

200401198A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

混合ワクチンの品質確保に関する研究

平成16年度総括・分担研究報告書

主任研究者 宮村 達男

平成17(2005)年 4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 | ----- 5 |
| 2. 健常者血清中の <i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib) 莢膜多糖 (PRP) 特異的抗体価に関する検討 | |
| 新谷 三春 | ----- 9 |
| 3. 海外混合ワクチンの力価と安全性の検討 | |
| 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. In vivo ラット力価試験に及ぼす雌雄、および 2-phenoxyethanol の影響 | |
| 武田 直和 | ----- 21 |
| 6. 不活化ポリオワクチン力価試験の検討 | |
| 堀内 善信、武田直和 | ----- 23 |
| III. 協力研究報告書 | |
| 7. 国内 IPV 参照品 (候補) の作製 | |
| 清水 文七 | ----- 26 |
| 8. 混合ワクチンの品質確保に関する研究 | |
| 駒瀬 勝啓 | ----- 36 |
| 9. 混合ワクチンの品質確保に関する研究 | |
| 大隈 邦夫 | ----- 38 |
| 10. 混合ワクチンの品質確保に関する研究 | |
| 末原 章宏 | ----- 42 |
| 11. sIPVを用いたDPT-IPV試作品の性状解析に関する研究 | |
| 東 雍 | ----- 45 |
| 12. 混合ワクチンの品質確保に関する研究 | |
| 佐藤 征也 | ----- 48 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧 | ----- 50 |
| IV. 研究成果の刊行物・別冊 | ----- 51 |

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）
総括研究報告書

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 の力価試験用参照品の D 抗原量が、I 型、II 型、III 型それぞれ 3 : 100 : 100 (Du/dose) とすることが決定された。また、ラット免疫原性試験法の骨子も決定された。sIPV は各種試験の規格値を満たしており、WHO 参照品に匹敵する国内 IPV 参照品（候補）として十分期待できるものと考えられた。sIPV は 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、その力価が上昇することが示された。DPT-sIPV の力価は、10℃以下の保存条件で1年間は安定であった。力価試験の解析法に関しては、当面ラットでの IPV 力価試験結果は、Probit 分析による確認および信頼区間等の評価の信頼性には問題があること前提に、分散の一要請を無視した平行線定量法の適用を図ってみることが考えられた。

分担研究者
多屋 馨子 国立感染症研究所
新谷 三春 同上
高橋元秀 同上
堀内善信 同上
武田 直和 同上

倉田 毅 同上
李 天成 同上
白土 東子 同上

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 同上
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 同上
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 同上
荒木 和子 同上
羽生 隆 同上
北元 理恵 同上
岡部 信彦 同上
岩城 正昭 同上
福田 靖国 同上
小宮 貴子 同上
山本 明彦 同上
蒲地 一成 同上
落合 雅樹 同上
片岡 紀代 同上
豊泉 裕美 同上
永田 典代 同上
原嶋 綾子 同上

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。本研究では 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成を目的とした。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. 百日咳、ジフテリア、破傷風感受性調査
感染症流行予測調査事業で実施されている、百日咳、ジフテリア、破傷風感受性調査の結果を解析し、年齢別抗体保有率、年齢別ワクチン接種率、接種歴別抗体保有率を調査した。原則として2003年7~9月に、8都府県の衛生研究所で百日咳1,417名、ジフテリア1,447名、破傷風1,448名について、百日咳は抗PTならびに抗FHA-ELISA抗体価、ジフテリア・破傷風は抗毒素抗体価が測定された。ワクチン接種歴は問診により調査された。
2. DTP力価試験および安全性試験
ジフテリア、破傷風トキソイド及び百日せきワクチンの力価は国内生物学的製剤基準の試験法に準拠して実施した。また、百日せきワクチンのマウス体重減少試験、マウス白血球数増加試験、マウスヒスタミン増感試験についても国内生物製剤基準に準じて実施した。局所刺激反応については、マウス足蹠の片足にワクチン、もう一方に生理食塩水を各50 μ lずつ接種し、経日的に対照足との肥厚の差を計測した。またウサギ背部皮内にワクチン0.1mlを投与し、経日的に腫脹径を測定し、接種後3週間まで接種局所を観察した。
3. 国内IPV参照品(候補)の作製と品質管理試験
1、2、3型をそれぞれ3, 100, 100 Du/0.5mL含むTIPV#04C(2-PE添加)(Lot 2)を国内IPV参照品の候補として調製し、免疫原生試験および各種規格試験に用いた。
4. IPV-DTPワクチンの調製
各社ごとに試作品を調製した。
5. ポリオウイルス免疫原性試験法
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中和抗体価の測定を行った。
6. ポリオウイルス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。

(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。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た。

C. 研究結果

1. 百日咳、ジフテリア、破傷風感受性調査
年齢群別ワクチン接種率は、不明であった682名と、接種回数が不明であった57名を除いた678名で検討した結果、0歳30.4%、1-4歳92.3%、5-9歳93.4%、10-19歳92.9%、20-29歳77.3%、30-39歳64.3%、40-49歳23.1%、50歳以上0%であった。0歳児のDTPワクチン接種率は30.4%と低く、百日咳、ジフテリア抗体保有率は30%台と低値であった。
2. DTPの力価および安全性
ジフテリアトキソイドの力価は、国内製剤とほぼ同様の値であったが、破傷風トキソイドおよび百日せきワクチンの力価は国内製剤より有意に高いものがあった。また、百日せきワクチンの安全性試験においては、マウス体重減少試験の結果は、国内製剤に比べて高い傾向であったが、マウス白血球数増加試験・マウスヒスタミン増感試験の成績は、おおむね国内製剤と同様の成績であった。
3. IPV追加による百日せきワクチン毒性試験への影響
マウス白血球数増加試験およびマウスヒスタミン増感試験においてはDTaPワクチンと同等の結果を示した。マウス体重減少試験において海外製品に強い活性が見られたので局所刺激反応について観察したところ、IPV追加による影響は見られなかったが、海外製品において強い腫脹が見られた。
4. 国内IPV参照品候補、TIPV #04C (Lot 2)

の性状と規格

全ての試験において規格値を満たしていた。更に、別途調製した TIPV#04C (Lot 1) との間で免疫原性に有意な違いは見られなかった。WHO 参照品及び外国製 IPV の免疫原性をプロビット法で比較したところ、どの型においても有意な差は見られなかった。

5. 試作ワクチンの力価、安定性

10℃以下の保存条件での1年間の安定性を検討した。6種類のうちから選択した2つの混合ワクチンの力価は、上記の保存条件で1年間は安定であった。

IPV 国内参照品候補と同量の IPV 抗原を含む DPT-IPV は、DPT の生物学的製剤基準の試験にすべて適合した。また、IPV 力価試験においては、国内参照品候補と比較して同等以上の力価を示した。他からも同様の報告があった。

6. 免疫原性試験の検討

IPV を2回免疫することによって、マウスでもラットと類似の中和抗体価がえられた。試作 DTP-IPV において、1型は3週目以降も IPV に対して有意に中和抗体価が上昇した。IPV 参照品のカットオフ値を 2^2 とした場合、1型および2型で用量反応性が認められなかった。

7. 力価試験解析法の検討

抗体価実測値あるいは最尤推定による分布補正值を用いた平行線定量法および Cut-off 値による離散量変換した抗体価による Probit 分析について予備的な比較検討を行った。その結果、Probit 分析では全施設共通より少なくとも施設毎の Cut-off 値を用いた方が分析結果の再現性が高くなる可能性があること、Probit 法の結果との照合による確認を前提として平行線定量法の適用が可能であることが明らかとなった。

考察

DTP ワクチンの0歳児の抗体保有率が百日咳、ジフテリアで30%台と低く、百日咳の患者報告の内、最も多いのが0歳児であることを考慮すると、生後3か月以降早期に DTP ワクチンを接種して百日咳に対する免疫を獲得しておくことが望まれる。また、小児期に受けた DTP ワクチン、DT トキソイド、DP ワクチンの効果により、20代までは抗体保有率が高く維持され、現行のワクチンの有用性が示された。

国内 DTaP-IPV 試作ワクチンに顕著な毒性は見られなかった。一方、海外製品においては、マウス体重減少試験において強い活性が見られ、局所刺激反応においても顕著に高い活性が見られた。接種回数、接種経路、接種計画が海外と異なる日本では、個々のワクチン成分について精度の高い品質試験法で試験し、さらに十分な臨床試験成績を分析した科学的根拠を明らかにすることが必要である。

今年度に入り、研究班において、懸案事項であった sIPV の力価試験用参照品の D 抗原量が、I 型、II 型、III 型それぞれ 3 : 100 : 100 (Du/dose) とすることが決まった。また、ラット免疫原性試験法の骨子も決定した。国内 sIPV 参照品 (候補) は各種試験の規格値を満たしており、高い品質を保持していることも示された。WHO 参照品に匹敵する国内 IPV 参照品 (候補) として十分期待できるものと考えられた。

DPT-IPV は、I 型、II 型、III 型のいずれも国内参照品候補と同等以上の力価があり、いずれの型も相対力価が2前後と混合前より上昇しており、これは DPT 中に含まれるアルミニウムゲルのアジュバント効果によるものと推察された。

中和抗体価を用いた平行線定量法による解析も行ったが、その結果はプロビット法で解析した場合とほぼ同等の相対力価が算出された。解析法として平行線定量法も採用可能であることが示唆された。解析法に関しては同様な結果が他からも報告されたが、さらに検討が必要である。

免疫原性試験の検討から、マウスの使用も可能であること、相対力価を算出する場合、免疫期間の検討も必要であること、プロビット解析を適用するには、カットオフ値または免疫希釈の見直しが必要である、という結果も得られているが今後の検討課題としたい。

D. 結論

- ・ 小児期に接種を受けたワクチンの免疫は成人になっても維持されていたが、0歳児の百日咳、40歳以上の破傷風対策が必要である。
- ・ 海外の DTaP 及び DTaP-IPV ワクチンについてジフテリア、破傷風、百日せきの力価および百日せきワクチンの毒性について

て試験した結果、マウス体重減少試験以外は大きな違いは認められなかった。

- ポリオ研製 IPV 追加による百日せきワクチン毒性試験への影響は見られなかったが、海外製品には局所刺激作用が見られた。海外からの輸入品に対しては臨床試験成績の分析を十分に行う必要がある。
- IPV のラット力価試験では全ての型に対してメスの感受性が高かった。2-PE の力価への影響はみられなかった。
- 国内 IPV 参照品（候補）は、WHO 参照品や外国製 IPV に匹敵する免疫原性を保持していた。
- DPT の生物学的製剤基準をベースに IPV の品質試験を上乗せすることで、DPT-IPV の生物学的製剤基準（案）を作成するこ

とが可能と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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 0歳児のDPTワクチン接種率は30.4%と低く、百日咳、ジフテリア抗体保有率は30%台と低値であった。百日咳の患者報告の内、最も多いのが0歳児であることを考慮すると、生後3か月以降早期にDPTワクチンを接種して百日咳に対する免疫を獲得しておくことが望まれる。百日咳の抗体保有率が年齢と共に減少しないのは、年長児、成人層で百日咳菌の曝露を受けているために、抗体が維持されていることが示唆される。年長児、成人の軽症百日咳が乳児への感染源となることが報告されているため、その対策も重要である。一方、40代以上の者では小児期にDPTワクチンを接種していないため、破傷風の抗体保有率は4%台と著明に低値であった。破傷風の患者報告はほとんどが40歳以上であることを考慮すると、成人層での破傷風トキソイドの必要性が示唆される。これら3つの抗体保有率を総合的に考えると、小児期に受けたDPTワクチン、DTトキソイド、DPワクチンにより、20年以上は抗体が維持され、現行のワクチンの有用性が示された。DPT-IPV混合ワクチンが導入されても、現在の高い免疫保有率を維持できるような品質管理が望まれる。

研究協力者：佐藤 弘¹、新井 智¹、荒木和子¹、丹生隆、北本理恵、岡部信彦¹、流行予測調査事業グループ³

(1 国立感染症研究所感染症情報センター、2 厚生労働省、山形、茨城、東京、福井、大阪、愛媛、福岡、宮崎の各都府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DPTワクチンはメーカーによって百日咳成分に若干の違いはあるものの、品質や抗体反応については良好に保たれており、わが国の感染症対策に多大な貢献がなされている。一方、現在40歳以上の年齢群においては、小児期に定期接種としてDPTワクチンを受けていない者が多く、抗体保有率については十分な情報が得られていなかった。本研究班ではOPVワクチン→IPVワクチンへの円滑な移行のためには、DPTワクチンとIPVワクチン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、百日咳、ジフテリア、破傷風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、百日咳、ジフテリア、破傷風感受性調査の結果を解析し、年齢別抗体保有率、年齢別ワクチン接種率、接種歴別抗体保有率を調査した。原則として2003年7～9月に、8都府県の衛生研究所で百日咳1,417名(0歳28名、1-4歳223名、5-9歳231名、10-19歳261名、20-29歳168名、30-39歳179名、40-49歳143名、50歳以上184名)、ジフテリア1,447名(0歳31名、1-4歳232名、5-9歳238名、10-19歳276名、20-29歳168名、30-39歳179名、40-49歳142名、50歳以上181名)、破傷風1,448名(0歳31名、1-4歳232名、5-9歳237名、10-19歳274名、20-29歳168名、30-39歳179名、40-49歳143名、50歳以上184名)について、百日咳は抗PTならびに抗FHA-ELISA抗体価、ジフテリア・破傷風は抗毒素抗体価が測定された。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

年齢群別ワクチン接種率（2回以上接種歴がある者を接種歴有りとしたため、1回だけの接種者は接種歴ありに算定していない。また、ワクチンの種類は、DPT ワクチンあるいはDP ワクチン接種者である。）は、不明であった682名と、接種回数が不明であった57名を除いた678名で検討した結果、0歳30.4%、1-4歳92.3%、5-9歳93.4%、10-19歳92.9%、20-29歳77.3%、30-39歳64.3%、40-49歳23.1%、50歳以上0%であった。

百日咳（抗PTおよび抗FHA）、ジフテリア、破傷風に対する年齢群別抗体保有率と、幾何平均抗体価は表1,2に示すとおりである。百日咳は感染発症防御に必要とされる10EU/ml以上、ジフテリア、破傷風は同様の理由で0.1IU/ml以上を陽性として検討した。

D 考察

0歳児の抗体保有率が百日咳、ジフテリアで30%台と低く、百日咳の患者報告の内、最も多いのが0歳児であることを考慮すると、生後3か月以降早期にDPTワクチンを接種して百日咳に対する免疫を獲得しておくことが望まれる。一方、40代以上の者では小児期にDPTワクチンを接種していないため、破傷風の抗体保有率は4%台と著明に低値であった。それに比して、百日咳の抗体保有率が年齢と共に減少しないのは、年長児、成人層で百日咳菌の曝露を受けていることが示唆される。

また、小児期に受けたDPTワクチン、DTトキソイド、DPワクチンの効果により、20代までは抗体保有率が高く維持され、現行のワクチンの有用性が示された。DPT-IPV混合ワクチンが導入

されても、現在の高い免疫保有率を維持できるような品質管理が望まれる。

E 結論

小児期に接種を受けたワクチンの免疫は成人になっても維持されていることが判明し、現行のワクチンの有用性が示された。一方、0歳児の百日咳、40歳以上の破傷風対策が必要であると考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) 森伸生, 多屋馨子, 砂川富正, 谷口清州, 石田久美子, 岡部信彦. 中学校での麻疹集団発生における疫学調査と対策. 日本小児科学会雑誌. 平成16年(2004); 108: 615-619.
 - 2) 鈴木里和, 砂川富正, 大山卓昭, 多屋馨子, 谷口清州, 岡部信彦. インフルエンザ相談ホットラインに基づくインフルエンザの情報提供に関する検討. 感染症学雑誌. 平成16年(2004); 78: 99-107.
 - 3) 多屋馨子. インフルエンザワクチン接種の必要性と動向. 内科. 平成16年(2004); 93: 142-148.
 - 4) 多屋馨子. 小児保健 抗体保有状況からみたインフルエンザ流行予測. 小児科. 平成15年(2003); 44: 1982-1990.
 - 5) 多屋馨子. 緊急寄稿 医療関係者に対する予防接種. 総合臨床. 平成16年(2004); 53: 1886-1890.
 - 6) 多屋馨子. 予防接種の現状と問題点 定期接種 副反応. 小児看護. 平成16年(2004); 27: 1609-1615.
- ### 2. 学会発表
- 1) Keiko Tanaka-Taya, Nobuhiko Okabe. Measles epidemiology in Japan. 国際麻疹フォーラム. (東京) 平成16年(2004)1月.
 - 2) 多屋馨子. シンポジウム: ワクチンに関する

最近の話題 予防接種の最新情報と vaccine preventable disease の国内発生状況 第 16 回臨床ウイルス学会. (大阪) 平成 16 年 (2004) 6 月.

