

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や国際整合化を目指すための研究

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 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究協力者 河原 円香 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究協力者 仲山 紀子 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究要旨：ヒト用狂犬病ワクチンの力価試験は動物を用いる方法で行われているが、動物愛護の観点から見直しが求められている。本研究では、欧州医薬品品質部門（EDQM）が主催する狂犬病ワクチンの力価試験を抗原 ELISA に置き換えるための国際共同研究に参加し、力価試験法を動物を用いる試験から抗原 ELISA に変更することを目的としている。本年度は EDQM から提供されたプロトコルに従い、国際標準品と試験サンプルを用いた ELISA 試験を行い、概ね良好な結果を得た。ただし、いくつかのサンプルでは結果にばらつきが見られたことから、引き続き原因究明と試験結果の安定化のための研究を行う。

A. 研究目的

狂犬病は日本では 1957 年以降、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っているとされており、トラベラーズワクチンとして需要がある。2006 年に 2 件、2020 年に 1 件の輸入狂犬病が国内で発生したことから狂犬病ワクチンに対する関心が高まり、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（乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン）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（ラビピュール）も供給されている。

ヒト用狂犬病ワクチンの力価試験では、マウスの腹腔内に段階希釈したワクチンを 2 回接種した後、致死性の狂犬病ウイルスを脳内接種してその生死によりワクチンの効果を見る方法が使用されている。しかしながら、動物愛護の観点より問題があるこ

とが指摘されている。我々はこれまでに、生物学的製剤基準に動物の苦痛を和らげるための人道的エンドポイントを導入してきた。しかし、最終的には動物を全く用いない代替試験法の導入が望まれる。

欧州医薬品品質部門（EDQM）では、2018 年から **Biologocal Standarisation Programme 148 (BSP148)** としてヒト用狂犬病ワクチン力価試験法を抗原 ELISA 法に置き換えるための国際共同研究を組織している。この研究の目的は①様々なウイルス株および製法を用いて製造されたヒト狂犬病ワクチンに対する抗原 ELISA の適応性および頑健性を評価すること。②抗原 ELISA のバッチリリースに対するグローバルな適用性と、欧州薬局法における実装を評価すること。となっており、**Phase1** では準備と事前評価、**Phase2** では国際共同研究による適応性および頑健性を評価、**Phase3** では各国で市販さ

れているワクチンの試験成績による適用性と頑健性の評価することになっている。コロナウイルスの世界的流行や抗体の準備などのためにスケジュールは大幅に遅れているが、2021年3月にはPhase2が開始された。本研究では、BSP148の国際共同研究に参加しその結果を評価することで、力価試験法を動物を用いる試験から抗原ELISAに変更することを目的としている。

B. 研究方法 抗原 ELISA

試験は EDQM により提供された BSP148 Phase 2 Study Protocol に従って行われた (図 1)。抗原補足用モノクローナル抗体(clone 1112-1)を Dilution buffer (Tween 20 0.05%および BSA 0.1%を含む DPBS : GIBCO 14190) により 200 倍に希釈して ELISA プレート (NUNC#439454) に 100 μ L/well 分注し、16–20 時間 4°C で放置した。プレートウォッシャー (MW-96EX : BioTec) で Washing buffer (0.05% Tween 20 を含む DPBS) を用いて 3 回の洗浄を行った。Blocking solution (BSA 1%を含む DPBS) を分注して 1 時間 37°C でブロッキングを行った。ワクチンサンプル 10 種類 (A–K) および国際標準品 (IS) を 0.4%NaCl または H₂O により溶解した。溶解したサンプルおよび IS は Dilution buffer (0.05%Tween 20 および 0.1%BSA を含む DPBS) を用いて適当な濃度に前希釈した。Washing buffer で 3 回の洗浄を行った後、希釈したサンプルおよび IS を 100 μ L/well 分注した。プレートをプレートシェーカー (BIOSAN LTD. PSU-2T) により 650rpm で振とうしながら 37°C で 1

時間感作した。Washing buffer で 3 回の洗浄を行い、Dilution buffer で 2500 倍に希釈した検出用モノクローナル抗体 (D1-25,biotin) を 100 μ L/well 分注し、振とうしながら 37°C で 1 時間感作した。Washing buffer で 3 回の洗浄を行い、Dilution buffer で 5500 倍に希釈した Streptavidin, Peroxidase Conjugated (SIGMA S2438) 100 μ L/well を分注し、振とうしながら 37°C で 1 時間感作した。o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD : SIGMA P3804) をクエン酸リン酸緩衝液で溶解した液に 30%過酸化水素水を溶解液の 0.03%分加えて 100 μ L/well 分注し、37°C で 30 分感作した。50 μ L/well の 2N 規定の H₂SO₄ を加え反応を止め、マイクロプレートリーダー (Multiskan FC:Thermo Fisher Scientific) を使用して OD492 nm および OD620nm での吸光度を測定した。IS および一部サンプルを用いたプレテスト 7 回の後、本試験 3 回を行った。

試験結果の解析

EDQM が品質管理試験のために開発したソフトウェアである Combi Stats を用いて試験結果を解析した。解析には OD492 nm から OD620nm を引いた値を使用した。サンプルを加えていないブランクの値が 0.02 以下であることを確認した。解析モデルを Sigmoid curves (In dose)、Transformation を 5-parameters (asymmetric) に設定して解析を行った。IS は 5 国際単位 (IU) /mL とした。結果をレポート用シートにまとめ、EDQM に送付した。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面への配慮が必要となる事項はない。

C. 研究結果

EDQM の BSP148 Phase 2 Study Protocol を元にチェックリスト形式のプロトコルを作成した (図 2)。これに従いプレテストを行ったところ、予想より OD 値が高かったため、EDQM の管理者責任者とオンライン会議およびメールにより協議し、前希釈の濃度の調整を行った。さらに試験結果が安定しなかったため、試薬の変更、プレートやチューブ等プラスチックウェアの変更、試薬保管方法の変更、機器の変更などを適宜行いながら合計 7 回のプレテストを行った。IS の結果が安定したところで本試験 3 回を行ったところ、ほとんどのサンプルでは、3 回の試験で安定して予想と近い値が得られた (図 3)。一方、サンプル F, H および K では結果にばらつきが見られた。

D. 考察

プレテストでは試験結果が安定しなかったが、EDQM のサポートを受け様々な改善を重ね、ほとんどの検体では予想通りの安定した結果を得ることが出来た。結果にばらつきが見られたサンプルについて、明確な原因を見出すことはできなかった。しかし、全て前希釈の倍率が高いもの (原液の濃度が高いもの) であったことから、試験に使用したピペットの精度によるブレの可能性が考えられた。今後ピペットおよびチップ

の精度管理をより厳しくし、EDQM より提供された追加のサンプルを用いて追加の実験を行う予定である。また、Phase3 のプロトコルの決定を待ち、国内のワクチンサンプルを使用した試験を行う予定である。

E. 結論

EDQM の国際共同研究に参加し、プロトコルに従って 3 回の試験結果を解析して報告した。今後引き続き試験の安定化および国内ワクチンを用いたバリデーションを行う。




F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nosaki Y, Maeda K, Watanabe M, Yokoi T, Iwai K, Noguchi A, Tobiume M, Satoh M, Kaku Y, Sato Y, Kato H, Okutani A, Kawahara M, Harada M, Inoue S, Maeda K, Suzuki T, Saijo M, Takayama-Ito M. Fourth imported rabies case since the eradication of rabies in Japan in 1957. J Travel Med. 2021 Dec 29;28(8):taab151.
- 2) 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*. 2021 70:59-63.

