

#### D. 考察

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 Crj: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。

その結果、体重、摂餌量、眼科学的検査及び剖検結果に被験物質投与の影響は認められなかった。

一般状態観察において尾の紅潮が雌雄の被験物質投与群で認められた。しかし、紅潮は対照群でも雌で第 3 日、雄で第 5 日以降に認められる程度の変化であり、剖検時に異常は認められなかったことから、毒性学的な意義は少ないものと判断した。ただし、本変化が対照群にもみられた理由は不明である。

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査において認められた変化はいずれも当研究所の背景データ範囲内の変化であったことから毒性学的意義のない偶発変化と判断した。

器官重量測定において認められた変化はいずれも当研究所の背景データ範囲内の変化であり、病理組織学的検査においてこ

れらの器官に変化は認められなかったことから、毒性学的意義のない偶発変化と判断した。

病理組織学的検査の結果、雌雄とも被験物質投与群の投与部位において被験物質に起因する変化が認められた。すなわち、投与部位皮下の炎症性細胞浸潤は対照群においても認められたが、被験物質投与群では発現例数が多く、病変程度も若干強かった。したがって、本被験物質は弱い刺激性を有すると思われる。

#### E. 結論

H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンをラットに 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。

#### 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 渡部 秀次 ㈱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, 200 および 400 倍である 1.0, 0.5 および 0.25 mL/kg の用量およびで 8 週齢の ICR 系 (Crj : CD-1) 雄マウス (SPF) に 2 回投与 (24 時間間隔) 皮下投与した時のマウス骨髄細胞における小核誘発性の有無を検討した。

マウスには一般状態に被験物質投与による変化は見られなかった。また、小核をもつ多染性赤血球 (MNPCE) の出現数および多染性赤血球 (PCE) の出現頻度は、いずれの被験物質投与群でも、陰性対照群と比較して有意な差はなかった。陰性対照群の小核をもつ多染性赤血球 (MNPCE) の出現数は、当研究所における背景データの変動範囲内の値であったこと、および陽性対照群の小核をもつ多染性赤血球 (MNPCE) の出現数が著しく増加したことにより、本試験が適切に行われたことを示唆した。

これらのことより本試験条件下において、本試験条件下における H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンの小核誘発性は陰性と結論した。

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、マウス骨髄細胞における小核誘発性の有無を検討する。

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 2002 年 2 月 6 日に入手した ICR 系 (Crj : CD-1) マ

ウス (SPF) 雄 30 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 6 匹を使用した。投与日の週齢は 8 週齢、体重範囲は 36.0~40.8 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。

検査・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度 22.2～23.6℃、相対湿度 48.4～61.4%、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）に調節されたマウス・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（2220W×325D×130H mm、トキワ科学器械株）に検査・馴化期間中はケージあたり 5 匹以下、群分け以降は 6 匹ずつ収容し、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（250 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 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）と 5 $\mu$ 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、ただし陽性対照の CP は腹腔内投与とした。投与回数は遺伝毒性試験ガイドラインに従った。また、一般的に小核試験でよく用いられている 2 回投与（24 時間間隔）とした。ただし陽性対照の CP は 1 回投与とした。投与部位はマウスの背部皮下織とし、25G 針付のディスプレイ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 の一用量および公比 2 で 0.50 および 0.25 mL/kg の 3 用量とし、その他に溶媒（生食）のみを投与する陰性対照群および CP 40 mg/kg を投与する陽性対照群を設定した。投与液量は、いずれも体重 1 kg あたり 10 mL とし、

各投与直前に測定した体重をもとに算出した。

被験物質原体を生理食塩液（株）大塚製薬工場、ロット番号 K1K99）で 1.43 倍希釈したものを原液としたものおよび、同じ溶媒で 2 および 4 倍希釈したものをそのまま投与した。

群構成は、生理食塩液 10 mL/kg を投与する対照群 6 匹と被験物質 1.0, 0.5 および 0.25 mL/kg を投与する群各 6 匹および陽性対照 CP を 40 mg/kg を投与する群 6 匹とした。

一般状態を 1 日 1 回観察した。

投与日（投与直前）及び標本作製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。

最終投与 24 時間後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、大腿骨を摘出した。リン酸緩衝生理食塩液 [PBS(-), 日水製薬株] で骨髓細胞を洗出し、細胞浮遊液を得た。この細胞浮遊液を 200 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を分取した。上清に 10% 中性緩衝ホルマリンを加え、1000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を捨てた。同様の操作を 2 回繰り返す。残った少量の 10% 中性緩衝ホルマリンで均一な骨髓細胞浮遊液を作り、保存した。骨髓細胞浮遊液をアクリジン・オレンジ染色し、骨髓細胞をスライドガラスに伸展した。

標本は B2 励起の蛍光顕微鏡を用いてブ

ラインド法により観察した。1 個体毎に全赤血球（多染性赤血球および正染性赤血球）1000 個における多染性赤血球の割合を調べると共に、多染性赤血球 2000 個中の小核をもつ細胞数を数えた（2 領域、合計 2000 個）。細胞の識別は Hayashi らの方法に従い、赤血球の細胞質中に黄緑色の蛍光を放つ顆粒を小核とした。なお、多染性赤血球とは赤血球の細胞質が赤色蛍光色のもの、正染性赤血球とは赤血球の細胞質が蛍光を発しないものとしてそれぞれを区別した。小核をもつ多染性赤血球の出現頻度については Kastenbaum と Bowman の統計学的方法、多染性赤血球出現頻度（%）については Student の *t*-検定を用いて有意水準 5% および 1% の有意差検定を実施した。用量の増加とともに小核をもつ多染性赤血球の有意な増加が認められる場合を陽性と判定した。

（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

一般状態に被験物質投与による変化は見られなかった。小核をもつ多染性赤血球（MNPCE）の出現数および多染性赤血球（PCE）の出現頻度は、いずれの被験物質投与群でも、陰性対

照群と比較して有意な差はなかった。

#### D. 考察

陰性対照群の小核をもつ多染性赤血球 (MNPCE) の出現数は、当研究所における背景データの変動範囲内の値であったこと、および陽性対照群の小核をもつ多染性赤血球 (MNPCE) の出現数が著しく増加したことにより、本試験が適切に行われたことを示唆した。

#### E. 結論

本試験条件下における H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンの小核誘発性は陰性と結論した。

#### 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。

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 中川 宗洋 (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のチャイニーズハムスター由来の細胞株 CHL/TU に対する染色体異常誘発性を検討した。

細胞増殖抑制試験の結果に基づいて、短時間処理法（6 時間処理，18 時間回復）の S9 mix 共存下では 1/10，2/10，3/10，4/10，5/10 希釈液，S9 mix 共存下では 1/4，1/2 希釈液および原液，連続処理法 24 時間処理では 1/20，1/10，2/10，3/10，4/10 希釈液で細胞を処理した。その結果，短時間処理法 S9 mix 非共存下および連続処理法 24 時間処理において，10% 以上の染色体構造異常誘発が認められた。一方，短時間処理法 S9 mix 共存下においては，染色体構造異常誘発頻度は 5% 未満であった。

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は染色体異常誘発性を有すると結論した。ただし，この染色体異常誘発性は，代謝活性化条件下では抑制されることが示唆された。

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，培養細胞（CHL/TU）に対する染色体異常誘発性を検討する。

細胞株 CHL/TU を使用した。購入した細胞を増殖後，凍結保存したものを融解して試験に使用した。

細胞の培養には，プラスチックプレート（直径 6 cm または 10 cm；Becton Dickinson and Company）を用い，炭酸ガス細胞培養装置内（炭酸ガス 5%，温度 37℃に設定，加湿，NAPCO 社，7300 型）で培養した。

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 日，HA 抗原濃度 430CCA/mL）を使用した。

培地として，イーグル MEM 培地「ニッスイ」①（日水製薬(株)）に L-グルタミンおよび炭酸水素ナトリウムを添加したものを使用した（以下 MEM）。これに仔牛血清を 10% の割合で添加したものを培養液として

大日本製薬(株)から 2001 年 7 月 17 日に入手した雌チャイニーズハムスター肺由来細

使用した（以下 MEM 培地）。

S9 はキッコーマン株から購入し、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で保存したものを、使用時に融解した。使用時に、S9 0.3 mL, D グルコース-6-リン酸  $5\ \mu\text{mol}$ ,  $\beta\text{-NADP}^+$   $4\ \mu\text{mol}$ , HEPES (pH 7.2)  $4\ \mu\text{mol}$ , 塩化マグネシウム  $5\ \mu\text{mol}$ , 塩化カリウム  $33\ \mu\text{mol}$ , 精製水 残量の割合で S9 mix を調製した。

被験物質の溶媒には生理食塩水を使用した。被験物質原体を必要量用時分取して、最高用量の被験物質溶液とした。これを溶媒で段階希釈して各用量の被験物質溶液を調製した。被験物質溶液は用時調製した。

細胞処理に先立ち、 $4 \times 10^3$  個/mL に調製した細胞浮遊液を 6 cm プレートに 5 mL ずつ播き、3 日間前培養した。MEM 培地を除去した後、短時間処理法 S9 mix 非共存下では被験物質溶液（または溶媒）0.3 mL, MEM 培地 2.7 mL で細胞を処理した。短時間処理法 S9 mix 共存下では被験物質溶液（または溶媒）0.3 mL, S9 mix 0.5 mL, MEM 培地 2.2 mL で細胞を処理した。連続処理法 24 時間処理では被験物質溶液（または溶媒）0.5 mL, MEM 培地 4.5 mL で細胞を処理した。1 用量あたり 2 枚のプレートを処理した。連続処理法では 24 時間、短時間処理法では 6 時間細胞を処理した。短時間処理法では 6 時間処理後、MEM で細胞表面を 3 回洗浄し、新たに MEM 培地 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

染色体異常試験の用量を決定するための細胞増殖抑制試験では、各処理条件について、1/10 希釈液, 1/5 希釈液, 2/5 希釈液, 3/5 希釈液, 4/5 希釈液, 原液で細胞を処理した。処理後の細胞をメタノールで固定、3%ギムザ液で染色した後、単層培養細胞密度計（モノセレーター, オリンパス光学工業株）を用いて細胞増殖率を測定した。

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験では、-S9 mix では 1/10 希釈液, 2/10 希釈液, 3/10 希釈液, 4/10 希釈液, 5/10 希釈液, +S9 mix では 1/4 希釈液, 1/2 希釈液, 原液, 24 時間処理では 1/20 希釈液, 1/10 希釈液, 2/10 希釈液, 3/10 希釈液, 4/10 希釈液でそれぞれ細胞を処理した。

陽性対照群として、短時間処理法 S9 mix 非共存下ではマイトマイシン C  $0.1\ \mu\text{g/mL}$ , 連続処理法 24 時間処理ではマイトマイシン C  $0.05\ \mu\text{g/mL}$ , 短時間処理法 S9 mix 共存下ではベンゾ[a]ピレン  $20\ \mu\text{g/mL}$  でそれぞれ処理した。

細胞処理は、細胞増殖抑制試験と同様に実施した。

処理細胞を 2 時間コルセミド処理した後、トリプシン処理による剥離、 $0.075\text{mol/L}$  塩化カリウム溶液による低張処理、メタノール：酢酸 (3:1) 混合液による低張処理により、染色体標本を作製した。標本をギムザ液で染色し、封入して観察に使用した。

観察は、プレート 1 枚につき 100 個、す



なわち 1 用量 200 個の分裂中期細胞を盲検法で観察した。構造異常は、染色分体型切断、染色分体型交換、染色体型切断、染色体型交換、断片化に分類して観察した。ただし、動原体数が  $25 \pm 2$  または 35 以上でない細胞は除外した。ギャップは、染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。数的異常は、動原体数が 35 以上のものとし、核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

構造異常を 1 個以上もつ細胞を染色体異常細胞として集計した。被験物質の染色体異常誘発性の判定は、各処理条件において、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に 5% 未満を陰性 (-)、いずれか一方または両方が 5% 以上 10% 未満を疑陽性 ( $\pm$ )、いずれか一方または両方が 10% 以上を陽性 (+) とした。結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

#### C. 研究結果

細胞増殖抑制試験の結果、細胞増殖が 50% 抑制される用量は、-S9 mix で約 3/10 希釈液、24 時間処理で約 1/5 希釈液であった。+S9 mix では 50% を超える細胞増殖抑制は認められなかった。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、-S9 mix の 4/10 希釈液、5/10 希釈液でそれぞれ 24.5、31.5%、

24 時間処理の 4/10 希釈液で 10.7% であった。一方、+S9 mix では、いずれの用量においても染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 5% 未満であった。また、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件のいずれの被験物質処理群においても 5% 未満であった。

すべての陰性対照群における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% 未満であり、一方、すべての陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 10% 以上であった。

#### D. 考察

短時間処理法 S9 mix 非共存下および連続処理法 24 時間処理で、10% 以上の染色体構造異常誘発が認められた。ただし、染色体異常誘発の認められた用量では、強い細胞毒性が認められたことから、これらの染色体異常誘発が細胞毒性に起因するものである可能性も示唆された。

短時間処理法 S9 mix 共存下では、いずれの被験物質処理群でも 50% 以上の細胞増殖抑制は認められず、5% 以上の染色体異常誘発も認められなかった。この結果から、本被験物質の細胞毒性および染色体異常誘発性は、S9 mix 共存下では抑制されたと考えられた。

また、すべての陰性対照群では、染色体構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度

は5%未満であり、一方、すべての陽性対照群では、染色体構造異常細胞の出現頻度は10%以上であったことから、これらの試験が技術的に成立していることが示された。

#### E. 結論

従って、H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンは、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と結論した。ただし、本被験物質の有する細胞毒性および染色体異常誘発性は、代謝活性化条件下では抑制されることが示唆された。

#### 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 榎本 佳明 ㈱三菱化学安全科学研究所

*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験で H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワクチンの変異原性を調べた。

用量設定試験を被験物質原体（430 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、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍以下であった。また、これらの結果をもとに、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535 および WP2uvrA/pKM101 については被験物質原体（430 CCA/mL）、1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 希釈液の 7 用量、TA98, TA1537 については 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 希釈液の 8 用量を、存在下のすべての菌株については被験物質原体（430 CCA/mL）、1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 希釈液の 6 用量をそれぞれ設定して本試験を実施した結果、S9 mix 存在下の TA100 で陰性（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が認められた。S9 mix 非共存下のすべての菌株および共存下の TA1535, WP2uvrA/pKM101, TA98 および TA1537 では、いずれの試験においても陰性（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 非存在下のすべての菌株で抗菌性が認められた。なお、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

試験の結果に再現性が得られなかったため、S9 mix 存在下の TA100 について被験物質原体（430 CCA/mL）、1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 希釈液の 6 用量を設定し、確認試験を実施した。その結果、S9 mix 存在下の TA100 では復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍以下であった。

以上の結果から、H5N1 型全粒子不活化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有さない（陰性）と結論した。

A. 研究目的

クチンの安全性に関する研究の一環として、

H5N1 型全粒子不活化インフルエンザワ

サルモネラ菌株および大腸菌株を用いる復

帰突然変異試験を実施し、被験物質の変異原性を検討する。

## 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。

陰性 (溶媒) 対照物質として、注射用水 (DW と略す; ㈱大塚製薬工場, ロット番号 K0C78) を、陽性対照物質として、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2 と略す; 和光純薬工業㈱, ロット番号 CAP0185, 純度 98.9%), アジ化ナトリウム (NaN<sub>3</sub> と略す; 和光純薬工業㈱, ロット番号 KWE6685, 純度 96.5%), *N*-エチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (ENNG と略す; Sigma Chemical Company, ロット番号 56F-3651, 純度 99.0%), 9-アミノアクリジン塩酸塩 (9-AA と略す; Sigma Chemical Company, ロット番号 80F-0186, 純度 99%) および 2-アミノアントラセン (2-AA と略す; 和光純薬工業㈱, ロット番号 TWH2355, 純度 98.0%) を用いた。

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および日本バイオアッセイ研究センターより 1997 年 9 月 18 日に入手した *Escherichia coli* WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株を用いた。

各テスト菌株のアミノ酸要求性, 紫外線感受性, 膜変異, 薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ, これらの特性を備えた菌株を用いた。

液体完全培地中に 37°C で 8 時間振盪培養した各菌懸濁液 24 mL に, 2.1 mL のジメチルスルホキシド (DMSO と略す; 関東化学㈱, ロット番号 207G1673) を加え, これを 200 μL ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した。凍結した菌懸濁液は超低温冷凍庫で -80°C 以下に保存した。各試験菌の凍結保存液 (20 μL) を液体完全培地 10 mL に接種し, 37°C で 8 時間振盪 (振盪回数: 90 回/分) 培養した。培養容器には L 字管を用いた。培養終了後, 濁度計を用いて菌懸濁液の濁度を測定した。濁度からの換算により菌数を算出し, 適切な菌濃度であることを確認した後, 試験に使用した。

精製水 100 mL に対して, ニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2; Unipath 社, ロット番号 028 59365) を 2.5 g の割合で加えて溶解し, オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分間) したものおよび寒天平板培地として, クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業㈱, 2001 年 6 月 19 日製造; ロット番号 ANI380FQ) を購入し使用した。

精製水 300 mL に粉末寒天 (Bacto-Agar; Difco 社, ロット番号 136958JC) 1.8 g およ

び塩化ナトリウム 1.5 g を加え、オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分間) し完全に溶解し、その後、サルモネラ用には 0.5 mmol/L D-ビオチンおよび 0.5 mmol/L L-ヒスチジン混合水溶液、あるいは大腸菌用には 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液をそれぞれ 1/10 量添加したものを使用した。使用時に約 45°C に保温した。

フェノバルビタール (1 日目 30 mg/kg を 1 回腹腔内投与, 2 日目以降 60 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与) と 5,6-ベンゾフラボン (3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与) で酵素誘導した SD 系雄ラット (体重 203 - 251 g) 肝由来 S9 (キッコーマン㈱, 2001 年 8 月 31 日製造; ロット番号 RAA-450) を購入し、使用した。S9 は使用時まで超低温冷凍庫 (三洋電気㈱, MDF-192AT: 実測値 -82°C ~ -88°C) に保存した。

試験委託者からの情報を基に、本被験物質の溶媒には注射用水 (DW) を用いた。被験物質原体 (430 CCA/mL) を必要量用時分取して、最高用量の被験物質溶液とした。これを同じ溶媒で段階希釈して各用量の被験物質溶液を調製した。被験物質溶液は用時調製し、被験物質の秤量、希釈、分注および調製後の保存は、室温、黄色灯下で行った。

陽性対照物質溶液はあらかじめ調製し、超低温冷凍庫で -80°C 以下に保存した。NaN<sub>3</sub> は DW (㈱大塚製薬工場, ロット番号

K9J78) に、その他の陽性対照物質は DMSO (関東化学㈱, ロット番号 207G1673) に溶解した。

用量設定試験を被験物質原体 (430 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、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍以下であった。また、これらの結果をもとに、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535 および WP2uvrA/pKM101 については被験物質原体 (430 CCA/mL), 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 希釈液の 7 用量, TA98, TA1537 については 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 希釈液の 8 用量を、存在下のすべての菌株については被験物質原体 (430 CCA/mL), 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 希釈液の 6 用量をそれぞれ設定して本試験を実施した結果、S9 mix 存在下の TA100 で陰性 (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が認められた。

S9 mix 非共存下のすべての菌株および共存下の TA1535, WP2uvrA/pKM101, TA98 および TA1537 では、いずれの試験においても陰性 (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 非存在下のすべての菌株で抗菌性が認められた。なお、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においてもプレ

ト上に沈殿物は認められなかった。

試験の結果に再現性が得られなかったため、S9 mix 存在下の TA100 について被験物質原体 (430 CCA/mL), 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 希釈液の 6 用量を設定し、確認試験を実施した。その結果、S9 mix 存在下の TA100 では復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍以下であった。

試験はプレインキュベーション法を用いて、S9 mix 非存在下および存在下で実施した。滅菌した試験管に被験物質溶液または陰性 (溶媒) 対照物質 0.1 mL, S9 mix 非存在下の場合、次いで 0.1 mol/L ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) を 0.5 mL, S9 mix 存在下の場合、S9 mix を 0.5 mL 添加し、さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加え、37°C で 20 分間振盪してインキュベーションした (プレインキュベーション)。

トップアガー 2 mL をこの混合液に加え、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37°C で 48 時間以上培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による菌の生育阻害の程度を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。

プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。各用量につき 2 枚のプレートを使用した。試験は用量設定試験および本試験の 2 回実施した。

また、用量設定試験および本試験で結果に再現性が得られなかったため、確認試験を実施した。

陽性対照試験については S9 mix 非存在下では TA100 は AF-2 を 0.01 µg/プレート、TA1535 は NaN<sub>3</sub> を 0.5 µg/プレート、WP2*uvrA*/pKM101 は ENNG を 2 µg/プレート、TA98 は AF-2 を 0.1 µg/プレート、TA1537 は 9-AA を 80 µg/プレートの用量で、S9 mix 存在下では TA100 は 2-AA を 1 µg/プレート、TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 および TA1537 は 2-AA を 2 µg/プレート、TA98 は 2-AA を 0.5 µg/プレートの用量で同様に実施した。

無菌試験にはそれぞれ 1 枚のプレートを用いた。最高用量の被験物質溶液または S9 mix をトップアガー 2 mL と混和し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37°C で 48 時間培養し、雑菌の混入について確認した。

試験結果の判定に際しては、いずれかの試験菌株で、S9 mix の有無にかかわらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数 (平均値) が陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する (陽性) と判定した。その他の場合は陰性と判定した。試験結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

(倫理面への配慮)

なし。

### C. 研究結果

用量設定試験を被験物質原体 (430 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、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍以下であった。また、S9 mix 非存在下のすべての菌株で抗菌性が認められた。なお、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

これらの結果をもとに本試験では、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535 および WP2uvrA/pKM101 については被験物質原体 (430 CCA/mL) , 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 希釈液の 7 用量, TA98, TA1537 については 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 希釈液の 8 用量を、存在下のすべての菌株については被験物質原体 (430 CCA/mL) , 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 希釈液の 6 用量をそれぞれ設定した。

本試験の結果、S9 mix 存在下の TA100 で陰性 (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が認められた。S9 mix 非共存下のすべての菌株および共存下の TA1535, WP2uvrA/pKM101, TA98 および TA1537 では、いずれの試験においても陰性

(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 非存在下のすべての菌株で抗菌性が認められた。なお、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

試験の結果に再現性が得られなかったため、S9 mix 存在下の TA100 について被験物質原体 (430 CCA/mL) , 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 希釈液の 6 用量を設定し、確認試験を実施した。その結果、S9 mix 存在下の TA100 では復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍以下であった。

最高用量の被験物質溶液および S9 mix について行った無菌試験の結果、試験に影響を及ぼすような菌、カビ等の混入は認められなかった。

### D. 考察

用量設定試験を被験物質原体 (430 CCA/mL) を最高用量として実施した結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍以下であった。

用量設定試験の結果をもとに、被験物質原体 (430 CCA/mL) あるいは抗菌性を示す用量を最高用量として本試験を実施した結果、S9 mix 存在下の TA100 で陰性 (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が認められた。

用量設定試験および本試験で結果に再現性が得られなかったため、S9 mix 存在下の TA100 について確認試験を実施した結果、復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍以下であった。

本試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値が背景データより算出した適正範囲の範囲内であったこと、また S9 mix 非存在下および存在下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数が、各菌株の陰性（溶媒）対照の復帰変異コロニー数と比較して明らかに 2 倍を超えて増加し陽性の結果を示したことから、試験が適切に実施されたことが確認された。

#### E. 結論

HSN1 型全粒子不活化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有さない（陰性）と結論した。

#### 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。



**研究要旨** 安全性の高い無毒化変異コレラ毒素 CT112K (A サブユニットの N 末から 112 番目のグルタミン酸をリシンに置換したものを)併用したインフルエンザワクチンの経鼻投与によって、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明らかになった。

#### A. 研究目的

H5N1 型全粒子不活化ワクチンの予防効果を高める戦術の一つとして、これを適当なアジュバントと共に経鼻投与し気道上に交叉反応性の高い IgA 抗体を誘導する方法がある。これまでの我々の実験から、この経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして、山本らによって報告されたコレラトキシンの変異毒素である CT112K (A サブユニットの N 末から 112 番目のグルタミン酸をリシンに置換したものが安全かつ有効であることが示されている。本研究では、ヒトへの投与を前提として、この CT112K 併用インフルエンザワクチンが、マウスにおいて、インフルエンザの防御に有効などのような免疫応答を誘導するのかを検討した。

#### B. 研究方法

ヒトでの安全性の観点から、最適ワクチン投与条件として、BALB/c マウスに、インフルエンザワクチン (H1N1 亜型、A/PR/8/34 ウイルス由来) (最小有効濃度 0.1 $\mu$ g) をアジュバント (0.1 $\mu$ g) と共に初回投与し、4 週間後に同じ A/PR/8/34 (PR8) 由来の HA ワクチン (0.1 $\mu$ g) のみを追加する投与方式を用いた。また、この追加ワクチン投与後 2 週間目に致死量のウイルスを感染し、その 1-3 日の鼻及び肺のウイルス価を測定し予防効果を判定した。その結果、この投与方式

において、初回投与のみの対照群では鼻で完全なまた肺では部分的な防御がみとめられ、2 回投与の実験群では、鼻でも肺でも完全な防御が認められた。しかも、鼻及び肺のウイルス価は、ウイルス感染 1 日目から検出限界以下になり、防御機構が感染直後にはじまり、感染 1 日目後には完了していることが示唆された。このような 2 回免疫方式でどのような抗体、および T 細胞免疫応答が誘導されるかを検討した。

#### (倫理面への配慮)

マウスの飼育環境は良好であり、また、マウスからの気道洗浄液、細胞等の採取は、マウスの苦痛が無いように麻酔条件での心臓からの全採血による死亡後に行った。

#### C. 研究結果

(1) 鼻咽頭粘膜関連リンパ組織 (NALT) には 1 回投与 7 日目に低レベルの IgA, IgG, IgM 抗体産生細胞 (AFC) が検出され、2 回投与 5 日目には、高いレベルの IgA, IgG と中等度の IgM AFC が検出された。また、脾臓では 1 回投与 7 日目に低レベルの IgA, IgG, IgM AFC が検出され、2 回投与 5 日目には高いレベルの IgG, IgM と中等度の IgA AFC が検出された。(2) AFC の出現と相関して、1 回投与 4 週目では、低レベルの鼻洗浄液中の抗 PR8 HA IgA, 血清中の抗 PR8 HA IgG 抗体応答が誘導された。2 回投与 2 週目

では、高いレベルの IgA と IgG が誘導された。(3) 1 回投与 4 週の血清 IgG 抗体のサブクラスは、IgG2a(Th1 型)の方が IgG1(Th2 型)よりも多く産生され、2 回投与では、IgG1 が IgG2a よりも多く産生された。(4) 1 回免疫後 7 日目にピークの遅延型過敏 (DTH) 応答が検出され、2 回免疫後 3 日目に DTH 応答が加速誘導されたが、その後 2 週目までに応答は低下した。(5) 2 回投与後 2 週目の脾細胞には CTL 誘導能力がなかったが、その脾細胞を培養して 5 日目の細胞にはウイルス感染群の約半分のメモリー CTL 活性が検出された。(6) 感染株と異なるワクチン株をもちいて、この 2 回免疫方式で免疫すると、上気道(鼻)では感染株に交叉する IgA 抗体が誘導され、感染に対しては同じ A 型内で強い交叉防御が認められた。一方、下気道(肺)では交叉 IgA がほとんど検出されず、交叉防御がほとんど認められなかった。

#### D. 考察

以上の結果により、CT112K 併用ワクチンの 2 回免疫方式によって、インフルエンザウイルス抗原に対する抗体応答、DTH 応答、CTL 応答などの獲得免疫応答が誘導されることが示された。これらの応答の中で、抗体応答が、初回免疫よりも 2 回免疫によって強化される防御機構として、しかも、感染直後から作用し感染 1 日目後には完了する防御機構として最も重要な役割を果たしていることが考えられた。さらに、上気道でのウイルス感染防御において IgA 抗体応答が、また、下気道において IgG 抗体応答が重要な役割を果たしていることが示された。さらに、ウイルスの侵入門戸である気道粘膜において分泌型 IgA 抗体の変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にもこの CT112K 併用経鼻接種ワクチンの有効性が確認された。

#### E. 結論

最小有効濃度(0.1 $\mu$ g)のインフルエンザワクチンと CT112K を共に初回投与し、4 週間後に PR8HA ワクチン(0.1 $\mu$ g)のみを追加するこの経鼻ワクチンの BALB/c マウスにおける最適投与条件において、誘導される獲得免疫応答のうち、抗体応答、特に、上気道の IgA 抗体応答が、また、下気道では IgG 抗体応答がウイルス感染阻止に最も重要な役割を果たしていることが示された。さらに、粘膜の IgA 抗体は変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にもこの CT112K 併用経鼻インフルエンザワクチンが有効であることを示唆していた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Watanabe, I. et al. : Characterization of protective immune responses induced by nasal Influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). Vaccine (submitted), 2002

##### 2. 学会発表

渡辺泉、他 9 名 ; アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンが誘導する免疫応答と防御効果。第五回日本ワクチン学会、2001 年 10 月、熊本。

#### 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。

6. 研究成果の刊行に関する一覧表（1）

刊行書籍又は雑誌名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
New Engl. J. Med. 344 Japanese Experience with vaccinating schoolchildren against influenza.	2001		Reickert, T., Sugaya, N., Fedson, D., Glezen, W., Simonen, L., <u>Tashiro, M.</u>
J. Infect. Dis. 39: Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan.	2001		Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Horimoto, T., Sawada, T., <u>Tashiro, M.</u> , Yamaguchi, K., Niwa, S., Shigeta, S.
J. Virol. 76 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.	2001		Kato, A., Ohnishi, Y., Kohase, M., Saito, S., <u>Tashiro, M.</u> , Nagai, Y.
Vaccine 19 Inhibition of rubella virus growth by Fungizone.	2001		Umino, Y., <u>Tashiro, M.</u>
Arch. Virol. 146 Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines.	2001		Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., <u>Tashiro, M.</u>
Vaccine 20 Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong.	2001		Saito, T., Lim, W., Suzuki, Y., Kida, H., Nishimura, S.-I., <u>Tashiro, M.</u>
Science 293: 1729 Global laboratory against influenza	2001		Layne, S. P., Beigelsdijk, T. J., Taubenberger, J. K., Cox, N. J., Gust, I. D., Hay, A. J., <u>Tashiro, M.</u> , Lavanchy, D.
J. Virol. Methods Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads.	2001		Yamamoto, A., Nakayama, M., Kurosawa, Y., Sugo, K., Karsawa, H., Ogawa, T., Takasaki, T., <u>Tashiro, M.</u> , Kurane, I.
Biologicals Rapid detection of one base substitution associated with neurovirulence of poliovirus by non-radioisotopic molecular method.	2001		Yoshida, H., Horie, H., Yamada, A., <u>Tashiro, M.</u>
予防接種の現状と今後の方向性 MEDICAL DIGEST Vol.50(2) 2-12	2001年	第一メディアカル	神谷 齊
Incidence of Haemophilus influenzae type b meningitis in Mie prefecture, Japan Pediatrics International 43,323-324	2001年6月	Blackwell Science	Tkakashi Nkano, <u>Hitoshi Kamiya,</u> et al
接種前抗体価陰性の高齢者患者におけるインフルエンザHAワクチンの有用性に関する検討 GERONTOLOGY Vol.14(1) 62-67	2002年1月	メディアカルレビュー社	近藤 昌秀、 神谷 齊、他

研究成果の刊行に関する一覧表（2）

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月	刊行書店名	執筆者氏名
Jpn. J. Infec. Dis. 53 (98-106) A proposal for safety standards for human use of cholera toxin (or <i>Escherichia coli</i> heat-labile enterotoxin) derivatives as an adjuvant of nasal inactivated influenza vaccine.	2000	国立感染症研究所	<b>Tamura, S.-I.</b> and Kurata T.
Jap. J. Infect. Dis. 53 (219-228), Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins.	2000	国立感染症研究所	Chen, Z., Kurata, T. and <b>Tamura, S.-I.</b>
Vaccine. 19 (1446-1455) Protection against influenza B-type virus infection by immunization with DNA vaccines.	2001	ELSEVIER	Chen, Z., Kadowaki, S., Hagiwara, Y., Yoshikawa, T., Sata, T., Kurata, T. and <b>Tamura, S.-I.</b>
Vaccine. 19 (1652-1660) Effects of intranasal administration of cholera toxin (or <i>Escherichia coli</i> heat-labile enterotoxin) subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain.	2001	ELSEVIER	Hagiwara, Y., Iwasaki, T., Asanuma, H., Sato, Y., Sata, T., Aizawa, C., Kurata, T. and <b>Tamura, S.-I.</b>
Vaccine. 19 (2071-2079) Effectiveness and safety of a mutant <i>Escherichia coli</i> heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine.	2001	ELSEVIER	Hagiwara, Y., Tsuji, T., Iwasaki, T., Asanuma, H., Chen Z., Komase, K., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T. and <b>Tamura, S.-I.</b>
Vaccine. 19 (3981-3989) Immune responses and protection in different strains of aged mice immunized intranasally with an adjuvant-combined influenza vaccine.	2001	ELSEVIER	Asanuma, H., Hirokawa, K., Uchiyama, M., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T., Sata, T. and <b>Tamur, S.-I.</b>