

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」

分担研究報告書

sIPV および sIPV・DPT 混合ワクチンの力価試験の検討

分担研究者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室長

研究協力者 李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究官

研究要旨：弱毒ポリオウイルスセービン株を用いた不活化ポリオワクチン（sIPV）、ならびにこれと現在製造市販されている沈降精製ジフテリア百日咳破傷風混合ワクチン（DPT）を混合した sIPV・DPT 混合ワクチンの力価を評価するにあたり、国内参照品を整備しなければならない。これらを作製するに当たっての問題点を整理した。

A. 研究目的

わが国で独自に開発された弱毒ポリオウイルスセービン株を用いた不活化ポリオワクチン（sIPV）、ならびにこれと現在製造市販されている沈降精製ジフテリア百日咳破傷風混合ワクチン（DPT）を混合した sIPV・DPT 4 価ワクチンの開発が焦眉の急である。本研究ではこれらのワクチンの安全性と有効性を評価する上で sIPV 側の問題点を整理し、安全で有効な sIPV および sIPV・DPT 混合ワクチン導入における施策に資する。本年度は有効性を判定する力価試験について検討した。

B. 研究方法

わが国における力価試験法は 2001 年に報告されている不活化ポリオワクチンの生物学的基準案の中で示されている。これは、その後 2002 年の WHO TRS910 に基づいて修正が検討されている。本年度は基準案に基づいてこれまで行なわれた力価試験の成績について考察した。

（倫理面への配慮）

本研究でこの項目に該当する事項はない。

C. 研究結果ならびに考察

動物を用いる力価試験

WHO 参照品 WHO の参照品は強毒ポリオウイルス株を不活化したものである。基準案では対数等間隔に階段希釈したワクチンをラットに一回接種し、3 週間後の血清中の中和抗体価を測定する。試験成績を統計学的に処理して比較するとき、検体の力価は参照品と同等かそれ以上でなければならないとされている。したがってまずは WHO の参照品と同等の力価を有する国内参照品を調製する必要がある。この調製には当然 WHO 参照品との比較実験を必要だけ繰り返し行なう必要がある。しかしながら、現行のルールでは十分量の WHO 参照品を入手することが困難である。また、相対力価を求めるために参照品である強毒株不活化ワクチン（vIPV）と試験ワクチンである sIPV が相互に比較可能な性

状を有しているかどうか十分な検討も必要である。悪いことに現在入手可能な WHO 参照品 (NIBSC Code 91/574) は 3 型が完全に免疫原性を失っている。従って 3 型は比較する基準がないといってよい。WHO には早急に改善してもらいたい事態であるが、いずれにせよ国内 sIPV 参照品の整備しなければ何事も始まらない。

混合ワクチン参照品の組成 sIPV を DPT と混合した場合、sIPV 単独の場合に比べ相対力価で 3-4 倍高い値が得られることが多くの実験から明らかになっている。DPT に含まれるアジュバントの効果である。単味の sIPV を参照品として混合ワクチンの評価に用いることは可能であるが、この場合もまた相互に比較可能な性状を有しているかどうか問題となる。できれば混合ワクチンとして参照品が調製できればよい。しかしながら、DPT は各製造所毎に組成が異なること、いずれもアジュバントを含んでいることなど sIPV の免疫原性に影響を及ぼすファクターが数多く含まれる。影響の程度も異なることが予想される。どのような組成を有する参照品を調製すべきであろうか。sIPV 単独で用いられる免疫期間が混合ワクチンの力価を評価するうえで適切であろうか。接種から採血までの免疫期間の検討も必要かもしれない。

動物 現在接種にはラットが用いられているが、中和抗体産性能は雄に比べ明らかに雌のほうが有意に高い。参照品との比較であれば格段問題はないのかもしてないが、メスだけの場合、オスだけの場合、オスメス半々にした場合などひとおりのデータは必要である。それにしてもラットは力価試験に使いやすい動物とはいえない。これまでのマウスを用いた実験では確かに血中に中和抗体を誘導する

