

200400018A

厚生労働科学研究費補助金

特別研究事業

インフルエンザワクチンの安全性向上のための  
品質管理に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 板村繁之

平成17(2005)年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- インフルエンザワクチンの安全性向上のための品質管理に関する研究 ----- 1  
板村繁之

## II. 分担研究報告

1. インフルエンザワクチンに含まれる白血球数減少活性物質の分析に関する研究 ----- 8  
竹森利忠：研究協力者 阿戸学 藤猪英樹 高橋宣聖 橋本修一 加地友弘  
山本紀一 板村繁之 堀内善信
2. インフルエンザワクチンの安全性向上のための品質確保に関する研究  
ーマウス白血球数減少試験法ー ----- 15  
堀内善信 真鍋貞夫 大隈邦夫 小幡朗 渡辺隆雄：研究協力者 落合雅樹  
山本明彦 蒲地一成 片岡紀代 豊泉裕美
3. 赤血球凝集阻止試験(HI)を用いたインフルエンザワクチン免疫原性測定系の検討 ----- 25  
西藤岳彦：研究協力者 堀内善信 板村繁之

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 29

## IV. 研究成果の刊行物・別刷〔別添〕

## インフルエンザワクチンの安全性向上のための品質管理に関する研究

主任研究者 板村繁之 国立感染症研究所 主任研究官

### 研究要旨

近年インフルエンザワクチンの需要は伸び続け2004年には、ワクチンの製造量は約2,074万本に達している。ワクチンの安全性の確保、安定供給は国民の健康を守るためにますます重要な課題となっている。一方で、現在の生物学的製剤基準が現行のワクチンに適合していない問題が出現してきた。本研究は、インフルエンザワクチンの安全性と有効性を確保するために必要な品質管理の試験方法の改良・開発やその意義について明らかにするとともに、現行の生物学的製剤基準の改訂の基礎になる知見を得ることを目的として実施した。（1）インフルエンザワクチンに含有されるマウス白血球数減少活性の実体についての解析を行い、ワクチンに含有されるウイルスRNAがその本体である可能性を見出した。また、マウス白血球数減少活性と相関する生体反応としてIFN $\alpha$ の産生が観察され、この反応は免疫応答とは別の機構として機能していることが示唆された。このような知見からワクチンの免疫原性を損なうことなく、ヒトでの副反応に関係する可能性のある白血球数減少活性を除去し得ることがわかった。ヒトにおける本活性の生物学的意義については依然として不明であるが、本活性の実体を証明することで臨床的な副反応への寄与について一定の評価が可能になると考えられる。（2）より精度、再現性の高いマウス白血球数減少試験の方法を確立し、本活性の製造工程での品質管理を容易にすることを可能にした。また、本試験法に替わるより定量性の高い試験方法の候補としてIFN $\alpha$ の測定を挙げることができた。（3）ワクチンの総蛋白量とマウス白血球数減少活性との関係についての解析を実施し、ワクチンの蛋白含量を現行の240 $\mu$ g/ml以下より高い300および800 $\mu$ g/mlに設定したワクチンでも、調べた3種類のウイルス株のHAワクチン原液については現行生物学的製剤基準を上回る活性を認めなかった。従って、現行のワクチンの蛋白含量の基準値を上げるのにマウス白血球数減少試験の基準を変更する必要はないと考えられる。（4）現行の力価試験である一元放射免疫拡散試験によるワクチンの力価と免疫原性について検討を行った。一元放射免疫拡散試験によって測定されたHA含量だけでは免疫原性を担保できない可能性があることがわかったが、これを結論付けるにはヒトでの免疫原性についての研究など更なる研究が必要である。

### 研究組織

#### 主任研究者

板村繁之 国立感染症研究所ウイルス第3部  
主任研究官

#### 分担研究者

竹森利忠 国立感染症研究所免疫部 部長  
堀内善信 国立感染症研究所細菌第2部 室長  
西藤岳彦 国立感染症研究所ウイルス第3部  
主任研究官

真鍋貞夫 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所  
グループリーダー  
大隈邦夫 (財) 化学及血清療法研究所 部長  
小幡朗 デンカ生研株式会社 部長  
渡辺隆雄 (社) 北里研究所 係長

## A. 研究の目的と背景

インフルエンザワクチンの接種対象は、1994年の予防接種法の改定に伴い従来の学童から実際に大きな健康被害を受けるいわゆるハイリスク者である65歳以上の高齢者に大きく変更された。それとともに接種者の増加に伴って、一時低下していたワクチン製造量が年々増加し2004年には約2,074万本に達している。このためワクチンの安全性の確保、安定供給は国民の健康を守るためにますます重要な課題となっている。

一方、ワクチンの品質管理に関して2000年にワクチンの力価を検定する方法として従来のマウスを用いた免疫原性を評価する方法(卵中和試験)からワクチンに含有される主要な有効成分を直接測定する一元放射免疫拡散試験法に変更された。新しい力価試験の導入によって、より多くのワクチンを短期間に検定できるようになり、さらに海外のインフルエンザワクチンの力価試験方法と同じ試験方法を用いたことによって世界的に統一された規格でワクチンを検定できるようになった。しかしながら、それに伴いワクチンに含有される有効成分量が増加したためワクチンの総蛋白含量も増加し生物学的製剤基準の上限に近いワクチンも出現してきた。そのためワクチンの蛋白含量の生物製剤基準について見直す必要性が出てきている。また、ワクチンの安全性試験のひとつであるマウス白血球数減少試験においても、ワクチンの蛋白含量の増加と符合して従来の基準の上限に近いようなワクチンが散見されるようになってきた。従って、ワクチンの蛋白含量の生物学

的製剤基準の見直しには他の安全性試験との関連についての解析が必須である。

安全性試験のひとつとして現在わが国で実施されているマウス白血球数減少試験は海外においては実施されておらず、その意義については議論のあるところである。しかしながら、一方でその因果関係が必ずしも明らかにされていないとはいえワクチンの副反応とも考える死亡例が米国などでは報告されている。わが国ではマウス白血球数減少活性を管理してきて現在まで副反応の低いワクチンを供給してきたことも事実である。このような安全性試験の意義についても研究を進めておくことがワクチンの安全性を確保するために重要であろう。

本研究ではインフルエンザワクチンの安全性と有効性を確保するために必要な品質管理の試験方法の改良・開発やその意義について明らかにするとともに、現行の生物学的製剤基準の改訂の基礎になる知見を得ることを目的として実施した。具体的には以下の研究課題について実施した。

(1) インフルエンザワクチンに含有されるマウス白血球数減少活性の実体についての解析を行い、ヒトにおける本活性の生物学的意義について推測しヒトでの安全性についての関連を考察する。

(2) より精度の高いマウス白血球数減少試験の方法を確立して、本活性の製造工程での品質管理を容易にする。

(3) ワクチンの総蛋白量とマウス白血球数減少活性との関係についての解析を行い、本活性とワクチン本体との関係を明らかにする。

(4) 現行の力価試験である一元放射免疫拡散試験がワクチンの力価を測定する方法として適しているのか明らかにする。

## B. 研究方法

1) インフルエンザワクチンに含有されるマウス白

## 血球数減少活性物質の分析

インフルエンザワクチンに含有されるマウス白血球数減少活性の実体についての情報を得るために、インフルエンザ HA ワクチンと全粒子ワクチンをマウスに接種し白血球数及びサイトカインや炎症反応マーカーの測定を実施した。また同時に、血清中の抗体価についても測定し、白血球数と免疫応答との関連について調べた。

