〔プロジェクト研究終了報告〕

鳥インフルエンザ不活化ワクチン等性能評価に係る技術的検討

鈴木祥子、中野秀樹[1]、渡辺有美[2]、曳地七星、谷村千栄子[3]、
堀内隆史[4]、嶋崎洋子、蒲生恒一郎、荒尾恵、中村成幸

（平成 25 年 4 月 24 日受付、平成 26 年 9 月 22 日受理）

[1]：現　秋田県家畜保健衛生所
[2]：現　農林水産省動物検疫所
[3]：現　農林水産省生産局
[4]：現　神奈川県横浜市役所

［FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY］

TECHNICAL STUDY EVALUATING THE QUALITY OF AN AVIAN INFLUENZA INACTIVATED VACCINE

Shoko SUZUKI, Hideki NAKANO[1], Yumi WATANABE[2], Nanase HIKICHI,
Chieko TANIMURA[3], Takashi HORIUCHI[4], Yoko SHIMAZAKI, Koichiro GAMOH,
Megumi ARAO and Shigeyuki NAKAMURA

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
1-15-1, Tokura, Kokubunji-shi, Tokyo 185-8511, Japan

（Received : April 24, 2013; Accepted : September 22, 2014）

[1] ; Livestock Hygiene Service Center, Akita Prefecture
[2] ; Animal Quarantine Service
[3] ; Agricultural Production Bureau, MAFF
[4] ; City of Yokohama, Kanagawa Prefecture

Abstract

We aimed to evaluate the stability of an inactivated and concentrated antigen of avian influenza virus grown in chicken embryonated eggs. Vaccines were prepared from antigen preserved at 2−10 ℃ for 0, 8, 12, 18, and 24 months. Each vaccine（0 M−, 8 M−, 12 M−, 18 M− and 24 M−VAIO）was inoculated into SPF chickens and tested for its safety and potency based on the Japanese Minimum Requirement for Veterinary Biological Products

standard for avian influenza inactivated vaccine with oil adjuvant. Further, after the preservation of 0 M− and 12 M−VAIOs at the aforementioned temperature for 24 and 12 months, respectively, both vaccines were tested for their safety and potency by inoculation into chickens. All tested vaccines met the standard. The inactivated, concentrated avian influenza virus antigen was antigenically−stable for 24 months at 2−10 ℃ and the 12 M−VAIO was stable for 12 months at the same temperature. These results suggest that antigen preservation at 2−10 ℃ will be useful in establishing an avian influenza vaccine antigen−banking system.

要旨

発育鶏卵で増殖させた鳥インフルエンザウイルスの不活化濃縮抗原を冷蔵保存した場合の性能評価として、保存不活化濃縮抗原から継時的に試作ワクチンを調整し、鳥インフルエンザ（油性アジュバント加）不活化ワクチン動物用生物学的製剤基準の安全試験及び力価試験を行うこととした。２～ 10 ℃において０、８、12、18 及び 24 か月間保存した不活化濃縮抗原から調整したワクチン（0M−、8M−、12M−、18M−及び 24M−VAIO）について、安全試験及び力価試験を行ったところ、いずれの規格にも適合し、少なくとも 24 か月間の不活化濃縮抗原の保存安定性が確認された。更に、0M−VAIO 及び 12M−VAIO を２～ 10 ℃で保存し（0M−VAIO；24 か月間、12M−VAIO；12 か月間）、安全試験及び力価試験を行ったところ、いずれの規格にも適合し、12M−VAIO は少なくとも 12 か月間の保存安定性が確認された。これらの結果から、不活化濃縮抗原の２～ 10 ℃保存による抗原バンクシステムの有用性が示唆された。

緒言

平成20年度から平成22年度までの３年間に亘り実施した業務プロジェクト研究「鳥インフルエンザ不活化ワクチン等性能評価に係る技術的検討」について、その成果概要を報告する。

目的

我が国では家畜防疫の一環として、口蹄疫不活化ワクチン、豚コレラ生ワクチン及び鳥インフルエンザ不活化ワクチンを国内（動物検疫所）で備蓄している。この内、口蹄疫不活化ワクチンについては、不活化濃縮抗原を海外で備蓄（抗原バンク）しているため、抗原の長期保存が可能であり、かつ、疾病の大規模発生でワクチン接種が必要と判断された場合には小分製品の緊急製造が可能となっている。しかしながら、鳥インフルエンザワクチンについては、薬事法の規定に基づき承認を受けた最終小分製品の不活化ワクチン（H5 又は H7 亜型）を国内で備蓄しているのみである。疾病発生農場の飼養家きんについて迅速な淘汰が困難となった場合等のワクチンの緊急大量使用に備えて、口蹄疫と同様な鳥インフルエンザウイルス抗原バンクシステムや不活化濃縮抗原を備蓄する際の評価手法等について検討しておく必要がある。そこで、本プロジェクト研究では、鳥インフルエンザウイルス不活化濃縮抗原の性能評価に係る技術的検討を行った。

研究成果の概要

１．不活化濃縮抗原の性能評価手法の検討

(1) 不活化濃縮抗原の製造方法について

鳥インフルエンザ(油性アジュバント加)不活化ワクチンは、動物用生物学的製剤基準（以下「動生剤基準」という。）において、その製造方法及び規格検査方法が定められており、ワクチン製造用株を発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を濃縮・不活化後、油性アジュバントを添加して製造される。

本研究を行うに当たって、不活化前のウイルス液を保存し、ウイルス価を経時的に調べる方法について検討したが、現行のワクチン製造用株は家畜伝染病予防法の輸入禁止株に該当し、その取扱いが限定されているとともに、発育鶏卵へのウイルスの接種からウイルス浮遊液の回収及び不活化までの工程を鳥インフルエンザ専用製造区域で行わなければならず、それ以外の区域に生ウイルスを持ち出せない規定となっている。これらの規制があるため、生ウイルスの保存による検討は選択しなかった。

実際のワクチン製造においては、中間製造工程に位置する不活化ウイルス液（濃縮・不活化したウイルス浮遊液）を一定期間保存した後、アジュバントの添加及び濃度調整、保護剤の添加等を行い、小分製品としている。従って、本研究においては、動生剤基準に準拠して発育鶏卵でウイルスを増殖し、不活化後、濃縮したものを不活化濃縮抗原として供試することとした。

(2) 保存法について

ウイルスは超低温（－ 70 ℃以下）で保存することにより、ウイルスの含有量や免疫原性を損なわずに長期間保存することが可能であるため、多くのほ乳類ウイルス性ワクチンでは、ウイルスを培養細胞で増殖し、その培養上清をウイルス浮遊液として超低温で保存するのが一般的である。一方、発育鶏卵で増殖させたウイルスを用いる鶏用ウイルス性ワクチンでは、発育鶏卵の感染尿膜腔液として回収したウイルスを２～10 ℃で比較的長期間安定して保存できることが経験的に知られている。これは、尿膜腔液に保護物質が含まれるため、ウイルスないしウイルス抗原が安定的になるものと思われる。

また、超低温保存に比べて２～ 10 ℃保存の方が、超低温庫等の機器が不要で通常の冷蔵保管施設を用いることが可能であること、保存作業が簡易であること、緊急時溶解作業が不要であること等の多くの利点がある。

従って、本研究における不活化濃縮抗原の保存は、２～ 10 ℃保存とした。

(3) 性能評価法について

動生剤基準では、不活化濃縮抗原に相当する「不活化ウイルス液」については、無菌試験及び不活化試験のみが設定されており、抗原の力価を測定する試験は設定されていない。また、不活化濃縮抗原に含まれる発症防御に係わる免疫抗原は、現時点では明確に特定されていないため、当該物質を直接定量し、その活性を調べることはできない状況である。そこで、保存する不活化濃縮抗原から継時的に試作ワクチンを製造し、動生剤基準の力価試験を準用して試験を行うことによって、不活化濃縮抗原の性能評価を行うこととした。

２．不活化濃縮抗原の経時的性能評価

(1) 不活化濃縮抗原の保存安定性

一般財団法人 化学及血清療法研究所（化血研）が自社の独自事業として、A/duck/Hokkaido/Vac-1/2004（H5N1）株を用いた不活化ウイルス液（不活化濃縮抗原に相当）を製造・保存し、その保存安定性を調べること、並びに上記１．不活化濃縮抗原の性能評価手法の検討における製造・保存及び評価方法に関する諸条件が一致していることが明らかとなった。そこで、化血研が平成20年10月に製造した不活化ウイルス液（Lot. F0801、ウイルス浮遊液の赤血球凝集価 512 倍）を２～ 10 ℃に保存したものを本研究における不活化濃縮抗原とし、これから継時的（製造直後、８、12、18 及び 24 か月後）に試作したワクチンを購入し、動生剤基準に準拠して安全試験及び力価試験を実施した。不活化濃縮抗原製造直後、保存８、12、18 及び 24 か月後に調整したワクチンを、それぞれ 0M−，8M−，12M−，18M−及び 24M−VAIO とした。安全試験及び力価試験の試験方法及び判定基準は以下の通りである。安全試験は、４週齢の SPF 鶏 10 羽を試験群とし、ワクチン２羽分（１ mL）を脚部筋肉内に注射し、対照群の３羽と同居飼育して４週間臨床観察を行うとき、観察期間中に試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。また、試験最終日に対照群鶏より採血し、得られた血清について鳥インフルエンザウイルスに対する赤血球凝集抑制（HI）試験を行うとき、いずれも HI 抗体価４倍未満でなければならない。力価試験は、４週齢の SPF 鶏 10 羽を試験群、３羽を対照群とし、ワクチン１羽分（0.5mL）を試験群の脚部筋肉内に注射し、４週間後に各個体より採血して、得られた血清について HI 試験を行うとき、試験群の全てが HI 抗体価 16 倍以上、対照群の全てが HI 抗体価４倍未満でなければならない。

その結果、0M−，8M−，12M−，18M−及び 24M−VAIO は、安全試験及び力価試験のいずれの規格にも適合した（Fig. 1、Table. 1）。これらの結果から、供試した不活化濃縮抗原については、２～ 10 ℃保存において 24 か月間の安定性が確認された。

（2）２～ 10 ℃保存不活化濃縮抗原から調製したワクチンの保存安定性

0M−及び 12M−VAIO を２～ 10 ℃に保存し（0M−VAIO；24 か月間保存、12M−VAIO；12 か月間保存）、動生剤基準に準拠して安全試験及び力価試験を実施した。

その結果、両ワクチンは安全試験及び力価試験のいずれの規格にも適合し、12 か月間保存した不活化濃縮抗原より調製したワクチンは、２～ 10 ℃保存で少なくとも 12 か月間は安定であることが明らかとなった（Fig. 2、Table. 2）。

まとめ

発育鶏卵で培養した鳥インフルエンザウイルス不活化濃縮抗原については、２～ 10 ℃保存で少なくとも 24 か月間安定であったことから、口蹄疫ワクチンと同様に抗原バンクのシステムを構築し、疾病の大規模発生により飼養家きんの迅速な淘汰が困難となった場合等におけるワクチンの緊急接種に対して、小分製品の緊急製造が可能となることが想定される。また、国内で不活化濃縮抗原を備蓄する際の評価手法等についても、一定の成果が得られたことから、動物用医薬品等の検査の充実強化の一助となるものと考えられた。

引用文献

動物用生物学的製剤検定基準；動物医薬品
検査所ホームページ
（http://www.maff.go.jp/nval/kijyun/index.html）

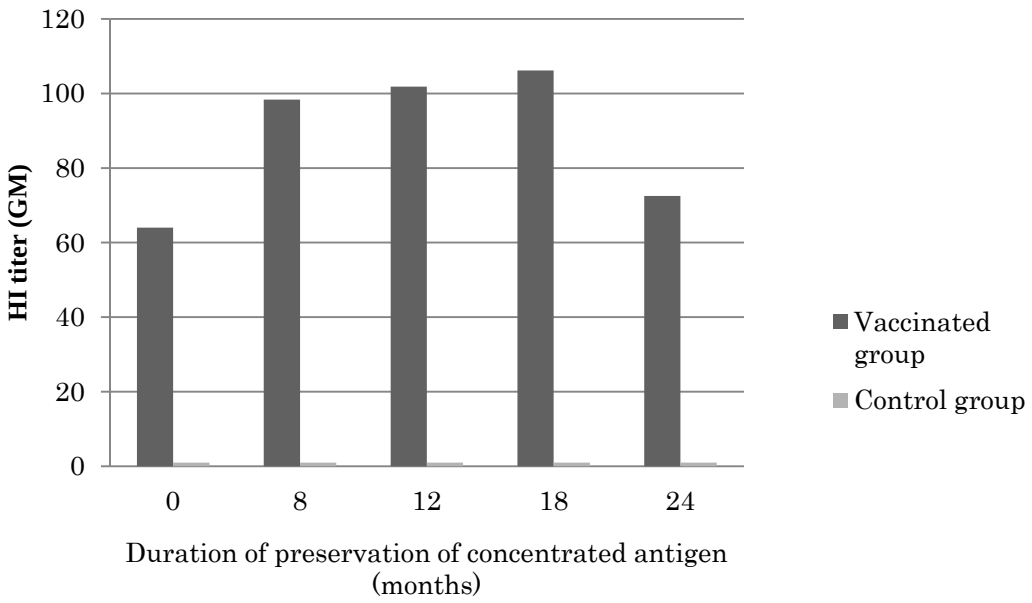

Fig.1 Stability of concentrated antigen preserved at 2 -10℃ .
HI titers of chicken serum were measured at 3 weeks after inoculation of vaccine prepared from the concentrated antigen preserved at 2 -10 ℃

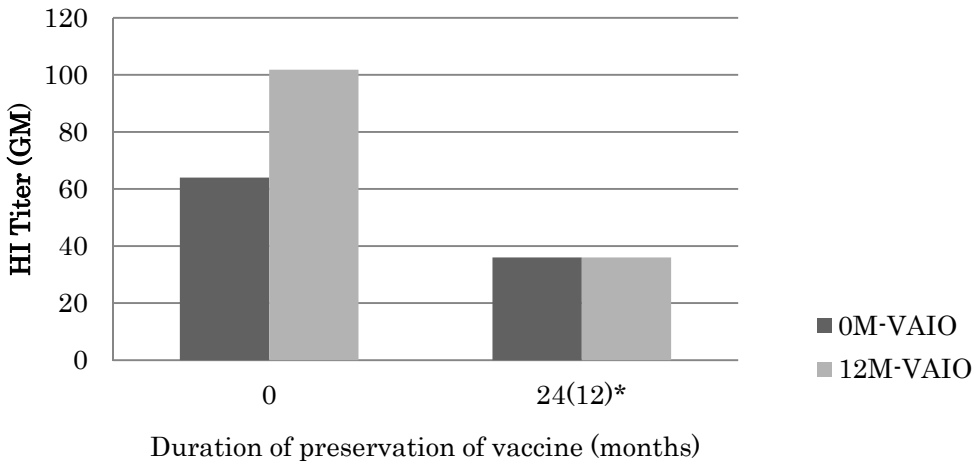

Fig.2 Stability of vaccine prepared from concentrated antigen preserved at 2 - 10℃ for 0 and 12 months.
HI titers of chicken serum were measured at 3 weeks after inoculation of 0M- and 12M-VAIO. * ; 0M- and 12M-VAIO were stored at 2-10℃ for 24 and 12 months, respectively.

Table 1 HI titers of chicken serum at 3 weeks after inoculation of vaccine prepared from the concentrated antigen preserved at 2 -10 ℃

Group	Chicken No.	Vaccine prepared from the antigen preserved for; (months)				
		0	8	12	18	24
Vaccinated	1	128	128	64	≧256	64
	2	32	128	64	32	64
	3	128	128	128	64	64
	4	64	≧256	≧256	32	64
	5	16	64	64	128	32
	6	128	64	64	≧256	≧256
	7	128	32	64	128	16
	8	≧256	128	64	128	≧256
	9	128	64	≧256	128	64
	10	≧256	128	128	≧256	64
	11		128	128	64	128
	12		64	128		
	13		128			
	GM	64.0	98.4	101.8	106.2	72.5
Control	1	＜4	＜4	＜4	＜4	＜4
	2	＜4	＜4	＜4	＜4	＜4
	3	＜4	＜4	＜4	＜4	＜4
	4	＜4	＜4	＜4		
	5	＜4	＜4			
	GM	＜4	＜4	＜4	＜4	＜4

Table 2 HI titers of chicken serum at 3weeks after inoculation of 0M- and 12M-VAIO

Chicken No.	0M-VAIO		12M-VAIO		Control	
	0M*	24M	0M	12M	0M	24(12)M
1	128	128	64	32	＜4	＜4
2	32	32	64	32	＜4	＜4
3	128	64	128	32	＜4	＜4
4	64	16	≧256	128	＜4	＜4
5	16	64	64	32	＜4	
6	128	32	64	32		
7	128	32	64	16		
8	≧256	64	64	64		
9	128	32	≧256	32		
10	≧256	32	128	16		
11		16	128	16		
12		16	128	128		
GM	64.0	36.0	101.8	36.0	＜4	＜4

* ; 0M- and 12M-VAIO were stored at 2-10℃ for 24 and 12 months, respectively.