

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特記すべきものなし

表1. 百日せきワクチン毒性試験の結果

	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	
	BWDU/ml (95%CI)	LPU/ml (95%CI)	EHSU/ml (95%CI)	LHSU/ml (95%CI)		
DTaPワクチン (1999~2003)	8.41	0.11	0.13	0.08		

DTaP-IPV試作ワクチン						
国内製						
A社	7.97 (1.53 - 21.97)	0.20 (0.11 - 0.33)	0.09 (0.05 - 0.15)	0.03 (0.01 - 0.07)		
B社	6.79 (1.20 - 18.92)	0.20 (0.11 - 0.33)	0.09 (0.05 - 0.15)	0.03 (0.01 - 0.07)		
C社	17.56 (4.89 - 49.47)	0.19 (0.10 - 0.31)	0.10 (0.06 - 0.17)	0.04 (0.02 - 0.09)		
D社	19.04 (5.46 - 54.18)	0.20 (0.10 - 0.32)	0.10 (0.06 - 0.17)	0.04 (0.02 - 0.09)		
E社	7.99 (1.54 - 22.02)	0.17 (0.09 - 0.28)	0.08 (0.04 - 0.13)	0.03 (0.01 - 0.06)		

DTaPワクチン						
A社	88.40 (27.71 - 428.95)	0.07 (0.02 - 0.19)	0.03 (0.01 - 0.07)	0.34 (0.15 - 0.65)		
B社	84.81 (26.58 - 405.51)	0.08 (0.02 - 0.19)	0.05 (0.02 - 0.11)	0.15 (0.05 - 0.32)		
海外製 DTaP-IPVワクチン						
A社	480.35 (90.16 - 194021)	0.22 (0.10 - 0.40)	0.21 (0.09 - 0.39)	0.12 (0.02 - 0.31)		
B社	13.28 (3.14 - 42.88)	0.06 (0.01 - 0.16)	0.04 (0.02 - 0.09)	0.26 (0.11 - 0.50)		

図1 マウス足蹠における腫脹の推移

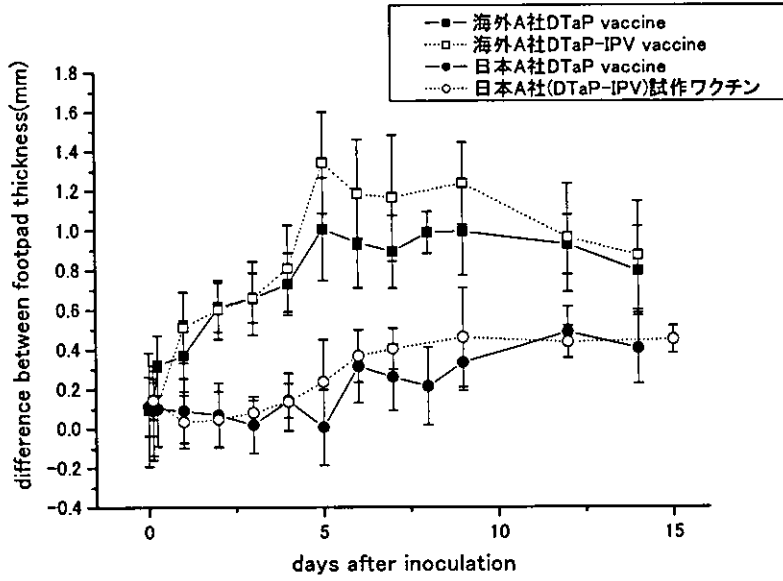
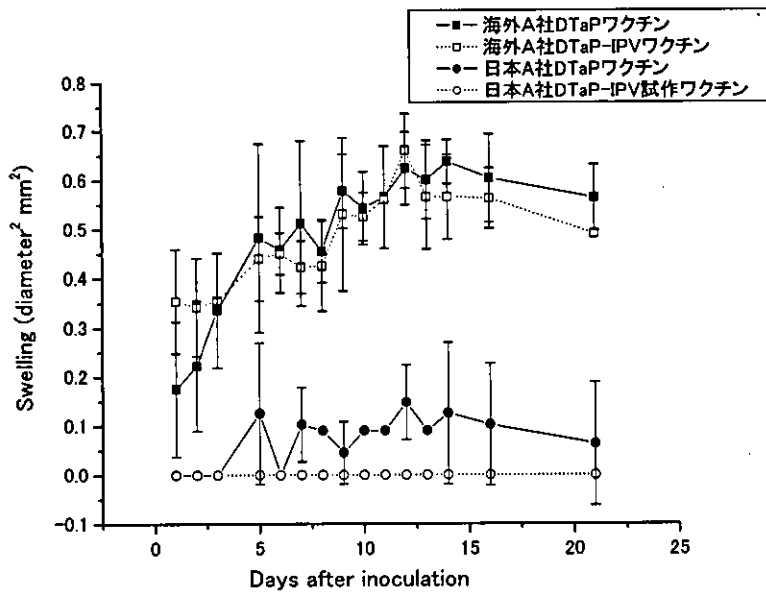


図2 ウサギ皮内における腫脹の推移



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

In vivo ラット力価試験に及ぼす雌雄、および 2-phenoxyethanol の影響

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

研究要旨：弱毒ポリオウイルスセーピ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ぬ。これらを作製するに当たっての問題点を整理した。

研究協力者 李 天成、白土東子（国立感染症研究所ウイルス第二部）

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ピ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。本年度はラットを用いた力価試験において、雌雄の別、および 2-phenoxyethanol（2-PE）の中和抗体産生に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

使用動物：ラットの種は SPF、Wister 種（SLC）でオス 60 匹、メス 60 匹である。これらをそれぞれ 30 匹の 2-PE（+）群と 30 匹の 2-PE（-）群にわけ、さらに各群 10 匹ずつを 3 用量に割り当てた。ラットは生

後 7 週齢で入荷し、一週間観察した後 8 週齢で接種した。接種部位 は後足筋肉、接種量は 0.5 ml/rat である。接種回数は 1 回とし、21 日の免疫期間 の後に採血した。

接種ワクチン：日本ポリオ研究所製 TIPV #04C w/ 2-PE および TIPV #04C w/o 2-PE をワクチン希釈液（0.15%Bica を含む Eagle's MEM）で 原液（1.00）、3 倍希釈（0.33）、9 倍希釈（0.11）となるように調製した。

中和試験：2002 年の WHO TRS910 に示されている A.3.6.2 Potency tests 基づいて行なった。

解析：Bioassay Assist を用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）及び「実験動物の飼育及び保管に関する基準」（昭和 55 年総理府公示第 6 号）の法律及び基準の他、国立感染症研究所

における動物実験指針に基づき、用いる動物の数は最小限とし、採血時には麻酔を施し動物愛護の精神のもとに実験を行った。

C. 研究結果ならびに考察

(1) 抗体価 0.5>の扱い

0.0 とした場合と 0.5 の場合の Regression (用量反応性) と Linearity (直線性) を検定した。その結果、両者での解析結果に差はなかった。1 検体につき 2 穴を使ったときのマイクロプレートにおける抗体価は 0.5 刻みの連続量であることから、0.5> は 0.0 より 0.5 が理にかなっていると考えられた。この条件で、1 型で 3 ケ、2 型で 2 ケ、3 型で 6 ケ、合計 11 個のデータが棄却された。1 型、2 型、3 型全てで棄却されるような異常に高い抗体価を示す個体もいた。

(2) 平行線検定による中和抗体価の比較

1 型で原液、3 倍希釈、9 倍希釈で直線性が成立したのはメスの w/ 2-PE だけであった。原因は 9 倍希釈で抗体が誘導されないことにあった。力価はメスのほうが有意に高く、2-PE による差はみられなかった。2 型では 2-PE のあるなしにかかわらず全て直線性は成立したが、オスとメスの間に反应用量線の平行性が成立しなかった。力価はメスのほうが高く、2-PE による差はみられなかった。3 型ではオスの抗体誘導が極めて低く、反应用量性が成立しなかった。メスでは 2-PE による差はなかった。

D. 考察

得られたデータから用量反応性、平行性、

直線性を全て満足しつつ解析することは困難であった。このことはとりまなおさず、比較するデータの性質が異なっていることを示唆し、要因のひとつは雌雄の差であることが考えられた。したがって、雌雄を混ぜて実験に供すべきではない。また、実験施設の要因を極力排除するためには、研究班で合意されたように、動物種、雌雄、週齢、接種部位、飼育条件等を極力統一する必要がある。

E. 結論

ラット力価試験は感受性が高いメスだけを用いて行なうべきである。2PE の有無に関し今回の実験規模では有意な差が見られなかったが、1 型と 3 型で力価を増強する傾向がみられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

－不活化ポリオワクチン力価試験の検討－

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

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

研究要旨:不活化ポリオワクチン力価試験のデータ解析法について、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。

研究協力者 佐藤征也(デンカ生研)、末原章宏(武田薬品工業)、大隈 邦夫(化血研)、山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡 紀代、豊泉裕美(国立感染症研究所細菌第二部第五室)

A. 研究目的

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)は現在試作段階であり、力価試験法の標準化に必要な基礎検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

不活化ポリオ国内参照品の2倍段階希釈4用量についてのラット免疫血清の中和抗体価を用い、Probit 分析用の離散量変換のための至適な Cut-off 値設定法について比較検討した。また抗体価実測値および最尤推定による抗体価の分布補正值を用いた平行線定量法ならびに Probit 法による解析結果を比較した。

C. 研究結果

1 離散量変換のための Cut-off 値

使用動物数を増やさない等の倫理的、また効率の点からも 1,2,3 型の力価を共通の

血清で求める工夫が必要であり、浮動 Cut-off 値の採用は避けられない。今回得られた 3 施設からの参照品に対する血清の 2 を底とした対数抗体価について、それぞれの型別に 1)全施設共通 2)施設毎 3)実験毎 に a)中央値((最大値+最小値)/2) b) 平均値 を求め、それぞれ Cut-off 値としての可能性評価を行った。その結果、中央値より平均値を用いた方が Probit 分析適用不能になる事例を避け易い可能性が示唆された。また予備的ではあるが、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示唆された。今回は実験毎の個別 Cut-off 値の必要性についての十分な評価はできなかった。従って今回の Probit 分析のための変換用 Cut-off 値には施設毎に求めた型別の Log_2 抗体価の平均値を用いた。

2 平行線定量法適用の可能性

多くの動物を用いるにもかかわらず、Probit 法では Cut-off 値の上下の情報のみとなることから、情報の有効利用と精度向上の点から平行線検定法の適用が望ましい。そこでその前提となる分布の正規性と各用

量での分散の一様性の評価を行った。その結果図1に示すように特に1型、2型では平行な回帰直線が得られた。しかし高頻度に分散の一様性が得られない測定値となる可能性が判明し、結果にモデル化が困難な偏りの入る危険性が考えられた。

3 Cut-offによる打ち切り分布の補正
測定値は、特に低用量では検出限界値(0.5)以下となる個体があり、切れた分布として観察される。そこで最尤推定による分布補正の必要性について評価した。その結果、特に高頻度に検出限界以下の結果の見られる3型で、図2で補正前の結果を*および点線で示したように、補正後の結果(●および実線)と大きく食い違う例がみられた。

4 解析法のバリデーションと選択
今のところプロビット法と変更線定量法以外に適当な方法がなく、平行線定量法には分散の一様性や検出限界による分布の打ち切り等の信頼性の問題はあるが、情報の有効利用の点から大きな利点が考えられる。そこでプロビット法、直線範囲の全データを用いた平行線検定法、分散の一樣な用量のみを用いた平行線定量法および最尤推定による分布補正を施した値での平行線定量法の結果を比較した。その結果図3に示すように、最尤推定による補正を行った場合で一部他の結果と食い違う例がみられた以外、いずれの方法も良く一致した。結果の高精度比較や信頼区間等については信頼性に問題が残るが、当面、常に実験毎の平均抗体価でのCut-offによるProbit法と食い違わないことを確認することを前提に、分散の一樣性を無視した平行線検定法を用いることも実用的には可能と考えられる。

5 DPTとの混合による力価への影響

DPTは沈降ワクチンであり、それとの混合によりIPVの力価が増強される可能性がある。今回1施設の成績について予備検討を行った。図3に示すようにDPTにより、1型に対して平均で約2.8倍の顕著な免役増強作用が観察されたが、2型、3型はそれぞれ1.3倍、1.1倍と有意な増強はみられなかった。

D. 考察

問題は残るが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と思われる。今後さらに体系立った計画の基に共同での評価が必要であろう。またDPTによる免役増強についても、臨床的にも期待できるのか、必要に応じてサル等を用いた検討が必要と考えられる。

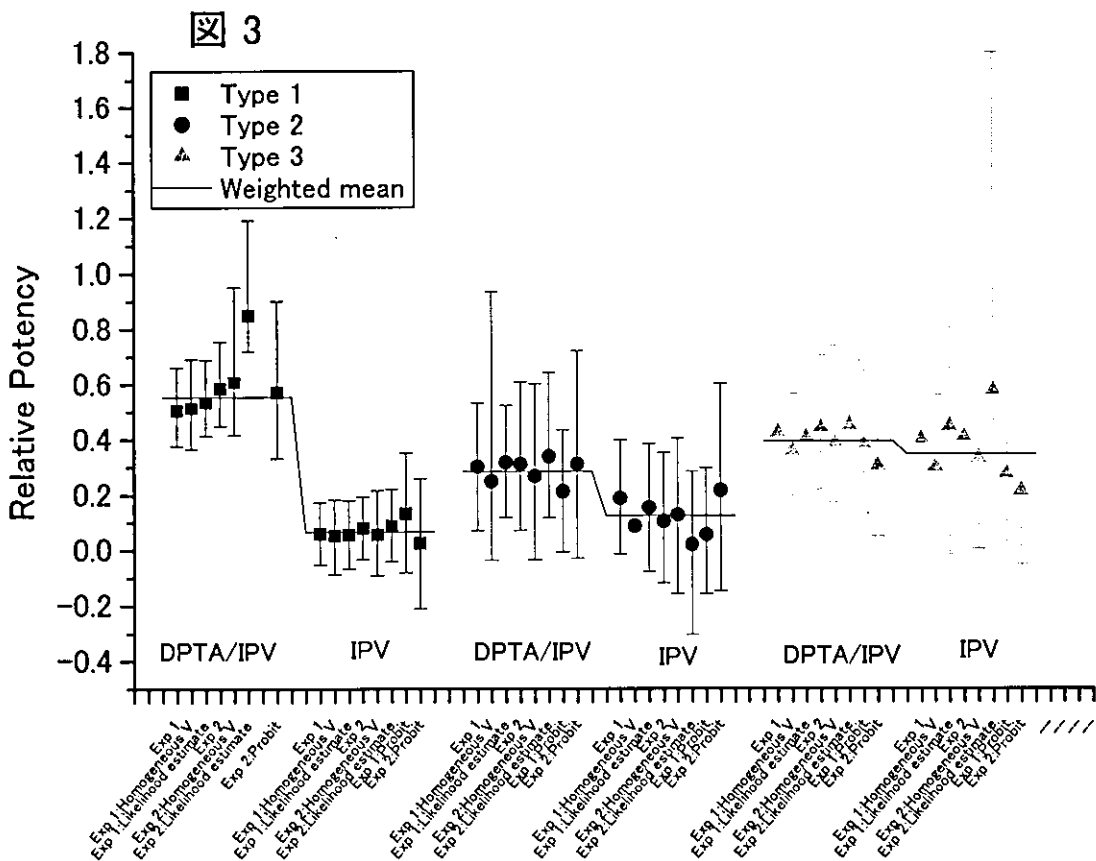
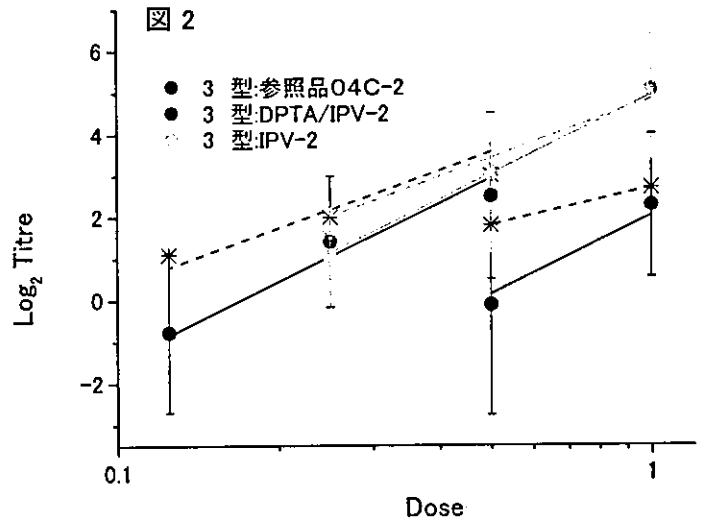
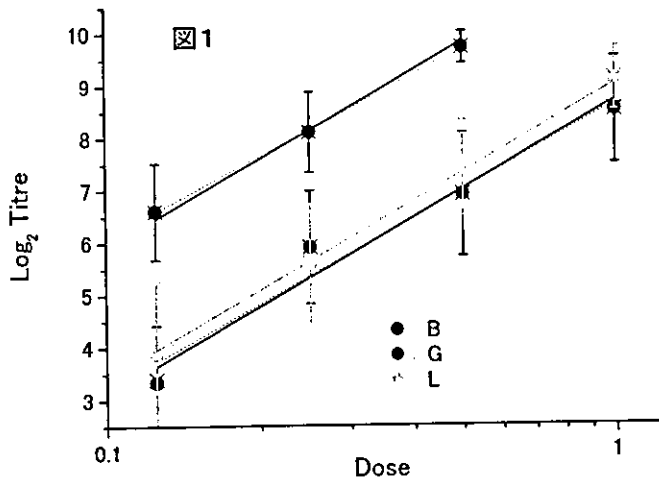
E. 結論

さらに追加的な確認実験が必要であるが、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。

E. 健康危険情報

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし



国内 IPV 参照品（候補）の作製

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。本年度は①国内 IPV 参照品（候補）を作製し、②各種品質管理試験の実施、③ラットでの免疫原性の確認、④WHO 参照品及び外国製 IPV との免疫原性の比較を行った。その結果、作製した国内 IPV 参照品（候補）は、高品質で WHO 参照品や外国製 IPV に匹敵する免疫原性を保持していることが確認された。

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）の開発及びその安全性と有効性の品質確保を図るためには IPV（弱毒株由来 IPV; sIPV）の国内参照品が必要である。sIPV の国内参照品を決定する上で、免疫原性は強毒株由来 IPV（vIPV）に匹敵することが望ましい。そのような sIPV を調製することを目的とした。

本年度は国内 IPV 参照品（候補）を作製し、ラットでの免疫原性試験を含めた各種品質管理試験を実施した。特に、免疫原性に関しては、vIPV（WHO 参照品及び外国製 IPV）との比較を行い評価した。

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 3, 100, 100 Du/0.5mL の標準的濃度より約 5 倍濃厚の 3 価混合不活化ポリオワクチン（濃厚 TIPV#04C（2-PE 無添加））を調製した。

④この濃厚 sIPV を希釈して 1 倍濃度にした 1 倍濃度 TIPV#04C（2-PE 添加）を 2 ロット（Lot 1, 2）作製した。その内比較的大量に調製した Lot 2 を国内 IPV 参照品（候補）とした。

⑤各型単価バルク、濃厚 TIPV#04C 及び 1 倍濃度 TIPV#04C（Lot 2）に関して、表 1～表 5 に示した各種品質管理試験を実施した。

⑥ 1 倍濃度 TIPV#04C（Lot 2）については、ラットでの免疫原性試験を 1 回免疫法（筋

肉内に接種後3週目に全採血)で行い、WHO参照品及び外国製IPVの結果と比較した。1倍濃度TIPV#04C(Lot 2)の免疫原性試験には8週齢のウイスター系SPFラットを一群雌のみ10頭使用した。

⑦1倍濃度TIPV#04C(Lot 1)に関しては、ラットでの免疫原性試験(1回免疫法、使用ラットについては同上)を3回実施し、Lot 2の結果と比較した。

C. 研究成果

国内IPV参照品(候補)(1倍濃度TIPV#04C Lot 2)の調製フロー図を図1に、同IPVの調製に使用した各型単価バルクの性状を表1～表3に示した。また、濃厚TIPV#04C及び1倍濃度TIPV#04C Lot 2の性状をそれぞれ表4、表5に示した。結果としてどのsIPVも全ての試験において規格値を満たしていた。

更に、1倍濃度TIPV#04C(Lot 1, 2)の免疫原性試験でのラットの平均中和抗体価を図2に、抗体陽性率を図3に示した。ロット間で免疫原性に有意な違いは見られなかった。また、Lot 2に関してはvIPV(WHO参照品及び外国製IPV)の免疫原性と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(表6)。

D. 考察

DPT/IPVの開発を進める上で必須となる国内IPV参照品(候補)を調製し、各種品質管理試験を実施した。表1から表5に示したように、使用した各型単価バルク及び調製した5倍濃厚TIPV#04Cと1倍濃度TIPV#04Cの全てにおいて、各種試験の規

格値を満たしており、作製した国内IPV参照品(候補)は高い品質を保持していることが示された。

1倍濃度TIPV#04C Lot 2のラット免疫原性はvIPV(WHO参照品及び外国製IPV)と比べて1型は若干高く、2型は殆ど同等、3型は若干低い成績であったが、全ての型において有意な違いは認められなかった。また、1倍濃度TIPV#04C Lot 2の免疫原性は、免疫原性試験を3回実施したLot 1と比べて有意な違いは見られず、Lot 1, 2とも安定した免疫原性が示された。これらの結果から、1倍濃度TIPV#04C Lot 2は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る。

E. 結論

国内IPV参照品(候補)を決定するために強毒株由来vIPVを参照にラットでの免疫原性試験を行った。得られた国内参照品(候補)の各種品質管理試験を実施し評価した。このIPVを参照品として使用することで、DPT/IPVの開発が大きく進展するものと期待される。

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

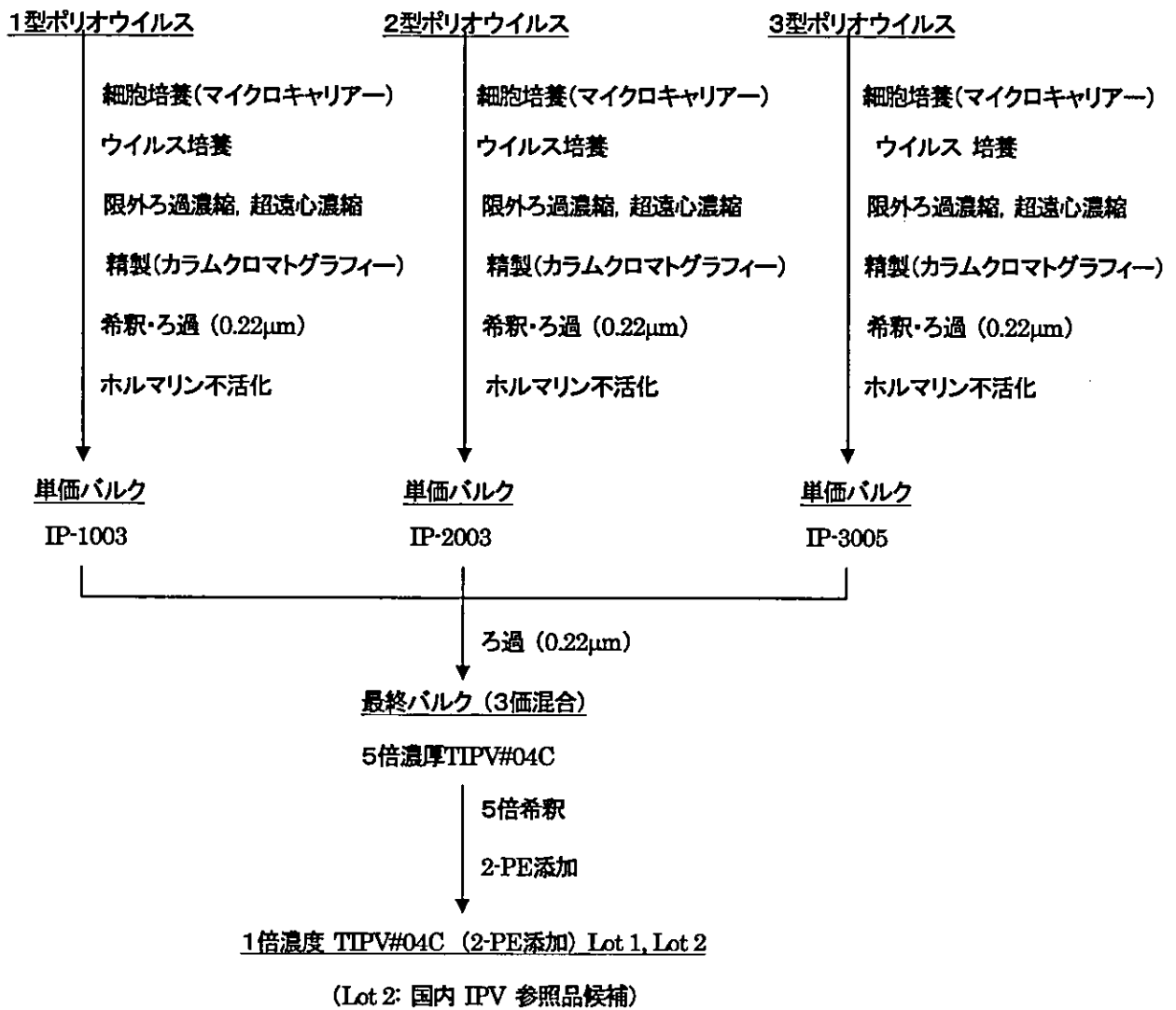


図1 国内IPV参照品(候補)の製造フロー

表1 1型単価バルク IP-1003 の試験成績

製造工程別検体名	試験検査名	規格値	試験結果	判定
個別細胞培養	対照細胞のCPE観察	ウイルスなどによる特異的細胞変性を認めない	陰性	適合
	血球吸着試験	細胞にモルモット赤血球に対する吸着性を認めない	陰性	適合
	Vero細胞接種試験	ウイルスなどによる特異的細胞変性を認めない	陰性	適合
個別ウイルス液	無菌試験	菌の発育を認めない	陰性	適合
	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{9.75} ~10 ^{9.88} CCID ₅₀ /mL	適合
	ウイルス同定試験	目的の型以外のウイルスの存在を認めない	1型	適合
プール・ろ過後ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{9.88} CCID ₅₀ /mL (2回測定の平均値)	適合
UF濃縮ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{11.81} CCID ₅₀ /mL (2回測定の平均値)	適合
精製後ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{12.19} CCID ₅₀ /mL	適合
不活化前ろ過前ウイルス液	たん白含量試験	0.1 µg/Du以下	3.35 x 10 ² µg/Du	適合
	ウシ血清蛋白量試験	20 ng/mL以下	<1 ng/mL	適合
	細胞由来DNA試験	100 pg/mL以下	<20 pg/mL (2回測定の平均値)	適合
不活化前ろ過後ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{11.13} CCID ₅₀ /mL	適合
	ウイルス同定試験	目的の型以外のウイルスの存在を認めない	1型	適合
	D抗原量試験	100 Du/mL以上	3,925 Du/mL	適合
不活化中ウイルス液	不活化効果試験	96時間以内に感染価が検出限界以下	78.72時間	適合
	ホルムアルデヒド量試験	74~102 µg/mL	0 day 94.68 2 day 92.29 4 day 92.49 6 day 89.69 µg/mL	適合
	ウイルス生残否定試験	ポリオウイルスによる細胞変性を認めない	細胞変性を認めない	適合
不活化後ウイルス液 (単価バルク)	ウイルス生残否定試験	ポリオウイルスによる細胞変性を認めない	細胞変性を認めない	適合
	無菌試験	菌の発育を認めない	陰性	適合
	D抗原量試験	不活化前の50%以上保持	3,632 Du/mL (92.5%) (2回測定の平均値)	適合
	エンドトキシン試験	0.001 EU/Du以下	<8.26 x 10 ⁻⁶ EU/Du	適合

表2 2型単価バルク IP-2003 の試験成績

製造工程別検体名	試験検査名	規格値	試験結果	判定
個別細胞培養	対照細胞のCPE観察	ウイルスなどによる特異的細胞変性を認めない	陰性	適合
	血球吸着試験	細胞にモルモット赤血球に対する吸着性を認めない	陰性	適合
	Vero細胞接種試験	ウイルスなどによる特異的細胞変性を認めない	陰性	適合
個別ウイルス液	無菌試験	菌の発育を認めない	陰性	適合
	ウイルス含量試験	10 ^{8.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{9.31} ~10 ^{9.63} CCID ₅₀ /mL	適合
	ウイルス同定試験	目的の型以外のウイルスの存在を認めない	2型	適合
プール・ろ過後ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{8.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{9.44} CCID ₅₀ /mL (2回測定の平均値)	適合
UF濃縮ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{11.50} CCID ₅₀ /mL (2回測定の平均値)	適合
精製後ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{11.88} CCID ₅₀ /mL	適合
不活化前ろ過前ウイルス液	たん白含量試験	0.1 µg/Du以下	1.44 x 10 ⁻² µg/Du	適合
	ウシ血清蛋白量試験	20 ng/mL以下	<1 ng/mL	適合
	細胞由来DNA試験	100 pg/mL以下	<40 pg/mL (2回測定の平均値)	適合
不活化前ろ過後ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{10.88} CCID ₅₀ /mL	適合
	ウイルス同定試験	目的の型以外のウイルスの存在を認めない	2型	適合
	D抗原量試験	100 Du/mL以上	7,989 Du/mL	適合
不活化中ウイルス液	不活化効果試験	96時間以内に感染価が検出限界以下	72.68時間	適合
	ホルムアルデヒド量試験	74~102 µg/mL	0 day 101.31 2 day 98.73 4 day 97.93 6 day 89.78 µg/mL	適合
	ウイルス生残否定試験	ポリオウイルスによる細胞変性を認めない	細胞変性を認めない	適合
不活化後ウイルス液 (単価バルク)	ウイルス生残否定試験	ポリオウイルスによる細胞変性を認めない	細胞変性を認めない	適合
	無菌試験	菌の発育を認めない	陰性	適合
	D抗原量試験	不活化前の50%以上保持	6,305 Du/mL (78.9%) (2回測定の平均値)	適合
	エンドトキシン試験	0.001 EU/Du以下	6.03 x 10 ⁻⁵ EU/Du	適合

表3 3型単価バルク IP-3005 の試験成績

製造工程別検体名	試験検査名	規格値	試験結果	判定
個別細胞培養	対照細胞のCPE観察	ウイルスなどによる特異的細胞変性を認めない	陰性	適合
	血球吸着試験	細胞にモルモット赤血球に対する吸着性を認めない	陰性	適合
	Vero細胞接種試験	ウイルスなどによる特異的細胞変性を認めない	陰性	適合
個別ウイルス液	無菌試験	菌の発育を認めない	陰性	適合
	ウイルス含量試験	10 ^{8.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{9.44} ~10 ^{9.56} CCID ₅₀ /mL	適合
	ウイルス同定試験	目的の型以外のウイルスの存在を認めない	3型	適合
プール・ろ過後ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{8.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{9.47} CCID ₅₀ /mL (2回測定の平均値)	適合
UF濃縮ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{11.53} CCID ₅₀ /mL (2回測定 of 平均値)	適合
精製後ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{12.06} CCID ₅₀ /mL	適合
不活化前ろ過前ウイルス液	たん白含量試験	0.1 µg/Du以下	5.03 x 10 ³ µg/Du	適合
	ウシ血清蛋白量試験	20 ng/mL以下	<1 ng/mL	適合
	細胞由来DNA試験	100 pg/mL以下	50.08 pg/mL (2回測定 of 平均値)	適合
不活化前ろ過後ウイルス液	ウイルス含量試験	10 ^{9.0} CCID ₅₀ /mL以上	10 ^{10.94} CCID ₅₀ /mL	適合
	ウイルス同定試験	目的の型以外のウイルスの存在を認めない	3型	適合
	D抗原量試験	100 Du/mL以上	11,734 Du/mL	適合
不活化中ウイルス液	不活化効果試験	96時間以内に感染価が検出限界以下	80.12時間	適合
	ホルムアルデヒド量試験	74~102 µg/mL	0 day 97.20 2 day 91.69 4 day 90.12 6 day 89.53 µg/mL	適合
	ウイルス生残否定試験	ポリオウイルスによる細胞変性を認めない	細胞変性を認めない	適合
不活化後ウイルス液 (単価バルク)	ウイルス生残否定試験	ポリオウイルスによる細胞変性を認めない	細胞変性を認めない	適合
	無菌試験	菌の発育を認めない	陰性	適合
	D抗原量試験	不活化前の50%以上保持	8,265 Du/mL (70.4%) (2回測定 of 平均値)	適合
	エンドトキシン試験	0.001 EU/Du以下	<3.63 x 10 ⁻⁶ EU/Du	適合

表4 濃厚 TIPV#04C (2-PE 無添加) の試験成績

試験検査名	規格値	試験結果	判定
無菌試験	菌の発育を認めない	陰性	適合
ウイルス生残否定試験	ポリオウイルスによる細胞変性を認めない	細胞変性を認めない	適合
pH試験	pH 6.8~7.4	pH 7.14 (3回測定 of 平均値)	適合
D抗原量試験	1型: 20~50, 2型: 700~1500 3型: 700~1500 Du/mL	1型: 39.0, 2型: 1132, 3型: 1119 Du/ml (3回測定 of 平均値)	適合
異常毒性否定試験	動物に異常を示さない	異常なし (5倍希釈した検体についての成績)	適合
ウシ血清蛋白量試験	20 ng/mL 以下	1 ng/mL 未満 (2回測定 of 平均値)	適合
エンドトキシン試験	0.25 EU/mL × 濃度倍数以下	0.03 EU/mL	適合
ホルムアルデヒド量試験	100 µg/mL 以下	26.05 µg/mL (3回測定 of 平均値)	適合
たん白含量試験	20 µg/mL × 濃度倍数以下	5.92 µg/mL (3回測定 of 平均値、5倍 希釈した検体についての成績)	適合
細胞由来 DNA 試験	100 pg/mL 以下	20 pg/mL 未満	適合

表5 1倍濃度 TIPV#04C (2-PE 添加) Lot 2 の試験成績

試験検査名	規格値	試験結果	判定
無菌試験	菌の発育を認めない	陰性	適合
pH試験	pH 6.8~7.4	pH 6.90 (3回測定の平均値)	適合
D抗原量試験	1型: 2~5, 2型: 70~150 3型: 70~150 Du/0.5mL	1型: 3.62, 2型: 103, 3型: 113 Du/0.5ml (3回測定の平均値)	適合
2-フェノキシエタノール含量試験	0.3~0.6 (W/V)%	0.54 (W/V)%	適合
たん白含量試験	20 µg/mL	3.46 µg/mL (3回測定の平均値)	適合

表6 1倍濃度 TIPV#04C (2-PE 添加) Lot 2 の免疫原性の強毒株 IPV との比較

	型	対照 IPV (強毒株 IPV)	相対力価 * (95% 信頼区間)	Cut off 値
1倍濃度 TIPV#04C (2-PE 添加) Lot 2	1型	WHO Reference IPV (91/574)	1.622 ** (0.552~4.582)	2 ²⁰
	2型	WHO Reference IPV (91/574)	1.055 ** (0.236~3.451)	2 ²⁰
	3型	市販 IPV	0.559 (0.251~1.192)	2 ²⁰

* TIPV#04Cは1群10頭、対照IPVは1群5頭のラット(どちらもメスのみ)の成績を比較

** TIPV#04Cの3倍希釈接種における1型、2型の陽性数10/10を9/10、WHO 91/574の3倍希釈接種における2型の陽性数5/5を4/5として計算

- ・ラットでの免疫原性試験では接種後21日目に採血し、各型約100CCID₅₀のSabin株に対する中和抗体価をHep2c細胞を用いたマイクロ法で測定した。
- ・中和抗体価 $\geq 2^8$ を陽性としてプロビット法で相対力価を求めた。
- ・WHO Reference IPVは1-20-04試験実施、市販IPVは1-27-04試験実施でそれぞれの結果と比較した。

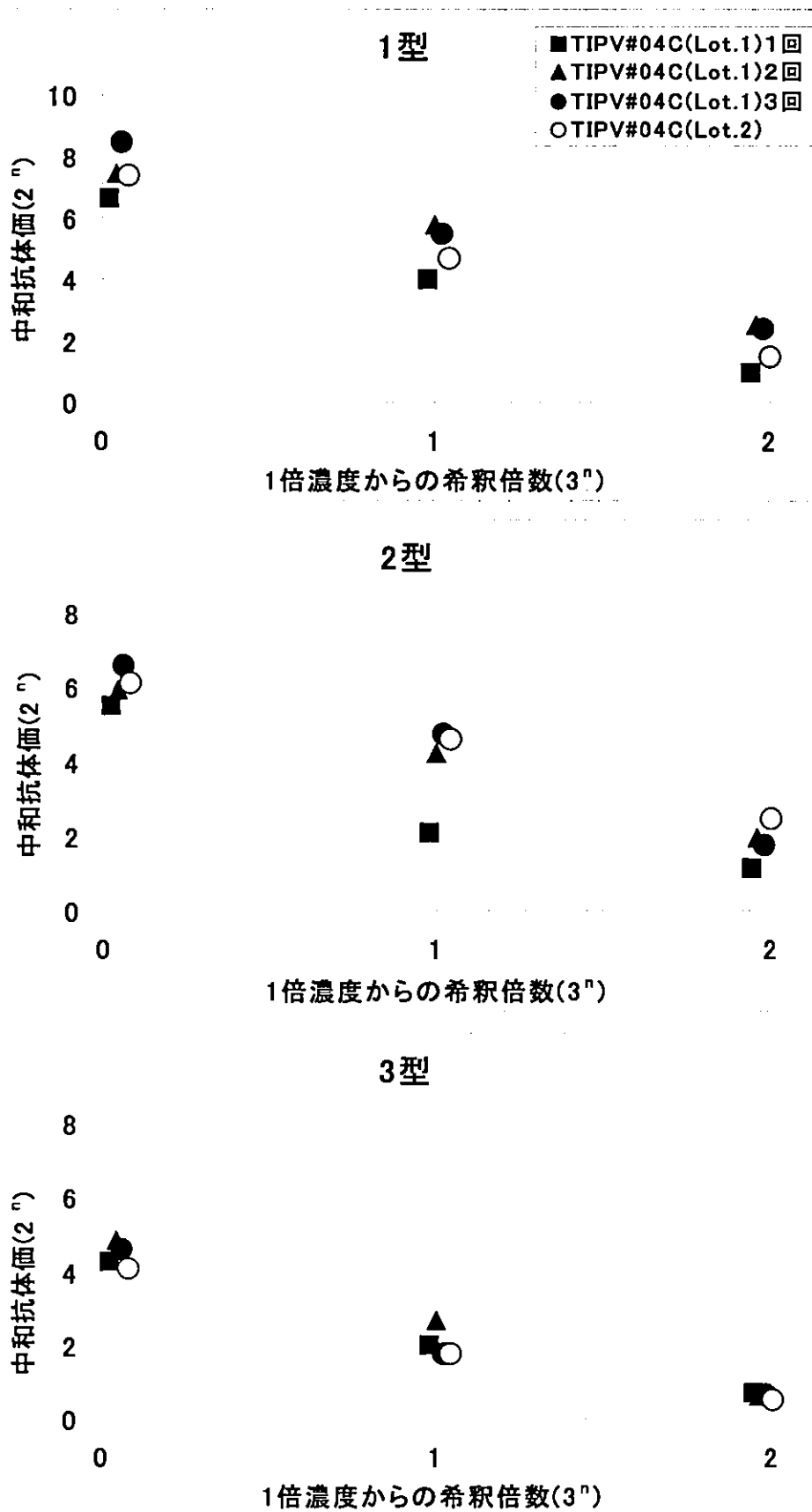


図2 1倍濃度TIPV#04C (2-PE添加) Lot 1, Lot 2のラット免疫原性試験成績 (平均中和抗体価)

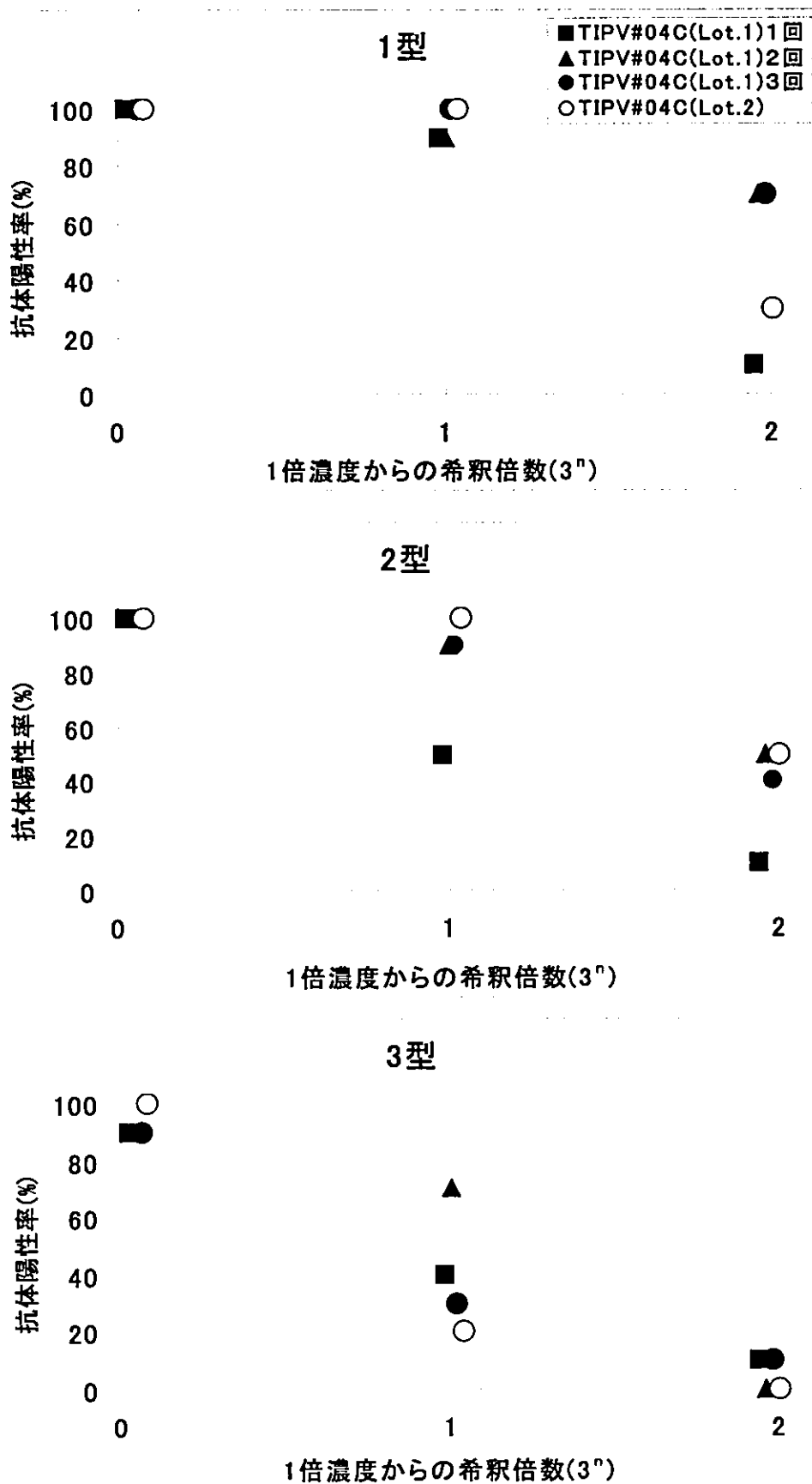


図3 1倍濃度TIPV#04C (2-PE添加) Lot 1, Lot 2のラット免疫原性試験成績 (中和抗体陽性率)

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、副所長

研究要旨 昨年度は（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 ワクチンを作製しそれらの IPV ワクチンとしての力価、DTP ワクチンとしての力価、安全性等を検討し、当所の DTP ワクチンを用いた IPV/DTP ワクチンが製造できる可能性を示した。今年度は試作したワクチンの 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、力価、安全性、DTP ワクチンとの製造の容易さか 2 つのワクチンを選択し、1 年後の IPV ワクチンとしての力価、DTP ワクチンとしての力価、安全性を検討した。上記の保存条件で一年間は安定であることが示された。

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/DTP 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。DTP 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) 昨年、試作した 6 種の IPV/DTP ワクチンのうち、2 種類の IPV/DTP ワクチンで 1 年間の安定を確認した。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 III 型に対しては顕著であった。
- 2) 安定性試験に供したワクチンに関して、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。

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要求されている。IPV の導入した場合、乳幼児の過密なワクチン接種スケジュールから接種率の減少が予想され沈降 DTP ワクチンとの混合（IPV/DTP ワクチン）が望まれている。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、一年間安定に効果、安全性が維持されることを示した。ポリオ研によって新たに設定された規格の IPV、感染研によって示された力価測定法で再度、当所の DTP ワクチンとの製剤化の検討を行い製品化に向けて検討する予定である。

E. 結論

試作した IPV/DTP ワクチンの 1 年後の性状を検討した。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。

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）
協力研究報告書

混合ワクチンの品質確保に関する研究

協力研究者：大隈 邦夫 財団法人 化学及血清療法研究所

研究要旨

不活化ポリオワクチン（以下、IPV）の力価試験参照品として、TIPV#04C（1:5）（I型、II型、III型：3, 100, 100 Du /0.5 mL）を国内参照品候補とすることが「混合ワクチンの品質確保に関する研究」の研究班会議で決定された。そこで、この参照品候補と同量の IPV 抗原を含む沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（以下、DPT/IPV）を調製し、その品質を確認した。調製には、当所製沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン（以下、DPT）バルクと日本ポリオ研究所（以下、ポリオ研）製三価混合 IPV バルクを用いた。品質試験としては、DPT の生物学的製剤基準の試験項目と IPV の力価試験（ラット免疫原性試験）を実施した。その結果、調製した 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。

A. 研究目的

IPV 国内参照品候補と同量の IPV 抗原を含む DPT/IPV を調製し、混合することによる DPT 各成分への品質の影響及び IPV 力価への影響を確認することを目的とした。

B. 研究方法

①DPT/IPV の組成

調製した DPT/IPV (lot CV02) 及び IPV 力価試験の国内参照品候補に含まれる抗原の組成を表 1 に示す。

②DPT/IPV の調製方法

1.5 倍濃厚 DPT バルクと 5 倍濃厚三価混合 IPV バルクを混合し、生理食塩水で最終濃度となるように希釈した。

三価混合 IPV バルクはポリオ研で調製したものを、DPT バルクは当所で調製したものをそれぞれ用いた。

③品質試験項目

DPT の生物学的製剤基準に設定されている

試験^{a)}に加えて IPV 力価試験（ラット免疫原性試験）を実施した。

a) DPT の生物学的製剤基準試験項目

pH 試験、アルミニウム含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、無菌試験、異常毒性否定試験、エンドトキシン試験、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、ジフテリア毒素無毒化試験、破傷風毒素無毒化試験、力価試験（ジフテリア、破傷風、百日せき）

④IPV 力価試験方法

1) 動物

Wistar 系ラット（メス、7 週齢）を 1 週間予備飼育して用いた。

2) 接種

DPT/IPV (lot CV02) 又は国内参照品候補を階段希釈したものを試料とし、それぞれをラット 10 匹の後肢大腿部に筋肉内接種した（0.5mL/匹）。