

日本財団補助金による  
1998年度日中医学協力事業報告書

—中国人研究者・医療技術者招聘助成—

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

1998年9月29日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招へい責任者 高橋元秀



所属機関 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

職名 室長

所在地 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

電話 042-561-0771

招へい研究者氏名 李 偉華

所属機関 中国衛生部 蘭州生物製品研究所

研究テーマ 生物製剤の品質管理技法の研修  
—特にバイオアッセイと統計解析について—

2. 日本滞在日程

別紙1の通り

### 3. 研究報告

#### ◆研究テーマ

生物製剤の品質管理技法の研修  
－特にバイオアッセイと統計解析について－

#### ◆来日研究者氏名

李 偉華 研究員

#### ◆中国での所属・役職

中国衛生部 蘭州生物製品研究所 医学工程師

#### ◆招聘者氏名・所属・役職

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 細菌製剤第3室長

#### ◆要旨

1. 日本の生物学的製剤基準の概要説明と試験の実施  
・ジフテリアおよび破傷風トキソイドの安全性と有効性について実験動物を用いた無毒化試験、力価試験を実施する
2. 試験成績の統計学的解析法の概要説明  
・コンピューター利用におけるバイオアッセイの理論とソフトの基礎研修とその応用について
3. 現在国際的に求められている基準とハーモナイゼーションについて  
・WHO基準との整合性

#### ◆KEY WORDS

生物学的製剤、品質管理、バイオアッセイ、統計学的解析

#### ◆研究報告

##### 1. 目的

生物学的製剤であるワクチンは多数の健康者の免疫に用いられるため十分安全でなくてはならない。また、当該疾病を予防する手段として免疫を付加するに十分なある一定水準以上の力価を有する必要がある。これら、生物学的製剤の品質を保証するために品質管理と呼ばれる手法が基本となる。製品の品質は

物理学的、科学的、あるいは生物学的手法により測定される。品質の測定値は偶然の結果としてある範囲で変動するもので有る。この変動の量は統計学的に平均と偏差値として把握される。これら生物学的手法を用いた測定法をバイオアッセーと呼び、安全性と有効性を評価する手段となっている。バイオアッセーに際しては、動物、培養細胞、微生物等が使用され、物理学的または化学的測定法より測定値の変動が大きくなる。変動の原因には、使用動物の種差、個体差、試験方法や動物の管理状況等があげられる。これら変動要因を考慮して、ワクチン等の本質に近い値を知るために統計学的手法が重要である。

今回、日本におけるこれらワクチン類の品質管理技術の実際を学び、中国での品質管理技術を振り返り整理する。ワクチン類の国際的市場開発が行われている今、両国間さらに国際的な視野においてこの分野の発展に資するために研修するものである。

## 2. 方法

生物学的製剤の品質管理の中で、国の管理機構を中心に調査、研修する。従って、ワクチンの国家検定と標準品の交付を行っている国立感染症研究所の組織とその機能について調査する。国立感染症研究所の行っている検定の中でジフテリアと破傷風トキソイドワクチンについて、安全性と有効性についての品質管理技術を細菌・血液製剤部、細菌製剤第3室において技術研修する。特に、有効性の保証試験である動物を用いた力価試験法について実習する。また、研修して得られた力価試験成績について、元国立感染症研究所 安全性研究部 統計室長 石田説而先生の元で生物定量法の統計学的解析を研修し、さらに通常の試験成績解析をコンピューターシステムの導入とその応用について発展させる。

