

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：海外で使用される 5 種混合ワクチンに含まれる不活化ポリオワクチン成分のラット免疫原性試験と D 抗原含量試験を国内で実施される試験法に基づき行ったところ、問題なく力価を測定することができた。Hib 成分の追加は試験法に影響はないと言える。セービン株由来不活化ポリオワクチン (sIPV) 韓国国内標準品制定のための共同研究に参加した。この共同研究で実施した試験成績から、sIPV 国際標準品に付された国際単位 SDU と国内 sIPV 製剤に付された単位 DU との比較を行い、両単位間の換算が可能と推測された。共同研究での n 数が少ないので、今後更なる検討を行う。in vivo 試験から in vitro 試験への移行を想定し、数年間にわたり国内 sIPV 製剤の D 抗原含量試験を国家検定外の試験として行ってきた。感染研での試験成績はメーカーの自家試験成績と大きく乖離することはなく、in vitro 試験でも同等に品質評価ができると言える。

一方、肝炎ワクチンに関しては、国内未承認肝炎ワクチン三製剤について、現行の力価試験であるマウス力価試験 (in vivo 試験) における至適免疫濃度を検討した。他抗原による干渉作用、異なるアジュバントによる免疫賦活性の違いなどが懸念されたが、三製剤とも既存単味ワクチンとほぼ同様の免疫応答を誘導した。既存の単味 B 型肝炎ワクチンについては、in vitro 試験の性能確認を行った。評価パラメータ (真度、併行精度、特異性、直線性、範囲) についてバリデーションを行い、in vivo 試験と同等の結果を示すことを確認した。

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 (sIPV)、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 不活化ポリオワクチン

(1) 5 種混合ワクチンの力価試験：ソークワ

クチン (cIPV) を含む GSK の Infanrix IPV Hib, Sanofi の Pentavac を購入し、国内 sIPV 向けに実施される試験法に従い、ラット免疫原性試験、D 抗原含量試験を行った。国内に導入されている単味製剤 (サノフィ イモバックスポリオ)、4 種混合ワクチン (第一三共バイオテック スクエアキッズ) を対照とした。

(2) sIPV の D 抗原量単位の比較：韓国国内標準品制定の共同研究で得られた実験データの一部を使用した。この共同研究で我々は、第 3 次 cIPV 国際標準品 (12/104)、第 1 次 sIPV 国際標準品 (17/160)、3 つの国内標準品候補と BIKEN が製造した D 抗原含量試験用標準物質 (TIPV) の D 抗原含量試験を実施し、12/104、17/160、あるいは、TIPV に対して、相互に D 抗原含量を算出した。本研究では 17/160 の提示 D 抗原量 (1 型、2 型、3 型とも 100 SDU/mL) と TIPV の提示 D 抗原量 (1 型 25.9 DU/mL、2 型 956 DU/mL、3 型 976 DU/mL) を用い、比較した。

(3) 国内 sIPV 製剤の D 抗原含量試験：BIKEN、KM バイオロジクスの 4 種混合ワクチン (それぞれ、テトラビック、クアトロバック) の D 抗原含量試験を実施し、メーカーの自家試験成績と比較した。

② 肝炎ワクチン

(1) 国内未承認肝炎ワクチンのマウス力価試験 (in vivo 試験)：GSK の Infanrix hexa (6 種混合ワクチン：DTP-IPV-HB-Hib)、Twinrix (2 種混合ワクチン：HA-HB)、Dynavax の Hcpilisav-B (CpG アジュバント：HB) について検討

した。それぞれ 2.5 倍から 160 倍に希釈し、BALB/c マウスに接種した。HBs-adr 抗原、adw 抗原を固相化したプレートを用いて B 型肝炎抗体を検出し、50% のマウスが抗体陽転化する濃度 (ED50) を Reed and Muench 法で算出した。比較のため、既存の単味 B 型肝炎ワクチン (KMB ビームゲン) も同様に ED50 を算出した。

