

表4 ポリオウイルス株に対するヒト血清検体の中和抗体価

ウイルス株	平均中和抗体価 (N=32)									
	Sabin 1	Sabin 2	Sabin 3	Mahoney	MEF-1	Saukett	SV3128	SV3130	11196	11198
由来	1型弱毒株	2型弱毒株	3型弱毒株	1型強毒株	2型強毒株	3型強毒株	2型 VDPV (ベトナム)	2型 VDPV (ベトナム)	2型 VDPV (ナイジェリア)	2型 VDPV (ナイジェリア)
2型 VDPV における主要なアミノ酸置換部位 (I1143T は除く)								P1021L	T3075V T3080A	N2172K S3073N T3075A R1103K
cIPV 接種前	138	95.0	53.4	39.4	80.0	16.1	92.0	72.9	81.1	60.1
cIPV1 回目後	962	945	756	906	994	738	993	977	977	977
cIPV2 回目後	946	977	727	886	996	701	994	993	993	981

対する平均中和抗体価は、Sabin 株と強毒株で大きな違いは認められなかった。2型 VDPV 株に対する中和抗体価も、Sabin 株に対する中和抗体価と、ほぼ同等であったが、SV3130 株と 11198 株に対する中和抗体価は、多少低い傾向が認められた。

cIPV 追加接種後、すべてのポリオウイルス株に対する平均中和抗体価は顕著に上昇した。cIPV 追加接種後の中和抗体価は、すべての血清型において、Sabin 株と強毒株での違いは認められなかった。2型 VDPV 株に対する平均中和抗体価も、Sabin 2 株に対する抗体価と同等であった。強毒株(cIPV)追加接種により誘導される中和抗体は、強毒株の抗原性を反映し、強毒株に対しても高い中和活性を示すことが示唆された。

D. 考察

広範なアフリカ諸国、および、野生株ポリオ流行国でもあるナイジェリア、パキスタン、アフガニスタンにおける2型 VDPV の検出は、これらの地域における trivalent OPV 接種率に問題があることを間接的に示す警告であり、2型 VDPV 伝播のコントロールのためには、trivalent OPV 接種率向上が必要となる。WHO は、世界的ポリオ根絶の最終段階において、trivalent OPV に替えて Sabin 1 株および Sabin 3 株のみを含む bivalent OPV を導入する方針を決めている。世界的な bivalent OPV 導入のためには、2型 VDPV によるポリオ流行のリスクを十分考慮し、徹底したサーベイランスにより、2型 VDPV 伝播の終息を評価・検証する必要がある。

本研究により、ナイジェリアにおける2型 cVDPV の出現および伝播が、長年断続的に発生しており、複数の2型

cVDPV genetic lineage が消長を繰り返していることが明らかとなった。また、本研究で解析したナイジェリアの2型 cVDPV 株の多くは、伝播の過程における変異の蓄積やC群エンテロウイルスとのゲノム遺伝子組換えにより顕著な毒性復帰を起しており、野生株ポリオウイルス同様、ポリオ流行に関与することが確認された。ナイジェリアにおける2型 cVDPV の長期的伝播の原因は、1型および3型野生株ポリオウイルスに対して高い有効性が期待できる monovalent OPV (1型および3型) が集中的に使用されたこと、また、2010年からは、Sabin 2型を除いた bivalent OPV が Supplemental Immunization Vaccine として用いられ、2型ポリオウイルスに対する集団免疫が低い状態が、北部ナイジェリアで長期間継続していることによるものと考えられている。

2012年に、いずれもベトナム南部の急性弛緩性麻痺症例から検出された2型 VDPV は、遺伝子解析の結果、共通の塩基置換部位を、ほとんど有していないことから、独立した2型 VDPV 孤発例であることが明らかとなった。近年多発している2型 VDPV によるポリオ流行事例、および、上述したナイジェリアにおける2型 cVDPV の出現・伝播機構の解析によると、2型 VDPV 孤発例の多発は、2型ポリオウイルスに対する集団免疫の低下を敏感に反映しており、集団免疫が低い状態が長期間継続することにより、2型 VDPV 伝播が広範かつ長期間伝播するリスクが増大することを明らかにしている。ベトナムで、2型 VDPV が検出された地域では、不十分なワクチン接種による集団免疫低下の懸念があることから、サーベイランスの強化とともに、追加接種キャンペーンが実施された。その後、あらたな2型 VDPV は検出されておらず、同地域で2型 VDPV が長期間伝播している可能性は低い。

ナイジェリアおよびベトナムで分離された2型VDPV株に対する血清中和抗体価は、親株であるSabin 2株と、ほとんど同じであり、アミノ酸変異による中和抗原性の変化は認められなかった。従来から報告されているとおり、1型ポリオウイルスについては、Sabin 1株とMahoney株の抗原性の違いを反映した中和抗体価の違いが認められたが、2型ポリオウイルスについては、Sabin 2、MEF-1、および、2型VDPV株間における中和抗体価の違いは、ほとんど認められなかった。cIPV接種前の中和抗体価が、SV3130株および11198株に対して多少低かったのは(表4)、中和エピトープにおけるアミノ酸置換の影響が考えられる。cIPV追加接種によるMEF-1抗原に対する中和抗体は、2型VDPV株に対しても、MEF-1株およびSabin 2株と、ほぼ同等の中和活性を有することが明らかとなった。本研究で用いた血清検体は、OPV接種により誘導された抗Sabin 2中和抗体(cIPV接種前検体)と、cIPV追加免疫により誘導された抗MEF-1中和抗体(cIPV接種後検体)を、ある程度反映するものと考えられるが、結果的には、異なる2型ポリオウイルス抗原により誘導される中和活性の違いは認められなかった。

本研究において、2型VDPVに対する集団免疫を評価するための血清疫学的解析にあたっては、強毒型VDPV分離株や2型強毒株を用いる必要はなく、中和抗原性が同等であるSabin 2型に対する中和抗体測定価測定により評価可能であることが示された。我が国の流行予測調査事業におけるポリオ血清疫学調査は、弱毒化Sabin株を用いて行われているが、2型ポリオウイルスに対する集団免疫は、Sabin 2株を用いた抗体保有率調査により評価可能であると考えられる。

F. 研究発表

3. 論文発表 (分担執筆した報告書等を含む)

- 33) Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumedé N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA, Kew O. Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria. *J Virol* (in press)

- 34) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein (OSBP) family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* (in press)
- 35) Arita M, Iwai-Itamochi M, Wakita T, Shimizu H. Reply to "poliovirus-neutralization test with poliovirus pseudovirus to measure neutralizing antibody in humans". *Clin Vaccine Immunol* 19: 459, 2012
- 36) Arita M, Iwai M, Wakita T, Shimizu H: Development of a poliovirus neutralizing test with poliovirus pseudovirus for measurement of neutralizing antibody titer in human serum. *Clin Vaccine Immunol* 18: 1889-1894, 2011
- 37) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87: 701-705, 2012
- 38) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
- 39) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen. *J Clin Microbiol* 50: 1764-1768, 2012
- 40) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 443-453, 2012
- 41) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
- 42) Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y, Okazaki T, Marumoto T, Takahashi A, Takayama K, Nakanishi Y, Shimizu H, Tani K. Coxsackievirus B3 is an oncolytic

- virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 72: 2609-2621, 2012
- 43) Arita M, Wakita T Shimizu H. Valosin-Containing Protein (VCP/p97) Is Required for Poliovirus Replication and Is Involved in Cellular Protein Secretion Pathway in Poliovirus Infection. *J Virol* 86: 5541-5553, 2012
- 44) 染谷雄一、清水博之、ポリオウイルスワクチンの品質管理、臨床とウイルス 40: 306-313, 2012
- 45) 高山直秀、清水博之、梅本哲. 不活化ポリオワクチン接種件数に関する調査：2011年の調査結果. *日本医学会雑誌* 141: 1052-1058, 2012
- 46) 高山直秀、崎山弘、岡部信彦、清水博之、梅本哲. 2011年度全国BCGワクチン、経口生ポリオワクチン、DPT3種混合ワクチン累積接種率調査報告. *日本医学会雑誌* 141: 1549-1555, 2012
- 47) 清水博之：不活化ポリオワクチンの現状、ファルマシア 49: 211-216, 2013
- 48) 清水博之：東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状、感染症 2013 (印刷中)
- 49) 清水博之：不活化ポリオワクチン導入の現状と今後の課題、*Bio Clinica* 28: 19-24, 2013
- 50) 清水博之：ポリオ流行のリスクとポリオワクチン. *モダンメディア*, 2013 (印刷中)
- 51) 清水博之：ポリオウイルスの病原体管理、*JBSA Newsletter* 2: 11-14, 2012
- 52) 清水博之：手足口病、特集「感染症動向2013」、*メディカル朝日* 1、28-30, 2012
- 53) 清水博之：ポリオの病態とポリオワクチン. *小児科臨床* 65: 2281-2287, 2012
- 54) 清水博之：不活化ポリオワクチンの導入と今後の課題. *日本医事新報*:4613, 70-75, 2012
- 55) 清水博之：感染症担当者が知っておきたい不活化ポリオワクチンの最新状況. *INFECTION CONTROL* 21: 1, 2012
- 56) 清水博之：不活化ポリオワクチン(IPV)と経口生ポリオワクチン(OPV). *小児内科* 44: 1234-1237, 2012
- 57) 清水博之：ポリオウイルスワクチン. *ウイルス* 62: 57-66, 2012
- 58) 清水博之：手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
- 59) 清水博之：不活化ポリオワクチン導入の現状と移行期の問題点. *愛知県小児科医会会報* 95: 14-17, 2012
- 60) 清水博之：世界ポリオ根絶計画とポリオの疫学. *バムサジャーナル* 24: 32-36, 2012
- 61) 清水博之. 手足口病(エンテロウイルス71)ワクチン開発の現状. *病原微生物検出情報* 33: 65-66, 2012
- 62) H. ブランズウェル: 根絶計画 詰めの一歩. *日経サイエンス* 7月号: 98-105, 2012 (監修)
- 63) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report (annual WHO report, 2012)
- 64) ポリオ 病原体検出マニュアル 改訂版 2012年 [分担執筆]

4. 学会発表等

- 18) 清水博之：ポリオワクチン. シンポジウム「ウイルス感染症とワクチン」. 第28回 日本環境感染学会総会. 横浜市、3月1日, 2013
- 19) 清水博之：ポリオ根絶計画とポリオワクチンの将来. 第16回 日本ワクチン学会学術集会. 横浜市、11月18日, 2012
- 20) 清水博之：不活化ポリオワクチン導入とポリオワクチンの将来. 第60回 日本ウイルス学会学術集会. 大阪、11月15日, 2012
- 21) 有田峰太郎、脇田隆字、清水博之：VCP/p97はポリオウイルスの複製に必要とされる新規宿主因子でありウイルス感染における細胞蛋白質分泌経路に関与する. 第60回 日本ウイルス学会学術集会. 大阪、11月14日, 2012
- 22) 清水博之：WHO ポリオ実験室ネットワークにおけるバイオセーフティ教育訓練. 第12回日本バイオセーフティ学会学術集会. 東京、11月7日, 2012
- 23) 清水博之：不活化ポリオワクチンの導入と今後の課題. 平成24年度感染症機器管理研修会. 東京、10月17日, 2012
- 24) 清水博之：世界のポリオ根絶とポリオワクチン. 理化学研究所 横浜研究所一般公開セミナー. 横浜市、9月29日, 2012
- 25) 清水博之：不活化ポリオワクチン導入 - 日本の課題・世界の課題 -第59回 日本小児保健協会 学術集会. 岡山市、9月28日, 2012

- 26) 不活化ポリオワクチンと移行期の課題. 相模原市小児科医会講演会、相模原市、9月19日、2012
- 27) 清水博之: ポリオ対策の現状と課題-日本における不活化ポリオワクチン導入の現状と問題点-中華人民共和国 「国家級公衆衛生政策計画管理プロジェクト」 EPI セミナー、北京 8月16日、2012
- 28) 清水博之: 不活化ポリオワクチンの導入と課題. 東大和市立保健センター、東大和市、2012年8月27日
- 29) 清水博之: 新しいポリオワクチン; 不活化ポリオワクチン導入と移行期の問題点. 第3回北里感染症教育フォーラム、東京、5月12日、2012
- 30) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
- 31) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
- 32) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S. The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 33) Arita M, Wakita T, Shimizu H. Valosin containing protein (VCP/p97) is required for replication of poliovirus and inhibition of cellular protein secretion caused by viral proteins. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 34) Umami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H. Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
片山和彦	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の品質管理	PHARM TECH JAPAN	28 (10)	39-43	2012
染谷雄一、清水博之	ポリオウイルスワクチンの品質管理	臨床とウイルス	40 (5)	306-313	2012

IV. 研究成果の刊行物・別冊

特集

ワクチン製造をめぐる 規制・製造技術の最新動向

4

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の品質管理

Production and Quality Control of DTaP-IPV Combination Vaccine

国立感染症研究所 ウイルス第二部 第一室

片山和彦

KAZUHIKO KATAYAMA

National Institute of Infectious Diseases

はじめに

ワクチン類は通常、病原微生物による感染を防御すること、感染症予防、病状の軽減などを目的として使用される。ワクチン類は生物学的製剤の一種であり、その製造は、病原微生物などを原材料として行われるため、通常の医療用医薬品などとは異なる技術や製品の品質管理が必要となる。ワクチンが他の医薬品と最も異なるのは、感染症や疾病の予防のため、いわゆる患者ではなく、健康体に接種されることである。したがって、ワクチンの予防効果だけでなく副反応の発生にも人々の大きな関心が寄せられている¹⁾。ワクチンの副反応を低減させ目的の効果を維持するのは、それぞれのワクチンに適した品質管理である。混合ワクチンは、一度の接種で複数の病原体に対する予防効果が期待できるなど、被接種者にとってメリットが大きい。単独で使用してきたいくつかのワクチンを混合することによって引き起こされるワクチン成分の相互作用や副反応の危険の増加などの問題もある²⁾。本稿では、WHOのリコメンデーションに沿った不活化ポリオウイルスワクチン部分の品質管理に加え、実用化目前の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開発段階で行われた“混合ワクチンの品質確保に関する研究”によって得られた混合ワクチン特有の品質管理について記す。

1. 新規成分である3価混合 不活化ポリオウイルスワクチン

ポリオウイルスにはType 1, Type 2, Type 3の抗原性の異なる3つのタイプが存在することから、ワクチンにはそれぞれのタイプの単価ワクチンと、2~3のタイプを混合した2価もしくは3価のワクチンがある²⁾。わが国の経口生ポリオワクチンは、セービン博士の開発した弱毒化ウイルスSabin type 1, Sabin type 2, Sabin type 3を用いて製造されている3価混合の生ワクチンである。海外では、ソーク博士の開発した強毒型ポリオウイルスtype 1, type 2, type 3(多くは, Mahoney株, MEF-1株, Saukett株)を不活化(ウイルスの感染性を奪う工程)したソークワクチンが実用化され、使用されている³⁾。海外ではすでにソークワクチン成分を百日せきジフテリア破傷風(DPT)と混合したDPT-IPV 4種混合ワクチンが実用化され、使用実績も蓄積されている²⁾。現在、わが国で開発が進められ、導入間近となっている4種混合ワクチンは、ポリオウイルス成分に独自に開発されたセービン由来3価混合不活化ポリオワクチンを使用している⁴⁾。つまり、将来わが国に導入される可能性のある4種混合ワクチンのポリオウイルス成分には、強毒型ポリオウイルスから調製されたものと弱毒化ポリオウイルスであるセービン株から調製されたものの2種類が使用される可能性がある。

