

學術研究報告編

[技術資料]

動物医薬品検査所標準製剤等配布規程に基づき配布する抗豚熱ウイルス GPE⁻モノクローナル抗体の新規ロットの調製

木田萌子、山下麻依子、落合絢子、榊基¹、曳地七星¹、山崎雅人、森崎一葉、
野口真由子、福田明子²、山本欣也

(令和5年7月31日受付、令和6年1月16日受理)

[TECHNICAL REPORT]

Preparation of a new lot of anti-classical swine fever virus GPE⁻ monoclonal antibody according to the National Veterinary Assay Laboratory regulations for the distribution of standard products

Moeko KIDA, Maiko YAMASHITA, Mariko OCHIAI, Hajime SAKAKI¹, Nanase HIKICHI¹, Masato YAMAZAKI, Kazuha MORISAKI, Mayuko NOGUCHI, Akiko FUKUDA², Kinya YAMAMOTO

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-15-1
Tokura, Kokubunji-shi, Tokyo 185-8511, Japan*

(Received: 31st Jul 2023, Accepted: 16th Jan 2024)

Abstract

The monoclonal antibody 3D11 (3D11 MAb), which is reactive with the classical swine fever (CSF) virus strain GPE⁻, was prepared in a fresh lot (Lot. 2021.09.30) for use as part of the indirect immunoperoxidase (IIP) method for virus content testing of live CSF vaccines. The frozen cell stock of hybridoma 3D11 was thawed and cultured. The resulting ascites fluid was collected after intraperitoneal administration of the hybridoma to mice. The potency of the 3D11 MAb (Lot. 2021.09.30) to detect cells infected with CSF virus decreased progressively from at x4,000 dilution but remained detectable at x48,000 dilution. Dilutions up to x24,000 had no impact on IIP method-based virus content test results; however, the absorbency of the infected cells decreased as the 3D11 MAb dilution decreased from x4,000 to x32,000. Therefore, we propose a reference dilution of x3,000 for virus content tests of live CSF vaccines produced in Japan for 3D11 MAb (Lot. 2021.09.30).

要旨

豚熱生ワクチンのウイルス含有量試験の間接イムノペルオキシダーゼ法（IIP法）に使用する、豚熱ウイルスGPE⁻株に反応する3D11モノクローナル抗体（3D11抗体）の新しいロットを調製した。凍結保存していた3D11ハイブリドーマ細胞を解凍し、継代したものを、マウスの腹腔内に投与し、腹水を採取した。3D11抗体（Lot. 2021.09.30）は2,000倍から48,000倍まで豚熱ウイルス感染細胞を検出で

¹ 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

Animal Products Safety Division, Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

² 国立感染症研究所

National Institute of Infectious Diseases

きたが、4,000倍からは徐々に結合する抗体量が減少した。24,000倍まではIIP法によるウイルス含有量試験に影響を与えなかった。しかし、ウイルス感染細胞の吸光度は4,000倍から32,000倍において、3D11抗体の希釈に伴い低下した。その結果、日本で製造された豚熱生ワクチンのウイルス含有量試験に使用するには3,000倍での使用が適切であると判断した。

緒言（背景）

動物医薬品検査所では動物医薬品検査所標準製剤等配布規程（昭和45年農林省告示第637号）に基づき、動物用医薬品の品質検査の精度管理等のために使用する標準製剤等を確保し、動物薬メーカー等に配布している。抗豚熱ウイルスGPE⁻モノクローナル抗体は、動物用生物学的製剤基準（平成14年農林水産省告示第1567号）（動生剤基準）のワクチン（シードロット製剤の部）の豚熱生ワクチン（シード）のウイルス含有量試験（間接イムノペルオキシダーゼ（IIP）法）に用いる標準製剤等の一つである。モノクローナル抗体を用いたIIP法は陣山ら（陣山ら1993）によって確立された。IIP法に用いるモノクローナル抗体は、筒井ら（筒井ら1994）が作出した抗豚熱ウイルスALD株モノクローナル抗体3D11を抗豚熱ウイルスGPE⁻モノクローナル抗体（3D11抗体）として配布している。

豚熱生ワクチンは平成18年3月に接種が完全中止となり、年間1ロット程度の備蓄用ワクチンとしての製造のみとなった。そのため、豚熱生ワクチンメーカーにおける品質管理及び検定に使用される3D11抗体は、平成18年から配布している3D11抗体ロット（Lot. 2006.03.30）（青木ら2006）から更新されていない。しかし、平成30年9月に我が国で26年ぶりに豚熱が発生したことにより、令和元年10月より豚熱生ワクチンの接種が開始され、年間の豚熱生ワクチン製造ロット数が増加した。このような状況を受け、当所における3D11抗体の調製技術を維持し、豚熱生ワクチン製造所社への3D11抗体の安定供給を図るため、新ロット（Lot. 2021.09.30）を調製した。本稿では、その内容について報告する。

材料及び方法、実験成績

1. 抗体産生ハイブリドーマの培養

-80℃で保存していた抗体産生ハイブリドーマ（3D11抗体産生ハイブリドーマ）（筒井ら1994）を、青木らの技術資料（青木ら2006）を参考にし、牛ウイルス性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性の牛胎子血清（株式会社ジャパン・バイオシーラム）を10%添加したS-Clone SF-O3培地（Iwai North America Inc.）で培養した。培養開始初期は、細胞数を $2.0 \sim 5.0 \times 10^5$ 個/mL、細胞が十分に増殖していることが確認できない場合は $5.0 \sim 9.0 \times 10^5$ 個/mLに調整して2～3日間隔で継代を行ったところ、2～3回継代した時点で継代後2～3日で培地の色調が橙色に変化し、 $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ 個/mLの細胞数が確認できた。その後、増殖した細胞数の上限を 1.5×10^6 個/mLとして2～3日間隔で細胞濃度が 1.5×10^6 個/mLを超えない時点で $1.5 \sim 3.0 \times 10^5$ 個/mLとなるように希釈して継代した。継代2回のうち1回は遠心分離により細胞のみを回収して、新しい培地に継代を行った。

2. マウス腹水の作製

BALB/c系マウス（4週齢、雌、日本エスエルシー株式会社）30匹にPristane（フナコシ株式会社）0.5 mLを腹腔内投与し、2週間後、 2.0×10^7 /mLとなるようにPBS（-）に浮遊させた3D11抗体産生ハイブリドーマ0.5 mLをマウス腹腔内に投与した。投与後7日目から軽度な腹部膨満を呈する個体が観察されるようになり、腹部膨満が認められた個体から投与後9～14日目に1～2日間隔で腹水を採取し、1個体あたり約3 mLの腹水が得られた。採取した腹水は遠心分離（450G、5分間）を行い、上清を個体別腹水として-30℃で保存した。

本動物試験は、動物医薬品検査所の動物等管理委員会の承認を得て実施した。

3. マウス腹水から 3D11 抗体原液の作製

個体別腹水に含まれる 3D11 抗体を IIP 法により確認した。IIP 法に用いるスクリーニング用抗原プレートは以下のように作製した。抗原は 3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) と Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG (H+L) 抗体 (invitrogen, A11001) を使用した間接蛍光抗体法 (IFA 法) で 10^3 TCID₅₀/mL を示した豚熱ウイルス GPE⁻株を用いた。PK15 細胞は細胞増殖用培養液 (0.295% Tryptose Phosphate Broth (TPB) (Difco Laboratories) を含有するイーグル MEM 培地「ニッスイ」(日水製薬株式会社) に、10%牛ウイルス性下痢ウイルス陰性牛胎子血清 (株式会社ジャパン・バイオシーラム)、0.105%炭酸水素ナトリウム、0.002mol/L L-グルタミン、100 単位/mL 結晶ペニシリン G カリウム、0.1mg/mL 硫酸ストレプトマイシンを含むもの) で 1.0×10^6 cells/mL に調整して用いた。96 穴プレートの 1 穴につき、豚熱ウイルス GPE⁻株 0.1 mL と PK15 細胞 0.1 mL を同時接種して抗原陽性穴とした。抗原陰性穴には、細胞増殖用培養液 0.1 mL と PK15 細胞 0.1 mL を接種した。37°C、5% CO₂ 下で 6 日間培養後、プレートを PBS (+) で洗浄し、-30°C に冷却した 80%アセトン PBS (+) (アセトン (富士フィルム和光純薬株式会社)) で固定した。

個体別腹水を、1.0w/v% BSA 加ハanks液 (ハanks液「ニッスイ」(1) (日水製薬株式会社) に、1%牛血清アルブミン (BSA)・コーンフラクション V pH7.0 (和光純薬工業株式会社)、0.105%炭酸水素ナトリウムを含むもの) で 100 倍から 8,000 倍まで希釈し、希釈毎に抗原陽性穴の 1 穴に 50 μL ずつ加えた。反応陰性の指標として、抗原陰性穴 6 穴に 1,000 倍希釈した 3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) を 50 μL 加えた。37°C で 60 分間反応後、PBS (+) で洗浄し 0.55w/v% BSA 加ハanks液 (1.0w/v% BSA 加ハanks液の BSA 濃度を 0.55w/v% に減じたもの) で希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (CAPPEL#55563) を全ての穴に 50 μL ずつ加え、37°C で 60 分間反応させた。PBS (+) で洗浄後、基質液 (0.2mol/L リン酸-0.1mol/L クエン酸緩衝液 (pH5.0) 20 mL に o-フェニレンジアミン二塩酸塩 (Sigma-aldrich, Merck) 10mg 及び過酸化水素水 (富士フィルム和光純薬株式会社) 0.004 mL を加えたもの) を 0.1 mL 加え、遮光して室温で 30 分反応させ、2.5mol/L 硫酸 0.05 mL を加えて反応を停止させた。492 nm 及び 630 nm で吸光度を測定し、492 nm の吸光度から 630 nm の吸光度を減じた値を算出し吸光度値とした。以下本稿における IIP 法は、特に記載がない条件についてはこの方法に従った。

Fig. 1 の吸光度値 0.192 の一点鎖線は、反応陰性の指標とした抗原陰性穴 6 穴の平均吸光度値の 2 倍を示す。動生剤基準のウイルス含有量試験において、豚熱ウイルス GPE⁻株陽性の判定は抗原陽性穴の吸光度値が抗原陰性穴の平均吸光度値の 2 倍以上の吸光度値を示すことが条件であるため、一点鎖線の吸光度値より高い吸光度値を示す個体別腹水が豚熱ウイルス GPE⁻株抗原を検出できる 3D11 抗体を含むと判断した。Fig. 1 の点線で示した 2 匹由来の個体別腹水は、それぞれが 1,000 倍と 4,000 倍で反応陰性の指標とした吸光度値を下回った。また、破線で示した 3 匹由来の個体別腹水は、他の 25 匹由来の個体別腹水と比較して 2,000 倍から 8,000 倍希釈において著しい吸光度値の低下が認められた。この結果から、それら 5 匹由来の個体別腹水は 3D11 抗体を含まないか、もしくは 3D11 抗体量が比較的少ないと判断し、それらを除外した 25 匹由来の個体別腹水 (Fig. 1 の実線) をプールし、3D11 抗体原液 (Lot. 2021.09.30) (以下 3D11 抗体原液) とした。

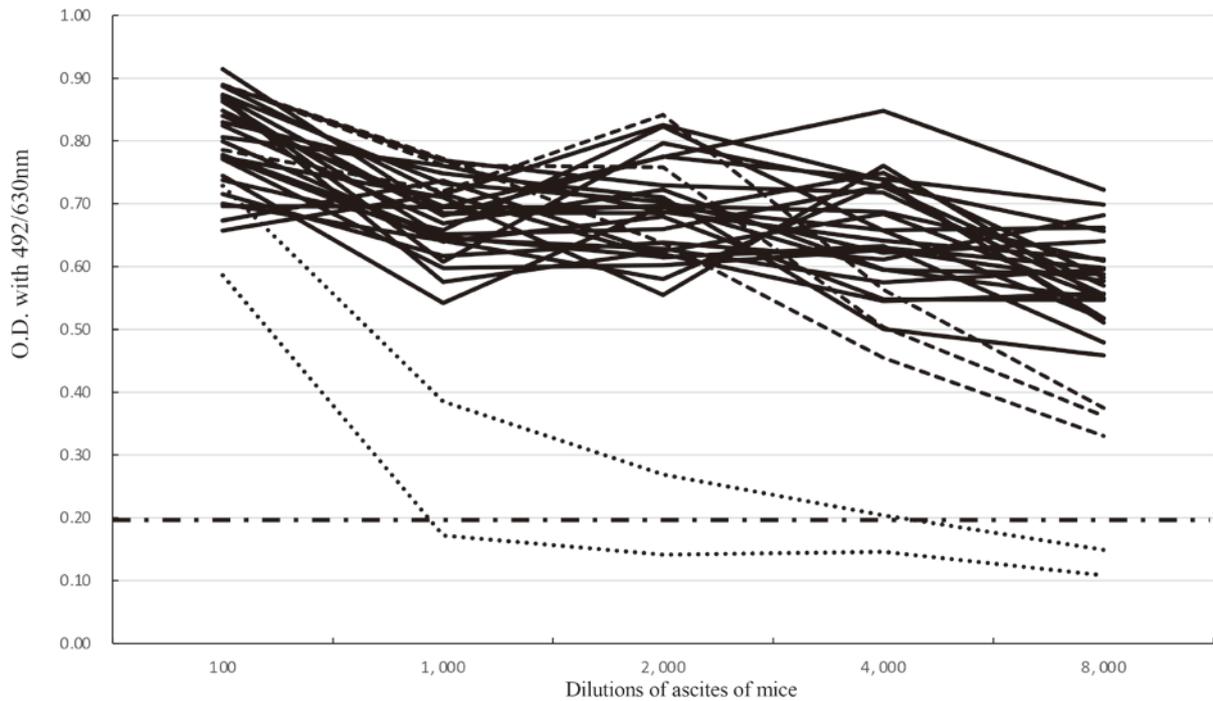


Fig. 1 Screening of the ascites pools of thirty mice injected with the 3D11 hybridoma. Production of the 3D11 monoclonal antibody (MAb) was confirmed using the indirect immunoperoxidase (IIP) assay. The absorbance values (OD at 492 nm subtracted from OD at 630 nm) of each pool were plotted. The values of each pool diluted from x100 to x8,000 were represented by solid, dashed and dotted lines respectively. An absorbance value of 0.192 (the double absorbance value of the mock-infected PK15 cells using 3D11 MAb (Lot. 2006.03.30)) was set as the cutoff value, indicated by the dashed dotted line. The new lot of 3D11 MAb (Lot. 2021.09.30) was prepared from 25 ascites pools marked with solid lines.

4. 3D11 抗体原液の豚熱ウイルス GPE⁻株抗原検出限界

3D11 抗体原液の豚熱ウイルス GPE⁻株抗原検出限界を IIP 法で評価した。抗原プレート作製の抗原には 3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) を使用した IIP 法で $10^{3.8}$ TCID₅₀/mL を示した豚熱ウイルス GPE⁻株を 10 倍希釈して用いた。3D11 抗体原液を 1.0w/v% BSA 加ハanks 液で 2,000 倍から 48,000 倍まで希釈し、希釈毎の試料を抗原プレートの抗原陽性穴 8 穴と抗原陰性穴 2 穴に 50 μ L ずつ加えて IIP 法を実施した。現在配布している 3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) は、動物医薬品検査所における IIP 法での使用条件である 1,000 倍希釈とした。Fig. 2 の破線は抗原陰性穴の吸光度値の 2 倍を示す。3D11 抗体原液は、2,000 倍から 3,000 倍の希釈で吸光度値の低下は見られなかったが、4,000 倍希釈から 48,000 倍では希釈倍率と吸光度値に低下の相関が認められた。すべての希釈において、抗原陰性穴の吸光度値の 2 倍を超える吸光度値を示したことから、3D11 抗体原液は少なくとも 48,000 倍までの希釈で豚熱ウイルス GPE⁻株抗原を検出できることが示された。また、3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) の抗原陽性穴における吸光度値は 0.6357 であり、3D11 抗体原液は 8,000 倍希釈までは、当所の使用条件における 3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) と同等以上の検出能力であることが示された。

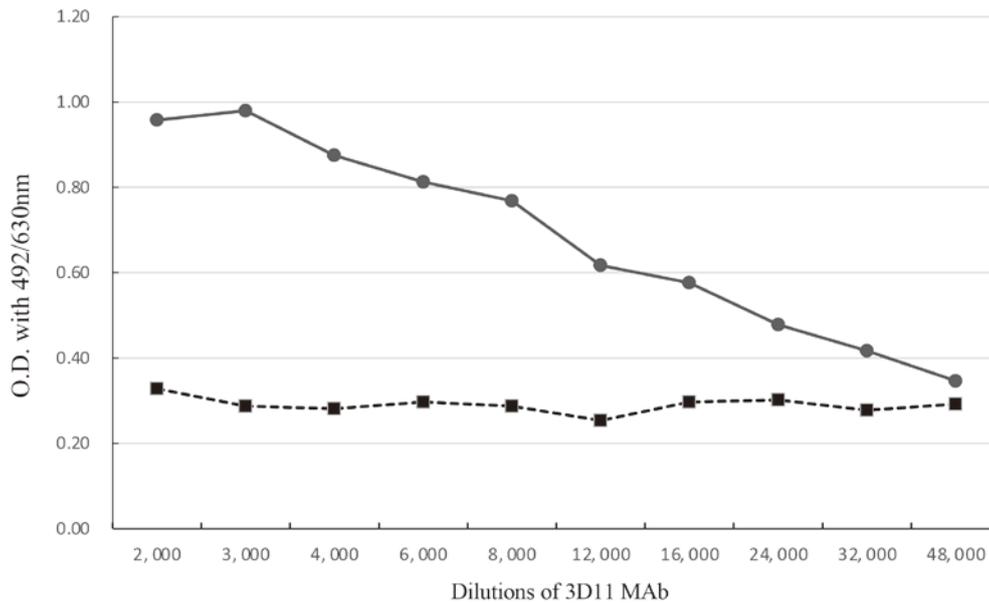


Fig. 2 Assessment of MAb titer in 3D11 MAb (Lot. 2021.09.30) using the IIP assay. Absorbance values of 3D11 MAb diluted from x2, 000 to x48, 000 were plotted. The solid line represents the absorbance of PK15 cells infected with CSF virus strain GPE⁻ (mean of 8 wells). The dashed line represents the criterion for the antigen-positive value, which is the double absorbance value of the mock-infected PK15 cells (mean of 2 wells).

5. 3D11 抗体原液の特異性

3D11 抗体原液の特異性を確認するため、日本脳炎ウイルス、豚パルボウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス、オーエスキー病ウイルス、豚流行性下痢ウイルス、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス、豚ロタウイルス、豚サーコウイルス 1 型、豚サーコウイルス 2 型及び豚サイトメガロウイルスの感染細胞を用いて、3,000 倍希釈した 3D11 抗体原液を用いて IFA 法を実施した。その結果、上記のウイルス感染細胞において特異的蛍光は観察されず、3D11 抗体原液は豚熱ウイルス GPE⁻ 株に対して特異的に反応することが確認された。

6. 3D11 抗体原液を用いた豚熱ウイルス GPE⁻ 株ウイルス含有量試験

3D11 抗体原液が豚熱ウイルス GPE⁻ 株抗原を検出できる希釈の範囲内について、動生剤基準の豚熱生ワクチン（シード）のウイルス含有量試験に準じた IIP 法を実施し、3D11 抗体原液の各希釈におけるウイルス含有量の結果を比較した。なお、48,000 倍は、抗原陽性と抗原陰性の吸光度値が近かったことから、ウイルス含有量試験では 32,000 倍希釈までを検討した。試験結果については一元配置分散分析及び Tukey 法による多重比較検定を用いて統計解析を行った。ウイルスは 3D11 抗体（Lot. 2006.03.30）を使用した IIP 法で 10^{38} TCID₅₀/mL を示した豚熱ウイルス GPE⁻ 株を用いた。Fig. 3 は 3D11 抗体原液の各希釈におけるウイルス含有量を示す。3,000 倍から 24,000 倍希釈までは、 10^{37} から 10^{43} TCID₅₀/mL を示し、有意差は認められなかった。しかし、32,000 倍では $10^{26\sim 36}$ TCID₅₀/mL であり、他の希釈倍率に比較して有意に低いウイルス含有量を示した。以上の結果から、3D11 抗体原液は 24,000 倍までの希釈においてウイルス含有量試験の結果に影響を与えないことが示された。

次に、ウイルスの希釈度と 3D11 抗体原液の希釈度の関係について、ウイルス含有量試験で得られた吸光度値を調べた。Fig. 4 は、各ウイルス希釈度において陽性となったウェルの吸光度値について平均値を算出し、3D11 抗体原液の希釈度の間で比較した結果を示す。ウイルス希釈度が $10^{-1}\sim 10^{-3}$ までは

同じウイルス希釈度における吸光度値が3D11抗体原液の希釈度に相関して低下し、同じ3D11抗体原液の希釈度における吸光度値はウイルスの希釈度に相関して低下することが示された。

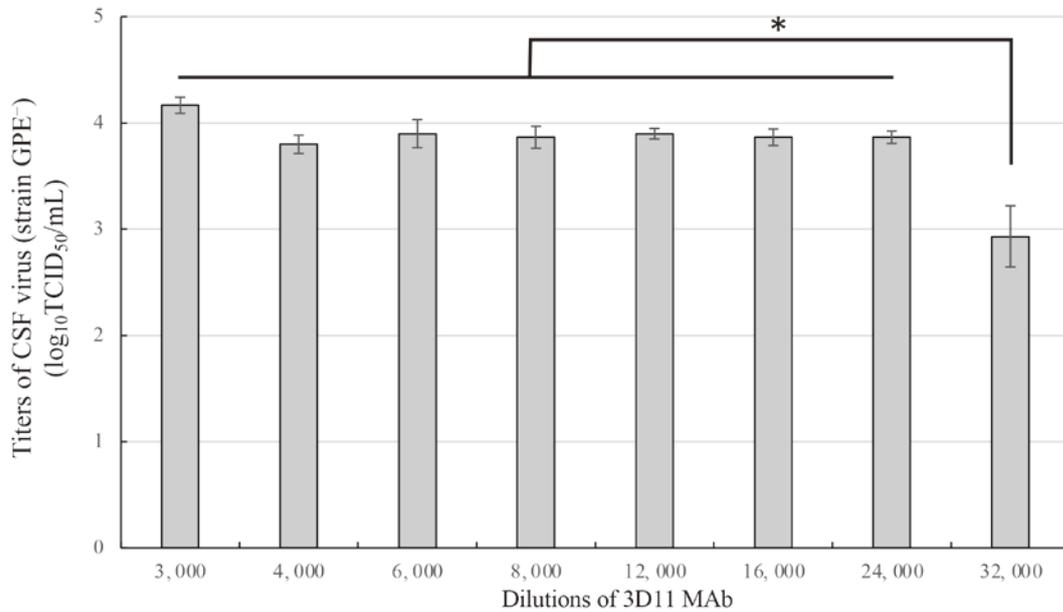


Fig. 3 Assessment of virus content test with 3D11 MAb.

