

## 4. 現在我が国で使用されていないワクチンの調査 — 腸チフスワクチンについて —

分担研究者：渡辺 治雄（国立感染症研究所・細菌部長）

**研究要旨** 発展途上国において腸チフスは大きな問題であり、多数の死亡者を出している。また、近年海外渡航者の増加に伴い、多くの旅行者が発展途上国に行き、腸チフスに罹患する機会が増えている。事実、我が国の腸チフス患者の7～8割が、インド、インドネシア、タイ等の帰国者で占められている。近年の腸チフス菌は薬剤耐性化傾向が高くなってきており、治療に抵抗を示す臨床例が増えている。このような状況において、海外渡航者の中にはワクチンを希望する例がみられているが、我が国では認可されているワクチンがないので個人輸入をして対応をするしかない。本研究においては、世界で使用されている腸チフスワクチンの現状を調査し、今後の要求に対応できるようにした。

### A. 研究目的

腸チフスは、全身性疾患であり、適切な治療を行わないと致死的になる。近年、アジアを中心に流行している腸チフス菌はクロラムフェニコールをはじめとする多くの薬剤に耐性を示す多剤耐性菌である。ニューキノロン剤に対する低感受性菌も出現してきており、治療に抵抗する臨床例が増加してきている。このようなケースを予防するにはワクチンを接種しておくのが効果的である。我が国においては認可されている腸チフスワクチンは現在のところ存在しないが、世界においては効果的なワクチンが使用されている。本研究においては、海外で使用されている腸チフスワクチンの現状およびその入手先を調査し、今後必要となる場合に備えることにした。

### B & C & D. 調査方法・結果・考察

腸チフスワクチン；ワクチンの種類と性状

#### 1) 弱毒生菌ワクチン

スイス血清ワクチン研究所で開発されたワクチンで腸チフス弱毒株 Ty21a 株を使用したワクチンである（商品名 Vivotif Berna）。Ty21a 株は1970年代に化学的な処理による突然変異の誘導により Ty2 株から作られた菌株である。Ty21a 株はその後の遺伝子解析により、UDP-galactose epimerase に欠陥がある galE 変異株であることがわかった。また、Ty21a 株はチフス菌の病原性に関係する Vi 抗原も持たない。このワクチンは、凍結乾燥された菌がゼラチンカプセルの中に入っているもので、腸管内で溶けるように作られている。ワクチンは腸溶錠として経口で投与される。6歳以上の人に投与が可能である。現在のところ、3歳未満の子供への投与の実験は行

われておらず安全性や効果などのデータはない。

投与方法は腸溶カプセル 1 個ずつを 1 日おきに 4 回、食事の 1 時間前に冷水で飲む。5 年間は効果が持続するといわれている。必要ならば最初に飲んでから 5 年目にブースターとして同量を服用すると効果が持続する。副作用は少なく、抗体は 2 年以上持続する。アジア、アフリカ、ヨーロッパ、アメリカ、南アメリカなどの 56 カ国で認可され使用されている。

このワクチンの禁忌は妊娠中の女性および細胞性免疫機能が低下する免疫疾患に罹っている人であるが、無症状の HIV 陽性者で CD4 陽性 T 細胞が 200 個/mm<sup>3</sup> 以上ある人には投与できる。その他に、このワクチンは、ポリオ、コレラ、黄熱病、風疹、麻疹、流行性耳下腺炎など他の生ワクチンと同時に投与しても問題がない。

問い合わせ先：

Swiss Serum and Vaccine Institute  
Berna Products  
Coral Gables, FL, USA  
Tel. (305)443-2900

製造方法：

Salmonella Typhi Ty2 の純培養菌を凍結乾燥しゼラチンカプセルの中に入れる。他国での検定方法は不明、情報なし。しかし、日本国内で検定をしたら 1 カプセル内の生存菌数、力価（動物に投与したときにチフス菌の Vi 抗原や O 抗原に対する抗体が誘導されるか）、菌の弱毒を示す遺伝子マーカーの確認、その他毒性試験など検定における一般的なことを調べなければならないと考えられる。

## 2) Vi 多糖体ワクチン

フランス Pasteur-Merieux 社で開発されたチフス菌の Vi 荚膜多糖抗原を精製したワクチン（商品名 Typhim Vi）である。皮下注射または筋肉注射により 1 回 25mg 投与する。ワクチン投与の効果は投与後 7 日から現れる。1 回の筋肉注射で効果が 2-3 年持続する。2 年ごとに追加接種をすることが望まれる。全菌体不活化ワクチンと同じような副作用があるが、その程度は比較的軽い。2 歳以下には使用が認められていない。推奨される保存温度は 2-8℃である。

しかし、他のワクチンと異なり、室温（22℃）でも約 3 年間保存可能である。さらに、冷蔵庫がない高温地域でも室温保存が可能である（37℃で約 6 ヶ月間）。ヨーロッパ、アフリカ、アジア、オーストラリア、アメリカなどで使用されている。

ワクチンの効果を持続させるため 3 年ごとの再接種を推奨している。黄熱病や A 型肝炎ワクチンといった海外旅行者が接種しなければならないワクチンと同時に接種することもできる。禁忌はワクチン成分に対する重篤な全身反応をおこす人である。それ以外に特に禁忌はない。このワクチンは HIV 感染者にも安全である。しかし、感染防御に有効な量の抗体産生は CD4 陽性 T 細胞の数に直接相関しているため、CD4 陽性 T 細胞が極端に少ない HIV 感染者には投与しても免疫が誘導されない。副反応は、発熱（0-1%）、頭痛（1.5-3%）、局所の紅斑・硬結（7%）に限られている。

問い合わせ先：

Pasteur-Merieux Connaught, USA.  
Discovery Drive, Swiftwater, PA  
18370-0187, USA  
Tel: (570)839-4267

製造方法：

Salmonella Typhi Ty2 の純培養菌から cetavlon（陽性界面活性剤）で沈殿させて Vi 抗原を抽出する。そして、Vi 抗原を精製して適当な緩衝液に溶かす。

他国での検定方法は不明。しかし、日本国内で検定をしたら Vi 抗原の純度（LPS や膜蛋白の混入がどれくらいあるか）の測定、力価（動物に投与したときに Vi 抗原に対する抗体が誘導されるか）試験、その他毒性試験など検定における一般的なことを調べる必要がある。

## 3) 全菌体不活化ワクチン（加熱フェノール不活化またはアセトン不活化ワクチン）

加熱フェノール不活化ワクチンは、日本でも腸チフス・パラチフス混合ワクチンとして、1974 年まで使用されていたものである。我が国では腸チフス患者が激減したことおよび重篤な副反応が生じたことから使用を中止した。アメリカでは現在も経口ワクチンが使用できない人に使用されている。その他に、アセトン不活化ワクチンも使用

されている。商品名は、Typhiod Vaccine, U.S.P., Typhoid Vaccine (Acetoe-killed and dried) である。初回 4 週間隔で 2 回皮下接種し、3 年ごとに追加接種を行う。効果は 2-3 年持続する。いくつかの発展途上国で現在も使用されており、コストも高くない。野外実験では、不活化ワクチン有効性は 51-67% であった。副反応はかなり強い。注射箇所反応としては、発赤、腫脹、疼痛などを認める。全身反応は、悪寒、発熱、頭痛、全身倦怠感、めまい、嘔吐、下痢、腹痛、関節痛、発疹をみることがある。野外実験ではワクチン接種者の 2-17% が短期間学校や仕事を休んだり、9-34% の人に発熱や全身性の反応を起こすような副反応があった。しかし、アナフィラキシーショックや慢性化する副反応、致死的な副反応はなかった。このワクチンに対する禁忌はないが、以前にこのワクチンを投与して重篤な全身症状を起こした人は接種しない方がよい。

問い合わせ先：

Wyeth-Ayerst Laboratories, Inc.  
Philadelphia, PA 19101, USA  
Tel. (215)688-4400

製造方法（過去に日本で使っていた腸チフスパラチフス混合ワクチン）：

チフス菌、パラチフス A 菌及びパラチフス B 菌のそれぞれ純培養したものを緩衝生理食塩水に浮遊して 56℃ で 1 時間殺菌しこれを一定の割合に混合し防腐剤を加えたもの。含有菌数は 1ml 中にチフス菌 10 億個、パラチフス A 菌パラチフス B 菌をそれぞれ 2 億 5 千万個の計 15 億個になっている

検定方法：

pH6.8-7.4 以内、所定以外の菌を含まないこと、無菌試験で雑菌や生菌を含まないこと、安全試験で外来の毒性物質の混入のないことを確かめる。

力価試験によって腸チフス菌に対するマウスの能動感染防御を試験する。この試験によりこのワクチンが腸チフス菌に対する能動免疫を与える効力があるか否かがわかる。ただ、このマウスにおける感染防御能は必ずしも人体における腸チフス感染防御能を忠実に表すものではない。WHO では力価試験法としてマウス能動感染防御試験の他にウサギにワクチンを注射し抗体産生能を測定することを併用するように勧めている。

## E. 結論

3 種のワクチンが世界において使用されている。特に、弱毒生菌ワクチン、Vi 多糖体ワクチンは副作用も少なく、効果があることが確認されている。腸チフスの流行地への旅行者等への接種が進められている。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

発表論文

Hirose, k., Tamura, K., Sagara, H., and Watanabe, H. Antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A isolated from clinical patients in Japan. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45:956-958. 2001

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし

## 5. 経口生ポリオワクチンの品質評価における日本と海外の相違点

分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部長）

協力研究者：永田 典代（同感染病理部）、倉田 毅（同感染病理部）

堀内 善信（同安全性研究部）

**研究要旨** 経口生ポリオワクチンの神経毒力試験について WHO 基準と日本の生物製剤基準を比較した。最も異なる点は比較に用いられる参照ワクチン株の相違であった。ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス TgPVR21 を用いた神経毒力試験により二つの参照ワクチン株の毒力に相違があることが明らかとなった。この相違は製造されるワクチンの毒力と力価に影響する可能性がある。このようにワクチンの品質管理に用いられている参照品が海外と異なる場合、その性状を把握しておくことが必要である。

### A. 研究目的

海外において用いられている経口生ポリオワクチンの品質評価のうち、最も重要な評価方法の一つである神経毒力試験について日本と海外の相違点を明らかにする。神経毒力試験はワクチン株の弱毒化と毒力復帰の有無を動物を用いて評価を行う安全性試験である。今回は基準に記載されている試験方法を比較するとともに、評価において用いられている欧米諸国と日本の参照ワクチン株についてポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス(TgPVR21)を用いて神経毒力の評価を行った。