(2) B 型肝炎ワクチン in vitro 試験の性能確認：抗原量が既知のワクチン (20 µg/ml) と同ワクチンを加温変性した低力価ワクチンをそれぞれ Duplicate で 2 倍階段希釈し、in vitro 試験で抗原の検出を行った。OD 値を測定し、併行精度、特異性、直線性、範囲について検討した。また、真度については 11 ロットについて、in vivo および in vitro 相対力価のトレンド比較を行った。

(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 不活化ポリオワクチン

(1) 5 種混合ワクチンの力価試験：D 抗原含量試験では、cIPV を含む 2 種の 5 種混合ワクチンは、国内の単味ワクチン、4 種混合ワクチンと同等の D 抗原を含むと算出された。また、ラット免疫原性試験でも、4 種混合ワクチンと同等の免疫原性力価が認められた。

(2) sIPV の D 抗原量単位の比較：第 1 次 sIPV 国際標準品 (IS) (17/160) に対する BIKEN TIPV の定量値を表 1 に示す。

表1. sIPV IS に対する BIKEN TIPV の定量: sIPV IS の D 抗原含量はどの型も 100 SDU/mL

TIPV	1 型	2 型	3 型
算出値 SDU/mL	36.9	549	475
提示 D 抗原量 DU/mL	25.9	956	976
DU/SDU	0.70	1.74	2.05

また、BIKEN TIPV に対する第 1 次 sIPV IS (17/160) の定量値を表 2 に示す。

表 2. BIKEN TIPV に対する sIPV IS の定量: TIPV の D 抗原含量は 1 型 25.9 DU/mL、2 型 956 DU/mL、3 型 976 DU/mL

sIPV IS	1 型	2 型	3 型
算出値 DU/mL	70.2	174	208
提示 D 抗原量 SDU/mL	100	100	100
DU/SDU	0.70	1.74	2.08

表 1、表 2 の D 抗原量算出法で、それぞれ、DU と SDU の比較 (DU/SDU) を行ったところ、ほぼ一致した数値が算出された。

(3) 国内 sIPV 製剤の D 抗原含量試験: BIKEN、KM バイオロジクスの 4 種混合ワクチン製剤 (テトラビック、クアトロバック) について、我々が実施して得た D 抗原含量試験の結果をメーカーの自家試験成績と比較したところ、大きな乖離がないことが分かった。

② 肝炎ワクチン

(1) 国内未承認肝炎ワクチンの in vivo 試験: 混合ワクチンの ED50 は 0.16~0.37 µg/mL (54~125 倍希釈) であった。各

ワクチンの ED50 を表 3 に示す。

表 3. BALB/c マウスにおける混合ワクチンおよび単味ワクチンの ED50

ワクチン	ED50 (µg/mL)	
	adr	adw
Infanrix hexa	0.24	0.16
Twinrix	0.27	0.27
Heplisav-B	0.32	0.37
ビームゲン	0.23	0.35

(2) B 型肝炎ワクチン in vitro 試験の性能確認: 既知ワクチンと低力価ワクチンに含まれる抗原はいずれも検出され、明確に区別することができた (感度)。一方、HBs 抗原を含まない検体での非特異反応は認められなかった (特異性)。各ワクチンの繰り返し測定値はほぼ一致し (併行精度)、3~167 ng/mL の範囲で直線性を示した (範囲、直線性) (図 1)。in vivo 相対力価と in vitro 相対力価のトレンド (11 ロット分) は、順に平均値 5.789 (95%信頼区間 4.932~6.797)、平均値 6.185 (95%信頼区間 5.585~6.850)、で推移し、各群の有意差は認められなかった (Student の t 検定) (図 2)。

