

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業

混合ワクチンの品質確保に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

宮 村 達 男

平成16（2004）年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
混合ワクチンの品質確保に関する研究 宮村 達男	1
II. 分担研究報告書	
1. 混合ワクチンの品質確保に関する研究 多屋 馨子	6
2. <i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib) コンジュゲートワクチンの 品質管理に関する研究 新谷 三春	9
3. ジフテリア、破傷風トキソイドおよび混合ワクチンの検討 高橋 元秀	13
4. 百日せきワクチンおよび混合ワクチンの検討 堀内 善信	17
5. sIPV および sIPV・DPT 混合ワクチンの力価試験の検討 武田 直和	19
III. 協力研究報告書	
6. 国産 IPV の調製及びラット免疫原性試験 清水 文七	21
7. 混合ワクチンの品質確保に関する研究 駒瀬 勝啓	25
8. 混合ワクチンの品質確保に関する研究 大隈 邦夫	27
9. 混合ワクチンの品質確保に関する研究 末原 章宏	30
10. sIPVを用いたDPT-IPV試作品の性状解析に関する研究 東 雍	33
IV. 研究成果の刊行に関する一覧	36

混合ワクチンの品質確保に関する研究

主任研究者 宮村 達男 国立感染症研究所 ウイルス第二部長

研究要旨 sIPV と DPT を混合することで DPT 中に含まれるアルミニウムアジュバントの影響を受け、IPV の力価が上昇することが示唆された。DPT の品質については、混合による変化はほとんど認められなかった。1型の抗体保有率が低かった年代は引き続き追加接種の勧奨をする必要がある。Hib ワクチンや試験用抗体の国際標準品がなく、それらの標準化や抗 PRP 抗体価測定法の標準化が検討課題である

分担研究者

多屋 馨子 国立感染症研究所室長
新谷 三春 国立感染症研究所
主任研究官
高橋元秀 国立感染症研究所室長
堀内善信 国立感染症研究所室長
武田 直和 国立感染症研究所室長

協力研究者

清水 文七 日本ポリオ研究所
駒瀬 勝啓 北里研究所
長井 正昭 北里研究所
大隈 邦夫 化学及血清療法研究
末原 章宏 武田薬品工業株式会社
山下 利明 武田薬品工業株式会社
東 雍 阪大微生物病研究会
佐藤 弘 国立感染症研究所
新井 智 国立感染症研究所
岡部 信彦 国立感染症研究所
岩城 正昭 国立感染症研究所
福田 靖国 国立感染症研究所
小宮 貴子 国立感染症研究所
李 天成 国立感染症研究所

A. 研究目的

わが国で開発されたセービンワクチン株を出発材料とした不活化ポリオワクチン（sIPV）の早期実現のひとつの条件として、ジフテリア、百日咳、破傷風（DPT）との混合ワクチン化が望まれる。本件急では sIPV と各社で既に製造使用されている DPT ワクチンとの試作混合ワクチンを試作し、その安全性、有効性を示し、ワクチンの品質管理を確立するための生物学的製剤基準の作製を目的とした。ワクチン関連マヒという生ポリオワクチンの重大な副作用をなくし、かつ社会レベルの免疫を保ち、ポリオの根絶を達成するためには不活化ポリオワクチンの導入は必須である。一方で児への負担をできるだけ軽くして、ポリオワクチンの高い接種率を保持するため、すでに存在しその有効性、安全性が示され、我が国で小児定期接種として確立している、DPT ワクチンとの不活化混合ワクチンを作製し、それぞれの有効性と安全性についてワクチンの品質確保をはかる。

さらに、将来混合ワクチンに Hib ワクチンを添加することも検討した。これにより新生

児～小児期において vaccine preventable disease について強固な免疫を付与することが可能となる。ポリオについては世界レベルでの根絶が達成され、その後10年ほどの精緻なフォローアップでもポリオの新しい発生がなければ、ワクチンを廃止することができる。

B. 研究方法

1. 濃厚不活化ポリオワクチン（濃厚 sIPV）
各型の単価バルクをこれまでの基礎実験から得られた推定濃度より約2倍濃厚と考えられる濃度での不活化ポリオワクチンを2ロット調製した。ラットでのポリオウイルスに対する免疫原性を6週齢のウイスター系 SPF ラットで一群雌雄同数を使用し1回免疫後及び2回免疫後で検討した。

2. IPV/DTP ワクチンの調製
各社ごとに試作品を調製した。

3. 不活化ポリオワクチン免疫原性試験法
不活化ポリオワクチンを対数等間隔に階段希釈したものを各群のラット（ウイスター系）の後肢大腿部筋肉内に免疫し、追加免疫を1回行った後に採血し、得られた血清について中和抗体価の測定を行った。

4. 混合ワクチンにおける D 抗原量試験法
混合ワクチン中の不活化ポリオワクチンに関する D 抗原量測定が可能であるか検討するため、アルミニウム沈降型混合ワクチンを調製し、アルミニウムゲルを溶解して得られた溶解品について D 抗原量測定を行った。

5. DPT の免疫原性試験ならびに安全性試験

現行 DPT の試験法に準じて実施した。

6. ポリオ感受性調査
感染症流行予測調査事業で実施されている、

ポリオ感受性調査の結果を解析し、年齢別中和抗体保有率、年齢別ポリオワクチン接種率、接種歴別抗体保有率を調査した。1999年ので1,318名のポリオウイルス1,2,3型に対する中和抗体価が測定された。中和抗体価は1:4以上を陽性とした。ワクチン接種歴は問診により調査された。

7. Hib ワクチン(単味)

多糖含量試験、PRP 同定試験、破傷風トキソイド同定試験を行なった。また Hib 臨床分離株（患者血液由来）の培養上清から PRP の分離精製、PRP 標品のチラミン化、免疫原性試験を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では、取り扱う情報の中に個人が特定されるような情報が含まれたとしても、それを研究の結果として含むようなことはしない。従って研究成果の公表にあたって個人的情報が含まれることはない。万一個人的情報が本研究の中に含まれる場合には、それに関する機密保護に万全を期するものである。実験動物の取り扱いに際しては、各研究所の規定に従い、年度ごとに実験計画書を提出・申請し、実験動物委員会の審査を経て実験を行っている。実験に際しても動物愛護の精神を考慮し、使用動物数、安楽死処理等については適正に実施している。

C. 研究結果

1. 濃厚 sIPV の免疫原性

ELISA にて測定する D 抗原量を基準とし実際の濃度の約2倍の濃厚 sIPV を調製した。試作2ロットは1回免疫法で推測されたとおり1型は高い免疫原性を示し、2型は推定どおり、3型は推定より若干低い免疫原性を

示した。

2. 試作混合ワクチンの有効性と安全性

いずれの試作混合ワクチンの相対力価は、単味ワクチンと比較して、全ての型に対して高かったが、特に I 型に対しては顕著であった。アルミゲルのみを添加した単味 IPV ワクチンも高い相対力価を示し、アルミゲルがアジュバンド活性を持つ可能性が示された。また、DTP ワクチンの力価は基準を満たしていた。異常毒性試験、マウ体重減少試験等の安全性基準を満たしていた。

3. ポリオ感受性調査

年齢群別ポリオワクチン接種率は不明であった 606 名を除いた 712 名で検討した結果、0-1 歳 87.0%、2-3 歳 98.0%、4-6 歳 99.0%、7-9 歳 96.7%、10-14 歳 97.1%、15-19 歳 95.9%、20-24 歳 96.8%、25-29 歳 92.6%、30-39 歳 88.1%、40 歳以上 35.2%であった。1 型の抗体保有率が低かった年代は、本年度の調査では 23 歳、24 歳に相当するが、抗体保有率は 23 歳 46%、24 歳 61%と他の年齢層に比して極めて低値であった。3 型に対する抗体保有率は 25-29 歳群で 61.2%と低く、特に 25 歳では 40%と極めて低かった。接種歴別の抗体保有率は、0-5 歳では 1 型に対しては 1 回投与で 90.2%、2 回投与で 98.8%と高い陽性率であった。2 型ではそれぞれ 97.6%、99.4%で高値であった。これに対して 3 型は、1 回投与では 41.5%と低く、2 回投与でも 86.1%であった。また、2 回投与後 1:64 以上の高い抗体保有者が 1 型 81.4%、2 型 80.7%と高かったのに対し、3 型は 30.7%と低値であった。

4. Hib ワクチンの検討

多糖含量は公定書 (EP) に定める規格値をクリアーしていた。PRP 同定試験で使える市販抗体 (試薬) はなかった。破傷風トキ

ソイド同定試験は所期の結果が得られた。

PRP をチラミン化して疎水性を強めてから固相化する ELISA 法で Hib ワクチンの免疫原性を検討したところ、マウス (クローズドコロニー) 3 回免疫後に血中抗体価の上昇が見られた。

5. 混合ワクチン実用化に向けた問題点の整理

IPV を含む混合ワクチン実用化に向けた基準作製のための必要な検討課題を整理した。早急に研究に必要な材料を入手して、我が国の予防接種の安全性、有効性確保のために必要な科学研究を進める必要がある。sIPV を用いた国内参照品を単味 sIPV、および sIPV・DPT 混合ワクチンについて早急に調製する必要がある。製造所は自社製品のロット間均一性を確認する必要がある、更に国は同種製剤の互換使用時の安全性、有効性を保証する必要がある。その為の基準を策定するため、局所反応原性、混入エンドトキシンに対する安全性、キャリアー蛋白に付随する過剰免疫原性等についての検討が必要と考えられた。

D. 考察

1. 濃厚 sIPV 試作ロット

試作ロットは今後の WHO 参照品との比較試験で十分比較検討ができ、WHO 参照品に匹敵する sIPV の抗原量が明らかになることが期待できるものと考えられる。

2. A 社製混合ワクチン

効果および安全性の面で実用化の可能性があることが示された。一方、ポリオワクチンの力価の検定において、Cut off 値を用いた検定ではばらつきが多く、必ずしも適当な方法ではないと思われた。また、相対力

価がポリオ研の策定した基準を超える物があるなど抗原量の見直し等の必要があるかもしれない。さらに、DTP ワクチンを製造しているメーカーは複数あり、各メーカーの DTP ワクチンの性状は多少異なる。ワクチンの上市には基準の策定が重要であり早急に解決していくべきであろう。

3. B 社製混合ワクチン

IPV を混合することによる DPT の力価の低下は認められず、いずれも DPT の生物学的製剤基準に適合し DPT の品質は、現行製剤の DPT と大きな差異は無いものと考えられた。IPV のラット免疫原性試験では各希釈検体での中和抗体価が全般的に IPV 参照品よりも高かったが、用量依存性に問題があったため精度のよい相対力価の値が得られなかった。混合ワクチンは単味の IPV に比べて明らかに相対力価が上昇した。アルミニウムアジュバントにより IPV の免疫原性が上昇することが示唆された。

4. C 社混合ワクチン

混合ワクチン溶解品は単味不活化ポリオワクチンと比較し、1 型と 3 型の値が約 50% 以下であった。一方、混合ワクチン沈降品は同様に 1 型の値が約 60% であったものの、2 型および 3 型の値は単味とほぼ同等であった。

5. D 社混合ワクチン

sIPV-DPT にすることによる DPT 側の力価に対する sIPV の干渉作用はないと考える。一方、sIPV は DPT と混合することで、アルミニウムによると思われるアジュバント効果により免疫原性が増強すると考える。今後、IPV-DPT の評価を行うにあたり、力価試験用参照品をどうするか、また、免疫回数によって各型の抗体産生に違いが見られるこ

とから、力価試験時のラットの免疫回数をどうするかを検討が必要であると思われる。

5. ポリオ感受性調査

すべてのポリオウイルス型に対して 2 歳までに急速に免疫を獲得していたが、2 歳におけるポリオ中和抗体保有率は 3 型は他の型に比してやや低率であった。1 型の抗体保有率が低い年代(23-24 歳)は本年度もそのまま低値であったことから、この年齢層に対するワクチン接種の勧奨は継続していく必要がある。

6. Hib ワクチンの問題点

Hib ワクチンの力価をどのように規定すべきかという問題がある。免疫原性の保持のためには立体構造の保持も必要であるが現行公定法の物理化学的測定法ではそれは検出できない。Routine lot release に使える適切な生物学的定量法が現在ないために物理化学的測定法で代替していると考えられ、これで十分と言えるかは検討の必要であろう。ワクチン、抗体ともに現在、国際標準品がないためラボラトリー間のデータ比較が難しい。Hib ワクチンを混合ワクチンとして接種する場合、DTaP/Hib の Hib 低免疫原性が問題である。早急に原因を明らかにする必要がある。

E. 結論

- ・ 濃厚 sIPV はほぼ期待どおりの免疫原性をラットで示した。この濃厚 sIPV を比較対象として WHO 参照品に免疫原性で匹敵する国内 IPV 参照品を調製する見通しがついた。
- ・ 各社で試作した IPV/DTP ワクチンは、いずれの場合も IPV の力価は上昇が認められ、DPT の品質に関してはほとんど変

化が認められなかった。したがって、免疫原性、安全性の面で混合が可能だと思われる。

- ・ しかし、混合ワクチン中の D 抗原量測定は、製剤では 1 型が測定できず、アルミニウムゲルを溶解した場合は、1 型および 3 型が測定できなかった。1,2 型は抗体保有率が高かったが、3 型はやや低かった。ワクチン投与歴別の抗体保有率でも 1,2 型は容易に抗体を獲得するのに対し、3 型では低い。23 歳群の 1 型抗体保有率は 46%と極めて低かった。引き続き追加接種の勧奨が必要であると考えられる。
- ・ Hib ワクチンの力価試験として物理化学的測定法のみでよいか検討の必要がある。また、標準品の制定や抗体価測定法の標準化が望まれる。Hib ワクチンと DTaP、DTaP/IPV との関係については接種スケジュールや共通抗原の問題も考慮し混合ワクチン化だけでなく同時接種も含めて検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi H, Suzumura S, Shirakizawa F, Wada N, Tanaka-Taya K, et al.: An epidemiological study on Japanese autism concerning routine childhood immunization history. *Jpn J Infect Dis.* 2003; 56 (3): 114-7.

2) 多屋馨子: 感染予防に欠かせないワクチン接種で知っておきたい基礎知識. *エキスパートナース.*19 (12). 126-129, 2003

3) 寺田春郎, 多屋馨子, 宮川広実, 他 : けいれん性疾患児への予防接種. *小児科臨床.* 56 (6). 1015-1022, 2003

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金 (医薬品等医療技術リスク評価研究事業)
分担研究報告書

「混合ワクチンの品質確保に関する研究」

分担研究者： 多屋 馨子 国立感染症研究所 感染症情報センター

研究要旨 ポリオウイルス 1,2 型に対する抗体保有率は概ね高かったが、3 型はやや低かった。ワクチン投与歴別の抗体保有率では、1,2 型は 1 回投与で 90%以上が抗体を獲得するのに対し、3 型では 41.5%と低く、2 回投与後に 86.1%に上昇するものの抗体価は 1,2 型に比して低値であった。1 型の抗体保有率が低かった年代は、調査された年では、23 歳、24 歳に相当するが、抗体保有率は 23 歳 46%、24 歳 61%と他の年齢層に比して極めて低値であった。引き続き追加接種の勧奨をする必要があると考えられる。

研究協力者：佐藤 弘¹、新井 智¹、岡部信彦¹、流行予測調査事業グループ²

(1 国立感染症研究所感染症情報センター、2 厚生労働省、秋田、東京、愛知、山口、愛媛、大分の各都県及びその衛生研究所)

A 研究目的

現在、わが国で使用されているポリオワクチンは生ワクチンであり、数百万人に一人の割合で発生するポリオワクチン関連麻痺を回避することはできない。公衆衛生審議会感染症分科会ポリオ予防接種検討小委員会の結果を受けて、ポリオ不活化ワクチンの導入が必須であること、そして OPV→IPV への円滑な移行のためには、OPV ワクチンと IPV の混合ワクチンの導入が望ましいとされ、本研究班で検討がなされている。本分担研究では、ポリオウイルスに対するわが国の健常人の免疫保有状況を検討し、年齢別ワクチン接種率、接種歴別の抗体保有率を調査することを目的とした。

B 研究方法

感染症流行予測調査事業で実施されている、ポリオ感受性調査の結果を解析し、年齢別中和抗体保有率、

年齢別ポリオワクチン接種率、接種歴別抗体保有率を調査した。1999 年 5～10 月に、6 都県の衛生研究所で 1,318 名(0-1 歳 124 名、2-3 歳 128 名、4-6 歳 136 名、7-9 歳 125 名、10-14 歳 141 名、15-19 歳 136 名、20-24 歳 118 名、25-29 歳 121 名、30-39 歳 125 名、40 歳以上 160 名)のポリオウイルス 1,2,3 型に対する中和抗体価が測定された。中和抗体価は 1:4 以上を陽性とした。ワクチン接種歴は問診により調査された。

(倫理面への配慮)

本研究では、取り扱う情報の中に個人が特定されるような情報が含まれたとしても、それを研究の結果として含むようなことはしない。従って研究成果の公表にあたって個人的情報が含まれることはない。万一個人的情報が本研究の中に含まれる場合には、それに関する機密保護に万全を期するものである。

C 研究結果

年齢群別ポリオワクチン接種率は、不明であった 606 名を除いた 712 名で検討した結果、0-1 歳 87.0%、2-3 歳 98.0%、4-6 歳 99.0%、7-9 歳 96.7%、10-14 歳 97.1%、15-19 歳 95.9%、20-24 歳 96.8%、25-29 歳 92.6%、30-39 歳 88.1%、40 歳以上 35.2%であった。

1,2,3 型に対する年齢別中和抗体保有率と、幾何平均抗体価は表 1,2 に示すとおりである。1 型の抗体保有率が低かった年代は、本年度の調査では 23 歳、24 歳に相当するが、抗体保有率は 23 歳 46%、24 歳 61%と他の年齢層に比して極めて低値であった。3 型に対する抗体保有率は 25-29 歳群で 61.2%と低く、特に 25 歳では 40%と極めて低かった。ワクチン接種歴別にみると、0-5 歳では 1 型に対しては 1 回投与で 90.2%、2 回投与で 98.8%と高い陽性率であった。2 型ではそれぞれ 97.6%、99.4%で高値であった。これに対して 3 型は、1 回投与では 41.5%と低く、2 回投与でも 86.1%であった。また、2 回投与後 1:64 以上の高い抗体保有者が 1 型 81.4%、2 型 80.7%と高かったのに対し、3 型は 30.7%と低値であった。

D 考察

すべての型に対して 2 歳までに急速に免疫を獲得していたが、2 歳におけるポリオ中和抗体保有率は 3 型において他の型に比してやや低率であった。1 型の抗体保有率が低い年代(23-24 歳)は本年度もそのまま低値であったことから、この年齢層に対するワクチン接種の勧奨は継続していく必要がある。2003 年にも調査が実施されているため、その結果との比較が必要である。2004 年には 28-29 歳になっており、子供がポリオワクチンを受け、家庭内でワクチン株に接触する可能性が高くなっている事が予想される。

E 結論

1,2 型は抗体保有率が高かったが、3 型はやや低かった。ワクチン投与歴別の抗体保有率でも 1,2 型は 1 回投与で 90%以上が抗体を獲得するのに対し、3 型では 41.5%と低く、2 回投与後に 86.1%に上昇するものの抗体価は 1,2 型に比して低値であった。23 歳群の 1 型抗体保有率は 46%と極めて低かった。引き続き追加接種の勧奨が必要であると考えられる。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi H, Suzumura S, Shirakizawa F, Wada N, Tanaka-Taya K, et al.: An epidemiological study on Japanese autism concerning routine childhood immunization history. Jpn J Infect Dis. 2003;56(3):114-7.
- 2) 多屋馨子: 感染予防に欠かせないワクチン接種で知っておきたい基礎知識. エキスパートナース.19(12). 126-129, 2003
- 3) 寺田春郎, 多屋馨子, 宮川広実, 他: けいれん性疾患児への予防接種. 小児科臨床. 56(6). 1015-1022, 2003

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 年齢群別ポリオウイルス中和抗体保有率 (80.0%未満太字)

年齢 (歳)	人数 (人)	1 型中和抗体保有率(%)	2 型中和抗体保有率(%)	3 型中和抗体保有率(%)
0-1	124	88.7	90.3	54.8
2-3	128	97.7	98.4	88.3
4-6	136	99.3	98.5	86.8
7-9	125	98.4	98.4	84.0
10-14	141	99.3	98.6	72.3
15-19	136	95.6	98.5	70.6
20-24	118	69.4	99.2	71.2
25-29	121	81.0	96.7	61.2
30-39	125	89.6	98.4	83.2
40-	160	90.6	97.5	92.5
不明	4	100	100	75.0
計	1,318	91.3	97.5	77.0

表2 年齢群別ポリオウイルス幾何平均抗体価

年齢 (歳)	人数 (人)	1 型幾何平均抗体価 (log2)	2 型幾何平均抗体価 (log2)	3 型幾何平均抗体価 (log2)
0-1	124	8.2	8.0	6.6
2-3	128	8.2	7.8	5.8
4-6	136	7.9	7.1	5.2
7-9	125	7.3	6.4	5.0
10-14	141	6.9	6.3	3.9
15-19	136	6.8	6.7	4.3
20-24	118	5.0	6.1	3.8
25-29	121	5.3	6.5	4.1
30-39	125	5.7	6.5	4.8
40-	160	5.8	6.0	5.5
不明	4	7.0	6.5	3.3
計	1,318	6.8	6.7	4.9

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

Haemophilus influenzae type b (Hib) コンジュゲートワクチンの品質管理に関する研究

分担研究者 新谷三春 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨：*Haemophilus influenzae* type b (Hib) による侵襲性感染症を予防する Hib 莢膜多糖 (PRP) -キャリア蛋白コンジュゲートワクチン (Hib ワクチン) の規格試験を一部実施して検討し、公的基準 (EP) の規定の問題点等を考察した。現在 Hib ワクチンや試験用抗体の国際標準品がなく、それらの標準化や抗 PRP 抗体価測定法の標準化が検討課題であると考えられた。Hib ワクチンの routine lot release 基準としての有効性試験は物理化学的測定法による重量表現となっているがそれで十分か検討が必要であろう。また、Hib ワクチンを百日せき (無細胞) ジフテリア破傷風混合ワクチン (DTaP) や DTaP-不活化ポリオ混合ワクチンとの混合ワクチンとして接種すると、別々に接種する場合に比べて PRP に対する抗体産生が低いことが指摘され、国によっていろいろな対応策が取られていることがわかった。Hib ワクチンは DTaP と共通する抗原成分を含むため相互作用も考慮した接種方法、接種スケジュールの検討が必要である。

A. 研究目的

Haemophilus influenzae type b (Hib) は、5 歳未満小児の髄膜炎をはじめとする重篤な侵襲性感染症の主要な起因菌である。欧米では Hib による侵襲性感染症の罹患率が 5 歳未満人口 10 万人あたり数十人で、死亡・後遺症も多かったためまず Hib ポリサッカライドワクチンが開発され、90 年代に Hib コンジュゲートワクチンが乳児を対象に承認され普及し始めてからは罹患が激減しつつある。このワクチンの本質は Hib の莢膜多糖 polyribosylribitol phosphate、PRP であるが、PRP が細胞非依存抗原であるので B 細胞系の未成熟な乳幼児に対しても免疫原性を持たせるために PRP にキャリア蛋白を共有結合させている。接種スケジュールが百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン (三種混合ワクチン、DTP、百日せきワクチンが無細胞の場合は DTaP、百日せきワクチンが全菌体である製剤を区別して示す場合は DTwP) と重なるためあって、国外では混合ワ

クチン (DTaP/Hib, DTaP/IPV/Hib, DTaP/IPV/HBV/Hib など)として使用されることがあり、単味ワクチンの場合でも異なる部位に他のワクチンと同時に接種することが多い。

我が国の場合も IPV と DTaP の混合ワクチンを製造したのち Hib ワクチンや B 型肝炎ワクチンを加えることが検討されるであろう。現在国内には混合すべき認可 Hib ワクチンは存在しないので国外製品を用いて品質管理に関する研究を行う。

B. 研究方法

15 年度は Hib ワクチン(単味)について情報収集するとともに基礎的な実験を行った。

ワクチン：国外 1 社 (A 社) より入手した Hib ワクチン (PRP-T, PRP に破傷風トキソイド T を炭素数 6 個のスペーサーを介して共有結合させたタイプ) 1 ロットを用いた。

ワクチン中の多糖含量試験：ワクチン製造者の

方法に従った。

ワクチン中の PRP 同定試験：ワクチン製造者の方法に従った。

ワクチン中の破傷風トキソイド同定試験：ワクチン製造者の方法に従った。

PRP の分離精製：Hib 臨床分離株（患者血液由来）の培養上清からセタブロン沈澱、エタノール沈澱、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより順次精製した。

PRP 標品のチラミン化：pH10.2-10.5 で PRP と CNBr を反応させたのちチラミンを加え、pH8.6 として反応後 PBS (-) に対して透析した。

ELISA：チラミン化 PRP を ELISA plate H type（住友ベークライト）に固相化した。二次抗体は AP 標識抗マウス IgG (Promega) を用いた。

免疫原性試験：マウス (ICR、雄、4 週) にワクチンを 1/5 SHD ずつ 2 週または 3 週間隔で 4 回、皮下 (5 匹) または筋肉内 (5 匹) に接種した。各 2 週間後に尾静脈より部分採血し ELISA により血中抗体価を測定した。

（倫理面への配慮）「国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会規程」、「国立感染症研究所における動物実験の基本原則」など諸規程を遵守した。

C. 研究結果

1. Hib ワクチンの規格試験法の検討

ワクチン中の多糖含量は公定書 (EP) に定める規格値をクリアしていた。

ワクチン中の PRP 同定試験：市販抗体 (試薬) を用いたところこれまでのところ十分なものはなかった。

ワクチン中の破傷風トキソイド同定試験：抗体として市販治療用製剤を用いたところ所期の結果が得られた。

2. ELISA 法の検討

PRP は親水性が強いいため ELISA プレート素材

のポリスチレンに吸着し難い。PRP をチラミン化して疎水性を強めてから固相化する方法と、アミノ基を結合させた市販プレートに PRP を結合させる方法を比較した。前者の方が抗体との反応において感度・特異性共に良くバックグラウンドが低かった。

3. 自家製チラミン化 PRP を用いた ELISA 法による Hib ワクチンの免疫原性の検討

非近交系マウス (クローズドコロニー) を用いているので個体差はあるが 3 回免疫後に血中抗体価の上昇が現れた (図 1)。

D. 考察

1. Hib ワクチン単独の問題点

Hib ワクチンの力価をどのように規定すべきかという問題がある。EP (及び A 社規格) では Hib ワクチンの量は PRP の重量で規定されている。防御抗原の本質は PRP であってそれが一定量以上含まれかつキャリア蛋白と結合していない PRP の量が全 PRP 量に対して一定割合未満であることを以って有効性の証拠とするという考え方である。つまり物質として物理化学的に定量することとし、活性を測る生物学的定量法は使わない。免疫原性の保持のためには立体構造の保持も必要であるが現行公定法の物理化学的測定法ではそれは検出できない。物理化学的測定法がワクチンの免疫原性について直接的情報を与えないということは WHO/NIBSC Informal Workshop(1998)においても指摘はされている。

旧 EP(1999)には Hib ワクチンの lot release の要件として、ワクチンが T 細胞依存性免疫反応を誘導できることを証明するためにマウスを用いる免疫原性試験が "ASSAY" として規定されていた。現行 EP(2002)ではそれが削除され lot release に必要なのは有効性に関しては物理化学的測定法のみとなった。マウスやモルモットにおける Hib ワクチンの免疫原性はヒト乳幼児にお

ける Hib ワクチンのそれと相関しないとされたこと、これまでに動物試験のデータの蓄積ができたこと、動物の権利尊重思想が背景にあると思われる。Routine lot release に使える適切な生物学的定量法が現在ないために物理化学的測定法で代替していると考えられ、これで十分と言えるかは検討の必要があろう。

2. Hib ワクチンの規格試験法に関するその他の問題点

ワクチン、抗体ともに現在、国際標準品がないためラボラトリー間のデータ比較が難しい。

抗 PRP 抗体価測定法も現在標準法というべきものはなく、ワクチン開発過程で利用された Furr 法 (RIA) がワクチン製造者により現在も使われている。ELISA 法の報告もあるが方法はまちまちである。

3. Hib ワクチンを DTaP あるいは DTaP/IPV との混合ワクチンとする場合あるいは同時接種する場合に生じる問題点

Hib ワクチンを DTaP との混合ワクチンとして接種すると別々に接種した場合に比べて抗 PRP 抗体価が有意に低い (1/3 という報告もある)。また DTwP/Hib との比較でも DTaP/Hib の Hib 免疫原性は低いという。これは液状の混合ワクチンとして供給される場合でも、Hib ワクチンが乾燥製剤であって液状の DTaP とともに供給され接種直前に DTaP で溶解する場合でも同様であったという。同様の現象は DTaP/IPV/Hib でも見られる。原因は確定されていない。

2003 年イギリスにおいて (Lancet, 361, 1521)1999 年に始まり 2002 年に続く侵襲性 Hib 感染症罹患率上昇と、2000-2001 年に DTwP/Hib が不足したために一部で DTaP/Hib を使用したこととの関連が議論された。時期がずれることなどから DTaP/Hib の Hib 低免疫原性だけでは説

明できず次のような他の要因なども複合したと思われる。i) Hib 感染症発生率のランダムな変動 ii) 集団免疫の低下 iii) イギリスでは Hib ワクチンの接種スケジュールが primary (生後 2, 3, 4 月) だけでブースターがないこと。

イギリスでは当面の対策として Hib ワクチン導入時に実施して有効であった catch-up campaign を 2003 年に再び実施した。米国では DTaP、IPV と Hib ワクチンは同時接種し、DTaP/Hib はブースター用 (第 4 回接種用) としてのみ認可されている。ドイツでは Hib について低免疫原性であってもなお有効の範囲内であるとして DTaP/IPV/HBV/Hib の使用が大部分であるという。

DTaP/Hib の Hib 低免疫原性の原因は DTaP 中の水酸化アルミニウムと PRP の相互作用により PRP の立体構造が歪んだためであるという意見 (Goldblatt, personal communication) があるがその可能性があるのか検討する必要がある。

同時接種する場合はこのようなワクチン同士の直接的相互作用は避けられるが、Hib ワクチンと混合ワクチン中の他の成分ワクチンとの間で抗原が共通するために生じ得る問題は残る。PRP-T の場合、キャリア蛋白の破傷風トキソイドと、DTaP 中の T が共通であるため被接種者によっては破傷風トキソイド抗原量が過剰になる可能性がある。

E. 結論

Hib ワクチンの力価試験として物理化学的測定法のみでよいか検討の必要がある。また、標準品の制定や抗体価測定法の標準化が望まれる。Hib ワクチンと DTaP、DTaP/IPV との関係については接種スケジュールや共通抗原の問題も考慮し混合ワクチン化だけでなく同時接種も含めて検討する必要がある。

F. 健康危険情報

2. 学会発表

G. 研究発表

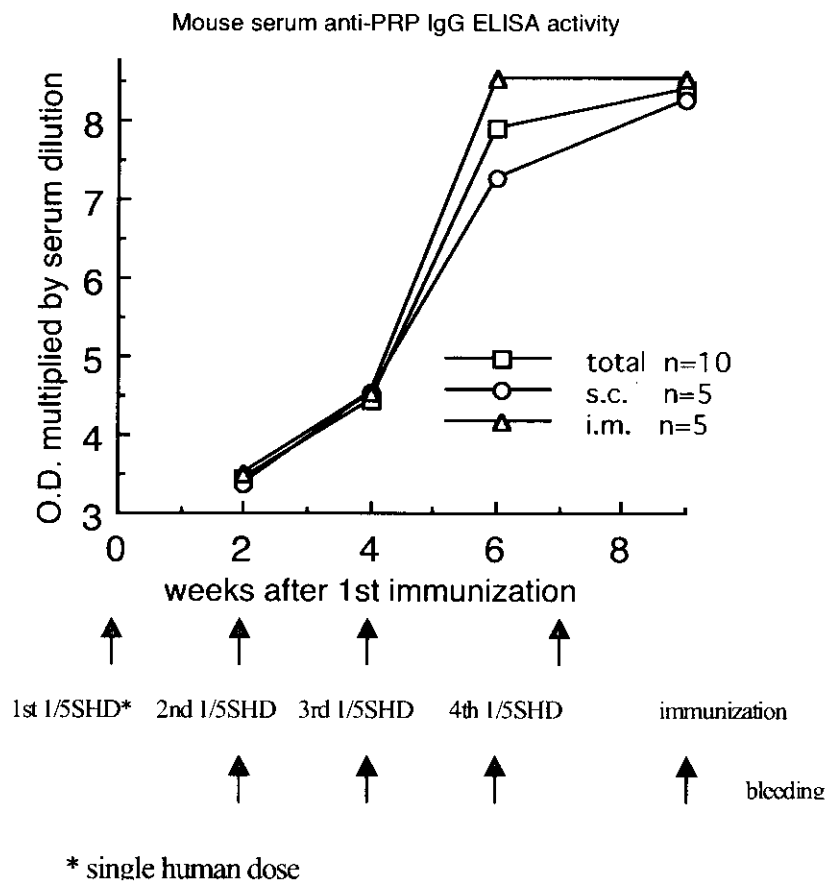
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 論文発表

(予定を含む。)

図1. Hib ワクチンのマウスに対する免疫原性

— Hib ワクチン単独接種の場合—



厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

分担研究報告書

「混合ワクチンの品質確保に関する研究」

－ジフテリア、破傷風トキソイドおよび混合ワクチンの検討－

分担研究者 高橋元秀 国立感染症研究所細菌第二部第三室長

研究協力者 岩城正昭、福田 靖、小宮貴子 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室

研究要旨：不活化ポリオワクチン、ヘモフィルスインフルエンザ b 型菌ワクチンおよびその混合ワクチンの国内導入・実用化に向けた基準案作成のための国内外の情報を整備し、今後検討が必要な科学的事象を整理した。

A. 研究目的

国内で開発中または海外既存製剤の導入が検討されている混合ワクチンが数種ある。最終的製剤の剤型としては、現行の沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン（DTaP）への混合型として、製造市販されているワクチンが海外では多い。不活化ポリオワクチン（IPV）、ヘモフィルスインフルエンザ b 型菌（Hib）ワクチンについては、国産品、海外製品の導入、あるいは双方の並列使用の可能性が考えられる。そこで、これらの可能性に沿って安全性、有効性およびその品質管理試験法に関する問題点を検討し、安全で有効な DTaP-IPV または DTaP-Hib 導入のための施策立案に資する。

B. 研究方法

本年度は、現行のジフテリア、破傷風トキソイド関係の生物学的製剤基準の中で、純度、力価試験等について、国内基準と海外、特に国際的基準である WHO 基準を比較検討する。これにより、海外

で製造されている製品の製造、品質管理手法を分析する。また、実際に海外で使用されている混合ワクチンの中で、入手が可能な製剤について、ジフテリア、破傷風トキソイドの力価試験を実施し、国内基準での評価を検討する。研究班の期間中（3ヶ年）に、少なくとも現在海外で使用されている DPT 関連の混合ワクチンを複数ロット輸入して、安全性および有効性について国内製品との比較試験を行い、基準作成のための科学的根拠、理論的評価体系を整える。

（倫理面への配慮）

現時点ではヒト由来材料の使用やヒトを対象にした実験を予定しておらず、この項目に該当する事項はない。

また、実験動物の取り扱いに際しては、国立感染症研究所の規定に従い、年度ごとに実験計画書を提出・申請し、実験動物委員会の審査を経て実験を行っている。実験に際しても動物愛護の精神を考慮し、使用動物数、安楽死処理等については適正に実施している。

C. 研究結果

WHO 基準と国内基準の違い: 現行の WHO 基準と国内基準の違いを Table. 1 に示した。大きな違いは、WHO 基準では、DTaP 製剤の力価試験をマウス法で実施した場合、ジフテリアトキソイドは 30 国際単位 (IU) / Single Human Dose (SHD)、破傷風トキソイドは 60 IU/SHD である。日本国内基準では、DTaP 1ml 中のジフテリアトキソイドの力価はマウス法で試験したときに 1ml の力価は 47IU 以上であり、WHO の SHD 表現にすると 23.5IU 以上となる。また、破傷風トキソイドは 27IU 以上であり、WHO の SHD 表現にすると 13.5IU 以上と比べると約 3 倍の違いがある。

また、DTaP 製剤中のアルミニウム含有量については、国内基準が 1ml 当たりの上限が 0.3mg であるのにたして、WHO 基準では SHD 当たり 1.25 mg であり 1ml 換算では 2.5mg となる。現実には本年海外から入手したワクチンの外観検査では、国内 DTaP のアルミニウム濃度は低いためにワクチン液は透明に近いが、海外のものはゲルの濃度が濃いことが明確に判定できた。

国内 IPV の開発の現状: 現在国内で使用が考えられている IPV は、DPT との混合製剤として、ポリオ研究所で製造された IPV 原液が各 DTaP 製造所に搬送され DTaP とブレンドして液状品として小分け分注する製造の流れが予想される。予想される製造システムに適合する生物学的製剤基準案のたたき台作成として、各々の力価試験、安全性試験を実施する方針である。従って、DTaP の基準案は、各社がすでに取得した製造認可承認の製法に

従った現行基準で問題はないか、各社と詳細を検討することも必要である。IPV の基準案は、ポリオ研で製造した原液を輸送するため、輸送前の有効性、安全性を確認するために、中間段階の試験を組み込む必要がある。

海外の混合ワクチンの製造販売の現状: 海外で市販されている DPT-IPV の情報を収集した結果、IPV 単独ワクチン又は DTaP と混合した複数の剤型のワクチンが市販されており、今後、これらのワクチン入手する予定である。海外から入手したそれぞれの DTaP 混合ワクチンについては、現行国内の DTaP 基準に合わせた品質試験を実施する。

D. 考察

製剤基準と予防接種計画について: WHO 基準で求めるトキソイドの力価を国内基準と比較すると、ジフテリア、破傷風トキソイドともに高い力価が設定されている。国内ではこの基準で製造された製剤を約 30 年以上使用して、

- (1) 両疾病ともに制御されていること、
- (2) 血清疫学調査で両者の抗毒素抗体価を測定した結果、基礎免疫(DPT4 回)および追加免疫(11歳でDT 1回)後、ワクチン接種後 10-15 年間はほぼ 0.1 単位以上の抗体が保有していることが確認されている。

従って、現在の WHO 基準の下に製造されているような海外ワクチンの導入は必要なく、必要以上の高力価の製剤は、接種後の副反応の増加が危惧されるために、現行の一定な品質であるワクチンによる乳児および学童への予防接種計画の変更も不必要と考える。日本の予防接種計画

に照らし合わせてトキソイド力価を適正に規定している現行の力価基準を国際調和のもとにモルモットに接種した後の血中抗毒素価を2単位以上とするような変更については慎重な検討を要する。

WHO の提唱している新しい品質管理法の導入について：近年 WHO により、ジフテリア、破傷風トキソイドの力価試験について、国際標準トキソイドによる評価ではなく、トキソイドを実験動物（モルモット）に接種して誘導された抗毒素価を測定する方法によることが提唱されている。

WHO から配布される Standard tetanus toxoid(Adsorbed)を標準品として、製剤の consistency 確認試験のために直線用量反応の適当な一用量をモルモットまたはマウスに接種して、採血した血清中の抗体価を国際標準破傷風抗毒素に対する相対価として ELISA、KPA 法等で測定したときに2単位以上の成績が得られるかは不明である。同一ワクチンを異なる研究所で現行日本基準と WHO 基準で試験した成績を Table.2 に示した。従って、国家試験（Lot Release）における力価試験法の一用量の試験法には同意できるが、提案されている方法で製剤が破傷風トキソイドで2単位、ジフテリアトキソイドで4単位を上回るかは、国内で製造されている製剤については、試験・検討が必要である。

WHO の標準品または試験品を、1 SHD の一部を希釈しないでモルモットまたはマウスに接種する場合、full dose の用量反応曲線を得る試験が求められる。この場合、希釈しないで接種可能な液量の調整には限界があり、用量直線反応が得ら

れるかは検討が求められる。

また、各国の乳幼児に対する予防接種計画は一樣ではなく（接種時期、回数および剤型）、さらに国情により成人へのワクチン接種の実情は異なる（軍隊では破傷風トキソイドがおおむね接種される）。

EPI の基軸ワクチンである DPT の力価試験方法の国際調和は重要であるが、国際的に多くの国で製造・使用されている DPT ワクチンの品質保証の本質は、接種される DPT 中の成分、互換性等により、効果と安全性が影響されることを念頭に、国によっては項目によって国際調和が（ICH）が不要なことも考慮すべきである。

ワクチン混合化上の問題：今後混合ワクチンとして Hib ワクチンのキャリア-Ttd や IPV が追加された場合、新たに局所反応の原因になる可能性が考えられる。図 1 に混合ワクチンの導入に必要な行政施策のフローを示した。ワクチンの開発、製造認可承認、品質管理および市販後の疫学的な調査は一体となっており、特に品質管理においては科学的な検証が求められる。実際に、過去に入手した DTaP-Hib ワクチン中の破傷風トキソイドの力価は、国内の DTaP ワクチンの破傷風トキソイドの力価の約 10 倍も高いことが確認されている。Hib ワクチンのキャリア-蛋白として CRM197 といったジフテリア変異毒素や Ttd が用いられている場合、DTaP のトキソイド成分に対して過剰免疫の可能性も考慮する必要がある、その場合の安全性規格の検討が必要である。

E. 結論

IPV、Hib ワクチンを含む DTaP 混合ワ

クチン実用化に向けた基準作製のための必要な検討課題を整理した。また、過去に入手したDTaP-Hib ワクチンについて、日本国内の力価試験を実施した結果、破傷風トキソイドの力価が国内のDTaPと比較して、約10倍高い力価であった。ワクチンは力価が高いことが品質を保証するものでなく、疾病が征圧できる最低量の抗原量、免疫誘導することが副反応等の軽減にも結びつく。国内の予防接種計画（接種経路、ワクチン品質）に適合した規格、品質のワクチン使用・接種が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(ア) 論文発表

(イ) 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

Table 1. Differences between Japan and WHO requirement for Diphtheria and tetanus toxoid

		Japan	WHO
Potency	Diphtheria.	>47 IU/ml	>30IU/0.5ml
	Tetanus	>27 IU/ml	>40IU/0.5ml
Purity	Diphtheria.	>1,500Lf/mgPN	>1,500Lf/mgPN
	Tetanus	(>1,500Lf/mgPN)	>1,000Lf/mgPN
Aluminium (mg/ml)	DTaP	<0.3 mg	<2.5 mg
	Diphtheria.	<1.0 mg	<2.5 mg
	Tetanus	<0.5 mg	<2.5 mg
Specific safety test	G.P test	>400 Lf/dose	>500Lf/dose
	Kept at 37°C	20 days	6 weeks

Table 2. Determination of each potency with deferent Lab.s

Lot	Diphtheria Txd			Tetanus Txd			Pertussis Txd		
	A ^{*1}	B ^{**}	C ^{**3}	A	B	C	A	B	C
KFDA	2<IU<4 (GP) ^{**4}	2<IU<4 (GP)	2<IU<4 (GP)	4< (Mice)	4< (Mice)	4< (Mice)	8.85	8.21	16.23
NIID, Jan	74.6	24.2	53.8	277	86	185			
(WHO, Std)	116			195.6 (96.2)	30 (30)	64.4 (64.4)	25.7		
Kaketsu	145			280.7			37.9		

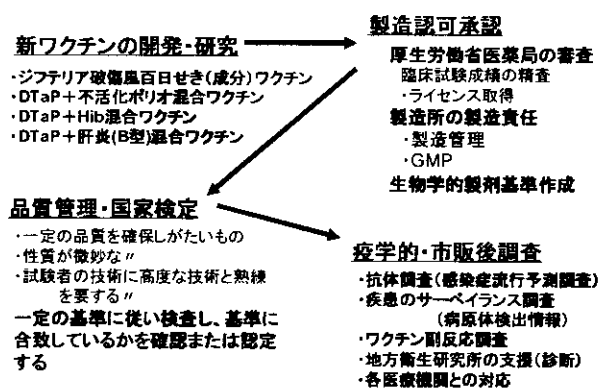
*1: Donshinn (Kaketsu-Lot 23A)

**3: Korea ? (Lot DPT0205-2)

**2: Green Cross (Lot 1420055)

**4: US method (old WHO)

図1. 混合ワクチンの導入に必要な行政施策



厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

「混合ワクチンの品質確保に関する研究」
－百日せきワクチンおよび混合ワクチンの検討－

分担研究者 堀内善信 国立感染症研究所細菌第二部第五室長

研究要旨：不活化ポリオワクチンおよびその混合ワクチン実用化に向けた基準整備に必要な科学的検討事項を整理した。製造所は自社製品のロット間均一性を確認する必要があり、更に国は同種製剤の互換使用時の安全性、有効性を保証する必要がある。その為の基準を策定するため、局所反応原性、混入エンドトキシンに対する安全性、キャリアー蛋白に付随する過剰免疫原性等についての検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

不活化ポリオワクチン(IPV)については、国産品、海外製品の導入、あるいは双方の並列使用の可能性が考えられる。また三種混合ワクチン(DTaP)あるいは更にヘモフィルスインフルエンザ b 型菌(Hib)ワクチンとの混合ワクチンとして使用される可能性も考えられる。そこで、これらの可能性に沿って安全性、有効性およびその管理試験法に関する問題点を検討し、安全で有効な IPV 導入のための施策立案に資する。

B. 研究方法

海外、特に米国での当該ワクチン接種に関する安全性情報による評価と問題の予測を行う。また海外のワクチンを入手して国内製品との比較試験を行い、日本のワクチンと比較する。併せて我が国の予防接種で利用した場合の問題点について、特に製造株の違いと混合使用の場合の安全性、有効性を評価する。初年度は混合ワクチンの調製あるいは海外からの入手を行うと同時に、問題点の理論的評価、検討を行う。

（倫理面への配慮）倫理規定に沿った。

C. 研究結果

米国ワクチン副反応報告：2003年に米国で、DTaP-IPV 混合ワクチンに関連して副反応として 352 件の届け出があった。そのうち入院が 10 件(2.8%)、後遺症が残ったのは 2 件(0.6%)、死亡 1 件であった。また DTaP に関する同報告数は、それぞれ届け出数 605 件、入院 11 件(1.8%)、後遺症例 2 件(1.8%)、死亡 0 であった。DTaP と DTaP-IPV の間に安全性に関する著しい差異はないように思われるが、入院等については時間的にワクチンとの関連性が疑われ、DTaP と DTaP-IPV の違いに関する注意深い評価が必要と思われる。

混合ワクチンの免疫原性：Hib と DTaP の免疫干渉については報告があるが、今のところ DTaP と IPV の免疫干渉等の報告は見られない。しかし一応実験的評価は必要と思われる。

混合ワクチンの安全性：かつてジフテリア破傷風トキソイド(DT-td) 追加接種時に強い局所腫脹が問題となった。マウス足蹠腫脹モデルによる検討により、DTaP は、残存百日咳毒素(PT)活性に相関してジフテリアトキ

ソイドに対する強い局所反応感作能を有することが判明した。PT は共存する抗原に対するアジュバント作用を示すことがわかっており、D-td に対する感作がみられたのは、T-td に比べて抗原量が多いことによる可能性が考えられる。今後混合ワクチンとして Hib ワクチンのキャリアーT-td や IPV が追加された場合、新たに局所反応の原因になる可能性が考えられる。マウスモデルでの解析の結果、我が国のワクチンでは、この問題は 1991 年の残存 PT 活性に関する規制の強化によりすでに解決していることが示唆された。しかし海外の DTaP ワクチンは、単回接種でマウス足蹠に強い腫脹を惹起する。さらにウサギ背部皮内にも同様の強い炎症および硬結を引き起こし、我が国の DTaP ワクチンとは明らかに異なる局所反応原性を有している。そこでこれら海外ワクチンの追加接種時の局所反応に対する感作能を評価、確認する必要がある。また IPV や Hib との混合の影響についても国産ワクチンとの比較により評価する必要があり、これらの副反応原性に関する簡便な評価試験法を確立する必要がある。さらに欧米の基準では Hib ワクチンには相当濃度のエンドトキシン混入が許容されている。これまでの結果で、少なくとも海外 1 社の Hib ワクチンではエンドトキシン混入量に関するロット間均一性はなく、臨床での発熱性評価が不可能であることが解っている。インフルエンザワクチン等では、投与時にサイトカイン産生を誘導する可能性が考えられる。またある種のサイトカインはエンドトキシンの *in vivo* 活性を増強する。今後 IPV としてウィルス抗原を含む混合ワクチンの安全性基準を考える場合、こうしたエンドトキシンの *in vivo* 活性増強を評価しておくことが必要である。さらに Hib のキャリアー蛋白として CRM197 といったジフテリア

変異毒素や T-td が用いられている場合、DTaP のトキシソイド成分に対して過剰免疫の可能性も考慮する必要があり、その場合の安全性規格の検討が必要である。

D. 考察

一般にワクチンは、他の医薬品同様、臨床試験による安全性有効性評価を基に製造承認される。その後各製造所は、製造ロットが臨床試験ロットと均質であることを保証する必要があり、そのことが製造承認の前提となる。しかし国内に数種の同種製剤がある場合、その互換使用時の予防接種自体の安全性、有効性が問題となるが、これは基準や国家検定等で国の責任で保証する必要がある。IPV 実用化のための基準整備に必要な基礎研究を行うに当たり、国内各社の DTaP の性状差の IPV の有効性、安全性への影響と並んで、海外の同種製剤の比較、検討により問題点を明らかにし、基準化に必要な科学的知見を得ることが重要である。

E. 結論

IPV を含む混合ワクチン実用化に向けた基準作製のための必要な検討課題を整理した。早急に研究に必要な材料を入手して、我が国の予防接種の安全性、有効性確保のために必要な科学研究を進める必要がある。

健康危険情報

E. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)