### B. 研究方法

1. 生物製剤基準（厚生省、1993 年版、pp183-188）と WHO Technical report series 800, 1990, p30-86 に記載されている経口生ポリオワクチンの神経毒力試験（Requirements for poliomyelitis vaccine (oral), Neurovirulence tests in

monkeys）に記載されている内容について比較した。

2. 欧米諸国で用いられている参照ワクチン（WHO/III）および日本の参照ワクチン（F313）株について TgPVR21 を用いて神経毒力試験を行った。尚、この実験は WHO 共同研究の一環として行った。

#### 使用動物：

TgPVR21 を合計 128 匹（雌雄同数）を用いた。これらの動物は SPF 下で飼育管理したもので、実験動物中央研究所より供与された。

#### 使用ウイルス：

WHO/III（NIBSC より供与）および F313 株を用いた。いずれも 3 型ポリオウイルスである。

#### 実験計画：

一群あたり 32 匹を用いた。マウス 1 匹に対し  $10^{3.5}$ CCID<sub>50</sub> あるいは  $10^{4.5}$ CCID<sub>50</sub>/5 $\mu$ l 量のウイルス液をそれぞれ脊髄内に接種し、接種後の麻痺の発現を観察した。観察期間は 14 日間

とした。なお、これらの動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の規定にもとづいて行った。

#### 統計解析：

ワクチンの神経毒力の比較は、麻痺が発現した動物数について常法どおり  $\chi^2$  検定を行った。

#### 組織病理学的解析：

観察期間中に瀕死になった動物および観察終了後の動物の組織材料を採取した。殺処分はエーテル過麻酔により行った。材料は脊椎を含む脊髄を採取し、定法通り 10%ホルマリン固定後 EDTA 脱灰を行い、パラフィン切片を作成した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色及びクリューバー・バレラ染色を行った。

### C. 研究結果

1. 両基準書における相違点は表 1 に示したとおりである。要約するとつぎの 3 つの点が異なった。

- 1) 試験での比較対照として用いる reference 株が異なる。
- 2) 試験動物種が異なる。
- 3) 材料の希釈段階数が異なる。

2. TgPVR21 マウスの神経毒力試験により 2 つの参照ワクチン株の神経毒力の相違が明らかとなった。実験結果は図 1 に示したとおりである。実数は次のとおりである。

- 1)  $10^{3.5}$ CCID<sub>50</sub> 接種群：WHO/III=5/32 (麻痺数/接種動物数)、F313=16/32。  
 $\chi^2=8.576$  (p=0.0034)。
- 2)  $10^{4.5}$ CCID<sub>50</sub> 接種群：WHO/III=19/32、F313=27/32。  
 $\chi^2=4.947$  (p=0.0261)。

統計処理の結果、WHO/III 株は F313 株より有意に神経毒力が弱かった。

3. 組織病変において株による特異性は無かった。麻痺を発症した動物は脊髄前角を中心に病変を認めた。病変は神経細胞の変性、壊死、消失とそれに伴う炎症性反応、すなわちグリオーシス、単核系細胞を中心とした血管周囲性細胞浸潤、髄膜における細胞浸潤であった。これらの病変は動物個体の病期と症状により様々な程度で見られた。図 2 に代表的な組織病変像を示した。

### D. 考察

経口生ポリオワクチンの神経毒力試験はワクチン株の弱毒化と毒力復帰を否定するための最も重要な品質評価の一つである。今回 WHO の基準と生物製剤基準を比較したが、最も異なる相違は比較対照に用いられる参照ワクチン株が異なることであった。この 2 つの株についてサルにおける神経毒力を比較したデータはないが、今回、同等の感受性をもつ TgPVR21 を用いて試験を行った。その結果、下肢の麻痺を指標とした神経毒力の相違が明らかとなった。したがって、F313 株を参照ウイルスとして製造されたワクチンの毒力の方が WHO/III のそれよりも強いことが予想される。神経毒力と力価は相関すると考えられているため、参照品のこのような相違は、製造されたワクチンの神経毒力と力価に影響する可能性がある。

### E. 結論

我が国のワクチンの品質管理に用いられている参照品は経口生ポリオワクチンのように、欧米諸国と異なるものが使用されている場合がある。それぞれの参照品の性状を把握しておくことが品質評価において必要である。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

発表論文

Noriyo Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzaki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A and Kurata T: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys. Vaccine 2001, 19: 3201-3208

### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

表1 WHO と日本の経口生ポリオワクチン神経毒力試験の比較

	WHO requirement	日本の生物製剤基準
参照ワクチン*	WHO/I, WHO/II, WHO/III	F113, F207, F313
使用動物 (サル)	<i>Macaca</i> 属 (カニクイザル、アカゲザルなど) または <i>Cercopithecus</i> 属 (アフリカミドリザル)	<i>Macaca</i> 属 (カニクイザル)
動物数 (1 群)	1, 2 型は 11 頭以上、3 型は 18 頭以上	
希釈段階 (一頭あたりの ウイルス量)	1 段階 ( $10^{5.5}$ – $10^{6.5}$ CCID <sub>50</sub> /0.1ml)	2 段階 ( $10^6$ CCID <sub>50</sub> および $10^4$ CCID <sub>50</sub> /0.1ml)
接種部位	腰髄膨大部	
評価部位	腰髄(12)、頸髄(10)、延髄(2)、橋と小脳(1)、中脳(1)、 大脳皮質(左右 1)、視床(左右 1)	
評価方法	組織病変度による 4 段階評価	

\*順に 1, 2, 3 型ポリオウイルス

図1 WHO/ III 株と F313 株の TgPVR21 を用いた神経毒力試験

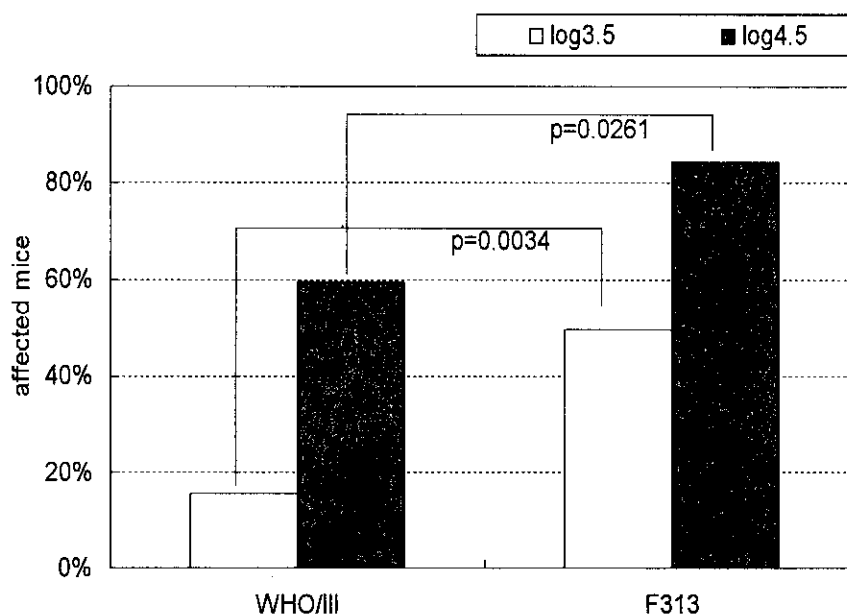
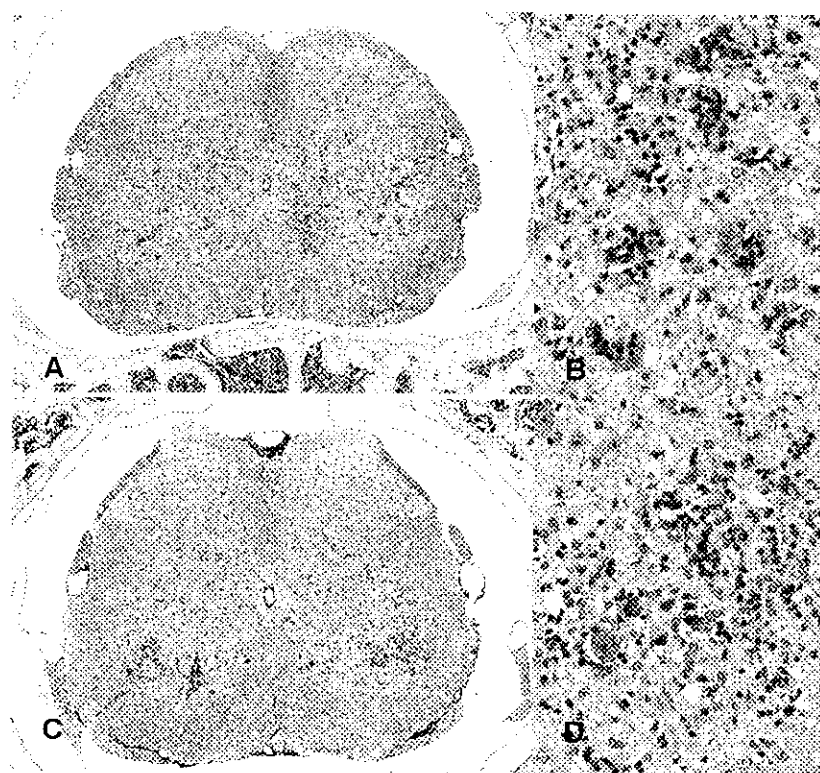


図2 WHO/III株もしくはF313株脊髄内接種後のTgPVR21の腰髄組織病変

- A. WHO/III株( $10^{4.5}$ CCID<sub>50</sub>/mouse量)接種後3日目に左後肢の弛緩性麻痺を発症しその後両側後肢麻痺に進展したTgPVR21(No.Tg5424)。接種後14日目に解剖し脊髄を採取した(HE染色、撮影倍率4倍)。
- B. 同部位拡大(HE染色、40倍)。
- C. F313株( $10^{4.5}$ CCID<sub>50</sub>/mouse量)接種後3日目に左後肢の弛緩性麻痺を発症しその後両側後肢麻痺に進展したTgPVR21(No.Tg5303)。接種後14日目に解剖し脊髄を採取した(HE染色、4倍)。
- D. 同部位拡大(HE染色、40倍)。



## 6. 細菌ワクチンの検討

分担研究者：荒川 宜親（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部長）

協力研究者：近田 俊文（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長）

高橋 元秀（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長）

山本 三郎（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長）

堀内 善信（国立感染症研究所 安全性研究部 室長）

佐々木次雄（国立感染症研究所 安全性研究部 室長）

新谷 三春（国立感染症研究所 安全性研究部 主任研究官）

**研究要旨** 海外で製造・使用されている細菌ワクチンについて、(1) ジフテリア・破傷風・百日咳ワクチンの混合ワクチン (2) インフルエンザ菌 b 型ワクチン (3) BCG ワクチンに関して、海外ワクチン製品情報とその品質管理情報を入手し、国内の生物学的製剤基準並びに国家検定基準と比較することによって、それらワクチンの品質評価の検討を行った。