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の品質管理

いずれのワクチンであっても、培養細胞に感染性のあるポリオウイルスを接種し、大量に増殖させ、それをホルマリンなどのタンパク質変性剤を用いて不活性化(感染性をなくす)して、ワクチンとして用いている。ワクチンによって誘導されるポリオに対する防御免疫は、麻痺性ポリオに対する予防効果を有するが、ポリオウイルスの感染および再感染を完全に防ぐ効果はない。したがって、嚴重に封じ込め対策がとられたラボにおいても、ワクチン製造のために強毒型ポリオウイルスを大量に増やす工程等での実験室作業者がポリオウイルスに感染し、ラボ外にポリオウイルスを持ち出してしまう可能性はゼロにはならない⁶⁾。現在、WHOを中心として世界ポリオ根絶計画が進行しており、われわれはポリオウイルス根絶後の世界におけるポリオウイルス感染について考えておく必要がある。このような背景から、将来、すべてのワクチンにおけるポリオウイルス成分はセービン株由来の成分に変更される可能性がある。

2. シードロットシステムによる ポリオウイルスの品質管理

生ワクチン、不活化ワクチンいずれにおいても、ワクチンの製造に供するウイルス株は、薬事法に基づき厚生労働大臣の承認を受けたものがマスターシードとして保存される。製造用株は、生物学的製剤基準(生物基)に従って、シードロットシステムによって管理する必要がある。ポリオウイルスのようなRNAウイルスは、核酸配列のサイト当たり変位速度が速く、単独のプラークから精製されたウイルスでさえ、継代数を重ねて増殖させるとゲノム上に塩基配列レベルの変異が蓄積されることが知られている⁶⁾。ワクチン製造株のマスターシードは、特性、同一性が保たれるように起源を明らかにし、継代細胞、継代方法、継代数を明記して管理、保管する。各血清型マスターシードに対しては、ウサギによるBウイルス混入否定試験、細菌および真菌の混入否定試験、抗酸菌混入否定試験、マイコプラズマ否定試験、SV40否定試験、初代サル腎細胞への接種による外来性ウイルス迷入否定試験、モルモットへの接種によるウイルス混入否定試験、ポリオウイルス血清型同定試験、ウイルス力価試験などを行い保管する。

通常、マスターシードからサブマスターシードロット、

ワーキングシードロットを厳格に継代数をコントロールして作製し、十分にワーキングシードロットを確保して保管し、ワクチンの製造を行う。これらのロットに関しても、上記試験のうちポリオウイルス血清型同定試験、ウイルス力価試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験などを実施する。マスターシードに関しては、全塩基配列を決定し、サブマスター、ワーキングシードにおいて塩基配列変化を追跡できるようにするのが望ましいが、ポリオウイルスの場合、マスターシードが確立された年代が古い場合があり、必ずしも塩基配列レベルでの品質管理ができるわけではない⁶⁾。以上、ポリオウイルスのシードロットシステムによる品質管理に関しては、WHO Technical Report Series (TRS) No.926, 2004 Annex 2, またはWHO TRS No.910, 2002 Annex 2^{7, 8)}に詳細が示されている。

ポリオウイルスの増殖に使用する細胞に関しても、起源、履歴を明記した上で、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクを作製し、品質を管理する必要がある。セルバンクは、作製の継代数を厳格に制限して継代培養する。細胞の品質管理項目は、細胞の形態観察(光学顕微鏡による細胞変性観察)、血球吸着試験(モルモット赤血球を使用して、細胞への血球吸着を観察)、サル細胞同定試験(等電点電気泳動によるアイソザイム解析)、細胞の培養上清に対する細胞変性試験(上清をVero細胞、MRC-5細胞、サル初代腎細胞などに接種し、細胞変性を観察する)、マイコプラズマ否定試験などを行い、異常が認められないことを確認したセルバンクを構築してウイルスの増殖に用いる。

3. ウイルス増殖工程、精製工程の 管理

ウイルスの増殖には、Vero細胞などの株化培養細胞が用いられる。前述のように管理されたセルバンクを用いて、増殖させる。増殖の際、細胞の維持増殖のため異種血清(ウシ血清など)もしくはその画分が使用される。最低限の抗生物質の使用は認められている。増殖後のポリオウイルスの各血清型のシングル・ハーベストは、ポリオウイルス血清型同定試験、ウイルス力価試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験を行う。特に増殖させたウイルスの精製工程の確認試験では、タンパク質量試験(ローリー法)、D抗原量測定(詳細を後述する)を行い、総タンパク質量に対するポリオウイルスの抗原量(比抗

原量)によって精製度を管理する。WHO TRS No.910, 2002 Annex 2では、0.1 μ g/D抗原ユニット以下の純度が推奨されている。また、細胞由来DNAの混入も10ng/human dose以下に抑えるよう推奨されている。

4. 不活化工程の管理

増殖後分離精製され、精製度が確認された感染性ウイルスは、ホルムアルデヒドによって感染性をなくす³⁾。この工程が不活化である。不活化条件については、ウイルスタイプ、ウイルスの株、精製度によって異なるので、最適化し、定められた濃度のホルマリン存在下、タイムコースに従ってサンプリングを繰り返し、ウイルスの感染力価の低下(不活化)をモニターする。これによって算出される不活化直線の傾きが不活化速度である。この値を厳格に管理することで、不活化工程の管理を行う。不活化処理が終了した不活化ウイルス液は、タンパク質濃度、D抗原量、比抗原量試験、ホルムアルデヒド含量試験、無菌試験を行うとともに、ウイルスの不活化を確認するための不活化確認試験を行う。不活化ポリオウイルスワクチン単価原薬において、D抗原量試験と不活化確認試験は、最も重要な品質管理試験といっても過言ではない。以下、それぞれについて、解説する。

(1) D抗原量試験

不活化されたポリオウイルスには、D抗原およびC抗原と呼ばれる2つのウイルス抗原が混在している。D抗原は完全ウイルス粒子である。D抗原に対する抗体は感染性ウイルスを中和する能力があり、防御抗体として機能する。C抗原は欠損粒子と呼ばれ、完全ウイルス粒子から中心の核酸RNAとウイルスタンパク質の一部が欠けた粒子であり、中空状粒子である。C抗原に対する抗体には感染性ウイルスを中和する能力はないか、あっても非常に低い。したがって、不活化ポリオウイルスをワクチンとして使用する場合には、D抗原が必要である。ポリオウイルスの感染に対する免疫は、1型、2型、3型の3つのウイルス型に特異的である。十分な中和抗体を誘導するために必要とするD抗原量は、1型、2型、3型ともにそれぞれ異なる上、強毒型ポリオウイルス株、セービン株の違いによっても異なる⁹⁾。

D抗原の測定は、通常D抗原に対する特異抗体を用いたELISAによって行う。この際、測定に用いる抗体は、測定対象のウイルスタイプ、株特異的な抗体を用いるの

がよい。検出に用いる抗体が異なると、容易にD抗原量の値に差が生じるので注意が必要である。また、D抗原の測定に用いる標準物質は、強毒型ポリオウイルスはWHOの標準品が用意されている。しかし、セービン株に対する標準品は存在しない。わが国では、平成15年から17年にかけて行われた厚生労働科学研究費補助金による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における“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)¹⁰⁾によって、国内参照品の開発研究が行われた。その後、国立感染症研究所とワクチンメーカーによって継続されたワーキンググループの共同研究により、開発研究が進められ、平成22年に制定された。本国内参照品は、後述する現在承認申請されている国産の4種混合ワクチンDPT-sIPVのポリオウイルスワクチンの力価測定(ラットを用いた免疫原性試験)にも使用可能である。

