

インフルエンザ HA ワクチンの小分製品に対する分画試験法の改良

研究協力者： 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

要旨

インフルエンザ HA ワクチンの生物学的製剤基準には、ウイルス粒子から主要なワクチン有効成分であるヘマグルチニン（HA）蛋白がウイルス膜から遊離してスプリットワクチン化されてワクチンが製造されているのか検証するために分画試験が導入されている。近年ワクチン株に使用されていたウイルス株の間ではHA含量当たりのHA活性に大きな差があるために、3種類のウイルス株に由来するワクチンを混合した小分製品では従来法の分画試験では各ワクチン株に由来する全ての分画パターンを確認することは困難であった。本研究において開発したキャプチャーELISA法を用いることによってHA含量当たりのHA活性の異なるウイルス株を使用したワクチンであっても最終小分製品において、HA含量を定量的に検出することができ、有用な検出法であることが判った。

A. 研究目的

インフルエンザ HA ワクチンの生物学的製剤基準には、ウイルス粒子から主要なワクチン有効成分であるヘマグルチニン（HA）蛋白がウイルス膜から遊離してスプリットワクチン化されてワクチンが製造されているのか検証するために分画試験が導入されている。現在、HA蛋白の検出にはHA蛋白の生物活性である赤血球凝集（HA）活性を利用しているが、近年ワクチンに使用されているウイルス株のHA蛋白は、ウイルス株によってHA含量当たりのHA活性に大きな差がある。そのため、最終の小分製品は3種類のウイルス株の原液がHA蛋白量として等濃度になるように混合されて製造されているが、HAの比活性がワクチン株ごとによって大きく異なるために3種類すべてのスプリット化を分画試験によって検証することが困難になっている。そこで、本研究では分画試験におけるHA蛋白の検出方法を、生物活性であるHA活性によるものからキャプチャーELISA法によりHA蛋白を定量的に検出する方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

ワクチンとして A/California/7/2009(X-179A) (H1N1) pdm、A/Uruguay/716/2007 (X-175C) (H3N2)、B/Brisbane/60/2008 のウイルス株のものを使用した。抗原キャプチャー用の抗血清としてそれぞれ、ヒツジ抗 X-179 (H1N1) pdm、A/Victoria/210/2009 (X-187) (H3N2)、B/Brisbane/60/2008 を使用した。また、検出用の抗体として A/Narita/1/2009 (H1N1) pdm ウイルスの HA に対するモノクローナル抗体 mAb NSP-2 (国立感染症研究所免疫部高橋先生より分与)、A/Aichi/2/68 の HA に対するモノクローナル抗体 F49(TAKARA)、抗 B/Aichi/20/99 の HA に

対するモノクローナル抗体 Ai71 (山形大学医学部菅原先生より分与) を使用して、キャプチャーELISA法によるHA含量の定量法を開発した。定量のため各ワクチンを標準抗原として、蛋白含量1 μ g/mLに含有されるHA抗原量を1U/mLとした。分画試験は生物学的製剤基準に基づき実施した。

C. 研究結果

まず、スプリット及び全粒子ワクチンとして A/California/7/2009(X-179A) を使用して、分画試験を通常のHA活性に基づく方法と、本研究で開発したキャプチャーELISA法による試験成績を比較した。その結果両試験法による試験成績はよく一致し、スプリットと全粒子ワクチンの分画パターンを区別することができた。次に、3種類のワクチンの単原液を使用して、HA活性による検出方法とキャプチャーELISA法による方法と比較したところ、各ワクチンについて両方法で同様にHA蛋白を検出できることが確認できた(図1)。そこで、市販のワクチンと同様に3種類のワクチンの単原液をHA含量が等しくなるように混合して、分画試験を実施した(図2)。キャプチャーELISA法によるHAの検出方法では混合前の単原液で実施した場合と同じように各ワクチンに特徴的な分画パターンが確認できた。一方、HA活性に基づく方法では各ワクチンのHA含量当たりのHA活性の比活性が異なるために主に比活性の高いB型ワクチンの分画パターンに類似していた。

D. 考察

近年ワクチン株に使用されていたウイルス株の間ではHA含量当たりのHA活性に大きな差があるために、3種類のウイルス株に由来するワクチンを混合した小分製品では従来法の分画試験では各ワクチン株に由来する全ての分画パターンを確認することは困難であった。本研究で開発さ

れた方法を使用することで小分製品であっても各ワクチン株に由来する HA 分画のパターンを観察することができた。

なし

E. 結論

本研究において開発したキャプチャー-ELISA 法を用いることによって HA 含量当たりの HA 活性の異なるウイルス株を使用したワクチンであっても最終小分製品において、HA 含量を定量的に検出することができ、有用な検出法であることが判った。

F. 健康危険情報

なし

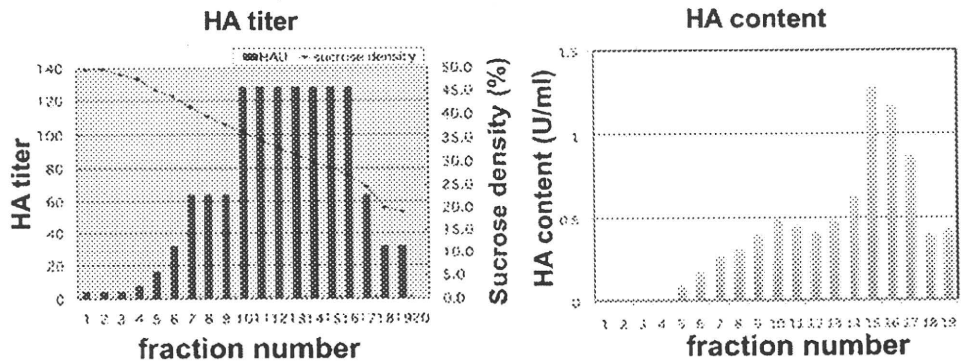
G. 研究発表

学会発表

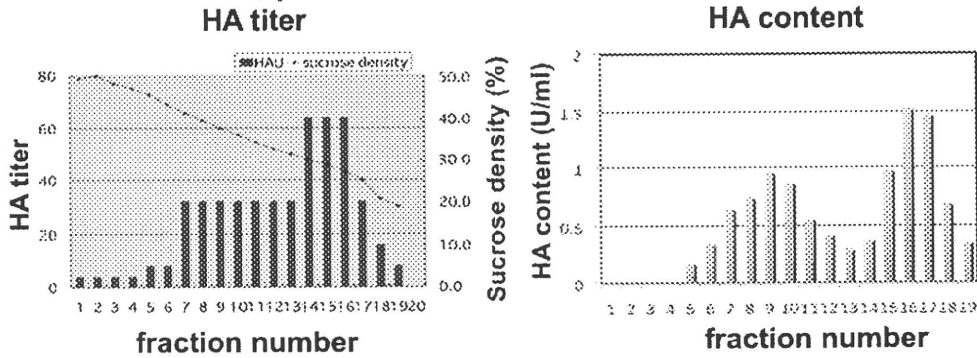
- 1) Kayoko Sato, Shigeyuki Itamura, Masato Tashiro. Development of quantitative ELISA for influenza virus haemagglutinin for the use of quality control test of inactivated influenza split-virus vaccine. Options for the control of influenza VII, Hong Kong, Sept. 3-7, 2010.

G. 知的所有権の取得状況

a) H1N1pdm monovalent



b) H3N2 monovalent



c) B monovalent

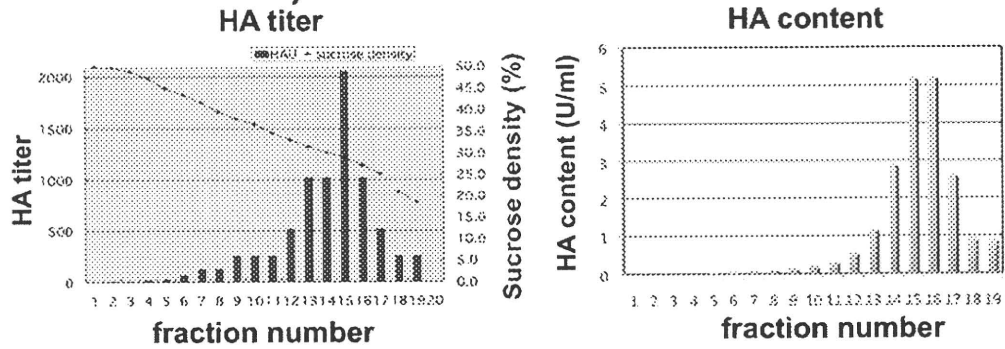


図1. 単原液ワクチンの従来法の HA 活性による検出法とキャプチャー-ELISA 法による検出法による分画試験成績

d) H1N1pdm, H3N2, B trivalent

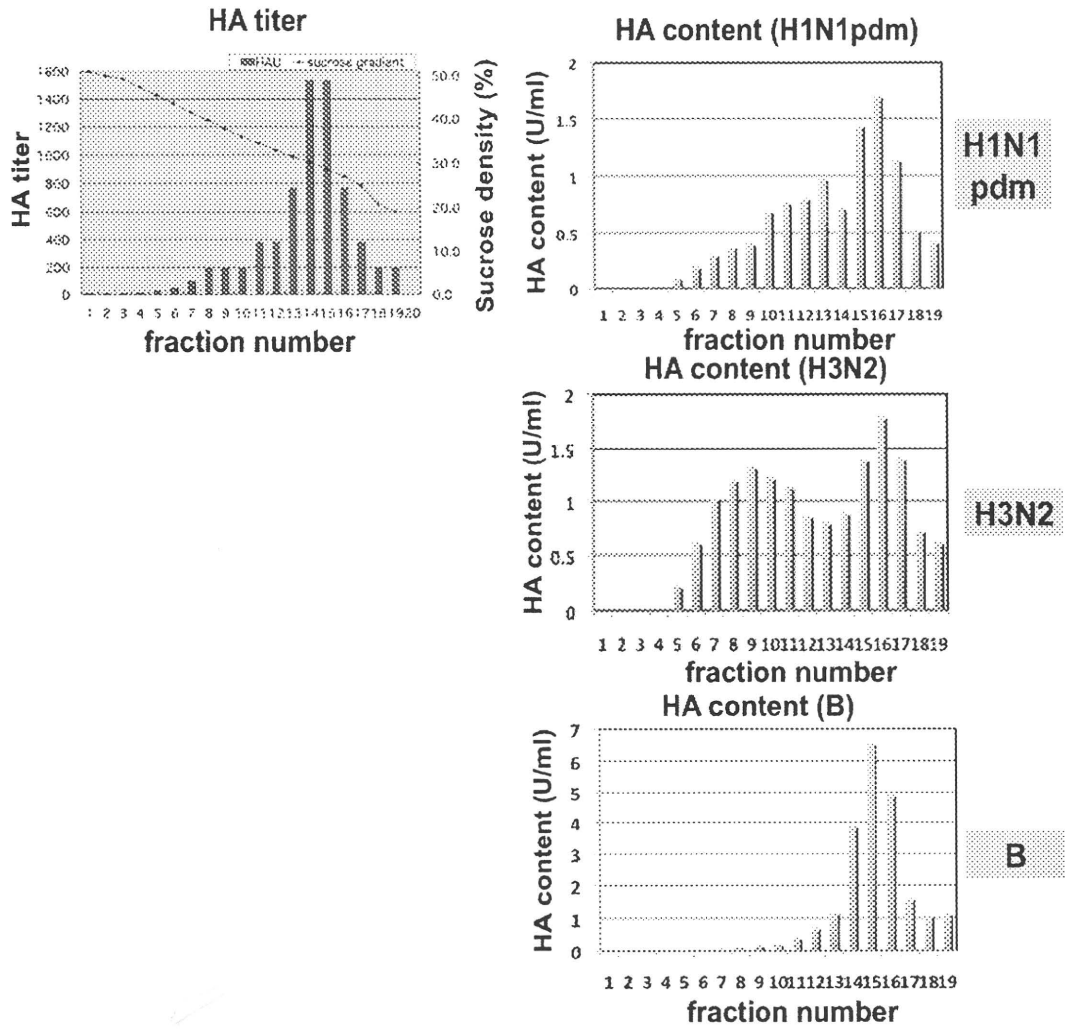


図2. 単原液ワクチン3種類を混合したワクチンの従来法の HA 活性による検出法とキャプチャー-ELISA 法による検出法による分画試験成績

新規ワクチンアジュバントの品質管理・安全性に関する研究

研究協力者： 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

要旨 アジュバント含有ワクチン製剤は近年多岐に渡り、その作用機序も多様化して来た。このような次世代型のワクチンに関して、その有効性や品質の評価方法開発は未熟であり早急に解決されなければならない課題である。我々はインフルエンザワクチン接種に伴いマウス肺組織で上昇するマーカー遺伝子群について、CpG ODN アジュバント含有 HA ワクチンの経鼻接種における応答を QuantiGene Plex 法を用いた遺伝子発現の一括測定で解析した。マーカー遺伝子群は全粒子インフルエンザウイルスワクチン腹腔内投与マウスの網羅的遺伝子発現解析から同定されたものであるが CpG アジュバント含有ワクチンの経鼻投与においてもほとんどの遺伝子で同様に発現上昇が認められ、使用したアジュバントの効果的な免疫賦活化能が認められた。これらのことから次世代のアジュバントの有効性・品質の確認に遺伝子発現レベルの変動解析は有効であることが考えられた。

A. 研究目的

近年、新規に販売承認されるワクチンには、免疫賦活化能を高める目的でアルミニウムアジュバントや MPL、スクワレンなどアジュバントを添加する製品が増加している。使用されるアジュバントは多岐に渡り、また今後も多様化が期待される昨今であるが、その安全性へ国民の関心が高まる中で、多種多様なアジュバントの安全性と有効性の評価に関する指標が不足もしくは欠如していることは、速やかに解決しなければならない課題の一つである。

そこで、アジュバント添加ワクチンの高度な品質管理を行うために、今回アジュバントを添加した経鼻インフルエンザウイルスワクチンを接種した動物における生体反応の変化を血液学的、免疫学的に解析、また遺伝子発現のアレイ解析から得られた情報を元に有効性評価や品質管理の指標となるバイオマーカーを探索することを目的として解析を行った。

B. 研究方法

1) 動物 Balb/c マウスを購入し、1週間の環境馴化期間を置き実験に使用した。

2) ワクチンとアジュバント： インフルエンザ HA ワクチン A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) および CpG アジュバント K3 をそれぞれ 1.5ug/mouse、10 μg/mouse 使用した。ワクチンおよびアジュバントは医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト石井健博士より供与されたものを使用した。

投与方法： Balb/c マウス(7週齢、1群5匹)

にネンブタール麻酔下でワクチン 30 μl を経鼻投与した。

3) 検体採取：血液、臓器および RNA 抽出 エーテル麻酔下のマウスの腹腔動脈より血液を採集した。肺を採取し PBS で洗浄後 RNeasy later にて RNA を安定化した。肺組織から ISOGENE で RNA を抽出した。

4) 血液学的解析 赤血球数、白血球数および血小板数などの血算は血球計算機（日本光電）で行った。末梢血を IOTest3 処理にて溶血後、それぞれの蛍光標識細胞表面抗体 (Sca-1, c-kit, Mac-1, Gr-1, lineage Marker 等) に対する抗体で染色し、FACS (JSAN) で解析した。

Quanti Gene Plex (QGP) 解析 200-400ng の total RNA を用いて QGP assay を行った。検出は、各遺伝子の発現量は β-actin のシグナルで補正した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) ワクチン経鼻投与後のマウスの体重変化および血液像： 生理食塩水、HA ワクチン単独 (HA)、CpG アジュバント含有 HA ワクチン (HA+CpG) をそれぞれ経鼻投与し、投与後 1 日目においてそれぞれの群の体重変化、血算を解析した (Fig. 1)。体重変化は HA+CpG 投与群において体重減少が認められたものの、目視ではマウスの体調の変化は認められなかった。また末梢血の血算においても赤

血球数、白血球数、および血小板数に顕著な変化は認められなかった。

2) ワクチン投与後のマウスの白血球細胞表面マーカーの変化

ワクチン経鼻投与後1日目の末梢血単核球の細胞表面マーカーの変化をフローサイトメーターで解析した。HA+CpG ワクチン投与群において、末梢血 Mac-1 陽性細胞が顕著に増加した。また興味深いことに lineage マーカー陽性細胞と陰性細胞の両方の細胞分画において HA+CpG ワクチン投与後1日目の群で特異的に Sca-1 陽性細胞集団の出現が認められた (Fig. 1 C)。

3) ワクチン投与後のマウス肺組織における遺伝子発現変化

これまで我々はインフルエンザウイルス HA ワクチンや全粒子インフルエンザワクチンを腹腔内に接種したマウスやラットにおいて様々な臓器で特異的に変化する遺伝子群を網羅的アレイ解析で解析して来た。ワクチン接種によって変動する遺伝子の変化は、一般的に毒性の評価の指標となる肝臓等よりも肺組織で最も顕著な変化が認められる。その中で全粒子インフルエンザワクチン接種群において特異的に発現変化するマーカー遺伝子 18 個の特定に成功した。これらの遺伝子群は全粒子ワクチンの接種量に依存して発現増加が認められ、ワクチンの有効性や品質の検討の際の指標として有用であることを示した。今回のワクチンを経鼻投与したマウスの肺組織においても、同定したマーカー遺伝子の発現変動が同様に認められるか検討した (Fig. 2)。ワクチン投与後1日目の肺の RNA を用いて QGP アッセイで解析し、遺伝子変化を定量した。アジュバント含有インフルエンザ HA ワクチンの経鼻投与で、ほぼすべてのマーカー遺伝子群 (Psmel, Timp1, Tap2, C2, Trfd1, Irf7, Cxcl11, Psmb9, Cxcl9, Csf1, Lgals9, Lgals3bp, Zbp1, Mx2, Ifi47, Tapbp) の著しい上昇が認められた。これらの遺伝子発現量の変化は HA 投与群では、生理食塩水投与群と同程度の発現量であったことから、HA+CpG 投与群に特異的に認められる遺伝子発現の変化であることが考えられた。これらのことから、今回のアジュバント含有 HA ワクチンの経鼻投与は、全粒子インフルエンザワクチンをマウスやラットに腹腔内投与した場合と同様の生体反応を引き起こすことが示唆された。

D. 考察

今回実験に用いた CpG ODN アジュバントは、医薬基盤研究所で開発中のワクチンアジュバントであるが、アジュバント含有ワクチンの経鼻投与

におけるマウスの遺伝子レベルでの生体反応は、全粒子インフルエンザワクチンを腹腔内投与した場合と同様に特異的にマーカー遺伝子群が発現上昇を示したことから、その有効性は極めて高いことが期待される。我々の同定したマーカー遺伝子群の中には、炎症によって誘導されると考えられる遺伝子が多く含まれることから、今後は血中や臓器におけるサイトカインの発現量変化を解析し、これらの遺伝子変動と関連するか確認する必要があると考えられる。

アジュバント含有ワクチン接種後1日目のマウスにおいてのみ特異的に Sca-1 陽性細胞集団の著しい増加が認められた。Sca-1 はもともと抗原刺激によってリンパ球で活性化される分子として同定された分子であり、活性化リンパ球やインターフェロン α/β や γ の存在下で発現が上昇することが知られる。つまりアジュバント含有ワクチンを経鼻投与後1日目のマウス末梢血では高率でリンパ球が活性化されていることが示唆された。今回認められた Sca-1 陽性細胞がどのようなメカニズムで出現し、それらの細胞集団が担当する免疫学的な機能がワクチンの有効性にどう関与するのか、また肺組織で変動したマーカー遺伝子群は、末梢血の Sca-1 陽性細胞集団の出現に関連するものであるか等々、今後骨髄細胞や脾臓、肺組織の細胞集団も含めて血液学・免疫学的に解析を進めることで明らかにする。

E. 結論

近年、ワクチンの形状は多岐に渡るようになったが、ワクチンを接種した動物の網羅的遺伝子解析から得られた情報をもとに、その特性や有効性を明らかにすることが可能になって来たと考えられる。今後、遺伝子発現情報をもとに分子レベルで解析することによって、より明確で詳細な有効性評価法や品質管理・安全性評価法が確立できると期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Momose, H., J. Imai, I. Hamaguchi, M. Kawamura, T. Mizukami, S. Naito, A. Masumi, J. Maeyama, K. Takizawa, M. Kuramitsu, N. Nomura, S. Watanabe & K. Yamaguchi (2010) Induction of indistinguishable gene expression patterns in rats by Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines. *Jpn J Infect Dis*, 63, 25-30.

2. 学会発表

百瀬暖佳、水上拓郎、倉光球、益見厚子、滝澤和也、前山順一、浜口功、遺伝子発現解析を応用したインフルエンザ HA ワクチンの新たな安全性評価法構築へ向けた試み、第14回日本ワクチン学会学術集会、東京、平成21年12月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

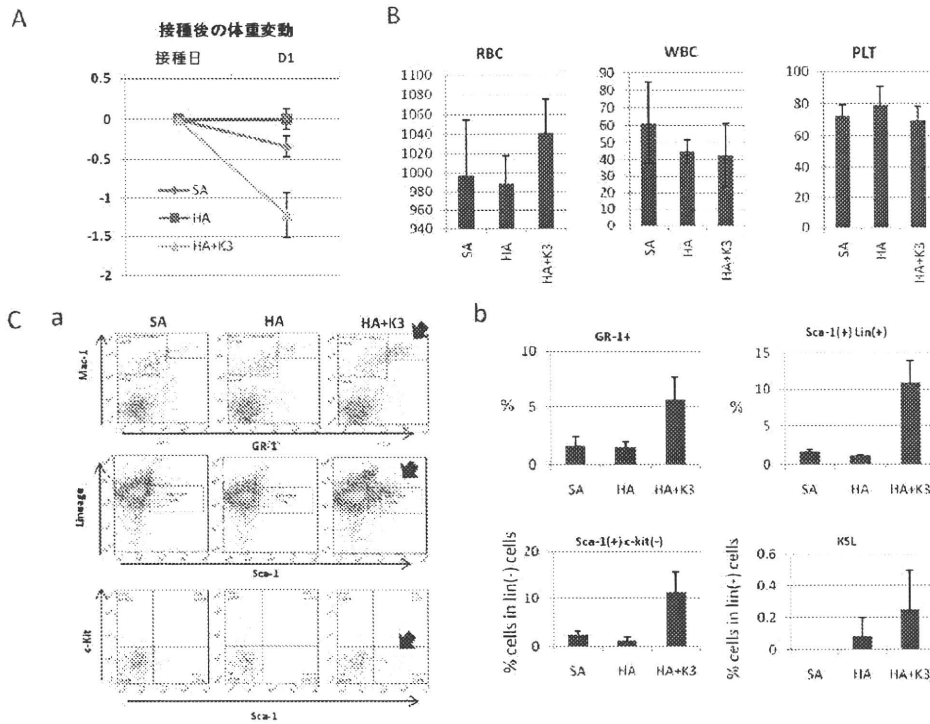


Fig.1 ワクチン経鼻投与後1日目のマウスの体重変動・血液学的解析

生理食塩水(SA)、インフルエンザHAワクチン単独(HA)、およびCpG ODNアジュバント含有インフルエンザHAワクチン(HA+K3)をそれぞれ1群5匹に経鼻投与し、投与後1日目の体重変動と血液の解析を行った。A. 接種後マウスの体重変動。B. 血算。C. 末梢血単核球の表面抗原マーカー解析。a それぞれの群の代表的FACS像を示す。b 1群5匹のFACS解析結果をグラフ化した。

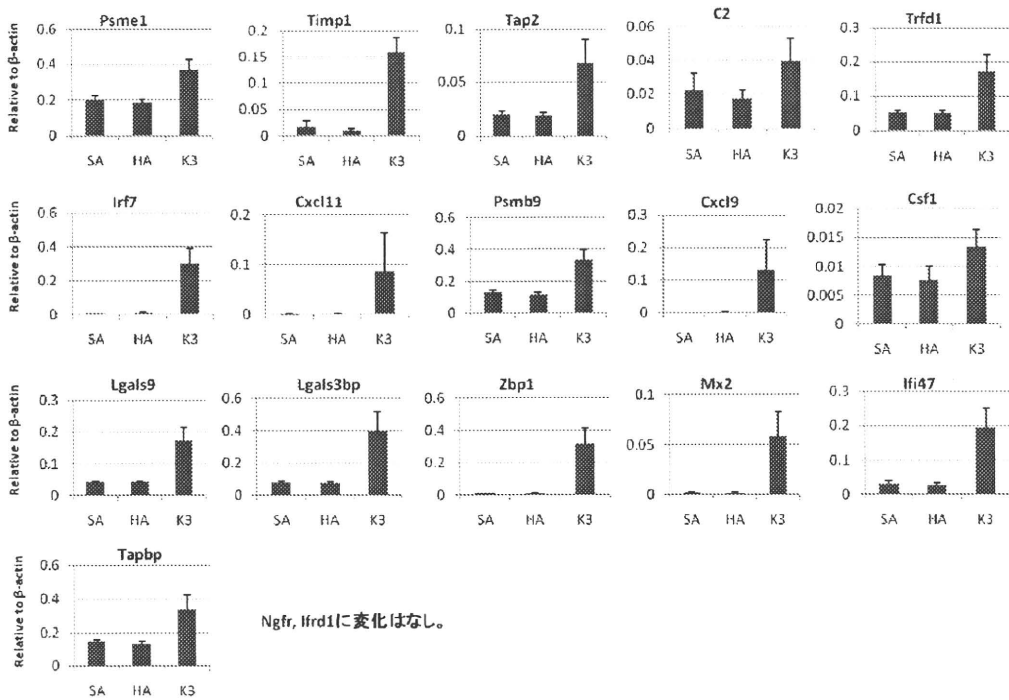


Fig.2 ワクチン経鼻投与後1日目のマウスの遺伝子発現変化

生理食塩水(SA)、インフルエンザHAワクチン単独(HA)、およびCpG ODNアジュバント含有インフルエンザHAワクチン(K3)をそれぞれ1群5匹に経鼻投与し、投与後1日目の肺組織の遺伝子発現をQuantigene Plex法で一括測定した。

B型肝炎ワクチン力価試験の *in vitro* 代替法の検討

研究協力者： 石井 孝司 国立感染症研究所 ウイルス第二部

要旨

B型肝炎ワクチンの力価検定について、これまで我々は *in vitro* 試験の Binding ELISA を検討し、アジュバント除去処理のバラツキ、各製剤の特性の違いから製剤ごとの参照ワクチンが必要であると結論づけた。近年、アジュバント除去が不要な Inhibition ELISA が海外メーカーや WHO で検討されている。我々は WHO が検討した Inhibition ELISA を参考に *in-house* Inhibition ELISA を構築し、力価検定への応用を検討した。

In-house Inhibition ELISA は、使用した一次抗体候補いずれもワクチン濃度に応じた Inhibition rate を示し、アッセイが成立した。同じ一次抗体を用いた Inhibition ELISA の再現性は良いが、一次抗体が異なると同じワクチンでも異なる値を示した。国内参照品をリファレンスとした相対力価は製造所ごとに偏り、各製剤の特性を考慮した製造所固有の参照ワクチンが必要である点は Binding ELISA と同様の結果になった。

A. 研究目的

B型肝炎ワクチンの力価検定は、検定対象ワクチンと、臨床的に有効と評価された承認時のワクチンとの一貫性を保証するものである。

日本の国家検定及びワクチン製造所の自社検定は *in vivo* 試験を実施しているが、海外では *in vivo* 試験にバリエーションされた *in vitro* 試験も承認されている。*in vitro* 試験は *in vivo* 試験に比べて試験期間が短く、動物を使わないので動物愛護の理念に則し、個体差の影響がなく、試験精度の向上が見込まれる。

これまで、我々は *in vitro* 試験の Binding ELISA を検討し、アジュバント除去処理のバラツキ、各製剤の特性の違いから製剤ごとの参照ワクチンが必要であると結論づけた。近年、アジュバント除去が不要な Inhibition ELISA が海外メーカーや WHO で検討されている。我々は WHO が検討した Inhibition ELISA を参考に *in-house* Inhibition ELISA を構築し、力価検定への応用を検討した。

B. 研究方法

Inhibition ELISA はワクチンと抗HBs抗体（一次抗体）を混合し、ワクチンに結合せずに余った一次抗体を回収して HBs 抗原固相化プレートと標識抗 IgG 抗体（二次抗体）で検出する。一次抗体候補として、抗 HBs マウスモノクローナル抗体、ワクチン接種者抗体、二次抗体はそれぞれに応じて、標識抗マウス IgG 抗体、標識抗ヒト IgG 抗体を使用した。

国内参照ワクチン、市販ワクチン（3製造所、各数ロットずつ）の Inhibition ELISA を行い、国内参照ワクチンに対する市販ワクチンの相対力価を Inhibition rate の平行線定量法で算出した。

（倫理面への配慮）

研究対象者への HB ワクチン接種については十

分なインフォームドコンセントのもとに行うとともに、対象症例のプライバシーの保護に十分留意する。また動物実験に際しては動物愛護の観点から 3R (Replacement, Reduction, Refinement) に基づき適正に実施する。

C. 研究結果

In-house Inhibition ELISA は、使用した一次抗体候補いずれもワクチン濃度に応じた Inhibition rate を示し、アッセイが成立した。同じ一次抗体を用いた Inhibition ELISA の再現性は良いが、一次抗体が異なると同じワクチンでも異なる値を示した。国内参照ワクチンをリファレンスにした *in vivo* 相対力価は製造所によって偏り、一元的な比較は不可能であった。

D. 考察

今回検討した *in-house* Inhibition ELISA は Binding ELISA に比べると、アジュバント除去操作が不要で簡便であり、ワクチン含有量と Inhibition rate が相関して、アッセイが成立した。国内参照品をリファレンスとした相対力価は製造所ごとに偏り、各製剤の特性を考慮した製造所固有の参照ワクチンが必要である点は Binding ELISA と同様の結果になった。

E. 結論

一次抗体が異なると同じワクチンでも相対力価が異なるため、一次抗体を選択する際に注意が必要である。この点から、我々が検討した *in-house* Inhibition ELISA は長期継続的なワクチンの国家検定および自社検定には適していないと考察された。

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

清原知子、石井孝司、脇田隆字：B型肝炎ワクチ

ンの *in vitro* 試験：Inhibition Assay、第14回日本
ワクチン学会、平成22年12月、東京

G. 知的所有権の取得状況

なし

風しん生ワクチンの動物使用試験の代替法に関する研究

研究協力者： 森 嘉生 国立感染症研究所 ウイルス第三部

要旨

風しん生ワクチンのマーカー試験ではモルモットにワクチンを接種し、抗体価の上昇がみられないことを確認する。風しんワクチン株5株は、いずれも増殖に温度感受性があることから、体温の高いモルモットでは増殖できず、抗体価が上昇しないのではないかと考えられている。本研究では、ワクチン検定に使用する動物の削減を目的に、培養細胞を用いた高温増殖性試験が、マーカー試験の代替法にならないかを検討した。その結果、全てのワクチン株はマーカー試験と高温増殖性試験の結果が相関していた。しかし、ワクチン株から分離した高温増殖性復帰クローンや、一部の野生型ウイルスでは、マーカー試験と高温増殖性試験の結果が相関しなかった。よって、培養細胞を用いた高温増殖性試験をマーカー試験の代替法とするためには更なる検討が必要であると思われた。

A. 研究目的

風しん生ワクチンのマーカー試験ではモルモットにワクチンを接種し、抗体価の上昇がみられない場合に適合となる。日本で承認されている風しんワクチン株5株は、いずれも増殖に温度感受性があることから、体温の高いモルモットでは増殖できず、抗体価が上昇しないのではないかと考えられている。一方、実験動物愛護の観点から、使用動物数の削減が求められている。そこで本研究では、ワクチン検定に使用する動物の削減を目的に、培養細胞を用いた高温増殖性試験が、マーカー試験の代替法にならないかを検討した。

B. 研究方法

培養細胞を用いた風疹ウイルスの高温増殖性試験は、ウイルスを接種した細胞を 39°Cおよび 35°Cで培養し、ウイルス増殖性を比較することで行った。

風しんワクチン5株、ワクチン株の親株を含む野生株4株、および T0-336 ワクチン株より高温馴化を行い高温で増殖可能となった高温増殖性復帰クローン1株の合計10株について、マーカー試験および高温増殖性試験を行い、両試験法の相関性を検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は国立感染症研究所 動物実験実施規定に基づき、動物愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

ワクチン株5株は全て、マーカー試験においてモルモットに対する抗体誘導能を示さず適合した。また、いずれのワクチン株も高温培養における培養細胞での増殖性を示さなかったことから、マーカー試験と高温増殖性試験の結果が一致していた。

一方、全ての野生型ウイルスは、モルモットに対する抗体誘導能を保有しており、マーカー試験に不適合であった。しかし、野生株3株については培養細胞での高い高温増殖性を示し、両試験の

結果は一致したが、1株においては高温増殖性が弱く、両試験の結果は一致しなかった。

逆に高温増殖性復帰クローンは培養細胞での高い高温増殖性を示したが、モルモットに対しては弱い抗体誘導能しか示さずマーカー試験に適合した。すなわち高温増殖性復帰クローンにおいては、高温増殖性試験とマーカー試験の結果が一致しないことが分かった。

D. 考察

本研究の結果より、日本で承認されている風しんワクチン株は、いずれもモルモットに対する抗体誘導能を持たないが、その原因を温度感受性だけで説明することは困難であることが分かった。一方、野生株でも温度感受性株が存在していたものの、感受性の程度はワクチン株に比べ軽微であった。また、高温増殖性復帰クローンは特殊な条件で獲得したクローンであり、ワクチン製造過程で産生される可能性は非常に低いと考えられる。以上のことを考え合わせると、培養細胞を用いた高温増殖性試験はマーカー試験の代替法として今後使用できる可能性があるものと思われる。

E. 結論

培養細胞を用いた高温増殖性試験はマーカー試験の代替法として使用できる可能性があるものの、更なる検討が必要であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Otsuki N, Abo H, Kubota T, Mori Y, Umino Y, Okamoto K, Takeda M and Komase K. Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine virus phenotypes. Vaccine, 2011. In press.

2. 学会発表

大槻紀之、阿保 均、久保田耐、森 嘉生、海野幸子、岡本貴世子、竹田 誠、駒瀬勝啓。風疹ウイルスによるモルモットでの抗体誘導は温度感受性と一致するわけではない。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010

大槻紀之、阿保 均、久保田耐、森 嘉生、海野幸子、岡本貴世子、竹田 誠、駒瀬勝啓。T0-336風疹ワクチン株及びその関連株における温度感受性とモルモットにおける抗体誘導能の比較。第14回日本ワクチン学会学術集会、2010

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し

経口生ポリオウイルスワクチン検定方法の改変

研究協力者： 片山和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部

要旨

ポリオウイルスワクチンは現在、弱毒化経口生ワクチンとして供給されている。当ワクチンの中間段階バルク品の検定には、カニクイザル、アフリカミドリザルの腎臓初代培養細胞を用いるウイルス力価試験、弱毒化マーカー試験、外来性ウイルス迷入否定試験が含まれており、多くの霊長類の生命を必要とする。本研究では、貴重な霊長類資源の節約を行うと共に、作業効率の向上、試験安定性の向上を目指し、腎臓初代培養細胞と同等の性質を有する株化培養細胞を開発し、それを用いた代替試験法の開発を試みた。

A. 研究目的

ポリオウイルスワクチンとして供給されている弱毒化経口生ポリオウイルスワクチン（OPV）は、セービン博士によって開発された神経病原性のない弱毒化ウイルス株であるセービン株の異なる3つの血清型 Sabin type 1, 2, 3 の混合ワクチンである。本ワクチンは、接種者体内で増殖し、それに伴う接種者体内の抗ポリオウイルス反応を誘導する。しかし、本ワクチン株は、神経指向性を示さず、麻痺などの神経病原性がない。通常、装飾後速やかに体外に排泄される。

