

測定の為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 × LD50 量を 1 μL 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 にておこなった。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 CTB*アジュバント併用ワクチンを経鼻免疫した BALB/c および B10 マウスでの抗体応答と感染防御効果

0.1, 0.5, 2 μg の CTB*とワクチンを経鼻免疫したマウスの H5-HA 分子に対する抗体応答(ELISA)とチャレンジ感染に対する感染防御効果(生存率)を図1に示す。BALB/c, B10 マウスは共に、CTB*をアジュバントとすることにより少量のワクチンでも鼻腔洗浄液中に特異的な IgA および IgG が、血清中には IgG が誘導され、強毒株 HK483 の致死的なチャレンジ感染に対し有効であることを示した。非免疫マウスではほとんどすべてのマウスがチャレンジ感染後に死亡した。

2、CTB*、poly(I:C)、CMP

poly(I:C)+CMP のアジュバント併用ワクチンを経鼻免疫した BALB/c マウスの抗体応答と感染防御効果の比較

2 μg のワクチンを様々なアジュバントと共に経鼻免疫した BALB/c マウスの H5-HA 分子に対する抗体応答(ELISA)を図2に示す。CTB*は最も強い IgA および IgG 抗体応答を誘導したが、poly(I:C)+CMP も CTB*よりはやや弱いものの鼻腔洗浄液中に IgA、血清中に IgG を誘導した。poly(I:C)および CMP を投与したマウスも、各々鼻腔洗浄液中および血清に特異的抗体が検出された。アジュバントを併用せずワクチンのみを経鼻免疫したマウスでは抗体が検出されなかった。また、NALT と脾臓の H5-HA 特異的 AFC 量を図 3 に示す。CTB*を投与したマウスでは、脾臓の IgA および IgG-AFC が他の群に比べて最も多かったが、NALT の IgA および IgG-AFC は、CTB*と poly(I:C)+CMP 投与群で同等に高かった。

3、病理像

Poly(I:C)+CMP アジュバント併用ワクチンを投与したマウスと、非免疫マウスのチャレンジ感染後 7 日目の各組織の病理像を比較

した。非免疫マウスでは鼻腔上皮細胞の脱落がみられ、ウイルス抗原が陽性であり、大脳の脳幹全体がウイルス抗原陽性であった(図4)。他の臓器や、ワクチンを投与したマウスでは病理学的変化およびウイルス抗原は認められなかった。

4 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た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。

5 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2ABC)。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2D)、IL12p40 は接種後6時間から24時間で上昇した(図2F)。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 特異的抗体応答に関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

・従来の皮下接種では抗体応答を得ずらいとされているインフルエンザウイルス H5N1 ワクチンを用い、投与方法を経鼻とすることにより防御効果の高い上気道での IgA, 血清中の IgG を誘導することができた。用いたアジュバントのうちもっとも抗体誘導能の高かったものは CTB*でありついでで poly(I:C), CMP の順番であった。CTB*はアジュバント効果が最も高かったがヒトへの応用を考えた場合その毒性によりヒトへの投与が認められていない。よってより毒性の低いアジュバントが求められているが今回得られた結果により二本鎖 RNA である poly(I:C)に防御効果のある粘膜免疫の誘導能があり、インフルエンザウイルス H5N1 に対して有効なアジュバントであることが示された、さらにその効果はキチン微粒子である CMP と併用することにより増強され、臨床応用に向けた研究が望まれる。

・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は作られる 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

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んがえられる。

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た。二本鎖 RNA である poly(I:C) とキチン微粒子(CMP)の併用により高い防御効果のある免疫誘導が可能であった。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。

・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. Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Nagashima K, Sata T, Kurata T. Topoisomerase I dissociates human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase from genomic RNAs. **Biochem Biophys Res Commun**. 2004 Jan 23;313(4):1073-8.
2. Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kurata T, Takahashi H. Nucleolin and the Packaging Signal, Promote the Budding of Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) **Microbiol Immunol**. 2004;48(2):111-8.
3. Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T. BCL-6-positive Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma Arising from Liver and Spleen as Multiple Nodular Lesions. **Leuk Lymphoma**. 2004 Oct;45(10):2169-72.
4. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. **J Gen Virol**. 2004 Oct;85(Pt10):2981-9.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
 10. Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda M, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hiramata 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
 11. 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.
 12. 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、渡邊泉、伊藤智史、森山雅美、田村慎一、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川 秀樹 合成 2 本鎖 RNA, Poly(I:C) をアジュバントに用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発。第 52 回日本ウイルス学会総会 (2004 年 11 月横浜)。
 2. 一戸猛志、渡邊泉、伊藤智史、森山雅美、田村慎一、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川 秀樹 合成 2 本鎖 RNA, Poly(I:C) をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発。第 8 回日本ワクチン学会学術集会 (2004 年 10 月札幌)。
 3. 長谷川秀樹、一戸猛志、渡邊泉、伊藤智史、千葉丈、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎。天然物由来微粒子の粘膜ワクチンアジュバント効果の検討
 4. 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
 5. 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
 6. 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 DI₅ 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
 7. 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 - 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 - 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
 8. 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
 9. 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

10 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

11 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

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年に三重県内の小児（0～12歳）を対象として0.25mL接種群と0.5mL接種群を設定し、HI抗体産生状況と副反応発現状況を比較検討した。また、接種後48時間以内の副反応発現状況を調査し、採血に同意が得られた者は接種前、1回接種後、2回接種後のHI抗体を測定した。副反応については、1回接種後に全身副反応、局所副反応のいずれも発現しなかった者は2回接種後でも発現しにくかったが、1回接種後に局所副反応が発現した者は、2回接種後に高い割合（56人中28人：50%）で発現し、2回接種後は特に注意して経過観察する必要性が明らかとなった。一方、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

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。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。

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。

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

(I) 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。

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 週間および 2 回目接種 4 週間後の計 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、同意をして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 接種群間でイェーツの 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

(I) 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。

(I I) 1. ワクチン接種による抗体産生に影響する要因

ワクチン接種前抗体価が 20 倍以下の者を対象として、抗体価の上昇状況の年齢間比較を

Wilcoxon 順位和検定により行ったところ、A/ニューカドニア、A/パナマ、B/山東のいずれも 1 回接種後では 2~5 歳児は 0~1 歳児に比べ有意 ($p < 0.05$) に上昇した。また、A/ニューカドニアでは 2~5 歳児と 6~12 歳児とでは有意差は認められなかったが、A/パナマおよび B/山東では 6~12 歳児より 2~5 歳児のほうが有意 ($p < 0.05$) に上昇した (表 2)。これらの結果から、年齢については、0~1 歳児、2~5 歳児、6~12 歳児の 3 区分にカテゴリー化し、以後の検討を行うこととした。

ワクチン接種による抗体価の上昇状況を分かりやすくするため、接種前 vs 1 回接種後、1 回接種後 vs 2 回接種後の抗体価をそれぞれ x 軸、y 軸としてプロットし図 1~3 に示す。これらの抗体価分布、ワクチン接種による抗体価 2 管以上の上昇者割合を比較すると、A/ニューカドニアと A/パナマでは比較的良好で類似した上昇傾向を示したが、B/山東では両株のような傾向はみられなかった。また、ワクチン 1 回 (2 回) 接種前抗体価 20 倍以下対象者の 1 回 (2 回) 接種後 2 管以上上昇者割合を株および年齢区分別に比較すると、上昇者割合は A/ニューカドニア、A/パナマ、B/山東の順であり、いずれの株においても、0~1 歳児では 1 回接種後より 2 回接種後のほうが高く (A/ニューカドニアおよび A/パナマでは $p < 0.05$ で有意)、2~5 歳児および 6~12 歳児では 1 回接種後より 2 回接種後のほうが逆に低くなった (A/パナマの 2~5 歳児、B/山東の 2~5 歳児および 6~12 歳児では $p < 0.05$ で有意) (図 4)。

また、ワクチン 1 回 (2 回) 接種前抗体価が 20 倍以下の対象者が 1 回 (2 回) 接種で感染防御水準の 40 倍以上に上昇した者の割合を株および年齢区分別に比較すると、2 管以上の上昇状況と同様にいずれの株においても、0~1 歳児では 1 回接種後より 2 回接種後のほうが高く (A/ニューカドニアでは $p < 0.05$ で有意)、2~5 歳児および 6~12 歳児では 1 回接種後より 2 回接種後のほうが低くなった (A/ニューカドニアおよび A/パナマの 2~5 歳児では $p < 0.05$ で有意) (表 3)。

一方、ワクチン接種前抗体価が 20 倍以下の対象者における接種後 2 管以上上昇に影響する要因を多重ロジスティックモデルにより解析したところ、解析対象者を 1 回接種前抗体価が 20 倍以下の 1~5 歳児に制限した場合、1 回接種後

の1歳児に対する2~5歳児の調整オッズ比はA/ニューカドニアでは2.55と有意(p値0.047)となり、A/ハナおよびB/山東では有意ではなかったが同様に1を越える調整オッズ比(それぞれ1.18および1.53)が得られ、Wilcoxon順位検定と同様の結果であった。また、前シーズンにワクチン接種を受けなかった者に対する受けた者の調整オッズ比は、A/ニューカドニアでは2.45(p値0.044)、A/ハナでは2.38(p値0.027)、B/山東では1.98(p値0.12)と前2株で有意となったことから、その影響をより詳細に検討するため、説明変数から年齢を除外し、解析対象者を1歳児のみに制限した場合と、2~5歳児のみに制限した場合で解析したところ、前者の場合は、いずれの株においても前シーズンのワクチン接種歴が有意(p<0.05)に影響したが、後者の場合はいずれも有意にはならなかった。これらの結果から、1歳児は2歳児以上に比べ抗体産生が悪く、その要因は前シーズンにおけるワクチン接種の有無、すなわち前シーズンにワクチン接種を受けなかった1歳児の抗体産生が最も悪くなることが明らかとなった。

解析対象者を1回接種前抗体価が20倍以下の2~12歳児に制限し、2~5歳児と6~12歳児にカテゴリー化した年齢を説明変数とした場合、1回接種後の2~5歳児(0.25mL接種)に対する6~12歳児(0.5mL接種)の調整オッズ比は、A/ニューカドニアでは0.57(p値0.20)、A/ハナでは0.099(p値0.040)、B/山東では0.31(p値0.0030)といずれも1を下回り、接種量に反する結果となった。

また、解析対象者から1回接種後より2回接種後のほうが良好な抗体産生を示した0~1歳児を除き、2回接種前抗体価が20倍以下の2~12歳児に制限した場合、2回接種前抗体価10倍未満に対する10~20倍の調整オッズ比は、A/ニューカドニアでは0.069(p値0.011)、A/ハナでは0.063(p値0.031)、B/山東では0.096(p値0.00009)といずれも有意に1を下回った。また、2~5歳児(0.25mL接種)に対する6~12歳児(0.5mL接種)の調整オッズ比は、A/ニューカドニアとB/山東では1を上回ったがいずれも有意にはならなかった。

2. ワクチン接種時の副反応

ワクチン接種時の重篤な副反応は1回目、2回目ともにみられなかった。全身副反応は1回目・2回目の接種を通じて0~1歳児では54人中3人(6%)、2~5歳児では158人中10人(6%)、6~12歳児では114人中1人(1%)で発現し、年齢区分間で有意差は認められなかった。局所副反応は1回目・2回目の接種を通じて、0~1歳児では54人中8人(15%)、2~5歳児では158人中36人(23%)、6~12歳児では114人中29人(25%)で発現し、発現率は0~1歳児より2~12歳児でやや高かったが有意差は認められなかった(表5-1)。

ワクチン1回接種後の副反応発現状況別に2回接種後の発現状況をみると、年齢区分間で有意差は認められなかった。また、1回接種後に全身副反応、局所副反応のいずれも発現しなかった者は2回接種後でも発現しにくかった(全身副反応発現率2%、局所副反応発現率5%)が、1回接種後に局所副反応のみが発現した者(56人)は2回接種後に28人(50%)と高い割合で発現することが明らかとなった(表5-2)。

(I I I) 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なり、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回接種後でみると、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回接種後でみると、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回接種後でみると、5歳を除き、有意ではないが用量反応関係がみられた。2回接種後でみると、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、これを含めいづれにおいても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

・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 μ 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 μ 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 $^{\circ}$ 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。

・インフルエンザHAワクチンの接種量の妥当性を明らかにすることを目的として、2003/2004年に三重県内の小児(0~12歳)を対象として0.25mL接種群と0.5mL接種群を設定し、HI抗体産生状況と副反応発現状況を、単変量解析(Wilcoxon順位和検定、 χ^2 検定)および多変量解析(多重ロジスティックモデル)により検討した。

A/ニューカドニアとA/ハチマでは比較的良好で類似した抗体価の上昇傾向を示したが、B/山東では両株のような傾向はみられなかった。また、ワ

クチン接種前抗体価が20倍以下の者が接種後2管以上上昇した割合は、A/ニューカドニア、A/パナマ、B/山東の順に高く、いずれの株においても、0～1歳児では1回接種後より2回接種後のほうが高くなったのに対し、2～5歳児、6～12歳児では1回接種後より2回接種後のほうが低くなった。

そこでこのような抗体産生に影響する要因を明らかにするため、多重ロジスティックモデル（説明変数として前シーズンインフルエンザ罹患の有無および前シーズンインフルエンザワクチン接種の有無を設定したため、解析対象年齢は0歳を除き1～12歳とした）により解析したところ、1歳児は2～5歳児に比べ抗体産生が悪く、その要因は前シーズンにおけるワクチン接種の有無、すなわち前シーズンにワクチン接種を受けなかった1歳児の抗体産生が最も悪くなることが明らかとなった。また、2～5歳児と6～12歳児との抗体産生状況を比較したところ、1回接種後においては、A/ニューカドニアでは有意差は認められなかったが、A/パナマ、B/山東ではともに0.5mL接種の6～12歳児よりもむしろ0.25mL接種の2～5歳児のほうが抗体産生は有意に良好であった。2回接種後においてはいずれも有意にはならなかった。

・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接種群の比較検討は、本来、同一シーズン内で両群の年齢ごとの調査件数が概ね揃っていることが望ましいが、2002/03年のように全年齢で現行接種群のみのデータであったり、2003/04年のように全年齢で欧米並み接種群のみのデータであったことが影響した可能性があること、②抗体測定に用いるワクチン抗原の力価がシーズンによって異なっていた可能性のあることも考えられたが、臨床治験であり患者さんの意向も考慮しながら検討を行うため、変更が難しいこともありいずれについても現状では明確にすることはできなかった。

一方、副反応発現状況は、全身副反応（37.5℃以上の発熱、発疹）、局所副反応（発赤、腫脹、硬結）のいずれについても、現行接種群と欧米並み接種群の間で、発現率に有意な差異はみられず、接種量の増加が副反応に影響することはなかった。

新型インフルエンザパンデミックに際してワクチン接種はかなりの混乱が予想され、1日に何千人もの接種をするような事態が発生した場合には小児についても現行のように接種量を細かく分けることは現実的でなく、欧米の接種のように0.25mL接種群と0.5mL接種群の2段階で安全に接種できるとがこの検討でも証明され、効果にも差がないと考えられることから利用できる結果と考える。

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。

・本研究においては、ワクチン接種量を0～5歳児に対しては0.25mL、6～12歳児に対しては0.5mLと設定したため、抗体産生に対する年齢と接種量の影響が交絡し個別に解析評価することができなかった。このため、今後は、各年齢において0.25mL接種群と0.5mL接種群を可能な限り同数設定し、統計学的に解析評価できる調査デザインにより比較検討する必要がある。

一方、ワクチン接種前抗体価の有・無については、1回接種後では有意にはならなかったが、2回接種後では、A/ニューカドニア、A/パナマ、B/山東のいずれも抗体既保有者（10～20倍）よりも非保有者（10倍未満）のほうが2管以上の抗体価上昇を有意に示した。これらの結果は、抗体既保有者では1回目の接種でブースター効果が現れ、抗体非保有者では1回目の接種でプライミングされ2回目の接種により2管以上の抗体価上昇となって現れる、という結果を支持するものと考えられた。

また、ワクチン接種時の副反応は、1回目、2回目ともに重篤なものはみられなかった。また、1回接種後に全身副反応、局所副反応のいずれも発現しなかった者は2回接種後でも発現しにくかったが、1回接種後に局所副反応が発現した者は、2回接種後にも高い割合（50%）で発現し、2回接種後は特に注意して経過観察する必要性が明らかとなった。

・本研究では、現行規定の接種群と0～5歳0.25mL、6～12歳0.5mLの欧米並み接種群を対象にHI抗体産生状況と副反応発現状況を比較検討したが、HI抗体産生状況については、考察でも述べたように、同一シーズン内で両群の年齢ごとの調査件数が揃っていないこと、シーズンによる抗体測定用ワクチン抗原の力価の違い等が影響したためか、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、全体を見るとB株を除き量が多い方が抗体価が高い傾向が見られた。さらに調査をするには前者の要因については新たな調査をしなければならないが、後者については現在残っている冷凍保存血清を用いて一括同時にHI抗体測定を行うことにより解決できる可能性が期待できるので、検討してみる所存である。また副反応については、今回検討した欧米並みの接種量であっても、現行規定の接種と同等であり、問題のない結果であった。

今後予想される新型ウイルスによるパンデミックが起こった場合には、成人はもとより小児にも大量の人数に接種する必要性が考えられる。その際現行ワクチンのように年齢によって接種量を細かく変更するようなことは現実的でなく、安全性を考慮した場合6歳未満0.25mL、6歳以

上0.5mLの接種で対応しても安全性に問題はないものと考えられる。この成績はもしパンデミック発生時にワクチン接種が必要になった場合には考慮する余地があるものとする。

F. 健康危険情報

該当なし

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
- 8) 大熊 和行、松村 義晴、神谷 齊 : 2002/2003年の三重県における乳幼児に対するインフルエンザ HA ワクチンの有効性と安全性. 小児感染免疫 17 (1) 3-16, 2005
- 9) 神谷 齊: わが国の予防接種の現状と問題点. 臨床と微生物 32 (5) 431-435, 2005
- 10) Akihisa Okumura, Takashi Nakano, Yukiko Fukumoto, Kazuo Higuchi, Hitoshi Kamiya, Kazuyoshi Watanabe, Tsuneo Morishima : Delirious behavior in children with influenza : its clinical features and EEG findings. Brain & Development 27, 271-274. 2005
- 11) 神谷 齊: これからの予防接種. 小児感染免疫 17 (4) 335-340. 2005

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

該当なし

平成 15-17 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

リバーズジェネティクス法による新型インフルエンザワクチン株の作出に使用する
細胞バンクの構築

分担研究者：城野洋一郎（財）化学及血清療法研究所
研究協力：水野喬介

研究要旨 新型インフルエンザの汎流行に際するワクチン製造にあたっては、リバーズジェネティクス (RG) 法によってワクチン製造用の弱毒化種ウイルスを作出することが効率的である。本研究は、①国立感染症研究所（感染研）が実施する RG 法の確立に当たり、化学及血清療法研究所（化血研）が所有する Vero 細胞から派生したクローンの樹立・供給と、その他の候補細胞あるいは新たに ATCC(the American Type Culture Collection)より入手する細胞株を感染研へ供給する、②上記細胞株のうち、満足のいく効率を示した細胞株について、マスター及びワーキングセルバンクを調製する、③調製したバンクに関して、感染研と共同で安全性試験を立案し試験を実施する、ことを目的とした。
昨年度までの検討において、RG によるウイルスレスキュー効率が高かった LLC-MK2 Derivative 細胞のマスター及びワーキングセルバンクの作製を行い、細胞バンクの安全性試験、特性試験を実施した。一部試験が未終了であるが、本細胞は安全性が高く RG 用細胞としての実用化の可能性が高いと考えられる。

A. 研究目的

新型インフルエンザの汎流行が起こった場合、従来のインフルエンザワクチンの製造手順では迅速な対応は困難である。リバーズジェネティクス (RG) 法を用いたワクチン用株の作出が最も効率的であり、国立感染症研究所（感染研）において RG 法の確立が行われている。本研究は、この RG 法に適した細胞株の検討とその細胞のバンク作製及び、安全性試験を実施することである。

新型インフルエンザ用ワクチンの作製に RG 法を用いる場合、Vero 細胞より RG 効率が高い LLC-MK2-Derivative 細胞について、化学及血清療法研究所（化血研）でセルバンクの作製を行い、セルバンクの安全性試験を実施することを目的とした。

B. 研究方法

1. Vero 細胞クローンの作出

化血研で調製・保管している Vero 細胞のワ

ーキングセルバンクを出発材料として、限界希釈法によって血清含有培地及び無血清培地で増殖する Vero 細胞クローンの作出を行った。作出したクローンは凍結保存を行い、別途培養して感染研へ供給した。

2. 化血研で保存されていた細胞クローン

化血研で以前に作出して凍結保存されていた Vero C1-11、Vero C6-2 細胞クローンを培養して、感染研へ供給した。

3. 感染研が American Tissue Culture Collection (ATCC) より入手したサル由来細胞株

RG 技術確立において、感染研では Vero 細胞以外の細胞を用いた検討も実施された。感染研が ATCC から入手した以下の細胞について培養、拡張し感染研へ供給するとともに、培養した細胞は別途凍結保存を行った。

LLC-MK2 Original (ATCC CCL-7)、LLC-MK2 Derivative (ATCC CCL-7.1)、BS-C-1 (ATCC CCL-26)、CV-1 (ATCC

CCL-70)

4. LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクの調製

感染研での RG 法によるウイルスレスキュー効率の検討の結果、LLC-MK2 Derivative 細胞でもっとも高率に組み換えウイルスが産生されることが明らかとなった。現在 RG によるインフルエンザウイルスの作出は Vero 細胞が至適とされているが、Vero 細胞のみで技術を確立することは危険であり、Vero 細胞のバックアップの位置付けとして、LLC-MK2 Derivative 細胞も RG 用細胞としてセルバンクを作製することとした。

5. LLC-MK2 Derivative 細胞の安全性試験

ATCC では RG 用細胞として各種安全性情報を添付した Vero 細胞を準備中との情報が得られ、Vero 細胞のバックアップの位置付けとする LLC-MK2 Derivative 細胞も ICH ガイドライン (Q5A、Q5D) を参考に特性解析試験、純度試験、核型分析、造腫瘍性試験等の安全性情報に関する試験を実施することとした。

6. 感染研において検討された RG によるウイルスレスキュー効率検討の結果、LLC-MK2 Derivative、でもっとも高率に組み換えウイルスが産生されることが明らかとなった。現在 RG によるインフルエンザウイルスの作出は Vero 細胞が至適とされているが、Vero 細胞のみで技術を確立することは危険であり、Vero 細胞のバックアップの位置付けとして、LLC-MK2 Derivative 細胞も RG 用細胞としてセルバンクを作製した。事実、Vero 細胞における H7N2 ウイルスの RG 法による弱毒化は非常に困難であることが報告されており、Vero 細胞に代わる細胞バンクの構築は大きな意義がある。

7. LLC-MK2 Derivative 細胞の安全性試験

ATCC では RG 用細胞として各種安全性を実施した Vero 細胞を準備中との情報が得られたが、我々の検討では Vero 細胞では満足いくレスキュー効率を得られなかったことから、Vero 細胞のバックアップの位置付けとする LLC-MK2 Derivative 細胞も ICH ガイドライン (Q5A、Q5D) を参考に特性解

析試験、純度試験、核型分析、造腫瘍性試験等の安全性情報に関する試験を実施することとした。

(倫理面への配慮)

本研究の研究対象はすべて既に樹立されている細胞株を出発材料としており、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

1. Vero 細胞クローンの作出

①血清含有培地及び無血清培地を用いて限界希釈法による Vero 細胞のクローニングを行った。96well 培養プレートに 2 cells/well、1 cell/well、0.5cell/well となるように播種して培養し、増殖がみられた well の細胞は継代拡張培養を行った。その結果、血清含有培地で増殖するクローンが 31 種、無血清培地で増殖するクローンが 75 種得られた。

②上記で得られたすべての Vero 細胞クローンを凍結保存した。

③血清含有培地で増殖する Vero 細胞クローンのうち増殖性の良い 5 種、同じく無血清培地で増殖する Vero 細胞クローンの 12 種を別途培養し、感染研へ供給した。

