

なし

文献

Kurokawa M. et al. Toxicities of influenza vaccine: peripheral leukocytic response to live and inactivated influenza viruses in mice., Jpn. J. Med. Sci. Biol. 1975; 28(1):37-52

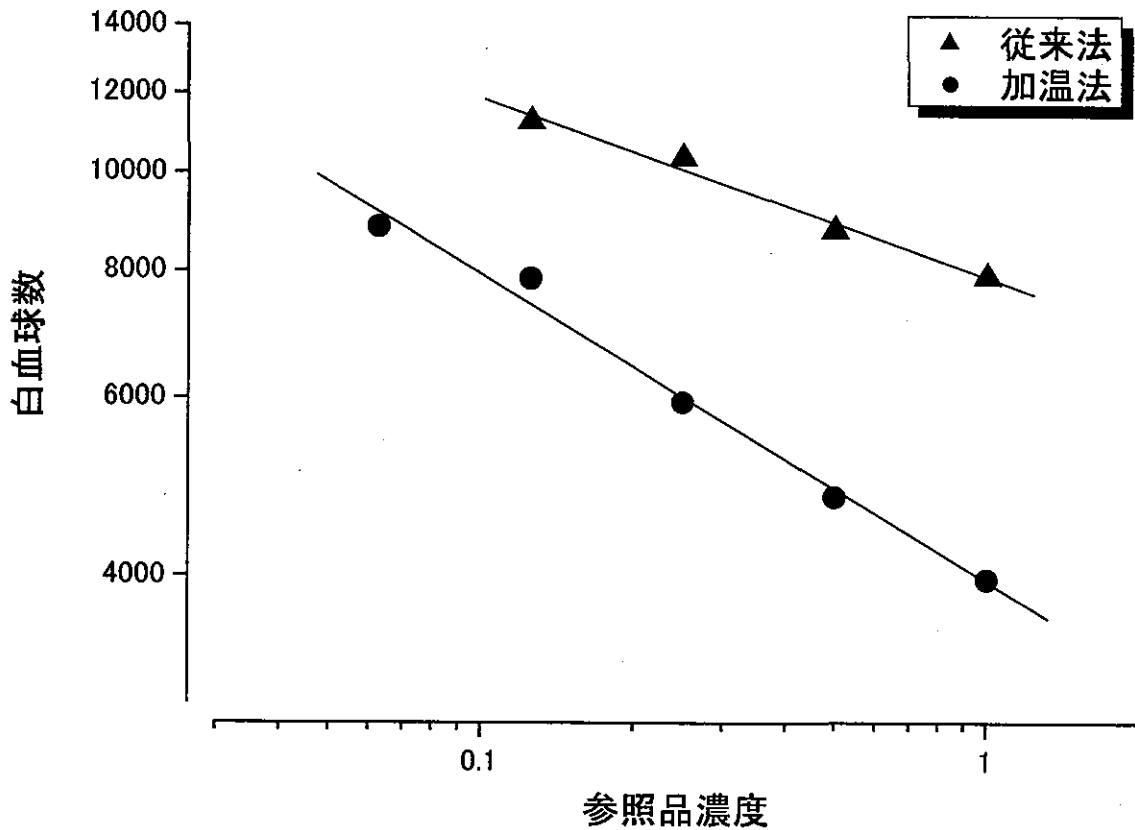


図1 マウス白血球数減少試験用参照品の回帰直線: 従来法(▲), 加温法(●)

