

厚生科学研究費補助金
厚生科学特別研究事業

痘そうワクチンの安全性等に関する研究

平成13年度 研究報告書

主任研究者 倉田 毅

平成14(2002)年3月

痘そうワクチンの安全性等に関する研究班（平成13年度）

区分	氏名	所 属	職名
班 長	倉田 毅	国立感染症研究所	副所長
協力研究者	倉根 一郎	国立感染症研究所ウイルス第一部	部長
	森川 茂	国立感染症研究所ウイルス第一部 外来性ウイルス室	室長
	西條 政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部 外来性ウイルス室	主任研究官
	前田 秋彦	国立感染症研究所ウイルス第一部 外来性ウイルス室	研究官
	高橋 元秀	国立感染症研究所細菌・血液製剤部 細菌製剤第三室	室長
	山本 三郎	国立感染症研究所細菌・血液製剤部 細菌製剤第一室	室長
	佐々木 次雄	国立感染症研究所安全性研究部 無菌性制御室	室長
	布施 晃	国立感染症研究所安全性研究部 物理化学分析室	室長
	堀内 善信	国立感染症研究所安全性研究部 生物統計室	室長
	田村 和満	国立感染症研究所細菌部 腸管系細菌室	室長

目 次

I. 総括研究報告書

痘そうワクチンの安全性等に関する研究..... 1

班長 倉田 毅 (国立感染症研究所副所長)

II. 研究報告書

痘そうワクチンの安全性等に関する研究..... 9

班長 倉田 毅 (国立感染症研究所副所長)

I. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

平成 13 年度総括研究報告書

痘そうワクチンの安全性等に関する研究

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所副所長

研究要旨：国家備蓄されている乾燥痘瘡ワクチン 12 ロット（昭和 55 年度に作成）は、これまで冷凍保存されている。この旧ワクチンに関して、生物製剤基準に準拠した試験およびその他の試験を行ったところ、現時点でも痘そうワクチンとしての有効性をほぼ満たしていた。平成 11 年度に作成された乾燥細胞培養痘そうワクチンは、正規のワクチンではないが検定基準を満たしていることが確認された。

協力研究者：

- 倉根 一郎： 国立感染症研究所
ウイルス第 1 部長
- 森川 茂： 国立感染症研究所
ウイルス第 1 部
外来性ウイルス室長
- 西條 政幸： 国立感染症研究所
ウイルス第 1 部
外来性ウイルス室主任研究官
- 前田 秋彦： 国立感染症研究所
ウイルス第 1 部
外来性ウイルス室研究官
- 高橋 元秀： 国立感染症研究所
細菌・血液製剤部
細菌製剤第 3 室長
- 山本 三郎： 国立感染症研究所
細菌・血液製剤部
細菌製剤第 1 室長
- 佐々木 次雄： 国立感染症研究所
安全性研究部無菌性制御室長
- 布施 晃： 国立感染症研究所
安全性研究部
物理化学分析室長
- 堀内 善信： 国立感染症研究所
安全性研究部生物統計室長
- 田村 和満： 国立感染症研究所
細菌部腸管系細菌室長

A. 研究目的

バイオテロの中で、最優先の対策が必要と考えられるもののひとつに痘そう（天然痘）がある。天然痘は 1980 年 5 月 WHO で根絶宣言が出された。このため定期的な種痘は 25 年以上行われていない。1980 年に作成された痘そうワクチン（以下「旧ワクチン」という）を国が買い上げ、冷凍保存し現在に至っている。この国家備蓄されている乾燥痘瘡ワクチン 12 ロットについては、これまでワクチンの有効性を確認するため、厚生省からの依頼試験として「備蓄乾燥痘瘡ワクチンの有効性確認のための試験」として力価試験、安定性試験が行われてきた。しかし、力価以外の検定項目に相当する試験は行われていない。また、平成 10 年、11 年の厚生省科学研究費で作成した痘そうワクチン（以下「新ワクチン」という）が国立感染症研究所に少量保存されており、これら新旧ワクチンを緊急時に使用することを想定し、その安全性等を確認しておく必要がある。本研究の目的は、製造後 20 年以上経過した旧ワクチンと試作的に作られた新ワクチンの安全性等を確認することである。

B. 研究方法

旧ワクチン 12 ロット分及び新ワクチン 1 ロット分について、各々以下の試験を実施する。各々の結果の評価並びに新旧ワクチンの試験結果の比較を実施する。

(ア) 旧ワクチン 12 ロット

1) 力価試験、2) 安定性試験、3) 総菌数試験、4) 総菌数試験で検出された菌の同定、5) 病原性クロストリジウム否定試験、6) コリネバクテリウム否定試験、7) マイコバクテリウム否定試験、8) 含湿度試験、9) 溶解液の無菌試験、10) 長期保存による力価推移の数学的解析

(イ) 新ワクチン 1 ロット

1) 力価試験、2) 安定性試験、3) 無菌試験、4) マーカー試験 (1) 増殖温度感受性試験、5) マーカー試験 (2) ふ化鶏卵漿尿膜接種試験、6) 含湿度試験、7) 溶解液の無菌試験

倫理面への配慮：

本研究は、ヒト検体を用いるものではないため倫理上特に問題はない。

C. 研究結果

(ア) 旧ワクチン 12 ロット

5 カ所の保管場所に、 -15°C あるいは -20°C で保管されている。この 12 ロット全てに関して行った試験成績は以下の通りであった。

1) 力価試験

生物学的製剤基準に準拠して、各ロット毎に、力価試験を行った。力価試験の参照痘そうワクチンとしては、ロット No. 5 (乾燥ワクチン型、Lister-Elstree 株：Ref-5) を使用し、その力価が一定の誤差範囲内(ポック算定法の許容誤差)にある事を確認した。参照痘そうワクチンの力価は、10 回の試験の標準偏差も 0.1 と良好であり試験の精度は高かった。旧ロットに関しては、12 ロットいずれもが本試験での生物学的製剤基準を満たす力価 ($10^{7.7}/\text{ml}$ 以上) を示した。

2) 安定性試験

生物学的製剤基準に準拠して、各ロット毎に、安定性試験を行った。本試験は、旧ワクチンのアンプル 2 本以上を 37°C に 4 週間保存後の力価の低下が保存前の $1/10$ 以内でかつ力価が $10^{7.7}/\text{ml}$ 以上であることを確認するものである。旧ロットの 12 ロット全てが、保存後の力価の低下は基準内であったが、2 ロットに関しては、保存後の力価が基準値を若干下回った ($0.1 \log_{10}$ および $0.2 \log_{10}/\text{ml}$)。

3) 総菌数試験

生物学的製剤基準に従い総菌数試験を行った。その結果、国家検定時の成績と今回の成績とを比較すると菌の増殖の認められなかったものが 8 ロットで、残りの 4 ロットに関しても菌数は同じか減少しており、生物学的製剤基準を満たしていた。

4) 総菌数試験で検出された菌の同定

総菌数試験で検出された菌の同定は、混釈平板培地に発育した菌に対し、好気性菌、嫌気性菌、真菌の検査を行った。好気性菌については「Cowan and Steel, 医学細菌同定の手引き 第 3 版」に基づき、また真菌については「厚生省監修 微生物検査必携 細菌・真菌 第 3 版」を参考に同定を行った。その結果、29 コロニーのうち 26 コロニーまでが *Bacillus subtilis* であり、他は *Nocardia spp.* と真菌であった。混入菌の病原体レベルは、*B. subtilis* はレベル 1、*Nocardia spp.* は菌種同定されていないので区分できないが、一般的に問題ないと考えられる。

5) 病原性クロストリジウム否定試験

生物学的製剤基準による病原性クロストリジウム否定試験を行った結果、3 ロットで加温 TG での菌の増殖が確認された。他の 9 ロットでは、菌の増殖は認められなかった。増殖した菌は、好気・嫌気の両条件で増殖した。また、芽胞非形成菌であった。以上の結果から、旧ワクチン 12 ロットいずれにも、クロストリジウム属菌を含め偏性嫌気性菌は検出されなかった。

6) コリネバクテリウム否定試験

本試験は検定項目には相当しないが、旧ワクチンはウシの皮膚材料由来であるため別

途行った。Zapardiel, Jらの方法 (J. Med. Microbiol. 1998; 47: 79-83) に従い CBU 平板培地に各ロットの原液を好気培養した結果、7 ロットでコロニーが出現した。これらは、すべてグラム陽性桿菌であった。さらに、チンスタール平板培地と羊血液寒天培地に移植し、チンスタール平板培地上で黒色コロニーを形成したものについては、異染小体染色とコロンピア平板培地に塗抹してアピコリネキットで同定試験を行った。異染小体染色は全て陰性であった。また、CBU 平板培地での培養で出現したコロニーは、rRNA 遺伝子の一部の遺伝子配列を決定することにより菌種の同定を行った。その結果、旧ワクチンの 12 ロットいずれにもコリネバクテリウムは検出されなかった。

7) マイコバクテリウム否定試験

生物学的製剤基準に沿って、小川培地による培養を行った結果、旧ワクチン全てのロットから、菌の増殖が認められなかった。この結果、結核菌を含むマイコバクテリウム陰性であった。

8) 含湿度試験

生物学的製剤基準に沿って、物理化学試験の含湿度試験を乾燥減量法により試験した。旧ワクチンのロット毎にランダムに抽出した 3 アンプルの含湿度を測定した。その結果、12 ロット全てが検定基準を満たした。

9) 溶解液の無菌試験

生物学的製剤基準に沿って、旧ワクチン 12 ロットの添付の溶解液の無菌試験を行った結果、全てのロットの溶解液から菌は検出されなかった。

10) 長期保存による力価推移の数学的解析

力価試験、安定性試験の参照品として用いられる参照痘そうワクチン (ロット 4) が、国立感染症研究所に 1972 年より 4℃に保存され、旧ワクチンの経時的な力価試験に際して常に参照品として力価測定が行われてきた。参照痘そうワクチンに関しては、各年 5 回以上の力価試験が行われている。ただし、4℃保存の成績しかないので、4℃保存での反応速度定数の推定と失活曲線あるいは直線の推定を行った。実測値に対して全体に一次回帰を当てはめた場合に比べ、

最初の 9 年間で 10 年目以降に別々の一次回帰を考えたほうが、よりよい当てはまりを示した。さらに全体に保存年数の対数に対する回帰がもっともよい当てはまりを示すように見うけられた。0 年次に 8.5 \log_{10}/ml の力価があった場合、それぞれの回帰の取り方によりばらつくが、検定合格ラインの 7.7 \log_{10}/ml に到達するのは 15 年から 19 年と推定された。しかし通常は前述のように、変性程度の対数が時間に対して一次回帰を示すと考えられることから、この場合ワクチンの安定性に、変性速度の異なる因子が 2 つ以上関わった結果、曲線回帰を示したものと考えられる。一方、旧ワクチンに関しては、各年での力価測定が 1 回のみであり、データのばらつきが大きいため力価の経時変化の推定は困難であった。

(イ) 新ワクチン 1 ロット

新ワクチンは、乾燥細胞培養痘そうワクチンで製造法が旧ワクチン (乾燥痘そうワクチン) と異なるため検定項目も異なる。このため、新ワクチンに関しては、生物学的製剤基準に適合するかを試験した。

1) 力価試験

力価は、8.7 \log_{10}/ml と検定合格基準 7.7 \log_{10}/ml の 10 倍で基準を満たした。

2) 安定性試験

37℃に 4 週間保存後の力価は、8.1 \log_{10}/ml と検定合格基準 7.7 \log_{10}/ml 以上でかつ力価の低下が 0.6 \log_{10}/ml と基準を満たした。

3) 無菌試験

生物学的製剤基準に沿って、新ワクチンの無菌試験を行った結果、いずれも菌は検出されず検定基準を満たした。

4) マーカー試験 (1) 増殖温度感受性試験

本試験は、本来最終バルクを対象に行う試験であるが、新ワクチンは小分け品しかないので、小分け品を対象として生物学的製剤基準に沿って、ウサギ初代腎細胞での 35℃および 41℃でのウイルス増殖をブラック力価により判定した結果、新ワクチンでは、35℃のブラック力価が 8.0 \log_{10}/ml で 41℃のブラック力価が <2.7 \log_{10}/ml

(検出限界以下)と両温度でブラック力価の差が $>5.3 \log_{10}/\text{ml}$ と基準を満たした。

5) マーカー試験 (2) ふ化鶏卵漿尿膜接種試験

本試験も、本来最終バルクを対象に行う試験であるが、新ワクチンは小分け品しかないので、小分け品を対象として生物学的製剤基準に沿って発育鶏卵の漿尿膜での接種 48 時間後のポックサイズを測定した。その結果、ポックサイズは、最小 1.0、最大 1.65、平均 1.2、SD 0.18mm であり、検定基準 (3 mm 以内) を満たした。

6) 含湿度試験

生物学的製剤基準に沿って、含湿度試験を行った結果、基準を満たした。

7) 溶解液の無菌試験

生物学的製剤基準に沿って、新ワクチンの添付の溶解液の無菌試験を行った結果、いずれも菌は検出されず基準を満たした。

D. 考察

本研究の目的は、製造後 20 年以上経過した旧ワクチンと試作的に作られた新ワクチンの安全性等を確認することである。旧ワクチンに関しては、ウシ皮膚由来のため検定基準にない菌の混入の有無についても検討した。その結果、コリネバクテリウム、マイコバクテリウムとも混入が否定された。本ワクチンは、無菌性を保証するものではなく、総菌数が基準以下であることを保証するものであるが、総菌数試験で検出された菌の同定を行った結果、通常、人に有害と考えられる菌は検出されなかった。力価および安定性に関しては、殆どのロットで検定基準を満たしていた。力価および安定性試験は、これまで旧ワクチンに関しては毎年あるいは隔年で行われているが、2 年前の試験成績と比べて全て力価の上昇が認められた。これは、試験の精度の問題ではなく、本年の試験に用いられた鶏卵のワクチニアウイルスに対する感受性が高かったためである。鶏卵のワクチニアウイルスに対する感受性の変動は、近年特に大きくなってきている。その原因は不明であるが、力価試験、安定性試験においては、鶏卵の感受性の変動は成績に大きな影響を与えるため、感受性の変動を補正するための標準化等の検討が今後必要になると考えられる。

長期保存による力価変動の予測は、今後の痘そうワクチンの備蓄およびワクチン生産を計画する上で重要である。参照痘そうワクチンの 4℃での長期保存の力価変動の生データから予測される保存期間は、当初の力価が $8.5 \log_{10}/\text{ml}$ である場合 15~19 年と予測された。しかし、これまでの力価データは、膨大ではあるが単一温度条件でのデータしかなく、正確な予測をするには不十分であることが明らかとなった。新ワクチンに関しては、平成 13 年度に新たに作成される乾燥細胞培養痘そうワクチンと基本的に同一なワクチンで旧ワクチンと製造法、内容物が異なるため、力価変動が異なることが考えられる。今後、新ワクチンに関して、複数温度条件での加速変性試験を行いより正確に保存条件、保存期間による力価変動の予測を行うためのデータを得る必要があると考えられる。

新ワクチンに関しては、製造から 2 年しか経過していないこともあり、検定基準を全て満たしていた。

今般、米国 NIID 主導で行われた、米国の備蓄ワクチンのポランティアへの接種実験から、 $7.0 \log_{10}/\text{ml}$ の力価があれば初種痘者への善感率が 97.1% (Frey, S.E., et al., N Engl J Med., 346(17), 1265-1274, 2002) と、かつて日本で行われた実験成績 (北村他、日本伝染病学会誌: 37 巻, p205, 1963) と同様の結果が得られている。これらの報告から、旧ワクチンのポテンシーは今だ有効であると判断される。

以上の結果から、新旧ワクチンとも備蓄を継続することが望ましいと考えられるが、特に旧ワクチンに関しては、人へ接種した場合の副反応に関して充分留意する必要がある。

E. 結論

国家備蓄されている乾燥痘瘡ワクチン 12 ロットは、昭和 55 年度に作成されたものであり、これまで冷凍保存されている。この旧ワクチンに関して、生物製剤基準に準拠した試験およびその他の試験を行ったところ、現時点でも痘そうワクチンとしての有効性をほぼ満たしていた。平成 11 年度に作成された乾燥細胞培養痘そうワクチンに関しては、検定基準を満たしていた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

特になし

II. 平成 13 年度研究報告

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
平成 13 年度研究報告書

痘そうワクチンの安全性等に関する研究

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所副所長

研究要旨：国家備蓄されている乾燥痘瘡ワクチン 12 ロット（昭和 55 年度に作成）は、これまで冷凍保存されている。この旧ワクチンに関して、生物製剤基準に準拠した試験およびその他の試験を行ったところ、現時点でも痘そうワクチンとしての有効性をほぼ満たしていた。平成 11 年度に作成された乾燥細胞培養痘そうワクチンは、正規のワクチンではないが検定基準を満たしていることが確認された。

協力研究者：

- 倉根 一郎： 国立感染症研究所
ウイルス第 1 部長
- 森川 茂： 国立感染症研究所
ウイルス第 1 部
外来性ウイルス室長
- 西條 政幸： 国立感染症研究所
ウイルス第 1 部
外来性ウイルス室主任研究官
- 前田 秋彦： 国立感染症研究所
ウイルス第 1 部
外来性ウイルス室研究官
- 高橋 元秀： 国立感染症研究所
細菌・血液製剤部
細菌製剤第 3 室長
- 山本 三郎： 国立感染症研究所
細菌・血液製剤部
細菌製剤第 1 室長
- 佐々木 次雄： 国立感染症研究所
安全性研究部無菌性制御室長
- 布施 晃： 国立感染症研究所
安全性研究部
物理化学分析室長
- 堀内 善信： 国立感染症研究所
安全性研究部生物統計室長
- 田村 和満： 国立感染症研究所
細菌部腸管系細菌室長

A. 研究目的

日本においても、現在様々なテロ対策が政府主導のもとで検討されており、バイオテロ対策は国民が最も関心を持っている対策のひとつである。バイオテロの中で、最優先の対策が必要と考えられるもののひとつに痘そう（天然痘）がある。天然痘は 1977 年 10 月に最後の患者、2 年後に根絶確認がなされ、1980 年 5 月 WHO で根絶宣言が出された。1980 年に作成され在庫として残っていた痘そうワクチン（以下「旧ワクチン」という）を国が買い上げ、冷凍保存し現在に至っている。この国家備蓄されている乾燥痘瘡ワクチン 12 ロットについては、これまでワクチンの有効性を確認するため、厚生省からの依頼試験として「備蓄乾燥痘瘡ワクチンの有効性確認のための試験」として力価試験、安定性試験が行われてきた。しかし、力価以外の検定項目に相当する試験は行われていない。

また、平成 10 年、11 年の厚生省科学研究費で作成した痘そうワクチン（以下「新ワクチン」という）が国立感染症研究所に少量保存されており、これら新旧ワクチンを緊急時に使用することを想定し、その安全性等を確認しておく必要がある。

本研究の目的は、製造後 20 年以上経過した旧ワクチンと試作的に作られた新ワクチンの安全性等を確認することである。

B. 研究方法

旧ワクチン 12 ロット分及び新ワクチン 1 ロット分について、各々以下の試験を実施する。各々の結果の評価並びに新旧ワクチンの試験結果の比較を実施する。

(ア) 旧ワクチン 12 ロット

- 1) 力価試験
- 2) 安定性試験
- 3) 総菌数試験
- 4) 総菌数試験で検出された菌の同定
- 5) 病原性クロストリジウム否定試験
- 6) コリネバクテリウム否定試験
- 7) マイコバクテリウム否定試験
- 8) 含湿度試験
- 9) 溶解液の無菌試験
- 10) 長期保存による力価推移の数学的解析

旧ワクチン 12 ロットに関しては、試験項目 6)、7) が検定項目にないが、旧ワクチンはウシの皮膚材料由来であるため、コリネバクテリウム（担当：細菌血液製剤部細菌製剤第三室長 高橋 元秀）およびマイコバクテリウム（担当：細菌血液製剤部細菌製剤第一室長 山本 三郎）の混入が有るか否かを試験する。

1) 及び 2) は従来通り生物学的製剤基準（1993）に沿って行う（担当：ウイルス第一部外来性ウイルス室長 森川 茂）。

3)、4) に関しては、総菌数試験を生物学的製剤基準に沿って行い（担当：安全性研究部無菌性制御室長 佐々木次雄）、出現したコロニーの全ての菌の同定を行う（担当：細菌部腸管系細菌室長 田村 和満）ことで、大腸菌否定試験／溶血レンサ球菌否定試験／ブドウ球菌否定試験／炭疽菌否定試験以上の成績が得られる。

5) の病原性クロストリジウム否定試験は、偏性嫌気性菌培養を行うので別途行う（担当：細菌血液製剤部細菌製剤第三室長 高橋 元秀）。

8) の含湿度試験は、生物学的製剤基準に沿って行う（担当：安全性研究部物理化学分析室長 布施 晃）。

10) に関しては、これまでの力価試験のデータから長期保存による力価の変動を数学的に解析し保存安定性を推定する（担当：安全性研究部生物統計室長 堀内善信）。

(イ) 新ワクチン 1 ロット

- 1) 力価試験
- 2) 安定性試験
- 3) 無菌試験
- 4) マーカー試験 (1) 増殖温度感受性試験
- 5) マーカー試験 (2) ふ化鶏卵漿尿膜接種試験
- 6) 含湿度試験
- 7) 溶解液の無菌試験

新ワクチンに関しては、試験項目 1) ～7) が検定項目に相当するが、1) 及び 2) は従来通り行う（担当：ウイルス第一部外来性ウイルス室長 森川 茂）。

4)、5) のマーカー試験（増殖温度感受性試験、ふ化鶏卵漿尿膜接種試験）は、最終バルクの試験（中間段階の試験）であるが、小分け品を対象にして行う（担当：ウイルス第一部外来性ウイルス室長 森川 茂）。

6) の含湿度試験は、生物学的製剤基準に沿って行い（担当：安全性研究部物理化学分析室長 布施 晃）、3) 無菌試験と 7) 溶解液の無菌試験は生物学的製剤基準に沿って行う（担当：安全性研究部無菌性制御室長 佐々木 次雄）。

C. 研究成績

(ア) 旧ワクチン 12 ロット

以下の 5 ヲ所の保管場所に、下記の温度（-15℃あるいは-20℃）で保管されている。この一部を国立感染症研究所（村山分室）に送付し、以下の試験を行った。

保管場所：

- a. 千葉県血清研究所（千葉県市川市）
2 ロット（千葉 7801-A, B）
- b. 北里研究所（東京都港区）
2 ロット（北研-38, 40）
- c. 阪大微生物研究会（香川県観音寺市）
3 ロット（阪大-116, 119, 120）
- d. 武田薬品工業株式会社（山口県光市）
3 ロット（H-015, 016, 017）
- e. デンカ生研株式会社（新潟市五泉市）
2 ロット（東芝-13, 14）

保管温度：

国家検定終了後 3 年間の、生物学的製剤基準による有効期限内は 4℃に保管し、この

期限に達した時点で-15℃あるいは-20℃に保管されている。但しデンカ生研のロットについては、有効期限後1~2年後の昭和58年7月29日に、-20℃保管に切り替えた。既に、昭和58年度中に、全ロットの-20℃又は-15℃保管への切り替えが終了しているので、次のように、2種類の温度で保管されたことになる。

A群 (-20℃保管) :

千葉血清 (2 ロット)、北研 (2 ロット)、
阪大 (3 ロット)、デンカ生研 (2 ロット)
合計 9 ロット

B群 (-15℃保管) :

武田 (3 ロット)
合計 3 ロット

1) 力価試験

生物学的製剤基準に準拠して、各ロット毎に、力価試験を行った。

力価試験は、旧ワクチンのアンプル内容2本以上をプールして、0.5 log₁₀ 刻みに階段希釈して1希釈当たり15個以上の12日令の発育鶏卵しょう尿膜(CAM)に、CAM1枚当たり0.1mlを接種して、37℃に静置培養し、リスター株ワクチンに関しては48時間後に、池田株ワクチンに関しては72時間後に、特異的ポック数から力価を算出した(検定合格基準は、力価が7.7 log₁₀/ml以上)。参照痘瘡ワクチンとしては、ロットNo.5(乾燥ワクチン型、Lister-Elstree株使用; Ref-5)を使用し、力価を測定する際には必ず本参照ワクチンの力価測定を平行して行い、その力価が一定の誤差範囲内(ポック算定法の許容誤差)すなわち8.3 ± 0.30 log₁₀/mlにある事を確認した。まず、参照痘瘡ワクチンの力価は表1に示すように全ての試験で基準を満たし、10回の試験の標準偏差も0.1と良好であり試験の精度は高いと考えられる。旧ロットに関しては、12ロットいずれもが本試験での検定基準を満たす力価を示した(表2)。

2) 安定性試験

生物学的製剤基準に準拠して、各ロット毎に、安定性試験を行った。

安定性試験は、旧ワクチンのアンプル2本以上を37℃に4週間保存した時点での力価を測定し、保存前の力価(log₁₀値)からの低下をみた(検定合格基準は、低下が保存前の-1以内でかつ力価が7.7 log₁₀/ml

以上)。この場合も、力価試験と同様に参照痘瘡ワクチン Ref-5 をおき、試験の有効性を確認した。本試験は、旧ロットの12ロット全てが、保存後の力価の低下は基準内であったが、北研-38と阪大-116の2ロットに関しては、保存後の力価が基準値を下回った(表2)。

3) 総菌数試験 :

現行の生物学的製剤基準に従い総菌数試験を行った。製剤を添付の溶解液に懸濁し、表示量0.5mlの製剤については5アンプル、表示量1mlの製剤については3アンプルの内容物をプールしたものを試料とした。これを生理食塩液で20倍希釈しシャーレ5枚に1mlずつ入れ、溶解して45℃に保ったチオグリコール酸寒天培地20mlずつを加えて混合し平板に固めた。25℃で2日、31℃で2日、36℃で1日好気培養した。平板を肉眼及び実体顕微鏡で観察し、生じたコロニーを計数した。その結果、国家検定時の成績と今回の成績とを比較すると菌数は同じか減少しており、増加したものはなく、生物学的製剤基準を満たしていた(表3)。

4) 総菌数試験で検出された菌の同定 :

総菌数試験で検出された菌の同定は、混釈平板培地に発育した菌に対し、好気性菌、嫌気性菌、真菌の検査を行った。

1. 菌分離

好気性菌、嫌気性菌の分離にはトリプチケース寒天培地を使用し、好気、嫌気培養を行い、真菌の分離にはサブロー寒天培地を用い再分離した。なお、混釈平板培地から釣菌する際、総菌数試験において1コロニーと計数されたコロニーでも外観的に二つのコロニーが混じっていると思われたものはそれぞれ純培養を行ったため、コロニー数はロットによっては総菌数試験の結果と一致しない。

2. 菌の同定

好気性菌については「Cowan and Steel, 医学細菌同定の手引き 第3版」に基づき、また真菌については「厚生省監修 微生物検査必携 細菌・真菌 第3版」を参考に同定を行った。

その結果を表 4 に示す。29 コロニーのうち 26 コロニーまでが *Bacillus subtilis* であり、他は *Nocardia spp.* と真菌であった。汚染菌の病原体レベルは、*B. subtilis* はレベル 1、*Nocardia spp.* は菌種同定されていないので区分できないが、一般的に問題ないと考えられる。

5) 病原性クロストリジウム否定試験

旧ワクチン 12 ロットを対象に、生物学的製剤基準による病原性クロストリジウム否定試験を行い、以下の成績を得た (表 5)。

- ① 加温 TG 培地での菌の確認：1 検体当たり 10 本の TG 培地 (15ml/本) に、検体 0.15ml をそれぞれ接種した (安全性研究部 無菌性制御室が実施)。クロストリジウムの芽胞の発芽を促し他の菌を殺すために、これらの TG 培地を 64.5℃ で 1 時間加温した後、37℃ で 6-8 日間培養した。その結果、検体番号 4 では 4 本で、検体番号 8 では 2 本で、検体番号 10 では 2 本で 菌の増殖が確認された。しかし、他の検体では、菌の増殖は認められなかった。
- ② 偏性嫌気性菌の検出：①で菌の増殖が認められた TG 培地から 50μl をそれぞれ 1 枚の GAM 培地に移植し、37℃ で 1~3 日間嫌気培養した。培養後これらの GAM 培地から釣菌した菌を、それぞれ 2 枚の GAM 培地に移植し、1 枚を好気、他の 1 枚を嫌気状態で培養 (37℃、1 日間) した結果、今回検出された菌は 好気および嫌気の両条件で増殖した。
- ③ 検出された菌やコロニーの観察：①で菌の増殖が認められた TG 培地から釣菌し、グラム染色後、菌を観察した。また②では GAM 培地上に形成されたコロニーを観察したところ、検体番号 4 と 8 では 2 種類の、検体番号 8 では 1 種類の芽胞非形成菌が確認された。

以上の結果から、旧ワクチン 12 ロットいずれにも、クロストリジウム属菌を含め偏性嫌気性菌は検出されなかった。

6) コリネバクテリウム否定試験

本試験は検定項目には相当しないが、旧ワクチンはウシの皮膚材料由来であるため別途行った。Zapardiel, J らの方法 (J. Med.

Microbiol. 1998; 47: 79-83) に従い CBU 平板培地に各検体の原液を 200 μl, 50 μl 塗抹し、37℃ 好気培養した。出現したコロニーを、チンスダール平板培地と羊血液寒天培地に移植した。同時にグラム染色を行った。(コロニーは 2~3 日培養で出現した。) グラム陽性桿菌で、チンスダール平板培地上で黒色コロニーを形成したものについて異染小体染色とコロンビア平板培地に塗抹してアピコリネキットで同定試験を行った。なお、コントロール株としては、*Corynebacterium diphtheriae gravis* 型、*mitis* 型、*intermedius* 型の 3 株、*C. propinquum*、*C. striatum*、*C. pseudodiphtheriticum*、*C. xerosis* を用いた。さらに、CBU 平板培地での培養で出現したコロニーは、rRNA 遺伝子の一部を PCR 法により増幅して遺伝子配列を決定することにより菌種の同定を行った。以上の試験から、旧ワクチンの 12 ロットいずれにもコリネバクテリウムは検出されなかった。

7) マイコバクテリウム否定試験

生物学的製剤基準に沿って、小川培地による培養を行った結果、旧ワクチン全てのロットから、菌の増殖が認められなかった。この結果、結核菌を含むマイコバクテリウム陰性であると結論された。

8) 含湿度試験

生物学的製剤基準に沿って、物理化学試験の含湿度試験を乾燥減量法により試験した。旧ワクチンのロット毎にランダムに抽出した 3 アンプルの含湿度を測定した。その結果、12 ロット全てが検定基準を満たした (表 7)。

しかし、千葉血清 7801-A に関しては、アンプル内容物の外観において透明なシート状のものと通常の不透明白色形状のものが認められた。アンプル溶封が不完全で長期にわたる備蓄期間中に徐々に吸湿した可能性を考慮し、両形状のものを別個に測定したところ、いずれの形状のアンプルも含湿度は検定基準を満たした (表 7-2)。

9) 溶解液の無菌試験

生物学的製剤基準に沿って、旧ワクチン 12 ロットの添付の溶解液の無菌試験を行った結果、全てのロットの溶解液から菌は検出されず、検定基準を満たした。

10) 長期保存による力価推移の数学的解析

力価試験、安定性試験の参照品として用いられる参照痘そうワクチン（ロット 4）が、国立感染症研究所に 1972 年より 4℃ に保存され、旧ワクチンの経時的な力価試験に際して常に参照品として力価測定が行われてきた。参照痘そうワクチンに関しては、各年 5 回以上の力価試験が行われている。1978 年からの生データが保管されていて、その対数力価の実測値は、図 1 に示すとおりであった。これらのデータから、同一年度内の測定値はその年度の繰り返し測定とみなして、各年度毎の平均値（対数平均あるいは幾何平均）を求め、その結果に対して回帰式を当てはめた。旧ワクチン 12 ロットに関して改めて加速変性試験を行うための十分な検体量がないことから、これまでに得られている過去の力価試験成績の再解析により、力価の安定性評価が可能であるかを検討した。

加速変性試験の場合、通常はもとの力価を a 、低下の程度を x とすると、 $a/(a-x)$ の自然対数 $\text{LN}(a/(a-x))$ と保存時間の間に一次関係が成立することを利用し、その時間に対する回帰係数、すなわち反応速度常数を推定し、評価する。同一検体について数温度の反応速度常数が得られる場合、さらに Arrhenius の法則に基づき、反応速度常数と絶対温度の逆数との間の一次関係を利用して、実測していない様々な温度における反応速度常数の推定が可能となる。ただし今回の場合、参照痘そうワクチンでは 4℃ 保存の成績しがなく、また旧ワクチンの場合も -20℃ 保存の成績しかない。そこで参照痘そうワクチンについては 4℃ 保存での反応速度常数、旧ワクチンについては -20℃ あるいは -15℃ での反応速度常数の推定と失活曲線あるいは直線の推定を行うこととした。加速変性試験の場合反応速度常数は、 $\text{LN}(a/(a-x))/t$ のかわりに $\text{Log}(a/(a-x))/t$ が用いられることが多い。この場合、 $\text{Log}(a/(a-x))/t$ と $\text{Log}(\text{力価})/t$ は絶対値は同じであることから、その後の有効性消失までの時間の評価の利便性を考え、 $\text{Log}(\text{力価})/t$ として計算した。こうした計算結果を図 2 および図 3 に示す。実測値に対して全体に一次回帰を当てはめた場合に比べ、最初の 9 年間で 10 年目以降に別々の一次回帰を考えたほうが、よりよい当てはまりを示すように見える。さ

らに全体に保存年数の対数に対する回帰がもっともよい当てはまりを示すように見うけられた。これらを表 8 にまとめた。0 年次に $8.5 \log_{10}/\text{ml}$ の力価があった場合、それぞれの回帰の取り方によりばらつくが、検定合格ラインの $7.7 \log_{10}/\text{ml}$ に到達するのは 15 年から 19 年と推定された。しかし通常は前述のように、変性程度対数の対数が時間に対して一次回帰を示すと考えられることから、この場合ワクチンの安定性に、変性速度の異なる因子が 2 つ以上関わった結果、曲線回帰を示したものと考えるべきであろう。一方、旧ワクチンに関しては、各年での力価測定が 1 回のみであり、データのばらつきが大きいため力価の経時変化の推定は困難であった。いずれにしても、より正確な力価の経時変動の予測は、痘そうワクチンの備蓄の観点から必要である。今後、新ワクチンあるいは、平成 13 年度に作成される新ワクチンを用いて、複数温度保存条件での加速変性試験を行う必要がある。

(イ) 新ワクチン 1 ロット

新ワクチンは、乾燥細胞培養痘そうワクチンで製造法が旧ワクチン（乾燥痘そうワクチン）と異なるため検定項目も異なる。このため、新ワクチンに関しては、検定基準に適合するかを生物学的製剤基準に沿って以下の試験を行った。

1) 力価試験

力価試験は、参照痘そうワクチンを力価試験の標準品として用い、各希釈 15 卵に接種して行った。その結果、表 9 に示すように力価は、 $8.7 \log_{10}/\text{ml}$ と検定合格基準 $7.7 \log_{10}/\text{ml}$ の 10 倍で基準を満たした。

2) 安定性試験

安定性試験は、新ワクチンを 37℃ に 4 週間保存し、力価の減少が基準以内であることを見る試験である。保存後の力価は力価試験に沿って行った。その結果、表 9 に示すように保存後の力価は、 $8.1 \log_{10}/\text{ml}$ と検定合格基準 $7.7 \log_{10}/\text{ml}$ 以上でかつ力価の低下が $0.6 \log_{10}/\text{ml}$ と基準を満たした。

3) 無菌試験

生物学的製剤基準に沿って、新ワクチンの

無菌試験を行った結果、いずれも菌は検出されず検定基準を満たした。

4) マーカー試験 (1) 増殖温度感受性試験

本試験は、本来最終バルクを対象に行う試験であるが、新ワクチンは小分け品しかないため、小分け品を対象として生物学的製剤基準に沿って、ウサギ初代腎細胞での35℃および41℃でのウイルス増殖をブラック力価により判定した。なお、ウサギはSPF日本白色種4週令♀を用いた。参照品には、試験時に細胞参照痘そうワクチンが認定されていなかったため、参照痘そうワクチン(Lister株)を用いた。その結果、表10に示すように新ワクチンでは、35℃のブラック力価が8.0 log₁₀/ml、41℃のブラック力価が<2.7 log₁₀/ml(検出限界以下)と両温度でブラック力価の差が>5.3 log₁₀/mlと基準を満たした。一方参照痘そうワクチン(Lister株)では、両温度でのブラック力価は35℃/41℃で7.4 / 7.1 log₁₀/ml(差は0.3 log₁₀/ml)であった。

5) マーカー試験 (2) ふ化鶏卵漿尿膜接種試験

本試験も、本来最終バルクを対象に行う試験であるが、新ワクチンは小分け品しかないため、小分け品を対象として生物学的製剤基準に沿って発育鶏卵の漿尿膜での接種48時間後のポックサイズを測定した。その結果、表10に示すようにポックサイズは、最小1.0、最大1.65、平均1.2、SD 0.18mmであり、検定基準(3 mm以内)を満たした。

6) 含湿度試験

生物学的製剤基準に沿って、含湿度試験を旧ワクチンと同様に行った結果、表11に示すように検定基準を満たした。

7) 溶解液の無菌試験

生物学的製剤基準に沿って、新ワクチンの添付の溶解液の無菌試験を行った結果、いずれも菌は検出されず検定基準を満たした。

D. 考察

本研究の目的は、製造後20年以上経過した旧ワクチンと試作的に作られた新ワクチンの安

全性等を確認することである。旧ワクチンに関しては、ウシ皮膚由来のため検定基準にない菌の混入の有無についても検討した。その結果、コリネバクテリウム、マイコバクテリウムとも混入が否定された。本ワクチンは、無菌性を保証するものではなく、総菌数が基準以下であることを保証するものであるが、総菌数試験で検出された菌の同定を行った結果、通常、人に有害と考えられる菌は検出されなかった。力価および安定性に関しては、殆どのロットで検定基準を満たしていた。力価および安定性試験は、これまで旧ワクチンに関しては毎年あるいは隔年で行われているが、2年前の試験成績と比べて全て力価の上昇が認められた。これは、試験の精度に関しては参照痘そうワクチンの力価測定の結果(表1)から保証されるが、本年の試験に用いられた鶏卵のワクチニアウイルスに対する感受性が高かったためである。鶏卵のワクチニアウイルスに対する感受性の変動は、近年特に大きくなってきている。その原因は不明であるが、力価試験、安定性試験においては、鶏卵の感受性の変動は成績に大きな影響を与えるため、感受性の変動を補正するための標準化等の検討が今後必要になると考えられる。

長期保存による力価変動の予測は、今後の痘そうワクチンの備蓄およびワクチン生産を計画する上で重要である。参照痘そうワクチンの4℃での長期保存の力価変動の生データから予測される保存期間は、当初の力価が8.5 log₁₀/mlである場合15~19年と予測された。しかし、これまでの力価データは、膨大ではあるが単一温度条件でのデータしかなく、正確な予測をするには不十分であることが明らかとなった。新ワクチンに関しては、平成13年度に新たに作成される乾燥細胞培養痘そうワクチンと基本的に同一なワクチンで旧ワクチンと製造法、内容物が異なるため、力価変動が異なることが考えられる。今後、新ワクチンに関して、複数温度条件での加速変性試験を行いより正確に保存条件、保存期間による力価変動の予測を行うためのデータを得る必要があると考えられる。

新ワクチンに関しては、製造から2年しか経過していないこともあり、検定基準を全て満たしていた。

今般、米国NIID主導で行われた、米国の備蓄ワクチンのポランティアへの接種実験から、7.0 log₁₀/mlの力価があれば初種痘者への善感率が97.1%(Frey, S.E., et al., N Engl J Med., 346(17), 1265-1274, 2002)と、かつて日本で行われた実験成績(北村他、日本伝

染病学会誌: 37 巻, p205, 1963) と同様の結果が得られている。これらの報告から、旧ワクチンのポテンシーは今だ有効であると判断される。

以上の結果から、新旧ワクチンとも備蓄を継続することが望ましいと考えられるが、特に旧ワクチンに関しては、人へ接種した場合の副反応に関して充分留意する必要がある。

E. 結論

国家備蓄されている乾燥痘瘡ワクチン 12 ロットは、昭和 55 年度に作成されたものであり、これまで冷凍保存されている。この旧ワクチンに関して、生物製剤基準に準拠した試験およびその他の試験を行ったところ、現時点でも痘そうワクチンとしての有効性をほぼ満たしていた。平成 11 年度に作成された乾燥細胞培養痘そうワクチンに関しては、検定基準を満たしていた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

特になし

表1 参照痘そうワクチンの力価試験での力価

試験 No.	力価 (\log_{10}/ml)	試験の正否 (注1)
1	8.15	正
2	8.25	正
3	8.17	正
4	8.38	正
5	8.30	正
6	8.15	正
7	8.38	正
8	8.06	正
9	8.26	正
10	8.08	正
平均(SD)	8.22 (0.11)	

注1：参照痘そうワクチンは、力価（対数表示）が、 8.3 ± 0.30 を示さなければならない。

表2 力価試験と安定性試験の成績

ロット	力価 (1)	安定性力価(2)	(1) - (2)	判定
千葉 7801-A	8.5	8.7	-0.2	適
千葉 7801-B	8.6	8.6	0	適
北研-38	7.8	7.6	0.2	注1
北研-40	7.9	7.8	0.1	適
阪大-116	7.9	7.5	0.4	注1
阪大-119	8.0	8.0	0	適
阪大-120	9.0	8.6	0.4	適
武田 H-015	8.9	8.4	0.5	適
武田 H-016	8.4	8.3	0.1	適
武田 H-017	8.8	8.5	0.3	適
東芝-13	8.3	8.4	-0.1	適
東芝-14	8.4	8.2	0.2	適

注1：安定性試験の力価が検定合格基準の7.7を下回る。その他は基準を満たす。

表 3 総菌数試験結果

整理番号	製造所	ロット番号	表示量	総菌数 (cfu/ml)	
				今回の成績	過去の国家検定の成績
1	千葉	7801-A	1 ml	0	0
2	千葉	7801-B	1 ml	0	0
3	北研	38	1 ml	0	4
4	北研	40	1 ml	60	228
5	阪大	116	0.5 ml	0	0
6	阪大	119	0.5 ml	0	0
7	阪大	120	0.5 ml	4	4
8	武田	H015	1 ml	0	0
9	武田	H016	1 ml	8	8
10	武田	H017	1 ml	36	60
11	東芝	13	1 ml	0	0
12	東芝	14	1 ml	0	0