

3. 5. 3 同定試験

試料を適当な培養細胞を用いて増殖させたとき、その増殖は、抗ムンプスウイルス免疫血清によって中和されなければならぬ。

3. 3. 4 同定試験

試料を適当な培養細胞を用いて増殖させたとき、その増殖は、抗ムンプスウイルス免疫血清によって中和されなければならぬ。

3. 3. 5 神経毒力試験

試験にはムンプスウイルスに対する抗体の証明されないマカカ (*Macaca*) 属又はセルコピテクス (*Cercopithecus*) 属のサルを用いる。

サル 10 匹以上に、1 匹当たり検体 0.5mL ずつを左右各半球視床内に、0.25mL を小脳延髄槽内にそれぞれ注射して、21 日間観察する。この間、いずれの動物も麻痺その他の神経系の障害を示してはならず、かつ動物の 80% 以上は生き残らなければならぬ。ただし、いずれの動物も接種ウイルスあるいは接種材料中の外来性微生物に基づく異常な臨床症状及び死亡を認めてはならない。更に、観察期間終了時に剖検を行うとき、試験動物の中枢神経組織に接種ウイルス若しくは、接種材料中の外来性微生物に基づく異常な病変を認めてはならない。また、臨床的あるいは病理組織学的に免疫不全を示唆する所見若しくは、明らかかな免疫学的な基礎疾患を認められた動物については判定対象から除外する。また、剖検時に採血して血中抗体を測定するとき、80% 以上の動物にムンプスウイルスに対する抗体の発現を認めなければならぬ。同じウイルス株から由来した製剤の連続した試験において、すべての動物についての試験の成績、すなわち、病変の性質、病変の強さ、病変の拡がり並びに観察期間中の症状などを統合して比較評価するとき、各試験間で明らかかな差があつてはならない。

本剤の製造に適当と認められたウイルス株から由来した製剤の連続した 5 回の製品において神経毒力のないことが確認された場合には、当該ウイルス株由来の以後の製品につい

ては、本試験を省くことができる。

3. 5. 4 ウイルス含量試験

3. 7. 3 を準用して、ウイルス含量を測定する。

3. 5. 5 マーカー試験

試料についてプラックサイズを測定するとき、その値は参照ウイルスと同程度でなければならぬ。

3. 6 最終バルクの試験

3. 6. 1 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、適合しなればならぬ。

3. 6. 2 ウイルス含量試験

3. 7. 3 を準用して、ウイルス含量を測定する。

3. 6. 3 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、適合しなればならぬ。

3. 7 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3. 7. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%以下でなければならぬ。

3. 7. 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、適合しなればならぬ。

3. 7. 3 力価試験

適当な培養細胞を用いて検体0.5mL中のPFU, FFU又はCCID₅₀を測定するとき、その値は5000以上でなければならぬ。

3. 7. 4 表示確認試験

3. 3. 6 ウイルス含量試験

3. 5. 3 を準用して、ウイルス含量を測定する。

3. 3. 7 マーカー試験

試料についてプラックサイズを測定するとき、その値は参照ウイルスと同程度でなければならぬ。

3. 4 最終バルクの試験

3. 4. 1 染色試験←削除済み

3. 4. 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、適合しなればならぬ。

3. 4. 3 ウイルス含量試験

3. 5. 3 を準用して、ウイルス含量を測定する。

3. 4. 4 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、適合しなればならぬ。

3. 5 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3. 5. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%以下でなければならぬ。

3. 5. 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、適合しなればならぬ。

3. 5. 3 力価試験

適当な培養細胞を用いて検体0.5mL中のPFU, FFU又はCCID₅₀を測定するとき、その値は5000以上でなければならぬ。

3. 5. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し、培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5℃以下とする。
有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称
2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類
3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、それらの名称及び分量
4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量
5. 次の用法及び用量

通常、0.5mLを1回皮下に注射する。

適当な培養細胞に検体を接種し、培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5℃以下とする。
有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称
2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類
3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、それらの名称及び分量
4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量
5. 次の用法及び用量

通常、0.5mLを1回皮下に注射する。

乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチン

1 本質及び性状

本剤は、弱毒生麻しんウイルス（以下「麻しんウイルス」という。）及び弱毒生風しんウイルス（以下「風しんウイルス」という。）を含む乾燥製剤である。溶剤を加えるときは、無色又は帯赤色の澄明な液剤となる。

2 製法

2. 1 原材料

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 1 及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 1 をそれぞれ準用したシードロット製剤である。

2. 2 原液

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 2 及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 2 をそれぞれ準用する。

