

時)。

3) Intravenous pathogenicity index (IVPI) :  
6週齢のニワトリ(品種:サクラ)8羽の静脈内にウイルス感染鶏胚尿液  $10^{5.5}$ EID<sub>50</sub>/ml を0.1ml 接種し、10日間観察した。スコア(0, normal; 1, sick; 2, paralysed; 3, dead)の合計を観察したニワトリ数で割った(最大指数3.00=全ニワトリが24時間以内に死亡、0.00=10日間いずれのニワトリも臨床症状を示さない時)。

#### (3) ウイルスのトリプシン依存性増殖試験

1) ウイルスのプラック形成に及ぼすトリプシンの影響: ウイルスを10倍段階希釈した後、各希釈を2組のマルチプレートウエルに培養したMDCK細胞に0.1ml 接種し、一方をトリプシン(10ug/ml)を加えた培地で他方をトリプシン(-)の培地でそれぞれ2日間35.5℃で培養して、プラックの形成を観察した。

2) ウイルスの増殖に及ぼすトリプシンの影響: ウイルスを2組のシャーレに培養したMDCK細胞にMOI 0.01で接種し、一方をトリプシン(10ug/ml)を加えた培地で他方をトリプシン(-)の培地でそれぞれ3日間35.5℃で培養して、培養上清中のウイルス感染価をHA活性を指標にして測定した。

3) ウイルスHA蛋白の開裂活性化に及ぼすトリプシンの影響: ウイルスを2組のシャーレに培養したMDCK細胞にMOI 3で接種し、一方をトリプシン(10ug/ml)を加えた培地で他方をトリプシン(-)の培地でそれぞれ20時間35.5℃で培養した。培養後、細胞内および細胞表面に検出されるHAを含むウイルス蛋白をA/duck/Hong Kong/820/80ウイルスに対するヤギ高度免疫血清を用いたウエスタンブロット法で検出した。

#### (4) ウイルスの抗原解析

A/duck/Hong Kong/820/80ウイルスに対するヤギ高度免疫血清、抗A/duck/Hong Kong/739.2/02ウイルスに対するアヒル感染血清(St. Jude Children's Research Hospital, R.G. Webster 博士より分与)、A/goose/Hong Kong/437/99ウイルスに対するニワトリ感染血清(St. Jude Children's Research Hospital, R.G. Webster 博士より分与)を用いた赤血球凝

集阻止試験を行った。

## C. 研究結果

### (1) H5N1 組み換えウイルスの作製

PR8ウイルスのvRNAおよびvRNPを発現するプラスミドを細胞に導入し、感染性ウイルス粒子の回収に成功した。これによって、PR8ウイルスを骨組みとしたRG系を確立した。この方法を用いて、弱毒化したH5N1組み換えウイルスを回収した。

### (2) ニワトリに対するウイルスの病原性試験

H5N1組み換えウイルスを接種したニワトリは臨床症状を全く示さなかった(表1)。このことから、このウイルスはニワトリに対して弱毒であると判断された。

#### ウイルスのトリプシン依存性増殖試験

1) ウイルスのプラック形成に及ぼすトリプシンの影響: H5N1組み換えウイルスを感染させた細胞では、トリプシンを加えた培地でのみプラックが出現した。一方、強毒型HK213ウイルスを感染させた細胞では、トリプシン無しの条件でもトリプシン存在下と同様にプラックが出現した。

2) ウイルスの増殖に及ぼすトリプシンの影響: H5N1組み換えウイルスを感染させた細胞では、トリプシンを加えた培地でのみHA活性が検出された。さらに、トリプシン非存在下で培養した細胞の上清をトリプシン処理し、これを新しい細胞に接種して3日間トリプシン存在下で培養したところ、上清中のHA活性が検出されるようになった。これは上清中に含まれていた非活性型HA0をもつウイルス粒子がトリプシンにより活性化をうけたことで、感染性を獲得したためと考えられる。一方、強毒型ウイルスを感染させた細胞では、トリプシンの有無にかかわらずHA活性が検出された。

3) ウイルスHA蛋白の開裂活性化に及ぼすトリプシンの影響: H5N1組み換えウイルスを感染させた細胞では、トリプシンを加えた条件でのみ開裂した活性型HA1が検出された。一方、強毒型HK213ウイルスを感染させた細胞では、トリプシンの有無にかかわらずHA1が検出された。

以上の結果から、H5N1 組み換えウイルスはトリプシンに依存して HA が開裂活性化し、増殖することが確認された。

#### (4) ウイルスの抗原解析

H5N1 組み換えウイルスはいずれの抗血清に対しても野生株である強毒型 HK213 ウイルスと同様の反応性を示した (表 2)。従って、このウイルスは野生株と抗原的に同じであることがわかった。

### D. 考察

トリの強毒型 H5 ウイルスを直接ワクチン製造株として用いると、ウイルスの増殖に用いる発育鶏卵が早期に死亡し、生産効率が非常に悪いなどの問題点がある。そこで、ワクチン製造用のウイルス株を開発するため、RG 法により弱毒化した H5N1 組み換えウイルスを作製した。このウイルスを接種したニワトリは臨床症状を全く示さなかった。さらに、培養細胞を用いて H5 ウイルスの弱毒化の指標であるトリプシン依存性試験を行ったところ、このウイルスはトリプシン非存在下では、その増殖が著しく抑制されることがわかった。従って、H5N1 組み換えウイルスは、ニワトリに対して十分に弱毒化されていることが確認された。また、抗 H5 ウイルス抗体を用いてウイルスの抗原性を解析したところ、H5N1 組み換えウイルスは野生株と抗原的に同じであることが明らかになった。このことは、このウイルスに対する抗体が強毒型ウイルスの感染を効果的に防ぐことを示している。今後、H5N1 組み換えウイルスのヒトへの安全性を検証する目的で、フェレットなどの哺乳類を使った感染実験を実施する必要がある。