## 3. 結果および考察

### (1) 日本の生物学的製剤の国の管理機構

「ワクチン開発と承認審査プロセス」について以下に示す。

候補ワクチン→



動物での前臨床試験



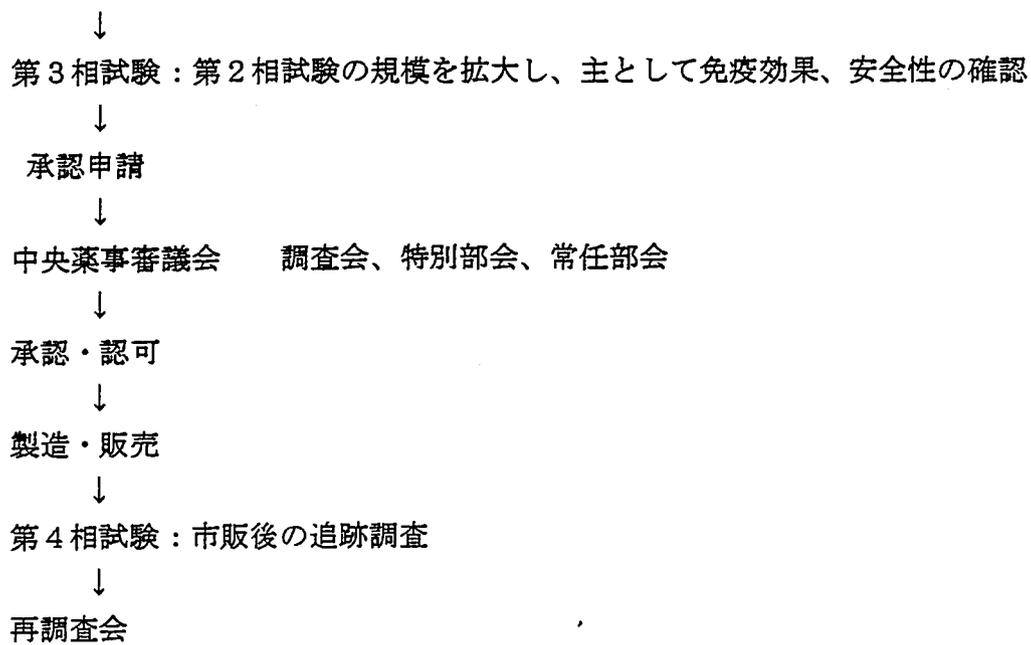
治験届



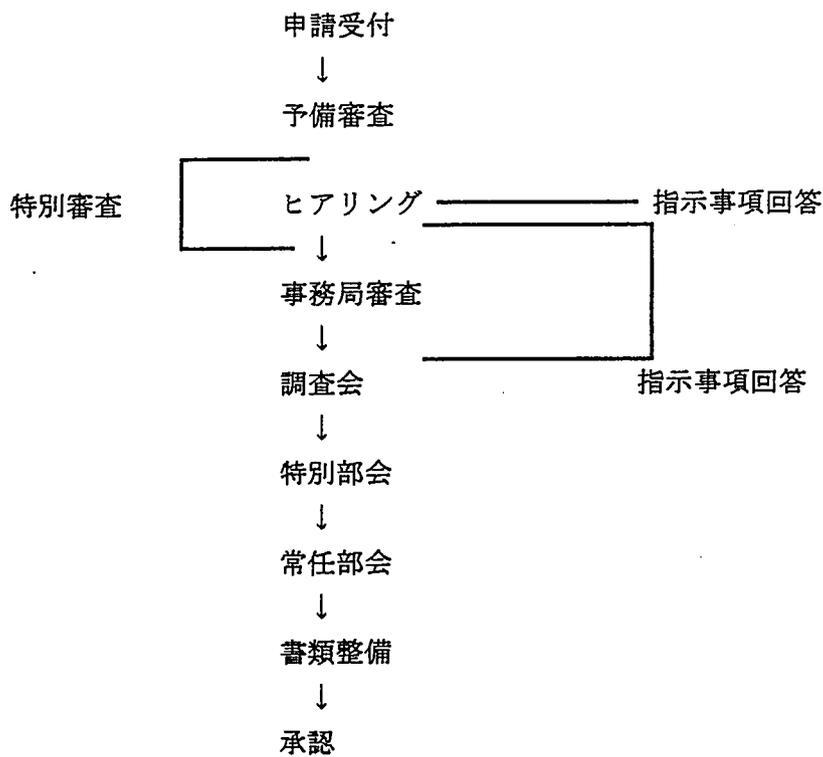
第1相試験：少数の健康人希望者で安全性（副作用）、免疫効果の確認



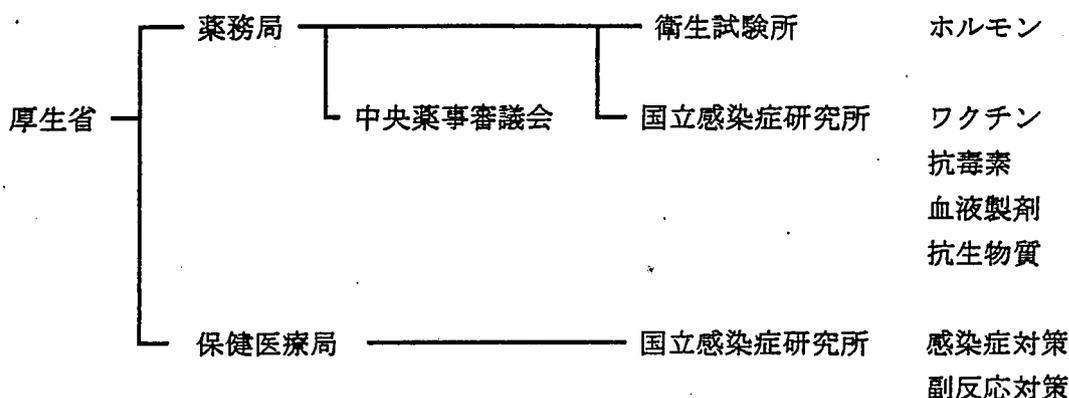
第2相試験：接種方法、接種量、副作用、免疫効果について検討



「厚生省内での手続きの流れ」を以下に示す。



「国家検定・検査システム」を以下に示す。



「国立感染症研究所の組織」を以下に示す。

- 戸山庁舎  所長            国家検定試験室 (NCL) の統括責任者
- 細菌部            NCL: コレラワクチン、肺炎球菌ワクチン
- ウイルス部        NCL: インフルエンザワクチン
- 感染症病理部    NCL: 病理学的検査
- 感染症情報センター: 国内感染症情報、流行予測調査
- 国際協力室: 海外感染症情報、研修生の受け入れ
- 村山分室  細菌・血液製剤部 NCL: 細菌製剤全般、血液製剤全般
- 安全性研究部    NCL: 安全性一般試験
- ウイルス製剤部    NCL: ポリオ、麻疹、風疹ワクチン等
- 動物管理室        NCL: 動物試験
- 筑波医学実験用霊長類センター: サル実験施設
- ハンセン病研究センター

## (2) 力価試験の実習

現在、中国においてはジフテリアと破傷風トキトイドの力価試験はモルモットを用いて行われているが、日本ではマウスを用いた試験方法で行われている。以下に日本における両トキトイドの生物学製剤基準試験方法を別紙2にあらわし、以下その概要を示す。

国内標準品と試験品を任意に希釈し、各用量を1群10匹のマウス(4-5週齢、雌、ddy/SPF)皮下に0.5ml宛注射する。ジフテリアの力価測定に関しては、トキソイド注射4-5週後に採血し、血清中の抗毒素を培養細胞法(Vero細胞)で定量する。また、破傷風はトキソイド注射4-5週後に破傷風毒素の100LD<sub>50</sub>を皮下に直接注射し、毒素による麻痺の出現(特異症状)と死亡日数を観察する。症状および死亡に至る日数はスコアに変換して、統計解析をする。標準品に対

する相対力価を平行線定量法で求めた。

上記の方法を用いて、日本の標準品と中国 蘭州研究所で製造した混合ワクチン中のジフテリアトキソイドの力価を比較試験するとともに、作製したソフトを用いてコンピューターで統計解析した。

培養細胞法で求めた個々のマウスのジフテリア抗毒素価表 3-1 に示した。表には簡単な計算機で求めた平均値を示した。さらに作製したソフトで計算した実例を表 3-2 に示した。個々の値を入力後に表される成績とその詳細解析は必要な要因を考慮に入れた成績としてあらわした。共通の回帰係数を採用して蘭州の製品を評価すると 960 単位となった。

日本の標準品を対照として蘭州研究所の製品を評価すると 677 単位または 960 単位となった。この計算の違いは、今回の実験だけで得られた成績だけ解析すると 960 単位、現在までに累積された日本国内の混合ワクチンの成績を考慮に入れると 677 単位となった。表中の図でわかるように標準品 (REF) と蘭州の製品 (RAN) は傾き (b) が異なり、平行性は否定された。これは両者の品質が異なることを意味し、統計学的には両者の解析に無理が生じる。また、結果的には RAN トキソイドは高力価のために、用いた用量が適当でなく、より希釈した用量で試験するべきであった。今回の成績によると蘭州研究所製のジフテリアトキソイドは国際的に求められている WHO 基準 (30 単位/0.5ml) を遙かに上回る力価であった。

### (3) その他作製した統計解析プログラムの実例

日常の実験で得られた成績を統計解析得るためのプログラムを作製した。実際に例題を作り、解析した実例を別紙 4 に示す。

別紙 4-1 : 一元配置法

別紙 4-2 : 二元配置法 (繰り返しのない場合)

別紙 4-3 : 相関係数

別紙 4-4 : 平均値の差の検定 (対応のない場合)

別紙 4-5 : 平均値の差の検定 (対応のある場合)

別紙 4-6 : 回帰係数 (繰り返しのある場合)

別紙 4-7 : 回帰係数 (繰り返しのない場合)

別紙 4-8 : 平行線定量法 (連続量の場合)

別紙 4-9 : 平行線定量法 (プロビット法)

別紙 4-10 : 度数分布

(4) National control authorities (NCA) の位置づけと役割を WHO のテキストで学んだ。

ワクチン等の生物学的製剤を製造する製造所は、Good Manufacturing Practice (GMP)で規制され、査察制度が国際的に導入されようとしている。それに伴い、国家検定をどのように行い、ワクチンの品質保証を確立するか、国際的にハーモナイゼーションが叫ばれていることを理解した。以下にそのガイドラインの要約を示す。

NCA は国内で生産されたものや輸入されたワクチン等について規制された品質であることを保証する義務がある。適切な品質、安全性および有効性を有することを保証するために製造者のための要求基準（生物学的製剤基準）および製剤に特有な品質管理に準拠しているかを確認する。その手段として、国家検定があり一般試験法と製剤別試験法について明記し用意する必要がある。これら基準は WHO から提供された資料や、各国の基準とできる限り調和しかつその時代に適合した水準を基盤として作られる。しかしながら、これら品質、安全性および有効性は背増車に主たる責任があるため、製造者は設立状況と設備の充実性、出発材料、製造工程、コントロールテスト過程及び製剤特殊性を評価するための専門家をもうける必要がある。一般的にこの機能は national control laboratory (NCL) として単独の行政的ユニットとして設立される。NCA は独立した専門顧問と適切な専門家との顧問審議会の活用と可否決定を援護するために NCL の試験施設と同様な施設との関連を持たなければならない。

要員：NCA と NCL の要員には訓練された専門家を含み、コントロール過程の技術的及び行政的両面の側面を包括する。

行政：NCA は製造者の提出書類の受理と評価のため裏付け過程を確立し（サンプルテスト等）、詳細報告の検討を含め承認または不承認の通達をする。

GMP 査察：査察の目的は製造者の施設及び製造工程が WHO 出版物に記載されているような GMP の原則または生物学的製剤基準または状況に適合していることを保証することにある。