2. 3 最終バルク及び乾燥

乾燥弱毒生麻しんワクチン原液及び乾燥弱毒生風しんワクチン原液を適量ずつ混合し、必要あれば薄めて最終バルクを作る。この際、適当な安定剤などを加えることができる。ただし、抗生物質を加えてはならない。

最終バルクを分注、凍結乾燥する。

最終バルクについて、3. 4 の試験を行う。

3 試験

3. 1 個別培養細胞試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 3 及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 3 をそれぞれ準用する。

乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチン

1 本質及び性状

本剤は、弱毒生麻しんウイルス（以下「麻しんウイルス」という。）及び弱毒生風しんウイルス（以下「風しんウイルス」という。）を含む乾燥製剤である。溶剤を加えるときは、無色又は帯赤色の澄明な液剤となる。

2 製法

2. 1 原材料

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 1 及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 1 をそれぞれ準用する。

2. 2 原液

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 2 及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 2 をそれぞれ準用する。

2. 3 最終バルク及び乾燥

乾燥弱毒生麻しんワクチン原液及び乾燥弱毒生風しんワクチン原液を適量ずつ混合し、必要あれば薄めて最終バルクを作る。この際、適当な安定剤などを加えることができる。ただし、抗生物質を加えてはならない。

最終バルクを分注、凍結乾燥する。

最終バルクについて、3. 4 の試験を行う。

3 試験

3. 1 個別培養細胞試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 1 及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 1 をそれぞれ準用する。

3. 2 ウイルス浮遊液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 4 及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 4をそれぞれ準用する。

3. 3 原液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 5 及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 5をそれぞれ準用する。

3. 4 最終バルクの試験

3. 4. 1 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. 4. 2 ウイルス含量試験

3. 5. 3を準用して、ウイルス含量を測定する。

3. 4. 3 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、
適合しなればならない。

3. 5 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3. 5. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%
以下でなければならぬ。

3. 5. 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. 5. 3 力価試験

適当な培養細胞を用いて検体0.5mL中のPFU, FFU又はCCID₅₀
を測定するとき、麻しんウイルスの値は5000以上、風しんウ

3. 2 ウイルス浮遊液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 2 及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 2をそれぞれ準用する。

3. 3 原液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 3 及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 3をそれぞれ準用する。

3. 4 最終バルクの試験

3. 4. 1 染色試験←削除済み

3. 4. 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. 4. 3 ウイルス含量試験

3. 5. 3を準用して、ウイルス含量を測定する。

3. 4. 4 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、
適合しなればならない。

3. 5 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3. 5. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%以
下でなければならぬ。

3. 5. 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. 5. 3 力価試験

適当な培養細胞を用いて検体0.5mL中のPFU, FFU又はCCID₅₀
を測定するとき、麻しんウイルスの値は5000以上、風しんウイ

イルスの値は1000以上でなければならぬ。

3. 5. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5℃以下とする。

有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称

2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類

3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、

それらの名称及び分量

4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量

5. 次の用法及び用量

通常、0.5mLを1回皮下に注射する。

イルスの値は1000以上でなければならぬ。

3. 5. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5℃以下とする。

有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称

2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類

3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、

それらの名称及び分量

4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量

5. 次の用法及び用量

通常、0.5mLを1回皮下に注射する。

乾燥弱毒生麻しんおたふくかぜ風しん混合ワクチン

1 本質及び性状

本剤は、弱毒生麻しんウイルス（以下「麻しんウイルス」という。）弱毒生ムンプスウイルス（以下「ムンプスウイルス」という。）及び弱毒生風しんウイルス（以下「風しんウイルス」という。）を含む乾燥製剤である。溶剤を加えるときは、無色又は帯赤色の澄明な液剤となる。

2 製法

2. 1 原材料

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 1, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン2. 1及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 1をそれぞれ準用したシードロット製剤である。

2. 2 原液

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 2, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン2. 2及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 2をそれぞれ準用する。

2. 3 最終バルク及び乾燥

乾燥弱毒生麻しんワクチン原液, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン原液及び乾燥弱毒生風しんワクチン原液を適量ずつ混合し, 必要であれば薄めて最終バルクを作る。この際, 適当な安定剤などを加えることができる。ただし, 抗生物質を加えてはならない。

最終バルクを分注, 凍結乾燥する。

最終バルクについて, 3. 4の試験を行う。

3 試験

乾燥弱毒生麻しんおたふくかぜ風しん混合ワクチン

1 本質及び性状

本剤は、弱毒生麻しんウイルス（以下「麻しんウイルス」という。）弱毒生ムンプスウイルス（以下「ムンプスウイルス」という。）及び弱毒生風しんウイルス（以下「風しんウイルス」という。）を含む乾燥製剤である。溶剤を加えるときは、無色又は帯赤色の澄明な液剤となる。

