

となり、1999年にはDPTaワクチンからゼラチンが除かれた経緯を持つ。現在の国内ワクチンには、ゼラチン、加水分解ゼラチンのどちらも含まれていない。Merk社はワクチン中に含まれる加水分解ゼラチンは、日本国内で問題となった高分子ゼラチンと比べて、免疫学的な活性が少ないとしており、アナフィラキシーに関する副反応調査結果もそれを裏付けている(表2)。また、一部の地域ではMMRワクチンが2回接種されているが、特に2回目でアナフィラキシーの頻度が上昇するという知見も得られておらず、加水分解ゼラチンが免疫源となる可能性も低いとしている。しかし、この一方で既に感作されている小児に注射すれば、アレルギー反応を惹起するとも言われている。この点においては、人種による免疫反応性の違いも考慮して引き続き調査が必要であると思われる。

次に、M-M-RTM II ワクチンには安定剤としてヒト血清アルブミンが含まれている(表1)。国内製品においては既に麻疹ワクチンでは全ての製剤から、風疹、おたふくかぜワクチンにおいては一社を除き、他社製品からは除かれている。ヒトを含め動物由来物質の使用は、BSE問題を含めて未知の感染性物質の混入の可能性を否定できないため、使用を控える方向に向かいつつあるのが現状である。このため海外M-M-RTM II ワクチンに含まれるヒト血清アルブミンへの対応については、慎重に考える必要がある。

3) ワクチンに含まれるウイルスについて

自然感染程の頻度ではないにしろ、如何に弱毒してあるとはいえワクチン接種後には副反応が伴い、その危険性について比較する必要がある。

麻疹ワクチンについて:1999年にM-M-RTM IIの輸入販売を考えているK国内メーカーが麻疹、風疹、おたふくかぜに対する既往歴及びワクチン接種歴のない生後12か月~90か月までの健康な小児を対象に多施設共同単盲検無作為化法で行った試験結果を用いて考察を試みた(表3)。この試験は、輸入販売承認申請に伴い行われた第I層、第II層試験でM-M-RTM II接種後の発熱(接種

者の47.7%が37.5℃以上)が認められ、その発熱のピークが麻疹ウイルスの潜伏期間と一致する接種後10日前後であったことから、その原因が主にM-M-RTM IIワクチン中の麻疹ウイルスに由来すると考えて、国内麻疹ワクチンと比較したものである。

これまで厚生労働省予防接種班の報告では国内麻疹ワクチン接種後の37.5℃以上の発熱は、13.0~27.0%とされており、M-M-RTM II接種後ではこれより発熱率が高い。そのため、同じ判定基準で直接比較試験が行われた。国産ワクチンも予防接種班の報告結果よりも発熱率が高い結果になったが、M-M-RTM IIについては、その国産ワクチンよりもさらに高い傾向が見られた。有害症状についてM-M-RTM IIでは鼻漏84.8%、咳78.1%、下痢56.2%、嘔吐42.1%、湿疹10.1%、不機嫌62.4%、食欲不振52.8%であった。国産ワクチンでは鼻漏92.1%、咳75.3%、下痢56.6%、嘔吐39.3%、湿疹7.9%、不機嫌41.6%、食欲不振42.7%であり、国産ワクチンの有害症状は、湿疹、不機嫌、食欲不振の割合がM-M-RTM IIより低い事を除いてはほぼ同等であった。

我が国においては、一般に発熱率の高いワクチンに対して使う側に抵抗感があると言われている。それは、発熱があるということは、何か好ましくない出来事が身体に起きていと推測する傾向があり、不安を生じさせるからである。実際、発熱率の高いM-M-RTM IIワクチンでは不機嫌、食欲不振の割合が国産ワクチンより高い。予防接種の行われる年齢層では発熱に起因して熱性けいれんが起り易いと言われている。仮に、予防接種後に予防接種と関係なくその小児がてんかん、急性神経系疾患などになってしまった場合、実質上予防接種との因果関係を断ち切ることは困難である。そのため、国産ワクチンの開発も発熱率の低いワクチンを目指して行われた経緯がある。たとえば1960年代初めのEndersワクチン、伝研ワクチン、微研ワクチンでは、発熱率95%であり、1960年代後半のSchwarz、CAM、CAM-CEFでそれが50%代に下がり、現在のCAM、Schwarz FF8、AIK-Cに至りようやく受け入れられるようになったとされている。この点から言うとM-M-RTM IIワク

チンに含まれる麻疹ワクチンは一世代前の日本のワクチンと同じであり、国産ワクチンの方が優れていると言わざるを得ない。

風疹ワクチンについて：M-M-R™ II ワクチン中の風疹ワクチン成分による副反応についての国産ワクチンとの差は認められていない。国産ワクチンは 1971~1974 年に風疹ワクチン研究会主導のもとにマーカー試験を使って開発された経緯を持つ。これは風疹ウイルスの弱毒化の過程で病原性の減弱とモルモット、ウサギの血中 HI 抗体産生の低下が相関していた為に採用されたものである(表 3)。モルモットやウサギの体温が 38.4~39.8℃である為に、温度感受性を獲得したワクチンウイルスの増殖が抑制された事によると考えられている。もちろん、野外風疹ウイルスはヒトのみならずモルモット、ウサギに血中 HI 抗体を誘導する。ところが、M-M-R™ II に含まれる風疹ワクチン成分は必ずしも温度感受性変異の程度は国産ワクチン程高くない。そのため、野外株程ではないもののモルモットやウサギに血中 HI 抗体を誘導することがある(表 4)。

温度感受性変異が加わる事により、よりヒトに対する安全性が増すことは間違いないだろうが、海外 M-M-R™ II の風疹ワクチン成分による副反応が、国産風疹ワクチンと比較して有意に高くないとすれば、温度感受性は、必ずしも必須なマーカーではないことなり、国産ワクチンの品質管理に必要な動物を用いたマーカー試験は、M-M-R™ II には、必須ではなくなる。ワクチンの品質管理の観点からは、それぞれの病原性を規定する直接的なマーカーを見つけ、それをもって株を品質管理する必要があると思われる。

おたふくかぜワクチンについて：かつて国産 MMR ワクチンがその中に含まれるおたふくかぜワクチン成分による副反応(無菌性髄膜炎)により中断したことを考えると、M-M-R™ II ワクチン中のおたふくかぜワクチンに由来する無菌性髄膜炎の頻度を比較する必要がある。現在、単味で任意接種されている国産おたふくかぜワクチンによる無菌性髄膜炎の発生頻度は、厚生科学研究医薬品安全総合事業による永井らの平成 15

年の中間報告がある(表 5)。国内ワクチン株は自然感染による髄膜炎の発生よりは、もちろん低いものの、1,000~2,000 接種に 1 例の頻度で無菌性髄膜炎が発生しており、この頻度は国産 MMR ワクチンで集計された値と同じである。すなわち、麻疹、風疹ワクチンとの混合の有無にかかわらず、無菌性髄膜炎は国産おたふくかぜワクチンに起因して同一頻度で発生することを示している。一方、M-M-R™ II に含まれる Jeryl Lynn 株は、Merk 社の資料ではそれよりも少なく、文献に報告された値もその資料の値の範囲に含まれている。すなわちおたふくかぜワクチンに関するかぎり、現状の国産ワクチンよりも優れている。

4) 生物製剤基準について

現在、麻疹、風疹、おたふくかぜワクチンは製造所ごとに異なる株を用いているが(表 1)、それぞれ一つの生物製剤基準を用いて製造されている。一方、過去に国産 MMR が製造されたときには、これら単味の生物製剤基準を基にして MMR 用の生物製剤基準が作られた経緯をもつ。では、海外の M-M-R™ II ワクチンは我が国の MMR 用基準を適応できるのだろうか。

麻疹ワクチンについて：麻疹弱毒生ワクチンの力価(感染価)が国内基準では 5,000TCD₅₀/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 1,000TCD₅₀/用量(0.5ml)以上となっていることが大きな違いである(表 1)。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 5,000TCD₅₀/用量(0.5ml)未満であり、力価に大きな差がある。この価では我が国の生物製剤基準を適応できない。

風疹弱毒生ワクチンについて：海外における基準上の力価は 1,000TCD₅₀/用量(0.5ml)以上であり、我が国と同等となっている(表 1)。この価そのものは、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。先に述べた様に、国産品ワクチンは高温で増殖が抑制される温度感受性変異株であり、マーカー試験として体温の高いウサギとモ

ルモットに接種した場合には、ウイルスの体内での増殖効率が悪くなり、血清抗体の誘導は 20%未満になる。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、欧米の製剤は我が国の生物学的製剤基準を適応できない。

おたふくかぜワクチンについて：M-M-R™ II ワクチンは輸出国によって若干の仕様変更されるようである。輸入予定の M-M-R™ II ワクチンに置けるおたふくかぜワクチンの力価は仕様上の最大量にあたる 20,000TCD₅₀/用量 (0.5ml) 以上を設定している(表 1)。この価そのものは、現行の生物学的製剤基準には抵触しない。

製造方法について：M-M-R™ II ワクチンを含め欧米所で製造されるワクチンはシド・ロット・システムで作られている事が多い。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なわれており、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の製造は、GMP 等によって製造過程の再現性を確保してはいるものの、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がメーカー毎に、また同メーカーでも製剤毎に異なっている。中間バルクは、バルクのバッチ毎に異なっていると可能性があり、ワクチン製造株の均一性と再現性を確認するために中間段階、最終段階に二段回で全ロット検定をおこなっている。

このような仕様上の特徴を持つ M-M-R™ II ワクチンは、国産 MMR 用の既存の生物製剤基準はなじまず、独自の基準を設定して運用するのが適当であると思われる。

D & E. 考察と結論

海外で製造され世界的に大きなシェアをもつ M-M-R™ II と国産ワクチンはどちらもワクチンに使われている原株の分離年代が古く、どちらも抗原性の観点から野外流行株と最適であるとは言えない。仮に M-M-R™ II を輸入して

使うようになって、抗原性と言う観点からは現状の国産ワクチン株と国内流行株の違いと類似しており、大差なく利用できると思われる。

実際の有効性という観点からは、防御抗体の上昇率及びその抗体の有効持続時間についての比較をしなければならないが、今回は証拠がなく比較できなかった。これらについては今後、輸入ワクチンが使われはじめてから、国産ワクチンと共にワクチン市販後調査を行い検証するしかないだろう。

ワクチンに含まれる安定剤については、国産ワクチンの方が進んでおりヒトを含め他動物由来物質を使用しない製造、あるいはアナフィラキシーを起こす可能性のある物質を使用しないなどの改善が行われている。しかし、現状の M-M-R™ II はその点で遅れており、低免疫反応性とはいえ加水分解ゼラチンやヒト血清アルブミンを含んでおり、Merk 社の改善を望みたい。

国産風疹ワクチンには M-M-R™ II の風疹ワクチン成分にはない温度感受性マーカーが含まれている。このマーカーがヒトへの安全に関わっているのかどうかの科学的証拠は乏しく、その点で国産と M-M-R™ II の優劣がつけられない。一方、麻疹ワクチンについては、明らかに国産ワクチンの方が発熱、発疹、不機嫌などの発生頻度が低く、優れていると思われる。おたふくかぜワクチン成分については、現在国内で製造されているどの株も無菌性髄膜炎の発生頻度が M-M-R™ II より数倍以上高く、現状の発生頻度では広くおたふくかぜワクチン接種を普及させる事に対して大きな障害となるが、発生頻度の少ない M-M-R™ II では利用促進が可能である。

風疹、麻疹、おたふくかぜワクチンを混合したワクチンの利点は大きく、経済的効果も大きい。国内ワクチンで混合できないのはもっぱらおたふくかぜワクチン株の神経毒力が依然として残っているためであり、過去の国産 MMR ワクチンの失敗をくり返さないためには、おたふくかぜワクチンの神経毒力評価システムを構築し、よりよいワクチンを継続して開発し、そして安定した品質の物をワクチンとして製造していくシステムが大切である。

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に乏しくなり、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り、同等製品でも海外と国産品では別基準で運用せざるを得ないと言える。

国際化・自由化が進む中で、M-M-R™ II に限らず、より多くの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と思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeuchi, K., Miyajima N., Kobune, F., and Tashiro, M. Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95 a cell-isolated and Vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes* 20:253-257, 2000
2. Okada, H., Kobune, F., Sato, T.A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tshuchiya, T., and Tashiro, M. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected

- lymphocytes in acute measles patients. *Arch. Virol.* 145:905-920, 2000
3. Takeda, M., Takeuchi, K., Miyajima, N., Koabune, F., Ami, Y., Nagata, N., Suzuki, Y., Nagai, Y. and Tashiro, M. Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 74: 6643-6647, 2000
4. Hasan, M.K., Kato, A., Muranaka, M., Yamaguchi, R., Sakai, Y., Hatano, I., Tashiro, M. and Nagai, Y. Versability of the accessory C protein of Sendai virus: contribution to virus assembly as an additional role. *J. Virol.* 74:5619-5628, 2000
5. Nishimura, H., Itamura, S., Iwasaki, T., Kurata, T., and Tashiro, M. Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. *J. Gen. Virol.* 81: 2503-2510, 2000
6. Yamamoto, A., Nakayama, M., Tashiro, M., Ogawa, T., and Kurane, I. Hydroapatite-coated nylon beads as a new reagent to develop a particle agglutination assay for detecting Japanese encephalitis virus-specific antibodies. *J. Clin. Virol.* 19:195-204, 2000
7. Reickert, T., Sugaya, N., Fedson, D., Glezen, W., Simonen, L., Tashiro, M. Experience in Japan of the vaccination of schoolchildren against influenza. *New Engl. J. Med.* 344:899-896, 2001
8. Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Horimoto, T., Sawada, T., Tashiro, M., Yamaguchi, K., Niwa, S., Shigeta, S. Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *J. Infect. Dis.* 39: 419-429, 2001
9. Kato, A., Ohnishi, Y., Kohase, M., Saito, S., Tashiro, M., Nagai, Y. The smallest Y2 of Sendai virus C proteins is fully capable of both counteracting the anti-viral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis. *J. Virol.* 76: 3802-3810, 2001
10. Umino, Y., Tashiro, M. Inhibition of rubella virus growth by Fungizone. *Vaccine* 19:1369-1372, 2001
11. Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., Tashiro, M.: Comparative analysis of host responses related to immuno-suppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch. Virol.* 146:859-874, 2001
12. Saito, T., Lim, W., Suzuki, Y., Kida, H., Nishimura, S.-I., Tashiro, M.: Characterization

of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. *Vaccine* 20:125-133, 2001

13. Layne, S. P., Beigelsdijk, T. J., Taubenberger, J. K., Cox, N. J., Gust, I. D., Hay, A. J., Tashiro, M., Lavanchy, D.: Global laboratory against influenza. *Science* 293:1729, 2001
14. Yamamoto, A., Nakayama, M., Kurosawa, Y., Sugo, K., Karsawa, H., Ogawa, T., Takasaki, T., Tashiro, M., Kurane, I.: Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads. *J. Virol. Methods* 104:195-201, 2002
15. Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Tanabayashi, K., Tashiro, M.: Recombinant wild-type and Edmonston strains measles viruses bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity. *J. Virol.* 76:4891-4900, 2002
16. Kato, A., Y. Ohnishi, M. Hishiyama, M. Kohase, S. Saito, M. Tashiro, and Y. Nagai. The amino-terminal half of Sendai virus C protein is not responsible for either counteracting the antiviral action of interferons or down-regulating viral RNA synthesis. *J Virol.* 76:7114-7124, 2002.
17. Kawakami C, Saito T, Nakaya Y, Nakajima S, Munemura T, Saikusa M, Noguchi Y, Fujii K, Takaoka M, Ito R, Saito T, Odagiri T, Tashiro M. Isolation of influenza A H1N2 viruses from an outbreak in Yokohama City during the 2001-2002 influenza season in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 56:110-113, 2003

2. 学会発表

1. Kato A, Ohnishi Y, Tashiro M, Nagai Y. Carboxy-terminal half of the Sendai virus C protein is responsible for both counteracting the antiviral action of interferons and down-regulating the viral synthesis, XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27 - August 1.
2. Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M. Development of a new class of the vectors for gene therapy; the cytoplasmic RNA vectors based on Sendai virus, XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27 - August 1
3. 菱山美智子、小浜友昭、竹内 薫、加藤 篤、田代真人。ニワトリ白血病ウイルスの各種検出法について 第4回日本ワクチン学会 2000年11月 横浜
4. 菱山美智子、小浜友昭、竹内 薫、加藤 篤、田代真人。麻疹・風疹・おたふくかぜの生ワクチンに混入するニワトリ白血病ウイルスの簡便な検出方法。第41回臨床ウイルス学会 2000年5月 広島
5. 平田隆洋、李 海鷗、飯田章博、加藤 篤、永井美之、長谷川 護。欠失型センダイウイルス(SeV) ペクターの再構成効率の向上。第48回日本ウイルス学会 2000年10月 津
6. 李 海鷗、飯田章博、平田隆洋、矢野峰、加藤 篤、永井美之、長谷川 護。F、HN 両欠失センダイウイルスペクターの作製。第48回日本ウイルス学会 2000年10月 津
7. 徳炭 剛、飯田章博、平田隆洋、加藤 篤、永井 美之、長谷川 護。Cytoplasmic RNA ベクター (センダイウイルスベクター) における遺伝子発現量コントロール。第48回日本ウイルス学会 2000年10月 津
8. 小山 一、小川基美、加藤 篤、永井美之、足立昭夫。センダイウイルスV欠損特異株に見られたTNFへの感受性。日本ウイルス学会 2000年10月 津
9. 後藤 敏、横尾順子、竹内健司、小松孝行、木村吉延、加藤 篤、永井美之。センダイウイルスのインターフェロンシグナル伝達阻害機構(I): Stat1 複合体形成と STATs チロシンリン酸化阻害に関わるウイルス因子。第48回日本ウイルス学会 2000年10月 津
10. 竹内健司、小松孝行、横尾順子、木村吉延、加藤 篤、永井美之、後藤 敏。センダイウイルスによる IFN シグナル伝達阻害機構(II): シグナル伝達分子 STAT1 の複合状態について。第48回日本ウイルス学会 2000年10月 津
11. 加藤 篤、清谷克寛、小長谷昌功、吉田哲也、田代真人、永井 美之。センダイウイルスC蛋白質の多機能性。第48回日本ウイルス学会 2000年10月 津
12. 斎藤早久良、竹内 薫、棚林 清、山田章雄、加藤 篤、荻野利夫、小長谷昌功。センダイウイルスC蛋白及びムンプスウイルスV蛋白による IFN シグナル伝達の抑制機構。第48回日本ウイルス学会 2000年10月 津
13. 久保田 耐、横沢紀子、横田伸一、藤井暢弘、竹内 薫、加藤 篤。IFN 情報伝達系抑制に関わるムンプスウイルス由来蛋白の同定。第48回日本ウイルス学会 2000年10月 津

14. 俣野哲朗、狩野宗英、加藤 篤、網康至、森 一泰、佐多 徹太郎、永井 美之。DNA・ウイルスベクター併用エイズワクチン：マカクサルモデルでの解析。第 48 回日本ウイルス学会 2000 年 10 月 津
15. 狩野宗英、加藤 篤、網康至、森 一泰、佐多 徹太郎、永井 美之、俣野 哲朗。Gag 特異的細胞性免疫誘導ワクチン：マカクサルエイズモデルでの解析。第 48 回日本ウイルス学会 2000 年 10 月 津
16. 竹内 薫：麻疹ウイルス野外株の遺伝子操作系の確立とその応用。第 5 回日本神経ウイルス研究会シンポジウム、11 月 2001 年、大阪
17. 加藤 篤。センダイウイルスリバーシジェネティクス系の開発と展開 国際シンポジウム「モノネガウイルスのリバーシジェネティクス」11 月 2001 年、東京
18. 竹内 薫、宮嶋直子、竹田 誠、田代真人：野外株 H タンパク質を持つ麻疹ウイルスの Vero 細胞感染機構。第 49 回日本ウイルス学会、11 月 2001 年、大阪
19. 竹内 薫：B95a 細胞が麻疹ウイルス研究に与えた衝撃、Overview：パラミクソウイルス（麻疹ウイルス）。第 49 回日本ウイルス学会、11 月 2001 年、大阪
20. 加藤 篤、大西由佳乃、田代真人、永井美之。宿主アダプター蛋白質に結合するセンダイウイルス C 第 49 回日本ウイルス学会 11 月 2001 年、大阪
21. 小山 一、小山基美、加藤 篤、永井美之、足立昭夫。センダイウイルス感染とアポトーシスの誘 第 49 回日本ウイルス学会 11 月 2001 年、大阪
22. 横沢紀子、横田伸一、久保田 耐、岡林環樹、藤井暢弘：ムンプスウイルス感染細胞における STAT1 および 3 の減少メカニズム 第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年 10 月
23. 久保田 耐、横沢紀子、加藤 篤、横田伸一、田代真人、藤井暢弘：ムンプスウイルス V タンパク質と宿主因子 RACK1 の結合が IFN シグナル伝達及ぼす影響について 第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年 10 月
24. 岡林環樹、横田伸一、横沢紀子、久保田耐、斉藤博之、天野憲一、藤井暢弘：麻疹ウイルスによる I 型インターフェロン細胞内情報伝達経路の抑制機構 第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年 10 月
25. 狩野宗英、中村浩美、武田明子、加藤篤、須崎百合子、網康至、永井美之、俣野哲郎 Gag 発現組換えセンダイウイルスベクターワクチンのマカクサルエイズモデルによる解析 第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年 10 月
26. 加藤 篤、小長谷昌功、菅原文博、久保田耐、坂口剛正、吉田哲也、田代真人、永井美之 センダイウイルスアクセサリー蛋白質の抗インターフェロン効果 第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年 10 月
27. 竹内 薫、宮嶋直子、竹田 誠、加藤 篤、門田伸一、永田恭介、田代真人 麻疹ウイルス V、C タンパク質の機能解析 第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 国産麻疹、風疹、おたふくかぜ生ワクチンと海外 MMR ワクチンの比較

		M-M-R™ II	武田薬品工業	北里研究所	阪大微研	化血研
麻 疹	株 力価	Edmonston Enders >1,000 CCID ₅₀	Edmonston Schwarzuz >5,000 CCID ₅₀ FF8	Edmonston AIK-C >5,000 CCID ₅₀	Tanabe CAM-70 >5,000 CCID ₅₀	-
	安 定 剤	ソルビトール 2.9% 蔗糖 0.38% 水解ゼラチン 2.9% ヒト血清アルブミン 0.06%	ソルビトール 1.5% 乳糖 5.0% K グルタミン酸 0.048%	ソルビトール 1.8% 乳糖 5.0% Na グルタミン酸 0.4%	ソルビトール 1.5% 乳糖 5.0% Na グルタミン酸 0.5%	-
風 疹	株 力価	Wistar RA27/3 >1,000 CCID ₅₀	To-336 >1,000 CCID ₅₀	Takahashi >1,000 CCID ₅₀	Matsuura >1,000 CCID ₅₀	Matsuba >1,000 CCID ₅₀
	安 定 剤	同上	乳糖 5.0% K グルタミン酸 0.048%	乳糖 5.0% Na グルタミン酸 0.2%	乳糖 5.0% Na グルタミン酸 0.5%	乳糖 5.0% アルギン酸塩 2.0% ヒト血清アルブミン 0.5%
お た ふ く か ぜ	株 力価	Jeryl Lynn >20,000 CCID ₅₀	Torii >5,000 CCID ₅₀	Hoshino >5,000 CCID ₅₀	-	Miyadera >5,000 CCID ₅₀
	安 定 材	同上	乳糖 5.0% K グルタミン酸 0.048%	ソルビトール 2.9% 乳糖 5.0% Na グルタミン酸 0.2%	-	蔗糖 10% アルギン酸塩 2.0% ヒト血清アルブミン 0.5%

表2 MMR ワクチンに由来するアナフィラキシー発生数

地 域	接 種 数	ア ナ フ ィ ラ キ シ ー 数
米 国	259,493,170	41
その他	143,066,678	51
合 計	402,559,848	92

(1979/4~2001/9 メルク社資料より)

表3 国産と MMR ワクチン中の麻疹ワクチン株による接種後の発熱反応発生頻度

分 類		MMR		国産麻疹ワクチン		相 対 比
		発 現 例 数	累 計 発 現 率	発 現 例 数	累 計 発 現 率	
最 高 体 温 (接 種 後 0~35 日)	>39.0℃	38/178	21.3%	12/89	13.5%	1.74
	38.0~38.9℃	41/178	44.4%	15/89	30.3%	1.83
	37.5~37.9℃	21/178	56.2%	12/89	43.8%	1.64

(K が行った第 III 層比較試験より)

表 4 国産と MMR ワクチン中の風疹ワクチン株の温度感受性

ウイルス株	国産				M-M-R™ II	野生株
	Matsuura	To-336	Matsuba	Takahashi	RA23/3	MM33
HI 陽性率	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	5/5

(宍戸ら、Jpn. J. Med. Sci. Biol. 29:227-253(1976)より)

表 5 国産と MMR ワクチン中のおたふくかぜワクチン株による無菌性髄膜炎発生頻度

ウイルス株	国産			野生株	M-M-R™ II*
	A	B	C		Jeryl Lynn
対象数	6,929	5,670	5,610	1,085	1,000,000
無菌性髄膜炎 発生数	5	2	3	13	1.2~100
発生頻度	0.07%	0.04%	0.05%	1.2%	0.00012~0.01%

(厚生科学研究医薬品安全総合事業 永井らの中間報告 2003 より、*Merk 社資料より)

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 —

分担研究者 渡辺 治雄 (国立感染症研究所細菌第一部部長)

研究協力者 廣瀬 健二 (国立感染症研究所細菌第一部主任研究官)

研究要旨 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。

A. 研究目的

世界でのコレラの発生状況は、WHOの統計によると2002年に、コレラが発生した国は世界中で52カ国、発生件数は142311件、死亡者は4564人の報告があった。この統計による死亡率は3.95%と以前に比較して高いものであった。特にアフリカでは全発生例のうち97%(137866件)が発生している。アジア、アメリカ大陸では減少傾向にある。

コレラ発生地域では衛生環境の改善がもっともコレラの減少に有効であるが、発展途上国などでは衛生環境の改は急速な改善は望めない。このような状況での効果的なコレラ予防策としては、コレラワクチンの接種がある。現在までに、非経口ワクチン、経口ワクチンが開発されている。近年まで使用されていた、非経口死菌ワクチンは腸管免疫を誘導できないという欠点があり、より自然感染に近い免疫を誘導できる経口ワクチンの開発に力が注がれている。そして、現在までにコレラワクチンの経口ワクチンが主なものとなり、世界のコレラ発生地域で使用されている。

B&C&D. 研究方法・研究結果・考察

世界で使用されているコレラワクチンの種類と性状

現在世界で使用されているコレラワクチンは (1) Parenteral Vaccine 全菌体フェノール不活化ワクチン、(2) Killed whole cell / recombinant cholera toxin B subunit (WC/rBS)、(3) Live attenuated vaccine (CVD-103HgR)の3種類である。世界のコレラワクチンの主流は非経口ワクチンから経口ワクチンに移っている。経口ワクチンである WC/rBS と CVD-103HgR が主に使用され、世界のコレラ発生地域でフィールドトライアルが繰り返され有効性が確認され、さまざまな国で使用されている。現在まで日本で使用されている非経口コレラワクチンは、腸管免疫を誘導するかどうかという点において効果に疑問があるため、世界各国は使用を中止している。世界中の国で入国にコレラワクチンの接種の必要がなくなったことや、先進国でコレラの発生が激減したことなどから、コレラワクチン自体の使用を中止している国もみられる。UK、ニュージーランドなどでは、コレラの患者が激減しもはやコレラにワクチンは必要な

いと行政府が考えている。USA では、唯一正式に FDA が認可しているコレラワクチンは非経口ワクチンのみで新たに経口コレラワクチンを導入する様子も見られない。また、USA で唯一認可されている非経口ワクチンの製造も近く製造が中止される予定である。各ワクチンの詳細を以下に示す。

(1) Parenteral Vaccine 全菌体フェノール不活化ワクチン

日本で使用されているコレラワクチンは、アジア型コレラ菌稲葉型 (NIH35A3 株)、アジア型コレラ菌小川型 (NIH41 株) の S 型菌の純培養しホルマリンまたはフェノールで不活化した後に緩衝生理食塩水で希釈し 1ml 中の菌数が稲葉型、小川型それぞれ 40 億個含むようにしたものである。接種は、5-7 日間間をあけて 2 回皮下接種する。副反応は局所の発赤、腫脹、疼痛、硬結、また、発熱倦怠感などの全身反応があることがある。ワクチンの有効性は 30-50% で、ワクチン効果の持続期間 6 ヶ月である。現在、日本、USA などでも認可され使用されているが、世界的には非経口ワクチンは有効性などの問題から使用されなくなってきている。日本国内では北里研究所が製造している。国家検定を受けたコレラワクチンは国家買い上げされ主に検疫所に保管されて緊急の場合に備えられている。

全菌体フェノール不活化ワクチン

商品名 コレラワクチン北研

製造所 北里研究所・生物製剤研究所 (東京、日本)

商品名 Cholera Vaccine, USP.

製造所 Wyeth Ayerst (USA)

(2) Killed whole cell / recombinant cholera toxin B subunit (WC/rBS)

Killed whole cell / recombinant cholera toxin B subunit (WC/rBS) は感染防御能のある抗毒素抗体の誘導、および粘膜免疫を誘導する目的でコレラ毒素の B サブユニットと不活化菌体 (エルトール型コレラ菌小川型とエルトール型コレラ菌稲葉型) を含んだワクチンである。1 錠あたり 1×10^{11} CFU のホルマリン死菌または加熱死菌を含み、組み換えコレラ毒素 B サブユニット 1mg

を含む。投与方法は、1 週間間隔で 2-3 回投与する。5 歳以上では、2 回投与後の半年間約 50-85% の防御効果がある。効果は約 2 年間持続する。WC/rBS ワクチンはアルゼンチン、グアテマラ、エルサルバドル、エストニア、ホンジュラス、マダガスカル、ニカラグア、ノルウェー、ペルー、スウェーデンなどで認可され使用されている。rBS を含まない WC のみの経口コレラワクチンはベトナムが自国で生産し使用している。1992 年にインドで *V. cholerae* O139 によるコレラが発生してからは、血清型 O139 を加えたワクチンも作られフィールドトライアルが行われている。

Killed whole cell / recombinant cholera toxin B subunit (WC/rBS)

商品名 Dukoral

製造所 SBL Vaccine, Sweden.

(3) Live attenuated vaccine (CVD-103HgR)

CVD-103HgR は自然感染に似た形で免疫を成立させる目的で、弱毒生菌経口コレラワクチンの開発がなされている。野生株と同等の腸管への定着力を持ち粘膜免疫を誘導しかつ副作用のないものがワクチン株の候補となり得る。CVD-103HgR はアジア型コレラ菌のコレラ毒素の A サブユニット遺伝子 *ctxA* を遺伝子工学的手法で欠失させた株である。そして、マーカーとして水銀耐性遺伝子 *mer* を挿入してある。このワクチン 1 錠には 1×10^6 CFU の菌体が含まれる。投与方法は 1 回 1 カプセルを飲むだけである。野外実験では、1 回投与で高い防御効果を示した。有効率は、60-100% で、効果の持続期間は約 6 ヶ月である。2 歳以下の小児への効果は不明である。弱毒生菌であるため効果は粘膜免疫を誘導し比較的高いが、軽い下痢などの副作用が見られる。このワクチンの重要な欠点は *V. cholerae* O139 には効果が見られない。

Live attenuated vaccine (CVD-103HgR)

商品名 Mutachol

製造所 Swiss Serum and Vaccine Institute, Swiss.

経口コレラワクチンの検定方法の問題点について

今後日本において非経口ワクチンから経口ワ

クチンに移行した場合、現在のコレラワクチンの国家検定の方法を改めなければならない。第一の問題点は、経口ワクチンでは、非経口ワクチンで行っているマウスに投与しての力価の測定ができないため力価の検定ができないことである。非経口ワクチンでは、ワクチンを腹腔内に注射してマウスを免役した後、コレラ菌をチャレンジし、その後のマウスの生死でワクチンの力価を調べていたが、経口ワクチンの場合ではマウスは経口摂取でコレラに感染しないのでマウスを用いての力価の測定は不可能となる。そのため経口ワクチンでは、弱毒生菌ワクチンの場合には、(1) 含まれている菌数の測定、(2) *ctxA* 遺伝子が不活化されているかどうかの確認検査、(3) マーカーである *mer* 遺伝子の確認、また、WC/rBS の場合には、(1) Recombinant コレラ毒素 B サブユニットが含まれているかをウエスタンブロット等の方法で確認、などを検査することで、ワクチンの品質が申請時の通りに確保されているかを調べることにより、品質を保証するという方法に変更しなければならないであろう。その他にも、ワクチンの安全性や有効性をどのように調べるのかなど、検討しなければならない問題は多くあると考えられる。

E. 結論

2 種類の経口コレラワクチンが世界に使用されている。特に弱毒生菌ワクチンは、予防効果も高く副作用も軽い下痢のみであることが確認されている。また、経口死菌ワクチンは新型コレラ菌 O139 にも有効なワクチンに改良される予定である。いずれのワクチンも現在日本で使用されている非経口コレラワクチンよりはるかに有効性が高いことが実証されている。今後、我が国で使用するとすれば、それらへの変更を検討する必要があると思われる。

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

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(国立感染症研究所感染病理部)
加藤 篤、荻野 倫子(国立感染症研究所ウイルス第三部)

研究要旨 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 10^2 PFU/10 μ 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。

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。

昨年度にひきつづき、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 B
- C株：日本のワクチン株 C
- D株：日本のワクチン C 株と同じ種ウイルスから数代継代したもの。

E 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。

F 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。

接種方法

脳内接種法。左側視床内に 10 μ l、イトーマイクロシリンジ（マウス脊髄内接種 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 3、6、9、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 細胞をもちいて常法通りプラーク測定を行い、ウイルス量を PFU で表した。

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。リン酸緩衝液（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 $^{\circ}$ C で一晚反応した。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。

ELISA 法

ウイルス接種後 30 日目の動物から心臓採血した血液より血清を分離し、血清中のムンプスウイルス特異的 IgG 量の測定を ELISA 法によって行った。

C. 研究結果

脳乳剤のウイルス量測定の結果、いずれの株も接種後 3 日目にウイルスの増殖が見られた。B 株と E 株接種群で 6 日目にウイルスの存在がみられたが、他の株は減少あるいは検出限界以下となった。（n=3）（図 1）。接種後 3 日目において、ワクチン A 株に比べてワクチン由来株 D 株と野外 E、F 株では有意なウイルスの増殖が観察された。t 検定による統計処理を行い、図中に A 株との比較の結果を p 値で示した。無表記のものは有意差がないもの。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。ワクチン B 株の 6 日目の脳乳剤のウイルス量は A 株に比べて有意に高かった。

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細胞が観察されるようになり、これに伴う炎症が認められた（表 1）。その程度は 3 日目のウイルス量測定結果に相関し、特に D、E、F 株接種群で広範囲であった（データは示さない）。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（昨年度の報告書参照）。炎症の程度はウイルス抗原の検出率と比例し、D、E、F 接種群で顕著であった。

接種後 30 日目の E、F 株接種群では脳室の拡張がみられた（図 2、表 2）。脳室の拡張がみられた動物では接種 25 日前後に鼻呼吸の異常音と

軽度の鼻出血が認められた。

接種後 30 日目の動物のムンプスウイルス特異的 IgG 測定の結果、感染成立、水痘症発症と特異抗体の有無に相関性はみられなかった。

D. 考察

総じて昨年度と同様の結果が得られ、乳のみラットを用いたムンプスウイルスの脳内接種によって野外株とワクチン株の区別が可能であった。これはすでに報告されているハムスターを用いた同様の実験に比べて神経毒力に対する特異性が高い。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。昨年度の結果と総合して試験法に用いる検索項目について考慮した。

ウイルス量は 3 日目をピークとする傾向があったが、B 株でずれが生じていたので例数を増やして検討する必要がある。ただし、9 日目にはウイルスは限界以下になり、これは野外株であるなしに関わらず、全て同様であったのでウイルス分離用採取は 3, 6 日目で十分と考えた。また、水頭症の原因となる基礎病変（ウイルス増殖に対する炎症性反応の開始）は 6 と 9 日目で確認されるので、病理検索はこれに 30 日目を加えた 3 点で十分と考えた。

ワクチンの力価を測る目的でムンプスウイルス特異的抗体価の測定を行ったが、感染成立と発症および特異抗体の有無に相関性は見られず、生後 4 週以内の動物の免疫は力価測定には不適であった。

また、今回は同じ種ウイルスを用いて作製された、細胞継代歴の異なる株同士を比較したが（C 株と D 株）、A 株との比較において明らかな毒力の差が認められた。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。

昨年度の結果に比べて病原性発揮が弱い傾向があり、接種ウイルス量のぶれがあったと考えられた。100PFU 量と一匹に対する接種量が非常に少ないので、接種液の back titration によって確認が必要である。

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。今後は、弱毒株同士の比較が可能な感度の高い試験法の確立を目指す。具体的にはウイルス接種量を 2 段階あるいは 3 段階にする。一群数を統計処理可能な例数に増やす。また、病理学的解析の数値化を行い、客観的な統計処理を可能にしたい。

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

表 1: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。

表 2:接種後 30 日目の水頭症発症、死亡、特異的 IgG 陽性動物について示した。表中の数字は陽性数/検索数を表した。

図 1: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 PFU 量をあらわした。一群 3 匹とした。また、Vaccine A 株との比較を t-検定で行い、有意なもの ($p > 0.1$) について数値を示した。グラフ中の縦太線は検出限界。

図 2: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, C, D 群においては脳室の拡張は見られないが、E, F 群において側脳室の拡張がみられた。

表1 ムンプスウイルス接種後のラットにおける組織病変

	3 d p. i.		6 d p. i.		9 d p. i.	
	Virus antigen	Inflam mation	Virus antigen	Inflam mation	Virus antigen	Inflam mation
Vaccine A	NE	NE	2/ 3	1/ 3	1/ 2	2/ 2
Vaccine B	NE	NE	1/ 3	0/ 3	2/ 2	2/ 2
Vaccine C	NE	NE	3/ 3	3/ 3	2/ 2	2/ 2
Vaccine D	NE	NE	3/ 3	2/ 3	2/ 2	2/ 2
Wild E	2/ 4	0/ 4	1/ 3	1/ 3	3/ 3	3/ 3
Wild F	NE	NE	3/ 3	3/ 3	2/ 2	2/ 2

表2 ムンプスウイルス接種後30日目のラットにおける病原性と特異抗体価

Virus	Hydrocephalus	Die d	Ig G (ELISA)
Vaccine A	0/ 4	0/ 4	2/ 4
Vaccine B	0/ 4	0/ 4	1/ 4
Vaccine C	0/ 4	0/ 4	3/ 4
Vaccine D	0/ 4	0/ 4	3/ 4
Wild E	3/ 4	0/ 4	1/ 4
Wild F	3/ 4	0/ 4	2/ 4

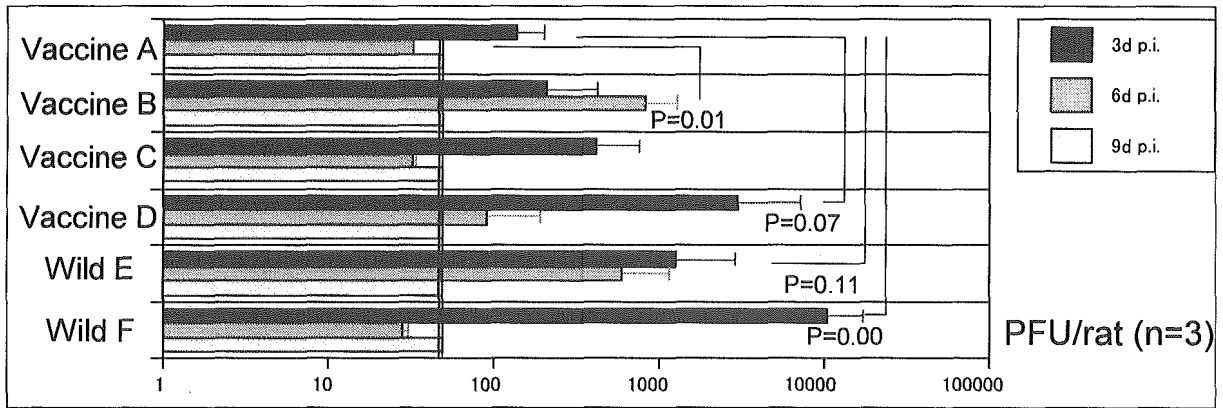


図1 ムンプスウイルス接種後のラット脳乳剤における1匹あたりのウイルス量

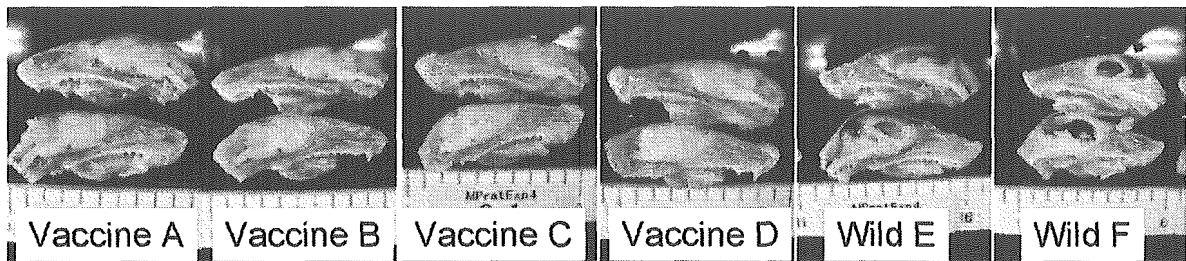


図2 ムンプスウイルス接種後のラット脳断面肉眼写真

5. 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 片岡 紀代、山本 明彦、永田 典代、落合 雅樹、蒲池 一成、
豊泉 裕美、高橋 元秀、堀内 善信、山本 三郎、佐々木 次雄、
近田 俊文、倉田 毅

研究要旨 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。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。

A. 研究目的

海外で製造・使用されている細菌ワクチンの安全性、有効性を、特に国内の同種ワクチンとの互換使用の際の問題に重点を置いて比較・評価する。

B. 研究方法

海外ワクチンの国内製品との比較試験あるいは評価成績の報告を用いて日本のワクチンと比較し、我が国で使用した場合の予防接種の安全性、有効性に及ぼす影響を検討する。具体的には、BCG については、モルモットで東京 172 株の防御能を確認する。さらに各種 BCG 亜株の遺伝学的比較および各国 BCG ワクチン中の生菌含量の比較を行う。DTaP については、基準にある主な試験に加え、成分の違いに付随する局所反応性等を国内品と比較し、国産品との同源性、互換性を評価する。Hib ワクチンについてはエンドトキシン含量とキャリアー蛋白の免疫原性を評価する。

(倫理面への配慮)
倫理規定に沿った。

C. 研究結果

BCG : *M.tuberculosis* H37Rv 株の全遺伝子配列を規準にした場合、BCG 亜株毎に種々の欠損が見られ、*mpb64* 遺伝子などを含む RD2 は、初期に分与されたブラジル株、ロシア株、日本株にのみ存在する。RD8 は Frappier 株及びそれに由来する Connaught 株では欠損し、RD14 は Pasteur 株でのみ欠損している。RD16 はブラジル株を除く全ての株に存在し、401bp の PCR 産物が認められ、日本株では更に 379bp の産物も認められる。ATCC-ブラジル株について MPB64 の発現をキャピリア TB で、RD16 を PCR で調べ、MPB64 を産生せず RD16 欠損がないことを確認した。感染研保有のブラジル株は、MPB64 は産生せず RD16 を欠損していた。また ATCC-ブラジル株は RD8 を欠損し、ブラジル株ではなく Connaught 株の可能性が示唆された。また日本と海外の BCG ワクチンの生

菌含有量を比較したところ、約 10 倍の違いがあるものと考えられた (表 1)。

DTaP および Hib ワクチン:平成 14 年度に海外 3 社(A,B,C)の DTaP について、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、強いマウス体重減少毒性がみられたことを報告した。これらのワクチンについてエンドトキシン試験を行ったところ、B 社と C 社の製品は反応阻害のため適用が困難であった。これら 3 社および国産の DTaP 各 1 ロット 50 μ l をマウス足蹠に投与したところ、海外ワクチンで国産に比べて強い腫脹が認められた(図 1)。5 日目での接種部位の病理組織学的解析の結果、海外 3 社いずれも接種物沈着および周辺の筋層も含めた激しい炎症性細胞反応と壊死が認められた。一方、我が国のワクチンでは接種物の沈着もなく、軽度の炎症性細胞反応を認めるのみであった(図 2)。さらにウサギ背部皮内に 0.1ml 接種したところ、海外ワクチンでは国内ワクチンに比べて長期に亘る強い硬結の残存が認められ、著しい好酸球の浸潤と急性期における強い組織の壊死が観察されたが、日本のワクチンでは軽度の細胞浸潤を認めるのみであった(図 3)。海外ワクチンは、接種部壊死巣での結合組織増殖により硬結を形成したと考えられた。

Hib ワクチン: Hib ワクチン 4 ロットについてエンドトキシン試験を行ったところ、ロットにより 27~350EU/ml の違いが見られた(表 2)。また破傷風トキソイドあるいは Hib ワクチン 0.5ml をマウスに 4 週間隔で、モルモットの場合 3 週間隔で 1mL を 2 回それぞれ交互に免疫した。その結果マウス(図 4)、モルモット(図 5)いずれでも Hib ワクチンのキャリアー破傷風トキソイドに明確な破傷風免疫原性が確認された。

D. 考察

BCG 亜株に関して、ATCC-ブラジル株と Connaught 株の由来に混乱が認められた。BCG 死菌は有効性より副反応の原因と考えられており、日本の BCG は生菌含量が多く、高い有効性と安全性が示唆された。日本と違い海外の DTaP には強い局所反応原性が示唆され、導入に当たっては注意深い臨床評価が必要となる。

また添加エンドトキシンが強い抑制により検出不能になるワクチンがあり、安全性確認法の検討が必要となる。Hib ワクチンキャリアー破傷風トキソイドの免疫原性は、マウスでは認められるがモルモットでは認められず、臨床的にも問題ないとされてきたが、モルモットでも確認された。モルモットでの免疫原性を否定した報告は、米国基準による方法で 2 単位を超える抗体誘導が見られないことで免疫原性を否定したものであり、結果の解釈間違いであると考えられた。

E. 結論

海外ワクチンは日本の現行ワクチンと性状が異なり、海外と日本での安全性に対する要求レベルの違いが示唆され、導入には十分な評価が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masaki Ochiai, Michiyo Kataoka, Hiromi Toyozumi, Akihiko Yamamoto, Kazunari Kamachi, Yoshichika Arakawa, Takeshi Kurata, Yoshinobu Horiuchi,(2004):Endotoxin content in Haemophilus influenzae type b vaccine:Jap J Infect Dis.(in press)

2. 学会発表

1. Yamamoto, S., Yamamoto, T., Nojima, Y., Umemori, K., Matsuo, K., Nomaguchi, H., Sato, Y., Yamada, T., Ohara, N., Matsumoto, S., Phalen S. and McMurray, D.N.: Protective Efficacy of Vaccine Candidates against Guinea Pig Pulmonary Tuberculosis.:(2001) US-Japan Cooperative Medical Science Program Thirty-Sixth Tuberculosis and Leprosy Research Conference,(New Orleans, Louisiana)
2. 堀内善信、高橋元秀、荒川宜親、倉田 毅: ワクチン国際化の潮流に関する一考察 (2002) 第 6 回 日本ワクチン学会学術集

