

Fig. 2. HA content (bars) and HA titer (symbols) in MDCK culture medium or allantoic fluid. All cultures were performed at 3 inoculum concentrations, except for A/Ku M1/E1 because of the small volume of A/Ku M1. Viruses from MDCK cells were purified and re-suspended in PBS at the same volume as that of the culture medium. Viruses from eggs were purified and re-suspended in PBS at 1/100 of the allantoic fluid volume. The HA content was measured by SRD (reagents consisted of egg-derived A/Wyoming antigen and anti-A/Wyoming sheep serum obtained by immunization with egg-derived A/Wyoming HA antigen).

sortant viruses (A/Ku IVR-135 E12/E2/E1, A/Wy IVR-134 E13/E2/E1). When these viruses were cultured in MDCK cells, they all produced high HA titers and HA yields at any inoculated MOI. The HA content of virus partially purified from pilot culture of A/Ku M1/M3 in MDCK cells was 24–39 µg/mL, which was 2–3 times higher than the HA content of the reassortant viruses A/Ku IVR-135 and A/Wy IVR-134 cultured in eggs. The HA content of the A/Kuamamoto reassortant cultured in MDCK cells (A/Ku IVR-135 E12/E2/M3) ranged from 105 to 267 µg/mL, which was 6–10 times higher than that after culture in eggs. On the other hand, the A/Wy IVR-134 E13/E2/M3 reassortant showed a similar HA yield to that of A/Ku M1/M3 in MDCK cells.

3.2. HA1 gene sequences analysis

The results of HA1 gene sequencing are summarized in Table 2. The positions of all genes and amino acids not described in the table were identical with the sequence of A/Fujian/411/2002. The gene sequences of A/Fujian/411/2002 and A/Wyoming/3/2003 were cited from The Influenza Sequence Database (<http://www.flu.lanl.gov/>). A/Ku M1 had nucleic acid point mutations at 3 sites (A6G, U75A, and A763C) compared with the sequence of A/Fujian/411/2002, but the sequence of translated amino acids was identical for these two viruses. A/Ku M1/M2 had a HA1 sequence identical to that of A/Ku M1. A/Ku E3 had point mutations at 3 sites

Table 2
Comparison of the HA1 sequences of A/Fujian, A/Kuamamoto and A/Wyoming cultured in eggs or MDCK cells.

Virus	Sequence at the indicated HA1 position									Amino acids				
	Nucleotides									Amino acids				
	6	76	382	469	557c	656	676	747	763	127	156	186	219	226
A/Fujian/411/2002 ^a	A	U	A	U	G	C	G	G	A	T	H	G	S	V
A/Ku M1	G	A	- ^b	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-
A/Ku M1/M2	G	A	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-
A/Ku E3	G	A	-	-	U ^c	A ^f	A ^g	-	C	-	-	V ^h	Y ⁱ	I ^j
A/Ku E3/M2	G	A	-	-	U	A	A	-	C	-	-	V	Y	I
A/Ku E5	G	A	-	-	U	A	A	-	C	-	-	V	Y	I
A/Ku E5/M2	G	A	-	-	U	A	A	-	C	-	-	V	Y	I
A/Ku IVR-135 E12/E2	G	A	-	A ^d	U	A	A	-	C	-	Q ^e	V	Y	I
A/Ku IVR-135 E12/E2/M1	G	A	-	A	U	A	A	-	C	-	Q	V	Y	I
A/Wyoming/3/2003 ^a	G	A	G ^c	-	U	A	A	A	C	A ^e	-	V	Y	I
A/Wy IVR-134 E13/E2	G	A	G	-	U	A	A	A	C	A	-	V	Y	I
A/Wy IVR-134 E13/E2/M2	G	A	G	-	U	A	A	A	C	A	-	V	Y	I
A/Wy X-147 E5/E2	G	A	G	A	U	A	A	A	C	A	Q	V	Y	I
A/Wy X-147 E5/E2/M2	G	A	G	A	U	A	A	A	C	A	Q	V	Y	I

Direct reverse transcriptase PCR was used for the amplification of the HA1 gene with the following sense and anti-sense primers:

- sense primer 1, 5'-CAGGGATAATCTATTAACCA-3'; sense primer 2, 5'-ATCAGATCCTTGATGGAG-3';
 sense primer 3, 5'-GCTCAATAATGAGATCAG-3'; sense primer 4, 5'-ACTCTGAAATGGCAACA-3';
 sense primer 5, 5'-CTAACTGACTCAGAAATG-3';
 anti-sense primer 1, 5'-TGAGGCAACTAGTGACCT-3'; anti-sense primer 2, 5'-CTATGAAACCCGCA-3';
 anti-sense primer 3, 5'-TGCACTCAAATGCAAATGTTGACC-3'.

^a Reported sequences are cited from the influenza sequence database (<http://www.flu.lanl.gov/>).

^b Same as A/Fujian.

^c Nucleotide mutation inducing amino acid substitution at position 127.

^d Nucleotide mutation inducing amino acid substitution at position 156.

^e Nucleotide mutation inducing amino acid substitution at position 186.

^f Nucleotide mutation inducing amino acid substitution at position 219.

^g Nucleotide mutation inducing amino acid substitution at position 226.

Table 3

Cross haemagglutinin-inhibition test of mouse serum with A/Kumamoto viruses grown in MDCK 33016 cells.

Ha antigen	Mouse antiserum	
	A/Ku M1/M3	A/Ku IVR-135 E12/E2/M3
A/Ku M1/M3	147 ^a ($p < 0.05^b$)	87
A/Ku IVR-135 E12/E2/M3	80 ($p < 0.05^b$)	147

^a Geometric mean titer.

^b Significant difference when individual serum was analyzed by unpaired Student's *t*-test (two-tailed).

(G557T, C656T, and G676A) compared with A/Ku M1. These point mutations were estimated to cause the following amino acid substitutions: G186V, S239V, and V246I, respectively. The HA1 gene sequences of A/Ku E3/M2 and A/Ku E5/M2 were identical with that of A/Ku E3. No HA1 gene additions or deletions were observed during passage of these viruses in MDCK cells.

In the A/Ku IVR-135 E12/E2 strain, in addition to the mutations seen in A/Ku E3, another mutation was observed (T469A). It was estimated that A/Ku IVR-135 E12/E2 had an additional amino acid substitution (H156Q) related to this mutation.

The HA1 gene sequence of the A/Ku IVR-135 E12/E2/M2 strain generated by two passages of A/Ku IVR-135 E12/E2 in MDCK cells was identical with that of A/Ku IVR-135 E12/E2.

Compared with A/Fujian/411/2002, A/Wyoming/3/2003 showed differences at 4 sites (A382G, G557U, G676A, and G747A), in addition to the mutations detected in A/Kumamoto/102/2002. The amino acid sequence of A/Wyoming/3/2003 also differed at 4 sites (T127A, G186V, S219V, and V226I) compared with that of A/Fujian/411/2002. The A/Wy IVR-134 E13/E2 virus used for our experiment was found to have the same sequence as that of A/Wyoming/3/2003 from the database. A/Wy IVR-134 E13/E2/M2 had the same HA1 gene sequence as that of A/Why IVR-134 E13/E2. A/Wy X-147 E5/E2 showed a point mutation (U469A) compared with the original A/Wyoming/3/2003 strain and this mutation was estimated to cause an amino acid substitution (H156Q). The HA1 gene sequence of A/Wy X-147 E5/E2/M2 was identical with that of A/Wy X-147E5/E2.

All the viruses generated from two passages in MDCK cells (/M2) were found to have completely identical HA1 gene sequences with those before passaging. That is, no additional mutations were caused by passaging in MDCK-33016 cells.

3.3. Immunogenicity

The results of the cross HI assay are shown in Table 3. Although there was no 4-fold significant difference between the geometric mean titers, a significant difference was detected when the unpaired Student's *t*-test was used. Serum from A/Ku M1/M3-immunized mice showed a significantly lower HI antibody titer ($p < 0.05$) for A/Ku IVR-135 E12/E2/M3 antigen than for A/Ku M1/M3 antigen. Serum harvested from A/Ku IVR-135 E12/E3/M3-immunized mice showed a low reactivity for A/Ku M1/M3 antigen but a significant difference was not detected.

4. Discussion

When an influenza vaccine is produced, two important factors are timeliness and antigenic match with those of the circulating strains. Because the recent egg isolates of type A viruses have not grown very well in eggs, reassortants have been used for vaccine production. Although it was expected that A/Fujian-like strains would appear during the 2003/2004 flu season, none of the vaccine candidates, including the A/Ku E3 or E5 viruses, showed satisfac-

tory growth in eggs. Vaccine manufacturers had to wait until the next year to obtain high growth reassortant viruses for vaccine production. Therefore, there are limits to egg culture in terms of timely production. As an alternative substrate for viral growth, MDCK cells have long been suggested. If these cells were used, timely production of vaccine could be expected because of the low selectivity of this substrate. To confirm this expectation, we evaluated the growth of viral isolates (isolated in MDCK cells and eggs) from the same clinical specimen in MDCK cells and eggs. Based on the results obtained with the A/Ku M1 virus, we demonstrated that viruses showing poor growth in eggs could still replicate well in MDCK-33016 cells.

A/Ku M1 grew well in MDCK-33016 cells for 3 passages. Assuming actual vaccine production, A/Ku M1/M1, A/Ku M1/M2, and A/Ku M1/M3 would correspond to the master seed virus, working seed virus, and vaccine, respectively. A very high HA yield was observed in the culture medium of A/Ku M1/M3 cells compared with the allantoic fluid of eggs inoculated with any of the viruses. Therefore, if we had used A/Ku M1 cultured in MDCK 33016 cells for vaccine production, we could have supplied a vaccine matching the A/Fujian-like virus for the 2003/2004 flu season. Even if the A/Ku E3 or A/Ku E5 virus had been chosen, growth of the seed virus and vaccine production could have been performed in a timely manner by culture in MDCK-33016 cells.

In this study, the HA content of culture medium and allantoic fluid were measured by an SRD assay designed for the A/Wy IVR-134 strain grown in eggs. If an assay for A/Kumamoto grown in MDCK cells had been available, the HA content of culture media could have been measured more precisely [13].

When the reassortant A/Ku IVR-135 E12/E2 virus was cultured in MDCK cells, a 5- to 10-fold higher yield was achieved than that in allantoic fluid. However, the reassortant A/Wy IVR-134 E13/E2/M3 virus showed a 2- to 3-fold higher yield in MDCK cells than in allantoic fluid, which was similar to the yields of other non-reassortant viruses. It may be necessary to investigate further whether a high growth reassortant virus is needed for MDCK cells or not.

Lu reported that the His-183 HA1 gene of the A/Fujian/411/2002 strain causes impairment of growth in MDCK cells [14]. However, all of the viruses that we studied had His-183 and still grew well in these cells. They used a PR-8-based RG [15,16] recombinant virus that differed from the wild-type strain with respect to the configuration of the genome, and this may partly account for the discrepancy between their results and ours.

The A/Kumamoto/102/2002 virus accumulated point mutations with an increase of passaging in eggs and the number of resultant amino acid mutations also increased. Three mutations in the HA1 gene (G557T, C656A, and G676A) were found in the A/Ku E3 virus after 3 passages in eggs and these mutations generated 3 amino acid substitutions (G186V, S219Y, and V226I, respectively). The substitutions were identical with those of other H3N2 influenza viruses, as reported elsewhere [17–20]. These sites are thought to be related to receptor binding activity, which suggests that viruses recognizing the receptors commonly expressed in eggs may become predominant during passage in eggs [21–23].

The reassortant A/Ku IVR-135 E12/E2 virus was generated through more than 10 passages in eggs and showed an additional H156Q amino acid substitution related to the T469A gene substitution. Amino acid 156 of HA1 is located at the tip of the HA molecule within an important region that determines antigenicity [24–28], so mutations at this site may influence the immunogenicity of vaccines. When immunogenicity was compared among the viruses generated by culture in MDCK cells, serum from mice immunized with A/Ku M1/M3 showed a weaker response to A/Ku IVR-135 E12/E2/M3 antigen. Serum from mice immunized with A/Ku IVR-135 E12/E2/M3 also showed a weaker response to A/Ku M1/M3

antigen. This suggests that the A/Kumamoto/102/2002 virus had developed amino acid substitution in the HA region that affects its immunogenicity during passage in eggs to form reassortants.

No new substitutions of the HA1 amino acid sequence were detected in any of the viruses (including A/Ku M1) passaged in MDCK-33016 cells, unlike the case for eggs. Viruses that were passaged in eggs and then cultured in MDCK cells did not revert to the amino acid sequence of the original virus cultured in MDCK cells. Unlike eggs, MDCK cells show weak selection pressure for the quasi-species of inoculated influenza virus and are therefore unlikely to allow a minor strain with a different amino acid sequence that grows well to become a major strain as a result of passaging. Therefore, these results indicate that MDCK cells can provide vaccines better matched to the circulating viral strain than culture in eggs.

Taken together, our findings suggest that HA1 (especially the amino acid at position 156) plays a key role in the immunogenicity of A/Fujian-like viruses. Jin et al. reported that the antigenicity of A/Wyoming/3/2003 can be converted to match that of A/Panama by simultaneous T155H and H156Q substitution of its HA1 sequence [17]. None of the viruses used in our study had both of these substitutions, although A/Ku IVR-135 and A/Wy X-147 possessed the latter substitution. Therefore, the production of influenza vaccine using A/Kumamoto/102/2002 IVR-135 and A/Wyoming/3/2003 X-147 might not have led to a vaccine with adequate antigenicity matching the predicted endemic wild strain if it had been attempted. Based on the actual events during 2003 in the northern hemisphere, it seems that an influenza vaccine matching the antigenic profile of A/Fujian could have been supplied for the 2003 winter season if vaccine manufacturing technology based on MDCK-33016 cells had been employed.

The MDCK-33016 cells used in our study were grown as a suspension culture in completely chemical medium and were therefore suitable for large-scale culture. The HA content in the culture supernatant of MDCK-33016 cells in the present study was at least twice that obtained in allantoic fluid. It is difficult to directly compare cell and egg culture with respect to vaccine production. However, the supernatant from a 1000-L bioreactor would be equivalent to allantoic fluid from at least 200,000 eggs and should produce more than 200,000 doses of vaccine, if the recovery of vaccine antigens is same as with egg-grown vaccines. Accordingly, the use of MDCK-33016 cells could make it possible to promptly supply a vaccine with superior immunogenicity to that of vaccines produced using eggs.

Under the current system of influenza vaccine production, only viruses passaged in specific pathogen-free (SPF) eggs are available as vaccine seeds. Serial passaging of viruses in eggs probably leads to the accumulation of gene and amino acid mutations, resulting in antigenic changes. When cultured in MDCK cells, influenza virus proliferates well, even during the first passage. Therefore, the first and second passages yield viral banks and the third passage allows the production of a vaccine. Thus, long-term passaging that is likely to induce amino acid mutations is not necessary in the case of MDCK cell-based vaccine production. A number of studies have shown that influenza virus cultured in cells has superior immunogenicity to that of virus cultured in eggs [28–30].

From the point of view of rapid production and antigenic matching, a vaccine based on a virus isolated from cells such as MDCK cells is preferable. According to available guidance [31], however, troublesome adventitious agent testing of seed viruses would be needed before vaccine manufacture because many agents must be detected by PCR or another method before vaccine production. To avoid such tests, a seed virus created by RG technology may be preferable for cell-based influenza vaccine production. But if the virus seed is made by RG technology, another new test which confirms the sequence of HA and NA genes may be needed [32]. Unexpectedly,

our study suggested that the genes related to viral growth in cells might differ between wild-type viruses and RG viruses with the PR-8 backbone, so more data about the growth of wild-type and RG influenza viruses in MDCK cells are needed.

Finally, because vaccine strains are often changed annually, a generic production system with low cost and high yield similar to the current egg system that can be used with any virus is required. Therefore, other issues need to be addressed, such as systems for the generation of seed viruses and establishment of SRD reagents.

Acknowledgement

We thank Dr. Kazuko Katsuki and the Kumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science for providing us the swab material and the A/Kumamoto viruses isolated in MDCK. We also thank Dr. Theodore Tsai (Novartis Vaccines and Diagnostics) for his helpful comments for our manuscript.

References

- [1] Baez M, Palese P, Kilbourne ED. Gene composition of high-yielding influenza vaccine strains obtained by recombination. *J Infect Dis* 1980;141(3):362–5.
- [2] W.H.O. The Wkly Epidemiol Rec(WER) 2003;78(9):57–64.
- [3] W.H.O. The Wkly Epidemiol Rec(WER) 2004;79(9):85–92.
- [4] Ritzwoller D, Shetterly S, Yamasaki K, France E, Gershman K, Shupe A, et al. Assessment of the effectiveness of the 2003-04 influenza vaccine among children and adults—Colorado, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53(31):707–10.
- [5] Robertson JS. An overview of host cell selection. In: Brown F, Robertson JS, Schild G, Wood JM, editors. *Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture*. KARGER; 1999. p. 7–11.
- [6] Gregersen J-P. A risk-assessment model to rate the occurrence and relevance of adventitious agents in the production of influenza vaccines. *Vaccine* 2008;26(26):3297–304.
- [7] Polymenidou M. Canine MDCK cell lines are refractory to infection with human and mouse prions. *Vaccine* 2008;26(21):2601–14.
- [8] Hughes K, Zachertowska A, Wan S, Li L, Klimaszewski D, Euloth M, et al. Yield in increases in intact influenza vaccine virus from chicken allantoic fluid through isolation from insoluble allantoic debris. *Vaccine* 2007;25(22):4456–63.
- [9] Horimoto T, Kawaoka Y. Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza A viruses in birds. *J Clin Microbiol* 1995;33(3):748–51.
- [10] Obata H, Tanaka T, Fujii T, Sasho C, Yamaguchi Y, Suzuki K. Dye terminator re-cycle-sequencing method: phage plaque direct sequencing. *Anal Biochem* 2001;297(1):102–5.
- [11] Auewarakul P, Antitontont U, Sornsathapornkul P, Tothong P, Kanyok R, Thongcharoen P. Antibody responses after dose-sparing intradermal influenza vaccination. *Vaccine* 2007;25(4):659–63.
- [12] Savitsky D, Calame K. B-1 B lymphocytes require Blimp-1 for immunoglobulin secretion. *J Exp Med* 2006;203(10):2305–14.
- [13] Wood JM, Dunleavy, Newman RW, Riley AM, Robertson JS, Minor PD. The influence of the host cell on standardisation of influenza vaccine potency. *Dev Biol Stand* 1999;98:183–8.
- [14] Lu B, Zhou H, Ye D, Kemble G, Jin H. Improvement of influenza A/Fujian/411/02(H3N2) virus Growth in embryonated chicken eggs by balancing the hemagglutinin and neromidasase activities, using reverse genetics. *J Virol* 2005;79(11):6763–71.
- [15] Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(16):9345–50.
- [16] Ozaki H, Govotkova EA, Li C, Xiong X, Webster RG, Webby RJ. Generation of high-yielding influenza A viruses in African green monkey kidney (Vero) cells by reverse genetics. *J Virol* 2004;78(4):1851–7.
- [17] Jin H, Zhou H, Liu H, Chan W, Adhikary L, Mahmood K, et al. Two residues in the hemagglutinin of A/Fujian/411/02-like influenza viruses are responsible for antigenic drift from A/Panama/2007/99. *Virology* 2005;336:113–9.
- [18] Kodihalli S, Justewicz DM, Gubareva LV, Webster RG. Selection of a single amino acid substitution in the hemagglutinin molecule by chicken eggs can render influenza A virus(H3) candidate vaccine ineffective. *J Virol* 1995;69(8):4888–97.
- [19] Romanova J, Katinger D, Ferko B, Vogluer R, Mochalova L, Bovin N, et al. Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology* 2003;307:90–7.
- [20] Katz JM, Wang M, Webster RG. Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus. *J Virol* 1990;64(4):1808–11.
- [21] Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, Skehel JJ, Wilson JA, Wiley DC. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* 1983;304:76–8.

- [22] Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the influenza virus haemagglutinin complex with its receptor, sialic acid. *Nature* 1988;333:426–31.
- [23] Rocha EP, Xu X, Hall HE, Allen JR, Regnery HL, Cox NJ. Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell- and egg-grown viruses. *J Gen Virol* 1993;74:2513–8.
- [24] Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 1981;289:366–73.
- [25] Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 1981;289:373–8.
- [26] Gerhard W, Tewdell J, Frankel ME, Webster R. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature* 1981;290:713–7.
- [27] Robertson JS, Bootman J, Newman R, Oxford JS, Daniels RS, Webster RG, et al. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A (H1N1) virus. *Virology* 1987;160:31–7.
- [28] Wood JM, Oxford JS, Dunleavy U, Newman RW, Major D, Robertson JS, et al. Influenza A (H1N1) vaccine efficacy in animal models is influenced by two amino acid substitutions in the hemagglutinin molecule. *Virology* 1989;171:214–21.
- [29] Katz JM, Webster RG. Efficacy of inactivated influenza A virus (H3N2) vaccines grown in mammalian cells or embryonated eggs. *J Infect Dis* 1989;160(2):191–8.
- [30] Govorkova EA, Kodihalli S, Alymova IV, Fanget B, Webster RG. Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. *Dev Biol Stand* 1999;98:39–51, discussion 73–4.
- [31] Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated). WHO Technical Report Series, No. 927, 2005.
- [32] Nicolson C, Major D, Wood JM, Robertson JS. Generation of influenza vaccine virus on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine* 2005;23:2943–52.

届け出が必要な疾患

カテゴリー	対象疾患	届出義務	届出期限→	
			届出先	措置
一類感染症 (全数届出)	1) エボラ出血熱 2) クリミア・コンゴ出血熱 3) 痘そう(天然痘) 4) 南米出血熱 5) ベスト 6) マールブルグ病 7) ラッサ熱	すべての医師	直ちに→ 保健所を通じ て都道府県知 事	患者は感染症指定医療 機関への入院が原則で、 就業制限も規定。 疑似患者および無症状 病原体保有者について も、届出・入院・就業 制限の規定あり。 消毒、動物駆除等の対 物措置可能。死体の移 動制限や火葬指示、給 水制限可能。 建物への立入り制限、 通行や交通制限等の措 置も可能。
二類感染症 (全数届出)	8) 急性灰白髄炎(ポリオ) 9) 結核 10) ジフテリア 11) 重症急性呼吸器症候群 (SARS コロナウイルス によるもののみ) 12) 鳥インフルエンザ (H5N1)	すべての医師	直ちに→ 保健所を通じ て都道府県知 事	患者は感染症指定医療 機関への入院が原則で、 就業制限も規定。一部 の疑似患者について、 届出・入院・就業制限 の規定あり。 無症状病原体保有者に ついては、届出と就業 制限は規定されるが、 入院規定なし。 消毒、動物駆除等の対 物措置可能。 死体の移動制限や火葬 指示、給水制限可能。
三類感染症 (全数届出)	13) コレラ 14) 細菌性赤痢 15) 腸管出血性大腸菌感染 症 16) 腸チフス 17) パラチフス	すべての医師	直ちに→ 保健所を通じ て都道府県知 事	患者の感染症指定医療 機関への入院は必須で はないが、就業制限の 規定あり。 疑似患者について、届 出や就業制限は規定な し。 無症状病原体保有者に ついては、届出と就業 制限が規定される。 消毒、動物駆除等の対 物措置可能。 死体の移動制限や火葬 指示、給水制限可能。
四類感染症 (全数届出)	18) E型肝炎 19) ウエストナイル熱(ウ エストナイル脳炎を含 む) 20) A型肝炎 21) エキノコックス症 22) 黄熱 23) オウム病 24) オムスク出血熱 25) 回帰熱 26) キャサナル森林病 27) Q熱 28) 狂犬病 29) コクシジオイデス症 30) サル痘 31) 腎症候性出血熱 32) 西部ウマ脳炎	すべての医師	直ちに→ 保健所を通じ て都道府県知 事	患者報告の届出のみ必 要で、感染症指定医療 機関への入院や就業制 限に関する規定なし。 疑似患者については規 定なし。 無症状病原体保有者に ついて、届出は必要で あるが、就業制限は規 定なし。 消毒、動物駆除等の対 物措置可能。

届け出が必要な疾患

カテゴリー	対象疾患	届出義務	届出期限→					
			届出先	措置				
四類感染症 (全数届出) (つづき)	33) ダニ媒介脳炎	すべての医師	直ちに→ 保健所を通じ て都道府県知 事	患者報告の届出のみ必 要で、感染症指定医療 機関への入院や就業制 限に関する規定なし。 疑似患者については規 定なし。 無症状病原体保有者に ついて、届出は必要で あるが、就業制限は規 定なし。 消毒、動物駆除等の対 物措置可能。				
	34) 炭疽							
	35) つつが虫病							
	36) デング熱							
	37) 東部ウマ脳炎							
	38) 鳥インフルエンザ (H5N1 を除く)							
	39) ニバウイルス感染症							
	40) 日本紅斑熱							
	41) 日本脳炎							
	42) ハンタウイルス肺症候 群							
	43) B ウイルス病							
	44) 鼻疽							
	45) プルセラ症							
	46) ベネズエラウマ脳炎							
	47) ヘンドラウイルス感染 症							
	48) 発しんチフス							
	49) ボツリヌス症 (乳児ボ ツリヌス症を含む)							
	50) マラリア							
	51) 野兔病							
	52) ライム病							
	53) リッサウイルス感染症							
	54) リフトバレー熱							
	55) 類鼻疽							
	56) レジオネラ症							
	57) レプトスピラ症							
	58) ロッキー山紅斑熱							
	五類感染症 (全数届出)				59) アメーバ赤痢	すべての医師	診断後 7 日以 内に→ 保健所を通じ て都道府県知 事	患者報告の届出のみ必 要で、感染症指定医療 機関への入院や就業制 限に関する規定なし。 疑似患者については規 定なし。 無症状病原体保有者は、 65) と 69) のみ報告が 必要。 消毒等の対物処置の規 定はなし。
					60) ウイルス性肝炎 (「18) E 型肝炎」, 「20) A 型肝 炎」を除く)			
61) 急性脳炎 (「19) ウエス トナイル脳炎」, 「32) 西 部ウマ脳炎」, 「33) ダニ 媒介脳炎」, 「37) 東部ウ マ脳炎」, 「41) 日本脳炎」, 「46) ベネズエラウマ脳 炎」, 「54) リフトバレー 熱」を除く)								
62) クリプトスポリジウム 症								
63) クロイツフェルト・ヤコ ブ病								
64) 劇症型溶血性レンサ球 菌感染症								
65) 後天性免疫不全症候群								
66) ジアルジア症								
67) 髄膜炎菌性髄膜炎								
68) 先天性風疹症候群								
69) 梅毒								
70) 破傷風								
71) バンコマイシン耐性黄 色ブドウ球菌感染症								
72) バンコマイシン耐性腸 球菌感染症								
73) 風疹								
74) 麻疹								

届け出が必要な疾患

カテゴリー	対象疾患	届出義務	届出期限→		措 置				
			届出先						
五類感染症 (定点届出)	75) RS ウイルス感染症	小児科定点医 療機関の担当 医師	週単位毎に→ 保健所を通じ て都道府県知 事		感染症発生動向調査事 業において定点と指定 されている医療機関は、 報告基準を参考に患者 と診断した者について、 届出を行う。 疑似患者や無症状病原 体保有者に関する規定 はなし。 消毒等の対物処置の規 定はなし。				
	76) 咽頭結膜熱								
	77) A 群溶血性レンサ球菌咽 頭炎								
	78) 感染性胃腸炎								
	79) 水痘								
	80) 手足口病								
	81) 伝染性紅斑								
	82) 突発性発しん								
	83) 百日咳								
	84) ヘルパンギーナ								
	85) 流行性耳下腺炎								
	86) インフルエンザ（「鳥イ ンフルエンザ」および 「新型インフルエンザ等 感染症」を除く）					小児科定点お よび内科定点 医療機関の担 当医師			
	87) 急性出血性結膜炎					眼科定点医療 機関の担当医 師			
	88) 流行性角結膜炎								
	89) 性器クラミジア感染症					性感染症定点 医療機関の担 当医師	月単位毎に→ 保健所を通じ て都道府県知 事		
90) 性器ヘルペスウイルス 感染症									
91) 尖圭コンジローマ									
92) 淋菌感染症									

届け出が必要な疾患

カテゴリー	対象疾患	届出義務	届出期限→	
			届出先	措置
五類感染症 (定点届出) (つづき)	93) クラミジア肺炎（「23）オウム病」を除く）	基幹定点医療機関の担当医師	週単位毎（ただし 97）、98）、99）については月単位毎）に→保健所を通じて都道府県知事	感染症発生動向調査事業において定点と指定されている医療機関は、報告基準を参考に患者と診断した者について、届出を行う。疑似患者や無症状病原体保有者に関する規定はなし。消毒等の対物処置の規定はなし。
	94) 細菌性髄膜炎（「67）髄膜炎菌性髄膜炎」を除く）			
	95) 無菌性髄膜炎			
	96) マイコプラズマ肺炎			
	97) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症			
	98) ペニシリン耐性肺炎球菌感染症			
	99) 薬剤耐性緑膿菌感染症			

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（2008年5月12日、一部改正）」に基づいて分類した。

- * 上記以外に、「新型インフルエンザ等感染症」「指定感染症」「新感染症」が、感染症法第6条に規定されている。たとえば、「12）鳥インフルエンザ（H5N1）」は、2008年5月に二類感染症となる以前の2年間は指定感染症であった。各種規定を運用しなければ国民の生命および健康に重大な影響を与えるおそれがあると考え、政令で定める期間各種規定を準用し、その発生およびまん延の防止を図ったのである。
- * 感染症指定医療機関：特定感染症指定医療機関（一類感染症、二類感染症、指定感染症、新感染症など）、第一種感染症指定医療機関（一類感染症、二類感染症、指定感染症など）、第二種感染症指定医療機関（二類感染症、指定感染症など）
- * 疑似患者：当該感染症の症状を有するが病原体診断の結果が未定の者
- * 無症状病原体保有者：当該感染症の病原体を保有しているが、症状を呈していない者

インフルエンザの疫学

—日本と世界のインフルエンザ—

中野 貴司*

Nakano Takashi

* 国立病院機構三重病院臨床研究部国際保健医療研究室長

要旨：感染症を論じる際に、疫学は欠かせない科学である。インフルエンザについては、疾患の頻度や病像、患者特性や生活習慣、発症の地域差や集積性、感染源や伝播経路を解析して、予防や治療に活用したい。国内のインフルエンザの流行には、地域や年による差異がある。輸送機関が発達し、国際間の交流が盛んになった現代においては、その検討対象を地球レベルにまで拡大して考える必要がある。人類の誰もか罹患するインフルエンザ、その制御策は重要である。

Key Words：インフルエンザ、疫学、抗原変異、ワクチン、新型インフルエンザ

I 「疫学」とは？

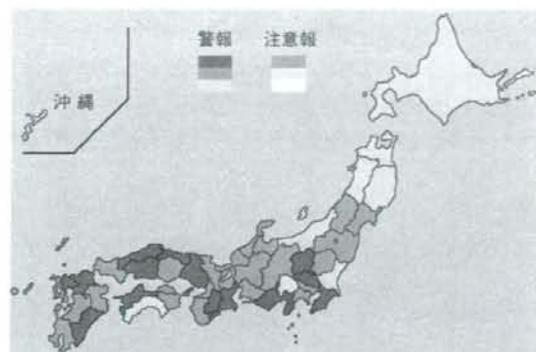
「疫学」という分野がカバーする領域は、どれくらいの範囲に及ぶのか。英語では“epidemiology”という単語に相当するが、辞書を開いて解説を読んでも、その意味をなかなか容易には理解しがたいのではないだろうか。

成書¹⁾によれば、「疫学」とは「明確に規定された人間集団の中で出現する健康関連のいろいろな事象の頻度と分布およびそれらに影響を与える要因を明らかにして、健康関連の諸問題に対する有効な対策樹立に役立てるための科学」と定義されている。国際疫学会(International Epidemiological Association)による“epidemiology”の定義は、“The study of the distribution and determinants of health-related status or events in specified populations, and the application of this study to control of health problems.”である。

小児看護, 31(1): 21-27, 2008.

インフルエンザは感染症、すなわちうつる病気であるが、感染症以外の疾患においても「疫学的解析」は保健医療対策を立案し実施するための大切な要素である。タバコは肺がんや心筋梗塞発症のリスクを増大させる、自ら喫煙する者のみならず受動喫煙にも害を及ぼす、塩分摂取量が多いと高血圧発症の頻度が高い、などはいずれも疫学が解き明かした偉大なる発見であり、私たちのより豊かな健康の維持に大きな恩恵をもたらしてくれた。小児期特有の疾患である川崎病は、欧米諸国と比べて日本人にその発症が多いことが疫学研究の結果判明している。数年前に世界を震撼させたSARSの流行時には、疫学的検討が日夜続けられた。

感染性疾患を対象とする「疫学」は、疾患の頻度や病像の特徴、患者の特性や生活習慣、発症の地域差や集積性、感染源や伝播経路を解析して、予防や治療に役立たせるための学問といえるであろう。以下、インフルエンザについて概説する。



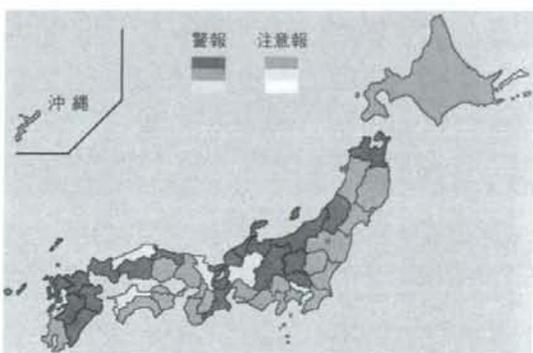
2006年第4週：1月23日～29日



2007年第4週：1月22日～28日



2006年第13週：3月27日～4月2日



2007年第13週：3月26日～4月1日

図1 ●インフルエンザ流行レベルマップ～2006年と2007年の比較(国立感染症研究所感染症情報センターホームページ²⁾より引用)

II 日本のインフルエンザ

わが国におけるインフルエンザの疫学については、国立感染症研究所感染症情報センターのホームページ²⁾で、詳細な解析が公開されている。

1. インフルエンザ流行の程度は？

わが国では厚生労働省による感染症サーベイランス事業が運営されている。全国で約5,000の内科や小児科の医療機関をインフルエンザ観測定点に指定し、受診したインフルエンザ患者の数を週ごとに報告するシステムであ

る。報告された患者数は、まず所轄保健所で集計され、その後、感染症情報センターへ集約することにより全国的な流行状況と地域による特徴が解析され、すぐに再度全国にフィードバックされるようになっている。

過去の患者発生状況をもとに算出した流行の基準値が設けられ、保健所ごとにその基準値を超えた場合には、インフルエンザ患者発生数が注意報や警報レベルを超えたことを知らせる仕組みとなっており、日本全国の流行状況が誰にでも迅速に把握できるように公開されている。

また、今シーズンのみならず、過去の流行レベルマップも掲載されており、年度別の比較も可能である。一例

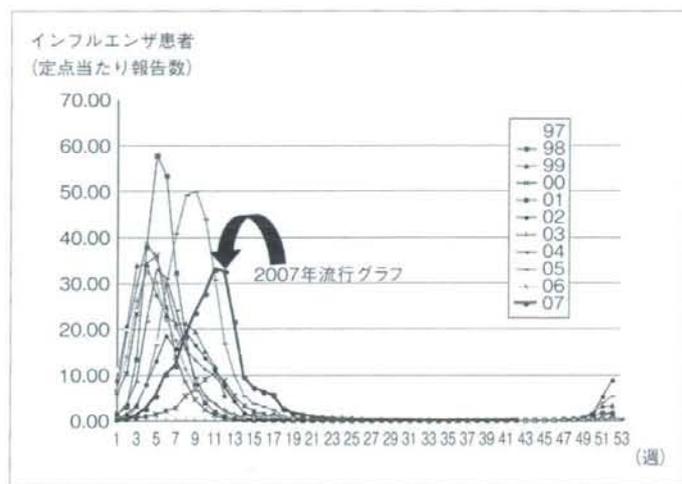


図2 ●週ごとのインフルエンザ報告数～2007年と過去10年間との比較(感染症情報センターホームページ²⁾より引用)

として、2006年と2007年の第4週と第13週の流行レベルマップをそれぞれ比較して図1に示した。地図が白抜きとなっている県は県内すべての保健所においてインフルエンザ流行が警報や注意報レベルを超えてない県、塗りつぶされている県は警報や注意報レベルを超えた保健所が存在する県である。

2006年第4週すなわち1月下旬は、日本全国でインフルエンザが流行中であった。全国の定点当たり報告数は32.4となり、注意報レベルを超えている保健所地域が233(43都道府県)、警報レベルを超えている保健所地域は287(44都道府県)であった。2006年の流行はこの第4週がピークであり、その後、徐々に患者報告数は減少した。第13週の3月末には、注意報レベルを超えている保健所地域は10(6道県)と減少し、警報レベルを超えている保健所地域はゼロとなった。すなわちこのころにはすでにインフルエンザ流行は終息に向かっていた。

それと比較して2007年は、流行の始まりが遅かった。2007年第4週の時点で、全国の定点当たり報告数は2.6で、2006年同時期の1/10以下であった。注意報レベルを超えている保健所地域は14(6県)、警報レベルを超えている保健所地域は1(1県)のみであった。しかし、本年の流行は春先まで持続した。2007年第13週、全国の定点当たり報告数は21.5であった。この時点でもま

だ警報レベルを超えている保健所地域が329(46都道府県)も存在していた。

感染症情報センターのホームページには、過去10年間の週ごとの患者報告数をグラフにした図も掲載されている。それを引用して図2に示すが、このグラフからも2007年は例年に比べて流行の始まりが遅く、春先まで患者発生が続いた年度であったことがよくわかる。

2. 流行のウイルス型は？

感染症情報センターのホームページからは、各シーズンの流行ウイルス型に関する情報も得られる。厚生労働省による感染症サーベイランス事業には、わが国で流行している感染症の原因はどのような病原微生物であるのかを調査する仕事も含まれており、各県においてインフルエンザ患者から分離されたウイルスのデータが感染症情報センターに集約され、解析されている。過去2シーズンに、各都道府県のインフルエンザ患者から分離されたウイルス型について、その分離数の集計と全体に占める割合を表1に示した。2007年は2006年と比較して、より多数例のB型インフルエンザの流行がみられたこと、両シーズンともA型インフルエンザについては、AH1(Aソ連型)よりAH3(A香港型)ウイルスがより流行していたことなどがわかる。

表1 ●過去2シーズンにわが国のインフルエンザ患者から分離されたウイルス型

	AH1	AH3	B	小計
2006年	1,375 (25.8%)	3,427 (64.3%)	527 (9.9%)	5,329
2007年	604 (12.0%)	2,392 (47.5%)	2,040 (40.5%)	5,036

(国立感染症研究所感染症情報センターホームページ²⁾のデータより作成)

表2 ●日本のインフルエンザワクチンに含まれるウイルス株

年	A型(H1N1)	A型(H3N2)	B型
1998	北京/262/95	シドニー/5/97	三重/1/93
1999	北京/262/95	シドニー/5/97	山東/7/97
2000	ニューカレドニア20/99	パナマ/2007/99	山梨/166/98
2001	ニューカレドニア20/99	パナマ/2007/99	ヨハネスバーグ/5/99
2002	ニューカレドニア20/99	パナマ/2007/99	山東/7/97
2003	ニューカレドニア20/99	パナマ/2007/99	山東/7/97
2004	ニューカレドニア20/99	ワイオミング/3/2003	上海/361/2002
2005	ニューカレドニア20/99	ニューヨーク/55/2004	上海/361/2002
2006	ニューカレドニア20/99	広島/52/2005	マレーシア/2506/2004
2007	ソロモン諸島/3/2006	広島/52/2005	マレーシア/2506/2004

3. ワクチンに含まれる株は、流行ウイルスに効果があるか?