2 製法

2. 1 原材料

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 1, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン2. 1及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 1をそれぞれ準用する。

2. 2 原液

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 2, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン2. 2及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 2をそれぞれ準用する。

2. 3 最終バルク及び乾燥

乾燥弱毒生麻しんワクチン原液, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン原液及び乾燥弱毒生風しんワクチン原液を適量ずつ混合し, 必要であれば薄めて最終バルクを作る。この際, 適当な安定剤などを加えることができる。ただし, 抗生物質を加えてはならない。

最終バルクを分注, 凍結乾燥する。

最終バルクについて, 3. 4の試験を行う。

3 試験

3. 1 個体別培養細胞試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 3, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 3及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 3をそれぞれ準用する。

3. 2 ウイルス浮遊液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 4, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 4及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 4をそれぞれ準用する。

3. 3 原液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 5, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 5及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 5をそれぞれ準用する。

3. 4 最終バルクの試験

3. 4. 1 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ぬ。

3. 4. 2 ウイルス含量試験

3. 5. 3を準用して、ウイルス含量を測定する。

3. 4. 3 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ぬ。

3. 5 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3. 5. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%

3. 1 個体別培養細胞試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 1, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 1及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 1をそれぞれ準用する。

3. 2 ウイルス浮遊液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 2, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 2及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 2をそれぞれ準用する。

3. 3 原液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 3, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 3及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 3をそれぞれ準用する。

3. 4 最終バルクの試験

3. 4. 1 染色試験←削除済み

3. 4. 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ぬ。

3. 4. 3 ウイルス含量試験

3. 5. 3を準用して、ウイルス含量を測定する。

3. 4. 4 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ぬ。

3. 5 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3. 5. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%

以下でなければならぬ。

3. 5. 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ぬ。

3. 5. 3 カ価試験

適当な培養細胞を用いて検体 0.5mL 中の PFU, FFU 又は CCID₅₀ を測定するとき、麻しんウイルス及びムンプスウイルスの値は 5000 以上、風しんウイルスの値は 1000 以上でなければならぬ。

3. 5. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5°C以下とする。
有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称
2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類
3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、それらの名称及び分量

4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量

5. 次の用法及び用量

通常、0.5mL を 1 回皮下に注射する

下でなければならぬ。

3. 5. 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ぬ。

3. 5. 3 カ価試験

適当な培養細胞を用いて検体 0.5mL 中の PFU, FFU 又は CCID₅₀ を測定するとき、麻しんウイルス及びムンプスウイルスの値は 5000 以上、風しんウイルスの値は 1000 以上でなければならぬ。

3. 5. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し培養した後、蛍光抗体法などによって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5°C以下とする。
有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称
2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類
3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、それらの名称及び分量

4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量

5. 次の用法及び用量

通常、0.5mL を 1 回皮下に注射する

細胞培養日本脳炎ワクチン力価試験と抗原 ELISA 法について

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

協力研究者 田島 茂、池田真紀子、林 昌宏、モイ メンリン、小滝徹
大松 勉、倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨 細胞培養日本脳炎不活化ワクチンは、力価を指標に最終製品が製造されていた従来のマウス脳由来ワクチンと比較して、含有蛋白量が少なく、製造承認の規格は蛋白量で規定されている。したがって抗原 ELISA 法により日本脳炎抗原含量と力価試験の結果が相関する可能性が高いと考えられる。H21 および H22 年度と日本脳炎抗原 ELISA 定量法を評価し、ロット間のばらつき、さらに製造メーカーによる違いについて関連を検討した。その結果、細胞培養日本脳炎ワクチン抗原定量 ELISA 法を開発し、小分け製品に関して抗原量を検討したところ、データの均一性は高く、原液が同じであればロット間のばらつきは非常に小さいことが確認された。しかし製造所が異なる場合、回帰係数が大きく異なり平行線定量法の信頼性が必ずしも担保されないことがわかり、この問題を解決する必要があることが明らかとなった。

A. 目的

細胞培養日本脳炎不活化ワクチンは、2009年2月に製造承認された。力価を指標に最終製品が製造されていた従来のマウス脳由来ワクチンと比較して、含有蛋白量が少なく、製造承認の規格は蛋白量で規定されている。本ワクチンは凍結乾燥品であり、同じ原液であっても凍結乾燥ラインが異なる製品は異なるロットとされる。異なるロットとされる小分け製品に関して、日本脳炎抗原 ELISA 法を確立し、力価に影響を及ぼす日本脳炎抗原量を測定し、ロット間のばらつきおよび原液との相関