製造者と製剤の承認過程：生産工程確立の承認またはライセンス授与は GMP の原則に対応している場合にだけ許可される。承認を許可されるためには製造法確立に関する情報、製剤に関する情報等についての詳細情報を精査しなければならない。

国家検定試験室 (NCL)：NCL の施設の大きさとスタッフの数は、要求される品質管理の性格と範囲に依存する。主な重要な機能は、試験室のテストと評価、生物学的製剤用の国内参照品の作製があげられる。

製造承認後のモニターリング：製剤出荷、監視、市場調査、リコールと取り消し、製造変更の承認、新しい指示の承認等について連続的に行う。

輸入製剤承認の手続き：輸入を希望する国の NCA は製剤の品質あるいは基準に合致することを説明する製造者 NCA により発行された証明書を受け、テス

トの必要性を減じライセンス書類を簡略化することができる。この際に、WHO 参加メンバー、製剤の証明、追加情報の請求、欠陥と副反応の報告等について検討する。

日本国の NCAs の現状はほぼガイドラインに沿うものと理解した。すなわち、予防接種による健康被害は国が責任を持ち迅速に対応すると法律で規定されていた（予防接種法 1994 年）。その責任を果たすために、生物学的製剤の品質、安全性および有効性を有することを保証するための機構が確立し、今回研修した国立感染症研究所の国家検定および GMP 査察等が行われていた。

#### 4. 参考文献

- 1: 石田説而、高橋元秀(1993) 生物学的製剤の統計学的品質管理法  
細菌製剤協会 平成5年8月
- 2: ワクチンハンドブック(1994)  
第2編 ワクチン各論 ジフテリアトキソイド 71-80. 佐藤博子、高橋元秀  
第2編 ワクチン各論 破傷風トキソイド 81-90. 佐藤博子、高橋元秀  
丸善株式会社
- 3: 日本臨床、増刊号 第53巻(1995)  
広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(下巻)  
破傷風菌 P148-150 ジフテリア菌 P204-206 日本臨床社
- 4: Vaccine Handbook (1996) MARUZEN, Tokyo  
Part Two: Chapter 9; Diphtheria Toxoid, Hiroko SATO and Motohide TAKAHASHI  
p52-59  
Part Two: Chapter 10; Tetanus Toxoid, Hiroko SATO and Motohide TAKAHASHI  
p60-67
- 5: 細胞培養法によるジフテリア抗毒素価測定の際にみられる VERO 細胞内の顆粒増加について . マウス血清について  
保田幸子、小宮貴子、高橋元秀、亀山昭一、松橋直  
日本臨床病理学会誌 第41巻第3号 P289-292(1993.3)
- 6: 細胞培養法によるジフテリア抗毒素価測定の際にみられる VERO 細胞内の顆粒増加について . 顆粒の性状と力価試験に及ぼす影響  
保田幸子、小宮貴子、高橋元秀、亀山昭一、松橋直  
日本臨床病理学会誌 第41巻第5号 P609-613(1993.5)
- 7: 百日咳・ジフテリア・破傷風・日本脳炎の抗体検査法  
近田俊文、高橋元秀 日本医事新報 P721-722(1996)
- 8: ジフテリア抗毒素価測定に用いる培養細胞法の改良  
小宮貴子、高橋元秀、福田靖、貞弘省二 医学検査 46巻2号 P135-138(1997)
- 9: Summary and recommendations. Brown F, Cussler K, Hendriksen C(eds): Dev Biol  
Stand. Basel, Karger, 1996, Vol.86, p353-358

## 滞 在 日 程 表

申請人：李 偉華 の滞在予定

予定滞在期間 1998年7月 5日 より 1998年10月 2日 (90日間)

月・日	予 定	宿 泊 先
7月 5日	北京空港から成田空港へ	日中友好会館後楽寮  東京都文京区後楽 一丁目五番三号  (03-3814-1261) に滞在。
7月 6日	国立感染症研究所(感染研)にて入所手続き	
7月 7日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月 8日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月 9日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月10日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月11日	行楽寮で自習及び休息	
7月12日	行楽寮で自習及び休息	
7月13日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月14日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月15日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月16日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月17日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月18日	行楽寮で自習及び休息	
7月19日	行楽寮で自習及び休息	

月・日	予 定	宿 泊 先
7月20日	行楽寮で自習及び休息	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
7月21日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月22日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月23日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月24日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月25日	高橋元秀室長宅訪問	
7月26日	行楽寮で自習及び休息	
7月27日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
7月28日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月29日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月30日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月31日	感染研、生物統計室にて生物統計学を聴講	
8月1日	行楽寮で自習及び休息	
8月2日	行楽寮で自習及び休息	
8月3日	感染研、生物統計室にて生物統計学を聴講	
8月4日	感染研、生物統計室にて生物統計学を聴講	
8月5日	前生物統計室長石田説而先生宅を訪問	
8月6日	前生物統計室長石田説而先生宅を訪問	

月・日	予 定	宿 泊 先
8月 7日	石田説而先生宅でコンピューター基礎学を聴講	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
8月 8日	行楽寮で自習及び休息	
8月 9日	行楽寮で自習及び休息	
8月10日	石田説而先生宅でコンピューター基礎学を聴講	
8月11日	石田説而先生宅でコンピューター基礎学を聴講	
8月12日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月13日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月14日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月15日	行楽寮で自習及び休息	
8月16日	行楽寮で自習及び休息	
8月17日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月18日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月19日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月20日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月21日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月22日	行楽寮で自習及び休息	
8月23日	行楽寮で自習及び休息	
8月24日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	

月・日	予 定	宿 泊 先
8月25日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
8月26日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月27日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月28日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月29日	行楽寮で自習及び休息	
8月30日	行楽寮で自習及び休息	
8月31日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月1日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月2日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月3日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月4日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月5日	行楽寮で自習及び休息	
9月6日	行楽寮で自習及び休息	
9月7日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月8日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月9日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月10日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月11日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	

月・日	予 定	宿 泊 先
9月12日	行楽寮で自習及び休息	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
9月13日	行楽寮で自習及び休息	
9月14日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月15日	石田説而先生と箱根研修旅行	箱根泊
9月16日	石田説而先生と箱根研修旅行	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
9月17日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月18日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月19日	行楽寮で自習及び休息	
9月20日	行楽寮で自習及び休息	
9月21日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月22日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月23日	行楽寮で自習及び休息	
9月24日	石田説而先生と京都・奈良見学	
9月25日	石田説而先生と京都・奈良見学	
9月26日	石田説而先生と京都・奈良見学	京都泊
9月27日	行楽寮で自習及び休息	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
9月28日	最終報告書の作成	
9月29日	帰国後の共同研究に関する打ち合わせ	

月・日	予 定	宿 泊 先
9月30日	帰国に関する部屋の整理	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
10月 1日	帰国に関する部屋の整理	
10月 2日	成田空港から北京空港へ	北京着

## ジフテリアトキソイド

## 1 本質及び性状

本剤は、ジフテリア毒素（以下「毒素」という。）をホルマリンでその免疫原性をなるべく損なわないように無毒化（以下「トキソイド化」という。）して得られた『ジフテリアトキソイド』（以下「トキソイド」という。）を含む無色ないし淡黄褐色の澄明な液剤である。

## 2 製 法

## 2.1 原 材 料

## 2.1.1 製 造 用 株

ジフテリア菌 Park-Williams No. 8 株又はこれと同等以上の毒素産生能をもつ株を用いる。

## 2.1.2 培 地

毒素の産生に用いる培地には、馬肉、人体に由来する材料、ヒト血液型物質を含む可能性のあるもの、又はその他の人体に高度のアレルギーを起こすおそれのあるものを用いてはならない。

