

図1 C1qは抗NIBRG-14抗体のウイルス付着阻害活性を部分的に増強する

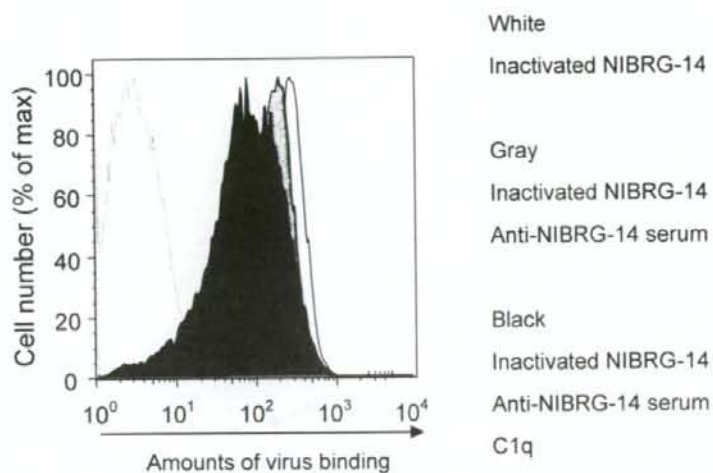


図2 バキュロウイルス発現系による rHA、rNA タンパクの作製

M 1 2 3 M

- 1; NIBRG-14 rHA
- 2; RG-Indonesia/5 rHA
- 3; NIBRG-14 rNA

図3 rHA、rNA タンパクを用いた ELISA による抗 HA 抗体と抗 NA 抗体の検出

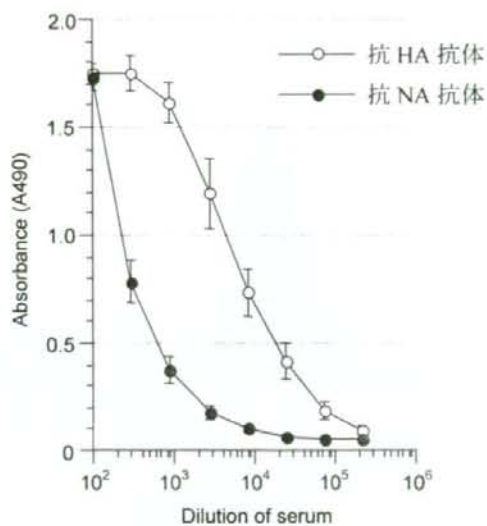


図4 HI 抗体価と中和抗体価が抗 HA IgG 抗体価に占める割合

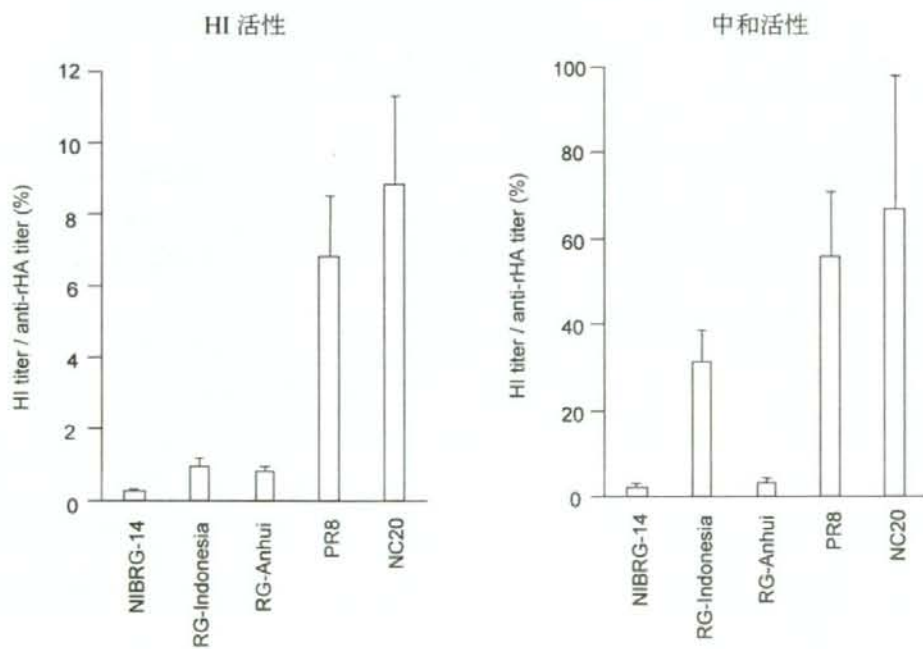
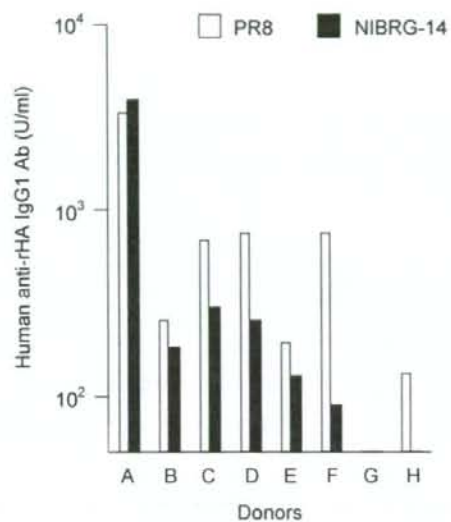


