

図 4. JEV I 期 1, 2 回目及び追加接種の累積接種率の比較
2010 年の調査結果

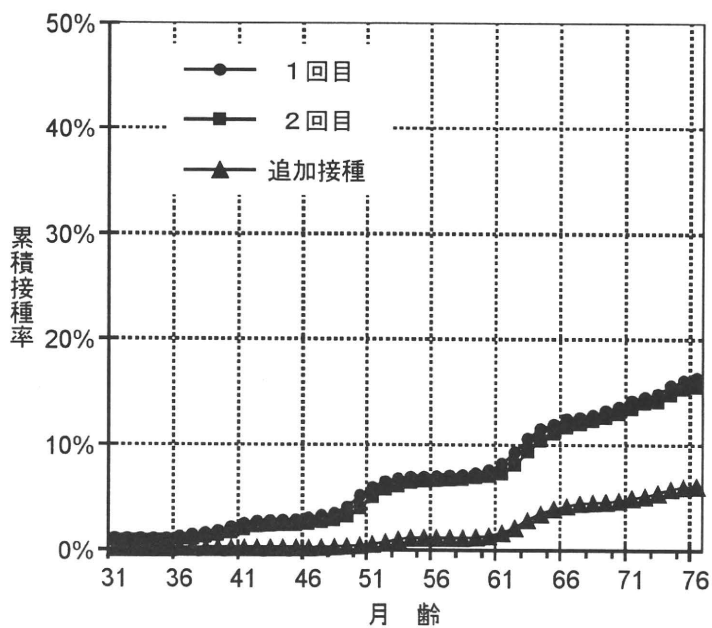


図 5. 日本脳炎ワクチン I 期 1, 2 回目及び追加接種の累積接種率の比較
2009 年の調査結果

X. 品質管理に関する 試験方法

平成22年度厚生科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

研究課題名：ワクチン戦略による麻疹および先天性風疹症候群の排除、およびワクチンで
予防可能疾患の疫学並びにワクチンの有用性に関する基礎的臨床的研究

(研究代表者：岡部信彦 国立感染症研究所・感染症情報センター長)
の追加交付について

一般の新型インフルエンザの発生や、新型インフルエンザに対するワクチン接種を契機として、新たな臨時接種の種類の創設を行うなどの予防接種法の見直しが進んでいる。この国会審議等において、Hib などこれまで予防接種法上に位置づけられていなかった感染症についても、定期接種の対象と位置づけるなど、予防接種法の抜本的な見直しが必要との議論がなされており、厚生労働省においては厚生科学審議会予防接種部会を中心に、有識者からのヒアリングを行うなど見直しに向け積極的に取り組んでいる。

しかしながら、個々のワクチンの評価にあたって、その品質が確保されていることが大前提となる。

そこで、最新の科学的知見、国際動向、動物福祉などの観点から、ワクチン等生物学的製剤の品質管理に関する各種試験方法等を改良するための基盤的整備を行うことを平成22年度の本研究班の追加研究内容として申請したところ、採用された。

そして、

- ① ワクチン等の試験の代替法・改良に関する研究
- ② アジュバントの品質管理・安全性に関する研究
- ③ 生物学的製剤の品質管理用統計解析ソフトウェア開発

に関わる10項目の課題を研究協力課題として早急に執り行なった。

以下に、この追加交付による研究協力課題の報告を参考資料として掲載する。

おたふくかぜ生ワクチンの品質管理に関する研究

研究協力者： 加藤 篤 国立感染症研究所 ウイルス第三部

研究要旨：生ワクチンは、ウイルスが変化し易いという性質を利用して本来の宿主とは異なる宿主、あるいは温度条件で継代馴化して弱毒化したものである。しかし、一度生ワクチンとして認可されたならば、ワクチンとしての品質を一定にするためにウイルスの遺伝学的、生物学的性質は一定に保たなければならない。そのため、生物学的製剤基準には株の継代制限に加え、多くの品質管理試験が設けられている。おたふくかぜ生ワクチンにおいては神経毒力試験、ブラックサイズマーカー試験がワクチン株の品質管理項目として採用されているが、この試験結果で株を厳密に判別するのは容易ではない。そこで、試験をより客観的に行うため、おたふくかぜワクチン・ミヤハラ株とその継代馴化中の親株のゲノムの塩基配列を比較し、ワクチン株マーカーの特定を試みた。全塩基配列を決定したところ、ゲノムの5カ所に塩基置換があり、そのうちの3カ所にアミノ酸置換があった。従って、これら3カ所をミヤハラ株ワクチン特異的マーカーとして使えることが判明した。

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え技術あるいは抗原の化学合成技術の進歩により病原体を直接原材料としなくても病原体の感染防御に重要な部分だけを直接生産し、ワクチンにすることが可能になっている。しかし、新技術によるワクチンは未だわずかで、大部分のワクチンは依然として病原体を大量に増やし、それらを集めた後に殺して病原体全体あるいはその一部を用いる不活化ワクチンと病原性を減弱させたものをワクチン株として生きたまま用いる弱毒生ワクチンにより占められている。

生きた病原体をワクチンの原材料にする場合、その製品性状の変化が他に比べて大きいことが予想され、それが原因で保健衛生上の危害を生ずる恐れがある。そのため、わが国ではワクチン製造所が行う自家検査に加えて国家検定が設けられ、それに合格したものでなければ展示及び販売することができないと定められている。医薬品であるワクチンの品質を均一にすることはワクチンを使った誰もが等しく恩恵を受けられる為に必要なことである。

一般的に微生物の世代交代速度は多細胞生物に比べて著しく早く、そのため時間当たりの変異体の発生数が多い。それに加えてRNAをゲノムとして持つウイルスは、ゲノム複製酵素の間違いを起こす頻度がDNAをゲノムとして持つ生物に比べて100倍程度高く、そ