(2) 不活化確認試験

ホルマリンによる不活化の速度は、不活化に供するポリオウイルス液の純度(精製工程、比抗原量試験によって担保される)、ポリオウイルスのタイプ(1型、2型、3型の違い)、ポリオウイルスの株によって異なる。もちろん、不活化条件はワクチンメーカーによって開発され、十分に検証された方法に基づいて実施され、さらに工程管理試験で品質を担保されている。不活化確認試験は、不活化処理の終了したウイルス液に感染性ウイルスの残存がないことを担保するための試験である。本試験法は、WHO TRS No.926, 2004 Annex 2またはWHO TRS No.910, 2002 Annex 2に記載された方法に基づいて行う必要がある。少なくとも不活化した単価バルクの1500 human dose以上を2サンプル用いて、サル初代培養腎細胞と同等以上のポリオウイルス感受性を持つ細胞(サンプル1 mL当たり3 cm²以上の細胞を用いる)に接種し、3週間細胞を観察する。この際、細胞に変性が認められてはならない。その後、サブカルチャーを行い少なくともさらに2週間の観察の間、細胞に変性が認められてはならないと記載されている。

このように厳格な不活化確認試験は、1955年に発生したカッター事件の教訓に鑑み、規定された。カッター事件とは、カッター社で製造した不活化ポリオワクチンに、製造過程における不十分なホルマリン処理により強毒株ポリオウイルスが残存していたことによる不活化ポリオワクチン接種による麻痺事故である。他社による不活化

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の品質管理

ポリオワクチンでは問題が認められず、カッター社ワクチンだけに問題があった原因として、事故後の調査等により以下の点が指摘された。①技術的問題点(不活化前に使用するろ過フィルターの品質(メーカー、ロット)、不十分な安全性試験、等)、②標準的品質管理プロトコール(SOP)のメーカーによる簡略化、③メーカーにおける品質検査体制に対する国の管理基準(権限・法的枠組)があいまいであったこと等である。不活化ポリオウイルスワクチンにおいて、このような麻痺事故を未然に防ぐ上で、不活化確認試験は、重要な工程管理試験であるとともに、安全性を担保するために極めて重要な試験である。しかし、全体の2%を試験しても、残り98%の不活化ワクチンバルク内の感染性ウイルス生残の可能性を完全に否定はできない。試験を2重、3重に行うことで、さらなる安全性を担保できる。

5. 3価混合不活化ポリオウイルス ワクチンにおけるD抗原量管理

前述のように十分な中和抗体を誘導するために必要とするD抗原量は、1型、2型、3型ともにそれぞれ異なる上、強毒型ポリオウイルス株、セービン株の違いによっても異なることが明らかにされている。WHO TRS No.910, 2002 Annex 2によれば、強毒型から作製された不活化ポリオウイルスワクチンにおける混合比は、1型：2型：3型がそれぞれ、40：8：32D抗原ユニット/doseになるように混合する。混合後、それぞれのタイプのD抗原量を再度測定して確認する。セービン由来不活化ポリオウイルスワクチンにおいても同様に管理するが、その混合比は、3：100：100D抗原ユニット/doseとすることが、前述の“混合ワクチンの品質確保に関する研究”で決定されている。

以上、3価混合ポリオウイルスワクチン原液について、解説した。4種混合ワクチンは、この原液を沈降精製百日せきジフテリア破傷風ワクチンと混合して、最終製剤とする。ワクチンは単に混合すれば混合した各種ワクチンをそれぞれ加算した有効性が得られるほど単純ではない。互いの成分による相互作用、含まれるアジュバントなどによる影響、副反応の問題などの調査研究を十分に行い、安定した有効性を発揮し、安全性の担保されたワ

クチンを継続して生産し供給するためには、4種混合ワクチン最終製品に適した品質管理手法が必要となる。以下に、“混合ワクチンの品質確保に関する研究”によって研究開発された品質管理手法について概説する。

6. DPT-IPV, DPT-sIPV 4種混合 ワクチンの品質管理

DPT-IPV, DPT-sIPV 4種混合ワクチンにおいてDPT成分については、ポリオ成分添加による相互作用の影響はほとんどなく、基本的にDPTの品質管理手法と同じ方法を導入することが可能であった。しかし、不活化ポリオウイルスワクチンは、強毒型由来IPV、セービン株由来sIPVの両者において、DPTに含まれるアルミニウムアジュバントの影響を受け、その免疫誘導能(力価)が上昇することが示された。また、D抗原量試験は、アルミニウムアジュバント混合後の最終製品において、抗原性を維持しつつアジュバントから遊離することが困難であることが明らかになった。ポリオウイルスワクチンの力価は、DPTに含まれるアジュバントによる影響を考慮に入れた品質管理手法が開発された。

7. ラット免疫原性試験による DPT-sIPVの力価試験

3価混合不活化ポリオウイルス、被検ワクチンを対数等間隔に段階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、21日後に採血して、得られた血清について各型のポリオウイルスに対する中和抗体価を測定する。被検ワクチンの力価は国内参照品各希釈段階における力価を近似最尤法を用いた平行線定量法により計算して求める。国内参照品としては、3価混合不活化ポリオウイルスを3：100：100のD抗原比で混合したものを調製し、プロフィシェンシー試験を実施し、国内参照品の単位を設定した。本方法に基づく被検ワクチンの力価の95%信頼区間は、試験的に製造したDPT-sIPVワクチンにおいて、相対力価1を挟んで推移すること、安定性試験においてもこの値を維持することが示され、本方法によってDPT-sIPV 4種混合ワクチンのポリオウイルス成分の免疫原性をもって、力価の評価が可能となった。本方法の詳細は、前述の研究報告書(平成18年、2006年4月)の生物基案として報告され、公開されている。また、最新の生物基は、現在厚生労働省

のホームページ上に生物学的製剤基準の一部を改正する件(案)の概要、平成24年6月15日版として公開され、パブリックコメントの募集が行われている。

まとめ

混合ワクチンは単独で使用されているワクチンをただ混合しただけでは完成しない。混合した場合、互いの免疫原性に与える相互作用、安全性試験に与える影響、副反応への影響を十分に考慮に入れ、製品を評価し、的確な品質管理手法を構築して、品質管理を行っていく必要がある。DPTとポリオウイルスワクチンを混合した4種混合ワクチンの導入が間近に迫っている。このワクチンの開発には長い歳月が費やされており、効果と安全性の評価が幾重にも行われたワクチンであることを忘れてはならない。近い将来、さらにHib、HBV、HAVなどの成分が混合され、5種、6種混合ワクチンの開発が行われると思われる。このような、新規混合ワクチンの品質を担保するための試験法の開発検討は、今後さらに重要になってくる。

参考文献

- 1) 一般社団法人 日本ワクチン産業協会：ワクチンの基礎 ワクチン類の製造から流通まで 2011
- 2) 清水博之、武田直和、宮村達男：日本の予防接種・海外の予防接種 定期接種対象疾患 ポリオワクチン、臨床と微生物、32、441-444、2005
- 3) Heymann DL., Sutter RW., Ayward RB.: A global call for new polio vaccines. *Nature*, 434, 699-700, 2005
- 4) Doi Y., Abe S., Yamamoto S, et al.: Progress with inactivated poliovirus vaccines derived from the Sabin strains, *DevBiol.*, 105, 163-269, 2001
- 5) Sabin AB., Ward RL.: Poliomyelitis in a laboratory worker exposed to the virus, *Science*, 94, 113-114, 1941
- 6) Neverov A and Chumakov K.: Massively parallel sequencing for monitoring genetic consistency and quality control of live viral vaccines.
- 7) World Health Organization Technical Report Series (TRS) No.926, 2004 Annex 2
- 8) World Health Organization Technical Report Series (TRS) No.910, 2002 Annex 2
- 9) 橋爪 社：国産IPVの特徴とポリオ根絶への役割、臨床とウイルス、30、326-343、2002
- 10) 宮村達男：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管理に関する研究 平成15年度～17年度 総合研究報告書 平成18年