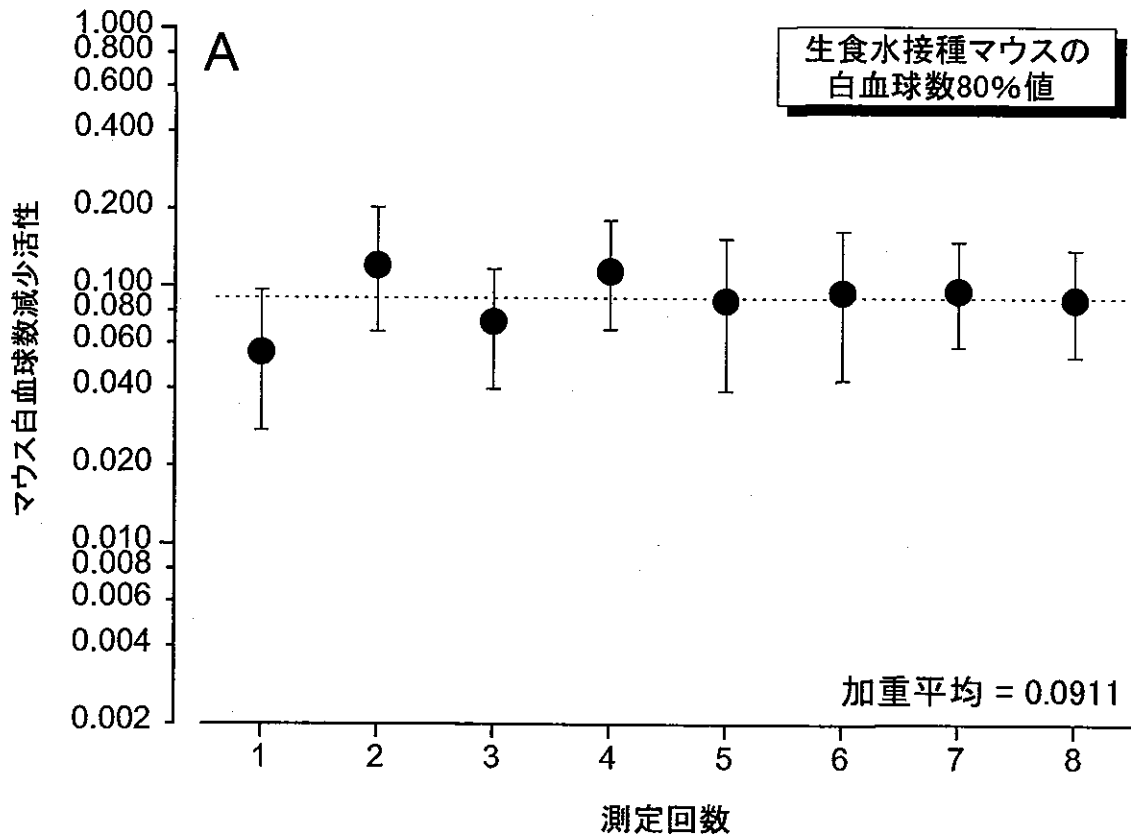


図2 マウス白血球数減少試験の加温法を用いた場合の繰り返し測定の再現性
生理食塩水接種群の白血球数80%値(A)、インフルエンザHAワクチン
原液総蛋白量200 (B), 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)

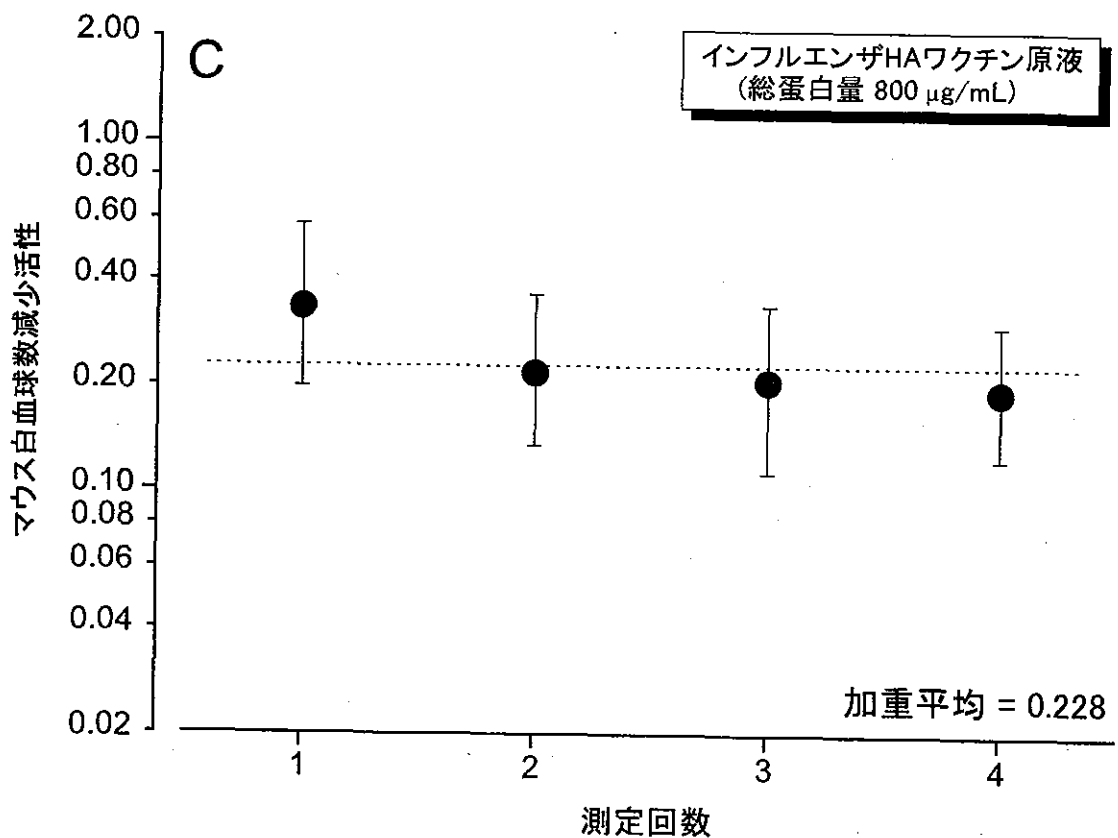
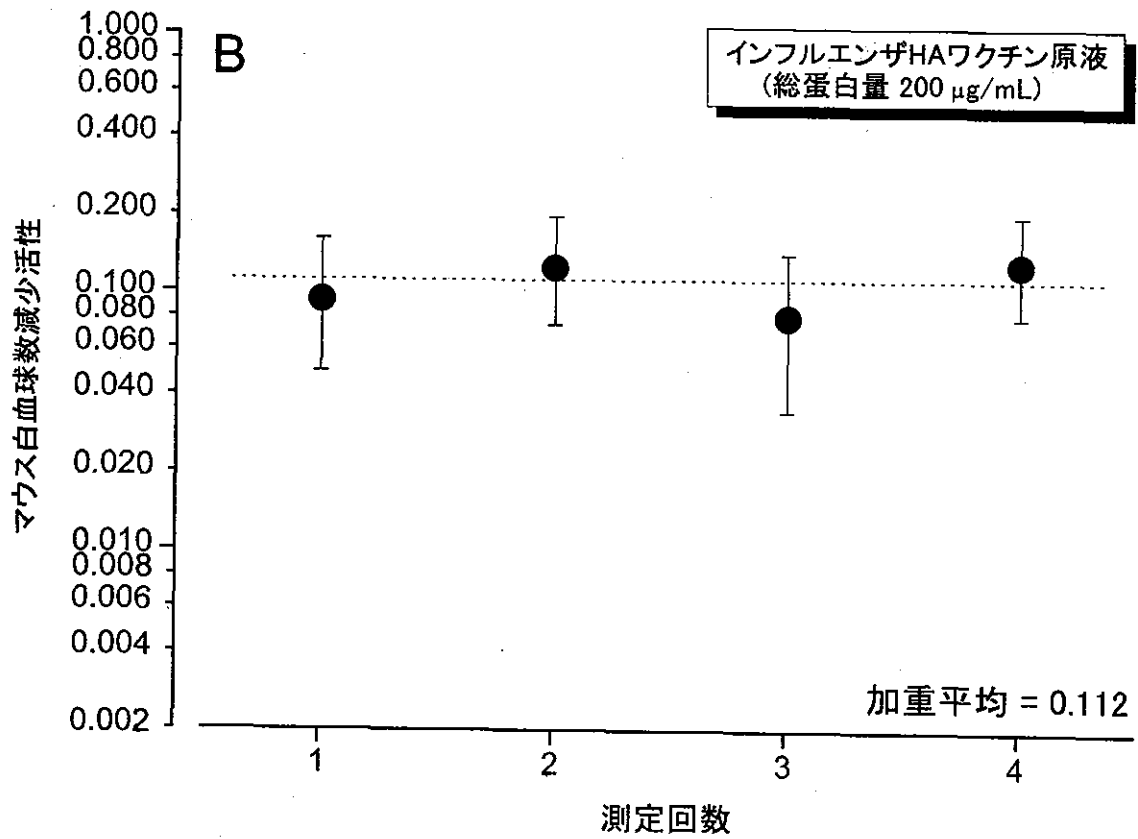


図2 マウス白血球数減少試験の加温法を用いた場合の繰り返し測定再現性
生理食塩水接種群の白血球数80%値(A)、インフルエンザHAワクチン
原液総蛋白量200 (B), 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)

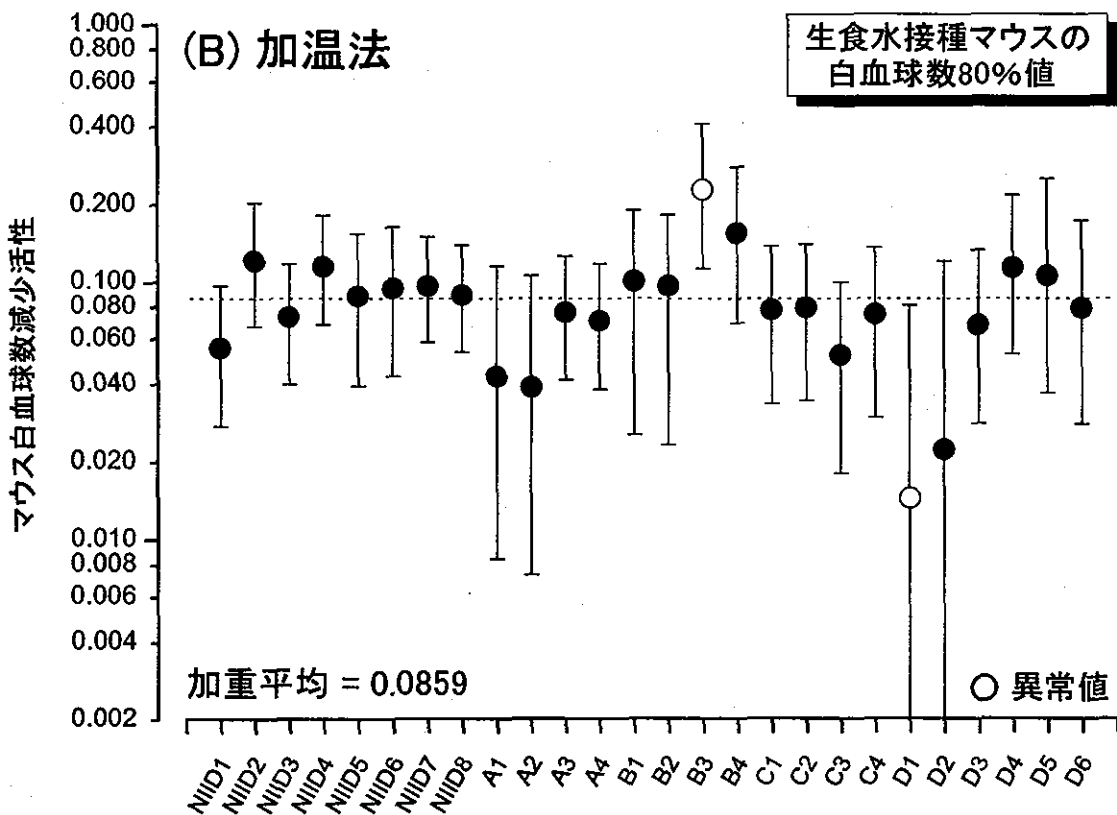
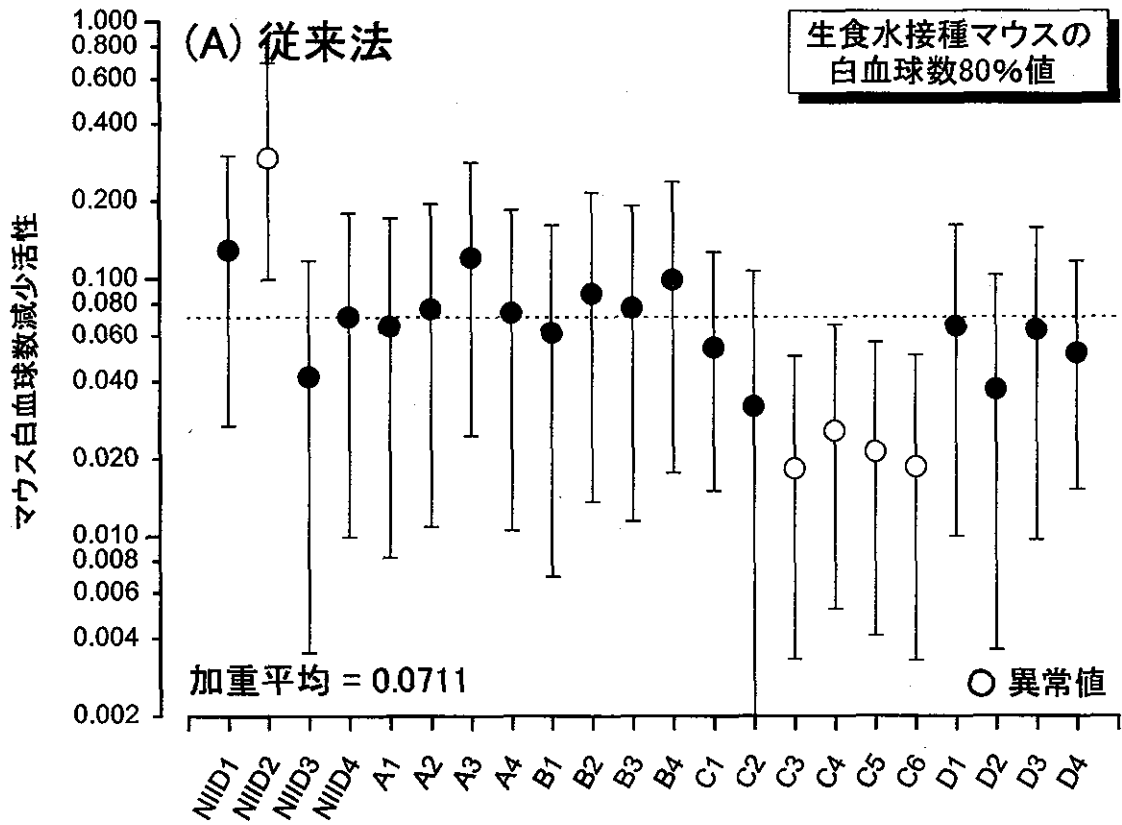


図3 生食水接種マウスの白血球数80%値の白血球数減少活性の施設間における再現性: (A) 従来法, (B) 加温法、○は異常値

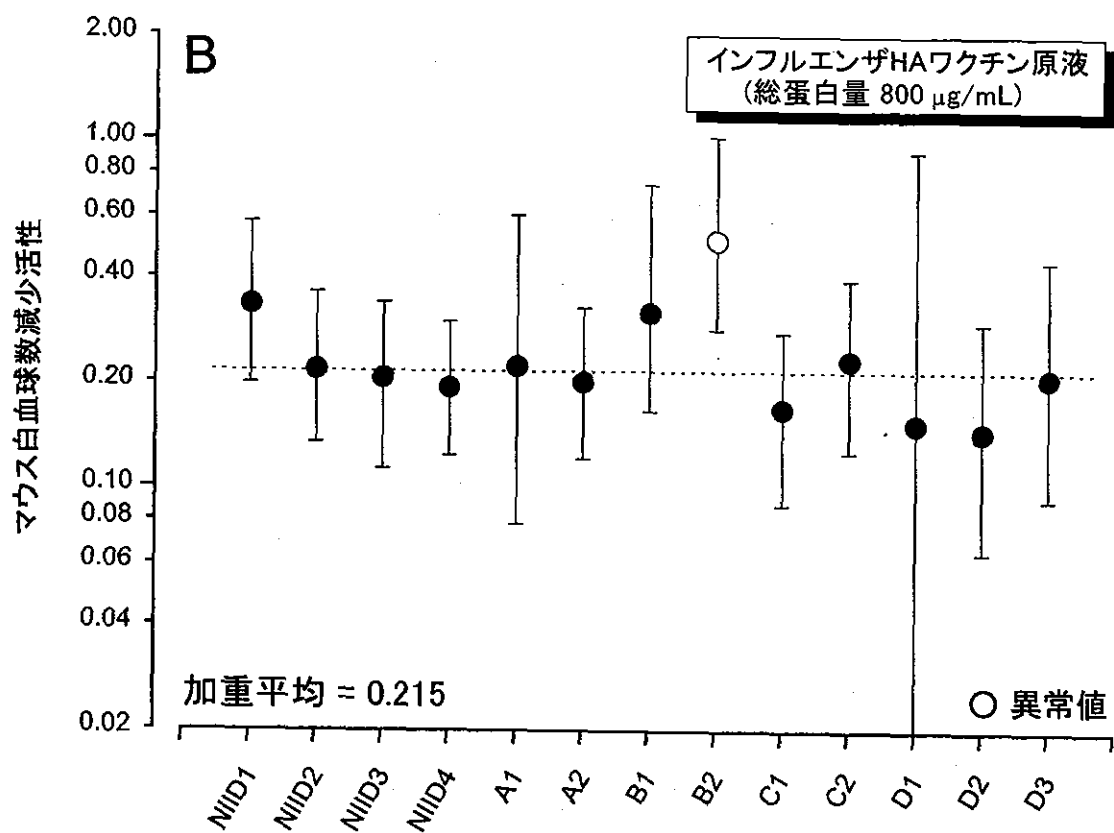
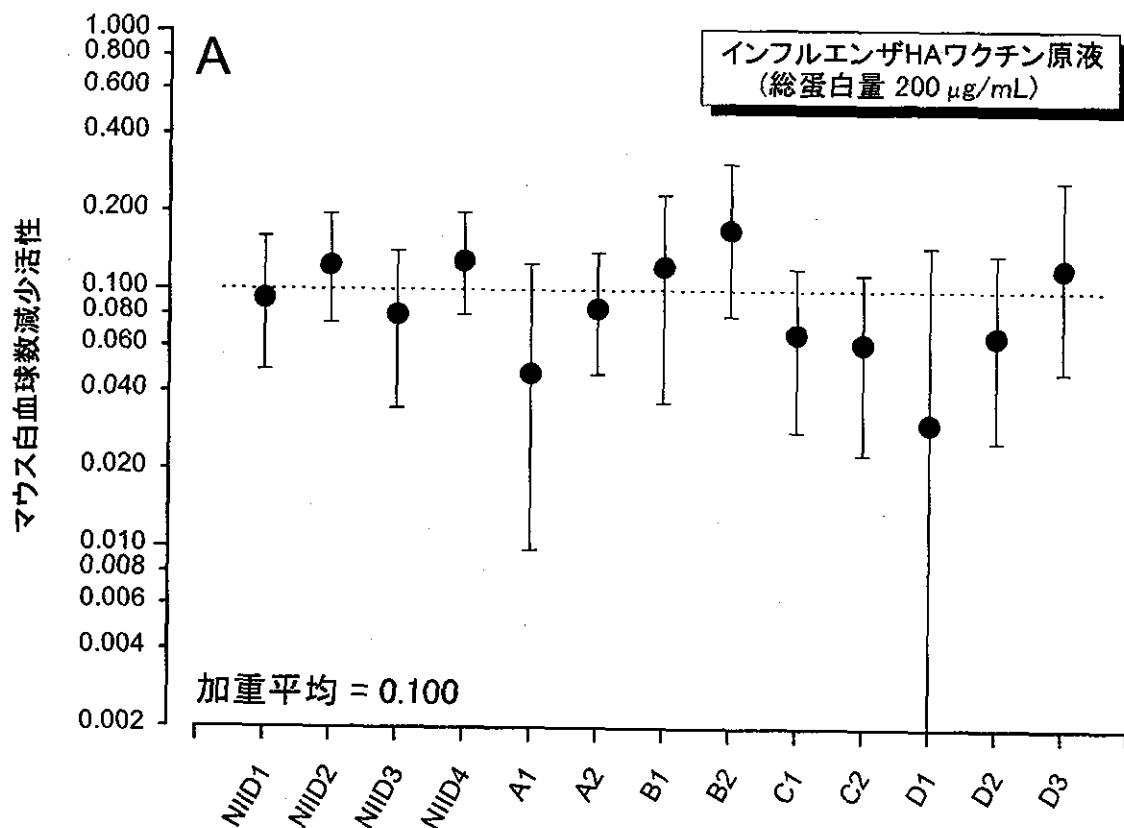


図4 マウス白血球数減少試験の加温法を用いた場合の施設間での再現性
インフルエンザHAワクチン原液総蛋白量200 (A), 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B)
○は異常値

表1 インフルエンザHA ワクチン原液一覧及びマウス白血球数減少活性

製造所	ウイルス株	マウス白血球数減少活性 (U/mL)		回帰係数
		300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹	800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹	
A社	A/New Caledonia/20/99 (IVR-116) (H1N1)	0.063	0.079	-0.076
	A/Wyoming/3/2003 (IVR-134) (H3N2)	0.065	0.114	-0.193
	B/Shanghai/361/2002	0.040	0.065	-0.169
B社	A/New Caledonia/20/99 (IVR-116) (H1N1)	0.065	0.112	-0.183
	A/Wyoming/3/2003 (IVR-134) (H3N2)	0.078	0.081	—
	B/Shanghai/361/2002	0.085	0.164	-0.225
C社	A/New Caledonia/20/99 (IVR-116) (H1N1)	0.065	0.108	-0.170
	A/Wyoming/3/2003 (IVR-134) (H3N2)	0.060	0.113	-0.213
	B/Shanghai/361/2002	0.065	0.089	-0.105
D社	A/Wyoming/3/2003 (IVR-134) (H3N2) ²	0.051	0.090	-0.241
	マウス白血球数減少試験用参照品			-0.333

1 ワクチン原液の総蛋白量

2 総蛋白量は 300 および 659 $\mu\text{g}/\text{mL}$

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

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

分担研究者 西藤 岳彦 国立感染症研究所

協力研究者 堀内 善信、板村 繁之国立感染症研究所

研究要旨

現行のワクチン力価試験は、一元放射免疫拡散法(Single radial immunodiffusion test: SRD)によっている。しかしこの方法は抗原抗体複合物の形成によってワクチン内の抗原量を測定する方法であり、ワクチンの免疫原性の程度を測定する方法ではない。本研究では、ワクチンの免疫原性を評価する為に、階段希釈したワクチン原液を各用量ごとに10匹のマウスに腹腔内接種し、接種2週間後の個体別血中抗体価をHI試験によって測定した。その結果、個体別に血中抗体価を測定することによって、異なったワクチン原液間の免疫原性を相対力価と評価出来ることが明らかになった。一方で、個体間での抗体応答にばらつきがあることも判明し、ばらつきを減少する為の検討が必要であることも示唆された。

A. 研究目的

ワクチンの品質管理において、適正なワクチン力価の評価は重要な課題である。インフルエンザ HA ワクチンの力価測定法として平成12年以前は免疫マウスのプール血清を用いた卵内中和法が採用されていた。しかし、この方法は大量のマウスを使用する為に時間的、物理的制約が大きく、ワクチン国家検定には不向きであった。さらにプール血清を用いるため、術式そのものの検出感度に関しても改善の余地を残していた。新型インフルエンザの出現によるパンデミックの際には、短時間に大量の検体の検定を求められることが想定されている為、平成12年以降短時間で大量の検体の検査が可能であり、国際的にも既に

標準的な術式として取り入れられている一元免疫拡散法(Single radial immunodiffusion test: SRD)が検定方法として採用された。

SRD法は抗原抗体複合体形成を測定するものであり、ワクチンの免疫原性を測定するものではない。このためワクチンの品質向上の為には、ワクチンの免疫原性を正當に評価する試験系に基づいた品質改善策を検討する必要がある。

本研究では、ワクチン原液の免疫原性を評価するため、これまでの卵内中和法に変わる方法を検討することを目的し、個々の免疫マウスから採取した血清を用いたHI試験に関して検討した。

B. 研究方法

ワクチン原液: インフルエンザワクチン製造 4 社より分与された、平成 17 年度インフルエンザ HA ワクチン製造用単味 AH3 用原液 (A/Wyoming/3/2003) および一社より分与された全粒子用ワクチン製造用単味 AH3 用原液 (A/Wyoming/3/2003) を使用した。各ワクチン原液の HA タンパク含量は SRD 法によって測定し、30 μ g/ml になるよう PBS(-) を用いて調製した。

マウス免疫: 雄 ddy マウス 4 週令を用い、各群 10 匹に 5 倍階段希釈したワクチン原液 0.2ml を腹内投与した。投与 2 週間後に、麻酔下で心臓穿刺によって採血を行い、各個体の血清を採取した。

赤血球凝集阻止 (HI) 試験: 採取した血清を RDE(II) (デンカ生研) 処理した後、最終濃度 1:10 になるように PBS で希釈し HI 試験に供した。HI 試験はマイクロタイター法により、A/Wyoming/3/2003 ワクチン原株発育鶏卵漿尿液を抗原とし、0.5% 鶏赤血球を用いて実施した。各個体由来血清ごとの HI 価を基に、平行線検定法によって全粒子用ワクチン製造用単味 AH3 用原液の免疫力価を 1 とした相対力価を算出した。

C. 研究結果

表 1 に示すように、各原液ともに用量依存的な HI 抗体価の上昇が認められた。しかし、用量ごとに詳細に HI 価を検討すると、同一検体の同一用量群内でも個体毎の HI 抗体価にばらつきが認められる傾向があった。特にこの傾向は低希釈倍率の群で著しく、HA ワクチン原液 2 の 5 倍希釈群においては、HI 価のばらつきが <10 から 640 倍までと最も大きかった。

HI 価を対数変換した後に、全粒子ワクチン

の免疫原性を 1 とした相対力価を平行線検定法によってそれぞれの HA ワクチン原液について求めた。平行性検定の際に HA ワクチン原液 2 に関してのみ、測定値の分散が他の検体と異なっているため、すべての原液を総合しての平行線検定が行えなかった。このため 2 を除くすべての検体について平行性検定を行って、相対力価を求めるとともに、HA ワクチン原液 2 に関しては、全粒子ワクチン原液との間で別途検定を行って相対力価を算出した。

表 2 に示すように HA ワクチン原液 1 は全粒子ワクチンと同等の力価を示したのに対し、他の 3 つの HA ワクチン原液の相対力価は低いものであった。また表には示してはいないが、HA ワクチン原液 2 に関しては HA ワクチン原液 1 を基準にした際と、全粒子ワクチン原液を基準にした際で、相対力価が異なっており、ワクチン原液 2 において認められた同一群内での HI 価のばらつきが大きさが検定結果に影響を与えていると考えられた。

さらにすべての検体について得られた各相対力価の 95% 信頼限界が広く、同一希釈群内での HI 価の分散の影響がここでも認められた。

表 2 全粒子ワクチン原液の力価を基準とした各検体の相対力価

	相対力価	95%信頼区間	
		下限	上限
HA ワクチン原液 1	1.24	0.42	5.53
HA ワクチン原液 2	0.72	0.12	5.46
HA ワクチン原液 3	0.20	0.07	0.61
HA ワクチン原液 4	0.19	0.07	0.58

D. 考察

今回の実験で、ワクチン原液接種後のマウスを個別別に血清採取して HI 試験に供することによって、平行性検定を利用して相対力価を推定することができることが明らかとなった。以前のインフルエンザワクチン検定ではワクチンの免疫原性を測定するために卵中和試験法を用いていた。さらに検定基準では各群に血清をプールした後に卵内接種試験に供することとなっていたため個体毎の免疫応答のばらつきに関して考察することが出来なかった。今回、個別血清を用いて HI 試験を行うことによって、個別別にどの程度のばらつきがあるかを把握することができ、また平行性検定によって相対力価を推定するに足るデータを得ることができると明らかとなった。

HA ワクチン接種後の各個体別の HI 価を測定することによって、同一接種量群内でも抗体応答にばらつきがあることが示された。これは、使用したマウスの系統によるものかもしれない。近交系のマウスを使うことによって免疫系に関与する遺伝子のバックグラウンドがより均一になり、抗体応答のばらつきが低く抑えられる可能性が考えられる。また今回は免疫から採血までの期間が 2 週間であったが、この期間では免疫応答がプラトーに達している個体とそうでない個体が共存することとなった可能性がある。免疫応答が大部分の個体でプラトーに達する期間を精査して設定する必要があるだろう。また、今回の試験では一回免疫によるプライミング効果のみを調べたが、複数回免疫によるブースター効果を見ることによって、よりばらつきの少ないデータを得ることが出来るかもしれない。

異なる製造所由来の抗原が SRD 法によって規定される同一の抗原量を接種したにもかかわらず異なる免疫原性を示すことが示唆された。各製造所間での HA 原液の作製法の違いによって、SRD 法による抗原量と、免疫原性との間に乖離が生じている可能性があり、今後免疫原性測定の実立とともに検討を要する課題であろう。

E. 結論

ワクチン原液の免疫原性を評価する試験系の一つとして免疫したマウスから個別に血清を採取して同一のウイルス抗原に対する HI 価を測定する方法が利用できると示された。一方で、このような試験系を採用するにあたって、使用するマウスの系統、免疫から採血までの期間や免疫回数が結果の信頼性に影響を与える可能性が考察された。

F. 健康危機情報

特記事項無し。

G. 研究発表

なし

表1 個別別HI価

被検検体	HI価						
	ワクチン原液希釈 $\times 5^n$						
	1	2	3	4	5	6	7
HA ワクチン原液1	80	40	10	20	40	5	ND
	80	40	10	5*	40	5	ND
	80	160	20	80	5	5	ND
	160	80	40	20	40	5	ND
	80	40	20	40	20	5	ND
	320	160	40	40	20	5	ND
	40	20	20	10	40	5	ND
	80	40	40	40	20	5	ND
	160	160	20	40	5	5	ND
	80	80	40	40	80	5	ND
HA ワクチン原液2	10	80	40	5	5	5	ND
	20	20	20	5	5	5	ND
	160	20	40	40	5	5	ND
	160	80	20	5	5	5	ND
	160	5	10	10	5	5	ND
	40	10	5	80	5	5	ND
	40	40	5	5	5	5	ND
	20	20	5	5	5	5	ND
	640	160	20	5	5	5	ND
	5	320	20	10	5	5	ND
HA ワクチン原液3	160	20	40	10	5	5	ND
	20	80	20	10	5	5	ND
	80	5	5	10	5	5	ND
	20	20	5	10	5	5	ND
	160	5	5	5	5	5	ND
	80	20	10	5	5	5	ND
	640	20	5	5	5	5	ND
	20	80	5	20	5	5	ND
	160	80	5	10	5	5	ND
	80	10	5	10	5	5	ND
HA ワクチン原液4	160	40	10	5	5	5	ND
	640	10	20	5	5	5	ND
	80	5	20	5	5	5	ND
	40	40	10	5	5	5	ND
	20	10	5	5	5	5	ND
	20	10	5	5	5	5	ND
	160	40	5	5	5	5	ND
	40	40	5	5	5	NA***	ND
	160	40	5	5	5	NA	ND
	320	5	5	5	5	5	ND
全粒子ワクチン原液	ND**	5	20	10	5	10	5
	ND	80	20	10	5	10	5
	ND	160	10	5	5	10	5
	ND	5	20	5	5	10	10
	ND	80	10	10	10	10	5
	ND	40	10	10	5	5	5
	ND	160	40	10	5	10	10
	ND	160	5	20	10	5	5
	ND	80	5	5	20	5	10
	ND	80	5	10	10	10	5

*: <10

** : Not done

***: Not applicable

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
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, <u>S. Itamura</u> , N. Miranda, T. Uyeki), and Jeremy Farrar	Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam.	N. Engl. J. Med.	350	1179-1188	2004
Iwasaki T, <u>Itamura S</u> , 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
<u>板村繁之</u>	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
<u>板村繁之</u>	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