

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

ワクチン等の品質確保を目的とした新たな国家検定システムの構築のための研究

分担研究報告書

日本脳炎・狂犬病ワクチン国家検定の見直し

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：狂犬病ワクチン検定試験における力価試験の代替法として動物を使用しない抗原 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法を導入することを目的として、EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines : 欧州医薬品品質理事会) 主催のプロジェクト「ヒト狂犬病ワクチンの ELISA 法による力価試験」に参加を行う。実際の試験は来年度から開始予定であるため、本年度は文献により代替法および本プロジェクトの概要について調査した。その結果、サンドイッチ ELISA は最も有望視されており、NIH 法との相同性も高いことが分かった。ELISA 法の実用化によって動物愛護における国際協調だけではなく、効率化および試験精度においても改善が期待される。

A. 研究目的

国家検定は、ワクチン及び血液製剤等の特に注意を要する医薬品に設けられている制度であり、品質確保において重要な役割を担っている。一方で、ワクチンの品質の向上によって国家検定制度は見直しの時期に来ている。本研究班では、製剤のリスクの度合いに応じた試験項目および実施回数の見直しと同時に試験方法の改良についても検討を行っている。試験方法の改良の際には、その試験法の妥当性や試験としての精度および再現性などが重要であることはもちろんであるが、実験動物に対する配慮も重要な課題となる。

狂犬病ワクチンの検定試験では、力価試験、不活化試験、異常毒性否定試験において実験動物が使用されている。ワクチンの

有効性を担保する力価試験は、NIH 法と呼ばれる免疫変量法によって行われており、マウスに 5 倍段階希釈したワクチンを 2 回腹腔内接種した後に攻撃用狂犬病ウイルスを脳内接種し、その防御能をマウスの生死により確認する試験である。この方法は使用動物に著しい苦痛を与えることが問題となっており、我々はこれまでに Refinement (動物が受ける苦痛の軽減) を目的に人道的エンドポイントの導入を行った。しかしながら、究極的には動物を全く用いない方法への転換が望ましい。

そこで、本研究では狂犬病ワクチン検定試験における力価試験の代替法として動物を使用しない抗原 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法を導入することを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、2018年度から2020年度に渡って行われるEDQM (European Directorate for the Quality of Medicines : 欧州医薬品品質理事会) 主催のBSP (Biological Standardisation Programme) 148プロジェクト「ヒト狂犬病ワクチンのELISA法による力価試験」Human Rabies vaccine ELISA potency assayに参加して、国際標準品および日本のワクチンを試料としてNIH法との比較を行い、自家試験および国家検定試験において力価試験としてELISA法が使用可能かを評価する。

実際の試験が開始されるのは2019年度であり、本年度はその準備期間に当たる。そこで、本年度は狂犬病ワクチンの力価試験代替法として、主にELISA法についての研究論文を検索して現在の状況について解析した。

C. 研究結果

1. 力価試験代替法

力価試験の代替法のうち動物を使用しない方法としては以下3つが主に検討されてきた。①抗原結合試験 (Antigen Binding Test) : 段階希釈したワクチンと一定量の中和抗体を反応させ、狂犬病ウイルスを加えてフォーカス減少法を行う。多くの抗原が含まれているほど中和抗体が吸着され、中和力価が低くなる。②単純放射状免疫拡散法 (single radial immunodiffusion method) : 主要抗原であるG(糖)タンパク質に対する抗体を含むゲルに穴を開けてワクチンを入れ、沈

降輪の大きさからタンパク含量を測定する。③ELISA法 : ワクチンに含まれるGタンパク質の量を酵素標識抗体によって検出することにより含量を測定する。これらのうち、ELISA法が最もよく検討されており、下記に示すいくつかの方法がある。

2. ELISA法の種類

1. 間接ELISA : 段階希釈したワクチンと一定量の中和抗体を反応させたものをプレート上の精製抗原と反応させ、酵素抗体により検出する。OD値が低い方が抗原量が多いと判定される。
2. 直接ELISA : Essen-ELISAとも呼ばれる。ワクチンを直接プレートに貼り付け、酵素標識抗体で抗原量の測定を行う。
3. サンドイッチELISA : Gタンパク質に対する抗体をコートしたプレートにワクチンを加え、捕捉された抗原を検出用の抗体で検出する。

3. これまでの研究

これまでの研究において、Gタンパク質の構造が非常に重要であることが明らかになっている。つまり、Gタンパク質はウイルス粒子上では3量体を形成しているが、このフォームのみが感染防御に働く免疫を惹起できるのである。そのため、検体をゲル濾過等によって処理して事前にsolubleのGタンパク質を除いておく、もしくは、3量体のみを認識するモノクローナル抗体を使用するという2つのアプローチが取られてきた。ELISA法のうち最もよく研究されているのは サンドイ

ッチ ELISA である。本法による研究では概ね NIH 法との高い相同性(0.71～0.99)が得られている。

4. BSP148 プロジェクトの事前実験:本プロジェクトの事前実験として3種類のワクチンを使用して、3つの異なる抗体を用いたサンドイッチ ELISA を用いた事前実験が行われ、その結果が論文として発表されている(参考文献10) 当該研究では Sanofi-Pasteur, Novartis Vaccines&Diagnostics および GlaxoSmithKline の3社のワクチンを使用し、G タンパク質に対するポリクローナル抗体および2種類のモノクローナル抗体を組み合わせた3種類のプロトコルについて、各ウイルス株に対する反応性、結果の安定性および抗体の供給等を比較した結果、捕捉抗体として Mab WI 1112, 検出抗体として Mab D1-25 を用いた方法が最も適していると判断された。本試験法は NIH 法に対して 0.78～0.99 という高い相同性を示している(参考文献11)。

D. 考察

これまでの研究においてサンドイッチ ELISA 法は現在のゴールドスタンダードである NIH 法と比較して高い相同性を有することが証明されている。工程内管理試験としてはすでに ELISA 法を使用している製造所も多い。また、動物用ワクチンでは ELISA 法または抗原結合試験のみによる検定が日本を含むいくつかの国で行われている。当該研究で使用されているモノクローナル抗体はパスツール研究所とウィスター研究所で作製されたものであ

るが、これらの抗体については、今後市販化される予定であり、誰でも入手が可能となる。これらのことから今回検討予定の ELISA 法は持続可能で非常に有用な方法であると期待される。

次年度は実際に本法を使用して国際標準品を用いた実験を行う予定であるが、バリデーション終了後には、実際の検定品についても NIH 法と同時に ELISA 法を使用してデータの蓄積を行いたい。また、生物基上は必要な時に NIH 法を行うことができるように、併記の形で改正を行いたいと考えている。

E. 結論

サンドイッチ ELISA はこれまでの研究から力価試験の代替法として最も有望視されている。ELISA 法の実用化によって動物愛護における国際協調だけではなく、効率化および試験精度においても改善が期待される。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献リスト

1. Rabies vaccine potency control: comparison of ELISA systems for antigenicity testing. Rooijackers EJ, Uittenbogaard JP, Groen J, Osterhaus AD. J Virol Methods, 1996
2. Use of ELISA for in vitro Potency Test of Rabies Vaccines for Animal Use. K. Gamoh, M. Senda, O. Itoh, M. Muramatsu, N. Hirayama, R. Koike, Y. S. Endoh, N. Minamoto. Biologicals, 1996

3. Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method. Fournier-Caruana J, Poirier B, Haond G, Jallet C, Fuchs F, Tordo N, Perrin P. *Biologicals* 2003
4. Establishment of a potency test by ELISA for a rabies vaccine for animal use in Japan. Gamoh K1, Shimazaki Y, Senda M, Makie H, Itoh O, Muramatsu M, Hirayama N, Hatakeyama H. *J Vet Med Sci*, 2003
5. A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. Nagarajan T, Reddy GS, Mohana Subramanian B, Rajalakshmi S, Thiagarajan D, Tordo N, Jallet C, Srinivasan VA. *Biologicals*, 2006
6. A relevant in vitro ELISA test in alternative to the in vivo NIH test for human rabies vaccine batch release. Gibert R, Alberti M, Poirier B, Jallet C, Tordo N, Morgeaux S. *Vaccine* 2013
7. A novel site-II directed glycoprotein estimation ELISA to aid rabies vaccine manufacture for veterinary and human use. Abhinay G, Dessain S, Srikanth A, Senthilkumar R L, Vidyasagar P, Praveen A, Chandrasekhar Reddy RV, Swapna Reddy E, Rajendra L. *Vaccine* 2014
8. A versatile in vitro ELISA test for quantification and quality testing of infectious, inactivated and formulated rabies virus used in veterinary monovalent or combination vaccine. Sigoillot-Claude C1, Battaglio M, Fiorucci M, Gillet D, Vimort A S, Giraud Y, Laurent S, Vaganay A, Poulet H. *Vaccine* 2015
9. Rabies vaccine response measurement is assay dependent. Moore SM, Pralle S, Engelman L, Hartschuh H, Smith M. *Biologicals* 2016
10. Replacement of in vivo human rabies vaccine potency testing by in vitro glycoprotein quantification using ELISA - Results of an international collaborative study. Morgeaux S, Poirier B, Ragan CI, Wilkinson D, Arabin U, Guinet-Morlot F, Lewis R, Meyer H, Riou P, Shaid S, Volokhov D, Tordo N, Chapsal JM. *Vaccine* 2017
11. G-protein based ELISA as a potency test for rabies vaccines. Chabaud-Riou M, Moreno N, Guinchard F, Nicolai MC, Niogret-Siohan E, Sève N, Manin C, Guinet-Morlot F, Riou P. *Biologicals* 2017
12. Development of a relative potency test using ELISA for human rabies vaccines. Wang Z, Sun Y, Wu X, Carroll DS, Lv W, You L, Ji Y, Shi J, Yan J, Xu G, Meng S. *Biologicals* 2018