を検討し、さらに製造メーカーの違いによるばらつきも検討した。

B. 方法

1) 日本脳炎抗原 ELISA 法

抗日本脳炎モノクローナル抗体（Group8, #503）を 96 ウェルプレートに 20 μ g/mL の濃度で固層化（Overnight, 4 $^{\circ}$ C）し、抗体を捨て磷酸緩衝液（PBS(-)）で洗浄する。そこに凍結乾燥品を溶解し 1 時間室温に放置したワクチンを原液から 2 倍階段希釈で 64 倍まで希釈し、各ウェルに 100 μ L を入れ、37 $^{\circ}$ C にて 1 時間インキュベーター

トする。プレートを6回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗フラビウイルスモノクローナル抗体(6B6C)を100 μ L/well 入れ、室温にて30分間インキュベートする。再びプレートを6回洗浄した後、TMB 溶液を各ウェルに100 μ l 入れて8分間反応させる。1N 硫酸液にて反応を停止した後、吸光度形にて Optical Density (OD) を測定した。

2) 使用したワクチン小分け品
製造承認後、平成21年4月から平成22年12月までB社のロットに関して抗原 ELISA を実施した。標準品(TJP012)を基準とした Index 値(相対抗原量価)の算出法は、平行線定量法(Bioassay Assist)により算出した。また、A社の1ロットに関しても同様にして検討した。

C. 結果

抗原検出 ELISA はワクチン原液から2倍階段希釈して64倍まで希釈し、抗原量を測定した。その結果 OD 値は希釈に相関して容量依存性に減少した。測定した OD 値を平行線定量法により標準品と相対抗原量価を算出した。本方法によるデータの均一性は高く、原液が同じであればロット間のぶれは非常に小さいことが確認された。

力価試験による相対力価(中和抗体力価)と抗原 ELISA 法による相対抗原量価は、3ロットに関しては、中和抗体力価が高くなったが、それ以外は比較的良好な相関関係を示した。しかし、製造メーカーが異なるロットに関して

は大きく外れ、平行線定量法に関して信頼性に注意すべき解析結果となった。

D. 考察

日本脳炎ワクチンの力価試験は、マウスにワクチンを2回免疫し、その中和抗体力価を参照品と比較することによって判定している。本方法は、動物(マウス)を用いる評価方法であり、一定の範囲内で結果がぶれる試験であり、許容範囲が設定されている試験である。一方、抗原 ELISA 法によるウイルス抗原定量ははるかに結果が一定の範囲内に収まる試験である。ワクチン力価と抗原量は異なる概念であり、まったく同一であると考えすることはできない。特に日本脳炎ワクチンは中和抗体力価を指標にワクチン行政を実施してきた歴史もあり、安易に力価試験を抗原定量試験に変更すべきではない。しかし、細胞培養日本脳炎ワクチン抗原定量 ELISA 法を開発し、小分け製品に関して抗原量を検討したところ、ワクチン原液との相関が認められた。また、データの均一性は高く、原液が同じであればロット間のぶれは非常に小さいことが確認された。製剤が液状ワクチンから凍結乾燥ワクチンに代わり、原液が同一であっても凍結乾燥ラインが異なる製品は異なるロットとされる現状では、原液が同一の小分け製品であれば、1ロットを選んで力価試験を実施し、その他のロットに関してはウイルス抗原量を比較し、同量であればそれを持って適とすることも考慮すべきではないかと考えられる。ただし、

製造メーカーが異なる場合、平行線定量法による相対抗原量価は回帰係数が大きく異なり、信頼性が失われた。検討したA社のロットは1ロットでありさらに検討が必要であるが、たとえば標準品をそれぞれ別に定めるなど条件を考慮する必要がある。

E. 結 論

細胞培養日本脳炎ワクチン抗原定量ELISA法を開発し、小分け製品に関して抗原量を検討したところ、データの均一性は高く、原液が同じであればロット間のぶれは非常に小さいことが確認された。また、マウスを用いた中和力価とそれなりに相関を示した。ただし、製造メーカーが異なる場合は信頼性が失われた。抗原ELISAの標準品を1つに定めると中和力価との相関が成

立しない可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

組換えヒトパピローマウイルスワクチンの規格試験についての研究

分担研究者 終元 巖 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長
研究協力者 松尾理加 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨：2価ヒトパピローマウイルスワクチン「サーバリックス」（製造所：グラクソ・スミスクライン株式会社）の VLP 力価試験を、検定試験として感染研に導入した。相対力価を算出するための二つの計算方法（4パラメータ回帰近似法と平行線定量法）を比較したところ、いずれの方法を用いてもばらつきが小さく精度が高い力価測定法であることが示された。また力価決定の物差しとなる参照ロットワクチンの切り替えに際して、新旧参照ロット間の力価の比較試験を行った。その結果、参照ロット切り替えの科学的な妥当性が示された。今後も感染研にて試験を行い、参照ロット切り替えの妥当性を確認することが、HPV ワクチンの品質管理上、重要と考えられた。