### E. 結論

RG 法により弱毒化した H5N1 組み換えウイルスを作製した。このウイルスは、ニワトリに対して強い病原性を示さず、トリプシンに依存して増殖することが確認された。さらに強毒型ウイルスと抗原的に同じであることから、ワクチン製造株として有用であることが示された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Imai M., Watanabe S., Odagiri T. : Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex. Archives of Virology, 148: 1873-1884, 2003.

2) Watanabe S., Imai M., Ohara Y., Odagiri T. : The influenza B virus BM2 protein is transported through the *trans* Golgi network as an integral membrane protein. Journal of Virology, 77: 10630-10637, 2003.

#### 2. 学会発表

1) Watanabe, S., Imai, M., and Odagiri, T.: The influenza B virus BM2 protein is transported in cytoplasm through the *trans* Golgi network as an integral membrane protein. Negative Strand Viruses 2003. Pisa, Italy. June 14-19, 2003.

2) Imai, M., Watanabe, S., Ninomiya, Ai., and Odagiri, T.: Integral membrane protein BM2 of influenza B virus is a necessary component for generation of infectious virus. Options for the Control of Influenza V. Okinawa, Japan. October 7-11, 2003.

3) Imai, M., Mizuno, T., and Kawasaki, K.: Numbers of influenza hemagglutinin trimers necessary for membrane fusion: a kinetics examination with single particle analysis of reconstituted vesicles of hemagglutinin. Options for the Control of Influenza V. Okinawa, Japan. October 7-11, 2003.

4) 今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小田切孝人：リバーシジェネティクス法による B 型インフルエンザウイルス BM2 変異株の作製と BM2 蛋白質の機能解析、第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月

表1

MDT/MLD	72hrs/10 <sup>1.5</sup> EID <sub>50</sub> /ml*
ICPI	0
IVPI	0

\*10<sup>-3</sup>希釈において72時間で全鶏胚が死亡

表2

	Antiserum Goat (Hyperimmune)	Antiserum duck (Post infection)	Antiserum chicken (Post infection)
<b>REFERENCE ANTIGENS</b>	A/duck/ Hong Kong /820/80	A/duck/ Hong Kong /739.2/02	A/goose/ Hong Kong /437/99
A/duck/Hong Kong/342/78(H5N2)	2560	<10	640
A/duck/Hong Kong/820/80(H5N3)	640	<10	160
HK /9-1-1(H5N1)	1280	<10	1280
A/Hong Kong/156/97(H5N1)	5120	<10	2560
A/Hong Kong/483/97(H5N1)	640	<10	640
A/Chicken/Hong Kong/YU562/01(H5N1)	2560	40	2560
A/Hong Kong/213/03(H5N1)	5120	320	2560
<b>TEST ANTIGENS</b>			
A/HK213×PR8(H5N1 組み換えウイルス)	5120	640	2560

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）  
分担研究報告書

「新型インフルエンザウイルスに対するワクチンのマウスにおける有効性の検討」に関する研究

分担研究者 二宮 愛 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室 研究員

研究要旨 2003年にヒトから分離された鳥由来のH5およびH7ウイルスに対する不活化全粒子ワクチンを作製した。これをアルミニウムアジュバントと共にマウスに皮下接種し、血清中のHIおよび中和抗体を測定してワクチンの効果を検討した。その結果、微量の抗原でもアジュバントの使用により、効果的に血中抗体を誘導できる可能性が示された。

A. 研究目的

2003年から2004年にかけて世界各地で鳥のインフルエンザウイルスが流行し、鳥からヒトへの散発的な感染も報告される中、ヒトにおける新型インフルエンザウイルスの出現がますます危惧されている。未だ制圧されていないアジア各地でのH5N1ウイルスをはじめ、2003年にオランダの家禽の間で流行したH7N7ウイルス、2003年末に香港でヒトから分離されたH9N2ウイルス、いずれもヒトにおいては散発的な発生あるいは小規模な流行にとどまっている。しかし、これらのウイルスがヒトからヒトへ効率よく感染するような変異を起こし、ヒトの間で大流行すれば、その被害は甚大なものになるであろう。したがって、新型インフルエンザウイルスの流行に備えた有効なワクチンの開発が望まれている。特に、現在アジア各地の家禽で流行し、タイおよびベトナムで合計20名余の死者を出しているH5N1ウイルスは、鳥の高病原性インフルエンザウイルスであり、現在流行しているインフルエンザウイルスに比べヒトでの健康被害も大きいと予測されることから、早急な対策を講じる必要がある。

これまでの報告（田代ら、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）では、1997年に香港で18名のヒトに感染し6名の死者を出す原因となった強毒H5N1ウイルスに対して、現行のスプリットワクチンではヒトでの抗体の有意な上昇が認められなかったことから、不活化全粒子ワクチンおよびアジュバント使用の必要性が示唆されている。本研究では、共に鳥の高病原性ウイルスであるH5N1およびH7N7ウイルスに対する不活化全粒子ワクチンを作製した。これを様々な条件でマウスに投与して免疫応答を調べ、効果的なワクチン投与方法の検討を行った。