2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare / Direction européenne de la qualité des médicaments & des soins de santé
 Funded by the European Union and the Council of Europe
 COUNCIL OF EUROPE / Implemented by the Council of Europe
 EUROPEAN UNION / CONSEIL DE L'EUROPE

EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION

MW/sw
 Working document, with no legally binding status, intended exclusively for the addressees and their associates, under the responsibility of the addressees (listed opposite). Level 4
 English / Anglais

PA/PH/BIO (20) 33 R1
 Strasbourg, February 2021

BIOLOGICAL STANDARDISATION PROGRAMME

BSP148 Phase 2 Study Protocol

- 1 **5. PROCEDURE**
- 2 **CAUTION: DO NOT LET THE MICROPLATES DRY OUT** during the whole procedure.
- 3 → always stack plates and cover the upper plate with an empty plate or a lid to
- 4 avoid plates to dry out.
- 5 **5.1. Plate coating**
- 6 - Dispense 100 µL/well of freshly prepared working solution of capture mAb in the 96-well
- 7 microplates.
- 8 - Seal plates with an adhesive plastic film and incubate for 16 to 20 hours at +5°C ± 3°C.
- 9 - After incubation, plates still filled with coating buffer can be stored at -70°C for up to 3
- 10 months until use.
- 11 **5.2. Blocking phase**
- 12 Washing volume should be adapted according to the available equipment:
- 13 • 500 µL/well if using an automated ELISA microplate washer (with liquid aspiration) or
- 14 • 300 µL/well if performing manual washing.
- 15 - If using coated microplates stored at -70°C: thaw plates at room temperature for about
- 16 30 min. (do not heat the plates).
- 17 - Wash plates 3 times with Washing buffer (PBS-T).

図1：EDQMから提供されたプロトコル

BSP148 Phase 2 Study Protocol

Trial No.

Laboratory of neuroviruses, National Institute of Infectious Diseases

<u>PLATE COATING</u>	
Date	
Sign	
Preparation of Capture Mab(clone 1112-1)	
Mab clone1112-1 RD biotech, Plate:NUNC#439454	
<input type="checkbox"/> Dilute capture Mab as below	
	:200 (Total 256well)
CaptureMab(clone 1112-1)	145 uL
Coating Buffer(Date: _____)	29 mL-145 uL
1. Plate coating	
<input type="checkbox"/> Dispense 100 µL/well of capture mAb.(Lane1–11)	
<input type="checkbox"/> Incubate plates at +5 °C ± 3 °C, 16 to 20 hours _____ : _____ ~ _____ : _____	
After incubation, plates still filled with coating buffer can be stored at -70°C for up to 3 months until use.	
<u>ELISA RE</u>	
<u>ACTION</u>	
Date	
Sign	
<input type="checkbox"/> If using coated microplates stored at –70°C: thaw plates at room temperature for about 30 min. (do not heat the plates).	
2(Pre) Preparation of reagent	
DPBS--GIBCO 14190(lot# _____), BSA: SIGMA A2153 (lot# _____), Tween20 WAKO 167-11515(lot# _____)	
<input type="checkbox"/> Blocking solution(PBS – BSA 1%) 0.35 g of BSA + 35 mL of PBS	
<input type="checkbox"/> Washing buffer: PBS 1X – Tween 20 0.05% (PBS-T) 1 mL Tween + 2 L PBS	
<input type="checkbox"/> Dilution buffer: PBS 1X – Tween 20 0.05% - BSA 0.1% (PBS-T-BSA) 0.2 g of BSA + 200 mL of Washing buffer (PBS-T)	

図 2 : 作成したチェックリスト方式のプロトコル

Calculated potencies vs. IS7 (IU/mL)

	Assay 1	Assay 2	Assay 3
Sample A	6.20601	6.05636	6.01132
Sample B	14.3831	13.3241	13.5208
Sample C	6.44070	6.24184	6.25614
Sample D	7.03583	6.66416	6.58243
Sample E	8.09377	9.49015	8.31316
Sample F	31.4241	35.4833	31.8947
Sample G	14.33565	9.08623	8.52608
Sample H	18.2601	26.7773	53.8101
Sample I	7.01303	7.02014	6.65297
Sample K	14.3983	14.8602	22.5646

Confidence limits do not have to be reported.

If CombiStats was used for the calculations, please submit the EPA files in addition to this reporting sheet.

図 3 : 本試験 3 回の試験結果