ことに成功していない。しかしながら、現在は遺伝学的背景が異なるマウスが多数使える時代である。いろいろな系統を試してみる価値は十分にある。

試験管内試験による力価試験

定量に及ぼすアジュバントの影響 抗原の物理学的定量、すなわち D 抗原量の測定はセービン株各型に特異的な単クローン抗体を用いた抗原 ELISA で測定される。製造方法によっても異なるであろうが、混合ワクチンでは sIPV のエピトープがアジュバントにマスクされ D 抗原量が正確に測定できないことが予想される。動物実験による生物学的定量に基づいた値と比較したとき、どの程度の許容範囲が設定できるのかを確認する必要がある。

最後に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 B 型肝炎ワクチンが追加された場合、新たに局所反応の原因になる可能性が考えられる。

D. 結論

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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

国産 IPV の調製及びラット免疫原性試験

分担研究者 清水文七 財団法人日本ポリオ研究所理事長

研究要旨

DPT/IPV（ジフテリア、百日咳、破傷風及び不活化ポリオ混合ワクチン）中の IPV の有効性に関する品質確保を図るため、国産 IPV での国内参照品の作製を主たる研究目的とした。そのための計画として①国産 IPV での濃厚 IPV を調製する、②国産 IPV のラットでの免疫原性を確認する、③WHO 参照品と国産 IPV の免疫原性比較試験の実施、④外国製 IPV と国産 IPV の免疫原性比較試験の実施、⑤国産 IPV での国内参照品の抗原量の決定、⑥国産 IPV 参照品候補の作製、等を行う。副次的目標として IPV の免疫原性に関する品質管理試験法としてラットを用いる 1 回免疫法の確立を検討する。

本年度は上記①及び②を実施した。その結果、国産の濃厚 IPV は次年度以降の# 以下の計画が支障なく実施可能と予測される。

A. 研究目的

DPT/IPV（ジフテリア、百日咳、破傷風及び不活化ポリオ混合ワクチン）の開発及びその安全性と有効性の品質確保を図るためには IPV の国内参照品が必要である。WHO には IPV の参照品が存在している。それは強毒ポリオウイルス株で作られている不活化ポリオワクチン（vIPV）である。

現在開発中の DPT/IPV はポリオウイルス弱毒株で製造されている IPV（sIPV）である。sIPV の国内参照品を決定する上で最も重要な点は免疫原性であり、それが vIPV と匹敵するものでなければならない。そのような sIPV を調製することを目的として、研究初年度としては sIPV の濃厚試作ワクチンを作製し、ラットに対する免疫原性を確認することとした。なお、この濃厚試作ワクチンは今後 WHO の参照品との比較や外国製 vIPV との比較などの試験を行い、

国内参照品作製のための基礎 data を得ることを目的とするものである。

ラットを用いる免疫法には 1 回免疫法と 2 回免疫法があるが、WHO 法にならって 1 回免疫法の確立を目的とする。

B. 研究方法

①ポリオウイルス増殖用細胞には米国 ATCC（American Type Culture Collection）より入手した Vero 細胞を使用した。

②Vero 細胞で増殖した弱毒ポリオウイルス 1 型、2 型、3 型（それぞれの Sabin 株）をそれぞれ濃縮精製しホルマリンを加え不活化した。

③各型の不活化ウイルス液（単価バルク）をこれまでの基礎実験から得られた推定ワクチン濃度より約 2 倍濃厚と考えられる濃度での 3 価混合不活化ポリオワクチン（濃厚 sIPV）を 2 ロット調製した。

④濃厚 sIPV のラットでのポリオウイルスに対する免疫原性を 1 回免疫後及び 2 回免疫後で検討した。

C. 研究成果

①国産 IPV (sIPV) 調製

2 ロットの sIPV をほぼ同じ抗原濃度で作製した。その性状を表 1 と表 2 に示す。

②国産 IPV (sIPV) のラット免疫原性試験

免疫試験には 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た。

1 回目免疫の 3 週後に部分採血し 2 回目免疫を行い、その 2 週後に 2 回目の採血を行った。その結果を表 3 と表 4 に示す。

D. 考察

これまで世界で類のない弱毒ポリオウイルス株で調製された sIPV の免疫原性は sIPV 開発において最も重要なポイントであり、強毒ポリオウイルス株で調製されている vIPV との免疫原性についての相関関係を明らかにすることは必須な項目である。sIPV と vIPV での各型によつての免疫原性に明らかな差があることは既に報告されている (文献 1)。sIPV は vIPV に比べ 1 型では高く、2 型では低く、3 型はほぼ同等であるとの報告である。欧米では全ての IPV は vIPV であり、WHO の参照品も vIPV である。そして、WHO Recommendation (文献 2) での免疫原性試験法はラットでの 1 回免疫法である。

