

する (図 1)。

## 2) 使用したワクチン小分け品

製造承認後、平成 21 年 3 月から平成 21 年中に出検された ロットに関して抗原 ELISA を実施した。標準品 (TJP012) を基準とした Index 値 (抗原量相対価) の算出法は、平行線定量法 (Bioassay Assist) により算出した。

## C. 結果

抗原検出 ELISA はワクチン原液から 2 倍階段希釈して 64 倍まで希釈し、抗原量を測定した。その結果 OD 値は希釈に相関して容量依存性に減少した (表 1)。各ロットの Index 値を算出し、原液との関係を検討した。表 2A に示す如く原液が同じ 09-01 と 09-02 は 1.07 と 0.96 で、別の原液で製造された 09-03 と 09-04 は 1.15 と 1.19 であった。同様の結果が表 2B に示す如く 09-04、09-10、09-11 の Index は約 1.2 であり、別の原液と混合したロット 09-05 は 1.12 とやや低い Index を示した。図 2 に示す如く抗原 ELISA の OD 値を平行線定量すると非常にきれいに線上に並ぶことがすべてのロットで確認された。

## D. 考察

日本脳炎ワクチンの力価試験は、マウスにワクチンを 2 回免疫し、その中和抗体力価を参照品と比較すること

によって判定している。本方法は、動物 (マウス) を用いる評価方法であり。一定の範囲内で結果がぶれる試験であり、許容範囲が設定されている試験である。一方、抗原 ELISA 法によるウイルス抗原定量ははるかに結果が一定の範囲内に収まる試験であることが確認された。ワクチン力価と抗原量は異なる概念であり、まったく同一であると考えすることはできない。特に日本脳炎ワクチンは中和抗体力価を指標にワクチン行政を実施してきた歴史もあり、安易に力価試験を抗原定量試験に変更すべきではない。しかし、製剤が液状ワクチンから凍結乾燥ワクチンに代わり、原液が同一であっても凍結乾燥ラインが異なる製品は異なるロットとされる現状では、原液が同一の小分け製品であれば、1 ロットを選んで力価試験を実施し、その他のロットに関してはウイルス抗原量を比較し、同量であればそれを持って適とすることも考慮すべきではないかと考えられる。

## E. 結論

細胞培養日本脳炎ワクチン抗原定量 ELISA 法を開発し、小分け製品に関して抗原量を検討したところ、ワクチン原液との相関が認められた。また、データの均一性は高く、原液が同じであればロット間のぶれは非常に小さいことが確認された。

今後、多施設で本方法を検討し、データ蓄積する予定である。

なし

**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

**H. 知的所有権の取得状況**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

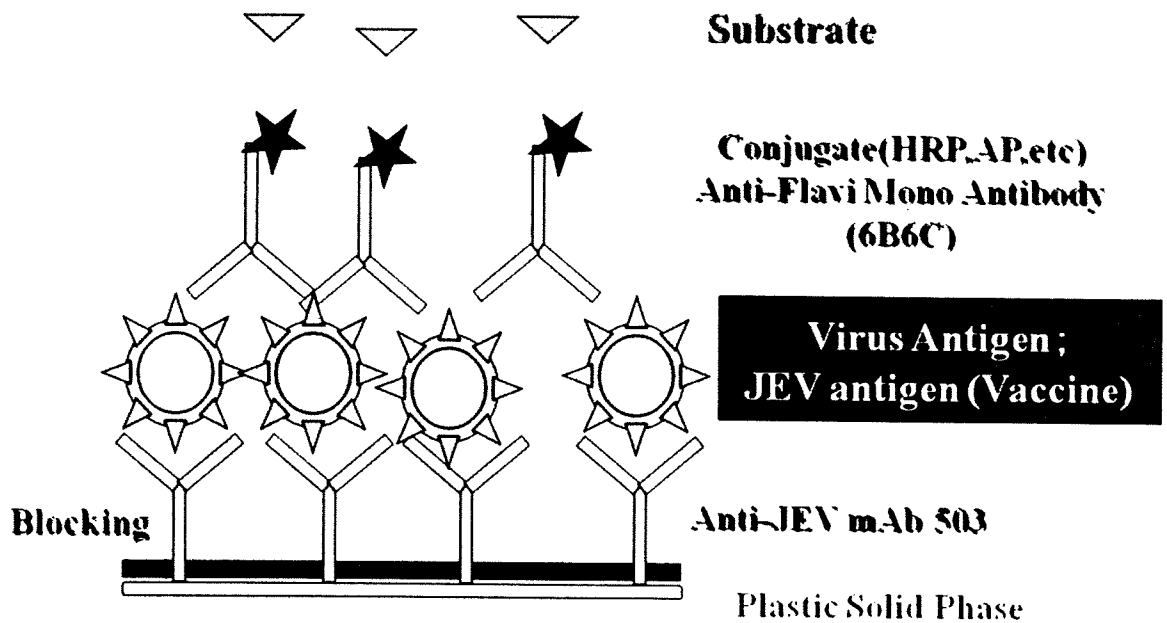
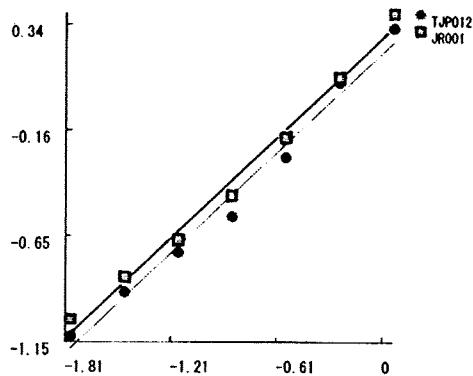


図1 日本脳炎ワクチン抗原 ELISA 法

96 ウェルプレートに抗日本脳炎ウイルス単クローン抗体 (mAb 503) を固層化し、日本脳炎抗原を捕捉する。



要因	平方和	自由度	平均平方和	F
検体間	0.01591	1	0.01591	3.879
回帰	3.08458	1	3.08458	752.010**
平行性	0.00018	1	0.00018	0.045
用量間	3.14169	13	0.24167	
誤差	0.04102	10	0.00410	
合計	3.14169	13		
TJP012		回帰係数	切片	
JR001		0.786	0.217	
共通の回帰係数:		0.774	0.274	
		0.780		
		相対力価	95%信頼区間	
JR001		1.22035	0.97419	1.53275
検体用量		相対力価		
1		1.43838		
0.5		1.20992		
0.25		1.07428		
0.125		0.99655		
0.0625		1.08448		
0.03125		1.32360		
0.015625		1.49116		

図2. 平行線定量法 (BioAssay assist) による Index (相対抗原価) の算出

TJP012: 標準抗原、JR001: 試験品

標準品に対して試験品の相対価は 1.22 と算出された。

表 1.希釈系列による日本脳炎ワクチン抗原 ELISA

希釈	TJP012	JR033	JR034	JR035	JR036
原液	2.49	2.01	2.06	2.04	1.95
2x	2.04	1.79	1.86	1.84	1.75
4x	1.11	1.03	1.09	1.01	0.92
8x	0.67	0.59	0.64	0.57	0.53
16x	0.36	0.32	0.33	0.32	0.36
32x	0.18	0.18	0.19	0.21	0.20
64x	0.13	0.13	0.12	0.11	0.12

数字は OD 値である。

表 2

A

感染研整理番号	原液番号	抗原 ELISA index
09-01	8001	1.07
09-02	8001	0.96
09-03	8002	1.15
09-04	8002	1.19

B

感染研整理番号	原液番号	抗原 ELISA index
09-04	8002	1.22
09-10	8002	1.25
09-11	8002	1.29
09-05	8002+8003	1.12

Index は平行線定量法により算出した。

A, B は検査日、プレートが異なるため別表とした。

## 組換えヒトパピローマウイルスワクチンの規格試験についての研究

分担研究者 柗元 巖

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長

**研究要旨：**我が国で 2009 年に販売承認され、「組換え沈降 2 価ヒトパピローマウイルス様粒子ワクチン（イラクサギンウワバ細胞由来）」の名称で新たに生物学的製剤基準に収載されたサーバリックス（製造所：グラクソ・スミスクライン）の VLP 力価試験を国立感染症研究所に導入し、検定試験として開始した。VLP 力価試験で用いる参照ロットの VLP 含量値を 7 回の試験で決定した。また相対力価を算出するための二つの計算方法（4 パラメータ回帰近似法と平行線定量法）を比較検討した。その結果、製造所が開発した VLP 力価試験は、ばらつきが小さく精度が高い力価測定法であることが示された。

### A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス（HPV）は子宮頸癌の原因ウイルスとして知られており、近年欧米にて HPV に対する感染予防ワクチン（HPV ワクチン）が開発され、2006 年から販売されている。HPV ワクチンは、HPV のキャプシド蛋白質 L1 を遺伝子組換え酵母細胞や昆虫細胞／組換えバキュロウイルス系で発現させ、ウイルス様粒子（VLP）に再構成させた「遺伝子組換え蛋白質ワクチン」である。その作製にはシードロットシステムが導入されており、高度に均一な品質のワクチン生産が期待される。我が国でも 2007 年に欧米の 2 製造所から HPV ワクチンの承認申請がなされ、1 製造所の製品（グラクソ・スミスクライン社：サーバリックス）が 2009 年 10 月に販売承認された。

サーバリックスの生物学的製剤規準においては、力価試験として従来型の動物を用いた試験ではなく、有効成分である VLP の含量を測定する試験（VLP 力価試験）が設定されている。この VLP 力価試験は、VLP の高次構造を認識する抗 L1 マウスモノクローナル抗体を用いて、立体構造を保持した VLP 量を酵素免疫測定法（ELISA）にて定量する。その際、VLP 含量値ではなく、参照ロットとなる小分けワクチン（臨床試験にて有効性が示されたロット）に対する相対力価値が規格値として設定されている。本研究では、この新たに生物学的製剤規準に収載された VLP 力価試験の特性を調べ、検定検査を実施する上でのポイントを検討することを目的とした。また製造所と共同で、参照ロットワクチンの切り替えに関するプロトコルの設定を目指した。

## B. 材料と方法

### VLP 力価試験

サーバリックス小分け製品及び参照ロット（グラクソ・スミスクライン社から提供）を 0.1 %カゼイン及び 0.1 %ポリソルベール 20 を含むリン酸緩衝液生理食塩溶液（PBS）で希釈して、試料溶液及び基準溶液とした。HPV16 L1 VLP 標準物質及び HPV18 L1 VLP 標準物質を 2 倍希釈で 11 段階に希釈し標準溶液とした。96 穴プレートは各ステップの後、0.05 %ポリソルベール 20 を含む生理食塩水で 4 回洗浄した。現時点での参照ロットは、海外での第 III 相臨床試験（HPV-008）で使用されて有効性が示されたロット（DHPV005A9）である。

96 穴プレートのウェルにウサギポリクローナル抗ヒトパピローマウイルス血清を 4 °C で一晩放置して結合させ、1%カゼインを含む PBS を加え 37 °C で 1 時間ブロッキングした。次に試料溶液、基準溶液及び標準溶液を加えて 37 °C で 2 時間振盪しながら結合させた。その後、マウスモノクローナル抗ヒトパピローマウイルス抗体を加えて 37 °C で 1 時間加温した。さらにビオチン標識抗マウス Ig 抗体を加え 37 °C で 1 時間加温した。最後にstreptavidin・ビオチン標識パーオキシダーゼ複合体を加え 37 °C で 30 分間加温した。テトラメチルベンジジンの過酸化水素溶液を加えて室温で 15 分間反応させ、波長 450 nm 及び 650 nm における吸光度を測定した。

### VLP 含量および相対力価の算出

標準溶液から得た検量線を用いて試料溶液及び基準溶液に含まれる VLP 量を測定し、基準溶液を 1.00 とした時の試料溶液の相対力価を算出した。検量線は SoftMax Pro ソフトウェアにて 4 パラメータ回帰近似法を

用いて算出した。また VLP 含量を算出せずに相対力価を算出する方法として、Bioassay Assist による平行線定量法を用いた。

## C. 研究結果

### 参照ロットの VLP 含量

製造所から提供を受けた試薬・材料を用いて、7 回の独立した VLP 力価試験を行い、参照ロットに含まれる VLP 含量を測定した。その結果、HPV16: 24.9 µg/ml、HPV18: 30.8 µg/ml を得た（図 1）。95 %信頼区間は HPV16: ±2.0 µg/ml、HPV18: ±1.4 µg/ml であった。

### 小分け製品の相対力価

3 回の VLP 力価試験を行い、製造所が採用している 4 パラメータ回帰近似法を用いた方法で小分け製品の相対力価を計算したところ、3 回の試験の平均値として、HPV16: 1.02、HPV18: 1.01 を得た。一方、標準溶液の検量線を作成せずに、直接、試料溶液と基準溶液の反応曲線を比較する平行線定量法を用いて力価を計算したところ、3 回の平均値として、HPV16: 1.02、HPV18: 1.02 を得た（図 2）。

## D. 考察

サーバリックスの生物学的製剤基準で設定された VLP 力価試験は、有効性が示された参照ロットに対して、小分け製品の相対力価を測定する試験であり、参照ロットの適正な管理運用が重要である。測定した参照ロットの VLP 含量は、7 回の試験ごとにある程度のばらつきを示した。参照ロットは 4 °C 保存で 3 年間の安定性が示されており、試験での VLP 含量値のばらつきは、アルミニウムアジュバントに吸着した小分け製品を ELISA で試験する時の、試験ごとの微妙な振盪条

件の違いなどに起因することが考えられた。一方、参照ロットに対する小分け製品の相対力価値は3回の試験でのばらつきは非常に小さかった。これらの結果から、VLP含量の絶対値ではなく、相対力価値を規格値として設定することの品質管理上の妥当性が確認された。

製造所が採用している4パラメータ回帰近似法によるVLP含量の計算法は、近似の精度は高いが、SoftMax Proなどの高価な市販ソフトウェアを必要とする。国立感染症研究所にて開発され、多くの検定試験で用いられているBioassay Assistでの平行線定量法による検討では、4パラメータ回帰近似法とほとんど同じ結果が得られ、また3回の試験値のばらつきは4パラメータ回帰近似法よりも若干小さかった(図2)。平行線定量法でばらつきが小さくなる理由としては、計算に用いる希釈点数が6-7点となり、4パラメータ回帰近似法での3-4点よりも多いことが考えられた。ただし、ばらつきの違いは大きなものではなく、相対力価の計算方法としては、どちらの方法も使用可能であることが示された。

## E. 結語

我が国で初めて承認されたHPVワクチンであり、「組換え沈降2価ヒトパピローマウイルス様粒子ワクチン(イラクサギンウワバ細胞由来)」の名称で生物学的製剤基準に収載されたサーバリックス(製造所:グラクソ・スミスクライン)のVLP力価試験を、国立感染症研究所に導入し、この新しい*in vitro*力価試験がサーバリックス

小分け製品の検定に十分適した試験方法であることを確認した。またサーバリックス参照ロットに含まれるVLP含量値を決定し、参照ロットの切り替えに向けた基礎データを得た。今後の課題としては、参照ロット切り替え時に製造所のバリデーションデータを確認し、国立感染症研究所においても実際に新旧参照ロットの比較試験を行い、切り替えの妥当性をチェックすることが、今後意味のある検定を続けるために重要と考えられる。

## F. 健康危害情報

無し

## G. 研究発表

論文発表

(欧文)

H. Sato, R. Kusumoto-Matsuo, Y. Ishii, S. Mori, T. Nakahara, F. Shinkai-Ouchi, K. Kawana, T. Fujii, Y. Taketani, T. Kanda, and I. Kukimoto. Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 387: 525-530, 2009.

(和文)

無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

無し

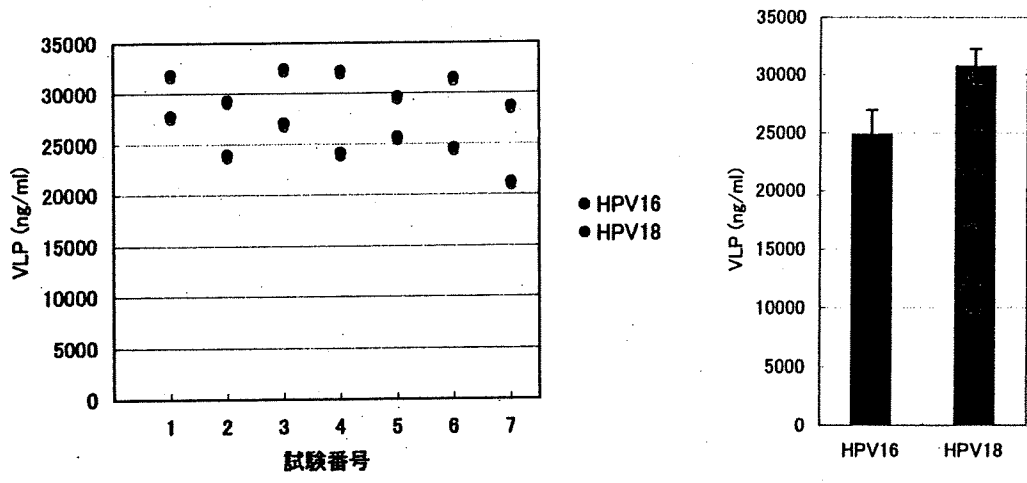


図1 サーバリックス参照ロットのVLP含量

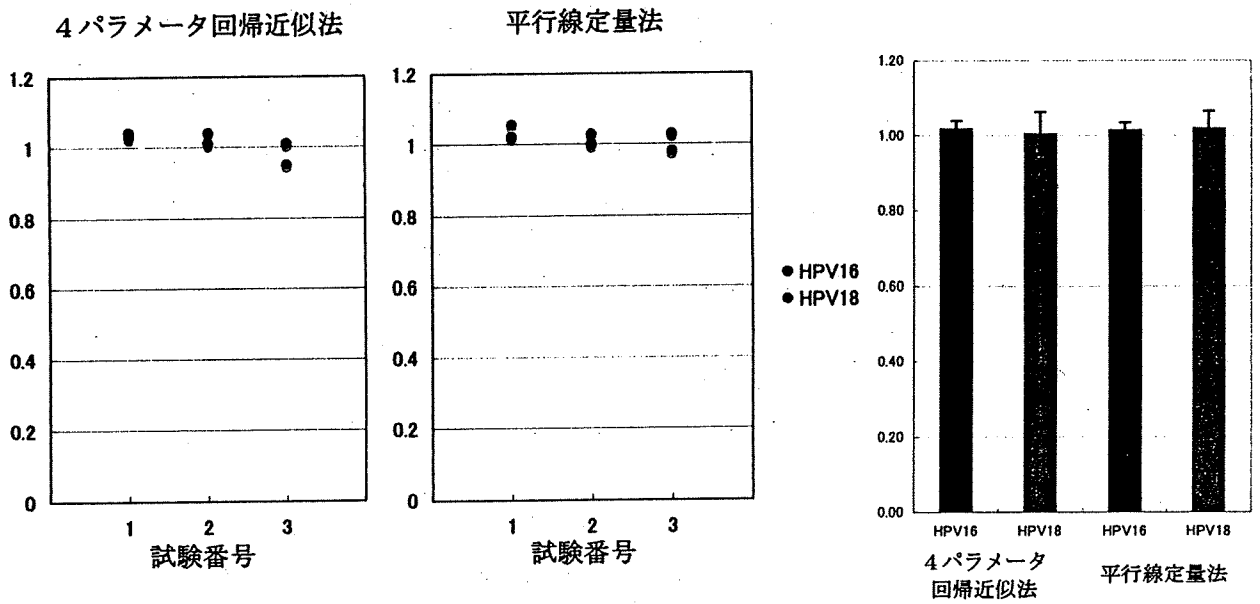


図2 サーバリックス相対力価の計算方法の比較



## インフルエンザ HA ワクチン及び沈降インフルエンザワクチン(H5N1 株)の 生物学的製剤基準に関する研究

分担研究者 板村繁之 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 室長  
研究協力者 佐藤佳代子 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター  
嶋崎典子 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター  
河野直子 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター

**研究要旨:**インフルエンザ HA ワクチンにはワクチンがスプリットワクチンであることを確認するために、ウイルス粒子とは異なる分画位置に HA 活性が存在していることを確認する分画試験がある。この試験ではウイルスの HA 活性に基づいて HA 分画を同定しているが、近年分離されるインフルエンザウイルス株では HA 蛋白量当たりの HA 活性に大きな差が認められる。通常の季節性インフルエンザ HA ワクチンは、A 型 2 種、B 型 1 種の混合ワクチンであり、ワクチン株の組合せによっては高い HA 活性と低い HA 活性の株が混合した状態になり、小分製品について分画試験を行っても高 HA 活性の株に隠れて、低い HA 活性の株の分画位置が識別できないことがある。混合前の原液の段階では HA 活性に基づいて試験に添加する検体量を調製することができ、個別に HA 活性の存在する分画を同定することが可能で、原液でワクチンのスプリット化が確認できれば、混合後の小分製品で確認する科学的な必然性は低いと考えられる。沈降インフルエンザワクチン(H5N1 株)は、パンデミックワクチンとして高病原性鳥インフルエンザ (H5N1 株) を想定して製造承認され、その生物基が作成された。沈降インフルエンザワクチン(H5N1 株)を、プレパンデミックワクチンとして使用するには、生物基の試験項目について見直しが必要か検討する必要がある。

### A. 研究目的

季節性のインフルエンザは北半球の温帯地域では毎年冬季に流行が拡大する。インフルエンザウイルスは抗原変異が極めて頻繁に起こることが知られており、そのため季節性のインフルエンザワクチンを製造するためのウイルス株は流行ウイルス株のサーベイランス情報に基づいて毎年見

直しが行なわれている。世界保健機関 (WHO) では、毎年 2 回、北半球と南半球向けにワクチン株の選定会議を開催して、ワクチン株の推奨を行っている。加えて、インフルエンザウイルスは抗原変異だけでなく、ウイルスレセプターへの結合力や特異性に変異が見られる。インフルエンザウイルスの生物学的活性として赤血球凝集

(HA)活性がよく知られているが、近年の流行ウイルス株は従来ニワトリ赤血球を凝集できたものが、ほとんど凝集できないように変異しており、ヒチメンチヨウやモルモットなどの赤血球でようやく HA 活性が検出できる。このようなウイルスの変異に伴って、インフルエンザワクチンの生物学的製剤基準（生物基）に規定されている規格試験の試験方法に見直しが必要なものが出てきた。

一方、1997年の香港に始まる高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ウイルスの鳥からヒトへの感染事例は、現在までのところ幸い本ウイルスによるパンデミックは発生していないが、2003年末以降アジア地域から中央アジア、中近東、欧州、アフリカへと本ウイルスは家禽や野鳥の世界で常在化し、ヒトへの感染を繰り返している。現在（3/4/2010）に至るまで486名の感染者が報告され、その内287名が死亡しており、致死率は約60%に及ぶ。このような高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ウイルスによるインフルエンザ・パンデミックに対応するためのワクチンとして沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1株）が開発され、2007年に製造承認された。本ワクチンは開発と並行して高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ウイルスによるパンデミックに対応するために国

家備蓄も実施された。2008年には本ワクチン接種によって得られるプライミングとブースター効果、抗原性の異なるウイルス株に対する抗体応答や持続期間についての臨床研究が実施され、本ワクチンが同亜型のウイルスについて比較的良好なプライミング効果を賦与することが明らかになった。そのために、医療従事者等を対象としたプレパンデミックワクチンとしての使用についても検討されるようになった。その後、本ワクチンは2009年に沈降インフルエンザワクチン（H5N1株）と改定された。しかしながら、本ワクチンはパンデミックを対象として、リスク・ベネフィットの観点から製造承認がなされていることから、プレパンデミック時での使用を考えるには生物基の項目等の見直しが必要であるのか検討する必要性がある。

このような観点から、インフルエンザHAワクチン及び沈降インフルエンザワクチン（H5N1株）の生物基に関連する問題点について検討を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

表1に示すようなウイルス株のインフルエンザHAワクチンの原液各々について、HA活性を0.5%ヒチメンチヨウおよび0.75%モルモット赤血球

を使用して測定し、HA 含量についてはHA 含量既知の標準抗原を用いて一元放射免疫拡散試験 (SRD) 法によって測定した。

### C. 研究結果・考察

インフルエンザHA ワクチンにはワクチンがスプリットワクチンであることを確認するために、ウイルス粒子とは異なる分画位置にHA 活性が存在していることを確認する分画試験がある。この試験では蔗糖密度勾配遠心法によってHA 活性がある分画が蔗糖密度勾配の上層に存在する事を確認している (図1)。ところが、近年分離されるインフルエンザウイルス株のいくつかはニワトリ赤血球凝集能が低下し、ヒチメンチョウあるいはモルモット赤血球を使ってHA 活性を測定している。通常の季節性インフルエンザHA ワクチンは、A 型2種、B 型1種の混合ワクチンであり、ワクチン株の組合せによっては高いHA 活性と低いHA 活性の株が混合した状態になっている。今回測定したワクチン株についても、最大で10倍程度のHA 比活性に違いが認められた。このようなワクチンをHA 含量に基づいて混合した小分製品について分画試験を行っても、高HA 活性の株に隠れて、低いHA 活性の株の分画位置が識別できない。一方、混合前の原液の段階では

HA 活性に基づいて試験に添加する検体量を調製することができ、個別にHA 活性の存在する分画を同定することが可能である。原液でワクチンのスプリット化が確認できれば、混合後の小分製品で確認する科学的な必然性は低いと考えられる。

沈降インフルエンザワクチン(H5N1株)は、パンデミックワクチンとして高病原性鳥インフルエンザ(H5N1株)を想定してリスクとベネフィットを考慮して製造承認され、その生物基が作成された。各クレードに対応したH5N1 ワクチンの国家備蓄が進められている一方で、これらの備蓄ワクチンのプレパンデミックワクチンとしての利用についても検討がなされている。このように当初想定されていたワクチンの使用方法とは異なる使用方法も検討されており、仮に本ワクチンの適応範囲がプレパンデミックワクチンまでも拡大されることになると、ワクチンの品質管理に関する試験項目(表2)について見直しが必要か検討する必要性がある。今後、プレパンデミックワクチンとしての観点から必要と考えられる点について検討を行う。

### D. 結論

1) インフルエンザHA ワクチンの分画試験について、原液でワクチンのス

プリント化が確認できれば、混合後の小分製品で確認する科学的な必然性は低いと考えられる。

2) 沈降インフルエンザワクチン(H5N1 株)を、プレパンデミックワクチンとして使用するには、生物基の試験項目について見直しが必要か検討する必要がある。

## E. 研究発表

### 1) 論文発表(英文)

Ikeno D, Kimachi K, Kudo Y, Goto S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains. *Vaccine* 27: 3121-3125 (2009)

### (和文)

緒方剛, 山崎良直, 岡部信彦, 中村好一, 田代真人, 永田紀子, 板村繁之, 安井良則, 中島一敏, 土井幹雄, 泉陽子, 藤枝隆, 大和慎一, 川田諭一: 一般住民のインフルエンザ予防接種歴と H5N2 鳥インフルエンザウイルス中和抗体, *厚生学の指標* 56: 33-38 (2009)

影山努, 板村繁之: 新型インフルエンザウイルス, *臨床と微生物* 36:193-198 (2009)

板村繁之: インフルエンザワクチン, *化学療法の領域* 25: 1453-1458 (2009)

板村繁之: インフルエンザワクチンの現状と課題, *診断と治療* 97: 2073-2077 (2009)

### 2) 学会発表

板村繁之: シンポジウム II インフルエンザワクチン 3. パンデミックワクチンの現状と課題 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009

河野直子, 板村繁之, 小田切孝人, 田代真人: インフルエンザワクチンの力価測定に用いる一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法の精度評価 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009

原田勇一, 河野直子, 板村繁之, 小田切孝人, 城野洋一郎, 五反田亨, 多田善一, 池田富夫, 田代真人: 沈降新型インフルエンザワクチン (H5N1 株) 接種者の血清ウイルス中和抗体の交差反応性の検討 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009

高橋 仁, 原田勇一, 佐藤佳代子, 河野直子, 板村繁之, 田代真人: インフルエンザワクチン力価測定に使用する標準抗原の HA 含量決定に重要な HA 含有率のエンドグリコシダーゼを用いた測定法の検討 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009

池野大介, 来海和彦, 工藤康博, 後藤修郎, 板村繁之, 小田切孝人, 田代真人, 城野洋一郎: マウスを用いた H5N1 株インフルエンザワクチンのプライム-ブースト効果の検討 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009

原田勇一, 高橋 仁, 佐藤佳代子, 信澤枝里, 河野直子, 板村繁之, 田代真人, 奥野良信, 佐々木学, 庵原俊昭, 小田切孝人: 沈降 H5N1 インフルエンザワクチン接種者の野生型ウイルス

株及び弱毒ワクチン株に対する抗体応答の評価 第 57 回日本ウイルス学会, 東京, 2009

#### G. 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

特記事項なし

図1 インフルエンザワクチンの分画試験

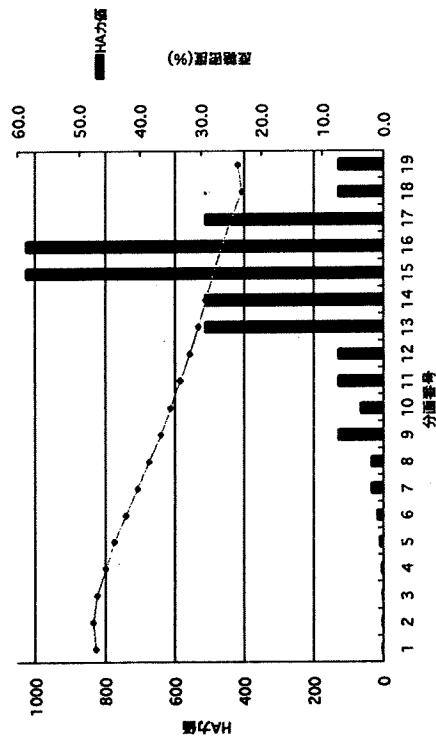


表1 インフルエンザワクチン原液のHA活性

平成21年度参照ワクチン作製用原液のHA活性 2009.7.28

試験品番号	ワクチン	株名	HA含量 (ug/ml)	HA活性 (HAU/ml)	HA比活性 (HAU/ugHA)
2009A	HAワクチン	A/Brisbane/59/2007 (VR-148) (H1N1)	953	6,400,000	6,716
	HAワクチン	A/Unguay/716/2007 (X-175C) (H3N2)	620	800,000	1,290
	HAワクチン	B/Brisbane/60/2008	426	3,200,000	7,512
2009B	HAワクチン	A/Brisbane/59/2007 (VR-148) (H1N1)	685	6,400,000	9,343
	HAワクチン	A/Unguay/716/2007 (X-175C) (H3N2)	713	640,000	898
	HAワクチン	B/Brisbane/60/2008	665	6,400,000	9,624

HA価測定は0.5%TRBCを使用

試験品番号	ワクチン	株名	HA含量 (ug/ml)	HA活性 (HAU/ml)	HA比活性 (HAU/ugHA)
2009A	HAワクチン	A/Brisbane/59/2007 (VR-148) (H1N1)	953	12,800,000	13,431
	HAワクチン	A/Unguay/716/2007 (X-175C) (H3N2)	620	3,200,000	5,161
	HAワクチン	B/Brisbane/60/2008	426	6,400,000	15,023
2009B	HAワクチン	A/Brisbane/59/2007 (VR-148) (H1N1)	685	6,400,000	9,343
	HAワクチン	A/Unguay/716/2007 (X-175C) (H3N2)	713	1,600,000	2,244
	HAワクチン	B/Brisbane/60/2008	665	12,800,000	19,248

HA価測定は0.75%GRBCを使用

表2 沈降インフルエンザワクチン(H5N1株)の試験項目

3 試験
3.1 不活化ウイルス汚濁液の試験
3.1.1 不活化試験
3.2 原液の試験
3.2.1 無菌試験
3.2.2 力価試験
一元抗射免疫拡散試験又はHA含量試験を行う。
3.2.2.1 一元放射免疫拡散試験
3.2.2.2 HA含量試験
3.2.3 発熱試験
3.2.4 卵アルブミン含量試験
3.2.5 エンドトキシン試験
3.3 小分製品の試験
3.3.1 アルミニウム含量試験
3.3.2 たん白質含量試験
3.3.3 チオキサール含量試験
3.3.4 ホルムアルドヒド含量試験
3.3.5 無菌試験
3.3.6 異常毒性否定試験
3.3.7 表示確認試験

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

分担研究者 白土東子 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）（生物基（案））小委員会を発足させ、Recommendations (WHO TRS 910 2002) にあつて、生物基(案) がない項目の洗い出しを行った。

**A. 研究目的**

先進国のほとんどは、すでに不活化ポリオワクチン（IPV）（通常、4 回接種）を使用している。わが国において、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。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、沈降精製百日せきジフテリア破傷風（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。早期の DPT-IPV ワクチンの導入には、ワクチンの製剤化のみでなく、生物基(案)の作成を早急に行う必要がある。

本研究では、平成 15-17 年度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」班において作製された生物基(案)が WHO の規制に比較して安全性と有効性を損なわないか否かを検討し、その改定案に反映させることを目的とする。

**B. 研究方法**

平成 15-17 年度「混合ワクチンの品質確保に関する研究」班において、作製された「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、Recommendations (WHO TRS 910 2002) にあつて、生物基(案)がない項目の洗い出しを行った。

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  
尾山誠一郎 武田薬品工業（株）

白井宏樹 (財)阪大微生物病研究会  
田野良夫 (財)ポリオ研究所  
高橋元秀 国立感染症研究所  
落合雅樹 国立感染症研究所  
脇田隆字 国立感染症研究所  
片山和彦 国立感染症研究所  
染谷雄一 国立感染症研究所  
白土東子 国立感染症研究所

### C. 研究結果、及び考察

平成 21 年 12 月 25 日に小委員会を開催し、生物基(案)の全ての項目を検討した。以下、議論された項目を列記する。(平成 15-17 年度「混合ワクチンの品質確保に関する研究」班において作製された「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)」は本報告書の末尾に参考資料として添付した。)

#### C-1. 生物基(案)全体に関して

WHO recommendations (WHO TRS 910 2002)は、強毒株由来、IPV 単味ワクチンをターゲットしているのに対し、生物基(案)はセービン株由来、DPT-IPV 4 混ワクチンをターゲットとしている点に違いがある。その違いを加味した上で、生物基(案)と Recommendations で大きく異なる点は、Identity tests、Test for retroviruses の 2 項目のみであった。他の項目は工程内

管理試験または社内工程内管理試験で大体網羅されており、社内工程内管理試験、工程内管理試験の項目を生物基(案)に入れるかどうかの判断を今後行うこととした。

#### C-2. 生物基(案) 2.1.2.1 製造用ウイルス株

1) 「・・・5 代以上継代されたものであってはならない。」の代数について:「〇代」または「科学的に問題ないと証明された代数」と表記を変更する。生物基最終作成時に、臨床試験の結果などを加味した上で、各メーカー毎に数値を決定することを小委員会で提案した。

#### C-3. 生物基(案) 3.2.1 培養細胞の試験

1) Recommendations の Tests for haemadsorbing viruses、Tests for other adventitious agents、Identity tests を生物基(案) 3.2.1 に組み込むべきか否かに関して: Master Cell Bank、Working Cell Bank を作成・更新する際に Identity tests を実施することが規定されているため、ロット毎に Identity tests に相当する試験を実施する必要は無い、すなわち生物基(案) 3.2.1 に組み込む必要はないのではないか、という議論があった。その一方で Tests for haemadsorbing viruses、Tests for other



adventitious agents に相当する試験が製造工程内管理試験として含まれているのであれば生物基に盛り込んでしまってもいいのではないかと、という議論もあった。

#### C-4. 生物基 (案) 3.2.2 ウイルス浮遊液の試験

Recommendations の Purification of monovalent pools に記載されている cellular DNA に関しても生物基 (案) 3.2.2 に組み込むべきか否かに関して: 精製工程において、細胞由来 DNA が除かれていることは確認している。よって、生物基 (案) に入れる必要はないではないかと、と小委員会で提案した。

Recommendations の Virus titration を生物基 (案) 3.2.2 に組み込むべきか否かに関して: 精製工程において、単味 IPV の力価を確認している。よって、生物基 (案) に入れる必要はないではないかと、と小委員会で提案した。

Recommendations の Test for effective inactivation を生物基 (案) 3.2.2 に組み込むべきか否かに関して: 製造所において現在すべてのバッチについてデーター取りを行い、96 時間以内に不活化されることを確認しており、不活化にはその3倍の時間を費やしている。実生産規模による製造において不活化の効率をモニターし、現在の不活化方法・不活化時間で問題ないこと

を確認しておく必要はあるが、問題なければ今後すべてのバッチについて不活化の効率をモニターする必要はない、すなわち生物基 (案) 3.2.2 に組み込む必要はない、と小委員会で提案した。

#### C-5 生物基 (案) 3.3 小分製品の試験

Recommendations の Protein content を生物基 (案) 3.3 に組み込むべきか否かに関して: Protein content の試験は IPV 原液で行っている。よって、生物基 (案) に組み込む必要はないと小委員会で結論づけた。

Recommendations の Preservative content を生物基 (案) 3.3 に組み込むべきか否かに関して: 4 混ワクチンに保存剤は含まれていない。よって、生物基 (案) に組み込む必要はないと小委員会で結論づけた。

生物基 (案) 3.3.8 マウス白血球数増加試験を生物基 (案) から除くか否かに関して: DPT ワクチンの試験項目からマウス白血球数増加試験は外された。よって、生物基 (案) に組み込む必要はないと結論づけた。

#### C-6 平成 17 年度からの持ち越し項目

生物基 (案) 2.2.2.3 濃縮・精製及び不活化 (3.2.3.3 エンドトキシン試験) に関して: 「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。」この表記に問題がないか、引き続き議論を重ねる。

#### D. 結 論

Recommendations (WHO TRS 910 2002) にあって、生物基(案)にない項目の洗い出しを行った。各メーカーにて審議の後に、第二回小委員会にて審議内容の確認を行う。

E. 健康危害情報  
無し

F. 研究発表  
論文発表  
(欧文)  
無し  
(和文)  
無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

## 【参考資料】：生物学的製剤基準

### 「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 µg/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