを試みた。試験液には、③ 900 mL を用いた。

その結果、1 とは異なり、試験開始後 360 分の試験液がわずかに着色したものの、試験品のほとんどはそのまま紙に付着しているか、又は塊となって浮いていた。また、ステンレス球は、バスケット及び試験品と同調して回転していた。

以上のことから、試料と試験液を十分に接触させるだけでは試料から有効成分を溶出させることが困難であること、ステンレス球が重すぎてバスケット内の試料を細分化させることが困難であることが示唆された。

3 パドル法（ポリプロピレン球使用）の検討

試験液にポリプロピレン球（直径約 4.8 mm）50 個（試験液表面の約 12 % を覆う量）を浮かべ、試験品の一定量（約 50 mg）を試験液に直接滴下し、パドル法で試験した。試験液には、④ 500 mL を用いた。ポリプロピレン球は、塊となって浮いている試験品を細分化させ、有効成分を効率的に溶出させることを目的として使用した。

その結果、試験開始後速やかに試験液が青色に着色したことが目視で確認されたことから、同条件で以下の手順により 6 回の繰返し試験を行った。

試験開始後 15 分、30 分、60 分、120 分、180 分、240 分、300 分及び 360 分の各時点において試験液 1.5 mL を採取し、孔径 0.45 mm のメンブランフィルターでろ過し、そのろ液を試料溶液とした。

別にセファゾリン標準品（Toronto Research Chemicals 社製の含量既知のもの）に試験液を加えて希釈して、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 及び 0.2 mg/mL の標準溶液を作成した。

試料溶液及び各標準溶液 10 mL につき、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、絶対検量線法を用いて各時点における試料溶液中のセファゾリン濃度を算出し、次式により各時点におけるセファゾリンの溶出率を算出した。

各時点におけるセファゾリンの溶出率

$$= \left\{ C_n * \left[V - \sum_{i=1}^{n-1} L_i \right] + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i * L) \right\} * \frac{10^5}{M * S}$$

Cn：検量線から算出した時点 n におけるセファゾリン濃度 (mg/mL)

V：試験液量 (mL)

L：各時点における採取液量 (mL)

M：製剤の秤取量 (mg)

S：製剤 1 g 当たりのセファゾリン量 (mg)

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：254 nm)

カラム：内径約 4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス管に粒子径 5 mm のオクタデシルシリル化シリカゲルを充てんしたもの (一般財団法人化学物質評価研究機構製の L-Column ODS 分析カラム)

カラム温度：40℃

移動相 A：薄めた試験液① (200 → 1000)

移動相 B：アセトニトリル

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御する。

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol %)	移動相 B (vol %)
0 ~ 5	85	15
5 ~ 6	85 → 15	15 → 85
6 ~ 20	15	85
20 ~ 21	15 → 85	85 → 15
21 ~ 30	85	15

その結果、平均溶出率は、試験開始後、15分で18% (0 ~ 56%)、30分で34% (0 ~ 68%)、60分で41% (0 ~ 73%)、120分で48% (31 ~ 75%)、180分で51% (39 ~ 76%)、240分で52% (41 ~ 75%)、300分で54% (47 ~ 76%) 及び360分で56% (47 ~ 75%) であった。