### 2) マウス白血球数減少試験方法の改良

ワクチンの接種経路や使用するマウスの系統、採血法などについて、マウス白血球数減少試験用参照品を使用して生物学的製剤基準に準じて実施して感度、精度、再現性について調べた。

### 3) ワクチンの総蛋白量とマウス白血球数減少活性との関係についての解析

2004-2005 年シーズン用のインフルエンザ HA ワクチンの原液から総蛋白量を 300 及び 800 $\mu$ g/ml に調製してマウスに接種して、ワクチンの総蛋白量とマウス白血球数減少活性との関係について調べた。

### 4) 一元放射免疫拡散試験による力価と免疫原性との関係についての解析

一元放射免疫拡散試験によってワクチンの有効成分である HA 含量を同じになるように調製したインフルエンザ HA ワクチンと全粒子ワクチンをマウスに接種し、2 週後に採血をして各個体ごとの血中 HI 抗体価について測定した。得られた各ワクチンの HI 抗体価に基づいて平行線定量法で全粒子ワクチンのそれと比較し全粒子ワクチンの免疫原活性を 1 とし、相対力価で算出して比べた。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトの検体を使用しないが、動物実験については現在実施されている国家検定と同様に、各研究機関が定めた実施規定を遵守し、実験動物の愛護に充分考慮して苦痛を与えないように配慮しながら試験を実施した。

## C. 研究結果

### 1) インフルエンザワクチンに含有されるマウス白血球数減少活性物質の分析

まず、インフルエンザワクチンのマウスへの接種によって減少する白血球がどの細胞種であるのか詳細に調べたところ、主として T 細胞と B 細胞であることがわかった。次に末梢血でのリンパ球減少が他臓器への移動によるものか検索した。その結果、脾臓、骨髄、腹腔での細胞数に有意な変動は認められず、末梢血リンパ球から一次および二次リンパ組織への移動については確認できなかった。また、白血球数の減少に伴い、炎症メディエーターのひとつである血中シアル酸の上昇が認められたので、白血球数減少のメカニズムが炎症に関係していることが示唆された。そこで、ワクチン接種後初期の末梢血のリンパ球減少がどのような炎症性サイトカイン産生と相関を示すのか明らかにするために、インフルエンザ全粒子ワクチンは HA ワクチンと比較して高いマウス白血球数減少活性を示すことを利用して、この両群のマウスでのサイトカインや炎症反応マーカーの応答の違いについて調べた。その結果、全粒子ワクチンを投与したマウスにおいて、末梢血リンパ球の有意な減少に伴って血中 IFN $\alpha$  の著しい産生上昇が認められた。一方、他の炎症性サイトカインやメディエーターである TNF、IL-1b、IL-12、シアル酸に関しては、両群の間で有意な発現の差は見られなかった。また、両群のマウスに抗体応答では同程度の応答の上昇が見られ、末梢血でのリンパ球減少はワクチンの免疫応答と別の機構による可能性が示唆された。

### 2) マウス白血球数減少試験方法の改良

ワクチンの接種経路や使用するマウスの系統、採血法などについて検討し、感度、精度、再現性につ

いて調べたところ、採血をマウスの加温後に行うことによって感度の向上ならびに参照品に対する用量依存性の改善が認められた。この方法を用いて再現性についても検討したが、単一施設内にとどまらず施設間でも良好な再現性が得られた。

### 3) ワクチンの総蛋白量とマウス白血球数減少活性との関係についての解析

3種類のウイルス株の HA ワクチン原液について、ワクチンの総蛋白量 300 および 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の2用量で白血球数減少活性を調べたところ、用量に依存した活性の増加が見られた。ワクチン株の違いによる活性の差は認められなかった。しかしながら、どちらの用量においても現行生物学的製剤基準を上回る活性は認められなかった。

### 4) 一元放射免疫拡散試験による力価と免疫原性との関係についての解析

ワクチン接種をしたマウスの各個体から HI 抗体価を測定すると、個体間のばらつきがかなり大きいことがわかった。一元放射免疫拡散試験による力価と免疫原性との関係について調べるために、同一のウイルス株で作製した4つの異なるワクチン原液について一元放射免疫拡散試験によってワクチンの有効成分である HA 含量を測定して、同じ HA 含量になるようにワクチンを調製した。次に、これらのワクチンをマウスに免疫し免疫原性を全粒子ワクチンに対する相対力価で算出した。その結果、同じ HA 含量のワクチンでもロット間で、マウスでの免疫原性ではかなり大きな差があることがわかった。

## D. 考察

1) インフルエンザワクチンに含有されるマウス白血球数減少活性物質の実体とヒトにおける本活性の生物学的意義

インフルエンザ全粒子ワクチンは HA ワクチンと比較して高いマウス白血球数減少活性を示すことが知られているが、このことを利用してワクチンの副反応に関連する可能性のある白血球数の減少とワクチンの有効性を発揮するのに必要な免疫応答を分離することが可能であるのか検討した。その結果、全粒子ワクチンを投与したマウスにおいて、末梢血リンパ球の有意な減少に伴って血中 IFN $\alpha$ の著しい産生上昇が認められた。一方、HA ワクチンを投与したマウスでは、末梢血リンパ球の有意な変化は認められないが、全粒子ワクチンを投与したマウスと同程度の免疫応答の上昇が認められたことから、白血球数の減少が免疫応答と異なる機構によって誘導される可能性が示唆された。この血中 IFN $\alpha$ の著しい産生上昇が、実際に白血球数の減少の機構として作用していることが判明すれば、ワクチンの免疫原性を損なうことなく白血球数減少活性を除去できる可能性が出てくる。そのためには今後、IFN $\alpha$ レセプターノックアウトマウスなどを用いて白血球数減少における IFN $\alpha$ の役割を明らかにすることが重要である。

ワクチンに含有される白血球数減少活性物質の実体については、本研究から直接同定することはできなかったが、ワクチンに含有されるウイルス RNA がその本体である可能性が示唆された。現行の HA ワクチンは精製ウイルス粒子をエーテル等によってウイルス膜の脂質成分を除去して製造された、いわゆるスプリットワクチンである。ウイルス RNA はウイルスの核蛋白と複合体を形成しているが、この複合体は RNA 分解酵素によって容易に RNA が分解されることがわかっている。従って、HA ワクチンの製造工程で溶液中にウイルス RNA・核蛋白複合体が遊離された際に RNA 分解酵素によって分解されることが考えられる。これに対して全粒子ワクチンではウイルス粒子の形状が保存されるために、ウイルス RNA

も分解されずに保持される可能性が高い。このような性状の違いが、全粒子ワクチンと HA ワクチンのマウス白血球数減少活性に大きな差となっている可能性があるが、これをさらに支持する観察結果として、全粒子ワクチン投与による IFN $\alpha$ の大量産生がある。最近の研究によると、ウイルス感染時に一部の樹状細胞に発現されている TLR-7 や TLR-3 にウイルス RNA が結合し、大量の IFN $\alpha$ が産生されることがわかっている。ワクチンに残存するウイルス RNA が白血球数減少活性の本体であるのかは、今後さらに検討を要するが、本研究によって有望な候補を挙げる事ができた。

