

した MDCK 細胞にウイルスを接種し、トリプシン添加 (10ug/ml) あるいはトリプシン無添加培地で9時間培養した。培養後、感染細胞内で合成される HA 蛋白質をウェスタンブロット法で検出した。

C. 研究結果と考察

(1) 組換えウイルスの増殖能：293T 細胞から回収した弱毒化 H5N1 組換えウイルスを発育鶏卵で継代した後、ウイルス液の感染価を EID₅₀ 法で測定した。その結果、10^{9.6} EID₅₀/ml と非常に高い収量のウイルス液が得られることが分かった。このことは、この組換えウイルスが発育鶏卵で効率良く増殖することを示している。

(2) 組換えウイルスの抗原解析：H5N1 組換えウイルスの抗原性が野生株と同じであるかどうかを赤血球凝集阻止試験で調べた。組換えウイルスは、いずれの抗血清に対しても強毒型野生株の VNJPHN30321 ウイルスと同様の反応性を示した (表 1)。したがって、このウイルスは野生株と抗原的に同じであることが明らかになった。このことは、組換え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御する可能性を示唆している。

(3) ウイルス HA 蛋白質の開裂活性化に及ぼすトリプシンの影響：組換えウイルスの HA 蛋白質が弱毒型であるかどうかを確認するために、培養細胞を用いたトリプシン依存性試験を行った。組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 HA1 と HA2 のサブユニットに開裂した活性型 HA 蛋白質が検出された (図 1)。一方、強毒型野生株の VNJPHN30321 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

ず活性型 HA 蛋白質が検出された。以上の結果から、組換えウイルスの HA 蛋白質はトリプシンに依存して開裂活性化する弱毒型であることが確認できた。このことは、この組換えウイルスがニワトリに対してほとんど病原性を示さないことを示唆している。この組換えウイルスの病原性を更に検証するために、今後ニワトリやフェレットを使ったウイルス接種試験を実施する必要がある。

D. 結論

2005 年の強毒分離株から作製された弱毒化試作ワクチン株は発育鶏卵での増殖能が高く、その抗原性は基の強毒株と同じであることが分かった。更にこの株は弱毒型の HA 蛋白質をもっていることが確認できた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表

1) Sakai T, Ohuchi M, Imai M, Mizuno T, Kawasaki K, Kuroda K, Yamashina S.: Dual wavelength imaging allows analysis of membrane fusion of influenza virus inside cells. *J Virol.*, 80:2013-2018, 2006.

2) Gopinath SC, Misono TS, Kawasaki K, Mizuno T, Imai M, Odagiri T, Kumar PK.: An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J Gen Virol.*, 87:479-487, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 赤血球凝集阻止試験によるH5ウイルスの抗原解析

ウイルス抗原	ヤギ免疫血清			ウサギ免疫血清					フェレット感染血清
	A/duck/Hong Kong/820/80	A/Hong Kong/213/2003	A/Vietnam/1194/04	A/Vietnam/HN30259/04	A/Vietnam/HN30321/05	A/chicken/Kyoto/3/04	A/chicken/Anhui-choahu/85/2004	A/Indonesia/6/05	
A/duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)	1280	160	10	<10	160	<10	10	10	
A/Hong Kong/156/97 (H5N1)	2560	640	160	80	640	40	160	20	
A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	1280	1280	640	160	640	160	80	320	
A/Vietnam/1194/04 (H5N1)	320	80	320	80	40	<10	10	10	
A/Vietnam/HN30259/04 (H5N1)	640	320	320	320	40	<10	10	80	
A/Vietnam/JPHN30321/05 (H5N1)	320	320	160	40	640	40	10	40	
A/chicken/Kyoto/3/04 (H5N1)	320	320	<10	<10	320	320	<10	80	
A/chicken/Anhui-choahu/85/2004 (H5N1)	320	10	20	10	10	<10	80	20	
A/Indonesia/6/05 (H5N1)	160	80	20	20	80	40	80	640	
弱毒化組換えウイルス(H5N1)	640	320	160	40	640	20	10	40	

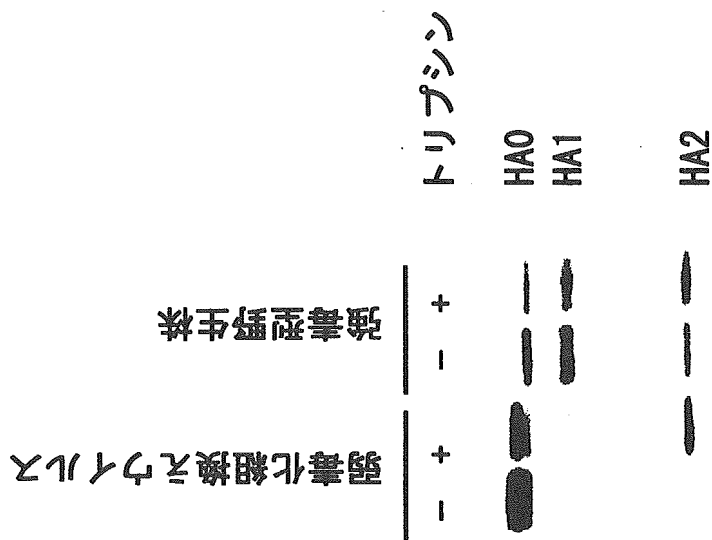


図1. H5N1ウイルスのHA蛋白質の開裂活性化に及ぼすトリプシンの影響

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
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

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 2004年にヒトから分離された鳥由来のH5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マウスに皮下接種した。免疫後、ワクチンの元株である強毒H5N1ウイルスを感染させ、感染防御効果を調べた。その結果、今回新たに作製したワクチン株rgVNJP1203/04は、やや免疫原性が低いものの強毒ウイルスでの攻撃に対する免疫応答を誘導できること、また、アジュバントの使用で、より効果的に感染防御能を誘導できる可能性が示された。

A. 研究目的

2003年末から東アジアを中心に続いていたH5N1高病原性鳥インフルエンザの流行は、2006年に入り、中近東、アフリカ、ヨーロッパへも広がる気配を見せている。現時点では、ヒトの感染は鳥との濃密な接触によるものがほとんどで、分離されるウイルスの遺伝子も全て鳥由来である。しかし、これらのウイルスが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ことが予想される。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急務となっている。

本研究では、2004年にベトナムでヒトから分離された強毒ウイルスをもとに作製した弱毒ワクチン株を用い、免疫・感染実験を行い、その効果を検討した。

B. 研究方法

不活化全粒子ワクチン

以下のウイルスを精製し、ホルマリン

で不活化してワクチンを作製した。

・rgVNJP1203/04: 2004年2月にベトナムでヒトから分離された強毒株A/Vietnam/JP1203/2004 (VNJP1203/04)をリバーズジェネティクス法で弱毒化したワクチン株

マウスの免疫・感染実験 (図1)

BALB/c (メス、4週齢)を各群15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3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、各群5匹から全採血し血清を採取した。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。残りのマウスにワクチンの親株である強毒ウイルスVNJP1203/04を感染させ、感染後の体重推移ならびに生残率により感染防御能を調べた。

表1) 免疫実験に使用したワクチン

group No.	抗原	抗原(HA 蛋白) 量/100ul	アジュバント (2% Alum) (100ul/匹)
1	rgVNJP1203/04	2ug	+
2			-
3		0.2ug	+
4			-
5		0.02ug	+
6			-
7	なし	-	+
8			-

C. 研究結果

rgVNJP1203/04 で免疫したマウス血清中の VNJP1203/04 に対する HI および中和抗体の測定を行った (図 2)。HI 抗体は全て検出限界以下であり、中和抗体もアジュバントの有無にかかわらず低かった。

次に、ワクチン接種マウスにおける強毒株に対する防御効果をチャレンジ実験で調べた。血中抗体はほとんど検出されなかったにもかかわらず、抗原量 2ug では 9 割以上、0.2ug の両群とアジュバントを添加した 0.02ug では 3 割以上のマウスが生残した (表 2)。

図 3 には抗原量 2ug を接種したマウスの体重変化を 1 匹ごとに示した。実線は免疫したマウス、点線はアジュバントのみ接種したマウス、×は感染により死亡したことを示す。生残率だけではアジュバントの有無による防御効果の違いがよく分からなかったものの、体重変化で比較すると、アジュバントなしでは体重減

少の後に回復したのに対し、アジュバント添加群ではほとんど体重が減少することなく推移していた。以上の結果から、2004 年のウイルスをもとに作製したワクチン株についても、アジュバントの使用で、より効果的にウイルスに対する免疫応答を誘導できることが分かった。

D. 考察

今回、2004 年に新たに分離されたウイルスをもとに作製されたワクチン株、rgVNJP1203/04 のマウスにおける効果を調べた。前回報告したワクチン株 rgHK213/03 (平成 15 年度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」の総括・分担研究報告書) に比べ、rgVNJP1203/04 はウイルス特異抗体を誘導しにくいことが分かった。この原因としては 1) rgVNJP1203/04 の免疫原性が低い 2) 抗体は誘導されていたが、VNJP1203/04 の抗体検出用抗原としての感度が低いという 2 点が考えられる。また、今回の実験とは別に (財) 阪大微生物病研究会の試作したアジュバントワクチンを使用し、同様の実験を行ったところ、低いながらも HI 抗体が検出された。このことから、アジュバントと抗原の混合方法等を工夫すれば、検出可能な抗体応答が期待できるかもしれない。一方、抗体価が低かったにもかかわらず、強毒株 VNJP1203/04 によるチャレンジ実験においては、前回報告の rgHK213/03 ワクチンと同様の防御効果を示した。さらに、アジュバント添加によりワクチンの効果

が增強されることが明らかとなった。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

D. 結論

本実験の結果から、より新しい分離株をもとに作製した rgVNJP1203/04 の不活化全粒子ワクチンを、Alum と共に皮下接種することで、強毒ウイルスに対する感染防御効果を効果的に誘導できることが判った。一方、抗体誘導能については、ワクチンの調製方法ならびに抗体検出法に関して改良の余地があるかもしれない。

今後、新たに分離された強毒ウイルスに対してもこの方法が有効かどうか検討する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