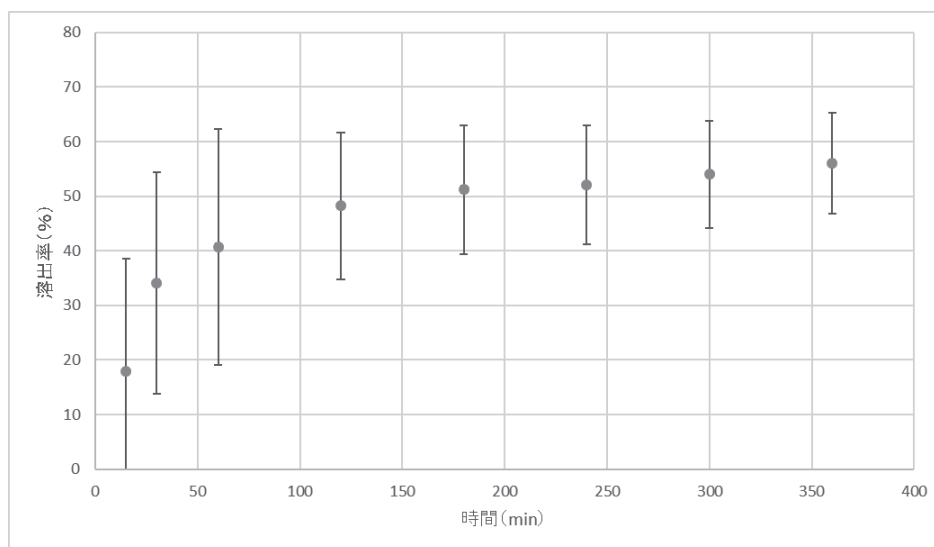


図 セファゾリンの平均溶出率

試験品を試験液に滴下すると、試験液の表面に浮いて油滴となって固まるため、通常のパドル法ではうまく溶出されないと考えられる。しかし、今回のように水に浮くポリプロピレン球を使用すると、ポリプロピレン球が試験品と接触する度に、試験品の油滴が細分化される様子が確認されたことから、このことにより、セファゾリンの溶出性が改善されたことが示唆された。また、認められたばらつきは、試験品の滴下方法の

違いによる油滴の大きさの差及びポリプロピレン球との接触の頻度によるものと推察された。

今後、試験品の滴下方法、ポリプロピレン球の大きさ・数、ポリプロピレン球への有効成分の付着及び吸着、回転数、試験期間中の有効成分の安定性、他の乳房注入剤への適用の可否などのさらなる検討が必要と考えられた。

引用文献

厚生労働省 (2016) 第十七改正日本薬局方 . pp.328. 平成 28 年 3 月 7 日

上野川雄一、清水誠、鈴木英毅、高瀬光徳、堂迫俊一、元島英雅 (2009) ミルクの辞典 . 上野川雄一：ミルクの辞典 . pp.488. 朝倉書店 . 東京

農林水産省 (2000) 農林水産省通知 12 動薬 A 第 418 号 “医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて” . 平成 12 年 3 月 31 日

豚熱ウイルス Subgenotype 2.1 実験感染豚における ボタン状潰瘍の形成過程について

(The formation process of button ulcers in pigs experimentally infected
with a subgenotype 2.1 isolate of classical swine fever virus)

須藤加澄¹, 山田学², 落合絢子, 岩本聖子, 榊基, 串田千帆, 山下麻衣子,
山本篤³, 長坂孝雄, 大出水幹男, 齋藤明人⁴, 山本欣也

本研究では、腸管粘膜でのボタン状潰瘍の形成における豚熱ウイルスの寄与について評価した。2019年に日本で分離された豚熱ウイルス Subgenotype 2.1 を実験感染させた豚の病理組織学的及び免疫組織学的評価により、粘膜下組織の粘膜関連リンパ組織における濾胞壊死および陰窩ヘルニアが、豚熱ウイルス感染においてボタン状潰瘍形成を生じさせる要素であることが明らかとなった。これらの結果は、豚熱ウイルスが濾胞壊死を引き起こし、また、豚熱ウイルスは豚におけるボタン状潰瘍の一因であることを示唆する。

(The Journal of Veterinary Medical Science 83(6): 990–993, 2021. 英文)

1 Food and Agriculture Organization of the United Nations

2 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門

3 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

4 独立行政法人農林水産消費安全技術センター

動物用ワクチンに対する実験小動物を用いたバッチ安全試験の病理学的解析

(Pathological analysis of batch safety testing of veterinary vaccines using small laboratory animals)

須藤加澄, 落合絢子, 相原尚之^{*1}, 堀内雅之², 山本篤, 松本幸子, 大石弘司³

動物用ワクチンのバッチ安全試験 (Batch Safety Testing; BST) は、ワクチンの安全性確保のために実験用小動物を用いた試験が行われる。この試験では体重変化が評価指標として用いられるが、試験期間中に体重へ影響する生体内変化についてはこれまで報告されていない。そこで我々は、マウスを用いた試験 176 バッチ及びモルモットを用いた試験 126 バッチの BST を病理学的に解析した。肉眼所見のほとんどは4つの病変タイプ (結節、癒着、腹水及び著変なし) に分類することができた。例外的に1つのワクチンだけは上記いずれのタイプにも当てはまらなかった。病理組織学的検索により、BSTによって化膿性炎症や肉芽腫性炎症が惹き起こされることが明らかとなった。これらの炎症は、腹水や著変なしタイプよりも、結節又は癒着タイプの方でより重度であった。また、結節又は癒着タイプの病変はアジュバント非含有ワクチンよりもアジュバント含有ワクチンで、より多く認められた。例外的な肉眼所見を示したケースでは重度の造血系の壊死が認められた。追加試験により、この例外的病変は特定の軽質流動パラフィンがワクチンの他の添加剤とともに接種されたときに惹き起こされることが判明した。本研究により、BSTで観察された体重減少・病変は、供試ワクチンの炎症誘発性により惹き起こされることが、また BST はワクチン成分による予期せぬ

影響を検出する感度の高い方法であることが示された。

(Journal of Toxicologic Pathology 34(2), 137-146, 2021.)

* 責任著者

1 麻布大学

2 帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター

3 日本動物用医薬品協会

家畜から分離された大腸菌における人用及び 動物用の抗菌剤の最小発育阻止濃度の相関

(Correlation of minimum inhibitory concentrations between human and animal antimicrobials
against *Escherichia coli* isolated from livestock)

小澤 真名緒¹、川西 路子¹、内山 万利子¹、三矢 大亮¹、阿保 均^{1,2}、小池 良治¹、木島 まゆみ¹

人に用いられている抗菌剤と動物に用いられている抗菌剤では、同系統であっても異なる成分の抗菌剤が使用されている場合があるが、動物用抗菌剤に対して耐性であることをもって、同系統の人用抗菌剤に対する耐性の判断を行わなければならない場合がある。そのため、動物（牛、豚、肉用鶏及び採卵鶏）から分離された大腸菌 103 株を用いて、人用抗菌剤とそれと同系統の動物用抗菌剤の最小発育阻止濃度（MIC）の比較を行った。耐性と感受性の一致度を判定するカッパ係数は、同系統の人用及び動物用抗菌剤、即ちピペラシリン（PIPC）及びアンピシリン（ABPC）、アミカシン（AMK）及びカナマイシン（KM）、ミノサイクリン（MINO）及びオキシテトラサイクリン（OTC）、レボフロキサシン（LVFX）及びエンロフロキサシン（ERFX）の組合せで、それぞれほとんど一致（ $\kappa = 0.81$ ）、わずかに一致（ $\kappa = 0.12$ ）、ある程度一致（ $\kappa = 0.37$ ）、適度に一致（ $\kappa = 0.46$ ）であった。これらの抗菌剤の組合せで、人用抗菌剤に耐性の株はすべて動物用抗菌剤に耐性であった。一方、人用抗菌剤に対して感受性であった株のうち、動物用抗菌剤に対しても感受性であった株の割合は、PIPC 及び ABPC、AMK 及び KM、MINO 及び OTC、LVFX 及び ERFX の組合せで、それぞれ 89.9%、87.3%、64.0%、89.9% であった。これらの結果から、同系統の動物用抗菌剤の MIC で耐性を判定したとしても、人用抗菌剤の耐性を見逃す可能性は低いことが示唆された。

(Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 33: 744–748, 2021. 英文)

1 農林水産省動物医薬品検査所 2 国立感染症研究所