

200838053A

厚生労働科学研究費補助金

レギュラトリーサイエンス総合研究事業

新型インフルエンザワクチンの性状及び免疫原性の正確、
かつ迅速な評価方法に関する研究
(H20-医薬一般-005)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 明子

平成21年 3月

目 次

- I. 総括研究報告
新型インフルエンザの性状及び免疫原性の正確、かつ迅速な
評価方法に関する研究 ----- 1
主任研究者 田中 明子 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部)
- II. 分担研究報告
1. 動的光散乱法によるインフルエンザウイルスの粒子分布の測定実験：
ライブウイルスとホルムアルデヒドによる不活化ウイルスの比較 ----- 5
分担研究者 矢野 茂生 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部)
2. 新型インフルエンザワクチン等不活化ワクチン中の核酸の性状について ----- 13
分担研究者 田中 明子 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部)
板村 繁之 (国立感染症研究所 ウイルス第3部)
3. 新型インフルエンザワクチンの免疫原性評価法に関する研究 ----- 19
分担研究者 笠井 道之 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部)

総括研究報告書

新型インフルエンザワクチンの性状及び免疫原性の正確、かつ迅速な
評価方法に関する研究

主任研究者：田中明子（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官）

研究要旨：

現在日本で開発中の新型インフルエンザワクチンは、ウイルス塩基配列上の強毒性に關する遺伝子の一部をリパースジェネティックスにより改変して作成したワクチン株を、ホルムアルデヒドにより不活化した後、アルミニウムアジュバントを加えた製品である。現在流通しているHAワクチンと異なるこの製剤の品質管理には、その粒子性やウイルス核酸の状態、アジュバントを含む多様な成分により惹起される免疫誘導能の正確な評価などについての新しい手法が必要とされている。本研究では、3つの角度からこれらの検討を行い、以下の成果を得た。1) ホルムアルデヒド処理により不活化したウイルスと処理していない live ウイルスについて、動的光散乱測定装置による粒度分布の計測を行ったところ、超音波処理に対する抵抗性に差が生じるなど、粒子形状に変化が生じていることが明らかになった。2) ワクチン中の核酸について、不活化の過程でどのように変化するか、を調べた。製造所間で差はあるが、プロテアーゼによる処理などにより、市販のインフルエンザHAワクチンからもウイルス核酸が分離出来、PCR増幅後の同定、定量も可能であった。すなわち、目的のワクチン株が正確に複製され、維持されているかどうかを不活化後でも検証できることがわかった。ホルムアルデヒド処理によりウイルス粒子中の核酸は、徐々に変性し、PCRによる増幅が困難になった。3) 転写因子(NF- κ B)の下流にレポーター遺伝子を組み込んだ人由来細胞株を用いて不活化型全粒子ワクチンの免疫誘導能力の評価を行う系を構築した。この測定を経時的に行うことにより、ワクチン中のウイルス分子の不活化プロセスをより厳密に管理することが可能となった。

分担研究者

- ・ 矢野 茂生（国立感染症研究所
血液・安全性研究部 主任研究官）
- ・ 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
ウイルス第三部 室長）
- ・ 田中 明子（国立感染症研究所
血液・安全性研究部 主任研究官）

A. 研究目的：日本で開発中の新型インフルエンザワクチンはウイルス塩基配列の一部をリパースジェネティックスにより改変して作成したワクチン株を、ホルムアルデヒドにより不活化した後、アルミニウムアジュバントを加えた全粒子型不活化ワクチンである。しかし、現在行われている品質管理手法は、通常のインフルエンザHAワクチンに対するものとはほぼ同じであり、全粒子ワクチンであるにもかかわらず、その粒子形状を調べる試

験や、遺伝子操作を加えた核酸がどのような状態にあるのか、等を検証する試験は、含まれていない。我々は、製剤中のウイルス粒子の粒径分布に関する情報がワクチンの有効性、安定性を評価するうえで重要と考え、動的光散乱による粒度分布測定により、ウイルス粒子の性状を調べた。また、近年、ウイルスの核酸や脂質が免疫誘導能に直接関与するという報告が相ついでなされており、これらを的確に管理することが、全粒子型ワクチンでは、重要と考えられている。そこで、不活化全粒子ワクチンの免疫誘導能力を簡単に比較、検討することを目的として、転写因子 (NF- κ B) の下流にレポーター遺伝子を組み込んだヒト由来細胞株を選択し、この細胞を用いて、ワクチンの免疫誘導能を測定するシステムの構築を行った。

B. 研究材料と方法

2008年度のインフルエンザHAワクチン株である、A/Brisbane/59/2007 (IVR148) (H1N1)、A/Uruguay/1716/2007 (X175C) (H3N2)、B/Florida/4/2006 の3種類をそれぞれ鶏卵で増殖させたのち、精製し、ホルムアルデヒドで不活化したものを実験に用いた。不活化は、たんぱく質濃度で1mg/mLに調整したウイルス液に、終濃度で0.05% となるようにホルムアルデヒド (分子生物学グレード) を添加することによって行った。4°Cに保存して、原則毎日攪拌した。また、市販(全4社)のインフルエンザHAワクチンを購入して解析に用いた。それぞれの実験における詳細条件に関しては、各々の報告書に記載した。

(倫理面への配慮) 特になし。

C. 研究結果

1. 動的光散乱法によるインフルエンザウイルス粒子分布の測定：ライブウイルスとホルムアルデヒドによる不活化ウイルスの粒子径を含む粒子形状の比較を行った。

3種類のウイルスについて、超音波処理の間も変えたデータを取得し、解析した。ウイルス粒子は、電子顕微鏡での観察とほぼ同等の粒径を示した。個々の粒子径に関しては、ホルムアルデヒド処理により著明な変化は認められなかったが、処理後のウイルスは、超音波処理に対する抵抗性に関しlive ウィルスとは異なる挙動を示した。

2. インフルエンザHAワクチン及び、不活化ウイルス液からの核酸の抽出とこれら核酸のPCRによる増幅：インフルエンザHAワクチン中の核酸も、ホルムアルデヒド処理した、ウイルス液中の核酸も、少なくとも一部分は、たんぱく質分解酵素による処理の過程を含む操作によって、精製することが出来、PCRによって、HA遺伝子やM遺伝子の増幅が検出できた。製造所間における増幅効率の差が、直接、ホルムアルデヒドによる不活化の影響によるものであるかどうかを検証するために、ウイルス液にホルムアルデヒドを加えた状態で冷暗所保存し、経時的にPCRによる増幅効率に変化するかどうかを調べた。特にHA遺伝子の場合、ホルムアルデヒド添加後、時間が経つにしたがってPCRによる核酸の増幅が困難になっていくことが観察された。すなわち、ホルムアルデヒド濃度によっては、保存中に、核酸分子を含め、成分の変性がすすむと考えられた。

3. 様々なTLRリガンド感受性をもつ、マクロファージへと分化させた細胞に不活化期間の異なるインフルエンザウイルスを加えて共培養した後、NF- κ B活性を調べたところ、ウイルスのたんぱく質濃度に依存してNF- κ B

活性を示すこと、A/H3N2インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスは共に不活化期間の長さに応じてNF- κ B活性の低下を示したが、低下の度合いは、B型よりもA/H3N2の場合の方が大であること、などが明らかになった。

D. 考察

新型インフルエンザワクチン等不活化全粒子ワクチンの品質管理に役立てる目的で、ワクチン中に含まれるウイルス粒子の形状の測定、ウイルス由来の核酸の分離とPCRによる増幅、不活化ウイルス粒子による免疫誘導能の新しい測定法の開発等を行った。ホルムアルデヒドにより不活化されたウイルス粒子の性状に関する同様の試みは、我が国でも海外でもほとんど報告されておらず、解明は、すすんでいない。

今回ワクチン中の粒子径測定に用いた動的光散乱法は、対象粒子の情報が測定に必要なため、ウイルスなどの物性（比重や屈折率など）が不明な微粒子の粒径測定に適していると考えられる。また、測定操作に熟練を必要とせず、測定時間も非常に短時間であるため、測定機器の価格は、かなり高額ではあるが、全粒子ワクチンの品質管理に非常に有用な手法と考えられる。海外ワクチンメーカーでは、ウイルス様粒子を用いたワクチンの品質管理などに、すでに導入しているところも多い。

不活化された核酸の分離と解析には、かなりの困難が伴うと予想していたが、ウイルス粒子の形状が維持されず、核酸の分解がすすんでいると推測されたインフルエンザHAワクチンからでも、解析に十分な量の核酸が容易に分離できた。新型インフルエンザワクチン株作製時、変異を導入した部位が維持されているか、別の変異が起こっていないかなども、

ワクチン製造後、ウイルスが不活化された状態でも検証できると考えられる。1 kbをこえる増幅産物が生成可能であることから、分節ウイルスであるインフルエンザの場合は、一つの遺伝子のほぼ全長が読みとり可能である、と考えられ、ホルムアルデヒドの濃度が低い場合、混合感染で新たなウイルスができる可能性も否定できない。すなわち、ホルムアルデヒドによる不活化の過程は、厳密に管理される必要があると思われる。

反応系中のホルムアルデヒド濃度がかなり低濃度でなければ、NF- κ B活性が検出できないことから、NF- κ B活性発現には、細胞膜上のTLRに対する刺激のみではなく、不活化ウイルスの取り込みなどの他の刺激が必要と考えられた。また、A/H3N2インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスは共にホルムアルデヒドの処理時間の長さに応じてNF- κ B活性の低下を示したが、その程度は、型によって異なり、この点からもホルムアルデヒドによる不活化過程の厳密な管理が必要であることが示された。また、市販のインフルエンザHAワクチン中の核酸の性状が製造所間でかなり異なっていたことから、製造工程の差により、ワクチン中のウイルス成分や核酸の状態にかなりの差があると推察され、免疫誘導能の差が存在することも示唆された。

E. 結論

本研究では、日本で開発中の新型インフルエンザワクチン（不活化全粒子ワクチン）の品質管理に役立てる目的で、不活化ワクチン中のウイルス粒子の性状や、核酸の状態について検討した。インフルエンザなどウイルス粒子の粒子形状の変化が粒度分布測定装置を用いて測定可能であった。また、ワクチンによるマクロファージ細胞のNF- κ B活性発現を指標にした免疫誘導能力の評価系を構築し、こ

これらの評価系を用いて、全粒子ワクチンの不活性化プロセス、ワクチン中のウイルス粒子の性状をより精緻に解析することが可能になった。また、製造所間で差はあるが、市販のインフルエンザHAワクチンからでも核酸が分離出来、PCR増幅後の同定、定量も可能であることがわかり、不活化後もウイルス由来の核酸の性状を検証できることが明らかになったが、ホルムアルデヒド処理が長時間に及ぶと、ウイルス粒子中の核酸は、徐々に変性し、PCRによる増幅が困難になっていった。近年、核酸等は免疫誘導能に大きな影響を及ぼすことが報告されているので、不活化の過程は、前出のNF- κ B活性発現などの指標を用いて厳密に制御すべきであると考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表： なし
2. 学会発表：
国内学会
笠井 道之 第38回 日本免疫学
会総会・学術集会 2008年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

分担研究報告

動的光散乱法によるインフルエンザウイルス粒子分布の測定実験：
ホルムアルデヒドによるウイルス不活化の有無がウイルス粒度分布に及ぼす効果の比較

分担研究者 矢野 茂生

研究要旨：新型インフルエンザワクチンが従来のコンポーネント HA ワクチン (seasonal) と性状・製法が大きく異なる全粒子ワクチンである。全粒子ワクチンの性状評価の基礎研究として、動的光散乱法による粒度分布測定を適用し、3種のインフルエンザウイルスを用いて、ホルムアルデヒドによる不活化が粒子的性状に及ぼす効果を明らかにしようとして研究を実施した。最終的には、ワクチンの有効性の評価と品質管理に利用する目的を持っている。動的光散乱で重要なファクターである粒子径は拡散運動に大きく寄与しているが、粒子と分散媒体との界面の状態によっても拡散係数は変化すると考えられる。今回、不活化によりインフルエンザウイルス粒子の膜上の糖脂質や蛋白質にホルムアルデヒドが反応することにより、界面状態が変化し、その結果、拡散係数の変化をもたらすと考えられる。この変化は粒度分布、特に平均粒径変化として観測されるのではないかと考え、動的光散乱法による測定を行った。その結果、実施した不活化の条件では、不活化による3種のインフルエンザウイルスの粒度分布と平均粒子半径に変化は認められなかった。さらに不活化の有無によるウイルス粒子の性状変化を調べるために、超音波を照射して粒度分布を測定した結果、ホルムアルデヒドで不活化した A 型インフルエンザ (H1N1, H3N2) の主粒度分布は不活化が未処理の検体とほぼ同一で変化が見られなかった。B 型の場合、不活化した検体は照射による主粒度分布の変化は見られなかったが、不活化が未処理の検体は照射により粒度分布パターンが変化した。

A. 研究目的

製剤中のウイルス粒子の粒径分布に関する情報がワクチンの有効性、安定性、および品質管理等について、どの程度関係しているのか報告は少ない。また、ウイルス粒子がワクチン製造の各工程でどのような変化を生じるのか情報は全く知られていない。この試験研究は、パンデミックインフルエンザ対策として、現在国内で製造、備蓄されている新型インフルエンザワクチンが従来のコンポーネント HA ワクチン (seasonal) と性状・製法が大きく異なる全粒子ワクチンであることを検討課題と考え、動的光散乱による粒度分布測定を適用し、全粒子ワクチンである新型インフルエンザワクチンの粒子的性状を明らかにしようとして研究を始めた。最終的には、ワクチンの有効性の評価と品質管理に利用する目的を持っている。

この研究はワクチン製造時に不活化の工程で実施される不活化処理がウイルス形状にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、基礎的試験として、インフルエンザ HA ワクチンの構成ウイルスとして広く採用されている3種のインフルエンザウイルス (A 型 H1N1, A 型 H3N2, B 型) を試験ウイルスとして選択し、これらのウイルスについて、それぞれホルムアルデヒド処理により不活化したウイルス

と処理していない非不活化ウイルス (live) を作成し、不

活化処理の有無が粒度分布にどのように作用するかを明らかにするため、動的光散乱法による粒度分布の測定を試みた。

B. 研究方法

ブラウン運動として知られる液体や微粒子の拡散現象を

$$R = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

R = hydrodynamic radius

D = translational diffusion coefficient

k = Boltzmann's constant

T = absolute temperature

η = viscosity

動的光散乱装置で散乱光を観測し、拡散係数を評価して粒子の大きさを求めることができる。この原理では微粒子を流体力学的回転半径 (R) の球とみなし、拡散係数 (D) でブラウン運動しているとみなされる。この場合、球状微粒子の材質は考慮されず、必要なパラメータは分散媒体の粘度 (η) と屈折率 (n) のみだけである。 η^{-1} は R に比例する。測定に用いたリン酸緩衝液は 1.0190 で純水

とほぼ同じであった。nは correlogram 決定に関与する。PBS の値として 1.3330 を用いた。微粒子の大きさや粒径分布を知る方法は沈降法や TEM 法など現在はいくつかの方法が用いられているが、測定対象に適した測定法を選択する必要がある。動的光散乱法は、測定に必要な情報が対象粒子ではなく、分散媒質の物理特性にのみ依存するため、ウイルスなどの物性(比重や屈折率など)が不明な微粒子の粒径測定に非常に適していると考えられる、また測定操作に熟練度を必要とせず、測定時間も非常に短時間であった。

動的光散乱測定は散乱光の時間差による強度変化の相関(correlogram)を測定し、これを用いて、粒子径(R)が計算される。散乱強度(I)、レーザー光波長(λ)と粒子径(R)は、Rが λ より十分に小さい場合、散乱は等方性となり、レイリー近似は次の関係になる。

$$I \propto R^6$$

$$I \propto 1/\lambda^4$$

本測定装置の動的光散乱の測定データは横軸に粒子半径(R)、縦軸を相対比として、散乱強度(I)、容量($1/R^3$)、数量($1/R^6$)の3種の表示ができる。散乱強度が最も直接的な測定量であるため、一般には、この表示が用いられるが、粒径の異なるインフルエンザウイルス数の測定が目的であることから、数量表示が適切と考え、得られたデータには数量表示も用いた。

使用した測定機器

- ・動的光散乱測定装置:Viscotek 製 Model 802DLS
レーザー光源:50mW、 $\lambda=830\text{nm}$
測定範囲:1nm~2000nm
(定性表示は>2000nm)
試料量:40 μL
測定温度:20 $^{\circ}\text{C}$
データサンプリング時間:10秒
解析ソフト:OmniSIZE Ver.3

- ・粘度測定装置:AND 製 SV-10 振動式粘度計
- ・屈折計:ATAGO 製 PAL-RI
- ・超音波洗浄機 YAMATO Branson 2200(60W、45kHz)

試料

- ・標準ポリスチレン粒子(トレーサブル):JSR 製 STADDEX(濃度 1%、10mL;粒径:29nm、61nm、100nm)。測定にはこれらの液を 100 倍希釈して検体液とした。
- ・インフルエンザウイルス液(A型 H1N1、A型 H3N2、B型)の培養液および不活化ウイルス液は主任研究者

の 田中明子から譲り受けた。

測定

P2 室クリーンベンチ内に動的光散乱装置を設置し、そのエリア内にてサンプリングと測定を実施した。検体液 40 μL を測定用石英セルに採取し、密栓して装置にセットした。一定時間後、20 $^{\circ}\text{C}$ で測定を実施した。超音波処理の検体測定は次の手順で実施した。3 段階の超音波照射を実施した(のべ照射時間:1 分間、6 分間、11 分間)。約 500 μL の検体をポリプロピレン遠心管に採り、洗浄機の水浴(20 $^{\circ}\text{C}$)に浸け、1 分間超音波照射後、取り出し、その一部(40 μL)採取し測定に用いた。さらに残液を超音波処理(5 分間)し、その一部(40 μL)を測定した。最後に、残液を再度、超音波処理(5 分間)し測定した。データ採取は連続 10 回繰り返して 1 検体の測定を完了した。PBS の屈折率と粘度をそれぞれ、1.3330 と 1.0190 として解析した。異常な相関データは除外し、残りのデータをすべて加算してデータ処理した。

C. 研究結果

動的光散乱測定から得られる流体力学的回転半径(R)の値は、一般に R(散乱強度) > R(容量) > R(数量) となる。標準品ポリスチレン粒子(60nm)とインフルエンザウイルス(A型 H1N1)の粒度分布測定データを散乱強度、容量、数量の 3 種の表示で示した結果を図 1 に示した。横軸は半径(R)の大きさをナノメートル単位で表示している。ヒストグラムの数平均に相当する平均半径がその上端に表示されている。散乱強度表示ではポリスチレン粒子もウイルス粒子も左右対称的な分布を示したが、容量表示や数量表示ではウイルス粒子は平均半径から大きな幅広い減衰曲線を描きながら増加傾向を示した。数量表示の場合、ウイルスの平均粒径は 110nm(平均半径 $\times 2$)と計算され、これは予想された大きさ(80~120nm)の範囲にあり、他に強い分布ピークが観測されなかったことから、この測定値を与える分布がウイルス粒子の粒度分布であると判断した。散乱強度表示では予想値よりも過大に見積もられた粒径が与えられた。粒径分布が非常に狭ければ表示の種類による大きな平均粒径差は与えないが、広範囲に分布している場合や分布パターンなどの分布表示の違いによる平均粒径値の変動が無視できなくなることを示している。3 種類のウイルス液にホルムアルデヒドを加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で 40 日間処理した不活化ウイルスと未処理のウイルスについて、粒度分布を測定し、数量表示した結果を図 2 に示した。平均半径(nm)はそれぞれ、A型 H1N1: 55.1(不活化あり)、54.6(不活化なし); A型 H3N2: 54.9(不活化あり)、58.5(不活化なし); B型: 55.7(不活化あり)、54.2(不活化なし)であった。不活化処理した 3 種類のウイルスのウイルス液は 200nm~2000nm の領域で微量ながら凝集塊の存在が検出されたが、主分布の粒子数と比較してほとんど無視できる量であった(0.1%以下)。一

方、不活化を実施しなかったウイルス液には検出されず、検出限界以下であった。平均半径値や粒度分布の形がほとんど同一の結果が得られたことから、試験に使用したホルムアルデヒド濃度(0.1%)を用いた不活化はウイルス粒子分布に影響を及ぼさなかったと考えられた。数量表示の粒度分布測定で、不活化の有無による粒度変化が検出されなかったことから、ホルムアルデヒドがウイルス粒子に力学的強度の変化を与えているのか調べるために、A型H1N1、A型H3N2、B型の各ウイルスの不活化処理と未処理のウイルスについて、超音波を一定条件で照射し、その粒度分布変化を測定した。微弱な変化を強調するため、数量表示に代えて散乱強度表示した測定結果を図3-1(H1N1)、図3-2(H3N2)、図3-3(B)に示した。超音波照射は1分間、6分間、11分間それぞれ実施した。H1N1(不活化なし)では照射前では凝集塊が観測されが、一分間の照射により消失した。新たな粒度分布の生成はなく、主分布の変化はほとんど観察されなかった。H1N1(不活化あり)も照射前では凝集塊が観測された。照射により主分布の左右の領域に新たな分布発生があった。特に、20nm付近の小分布は照射量が増加するに従い、粒度低下が観測された。主分布の変化はほとんど観察されなかった。H3N2は主分布以外にかなり大きい分布が観察された。照射によりこれらの分布は変化した。主分布パターンに変化は見られなかった。B(不活化あり)は照射の前に主分布の左右に小分布が観測され、照射後も分布パターンであった。主分布の変化はみられなかった。B(不活化なし)は照射前に主分布よりおおきな凝集塊が観測されたが、照射後に消失した。主分布は照射1分間で粒度分布が変化し、主分布より粒度が小さい分布が生成したと考えられる分布パターンが観測された。

D. 考察

動的光散乱法による粒度分布測定を用いて、インフルエンザウイルス粒子の測定を実施し、粒度分布を得ることができた。この分布から得られた平均半径はA、B型ウイルスをホルムアルデヒドで不活化した場合と比較しても変化が見られなかった。超音波処理を行った場合には、A型は主分布に変化は見られなかったが、B型は不活化の前後で分布パターンの変化が観測された。この不活化の有無が、粒度分布の変化で数量化できれば非常に有用な測定手段になる。今回は室温での短時間の効果しか観測できなかったことから、さらに超音波処理の条件(温度、時間、照射強度等)を検討する予定である。

E. 結論

動的光散乱法による測定を実施し、3種のインフルエンザウイルスの粒度分布に関するデータを得、その結果、ウイルス粒子径は文献に記載されている範囲にあることが示された。ホルムアルデヒドによる不活化による3種の

インフルエンザウイルスの粒度分布と平均粒子半径に変化は認められなかった。さらに不活化の有無によるウイルス粒子の性状変化を調べるために、超音波を照射して粒度分布を測定した結果、A型インフルエンザ(H1N1、H3N2)の主粒度分布は変化が見られなかった。B型の場合、不活化した検体は照射による主粒度分布の変化は見られなかったが、不活化が未処理の検体は照射により粒度分布パターンが変化した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表(著書を含む)

なし

2. 学会発表

なし

H. 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

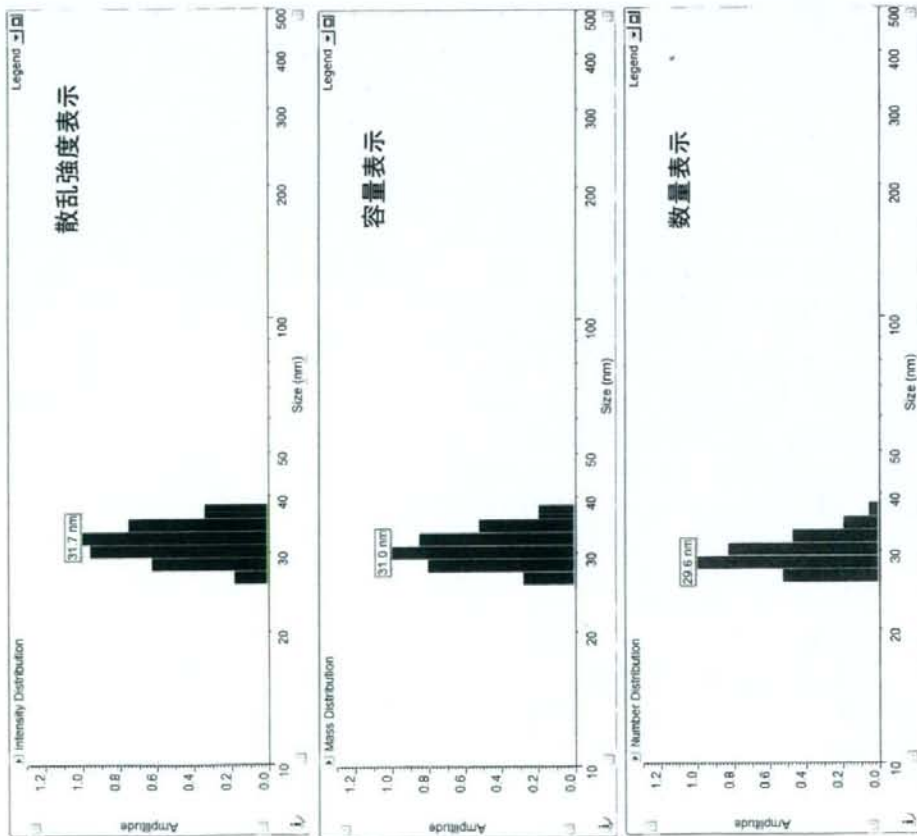
なし

3. その他

なし

図1. 標準ポリスチレン粒子とインフルエンザ粒子の散乱強度、容量、数量の表示による粒度分布

60nm 標準ポリスチレン粒子



インフルエンザ A 型 H1N1 ウイルス

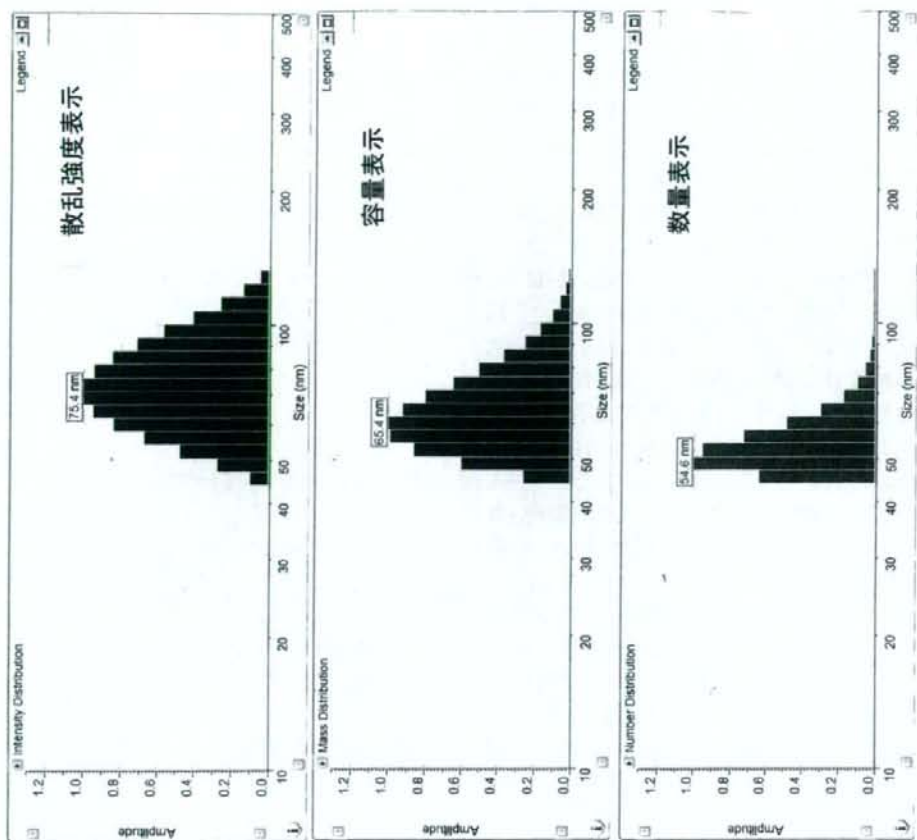


図2. ホルムアルデヒドにより不活化したインフルエンザウイルスと未処理のウイルスの粒度分布(数量表示)の比較

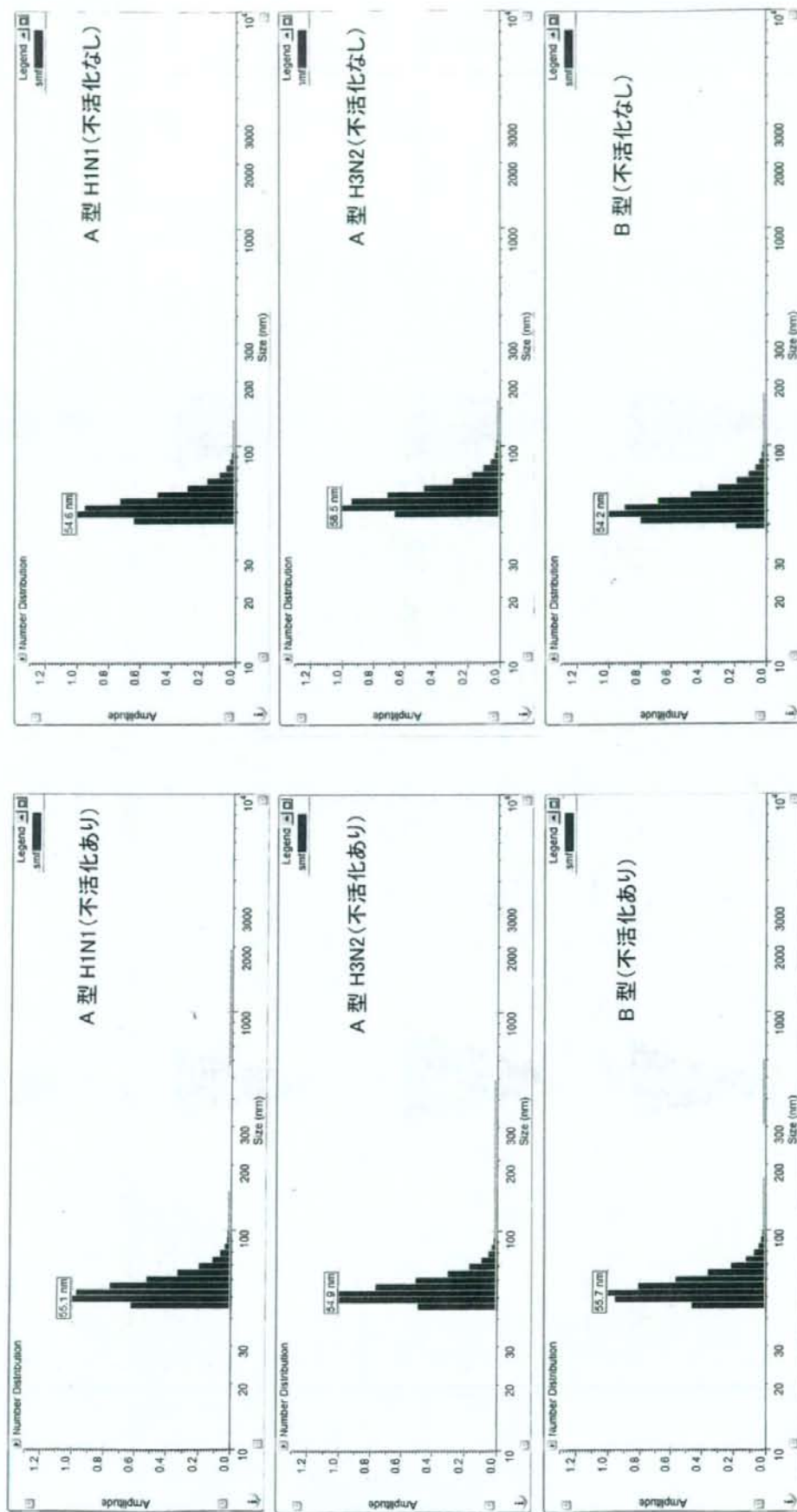


図3-1. 不活化の有無によるA型H1N1ウイルスの粒度分布(散乱強度表示)への超音波照射の効果

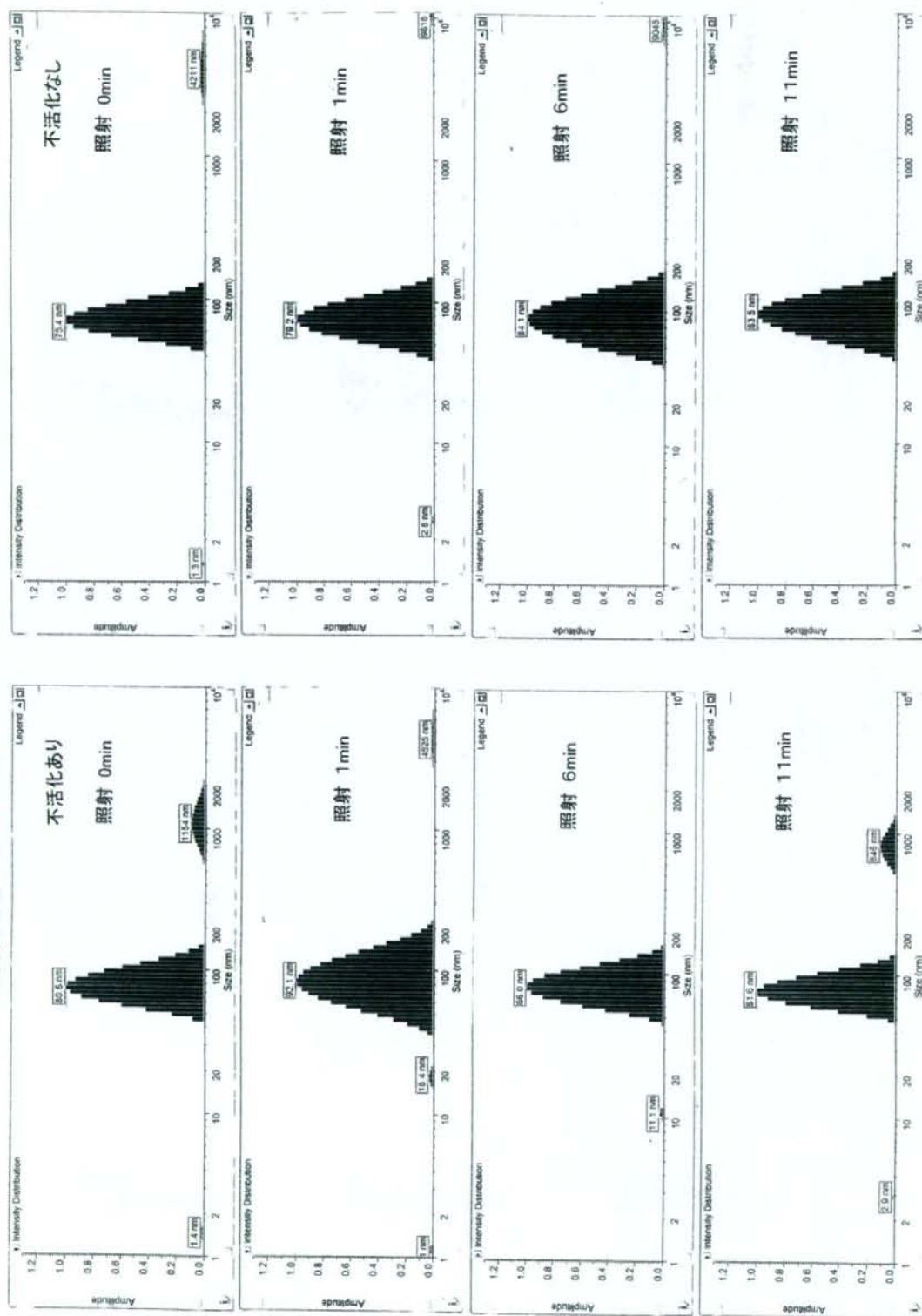


図3-2. 不活化の有無によるA型H3N2ウイルスの粒度分布(散乱強度表示)への超音波照射の効果

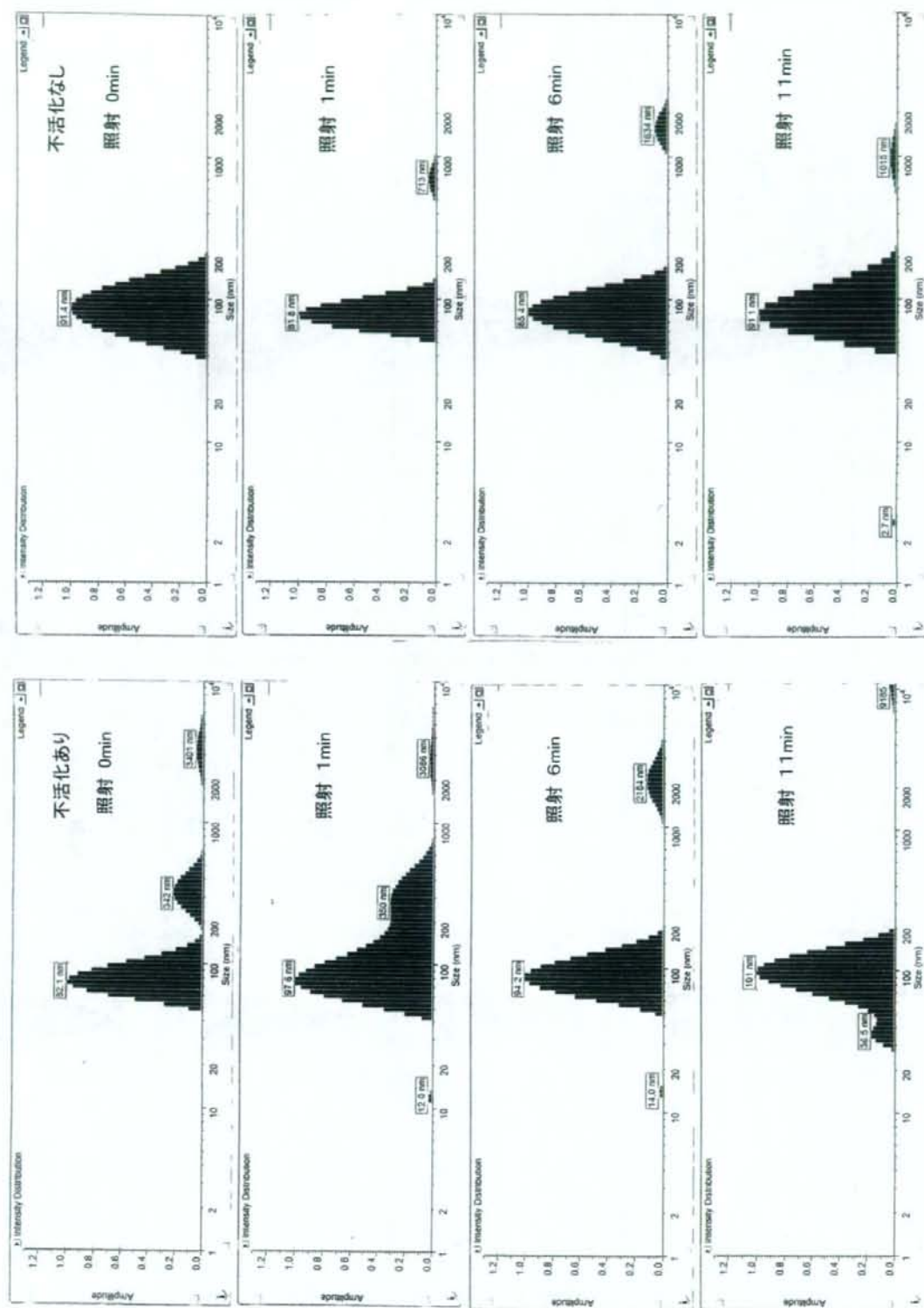
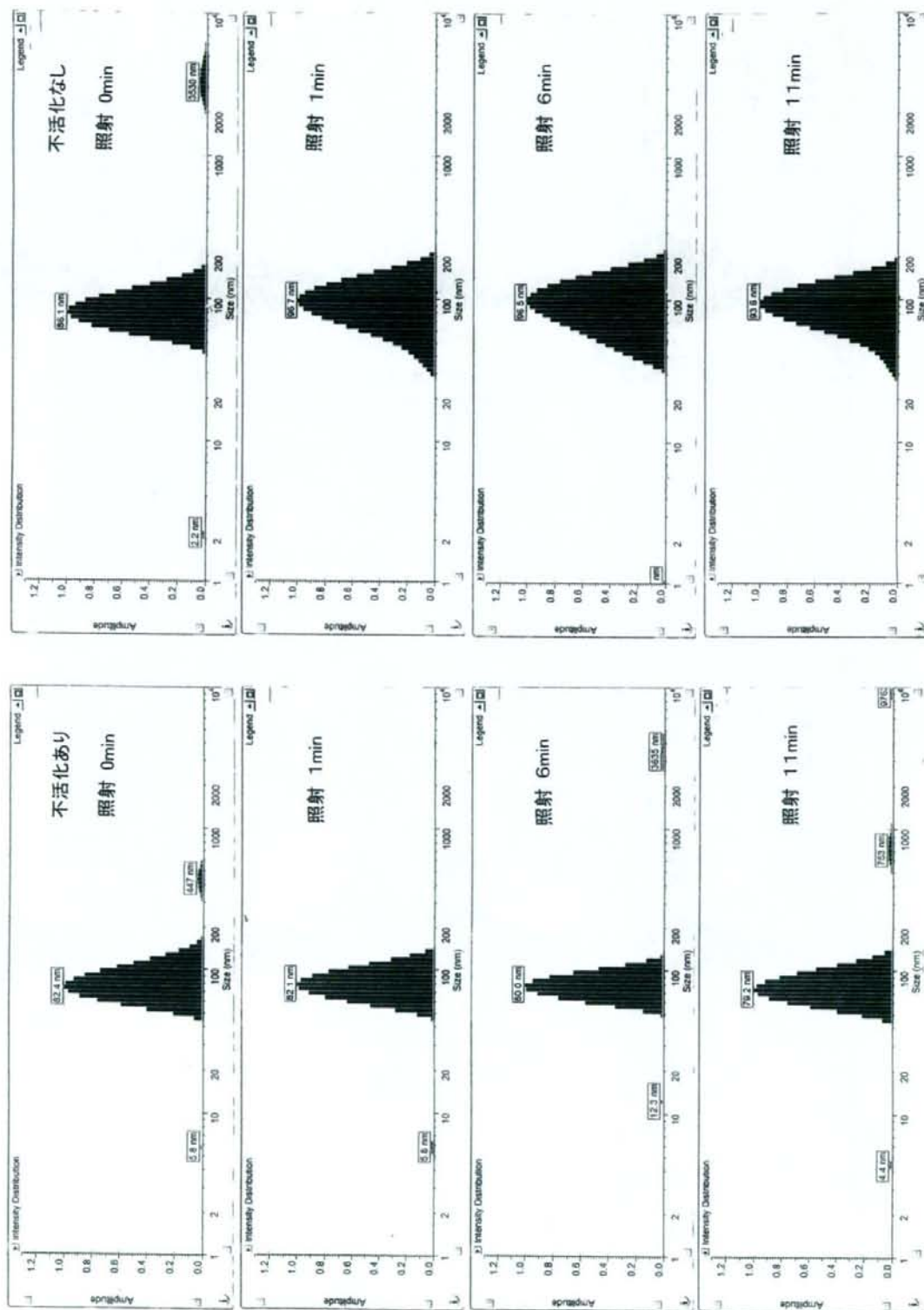


図3-3. 不活化の有無によるB型ウイルスの粒度分布(散乱強度表示)への超音波照射の効果



分担研究報告書

新型インフルエンザワクチンの性状及び免疫原性の正確、かつ迅速な
評価方法に関する研究

—新型インフルエンザワクチン等不活化ワクチン中の核酸の性状について—

分担研究者： 田中明子 （国立感染症研究所 血液・安全性研究部）

分担研究者： 板村繁之 （国立感染症研究所 ウイルス第3部）

研究要旨： 現在日本で開発中の新型インフルエンザワクチンはウイルス塩基配列上の強毒性に關与する遺伝子の一部を、リバーシジェネティックスにより改変して作成したワクチン株を、ホルムアルデヒドにより不活化した後、アルミニウムアジュバントを加えた製品である。改変した部分を含むウイルスの塩基配列が正確に維持されたウイルス株が増殖し、不活化されているのか、また、近年、免疫誘導能に直接關与すると考えられるようになったウイルス由来の核酸がワクチン中にどのような形で含まれているのか、を検証することが品質管理上重要であると考えられる。本研究では、ワクチン中の核酸が、不活化の過程でどのように変化するのか、不活化ワクチンからの核酸の分離と同定は可能か、等を調べるための基礎的検討を行った。製造所間で差はあるが、市販のインフルエンザHAワクチンからも核酸を分離することが出来、PCRで増幅した後の同定、定量も可能であった。すなわち、目的のワクチン株が正確に複製されているかどうかを不活化後でも検証できることがわかった。また、プロテアーゼ処理は、核酸の分離に促進的に働くこと、ホルムアルデヒド処理によりウイルス粒子中の核酸は、徐々に変性し、PCRによる増幅が困難になっていくこと、等が明らかになった。核酸の存在とその性状が免疫誘導能に大きな影響を及ぼすことから、不活化の過程は、厳密に制御し、検証すべきであると考えられた。

A. 研究目的 日本で開発中の新型インフルエンザワクチンは、ウイルス塩基配列の一部をリバーシジェネティックスにより改変して作成したワクチン株を、ホルムアルデヒドにより不活化した後、アルミニウムアジュバントを加えた製品である。しかし、現在行われている品質管理は、通常のインフルエンザHAワクチンに対するものとほぼ同じであり、物理化学試験の国家検定項目は、たんぱく質含量試験とアルミニウム含量試験のみである。全粒子型ワクチンであるにもかかわらず、その

粒子形状を調べる試験や、遺伝子操作を加えた核酸がどのような状態にあるのか、等を検証する試験は、含まれていない。また、近年、免疫誘導能にウイルスや細菌の核酸が直接關与するという報告が相ついでなされており、これらを的確に管理することが、全粒子型ワクチンでは、重要と考えられる。これらを検証し、的確に管理することは、人体に対する有害性に関連するのはもちろんのこと、全粒子型不活化ワクチンでは、その有効性を保証する重要な過程であると考えられる。本研究

では、特にワクチン中の核酸について、不活化の過程でどのように変化するのか、不活化ワクチンからの核酸の分離と同定、定量は、可能なのか、等を調べるための基礎的検討を行った。

B. 研究材料と方法

2008年度のインフルエンザHAワクチン株である、A/Brisbane/59/2007 (IVR148) (H1N1)、A/Uruguay/1716/2007 (X175C) (H3N2)、B/Florida/4/2006 の3種類をそれぞれ鶏卵で増殖させたのち、精製し、ホルムアルデヒドで不活化したものを実験に供した。不活化は、たんぱく質濃度で1mg/mLに調整したウイルス液に、終濃度で0.05% となるようにホルムアルデヒド (分子生物学グレード) を添加することによって行った。4°Cに保存して、原則毎日攪拌した。また、市販(全4社)のインフルエンザHAワクチン(ウイルス粒子を精製した後、エーテル処理して、たんぱく質を分離(split)したもの)を購入して、解析に用いた。

ホルムアルデヒドで不活化したウイルス液、及び、HAワクチンからのウイルス核酸の抽出には、Recover All total RNA kit (Ambion社) と Nucleospin (Macherey-Nagel社) を用いた。前者は、操作にたんぱく質分解酵素による処理の過程を含む。抽出した核酸は、定量したのち、逆転写酵素 (Superscript ; Invitrogen社) を用いて逆転写し、cDNAにした。さらに、EX Taq (Takara社) を用いてPCRを行った後、アガロースゲル電気泳動により、ワクチン中の核酸の同定、定量を行った。PCRの条件等については、おおむね添付の説明書に従ったが、EX Taqを用いた場合、annealing は、57°C、1分間、extension は、72°Cで3分間行った。

(倫理面への配慮) 特になし。

C. 研究結果

1. ホルムアルデヒドによるウイルス粒子の不活化：研究材料と方法の項に記載した方法にしたがって、ほぼ10日おきに、ウイルス液3種類それぞれに、ホルムアルデヒドを1回だけ、添加した。4°Cに保存して、不活化期間 (保存期間) の異なるウイルス液を用いてホルムアルデヒドを含む状態で実験に供した。通常この濃度の処理により、2週間程度で鶏卵での増殖が検出されなくなる、とされている。これらの不活化ウイルス液は、動的光散乱装置を用いて粒径を測定するなど、その粒子形状を調べる (矢野の報告書 (p5) を参照) とともに、免疫系の転写因子の活性化の程度を比較した (笠井の報告書 (p 19) を参照)。
2. インフルエンザHAワクチン及び、不活化ウイルス液からの核酸の抽出：予備的検討時に、インフルエンザHAワクチン中の核酸はそのまま遠心分離した (15,000g, 20mins) 場合、沈殿として回収されず、たんぱく質と結合していない状態で存在する割合が高いと推定されたので、酢酸ナトリウム及び、グリコーゲン存在下でエタノール沈殿を行い、沈殿物として回収した後、水に溶解した。回収された核酸の量は、製造所によって差があった (未発表データ)。未処理のウイルス液中の核酸は、やはり、15,000g, 20minsの遠心分離で回収されなかったが、ホルムアルデヒド処理7日後には、一部、遠心分離によって回収可能になり、20-30日後には、その量は、3倍ほどになった。ホルムアルデヒド処理により、ウイルスが沈殿しやすくなっていると考えられた。沈殿として回収された分画中の核酸は、Recover All total RNA kit を用いて精製した。たんぱく質分解酵素による処理

の時間を、1時間と3時間で比較したところ、HAワクチンの場合、3時間の処理により回収率が上昇する製品もあったが、回収率が1時間の場合と変わらない製品もあり、製造所によって差があった。無処理のウイルス液からの核酸の分離には、Nucleospin kitを用いた。

3. ウイルス遺伝子のPCRによる検出: 抽出した核酸画分を用いてPCRを行い、ウイルス遺伝子の増幅を試みた。Fig. 1 に示したようにインフルエンザウイルスは、8本の遺伝子を有する分節ウイルスであり、新型インフルエンザワクチン株は、通常、強毒性と関連するHA(ヘマグルチニン)遺伝子上の部位(図中にxで示した)に変異を導入している。用いたプライマーの配列等をTable 1 にまとめた。今回は、HA遺伝子とM 遺伝子について解析した。

Fig. 2 のAからわかるように、製造所Cの HA ワクチンから分離した核酸は、Ambion 社のキットを使用して、プロテアーゼで三時間処理した場合、HA遺伝子の増幅が、25 cycles くらいから観察され、30 cycles では、明瞭なシグナルとして検出できた。プロテアーゼの処理時間が1時間の場合は、少し増幅効率が低く、また、MN社のキットを用いて抽出した核酸を用いた場合は、35cycles でようやく弱い増幅が検出された。ところが、製造所Dの HA ワクチンからは、いずれの方法を用いても、得られた核酸からのHA遺伝子の増幅は、観察されなかった。結果の一部をTable 2にまとめた。HA遺伝子に関しては、製造所Bのワクチンは、製造所Dの製品と同じく、増幅は認められなかったが、製造所Aのワクチンから分離した核酸からの増幅は、製造所Cとほぼ同程度であった。M遺伝子に関しては、同様の傾向を示したが、増幅産物の鎖長が短いためか、HA遺伝子ほどの顕著な差はみとめられなかった (Fig. 2B)。M遺伝子の場合、増幅効率が一番低い製造所Bのワクチンから分離した核酸は、プ

ロテアーゼ処理により顕著な効率の上昇を示したが、他社の製品から分離した核酸は、プロテアーゼ処理による顕著な効率の上昇を示さなかった。

4. 核酸の増幅効率に及ぼすホルムアルデヒドの影響: 製造所間における増幅効率の差が、直接、ホルムアルデヒドによる不活化の影響によるものであるかどうかを検証するために、ウイルス液にホルムアルデヒドを加えた状態で4°Cで保存し、経時的にPCRによる増幅効率に変化するかどうかを調べた。Fig. 2CにH1N1のHA遺伝子の増幅効率を、Fig. 2 DにM遺伝子とtype BウイルスのHA遺伝子の経時的増幅効率を解析した電気泳動の図を示した。特にHA遺伝子の場合、ホルムアルデヒド添加後、時間が経つにしたがってPCRによる核酸の増幅が困難になっていくことが観察された。ホルムアルデヒド添加後、30日を超えたあたりで明白な効率の低下が観察され、添加後84日では、増幅可能な分子数は、当初の1/10,000以下になっている計算になった、すなわち、このホルムアルデヒド濃度では、保存中に、核酸分子を含む成分の変性がすすむと考えられた。

D. 考察

新型インフルエンザワクチン等不活化ワクチンの品質管理に役立てる目的で、ワクチン中に含まれるウイルス由来の核酸の分離とPCRによる増幅を試みた。同様の試みの報告は我が国でも海外でもほとんどなく、ホルムアルデヒドにより不活化された核酸の分離と解析には、かなりの困難が伴うと予想していたが、ウイルス粒子の形状が保たれず、核酸の分解がすすんでいると思われたインフルエンザHAワクチンからも、分析に十分な量の核酸が容易に分離できた。今回は、詳しく記載していないが、新型インフルエンザワクチン株作製時、変異を導入した部位が維持されているか、別

の変異が起こっていないかなども、ワクチン製造後、不活化された状態でも検証できると考えられる。1 kbをこえる増幅産物が生成可能であることから、分節ウイルスであるインフルエンザの場合は、一つの遺伝子のほぼ全長が読みとり可能、と考えられることになり、ホルムアルデヒドの濃度が低い場合、混合感染で新たなウイルスができる可能性も否定できない。ホルムアルデヒドでの不活化の過程は、厳密に管理される必要がある。また、市販のインフルエンザHAワクチン中の核酸の性状が製造所間でかなり異なっていることから、製造工程の差により、ワクチン中のウイルス粒子、核酸の状態にかなりの差が存在することが推察され、免疫誘導能の差が存在することも考えられる。

E. 結論

本研究では、不活化全粒子ワクチンである、日本で開発中の新型インフルエンザワクチンの品質管理に役立つ目的で、不活化ワクチン中の核酸について検討した。製造所間に差はあるが、市販のインフルエンザHAワクチンからも核酸が分離出来、PCR増幅後の同定、定量も可能であった。リバーシジェネティクスにより改変されている、新型インフルエンザワクチン株が正確に複製されているかを不活化後でも検証できることがわかった。また、プロテアーゼ処理は、核酸の分離に促進的に働くことも明らかになった。ホルムアルデヒド処理によりウイルス粒子中の核酸は、徐々に変性し、PCRによる増幅が困難になっていった。近年、核酸は免疫誘導能に大きな影響を及ぼすことが報告されているので、不活化の過程は、厳密に制御すべきであると考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表： なし
2. 学会発表： なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

Fig. 1

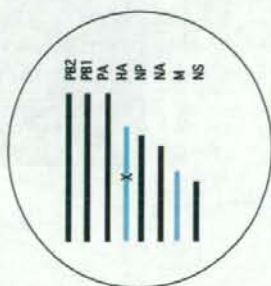


Table 1

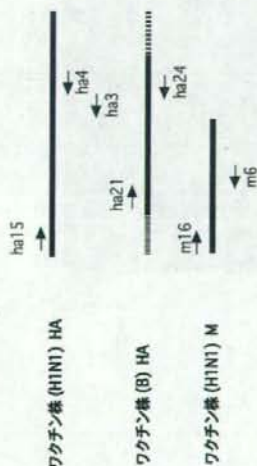
PCRに使用した塩基配列

virus (serotype)	gene	Ac.No.	name	sequence (5' - 3')	position (5' end)
A/Brisbane/ 59/2007 (H1N1)	HA	CY030232	ha3	TTCTGCATTATATGTCCAAAATGTC	No.1352
			ha4	AGTCCTTTTCATTTTTCCAGTAGAAC	No.1382
			ha15	CACAATATGTATAGGCTACCATGCC	No.86
B/Florida/4/ 2006	M	CY031391	m6	TAGCCTTAGCTGTAGTGCTG	No.590
			m16	GCAGGTAGATATTGAAAAGATGAG	No.8
	HA	EU100604	ha21	GGTCAATGTGACTGGGTGTGATAC	No.69
			ha24	CATGTTCTCTCCTGTGTAGTAAGGC	No.940

Table 2

プロテアーゼ処理後の核膜のPCRによる検出

sample	製造所	最終ホルム濃度 (%)	PCR	
			HA gene (A)	HA gene (B)
インフルエンザ HAワクチン	A	0.00042	++	+++
	B	0.00033	-	++
	C	0.00042	++	+++
	D	0.00052	-	+++
不活化ウイルス液	不活化期間	ホルム濃度 (%)		
	0 day	0.05	+++	++
	16 days	0.05	+++	++
	34 days	0.05	++	+
	57 days	0.05	+	+
	84 days	0.05	+	++



インフルエンザウイルスの遺伝子構造とプライマーの位置

Fig. 2