のため更に変異体の発生率が高い。弱毒生ワクチンは微生物の遺伝的に変化しやすい性質を利用して異なる条件下あるいは異なる宿主に継代馴化することにより弱毒された歴史を持つ。ワクチン株として定められた後も遺伝的に変化し易いという微生物の性質は変わらない。それ故、生ワクチンの品質を一定に保つことは一般医薬品よりも難しく、生物学的製剤基準には株の継代制限に加え、多くの品質管理試験が設けられている。

弱毒生おたふくかぜワクチンにおいて、ワクチンの生物学的性質が一定に保たれていることを、一つにはサルを用いた神経毒力試験により毒力復帰した変異株を含まないこと、また、もう一つにはブラックサイズマーカー試験により、ウイルス株に特有のブラックサイズを示すことにより検査している。ところが、一つ目の試験も二つ目の試験も、“ばらつき”をもって測定され、よほど強い病原性を復帰した変異体が出現するか、あるいは、ワクチンの多数が病原株で占められるようにならないと変化としては捉えることができない。従って、この試験結果で株を厳密に判別するのは容易ではない。

そこで、本研究ではワクチン株固有の生物学的現象によらない、直接的な物質的マーカーを探し出し、それにより品質管理できないかを検討することにした。

B. 方法

ウイルス株

おたふくかぜワクチン・ミヤハラ株は、アフリカミドリザル腎細胞を用いて分離後、ニワトリ胚由来(CE)細胞に馴化させた化学及血清療法研究所が 1986 年から製造している生ワクチン株である。本実験には市販ワクチン(ロット 301)と、国立感染症研究所の-80℃冷凍庫に保存されていた「ミヤハラ原株」と記されたガラス瓶に由来する検体を用いた。

ウイルスブラック

Vero 細胞を 6×10^5 cell/well で 6 穴プレートにまき、細胞が密な単層状態になるまで 2 日間 37℃で培養した。適当に希釈したウイルス液を 0.1ml/well でプレートに加え、1 時間吸着させた。その間、細胞が乾かないように 15 分おきにプレートを傾けた。次に 1%アガロース溶液と 2x 培地 (2x Eagle MEM、4%CS) を等量混合して 3 ml/well ずつ重層し、アガロースが固まったら 37℃で、7 日間培養した。0.09%ニュートラルレッド液を含む 1%アガロース液を作製し、3ml/well ずつ重層した。翌日、ブラックを観察した。

RNA 抽出

Roche Diagnostics 社のキットを用いて、ワクチン株および原株から RNA を抽出した。方法の概要は以下の通りである。検体 200 μ l と 400 μ l の Binding buffer を混ぜ、Collection tube に差し込んだ Filter unit に混合液を加えた。10,000 回転で 15 秒間遠心し、Filter unit を新しい Collection tube に移した。450 μ l の Wash buffer を Filter unit に加え、再び 10,000 回転、15 秒間遠心した。Filter unit を新しい Collection tube に移し、450 μ l の Wash buffer で洗浄した。最後に Filter unit を 1.5ml チューブに移し、50 μ l の Elution buffer を加え、10,000 回転、1 分間遠心で RNA を容出した。

ゲノム塩基配列の決定

ムンプスウイルスのゲノムは、15384 塩基からなる一本鎖のマイナス極性の RNA である。特異的プライマーと One Step PrimeScript RT-PCR キット(タカラバイオ)を用いてワクチン株と原株の両方のウイルス RNA から cDNA を合成した。cDNA 合成はゲノム部分を 4 つの断片 01(1-4592)、02(3051-7413)、03(6049-10233)、04(8518-12935)、05(11328-15384)に分けて

合成し、TA クローニング用 pCR2.1(インビトロジェン)ベクターにクローニングした。それぞれの部分において 3 つ独立したコロニーから採取したプラスミドを塩基配列決定に用いた。

通常の RT-PCR 法でカバーできないゲノムの両末端部分については、次のように行った。5 端はターミナルデオキシトランスフェラーゼ(TdT)法を用いて、3 端はポリ A ポリメラーゼ法を用いて、それぞれ末端 RACE 法により増幅し、塩基配列を決定した。

C. 研究結果

おたふくかぜワクチン・ミヤハラ株

弱毒おたふくかぜワクチンの原液の品質管理試験の一つとして、ブラックサイズマーカー試験を行うことが生物学的製剤基準に定められている。国産のおたふくかぜワクチン株はいずれもニワトリ胚由来(CE)細胞に馴化されおり、馴化の度合いが進むにつれサル由来の Vero 細胞でのブラックサイズが、臨床分離株に比べて小さくなるという全臨床試験の結果を品質管理試験に応用したものである。

国立感染症研究所ウイルス第三部の冷凍庫に保存されていたミヤハラ株原株と記されたガラス瓶は、CE 細胞に馴化途上の株を品質管理際の参照として化学及血清研究所から分与されたものであるらしいが、CE に何継代したのかを含め、記録が残されておらず不明であった。

そこで、この検体がほんとうにミヤハラ株であるか否かを確かめるため、検体の一部から RNA を抽出した。ムンプスウイルスの遺伝子型別に用いる SH 遺伝子部分を RT-PCR により増幅し、塩基配列を決定したところ、その配列は間違いなくミヤハラ株のものであり、ガラス瓶の中味がミヤハラ株であることが確認された(結果未表示)。

ミヤハラ株のブラックサイズ

次に、ほんとうに原株か否かを確かめるために Vero 細胞でのブラックサイズを、ミヤハラ株ワクチンと比較した。Vero 細胞に二つの株を接種し、常法に則りブラックを形成させニュートラルレッドで生細胞を染色して評価した。原株由来ブラックは縁辺部分が明瞭で、内側部分がニュートラルレッドに染まりにくい直径サイズの大きなブラックを形成した。それに対して、ワクチン株は縁辺部分が不明瞭で、内側部分がニュートラルレッドに薄く染まった直径の小さなブラックを形成した

