

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
河原 円香 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究要旨：本研究は、狂犬病ワクチンの力価試験を動物実験から *in vitro* の抗原 ELISA 法に変更することを目的としている。狂犬病は致死率がほぼ 100% の人獣共通感染症であり、世界では年間約 59,000 人が亡くなっている。日本では 1957 年以降国内発生はないが、渡航用ワクチンとして重要である。上記目的のため、我々は欧州医薬品品質部門（EDQM）の国際共同研究 BSP148 に参加している。BSP148 では、Phase1 でプロトコル準備、Phase2 で国際標準品を用いた試験、Phase3 で各国のワクチンを使用した試験が行われる。本年度は Phase3 として、バーバリアンノルディック社のワクチンサンプルを輸入し、それを用いて前希釈決定の試験を実施した。実験では、ワクチンサンプルを 50 倍、100 倍、150 倍に希釈し、100 倍希釈が最適であることが確認された。電動ピペットの設定ミスによる数値のブレも発見され、プロトコルに設定確認項目を追加した。来年度は決定したプロトコルに従い試験を行い、国際会議に参加する予定である。

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る。日本では 1957 年のネコの症例を最後に狂犬病の国内発生はないが、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、厚生労働科学研究費補助金による研究成果を受けて、2017 年より人道的エンドポイントの導入がされた。本研究では、さらなる改善として力価試験を *in vitro* 力価試験である抗原 ELISA 法に変更することを目的としている。

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。BSP148 は 3 つの Phase からなっており、Phase1 は EDQM 協カラボによるプレテスト・プロトコル準備、

Phase2 は国際標準品および EDQM 提供サンプルを用いた参加ラボによる共同試験、Phase3 は各国での国内ワクチンを使用した試験となっている。これまでに、我々は Phase2 において EDQM のプロトコルに従って試験を繰り返し、その結果より、試薬、前希釈および使用機器の変更等を行うことにより、プロトコルの調整を行った。また、Phase2 の結果について国際会議が開催され、最終的なプロトコルについて確定された。

本年度は Phase3 の実施のため、バーバリアンノルディック社より試験に用いるワクチンサンプルを輸入し、これを用いた前希釈決定のための試験およびその確認を行った。

B. 研究方法

材料：

- ・ 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)
- ・ Capture Mab: Anti-Rabies Virus Antibody, clone 1112-1 (RD biotech/MERCK)
- ・ Detection Mab: Anti-RABV Glycoprotein Antibody, clone D1-25 (MERCK)
- ・ DPBS (GIBCO 14190)
- ・ BSA(SIGMA A2153)
- ・ Tween20 (WAKO 167-11515)
- ・ Streptavidin, Peroxidase Conjugated (SIGMA S2438)
- ・ Citate 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：抗原 ELISA については EDQM により提供された BSP148 Phase 2 Study Protocol に従って行った。Capture Mab を Buffer で希釈し、プレートに播種して 4°C で 16—20 時間放置した。プレートを 0.05%Tween20 含有 DPBS で洗浄後、BSA1%含有 DPBS でブロッキングし、洗浄後前希釈したワクチン試料を 1.8 倍段階希釈して添加した。ビオチン化 Detection Mab、Streptavidin-Peroxidase、OPD を毎回洗浄後に順に反応させた後、stop solution を加えた。492nm で測定した数値より 620nm で測定した数値を引き、結果を GraphPad Prism10 および CombiStats ソフトウェアで 5-parameter logistic (5PL) model を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

実験 1：Phase2 では事前に EDQM が試験ワクチンの前希釈について検討を行い決定されていた。しかし、今回各国で使用するワクチン製剤を使用するため、各製剤の濃度や特性に合わせた前希釈を設定する必要がある。そこで、各ワクチンサンプルを 50 倍、100 倍および 150 倍に希釈して試験を行った (繰り返し 1 回)。GraphPad Prism10 による解析の結果、各サンプルはほぼ完全なシグモイド曲線を取っていた。図 1A に示すように試験ワクチンは 100 倍希釈で 7thIS と近い曲線を示したことから、試験ワクチンの前希

積としては 100 倍が適当であると考えられた。12 のワクチンサンプルのすべてで 100 倍希釈が最も適当な前希釈の濃度であった (図 1C)。

実験 2: 実験 1 により決定した前希釈 : 100 で各試験ワクチンを希釈して試験を行った (繰り返し 2 回)。Combistats による解析の結果、各曲線はほぼ完全なシグモイド曲線を取っていたが、Plate2 においては 2 段階目の希釈で数値のブレが見られた。7thIS の各数値はプレート間でほぼ一定であった。

D. 考察

現在日本で承認されているワクチンは、バーバリアンノルディック社 (販売: オーフアンパシフィック社) のラビピュール筋注用と KM バイオロジクス社の乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの 2 製品であり、そのうち KM バイオロジクス社のワクチンについては 2019 年以降製造がない。本研究では、バーバリアンノルディック社より、12 ロットのサンプル供与を受け、それを用いた条件検討を行った。実験 1 によりラビピュールについては前希釈 100 倍が適当であることが分