これまでの研究によって、マウス白血球数減少活性の本体についてある程度の状況証拠を集めることができたが、本活性のヒトにおける生物学的意義については依然として不明であり、臨床的にどのような副反応と関連するのか明らかにすることが今後の課題である。しかしながら、IFN $\alpha$ の著しい産生上昇が本活性の実際の作用物質であることが突き止めることができれば、現在ウイルス肝炎の治療として IFN $\alpha$ の投与が行われており、その副作用のひとつとしてリンパ球減少が知られているが、これらのヒトでの副反応の程度を検討することで一定の評価をすることが可能になると思われる。

## 2) マウス白血球数減少試験方法の改良と品質管理

試験方法の改良によって、本試験の感度および再現性を向上させることができた。従って、ワクチン製造所と感染研でよく一致した結果を得られるようになり、ワクチンの製造工程において本活性の品質管理の向上が期待される。現時点で、本活性の本体についての解明はできていないが、試験方法の改良により基準を満たさないワクチン原液を検出して除くことが可能になった。今のところ本活性が全てのインフルエンザワクチン原液に基準以上に含有され

ていないので、当面このような対応によって現行のワクチン検定の安全性試験のひとつであるマウス白血球数減少試験の基準に適合するワクチンを製造することができよう。また、本活性の実際の作用物質が IFN $\alpha$ であることが証明できれば、現行の試験方法を IFN $\alpha$ 産生の定量に代替えすることが可能であり、これによってより定量性の高い試験方法を導入することができる。ワクチンの品質管理の上で大きな進展が期待される。

## 3) ワクチンの総蛋白量とマウス白血球数減少活性との関係

インフルエンザワクチンの品質管理に関して 2000 年にワクチンの力価を検定する方法として一元放射免疫拡散試験法が導入された。それに伴いワクチンに含有される有効成分量が増加し、ワクチンの総蛋白含量も増加し生物学的製剤基準の上限に近いワクチンも出現してきた。そのためワクチンの蛋白含量の生物学的製剤基準について見直す必要性が出てきている。また、ワクチンの安全性試験のひとつであるマウス白血球数減少試験においても、ワクチンの蛋白含量の増加と符合して従来の基準の上限に近いようなワクチンが散見されるようになってきた。従って、ワクチンの蛋白含量の生物学的製剤基準の見直しには他の安全性試験との関連についての解析が必須である。本研究では、そのための基本的条件として、ワクチンの総蛋白量を現行の 240 $\mu$ g/ml 以下より高い値に設定した場合に、現行の安全性試験のひとつであるマウス白血球数減少試験の生物学的製剤基準に適合するのかが検討した。その結果、調べた 3 種類のウイルス株の HA ワクチン原液について、ワクチンの総蛋白量 300 および 800 $\mu$ g/ml の 2 用量で現行基準を上回る活性は認められず、少なくとも総蛋白量 300 $\mu$ g/ml 程度の基準値の変更は現行のマウス白血球数減少試験の基準に適合すると考え

られる。但し、白血球数減少活性のヒトにおける臨床的意義が依然として解明されていないため、この基準変更には臨床試験の実施を必要とするのかは議論のあるところである。

#### 4) 一元放射免疫拡散試験による力価と免疫原性との関係

インフルエンザワクチンの力価試験として 2000 年よりわが国では一元放射免疫拡散試験を導入している。本試験法は、以前より早い時期から世界的に広く使用されている方法ではあるが、力価試験としては間接的な方法であり、ワクチンの有効成分である HA を測定することによってワクチンの力価を担保しようとするものである。EU では新しいワクチン株が選択される度に少数ではあるが臨床試験が義務付けられヒトでの免疫原性を調べているために、製造工程を GMP によって管理し、ワクチンの力価として HA 含量を測定することによってワクチンの免疫原性を担保しようとしている。わが国にはこのような制度が無いために、ワクチンの免疫原性を現行の試験によってどのように担保していくのかは、大きな課題である。本研究では、異なる製造ロットのワクチンについて一元放射免疫拡散試験によって HA 含量を同一にしてワクチンを調製し、マウスでの免疫原性について高感度な解析を実施した。その結果、同一の HA 含量にもかかわらずマウスにおける免疫原性にはばらつきが認められた。しかしながら、本研究では多くの検討項目について調査できなかったため、更なる研究が必要である。また、ヒトでの免疫原性についての研究が必須であり、従って本研究結果が、直ちに HA 含量を測定している現行の力価試験の意義を否定するものではない。現行の力価試験は検体の処理数及び処理に必要な時間などに優れており、新型インフルエンザ対策にとっても有利な試験方法でもある。一方、ワクチンにとって

重要な有効性を確保するために、ワクチンの免疫原性についても現行の試験を担保するための研究が必要と思われる。

#### E. 結論

本研究は、インフルエンザワクチンの安全性と有効性を確保するために必要な品質管理の試験方法の改良・開発やその意義について明らかにするとともに、現行の生物学的製剤基準の改訂の基礎になる知見を得ることを目的として実施した。

(1) インフルエンザワクチンに含有されるマウス白血球数減少活性の実体についての解析を行い、ワクチンに含有されるウイルス RNA がその本体である可能性が示唆された。また、マウス白血球数減少活性と相関する生体反応として IFM $\alpha$ の産生が観察され、この反応は免疫応答とは別の機構として機能していることが示唆された。従って、ワクチンの免疫原性を損なうことなく、ヒトでの副反応に関与する可能性のある白血球数減少活性を除去できることが期待される。ヒトにおける本活性の生物学的意義については依然として不明であるが、本活性の実体を証明することで臨床的な副反応への寄与について一定の評価が可能になると期待される。

(2) より精度、再現性の高いマウス白血球数減少試験の方法を確立し、本活性の製造工程での品質管理を容易することが可能になった。また、本試験法に替わるより定量性の高い試験方法として IFN $\alpha$ の測定を候補に挙げる事ができた。

(3) ワクチンの総蛋白質量とマウス白血球数減少活性との関係についての解析を実施した。ワクチンの蛋白含量を現行の 240 $\mu$ g/ml 以下より高い 300 および 800 $\mu$ g/ml 値に設定したワクチンでも、調べた 3 種類のウイルス株の HA ワクチン原液については現行生物製剤基準を上回る活性は認められなかった。従って、マウス白血球数減少活性の観点からは現行



のワクチンの蛋白含量の基準値を増加させることは可能である。

(4) 現行の力価試験である一元放射免疫拡散試験によるワクチンの力価と免疫原性について検討した。一元放射免疫拡散試験によって測定された HA 含量だけでは免疫原性を担保できない可能性が判明したが、これを結論付けるにはヒトでの免疫原性についての研究など更なる研究が必要であろう。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tran Tinh Hien, Nguyen Thanh Liem, Nguyen Thi Dung, Luong Thi San, Pham Phuong Mai, Nguyen van Vinh Chau, Pham Thi Suu, Vo Cong Dong, Le Thi Quynh Mai, Ngo Thi Thi, Dao Bach Khoa, Le Phuc Phat, Nguyen Thanh Truong, Hoang Thuy Long, Le Truong Giang, Nguyen Dac Tho, Nguyen Thi Kim Tien, Le Hoang San, Le Van Tuan, Christiane Dolecek, Tran Tan Thanh, Menno de Jong, Constance Schultsz, Peter Cheng, Wilina Lim, Peter Horby, the World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team (N. Bhat, P. Brudon, P. Calain, A. Curns, R. Doran, K. Fukuda, T. Grein, P. Horby, S. Itamura, N. Miranda, T. Uyeki), and Jeremy Farrar. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* 350: 1179-1188 (2004)