図5 ヒト血清中に含まれる抗 HA IgG1 抗体価の比較



平成 18-20 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」

分担研究者:長谷川秀樹(国立感染症研究所、感染病理部)

協力研究者:一戸猛志、相内章、佐多徹太郎(同所、感染病理部)

### 研究要旨

高病原性トリインフルエンザ H5N1 の家禽での蔓延と、ヒトへの感染が報告され、新型インフルエンザの出現が危惧されている。ヒトの新型インフルエンザがどの株から発生するのかは予測が困難で、流行前に株を決定してワクチンを準備する事は困難である。我々はいままえマウスを用いて経鼻不活化ワクチンの有効な接種方法と安全性を検討してきた。ヒトでの安全性が確認されている二本鎖 RNA、poly(I:C12U)及び天然物由来のキノコ菌糸体抽出物がインフルエンザ粘膜アジュバントとして有効であり、株の異なる高病原性鳥インフルエンザに対しても有効であることが示された。また経鼻ワクチンのアジュバントとして有効な Chitin microparticles (CMP) の高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)に対する予防効果をマウスモデルで調べた。CMP 処置した群においては非処置群と比較し有意に生存率が改善された。これらの現象は CMP による粘膜局所での Natural Killer 細胞の活性化や過剰なサイトカインの産生を抑える事により H5N1 ウイルスによる発病を抑える事が示唆された。

### A. 研究目的

高病原性トリインフルエンザ H5N1 の蔓延を発端とする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。高病原性のインフルエンザウイルスがヒトからヒトへの感染能を獲得し爆発的な拡大を起こす可能性がありそれを防御する有効な手段は有効な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及びインターフェロン

以外の自然免疫の誘導による高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)の感染防御法の開発を目的とする。

### B. 研究方法

#### 材料と方法:

ウイルス株及びワクチン株

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 株 (A/VN/1194/2004, A/HK/483/97, A/Indonesia/6/05 (H5N1) 株)を用いてマウス感染実験

を行った。ワクチン株としては H5N1 株の遺伝子組換えワクチン (NIBRG14) 株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを使用した。インフルエンザウイルス H1N1 のワクチンとしては A/PR8/H1N1, H3N2 ウイルスのワクチンとしては A/Guizhou/H3N2 のスプリットワクチンを用いた。

#### アジュバントの調整

合成二本鎖 RNA (polyI:C) は株式会社東レより分与を受けた。

poly(I:C12U) (Ampligen) は米国 Hemispherex Biopharma 社より分与を受けた。きのこの熱性抽出物 *Phellinus linteus*, *Macrolepiota gracilentia*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, (応用きのこ研究所、山梨県韮崎市) を用いた。

#### Chitin Microparticles (CMP)

Chitin microparticles (CMP) は P. Strong 博士 (CMP Therapeutics Ltd, Oxford, UK) より提供された。

#### 免疫方法

7 週齢の BALB/c 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) アジュバント及び polyI:polyC12U アジュバントと共に経鼻投与した。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。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。

#### 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。

#### 結果

##### 1、 poly(I:C) 併用経鼻ワクチン接種による交叉防御

二本鎖 RNA アジュバントを用いた経鼻インフルエンザワクチンの亜型を越えた交叉防御を調べる目的で A/PR8/H1N1, A/Guizhou/H3N2, A/Vietnam/H5N1 のそれぞれのワクチンと poly(I:C) を共に経鼻接種し、その後の A/Vietnam/H5N1 に対する抗体応答と感染防御能を調べた。A/Vietnam/H5N1 ワクチンを用いた時鼻腔洗浄液中に A/Vietnam/H5N1 特異的な分泌型 IgA が誘導され、同型のウイルスによる攻撃感染時に鼻腔でのウイルス増殖が完全に抑えられた。その時の生存率は 100% であった。一方亜型の異なるワクチン A/PR8/H1N1 や A/Guizhou/H3N2 を用いた時攻撃感染後の鼻腔でのウイルス増殖を有意に低下させた。攻撃感染後の死亡率は A/PR8/H1N1 ワクチンを用いた時に 80%、A/Guizhou/H3N2 を用いた時が 40% で共に非免疫群の 0% より生存率の改善が見られた。

## 2、 polyI:polyC12U の粘膜アジュバント作用と感染防御。

次にヒトへの応用を考え、ヒトで安全性が確認されている二本鎖 RNA,

polyI:polyC12U を用いてその経鼻インフルエンザワクチンのアジュバント作用を調べた。A/Vietnam/H5N1 不活化全粒子ワクチン 1 $\mu$ g を単独もしくは polyI:polyC12U を 10 $\mu$ g を共に 3 週間間隔で 2 回経鼻接種しその 2 週間後の鼻腔洗浄液中の A/Vietnam/H5N1 特異的 IgA 抗体を調べ、皮下接種群と比較した。皮下接種群においては鼻腔洗浄液中の A/Vietnam/H5N1 特異的 IgA 抗体はまったく認められず、経鼻接種群のみで認められた。また polyI:polyC12U 併用群においてワクチン単独接種と比較して、より高い IgA 価が認められ、さらに攻撃感染後 3 日目に鼻腔洗浄液において polyI:polyC12U 併用ワクチン経鼻接種群においてのみウイルス感染の完全防御が可能であった。