会（千葉）

3. 山本明彦、片岡紀代、永田典代、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、倉田 毅、堀内善信：海外沈降精製 DPT ワクチンの安全性の検討(2003) 第7回 日本ワクチン学会学術集会（名古屋）
4. 落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信：海外製の DTaP ワクチンおよび Hib ワクチン中エンドトキシン量の評価(2003) 第7回 日本ワクチン学会学術集会（名古屋）
5. 新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親：Haemophilus influenzae type b 莢膜多糖体 PRP の分離精製とその性状並びに免疫化学的測定法への利用(2002)第6回日本ワクチン学会学術集会(千葉) 川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親：Haemophilus influenzae type b 莢膜多糖体の精製と利用(2003)第76回日本細菌学会総会(熊本)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図・表

表 1. BCG ワクチンの生菌含量比較

	Strain	CFU (x10 ⁶)/ml
Japan BCG	Tokyo-172	20 - 30
Statens Seruminstitut	Danish-1331	2 - 8
InterVax	Russia	~ 1
Serum Institute of India	Russia	1 - 33

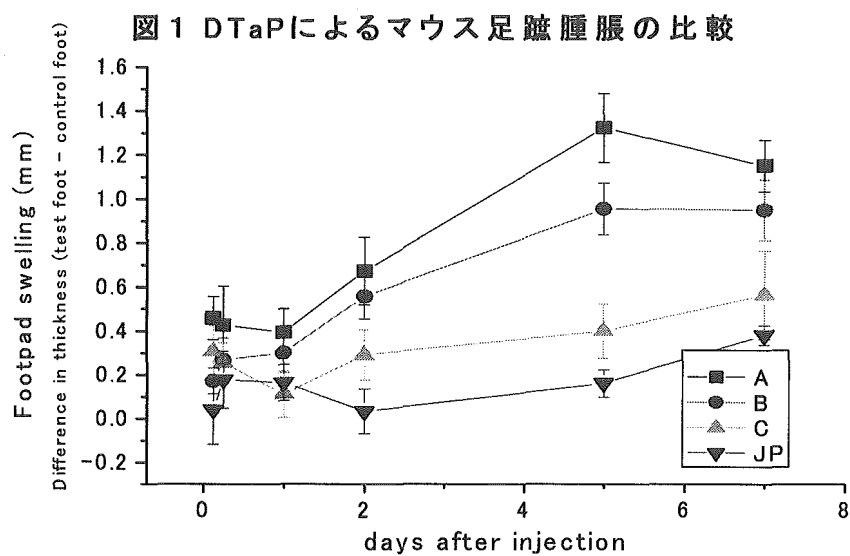


図 2. DTaP ワクチン： 海外 A、B、C および国産 (JP) : マウス足蹠 5 日目

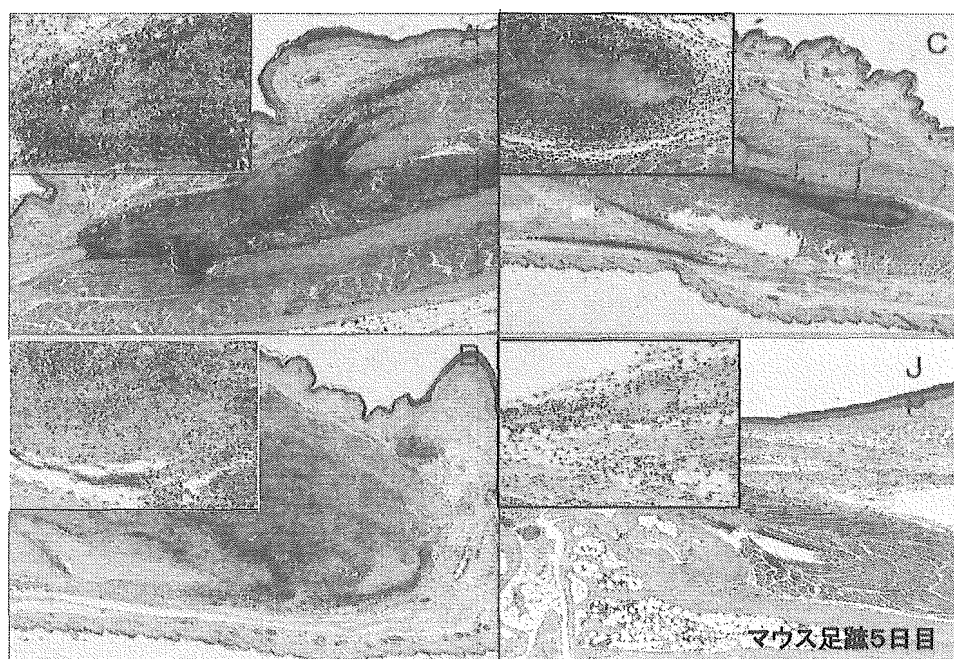


図3. DTaP ワクチン： 海外 A、B、C および国産 (JP)：ウサギ皮膚 21 日目

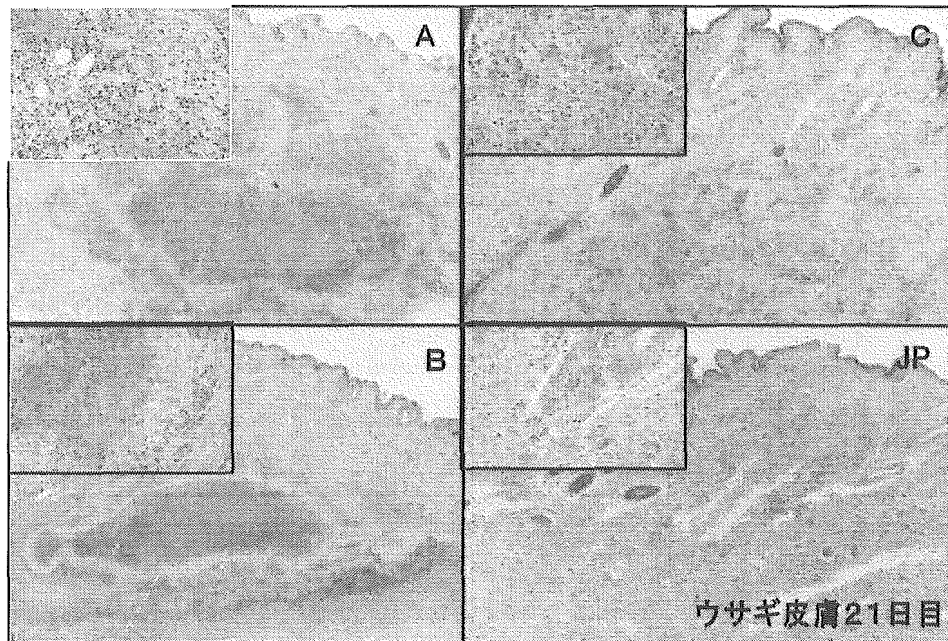


表2. Hib ワクチンのエンドトキシン含量

Hib vaccine Batch	LAL activity (EU/ml)			Recovery percent of spiked endotoxin ¹⁾
	Mean	95% confidence interval		
A	328.5	278.3	— 386.9	103.4
B	347.3	275.1	— 440.7	104.9
C	158.5	124.8	— 200.2	97.1
D	45.1	35.6	— 56.9	94.3
E	27.9	21.8	— 35.3	91.3

¹⁾: Japanese reference standard endotoxin was spiked to each Hib vaccine batch.