(図 1)。同じミヤハラ株でもブラックのサイズ、形状に違いがあり、その差は CE 細胞での馴化状態の差を表しているかのように見られ、ガラス瓶に書いてあった通り、原株であると判断した。

ミヤハラ株ゲノム塩基配列の決定

ミヤハラ株ゲノムの配列は、Okazaki ら (Virology, 188:926-930, 1992)により部分配列が報告され、その後 Takeuchi により完全長の配列(AB040874)が DNA データベースに登録されている。今回、原株との比較のため改めてワクチン株(ロット 301)の配列決定を原株と同時に行った。

塩基配列決定は、ゲノムを重複させながら 4 つの部分に分けてプラスミドにクローン化し、同じ部分を三つ別々のクローンを用いて配列決定することで PCR のエラーあるいはマイナーポピュレーションを見つげられる様に工夫した。

その結果、(1)登録済みの AB040874 とワクチン株の配列の間に 15384 塩基中 3 つの違いがあることが判明した。それは 4941, 5835, 11484 番目の塩基であった。これら 3 つの塩基は、原株とワクチン株で一致しており、登録された塩基の間違いであると判断した。(2)原株のゲノム配列の決定過程で同じ部分をカバーする 3 つのクローンの配列が一致しない部分が 2727 と 8040 の二カ所にあった。この部分を確認するため、ゲノム RNA をダイレクトシーケンスしたところ、2727 は塩基の種類を示す波形が二つ混在しており、株自身がヘテロであることが判明した(図 2)。一方 8040 は塩基の種類を示す波形は一つであり、PCR クローニング時のエラーであると判断した(結果未表示)。(3)ミヤハラワクチン株と原株の間の塩基配列の違いは、1337, 2727, 5024, 5129, 14355 の 5 カ所であった。このうち、1337 の変異は、ヌクレオカプシド(N)遺伝子内に、5129 の変異は、融合(F)遺伝子内に、14355 の変異は、ラージ(L)遺伝子内にあり、これら 3 つの変異はいずれもアミノ酸変化を伴っていた。一方、2727 の変異はリン酸化(P)遺伝子内に、5024 の変異は F 遺伝子内であったが、どちらもアミノ酸変異を伴っていなかった(図 3)。わずか 3 つのアミノ酸変異が、少なくともブラックサイズの違いという生物学的表現型として現れてくるのは興味深いことである。

D. 考察

いくつかの生ワクチンには開発の段階で生

物学的マーカーが付与されており、このマーカーが基準値を満たさなかった場合には品質的に不適合とされ、そのロットは廃棄される。たとえばポリオワクチンの場合、生物学的製剤基準に rec/40 (reproductive capacity at different temperatures at 40°C)マーカー試験が設けられている。この試験では $36.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ と $40.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ におけるワクチンウイルスの増殖能力の比率を求め、強毒ポリオウイルスが 10^2 以内の増殖力の差である時、I 型ポリオウイルスで 10^6 以上、II 型と III 型ポリオウイルスで 10^5 以上の温度感受性差がなければならぬと定めている。ポリオワクチンはこれに加えて更に d (delayed)マーカー試験も設けられている。この試験では濃度の異なる炭酸水素ナトリウムカンテン培地でワクチンウイルスの増殖能力の比率を求め、強毒ポリオウイルスが 10 倍以下の増殖差である時に、I 型、II 型と III 型ポリオウイルスで 10^2 以上の差がなければならぬと定めている。痘瘡ワクチンにもマーカー試験が設けられており、この試験では $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ と $41.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ におけるワクチンウイルスの増殖能力の比率を求めたとき、 10^5 以上の温度感受性差がなければならぬと定めている。

一方、おたふくかぜワクチンにもブラックサイズマーカー試験が設けられている。しかし、規格値が厳密ではなく、常に一定のばらつきを持って観察されるため、ワクチン株に含まれる変異体のスクリーニングという定量的な観点よりも、ワクチン株としての性質が保たれているか否かを定性的に調べる意味合いが強い試験となっている。

本研究で発見した、おたふくかぜワクチン、ミヤハラ・原株とワクチン株の比較により発見した変異部分を品質管理の指標にすることにより、従来よりも客観的かつ、直接的に生ワクチンの弱毒性にかかわる遺伝子変化を捉えられると思われる。アミノ酸変異を伴った N1337, F5024, L14355 変異の中でどれか一つが特に弱毒性にとって重要なのか、あるいはこれらが相加的あるいは相乗的に作用して弱毒性に関与しているのかは、今後の研究課題である。

E. 結語

生ウイルスワクチンは本来的に変異しやすいウイルスの性質を利用して開発され、ウイルスが複製毎にランダムに変異体が生じること、ウイルスの特性であり回避できない。しかし、この一方で、ひとたび医薬品として

認可された以上は国民の健康管理上、製品として一定の有効性と安全性規準を満たすため、遺伝的にも安定したワクチンを供給することが求められる。そのための管理技法としては、ワクチン株の弱毒性に関連する遺伝子部位に変化が起きていないことを検査するのが最も直接的で合理的な方法である。おたふくかぜ生ワクチン・ミヤハラ株の管理には、元株とワクチン株の比較によって得られた N1337、F5024、L14355 の三つの部位をモニターすることが適していると考えられる。

F. 健康危害情報

無し

G. 研究発表

論文発表

(欧文)

無し

(和文)