結果：ウイルスレスキュー効率の良い細胞クローンは無かったとの報告を受けた。

2. 化血研で保存されていた細胞クローン

①化血研で以前に作出して保存されていた Vero C1-11、Vero C6-2 細胞クローンを復元培養し、感染研へ供給した。

結果：ウイルスレスキュー効率の良い細胞クローンは無かったとの報告を受けた。

3. 感染研が ATCC より入手したサル由来細胞株

①感染研が ATCC へ分与申請したサル由来細胞株は、一旦感染研が受領した後、未開封の状態で化血研へ再送付された。これらの細胞株を復元培養し、凍結保存した。

②別途培養して、感染研へ供給した。

4. RG 法によるウイルスレスキュー効率の検討

①感染研において、供給した上記細胞株での RG 法によるウイルスレスキュー効率の検討が実施された。その結果、LLC-MK2 Original、及び LLC-MK2 Derivative 細胞

で効率的なウイルスレスキューが認められた。LLC-MK2 Derivative 細胞は、再現性も確認された。

②上記の検討結果、及び細胞の増殖性を基に、LLC-MK2 Derivative 細胞を Vero 細胞のバックアップとしてセルバンクを作製することとした。

5. LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクの調製

①治験薬製造の構造設備を使用して、GMP 基準に準じたセルバンクを調製し、マスターセルバンク 162 本を調製した。マスターセルバンクは、気相式液体窒素保存容器にて保管・管理した。

②同様の方法で、ワーキングセルバンク 162 本を調製した。ワーキングセルバンクは、気相式液体窒素保存容器にて保管・管理した。

6. LLC-MK2 Derivative 細胞の安全性試験

①調製したマスター及びワーキングセルバンクについて、ICH ガイドライン(Q5A, Q5D)を参考に特性解析試験、純度試験、核型分析、造腫瘍性試験等試験を英国 BioReliance 社に依頼した。試験項目は以下の通りである。

1) マスターセルバンク

- Qualification of test article material for sterility by direct inoculation method
- Sterility testing by direct inoculation method
- Mycoplasma Detection EP
- Other services (Mycobacterium)
- Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Culture(200 cell profiles)
- Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase (FPERT) assay
- 28Day In Vitro assay for the Detection Viral Contaminants – 3 detector cell lines (MRC-5, Vero, BCS)
- In Vivo assay for cell substrates according to EP requirements
- Q-PCR detection of a range of human viruses (CBER PTC and CPMP)
- Q-PCR detection of Bovine polyomavirus (BPyV)

- Q-PCR detection of Bovine/porcine circovirus

- PCR detection of Simian Immunodeficiency Virus (SIV)

- Other Services (Karyology)

- Identification and Characterisation of Cultured Cells By Analysis of 4 Isoenzymes

- In vivo tumorigenicity (FDA points to Consider 1993)

- Detection of viral contaminants in Bovine serum according to CPMP and US 9CFR requirements

- In vitro assay for the detection of Porcine viruses according to 9CFR

2) ワーキングセルバンク

- Qualification of test article material for sterility by direct inoculation method

- Sterility testing by direct inoculation method

- Mycoplasma Detection EP

- Identification and Characterisation of Cultured Cells By Analysis of 4 Isoenzymes

②これら試験項目の中には、試験期間が長期にわたるものが含まれており、最終的な試験報告書が入手できるのは、H17年10月の予定である。

7. LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクの調製

①治験薬製造の構造設備を使用して、GMP 基準に準じたセルバンクを調製し、マスターセルバンク 162 本を調製した。マスターセルバンクは、気相式液体窒素保存容器にて保管・管理した。

②同様の方法で、ワーキングセルバンク 162 本を調製した。ワーキングセルバンクは、気相式液体窒素保存容器にて保管・管理した。

8. LLC-MK2 Derivative 細胞の安全性試験

①調製したマスター及びワーキングセルバンクについて、ICH ガイドライン(Q5A, Q5D)を参考に特性解析試験、純度試験、核型分析、造腫瘍性試験等試験を英国 BioReliance 社に依頼した。試験項目は以下の通りである。

1) マスターセルバンク

• Qualification of test article material for sterility by direct inoculation method

無菌試験を実施するにあたり、検体である細胞自体が無菌試験へ影響を及ぼさないことを検証する試験。試験の結果、細胞が無菌試験へ影響を与えることは認められなかった。

• Sterility testing by direct inoculation method

チオグリコール酸培地およびSCD培地の各 100mL にサンプル (被験細胞の培養液) 10mL ずつを接種し、それぞれ 30-35°C および 20-25°C で 14 日間培養し、菌の増殖の有無を確認する試験。いずれの培地でも菌の混入は認められなかった。

• Mycoplasma Detection EP

サンプル (被験細胞の培養液) を寒天培地に接種後、好気的および嫌気的条件下、37°C で 14 日間培養し、マイコプラズマの存在の有無を確認する試験。マイコプラズマの混入は認められなかった。

• Test for Mycobacterium spp by culture medium method

培養法による結核菌否定試験。
菌の増殖は認められなかった。

• Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Culture(200 cell profiles)

細胞をグルタルアルデヒドで固定後、超薄切片を作成し、ネガティブ染色を行って透過電子顕微鏡により 200 個の細胞について観察。

いずれのタイプのウイルス様粒子も認められなかった。

• Flourescent Product Enhanced Reverse Transcriptase (FPERT) assay

検体を破壊し逆転写酵素の抽出操作を行い、テンプレート RNA と混和し、逆転写反応が行われるか否かを判定する。逆転写酵素活性は認められなかった。

• 28Day In Vitro assay for the Detection Viral Contaminants - 3 detector cell lines (MRC-5, Vero, BCS)

サンプル(被験細胞の培養液)を MRC-5、Vero および BCS 細胞に接種後、14 日間培養し、検鏡により細胞変性の有無を確認。いずれのインジケータ細胞も細胞変性を認めなかった。

• In Vivo assay for cell substrates according to EP requirements

(1)動物接種試験

検体 (凍結融解による細胞破碎液) を乳のみマウスの頭蓋内、腹腔内および経口接種を行い、14 日間観察する。生存マウスをホモジネート後、その上清を同様に別の乳のみマウスに接種し、更に 14 日間観察する。検体を離乳マウスおよびモルモットの頭蓋内、腹腔内に、更に離乳マウスには鼻内および経口接種を行い、28 日間観察する。試験結果は陰性であった。

(2)発育鶏卵接種試験

サンプルを尿膜液内に接種し、3 日間保育後、尿膜液について鶏、モルモットおよび O 型ヒト血球での血球凝集反応を確認。また、この尿膜液を同様に別の発育鶏卵の尿膜液内に接種し、3 日間保育後、血球凝集反応を確認。

試験結果は陰性であった。

• Q-PCR detection of a range of human viruses (CBER PTC and CPMP)

HBV, HCV, HIV-1,2, HTLV, HHV-6,7,8, EBV, hCMV, SV40 を定量 PCR により検出する試験。

いずれのウイルス由来核酸も検出されなかった。

• Q-PCR detection of Bovine polyomavirus (BPyV)

定量 PCR による検出系。

BPyV 特異核酸は検出されなかった。

• Q-PCR detection of Bovine/porcine circovirus

定量 PCR によるサーコウイルス核酸検出系。ウイルス由来核酸は認められなかった。

• PCR detection of Simian

Immunodeficiency Virus (SIV)

SIV 検出 PCR。SIV 由来核酸は検出されなかった。

• **Detection of viral contaminants in Bovine serum according to CPMP and US 9CFR requirements**

検体(被験細胞の培養液)をウシ睾丸細胞、ウシ鼻甲介細胞および Vero 細胞に接種し、21 日間の培養中に細胞変成の出現の有無を確認する。

細胞の変成は確認されなかった。

• **In vitro assay for the detection of Porcine viruses according to 9CFR**

検体(凍結融解による細胞破砕液)をブタ睾丸細胞に接種し、21 日間培養(7 日目、14 日目に継代)する。培養 7 日目、14 日目および 21 日目に蛍光抗体法により PPV(ブタパルボウイルス)の検出をおこなう。

ウイルスは検出されなかった。

• **Karyology**

核分析:細胞をスライドガラス上に固定後、100 個の細胞について染色体数を測定。50 個の細胞について染色体異常の有無を観察。また 3 個の細胞について、核型を分析。染色体数はアカゲサル細胞の 63~72 であり、オリジナルの LLC-MK2 細胞と同じであり、染色体異常は認められなかった。

• **Identification and Characterisation of Cultured Cells By Analysis of 4 Isoenzymes**

アイソエンザイム分析

被験細胞抽出液をサンプルとして、オーセンティブキットを用いて G6PD、MD、LD、NP 及び AST の各酵素について電気泳動易動度をコントロールと比較。対照とするアカゲサル細胞のものと同様であった。

• **In vivo tumorigenicity (FDA points to Consider 1993)**

ヌードマウス 10 匹の皮下に約 10^7 個の被験細胞を接種後、84 日間観察。

陰性対照からは腫瘍は観察されなかった。検体を接種したマウスからも腫瘍は観察されなかった。

組織病理学的観察の結果、細胞を接種した 10 匹のマウス中、1 匹において、細胞

接種部位と肺で脈管周囲炎が認められたが、これはこの種のマウスで自然発生する病巣と診断された。

しかし、陽性対照接種マウスは 10 匹中、8 匹からしか腫瘍が観察されなかった。試験成立要件は、陽性対照では 10 匹中 9 匹以上で腫瘍が発見されることが必須であり、再試験を計画中である。

2) ワーキングセルバンク

• **Qualification of test article material for sterility by direct inoculation method**

マスターセルバンクと同様に試験に影響を与えることはなかった。

• **Sterility testing by direct inoculation method**

マスターセルバンクと同様に菌の混入は認められなかった。

• **Mycoplasma Detection EP**

マスターセルバンクと同様にマイコプラズマの混入は認められなかった。

• **Identification and Characterisation of Cultured Cells By Analysis of 4 Isoenzymes**

マスターセルバンクと同様に、対照とするアカゲサル細胞のものと同様であった。

3) 試験の監査

試験を実施した BioReliance 社を訪問し、適格性確認(audit)を行った。

(1)適格性確認の結果、試験を実施する上で必要なシステムが構築されており、実際の試験記録も確実に保管されていることを確認した。またイギリス公的機関(MHRA)の査察により GLP 適合施設の認証と GMP 設備としての認証を取得していること、2005 年 9 月に FDA の査察を受け、問題なく成功していることより、試験委託機関先として問題ないと判断した。

(2)造腫瘍性試験について、試験の詳細を確認した。その結果、①試験に用いられた細胞は 20 代も継代されていた。②陽性対照試験区が基準を満たしていなかったが、試験実施者は脱落例としての処理により試験が成立すると誤解していた。試験の品質保証部門のチェックにより、試験が不成立となることが判明したが、チェッ

クまでに期間を要してしまい、結果的に今年度内に再試験結果をえることが不可能となった、ことが判明した。

試験対象の LLC-MK2-Derivative 細胞、陰性対照接種区では、腫瘍の形成は認められなかった。

D. 考察

・クローニングした Vero 細胞については、ウイルスレスキュー効率の良い細胞は得られなかった。しかし、検討の後も感染研において、RG 技術の改良が検討され、これによってウイルスレスキュー効率を高めることにより、現在保有している Vero 細胞クローンでも使用可能になる可能性が期待される。特に無血清馴化クローンは、安全性の面からも今後候補となり得る可能性を持っていることから、RG 技術の改良が望まれる。

一方、Vero 細胞については、ATCC が新型インフルエンザワクチンを想定した RG 用細胞として、各種の安全性試験を実施した Vero 細胞を H17 年中に市販するという情報もある。この細胞株が入手可能となった際には、RG 用のセルバンクの一つとして検討を予定している。

現在、WHO は RG 技術による新型インフルエンザワクチンの開発には Vero 細胞を推奨しているが、プラスミドの取り込み効率のより高い細胞株を検索し、それを用いたセルバンクの構築を行うことにより、RG 法に用いる細胞株の選択肢を広げることが可能となる。本研究においては、Vero 細胞の検討と並行して LLC-MK2 Derivative 細胞のウイルスレスキュー効率についても検討し、組み換えウイルス回収効率が Vero 細胞より数十倍高いことを確認した。そこで、LLC-MK2 Derivative 細胞についてマスター及びワーキングセルバンクを治験薬製造設備内にて作製した。現在各種試験中であり最終的な結論は出ていないが、安全性に問題がなければ LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクシステムは、新型インフルエンザワクチンの種ウイルス作出の際に使用される Vero 細胞のバックアップとして、リスク分散の意味からも重要な位置付けとなり得る。

・WHO は RG 技術による新型インフルエンザワクチンの開発には Vero 細胞を推奨しているが、プラスミドの取り込み効率のより高い細胞

株を検索し、それを用いたセルバンクの構築ができれば、RG 法に用いる細胞株の選択肢を広げることが可能となる。実際に、H7N2 ウイルスなど Vero 細胞では、ほとんどレスキューされない場合があることが報告されており、Vero 細胞に代わる細胞バンクを構築することは大きな意義がある。また、本研究において LLC-MK2 Derivative 細胞のウイルスレスキュー効率が Vero 細胞より数十倍高いことを確認した。そこで、LLC-MK2 Derivative 細胞についてマスター及びワーキングセルバンクを治験薬製造設備内にて作製した。

マスターおよびワーキングセルバンクの安全性を確認するため、各種のウイルス、細菌、マイコプラズマの迷入否定試験を実施した。その結果、細胞バンクにウイルス他の因子が迷入しているデータは得られなかった。

LLC-MK2 細胞はアカゲサル腎由来細胞を 195 代継代して樹立された細胞である。さらに、Eagle-MEM 培地に馴化させるため 8 代継代して得られた細胞が LLC-MK2-Derivative 細胞である。長期間の継代により細胞の性状が大きくことなっていることが懸念されたが、核型分析、アイソザイム分析の結果、LLC-MK2-Derivative 細胞はサル由来細胞の特長を有しており、異常な染色体は検出されなかった。

造腫瘍性試験は再試験を計画中である。

再試験を実施するに当たっては、試験の計画の提出、細胞はなるべく少ない継代歴で接種することと、接種前に細胞の継代歴等を事前に知らせることとした。バイオリアランス社側は、上記条件以外に、試験の進捗管理システム等を改善し、試験に異常が発生した場合の速やかな対応策を構築している。再試験は 2006 年 4 月に開始され、2006 年 8 月に報告書が提出される予定である。

最終的な結論は出ていないが、腫瘍原性に問題がなければ LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクシステムは、新型インフルエンザワクチンの種ウイルス作出の際に使用される Vero 細胞のバックアップとして、Vero 細胞における RG 法の効率が悪いウイルスに対するリスク分散の意味からも重要な位置付けとなり得る。

E. 結論

・、RG用細胞としてVero細胞以外にLLC-MK2 Derivative細胞を用いることができる可能性が明らかとなった。

・ LLC-MK2 Derivative細胞についてマスター及びワーキングセルバンクを作製した。

・ このセルバンクについて細胞特性、安全性試験は腫瘍原性試験を除き終了し、全て陰性であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし