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
　　　　　　河原　円香　国立感染症研究所　ウイルス第一部　研究員
　　　　　　林　昌宏　　国立感染症研究所　ウイルス第一部　室長



研究要旨：狂犬病は致死率 100％の恐ろしい人獣共通感染症であるが、ワクチンによって予防および防御可能である。狂犬病ワクチンの安全性を確認するうえで、不活化狂犬病ワクチンの残存ウイルスを検出する不活化試験は非常に重要である。本試験は通常多くの動物を使用するため，長い時間と多大な労力を要する。動物を使用しない代替法の開発および導入は、3R の視点からも求められている。我々はこれまでに哺乳マウスに替えて培養細胞を用いた *in vitro* アッセイについて報告してきたが、本研究ではこの改良に取り組んだ。培養を 96well プレートから 75cm$^2$ フラスコに変更することで、検出感度の向上と実験操作の簡便化を図った。また検出法を高額な機械と技術を必要とする Direct immunofluorescent assay (DIFA)から、簡便な Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)に変更した。その結果、以前報告した方法とほぼ同じ高い検出感度を得ることができたことから、高感度、簡便かつ安価な検出系を開発することができたと考える。


## A. 研究目的

ヒト用狂犬病ワクチンは、培養細胞または鶏胚初代培養細胞を用いて培養した狂犬病ウイルスをβプロピオラクトン等で不活化することにより製造されている。WHO の推定では毎年 1500 万人が暴露後予防のため、狂犬病ワクチンを接種するとされており、ワクチンの評価を迅速かつ簡便、および安価に行うことは安定したワクチン供給の面から重要である。ワクチンを含む生物学的製剤はロットリリース前に安全性と有効性を担保するための試験を受ける。一般的に狂犬病ワクチンでは、物理化学試験に加えて動物を使用した力価試験および不活化試験がおこなわれている。

不活化試験は、国際的または各地域のガイドラインに従って、ワクチン製剤に感染性ウイルスが残留していないことを確認するために実施されている。本試験は多くの場合、哺乳マウスや成熟マウスを使用して行われているが、動物試験の代替・改善・削減（3R）の観点からその代替法の開発が求められている。

我々の研究グループはこれまでに、不活

化狂犬病ワクチンの残存ウイルス検出のための高感度 *in vitro* アッセイを開発し、十分な感度と信頼性を持つ系であることを示した（引用文献）。しかし本法でウイルス抗原の検出に用いられている Direct immunofluorescent assay (DIFA)は高額である蛍光顕微鏡を使用する必要があり、またその観察は特異的蛍光と非特異的蛍光を見分けるための熟達した技術が必要とされる。そのため、一部の発展途上国では実施が難しいという問題があった。一方、抗原や抗体の検出に広く用いられている Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（ELISA）に使用するプレートリーダーは蛍光顕微鏡を導入するよりも安価に入手できる。また、結果が数値として現れるため施行者による評価のばらつきが少ない。

そこで、本研究では簡便かつ低価格で行うことのできる *in vitro* アッセイ系の確立を目的として、ウイルス抗原の検出方法を DIFA から ELISA に変更するための検討を行った。

## B. 研究方法

### DIFA

培養上清を除去し、80%Aceton 100μl/well を加え室温で 20 分間 UV 照射しながら放置して細胞を固定した。PBS で 500 倍希釈した FITC-Anti Rabies Monoclonal Globulin (FUJIREBIO）を、40μl/well 加え、37℃で 40 分間反応させ、PBS で洗浄後蛍光顕微鏡でウイルス抗原陽性細胞を観察した。同じ培養液を接種して培養した 24well のうち 1well でも抗体反応が確認できた区画は陽性と判断した。