医薬品業界のFA化促進にIWAKUROの各種自動機械

PTP自動包装集積ライン

PTP仕様

本体能力：6,000錠/分 (2シート取り300ショット)

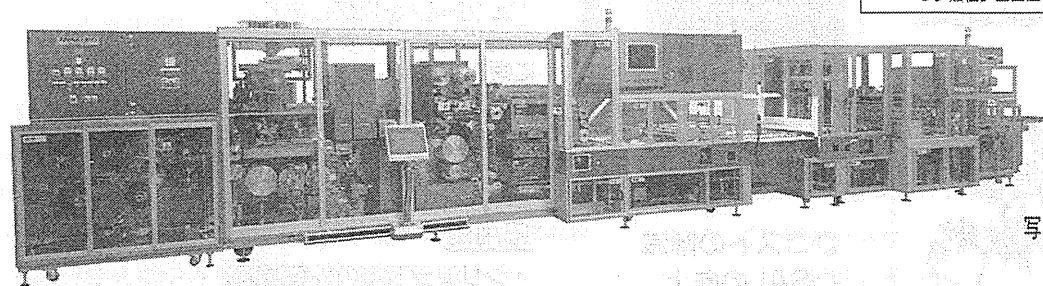
特長：●蓋フィルムマーク合わせ

●サーボ駆動システムで再現性・操作性向上

●異物混入防止対策

●工具レス化による型交換時間短縮

●多品種少量生産に最適



写真はNo.856P
6000錠/分
(300ショットタイプ)

各種自動包装機・製薬機械設計製作



株式会社

岩黒製作所

〒939-0418 富山県射水市布目沢480-2 TEL (0766) 53-1116 FAX (0766) 53-1727

DM資料請求カードNo.4

ポリオウイルスワクチンの品質管理

染谷 雄一, 清水 博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部

〔論文要旨〕

ポリオワクチン関連麻痺およびワクチン由来ポリオウイルス伝播によるポリオ流行のリスクを避けるため、ポリオ流行のリスクが低い多くの国々では、不活化ポリオウイルスワクチン (IPV) が定期予防接種に導入されている。我が国でも、最近、単独 IPV と 2 種類の百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチンの開発・導入が進められ、2012年9月に、ポリオ定期接種は、経口生ポリオワクチン (OPV) から IPV に切り替わった。弱毒生ワクチンである OPV と不活化ワクチンである IPV は、まったく性状の異なる生物学的製剤であり、品質管理の方法も大きく異なる。我が国では、不活化抗原として強毒株ポリオウイルスを用いる IPV (conventional IPV ; cIPV) 単独ワクチンと、弱毒化 Sabin 株を用いる IPV (sIPV) 含有 4 種混合ワクチンのように、異なる IPV 抗原を含有する複数のワクチン製剤が導入されて、cIPV と sIPV で国家検定を含めた品質管理の手法が異なる。現在導入されている、また、今後導入される予定の、複数の IPV 含有ワクチンの品質管理の基本的な考え方について整理する。

1. はじめに

2012年8月まで、我が国では、ポリオの定期接種ワクチンとして、弱毒生ポリオウイルスワクチン (Oral poliovirus vaccine ; OPV) が使用されていた。2012年4月27日、単独不活化ポリオウイルスワクチン (Inactivated Poliovirus Vaccine ; IPV) が薬事承認され、それ以降2012年9月からの定期予防接種への導入に向けて、国家検定が進められた¹⁾。単独 IPV 導入後、定期接種用ポリオワクチンは OPV から IPV に置き換わった。11月には、2012年7月27日に薬事承認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 (セービン株由来) 混合ワクチン (DPT-IPV ; 4 種混合ワクチン) が導入され、現行 DPT と同様の接種スケジュールで、4 種混合ワクチンによる定期接種が行われている¹⁾。

弱毒生ワクチンである OPV と不活化ワクチ

ンである IPV は、同じポリオワクチンといえども、まったく性状の異なる生物学的製剤であり、品質管理の方法も大きく異なる。また、我が国で導入が予定された IPV 含有ワクチンは、不活化ポリオウイルス抗原としてポリオウイルス強毒株を用いる conventional IPV (cIPV) と弱毒化 Sabin 株を用いる Sabin-IPV (sIPV) が²⁻⁴⁾あり、品質管理の手法も両者で異なる。本稿では、OPV の品質管理については最小限に留め、最近導入された cIPV および sIPV の品質管理の基本的な考え方について整理する。

2. 日本における IPV 導入の現状

我が国では、1980年代から、弱毒化 Sabin 株をホルマリン不活化したポリオウイルス抗原を含む IPV (sIPV) の開発が試みられてきたが、sIPV の国内開発は必ずしも順調に進まず、海外で広く実用化されている cIPV 含有ワクチン

Quality control of poliovirus vaccines

Yuichi SOMEYA, Hiroyuki SHIMIZU, Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

別刷請求先: 清水博之 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1 国立感染症研究所 ウイルス第2部 第2室

Tel : 042-561-0771 Fax : 042-561-4729 E-mail : hshimizu@nih.go.jp

の国内開発は行われてこなかった⁵⁻⁸⁾。(財)日本ポリオ研究所(ポリオ研)により開発が進められていた単独 sIPV は、製造承認申請が提出されたものの審査に合格せず、2005年に薬事承認申請が取り下げられた⁹⁾。その後、DPT と sIPV の混合ワクチン(4種混合ワクチン)としての開発が進められ、現在にいたっている。そのうち、(財)阪大微生物病研究会(阪大微研)および(財)化学及血清療法研究所(化血研)の sIPV 含有4種混合ワクチンについては、2012年7月27日に薬事承認申請が認められた(表1)。一方、DPT-IPV 接種による、現行 DPT 既接種者への DPT 過剰免疫を避けるため、単独 cIPV の国内導入が進められ、2012年4月27日に、サノフィパスツール社の「イモバックスポリオTM皮下注」が薬事承認された(図1,表1)。以降、イモバックスポリオ皮下注の国家検定が進められ、2012年9月1日に導入された。このように、我が国では、複数の異なる IPV 製剤が異なるタイミングで導入されたため、IPV 製剤の供給量や移行期の接種スケジュールについての慎重な配慮が必要とされる。IPV 導入期・導入後の接種スケジュールや複数の IPV 含有ワクチン

の互換性等については、厚生労働省あるいは「不活化ポリオウイルスワクチンの円滑な導入に関する検討会」等の資料を参考にされたい^{1,9)}。

3. OPV の品質管理

日本では、1961年7月、ソ連およびカナダからの緊急輸入した OPV の一斉投与によりポリオ流行は終息に向かい、1964年から国産 OPV による定期予防接種が開始された。現在、ポリオ流行のリスクが低い地域の多くでは、OPV によるワクチン関連麻痺やワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行のリスクにより、すでに IPV が導入されているが^{10,11)}、OPV は依然、流行国およびハイリスク地域におけるポリオコントロールのための不可欠なツールである¹²⁾。OPV の品質管理試験として、安全性および有効性の確保の観点から、表2に示した試験が国家検定として実施されている。OPV は、3種類の血清型の弱毒化ポリオウイルスを、それぞれ、培養細胞で大量培養することにより生産するので、複数の異なる手法による弱毒性(遺伝的安定性)の確認試験が、弱毒化ワクチンの品質管理試験として重要な位置を占めている¹³⁾

表1 日本で開発中の不活化ポリオウイルスワクチン

ワクチン		開発メーカー	発状況
種類	成分		
4種混合ワクチン (沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ(セービン株由来)混合ワクチン) 「テトラビック皮下注シリンジ」	DPT-sIPV	(財)阪大微生物病研究会	薬事承認申請 (2011年12月27日申請) 薬事承認 (2012年7月27日)
4種混合ワクチン (沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ(セービン株由来)混合ワクチン) 「クアトロバックス皮下注シリンジ」	DPT-sIPV	(財)化学及血清療法研究所	薬事承認申請 (2012年1月27日申請) 薬事承認 (2012年7月27日)
4種混合ワクチン	DPT-cIPV	(株)北里第一三共ワクチン	第三相臨床試験 ⁴⁾
4種混合ワクチン	DPT-sIPV	武田薬品工業(株)	第二相臨床試験 ⁴⁾
IPV 単独 「イモバックスポリオ皮下注」	cIPV	(株)サノフィパスツール	薬事承認申請 (2012年2月23日申請) 薬事承認 (2012年4月27日)

	薬事承認等	省令改正等	周知・体制構築	供給の確保・検定
4月19日	単独のポリオワクチンについて、薬食審・医薬品第2部会で承認了承			
4月23日	第3回不活化ポリオワクチンの円滑な導入に関する検討会			
4月末	単独の不活化ポリオワクチンが承認予定			
5月			市町村に対する周知	
6月		予防接種実施規則改正等の手続き (パブリックコメントの実施等)	市町村での接種体制の構築 (医療機関との委託契約等) 概ね3か月	
7月				
8月				省令改正の公布
9月	9月1日: 単独の不活化ポリオワクチンの定期接種への導入			

図1 単独不活化ポリオワクチン導入に向けた大まかなスケジュール

第三回 不活化ポリオワクチンの円滑な導入に関する検討会，資料2（厚生労働省健康局結核感染症課より引用（<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002935e-att/2r9852000002937t.pdf>）

表2 経口生ポリオワクチンの品質管理試験

品質管理試験	試験対象	試験方法・目的等
神経毒力試験	中間段階品（単価バルク）	カニクイザル脊髄内に検体あるいは参照ウイルスを接種し，臨床症状と病理学的所見により検体の神経毒力を評価する
マーカー試験 rct/40マーカー	中間段階品（単価バルク）	培養細胞における温度感受性試験（弱毒株の遺伝的安定性の確認）
マーカー試験 d マーカー	中間段階品（単価バルク）	培養細胞における炭酸水素ナトリウム濃度感受性試験（弱毒株の遺伝的安定性の確認）
ウイルス同定試験	中間段階品（単価バルク）	ポリオウイルスの同定およびポリオウイルス血清型の同定
外来性ウイルス否定試験	中間段階品（単価バルク）	動物接種試験（乳のみマウス，成熟マウス，ウサギ，モルモット） 培養細胞接種試験（ヒト，ウサギ腎，ミドリザル腎）
ウイルス含量試験	中間段階品（単価バルク） 小分製品（最終バルク）	培養細胞によるウイルス力価の測定 （小分け製品については各血清型の力価を測定）

国家検定として実施されている経口生ポリオワクチン品質管理試験の一部

4. IPVの品質管理 —カッター事件の教訓—

現在、諸外国で実用化されているIPV製剤は、3種類の血清型のポリオウイルス強毒株を、それぞれホルマリン不活化したcIPV抗原を含有する。2012年9月から定期接種に導入されたイモボックスポリオ皮下注は、海外で生産されたcIPV抗原を含有する。一方、11月に導入された阪大微研および化血研の4種混合ワクチンは、不活化ポリオウイルス抗原として、ポリオ研で製造されたsIPV抗原を含有する。IPVの製造工程では、各血清型の感染性ポリオウイルス粒子を、出来るだけ抗原性・免疫原性を保ったまま、ホルマリンにより不活化するとともに、感染性ウイルス粒子が完全に不活化したことを検証する過程が、きわめて重要である。

1955年、米国でIPV(いわゆるソークワクチン)が承認され、いくつかのワクチンメーカーにより製造されたIPVの大規模接種が始まってまもなく、カッター事件(The Cutter Incident)が発生した。IPV接種後に発症したポリオ疑い症例の報告から48時間以内にカッター社製IPVの回収措置がとられたものの、すでに38万人がカッター社製IPVを接種済みで、問題があったとされる2ロットにより、51名のIPV接種者が麻痺を発症し5名が死亡する大惨事となった¹⁴⁾。カッター事件は、製造工程における不十分なホルマリン処理により、強毒株ポリオウイルスが、IPV製剤中に残存していたことによる^{14,15)}。そのため、IPV接種者だけでなく、接種者から家族や地域に強毒株ポリオウイルス(1型 Mahoney 株)が伝播したことによるポリオ患者も多く、カッター社製IPVに関連したポリオ症例は200名以上と報告されている^{15,16)}。表3に、“The Cutter Incidence”の中でPaul Offitが指摘した、カッター社で製造されたIPVの安全性と品質管理に関する問題点について整理した¹⁴⁾。カッター事件は、IPVのみならず、生物学的製剤一般における安全性・品質管理体制確立の重要性を示す事例として、いまだに多くの教訓を含んでいる¹⁶⁾。

現在、世界で広く用いられているcIPVは、初代ソークワクチン同様、強毒株ポリオウイルスをホルマリン不活化することにより製造され

ているが、ウイルス培養方法等の改良により有効性が向上し(いわゆる高力価IPV(enhanced-potency IPV)製造技術の確立)¹⁷⁾、また、メーカーによる自家試験あるいは国家検定等による品質管理システムにより、高いレベルでの安全性および有効性が証明されている。カッター事件で問題となった感染性ウイルス不活化工程については、ウイルス生残率曲線をもとにしたinactivation kineticsの解析が重要とされており、そのためには、信頼性の高い感染性ウイルス力価測定法が必要とされる¹⁴⁾。

培養細胞で増殖した、それぞれの血清型のポリオウイルス(1型~3型)を精製・濃縮し、ホルマリンで不活化する製造工程そのものは、sIPVとcIPVに大きな違いはないとされており^{8,18)}、cIPVの品質管理で確立された手法と、ほぼ同様の方法により、感染性ウイルス粒子の不活化を確認する。ポリオ研におけるsIPVの製造工程では、ホルマリン不活化開始後、9日目と12日目の試料を用いて、ウイルス生残否定試験が実施される⁸⁾。

5. cIPV(ソークワクチン)の品質管理

ホルマリン不活化後のポリオウイルス免疫原性に基づく力価測定試験は、IPVの有効性を保証するための品質管理試験として不可欠である。発症予防ワクチンとしてポリオワクチンの有効性に直接関与するのは、ワクチン接種による血中中和抗体の誘導にあると考えられており、そのため、ヒトにおける中和抗体誘導との相関性の高いIPV力価測定試験が必要とされる。現行のIPV力価測定試験は、動物にIPV抗原を接種したのち誘導される血中中和抗体価を測定する*in vivo*免疫原性試験と、IPV抗原特異的抗体を用いたELISA等の手法によりIPV抗原量を測定する*in vitro*抗原量測定試験に大別される¹⁹⁾。

ソークワクチン開発以来の技術的蓄積およびヒトにおける臨床成績による有効性の検証をもとに、cIPVの力価試験測定法として、ラット等を用いた免疫原性試験、あるいは、中和抗体誘導能に相関するとされている完全ウイルス粒子抗原量(D antigen unit; DU)測定試験が用いられてきた^{15,17,19)}。培養細胞でのウイルス培

表3 カッター事件における IPV の製造・品質管理上の問題点

問題点	問題点のおもな内容	問題点の評価
ウイルス株の選択	病原性の高い1型 Mahoney 株を不活化抗原として使用	不活化抗原としての免疫原性の高さから Jonas Salk が Mahoney 株を選択。米国の他のメーカーも Mahoney 株を使用しており、カッター社のみ責任とはいえない。
ウイルス液の濾過法	不活化処理前のウイルス液濾過工程で Seitz フィルターではなくグラスフィルターを使用	効率的な不活化処理のためには培養夾雑物・ウイルス凝集塊の除去が必要で、濾過工程はきわめて重要。グラスフィルターは Seitz フィルターと比較すると、夾雑物の濾過が不十分なことがありフィルターのロットにより品質が不均一（当時）。1955年当時、この問題点は十分認識されていなかった。
安全性試験	ウイルス生残否定試験（サルおよび培養細胞）	カッター社のウイルス生残否定試験は感染性ウイルス検出感度が低かった。サル腎細胞を用いた生残ウイルス否定試験における検体接種量がカッター社は他社と比較して少なかった。カッター社のサル接種試験はステロイド未投与サルへの脳内・筋注接種で、神経毒力試験の感度が低かった。（その後より感度の高い脊髄内接種法が導入された）
濾過後のウイルス液の処理時間	濾過後のウイルス液を不活化処理まで、数週間から数ヶ月冷蔵庫で放置	濾過後のウイルス液を不活化処理まで長期間放置していたのはカッター社のみ。その後、政府により濾過後72時間以内に不活化処理を開始するよう要綱が改訂された。
不活化曲線の確認・検証	ホルマリン不活化工程における不活化曲線解析（inactivation kinetics）を実施せず	Jonas Salk によるガイドラインと SOP には、ホルマリン不活化工程における感染性ウイルス量測定に基づく不活化曲線（inactivation kinetics）の作成・解析の必要性が明記されていたが、カッター社は遵守せず。
問題点の外部専門家との共有	技術的問題点について規制当局や外部専門家へ照会せず	技術的問題点に対する認識にもかかわらず、カッター社から規制当局や外部専門家への連絡・問い合わせは、カッター事件発生まで、ほとんどなされなかった。
政府による問題点の把握	政府はカッター社における技術的問題の存在を十分認識していなかった	臨床試験に使用する IPV については、安定的な品質管理試験成績をメーカーに要求していたが、上市された IPV については要求しなかった。そのため、政府は、カッター社における技術的問題について把握できなかった。

文献14の Chapter 6 “What Went Wrong at Cutter Laboratories” における論点を筆者らが整理した。

養工程あるいはウイルス粒子の加熱処理等の過程で生じる感染性を有しない不完全ウイルス粒子（C抗原）の抗原性はD抗原とは異なり、効果的に中和抗体を誘導しないとされているため、C抗原を検出せず、特異的にD抗原のみを検出する力価測定法が必要とされる¹⁵⁾。cIPV製造に関わる国際的ワクチンメーカーの多くが準拠する European Pharmacopoeia（欧州薬局方）では、通常出検されるcIPVの力価測定試験として、D抗原量測定試験（ELISA法）によりcIPV抗原量を測定することが定められている¹⁷⁾。

cIPV含有ワクチン製剤中に含まれるcIPV抗原量はD抗原量により規定されているため、D抗原量測定はcIPVの品質管理試験として重要であり、現行cIPV製剤は、1ドーズあたり、1型40DU、2型8DU、3型32DUを含有する^{15,17)}。ELISA法によるD抗原量測定は、アッセイに使用する型特異的抗体（モノクローナルあるいはポリクローナル）の種類やデータ解析法に依存するため、WHOは、国際参照不活化cIPV株を提供することにより、異なる施設間におけるD抗原ELISA法の精度管理を実施している²⁰⁾。

6. sIPV の品質管理

日本で開発されている sIPV の D 抗原量については、厚生労働科学研究事業「混合ワクチンの品質管理に関する研究班」(平成15~17年度)により、0.5mL 中、1 型3DU, 2 型100DU, 3 型100DU を含む sIPV 国内参照品が採用され²¹⁾、参照品を基準として設定された sIPV 抗原を含む DPT-sIPV について、第Ⅱ相/第Ⅲ相臨床試験が実施された⁴⁾。阪大微研と化血研により開発された 4 種混合ワクチンは、7 月に薬事承認され、「sIPV の D 抗原量が上記の 3 : 100 : 100D units/dose の 1/2 量を含む DPT/sIPV の注射 (約 1 月間隔で 3 回投与) によっても十分有効な中和抗体価 (発症防御抗体価) を誘導できる⁸⁾」ことから、1 ドーズ (液剤 0.5mL) 中に、1 型 1.5DU, 2 型 50DU, 3 型 50DU を含む。ヒトにおける有効性 (血中中和抗体誘導効果) と D 抗原量の関連性については、DPT-sIPV に含まれる他の不活化抗原やアジュバントの効果も考慮する必要があるため、各メーカーの混合ワクチンの臨床試験成績を踏まえた抗原量の評価が必要となる。また、ELISA 法により最終品の sIPV 抗原量を測定する際には、他の不活化抗原やアジュバントの影響も考慮する必要がある。いっぽう、厚生労働科学研究事業「混合ワクチンの品質管理に関する研究班」により、sIPV の *in vivo* 免疫原性試験として、ラット免疫原性試験の標準化が進められてきた²¹⁾。

sIPV 含有ワクチンは日本で初めて実用化されたが、世界的には、日本以外では、中国で Chinese Academy of Medical Sciences による sIPV の臨床開発が進行中であり²²⁾、オランダ National Institute for Public Health and the Environment は、WHO を中心とした国際協力体制を基盤にして、途上国への sIPV 開発・導入のための技術協力および sIPV 品質管理の国際的標準化を進めている^{18,23-25)}。中国で開発中の sIPV については、最近、OPV あるいは cIPV 接種群を対照とした第Ⅱ相試験の結果が報告された²²⁾。生後、2, 3, 4 ヶ月の 3 回接種により、sIPV は高い中和抗体誘導効果を示し、容量設定試験の結果、対照群と同程度の抗体誘導を示す D 抗原量として、1 型 15DU, 2 型 32DU, 3 型 45DU が適当とさ

れた。しかし、ELISA 法による sIPV の D 抗原量測定法は国際的に標準化されておらず、使用する抗体や測定方法は施設により、まちまちであるため、日本および中国で開発されている sIPV の D 抗原量を、そのまま比較することは出来ない^{15,24)}。

同様に、sIPV 抗原量測定に用いられている D 抗原 ELISA は、cIPV 抗原 ELISA 法と使用する抗体等が異なるため、cIPV 製剤中の D 抗原量 (1 ドーズあたり、1 型 40DU, 2 型 8DU, 3 型 32DU) と sIPV の D 抗原量を、そのまま比較することは出来ない。これまでの一連の研究により、cIPV と sIPV との抗原性および免疫原性の違いが明らかにされており、また、ホルマリン不活化過程で認められる一部抗原決定基の抗原性の変化が、cIPV と sIPV では異なることが知られている²⁶⁻²⁹⁾。前述の理由により、D 抗原量による定量的な比較は出来ないが、sIPV の免疫原性は、1 型では cIPV より優れており、2 型では cIPV よりも低いとされてきた³⁰⁾。そのため、現在導入が予定されている sIPV 含有ワクチン製剤では、1 型では cIPV と比較して少ない抗原量、2 型では cIPV より多い抗原量を設定することにより、十分な中和抗体誘導効果が得られることが、中国 (1 ドーズあたり、1 型 15DU, 2 型 32DU, 3 型 45DU) あるいは日本 (1 ドーズあたり 1 型 1.5DU, 2 型 50DU, 3 型 50DU) における sIPV の臨床研究により示唆されている^{8,22,31)}。sIPV 抗原量測定法の国際的な標準化は、出来るだけ低い抗原量のワクチン接種により十分な有効性を示す抗原量を比較・設定するうえで重要であり、国内外の異なる施設で製造される sIPV の品質管理の観点からも必要性が高い^{18,24)}。

