

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について、動物愛護の観点から動物を用いない方法への転換が求められている。本研究では、欧州医薬品品質部門（EDQM）が主催する国際共同研究に参加し、力価試験法として抗原 ELISA を導入することを目的としている。昨年度の試験の結果、力価の高いワクチンサンプルについて算出された力価が安定しないという問題があった。そこで、本年度はプロトコルの細かい点について見直しを行い、改めて試験を行った。その結果、安定した結果が得られた。今後は国内のワクチンについて、同方法で力価測定が可能か検証する。

A. 研究目的

狂犬病は狂犬病ウイルスによる人獣共通感染症であり、発症した場合その致死率はほぼ 100%となる恐ろしい人獣共通感染症である。日本は狂犬病清浄国であるが、1970年、2006年、2020年に計4例のヒトの輸入例が報告されている。特に36年ぶりとなった2006年の発症後、国内での狂犬病ワクチンの予防ワクチンとしての需要が高まり、KM バイオロジクス（KMB）社製の国産品の生産が追い付かなくなったため、2019年からはグラクソスミスクライン（GSK）社製の輸入ワクチン（ラビピュール）が供給されている。

ヒト用狂犬病ワクチンの力価試験では、マウスを用いた方法が行われている。本方法は致死的な動物実験であり、動物愛護の観点より改善が求められている。そこで、本研究で

は、*in vitro* 力価試験である抗原 ELISA 法を導入することを目的としている。

現在、欧州医薬品品質部門（EDQM）では、Biological Standardisation 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行っている。我々と KMB 社、GSK 社はそれぞれこの共同研究に参加している。

狂犬病ワクチンは世界中で製造されているが、それらの細胞基材、添加物、pH、ウイルス株等は統一されていない。EDQM は本共同研究の目標として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方における実装を評価する

こと。を掲げており、ヨーロッパだけではなくアジアやアメリカ地域のラボも多数参加している。

これまでに、EDQM のプロトコルに沿って3回の試験を行った結果、濃度の濃いサンプルで力価の値のブレが大きいという問題があった。そこで、本年度は安定性を高めるための改善を行った。

B. 研究方法

抗原 ELISA は EDQM により提供された BSP148 Phase 2 Study Protocol に従って行った。詳細は昨年の報告書を参照のこと。

EDQM の担当者との協議により以下の点を変更して試験を行った。

1. 前希釈：最初に設定された前希釈の条件では測定に用いた ELISA プレートリーダー（Multiskan FC: Thermo Fisher Scientific）の測定上限を超えてしまうため、希釈率を高く設定した。
2. 反応条件：抗体の反応に用いるプレートシェーカーについて、回転数の表示のないモデルでは条件を合わせることが難しかったため、表示のあるモデル（BIOSAN LTD. PSU-2T）に変更した。
3. ピペット：前希釈で 20 もしくは 30 μ L の計量を行う際 20–200 μ L を測定可能な P200 ピペットを用いていたが、より正確な計量を行うため、10–100 μ L の GILSON 社 P100 ピペットに変更した。
4. プラスチックウェア：プラスチックウェアを全て EDQM 推奨のものに変更した。
5. DPBS：試験に用いる DPBS について汎用の pH 7.1–7.7（Wako 048-29805）を使用していたが、プロトコルの pH7.2 により近い pH 7.0–7.3 の DPBS（Gibco 14190235）

を用いた。

試験結果の解析は 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。解析モデルを Sigmoid curves (In dose)、Transformation を 5-parameters (asymmetric) に設定した。

（倫理面への配慮）該当なし

C. 研究結果

低希釈帯での OD 値がプラトーに達しないサンプルがあるものの、5-parameter ロジスティック回帰で標準品およびサンプルの測定値をプロットしたところ、逆シグモイド曲線が得られた。図 1 に示すように、国際標準品の OD 値の推移は、前回同様試験間ではほぼ一致していた。算出された各サンプルの力価試験品の力価を表 1 に示した。各サンプルの力価は明らかにされていないため、今回は KMB 社の結果から平均値および SD を算出し、平均値 \pm 3SD 以上および以下のものを外れ値として太字で示した。旧プロトコルの結果（1st–3rd）では sample G, H, K といった前希釈が高いもの（ワクチン力価が高いもの）において外れ値が出ていたが、改善後の新プロトコル（4th–5th）では外れ値は認められなかった。

D. 考察

プロトコル改善後の2回の試験では、外れ値は確認されず、新しいプロトコルにより試験の安定性が向上したことが分かった。次年度は新プロトコルでさらに数回試験を行い、安定性を確認後、国内のワクチンについて、同方法で力価測定が可能か検証する。

E. 結論

試験プロトコルの見直しによって、結果の安定性が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horiya M, Posadas-Herrera G, Takayama-Ito M, Yamaguchi Y, Iizuka-Shiota I, Kato H, Okamoto A, Saijo M, Lim CK. Genetic Characterization of Human Rabies Vaccine Strain in Japan and Rabies Viruses Related to Vaccine Development from 1940s to 1980s. *Viruses*. 2022 ;14(10):2152. doi: 10.3390/v14102152.

2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

H. 経済的利益相反

本研究班に関係し、共同研究契約（課題名：狂犬病ワクチン抗原含量試験法に関する研究）をKMバイオロジクス株式会社と締結している。内容：情報及び技術交換などの協力を行う（金銭の授受はない）。

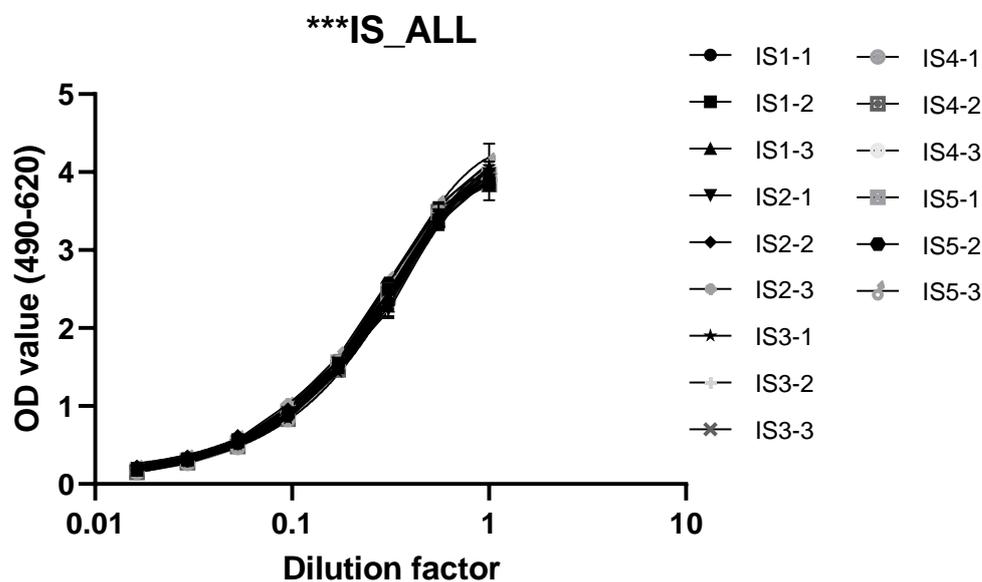


図 1：国際標準品の結果

IS-1–IS3 が 2021 年のプロトコル改定前のデータ。IS-4–IS-5 がプロトコル改定後のデータを示す。各試験でそれぞれ 3 回ずつ測定を行った。

表 1：算出力価

1st–3rd が 2021 年のプロトコル改定前のデータ。4th と 5th がプロトコル改定後のデータを示す。太字は KMB 社の平均±3SD から外れた値を示す。

	前希釈	旧プロトコル			新プロトコル	
		1st	2nd	3rd	4th	5th
SampleA	50	6.20601	6.05636	6.01132	6.26359	6.19984
SampleB	100	14.3831	13.3241	13.5208	14.46	13.5485
SampleC	50	6.4407	6.24184	6.25614	6.06868	5.80058
SampleD	50	7.03583	6.66416	6.58243	7.21845	6.71471
SampleE	50	8.09377	9.49015	7.58242	7.28382	7.39043
SampleF	150	31.4241	35.4833	29.0905	29.8397	29.3869
SampleG	80	14.33565	9.08623	7.77555	9.89433	9.25398
SampleH	150	18.2601	26.7773	49.069	27.5573	26.5921
SampleI	50	7.01303	7.02014	6.65297	6.60785	5.97588
SampleK	100	14.3983	14.8602	22.5646	13.1763	13.3188