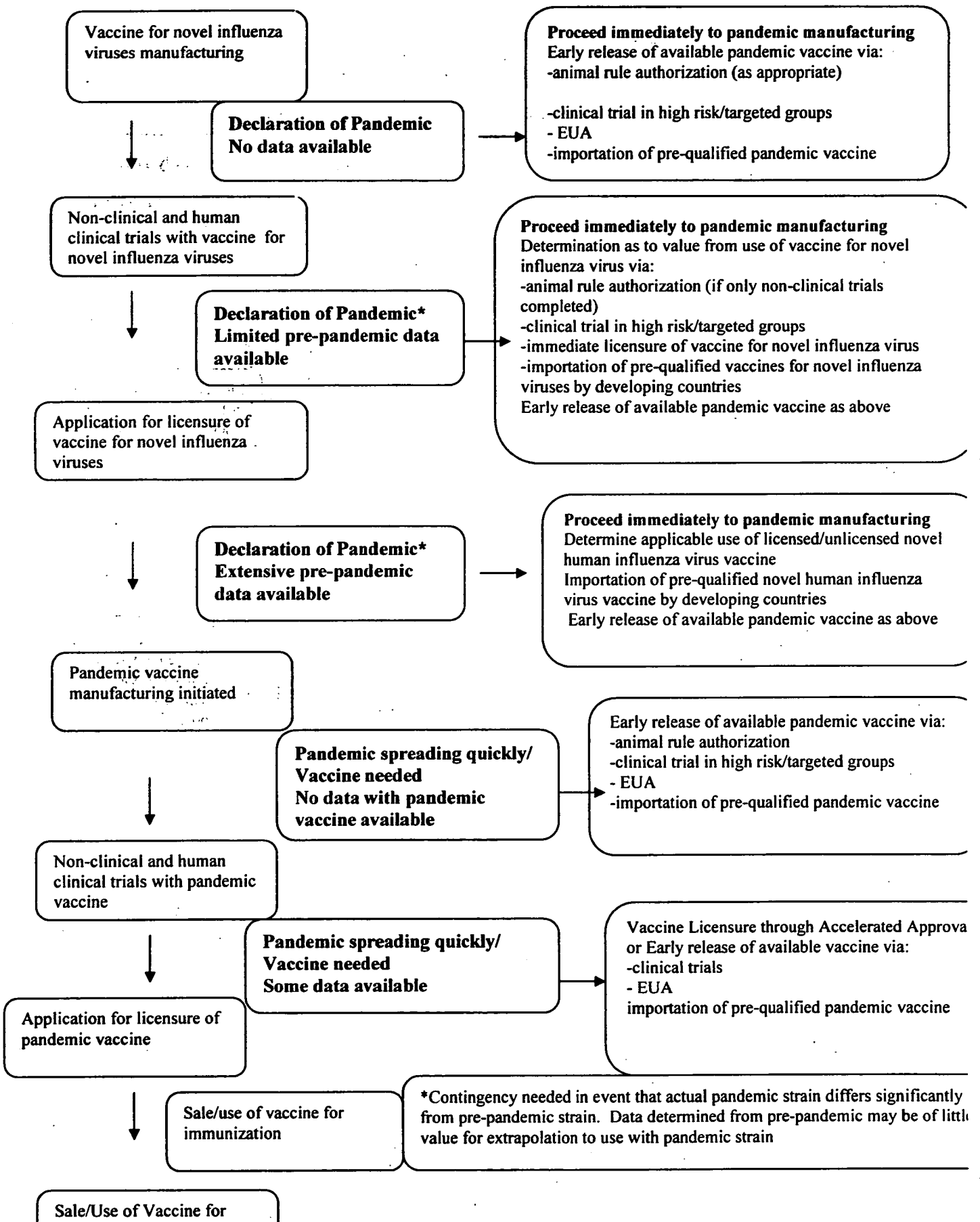


Appendix III: Emergency use pathways for human pandemic influenza vaccine



## **Appendix IV Inventory of Guidance Documents from selected National Regulatory Authorities, and the World Health Organization**

### **Australia**

**Official Control Authority Batch Release of Influenza Vaccines Adopted by the TGA with the following notation:** Sponsors should note that Section 2 of this guideline (which refers to mandatory testing) is NOT adopted, however TGA reserves the discretionary right to take samples and test. Sponsors should also note in respect of Section 4 (which relates to certification that materials derived from ruminants are compliant with Directive 1999/82/EEC), that the 'TGA Approach to Minimising the Risk of Exposure to Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) Through Medicines' is relevant to assessment in Australia." Effective February 7, 2003  
<http://www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/edqm/ocabr26.pdf>

**Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines** Adopted by TGA July 1994  
<http://www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/vol3a/3ab14aen.pdf>

**Cell Culture Inactivated Influenza Vaccines - Annex to Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines CPMP/BWP/214/96 (EMEA Guidance)**  
Effective: 5 March 2003 <http://www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/bwp/249000en.pdf>

**Guideline on the Scientific Data Requirements for a Vaccine Antigen Master File (VAMF)** (EMEA Guidance) Published: TGA Internet Site Effective: 24 August 2004  
<http://www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/bwp/454803en.pdf>

**Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use**  
<http://www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/veg/134716en.pdf>

**Guideline on Dossier Structure and Content for Pandemic Influenza Vaccine Marketing Authorisation Application**  
<http://www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/veg/471703en.pdf>

**Canada**

**Regulatory Preparedness for Pandemic Influenza Vaccines**

[http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/brgtherap/reg-nit/vac/pandemicvaccine\\_nov2005\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/brgtherap/reg-nit/vac/pandemicvaccine_nov2005_e.html)

**Good Manufacturing Practices Guidelines, 2002 edition, Version 2**

[http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt\\_formats/hpfb-dgpsa/pdf/compli-conform/2002v2\\_e.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/compli-conform/2002v2_e.pdf)

**Emergency interim orders**

[http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/nr-cp/2002/2002\\_emergency-urgence\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/nr-cp/2002/2002_emergency-urgence_e.html)

**Administrative Policy: Management of Biologics Submissions for Public Health Need**

Available upon request

**Guidance for Sponsors-Lot Release Program for Schedule D (Biologic) Drugs (2005)**

[http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt\\_formats/hpfb-dgpsa/pdf/brgtherap/gui\\_sponsors-dir\\_promoteurs\\_lot\\_program\\_e.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/brgtherap/gui_sponsors-dir_promoteurs_lot_program_e.pdf)

**Guidance Document: Pandemic Influenza Vaccine, Manufacturing & Clinical Information Review & Regulatory Authorization** Available on Request

**European Union**

**EU/2001/20/EU of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States related to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use.** [www.eortc.be/Services/Doc/clinical-EU-directive-04-April-01.pdf](http://www.eortc.be/Services/Doc/clinical-EU-directive-04-April-01.pdf)

**Harmonization of requirements for influenza vaccines CPMP/BWP/214/96;**

<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/021496en.pdf>

**International Conference on Harmonisation. E11: Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population, July 2000** (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>; <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/271199en.pdf>)

**Cell culture inactivated influenza vaccines (Annex to note for on harmonization of requirements for influenza vaccines), CPMP/BWP/2490/00;**  
[www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/249000en.pdf](http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/249000en.pdf)

**Committee for Proprietary Medicinal Products—Guideline on Core Dossier Structure and Content for Pandemic Influenza Vaccine Marketing Authorisation Application**  
<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/vwp/471703en.pdf>

**Committee for Proprietary Medicinal Products—Guideline on Submission of Marketing Authorisation Applications for Pandemic Influenza Vaccines Through the Centralised Procedure** <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/vwp/498603en.pdf>

**EMEA pandemic influenza preparedness**

<http://www.emea.europa.eu/htms/human/pandemicinfluenza/background.htm>

**Core Summary of Product Characteristics for Pandemic Influenza Vaccines, Adopted June 2005**  
<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/vwp/19303104en.pdf>

**Guideline on dossier structure and content of marketing authorisation applications for influenza vaccines derived from strains with a pandemic potential for use outside of the core dossier context** <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/vwp/26349906en.pdf>

**Guideline on Summary of Product Characteristics, published by the European Commission—December 1999** <http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-2/C/SPCGuidRev0-Dec99.pdf>

**WHO/BS/07.2074**

**Page 92**

**Guideline on Pharmaceutical Aspects of the Product Information for Human Vaccines**

<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/bwp/275802en.pdf>

**Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use- 2005**

<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/vwp/13471604en.pdf>

**Cell Culture Inactivated Influenza Vaccines**

<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/bwp/249000en.pdf>

**Japan**

**Regulatory Preparedness for Pandemic Influenza Vaccines**

<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou04/pdf/03-03-02-en.pdf>

Guideline on manufacturing, use and post-marketing surveillance of H5N1 vaccine (after pandemic is declared)

<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou04/pdf/09-09.pdf>

**United States Food and Drug Administration**

**Guidance for Industry: Clinical Data Needed to Support the Licensure of Pandemic Influenza Vaccines** <http://www.fda.gov/cber/gdlns/panfluvac.pdf>

**Guidance for Industry: Clinical Data Needed to Support the Licensure of Seasonal Inactivated Influenza Vaccines** <http://www.fda.gov/cber/gdlns/trifluvac.pdf>

**Draft Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases**

<http://www.fda.gov/cber/gdlns/vaccsubstrates.pdf>

**Guidance for Industry: Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications**

<http://www.fda.gov/cber/gdlns/reprotox.htm>

**Draft Guidance for Industry: Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials**

<http://www.fda.gov/cber/gdlns/toxvac.pdf>

**Draft Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications**

<http://www.fda.gov/cber/gdlns/plasdnvac.pdf>

**Guidance for Industry: How to Comply with the Pediatric Research Equity Act**

<http://www.fda.gov/cber/gdlns/pedreseq.pdf>

**Draft Guidance: Emergency Use Authorization of Medical Products**

<http://www.fda.gov/cber/gdlns/emerase.pdf>

**Guidance for Industry: Fast Track Drug Development Programs —Designation, Development,**

**and Application** <http://www.fda.gov/cber/gdlns/fsttrk.pdf>

**Guidance for Industry: Content and Format of Chemistry, Manufacturing and Controls Information for a Vaccine or Related Product**

<http://www.fda.gov/cber/gdlns/cmccvacc.pdf>

**Pediatric Research Equity Act of 2003, U.S. Public Law 108-155**

<http://www.fda.gov/opacom/laws/default.html>

**World Health Organization**

**WHO Guidelines for good clinical practices (GCP) for trial on pharmaceutical products.**

World Health Organization Expert Committee on the use of essential drugs, Sixth report., 1995  
Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 850)

**WHO Programme for International Drug Monitoring and the Uppsala Data Monitoring Centre** <http://www.who-umc.org/DynPage.aspx>

**WHO revised requirements for influenza vaccine (inactivated) and WHO requirements for influenza vaccine (live)** World Health Organization, 1978, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 638)

<http://www.who.int/biologicals/publications/Influenza%20inactivated%20recommendations%20annex%203.pdf>

**WHO Good Manufacturing Practices for biological products**, World Health Organization, 1991, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 822)

[http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological\\_products/WHO\\_TRS\\_822\\_A1.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological_products/WHO_TRS_822_A1.pdf)

**WHO General requirements for the sterility of biological substances** World Health Organization, 1998, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 872)

[http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological\\_products/WHO\\_TRS\\_872\\_A3.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological_products/WHO_TRS_872_A3.pdf)

**WHO Guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology.** World Health Organization, 1991, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 814)

[http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/rdna/WHO\\_TRS\\_814\\_A3.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/rdna/WHO_TRS_814_A3.pdf)

**WHO guidelines on regulatory expectations related to the elimination, reduction or replacement of thiomersal in vaccines.** In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-third report. Geneva, World Health Organization, 2004, Annex 4 (WHO Technical Report Series, No. 926) <http://www.who.int/biologicals/en/926-Inside%20page.pdf>

**WHO Regulation and licensing of biological products in countries with newly developing regulatory authorities.** In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-fifth report. Geneva, World Health Organization, 1995, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 858)

[http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological\\_products/WHO\\_TRS\\_858\\_A1.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological_products/WHO_TRS_858_A1.pdf)

**WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines.** In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-fourth report. Geneva, World Health Organization, 2005, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 927)

[http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical\\_evaluation/ANNEX%201Nonclinical.P31-63.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical_evaluation/ANNEX%201Nonclinical.P31-63.pdf)

**WHO guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations.** In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-second report. Geneva, World Health Organization, 2003, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 924)

[http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/clinical\\_evaluation/035-101.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/clinical_evaluation/035-101.pdf)

**WHO Biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines.** In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-sixth report. Geneva, World Health Organization, 2005, Annex 5

[www.who.int/entity/biologicals/publications/ECBS%202005%20Annex%205%20Influenza.pdf](http://www.who.int/entity/biologicals/publications/ECBS%202005%20Annex%205%20Influenza.pdf)

**WHO Recommendations for the production and control of influenza vaccines (inactivated).** In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-fourth report. Geneva, World Health Organization, 2005, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 927)

<http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/ANNEX%203%20InfluenzaP99-134.pdf>

**WHO Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals (Addendum 2003)** In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-fourth report. Geneva, World Health Organization, 2005, Annex 4 (WHO Technical Report Series, No. 927)



WHO/BS/07.2074

Page 96

[http://www.who.int/biologicals/areas/blood\\_products/ANNEX%204%20Animal%20cellsP135-137.pdf](http://www.who.int/biologicals/areas/blood_products/ANNEX%204%20Animal%20cellsP135-137.pdf)

**WHO Guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics.**

Geneva, World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response, Global Influeza Programme, WHO/CDS/CSR/GIP/2006.6.

[http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/influenza/WHO\\_guidance\\_on\\_development\\_of\\_influenza\\_vaccine\\_reference\\_viruses\\_by\\_RG\\_2005\\_6.pdf](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/WHO_guidance_on_development_of_influenza_vaccine_reference_viruses_by_RG_2005_6.pdf)

**WHO Global influenza preparedness plan.** The role of WHO and recommendations for national measures before and during a pandemic. World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response, Global Influeza

Programme, WHO/CDS/CSR/GIP/2005.5

[http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_GIP\\_2005\\_5/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5/en/)

**WHO Final draft: special considerations for the expedited procedure for evaluating seasonal influenza vaccines.**

[http://www.who.int/immunization\\_standards/vaccine\\_quality/final\\_expedited\\_procedure\\_flu\\_240207.pdf](http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/final_expedited_procedure_flu_240207.pdf)

**WHO Stockpiling H5N1 influenza vaccine and establishing a mechanism for providing access to a pandemic vaccine for developing countries without influenza vaccine manufacturing capacity.** Weekly Epidemiological Record. May 2007 (21): 192-93

<http://www.who.int/mediacentre/events/2007/avianinfluenza/sage.pdf>

**WHO Pandemic influenza preparedness: sharing of influenza viruses and access to vaccines and other benefits.** The sixtieth World Health Assembly resolution WHA6028, 23 May 2007

[http://www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA60/A60\\_R28-en.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA60/A60_R28-en.pdf)

**WHO recommendations from the 3rd WHO meeting on evaluation of pandemic influenza prototype vaccines in clinical trials, 15-16 February 2007, WHO, Geneva.**

[http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/influenza/meeting\\_150207/en/print.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/meeting_150207/en/print.html)

## Appendix V

### WHO Recommendations on production and control of influenza vaccines (inactivated) – seasonal vaccines

*WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty fourth report. Geneva, World Health Organization, 2005. (WHO Technical Report Series No. 927)*

#### Summary of recommendations

#### 1 Production control

##### 1.1 Control of source material

- 1.1.1 Eggs used for seed virus growth
- 1.1.2 Eggs used for vaccine production
- 1.1.3 Master cell bank and manufacture of working cell bank (cell-derived vaccine)
  - 1.1.3.1 Identity test
- 1.1.4 Cell culture medium (cell-derived vaccine)
- 1.1.5 Virus strains
- 1.1.6 Seed lot system
  - 1.1.6.1 Identity of haemagglutinin and neuraminidase
- 1.1.7 Tests on seed lots
  - 1.1.7.1 Extraneous agents
    - either validation or testing

##### 1.2 Production precautions

##### 1.3 Production of monovalent virus pools

- 1.3.1 Single harvests
- 1.3.2 Inactivation procedure
- 1.3.3 Testing of control cells (cell-derived vaccine)

##### 1.4 Control of monovalent virus pools

- 1.4.1 Effective inactivation
- 1.4.2 Haemagglutinin content
- 1.4.3 Presence of neuraminidase
- 1.4.4 Virus disruption (split vaccine)
- 1.4.5 Surface antigens (subunit vaccine)
- 1.4.6 Identity
- 1.4.7 Extraneous agents
- 1.4.8 Purity of cell-derived vaccine
- 1.4.9 Test for chemicals used in production

##### 1.5 Control of final bulk

- 1.5.1 Test for content of haemagglutinin antigen
- 1.5.2 Sterility tests
- 1.5.3 Total protein
- 1.5.4 Ovalbumin (egg-derived vaccine)
- 1.5.5 Adjuvant content

- 2 Filling and containers
- 3 Control tests on final lot
  - 3.1 Identity test
  - 3.2 Sterility test
  - 3.3 Haemagglutinin content
  - 3.4 General safety (innocuity) tests
  - 3.5 Endotoxin
  - 3.6 Inspection of final containers
- 4 Records
- 5 Retained samples
- 6 Labelling
- 7 Distribution and transport
- 8 Stability testing and expiry date
  - 8.1 Stability tests
  - 8.2 Storage conditions
  - 8.3 Expiry date

= = =

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業  
「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ワクチン製造用 LLC-MK2 細胞の有用性に関する研究 2

分担研究者 今井正樹 国立感染症研究所ウイルス第 3 部主任研究官  
協力研究者 影山 努 国立感染症研究所ウイルス第 3 部研究員  
白倉雅之 国立感染症研究所ウイルス第 3 部研究員  
岸田典子 国立感染症研究所ウイルス第 3 部研究員

**研究要旨** これまでの本研究では、LLC-MK2 細胞を用いたリバーシジェネティクス (RG) 法により、A/H5 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスから弱毒化ワクチン株を作製できることを、また、通常の A/H3 亜型ヒトインフルエンザウイルスや B 型インフルエンザウイルスからもリアソータントウイルスを作製できる事を明らかにしてきた。本年度は、LLC-MK2 細胞を用いた RG 法により、A/H5 亜型以外の新型インフルエンザとして出現の可能性がある A/H6、A/H7 および A/H9 亜型株のリアソータントウイルスの作製が可能かどうかを検討した。その結果、LLC-MK2 細胞を用いた RG 法によりこれらすべてのリアソータントウイルスの作製が可能である事が分かった。一方、WHO の推奨する Vero 細胞を用いた RG 法では、A/H7 亜型のリアソータントウイルスを作製する事ができなかった。

#### A. 研究目的

遺伝子操作技術のリバーシジェネティクス (RG) 法を用いた遺伝子再集合体 (リアソータントウイルス) の作製には、ウイルス遺伝子をコードするプラスミド DNA を培養細胞にトランスフェクションして、感染性ウイルス粒子を回収しなければならない。WHO は RG 用の細胞にアフリカミドリザル腎臓由来の Vero 細胞を推奨しているが、この細胞はトランスフェクション効率が低いいため、用いる株によっては、リアソータントウイルスの回収が困難な事態も考えられる。昨年度までの本研究では、ATCC から購入したアカゲザル腎臓由来の LLC-MK2 細胞が Vero 細胞よりも高効率でプラスミド DNA を取り込むことを明らかにし、A/H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスである

A/Vietnam/JP1203/04 (H5N1) の弱毒型株、通常の A/H3 亜型ヒトインフルエンザウイルスである A/Panama/2007/99 (H3N2) 株の感染性リアソ

ータントウイルスは、Vero 細胞よりも LLC-MK2 細胞を用いた RG 法の方が高効率に回収できる事を報告した。一方、B 型インフルエンザウイルス B/Yamagata/1/73 株の感染性リアソータントウイルスは、Vero 細胞から回収することはできず、LLC-MK2 細胞を用いた RG 法で回収できた事を報告した。

本年度は、A/H5 亜型以外にも新型インフルエンザとして出現する可能性のある A/H6、A/H7 および A/H9 亜型株について、LLC-MK2 細胞を用いた RG 法で、これら感染性リアソータントウイルスが作製できるかどうかを検討した。

#### B. 研究方法

- (1) 細胞：LLC-MK2 細胞および Vero 細胞を用いた。
- (2) インフルエンザウイルス遺伝子のクローニング：A/duck/Hong Kong/716/79 (H6N1) 株 (A/H6 亜型株)、A/mallard/Netherlands/12/00 (H7N3)

株(A/H7 亜型株)あるいは A/swine/Hong Kong/9/98 (H9N2) 株(A/H9 亜型株)の 2 種類(HA、NA)の遺伝子を vRNA 合成プラスミドに組み込んだ。

(3) 組換え A 型インフルエンザウイルスの作製: A/H6、A/H7 あるいは A/H9 亜型株の 2 種類(HA、NA)の遺伝子と高増殖性標準株(A/PR/8/34)株の 6 種類(PB1、PB2、PA、NP、M、NS)の遺伝子の vRNA 合成プラスミドと 4 種類(PB1、PB2、PA、NP)のタンパク質発現プラスミドを各細胞に FuGENE HD Transfection Reagent(Roche)を用いてトランスフェクションした。18 時間後にトリプシン(5  $\mu$ g/ml)を添加した Opti-Pro SFM 培地に交換し、その後 30 時間培養して培養上清を回収した。

(4) ウイルス感染価の測定: 培養上清中のウイルス感染価は MDCK 細胞を用いた 50%培養細胞感染量(TCID<sub>50</sub>)で測定した。

### C. 研究結果

LLC-MK2 細胞または Vero 細胞にトランスフェクションして得られた培養上清中の、A/duck/Hong Kong/716/79 (H6N1)株、A/mallard/Netherlands/12/00 (H7N3)株あるいは A/swine/Hong Kong/9/98 (H9N2)株と高増殖性標準株とのリアソータントウイルスの感染価(TCID<sub>50</sub>)をそれぞれ測定した(表 1)。その結果、LLC-MK2 細胞では、すべての亜型で 2.5~4.3 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml の感染価のあるリアソータントウイルスが産生されていた。一方、Vero 細胞では A/H6 および A/H9 亜型で 2.2 および 3.5 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml の感染価のあるリアソータントウイルスが産生されていたが、A/H7 亜型では TCID<sub>50</sub>で感染価のあるリアソータントウイルスは産生されなかった。なお、Vero 細胞での感染性リアソータントウイルスの産生効率は LLC-MK2 細胞と比べて、A/H9 亜型では 1/10 低く、H6 亜型ではほぼ同等であった。

### D. 考察

現行の不活化ヒトインフルエンザワクチンは、

孵化鶏卵で分離・継代されたウイルス株から製造しなければならない。しかし、孵化鶏卵での分離効率は、培養細胞での分離効率と比べて非常に低く、短期間にワクチン株を開発するには限界があった。また、孵化鶏卵でのウイルス株分離は、ウイルスの抗原性が孵化鶏卵型に馴化して変化する場合があります、ヒトに使用するワクチン株の開発には十分に対応できないという欠点があった。一方、ウイルス遺伝子を出発材料とする RG 法では、培養細胞から分離された流行株を用いたワクチン株の開発が可能で、流行株と抗原性が一致したワクチン株を迅速に供給することができる。

LLC-MK2 細胞を用いた RG 法では、今後、新型インフルエンザとして出現する可能性がある A/H6、A/H7 および A/H9 亜型株と高増殖性標準株とで感染性リアソータントウイルスを産生する事が可能であった。

一方、WHO の推奨する Vero 細胞を用いた RG 法では、A/H7 亜型の感染性リアソータントウイルスは産生できず、また、昨年度の本研究で報告したように B 型のリアソータントウイルスは産生できないことから、亜型によっては、リアソータントウイルスの作製ができず、ワクチン候補株の供給ができない可能性がある。

LLC-MK2 細胞の安全性は、当研究班によって検証され、高い事が証明されており、将来、LLC-MK2 細胞の品質を管理できる施設が整備されれば、RG 法によるワクチン候補株の迅速な供給が可能になる。今後は細胞培養ワクチンへ応用できるのかどうか検討する予定である

### E. 結論

LLC-MK2 細胞を用いた RG 法で、新型インフルエンザとして出現する可能性のある A/H6、A/H7 および A/H9 亜型株のワクチン候補株となりうるリアソータントウイルスを作製する事ができた。これにより、WHO の推奨する Vero 細胞では産生できない亜型のワクチン製造用シードウイルス株の迅速な供給が可能になった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ・ Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Phan Van Tu, Nguyen Thi Kim Tien, Masato Tashiro, and Takato Odagiri Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific Loop-Mediated Isothermal Amplification method *J. Virol. Method* 141, 173-180, 2007
- ・ Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminum adjuvant induces homologous and heterologous protective immunities against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in a mouse model. *Vaccine* 25, 3557-3560, 2007
- ・ Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Cross-Protection against H5N1 Influenza Virus Infection Is Afforded by Intranasal Inoculation with Seasonal Trivalent Inactivated Influenza Vaccine. *J Infect Dis.* 2007 Nov 1;196(9):1313-20
- ・ Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C(12)U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.* 2007 Sep;9(11):1333-40.
- ・ Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura S, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1 influenza

virus. *J Med Virol.* 79(6):811-9, 2007.

- ・ Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri Cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles in production of infectious virus. *J. Virol.* 82, 728-739, 2008

### 2. 学会発表

- ・ Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri The cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles for the production of influenza virus. Options for the Control of Influenza VI, Tronto, June, 2007.
- ・ 小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人 2006/07シーズンのインフルエンザ流行株と平成19年度のワクチン株 第55回日本ウイルス学会、札幌、10月(2007)
- ・ 今井正樹、影山努、氏家誠、納富継宣、峰川晴美、田代真人、小田切孝人 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)法によるH5N1型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検出系の開発 II 第55回日本ウイルス学会、札幌、10月(2007)
- ・ 影山努、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人、小田切孝人 Real-time RT-PCR法によるH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス核酸検出系の構築 第55回日本ウイルス学会、札幌、10月(2007)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. リアソータントインフルエンザウイルスの感染価

リアソータントウイルス	細胞	ウイルス感染価 ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml)*
A/H6	LLC-MK2	2.6
	Vero	2.3
A/H7	LLC-MK2	4.0
	Vero	-
A/H9	LLC-MK2	4.3
	Vero	3.5

\* 培養上清中のウイルス感染価は MDCK 細胞を用いた 50%培養細胞感染量(TCID<sub>50</sub>)で測定した。

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業  
「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

LLC-MK2-Derivative 細胞の現行インフルエンザワクチン株に対する感受性の検討

分担研究者 城野洋一郎

**研究要旨** 新型インフルエンザの凡流行に対応してワクチンを製造する際に、ワクチン用ウイルスシードはリバースジェネティクス (RG) 法により作出するのが最も効率的である。RG によってウイルスを作出するにあたって、基質となる細胞は Vero 細胞より LLC-MK2-Derivative 細胞の方が優れていることが国立感染症研究所のこれまでの研究で明らかとなった。更に我々が構築した LLC-MK2-Derivative 細胞バンクの各種安全性試験を実施した結果、迷入因子が無く、造腫瘍性も陰性であることが昨年度の研究で明らかとなった。

本年度は、この LLC-MK2-Derivative 細胞の各種インフルエンザウイルスに対する感受性を確認する目的とし、近年現行の卵ワクチンに用いられた H1N1, H3N2, B の複数のウイルス株に対する感受性を試験した。その結果、LLC-MK2-Derivative 細胞は、試験した全てのワクチン用ウイルス株に感受性であった。LLC-MK2-Derivative 細胞でのウイルスの増殖性は MDCK-CCL34 細胞には劣るものの、Vero-CCL81 細胞より高いものであった。

#### A. 研究目的

新型インフルエンザの凡流行が予測された際にワクチンを製造するにあたり、リバースジェネティクス法(RG)によりワクチン製造用ウイルス株を作製することが効率的である。国立感染症研究所のこれまでの研究により複数の候補細胞の中から LLC-MK2-Derivative 細胞が、一般的に使用される Vero 細胞より効率的に RG による組み換えインフルエンザウイルスが得られることが明らかとなった。この RG によりウイルスを作製するには安全性・特性が十分に解析された細胞を用いることが必須であるため、我々は、この LLC-MK2-Derivative 細胞のマスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、それらについて安全性・特性試験を実施した。

その結果、実施した無菌試験、マイコプラズマ否定試験、多種のウイルス検出試験の全てにおいて迷入する因子は検出されなかった。特性試験として核分析、アイソエンザイム分

析を実施した。その結果、バンキングされた細胞はオリジナルのアカゲサルの特性を保持しており染色体、アイソエンザイムに異常は認められなかった。更に、「FDA Point to Consider 1993」に定める手法で造腫瘍性試験を実施した結果、このバンキングした細胞は造腫瘍性が陰性であることを明かにした。この結果は、より安全性の高いワクチンを製造するために重要である。

今年度は、この LLC-MK2-Derivative 細胞のウイルス感受性について検証する目的で、2005/06 年シーズン以降に推奨あるいは実際に使用された、現行卵ワクチン用ウイルス株 7 種を LLC-MK2-Derivative 細胞へ接種し、その増殖性を、試験した。試験の際には、最もインフルエンザウイルスに対し感受性が高い MDCK-CCL34 や、RG に用いられ、日本脳炎ワクチン等で実際にワクチンの基質となっている Vero-CCL81 細胞を対照に用い比較検証した。



## B. 研究方法

### 材料

#### LLC-MK2-Derivative 細胞

H17年に調製した LLC-MK2-Derivative のワーキングセルバンクより起こし継代・拡張した細胞を使用した。

#### 対照の細胞

対照として、MDCK-CCL34 及び Vero-CCL81 の 2 種の細胞を用いた。これらの細胞は、化血研が過去に ATCC より入手し、調製した細胞バンクより起こし、継代・拡張して試験に用いた。

#### ウイルス

近年ワクチン株として推奨あるいは実際に使用された以下の 7 種のウイルス株について、本研究のため感染研より分与を受け検討に用いた。

**H1N1 亜型** 2000 年から 2007 年シーズンまで用いられた A/New Caledonia/20/99 IVR116 株

**H3N2 亜型** 2005/06 年シーズンの WHO 推奨株となった、A/California/7/2004 株、同シーズンのワクチン株となった、A/New York/55/2004 株、2006/07 年シーズンの WHO 推奨株となった A/Wisconsin/67/2005 X-161 株、同シーズンのワクチン株となった A/Hiroshima/52/2005 IVR-142 株。

**B 株** 2005/06 年シーズンのワクチン株となった Yamagata-lineage の

B/Shanghai/361/2002 株、2006/07 年シーズンのワクチン株となった Victoria-lineage の B/Malaysia/2506/2004 株。

#### 培地

LLC-MK2-Derivative 細胞は MEM 培地、MDCK-CCL34 細胞と Vero-CCL81 細胞は D-MEM 培地で培養した。それぞれの培地と添加物は以下の通りである。

MEM GIBCO 11095-080、DMEM GIBCO 11965-092、MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100×) GIBCO 11140-050、MEM Sodium Pyruvate Solution

(100×) GIBCO 11360-070、FOETAL BOVINE SERUM (New Zealand) GIBCO 10091-148、ゲンタマイシン SIGMA G-1397

### 方法

#### 1. ワクチン株ウイルス液の感染価計測

先ず、分与された 7 種のウイルス液の感染価を計測した。計測は 96well プレートに播いた MDCK-CCL34 細胞へ、10 倍段階希釈した各ウイルス液を接種し、34°C で培養を行い、接種後 5 日目に CPE の有無を well ごとに観察した。感染価は Kaber 法を用いて算出した。

#### 2. ウイルス接種試験

LLC-MK2-Derivative 細胞、MDCK-CCL34 細胞、Vero-CCL81 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/mL となるよう調製し、6well プレートに 3mL づつ播きコンフルエントになるまで 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータで培養した。ウイルスを接種しない well の細胞をトリプシンで消化し、細胞数を計測した。

計測した細胞数と、事前に測定した接種するウイルスの感染価より、それぞれの細胞について重複感染度 (Multiplicity of infection 以下 M.O.I と略)  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  となるようウイルス液を希釈し細胞プレートへ接種した。接種後、1  $\mu$ g/mL のトリプシンを添加した血清を含まない D-MEM あるいは MEM 培地を 3mL/well で添加し、34°C の CO<sub>2</sub> インキュベータで培養した。

培養は、CPE の出現により細胞が死滅した well が出現するまで実施した。MDCK-CCL34 細胞は、接種後 3 日で細胞は CPE により死滅、剥離した。LLC-MK2-Derivative は、接種後 5 日に、CPE により細胞が剥離・死滅した well が観察された。

培養後、培養液を回収し、320×g で 10 分遠沈し上清の HA 価と感染価を計測した。

HA 価計測において、A/California/7/2004 株、A/New York/55/2004 株、

A/Wisconsin/67/2005 X-161 株、

A/Hiroshima/52/2005 IVR-142 株はモルモツ

ト血球で、A/New Caledonia/20/99 IVR116 株、B/Shanghai/361/2002 株、B/Malaysia/2506/2004 株はニワトリ血球で計測した。

### 3.Vero-CCL81における追加試験

上記 2.の試験において、Vero-CCL81 では 2 週間の観察でも CPE の出現が確認されなかった。そこで、トリブシン濃度を 2 および 4  $\mu\text{g/mL}$  に、M.O.I.も 10 倍ほど変化させる等の接種試験を繰り返したが、7 種のウイルス株を接種した Vero-CCL81 は CPE が観察されず、上清中の HA 価も観察されなかった。

### C. 研究結果

細胞へ接種したウイルスの感染価計測の結果及び、LLC-MK2-Derivative 細胞と MDCK-CCL34 細胞の感受性の検討結果を表 1.にまとめて示す。

試験に用いたワクチン株を MDCK-CCL34 細胞へ M.O.I= $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$  で接種すると、いずれの接種 M.O.I でも接種後第 3 日で CPE により細胞は死滅し、プレート面から剥離した。培養上清中の HA 価をニワトリ血球或いは、モルモット血球で計測した結果、32~256 の HA 価であった。接種前のウイルス感染価とほぼ同等で株によっては接種前より高い感染価も観察された。同じウイルスを LLC-MK2-Derivative 細胞へ接種した場合、株によっては低い M.O.I では CPE が観察されない場合もあった。より高い M.O.I 接種 well で CPE が観察された培養第 7 日目で全ての well の培養上清を回収し、それぞれ HA 価を計測した。その結果、CPE が観察された well では HA 価が認められた。観察された HA 価は 16~64 であった。

ウイルス感染価を計測した結果、CPE,上清中の HA 価が認められた well ではウイルス感染価も認められた。観察された感染価は、 $10^{5.5}$ ~ $10^{7.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL であった。

MDCK-CCL34 細胞、LLC-MK2-Derivative 細胞と同じ条件でウイルスを接種した場合、Vero-CCL81 細胞では全く CPE は観察されず、

培養上清中の HA 価も観察されなかった。この結果を受け、Vero-CCL81 細胞については、1)トリブシン濃度を 2、4  $\mu\text{g/mL}$  に上げる、2)文献に従い、培養期間中 2 日おきにトリブシンを追加する、3)接種 M.O.I を 1 まで引き上げる工夫を行い、試験したが、いずれの試験においても細胞に CPE は観察されず、上清中の HA 価も観察されなかった。

### D. 考察

昨年度までの研究で、LLC-MK2-Derivative 細胞の RG によるウイルスのレスキュー効率 は Vero-CCL81 細胞よりも高いことが明らかとなっている。さらに調製した LLC-MK2-Derivative セルバンクの性状解析の結果、各種の迷入因子が否定され更に、パンキングした LLC-MK2-Derivative 細胞は、造腫瘍性を示さないことが明らかとなっている。これらの性状は、RG によるワクチン用シードウイルスを調製する基質として適していることを示す。

今年度は、LLC-MK2-Derivative 細胞が RG の基質のみならず、ウイルス培養を目的とした基質に成り得るかどうかを検証した。もし、ワクチン製造のためのウイルス培養基質として十分な性状をもっていることが判明すれば、RG で調製されたシードウイルスをそのまま、同じ培養基質でワクチンを製造できる可能性が高まる。LLC-MK2-Derivative 細胞でのウイルスの増殖性を検証する目的で、近年ワクチン用株となったインフルエンザウイルス株を複数選定した。H1N1 株は、2000 年から 2007 年シーズンまで使用された A/New Caledonia/20/99 IVR-116 株を用いた。H3N2 株は近年毎年のようにワクチン株が変更されているため、2005/06 年シーズンと 2006/07 年シーズンの WHO が推奨した株および実際に国内で採用されたワクチン株 4 種を用いた。これらの 4 種の株の内 2005/06 年シーズンの 2 株は、リアソータント株ではない。2006/07 年シーズンの 2 株はリアソータント株である。B 株については、近年 Yamagata 系統と

Victoria 系統のウイルス株が 1,2 年ごとに推奨・採用されている。今回は、2005/06 年シーズンの Yamagata 系統の B/Shanghai/361/2002 株と、2006/07 年シーズンの Victoria 系統の B/Malaysia/2506/2004 株を用いた。

MDCK-CCL34 にこれらのウイルスを M.O.I= $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$  で接種した場合、培養第 3 日目には強い CPE により細胞が死滅・剥離した。培養上清中の HA 価は 32~256 であった。同一株内において M.O.I によって 2 管以上 HA 価が異なることはなかった。上清中の感染価はどの株も接種前のウイルス感染価とほぼ同等の力価を示した。M.O.I によって上清中の感染価に差はほとんど見られなかった。総じて MDCK-CCL34 細胞は発育鶏卵で継代されてきたワクチン用ウイルスに対し、発育鶏卵と同等の感受性を持っていることが示された。

LLC-MK2-Derivative 細胞へこれらウイルスを接種した場合、M.O.I= $10^{-3}$  では全てのワクチン株が LLC-MK2-Derivative 細胞で CPE を起こし、ウイルスが増殖できた。しかし、M.O.I= $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  では株によっては CPE がおこらず、ウイルスが増殖し得なかった。CPE の出現は MDCK-CCL34 細胞にくらべ遅く、接種後第 7 日目に出現した。第 7 日目にすべての well の培養上清を回収し、HA 価を計測した結果、CPE が出現した well の培養上清では HA 価が確認された。計測された HA 価は 16~64 で、MDCK-CCL34 細胞の培養上清にくらべ相対的に低い値であった。ウイルス感染価を計測した結果、CPE, HA 価が認められた well ではウイルスの感染価も認められた。計測された感染価は  $10^{5.5}$ ~ $10^{7.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL で MDCK-CCL34 細胞における感染価より相対的に低い値であった。

株別に比較した場合、全ての株において MDCK-CCL34 細胞の方が高い感染価であった。LLC-MK2 細胞は、アカゲサルの腎由来細胞を 195 代継代して得られた細胞である。LLC-MK2 細胞に関するインフルエンザウイ

ルスの増殖性は幾つかの報告がある。しかし、LLC-MK2 細胞を Eagle-MEM 培地へ馴化させ更に 8 代継代して作製された LLC-MK2-Derivative 細胞について、インフルエンザウイルスの増殖性を検討した報告はない。今回の検討において、MDCK-CCL34 細胞と同一の培養条件でインフルエンザワクチン株の増殖性を比較した結果、試験したウイルスは MDCK-CCL34 細胞の方が増殖性は高い結果であった。しかし、LLC-MK2-Derivative 細胞は同様なサルの腎由来細胞である Vero-CCL81 細胞よりも、試験したウイルスに対して高い感受性を示した。

LLC-MK2-Derivative 細胞におけるインフルエンザウイルスの培養について、より至適な条件を設定すれば、MDCK-CCL34 細胞と同程度の感受性を示し得る可能性はあると考えられる。

今回、対照として用いた Vero-CCL81 細胞について MDCK-CCL34 細胞と同じ培養条件では、インフルエンザウイルスの増殖は確認できなかった。そこで、Nicolai らの報告(J Virol. 1995 ;69(4):2700-3.)を参考に、トリプシンの追加、接種 M.O.I を上げて培養を検討したが、試験したウイルスの増殖は確認できなかった。

これらの結果を総合すると、LLC-MK2-Derivative 細胞の現行インフルエンザワクチン株に対する感受性は、細胞由来ワクチン製造用基質として実用化されている MDCK 細胞には若干劣るものの、Vero 細胞よりはるかに高い感受性を持つ、更に至適条件を求めれば MDCK-CCL34 と同等の感受性を持つ可能性もあると考察される。

## E. 結論

本研究において、RG によるウイルスが Vero 細胞より高い効率でレスキューされ、更に造腫瘍性が無い LLC-MK2-Derivative 細胞は、MDCK-CCL34 細胞と同一の条件でインフルエンザワクチン用ウイルス株を接種すると、MDCK-CCL34 には若干劣るものの、

Vero-CCL81 より高い感受性を示すことが明らかとなった。

**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

表1. LLC-MK2-Derivative細胞とMDCK-CCL34細胞のワクチン株に対する感受性の検討

株	感染価 <sup>i)</sup>	MDCK-CCL34		LLC-MK2-Derivative		
		Trypsin: 1 μg/mL		Trypsin: 1 μg/mL		
		Day 3 回収		Day 7 回収		
		M.O.I	HA価	感染価 <sup>j)</sup>	HA価	感染価 <sup>j)</sup>
A/New Caledonia/20/99 IVR-116 (H1N1) <sup>a)</sup>	8.5	10 <sup>-3</sup>	256	8.0	16	6.5
		10 <sup>-4</sup>	256	7.8	0	0.0
		10 <sup>-5</sup>	256	8.3	0	0.0
A/California/7/2004 (H3N2) <sup>b)</sup>	8.4	10 <sup>-3</sup>	32 <sup>h)</sup>	8.0	32 <sup>h)</sup>	6.5
		10 <sup>-4</sup>	32 <sup>h)</sup>	7.8	64 <sup>h)</sup>	7.0
		10 <sup>-5</sup>	32 <sup>h)</sup>	7.8	0 <sup>h)</sup>	0.0
A/New York/55/2004 (H3N2) <sup>c)</sup>	8.3	10 <sup>-3</sup>	64 <sup>h)</sup>	7.5	32 <sup>h)</sup>	7.0
		10 <sup>-4</sup>	64 <sup>h)</sup>	8.0	16 <sup>h)</sup>	6.8
		10 <sup>-5</sup>	64 <sup>h)</sup>	8.0	32 <sup>h)</sup>	7.3
A/Wisconsin/67/2005 X-161 (H3N2) <sup>d)</sup>	8.6	10 <sup>-3</sup>	64 <sup>h)</sup>	8.3	64 <sup>h)</sup>	7.3
		10 <sup>-4</sup>	64 <sup>h)</sup>	8.5	64 <sup>h)</sup>	7.3
		10 <sup>-5</sup>	32 <sup>h)</sup>	8.5	0 <sup>h)</sup>	0.0
A/Hiroshima/52/2005 IVR-142 (H3N2) <sup>e)</sup>	8.0	10 <sup>-3</sup>	64 <sup>h)</sup>	7.8	16 <sup>h)</sup>	7.3
		10 <sup>-4</sup>	64 <sup>h)</sup>	8.5	32 <sup>h)</sup>	7.0
		10 <sup>-5</sup>	64 <sup>h)</sup>	8.8	0 <sup>h)</sup>	0.0
B/Shanghai/361/2002 <sup>f)</sup>	8.3	10 <sup>-3</sup>	128	7.8	32	6.5
		10 <sup>-4</sup>	64	8.3	32	7.5
		10 <sup>-5</sup>	128	8.3	64	7.5
B/Malaysia/2506/2004 <sup>g)</sup>	8.9	10 <sup>-3</sup>	128	8.3	64	7.5
		10 <sup>-4</sup>	128	8.5	32	5.5
		10 <sup>-5</sup>	64	7.8	0	0.0

a) 2000～07年シーズンのワクチン株

b) 2005/06年シーズンのWHO推奨株

c) 2005/06年シーズンのワクチン株、非リアソータント株

d) 2006/07年WHO推奨株、ワクチン株

e) 2006/07年シーズンワクチン株

f) 2005/06年シーズンWHO推奨、ワクチン株、Yamagata-lineage

g) 2006/07年シーズンWHO推奨、ワクチン株、Victoria-lineage

h) モルモット血球でのHA価

i) 接種前のウイルス液の感染価、log (TCID<sub>50</sub>/mL)で表示

j) 接種後の培養上清中の感染価、log (TCID<sub>50</sub>/mL)で表示