

200606044A

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

新型インフルエンザ対応ワクチンの効果測定法及び
品質管理に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 板村繁之

平成19(2007)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 新型インフルエンザ対応ワクチンの効果測定法及び品質管理に関する研究 ----- 1
板村繁之

II. 分担研究報告

1. ワクチン効果の指標となる中和抗体価の測定方法の標準化とワクチン接種者の血清抗体の
交差反応性に関する研究 ----- 7
板村繁之・福家 功・細井和男・来海和彦・渡辺隆雄・：研究協力者 河野直子
2. 新型インフルエンザ対応ワクチンの効果測定法及び品質管理に関する研究 -ワクチンの力
価試験法の開発 ----- 12
横田恭子
3. 新型インフルエンザ対応ワクチンの効果測定法及び品質管理に関する研究-安全性管理に
関する検討 ----- 14
堀内善信
4. 新型インフルエンザワクチンのたんぱく質含量測定法の検討 ----- 16
笠井道之

新型インフルエンザ対応ワクチンの効果測定法及び品質管理に関する研究

主任研究者 板村繁之 国立感染症研究所ウイルス第3部 主任研究官

研究要旨

新型インフルエンザの発生がますます危惧され発生に備えたワクチンの準備は緊急の課題である。本研究では、新型インフルエンザ対応のワクチン開発をワクチンの品質管理及びワクチン効果の指標となる抗体応答の測定方法などの側面から支援して臨床試験を円滑に進めること、また新型インフルエンザワクチン原液の貯留製造支援のために品質管理の研究を実施して安全性が高く高品質のワクチン供給を可能にすることを目的として実施した。さらに、世界的に流行している現在の高病原性鳥インフルエンザウイルス（A/H5N1）には遺伝的にも抗原的にも異なるいくつかのグループが存在しているが、より効果的なワクチン株の選択についての知見を集めることも目的とした。(1) ワクチン効果を評価する指標のひとつとして抗体応答を測定することは重要であり、中和抗体価の測定方法、材料をできるだけ標準化して、研究室間での試験成績の一致度、再現性を一定のレベルにすることができた。これによって国内で実施された臨床試験における抗体応答についての評価を同一の基準によって比較することが可能になった。(2) 特定のワクチンで免疫された接種者の血清には、抗原性の異なるグループのウイルス株に対しては反応性が低下しており、ワクチン株としては抗原性がより一致することが望ましいと考えられるが、その防御効果などに関する意義については不明である。(3) H5型HA特異的なモノクローナル抗体を6クローン確立し、これらの抗体は新型インフルエンザ対応ワクチンの力価の品質管理に有用であると思われる。(4) インフルエンザ全粒子ワクチンのマウス白血球減少毒性はウイルス株やウイルス液のロットによらずウイルス蛋白含量に比例することが示唆され、ウイルス蛋白含量を管理することで高精度の管理が可能であると考えられる。(5) ワクチン原液については蛋白含量測定法として試験方法による大きな影響は少ないと判断されるが、小分け製品については方法、採取量による差異が生じる可能性があり、測定方法については十分な標準化が必要と思われる。

研究組織	横田恭子 国立感染症研究所免疫部 室長
主任研究者	笠井道之 国立感染症研究所血液・安全性研究部 主任研究官
板村繁之 国立感染症研究所ウイルス第3部 主任研究官	福家功 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所 課長
分担研究者	来海和彦 (財) 化学及血清療法研究所 上級研究員
堀内善信 国立感染症研究所細菌第2部 室長	

細井和男 デンカ生研株式会社 部長
渡辺隆雄 (社) 北里研究所 課長

A. 研究の目的と背景

新型インフルエンザはこれまでも人類に未曾有の健康被害をもたらしてきた。2005年の夏以降、高病原性鳥インフルエンザ(A/H5N1)の家禽での流行がアジアからロシア、中近東を経て欧州、さらにアフリカにまで拡大し、さらに感染した家禽からヒトへの感染も発生し続けている。新型インフルエンザの発生がますます危惧され発生に備えたワクチンの準備は緊急の課題である。わが国では既存のインフルエンザワクチンでは新型インフルエンザに対して効果が期待できないことから、国とワクチン製造所が協力してアジュバントを添加した新型インフルエンザ対応ワクチンの開発を進め、現在製造承認申請が提出されて審査が行われているところである。

本研究では、新型インフルエンザ対応のワクチン開発をワクチンの品質管理及びワクチン効果の指標となる抗体応答の測定方法などの側面から支援して臨床試験を円滑に進めること、また平成18年度に新型インフルエンザワクチン原液の貯留製造が計画されていたが、ワクチンの品質保証を行うための品質管理の研究を実施して安全性が高く高品質のワクチン供給を可能にすることを目的として実施した。さらに、世界的に流行している現在の高病原性鳥インフルエンザウイルス(A/H5N1)には遺伝的にも抗原的にも異なるいくつかのグループが存在しているが、どのウイルス株をワクチンとしたときにより多くの異なるウイルス株のグループに対応できるのかについても検討し、より効果的なワクチン株の選択についての知見を集めることも目的とした。具体的には以下の研究課題について実施した。

(1) ワクチン効果を評価する方法として中和試験法の手技について標準化を行うとともに、陽性、陰性

対照血清などを共通で導入して研究室間での試験成績の一致度、再現性について検討し、ワクチン効果判定のための基盤を整備する。

(2) ワクチン株で製造したワクチンの接種者の抗体応答についてワクチン株以外のウイルス株について中和抗体の交差反応性について解析し、ワクチン株選択のための知見を得る。

(3) 新型インフルエンザの候補である高病原性鳥インフルエンザ A/H5N1 ウイルスに対する HA 蛋白に特異的に反応するモノクローナル抗体を作製し、新型インフルエンザ対応ワクチンの力価試験としてワクチンの有効成分である HA 蛋白を定量するための ELISA 法を開発する。

(4) マウス白血球数減少毒性とウイルス含量との関係について解析し、新型インフルエンザ対応ワクチンの安全性について均質なワクチン製造を可能にするための管理すべき試験項目、試験方法を検討する。

