

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」

―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 片岡紀代、落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、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、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、特に局所反応原性の評価を行った。併せてエンドトキシン試験の適用可能性を確認した。

A. 研究目的

不活化ポリオ沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合(DTaP-IPV)ワクチンの実用化に向け、試作品に対して動物モデルを用いた安全性評価を行う。特に昨年度までに海外のDTaPが強い局所反応原性を示す可能性が示されたことから、臨床的性状評価が可能なモデル開発を行う。併せてエンドトキシン試験の適用可能性を確認する。

B. 研究方法

エンドトキシン試験は生物学的製剤基準に準じて実施した。検体の反応干渉作用は、標準エンドトキシンを添加して評価した。また、2型のIPV原液にエンドトキシン陽性反応が認められるとの報告があり、その際用いられた試薬を含め、確認試験を行った。

昨年報告したマウス足蹠皮下およびウサギ背部皮内接種による海外製ワクチンを陽性対照とした局所反応原性評価モデルを用い、国内5社のDTaP及びDTaP-IPV試作品

についての評価を行った。また海外では筋肉内に接種することを考慮し、局所反応モデルの臨床的性状評価の性能向上を図るため、更にマウス大腿部筋肉内50 μ L投与により評価する方法を追加し、試作ワクチンおよびIPVの安全性を確認した。

C. 研究結果

1 エンドトキシン試験

DTaP-IPV開発初期の段階では、DTaPに比べてアルミアジュバントを増量した結果、添加エンドトキシンに対する阻害作用を示す試作品がみられたが、新たに作成されたロットでは改善され、全試作品についてエンドトキシン試験の適用が可能となった(表1)。IPV2型原液でエンドトキシン試験陽性反応が見られたという報告があり、その際用いられたES-J以外にエンドスペシーおよびES-IIIの各リムルス試薬を用いて確認試験を行った。その結果、ES-Jによるカイネティック比濁法では、試験した3ロットはそれぞれ0.0688 EU/mL、0.1277

EU/mL、0.1525 EU/mL、ゲル化法では、0.125、0.250、0.250 EU/mL と有意な検出が認められた。一方、エンドスペシー（カインティック比色法）で試験した結果、すべて0.0122 EU/mL 以下、ES-Ⅲを用いたカインティック比濁法では0.0095 EU/mL 未満であった。またいずれの試薬の場合も反応干渉は認められなかった。エンドスペシーおよびES-Ⅲは生物製剤用にバリデートされた試薬であり、ES-Jによる陽性反応は、試薬性能に関連した非特異反応の可能性が示唆された。

2 局所反応原性試験

マウス足蹠皮下に0.05mL (2.5mL/kg) 及びウサギ背部皮内に0.1mL (0.04mL/kg) 接種して経日的に腫脹を測定したところ、国内5社のDTaP、DTaP-sIPV、sIPVいずれも海外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(図1、2)。

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。以上マウス足蹠、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(図3)。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。

D. 考察

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

適切な試薬を用いることにより、DTaP-IPVに対するエンドトキシン試験適用は可能である。局所反応原性については、複数の動物種、接種量および接種部位を用いて性状の異なる同種のワクチンを比較、一貫してワクチン間の差異を検出できる条件下で、DTaPとDTaP-sIPVの間に差を認めなかった。従ってsIPVの局所反応への影響は少ないと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 参考文献
2. 学会発表

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
(予定を含む)
特記すべきものなし

表1. DTaP-IPVのエンドトキシン試験

製造所	内毒素含量	反応干渉
	EU/ml	添加回収率(%)
A社	0.021	112.3
B社	0.029	101.8
C社	0.026	92.3
D社	0.012	98.3
E社	0.091	89.2

図1. マウス足蹠腫脹

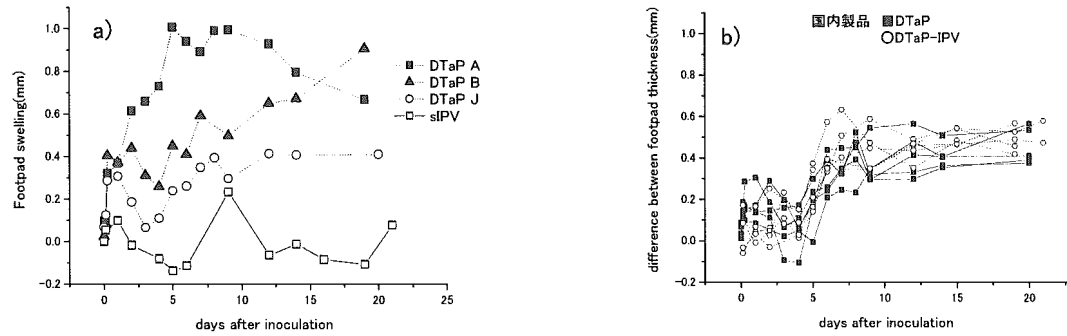


図2. ウサギ背部皮内接種局所の腫脹

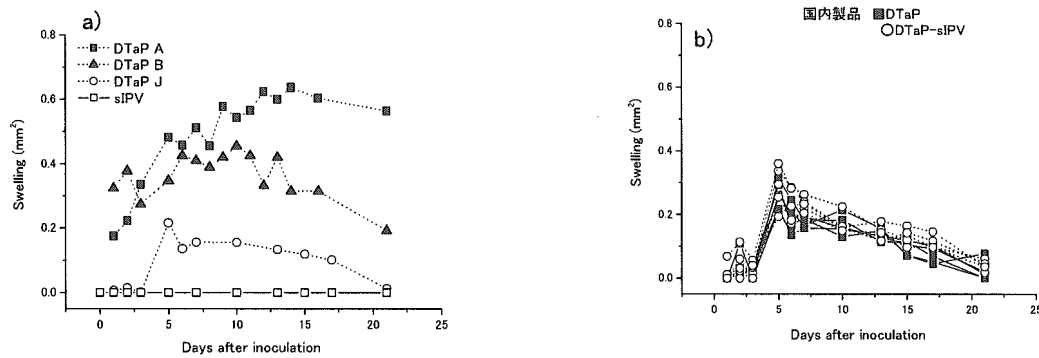
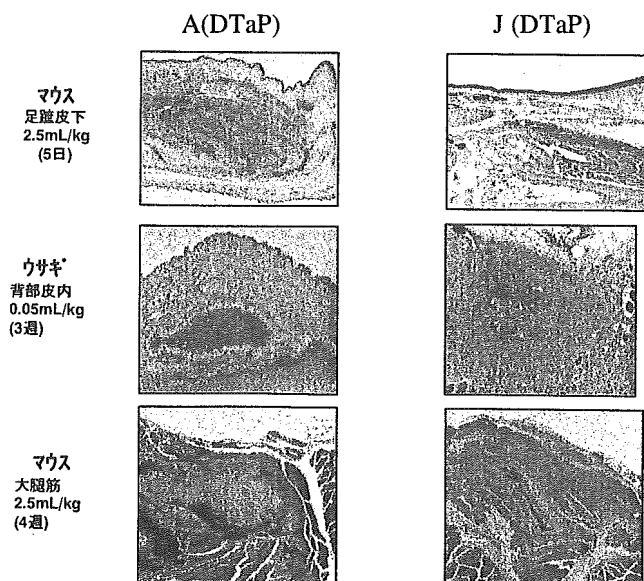


図3. 局所反応動物モデルの病理学的評価



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」

分担研究報告書
不活化ポリオワクチンプロフィシェンシー試験

分担研究者

堀内善信 国立感染症研究所細菌第二部
武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部

協力研究者

塩先巧一、水野喬介、野崎周英、園田憲悟、後藤優治
(財)化学及血清療法研究所第二研究部
山下利明、末原章宏 武田薬品工業(株)生物製剤部
小川博暢 (財)阪大微生物病研究会観音寺研究所
太田芳宏 (財)ポリオ研究所技術部
渡辺徹也 デンカ生研(株)品質管理第一部
高橋元秀 国立感染症研究所細菌第二部
白土東子、小川智子、小西恭子、岡 智一郎、李 天成、染谷雄一、宇田川悦子
国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 ラット免疫原性試験における中和抗体価は、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とも相関は認められなかった。中和抗体価には高頻度に検出限界以下の値が含まれることから、近似推定法を作成した。近似最尤法による平行線定量法と Probit 法で求めた結果が一致した。DTaP-IPV 試作品も製造所毎の DTaP の性状に関わらず同等の力価であることが確認され、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はない。

A. 研究目的

わが国において経口生ポリオワクチン(OPV)から弱毒株由来不活化ポリオワクチン(sIPV)への円滑な移行のためには、DPT ワクチンとsIPVの混合ワクチンの導入が望ましい。海外では既にIPVとDPT混合ワクチンが市販されており、乳幼児の予防に用いられている国もある。我が国への導入に当たっては、国内と海外の予防接種計画、検定基準等に違いがあることでもあり、ワクチン接種の時期および含有成分等についての検討が必要である。新たなワクチンを導入するためには、製剤の品質規格を作成した上で、臨床試験でヒトへの有効性安全性を確認していくこととなる。早期のDPT-IPVワクチンの導入には、生物学的製剤基準の作成を含め、ワクチンの製剤化を早急に行う必要がある。

本研究では、現行のOPVに用いられているセービン株を不活化して作製したわが国で開発

されたIPVとDPTとの混合ワクチンについて生物学的製剤基準の案を作成する過程で浮上してきた、ラット免疫原性試験に関し、プロフィシェンシー試験によって各機関の習熟度を評価し、同時にsIPV参照品の評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

本研究班の生物学的製剤基準(案)小委員会で作成した、「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)」に基づき、ラット免疫原性試験を行なった。以下に全機関で共通に用いた材料と方法を示した。

動物、及び接種方法

ラットは日本 SLC 株式会社産のメス、Wistar (SPF)を用いた。7週齢で入荷、8週齢で接種した。後足筋肉内に一匹あたり0.5 ml接種した。

接種材料、及び検体の希釈

sIPV #04C および#05J については、原液、2 倍希釈、4 倍希釈、および 8 倍希釈を、共通 DPT-sIPV 試作品については、原液、4 倍希釈、16 倍希釈、および 64 倍希釈を用いた。各機関で調製した DPT-IPV 試作品については、各機関で最適と思われる希釈倍数を用い、施設ごとに試験を行なった。DPT-sIPV 試作品は一回だけの試験とした。

中和抗体の測定

接種後、21 日目に採血し、ポリオウイルスに対する中和抗体価をマイクロプレート法で測定した。ポリオウイルス抗血清、攻撃ウイルスは日本ポリオ研究所より分与された。

中和抗体価、および統計解析

国立感染症研究所において、近似最尤法による平行線定量法と Probit 法等で解析した。

C. 研究結果、及び考察

以下に試験結果を示す。

1. ラットの体重が力価に及ぼす影響

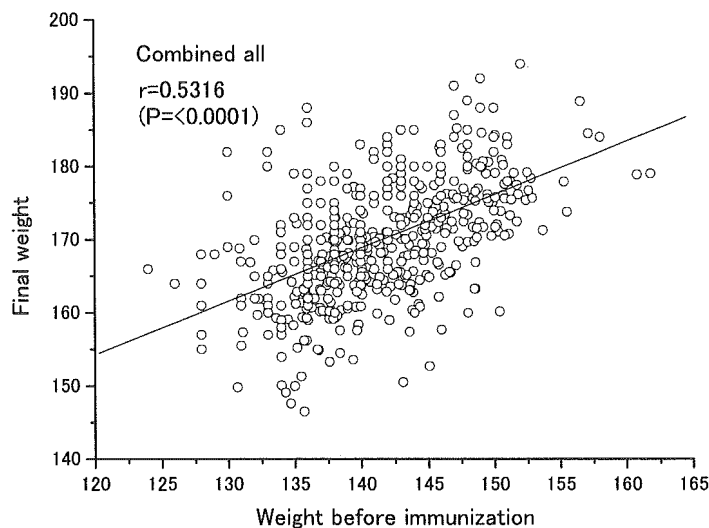


図1. 試験開始前後でのラットの体重の変化

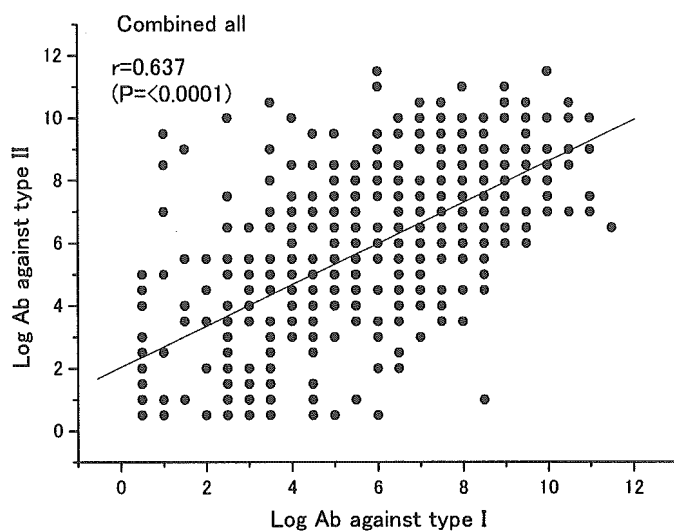


図2. ラットのポリオウイルス1型と2型に対する抗体産生

偏ることがないようにするためには、動物への検体および用量の割付の際に注意深く確率化(ランダム化)を行う必要があるが、その際体重は有効な指標となり得ないと考えられる。

IPV 力価試験の際の影響因子を評価した。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。図に示すように、特に免疫前と採血時の体重の間には強い相関が認められた。しかし入荷時、免疫前、採血時の体重のいずれにも免疫前から採血時の間の体重増加との相関は認められず、採血時のラットの体重は入荷時あるいは免疫前の体重にある程度依存している可能性が示唆された。また同一個体からの血清についてI型～III型の3種の抗体価を測定することから、これらの免疫反応が互いに独立か、または個体に依存して互いに相関したものであるかを調べた。その結果I、II、III型それぞれの抗体価相互間に有意な相関が認められた。こうした型間の抗体価の相関はワクチンの用量に依存せず、同一検体の同一用量を免疫された動物においても認められたことから、ラット個体の反応性の差によるものと考えられた。すなわち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すものと思われる。そこでこうした反応性と体重の間に相関が見られる場合、体重に基づく厳重な割付の管理が必要となる。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。従って反応性の高い動物や低い動物が特定の検体や用量に

2. 最小中和抗体価の扱いについて

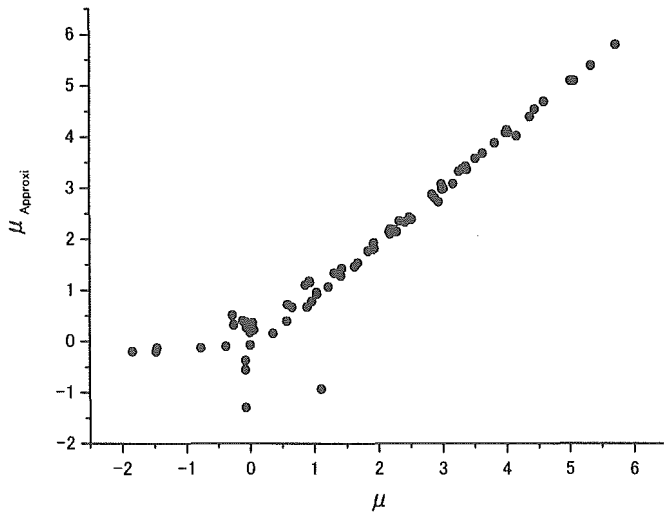


図3. 最尤推定平均抗体価(μ)とその近似推定値(μ_{Approx})

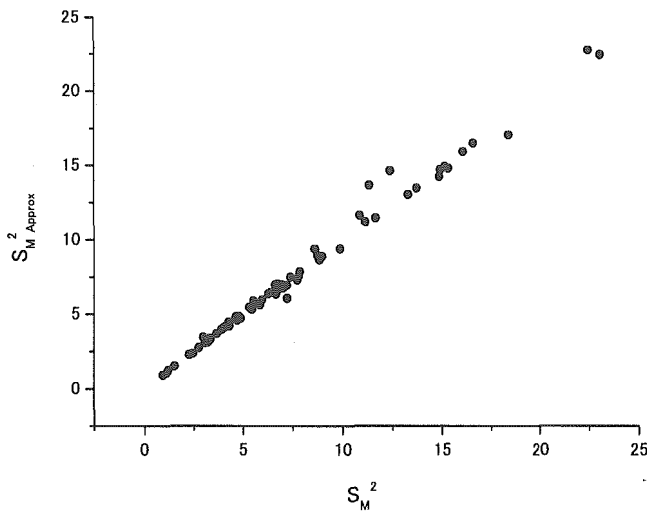


図4. 分散の最尤推定値(S_M^2)とその近似推定値($S_M^2_{\text{Approx}}$)

一致した。分散は、 S^2 をCut-off値を含む実測値の分散、 $S_M^2_{\text{Approx}}$ を分散の近似推定値、 S_M^2 を分散の最尤推定値とすると、 $S_M^2_{\text{Approx}}$ は、 $S_M^2_{\text{Approx}} = S^2(0.6297 + 0.2947 \times \exp(h/0.3195) + 0.03447 \times \exp(2h/0.3195))$ により求められる。こうして求めた $S_M^2_{\text{Approx}}$ は図に示すように S_M^2 とよく一致した。

そこで当面この近似推定法を用いて計算することし、結果については一般的なProbitによる方法と比較、確認することとした。

ラットを用いた力価試験では、2を底とした対数抗体価として得た測定結果より、実験毎、型毎の浮動カットオフ値を用いて反応陽性率を求め、Probit分析により標準品に対する相対力価を求めることとされている。その場合、100%、0%以外の陽性反応率の結果が2用量以上必要となるが、この条件を満たさない結果となる場合もある。またProbit変換により精度の損失が生じうる。ただし測定値に高頻度に検出限界以

下の値が含まれることから、平均抗体価や分散を求めるには、切れた分布として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。mYをCut-off値を除外した測定値の平均、 μ を最尤推定した平均値、 μ_{Approx} を平均値の近似値とすると、

$$\mu_{\text{Approx}} = mY(-1.579 \cdot h + 1.068)$$

の関係が成り立つ。但しhはカットオフ値の出現確率である。こうして求めた平均値の近似値は、図にみられるように0<の区間で最尤推定により求めた平均値とよ

3. sIPV 参照ワクチンの力価

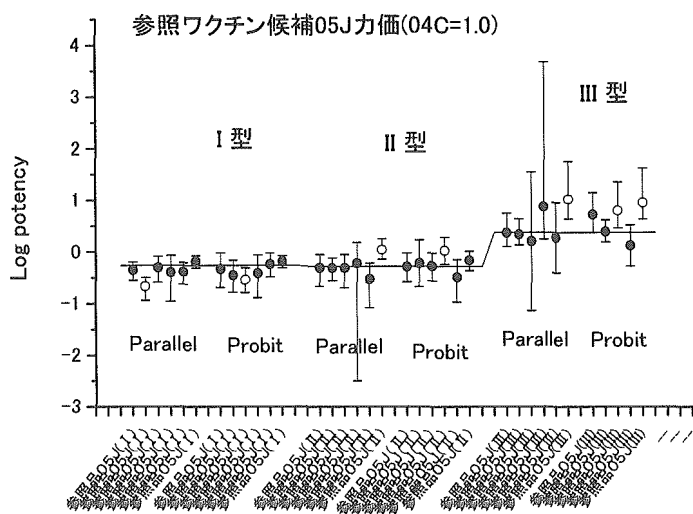
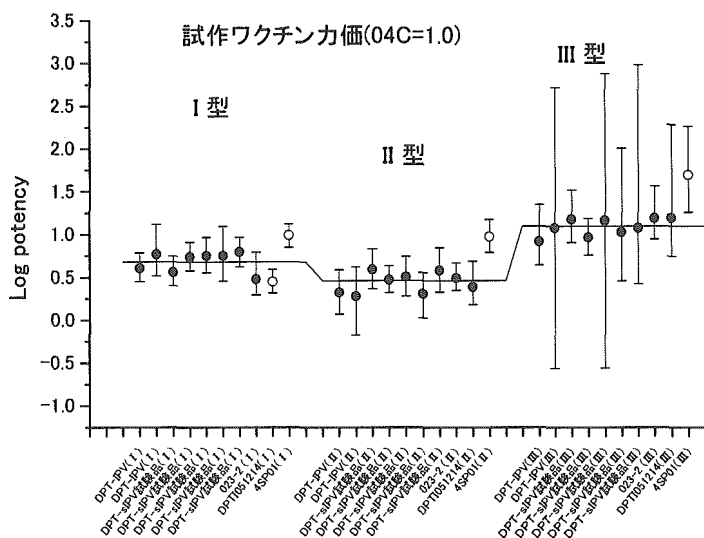


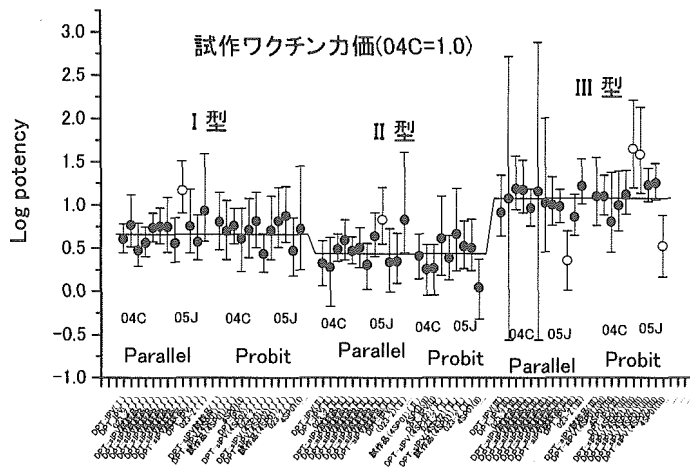
図5. 各施設での#05Jの#04Cに対する相対力価

現行#04Cの後継参照品候補として#05Jを作製し、感染研、日本ポリオ研、阪大微研、武田、化血、デンカ生研で力価標定のための測定を行うこととした。1回目の試験が終了し、結果を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。その結果#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。また近似最尤法による平行線定量法とProbit法で求めた結果が一致するか検討したところ、図に示したようにI型、II型、III型ともよく一致することが確認された。ただ、#04Cと#05JのI型、II型、III型の抗原量はそれぞれ同等であるにもかかわらず、いずれも#04Cと#05Jの間に有意な違いが認められた。その原因として、#04CのI型、II型の力価が上昇しIII型が低下したか、#05J調製用原液のI型、II型の力価が保存中に低下しIII型が上昇した可能性が考えられる。いずれにしろ、早急に解決する必要がある。



不活化ポリオの予防接種を行う場合DTaPとの混合ワクチンとして用いられる可能性が高い。初回、追加接種で異なる製造所のワクチンが区別なく使われる可能性が高いことから、製造所毎に力価が異なる場合、最終的な有効性に影響が出る可能性があり、製造所によらずDTaP-IPVは互換使用が

図6. 各施設での共通 DPT-sIPV の#04C に対する相対力価



可能である必要がある。共通 DTaP-sIPV 試作品については感染研、日本ポリオ研を含めた施設で力価試験を行った。また、DTaP 製造施設独自の試作品についても当該施設で力価試験を行なった。その結果、いずれの試作品も製造所毎の DTaP の性状に関わらず同等の力価であることが確認され、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

図7. 各施設で調製した DPT-IPV の#04C に対する相対力価

と考えられた。さらに、IPV 添加による DPT の安全性に対する影響は検出されなかったことから、臨床評価については DPT の実績をもとに IPV 添加追加の影響評価が主要課題と考えてもよい可能性が示唆された。また#04C に対して力価を算定した#05J に対して試作品の力価を計算し、#04C に対して計算した力価と比較した。結果は図に示すようによく一致していた。さらに近似最尤法による平行線定量法と Probit 法で求めた結果を比較したところ、よく一致していた。

Probit 法に比べて近似最尤法による平行線定量法では計算不能の結果となる可能性は低い。また Probit 法では例えば 10 匹の動物から陽性率などの 1 個のデータを得る事になるが、平行線定量法の場合 10 個のデータからの平均値に加えて分散といった精度情報が得られる。

D. 結論

今回の試験では、機関による差が見られず、
習熟度に問題点はみいだされなかった。
sIPV 参照品に関しては2回目、3回目の試験
が終わってから評価する。

なし

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

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」

分担研究報告書

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

塩先巧一 (財) 化学及血清療法研究所第二研究部
山下利明 武田薬品工業(株) 生物製剤部
小川博暢 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所
太田芳宏 (財) ポリオ研究所技術部
渡辺徹也 デンカ生研(株) 品質管理第一部
高橋元秀 国立感染症研究所細菌第二部
堀内善信 国立感染症研究所細菌第二部
武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部
白土東子 国立感染症研究所ウイルス第二部
宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 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。試験方法、および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。

A. 研究目的

先進国のほとんどは、すでに IPV (通常、4回接種) を使用している。しかし、OPV から IPV に転換するには、高い接種率を保持することが必須の条件となる。そのため、公衆衛生審議会感染症分科会ではポリオ予防接種検討小委員会の答申をうけ (平成15年3月)、ポリオ不活化ワクチンの早期導入が必須であること、そして OPV から IPV への円滑な移行のためには、DPT ワクチンと IPV の混合ワクチンの導入が望ましいとしている。海外では EPI 対象疾患であるこれら4疾患に対して、IPV と DPT 混合ワクチンが既に市販されており、乳幼児の予防に用いられている国もある。我が国への導入に当たっては、国内と海外の予防接種計画、検定基準等に違いがあることでもあり、ワクチン接種の時期、接種経路および含有成分等についての検討が必要である。新たなワクチンを導入するためには、製剤の品質規格を作成した上で、臨床試験でヒトへの有効性安全性を確認していくこととなる。そのため、早期の DPT-IPV ワクチンの導入には、生物学的製剤基準の作成を含め、ワクチンの製剤化を早急に行う必要がある。

本研究では、現行の OPV に用いられているセービン株を不活化して作成したわが国で開発された IPV と DPT との混合ワクチンについて、免疫原性の試験方法の確立、製造方法、及び品質管理試験方法を標準化するための生物学的製剤基準の案を作成することを目的とする。

B. 研究方法

沈降精製百日せきワクチン、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド、沈降精製百日せきワクチンジフテリア破傷風混合ワクチンの生物学的製剤基準、およびセービン株由来不活化ポリオワクチン (sIPV) の生物学的製剤基準 (案) を参考にして作製した「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)」について、以下のメンバーから成る生物学的製剤基準 (案) 小委員会を発足させ、審議した。

C. 研究結果、及び考察

平成17年9月16日、10月15日、および11月17日に小委員会を開催し、基準 (案) の全

での項目を検討した。本報告書の末尾に確定した基準（案）を添付した。検討過程でラット免疫原性試験に関して以下の点を決定し、同時に試験を行なった。

1. プロフィシェンシー試験を3回行い、各機関の習熟度を評価する。同時に不活化ポリオワクチン参照品を評価した。試験結果は、分担研究報告書として取りまとめた。
2. 試験に用いる試薬の製造記録、試験記録、および細胞に関する継代歴、感受性試験等に関する記録を確認し、ドキュメントとして整備した。本報告書の末尾に記録を添付した。
3. 統計解析法を評価し、必要に応じ新たな解析法を配布した。

D. 結論

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。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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

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（案）

1 本質及び性状

本剤は、百日せき菌の防御抗原を含む液及び「ジフテリアトキソイド」、「破傷風トキソイド」並びに「不活化したⅠ型、Ⅱ型及びⅢ型弱毒ポリオウイルス（以下「不活化ポリオウイルス」という。）」を含む液にアルミニウム塩を加えて、不溶性とした液剤である。振り混ぜるとき均等に白濁する。

2 製法

2. 1 原材料

2. 1. 1 百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド

沈降精製百日せきワクチン2. 1、ジフテリアトキソイド2. 1、破傷風トキソイド2. 1をそれぞれ準用する。

2. 1. 2 不活化ポリオウイルス

2. 1. 2. 1 製造用ウイルス株

Ⅰ型ウイルス LS-c, 2ab 株、Ⅱ型ウイルス P712, Ch, 2ab 株、Ⅲ型ウイルス Leon, 12a,b 株で本剤の製造に相当と認められたウイルス株を用いる。本剤の含むウイルスは、製造株として相当と認められた後、5代以上継代されたものであってはならない。

製造用細胞株

本剤の製造には相当と認められたアフリカミドリザル腎臓細胞由来の Vero 細胞を用いる。細胞株は一定の培養条件下で定められた継代数だけ培養を行い、シードロットシステムで用いる。

2. 1. 2. 3 培養液

細胞培養には、適当な細胞増殖因子、0.002 w/v% 以下のフェノールレッド及び必要最少量の抗生物質を加えることができる。ただし、ペニシリンは加えてはならない。

2. 2 原液

2. 2. 1 百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド

沈降精製百日せきワクチン2. 2、ジフテリアトキソイド2. 2、破傷風トキソイド2. 2をそれぞれ準用する。

2. 2. 2 不活化ポリオウイルス

2. 2. 2. 1 細胞培養

細胞培養は、凍結保存された製造用細胞バンクから行い、継代数が所定の継代数を超えてはならない。

培養細胞について、3. 2. 1の試験を行う。

2. 2. 2. 2 培養及び採取

型別に培養細胞で培養したウイルス浮遊液を適当な方法で採取、処理したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について3. 2. 2の試験を行う。

2. 2. 2. 3 濃縮、精製及び不活化

同一株のウイルス浮遊液の適当量を集めて、適当な方法で濃縮、精製及び不活化し、これを原液とする。

原液について、3. 2. 3の試験を行う。

2. 3 最終バルク

百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド及び不活化ポリオウイルスの各原液を生理食塩液等で希釈し、アルミニウム塩を加えて作る。ただし、百日せき菌の防御抗

原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイドは、沈降精製百日せきワクチン2. 3及び沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド2. 3にそれぞれ適合するようにして作る。また、不活化ポリオウイルスは、3. 3. 1 3のラット免疫原性試験に適合するようにして作る。ただし、不活化ポリオウイルスの含量は、たん白質量として $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下でなければならない。適当な保存剤及び安定剤等を用いることができる。

3 試験

百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイドについて3. 1の試験を行う。不活化ポリオウイルスについては3. 2の試験を行う。

3. 1 百日せき菌の防御抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド

沈降精製百日せきワクチン3. 1、ジフテリアトキソイド3. 1、破傷風トキソイド3. 1をそれぞれ準用する。

3. 2 不活化ポリオウイルス

3. 2. 1 培養細胞の試験

培養細胞の500mL以上に相当する量を対照培養細胞とし、ウイルスを接種することなく、ウイルス培養と同じ培養条件で観察するとき、細胞変性を認めてはならない。また、観察期間中、その20%以上が非特異的又は偶発的事由により観察できなくなってはならない。

3. 2. 2 ウイルス浮遊液の試験

3. 2. 2. 1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3. 2. 2. 2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3. 2. 2. 3 ウイルス同定試験

それぞれの型特異ポリオウイルス免疫血清を用い、検体中のウイルスの型を同定する。

3. 2. 3 原液の試験

3. 2. 3. 1 ウイルス生残否定試験

原液の全量の1%もしくは1,500ドース以上に相当する量の検体を用いる。この検体に適当な中和剤を加え、適当な緩衝剤等の十分な量を用いて透析し、混在する不活化剤等の培養細胞に対する変性効果を除いたものを試料とする。

試料をアフリカミドリザル腎臓細胞又はこれと同等以上の感受性をもつ培養細胞に接種し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で21日間培養観察する。この際、試料1mLにつき培養細胞 3cm^2 以上を用いる。観察の間、細胞変性の出現を認めてはならない。

3. 2. 3. 2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3. 2. 3. 3 エンドトキシン試験

最終バルクと等濃度以上にしたものを試料とする。検体を希釈する場合は、エンドトキシン試験用水を用いる。一般試験法のエンドトキシン試験を準用して試験するとき、 $0.25\text{EU}/\text{mL}$ 以下でなければならない。

3. 2. 3. 4 比抗原量試験 (たん白質量/D抗原量)

酵素免疫測定法等、適当な免疫学的方法によりD抗原量を各型毎に測定する。一般試験法のたん白質量法を準用してたん白質量を測定するとき、D抗原量1Duにつき、たん白質量が $0.1\mu\text{g}$ 以下でなければならない。

3. 3 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3. 3. 1 pH試験

一般試験法のpH測定法を準用して試験するとき、○～△でなければならない。

3. 3. 2 アルミニウム含量試験

- 沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン3. 2. 2を準用する。
3. 3. 3 ホルムアルデヒド含量試験
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン3. 2. 4を準用する。
3. 3. 4 無菌試験
一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。
3. 3. 5 異常毒性否定試験
一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。
3. 3. 6 エンドトキシン試験
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン3. 2. 7を準用する。
3. 3. 7 マウス体重減少試験
沈降精製百日せきワクチン3. 2. 9を準用する。
3. 3. 8 マウス白血球数増加試験
沈降精製百日せきワクチン3. 2. 10を準用する。
3. 3. 9 マウスヒスタミン増感試験
沈降精製百日せきワクチン3. 2. 11を準用する。
3. 3. 10 ジフテリア毒素無毒化試験
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン3. 2. 11を準用する。
3. 3. 11 破傷風毒素無毒化試験
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン3. 2. 12を準用する。
3. 3. 12 力価試験
3. 3. 12. 1 沈降精製百日せきワクチンの力価試験
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン3. 2. 13. 1を準用する。
3. 3. 12. 2 沈降ジフテリアトキソイドの力価試験
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン3. 2. 13. 2を準用する。
3. 3. 12. 3 沈降破傷風トキソイドの力価試験
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン3. 2. 13. 3を準用する。
3. 3. 13 ラット免疫原性試験
ラットを免疫し、得られた血清中の中和抗体価を型別に測定する。
3. 3. 13. 1 材料
検体、IPV 力価試験用参照品（以下「参照品」という。）、各型の標準血清及び中和試験攻撃用
セービン株ポリオウイルス（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型）（以下「中和用ウイルス」という。）を用いる。
指標細胞として、HEp2 細胞又は Vero 細胞を用いる。MEM 培地（適量の炭酸水素ナトリウム、
抗生物質及びウシ血清を含む）で 1×10^5 cells/mL となるようにしたもの（以下「細胞浮遊液」
という。）を調製する。
検体及び参照品の希釈は、MEM 培地（適量の炭酸水素ナトリウムを含む）による。
中和用ウイルスは、MEM 培地（適量の炭酸水素ナトリウム、抗生物質及びウシ血清を含む）で
希釈して、0.05mL 中に約 100CCID₅₀ のウイルスを含むようにしたもの（以下「中和用ウイルス浮
遊液」という。）を調製する。
3. 3. 13. 2 試験
検体及び参照品をそれぞれ希釈し、対数的等間隔の希釈を作る。
Wistar 系 8 週齢、雌ラット 10 匹以上を 1 群とし、各希釈に 1 群ずつ用いる。1 匹当たり 0.5mL
を後肢大腿部に筋肉内接種する。接種の 21 日後に、個体別に全ての動物から採血し、血清を採
り 56℃ 30 分間加熱する。個体別血清及び標準血清を各血清につき 2 ウエル以上添加し、MEM 培地
（適量の炭酸水素ナトリウム、抗生物質及びウシ血清を含む）で 2 倍階段希釈する。さらに、各
ウエルに各型の中和用ウイルス浮遊液を約 100CCID₅₀ となるように接種する。その後、すべての
プレートを $36 \pm 1^\circ\text{C}$ の CO₂ インキュベータに 3 時間置いた後、約 4℃ で一晩反応させる。翌日、各
ウエルに 1×10^4 cells となるように細胞浮遊液を添加し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ の CO₂ インキュベータで 7 日間

培養する。培養終了後、各ウエルの CPE を観察し、50%中和点の血清希釈倍数を算出し、その逆数を中和抗体価とする。このとき、各型の標準血清の中和抗体価は適正範囲内でなければならない。

また、中和用ウイルス浮遊液の感染価を測定するとき、その値は $32 \sim 320 \text{ CCID}_{50} / 0.05 \text{ mL}$ でなければならない。

3. 3. 1 3. 3 判定

試験の成績を統計学的に処理して比較するとき、検体の力価は参照品と同等以上でなければならない。

3. 3. 1 4 表示確認試験

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン 3. 2. 1 4 及び 3. 2. 3. 4 の D 抗原量測定法をそれぞれ準用して行う。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、○年とする。

5 その他

5. 1 添付文書等記載事項

1. 使用した菌株名並びにウイルス株名
2. 使用時振り混ぜて均等とする旨
3. 次の用法及び用量

初回免疫には、通常、1回 0.5mL ずつを 3 回、いずれも 3~8 週間の間隔で皮下に注射する。

追加免疫には、通常、初回免疫後 6 箇月以上の間隔をおいて、(標準として初回免疫終了後 12 箇月から 18 箇月までの間に) 0.5mL を 1 回皮下に注射する。

ラット免疫原性試験

試薬

- 1) 試験サンプル希釈液：0.15% (w/v) NaHCO_3 を含むEagle MEM。
- 2) 血清希釈液：0.15% (w/v) NaHCO_3 、2vol% FBS、200u 以下/mL ペニシリン、200 γ 以下/mL ストレプトマイシンを含むEagle MEM。
- 3) 細胞浮遊液調製用培地：0.15% (w/v) NaHCO_3 、5%(v/v) FBS、200u 以下/mL ペニシリン、200 γ 以下/mL ストレプトマイシンを含むEagle MEM

方法

1. 試験サンプルの希釈

試験サンプル希釈液を用い、不活化ワクチンsIPV、またはsIPV含有試料を原液として、原液、2倍、4倍、8倍、または原液、3倍、9倍等に希釈する。

2. 使用動物

Wistar 系8週齢、メスのラットを用いる。各希釈につき10頭に接種する。

3. 接種と採血

免疫は1回免疫法で行う。ラットの後肢大腿部に0.5mL試験サンプルを筋肉内注射する。3週間後に採血する。

4. ラット血清分離と保存

- 1) 採血した血液を $4\pm 2^\circ\text{C}$ に一晩置き、血清分離 (2500 rpm、20分間遠心) を行う。採血管によっては分離操作が異なるので、適宜、変更する。
- 2) 被検血清は -20°C 以下で凍結保存する。3) 被検血清は、あらかじめ $56\pm 1^\circ\text{C}$ 、30分加熱し非働化する。

5. ラット血清中の中和抗体測定試験 (マイクロタイター法)

- 1) マイクロプレートの全てのwellに血清希釈液を0.05mLずつ分注する。
- 2) 1列目および2列目のwellに被検血清0.05mLを加える (2 wells/被検血清)。
- 3) 2～12列目のwellまで希釈する ($\times 2 \sim 2048$ 、1列目のwellは血清対照とする)。
- 4) 各型標準血清についても1標準血清につき2well以上血清希釈液を用いて同様に希釈する。
- 5) 各型の攻撃ウイルスを血清希釈液で100 CCID₅₀/0.05mLに希釈調製する。
- 6) Back titration 用に攻撃ウイルスを 10^{-1} から 10^{-3} まで10倍階段希釈する。
- 7) 各wellに攻撃ウイルスを0.05mL接種する。Back titrationに関しても、0.05mL/wellで1希釈につき8well以上接種する。ただし、1列目の血清対照のwellにはウイルスを接種しない。
- 8) 中和反応は $36\pm 1^\circ\text{C}$ で3時間 (CO₂インキュベーター内) および $4\pm 2^\circ\text{C}$ で一晩行う。
- 9) 翌日、 1×10^4 cells/0.1mL の HEp2 細胞浮遊液を必要量調製し、マイクロプレートの全てのwellに0.1 mL ずつ分注する。
- 10) $36\pm 1^\circ\text{C}$ のCO₂インキュベーター内で7日間培養する。途中、必要に応じて顕微鏡によるCPEの観察を行なう。

6. 判定

培養7日目の観察結果から50%中和点の血清希釈倍数をケルバー法で求め、その逆数をラット血清の中和抗体価とする。ただし、標準血清の中和抗体価が、規格値 (設定値) の $\pm 400\%$ より大きく異なる場合は再試験を行う。また、攻撃ウイルスの力価が $10^{1.5}$ (32)～ $10^{2.5}$ (320)の範囲から外れた場合も再試験を行

う。試験の成績を統計学的に処理して比較するとき、参照品と同等以上である場合、合格とする。

免疫原性試験に使用する細胞・標準血清・攻撃ウイルス

1. 細胞

HEp2cN細胞を用いる。細胞増殖用培地は8%(v/v) FBS, 0.11%(w/v) NaHCO₃, 200u以下/mL ペニシリン, 200γ以下/mL を含む Eagle Minimum Essential Medium を用いる。100代から139代までを試験に使用する。

継代歴、凍結保存および在庫数

- 1) 0代 1998.2.10 感染研より HEp2c(AH)14-4、角瓶1本(培養面積 156cm²) の分与を受けポリオ研における0代目とした。
- 2) 1代 同日継代し、HEp2c/AH 15 を作製し、1代目とした。
- 3) 4代 1998.2.27 ポリオ研で4代継代した HEp2c/AH 18 をポリオ研における HEp2cN 4 とした。
- 4) 5代 1998.3.14 HEp2cN 5 大ルー瓶(培養面積 274cm²) 3本からアンプル12本を作製し、液体窒素に凍結保存した。
- 5) 8代 1999.11.15 HEp2cN 5 アンプル1本をリカバーし 2回継代し、1999.12.3 HEp2cN 8 LR12本・SR2本からアンプル17本を作製し、液体窒素に凍結保存した。
- 5) 98代 98代まで継続して継代し、1999.11.25 HEp2cN 98 LR12本からアンプル18本を作製し、液体窒素に凍結保存した。

2005.10.6 現在の在庫数

5代	HEp2cN 5	10本
8代	HEp2cN 8	5本
98代	HEp2cN 98	8本

2. 標準血清

原液で使用する。

I型	I-ASP-10(ab)	1:200
II型	II-ASP-06M	1:20
III型	III-ASP-14M	1:20

3. 攻撃ウイルス

試験に使用する際は100CCID₅₀/0.05mLに希釈して用いる。

I型	S1-CP1	10 ⁴
II型	S2-CP1	10 ⁴
III型	S3-CP1	10 ⁴

攻撃ウイルス、および標準血清希釈液は2%(v/v) FBS, 0.15%(w/v) NaHCO₃, 200u以下/mL ペニシリン, 200γ以下/mL ストレプトマイシンを含む Eagle Minimum Essential Medium を用いる。