3) 多屋馨子. シンポジウム: 最近の麻疹の流行とワクチン接種の問題点 第 31 回日本小児臨床薬理学会. (静岡) . 平成 16 年 (2004) 9 月.

4) Keiko Tanaka-Taya, Nobuhiko Okabe. Action plans to control measles and the future problems in Japan. 4th World congress on vaccines and immunization. (つくば) . 平成 16 年 (2004) 9 月

5) 多屋馨子, 新井 智 佐藤

弘 荒木和子, 岡部信彦, 担当都道府県ならびに都道府県轄研究所感染症. 流行予測調査事業より

得られた近年の年齢別麻疹, 風疹, MMR ワクチン接種状況 第 8 回日本ワクチン学会. (札幌) 平成 16 年 (2004) 10 月.

6) 多屋馨子. 最近の感染症の実態とその予防ワクチン. 第 51 回日本小児保健学会. (盛岡). 平成 16 年 (2004) 10 月.

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 年齢群別百日咳、ジフテリア、破傷風抗体保有率 (50.0%未満太字)

| 年齢 (歳) | 百日咳抗 PT 抗体保有率 (%) (10EU/ml 以上) | 百日咳抗FHA抗体保有率 (%) (10EU/ml 以上) | ジフテリア抗体保有率 (%) (0.1IU/ml 以上) | 破傷風抗体保有率 (%) (0.1IU/ml 以上) |
|--------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 0 | 39.3 | 39.3 | 35.5 | 58.1 |
| 1-4 | 62.3 | 77.6 | 80.2 | 92.2 |
| 5-9 | 46.8 | 76.6 | 68.9 | 86.1 |
| 10-19 | 55.9 | 88.5 | 66.7 | 84.3 |
| 20-29 | 46.4 | 73.2 | 60.7 | 78.0 |
| 30-39 | 44.7 | 54.2 | 55.3 | 41.9 |
| 40-49 | 36.4 | 60.1 | 31.7 | 4.2 |
| 50- | 49.5 | 79.3 | 17.1 | 4.3 |
| 計 | 49.8 | 73.7 | 56.8 | 61.3 |

表 2 年齢群別百日咳、ジフテリア、破傷風幾何平均抗体価

| 年齢 (歳) | 百日咳抗 PT 幾何平均抗体価 (EU/ml) | 百日咳抗FHA幾何平均抗体価 (EU/ml) | ジフテリア抗毒素幾何平均抗体価 (IU/ml) | 破傷風抗毒素幾何平均抗体価 (IU/ml) |
|--------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 0 | 14.2 | 12.6 | 0.280 | 0.398 |
| 1-4 | 19.1 | 28.7 | 0.609 | 1.271 |
| 5-9 | 11.9 | 25.3 | 0.324 | 0.687 |
| 10-19 | 14.8 | 38.7 | 0.253 | 0.587 |
| 20-29 | 10.3 | 21.7 | 0.214 | 0.529 |
| 30-39 | 9.2 | 10.4 | 0.166 | 0.220 |

| | | | | |
|-------|------|------|-------|-------|
| 40-49 | 7.5 | 13.2 | 0.120 | 0.035 |
| 50- | 11.3 | 21.1 | 0.068 | 0.061 |
| 計 | 12.1 | 22.2 | 0.246 | 0.522 |

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

健康者血清中の *Haemophilus influenzae* type b (Hib) 莢膜多糖 (PRP) 特異的抗体価に関する検討

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の病原因子であり防御抗原でありワクチン抗原である b 型莢膜多糖 (PRP) に対する血清抗体価について検討した。11～69 歳の健康な男性 41 名から採取された血清について ELISA により抗 PRP IgG の濃度を測定したところ、殆どの人において自然免疫における protective level とされる 0.15 $\mu\text{g/ml}$ より高く、78% の人においてはワクチンによる免疫での protective level とされる 1 $\mu\text{g/ml}$ より高かった。60 代で他の年齢層に比べ抗体価がやや低い傾向が見られた。ワクチン未接種の集団における 10 代以上の年齢層の自然免疫を反映していると考えられる。感受性のある低年齢層についても調べる必要がある。

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原菌である。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 が胸腺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 にキャリアー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

傷風混合ワクチンと重なるためもあって国外では混合ワクチン (DTaP/Hib, DTaP/IPV/Hib, DTaP/IPV/HEV/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 の混合ワクチンを開発したのち 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。また外国製混合ワクチンが輸入される可能性もある。開発過程でも認可後でもワクチンの免疫原性を試験することは必須であり、その測定法の開発・改良も不可欠である。今年度は健康者血清について特異抗体 (抗 PRP 抗体) 価の測定を検討する。

B. 研究方法

血清： 11 歳～69 歳の健康な男性 41 名（年齢層別人数：10 代～50 代は各 7 名、60 代は 6 名）から採取された血清を用いた。

抗 PRP 抗体測定法： The Binding Site 社製 BINDAZYME™ Human Anti Haemophilus influenzae Enzyme Immunoassay Kit を製造者の指示に従って用いた。インキュベーションの温度管理（20-24℃）のために低温孵卵器を用いた。血清はキット添付の希釈液で 100 倍希釈した。キット添付の Calibrator も含めすべての検体は 2 重に測定した。Calibrator は FDA の米国内参照血清（Lot 1983）に対して校正してあり、その吸光度から検量線を作成して検体血清中の抗 PRP IgG 濃度を算出した。

