

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 15 年度～17 年度 総合研究報告書

主任研究者 宮村 達男

平成 18 (2006) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告書

混合ワクチンの品質確保に関する研究 宮村 達男1

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）7

II. 研究成果の刊行に関する一覧11

III. 研究成果の刊行物・別冊13

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）
総合研究報告書

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が、1 型の抗体保有率が低かった年代は引き続き追加接種の勧奨をする必要がある。Hib ワクチンや試験用抗体の国際標準品がなく、それらの標準化や抗 PRP 抗体価測定法の標準化が必要である。である 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。sIPV の力価試験用参照品の D 抗原量を、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。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。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		佐藤 弘	国立感染症研究所
多屋 馨子	国立感染症研究所	新井 智	同上
新谷 三春	同上		
高橋元秀	同上	荒木 和子	同上
堀内善信	同上	羽生 隆	同上
武田 直和	同上	北元 理恵	同上
		上野 久美	同上
協力研究者		岡部 信彦	同上
清水 文七	日本ポリオ研究所	岩城 正昭	同上
太田 芳宏	同上	福田 靖国	同上
塩先 巧一	化学及血清療法研究所	小宮 貴子	同上
水野 喬介	同上	山本 明彦	同上
野崎 周英	同上	蒲地 一成	同上
園田 憲悟	同上	落合 雅樹	同上
後藤 優治	同上	片岡 紀代	同上
大隈 邦夫	同上	豊泉 裕美	同上
末原 章宏	武田薬品工業株式会社	永田 典代	同上
山下 利明	同上	原嶋 綾子	同上
東 雍	阪大微生物病研究会	倉田 毅	同上
小川 博暢	同上	李 天成	同上
渡辺 徹也	デンカ生研（株）	白土 東子	同上
駒瀬 勝啓	北里研究所	小川 智子	同上
長井 正昭	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

A. 研究目的

わが国で開発されたサ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. ポリオ感受性調査

感染症流行予測調査事業で実施されている、ポリオ感受性調査の結果を解析し、年齢別中和抗体保有率、年齢別ポリオワクチン接種率、接種歴別抗体保有率を調査した。中和抗体価は 1:4 以上を陽性とした。ワクチン接種歴は問診により調査された。

2. 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。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。

3. 無菌試験への 2-フェノキシエタノールの影響

液状チオグリコール酸培地、2-フェノキシエタノール (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。

4. Hib ワクチン (単味) の試験

多糖含量試験、PRP 同定試験、破傷風トキソイド同定試験を行なった。また Hib 臨床分離株 (患者血液由来) の培養上清から PRP の分離精製、PRP 標品のチラミン化、免疫原性試験を行った。

5. 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 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。

6. 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。

7. 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。

8. 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。

9. 混合ワクチンにおける 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

すべてのポリオウイルス型に対して 2 歳までに急速に免疫を獲得していた。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。ワクチン投与歴別の抗体保有率でも 1, 2 型は容易に抗体を獲得するのに対し、3 型では低い。23 歳群の 1 型抗体保有率は 46%と極めて低かった。

2. 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、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 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。

3. 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。

4. Hib ワクチンの検討

多糖含量は公定書に定める規格値をクリアーしていた。PRP 同定試験で使える市販抗体はなかった。破傷風トキソイド同定試験は所期の結果が得られた。PRP をチラミン化して疎水性を強めてから固相化する ELISA 法で Hib ワクチンの免疫原性を検討したところ、マウス 3 回免疫後に血中抗体価の上昇が見られた。

5. 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-IPVHib (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。

6. 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-IPVHib (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。

7. DTaP-IPV-Hib とこれらの構成ワクチン

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 (Hiberix: 単独ワクチン) で 3.03 倍高い価であった。

8. 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。

9. 不活化ポリオワクチンのプロフシェンシ―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。

10. 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。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、この年齢層に対するワクチン接種の勧奨は継続していく必要がある。

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 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。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。国内 DTaP-IPV 試作ワクチンに顕著な毒性は見られなかったが、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。

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。

Hib ワクチンの問題点として、Hib ワクチンの力価をどのように規定すべきかという問題がある。免疫原性の保持のためには立体構造の保持も必要であるが現行公定法の物理化学的測定法ではそれは検出できない。Routine lot release に使える適切な生物学的定量法が現在ないために物理化学的測定法で代替していると考えられ、これで十分と言えるかは検討の必要があろう。ワクチン、抗体ともに現在、国際標準品がないためラボラトリー間のデータ比較が難しい。Hib ワクチンを混合ワクチンとして接種する場合、DTaP/Hib の Hib 低免疫原性が問題である。早急に原因を明らかにする必要がある。

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。Hib ワクチンと DTaP、DTaP/IPV との関係については接種スケジュールや共通抗原の問題も考慮し混合ワクチン化だけでなく同時接種も含めて検討する必要がある。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能による差が見られず、各機能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

II. 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

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, 12a₁b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. 13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 μ g/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の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 $^{\circ}$ Cで21日間培養観察する。この際、試料1mLにつき培養細胞3cm²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 EU/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定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 μ 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ピ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°C 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°C 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、〇年とする。

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。

研究成果の刊行に関する一覧表

Takahashi H, Suzumura S, Shirakizawa F, Wada N, Tanaka-Taya K, et al. : An epidemiological study on Japanese autism concerning routine childhood immunization history. *Jpn J Infect Dis.* 2003;56 (3) :114-7.

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

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

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

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.

多屋馨子: 感染予防に欠かせないワクチン接種で知っておきたい基礎知識. *エキスパートナー* ス. 19 (12). 126-129, 2003

寺田春郎, 多屋馨子, 宮川広実, 他 : けいれん性疾患児への予防接種. *小児科臨床.* 56 (6). 1015-1022, 2003

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.

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.

多屋馨子. インフルエンザワクチン接種の必要性和動向. 内科. 平成 16 年 (2004); 93: 142-148.

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.

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.

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.

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.

Epidemiological Report

An Epidemiological Study on Japanese Autism concerning Routine Childhood Immunization History

Hiroshi Takahashi*, Syunsuke Suzumura¹, Fumiko Shirakizawa¹, Noriyuki Wada², Keiko Tanaka-Taya³, Satoru Arai³, Nobuhiko Okabe³, Hironobu Ichikawa¹ and Taizo Sato¹

Institute for International Cooperation, Japan International Cooperation Agency, Tokyo 162-8433,

¹Tokyo Metropolitan Umegaoka Hospital, Tokyo 156-0043,

²Wada Pediatric Clinic, Tokyo 121-0812 and

³Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

(Received February 21, 2003. Accepted May 16, 2003)

SUMMARY: To assess the causal association of autism with measles, mumps, and rubella (MMR) vaccine versus that with monovalent measles, mumps, and rubella immunization, a 1:2 sex-adjusted logistic regression analysis was conducted using data on subjects who were growing up in the Tokyo area between 1988 and 1992. When MMR immunization was used as a reference, monovalent measles immunization (odds ratio [OR] = 5.33, 99% confidence interval [CI]: 1.03-27.74), non-mumps immunization (OR = 8, 99% CI: 1.33-48.2), and non-rubella immunization (OR = 8.57, 99% CI: 1.30-56.4) with development of autistic spectrum disorders (ASD) were significantly increased. These results suggest a decreased risk of developing ASD with MMR compared to monovalent antigens. However, our findings may reflect potential selection bias due to requiring written consent, possible delayed vaccination in suspected autism cases, and small sample size (case = 21). For the case group and the control group, immunization completeness rate of each antigen, regardless of the timing of immunization, was 90.5% versus 100% in measles, 42.9% versus 78.6% in mumps ($P < 0.01$), 52.3% versus 83.3% in rubella ($P < 0.01$), 14.3% versus 45.2% in varicella ($P < 0.01$), 100% versus 90.5% in polio ≥ 2 , 100% versus 97.6% in Diphtheria (D), pertussis, and tetanus (T) ≥ 3 , 85.7% versus 66.7% in DT, 95.2% versus 92.9% in BCG, and 52.4% versus 81.0% in Japanese encephalitis ≥ 3 ($P < 0.01$). Only two case subjects and four control subjects received their measles, mumps, and rubella immunizations separately, suggesting that few Japanese parents might have had concerns about the safety of MMR vaccine. A nation-wide study would be a practical measure to scientifically judge the safety of MMR and other routine childhood immunizations.

INTRODUCTION

The etiology of autism with special attention to infection/immunization has been vigorously discussed. Wakefield and colleagues speculated that persistent measles virus infection of the gastrointestinal tract could have resulted in ileocolonic lymphonodular hyperplasia that allowed gastrointestinal absorption of toxic neuropeptides, which then caused central nervous system damage followed by neurodevelopmental regression (1). The authors hypothesized that combined measles, mumps, and rubella (MMR) vaccine might cause autism, and recommended alternative use of a monovalent measles vaccine. However, to date, no published report has supported their hypothesis (2).

The Japanese mother-child health law (article 12) regulates that all children are to receive a health check including a neurodevelopment assessment by their local health authority at least twice, once between the ages of 12 and 23 months and again around 3 to 4 years of age. Development and immunization history are recorded in "Boshitecho", the Maternal and Child Health (MCH) handbook.

From 1989 to 1993, MMR vaccine sold on the Japanese market contained AIK-C (measles), Urabe AM9 (mumps),

and TO-336 (rubella) strains. At the same time, a monovalent measles vaccine with AIK-C, Schwarz FF8, TD97, or the Tanabe CAM strain was simultaneously in use in the Japanese national childhood immunization program. We considered that if the immunization data of autistic children's MCH handbook were available, the data on children who were born during that period constitute a good birth cohort for analysis of vaccine implications (3). Causal association of autism with immunization can be assessed in terms of immunization history. When the catchment areas of the case and the control populations, respectively, are geographically matched, any possible bias involving environmental factors would be minimized.

This paper summarizes immunization trends and the results of a case-control study of autistic children who were growing up in the Tokyo area from 1988 to 1992, with special attention to the causal association between autism and MMR/monovalent measles, mumps, and rubella vaccines, respectively.

METHODS

During the period from 1989 to 1993, the Japanese national immunization program recommended MMR vaccine or monovalent measles vaccination be given at the age of 12 months, diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccine at 2, 4, and 6 months old, oral polio vaccine (OPV) at 3 and 9 months, and BCG at 3 months. Monovalent mumps and rubella vaccine remained optional for those who did not receive MMR

*Corresponding author: Mailing address: Institute for International Cooperation, Japan International Cooperation Agency, Ichigaya-honmura cho 10-5, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8433, Japan. Tel: +81-3-3269-3851, Fax: +81-3-3269-6992, E-mail: takahashi.hiroshi@jica.go.jp

vaccination. Diphtheria-tetanus toxoid (DT) was given at 12 years of age, and Japanese encephalitis (JE) vaccine was administered 3 times between 3 and 4 years.

The Tokyo Metropolitan Umegaoka Hospital is a specialized pediatric psychiatry facility in the Tokyo area. Approximately 130 school-aged children visit the hospital for treatment of and care for autistic spectrum disorders (ASD). From July 2001 to February 2002, the attending physicians of the hospital requested that the caregivers of ASD patients born between 1988 and 1992 disclose the patients' clinical records. After the caregivers had received an explanation of the study's purposes, they gave their written informed consent to release the records. Subsequently, year of birth, age at initial onset of autistic symptoms, age of diagnosis according to the ICD10 code, and family history of ASD were reviewed. The infantile autistic symptoms were defined using the criteria of the hospital (Table 1). Diagnosis was made based on the definition set out in the diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edition (DSM-IV). Immunization records including vaccination date, vaccine type, lot number, provider's name, and adverse events and any unusual episodes, if any, were collected from the MCH handbooks.

A sex-adjusted logistic regression analysis was planned. If immunization was given after ASD diagnosis, those cases were regarded as non-vaccination in each relevant antigen setting. The control group was selected from the same birth year cohort (approximately 1,700 children born between 1988 and 1992), of children who were attending one of the two pediatric clinics in Tokyo. Using a randomized table (Fisher and Yates 1974), the eligible boys and girls were selected by their last two-digit registration number, and among those selected, only those who had no neuropsychiatric disorders

and whose guardians had consented to disclosure of the MCH handbook data were enrolled in the control population. For both males and females, this process was repeated until the sample size for the control reached twice as those of the case.

Using MMR immunization as a reference, odds ratios (OR) with a 99% confidence interval (CI) for development of ASD were calculated for each immunization antigen setting (i.e., immunization with monovalent vaccine or non-immunization for measles, mumps, and rubella antigens). The data were summarized by using Microsoft Excel (Microsoft Japan Co., LTD, Tokyo), then analyzed using SPSS ver.11.5J (SPSS Co., LTD, Tokyo).

RESULTS

Case and control selection: A total of 21 autistic children were enrolled in the case-control study (Table 2). Response rate with informed consent was 87.5% (21/24). Among those 21 cases, four (19%) were female, which ratio corresponded to the previously reported sex ratio in Japan (male:female = 3-4:1) (4). Distribution of birth year was as follows: 1 in 1988, 2 in 1989, 3 in 1990, 9 in 1991, and 6 in 1992. Two cases were diagnosed with Asperger's syndrome (ICD10 84.5). One case (No. 13) had a regressive clinical course (i.e., history of loss of verbal expression at 18 months of age). The average age at which the initial autistic symptom appeared and diagnosis was made 2.46 years (median = 2 years, standard deviation = 1.65 years) and 6.57 years (median = 5 years, standard deviation = 2.79 years), respectively.

For the control matching, 8 females and 34 males were selected, based on a response rate of 58% (42/72). Distribution of birth year was as follows: 26 in 1988, 9 in 1989, 2 in 1990, 4 in 1991, and 1 in 1992.

Measles antigens given to the case and control groups included: AIK-C (case = 9, control = 30), Schwarz FF8 (case = 5, control = 7), TD97 (case = 2, control = 2), Tanabe CAM (case = 1, control = 2), and unknown (case = 3, control = 1).

Table 1. Abnormal infantile behavior check list for autistic spectrum disorders (ASD), Tokyo Metropolitan Umegaoka Hospital

1. lack of social smiling
2. hypersensitivity to soft sounds
3. hyposensitivity to loud sounds
4. lack of babbling
5. lack of stranger anxiety
6. aloneness or indifference
7. disinterest in or inattention to parents
8. no response to being called by name
9. expressionless face
10. no response to "peek-a-boo" game
11. lack of anticipatory motor adjustment (e.g., when held in arms)
12. lack of eye-to-eye contact
13. no use of finger pointing
14*. speech delay: 2 to 3-word vocabulary at 2 years of age
15**. loss of verbal expression
16. difficulty in mimicking movements of others
17. autostimulation behavior: flapping and staring at hands
18. extreme withdrawal, indifference to others
19*. rejection of others' intervention during play
20. no symbolic play
21. insistence on sameness
22*. hyperactivity
23*. Sudden laughing and crying without apparent reason
24*. Irregular and disturbed nocturnal sleep patterns

Numbering in developmental order: #1-12 before the age of 12 months. #13-24 after the age of 1 year.

* May be observed in normal children.

**Often seen in regressive ASD.

Table 2. List of the autistic cases (n = 21)

Case No.	Sex	Onset of initial symptom	Age of diagnosis	ICD10
1	F	11 mo	9 yr	84.0
2	M	18 mo	5 yr	84.0
3	M	3 yr	9 yr	84.0
4	F	2 yr	10 yr	84.5
5	M	3 yr	5 yr	84.0
6	M	2 yr	6 yr	84.0
7	F	2 yr	9 yr	84.0
8	M	5 yr	8 yr	84.0
9	M	5 yr	10 yr	84.0
10	M	5 yr	10 yr	84.0
11	M	12 mo	10 yr	84.0
12	M	18 mo	2 yr	84.0
13	M	18 mo	7 yr	84.0
14	M	2 yr	5 yr	84.0
15	M	18 mo	3 yr	84.0
16	M	2 yr	5 yr	84.0
17	M	7 yr	8 yr	84.0
18	M	2 yr	8 yr	84.5
19	M	12 mo	4 yr	84.0
20	M	18 mo	3 yr	84.0
21	F	14 mo	2 yr	84.0

Table 3. The immunization completeness rate of the case group and the control group, and the estimated rate of immunization for the general population in Tokyo, 1988-1992 birth cohort

Antigen	Case (n = 21)	Control (n = 42)	Tokyo (mean ± SD)
Measles	95.2%	100%	77.4 ± 5.86%
Mumps	42.9%	78.6%	N/A
Rubella	52.3%	83.3%	70.4 ± 2.19%
Varicella	14.3%	45.2%	N/A
Oral Polio ≥ 2	100%	90.5%	90.8 ± 1.81%
DTP ≥ 3	100%	97.6%	77.8 ± 8.65%
DT	85.7%	66.7%	83 ± 10.9%
BCG	95.2%	92.9%	95.7 ± 1.74%
JE ≥ 3	52.4%	81.0%	78.8 ± 5.72%

JE: Japanese encephalitis.

N/A: data not available.

Table 4. Association of autism to measles, mumps, and rubella immunization settings

Immunization setting	Case Group	Control Group	Odds Ratio	99% Confidence Interval
MMR	4	24	Ref.	—
Monovalent measles	16	18	5.33	1.03-27.7
Monovalent mumps	4	9	3.33	0.45-24.6
Monovalent rubella	4	12	3.82	0.59-24.7
Non-measles	1	0	∞	immeasurable
Non-mumps	13	9	8	1.33-48.2
Non-rubella	13	7	8.57	1.30-56.4

No specific lot number was recorded for any subject in the case group or the control group.

Immunization records: For the case group versus the control group, immunization completeness rate of each antigen, regardless of timing of immunization, was 90.5% versus 100% in measles, 42.9% versus 78.6% in mumps ($P < 0.01$), 52.3% versus 83.3% in rubella ($P < 0.01$), 14.3% versus 45.2% in varicella ($P < 0.01$), 100% versus 90.5% in polio ≥ 2, 100% versus 97.6% in DTP ≥ 3, 85.7% versus 66.7% in DT, 95.2% versus 92.9% in BCG, and 52.4% versus 81.0% in JE ≥ 3 ($P < 0.01$). No adverse events or unusual episodes were recorded after immunization. The Tokyo Metropolitan Annual Report of Hygiene summarized the estimated rate with standard deviation for each antigen during the observation years as: 77.4 ± 5.86% (measles), 70.4 ± 2.19% (rubella), 90.8 ± 1.81% (polio), 77.8 ± 8.65% (DTP), 83 ± 10.9% (DT), 95.7 ± 1.74% (BCG), and 78.8 ± 5.72% (JE) (Table 3).

Statistical analysis: A total of four shots (i.e., one mumps and three rubella immunizations) were given after ASD diagnosis; in this study, this was regarded as non-vaccination. Among subjects in the control group, all had received either MMR vaccine or monovalent measles vaccine; therefore, the OR for measles antigen was immeasurable. When MMR immunization was regarded as a reference, monovalent measles immunization (OR = 5.33, 99% CI: 1.03-27.74), non-mumps immunization (OR = 8, 99% CI: 1.33-48.2), and non-rubella immunization (OR = 8.57, 99% CI: 1.30-56.4), respectively, to development of ASD was significantly increased. All the other associations were statistically non-significant (Table 4).

DISCUSSIONS

This is the first epidemiological study to analyze the causal association between routine immunization history and Japanese autism.

The results of this study contradicted the hypothesis by Wakefield's group, and allayed concerns about the reintroduction of MMR to the Japanese immunization schedule. However, the statistically significant association of ASD with monovalent measles immunization, non-mumps, and non-rubella immunization might be exaggerated in our study, due to the small sample size and possible bias due to the informed consent process; in both the case group and the control group, the informed consent process might have discouraged caregivers from enrolling children with a poor or incomplete immunization history. For instance, mumps and rubella immunization were to be given after the age of 12 months, and whether these immunizations were obtained during the observation years was the parent's or caregiver's choice. The difference in immunization completeness rates between the case group and the control group ($P < 0.01$) could be explained that the case group caregivers were satisfied with the minimal required antigens, especially after they became aware of the child's abnormal autistic symptoms, whereas the control group parents wished to have their children receive the maximum antigens available via MMR immunization, and these circumstances created a possible bias in this study. The relatively poor response rate (58%) of the control population presents another possible bias, though the estimated immunization rate for the general Tokyo population during the same time period was similar to that of the control group. The measles immunization rate is exceptionally lower among the Tokyo population, probably because many healthy infants might have been infected naturally before the age of 12 months. The immunization rates for mumps and varicella were not available, because these immunizations were optional.

In the United States, the vaccine safety data link project revealed that the vaccination rate begins to fall off significantly for neurologically abnormal children right around the age of 12-15 months (Dr. Robert Davis, personal communication, October 31, 2002). In fact, the immunization completeness rate of JE, which is given 3 times between the ages of 3 and 4 was 52.4% in the case group, and 81.0% in the control group ($P < 0.01$). Of 17 JE-immunized subjects in the case group, only five received JE immunizations after ASD diagnosis. Such a clearly intentional delay in immunization could present another bias. The presence of such a trend in the infantile period would suggest that immunization with MMR appeared less attractive after the second year of life, and many have been actively withheld due to either the caregivers' or the physicians' concerns. However, this study demonstrated that only two case subjects and four control subjects received all measles, mumps, and rubella vaccines separately, suggesting that few parents had special concerns about the safety of MMR vaccine.

The causal-effect association, i.e., the timing of the initial onset of autistic symptoms relative to that of immunization, is a crucial focus of this study. Diagnosis of ASD using DSM-IV criteria is often difficult at the infantile stage. Some researchers argue that autism has a strong genetic component and that the associated neurological defects probably occur early in the course of embryonic development (5, 6). In most cases, abnormal symptoms are present at birth, although autism might not be diagnosed until later in life when communi-

cation delays and characteristic behaviors become apparent (7). If this is the case, the effect of immunization would contribute little more than some modification to a congenital disorder. If regressive autism occurs in conjunction with one or more congenital abnormalities (5), analysis of biological plausibility, consistency, and strength of the association would be greatly complicated.

A population-based study using a rigorous case series methodology is one way to assess the relative incidence of autism within predefined time periods (8). However, such a study should address the loss of subjects to follow up over a long time period. A study design with a shorter observation period should address potential confounding factor of normal children with temporary symptoms. For example, it is noteworthy that infants with autism-like symptoms often resume normal development after 1 year of age.

In conclusion, the former Japanese MMR and other immunizations have demonstrated no harmful causal association with ASD in Japanese children. A nation-wide study would be a practical measure to scientifically confirm the safety of MMR and other routine childhood immunizations.

REFERENCES

1. Wakefield, A. J., Murch, S., Anthony, A., Linnell, J., Casson, D. M., Malik, M., Berelowitz, M., Dhillon, A. P., Thomson, M. A., Harvey, P., Valentine, A., Davies, S. E., and Walker-Smith, J. A. (1998): Ileal lymphoid nodular hyperplasia, non-specific colitis, and regressive developmental disorder in children. *Lancet*, 351, 637-641.
2. Editorial (2000): Measles, MMR, and autism: the confusion continues. *Lancet*, 355, 1379.
3. Takahashi, H., Arai, S., Tanaka-Taya, K. and Okabe, N. (2001): Autism and infection/immunization episodes in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 54, 78-79.
4. Kurita, H. (2001): Current status of autism studies. "Seishinshinkeigaku zasshi", 103, 64-75, (in Japanese).
5. Rodier, P. M. and Hyman, S. L. (1998): Early environmental factors in autism. *MRDD Res. Rev.*, 4, 121-128.
6. Nelson, K. B., Grether, J. K., Croen, L. A., Dambrosia, J. M., Dickens, B. F., Jelliffe, L. L., Hansen, R. L. and Phillips, T. M. (2001): Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Ann. Neurol.*, 49, 597-606.
7. DeStefano, F. and Chen, R. T. (2001): Autism and measles-mumps-rubella vaccination, controversy laid to rest. *CNS drugs*, 15, 1-7.
8. Taylor, B., Miller, E., Farrington, C. P., Petropoulos, M. C., Favot-Mayaud, I., Li, J. and Waight, P. A. (1999): Autism and measles, mumps, and rubella vaccine: no epidemiological evidence for a causal association. *Lancet*, 353, 2026-2029.

Original Article

Attempt to Curtail the Observation Period of Mice in the Tetanus Vaccine Potency Tests

Tadashi Fukuda*, Masaaki Iwaki, Takako Komiya, Yoshichika Arakawa and Motohide Takahashi

*Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control,
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, Japan*

(Received April 21, 2004. Accepted July 23, 2004)

SUMMARY: Curtailing the observation of mice challenged with tetanus toxin in potency test of tetanus vaccine would reduce the agony of mice from spastic paralysis. From the viewpoint of animal welfare, we investigated the feasibility of this measure. The potencies of 85 lots of vaccine obtained on the 4th day after challenge were compared with those obtained on the 7th day. No significant difference was found ($P = 0.05$), indicating that the observation period could be curtailed from 7 days to 4 days without impairing the assessment of the vaccine's potency.

INTRODUCTION

Tetanus vaccines are used in many countries, each employing their own domestic standard to ensure the efficacy of the vaccine. The toxin challenge is the most convenient method for estimation of tetanus vaccine potency. In this method, mice immunized with the vaccine are challenged with tetanus toxin. The mice that have produced sufficient amount of anti-tetanus antibody by vaccination will not develop spastic paralysis, whereas those that have not been endowed with sufficient antibody will develop paralysis and die.

There is increasing controversy over the issue of animal welfare, in light of which it seems desirable to avoid any unnecessary agony of mice. Ideally, a tetanus vaccine potency testing method that would not use experimental animals will eventually be developed. At present, methods based on immunological assay are being considered as a possible alternative for the tetanus toxin challenge method (1-6). These methods are not based on the tetanus toxin-neutralizing ability but on its binding ability. In Japan, such alternative methods have not yet been accepted for use in a routine tetanus antibody measuring system.

Under these circumstances, curtailing the observation period would be one of the possible options to reduce the suffering period of mice. This report describes the results of our investigations in this area, which demonstrated that the observation period can be curtailed from 7 to 4 days without affecting the potencies.

MATERIALS AND METHODS

Tetanus vaccines: Forty-six lots of adsorbed diphtheria, tetanus, and acellular pertussis combined vaccine (DTaP), 14 lots of adsorbed diphtheria and tetanus combined toxoid vaccine (DT), and 25 lots of adsorbed tetanus toxoid vaccine (T) were used in this study.

Reference preparations: To measure the potency of DTaP,

a preparation of the Japanese reference tetanus vaccine (lot 2, 40 U/vial) was used. It was dissolved and diluted in sterile distilled water.

To measure the potency of DT and T, the Japanese standard tetanus toxoid preparation (Lot 3, 65 IU/vial) was used. It was dissolved and diluted in sterile saline.

Potency test: The potency tests were performed according to the method described in the Japanese Minimum Requirements for Biological Products (7). Several vaccine sample lots can be titrated simultaneously in one assay. Successive twofold dilutions were used to immunize mice; three doses for the reference preparations and two for the sample lots. Appropriate dilutions were employed for each sample lot and the reference preparation in order to obtain adequate dose-responses. Mice (Slc:ddY, SPF, female, body weight 22-24 g, 5 weeks old, 10 mice/group) were immunized subcutaneously, in the lumbar region, with 0.5 ml of each dilution.

At 32 days after immunization, the mice were subcutaneously challenged in the left lumbar region with 0.5 ml of a tetanus toxin solution containing approximately 200 mouse LD₅₀/ml. The time of death and the symptoms of the challenged mice were observed daily over 7 days, and this data was converted to scores according to the method of Murata et al. (8), with some modifications (Table 1). In 1952, the score method was established by Ipsen (9). The scores

Table 1. The scores assigned to the time of death and the symptoms of the challenged mice

Symptoms	Score
Death on 1st day	0
Death on 2nd day	1
Death on 3rd day	2
Death on 4th-7th day	3
Severe tetanus ¹⁾	3
Mild tetanus ²⁾	4
No tetanus ³⁾	8

¹⁾ Difficulty of moving, tonic spasm or respiratory distress.

²⁾ Local spasm of the abdominal muscle in opposite side to the site of injection, or mouse's body bends to the injected side.

³⁾ No specific symptoms.

*Corresponding author: Mailing address: Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81-42-561-0771 ext. 545, Fax: +81-42-561-7173, E-mail: yfukuda@nih.go.jp

of this method were prescribed so that mean scores of groups of mice would have approximately linear regression when plotted versus a log dose of toxoid. The potency of the tetanus vaccine sample lot was calculated by statistical analysis of scores by using the parallel line assay method (10,11). Pathological examination, not described in the Japanese Minimum Requirements (7), was not undertaken in this study.

For confirmation of the toxicity of the challenge toxin solution used for the assay, four groups of unvaccinated mice were challenged with 0.5 ml of 1:1 (undiluted), 1:50, 1:100, and 1:200 dilutions of the challenge toxin solution (i.e., 100, 2, 1, and 0.5 LD₅₀/mice, respectively). These mice, along with the vaccinated groups, were observed daily for 7 days.

RESULTS

Comparison of scores of challenged mice on the 4th and 7th days: The potencies of 85 tetanus vaccine sample lots were determined in 3,269 mice in 28 tests. A total of 1,175 mice (35.9 %) died by the 4th day after tetanus toxin challenge. Among the mice surviving on the 4th day after the

toxin challenge, those having the same scores on the 4th and the 7th days accounted for 94.1 % (1,971/2,094 mice). In these mice, there was no statistically significant difference in the score on the 4th and that on the 7th day ($r = 0.919$, $n = 2094$) (Figure 1).

Comparison of the potencies estimated from the 4th- and 7th-day scores: The regression of 4th and 7th day potencies were $y = 0.903x + 10.257$ in the DTaP group ($n = 46$), $y = 0.960x + 5.845$ in the DT group ($n = 14$), and $y = 0.871x + 12.980$ in the T group ($n = 25$) (Figure 2). The correlation coefficients were $r = 0.964$ in the DTaP group ($n = 46$), $r = 0.975$ in the DT group ($n = 14$), $r = 0.983$ in the T group ($n = 25$), and $r = 0.973$ in the whole group ($n = 85$). No significant difference ($P = 0.05$) was observed between the 4th and 7th day among groups.

Confirmation of toxicity of the challenge toxin solution: Based on the results of the observation of the groups for confirmation of the toxicity of the challenge toxin solution, the challenge toxin solution was confirmed to contain 68.0 LD₅₀/mouse on the 4th day and 103.4 LD₅₀/mouse on the 7th day. The toxicity of the toxin solution satisfied the minimum requirement.

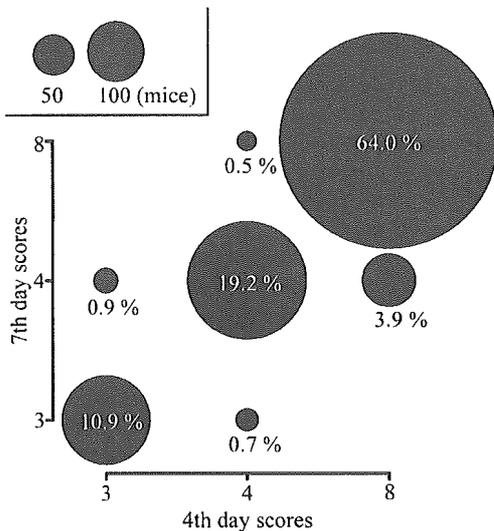


Fig. 1. Comparison of scores of mice immunized with tetanus toxoid vaccine at 4 and 7 days after toxin challenge. The square measure of a closed circle (●) indicates the number of mice with corresponding scores (see inset: the largest circle in the figure corresponds to 1,341 mice). The values in or below each circle indicate the % ratio of the number to the number of surviving mice at 4 days (2,094), rounded off to the first decimal place. Correlation coefficient: 0.919 ($n = 2094$).

DISCUSSION

To reduce the period of experimental animals' suffering, we examined the possibility of curtailing the conventional observation period used in the tetanus toxin challenge method from 7 to 4 days. Based on previous findings that the symptoms of challenged mice progress until the 6th day after the tetanus toxin challenge (12), the Japanese official procedure currently requires an observation period of 7 days, which is notably longer than the 5 days required in the WHO method (13). However, from the results described herein, symptoms on the 4th and 7th days showed no significant difference when converted to scores. The parallel line assay method (10,11) is in current use to calculate vaccine potencies. The application of this method to statistical analysis of assigned scores requires satisfying the following three conditions: (i) similar variances of average scores of mice immunized with each dose of tetanus vaccine sample lots and that of the reference preparation; (ii) linearity of dose-response curves of each sample lot and the reference preparation; and (iii) parallelism between the dose-response curves of each sample lot and the reference preparation. In this study, all three conditions were satisfied. There was no significant difference in the variances of average scores of mice immunized with each tetanus vaccine sample lot and those immunized with the reference

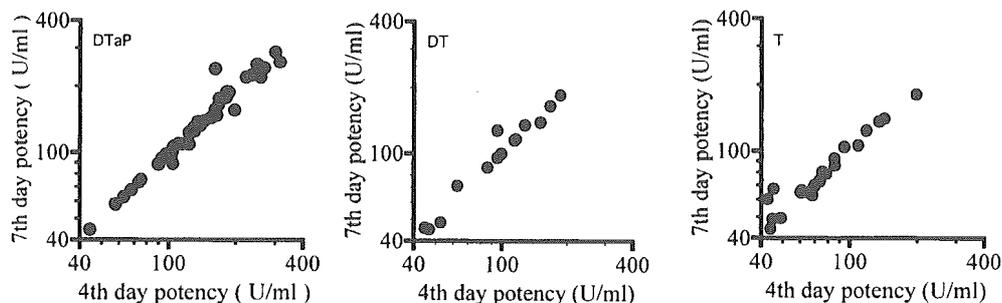


Fig. 2. Correlation of the potencies obtained from the scores on the 4th and 7th days. DTaP, DT, and T, respectively show adsorbed diphtheria, tetanus, and acellular pertussis combined vaccine, adsorbed diphtheria and tetanus combined toxoid vaccine, and adsorbed tetanus toxoid vaccine. Correlation coefficient (r) for DTaP: 0.964 ($n = 46$), r for DT: 0.975 ($n = 14$), r for T: 0.983 ($n = 25$), r for all the vaccines: 0.973 ($n = 85$).