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

図1 おたふくかぜ生ワクチン・ミヤハラ株のブラック

ミヤハラ・原株およびワクチン株を Vero 細胞に感染させ、ブラックを作らせた後、ニュートラルレッドで染色した。右が原株、左がワクチン株である。

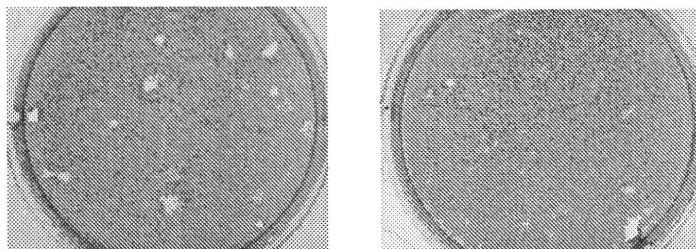


図2 おたふくかぜ生ワクチン・ミヤハラ・原株 2727 番目の塩基は T と G の二つが混在している

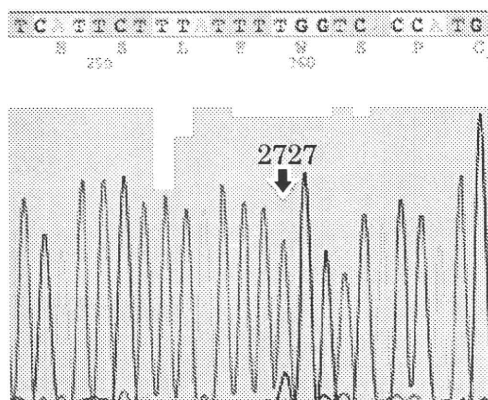
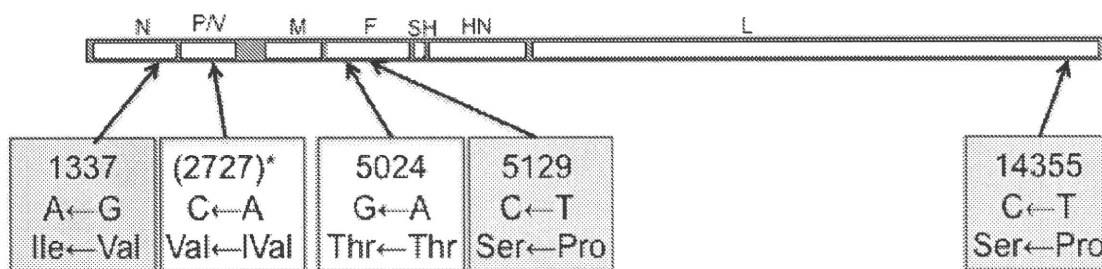


図3 おたふくかぜ生ワクチン・ミヤハラ原株とワクチン株との間に見られた変異
アミノ酸変異を伴った塩基置換部位が3カ所、伴い部分が2カ所あった。



トキソイド製剤の精度管理された抗原定量法の開発

研究協力者： 山本 明彦 国立感染症研究所 細菌第二部

要旨： トキソイドワクチン（ジフテリア、破傷風）における抗原量と抗原純度は、抗原抗体複合物生成時間を測定する 1920 年に確立された目視法が長年用いられてきた。本研究では、従来あるこの方法を現在ある技術として、1) トキソイドに結合するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法と、2) レーザー光散乱による沈殿物の検出系で代替可能かどうかを検証したところ、旧来法とよく相関し、測定に誤差が少なく誰にでも試験可能な成績が得られた。

A. 研究目的

トキソイドワクチン（ジフテリア、破傷風）において、抗原量と抗原純度は、ワクチンの本質にかかわる量のため、日本の生物学的製剤基準、WHO の recommendation に詳細に規定されている。その単位は Lf (Limit of Flocculation) である。被検抗原と、ものさしとなる参照抗毒素（抗体）を、比率を変えながら混合し、抗原抗体複合物が最も早く形成されたときの抗体量から抗原量を定量する（この最適比において抗体量が x 単位/ml であるとき、そこに含まれる抗原量は x Lf であるという）。この現象が初めて記述された 1920 年代以来、複合物形成の観察は肉眼による目視によっていた。しかし肉眼目視は測定者により結果がばらつくことがあり、測定結果は測定者の視力や体調にも影響を受けることや、年配者には測定の困難を伴うなど、客観性に優れているとは言い難い。

そこで我々は、1) トキソイドに結合するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法による検出系および 2) レーザー光散乱型血小板凝集計による抗原抗体複合物粒子の検出系の 2 つの方法を用いて旧来の抗原量の測定法の

目視に代わって行なうことで、目視に由来する問題の解決を図った。

B. 研究方法

ジフテリアトキソイド (DTd) と破傷風トキソイド (TTd) の各々について、下記 1) 2) による新定量法の確立をめざす。

1) Lf (Limit of Flocculation) 測定 (肉眼法) : WHO の recommendation に詳細に規定される。5 段階に抗体量を希釈し、一定量の抗原とともに 50 度に加温しながら抗原抗体複合物による沈殿生成の時間を目視にて測定する (図 1)。

2) トキソイドに結合するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法 : (財) 阪大微研会において樹立されたハイブリドーマからモノクローナル抗体 (抗 DTd、抗 TTd) を調製する。モノクローナル抗体と肉眼定量用参照抗毒素を「ものさし」となるトキソイドを用いて、国立感染症研究所にて ELISA と肉眼法によるトキソイド定量結果、精度を比較した。

レーザー光散乱による沈殿物の検出 : レーザー光散乱型血小板凝集計 (PA-20 : 興和株式会社、名古屋) を用いて、抗原抗体複合物粒子肉眼定量用参照抗毒素とトキソイドにつ