## 2.2 原 液

## 2.2.1 毒 素 液

ジフテリア菌の培養終了後、鏡検又は適当な培養法によって検査するとき、他の細菌の混入を認めない培養液を適当な方法で除菌し、これを毒素液とする。

毒素液は、3.2.8を準用して試験するとき、1 ml 中に毒素の 100 Lf 以上を含まなければならない。

## 2.2.2 トキソイド化及び精製

トキソイド化には、ホルマリンを用いる。トキソイド化の前あるいは後に精製しなければならない。

この精製トキソイドを含む液を原液とする。

原液について、3.1の試験を行う。

## 2.3 最終バルク

原液を緩衝性の生理食塩液等で希釈し、1 ml 中のトキソイドの含量が 70 Lf を超えないようにして作る。

この際、チメロサルを 0.01 % になるように添加することができる。また、適当な安定剤を加えることができる。

## 3 試 験

## 3.1 原液の試験

## 3.1.1 純 度 試 験

一般試験法のたん白窒素定量法を準用してたん白窒素含量を、また、3.2.8を準用してトキソイド含量を測定するとき、たん白窒素 1 mg につきトキソイドの 1,500 Lf 以上を含まなければならない。

## 3.1.2 無 菌 試 験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.1.3 無 毒 化 試 験

検体を 0.017 M リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (pH 7.0) で薄めて、1 ml 中にトキソイドの 200 Lf を含むようにしたもの、及び最終バルクと同等の濃度となるようにして 37°C に 20 日間置いたものを試料として、次の試験を行う。

## ジフテリアトキソイド

### 3.1.3.1 モルモット試験

3.2.6.1を準用する。ただし、1 ml中にトキソイドの200Lfを含む試料の場合には、動物1匹当たりの注射量は、2 mlとする。

### 3.1.3.2 ウサギ試験

3.2.6.2を準用する。

## 3.2 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

### 3.2.1 pH 試験

一般試験法のpH測定法を準用して試験するとき、6.6~7.4でなければならない。

### 3.2.2 チメロサル含量試験

一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、0.012 %以下でなければならない。

### 3.2.3 ホルムアルデヒド含量試験

一般試験法のホルムアルデヒド定量法を準用して試験するとき、0.01 %以下でなければならない。

### 3.2.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.5 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.6 無毒化試験

検体及びこれを37℃に20日間置いた試料について、次の試験を行う。

#### 3.2.6.1 モルモット試験

検体及び試料にそれぞれ体重300~400gのモルモット4匹以上を用い、1匹当たり5mlを皮下に注射して30日間以上観察する。

この間、いずれの動物も毒素による中毒死、壊死、麻痺等の中毒症状、著しい体重減少、その他の異常を示してはならない。

#### 3.2.6.2 ウサギ試験

検体、試料及び0.2 %ゼラチン加0.017 Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液(pH 7.0)で40倍に薄めたシック試験液(動物用)のそれぞれ0.1 mlを体重約2.5 kgのウサギ2匹以上の各々の皮内に注射して、2日間観察す

る。この間に異常を示す。

この間、シック試験液(動物用)希釈の注射部位は、毒素による明らかな特異反応を示さなければならず、かつ、各試料の注射部位は、この特異反応その他の異常を示してはならない。

### 3.2.7 力価試験

モルモットを用いる毒素攻撃法若しくは血中抗毒素価測定法又はマウスを用いる血中抗毒素価測定法によって試験する。

#### 3.2.7.1 毒素攻撃法

##### 3.2.7.1.1 材料

検体、標準ジフテリアトキソイド(以下「標準品」という。)及び適当な毒素液を用いる。検体及び標準品の希釈は、0.02 %ゼラチン加0.017 Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液(pH 7.0)に、また、毒素液の希釈は、

0.2 %ゼラチン加0.017.Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (pH 7.0) による。

### 3.2.7.1.2 試 験

検体及び標準品をそれぞれ希釈し、対数的等間隔の階段希釈を作る。

体重 300~400 g のモルモット 10 匹以上を 1 群とし、検体及び標準品の各希釈に 1 群ずつを用い、1 匹当たり 2 ml を 1 回皮下に注射する。免疫注射の 4~6 週間後に、それぞれの動物を約 50 LD<sub>50</sub> の毒素で攻撃して、7 日間観察する。

また、非免疫対照群の体重約 400 g のモルモット 3 匹以上を 1 群とし、その 3 群以上を用いて攻撃に用いた毒素の LD<sub>50</sub> 数を測定するとき、その値は 25~100 でなければならない。

### 3.2.7.1.3 判 定

試験の成績を統計学的に処理して比較するとき、検体の力価は 3 国際単位以上でなければならない。

### 3.2.7.2 血中抗毒素価測定法

ウサギ皮内法、培養細胞法又は血球凝集反応法によって行う。

#### 3.2.7.2.1 材 料

検体、標準品、標準ジフテリア抗毒素及び結合価既知の毒素液を用いる。ただし、血球凝集反応法により行うときは、純度 2,500 Lf/mgN 以上のジフテリア毒素又はトキソイドの感作血球を用いる。

#### 3.2.7.2.2 試 験

動物の免疫は、3.2.7.1.2 を準用して行う。ただし、マウスを用いるときは約 5 週齢 (体重約 20 g) のマウス 10 匹以上を 1 群とし、検体及び標準品の各希釈に 1 群ずつを用い、1 匹当たり 0.5 ml を皮下に注射する。

免疫注射の 4~6 週間後にそれぞれの動物から採血し、血中抗毒素価を測定する。

#### 3.2.7.2.3 判 定

3.2.7.1.3 を準用する。

### 3.2.8 表示確認試験

参照ジフテリア抗毒素 (フロキュラシオン用) を用い、抗体変量法による試験管内沈降反応によって行う。

## 4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年とする。

## 5 そ の 他

### 5.1 添付文書等記載事項

#### 次の用法及び用量

初回免疫には、通常、1 回 0.5 ml ずつ 3 回、いずれも 3~8 週間の間隔で皮下に注射する。ただし、10 歳以上の者には、第 1 回量を 0.1 ml とし、副反応の少ないときは、第 2 回以後適宜増量する。

第 1 回の追加免疫には、通常、初回免疫後 12~18 箇月の間に 1 回 0.5 ml を皮下に注射する。ただし、初回免疫のとき副反応の強かった者には適宜減量し、以後の追加免疫のときの接種量もこれに準ずる。また、10 歳以上の者には、0.1 ml 以下を皮下に注射する。

## 破傷風トキソイド

## 1 本質及び性状

本剤は、破傷風毒素（以下「毒素」という。）をホルマリンでその免疫原性をなるべく損なわないように無毒化（以下「トキソイド化」という。）して得られた『破傷風トキソイド』（以下「トキソイド」という。）を含む無色ないし淡黄褐色の澄明な液剤である。

## 2 製 法

## 2.1 原 材 料

## 2.1.1 製 造 用 株

破傷風菌 Harvard 株又はこれと同等以上の毒素産生能をもつ株を用いる。

## 2.1.2 培 地

毒素の産生に用いる培地には、馬肉、人体に由来する材料、ヒト血液型物質を含む可能性のあるもの、又はその他の人体に高度のアレルギーを起こすおそれのあるものを用いてはならない。

## 2.2 原 液

## 2.2.1 毒 素 液

破傷風菌の培養終了後、鏡検又は適当な培養法によって検査するとき、他の細菌の混入を認めない培養液を除菌ろ過し、これを毒素液とする。

毒素液は、標準破傷風抗毒素を用いて結合価を測定するとき、1Lf量が0.05 ml以下であるか、又は3.2.8を準用して試験するとき、1 ml中に毒素の20Lf以上を含まなければならない。

