

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
ワクチンの品質確保のための国家検定制度の抜本的改正に関する研究

分担研究報告書

分担研究課題：国家検定の意義「B型肝炎ワクチンの *in vivo* 試験から *in vitro* 試験への移行について」

研究分担者 脇田 隆字 国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究協力者 清原 知子 国立感染症研究所 ウイルス第二部第五室
石井 孝司 国立感染症研究所 ウイルス第二部第五室

研究要旨：日本の国家検定及びワクチンメーカーの自社検定はB型肝炎ワクチンの力価測定として *in vivo* 試験を実施しているが、海外では *in vitro* 試験も承認されている。*in vivo* 試験は多数のマウスを必要とし、動物の馴化期間・免疫期間を含めて6週間以上かかるが、全メーカー共通の参照ワクチンを用いて一律に力価を測定・評価できる。一方の *in vitro* 試験はワクチンに含まれる抗原量を測定する方法で、短期間で実施できる反面、抗原の特性（遺伝子型、製造法等）の影響が大きく、メーカー別の参照ワクチンを制定する必要がある。B型肝炎ワクチンの力価検定は、検定対象ワクチンと、臨床的に有効と評価された承認ワクチン（または参照ワクチン）との Consistency を保証するものである。参照ワクチンは Consistency の基準となるため、力価の指標となるパラメータ（*in vivo* 試験であれば抗体誘導能、*in vitro* 試験であれば抗原量）について前ロットからの値付けをされるとともに、そのパラメータに頑健性が有り長期使用できるものが望ましい。本研究では、*in vitro* 試験用参照ワクチン候補の頑健性を検討し、メーカー特異的な参照ワクチンの制定基準が必要であることを示した。

A. 研究目的

現在、我が国ではB型肝炎ワクチンの国家検定として力価試験とサマリーロットプロトコール(SLP)審査が定められている。このうち力価試験は動物(*in vivo*)試験を行っている。これはマウスにワクチンを接種し、誘導された抗HBs抗体をELISA法などで測定する方法である。一方、欧米では*in vivo*試験に替わって試験管内(*in vitro*)試験が採用、または併用されている。*in vitro*試験はワクチンに含まれるHBs抗原量をELISA法等で測定するものである。B

型肝炎ワクチンの需要増加に対応した検定の効率化、動物愛護の観点からも可及的速やかな*in vitro*試験の導入が臨まれる。これまで国内流通ワクチンに適した*in vitro*試験法について検討を重ね、in-house試験法を確立した。*in vitro*試験においては抗原や製造の特性が強く反映されるため、各メーカー固有の参照ワクチンの制定が必要である。具体的には現行の*in vivo*試験で保証された製造ワクチンをそれぞれの参照ワクチンとして制定することになる。本研究では各メーカーのワクチンについて頑健性と

in vitro 試験用参照ワクチンとしての取扱いを検討した。*in vitro* 試験は各検体複数回繰り返し、その平均を最終的な相対力価とした。

B. 研究方法

メーカー別に保存年数（保存温度 4℃）の異なるロットの *in vitro* 相対力価を比較した。相対力価の測定方法は Binding ELISA（H24 年度既出）を採用した。

材料：

メーカーA

暫定参照ワクチン（保存期間 1 年以内）、保存ワクチン（保存期間 1 年、3 年、5 年、各 1 ロット、6 年、2 ロット）。

メーカーB

暫定参照ワクチン（保存期間 1 年以内）、保存ワクチン（保存期間 1 年、3 年、8 年、各 1 ロット、7 年、2 ロット）。

C. 研究結果（図 1）

メーカーA のワクチンは保存 6 年でも *in vitro* 相対力価の変化は無かった。一方、メーカーB のワクチンは同じ保存期間 1 年のロット間で力価の巾があり、また、保存期間と力価が負の相関を示した。近似式から推定した 2 年後の力価はメーカーA、メーカーB の順に 0.98、0.79、8 年後はそれぞれ 0.92、0.35 であった。

D. 考察

in vitro 試験の導入にあたり、参照ワクチンの制定は重要である。今年度の研究結果からメーカーA に関しては参照ワクチンを一度制定すると長期間使用可能であることが推察された。メーカーB については同じ

保存期間 1 年のロット間（暫定参照ワクチンと試験ワクチン）で *in vitro* 相対力価の差が認められた。各ロットの繰り返し測定における差は無いことから測定誤差ではなくロット間差と考えられた。メーカーB のワクチンは有効期間の 2 年で相対力価が 0.79 に変化するが、これが正常値の許容範囲かどうかは今後さらに検討が必要である。以上の結果から、*in vitro* 試験の参照ワクチンのロット切り替えについて、メーカー別に規定するか、ワクチンの有効期間に合わせるか実用化において検討が求められる。

in vitro 試験への移行について、各メーカーの準備状況等のアンケートを採ったが、企業秘密にかかる案件もあり、公開しないことを条件とするメーカーもあった。力価試験のような重要な試験の変更において複数メーカーが関与する場合の実用化の進め方について課題が残った。

E. 結論

1) *in vitro* 試験（Binding ELISA）を力価試験法として採用する場合、参照ワクチンの制定に関する規定について慎重に検討する必要がある。

2) Recommendation to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines. (WHO, 2010)ではモニタリングパラメータとして *in vivo* 試験による力価試験が認められており、同時に、新しいB型肝炎ワクチンが承認された場合や製造工程の変更があった場合は *in vivo* 試験によるバリデーション実施が明記されている。*in vivo* 試験から *in vitro* 試験への移行に併せて両試験の併用条件、技術維持等も検討が必要であ

る。

F. 研究発表

1.なし

2.なし

図1. 力価と保存期間の相関

