

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

セービン株由来不活化ポリオワクチンと肝炎ワクチンの  
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：

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、および、参照不活化ポリオワクチン（セービン株）（いわゆる、国内参照品）を試験材料とし、D抗原量と免疫原性に対する加温処理の効果に関する一連の実験データを精査、解析し、D抗原量測定試験がワクチンの劣化をより鋭敏に測定できると判断した。これらの成果は原著論文にまとめ、Vaccine誌に掲載が受理された。これにより、実験動物を用いた免疫原性試験（in vivo試験）に基づく現行の力価試験を、近い将来D抗原量を測定するin vitro試験に移行する科学的根拠が得られたものと期待する。一方、A型およびB型肝炎ワクチンについても加温劣化の効果を検証するため、ワクチン製剤の劣化条件を検討している。

**A. 研究目的**

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、A型肝炎ワクチン、および、B型肝炎ワクチンの国家検定では、その力価測定に小動物（ラット、あるいは、マウス）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試験の導入が必須である。日本国内で実用化されているワクチン製剤について、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 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°C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°C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°C保存の国内参照品の値と比較した。

### ② 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。それぞれの製剤において、加温変性させた劣化ワクチンを作製し、*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。

### ③ A型肝炎ワクチンについて

海外で導入されているA型肝炎ワクチン製剤を購入し、その免疫原性を日本国内で導入されているA型肝炎ワクチン製剤と比較した。試験は国家検定試験法に準じて行った。

(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 セービン株由来不活化ポリオワクチン

について

昨年度までに得た実験結果を精査、解析した。2種の4種混合ワクチン製剤(AおよびB)について、表1と表2に概略を示す。

(表1. 4混製剤Aの加温に伴うD抗原含量と免疫原性の変化：残存D抗原含量は加温未処理(4°C保存)のD抗原含量に対する相対値として示した。中和抗体価(log2)はそれぞれの条件で処理した製剤を接種したラット10匹の血清抗体価の平均値を示した)

血清型	残存 D抗原量	中和抗体価 (log2)		
	37°C	4°C	37°C	p
1型	42%	7.0	4.3	0.002
2型	35%	6.6	6.6	0.9
3型	49%	3.0	2.1	0.3

(表2. 4混製剤Bの加温に伴うD抗原含量と免疫原性の変化)

血清型	残存 D抗原量	中和抗体価 (log2)		
	37°C	4°C	37°C	p
1型	32%	7.2	6.8	0.6
2型	13%	6.5	4.8	0.006
3型	16%	1.8	0.8	0.04

また、国内参照品 Lot 12A (-80°C保管)を37°C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3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3. 37°C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

#### ② B 型肝炎ワクチンについて

メーカーA の製剤（冷蔵）の *in vivo* 相対力価、*in vitro* 相対力価はそれぞれ 2.88 単位、0.97 単位であるのに対し、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%) するが、*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。

一方、メーカーB の製剤（冷蔵）の *in vivo* 相対力価、*in vitro* 相対力価はそれぞれ 3.09 単位、0.57 単位であるのに対し、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。

#### ③ A 型肝炎ワクチンについて

国内では導入されていない、海外製の A 型肝炎ワクチン製剤のマウスでの免疫原性を評価したところ、国内で導入されている製剤に比べ、力価が低い傾向が認められた。

## D. 考察

### ① セービン株由来不活化ポリオワクチンについて

D 抗原量、免疫原性に対する加温劣化の効果は、製剤により、また、抗原の血清型により異なり、概ね D 抗原量の低下が免疫原性の低下に反映されるものの、それぞれの低下の度合いが必ずしも相関しない。D 抗原量はスカラー量であるのに対し、免疫原性は生体応答を含む複雑な反応の結果であることが大きな要因と考えられる。しかしながら、ワクチンの劣化を検出するという観点においては、D 抗原量を測定する方がより鋭敏であることは明らかである。

### ② B 型肝炎ワクチンについて

同様に、抗原量と免疫原性に対する加温の効果は、製剤により異なるが、抗原量測定がより鋭敏にワクチンの劣化を検出できる。

### ③ A 型肝炎ワクチンについて

海外製剤と国内製剤の抗原量が異なるため、1 ドーズあたりの抗原量が同等か、今後検証する必要がある。また、前者にはアルミニウムアジュバントが含まれており、その効果についても検討する必要がある。

## E. 結論

### ① 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、ワクチンの劣化を検出する

には、*in vivo* 試験よりもむしろ、*in vitro* 試験を実施するほうがより鋭敏で感度が高いと言える。すなわち、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、今後、試験法の移行が推進されるものと期待する。

② B 型肝炎ワクチン、および、A 型肝炎ワクチンについて

引き続き、加温劣化の効果を慎重に精査し、より適切な劣化条件を設定し、*in vivo* 試験成績と *in vitro* 試験成績を比較する必要がある。

**F. 研究発表**

1. 論文発表

- 1) Murakami K, Fujii Y, Someya Y. Effects of the thermal denaturation of Sabin-derived inactivated polio vaccines on the D-antigenicity and the immunogenicity in rats. *Vaccine*, 38:3295-3299,2020.

2. 学会発表 なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況** なし