

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2016
課題番号：25350587
研究課題名（和文）生命にやさしいワクチン品質管理法の開発

研究課題名（英文）Replacement method for vaccine potency tests

研究代表者
岩城 正昭（Iwaki, Masaaki）

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：20176530
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：ワクチンなどの生物学的製剤は一般の医薬品とは異なり、「品質管理において実験動物が用いられることが多い。特に破傷風トキソイドワクチンの有効性を調べる力価試験は、マウスにワクチンを投与（免疫）しておいてから人為的に毒素を投与（毒素攻撃）して耐えるかどうかを指標にした、動物に苦痛を強いる試験法のため、動物に苦痛を与えない防御能試験法開発が動物福祉の観点から望まれている。本研究では、動物の苦痛を軽減することを目的に、上記試験の「毒素攻撃」の部分代替できるようなin vitro試験系の開発を目指した。その結果、すぐに実用化できるレベルではないが、in vitro試験系開発の可能性を示す結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Quality control of vaccines largely rely on animal experiments. Potency tests for tetanus toxoids employ animal challenge with tetanus toxin sometimes stressful to animals. To avoid unnecessary stress by in vivo challenge method, we tried to construct a system for tetanus toxoid potency test, with less stress to animals. The test system needs to measure toxin-neutralizing activity in immunized animals accurately and sensitively enough to be applied in quality control of vaccines. Our results suggest, although not immediately applicable to routine testing, a possibility of developing an in vitro test system by further studies.

研究分野：細菌学、ワクチン品質管理

キーワード：ワクチン 品質管理 動物福祉

1. 研究開始当初の背景

ワクチンは、健康な多数の被接種者に対して接種されるという点で、医療技術の中でもヒトと医療のインターフェースとして最もセンシティブな分野の一つである。レギュラトリーサイエンスの重要な一分野であるワクチンの品質管理には、細心の注意が必要であると同時に、現在ではその品質管理法自体が「生命にやさしい」かどうか目が向けられている。ワクチンなどの生物学的製剤は一般の医薬品とは異なり、「物理化学的手法だけではその安全性・有効性を評価できない (WHO)」ため、品質管理においては実験動物が用いられることが多い。特に破傷風トキソイドワクチンの有効性を調べる力価試験は、マウスにワクチンを投与 (免疫) しておいてから人為的に毒素を投与 (毒素攻撃) して耐えるかどうかを指標にした、動物に苦痛を強いる試験法のため、動物に苦痛を与えない防御能試験法開発が動物福祉の観点から望まれている。

2. 研究の目的

破傷風毒素を主な因子とする感染症である破傷風は、終戦直後には年間数千人の患者・死者がみられたが、現在では年間 100 人程度の発生にまで抑えられている。予防に大きく寄与したのが、破傷風毒素をホルマリンで無毒化し抗原性を残した破傷風トキソイドワクチンである。

ワクチンの品質管理はメーカーおよび各国政府機関に義務づけられ、中でも重要な効力は、動物を用いた力価試験によって求められる。

現在世界で最も広く行なわれている破傷風ワクチンの力価試験法は、マウス毒素攻撃法である。この方法では、マウスに被検ワクチンを接種して免疫を付与した後、LD50 の 50-200 倍の破傷風毒素でマウスを攻撃して、生死と症状を数日間観察することで付与された免疫の程度を測り、ワクチンの力価を定量する。この観察期間中、マウスは著しい麻痺及び強直性痙攣を示し、多大な苦痛を被ることになる。そのため、動物福祉の観点から、代替法開発が課題とされてきた。毒素活性解析のための *in vitro* 実験系はいくつか報告されているが、ワクチンの力価試験において、現行の試験に置き換わるような試験法は報告されていない。

本研究では、破傷風トキソイド力価試験の「毒素攻撃」の部分代替できるような *in vitro* 試験系を開発を行なうことで、試験における動物の苦痛を軽減することを目指した。具体的には、(1) 破傷風毒素のエンドペプチダーゼ活性の阻害および (2) 破傷風毒素のレセプター結合の阻害を指標とした防御能の *in vitro* 測定系の開発について検討した。

(3) また、より *in vivo* に近い、発育鶏卵の正常発生に対する毒素の作用を解析し、指標として用いることができるのかも検討した。

3. 研究の方法

(1) 標的蛋白質切断活性の測定系構築

破傷風毒素は、SNARE 蛋白質 VAMP2 (Synaptobrevin 2) の 76-77 残基目の間を選択的に切断する。標的部位を含む VAMP2 断片と分子量数万のタグ蛋白質の融合蛋白質を作成し、切断による分子量の変化を指標に、切断の有無を Western blotting で検出した。VAMP2 遺伝子は、市販のマウス cDNA ライブラリーよりクローンを指定して全長を入手し、PCR により必要部分を増幅してサブクローン化した。VAMP2 の標的部位周辺の 65 アミノ酸残基の N 末端側に pCold ProS2 ベクター (タカラ) 由来の S protein および SNAP25 の断片を連結し、C 末端側には傾向蛋白質 EYFP を連結した基質蛋白質クローンを 3 種類作成した (図 1)。作成した蛋白質は pCold ProS2 ベクターを用いて低温で大量発現し精製した。

