

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 明子

平成22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粒度分布を適用したインフルエンザワクチンの品質管理の
新しい試み ----- 4
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定量と
品質管理手法としての応用 ----- 16
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 インフルエンザウイルス
研究センター)
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
----- 23
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)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
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：わが国で開発、備蓄している新型インフルエンザワクチン(H5N1)はウイルス塩基配列のうち、強毒性に関与する遺伝子の一部をリバースジェネティクスにより改変したワクチン株を、ホルムアルデヒドにより不活化し、アルミニウムアジュバントを加えた製品である。増殖させたウイルスの塩基配列が、改変した部分を含め正確に保持されているのか、を常に検討する必要があるなど、現在用いられている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、新しい手法が必要であると考えられる。本研究では、3つの角度から品質管理手法の検討を行い、以下の成果を得た。1) 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、インフルエンザワクチン株を不活化した検体（全粒子型ワクチン）のみならず、市販HAワクチン（エーテル処理によりウイルス粒子の形状は失っている）の形状についても比較的容易に粒子径等の情報を得ることができた。2) 不活化ウイルス粒子及びHAワクチンからの核酸の分離、及び定量と塩基配列の解析などを行ったところ、市販のHAワクチン中の核酸の量や性状には、製造所間で著しい差があり、ウイルス遺伝子が容易に分離、定量できた製品と、困難であった製品とがあった。さらに、ウイルス核酸が保持されている場合のほうが、インフルエンザ感染関連遺伝子の発現を促進する傾向があることがわかった。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ワクチンの免疫誘導能力を評価できる系を構築した。炎症性サイトカイン等を含めた測定を経時的に行うことにより、ワクチン中ウイルスの不活化の程度や免疫誘導能を数値であらわすことができ、それらを用いた品質管理が可能となった。これら3つの方法を、現在市販されているHAワクチンに適用して得られた結果は、密接に関連していた。すなわち、粒子形状が保たれている製品は、核酸の分離も容易で塩基配列もホルムアルデヒドによる固定の影響を受けず、ウイルス本来のものに近く、また、インフルエンザ感染関連遺伝子の発現が惹起されやすい傾向があった。

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
インフルエンザウイルス研究センター
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(H5N1)はウイルス塩基配列の一部をリバースジェネティ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。近年、粒子

形状やウイルス由来の核酸が、免疫誘導能と密接に関連しているとの報告が数多くなされており、我々は、製剤中のウイルス由来成分の粒径分布やウイルス核酸の状態に関する情報を得ることが、ワクチンの有効性や安定度を規定するうえで重要と考え、これらの性状を評価する方法の開発を行った。主に検討した方法は、以下の3つである。1) 動的光散乱測定装置による粒度分布の測定を、インフルエンザワクチン株を不活化した検体(全粒子型ワクチン)のみならず、市販HAワクチン(エーテル処理によりウイルス粒子の形状は失っている)の形状についても行った(矢野の項参照)。2) 不活化ウイルス粒子及びHAワクチンからの核酸の分離、及び定量と塩基配列の解析などの方法の検討を行った(田中の項参照)。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ワクチンの免疫誘導能力を評価できる系を構築し、炎症性サイトカイン等を含めた測定を経時的に行なって、品質管理手法として有用であるかどうかを検証した(笠井の項参照)。

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。不活化の条件については、田中の報告書(p16-22)を参照。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、かつホルムアルデヒドで不活化したもの)を購入して解析に用いた。それぞれの実験における条件の詳細に関しては、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、ワクチン中のインフルエンザウイルス由来粒子の分布測定：動的光散乱法による粒度分布測定を行い、条件検討を行った後、実際にインフルエンザワクチン株を不活化した検体(全粒子型ワクチン)や市販HAワクチンの測定を行った。HAワクチンは、製造工程中で脂質除去のためのエーテル処理が行われており、外膜の破壊により、ウイルス粒子がたんぱく質、核酸等の凝集物(ロゼッタ、半径10-30nm程度)になっていると考えられている。4製造所のHAワクチンの粒子径を測定したところ、製造所ごとに特徴のあるパターンを示し、例えば、A社の製品は、ごく小さい粒子径の分子がほとんどであったが、D社の製品には、その大きさ

の粒子はほとんど含まれず、より大きな粒子が大多数を占めた。これらの結果から、各社の製造工程の差が示唆されるとともに、粒子径の測定を、工程中の品質の評価に用いることが可能であると考えられた。

2. 不活化ウイルス液及び市販のインフルエンザHAワクチンからの核酸の抽出、PCRによる増幅とその定量：不活化したウイルス液、及びHAワクチンから核酸を抽出し、Real time PCR等を用いて、ウイルス由来核酸を定量した。A型に関しては、ホルムアルデヒドによる不活化期間が長くなるほど検出される量は低下したが、B型に関しては、それほど顕著な低下を示さなかった。市販のHAワクチン中の核酸を同様に解析、定量したところ、4社中2社の製品からは容易にウイルス由来核酸が増幅できたが、他2社の製品からはほとんど増幅されず、プロテアーゼ処理の効果もほとんどなかった。増幅効率において、両者の差は、20倍から50倍程度あった。塩基配列を解析したところ、ホルムアルデヒド処理後の核酸は、本来のウイルスの配列と異なっている場合があり、そのほとんどがU(またはA)からG、またはCへという変化であった。ウイルス液をホルムアルデヒド処理せずにPCR増幅し後に解析した場合には、上記のような変化は観察されず、塩基配列の変化がホルムアルデヒドによる不活化と密接な関係があることが示唆された。不活化したウイルス液、及び各製造所のワクチンがインフルエンザ感染関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調べるため、モノサイト系の培養細胞であるTHP-1を用いてReal time PCRによる解析を行った。矢野の測定で、大きな粒子径を維持しているとされた検体のほうが、インフルエンザ関連抗原の発現を惹起しやすい傾向があり、ここでも製造所間の差が明らかになった。

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ウイルス液やHAワクチンを加えて共培養した後、NF- κ B活性とそれによるIL-1 β 産生能力を調べた。その結果、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、不活化の期間に応じて活性の低下が示されたことなどから、不活化プロセスの管理や、免疫賦活化能力などの評価にこの系を用いることができることが明らかになった。

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つ目的で、ワクチン中に含まれるウイルス粒子の粒子径の測定、ウイルス由来の核酸の分離とPCRによる増幅、定量、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ではないため、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おり、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、ウイルス様再構成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。

ウイルス核酸の同定、定量などの過程で明らかになったように、同じ濃度、期間のホルムアルデヒド処理でもウイルスの型によって、またどの遺伝子を主に考えるか、などによって不活化の程度が異なってくるので、ワクチンの製造時には、きめこまかく検討していく必要があると思われる。市販のインフルエンザHAワクチンの場合、添加された界面活性剤の影響も除外できないが、製造所間で、製法その他に大きな差があり、そのことがワクチンの性状の差につながっていることが推察される。各製造所のワクチンの粒子径を調べた矢野の報告書にも、ほぼ同様の結果が示されている。不活化ウイルス液、またはHAワクチンによるIL-1 β の産生は、IL-18の産生を示さないことからNF- κ Bの活性化を介すると考えられる。NF- κ B活性とそれによるIL-1 β 産生能力を調べたところ、やはり不活化期間の長さやウイルスの型、市販のワクチンの場合、製造所による差があることが明らかになった。また、簡単な評価法ではあるが、モノサイト系の培養細胞であるTHP-1細胞に各ワクチンを添加した実験において、インフルエンザ感染関連遺伝子の発現にも大きな差があったことなども考えあわせると、各製造所のHAワクチン間には単なる性状の差のみではなく、免疫誘導能力に差がある可能性もある、と考えられる。

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）の品質管理に役立つ目的で、不活化ウイルス液や市販のインフルエンザHAワクチン中のウイルス由来粒子の性状や、核酸の状態などについて検討し、品質管理手法として用いることができるかどうかを検討した。その結果、ウイルス由来の粒子形状の変化を、不活化全粒子ワクチンのみならず、HAワクチンにおいても、粒度分布測定装置を用いて測定可能であった。また、市販のインフルエンザHAワクチンからも製造所によって差はあったが、ウイルス由来核酸を分離でき、その定量も可能であった。現在の国家検定項目である、たん白質含量試験と力価試験ではほとんど差が認め

られない4社のインフルエンザHAワクチン間に免疫誘導能力に差があることを示唆する結果も得られた。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、また免疫誘導能力の低下も認められた。よって、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 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表：

田中明子、笠井道之 矢野茂生
第57回 日本ウイルス学会学術集会
2009年10月

原田勇一、板村繁之他
第57回 日本ウイルス学会学術集会
2009年10月

笠井 道之
第38回 日本免疫学会総会・学術集会
2009年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし。

分担研究報告

動的光散乱法による粒度分布を適用したインフルエンザワクチンの品質管理の新しい試み

分担研究者 矢野 茂生

研究要旨：インフルエンザワクチンの品質は抗原とたん白質の2つの含量が基本となり、それぞれ力価試験とたん白質含量試験（ローリー法）が生物基準に定められている。最近の生体内の免疫プロセス分野の進歩により、抗原の粒子径と免疫活性の関係が示唆され、ワクチンの品質管理試験としての上記の試験法以外に、抗原の粒度分布がワクチンの品質評価に有効となる可能性があると考え、国内メーカー4社の2009年度季節型インフルエンザHAワクチン製剤（A/H1N1、A/H3N2、B）の粒度分布を調べるために、動的光散乱法を用いた粒度分布の測定法を検討した。測定システムは、ポリスチレン粒子などの単分散系の測定では、非常に精度の良い、再現性のある堅牢な測定結果を与えた。一方、HAワクチンは、すべての測定で得られた粒度分布から、製剤はすべて多分散系であることが判明した。全く同一のサンプルであっても測定回毎に異なる分布を与え、標準PS粒子の粒度分布のような高い再現性は得られなかった。しかし、これらの分布の相関関数を平均化処理した結果、二峰性又は三峰性粒度分布（粒度半径：1 nm～1000 nm）が得られた。各分布ピークを、G1（50 nm以上：ウイルス粒子又はそれらの凝集体）、G2（10 nm以上～50 nm未満：ロゼッタ凝集体）、G3（3 nm以上～10 nm未満のピーク：たんぱく質又はその重合体）、G4（1 nm～3 nm未満：たんぱく質以外の低分子又はその多量体）の4つに分類し、粒度分布を分析した結果、メーカー別、ロット別により、粒度分布に特徴を有することが判明した。HAワクチン製造工程の品質管理において、試験法とするには、現在は堅牢性に問題があるが、将来、粒度－ワクチン効果の関係が一般に認められれば、この測定法が評価されると考える。

A. 研究目的

毎年3種類のインフルエンザウイルスから製造されている季節型インフルエンザHAワクチンは、力価、成分組成、及び安全性を確認するための試験法が生物学的製剤基準に記載され、製造したロット毎に試験を実施するよう定められている。さらに、感染研の国家検定試験を最後に合格することで有効性と安全性が保障されている。ワクチン製造工程の品質管理は抗原量とたん白質純度が基本であり、それぞれ力価試験とたん白質含量試験（ローリー法）が生物基準に定められてきた。最近のワクチン関係の生体内の免疫プロセスの研究の進歩により、免疫系（リンパ節）と抗原の初期の段階において、抗原の

粒子径が免疫能の効果に影響を及ぼす可能性が示唆されている。抗原粒度の情報がワクチンの有効性評価の品質管理の新しい試験法として成立する可能性があると考え、市販の季節型インフルエンザHAワクチンの抗原の粒度分布を調べるために、動的光散乱法を用いた粒度分布測定法を検討した。

B. 研究方法

（1）. 使用した測定機器

- ・動的光散乱測定装置：
Viscotek製 Model 802 DLS
- ・測定セル：容量 12 μ L

- ・粘度測定装置：AND製 SV-10 振動式
 - ・屈折計：ATAGO製 PAL-RI
- (2). 試料
- ・標準ポリスチレン粒子：JSR製 STADEX (粒径：29nm、61nm、100nm；濃度 0.5%又は1%、10mL)
 - ・測定に使用したワクチン：国内メーカー4社が2009年度に製造市販した3株 (A/H1N1、A/H3N2、B) からなる季節型インフルエンザHAワクチン (0.5mL又は1mL/1バイアルの無色透明液)
 - ・局方注射用水 (20mL、大塚製薬)
- (3). 測定条件：
- ・測定温度：20℃
 - ・測定粒子カウント数の設定： 300×10^3
 - ・測定スパイクピーク許容：20%
 - ・測定ベースライン変動：15%
 - ・測定測定時間：30秒/1回
 - ・測定測定回数：10回以上 (測定上限：99回)
 - ・測定測定に使用したサンプル量：50μL/1回

測定セルはサンプル注入前に注射用水 (5mL) を用いて、アスピレーターで吸引洗浄し、キャリーオーバーがないことを確認し、サンプル充填 3分後に測定を開始した。

C. 研究結果

(1) DLS の90° 散乱光強度

図1. に4種のサンプル (①、②、③、④) を用いて、入射光の90° 散乱光強度と測定セルの温度の変動の8分間のモニター結果を表示した。散乱強度は 300×10^3 ウントになるように入射強度を自動設定した。また、B. 研究方法で規定した測定条件を満たさなくなった時点でデータを廃棄し、自動的に再測定が繰り返される様子をデータ採取間隔を色分けして表示した。①は今回実験に使用した局方注射用水である。図から明らかなように、スパイクノイズや散乱光強度の時間変動 (400カウント程度) がほとんど無いことを確認した。実験に適した水の選択については、ミリQ水、局方注射用水、局方生理食塩液を調べた結果、散乱強度のノイズ、

品質の均一性、使い易さ (容量：20mL) の点で、局方注射用水が優れていた。②は(公証直径100nm) のポリスチレン(PS)標準粒子で、局方注射用水で100μg/mLに希釈した水溶液である。8分間にスパイクノイズによりデータ採取が3回棄却された。PS微粒子の熱運動による揺らぎが顕著に散乱光に反映され、約2秒の周期で小さな振幅 (10カウント) の変動波が観測された。測定時間 (30秒間) 内で、時間域に依らず、ほぼ均質な変動幅が確認された。③と④は、異なる製造メーカーのインフルエンザHAワクチン製剤 (ワクチン1、ワクチン2) である。両製剤でデータ棄却が多数生じた。また棄却数に差があることから、④は変動パターンやスパイクピーク量が明らかに異なることが判明した。表1に各サンプル (8分間) の散乱強度の平均値と標準偏差を表示した。このワクチンの主成分であるたん白質の濃度は普通、150~200μg/mLであり、DSL測定の濃度として適しており、以下の実験では、製剤を水で希釈しないで測定を実施した。

(2) 粒度分布の精度と信頼性

実験に使用した粒度測定装置の精度と再現性を標準ポリスチレン粒子 (直径 100 ± 3 nm、NIST公証品) を用いて調べた。測定は上記の測定条件で11回実施した。その結果を、DSL装置のコリレータにより観測されたデータから自動生成して得られた相関関数 (図2-1) とこれを質量分布/粒子半径軸に展開した粒子分布 (図2-2) に表示した。図から明らかなように、11回の粒子半径の測定値はほぼ一定で再現性が非常に高かった。測定される粒子の粒子半径が均一 (偏差： ± 3 nm) に揃った単分散の集団の測定の場合、我々の実験に使用した装置では再現性のよい相関関数が得られ、内臓されているアルゴリズム処理により極めて正確に平均粒子半径が測定された。また狭い粒子分布が得られ、サンプルの特性をかなり忠実に表示することが確認された。DLS法の測定では微量の塩化ナトリウムを含んだ水溶液がよいとされているが、標準PS粒子を注射用水のみで希釈して測定した結果、表示粒子径とほぼ完全に一致した値 (実測値/表示値=99%) が得られたことから、今回の実験の精度上、影響は無視できると考え、ワクチン測定時の測定セル洗浄

に局方注射用水を使用した。

次に、多分散系の粒度分布測定の場合として、100 $\mu\text{g/mL}$ の標準PS粒子（粒径が①：60 nm、②：200 nm）とこれらの等量混合液の測定結果を図3に表示した。単分散の場合は、それぞれの半径が31.1 nm、99.5 nmと測定され、非常に精度よい値が得られた。一方、等量混合物の場合は二峰性分布が得られたが、その分布の粒度半径はそれぞれ、21.0 nmと87.8 nm表示され、単分散の場合の70%～80%に減少した。また、単分散時と比べて、①の分布幅は狭くなり、②は大きくなった。この結果から、DLS法による多分散系の粒度分布は単分散系の粒度分布の精度が得られないことが判明した。

(3) インフルエンザHAワクチンの粒度分布

製造メーカー4社（A、B、C、D）の各5ロットの製剤の粒度分布を測定し、測定結果を質量表示で分布図Iと分布図IIに表示した。また粒径は半径表示にした。

分布図Iは、同じロットを10回以上測定して得た粒度分布を重ねて表示した。粒度分布の各ピーク面積値はピーク集団の質量の大きさを定性的に表している。粒度分布（粒度半径：1 nm～10000 nm）に表示されるピークを、G1（50 nm以上：ウイルス粒子又はそれらの凝集体）、G2（10 nm以上～50 nm未満：ロゼッタ凝集体）、G3（3 nm以上～10 nm未満のピーク：たんぱく質又はその重合体）、G4（1 nm～3 nm未満：たんぱく質以外の低分子又はその多量体）の4つに分類し、粒度分布の分析を試みた。分布図IIには、分布図Iに表示した個々の分布に対応するそれぞれの相関関数を加算平均化した相関関数を用いて処理した粒度分布と分布ピークの粒度半径と相対ピーク面積を表示した。またこれらの分布図IIの分布ピークのデータのまとめを表2に示した。また分布図IIIに、メーカー毎に分布図IIを重ねて表示した。全く同一のサンプルであっても測定回毎に結果が異なることも多く、標準PS粒子の粒度分布のような高い再現性は得られなかった。また、すべての測定で得られた粒度分布から、製剤はすべて多分散系であることが判明した。A：分布図Iでは、全ロットで主ピークがG2から

G4に亘って現れた。G4が主ピークの分布の頻度が高メーカーより特に多く表示された。分布図IIにおいても4ロットでG4が90%を占める分布を与えた。またG1は4ロットで現れたがピーク面積はすべて2%以下であった。G4を無視すれば、G1とG2の二峰性分布であった。

B：分布図Iでは、G4のピークが5ロット全部に現れたが、図IIでは2ロットだけであった。ほとんどのロットでG1からG4のピークが図Iで観測され、特にG2-G3の領域に主ピークが幅広く分布していた。G1は10%を超えることはないがすべてのロットで表示された。図IIではG4を無視すれば、Aと類似のG1とG2の二峰性分布が4ロットで観測された。

C：分布図Iでは、G1～G4のすべてを含んだピークの分布を示し、Bとよく似た結果がえられた。特に、面積比を無視すれば、G1とG2の領域で二峰性（G2>G1）の連続したピークが全ロットで観測された。