いて、肉眼法とレーザー法による定量を行い、その精度を比較した。

(倫理面への配慮)
特になし

C. 研究結果

- 1) モノクローナル抗体を用いたELISA法での結果： 定法に従ってモノクローナル抗体を作成し、感受性の高いクローンを選択し、固相化用抗体とHRP0標識して二次抗体そして用いたときにもっとも高い感受性で、Lf測定が可能な組み合わせを選出した。構築したモノクローナル抗体によるLf測定系(図2)を用いて、目視法によって決定している異なる7つの破傷風トキソイドを測定した。その結果、目視によるLf測定とほぼ同等であった(図3)。
- 2) レーザー光散乱による沈殿物の検出(図3)： 検出系は我々のグループにより既に構築されている(Iwaki et al. J. Immunol. Meth. 318 (2007) 138-146)。Lf測定用の参照破傷風抗毒素の標準化という良い機会があったので、所定の目視法により得られた結果(1200Lf/vialの値付けになった)とレーザー法の比較を行ない、目視法と一致する測定結果が得られるかどうかを検討した。抗毒素の値付け実験なので、トキソイドの抗原量定量とは少し測定の進め方が異なる。つまり、「旧参照品と同じようにトキソイドの定量が行なえるようにするためには、1バイアルを何mlに溶解するとちょうど良いか」を決定することで抗毒素の量を決定するという、遠回りな方法をとる。これは、比較の対象が旧ロットの抗毒素であるため、こうなってしまうのである。

このように測定を行なった結果、表1の黄色い部分にあるように、12mlに溶解したときに最も旧ロットと近い結果が得られた。すなわち、新ロットは12mlに溶解したときに100U/mlになることから1200U/vialということになり、目視による値付けと一致した。

これらの結果は、レーザー法により目視法と同等の結果が実際の測定で得られた例となった。

ジフテリアおよび破傷風トキソイドワクチンの製造現場での工程管理においても、抗原量はLfで表現されるため、Lf測定法の改良が有用である。そこで国内ワクチンメーカー5社(化血研、武田薬品工業、阪大微研会、北里研究所、デンカ生研)および興和(株)の協力を得て、工程管理において従来法と並行して本方法を用いることで評価を行なった。その結果、ジフテリアおよび破傷風の両者において、精製毒素、トキソイドおよびバルク(原液)のLf測定に本方法が使用できる可能性が示された。毒素精製前の培養濾液については、ジフテリアでは測定可能であったが、破傷風では測定困難であった。また、アルミウムアジュバントを含む最終小分け製品の表示確認試験については、ジフテリア、破傷風とも本方法によるLf測定は不可能であった。

D. 考察

トキソイドワクチン(ジフテリア、破傷風)における抗原量と抗原純度は、抗原抗体複合物生成時間を測定する1920年に確立された目視法が長年用いられてきた。抗原抗体複合物を目視でとらえるには、長時間集中して計測をしなければならない。また、測定可能な

抗原濃度は測定者の視力と熟練によるところが大きい。

本研究では、従来あるこの方法を現在ある技術で代替可能かどうかを検証し、トキソイドに結合するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法及びレーザー光散乱による沈殿物の検出系どちらも旧来の方法との相関が高く、さらに測定精度がよく、測定者の視力に左右されない結果が得られた。

レーザー法は従来の方法と同じ抗原抗体複合物を肉眼ではなくレーザー光が複合物に当たって散乱する光を測定する方法で、従来法の応用系である。また、ELISA 法は抗原量を直接モノクローナル抗体を用いて直接による定量する。原理の異なる 2 つの方法で、従来の方法を代替可能な結果が得られ、レーザー光散乱法については各製造所社との間での共同実験による検討を行うことができた。今後さらに検討を重ね、これらの方法の、トキソイドワクチンのより精度の高い、熟練を要しない品質管理法として導入が期待される。

E. 結論

トキソイドワクチン（ジフテリア、破傷風）における抗原量と抗原純度測定用の目視法を現在ある技術として、1) トキソイドに結合するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法と、2) レーザー光散乱による沈殿物の検出系で代替可能かどうかを検証したところ、旧来法とよく相関し、測定に誤差が少なく誰にでも試験可能な成績が得られた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表 1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

G. 知的所有権の取得状況 1. 特許取得 なし

2. 実用新案 なし

図1 目視法(肉眼で検出)

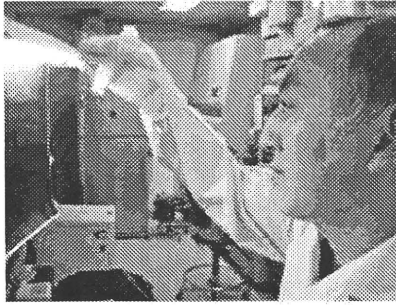


図2 抗原定量の特異性

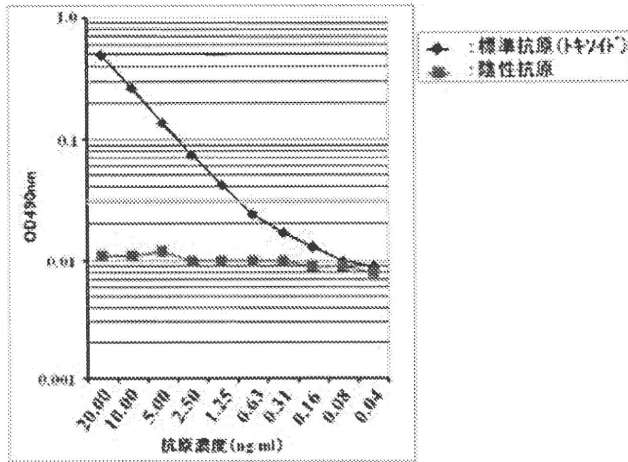


図3 LfとELISAの相関

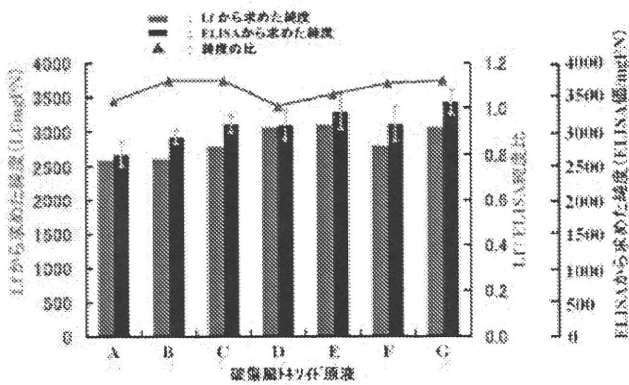


図4 レーザー光散乱型血小板凝集計による抗原抗体複合物の計測 (Iwaki et al. J. Immunol. Meth. より引用)