## 2.2.2 トキソイド化及び精製

トキソイド化には、ホルマリンを用いる。トキソイド化の前あるいは後に精製しなければならない。この精製トキソイドを含む液を原液とする。

原液について、3.1の試験を行う。

## 2.3 最 終 バ ル ク

原液を緩衝性の生理食塩液等で希釈し、1 ml中のトキソイドの含量がたん白質として200 $\mu$ gを超えないようにして作る。

この際、チメロサールを0.01 %になるように添加することができる。また、適当な安定剤を加えることができる。

## 3 試 験

## 3.1 原 液 の 試 験

## 3.1.1 純 度 試 験

最終バルクと同等の濃度に薄めたものを試料とし、一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、1 ml中のたん白質量は200 $\mu$ g以下でなければならない。

## 3.1.2 無 菌 試 験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.1.3 無 毒 化 試 験

検体を0.017 M リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (pH 7.0) で薄めて最終バルクの3倍の濃度となるようにした

## 破傷風トキソイド

もの及び最終バルクと同等の濃度となるようにして37℃に20日間置いたものをそれぞれ試料とし、3.2.6を準用する。

### 3.2 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

#### 3.2.1 pH 試験

一般試験法のpH測定法を準用して試験するとき、6.6～7.4でなければならない。

#### 3.2.2 チメロサル含量試験

一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、0.012 %以下でなければならない。

#### 3.2.3 ホルムアルデヒド含量試験

一般試験法のホルムアルデヒド定量法を準用して試験するとき、0.01 %以下でなければならない。

#### 3.2.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.5 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.6 無毒化試験

検体及びこれを37℃に20日間置いた試料について、次の試験を行う。

検体及び試料にそれぞれ体重300～400gのモルモット4匹以上を用い、1匹当たり5mlを皮下に注射して、21日間以上観察する。

この間、いずれの動物も毒素による中毒死、けいれん、強直等の中毒症状、著しい体重減少、その他の異常を示してはならない。

#### 3.2.7 力価試験

モルモット又はマウスを用い、毒素攻撃法又は血中抗毒素価測定法によって試験する。

##### 3.2.7.1 毒素攻撃法

###### 3.2.7.1.1 材 料

検体、標準破傷風トキソイド（以下「標準品」という。）及び適当な毒素液を用いる。検体及び標準品の希釈は、0.02 %ゼラチン加0.017 Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液（pH7.0）に、また、毒素液の希釈は、0.2 %ゼラチン加0.017 Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液（pH7.0）による。

###### 3.2.7.1.2 試 験

検体及び標準品をそれぞれ希釈し、対数的等間隔の階段希釈を作る。

体重300～400gのモルモット又は約5週齢（体重約20g）のマウス10匹以上を1群とする。検体及び標準品の各希釈に1群ずつを用い、1匹当たりモルモットでは2ml、マウスでは0.5mlを1回皮下に注射する。免疫注射の4～6週間後に、それぞれのモルモットを約50 LD<sub>50</sub>の毒素で、又はそれぞれのマウスを約100 LD<sub>50</sub>の毒素で攻撃して、7日間観察する。

また、非免疫対照群の体重約400gのモルモット又は免疫マウスと週齢をあわせたマウス3匹以上を1群とし、その3群以上を用いて攻撃に用いた毒素のLD<sub>50</sub>数を測定するとき、その値は、モルモットでは25～100、マウスでは50～200でなければならない。

###### 3.2.7.1.3 判 定

試験の成績を統計学的に処理して比較するとき、検体の力価は 30 国際単位以上でなければならない。

### 3.2.7.2 血中抗毒素価測定法

#### 3.2.7.2.1 材 料

検体、標準品及び結合価既知の毒素液を用いる。これらの希釈は、3.2.7.1.1 を準用して行う。

#### 3.2.7.2.2 試 験

動物の免疫は、3.2.7.1.2 を準用して行う。

免疫注射の 4～6 週間後にそれぞれの動物から採血し、血中抗毒素価をマウス法によって測定する。

#### 3.2.7.2.3 判 定

3.2.7.1.3 を準用する。

### 3.2.8 表示確認試験

参照破傷風抗毒素（フロキュラシオン用）を用い、抗体変量法による試験管内沈降反応によって行う。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年とする。

### 5 そ の 他

#### 5.1 添付文書等記載事項

次の用法及び用量

初回免疫には、通常、1 回 0.5 ml ずつ 3 回いずれも 3～8 週間の間隔で皮下に注射する。

追加免疫には、通常、初回免疫後 6～18 箇月の間に、0.5 ml 以下を 1 回皮下に注射する。ただし、初回免疫のとき、副反応の強かった者には、適宜減量する。以後の追加免疫のときの接種量もこれに準ずる。

ジフテリアトキソイド力価試験成績 (培養細胞法) (60PC)

# 実習  
試験毒素 Lot M59

免疫年月日 1998.8.13  
測定年月日 1998.9.14

採血年月日 1998.9.10  
力価判定年月日 1998.9.18

検定番号	Ref. DT. comb Lot. 2 (Ab)(64 $\mu$ ml)			蘭川 DPT			
検体番号	④	⑤	⑥	①	②	③	
注射量(ml) 希釈倍数	0.5 / 0.125 $\times$ 4X	0.5 / 0.040 $\times$ 12.5X	0.5 / 0.0125 $\times$ 40X	0.5 / 0.065 $\times$ 8X	0.5 / 0.0195 $\times$ 25.6X	0.5 / 0.0063 $\times$ 80X	
x	-0.903	-1.398	-1.903	-1.204	-1.710	-2.201	
抗毒素価 個体/ml	CCU/ml	CCU/ml	CCU/ml	CCU/ml	CCU/ml	CCU/ml	
♀	1	0.294	0.0408	0.0010	0.137	0.137	0.0686
	2	0.0196	0.0086	0.0010	0.0971	0.0485	0.156
	3	0.294	0.0329	0.0036	0.589	0.416	0.0288
	4	0.147	0.0277	0.0010	0.832	0.832	0.137
	5	0.0485	0.0086	0.0010	0.104	0.104	0.0686
♀	6	0.0686	0.0243	0.0007	0.294	0.147	0.0138
	7	0.0485	0.137	0.0010	0.147	0.186	0.104
	8	0.0783	0.0204	0.0233	0.416	0.147	0.104
	9	0.294	0.0172	0.0184		0.263	0.0783
	10		0.0164	0.0086			0.147
$\Sigma y$	-9.0338	-16.2783	-26.0319	-4.9140	-6.5972	-11.3031	
$\bar{y}$	-1.0038	-1.6278	-2.6032	-0.6143	-0.7330	-1.1303	
$\Sigma y^2$	10.4902	27.5964	70.8677	3.9175	5.8470	13.7877	
$(\Sigma y)^2 / f$	9.0677	26.4983	67.7660	3.0184	4.8359	12.7760	
E	1.4225	1.0981	3.1017	0.8991	1.0111	1.0117	
$(S^2)$	0.1778	0.1220	0.3446	0.1284	0.1264	0.1124	

$\Sigma x = (0.0991) \times + (0.0236) \times (0.0025) (0.243) = (0.185) (0.0741)$

$S_{xx} = \{ ( )^2 \times + ( )^2 \times \} - ( )^2 =$

$S_{xy} = ( ) \times ( ) + ( ) \times ( ) - \{ ( ) + ( ) \} \times ( )$

=

b =

	REF		RAN			
	-0.903	-1.398	-1.903	-1.204	-1.710	-2.201
1	0.294	0.041	0.001	0.137	0.137	0.069
2	0.020	0.009	0.001	0.097	0.048	0.156
3	0.294	0.033	0.004	0.589	0.416	0.029
4	0.147	0.028	0.001	0.832	0.832	0.137
5	0.048	0.009	0.001	0.104	0.104	0.069
6	0.069	0.024	0.001	0.294	0.147	0.014
7	0.048	0.137	0.001	0.147	0.186	0.104
8	0.078	0.020	0.023	0.416	0.147	0.104
9	0.294	0.017	0.018		0.263	0.078
10		0.016	0.009			0.147
平均	-1.004	-1.628	-2.603	-0.614	-0.733	-1.130
分散	0.178	0.122	0.345	0.128	0.126	0.112

