

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国家検定の最適化と国際整合化のための研究

分担研究報告書

不活化ウイルスワクチンの国家検定の見直し

研究分担者 伊藤 睦代 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 ウイルス第一部
研究協力者 仲山 紀子 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 ウイルス第一部
河原 円香 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究要旨：狂犬病は狂犬病ウイルスによる人獣共通感染症であり、発症した場合の致死率はほぼ 100%である。日本では 1957 年以降国内発生はないが、世界では年間約 59,000 人が亡くなっており、渡航用ワクチンとして重要である。狂犬病ワクチンの力価試験は現在マウスを用いた NIH 法が標準的だが、動物実験の 3R 原則の観点から代替法の導入が求められている。本研究では動物を使用しない抗原 ELISA 法の導入に向け、欧州医薬品品質部門（EDQM）の国際共同研究 Phase3 として、国内承認ワクチンの 12 サンプルを用いた検証を実施した。その結果、ELISA 法は高い精度と安定性を示し、品質評価に十分機能することが実証された。NIH 法との間に相関性は認められなかったが、これは試験原理の相違と NIH 法の精度の低さに起因し、一貫性アプローチの概念に基づけば実用上問題ないと結論づけた。導入に向けて現行法との並行試験を最低 10 回行う予定であるが、当該ワクチンのロット数は年間 2～3 のため、導入には数年を要する見込みである。

A. 研究目的

狂犬病は、狂犬病ウイルスを原因とする致死的な人獣共通感染症である。我が国では 1957 年のネコでの発生を最後に国内での感染例は報告されていないものの、世界的には現在も年間約 59,000 人が本疾患により死亡していると推定されている。主な感染経路は発症動物による咬傷やエアロゾル曝露であり、発症した場合の致死率はほぼ 100%に達する。

一方で本疾患は、感染疑いのある動物による咬傷を受けた後であっても、1～3 か月に及ぶ長い潜伏期を利用してワクチンを接種することで発症を阻止できる（曝露後免疫）。

また、流行国への渡航前などに、あらかじめ免疫を獲得するための予防接種としても広く使用されている（曝露前免疫）。

現在、ヒト用狂犬病ワクチンの力価試験においては、マウスを用いた致死的な動物実験（NIH 法）が標準的に実施されている。厚生労働科学研究費補助金による研究成果を受け、2017 年より人道的エンドポイントが導入されたが、動物実験の 3R（Replacement：代替、Reduction：削減、Refinement：苦痛の軽減）の原則に基づくさらなる改善が強く求められている。

上記目的の達成に向け、我々は欧州医薬品品質部門（EDQM）が主導する国際共同研究

「Biological Standardisation Programme 148 (BSP148)」に参加している。本プログラムは以下の3つのフェーズで構成されている。

Phase 1: EDQM 協ラボによるプレテストおよびプロトコルの準備

Phase 2: 国際標準品および EDQM 提供サンプルを用いた、参加各国のラボによる共同試験

Phase 3: 各国の国内市販ワクチンを使用した適用試験

我々は Phase2 から参加し、国際標準品による試験実施の条件検討を行なった。昨年度は Phase3 として、現在日本で使用されているラビピュールの試験品を用いて、前希釈等の条件検討を行なった。本年度は試験導入に向けて当該条件を用いたプレ実験と本試験を行った。

B. 研究方法

材料：

- ・ 検体：ラビピュール 12 バイアル（バーバリアンノルディック社より分与）
- ・ 第7次国際標準品：7thIS（NIBSC より購入）
- ・ 国内標準品（GSK 社 ラビピュール）
- ・ 96-well plates for ELISA (NUNC Maxisorp, ref 439454)
- ・ Capture Mab: Anti-Rabies Virus Antibody, clone 1112-1 (RD biotech/MERCK)
- ・ Detection Mab: Anti-RABV Glycoprotein Antibody, biotinylated, clone D1-25 (MERCK)
- ・ DPBS (GIBCO 14190)
- ・ BSA(SIGMA A2153)
- ・ Tween20 (WAKO 167-11515)
- ・ Streptavidin, Peroxidase Conjugated

(SIGMA S2438)

- ・ Citrate buffer (SIGMA P4809)
- ・ o-Phenylenediamine dihydrochloride:OPD (SIGMA P3804)
- ・ H₂O₂ (WAKO 10977-015)
- ・ Coating buffer: Carbonate-bicarbonate buffer(0.2M), pH 9.6
- ・ Stop solution: 1M H₂SO₄ (WAKO 198-09595)

方法：試験は昨年の報告書と同様にサンプルを用いて3回行なった。概略は以下の通りである。Capture Mab を Carbonate- bicarbonate buffer で希釈し、プレートにコーティングした。プレートを 0.05% Tween 20 含有 DPBS (PBS-T) で3回洗浄後、1% BSA 含有 PBS で1時間ブロッキングした。PBS-T で3回洗浄後、0.1% BSA 含有 PBS-T（希釈バッファ）を用いてワクチンを下記のように希釈した。7thIS：36倍、国内標準品：72倍、サンプル：100倍希釈。その後マイクロプレート上でそれぞれをさらに1.8倍段階希釈した。振盪しながら37℃で1時間反応させ、PBS-T で5回洗浄後 Detection Mab および Streptavidin conjugate、H₂O₂ 添加 OPD で反応させた。Stop solution を添加してマイクロプレートリーダーで吸光度(OD)を測定した。OD₄₉₂ の吸光度を OD₆₂₀ で補正して CombiStats ソフトウェア (EDQM) の 5-parameter logistic(5PL) 及び Parallel line analysis (PLA) モデルを用いて解析した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

前年に決定した希釈倍率（100 倍）でサンプルを希釈し、国際標準品（7thIS）と比較した結果、ほぼ同等のカーブが得られたため（図 1）、本試験 3 回を行なった。

1. 標準品による精度検証

国内標準品を指標とし、試験内および試験間の再現性（精密度）を評価した。全 3 回の試験（各 4 プレート構成）を実施した結果、各回の平均値は第 1 回（ELISA-1）が 10.38、第 2 回（ELISA-2）が 10.57、第 3 回（ELISA-3）が 11.11 であった。試験ごとのばらつきを詳細に解析すると、第 1 回試験においては各プレートの測定値が 10.29～10.47 の範囲に収まり、標準偏差 0.06、変動係数（CV 値）0.70%と極めて高い精密度を示した。第 2 回試験においても CV 値 3.14%（標準偏差 0.29）と良好な結果が得られた。一方、第 3 回試験においてはプレート間の測定値（9.43～12.16）の変動が最も大きくなり、標準偏差 1.03、CV 値 10.73%を示した。しかしながら、全 3 回の試験を通じた総合的な平均値は 10.69、全体の CV 値は 3.53%（標準偏差 0.38）であった（表 1）。一般的にアッセイ間の許容精度とされる CV 値 15%未満という基準を十分に満たしていることから、本アッセイ系が高い一貫性と信頼性を有していることが確認された。

2. 検体の結果解析

12 種類の検体（A～L）に関する全 3 回の測定値に基づき、各検体の平均力価、標準偏差、および変動係数を算出し、結果を図 2 ならびに表 2 に要約した。当研究室の測定環境においては、使用機器の特性に起因すると推測されるシグナル上限のプラトー（平坦化）が形成されない現象が確認されている。これに伴い、5PL モデルによる解析が困難となっ

たため、PLA を適用して力価を算出した。測定の結果、検体の力価は 15～20 I.U.の範囲となった。最小値を示した検体は J（15.32 I.U.）、最大値を示した検体は K（19.33 I.U.）であった。

また、測定精度の指標となる CV 値について解析したところ、全 12 検体中 10 検体において CV 値が 10%未満（そのうち 6 検体は 5%未満）を記録しており、本アッセイ系が極めて高い再現性を有していることが示された。各検体のばらつきの傾向を見ると、検体 F が他検体と比較して測定値の振れ幅が大きく CV 値 16.65%となったほか、検体 L でも CV 値 11.81%とやや高い変動を示した。対照的に、極めて高い測定精度を示した検体も存在し、検体 E が最も小さい CV 値（0.51%）を示したほか、検体 G（1.85%）や検体 J（2.23%）においても測定ごとの変動が極めて小さい安定した結果が得られた。

3. ELISA 法と NIH 法の比較および相関性

バーバリアンノルディック社より提供された NIH 法による力価情報（検体 J を除く）と、本試験における ELISA 法による測定結果を比較評価した。図 3 に示す通り、全体として ELISA 法による算出値が NIH 法を上回る傾向が認められた。例外として、検体 H においては NIH 法で 42.1 I.U.という突出した高値が報告されていたのに対し、ELISA 法では 16.47 I.U.であった。ELISA 法および NIH 法による力価測定結果の相関を図 4 に示す。NIH 法の結果が得られていない検体 J および NIH 法で異常な高値を示した検体 H を解析から除外し、両試験法間の Pearson の相関係数を算出したところ $r=0.08550$ であり、両者間に有意な相関関係は認められなかった。

D. 考察

本年度は将来的に当該 ELISA 法を日本でも使用するため、実際の承認ワクチンのサンプルを用いた試験を行なった。その結果 NIH 法と比較して、試験結果の安定性と正確性に優れていることが実証された。CV 値は一般的にアッセイ間の精度は CV 15%未満が許容範囲とされる。12 サンプルの測定結果においても、サンプル F (CV 16.65%) という一部の例外を除き、概ね安定した力価が得られており、本測定系が品質評価において十分に機能していると言える。

本試験の解析において、5PL モデルではなく PLA を使用した。PLA は抗原濃度が用量依存的な直線領域において標準品と検体の平行性が担保されていれば正確な定量が可能な手法である。本アッセイにおける抗原抗体反応の特異性および測定範囲を考慮すれば、この手法の切り替えが定量性に悪影響を及ぼす可能性は低い。Phase2 の会議においても両手法が許容されており、PLA の妥当性は担保されていると考えられる。

一方で、ELISA 法と従来法である NIH 法との間に相関性は認められなかった。同様のことは本共同研究の Phase1 および他の論文においても報告されている。この要因として、①ELISA 法が感染防御に関与するウイルス糖タンパク質抗原量を直接的に定量するのに対し、NIH 法は動物個体の免疫応答を介した生残率を指標とするという試験原理の根本的な相違および②NIH 法の測定精度が著しく低く、結果のばらつきが大きい(変動係数: 25%~400%)ことが挙げられる。両者の相関性の欠如については国際的にも長ら

く議論の対象となってきたが、近年は医薬品の品質管理において「一貫性アプローチ (Consistency Approach)」の概念が主流となっている。すなわち、動物実験との直接的な相関を必須とするのではなく、高い再現性を持つ *in vitro* 試験による製造工程の恒常性を監視し、品質を担保できれば実用上問題はないとする見解が国際的なコンセンサスを得ている。

E. 結論

本研究結果は当該 ELISA 法が、現在日本で使用されているヒト用狂犬病ワクチンの抗原量を高い精度で定量評価することが可能であり、代替法として科学的に妥当であることを示している。

実際の検定への正式導入に向けては、製造業者との合意締結に加え、現行の NIH 法による検定と並行した導入前試行(バリデーション)を最低 10 回以上行うことが必要と考えている。しかしながら、代替法導入への社会的・科学的要請を踏まえ、今後は前向きな並行試験データの蓄積に加え、過去の保管サンプルを用いたレトロスペクティブなデータ解析の活用等も模索していく。

今後着実に試験データの蓄積を進めるとともに、国家検定に当該 ELISA 法を導入するためには生物学的製剤基準の改訂が必要となるため、改訂に向けた準備等を継続していく必要がある。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

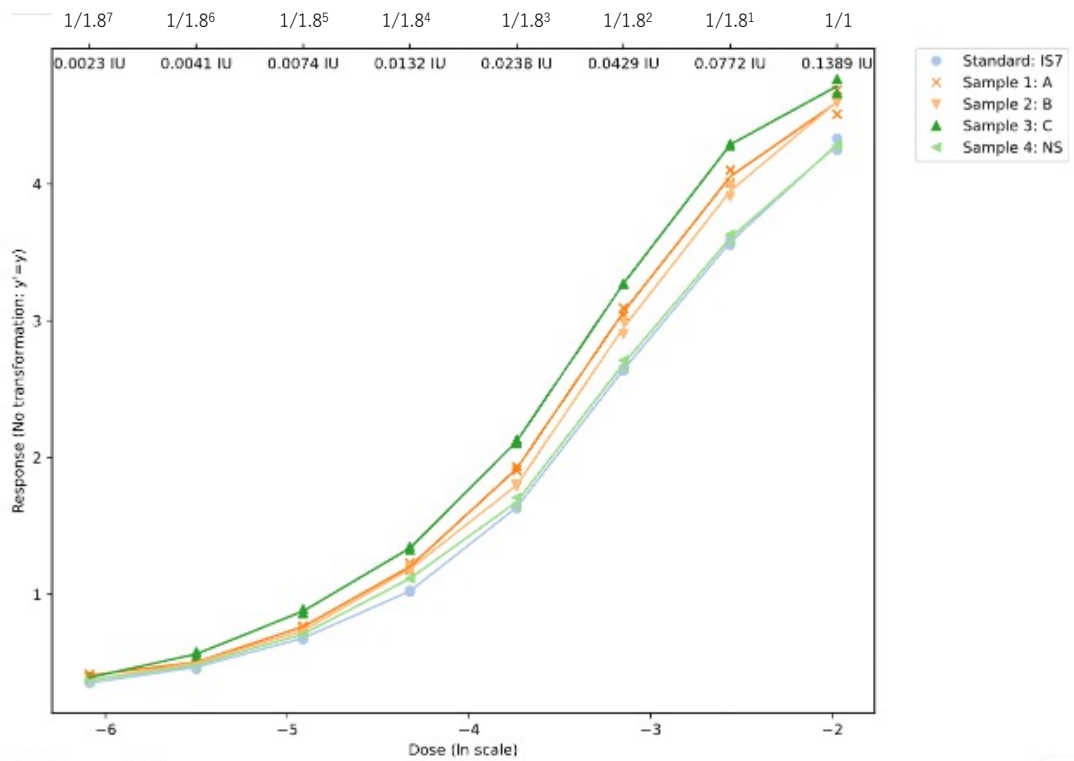
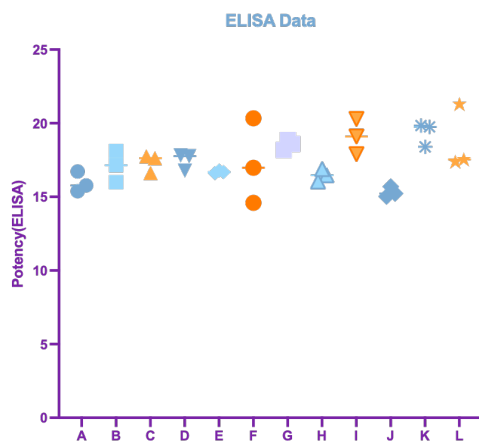


図 1: サンプルを用いた試験結果の一例



	ELISA-1	ELISA-2	ELISA-3	
Plate1	10.37	10.48	11.15	
Plate2	10.41	11.05	9.43	
Plate3	10.29	10.47	11.70	
Plate4	10.47	10.28	12.16	
平均	10.38	10.57	11.11	10.69
標準偏差	0.06	0.29	1.03	0.38
変動係数(%)	0.70	3.14	10.73	3.53

表 1 : 標準品による精度検証

図 2 : 12 サンプルの力価 (I.U.) の分布

Batch No.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
ELISA-1	16.72	17.15	17.63	17.81	16.78	20.33	18.59	16.47	19.09	15.23	19.84	21.29
ELISA-2	15.77	16.00	16.62	16.78	16.61	16.97	18.18	16.05	17.89	15.03	18.40	17.38
ELISA-3	15.38	18.11	17.75	17.76	16.68	14.59	18.86	16.89	20.28	15.69	19.75	17.54
平均	15.96	17.09	17.33	17.45	16.69	17.30	18.54	16.47	19.09	15.32	19.33	18.74
標準偏差	0.69	1.06	0.62	0.58	0.09	2.88	0.34	0.42	1.19	0.34	0.80	2.21
変動係数(%)	4.32	6.18	3.57	3.33	0.51	16.65	1.85	2.57	6.24	2.23	4.16	11.81

表 2：12 サンプルの 3 回の試験の力価（I.U.）、平均値、標準偏差、および変動係数

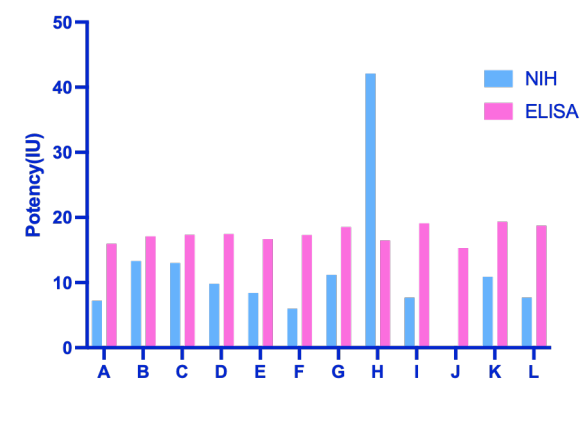


図 3：両試験法の力価(I.U.)の比較

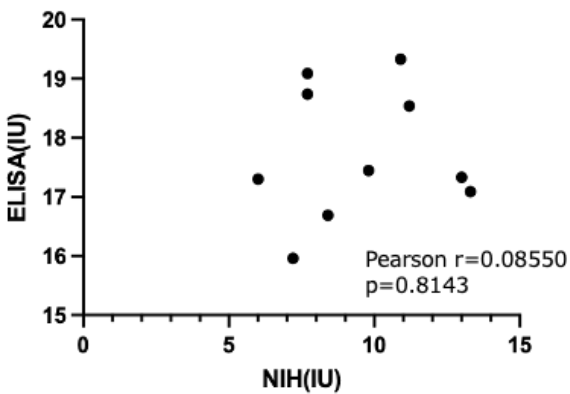


図 4：両試験法の力価(I.U.)の相関