The titer of the CSF virus strain GPE⁻ stock was determined by using the IIP assay with the 3D11 MAb at different dilutions. Virus-infected wells were identified by the antigen-positive value criterion (described in Fig.2), and then TCID₅₀ was calculated. The data shows the mean with a standard deviation of the IIP assay, which was carried out three times independently. The titer of CSF virus strain GPE⁻ is 3.8 log₁₀TCID₅₀/mL as determined by the IIP assay using 3D11 MAb (Lot. 2006.03.30). *: *p* < 0.05

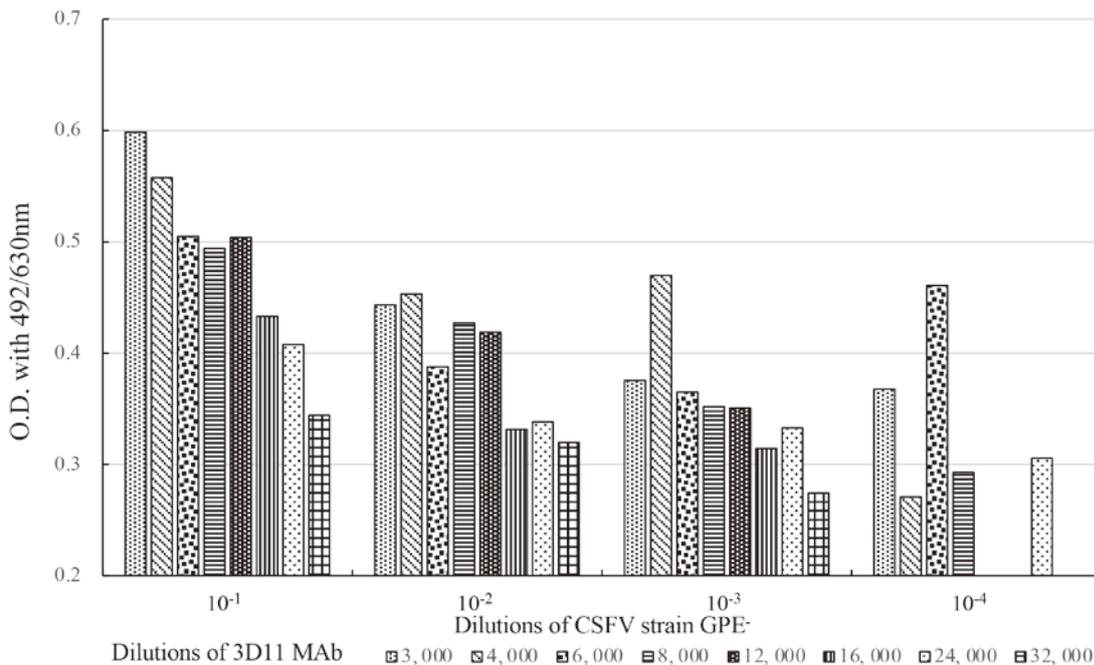


Fig. 4 Relationship of the absorbance value of 3D11 MAb dilution and PK15 cells infected with various amounts of CSF virus strain GPE⁻.

The absorbance value data was obtained from the assay carried out in Fig.3. The graph shows the mean absorbance value of positive wells in PK15 cells infected with the same amount of the virus. The titer of CSF virus strain GPE⁻ is 3.8 log₁₀TCID₅₀/mL as determined by the IIP assay using 3D11 MAb (Lot. 2006.03.30).

7. 各メーカーのワクチンを使用したウイルス含有量試験の結果

現在製造されている4種類の豚熱生ワクチン（共立製薬株式会社：スワイバック C、日生研株式会社：豚コレラ生ワクチン、株式会社科学飼料研究所：豚熱生ワクチン「科飼研」、松研薬品工業株式会社：豚熱生ウイルス乾燥予防液）について、3,000倍希釈した3D11抗体原液を用いて、豚熱ウイルス含有量試験に準じたIIP法によるウイルス含有量を測定した。いずれの豚熱生ワクチンも、小分製品のウイルス含有量試験の規格値を満たした。

8. 3D11抗体（Lot. 2006.03.30）との比較

最後に、3,000倍希釈した3D11抗体原液と1,000倍又は3,000倍希釈した3D11抗体（Lot. 2006.03.30）を用いたウイルス含有量試験の結果を比較した（Table 1）。4種類の異なる豚熱ウイルスGPE⁻株のストックを使用し、7日間培養した後に豚熱ウイルス含有量試験に準じたIIP法によるウイルス含有量を測定した。その結果、3,000倍希釈した3D11抗体原液は、現在当所で使用している1,000倍希釈した3D11抗体（Lot. 2006.03.30）と同等のウイルス含有量を検出した。

Table 1 Virus content test using 3D11 MAb(Lot. 2021.09.30) and 3D11 MAb(Lot. 2006.03.30)

MAb	dilution (x)	CSFV strain GPE ⁻ stock			
		A	B	C	D
3D11(Lot. 2021.09.30)	3,000	3.4 *	4.0	3.3	3.8
3D11(Lot. 2006.03.30)	1,000	3.4	4.1	3.4	3.6
3D11(Lot. 2006.03.30)	3,000	3.1	2.9	2.6	2.7

* : \log_{10} TCID₅₀/mL

考察

今回、3D11抗体原液を調製するために、2006年に凍結保存したハイブリドーマを解凍し、培養したハイブリドーマを30匹のマウス腹腔内に接種して25匹のマウスから3D11抗体を含む腹水が得られた。解凍したハイブリドーマは2～3回継代することにより、 $1.5 \sim 3.0 \times 10^5$ 個/mLで播種した細胞が2～3日の培養で $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ 個/mLに増殖する性状を示した。この細胞増殖率は、今後の3D11抗体マウス腹水の調製における指標にできると考えられた。

3D11抗体原液は48,000倍希釈まで豚熱ウイルスGPE⁻株抗原を検出できたが、4,000倍希釈からは希釈倍率と吸光度値の低下が相関する傾向が認められた（Fig. 2）。抗原プレートの作製には本試験における最小希釈のウイルスが接種されていることから、抗原陽性穴には実験的に最大量の抗原が存在すると考えられる。Fig. 2の結果は、この条件において3,000倍までの希釈では抗原量に対して十分な抗体量（抗体と結合できる抗原がすべて抗体と結合できる量）であり、4,000倍より高い希釈では、抗原量に対して抗体量が不足していることを示唆している。Fig. 4で示したように、IIP法では抗原陽性穴の吸光度値はウイルスの希釈度に相関して低下していることから、検体の希釈が高く抗原量が少ないと考えられる場合では、3D11抗体原液の希釈が3,000倍以下と4,000倍以上で陽性と陰性の判定が異なる可能性がある。実際に各希釈で実施したウイルス含有量試験（Fig. 3）では、24,000倍までの各希釈で得られたウイルス含有量の間では有意差が認められなかったが、4,000倍以上でIIP法を実施する場合は、上記のことに注意する必要がある。

今回の検討においては、Fig. 2 に示したように、2,000 倍から 48,000 倍の希釈において抗原陰性穴での吸光度値が一定であったことから、調べた希釈においては非特異反応がないと考えられた。さらに 3D11 抗体原液の 3,000 倍希釈において、豚熱ウイルス以外のウイルス抗原を検出できなかったことから、3,000 倍以上の希釈倍率であれば豚熱ウイルス GPE 株に特異的に反応すると判断した。

3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) は 2006 年の作製時の条件検討において、3,000 倍希釈が至適希釈倍率とされたが、当所における近年の検討により、現在は 1,000 倍希釈で試験に用いている。今回 3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) の 3,000 倍と 1,000 倍の希釈を直接検討したところ、3,000 倍希釈でのウイルス含有量は 1,000 倍と比較して $\log_{10}TCID_{50}/mL$ で 0.3 ~ 0.9 低い値となった。したがって、今回調製した 3D11 抗体原液において、3,000 倍を希釈倍率の基準とするものの、試験実施に際してはその都度至適希釈倍率を検討することが望ましいと考えられた。

以上のことから、今回調製した 3D11 抗体原液は、現在標準製剤等として配布している 3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) と同等の検出能力を持つことから、3D11 抗体 (Lot. 2021.09.30) として配布可能であると判断された。

現在使用されている豚熱生ワクチンは、実用化された昭和 44 年 (1969 年) から平成 18 年 (2006 年) の接種完全中止まで 38 年間使用された。平成 30 年 9 月から発生した豚熱流行に対しても、豚熱生ワクチンの継続的な使用を想定した場合、長期間の 3D11 抗体の品質と生産の確保を図る必要がある。そのために、3D11 抗体産生ハイブリドーマの維持管理及び 3D11 抗体の調製方法等の技術を維持する体制の整備が今後より一層重要である。

引用文献

青木博史、関口秀人、小佐々隆志、中村成幸 (2006) 動物医薬品検査所が配布する豚コレラウイルス単クローン抗体の新規ロットの調整. 動物医薬品検査所年報 43, pp57-61

陣山真理子、杉山誠、井上剛光、田口邦史、石川清康、齋藤明人、伊藤治、村松昌武 (1993) 単クローン抗体を用いた間接イムノペルオキシダーゼ法による豚コレラワクチンウイルスの定量法. 動物医薬品検査所年報 30, pp1-6.

筒井真理子、石川清康、齋藤明人、村松昌武、杉山誠、伊藤治、井上剛光、田口邦史 (1994) 豚コレラウイルスに対する単クローン抗体の作製と PK15 細胞を用いた定量への応用. 動物医薬品検査所年報 31, pp37-39

[技術資料]

参照狂犬病組織培養不活化ワクチンロット No.5 の適格性確認

榑基、山崎雅人、落合絢子、木田萌子、曳地七星、山本欣也

(令和5年8月21日受付、令和6年1月16日受理)

[TECHNICAL REPORT]

Validation of Reference Vaccine Lot No.5 for Potency Test of Tissue Culture Inactivated Rabies Vaccine

Hajime SAKAKI, Masato YAMAZAKI, Mariko OCHIAI, Moeko KIDA, Nanase HIKICHI, Kinya YAMAMOTO

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-15-1

Tokura, Kokubunji-shi, Tokyo 185-8511, Japan

(Received: 21st Aug 2023, Accepted: 16th Jan 2024)

Abstract

A reference tissue culture-inactivated rabies vaccine (reference vaccine) is used as an index for measuring the relative concentration of effective antigen in test tissue culture-inactivated rabies vaccines in the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), for potency test of tissue culture-inactivated rabies vaccines. In order to confirm the eligibility of the newly manufactured reference vaccine lot No.5 as a reference vaccine, we conducted potency test using mice and quantification of antigen concentration by ELISA. As a result, it was confirmed that lot No.5 had a titer that met the international standard, and an appropriate dilution factor was obtained when lot No.5 was used for ELISA.

要旨

狂犬病組織培養不活化ワクチン（狂犬病ワクチン）の力価試験に用いる参照狂犬病組織培養不活化ワクチン（参照ワクチン）は、狂犬病ワクチンの品質試験であるサンドイッチ ELISA（ELISA）における被検ワクチン中の有効抗原量を相対的に測定する際の指標として用いられている。今回、新たに製造された参照ワクチンロット No.5 について、参照ワクチンとしての適格性を確認するため、マウスを用いた力価試験及び ELISA による抗原量の定量を行った。その結果、当該ロットは国際基準を満たす力価を有していることが確認されるとともに、当該ロットを ELISA に供する際の適当な希釈倍率が得られた。

緒言

狂犬病組織培養不活化ワクチン（狂犬病ワクチン）の力価試験に用いる参照狂犬病組織培養不活化ワクチン（参照ワクチン）は、動物用生物学的製剤基準（動生剤基準）（農林水産省 2002）に規定されたサンドイッチ ELISA（ELISA）により、被検ワクチン中の有効抗原量を相対的に測定する際の指標として用いられる。参照ワクチンロット No.4（現行ロット）は、財団法人化学及血清療法研究所が平成 23 年 5 月に製造したもので、狂犬病ワクチンとしての有効性については、犬に対して感染防御が可能な抗体価を賦与できる免疫原性を有すること、マウスを用いた力価試験（NIH 法）で 3.08 国際単位（IU）を示すことにより確認されている（田村ら 2015）。

凍結乾燥品である参照ワクチンの保存安定性については、経時的な確認により製造後 10 年までは安定であることが確認されている。今般、現行ロットの保存年数が 10 年を経過することから、KM バイオロジクス株式会社により、参照ワクチンロット No.5（候補ロット）が新たに製造された。そこで、候補ロットについて NIH 法により有効性確認を行った。なお、現行ロットの評価時に設定されていた犬における抗体応答試験については、これまで製造された参照ワクチンロットにおいて NIH 法と ELISA 力価試験との相関が十分に確認されていることから、実施しないこととした（金井ら 1997; Gamoh ら 2003; 小林ら 2003; 田村ら 2015）。

また、NIH 法により現行ロットの有効性に变化がないことを確認の上、候補ロットについて ELISA を用いた相対力価の測定を行い、候補ロットの試験時の希釈率の算定を行った。

材料および方法

NIH 法

NIH 法は、試験ごとの成績にばらつきが大きい（Barth ら 1988）、世界的に広く採用されている狂犬病ワクチンの力価試験法であり（Seligmann 1973）、国際標準狂犬病ワクチン（国際標準ワクチン）の力価（国際単位（IU））から被検ワクチンの力価（IU）が得られる。当該試験法はこれまでの参照ワクチン候補品の評定に用いられてきた試験法である。

1) 供試ワクチン

世界保健機関（WHO）から入手した第 7 次国際標準狂犬病ワクチン（The 7th International Standard for Rabies Vaccine）については、滅菌精製水 1.0mL で溶解後、3.45mL のリン酸緩衝食塩液（PBS）を加えて全量を 2IU/mL としたものをを用いた。現行ロットは、製造時に実施した試験と同様に滅菌精製水 2.4mL で溶解後、5.6mL の PBS を加えて全量を 8.0mL としたものをを用いた（田村ら 2015）。候補ロットについては、①現行ロットと同倍率に希釈したもの（滅菌精製水 2.4mL、PBS5.6mL（全量 8.0mL））、②候補ロット製造時の ELISA による抗原量測定の結果から、現行ロットと同程度の力価（IU）になるよう希釈したもの（滅菌精製水 2.4mL、PBS2.6mL（全量 5.0mL））の 2 通りを用いた。

2) 試験動物

4 週齢 ddy 系雌マウスを用いた。

3) 攻撃ウイルス

狂犬病ウイルス CVS 株の感染マウス脳乳剤を 2% 馬血清加滅菌生理食塩水で 25LD₅₀/0.03mL を目安に調製したものをを用いた。

4) 試験方法

国際標準ワクチン、候補ロット及び現行ロットをそれぞれ PBS で 5 倍、25 倍、125 倍及び 625 倍に希釈し、それぞれ 16 匹以上のマウスの腹腔内に 0.5mL ずつ 1 週間隔で 2 回免疫した。

初回免疫後、14 日目に免疫群のマウスに、攻撃ウイルスを 0.03mL ずつ脳内接種し、14 日間観察した。観察期間中、死亡又はエンドポイント（神経症状等により衰弱、摂水・摂餌困難）に達した個体数から候補ロット及び現行ロットの 50% 有効量（ED₅₀）を算出し、次式により国際単位を求めた。

候補（現行）ロット IU = 候補（現行）ロット ED₅₀ / 国際標準ワクチン ED₅₀ × 2

ELISA による相対力価定量試験

ELISA は、狂犬病ワクチン中の抗原量を直接定量する試験法で、平成 8 年度から動生剤基準に力価試験法として採用されている。NIH 法で得られた成績をもとに、候補ロットを 1IU/mL となるように調製した試料について ELISA をを行い、現行ロットと比較した。

1) 試験材料

NIH法で得られた各試験条件の成績から、力価が1IU/mLとなるように、候補ロットを2つの条件で希釈した検体を試験材料とした。すなわち、2.4mLの滅菌精製水で溶解後、PBSを5.6mL加えて全量8mLとしたものを、更に抗原希釈液を加えて2.22倍に希釈したもの（希釈条件①）、候補ロットを2.4mLの滅菌精製水で溶解後、PBSを2.6mL加えて全量5mLとしたものを、更に抗原希釈液を加えて3.89倍に希釈したもの（希釈条件②）である。現行ロットは、2.4mLの滅菌精製水で溶解後、PBSを5.6mL加えて全量8.0mLとしたものに、更に抗原希釈液を加えて2.81倍希釈したものを試験材料とした。

2) 試験方法

試験は、動生剤基準の狂犬病組織培養不活化ワクチン力価試験法に準じて行った。希釈後の供試ワクチンを規定の処理後、その4mLについて液体クロマトグラフィーにより第1分画のピークを採取し、ELISA試料とした。採取したELISA試料を抗原希釈液で更に2倍、4倍に希釈したものをそれぞれELISAによりOD値を測定し、現行ロットに対する候補ロットの相対力価を算出した。試験は3回繰り返し実施した。

試験成績

NIH法

攻撃ウイルス力価は1接種量当たり10LD₅₀以上であり、国際獣疫事務局（WOAH）陸生動物の診断及びワクチンに関するマニュアル（WOAH 2023）で規定される試験の成立基準を満たした。候補ロットは、WHOにおいて推奨される動物用狂犬病不活化ワクチンに必要な力価である1ドーズ当たり1IU以上を満たした。現行ロットについても、同推奨力価を満たし、力価の低下は確認されなかった（Table 1）。

ELISAによる相対力価定量試験

NIH法の成績から1IU/mLとなるよう調製した候補ロットの現行ロットに対する相対力価は、希釈条件①の場合の幾何平均値は1.0078、希釈条件②の場合は0.7719となった（Table 2）。希釈条件①では相対力価が1に近い値となり、当該条件において現行ロットと同等の抗原量を含有することがわかった。

考察

以上の結果より、現行ロット及び候補ロットの参照ワクチンとしての適格性が確認された。また、NIH法及びELISAによる相対力価定量試験の成績から、現行ロットと同等の試験品質を確保するためには、候補ロットを力価試験に用いる場合の調整については、2.4mLの滅菌精製水で溶解後、PBSを5.6mL加えて全量8mLとしたものに、更に抗原希釈液を加えて2.22倍希釈して使用することが妥当と考えられた。

引用文献

農林水産省（2002）動物用生物学的製剤基準。令和3年5月。農林水産省（2021）農林水産省告示第798号（動物用生物学的製剤基準の一部改正）（令和3年5月17日）

田村直也、飯田将行、堀内雅之、荒尾恵、石丸雅敏、安田博美（2015）狂犬病組織培養不活化ワクチンの力価試験用参照ワクチンロット No.4 の有効性確認。動物医薬品検査所年報 **52**, 150-155.

Barth, R., Diderrch, G. & Weinmann, E. (1988) NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. *Vaccine* **6**, 369-377.

Seligmann, E. B. (1973) The NIH test for potency. In *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd edn. Eds. Kalpan,

M. M. & Koprowski, H. pp.279-285. World Health Organization, Geneva.

Chapter 3.1.18: Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). (2023) In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, World Organisation for Animal Health, Paris.

Dianna E. Wilkinson, Jason Hockley, Peter Rigsby and the Collaborative Study Group. (2018) *International collaborative study to assess the suitability of the candidate 7th WHO International Standard for rabies vaccine*. World Health Organization, Geneva.

Gamoh, K., Shimazaki, Y., Senda, M., Makie, H., Itoh, O., Muramatsu, M., Hirayama, N & Hatakeyama, H. (2003) Establishment of a Potency Test by ELISA for a Rabies Vaccine for Animal Use in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* **65(6)**, 685-688

金井洋子、蒲生恒一郎、千田恵、伊藤治、銀永明弘（1997）狂犬病組織培養不活化ワクチンの力価試験用参照ワクチンの更新。動物医薬品検査所年報 **34**, 55-58.

小林理絵子、蒲生恒一郎、千田恵、井上剛光、伊藤治、江副伸介、銀永明弘（2003）狂犬病組織培養不活化ワクチンの力価試験用参照ワクチンロット No.3 の有効性確認。動物医薬品検査所年報 **40**, 25-28.

Table 1 Potency of the candidate reference vaccine by NIH potency test

Test No.	International standard vaccine ^{*1}	Candidate reference vaccine ^{*2}		Current reference vaccine ^{*3}		Potency of challenge virus
	(ED ₅₀)	(ED ₅₀)	(IU /mL)	(ED ₅₀)	(IU /mL)	(LD ₅₀ /0.03mL)
1	24.5	27.16	2.22	42.11	3.44	32.7
2	21.26	41.34	3.89	22.22	2.09	39.81

*1: The 7th International standard for Rabies Vaccine (2 IU/mL)

*2: Reference vaccine (Lot No. 5) for potency test of tissue culture inactivated rabies vaccine

*3: Reference vaccine (Lot No. 4) for potency test of tissue culture inactivated rabies vaccine

Table 2 Relative potency of the candidate reference vaccine

Test No.	Dilution condition No.1 ^{*1}	Dilution condition No. ^{*2}
1	1.1231	0.9395
2	0.9074	0.6940
3	1.0043	0.7053
Geometric mean	1.0078	0.7719

*1: The candidate reference vaccine was dissolved in 2.4mL of sterilized pure water, and was added 5.6mL of PBS, and was further diluted 2.22 times with antigen diluent.

*2: The candidate reference vaccine was dissolved in 2.4mL of sterilized pure water, and was added 2.6mL of PBS, and was further diluted 3.89 times with antigen diluent.

日本の豚から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学的解析

(Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pigs in Japan)

小澤真名緒¹、古谷ゆかり¹、赤間亮子¹、原田 咲¹、松田真理¹、阿保 均¹、白川崇大¹、
川西路子¹、吉田英二²、古野美南子²、福原久江²、粕谷和史²、嶋崎洋子¹

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、院内感染の主な原因であり、さまざまな動物種も保有している。ヨーロッパ諸国では、クローナルコンプレックス 398 (CC398) に属する MRSA 分離株が豚から高い割合で検出されている。しかし、日本の豚や農場環境における MRSA の分布状況は不明である。本研究では、MRSA を食肉処理場の豚、農場の病気の豚、輸入された繁殖豚、農場のほこりから分離した。全ゲノムシーケンスを実施し、コアゲノムマルチローカスシーケンスタイピング (cgMLST) によってこれらの MRSA 分離株間の分子疫学的関係を分析した。その結果、と畜場の豚、農場の病気の豚、輸入された繁殖豚、農場のほこりにおける MRSA の分離率は、それぞれ 5.2%、3.4%、28.8%、0.06% だった。ST398/t034 として分類された ST398 株は、と畜場の豚、病気の豚、輸入された繁殖豚、および農場のほこりから分離された。cgMLST の結果は、国内の豚由来の ST398/t034 株が、輸入された繁殖豚由来株と同じクラスターに含まれることを示した。しかし、国内の豚由来の分離株のみを含むクラスターもあった。この研究のほとんどの MRSA 分離株は、アミノグリコシド、 β -ラクタム、マクロライド、テトラサイクリン、及び亜鉛の耐性遺伝子を持っていた。市中感染型 MRSA の指標とされている Panton-Valentine leukocidin (PVL) 毒素遺伝子を保有している株はなかった。これらの結果は、国内の豚における MRSA の検出率はそれほど高くないが、輸入された繁殖豚による MRSA の日本への導入の可能性を示した。しかし、国内由来と考えられる MRSA も存在した。日本の豚に MRSA がさらに広がるのを防ぐために、抗菌剤と亜鉛を注意深く使用し、農場でのバイオセキュリティ対策を強化し、MRSA を継続的に監視することが重要である。

(Veterinary Microbiology 273: 109523, 2022. 英文)

¹ 農林水産省動物医薬品検査所

² 農林水産省動物検疫所