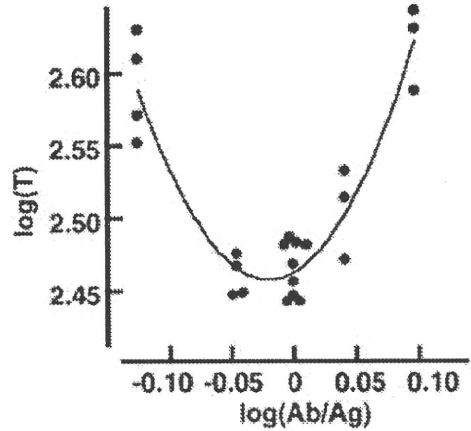
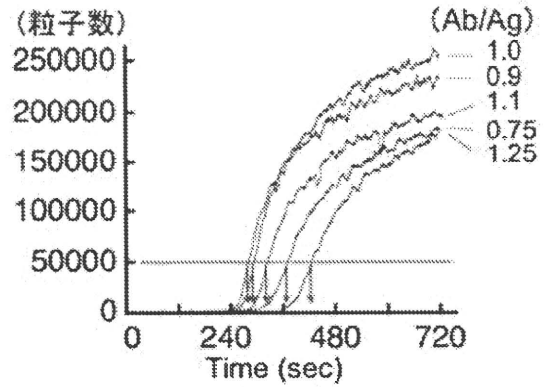


表1

参照抗毒素を用いたトキソイド抗原定量

旧ロット参照抗毒素	測定された抗原量 (Lf/mL)	
	トキソイドA	トキソイドB
100 U/mL	197	177

候補品の試験

抗毒素新ロットを溶解する液量	計算される抗原量 (Lf/mL)	
	トキソイドA	トキソイドB
10.8mL溶解時	170	測定不能
12.0mL溶解時	204	177
13.2mL溶解時	209	205

ポリサッカライド含量試験における精度向上のための試験法改良

協力研究者： 和田昭仁 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨

ポリサッカライド含量試験は、肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV)および肺炎球菌ポリサッカライドワクチン(PPV)に含まれる各血清型ポリサッカライドを定量するために設定されている規格試験である。試験に用いられる専用機器(IMMAGE800)純正シリンジの耐久性は低いため、頻繁な交換または、特注品の使用が勧められる。キュベット外側の清掃も重要である。

A. 研究目的

ポリサッカライド含量試験は、肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV)および肺炎球菌ポリサッカライドワクチン(PPV)に含まれる各血清型ポリサッカライドを定量するために設定されている規格試験である。この試験では、ワクチンと各血清型ポリサッカライド特異的抗体を反応させ、生じる抗原抗体複合体の生成速度より、ワクチン中の各ポリサッカライドを定量している。試験に用いられる専用測定機器(Beckman IMMAGE 800)では、抗原および抗体を一定量採取するために専用のシリンジ(海外製)を用いているが、この耐久性に問題があり、高精度で迅速な検定実施の障壁となっている。本研究では、国内製特注シリンジと海外製シリンジとの耐久性を比較し、測定条件の最適化により、精度向上と試験の迅速化を目指す。

B. 材料ならびに方法

抗原(ワクチン)および抗体採取用純正シリンジ(海外製)および純正品と互換性を持った国内特注シリンジを用いた。機械から出力される生データを比較するため、製造販売会社の指定する方法で処理し 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した血清型 14 ポリサ

ッカライドを抗原として用いた。血清は製造販売会社から提供されたものを使用した。中で抗原抗体反応を行わせるキュベットは純正品を用いた。

C. 研究結果

同一検体(3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 血清型 14 ポリサッカライド)を連続で 8 回測定したときの IMMAGE 800 が出力したデータを表 1 と図 1 に示す。

で示したパネルは反応陽性であることを示している。

市販因子血清 6b(図 1 中では b)は血清型 6A と 6C を区別することはできないが、自家製 6b' 血清(図 1 中では b')は 6C にだけ特異

測定 1 は、純正シリンジ約 4200 回使用後、キュベット約 2300 回使用後の結果である。シリンジ交換前の%SD が 25%であったのに比べ、交換後は 5.3%にまで改善が見られた。しかし、8 回の測定のうち、その平均の $\pm 5\%$ (270-298)の範囲に入ったのは 4 回だけであったため、キュベットの交換も追加でおこなった。シリンジとキュベット両方の交換により%SD は 1.27%にまで改善し、8 回の測定値すべてが、平均 $\pm 5\%$ (200-221)の範囲に入

った。なお、このシリンジ交換には、純正品をもちいた。

この直後に、ポリサッカライド含量試験を行うと、検体 77 サンプルを各 2 回測定したときにその差が 2 回測定平均の 10%を超えた回数は 0 回となった。しかし、シリンジ交換後約 1500 回使用時に行った試験においては、91 サンプルの測定で、2 回測定値の差がその平均の 10%を超えた回数は 8 回と再び悪化してしまった。

純正シリンジの耐久性に問題があることから、国内製作所に純正品と互換性のある特注品の作製を依頼した。特注シリンジ交換後試験行ったところ、91 サンプルで、2 回測定値の差がその平均の 10%を超えた回数は 0 回となった。

D. 考察

純正シリンジでは、交換直後は良好な再現性が得られるが、その耐久性は低く、約 1500 回使用後には同一検体測定値の再現性に低下が見られる。この純正シリンジは高価であり(抗原および抗体採取シリンジ交換で約 9 万円)、試験ごとの交換は検定費の上昇につながる。一方、国内製特注品はこれより安価である。2011 年 2 月時点で、特注シリンジは交換後約 1000 回使用しているが、劣化は見られていない。今後、検定およびバリデーション試験で特注品の使用を重ね、その耐久性の確認を行う。もし、良好な結果が得られれば、純正品の代わりに特注品を用いることは、検定の精度向上、費用削減、測定時間短縮に有用であると考えられる。なお、製造会社によると、特注品は 10 万回の使用に耐えるとのことである。

キュベットの耐久性に関しては、今回の期間で評価を完了することはできなかった。IMMAGE 800 では、キュベットの洗浄にアルカリ性(pH10)の専用

洗浄液の使用が規定されている。しかし、これは、血清などの臨床検体を想定したものであり、検定に用いる抗体、ポリサッカライドを混合したキュベットの洗浄に、このようなアルカリ溶液は必ずしも必要ではないと考えられる。実際に、防腐剤を加えた milliQ 水を用いても、キュベットの洗浄性に問題は見られていない。キュベットのメンテナンス上で一番問題になるのは、外側の汚れである。感染研での試験では、測定前に、キュベット外側を水でぬらしたトレシー®で清掃することを行っている。これにより、特に低濃度サンプルでの測定値再現性の向上が見られている。

今後、このような情報を、ワクチンの製造販売業者さんと共有することにより、検定だけでなく、自家試験の測定精度向上に役立てることが重要であると考えられる。

E. 結論

ポリサッカライド含量試験の精度向上のためには、2000 回以内での純正シリンジの交換、または特注シリンジの使用が有効である。キュベット外側の清掃は、低濃度サンプルの測定値再現性向上に有効である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

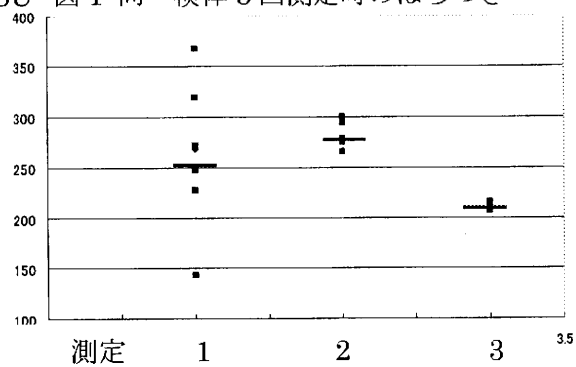
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 シリンジおよびキュベット交換前後の生データ

測定	1	2	3
シリンジ	シリンジ	シリンジ	シリンジ
交換前	交換後	交換後	交換後
キュベット	キュベット	キュベット	キュベット
交換前	交換前	交換後	
検体採取量	20 micrL	20 micrL	20 micrL
	268	295	211
	319	294	212
	367	300	216
	251	264	209
	248	300	209
	228	266	210
	143	275	207
	272	279	211
平均	262	284.125	210.625
SD	65.51336	14.94215	2.66927
%CV	25.0051	5.259006	1.267309

LSU 図 1 同一検体 8 回測定時のばらつき



人免疫グロブリン麻しん抗体価測定法の改良に関する研究

研究協力者： 駒瀬勝啓 国立感染症研究所 ウイルス第三部

研究要旨

生物学的製剤基準（生物基）では人免疫グロブリン製剤中の麻しん抗体価を規定している。また、麻しん抗体測定法として中和法、赤血球凝集阻止法（HI法）、受身赤血球凝集反応法（PHA法）を定めているが、それぞれに問題があり、将来、安定的にグロブリン製剤の麻しん抗体価を測定する事が困難になる可能性が考えられている。そこでHI法や中和法とよく相関を示し、機械化することも可能なELISA法を測定法として用いる事を検討した。抗体価を測定した結果、WHO標準抗体との相対力価であらわした中和抗体価との乖離がみられる製剤もあった。この事は製剤の特性と関連すると考えられたが、ELISA法を麻しん抗体力価の測定法として生物基に掲載するにはさらに詳細な検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

人免疫グロブリン製剤には筋注用グロブリン製剤、静注用ガンマグロブリン製剤と特殊グロブリン製剤があり、このうち筋中用と静注用グロブリンは、抗麻しんウイルス抗体価をガンマグロブリン150mg（ペプシン処理ガンマグロブリンは100mg）あたり5単位以上含まなければならないと生物学的製剤基準（生物基）に定められている。特に筋注用グロブリン製剤はその適応に麻しん予防が記載されており、麻しん抗体価測定は製品の品質管理上、必要と考えられている。生物基の抗麻しん抗体価測定法には中和法、HI（赤血球凝集抑制）試験、PHA（受身

凝集）法が記載されているが、中和法は生きた麻しんウイルスを用いるため実施できる施設等に制限があり、また、HI法はアフリカミドリザルの赤血球を用いるため、将来的には実施が不可能になると考えられている。また、PHA法もキットの供給に問題がある。これらのことから、グロブリン製造所からは機械化が可能で広く使用されているELISA等の新たな試験法の生物基への掲載の希望もある。本研究は将来における人免疫グロブリン製剤における新規麻しん抗体測定法の導入について検討する事を目的としている。

B. 方法

WHO 標準麻疹抗体 (WHO International standard, 3rd International standard for anti-Measles; 3IU) 並びにグロブリン製剤 (表 1) を入手し、Vero 細胞、麻疹ウイルスワクチン株を用いてプラーク減少法によって麻疹中和抗体力価を測定し、平行線定量法によってグロブリン製剤の標準品に対する相対力価を算出した。また同様に標準品、グロブリン製剤の麻疹抗体価を麻疹 IgG ELISA kit (デンカ生研) を用いて測定し、ELISA 法による相対力価を測定した。中和法と ELISA 法によって算出された相対力価を比較し麻疹抗体価測定法としての妥当性を検討した。

C. 研究結果

1) 中和抗体価の測定

4名で4種のグロブリン製剤 (表 1) の中和抗体価を測定し、平均値よりそれぞれの相対力価を算出した。WHO 標準品の力価 (3IU) から各グロブリン製剤の相対中和力価を算出した。各グロブリン製剤の標準血清に対する相対中和力価は製剤 A: 4.3、製剤 B: 5.7、製剤 C: 7.6、製剤 D: 6.8 となった (表 2)。

2) ELISA 法による抗体価の測定、並びに比較

予備実験で WHO 標準品、各グロブリン製剤を ELISA 法で定量できる希釈率を検討した。その希釈率からさらに 2 倍階段希釈を 2 階行い、合計 3 階段希釈液を作製し、それぞれの ELISA 抗体価 (EIA 価) を測定した。平行線定量法で標準品との相対力価を算出し、製剤 A: 7.53、製剤 B: 27.0、製剤 C: 6.86、製剤 D: 11.26 を得た。また相対中和抗体価に対する ELISA 相対力価は、製剤 A: 1.75 倍、製剤 B: 3.55 倍、製剤 C: 1.20 倍、製剤 D: 1.66 倍であった。(表 3-1、表 3-2)。

D. 考察

現在、麻疹抗体測定法として中和法、HI 法、PHA 法が生物基に掲載されているが、これらの方法はウイルス、あるいは血液等と抗体の結合反応を利用して抗体量を測定する間接的な方法であり、ウイルス、細胞、血液などの性状や質によって値に影響が出る事が知られている。一方、ELISA 法はグロブリン中に含まれる抗体量を、抗原抗体反応を利用して直接定量する方法で、感度が高く、一般に安定した結果が得られ、手技が比較的簡便であり機械化ができるなど使用者側にとって有利な点以外にも、キットを供給する製造所にとっても製品の品質管理が容易等の利点もある。また、中和、HI、PHA 法は、検査に用いる施設、血球、あるいはキットの供給に問題があり、将来は利用が困難になる事も考慮

され、今後もグロブリン製剤中の麻しん抗体価測定を安定的に行うために ELISA 法を検討した。

ELISA 法の妥当性は、中和法と ELISA 法から平行線定量法によって算出された WHO 国際標準品に対する相対力価を比較する事で考察した。表 3-1、3-2 に示すように、ELISA 法で得られた、各グロブリン製剤の WHO 国際標準品に対する相対力価が、3 製剤においては中和法による相対力価とほぼ同等の相対力価を示したが、製剤 B においてはやや乖離した結果が得られた。乖離した理由としては、グロブリン製剤はその副作用に関連すると考えられている凝集素を除去するために酸性処理、スルホ化処理、ポリエチレングリコール処理などが施されており、その処理に過程、あるいは最終製剤の形態(pH 値、塩濃度等)によって ELISA 法の測定原理である抗原抗体結合反応に影響があった可能性が考えられた。今後製剤の特徴と抗体価に関するさらなる検討が必要である。今回は各製剤 1 ロットから中和相対抗体価、ELISA 相対抗体価を求めたが、今後は各製剤のロット間の均一性を検討した上で、ELISA 法による麻しん抗体価の測定の合理性を検討していく必要がある。また、製剤 B のように、中和相対値からの乖離がみられた製剤は、製剤の均一性を確認した上で、補正式等で補正する事が可能であるかを検討する必要もある。今回の結果に加え

て、将来において他の麻しん抗体測定法の使用が困難になる可能性がある事、ELISA 法は血清の麻しん抗体価測定法としてすでに評価を得ている事から、ELISA 法を生物基に記載する新しい一般試験法として今後も検討していく必要があると考えられた。

一方、現在、WHO は麻しん排除を目指しており、日本を含む西太平洋地区では 2012 年を達成の目標年としている。今後、麻しん罹患者が減少し、人が保持する麻しん抗体価が低下する可能性があり、製剤の品質に関係なく、生物基の基準値を維持できなくなる事が予想される。麻しん抗体価測定以外の方法でグロブリン製剤の品質を確認する方法を考慮していかなければならないであろう。

E. 結果

ELISA 法は新規の麻しん抗体測定法として使用できる可能性が示された。しかし、製剤のロット間での均一性等の検証が十分ではないこと、またある製剤においては、ELISA 法で算出される抗体価の補正を行う必要性が考えられる事などから、ELISA 法を一般試験法として生物基に導入するにはさらなる検討が必要であろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. その他 なし

表 1 グロブリン製剤の種類

凝集体除去の方法	乾燥スルホ化処理	pH4 処理 (酸性処理)	乾燥ポリエチレングリコール処理	ポリエチレングリコール処理
----------	----------	------------------	-----------------	---------------

表 2 各グロブリン製剤の国際標準品に対する相対中和力価

	製剤 A	製剤 B	製剤 C	製剤 D
平均相対値	1.43	1.90	2.52	2.27
標準偏差	0.27	0.46	0.95	0.54
相対中和力価	4.3	1.9	7.6	6.8

表 3-1 グロブリン製剤の国際標準品に対する相対力価(ELISA 法)

製剤	平均 EIA 価	標準品に対する相対価	相対 ELISA 力価 (IU)	相対中和力価	相対 ELIA 力価/相対中和力価
製剤 A	84.74	2.52	$2.52 \times 3 = 7.53$	4.3	$7.53 / 4.3 = 1.75$
製剤 B	303.65	9.00	$9.00 \times 3 = 27.0$	7.6	$27 / 7.6 = 3.55$
製剤 C	71.57	2.28	$2.287 \times 3 = 6.86$	5.7	$6.86 / 5.7 = 1.20$
WHO 標準品	38.56	1	$1 \times 3 = 3$	3	1

表 3-2 グロブリン製剤の国際標準品に対する相対力価(ELISA 法)

製剤	平均 EIA 価	標準品に対する相対価	相対 ELISA 力価 (IU)	相対中和力価	相対 ELIA 力価/相対中和力価
製剤 D	149.68	3.75	$3.753 \times 3 = 11.26$	6.8	$11.26 / 6.8 = 1.66$
WHO 標準品	49.87	1	$1 \times 3 = 3$	3	1