本ワクチンの検定には、リバータントの出現を予防、検出するために、嚴重な神経病原性の確認、弱毒化の確認が行われている。本ワクチンは、アフリカミドリザルの腎臓初代培養細胞で増殖させ、製造するため、サルに由来するウイルスの迷入、最近の迷入、結核菌などの迷入を否定する試験も行われている。

これらの試験の内、カニクイザル、アフリカミドリザルなどの腎臓初代培養細胞を用いたウイルス力価試験、弱毒化マーカー試験、外来性ウイルス迷入否定試験は、細胞を得るために多くの霊長類の生命を必要とする。本研究では、貴重な霊長類資源の節約を行うと共に、作業効率の向上、試験安定性の向上を目指し、腎臓初代培養細胞と同等の性質を有する株化培養細胞を開発し、それを用いた代替試験法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

・細胞

アフリカミドリザル腎臓初代培養細胞を継代培養して得られた GL-37 細胞は、A 型肝炎（HAV）感受性細胞として、感染研の戸塚らによって樹立された細胞である。本細胞は、継代数が 60 世代以上にわたっても HAV 感受性が損なわれ無いたことが確認されている。本研究では、GL-37 細胞をアフリカミドリザル腎臓初代培養

細胞の代替細胞として用いた。GL-37 細胞は、目的環境下で 10~20 代の継代培養を行い、LowPH コンディションまたは、40℃に順化させた。

カニクイザル腎臓初代培養細胞の代替細胞としては、OPV 小分け製品のウイルス力価試験に使用している HEp2 細胞を用いた。

・弱毒化マーカー試験（d-marker, t-marker test）

d-marker 試験は、ワクチン株が PH 感受性を示し、Low PH コンディション下でプラーク形成速度が低下する現象を確認する試験である。通常の細胞は Low PH コンディションで細胞を維持できないため、PH 抵抗性のあるカニクイザル腎臓初代培養細胞以外の細胞での試験は不可能であった。

GL-37 細胞と、カニクイザル腎臓初代培養細胞を T25 フラスコまたは、6 well plate にほぼコンフルエントになるように捲き込み、100%コンフルエントとなった翌日に、ワクチン株、野生株をそれぞれ接種した。異なる PH コンディションのアガロースオーバーレイでコートし、35.5℃の CO₂ インキュベータにインキュベートし、ニュートラルレッドによる染色で 3-5 日後にプラークの出現を観察した。

t-marker 試験は、ワクチン株が温度感受性を示し、40℃インキュベータでは、プラーク形成能を失うことを確認する試験である。通常の細胞は 40℃のコンディションで細胞が生存できないため、温度抵抗性のあるカニクイザル腎臓初代培養細胞以外の細胞での試験は不可能であった。

野生株も 40℃では、プラーク形成が僅かであり、判断が厳しい場合もあるため、参考値として 39℃もテストする。GL-37 細胞と、カニクイザル腎臓初代培養細胞を T25 フラスコまたは、6 well plate にほぼコンフルエントになるように捲き込み、100%コンフルエントとなった翌日に、ワクチン株、野生株をそれぞれ接種した。

同じ条件のアガロースオーバーレイでコートし、37°CのCO₂インキュベータにインキュベートし、ニュートラルレッドによる染色で3-5日後にプラークの出現を観察した。35.5°C, 39°C, 40°Cのwater bathもしくはCO₂インキュベータにインキュベートし、4日後にプラーク数を比較した。

・外来性ウイルス迷入否定試験

ワクチン液をT75フラスコにコンフルエントに蒔き込んだアフリカミドリザル腎臓初代培養細胞に接種し、約4週間(2週間終了後、一度継代し、更に2週間観察)細胞を観察する。細胞に異常が認められない場合、試験が成立する。アフリカミドリザル腎臓初代培養細胞は、コンフルエントから2週間維持培養が可能であるが、通常の細胞は維持できない。

アフリカミドリザル腎臓初代培養細胞とGL-37細胞をT75フラスコにコンフルエントになるように培養し、ワクチン液を接種した。その後、アフリカミドリザル腎臓初代培養細胞とGL-37細胞を同一成分の培地で維持し、約4週間(2週+2週)の観察を行い、CPEの有無を観察すると共に、培養上清の研究吸着反応を確認した。

・ウイルス力価試験

HEp2およびカニクイザル腎臓初代培養細胞を用いて力価試験、同定試験を行い結果を比較検討した。

(倫理面への配慮)

研究は、動物実験の指針に基づいて計画を申請し、審査を経て受理された後、研究を施行した。ヒト臨床検体は用いていない。また、組換え体も用いていない。ワクチンを含むウイルスは、バイオセーフティの基準に沿って取り扱った。

C. 研究結果

弱毒化マーカー試験(d-marker, t-marker test)

GL-37細胞は、d-markerにおいて、カニクイザル腎臓細胞とほぼ同等のPH耐性を示し、プラークサイズも良好。統計学的に同等の試験結果が得られた。t-marker testにおいても、GL-37細胞は、カニクイザル腎臓細胞とほぼ同等の温度耐性を示し、プラークサイズも良好であった。しかし、オーバーレイに用いるアガーロットの影響を受ける傾向が認められた。現在、統計学的データ解析を行っている。

力価試験におけるHEp2細胞は、N2チュアールから取り出し、継代培養を少なくとも2回以上繰り返さないとカニクイザル腎臓初代培養細胞よりもウイルス感受異性が劣ることが明らかになった。しかし、継代培養を繰り返し、状態が安定してくると、カニクイザル腎臓初代培養細胞よりも若干であるが、高感度になる傾向が認められた。しかし、アッセイ間変動はHEp2細胞が統計学的に有為に優れていた。

D. 考察

GL-37細胞のPH耐性は、カニクイザル腎臓初代培養細胞と同等以上であった。ポリオウイルスプラークサイズは、GL-37細胞の方が均一であり、プラーク形状も真円に近く、判定が容易であった。この傾向は、温度耐性についても同様であった。しかし、GL-37細胞はアガーロットの違いによって、細胞の生存性に影響が出る傾向が認められた。T-markerにおける試験の安定性向上のためには、培地の組成を含め、重金属、塩類の含有量などを微調整し、アガーのロット間鎖に影響を受けないように条件をコントロールする必要がある。

ウイルス同定試験、力価試験にHEp2を用いることについては、HEp2の再生初期の感受性不良を考慮に入れ、細胞をN2チュアールから起こしてから、2継代以上の継代培養を行うことを条件に代替が可能であると思われる。

アフリカミドリザルの腎臓初代培養細胞を用いた外来性ウイルス迷入否定試験は、GL-37細胞のウイルス感受性について、更なる検討が必要であると思われる。

E. 結論

カニクイザル腎臓初代培養細胞を用いたd-marker, t-marker test, ウイルス力価試験、同定試験を、アフリカミドリザル由来株細胞GL-37に置き換えることに成功した。本改良法により、検定に用いるサル総数から8頭のサルを減らすことに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：本年度は無し
2. 学会発表：本年度は無し

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：無し
2. 実用新案登録：無し

生物学的製剤の品質管理用統計解析ソフトウェア開発に関する研究

研究協力者：落合雅樹 国立感染症研究所 検定検査品質保証室

要旨

生物学的製剤の品質管理に用いられる生物定量法の試験データ解析には、平行線定量法及びプロビット法等が用いられるが、市販統計解析ソフトウェアはこれらの解析には対応していないのが現状である。そこで平行線定量法及びプロビット法による統計学的方法に特化した統計解析ソフトウェアを設計・開発し、作成したソフトウェアに対してバリデーションを行い解析結果の信頼性を確認した。

A. 研究目的

生物学的製剤の国家検定あるいは製造所の自家試験の試験データを解析する際に、適切な統計学的手法を用いることは解析結果の信頼性を保証する上で重要である。とくに医学、生物学における試験データは誤差が大きいことが多く、その結果を客観的に判断するためには、統計学的な理論及び手法の適用が必須である。生物定量法における試験データの解析には Finney*が体系化した統計学的方法（平行線定量法及びプロビット法）があるが、市販統計解析ソフトウェアではこれらの方法を用いた解析を行うことができないのが現状である。本研究は、これらの統計学的方法に対応した専用ソフトウェアを作成し、生物学的製剤における品質管理の質及び利便性の向上を図ることを目的とする。

* Finney DJ. (1978) Statistical Methods in Biological Assay, 3rd Ed. Griffin, London.

B. 研究方法

1. ソフトウェア設計

生物学的製剤の品質管理に用いられる生物定量法の試験データ解析においては、平行線定量法及びプロビット法がしばしば用いられるが、市販の統計解析ソフトウェアを使用した場合、これらの方法による統計学的解析を行うことはできない。国立感染症研究所で作成され品質管理に用いられてきた統計解析ソフトウェアは、Microsoft Windows VistaあるいはWindows 7上で正常に動作しないことが明らかになっている。したがって、これらのオペレーションシステム(OS)上で動作する専用ソフトウェアを作成し、引き続き品質管理に用いられる生物定量法のデータ解析を支援することは、生物学的製剤の検定検査の品質を確保する上で重要である。そこで、従来のソフトウェアの仕様をベースとして、機能改善により品質管理の質及び利便性の向上を図るため、ソフトウェアの設計（仕様書の作成）を行った。

2. ソフトウェア開発

ソフトウェア開発（プログラミング等）はソフトウェア仕様書に基づき、外部委託により実施した。

3. ソフトウェアのバリデーション

作成されたソフトウェアの仕様書に定められた性能要件への適合性及び解析結果の信頼性を確認した。必要に応じ、計算部分のプログラムソースの検証を行った。

（倫理面への配慮）

本研究において、倫理面への配慮が必要な情報や材料等は扱っていない。

C. 研究結果

ソフトウェアを設計するにあたり、本研究で開発するソフトウェアが対応する統計学的方法は従来同様、平行線定量法（図1）とプロビット法（図2）とした。ソフトウェアの基本要件としては、OS: Microsoft Windows XP, Windows Vista, Windows 7上で動作すること、Excelファイル: Microsoft Excel 2003, 2007, 2010で作成したファイル(xls, xlsx形式)が読み込めること、テキストファイル(txt, csv形式)が読み込めることとし、多くのWindows、Officeバージョンに対応することで、汎用性の高いソフトウェアとして利用可能であることを要件とした。

本ソフトウェアの基本機能（図3）として、

1. 統計解析
平行線定量法及びプロビット法の解析に特化し、簡便な操作により解析を可能とする
2. 蓄積データの利用
蓄積データの度数分布グラフや結果推移グラフの表示を可能とする
蓄積データをファイル出力する機能を有し、他のソフトウェアによる加工を可能とする
3. メンテナンス
蓄積データのバックアップ機能等を有することとした。

本ソフトウェアは、平行線定量法及びプロビット法による統計学的な解析に対応するだけでなく、品質管理の質的向上に寄与するため、本ソフ

トウェアの解析結果保存により蓄積された解析データを度数分布グラフとして表示可能であり、また表示対象データの絞り込み、検体情報指定により指定した検体の階級の表示等が可能であることを要件として開発した。さらに、解析結果保存により保存した解析データについて結果推移グラフの表示が可能なものとした。近年、データトレンドのモニタリングは国際的に品質管理上重要な評価手法の一つとして位置づけられており、結果推移グラフの表示機能は、こうした国際的な流れに対応しうるものになっている。表示対象データの絞り込み機能については、今後ワクチンの混合化が進み、同一疾患に対するワクチン製品が増加した場合においても、複数製品を選択して絞り込みができるものとした。製造所の絞り込みについても同様とした。また、保存した蓄積データから検索条件に従いデータを抽出し、テキストファイルとして出力する機能を有することで、出力ファイルをMicrosoft Excel 又はその他のグラフ作成ソフトウェア等で読み込み、データの整理や加工ができるようにした。さらに、本ソフトウェアに保存された蓄積データを保全するためのバックアップ機能を有し、バックアップ対象とするデータの選択には自由度を持たせる仕様とした。

信頼性の高い解析結果を得るため、必要に応じソフトウェアの計算部分のプログラムソースを確認し、生物統計学の専門家（堀内善信博士）の助言を受けながら計算式をプログラムソースに反映した。こうして作成されたソフトウェアにより算出される解析結果の信頼性を確認するため、参考図書の例題を使用したバリデーションを行い、分散分析結果に齟齬がないこと及び従来の統計解析ソフトウェアにより算出される解析結果と違いがないことを確認した。

また、平行性定量法及びプロビット法の解析以外の各種機能についても、ソフトウェア仕様書に定めた性能を有していることを確認した。

(参考図書)

European Pharmacopoeia 7.0: 5.3. Statistical analysis of results of biological assays and tests, 5. Examples

生物学的製剤の統計学的品質管理法、細菌製剤協会、国立予防衛生研究所 石田説而、高橋元秀

D. 考察

本研究により開発した統計解析ソフトウェアは、生物定量法により得られた試験データを簡便に平行線定量法及びプロビット法により解析することが可能であり、生物学的製剤に対する検定検査のデータ解析における信頼性確保に貢献しうるものと考えられた。また、蓄積データを基に度数分布グラフあるいは結果推移グラフの表示機能を活用することで、品質管理の質的向上につながることが期待される。生物学的製剤の品質管理試験は、医薬品製造所においても製品の品質を確認するため、生物学的製剤基準ならびに製造販売承認書等に従い実施される。製造所において実施した自家試験のデータ解析にも本ソフトウェアが活用されることは、品質管理上の意義があると考えられる。ただし、製造所で本ソフトウェアを利用する場合は、製造所の責任でバリデーションを行い、期待した解析結果が本ソフトウェアにより得られることを事前に検証しておく必要がある。

E. 結論

生物定量法の試験データ解析（平行線定量法及びプロビット法）に最適化した統計解析ソフトウェアの設計を行った。ソフトウェアのプログラミングを外部委託により実施し、作成したソフトウェアに対してバリデーションを行った結果、従来の統計解析ソフトウェアにより算出される解析結果と違いがなく、期待した解析結果が得られることが確認された。

F. 研究発表

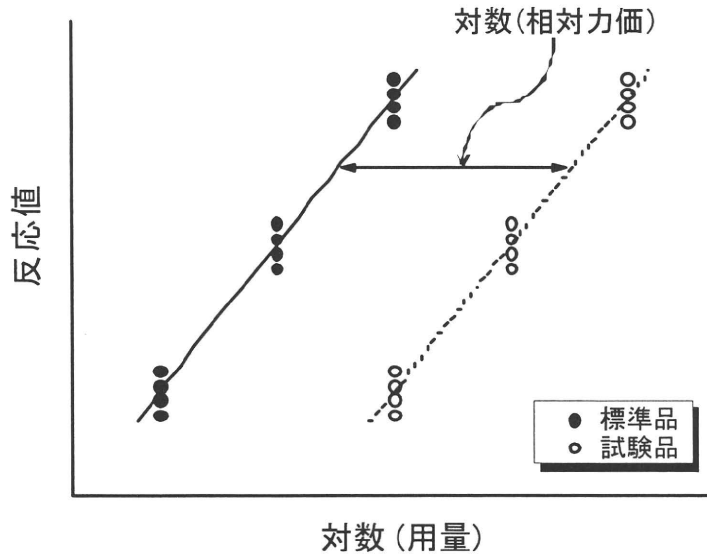
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. 平行線定量法

連続量として測定される反応値(もしくは適当な変換値)と対数用量の間に直線的な関係があり、用量回帰線の間には平行性がある場合に適用できる



用量回帰線間の水平方向の距離が生物活性の強さの違いを表す

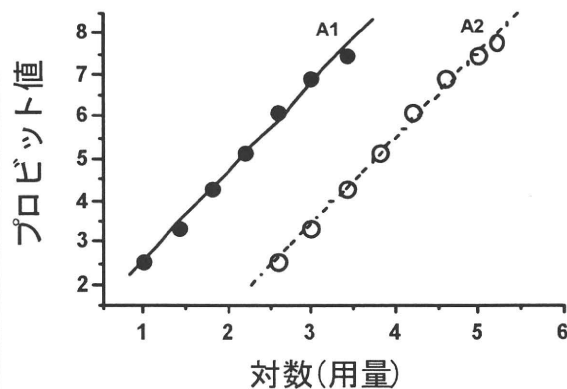
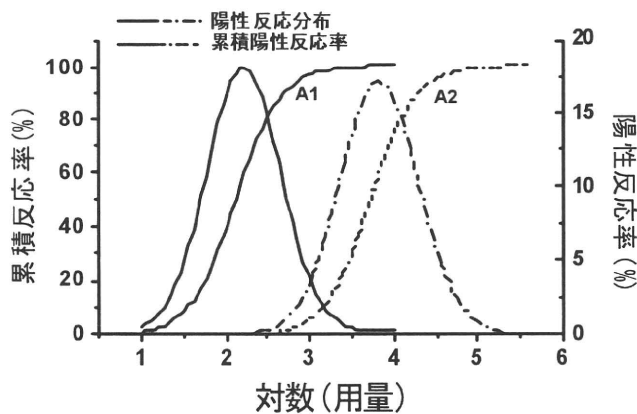


図2. プロビット法

- 用量ごとの陽性反応率(離散量、例.10匹中陽性5匹など)をプロビット変換した値を縦軸にとって用量の対数を横軸、用量-反応曲線を描くと直線で近似できる

- 平行線定量法と同様、水平方向の距離が生物活性の強さの違いを表す

図3. 基本機能

統計解析

- 平行線定量法
- プロビット法

蓄積データの 利用

- 度数分布グラフ
- 結果推移グラフ
- 解析結果出力

メンテナンス

- データバックアップ

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
岡部信彦、 多屋馨子	予防接種に関するQ&A	細菌製剤協会	予防接種に関するQ&A集2010	社団法人細菌製剤協会	東京	2010	1-155
岡部信彦、 庵原俊昭、 岡田賢司、 砂川富正、 多屋馨子、 中野貴司、 宮崎千明、 山本久美、 他	最新感染症ガイド(翻訳)	監修岡部信彦、編集米国小児科学会	最新感染症ガイド R-Book2009、日本版 Red Book 感染症の実践的なバイブル	日本小児医事出版社	東京	2011	1-996
宮崎千明(共著)	Q26) 生ワクチンの開発状況は?	鈴木宏、松本慶蔵 編集	インフルエンザの最新知識 Q&A2010 パンデミック H1N12009 第一波を振り返って	医薬ジャーナル社	大阪	2010	110-112
宮崎千明(共著)	日本脳炎	五十嵐隆ら編集	小児科臨床ピクシス 25 小児感染症-最新カレンダー&マップ	中山書店	東京	2010	140-142
宮崎千明(翻訳)	最新感染症ガイド・アトラス	監修 岡部信彦 米国小児科学会編集	最新感染症ガイド・アトラス	日本小児医事出版社	東京	2010	
今野 良	報告の実際	坂本穆彦	子宮頸部細胞診ベセスダシステム運用の実際	医学書院	東京	2010	193-209
今野 良	子宮頸がんは原因が解明されているがん、だから、本当に予防が可能!	市民のためのがん治療の会	がん治療の今第1集	文成社	東京	2010	346-351
今野 良	子宮頸がん・ワクチン最新情報	日本放送協会出版協会	きょうの健康 1月号	日本放送協会出版協会	東京	2010	94-97
今野 良	HPVワクチンによる子宮頸がん予防	伴信太郎 他	JIM, 20(4)	医学書院	東京	2010	258-260

今野 良	HPVワクチンと検診による子宮頸がんの予防	三橋 信宏 他	INNERVISION, 25(8)	欧文印刷	東京	2010	55-57
齋藤良一, 蒲地一成	百日咳菌		広範囲 血液 ・尿化学検査 , 免疫学的検査 (第七版)	日本臨 牀	大阪	2010	189-1 92
多屋馨子	ウイルス感染症患者 への対応	編集浅利誠 志、木下承皓 、山中喜代治	こんなときど うする実践感 染管理	金原出 版株式 会社	東京	2011	91-10 1

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡部 信彦	感染症の現状、感染症サーベイランス、予防接種	分子予防環境医学 ・改訂版 編・分子 予防環境医学研究 会		P. 129 -140	2010
Okada K, Komiya T, Yamamoto A, Tak ahahi M, Kamach i K, Nakano T, Nagai T, k Okabe _N, Kamiya H and Nakayama T.	Safe and effective booster immunization using DTaP in teenagers.	Vaccine	28(2010)	7626- 7633	2010
高山直秀、崎山 弘、岡部信彦、梅 本 哲	日本脳炎ワクチン第1期1, 2回 目及び追加接種の全国累積接種 率 - 2009年の調査結果	日本医師会雑誌	139(2)	411-4 14,	2010
Kamiya H, Shima da T, Okabe N.	Current Incident Status of Vaccine-Preventable Bacterial and Viral Infectious Diseases in Japan.	JMAJ	53(2)	106-1 10	2010
菅原民枝、大日康 史、多屋馨子、山 本久美、佐藤弘、 安井良則、岡部信 彦	百日咳のデータベース構築と運 用の検討	小児科	51 (7)	929-9 34	2010
大日康史、菅原民 枝、多屋馨子、山 本久美、佐藤弘、 安井良則、岡部信 彦	「Hib(b型インフルエンザ菌)感 染症発生データベース」によ るHib感染症の動向	病原微生物検出情 報	31(4)	97- 98	2010
大日康史、菅原民 枝、三野正博、島 内康宏、尾崎貴視 、香川嘉宏、岡部 信彦	水痘予防接種に対する公費補助 制度の政策評価	感染症学雑誌	84(2)	159-1 64	2010
庵原俊昭	ムンプス	小児科診療	73	S152- s154	2010
庵原俊昭	任意接種のワクチン「ムンプス」	臨床検査	54	1339- 1344	2010