

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮村 達男

平成 18 (2006) 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	7
----------------------	-------	---

2. 無菌試験への保存剤の影響並びに外国製 混合ワクチンの組成に関する検討	新谷 三春	11
--	-------	----

3. 海外混合ワクチンの力価の検討	高橋 元秀	17
-------------------	-------	----

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	21
-------------------------	-------	----

5. 不活化ポリオワクチンプロフィシエンシー試験堀内 善信、武田 直和		25
--	--	----

6. 沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ 混合ワクチン生物学的製剤基準（案）の作成 生物学的製剤基準（案）作成ワーキンググループ		33
---	--	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧		49
--------------------	--	----

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 ポリオウイルス1型、2型の抗体陽性率は高く維持されていた。DTaP-IPV-JPに保存剤として用いられる可能性のある2-POEは無菌試験に影響を与える可能性は少なかった。海外では、HibワクチンをDTaP、DTaP/IPVに混合するかどうかは国によって方針が異なっていた。破傷風トキソイドの力価は、HepBやIPVの混合では影響は少なかったが、破傷風トキソイドをキャリア蛋白として含んでいるHibを混合した場合、破傷風トキソイドの力価は大きく上昇する事が判った。Hibを混合したDTaPを導入する際には、破傷風抗体価の推移などを広く調査する必要がある。国内5社のDTaP-sIPV試作品について、動物モデルを用いた安全性、特に局所反応原性に問題はみられなかった。生物学的製剤基準（案）小委員会を発足させ、3回の審議を経て基準（案）を作成した。ラット免疫原性試験に関してプロフィシェンシー試験を行なった。試験に用いる試薬等に関する製造記録、試験記録を整備した。

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

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
倉田 毅 同上
李 天成 同上
白土 東子 同上
小川 智子 同上
小西 恭子 同上
岡 智一郎 同上
染谷 雄一 同上
宇田川悦子 同上

協力研究者

清水 文七 日本ポリオ研究所
太田 芳宏 同上
塩先 巧一 化学及血清療法研究所
水野 喬介 同上
野崎 周英 同上
園田 憲悟 同上
後藤 優治 同上
末原 章宏 武田薬品工業株式会社
山下 利明 同上
小川 博暢 阪大微生物病研究会
渡辺 徹也 デンカ生研（株）
佐藤 弘 国立感染症研究所
荒木 和子 同上
羽生 隆 同上
北元 理恵 同上
上野 久美 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

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 ワクチンを追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. ポリオ感受性調査

日本在住の健常人に対するポリオワクチン年齢別接種率、ポリオウイルス年齢別抗体保有率、ワクチン接種歴別抗体保有率を調査した。原則として2004年5～12月に、北海道、宮城県、山形県、富山県、愛知県、山口県、愛媛県7道県で以下の年齢群の人々の血清について中和抗体が測定された。0～1歳、2～3歳、4～6歳、7～9歳、10～14歳、15～19歳、20～24歳、25～29歳、30～39歳、40歳以上の10区分より20名ずつ自治体毎に合計200人程度を目安として検体を採取した。

2. 無菌試験への2-フェノキシエタノールの影響

2-フェノキシエタノール(2-POE)の終濃度0.00617v/v%=0.00679 w/v%)し、液状チオグリコール酸培地、2-POE添加同培地に、新たに培養した *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* の希釈菌液を接種し31℃で培養した。ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地、2-POE添加同培地に新たに培養した *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* の希釈菌液を接種し23℃で培養した。菌の生育を5日目まで肉眼的に観察した。

3. DTP力価試験および安全性試験

海外のDTaP、DTaP-wIPV、国産DTaPとwIPVの局所反応原性を比較、評価した。試験としてワクチンをマウス足蹠皮下に0.05mL(2.5mL/kg)およびウサギ背部皮内に

0.1mL(0.04mL/kg)接種し、それぞれ経日的に腫脹を計測した。また接種5日目のマウスおよび21日目のウサギの接種局所について病理組織学的評価を行った。

4. ジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドの力価測定

現在、海外で市販されているDTaP-IPV-Hib、DTaP-IPV、DTaP、そしてHibを輸入し、国内の生物学的製剤基準に従い、ジフテリアと破傷風トキソイドの力価を測定し、2004年度に国内で国家検定に出検されたDTaP(20件)の力と比較・検討した。

5. エンドトキシン試験

生物学的製剤基準に準じて実施した。

6. 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(ウイスター系メス)の後肢大腿部筋肉内に免疫した。21日後に採血し、得られた血清について中和抗体価の測定を行った。

(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。万一個人的信息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. ポリオ受性調査

全体のポリオワクチン接種率は95.0%と高く維持されていた。3型以外においては、抗体陽性率は高く維持されていた。3型に対してはいずれの年齢においても他の型に比して抗体保有率は低値であった。昭和50-52年生まれの世代の1型ポリオウイルス抗体陽性率は、前後の年齢群より低かった。3つの型ともに抗体陽性である割合は、20代後半で一旦減少し、その後上昇していた。これは、丁度昭和50-52年生まれの世代に相当していた。

2. 無菌試験への保存剤の影響

従来の接種法（直接法、検体と培地との量比）では各菌とも生育障害は見られなかった。すなわち培地間で生育速度、生育した菌量に差はなかった。

3. 海外で市販されている各種混合ワクチンのジフテリアトキソイドの力価

DTaP-IPV Hib（1件）、DTaP-IPVB-HepB（1件）、DTaP-IPV（2件）、そしてDTaP（2件）のジフテリアトキソイドの力価は65-122単位/mLで大きな違いはみられなかった。海外で接種されているこれらのワクチンは国内で製造されているDTaPと同様な力価を保持していた。

4. 海外で市販されている各種混合ワクチンの破傷風トキソイドの力価

DTaP-IPV Hib（2件）、DTaP-IPVB-HepB（1件）、DTaP-IPV（2件）、そしてDTaP（2件）の破傷風トキソイドの力価は179-3376単位/mLであった。国内のDTaP（20件：平均力価143単位/mL）に対して、DTaP-HepB、DTaP-IPV、そしてDTaPは1.25-5.02倍の力価であったが、DTaP-IPV-Hibは19.8と23.6倍の力価であった。

5. DTaP-IPV-Hibとこれらの構成ワクチン、およびHib単独ワクチンの破傷風トキソイドの力価

DTaP-IPV-Hibの力価が2830・3376単位/mLであったのに対して、これらを構成するDTaP-IPVとHibは、それぞれ284・373単位/mLと777・937単位/mLであった。また、Hibの単独ワクチンであるHiberixは434単位/mL、PedavaxHibは検出限界未満であった。これらは、平均値として国内の2004年度に出検されたDTaPよりも、DTaP-IPV-Hibで約21.6倍、DTaP-IPVで約2.28倍、Hib（DTaP-IPV-Hibの構成成分）で約5.97倍で、Hib（Hibrix：単独ワクチン）で3.03倍高い値であった。

6. 局所反応原性試験

国内5社のDTaP、DTaP-sIPV、sIPVはいずれもマウス足蹠、ウサギ背部皮内接種で、海外DTaPのような強い腫脹は認められず、また製造所による差もみられなかった。またDTaPをマウス大腿部筋肉内に0.05mL(2.5mL/kg)接種した場合、海外製品では肉眼的に筋膜を通して白い沈着物の残存が確認され、接種後8週間経っても消失しなかったが、国内5社のDTaPワクチンでは沈着

物の残存は軽微であった。マウス足蹠、ウサギ背部皮内およびマウス大腿筋の3種の局所反応モデルで、病理組織学的にも海外および国産のDTaPの性状の違いを検出できることが確認された。従ってsIPVは単独でもDTaPに添加した場合も局所反応への影響は少ないと考えられる。

7. 不活化ポリオワクチンのプロフシェンシー試験

1) ラットの体重に関して

ラットの入荷時あるいは免疫前の体重と採血前の体重の間に有意な相関が認められた。I、II、III型のいずれかに対して高い反応性を持つ個体は他の型に対しても強い抗体産生を示した。しかし免疫前、採血時、またその間の体重増加のいずれの体重指標にも抗体価との相関は認められなかった。動物への検体および用量の割付の際に注意深くランダム化を行う必要がある。

2) 近似最尤法について

ラットを用いた力価試験では、測定値に高頻度に検出限界以下の値が含まれる。したがって、平均抗体価や分散を求めるには、最尤法による推定が必要となる。今回は簡便のためその近似推定法を作成した。

3) 不活化ポリオワクチン#05、および#04Cの中和抗体価について

近似最尤法を用いた平行線定量法により計算し、#05Jの#04Cに対する相対力価を求めた。#04Cの力価を1.0とすると、#05Jの力価は、I型が0.532(0.440 - 0.642)、II型が0.466(0.334 - 0.649)、III型が2.229(1.459 - 3.406)であった。近似最尤法による平行線定量法とProbit法で求めた結果は、I型、II型、III型ともよく一致した。施設間の差もみられなかった。

4) 共通に試験した試作DPT-sIPVワクチンの中和抗体価について

I、II、III型の全てにおいて、施設間で差は見られなかった。各社ごとに作製した試作DPT-sIPVワクチンとの差も認められなかった。

5) 各社ごとに作製した試作DPT-sIPVワクチンの中和抗体価について

製造所毎のDTaPの性状に関わらず、いずれの試作品においてI、II、III型で同等の力価であることが確認された。したがって、互換使用とそれを確認するための統一基準の適用に問題がないものと考えられた。

8. 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生物学的製剤基準（案）の作成

生物学的製剤基準（案）小委員会を発足させ、3回の審議を経て基準（案）を作成した。ラット免疫原性試験に関してプロフィシェンシー試験を行なった。試験に用いる試薬等に関する製造記録、試験記録を整備した。

D. 考察

ポリオワクチン接種率は現在も高く維持されており、0-5歳におけるワクチン2回接種後の抗体陽性率は高値であった。3つの型ともに抗体陽性である割合は、20代後半で一旦減少し、その後上昇していた。これは、丁度昭和50-52年生まれの世代に相当し、現在もなお、抗体保有率の落ち込み世代は残存していた。この世代は丁度今、父親、母親世代であり、家族に生ポリオワクチンを接種した小児がいる可能性が高くなる年齢である。子供が生ポリオワクチンを受ける際には、十分に便の取扱いに注意すると共に、同時にポリオワクチンの接種を受けることが望まれる。

2-POEの作用はチメロサルと異なり静菌作用であり、殺菌的には働かない。培地による希釈で無力化されると考えられる。実際の製品の無菌試験にあたってはバリデーション試験により実証することが求められる。2-POEの*A. niger*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*に対するMICは、それぞれ3300, 5400, 3600, 3200, 8500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という報告があり、計算上は矛盾しない結果であった。エンドトキシン試験については、国内5社のDTaP-IPV試作品は全て、阻害作用もなく、エンドトキシン含量もDTaPワクチンと同等であり、IPVを追加した事による影響は認められなかった。ただし試薬により2型のIPVによる非特異的な偽陽性反応が見られ、注意を要することが判明した。

局所反応試験については昨年、海外と国産のDTaPに差が見られたことから、さらに国内5社全てのDTaPおよびDTaP-sIPV試作品について、マウス足蹠皮下及びウサギ背部皮内に接種して比較した。同時に接種した海外ワクチンでは昨年同様接種局所の強い腫脹および炎症が観察されたが、国産DTaPでの反応は軽微であった。その際、国産DTaPとDTaP-sIPV

試作品の間に違いは認められず、sIPV添加の影響はみられなかった。さらにマウス大腿筋においても、海外と国産のDTaPでマウス足蹠及びウサギ皮内と同様の差異が確認され、ワクチン自体の性状の違いが強く示唆された。これらのモデルの組み合わせによりワクチンの比較が可能と考えられた。

E. 結論

3型以外においては、ポリオウイルス抗体陽性率は高く維持されていたが、昭和50-52年生まれの世代の1型抗体陽性率は、前後の年齢群より低く、引き続き予防接種の勧奨が必要である。IPV、HepBの混合によるDTaPのジフテリアと破傷風トキソイドの力価は大きく影響を受けない。HibをDTaPに混合した場合、破傷風トキソイドの力価は、混合前よりも10倍以上に上昇する可能性がある。2-POE無菌試験に影響を与える可能性は少ない。DTaP-sIPVでsIPVの局所反応への影響は少ない。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生物学的製剤基準（案）を作成した。プロフィシェンシー試験は機関による差が見られず、各機関の習熟度に問題点はなかった。

F. 健康危険情報

現在、日本で接種されているDTaPは、小児期の4回の接種により破傷風の発症防御に十分な抗体(0.01単位/mL以上)を誘導する事がわかっている。しかし、DTaP-IPV-Hibに含まれるHibは、現在国内で接種されているDTaPよりも高い破傷風トキソイドの力価を有し、これらのHibを日本国内のDTaPと混合した場合、DTaPの破傷風トキソイドの力価は増強し、現在以上に破傷風トキソイドに対して高い免疫を誘導する可能性がある。現在までに、日本国内では、これ程の高い破傷風トキソイドの力価(2000単位/mL以上)を持つワクチンを使用した経験が無い。そこで、今後、日本国内でこのような混合ワクチンを導入する際には、ワクチンの接種後における破傷風抗体価の推移や副反応を十分に調査する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Chen-Fu Yang, Hour-Young Chen, Jaume Jorba,

Hui-Chih Sun, Su-Ju Yang, Hsiang-Chi Lee, Yhu-Chering Huang, Tzou-Yien Lin, Pei-Jer Chen, Hiroyuki Shimizu, Yorihiro Nishimura, Andi Utama, Mark Pallansch, Tatsuo Miyamura, Olen Kew, and Jyh-Yuan Yang. Intratypic Recombination among Lineages of Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus Emerging during Chronic Infection of an Immunodeficient Patient.

J. Virol. 2005 79: 12623-12634.

Minetaro Arita, Shuang-Li Zhu, Hiromu Yoshida, Tetsuo Yoneyama, Tatsuo Miyamura, and Hiroyuki Shimizu. A Sabin 3-Derived Poliovirus Recombinant Contained a Sequence Homologous with Indigenous Human Enterovirus Species C in the Viral Polymerase Coding Region. J. Virol. 2005 79: 12650-12657.

Q Sue Huang, Gail Greening, Michael G Baker, Keith Grimwood, Joanne Hewitt, Debbie Hulston, Lisa van Duin, Amanda Fitzsimons, Nick Garrett, David Graham, Diana Lennon, Hiroyuki Shimizu, Tatsuo Miyamura, Mark A Pallansch. Persistence of oral polio vaccine virus after its removal from

the immunisation schedule in New Zealand. *Lancet* 2005; 366: 394-396.

清水博之、吉田 弘、宮村達男：野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関するWHO 世界的行動計画（第2版） ウイル

ス 55:161-178, 2005.

清水博之、武田直和、宮村達男：ポリオワクチン 臨床と微生物 32:441-444, 2005.

2. 学会発表

岩城 正昭、堀内 喜信、小宮 貴子、福田 靖、荒川 宜親、高橋 元秀：レーザー粒径測定型血小板凝集計を用いたフロキュレーションアッセイ系の構築、第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月 大阪市

福田 靖、岩城 正昭、小宮 貴子、荒川 宜親、高橋 元秀：ヘモフィルス インフルエンザ B 型菌ワクチンに含まれる破傷風トキソイドの免疫原性の検討、第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月 大阪市

片岡紀代、山本明彦、永田典代、落合雅樹、長谷川秀樹、蒲地一成、豊泉裕美、荒川宜親、倉田毅、堀内善信（原嶋綾子、長岡芳昭）：沈降精製 DPT 及び DPT-IPV ワクチンの安全性 第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月 大阪

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

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 現行の生ポリオワクチンの接種率は良好であり、3型以外においては、抗体陽性率は高く維持されていた。一方、昭和50-52年生まれの世代の1型ポリオウイルス抗体陽性率は、前後の年齢群より低く、この世代は丁度今、父親、母親世代であり、家族に生ポリオワクチンを接種した小児がいる可能性が高くなる年齢である。子供が生ポリオワクチンを受ける際には、十分に便の取扱いに注意すると共に、同時にポリオワクチンの接種を受けることが望まれる。3つの型ともに抗体陽性である割合は、20代後半で一旦減少し、その後上昇していた。これは、丁度昭和50-52年生まれの世代に相当していた。

研究協力者：佐藤 弘¹、北本理恵¹、丹生隆¹、荒木和子¹、上野久美¹、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、北海道、宮城県、山形県、富山県、愛知県、山口県、愛媛県の各道県及びその衛生研究所)

ワクチン接種率、接種歴別の抗体保有率を調査してきた。今年度は、初年度より対象数を増やして、再度ポリオに対する免疫保有率について検討することを目的とした。

B 研究方法

日本在住の健常人に対するポリオワクチン年齢別接種率、ポリオウイルス年齢別抗体保有率、ワクチン接種歴別抗体保有率を調査した。原則として2004年5～12月に、北海道、宮城県、山形県、富山県、愛知県、山口県、愛媛県7道県で以下の年齢群の人々の血清について中和抗体が測定された。0～1歳、2～3歳、4～6歳、7～9歳、10～14歳、15～19歳、20～24歳、25～29歳、30～39歳、40歳以上の10区分より20名ずつ自治体毎に合計200人程度を目安として検体を採取した。

7都県の衛生研究所で、計1,636名(0-1歳123名、2-3歳145名、4-6歳162名、7-9歳182名、10-14歳180名、15-19歳153名、20-24歳134名、25-29歳171名、30-39歳164名、40歳以上222名)について、ポリオウイルス1型、2型、3型に対する中和抗体が測定された。ワクチン接種歴については、問診により調査したが、できるだけ母子手帳あるいは予防接種台帳と照合し、確認を行うこととした。

A 研究目的

わが国で使用されているDPTワクチンは、百日咳成分にメーカーによる若干の違いがあるものの、品質についてはいずれの製品においても良好に保たれており、国内では定期接種が完了している者においては、これら3疾患が効果的に予防可能となっている。一方で、国内のポリオワクチンは生ワクチンに限られているために、数百万人に一人の割合で発生するワクチン接種後麻痺例あるいはワクチン接種者との接触による麻痺例の発生が毎年認められている。そこで、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、検討がなされている。本分担研究では、これまで、ポリオ、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

(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

全体のポリオワクチン接種率は 95.0%と高く維持されていた。年齢群別にワクチン接種率(1回以上)を検討すると、0-1歳で 84.9%、2-3歳で 98.1%に急上昇し、4-6歳 99.2%、7-9歳 100%に上昇した。10-14歳 98.5%、15-19歳 98.2%、20-24歳 94.3%、25-29歳 97.8%、30-39歳 96.4%と高く、50歳以上で 57.1%に低下した。

年齢別抗体保有率をみると、1型、2型、3型共に抗体陰性である割合は、0歳で 10%以上、それ以降、急激に減少し 2歳以上では 5%未満であった。一方、1型、2型、3型共に抗体陽性である割合は、0歳以降急激に上昇し、4-6歳をピークとしてその後漸減し、20代後半を最低としてその後上昇した(図1)。

また昭和 50-52 年生まれのポリオウイルス 1 型抗体保有率が低いことが指摘されているが、図 2 に示すように、同年齢群に抗体保有率の落ち込みが認められた。また 3 型に対してはいずれの年齢においても他の型に比して抗体保有率は低値であった。

0-5 歳児におけるワクチン接種回数歴別抗体保有率を図 3 に示した。1 回接種で 3 つの型ともに中和抗体が陽性になる率は 36.6%と低く、2 回接種により、85.4%に上昇した。一方で、ワクチン接種歴のない小児においても、60%はいずれかの型に対して中和抗体を保有しており、20%は 3 つの型ともに中和抗体を保有していた。

D 考察

ポリオワクチン接種率は現在も高く維持されており、0-5 歳におけるワクチン 2 回接種後の

抗体陽性率は高値であった。3 つの型ともに抗体陽性である割合は、20 代後半で一旦減少し、その後上昇していた。これは、丁度昭和 50-52 年生まれの世代に相当し、現在もなお、抗体保有率の落ち込み世代は残存していた。この世代は丁度今、父親、母親世代であり、家族に生ポリオワクチンを接種した小児がいる可能性が高くなる年齢である。子供が生ポリオワクチンを受ける際には、十分に便の取扱いに注意すると共に、同時にポリオワクチンの接種を受けることが望まれる。

E 結論

現行の生ポリオワクチンの接種率は良好であり、3 型以外においては、抗体陽性率は高く維持されていた。一方、昭和 50-52 年生まれの世代の 1 型ポリオウイルス抗体陽性率は、前後の年齢群より低く、引き続き予防接種の勧奨が必要であると考えられた。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

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

図1 年齢群別ポリオウイルス中和抗体保有率

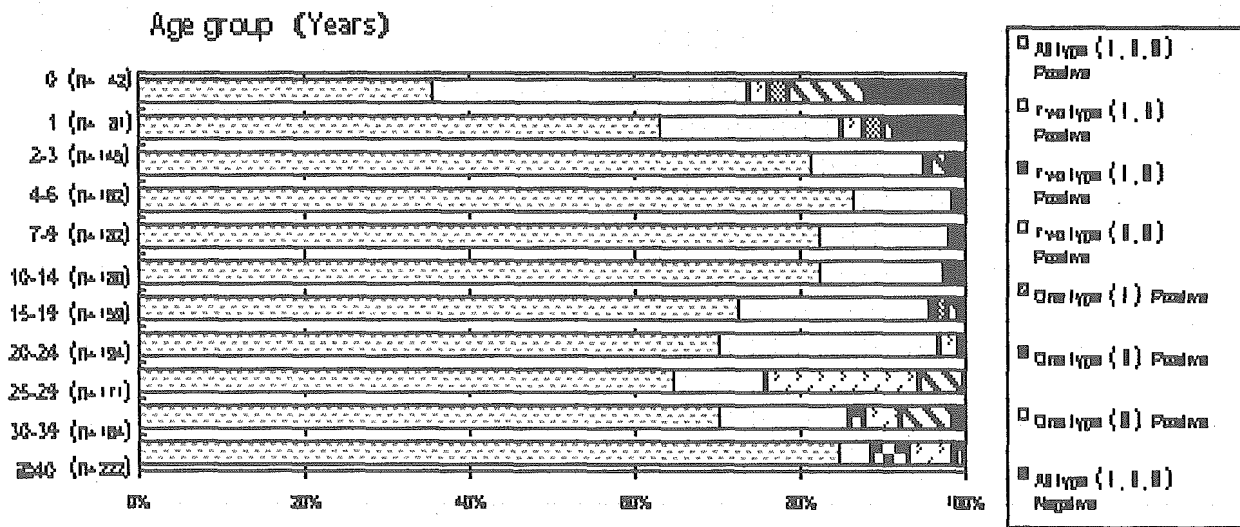
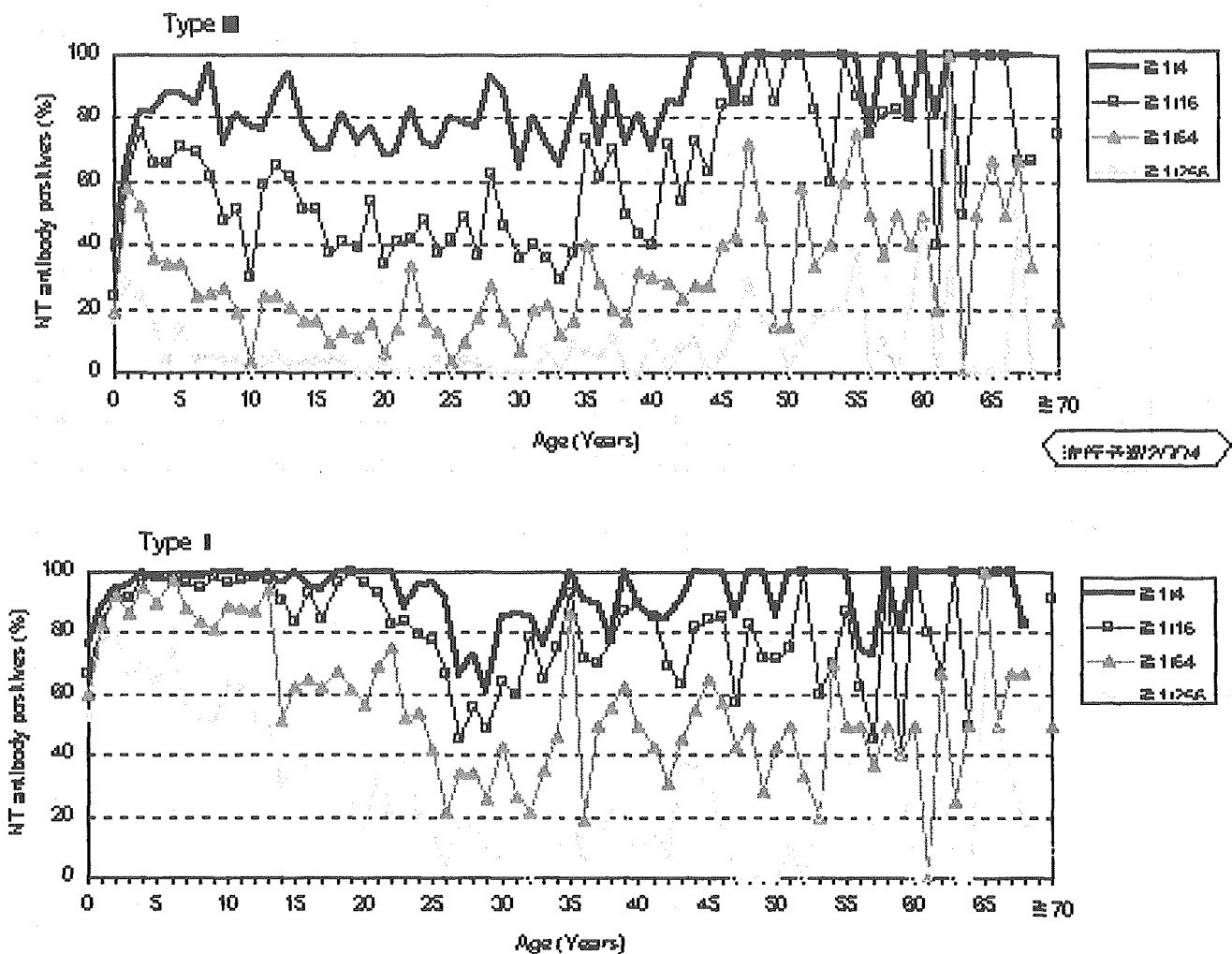


図2 年齢別ポリオウイルス中和抗体保有率



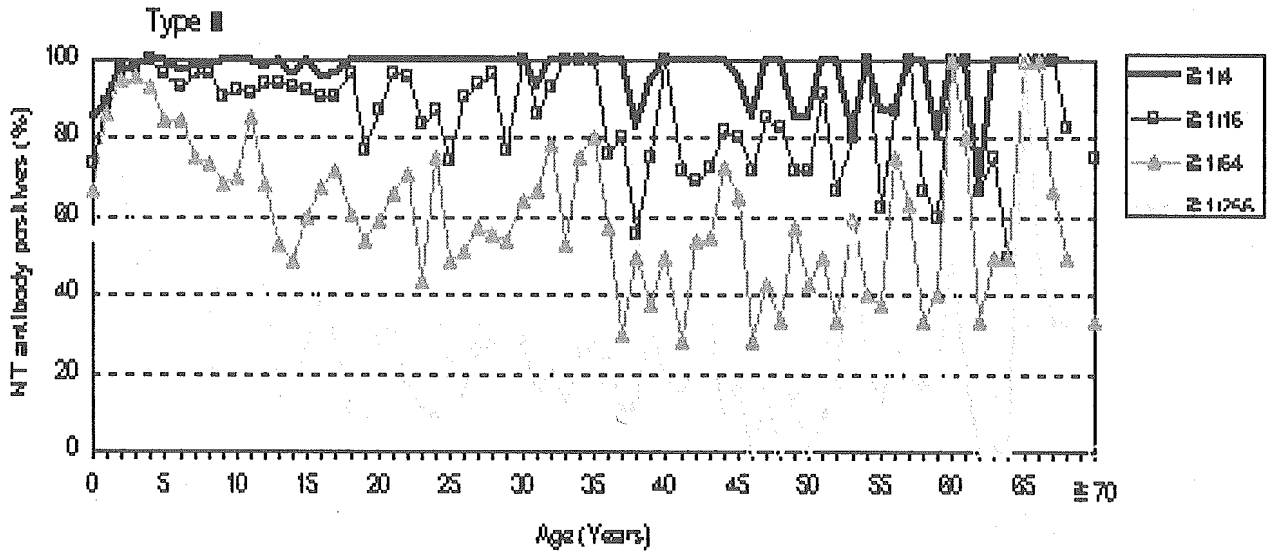
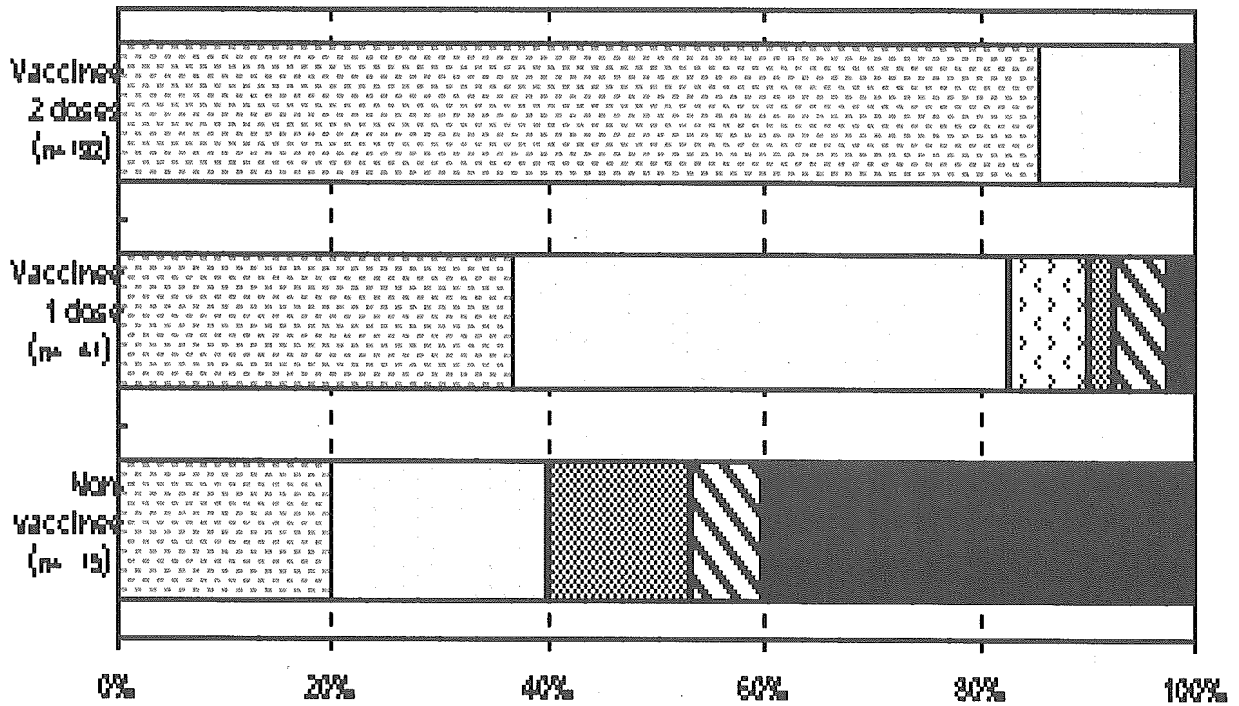


図3 ワクチン接種歴別ポリオウイルス中和抗体保有率 (0-5歳) : 凡例は図1と同じ

History of vaccination (0 - 5 years old)



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
「混合ワクチンの品質確保に関する研究」

無菌試験への保存剤の影響並びに外国製混合ワクチンの組成に関する検討

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：「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」に適した保存剤の 2-フェノキシエタノール (2-POE) の無菌試験への影響を見るために 2-POE を添加した無菌試験用培地における試験菌の生育を検討したところ、従来の直接法と同じ条件下では調べた菌株については生育阻害は見られなかった。また Hib 破傷風トキソイドコンジュゲートワクチン (HIB-TT) を製造している国外 2 社の HIB-TT, DTaP, 及び関連混合ワクチンを中心に組成を比較調査し、最近の変更点などを整理把握した。Hib ワクチンの混合化の是非に関連して米国などのワクチン接種勧告にも言及した。

A. 研究目的

国内で「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 DTaP-IPV-JP) の開発が進行中であり、規格試験法も検討されている。現在 DTaP の保存剤については製造所により保存剤無添加、チメロサル添加、2-フェノキシエタノール (以下 2-POE) 添加の 3 通りがある。IPV はチメロサルにより影響を受けることが知られていること等により DTaP-IPV に保存剤を添加する場合には 2-POE が選択される。そこで品質管理試験のうち無菌試験への 2-POE の影響を検討する。

また近年国内外で DTwP→DTaP, OPV→IPV, 単味ワクチン→混合ワクチンへの切换え、その他の新規ワクチンの開発・貿易などの動きが以前よりも活発になりその動向を常に把握す

る必要がある。

外国製混合ワクチンが輸入される可能性もあるので、国産ワクチンとは異なるその特性を把握するために情報を収集する。

B. 研究方法

1. 無菌試験への保存剤の影響

基本的に現行生物学的製剤基準収載の無菌試験法すなわち第 14 改正日本薬局第二追補収載の無菌試験法に拠った。沈降ワクチンであるため濾過不可能であるから直接法を用いた。保存剤として 2-POE を添加する場合を想定して 2-POE による菌生育の阻害について調べた。

2-POE の使用濃度は通常 0.5% とする場合が多いのでこの濃度を用いた。2-POE を液状チオグリコール酸培地、ソイビーン・カゼイン・ダイジェス

ト培地に 0.5v/v%=0.55w/v%になるようにそれぞれ添加した。これを更に各培地で 31 倍希釈 (培地 15ml に小分製品 0.5ml を接種するとして、2-POE の終濃度 0.0161v/v%=0.0177w/v%)、81 倍希釈 (培地 40ml に小分製品 0.5ml を接種するとして、2-POE の終濃度 0.00617v/v%=0.00679 w/v%) した。液状チオグリコール酸培地、2-POE 添加同培地に、新たに培養した *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* の希釈菌液を接種し 31°C で培養した。ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地、2-POE 添加同培地に新たに培養した *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* の希釈菌液を接種し 23°C で培養した。菌の生育を 5 日目まで肉眼的に観察した。

2. 混合ワクチンの組成

現在 Hib ワクチン (単味) には国産品がなく、破傷風トキソイドをコンジュゲートしたタイプのワクチン (HIB-TT) を製造している 2 社のうち 1 社から輸入承認申請がなされ、審査中である。同じ会社から DTaP/IPV, DTaP/IPV/Hib も輸入承認申請される可能性が考えられる。そこでこの会社の HIB-TT, 及び関連するワクチンを中心に、もう 1 社の製品の一部についても公称の組成を調べ比較した。情報はすべて実名で公表されているもので、論文、単行本、インターネットから収集した。

(倫理面への配慮) 本研究はヒトを対象としないため倫理上特段の問題は発生しないと判断された。

C. 研究結果

1. 無菌試験への保存剤の影響

表 1 に結果を示した。従来の接種

法 (直接法、検体と培地との量比) では各菌とも生育阻害は見られなかった。すなわち培地間で生育速度、生育した菌量に差はなかった。

2. 混合ワクチンの組成

各情報を表 2 に整理した。以下のことが把握された。

1) HIB-TT は 2 製造所がライセンスを持っているが、もとは同じ方法で作られ、同じであった 2 製造所の製品の組成が異なって来た。即ち 1 HSD 当たりの破傷風トキソイドの量が Sanofi Pasteur では 20 μ g のままであるのに対し GSK では 30 μ g と 1.5 倍に増加した。この両者を区別するために前者を HIB-TT-S, 後者を HIB-TT-G と記述した。

2) 無細胞百日咳ワクチン (aP) については GSK では PT, FHA, PRN の 3 成分で構成し、D, T との混合ワクチン (DTaP3) を製造している。

他方 Sanofi Pasteur では PT, FHA の 2 成分で構成した aP と D, T との混合ワクチン (DTaP2)、及び PT, FHA, PRN, fimbriae2+3 の 5 成分で構成した aP と D, T との混合ワクチン (DTaP5) を製造し、それぞれについて IPV, Hib との混合ワクチンを製造するという 2 系列になっている。但し同じ製造所の DTaP2 でも米国向けには各成分量・製造法の異なる aP (阪大微研が供給) を用いている。

3) Sanofi Pasteur について見ると、これまでの DTaP2/HIB-TT-S, DTaP2/IPV/HIB-TT-S, DTaP5/IPV/HIB-TT-S は、すべて凍結乾燥品の HIB-TT-S を、セットになっている液状の他のワクチン成分で用

時溶解してすぐに接種するというワクチンであり、ライセンスであったが、初めから全成分が混合された液状ワクチン (Pediace1) が開発された。

CSK においては DTaP3/HIB-TT-G (商品名 Infanrix-HIB)、DTaP3/IPV/HIB-TT-G とともに凍結乾燥品の HIB-TT-G を、セットになっている液状の他のワクチン成分で用時溶解してすぐに接種するというワクチンであり、初めから全成分が混合された液状ワクチンはない。

4) アジュバント、破傷風トキソイドなどは、日本のワクチンにおけるよりも量が多い。

D. 考察

1. 無菌試験への保存剤の影響

2-POE の作用はチメロサルと異なり静菌作用であり、殺菌的には働かない。培地による希釈で無力化されると考えられる。実際の製品の無菌試験にあたってはバリデーション試験により実証することが求められる。2-POE の *A. niger*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* に対する MIC は、それぞれ 3300, 5400, 3600, 3200, 8500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という報告があり、計算上は矛盾しない結果であった。また、2-POE の抗菌スペクトルは狭いと言われている。

2. 混合ワクチンの組成

DTaP と Hib, あるいは DTaP/IPV と Hib との混合については、別々に接種した場合に比べて Hib の免疫原性が低下するという知見があり、原因は確定していない。これについては研究報告は様々でありワクチンの種類に特異的な現象であるとも言われ

ている。各国で対応が異なっている。米国ではすくなくとも Hib については混合ワクチン化をしていない。2006 年の ACIP 勧告によれば Hib については 2005 年から変更はなく、初回免疫 (2, 4, 6 月) には DTaP/Hib は用いてはならないがブースター (12~15 月) には使ってもよい。

ヨーロッパにおいてはワクチン政策は国によって様々であり、国の数だけあると言われる。ワクチンの種類も、接種回数・スケジュールも、DTwP か DTaP かも、混合するかしないかも、国それぞれである。我が国もそうであるがそれぞれの国において独自の歴史を経てそれぞれの制度があるのは当然である。言語の制約もあり、インターネットが利用できても情報入手には偏りが生じ、特定の少数の国の制度だけが取り上げられ易いという方法の限界に心すべきと思われる。この点をふまえて英国の場合にふれる。英国 NHS (The National Health Service (国営医療保険制度、国民保健サービス)) は 2004 年 8 月に DTwP から DTaP へ、OPV から IPV へ、即ち DTwP/Hib と OPV から DTaP/IPV/Hib へと公費で接種するワクチンを変更した。DTaP と Hib との混合ワクチン化は Hib の免疫原性を低下させるという問題はブランドによるものであるとして一社の一製品 (商品名 Pediace1) のみを指定した。2 年後の 2006 年にこの新制度の結果について評価することになっている。

E. 結論

DTaP-IPV-JP に保存剤として用いられる可能性のある 2-POE は無菌試験に影響を与える可能性は少ない。国産 DTaP と海外 2 社の DTaP とでは組成や成分量が異なっている。Hib ワク

チンを DTaP、DTaP/IPV に混合するかどうかは国によって方針が異なっている。国産ワクチンのない Hib ワクチンを導入するならば、単味ワクチンとして DTaP、DTaP/IPV との同時接種という選択肢も含めて検討する必要がある。

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

表 1. 2-POE 添加培地における菌の生育

培地	試験菌	接種菌数	生育					
			2-フェノキシエタノール濃度 ($\mu\text{g/ml}$)					
			0		67.9		177	
			No.1	No.2	No.1	No.2	No.1	No.2
液状チオグリコール酸培地	<i>S. aureus</i>	43.5	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i>	26	+	+	+	+	+	+
ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地	<i>B. subtilis</i>	14	+	+	+	+	+	+
	<i>C. albicans</i>	16.6	+	+	+	+	+	+

表2. 国外2社のHIB-TT及び関連ワクチンの組成の比較

組成	Trade names	Manufacturer	Country	HIB		Adjuvant mg	D	T	aP			IPV		
				PRP µg	TT µg				PT µg	FHA µg	PRN µg	fimbriae2+3 µg	Type1 Du	Type2 Du
HIB-TT-G	Hiberix	GSK		10	30									
HIB-TT-S	ActHIB	Sanofi Pasteur	UK, USA	10	20									
DTaP2	Tripedia	Sanofi Pasteur (USA)	USA			AI (0.17)	6.7 Lf 5 Lf	23.4	23.4					
DTaP2/HIB-TT-S (TripediaとActHIBを同梱、用時ActHIBをTripediaで溶解、ブースターのみ)	TriHIBit	Sanofi Pasteur (USA)	USA	10	20	AI (0.17)	6.7 Lf 5 Lf	23.4	23.4					
DTaP2	Triavax	Sanofi Pasteur (France)	Europe			Al(OH) ₃ , Al (0.3)	15 Lf 5 Lf	25	25					
DTaP2	Triaxim	Sanofi Pasteur (France)	outside Europe			Al(OH) ₃ , Al (0.3)	15 Lf 5 Lf	25	25					
DTaP2/IPV	Tetrvac	Sanofi Pasteur (France)	Europe			Al(OH) ₃ , Al (0.3)	30 IU 40 IU	25	25			40	8	32
DTaP2/IPV	Tetraxim	Sanofi Pasteur (France)	outside Europe			Al(OH) ₃ , Al (0.3)	30 IU 40 IU	25	25			40	8	32
DTaP3	Infanrix	GSK (Bergium)	UK			Al(OH) ₃ , Al (≤0.625)	30 IU 40 IU	25	25	8				
DTaP3	Infanrix	GSK (Bergium)	USA			Al(OH) ₃ , Al (≤0.625)	25 Lf 10 Lf	25	25	8				
DTaP3/IPV	Infanrix IPV	GSK (Bergium)	UK			Al(OH) ₃ , Al (0.5)	30 IU 40 IU	25	25	8		40	8	32
DTaP3/IPV/HIB-TT-G (Infanrix IPVとHiberixを同梱、用時HiberixをInfanrix IPVで溶解)	Infanrix-IPV+Hib	GSK (Bergium)		10	30	Al(OH) ₃ , Al (0.5)	30 IU 40 IU	25	25	8		40	8	32
DTaP5	DAPTACEL	Sanofi Pasteur (Canada)	USA			AlPO ₄ (1.5), Al (0.33)	15 Lf 5 Lf	10	5	3				
DTaP5	Tripacel	Sanofi Pasteur (Canada)	Canada			AlPO ₄ (1.5), Al (0.33)	30 IU 40 IU	10	5	3				
DTaP5/IPV	QUADRACEL	Sanofi Pasteur	Canada			AlPO ₄ (1.5), Al (0.33)	15 Lf 5 Lf	20	20	3		5	40	32
DTaP5/IPV/HIB-TT-S (QuadracelとActHIBを同梱、用時ActHIBをQuadracelで溶解)	PENTACEL	Sanofi Pasteur	Canada	10	20	AlPO ₄ (1.5), Al (0.33)	15 Lf 5 Lf	20	20	3		5	40	32
DTaP5/IPV/HIB-TT-S (5つの成分ワクチンすべてが初めから混合された液状製品)	Pediacel	Sanofi Pasteur	UK	10	20	AlPO ₄	30 IU 40 IU (15 Lf)	20	20	3		5	40	32
DTaP2/IPV/HIB-TT-S (TetrvacとActHIBを同梱、用時ActHIBをTetrvacで溶解)	PENTAVAC	Sanofi Pasteur (France)	Europe	10	20	Al(OH) ₃ , Al (0.3)	30 IU 40 IU	25	25				40	32
DTaP2/IPV/HIB-TT-S (TetraximとActHIBを同梱、用時ActHIBをTetraximで溶解)	PENTAXIM	Sanofi Pasteur (France)	outside Europe	10	20	Al(OH) ₃ , Al (0.3)	30 IU 40 IU	25	25				40	32

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

「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：海外では、DTaP に HepB、IPV、Hib など混じた混合ワクチンが広く実用化されている。しかし、これらの混合化により、有効性などのワクチンの品質への影響は十分解明されていないので、今回これらの混合ワクチンの有効性（ジフテリアと破傷風トキソイドの力価）を測定した。その結果、HepB、IPV、Hib の混合により DTaP のジフテリアトキソイドの力価は大きな影響を殆ど受けない事がわかった。一方、破傷風トキソイドの力価は、HepB や IPV の混合では、ジフテリアトキソイドと同様に影響は少なかったが、破傷風トキソイドをキャリア蛋白として含んでいる Hib を混合した場合、破傷風トキソイドの力価は大きく上昇する事が判った。Hib を混合した DTaP を導入する際には、破傷風抗体価の推移などを広く調査する必要がある。

A. 研究目的

ワクチンの効率的接種やコスト削減のためには、ワクチンの多価化が重要である。海外では、既に小児に対して広く接種されている沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン (DTaP) に、ヘモフィルスインフルエンザ B 型菌ワクチン (Hib)、不活化ポリオワクチン (IPV)、そして B 型肝炎ワクチン (HepB) などを混合した混合ワクチンが広く接種されている。今後、日本国内でもこのような混合ワクチンの導入が期待されているが、

これらのワクチンでは混合化による有効性への影響は十分調べられていない。そこで、現在海外で接種されている、これらのワクチンのジフテリアトキソイドと破傷風トキソイドの力価を測定し、ワクチンの混合化によるこれらの力価が受ける影響の程度を検討した。

B. 研究方法

現在、海外で市販されている DTaP-IPV-Hib、DTaP-IPV、DTaP、そして Hib を輸入し、国内の生物学的製剤基準に

従い、ジフテリアと破傷風トキソイドの力価を測定し、2004年度に国内で国家検定に出検されたDTaP(20件)の力と比較・検討した。

C. 研究結果

1. 海外で市販されている各種混合ワクチンのジフテリアトキソイドの力価 (表.)

今回、輸入したDTaP-IPV Hib(1件)、DTaP-IPV B-HepB(1件)、DTaP-IPV(2件)、そしてDTaP(2件)のジフテリアトキソイドの力価(65-122単位/mL)には大きな違いはみられなかった。国内で2004年度に国家検定に出検されたDTaP(20件)の平均力価は120単位/mLであったことから、海外で接種されているこれらのワクチンは国内で製造されているDTaPと同様な力価を保持していた。

2. 海外で市販されている各種混合ワクチンの破傷風トキソイドの力価 (表.)

今回、輸入したDTaP-IPV Hib(2件)、DTaP-IPV B-HepB(1件)、DTaP-IPV(2件)、そしてDTaP(2件)の破傷風トキソイドの力価(179-3376単位/mL)はであった。国内の2004年度に出検されたDTaP(20件:平均力価143単位/mL)に対して、DTaP-HepB、DTaP-IPV、そしてDTaPは1.25-5.02倍の力価であったが、DTaP-IPV-Hibは19.8と23.6倍の力価であった。

3. DTaP-IPV-Hibとこれらの構成ワクチン、そしてHib単独ワクチンの破傷風トキソイドの力価 (表.)

DTaP-IPV-Hib(液状品であるDTaP-IPVで、凍結乾燥品であるHibを溶解し、DTaP-IPV-Hibとするキットワクチン)の力価が2830・3376単位/mLであったのに対して、これらを構成するDTaP-IPVとHibは、それぞれ284・373単位/mLと777・937単位/mLであった。また、Hibの単独ワクチンであるHiberix(GSK、キャリア蛋白とし破傷風トキソイドを含む)は434単位/mL、PedavaxHib(Merck、キャリア蛋白として髄膜炎菌の外膜蛋白を含む)は検出限界未満(破傷風毒素の攻撃により免疫マウスが全て死亡)であった。これらは、平均値として国内の2004年度に出検されたDTaPよりも、DTaP-IPV-Hibで約21.6倍、DTaP-IPVで約2.28倍、Hib(DTaP-IPV-Hibの構成成分)で約5.97倍で、Hib(Hibrix:単独ワクチン)で3.03倍高い価であった。

D. 考察

ジフテリアトキソイドの力価に関しては、今回試験したDTaP-IPV-Hib、DTaP-IPV、DTaP-HepB、DTaPの結果より、国内のワクチン製造所がDTaPにHib、IPV、そしてHepBを混合しても力価が大きく変化する事はないと考えられた。破傷風トキソイドの力価でも、DTaPへのIPVやHepBの混合による影響は大きく無いと推測されるが、Hibを混合した場合、Hibの作用によりDTaP-IPVの力価が10倍以上に上昇する事がわかった。

ヘモフィルスインフルエンザB型菌に対するワクチンであるHibは、ワクチン中にヘモフィルスインフルエンザB型菌の莢膜多糖体に対するキャリア蛋白とし

破傷風トキソイドや髄膜炎菌の外膜蛋白など含んでいる。今回検討した2種類のHibは、Hiberixは破傷風トキソイドを、PedavaxHibは髄膜炎菌の外膜蛋白を、それぞれ含んでいる。Hiberixはそれ自身で国内のDTaPの6倍程度の力価を有しているが、PedavaxHibは破傷風トキソイドの力価が認められなかった。HibによるDTaP-IPVの破傷風トキソイドの力価の増強作用はキャリア蛋白として破傷風トキソイドを含むHibの作用であると推測される。

E. 結論

IPV、HepBの混合によるDTaPのジフテリアと破傷風トキソイドの力価は大きく影響を受けないと推測される。一方、HibをDTaPに混合した場合、ジフテリアトキソイドの力価は大きな影響を受けないが、破傷風トキソイドの力価は、混合前よりも10倍以上に上昇する可能性がある。

F. 健康危険情報

現在、海外では、ワクチンの効率的な接種やコスト削減のために、DTaPと、HepB、IPVやHibなどとの混合ワクチンが導入され、広く接種されている。今後、日本でもこれらの混合ワクチンの導入が検討されると考えられる。現在、日本で接種されているDTaPは、小児期の4回の接種により破傷風の発症防御に十分な抗体

(0.01単位/mL以上)を誘導する事がわかっている。しかし、DTaP-IPV-Hibに含まれるHibは、現在国内で接種されているDTaPよりも高い破傷風トキソイドの力価を有し、これらのHibを日本国内の

DTaPと混合した場合、DTaPの破傷風トキソイドの力価は増強し、現在以上に破傷風トキソイドに対して高い免疫を誘導する可能性がある。現在までに、日本国内では、これ程の高い破傷風トキソイドの力価(2000単位/mL以上)を持つワクチンを使用した経験が無い。そこで、今後、日本国内でこのような混合ワクチンを導入する際には、ワクチンの接種後における破傷風抗体価の推移や副反応を十分に調査する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 岩城 正昭、堀内 喜信、小宮 貴子、福田 靖、荒川 宜親、高橋 元秀：レーザー粒径測定型血小板凝集計を用いたフロキュラシオンアッセイ系の構築、第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月 大阪市

(2) 福田 靖、岩城 正昭、小宮 貴子、荒川 宜親、高橋 元秀：ヘモフィルスインフルエンザB型菌ワクチンに含まれる破傷風トキソイドの免疫原性の検討、第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月 大阪市

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

表. 海外市販各種ワクチンのジフテリアと破傷風トキソイドの力価

製造所	ワクチン名	製剤	ジフテリアトキソイド			破傷風トキソイド		
			力価	95%信頼限界		力価	95%信頼限界	
Aventis	Pentavac ^{a)}	DTaP-IPV-Hib ^{b)}	122	89 -	170	3376	1682 -	23646
		DTaP - IPV	81	59 -	112	373	232 -	600
		Hib ^{b)}		未実施		777	492 -	1448
	Pentaxim ^{a)}	DTaP-IPV-Hib ^{b)}		未実施		2830	1472 -	16393
		DTaP - IPV		未実施		284	169 -	447
		Hib ^{b)}		未実施		937	577 -	1953
	Tetravac	DTaP - IPV	76	56 -	101	179	121 -	247
Tripacel	DTaP	65	48 -	87	487	362 -	672	
GSK	Pediarix	DTaP-IPV-Hib ^{b)}	76	56 -	101	718	522 -	1040
	Infarix-IPV	DTaP - IPV	80	58	110	612	390 -	1072
	Infarix	DTaP	74	55 -	99	347	255 -	469
	Hiberix	Hib ^{b)}		未実施		434	274 -	711
Merck	PedvaxHib	Hib ^{c)}		未実施		測定レベル以下		
国内製造所 2004年度出検分		DTaP	120	(平均値)		143	(平均値)	

(U/mL)

^{a)} DTaP-IPV-Hibは、Hib（凍結乾燥品）をDTaP-IPV（液状）で溶解後用いるキットワクチン

^{b)} キャリア蛋白として破傷風トキソイドを含む製剤