（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」など諸規程を遵守した。

C. 研究結果

11 歳～69 歳の 41 名の血清抗 PRP IgG レベルの分布を図 1 に示した。自然免疫での protective level とされる 0.15 $\mu\text{g/ml}$ より低かったのは 60 代の 1 名のみで他はすべて 0.15 $\mu\text{g/ml}$ より高かった。32 名（78%）においてワクチンによる免疫での protective level とされる 1 $\mu\text{g/ml}$ より高かった。

年齢層別の抗体価の分布を図 2 に示した。例数が少ないのではっきりしたことは言えないが若年～中年層に比べ老年層では抗体価が低い傾向があった。

D. 考察

日本においてはまだ Hib ワクチンは接種されていないので現時点での

自然免疫による抗体価のレベルを調べておく必要がある。また Hib ワクチン導入後にその効果を調べるために比較すべき導入前のデータが必要である。今回調べた対象者が 11 歳以上の健常者であることから予想されるように大半の人は protective level より高い抗体価を持っていた。本来ワクチン接種対象となる低年齢層についても調べる必要がある。国内では ELISA 抗体価に関する報告は殆どないが、7 ヶ月～4 歳の Hib 侵襲性感染症患者 10 例において同じキットを用いて抗 PRP 抗体価を測定したところ急性期で 70%の症例で 0.15 $\mu\text{g/ml}$ より低く、また全例で回復期にかけて抗体価が上昇したことが報告されている。

抗 PRP 抗体価の測定に ELISA 法を応用するには多くの問題がある。PRP は多糖であり非常に親水性であるため、疎水性表面を持つ ELISA 用ポリスチレンプレートに吸着されにくい。そのためプレートを poly-L-lysine で coat したのち PRP を固相化したり、avidin で coat したプレートに biotin 化した PRP を固相化するなどの工夫がされたが、多くは background が高くなるなど不満足なものであった。中では PRP に tyramine を結合させたのち固相化する方法が background が低く特異性も高いので実用化に耐え、我々の研究室を含め現在も使われている（前年度本分担研究）。しかしながらこれらの抗原は自製しなければならず、一般的なラボでは抗 PRP 抗体価の測定はなお困難である。

今回用いた製品では Hib の莢膜多糖のオリゴマー（20～30 units）にヒト血清アルブミン（HSA）をコンジュゲートさせたものを固相化しているのでヒト血清が検体であればキャリ

ア一部分への反応は起こらない。抗原や固相化プレートの作成過程で混入する可能性のあるエンドトキシンは background を高めるので極力低減させるよう注意が必要である。

E. 結論

市販 ELISA キットを用いて 11 歳～69 歳の健康な男性の血清抗 PRP 抗体価を測定したところ殆どが 0.15 $\mu\text{g/ml}$ より高く、8 割近くは 1 $\mu\text{g/ml}$ より高く、protective level より上であった。さらに低年齢層についても調べ

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
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)
なし

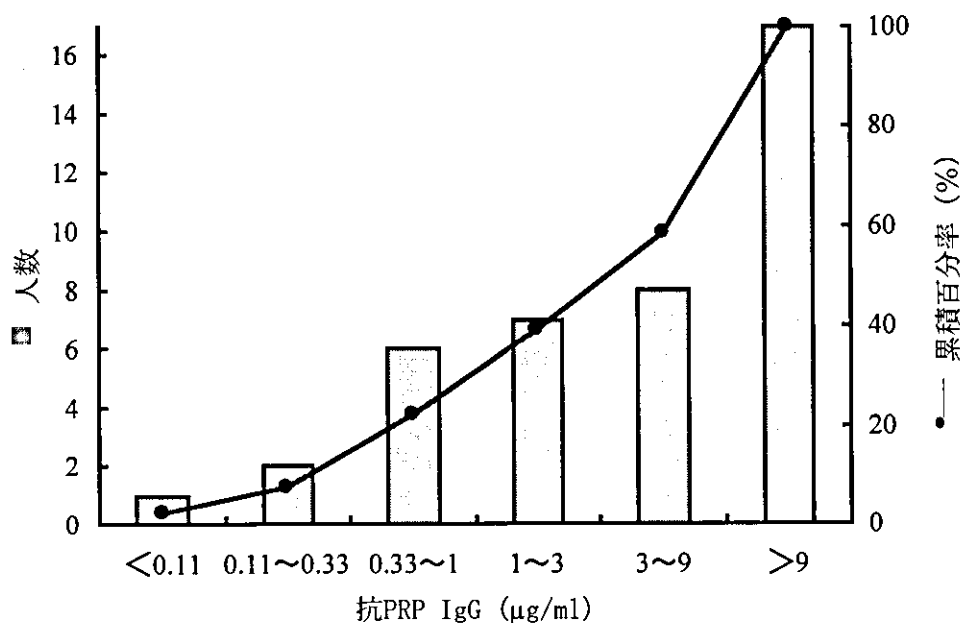


図 1: 血清抗 PRP IgG レベル別の人数の分布

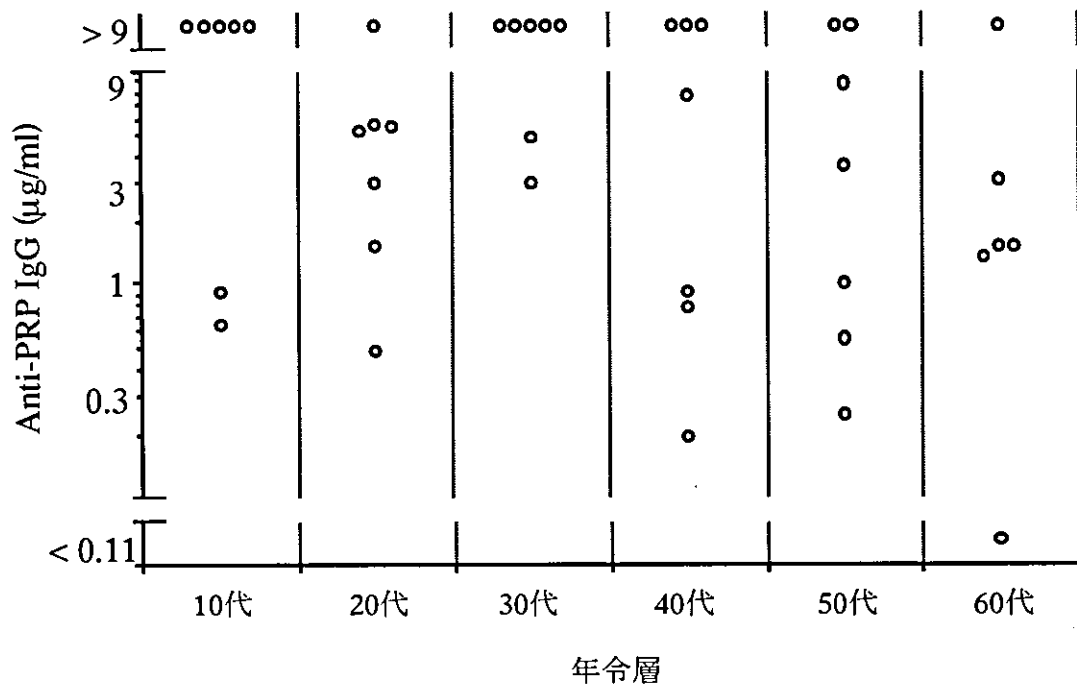


図 2. 年齢層別の抗体価の分布

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」

－海外混合ワクチンの力価と安全性の検討－

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、小宮貴子、福田 靖（第三室）

堀内善信、山本明彦、蒲地一成、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美（第五室）

研究要旨：不活化ポリオワクチン混合沈降精製百日せきジフテリア破傷風ワクチン（DTaP-IPV）の実用化が国内では急務である。国内製造所の開発に伴い、輸入した海外 DTaP-IPV 中のジフテリア、破傷風トキソイドおよび百日せきワクチンの力価試験と百日せきワクチン成分の毒性試験を実施した。その結果、ジフテリアトキソイドの力価は、国内製剤とほぼ同様の値であったが、破傷風トキソイドおよび百日せきワクチンの力価は国内製剤より有意に高いものがあった。また、百日せきワクチンの安全性試験においては、マウス体重減少試験の結果は、国内製剤に比べて高い傾向であったが、マウス白血球数増加試験・マウスヒスタミン増感試験の成績は、おおむね国内製剤と同様の成績であった。

A. 研究目的

国内の不活化ポリオワクチン（IPV）は単独ワクチンとして臨床試験が実施されており、今後、沈降精製百日せきジフテリア破傷風ワクチン（DTaP）と混合した製剤（DTaP-IPV）が、国内 DTaP 製造 5 社によって開発予定である。一方、海外では複数の製造所により DTaP に IPV、B 型インフルエンザ菌ワクチン（Hib）または B 型肝炎ウイルスワクチン（HepB）を混合した製剤が市販されている。国内で開発されるワクチンの品質を確認・評価する上でも海外の混合ワクチン中に含まれるジフテリア、破傷風トキソイドおよび百日

せきワクチンの力価や安全性を知ることが必要である。

B. 研究方法

海外で市販されている DTaP、DTaP-IPV ワクチン製剤のうち輸入可能なものについて、ジフテリア、破傷風トキソイド及び百日せきワクチンの力価を国内生物学的製剤基準の試験法に準拠して実施した。また、百日せきワクチンのマウス体重減少試験、マウス白血球数増加試験、マウスヒスタミン増感試験についても国内生物製剤基準に準じて実施し、その成績を過去 5 年間（1999～2003 年度）における

国内製剤 5 社 (DTaP) の平均と比較した。

C. 研究結果

1. 海外 DTaP 中のジフテリア、破傷風トキソイドおよび百日せきワクチンの力価試験 (表 1)

海外の DTaP または DTaP-IPV の破傷風トキソイドの力価は、373、275 および 645 U/mL と国内製剤の平均値である 149 U/mL に比べて 2~4 倍程度高い傾向にあった。ジフテリアトキソイドの力価は、81、66 および 80 U/mL と国内製剤の平均値である 119 U/mL とほぼ同様の値であった。百日せきワクチンの力価は、57 と 117 U/mL で国内製剤の平均値である 27.1 U/mL より 2~5 倍程度高い値を示した。

2. 百日せきワクチン毒性試験 (表 1)

百日せきワクチンの毒性試験は、海外 2 社の DTaP 及び DTaP-IPV ワクチンについて、マウス体重減少試験 (BWD)、マウス白血球数増加試験 (LP)、マウスヒスタミン増感試験 (HS) を行ったところ、B 社の DTaP+IPV については BWD が 480、LP が 0.22、HS が 0.21 U/mL と他の製剤に比べて高い値であった。従って、BWD に関しては国内基準を満たしていないものがあったが、LP と HS に関しては、いずれの製剤でも国内基準の合格範囲内であった。

