

20010989

厚生労働省
平成13年度

平成13年度厚生科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業)

研究報告書

H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの
安全性・有効性に関する研究

平成14年3月

主任研究者 田代眞人
(国立感染症研究所ウイルス製剤部)

H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究

平成13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

神谷 齊 国立療養所三重病院 院長

小田切 孝人 国立感染症研究所ウイルス第1部 室長

板村 繁之 国立感染症研究所ウイルス第1部 主任研究官

田村 慎一 国立感染症研究所感染病理部 室長

堀内 清 千葉県血清研究所 理事

大塚 道夫 三菱化学安全科学研究所 主任研究員

目 次

I. 総括研究報告	
H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究	
田代 真人	1
II. 分担研究報告	
1. H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究	
高橋 要	8
2. H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究	
高橋 要	12
3. H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究	
渡部 秀次	20
4. H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究	
中川 宗洋	24
5. H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究	
榎本 佳明	28
6. 変異コレラ毒素併用経鼻インフルエンザワクチンによって誘導される防御免疫応答	34
田村 慎一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	36

H5N1型全粒子不活化インフルエンザワクチンの 安全性・有効性に関する研究

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

A型インフルエンザは数10年周期で新型ウイルスがヒトの世界に出現して大流行を起こし、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H5N1インフルエンザウイルスがヒトに感染して致死率33%という流行が発生し、未曾有の大被害をもたらす汎流行への進展が危惧された。国立感染症研究所では、WHOの要請に応じてワクチンの緊急開発研究に着手し、遺伝子組み換えによる弱毒化ウイルスの作製に初めて成功するとともに、これを用いて現行HAワクチンを試験製造した。前臨床試験および臨床第1相試験を行った結果、安全性については問題がないことが示された。しかし、ワクチン接種を受けたヒトにおいては血清抗体の有意の上昇が認められず、現行のHAワクチンでは新型インフルエンザには対応できない可能性が指摘された。そこで、トリウイルスに由来する有効なワクチン製剤の開発およびその接種法を確立して、新型インフルエンザ対策の根幹であるワクチン緊急製造を準備しておくことが国際的にも緊急課題となっている。本研究では、①H5N1型ウイルスに対する不活化全粒子ワクチンを製造し、前臨床試験および臨床第1相試験を行って安全性・有効性を検討する。②ヒトに高い免疫原性を示すワクチン製剤への改良と接種方法の確立し、新型インフルエンザ対策準備態勢の確立に寄与することを目的としている。本年度は、全粒子型ワクチンを試験製造し、その安全性を動物を用いた前臨床試験によって確認出来たので、来年度における第1相臨床試験の実施が可能となった。また、改変コレラ毒素を添加した経鼻不活化ワクチンを開発し、マウスにおいて有効性を検証した。

分担研究者

神谷 斉（国立療養所三重病院長）

板村繁之（国立感染症研究所ウイルス

第1部呼吸器系ウイルス室主任研究官）

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）

田村慎一（国立感染症研究所感染病理部
感染免疫室長）

堀内 清（細菌製剤協会理事）

大塚道夫（三菱安全科学研究所主任研究員）

A. 研究目的

A型インフルエンザでは数10年周期で新型ウイルスがヒトの世界に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H5N1インフルエンザウイルスがヒトに感染して致死率33%という流行が発生し、未曾有の大被害をもたらす汎流行への進展が危惧された。国立感染症研究所では、WHOの要請に応じてワクチンの緊急開発研究に着手し、遺伝子組み換えによる弱毒化ウイルスの作製に初めて成功するとともに、これを用いて現行HAワクチンを試験製造した。前臨床試験および臨床第1相試験を行った結果、安全性については問題がないことが示された。

しかし、このワクチンはニワトリやマウスにおいては高い感染防御免疫を誘導するにも拘わらず、ワクチン接種を受けたヒトにおいては血清抗体の有意の上昇が認められなかった。一方、海外におけるトリH5型ワクチンの開発においても同様の成績が報告されており、新型インフルエンザのワクチン政策は、現行のHAワクチンを用いるやり方では対応できない可能性が指摘されている。現在のところ、H5N1型インフルエンザの流行は終息しているが、その起源・伝播経路は不明であり、再出現の可能性が依然危惧されており、更にH9型など他のトリ型インフルエンザの出現も想定されている。そこで、トリウイルスに由来する有効なワクチン製剤の開発およびその接種法を確立して、新型インフルエンザ対策の根幹であるワクチン緊急製造を準備しておくことが国際的にも緊急課題となっている。

本研究では、①HAワクチンの皮下接種

では有意の抗体上昇が認められなかった原因の解明、②ヒトに高い免疫原性を示すワクチン製剤への改良と接種方法の検討、③不活化全粒子ワクチン製剤を試験製造し、これについて前臨床試験および臨床第1相試験を行って安全性・有効性を検討する。これらの成績から直面するH5N1ワクチンの準備を完成させるとともに、新型インフルエンザワクチンの製剤様式と接種方法を確立し、我が国および世界における新型インフルエンザ対策準備態勢の確立に寄与することを目的とした。

[研究の背景と従来経緯]

A型インフルエンザは10～40年周期で新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。そこで国立感染症研究所では、厚生省科学研究費補助金による研究事業の一環として、国際協力のものでワクチン製造に向けた新型ワクチン開発研究に着手した。

トリ強毒型ウイルスをワクチン製造株に用いた場合には、製造従事者が感染を受けた場合の健康被害、外部への汚染から世界的な大流行へ拡がる危険性、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指摘され、まず原材料のウイルスの弱毒化が課題となった。これに対しては、国立感染症研究所において遺伝子組換え技術に

よるウイルスの弱毒化が進められ、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。具体的には、香港で患者から分離されたトリ強毒型H5N1型ウイルスA/香港/164/97 (H5N1) 株のHA遺伝子をクローニングし、このcDNAに対して、HA蛋白上の宿主プロテアーゼによる開裂活性化部位のアミノ酸配列（強毒株の特徴である塩基性アミノ酸が多数連続している）を、弱毒型の単一アルギニン残基をコードするように改変を加えて弱毒型の構造にした。この更に他の弱毒型トリインフルエンザウイルスA/シンガポール株に導入して弱毒型ウイルス9-1-1株を作製した。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、社団法人細菌製剤協会に委託して、株式会社デンカ生研において、現行の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の基準に合致した現行ワクチンの製造方法に準じて、この弱毒ウイルスを用いて不活化HAワクチンの試験製造を行った。

本ワクチンに対しては、厚生省医薬安全局から

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しうるものではなく、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。

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じと見なされるので、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、平成10年度には前臨床試験として、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、平成11年度に実施した。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。

健康成人被検者10名についてHAワクチンを2回皮下接種したところ、臨床上および検査所見には異常は認められず、安全性については問題がないことが確認された。しかし、被検者ではH5N1型ウイルスに対する血清抗体価の有意の上昇は認められず、有効性は確認されなかった。同様の成績が諸外国からも報告され、HAワクチンでは新型インフルエンザに対して有効な免疫を誘導できない可能性が指摘された。一方、アジュバント添加ワクチン製剤では、ある程度の抗体上昇が認められるため、1957年のアジアかぜや1968年の香港かぜの際に使用されて有効性が認められている全粒子型の不活化ワクチンの有効性が期待されている。

このような背景のもとに、H5N1型インフルエンザに対する緊急対応とともに、トリウイルスに由来する新型インフルエンザワクチンの安全性と有効性を検証して、今後の新型インフルエンザへのワクチン行政を確立するために、本研究は企画された。

B. 研究方法

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(H9-1-1)を用いて、製造承認を得ている製造方法に準じてGMP基準ならびに生物学的製剤基準を満たす全粒子型の不活化インフルエンザワクチンを試験製造して用いた。

本試験ワクチンの製造過程は、平成11年度に報告した通りであるが、エーテル処理による部分分解を行っていないことが異なる。まず1997年5月に香港で第1例患者から分離されたトリ強毒型ウイルスA/Hong Kong/156/97(H5N1)株のHA遺伝子をクローニングし、このcDNAの解裂部位に相当する塩基配列に改変を加

えて弱毒型構造にしたものを、更に他の弱毒型トリインフルエンザウイルスA/シンガポール株に導入して弱毒型ウイルスを複製した。このワクチン製造株の弱毒性および安全性を組織培養、発育鶏卵およびマウスで確認した後に、この製造株を材料として、GMP基準のもとで製造認可されたワクチン製造方法に則って試験ワクチンを製造した。すなわち、発育鶏卵の尿膜腔にウイルスを接種して増殖させ、尿膜液を採取して分別遠心によりウイルスを精製した。これをホルマリン処理により感染性を完全に不活化させ不活化全粒子ワクチンである。最終製品は、蛋白含量80、ホルムアルデヒド0.01%未満、保存剤としてチメロサル0.01%を含む無色透明の生理食塩液剤である。

これについて、動物を用いた前臨床試験を行って、安全性を確かめた。平成11年度のHAワクチンを対象とした研究の結果を参考にして試験項目を選択し、(1)ラットを用いる単回投与毒性試験：臨床用量の100倍量を5週齢SPFラットに皮下接種して14日間に亘り毒性を検討した。

(2)ラットを用いる複数投与毒性試験：臨床用量及びその100倍量をラットに4週間反復皮下投与して、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、眼科検査、器官重量、剖検結果に対する影響を生理食塩水投与の対照ラットと比較して毒性を検討した。(3)マウスを用いる小核試験：臨床量の100, 200, 400倍量をマウスに2回皮下投与して骨髓細胞の小核誘発性を調べた。(4)染色体異常誘発試験：チャイニーズハムスター細胞株に対して、ワクチン希釈液でS9mix存在・非存在下で6時間の短時間処理、または連続24時間処理し、染色体構造異常を調べた。(5)復帰突然変異試験：臨床用

量から7段階に希釈し、9株のネズミチフス菌と大腸菌に対する遺伝子変異原性を調べた。

[物理的・化学的および薬剂的性質並びに製剤組成]

新型H5N1インフルエンザワクチンの本試験ワクチンの製造過程は以下の通りである。弱毒化トリインフルエンザウイルス株9-1-1株を製造株として、GMP基準のもとで現行のワクチン製造方法に則って試験ワクチンを製造した。すなわち、発育鶏卵の漿尿膜腔にウイルス製造株を接種して3日間増殖させ、漿尿液を採取して分別遠心によりウイルスを精製した。これをホルマリン処理により感染性を完全に不活化させた全粒子型不活化ワクチンである。最終製品は、H5型インフルエンザHA蛋白を850CCA/mlを含むものであり、蛋白含量240ug、ホルムアルデヒド0.01%未満、保存剤としてチメロサル0.01%を含む無色透明の生理食塩液剤である。本ワクチンは、現行の3価ワクチンとは異なって、H5型のみ単価ワクチンであるので、実際にヒトに接種する場合には、生理食塩液で2.83倍に希釈して350CCA/mlとしたものを使用することとなる。

なお、発育鶏卵で増殖させたウイルスを材料としているので、微量ではあるが鶏卵成分が残存していることが予想される。

C. 結果と考察

1. 前臨床試験における新型H5N1インフルエンザワクチンの毒性試験

本試験はすべて下記のGLPに従って、

株式会社三菱化学安全科学研究所において実施したものである。

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）

(1) ラットを用いる単回投与毒性試験

H5N1型インフルエンザワクチンをSPF5週齢の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。

被験物質の毒性は低いと考えられたので、臨床用量(350CCA/ml)の100倍である1.0ml/kgの1用量投与する群を設け、生理食塩液のみを投与した対照群と比較した。

1.0ml/kgの用量を投与されたラットには、接種部位である尾の紅潮以外には、死亡、異常行動、歩行異常、痙攣などの毒性症状をはじめとした一般状態の変化は認められなかった。体重は生理食塩液を投与した対照群と同様に増加した。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。

これらのことより、本試験条件下においては、H5N1インフルエンザ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

臨床用量及びその100倍量のH5N1型インフルエンザワクチンを5週齢SPFDrj: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。

被験物質の毒性は低いと考えられたので、臨床量(350CCA/ml)およびその100倍である1.0ml/kgの1用量投与する群を設け、生理食塩液のみを投与した対照群と比較した。

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、死亡、異常行動、歩行異常、痙攣などの毒

性症状をはじめとした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。体重は生理食塩液を投与した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の病理組織検索では、接種部位に軽い細胞浸潤が認められたのみで、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、眼科検査、器官重量、剖検結果に対する影響は認められなかった。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。

これらのことより、本試験条件下においては、H5N1インフルエンザワクチンの4週間反復投与毒性は低い（陰性）と判断された。

（3）変異原性試験

1）細菌を用いる復帰突然変異試験

H5N1型インフルエンザワクチンについて、9株のネズミチフス菌と大腸菌を指標とする遺伝子変異原性を実施した。

用量設定試験を被験物質原体（350 CCA/ml）を最高用量として、以下1/4, 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024, 1/4096希釈液の7用量で実施した結果、S9mix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、S9mix非存在下の全ての菌株で抗菌性が認められた。これらの結果を基に本試験の用量を設定した。

本試験の結果、S9mix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

H5N1型インフルエンザ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（チャイニーズハムスター細胞株）を用いる染色体異常試験を実施した。

ワクチン希釈液でS9mix存在・非存在下で6時間の短時間処理、または連続24時間処理し、染色体構造異常を調べた結果、S9mix存在下短時間処理と連続処理法24時間処理では10%以上の異常が認められ、再現性および用量依存性が認められた。しかし、S9mix非存在下短時間処理では染色体構造異常または数異常を持つ細胞の出現頻度は5%未満であった。一方、連続処理法および短時間処理用+S9mixの陽性対照群において染色体構造異常細胞の出現頻度が10%以上であったこと、さらに短時間処理-S9mixの陽性対照群における染色体構造異常出現頻度が5%未満であったことは、本試験が適切に行われていたことを示す。これらの結果から、本試験における連続処理法の条件下において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。本製剤は染色体異常誘発性を持つが、代謝活性化条件では抑制されることが示唆されたことから、ヒトの生体内では染色体異常誘発は非常に低いことが推定される。

3）マウスを用いる小核試験

I CR系雄性マウス（Crj：CD-1，8週齢）を用いてH5N1型インフルエンザワクチンの骨髄細胞に対する小核試験を行った。被験物質の臨床用量の100倍（1.0ml/kg）、200倍、400倍量の3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時間に骨髄塗抹標本を作製し、小核をもつ多染色赤血球の出現数および多染性赤血球の頻度を検索した。その結果、小核をもつ多染性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型インフルエンザワクチンの小核誘発性は陰性と結論された。

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、来年度にはこのワクチンを用いて、第1相臨床試験を施行することが可能となった。

2. 変異コレラ毒素併用経鼻インフルエンザワクチンによって誘導される防御免疫応答

安全性の高い無毒化コレラ毒素CT112K（AサブユニットのN末端から112番目のグルタミン酸を遺伝子操作技術によりリシンに置換したもの）を併用した現行インフルエンザHAワクチンのマウス経鼻投与によって、インフルエンザの防御に有効なIgA抗体応答を優先的に誘導でき、効率的にインフルエンザを予防できることが示された。今後これを応用した新型インフルエンザワクチンの開発が可能となる。

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

用いて全粒子型不活化ワクチンを試作したが、これ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が確認された。今回の前臨床試験の結果、来年度はヒトにおける第1相臨床試験を施行する予定である。このことにより、今後新型インフルエンザが出現した場合にトリインフルエンザウイルスを用いた緊急ワクチン開発が現実的となり、新型インフルエンザ危機管理体制の構築に大きく寄与したものと評価できる。

分担 研究報告書

H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究

分担 研究者 高橋 要 (株)三菱化学安全科学研究所

H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンを臨床量の 100 倍である 1.0 mL/kg の用量で 5 週齢の Crj:CD(SD)IGS 系雌雄ラット (SPF) に 1 回皮下投与した時の毒性を検討した。

ラットには投与後 30 分から尾の潮紅が認められ、14 日間の観察期間終了時まで継続した。しかし、体重増加及び観察期間終了時の剖検結果に異常は認められなかった。

これらのことより本試験条件下において、H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンの致死量は 1.0 mL/kg を越え、単回投与毒性は低いと考えられる。

A. 研究目的

H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性に関する研究の一環として、ラットにおける単回投与毒性を検討する。

B. 研究方法

国立感染症研究所から提供された H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチン（製造番号 A-H-98-2, 製造日 1999 年 1 月 25 日, HA 抗原濃度 430CCA/mL）を使用した。

日本チャールス・リバー(株)から 2001 年 10 月 3 日に入手した Crj:CD (SD) IGS ラット (SPF) 雌雄各 12 匹を使用した。

動物入荷後、全例について一般状態を 5 日間毎日観察して健康状態が良好であることを確認し、動物入荷時及び検疫終了時に体重測定して体重増加を確認した。検疫終了以降も馴化は継続し、投与直前まで 2 日間毎日観察した。投与前日に、体重層別化

無作為抽出法で各群の体重がほぼ均一となるように動物を群分けし、1 群あたり雌雄各 5 匹、合計雌雄各 10 匹を使用した。投与日の週齢は 5 週齢、体重範囲は雄が 164～176 g、雌が 126～143 g であった。また、それぞれ投与時の体重が平均体重の ±20% 以内であることを確認した。

検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度 20.9～23.5℃、相対湿度 48.8～67.4%、換気約 12 回/時（オールフレッシュエア供給）、照明 12 時間/日（7:00～19:00）に調節されたラット・マウス飼育室を使用した。

動物は滅菌済の実験動物用床敷（ベータチップ、日本チャールス・リバー(株)）を敷いたポリカーボネート製ケージ（265W×426D×200H mm、トキワ科学器械(株)）に検疫・馴化期間中はケージあたり 4 匹（同性）、

群分け以降は5匹（同性）ずつ収容し、スチール製架台（トキワ科学器械株式会社）上に配置して飼育した。給餌には滅菌済ステンレス製固型飼料用給餌器（トキワ科学器械株式会社）を、給水には滅菌済ポリカーボネート製給水瓶（700 mL、トキワ科学器械株式会社）を使用した。ケージ（含床敷）、給餌器及び給水瓶は6または8日に1回オートクレーブ滅菌したものと交換した。

動物には、実験動物用固型飼料（MF、オリエンタル酵母工業株式会社）と5 μ mフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由に摂取させた。飼料と飲用水はケージ交換時に交換した。

飼料中の残留農薬等の汚染物質濃度が、当研究所で定めた基準に適合していることを確認した。また、床敷中の残留農薬等の汚染物質濃度が、当研究所で定めた基準に適合していることを確認した。飲用水は水質検査を定期的実施し、分析値が水道法の基準に適合していることを確認した。

投与経路は、臨床適用経路に準じ皮下とし、投与回数は医薬品毒性試験法ガイドラインに従い1回とした。投与部位はラットの背部皮下織とし、27G針付のディスプレイザブルシリンジを用いて投与した。

臨床の際には300CCA相当量/mLに希釈したものを成人で0.5 mL/1回投与する。よって、本試験における用量表記は、被験物質原体（430CCA相当量/mL）を300CCA

相当量/mLとなるように1.43倍希釈したものを原液として、体重あたりの液量で表示するものとした。

被験物質の毒性は低いと考えられるので、臨床量の100倍を最高用量とした。臨床量は成人で0.5 mL/1回であり、体重あたりに換算した臨床量は0.5 mL/50 kg（0.01 mL/kg）と推定できるので、その100倍は1.0 mL/kgである。

よって本試験の用量は1.0 mL/kgの一用量とし、その他に生理食塩液を1.0 mL/kg投与する対照群を設けた。投与液量は1.0 mL/kgとし、投与直前に測定した体重に基づいて各個体の投与液量を算出した。

被験物質原体を生理食塩液（株式会社大塚製薬工場、ロット番号K1G85）で1.43倍希釈したものを原液とし、そのまま投与した。なお、投与液調製後約16分で投与は完了した。

群構成は、生理食塩液1.0 mL/kgを投与する対照群雌雄各5匹と被験物質1.0 mL/kgを投与する1.0 mL/kg群雌雄各5匹とした。

一般状態を投与日には1日5回（投与後30分、1、3、6及び8時間）、その後は1日1回、14日間（第15日まで）観察した（投与日を第1日とする）。

投与日（投与直前）及び第4、8及び15日に全例の体重を電子天秤（EB-3200S、株式会社島津製作所）を用いて測定した。また、各測定日間の体重増加量を算出した。

第 15 日に全例をチオペンタールナトリウム（ラボナール、田辺製薬株）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後剖検した。また、1.0 mL/kg 群の一般状態観察で尾の潮紅が認められたため、対照群を含む全動物の尾を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定して、保存した。剖検所見では尾に変化がみられなかったため、病理組織学的検査は実施しなかった。

体重データについて統計学的解析を行った。F 検定による等分散の検定を行い、分散が等しい場合は Student の t 検定、分散が等しくない場合は Welch の t 検定を行った。いずれの検定でも有意水準は 5%とした。

(倫理面への配慮)

本研究は(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所動物実験倫理委員会の承認を受けて実施したものである。

C. 研究結果

一般状態観察の結果、1.0 mL/kg の全例で投与後 30 分より尾の潮紅が認められ、14 日間の観察期間終了時（第 15 日）まで継続して認められた。

体重及び体重増加量測定の結果、対照群と 1.0 mL/kg 群との間に差は認められなかった。

剖検の結果、いずれの動物にも所見は認められなかった。

D. 考察

1.0 mL/kg の用量を投与されたラットには死亡は認められなかった。投与後 30 分から尾の潮紅が認められ、14 日間の観察期間中継続して認められた。体重は生理食塩液を投与した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。尾の潮紅は剖検時（放血後）には確認できなかったことから、末梢血管が拡張していたものと考えられる。

E. 結論

本試験条件下において H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンの致死量は 1.0 mL/kg を越え、単回投与毒性は低いと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性・有効性に関する研究

分担 研究者 高橋 要 (株)三菱化学安全科学研究所

H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンを 0.01 及び 1.0 mL/kg の用量で雌雄の Cj:CD(SD)IGS ラットに 4 週間反復皮下投与してその毒性を検討した。H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンは生理食塩液で 1.43 倍希釈したものを原液とし、1.0 mL/kg 群には原液をそのまま、0.01 mL/kg 群には原液を生理食塩液で 100 倍希釈したものを投与し、生理食塩液を 1.0 mL/kg 投与した対照群と比較した。

一般状態観察で尾の潮紅が認められたが、対照群にも認められる程度の変化であり、剖検で尾に変化は認められなかった。病理組織学的検査において、被験物質投与群の投与部位において炎症性細胞浸潤の発現例数が増加し、病変程度も若干強かった。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、器官重量及び剖検結果には H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチン投与の影響は認められなかった。

以上、本試験条件下において H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンを 4 週間反復皮下投与した結果、尾に紅潮がみられたが対照群にも認められる程度の変化であった。病理組織学的には投与部位皮下に弱い刺激性が示された。

A. 研究目的

H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンの安全性に関する研究の一環として、ラットにおける 4 週間反復投与毒性を検討する。

日、HA 抗原濃度 430CCA/mL、製造者デ
ンカ生研(株)を使用した。

日本チャールス・リバー(株)から 2001 年
10 月 10 日に Cj:CD(SD)IGS ラット (SPF)
雌雄各 42 匹を入手した。

B. 研究方法

国立感染症研究所から提供された H5N1
型全粒子不活化インフルエンザワクチン
(製造番号 A-H-98-2, 製造日 1999 年 1 月 25

動物入荷後、全例について一般状態を 5
日間毎日観察して健康状態が良好であるこ
とを確認し、動物入荷時及び検疫終了時に
体重測定して体重増加を確認した。検疫終
了以降も馴化は継続し、投与直前まで毎日

観察した。投与開始前日に、体重層別化無作為抽出法で各群の体重がほぼ均一となるように動物を群分けし、雌雄各 36 匹を使用した。投与開始日の週齢は 5 週齢、体重範囲は雄が 151~167 g、雌が 130~151 g であった。また、それぞれ投与時の体重が平均体重の±20%以内であることを確認した。

検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度 21.9~23.9℃、相対湿度 45.1~64.5%、換気約 12 回/時（オールフレッシュエア供給）、照明 12 時間/日（7:00~19:00）に調節されたラット・マウス飼育室を使用した。

動物は滅菌済の実験動物用床敷（ベータチップ、日本チャールス・リバー(株)）を敷いたポリカーボネート製ケージ（265W×426D×200H mm、トキワ科学器械(株)）に検疫・馴化期間中はケージあたり 2 または 5 匹（同性）、群分け以降は 2 匹（同性）ずつ収容し、スチール製架台（トキワ科学器械(株)）上に配置して飼育した。給餌には滅菌済ステンレス製固型飼料用給餌器（トキワ科学器械(株)）を、給水には滅菌済ポリカーボネート製給水瓶（700 mL、トキワ科学器械(株)）を使用した。ケージ（含床敷）、給餌器及び給水瓶は 5~8 日に 1 回オートクレーブ滅菌したものと交換した。また、ケージの配置位置をケージ交換時にローテーションした。

動物には、実験動物用固型飼料（MF、オリエンタル酵母工業(株)）と 5μm フィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由に摂取させた。飼料と飲用水はケージ交換時に交換した。

飼料中の残留農薬等の汚染物質濃度が、当研究所で定めた基準に適合していることを確認した。また、床敷中の残留農薬等の汚染物質濃度が、当研究所で定めた基準に適合していることを確認した。飲用水は水質検査を定期的実施し、分析値が水道法の基準に適合していることを確認した。

投与経路は、臨床適用経路に準じ皮下とし、投与回数は医薬品毒性試験法ガイドラインに従い 1 日 1 回 4 週間（28 回）とした。投与部位はラットの背部皮下織とし、毎日 27G 針付のディスプレイシリンジを用いて投与した。なお投与部位はラットの背部を 6 箇所に分けて、毎日場所を変えた。

臨床の際には 300CCA 相当量/mL に希釈したものを成人で 0.5 mL/1 回投与する。よって、本試験における用量表記は、被験物質原体（430CCA 相当量/mL）を 300CCA 相当量/mL となるように 1.43 倍希釈したものを原液として、体重あたりの液量で表示するものとした。

被験物質の毒性は低いと考えられるので、臨床量の 100 倍を最高用量とし、さらに臨床量に相当する用量を設けた。臨床量

は成人で 0.5 mL/1 回であり、体重当たり
に換算した臨床量は 0.5 mL/50 kg (0.01
mL/kg) と推定できるので、その 100 倍は
1.0 mL/kg である。

よって本試験の用量は 1.0 及び 0.01
mL/kg の 2 用量とし、その他に生理食塩液
を 1.0 mL/kg 投与する対照群を設けた。投
与液量は 1.0 mL/kg とし、至近日に測定し
た体重に基づいて各個体の投与液量を算出
した。

被験物質原体を生理食塩液 (株)大塚製
薬工場、ロット番号 K1G85) で 1.43 倍希
釈したものを原液とし、1.0 mL/kg 群には
そのまま投与した。0.01 mL/kg 群には原液
を生理食塩液で 100 倍希釈したものを投与
した。投与液の調製は投与直前とし、調製
後約 90 分以内に投与完了した。

群構成は、生理食塩液 1.0 mL/kg を投与
する対照群と被験物質 0.01 mL/kg を投与
する 0.01 mL/kg 群及び被験物質 1.0 mL/kg
を投与する 1.0 mL/kg 群をそれぞれ雌雄各
12 匹とした。

一般状態を投与日には 1 日 2 回 (投与
前、後)、解剖日には 1 日 1 回観察した。

投与開始日 (第 1 日) 並びに第 8, 15,
22 及び 28 日 (最終投与日) に全例の体重
を電子天秤 (EB-3200S, (株)島津製作所)
を用いて測定した。また、各測定日間の体
重増加量を算出した。

各ケージごとの給餌器の風袋込み重量

を投与開始日から週 1 回、電子天秤 (EB-
3200S, (株)島津製作所) を用いて測定し、
その間の 1 匹あたりの 1 日平均摂餌量を算
出した。

投与開始前日及び投与期間最終週 (第 4
週) に各用量群雌雄各 6 例について、スリ
ットランプ (SL-14, 興和(株)) と眼底カメ
ラ (GENESIS K9L29, 興和(株)) を用い、
前眼部、中間透光体及び眼底を検査した。
なお、中間透光体及び眼底の検査は散瞳剤
(ミドリリン P, 参天製薬(株)) 点眼後に行っ
た。

投与最終週に各群雌雄各 6 例の新鮮尿
を採取して試験紙法 (マルティスティック
ス, バイエル メディカル(株)) によって pH,
蛋白, グルコース, ケトン体, ビリルビン,
潜血及びウロビリノーゲンを自動尿分析器
(クリニテック 100, バイエル メディカ
ル(株)) で測定し、尿沈渣を Sternheimer-
Malbin 染色して鏡検した。引き続き約 21
時間蓄積尿を採取して尿量をメスシリンダ
ーで、比重 (屈折法) を尿比重屈折計 (ユ
リコン-JE, (株)アタゴ) で、ナトリウム量
及びカリウム量 (イオン選択電極法) 並び
にクロール量 (電量滴定法) を自動電解質
分析装置 (PVA- α III, (株)エイアンドティ
ー) で測定した。

投与期間終了時の計画解剖日 (第 29 日)
に、全動物を前日夕方から絶食して、チオ
ペンタールナトリウム (ラボナール, 田辺

製薬(株)を腹腔内投与して麻酔し、後大静脈より採血した。凝固阻止剤 EDTA-2K で処理した血液を用い赤血球数 (球状化処理二次元レーザー FCM 法)、ヘモグロビン濃度 (シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値 (球状化処理二次元レーザー FCM 法)、網赤血球数 (RNA 染色によるレーザー FCM 法)、血小板数 (球状化処理二次元レーザー FCM 法) 及び白血球数 (酸性界面活性剤によるレーザー FCM 法) を自動血球分析装置 (ADVIA120, バイエル メディカル(株)) で測定し、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH) 及び平均赤血球血色素濃度 (MCHC) を算出した。また、Wright 染色塗抹標本を用いて白血球百分率を自動血液細胞分析装置 (HEG-50 及び HEG-50VF, (株)オムロン) で測定した。さらに血液の一部を 3.2w/v% クエン酸三ナトリウム溶液で凝固阻止後、遠心分離して得られる血漿を用いてプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (光散乱検出方式) を自動血液凝固測定装置 (CA-510, シスメックス(株)) で測定した。なお、対照群の雌 1 例 (#50112) のプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間は測定中にフィブリン塊が出現したため測定できなかった。

計画解剖時に採取した血液の一部を室温で約 30 分間放置後遠心分離し、得られ

た血清を用いて ASAT (GOT)及び ALAT (GPT) (JSCC 改良法), γ GT (SSCC 改良法), ALP (JSCC 改良法), 総ビリルビン (BOD 法), 尿素窒素 (Urease-LEDH 法), クレアチニン (Creatine Kinase 法), グルコース (GlcK-G6PDH 法), 総コレステロール (CO-HDAOS 法), リン脂質 (COD-DAOS 法), トリグリセライド (GPO-HDAOS 法, グリセリン消去法), 総蛋白 (Biuret 法), アルブミン (BCG 法), カルシウム (OCPC 法), 無機リン (PNP-XOD-POD 法), ナトリウム, カリウム及びクロール (イオン選択電極法) を自動生化学分析装置 (TBA-200FR, (株)東芝) で、グロブリン分画 (セルロースアセテート膜電気泳動法) を自動電気泳動分析装置 (Epalyzer, (株)ヘレナ研究所) で測定し、A/G 比を総蛋白及びアルブミンから算出した。

投与期間終了時の計画解剖日 (第 29 日) に、全例を採血後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後剖検した。全動物の心臓、リンパ節 (下顎・腸間膜)、胸腺、脾臓、気管、肺、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、唾液腺 (下顎・舌下)、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、精巣、精囊、前立腺 (腹葉)、精巣上部、下垂体、甲状腺及び上皮小体、副腎、大腿骨及び骨髄 (片側)、胸骨及び骨髄、皮膚、乳腺、眼球、ハーダー腺、視神経、脳、脊髄、卵巣、子宮、膣、投与部位 (背部皮膚)、

尾を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣はブアン液で、眼球、ハーダー腺及び視神経はダビドソン液でそれぞれ固定した後、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。

次に肝臓、腎臓、甲状腺、胸腺、副腎、下垂体、卵巣、子宮、精巣、前立腺（腹葉）、精嚢、脳、唾液腺（下顎及び舌下）、肺、心臓、脾臓の重量を電子天秤（EB-H60、株島津製作所）で測定した。ただし甲状腺及び下垂体はホルマリン固定後に測定した。また、解剖日に体重を測定し、相対重量（対体重比）を算出した。

投与期間終了時に採取した対照群と 1.0 mL/kg 群の全例の器官・組織は常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、鏡検した。ただし唾液腺、眼球、ハーダー腺及び視神経は片側のみ標本作製し、鏡検した。検査の結果、投与部位（背部皮下）において被験物質投与の影響が疑われる変化が認められたので、0.01 mL/kg 群の当該組織も検査した。なお、1.0 mL/kg 群の雄 1 例（#10305）の片側上皮小体及び同群の雄 1 例（#10309）の両側上皮小体は標本作製過程で失われたため組織検査できなかった。

尾については、一般状態観察で対照群を含む全動物に尾の潮紅が認められたため、全動物の当該部位を採取した。しかし、剖

検では変化が認められなかったこと、及びその発現状況から被験物質との関連はないと判断し、組織検査は行わなかった。

計量データは、多重比較検定法で統計学的有意性を検討した。すなわち Bartlett 法による等分散の検定を行い、分散が等しい場合は一元配置分散分析、分散が等しくない場合は Kruskal-Wallis の検定を行った。群間に有意な差が認められた場合は Dunnett 法または Dunnett 型の多重比較検定を行った。計数データは $a \times b$ の χ^2 検定を行い、有意差が認められた場合は Armitage の χ^2 検定で対照群と各用量群を比較した。

いずれの検定でも有意水準は5%とした。

一般状態、眼科学的検査、病理解剖検査及び病理組織学的検査結果については、統計学的解析を実施しなかった。

（倫理面への配慮）

本研究は株三菱化学安全科学研究所鹿島研究所動物実験倫理委員会の承認を受けて実施したものである。

C. 研究結果

一般状態観察の結果、尾の潮紅が 1.0 mL/kg 群の雌で第 1 日の投与後から、同群の雄で第 2 日の投与後から、0.01 mL/kg 群の雌で第 3 日の投与前から、同群の雄で第 5 日の投与前からそれぞれ認められ、観察

期間終了時まで継続した。しかし、本症状は対照群でも雌で第3日の投与前から、雄で第5日の投与前から認められ、観察期間終了まで継続した。

体重及び体重増加量測定の結果、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

摂餌量測定の結果、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

眼科学的検査の結果、被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

尿検査の結果、対照群と比較して有意な尿比重の高値及び尿量の低値が雌の1.0 mL/kg 群で認められた。しかし、いずれも当研究所の背景データ範囲内の変化であった。

血液学的検査の結果、対照群と比較して有意な網赤血球数の低値が雌の0.01 及び1.0 mL/kg 群で認められた。しかし、当研究所の背景データ範囲内の変化であった。

血液化学的検査の結果、対照群と比較して有意なグロブリンβ分画の高値が雄の1.0 mL/kg 群で、A/G 比の低値が雌の1.0 mL/kg 群でそれぞれ認められた。しかし、いずれも当研究所の背景データ範囲内の変化であった。

剖検の結果、被験物質投与に起因する所見は認められなかった。

器官重量測定の結果、対照群と比較し

て有意な下垂体重量の低値が雌の0.01 mL/kg 群と雌雄の1.0 mL/kg 群で、下垂体対体重比の低値が雌の0.01 及び1.0 mL/kg 群で、副腎重量の低値が雄の0.01 及び1.0 mL/kg 群で、肺体重比の低値が雌の1.0 mL/kg 群で、卵巣対体重比の低値が0.01 及び1.0 mL/kg 群でそれぞれ認められた。

しかし、いずれも当研究所の背景データ範囲内の変化であった。その他に胸腺重量および対体重比の低値が雄の0.01 mL/kg 群で、肝臓重量および対体重比ならびに卵巣重量の低値が0.01 mL/kg 群の雌でそれぞれみられたが、1.0 mL/kg 群では認められないことから被験物質投与とは関連のない偶発変化と判断した。

病理組織学的検査の結果、被験物質に起因すると思われる変化が投与部位に認められた。投与部位の炎症性細胞浸潤が対照、0.01 mL/kg 及び1.0 mL/kg 群の雄でそれぞれ2, 11, 12 例に、同じく雌で5, 10, 10 例に認められ、ほとんどが軽度の変化であったが、1.0 mL/kg 群の雄2例と雌1例では中等度の変化であった。中等度の変化を示した雄2例にみられた変化は出血とコラーゲン変性を伴っていた。また、軽度の変化としたなかでも0.01 mL/kg 群の雄4例と雌3例、1.0 mL/kg 群の雄5例と雌2例では、対照群と比較して浸潤する炎症性細胞の数が多かった。