2) Iwasaki T, Itamura S, Nishimura H, Sato Y, Tashiro M, Hashikawa T, Kurata T. Productive

infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation. *Acta Neuropathol.* 108: 485-492 (2004)

3) 板村繁之: 重症急性呼吸器症候群(SARS)とインフルエンザ-病原体. *臨床と微生物* 31: 65-71 (2004)

4) 板村繁之: SRAS、新型インフルエンザ、トリインフルエンザ-missing link を探して. *蛋白質核酸酵素* 49: 772-780 (2004)

### 2. 学会発表

1) 小田切孝人, 西藤岳彦, 小淵正次, 板村繁之, 今井正樹, 二宮愛, 田代真人: 2003/2004 シーズンのインフルエンザ流行株の解析と次シーズンのワクチン株, 第52回日本ウイルス学会総会, 横浜, 2004年11月.

2) 板村繁之: 高病原性鳥インフルエンザ, 第4回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会, 横浜, 2004年11月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金

(特別研究事業)

分担研究報告書

インフルエンザワクチンに含まれる白血球数減少活性物質の分析に関する研究

分担研究者	竹森 利忠	国立感染症研究所免疫部長
研究協力者	阿戸 学	国立感染症研究所免疫部研究員
研究協力者	藤猪 英樹	国立感染症研究所免疫部研究員
研究協力者	高橋 宣聖	国立感染症研究所免疫部主任研究官
研究協力者	橋本 修一	国立感染症研究所免疫部研究員
研究協力者	加地 友弘	国立感染症研究所免疫部研究員
研究協力者	山本 紀一	国立感染症研究所免疫部協力研究員
研究協力者	板村 繁之	国立感染症研究所ウイルス3部主任研究官
研究協力者	堀内 善信	国立感染症研究所細菌第二部室長

研究要旨

インフルエンザワクチンの安全性試験としてのマウス白血球減少試験における白血球減少活性の免疫学的意義について解析するため、白血球減少試験と同様に現行の HA ワクチン、および全粒子ワクチンを ddY マウスに投与し、マウス各臓器の白血球数をフローサイトメトリーで精密に測定するとともに、接種後血液中の炎症性サイトカインおよび炎症性メディエーターであるシアル酸の濃度を ELISA で解析した。その結果、全粒子ワクチン投与16時間後の末梢血中の白血球減少は、検定で用いられている核の測定だけでなく、細胞レベルにおいても同様に、T 細胞、B 細胞、顆粒球いずれの分画においても認められた。また、抗 HA 抗体価が同程度になるように調製した HA ワクチンと全粒子ワクチンの投与比較においては、全粒子ワクチン接種16時間後のみに、白血球減少が認められ、血中インターフェロンアルファ (IFN $\alpha$ ) 濃度の著しい上昇を認めた。以上より、インフルエンザワクチンによる白血球減少は、IFN $\alpha$  の産生と強く関連するが、ワクチンの力価とは相関しないことが判明し、HA ワクチンに含まれず、全粒子ワクチンに含まれている成分が、IFN $\alpha$  産生を誘導して白血球減少を引き起こす可能性が示唆された。

A. 研究目的

インフルエンザワクチンは近年接種者の増加と、接種対象者が学童から高齢者を中心としたハイリスク者に変化したことから、ワクチンの安全

性の確保と安定供給が、国民の健康を守るため、厚生労働政策上重要な課題となってきた。我が国でのワクチン安全性試験の一つとして、マウスに HA ワクチン接種後 16 時間で対照群

の 80%を下回る白血球減少を起こしてはならないとする、マウス白血球減少試験が行なわれているが、海外ではこの試験は行われておらず、その意義に関しては議論がある。一方、アメリカでは我が国ではみられないワクチン接種後の副反応によるとも考えうる死亡例が報告され、我が国ではマウス白血球減少活性を管理して現在まで副反応の低いワクチン供給を続けて来た現状を考え、この試験の有用性を慎重に検討する必要がある。しかし、この白血球減少活性の実体について、また、この活性とワクチンの安全性および免疫原性（力価）との関連についてはほとんど明らかにされていない。このため我々は、ワクチンの安全性に関係すると考えられているマウス白血球減少試験について免疫学的に検証し、より精度の高いマウス白血球減少試験の方法を確立するとともに、白血球減少活性を誘導する要因について明らかにする目的で解析を行なった。本研究の遂行は、本活性とワクチン本体との関係を明らかにし、ワクチンの安全性向上のための品質管理の技術を向上させる。

## B. 研究方法

### (1)インフルエンザワクチンの調製

不活化全粒子ワクチン (K-2) は、現行ワクチンと同様に HA 濃度が 90 $\mu$ g/ml となるよう生理食塩水で希釈した。同一ロットの現行 HA ワクチンと不活化全粒子ワクチン A3/Wyoming/2003 (IVR134) (H3N2)は、HA 濃度が 90 $\mu$ g/ml としたものを原液とし、それらの 5 倍希釈液、25 倍希釈液の 3 用量を接種した。

### (2)マウス白血球減少

国家検定に準じて、ddY マウス（メス、4 週齢）の腹腔内に、500 $\mu$ l のワクチン溶液または生理食塩水を投与し、16 時間後に尾静脈より 10 $\mu$ l 採血して末梢血細胞を蛍光標識された抗 B220、

抗 CD3, Gr-1 のそれぞれの抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーを用いて死細胞を除いた総細胞数および各細胞分画の実数を測定した。さらに同様の実験をワクチン後各リンパ組織より調製した造血細胞に対しても行なった。動物実験については、国立感染症研究所が定めた動物実験指針を遵守し、実験動物の愛護に十分考慮して苦痛を与えないように配慮しながら行なわれた。

### (3) ワクチン接種後のサイトカインおよび炎症反応マーカーの測定

ワクチン投与後経時的にマウス尾静脈より採血して、血清中の TNF、IL-1 $\beta$ 、IL-12、IFN $\alpha$ の濃度を ELISA にて測定した。また、血清中シアル酸の測定は、血清をシアル酸測定試薬と反応させ、自動分析装置で測定した（極東製薬に委託）

### (4)抗 HAIgG 抗体価の測定

血清中の、HA に対する IgG 力価は ELISA にて測定した。

## C. 研究結果

ddY マウスに白血球減少を引き起こすことがわかっている全粒子ワクチン、もしくは生理食塩水を接種し、接種後経時的に末梢血の各細胞分画の実数を測定した。その結果、核数の計測による現行検定と同様に、HA ワクチン全粒子ワクチン投与群で 16 時間後に末梢血細胞の優位な減少を認めた。また、FACS による解析から、減少する細胞の分画は、主として T 細胞と B 細胞であることが示唆された（図 1）。末梢血リンパ球の減少が多臓器への移動によるかどうかを検索する目的で、ワクチン接種後脾臓、骨髄、腹腔より細胞を調製し、FACS を用いた蛍光染色により T リンパ球、B リンパ球および顆粒球の細胞数を計測した。その結果、脾臓、骨髄、腹腔での細胞数に統計学的に有意な変動