### ELISA

ウイルス接種 2 日後に培養上清を除去し、ホルマリンを 100μl/well 分注し室温で 30 分間 UV 照射しながら放置して細胞を固定した。ホルマリンを除去し PBS で洗浄後、0.5% Triton-100 を 100μl 加え、10 分間室温で静置し透過処理をした。洗浄後 10%FBS-PBS を 100μl/well 分注し室温で 1 時間静置して blocking した。洗浄後 PBS で 1600 倍に希釈した anti-Rabies Virus Glycoprotein 1C5 (Abcam ab824609) を 40μl/well 加え 37℃で 1 時間反応させた。次に PBS で 400 倍に希釈した HRP-anti mouse IgG(H+L) (Thermo) 40μl/well を加え、37℃で 1 時間反応させた。発色試薬を加えて室温で 20 分間遮光して静置し、停止液を加えてマイクロプレートリーダー(450nm)で吸光度を測定した。

## C. 研究結果

### Infection experiments

検出感度の測定のため、以下の実験を行った（Fig.1）。以前の論文では、ワクチンに含まれる残存ウイルス量を推定する目的で最初の培養を 96well plate で行っていたが、本研究では、作業の効率化と検出率の向上を狙って、初回の培養を扱いが簡便で培養面積の広い 75cm$^2$ フラスコで行うこととした。接種前日に N2a 細胞を 3x10$^6$ cells/15ml になるように調整して 6 つの 75cm$^2$ フラスコに播種した。ウイルス原液を DMEM 培地により 1x10$^2$ ffu/ml になる

ように希釈した。それを更に 1.25, 0.3125, 0.0781, 0.0195, 0.049 ffu/flask となるようにワクチン溶液に加え接種液とした。N2a 細胞を単層培養した 75 $cm^2$ フラスコの上清を除き 2%FBS を含んだ DMEM 培地 13ml を入れ、先に準備した希釈ウイルス接種液 2ml をそれぞれ加えた。陰性対照としてワクチン溶液のみを 2ml 入れたフラスコを準備した。各フラスコを 33℃の $CO_2$ インキュベーターで 72 時間培養した。

狂犬病ワクチン溶液には添加剤や不活化ウイルス粒子が多く含まれ、残存しているウイルスの感染性に影響を与える可能性がある（引用文献）。そこで、以前と同様に残存ウイルスの検出感度を高めるため、継代培養を行った。75 $cm^2$ フラスコの培養上清を回収し、単層になるよう前日に 96well プレートに播種・培養しておいた N2a 細胞に 50µl/well ずつ接種した。この際、1 希釈ごとに 24well 分に接種し、同じセッティングのプレートを 2 枚ずつ作製した。33℃の $CO_2$ インキュベーターでさらに 2 日間培養し固定を行った。各 1 枚をそれぞれ DIFA と ELISA に使用した。なおこの感染実験は 5 人の実験者によって別々の機会に独立して計 10 回行なわれた。

**DIFA および ELISA の比較**

ELISA の測定値は、Blank 測定値の平均値＋3SD（標準偏差）を基準に陽性と陰性を判定した。陽性区は黒字に白文字で示した（Table 1）。DIFA では 0.0195 ffu/assay で全て陽性、0.0049 ffu/assay では 10 回中 2 回が陽性となった（Table1）。一方、ELISA では 0.0781 ffu/assay で全て陽性、0.0195 ffu/assay では 10 回中 6 回で陽性反応を示した（Table1）。

**ELISAassay の検出限界**

ELISA アッセイで得られた吸光度の測定値を用いて検出限界値を決定した。各試験の ELISA 陽性区について、ウイルススパイク量の少ない区から 2 点、Blank 測定値 1 点の計 3 点を用いて X 軸にウイルススパイク量（ffu/frask 値）、Y 軸に吸光度測定値として回帰直線と傾き（slope）を計算した。検出限界値は VICH ガイドラインに従い「3.3×Blank 平均標準偏差÷slope」の式に導入して試験ごとに算出した。その結果検出限界値は 0.015ffu/assay となった（Table 1）。

**D. 考察**

本研究で行った 10 回の感染実験において DIFA と ELISA の二つの検出方法による感度は DIFA の方が若干高かったものの以前報告した *in vitro* アッセイ(DIFA を用いたもの)の検出感度(0.023 ffu/assay)とほぼ同じ(0.0195 ffu/ assay)であった。以前の *in vitro* アッセイは哺乳マウスを用いた *in vivo* アッセイと比較して約 5 倍の感度であることから、今回の ELISA による *in vitro* アッセイは十分な検出感度を持つことが示された。細胞を用いた方法に変更することは、3R の観点から大きな意義を持つと考えられる。また哺乳マウスに接種する方法は 14-21 日の日数が必要であることと比較して、今回の方法ではワクチン接種後 6 日間

で結果を得ることが出来るという利点があり（Fig.1）、本方法を採用することで検定作業の工程を大幅に短縮することが可能になる。

**E. 結論**

本方法は狂犬病ワクチンの不活化試験において動物福祉の改善のみならず、作業工程の短縮による標準事務処理期間の短縮を可能にする。従来の *in vivo* 法より高感度、簡便かつ安価な方法であることからも、試験導入のメリットは大きいと考える。また、ELISA は DIFA に比べ高額な機器や試薬を必要としないため、多くの国において実施が可能になると考えられる。

現在、ワクチンメーカーとワーキンググループを立ち上げ、本法の国家検定および自家試験への導入を検討しているところである。

引用文献

Takayama-Ito M, Nakamichi K, Kinoshita H, Kakiuchi S, Kurane I, Saijo M, Lim CK. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. Biologicals 2014. 42: 42-7.