B. 研究方法

不活化全粒子ワクチンの作製

以下のウイルス2株を精製し、ホルマリ

ンで不活化してワクチンを作製した。

- rg-A/HK/213/2003 (dH5N1) × A/PR/8/34 (Internal) (rgHK213) : 2003年2月に香港でヒトから分離された強毒株 A/HK/213/2003 (H5N1) (HK213) をリバー

- A/mallard/NL/12/2000 (H7N3)

(malNL12) : 2003 年にオランダでヒトから分離された強毒株 A/NL/219/2003 (H7N7) (NL219)とヘマグルチニン(HA)遺

group No.	HI 抗体の有無	中和抗体の有無
1	4/5	5/5
2	5/5	5/5
3	2/5	3/5
4	2/5	2/5
5	2/5	4/5
6	0/5	0/5
13	0/5	0/5
14	0/5	0/5

伝子が近縁の弱毒株  
マウスの免疫実験

BALB/c (メス、4 週齢) を各群 5 匹ずつ使用した。表 1 のとおり調整したワクチン(総量 200ul/匹)を 2 週間隔で 2 回、マウスに皮下接種した。2 回目の免疫後 1 週目に全採血し、血清を採取した。

#### 免疫応答の解析

採取した血清を用いて、赤血球凝集阻止 (HI)試験および中和試験を行った。

表 1) 免疫実験に使用したワクチン

#### C. 研究結果

rgHK213 で免疫したマウス血清中の HK213 に対する HI および中和抗体の有無を表 2 に示した。最も少ない抗原量 0.02ug を免疫したマウスのうち、アジュバント非添加群 (group 6) では抗体が検出されなかったが、アジュバント添加群 (group 5) では 5 匹中 2 匹で HI 抗体、4 匹で中和抗体が検出された。同じ群のマウスでも抗体の上昇率にばらつきがあった。そのため、アジュバント添加群と非添加群との間で、抗体価に有意な差は見られなかったものの、5 匹の平均値はいずれの抗原量でもアジュバント添加群の方が高かった。一方、2003 年 12 月にベトナムでヒトから分離された

強毒 H5N1 ウイルス (VNJP1203) に対するこれらの血清の交差反応を調べた。HI 試験では全く反応せず、中和試験では group 1 の 1 匹で反応が見られただけであった。

表 2) rgHK213 免疫マウスの HK213 に対する抗体保有率

malNL12 で免疫したマウス血清中の NL219 に対する HI および中和抗体の有無を表 3 に示した。H5 ウイルスでの実験に比べ、全体的に抗体保有率が低く HI 抗体は検出されなかった。中和抗体は抗原量 2ug、0.2ug の群で上昇しており、いずれ

group No.	抗原	抗原(HA 蛋白)量/100ul	アジュバント (2% Alum) (100ul/匹)
1	rgHK213	2ug	+
2			-
3		0.2ug	+
4			-
5		0.02ug	+
6			-
7	malNL12	2ug	+
8			-
9		0.2ug	+
10			-
11		0.02ug	+
12			-
13	なし	-	+
14			-

もアジュバント添加群の方が非添加群より保有率が高かった。抗原量 2ug の群では、アジュバント添加群と非添加群との間に中和抗体価に有意な差 ( $p < 0.05$ ) があった。抗原量 0.02ug の群では、アジュバントの有無にかかわらず NL219 に対する抗体は検出されなかった。

表 3) malNL12 免疫マウスの NL219 に対する抗体保有率

#### D. 考察

今回の実験では、同じ群内でも抗体価にばらつきがあったことから、(H7 ウイルスの抗原量 2ug 接種群以外は) 有意差のある結果を得ることはできなかった。しかし、全体的な傾向として、アジュバントの添加がウイルス特異的な抗体をより効果的に誘導する可能性が示された。特に、H5 ウイルスを用いた実験では、0.02ug という少ない抗原量でも、アジュバントの添加により 5 匹中 4 匹で中和抗体価の上昇が見られた。アジュバントの使用により、抗原量を減らすことができれば、より多くの人々にワクチンを接種することが可能となる。本実験で使用したアルミニウムアジュバントはヒトでの使用が認可されており、その効果が確認できれば、新型インフルエンザ流行の際にも、早期に実用化可能なワクチン接種法として期待できる。

H5 ウイルスを用いた実験では、2003 年 12 月にヒトから分離された VNJP1203 に対する抗体価の測定も行った。rgHK213 で免疫した血清中の抗体は、VNJP1203 に対してほとんど反応せず、同じ H5N1 ウイルスでも抗原性はかなり異なっていた。今後、新型ウイルスが出現した場合には抗原性を考慮し、その都度新しいワクチンを準備する必要があるかもしれない。

今回、抗体検出法として HI 試験および中和試験を行った。現在、ヒトで流行しているウイルスに対する抗体保有状況は HI 試験によって調べられている。しかし、本実験の結果から、ウイルス特異的な抗体が存在しても HI 試験では検出できない可能性があること、また、一般的に鳥由来のウイルスに対する HI 抗体は上昇しにくいという考えもあることから、新型ウイルスに

対する抗体検出には HI 試験以外の方法を検討する必要がある。

group No.	HI 抗体の有無	中和抗体の有無
7	0/5	4/5
8	0/5	1/5
9	0/5	2/5
10	0/5	0/5
11	0/5	0/5
12	0/5	0/5
13	0/5	0/5
14	0/5	0/5

#### E. 結論

本実験の結果から、弱毒ウイルスで作製した不活化全粒子ワクチンを、アルミニウムアジュバントと共に皮下接種することで、強毒ウイルスに対する血中抗体を、ある程度効果的に誘導できることが判った。今後、感染実験を行い、より効果的なワクチン接種方法を開発、検討していく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Park CH, Matsuda K, Sunden Y, Ninomiya A, Takada A, Ito H, Kimura T, Ochiai K, Kida H, Umemura T  
Persistence of viral RNA segments in the central nervous system of mice after recovery from acute influenza A virus infection. *Vet Microbiol* 97:259-268. 2003
- 2) Tanaka H, Park CH, Ninomiya A, Ozaki H, Takada A, Umemura T, Kida H  
Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. *Vet*

Microbiol 95:1-13. 2003

3) Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, Kawaoka Y, Kida H

Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. Vaccine 21:3212-3218. 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

分担研究報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

分担研究課題「現行のインフルエンザワクチンの効果と安全性に関する研究」

分担研究者：神谷齊（国立療養所三重病院院長）

（研究要旨）新型インフルエンザ用ワクチンの臨床応用を見据えて、現行のインフルエンザワクチンについて乳幼児における有効性と至適投与量、安全性の検討を行った。2003/2004 シーズンに三重県下 11 医療施設において 333 例が登録され、血中 HI 抗体価、接種 48 時間後の副反応データを収集し解析中である。

A. 研究目的

新型インフルエンザ用ワクチンの開発、ヒトへの臨床応用の検討に際しては、現行のインフルエンザワクチンの有効性と安全性が基礎データとなる。現在わが国で用いられている不活化インフルエンザワクチンは、年少小児におけるプライミング効果やウイルス感染部位の粘膜免疫獲得などについては未確定である。規定接種量は、1 歳未満 0.1ml/回、1 歳以上 6 歳未満 0.2ml/回、6 歳以上 13 歳未満 0.3ml/回、13 歳以上 0.5ml/回となっているが、小児における至適接種量の根拠を検討した研究は見当たらない。本研究では、乳幼児など小児に対する不活化インフルエンザワクチン（HA ワクチン）の至適接種量について、効果と副反応の見地から検討することを目的とした。

B. 研究方法

2003/2004 流行シーズン前に、インフルエンザワクチンの接種を希望し来院した児の保護者に研究目的を説明し、研究への参加を承諾し文書による保護者の同意が得られた 13 歳未満小児に対して下記の用量に

て、インフルエンザ不活化ワクチンを接種した。

	接種量	回数
6歳未満	0.25cc	2回
6歳以上-13歳未満	0.5cc	2回

現行の HA ワクチンを使用し、製品メーカーについては特に限定しないが、1 回目接種と 2 回目接種では同一メーカーを使用した。1 回目接種と 2 回目接種の間隔は、原則として 4 週間（4±1 週間の範囲で）とした。2 回目接種ワクチンの 1 回接種量は、1 回目接種時の年齢に合わせる（例えば 1 回目接種時は 5 歳、2 回目接種時には 6 歳となった対象者の接種量は、1 回目、2 回目とも 0.25cc）こととした。インフルエンザの流行シーズンを迎える前に接種を完了するため、2 回目の接種は 2003 年 11 月 30 日までに終了することとした。

副反応については、別紙様式 1 を用いて、保護者からのハガキ郵送により調査した。

第一回接種前、第二回接種前（第一回接種 4 週間後）、第二回接種 4 週間後の計 3 回採血（2cc 採血後、速やかに遠心分離し、凍結保存する）を行い、血清抗インフルエ



ンザウイルス HI 抗体を三重県保健環境研究部で測定した。

研究登録対象者については、各医療機関ごとに別紙様式 2 に記載した。三重県全体で対象数 300 名を目標とし、県下 11 施設（表 1）による共同研究とした。

（倫理面への配慮）

被験者の研究への参加に際しては、別紙同意書（様式 3）による文書での同意をいただいた。また、個人のプライバシーには十分配慮し、個人情報特定されないことないようにした。

### C. 研究結果

本研究においては、インフルエンザワクチン 2 回目接種後 4 週間の時点での血清抗体価までが検討内容に含まれており、初年度の現時点ではまだすべての測定結果が判明していない。11 施設における症例登録状況を表 1 に示す。

合計 333 例が登録され（本研究計画で定めたワクチン接種量により 2 回の接種が実施され）、3 回の血清抗体採取率 99.7%、副反応ハガキ回収率 99.4%という良好な成績である。性別は男児 182 例（54.7%）、女児 151 例（45.3%）であった。年齢内訳は、3 歳未満 100 例（30.0%）、3 歳以上 6 歳未満 116 例（34.8%）、6 歳以上 13 歳未満 117 例（35.1%）であった。3 歳未満児 100 例のうち、16 例（全体の 4.8%）は 1 歳未満児であった。

副反応については集計中であるが、登録症例において今のところ著明な腫脹や発赤など大きな問題となる副反応は報告されていない。すべての抗体価を測定した後、年齢ごとの比較、過去の接種歴や罹患歴によ

る比較を行う予定である。

### D. 考察

現行の不活化インフルエンザ HA ワクチンの接種量は年齢区分による細かい規定があるが、その根拠に関するデータを示した研究は見当たらない。米国の split ワクチンは日本の HA ワクチンとほぼ同様の製品（日本の製剤は 1 瓶 1ml 中にインフルエンザウイルスの HA を 1 株当たり 30 $\mu$ g 以上含有、米国の split ワクチンは 0.5ml 仕様のワクチン液中にインフルエンザインフルエンザウイルス HA を 1 株当たり 15 $\mu$ g 含有）であるが、接種量の規定について日米を比較すると表 2 のごとくである。