図 1

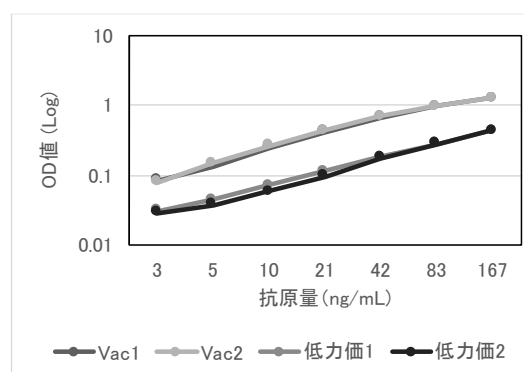
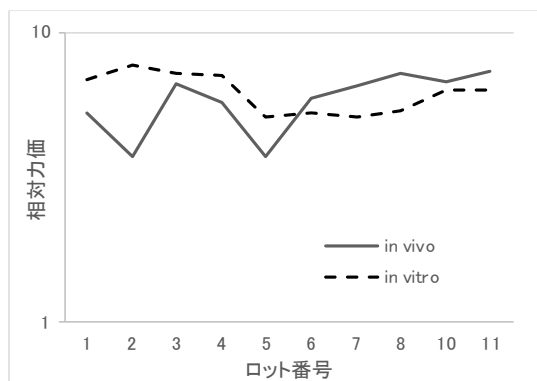


図 2



D. 考察

① 不活化ポリオワクチン

(1) 5種混合ワクチンの力価試験：5種混合ワクチンに含まれる Hib 成分はラット免疫原性試験および D 抗原含量試験にはほぼ影響しないと言える。

(2) sIPV の D 抗原量単位の比較：SDU に対する DU の相対値は、1 型で 0.7、2 型で 1.7、3 型で 2.1 と算出された。韓国国内標準品制定の共同研究では、データ数が限られており、今後更なる検討が必要であるが、おおまかな目安が得られたものとする。

(3) 国内 sIPV 製剤の D 抗原含量試験：BIKEN、KM バイオロジクスの 4 種混合ワクチン製剤の D 抗原含量試験は感染研においてもメーカーと同等に実施でき、品質評価上問題はないと考えられる。

② 肝炎ワクチン

(1) 国内未承認肝炎ワクチンの in vivo 試験：未承認ワクチンと既知単味ワクチンの ED50 は近似した結果となった。今回検討した三製剤については、他抗原の干渉やアジュバントの違いによる試験阻害はないと推察された。単味ワクチンと

同じ希釈範囲で in vivo 試験の実施が可能である。

(2) B型肝炎ワクチン in vitro 試験の性能確認：in vitro 試験は評価パラメータにおいて十分な性能を示した。トレンド解析では in vivo 試験との相同性も示された。メーカー試験成績との比較や参照ワクチンの調整など残された課題はあるが、試験法の移行について議論を進める土台ができたと考えている。

E. 結論

① 不活化ポリオワクチン：さまざまな製剤に含まれる sIPV 成分ならびに cIPV 成分のラット免疫原性試験 (in vivo 試験) と D 抗原含量試験 (in vitro 試験) を実施したことにより、両試験成績間で大きな矛盾が発生することはない、いずれの方法でもワクチン製剤の品質管理が可能であると言える。cIPV 製剤の国家検定は D 抗原含量試験であるが、sIPV 製剤については現時点でラット免疫原性試験が採用されている。実験動物に関する 3R の観点とともに、試験に要する時間、費用、人員を加味すると、sIPV 製剤についても D 抗原含量試験への移行は進められるべきである。現在、sIPV 接種後の抗体価が高く維持される状況も明らかになってきており、規定の D 抗原量の確保が高い免疫原性を担保していることを示す有力なデータと言える。

② 肝炎ワクチン：B型肝炎ワクチンを含む国内未承認ワクチンの in vivo 力価試験の条件設定が完了した。一方、既存の単味 B型肝炎ワクチンについては in vitro 試験のバリデーションがほぼ終了した。

in vivo 試験と in vitro 試験の成績が矛盾することはなく、いずれの方法でも品質管理が可能であることが示唆された。現行の国家検定は in vivo 試験であるが、不活化ポリオワクチン同様、実験動物に関する 3R の観点とともに、試験に要する時間、費用、人員を加味すると、in vitro 試験への移行は進められるべきである。2016 年 10 月以降、B 型肝炎ワクチンは定期接種化され、出検ロット数、ロットリリース数も増加している。B 型肝炎ワクチンの in vitro 試験採用による国家検定の合理化は引き続き喫緊の課題である。

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(17), 3295-3299, 2020. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.03.027.
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし