

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

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成 16 (2004) 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 15 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…………… 3
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…………… 9
小室 勝利（国立感染症研究所血液・安全性研究部長）
2. B型肝炎ワクチンの力価試験法の検討…………… 12
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…………… 18
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
— コレラワクチンについて —…………… 28
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…………… 31
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…………… 35
荒川 宜親（国立感染症研究所細菌第 2 部長）
7. 黄熱ワクチンにおける混入ニワトリレトロウイルス遺伝子の検出に関する研究…………… 41
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…………… 51

I. 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 本研究では海外において製造、使用されているウイルス及び細菌の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して、その結果から海外ワクチンと国内ワクチンの互換性を検討した。(1) 日本国内で製造されているワクチンについては海外ワクチンを現在の国内検定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った。(2) 国内で製造されていない海外製造ワクチンについては、現在考えうる検査法により品質の評価を行った。これにより、海外で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と考えて実施した。

細菌ワクチンについては特に海外 3 社の DTaP や Hib は国内品と比較にはならない量のエンドトキシンを含有しており、*in vivo* 試験で顕著な毒性を示した。互換性についてはほとんど不可能と推定された。

ウイルスワクチンについては、MMR は海外品と国内品は基準、規格も大きく異なっており、やはり互換性には問題があり、神経病原性試験が実施されていない、マーカ一試験が欧米基準には無い等がわかり、今後検討することが多い。また黄熱ワクチンについては内因性 ALV RNA、DNA が検出された。

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)

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、国内製造されているワクチンについても将来の自由化に伴う輸入の可能性を考慮しておく必要がある。

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、現在考えうる検査法により、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

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、現在国内製造の無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

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

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に関し、その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。一方(2) 国内では製造されていないワクチンについては、現在考える品質管理法により、品質の評価を行う。

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

国内外のワクチンによる抗体産生の誘導について、主としてマウスを用いた検討を行う。特に抗原特異的 IgE 抗体産生誘導について比較検討し、ワクチンのロット間での差異があればその機序を解明する(小室)。

2) ウイルスワクチンについて

- ① 国内に無いアジア、ヨーロッパの単味の B 型肝炎ワクチン及び他のワクチンとの多価ワクチンについて国家検定に順ずる *in vivo* 試験、現在検討中の *in vitro* 試験を行い、反応性、力価につき国内品との比較を行う(宮村)。
- ② ムンプスと風疹ワクチンにつき、国内品との比較検討を行う。各国ワクチンの安全性基準の妥当性につき検討する(田代)。
- ③ ムンプスワクチンの神経毒力試験法の問題点：マーモセットに海外ワクチン JL 株として日本のワクチン株、野生株を感染させ、神経毒力の比較検討を行う(佐多)。
- ④ 黄熱ワクチンの Back Mutation に関する研究：17D ワクチンを乳のみマウス脳、Vero 細胞、C6/36 細胞(蚊由来)でそれぞれ各 5 代継代し得られたウイルス

遺伝子(RNA)を解析し、Asibi 株と比較する。またワクチン被接種者血清及び抗黄熱ウイルス単クローン抗体を用いて各ウイルスを中和し、中和能の差異を比較解析する(倉根)。

3) 細菌ワクチンについて

- ① 各国で使用されている髄膜炎菌性髄膜炎ワクチンの性状、品質管理状況を調査する。製剤を入手し抗体価、評価法について検討する(渡辺)。
- ② DPT、Hib ワクチン：海外製造ワクチンあるいは製造株について国内品と平行して初回、追加接種で互換使用された際の問題点を中心に検討する。BCG については世界で広く使われている多数の株を購入し、我が国の Tokyo-172 株と比較する(荒川)。

(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等を用いて力価、安全性等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 & D. 研究結果と考察

- 1) 各種ワクチンの抗原特異的 IgE 産生について：国内外の破傷風トキソイドワクチンおよびリポソーム結合破傷風トキソイドをマウスに投与し、破傷風トキソイド特異的抗体産生および破傷風毒素に対する抵抗性の誘導について検討を行った。現行の破傷風トキソイドワクチンはすべて抗破傷風 IgG および IgE 抗体産生を誘導したが、リポソーム結合破傷風トキソイドは抗破傷風 IgG 抗体産生を誘導して抗破傷風 IgE 抗体産生を誘導しなかった(小室)。
- 2) B 型肝炎ワクチンについて：①今年度は B 型肝炎ワクチンの力価評価方法の一環として国内参照ワクチンの品質管理基準を検討した。国内参照ワクチンと国際参照ワクチンを比較すると国際参照ワクチンの相対力価は国内参照ワクチンに対して $adr : 5.098$ (95%信頼区間 3.469-7.577)、

adw : 4.726 (95%信頼区間 3.073-7.202) であった。免疫応答に差は見られたものの二回繰り返した試験結果は安定していた。今後、国内参照ワクチンの品質管理の一つとして、国際参照ワクチンと比較した力価確認を取り入れる予定である。

②B 型肝炎ワクチンに関する副反応情報を整理した。B型肝炎ワクチンは世界中で多くの成人、小児を対象に接種されているワクチンであるが、深刻な副反応の報告は少ない。B型肝炎ワクチンの副反応の要因と見なされるのは以下の3つである。

- i) 製造中に使用された HBs 抗原発現用宿主細胞成分、添加物等の残留。
- ii) 免疫反応を増強するために加えられたアジュバント。
- iii) 汚染を防ぐために加えられたチメロサル (水銀化合物)。

i)については酵母などのタンパク成分、水銀にアレルギーを持つ人は成分を比較して接種ワクチンを選択することが望ましい。ii)は現時点では深刻な副反応との関連に否定的なコメントが出されている。iii)のチメロサルについて、国外ではチメロサルフリーまたは低容量のワクチンが開発されている。国内メーカーもチメロサル含量について検討中である (宮村)。

3) MMR について:海外品 A は多くの国で使用されて入るが、国内品とは全く別の規格・基準である。WHO の規格 minimum requirements は、わが国の力価と大きな隔たりがある。また神経病原性試験は行われてはいない。国内品は (風疹を含めて) 全て温度感受性変異株である、マーカー試験があるが、欧米の基準にはない (田代)。

4) 乾燥弱毒おたふくかぜワクチン について:昨年度にひきつづき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検討した。海外で用いられているワクチン 1 株と日本のワクチン 2 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 6 株の神経毒力をラットを用いて比較した。乳のみラット一匹あたり 102PFU/10ul 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 3, 6, 9, 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 日目の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 日目には野外株を接種した群において重度の脳室の拡張がみられた。以上のように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。また、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 (佐多)。

5) 黄熱ワクチン について:現行の黄熱ワクチンはニワトリ胚細胞を用いて増殖させている。近年ニワトリ胚細胞を用いて生産されている麻疹およびおたふく風邪ワクチンに、ニワトリ胚線維芽細胞に由来する内在性ニワトリレトロウイルス (EAV) および内在性ニワトリレトロウイルス (ALV-E) の粒子が混入していることが示された。最近、黄熱ワクチンにもこれらの粒子の混入が認められたという報告がなされた。そこで我々が所有する黄熱ワクチンにこれらのウイルス RNA および DNA が混入しているかを調べた。日本で使用している YF-VAX 4 ロット 6 バイアルを蒸留水で溶解後 RNA を抽出し、ALV-E に特異的なプライマーを用いて RT-PCR および PCR を行った。調べたすべてのロットにおいて RT-PCR および PCR 産物が得られた。次に RNA 溶液を DNaseI で処理後 RT-PCR および PCR を行ったところ、RT-PCR 産物に比べ PCR 産物の量が顕著に低下した。このことから、YF-VAX には E-ALV RNA および DNA が混入していることが明らかとなった。一方、外来性 ALV の混入についても調べたが、RNA、DNA ともに検出されなかった。これまでの報告から、ALV-E がヒトに感染する可能性は非常に低いと考えられるが、更なる検討および混入防止策が求められる (倉根)。

- 6) BCG について：マウス法で劣るとされた BCG ワクチン東京 172 株の防御能が、結核ワクチンの国際標準的な評価法であるモルモットに対する噴霧感染法ではデンマーク株と同等であることを確認した。遺伝学的性状比較から、BCG 亜株のうち ATCC ブラジル株が実は Connaught 株の可能性が判明した。また海外の BCG ワクチンに比べ日本のものは生菌含量が多く、優れた有効性、安全性が期待できた(荒川)。
- 7) DTaP 及び Hib ワクチンについて：海外 3 製造所の三種混合(DTaP)ワクチンにエンドトキシン試験を強く阻害するものがあり、また国内品に比べてウサギおよびマウスで強い局所反応原性を示した。Hib ワクチンのエンドトキシン含量がロット間均一性を欠き、臨床的発熱性評価が不可能であることが判明した。またキャリアー破傷風トキソイドに明らかな免疫原性が確認され、DTaP に対する破傷風過剰免疫の可能性が示唆された(荒川)。
- 8) コレラワクチンについて：現在も発展途上国においてコレラは公衆衛生上の大きな問題であり、多数の死亡者を出している。衛生環境の改善がすぐに望めない発展途上国では、ワクチン接種による感染症の予防が非常に有効的である。現在、経口死菌トキソイド混合ワクチン(whole cell with recombinant cholera toxin B subunit)と弱毒生菌(CVD-103H g R)の2種類の経口コレラワクチンが主流となっている。ともに、コレラワクチンとしての有効性が野外実験にて確認され、世界のコレラ発生国で使用されている。本研究では、世界で使用されているコレラワクチンの現状を調査し、今後の日本での要求に対応できるようにした(渡辺)。

E. 結論

以上の研究成果から、海外、国内双方で製造されている製剤について、細菌ワクチンではエンドトキシン量等に大きな差があり、またウイルスワクチンでは製剤そのものの規格が全く異なっており、試験法も異なっている。これらの導入が行われるとするなら、安全性、力価等の

面で互換性を考慮した上で厳密な検討を事前に充分行う必要があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
別紙参照
2. 学会発表
各分担研究報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

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・安全性研究部部長)

研究協力者 内田 哲也、内藤 誠之郎、種市 麻衣子、加藤 博史
(国立感染症研究所血液・安全性研究部)

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

国内外のワクチンによる IgG および IgE 抗体産生の誘導について、マウスを用いた検討を行った。マウスに 2 種類の外国製アルミニウム沈降破傷風トキシイドワクチン (TETVAX および DiTePer)、国産アルミニウム沈降破傷風トキシイドワクチン (KAKETSUKEN)、破傷風トキシイド溶液、あるいはリポソーム結合破傷風トキシイドを、0 週および 4 週の 2 回 0.8IU/マウス、腹腔投与し、尾静脈より経時的に採血して血清中の抗破傷風抗体価を検討した。また、初回免疫 7 週後、致死量の破傷風毒素を投与して破傷風毒素に対する抵抗性を検討した。このとき、同一週齢の非免疫マウスを対照として用いた。

(倫理面への配慮)

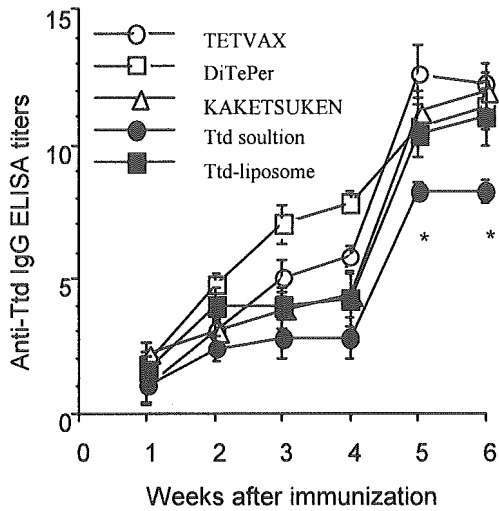
本研究に使用する実験動物は「国立感染症研究

所実験動物管理運営規定」に基づいて飼育されており、実験動物の取り扱いは(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

第 1 図に示すように、破傷風ワクチンを接種したマウスにおいて国内ワクチン、国外ワクチンの別にかかわらず抗破傷風 IgG 抗体産生とともに抗破傷風 IgE 抗体産生が誘導された。破傷風トキシイド溶液を投与したマウスにおいても破傷風ワクチン投与群と比較して低値ながら抗破傷風 IgG とともに顕著な抗破傷風 IgE 抗体産生が誘導された。一方、リポソーム結合破傷風トキシイド投与群においては、破傷風ワクチン投与群に匹敵する IgG 抗体産生が誘導されたが、抗破傷風 IgE 抗体産生は誘導されなかった。初回免疫 6 週後のマウスの血清について抗破傷風 Ig サブクラス抗体価を検討したところ、表-1 に示すように、すべての群において IgG1 が IgG2a に比べて優位であった。初回免疫 7 週後に致死量の破傷風毒素を投与したところ、非免疫対照群では 24 時間以内にすべてのマウスが死亡したのに対して、破傷風トキシイド投与群では破傷風トキシイド溶液投与群、リポソーム結合破傷風トキシイド投与群も含めて全群のマウスが無兆候のまま生存した。

第1図a: 抗Ttd IgG抗体産生



第1図b: 抗Ttd IgE抗体産生

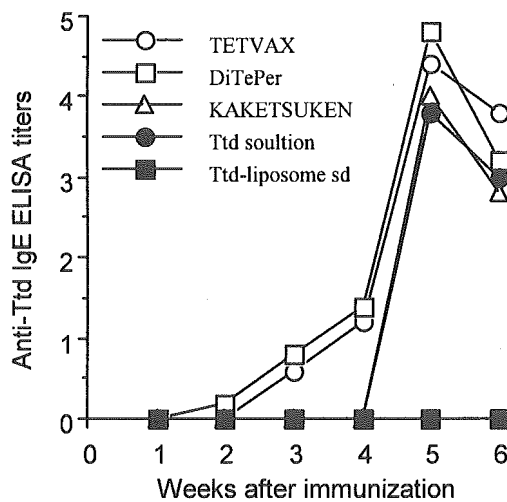


表-1: 初回免疫6週後における抗Ttd Igサブクラス

Immunization	Anti-Ttd ELISA titers	
	IgG1	IgG2a
TETVAX	17.4 ± 0.5	10.2 ± 1.5
DiTePer	16.6 ± 0.5	11.8 ± 0.4
KAKETSUKEN	16.7 ± 0.6	8.7 ± 0.6
Ttd solution	14.6 ± 1.3	3.6 ± 2.4
Ttd-liposome	16.4 ± 0.4	7.6 ± 0.5

Anti-Ttd IgG1 and IgG2a antibodies in the sera of mice six weeks after primary immunization in the experiment shown in Fig. 1.

Data represent the mean and SE of five mice per group.

D. 考察

破傷風トキソイド溶液は顕著な IgE 抗体産生を誘導した。一方、アルミニウムアジュバントには IgE 抗体産生を誘導、増強する性質があることがよく知られており、アルミニウム沈降破傷風トキソイドワクチンが国内製、海外製にかかわらず高値の抗破傷風 IgE 産生を誘導したことは当然の結果であると言える。これに対して、リポソーム結合破傷風トキソイドは抗破傷風 IgG 抗体産生をアルミニウム沈降破傷風トキソイドワクチンと同程度に誘導したが抗破傷風 IgE 抗体産生は誘導しなかった。リポソーム結合破傷風トキソイドによっても致死量の破傷風毒素に対する抵抗性が誘導された。リポソーム結合破傷風トキソイド免疫群において抗破傷風 IgG1 抗体産生が IgG2a と比較して有意であったことは、リポソーム結合破傷風トキソイドによって誘導される IgE 抗体産生の選択的抑制効果がタイプ-1 免疫応答の誘導を介したのではないことを示唆している。

ワクチン接種後の副反応の報告の多くにワクチン抗原に特異的な IgE 抗体産生の誘導が関与するアレルギー反応が含まれていることが知られており、これを回避する方策の一つとして IgE 抗体産生を誘導しにくいワクチンアジュバントの開発が挙げられる。この目的においてリポソーム結合抗原をアレルギー反応を惹起しにくいワクチンアジュバントとしてワクチンの創製に応用することが期待される。

E. 結論

国内外の破傷風トキソイドワクチンおよびリポソーム結合破傷風トキソイドをマウスに投与し、破傷風トキソイド特異的抗体産生および破傷風毒素に対する抵抗性の誘導について検討を行った。現行の破傷風トキソイドワクチンはすべて抗破傷風 IgG および IgE 抗体産生を誘導したが、リポソーム結合破傷風トキソイドは抗破傷風 IgG 抗体産生を誘導して抗破傷風 IgE 抗体産生を誘導しなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uchida, T. (2003) Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness in a T-cell independent fashion. *Current Drug Targets* 3:119-135.
2. Uchida, T. (2003) Stx-liposome conjugates as candidate vaccines. *Drugs of Today* 39:673-693.
3. Tanaka, Y., Kasai, M., Taneichi, M., Naito, S., Kato, H., Mori, M., Nishida, M., Maekawa, N., Yamamura, H., Komuro, K., Uchida, T. (2004) Liposomes with differential lipid components exert differential adjuvanticity in antigen-liposome conjugates via differential recognition by macrophages. *Bioconjugate Chemistry* (印刷中)
4. Naito S, Kato H, Taneichi M, Takahashi M, Ohkuma K, Morokuma M, Mori M, Yamamura H, Uchida T, Komuro K. (2004) IgE antibody response against tetanus toxoid in mice immunized with tetanus vaccine: Comparison among domestic-, foreign-, and candidate liposomal vaccine. (投稿中)

2. 学会発表

1. 内田哲也：リポソーム結合抗原によって誘導される T 細胞非依存的 IgE 産生抑制 第 53 回日本アレルギー学会総会、2003 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：修飾抗原と非修飾抗原によって修飾される T-cell epitope の違いについて 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年
3. 内藤誠之郎、田中ゆり子、加藤博史、種市麻衣子、内田哲也：リポソーム結合 OVA に対する MHC 非依存的、strain 拘束性免疫応答 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年
4. 種市麻衣子、加藤博史、田中ゆり子、内藤誠之郎、内田哲也：T-cell epitope の異なる CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカインプロファイルの違いについて 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年
5. 田中ゆり子、種市麻衣子、内藤誠之郎、加藤博史、笠井道之、内田哲也：フォスファチジルセリン含有によって増大するリポソームのアジュバント効果 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

2. B 型肝炎ワクチンの力価試験法の検討

分担研究者 宮村 達男 (国立感染症研究所ウイルス 2 部)

研究協力者 清原 知子、佐藤 知子、戸塚 敦子、下池 貴志、米山 徹夫
(国立感染症研究所ウイルス 2 部)

研究要旨 1) 今年度は B 型肝炎ワクチンの力価評価方法の一環として国内参照ワクチンの品質管理基準を検討した。国内参照ワクチンと国際参照ワクチンを比較すると国際参照ワクチンの相対力価は国内参照ワクチンに対して $adr : 5.098$ (95%信頼区間 3.469-7.577)、 $adw : 4.726$ (95%信頼区間 3.073-7.202) であった。免疫応答に差は見られたものの二回繰り返した試験結果は安定していた。今後、国内参照ワクチンの品質管理の一つとして、国際参照ワクチンと比較した力価確認を取り入れる予定である。

2) B 型肝炎ワクチンに関する副反応情報を整理した。B 型肝炎ワクチンは世界中で多くの成人、小児を対象に接種されているワクチンであるが、深刻な副反応の報告は少ない。B 型肝炎ワクチンの副反応の要因と見なされるのは以下の 3 つである。

1. 製造中に使用された HBs 抗原発現用宿主細胞成分、添加物等の残留。
2. 免疫反応を増強するために加えられたアジュバント。
3. 汚染を防ぐために加えられたチメロサル (水銀化合物)。

1. については酵母などのタンパク成分、水銀にアレルギーを持つ人は成分を比較して接種ワクチンを選択することが望ましい。2. は現時点では深刻な副反応との関連に否定的なコメントが出されている。3. のチメロサルについて、国外ではチメロサルフリーまたは低容量のワクチンが開発されている。国内メーカーもチメロサル含量について検討中である。

A. 研究目的

B 型肝炎は B 型肝炎ウイルスによる非経口感染症である。慢性化すると、肝硬変、肝癌に至ることもある。母子感染がキャリア成立のためのメインの感染ルートであることから、我が国では母子感染によるウイルス保持者＝キャリア対策として世界的にユニークな母子感染防止事業を採用し、著しい効果を上げてきた。現在、危惧される B 型肝炎の感染ルートは性行為感染、薬物常用者による注射針の使い回し、または医療事故 (針刺し事故、透析ユニットの管理ミス等) などである。

B 型肝炎の予防法として、B 型肝炎ワクチンは極めて有効である。国内ではハイリスク群 (医療従事者、頻回注射を必要とする患者、海外渡航者等) への接種が薦められる一方、海外では出生時のユニバーサルワクチネーション、school entry requirements など、その需要は大きく、他のウイルスと組み合わせた多価混合ワクチンなど種類も増えてきている。

現在我が国で使用されている B 型肝炎ワクチンは国内製品、外国製品ともに B 型肝炎ウイルスの HBs 抗原遺伝子を細胞で発現さ

せた蛋白を精製したものである。すべて我が国の生物学的製剤基準に則り、その安全性と有効性が評価されている。しかし、B型肝炎ウイルスのサブタイプ、遺伝子型、ワクチン製造の宿主細胞にはいろいろな種類がある。ヒトとチンパンジー以外には感受性の動物はいないのでワクチンの力価はマウスやモルモットに対する血中抗体誘導能であらわされている。ワクチンの品質評価は市販後の調査、副反応調査を含め、真のB型肝炎感染阻止能をもってなされなければならない。

当研究は多様な国内流通ワクチンと海外ワクチンを比較し、その差違を把握することを目的とした。更に多様なB型肝炎ワクチンの品質評価に資するための力価試験法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1) ワクチンの *in vivo* 力価試験

国家検定に使用される国内参照ワクチンについて国外検定機関、国内各メーカーから品質管理に関する問い合わせが増えてきた。これに対応して現行の品質管理基準に加えて新たな基準の設定を検討した。

国内参照ワクチンをリファレンスにして国際参照ワクチンの *in vivo* 力価試験を行った。国際参照ワクチンは National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) から供与（一部購入）された。*in vivo* 試験は生物学的製剤基準に従って行い、2回繰り返した。昨年度行った試験結果を参考に、国際参照ワクチンの接種濃度を決定した。

2) *in vitro* 試験

国内参照ワクチン (P3)、輸入時期が異なる3本の国際参照ワクチン (NIBSC: N0, N1, N2) 及びHBs抗原について *in vitro* 試験を行った (表1)。方法は当室で検討した方法 (13年度報告) に従った。ワクチンを希釈し、デソープシヨ

ン・バッファー (DB, 0.09M Citric acid, 0.36M Na₂HPO₄, pH6.0) と 1:3 で混和し、60°C、1時間感作した。サンプルを遠心し、遠心上清中に含まれるアジュバントから遊離したHBs抗原を DADE BEHRING; Enzygnost HBsAg 5.0 キットで検出した。既知濃度のHBs抗原をリファレンスとして平行線定量法で回収抗原量を算出した。

更に各ワクチンの抗原回収率を推定した。ワクチンに含有されるタンパク質は99%以上がHBs抗原であることから Lowry 法でワクチンの総タンパク量を測定し、全抗原量とした。
推定抗原回収率 = 回収抗原量 / 総タンパク量 × 100

3) 副反応情報

B型肝炎ワクチンの副反応についてインターネットおよび文献から情報を収集した。

C. 研究結果

1) ワクチンの *in vivo* 力価試験

国際参照ワクチンの *in vivo* 力価は国内参照ワクチンに対して $adr: 5.098$ (95%信頼区間 3.469-7.577)、 $adw: 4.726$ (95%信頼区間 3.073-7.202) であった (表1)。抗 *adw* 抗体のELISAでは国内参照ワクチンに比較して、国際参照ワクチンの各免疫群での抗体陽転率の変化が大きく、統計処理で有効な領域が狭かった (図1)。今後、国際参照ワクチンを用いた力価試験を行い、国内参照ワクチン力価の変動をモニタリングする予定である。しかしながら、世界的にB型肝炎ワクチンの力価検定方法が *in vivo* 試験から *in vitro* 試験に移行しているため、NIBSCで管理されている *in vivo* 試験用の国際参照ワクチンについて取扱いの変更があるかもしれない。

2) *in vitro* 試験

試験品3本すべて等量のHBs抗原を含

んでいることを確認した(表1、図2)。ワクチンはDB処理をしたものだけがHBs抗原検出可能であった(図3)。HBs抗原は可溶化処理に影響されなかった。可溶化後の各試験品のOD値が同様の推移を示すことから同一の製造所で作製されたワクチンは可溶化後の抗原回収率が一定であると考えられた。一方で、製造所が異なるワクチン、P3とNIBSCを比較すると推定抗原回収率に違いが見られた(表2)。

3) 副反応情報

国内で使用されているB型肝炎ワクチン、及び海外で供給量の多いB型肝炎ワクチンを表3に示した。

B型肝炎ワクチン固有の問題点

B型肝炎ワクチンは血清由来のHBs抗原、またはHBs抗原遺伝子を酵母や細胞で発現させた組換えHBs抗原をアルミニウムアジュバントに吸着させた製剤であり、保存剤としてチメロサルが添加されている。現在ではほとんどのワクチンが組換えHBs抗原から作られている。

B型肝炎ワクチンの副反応として多く報告されるのは注射部位の腫脹、疼痛などである。いずれも軽く一過性のものである。深刻な副反応としては60万回の接種に1回の割合でアナフィラキシーが起こる(死亡例無し)。白血病、多発性硬化症との関連を指摘する報告もあるが、2002年のGlobal Advisory Committee on Vaccine Safety (GACVS)において科学的関連は認められないうコメントが出された。

2003年のGACVSではアルミニウムアジュバントとmacrophagic myofascitisの関連も否定された。

このほかに、酵母、水銀にアレルギーのある人はワクチンの成分を検討して選択することが推奨される。

チメロサル含有ワクチンとしての問題点

チメロサル含有ワクチンとしての側面か

ら、他のチメロサル含有ワクチン同様に、ワクチン接種による水銀摂取量の増加、心身発育遅滞等も危惧されているが肯定も否定もできない状況である。近年、チメロサルに含有される水銀の生体に及ぼす影響を考慮し、チメロサルフリーまたは低容量のワクチンが研究、開発されている。

参考サイト、文献

http://www.who.int/vaccine_safety/en
<http://www.cdc.gov/nip/news/iom-thim10-1-01.htm>
<http://www.cdc.gov/nip/vacsafe/concerns/hepB/q&a.htm#6>
http://www.childrensvaccine.org/files/thimerosal_decision.pdf
<http://www.vaers.org/>
<http://www.fda.gov/cber/vaccine/thimerosal.htm>
<http://www.cdc.gov/nip/vacsafe/concerns/gen/additives.htm>
<http://www.who.int/wer>
Weekly epidemiological record, 2002, No.77, 2003, No.78, 2004, No.3
Pocket ImmunoFacts (4th ed.) J.D.Grabenstein and L.A.Grabenstein, Facts and Comparisons, 2002
Addressing parents' concerns: Do vaccines contain Harmful preservatives, adjuvants, additives, or residuals? P. A. Offit, et.al.: Pediatrics, 112(6)1394-1401, 2003

D. 考察

力価試験

in vitro 試験をELISAで行う際、抗原をアジュバントから遊離させるDB処理を行う必要がある。この処理によるHBs抗原回収率は、同一製造所で作られたワクチン間では一定であるが、製造所が異なると回収率も違った。この要因として、アッセイ法、ワクチンの製造法、サブタイプの相違などが考えられる。この点は同一製造所で作られたワクチンをリファレンス(ワーキングリファレンス)に設定することで解決できる。

国内参照ワクチンP3をリファレンスとした*in vivo*試験の結果、国際参照ワクチンNI

と N2 の抗 adr 抗体から算出した相対力価はほぼ同じであった。抗 adw 抗体から算出した相対力価はばらついているが、これは P3 と NIBSC の抗体陽転率の差による誤差と推察された。

同一製造所で作られた国際参照品 N0 をワーキングリファレンスとした *in vitro* 試験でも N1、N2 の相対力価はほぼ同じであり、*in vivo* 試験と同様の傾向を示した。

in vivo 試験の結果に基づいた各製造所固有のリファレンスを設定すれば *in vitro* 試験による品質管理が可能になると考えられる。

副反応

B 型肝炎ワクチンは世界中で使用されており、2003 年には WHO 加盟国の 79% が小児・子供のルーティンワクチネーションに組み入れている。一方で B 型肝炎ワクチンには他のワクチン同様副反応の報告がなされている。多くは一般的によくみられる接種部位の腫脹、疼痛など一過性のものである。深刻な副反応として多発性硬化症、自閉症などが疑われたが現時点ではいずれも否定的である。

E. 結論

力価試験

これまで、B 型肝炎ワクチンの *in vitro* 試験方法について検討を重ねてきた。現在行っている *in vivo* 試験はワクチンの抗体産生能を相対的に算出、比較したが、*in vitro* 試験はワクチンに含まれる抗原そのものを比較することになる。B 型肝炎ワクチンは各製造所によって、HBs 抗原発現宿主細胞、HBs 抗原のサブタイプ、アジュバントの種類などが異なるので *in vivo* 抗体価のように一律に比較することは困難である。

今年度の報告書で示したように、同じ製造所で作られたワクチンであれば *in vitro* 試験と *in vivo* 試験は相関した。各製造所で現行の *in vivo* 試験結果に基づいた *in vitro* 試験用ワーキングリファレンスを設定すれば一

貫した抗原性を持つワクチンの品質管理が可能である。

また、B 型肝炎ワクチンの免疫原性はアジュバントによるところが大きく（平成 14 年度報告）抗原量とは別に、アジュバントの効果を保証する試験も必要と思われる。

今後は実際に市販されているワクチンを用いて、*in vivo*、*in vitro* の相関、アジュバント試験法を検討し、データが蓄積すれば B 型肝炎ワクチンの試験管内試験法も実用可能である。

副反応

現時点で B 型肝炎特有の深刻な副反応では製造過程で混入する異種タンパクによるアナフィラキシーがもっとも危惧されるべきものである。チメロサルについては海外ではチメロサルフリーまたは低容量のワクチンが認可されており、国内ワクチンも研究開発が進んでいる。

しかしながら、被接種者のコンディション、他ワクチンや薬剤との併用、製造過程のアクシデントなどから予測不能な副反応がおこる危険性は否定できない。

今後も品質管理、副作用情報の収集と検討には慎重に取り組むべきである。

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

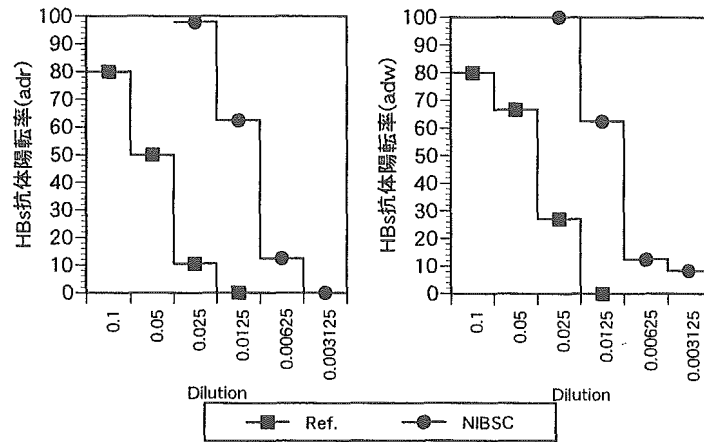


図1 国内参照ワクチン及び国際参照ワクチンの抗体陽転率

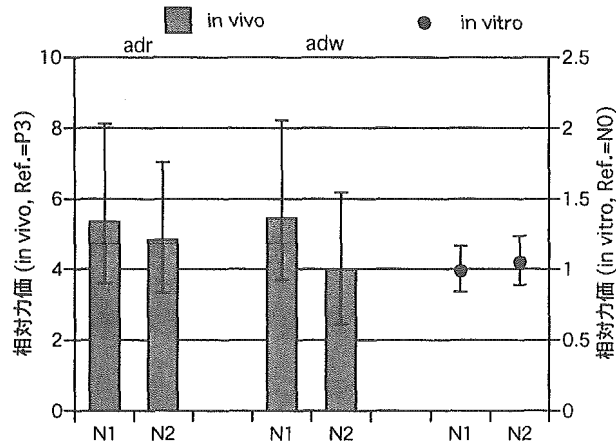


図2 *in vivo*, *in vitro*相対力価 (| 95%信頼区間)

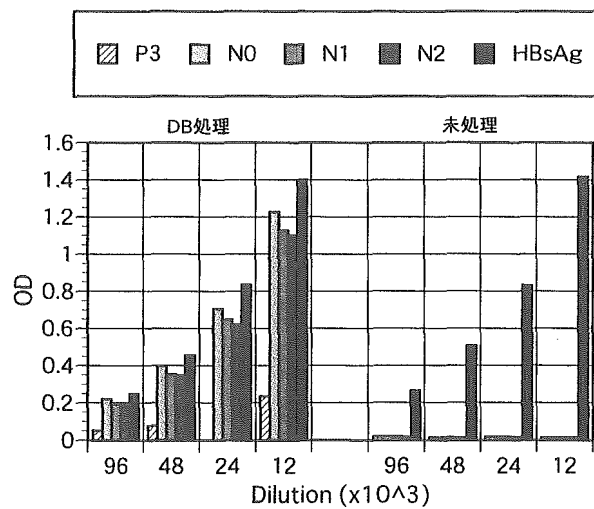


図3 DB処理による抗原量の差

表 1. 試験に使用したワクチンの *in vivo*, *in vitro* 相対力価

ワクチン名	P3をリファレンスとした <i>in vivo</i> 相対力価		N0をリファレンスとした <i>in vitro</i> 相対力価 (95%信頼区間)
	抗adr抗体 (95%信頼区間)	抗adw抗体 (95%信頼区間)	
国内参照ワクチンP3 <i>in vivo</i> assayのリファレンス	1.0	1.0	-
国際参照ワクチンNIBSCO: N0 <i>in vitro</i> assayのリファレンス	-	-	1.0
国際参照ワクチンNIBSC1: N1 試験品	5.354 (3.607-8.121)	5.456 (3.698-8.221)	0.989 (0.841-1.165)
国際参照ワクチンNIBSC2: N2 試験品	4.843 (3.698-8.221)	3.996 (2.448-6.182)	1.049 (0.890-1.239)
N1, N2平均値	5.098 (3.469-7.577)	4.726 (3.073-7.202)	1.019 (0.866-1.202)

表 2. 各ワクチンの総タンパク量、回収抗原量及び推定抗原回収率

ワクチン名	Lowry法による 総タンパク量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	<i>in vitro</i> 試験による 回収HBs抗原量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	推定抗原回収率 (%)
国内参照ワクチンP3 <i>in vivo</i> assayのリファレンス	26.4	9.5	36.0
国際参照ワクチンNIBSCO: N0 <i>in vitro</i> assayのリファレンス	26.4	29.0	109.8
国際参照ワクチンNIBSC1: N1 試験品	26.8	27.1	101.1
国際参照ワクチンNIBSC2: N2 試験品	26.6	26.9	101.1
N0, N1, N2平均値	26.6	27.7	104.1

表 3. 国内、国外のワクチン

国内メーカー	HBs 抗原 産生細胞	アジュバント (アルミニウム含量規格)	チメロサル
A	酵母	水酸化アルミニウム (0.25mg/dose)	5 μg / dose
B	huGK-14 細胞 (ヒト肝癌細胞)	水酸化アルミニウム (0.15mg/dose)	25 μg / dose チメロサル含量検討中 (安全性試験)
C	酵母	硫酸アルミニウム (0.25mg/dose)	25 μg / dose チメロサル含量検討中 (安全性試験)

国外メーカー	HBs 抗原 産生細胞	アジュバント (アルミニウム含量規格)	チメロサル
D	酵母	硫酸アルミニウム (0.5mg/dose)	free
E	酵母	水酸化アルミニウム (0.25mg/dose)	< 1 μg / dose

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、海外製品の輸入を検討する時期が来た。現在国内で使用されている麻疹、風疹、おたふくかぜワクチン製剤は、全て国内で製造され単味ワクチンとして使用されている。一方、海外では麻疹、風疹、おたふくかぜワクチンは、混合されたMMRワクチンとして使用されることが多い。海外で製造されたMMRワクチンを輸入し、国内で販売しようとする動きがあり、その品質管理上、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ため調査・比較した。

A. 研究目的

我が国では麻疹、風疹、おたふくかぜ単味ワクチンがその疾病の重要度を鑑みて1960年代に相次いで開発された。その後、米国企業が持つMMR混合ワクチン特許期間終了を待って国産ワクチンを混合したMMRワクチンが開発され、1989年4月から定期接種が開始された。しかし、MMRワクチン接種後、おたふくかぜワクチンに起因する無菌性髄膜炎が、約1000人に1人の頻度で発生し、MMRワクチンの定期接種は1993年4月より中止されるに至った。その後、現在に至るまでそれぞれ単味ワクチンとして任意接種されている。一方米国Merk社の製造するMMRワクチン(商品名M-M-R™ II)は、30年にわたって世界72ヶ国に供給され既に4億ドースの接種実績をもつ。

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了。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の否かを予め検証しておく必要がある。

B. 研究方法

- 1) 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。
- 2) 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。

(倫理面への配慮)

本研究のワクチンの比較部分は、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は存在しないが、ワクチンの効果については、ヒトに接種した成績記録を含むので、個人が特定されないように注意した。

C. 研究結果

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・検討を行った結果、製品規格についての多くの情報が得られた。各国の National Control Authority (NCA)等から得た試料により、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。これらに関しては、海外ワクチンの代表として米国 Merk 社の製造する M-M-R™ II を選んで国産ワクチンを比較・考察した。

1) ワクチンに含まれるウイルス株

麻疹、風疹、ムンプスウイルスについては元来血清型が存在せず、抗原的にほぼ単一と考えられている。しかしながら遺伝子型解析の結果、これらのウイルスも遺伝子型は決して単一ではなく、いくつかの遺伝子型が存在することが判明している。このことから遺伝子型が異なれば少なからず抗原性も異なり、そのためワクチンの効果が流行株によっては弱い可能性も指摘されている。そこでワクチン中に含まれるウイルス株について比較した(表 1)。

麻疹ウイルスは、N 遺伝子解析結果から現在、8 群 21 の遺伝子型に分けられている。海外 M-M-R™ II ワクチンはその麻疹ワクチン成分として 1954 年に麻疹に罹患した David Edmonston, から Enders が分離した Edmonston/Enders 株を基に作出した Edmonston, Moraten 株を用いている。これは A 遺伝子型に属している。一方、国産メーカーは、Edmonston, Schwaruz FF-8 株、Edmonston AIK-C 株、Tanabe CAM-70 株を用いている。国産ワクチンも二社が Edmonston 株をベースに開発しており、新しく MMR ワクチンが国内に導入されても、

株の違いによる混乱は生じないと思われる。

風疹ウイルスについては、海外 MMR ワクチンには、その風疹ワクチン成分として、Wistar RA27/3 株を含んでいる。一方、国産ワクチンは、To-336、Takahashi、Matsuura、Matsuba 株を含んでいる。風疹ウイルスは、現在、I 型遺伝子群と II 型遺伝子群の 2 群に分けられている。野外の風疹ウイルスはこの二つの遺伝子群のうち、どちらかが単独、あるいは混在して発生しており、どちらに対してもワクチンは有効である。そのため輸入 M-M-R™ II に含まれる株と国内株と起原を異にしている株の抗原性の問題点は小さいと推察される。

おたふくかぜワクチンについては、現在までに SH 遺伝子の解析結果から A~K の 11 の遺伝子型があることが報告されている。輸入 M-M-R™ II に含まれる Jeryl Lynn 株は A 型で国内ワクチン株はすべて B 型である。かつて国内では 3~4 年ごとにおたふくかぜの流行がくり返されていたが、ワクチン接種とともにその規模は小さくなっていった。ところが近年またその流行が起き、それが新しい遺伝子型のウイルスによって起きたことが明らかになった。そのため、この原因の一つとして、ワクチン株である Jeryl Lynn 株と流行株の抗原性が若干異なり、抗体価が低くなると、流行株に対して十分な防御能を発揮できなくなる可能性が疑われている。これが A 遺伝子型ワクチンだけの問題なのか、国内で使用されている B 遺伝子型のワクチンでも、同様に十分に防御能を発揮できないのについては十分な検証が必要である。

抗体陽性率に関して文献的には、ワクチン接種により M-M-R™ II ワクチンの各成分も国産単味ワクチンも同程度(90%以上)となっており、この点では大差ないと思われる。

2) ワクチンに含まれるウイルス以外の成分について

M-M-R™ II の安定剤には加水分解ゼラチン(2.9%)及びヒト血清アルブミン(0.06%)が含まれている(表 1)。日本では、ゼラチンによるアナフィラキシーが 1994 年頃より問題