D：分布図IのG4のピーク数は非常に少なかった。分布図IIでは、4メーカーで、最もばらつきの少ない粒度分布を与えた。G4のピークは全く表示されず、ほとんどのピークがG1とG2であった。主ピークはG2で、粒径は20 nm～30 nmであったが、100 nm付近にも強いピークが表示された（G2：G1=8:3）。

D. 考察

DLS法では、サンプルに大きな粒子が微量混入している場合、散乱強度はこの粒子に敏感に反応する（感度 \propto 粒径^{3乗}、図1）。その結果、相関関数が変動し、粒度分布に影響する。得られる分布は再現性が低下し、粒度分布のゆらぎが大きくなる。このDLS測定の特性を考慮して、測定データの棄却条件を設定した。ワクチンサンプル中のスパイクノイズの原因を除去する方法として、フィルターによるろ過や遠心処理が可能だが、粒度分布が変化する可能性があるため、採用しなかった。測定に使用したセルはバッチ用であるが、連続測定が実行できるようにした。セル温度の変動を極力さげ、サンプルのキャリーオーバーが生じないようにするため、測定セルを測定

装置に装着固定したまま、測定毎にセル内を注射用水 5 mL で減圧吸引して十分に洗浄した。単分散のサンプルの場合、DSL による粒度分布測定は、非常に高い精度の分布が得られ、簡便で有効な測定法であることを示した (図 2)。しかし、標準 PS 粒子混合液の粒度分布で明らかなように多分散の試料の場合では、粒度分布の精度と信頼度が劣ることが示された (図 3)。また、粒径差や組成比が小さい二分散系では一峰性の分布が得られる場合が生じた (未表示データ)。これらの結果から、我々の DLS 測定装置の性能では、多分散の正確な粒度分布を得るには必ずしも十分でないことが示された。

前年度の研究の結果から、インフルエンザウイルス (A/H1N1、A/H3N2、B 型) の DLS 法によるウイルス粒子半径は数量表示で 55 nm、質量表示では約 65 nm を中心とする分布が得られた。ウイルス粒径は H1N1 と N3N2 間、あるいは A 型と B 型間で、ほとんど同粒径であり、また実験室レベルのホルムアルデヒドによる不活化に対しても粒径はあまり影響を受けないことが明らかした。HA ワクチンはこれらの三つのウイルス株の混合であるが、各ウイルスの粒径がほぼ同じであることから、単一ウイルス株の状態と看做すことができた。これは多分散系測定が不利な DLS 法の測定サンプルとしては、特に有利であった。インフルエンザウイルスの構成成分はたんぱく質 75%、脂質 18%、RNA 1% である (Frommhamen, L. H., et al., Viorogy 8, 176-197, 1959)。脂質は製造工程のエーテル処理により除去される。この処理によりウイルス粒子の大部分が壊れ、表層に存在していた多量の糖たん白質 (HA、NA) 及び核酸や他の微量の構成たんぱく質の一部は分散し、一部は凝集してロゼッタ状凝集体 (粒径は 30 nm ~ 50 nm) を形成することは電顕により観測されている。以上のことから、ワクチンの粒度分布で観測されるピークのほとんどがウイルス由来たん白質成分から構成されていると判断した。DLS 法で表示される粒子の大きさの例として、低分子の C60 フラーレンは約 1 nm と観測され、ウシ血清アルブミン (分子量 6.6 万) は半径が約 4 nm の粒子として観測される。単純に分子容積が分子量に比例すると考えると分子量 100 万の球状たんぱく質の

半径は約 10 nm になると推定される。ワクチンの粒度分布に現れるたピークを分類するために、ワクチン成分を粒径の大きさに応じて、G1、G2、G3、G4、の 4 つのグループを設定し、4 社の粒度分布を分析した (分布図 I、II)。分布図 I には測定ごとに粒度分布に変化があり、表面的には再現性のある分布を得ることの困難さを示した。しかし、我々の粒度分布の目的は、高い精度よりも粒度分布のパターンにより品質を評価できる可能性を示すことと考え、複数回の測定により得られた粒度分布の相関関数を平均化して、ワクチンの品質 (粒度組成としての成分) を評価することを試みた。分布図 I を分布図 II に変換する平均化により、1 nm ~ 10 nm の粒径分布の寄与が大きい相関関数の 10^{-6} 秒オーダーの付近のデータは、大きな粒径のデータに組み込まれる傾向が高くなった結果、分布図 II では G4 のピークが減少または消失したと考えた。この処理により得られた分布図 II は、データとして敏感 (minor) な部分が切り捨てられるが、実際の分布を現す可能性が最も高いと判断した。さらに、同質成分から構成され、且つ、製造法が大きく異なっていないと予想される同じメーカーのワクチンに対しては、特徴的な粒度分布が存在すると予想した。処理を実施した結果、粒度分布には、各メーカーの分布パターンが存在することが判明した (分布図 III、表 2)。この事実は、粒度分布が製品の品質を特徴づけることが可能で、品質管理に適用可能であることを強く示唆した。ワクチンの粒径と免疫活性の関係は明らかにされるべき重要な問題であるが、インフルエンザワクチンについての実験報告は知られていない。しかし、免疫分野の研究の進展により、ワクチン抗原成分の大きさに関心が増えつつあり、近年認可され市場されている HPV ワクチンや肺炎球菌ワクチンには、ワクチンの有効性の保持と品質管理の観点から、抗原成分の高分子量あるいは粒径の大きさが品質規格試験の一つに定められている。DLS 試験法は、現在は堅牢性に問題が多いが、将来、粒度とワクチン効果の関係が一般に認められれば、この粒度分布測定が評価されると考える。

DLS 法を高い精度の信頼性のある測定法にするには、粒度の大きさを分離できる現在、非対称流フイ

ードフローフラクシヨネーション (AFFF) を組み込むシステムが有効であるが、高価で、分離能が十分でない場合がある。我々は多分散から単分散状態に変換できる簡便で有効な分離法を研究中である。

E. 結論

DLS法による4メーカーのインフルエンザHAワクチンの粒度分布を測定した結果、二峰性又は三峰性粒度分布が得られた。メーカー別、ロット別により、粒度分布に特徴を有することが判明した。HAワクチン製造工程の品質管理において、試験法とするには、現在は堅牢性に問題が多いが、将来、粒度-ワクチン効果の関係が一般に認められれば、この測定法が評価されるものとする。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表 (著書を含む)
なし
2. 学会発表
第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年10月)

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. 散乱光強度(モニター光)の経時変動

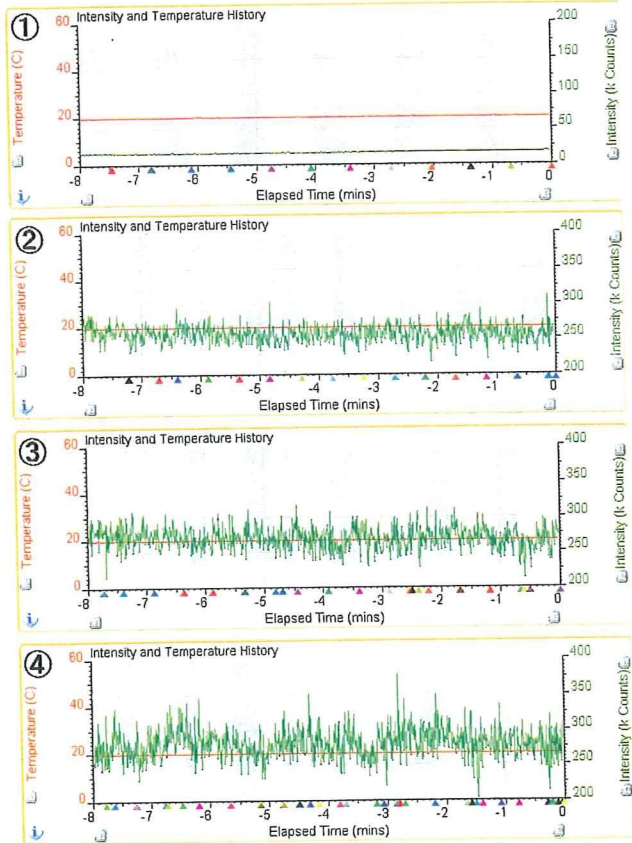


図 2-1

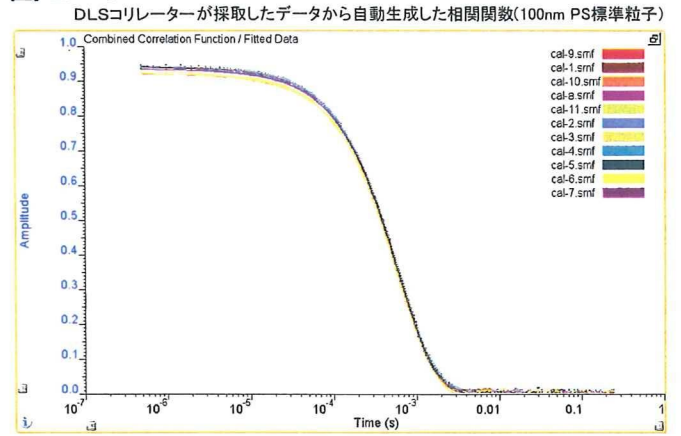


図 2-2

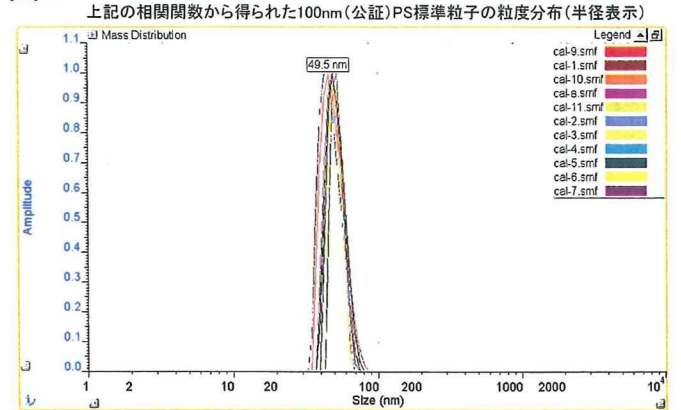


図 3. 単分散と重分散の粒径分布 (半径表示)

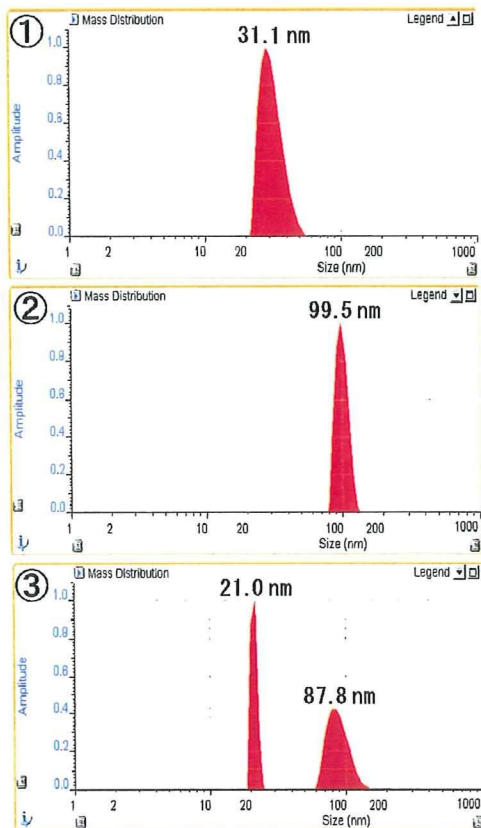


表 1.

サンプル		注射用水	100nm標準粒子	ワクチン1	ワクチン2
散乱強度 ($\times 10^3$ カウント)	平均値	15.3	257	269	280
	標準偏差	0.4	12	16	22

表 2. メーカー別 分布図 II のピーク分類

メーカー A	ピーク面積					粒子半径(nm)					% RSD				
	Lot No.	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
G1(50nm-)	2	19	1	1	2	107	57	105	88	104	31	60	28	35	23
G2(10nm-50nm)	7		7	2	9	26		21	14	22	13		10	9	9
G3(3nm-10nm)			81					7					6		
G4(1nm-3nm)			91					92	97	89	3		2	1	3

メーカー B	ピーク面積					粒子半径(nm)					% RSD				
	Lot No.	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
G1(50nm-)	12	17	1	17	3	73	86	102	84	95	47	37	27	34	27
G2(10nm-50nm)			82	6	83	13		16	27	17	23		10	12	11
G3(3nm-10nm)			88					7					5		
G4(1nm-3nm)				93				93		84			2		1

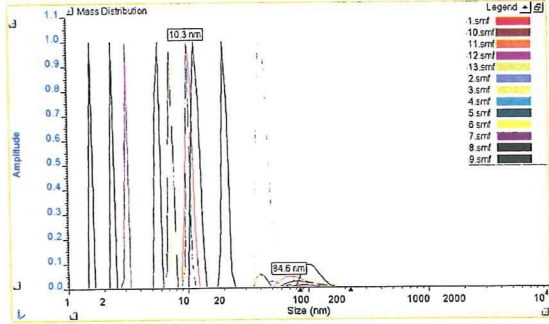
メーカー C	ピーク面積					粒子半径(nm)					% RSD				
	Lot No.	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
G1(50nm-)	1	26	21	42	28	66	50	50	54	70	42	57	53	48	40
G2(10nm-50nm)				45	47	21			16	27	19			15	22
G3(3nm-10nm)				74	80	13			7	6	6	9		5	9
G4(1nm-3nm)															

メーカー D	ピーク面積					粒子半径(nm)					% RSD				
	Lot No.	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
G1(50nm-)		34	26	27	23	30	62	69	76	82	71	43	34	31	28
G2(10nm-50nm)		33	74	73	77	70	21	18	24	27	21	21	10	13	14
G3(3nm-10nm)		33													
G4(1nm-3nm)															

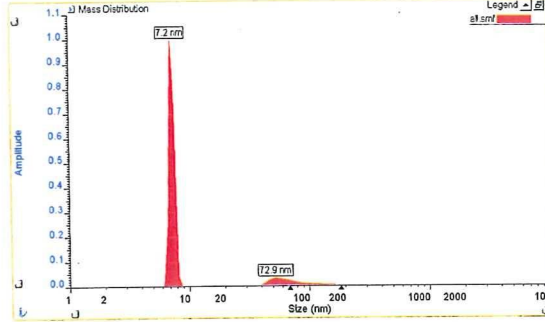
[主ピークは緑色、ピークがない領域は褐色で表した]

分布图 I -A1

A/H1N1 + A/H3N2 + B



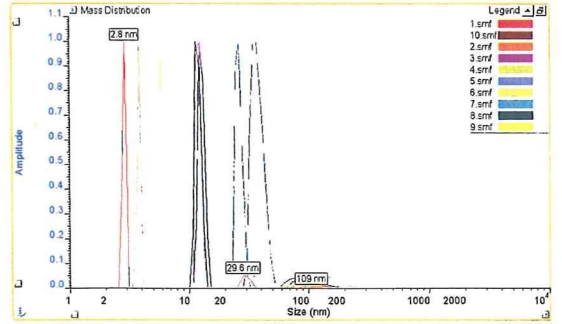
分布图 II -A1



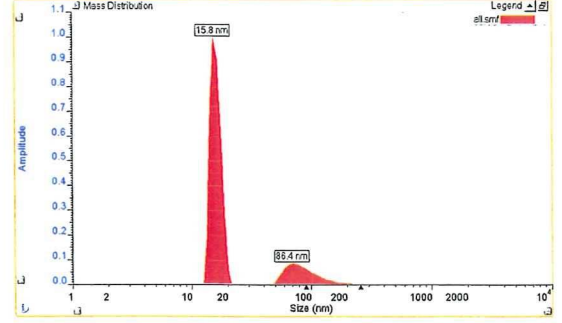
Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	87.7	7.22	7.08	4.8
2	12.3	72.92	52.48	46.7

分布图 I -A2

A/H1N1 + A/H3N2 + B



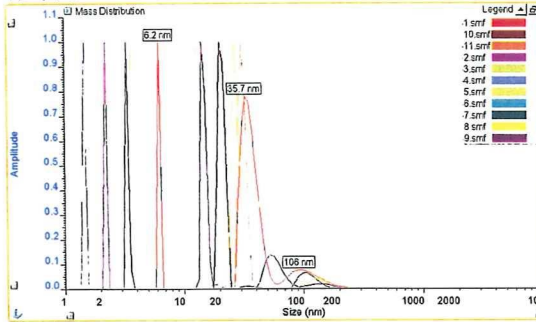
分布图 II -A2



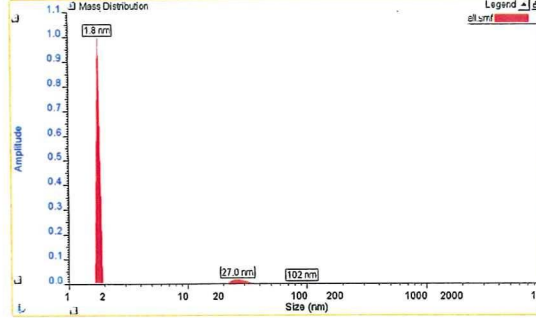
Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	82.1	15.81	15.14	9.7
2	17.9	86.40	69.18	37.4

分布图 I -A3

A/H1N1 + A/H3N2 + B



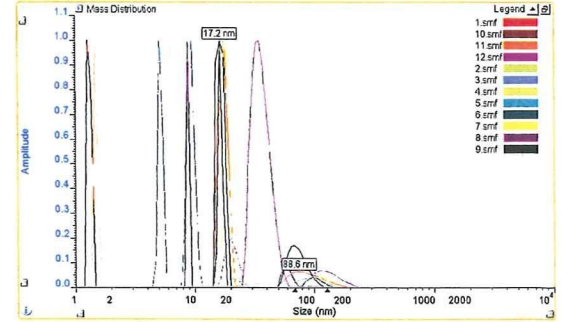
分布图 II -A3



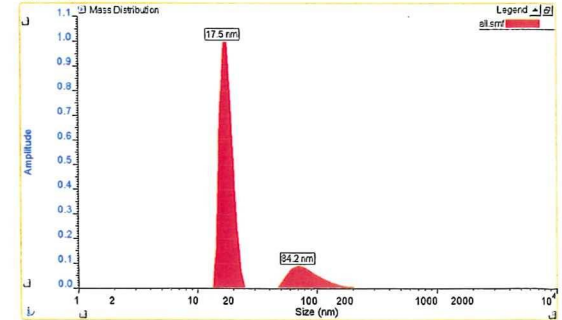
Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	92.9	1.78	1.78	0.0
2	5.8	26.95	26.30	12.0
3	1.3	101.63	91.20	26.7

