

厚生科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

新型インフルエンザワクチンの
開発・製造・品質管理に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田代真人

平成13年(2001)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

新型インフルエンザワクチンの開発・製造・品質管理に関する研究

主任研究者 田代 真人 1 頁

II. 分担研究報告書

1. 遺伝子組み換えワクチンの安全性・力価試験法の開発

田代 真人 4 頁

2. リバースジェネティクスを応用した生ワクチンの開発

河岡 義裕 9 頁

3. 噴霧型不活化インフルエンザHAワクチンの開発

堺 春美 1 2 頁

4. 介護老人保健施設におけるインフルエンザ対策に関する研究

堺 春美 2 3 頁

5. インフルエンザウイルスの分子系統解析の自動化システムの開発

五條堀 孝 4 4 頁

6. インフルエンザウイルス合併症（脳炎・脳症）の研究

豊田 哲也 4 6 頁

7. SRID法によるワクチン力価測定法の開発に関する研究

小田切 孝人 5 1 頁

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

6 4 頁

IV. 研究成果の刊行物・別刷

新型インフルエンザワクチンの開発・製造・品質管理に関する研究

平成12年度 研究組織

主任研究者

田代 真人 国立感染症研究所 ウイルス製剤部 部長

分担研究者

河岡 義裕 東京大学医科学研究所 教授

堺 春美 東海大学医学部 助教授

五條堀 孝 国立遺伝学研究所 教授

豊田 哲也 久留米大学医学部 教授

小田切 孝人 国立感染症研究所 室長

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

新型インフルエンザワクチンの開発・製造・品質管理に関する研究

主任研究者 田代 真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部長

研究要旨 新型インフルエンザに対する健康危機管理の面からの対応としては、ワクチン接種体制の確立が中心となる。その為にはサーベイランスの成績に基づいた流行ウイルスの的確な予測と、これに対応したワクチン開発、及び緊急時のワクチン生産、供給、品質管理を如何に効率よく短時間で行うかという準備体制を確立しておく必要がある。これらの問題解決を目的として研究を進めた結果、1) 新たな分離ウイルス株の遺伝子配列を与えると、直ちにマルチプルアラインメントの作成から分子系統樹の作成までを自動的に行うシステムを構築し、流行予測の可能性を開いた。2) 新型インフルエンザに対するワクチンを速やかに製造するために、任意の改変遺伝子を持つウイルスを作製できる遺伝子操作技術を開発した。これを応用して増殖性を欠如した半生ワクチンの開発を行った。3) ワクチンの品質管理として、現行の卵内中和法に変えて、国際的な一次元放射免疫拡散法（SRID）による迅速なワクチン力価測定法を確立した。4) インフルエンザにおける脳炎・脳症等の合併症例について、宿主側要因を検討した。5) 現行HAワクチンを軽鼻接種することにより局所粘膜免疫を付与する新しいワクチン投与方法を開発した。6) 1997年にホンコンで流行したトリ強毒株から、遺伝子操作技術により弱毒化したH5N1型インフルエンザウイルス株を用いて作製したHAワクチンについて、前臨床試験と臨床第1相試験を計画して実施した。

分担研究者

河岡 義裕 東京大学医科学研究所教授
五條堀 孝 国立遺伝学研究所教授
堺 春美 東海大学医療技術短期大学教授
豊田 哲也 久留米大学医学部教授
小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第1部
呼吸器系ウイルス室長

A. 研究目的

近く予想される新型インフルエンザの出現の際には、未曾有の健康被害と社会的混乱が危惧される。健康危機管理対策の対象として、新型インフルエンザを含むインフルエンザ対策の中心は、ワクチン接種体制の確立である。その為には、流行ウイルスの的確な予測と、これに対応した有効且つ安全なワクチンの開発、及び緊急時におけるワクチン生産、供給、品質管理を如何に効率よく短時間で行うかという準備体制を確立しておく必要がある。これらの問題解決を目的として本研究を行った。

B. 研究方法

- 1) 過去の分離ウイルスの遺伝子解析成績を基にデータベースを作製した。これに新たな分離株の遺伝子配列を与えると、直ちにマルチプルアラインメントの作成から分子系統樹の作成までを自動的に行うシステムを設計した。
- 2) 新型インフルエンザに対するワクチンを速やかに製造するために、任意の改変遺伝子を持つウイルスを作製できる遺伝子操作技術を開発した。これを応用して増殖性を欠如した半生ワクチンの開発を行った。
- 3) ワクチンの品質管理として、現行の卵内中和法に変えて、国際的な一次元放射免疫拡散法（SRID）による迅速なワクチン力価測定法を検討した。
- 4) インフルエンザにおける脳炎・脳症等の合併症例について、宿主側要因を検討した。
- 5) 現行HAワクチンを軽鼻接種することにより局所粘膜免疫を付与する新しいワクチン投与方法を開発した。
- 6) 1997年にホンコンで流行したトリ強毒株が

ら、遺伝子操作技術により弱毒化したH5N1型インフルエンザウイルス株（9-1-1株）を用いて作製したHAワクチンについて、前臨床試験と臨床第1相試験を計画して実施した。

C. 結果と考察

(1) 新たな分離ウイルス株の遺伝子配列を与えると、直ちにマルチプルアラインメントの作成から分子系統樹の作成までを自動的に行うシステムの構築を行った。更にこれを改良して公開する予定である。その結果、専門家でなくても直ちに分離ウイルスの進化上の位置づけが分かり、流行ウイルスの予測に貢献することが期待される。

(2) 任意の改変遺伝子を持つウイルスを作製できる遺伝子操作技術の開発に成功した。これによって、今後どのような新型インフルエンザが出現しても、速やかに安全で有効性の高いワクチン製造株を開発できる可能性が示された。これを応用した半生ワクチンを開発し、その安全性と有効性を動物実験で確かめた。これは次世代のワクチンとして期待できる

(3) 現行の卵内中和法に変えて、国際的な一次元放射免疫拡散法（SRID）による迅速なワクチン力価測定法を確立し、既に生物学的製剤基準の変更など、国家検定を含むワクチンの品質管理にも使用を開始した。これによって、従来一ヶ月以上を要した力価試験が数日で終了出来ることになり、緊急時のワクチン迅速供給に貢献することとなる。

(4) インフルエンザ脳症とHLA60との関連性が示唆された。今後リスク群の予知と予防・治療方法の確立に向けた前進である。

(5) 現行HAワクチンを軽鼻接種することにより局所粘膜免疫を付与する新しいワクチン投与方法を開発した。今後のワクチン政策に具体的に反映されることが期待される。

(6) 弱毒化H5N1型インフルエンザウイルス株を用いて作製したHAワクチンは、動物を用いた前臨床試験において安全性と有効性が確認された。さらに第1相臨床試験でもヒトにおける安全性に問題がないことが示された。しかし、ヒトにおいては抗体の有意な上昇が認められなかったことから、現行のHAワクチン製剤には免疫記憶を賦与する能力が劣っており、新型インフルエンザに対するワクチンとしては、不適當である可能性が示された。新型インフルエンザに備えたワクチン開発のためには、今後緊急に、全粒子ワクチン製剤およびアジュバントワクチンの開発を検討し、これらについて、安全性と有効性を検証する必要がある。

D. 結論

新型インフルエンザに対する健康危機管理の面からの対応としては、ワクチン接種体制の確立が中心となる。その為にはサーベイランスの成績に基づいた流行ウイルスの的確な予測と、これに対応したワクチン開発、及び緊急時のワクチン生産、供給、品質管理を如何に効率よく短時間で行うかという準備体制を確立しておく必要がある。本研究の成果は、これら問題解決の為の基礎研究を行い、より有効で安全なワクチンを効率よく生産するための方法を開発して、新しいインフルエンザワクチン政策の構築に資するものである。また、新型インフルエンザに備えたワクチン開発のためには、今後緊急に、全粒子ワクチン製剤およびアジュバントワクチンの開発を検討し、これらについて、安全性と有効性を検証する必要がある。

E. 健康危険情報

弱毒化H5N1型インフルエンザウイルス株（9-1-1）を用いて作製したHAワクチンは、動物を用いた前臨床試験において安全性と有効性が確認され、第1相臨床試験でもヒトにおける安全性に問題がないことが示された。しかし、ヒトにおいては抗体の有意な上昇が認められなかったことから、現行のHAワクチン製剤には免疫記憶を賦与する能力が劣っており、新型インフルエンザに対するワクチンとしては、不適當である可能性が示された。新型インフルエンザに備えたワクチン開発のためには、今後緊急に、全粒子ワクチン製剤およびアジュバントワクチンの開発を検討し、これらについて、安全性と有効性を検証する必要がある。

F. 研究発表

1. Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., Tashiro, M. Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and Ver cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes* 20: 253-257 2000
2. Okada, H., Kobune, F., Sato, T. A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tsuchiya, T., Tashiro, M. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients *Arch. Virol.* 145: 905-920 2000
3. 森島恒雄、富樫武弘、横田俊平、奥野良信、宮崎千明、田代真人、岡部信彦、葛西 健

- インフルエンザに合併する脳炎・脳症に関する全国調査 日本医事新報 3953:26-28 2000
4. Takeda, M., Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., Ami, Y., Nagata, N., Suzuki, Y., Nagai, Y., Tashiro, M. Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *Arch. Virol.* 74: 6643-6647 2000
5. Hasan, M. K., Kato, A., Muranaka, M., Yamaguchi, R., Sakai, Y., Hatano, I., Tashiro, M., Nagai, Y. Versability of the accessory C protein of Sendai virus: contribution to virus assembly as an additional role. *J. Virol.* 74: 5619-5628 2000
6. Nishimura, H., Itamura, S., Iwasaki, T., Kurata, T., Tashiro, M. Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. *J. Gen. Virol.* 81: 2503-2519 2000
7. Yamamoto, A., Nakayama, M., Tashiro, M., Ogawa, T., Kurane, I. Hydroxyapatite-coated nylon beads as a new reagent to develop a particle agglutination assay for detecting Japanese encephalitis virus-specific antibodies. *J. Clin. Virol.* 19: 195-204 2000
8. Reickert, T., Sugaya, N., Fedson, D., Glezen, W., Simonen, L., Tashiro, M. Experience in Japan of the vaccination of schoolchildren against influenza. *New Engl. J. Med.* 2001
9. Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Horimoto, T., Sawada, T., Tashiro, M., Yamaguchi, K., Niwa, S., Shigeta, S. Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *J. Infect. Dis.* 39: 2001
10. Kato, A., Ohnishi, Y., Kohase, M., Saito, S., Tashiro, M., Nagai, Y. The smallest Y2 of Sendai virus C proteins is fully capable of both counteracting the anti-viral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis. *J. Virol.* 76: 2001
11. Umino, Y., Tashiro, M. Inhibition of rubella virus growth by Fungizone. *Vaccine* 19: 1369-1372 2001
12. Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., Tashiro, M. Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch. Virol.* 2001

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

遺伝子組み換えワクチンの安全性・力価試験法の開発

主任研究者 田代 真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部長

研究要旨 A型インフルエンザは数10年周期で新型ウイルスが出現して大流行を起こし、大きな健康被害と社会的混乱・損失をもたらす。新型インフルエンザ対策の要はワクチンの緊急開発・増産・供給・接種体制の確立である。1997年に香港でトリ強毒型のH5インフルエンザウイルスがヒトに感染し、18名の患者中6名が死亡するという事態が発生した。そこで、WHOに協力してワクチンの開発が進められ、国立感染症研において遺伝子組み換え技術を駆使したウイルスの弱毒化に成功した。この遺伝子組み換えワクチン候補株（9-1-1）を用いて試験ワクチンを製造し、平成10年度は動物を用いた前臨床試験において安全性が確認された。そこで、ヒトにおける安全性と免疫原性を確かめるために、第1相臨床試験のデザインを検討し実施した。またトリ由来のワクチン製造株の開発方法および免疫原性の評価方法を検討した。

第1相臨床試験の結果、ヒトにおける安全性も問題がないことが示唆された。しかし、血清抗体の有意な上昇が認められなかったことから、現行のHAワクチン製剤は、新型インフルエンザに対するワクチンとしては、不相当である可能性がある。従って十分な、免疫記憶を賦与するためには、全粒子ワクチン製剤が必要であると考えられる。そこで今後緊急に、全粒子ワクチン製剤について、安全性と有効性を検証する必要がある。

研究協力者

小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第一部
呼吸器系ウイルス室長
板村 繁之 国立感染症研究所ウイルス第一部
呼吸器系ウイルス室主任研究官
西藤 岳彦 国立感染症研究所ウイルス第一部
呼吸器系ウイルス室主任研究官
榎並 正芳 金沢大学医学部第一生化学講座
助教授
喜田 宏 北海道大学大学院獣医研究科教授

ば、甚大な被害をもたらす汎流行となる可能性がある。そのため、世界保健機構（WHO）ではワクチン株の開発を勧告した。それを受けて、国立感染症研究所では新型インフルエンザワクチン製造に向けたワクチン製造株の開発研究に着手した。

しかし、トリ強毒型ウイルスを直接にワクチン製造株に用いた場合には、製造従事者が感染して健康被害が生じ、外部へ漏出・汚染が起これば世界的な大流行へ広がる危険性があり、またウイルスの増殖に用いる発育鶏卵が早期に死亡するためにワクチン製造効率が極端に悪い等の点が問題となる。そこで第一に、ウイルスの弱毒化が課題となった。国立感染症研究所において遺伝子組換えによるウイルスの弱毒化が世界で初めて成功し、安全性の高いワクチン製造候補株が作製された。更に、このワクチン製造株の弱毒性、安全性および免疫原性を確認した後に、生物学的製剤基準および一般医薬品及び生物学的製剤GMPの基準に合致した製造方法に準じて、不活化HAワクチンの試験製造を行った。前臨床試験を

A. 研究目的

A型インフルエンザは数10年周期で新（亜）型ウイルスが出現して地球レベルでの大流行を起こし、大きな健康被害と社会的損失をもたらす。1997年に香港でトリ強毒型のH5インフルエンザウイルスがヒトに感染し、18名の患者中6名が死亡するという事態が発生した。このような新型インフルエンザウイルスがヒトからヒトへの伝播性を獲得すれ

行った結果、動物における安全性が確認されたので、健康成人男性志願者を対象とした臨床第1相試験を計画して実施した。

本試験の目的は、本試験ワクチンを現行の接種方法に基づいて健康成人に接種した場合の、健康面での安全性とH5N1型インフルエンザウイルスに対する免疫反応を検証することにある。

B. 研究方法

1. 遺伝子操作技術により弱毒化したH5N1型インフルエンザウイルス株（9-1-1株）から、現行の製造方法に準じてGMP基準ならびに生物学的製剤基準を満たす試験ワクチンを製造して用いた
2. 動物を用いた前臨床試験はすべてGLPに従って、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（厚生省令第21号、1977）に沿って実施した。

1) ラットを用いる単回投与毒性試験： H5N1型インフルエンザHAワクチンをDrj:CD(SD)IGSラットに1回皮下投与した時の毒性を検討した。

2) ラットを用いる4週間反復投与毒性試験： ワクチンをDrj:CD(SD)IGSラットに4週間反復皮下投与した時の毒性を検討した。

3) ラット及びウサギを用いる生殖発生毒性試験： ワクチンを妊娠ラットの着床から硬口蓋の閉鎖までの期間に皮下投与し、母動物および胎児の発生に及ぼす影響を検討した。投与用量は臨床量の100倍である1.0ml/kgおよび臨床量にあたる0.01ml/kgとした。

4) ウサギを用いる局所刺激性試験： 日本白色種の雌性ウサギ12匹を用いて、H5N1型インフルエンザHAワクチンの筋肉内投与による局所刺激試験を行った。ワクチンをウサギの後肢大腿部外側広筋に投与し、投与後2日および7日に筋肉の障害の程度を観察した。また陽性対照物として0.425%および1.7%酢酸を、陰性対照物として生理食塩液を用いた。

5) 変異原性試験

(1) 細菌を用いる復帰突然変異試験： H5N1型インフルエンザHAワクチンについて、5菌株を指標とする復帰変異試験を実施した。

(2) 染色体異常試験： H5N1型インフルエンザHAワクチンの染色体異常誘発性を検討するために、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

(3) マウスを用いる小核試験： ICR系雄性マ

ウス（Crj:CD-1, 8週齢）を用いてH5N1型インフルエンザHAワクチンの骨髓細胞に対する小核試験を行った。被験物質の臨床量の100倍である1.0ml/kgを高用量とし、以下公比2で0.5および0.25mg/kgの2用量を設定した。被験物質を24時間間隔で2回皮下投与し、最終投与後24時間に骨髓塗抹標本作製し、小核をもつ多染色赤血球の出現数を検索した。

(4) ラットを用いる肝・不定期DNA合成(UDS)試験： 染色体異常試験の一部に陽性の成績が出たので、その成績がDNAの損傷に基づく染色体異常を反映しているのか否かの確認と、更にDNA損傷性の確認のために、ラットを用いる肝・不定期DNA合成(UDS)試験を行った。ワクチンのDNA損傷性(イニシエーター活性)の有無を調べるために、8週齢(F344/DCrj, SPF)の雄性ラットにH5N1型インフルエンザHAワクチンを投与し、定法に従って肝細胞を分離後、オートラジオグラフィ法により不定期DNA合成(UDS)試験を実施した。

3. 第1相臨床試験は、GCP基準に準じて、健康成人男子の被験者10名、対照者5名に対して、試験ワクチンまたは対照薬(生理食塩水)0.5mlを3週間間隔で2回皮下接種し、経時的に臨床上への影響、臨床検査所見および血清抗体価(HI抗体および中和抗体)を測定し、安全性および有効性を検討した。

C. 結果

1. 前臨床試験における新型H5N1インフルエンザHAワクチンの毒性試験

(1) ラットを用いる単回投与毒性試験

1.0ml/kgの用量を投与されたラットには、一般状態の変化は認められなかった。体重は対照群と同様に増加し、14日間の観察期間終了時の剖検結果に異常は認められなかった。以上より、H5N1インフルエンザHAワクチンの単回投与毒性は低い(陰性)と判断された。

(2) ラットを用いる4週間反復投与毒性試験

1.0ml/kgの用量を投与されたラットには、接種局所の発赤、硬結以外には一般状態の変化は認められなかった。皮膚局所の変化は生理食塩液を投与した対照群においても同様の変化が生じたことから、非特異的反応であると判断される。体重は対照群と同様に増加し、血液学的検査および生化学的検査においても28日間の観察期間に有意の変化は生じなかった。また観察期間終了時の剖検観察では、

1. 0 ml/kgの用量を投与されたラットでは脾臓の重量増加が認められたが、これはワクチン投与に反応した免疫担当細胞の増殖によるものと考えられる。その他の臓器における肉眼的観察および病理組織学的検査においては、異常は認められなかった。

以上より、H5N1インフルエンザHAワクチンの4週間反復投与毒性は低い（陰性）と判断された。

(3) ラット及びウサギを用いる生殖発生毒性試験

母動物への影響として、H5N1型インフルエンザHAワクチンの0.01および1.0 ml/kgを投与された群のラットには、一般状態の変化は認められなかった。また、体重および接種量とも対照群と同様に推移し変化は認められなかった。剖検では投与部位（皮下）の出血が1.0 ml/kg群でみられたが、反復投与試験でも認められており、同質の刺激性変化と考えられた。

胚・胎児への影響については、HAワクチンの0.01および1.0 ml/kgを投与された群で、黄体数、着床数、死亡胚数、胚死亡率、生存胎児数、性比および生存胎児体重のいずれにも変化は認められず、対照群と同様な数値を示した。外表、内臓および骨格検査において認められた種々の変化は、いずれも自然発生的に認められる所見であり、対照群と比べて有意な増加を示す所見は認められなかったことから、H5N1型インフルエンザHAワクチン投与に起因した変化ではないと判断した。また、骨化進行については、いずれの指標にも順調な骨化が認められた。従って本試験条件下においては、H5N1型インフルエンザHAワクチン投与による胚・胎児への致死作用、発育抑制および催奇形性作用は無いと判断された。

(4) ウサギを用いる局所刺激性試験

被験物質投与部位では、肉眼的観察において軽度の変化（充血）が認められた。また、肉眼的観察後に行った病理組織学的検査においても、筋繊維の壊死、出血および炎症性細胞浸潤が認められたが、どの変化も軽度のものであった。これらの変化は生理食塩液投与部位においても同様に認められ、変化の程度も同等なものであった。一方、0.425%酢酸、0.17%酢酸の各投与部位では、肉眼的観察および病理組織学的検査ともに中程度から重度の変化が認められ変化の程度は被験物質投与部位と比べて明らかに強いものであった。肉眼的観察および病理組織学的検査の結果から、H5N1型インフルエンザHAワクチンの筋肉への局所障害性に対する総合判定は“グレード1”に分類された。

以上の結果から、本試験条件下でH5N1型イン

フルエンザHAワクチンの筋肉組織に対する障害性は生理食塩液と同等（陰性）であると結論した。

(5) 変異原性試験

1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

7用量で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix非存在下の全ての菌株で抗菌性が認められた。本試験の結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、H5N1型インフルエンザHAワクチンは、細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を示さない（陰性）と結論した。

2) 染色体異常試験

連続処理法24時間処理の染色体構造異常細胞誘発が擬陽性の範囲で認められ、再現性および用量依存性が認められた。また、48時間処理の染色体数的異常細胞誘発は10%異常となり、再現性および用量依存性が認められた。これらの結果から、連続処理法における染色体異常誘発性は陽性と判定した。一方、短時間処理法の染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は5%未満であった。

従って、H5N1型インフルエンザHAワクチンは、本試験条件下においてCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性を有する（陽性）と結論した。しかしながら、本結果をもって、この被験物質が変異原性を持つと判断することは困難である。更にEN A損傷性を指標とする不定期DNA合成（UDS）試験、プロモーター活性検出試験の実施等によって、総合的に判断することが必要であると考えられた。

3) マウスを用いる小核試験

被験物質の臨床量の100倍である1.0 ml/kgを高用量とし、以下公比2で0.5および0.25 mg/kgの2用量を設定した。被験物質を24時間間隔で2回皮下投与し、最終投与後24時間に骨髓塗抹標本を作製し、小核をもつ多染色赤血球の出現数を検索した。その結果、小核を持つ多染色赤血球の有意な増加は認められず、本試験条件下におけるH5N1型インフルエンザHAワクチンの小核誘発性は陰性と結論された。

4) ラットを用いる肝・不定期DNA合成（UDS）試験

H5N1型インフルエンザHAワクチンのDNA損傷性（イニシエーター活性）の有無を調べるために、8週齢（F344/DCrj、SPF）の雄性

ラットにH5N1型インフルエンザHAワクチンを投与し、定法に従って肝細胞を分離後、オートラジオグラフィ法により不定期DNA合成(UDS)試験を実施した。

UDS試験は、0.2および1.0ml/kgの2用量を設定し、単回皮下投与2時間および16時間後の肝細胞におけるUDS誘発作用の有無を調べた。その結果、すべての被験物質投与群においてUDSの誘発は認められなかった。以上の結果から、本実験条件下ではH5N1型インフルエンザHAワクチンは、肝発がんイニシエーター活性を有しないものと判断した。このことから、上記の染色体異常試験の陽性結果は、DNA損傷性を反映したものと考えられず、非特異的なものであり、ヒトに投与した場合にも変異原性をしめして特に問題となることはない判断された。

以上、前臨床試験において安全性が確認された

2. 第1相臨床試験

GCP基準に準じて、健康成人男子の被験者10名、対照者5名に対して、試験ワクチンまたは対照薬(生理食塩水)0.5mlを3週間間隔で2回皮下接種し、経時的に臨床所見への影響、臨床検査所見および血清抗体価を測定し、安全性および有効性を検討した。

1) 試験ワクチン接種者および対照薬接種者のいずれにおいても、異常反応、異常臨床所見、異常臨床検査所見は認められなかった。このことから、第1相臨床試験においては、安全性上問題は無いものと判断された。

2) 血清抗体価の推移については、ワクチンウイルスを抗原とするHIおよび中和試験を行った。

ワクチン接種者および対照者のいずれも、接種前の抗体価は検出限界以下であった。

ワクチン接種者においては、2回目接種後2週間の血清について検索したが、HI抗体の有意な上昇は認められなかった。中和抗体についても、通常のインフルエンザワクチンに比較して低く、感染防御には不十分であると考えられた。

一方、対照者においても非常に低い中和活性が認められる場合もあり、血清中の非特異的阻害物質によるものと判断された。

D. 考察

本ワクチンは、

1) 製剤としては、現行のインフルエンザHAワクチンと同一である。トリインフルエンザウイルス由来の9-1-1株を原材料としている点のみが、

ヒトインフルエンザウイルスを原材料としている従来からのワクチンと異なる。しかし、トリインフルエンザウイルスもヒトインフルエンザウイルスもウイルスとしては区別するものではなく、また現行のインフルエンザワクチンの製造株には、特別の製造承認または一部変更することなく毎年異なるウイルス株が用いられている。従って、今回のウイルス株を製造株として用いた場合には、原材料に関しては製造承認の一部変更は必要ないと判断された。

2) 新型H5N1インフルエンザHAワクチンは、現行の生物製剤基準ならびにGMP基準を満たしているために、改めて製剤としての製造承認を求める必要はない。

3) 組換えDNA技術応用医薬品調査会に相談した結果、本ワクチンのワクチン製造株である弱毒ウイルスの作製には遺伝子組換え技術を用いてはいるが、これは自然界に存在するものと同一と見なされるので、組換えDNA医薬品とは見なされない、との見解を得ている。従って、本ワクチンに関しては、製造承認申請を目的とした臨床試験を行う必要はない。

しかし、これまでにトリインフルエンザウイルスを原材料としたワクチンをヒトに接種した経験は乏しいので、緊急事態発生時に多くのヒトに接種をする場合を想定して、その安全性を確認しておくことが適当であろうと判断された。

そこで、前臨床試験として、ラットを用いる単回投与毒性試験、同4週間反復投与毒性試験、ラット及びウサギを用いる生殖発生毒性試験、ウサギを用いる局所刺激性試験および変異原性試験(Ames試験、染色体異常試験、マウスを用いる小核試験)を行った。染色体異常試験において一部陽性の成績が出たため、確認のためにラット肝不定期DNA合成(UDS)試験を行った結果、変異原性は否定された。

以上のように前臨床試験において安全性が確認されたので、健康成人男性志願者を対象とした臨床第1相試験を計画し、実施した。

その結果、安全性には問題がなかったが、ヒトに対する免疫原性が極めて低いことが示された。その後、我々の方法と同じように米国で開発された組み換え弱毒化ウイルス(HA遺伝子は、9-1-1とほぼ同一であるが、内部蛋白の遺伝子は低温馴化弱毒生ワクチン株A/Ann Arbor/2/66(H2N2)由来の遺伝子を持つ)を用いて製造されたHAワクチン、および英国においてトリ弱毒型H5ウイルスから製造されたHAワクチンについての試験成績が報告さ

れている。これらによると、いずれのH5型ワクチンも、動物実験においては抗体の上昇が認められて、攻撃実験においても感染防御効果が示されているにも関わらず、ヒトに接種した場合には抗体の上昇が認められていない。

この理由に関しては今後の検討課題であるが、可能性として、1) トリのウイルスがそもそもヒトに免疫原性が低い。2) スプリットワクチンであるHAワクチンが、免疫記憶を誘導する能力が低い2つの理由が考えられる。英国においては、HAワクチンにMF59というアジュバントを加えたワクチン製剤を開発したが、これを2回接種すると有意の抗体上昇が認められていることから、2番目の可能性が高い。

これまで新型インフルエンザに対して効果が認められてる1957年のアジア型、1968年の香港型に対する新型インフルエンザワクチンは、現行のHAワクチンではなく、全粒子ワクチンであった。全粒子ワクチンの製造は、現在も認可されており、生物学的製剤基準も有効である。当時問題となっていた副反応も、その後の精製技術の進歩と発育鶏卵の品質向上によって、大幅に解決されているものと判断される。

我々は既に9-1-1株を用いた全粒子ワクチンの試験製造を終わっているので、今後緊急に、全粒子ワクチン製剤について、安全性と有効性を検証する必要がある。

E. 結 論

1997年にホンコンで流行したトリ強毒株から、遺伝子操作技術により弱毒化したH5N1型インフルエンザウイルス株を用いて現行HAワクチンに準じて作製した試験ワクチンは、生物学的製剤基準を満たしており、更に動物を用いた前臨床試験において安全性と有効性が確認された。第1相臨床試験の結果、ヒトにおける安全性にも問題がないことが示された。

しかし、ヒトにおいては抗体の有意な上昇が認められなかったことから、現行のHAワクチン製剤には免疫記憶を賦与する能力が劣っており、新型インフルエンザに対するワクチンとしては、不适当である可能性がある。新型インフルエンザに備えたワクチン開発のためには、今後緊急に、全粒子ワクチン製剤およびアジュバントワクチンの開発を検討し、これらについて、安全性と有効性を検証する必要が

ある。

F. 健康危険情報

新型インフルエンザに対するワクチンとしては、現行のHAワクチン製剤では免疫記憶を賦与する能力が劣っているために、十分に対応できない可能性がある。新型インフルエンザに備えたワクチン開発のためには、今後緊急に、全粒子ワクチン製剤およびアジュバントワクチンの開発を検討し、これらについて、安全性と有効性を検証する必要がある。

厚生科学研究費補助金（厚生省医薬安全総合研究事業）

分担 研究報告書

リバーシジェネティクスを応用した生ワクチンの開発

分担 研究者 河岡 義裕 東京大学医科学研究所 ウイルス感染分野教授

研究要旨 私達は、インフルエンザウイルスを人工的に作成する遺伝子操作技術を用いて、抗原性は通常のウイルスを変えないが、増殖能を持たない“半生”インフルエンザワクチンを設計した。その効果をマウスを用いて検定したところ、“半生”ワクチンは顕著な感染防御効果を示した。“半生”インフルエンザワクチンは、新しいタイプのワクチンとして有望である。

A. 研究目的

インフルエンザは毎年冬になると流行し、乳幼児や高齢者を中心に犠牲者を多数出しており、社会的な問題となっている。また、ヒトだけでなく、ブタ、ウマ、家禽においても深刻な伝染病を引き起こし、その経済的損失は多大である。現在、不活化ワクチンがインフルエンザの予防に用いられているが、細胞性免疫や粘膜免疫の誘導が不十分なため、その感染防御効果には限界がある。そのため、効果的なワクチンの開発が緊急な課題となっている。私達が開発したインフルエンザウイルスを生成する遺伝子操作技術により、新しいタイプのワクチンの設計が可能となった。本研究では、この遺伝子操作技術を用いて、抗原性は通常のウイルスを変えないが、増殖能を持たない“半生”インフルエンザウイルスを作出し、インフルエンザに対する効果的なワクチンを開発することを目的とする。

B. 研究方法

8本のRNAセグメントのうち、NS遺伝子はNS1とNS2の2種類の蛋白質を

コードしており、NS2蛋白質はウイルス構造蛋白質の発現には必要ないが、ウイルス粒子の形成には不可欠である。我々は、このNS2を発現しないような変異を導入したプラスミドを用いて、インフルエンザウイルスを作製し、その生物性状について調べた。つぎに、NS2欠損ウイルスを、3週間おきに3回マウスに経鼻接種し、最終免疫から1ヵ月後、あるいは3ヵ月後に、致死量の10倍量と100倍量のウイルスでマウスを攻撃して、NS2欠損ウイルスのワクチンとしての効果を検定した。

C. 研究結果

プラスミドから作出したNS2欠損ウイルスを、細胞に感染させたところ、感染細胞でインフルエンザウイルス感染防御蛋白質であるNP、HA、NA、M1が検出された。しかし、ウイルス粒子形成に必要なNS2蛋白質ができないため、新たな感染性ウイルスは産生されなかった。

つぎに、“半生”インフルエンザウイルスのワクチンとしての効果を検定するため、50ulの免疫原を、3週間おきに3回

マウスに経鼻接種し、血清中と鼻腔及び肺胞洗浄液中の抗体を調べた。NS2 欠損ウイルスで免疫したマウスの血清からは IgG 抗体が、そして洗浄液からは IgA 抗体がそれぞれ検出された。続いて、最終免疫から 1 ヶ月後、あるいは 3 ヶ月後に、致死量の 10 倍量と 100 倍量のウイルスでマウスを攻撃した。コントロールとしては、ベクターを導入した細胞の培養上清を用いた。最終免疫から 1 ヶ月後に攻撃したとき、コントロール群のマウスが全て死亡したのに対し、半生ウイルスワクチン群では致死量の 100 倍のウイルスで攻撃した場合でも全てのマウスが生残した。また、ウイルス攻撃後の肺のウイルス価を調べたところ、NS2 欠損ウイルス群では、コントロール群の 1000 分の 1 以下であった。最終免疫から 3 ヶ月後に致死量の 100 倍のウイルスで攻撃した場合にも、NS2 欠損ウイルスで免疫したマウスのうち、9 匹中 8 匹が生残した。これらの結果は、半生ウイルスが感染防御免疫応答を効果的に誘導したことを示している。

D. 考察

上述の通り、インフルエンザは世界各地で毎年流行を繰り返し、様々な予防対策にも関わらず、未だ多大な被害を及ぼす重要な疫病である。インフルエンザを予防するため、ホルマリン不活化ワクチンが現行ワクチンとして用いられているが、細胞性免疫や粘膜免疫の誘導が不十分なため、完全にウイルスの感染を防ぐことはできない。そのため、効果的なワクチンの開発が緊急な課題となっている。私達は最近、インフルエンザウイルスを

cDNA から生成する遺伝子操作技術を開発した。この技術はインフルエンザウイルスを自由自在に設計できるものであり、新しいタイプのワクチン開発を可能とした。理想的なワクチンとは、弱毒生ワクチンのようにウイルスの侵入門戸において粘膜免疫や細胞性免疫を効果的に誘導し、感染を防御する能力を持ち、なおかつ、不活化ワクチンのように感染性ウイルスの排出がない安全性の高いものであろう。本研究では、この技術を用いて作成した“半生”インフルエンザウイルス（NS2 欠損ウイルス）のワクチンとしての効果を検定した。その結果、“半生”ウイルスは粘膜免疫や細胞性免疫を効果的に誘導し、侵入門戸におけるウイルス感染を防御した。さらに、増殖能を欠くため、弱毒生ワクチンで危惧されるような野生株への復帰の可能性はなく、安全性の面からも優れたワクチンになることが期待される。

私達は、インフルエンザウイルスを自由自在に設計する遺伝子操作技術を開発した。その結果、インフルエンザウイルスの生活環において、今まではウイルスから切り離れた状態でしか調べることのできなかつた病原性を制御するウイルスの遺伝子とウイルス蛋白質の機能を解析することが可能となった。この系により、宿主の免疫は誘導するが病原性復帰の危険性がほとんどないといったような理想的な弱毒生ワクチンの開発も可能である。さらに、他の病原微生物の感染防御抗原をコードする遺伝子を組み込んだインフルエンザ粒子を作製することにより、インフルエンザウイルスをベクターとした“半生”ワクチンを開発すること

も可能である。不活化ワクチンでは効果的な免疫を誘導できず、さりとて生ウイルスは危険性が高すぎるようなウイルス感染症において、“半生”ワクチンは効果をあげることができるかもしれない。ほかに、外来遺伝子を取り込むように設計したインフルエンザウイルスは、標的細胞に感染して、目的の遺伝子を発現するウイルスベクターとして有効で、さらには、遺伝子治療への応用も期待される。