は認められず、ワクチン接種後の末梢血リンパ球から一次および二次リンパ組織への移動を確定することは出来なかった。一方、炎症メディエーターのひとつである血中シアル酸の上昇がワクチン接種群で認められ、白血球減少のメカニズムに炎症が関与することが示唆された。

ワクチン接種後初期の末梢血のリンパ球減少が、どのような炎症性サイトカイン産生と相関を示すかを明らかにするために、現行 HA ワクチンより副反応を強く誘導する不活化全粒子ワクチン接種と HA ワクチン接種間での白血球減少と血中炎症性サイトカインのレベルについて解析した。その結果、全粒子ワクチン接種群のみに 16 時間後で末梢血リンパ球の有意な減少が認められた。

また、全粒子ワクチン群で血中 IFN $\alpha$ の著しい産生上昇を認めた(図 2)。一方、炎症性サイトカインおよびメディエーターである TNF、IL-1 $\beta$ 、IL-12、シアル酸に関しては、HA ワクチン群、全粒子ワクチン群ともに投与後初期に有意な発現の上昇は認められなかった。

次に、末梢血のリンパ球減少が、ワクチンの免疫原性といかなる相関を示すかを明らかにする目的で、HA ワクチン接種群と全粒子ワクチン接種群で、それぞれ希釈率を変えて接種し、10 日後、および 30 日後の血中の抗 HA 抗体力価を測定した、その結果、HA ワクチンと全粒子ワクチンは同程度の HA 抗体力価の上昇を示した(図 3)。さらに、50 日後初回摂取量の 1/5 量のワクチンを投与し、その 10 日後に二次抗体反応を測定した結果、HA ワクチン群と全粒子ワクチン群の間で HA 抗体力価に差はなく、白血球減少と抗体産生能の間に相関を認めなかった

以上のことから、ワクチン接種後のリンパ球

減少は IFN $\alpha$ 産生と強い相関を示すが、免疫原性とは相関しない可能性が判明した。

#### D. 考察

現行の白血球減少試験は、末梢血細胞数の同定を核数の計測によって行なわれている。しかし、死細胞と生細胞が判別できないこと、細胞分画の情報が得られないことから、今回その精度についてフローサイトメトリーを用いた解析で検討した。この結果、細胞核の計測結果と全細胞の計測結果に相関を認め、さらにワクチン投与後の白血球減少が血中の T 細胞および B 細胞の減少を主体とすることが判明した。末梢血リンパ球の組織間移動に関しては、本研究ではマウス間のばらつきが大きく、確認出来なかったため、個体差の少ない近交系マウスを用いて今後解析を行なう必要がある。現行の 4 週令の ddY マウスを用いた試験では、マウス間のばらつきが大きく、検査精度の向上に対する障壁となっている。従って ddY マウスのコスト面での利点と近交系マウスを用いた試験の精度向上による利益について今後慎重な検討が必要とされる。

今回我々は、全粒子ワクチンの接種によって白血球減少と IFN $\alpha$ 産生が同時期に認められることを初めて明らかにし、白血球減少を誘導する活性成分は、IFN $\alpha$ である可能性が示唆された。ウイルス感染時には、一部の樹状細胞に発現されている TLR-7 や TLR-3 にウイルス RNA が結合し、大量の IFN $\alpha$ が産生されることが知られている。全粒子ワクチンはその内部にウイルス RNA を含み、樹状細胞にウイルスごと RNA が取り込まれると考えられるが、HA ワクチンに含まれる RNA は血液中で分解される可能性が低いため、ウイルス核酸が白血球減少を引き起こす成分である可能性は高い。今後、全粒子ワクチンワクチンもしくは全粒子ワクチ

ンを RNA 分解酵素処理し、白血球減少活性が消失するかどうか解析することによって、この仮説を検証する予定である。また、IFN $\alpha$ はウイルス肝炎などの治療に用いられるが、その副作用の一つとして、リンパ球減少を引き起こすことが知られている。その機序として、IFN $\alpha$ がリンパ球の生存に必要な IL-7 と拮抗することによるという報告があるが、本研究におけるリンパ球減少と IFN $\alpha$ 産生の因果関係は現時点では不明である。マウス IFN $\alpha$ には13種類のアイソタイプが存在し、単一の IFN $\alpha$ レセプターを共有することが判明しているため、IFN $\alpha$ レセプターノックアウトマウスを用いて、白血球減少における IFN $\alpha$ の役割を明らかにすることを、今後の研究で目指す。

全粒子ワクチン接種後の IFN $\alpha$ 産生が臨床的にどのような副反応と関連するか明らかにすることは今後の調査課題となるが、post marketing における研究実施は簡単ではない。一方、全粒子ワクチン接種においてリンパ球減少と IFN $\alpha$ 産生に密な相関が証明され、また不合格品等におけるデータが蓄積されれば、現行の試験法を IFN $\alpha$ 産生の評価に代替えることは可能である。現象から物質の抽出はワクチン品質管理において重要な課題である。

#### E. 結論

インフルエンザワクチンの安全性試験としてのマウス白血球減少試験における、接種後の白血球減少活性の実体、およびその免疫学的意義について解析した。その結果、全粒子ワクチン投与16時間後の末梢血中の白血球減少は、検定で用いられている核の測定だけでなく、細胞レベルにおいても同様に認められた。また、不活化全粒子ワクチン接種16時間後で、白血球減少と血中 IFN $\alpha$ の著しい上昇を認めたが、抗 HA 抗体力価は HA ワクチンとの間で差は認められ

なかった。以上より、インフルエンザワクチンによる白血球減少は、IFN $\alpha$ の産生と強く相関するが、ワクチンの力価とは相関しないことが判明し、HA ワクチンに含まれず、全粒子ワクチンに含まれている成分が、IFN $\alpha$ 産生を誘導して白血球減少を引き起こす可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案