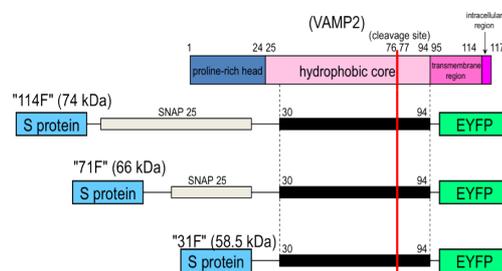


図 1. 基質蛋白質クローン

切断反応は、0-5000 マウス LD50 の精製破傷風毒素を、2-4 μ g の精製した基質蛋白質を含む緩衝液 (20mM HEPES pH7.0、20 μ M ZnCl₂、2.5mM DTT、0.2% gelatin) 中に加え、37°C 18 時間インキュベートして行なった。抗体による中和反応の測定は、上記反応系に 0-0.5 国際単位のウマ破傷風抗毒素、抗破傷風人免疫グロブリン、抗破傷風マウス血清を 0-0.5 単位加えた。

切断の有無は、反応後の反応液を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後ニトロセルロース膜に Western blotting し、抗 EYFP マウス一次抗体とアルカリホスファターゼ標識抗マウスイムノグロブリン二次抗体で処理したのち NBT-BCIP (Promega) を用いて発色・検出した。

(2) 破傷風毒素のレセプター結合の阻害を指標とした防御能の *in vitro* 測定系

2014 年に破傷風毒素のレセプターとして新たに報告されたタンパク質 nidogen 1 の全長および毒素結合部位のペプチドを固相 (96 穴プレート) に固定し、ビオチン化した破傷風毒素を加えてインキュベートし、プレートに結合したビオチン化破傷風毒素を、ストレプトアビジン-HRP コンジュゲートによる発色反応で検出した。

(3) 発育鶏卵に対する破傷風毒素の影響 100-10000 マウス LD50 の破傷風毒素を 0.2ml の 0.2%ゼラチン加 PBS に溶解し、10

日齢の発育鶏卵の漿尿膜腔内に、26Gの注射針を用いて無菌的に投与した(n=3)。投与後、卵殻の穴を封じて転卵機能付き孵卵器で37.5℃、湿度70%で孵卵した。孵化の兆候が判別できる段階で、低温処理により卵の発育を中止した。

4. 研究成果

(1) 標的蛋白質切断活性の測定系構築と抗体による切断反応の阻害

a. 基質蛋白質の選択

図1に示した3種の基質を破傷風毒素で処理したところ、”31F”が最も効率よく切断されることが判明したので(図2)、以後の実験には31Fを基質として用いた。

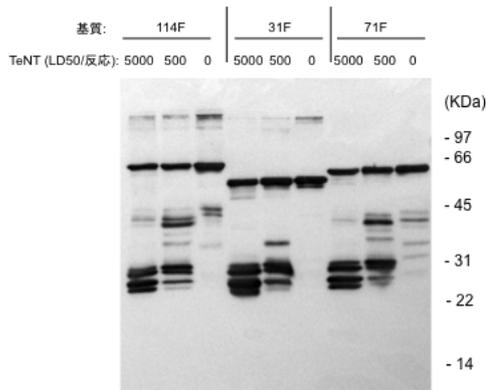


図2. 3種の基質の破傷風毒素による切断

b. 基質蛋白質の切断と抗体による阻害

次に、抗毒素価が既知の抗体を用いて、中和による切断反応の阻害が検出できるかどうか調べた(図3)。抗毒素価が既知の、ウマおよびヒト由来の抗体(いずれもポリクローナル抗体)を用いて、中和による切断反応の阻害が検出できるかどうか調べた(図4)。ウマ由来の標準抗体により、破傷風毒素による基質蛋白質の切断が部分的に中和されることが認められた(図4)。一方、ヒト由来の抗体による中和は認められなかった(図4)。

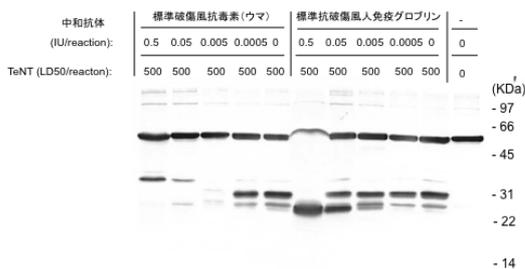


図4. ウマおよびヒト抗体による切断反応の阻害

また、マウス由来の抗破傷風毒素ポリクローナル抗体によっても、部分的な中和が認められた(図6)。

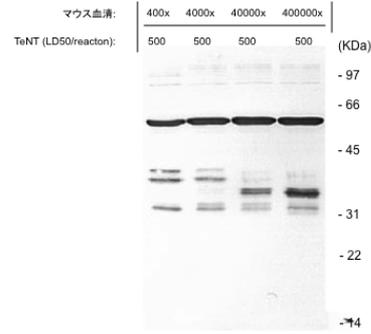


図5. マウス由来抗破傷風毒素血清による切断反応の阻害

一方で、基質に破傷風毒素の非存在下で高濃度のヒト由来抗体を加えてインキュベートすることによっても異質の切断が起こることが観察された(図6)。同様の切断は高濃度のウマ抗体およびマウス抗血清によっても認められた。この切断はプロテアーゼ阻害剤ペプスタチンによっても阻害されなかった(図6)。切断が抗体自身によるのか、プロテアーゼ活性を持つ物質の混在によるのかについては不明である。

