

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、狂犬病ワクチンの国家検定の見直し

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。日本は狂犬病清浄国であるが、世界では未だ多くのヒトが亡くなっており、日本においてもトラベラーズワクチンとしての需要が高い。狂犬病ワクチンの国家検定試験のうち有効性を確認する力価試験と安全性を確認する不活化試験については動物が使用されている。しかし、動物愛護の観点より、より苦痛の少ない試験方法や動物を使用しない代替法の開発および導入が求められている。力価試験についてはこれまでの研究成果をもとに本年度生物基の改訂を行った。これにより動物の苦痛軽減だけではなく、作業者の精神的苦痛の軽減、作業時間の短縮などの効果が期待される。また、不活化試験については我々が開発した簡便な代替法について解析を行い、導入に向けた課題を整理した。今後製造者とも協力しながら、力価試験、不活化試験ともに動物を使用しない方法に移行することを目指したい。

A. 研究目的

狂犬病は一旦発症すれば、致死率 100%の恐ろしい人獣共通感染症である。狂犬病疑い動物による咬傷などの暴露を受けた後、直ちにワクチン接種と抗狂犬病ウイルス抗体を接種することで防ぐことが出来る（暴露後免疫治療）。日本では 1957 年以降、ヒトの狂犬病は輸入例を除き発生していない。しかし、世界では毎年 5 万人以上が狂犬病で亡くなり、暴露後免疫治療を受けている人は 1,500 万人以上とされる。日本においてもトラベラーズワクチンとして需要がある。特に 2006 年に 2 件の輸入狂犬病が発生したことを受けて、国内需要が増加したことから KM バ

イオロジクス社製の国産品に加え 2019 年からはグラクソスミスクライン社製の輸入ワクチンも供給されている。

ヒト用狂犬病ワクチンの国家検定では、異常毒性否定試験、力価試験および不活化試験において動物を使用した試験が行われている。しかしながら、動物愛護の観点より、より苦痛の少ない試験方法や動物を使用しない代替法の開発および導入が求められている。また、一般的に動物実験は個体差が大きいこと、実験手技に熟練を要すること、結果が出るまでに時間がかかることから、代替法は試験結果の安定性や試験期間の短縮と言った面で優れていることも多い。

本研究では、狂犬病ワクチンの国家検定および自家試験において代替法を導入することを目的とする。本年度は力価試験における人道的エンドポイントの導入に関する生物学的製剤基準（生物基）の改訂および *in vitro* 不活化試験法についての導入に向けた解析を行った。

B. 研究方法

力価試験の生物基改訂

生物基では、力価試験におけるエンドポイント（評価のための最終的な到達指標）は死亡とされている。これまでに我々が検討したところ(Takayama-Ito et al. Biologicals 2017)、死亡に変えて麻痺をエンドポイントとすることで約 4 日の苦痛軽減効果が得られることが分かった。そこで、製造所（KM バイオロジクス）においても、この変更により試験結果に影響が出るかについて 4 回の試験結果（マウス 640 匹分）を用いて検証した。マウスの症状をスコア 0（正常）、スコア 1（被毛粗剛、元気消失）スコア 2（麻痺：四肢のいずれかの麻痺、痙攣、昏睡）スコア 3（死亡）の 4 つの指標にスコアリング化し、スコア 1, 2, 3 をエンドポイントとした場合の結果について検討した。

不活化試験代替法の開発

不活化試験は不活化ワクチン溶液中に感染性の残ったウイルスが存在しないことを確認する試験である。我々はこれまでに代替法として Direct immunofluorescent assay (DIFA)を用いた *in vitro* アッセイを確立してきた(Takayama-Ito et al. Biologicals 2014)。また、昨年の本研究班において、より簡便な Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)を用いた方法を開発した。今年度は

ELISA 法による *in vitro* アッセイの結果をさらに解析し、実際の導入における課題について考察した。

（倫理面への配慮）該当なし

C. 研究結果

力価試験の生物基改訂

いずれの試験においても、スコア 2 を指標とした場合、これまでの指標（スコア 3）を用いた場合と齟齬がなかった。これまでの結果と合わせて平成 28 年 10 月の検定協議会において人道的エンドポイントの導入に関する承認を得た。その後平成 29 年 2 月の業務委員会において、生物基通則 35 項（生物学的な試験法の規定は、試験の本質に影響のない限り試験方法の細部については変更することができる。）を適応し、生物基改正を待たずに人道的エンドポイントを導入することの承認を得て、同年 4 月より検定において実施した。そして、パブリックコメント等を経て、令和 3 年 1 月に以下の改訂が行われた。改訂前「これらの観察の最終日に麻ひを示す動物は死亡に算入する」改訂後「これらの観察期間中に麻ひを示す動物は死亡に算入する」。この改訂により、マウスが麻ひを示した場合には直ちに安楽殺を行うこととなった。

不活化試験代替法の開発

昨年の報告にあるように ELISA 法による *in vitro* アッセイの検出限界は 0.015 ffu/assay であり、以前の DIFA を用いたアッセイの検出限界(0.023 ffu/assay)とほぼ同等であった。一方、図 1 に示す様に同じサンプルについて、DIFA と ELISA の両方法で判定した場合には DIFA 法がより少ないウイルスを検出出

来ることが分かった。また、ELISA法の光学濃度(OD値)はスパイクしたウイルスの濃度依存的に上昇しており、各ウェルのばらつきは少ないことが分かった(図2)。

D. 考察

力価試験の生物基改訂

実施において、スコア2の判別は容易ではあるものの、主観的な指標であるため、2名以上で観察を行うことが重要であると考えられた。生物基の改訂により、製造者の自家試験においても人道的エンドポイントが実施される。感染研では上記の様に先んじて導入を行っているが、マウスの苦痛軽減だけではなく、作業者の精神的苦痛の軽減、作業時間の短縮などの効果があった。また、生物基改定時のパブリックコメントでは、動物を使用しない方法に切替えるべきという意見が寄せられた。この件に関しては現在欧州医薬品品質部門(EDQM)の国際共同プロジェクトに参加し、抗原ELISA法の導入に向けて取り組んでいる。

不活化試験代替法の開発

検出方法としてELISA法よりDIFAの方がより鋭敏であること理由として、ELISA法では抗原量が少ない時にはしきい値(Blank測定値の平均値+3標準偏差)を超えずに陰性の判定となっているためと考えられた。しかしながら、ELISA法の検出限界は0.015 ffu/assayと非常に低く、ワクチン1本あたりに感染性ウイルスが1粒子でも混入した場合には検出可能であることから、現実的には問題とならないと考えられた。今後導入に向けては、陽性対照の設

定、哺乳マウスもしくは欧州薬局方(EP)掲載の*in vitro*アッセイとの直接比較、不活化不足のワクチンを用いた実験、複数ラボでのバリデーションを行う必要があると考えている。EP記載の方法については文献的にその検出限界や検出感度が示されておらず、試験日数もELISAによる*in vitro*アッセイ7日と比較して21日以上と長い。ELISAによる*in vitro*アッセイの感度がEP記載の方法と同等かそれ以上であれば本法を採用するメリットは大きいと考えている。

E. 結論

代替法の導入は動物愛護の面からだけではなく、検定期間の短縮や精度管理の改善にも効果的である。今後、製造者とも協力しながら、力価試験、不活化試験ともに動物を使用しない方法に移行することを目指したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawahara M, Takayama-Ito M, Kato H, Kitaura S, Satoh M, Saijo M. Development of an assay for detecting the residual viable virus in inactivated rabies vaccine by enzyme-linked immunosorbent assay. *Biologicals*.28;S1045-1056(21)00017-8. 2021

