

## IV ウイルス感染症

### RNA ウイルス感染症

# ムンプスウイルス感染症：流行性耳下腺炎 (おたふくかぜ)

Mumps virus infection: Epidemic parotitis (mumps)

Key words: ムンプスウイルス, 髄膜炎, ムンプスワクチン, 抗体, ウイルス分離

庵原俊昭

### はじめに

ムンプスウイルス感染の臨床像がムンプスである。流行性耳下腺炎, おたふくかぜとも呼ばれ, 小児の代表的な全身性ウイルス感染症である。ムンプスの臨床像を解説する。

### 1. 概念・定義

ムンプスは48時間以上持続する急性耳下腺腫脹が特徴である。ムンプス流行時期に認める急性耳下腺腫脹の多くはムンプスであり, ムンプス流行時期以外に認める急性耳下腺腫脹の多くはムンプス以外である<sup>1)</sup>。

### 2. 疫学

我が国のムンプス好発年齢は4-6歳である。3歳未満の顕性感染率は低いが, 4歳を超えると顕性感染率は90%であり, 全年齢の顕性感染率は70%である<sup>2,3)</sup>。ムンプスは春先から夏にかけて流行する。大きな流行は4年ごとに認められる。我が国で麻疹ムンプス風疹(measles-mumps-rubella: MMR)ワクチンが使用されていた時期は, 一時的にムンプス発症者数が減少したが, 中止後はMMRワクチン開始前と同じ流行パターンに戻っている。

ムンプスの潜伏期間は8-25日(通常16-18日)である。ムンプスの基本再生産数(1人の患者が免疫のない人に感染させる人数)は11-14, 流行を抑制するための集団免疫率は85-90%

である<sup>4)</sup>。ムンプスウイルスを含むワクチンを1回定期接種している国では患者数が90%減少し, 2回定期接種をしている国では患者数が99%減少している<sup>5)</sup>。しかし, Jeryl Lynn株を2回接種している国では, ムンプス流行を時々認めている<sup>6-8)</sup>。ムンプス流行を認めたときは3回目のMMRワクチン接種が推奨されている。

米国でムンプスにより学校や仕事を休む期間は, 唾液中のムンプスウイルス遺伝子検出結果から, '2008年から耳下腺腫脹後5日間に短縮された<sup>9)</sup>。我が国でも2012年からムンプスによる園や学校の出席停止期間は, 耳下腺腫脹後5日を経過するまでに変更されている。

### 3. 病因

パラミクソウイルス科ブラウイルス属に属するムンプスウイルス感染により発症する。ムンプスウイルスには12種類の遺伝子型(A型~L型)が存在する。Jeryl Lynn株は遺伝子型A, 日本のワクチン株4株(星野株, 鳥居株, 宮原株, Urabe株)はすべて遺伝子型B, 現在日本や欧米で流行しているのは遺伝子型Gである<sup>2)</sup>。遺伝子系統樹解析によると, 遺伝子型Aと遺伝子型Gは離れており, 遺伝子型Aで誘導された抗体は遺伝子型Gに対して効果が劣っている<sup>6)</sup>。

### 4. 病態

飛沫感染と接触感染で感染する。感染したムンプスウイルスは上気道で増殖した後リンパ流

## IV

### ウイルス感染症

Toshiaki Ihara: Department of Pediatrics, National Hospital Organization Mie Hospital 国立病院機構三重病院 小児科

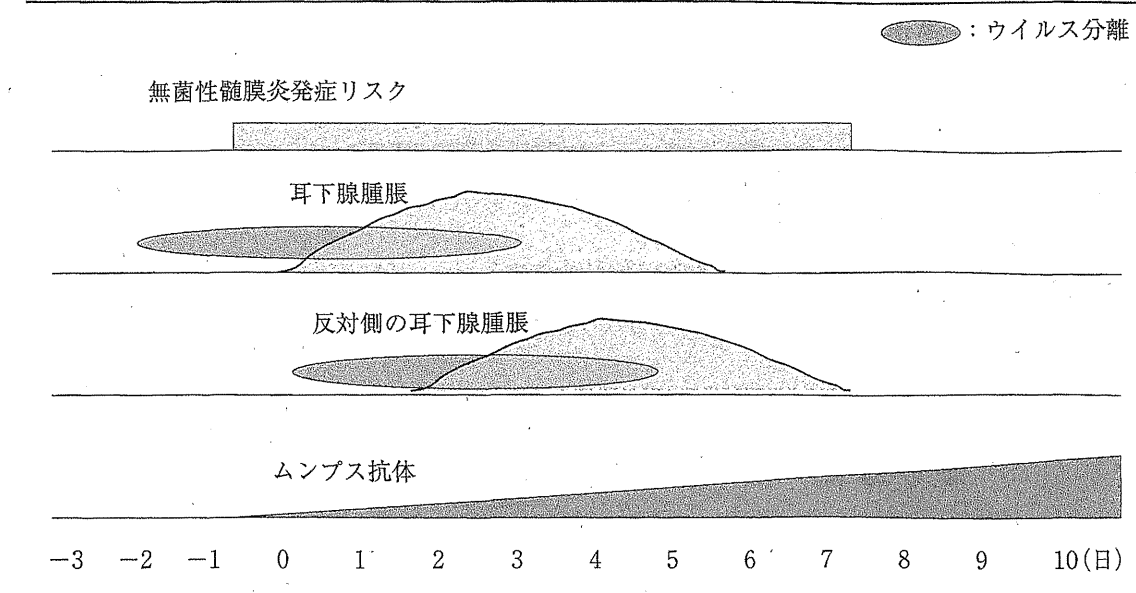


図1 ムンプスの臨床像と抗体価の上昇

発症前から唾液にムンプスウイルスを排泄している。反対側の耳下腺腫脹が7-10日遅れたときも唾液からムンプスウイルスは分離される。

から血流に入り、ウイルス血症により全身の親和性臓器に運ばれ、そこで増殖して症状や副反応が出現する。

ムンプス髄膜炎は、耳下腺腫脹前、耳下腺腫脹時、耳下腺腫脹後のいずれの時期でも発症する(図1)。ムンプス流行時、耳下腺腫脹を伴わずにムンプスウイルスによる髄膜炎を時に認めることがある。ムンプス発症者の50%に髄液細胞数増多を認めるが、髄膜炎を発症するのは3-10%である。年齢が高くなるほど髄膜炎の合併頻度が増加する<sup>2)</sup>。

ムンプスの予後が悪い合併症として脳炎と難聴がある。脳炎の頻度は0.02-0.3%である。我が国の難聴の頻度は400-1,000人に1人である<sup>10,11)</sup>。年長児では難聴出現時にめまいを合併する。ムンプス急性期に難聴に気づいた場合回復する例もあるが、回復期に難聴に気づいたときは、回復は困難である。蝸牛へのムンプスウイルス感染が関与している。

思春期以降の男子では睾丸炎を25%に発症する<sup>9)</sup>。両側の睾丸炎は10%である。睾丸炎を発症するとその後の精子数は減少するが、不妊になるのは極めてまれである。ムンプス流行時には耳下腺腫脹を伴わずに睾丸炎を発症するこ

とがある。思春期以降の女性では乳腺炎を15-30%、卵巣炎を5%に発症する。いずれも予後の良い合併症である。妊婦がムンプスに罹患すると、第1三半期では27%が自然流産するが、第2三半期以降では特別な異常は認められない。ムンプスウイルスが関与する胎児奇形も報告されていない。その他のムンプスウイルスの合併症として、膵炎、甲状腺炎、腎腫大、心筋炎などがある。

唾液腺腫脹は唾液腺でのウイルス増殖と、リンパ球の唾液腺への浸潤により発症する。ムンプス不顕性感染者でも唾液からムンプスウイルスは分離される。ムンプスウイルスは、耳下腺腫脹が始まる3日前から耳下腺腫脹が退縮し始める腫脹5日後頃まで唾液から排泄される(図1)<sup>12)</sup>。多くのムンプス例では、片側の耳下腺腫脹開始後24-48時間以内に反対側の耳下腺が腫脹するが、時に片側の耳下腺腫脹の消退後(片側の耳下腺腫脹7-10日後)に反対側の耳下腺が腫脹することがある。反対側の耳下腺腫脹時にも唾液からウイルスは分離される<sup>12)</sup>。遅れて反対側の耳下腺が腫脹した場合は、反対側の腫脹が退縮し始めるまで登園登校の停止が必要である。なお、唾液腺は血中IgG抗体が作用し

表1 急性耳下腺腫脹例におけるムンプス抗体の特徴と診断(文献<sup>1)</sup>より改変)

既往歴	ワクチン歴	IgM 抗体	IgG 抗体	診断
なし	なし	+~++	+	ムンプス初感染*
なし	なし	-~+	+++ <sup>†</sup>	ムンプス再感染 <sup>‡</sup>
なし	なし	-	-~+ <sup>†</sup>	ムンプス以外が原因
なし	あり	+~++	+	PVF*
なし	あり	-~+	+++	SVF <sup>‡</sup>
なし	あり	-	+	ムンプス以外が原因
あり	なし	-	+	ムンプス以外が原因
あり	なし	-~+	+++	ムンプス再感染 <sup>‡</sup>

PVF: 一次性ワクチン不全(primary vaccine failure), SVF: 二次性ワクチン不全(secondary vaccine failure).

\*急性期 IgM 抗体 $\geq$ 1.2 抗体指数, 急性期 IgG 抗体 $<$ 20.0 EIA 価.

<sup>†</sup>ムンプスの顕性感染率は70%, 不顕性感染例がある.

<sup>‡</sup>急性期 IgM 抗体 $<$ 1.2 抗体指数, 急性期 IgG 抗体 $\geq$ 20.0 EIA 価.

にくい臓器であり, 血中 IgG 抗体が存在していても唾液腺でのムンプスウイルス増殖は抑制されない. 唾液中の IgA 抗体が唾液腺のムンプスウイルス増殖抑制に関与している.

### 5. 診断と鑑別診断

急性耳下腺腫脹をきたす疾患として, ムンプス以外にも, 化膿性耳下腺炎, 反復性耳下腺炎, 唾石などがある. 臨床診断の基準は, ムンプス流行時の48時間以上持続する急性耳下腺腫脹である. ムンプスをウイルス学的に確定診断する方法として, ①唾液からのウイルス分離, ②唾液からのウイルス遺伝子の検出, ③IgM 抗体の検出, ④血清抗体の有意上昇, がある<sup>1)</sup>. ムンプス IgM 抗体および血清抗体は, 酵素免疫法(enzyme immunoassay: EIA)で測定する. 方法①および②はウイルス感染症診断の王道であるが, 保険適用されていないため臨床現場では血清抗体検査が用いられている. ワクチン後のムンプス罹患例でも唾液からウイルスは分離され, ウイルス遺伝子が検出される.

ムンプス既往歴, ムンプスワクチン歴による血清抗体のパターンと診断を表1に示した<sup>1)</sup>. ムンプス既往者の再感染は時に経験する. 二次性ワクチン不全(secondary vaccine failure: SVF)やムンプス再感染の場合は, 早期からIgG 抗体の二次免疫応答が始まっているので, IgM 抗体検出の有無にかかわらずIgG 抗体が20 EIA

価以上の高値を示している. SVF 例やムンプス再感染例では抗体価の有意上昇(EIA-IgG 抗体では2倍以上)を認めないことがある. なお, ワクチン歴がないムンプス発症者の発症日のIgM 抗体陽性率は70%程度であり, 臨床経過からムンプスが疑われる場合は, 第2病日以降に再検査する必要がある<sup>13)</sup>.

ムンプス髄膜炎や脳炎の診断は, 髄液からのウイルス分離またはウイルス遺伝子の検出である. 髄膜炎発症早期ほどウイルス分離率は高率であり, 髄液細胞数が増加するとウイルスは分離されにくくなる<sup>2)</sup>.

ムンプスに対する免疫を確認するためには, 感度が高いEIA法で測定する. 成人の抗体陽性率( $\geq$ 4.0 EIA 価)は85-90%である. ムンプスの発症予防抗体価は未確定であるが, 我が国ではEIA-IgG 抗体価が4 EIA 価未満のときワクチン接種を勧めている.

### 6. 治療

ムンプス, ムンプス髄膜炎, ムンプス難聴, 睾丸炎に対しては対症的に治療する.

### 7. 予防

ムンプス予防にはムンプスワクチンを接種する. ムンプスワクチン後の耳下腺腫脹出現頻度は1歳児が一番低く, 年齢が高くなるにつれて増加する<sup>2)</sup>. ワクチンを安全に接種するために

は1歳での接種が勧められる。

多くの先進国ではムンプスウイルスを含むワクチンの2回接種が行われている。ムンプスワクチン初回接種の時期は1歳であり、2回目の接種時期は、ドイツでは初回接種4-12カ月後、米国では4-6歳である。日本小児科学会は1歳と小学校就学1年前の2回の接種を推奨している。

ムンプスワクチンの副反応として無菌性髄膜炎がある。Jeryl Lynn 株の合併率は1/1,000,000と極めて低率である。一方、我が国のワクチン

株を含む世界の株の頻度は1/2,000-20,000であり、自然感染時の1/100-1,000である<sup>14)</sup>。ムンプスワクチン後の難聴、脳炎、睾丸炎は極めてまれである。

### おわりに

ムンプスはワクチン予防可能疾患であり、先進国や中興国では定期接種である。我が国で2回の定期接種をしたとしても医療経済効果が認められており<sup>15)</sup>、早期に定期接種になることが期待される。

### ■ 文 献

- 1) 庵原俊昭：ワクチンで予防可能な疾患の病原診断とその読み方3：ムンプス。小児科 50: 15-21, 2009.
- 2) 庵原俊昭：ムンプスワクチン：現状と今後。臨床とウイルス 38: 386-392, 2010.
- 3) 庵原俊昭：ムンプスとムンプスワクチン。日本小児科医会会報 41: 95-98, 2011.
- 4) Nokes DJ, Anderson RM: The use of mathematical models in the epidemiological study of infectious diseases and in the design of mass immunization programmes. *Epidem Inf* 101: 1-20, 1988.
- 5) Galazka AM, et al: Mumps and mumps vaccine: a global review. *Bull World Health Organ* 77: 3-14, 1999.
- 6) Dayton GH, Rubin S: Mumps outbreak in vaccinated populations: Are available mumps vaccines effective enough to prevent outbreak? *Clin Infect Dis* 471: 1458-1467, 2008.
- 7) Greenland K, et al: Mumps outbreak among vaccinated university students associated with a large party, the Netherland 2010. *Vaccine* 30: 4676-4680, 2012.
- 8) Ogbuanu IU, et al: Impact of a third dose of measles-mumps-rubella vaccine on a mumps outbreak. *Pediatrics* 130: 1-8, 2012.
- 9) CDC: Updated recommendations for isolation of persons with mumps. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 57: 1103-1105, 2008.
- 10) 川島慶之ほか：流行性耳下腺炎(ムンプス)と難聴。小児内科 37: 63-66, 2005.
- 11) Hashimoto H, et al: An office-based prospective study of deafness in mumps. *Pediatr Infect Dis J* 28: 173-175, 2009.
- 12) 庵原俊昭ほか：唾液からのウイルス分離成績からみたムンプス患児の登校登園停止期間。日本小児科医会会報 36: 163-166, 2008.
- 13) 庵原俊昭ほか：改良されたムンプス酵素免疫法(EIA)-IgM抗体検査法の臨床評価。小児感染免疫 23: 123-129, 2011.
- 14) 庵原俊昭：ムンプス。臨床検査 54: 1339-1344, 2010.
- 15) 庵原俊昭, 落合 仁：ムンプスワクチン-合併症に対する予防効果。小児科診療 75: 655-659, 2012.

原 著

## MR ワクチンと水痘ワクチン同時接種の効果ならびに安全性

藤田保健衛生大学医学部小児科<sup>1)</sup>、豊川市民病院小児科<sup>2)</sup>、江南厚生病院こども医療センター小児科<sup>3)</sup>、  
国立病院機構三重病院小児科<sup>4)</sup>、医療法人落合小児科医院<sup>5)</sup>、医療法人竹内小児科医院<sup>6)</sup>、  
医療法人宏知会馬場小児科<sup>7)</sup>、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター<sup>8)</sup>

大橋 正博<sup>1)</sup> 河村 吉紀<sup>1)</sup> 浅野 喜造<sup>1)8)</sup> 松本 祐嗣<sup>2)</sup>  
加藤 伴親<sup>2)</sup> 西村 直子<sup>3)</sup> 尾崎 隆男<sup>3)</sup>  
菅 秀<sup>4)</sup> 庵原 俊昭<sup>4)</sup> 落合 仁<sup>5)</sup>  
竹内 宏一<sup>6)</sup> 馬場 宏一<sup>7)</sup> 吉川 哲史<sup>1)</sup>

### 要 旨

【目的】MR ワクチンと水痘ワクチンの同時接種の効果と安全性を評価する。

【対象と方法】MR ワクチンの第1期接種時に水痘ワクチンの同時接種に同意した82名と、年齢、性別をそろえた水痘ワクチン単独接種43名、およびMR ワクチン単独接種51名を対象とした。ワクチン接種前後の水痘、麻疹、風疹の各ウイルス抗体価を測定し、副反応を調査し、同時接種者には水痘抗原に対するELISPOTアッセイを実施した。さらに接種1年後に水痘罹患状況を調査し、未罹患者に水痘ワクチンを追加接種し評価した。また1歳時にMR ワクチンと、水痘ワクチンが接種された28名を対象に、MR ワクチンの第2期接種時に水痘ワクチンの同時接種を実施し、同様にウイルス抗体価を評価した。

【結果】水痘抗体陽転率、平均抗体価ともに単独接種群と同時接種群間で有意差はなかった。麻疹、風疹も同様に抗体陽転率、接種後平均抗体価に両群間で有意差はなかった。水痘特異的細胞性免疫能の評価では71.4%に細胞性免疫の獲得が示唆された。また、特に問題となる副反応はなかった。ワクチン接種後1年間の水痘罹患は11%であった。接種1年後に水痘ワクチンの追加接種を実施し、明確なブースター効果が確認された。MR ワクチン第2期接種時の水痘ワクチン追加接種においても接種前に比べ水痘抗体価の有意な上昇を示した。

【考察】MR ワクチンと水痘ワクチンの同時接種は、安全かつ有効であり、また水痘ワクチンの追加接種の有効性が示された。

キーワード：水痘ワクチン、MR ワクチン、ワクチンの同時接種、定期接種

### はじめに

我が国の小児予防接種を欧米先進国レベルに引き上げるため、現行の定期接種ワクチンに加え任意接種ワクチンを定期接種化し、より多くのワクチンを効率的に接種してゆく必要があり、複数ワクチンの同時接種は極めて有用な手段である。欧米ではワクチン同時接種が一般的に実施されているが、我が国ではその歴史がなく、その効果、安全性に関する基礎的なデータが求められている。

水痘ワクチンは、Takahashiら<sup>1)</sup>により開発、実用化された唯一のヒトヘルペスウイルスワクチンである。開発当初、わが国で安全性、有効性についての数多く

の知見が蓄積され<sup>2)3)</sup>、それを基盤として1995年米国食品医薬局の承認を受け、翌年から米国でuniversal vaccinationが開始された<sup>4)~6)</sup>。その目覚ましい効果については既に数多くの報告があり、水痘の季節流行パターンが消失しつつあることも明らかになっている<sup>7)</sup>。しかしながら、ワクチン開発国であるわが国では未だ任意接種のため、接種率は約40%程度にとどまっております。毎年春の流行期には数多くの患者が発生し、中には重篤な合併症を来す症例がみられる。特に免疫不全宿主では極めて重症化し、中には致死的な経過をたどる例がある<sup>8)</sup>。費用対効果分析の結果から、定期接種化のメリットが明らかになっており<sup>9)10)</sup>、わが国においても早急に定期接種化がなされるべき重要なワクチンである。

そこで本研究では、水痘ワクチン定期接種化に際し、現時点で問題となる麻疹風疹混合(MR)ワクチンとの同時接種について、その効果と安全性を評価すること

(平成24年10月2日受付)(平成25年4月13日受理)

別刷請求先：〒470-1192 豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98

藤田保健衛生大学医学部小児科 大橋 正博

E-mail: mohashi@fujita-hu.ac.jp

を目的とした。さらに、水痘帯状疱疹ウイルス (varicella zoster virus, VZV) 感染制御に重要な役割を果たすと考えられている VZV 特異的細胞性免疫反応を評価するため、被検児の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) を用いて interferon- $\gamma$  enzyme-linked immunospot (ELISPOT) アッセイを実施した。

## 対象と方法

### 1. 対象

現在の MR ワクチンの定期予防接種時期である第 1 期 (1 歳) と第 2 期 (小学校就学前) に水痘ワクチンを同時接種し、それぞれ study 1, study 2 として実施した。

1) 第 1 期 MR ワクチン接種との同時接種 (study 1): 2009 年 7 月~2012 年 3 月の 3 年間に、藤田保健衛生大学小児科、国立病院機構三重病院小児科、豊川市民病院小児科および竹内小児科医院 (京都市) にて第 1 期 MR ワクチン接種を希望して来院した健康小児の中で、水痘ワクチンの同時接種に同意した 82 名を対象とした。同時接種者の平均年齢は  $16.4 \pm 4.6$  か月、性別は男児 45 例、女児 37 例。また、MR ワクチンとの同時接種の有効性と安全性を評価するため、江南厚生病院小児医療センターにて実施した MR ワクチン単独接種群 51 名と水痘ワクチン単独接種群 42 名と比較検討した。MR ワクチン単独接種群の平均年齢は  $15.4 \pm 2.5$  か月、男児 25 例、女児 26 例。水痘ワクチン単独接種群の平均年齢  $16.9 \pm 3.0$  か月、男児 21 例、女児 21 例だった。MR ワクチンと水痘ワクチン同時接種群と、MR ワクチン単独接種群 ( $p=0.19$ )、水痘ワクチン単独接種群 ( $p=0.17$ ) 間の年齢に有意差はなかった。尚、本研究については、藤田保健衛生大学倫理審査委員会の承認を受け (承認番号: 09-070)、説明文書に従い保護者へ説明を行い、同意を得たのちに研究へ組み入れた。

2) 第 2 期 MR ワクチンとの同時接種 (study 2): 国立病院機構三重病院小児科、落合小児科医院、竹内小児科医院および馬場小児科にて、1 歳時に MR ワクチンと水痘ワクチンの接種を受け、小学校就学前の第 2 期 MR ワクチン接種時期までに水痘の既往がなく水痘ワクチンの追加同時接種に同意した小児 28 名を対象とし、接種前後の各抗体価を測定した。平均年齢は  $5.2 \pm 0.6$  歳、性別は男児 12 例、女児 16 例。本研究については、国立三重病院倫理審査委員会の承認を受け、説明文書に従い保護者へ説明を行い、同意を得た後に研究へ組み入れた。

### 2. 血清抗体価測定

ワクチン接種前と接種後 (4~6 週間後) のペア血清

を採取し、(財) 阪大微生物病研究会にて各ウイルス抗体価を測定した。測定方法は麻疹が中和法 (neutralization test, NT 法)、風疹は赤血球凝集抑制試験 (hemagglutination inhibition, HI 法)、水痘は免疫粘着赤血球凝集反応 (immune adherence hemagglutination, IAHA 法) と glycoprotein antigen based enzyme-linked immunosorbent assay (gp-ELISA 法) の二つの方法で実施した。麻疹と風疹においては 2 回測定し抗体価の幾何平均値を結果とした。IAHA 法と gp-ELISA 法については以下の方法で実施した。

a) IAHA 法: 被験者血清を希釈液にて 2 倍希釈後、 $56^{\circ}\text{C}$  60 分で非働化、さらに 2 倍段階希釈しマイクロプレートの各 well に添加した。その後各 well に抗原液を添加し攪拌、 $37^{\circ}\text{C}$  60 分間静置し、補体を添加攪拌し静置、ヒト O 型赤血球を添加し室温で 2 時間反応後ウイルス抗原添加列の凝集像を観察した。抗体価算出は赤血球凝集を抑制する検体の最大希釈倍数とした。判定基準は抗体価 2 倍未満を陰性、2 倍以上を陽性と定義した。尚、幾何平均抗体価算出において便宜的に 2 倍未満を 1 とし、256 倍以上を 256 とした。

b) gp-ELISA 法: マイクロプレートに VZV 糖蛋白抗原及びコントロールとして MRC-5 糖蛋白抗原を固相化し、その後標準血清および検体を添加、 $37^{\circ}\text{C}$  60 分間反応させた。その後酵素標識抗体を添加し  $37^{\circ}\text{C}$  60 分間反応させ、洗浄後基質・発色液を添加した後  $25^{\circ}\text{C}$  40 分間反応させ、最終的に吸光度 (OD<sub>405nm</sub>) を測定した。検体の吸光度は、コントロールの吸光度を差し引き、標準血清による検量線を参考にして算出した値を水痘ウイルス抗体価とした。抗体価 50 単位以上を陽性、50 単位未満を陰性と定義した。幾何平均抗体価算出においては、50 単位未満は 49 単位として計算した。

### 3. 水痘細胞性免疫能評価

VZV 特異的細胞性免疫反応を評価するため、第 1 期 MR ワクチン・水痘ワクチン同時接種群においてワクチン接種前と接種後 (4 週間) にヘパリン加血を採取し PBMCs を凍結保存 (液体窒素) し、後日医薬基盤研究所で ELISPOT アッセイを実施した<sup>11)</sup>。96 well プレートに抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体を加え、 $4^{\circ}\text{C}$  で over night インキュベートし、その後、PBS にて洗浄した。PBMCs を  $4 \times 10^6$  cells/ml に調整した浮遊液を 100 $\mu$ l ずつ各 well に加え、次に VZV 抗原を含む同量のメディウムを添加した。VZV 抗原は水痘ワクチンを UV 処理 ( $5,000\text{J}/\text{m}^2$ ) して使用した。陽性コントロールとして、phytohemagglutinin-L4 (Wako) を  $2\mu\text{g}/\text{mL}$  含むメディウムを使用した。陰性コントロールは VZV 抗原を含まないメディウムとした。5%  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で 40 時間反応後、PBS で洗浄し、 $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$  ビオチン化抗ヒト IFN- $\gamma$  を各 well に添加した。1 時間

室温放置し、洗浄後ストレプトアビシン標識ペルオキシダーゼ添加、45分間室温放置したのち、テトラメチルベンジンを添加して3分間静置後にスポット数測定に使用した。スポットの検出はES ELISPOT system (Carl Zeiss) で行った。

#### 4. 副反応調査

調査項目(37.5°C以上の発熱、発疹、咳嗽、鼻汁、接種部腫脹発赤)が記された調査票に被検児の保護者が記載する方法でワクチン接種日から接種後28日間までの症状を前方視的に調査した。

#### 5. 水痘ワクチン接種後罹患に関する調査

第1期MRワクチンと水痘ワクチン同時接種例82名のうち藤田保健衛生大学病院ならびに豊川市民病院で接種を受けた50名を対象として、ワクチン接種後罹患のアンケート調査を行った。平成23年12月に往復ハガキによる調査を行った。調査項目は水痘罹患の有無、罹患した場合は罹患時期、発疹数、発熱の有無、感染源、抗ウイルス剤治療の有無について確認した。

#### 6. 水痘ワクチン追加接種

上記アンケート調査の中で、水痘未罹患の場合には希望者に水痘ワクチン追加接種することを記載し、水痘ワクチン追加接種の希望者を募集した。応募者9名に水痘ワクチンを接種し、ワクチン接種前と接種後1か月の2回血清を採取し、水痘抗体価を測定した。

#### 7. 統計学的解析

統計解析には「Microsoft エクセル統計 2008(SSRI, Tokyo, Japan)」を使用した。ウイルス抗体価の比較はMann Whitney U-testを用い、対象者の年齢、性別、副反応発生頻度の比較は $\chi^2$ 検定およびt検定で解析した。

## 結 果

### 第1期MRワクチンとの同時接種 (study 1)

#### 1. 水痘抗体価の推移

MRワクチンと水痘ワクチン同時接種群82例の接種前水痘抗体はIAHA法で判定不能であった1例を除き全例が陰性、接種後水痘平均抗体価は、IAHA法で $3.81 \pm 2.17$  (log<sub>2</sub>で表記)、gp-ELISA法で $2.38 \pm 0.40$  (log<sub>10</sub>で表記)であった(表1A)。各抗体の陽転者数はそれぞれ66例(81.5%)、74例(90.2%)であった。また、水痘ワクチン単独接種群42例の接種前水痘抗体も全例で陰性、接種後抗体価は $3.31 \pm 2.38$  (IAHA法)、 $2.34 \pm 0.46$  (gp-ELISA法)であり、それぞれの抗体陽転例は30例(71.4%)と36例(85.7%)だった。同時接種群と単独接種群間の各抗体価を比較すると、IAHA ( $p=0.33$ )、gp-ELISA ( $p=0.57$ )とともに2群間で有意差はなかった。

#### 2. 水痘 ELISPOT アッセイ

凍結保存細胞の解凍後にアッセイに必要なPBMCs数( $4 \times 10^6$  cells/ml)に調整した浮遊液を1.5ml)が得られた7名について水痘ワクチン接種前後のELISPOTアッセイの結果を解析した(表2)。水痘抗原刺激、PHA刺激および対象の数値は2回実施した平均値を記載した。VZV抗原刺激による反応が陰性コントロールに対し2倍以上の場合を陽性と定義すると、7名中5名(71.4%)が接種後陽性となった。ワクチン接種後もIAHA法とgp-ELISA法の両方法で抗体陽転を認めなかった5名の中で、3名でELISPOTアッセイを実施し、うち2名(No.7,8)が陽性を示した。

#### 3. 麻疹・風疹抗体価

MRワクチンと水痘ワクチンの同時接種群82名中2名が接種前麻疹抗体陽性であったため、接種前抗体陰性の80名について評価した(表1B)。その結果、接種後麻疹抗体価(log<sub>2</sub>で表記)は $5.41 \pm 1.57$  (NT法)、風疹抗体価(log<sub>2</sub>で表記)は $5.54 \pm 1.74$  (HI法)であった。麻疹NT抗体 $\geq 2$ 、風疹HI抗体 $\geq 8$ を陽性と定義すると、各抗体のワクチン接種後陽転者はそれぞれ79例(98.8%)、77例(96.3%)であった。また、MRワクチン単独接種群51名の接種後抗体陽転者は、麻疹51例(100%)、風疹49例(96.1%)であった。接種後平均抗体価は、麻疹 $5.34 \pm 1.29$  (NT法)、風疹 $5.63 \pm 1.62$  (HI法)であり、それぞれMRワクチンと水痘ワクチン同時接種群との間に有意差はなかった(麻疹NT抗体： $p=0.40$ 、風疹HI抗体： $p=0.52$ )。

#### 4. 副反応

水痘ワクチン・MRワクチン(第1期)同時接種群(n=50)で副反応について調査した結果、重篤な副反応は認めず、今回の調査対象とした発熱、発疹、咳嗽、鼻汁、接種部発赤や腫脹のみであった。MR単独接種群(n=50)と比較した結果、発熱(同時接種群：26.0%、MR単独接種群：28.0%、 $p=0.82$ )、発疹(同時接種群：10.0%、MR単独接種群：12.0%、 $p=0.75$ )、咳嗽(同時接種群：12.0%、MR単独接種群：12.0%、 $p=1.00$ )、鼻汁(同時接種群：16.0%、MR単独接種群：20.0%、 $p=0.60$ )、接種部発赤(同時接種群：4.0%、MR単独接種群：6.0%、 $p=0.65$ )、接種部腫脹(同時接種群：2.0%、MR単独接種群：2.0%、 $p=1.00$ )と両群間に有意差は認めなかった。

#### 5. 水痘ワクチン接種後1年間の水痘罹患状況

50名中36名(回収率72%)から返信があり、ワクチン接種後罹患者は4例(11.1%)であった。罹患時期は全例接種後7か月以降であり、いずれも発熱はなく、発疹数100個未満と軽症だった。感染源は同胞3例、保育所の友人1例であった。

表1 MR1期と水痘ワクチン同時接種における水痘抗体反応(A)と麻疹・風疹の抗体反応(B)

A

接種方法	測定法	接種前 抗体陰性者	陽転率 (%)	接種後平均抗体価 (平均値±標準偏差)	p値
VZV 単独	IAHA 法	43	72.1	3.35±2.37*	0.368
MR+VZV		81	81.5	3.81±2.17*	
VZV 単独	gp-ELISA 法	42	85.7	2.36±0.50**	0.529
MR+VZV		82	90.2	2.38±0.40**	

\*log2を表記. \*\*log10を表記.

IAHA抗体価 $\geq 2$ を陽性(+), gp-ELISA抗体価 $\geq 50$ を陽性(+ )とした.

B

ウイルス	測定法	接種前 抗体陰性者	陽転率 (%)	接種後 平均抗体価*	接種前 抗体陰性者	陽転率 (%)	接種後 平均抗体価*	p値
		MR+VZV			MR 単独			
麻疹	NT 法	80	98.6	5.41±1.57	51	100.0	5.34±1.29	0.400
風疹	HI 法	80	96.3	5.54±1.74	51	96.1	5.63±1.62	0.520

\*log2を表記:(平均値±標準偏差)

麻疹 NT 抗体価 $\geq 2$ を陽性(+), 風疹 HI 抗体価 $\geq 8$ を陽性(+ )とした.

表2 水痘ワクチン接種前後の水痘 ELISPOT アッセイ結果(第1期 MR ワクチンと同時接種群)

Case	接種前					接種 4 週間後				
	IAHA	gp- ELISA	ELISPOT			IAHA	gp- ELISA	ELISPOT		
			VZV Ag	PHA	Control			VZV Ag	PHA	Control
1	<2	<50	5	168	2.5	32	466	42	200	4
2	<2	<50	1	103	0.5	16	317	n.d.	n.d.	n.d.
3	<2	<50	18	200	20	16	310	0	124	1
4	<2	<50	3.5	107	1	16	147	13	200	2
5	<2	<50	0	170	2	8	114	n.d.	n.d.	n.d.
6	<2	<50	0.7	200	0.5	8	93	n.d.	n.d.	n.d.
7	<2	<50	1	92	3	<2	<50	2.5	72	0.5
8	<2	<50	n.d.	n.d.	n.d.	<2	<50	9.7	200	3
9	<2	<50	3	194	4	<2	<50	0.5	200	1
10	<2	56	3	200	1.5	16	355	10	200	2

陽性率

70%  
(7/10)      70%  
(7/10)      71.40%  
(5/7)

n.d.: 未実施

## 6. 水痘ワクチン追加接種の効果

MR ワクチンと水痘ワクチンを同時接種した1年後に9例に対して水痘ワクチンを追加接種したが, その前後の抗体価を表3に示した. 初回接種時月齢は中央値12か月で, 追加接種までの間隔は平均 $15 \pm 1.1$ か月(13か月~17か月)であった. IAHA法では初回接種後66.7%が抗体陽転したが, 追加接種前には陽性率は33.3%に低下した. 陰性化した中には初回接種後抗体

価が比較的高値であった例も含まれた(64倍を示した児が1例, 32倍を示した児が2例). 一方, gp-ELISA法では初回接種後陽転率は77.8%で, 追加接種前には100%の陽性率であった. 追加接種後の抗体陽性率はIAHA法, gp-ELISA法とも100%で, 平均抗体価はIAHA法 $6.9 \pm 1.4$ , gp-ELISA法 $4.0 \pm 0.4$ と著明に上昇した.



表3 水痘ワクチン追加接種の効果

MR ワクチン第1期と水痘ワクチンの同時接種者への水痘ワクチン追加接種効果.

Case	初回接種				追加接種				接種間隔 (月)
	接種前		接種後		接種前		接種後		
	IAHA	gp-ELISA	IAHA	gp-ELISA	IAHA	gp-ELISA	IAHA	gp-ELISA	
1	<2	<50	32	218	<2	211	128	30,954	15
2	<2	<50	<2	<50	<2	250	32	3,182	14
3	<2	<50	8	204	<2	198	64	5,012	16
4	8	<50	32	180	<2	208	128	12,813	13
5	<2	<50	<2	<50	<2	150	32	2,102	17
6	<2	60	64	364	<2	334	128	7,654	15
7	<2	73	<2	414	2	388	≥256	20,948	15
8	<2	<50	64	770	64	5,496	≥256	12,694	15
9	<2	<50	32	148	4	371	128	15,348	15
陽性率 (%)			66.7	77.8	33.3	100	100	100	
平均抗体価 (Ave. ±SD)			3.3±2.6	2.3±0.4	1.0±2.0	2.5±0.5	6.9±1.4	4.0±0.4	15.0±1.1*

(平均抗体価は IAHA 法 : log2, gp-ELISA 法 : log10 で表記.)

\*平均接種間隔を示す

## 第2期 MR ワクチンとの同時接種 (study 2)

## 1. 水痘抗体価の推移 (表 4A)

第2期 MR ワクチンと水痘ワクチンの同時接種では、接種前水痘平均抗体価および陽性率は IAHA 法で  $2.96 \pm 3.10$ , 55.6%, gp-ELISA 法で  $3.02 \pm 0.92$ , 89.3% であったが、ワクチン接種後は、IAHA 法で  $6.07 \pm 1.38$ , 100%, gp-ELISA 法で  $3.97 \pm 0.56$ , 100% であり、接種前後で平均抗体価の有意な上昇 (それぞれ  $p=0.0017$ ,  $p=0.0003$ ) が認められた。

## 2. 麻疹・風疹抗体価 (表 4B)

接種前麻疹平均抗体価および陽性率は NT 法で  $5.71 \pm 1.37$ , 100% であったが、ワクチン接種後は、 $6.66 \pm 0.81$ , 100% と抗体価の有意上昇を認めた。接種前に比較的低い抗体価を示したのは 2.5 (1名), 3.5 (1名), 4.0 (1名) であり、その他は 4.5 以上と比較的高い抗体価が維持されていた。接種後抗体価は 5.0 (1名) と 5.5 (2名) を除き、6.0 以上の抗体価を示した。また、風疹においても接種前平均風疹抗体価および陽性率は HI 法で  $5.93 \pm 1.30$ , 100% であったが、ワクチン接種後は、 $6.57 \pm 0.88$ , 100% と、抗体価の有意上昇を認めた。接種前最低抗体価は 8 倍が 2名, 16 倍が 2名であり比較的高い抗体価が維持されていたが、接種後抗体価は 32 倍 (3名) を除き、他は 64 倍以上の抗体価を示した。

## 3. 副反応

第2期の MR ワクチンと水痘ワクチンの同時接種において全身性の有害事象はなかった。17人中接種局

所の発赤を 2名に、腫脹を 2名に認めた程度で特に問題となる副反応はなかった。

## 考 察

水痘ワクチンの universal immunization の効果は、既に導入後 16 年が経過した米国からの種々の報告を見れば明らかである<sup>12)13)</sup>。さらに、わが国における費用対効果研究においても、間接効果を考慮に入れることにより定期接種化が有益なことが示されていることから<sup>9)10)</sup>、一刻も早い水痘ワクチンの定期接種化が望まれている。実際に水痘ワクチンの定期接種化を導入する際、最も現実的なスケジュールは第1期 MR ワクチンとの同時接種と考えられる。今回の研究の結果、水痘ワクチン単独接種群と水痘ワクチンと MR ワクチン同時接種群間でワクチン接種後 VZV 抗体価に有意差は認められなかったため、水痘ワクチンと MR ワクチンの同時接種により、VZV に対する液性免疫誘導に支障のないことが裏付けられた。また、MR ワクチン単独接種群と水痘ワクチン、MR ワクチン同時接種群間でワクチン接種後の麻疹、風疹抗体価を比較したが、両群間で有意差がなかったことから、同時接種は麻疹ワクチン、風疹ワクチンの抗体誘導能についても影響がないことが示された。さらに 2期 MR ワクチンとの同時接種でも VZV 抗体価の上昇が確認でき、追加接種の有効性も示唆された。以上の結果から、水痘ワクチンと MR ワクチンの同時接種が、両ワクチンの効果に影響を与えないことが示された。これは、対象数は

表4 MR ワクチン第2期接種と水痘ワクチンの同時接種における水痘抗体反応 (A) と麻疹・風疹の抗体反応 (B)

A

採血時期	測定法	陽転率 (%)	抗体範囲	平均抗体価	p 値
接種前	IAHA 法	15/27 (55.6)	<2 ~>256 倍	2.96 ± 3.10*	0.0017
接種後		27/27 (100)	16 ~>256 倍	6.07 ± 1.38*	
接種前	gp-ELISA 法	25/28 (89.3)	<50 ~ 55,859	3.02 ± 0.92**	0.0003
接種後		28/28 (100)	292 ~ 94,256	3.97 ± 0.56**	

\*log<sub>2</sub> を表記：(平均値 ± 標準偏差)\*\*log<sub>10</sub> を表記：(平均値 ± 標準偏差)

IAHA 抗体価 ≥ 2 を陽性 (+), gp-ELISA 抗体価 ≥ 50 を陽性 (+) とした。

B

ウイルス (検査方法)	測定時期	陽転率 (%)	抗体価の範囲	平均抗体価	p 値
麻疹 (NT 法)	接種前	28/28 (100)	2.5 ~ 8.5*	5.71 ± 1.37*	0.0017
	接種後	28/28 (100)	5.0 ~ 8.5*	6.66 ± 0.81*	
風疹 (HI 法)	接種前	28/28 (100)	8 倍 ~ 256 倍	5.93 ± 1.30*	0.0003
	接種後	28/28 (100)	32 倍 ~ 256 倍	6.57 ± 0.88*	

\*log<sub>2</sub> を表記：(平均値 ± 標準偏差)

麻疹 NT 抗体価 ≥ 2 を陽性 (+), 風疹 HI 抗体価 ≥ 8 を陽性 (+) とした。

少ないものの、既に欧米での MMR ワクチンと水痘ワクチンの同時接種データで示されている有効性の評価結果を裏付けるものと思われる<sup>14)</sup>。

本邦の水痘ワクチンは極めて安全性が高く、健康小児に接種した場合ほとんど副反応を生じない<sup>2)15)</sup>。したがって、同時接種時の安全性についての評価に際し、本研究では水痘ワクチン、MR ワクチン同時接種群と MR ワクチン単独接種群間で接種後1か月間の副反応の発生状況を比較した。発熱、発疹、接種局所反応など全ての項目で両群間に差は認められず、安全性の点でも同時接種は問題のないことが明らかとなった。対象症例が少ないため、極めて頻度の低い副反応については正確な評価は困難と思われ、その点については実際に定期接種が導入された後に注意深く観察してゆく必要がある。

VZV の感染制御においては、液性免疫よりむしろ細胞性免疫が重要なことは良く知られている。我々は既に ELISPOT アッセイによる VZV 特異的細胞性免疫反応の評価法を報告した<sup>11)</sup>。今回その方法を用いて水痘ワクチンと MR ワクチン同時接種時の VZV 特異的細胞性免疫能の解析を試みた。残念ながら、今回の研究では保存 PBMCs を ESISPOT アッセイのために融解した際、生存細胞の割合が極めて低く、多くの症例で解析が不可能だった。これは、被検者から末梢血を採取した後、PBMCs を分離、液体窒素保存するまでのタイムラグ(施設間輸送に伴う)が PBMCs の生存状況

に影響したと考えられ、今後の検討課題である。しかしながら、解析可能であった一部症例を見ると、7名中5名(71.4%)で細胞性免疫が獲得されていると考えられた。さらに今回 VZV 抗体陽転を認めなかった5名のうち3名で ELISPOT アッセイが実施され、そのうち2名で細胞性免疫の獲得が認められた。抗体測定法の感度の問題もあるが、primary vaccine failure と思われる被接種者の中には弱いながら VZV 特異的細胞性免疫を獲得し得るものが存在することがうかがわれる。

水痘ワクチンは他の弱毒生ワクチンに比べ安全性が高い半面、ワクチン接種後罹患がみられることも知られている<sup>2)</sup>。本研究では、同時接種例について1年間の観察期間をもうけワクチン接種後罹患の調査を実施した。その結果、過去の報告<sup>15)16)</sup>同様11%(36名中4名)で接種後罹患が認められた。いずれも、家族内あるいは幼稚園での水痘患児との接種を契機としており、接種後7か月から1年間の間に発生していた。ワクチン接種後罹患患者数の抑制は、今後定期接種化を進める上で重要な課題である。米国では、全員接種方式導入後接種率の上昇に伴い、患者数は減少したが secondary vaccine failure の増加が問題となった<sup>12)17)</sup>。そのため、現在は水痘ワクチン二回接種が推奨され、追加接種の時期は抗体価の減衰が進む4~6歳が勧められている<sup>18)</sup>。現在のわが国での接種後罹患はこの状況とは異なり、primary vaccine failure のみならず1回接種

では十分な免疫誘導ができず接種後罹患を起こすことが問題となっている。したがって、現時点でのわが国での水痘ワクチン接種施策は、米国とは異なり、より早期の追加接種で全体の患者数削減を目指すことが重要と思われる。実際、一部のワクチン接種後水痘未罹患患者について1年後のVZV抗体価を調べた結果、IAHA法では9名中6名(67%)の対象者で検出限界以下であった。さらにこれらの患者に水痘ワクチンを追加接種することにより、明確なブースター効果が確認されたことから、今後は適切な追加接種時期を明らかにするために、水痘ワクチン2回接種時期について検討してゆく必要があると思われる。

謝辞 本研究にご協力いただいた医薬基盤研究所感染制御プロジェクト、森石永子先生、森 康子教授(現在、神戸大学医学部臨床ウイルス学)、阪大微生物研究会青木秀訓先生に深謝いたします。また、本研究は、新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業(研究代表者:国立成育医療研究センター 加藤達夫先生)の補助を受けて行ったものである。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

#### 文 献

- 1) Takahashi M, et al. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet* 1974 ; 2 : 1288—1290.
- 2) Ozaki T, et al. Safety and immunogenicity of gelatin-free varicella vaccine in epidemiological and serological studies in Japan. *Vaccine* 2005 ; 23 : 1205—1208.
- 3) Seward JF, et al. Varicella disease after introduction of varicella vaccine in the United States, 1995-2000. *JAMA* 2002 ; 287 : 606—611.
- 4) From the Centers for Disease Control and Prevention. Licensure of Varicella Virus Vaccine, Live. *JAMA* 1995 ; 273 : 1253.
- 5) DiNicola AF. Varicella vaccine guidelines. *Pediatrics* 1995 ; 96 (Pt 1) : 375—376.
- 6) Stein ND. Recommendations for varicella vaccine. *Pediatrics* 1995 ; 96 (Pt 1) : 545.
- 7) Perella D, et al. Validity of reported varicella history as a marker for varicella zoster virus immunity among unvaccinated children, adolescents, and young adults in the post-vaccine licensure era. *Pediatrics* 2009 ; 123 : e820—828.
- 8) 中井英剛, 他. 医原性免疫不全宿主に発症した水痘または帯状疱疹による重症化例の全国調査. *小児感染免疫* 2011 ; 23 : 29—34.
- 9) 須賀万智, 他. 水痘ワクチンの定期接種化に関する医療経済分析. *厚生の指標* 2011 ; 58 : 15—22.
- 10) 大日康史, 他. 水痘予防接種に対する公費補助制度の政策評価. *感染症学雑誌* 2010 ; 84 : 159—164.
- 11) Sadaoka K, et al. Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity : comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay. *J Infect Dis* 2008 ; 198 : 1327—1333.
- 12) Marin M, Meissner HC, Seward JF. Varicella prevention in the United States : a review of successes and challenges. *Pediatrics* 2008 ; 122 : e744—751.
- 13) Seward JF, Marin M, Vazquez M. Varicella vaccine effectiveness in the US vaccination program : a review. *J Infect Dis* 2008 ; 197 (Suppl 2) : S82—89.
- 14) Shinefield H, et al. Evaluation of a quadrivalent measles, mumps, rubella and varicella vaccine in healthy children. *Pediatr Infect Dis J* 2005 ; 24 : 665—669.
- 15) Ozaki T, Nishimura N, Kajita Y. Experience with live attenuated varicella vaccine (Oka strain) in healthy Japanese subjects ; 10-year survey at pediatric clinic. *Vaccine* 2000 ; 18 : 2375—2380.
- 16) 高山直秀. 水痘ワクチン接種後自然水痘発症例の臨床像. *小児科臨床* 1996 ; 49 : 927—932.
- 17) Gould PL, et al. An outbreak of varicella in elementary school children with two-dose varicella vaccine recipients—Arkansas, 2006. *Pediatr Infect Dis J* 2009 ; 28 : 678—681.
- 18) Marin M, et al. Prevention of varicella : recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2007 ; 56 (RR-4) : 1—40.

Efficacy and Safety of Co-administration of Live Attenuated Varicella Vaccine and Measles-rubella (MR) Vaccine

Masahiro Ohashi<sup>1)</sup>, Yoshiaki Kawamura<sup>1)</sup>, Yoshizo Asano<sup>1)8)</sup>, Yuji Matsumoto<sup>2)</sup>, Tomochika Kato<sup>2)</sup>, Naoko Nishimura<sup>3)</sup>, Takao Ozaki<sup>3)</sup>, Shigeru Suga<sup>4)</sup>, Toshiaki Ihara<sup>4)</sup>, Hitoshi Ochiai<sup>5)</sup>, Koichi Takeuchi<sup>6)</sup>, Koichi Baba<sup>7)</sup> and Tetsushi Yoshikawa<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Toyokawa Municipal Hospital

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, Konan Kosei Hospital

<sup>4)</sup>Department of Pediatrics, Mie National Hospital

<sup>5)</sup>Ochiai Pediatric Clinic

<sup>6)</sup>Takeuchi Pediatric Clinic

<sup>7)</sup>Baba Pediatric Clinic

<sup>8)</sup>Zambia Project Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University

The aim of this study was to elucidate the efficacy and safety of the co-administration of a varicella-zoster virus (VZV) vaccine and the measles-rubella (MR) vaccine. One hundred seventy-six children who had no history of varicella were enrolled. Eighty-two children received simultaneous administration of the VZV vaccine and MR vaccine (VZV/MR). As controls, 42 age-matched children received the VZV vaccine only and 51 age-matched children received the MR vaccine only. Serum samples were drawn before vaccination and 4 weeks after vaccination. Antibody titers were measured by immune adherence hemagglutination (VZV), glycoprotein antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays (VZV), neutralization tests (measles), and hemagglutination inhibition (rubella). Additionally, cell-mediated immunity (CMI) against VZV was tested in 7 children after vaccination. There were no significant differences in the seroconversion rates and mean antibody titers between the VZV/MR simultaneous vaccination group and the VZV only or MR only vaccination group. Of the 7 (71.4%) cases, 5 had measurable CMI. The incidence of breakthrough varicella in the 1 year following vaccination was 11%. At 1 year after the initial vaccination, a second dose of the VZV vaccine was administered to 9 children without breakthrough varicella, and a booster effect was observed in all subjects. VZV vaccination did not affect the antibody responses induced by the co-administration of the VZV and MR vaccines, and there were no severe side effects. Furthermore, the second dose of VZV vaccine had booster activity.

部位が新たに出現している。PCR産物の制限酵素処理後の電気泳動パターンを前ページ図1に示した。星野株は*Mfe* Iで313bpと271bpに切断され、鳥居株は*Eco*T22 Iで332bpと252bpに切断される。主流野生株の切断パターンは2パターンに分類される。Genotype B, J, Lは*Eco*T22 I, *Mfe* Iでは切断されずに*Xba* Iで299bp, 285bpに切断される。Genotype Gでは*Xba* I部位が消失し、*Mfe* Iにより451bpと133bpに切断される。*Eco*T22 I, *Mfe* I, *Xba* Iの制限酵素を用いてワクチン株と野生株が鑑別できる<sup>7)</sup>。

1994年以降星野株ムンプスワクチンは350万ドースが出荷され、市販後調査に報告された副反応をまとめて自然感染の合併症の出現頻度を比較して前ページ表1に示した。ワクチン接種後の無菌性髄膜炎は223例報告され、85例の検索が依頼され、66例がPCR陽性で58例がワクチン株、8例が野生株と判定された<sup>7)</sup>。耳下腺炎、睾丸炎も同様に野生株の感染例が紛れ込んできく。また、エンテロウイルスの流行期には紛れ込みが認められ、病原診断を確実に行うことが必要である。

#### 参考文献

- 1) Yoshida N, *et al.*, J Med Virol 80: 517-523, 2008
- 2) Jin L, *et al.*, Arch Virol 150: 1903-1909, 2005
- 3) Okafuji T, *et al.*, J Clin Microbiol 43: 1625-1631, 2005
- 4) 加藤 篤, 臨床とウイルス 34: 261-270, 2006
- 5) Nagai T, *et al.*, Vaccine 25: 2742-2747, 2007
- 6) Inou Y, *et al.*, J Med Virol 73: 97-104, 2004
- 7) Sawada A, *et al.*, J Infect Chemother 19: 480-485, 2013

北里生命科学研究所 中山哲夫

#### <特集関連情報>

##### ムンプスウイルスの新たな分類基準と国内流行状況

おたふくかぜ(流行性耳下腺炎)の原因ウイルスであるムンプスウイルスは、モノネガウイルス目パラミクソウイルス科パラミクソウイルス亜科ブラウイルス属に分類されるエンベロープウイルスである。ムンプスウイルスのゲノムは、NP, V/P, M, F, SH, HN, Lの7つの遺伝子から構成される(次ページ図1a)。これらの遺伝子のうち最も小さいSH (small hydrophobic) 遺伝子(316塩基)は最も多型性に富んでいることから、この領域の塩基配列を元にしたムンプスウイルスの分類が行われてきた。2005年にはWHOのLabNet Meetingのメンバーが中心となり統一的な分類基準が提案された<sup>1)</sup>。その後のデータの蓄積からこの基準にそぐわない分類例が散見されるようになり<sup>2)</sup>、2012年に新たな分類基準が再提案されている<sup>3)</sup>。新基準では、新規の遺伝子型を決定する際にはSH遺伝子に基

づく解析に加え、より遺伝的安定性の高いHN遺伝子による解析結果を考慮することが加えられた。また、一部の遺伝子型の再区分が提案された。新基準ではムンプスウイルスの遺伝子型はA~Nまでの12群に分類され、従来のEはCに、MはKに再分類され、EとMは欠番とされた。旧基準では遺伝子型が未定であったワクチン株Leningrad-3株とその派生株Leningrad-Zagreb株がNに分類されている。ちなみに国産のワクチン株はいずれもB、海外のワクチン株ではJeryl-Lynn株と、その派生株RIT-4385株はAである。また、株の命名法についても新たな提案がされた。しかし、新しい分類基準では、EとMを無くす一方で、系統学的に近接したDとKを異なる遺伝子型として残すという矛盾点も残された。

わが国では1993年4月にMMR(麻しん・おたふくかぜ・風しん3種混合)ワクチンの定期接種が中止されて以降、任意接種用として用いられているおたふくかぜ単味ワクチンの接種率は20%以下と低迷し、国内におけるおたふくかぜの流行はいまだに制御できていない。MMRワクチンによる2回の定期接種が定着し、おたふくかぜの発生件数が激減した他の先進諸国とはまったく異なる状況にある。こうした現状を反映して、日本国内では相変わらず4、5年ごとに全国的なおたふくかぜの流行が繰り返されている。しかし、流行をその原因となるウイルスの側から眺めてみると、流行するウイルスは一様ではないことが分かる。

我々は国内におけるムンプスウイルス流行の実態を把握するため、1986~2012年にかけて山形県(47株)、三重県(201株)、岡山県(16株)および横浜市内(6株)で分離されたムンプスウイルスについて分子系統学的解析を行い、国内で流行する遺伝子型の経年変化を解析した(次ページ図1b)。その結果、1980年代はBのみが流行していたのに対し、1990年代(1993~1998年)になって新たにJがBと拮抗する状態で流行していたことが判明した。それが1999年になると、突然GとLに取って代われ、2000年以降はGのみが流行の主体を占めるようになっていた。それ以降Gの流行は現在まで継続している。このG型ウイルスはさらに2つの系統に分類され、一方(以下Gw)は主に三重県、岡山県などの西日本で流行しているのに対し、他方(以下Ge)は首都圏を含む東日本で主に流行していることがあきらかとなった。しかし、GwとGeの流行域は必ずしも固定的ではなく、年によって首都圏でGwが流行したり、西日本でGeが流行したりと、一方から他方へと入れ替わる場合もあることが分かった。いずれにしても2000年以降の国内流行株はこれら2つの系統によって占められていることは明らかである。また、これらの系統は欧米でアウトブレイクを繰り返しているG型ウイルスとは系統学的にやや異なっており、その由来は現時点では不明である。

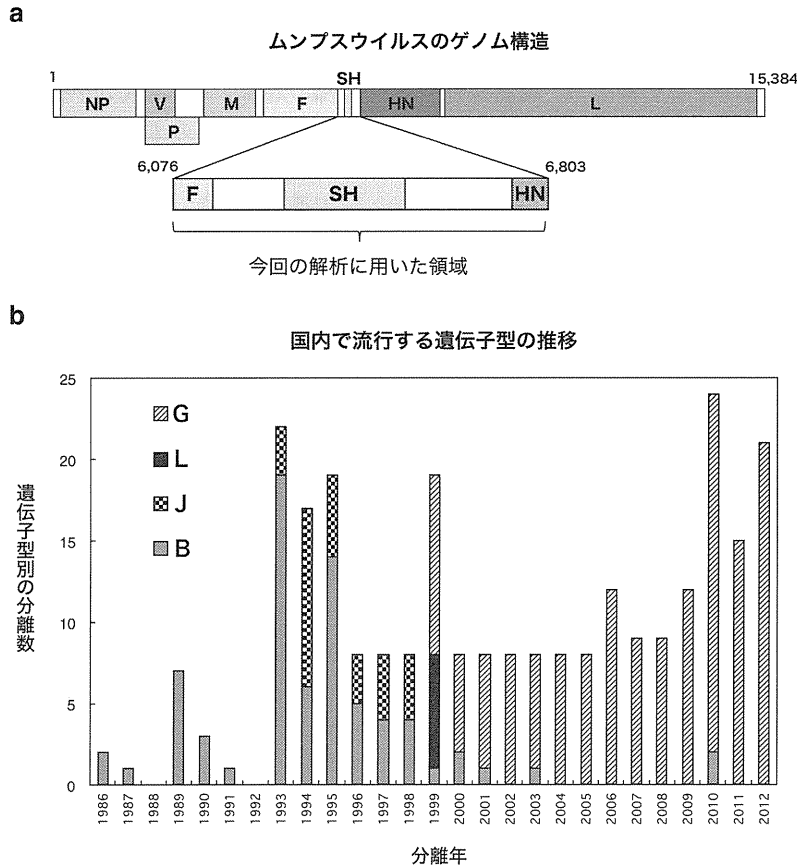


図1. ムンプスウイルスのゲノム構造と国内で流行する遺伝子型の推移

a: 図では遺伝子型同定の際RT-PCRで増幅する領域を示している。  
 b: グラフは今回解析した分離株の実数を分離年と遺伝子型別で示した。

また、1990年代まで流行の主流を占め、日本固有の遺伝子型と考えられるBにも2つの系統が存在する。その一方(以下B1)には占部株を除くすべての国産ワクチン株が含まれる。他方、今回解析した1986年以降の分離株はすべて別の系統(以下B2)に分類された。ワクチン株の親株はすべて1960年代～1970年代初頭に分離されており、ワクチン株のほとんどはB1系統に含まれる。しかし、同時期に分離された占部株はもう一方のB2の系統に含まれることから、これら2つの系統はその当時から並行して国内に流行していたと考えられる。しかし、1980年代以降はもっぱらB2系統のみが流行の主流を占めていると考えられる。今回の解析に限らず、これまで国立感染症研究所で同定した1980年代以降のB型分離株はすべてB2に分類された。

このように遺伝子型を調べることにより、ムンプスウイルスの流行の動態をより詳細に把握することが可能となる。また、ワクチンによる副反応例を確定する上でも遺伝子型別同定は必須である。今後、日本においてもムンプスワクチンが定期接種化され、おたふくかぜ流行の制御が可能になった段階においては、散发例が輸入例であるか国内流行株であるかの同定が重要になる。そのためには全国的なムンプスウイルスの

サーベイランス網を構築することが必須である。我々はその準備段階として、全国の小児科定点や地方衛生研究所から候補を募り、ネットワーク作りを始めたいと考えている。

最後に、多数の分離株を分与頂いた国立病院機構三重病院の庵原俊昭先生、すずかこどもクリニックの渡辺正博先生、落合小児科医院の落合仁先生、水島中央病院の名木田章先生、国立病院機構仙台医療センターの西村秀一先生、木須友子先生の諸先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Jin L, *et al.*, Arch Virol 150: 1903-1909, 2005
- 2) Kidokoro M, *et al.*, J Clin Microbiol 49: 1917-1925, 2011
- 3) WHO, WER 87: 217-224, 2012

国立感染症研究所ウイルス第三部  
 木所 稔 竹田 誠

訂正のお詫びとお願い

IASR Vol. 34, No. 1 掲載記事に誤りがありました。下記のように訂正をお願いいたします。  
 p.8 表1 一番下の行の渡航先:  
 誤: 中国 正: 米国

## Clinical and Vaccine Immunology

cvi.asm.org

Published ahead of print 11 December 2013, doi: 10.1128/CVI.00377-13  
Clin Vaccine Immunol February 2014 vol. 21 no. 2 188-195

## Phase III Clinical Trials Comparing the Immunogenicity and Safety of the Vero Cell-Derived Japanese Encephalitis Vaccine Encevac with Those of Mouse Brain-Derived Vaccine by Using the Beijing-1 Strain

Chiaki Miyazaki<sup>a</sup>, Kenji Okada<sup>b</sup>, Takao Ozaki<sup>c</sup>, Mizuo Hirose<sup>d</sup>, Kaneshige Iribe<sup>e</sup>,  
Hiroyuki Yokote<sup>f</sup>, Yuji Ishikawa<sup>g</sup>, Takehiro Togashi<sup>g</sup> and Kohji Ueda<sup>h</sup>

M. F. Pasetti, Editor

 Author Affiliations

### ABSTRACT

The immunogenicity and safety of an inactivated cell culture Japanese encephalitis vaccine (CC-JEV) were compared with those of an inactivated mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccine (MB-JEV) in phase III clinical multicenter trials conducted in children. The vaccines contain the same Japanese encephalitis virus strain, the Beijing-1 strain. Two independent clinical trials (trials 1 and 2) were conducted. Trial 1 was conducted in 468 healthy children. Each subject was injected with 17  $\mu$ g per dose of either CC-JEV or MB-JEV, and the immunogenicity and safety of the vaccines were investigated. Trial 1 showed that CC-JEV was more immunogenic and reactive than MB-JEV at the same dose. Therefore, to adjust the immunogenicity of CC-JEV to that of MB-JEV, a vaccine that has had a good track record regarding its efficacy for a long time, trial 2 was conducted in 484 healthy children. To improve the stability, CC-JEV was converted from a liquid type to a freeze-dried type of vaccine. Each subject was injected subcutaneously with either 4  $\mu$ g per dose of CC-JEV, 8  $\mu$ g per dose of CC-JEV, or 17  $\mu$ g per dose of MB-JEV twice, at an interval of 2 to 4 weeks, followed by an additional booster immunization 1 to 15 months after the primary immunization. Based on the results of trial 2, 4  $\mu$ g per dose of the freeze-dried CC-JEV (under the label Encevac) was selected as a substitute for the MB-JEV. Encevac was approved and launched in 2011 and has since been in use as a 2nd-generation Japanese encephalitis vaccine in Japan. (These studies have been registered at the JapicCTI under registration no. JapicCTI-132063 and JapicCTI-080586 for trials 1 and 2, respectively.)

### FOOTNOTES

Received 29 June 2013.

Returned for modification 23 July 2013.

Accepted 8 December 2013.

Address correspondence to Hiroyuki Yokote, yokote@kaketsuken.or.jp.

Published ahead of print 11 December 2013

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

# Phase II and III Clinical Studies of Diphtheria-Tetanus-Acellular Pertussis Vaccine Containing Inactivated Polio Vaccine Derived from Sabin Strains (DTaP-sIPV)

Kenji Okada,<sup>1</sup> Chiaki Miyazaki,<sup>2</sup> Yoichiro Kino,<sup>3</sup> Takao Ozaki,<sup>4</sup> Mizuo Hirose,<sup>5</sup> and Kohji Ueda<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Fukuoka National Hospital, Fukuoka, <sup>2</sup>Fukuoka-West Rehabilitation Center for Children, Fukuoka, <sup>3</sup>Second Research Department, Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (Kaketsuken), Kikuchi, <sup>4</sup>Department of Pediatrics, Konan Kosei Hospital, Konan, <sup>5</sup>Hirose Pediatric Clinic, Saga, and <sup>6</sup>Seinan Jo Gakuin University, Kitakyushu, Japan

**Background.** Phase II and III clinical studies were conducted to evaluate immunogenicity and safety of a novel DTaP-IPV vaccine consisting of Sabin inactivated poliovirus vaccine (sIPV) and diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine (DTaP).

**Methods.** A Phase II study was conducted in 104 healthy infants using Formulation H of the DTaP-sIPV vaccine containing high-dose sIPV (3, 100, and 100 D-antigen units for types 1, 2, and 3, respectively), and Formulations M and L, containing half and one-fourth of the sIPV in Formulation H, respectively. Each formulation was administered 3 times for primary immunization and once for booster immunization. A Phase III study was conducted in 342 healthy infants who received either Formulation M + oral polio vaccine (OPV) placebo or DTaP + OPV. The OPV or OPV placebo was orally administered twice between primary and booster immunizations.

**Results.** Formulation M was selected as the optimum dose. In the Phase III study, the seropositive rate was 100% for all Sabin strains after primary immunization, and the neutralizing antibody titer after booster immunization was higher than in the control group (DTaP + OPV). All adverse reactions were clinically acceptable.

**Conclusions.** DTaP-sIPV was shown to be a safe and immunogenic vaccine.

**Clinical Trials Registration.** JapicCTI-121902 for Phase II study, JapicCTI-101075 for Phase III study ([http://www.clinicaltrials.jp/user/cte\\_main.jsp](http://www.clinicaltrials.jp/user/cte_main.jsp)).

**Keywords.** clinical study; combination vaccine; DTaP; IPV; Sabin strain.

Since the World Health Organization (WHO) launched the global polio eradication program in 1988, the number of patients with polio caused by wild-type polioviruses worldwide has steadily decreased from a 1988 estimate of approximately 350 000 cases to 67 cases on 5 June 2012 [1]. The oral polio vaccine (OPV) has played a leading role in the program as not only

is it very effective and safe but it also has several important advantages, including low cost, ease of administration, and induction of superior mucosal immunity, compared to inactivated polio vaccine (IPV). In polio-free areas, however, concerns have been raised regarding 2 negative aspects of OPV as a live vaccine: One issue is a risk of causing vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) in OPV vaccinees and those in contact with them, although this occurred very infrequently [2]. The other issue is a risk of polio epidemics caused by vaccine-derived polioviruses (VDPVs), which have highly neurovirulent and transmissible properties [3]. As long as OPV is in use, it will be impossible to avoid the occurrence of VAPP and polio caused by VDPVs. Therefore, many countries in which polio has been eradicated have been shifting from OPV to IPV.

Received 29 October 2012; accepted 14 January 2013; electronically published 8 April 2013.

Correspondence: Yoichiro Kino, PhD, Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (Kaketsuken), 1314-1, Kyokushi-Kawabe, Kikuchi, Kumamoto, 869-1298, Japan (kino-yo@kaketsuken.or.jp).

**The Journal of Infectious Diseases** 2013;208:275–83

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com).

DOI: 10.1093/infdis/jit155



In addition to conventional IPV produced using virulent polioviruses (cIPV), a novel IPV produced using nonvirulent poliovirus seed strains, such as the attenuated Sabin strains, is now under investigation. However, with a view to eradicating wild-type polioviruses, regulations have been placed on manufacturing of bulk cIPV from virulent poliovirus strains at new manufacturing sites [4]. On the other hand, manufacturing of an IPV using attenuated Sabin strains (sIPV) is not regulated because it is made from attenuated Sabin strains. Moreover, the use of attenuated Sabin strains not only provides additional safety during vaccine production, but also reduces the risk of recurrent polio epidemics in the unlikely event of an unintentional or intentional release into the human population or environment. Therefore, manufacturing of sIPV is also encouraged by the WHO in consideration of social safety and IPV supply post polio eradication [5, 6].

The first Phase I clinical study using an sIPV was carried out in the United States starting in 1985 to evaluate its safety and immunogenicity [7]. Since then, many institutes have been continuing the development of sIPV to further optimize doses through preclinical and clinical studies [8–10].

The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (Kaketsuken) initiated development of a diphtheria-tetanus-acellular pertussis (DTaP) vaccine that contains a domestically produced sIPV (DTaP-sIPV). The optimum dose of the sIPV in DTaP-sIPV was determined in a Phase II clinical study, and the safety and immunogenicity of DTaP-sIPV manufactured at the optimum dose of the sIPV were evaluated in a Phase III clinical study. This is the first report on the immunogenicity and safety of the sIPV in the Phase III study.

## MATERIALS AND METHODS

### Vaccines

Type 1, type 2, and type 3 sIPV bulk stocks manufactured by Japan Poliomyelitis Research Institute were purchased to manufacture DTaP-sIPV [10]. The following Sabin strains were used to manufacture the sIPV bulks: LSc, 2ab strain for type 1; P712, Ch, 2ab strain for type 2; and Leon, 12a<sub>1</sub>b strain for type 3.

Given a previous report that the immunogenicity of sIPV differs from that of cIPV, it was necessary to select the optimum dose of sIPV [11]. The National Institute of Infectious Diseases, Japan, played a central role to determine the required D-antigen units (DU) content of sIPV that would be equivalent to the WHO reference IPV (91/574) or cIPV derived from virulent polioviruses (type 1 : type 2 : type 3 = 40 DU : 8 DU : 32 DU) in terms of immunogenicity using rats, and concluded that the relevant DU of sIPV is 3, 100, and 100 DU for types 1, 2, and 3, respectively [10]. Guoyang Liao et al [9] conducted a Phase II clinical study of sIPV in China, and reported that the appropriate concentrations of sIPV were 15 DU, 32 DU, and 45 DU for types 1, 2, and 3, respectively. However,

regarding the methods of testing for D-antigen content, the antibody and standards that Guoyang Liao et al used in their study differed from those used in the present study. Therefore, we could not compare the antigen contents. As the DTaP components, antigens (diphtheria toxoid, tetanus toxoid, pertussis toxoid [PT]) and filamentous hemagglutinin (FHA) manufactured by Kaketsuken were used [12–16].

The final bulk of DTaP-sIPV was prepared by mixing a trivalent sIPV with the licensed DTaP final bulk. Syringes were used as single-dose containers of the final product. In addition to Formulation H, a DTaP-sIPV containing the same amount as the sIPV (type 1 : type 2 : type 3 = 3 DU : 100 DU : 100 DU), Formulations M and L, containing half and one-fourth of the amount in the sIPV, respectively, were prepared to determine the optimum dose of sIPV in DTaP-sIPV in the Phase II study. These formulations differed only in the amount of sIPV. In the Phase III study, the DTaP vaccine (manufactured by Kaketsuken), the OPV vaccine (Japan Poliomyelitis Research Institute), and an OPV placebo (Japan Poliomyelitis Research Institute), excluding the active ingredient (Sabin viruses) from the OPV vaccine, were used as control drugs. The DTaP vaccine contained 4 U (pertussis protective unit) or more of *Bordetella pertussis* protective antigen, 16.7 limit of flocculation (Lf) or less of diphtheria toxoid, and 6.7 Lf or less of tetanus toxoid per dose. The OPV contained 6.0, 5.0, and 5.5 log<sub>10</sub> 50% cell culture infectious doses for Sabin types 1, 2, and 3, respectively.

### Study Design

#### Phase II Study

The immunogenicity and safety of Formulations H, M, and L were evaluated in 104 healthy infants (age range, 3–89 months) who were recruited between 12 May and 20 June 2009. This was a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group study. After informed consent was obtained from parents, eligible participants were randomly assigned to 3 groups (Group H, Group M, and Group L), which received Formulation H, M, or L, respectively. Formulation H, M, or L was subcutaneously administered at a dose of 0.5 mL four times as follows: a series of 3 doses given at intervals of 3–8 weeks for primary immunization, and 1 dose for booster immunization 6–18 months after the third vaccination.

#### Phase III Study

The immunogenicity and safety of DTaP-sIPV (Formulation M) was evaluated in 342 healthy infants (age range, 3–89 months) who were recruited between 9 March and 30 June 2010, using DTaP plus OPV as a control. This was a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group study. After informed consent was obtained, eligible participants were randomly assigned to 2 groups, Group M and the Control group, which received either Formulation M and OPV placebo, or DTaP and OPV, respectively. Formulation M or DTaP was

subcutaneously administered at a dose of 0.5 mL four times as follows: a series of 3 doses given at intervals of 3–8 weeks for primary immunization, and 1 dose for booster immunization 6–18 months after the third vaccination. OPV placebo or OPV at a dose of 0.05 mL was orally administered twice at an interval of at least 6 weeks during the period from completion of blood collection for primary immunization with Formulation M or DTaP to 35 days before booster immunization.

In the Phase II and Phase III studies, blood was collected before immunization, 4–6 weeks after primary immunization, before booster immunization, and 4–6 weeks after booster immunization to determine the antibody titers against attenuated poliovirus strains (Sabin 1, 2, and 3 strains), PT, FHA, diphtheria toxin, and tetanus toxin. The neutralizing antibody titers against virulent poliovirus strains were determined only in the Phase II study. Participants were monitored for safety by means of a health diary for 27 days after immunization. Those who received OPV placebo or OPV in the Phase III study were monitored for safety by means of a health diary for 34 days after immunization. For severity classification, the criteria were defined in Grades 1 to 4, with Grade 4 being the most severe grade. These clinical studies were conducted in accordance with the ethical principles that have their origin in the Declaration of Helsinki, Good Clinical Practice, and relevant regulatory laws.

### Serological Methods

The neutralizing antibody titers against polioviruses were determined by neutralization test [17]. Challenge viruses were Sabin strains (types 1, 2, and 3) and virulent poliovirus strains (type 1: Mahoney strain; type 2: MEF-1 strain; type 3: Saukett strain). The protective level of neutralizing antibody titer against Sabin strains and virulent poliovirus strains was thought to be 1:8 or more [18]. The antibody titers against PT and FHA were determined using a Wako reagent kit for anti-*Bordetella pertussis* antibody titers. The protective level of antibody titers against both PT and FHA was 10 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) units (EU)/mL [19]. The neutralizing antibody titer against diphtheria toxin was determined by neutralization test using Vero cells as indicator cells. The protective level of antibody titer against diphtheria toxin was 0.1 international units (IU)/mL [20]. The antibody titer against tetanus toxin was determined using a KPA kit (manufactured by Kaketsuken). In this system, the tetanus antibody titer is measured based on indirect agglutination using sensitized particles (artificial synthetic particles bound to tetanus toxoid). The protective level of antibody titer against tetanus toxin was 0.01 IU/mL [21].

### Statistics

#### Phase II Study

For each group, the seropositive rate, the geometric mean antibody titer (GMT), and their 2-sided 95% confidence intervals (CIs) after primary and booster immunizations were calculated

for all active components. In terms of sample size, from the results of an immunogenicity examination of the primary immunization conducted in the previous clinical trial, as well as immunogenicity tests in *Macaca fascicularis*, it was thought possible to confirm the dose response ( $\alpha = .025$  [1-tailed test];  $\beta = .20$ , power of 0.80, contrast method) with 20 participants or less per group. However, considering the inevitable attrition of study participants, we required 30 participants per group.

#### Phase III Study

The primary endpoint in this study was the seropositive rates of Group M, which were to be higher than 90% for Sabin types 1, 2, and 3 after primary immunization. The secondary endpoint was that the seropositive rates for all components of DTaP after primary immunization in Group M were not to be inferior to those in the Control group. To verify that the seropositive rates ( $p_1$ ) for neutralizing antibodies against Sabin types 1, 2, and 3 in Group M were higher than the statistical tolerance limit ( $p_0$ ) (90%) for the analysis of the primary endpoint, the following were tested by 1-sample binomial test with a 1-sided significance level of 2.5%: the null hypothesis that the respective seropositive rates ( $p_1$ ) were equal to or lower than the statistical tolerance limit ( $p_0$ ) ( $H_0: p_0 \geq p_1$ ); and an alternative hypothesis that the respective seropositive rates ( $p_1$ ) were higher than the statistical tolerance limit ( $p_0$ ) ( $H_1: p_0 < p_1$ ). To verify that the seropositive rate against PT, FHA, diphtheria toxin, or tetanus toxin in Group M was not inferior to the Control group by more than 10% for the analysis of the secondary endpoint (clinically acceptable maximum difference [ $s_0$ ]), a 1-sided Farrington–Manning test was used with a significance level of 2.5%. The full-analysis set (FAS) was used to represent the immunogenicity population for the primary endpoint, because this analysis was intended to verify the superiority. The per-protocol set (PPS) was used to represent the immunogenicity population for the secondary endpoint, because this analysis was intended to verify the noninferiority. In terms of sample size, an accurate sample size of 180 participants in Group M was needed to verify that the seropositive rates ( $p_1$ ) for neutralizing antibodies against Sabin types 1, 2, and 3 of the primary endpoint were higher than the statistical tolerance limit ( $p_0$ ) (90%), ( $\alpha = .025$  [1-tailed test];  $\beta = 0.115$ , power of 0.96<sup>3</sup>, expectation value = 97%). Because of an inevitable attrition of study participants, we required 210 patients in Group M. Eligible participants were randomly assigned in a 2:1 ratio to Group M and the Control group, respectively. Even for calculations regarding the secondary endpoint, the number of participants was sufficient.

## RESULTS

#### Phase II Clinical Study

All 104 participants were included in the safety population, and 102 participants (Group H: 32; Group M: 38; Group L: 32) who

received the booster immunization were included in the FAS immunogenicity population (2 participants did not receive the booster immunization: 1 in Group H who withdrew consent, and 1 in Group L who moved elsewhere).

The seropositive rate was 100% for all poliovirus strains in all groups, except for virulent type 1 after primary immunization. There was no clear dose response effect among the Sabin strain groups. After primary immunization, the seropositive rates against the virulent type 1 in Groups H, M, and L were 90.9% (30/33 participants), 97.4% (37/38), and 97.0% (32/33), respectively. However, after the booster immunization, the seropositive rate was 100% for all virulent types as well as for all Sabin strains in all groups. The GMTs ( $\log_2$ ) against polioviruses after primary and booster immunizations are shown in Table 1. After primary and booster immunizations, no clear dose response was observed in the neutralizing antibody titers.

As for adverse reactions, the incidence of erythema at the injection site was 87.9% (29/33; 95% CI, 71.8–96.6), 73.7% (28/38; 95% CI, 56.9–86.6), and 72.7% (24/33; 95% CI, 54.5–86.7) in Groups H, M, and L, respectively. The incidence of pyrexia was 63.6% (21/33; 95% CI, 45.1–79.6), 47.4% (18/38; 95% CI, 31.0–64.2), and 48.5% (16/33; 95% CI, 30.8–66.5) in Groups H, M, and L, respectively. The incidence of adverse reactions was higher in Group H compared with Groups M and L; however, there were no statistically significant differences among the 3 groups. Considering the GMT (Table 1) and adverse reactions, we selected Formulation M containing type 1 : type 2 : type 3 = 1.5 DU : 50 DU : 50 DU of sIPV in the DTaP-sIPV as the optimum dose.

### Phase III Clinical Study

In this study, the immunogenicity and safety of Formulation M, selected as the optimum dose in the previous Phase II study, were evaluated. Of 342 participants enrolled in the study, 221 and 121 participants were randomly assigned to Group M and the Control group, respectively (Figure 1). A total of 337 participants completed this study. All participants were included in the safety population. One participant in the Control group withdrew from this study after the first immunization because of relocation, with no postimmunization. Therefore, this participant was excluded from the FAS immunogenicity population. There were 336 participants in the PPS immunogenicity population, after the exclusion of protocol deviations. The baseline attributes of participants are shown in Table 2. In both groups, the preimmunization seropositive rate was high for tetanus and low for poliovirus type 3. No statistically significant differences were observed in the baseline factors between the 2 groups.

### Immunogenicity

#### Primary Immunization

The seropositive rates and GMTs after primary immunization are shown in Table 3. The seropositive rate was 100.0% for Sabin types 1, 2, and 3 after primary immunization. The null hypothesis (seropositive rate  $\leq 90\%$ ) was rejected by binomial test ( $P < .001$ ), verifying that the seropositive rates of Group M were higher than 90% for Sabin types 1, 2, and 3 after primary immunization, which met the primary endpoint.

In addition, results of the Farrington–Manning test verified that Group M was not inferior to the Control group in terms of

**Table 1. Poliovirus Type-Specific Neutralizing Antibody Geometric Mean Titers After Primary and Booster Immunization in Phase II Study**

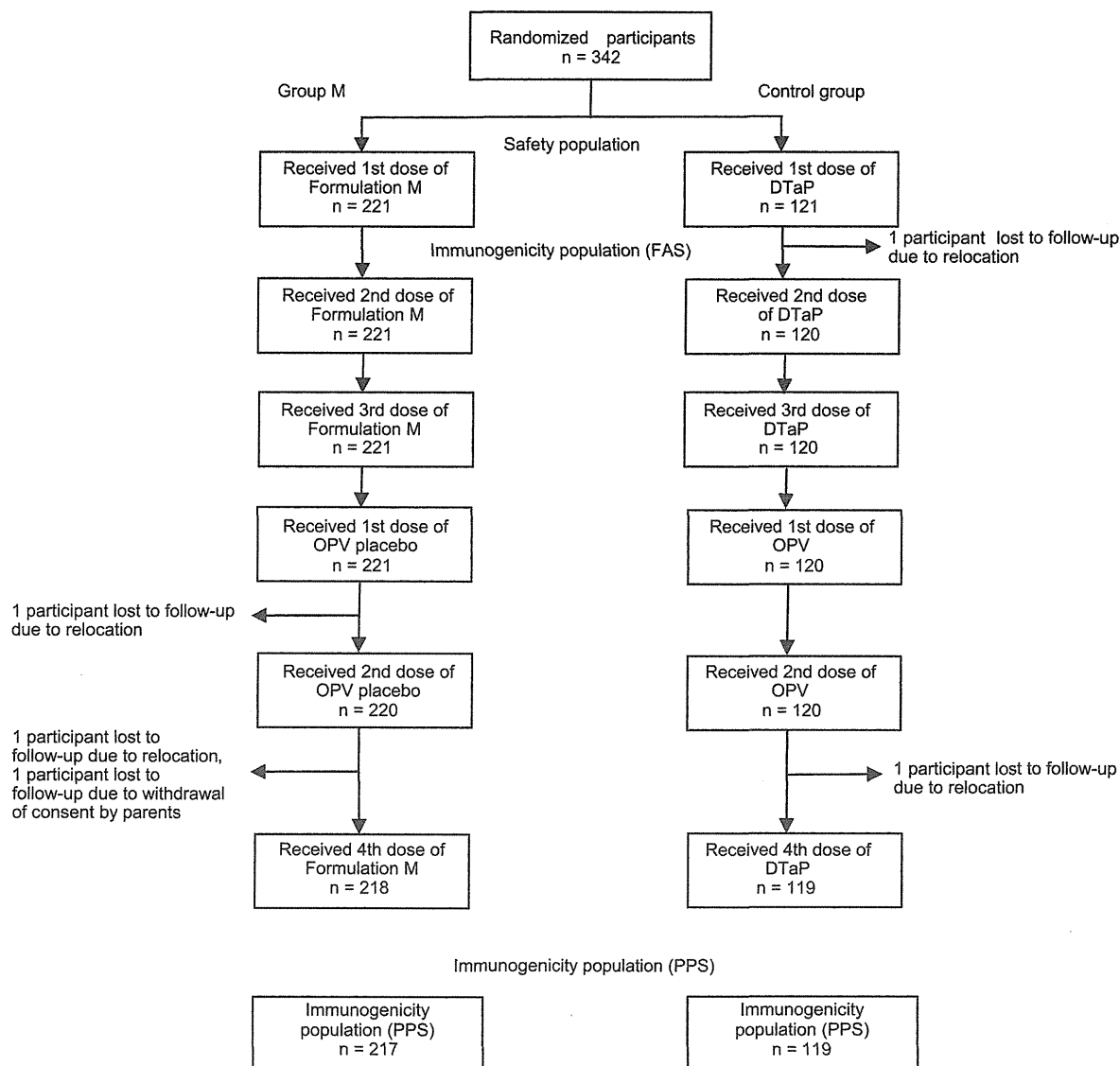
Time Point	Poliovirus		GMT <sup>a</sup> (95% CI)		
			Group H (n = 33) <sup>b</sup>	Group M (n = 38) <sup>b</sup>	Group L (n = 33) <sup>b</sup>
Primary immunization	Sabin strain	Type 1	9.94 (9.25–10.62)	10.26 (9.73–10.80)	10.55 (9.89–11.20)
		Type 2	10.33 (9.88–10.79)	9.79 (9.35–10.22)	9.71 (9.20–10.23)
		Type 3	9.97 (9.47–10.47)	9.93 (9.46–10.41)	9.14 (8.50–9.78)
	Virulent strain	Type 1	5.71 (4.97–6.45)	5.93 (5.50–6.37)	5.94 (5.29–6.58)
		Type 2	9.77 (9.23–10.31)	9.16 (8.68–9.63)	9.11 (8.48–9.73)
		Type 3	9.82 (9.37–10.27)	9.54 (9.07–10.01)	8.92 (8.33–9.52)
Booster immunization	Sabin strain	Type 1	12.05 (11.42–12.68)	12.50 (11.89–13.11)	12.39 (11.77–13.01)
		Type 2	13.64 (13.14–14.14)	13.79 (13.27–14.31)	12.56 (11.93–13.20)
		Type 3	12.55 (12.00–13.10)	12.75 (12.26–13.24)	11.64 (10.97–12.31)
	Virulent strain	Type 1	8.66 (8.07–9.25)	8.33 (7.70–8.96)	8.09 (7.34–8.85)
		Type 2	13.56 (12.99–14.14)	13.46 (12.86–14.06)	12.36 (11.61–13.11)
		Type 3	12.41 (11.75–13.06)	12.50 (12.02–12.98)	11.42 (10.78–12.06)

Group H received Formulation H, Group M received Formulation M, and Group L received Formulation L. Primary immunization consisted of 3 immunizations; booster immunization was the fourth immunization. Seropositive is  $\geq 1:8(2^3)$ .

Abbreviations: CI, confidence interval; GMT, geometric mean titer.

<sup>a</sup>  $\log_2$ .

<sup>b</sup> Immunogenicity population for primary immunization: 33 participants in Group H, 38 participants in Group M, 33 participants in Group L. Immunogenicity population for booster immunization: 32 participants in Group H, 38 participants in Group M, 32 participants in Group L.



**Figure 1.** Flow of Phase III study. Abbreviations: DTaP, diphtheria-tetanus-acellular pertussis; FAS, full-analysis set; OPV, oral polio vaccine; PPS, per-protocol set.

the seropositive rate for any component of DTaP, which met the secondary endpoint. The GMTs against each component of DTaP were almost similar between Group M and the Control group, showing that the addition of sIPV did not affect the immunogenicity of DTaP in Formulation M.

### Booster Immunization

The seropositive rates and GMTs after booster immunization are shown in Table 4. In Group M, the seropositive rate was 100.0% for all neutralizing antibodies against Sabin types 1, 2, and 3 after booster immunization. After booster immunization, the GMTs ( $\log_2$ ) against Sabin types 1, 2, and 3 were higher in Group M than in the Control group, and they were almost similar among these 3 types in Group M, whereas the GMT

against Sabin type 3 tended to be lower in the control OPV group.

The seropositive rate was 100.0% for all components of DTaP in both groups. In addition, the GMTs against each component of DTaP further increased after primary immunization. The GMTs against each component of DTaP were almost the same in Group M and the Control group, showing that the addition of sIPV did not affect the immunogenicity of DTaP in Formulation M.

### Safety

Adverse reactions with an incidence of  $\geq 5\%$  in this study are listed in Table 5. The most common adverse reaction was