次に交叉防御能を調べた。A/Vietnam/H5N1 全粒子不活化ワクチンと polyI:polyC12U を併用した群において抗原性の異なる A/HongKong/H5N1 による攻撃感染後に鼻腔洗浄液中のウイルス価を 100 分の 1 に現象させた。アジュバントを用いない群においてはウイルスの減少はほとんど見られなかった。

## 3. PL アジュバント併用 H5N1 ワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザの

## 感染防御

粘膜アジュバント効果の見られる *Phellinus linteus* (PL) の熱性抽出物を用い Balb/c マウスにベトナム株由来の全粒子不活化ワクチン NIBRG 14 ワクチンを経鼻接種しその後相同株である A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) 及び非相同株である A/Hong Kong/483/97 (H5N1)、A/Indonesia/6/2005 (H5N1) を用い交叉防御能を調べた。相同ウイルス株 (A/Vietnam/1194/2004) での攻撃感染に対し、PL アジュバント併用ワクチン接種群では対照群と比較し有意にウイルス価を減少させたまた PL アジュバントワクチンを経鼻接種した群では攻撃感染後観察期間である 14 日間 全て生存した。非相同ウイルス株による感染である A/Indonesia/6/2005 株ウイルスの攻撃感染マウスでは有意なウイルス価の減少が認められ全てのマウスが 14 日以上生存した。これらの結果から H5N1 ワクチンを PL 抽出アジュバントと併用する事により高病原性鳥インフルエンザウイルスの相同ウイルス株だけでなく非相同ウイルス株に対しても感染防御効果および病原性の低減が認められることが明らかとなった。

## 1、Chitin microparticle (CMP) のインフルエンザウイルス感染予防作用

自然免疫誘導物質のインフルエンザ予防効果を調べるために Chitin microparticles (CMP)、poly(I:C)、LPS を経鼻投与しその後 A/PuertoRico/8/34/ (H1N1) または高病原性鳥インフルエンザウイルス

A/Vietnam/1194/2004, (H5N1)を感染させ自然免疫によるその感染予防効果を調べた。

CMP を3日間経鼻投与したマウスにA/PR8 (H1N1) インフルエンザウイルスを感染させると鼻腔洗浄液中のウイルス価が有意に減少した。同様にCMPを3日間経鼻投与したマウスに高病原性鳥インフルエンザウイルスA/VN (H5N1)を感染させると鼻腔洗浄液中のウイルス価が著しく減少した。

#### Chitin microparticles (CMP) の前投与による致死感染の防御

次にCMPを経鼻投与した後にH1N1及びH5N1インフルエンザウイルスの致死感染を行いその防御効果を調べた。

、致死的高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)感染前に2日間CMPを100 $\mu$ g経鼻投与した場合コントロール群の比較し著しい症状の改善と80%の生存を示した。コントロール群の死亡率は40%であった。

以上の結果からCMPの経鼻投与はH5N1インフルエンザウイルスの致死感染に対して防御効果がある事が示された。

#### D. 考察

合成二本鎖RNA及びキノコ由来熱性抽出物のうち*Phellinus Linteus*(PL)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IgA抗体、及び血清中のIgG抗体が誘導される。Cladeの異なるウイルス株に対して交叉防御能が確認された。ヒトで安全性が確認されている二本鎖RNAである

polyI:polyC12U Ampligenを同様に経鼻アジュバントとして用いてpolyI:polyCと同等の粘膜アジュバント作用が確認された。

またchitin microparticles (CMP)の経鼻投与によってH5N1インフルエンザウイルスに対して呼吸器での予防効果がある事が示された。我々は以前CMPがインフルエンザワクチンの粘膜アジュバントとして効果がある事を示してきた。今回の結果はCMPが粘膜でインフルエンザウイルスに対する自然免疫を誘導し高病原性鳥インフルエンザウイルスに有効である事を示した。

#### 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たアジュバント併用経鼻H5N1ワクチンによる交叉防御能を示した。また、ヒトでの安全性が確認されている二本鎖RNAであるpolyI:polyC12Uを用いてpoly(I:C)同様に、交叉防御能を持つ粘膜免疫誘導が可能であった。またChitin microparticles (CMP)の事前経鼻投与によりH1N1及びH5N1インフルエンザウイルスの致死感染を防御し生存率を改善させる事が示された。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. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba

- J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H\*  
Protection against influenza virus infection  
by intranasal vaccine with Surfclam  
Powder as a mucosal adjuvant. **J Med  
Virol**, 2006 78:954-963.
2. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani  
T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T.,  
Taguchi F., Takemori T., Takatsugu-Yokota  
Y., Miyamura T. Induction of Protective  
Immunity against Severe Acute Respiratory  
Syndrome Coronavirus (SARS-CoV)  
Infection using Highly Attenuated  
Recombinant Vaccinia Virus DIs. **Virology**  
2006 Aug;20(8):1329-31. 2006 May 5;  
[Epub ahead of print].
  3. Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga  
K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T,  
Moriyama M, Hall WW, Kurata T,  
Takahashi H. Tristetraprolin inhibits HIV-1  
production by binding to genomic RNA.  
**Microbes and Infection**. 2006  
Sep;8(11):2647-56. 2006 Aug 8; [Epub  
ahead of print]
  4. Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T.,  
Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa  
H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T.,  
Kurata T., Hasegawa H\*., Intranasal  
administration of adjuvant-combined  
recombinant influenza virus HA vaccine  
protects mice from the lethal H5N1 virus  
infection. **Microbes and Infection** 2006  
Oct;8(12-13):2706-14. 2006 Aug 28; [Epub  
ahead of print]
  5. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H,  
Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A,  
Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T,  
Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T.  
Pathological and virological analyses of  
severe acute respiratory  
syndrome-associated coronavirus infections  
in experimental animals. **Adv Exp Med  
Biol**. 2006;581:515-8.
  6. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T,  
Morikawa S, Tashiro M, Suzuki T, Taguchi  
F, Takemori T, Miyamura T,  
Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated  
vaccinia virus DIs as a potential SARS  
vaccine. **Adv Exp Med Biol**.  
2006;581:593-6.
  7. Hasegawa H\*, Ichinohe T, Tamura S,  
Kurata T Development of a mucosal  
vaccine for influenza viruses: preparation  
for a potential influenza pandemic. *Expert  
Review of Vaccines*, April 2007, Vol. 6, No.  
2, Pages 193-201.
  8. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI,  
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 (CMP) on highly  
pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med  
Virol*. 2007 Jun;79(6):811-819
  9. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S,  
Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T,  
Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and  
Hasegawa H\* Intranasal immunization



- with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40.
10. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol*. 2008 Jun;172(6):1625-37.
11. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H\*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol*. 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.  
\*corresponding author
12. Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2008 Nov;7(9):1435-45.
13. Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. **Therapeutic and Clinical Risk Management** 2009, in press.
14. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis*, in press.

学会発表

1. 一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第 10 回日本ワクチン学会学術集会 平成 18 年 10 月 21 日-22 日 大阪
2. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、富士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎 マウス、ラット馴化 SARS-CoV を用いた SARS 発症動物モデルの作製 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋
3. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、川口晶、岩田奈織子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 経鼻ワクチンによる感染防御 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋

4. 一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の感染抑制効果 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
5. 一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、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交叉防御効果の検討 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
6. 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅 2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)感染の交叉防御効果の検討 第11回日本ワクチン学会学術集会(2007年11月横浜)
7. 長谷川秀樹、一戸猛志、相内章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎:キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御。第56回日本ウイルス学会総会(岡山)2008年10月
8. 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹:経鼻ワクチンにおけるDectin-1リガンドによるアジュバント効果の亢進。第56回日本ウイルス学会総会(岡山)2008年10月
9. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、富士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎:SARS-CoV感染動物モデルを用いたSARS発症機序の解明と治療法の検討。第56回日本ウイルス学会総会(岡山)2008年10月
10. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎:経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンのカニクイザルを用いた効果検討。第12回日本ワクチン学会学術集会(熊本)2008年11月
- H. 知的財産権の出願、登録状況  
なし

平成 18-20 年度厚生労働科学研究費補助金（創業基盤推進研究事業：政策創業総合研究事業）

「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

研究分担者 神谷 齊（国立病院機構 三重病院）

研究要旨：我々は新型インフルエンザの出現によるパンデミックに備えて、プレパンデミックワクチンの治験に関与してきているが、現在プレパンデミックワクチンは医師指導型治験が行われており、試験ワクチンはこの研究班では入手できない。私は20歳以上65歳未満の成人に対する治験に関与し、製造承認が得られているが国の管理下にある。その治験では小児に対する試験は行われていなかったが、昨年からは継続して日本医師会治験センターでベトナム株をつかって検討が開始されている。一方インフルエンザに対しては厚生労働省でも新型インフルエンザ対策会議を召集し、インフルエンザ（H5N1）に対するガイドラインを作成して WHO の言うフェーズ4以降の準備をしているが、小児に対する対策は明確には出来ていない。我々はこの3年間小児に対するワクチン接種が実際必要になった場合の投与量について検討を行ってきた。阪大微研会ならびにサノフィパスツール社の協力を得て初年度は我々の測定結果とフランス WHO collaborating centre for virus reference and research ラボである National Influenza centre Laboratoire de Virologie du C.H.U.de Lyon に依頼して我々の保存血清の一部（244名分）の血清 HI 抗体価を測定していただきその値について比較検討し、ほぼデータに差はないことを確認した。その実績をもとにして、日本の代表的なインフルエンザワクチン（阪大微研会製）とサノフィアヴェンティス製のワクチンを使用して、接種量を外国並みに3歳未満0.25mL、3歳以上13歳未満には0.5mL、を接種し接種前後の抗体価を実績のある三重県科学技術研究センターにて測定し、抗体価、副作用等について検討した。この結果はプレパンデミックワクチンの小児への接種量の決定に今後参考になると期待している。