2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Exp.No.		Input virus (ffu / test)					Negative control (OD value)			Slope	DL (ffu / test)
		A	B	C	D	E	Average	SD	Cut off value		
		0.0049	0.0195	0.0781	0.3125	1.2500					
1	ELISA	0	24	24	24	24	0.203	0.018	0.257	6.056	0.01
	DIFA	0	24	24	24	24					
2	ELISA	0	24	24	24	24	0.309	0.030	0.399	11.786	0.008
	DIFA	0	24	24	24	24					
3	ELISA	0	24	24	24	24	0.299	0.030	0.389	9.15	0.011
	DIFA	0	24	24	24	24					
4	ELISA	0	24	24	24	24	0.305	0.026	0.382	11.028	0.008
	DIFA	0	24	24	24	24					
5	ELISA	0	3	24	24	24	0.286	0.031	0.378	2.587	0.039
	DIFA	0	24	24	24	24					
6	ELISA	1	16	24	24	24	0.213	0.011	0.247	1.913	0.02
	DIFA	0	24	24	24	24					
7	ELISA	7	0	24	24	24	0.231	0.013	0.271	7.471	0.006
	DIFA	24	24	24	24	24					
8	ELISA	0	4	24	24	24	0.220	0.009	0.247	1.908	0.016
	DIFA	0	24	24	24	24					
9	ELISA	8	0	24	24	24	0.207	0.013	0.246	4.781	0.01
	DIFA	24	24	24	24	24					
10	ELISA	0	13	24	24	24	0.383	0.024	0.453	8.284	0.009
	DIFA	0	24	24	24	24					
Average										0.014	
Average SD										0.009	

SD: standard deviation, DL: detection limit.
 *All ELISA and DIFA assay were 24 wells per dose.

図1 : ELISA法とDIFA法による検出限界の比較

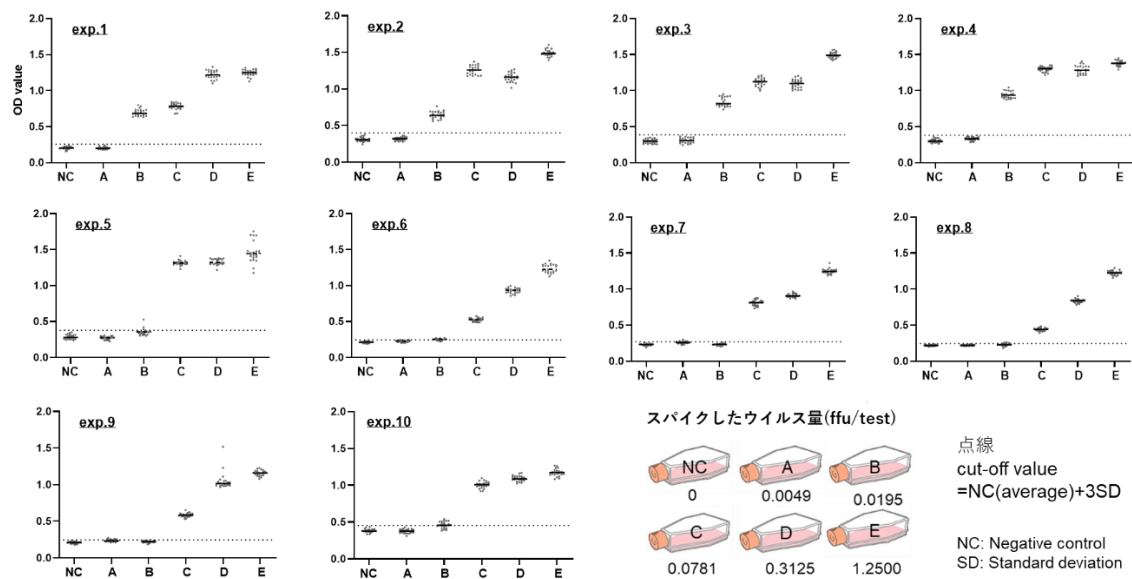


図2 : ELISA法による10回の試験のOD値の分布