E. 結論

本研究では、“半生”インフルエンザウイルスのワクチンとしての効果を検討した。“半生”ウイルスをマウスの粘膜に接種したところ、ウイルスの侵入門戸における粘膜免疫を効果的に誘導し、感染を防御した。“半生”インフルエンザワクチンは、新しいタイプのワクチンとして有望である。

F. 研究発表

1. 論文発表

インフルエンザウイルスの遺伝子操作系の確立と応用

渡辺登喜子、喜田宏、河岡義裕

ウイルス 第50巻 第1号 p.1-9 2000年6月

2. 学会発表

1. 渡辺登喜子、渡辺真治、喜田宏、河岡義広

半生インフルエンザワクチンの開発

第129会 日本獣医学会 東京 平成12年4月

2. Watanabe, T., Watanabe, S., Kida, H., and Kawaoka, Y.

Replication-incompetent influenza virus

for vaccines.

THE WORLD CONGRESS ON
OPTIONS FOR THE CONTROL OF
INFLUENZA IV ギリシャ 2000年9月

G. 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

分担研究報告書

噴霧型インフルエンザHAワクチンに関する研究

分担研究者 堺 春美 東海大学医学部助教授

研究協力者 木村 三生夫 東海大学名誉教授

インフルエンザ対策は、わが国ならびに世界の感染症対策の中において重要な位置を占める。

20世紀までは、積極的なインフルエンザ対策としては、ワクチン接種しかなかった。しかし、新しい世紀の始まりとともに、インフルエンザ対策にはワクチン接種に加えて、アマンタジンの予防投薬、ウイルス迅速診断が加わった。

このような状況で、ワクチン対策として、現行の皮下接種用ワクチンだけでは必ずしも十分ではなく、受け入れられやすいワクチンを選択肢として加えることが望まれる。噴霧型不活化インフルエンザワクチンは現在実用化可能な次世代インフルエンザワクチンのトップである。

本研究は、噴霧型インフルエンザワクチンの実用化と現行皮下接種インフルエンザワクチンの評価を目的とした。

A. 研究目的

新しい世紀の始まりである2000-2001年シーズンにおいて、A型インフルエンザ迅速診断キットであるダイレクトジェンFluAキットが保険適応となっており、抗インフルエンザ薬として既に保険適応となっていたアマンタジン(内服)に加えて、リレンザ(吸入)、タミフル(内服)が薬価収載された。従来、行政はインフルエンザシーズンには、うがい、手洗い、マスクを推奨していたが、新世紀に入って、予防接種、迅速診断、抗インフルエンザウイルス薬という3つの強力な手段を得て、インフルエンザ対策は全く新しい局面を迎えた。

予防接種法の一部改正が平成10年6月以降、公衆衛生審議会感染症部会予防接種問

題検討小委員会にて検討された。平成13年2月20日に「予防接種法の一部を改正する法律案が閣議決定し、第151回国会に提出された。平成13年3月末日現在予算関連法案の1つとして審議を待っている段階である。本法律案の骨子は、高齢者においてインフルエンザを予防接種の対象疾病とし、あわせてインフルエンザを二類疾病として類型化するところにある。審議が完了すれば、本法律は平成13年10月1日から施行される。わが国においては、法律によって臨時接種として規定されてインフルエンザ学童接種が行なわれていたが、80%の接種率が維持されていてもインフルエンザ流行を抑止できなかったことから、平成6年には学童接種が中止となった。爾来7年を経

過して、従前と全く同じ皮下接種不活化インフルエンザHAワクチンは高齢者への法による接種として復活をとげる。既に2000年10月11日付で厚生省4課長通知として、65歳以上のインフルエンザワクチン接種は1回でよい、その他の年齢では、これまでと同様に2回接種が基本であるという指示が出されている。一方、過去3年間の本研究班における研究の結果、成人(13歳以上65歳未満)においては抗体レスポンスが良く、1回接種で十分な抗体レスポンスが得られることが明らかとなっている。

以上の2つの大きな変革(インフルエンザ対策の手段の多様化および高齢者を対象とするインフルエンザ予防接種の法制化)を背景として、臨床に直結した2つの研究テーマが浮かび上がる。第一は、ワクチン接種のみが唯一の予防対策ではなくなり、ワクチンの相対的な“地位”が下降したことである。それをふまえると、より受け入れられやすく、また上気道粘膜面(感染の局所)に免疫を付与し、局所でのウイルス増殖を抑制する可能性のある予防接種法として以前に増して噴霧型不活化インフルエンザHAワクチンへの期待が高まったことである。第二には、予防接種法の見直しにあたって、小児におけるインフルエンザワクチン接種のあり方に関する決定が先送りとなってしまったことである。少なくとも、小児における皮下接種インフルエンザワクチンの接種回数の検討が急務となった。

本研究は新型インフルエンザ対策を最終的な目的とするものであるが、それに備えるもとして、毎年のルーチンのインフルエンザ対策整備が基本となる。以上のことから、今年度は、噴霧型不活化インフルエン

ザHAワクチンの研究の継続と小児における皮下接種インフルエンザHAワクチンの接種回数の検討を行なった。なお、高齢者におけるワクチン接種については、膨大な研究結果が出ているので、別途の分担研究報告書として本報告書の次に続けた。

B. 研究実施施設

長期療養施設(K療養所)入所者61名と全寮制学校(S校)在学者65名(年齢3歳—18歳)を対象として研究を行なった。

C. 研究方法

事前に十分な説明をし、同意を得た上でインフルエンザワクチン接種と採血を行なった。ワクチンは阪大微研 インフルエンザHAワクチン lot No. HA014Aを両施設で使用した。

K療養所においては、2週間間隔で2回、1回に両鼻腔内に0.25 ml づつ 計0.5 ml をキートロン社製デイスポーザブル噴霧器を用いて接種した。接種前と2回目接種4週後に採血した。血清は-20℃に保存した。

S校2回においては、年齢を勘案して、2群に分け、1群には年齢による規定量を2週間間隔で2回接種、他の群には1回目にはワクチン接種、2回目には生理的食塩水を接種した。採血は、接種前、2回目接種時、および2回目接種3週間後の3回行なった。血清はすべて-20℃に保存した。

(図1)

ワクチン組成(平成12年度インフルエンザHAワクチン製造株)

A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) 30
μg/mL

A/パナマ/2007/99(H3N2) 30 μ g/mL

B/山梨/166/98 30 μ g/mL

血清はRDE処理により非特異的凝集抑制物質を除去した後、0.7%ヒトO型赤血球液を用いて国立感染研による標準法によりHI抗体価を測定した。

D. 研究期間

平成12年11月—平成12年12月

E. 研究結果

(1) K療養所における接種前後抗体保有状況 (図2(1)—図2(3)、表1)

本療養所においては、毎年不活化インフルエンザHAワクチンの噴霧接種を行なっている。本年度の接種前抗体価はA H1N1型、A H3N2型、B型のいずれも<10から80以上まで広く分布していた。接種後には、接種前に比較して著明な抗体上昇を認めた。

(2) S校における皮下接種成績—1回接種と2回接種の比較

表2にS校在校生における皮下接種インフルエンザHAワクチン1回接種と2回接種の比較を示す。1回目後採血と2回目後採血の血清HI抗体価の分布を見ると、いずれの株についても1回接種群(1回目ワクチン、2回目生理的食塩水接種)と2回接種群のHI抗体価の分布状況に差はみられない。

表3は表2のまとめである。1回接種群、2回接種群とも1回目は同じワクチンを接種したので、1回目後採血の血清HI幾何平均抗体価に違いは見られない。ところが、1回接種群はその後に生理的食塩水を接種し、2回接種群は2回目のワクチン接種を

してその後3週間経ってから2回目後採血をして、血清HI抗体価を測定したのであるが、1回接種群と2回接種群の間に2回目後採血の血清HI幾何平均抗体価に違いはみられなかった。

4倍以上抗体上昇率でみると1回目後採血の血清HIに比べて2回目後採血の血清HI抗体価が上昇したのは、1回接種群、2回接種群ともごく少数例であった。これはこの間の自然感染による追加免疫効果を検出した可能性が高い。幾何平均抗体価の上昇はそのような症例の存在の影響を受けただけで、2回接種群の2回目のワクチンに追加免疫効果があったという明らかな証拠は得られなかった。接種前に比較して2回目後採血時に血清HIが4倍以上上昇した率についても1回接種群と2回接種群の間に大きな違いがみられなかった。すなわち、2回目の接種は生理的食塩水でもインフルエンザHAワクチンでもどちらでも結果に変わりがなかったということになる。

以上のことから、小児において、皮下接種インフルエンザHAワクチンを2回接種しても2回目の上積み効果は殆ど期待できないと結論した。

E. 結語

噴霧型不活化インフルエンザHAワクチンは次世代のインフルエンザワクチンとして極めて有望である。

小児における皮下接種インフルエンザワクチンの接種回数は現行の接種方式では2回と定められているが、抗体レスポンスからみた追加免疫効果を検証してみたところ、2回目の接種は行なっても殆ど効果が期待できないことが明らかとなった。

F. 研究成果の発表

1. 三上稔之 他：介護老人保健施設におけるインフルエンザワクチン接種成績について。臨床とウイルス 28(4):219-228, 2000
図表訂正：臨床とウイルス 28(5):427-430, 2001
2. 木村 三生夫、堺 春美 他：介護老人保健施設におけるインフルエンザワクチン接種に対する前年度ワクチン接種の影響。臨床とウイルス 28(4):229-236, 2000
3. 後藤郁夫、沖村容子、白石廣行、秋山和夫、堺 春美：A型インフルエンザ迅速診断キット（ダイレクテイジェンFlu A）の検出感度と特異性に関する研究。臨床とウイルス 28(4):248-252, 2000
4. 木村 三生夫、堺 春美：インフルエンザ予防接種の最近の動向。臨床とウイルス 28(4):253-296, 2000

表 1 K療養所
不活化インフルエンザHAワクチン噴霧接種前後の抗体価、2000-2001シーズン

	A/ニューカレドニア /20/99(H1N1)	A/パナマ/2007/99 (H3N2)	B/山梨/166/98
接種前幾何平均抗体価	0.7*	1.4	2.4
接種後幾何平均抗体価	1.7	2.1	3.0

注* 10×2^n

注 <10は 10×2^{-1} として計算した

4倍以上上昇率	15/55 27%	9/55 16%	6/55 10%
---------	-----------	----------	----------

表 2 小児における(S校在校)皮下接種インフルエンザHAワクチン皮下接種1回接種と2回接種の比較
2000-2001シーズン

1回接種群	HI抗体価	A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)		A/パナマ/2007/99 (H3N2)		B/山梨/166/98	
		接種前	1回目後採血 2回目後採血	接種前	1回目後採血 2回目後採血	接種前	1回目後採血 2回目後採血
	<10	2	0 0	0	0 0	2	0 0
	10	3	0 0	2	0 0	2	0 0
	20	2	1 0	3	2 0	0	2 1
	40	4	0 0	5	1 1	3	1 1
	80	8	3 2	7	7 5	8	3 2
	160	2	10 10	4	5 7	5	9 8
	320	0	6 7	0	6 6	1	5 8
	640	0	1 2	0	0 2	0	1 1

2回接種群	HI抗体価	A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)		A/パナマ/2007/99 (H3N2)		B/山梨/166/98	
		接種前	1回目後採血 2回目後採血	接種前	1回目後採血 2回目後採血	接種前	1回目後採血 2回目後採血
	<10	1	0 0	0	0 0	0	0 0
	10	8	0 0	2	0 0	1	0 0
	20	6	0 0	8	0 0	1	0 0
	40	7	3 2	4	2 0	9	1 1
	80	1	4 5	8	8 5	7	7 1
	160	2	8 6	3	10 13	5	9 12
	320	0	9 11	0	5 4	2	8 9
	640	0	1 1	0	0 3	0	0 2