本研究ではラットでの 1 回免疫法による試験で WHO 参照品との比較可能と考えられる濃度の sIPV を調製し、WHO 参照品との比較試験の前に単独でその免疫原性を試験した。免疫原性試験に用いる抗原量は ELISA にて測定する D 抗原量を基準とした。過去

の経験から、濃厚 sIPV は実際の濃度の約 2 倍と設定した。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 型は推定どおりで 3 型は推定より若干低い免疫原性を示した。これらの結果から、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出来、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。

文献 1 : Gideon Kersten, Ton Hazendonk, Coen Beuvery., Antigenic and immunogenic properties of inactivated polio vaccine made from Sabin strains., Vaccine, 17, 2059-2066, 1999.

文献 2 : World Health Organization, Annex 2 Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated), WHO Tech. Rep. Ser. 910, 32-65, 2002

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。

F. 健康危害情報

なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。

表 1.

sIPV (TIPV-17) の組成と性状

	1 型	2 型	3 型
各型単価バルクコード	IP-1001	IP-2002	IP-3002
各型単価バルク量	2.4 mL	12.0 mL	18.5 mL
試験と結果(単価バルク)			
たん白量	105.5 $\mu\text{g/mL}$	89.0 $\mu\text{g/mL}$	18.1 $\mu\text{g/mL}$
Vero 細胞由来 DNA 量	<40 pg/mL	<40 pg/mL	<40 pg/mL
ウシ血清アルブミン量	<3 ng/mL	<1 ng/mL	<3 ng/mL
エンドトキシン量	0.09-0.18 EU/mL	0.18-0.37 EU/mL	0.24-0.48 EU/mL
ホルムアルデヒド量	83.8 $\mu\text{g/mL}$	97.6 $\mu\text{g/mL}$	90.3 $\mu\text{g/mL}$
D 抗原量	3,239 Du/mL	5,171 Du/mL	3,346 Du/mL
pH	7.21	7.18	7.17
試験と結果(TIPV-17)			
調製量		200 mL	
D 抗原量	16.4 Du/0.5mL	153 Du/0.5mL	151 Du/0.5mL
pH		7.20	

表 2.

sIPV (TIPV-18) の組成と性状

	1 型	2 型	3 型
各型単価バルクコード	IP-1002	IP-2003	IP-3003
各型単価バルク量	2.0 mL	9.6 mL	9.5 mL
試験と結果(単価バルク)			
たん白量	119.4 $\mu\text{g/mL}$	115.4 $\mu\text{g/mL}$	64.9 $\mu\text{g/mL}$
Vero 細胞由来 DNA 量	<40 pg/mL	<40 pg/mL	<40 pg/mL
ウシ血清アルブミン量	<1 ng/mL	<1 ng/mL	<3 ng/mL
エンドトキシン量	≤ 0.03 EU/mL	0.38 EU/mL	≤ 0.053 EU/mL
ホルムアルデヒド量	90.4 $\mu\text{g/mL}$	89.8 $\mu\text{g/mL}$	93.1 $\mu\text{g/mL}$
D 抗原量	3,533 Du/mL	6,305 Du/mL	6,907 Du/mL
pH	7.23	7.19	7.19
試験と結果(TIPV-18)			
調製量		200 mL	
D 抗原量	17.0 Du/0.5mL	160 Du/0.5mL	162 Du/0.5mL
pH		7.25	

表3.

sIPV (TIPV-17) のラット免疫原性試験

1 回免疫試験	1 型				2 型				3 型			
希釈倍数	x1	x2	x4	x8	x1	x2	x4	x8	x1	x2	x4	x8
陽性ラット数*	12	12	12	10	12	12	9	3	10	2	0	0
試験ラット数	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
2 回免疫試験	1 型				2 型				3 型			
希釈倍数	x1	x2	x4	x8	x1	x2	x4	x8	x1	x2	x4	x8
陽性ラット数*	11	12	12	12	11	12	12	12	11	12	12	7
試験ラット数	11	12	12	12	11	12	12	12	11	12	12	12

* 陽性：中和抗体価 $\geq 2^2$

表4.

sIPV (TIPV-18) のラット免疫原性試験

1 回免疫試験	1 型				2 型				3 型			
希釈倍数	x1	x2	x4	x8	x1	x2	x4	x8	x1	x2	x4	x8
陽性ラット数*	12	12	12	12	12	10	6	5	8	7	3	0
試験ラット数	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
2 回免疫試験	1 型				2 型				3 型			
希釈倍数	x1	x2	x4	x8	x1	x2	x4	x8	x1	x2	x4	x8
陽性ラット数*	12	11	12	12	12	11	11	10	12	11	10	6
試験ラット数	12	11	12	12	12	11	12	12	12	11	12	12

* 陽性：中和抗体価 $\geq 2^2$

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

研究者協力者 駒瀬 勝啓、長井 正昭 （社）北里研究所、部門長

研究要旨 （財）日本ポリオ研究所から購入した不活化ポリオワクチン（IPV）と当所の沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合（DTP）ワクチンを様々な条件で混合し、6種の試作 IPV/DTP ワクチンを作製した。これらのワクチンの IPV の力価、DTP の力価、安全性等を検討した。試作したワクチンを接種したラットから得られた血清中の抗ポリオウイルスの中和抗体価は、IPV 単味ワクチンを接種したときよりも高く、特に I 型ウイルスに対する相対力価は顕著に上昇した。また、すべてのワクチンは効果、安全性の面で DTP ワクチンに対する要件を満たしていた。一方、IPV ワクチンの力価の検定法、IPV の抗原量など今後も検討が必要な点が明らかになった。

A. 研究目的

現在、日本ではポリオの予防接種に経口弱毒生ポリオウイルスワクチン(OPV)を用いている。OPV は日本のポリオ予防に大いに貢献し、1980 年を最後に野外株ポリオウイルスによる患者は発生していない。一方、OPV の投与によるポリオ様麻痺(VAPP)の発生は約 440 万投与に一回の頻度で、また投与を受けた周囲の、免疫を持たない人での VAPP の発症も約 580 万人に一例の頻度で報告され問題となっている。また、投与した OPV が環境へ漏出し、他のウイルスと recombination をおこし、ポリオ様麻痺の新たな感染源となったケースも他の国では報告されており、ポリオの根絶がなされようとしている現在、OPV から不活化ポリオワクチン(IPV)への転換が必要となっている。IPV は接種回数が多く、注射による皮下（筋肉内）接種であるため被接種者への負担

の増加による接種率の低下が予想される。そこで欧米で使われている様な IPV と沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合（DTP）ワクチンを混合したワクチンが必要となってくる。本研究は IPV/DPT 混合ワクチンを開発するためのものである。

B. 研究方法

- 1) 材料：IPV は（財）日本ポリオ研究所（ポリオ研）より入手した。DPT ワクチンは自社の製品を用いた。
- 2) D 抗原価、力価の測定：ポリオ研が示した方法に従って検定を行った。対照として IPV ワクチンを用いた。また中和力価は Hep-2 細胞を用い細胞変性阻止効果を指標に行った。
- 3) DTP 試験：生物製剤基準に基づいて DTP ワクチンの小分製品の試験の一部を実施し、評価した。

C. 研究結果

1) 6種のIPV/DTPワクチンを試作した。それぞれのワクチンが惹起するポリオウイルスに対する相対力価は、単味IPVワクチンが惹起するものと比較して、I型、II型、III型ウイルスのすべてに対して高かったが、特にI型に対しては顕著であった。また、アルミゲルのみを添加したIPVワクチンも高い相対力価を示し、アルミゲルがIPVに対しアジュバンド活性を持つ可能性が示された。

2) 試作した6種のワクチンに含まれるDTPワクチンの力価を生物製剤基準に基づいて検討した。すべてのワクチンにおいて、D、T、Pワクチンの力価基準を満たしていた。また、異常毒性試験、マウス体重減少試験等の安全性基準を満たしていた。

