

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
仲山 紀子 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究要旨：狂犬病ワクチンは致死率 100%の狂犬病の発症を予防する唯一の手段である。日本は狂犬病清浄国であるが、渡航用のワクチンとして大変重要である。ワクチンの力価試験は現在動物を用いた方法が実施されているが、動物愛護の観点から改善が求められている。そこで、動物を用いない力価試験法である抗原 ELISA について、欧州医薬品品質部門 (EDQM) との共同研究を行った。その結果、試供された 10 種類の試験品において、安定的な値を得ることが出来た。今後国内流通品において本方法を実装可能かについての検討を行いたい。

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、世界では 59,000 人のヒトが狂犬病により亡くなっていると推定されている。ヒトは狂犬病を発症した動物に咬まれたり、エアロゾルによる暴露を受けたりして感染し、発症した場合、その致死率はほぼ 100%となる。一方、感染疑いの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接種を行うことにより、発症を防ぐことが出来る（暴露後免疫）。また、通常のワクチンと同じように狂犬病流行国に渡航する前に免疫をつけるためにも使用される（暴露前免疫）。

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実施されている。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する。

上記目的のため、我々は欧州医薬品品質部門 (EDQM) が行っている、国際共同研究 Biological Standardisation Programme 148

(BSP148) に参加している。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試験間の力価のブレが大きいという問題があった。そのため、昨年度は安定性を高めることを目的にプロトコルの改善を行った。本年度はその方法によって、3 回の試験を実施し、結果の解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 抗原 ELISA : EDQM により提供された

BSP148 Phase 2 Study Protocol に従って行った。特に下記の点については、プロトコルに記載のない部分であったが、EDQM と議論して改善を行った。詳細は令和3年度及び4年度の報告書を参照のこと。

1. 前希釈の希釈率の変更
2. 抗体の反応に用いるプレートシェーカーの変更
3. 使用するピペットの容量の変更
4. ELISA プレートや希釈に用いるチューブ、チップ等の変更
5. DPBS の変更
6. 試薬の管理方法の変更

2. 試験結果の解析：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 Combi Stats を用いた。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

表 1 に示すようにプロトコルの改善前 (NIID2021) では、試験品 E を除き、Pre-Dilution の希釈率が 80-100 倍と高い試験品 G,H 及び K において特に試験間での値のばらつきが大きくなっていた。一方、改善後 (NIID2023) では各試験間のばらつきが少なくなっていた。実際、表 2 に示すように標準偏差 (SD: Standard Deviation) は試験品 E, F, G, H 及び K において約 3~30 倍の改善が見られた。平均値については改善前、改善後ともに EDQM の平均値と大きな相違はなかった (表 3)。また、図 1 に示すように OD 値の容量反応曲線は高希釈及び低希釈帯での

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。

D. 考察

これまでに我々は、死亡を待たずに麻ひを指標として安楽殺を行うことで、結果に影響を与えずに苦痛の軽減 (Refinement) が可能であることを示し (Takayama-Ito et al. Biologicals, 2017)、生物基の改訂を行った。しかし、最終的には動物を使用しない方法の導入が望まれるため、本研究により検定試験方法を変更することを目指している。

今回抗原 ELISA によって安定的な力価の値を得ることが出来たことから、今後国内で使用されているワクチンを用いて本方法のバリデーションを行い、力価試験法を変更する道筋が出来たと考えている。現在日本で承認を受けている狂犬病ワクチンは、KM バイオロジクス (KMB) 社製の国産品と 2019 年から輸入が開始されたグラクソスミスクライン (GSK) 社製のラビピュールの 2 つである。しかし、2018 年から KMB のワクチンの製造は停止しており、今後再開の見込みは立っていないことから、ラビピュールについての検討を行う予定である。

E. 結論

動物を用いない狂犬病ワクチンの力価試験法である抗原 ELISA について、EDQM との共同研究により試供された 10 種類の試験品において、安定的な値を得ることが出来た。今後国内流通品において本方法を実装可能かについての検討を行いたい。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

	Pre-Dilution (times)	NIID 2021			NIID 2023			IU/mL
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	
SampleA	50	6.21	6.06	6.01	6.26	6.20	5.97	
SampleB	100	14.38	13.32	13.52	14.46	13.55	13.47	
SampleC	50	6.44	6.24	6.26	6.07	5.80	5.41	
SampleD	50	7.04	6.66	6.58	7.22	6.71	6.67	
SampleE	50	8.09	9.49	7.58	7.28	7.39	7.09	
SampleF	150	31.42	35.48	29.09	29.84	29.39	27.76	
SampleG	80	14.34	9.09	7.78	9.89	9.25	9.65	
SampleH	150	18.26	26.78	49.07	27.56	26.59	21.43	
SampleI	50	7.01	7.02	6.65	6.61	5.98	6.27	
SampleK	100	14.40	14.86	22.56	13.18	13.32	13.49	

表 1：プロトコル改善前(NIID2021)及び改善後(NIID2023)のワクチン力価
太字は平均値+3SD 以上の外れ値を示す。

SD	NIID 2021	NIID 2023
SampleA	0.10	0.15
SampleB	0.56	0.55
SampleC	0.11	0.33
SampleD	0.24	0.30
SampleE	0.99	0.15
SampleF	3.23	1.09
SampleG	3.47	0.32
SampleH	15.91	3.29
SampleI	0.21	0.32
SampleK	4.59	0.15

表 2：プロトコル改善前(NIID2021)及び改善後(NIID2023)の標準偏差の比較

AVERAGE

	NIID 2021	NIID 2023	EDQM Ph1	EDQM Ph2.
SampleA	6.1	6.1	6.0	5.9
SampleB	13.7	13.8	15.0	13.8
SampleC	6.3	5.8	6.8	6.2
SampleD	6.8	6.9	6.7	6.7
SampleE	8.4	7.3	8.0	7.8
SampleF	31.9	29.0	29.3	28.6
SampleG	10.0	9.6	10.0	9.7
SampleH	28.8	25.0	22.0	24.5
SampleI	6.9	6.3	7.3	7.1
SampleK	16.9	13.3	14.6	13.8

表 3：プロトコル改善前(NIID2021)及び改善後(NIID2023)の平均値と EDQM の行った Phase1（開発施設での結果）及び Phase2（協力施設 12 か所）のワクチン力価の比較

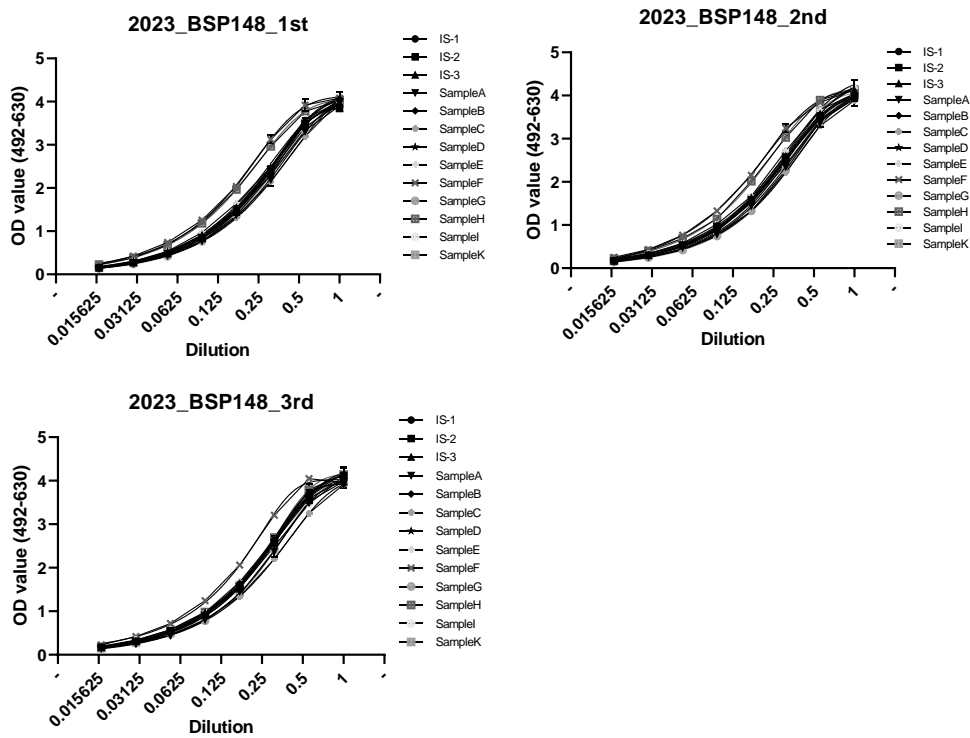


図 1：プロトコル改善後(NIID2023)の ELISA 試験の OD 値の推移