

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

インフルエンザワクチンの国家検定試験の精度維持に関する調査・研究

研究分担者	板村 繁之	国立感染症研究所	インフルエンザウイルス研究センター
研究協力者	原田 勇一	国立感染症研究所	インフルエンザウイルス研究センター
	嶋崎 典子	国立感染症研究所	インフルエンザウイルス研究センター
	佐藤佳代子	国立感染症研究所	インフルエンザウイルス研究センター

研究要旨：ワクチンの品質は製造販売承認、GMP 調査、国家検定などの制度によって維持されている。近年、製造・試験記録等要約書（SLP）の審査が国家検定の一部として運用され始めた。また、ワクチン製造技術の向上や GMP に基づく品質管理能力の向上などから国家検定試験の試験項目や国家検定として二重に品質管理試験を実施していく必要性についての見直しが必要となっている。本研究では、平成 28 から 30 年度までの 3 年間のインフルエンザ HA ワクチンの国家検定試験である力価試験の再現性について解析を行った。その結果、ワクチンの力価試験として実施されている SRD 試験では、事前に十分な試験条件の検討や測定基準を確立すると、かなり再現性の良い試験法であることが分かった。加えて標準抗原の安定性に与える品質や試験者の習熟度が試験成績に大きな影響を与えることに留意すべきであることも分かった。全ロット検定から一部ロット検定の実施も充分検討に値すると考えられる。

A. 研究目的

ワクチンの国家レベルでの品質管理は、製造販売承認、GMP 調査、国家検定などの制度によって維持されている。2012 年には製造・試験記録等要約書（SLP）に対する審査が国家検定の一部として本格的に運用されるようになった。国家検定ではこれまで全ロットに対して検定試験を実施してきた。しかしながら、ワクチン製造技術の発展による品質の向上、また GMP に基づく品質管理能力の向上があり、一方で人的、経済的資源の合理化が求められている状況を考慮すると、国家検定の試験項目や国家検定として二重に品質管理試験

を実施していく必要性についても見直す時期と考えられる。

本研究では、国家検定試験の精度維持を図ること及び品質管理試験として二重に独立して試験を実施する有益性の考察に資するために、継続して平成 30 年度のインフルエンザ HA ワクチンの国家検定試験である力価試験の再現性について解析を行った。

B. 研究方法

平成 28 年度から 30 年度までに本邦で販売されたインフルエンザ HA ワクチンの力価試験（一元放射免疫拡散試験法 [SRD 試

験法])の製造所での試験成績と感染研での検定成績について解析を行った。ワクチンは、デンカ生研株式会社、一般財団法人阪大微生物病研究会、北里第一三共ワクチン株式会社、KM バイオロジクス株式会社の4製造所で製造された。各年度のワクチンに含有されるワクチン製造株を表1に示した。平成26年度まではA/H1、A/H3とBの3価ワクチンであったが、平成27年度以降は4価ワクチンとして系統の異なるB型が1株増えて、山形系統(Byam)とビクトリア系統(Bvic)の両系統のウイルス株が含有されている。各ワクチンの力価(HA含量)について各製造所での測定値と感染研での検定における測定値の比を求め、その対数について分布を解析した。

C. 研究結果と考察

SRD試験はワクチンの主要な有効成分であるヘマグルチニン(HA)たん白質の含有量を、アガロースゲル内に一定量のHA特異的な抗血清を添加して、抗原抗体反応によって形成される沈降輪の面積をHA含量既知の標準抗原と同時に測定することによって定量する試験法である。インフルエンザワクチンは毎年ワクチン製造株の見直しが行われワクチン株が変更になる特徴を有するワクチンであり、SRD試験に使用する標準抗原や参照抗血清を毎年製造する必要がある(表1)。

試験の再現性を検証するために、同一ロットのワクチンの力価について製造所での試験成績と感染研での検定成績の比を計算し、その対数値の分布を解析した(図1)。通常、SRD試験では、異なる実験室での同一検体の測定値の比の対数分布は

正規分布で近似され、対数で-0.1から0.1の範囲にほぼ99%が含まれるような再現性であることが分かっている。これらのデータについて、自家試験成績/感染研成績の対数値が、-0.1から0.1の範囲に出現する頻度の積算値(積算%)を求めたところ、平成28年度のByamの98.3%(57/58ロット)及び平成30年度のA/H3N2の93.1%(54/58ロット)、Byamの94.8%(55/58ロット)と乖離が認められるものがあった。これまでに、これほどの乖離が認められたことはなかったので、それら対象の検体について再度試験を実施してその原因を調べた。再現性の確認試験を2回繰り返したところ、A/H3N2は検定成績よりワクチン力価が高く測定されるケースがあり、更に乖離が広がった。一方、Byamは顕著な乖離は見られなくなった。繰り返し試験で乖離が広がった原因として、測定の基準になっている標準抗原自体の力価低下が懸念されたため、安定性を保存温度毎に調べたところ、A/H3N2は-80℃と比較して現行管理温度の4℃保存(8月から6ヶ月間)で有意な力価低下が認められ、標準抗原のバイアル間ばらつきも大きかった。比較として調べたByamの標準抗原は、有意な低下が認められなかった。従って、検定における自家試験成績と感染研成績の測定乖離は、A/H3N2では、現行の4℃保管における標準抗原の経時的な不安定性さと、バイアル間ばらつきに起因すると推定され、標準抗原の管理条件を見直す必要性が示唆された。Byamでは、標準抗原は経時的に安定していたことから、ワクチンに対する測定誤差が偶発的に大きく出現したと考えられ、再現性良く試験実施するために試

験者の習熟が重要であることが示唆された。

一部の検体について、これまでに認められなかった乖離があったが、その他について大きな乖離は認められず全体としての試験精度は確保できていたと評価された。ワクチン株が毎年のように更新され、試験に使用する標準抗原等もロット変更があるにもかかわらず、一般的に SRD 試験の実験室間再現性は高いものであることがわかった。また、平成 26 年度まではインフルエンザ HA ワクチンは A/H1N1、A/H3N2 及び B 型ウイルスの 3 種類のウイルス株で製造された 3 価ワクチンであった。しかしながら、B 型ウイルスについては抗原性の大きく異なる 2 系統のウイルスの混合流行が常態化してきたために、平成 27 年度からは B 型 2 系統のウイルス株を含有する 4 価ワクチンに変更になった。SRD 試験では使用する標準抗原や参照抗血清の反応性によっては B 型 2 系統のウイルス間で交差反応が認められるので、HA 含量を正確に測定するには事前検討が必要である。しかしながら、3 価から 4 価に変更になった平成 26 年度から 27 年度においても高い試験の再現性が確認された。このような高い試験成績の再現性を維持するために、毎年、検定開始までに試験条件や標準抗原の HA 含量値付けの作業の際に、ワクチン製造所とも共同で試験検討を実施している。このように SRD 試験では試験精度、再現性の確保には十分な検討が必要であることから、検定によって独立して二重に確認することはワクチンの品質を確保するために有益と考えられる。一方で、品質の良い標準抗原等を用いて一度試験条

件や測定基準を確立すると、かなり再現性の良い試験法であることも今回の解析で分かった。

現在、年間 60 から 80 ロット程度が国家検定に提出されているが、変動要因の多い SRD 試験においても最初の数ロットについて試験をすれば試験成績の傾向について評価できるため、全ロットについて試験を実施しなくてもワクチンの品質を確保できる可能性は高く、全ロット検定から一部ロット検定の実施も充分検討に値すると考えられる。

D. 結論

インフルエンザ HA ワクチンの力価試験として実施されている SRD 試験では、標準抗原の品質を高め、事前に十分な試験条件の検討や測定基準を確立すると、かなり再現性の良い試験法であることが分かった。従って、全ロット検定から一部ロット検定の実施も充分検討に値すると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Noriko Shimasaki, Akira Okaue, Ritsuko Kikuno, Katsuaki Shinohara. Comparison of the filter efficiency of medical nonwoven fabrics against three different microbe aerosols. *Biocontrol Science*, 23(2), 61-69 (2018)
 - 2) Kayoko Sato, Yoshimasa Takahashi, Yu Adachi, Hideki Asanuma, Manabu Ato, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura. Efficient protection of mice from influenza A/H1N1pdm09 virus challenge

infection via high avidity serum antibodies induced by booster immunizations with inactivated whole virus vaccine. *Heliyon* 5 (1), e01113 (2019)

- 3) Sun, L., Kono, N., Toh, H., Xue, H., Sano, K., Suzuki, T., Ainai, A., Orba, Y., Yamagishi, J., Hasegawa, H., Takahashi, Y., Itamura, S., Ohnishi, K. Identification of Mouse and Human Antibody Repertoires by Next-Generation Sequencing. *J. Vis. Exp.* (145), e58804, doi:10.3791/58804 (2019).

2. 学会発表

- 1) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Takato

Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura. Establishment of in vitro assays for the potency of the influenza vaccines based on the macrophage activations. 6th International Influenza Meeting, Muenster, Germany, 2018年9月

- 2) Noriko Shimasaki, Takato Odagiri, Shigeyuki Itamura, Development of antigen-capture ELISA to measure the HA content of two influenza B vaccine viruses included in quadrivalent influenza vaccine. 第66回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018年10月.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 わが国で使用されたインフルエンザワクチン製造株のリスト

インフルエンザシーズン	ウイルスの型及び亜型	ワクチン製造株	標準抗原ロット番号	参照抗血清ロット番号
平成28年度	A/H1N1pdm09	A/California/7/2009 (X-179A)	2016AH1A	2014AH1-1
2016/17season	A/H3N2	A/Hong Kong/4801/2014 (X-263)	2016AH3A	2016AH3-1
	B/Yam	B/Phuket/3073/2013	2015BYB	2015BY-1
	B/Vic	B/Texas/2/2013	2015BVA 2015BYB	2015BV-1
平成29年度	A/H1N1pdm09	A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180)	2017AH1B	2017AH1-1
2017/18season	A/H3N2	A/Hong Kong/4801/2014 (X-263)	2016AH3A	2016AH3-1
	B/Yam	B/Phuket/3073/2013	2017BYA	2017BY-1
	B/Vic	B/Texas/2/2013	2017BVA 2017BYA	2017BV-1
平成30年度	A/H1N1pdm09	A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180)	2017AH1B	2017AH1-1
2018/19season	A/H3N2	A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (IVR-186)	2018AH3B	2016AH3-1
	B/Yam	B/Phuket/3073/2013	2018BYA	2017BY-1
	B/Vic	B/Maryland/15/2016 (NYMC BX-69A)	2018BVA 2018BYA	2018BV-1

