

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

神経病原性ウイルスに対するワクチンに関する研究

研究分担者 西條 政幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部 部長
研究協力者 伊藤 睦代 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長
林 昌宏 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長

研究要旨：ワクチンの検定試験における 3Rs の導入についての取り組みとして、私たちはこれまで乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの安全性を確認するための不活化試験において、動物を使用しない *in vitro* 試験法を開発してきた。今回本試験法の検出法について、より簡便で客観的である ELISA 法に変更するための検討を行った結果、その検出感度は現行の蛍光抗体法と比較して同等であることが分かった。さらに、培養方法についても、より簡便な方法に変更可能であることが示唆された。

A. 研究目的

生物学的製剤の検定試験の一部では動物を使用した試験法が用いられている。狂犬病ワクチンの不活化試験は、ワクチン中に残存するウイルスがないことを確認する試験であるが、本試験では哺乳マウスがその検出のために使用されている。

近年、検定試験においても 3Rs (Reduction：使用動物数の削減、Refinement：動物が受ける苦痛の軽減、Replacement：動物を使用しない代替法への置き換え)への対応が望まれていることから、我々はこれまでに代替法として培養細胞を使用した *in vitro* 試験法の開発を行ってきた (M, Takayama-Ito et al. Biologicals, 2014)。本 *in vitro* 試験法は、現行の哺乳マウス試験法に比べ、約 5

倍の感度を持ち、試験の安定性、試験期間および簡便性においても従来法より優れていることが示された。本 *in vitro* 試験法では検出方法として蛍光抗体法を使用している。しかしながら、途上国では蛍光抗体法に必要な蛍光顕微鏡がなかったり、蛍光標識抗体が高価で入手困難であったりする問題がある。また、蛍光顕微鏡による観察はある程度主観的なものであるため、特異的蛍光と非特異的蛍光を見分けるための経験が必要となる。

そこで、本研究では実用化に向けた取り組みの一つとして、本 *in vitro* 試験法の検出方法を蛍光抗体法から細胞を抗原とした Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法に変更するための検討を行った。

B. 研究方法

1) ウイルス：日本のヒト用狂犬病ワクチン製造株である HEP-Flury 株を Neuro-2a 細胞で増殖させたストックウイルスを用いた。

2) ワクチン：乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン（化学及血清療法研究所）を使用した。添付の説明書に従い注射用水 1 ml にて溶解してワクチン原液とした。

3) 細胞：JCRB セルバンクより分譲された Neuro-2a 細胞(#IF050081)から作製したシードストックを継代したワーキングストックを使用した。培養には牛胎児血清 (FBS) 10%を含む D-MEM 培地を使用した。抗生物質として 100U/ml ペニシリンと 100 mg/ml ストレプトマイシンを添加した。ウイルス接種時の培養には FBS 濃度を 2%に減らした培地を使用した。培養には温度 37°C、二酸化炭素濃度 5%に設定した CO₂ インキュベーターを使用した。ウイルス接種後は設定温度を 33~35°C に下げて培養を行った。

4) *in vitro* 不活化試験法：図 1 に示すように現行法、プレート/ELISA 法およびボトル/ELISA 法の 3 つの方法で行った。0.391, 1.56 または 6.25 フォーカス形成単位 (ffu) /0.02ml になるように 4 倍段階希釈したウイルスをスパイクしたワクチン原液を作製した。現行法およびプレート/ELISA 法では、前日に 96 well 培養プレートに播種した Neuro-2a 細胞の上清を除き、10ml の培養液に上記希釈ウイルス液 2 ml を加え、各 well につき 120 μ l ずつ分注した。ボトル/ELISA 法では、前日に 75cm² 培養ボトルに播種した Neuro-2a 細胞に、希釈ウイルス液を各ボトル 2 ml

ずつ加えた。72 時間培養し、現行法およびプレート/ELISA 法では、上清 50 μ l を新しく Neuro-2a 細胞を播種した 96 well プレートに移した。ボトル/ELISA 法では、96 well プレートに播種した Neuro-2a 細胞を各ボトルにつき 24well ずつ使用し、上清を回収して 50 μ l/well ずつ分注した。これらを、72 時間培養した。

5) 直接蛍光抗体法：培養後の細胞の上清を除き、紫外線点灯下で 80%のアセトンを用いて 20 分間固定した。固定後の細胞は使用まで-20°C に保存した。200 倍希釈された FITC 標識 Anti Rabies monoclonal globulin (FUJIREBIO) により染色し、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS) を用いて観察した。狂犬病抗原陽性細胞の特異的蛍光が確認された well を陽性 well とした。

6) ELISA：固定は 80%アセトン (Wako) もしくはマイルドホルム 10N (Wako) で固定後 0.5%TritonX で透過処理を行った。その後 10%FBS で室温 1 時間のブロッキングを行った。一次抗体として狂犬病ウイルス G タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 ab1002(abcam) および ab82460(abcam)を使用した。二次抗体として Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) preadsorbed (ab97040) (piece)を使用した。発色試薬は ELISA POD 基質 TMB キット popular (Nacalai tesque)を、停止試薬として 1 mol/L 硫酸(Nacalai tesque)を使用した。検出は iMark (Bio-Rad)を使用した。

C. 研究結果

1) 条件検討：ELISA 法の条件について、①固定法、②一次抗体の種類、③一次抗体

の希釈率, ④二次抗体の希釈率についての検討を行った。

①固定法の検討のため, 狂犬病ウイルス感染 N2a 細胞または非感染 N2a 細胞について, A ; 80%アセトンで室温 20 分の固定, B ; 緩衝ホルマリン液で 20 分の固定後, 0.5%TritonX による 20 分の透過処理の二種類の固定法を検討した。②③一次抗体として二種類のモノクローナル抗体について, 二倍段階希釈で 400 倍から 6400 倍希釈までについて検討した。④二次抗体は 200 倍, 400 倍および 800 倍について検討した。

各組み合わせでの OD 値を比較した結果, 最適な条件はホルマリン固定で, 一次抗体として ab82460 を 1600 倍希釈で使用, 二次抗体は 400 倍希釈で使用した場合であった。

2) 培養条件の検討 : 図 1 に示すように, 現行法に加えて, 現行法と同じ培養条件で培養した後に検出を ELISA 法に換えた方法(プレート/ELISA 法)および最初の培養をプレートに換えて培養ボトルで行う方法(ボトル/ELISA 法)について検討を行った。その結果図 2 に示すように, いずれの方法においても一番少ないウイルス量である 0.391 ffu/0.02ml を検出することが出来た。また, 現行法と比較してプレート/ELISA 法の方が多くの well で陽性となった。ボトル/ELISA 法では使用した 24well 全てで陽性となったため検出率は 100%となった。

3) ELISA 法のプロトコル作成 : 条件検討の結果, ELISA 法のプロトコルを作成した。2.0×10⁵/ml に希釈した N2a 細胞を T75 培養ボトルに 1 本あたり 15ml 播種し, 37℃

で 1 日培養する。その後, ワクチン原液 2 ml を加え, 33~35℃ で培養する。3 日目に培養液を回収し, 2,900xg で 5 分間遠心し, その上清を新たに 96well に播種して 1 日間培養した N2a 細胞 24well 分に 50 μl/well ずつ分注し, さらに 33~35℃ で 3 日間培養する。上清を除き 2 回 PBS で細胞を洗浄する。干渉ホルマリンを用い, 室温で 20 分間固定する。0.5%TritonX による室温 20 分間の透過処理後, 10%FBS を用いて 1 時間ブロッキングを行う。PBS での洗浄後 1600 倍希釈した一次抗体 40 μl/well を加え, 37℃ で 1 時間反応させる。PBS での洗浄後 400 倍希釈した二次抗体 40 μl/well を加え, 37℃ で 1 時間反応させる。PBS での洗浄後, 発色試薬 100 μl/well を加え, プレートミキサーで混合する。室温, 遮光下で 20 分放置する。停止液 100 μl/well を加え混合し, ELISA リーダーで測定波長 450nm の吸光度を測定する。ネガティブコントロール(ワクチン液のみ) 24well 分の平均値の 3 SD を超えた値をポジティブと判定する。

D. 考察

我々が開発した *in vitro* 試験法について, さらに簡便に試験が行える様に検出方法を現行の蛍光抗体法から ELISA 法に変更することを検討した結果, 検出感度は同等かそれ以上であることが分かった。また, 培養方法についても, 最初の培養をプレートからボトルに換える検討を行ったところ, 少なくとも 0.391 ffu/0.02 ml (20 ffu/ml) の検出感度を有することが分かった。ボトルを用いる場合, 最初にワクチンに含まれていたウイルス量を推察するこ

とは出来なくなる一方, 手間については大幅に削減することができる. 今後, 本方法の検出限界についてさらに検討したいと考えている.

E. 結論

狂犬病ワクチンの不活化試験法では, 哺乳マウスを使用した試験が実施されている. 我々は本試験法の代替法としてこれまでに *in vitro* 試験の開発を行ってきた. そこで, 本研究では試験法の簡便化を目指し, 検出法を直接蛍光抗体法から

ELISA 法に変更するための検討を行った. その結果, ELISA 法を用いた場合でも十分な検出感度があることが示された. また, 培養条件についてもより簡便な培養ボトルを使用した方法に転換できることが示唆された.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

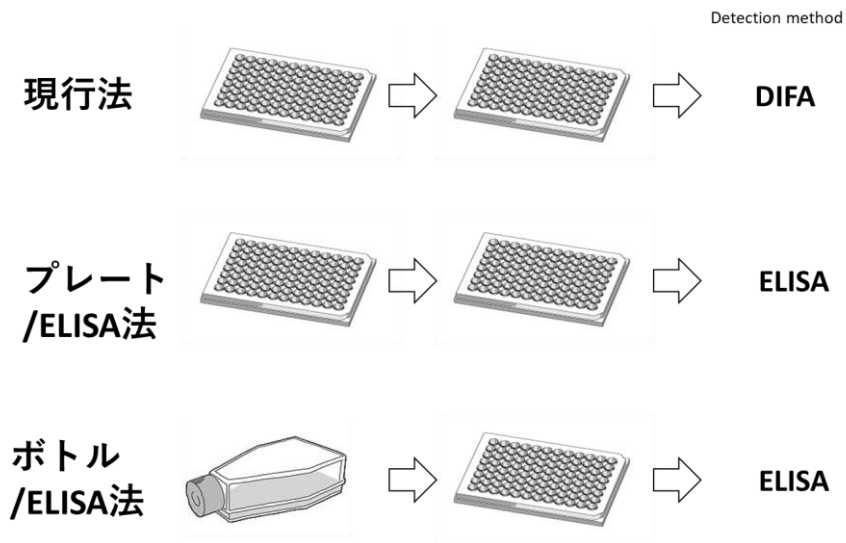


図1；in vitro不活化試験法の改良概要

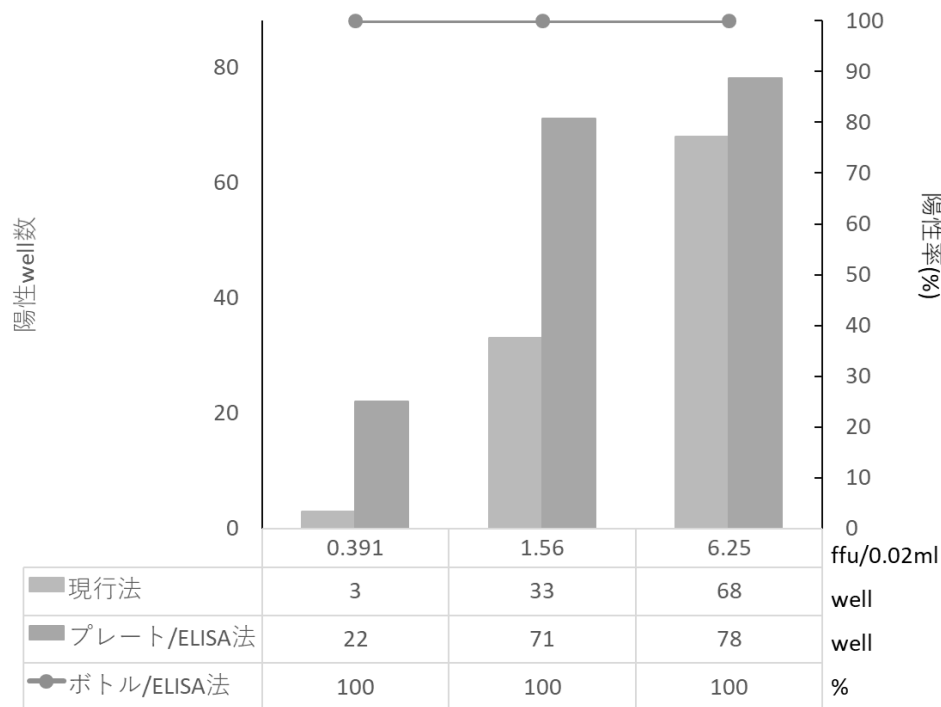


図2；現行法およびボトルおよびプレートを使用したELISA法の感度比較