### A. 研究目的

海外で製造・使用されている細菌ワクチンについては、国内で製造・使用されている同種類の製剤が存在するものと、国内では未認可のものがある。それら細菌ワクチンの品質については、国内では生物学的製剤基準、国家検定基準に準拠して品質評価を行っているが、海外では品質評価法が異なることが予想される。本研究では、海外（特に欧米）で製造・使用されている細菌ワクチンの製品検索を行い、その品質管理に関する情報を入手することを目的として研究を行った。また、国内では製造されていない海外製造ワクチンについてもその品質管理に関する情報を入手することも目的とした。

### B. 研究方法

海外で製造・使用されている細菌ワクチン製剤の製品検索とその品質管理情報は、文献（論文、学会、国際会議）情報、製造メーカーのインターネット情報などで入手を行った。また、製品の添付文書を入手することによっても行った。一部、製品を入手できたものは予備的に品質管理試験を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究はヒト検体を使用しない。実験動物を使用する場合があるが、国立感染症研究所実験動物委員会で定められた方法に準拠して行った。



## C. 研究結果

海外で製造・使用されている細菌ワクチンは以下のような製品情報と品質管理情報であった。

- (1) ジフテリア・破傷風・百日咳ワクチン関係 (DTwP, DTaP) では、基本的に混合ワクチンとして製造、使用されており、国内では同種類の製剤が存在する。無細胞百日咳ワクチンの抗原組成に関しては、国内も欧米も、製造メーカーによりかなり独自であり、含有防御抗原 (PT, FHA, Pertactin, Fimbriae) の量と比は異なっていた。無毒化された PT (百日咳毒素) は共通して含まれている。また、欧米で使用されている無細胞百日咳ワクチンの中には、わが国の製造メーカーが製造したワクチン原液を輸入して使用しているものもある。一方、欧では、まだ旧来の不活化全菌体の百日咳ワクチン (副反応の強い) も使用している国々も存在している。品質管理については、欧米では一応 WHO ガイドラインと WHO 基準に従っているが、製造メーカー独自の品質管理法を用いており、わが国の生物学的製剤基準並びに国家検定基準のような統一された高度の品質管理法を用いていない。特に、有効性と安全性の品質管理試験で大きな相違が見られた。また、ワクチン中に含まれるアルミニウム含量も、わが国の生物学的製剤基準 0.3mg 以下に比べ、WHO ガイドラインと WHO 基準では 2.5mg 以下となっている。実際に市販されているアルミニウム量は、わが国製剤では 0.2mg 前後であり、海外製剤では大半が 1.0mg 程度であった。

### 海外 DTaP 関連ワクチンリスト

- [1] Chiron: Tricelluvax (組換 PT, FHA, Pertactin, D, T)
- [2] GlaxoSmithKline : Infanrix (成分 : PT, FHA, Pertactin, D, T)
- [3] Aventis Pasteur Canada : Tripacel (PT, FHA, Pertactin, fimbriae, D, T) , Quadracel (PT, FHA, Pertactin, fimbriae, D, T, IVP)
- [4] Aventis Pasteur Canada : Adacel (PT, FHA, Pertactin, fimbriae, D, T) 成人用
- [5] Aventis Pasteur France: Tetravax, Tetraxim (PT, FHA, D, T, IVP) ,

Pentaxim (PT, FHA, D, T, IVP, Hib)

- [6] Aventis Pasteur USA : Tripedia (PT, FHA, D, T) aP 成分 from Biken, Japan
- [7] Wyeth Lederle USA : Acel-Imune (PT, FHA, Pertactin, fimbriae, D, T) aP 成分 from Takeda, Japan (USA 製造中断)
- [8] Baxter Healthcare (North American Vaccine) : Certiva (PT, D, T) (USA 製造中断)

- (2) インフルエンザ菌 b 型ワクチンでは、国内では未認可である。欧米では、製造メーカーにより組成の異なった 3 種類のワクチンが使用されている。PRP-T は莢膜多糖と破傷風トキソイドを共有結合させたものである。HbOC は PRP と CRM197 (変異ジフテリア毒素、無毒) を共有結合させたものであり、PRP-OMP は PRP と Group-B 髄膜炎菌の外膜蛋白複合体を共有結合させたものである。品質管理については、WHO 基準によると以下のようなものである。

- A) ヒト乳児の免疫学的特性と関連する生物検定法がないとしている。
- B) 従って品質管理の方法として、毎ロットのワクチンの組成が、決定的臨床試験に用いたロットの規格と一貫性があることを保証するために分子特性と純度の試験の採用を強調している。
- C) Lot release の試験として動物を使う力価試験は不要で、代わりに物理化学的なクライテリアに焦点を当てるべきであるとしている。
- D) 国際標準品はない。

### 海外 Hib 関連ワクチンリスト

- [1] Aventis Pasteur : ActHIB, OmniHIB ( PRP-T, Tetanus toxoid conjugate)
- [2] Wyeth Lederle: HibTITER (HbOC, Diphtheria CRM197 protein conjugate)
- [3] Merck : PedvaxHIB (PRP-OMP, Meningococcal protein conjugate)

- (3) BCG ワクチンでは、欧米の BCG ワクチンは基本的には国内と類似しているが、

その製造菌株は異なっている。各菌株(菌株)の間には固形培地上のコロニーの形態、菌体の大きさ、脂質含量、分泌タンパク質の性状、毒力などに差異が認められる。品質管理については、わが国の生物学的製剤基準と WHO 基準があり、大まかには類似しているが、シード、バルク、小分製品の各試験項目の試験法などに差異が認められる。

#### 海外 BCG 関連ワクチンリスト

- [1] Aventis Pasteur (Immucyst)
- [2] Aventis Pasteur MSD (BCG Vaccine)
- [3] National Center for Infectious and Parasitic Diseases-Bulgaria (BCG Vaccine, BCG for Immunotherapy)
- [4] Evans Medeva (BCG Vaccine)
- [5] Statens Seruminstitut Copenhagen (BCG Vaccine SSI, BCG Danish Strain 1331 for Immunotherapy)

#### D. 考察

海外で製造・使用されている細菌ワクチン製剤に関して製品情報と品質管理情報を入力し、(1)ジフテリア・破傷風・百日咳ワクチンの混合ワクチン、(2)インフルエンザ菌 b 型ワクチン、(3)BCG ワクチンについて、研究結果の項目に製品一覧表と共にまとめを行った。特に、海外と国内の双方で製造・使用されている細菌ワクチン製剤については、その製品性状と品質は、かなり相違していることが予想された。海外で製造・使用されている細菌ワクチンも有効で安全な製剤と思われるが、その有効性の程度、安全性の程度などについては、文献(論文、学会、国際会議)情報、製造メーカーのインターネット情報からのみでは判断がつかない場合が多いことが明かとなった。一部実施したの安全性に関する動物試験では、海外製造ワクチンにわが国においてこれまで使用経験のない強い動物毒性を示す製品が存在することが明かとなっている。また、ワクチン中に含まれるアルミニウ

ム含量も問題があることが明かとなった。今後、わが国の生物学的製剤基準、国家検定基準に準拠した試験を行い、海外製造ワクチンの品質評価を行う予定である。また、国内未認可のワクチンについては、WHO 基準などに準拠して品質評価を行う予定である。

#### E. 結論

海外で製造・使用されている細菌ワクチンについて、(1)ジフテリア・破傷風・百日咳ワクチンの混合ワクチン(2)インフルエンザ菌 b 型ワクチン(3)BCG ワクチンに関して、海外ワクチン製品情報とその品質管理情報を入力し、国内の生物学的製剤基準並びに国家検定基準と比較することによって、それらワクチンの品質評価の検討を行った。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Horiuchi, Y., Takahashi, M., Konda, T., Ochiai, M., Yamamoto, A., Kataoka, M., Toyozumi, H. and Arakawa Y.: Japanese experience and concepts in quality control of diphtheria tetanus acellular pertussis combined (DTaP) vaccines. Jpn. J. Infect. Dis., 54 (5), 167-180, 2001.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

## 7. 海外において使用されている不活化インフルエンザ ワクチンの品質評価に関する研究

分担研究者：倉根 一郎（国立感染症研究所 ウイルス第 1 部長）

共同研究者：小田切孝人、板村繁之

（国立感染症研究所ウイルス第 1 部呼吸器系ウイルス室）

**研究要旨** インフルエンザの予防に最も効果的なのは、ワクチン接種である。有効性の高いワクチン製剤を供給するためには、海外で市販されているワクチンと国産ワクチンとの性状の違いを明確にし、国産ワクチンについて改善すべき点を検討する必要がある。そこで本研究では、海外で市販されているワクチン製剤を輸入し、現行の製剤基準にそって国産ワクチンとの間で性状比較を行う。今年度は、輸入に先立ち海外のワクチンの性状に関する情報を収集し、製造元との輸入交渉を行った。また、性状解析項目を立案し、次年度に輸入されるワクチンの解析に備えた基礎研究を行った。

### A. 研究目的

平成 12 年度からインフルエンザワクチンの検定法が一部改正され、ワクチンに含まれるウイルス量が赤血球凝集（HA）活性を基準にした CCA からウイルス HA 蛋白の絶対量（ウイルス 1 株あたり 30 mg/ml 以上）で規定されるようになった。また、ワクチン力価の評価も、従来の卵内中和試験を用いた中和抗体産生能に変わって、一元免疫拡散（SRID）法による HA 蛋白含量に変更された。SRID によるワクチンの評価は欧州では 1992 年から採用されていたもので、今回の改正によってわが国のインフルエンザワクチンも欧米のワクチンと直接比べることができるようになった。さらに、ワクチン検定に SRID 法を採用することにより、検定に要する時間を大幅に短縮できるようになり、新型ウイルスによる pandemic の際には速やかにワクチン供給を

行うことが期待できる。

一方、ワクチン検定の評価法の変更に伴って、従来の基準では対応できない問題点も浮上してきた。そこで、本研究では、わが国で製造されている現行のインフルエンザ不活化ワクチンと諸外国のワクチンとの性状および検定基準などを比較して、今後改善すべき点について基礎的な研究を行うことを目的としている。

### B. 研究方法

#### 1. 諸外国で産生されているワクチンの性状に関する情報収集

インフルエンザワクチンは輸入禁止製剤であり、外国のワクチンの入手には厚労省の輸入許可が必要である。そこで、海外のワクチンの性状解析に先立って、本年度は EU、

米国および豪州からそれぞれの国で市販されているワクチンに関する情報を収集した。

## 2. 海外ワクチンの輸入手続き

海外のインフルエンザワクチンを試験的に輸入するために、厚労省医政局へ輸入申請を行った。また、ワクチン製品を分与してくれる製造メーカーの調査を行い、輸入交渉を行った。

## 3. ワクチンの性状解析項目の検討

現行のわが国のインフルエンザワクチン検定基準および製造所で行われる自家試験項目を基準として、輸入ワクチンの試験項目を立案した。

## C. 研究結果

### 1. 海外のインフルエンザワクチン製剤とわが国の製剤の情報にもとづいた性状比較

海外のワクチン製剤の輸入に先立ち、EU、米国および豪州で市販されているワクチンの性状について、それぞれの地域で国家検定を担当している NIBSC、CBER、CSL の責任者から情報収集を行った。米国で認可されているインフルエンザワクチンは、split および不活化全粒子ワクチンであるが、全ての製造所は split ワクチンのみを製造している。ワクチン製剤は H1、H3、B 型インフルエンザウイルスを含む 3 価ワクチンで、それぞれのウイルス含量はわが国の基準と同じく、HA 蛋白で 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上である。

一方、EU と豪州では、split ワクチンと精製 HA サブユニットワクチンが認可されており、これらは 1 dose/シリンジという形態で市販されている。ワクチンの力価検定は SRID 法で行われ、わが国や米国と同様に、ワクチンには 1 株あたり 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の HA 蛋白を含むことが要求されている。わが国のインフルエンザワクチン製剤と諸外国の製剤とでは、含まれている総蛋白量に大きな違いが見られる。すなわち、わが国のワクチンの総タンパク量は 240  $\mu\text{g}/\text{ml}$  が上限であるのに対して、諸外国のワクチンにはその上限はない。したがって、海外のワクチンには通常 150~400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のウイルスが含まれている。

### 2. ワクチン検定項目の比較

ワクチンの検定項目については、それぞれの国で定めている国家検定基準に沿って行われているが、わが国の検査項目と大きな違いは認められなかった。例えば、米国では無菌試験、マウスまたはモルモットにおける安全性試験、エンドトキシン試験などが行われている。さらに、製造過程で使用した抗生剤、界面活性剤の残量検査や孵化鶏卵を用いたウイルス不活化試験などが行われている。一方、EU では LAL (Limulus amoebocyte lysate) テストによるエンドトキシン試験、サブユニットワクチンの場合には SDS-PAGE による HA とノイラミニダーゼ (NA) 蛋白の純度試験などが行われている。

### 3. 臨床試験による認可基準

EU においてはインフルエンザワクチン製剤の市販に先立ち、ヒトにおける臨床試験で以下の 3 つの基準のうち、いずれかひとつを満たすことが要求されている。

- ワクチン接種後に 18-60 歳代で 40%以上、60 歳以上では 30%以上の人々が HI 抗体応答があること。
- 接種後の抗体価は接種前に比べて 18-60 歳代では 2.5 倍、60 歳以上では 2.0 倍以上の上昇が認められること。
- 接種後の HI 抗体価が 40 倍以上または SRH で 25mm<sup>2</sup> 以上になるものが、18-60 歳代で 70%以上、60 歳以上では 60%以上いること。

このような臨床試験によるワクチン製剤の事前評価はわが国では行われていない。

### 4. 海外のインフルエンザワクチン製剤の輸入手続き

輸入禁止製剤であるインフルエンザワクチンの輸入のために、厚労省医政局経済課に米国、EU、豪州からそれぞれ 120 dose の輸入申請をした。また、ワクチン入手先として、米国はワイスレダリー社、EU はアベンティスパスツール社、豪州は CSL 社と交渉を行った。現時点で輸入交渉に応じたのは米国と EU の 2 社にとどまっている。

## 5. ワクチンの性状解析項目

それぞれの国で市販されているワクチンの性状を明らかにするために以下の項目について検討する。

### a) 現行の国家検定試験項目

- ・ 分画試験
- ・ エーテル否定試験
- ・ たん白質含量試験
- ・ ホルムアルデヒド含量試験
- ・ 無菌試験
- ・ 異常毒性否定試験
- ・ マウス白血球数減少試験
- ・ 力価試験（一元放射免疫拡散試験）

### b) 検定項目には含まれないが、メーカーの自家試験で行われている項目。

- ・ pH 試験
- ・ チメロサル含量試験
- ・ 不活化試験
- ・ マウス体重減少試験

### c) 国家試験項目から除外された項目。

- ・ 力価試験（卵中和試験）

## D & E. 考察 & 結論

インフルエンザの予防に最も効果的なのは、インフルエンザワクチンの接種である。ワクチンの有効性に関する研究は国内外の多くの研究グループによって行われ、その発病阻止効果は一般健常人で 70~90%とされている。このような効果を確実にあげるためには、ワクチン製剤に含まれるウイルス含量やワクチンの品質が国際レベルでの評価に耐え得るものでなければならない。これまで国産のワクチンはウイルス含量や力価の評価法が諸外国のそれとは異なっていたなどの理由から、海外のワクチン製剤と直接比較されることはなかった。しかし、平成 12 年度からワクチン製剤基準の一部改訂により、比較が可能になったことから、それぞれのワクチンの性状について徹底的に比較して、今後改善すべき点を明確にし、また、それに伴って検定基準の見直しについても検討する必要がでてきた。これによって、将来的に海外のワクチンが輸入された場合でも、競争に耐え得るよりよいワクチンの供給が期待できる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Odagiri, T., Kariwa, H., and Ohara, Y.: The influenza B virus BM2 protein may be involved in the ribonucleoprotein complexes through the binding with membrane protein M1. International Congress Series 1219, 411-419 (2001)
2. Obuchi, M., Odagiri, T., Asakura, K. and Ohara, Y.: Association of L\* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus with microtubules in infected cells. Virology 289 95-102 (2001)
3. 小田切 孝人: インフルエンザワクチン株とワクチンの効果, MEDICO 32, 321-325 (2001)
4. 小田切 孝人: インフルエンザウイルス株サーベイランスの現状と問題点 インフルエンザ 3, 45-52 (2002)

### 2. 学会発表

1. 小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、渡邊真治、今井正樹、倉根一郎、田代真人。200/2001 シーズンのインフルエンザの流行状況。第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪、11 月 (2001)。
2. 西藤岳彦、小田切孝人、田代真人。B 型インフルエンザウイルス HA 遺伝子の分子進化。第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪、11 月 (2001)。
3. 今井正樹、渡邊真治、小田切孝人。B 型インフルエンザウイルス NS2 蛋白質の性状。第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪、11 月 (2001)。
4. Masaki Imai, Shinji Watanabe and Takato Odagiri. The influenza B virus NS2 protein is involved in the ribonucleoprotein complexes by direct binding with nucleoprotein. Research Conference on Orthomyxoviruses, Texel, The Netherlands, November (2001).

5. Sinji Watanabe, Masaki Imai and Takato Odagiri. Cytoplasmic transport of the influenza B virus BM2 protein. Research Conference on Orthomyxo-viruses, Texel, The Netherlands, November (2001).
6. 今井正樹、渡邊真治、小田切孝人。B型インフルエンザウイルス NS2 蛋白の性状。第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)。
7. 渡邊真治、今井正樹、小田切孝人。B型インフルエンザウイルス BM2 蛋白質の細胞内輸送。第 24 回日本分子生物学会年会、横浜 (2001)。
8. Takato Odagiri, Shinji Watanabe

and Masaki Imai: Molecular characterizations of the small viral products of influenza B virus. 6<sup>th</sup> Annual Meeting of US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute Respiratory Infections (ARI) Panel. New Orleans, February 14-15 (2002)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Tanabayashi, K, Tashiro, M	Recombinant wild-type and Edmonston strains measles viruses bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity.	J Virol			in press
Kato A, Onishi Y, Hishiyama M, Kohase M, Saito S, Tashiro M, Nagai Y	Carboxy-terminal half of the Sendai virus C protein is responsible for both counteracting the antiviral action of interferon and down regulating the viral RNA synthesis.	J Virol			in press
Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S	Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines.	J Immunol	168	2930-2938	2002
Yoshikawa T, Asao Y, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Goshima F, Nishiyama Y	Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis.	J Med Virol	66	497-505	2002
Hasegawa H, Kadowaki S, Watanabe I, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T	Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination.	Vaccine	20	1050-1057	2002
Hirose K. et al.	Antibiotic susceptibility of Salmonella enterica serovar Typhi and Salmonella enterica serovar Paratyphi A isolated from clinical patients in Japan	Antimicrobiol Agents Chemo	45	956-958	2001
Odagiri T, Kariwa H, Ohara Y	The influenza B virus BM2 protein may be involved in the ribonucleoprotein complexes through the binding with membrane protein M1.	International Congress Series	1219	411-419	2001
Shimoda M, Nakamura T, Takahashi Y, Asanuma H, Tamura S, Kurata T, Mizuochi T, Azuma N, Kannno C, Takemori T	Isotype-specific Selection of High Affinity Memory B Cells in Nasal-associated Lymphoid Tissue.	J Exp Med	194	1597-1607	2001



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kato A, Ohnishi Y, Hohase M, Saito S, Tashiro M, Nagai Y	Y2 the smallest of the Sendai virus C proteins, is fully capable of both counteracting the anti-viral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis.	J Virol	75	3802-3810	2001
Horiuchi Y, Takahashi M, Konda T, Ochiai M, Yamamoto A, Kataoka M, Toyozumi H, Arakawa Y	Japanese experience and concepts in quality control of diphtheria tetanus acellular pertussis combined (DTaP) vaccines.	Jpn J Infect Dis	54	167-180	2001
Reickert T, Sugaya N, Fedson D, Glezen W, Simonen L, Tashiro M	The Japanese Experience with vaccinatiog schoolchildren against influenza.	New Engl J Med	344	889-896	2001
Layne SP, Beigelsdijk TJ, Taubenberger JK, Cox NJ, Gust ID, Hay AJ, Tashiro M, Lavanchy D	Global laboratory against influenza.	Science	293	1729	2001
Saito T, Lim W, Suzuki Y, Kida H, Nishimura S-I, Tashiro M	Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong.	Vaccine	20	125-133	2001
Umino Y, Tashiro M	Inhibition of rubella virus growth by Fungizone.	Vaccine	19	1369-1372	2001
Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Sata T, Kurata T	Protection against influenza B virus infection by immunization with DNA vaccines.	Vaccine	19	1446-1455	2001
Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, Kurata T, Tamura S	Effects of intranasal administration of cholera toxin (or Escherichia coli heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain.	Vaccine	19	1652-1660	2001
Hagiwara Y, Tsuji T, Iwasaki T, Kadowaki S, Asanuma H, Chen Z, Komase K, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S	Effectiveness and safety of mutant Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine.	Vaccine	19	2071-2079	2001
Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzuki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T	Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys.	Vaccine	19	3201-3208	2001
Asanuma H, Hirokawa K, Uchiyama M, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T	Immune responses and protection in different strains of aged mice immunized intranasally with an adjuvant-combined influenza vaccine.	Vaccine	19	3981-3989	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Obuchi M, Odagiri T, Asakura K, Ohara Y	Association of L* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus with microtubules in infected cells.	Virology	289	95-102	2001
Chen Z, Kurata T, Tamura S	Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins.	Jpn J Infect Dis	53	219-228	2000