分布图 I -A4

A/H1N1 + A/H3N2 + B



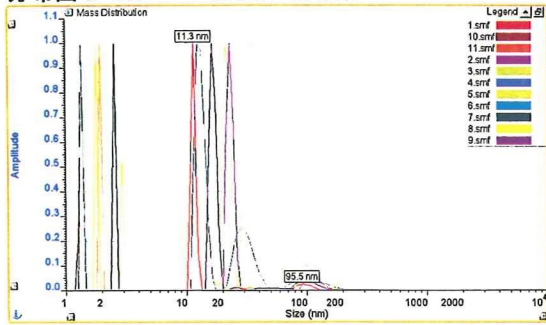
分布图 II -A4



Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	83.2	17.46	16.22	11.2
2	16.8	84.17	69.18	33.6

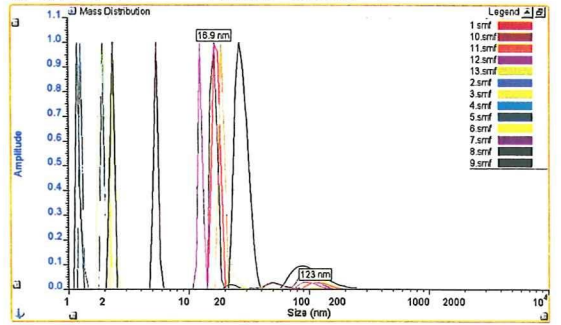
分布图 I -A5

A/H1N1 + A/H3N2 + B

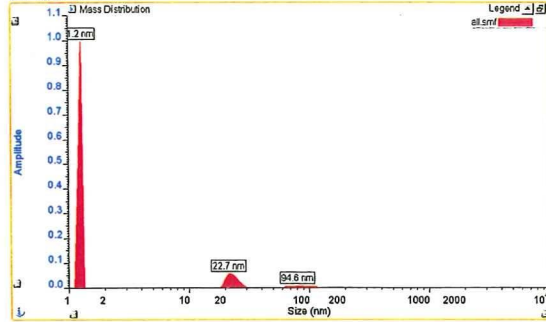


分布图 I -B1

A/H1N1 + A/H3N2 + B

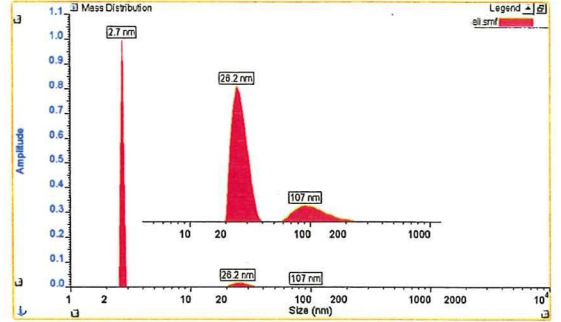


分布图 II -A5



Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	84.2	1.23	1.26	3.1
2	13.2	22.73	21.38	10.2
3	2.6	94.55	79.43	27.1

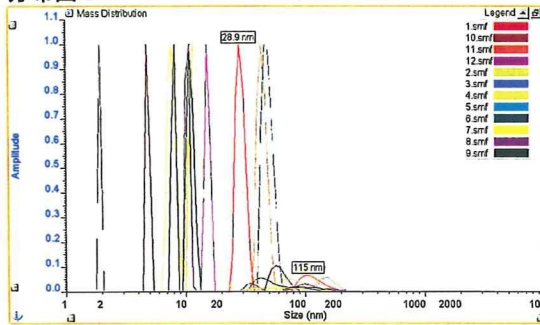
分布图 II -B1



Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	91.1	2.69	2.69	0.0
2	7.2	26.24	24.55	13.2
3	1.7	107.26	91.20	30.7

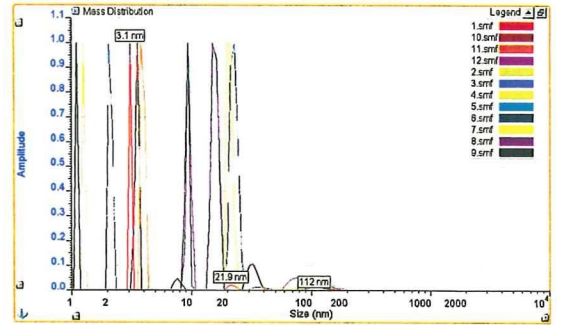
分布图 I -B2

A/H1N1 + A/H3N2 + B

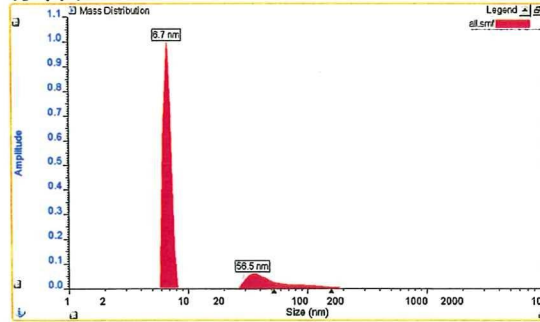


分布图 I -B3

A/H1N1 + A/H3N2 + B

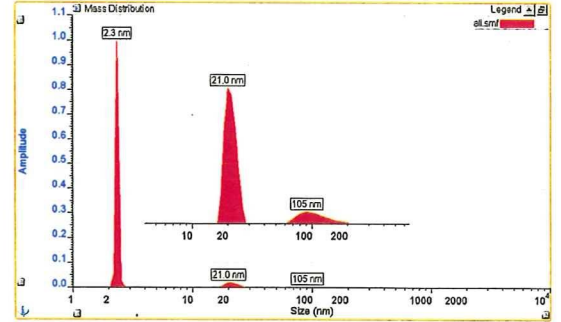


分布图 II -B2

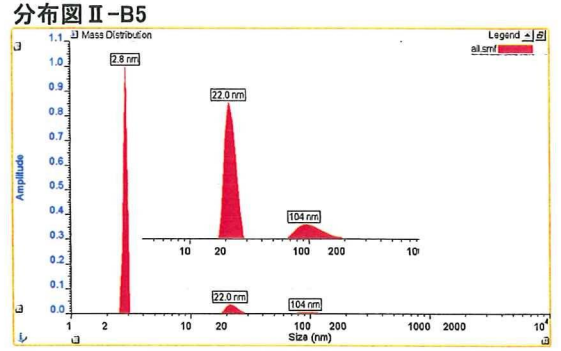
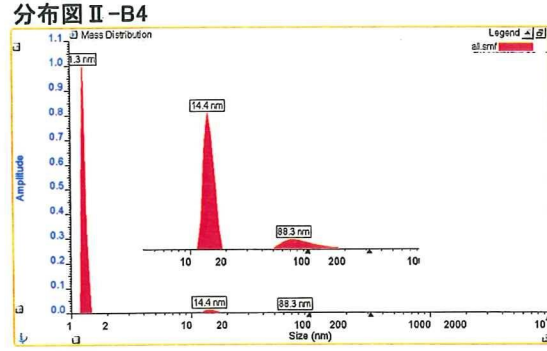
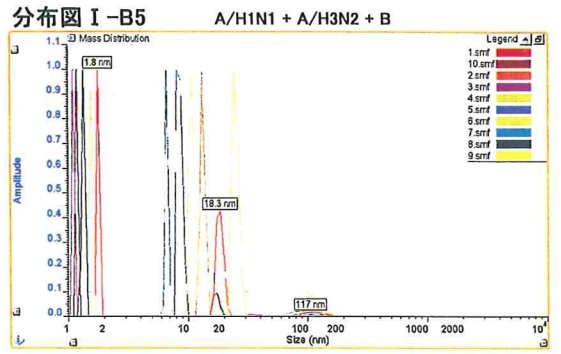
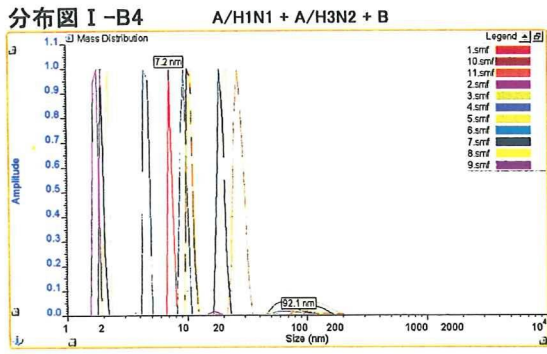


Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	80.9	6.68	6.61	6.2
2	19.1	56.51	34.67	59.9

分布图 II -B3

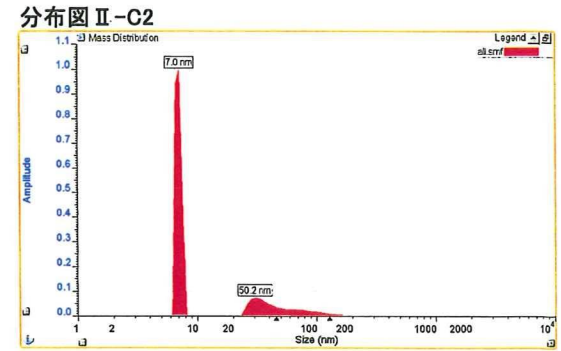
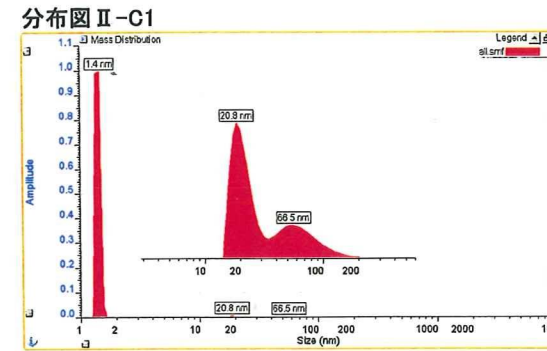
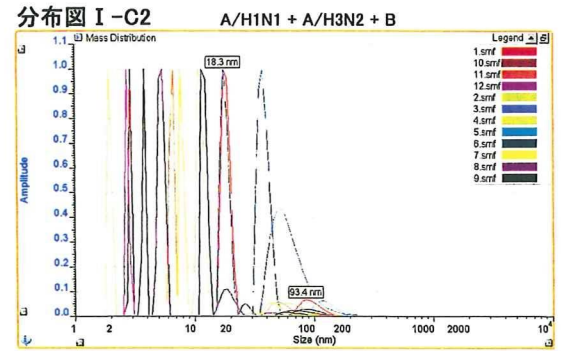
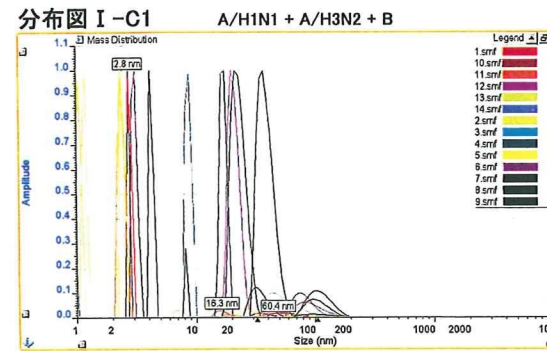


Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	92.3	2.34	2.34	1.9
2	6.5	21.05	19.95	10.3
3	1.2	105.10	91.20	27.7



Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	97.3	1.28	1.26	3.1
2	2.3	14.44	14.13	8.8
3	0.4	88.27	74.13	35.4

Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	89.1	2.84	2.88	2.7
2	8.9	22.00	21.38	9.2
3	2.0	104.34	91.20	23.1

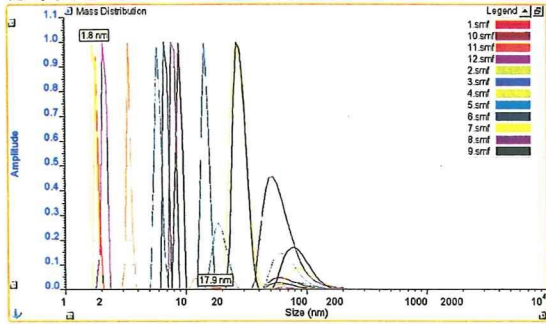


Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	98.8	1.40	1.45	3.8
2	0.8	20.82	18.62	19.4
3	0.4	66.48	56.23	41.5

Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	74.1	6.97	7.08	5.0
2	25.9	50.20	30.20	56.8

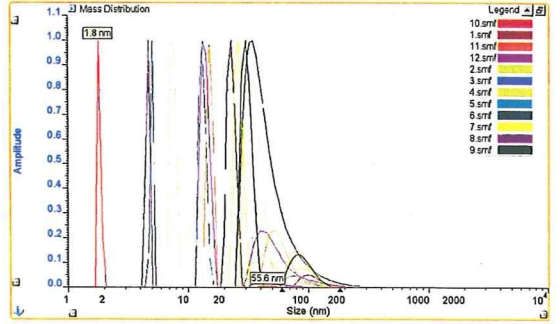
分布图 I -C3

A/H1N1 + A/H3N2 + B

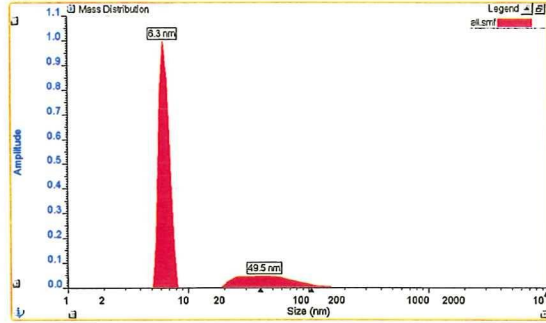


分布图 I -C4

A/H1N1 + A/H3N2 + B

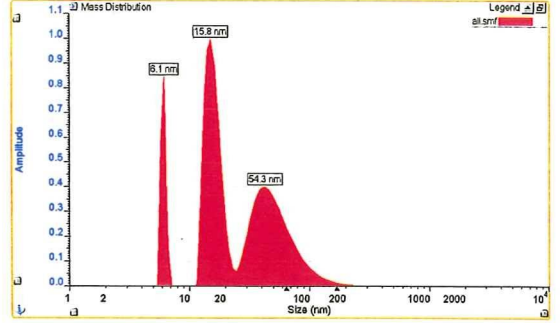


分布图 II -C3



Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	79.5	6.33	6.17	8.8
2	20.5	49.54	42.66	52.6

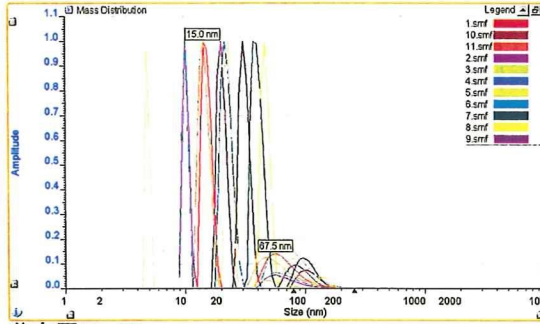
分布图 II -C4



Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	12.6	6.06	6.17	4.3
2	44.8	15.79	15.14	14.9
3	42.6	54.27	42.66	48.1

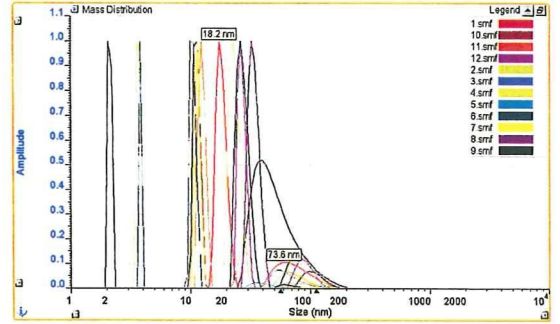
分布图 I -C5

A/H1N1 + A/H3N2 + B

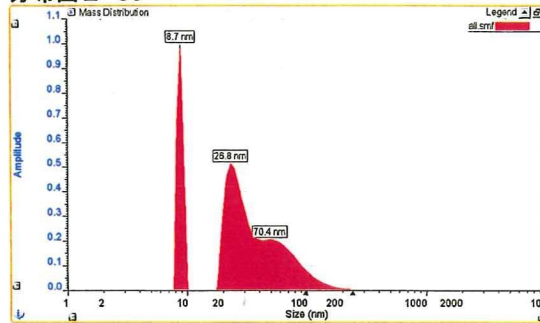


分布图 I -D1

A/H1N1 + A/H3N2 + B

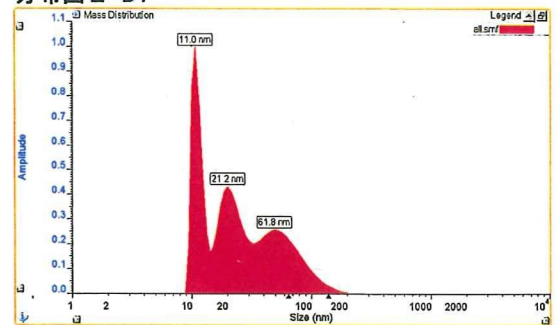


分布图 II -C5

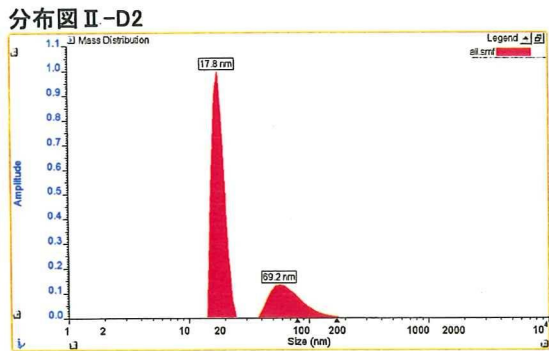
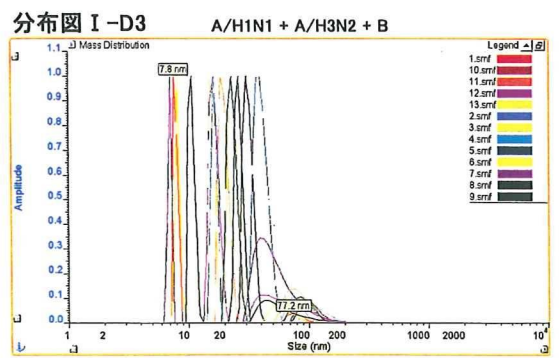
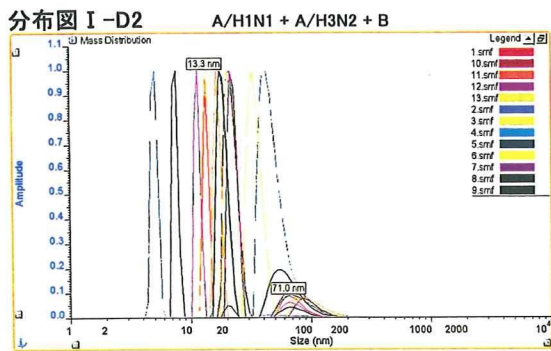


Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	25.0	8.66	8.71	5.0
2	47.0	26.81	22.91	21.6
3	28.0	70.44	48.98	40.0

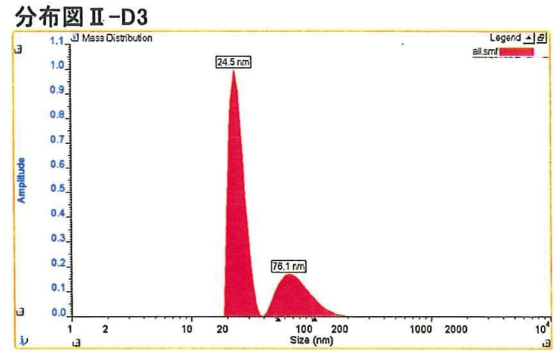
分布图 II -D1



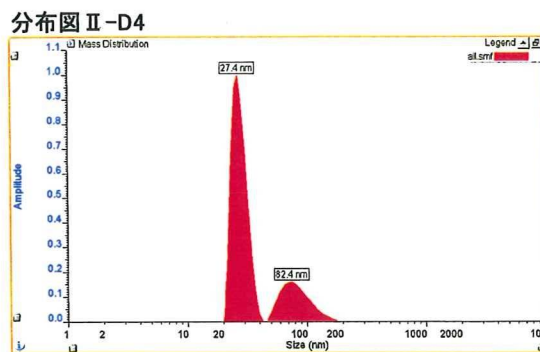
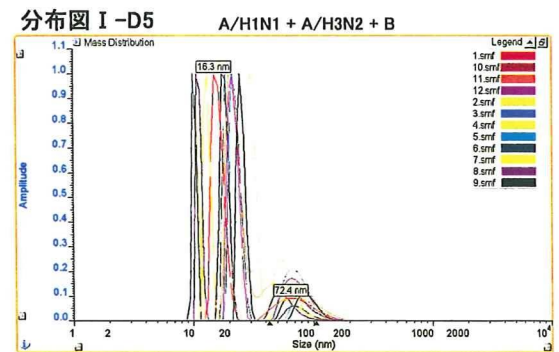
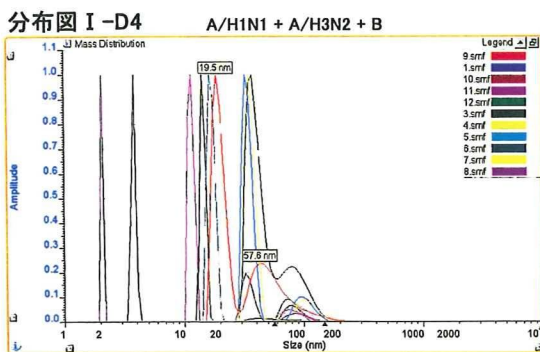
Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	32.4	11.03	10.72	9.2
2	33.3	21.20	19.95	20.8
3	34.3	61.79	48.98	43.1



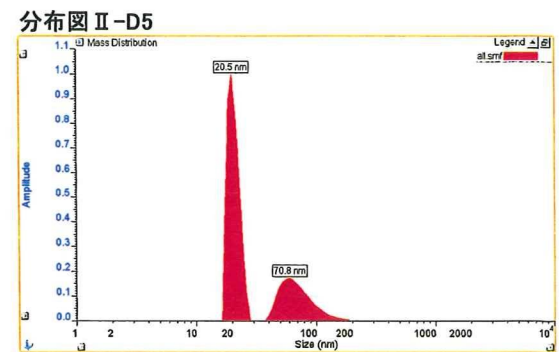
Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	74.4	17.80	17.38	10.4
2	25.6	69.23	56.23	33.5



Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	73.0	24.45	22.91	13.4
2	27.0	76.12	64.57	31.4

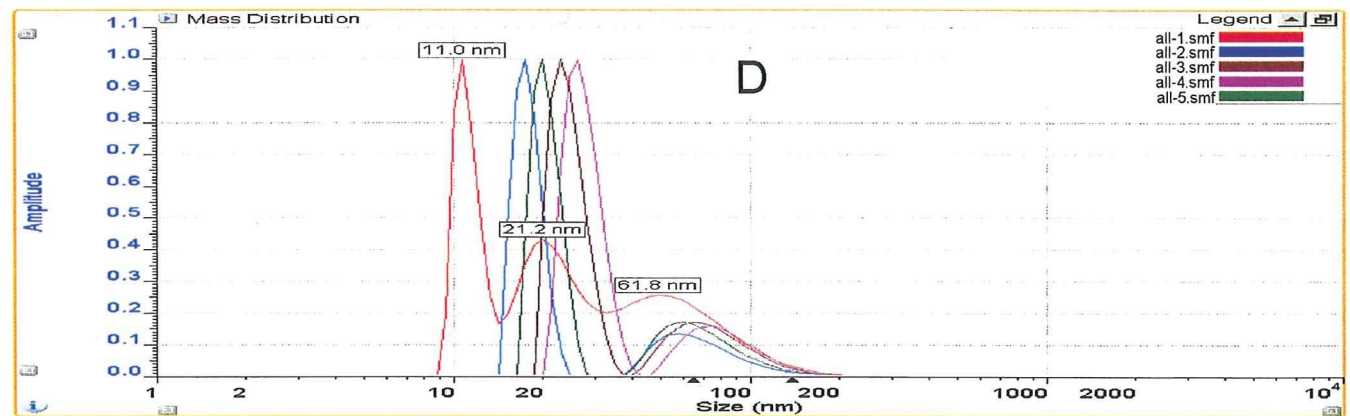
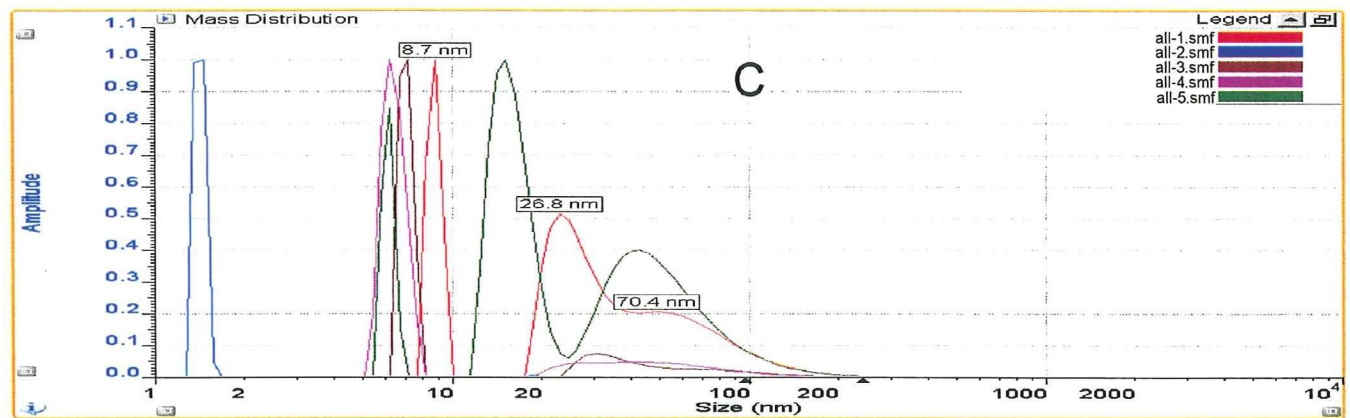
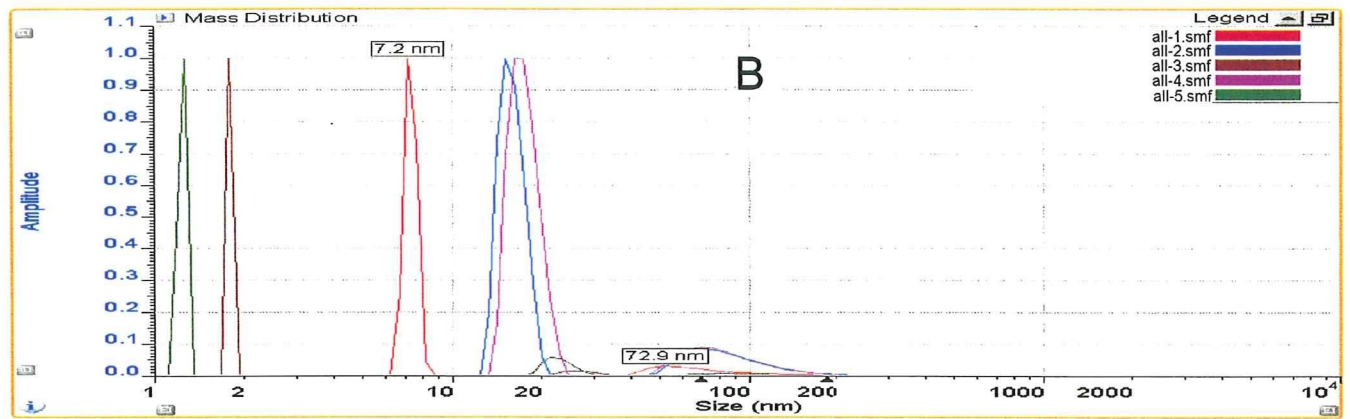
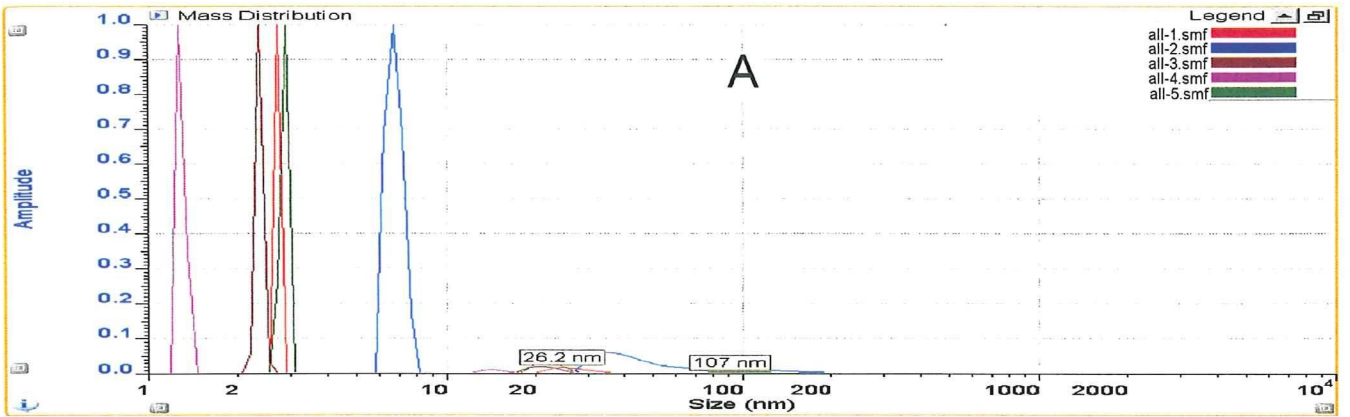


Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	76.6	27.37	26.30	13.9
2	23.4	82.41	74.13	28.3



Pk	% Area	Rh (nm)	Position	% RSD
1	70.1	20.54	19.95	10.7
2	29.9	70.83	60.26	33.6

分布図Ⅲ 4社(A、B、C、D) HAワクチン



厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
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定量と
品質管理手法としての応用--

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 インフルエンザウイルス研究センター）

研究要旨： わが国で開発、備蓄しつつある新型インフルエンザワクチン(H5N1)はウイルス塩基配列のうち、強毒性に関与する遺伝子の一部をリバースジェネティクスにより改変したワクチン株を、ホルムアルデヒドにより不活化し、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保持されたウイルス株が増殖しているのかを常に監視する必要がある。また、近年、免疫能にウイルスや細菌の核酸が直接関与するという報告が相次いでなされており、ワクチン中の核酸を的確に計測し、管理することが、全粒子型に限らず、ワクチンの効果を考える上でも重要と考えられる。昨年度は、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。今年度は、インフルエンザワクチン株を不活化した検体（全粒子型ワクチン）及び市販のインフルエンザHAワクチンからの核酸の分離、及び定量と塩基配列の解析など詳しい性状解析を行った。ホルムアルデヒド及びエーテル処理により、ウイルス粒子中の核酸の分離の効率や、PCRによる増幅効率などは低下していたが、その程度は、ウイルスの型により差があった。また、市販のHAワクチン中の核酸の量や性状には、製造所間(4社)で著しい差があり、うち2社の製品からは比較的容易にウイルス遺伝子の増幅が可能であったが、他の2社の製品からはほとんど増幅が観察できなかった。ウイルス核酸が保持されている場合のほうが、インフルエンザ感染関連遺伝子の発現が惹起されやすいことなどがわかった。これらの結果により、インフルエンザワクチン中のウイルス核酸を直接評価できることがわかり、不活化プロセス等をより精緻に管理できることが明らかになった。また、各製造所のHAワクチン間には性状の差があり、それにともなって、免疫誘導能力に差がある可能性もあると考えられた。

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強毒性にかかわる部分を遺伝子操作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、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。全粒子ワクチンでありながら、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、免疫能にウイルスや細菌の核酸が直接関与するという報告が、あいついでなされており、ウイルス核酸の状態を把握することが、全粒子型ワクチンでは、特に重要と考えられる。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ているのか、ホルムアルデヒドにより不活化した核酸の状態がどのようになっているのかを検証し、的確に管理することは、人体における安全性の評価に関連するのはもちろんのこと、その免疫能を考えるうえでも重要な過程であると考えられる。本研究では、前年度（平成 20年度）の基礎的検討の結果をふまえて、不活化ウイルス液、市販のHAワクチン等を用いてそれらに含まれる核酸について定量及び塩基配列の決定等の詳細な検討を行い、不活化の過程でどのように変化するかを調べた。また、モノサイト系の培養細胞であるTHP-1の培養液に添加した場合、インフルエンザ感染関連遺伝子の発現がどのように変化するかを調べ、免疫系における作用の差についても検討した。

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℃に保存して、ほぼ毎日数分間ずつ撹拌した。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、たんぱく質を解離（split）し、かつホルムアルデヒドで不活化したもの）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 Co.) を用いた。この製品は、ホルムアルデヒド処理された病理標本等からの核酸の分離用に開発されたもので、操作にたんぱく質分解酵素による処理の過程を含む。昨年度の報告書に記載したように、分解酵素による処理の時間を長めにし

たほうが回収率が上昇する製品もあったので、処理は3時間行った。無処理のウイルス液からの核酸の精製には、Nucleospin (Macherey Nagel Co.) を用いた。

抽出した核酸は、定量したのち、逆転写酵素 (Thermoscript ; Invitrogen Co.) を用いて逆転写し、cDNA にした。さらに、EX Taq (Takara Co.) を用いてPCRを行った後、制限酵素による切断なども含めた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。EX Taqを用いた場合の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、annealing は、57℃、1分間、extension は、72℃で3分間行った。

PCR 産物の一部は、アガロースゲルから精製して、そのまま、または、TAクローニングを行った後に塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、Big Dye Termination kit (Applied Biosystems Co.) と 3730XI DNA Analyzer (ABI Co.) 用いた。

Real time PCR は、Applied Biosystems Co. のPower SYBR Green PCR Master mixを用いてPerkin Elmer ABI PRISM Sequence Detectorで行った。

不活化したウイルス液や各製造所のHA ワクチンがインフルエンザ感染関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調べるため、モノサイト系の培養細胞であるTHP-1を用いた。濃縮した検体を細胞の培養液に添加して、24時間培養した後細胞を回収してRNAを分離精製し、THP-1細胞におけるインフルエンザ感染関連遺伝子の発現をReal time PCR を用いて調べた。

（倫理面への配慮）特になし。

C. 研究結果

1. ウイルス粒子の不活化： 研究材料と方法の項で記載した方法にしたがって、ウイルス液3種類を別々にホルムアルデヒドによって処理した。通常この濃度の処理により、2週間程度で完全に不活化するとされている。不活化の期間

の異なるウイルス液をホルムアルデヒドを含んだ状態で実験に供した。今回の実験に用いた検体の最長の不活性化期間は、A型については、145日である。

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：予備的検討により、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、たんぱく質とは分離して存在する割合が高いと推定されたので、酢酸ナトリウム存在下でエタノール沈殿を行い、沈殿物とした後、水に溶解した。回収される核酸の量は、製造所によって大きな差があった（data not shown）。ウイルス液中の核酸は、やはりそのままでは、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後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（data not shown）。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核酸分画は、Recover All total RNA kit (Ambion Co.) を用いて精製した。

3. ウイルス遺伝子のPCRによる検出：抽出した核酸分画を用いてEx Taq を用いたPCRを行い、ウイルス遺伝子の増幅を試みた。昨年度の報告書に記載した塩基配列のプライマーを主に用いた。サイクル数を変えたPCRによる不活化したウイルス液 及びHAワクチン中のウイルス由来核酸についての結果をTable 1の左側に記載した。ホルムアルデヒドによる不活化期間が長期に及ぶほど、核酸の検出は困難になった。ただし、B型ウイルスは、A型ウイルスと比較すると不活化期間が長くなっても、増幅量にはあまり変化がなかった。またM遺伝子は、HA遺伝子と比較すると増幅される量の変化は少なかった。4 製造所のインフルエンザHAワクチンから分離した核酸については、うち2社（A社、D社）の核酸からのHA遺伝子の増幅効率は非常に低く（うすいシグナルが観察された場合もある）、一方別の2社（B社、C社）の製品からの増

幅効率はよかった。M遺伝子についても同様の傾向があったが、HA遺伝子における差ほど顕著ではなく、期待される増幅産物の大きさが少し小さいなど、HA遺伝子と比較して増幅しやすいためかと思われた。

4. Real time PCRを用いたウイルス由来核酸の定量：Real time PCRを用いて不活化したウイルス液 及びHAワクチン中のウイルス由来核酸の定量を行った。結果をFig. 1、Fig. 2 と Table 1の右側に示した。Fig. 1に示したように、ウイルス核酸の増幅効率は、ホルムアルデヒドによる不活化期間が長くなるほど低下し、A型に関しては、145日で1/7以下になった。B型に関してはEx Taqによる上記の結果と同じく、それほど顕著な低下を示さなかった。市販の製造所4社のワクチン中の核酸のReal time PCRの結果も、Ex Taqによる結果とほぼ同じ傾向を示した。HA遺伝子に関する結果をFig. 2 に示した。この図からわかるように、B、C2社の製品からは容易にウイルス由来核酸が増幅でき、またプロテアーゼ処理によりその効率が5倍以上、上昇した。一方 A、D2社の製品からは、ウイルス由来核酸は、ほとんど増幅されず、プロテアーゼ処理の効果もあまりなかった。C社のワクチンからプロテアーゼ処理時に増幅される核酸の量を1.0 とした場合の各々の増幅量をTable 1にまとめた。A、D2社の増幅効率は、1/20から 1/50 程度であった。Real time PCR の結果から推定したC社のワクチン中の核酸の量は、ワクチンに含まれるたんぱく質の量から推定できるウイルス核酸の量と大きな差はなく、C社（B社）のHAワクチン中のウイルス核酸は、その多くがPCRによる増幅可能な状態にあると推定できた。

5. 不活化ワクチン中などのウイルス核酸の塩基配列の解析：ワクチンなどからPCRによって増幅されたウイルス核酸の塩基配列が、ホルムアルデヒド等の処理により塩基配列が一部でも変化しているのかどうか、を調べるため、増幅産物を直接、またはベクターにクローニングした後、その塩基配列を決定した。特に増幅効