

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

B型肝炎ワクチンとセービン株由来不活化ポリオワクチンの
in vitro 試験法に関する研究
(肝炎・ポリオワクチン国家検定の見直し)

研究分担者 染谷 雄一 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究協力者 清原 知子 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨：B型肝炎ワクチン、および、4種混合ワクチンに含まれるセービン株由来不活化ポリオワクチンについて、実験動物を用いて免疫原性を評価する in vivo 試験から抗原量を測定する in vitro 試験への移行を促すための基礎的データを得るために、加温処理したワクチン製剤の in vitro 試験成績と in vivo 試験成績の評価を行った。いずれのワクチンも製剤による差異があること、セービン株由来不活化ポリオワクチンでは血清型による差異があることから、一定の相関を見出すことは難しいが、概ね抗原量の低下に応じて免疫原性は低下する傾向にあった。製剤、あるいは、血清型によっては、抗原量は低下していても高い免疫原性を維持しており、製剤毎の基準を満たす抗原量が測定できていれば免疫原性は確保できると考えられる。

A. 研究目的

B型肝炎ワクチン、および、4種混合ワクチンに含まれるセービン株由来不活化ポリオワクチンの国家検定では、その力価測定に小動物(それぞれ、マウス、ラット)を用いた in vivo 試験が行われている。動物実験に関する 3R (Replacement, Reduction, Refinement) の観点から、将来的に抗原量を測定する in vitro 試験の導入が必須と考える。日本国内で実用化されている B型肝炎ワクチン 2 製剤、セービン株由来不活化ポリオワクチンを含む 4種混合ワクチン 2 製剤について、in vitro 試験法の確立を目指すと共に、in vivo 試験成績と in vitro 試験成績との相関、関連

性について検討した。

B. 研究方法

① B型肝炎ワクチンについて

市販の組換え沈降B型肝炎ワクチン(2メーカー、各製剤 2 ロット)を試験対象とした。それぞれのメーカーの製剤において、1ロット(冷蔵)を参照品とし、もう1ロットから冷蔵のままの無処置ワクチンと加温変性させた劣化ワクチンを作製した。劣化ワクチンは、in vitro 試験で相対力価の低下を確認した。参照品、無処置ワクチン、劣化ワクチンについて in vivo 試験を行い、劣化ワクチンの in vitro 相対力価の低下が in vivo 相対力価の低下に反

映されているかを確認した。in vitro 試験は既報の通り、in-house ELISA を実施した。in vivo 試験は国家検定試験法に準じて行った。

② セービン株由来不活化ポリオワクチンについて

市販の沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ（セービン株）混合ワクチン（4 種混合ワクチン）（2 メーカー、各 1 ロット）を試験対象とした。in vitro 試験である D 抗原含量試験（D 抗原 ELISA）は日本ポリオ研究所（現 阪大微研会）が開発した方法を一部変更して感染研法とした。それぞれの 4 種混合ワクチン製剤を 37℃、50℃で処理し、D 抗原含量を in vitro 試験法で測定した。また、37℃、50℃で 1 週間加温処理したワクチンの免疫原性測定（in vivo 試験）は国家検定に準じてラット（Slc:Wistar、メス、接種時 8 週齢）を用い、中和試験を実施した。いずれも、加温処理しない、4℃保存の製剤の値と比較した。

更に、参照不活化ポリオワクチン（セービン株）（以下、国内参照品）についても 37℃で 1 週間処理し、D 抗原含量試験とラット免疫原性試験を実施し、加温未処理の-80℃保存の国内山椒品の値と比較した。（倫理面への配慮）

動物を用いる実験は、国立感染症研究所が定める動物実験計画書を実験動物委員会に提出し、承認を受けた後実施する。

C. 研究結果

① B 型肝炎ワクチン

(1) メーカーA の製剤について

冷蔵ワクチンの相対力価は in vivo 相対

力価、in vitro 相対力価の順に 2.88 単位、0.97 単位であった。一方、劣化ワクチンは 2.93 単位、0.41 単位であった。加温変性によって in vitro 相対力価が 0.97 単位から 0.41 単位に低下（-57.7%）しているにもかかわらず、in vivo 相対力価は 2.88 単位と 2.93 単位で有意な変化は認められなかった。

(2) メーカーB の製剤について

冷蔵ワクチンの相対力価は in vivo 相対力価、in vitro 相対力価の順に 3.09 単位、0.57 単位であった。一方、劣化ワクチンは 1.28 単位、0.14 単位であった。加温変性によって in vitro 相対力価が 0.57 単位から 0.14 単位に低下（-75.4%）し、in vivo 相対力価も 3.09 単位から 1.28 単位に低下した。