	SXX	SXY	直線式	共通回帰使用可否
REF	4.743	7.621	Y= 1.607X + 0.509	可
RAN	4.432	2.335	Y= 0.527X + 0.073	不可

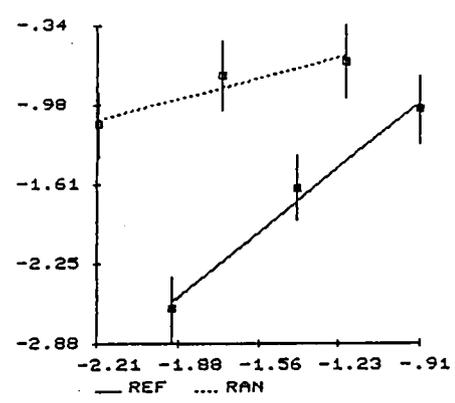
用量	SS	DF	MS	F
検体間	11.977	1	11.9767	70.09**
回帰	10.803	1	10.8034	63.22**
平行性	2.671	1	2.6713	15.63**
直線性	0.306	2	0.1532	0.90
用量間	25.758	5	5.1516	
誤差	8.544	50	0.1709	
合計	34.302	55		

共通の分散: 0.1709  
 分散の一樣性の検定  
 $\chi^2 = 4.38$   
 一樣性あり

共通の回帰係数:	1.085	95% 信頼区間	V(M)
	力価		
1 RAN	960.489	534.658, 2255.150	0.02188

共通の回帰係数 ( 1.320 ) で計算した相対力価  
 力価 基準値との比較

RAN	677.226	1%の危険率で差あり
-----	---------	------------



系統 4-1

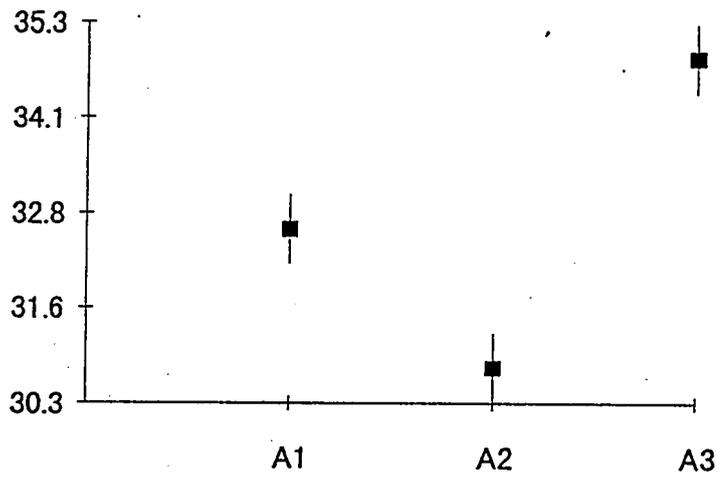
一元配置法  
単要素設計法

ファイル名: EX15

	A1	A2	A3
1	31.5	31.4	34.2
2	31.6	30.4	35.5
3	33.0	30.5	35.5
4	32.3	30.9	34.3
5	33.0	30.9	35.2
6	32.0	30.5	35.4
7	33.0	32.0	35.0
8	32.8	29.8	34.1
9	33.5	30.4	33.5
10	33.5	31.2	35.9

水準間  $F=81.0313$

1%以下の危険率で有意差あり



二元配置法(繰返しのない場合)

別紙 4-2

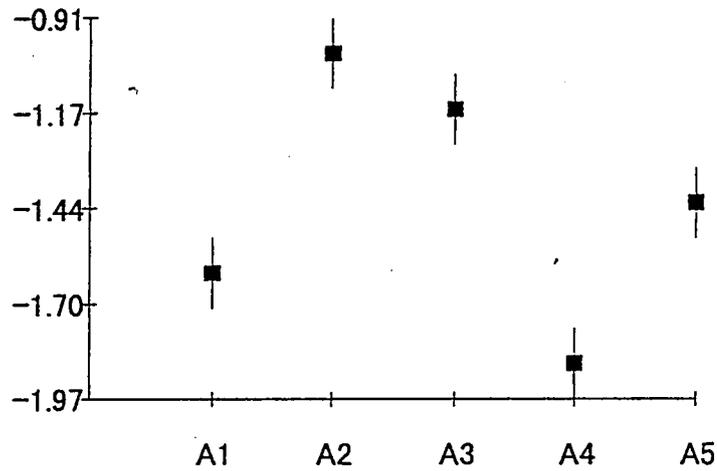
双因子設計法(不重复)

ファイル名: EX16

	A1	A2	A3	A4	A5
B1	0.033	0.119	0.062	0.014	0.039
B2	0.025	0.071	0.056	0.009	0.034
B3	0.019	0.101	0.075	0.018	0.030
B4	0.022	0.109	0.086	0.015	0.052

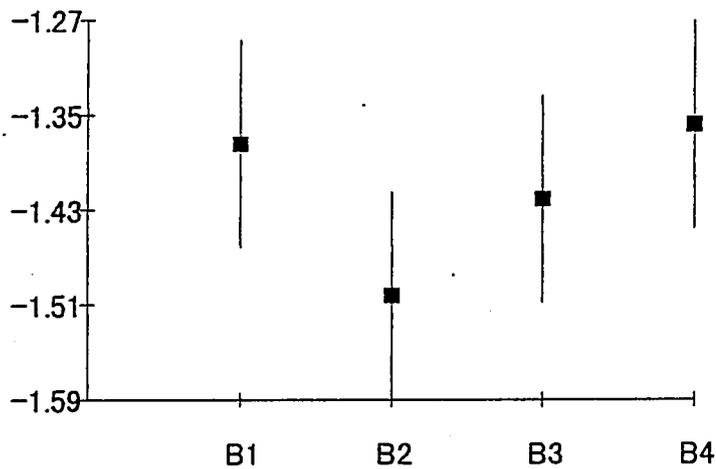
Aの水準間 F=57.83

1%以下の危険率で有意差あり



Bの水準間 F=2.56

有意差なし



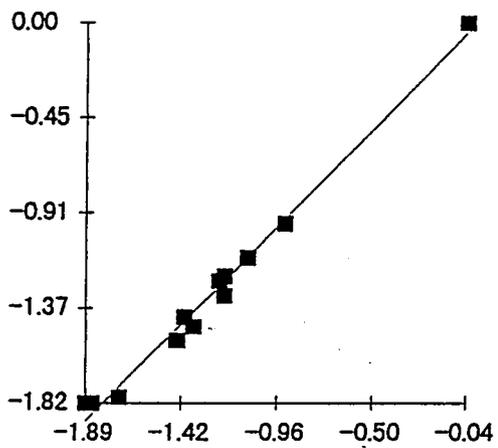
## 相関係数

ファイル名: EX27

	X	Y
1	0.060	0.049
2	0.043	0.035
3	0.119	0.109
4	0.036	0.030
5	0.057	0.058
6	0.013	0.015
7	0.912	1.007
8	0.060	0.061
9	0.078	0.075
10	0.014	0.015
11	0.019	0.016
12	0.039	0.039

相関係数=0.9943

1%以下の危険率で相関有意



平均値の差の検定(対応の無い場合)

別紙 4-4

平均値的差の検定(非対応設計)

ファイル名: EX07

	A1	A2
1	0.8	2.2
2	0.7	1.7
3	0.6	2.0
4	1.3	2.1
5	0.7	2.1
6	1.0	2.5
7	1.3	1.7
8	0.6	2.3
9	0.9	2.1
10	0.9	2.3

平均値=0.8800      分散=0.0662

平均値=2.1000      分散=0.0644

t=10.673

1%以下の危険率で有意差あり

平均値の差の検定(対応のある場合)  
平均値的差の検定(配対設計)

別紙 4-5

ファイル名: EX06

	X	Y
1	0.022	0.019
2	0.008	0.010
3	0.049	0.040
4	0.109	0.110
5	0.076	0.051
6	0.026	0.022
7	0.064	0.055
8	0.015	0.008
9	0.052	0.048
10	0.023	0.019

平均値=-0.075

分散=0.010

t=2.427

5%以下の危険率で有意差あり

回帰分析(繰り返しのある場合)

別紙 4-6

回帰分析(裏表)

ファイル名: EX24

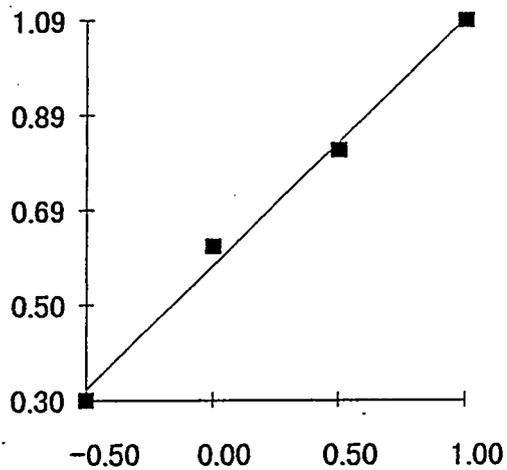
Dose	10.0	3.16	1.0	0.316
1	1.0	1.3	0.5	0.3
2	1.5	0.7	0.3	0.4
3	1.2	0.8	1.0	0.2
4	1.4	0.5	0.4	0.3
5	0.9	1.2	0.5	0.1
6	1.0	0.5	1.1	0.2
7	0.9	1.1	0.4	0.3
8	1.3	0.6	0.8	0.5
9	0.8	0.9	0.7	0.6
10	0.9	0.6	0.5	0.1

回帰  $F=54.02$  1%以下の危険率で回帰成立

$F(1, 36, 0.01)=7.40$

直線性  $F=0.20$  直線性成立

$F(2, 36, 0.05)=3.26$



回帰分析 (線形でない場合)  
回帰分析 (不変)

別紙 4-7

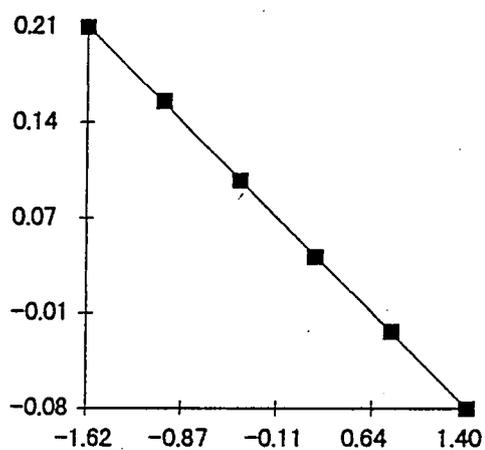
ファイル名: EX23

	X	Y
1	25.0	6.8
2	6.25	9.0
3	1.561	12.3
4	0.391	17.7
5	0.098	27.3
6	0.024	43.5

一次回帰  $F=54482.2070$

1%以下の危険率で一次回帰成立

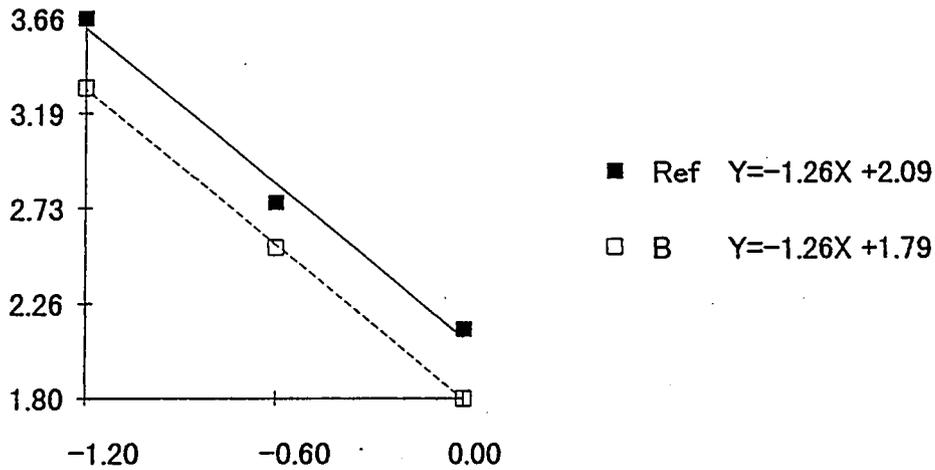
$Y=-.098X+.057$



DOSE	Ref			B		
	1	0.25	0.0625	1	0.25	0.0625
1	2.3	2.6	3.6	1.6	2.4	3.1
2	1.9	2.9	4.1	2	2.6	3.2
3	2.5	3	3.7	1.4	2.9	3.3
4	2.2	2.5	3.5	2.3	2.2	3.4
5	1.8	2.8	3.4	1.7	2.6	3.6
平均	2.140	2.760	3.660	1.800	2.540	3.320
分散	0.083	0.043	0.073	0.125	0.068	0.037

標本間 F=9.44 1% Significance F( 1, 24, 0.01)=7.82  
 回帰 F=161.57 1% Significance F( 1, 24, 0.01)=7.82  
 平行性 F=0.00 No Significance F( 1, 24, 0.05)=4.26  
 直線性 F=0.47 No Significance F( 2, 24, 0.05)=3.40

相対力価 95%信頼区間  
 1.728 2.574, 1.195



プロビット法による平行線定量法  
 概率単位平行線定量法

別紙4-9

ファイル名: EX302

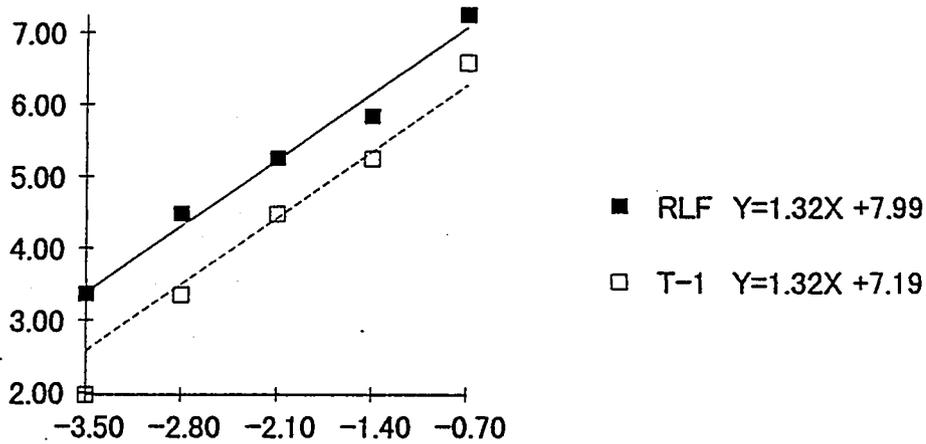
RLF		
DOSE	N	r
-0.699	20	20
-1.398	20	16
-2.097	20	12
-2.796	20	6
-3.495	20	1