D. 考察

試験した海外ワクチンについては、国内で製造している 5 社の両トキソイドの力価と比較して、DTaP に IPV を混合することによるジフテリア・破傷風トキソイド及び百日せきの力価に及ぼす影響は少

ないと考えられた。しかし、百日せきワクチンの毒性試験では、マウス体重減少試験成績は、国内製剤に比べて高い値を示した。特に B 社においては、DTaP より DTaP-IPV というように多価になるにつれ、マウス体重減少活性が強くなる傾向が見られたことは、IPV の製法または DTaP との最終製剤調製による影響か、今後の検討課題である。

また、海外では DTaP 関連の混合ワクチンの乳幼児への接種経路は、筋肉内接種であり、我が国の皮下接種とは異なる。海外での接種実績が多数あっても、接種回数、経路が国内外のワクチン接種計画が海外と異なる日本では、個々のワクチン成分について精度の高い品質試験法で試験し、さらに十分な臨床試験成績を分析した科学的根拠を明らかにすることが必要である。

E. 結論

今回、輸入が可能であった DTaP 及び DTaP-IPV ワクチンについて国内生物学的製剤基準に準拠した動物試験として、ジフテリア、破傷風、百日せきの力価および百日せきワクチンの毒性について試験した結果、マウス体重減少試験以外は大きな違いは認められなかった。

F. 健康危険情報

海外で市販されている混合型 DPT 関連ワクチンにおいて DPT ワクチン成分以外である IPV、Hib ワクチンおよびアジュバントは、DPT の個々の成分の免疫原性に対して影響を与えることが知られている。特に、破傷風トキソイドをキャリアー蛋

白としている Hib ワクチンは、それだけで高い破傷風抗毒素の誘導能を有する。また IPV の混合ではジフテリアトキソイドの効果を抑制することも報告されている。海外ワクチンの導入または現在国内で使用されていない剤型の導入にあっては、中長期的な副反応調査と解析が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tadashi Fukuda, Masaaki Iwaki, Takako Komiya, Yoshichika Arakawa and Motohide Takahashi. Attempt to curtail the observation periods of mice in the tetanus vaccine potency tests. Japanese Journal of Infectious Diseases 57, 257-259, 2004

(2) M. Isaka, T. Komiya, M. Takahashi, Y. Yasuda, T. Taniguchi, Y. Zhao, K. Matano, H. Matsui, J. Maeyama, K. Morokuma, K. Ohkuma, N. Goto and K. Tochikubo: Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with Diphtheria- pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine. Vaccine 22, 3061-3068, 2004

(3) Nilay Coplu, Berrin Esen, Aysegul Gozalan, Kikuko Miyamura, Iwao Yoshida, Demet Kurtoglu, Nuvide Ozturk Dogan, Gokhan Afacan, Ahmet Unal, Setsuji Ishida and Motohide Takahashi Tetanus: Antibody Assay Combining In-House

ELISA and Particle Agglutination Test and Its Serosurvey Application in a Province in Turkey. Japanese Journal of Infectious Diseases Vol. 57 No. 3, 2004

2. 学会発表

(1) 高橋元秀、岩城正昭、福田 靖、小宮貴子、新谷三春、荒川宜親、佐々木次雄：Hib ワクチンにキャリアーとして含まれる破傷風トキソイドの免疫原性、第 77 回日本細菌学会総会 平成 16 年 4 月 大阪

(2) 片岡紀代、山本明彦、永田典代、後藤紀久、加藤博史、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、高橋元秀、荒川宜親、倉田毅、堀内善信：国内外沈降精製 DPT ワクチンの比較と検討 第 77 回日本細菌学会総会 平成 16 年 4 月 大阪

(3) 岩城正昭、三枝智美、高橋元秀：マウスを用いたジフテリア菌感染実験系の検討 第 77 回日本細菌学会総会 平成 16 年 4 月 大阪

(4) 岩城正昭、福田靖、小宮貴子、荒川宜親、高橋元秀：抗破傷風人免疫グロブリン製剤の現状、第 8 回日本ワクチン学会 平成 16 年 10 月 札幌市

(5) 福田靖、小宮貴子、岩城正昭、益見厚子、末原章宏、多田善一、長井正昭、坂口孝廣、小幡朗、荒川宜親、高橋元秀：ジフテリア及び破傷風トキソイドにおけるトキソイド抗原とたん白含量の測定に関する感染研と国内製造所による比較検討について、第 8 回日本ワクチン学会 平成 16 年 10 月 札幌市

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） なし
 特許取得 その他
 なし なし

実用新案登録

表1. 海外DTaP、DTaP-IPVと日本DTaP（5社平均）の力価、毒性試験成績

| Manufacture | Products | Potency Test | | | Pertussis toxicity Test | | | |
|---|----------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | | Tetanus U/mL (C.I.) | Diphtheria U/mL (C.I.) | Pertussis U/mL (C.I.) | BWD test BWDU/mL (C.I.) | LP test LPU/mL (C.I.) | HS test (4°C) HSU/mL (C.I.) | HS test (37°C) HSU/mL (C.I.) |
| A | DTaP+IPV | 373 (214 - 647) | 81 (59 - 112) | 57 (31 - 110) | 13 (3 - 43) | 0.06 (0.01 - 0.16) | 0.04 (0.02 - 0.09) | 0.08 (0.04 - 0.17) |
| B | DTaP | 275 (207 - 398) | 66 (49 - 88) | 117 (55 - 323) | 43 (13 - 178) | 0.09 (0.03 - 0.18) | 0.08 (0.03 - 0.21) | 0.10 (0.04 - 0.25) |
| B | DTaP+IPV | 645 (388 - 1275) | 80 (58 - 110) | N.D | 480 (90 - 194021) | 0.22 (0.10 - 0.40) | 0.21 (0.09 - 0.39) | 0.23 (0.10 - 0.45) |
| Japanese DTaP vaccines (1999 ~ 2003) | | 149 | 119 | 27.1 | 8.41 | 0.11 | 0.13 | 0.15 |
| Japanese Minimum Requirements | | ≥27 | ≥47 | ≥8 | ≤10 | ≤0.5 | ≤0.4 | ≤0.4 |

厚生労働科学研究費補助金(医薬品医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業)

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

研究協力者 山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡 紀代、豊泉裕美 (第五室)

永田典代、原嶋綾子、倉田毅 (感染病理部)

研究要旨: 不活化ポリオワクチン混合沈降精製百日せきジフテリア破傷風ワクチン(DTaP-IPV)の実用化に向け、現在試作段階のDTaP-IPVワクチンについてIPV追加による百日せきワクチン毒性試験への影響を検討した。また、海外製DTaP-IPVワクチンについても、同様の試験を行った。その結果、マウス体重減少試験において海外製品に強い活性が見られたので局所刺激反応について観察したところ、IPV追加による影響は見られなかったが、海外製品において強い腫脹が見られた。

A. 研究目的

国内において不活化ポリオ沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン(DTaP-IPV)は現在試作段階であるが、今回DTaP製造5社のDTaP-IPV試作ワクチンを用いて、IPVを追加したことによる百日せきワクチン毒性試験への影響を検討した。また、海外製DTaP-IPVワクチンについても、比較・検討を行った。

B. 研究方法

国産DTaP-IPV試作ワクチン及び海外製DTaP,DTaP-IPVワクチンについて、マウス体重減少試験・マウス白血球数増加試験・マウスヒスタミン増感試験を生物製剤基準に準じて実施した。局所刺激反応については、マウス足蹠の片足にワクチン、もう一方に生理食塩水を各50 μ lずつ接種し、経日的に対照足との肥厚の差を計測した。またウサギ背部皮

内にワクチン0.1mlを投与し、経日的に腫脹径を測定し、接種後3週間まで接種局所を観察した。

C. 研究結果

1 百日せきワクチン毒性試験

今回使用した試作ワクチンは、製品化には未だ検討課題を残すものであるため、マウス体重減少試験においてやや高い活性を示すワクチンも見られたが、マウス白血球数増加試験およびマウスヒスタミン増感試験においてはDTaPワクチンと同等の結果を示した。また海外製品については、マウス体重減少試験において顕著に高い活性が見られた。(表1)

2 局所刺激反応試験

マウス足蹠による腫脹反応では、海外A社と国内A社のDTaPワクチンおよびDTaP-IPVワクチンを比較した結果、双方

とも IPV を追加したことによる影響は見られなかったが、海外製品と国内製品との間では顕著な差が見られた。(図 1) なお、国内他社の DTaP ワクチン及び DTaP-IPV 試作ワクチンともに国内 A 社と同等の結果であった。

また、ウサギ背部皮内での局所刺激作用を比較したところ、マウス足蹠腫脹反応と同様、IPV 追加による影響は見られなかったが、海外製と日本製の間には顕著な差が認められ、海外製ワクチンでは、接種 3 週間後においても強い腫脹が残存した。(図 2) 国内他社の製品では初期に若干の腫脹は見られるものの早期に消退した。また DTaP では、かつてより軽減したとはいえ、今なお臨床的に追加接種時の局所反応が問題となっている。ワクチン 0.1ml を 1 ヶ月間隔で 2 回大腿部筋肉に接種し、その 2 週後にワクチン抗原を足蹠皮下に接種することで、初回免疫時のワクチンによる局所反応への感作状態を評価するモデルを作成して報告した。このモデルで海外 A 社 DTaP-IPV および国内 A 社の DTaP-IPV 試作ワクチンについて、IPV およびトキソイド等のワクチン抗原に対する感作の有無を評価した。いずれも IPV に対する感作は認めなかったが、Dトキソイドに対しては海外製品で残存 HS 活性はみられないにも関わらず、我が国の 1984 年当時の DTaP に相当するレベルの感作能を有している可能性が示唆された。

D. 考察

今回、試作ワクチンであるが IPV が百日せきワクチン毒性試験に影響することはないと考えられた。また、マウスおよびウサギによる局所刺激反応においても、国内 DTaP、DTaP-IPV 試作ワクチンともに顕著な腫脹は見

られなかった。

一方、海外製品において DTaP、DTaP-IPV ワクチンともにマウス体重減少試験において強い活性が見られ、局所刺激反応においても顕著な腫脹が見られた。マウス・ウサギでの海外製ワクチン接種部位の病理像では、急性期における組織の強い壊死が観察され、人でも同じような現象が起こりうると考えられる。海外で局所反応がさほど問題とされないのは、接種ルートが筋肉内であることが理由の可能性もあり、我が国で皮下投与を行った場合、臨床的に問題となる可能性がある。また製造所毎に接種ルートを違えることで混乱はないか検討が必要であろう。

E. 結論

今回の実験で IPV 追加による百日せきワクチン毒性試験への影響は見られず、国内製 DTaP-IPV ワクチンの早急な製造・導入が望まれる。海外製品には局所刺激作用が見られたため、海外からの輸入には十分な臨床試験成績の分析を行い科学的根拠を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 参考文献

Yamamoto A, Nagata N, Ochiai M, Kataoka M, Toyoizumi H, Okada K, Horiuchi Y.
Enhanced sensitisation of mice with diphtheria tetanus acellular pertussis vaccine to local swelling reaction to the booster immunisation. Vaccine. 2002 Aug 19; 20 (25-26) : 3088-94.