なし

##### 3. その他

なし

# The effect of whole vaccine on the number of lymphocytes and granulocytes

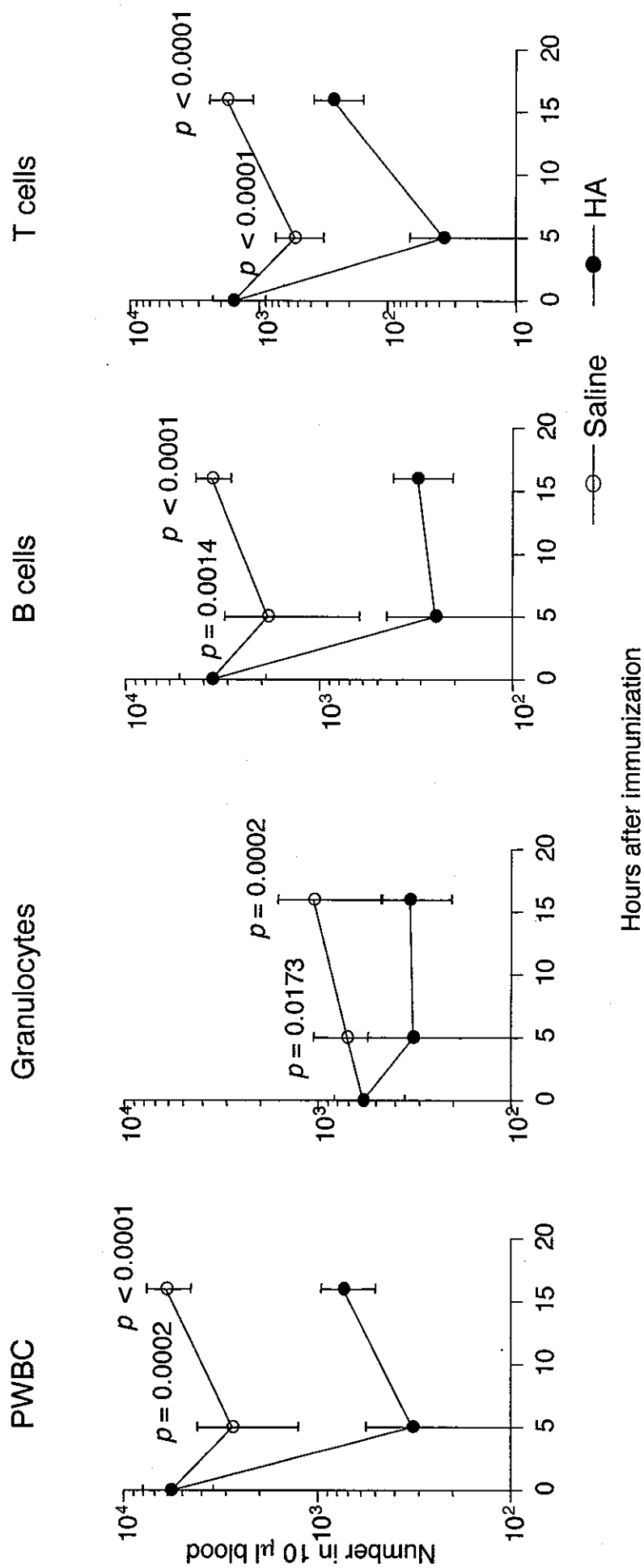


図1 全粒子ワクチン接種後のddYマウス末梢血10µl中の総白血球数および各分画細胞数の経時的変化

# IFN $\alpha$ in sera at 16h post-injection of influenza vaccine

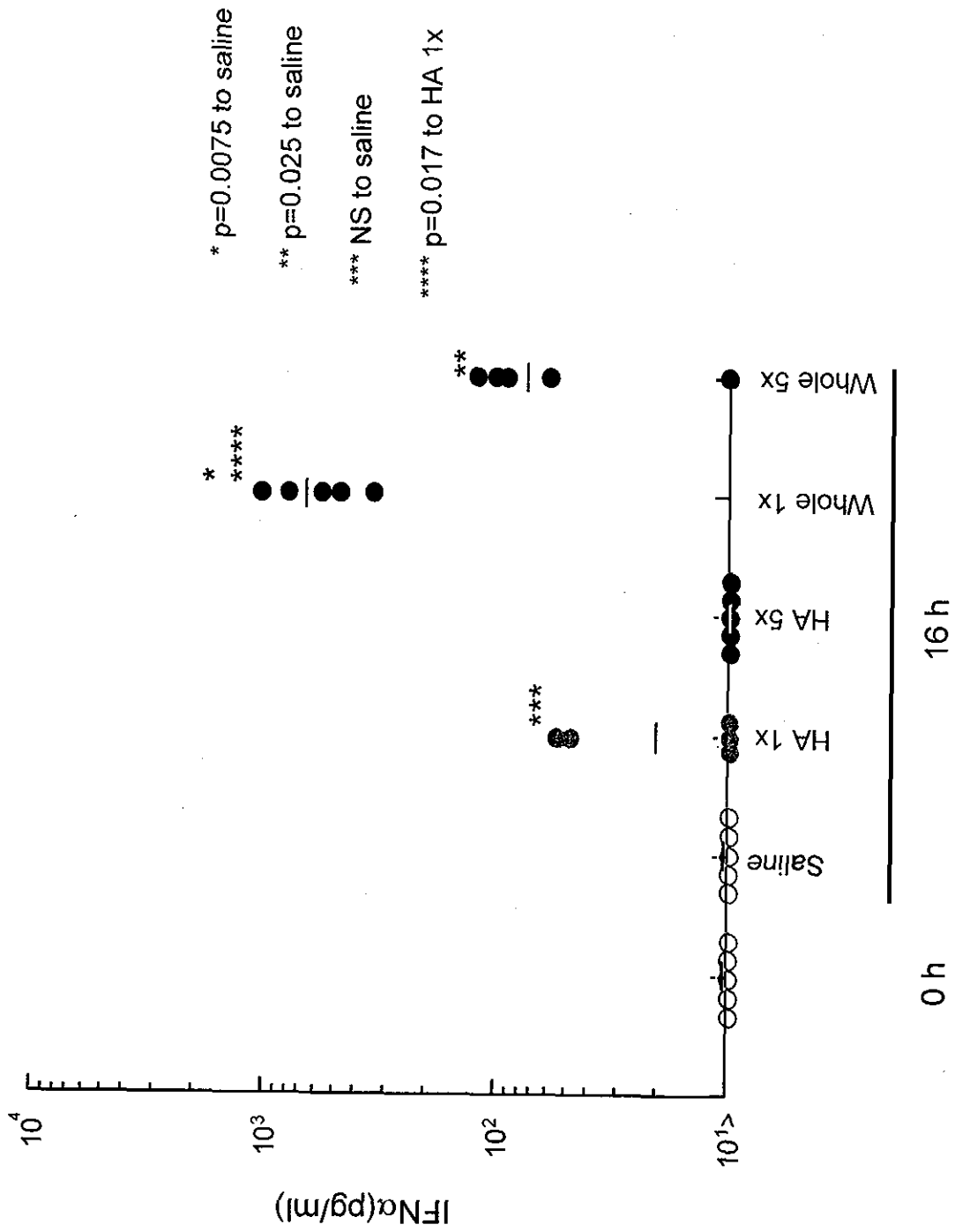


図2 インフルエンザワクチン接種16時間後の血清中IFN $\alpha$ 濃度

# Anti-HA IgG1 Ab titer in mice immunized with HA or whole vaccine

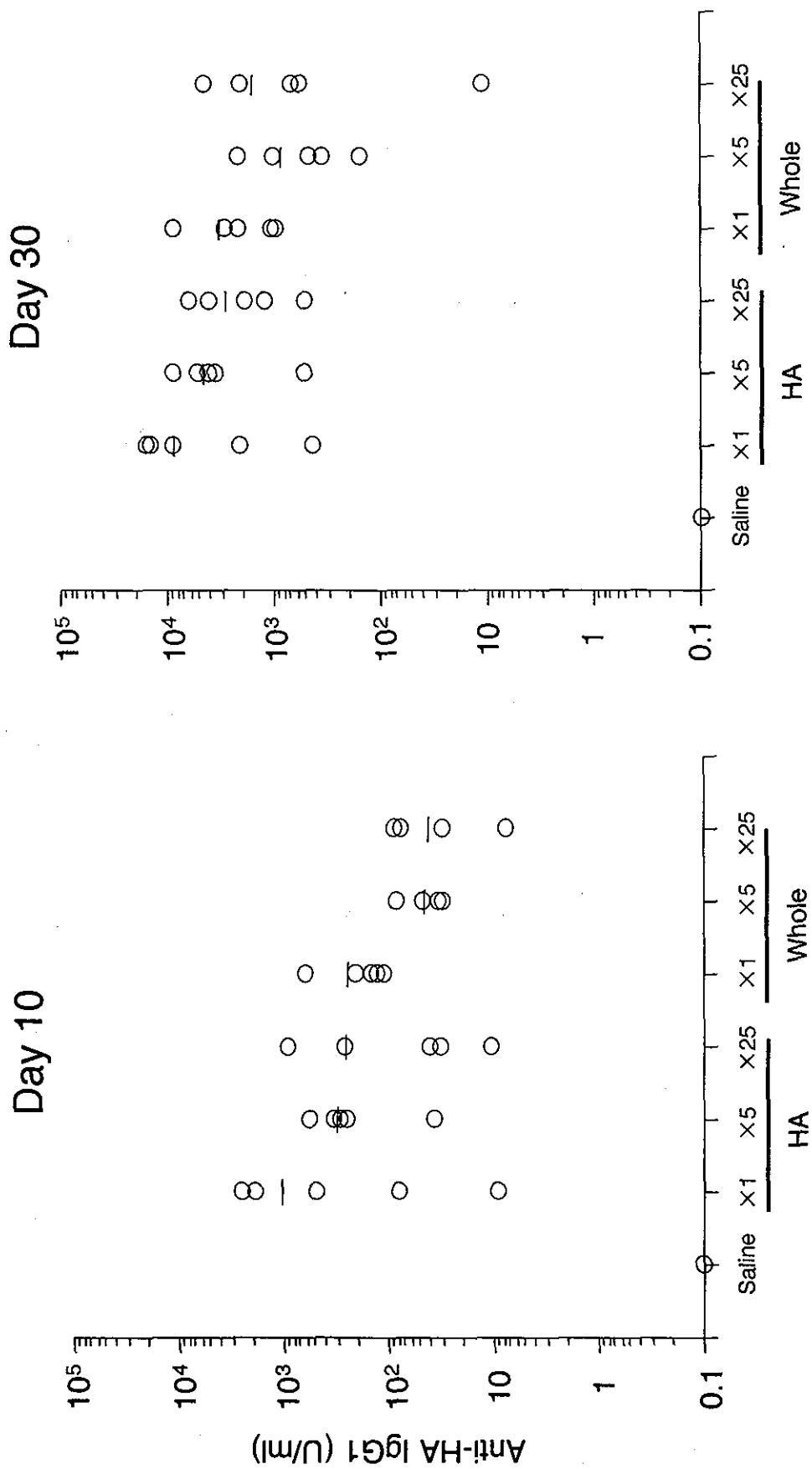


図3 ワクチン接種10日または30日後の血清HA抗体力価



厚生労働科学研究費補助金  
(特別研究事業)

分担研究報告書

インフルエンザワクチンの安全性向上のための品質確保に関する研究  
－ マウス白血球数減少試験法 －

分担研究者 堀内善信 国立感染症研究所 細菌第二部  
真鍋貞夫 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所  
大隈邦夫 (財) 化学及血清療法研究所  
小幡 朗 デンカ生研株式会社  
渡辺隆雄 (社) 北里研究所

研究協力者 落合雅樹 国立感染症研究所 細菌第二部  
山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部  
蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部  
片岡紀代 国立感染症研究所 細菌第二部  
豊泉裕美 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

ワクチンの安全性向上のため、精度及び再現性に優れたマウス白血球数減少試験法への改善を試みた。接種経路、マウス系統及び週齢、採血法について検討したところ、採血法を改良することで最も本試験の感度、精度及び再現性の向上が認められた。また採血法の改良により、施設間の測定結果もよく一致することが示された。マウス白血球数減少活性と、ワクチン中の総蛋白量及びワクチン株の関係について評価したところ、ワクチン中の総蛋白量に依存したマウス白血球数減少活性の増加が認められたが、本研究で用いたインフルエンザHAワクチン原液においてはワクチン株による違いは認められなかった。

A. 研究目的

近年、力価試験の変更によりワクチン中の総蛋白含量が増加し、これに伴い本試験において基準値に近いワクチンが認められるようになった。従来、マウス白血球数減少試験では、ワクチン接種マウスの白血球数と対照マウス（接種前ある

いは生理食塩水接種）の白血球数の比較により本活性を評価してきた（生物学的製剤基準1993年改正）。実際の測定においては多検体を同時に試験するなどの理由から生食水接種マウスの白血球数を対照として用いてきた。しかし、対照マウスの白血球数の変動が試験結果へ大きく

影響し基準値に近いワクチンの品質を評価するには、その変動がワクチン中の本活性を評価する上で問題となってきた。そこで、生食水接種マウスの白血球数に比較して変動が少ないインフルエンザ全粒子ワクチンを凍結乾燥したマウス白血球数減少試験用参照ワクチン（毒性参照品）を作製し、ワクチン中の本活性を参照品に対する相対活性として評価することで、問題の解決を図った。しかし、高度な品質管理を確保するには、さらなる試験評価法改善の努力が必要であると考えられた。本研究ではワクチンの安全性向上のため、より精度及び再現性の高いマウス白血球数減少試験評価法を確立し、本活性の製造工程での品質管理を容易すること、またマウス白血球数減少活性とワクチン中の総蛋白量との関係及びマウス白血球数減少活性とワクチン株の違いとの関係について明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

本研究には、インフルエンザHAワクチン原液及び小分け品そして毒性参照品を用いた。マウス白血球数減少試験は特に記載がない限り生物製剤基準に準じて実施した。毒性参照品は2倍希釈間隔で4または5段階の希釈液を生食水を用いて調製した。ワクチン原液は必要に応じて生食水により希釈した。検体及び毒性参照品の各希釈に1群ずつを用い、1匹当たり0.5 mLずつを1回腹腔内に注射した。注射の12~18時間後に尾静脈より採血し、マウスの末梢白血球数を測定した。検体のマウス白血球数減少活性は、毒性参照品に対する相対活性として平行線定量法を用いて統計的に算出した。

## C. 研究結果

### 1. 試験法の改善に関する研究

近年、ワクチンのマウス白血球数減少活性を評価するには、対照マウスの白血球数の変動による試験結果への影響が問題となってきた。そこで、生食水接種マウスの白血球数に比較して変動が少ない毒性参照品接種マウスの白血球数を対照として評価することで問題の解決を図った。しかし、信頼性の高い品質管理を実施するためには精度及び再現性の更なる向上が必要と考えられた。こうした背景から試験評価法の改善を試みた。

腹腔内接種と静脈内接種の接種経路の違いによる影響を調べたが、静脈内接種で毒性参照品に対する感度の向上が認められたが、精度や再現性の点で有効な改善は認められなかった。マウス系統に関しては、現在検定で使用しているddYマウス(4週齢)に加え、ddY(6週齢)、BALB/c(6週齢)、ICR(4/6週齢)マウスについて比較した(すべて雌マウスを使用)。4週齢マウスの比較ではddYとICRマウスの間で違いは認められなかった。6週齢マウスではICRマウスで毒性参照品に対する用量依存性に若干の改善が認められたが、再現性において違いは認められなかった。

採血法の検討からマウスを加温後に採血したところ、感度の向上ならびに毒性参照品に対する用量依存性の改善が認められた。従来法では、毒性参照品の8倍希釈液が感度の限界であったが、加温法では16倍希釈液まで用量直線性が再現的に得られることが確認された(図1)。そこで、生食水接種マウスの白血球数80%値およびインフルエンザHAワクチン原液(総蛋白量200および800 µg/mL)の毒性参照品に対する相対活性を算出し再現性を評価した(ddYマウス雌、4週齢)。図2に示すように、加温法はいずれの検体についても毒性参照品に対する相対活性は、試験回によらずよく一致した結果が得られ、再現性にも優れていることが確認された。

そこで、感染研及びワクチン4製造所の全5施設で、上記検体を測定し、施設間の再現性について評価した。図3では、従来法及び加温法による生食水接種マウスの80%白血球数値の毒性参照品に対する相対活性を示した。加温法は、従来法と比較して高精度であり、さらに異なる施設間での再現性も優れていることが確認された。またインフルエンザHAワクチン原液(総蛋白量200および800 µg/mL)についても施設間で良好な再現性が得られた(図4)。

以上の結果から、採血法を改良することにより最も本試験の精度及び再現性の向上が認められた。したがって、以後の試験では加温法により採血を行い、接種経路(腹腔内接種)及びマウス系統(ddYマウス雌、4週齢)は、従来の検定法に準じて実施することとした。

## 2. マウス白血球数減少活性とワクチンの総蛋白量及びワクチン株の違いとの関係

ワクチン製造4施設から得た2004-2005年シーズン用インフルエンザHAワクチン原液を用いた。ワクチン原液は総蛋白量300及び800 µg/mL(1株のみ659 µg/mL)に調製したワクチン原液希釈液を用いてマウス白血球数減少活性とワクチン中の総蛋白量の関係の評価した。ワクチン原液は3種のウイルス株(A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Wyoming/3/2003(H3N2), B/Shanghai/361/2002)をそれぞれ試験することで、マウス白血球数減少活性とワクチン株の関係を評価した。本研究に用いたインフルエンザHAワクチン原液の一覧及びマウス白血球数減少活性を表1に示した。1検体を除き、ワクチン中の総蛋白量に依存したマウス白血球数減少活性の増加が認められた( $P < 0.01$ )。しかし、毒性参照品の回帰係数と比較してワクチ

ン原液の回帰係数の絶対値は小さかった(表1)。一方、ワクチン株の違いによるマウス白血球数減少活性の差は認められなかった。

## D. 考察

インフルエンザワクチンの安全性試験のひとつであるマウス白血球数減少試験は、国外では実施されておらず、その意義については議論のあるところである。しかし、因果関係が必ずしも明らかにされていないとはいえワクチンの副反応と考えられる死亡例が米国などでは報告されている。一方、わが国ではマウス白血球数減少試験を含めた安全性管理の実施により現在まで副反応の低いワクチンが供給されてきたことも事実である。ところが近年、力価試験の変更によりワクチン中の総蛋白含量が増加し、これに伴い本試験において基準値に近いワクチンが認められるようになり、従来のマウス白血球数減少試験では、品質の十分な管理が難しくなりつつある。そこで本研究では、こうした問題を解決してワクチンの安全性を確保するために、マウス白血球数減少試験の精度及び再現性の向上を目的とした検討を行った。

ワクチンの接種経路の検討から、従来の腹腔内接種に比較して静脈内接種で毒性参照品に対する感度の向上が認められたが、精度及び再現性の改善は認められなかった。また、マウス系統及び週齢の検討では、国家検定及びワクチン製造所の自家試験で使用されているddYマウス、生物製剤基準で規定されている4週齢に比較して、ICRマウス6週齢で毒性参照品の用量依存性の向上が認められたが、再現性の有意な改善は認められなかった。一方、マウスを加温後に採血すると、感度の向上ならびに毒性参照品に対する用量依存性の改善が認められた。従来法では、毒性参照品の8倍希釈液が感度の限

界であったが、加温法では16倍希釈液まで用量直線性が再現的に得られることが確認された(図1)。また、毒性参照品の回帰直線の母回帰係数が、従来法では-0.24であったのに対して加温法では-0.35とその絶対値が約1.5倍増加していることから、試験精度も向上していることが示された。さらに、生食水接種マウスの白血球数80%値、インフルエンザHAワクチン原液及び毒性参照品の加温法による繰り返し測定(ddYマウス雌、4週齢)から、毒性参照品に対するこれらの検体の相対活性が再現的に測定されることが示された(図2)。そこで、ワクチン製造所4施設で同一の検体を加温法により測定したところ、感染研を含む全施設でよく一致した結果が得られ、施設間における再現性の向上が認められた(図3, 4)。従来法及び加温法による生食水接種マウスの80%白血球数値の毒性参照品に対する相対活性の評価から、従来法では施設Cで他の施設に比べて低い活性として測定される傾向が認められ、多くの測定が統計的に異常値として棄却される結果となった(図3A)。また加温法は、従来法に比較して精度の向上が認められ、95%信頼区間が小さくなっていることがわかる(図3)。さらに、加温法を用いた場合の毒性参照品の母回帰係数は、感染研で-0.35であったのに対して、感染研を含めた全施設の母回帰係数は-0.34とよく一致していたことから、施設によらず同等な精度で試験が可能であることが示され、品質管理の上で加温法が非常に有効であることが確認された。

つぎに、ワクチン製造所から得た2004-2005年シーズン用インフルエンザHAワクチン原液を総蛋白量300及び800 µg/mL(1株のみ659 µg/mL)に調製して、マウス白血球数減少活性とワクチン中の総蛋白量との関係ならびにワクチン株による違いについて評価した。マウス白血球数減

少活性は、1検体を除きワクチン中の総蛋白量に依存して増加した( $P < 0.01$ )。しかし、毒性参照品の回帰係数(-0.333)と比較してワクチン原液の回帰係数の絶対値は小さく、ワクチン原液(1検体を除く)の共通回帰係数は、-0.172と算出された(表1)。一方、今回試験したインフルエンザHAワクチン原液ではウイルス株の違いによるマウス白血球数減少活性の差は認められなかった。

#### E. 結論

マウス白血球数減少試験の信頼性向上のため、接種経路、マウス系統及び週齢、採血法に関して検討したところ、マウスを加温して採血を実施することで最も本試験の感度、精度及び再現性の向上が認められた。また、同一検体を多施設で測定する場合に、採血を加温法により実施したところ、各施設でよく一致する結果が得られた。

マウス白血球数減少活性とワクチン中の総蛋白量及びワクチン株の関係について、インフルエンザHAワクチン原液を用いて評価したところ、ワクチン中の総蛋白量の増加にともなうマウス白血球数減少活性の増加が認められたが、本研究で用いたインフルエンザHAワクチン原液においてはワクチン株の違いによる本活性の差は認められなかった。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況考察

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他