

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業の総合的推進に関する研究」班
分担研究報告書

セービン株由来不活化ポリオワクチンの国際標準品制定に向けた国際共同研究

研究分担者 片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究協力者 染谷 雄一 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨

WHO および NIBSC が中心となって行っている sIPV の D 抗原定量試験、および、力価試験を共通化するための国際共同研究に試験機関のひとつとして参加し、世界のワクチンメーカーが製造したセービン株由来不活化ポリオワクチン国際標準品候補品 7 種の D 抗原含量を決定し、NIBSC に報告した。

セービンワクチン製剤の国家検定試験に使用されている日本エスエルシー社の Wistar ラット (Slc:Wistar) が真の Wistar ラットとは異なるという報告を受けて、種々の系統のラットを検討し、免疫応答の差異を明らかにした。他の国でセービン株由来不活化ポリオワクチンに用いられている真の Wistar ラット(日本チャールス・リバー社、Crlj:WI) は Slc:Wistar 同様、評価に適した系統のラットといえる。

A . 研究目的

我が国はセービン株由来不活化ポリオワクチン (sIPV) を導入した世界で初めての国であり、その最終小分け品評価のための国内参照品 (参照不活化ポリオワクチン (セービン株)) を有する。現在、オランダや中国のワクチンメーカーでもセービン株由来不活化ポリオワクチンが製造され、いずれも承認前段階にある。

すでに世界中で広く使用されている野生株由来ソークワクチン (cIPV) はその国際標準品のもと、D 抗原量単位が世界的に統一されているが、sIPV の D 抗原量単位は 3 カ国間で必ずしも一致しない。これは D 抗原定量 ELISA において、それぞれの国で独自に開発した抗ポリオウイルス抗体を使用することによるところが大きい。この問題を解決するには、cIPV 国際標準品制定に倣って、sIPV の国際標準品を制定し、統一された D 抗原量単位

を測定できる ELISA 系を構築する必要がある。

2014 年 9 月にワシントン DC で開催された関連会議の決定事項を受けて、WHO および NIBSC 主導のもと、sIPV の D 抗原定量試験、および、力価試験を共通化するための国際共同研究が開始されるにいたった。この国際共同研究により、まずは sIPV D 抗原量単位の世界的統一が諮られることになることと期待される。

ラット免疫原性試験に基づく力価試験はまだ国際共同研究としては実施されていないが、本試験に使用するラットの系統について検討を行った。2015 年初頭、京都大学の実験動物施設より、日本エスエルシーの Wistar ラット (Slc:Wistar) が遺伝的に F344 ラットの近縁であり、真の Wistar ラットとは異なることが示された。日本国内の sIPV の評価は長期に渡り Slc:Wistar が使われてきているのに対し、オランダや中国の sIPV 開発グルー

ブは Wistar ラット(供給元は不明であるが、日本エスエルシーがほぼ日本国内向けであることから、真の Wistar ラットであると考えられる。)を使用している。従って、日本国内の評価成績を他グループの成績と単純に比較することができない可能性がある。そこで、いくつかの系統のラットを日本エスエルシー、および、世界的なプロバイダーであるチャールス・リバー(日本チャールス・リバー)から購入し、sIPV 国内参照品に対する免疫応答の違いを調べることにした。

B . 研究方法

(1) D 抗原定量試験

世界のいくつかのワクチンメーカーより sIPV 国際標準品候補品を受領した NIBSC は、それらをブラインド試料としていくつかのワクチンメーカーや試験機関に配布した。国立感染症研究所ウイルス第二部も本国際共同研究に参加を表明し、NIBSC より 7 種のブラインド試料とそれら試料の D 抗原量測定のための標準物質となる現行 cIPV 国際標準品(ロット 12/104) および、cIPV 国際参照品(ロット 08-143)を受領した。

