

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

海外において製造・使用されている
ワクチンの品質評価に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成 15 (2003) 年 3 月

海外において製造・使用されているワクチンの 品質評価に関する研究班

区分	氏名	所 属	職名
班長	倉田 毅	国立感染症研究所	副所長
班員	小室 勝利	国立感染症研究所血液・安全性研究部	部長
	宮村 達男	国立感染症研究所ウイルス第2部	部長
	田代 真人	国立感染症研究所ウイルス第3部	部長
	渡辺 治雄	国立感染症研究所細菌第1部	部長
	佐多 徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
	荒川 宜親	国立感染症研究所細菌第2部	部長
	倉根 一郎	国立感染症研究所ウイルス第1部	部長

目 次

I. 総括研究報告書（平成 14 年度）

- 海外において製造・使用されているワクチンの品質評価に関する研究…………… 1
班長 倉田 毅（国立感染症研究所副所長）

II. 分担研究報告

1. 各種ワクチンの抗原特異的 IgE 産生と安全性に関する研究…………… 7
小室 勝利（国立感染症研究所血液・安全性研究部長）
2. B 型肝炎ワクチンの試験管内力価試験法の検討…………… 10
宮村 達男（国立感染症研究所ウイルス第 2 部長）
3. 海外で製造・使用されている麻疹、風疹、ムンプスワクチンの
品質評価に関する研究…………… 15
田代 真人（国立感染症研究所ウイルス第 3 部長）
4. 現在我が国で使用されていないワクチンの調査
— 髄膜炎菌ワクチンについて —…………… 19
渡辺 治雄（国立感染症研究所細菌第 1 部）
5. 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチンの神経毒力試験における問題点…………… 23
佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部長）
6. 細菌ワクチンの検討…………… 29
荒川 宜親（国立感染症研究所細菌第 2 部長）
7. 黄熱ワクチンの品質評価に関する研究…………… 39
倉根 一郎（国立感染症研究所ウイルス第 1 部長）

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 45

1. 総括研究報告書

海外において製造・使用されているワクチンの 品質評価に関する研究

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所副所長

研究要旨 現在国内で製造され使用されているワクチンは、国立感染症研究所において国家検定が行われ最終的な品質の管理がなされている。国内においては製造されていないが、危機管理上あるいは厚生労働行政上備蓄が必要と考えられるワクチンも多い。さらに、国内においても海外においても製造されているワクチンについても、日本人が海外において接種される可能性や、また将来自由化にともない我が国への輸入の可能性も否定できない。従って、海外で製造されているワクチンに関して日本の品質管理基準により評価しておくことは、意義のあることである。本研究においては、(1)日本国内でも製造されているワクチンについては、海外において製造されているワクチンを、現在の品質管理法により力価、安全性、物理化学の面から品質を検討する。さらに日本で製造されているワクチンとの対比を行う。(2)日本国内において製造されていない海外製造ワクチンについては、現在考え得る試験法により品質の評価を行う。各々のワクチンについては国立感染症研究所ワクチン担当部が評価に当たる。初年度は各々の製剤についての入手先を調査し輸入を開始し、同時に試験項目の基礎的検討を行った。ワクチン接種に伴う副反応としてしばしば問題となる IgE 抗体の産生について、T 細胞サブセットの Th1 と Th2 のバランスによって調節されているとされてきたが、OVA-liposome、-alum のマウス免疫系で T 細胞に依存しない IgE 産生調節機構が存在することが示唆された。

分担研究者

小室 勝利 (国立感染症研究所部長)
宮村 達男 (国立感染症研究所部長)
田代 真人 (国立感染症研究所部長)
渡辺 治雄 (国立感染症研究所部長)
佐多 徹太郎 (国立感染症研究所部長)
荒川 宜親 (国立感染症研究所部長)
倉根 一郎 (国立感染症研究所部長)

れているワクチンの接種を受ける機会も増加すると考えられる。また現在国内製造のないワクチンや抗血清についても危機管理上、あるいは海外旅行者用等厚生労働行政上、輸入し備蓄する必要性は増加している。さらに、国内製造されていないワクチンについては将来の自由化にともなう輸入の可能性を考慮しておく必要がある。

A. 研究目的

現在日本国内において使用されているワクチンは、例外的なものを除き、国内で製造され国家検定により品質管理が行われている。海外への長期旅行者や海外居住者の増加により、日本人が海外において、外国において製造さ

本研究においては海外において製造、使用されているウイルスワクチン及び細菌ワクチンの主なものに関し、その力価と安全性の比較検討を行うことを目的とする。(1)日本国内でも製造されているワクチンについては海外のワクチンを現在の国内検定基準に準じた方法により力価と安全性を検討し、日本で製造されているワクチンとの対比を行う。(2)

国内では製造されていない海外製造ワクチンについては、現在考え得る検査法により品質の評価を行う。本研究により、海外において製造使用されているワクチンの品質を日本における品質管理基準に基づき明らかにすることができる。本研究によって得られる成果は安全で高力価のワクチンを国民に供給するという観点から、日本国民の保健・医療に大きく貢献する。また危機管理の点からも厚生労働行政上大きな意義を有する。

B. 研究方法

力価と安全性の検討を行うことを目的としている。(1) 日本国内でも製造されているワクチンについては、海外のワクチンを現在の国内検定基準により力価と安定性を検討し、日本で製造されているワクチンとの対比を行う。一方(2) 国内では製造されていないワクチンについては、現在考え得る品質管理法により、品質の評価を行う。研究対象とするワクチン及び抗血清は、インフルエンザワクチン、麻疹ワクチン、おたふくかぜワクチン、狂犬病ワクチン、黄熱ワクチン、ダニ媒介性脳炎ワクチン、肺炎球菌ワクチン、インフルエンザ菌ワクチン、腸チフスワクチン、コレラワクチン等及び狂犬病免疫グロブリンである。

初年度：

- 1) 各々のワクチンについて入手先、入手方法を調査し輸入手続きを開始する。
- 2) これらのワクチンの製造国における品質管理に関する情報を収集する。
- 3) 海外製造ワクチンの品質を調査するに当たっての試験項目の基礎的検討を行う。海外製造ワクチンと同類のワクチンが国内においても製造され国家検定が行われている場合には、同様の方法により力価、安全性、物理化学等品質の評価を行う。国内では製造されていないワクチンについては、各々のワクチンの評価に最も適切であると考えられる試験法を検討し、基礎的実験を行う。試験項目の基礎的検討は各々のワクチンについて担当となる国立感染症研究所、ウイルス第1部、ウイルス第2部、ウイルス製剤部、細菌部、

細菌・血液製剤部、安全性研究部、感染病理部において行う。

2年度：

- 1) 初年度の基礎的検討に基づき海外製造ワクチンの品質の検討を行う。
- 2) 検討結果については、製造国の品質管理結果と対比する。

3年度：

- 1) 2年度に検討した海外製造ワクチンに関し異なるロットを用いて品質を再度確認する。
- 2) 2年度、3年度の検討結果に基づき、国内には存在しないワクチンの輸入及び備蓄に関するプログラムを作成する。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト検体を使用しない。現在実施されている検定と同様に、動物、特にマウスあるいは必要に応じてサル類を用いて力価、安全正当性を評価する必要があるが、実験動物の愛護に充分考慮し苦痛を与えない配慮をしながら検査を実施する。

C. 研究結果

ワクチンにより方法が異なるので、ワクチン別に研究進行状況を記す。

1) 各種ワクチンの抗原特異的 IgE 産生と安全性に関する研究

OVA-alum と OVA-liposome をマウスに免疫すると、前者が IgG と IgE を産生するのに対し、後者は抗 OVA-IgE の産生能は誘導されなかったことから、従来の IgE 産生には 2 種の T ヘルパー細胞のサブセットである Th1 と Th2 のバランスによって調節されていると考えられていたが、今回の結果から T 細胞非依存性 IgE 産生の調節機構が存在することが示唆された (小室)。

2) B 型肝炎ワクチンの試験管内力価試験法の検討

国内参照品ワクチン (NIID) をレファ

レンスとした国際参照ワクチン (NIBSC) を用いて B 型肝炎ワクチンの試験管内力価試験方法の検討を行い、以下の点を明らかにした。

- ① 各メーカー固有のリファレンスワクチンを設定する必要がある。
 - ② サブタイプの差を考慮した試験方法の開発 (共通抗原 HBs/a の測定など) が望ましい。
 - ③ 抗原性の測定は可能であるが、免疫原性の測定はできない。
 - ④ in vitro 試験をバリデイトする in vivo 試験の国内参照ワクチンの品質管理基準に NIBSC で管理する国際参照ワクチンが使用できる。(宮村)
- 3) 海外において製造・使用されている麻疹、風疹、ムンプスワクチンの品質評価に関する研究

- ① M, M, R の各弱毒生ワクチンについて製造国、製造メーカー、製品規格、品質に関する情報は収集できたが、有効性と安全性に関する内部資料については提供を得られなかった。
- ② M, M, R について各国の NCA から得られた生物学的製剤基準は WHO のそれに準拠していることがわかったが、我が国の基準とは必ずしも一致してはいない。
- ③ 麻疹弱毒生ワクチン力価は国内基準では 5000TCID₅₀/dose (0.5 ml) 以上であるのに対して、WHO 及び他国では 1000TCID₅₀/dose (0.5 ml) で、大きな差がある。ウイルス株が異なっているので、単純には優劣を決めかねる。現行基準で国家検定を実施すると欧米製剤は不合格となることが予想される。
- ④ 風疹弱毒生ワクチンは国産品は全て高温で増殖が抑制される温度感受性変異株である。抗体誘導に関して、「マーカー試験でも製剤基準は合致しない。」我が国の高温では増殖しにくいという性状がウイルスの弱毒性に関連している根拠は曖昧である。
- ⑤ 欧米メーカーではワクチン製造株

に関して当初からシードロットシステムを導入しており、ワクチン製造用のウイルス株と細胞株についての品質管理が厳密に行われている。我が国ではこのあたりが極めて曖昧である (田代)。

4) 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチンの神経毒力試験における問題点

海外で使用されているワクチン株と日本のワクチン株、臨床分離株の神経毒力をラットで検討したところ、患者由来株とワクチン株の数代継代株で脳室拡大があり脳組織に有意なウイルス増殖と病原性が見られた。ワクチン株との間で大きな差が見られ、この乳のみラット系は神経毒力をテストするのによい方法と考えられる。(佐多)。

5) 黄熱ワクチンの品質評価に関する研究

黄熱ワクチンはワクチン株ウイルスを発育鶏卵に接種して作られている。日本で使用されている物は Aventis Pasteur 者からの輸入品である。現行のこのワクチンの試験は海外旅行者向けであり、行政検査として無菌試験と異常毒性否定試験が行われているが、それにさらに今回試験をした結果から、ウイルス力価試験と同定試験を加えるべきと考える。2001 年に我が国でも 1 名の接種後原因不明の死亡が出ている (倉根)。

6) 髄膜炎菌ワクチンについて

アフリカ、中央アジア以外の欧米においても髄膜炎菌性髄膜炎がしばしば発生している。年間 30 万の患者と 3 万人の犠牲者が出ている。我が国では 10 例ほどの患者がみられるのみである。2002 年初めにメッカ巡礼イスラム教徒が血清型 W-135 の菌により集団感染し、帰国後世界中で髄膜炎の大流行が発生した。国産ワクチンはないが、現在 A、C、Y、W-135 血清群に対する 2 種のワクチンが世界で使用されている。C 型菌の夾膜多糖体 conjugate ワクチンは永続的効果があることが確認されつつある。また A-C conjugate ワクチンも実用化段階に入っている (渡辺)。

7) 海外で使用されている細菌ワクチンの品質評価

国産の BCG ワクチンにつき外国株との遺伝的性状を文献的に、また東京 172 株とデンマーク株の防御能につきモルモットで比較し、両株とも同等の防御能を有することを確認した。また三種混合 (DTaP) ワクチンにつき海外の 3 製剤を入手し比較したところ、いずれも我が国の製剤に比べて強い局所反応がみられ、我が国の基準ではかつての全菌ワクチン並みの強い毒性を示し不適合と判断されることが示唆された。また海外ワクチンの中にはアジュバント成分の干渉等によると思われる影響により含有されるエンドトキシン量が正確に測定できない製剤が存在する事がわかった。さらに破傷風トキソイドをキャリアー蛋白とする Hib ワクチンにおいて異常に高い破傷風力価 (>500IU/ml) が認められ、DPT ワクチンとの同時期接種により過免疫等安全性が懸念される結果が得られた (荒川)。

D. 考察

研究結果に記した如く、免疫原性、動物実験等の結果から海外ワクチンが我が国のそれよりも優れているという根拠は多くはない。欧米のワクチン業界がごく少数の大手に収斂されてきており、遺伝子解析学の進歩による一部を除き種々の異なった発想と技術による開発は多くはない。我が国では子供及び大人用ワクチンとして数社のメーカーが存在し、生物製剤基準に従い一定の品質の物を生産している。従来国内使用品については一部の国内で製造されていない物が輸入されている。貿易の自由化、自由競争の流れ、消費者の選択肢の拡大に関する議論がある折から、海外製品についても十分事前に検討しておく必要があると考える。海外製造ワクチンについては品質の異同、我が国の生物学的製剤基準に合致するか否かを検証しておく必要があり、今回の各ワクチン担当グループによる比較となった。

大部分のウイルスワクチンが製品規格において我が国の製品とは異なっており、生物学的

製剤基準に合致しない製品が存在した。さらに現時点では海外メーカーからの製品供与の点で協力、合意が得られないものも多くあり、引き続き調査検討を進める必要がある。まだ我が国では生ワクチンで製造種ウイルスにシードロットシステムが導入されていないこともあり、今後早急に解決すべき問題点と思われる。さらに、たとえば、我が国ではワクチン接種後の発熱も副反応として重要視されるが、欧米ではほとんどの場合無視されており、“副反応” “副作用” のとらえ方も受け入れられ方＝社会的背景＝も大きく異なっており、そのあたりも“自由化”がもしあるなら考えて対応していく必要がある。我が国も製品が副反応を抑えるための努力が大きくされていることはまぎれもない事実である。国際化、自由化が進む中で、ワクチン製品の輸入が不可避の時がいずれ到来するであろうが、その際のワクチンの安全性と有効性を確保することは科学的証左を提供する国立感染症研究所と行政一体の責任であろう。

E. 結論

海外ワクチンの安全性、有効性を基盤に、我が国のワクチンとの比較検討を実施した。一部は終わり、次年度 (3 年目) には入手可能な製品についてできるだけ多く比較をし、海外ワクチンの品質の精度の精度について実態を示したい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
別紙参照。
2. 学会発表
各分担研究報告書参照。

H. 知的所有権の取得状況

なし。

II. 分担研究報告

1. 各種ワクチンの抗原特異的 IgE 産生と安全性に関する研究

分担研究者 小室 勝利（国立感染症研究所血液・安全性研究部長）

研究協力者 内田 哲也（同主任研究官）、内藤 誠之郎（同主任研究官）
種市 麻衣子（同主任研究官）、加藤 博史（同研究員）

研究要旨 本研究においては、行政的に優先的に考えるべきものを含み、近々輸入、導入が予定されるワクチン、問題点のある程度予測できるワクチン、日本において問題の多いと考えられるワクチン、副作用頻度の多いワクチン、等を対象に安全性に関する検討を行う。

A. 研究目的

国内使用ワクチンにおいても、種々のアレルギー反応が生じ、時には重い症状を呈することがある。原因としては、個体要因、抗原組成、アジュバントの違い等多くが考えられる。ワクチンの差による抗原特異的 IgE 産生を検討し、安全性との関連を考察することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

IgE 抗体産生の調節機序については未だ不明の点が多い。本年度は、IgE 産生をよく誘導することが知られている、現行のワクチンに多用されているアルミニウムアジュバントと、IgE 産生を選択的に抑制するリポソームアジュバントを用いて、両アジュバントによって誘導される IgE 産生の調節機序を比較検討した。

（倫理面への配慮）

本研究に使用する実験動物は「国立感染症研究所実験動物管理運営規定」に基づいて飼育されており、実験動物の取扱いは（社）日本実験

動物学会の定めた「動物実験の指針」に従って、苦痛の軽減、安楽死等に配慮しつつ行っている。

C. 研究結果

卵白アルブミン(OVA)をアルミニウムアジュバントを用いて(OVA-alum)、あるいはリポソーム表面に結合させて(OVA-liposome)マウスに免疫すると、OVA-alum は抗 OVA IgG 産生とともに抗 OVA IgE 産生も誘導したが、OVA-liposome は抗 OVA IgG 産生は誘導し、抗 OVA IgE 産生は誘導しなかった（第 1 図）。この結果から、OVA-alum はタイプ 2 免疫応答を誘導し、OVA-liposome はタイプ 2 免疫応答を誘導することが予想された。第 1 図における初回免疫 6 週後のマウス血清について、OVA 特異的 Ig サブクラスを検討したところ、OVA-alum 免疫群においては IgG1 が IgG2a と比較して有意に高値であったが、OVA-liposome 免疫群においては IgG1 と IgG2a との間に有意差が無かった（表-1）。また、OVA-alum あるいは OVA-liposome を免疫したマウス由来の脾臓 CD4 陽性 T 細胞を試験管内で抗原刺激したところ、両免疫群において Th1 サイトカイン(IL-2, IFN-g)、Th2 サイト

カイン(IL-4, IL-5, IL-10)の産生が観察された(表-2)。これらのことから、OVA-liposomeによって誘導されるIgE抗体産生の選択的抑制効果はタイプ1免疫応答の誘導によるものではないことが示唆された。

さらに、OVA-alumあるいはOVA-liposome免疫マウス由来の脾臓CD4陽性T細胞をT細胞欠損マウス(ヌードマウス)に移入し、細胞移入後、ヌードマウスをOVA-alumあるいはOVA-liposomeで免疫したところ、OVA-liposome免疫マウス由来の脾臓CD4陽性T細胞を移入したヌードマウスにおいてもOVA-alum免疫後にIgE産生が観察された。また、OVA-alum免疫マウス由来の脾臓CD4陽性T細胞を移入したヌードマウスにOVA-liposomeを免疫したときIgE産生は抑制された(表-3)。これらのことから、OVA-liposomeによって誘導されるIgE産生の選択的抑制はT細胞に非依存的であることが示唆された。

D. 考察

従来、IgE抗体産生は2種類のTヘルパー細胞サブセット、Th1およびTh2のバランスによって調節されていると考えられてきたが、本研究で得られた結果から、T細胞に依存しないIgE産生の調節機構が存在することが示唆された。

E. 結論

IgE産生の調節機構についてこれまでに得られた知見を踏まえ、ワクチン接種後のIgE抗体産生応答の検討を今後行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, Y., Ami, Y., Nagata, N., Naito,

S., Kato, H., Taneichi, M., Takahashi, M., Komiya, T., Satoh, S., Gondaira, F., Sugiyama, J., Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K., Uchida, T. (2002) Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates. *Int Arch Allergy Immunol* 127:294-298.

2. Nakano, Y., Mori, M., Yamamura, H., Naito, S., Kato, H., Taneichi, M., Tanaka, Y., Komuro, K., Uchida, T. (2002) Cholesterol Inclusion in Liposomes Affects Induction of Antigen-Specific IgG and IgE Antibody Production in Mice by a Surface-Coupled Liposomal Antigen. *Bioconjugate Chemistry* 13:744-749.
3. Taneichi, M., Naito, S., Kato, H., Komuro, K., Uchida, T. (2002) T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. *J Immunol* 169:4246-4252.
4. Naito, S., Taneichi, M., Kato, H., Ami, Y., Suzaki, Y., Mori, M., Nakano, Y., Yamamura, H., Morokuma, K., Ohkuma, K., Miyake, H., Kuniwa, M., Komuro, K., Uchida, T. (2002) Selective inhibition of systemic anti-OVA IgE production in response to oral preadministration with OVA-liposome conjugates. *Int Arch Allergy Immunol*. 129 (in press).
5. 種市麻衣子、内田哲也、完全フロイントアジュバントのIgE産生抑制機構 臨床免疫、科学評論社、東京、38巻、102-106、2002

2. 学会発表

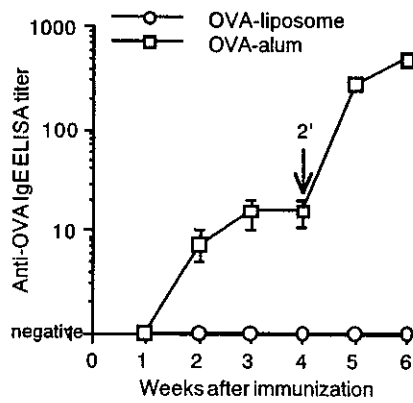
1. 種市麻衣子、内藤誠之郎、加藤博史、田中ゆり子、内田哲也：リポソーム結合抗原による抗原特異的、IgE選択的無反応の誘導メカニズム 第32回日本免疫学会総会、2002年
2. 加藤博史、内藤誠之郎、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也：リポソーム結合抗原経口投与マウスにおける抗体産生 第32回日本免疫学会総会、2002年

3. 内藤誠之郎、種市麻衣子、加藤博史、田中ゆり子、内田哲也：スギ花粉抗原リポソーム結合物の花粉症治療への応用可能性 第32回日本免疫学会総会、2002年
4. 田中ゆり子、笠井道之、内藤誠之郎、種市麻衣子、加藤博史、内田哲也：マクロファージにおけるリポソーム結合抗原の細胞内動態 第32回日本免疫学会総会、2002年

H 知的所有権の取得状況

なし

第1図 a: 抗 OVA IgG 抗体産生



第1図 b: 抗 OVA IgE 抗体産生

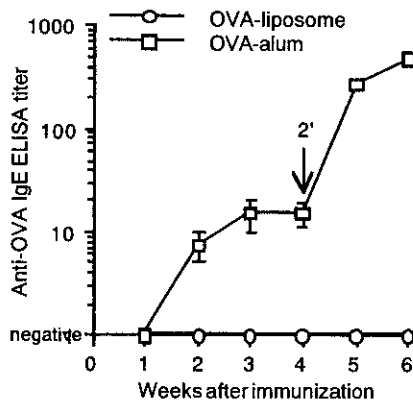


表-1: 抗 OVA Ig サブクラス

Immunization	Anti-OVA antibodies (mg/ml)	
	IgG1	IgG2a
OVA-liposome	260 ± 72.7	239 ± 80.8
OVA-alum	253 ± 70.4	32.6 ± 5.4*

表-2: OVA-alum あるいは OVA-liposome 免疫マウス由来 CD4 陽性 T 細胞によるサイトカイン産生

Immunization of T-cell donor	Cytokines (pg/ml)				
	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IFN-g
OVA-liposome	1068	146.6	389.3	707.9	1336
OVA-alum	1256	205.5	557.2	1172	1270

表-3: OVA-alum あるいは OVA-liposome 免疫マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を移入したヌードマウスにおける抗体産生

Immunization of T-cell donor	Immunization of recipient mice	Anti-OVA Abs	
		IgG (µg/ml)	IgE (titer)
No immunization	OVA-liposome	12	N.D.
	OVA-alum	18	N.D.
OVA-liposome	OVA-liposome	145	N.D.
	OVA-alum	124	105.6
OVA-alum	OVA-liposome	178	N.D.
	OVA-alum	247	139.3

2. B型肝炎ワクチンの試験管内力価試験法の検討

分担研究者 宮村達男（国立感染症研究所ウイルス第二部長）

共同研究者 清原知子、佐藤知子、戸塚敦子、下池貴志、米山徹夫

研究要旨 組換え B 型肝炎ワクチンの力価試験法はマウスやモルモットに対する抗体誘導能を測定する *in vivo* 試験が主流であったが、数年前からワクチンに含まれる抗原量を測定する *in vitro* 試験が検討され、1997 年のヨーロッパ薬局方からは力価試験法の一つとして「動物試験でバリデイトされた *in vitro* 試験」も記載されるようになった。本研究では *in vitro* 試験の方法を検討するとともに国内のワクチンについて *in vitro* 試験と *in vivo* 試験の比較を行い、またワクチン及び参照品の品質管理方法の検討を行ってきた。

A. 研究目的

- 1) 現行の国内参照ワクチンの品質管理基準（参照品 0.1 単位を免疫したマウス群の抗体陽転率が 60%以上であること）に加えて国際参照ワクチンとの相対力価による品質管理基準を検討する。
- 2) 現在製造中の国内参照ワクチン候補品（ヒト血漿由来 HBs 抗原）を用いて抗体誘導に関する基礎的実験を行う。

B. 研究方法

- 1) 生物学的製剤基準に準拠した方法で国内参照ワクチン（参照沈降 B 型肝炎ワクチン Lot.P3；以下 NIID）と NIBSC から供給されている国際参照ワクチン（International Reference Reagent for adsorbed Hepatitis B Vaccin；以下 NIBSC）の力価試験（*in vivo*）を行った。

【ワクチンの稀釈】

NIID を 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍、NIBSC

を 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍、160 倍に生理食塩水で稀釈する。

【マウスの免疫】

各稀釈ワクチンを一群 16 匹のマウスに 1ml ずつ腹腔内接種する。5 週の免疫期間後、採血・血清分離する。

【抗体検出 ELISA】

免疫したマウスの血清と抗 HBs 抗体陽性マウス血清、無処置マウス血清について、HBs 抗原サブタイプ adr, adw をそれぞれ固相化した 96well プレートを用いた抗体検出 ELISA を行う。

- 2) アルミアジュバント吸着キット「Imject Alum (PIERCE)」を用いて国内参照ワクチン候補品 p4 のアジュバント吸着抗原とアジュバント非吸着抗原を作製した。これらをマウスに免疫して抗 HBs 抗体を測定し、p4 の免疫原性とアジュバントの影響を確認した。

C. 研究結果

- 1) 国内参照ワクチン（NIID）をリファレンスと

した国際参照ワクチン（NIBSC）の相対力価の測定

判定方法

無処置マウス群の OD 値を対数変換し、その平均値に係数をかけた SD 値を加える。これを実数に再変換したものをカットオフ値とする。免疫血清の OD 値がカットオフ値以上であれば陽性、カットオフ値より低い場合は陰性と判定する。

係数は SD 値が 0.15 より低い場合は 3.5、0.15 以上 0.3 以下のとき 3.0、0.3 より高い場合は 2.5、または 2.0 とし、それぞれの係数を用いたカットオフ値を 3.5SD、3SD、2.5SD、2SD と称する。

今回行った実験では無処置群の SD=0.144 より 3.5SD を採用した。参考として 2SD、2.5SD、3SD の陽性数も表記した。（表 1）カットオフ値=3.5SD において、NIID は 10 倍から 80 倍まで陽性数は濃度依存性に徐々に減少した。

一方、NIBSC は 40 倍希釈まではすべてが抗体陽性で、80 倍で減少し、160 倍ではすべてが陰性になった。

統計処理

統計処理は生物統計ソフト「バイオアッセイアシスト」のプロビット法プログラムで行った（図 1）。各希釈濃度の陽性数を一検体とし、NIID4 検体、NIBSC5 検体で計算を行った。NIBSC はサブタイプ adw の陽性数の変化が急激で 3.5SD では検体数が必要数に達しなかった（解析に必要な検体数:0%及び 100%を除いた検体が 2 検体以上）。2SD を採用すると必要な検体数に達するが係数を下げることはカットオフ値を低くすることであり、非特異反応を陽性と判定する危険性が高まる。

相対力価

NIID に対する NIBSC の相対力価はサブタイプ adr について 2.221(95%信頼区間 1.643~3.054)単位 [3.5SD]、サブタイプ adw について 2.500(95%信頼区間 1.613~3.944)単位[2SD]であった。サブタイ

プ adw は非特異反応を陽性と判定している危険性があることから実際の相対力価より高く計算されていると考え、参考データとした。

- 2) 国内参照ワクチン候補品 p4 はアジュバントをつけることによって高い抗体誘導を示したが、抗原だけを免疫したマウスでは抗体誘導は見られなかった。（図 2）

D. 考察

近年、国外検定機関から国内参照ワクチンの品質管理に関する問い合わせが増えてきた。これに対応するため、現行の品質管理基準に加えて新たな品質管理基準の設定を検討した。国内参照ワクチンに対して NIBSC から供給される国際参照ワクチンの *in vivo* 相対力価が一定の値を示すことを規定する方法である。国際参照ワクチンの力価は adr 抗原に対して 2.221（95%信頼区間 1.643~3.054）であった。adw 抗原に対しては抗体陽性群から陰性群への変化が急激であり、通常のカットオフ値では計算不能であった。これは、adw のアッセイに使用した抗原がリコンビナント抗原であることが原因と推察される。今回の adw の結果は参考データとした。

使用する抗原やアッセイ系の違いで力価試験の結果が異なることは B 型肝炎ワクチンの製剤上の特性（サブタイプ、リコンビナント技術、アジュバント等の影響）であるが、これをいかに処理するかが今後の課題であり、試験管内試験を含めたアッセイ系の検討が必要である。

今回行った研究から国際参照品を対照とする品質管理法は adr 抗原プレートを使えば実際に使用できると考えられた。

現在様々な B 型肝炎ワクチンが世界中で使用されている。海外渡航者には B 型肝炎ワクチンの接種が推奨されているが、100%が接種を受けて渡航するわけではなく、渡航先で使用されているワクチンの接種を受けることも考えられる。さらに、現在国内で使用されていない海外のワクチンについては将来の規制緩和、輸入自由化に伴う輸入の可能性を考慮しておく必要がある。このような事態に速やかに対応できるようにワクチンの評

価方法を検討することは必要である。

国内参照ワクチン候補品 p4 の免疫の結果から B 型肝炎ワクチンの抗体誘導にはアジュバントの影響が大きく、抗原量の測定だけでワクチンの品質を保証するのは困難であると推察された。

E. 結論

平成 13 年度、14 年度にかけて B 型肝炎ワクチンの試験管内力価試験方法の検討を行い、以下の点が明らかになった。

- 1) 各メーカー固有のリファレンスワクチンを設定する必要がある。
- 2) サブタイプの差を考慮した試験方法の開発(共通抗原 HBs/a の測定など) が望ましい。
- 3) 抗原性の測定は可能であるが免疫原性の測定はできない。
- 4) *in vitro* 試験をバリデイトする *in vivo* 試験の国内参照ワクチンの品質管理基準に NIBSC で管理する国際参照ワクチンが使用できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1. 国内参照ワクチン (NIID) と国際参照品 (NIBCS) の陽性判定

サブタイプ adr

NIID	全数	陽性数			
希釈倍数		2SD	2.5SD	3SD	3.5SD
10倍	16	16	15	15	15
20倍	16	15	15	15	15
40倍	16	7	6	6	6
80倍	16	2	2	2	1

NIBSC	全数	陽性数			
希釈倍数		2SD	2.5SD	3SD	3.5SD
10倍	16	16	16	16	16
20倍	16	16	16	16	16
40倍	16	16	16	16	16
80倍	16	10	10	10	5
160倍	15*	8	4	3	1

*ワクチンとは関係ない原因で一匹死亡した。

サブタイプ adw

NIID	全数	陽性数			
希釈倍数		2SD	2.5SD	3SD	3.5SD
10倍	16	14	14	14	14
20倍	16	13	13	13	12
40倍	16	9	6	4	2
80倍	16	4	4	2	1

NIBSC	全数	陽性数			
希釈倍数		2SD	2.5SD	3SD	3.5SD
10倍	16	16	16	16	16
20倍	16	16	16	16	16
40倍	16	16	16	16	16
80倍	16	11	8	8	7
160倍	15*	3	0	0	0

*ワクチンとは関係ない原因で一匹死亡した。

P3adr			NIBSC		
Dose	N	r	Dose	N	r
*0.1	16	16	*0.1	16	16
0.05	16	14	*0.05	16	16
0.025	16	5	0.025	16	16
0.0125	16	1	0.0125	16	5
			0.00625	16	1

P3adw			NIBSC		
Dose	N	r	Dose	N	r
*0.1	18	14	*0.1	16	16
0.05	16	13	*0.05	16	16
0.025	16	9	0.025	16	16
0.0125	16	4	0.0125	16	11
			0.00625	15	3

	LD50	95%信頼区間	直線性	回帰式
P3adr	-1.52803	-1.62853 ~ -1.41326	成立	$Y = 4.595 X + 12.005$
NIBSC	-1.87641	-1.84727 ~ -1.78859	成立	$Y = 6.100 X + 16.447$
共通の回帰係数: 5.1476				
	直線性	X2	平行性	X2
検体間	成立	3.1952	成立	0.7855
	相対力価	95%信頼区間		
NIBSC	2.221	1.643 ~ 3.054		

	LD50	95%信頼区間	直線性	回帰式
P3adw	-1.45084	-1.88426 ~ -1.48148	成立	$Y = 2.588 X + 9.288$
NIBSC	-2.02288	-2.13744 ~ -1.92819	成立	$Y = 6.192 X + 15.366$
共通の回帰係数: 3.3828				
	直線性	X2	平行性	X2
検体間	成立	0.4320	成立	2.9123
	相対力価	95%信頼区間		
NIBSC	2.500	1.613 ~ 3.944		

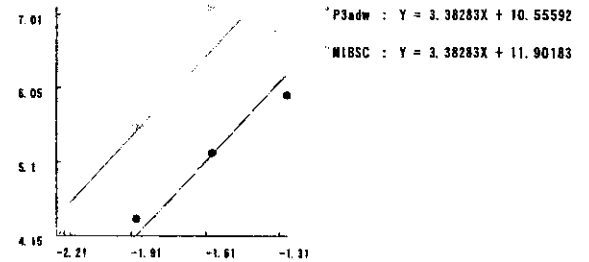
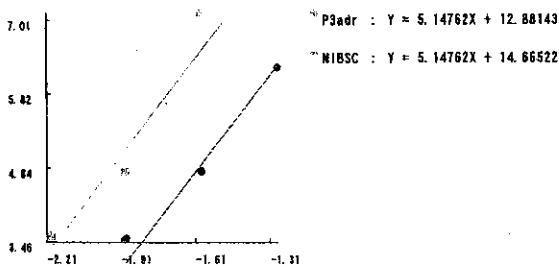


図1. バイオアシストアッセイの解析結果

左: adr (3.5SD)、右: adw (2SD)

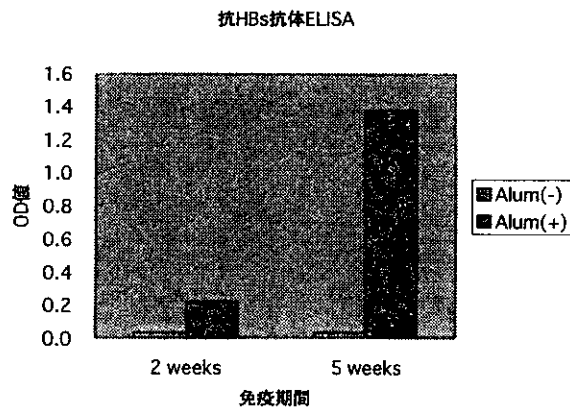


図2. 精製 HBs 抗原 p4 の免疫原性の確認

2.5 μg の HBs 抗原をアラムアジュバント(Imject Alum : PIERCE)と混和し1群4匹のマウス(Balb/c、5週令メス)に腹腔内接種した [Alum (+)]。対照群は等量の HBs 抗原と生理食塩水を混和し接種した[Alum (-)]。2週後に部分採血、5週後に全採血を行い各個体の血清中抗 HBs 抗体を ELISA で測定した。各血清の160倍希釈の OD 値の平均をグラフにした。

3. 海外で製造・使用されている麻疹、風疹、ムンプス ワクチンの品質評価に関する研究

分担研究者 田代 真人（国立感染症研究所ウイルス第3部長）

研究要旨 従来国内で使用されるワクチンに関しては、一部の例外を除いて海外製品の輸入は行われていなかったが、貿易の自由化と自由競争の趨勢、消費者の選択権の拡大等に関する議論から、海外製品の輸入も検討する時期に来ている。この際に、海外製品の品質に関しては、国内製品との品質の異同、我が国の生物学的製剤基準に合致するか否かを予め検証しておく必要がある。そこで、海外で製造・使用されている代表的な麻疹、風疹、ムンプスワクチンの品質に関する情報を収集・検討するとともに、これらの品質に関して検査を行った。一部の麻疹、風疹ワクチンについては、製品規格において我が国の製品とは異なっており、生物学的製剤基準に合致しないものも存在した。一方、現時点では、海外メーカーからの製品供与についての協力・合意が得られていないものがほとんどであり、引き続き調査を進める必要がある。

A. 研究目的

従来国内で使用されるワクチンに関しては、一部の例外を除いて海外製品の輸入は行われていなかった。しかし、貿易の自由化と自由競争の趨勢、より高品質でより安価な製剤に対する消費者の選択権の拡大等に関する議論から、海外製品の輸入も検討する時期に来ている。現在国内で使用されている麻疹、風疹、おたふくかぜに対する弱毒生ワクチンの各製剤は、全て国内で製造されており、GMP 管理および中間製品と最終製品についての国家検定により品質管理が行われている。

今後これらのワクチンの輸入が行われた際には、その品質管理、安全性や有効性について、我が国のワクチンとの異同を明らかにしておく必要がある、更に我が国の生物学的製剤基準に合致するか否かを予め検証しておく必要がある。

これらを明らかにするために、海外で製造・使用されている代表的な麻疹、風疹、おたふくかぜワクチンについて、品質に関する情報を収集して評価すると共に、これらを入手して、安全性および

有効性についての試験を行い、我が国の製剤との異同および生物学的製剤基準への準拠状況を検討する。

B. 研究方法

麻疹、風疹、おたふくかぜの各弱毒生ワクチンを製造している海外の代表的な製造所から、これらの製剤に対する製品規格書またはそれに準じた書類を取り寄せて、WHO 製品規格 (Minimum Requirements) および我が国の生物学的製剤基準との整合性、異同を検討した。

また、各製造所による有効性、安全性に関する資料、一般に公表されている学術論文等の文献、各国の副作用情報等を入手し、これらの評価・検討を行った。

さらに、一部の製品については、直接に製造メーカーからの供与を受け、我が国で行われている国家検定に準じた試験を行いつつある。また、それ以外の生物学的製剤基準に指定されている試験、

およびそれ以外にも品質評価上から必要と考えられる試験に関しても、順次行うことを計画している。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト及びヒト由来の材料を対象とせず、医学研究倫理等に関わる問題な存在しない。

C. 研究結果

1. 麻疹、風疹、おたふくかぜの各弱毒生ワクチンについて、製造国、製造メーカー、製品規格、品質、有効性、安全性に関する情報を収集し、その評価・検討を行った。その結果、製品規格についての多くの情報は得られたが、有効性と安全性に関する内部資料に関しては、提供されないものが多かった。特に副作用情報については、評価に耐えうるデータの開示が無く、一方的な報告や声明に留まるものがほとんどであった。一方、各製剤の入手先、入手方法を調査して、輸入手続きを進めるべく問い合わせを行っているが、未だほとんどのメーカーからは協力的な返答はもらっていない。
2. 麻疹、風疹、おたふくかぜの弱毒生ワクチンの製造国における品質管理に関する情報を、各国の National Control Authority (NCA) 等から入手・収集し、我が国の生物学的製剤基準および WHO 基準を比較検討した。その結果、欧米諸国で製造されているワクチン製剤については、原則的に WHO の製剤基準に準拠していることが分かった。しかし、我が国の基準とは必ずしも一致していないものもあった。
3. MMR 製剤の全世界における販売量の 26% のシェアを占める米国メルク社の MMR II については、既に国内メーカーによって、国内での臨床第 2+3 相試験が終了して輸入発売の申請が出されており、国立医薬品審査センターにおいて審査過程にある。この製品の規格は、WHO の Minimum Requirements に準拠しているが、我が国の生物学的製剤基準と異なる点がある。これらに関しては、以下の点が問題となる。

- 1) 麻疹弱毒生ワクチンの力価（感染価）が

国内基準では 5000TCID₅₀/用量 (0.5ml) 以上であるのに対して、WHO をはじめとして、海外では 1000TCID₅₀/用量 (0.5ml) 以上となっていることが大きな違いである。最近では国産品の力価が基準最低値の 100 倍程度まで高くなっている場合もあるが、欧米の製剤はせいぜい 5000TCID₅₀/用量 (0.5ml) 未満であり、力価に大きな差がある。ウイルス製造株が異なっているために、安全性と有効性を十分に考慮せずに、単純に力価のみで優劣・安全性等の評価を行うことは危険である。

現行の生物学的製剤基準では、欧米の製剤は基準を満たさないもので、そのまま販売承認を得ることは困難となろう。また、国家検定を行うと、欧米の製剤は不合格となることが予想される。

- 2) 風疹弱毒生ワクチンについては、海外における基準上の力価は 1000TCID₅₀/用量 (0.5ml) 以上であり、我が国の 2 倍以上となっている。この基準そのものは、現行の生物学的製剤基準には抵触しない。また、海外製品を我が国の検定基準で検査した場合にも、力価に関しては合格となるものと予想される。
- 3) 風疹ワクチンについては、国産品は全て高温では増殖が抑制される温度感受性変異株である。マーカー試験としてウサギとモルモットに接種した場合には、体温の高いこれらの動物生体内では増殖効率が悪く、血清抗体の誘導は 20% 未満であり、これが生物学的製剤基準となっている。これに対して、WHO および欧米の基準にはこの項目は無く、実際に欧米の製剤はマーカー試験を行うと抗体誘導が認められている。従って、マーカー試験においても、欧米の製剤は我が国の生物学的製剤基準には合致していないことが予想される。

但し、我が国の製品に関して、高温で増殖しにくいという性状がウイルスの弱毒性と関連しているとの根拠は曖昧であり、必ずしも弱毒性・安全性を保証するものではない。同様に、欧米の製品について

も、温度感受性では無いことが、国産品に比べて安全性が低いことには繋がらない。

- 4) 欧米のメーカーでは、ワクチン製造株に関して当初からシード・ロット・システムを導入している。従って、ワクチン製造用のウイルス株と細胞株についての品質管理を厳密に行っており、その代わりに中間バルク製品の検査を大幅に省略しているものが多い。

これに対して、我が国の麻疹・風疹・おたふくかぜの弱毒生ワクチンに関しては、製造承認当初からシードロット・システムは導入されていない。実際に、製造承認を受けたウイルスの継代歴と、各バルク製造に用いている種ウイルスとの関係は、メーカー毎に、また同メーカーでも製剤毎に異なっており、中間バルクは、バルクのバッチ毎に異なっていると考えるべきである。従って、GMP等によって製造過程の再現性をどんなに確保したとしても、出発材料であるワクチン製造株の均一性と再現性が保証されていない以上、最終製品の各ロット間の再現性は確保できないことになる。

D. & E. 考察・結論

海外で製造・使用されているワクチン製剤は、我が国の生物学的製剤基準に合致しないものがあることが明らかになった。将来これらを輸入販売する際には、現行の基準を海外製品に合わせて変更するか、または別の製剤として別個の製剤基準を設けるかの二者択一が迫られるものと考えられる。国内に Double standards が併存することは様々な問題があり、今後の検討課題である。

また、国内製品に関しては、現行基準と製品規格に基づいた製剤を長年にわたって製造され使用されてきたが、おたふくかぜワクチンを除き、麻疹と風疹ワクチンに関しては、有効性と安全性には特に問題はなく、欧米の製剤に劣らないか、むしろ優れていると評価できる。特に、麻疹ワクチンに関しては、海外製品においては力価が低いにもかかわらず、発熱等の副反応が強く、我が国の

基準に合わせることは危険性が危惧される。

一方、おたふくかぜ弱毒生ワクチンに関しては、海外製品に使用されている Jeril Lynn 株は、弱毒性・安全性において、我が国の何れのワクチン株よりも優れていると判断される。我が国におけるおたふくかぜワクチン接種後の無菌性髄膜炎の発生頻度が高い事実を勘案すると、少なくともおたふくかぜワクチンに関しては、海外製品である Jeril Lynn 株の導入が望ましいと判断される。

一般的には、国内の麻疹、風疹、おたふくかぜワクチンの製造種ウイルスでは、シードロットシステムは導入されていない。極端な場合には、製造承認申請の際に行った野外試験に用いたワクチン株と、製造承認を受けたワクチン製造原株、更にそれを継代したワクチン製造用の種ウイルスとが、遺伝学的・生物学的に均一のものであるとの保証が無いとも言える。もしそうであるならば、最終製品の各ロットは、同一製剤であるとの保証も無いことになる。従って、中間バルク製品と最終製品の各ロットの全てについて、基準を満たすことを確認する試験を行う必要が生じると言うことになる。一方、ほとんどの海外製品は当初からシードロットシステムの下にGMPによる品質管理がなされている。従って、中間バルク製品の試験を大幅に省略することが可能となっている。この点も、海外製品にとって、全ロット検定を前提としている我が国の品質管理体制とは相容れない問題であり、今後国際的にも大きな争点となることが予想される。

国際化・自由化が進む中で、早晚ワクチン製剤の輸入は不可避であると考えられるが、その際に、ワクチンの安全性と有効性を確保することは行政の責任であり、その検討のために、科学的批判に十分に耐えられる基礎資料の提供が必要である。また、ワクチン接種を受ける国民一般および医師・保健衛生行政担当者にとっても、ワクチン製剤の選択に関して、国産ワクチンと海外ワクチンの相違・優劣等に関する信頼できる情報の提供が不可欠である。

F. 健康危険情報

なし