研究協力者

中野貴司、庵原俊昭、木下麻衣子（国立病院機構 三重病院）

高橋裕明、矢野拓也、大熊和行（三重県保健環境研究所）

村田直樹、Didier LEBoulleux M.D.、Bruno LINA M.D.（サノフィパスツール KK）

松田 正（まつだ小児科クリニック）

鳥越貞義（アクエアメディカルステーション）

二井立恵、伊佐地真知子（白子クリニック）

渡辺正博（すずかこどもクリニック）

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）

安田尚樹（安田小児科内科）

酒徳浩之（さかとく小児科）

羽根靖之（はね小児科医院）

#### A. 研究目的

現行のシーゾナルインフルエンザワクチンの接種量と効果の検討をすることにより、ブレパンデミックワクチンの小児への投与量を決める参考データを得ることを目的とした。

我が国では小児期については年齢により接種量を異にする。すなわち6カ月以上1歳未満は0.1mL、1～6歳未満は0.2mL、6歳以上13歳までは3.0mLで接種している。外国では3歳未満は0.25mLそれ以上は0.5mLが一般的である。しかしパンデミックが発生した場合我が国では現実的にはこのような細分化された接種は混乱の基になるため、シーゾナルに使用している現行ワクチンで調査した。

#### B. 研究方法

それぞれの年度で詳しいことは、報告書で説明しておりここでは細部については省略するので、原本を見ていただきたい。ワクチン効果についても日本の小児インフルエンザ対策は、抗原量について少ないのではないかという問題点が指摘されている。我々は初年度では我々が共同研究している三重県保健衛生研究所の測定値と、共同研究に同意してくれたフランスのアベンティスパスツール社が依頼しているWHO collaborating center for virus reference and research ラボである Natuonal Influenza center Laboratoire du Virologie du C.H.U. du Lyon に協力していただき、保存同一血清をHI法でそれぞれ測定し、両社に大きな差がないことを確認

した。

平成19年—20年にはこの経験を生かし、パンデミック時の混乱を避けることと、外国並みにワクチンの接種量を増量すれば、日本のワクチンも効果が高いのではないかを考え、阪大微研会ならびにアベンティスパスツール社のご協力を得て、日本を代表したワクチンとして阪大微研会のフルービック HA を、ヨーロッパの物では、欧州を代表してアベンティスパスツール社の VAXIGRIP を購入して、同時期に両ワクチンをそれぞれ150名目標で小児に年齢を分けて接種した。

接種量はともに3歳未満0.25mL、3歳以上13歳までは0.5mLを接種して、抗体価の上昇程度、副反応の程度等を比較検討した。接種は平成18年10月から平成19年4月10日までの間に実施し、その後の経過を追跡確認した。

なおサノフィのワクチンはわが国では未承認のものであるため、接種のためには接種医師は自己輸入で行い、万一の事故に備えて保険をかけた。日本のワクチンは許可されているものであるが、投与量を変えて行うため日本の法律で処理できず、同一に対処した。

血清抗体価の測定はすべてHI法で抗原はそれぞれのワクチン中に含まれる抗原を取り寄せて測定した。両社で別々に測定し、相互間で大きな差異はないことを確認したのち報告する約束になっているが、フランス側の測定が遅れているため、とりあえず報告のために我々の測定データのみで、比較検討したので、まだ値の確定はしていない。

日本で使用するインフルエンザワクチン

と外国のワクチンとの接種量を同一にして、効果について検討した背景は、現行の **trivalent split HA** ワクチンは、現行の投与方法と接種量で実施する限りにおいては、罹患については疫学的効果ははっきりせず、また軽症化についてもコントロールがないため、臨床現場では満足出来る状態ではない。我国ではインフルエンザワクチンは任意接種で6カ月から使用は出来ることになっているが、特に1歳未満は有意差が証明出来ないという小児科学会の見解もあり、現在では1歳未満への接種は推奨していない。なお細部の手技についてはそれぞれの年度の報告書を参照していただきたい。倫理面の配慮としては、本研究は平成19年10月16日に国立病院機構三重病院倫理委員会において承認を得た。(受付番号19-22題名「小児におけるインフルエンザワクチンの接種量と効果に関する研究」) また治験に際しては保護者にたいし時間をかけて必要な事項について説明をし文書にて同意を得ており倫理的にも問題はないと考える。

### C. 研究結果

#### 平成18年のまとめ

平成18年度の研究では我々の測定結果とフランスでの測定結果と大きなずれはな

いと考えられることがわかったので、サノフィアスツール社が外国で接種した3歳以下児の測定した結果を参考にして、今回の三重県保健環境研究所で測定した結果をグラフにまとめ外国との接種量の差による変化がどのようなものであったかについて再度分析をしてみた。

年齢的にすべての年齢が同数でなく接種症例数が少ない年齢もある。しかしほとんどの年齢では50例以上であった。また血清の採取は接種前、初回接種4週後、2回目接種後4週後の採血を原則とし、ほとんどの症例はそのルールに乗っているが来院日が数日ずれている症例も少ないが存在する。なお、この検討には小児のクライテリアが世界共通のものが無いので、成人で使用している EMEA(European Agency for Evaluation of Medical Products)の有効性のクライテリアを使用した。すなわち① HA ワクチン接種21日後の抗体保有率 (seroprotection rate) >70% (20-60歳)、>60% (60歳以上) ②接種前と接種後21日の抗体上昇率 (sero-conversion rate) 4倍以上の人が>40% (20-60歳)、>30% (60歳以上) ③HI 抗体価の前値と21日後の値の幾何平均値が>2.5倍以上 (20-60歳、>2以上 (60歳以上) と決められているものである。

分析した症例数は下記の別表のとおりである。

#### 1: Sample distribution per age group and per schedule

Sample size	0 to 1 year	1 to 2 years	2 to 3 years	3 to 12 years
0.1mL x 2	11	0	0	0
0.2mL x 2	6	60	52	229
0.25mL x 2	18	43	70	208
0.30mL x 2	0	0	0	81
0.5mL x 2	0	0	16	265

#### 1) 1歳未満の症例

日本のワクチンに対する抗体保有率、抗体上昇率、幾何平均値とも低い。EMEA クライテリアを満足させるような値ではなく、最低量でも 0.25mL は必要と思われるが、抗体保有率は 0.25mL でも 50%程度であり、赤線で囲んであるサノフィワクチン VAXIGRIP を見ると 0.25mL で 1歳以下では A 型で 80%、B 型では 50%で我が国のワクチンとは有意に差があることが示された。

#### 2) 1～3歳未満の症例

この年齢層は中間量の 0.2mL の接種では EMEA に合致するものは無く、中途半端である。1歳以上では H1N1 では 0.25mL 2回接種で EMEA のクライテリアをパスする。しかしながら H3N2 株では抗体保有率 70% をクリアできない。これでは基準値を GMTR クライテリアのみが満足している。一方 VAXIGRIP 0.25mL 2回接種で有効な値を示している。

#### 3) 3歳から 12歳のグループ

この年齢層の人たちは驚くべきことに 0.5mL 接種の結果は B 型を除き抗体保有率は 70% 以上で EMEA クライテリアをパスしている。しかし VAXIGRIP の値は B 型も含めて良好な結果であった。

#### 4) まとめ

以上の結果より来期は日本のインフルエンザ不活化ワクチンと VAXIGRIP とで 2重盲験試験を実施して、同量接種による抗体価についてワクチン評価をしてみたい。出来なければ日本のワクチンのみで 3歳未満は 0.25mL、3歳以上には 0.5mL を接種しその免疫反応を調査してみたい。そうすることによりワクチンの良否、あるいは新型インフルエンザ使用時における接種量の決定も可能かと思われる。今後使用が予想される新型インフルエンザワクチン接種に向けて有効接種量を決めておくことは重要と考える。

#### 平成 19・20 年度のまとめ

今回接種の対象にできた症例は下図の如く 560 名で、3歳未満でのフルービック群 127 名、Vaxigrp 群 125 名の計 251 名、3～13歳はフルービック群 155 名、Vaxigrp 群 144 名計 299 名 560 名に接種を実施し、副反応を調査した。局所反応が中心で接種に関しては大きなトラブルもなく無事接種ができた。抗体価の測定は接種前、2回接種後 1カ月のそれぞれ採血して行った。

表1. 調査対象者内訳

機関名	性別	接種時年齢													総計	
		0歳	1歳	2歳	3歳	4歳	5歳	6歳	7歳	8歳	9歳	10歳	11歳	12歳		13歳
まつだ小児科クリニック	男	2	11	4	4	5	3	3					2			37
	女	2	6	2		4	3	3					1			23
すずかこどもクリニック	男		5	5	4	1	1	2	2	1					1	20
	女		5	5	2	1	1	2	2		1	1				20
白子クリニック	男		6	5	1	1	3	2	2	1		1				22
	女		14	5	5	7		5		1	1					38
清合小児科医院	男	2	11	5	4	6	1	3	1	2		2				37
	女		7	5	2	3	1				2	1	1			24
国立三重病院	男	2	1	3	4	4	3	3	1	1		1	2	1	1	27
	女	2	3		3		3					1	2			14
うめもとこどもクリニック	男	1	9	7	6	4	5		4	1	1				1	39
	女	5	4	4	1	3		2	1		1					21
安田小児科内科	男	2	5	5		3	2	3	2	3	3	1				32
	女	1	1	5	1	4	1	1			1	5	3			23
さかとく小児科	男	1	5	1	1	2	4	3	1	2	1	2				23
	女		2	4	2	3		2	1	5	1					20
はね小児科医院	男		3	5	3	3	4	1	1		1	1		1		23
	女		7	5	2	1	1	1								17
かとう小児科	男	1	4	2	2	1	2	1	1	1	1	1				17
	女	3	6	4	1	1	1	2		1		1	1	2		23
アクエア・メディカル・ステーション	男	1	8	8		3	3	4		3		1		1		32
	女	1	6	6		2	2	4	1	1	3	1	1			28
男計		12	68	53	25	36	31	23	18	15	7	11	4	5	1	309
女計		14	61	45	19	28	13	21	8	11	14	9	5	2		251
総計		26	129	98	44	65	44	44	26	26	21	20	9	7	1	560

ワクチン接種後の抗体価の測定は三重県保健環境研究所で実施した。

まだワクチン提供者との測定結果の打ち合わせがしてないので、この結果が独り歩きしないようにお願いしたい。

解析の結果、AH1については40倍以上の抗体価を有することが罹患時の症状軽減に繋がることを確認できたと思われる。しかし今回の期間中のインフルエンザ非罹患群には、罹患したが症状が軽微であったため医師の診察を受けなかった者が含まれることが推察され、確認できたのは、感染防御効果ではなくあくまでも症状軽減効果であるとかんがえている。しかしこの量の接種を実施しても40倍以上の抗体価を保有しているにもかかわらず、38.5℃以上の発熱を来す患者の存在もあり、スプリットワクチンを注射で接種する効果の限界であると思われた。

ワクチン接種と抗体価の獲得であるが、この量の接種をおこなってもBに対する効果の弱さは従来から報告されているとおり

であり、ワクチン接種量を0.50mLに増量しても大きな効果は得られなかったことは、現行のインフルエンザワクチンについて、しっかりした検討する必要があると思われる。さらにAH3に対する効果は、「阪大微生物病研究会製」と「サノフィバツール製」では、抗体価の上昇に対して大きな差が認められたことから、この原因の追及と国内のメーカー間でも差が生じているかどうかについても、測定の方法も含めて今後の検討課題と考える。

なお接種量との比較については測定値が固定されてから、比較検討するので、ここではデータのみ報告とする。

## E. 結論

3年間にわたって新型インフルエンザによるパンデミックワクチン対策として、側面から本研究に取り組み、現行のインフルエンザワクチンを含めて示唆に富む結果が得られた。今後はプレパンデミックワクチンが全粒子ワクチンで検討されているので、

使用できるようになれば、今回の結果を参考にしながらアジュヴァントを入れないワクチンの検討がしてみたい。もし可能であれば現行ワクチンと混合して、新しいプレパンデミックワクチンへの応用も可能かもしれない。0.25mL, 0.5mLの結果については、データ固定後に検討し追加報告をする。

#### 参考文献

- 1) 神谷 齊、他：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。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）2004年総括・分担研究報告書。38-59,2005
- 2) 神谷 齊、他：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。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）2005年総括・分担研究報告書。38-59,2006
- 3) 神谷 齊：我が国の予防接種の仕組みと問題点。NEUROINFECTION 神経感染症。Vol.12(1)12:23-27, 2007
- 4) 神谷 齊：予防接種率向上の努力。小児感染免疫。Vol.19(2)145-146, 2007
- 5) 神谷 齊：臨床の立場からみたワクチンの重要性。ファルマシア。vol.44(7), 2008
- 6) 神谷 齊：新型インフルエンザについて。母子保健。11月号 P8, 2008
- 7) 神谷 齊、岩田 敏、石和田 稔彦、山中 昇、杉田麟也：小児用7価肺炎球菌結合型ワクチンの医療経済効果。小児科臨床。vol61(11):2233(123)-2241(131), 2008
- 8) 大熊和行、神谷 齊、他：腎疾患患者に対するインフルエンザHAワクチン接種によるHI抗体産生と副反応。小児感染免疫。Vol.19(2)147-155, 2007
- 9) 大熊和行、神谷 齊、他：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ワクチンHAワクチンの有効性と安全性。小児感染免疫。17(1):3-16,2005
- 10) 大熊和行、神谷 齊、他：1999/2000~2002/2003年の三重県における幼児に対するインフルエンザワクチンHAワクチンによるHI抗体産生と副反応。小児感染免疫。18(3):239-254,2006
- 11) 廣田良夫：インフルエンザワクチンの有効性と安全性と疫学的考察。インフルエンザ。1(1):35-40,2000
- 12) 池岡秀之：インフルエンザワクチンの接種回数。インフルエンザ。2(3):237-243,2001
- 13) Gross PA.,et al.:Association of influenza immunization in elderly population : a prospective study. Arch. Intern.Med. 148:562-565.1988
- 14) Bruijin IA .,et al.: Quality and quantity of the humoral immune response in healthy elderly and young subjects after annually repeated influenza vaccination. J Infect Dis.179:31-36,1999
- 15) 中野貴司。「発熱」に対する薬物療法⑩ “乳幼児におけるインフルエンザワクチンの有効性について教えてください。またワクチン接種時の発熱に対する投薬で考慮すべきことはありますか？”(特集；こどもの発熱・薬物療法とホームケア)。薬局。第58巻、第1号。P61-64、2007年1月。南山堂。



- 16) 中野貴司. インフルエンザワクチンの有用性—わが国の不活化インフルエンザワクチンは、どの程度の予防効果が期待できるのか? 医学のあゆみ, 第 220 巻、第 10 号. P857-858、2007 年 3 月 10 日. 医歯薬出版 (株).
- 17) 中野貴司. 診療研究「今冬のインフルエンザ治療の留意点」, 月刊保団連, 第 950 号 (2007 年 10 月号). P47-50、2007 年 10 月 1 日. 全国保険医団体連合会.
- 18) 中野貴司. インフルエンザワクチンの効果 (特集: 冬のウイルス感染症). 小児科診療. 第 70 巻、12 号. P2207-2212、2007 年 12 月 1 日. 診断と治療社.
- 19) 中野貴司. インフルエンザの疫学・日本と世界のインフルエンザ (特集: 小児看護に必要なインフルエンザの知識とケア). 小児看護. 第 31 巻、1 号. P21-27、2008 年 1 月 15 日. へるす出版.
- 20) 中野貴司. インフルエンザワクチンの有効性 (今月の主題: インフルエンザ診療のブレイクスルー). 臨床検査. 第 52 巻、1 号. P53-56、2008 年 1 月 15 日. 医学書院.

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
Subash C. B. Gopinath, Tomoko S. Misono, Kazunori Kawasaki, Takafumi Mizuno, Masaki Imai, Takato Odagiri and Penmetcha K. R. Kumar	An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion	J.Gen. Virol.	87	479-487	2006
Horimoto T, Takada A, Fujii K, Goto H, Hatta M, Watanabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Tagawa-Sakai Y, Yamada S, Ito H, Ito T, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kawaoka Y.	The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate.	Vaccine	24	3669-76	2006
Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Masato Tashiro and Takato Odagiri	Development of H5-RT-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection.	Vaccine	10	6679-6682	2006
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 aluminium adjuvant induces cross-protective immunity against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses	Vaccine	25	3554-3560	2006
Horimoto, T., et al.:	The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate.	Vaccine,	24;	3669-3676	2006
Monto, A. S.et al.	Influenza viruses resistant to the neuraminidase inhibitors detected during the first three years of their use.	Antimicrob. Agents Chemother.	50	2395-2402	2006
Asahi-Ozaki, Y., et al	Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection.	Microbiol. Infect.		In press	2006
Kamijuku H., et al.	Mechanism of NKT cell-mediated nasal vaccine which induces effective	J. Clin. Invest		In press	2006

	cross-protection against highly pathogenic avian influenza				
Asahi-Ozaki, Y., Itamura, S., Ichinose, T., Steng, P., Tamura, S., Sawa, H., Tadano, M., Sato, T., Tashiro, M., Kurata, T., Hasegawa, H.	Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection.	Microbiol. Infect.		In press	2007
Kamijuku H., Nagata, Y., Jiang X., Tashiro, T., Mori, K., Taniguchi, Y., Hase, K., Ohno, H., Shimaoka, T., Tonehara, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Ichinose, T., Hasegawa, H., Seino, K.	Mechanism of NKT cell-mediated nasal vaccine which induces effective cross-protection against highly pathogenic avian influenza. J. Clin. Invest.	J. Clin. Invest.		In press	2007
Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H.	Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens.	Microbiol Immunol	50:	73-81,	2006.
Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y.	Hierarchy among vRNA segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions.	J Virol	80:	2318-25,	2006
Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y.	The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly.	J Virol	80:	5233-5240	2006.
Chen H, Li Y, Li Z, Shi J, Shinya K, Deng G, Qi Q, Tian G, Fan S, Zhao H, Sun Y, Kawaoka Y.	Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China.	J Virol	80:	5976-59831	2006
Muramoto Y, Le TQ, Phuong LS, Nguyen T, Nguyen TH, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y.	Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005.	J Vet Med Sci	68:	527-531,	2006.
Kogure T, Suzuki T, Takahashi T, Miyamoto D, Hidari KI, Guo CT, Ito T, Kawaoka Y, Suzuki Y.	Human trachea primary epithelial cells express both sialyl( $\alpha$ 2-3)Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl( $\alpha$ 2-6)Gal receptor for human influenza viruses.	Glycoconj J	23:	101-106	2006
Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida A, Cheng RH, Kawaoka Y.	Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles.	Nature	439	490-492	2006.
Shinya K, Ebina M, Yamada S.	Influenza virus receptors in the human	Nature	440	435-4	2006

Ono M, Kasai N, Kawaoka Y.	airway.			36	
Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y.	Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication.	J Virol		In press	2007
Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso K, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y.	Hemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors.	Nature		In press	2007
Imai, M., Mizuno, T., and Kawasaki, K.	Membrane fusion by single influenza hemagglutinin trimers. Kinetic evidence from image analysis of hemagglutinin-reconstituted vesicles.	J Biol Chem	281	12729-35	2006
Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H	Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant.	J Med Virol,	78	954-963	2006
Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Takatsugu-Yokota Y., Miyamura T	Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs.	Virology	20	1329-31.	2006
Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T, Moriyama M, Hall WW, Kurata T, Takahashi H.	Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA.	Microbes and Infection	8	2647-56	2006
Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H.	Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection.	Microbes and Infection	8	2706-14	2006
Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T,	Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals.	Adv Exp Med Biol.	581	515-8	2006