T-1		
DOSE	N	r
-0.699	18	17
-1.398	20	12
-2.097	20	6
-2.796	20	1
-3.495	20	0

	LD50	95%信頼区間	直線性	Y=BX + C
RLF	0.0053	0.0097, 0.0029	成立	Y=1.233X + 7.804
T-1	0.0214	0.0380, 0.0121	成立	Y=1.477X + 7.466

共通の回帰係数	直線性	平行性
1.320	成立	成立

	相対力価	95%信頼区間
T-1	0.246	0.105, 0.549



度数分布および散布図

別紙 4-10

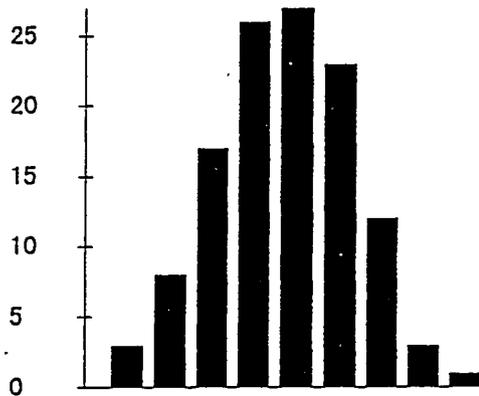
頻度分布

ファイル名: EX03

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
1	19	16	19	18	18	21	23	18
2	16	14	9	23	12	11	17	13
3	15	14	16	13	13	20	14	13
4	18	15	11	16	17	27	23	15
5	15	18	18	13	18	16	16	18
6	14	15	17	16	18	10	11	16
7	16	13	16	25	20	21	17	22
8	11	13	18	22	16	15	19	14
9	14	23	16	15	16	15	20	12
10	11	11	15	13	14	16	15	12
11	12	16	19	19	17	25	18	14
12	21	21	21	14	13	17	20	24
13	15	20	14	16	16	11	14	17
14	18	19	21	16	14	13	16	16
15	14	12	15	12	14	9	13	11

平均 = 1.198

分散 = 0.009



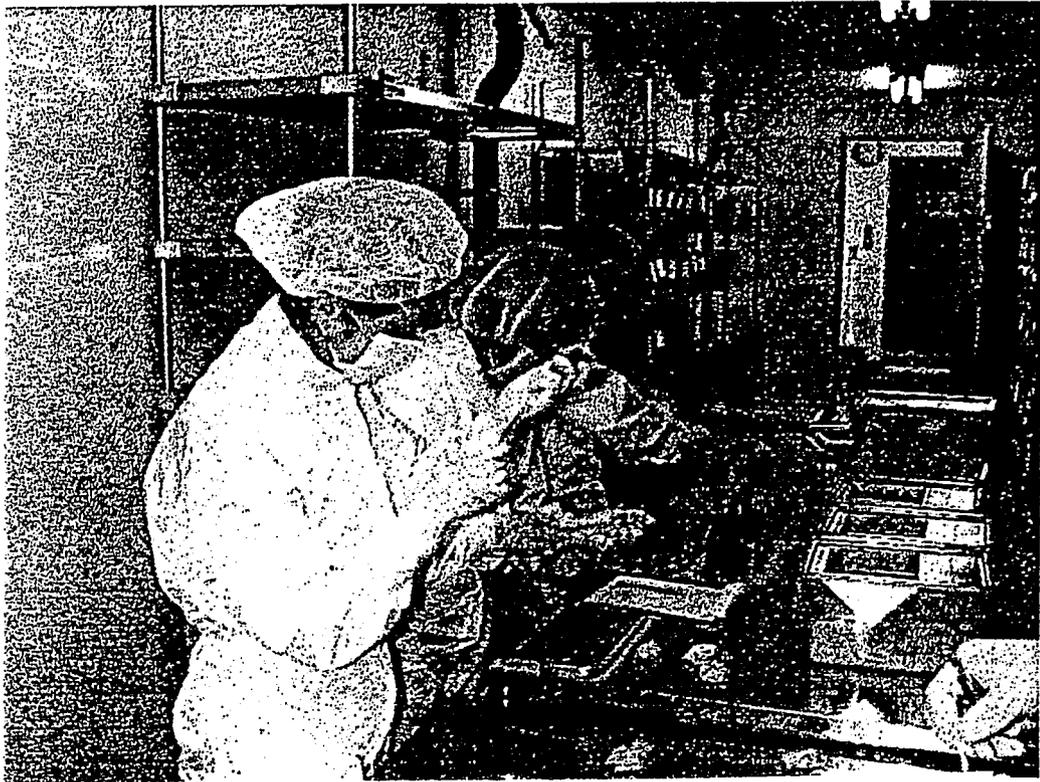
範囲	度数	
0.945	1.005	3
1.005	1.065	8
1.065	1.125	17
1.125	1.185	26
1.185	1.245	27
1.245	1.305	23
1.305	1.365	12
1.365	1.425	3
1.425	1.485	1



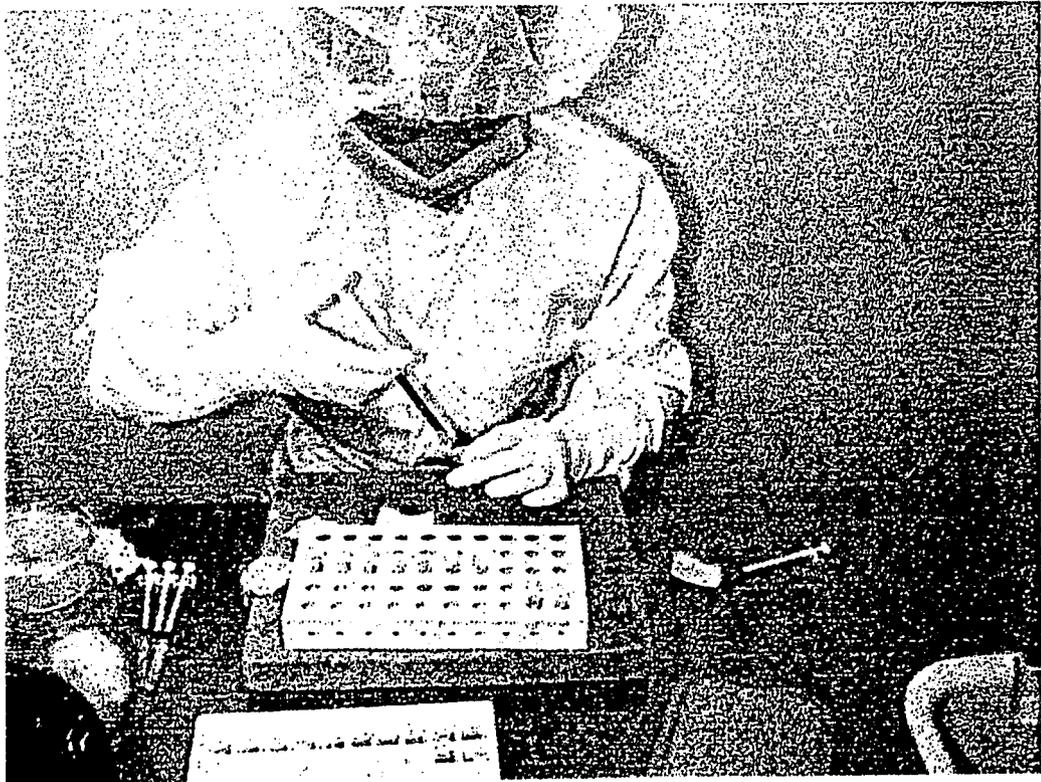
研究室で記録中の李研究員



石田先生宅で統計解析用プログラム作製



マウス免疫中の李研究員



マウス採血中の李研究員