A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス（HPV）は子宮頸癌の原因ウイルスとして知られており、近年欧米にて HPV に対する感染予防ワクチン（HPV ワクチン）が開発され、2006 年から販売されている。HPV ワクチンは、HPV のキャプシド蛋白質 L1 を遺伝子組換え酵母細胞や昆虫細胞／組換えバキュロウイルス系で発現させ、ウイルス様粒子（VLP）に再構成させた「遺伝子組換え蛋白質ワクチン」である。その作製にはシードロットシステムが導入されており、高度に均一な品質のワクチン生産が期待される。我が国でも 2 価 HPV ワクチン（サーバリックス：グラクソ・スミスクライン株式会社）が 2009 年 10 月に承認され、2009 年 12 月から販売が開始されている。

サーバリックスの生物学的製剤規準においては、力価試験として従来型の動物を用いた試験ではなく、有効成分である VLP の含量を測定する試験（VLP 力価試験）が設定されている。この VLP 力価試験は、VLP の高次構造を認識する抗 L1 マウスモノクローナル抗体を用いて、立体構造を保持した VLP 量を酵素免疫測定法（ELISA）にて定量する。その際、VLP 含量値ではなく、参照ロットとなる小分けワクチン（臨床試験にて有効性が示されたロット）に対する相対力価値が規格値として設定されている。本研究では、この新たに生物学的製剤規準に収載された VLP 力価試験の特性を調べ、検定検査を実施する上でのポイントを検討することを目的とした。また製造所と共同で、参照ロットワクチンの

切り替えに関するプロトコールの確立を試みた。

B. 材料と方法

VLP 力価試験

サーバリックス小分け製品及び参照ロット（グラクソ・スミスクライン社から提供）を 0.1%カゼイン及び 0.1%ポリソルベール 20 を含むリン酸緩衝液生理食塩溶液（PBS）で希釈して、試料溶液とした。HPV16 VLP 標準物質及び HPV18 VLP 標準物質を 2 倍希釈で 11 段階に希釈し標準溶液とした。現時点での参照ロットは、海外での第 III 相臨床試験（HPV-008）で使用されて有効性が示されたロット（DHPV005A9）である。またグラクソ・スミスクライン社から新規参照ロットとしてロット（AHPVA96A）の提供を受けた。

希釈した試料溶液及び標準溶液に含まれる VLP 含量を、抗 HPV16 L1 蛋白質ウサギポリクローナル抗体及び HPV16 VLP の主要な中和エピトープを認識するマウスモノクローナル抗体又は抗 HPV18 L1 蛋白質ウサギポリクローナル抗体及び HPV18 VLP の主要な中和エピトープを認識するマウスモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法により、それぞれ測定した。

VLP 含量および相対力価の算出

標準溶液から得た検量線を用いて試料溶液及び基準溶液に含まれる VLP 量を測定し、基準溶液を 1.00 とした時の試料溶液の相対力価を算出した。検量線は SoftMax Pro ソフトウェアにて 4 パラメータ回帰近似法を用いて算出した。また VLP 含量を算出せずに相対力価を算出する方法として、Bioassay Assist による平行線定量法を用いた。

C. 研究結果

相対力価の算出方法の比較

VLP 力価試験を 3 回行い、製造所が採用している 4 パラメータ回帰近似法を用いた方法で小分け製品の相対力価を計算したところ、3 回の試験の平均値として、HPV16: 1.02、HPV18: 1.01 を得た。一方、標準溶液の検量線を作成せずに、直接、試料溶液と基準溶液の反応曲線を比較する平行線定量法を用いて力価を計算したところ、3 回の平均値として、HPV16: 1.02、HPV18: 1.02 を得た（図 1）。

新旧参照ロットの力価の比較

新旧参照ロットに含まれる HPV-16 VLP および HPV-18 VLP の含量、および旧参照ロットに対する新参照ロットの相対力価を表 1、表 2 に示す。3 回の試験の平均値は、HPV16: 0.99（標準偏差：0.02）、HPV18: 1.03（標準偏差：0.04）であった。新旧参照ロットに含まれる VLP 含量に差があるかを、対応のある t 検定により検定した結果は、HPV16 および HPV18 とともに 5% の有意水準で有意差は検出されなかった。

グラクソ・スミスクライン社のバリデーションデータでは、旧参照ロットに対する新参照ロットの相対力価は、31 回の試験の平均値で HPV16: 0.96（標準偏差：0.06）、30 回の試験の平均値で HPV18: 1.01（標準偏差：0.08）と報告されている。感染研とグラクソ・スミスクライン社のデータを比較した box plot を図 2 に示す。等分散を仮定しない Welch の検定の結果は、感染研とグラクソ・スミスクライン社のデータの間、HPV16 および HPV18 とともに 5% の有意水準で有意差は検出されなかった。なお有意差は認められなかったが、感染研の試験値がグラクソ

•スミスクライン社の試験値より若干高めとなる傾向が認められた。

D. 考察

製造所が採用している4パラメータ回帰近似法によるVLP含量の計算法は、近似の精度は高いが、SoftMax Proなどの高価な市販ソフトウェアを必要とする。国立感染症研究所にて開発され、多くの検定試験で用いられているBioassay Assistでの平行線定量法による検討では、4パラメータ回帰近似法とほとんど同じ結果が得られ、また3回の試験値のばらつきは4パラメータ回帰近似法よりも若干小さかった。ただし、ばらつきの違いは大きなものではなく、相対力価の計算法としては、どちらの方法も使用可能であることが示された。

サーバリックスのVLP力価試験は、有効性が示された参照ロットに対して、小分け製品の相対力価を測定する試験であり、参照ロットの適正な管理運用が重要である。感染研の試験で新旧参照ロット間の力価に有意差は検出されず、感染研とグラクソ・スミスクライン社のデータの間に乖離は認められないことから、AHPVA96Aを新しい参照ロットとしてVLP力価試験に用いるのは妥当と考えられる。サーバリックスの生物学的製剤基準でのVLP力価試験の規格は、参照ロットに対する相対力価で、HPV16: 0.78 - 1.45、HPV18: 0.79 - 1.47と規定されている。新規参照ロットを用いた今後のVLP力価試験では、グラクソ・スミスクライン社のバリデーションデータにもとづいて、HPV16では0.96、HPV18では1.01を、試験で得られた相対力価に乗じた値が規格内に収まる必要があると考えられた。

E. 結語

サーバリックスのVLP力価試験を、国立感染症研究所に導入し、この新しいin vitro力価試験がサーバリックス小分け製品の検定に十分適した試験方法であることを確認した。

またサーバリックスのVLP力価試験に用いられる参照ロットワクチンの切り替えが、科学的に妥当であることを確認した。参照ロットワクチンの有効期間が2-8°Cで3年間であることから、今後も同様の切り替えが行われると考えられる。参照ロットの切り替えは一部変更承認申請に該当し、試験品の提供を受けて試験を行うことは法的には求められていないが、少なくとも切り替え時に製造所のバリデーションデータを確認し、国立感染症研究所においても新旧参照ロットの比較試験を最小限行うことが、今後のHPVワクチンの品質管理上、重要と考えられる。

F. 健康危害情報

無し

G. 研究発表

論文発表

(欧文)

- (1) Sato, R. Kusumoto-Matsuo, Y. Ishii, S. Mori, T. Nakahara, F. Shinkai-Ouchi, K. Kawana, T. Fujii, Y. Taketani, T. Kanda, and L. Kukimoto. Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 387: 525-530, 2009.
- (2) R. Kusumoto-Matsuo, T. Kanda, and L. Kukimoto. Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes to Cells*, 16: 23-33, 2011.

(和文)

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

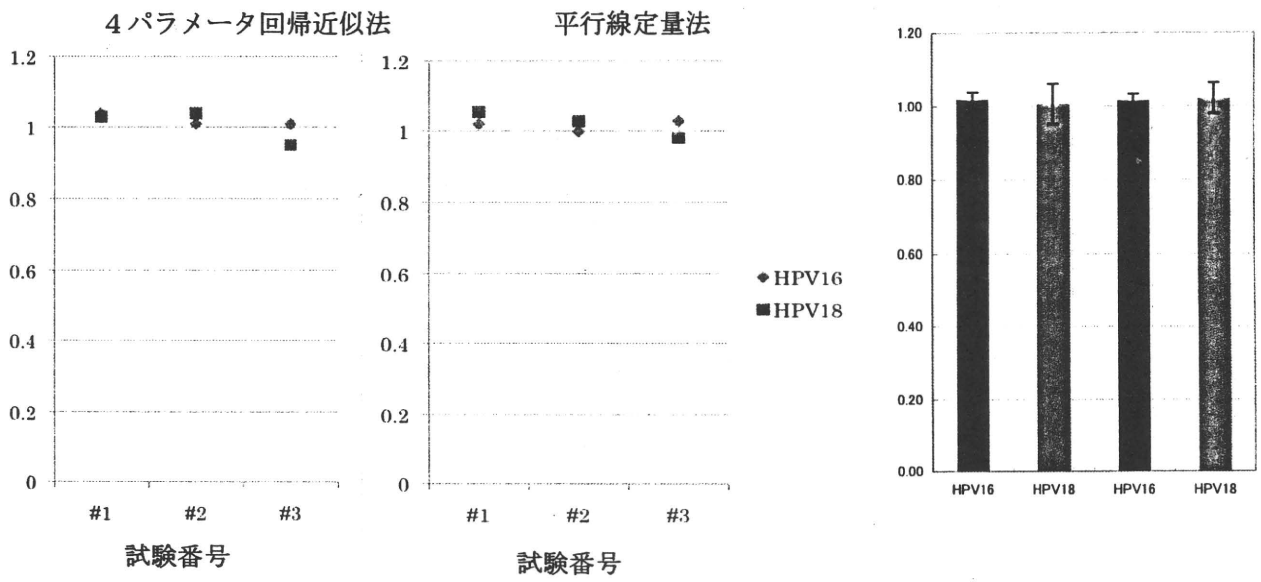
無し

2. 実用新案登録

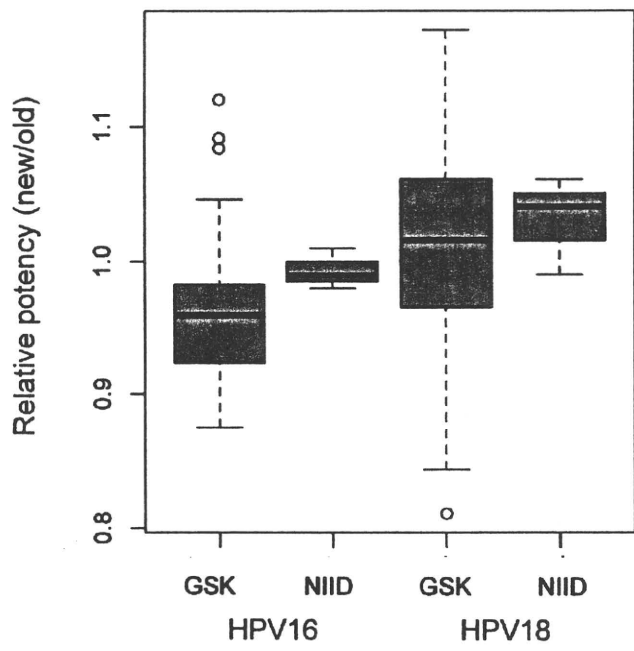
無し

3. その他

無し



【図1】 サーバリックス相対力価の計算方法の比較



【図2】 感染研 (NIID) とグラクソ・スミスクライン社 (GSK) のデータ比較

【表 1】新旧参照ロットに含まれる HPV-16 VLP 含量

試験日 (YY/MM/DD)	HPV-16 L1 VLP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Ratio AHPVA096A / DHPV005A9/Q
	AHPVA096A (new)	DHPV005A9/Q (old)	
2010/08/24	33.5	33.9	0.99
2010/08/26	30.8	30.6	1.01
2010/08/31	36.0	36.6	0.98
平均	33.4	33.7	0.99
標準偏差	2.6	3.0	0.02

【表 2】新旧参照ロットに含まれる HPV-18 VLP 含量

試験日 (YY/MM/DD)	HPV-18 L1 VLP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Ratio AHPVA096A / DHPV005A9/Q
	AHPVA096A (new)	DHPV005A9/Q (old)	
2010/08/24	30.0	28.2	1.06
2010/08/26	30.7	29.6	1.04
2010/08/31	30.8	30.9	1.00
平均	30.5	29.6	1.03
標準偏差	0.4	1.4	0.04

インフルエンザ HA ワクチン及び沈降インフルエンザワクチン(H5N1 株)の 生物学的製剤基準に関する研究

分担研究者 板村繁之 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 室長
研究協力者 佐藤佳代子 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター
嶋崎典子 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター
河野直子 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター

研究要旨：インフルエンザ HA ワクチンの生物学的製剤基準には、ウイルス粒子から主要なワクチン有効成分であるヘマグルチニン（HA）蛋白がウイルス膜から遊離してスプリットワクチン化されてワクチンが製造されているのか検証するために分画試験が導入されている。分画試験ではウイルスの HA 活性に基づいて HA 分画を同定しているが、近年分離されるインフルエンザウイルス株では HA 蛋白量当たりの HA 活性に大きな差が認められる。通常の季節性インフルエンザ HA ワクチンは、A 型 2 種、B 型 1 種の混合ワクチンであり、ワクチン株の組合せによっては高い HA 活性と低い HA 活性の株が混合した状態になり、小分製品について分画試験を行っても高い HA 活性のワクチン株に隠れて、低い HA 活性のワクチン株の分画位置が識別できない。混合前のワクチン単原液と小分製品についてワクチン株ごとに HA 分画を検出できるキャプチャー-ELISA 法を開発して、比較したところ HA の分画パターンに大きな差異は認められなかった。従って、インフルエンザ HA ワクチンの小分製剤について、ワクチン単原液において分画試験に適合していれば、改めて試験を実施する必要性は低いと考えられ、現行の生物学的製剤基準に定められている小分製品での分画試験は削除可能であろう。沈降インフルエンザワクチン（H5N1 株）の小分製品での力価試験も技術的には可能になってきているので方法の検討を行った上で、小分製品での力価試験の導入を検討すべきである。沈降インフルエンザワクチン（H5N1 株）は、パンデミックワクチンとして高病原性鳥インフルエンザ（H5N1 株）を想定して製造承認され、その生物基が作成された。沈降インフルエンザワクチン（H5N1 株）を、プレパンデミックワクチンとして使用するのに現行の試験項目で充分であるかどうかについては、さらにワクチン製造所、関係規制当局を含めて議論する必要がある。

A. 研究目的

季節性のインフルエンザは北半球の温帯地域では毎年冬季に流行が拡大し、インフルエンザウイルスは抗原変異が極めて頻繁に起こることが知

られており、そのため季節性のインフルエンザワクチンを製造するためのウイルス株は流行ウイルス株のサーベイランス情報に基づいて毎年見直しがなされている。このように毎年の

ようにワクチン株が変更されるインフルエンザHA ワクチンの生物学的製剤基準（生物基）に、ウイルス粒子から主要なワクチン有効成分であるヘマグルチニン（HA）蛋白がウイルス膜から遊離してスプリットワクチン化されてワクチンが製造されているのか検証するために分画試験が導入されている。現在、HA 蛋白の検出にはHA 蛋白の生物活性である赤血球凝集（HA）活性を利用しているが、インフルエンザウイルスは抗原変異だけでなく、ウイルスレセプターへの結合力や特異性に変異が見られ、近年の流行ウイルス株は従来ニワトリ赤血球を凝集できたものが、ほとんど凝集できないように変異しており、ヒチメンチョウやモルモットなどの赤血球でようやくHA 活性が検出できる。そのため、近年ワクチンに使用されているウイルス株のHA 蛋白は、ウイルス株によってHA 含量当たりのHA 活性に大きな差がある。インフルエンザHA ワクチンの最終の小分製品は3種類のウイルス株の原液がHA 蛋白量として等濃度になるように混合されて製造されているが、HA の比活性がワクチン株ごとによって大きく異なるために3種類すべてのスプリット化を分画試験によって検証することが困難になっている。このようなウイルスの変異に伴って、インフルエンザHA ワクチンの生物基に規定されている分画試験について見直しが必要となっている。

一方、1997年の香港に始まる高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ウイルスの鳥からヒトへの感染事例は、現在までのところ幸い本ウイルスによるパンデミックは発生していないが、2003年末以降アジア地域から中央アジア、中近東、欧州、アフリカへと本

ウイルスは家禽や野鳥の世界で常在化し、ヒトへの感染を繰り返している。現在（3/3/2011）に至るまで526名の感染者が報告され、その内311名が死亡しており、致死率は約60%に及ぶ。このような高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ウイルスによるインフルエンザ・パンデミックに対応するためのワクチンとして沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1株）が開発され、2007年に製造承認された。本ワクチンは開発と並行して高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ウイルスによるパンデミックに対応するために国家備蓄も実施された。2008年には本ワクチン接種によって得られるプライミングとブースター効果、抗原性の異なるウイルス株に対する抗体応答や持続期間についての臨床研究が実施され、本ワクチンが同亜型のウイルスについて比較的良好なプライミング効果を賦与することが明らかになった。そのために、医療従事者等を対象としたプレパンデミックワクチンとしての使用についても検討されるようになった。その後、本ワクチンは2009年に沈降インフルエンザワクチン（H5N1株）と改定された。しかしながら、本ワクチンはパンデミックを対象として、リスク・ベネフィットの観点から製造承認がなされていることから、プレパンデミック時での使用を考えるには生物基の項目等の見直しが必要であるのか検討する必要性がある。

このような観点から、インフルエンザHA ワクチン及び沈降インフルエンザワクチン（H5N1株）の生物基に関連する問題点について検討を行うことを本研究の目的とした。

B. 研究方法