7. おわりに

2012年9月1日からのポリオ定期接種への IPV の導入にむけて、複数の IPV 含有ワクチン導入のタイミングの検討や供給量の確保、また、接種スケジュールの調整が急ピッチで進められてきた。阪大微研と化血研の DPT-sIPV については、2012年7月20日の厚生労働省の薬事・食品衛生審議会医薬品第二部会において承認が了承され、7月27日に製造販売が承認され

た。世界で初めて国としての定期接種に導入された、あらたな不活化ポリオワクチンである sIPV の有効性、安全性、および、品質管理に関する科学的知見を集積し公表することは、日本のみならず、海外における sIPV 開発にとっても、今後、重要な意味を持つ。

謝 辞

本稿をまとめるにあたり、貴重なご意見をいただいた、国立感染症研究所ウイルス第二部、脇田隆字先生、片山和彦先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課：第3回 不活化ポリオワクチンの円滑な導入に関する検討会、資料2、不活化ポリオワクチンの導入に関する方針について（案）
(<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002935e.html>), 2012
- 2) 国立感染症研究所：ポリオワクチンに関するファクトシート
(<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000000bx23-att/2r9852000000bybl.pdf>), 2010
- 3) 清水博之：Sabin 株由来不活化ポリオワクチン開発の必要性和問題点。Bio Clinica 26：19-23, 2011
- 4) 清水博之：ポリオウイルスワクチン。ウイルス 62：57-66, 2012
- 5) 安部 忍、八巻厚司、土居 穰：弱毒ポリオウイルス Sabin 株による不活化ワクチン調整の試み。ウイルス 36：125-137, 1986
- 6) Doi Y, Abe S, Yamamoto H, Horie H, Ohyama H, Satoh K, Tano Y, Ota Y, Miyazawa M, Wakabayashi K, Hashizume S：Progress with inactivated poliovirus vaccines derived from the Sabin strains. Dev Biol (Basel) 105：163-169, 2001
- 7) Simizu B, Abe S, Yamamoto H, Tano Y, Ota Y, Miyazawa M, Horie H, Satoh K, Wakabayashi K：Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains. Biologicals 34：151-154, 2006
- 8) 山崎修道、安部 忍：日本における不活化ポリオワクチン (sIPV) 開発の経緯と現状。Bio Clinica 26：45-51, 2011
- 9) 厚生労働省：予防接種情報、ポリオワクチン (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/polio/>)
- 10) 厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会ワクチン評価に関する小委員会、ポリオワクチン作業チーム：ポリオワクチン作業チーム報告書 (<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000014wdd-att/2r98520000016rr8.pdf>), 2011
- 11) Nakano T：Japanese vaccinations and practices, with particular attention to polio and pertussis. Travel Med Infect Dis 9：169-175, 2011
- 12) 清水博之：世界ポリオ根絶の失われた10年とポリオ根絶計画のこれから。ウイルス 60：49-58, 2010
- 13) 有田峰生：ポリオワクチン、ワクチンハンドブック、国立予防衛生研究所学友会編、1994, pp120-129
- 14) Offit PA. In The Cutter Incident. Yale University Press. New Haven and London, 2005
- 15) Plotkin SA, Vidor E：Poliovirus Vaccine-inactivated. In Vaccines, Fifth Edition. Eds. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. Elsevier Inc. 2008, pp.605-629
- 16) Offit PA, Davis RL, Gust A：Vaccine safety. In Vaccines, Fifth Edition. Eds. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, MD, Elsevier Inc. 2008, pp.1629-1650
- 17) Duchêne M. Production：testing and perspectives of IPV and IPV combination vaccines：GSK biologicals' view. Biologicals 34：163-166, 2006
- 18) Bakker WA, Thomassen YE, Van't Oever AG, Westdijk J, van Oijen MG, Sundermann LC, Van't Veld P, Sleeman E, van Nimwegen FW, Hamidi A, Kersten GF, van den Heuvel N, Hendriks JT, van der Pol LA：Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. Vaccine 29：7188-7196, 2011
- 19) WHO：WHO Recommendations for the Production and Control of Poliomyelitis Vaccine (Inactivated), WHO TRS, n_910, 2002
- 20) Wood DJ, Heath AB, Kersten GF, Hazendonk T, Lantingá M Beuvery EC：A new WHO International Reference Reagent for use in potency

- assays of inactivated poliomyelitis vaccine. *Biologicals* 25 : 59-64, 1997
- 21) 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, 総合研究報
告書, 2005
- 22) Liao G, Li R, Li C, Sun M, Li Y, Chu J, Jiang S,
Li Q : Safety and immunogenicity of inactivated
poliovirus vaccine made from Sabin strains : a
phase II, randomized, positive-controlled trial.
J Infect Dis 205 : 237-243, 2012
- 23) Verdijk P, Rots NY, Bakker WA : Clinical
development of a novel inactivated poliomyelitis
vaccine based on attenuated Sabin poliovirus
strains. *Expert Rev Vaccines* 10 : 635-644, 2011
- 24) Westdijk J, Brugmans D, Martin J, van't Oever A,
Bakker WA, Levels L, Kersten G : Characterization
and standardization of Sabin based inactivated polio
vaccine : proposal for a new antigen unit for
inactivated polio vaccines. *Vaccine* 29 : 3390-3397,
2011
- 25) The Global Polio Eradication Initiative : Developing
affordable inactivated polio vaccine.
([http://www.polioeradication.org/Research/
AffordableIPV.aspx](http://www.polioeradication.org/Research/AffordableIPV.aspx)), 2012
- 26) Kersten G, Hazendonk T, Beuvery C : Antigenic
and immunogenic properties of inactivated polio
vaccine made from Sabin strains. *Vaccine* 17 :
2059-2066, 1999
- 27) Martin J, Crossland G, Wood DJ, Minor PD :
Characterization of formaldehyde-inactivated
poliovirus preparations made from live-attenuated
strains. *J Gen Virol* 84 : 1781-1788, 2003
- 28) Dragunsky EM, Ivanov AP, Wells VR, Ivshina
AV, Rezapkin GV, Abe S, Potapova SG, Enterline
JC, Hashizume S, Chumakov KM : Evaluation of
immunogenicity and protective properties of
inactivated poliovirus vaccines : a new surrogate
method for predicting vaccine efficacy. *J Infect Dis*
190 : 1404-1412, 2004
- 29) Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Simizu
B, Miyamura T : Antigenic characterization of a
formalin-inactivated poliovirus vaccine derived
from live-attenuated Sabin strains. *Vaccine* 25 :
7041-7046, 2007
- 30) Commissioned by the Bill & Melinda Gates
Foundation, Prepared by Oliver Wyman Inc. :
Global post-eradication IPV supply and demand
assessment : Integrated findings
([http://www.polioeradication.org/content/
general/March%202009%20OW%20IPV23%20
Effort%20Report.pdf](http://www.polioeradication.org/content/general/March%202009%20OW%20IPV23%20Effort%20Report.pdf)), 2009
- 31) 石川豊教, 奥野良信:混合ワクチン. *BIO Clinica*
26 : 73-77, 2011