

G 研究発表

なし

H 知的所有権の取得状況

なし

## 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—

分担研究者 渡辺 治雄（国立感染症研究所細菌第一部長）

協力研究者 高橋英之（国立感染症研究所細菌第一部）

**研究要旨** アフリカや中東アジアといった発展途上国以外にも米国、英国等の先進国においても髄膜炎菌性髄膜炎のアウトブレイクはしばしば発生しており、年間 30 万人の患者と 3 万人もの犠牲者を出している。日本国内においては年間 10 例ほどの希少な感染症として認識されておるが、航空輸送が発達した現代において髄膜炎菌性髄膜炎の輸入感染の危険性はより高まってきていると考えられる。事実 2002 年始めにメッカに巡礼したイスラム教徒が血清型 W-135 の髄膜炎菌による集団的な不顕性感染、もしくは初期感染を起こし、各々の本国に帰国後小規模の髄膜炎菌性髄膜炎の流行が世界中で発生した。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髄膜炎菌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

髄膜炎菌性髄膜炎は化膿性髄膜炎の起炎菌の中で唯一流行を発生させることから流行性髄膜炎とも呼ばれ、特にアフリカや中東、そして英国やカナダ、ニュージーランドの先進国でも endemic な流行が発生している。比較的抗生物質が有効であるため、二次感染を防止するためにリファンピシンの予防投与が WHO でも推奨されているが、流行地においてはやはりワクチンの投与による予防が唯一の有効手段と考えられる。

我が国においては髄膜炎菌性髄膜炎菌の発症例数が年間 10 例程度の希少な感染症であるために、日本国内で認可されている髄膜炎菌ワクチンは現在のところ存在しないが、世界においては様々な種類の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髄膜炎菌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

髄膜炎菌ワクチン；ワクチンの種類と性状

#### 1) 荚膜多糖体ワクチン

現在までに最もよく使用され、検討されてきた髄膜炎菌ワクチンである。髄膜炎菌はその荚膜多糖体の種類によって 13 群の血清群に分類されるが、その中で髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌となるのは A、B、C、Y 及び W-135 群であり、A、B、C 群は特に流行の起炎菌として同定される。現在販売されているワクチンは A、C の二価ワクチン及び A、C、Y、W-135 の四価ワクチンであり、培養された髄膜炎菌から分離、精製され、凍結乾燥体として数社から販売されている。基本的には 50mg のワクチンを筋肉注射によって一度投与

する。約 85%の接種者において 10 日前後で抗体価が上昇し、副作用は少ない。

Tel:+33 4 72 73 77 07  
Fax: +33 4 72 73 78 30

髄膜炎菌ワクチンは血清群特異的であるため、流行地における髄膜炎菌のドミナントである血清群を判断した後にその流行型と同一のものを投与する必要がある。現在問題視されている流行地は

- a) A 群髄膜炎菌によるアフリカの髄膜炎ベルト地帯
- b) Y 群による米国の小規模な流行
- c) イスラム教徒のメッカ巡礼による W-135 群の小規模な流行
- d) その他発展途上国における A 群の流行

であり、a) に関しては WHO により二価もしくは四価のワクチンが積極的に導入されている。またその他の国々においても二価もしくは四価ワクチンが認可され、導入されている。しかし、Y、W-135 群髄膜炎菌に対しては荚膜多糖体ワクチンはかなり効果的であるとされているが、A 群に対しては 2 歳以上の子供や成人においてはその効果は認められるものの、抗体価の維持が 2 年ほどしか認められなく、その後減衰するために抗体価の永続的な持続性に欠けるとされており、現状では WHO はある一定期間 (2~3 年) の抗体価の維持を目的で二度の接種を推奨している。また、最も罹患率の高い 2 歳以下の乳幼児には効果がないため、現在においては世界的に見てもワクチンキャンペーンに導入している例はない。また、C 群においても 10 歳以上ではその効果を示すが、2 歳以下の乳幼児では A 群同様効果がないとされている。上述の理由により荚膜多糖体ワクチンの投与は 2 歳以上の子供と大人に限っている。現時点においては、髄膜炎ベルトや北アメリカ等で流行の沈静化や短期間の予防を目的に使用されているのが現状であると考えられる。なお、B 群髄膜炎菌は荚膜多糖体がヒトの脳内糖鎖と類似の構造であるが故に抗体惹起能がなく、現時点では有効な B 群髄膜炎菌に対する荚膜多糖体ワクチンは存在しない。

#### 製品名及び問い合わせ先：

- a) Mengivac(A+C)  
Pastuer Merieux,  
58, avenue Leclerc  
B.P.7046  
F-69348 Lyon Cedex 7, France

- b) AC Vax  
ACWY Vax  
GlaxoSmithKline,  
Glaxo Wellcome UK Ltd.,  
Stockley Park West,  
Uxbridge,  
Middlesex, UB11 1BT  
General Enquiries:  
Tel: 020 8990 9000  
Fax: 020 8990 4321

#### 検定方法：

他国での検定方法は不明。しかし、国内で検定を行う場合には荚膜多糖体抗原の純度(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荚膜多糖体に対する抗体が一定規定量誘導されるか)試験、血清群特異性、その他無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と考えられる。

#### **2) C 群荚膜多糖体 conjugate ワクチン**

前述のとおり C 群荚膜多糖体ワクチンが成人でも持続性がなく、さらには 2 歳以下の乳幼児には効果がないためにワクチンプログラムが実施できない状況を克服する目的で開発され、英国の 1999 年の C 群髄膜炎菌によるアウトブレイクを機に 1999 年 11 月に英国で世界で初めて認可され、ワクチンプログラムに導入された。インフルエンザ菌や肺炎球菌の conjugate ワクチンの成功を参考に髄膜炎菌でも開発されたワクチンであり、英国では既に 3 社からの製品が認可されている。

- a) Meningitic (Wayth)  
C 群髄膜炎菌の精製荚膜多糖体に無毒化ジフテリア毒素、CRM197 (CRM197)を結合させ、溶液としてガラスバイアルに封入されている。
- b) Meninjugate (Chiron)  
a)と同質の製品であるが、凍結乾燥体としてガラスバイアルに封入されている。

c) Neis-Vac-C (Baxtor)

C 群髄膜炎菌の精製莢膜多糖体に破傷風菌トキソイドを結合させた製品で溶液としてシリンジに封入されている。

a)のワクチンが英国の他、アイルランド、ポルトガル、ベルギー、ドイツ等のヨーロッパで広く認可され、b)のワクチンもアイルランドやスペイン、EU、カナダといった先進国で認可され、使用されている。

いずれの製品も1回の投与には1バイアル(0.5 ml)を使用し、2、3、4ヶ月の3回投与、5～12ヶ月の乳幼児は1ヶ月のインターバルを含んだ2回投与、1歳から24歳までは1回の筋肉注射により投与する。現在は経過追跡中であるが、ワクチンプログラム開始から1年後の英国における中間報告ではワクチン接種対象の年齢層におけるC群髄膜炎菌による感染症の発生率は開始前年度と比較して85%前後低下しており、その有効性が認識されている。また臨床実験では莢膜多糖体ワクチンでは懸念されていた予防効果の長期持続性も保持しており、現時点では最も有効なC群髄膜炎菌ワクチンとして使用されている。臨床実験やワクチンプログラム開始後の現在において重篤な副作用は報告されておらず、副作用は少ないと推測されるが、その詳細は現時点では不明である。

現在はC群髄膜炎菌ワクチンのみならずアフリカの髄膜炎ベルトを中心とした髄膜炎菌性感染症をコントロールするためにWHOが中心となり、A+C群 conjugate ワクチンを開発中であり、近年中に実用化される見通しになっている。

製品名及び問い合わせ先：

a) Meningitic (Wyeth Laboratories)

Wyeth Vaccines  
5 Giralda Farms  
Madison, NJ 07940, U.S.A.  
Tel:1-617-665-8708

b) Meninjugate (Chiron)

Chiron Corporation  
4560 Horton Street  
Emeryville, CA 94608-2916  
U.S.A.

Phone: 1-510-655-8730

Fax: 1-510-655-9910

c) Neis-Vac-C (Baxtor)

Baxter Healthcare Corporation  
One Baxter Parkway  
Deerfield, IL 60015, U.S.A.  
Tel:1-847-948-2000

検定方法：

他国での検定方法は不明。しかし、国内で検定を行う場合には莢膜多糖体ワクチンと同様の検定が必要であると考えられる。

**3) 外膜タンパクワクチン (VA-MENGOC-BC)**

前述2項で対応できなかったB群髄膜炎菌に対する開発中のワクチンであり、2002年の時点でFinlay Institute社がPhase IIIまで開発を進めている。B群髄膜炎菌キューバ株CU385のリポオリゴ糖を減らした外膜 vesicle を水酸化アルミニウムに吸着させたものが主材料となる。キューバにおいて実施されたPhase IIまでの臨床実験では2回の投与によって10代の年齢層における髄膜炎菌性感染症が83%低下したとしている。しかし、ブラジルでは70%程度であり、2歳以下では37%程度であることからその有効性は未だ未知数である。B群髄膜炎菌による小規模な流行はC群による流行と共に特に先進国では深刻な問題となっている。日本においても症例数は少ないながらも発生する髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌の半数以上はB群によるものであり、日本国内のドミナント血清群であると推測されることから今後のB群髄膜炎菌に対するワクチンの開発状況が注目される。

**E. 結論**

A、C、Y、W-135血清群に対する2種の髄膜炎菌ワクチンが世界において使用されている。特にC群髄膜炎菌の莢膜多糖体 conjugate ワクチンは永続的な効果があることが確認されつつあり、国家的なワクチンプログラムに導入する先進国が増加しつつある。さらに上記ワクチンの成功を受けてアフリカ髄膜炎ベルト地帯に対するA+C conjugate ワクチンの開発も実用化段階に入ってきている。また、髄膜炎菌の全ゲノム配列が解読されたのを受けて世界中で莢膜多糖体に代わる

ワクチン抗原が積極的に探索されている。現在日本においては B 群や Y 群の髄膜炎菌による髄膜炎菌性髄膜炎が年間 10 例ほどのみの報告となっているため、現時点における髄膜炎菌ワクチンの対策は必要ないと考えられる。一方、行政として髄膜炎菌の流行地への日本人旅行者への接種は特に指導していない状況である。しかし、短期間や留学、海外転勤などによる長期海外滞在者に対してや、さらには海外渡航者の帰国による輸入感染の例も想定できるため、海外における髄膜炎菌ワクチンに関する動向、政策は常に把握しておく必要性はあると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. H. Takahashi, H. Tanaka, H. Inouye, T. Kuroki, Y. Watanabe, S. Yamai and H. Watanabe: Isolation and characterization of a *Neisseria meningitidis* strain from healthy carrier that is deficient in  $\gamma$ -glutamyl aminopeptidase activity. *J.Clin.Microbiol.* 40: 3035-3037, 2002
2. H. Takahashi, T. Kuroki, Y. Watanabe, S. Yamai and H. Watanabe: Identification of *tet(B)*, Encoding High-Level Tetracycline Resistance, in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 4045-4046, 2002

## H. 知的所有権の取得状況

なし

## 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

分担研究者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長)

共同研究者 永田 典代、佐藤 由子(同・感染病理部)  
加藤 篤、荻野 倫子(同・ウイルス第三部)

**研究要旨** 弱毒生おたふくかぜワクチンの安全性確認試験のひとつである神経毒力試験の改良法について、海外で用いられているワクチン1株と日本のワクチン1株およびワクチン由来の継代株、そして患者由来の臨床分離株2株の合計5株の神経毒力について、ラットを用いて検討比較した。乳のみラット一匹あたり102PFU/10 $\mu$ lを脳内接種し、接種後3, 6, 9日目の脳乳剤におけるウイルス量測定と6, 30日目に病理組織学的検索を実施した。その結果、患者由来の2株およびワクチン株を数代継代したワクチン由来株を接種した群のラット脳組織において有意なウイルス増殖と病変の発現がみられた。ウイルスの感染は、接種後6日目に脳室上衣細胞と脈絡膜細胞におけるウイルス抗原の検出によって確認され、病変部に一致して炎症が惹起されていた。接種後30日目には上記3株を接種した群において軽度から重度の脳室の拡張がみられた。これらの結果により、弱毒生ワクチン株と、患者分離株および継代を重ねたワクチン由来株との間で差がみられた。海外で用いられているワクチン株と日本で使われているワクチン株の弱毒化は乳のみラットにおいて同等であることが判明した。

### A. 研究目的

現在、弱毒生おたふくかぜワクチンの弱毒化あるいは毒力復帰を否定するため、カニクイザルを用いた神経毒力試験がおこなわれている。ワクチンの品質管理において、日本と海外ともに抱えている問題は同じである。すなわち、弱毒化マーカーが決定されていないこと、reference株がないことである。そのため、神経毒力や力価の相違の予想がつかないまま、異常病変がないことを確認する試験を行っているのが現状である。Rubinらはこの試験法の改良に取り組み、これまでに現行のサルを用いた試験法における新しい評価方法の提案とラットを用いた試験法が報告された。

今年度は、Rubinらが提案したラットを用いた新しい試験法の再現性と有用性をはかる目的で海外のワクチンと日本のワクチンおよび患者分離株をもちいて乳のみラットを用いた感

染実験を行った。

### B. 研究方法

#### 使用動物

Lewis Rat 生後24時間以内の乳のみラット10腹。

#### ウイルス

A株：海外でワクチンとして用いられている Jeryl Lynn 株 (化血研から供与)

B株：日本のワクチン株

C株：日本のワクチン由来株で数代継代したもの。B株と種ウイルスは異なる。

D株：大館株。1993年に秋田県大館市でおたふくかぜ発症後、無菌性髄膜炎を発症した患者の咽頭ぬぐい液から分離され

た。

E株：02-49株。2002年に新潟県でおたふくかぜを発症した患者の咽頭ぬぐい液から分離された。

F液：陰性コントロールとして、ウイルス液の希釈に用いた培養液のみを用いた。

### 接種方法

脳内接種法。左側視床内に10 $\mu$ l、イトローマイクロシリンジ（ISP用）を用いて接種した。

### 材料採取

接種後30日目まで動物の観察と体重測定を行った。また、一部の動物を用いて接種後3、6、9日目に脳乳剤を作製し、ウイルス感染価の測定（一群3匹）あるいは接種後6、30日目に組織材料を採取し、病理組織学的観察を行った。

### ウイルス分離

脳乳剤は1匹分の全脳を無血清培地で希釈し20%乳剤とした。マイクロチューブ内で乳剤を作成し、遠心後上清を得た。Vero細胞をもちいてマイクロタイター法によりウイルス感染価を測定しCCID<sub>50</sub>を算出した。

### 病理組織学的検索

ウイルス接種動物をエーテル過麻酔殺後、心臓から血液を採取した。胸骨を除去して開胸し、5mlシリンジ25Gをもちいて左心室より10%ホルマリン緩衝液を還流し全身を固定した。頭蓋を含む全脳を採取し、さらに一晚浸漬固定してから正中線で左右に切開した。なお、接種後30日目の頭蓋は2日間の固定後、EDTA4Na緩衝液で脱灰処理（80%エタノールによる脱脂後、1週間浸漬）を行い、頭蓋を正中で切開した。正中で切開した脳組織の肉眼写真をデジタルカメラで撮影後、再固定し通常のパラフィン包埋切片を作成した。

### ウイルス抗原の検出

ホルマリン固定パラフィン切片を用いてsABC法によりウイルス抗原の検出を試みた。概略すると、脱パラフィン後、0.25%トリプシン処理を行い、0.3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。燐酸緩衝液（PBS）洗浄後、ヤギ正常血清と反応後、一次抗体の抗ム

ンプスウイルス抗体ウサギ血清を適宜希釈し4℃で一晩反応した。PBS洗浄後、ビオチン化抗ウサギ抗体ヤギ血清と反応し、洗浄後ストレプトアビジンペルオキシダーゼと反応した。次にジアミノベンチジン(DAB)でシグナルの可視化を行い、ヘマトキシリンで核対比染色を行った。

### C. 研究結果

脳乳剤のウイルス感染価測定の結果、いずれの株も接種後3日目にウイルスの増殖が見られるが、6、9日目には減少した(n=3)（図1A）。接種後3日目において、ワクチンA、B株に比べて野外D、E株では有意なウイルスの増殖が観察された。また、数回継代を重ねたワクチン由来C株では野外D、E株と同等の増殖がみられた。免疫組織化学検索では、接種後6日目にはすべての群においてウイルス抗原陽性の動物が存在したが、特にC、D、E株接種群で高率であった（図1B）。ウイルス抗原は脳室周囲の上皮細胞と脈絡叢において検出され、その部位に一致して炎症性変化が観察された（図2A、B）。炎症の程度はウイルス抗原の検出率と比例し、C、D、E接種群で顕著であった。接種後30日目のC、D、E株接種群では脳室の拡張がみられた（図4、表1）。このうち1匹は接種後27日目から明らかな体重の減少と活動の低下と後頭部の膨張がみられ28日目には瀕死となった（図3A）。

### D. 考察

感染性ウイルス量と臓器組織切片中のウイルス抗原の検出と炎症性反応（図1）は時期にずれがみられ、ウイルス→ウイルス抗原→炎症性反応の順にピークがみられた。ウイルスの感染動態と宿主の免疫反応を明らかにする上で興味深い。また、野外株接種群において接種後30日目には水頭症の発症がみられたが、脳室上皮細胞および脈絡膜細胞のウイルス感染と炎症が原因で脳脊髄液の流通障害あるいは分泌過剰によって脳室に液が徐々に貯留し、水頭症となったと推測される。

乳のみラットを用いたムンプスウイルス脳内接種の結果、ウイルス増殖とウイルス抗原の検出や組織病変において、ワクチン株と野外株お

よび継代を重ねたワクチン由来株で明らかな差が認められた。なお、細胞を使った継代による病原性復帰の可能性は乳のみハムスターをもちいた同様の感染実験においても報告されている。

乳のみラットを用いた神経毒力試験は弱毒株と野外株の区別が可能であることが示唆され、乳のみラットにおける海外ワクチンと日本ワクチンの弱毒化は同等であることが明らかとなった。

## E. 結論

乳のみラットを用いたおたふくかぜワクチンの神経毒力試験の有用性が示唆された。再現性を確認するために同じ株をもちいて再試験を予定している。さらに、海外ワクチンと日本ワクチンの抗原性について調べるために、ワクチン脳内接種後 30 日目の動物から採取した血清を用いてムンプス中和抗体の測定を予定している。

## 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

特になし

## 図表について

図 1A: ウイルス接種後 3, 6, 9 日目の乳のみラット脳乳剤中の感染性ウイルス量測定の結果を示した。横軸は動物一匹あたりの脳中の CCID50 量をあらわした。一群 3 匹としたが、一部、一匹のみから分離した (\*印)。

図 1B: ウイルス接種後 3, 6, 9 日目の乳のみラット脳組織のウイルス抗原と炎症像を示した。表中の数字は陽性数/検索数を表した。NE は未検索。

図 2: ウイルス接種後 6 日目の乳のみラットの脳組織の変化を示した。すべて同じ日齢のものである。左から正常コントロール F 群の HE 像、野外 D 株接種動物の HE 像、同ウイルス抗原を示した。A: 大脳皮質側脳室、B: 第四脳室。野外 D 株を接種した動物の脳室内、上衣細胞および脈絡細胞層に好中球および単核系細胞の浸潤が見られた。この部位に一致して上衣細胞と脈絡膜細胞の細胞質にウイルス抗原が検出された。

図 3A: 野外 D 株接種後に水頭症を発症し、瀕死となったラットの全体像と脳断面写真。接種後 26 日前後から活動が低下し、食欲が低下した。28 日目には体重の顕著な現象がみられ、瀕死となったので過麻酔殺とした。生存時、頭部の膨隆がみとめられた。解剖後、脳断面を観察すると、側脳室の大きな拡張がみられ、左側大脳皮質(接種側)はひ薄であった。組織的には拡張した脳室周囲にリンパ球の小さな集簇が数個、見られるのみで炎症は沈静していた。ウイルス抗原は検出されなかった。

図 3B: 同時期に培養液のみを接種した正常コントロール F 群。全体像は接種後 28 日目に、脳断面採取は 30 日目に行った。

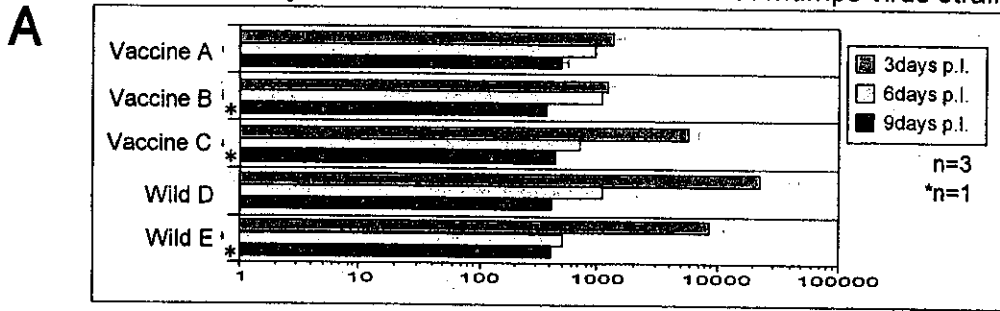
図 4: ウイルス接種後 30 日目に解剖した動物の脳断面肉眼写真。A, B, F 群においては脳室の拡張は見られないが、C, D, E 群において側脳室の拡張がみられた。

表 1: 接種後 30 日目の水頭症発症数を示した。表中の数字は陽性数/検索数を表した。



**Fig. 1**

Virus isolation and histopathological examination of suckling rat of 3, 6 and 9 days after intracerebral inoculation with mumps virus strains

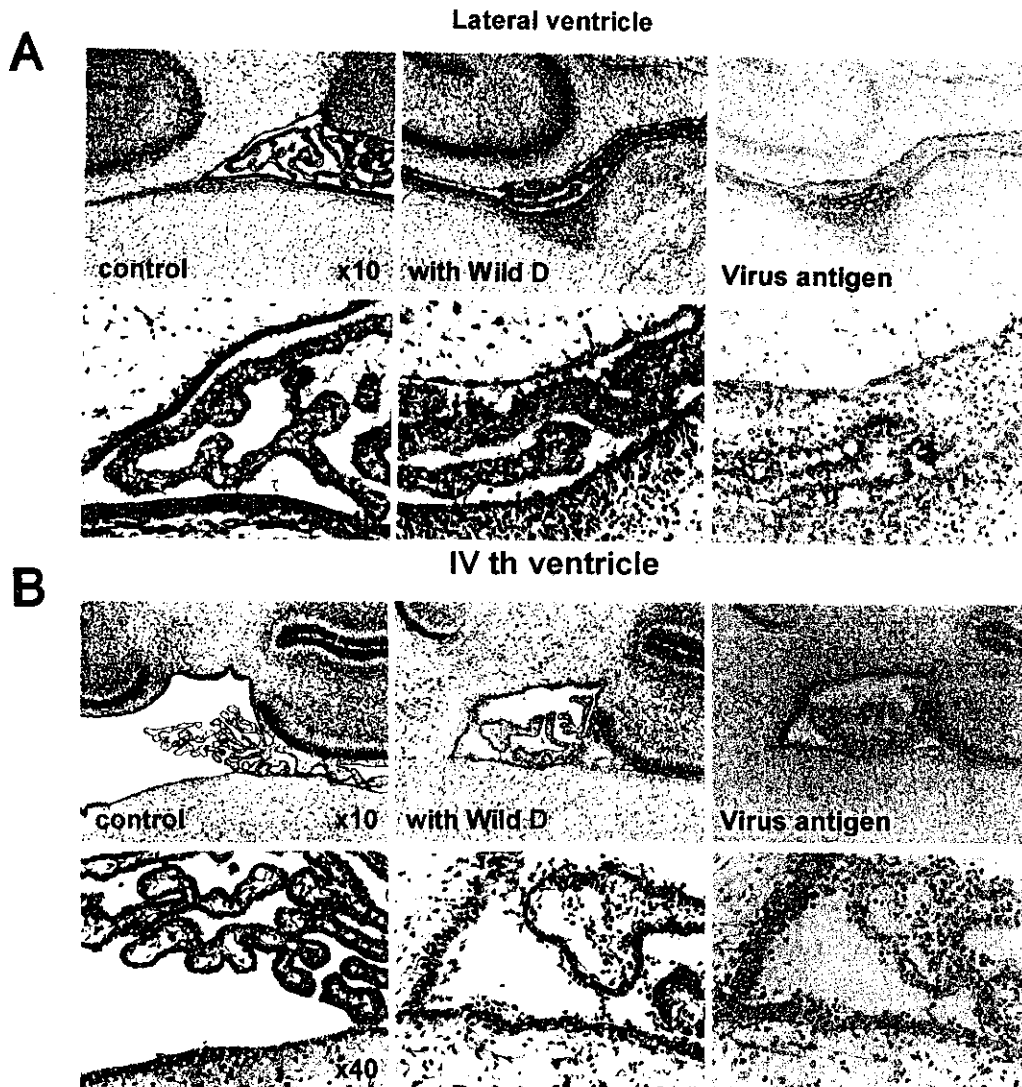


**B**

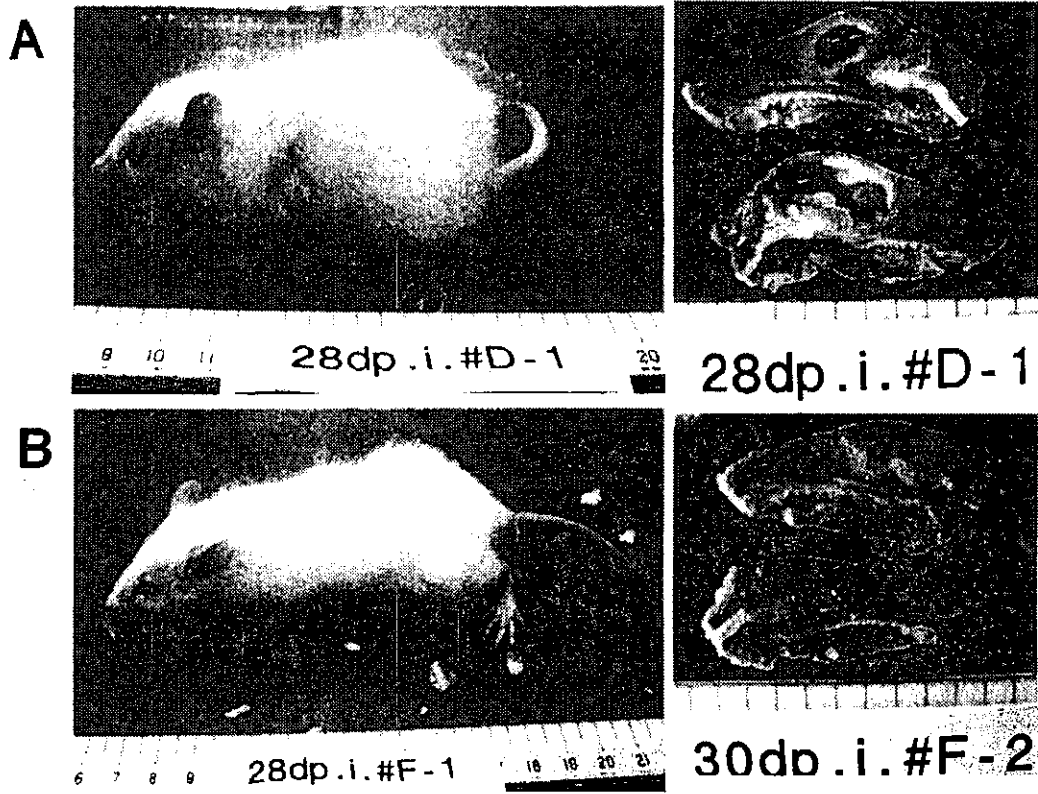
	3d p.i.		6d p.i.		9d p.i.	
	Virus antigen	Inflam-mation	Virus antigen	Inflam-mation	Virus antigen	Inflam-mation
Vaccine A	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	1/3
Vaccine B	0/3	0/3	2/5	1/5	NE	NE
Vaccine C	NE	NE	3/3	3/3	NE	NE
Wild D	NE	NE	2/3	2/3	1/1	1/1
Wild E	NE	NE	3/3	3/3	NE	NE
control	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1

**Fig. 2**

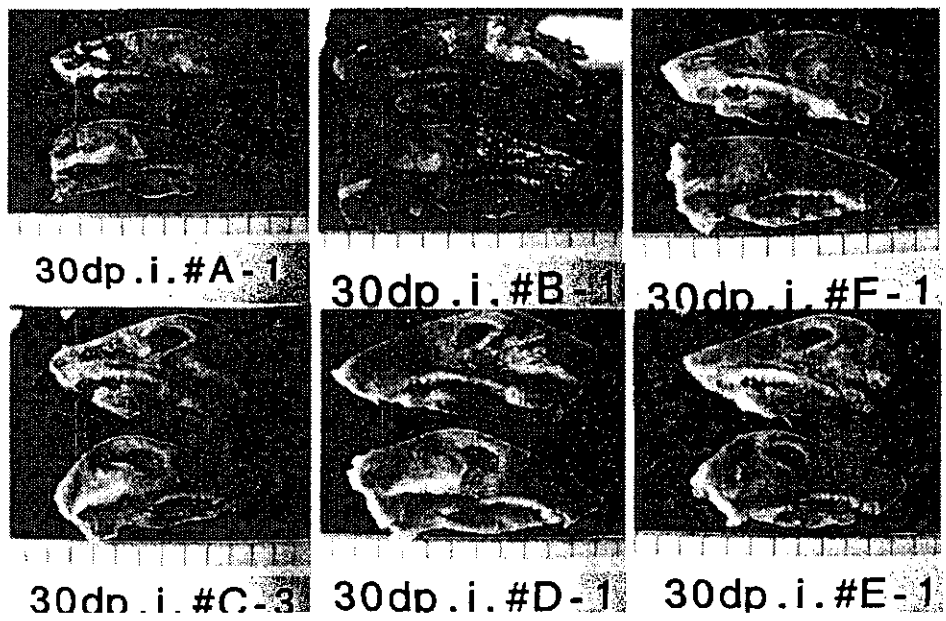
Histopathological changes of suckling rat brain 6 days after intracerebral inoculation of the Wild strain of mumps virus



**Fig. 3 Hydrocephalus with mumps virus in rat**



**Fig. 4**



**Table 1****Virulence of mumps virus strains in suckling rat  
after intracerebral inoculation**

Virus	Hydroencephalus	Died
Vaccine A	0/4	0/4
Vaccine B	0/4	0/4
Vaccine C	4/4	0/4
Wild D	2/4	1/4 (28d p.i.)
Wild E	2/2	0/2
control	0/2	0/2

## 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第二部長)

研究協力者 堀内善信、山本三郎、高橋元秀、佐々木次雄、近田俊文、  
山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、持田恵子、八木哲也、  
柴山恵吾 (国立感染症研究所細菌第二部)

**研究要旨** 国産の BCG ワクチンについて文献的に外国株との遺伝学的性状を比較した。また、以前マウス法で防御能が劣ると報告された我が国の BCG 製造の種株である東京 172 株が、デンマーク株と同等の防御能を有する事をモルモット法により確認した。

三種混合 (DTaP) ワクチンについて、海外の 3 製剤を入手し、比較解析を実施した結果、我が国の製剤に比べて強い局所反応原性がみられた。たとえば、白血球増加 (LP) およびヒスタミン増感 (HS) 試験に適合したが、マウス体重減少試験ではかつての全菌ワクチン並の強い毒性を示し、不適合と判定された事が示唆された。また、海外の DTaP ワクチンなどの中には、ワクチン成分(おそらく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、含有されてい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ことが明らかとなった。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 (>500 IU/ml) が認められ、DPT ワクチンと同時期接種により、過免疫等、その安全性が懸念される結果が得られた。

### A. 研究目的

海外で製造・使用されている細菌ワクチン製剤の品質を、特に国内の同種ワクチンとの互換使用の際の問題点に重点を置いて比較・評価する。

### B. 研究方法

海外のワクチンを入手して国内製品との比較試験を行うか、あるいはその評価成績の報告がある場合、日本のワクチンについての評価結果と比較する。併せて我が国の予防接種で使用した場合の問題点について検討を加える。具体的には、DtaP ワクチンについては、基準にある主な試験に加え、Adjuvant 濃度等の成分の違いに付随する性状を比較する。BCG ワクチンについては、既に各種 BCG 株の遺伝学的比較が実施されており、マウスの感染実験で東京 172 株の防御能が低かったという指摘に対して、モ

ルモットを用いて検証を行った。

(倫理面への配慮)

人由来材料や個人に関する情報は扱わない為、その点における倫理的問題点は発生しなかった。また、動物実験は感染研の倫理規定に沿って実施した。

### C. 研究結果

**BCG ワクチン:** BCG ワクチンは強毒の牛型結核菌を長期継代して得た弱毒株を元にして作られており、1960 年代に凍結乾燥技術が確立するまでは、分与後の各国で継代されてきたことから、現在各地で保存、利用されている個々の BCG 株は遺伝学的に同等とは限らないと指摘されている。既報の *M.tuberculosis* H37Rv 株の全遺伝子配列を規準に、*M.bovis* や BCG 各亜株の違いをマイクロアレイで調べた最近の

報告によれば、少なくとも 11 の領域(RD)が M.bovis ではみられず、さらに M.bovis にみられる 5 つの領域が大半の BCG 株では欠失している(表 1)。一方、マウスに対する病原性にも亜株間に違いが見られ、日本株は増殖力が弱く免疫誘導能も低いと報告されている。しかしモルモットでの防御免疫誘導効果をデンマーク株と比較したところ、有効性に差はないとの結果が得られた(表 2)。

DTaP および Hib ワクチン：現在西欧諸国を中心に広く使われている DTaP のうち、破傷風トキソイド(T-td)をキャリアーとした Hib 混合 1 種類を含む 3 種類(Chiron 製 1 ロット、S.K.B. 製 2 ロット、Aventis Pasteur 製 IPV-DTaP および IPV-DTaP-Hib 各 1 ロットの計 5 ロット)について、国内基準による評価を行った。いずれも、白血球増加(LP)およびヒスタミン増感(HS)試験に適合したが、マウス体重減少試験ではかつての全菌ワクチン並の強い毒性を示し、生物学的製剤基準に従えば不適合と判定される事が章かとなった(表 3)。また、今後、我が国でも日本薬局方により導入が予定されているエンドトキシン試験を実施したところ、反応阻害のため試験の実施が困難であった製剤がみられた。特に IPV-DTaP-Hib は 400EU/ml の強いリムルス活性を示し、発熱試験陽性であった。モルモットでの異常毒性否定試験では、マウスと異なり体重減少毒性は見られなかったが、腹腔大網膜に強い炎症が見られた。更に局所刺激作用等の局所反応原性についてウサギ皮内での硬結およびマウス足蹠腫脹を指標に比較した。その結果、ウサギ皮内では日本の DTaP 接種部位の反応は 2 週以内に消失したが、外国ワクチン 3 種の反応は 3 週以上残存した。マウス足蹠についても、日本のワクチンは軽微な腫脹しか惹起しなかったが、SKB および Aventis のワクチンでは強い腫脹がみられ、Chiron のワクチンも他の 2 種より軽微であったものの日本のワクチンに比べて強い腫脹を惹起した。さらに引き続き病理組織学的検討を行っているところである。またトキソイド力価試験を行ったところ、概ね国内ワクチンと同等の結果が得られたが、Hib 含有ワクチンで異常に高い破傷風トキソイド力価 (>500 IU/ml) が観察された(表 4)。