インフルエンザウイルスの抗原性が変異しやすいことは、よく知られている。ワクチンとは、抗原の働きにより免疫反応を誘導し個体に抵抗力を付与する予防手段であるから、流行ウイルスに抗原変異が起り、ワクチンに含まれるウイルスの抗原性と大きくはずれてしまった場合は、接種しても流行ウイルスに対する十分な免疫を獲得できないことがある。

流行ウイルスの抗原性がワクチン株と一致しているのか、あるいはどの程度はずれているのかは、流行株とワクチン株に使用したウイルスをそれぞれフェレットに感染させ、その免疫血清に対するウイルス株の赤血球凝集抑制(HI)試験を行い、その反応の違いにより評価する。流行株とワクチン株に対するフェレット免疫血清のHI試験の結果と、ワクチン株とワクチン株に対するフェレット免疫血清の同結果の違いが4倍以内であれば、流行株はワクチン類似株と判定される。もし本結果が8倍以上離れていれば、ワクチン株と抗原性の異なるウイルスが流行していたということになる。

このような分離ウイルスの疫学的解析は、ワクチンに用いるウイルスタイプを決定することにも役立っている。例えばWHOは、2008年流行シーズンに備えて北半球諸国で2007年に製造するインフルエンザワクチンのAH1コンポーネントについて、それまで何年も使わ

れてきたニューカレドニア株に代わって、A/ソロモン諸島/3/2006に変更する勧告を出した(表2)。これは、全世界的な分離ウイルスの疫学解析の結果、これまでワクチン株として使用されてきたA/ニューカレドニア/20/99/H1N1株ウイルスとは抗原性が乖離したウイルスが出現してきており、今後、変異株が流行する可能性が指摘されたからである。わが国においても、2007年2月に福岡市で分離されたAH1型ウイルスの抗原性を解析した結果³⁾、抗原性がワクチン株と大きく異なるウイルスの割合が、分離AH1型ウイルスの半分近くを占めていた。すなわち日本も、流行ウイルスの世界的動向と一致して、これまでのワクチンに含まれていたニューカレドニア株ウイルスでは防御効果の乏しいAH1型ウイルスが流行する可能性が高く、ワクチンに用いるAH1ウイルスを変更することは理にかなっていることを裏付けているのである。

4. ワクチンウイルス株の選定

地球は赤道を挟んで北半球と南半球に分かれ、冬と夏の季節は逆転している。温帯地方でインフルエンザが流行するのは冬季である。世界的には、WHOの専門会議で来るべき次シーズン用のインフルエンザワクチンに用いる株が毎年2回選定される。そしてわが国は、WHO推奨株を参考にして、日本における流行状況も考慮して毎年5～6月ごろにワクチン株を決定する。

また、ワクチンは来シーズンに備えて一気に大量に生

産される。したがって、製品安定供給のことを考えれば、卵での増殖が良好なことや継代培養による抗原性の変化がないことなども株選定の大切な条件となる。このようにして決定されたわが国の近年のインフルエンザワクチン株を表2に示す。インフルエンザウイルスの名前は、そのウイルスが初めて分離された(「初めて流行した」ではない)土地の名称がつけられており、例えば「A/広島/52/2005(H3N2)」は「2005年に広島で52番目に分離されたA香港型(H3N2)のウイルス」という意味である。数年続けて同一の株が選定されることもあれば、1シーズンのみで変更される株もある。実際に流行しているインフルエンザの疫学データを解析して、その結果に基づいたより有効なワクチンを世に出す努力が毎年継続されているわけである。

III 世界のインフルエンザ

1. 過去に起こったインフルエンザ大流行

私たち人類は、これまでにおよそ10~40年くらいの周期で、新型インフルエンザウイルスの出現による大流行を経験している。20世紀になってから報告されているものを、参考文献⁴⁾から引用したその被害状況と併せて表3に示した。新型のウイルスであれば、当然誰もが免疫を有しないわけであるから、その健康被害は甚大なものとなる。

しばしば紹介されるのは、1918年から翌年にかけて発生した「スペインかぜ」の流行であろう。時はおりしも第一次世界大戦の最中であつたが、世界中で5億人が罹患し、2,500万人以上が死亡したともいわれている。当時の記録では、高齢者や乳幼児などハイリスク群の罹患のみではなく、青壮年層の患者が目立ち20~30歳代にかけて死亡者のピークがあつたとされているが、この理由はわかっていない。インフルエンザの流行として明らかな記録が残るものの中では、最大の被害を出したウイルスである。当時はまだウイルス分離の技術が確立していなかったため、スペインかぜウイルスは世界中のどこにも保存されていない。しかし、その後の遺伝子工学の発展により、当時の犠牲者の肺組織からPCR法により

表3 ●20世紀以降に世界で流行した新型インフルエンザ

1918年	スペインかぜ(H1N1)	世界中で5億人が罹患し、2,500万人以上が死亡。 日本では感染者2,300万人、死者39万人。
	(39年間隔)	
1957年	アジアかぜ(H2N2)	日本での罹患者98万人、死者7,000人。
	(11年間隔)	
1968年	香港かぜ(H3N2)	日本での罹患者14万人、死者2,000人。
	(40年間隔?)	
2008年?	新型パンデミック?	

ウイルス遺伝子を復元する試みが行われた。その結果、スペインかぜの病原体であるH1N1インフルエンザウイルスは、HA遺伝子の一部分がトリのものに類似であることも判明した⁴⁾⁵⁾。

2. 新型インフルエンザ対策とトリインフルエンザH5N1

WHOは、全世界を網羅するインフルエンザサーベイランスのネットワーク構築をめざしている。専門研究を実施する機関と併せて、各国に流行ウイルスの分離や解析を担当する観測定点の設置をすすめている観測定点からの情報は、現在使用されるインフルエンザワクチン用の毎年のウイルス株選定にも役立っているが、本ネットワークの果たす役割として、新型ウイルス出現を監視することやパンデミック発生への備えも期待されている。

近年問題となっている高病原性トリインフルエンザウイルスH5N1のヒトへの感染が初めて報告されたのは、1997年香港においてであった。その後、アジアさらには世界各地で、本ウイルスによる家禽や鳥類でのアウトブレイク、さらにはヒトへの感染事例が相次いで報告されている。現時点では、いまだヒトからヒト間での感染伝播は通常は起こらない状態であるが、変異によりヒトからヒトへ感染するウイルスになる可能性は十分にある。現在報告されている患者は病鳥との接触歴のある者が多いが、2007年10月の時点でWHOが発表している世界の患者発生状況を表4に示す。最近40年間発生して