わが国のインフルエンザワクチンの効果に関する検討については、以下のような研究結果が報告されている。高齢者では、65 歳以上施設入所者の場合、死亡のリスクを OR' 比（オッズ比）0.2 以下（有効率 80% 以上）、発病のリスクを OR' 0.45–0.66（有効率 34–55%）に減らすことができる。小児における検討ではいまだ中間報告の段階であるが、6 歳未満小児においてワクチン接種群ではインフルエンザ流行期における 38°C 以上の発熱リスクを OR' 0.6 程度に減少させる（有効率 40%）という結果が得られている。小児において年齢別検討を行うと、1 歳未満乳児では発病防止効果に乏しく、基礎免疫をもたない状態ではワクチンの有効性は低い、すなわち現行のワクチンは免疫プライミング効果が低い可能性が考えられている。この理由が、現行のインフルエンザ HA ワクチンが不活化ワクチンであるがゆえの効果の限界であるのか、乳幼児における接種量が少ないことによる

のかは十分検討した研究は見当たらない。

私たちは2000/2001シーズン、2001/2002シーズンに保護者の同意を得た6歳未満小児78名に対して1回0.25ccの接種を行い副反応と抗体価について検討した。その結果、副反応については現行の規定接種量(0.1cc, 0.2cc)に比して差は認められなかった。抗体価については対象症例数が少なく結論は得られなかった。

今回333例を登録することができたので、この結果を分析し、新型ワクチンが必要となった時に、接種量等の決定に必要な参考データが得られるものと期待している。

#### E. 結論

現行の不活化インフルエンザHAワクチンの乳幼児に対するプライミング効果、至適接種量を検討するための研究を開始し、333例を登録し血中HI抗体価の測定を行い検討中である。安全性についても48時間後における副反応データを収集し検討中である。

#### F. 健康危険情報

今回の研究中に報告なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 神谷 齊. インフルエンザ. 日本医師会雑誌 128 (8) : 272—273、2002
- 2) Hitoshi Kamiya. Revision of Preventive Vaccination Law and Future Trends. JMAJ 45 (2) : 75-79、2002
- 3) 妊娠の日常生活習慣の指導ポイント「予防接種」 Medical Practice 20 (9) : 1595-1593、2003

4) 神谷 齊. 感染症の予防「予防接種の見直しと今後の方向性. 日本臨床 61 : 286-291、2003

5) 神谷 齊. 免疫グロブリン、ワクチンおよび免疫調整薬. Medical Practice 20 : 59-67、2003

6) 高橋裕明、大熊和行、神谷 齊、他. 1999/2000年の三重県における乳幼児に対するインフルエンザワクチンの有効性. 日本公衆衛生雑誌 50 : 389-399、2003

7) 神谷 齊. 日本のワクチン政策の問題点. インフルエンザ 4 (2) : 141-147、2003

#### 2. 学会発表

1) 廣田良夫、藤枝恵、田中隆、前田章子、神谷齊、中野貴司. 第7回日本ワクチン学会. 乳幼児におけるインフルエンザワクチンの有効性. 2003年10月18-19日. 名古屋市.

2) 藤枝恵、田中隆、前田章子、廣田良夫、神谷齊、中野貴司. 第7回日本ワクチン学会. 乳幼児におけるインフルエンザワクチンの副反応. 2003年10月18-19日. 名古屋市.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

表 1. 三重県下 11 施設における症例登録状況

	2 回接種済み症例	3 回採血済み症例	副反応ハガキ回収症例
まつだ小児科クリニック	30	30	30
アクエアメディカル	35	35	34
白子クリニック	41	41	41
すずかこどもクリニック	30	30	30
落合小児科医院	31	30	31
うめもとこどもクリニック	27	27	27
安田小児科内科	20	20	20
さかとく小児科	26	26	25
はね小児科医院	33	33	33
かとう小児科	30	30	30
国立療養所三重病院	30	30	30
計	333	332 (99.7%)	331 (99.4%)

表 2. インフルエンザ不活化ワクチン、日米の接種量比較

		1 回接種量	回数	
日本	1 歳未満	HA ワクチン	0.1cc	2 回
	1-6 歳未満	HA ワクチン	0.2cc	2 回
	6-13 歳未満	HA ワクチン	0.3cc	2 回
	13 歳以上	HA ワクチン	0.5cc	1 回または 2 回
米国	6 ヶ月-3 歳未満	split ワクチン	0.25cc	1 回または 2 回
	3-9 歳未満	split ワクチン	0.5cc	1 回または 2 回
	9-13 歳未満	split ワクチン	0.5cc	1 回
	13 歳以上	全粒子型あるいは split ワクチン	0.5cc	1 回

## 別紙様式 1. 副反応調査ハガキ

インフルエンザワクチン接種後の健康状態について  
(第一回目接種)

氏名：( )

接種後 48 時間以内の健康状態について記載して下さい

1. 37.5℃以上の発熱は？ (0.なし 1.あり)  
「あり」の場合、最高体温は？ ( . °C)
2. からだに発疹が出来たか？ (0.なし 1.あり)
3. 注射した部位の赤みは？ (0.なし 1.あり)  
「あり」の場合、最大直径は？ ( mm)
4. 注射した部位の腫れは？ (0.なし 1.あり)  
「あり」の場合、最大直径は？ ( mm)
5. 注射した部位が硬くなったか？ (0.なし 1.あり)  
「あり」の場合、最大直径は？ ( mm)
6. 注射した部位のかゆみは？ (0.なし 1.あり)
7. 注射した部位の痛みは？ (0.なし 1.あり)
8. 上の症状で病院を受診したか？ (0.なし 1.あり)

インフルエンザワクチン接種後の健康状態について  
(第二回目接種)

氏名：( )

接種後 48 時間以内の健康状態について記載して下さい

1. 37.5℃以上の発熱は？ (0.なし 1.あり)  
「あり」の場合、最高体温は？ ( . °C)
2. からだに発疹が出来たか？ (0.なし 1.あり)
3. 注射した部位の赤みは？ (0.なし 1.あり)  
「あり」の場合、最大直径は？ ( mm)
4. 注射した部位の腫れは？ (0.なし 1.あり)  
「あり」の場合、最大直径は？ ( mm)
5. 注射した部位が硬くなったか？ (0.なし 1.あり)  
「あり」の場合、最大直径は？ ( mm)
6. 注射した部位のかゆみは？ (0.なし 1.あり)
7. 注射した部位の痛みは？ (0.なし 1.あり)
8. 上の症状で病院を受診したか？ (0.なし 1.あり)

別紙様式 2. 研究登録対象者一覧

医療機関名：( )

No	氏名	性別	生年月日	第一回接種日	第二回接種日	第一回採血日	第二回採血日	第三回採血日
1		(男・女)	H . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H . . . . .
2		(男・女)	H . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H . . . . .
3		(男・女)	H . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H . . . . .
4		(男・女)	H . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H . . . . .
5		(男・女)	H . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H15 . . . . .	H . . . . .

昨冬のインフル罹患	昨冬のインフル予防接種	1回目副反応調査ハガキ	2回目副反応調査ハガキ
( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 1回 ・ 2回 )	( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 有 )
( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 1回 ・ 2回 )	( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 有 )
( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 1回 ・ 2回 )	( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 有 )
( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 1回 ・ 2回 )	( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 有 )
( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 1回 ・ 2回 )	( 無 ・ 有 )	( 無 ・ 有 )

### 様式 3. 同意書

#### 「小児におけるインフルエンザワクチンの接種量に関する研究」説明書

今回の研究の目的は、別紙に記載いたしましたように、各年齢の小児におけるインフルエンザワクチンの適切な接種量を検討することです。

接種により免疫ができたかどうかを見るために、第一回接種前、第二回接種前（第一回接種 4 週間後）、第二回接種 4 週間後の計 3 回採血を行い血中インフルエンザ抗体の測定に用います。採血量は約 2cc です。採血させていただいた血清は、他の目的には使用いたしません。また、検査結果に関して個人名が公表されることはありません。

副反応調査としては、接種後 48 時間の発熱、発疹、接種部位の反応などをお尋ねいたします。

本研究は、厚生労働省の研究事業である厚生労働科学研究費補助金・医薬品等医療技術リスク評価研究事業「現行のインフルエンザワクチンの効果と安全性に関する研究（班長：小田切 孝人、分担研究者：国立療養所三重病院院長、神谷齊）」により行われ、参加されるかどうかは個人の自由意志に基づき決定されます。

本研究の意義をご理解いただき、ご協力よろしくお願ひ申し上げます。

平成 年 月 日

医師（署名） \_\_\_\_\_

---

#### 同意書

私は、本研究の内容につき説明を受け理解し、参加に同意いたします。

平成 年 月 日

患者氏名 \_\_\_\_\_

保護者氏名（署名） \_\_\_\_\_

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）  
「新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究」  
分担研究報告書

新型インフルエンザ用ワクチン製造に用いる GMP 対応細胞株の確立と安全性確保に関する研究

分担研究者 佐藤 征也 デンカ生研株式会社  
研究協力責任者 桑原 靖 デンカ生研株式会社  
城野 洋一郎 (財)化学及血清療法研究所  
福家 功 (財)阪大微生物病研究会観音寺  
研究所  
五反田 亨 北里研究所生物製剤研究所

**研究要旨** 新型インフルエンザ用ワクチンの製造と安全性確保には、リバースジェネティック (RG) 法を利用したワクチン製造用の弱毒化種ウイルスの作製が必要である。また、RG 法に使用される株化細胞 (Vero 細胞) は GMP に適合し、その細胞株の安全性が担保されていることがワクチンの安全性確保には重要である。本分担研究では RG 法を用いたワクチン製造用種ウイルス作製のために、新たに GMP 対応 Vero 細胞株の開発を目的として、国内インフルエンザワクチンメーカーがワクチン開発等を目的に調製した Vero 細胞バンクより有用な細胞株を選定することを目的とした検討を行った。

#### A. 研究目的

新型インフルエンザ用ワクチンの製造用種ウイルスの作製には分離ウイルスの弱毒化が必要であり、現在はリバースジェネティック (RG) 法を利用した弱毒化種ウイルスの作製が有用である。しかし、RG 法においてはトランスフェクション用の Vero 細胞の使用が必要であり、ワクチン製造用として使用するためにはその細胞の安全性が確保され、GMP に適合した細胞バンクを確立する必要がある。本分担研究では RG 法に使用される GMP 対応 Vero 細胞の確立のために最適な Vero 細胞バンクを選定することを目的とした。

GMP 対応 Vero 細胞とは GMP に従った設備・手順に基づくマスターセルバンク、ワーキングセルバンクの調製と ICH Q5D 及び Q5A 等を参考にした各セルバンクの迷入因子否定試験、細胞特性等の解析実施が要求される。これら要求事項を満足するセルバンクを確立するためには、それに見合った検討時間が必要になる。そこで、本分担研究では新型インフルエンザ用ワクチンの製造法を迅速に確立するために、国内インフルエンザワクチンメーカーがワクチン開発用に調製・保有している Vero 細胞バンク

を事前検討し、その候補とする細胞バンクの中から最も目的 (性能、品質・安全性) に合った Vero 細胞株を選定し、そのセルバンクを新たに調製し、安全性試験等を実施して新型インフルエンザ用ワクチンの安全性確保を行うことを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 材料と方法

##### 1. Vero 細胞

国内インフルエンザワクチンメーカー 4 社 (デンカ生研、化血研、阪大微研、北里研) がそれぞれワクチン開発等を目的として調製・保有している Vero 細胞株を本検討の対象とし、各ワーキングセルバンクから細胞をリカバリーし、1 代継代した Vero 細胞を本研究班の主任研究者 (国立感染症研究所) に提出して RG 法での有用性を検討の上で最適な細胞株を選定する。

なお、検討する内容は以下の手順とした。

- ① 国立感染症研究所に提出された Vero 細胞は、細胞増殖培地にて更に 1 代継代し、トランスフェクション用シャーレを作製する。
- ② 組換えプラスミドベクター (po I /H5-

PR8)を導入する。

- ③ 数日間の培養後に、培養上清中の HA 価を測定する。
- ④ 培養上清を MDCK 細胞に接種し、感染性ウイルス量をプラークアッセイ法にて測定する。

## 2. Vero 細胞株に関する情報についての検討

Vero 細胞の安全性担保に関する予備評価として、検討用に提出された Vero 細胞バンクに関する安全性に関する各種情報も主任研究者に合わせて提出し、安全性の面からの検討を行う。

## C. 研究結果

### 1. Vero 細胞

本分担研究に協力した国内インフルエンザワクチンメーカー 4 社より、それぞれワクチン開発等を目的として調製・保有されている Vero 細胞のワーキングセルバンクから細胞をリカバリーし、1 代継代された Vero 細胞 75cm<sup>2</sup> 培養フラスコ 1 本及び継代に使用した細胞増殖培地 100mL を本研究班の主任研究者に提出し、RG 法での有用性が検討された。

### 2. Vero 細胞バンクに関する情報

上記の各メーカーより提出された Vero 細胞バンクの安全性等に関する以下の情報を提出し、安全性の面からの予備評価が検討された。

(提出した Vero 細胞バンクに関する情報)

- ① Vero 細胞の供給元及び細胞の素性
- ② 細胞バンクの継代歴と細胞増殖培地の組成 (使用した血清の品質管理、試験結果を含む)
- ③ マスターセルバンクに関して既に実施されている安全性試験項目とその結果
- ④ 細胞バンクの保存施設 (保存システム、保存中の他の細胞との交叉汚染回避法)

## D. 考察

新型インフルエンザ用ワクチンを製造するための基本は有効性と安全性を如何に確保するか、それを担保するエビデンスをどのように迅速に取得するかが重要である。そのためには RG 法による新型インフルエンザ用ワクチンの製造用種ウイルス調製過程の安全性を担保する必要がある、本分担研究では RG 法に使用される GMP

対応 Vero 細胞の安全性確保を目的とした。

GMP 対応 Vero 細胞とは GMP に従った設備・手順に基づくマスターセルバンク、ワーキングセルバンクの調製と ICH Q5D 及び Q5A を参考にした各セルバンクの迷入因子否定試験、細胞特性等の解析実施が要求される。しかし、これら要求事項を満足するセルバンクを確立するためには、それに見合った検討時間が必要になる。そこで、新型インフルエンザ用ワクチンの製造法を迅速に確立するためには国内ワクチンメーカーがワクチン開発用に調製・保有している Vero 細胞バンクを事前検討し、その候補とする細胞バンクの中から最も目的 (性能、品質・安全性) に合った Vero 細胞を選定し、そのセルバンクを新たに調製し、安全性試験等を実施することが効率的と考えられる。従って、ワクチンの安全性確保に関する今後の重要な検討課題としては選定された Vero 細胞株について新たなマスターバンクの調製及びその安全性試験の実施、細胞特性等の解析さらにマスターセルバンクから無血清培地への細胞馴化などが挙げられる。

## E. 結論

新型インフルエンザ用ワクチン製造用の弱毒化種ウイルスの作製には RG 法が利用されるが、RG 法で使用される Vero 細胞はワクチンの安全性確保の観点から安全性が十分に担保された GMP 対応細胞株であることが要求される。本分担研究では RG 法での Vero 細胞株の性能・品質評価及び安全性資料の事前検討より最適な細胞株を迅速に選定するために、国内インフルエンザワクチンメーカー 4 社がワクチン開発等を目的として調製・保有されている Vero 細胞バンクとその細胞バンクに関する情報を評価することで、最適な Vero 細胞株を選定するための検討を進めている。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得



なし

2. 実用新案登録

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Masaki Imai, Shinji Watanabe and <u>Takato Odagiri</u>	.Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex.	Arch. Virol.	148	1873-1884	2003
Shinji Watanabe, Masaki Imai, Yoshiro Ohara and <u>Takato Odagiri</u>	The influenza B virus BM2 protein is transported through the <i>trans</i> Golgi network as an integral membrane protein.	J. Virol.	77	10630-10637	2003
Noriko Nakajima, Yasuko Asahi-Ozaki, Noriyo Nagata, Yuko Sato, Florencio Dizon, Fem J. Paladin, Remigo M. Olveda, <u>Takato Odagiri</u> , Masato Tashiro and Tetsutaro Sata	SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique.	Jpn. J. Infect.Dis.	56	139-141	2003
Chiharu Kawakami, Takehiko Saito, Yoko Nakaya, Setsuko Nakajima, Tsuya Munemura, Miwako Saikusa, Yozo Noguchi, Kikushige Fujii, Mikio Takaoka, Reiko Ito, Toshinori Saito, <u>Takato Odagiri</u> and Masato Tashiro	Isolation of influenza AH1N2 viruses from an outbreak in Yokohama city during the 2001-2002 influenza season in Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	56	110-1131	2003
J. McKimm-Breschkin, T. Trivedi, A. Hampson, A. Hay, A. Klimov, <u>M.Tasihro</u> , F. Hayden, M. Zambon	Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to Zanamivir and Oseltamivir.	Antimicrobial agents and Chemotherapy	47-7	2264-2272	2003
C. Kawakami, T. Saito, Y. Nakaya, S. Nakajima, T. Munemura, M. Saikusa, Y. Noguchi, K. Fujii, M.Takaoka, R. Ito, T. Saito, T. Odagiri, <u>M. Tashiro</u>	Isolation of influenza A H1N2 viruses from an outbreak in Yokohama city during the 2001-2002 influenza season in Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	56	110-113	2003
Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Goto H, <u>Kawaoka Y.</u>	Generation of influenza A viruses with chimeric (type A/B) hemagglutinins.	J Virol	77	8031-8038	2003

Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, <u>Kawaoka Y.</u> Kida H.	Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice.	Vaccine	21	3212-3218	2003
Watanabe T, Watanabe A, Noda T, Fujii Y, <u>Kawaoka Y.</u>	Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes.	J Virol	77	10575-10583	2003
Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, <u>Kawaoka Y.</u>	A protective immune response in mice to viral components other than hemagglutinin in a live influenza A virus vaccine model.	Vaccine			In press
Horimoto T, Fukuda N, Iwatsuki-Horimoto K, Guan Y, Lim W5, Peiris M, Sugii S, Odagiri T, Tashiro M, <u>Kawaoka Y.</u>	Antigenic Differences between H5N1 Human Influenza Viruses Isolated in 1997 and 2003.	J Vet Med Sci			In press
Iwatsuki-Horimoto K, Kanazawa R, Sugii S, <u>Kawaoka Y.</u> Horimoto T.	The index influenza A virus subtype H5N1 isolated from a human in 1997 differs in its receptor binding properties from a virulent avian influenza virus.	J Gen Virol			In press
Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, <u>Kawaoka Y.</u>	PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice.	Virology			In press
Shinya K, Fujii Y, Ito H, Ito T, <u>Kawaoka Y.</u>	Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine.	J Virol			In press
Maeda Y, Goto H, Horimoto T, Takada A, <u>Kawaoka Y.</u>	Biological Significance of the U Residue at the -3 Position of the mRNA Sequences of Influenza A Viral Segments PB1 and NA.	Virus Res (in press).			
<u>Masaki Imai</u> , Shinji Watanabe and Takato Odagiri	.Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex.	Arch. Virol.	148	1873-1884	2003
Shinji Watanabe, <u>Masaki Imai</u> , Yoshiro Ohara and Takato Odagiri	The influenza B virus BM2 protein is transported through the <i>trans</i> Golgi network as an integral membrane protein.	J. Virol.	77	10630-10637	2003

Park CH, Matsuda K, Sunden Y, <u>Ninomiya A</u> , Takada A, Ito H, Kimura T, Ochiai K, Kida H, Umemura T	Persistence of viral RNA segments in the central nervous system of mice after recovery from acute influenza A virus infection.	Vet Microbiol	97	259-268	2003
Tanaka H, Park CH, <u>Ninomiya A</u> , Ozaki H, Takada A, Umemura T, Kida H	Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice	Vet Microbiol	95	1-13	2003
Takada A, Matsushita S, <u>Ninomiya A</u> , Kawaoka Y, Kida H	Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice.	Vaccine	21	3212-3218	2003
<u>小田切孝人</u>	近年のインフルエンザの流行状況	Pharma Medica	21	23-28	2003
<u>小田切孝人</u> 、二宮愛、板村繁之、西藤岳彦、宮嶋直子、森川茂、西條政幸、田代真人	SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果	インフルエンザ	5	35-24	2004
二宮愛、 <u>小田切孝人</u>	SARS の診断	臨床医	29	1922-1929	2003
<u>神谷 齊</u>	齊.感染症の予防「予防接種の見直しと今後の方向性	日本臨床	61	286-291	2003
<u>神谷 齊</u>	免疫グロブリン、ワクチンおよび免疫調整薬	Medical Practice	20	59-67	2003
高橋裕明、大熊和行、 <u>神谷 齊</u>	1999/2000 年の三重県における乳幼児に対するインフルエンザワクチンの有効性	日本公衆衛生雑誌	50	389-399	2003
<u>神谷 齊</u>	日本のワクチン政策の問題点	インフルエンザ	4	141-147	2003