(5) ワクチンの物理化学試験であるたんぱく質含量試験について、従来のスプリットワクチンであるインフルエンザ HA ワクチンに用いていたローリー法による試験方法が、現在開発されている新型インフルエンザに対応した全粒子ワクチンの試験方法として適しているのか、他の試験方法と比較検討を実施する。

B. 研究方法

1) ワクチン効果の指標となる中和抗体価の測定方法の標準化

感染研と各ワクチン製造所で中和試験について標準化した方法で実施するようにした。また試験に使用する培養細胞、陽性対照血清、陰性対照血清として共通のものを導入した。検体としては、第一相臨床試験のワクチン接種者の血清を接種者の了解を書面で得たものについて使用した。使用したワクチン

は、A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) 株をワクチン製造株として製造されたものである。測定は、各製造所と感染研との間で同一の検体について実施し測定値の一致度について検討を行った。

2) ワクチン接種者の血清抗体の交差反応性

A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) 株で製造されたワクチンの接種者血清について、同一ウイルス株として A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) 株、また異なる抗原性のウイルス株として A/Indonesia/05/2005 (Indo5/RG-2) (H5N1) 株、A/turkey/Turkey/1/2005 (NIBRG-23) (H5N1) 株を使用して中和試験を行い、交差反応性を調べた。

3) HA 含量測定によるワクチン力価試験法の開発のためのモノクローナル抗体の作製

A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) 株を発育鶏卵で増殖させたのち蔗糖密度勾配遠心法で精製し、UV またはホルマリンで不活化して免疫抗原としてマウスに免疫した。免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を細胞融合させてハイブリドーマを作製した。ELISA 法で NIBRG-14 (H5N1) 株に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。得られたモノクローナル抗体について組換え H5 HA、N1 NA 蛋白を使用してウエスタンブロット法によって反応性を調べた。

4) 新型インフルエンザ対応ワクチンの安全性管理に関する検討

マウス白血球数減少毒性をウイルス株間およびウイルス蛋白量との比較を行った。さらにウイルス蛋白含量 240 $\mu\text{g/mL}$ と 150 $\mu\text{g/mL}$ の不活化精製ウイルス液数株について本毒性を測定し、それぞれの用量回帰と併せてウイルス蛋白含量と本毒性が比例する

可能性について評価した。

5) 新型インフルエンザ対応ワクチンの蛋白含量測定試験法の検討

ワクチン製造所 4 社がそれぞれ試験製造したウイルス原液、高容量 及び低容量の小分け製品の全 12 種類について 4 つの異なる方法で蛋白含量を測定し比較解析を実施した。

C. 研究結果

1) ワクチン効果の指標となる中和抗体価の測定方法の標準化

ワクチン効果を評価する方法のひとつとしてワクチン接種者の抗体応答を測定することが行われてきたが、現在流行している高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) ウイルスについては通常の HI 試験による方法では感度が低いことや、使用する赤血球によって試験感度に差が認められることがわかっている。また、中和試験法による抗体価測定は感度が高く特異的と考えられているが、手技や使用する材料に細胞などが含まれ同一検体の測定値の研究室間でのばらつきが大きく一定の成績を得るのは容易ではない。そこで、中和試験法の手技について標準化を行うとともに、陽性、陰性対照血清などを共通で導入して研究室間での試験成績の一致度、再現性について検討を実施した。

陽性血清を使用してその中和抗体価を測定し再現性について検討したところ、安定して高い再現性が認められた。また、第 1 相臨床試験での同一のワクチン接種者の血清を使用して感染研とワクチン製造所との間の測定結果の一致度について検討を行ったところ、平均すると高い一致した試験成績を得ることができた。一方、感染研と製造所間の一致度について一定の傾向も認められた。すなわち、全般的に高めに測定される傾向のある製造所と低めに測定さ

れる傾向のある製造所があった。

2) ワクチン接種者の血清抗体の交差反応性

世界的に現在流行している高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1) は遺伝的にも抗原的にも異なるいくつかのグループが存在している。第1相臨床試験でのワクチン接種者の血清を使用してワクチン株とは異なるグループのウイルス株に対する反応性を中和試験によって解析し、交差反応性について解析した。今回の臨床試験で使用されたワクチンの製造株はクレード1に属するNIBRG-14株が用いられている。そこで、これとは異なるクレード2サブクレード1に属するIndo5/RG-2株とクレード2サブクレード2に属するNIBRG-23株に対する中和抗体価を測定して、その交差反応性について調べた。その結果、現在流行の主流であるウイルス株のグループであるクレード2のウイルスに対しては中和抗体価が低く、その程度はウイルスの属するサブクレードによって異なることがわかった。Indo5/RG-2株に対する交差反応性がNIBRG-23株に対するよりも低かった。それぞれのウイルス株に対する中和抗体価の幾何平均を見ても、その抗体価はNIBRG-14>NIBRG-23>Indo5/RG-2の順になっている。

3) HA含量測定によるワクチン力価試験法の開発のためのモノクローナル抗体の作製

ELISA法でH1N1亜型ウイルスであるPR8株に反応せずH5N1亜型ウイルスのNIBRG-14株に反応する16クローンを選択した。更にバキュロウイルスで発現させた組換えH5型HAを抗原としてELISA法で確認し、最終的にH5-HA特異的モノクローナル抗体を6クローン (YH-1A1, YH-2F11, OM-a, OM-b, OM-c, AY-2C2) を確立した。これらの培養上清をウェスタンブロットで確認したところ、AY-2C2は全く検出できなかったことから、この抗体は conformational

epitope を認識すると思われた。これらの抗体の交差反応性をエライザで確認したところ、YH-1A1 と OM-c はNIBRG-14株に特異的であった。

4) 新型インフルエンザ対応ワクチンの安全性管理に関する検討

新型インフルエンザ対応ワクチンの安全性について管理すべき試験項目、試験方法を検討するために、マウス白血球数減少毒性とウイルス蛋白含量との関係について検討した。ウイルス蛋白含量をほぼ同量に調製した2つのウイルス株の異なる組合せで作製された精製不活化ウイルス液2ロットについて感染研を含む5施設で各々4回以上測定して計21回の測定値を得、それぞれロット1に対するロット2の相対力価を求めた。さらに共通の力価を推定していると見なすことのできた16回の測定値より加重平均値を求めた。その結果、ロット1とLot2の間には有意な差は認められなかった。また、異なる3つのウイルス株より240 μ g/mLおよび150 μ g/mLの精製不活化ウイルス液を調製し、マウス白血球減少活性を相対力価として定量した。その結果、ウイルス株間での有意な差は認められなかった。そこで濃度ごとに相対活性の加重平均を求めたところ、150 μ g/mLと240 μ g/mLとの濃度比と有意な違いはなかった。従って今後さらに他の株について確認が必要であるが、本毒性は不活化精製ウイルス液の調製法が一定であればウイルス蛋白含量に比例する可能性が考えられる。

5) 新型インフルエンザ対応ワクチンの蛋白含量測定試験法の検討

ワクチン原液については、攪拌を十分にすれば、方法による差は、あまりないと考えられるが、小分け製品については、添加された物質の影響か、方法、採取量による差異が生じる可能性がある。

D. 考察

1) ワクチン効果の指標となる中和抗体価の測定方法の標準化

ワクチン効果を評価する指標のひとつとして抗体応答を測定することは重要であるが、HI 試験や中和試験は測定の変動要因が制御しにくいバイオアッセイであるために十分な標準化が行われなければ、相互のデータを比較することは不可能に近い。本研究によって中和抗体価の測定方法のある程度標準化できたことの意義は大きく、これによって国内で実施された臨床試験における抗体応答についての評価を同一の基準によって比較することが可能になった。一方で、測定結果の一致度について製造所によって一定の傾向が見られたことは改善する必要がある。予備的な検討では、全般に低めに測定される製造所での試験方法を、ウイルスと血清を添加後の培養日数を減らすことで良く一致した成績が得られている。今後さらに詳細に試験条件を検討してより再現性、一致度の高い試験方法を確立することが重要である。

本研究では、国内の製造所との共同研究によって試験方法の標準化を実施してきたが、新型インフルエンザワクチン開発は海外でも実施されており、それらの臨床試験の成績を評価する際には同様の標準化作業が必須ではあるが現時点では実施されておらず、その相互比較は極めて困難な状況である。WHO が中心になって標準化の動きがあるが、迅速な標準化作業が必要と思われる。2006 年 10 月に開催された WHO の「インフルエンザウイルスに対するマイクロ中和試験の標準化に関するワークショップ」でも、H5N1 ウイルスではないが、H3N2 ウイルスを用いた国際共同研究の解析結果が報告され中和試験の絶対値には各実験室間で大きな違いがあり、絶対値の比較はほとんど意味のないことが報告されている。しかしながら、抗体価の順位については極めて良く一致

していることがわかり、そこで標準血清の導入による標準化が提案された。H5N1 ウイルスに対する標準血清の準備が計画され、今後それを用いた国際共同研究が実施される予定である。

2) ワクチン接種者の血清抗体の交差反応性

第 1 相臨床試験でのワクチン接種者の血清を使用してワクチン株とは異なるグループのウイルス株に対する反応性を中和試験によって測定し、交差反応性について解析した。抗原性の異なるグループのウイルス株に対しては反応性が低下しており、ワクチン株としては抗原性がより一致することが望ましいと考えられる。しかしながら、このような低い抗体応答ではあるがこれらウイルス株に感染した場合の防御効果について、現時点でどの程度の抗体応答が防御レベルであるのか判明していないために不明である。海外での研究では、抗原性の異なるウイルス株で製造したワクチン接種者が、その後異なる抗原性のウイルス株で製造したワクチンを接種したところ未接種者と比較するとブースター効果が見られたことから、低い抗体応答であってもプライミング効果としては評価できる可能性は残されている。

3) HA 含量測定によるワクチン力価試験法の開発のためのモノクローナル抗体の作製

得られた H5 HA に特異的なモノクローナル抗体は NIBRG-14 株特異的に反応するものとインドネシア株にも交差反応するものの 2 種類あることがわかった。今後、これらのモノクローナル抗体を使用してワクチンの力価試験として HA 含量をウイルス株特異的に測定できるのか検討していく必要がある。

4) 新型インフルエンザ対応ワクチンの安全性管理に関する検討

黒川らは全粒子ワクチンに 3 種類のマウス白血球

減少活性を報告している (Kurokawa et. al., JJMSB, 28:37-52, 1975)。腹腔内接種 2 時間目に耐熱性の混入細菌内毒素による減少活性がみられ、5 時間目での活性はマウス体重減少や免疫熱活性と相関し、熱やホルマリン処理により失活する。接種 16 時間目の活性は熱やホルマリンに耐性であるという。そこで当時、16 時間目の活性のみを管理することとされたが、ワクチン原液が使用されるまで時間がかかり、5 時間目の活性は不活化すると考えられることから、合理的と考えられる。当時その活性の管理は定性的実測によったが、測定精度は必ずしも十分とはいえ、全粒子ワクチンの場合、活性はウイルス量に依存する可能性があり、必ずしも実測が最も優れた管理法とは限らない。これまで得られたデータより、全粒子の場合白血球減少活性がウイルス株に関係なくウイルス蛋白量に比例する可能性が示唆された。さらに新型インフルエンザ対応ワクチン製造に使用するウイルス株について確認できれば、ウイルス蛋白含量試験により少なくともマウス白血球数減少毒性について高精度の管理が可能であると考えられる。従って、一定のウイルス精製度が確保されるような製造工程が担保されていれば、ワクチンの安全性管理の手法としてはウイルス蛋白含量を測定することで管理が可能と思われる。

5) 新型インフルエンザ対応ワクチンの蛋白含量測定試験法の検討

ワクチン原液については攪拌を十分にすれば、方法による差はあまりないと考えられるため、蛋白含量測定法として試験方法による大きな影響は少ないと判断される。一方、小分け製品については方法、採取量による差異が生じる可能性があり、測定方法については十分な標準化が必要と思われる。

E. 結論

(1) ワクチン効果を評価する指標のひとつとして抗体応答を測定することは重要であり、本研究によって中和抗体価の測定方法を一定レベルに標準化できた。これによって国内で実施された臨床試験における抗体応答についての評価を同一の基準によって比較することが可能になった。

(2) 特定のワクチンで免疫された接種者の血清には、抗原性の異なるグループに属するウイルス株に対しては低い中和抗体価を示したが、その防御効果などに関する意義については不明である。

(3) H5 型 HA 特異的なモノクローナル抗体を 6 クローン確立し、これらの抗体は新型インフルエンザ対応ワクチンの力価の品質管理に有用であると思われる。

(4) インフルエンザ全粒子ワクチンのマウス白血球減少毒性はウイルス株やウイルス液のロットによらずウイルス蛋白含量に比例することが示唆され、ウイルス蛋白含量を管理することで高精度の管理が可能であると考えられる。

(5) ワクチン原液については蛋白含量測定法として試験方法による大きな影響は少ないと判断されるが、小分け製品については方法、採取量による差異が生じる可能性があり、測定方法については十分な標準化が必要と思われる。

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。)

モノクローナル抗体の作製について特許出願予定

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告書

ワクチン効果の指標となる中和抗体価の測定方法の標準化とワクチン接種者の血清抗体の交差反応性に関する研究

分担研究者 板村繁之 国立感染症研究所 主任研究官
分担研究者 福家 功 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所
分担研究者 細井和男 デンカ生研株式会社
分担研究者 来海和彦 (財) 化学及血清療法研究所
分担研究者 渡辺隆雄 北里研究所 生物製剤研究所
協力研究者 河野直子 国立感染症研究所

研究要旨

ワクチン効果を評価する指標のひとつとして中和抗体価を測定する方法について標準化を行うとともに、陽性、陰性対照血清などを共通で導入して研究室間での試験成績の一致度、再現性について検討を実施し、比較的高い一致した試験成績を得ることができた。その結果、国内で実施された臨床試験における抗体応答についての評価を同一の基準によって比較することが可能になった。また、現在流行している高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) ウイルスには、抗原的にも遺伝的にも異なるいくつかのグループが存在しており、ワクチンで免疫された接種者の血清の交差反応性について調べた。抗原性の異なるグループに属するウイルス株に対しては低い中和抗体価を示し、ワクチン株としては抗原性がより一致することが望ましいと考えられるが、その防御効果などに関する意義については不明である。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) の家禽での流行がアジアからロシア、中近東を経て欧州、さらにアフリカにまで拡大し、加えて感染した家禽からヒトへの感染も発生し続けている。新型インフルエンザの発生がますます危惧され発生に備えたワクチンの準備は緊急の課題となっている。わが国では既存のインフルエンザワクチンでは新型インフルエンザに対し

て効果が期待できないことから、国とワクチン製造所が協力してアジュバントを添加した新型インフルエンザ対応ワクチンの開発が進められているところである。

本研究では、新型インフルエンザ対応のワクチン開発を、ワクチン効果の指標となる抗体応答の測定方法の標準化を行い臨床試験を円滑に進めることを目的とした。さらに、世界的に流行している現在の高病原性鳥インフルエン

ザウイルス (A/H5N1)には遺伝的にも抗原的にも異なるいくつかのグループが存在しているが、どのウイルス株をワクチンとしたときにより多くの異なるウイルス株のグループに対応できるのかについても交差反応性を検討し、より効果的なワクチン株の選択についての知見を集めることも目的とした。

B. 研究方法

96 ウェルのマルチ培養プレートを用いた標準的な中和試験法によって実施した。血清は、RDE で前処理を実施した。中和の判定は、MDCK細胞が細胞変性効果 (CPE) を示すかどうかで判定し、50%以上のウイルス増殖抑制する血清の最大希釈倍数で中和抗体価を表した。使用するウイルス株としては、A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1)、A/Indonesia/05/2005 (Indo5/RG-2) (H5N1) A/turkey/Turkey/1/2005 (NIBRG-23) (H5N1)を発育鶏卵で増殖させて、それぞれ用いた。陽性対照血清としては、NIBRG-14株のHA蛋白で免疫したヒツジ血清を使用した。ワクチン接種者の血清は、接種者の了解を文面で得たものについて使用した。血清検体は、NIBRG-14株に対する中和抗体価によって低、中、高の3段階に分類して製造所ごとにそれぞれ約5検体ずつ測定した。

C. 研究結果

1) ワクチン効果の指標となる中和抗体価の測定方法の標準化

ワクチン効果を評価する方法のひとつとしてワクチン接種者の抗体応答を測定することが行われてきたが、現在流行している高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) ウイルスについては通常の HI 試験による方法では感度が低いこ

とや、使用する赤血球によって試験感度に差が認められることがわかっている。また、中和試験法による抗体価測定は感度が高く特異的と考えられているが、手技や使用する材料に細胞などが含まれ同一検体の測定値の研究室間でのばらつきが大きく一定の成績を得るのは容易ではない。そこで、中和試験法の手技について標準化を行うとともに、陽性、陰性対照血清などを共通で導入して研究室間での試験成績の一致度、再現性について検討を実施した。

陽性血清を使用してその中和抗体価を測定し再現性について検討したところ、安定して高い再現性が認められた。また、第1相臨床試験での同一のワクチン接種者の血清を使用して感染研とワクチン製造所との間の測定結果の一致度について検討を行ったところ、平均すると高い一致した試験成績を得ることができた。一方、感染研と製造所間の一致度について一定の傾向も認められた。すなわち、全般的に高めに測定される傾向のある製造所と低めに測定される傾向のある製造所があった。

2) ワクチン接種者の血清抗体の交差反応性

世界的に現在流行している高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1) は遺伝的にも抗原的にも異なるいくつかのグループが存在している。第1相臨床試験でのワクチン接種者の血清を使用してワクチン株とは異なるグループのウイルス株に対する反応性を中和試験によって解析し、交差反応性について解析した。今回の臨床試験で使用されたワクチンの製造株はクレード1に属するNIBRG-14株が用いられている。そこで、これとは異なるクレード2サブクレード1に属するIndo5/RG-2株とクレード2サブクレード2に属するNIBRG-23株に対する中和抗体価を測定して、その交差反応性

について調べた。図中上段にその結果を、NIBRG-14 株に対して得られた中和抗体価をそれぞれのウイルス株に対して得られた中和抗体価で割った比で示した。下段には、それぞれの血清の NIBRG-14 株とクレード 2 に属するウイルス株に対する中和抗体価の分布を示した。その結果、現在流行している異なるグループであるクレード 2 のウイルスに対しては中和抗体価が低く、その程度はウイルスの属するサブクレードによって異なることがわかった。Indo5/RG-2 株に対する交差反応性が NIBRG-23 株に対するよりも低かった。それぞれのウイルス株に対する中和抗体価の幾何平均を見ても、その抗体価は NIBRG-14>NIBRG-23>Indo5/RG-2 の順になっている (表)。

D. 考察

ワクチン効果を評価する指標のひとつとして抗体応答を測定することは重要であるが、HI 試験や中和試験は測定の変動要因が制御しにくいバイオアッセイであるために十分な標準化が行われなければ、相互のデータを比較することは不可能に近い。本研究によって中和抗体価の測定方法がある程度標準化できたことの意義は大きく、これによって国内で実施された臨床試験における抗体応答についての評価を同一の基準によって比較することが可能になった。一方で、測定結果の一致度について製造所によって一定の傾向が見られたことは改善する必要がある。予備的な検討では、全般に低めに測定される製造所での試験方法を、ウイルスと血清を添加後の培養日数を減らすことで良く一致した成績が得られている。今後さらに詳細に試験条件を検討してより再現性、一致度の高い試験方法を確立することが重要である。

本研究では、国内の製造所との共同研究によ

って試験方法の標準化を実施してきたが、新型インフルエンザワクチン開発は海外でも実施されており、それらの臨床試験の成績を評価する際には同様の標準化作業が必須ではあるが現時点では実施されておらず、その相互比較は極めて困難な状況である。WHO が中心になって標準化の動きがあるが、迅速な標準化作業が必要と思われる。2006 年 10 月に開催された WHO の「インフルエンザウイルスに対するマイクロ中和試験の標準化に関するワークショップ」でも、H5N1 ウイルスではないが、H3N2 ウイルスを用いた国際共同研究の解析結果が報告され中和試験の絶対値には各実験室間で大きな違いがあり、絶対値の比較はほとんど意味のないことが報告されている。しかしながら、抗体価の順位については極めて良く一致していることがわかり、そこで標準血清の導入による標準化が提案された。H5N1 ウイルスに対する標準血清の準備が計画され、今後それをを用いた国際共同研究が実施される予定である。

第 1 相臨床試験でのワクチン接種者の血清を使用してワクチン株とは異なるグループのウイルス株に対する反応性を中和試験によって測定し、交差反応性について解析した。抗原性の異なるグループのウイルス株に対しては反応性が低下しており、ワクチン株としては抗原性がより一致することが望ましいと考えられる。しかしながら、このような低い抗体応答ではあるがこれらウイルス株に感染した場合の防御効果について、現時点でどの程度の抗体応答が防御レベルであるのか判明していないために不明である。海外での研究では、抗原性の異なるウイルス株で製造したワクチン接種者が、その後異なる抗原性のウイルス株で製造したワクチンを接種したところ未接種者と比較するとブースター効果が見られたことから、

低い抗体応答であってもプライミング効果としては評価できるかもしれない。

E. 結論

ワクチン効果を評価する指標のひとつとして抗体応答を測定することは重要であり、本研究によって中和抗体価の測定方法を一定レベルに標準化できた。これによって国内で実施された臨床試験における抗体応答についての評価を同一の基準によって比較することが可能になった。また、特定のワクチンで免疫された接種者の血清には、抗原性の異なるグループに属するウイルス株に対しては低い中和抗体価を示したが、その防御効果などに関する意義については不明である。

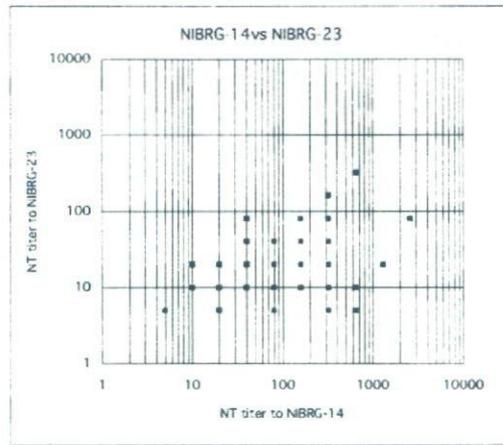
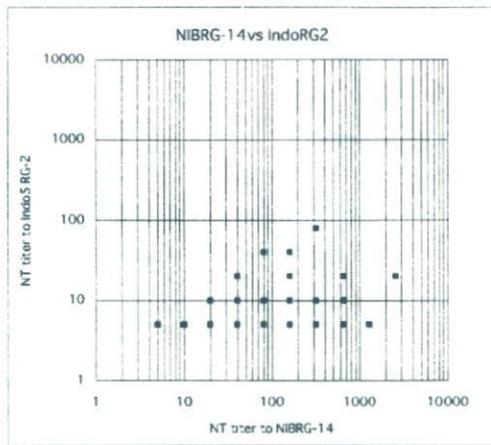
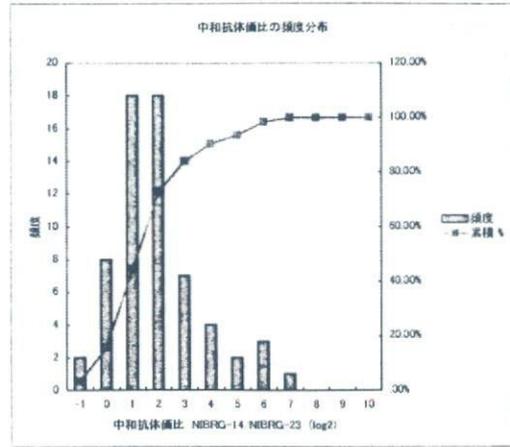
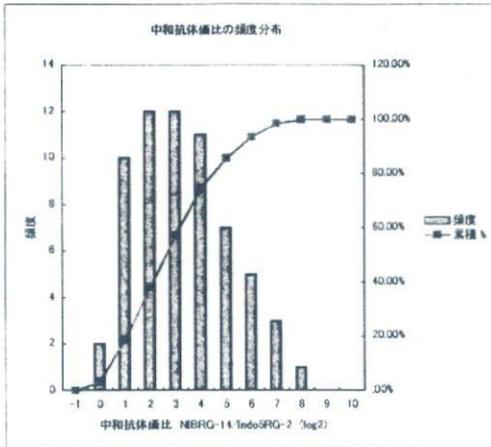
F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特記事項なし

NIBRG-14株のワクチン接種者血清中のクレード2ウイルス株Indo5 RG-2及びNIBRG-23に対する中和抗体の交差反応性



	NT titer to (pre-vaccination)			NT titer to (2nd-postvaccination)		
	Indo5 RG-2	NIBRG-23	NIBRG-14	Indo5 RG-2	NIBRG-23	NIBRG-14
GMT	5.2	5.2	6.5	7.7	19.4	75.7

新型インフルエンザ対応ワクチンの効果測定法及び品質管理に関する研究
ワクチンの力価試験法の開発

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所・免疫部・第一室長

研究要旨 新型インフルエンザワクチンの品質管理を可能とするため、UVあるいはホルマリンで不活化した新型インフルエンザワクチン・ベトナム株を抗原としてマウスに免疫し、新型インフルエンザにのみ反応するモノクローナル抗体を作製した。その結果、H5-HA に特異的なものは6クローンあり、ベトナム株にのみ反応するものとインドネシア株にも交叉反応する抗体との2種類あることが明らかとなった。

A. 研究目的

新型インフルエンザワクチンの品質管理に有用な、新型インフルエンザ特異的抗体を確立する。

B. 材料と方法

1. ウイルス抗原

H1N1型ワクチンPR8とH5N1型ワクチンN1BRG-14 (N. Vietnam/1194/2004) を発育鶏卵で増幅した後、ショ糖密度勾配遠心法で精製した。免疫抗原としてはN1BRG-14をUVで不活化したワクチン(ウイルス3部・板村先生より供与)と0.05%ホルマリン不活化したワクチンを用いた(それぞれUV-H5N1-VおよびF-H5N1-Vと略称する)。

2. 免疫

6週齢のBALB/cマウス3匹づつにUV-H5N1-VあるいはF-H5N1-20 μ gをCFAと共に皮下接種し、2週後に半量の抗原をIFAと共に皮下接種した。約10日後に前採血して血中抗体価を測定したのち、最終免疫を行い、3日後のマウスの脾臓細胞を採取した。

3. ハイブリドーマの作製

血中抗体価の最も高いマウス1匹づつの脾臓細胞をSp2/0-Ag14ミエローマ細胞と定法どおりポリエチレングリコールで細胞融合させ、HAT培地中で増殖してきた細胞の培養上清を回収した。

4. エライザ

ウイルス抗原は0.5%Triton-X100を加え、一晚エライザプレートにコートした。1%BSA/PBSで室温1時間ブロッキングした後、ハイブリドーマの培養上清を加え、HRP標識抗マウスIgG抗体

で検出した。

5. ウェスタンブロット

F-H1N1-PR8、F-H5N1-V、更にバキュロウイルスで発現させた組換えH5型HA及びNAを12.5% SDS-PAGEした後メンブランに転写した。これらのメンブランにそれぞれのハイブリドーマ培養上清を反応させ、HRP標識抗マウスIgG抗体と化学発光反応で検出した。

C. 研究結果

スクリーニングとしてエライザでF-H1N1-PR8に反応せずF-H5N1-Vに反応する16クローンを選択した。更にバキュロウイルスで発現させた組換えH5型HAを抗原としてエライザで確認し、最終的にH5-HA特異的モノクローナル抗体を6クローン(YH-1A1, YH-2F11, OM-a, OM-b, OM-c, AY-2C2)を確立した。興味深いことに、6クローンのうち5クローンはUV-H5N1-Vを免疫したマウスから得られたハイブリドーマ由来であった。

これらの培養上清をウェスタンブロットで確認したところ、AY-2C2は全く検出できなかったことから、この抗体はconformational epitopeを認識すると思われた。

これらの抗体の交差反応性をエライザで確認したところ、YH-1A1とOM-cはベトナム株に特異的であることが明らかとなった。また、通常のインフルエンザワクチンに用いられるH1N1(New Caledonia), H3N2(Hiroshima), B株(Malaysia)には全く反応しないことを確認した。

D. 考察

マウスへの免疫原としてはホルマリン不活F-H5N1-VよりもUV不活UV-H5N1-Vの方がHAに

対するモノクローナル確立には適していると思われる。我々は以前 SARS-CoV の不活化ウイルスワクチンを用いたマウスの研究において UV と UV+ホルマリンのワクチン効果を比較し、ホルマリン処理を加えることによって血中抗体が IgG1 有意となり、サイトカインも Th2 へ偏りやすいことを報告している。従って、現存のホルマリン処理が不活化の手段として妥当かどうかは改めて検証する必要があると思われる。

確立された 6 クロームは交叉反応性においても異なっており、組み合わせて高感度のエライザシステムを開発することにより、ワクチンの品質管理だけでなく、感染者の診断にも応用できるかもしれない。

E. 結論

我々は H5 型 HA 特異的なモノクローナル抗体を 6 クローム確立した。これらの抗体は、新型インフルエンザワクチンの品質管理に有用であると思われる。

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

特許出願予定

分担研究報告書

「新型インフルエンザ対応ワクチンの効果測定法及び品質管理に関する研究」

－安全性管理に関する検討－

分担研究者 堀内善信 国立感染症研究所細菌第二部第五室長

研究要旨: インフルエンザ全粒子ワクチンのマウス白血球減少毒性管理法について検討した。全粒子ワクチンの場合、本毒性はウィルス量に比例する可能性が考えられる。今回の検討で、結論的とまではいえないが本毒性はウィルス株やウィルス液のロットによらずウィルス蛋白含量に比例する可能性のあることが示唆された。

A. 研究目的

新型インフルエンザ対応全粒子ワクチンの安全性確認を目的としてマウス白血球減少毒性のより高精度の管理法の可能性を検討した。そのために、より高精度であるウィルス含量試験による本毒性の管理の可能を評価することを研究の目的とした。

B. 研究方法

今日では通常全粒子ワクチンを入手したり測定したりする機会を得ることは難しい。従ってインフルエンザワクチンマウス白血球減少毒性用参照品作成時に得られたデータを用いて、マウス白血球減少毒性をウィルス株間およびウィルス蛋白量との比較を行うこととした。そのデータより一部ウィルス株および組成の異なるロットの精製ウィルス液について本毒性を比較した。さらにウィルス蛋白含量 240 $\mu\text{g/mL}$ と 150 $\mu\text{g/mL}$ の不活化精製ウィルス液数株について本毒性を測定し、それぞれの用量回帰と併せてウィルス蛋白含量と本毒性が比例する可能性について評価した。

C. 研究結果

1) 精製不活化ウィルス液のロット間でのマウス白血球減少毒性の比較:

ウィルス液 Lot 1: 2001 年度作成
A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)
A/パナマ/2007/99
B/山梨/166/98

のウィルスを 5% ラクトース、0.01% ホルマリンを加えた 0.01MPBS に等量に浮遊した 3 株混合液を調製し、ウィルス蛋白濃度を 1.242 $\mu\text{g/mL}$ としたものをバイアルに 3 mL/vial 宛分注し、凍結乾燥した。

ウィルス液 Lot 2: 2002 年度作成
A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)
A/パナマ/2007/99(H3N2)
B/ヨハネスバーグ/5/99

のウィルスを Lot 1 同様に浮遊したものを混合比 1.85:1.00:1.65 に混合し、ウィルス蛋白濃度を 1.269 $\mu\text{g/mL}$ としたものをバイアルに 3 mL/vial 宛分注し、凍結乾燥した。

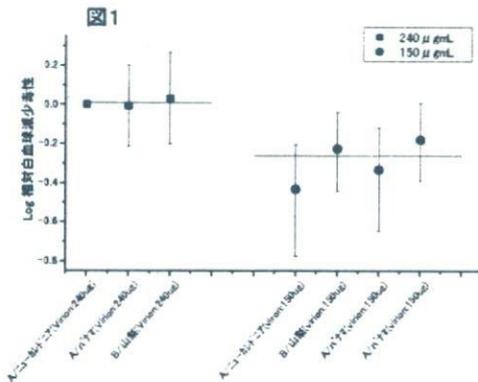
これらの凍結乾燥品を 12mL の生理食塩液に溶解したものを原液(1 倍液)を 2 倍間隔で 4 段階希釈し、各々 10 匹の 4 週齢 ddY 雌マウス腹腔内に投与し、約 16 ないし 18 時間目での末梢白血球数を感染研を含む 5 施設で各々 4 回以上測定して計 21 回の測定値を得、それぞれ Lot 1 に対する Lot 2 の相対力価を求めた。さらに共通の力価を推定していると見なすことのできた 16 回の測定値より加重平均値を求めた。その結果、Lot 2 の Lot 1 に対する相対力価およびその 95% 信頼区間は、対数で 0.086(-0.112 ~ 0.284)、真数で 1.219(0.773 ~ 1.923) と推定され、Lot 1 と Lot 2 の間に有意な差はみられなかった。すなわち B 型を山形からヨハネスバークに入れ替え、更に 3 株の混合比を変えたにも関わらず、ウイルス濃度をそろえた場合、マウス白血球減少毒性に有意な違いは検出されなかった。

2) 精製不活化ウイルス液の株間でのマウス白血球減少毒性の比較: A 社および B 社で A/ニューカレドニア、A/パナマ、B/山梨により 240 μ g/mL および 150 μ g/mL の精製不活化ウイルス液を調製し、マウス白血球減少活性を A/ニューカレドニア 240 μ g/mL 液に対して相対的に定量した。その

結果、図 1 に示す様に株間での有意な差は認められなかった。そこで濃度ごとに相対活性の加重平均を求めたところ、240 μ g/mL 液が 1.021(0.719 - 1.450)、150 μ g/mL 液が 0.542(0.419 - 0.702) であった。すなわち結果は 150 μ g/mL の 240 μ g/mL 濃度比 0.625 と有意な違いはなかった。従って今後さらに他の株について確認が必要であるが、本毒性は不活化精製ウイルス液の調製法が一定であればウイルス含量に比例する可能性が考えられた。

考察: 黒川らは全粒子ワクチンに 3 種類のマウス白血球減少活性を報告している (Kurokawa et.al., JJMSB, 28:37-52, 1975)。

腹腔内接種 2 時間目に耐熱性の混入細菌内毒素による減少活性がみられ、5 時間目での活性はマウス体重減少や兔発熱活性と相関し、熱やホルマリン処理により失活する。接種 16 時間目の活性は熱やホルマリンに耐性であるという。そこで当時、16 時間目の活性のみを管理することとされたが、ワクチン原液が使用されるまで時間がかかり、5 時間目の活性は不活化すると考えられることから、合理的と考えられる。当時その活性の管理は定性的実測によったが、測定精度は必ずしも十分とはいえず、全粒子ワクチンの場合、活性はウイルス量に依存する可能性があり、必ずしも実測が最も優れた管理法とは限らない。これまで得られたデータより、全粒子の場合白血球減少活性がウイルス株に関係なくウイルス蛋白量に比例する可能性が示唆された。さらにパンデミックワクチン株について確認できれば、ウイルス蛋白含量試験により高精度の管理が可能であると考えられる。



厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告書

新型インフルエンザワクチンのたんぱく質含量測定法の検討

分担研究者 笠井道之 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

現在日本で生産、接種されているインフルエンザワクチンは、エーテル処理をおこなったスプリットワクチン(HA ワクチン)であり、品質管理の一環として、ローリー法によるたんぱく質定量試験が国家検定項目となっている。新型インフルエンザの発生に備えたワクチンとしては、免疫原性の観点から、全粒子ワクチンの開発がおこなわれており、その品質管理にはHA ワクチンとは異なった問題点が存在する可能性がある。今回我々は、新型インフルエンザワクチン試験製造品を用いて、数種類の方法でたんぱく質定量試験を行い、その数値について検討した。原液については、攪拌を十分にすれば、方法による差は、あまりないと考えられるが、小分け製品については、添加された物質の影響か、方法、採取量による差異が生じる可能性がある。

A. 研究目的

現在日本で生産、接種されているインフルエンザワクチンは、エーテル処理をおこなったスプリットワクチン(HA ワクチン)であり、品質管理の一環として、ローリー法によるたんぱく質定量試験が国家検定項目となっている。新型インフルエンザの発生に備えたワクチンとしては、免疫原性の観点から、全粒子ワクチンの開発がおこなわれており、その品質管理には HA ワクチンとは異なった問題点が存在する可能性がある。今回我々は、新型インフルエンザワクチン試験製造品を用いて、数種類の方法でたんぱく質定量試験を行い、その数値について検討した。

B. 研究方法

ワクチンメーカー4 社がそれぞれ試験製造したウイルス原液、高容量 及び低容量の小分け製品の全 12 種類について以下の 4 つの方法で測定を行った。method 1-3 については、詳細をフローチャートで示した。

method 1: メーカー3 社が提出したプロトコールに準拠、ただし、条件に差のあった遠心条件とアルカリ溶液添加後の incubation time については、それぞれ 1,900g 20min. と 45min. とした。フォリン試薬は、2 倍希釈した。吸光度の測定前に、遠心操作(2,500g, 20 min.)を行った。

method 2: method 1 と同様、ただし、測定前の遠心操作は、行なわなかった。

method 3: HA ワクチンに対する国家検定と同様

の操作、アルカリ液添加後の加温等に特徴がある。

method 4: ケルダール分解によるたんぱく窒素の絶対量を測定し、6.25の定数を用いてアルブミン重量に換算した。今回実施したケルダール測定法は、新規に開発した方法で、マイクログラムオーダーの微量たんぱく質の測定が可能である。このため、測定に必要なサンプル量はローリー法に用いるサンプル量で十分であった。今回のインフルエンザ検体の場合、原液(300 $\mu\text{g/mL}$ ~800 $\mu\text{g/mL}$)は0.1mLを採取し、小分け低濃度検体(20 $\mu\text{g/mL}$ ~30 $\mu\text{g/mL}$)は、0.5mLを採取し、ケルダール測定を実施した。原液1検体、小分け低濃度2検体と高濃度検体はアンプルが無かったため測定をすることはできなかった。

原液の測定: ローリー法と同様に、TCA処理液(A)を遠心分離により上澄み液(B)と沈殿(C)に分離した。A、B、Cの3種類のサンプルをケルダール分解処理し、各窒素量を測定した。沈殿(C)の窒素量からアルブミン換算としてたんぱく濃度($\mu\text{g/mL}$)を計算した。

小分け低濃度検体の測定: 原液のA、B、Cの3種類のサンプルについてそれぞれたんぱく濃度を測定し、 $A=B+C$ の関係を確認する。小分け低濃度検体はCのサンプルを調製することが難しいので、AとBをケルダール分解処理し、それぞれの得られた窒素量からサンプルCのたんぱく濃度($\mu\text{g/mL}$)を計算した。

C. 研究結果と考察

得られた数値を表1にまとめた。ワクチンメーカー4社の自家試験の数値とそれぞれの標品を全4社が相互に計測した値の範囲も記載した。原液に関しては、測定値のずれが大きく、50%以上の差を示したケースもあった。感染研での

測定に関しては、method 1-4のいずれの方法を用いても、数値に差はほとんどなく、いずれの方法を用いても可であることが示唆された。以下に述べるように、小分け製品での測定値の差は、さほど顕著ではなく、メーカー間での原液の測定値のずれは、攪拌不十分の可能性もある。高容量、及び低容量の小分け製品に関しては、4社間の数値のずれは原液と比較すると小さく、特に高容量の標品では、たかだか20%程度であった。感染研での数値は、method 3で高めにでる傾向があったが、method 1,2の場合は0.5mLのサンプルを用いて測定し、method 3では、0.3mLを用いて測定しておりその影響を否定できない。なお、HAワクチンでは、同一の量を用いて計測した場合、method 2とmethod 3の間に差は認められない。また、ごく薄いために管壁に付着するケースをのぞいては、用いるサンプル量が測定値に影響することはほとんどないと考えられている。よってこの差は、新型ワクチン特有の可能性もある。小分け製品は、アルミニウムアジュバントを含む沈降製剤であるが、遠心操作の後の測定(method 1)では、遠心操作なし(method 2)と比較して数値が低めにでるものの、その差は最大でも数%程度であった。

以上まとめると、原液については、攪拌を十分にすれば、方法による差は、あまりないと考えられるが、小分け製品については、添加された物質の影響か、方法、採取量による差異が生じる可能性がある。

method 4を用いて測定しサンプルAの値からサンプルBの値を差し引くことによって得られるサンプルCのたんぱく質濃度は、ローリー法を用いて測定した値とほとんど差はなかった。原液の場合、このサンプルCの値は沈殿を直接ケルダール分解することにより得られる

窒素量から求めたたんぱく質濃度とほとんど同じ値を示した。不活化型全粒子ワクチンをキエルダール分解した場合、ウイルス由来のたんぱく質、糖脂質、核酸に由来する窒素量（サンプルAの窒素量にあたる）を測定することになる。従って、TCA沈殿またはTCA沈殿に相当するたんぱく質の値（サンプルAの値からサンプルBの値を差し引いた値）がローリー法から得られるたんぱく質の値と相関性があるといえる。

不活化型全粒子インフルエンザワクチンにおいて、SRID法によるHA抗原量はローリー法または、サンプルCのキエルダール分解法から求められるたんぱく質の値と相関性があると考えられる。一方、不活化型全粒子インフルエンザワクチンによって誘導される免疫賦活化能力は、全粒子ワクチンをキエルダール分解することにより求められる窒素量と相関性があると考えられる。