② セービン株由来不活化ポリオワクチン

(1) メーカーC の製剤について

37℃で加温処理することにより血清型毎の D 抗原含量は表 1 のように顕著に低下した。

（表 1. 加温に伴う D 抗原含量の変化：加温未処理（4℃保存）の D 抗原含量に対する相対値として残存 D 抗原含量を示した）

血清型	37℃、1 週間	37℃、2 週間
1 型	42%	38%
2 型	35%	27%
3 型	49%	36%

50℃で加温処理すると、1 週間でいずれの血清型についても D 抗原は消失（測定限界以下）した。

一方、37℃、50℃で1週間処理後、ラットに接種して得られた血清に含まれる中和抗体価は表2のようになった。

(表2. 免疫原性への加温影響: それぞれの条件で10匹のラットを用い、中和抗体価(log2)の平均値を示した)

血清型	4℃	37℃	50℃
1型	7.0	4.3	- *
2型	6.6	6.6	0.9
3型	3.0	2.1	- *

(* 有意の中和活性を示さない)

37℃処理した製剤を接種したラットでは、血清型1型と3型に対する中和抗体価が低下したが、2型に対する中和抗体価は顕著な変化が認められなかった。

(2) メーカーDの製剤について

37℃で加温処理した製剤の残存D抗原含量は表3のようになった。

(表3. 加温に伴うD抗原含量の変化: 加温未処理(4℃保存)のD抗原含量に対する相対値として残存D抗原含量を示した)

血清型	37℃、1週間	37℃、2週間
1型	32%	32%
2型	13%	5%
3型	16%	4%

メーカーCの製剤よりも低下の程度は大きかった。50℃処理では同様に、1週間でいずれの血清型についてもD抗原は消失(測定限界以下)した。

一方、37℃、50℃で1週間処理後、ラットに接種して得られた血清に含まれる

中和抗体価は表4のようになった。

(表4. 免疫原性への加温影響: それぞれの条件で10匹のラットを用い、中和抗体価(log2)の平均値を示した)

血清型	4℃	37℃	50℃
1型	7.2	6.8	- *
2型	6.5	4.8	1.3
3型	1.8	0.8	- *

(* 有意の中和活性を示さない)

37℃処理した製剤を接種したラットでは、すべての血清型に対して中和抗体価の低下が認められた。

(3) 国内参照品 Lot 12A について

-80℃に保管される国内参照品 Lot 12A を37℃で1週間処理後、D抗原含量試験とラット免疫原性試験を実施した。表5に残存D抗原量(相対値)と残存免疫原性力価(相対値)を示す。

(表5. 37℃で1週間処理した国内参照品 Lot 12A の残存D抗原含量と残存免疫原性力価: 残存D抗原含量は融解直後に測定されたD抗原含量に対する相対値として、残存免疫原性力価は加温未処理の免疫原性力価に対する相対値として示した)

血清型	残存D抗原量	残存免疫原性相対力価
1型	43%	0.52
2型	72%	1.16
3型	78%	0.45

加温処理することにより、すべての血清型でD抗原含量の低下が認められ、1型

と 3 型については免疫原性の低下も有意であった。一方、2 型の免疫原性については変化が認められなかった。

D. 考察

① B 型肝炎ワクチンについて

in vivo 相対力価と in vitro 相対力価の相関はメーカーによって異なった。メーカー A では in vitro 相対力価が低いにもかかわらず in vivo 相対力価は維持されており、今回の加温変性条件では十分な抗原量が残っていて免疫原性も維持されたと推察された。メーカー B は in vitro 相対力価の低下によって免疫原性も低下しており、in vitro 相対力価が in vivo 相対力価に反映されていることが確認された。

② セービン株由来不活化ポリオワクチンについて

4 種混合ワクチンは 50°C で処理すると、中和抗体誘導に関わる D 抗原を検出限界以下に消失させ、免疫原性を著しく減少、あるいは、消失させたが、37°C 処理では D 抗原含量が残存した。この D 抗原含量低下の度合いは製剤毎に異なり、両製剤の組成の違いが影響すると考えられる。また、37°C で 1 週間処理した製剤の中和抗体誘導能は、概ね D 抗原量の低下の程度に応じ低下していたが、製剤の違いや血清型毎のラットへの免疫原性の差異があることから、必ずしも一定の相関を見出すことは難しい。また、国内参照品 Lot 12A を用いた検討でも、加温処理により D 抗原含

量、免疫原性の低下が認められるものの、血清型による違いは明らかである。

E. 結論

① B 型肝炎ワクチンについて

メーカー A もメーカー B も製造工程の変更が行われたため、新規製造ワクチンで再度 in vivo および in vitro 相対力価のバリデーションを取り直す予定である。その際には上記のメーカー特性や加温変性条件を再検討しバリデーションを進める必要がある。

② セービン株由来不活化ポリオワクチンについて

4 種混合ワクチンの加温処理に伴う D 抗原量の低下 (in vitro 試験の結果) は概ね免疫原性の低下 (in vivo 試験の結果) に反映される。また、全体的に、D 抗原含量の低下の度合いに比べて、免疫原性の低下の度合いは小さく、製剤の D 抗原含量の測定に問題がなければ、その免疫原性は確保できると結論できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 染谷雄一、清水博之「ポリオワクチンとポリオウイルスのバイオリスク管理」ウイルス 68(1):31-40, 2018.

2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし