

## ワクチンの有効性を評価する方法

ワクチンを投与したら、その効果を確認するために抗体検査を依頼されることも多いかと思います。しかし、その検査結果をどう判断すればよいか迷うことではないでしょうか？一言に抗体検査と言っても、そこには様々な前提や条件が絡んでおり、それが結果の読み方を複雑にしています。

そこで今回は、ワクチンの有効性を評価するための抗体検査方法について解説します。今後の皆様の判断の一助となれば幸いです。

### 1. 抗体は1種類ではなく多種類作られる

ワクチンを投与すると、ワクチン抗原として用いられる菌やウイルスなどの様々な構成成分に対する抗体が産生されます。

例えば、菌体そのものがワクチン抗原である場合は、菌を構成する細胞壁、細胞膜、鞭毛、線毛、細胞内蛋白などに対する抗体が産生されます。目の不自由な人たちが象を触り、鼻に触れた人は「象は管のようだ」、脚に触れた人は「象は樽のようだ」、耳に触れた人は「象はふとんのようだ」と感想を述べる寓話がありますが、抗体も同じように菌やウイルスの分断された小さなパーツをそれぞれ認識するのです(図1)。それら様々なパーツの抗体が協力して病原体感染を防御したり、感染力を弱めたりするのがワクチンの効果です。

なお、ワクチンの中には、菌体から発症防御に強く関係する抗体を導く成分だけを取り出して抗原としたものもあり、そのようなワクチンをコンポーネント(構成要素)ワクチンと言います。弊所の鶏用ワクチンでは、オイルバックシリーズに含まれる伝染性コリーザの抗原がこのようなワクチン抗原にあたります。

抗原の種類(抗原を細分化した小単位)ごとに抗体の反応性を見る試験:ドットプロット法という実験方法を用いてワクチン抗原とワクチン免疫後の血清を反応させると、非常に数多くの種類の抗体が検出されます。一方で、コンポーネントワクチンとその免疫血清を反応させると、ごく僅

かな種類の数の抗体しか検出されません(図2)。

ドットプロット法で検出されるこれらの多数の抗体の中には、発症防御に全く影響しないもの、多少関係するもの、または強く関連するもの、など様々な種類のものがあります。

### 2. ワクチンの有効性評価のための検査方法

本来であれば、発症防御と関連の深い抗体の強さ(量)を測定することが、最も分りやすくワクチンの効果の評価できる方法です。しかし、実際は様々な成分に対する抗体の中から、発症防御との相関が明らかで(すなわち、ある一定量以上の抗体価を持っていれば病原体を投与しても発症しない/抗体価のレベルと発症防御の強さが相関する等)、検査室で実施し易い検査方法(検査手技の簡便さやコスト、製品キット化など)であることなどから、ワクチン効果の指標として有効抗体価が設定されています。以下に、鶏で用いられている抗体検査方法とワクチンの評価について幾つかご紹介します。

最も簡便な検査方法は、凝集試験です<sup>1)</sup>。凝集試験では、菌と抗体が結合すると、その結合物が次々に重合して目に見える凝集塊を形成することを利用します(写真1)。菌液と血清を混ぜて凝集が起きるかどうかに、その血清中に、菌に対する抗体があるかどうかを調べます。もし抗体があれば、菌液と血清の混合液に多くの小さな塊が見られます。また、ある種のウイルスが赤血球を凝集させることを利用した試験も似たような原理です(写真2)。ウイルスの量を測定する場合を赤血球凝集試験:HA試験、一定のウイルス量と段階的に希釈した血清とをそれぞれ混合させ、どの希釈濃度までがウイルスの赤血球凝集を抑制するのかが抗体量を測定するものを赤血球凝集抑制試験:HI試験と言います。

ELISA法は一度に多くの検体を処理でき、測定も一日で終了するため、多くの検査機関で実施されています(写真3)。ELISAの簡単な原理は以下の通りです(実際はより複雑な反応です。また方法も一様ではありません)。

詳細は成書をご覧ください。)。まず、測定用のプレートに抗原を貼り付けておき、その上に血清を添加し反応させます。次に抗体に結合する、発色基質付の抗体を添加します。血清中に抗体があれば、プレートに貼り付いた抗原と抗体が結合し、その抗体に色素基質付抗体が結合します。最後に酵素を添加することで基質が反応してプレートが発色します。その発色の強さから抗体量を測定するものです。

最も煩雑な検査法は、中和試験です。中和試験は、ウイルスが細胞に感染して破壊することを利用したものです(細胞変性効果(CPE) 写真4)。ウイルスと血清の反応物を細胞に添加します。中和抗体があれば細胞は破壊されず綺麗なままですが、中和抗体がなければウイルスによりCPEが観察されますので、顕微鏡下でそれを判定します。中和試験では、細胞培養の器材や技術が必要ですし、細胞の準備からウイルスを感染させCPEを確認するまでに通常一週間以上培養しますので、時間もかかります。

現在販売されている製剤の有効性判定のための試験法および基準値の一部をご紹介します<sup>2)</sup>。オイルアジュバント加産卵低下症候群不活化ワクチンほどの製剤であっても同じHI試験を用い、判定基準は鶏群の80%以上のHI価が32倍以上となることです。伝染性気管支炎生ワクチンはいずれも中和試験を用い、判定基準はプール血清の中和指数2.0以上ですが、使用している抗原ウイルスがそれぞれ異なります。免疫したワクチン株とは異なる抗原を試験に用いた場合の中和指数では同じ値を示しません。マイコプラズマ・ガリセプチカム(MG)不活化ワクチンはいずれの製剤もHI試験ですが、メーカー毎にHI価の基準値が異なりますし、用いる抗原も異なっています。サルモネラ不活化ワクチンは、製剤により検査方法が異なります(凝集試験やELISA)。また同じELISA法でも使用する抗原や基準値が異なります。

それぞれの製剤の開発時にワクチン効果の検討をそれぞれで評価し、最適な条件を設定することからこのような違いとなるのです。弊所のサルモネラ3価不活化ワクチン「オイルボックスSETi」では、ワクチン効果の指標として鞭毛抗原に対するELISA抗体価で評価します。オイルボックスSETiの開発において、ワクチン投与後の鞭毛抗原(H抗原)を用いたELISA法(H-ELISA)による平均抗体価が、SEで0.25、STで0.2、SIで0.25以上であればサルモネラ菌を攻撃した際に腸管に定着する菌量を低減することが確認されたことから設定したものです<sup>3)</sup>。

### 3. 検査結果は何を見ている？

ワクチンメーカーとしては、承認申請書に評価方法を設定して、農水省から承認を得た方法による測定値でなければ、胸を張って有効ですと申し上げることはできません。

冒頭に述べた通り、ワクチンを投与すると様々な成分に

対する抗体が産生されるため、オイルボックスSETi注射鶏では鞭毛抗原以外の抗原に対する抗体(例えばO抗体)でも、またELISA以外の測定方法(例えば凝集試験)でも抗体価の上昇が認められる場合もありますし、逆に全く抗体価が検出されない場合もあります。ただし、その数値がワクチンの効果として有効なのかそうでないのかは判断できないのです。

オイルボックスSETiに含まれる抗原のうち、SEに関しては、ひな白痢(SP)凝集試験で凝集抗体価が100倍以上であれば有効であることが分っています<sup>3)</sup>。これは、ワクチン投与後4週目での試験結果から導かれています。SP凝集抗体価は、その後速やかに低下します。免疫後時間が経過し、凝集抗体価が100倍未満となった場合の評価(=その時にサルモネラ菌の攻撃を行って、腸管に定着する菌量が低減するか)は実施していません。攻撃試験では1年後まで定着軽減効果が確認されているので、SP凝集抗体価が低下したから効果がなくなったと判断するのは早計かもしれません。

上記のように、ワクチンを投与後時間が経過すると、いったん上昇した抗体価が速やかに低下する場合があります。例えば、MG凝集抗体価などです。これらは、上述の通り抗原抗体反応が凝集することを利用した測定方法です。凝集を強く促進する抗体は、抗原と結合する手(学術的には抗原結合領域)を10本持つIgMという種類の抗体が含まれている場合が多いと思われます。IgMは感染の初期に産生され、その後速やかに消失する性質があります。IgMに代わって、次に防御の主体であるIgG(手は2本)という抗体が著しく産生され主役交代となります。すなわち、凝集試験など一部の抗体測定法ではワクチン免疫初期の反応は分かりやすいのですが、その後の感染防御主体となるIgGの動きが見にくい場合があります。

オイルボックスSETiにおけるSP凝集抗体価は、主に感染初期に出現するIgMの動きを見ているにすぎず、その後感染防御の主体となるIgGの動きはH-ELISAの方がよく反映しているものと思われます。

ワクチンの効果判定のための検査は、メーカー毎にワクチン開発時の検討や抗原が異なることから試験法や基準値が様々であること、またどの測定法を使うのか、抗原に何を使うのか、測定結果は何を見ているのか、で判断が複雑となることをご説明致しました。検査方法の統一についてのご要望をしばしば頂きますが、以上の様な理由により統一が困難となっており、お手数をおかけします。どうかご理解の上、検査機関をご利用ください。

検査値につきましては、上述のような原理を踏まえて測定したメーカーまたは検査機関と議論いただくことが、双方によりよい理解と関係を構築する上で重要かと思っております。

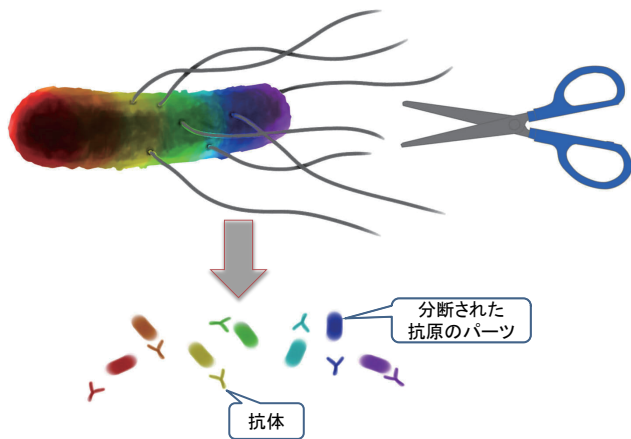


図1 様々な抗体が作られる(イメージ図)

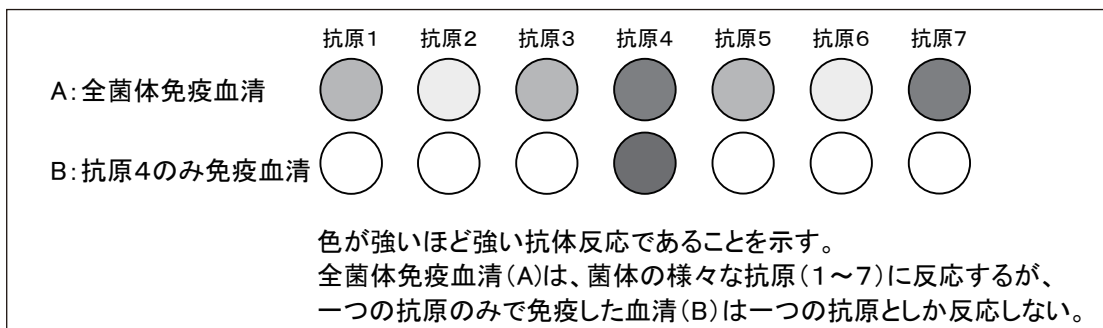
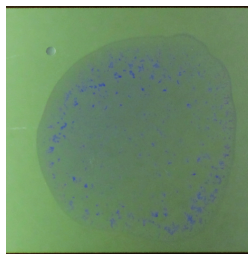


図2 ドットプロット法による免疫血清と抗原の反応性(イメージ図)

写真1 凝集試験



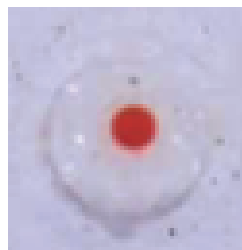
・抗体なし  
 ・濁った菌液



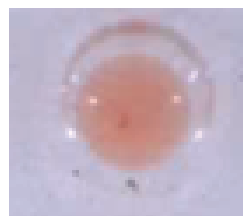
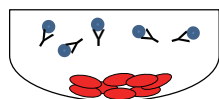
・抗体あり  
 ・菌と抗原の結合物が凝集して塊(ツブツブ)を形成

(化血研原図)

写真2 HI試験

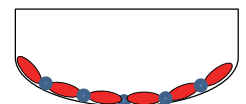


・抗体あり  
 ・抗体でウイルスが中和されるため、血球はプレートの底に沈む

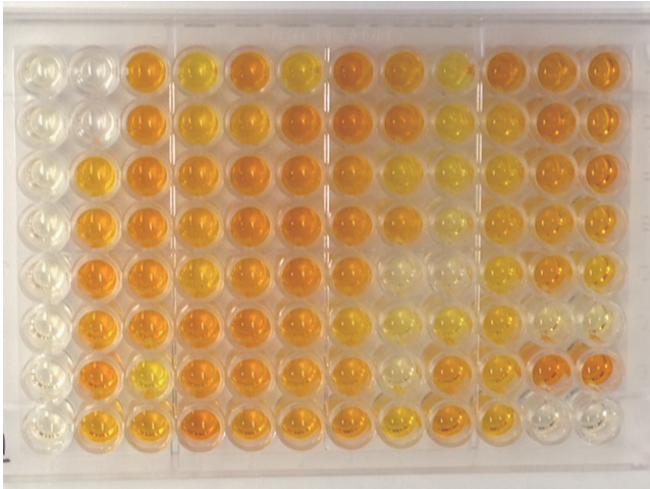


・抗体なし  
 ・ウイルスが血球を架橋して血球がプレート全面に膜状に広がる。

(化血研原図)



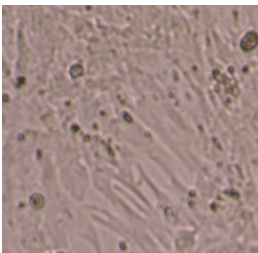
### 写真3 ELISA



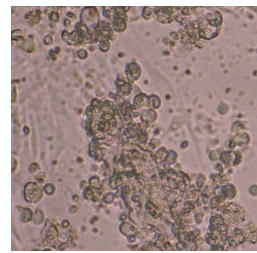
(化血研原図)

抗体量が多いほど発色が濃い

### 写真4 中和試験



- ・抗体あり
- ・抗体でウイルスが中和されるため、細胞はプレートに張り付いて繊維状に伸びている。



- ・抗体なし
- ・ウイルスで細胞が破壊され、プレートから剥がれて縮んでいる。

(化血研原図)

### 参考資料

- 1) 家禽疾病学 第一版 鶏病研究会編 2015年
- 2) 動物医薬品検査所HP 検定・検査情報 (<http://www.maff.go.jp/nval/kiyun/index.html>)
- 3) 「オイルボックスSETi」製造承認申請書