## D. 考察

BCG ワクチンでは Tokyo172 株の有効性に関しマウスを用いた試験での結果を基にした懸念について、より人に近い系とされるモルモットを用いて試験を実施した結果、Tokyo172 株と海外の BCG 株の間で、結核免疫の誘導能に関し優位な差は認められずほぼ同等である事が確認された。また、今後海外の BCG ワクチンが導入された場合、その安全性や有効性について、日本の BCG ワクチンとの比較や互換性の問題点などの検討が必要となると考えられる。DTaP ワクチンについては、検討した 3 種類の製品は、現行基準上はマウス体重減少(BWD)試験には適合しなかったが、他の毒性試験の基準には適合した。現在 BWD 試験をエンドトキシン試験に置き換える基準改定の検討が進んでおり、このエンドトキシン試験適用可能性について評価したところ、SKB のワクチンでは適用が困難であることが判明した。これは、おそらくはアジュバント成分の干渉によりエンドトキシン量が実際の量より少なく検出される為であると推察された。また百日せき、ジフテリア、破傷風のいずれの力価も十分基準値を超えるものであったが、IPV-DTaP-Hib で、異常に高値の破傷風力価が観察され、過剰免疫等の安全性の問題が懸念された。ウサギ皮内およびマウス足蹠での局所反応原性の比較では、いずれの海外製剤も、日本の DtaP ワクチンに比べて強い局所刺激作用を示した。基準上問題とならないが、臨床上の安全性が懸念される。また米国のワクチン接種後の副反応データ(VAERS)によると、因果関係は不明ではあるが、年間約 70 人の接種後死亡が報告されている(表 5、図 1、2)。日本ではこうした事例は皆無であり(表 6)、こうした差の原因について解析の必要があろう。今後さらに外国ワクチンについては日本の現行ワクチンとの互換使用の際の安全性や有効性の評価が必要である。

## E. 結論

海外で生産されている DtaP ワクチンなどの細菌ワクチンは、局所反応を強く惹起するものがあること、エンドトキシンの正確な測定が困難であるもの、またキャリアー蛋白としての破傷風トキソイド成分の影響で、抗破傷風力価が高く出るものなどがあり、その成分や性状が、国

産の現行ワクチンと比べ、異なる可能性が示唆された。したがって、海外の細菌ワクチン製剤を導入する際には、副反応などの発生を未然に低く抑えるため、その安全性に関し十分に検討と事前評価を行うとともに、現行ワクチンとの互換使用の際の有効性、安全性の検討や確認が必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

投稿準備中

##### 2. 学会発表

抄録準備中

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1. BCG亜株、BCG以外の*M. bovis*および*M. tuberculosis*の分子生物学的違い

	MPB54	MPB64 の 遺伝子	MPB70 とMPB80 発現量	methoxy- mycolates	mmvc3 遺伝子 点突然変異	Bst E II REL P の パターン	IS6110 REL P の コピー数
BCG Denmark Copenhagen	-	-	-	-	+	A	1
BCG Glaxo	-	-	-	-	+	A	1
BCG Pasteur	-	-	-	-	+	A	1
BCG Tice	-	-	-	-	+		1
BCG Tokyo	+	+	+	+	-	B	2
BCG Moreau	+	+	+	+	-	B	2
BCG Russia	+	+	+	+	-	B	2
BCG Sweden	+	+	+	+	-	B	1
<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	-	B	2
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	+	+					
<i>M. tuberculosis</i> H37Rz	+	+					

表2. 結核菌攻撃後に対するTokyo172株とCopenhagen1331株の防御能の比較

肺

要因	偏差平方和	自由度	平均平方和	F
ワクチン接種の有無	6.616	1	6.616	40.121 *
ワクチンの種類	0.673	2	0.337	2.041
誤差	2.639	16	0.165	
全体	9.928	19		

ワクチン	平均(log CFU)(95% 信頼区間)	
東京172株(凍結標品)	4.7241	(4.2840 - 5.1642)
東京172株(凍結乾燥標品)	4.2275	(3.5224 - 4.9326)
Copenhagen 1331株(凍結乾燥品)	4.3455	(3.8436 - 4.8473)
対 照	5.7606	(5.4888 - 6.0325)

脾

要因	偏差平方和	自由度	平均平方和	F
ワクチン接種の有無	67.277	1	67.277	52.795 *
ワクチンの種類	1.552	2	0.776	0.609
誤差	20.389	16	1.274	
全体	89.218	19		

ワクチン	平均(log CFU)(95% 信頼区間)	
東京172株(凍結標品)	2.1132	0.6166 - 5.1642)
東京172株(凍結乾燥標品)	1.5139	0.2319 - 4.9326)
Copenhagen 1331株(凍結乾燥品)	1.3704	( 0 - 4.8473)
対 照	5.9015	4.7351 - 6.0325)

\*:有意(p<0.01)

攻撃: 結核菌H37Rv



表 3.

Manufacturer	DTaP Product	Lot no.	Treatment	BWD toxicity		LP toxicity		HS toxicity at 4-day		HS toxicity at 11-day	
				BWU(95% confid. Limits)	LPJ(95% confid. Limits)	HSU(95% confid. Limits)	HSU(95% confid. Limits)	HSU(95% confid. Limits)	HSU(95% confid. Limits)		
Aventis Pasteur (France)	PENTAXIM	Lot.T1091-1	-	138.3 (17.1 - 1121.5)	0.063 (0.0061 - 0.20)	0.096 (0.054 - 0.16)	0.13 (0.033 - 0.34)				
		Lot.R1400-2	37°C 4wks	494.7 (27.1 - 9043.2)	0.047 (0.0038 - 0.16)	0.15 (0.087 - 0.24)	0.12 (0.031 - 0.33)				
S.K.B. (Belgium)	INFARIX	59002B9	-	418.6 (39.0 - 4489.2)	0.086 (0.048 - 0.14)	0.10 (0.059 - 0.17)	0.12 (0.030 - 0.32)				
			37°C 4wks	625.2 (54.2 - 7206.3)	0.025 (0.0013 - 0.096)	0.080 (0.044 - 0.14)	0.087 (0.019 - 0.23)				
		59003B9	37°C 4wks	1020 (45.8 - 22882.1)	0.088 (0.033 - 0.18)	0.080 (0.044 - 0.13)	0.063 (0.012 - 0.17)				
Chiron (Italy)	Triacelluvax	Lot.6304	-	42.6 (13.2 - 177.9)	0.10 (0.035 - 0.25)	0.10 (0.035 - 0.25)	0.13 (0.060 - 0.26)				
		37°C 4wks	125.6 (16.9 - 934.0)	0.099 (0.013 - 0.29)	0.059 (0.032 - 0.10)	0.023 (0.0025 - 0.074)					
Japanese vaccines	Acellular(1990~2002) (±2SD)	Whole cell(1981)	-	409.9 (34.6 - 4852.1)	0.097 (0.055 - 0.16)	0.11 (0.027 - 0.30)	0.083 (0.012 - 0.55)				
			37°C 4wks	8.033 (2.34 - 27.6)	0.13 (0.035 - 0.47)	0.085 (0.026 - 0.28)	0.15 (0.018 - 1.25)				
				56.4 (16.8 - 188.8)	1.8 (0.66 - 4.8)	1.92 (0.562 - 6.54)					

Blocked : Not comply with Japanese Minimum Requirements

表 4.

Exp.1 Ref.Lot.2.	Diphtheria Toxoid			Tetanus Toxoid		
	Regression	Potency	(95% C.I.)	Regression	Potency	(95% C.I.)
	1.922	64				
WHO TE(160IU)	1.494	310.8 ( 233.1 - 420.2 )				
Reg.Refe	1.996	191.7 ( 140.9 - 255.5 )				
ST.L4(160IU)	2.131	194.6 ( 143.2 - 259.3 )				
DTaP (BUKAN)	2.039	349.6 ( 262.3 - 476.3 )				
DTaP (SKB)	0.459	178.3 ( 118.6 - 248.8 )				
DTaP (Chiron)	0.936	107.4 ( 62.8 - 158.2 )				
Exp.2 Ref.Lot.2.	1.643	64	Exp.1 Ref.Lot.2.	40		
PENTAXIM Hib(+)	1.136	128.07 ( 101.6 - 160.9 )	PENTAXIM Hib(+)	-0.199	1416.8 ( 590.1 - 8482 )	
PENTAXIM Hib(-)	1.349	119.25 ( 94.6 - 149.8 )	PENTAXIM Hib(-)	9.301	252.3 ( 144.8 - 612.8 )	
	Common	1.282				
Exp.3 Ref.Lot.2.	1.28	64	Exp.2 Ref.Lot.2.	40		
TETRAXIM	1.227	88.2 ( 65.9 - 116.8 )	TETRAXIM	9.966	188.6 ( 144.6 - 256 )	
DTaP (SKB)	( 0.459	178.3 ( 118.6 - 248.8 ) )	SKB59002	17.938	472.6 ( 335.1 - 798.3 )	
SKB59003	1.281	66.3 ( 49.1 - 88.2 )	SKB59003	10.464	275.4 ( 207.2 - 398.1 )	
LAN ZHOU	1.124	309.6 ( 233.4 - 416.7 )	TRIACELLVAX	9.124	275.4 ( 207.2 - 398.1 )	
CHANG CHUN	1.277	284.1 ( 214.4 - 381.3 )				
	Common	1.23				

表 5. 米国ワクチン副反応報告システムデータ(DTaP)

Year	1996	1997	1998	1999	2000
Total	526	1,121	1,699	2,444	2,872
Adverse events	3	30	57	64	76
SIDS among dead	1	17	35	31	41
Disabled	7	8	14	29	44
Hospitalized	38	112	151	334	264
The US VAERS					
Live Births	3,891,494	3,880,894	3,941,553	3,899,589	4,064,948
Infant mortality(/1,000)	7.3	7.2	7.2	7.0	6.9
Coverage >=3 Doses (%)	95	95	96	96	96
>=4 Doses (%)	78	81	82	84	83
Total doses	14,216,157	14,294,450	14,635,270	14,559,817	15,138,374
SIDS/1,000	0.78	0.77	0.64		
SIDS cases	3,035	2,988	2,523		2,523

CDC NCHS data

表 6. 日本に於ける DTap ワクチン副反応

Year	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Total	57	196	270	167	198	225
Dead		1(Sleep positioning)		1		
Encephalopathy	1			(1)		1(Viral)
Anaphylaxy		2	8	1	6	1
Neuropathy					1	
Convulsion	3	5	15	8		
Allergic reaction					9	1
Local	35	88	124	81	108	89
Immunized doses	4,793,117	4,880,134	4,800,174	4,800,894	4,645,598	4,751,154
SIDS/1,000				0.299	0.31	0.266
SIDS cases				360	365	317
Live Births				1,204,013	1,177,419	1,191,729

MHLW VAE reports