**F. 研究発表** なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況** なし

Fig.1 不活化狂犬病ワクチン中の残留ウイルスの検出のための ELISA 法

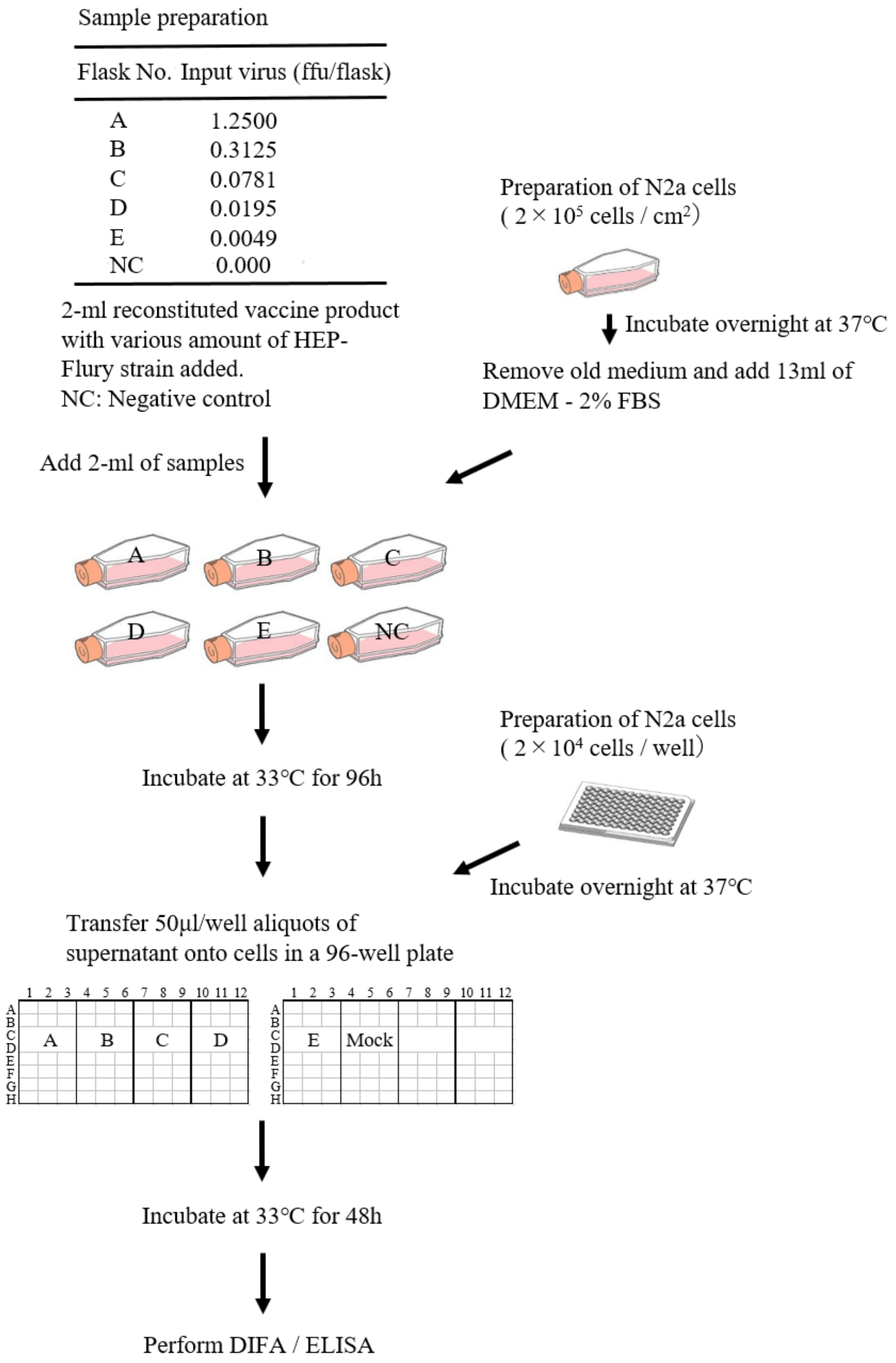

Table 1　DIFA および ELISA 法による残留ウイルスの検出結果と検出限界値

Table 1　Results of detection of residual virus by DIFA and ELISA methods

| Exp.No. | | Input virus (ffu/flask) | | | | | | Brank SD | Slope | DL |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1.2500 | 0.3125 | 0.0781 | 0.0195 | 0.0049 | Brank | | | |
| 1 | DIFA | + | + | + | + | - | | | | |
| | ELISA | **1.246** | **1.224** | **0.783** | **0.696** | 0.202 | 0.203 | 0.018 | 6.0556 | 0.010 |
| 2 | DIFA | + | + | + | + | - | | | | |
| | ELISA | **1.492** | **1.158** | **1.261** | **0.646** | 0.322 | 0.309 | 0.030 | 11.786 | 0.008 |
| 3 | DIFA | + | + | + | + | - | | | | |
| | ELISA | **1.491** | **1.096** | **1.118** | **0.841** | 0.308 | 0.299 | 0.030 | 9.1513 | 0.011 |
| 4 | DIFA | + | + | + | + | - | | | | |
| | ELISA | **1.380** | **1.288** | **1.298** | **0.941** | 0.333 | 0.320 | 0.026 | 11.028 | 0.008 |
| 5 | DIFA | + | + | + | + | - | | | | |
| | ELISA | **1.464** | **1.331** | **1.316** | 0.356 | 0.273 | 0.286 | 0.031 | 2.5866 | 0.039 |
| 6 | DIFA | + | + | + | + | - | | | | |
| | ELISA | **1.237** | **0.929** | **0.527** | **0.251** | 0.226 | 0.213 | 0.011 | 4.1762 | 0.009 |
| 7 | DIFA | + | + | + | + | + | | | | |
| | ELISA | **1.248** | **0.911** | **0.811** | 0.232 | 0.260 | 0.231 | 0.013 | 1.7722 | 0.025 |
| 8 | DIFA | + | + | + | + | - | | | | |
| | ELISA | **1.227** | **0.837** | **0.441** | 0.230 | 0.222 | 0.220 | 0.009 | 1.908 | 0.016 |
| 9 | DIFA | + | + | + | + | + | | | | |
| | ELISA | **1.157** | **1.047** | **0.583** | 0.220 | 0.237 | 0.207 | 0.013 | 2.5235 | 0.017 |
| 10 | DIFA | + | + | + | + | - | | | | |
| | ELISA | **1.172** | **1.093** | **1.006** | **0.461** | 0.375 | 0.383 | 0.024 | 8.2836 | 0.009 |
| Average | | | | | | | | 0.021 | 5.927 | 0.015 |

Detaction Limit = 3.3 x standard deviation of the blank /the slope of the calibration curve