D. 考察

OPVは効果、安全性の面で優れたワクチンであるが、ポリオウイルスがほぼ根絶された現代ではより安全なワクチンが必要となる。IPVの導入は必要であるが、乳幼児の過密なワクチン接種スケジュールを考えると沈降DTPワクチンとの混合が望ましい。今回の実験でポリオ研製のIPVを用いることで当所のDTPワクチンとの混合ワクチンが、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。

E. 結論

IPV/DTPワクチンを試作した。これらは、免疫原性、安全性の面で混合が可能だと思われた。今後は基準の策定等の問題を解決していく必要があるだろう。

F. 健康危険情報

北里研究所病原体等安全管理規定に従って行った。

G. 研究発表

1. 論文

なし

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 大隈 邦夫 財団法人 化学及血清療法研究所

研究要旨 DPT/IPV（沈降百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン）の開発にあたり、DPT/IPV の品質確保を図るため、DPT（沈降百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン）と IPV（不活化ポリオワクチン）を混合して DPT/IPV を調製し、DPT および IPV の品質に変化が生じないかを確認することを主たる研究目的とした。当所の DPT と日本ポリオ研究所の IPV を混合して DPT/IPV を調製し、IPV 関連の試験項目として IPV の力価試験であるラット免疫原性試験、DPT 関連の試験項目として D、P、T の各力価試験および異常毒性否定試験などを実施した。その結果、両ワクチンを混合することで 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。

A. 研究目的

DPT/IPV（ジフテリア、百日咳、破傷風及び不活化ポリオ混合ワクチン）の開発にあたり、DPT/IPV の品質確保を図るため、DPT（沈降百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン）と IPV（不活化ポリオワクチン）を混合して DPT/IPV を調製し、DPT および IPV の品質に変化が生じないかを確認することを主たる研究目的とした。

B. 研究方法

①検体の調製

調製した DPT/IPV、対照においた DPT および IPV の組成を表 1 に示す。

②DPT/IPV の調製方法

濃縮 IPV 原液は日本ポリオ研究所で調製したもの、沈降 DPT は当所で調製したものをそれぞれ用いた。

1)DPT/IPV-①

1.5 倍濃縮沈降 DPT バルク原液と 3 倍

濃縮 IPV バルク原液を 2：1 の容量比で混合して DPT/IPV-①を調製した。

2)DPT/IPV-②

1.5 倍濃縮沈降 DPT バルク原液と 1.5 倍濃縮 IPV バルク原液を 2：1 の容量比で混合し、IPV の抗原量を DPT/IPV-①の半量の DPT/IPV-②を調製した。

③試験項目

DPT 関連の試験として、力価試験（ジフテリア、破傷風、百日せき）、マウス体重減少試験、マウスヒスタミン増感試験、マウス白血球減少試験、異常毒性否定試験を実施した。

IPV 関連の試験として、力価試験を実施した。

C. 研究結果

①DPT 関連の試験

調製した DPT/IPV および対照においた DPT の試験成績を表 2 に示す。

②IPV 関連の試験

ラット免疫原性試験は、Wister 系 SPF ラット（メス）9 週齢を用いて実施した。3 週間隔で 2 回免疫し、2 回目の免疫の 2 週間後に採血を行った。その結果を表 3 に示す。

D. 考察

表 2 の DPT と DPT/IPV-①の力価試験の結果から、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ていた。

また、DPT/IPV-①は異毒およびマウス毒性試験も DPT の生物学的製剤基準に適合していた。このことから、DPT/IPV-①中の 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 の力価については、今回のラット免疫原性試験では、希釈系列を×1 倍、×2 倍、×4 倍の 3 系列で実施したが、いずれの DPT/IPV 試料においても、各希釈検体での中和抗体価が全般的に IPV 参照品よりも高く、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。しかしながら、DPT/IPV-①では単味の IPV に比べて明らかに相対力価が上昇した。また、IPV 抗原量を半量にした DPT/IPV-②でも単味の IPV に比べて同等以上の相対力価を示した。このことから、DPT/IPV では DPT 中に含まれる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。

E. 結論

DPT と IPV を混合して DPT/IPV を調製したところ、IPV の力価は上昇が認められたが、DPT の品質に関してはほとん

ど変化が認められなかった。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1

各試料の抗原量

試料名	抗原量 (/mL)					
	D (Lf)	P (μ gPN)	T (Lf)	IPV (Du)		
				1 型	2 型	3 型
DPT/IPV	25	12.5	3	34	104	92
DPT/IPV-1/2	25	12.5	3	17	52	46
DPT	25	12.5	3	-	-	-
IPV	-	-	-	34	104	92

表 2

DPT 関連の試験成績

試験項目	生物学的製剤基準	DPT/IPV-①	DPT
力価試験 (ジフテリヤ)	47 IU/mL 以上	141.2 IU/mL	139.4 IU/mL
力価試験 (百日せき)	8 IU/mL 以上	18.4 IU/mL	22.1 IU/mL
力価試験 (破傷風)	27 IU/mL 以上	257.0 IU/mL	151.9 IU/mL
マウス体重減少試験	10 BWDU/mL 以下	10.3 BWDU/mL	-
マウス白血球数増加試験	0.5 LPU/mL 以下	0.44 LPU/mL	-
マウスヒスタミン増感試験 (加温)	0.4 HSU/mL 以下	0.19 HSU/mL	-
マウスヒスタミン増感試験 (非加温)	0.4 HSU/mL 以下	0.08 HSU/mL	-
異常毒性否定試験 (モルモット)	異常を認めない	適合	-

表 3

IPV 関連の試験成績

試料名	相対力価*		中和抗体価**			
				× 1	× 2	× 4
DPT/IPV-①	1 型	3.318	1 型	11.55	10.70	10.75
	2 型	2.260	2 型	10.30	9.80	9.65
	3 型	3.352	3 型	9.80	9.55	10.10
DPT/IPV-②	1 型	1.511	1 型	9.85	10.30	10.85
	2 型	1.534	2 型	9.95	8.90	9.25
	3 型	13.759	3 型	9.80	10.15	10.30
IPV	1 型	1.397	1 型	10.75	10.00	9.20
	2 型	0.941	2 型	9.75	8.55	8.75
	3 型	1.000	3 型	8.05	7.90	7.35

* 日本ボツリ研究所で設定された自家参照品 (TIPV#03C (1:5)) に対する相対力価

ボツリ法で解析できなかつたため、中和抗体価を平行線定量法で解析した値を示した

**中和抗体価：10 匹 (1 群) の平均値を示した

混合ワクチンの品質確保に関する研究

協力研究者 末原章宏、山下利明 武田薬品工業株式会社

研究要旨 混合ワクチン中の不活化ポリオワクチン免疫原性試験法の評価に先立ち、単味不活化ポリオワクチンを原液、2 倍、4 倍に希釈したものをラット後肢大腿部筋肉内に免疫し、追加免疫の後に採血して得られた血清について中和抗体価測定を実施した結果、いずれの型も 22 以上の中和抗体価は確認されたが、用量反応性が十分には得られず、今後、免疫用量の最適化検討が必要と考えられた。

また、不活化ポリオワクチン原液、精製百日せきワクチン原液、ジフテリアトキソイド原液、破傷風トキソイド原液を混合し、アルミニウム沈降型とした混合ワクチン中の不活化ポリオワクチン D 抗原量試験法の評価として、アルミニウムゲルを溶解した場合と溶解しない場合について D 抗原量測定を実施した結果、溶解した時 1 型、3 型の D 抗原測定値が単味不活化ポリオワクチンの約 50%以下であり、溶解しない場合は、1 型が単味の約 60%に低下したことより、混合ワクチン中の D 抗原量を測定する際のアルミニウムゲルの干渉作用が示唆された。

A. 研究目的

3 価混合不活化ポリオワクチン sIPV（以下、不活化ポリオワクチン）、精製百日せきワクチン、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドを混合し、アルミニウム沈降型とした新たな混合ワクチンの品質確保に関する研究として、混合ワクチン中の不活化ポリオワクチン免疫原性試験法の評価に先立ち、単味不活化ポリオワクチンの最終バルクの規格として想定されている免疫原性試験法の評価を行った。

また、単味不活化ポリオワクチンの小分製品の規格として想定されている D 抗原量試験法が、アルミ沈降型である混合ワクチンで評価可能なものか併せて検討を行った。

B. 研究方法

1. 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に関する免疫原性を測定するため、不活化ポリオワクチンを原液、2 倍、4 倍に希釈したものを各群 5 匹ずつのラット（ウィスター系）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、HEp2cN 細胞および各型セービンウイルスを攻撃ウイルスとして用い中和抗体価の測定を行った。

2. 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、処理を行っていない沈降品及び単味不活化ポリオワクチンについて D 抗原量測定を行った。

アルミニウムゲル溶解法は、混合ワクチンを 1500rpm×30 分でアルミニウムゲルを遠心分離し上清を除いた後に、沈殿にクエン酸ナトリウムと水酸化ナトリウムを加え溶解し、塩酸で pH を中性に調製し、D 抗原量測定を行った。

D 抗原量の測定は、マイクロプレートに各型モノクロナール抗体をコーティングし、試料、2 次抗体、HRP 抗体処理を行い、オ-フェニレンジアミンによる発色を 490nm の吸光度として測定した。

C. 研究結果

1. 不活化ポリオワクチンの免疫原性試験法

表 1 に示したとおり、1 型、2 型、3 型ともに、陽性下限値とされる 22 を十分上回っていた。しかし、2 型および 3 型においては 2 倍希釈と 4 倍希釈した試料の中和抗体価がほぼ等しくなり、用量反応性が低かった。

表 1 中和抗体価の測定結果

免疫希釈	1 型	2 型	3 型
原液	10.1	8.9	8.3
2 倍	9.2	7.5	7.7
4 倍	8.2	7.5	7.7

中和抗体価 (log₂)

2. 混合ワクチンにおける D 抗原量試験法

表 2 に示したとおり、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。次に、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。

表 2 D 抗原量の測定結果

測定試料	1 型	2 型	3 型
混合ワクチン溶解品	7.5	86.6	56.8
混合ワクチン沈降品	16.8	82.2	116.8
不活化ポリオワクチン	26.4	91.2	112.1

D 抗原量 (Du/mL)

D. 考察

3 価混合不活化ポリオワクチン、精製百日せきワクチン、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドを混合したアルミニウム沈降型製剤である新たな混合ワクチンの品質確保に関する研究として、不活化ポリオワクチンのラット免疫原性試験法の検討並びに混合ワクチン中の D 抗原量試験法の検討を行った。

単味不活化ポリオワクチンの最終バルクの規格として想定されているラット免疫原性試験法は、免疫希釈を原液、2 倍、4 倍希釈で実施したところ、中和抗体価に用量反応性が認められなかったことより、用量反応性が得られる条件を検討する必要性があると思われた。

単味不活化ポリオワクチンの小分製品の規格として想定されている D 抗原量試験法は、クエン酸ナトリウムと水酸化ナトリウムによりアルミニウムゲルを溶解すると D 抗原量測定値が低下し、アルミニウムゲル沈降製剤においては 1 型の D 抗原量が低いことから、混合ワクチン中の D 抗原量を測定する際のアルミニウムゲルの干渉作用が示唆された。

E. 結論

1. ラット免疫原性試験における不活化ポリオワクチンの免疫用量は、原液、2倍、4倍では用量反応性が低くかった。
2. 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 型が測定できなかつた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
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。)

1. 特許取得
予定なし。
2. 実用新案登録
予定なし。
3. その他
特記なし。

厚生労働省科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
研究協力報告書

s I P Vを用いたD P T－I P V試作品の性状解析に関する研究

研究協力者 東 雍 （財）阪大微生物病研究会

研究要旨 現行の沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン（D P T）に財団法人日本ポリオ研究所が開発しようとしている弱毒株由来不活化ポリオワクチン（s I P V）を混合したD P T－I P V試作ワクチンを作製し、性状解析を行った。その結果、D P Tワクチンの力価に変化はほとんど見られず、s I P Vの干渉作用が無いことが確認された。一方、s I P Vは、D P Tに混合することで免疫原性の増強が認められた。

A. 研究目的

現在、日本では、生ポリオワクチン（O P V）を使用しているが、O P V由来のワクチン関連麻痺が世界で報告されており、O P V由来の変異株が世界のポリオ根絶の問題点となっている。世界的には、強毒株由来の不活化ポリオワクチン（I P V）が普及しているが、日本では、s I P Vを開発中であり、世界からも注目されている。今後、乳幼児への注射の負担を軽減するとともに高い接種率を維持するために、D P T－I P Vの早期開発が要望されている。そこで、予備試験としてD P Tにs I P Vを混合したD P T－I P V試作品を作製し、それぞれの抗原の免疫原性を調査することにより混合ワクチンの可能性を検討する。

B. 研究方法

(1) D P T－I P Vの試作

財団法人日本ポリオ研究所からs I P Vを購入し、現行のD P Tと混合してD P T－I P V試作品を作製した。D P Tの

各抗原含量は現行ワクチンと同量とした。

s I P Vについては、財団法人日本ポリオ研究所が設定した抗原量（I 型：約35Du/mL、II、III 型：100Du/mL）に調製した。チメロサル及び2－PE（フェノキシエタノール）等の防腐剤は添加しなかった。

(2) D P Tの免疫原性の調査

現行D P Tの力価試験法に準じて実施した。

(3) I P V免疫原性

財団法人日本ポリオ研究所のラット免疫原性試験法に準じて実施した。s I P V及びD P T－I P Vを3段階希釈（1：1、1：4、1：16）した後、各希釈につき、雌雄同数のWistar系ラット10匹（11週齢♂：5匹、13週齢♀：5匹）に筋肉内接種した（0.5mL／匹）。1回接種から3週間後に部分採血した後、同量を追加接種した。さらに、追加接種から2週間後に全採血した。得られた個体別血清についてマイクロタイター法による中和試験を実施した。中和抗体価から抗

体陽性率を算出し、s I P Vに対するD P T-I P Vの各型の免疫原性をプロビット法により解析した。

(倫理面への配慮)

実験動物であるラットに対しては、採血時に麻酔処置を施し、負担を最大限軽減した。

C. 研究結果

(1) D P Tに対するs I P Vの影響

D P Tにs I P Vを混合したD P T-I P V試作品についてD P Tの力価を調査したところ、現行D P Tとほぼ同様の力価を示した(表1)。

(2) ト免疫原性の比較

・s I P V

1回免疫；I型は抗体産生が良好であったが、II、III型は悪かった。

2回免疫；1回免疫と同様にI型は良好であった。一方、II、III型は2回免疫することで著しく高くなった(表2)。

・D P T-I P V

1回免疫；各型共に、s I P Vと比べて高く、抗体産生は良好であった。

2回免疫；各型共に、s I P Vと比べて高かった。I型は抗体価が上限値となり変動しないが、II、III型は2回免疫することでより高くなった(表2)。

D. 考察

以上の検討結果から、D P T-I P VにすることによるD P Tの力価に対するs I P Vの干渉作用はないと考える。一方、s I P VはD P T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、D P T-I P V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。

E. 結論

D P T-I P Vの製剤化のための予備試験としてD P T-I P V試作品の性状解析を行った。D P T及びI P Vの免疫原性を調査した結果、D P T-I P Vの開発は可能であることが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

なし

(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。)

(1) 特許取得

なし

(2) 実用新案登録

なし

(3) その他

なし

表1. DPTの免疫原性

検体名	抗原名	力価	試験規格値
DPT	百日せき	11.3	8 IU/mL 以上
	ジフテリア トキソイド	101.3	47 IU/mL 以上
	破傷風 トキソイド	93.9	27 IU/mL 以上
DPT-IPV	百日せき	12.3	
	ジフテリア トキソイド	153.6	
	破傷風 トキソイド	145.0	

表2. sIPVの免疫原性 (2回免疫)

検体名		I型			II型			III型		
		1:1	1:4	1:16	1:1	1:4	1:16	1:1	1:4	1:16
sIPV	平均抗体価 (2 ⁿ)* ¹	9.9	6.8	<5.6	8.9	<7.3	<5.9	8.8	6.8	<3.5
DPT- IPV	平均抗体価 (2 ⁿ)	9.7	9.3	8.9	7.3	8.2	8.1	10.5	8.7	9.3
	相対力価* ²	18.4			4.2			21.0		

*1: 各群の幾何平均値を示した。不等号 (<) は、1群当たり1匹以上のラットの中和抗体価が < 2^{1.0} であることを示す。

*2: sIPVの免疫原性を1とした時の相対力価を示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

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