

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に関する研究

分担研究報告書

肝炎ワクチン検定の試験法及びリスク評価法に関する研究

研究分担者 石井 孝司 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長
研究協力者 清原 知子 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官
脇田 隆字 国立感染症研究所 副所長

研究要旨：肝炎ワクチンの検定において、力価評価は *in vivo* 試験で行われている。これを短期間、低コストの *in vitro* 試験に移行するため、試験法の決定、バリデーション、*in-house* ELISA kit の作製、規定の改正準備等を行っている。
今年度は複数ロットの B 型肝炎ワクチンについて *in vitro* 試験でワクチンの抗原含量を相対的に測定し、製品の一貫性が示されているか、合格基準はどのように設定すればよいかを検討した。
その結果、同一製品であっても原液が異なると相対力価がばらつく可能性が示唆された。原液の差を含めた合格範囲の設定、あるいは試験法の改良について更に検討が必要である。

A. 研究目的

肝炎ワクチンの *in vitro* 試験の実用化に向けて、*in vivo* 試験との相関が担保されること、*in vitro* 相対力価によって品質の一貫性が示されること、安定した参照ワクチンの設定等について検討を進めている。今年度は、B 型肝炎ワクチンの *in vitro* 試験による相対力価の一貫性、参照ワクチンの設定について試験・解析を行った。

B. 研究方法

1 メーカーのワクチン 8 ロット (No.1-8) を対象として *in vitro* 試験を実施した。8 ロットのうち任意の 1 ロット (No.2) を参照検体として相対力価を計算した。No.1 と No.2-8 は同製品であるが原液が異なる。

in vitro 試験は、アジュバントを外して回収したワクチン含有 HBs 抗原を、抗 HBs 抗体固相化プレートで吸着し、抗 HBs 抗体 (単クローン抗体 2 種類混合) と標識抗マウス IgG 抗体で検出するサンドウィッチ ELISA で行った。ワクチンの他に抗原含量を 20 μ g/mL に調整した組換 HBs 抗原 (adw, GenScript 社, Z02814) も同時に測定した。
(倫理面への配慮)

in vitro 試験の検討であり、倫理面の問題は生じない。

C. 研究結果

任意の 1 ロット (No.2) を参照検体 (1 単位) とした時、各ワクチンの *in vitro* 相対力価は表 1 の通りであった。No.1、3-8

すべて平均値 $\pm 2SD$ (標準偏差) 内に収束した。No.5-8 は 95%信頼区間に 1 を含み、No.2 との同等性が確認されたが、No.1-4 は 1 以下であった。特に、原液が異なるワクチン No.1 は低値となった。

組換 HBs 抗原を参照検体 (1 単位) としたとき、ワクチン No.2-No.8 は平均 $\pm 2SD$ の範囲内に入った (表 2)。ワクチン No.1 も入れると平均 $\pm 2.5SD$ の範囲内に収束した。

D. 考察

市販されているワクチンは厳密な製造管理の下、一貫した品質を保ち、それを自社検定と国家検定 (力価: *in vivo* 試験) で二重に検査されたものである。これまでの研究から、現行の *in vivo* 試験で合格したワクチンは、*in vitro* 試験でも一定の範囲に収束することが確認されたが、一方で、数値としては相関せず、測定対象が異なるパラメータ (抗体産生能 = *in vivo* 試験、抗原含量 = *in vitro* 試験) をどのように取り扱うかが課題であった。今回行った *in vitro* 試験では任意の 1 ロット (No.2) を参照検体とした時、全てのロットが平均値 $\pm 2SD$ の範囲に入ったが一部のロットは参照品以下の相対力価となった。しかしながら、試験対象は全て *in vivo* 試験において合格しており、No.2 と同等であることが予測される。「同等」の範囲をどのように定めるか更なる検討が必要である。特に、原液が異なるワクチン No.1 は相対力価が低く、この原因として、原液が異なることによる抗原量やアジュバント除去・回収効率の差などが考えられた。

ワクチンを参照品として設定する場合、使用期限と継続性の問題が生じる。もし、

全てのロットにおいてアジュバント除去・回収効率が一定であれば、ワクチンより安定性が高い HBs 抗原液を参照品とし、メーカーごとにワクチンの合格範囲を設定することも可能ではないかと考え、抗原含量を 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した組換 HBs 抗原を参照検体として相対力価を計算した。相対力価は平均値 $\pm 2.5SD$ の範囲に収束したが、No.2 を参照検体としたとき同様、原液が異なる No.1 は低値を示した。平均値 $\pm 2.5SD$ は相対力価 0.555~1.108 に相当する。*in vitro* 試験を用いる際に、合格範囲が平均値に対して 70.8%~141.3%というのが適切かどうか、更に検証が求められる。

E. 結論

B型肝炎ワクチンの *in vitro* 相対力価の一貫性、参照ワクチンの設定について検討するため、今回は同一製品の中から同じ原液由来の 7 ロットと異なる原液由来の 1 ロットについて試験・解析を行った。原液が異なる 1 ロットは他に比べて低い相対力価を示した。今後、異なる原液由来のワクチンを揃えてその差を検証し、一貫性や合格範囲の設定に寄与するデータを蓄積する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Dahanayaka NJ, Kiyohara T, Agampodi SB, Samaraweera PK, Kulasooriya GK, Ranasinghe JC, Semage SN, Yoshizaki S, Wakita T, Ishii K. Clinical Features and Transmission Pattern of Hepatitis A: An Experience from a Hepatitis A Outbreak Caused by Two

Cocirculating Genotypes in Sri Lanka.
Am J Trop Med Hyg. 2016 Jul 5. pii:
16-0221. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 清原知子, 石井孝司, 砂川富正, 加納和彦, 木下一美, 大石和徳, 脇田隆字. A型肝炎と海外渡航. 第20回日本渡航医学会, 岡山(倉敷), 2016/7/23,24.
- 2) 法月正太郎, 木多村知美, 溝上雅史, 清原知子, 脇田隆字, 蜂矢正彦. ラオスにおけるB型肝炎ワクチン接種歴とHBs抗原、HBc抗体、HBs抗体の陽性率

についての検討. 第20回日本ワクチン学会. 2016/10/22,23.

- 3) 福島慎二, 清原知子, 石井孝司, 中野貴司, 濱田篤郎. A型肝炎ワクチン接種後の抗体価維持期間と追加接種の効果(第一報). 第20回日本ワクチン学会. 2016/10/22,23.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 1 : 参照検体 = ワクチンロット No.2

検体番号	力価	95%信頼区間	
		下限	上限
No.1	0.670	0.598	0.751
No.2	1.000		
No.3	0.891	0.796	0.997
No.4	0.827	0.738	0.925
No.5	0.908	0.811	1.016
No.6	0.923	0.824	1.033
No.7	0.918	0.820	1.027
No.8	1.062	0.949	1.189
平均値(GMT)	0.878		
GMT ± 2SD	0.663~1.164		
GMT ± 2.5SD	0.618~1.249		

表 2 : 参照検体 = 組換 HBs 抗原

検体番号	力価	95%信頼区間	
		下限	上限
No.1	0.589	0.524	0.661
No.2	0.879	0.785	0.984
No.3	0.783	0.699	0.877
No.4	0.726	0.648	0.813
No.5	0.798	0.713	0.894
No.6	0.811	0.724	0.908
No.7	0.807	0.720	0.903
No.8	0.934	0.834	1.045
平均値(GMT)	0.785		
GMT ± 2SD	0.595~1.034		
GMT ± 2.5SD	0.555~1.108		