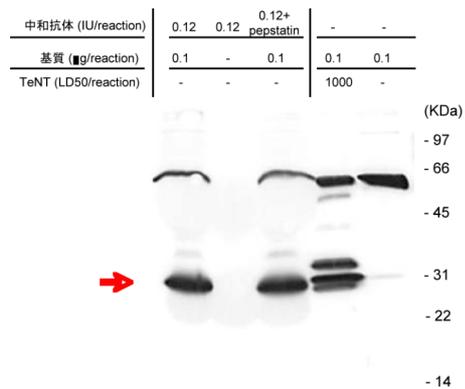


図6. 抗体処理による基質の切断

(2) 破傷風毒素のレセプター結合の阻害
2014年に同定されたレセプター分子nidogenの全長および毒素結合部位のペプチドを固相に固定し、ビオチン標識した破傷風毒素のレセプターへの結合を定性的に検出することができた。しかし定量性に乏しく、測定系として利用するには定量性を確立するなど更なる検討が必須と考えられた。

(3) 発育鶏卵の正常発生に対する毒素の作用

100-10000マウスLD50の破傷風毒素を発育鶏卵に投与し、孵卵中に死亡するかどうかを指標に、鶏卵の発生に対する破傷風毒素の作用を調べた。用いたいずれの濃度の破傷風毒素によっても、鶏卵の正常発生に対する影響を認めることができず、発育鶏卵は破傷風毒素の作用およびその中和による阻害を指標としたワクチン力価試験系としては適してい

ないことが明らかになった。ニワトリはマウスに比べて破傷風毒素に対する感受性が低いとの報告があるが、10000 マウス LD50 の毒素が胚の正常発育に影響しないという今回の結果は予想外であった。胚に直接毒素を注入することでより高い感受性を得ることができた可能性があるが、技術的に難しくルーチンには不向きのため、本研究の対象としなかった。

(考察)

世界的に動物実験に対して。他の方法で置き換えられる可能性があるか (Replacement)、使用する動物数および実験に拘束する期間が科学的根拠に立脚し、かつ動物福祉倫理上問題がないか (Reduction)、実験に伴い動物に与えると考えられる苦痛をできる限り軽減することが考慮されているか (Refinement) のいわゆる「3Rs」が提唱され、対応して湯九個 t が求められている。しかし動物を用いた力価試験の代替法開発は容易ではない。まず、ワクチンのスペックとしての抗原量を力価の指標にすることはできない。微妙な製法の差異が大きく影響し、抗原量と力価の間に相関がないためである。従って、代替法には、マウス等の動物に被検ワクチンを接種して抗体価の上昇を測定することが求められる。最も簡単な方法は、ELISA、凝集法などにより測定可能な、血中「結合抗体価」の測定だが、破傷風ワクチンの力価測定においては、結合抗体価は力価測定の指標としては不十分とされており、WHOでも一部の用途に限定して認めるのみである。従って、代替法には、毒素に結合するだけでなくその作用を打ち消す「中和抗体価」の測定系であることが要求される。そこで本研究では、中和抗体価を *in vitro* で測定できる実験系の開発を目指した。本研究では、中和抗体価を *in vitro* で効率よく正確に測定することのできる実験系を開発することができなかつた。以上の結果より、当面、破傷風トキシノイドの力価試験においては、現行の毒素攻撃法を継続せざるを得ないと考えられる。その一方で、*in vitro* 測定系の開発は、避けて通れない課題である、破傷風毒素の活性の *in vitro* 測定系としては、レセプター結合と基質切断を組み合わせた Binacle という実験系がある (Behrendorf-Nicol, H.A., et al., Vaccine, 2013, 31(52): p. 6247-6253)。この実験系は破傷風トキシノイドワクチンに残存する毒素活性の検出 (無毒化試験) のために開発されたものであり、力価試験への適用については論文に記述がないが、適用が可能かどうか検討課題の一つである。また、ELISA 等の結合抗体価測定系の適用の可否も今後検討課題になると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩城正昭 (IWAKI, Masaaki)
国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究
官
研究者番号：20176530

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

見理 剛 (KENRI, Tsuyoshi)
国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究
官
研究者番号：80270643

佐藤智典 (SATO, Toshinori)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：00162454

(4) 研究協力者

嶋崎典子 (SHIMASAKI, Noriko)
国立感染症研究所・インフルエンザウイル
ス研究センター・研究員