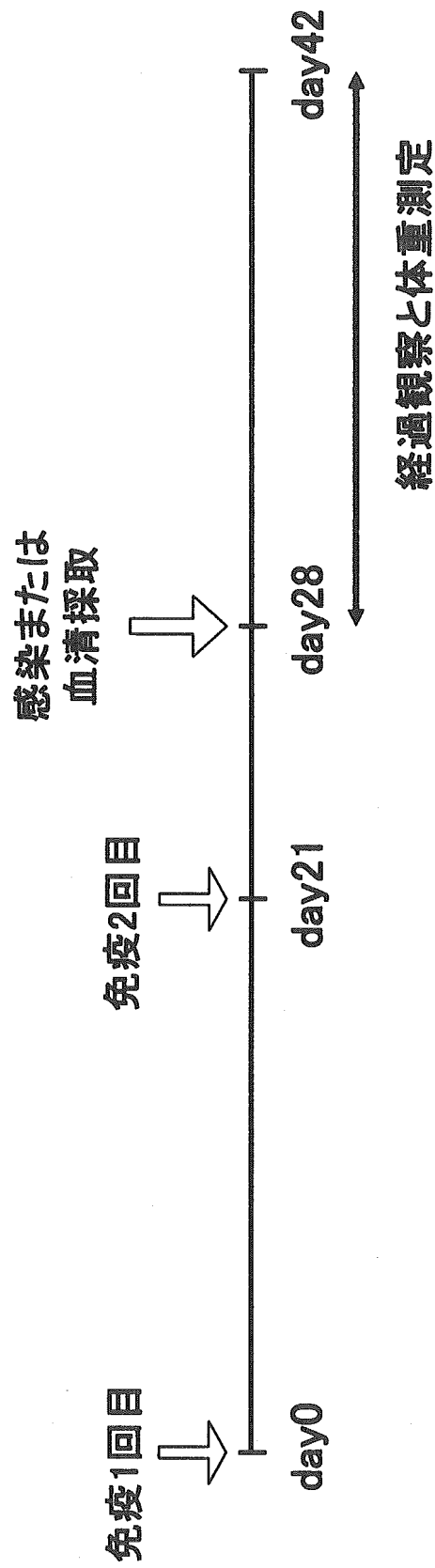
1. 学会発表

1) 二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人 弱毒化H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いたアルムアジュバント添加ワクチンのマウスにおける有効性の検討
第9回日本ワクチン学会、大阪、10月、2005年

2) 二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人 弱毒化H5N1型高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いたアルムアジュバント添加ワクチンのマウスにおける有効性の検討
第53回日本ウイルス学会、横浜、11月、2005年

図1. 材料と方法

<スケジュール>



<攻撃ウイルス>
強毒H5N1株
A/VN/JP1203/04 (VNJP1203/04)

図2. VNJP1203/04に対する血中抗体価

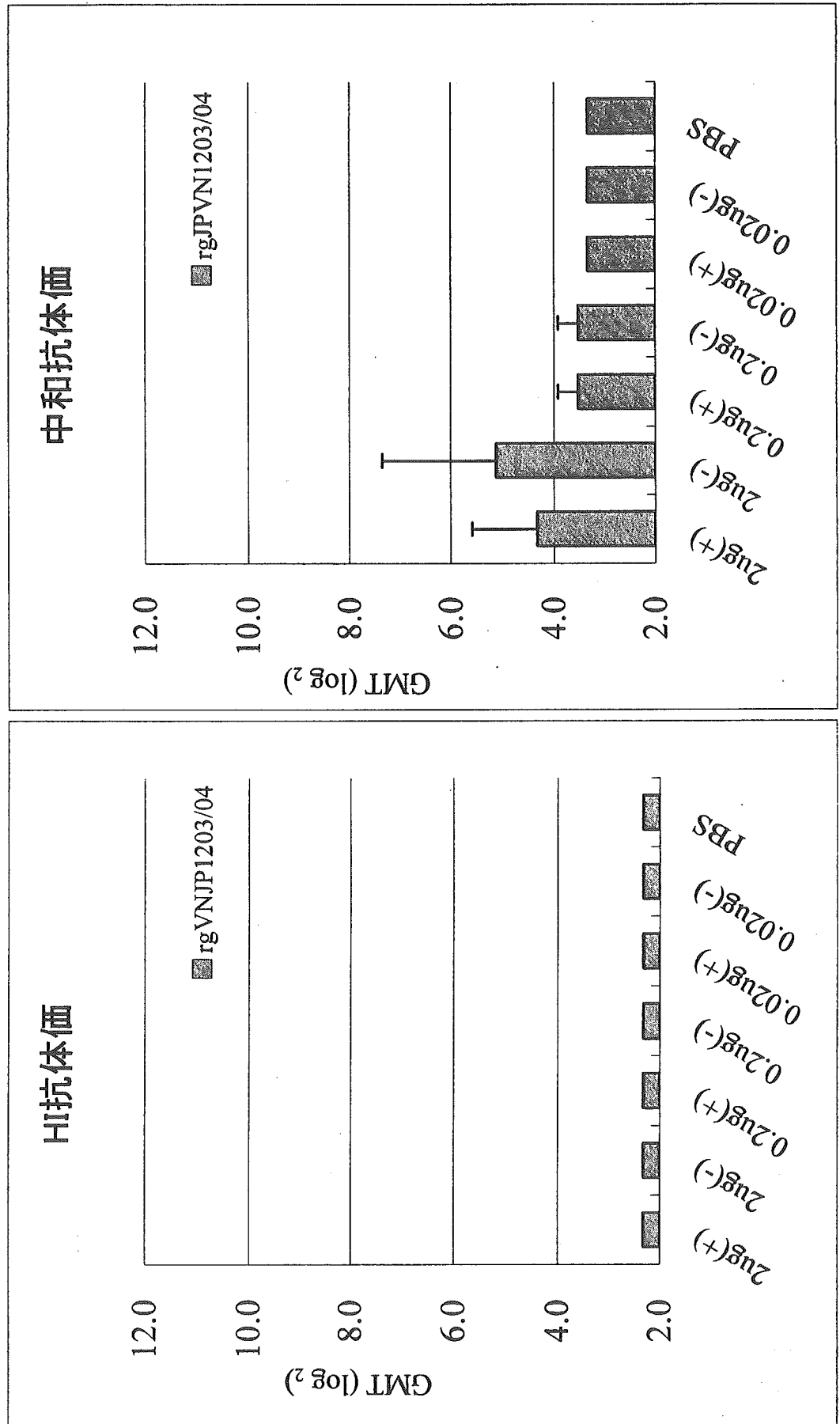
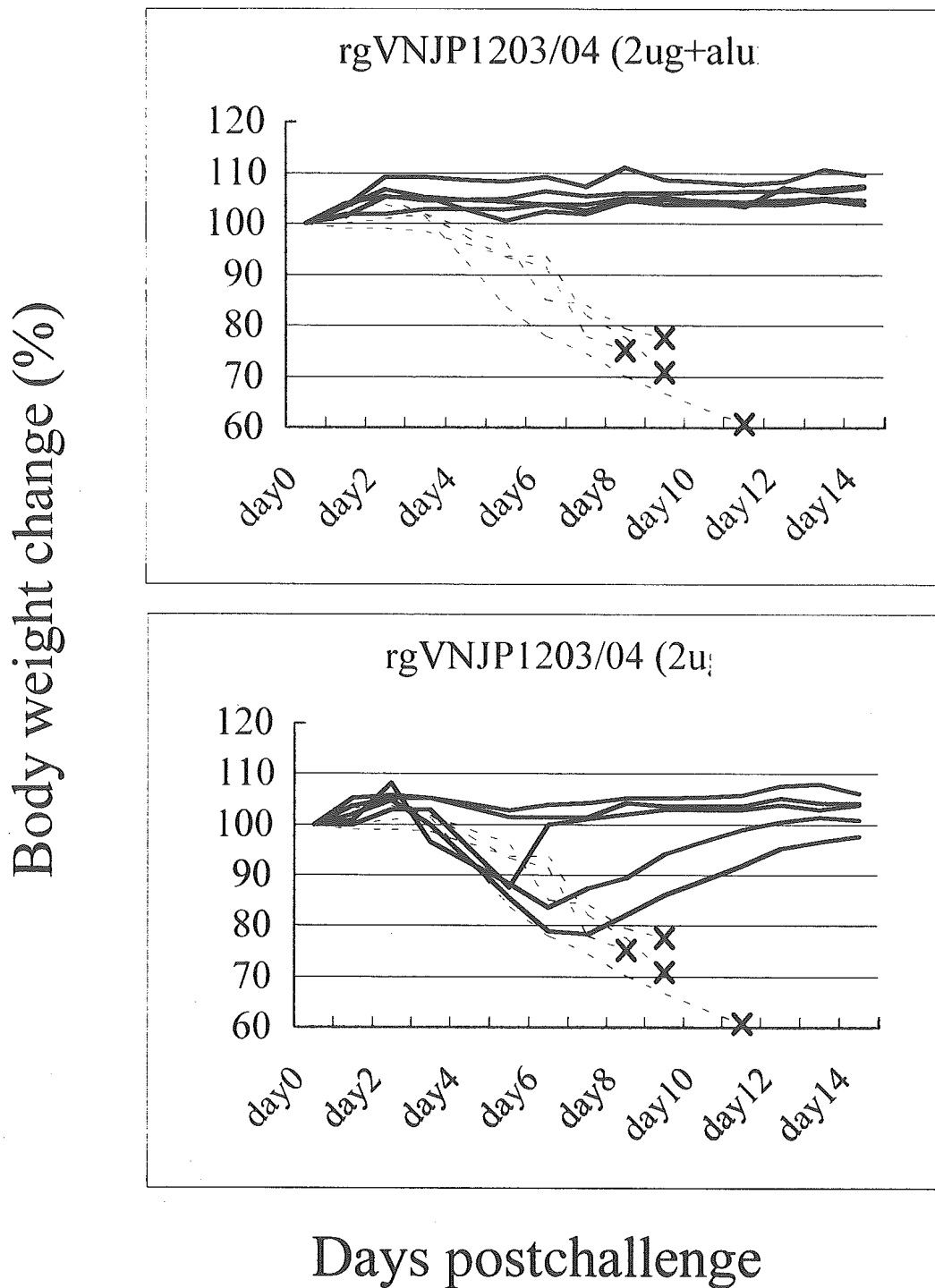


表2. VNJP1203/04によるチャレンジ実験における生残数

Vaccine group	生残数/全頭数
2ug+alum	10/10
2ug	9/10
0.2ug+alum	4/10
0.2ug	3/10
0.02ug+alum	3/10
0.02ug	0/10
alum	0/10

図3. VNJP1203/04感染時の体重推移



アジュバント併用経鼻高病原性鳥インフルエンザワクチンの有効性の解析

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：尾崎泰子、一戸猛志、佐多徹太郎（同所、感染病理部）

研究要旨

マウスを用いた感染モデルにおける高病原性トリインフルエンザ H5N1 の経鼻不活化スプリットワクチンの有効な接種方法と安全性を検討してきた。いままでの研究により H5N1 不活化ワクチンを種々のアジュバントと共に経鼻接種することによりその感染防御に成功した。感染防御のメカニズムの解析及びアジュバントの安全性について更に検討を行った。インフルエンザウイルス感染に伴い最初に応答するリンパ装置である Nasopharyngeal Lymphoid Tissue, (NALT)における Toll like receptor (TLR) 3 及び 7 の発現亢進が認められた。インフルエンザウイルス感染を模倣する形で poly(I:C)併用スプリットワクチン経鼻投与後 NALT ではその receptor である Toll-like receptor (TLR)3 の発現が亢進しインターフェロン α 、 β 、 γ 、その他種々のサイトカインの発現がみられ粘膜免疫誘導へ働いている事が明らかにされた。

A. 研究目的

高病原性トリインフルエンザ H5N1 はその流行がアジア地域に留まらずヨーロッパにまで広がりヒトの死亡例も出ている現状で、新型インフルエンザの出現とヒトからヒトへの感染が脅威となっている。その爆発的な感染を防御する有効な手段はワクチンしかないと考えられる。そこで H5N1 インフルエンザウイルスに対する有効で安全なワクチン開発とその接種方法の開発を目的とする。

B. 研究方法

材料と方法：

ワクチンの作製

リバースジェネティクス法により、A/HK/156/97(H5N1)の HA 遺伝子を弱毒型に改変し鳥由来のウイルスに導入した遺伝子組換えワクチン（HK9-1-1, H5N1）株及び A/Puerto Rico/3/334 (A/PR8; H1N1)株を用いて、定法のワクチン製造手法によって作成した不活化（スプリット）ワクチンを使用した。

アジュバントの調整

コレラトキシン B サブユニット（CTB; Sigma-Aldrich）は、0.2%のホロトキシンを添加して用いた（CTB*）。合成二本鎖 RNA（polyI:C）は東レより分与を受

けた。

免疫方法

7 週齢の BALB/c マウス(雌)または 23 週齢の B10 マウス(雌)を用いた。1 群 5 匹のマウスにエーテル麻酔下で $1\mu\text{g}$ のワクチンを $10\mu\text{g}$ の poly(I:C) アジュバントと共に経鼻投与した。一部のグループは 4 週後に、初回免疫と同じ材料の追加免疫をおこない、その 2 週後に 5 匹/群から血清、鼻腔洗浄液、鼻腔関連リンパ組織(NALT)および脾臓を回収し抗体応答と抗体産生細胞数の測定をおこなった。TLR 発現及び IFN、サイトカイン測定のためのマウスは初回免疫のみとし経時的に NALT を採取した。すべての動物実験は国立感染症研究所の動物実験ガイドラインに従っておこなった。

感染

HK483 株は、MDCK 細胞で 4 代継代した。チャレンジ感染は $100 \times \text{LD}_{50}$ 量を $1\mu\text{L}$ ずつ両鼻腔に接種した。感染実験は、レベル 3 の動物実験施設でおこなった。

ELISA アッセイ

遺伝子を改変した H5HA に対する IgA および IgG 抗体価の測定は、ELISA でおこなった。バキュロウイルスで発現させ、精製した HA 蛋白を ELISA プレートにコートし、血清サンプルまたは鼻腔洗浄液を加えて培養後、ビオチン化ヤギ抗マウス IgA (α 鎖) または IgG (γ 鎖) を反応させた。アルカリホスファターゼーストレプトアビジンを加えて培養した後、基質を加えて発色さ

せ吸光度を測定した。あらかじめ精製した H5-HA 反応性の IgA と IgG を任意の単位 (160U) のスタンダードとして用い、2 段階希釈の標準曲線を作成して抗体価を表現した。

RNA 分離、cDNA 合成、定量 PCR.

インフルエンザウイルス感染マウス、poly(I:C) 併用インフルエンザ不活化ワクチン接種マウスの NALT での Toll-like receptor (TLR) 3, TLR4, TLR7 の発現を調べる為、感染後、もしくはワクチン接種後に 72 時間まで経時的に NALT を回収し SV-Total RNA Isolation kit (Promega, Madison, WI) を用いて RNA を分離後 Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Valencia, CA) を用いて cDNA 合成を行った。

定量 PCR は ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使い QuantiTect Probe PCR kit (Qiagen), TaqMan probes (Applied Biosystems), primers (Sigma Genosys, Ishikari, Japan) をもちいて行った。定量 PCR により IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-12 p40, TLR-3, TLR-4, TLR-7 特異的プライマー及びプローブを用いて遺伝子発現の定量を行った。全ての遺伝子発現量は β -actin 発現量により補正を行った。

結果

1、 poly(I:C) 併用経鼻ワクチン接種による Toll-like receptor 3 (TLR3), TLR7 の発現誘導

インフルエンザワクチンと poly(I:C) を

共に経鼻接種したときのアジュバント作用の機序を調べる為にウイルス感染後およびワクチン経鼻接種後の責任リンパ装置である鼻咽頭関連リンパ装置 (NALT) での Toll-like receptor, の遺伝子発現を調べた。調べた Toll-like receptor は double stranded RNA のレセプターである TLR3, Lipopolysachalide のレセプターである TLR4, single-stranded RNA のレセプターである TLR7 の 3 種である。図 1 に示す如くインフルエンザウイルス感染後 72 時間をピークに TLR3 及び TLR7 の発現の亢進が認められた。TLR3 は非感染時に比べ 30 倍に増幅され TLR7 は 15 倍に増幅された。また poly(I:C) をアジュバントとして用い経鼻ワクチン接種を行ったマウスの NALT においては TLR3 は 6 時間後、TLR7 は 24 時間後をピークに発現の増幅がみられた。その間 TLR4 の発現に変化は無かった。ワクチンのみを接種したマウスの群においては TLR3, 4, 7 いずれも発現に変化は見られなかった。これらの結果より poly(I:C) によって自身のレセプターである TLR3 が誘導されアジュバント効果を増強している事が考えられる。

2、poly(I:C)併用経鼻ワクチン接種による Type1, Type2 インターフェロンの誘導と Th1, Th2 関連サイトカインの誘導

次に poly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチン接種後の NALT におけるインターフェロン及びサイトカインの遺伝子発現を調べた。IFN- α , IFN- β , IFN- γ の発現がワクチン接種後 6 時間で上昇し 24 時間で元の発現

レベルに戻った。(図 2 ABC)。NALT でのサイトカイン遺伝子発現を調べると、IL-4 の値が接種後 72 時間で上昇し (図 2 D)、IL12p40 は接種後 6 時間から 24 時間で上昇した (図 2 F)。これらの結果より NALT における IL-4 と IL-12p40 の遺伝子誘導が HA 特異的抗体応答に参与していることが示唆された。

なお、いずれの感染実験も国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設においてバイオセーフティーレベル 3 病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

D. 考察

合成 Double stranded RNA をアジュバントとして用いた経鼻ワクチンの接種により鼻腔粘膜上に感染防御に有効な HA 特異的分泌型 AgA 抗体、及び血清中の IgG 抗体が誘導され高病原性鳥インフルエンザに対しても有効な方法として研究が続けられているが、dsRNA である poly(I:C) を経鼻投与することによりそのレセプターである Toll-like receptor3 (TLR3) の発現が誘導されそのアジュバント作用を増強する事が示唆された。TLR3 はインフルエンザウイルスが増殖するときに作られる dsRNA を認識し抗ウイルス状態を作る事が知られているのでその発現誘導は経鼻ワクチンのアジュバント作用の増強のみならず抗ウイルスにも働く事が予測される。さらに poly(I:C) 併用経鼻ワクチンの接種により接種後早い時期から IFN- α , IFN- β , IFN- γ の誘導がみられ、更に Th1, Th2 関連サイトカインである IL-4, IL-12p40 の誘導がみられこれらが

ウイルスの感染部位を担当する免疫組織 NALT で発現され自然免疫から獲得免疫への橋渡しをしているとかがえられる。

E. 結論

高病原性インフルエンザ H5N1 のマウス感染モデルを用いアジュバント併用経鼻 H5N1 ワクチンの有効性を示してきたがその機序として二本鎖 RNA である poly(I:C) による Toll-like receptor3 を誘導する事により Th1, Th2 関連サイトカインを誘導し、感染防御に働く自然免疫と感染免疫の架け橋をしている事がわかった。今後はヒトへの応用を考えた研究につなげていく予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. **Journal of Medical Virology**, 2005 Jan; 75:130-136.
2. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H*, Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. **Journal of Virology**, 2005 Mar;79(5):2910-9.
3. Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. **Antiviral Res.** 2005 Jun;66(2-3):159-63. Epub 2005 Feb 19.
4. Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda M, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hirama C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, and Kojima A. An Attenuated LC16m8 Smallpox Vaccine: Analysis of Full-Genome Sequence and Induction of Immune Protection. **Journal of Virology**. 2005 79:11873-11891
5. Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). **Nature Medicine** *in press*.
6. Takahashi H, Maeda M, Sawa H, Hasegawa H, Moriyama M, Sata T, Hall WW, Kurata T. Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. **Biochem Biophys Res Commun**, *in press*.

学会発表

1. 一戸猛志、尾崎泰子、板村繁之、田村慎一、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 インフルエンザワクチンの有効性の検討 第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月15日-16日 大阪
 2. 田村慎一、尾崎泰子、長谷川秀樹、谷本武史、鈴木雄次郎、山本三郎、佐多徹太郎、倉田毅 経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発 第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月15日-16日 大阪
 3. 石井孝司、横田恭子、大西和夫、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI_s の組換え SARS ワクチンとしての検討 第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月15日-16日 大阪
 4. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、加藤篤、網康至、田代真人、小船富美夫、倉田毅、佐多徹太郎 弱毒生おたふくかぜワクチンの神経毒力試験に用いる動物モデルの開発ー各種実験動物におけるムンプスウイルスの感受性についての病理学的検討ー第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月15日-16日 大阪
 5. 一戸猛志、田村慎一、千葉丈、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 NKT 細胞活性化による粘膜免疫応答の誘導と高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するワクチンへの応用 第53回日本ウイルス学会学術集会 2005年11月20-22日 横浜
 6. 山本典生、松本武久、森川茂、長谷川秀樹、永田典代、山本直樹 In silico screening による SARS コロナウイルス増殖抑制薬剤の同定 第53回日本ウイルス学会学術集会 2005年11月20-22日 横浜
 7. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎 マウス、ラットを用いた継代による SARS-CoV の病原性の変化 第53回日本ウイルス学会学術集会 2005年11月20-22日 横浜
 8. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI_s の組換え SARS ワクチンとしての検討 第53回日本ウイルス学会学術集会 2005年11月20-22日 横浜
- H. 知的財産権の出願、登録状況
経鼻ワクチン（感染研発277号）出願中

図1 インフルエンザウイルス感染及び経鼻ワクチン接種による toll-like receptor の発現

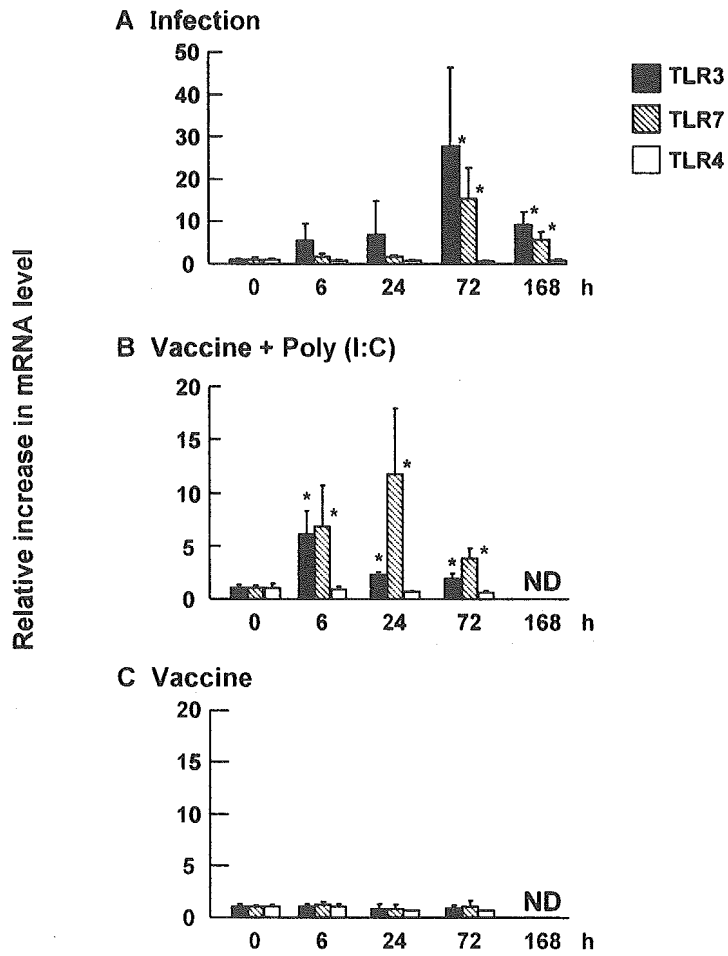
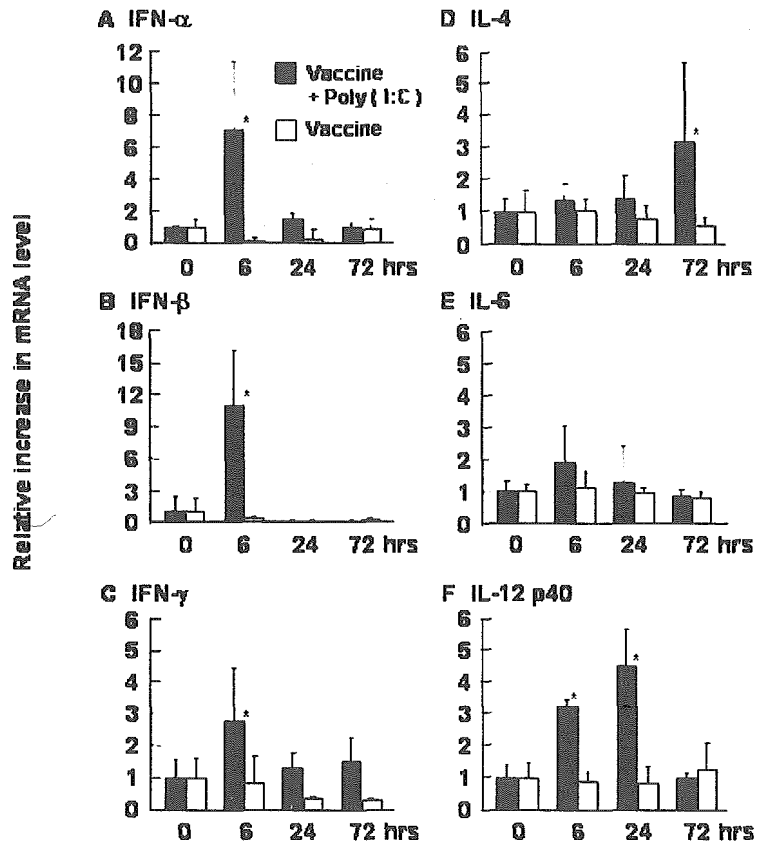


図2 経鼻ワクチン接種によるサイトカインの誘導



平成17年度厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
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

分担研究者 神谷 齊 (国立病院機構三重病院 名誉院長)

研究要旨

新型インフルエンザウイルスの出現の可能性が高まり、国民に重大な被害が出現するパンデミックに至る可能性が懸念されている。もし現実の問題となった場合には緊急予防接種の必要性が出てくる。それに備えて我々は特に小児に対する対策を検討するため、インフルエンザ HA ワクチンの有効な接種量を明らかにすることを目的として、1999/00～2004/05 年の 6 シーズンにわたって三重県内の小児 (0 歳～12 歳) を対象に検討を行った。現行薬事法に基づく規定量の接種群と欧米の接種条件のごとく 0～5 歳 0.25mL、6～12 歳 0.5mL の接種群の HI 抗体産生状況と接種後 48 時間以内の全身・局所副反応発現状況を比較検討した。その結果、HI 抗体産生状況は、同一シーズン内で両群の年齢ごとの調査件数が同一でないこと、シーズンによるワクチン抗原の力価の違い等が影響もあるかと思われるが、用量反応関係が明らかにみられたのは A(H1N1)株と A(H3N2)株の 0～3 歳であったが、総括的には 0～5 歳の 0.25mL、6～12 歳の接種の方が抗体価の上昇は良好と思われた。副反応については、今回検討した接種であっても、現行規定の接種群と同等であり臨床上問題のない結果であった。この結果は新型インフルエンザウイルスによるパンデミックが発生して緊急に多くの人に接種が必要な場合には、接種量は 6 歳未満 0.25mL、6 歳以上 0.5mL で安全に対応できることを示していると思う。

研究協力者

中野 貴司、庵原俊昭、木下麻衣子 (独立行政法人国立病院機構三重病院)

大熊 和行、矢野 拓弥 (三重県科学技術振興センター保健環境研究部)

松田 正(松田小児科院長)

鳥越 貞義 (アクアメディカル院長)

二井 立恵、伊佐地 真智子(白子クリニック院長、医師)

渡辺 正博 (すずかこどもクリニック院長)

落合 仁 (落合小児科医院)

梅本 正和(うめもとこどもクリニック院長)

安田 尚樹 (安田小児科内科院長)

酒徳 浩之 (酒徳小児科院長)

羽根 靖之、竹村 統成 (はね小児科医院)

院長、医師)

加藤 孝 (かとう小児科院長)

A. 研究目的

現行のインフルエンザ HA ワクチン接種量は、薬事法に基づき、1 歳未満 (以下「0 歳」と記述する。) 0.1mL、1 歳～6 歳未満 (以下「5 歳」と記述する。) 0.2mL、6 歳～13 歳未満 (以下「12 歳」と記述する。) 0.3mL、13 歳以上 0.5mL と規定され、平成 12 年 7 月から適用されているが、その科学的根拠となるデータを明確に示した論文はない。一方、著者らは、1999/2000 (以下「1999/00」と記述し、他も同様に記述する。) ～2004/05 年の 6 シーズンにわたって三重県内の小児 (0 歳～

12歳)を対象にインフルエンザHAワクチンの有効性と安全性に関する研究を行ってきた。これらの研究で得られたデータをもとに、現行規定の接種量と、0～5歳の0.25mL接種群、6～12歳の0.5mL接種群に分け、HAワクチン接種によるHI抗体産生状況と副反応発現状況を比較検討することを目的に検討を行った。この検討は今後新型インフルエンザが出現し小児に対するワクチン接種の必要性が出た場合の緊急対策対応を目的の一つとして実施した。

B. 研究方法

1. 解析対象者

解析対象者は、1999/00～2004/05年の6シーズンにわたる調査でワクチン接種群に登録された健常小児であって、ワクチン接種前、1回目接種4週後および2回目接種4週後の計3回のHI抗体測定が行い得た者6シーズン合計981人である。シーズン別・ワクチン接種量別の年齢別内訳を表1に示した。また、1999/00～2004/05年各シーズンのワクチン株を表2に示した。

なお事前に主治医より研究目的・方法を接種に来院した児及び保護者に説明し原則として文書同意を得た後、同意をいただいた方に対し、それぞれの接種量で接種を行った。又実施に先立ち三重病院倫理委員会の審議と許可を得て実施した。

2. 解析方法

1) HI抗体産生状況の解析

ワクチン接種によるHI抗体産生状況の解析は、0歳児は0.1mL接種群(11人)と0.25mL接種群(18人)、1～5歳児は0.2mL接種群(341人)と0.25mL接種群(321人)、6～12歳児は0.3mL接種群(81人)と0.5mL接種群(209人)を対象に、年齢・接種量別に、ワクチン

1回接種または2回接種によるHI抗体価の有意な(2管以上の)上昇者割合を求め、0.1～0.3mL接種群と0.25mLまたは0.5mL接種群間でイエーツの χ^2 検定により比較検討した。

また、HI抗体価の有意な上昇は2管以上とされていることから、ワクチン接種前HI抗体価10倍未満を対象に、1回接種または2回接種で感染防御水準とされる40倍以上に上昇した割合を求め、前述と同様に、0.1～0.3mL接種群と0.25mLまたは0.5mL接種群間でイエーツの χ^2 検定により比較検討した。

2) 副反応発現状況の解析

ワクチン接種後48時間以内に発現した副反応は、全身副反応(37.5°C以上の発熱、発疹)と局所副反応(発赤、腫脹、硬結)に分け、ワクチン接種量を考慮し、年齢を0歳、1～5歳、6～12歳に3階級に区分し、1回接種後と2回接種後の発現者割合に加え、1回接種と2回接種を通じた発現者割合を求め、両群間でイエーツの χ^2 検定により比較検討した。

3) データの集計・解析

データの基礎的な演算、クロス集計等はMicrosoft office Excel 2003を用いて行った。また、イエーツの χ^2 検定はSPSS 14.0J for Windowsを用いて行った。

C. 研究結果

1. ワクチン接種によるHI抗体産生状況

1) HI抗体価2管以上の上昇状況

A(H1N1)株接種によるHI抗体価2管以上の上昇状況を表3および図1に示した。0歳児における2管以上上昇者割合は、1回目の接種、2回目の接種ともに、有意ではないが0.1mL接種群より0.25mL接種群のほうが高かった。1歳児では、1回目の接種ではやはり

有意ではないが高く、2回目の接種で0.2mL接種群より0.25mL接種群のほうが有意 ($p<0.05$) に高かった。2～3歳児では1回目の接種で有意ではないが0.2mL接種群より0.25mL接種群のほうが高かった。また、5歳および6～12歳でも1回目の接種で有意ではないが0.2mLまたは0.3mL接種群より0.25mLまたは0.5mL接種群の方が高かった。しかしながら、4歳のみは用量反応関係が逆転する結果であった。

A(H3N2)株接種によるHI抗体価2管以上上昇状況を表4および図2に示した。2管以上上昇者割合は、A(H1N1)株とほぼ同様に、0～3歳および6～12歳では有意ではないが0.1～0.3mL接種群より0.25mLまたは0.5mL接種群のほうが高かったが、4～5歳では逆転する結果であった。

B株接種によるHI抗体価2管以上上昇状況を表5および図3に示した。2管以上上昇者割合は、いずれの年齢でもA(H1N1)株、A(H3N2)株に比べ低く、用量反応関係がみられたのは有意ではないが2歳のみであった。

2) HI抗体価40倍以上への上昇状況

接種前抗体価10倍以下の小児のA(H1N1)株接種による40倍以上への上昇状況を表6および図4に示した。40倍以上への上昇状況を1回接種後で見ると、すべての年齢で有意ではないが用量反応関係がみられた。しかし2回接種後で見ると、3歳では僅かではあるが用量反応関係が逆転する結果であった。

A(H3N2)株接種による40倍以上への上昇状況を表7および図5に示す。40倍以上への上昇状況を1回接種後で見ると、5歳を除き、有意ではないが用量反応関係がみられた。2回接種後で見ると、0～3歳で用量反応関係がみられ、しかも2歳では有意 ($p<0.05$)) であったが、4歳以上では逆転する結果であった。

B株接種による40倍以上への上昇状況を表8および図6に示した。40倍以上への上昇者割合は、A(H1N1)株、A(H3N2)株に比べ概して低く、用量反応関係がみられたのは有意ではないが0～2歳の1回接種後のみであった。

2. 副反応発現状況

ワクチン接種1回目、接種2回目の全身副反応および局所副反応の発現率を表9に示した。接種2回目の6～12歳では0.5mL接種群の局所副反応発現率がやや高かったが、これを含めいずれにおいても0.1～0.3mL接種群と0.25～0.5mL接種群の間で発現率に有意な差異はみられなかった。

D. 考 察

インフルエンザHAワクチンの有効な接種量を明らかにすることを目的として、1999/00～2004/05年の6シーズンにわたって三重県内の小児(0歳～12歳)を対象に行った調査データをもとに、薬事法に基づく現行規定の接種量(0歳0.1mL、1～6歳未満0.2mL、6～13歳未満0.3mLの接種群)と、0～6歳未満の0.25mL接種、6～13歳未満の0.5mL接種群に分け、HI抗体産生状況と副反応発現状況を比較検討した。

HI抗体産生状況はワクチン株によるHI抗体価2管以上の上昇状況と40倍以上への上昇状況の2通りで比較検討した。その結果、A(H1N1)株およびA(H3N2)株では、0～3歳は統計学的に有意となったものは1部ではあるがいずれにおいても用量反応関係がみられたが、4～5歳では用量反応関係がみられなかった。また、B株では、HI抗体価2管以上の上昇状況、40倍以上への上昇状況のいずれもA(H1N1)株、A(H3N2)株に比べ良好ではなく、用量反応関係はほとんどみられなかった。この原因としては、①現行接種量群と欧米並み