国立感染症研究所ウイルス第二部では、それぞれのブラインド試料の D 抗原量は、現行 cIPV 国際標準品(ロット 12/104) cIPV 国際参照品(ロット 08-143) 日本ポリオ研究所(現 阪大微生物研究会ポリオ研究所)製造の標準ウイルス(ロット 6-13-12)それぞれに対して決定された。D 抗原定量 ELISA には、日本ポリオ研究所製造の血清型別抗ポリオウイルスマウスモノクローナル抗体、血清型別抗ポリオウイルスウサギポリクローナル抗体を、それぞれ、捕獲抗体、一次抗体として用いた。二次抗体はペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体(Bethyl A120-201P)を使用し、ABTS(Roche)で発色し、吸光度を測定後、Bioassay Assist(国立感染症研究所)を用いて D 抗原量を算出した。D 抗原定量試験はそれぞれのブラインド試料につき 3 回行った。

(2) ラット免疫原性試験

ラット免疫原性試験に使用するラットの系統について検討した。

検討に使用したラットの系統は、日本エスエルシー社の Wistar 系統(Slc:Wistar) SD 系統(Slc:SD) Fischer 344 系統(F344/NSlc) 日本チャールス・リバー社の Wistar 系統(Crlj:WI) Wistar Hannover 系統(Crl:WI(Han)) SD 系統(Crl:CD(SD))である。F344/NSlc が近交系であるほかはいずれもクローズドコロニーに由来する。

ラットはいずれの系統も雌を使用し、7 週齢で納入後、1 週間の馴化期間を経て、8 週齢で検体を接種した。種々の系統のラットの検討には、検体は sIPV 国内参照品ロット 12A を用い、原液を 2 倍系列希釈して 4 濃度の検体を準備した。それぞれの検体濃度に対応する 1 群は 10 匹で構成され、検体 0.5 mL を後肢筋肉内に接種した。3 週間後に炭酸ガスで全身麻酔し、心臓から全血液を採取し、分離した血清中の抗ポリオウイルス中和抗体価を測定した。このとき、攻撃ウイルスとしてそれぞれの血清型のセービンポリオウイルスを、指示細胞として HEp-2c 細胞を用いた。

Crlj:WI を使用した国内参照品力価単位確認試験には、現行国内参照品ロット 12A に加えて、ロット 05J とロット 09A を検体として用いた。ロット 05J は原液から 2 倍系列希釈して 4 濃度を、ロット 09A および 12A は原液から 2 倍系列希釈して 5 濃度を準備した。

(倫理面への配慮)

本研究において、動物実験を要する実験は、当該年度に実験機関である国立感染症研究所(村山庁舎)で実験計画書を提出して承認を得た。また、国立感染症研究所で策定された動物実験指針を遵守し、実験指針に示される通り、実験中は動物の苦痛を軽減及び排除し、実験終了時には安楽死させた。また、研究に係る個人情報や研究内容の取

扱いについては、その秘匿性が保たれるように十分に配慮した。

C . 研究成果

(1) 国際共同研究として実施した D 抗原定量試験

NIBSC より配付された 7 種のブラインド試料の D 抗原含量を、現行 cIPV 国際標準品 (ロット 12/104)、cIPV 国際参照品 (ロット 08-143)、日本ポリオ研究所製造の標準ウイルス (ロット 6-13-12) それぞれに対して定量した。それぞれのブラインド試料につき 3 回の独立した試験を行い、得られた試験成績は NIBSC に提出した。NIBSC はいくつかのワクチンメーカーや試験機関で得られた試験成績を総括することになっている。

(Confidential 扱いのため、試験成績はここでは省略する。)

(2) 力価試験 (免疫原性試験) に用いるラット系統の検討

C. 研究方法に示したいいくつかの系統のラットについて、国内参照品ロット 12A に対する免疫応答の違いを検討したところ、Slc:Wistar は F344/NSlc とほぼ同等の免疫応答を、3 つのポリオウイルス血清型全てについて示した。動物実験で頻繁に使用される SD ラット (Slc:SD、Crl:CD(SD)) は、1 型に対する応答が Slc:Wistar の半分程度であったのに対し、2 型および 3 型に対しては 2 倍程度高かった。真の Wistar ラット (Crlj:WI) および、その派生系統 Wistar Hannover ラット (Crl:WI(Han)) は、いずれも 1 型に対しては Slc:Wistar とほぼ同等の免疫応答であったが、2 型および 3 型に対しては概ね 2 倍以上の高い反応性を示した。

(3) Crlj:WI ラットを使用した国内参照品力価単位確認試験

sIPV 国内参照品の力価単位 (U/mL で現される) は Slc:Wistar を使用して決められている。国内参

照品ロット 05J の力価単位を 3 つの血清型いずれについても 1 U/mL とし、免疫原性試験の成績に基づき、ロット 09A の力価単位はロット 05J に対して求められている。また、ロット 12A の力価単位はロット 09A を基準に算出されている。

京都大学実験動物施設の報告、および、上記(2)の結果より、Slc:Wistar と真の Wistar ラットである Crlj:WI は、sIPV 国内参照品に対して異なる免疫応答を示すことが明らかになった。そこで、Slc:Wistar で決められた国内参照品の力価単位が Crlj:WI でも再現されるのかを確認することにした。力価単位確認試験は独立に 3 回行うこととした。現時点で 2 回の試験成績を得、3 回目の試験成績が間もなく得られるところである。2 回目までの試験成績によれば、Crlj:WI を使用しても Slc:Wistar で決められた力価単位が概ね再現できているとみられる。

D . 考察

(1) D 抗原定量試験

7 種のブラインド試料の D 抗原含量は、現行 cIPV 国際標準品 (ロット 12/104)、cIPV 国際参照品 (ロット 08-143)、日本ポリオ研究所製造の標準ウイルス (ロット 6-13-12) それぞれに対して定量された。日本ポリオ研製造の標準ウイルスはセービンポリオウイルスであり、これに対して定量された D 抗原単位 (DU) は cIPV 標準品あるいは参照品に対して定量された DU とは異なる。従って、前者は sDU、後者は cDU のように示すべきと考える。両者が等価ではないことは注意を要する。

(2) 力価試験 (免疫原性試験) に用いるラット系統の検討

京都大学実験動物施設が遺伝子レベルの解析で Slc:Wistar が F344/NSlc に近縁であることが示されたのと類似して、sIPV に対する免疫応答も近似していた。個体の大きさは Slc:Wistar の方がやや

大きく、これは繁殖形態が F344/NSlc が近交系であるのに対し、Slc:Wistar はクローズドコロニーであることに依存するのかもしれない。

不活化ポリオワクチン（cIPV および sIPV）の評価に頻繁に使用される真の Wistar 系統（Crlj:WI）および、その派生系統（Crl:WI(Han)）は、いずれの血清型についても良好な免疫応答を示し、sIPV の評価には適しているといえる。

一方、多くの実験動物で使用される SD 系統ラットは血清型 1 型に対する免疫応答が弱く、本試験には適さないと判断した。

(3) Crlj:WI ラットを使用した国内参照品力価単位確認試験

現時点では 3 回の試験のうち 2 回目までの試験成績での判断になるが、Slc:Wistar で決められた国内参照品の力価単位は概ね Crlj:WI を使用しても再現できているとみられ、国内外の試験成績は、使用するラットの系統に注意を払うべきであるが、比較評価が可能といえる。

E . 結論

(1) D 抗原定量試験

2016 年 5 月 2 日にシアトルにて「セービン株由来不活化ポリオワクチンの D 抗原量試験および力

価試験の共通化に関する会議」が開催される。そこで、今回の国際共同研究の成果が報告され、次に何をすることが議論され、決定される。

(2) ラット免疫原性試験

日本国内での sIPV の国家検定試験では、Slc:Wistar を使用して力価試験（ラット免疫原性試験）が行われてきているので、使用するラット系統を変更しない方針であるが、今後行われる可能性のある国際共同研究でのラット免疫原性試験では Crlj:WI を（あるいは Slc:Wistar とともに）使用することを検討する必要がある。

F . 健康危機情報

特になし

G . 研究発表

現時点でなし

H . 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

実用新案登録

その他

上記特になし