かった。実験 2 では前希釈 100 倍で試験を行い、本希釈率で試験を行うことが適当であると再確認された。一方、プレート 2 では数値のブレが見られたが、これは電動ピペットの速度の設定を間違えて通常より早くしたことにより、攪拌に異常があったこと原因と考察された。再発防止のため、プロトコルに電動ピペットの設定値とその確認の項目を追加した。

E. 結論

Phase3 は各国での国内ワクチンを使用した試験を行うが、それに必要なワクチンの前希釈率を決定することが出来た。また、電動ピペットの設定の重要性が明らかとなったことから、設定とその確認について新たにプロトコルに追加した。来年度は決定したプロトコルと前希釈に従い試験を行うとともに、試験の導入に向けて国際会議に参加する予定である。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

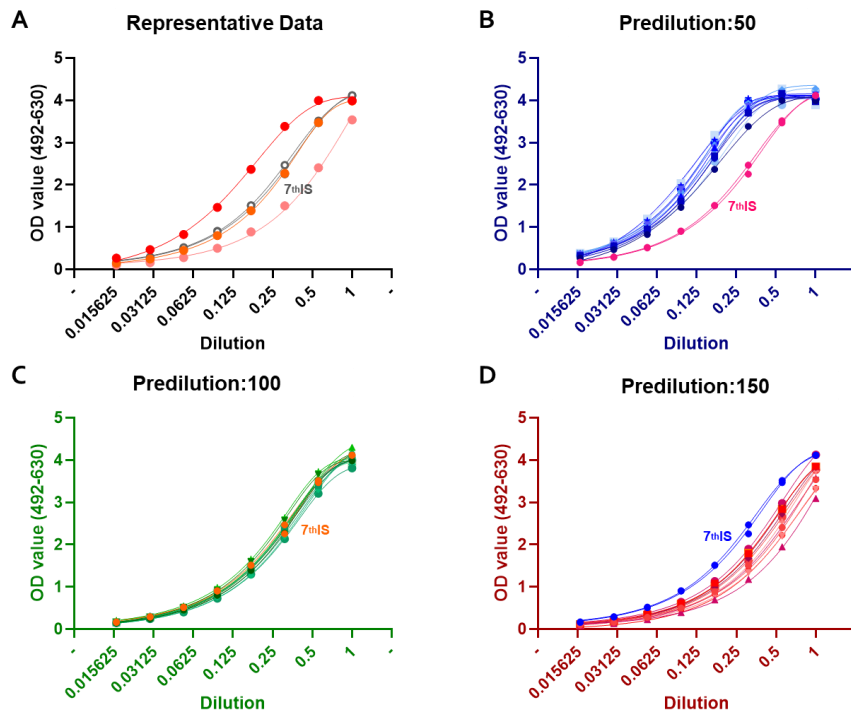


図 1：実験 1 の GraphPad Prism10 による解析

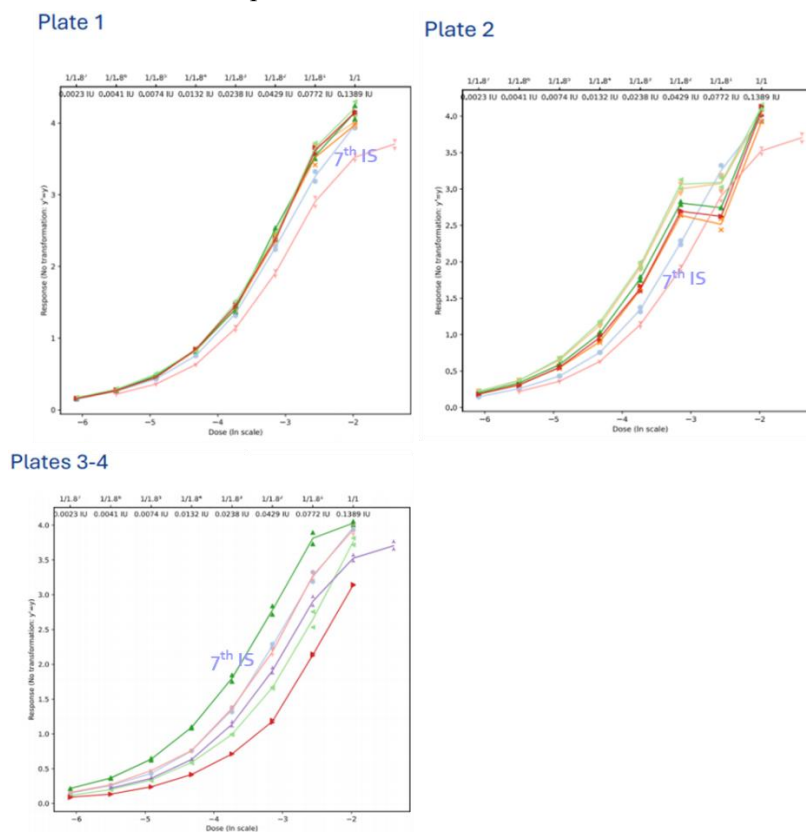


図 2：実験 2 の Combistats による解析