表4 ●高病原性トリインフルエンザ H5N1によるヒト患者数

	2003		2004		2005		2006		2007		合計	
	確定数	死亡数	確定数	死亡数								
アゼルバイジャン	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	8	5
カンボジア	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	7	7
中国	1	1	0	0	8	5	13	8	3	2	25	16
ジブチ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
エジプト	0	0	0	0	0	0	18	10	20	5	38	15
インドネシア	0	0	0	0	20	13	55	45	33	29	108	87
イラク	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	3	2
ラオス人民民主共和国	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
ナイジェリア	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
タイ	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	25	17
トルコ	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	12	4
ベトナム	3	3	29	20	61	19	0	0	7	4	100	46
合計	4	4	46	32	98	43	115	79	67	44	330	202

* 確定例数には死亡例数も含む。なお、ウイルス学的検査により確定診断された例のみを患者数として算定した。
(WHOによる発表、2007年10月8日現在)

(http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2007_10_08/en/index.htmlより引用して作成)

いない新型インフルエンザウイルスによる大流行、すなわちインフルエンザパンデミックが近未来に起こるのか(表3)。また、その流行ウイルスがH5N1由来のものになるのかは定かではない。しかし、現時点における世界の患者発生状況を考慮すれば、H5N1ウイルスに対する備えは健康危機管理対策の一つとして不可欠である。

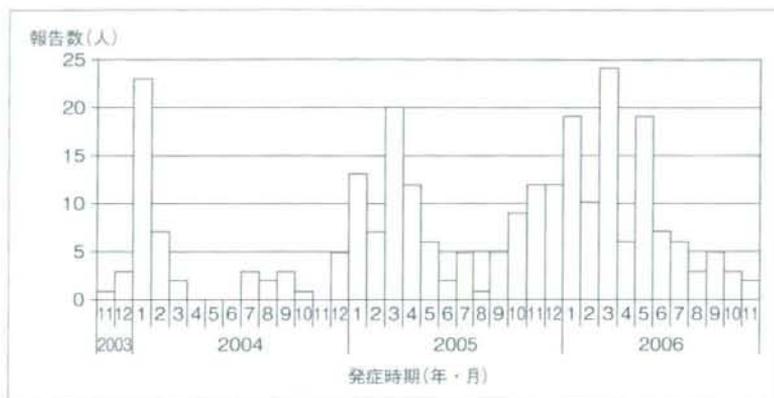
3. H5N1型ウイルスの疫学

本稿では現在までにわかっているH5N1型ウイルスの疫学的事項についてWHOの資料⁹⁾をもとに紹介する。患者の発症時期を図3に示す。北半球のアジア地域で患者報告が多いせいか、日本の冬に相当する時期の発症が最も目立つが、年間を通じて患者は発生している。従来から、温帯地域におけるインフルエンザ流行期は冬季であるが、亜熱帯地域では年間を通じてウイルスが分離されることが報告されている。今後のパンデミック対策を考えるうえで、忘れてはならない事項である。

患者の年齢分布を図4に示す。小児や20歳未満の若年層の患者が最も多く、次いで20歳代、30歳代の順である。現状ではH5N1型ウイルスによる患者発生はいくつかの国に限定されており、その国の年齢別人口分布、生活習慣上トリとの接触が多い年齢層なども患者年齢と関連するであろうが、かつて世界を震撼させたSARSにおいては小児患者の発生がほとんどなかったことと対比すると、原因病原体により患者年齢に差異があることは制御策を講じるうえで重要である。

4. 世界のウイルスサーベイランスとパンデミック対策

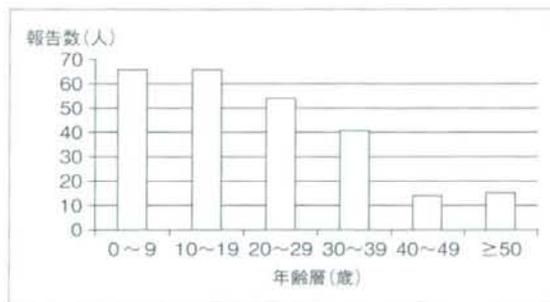
すでに日本を含むいくつかの国で、H5N1型ウイルスを用いてパンデミック用ワクチンのヒトを対象とした臨床研究が行われている。しかし、インフルエンザウイルスは抗原変異を起こすわけであるから、パンデミックが発生したときにはすでに現在のウイルスから抗原性が変化している可能性が高い。したがって、現在開発中のワ



(WHO: WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection, 25 November 2003-24 November 2006. Weekly Epidemiological Record, 82(6): 41-47, 2007. より改変して作成)

(2003年11月25日～2006年11月24日)

図3 ●高病原性トリインフルエンザ H5N1によるヒト患者の発症時期



(WHO: WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection, 25 November 2003-24 November 2006. Weekly Epidemiological Record, 82(6): 41-47, 2007. より改変して作成)

(2003年11月25日～2006年11月24日)

図4 ●高病原性トリインフルエンザ H5N1によるヒト患者の年齢分布

ワクチンは「プレパンデミックワクチン」と呼ばれ、製造手法などは応用が可能であるが、ウイルス自体は実際にパンデミックになったときのものを用いる必要がある。ただし、日常からウイルスのタイプを監視していない限り、どのウイルスが大流行を起こしたのかを早急に察知する

ことはできない。全世界を網羅するウイルスサーベイランスのネットワークを設け、日常から分離ウイルスの疫学的検討を行っていくことは、パンデミック対策としても大切である。

●参考文献●

- 1) 佐々木敏: 疫学とは何か, 日本疫学会・監修, 田中平三, 能勢隆之・総編集, 初めて学ばやさしい疫学, 南江堂, 東京, 2002, pp. 1-7.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センターホームページ: <http://idsc.nih.go.jp/disease/influenza/index.html>
- 3) 岡本道子, 近江彰, 千葉ふみ子, 他: 2007年2月に福岡市の複数医療機関で採取された検体から分離されたAH1亜型ウイルスの抗原性; 今後の抗原変異株の流行の可能性について, IASR, 28(4)(No. 326): 111-112, 2007.
- 4) 清水文七: 変遷する感染症, 感染症とどう闘うか, 東京化学同人, 東京, 2004, pp. 5-36.
- 5) Taubenberger, J. K.: Seeking the 1918 Spanish influenza virus. American Society for Microbiology News, 65: 473-478, 1999.
- 6) WHO: WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection, 25 November 2003-24 November 2006. Weekly Epidemiological Record, 82(6): 41-47, 2007.

インフルエンザワクチンの有用性

中野貴司¹⁾

[SUMMARY] ワクチンの有用性は、有効率と安全性とにより評価される。現行の不活化インフルエンザワクチンは、高齢者に対して死亡回避 80% 以上、罹患予防 30~50% 台の有効率であり、米国のデータとはほぼ一致する。小児に対しても統計学的に有意に罹患予防効果があるが、わが国の全国多施設共同研究では有効率 20% 台であった。今後さらに有効なワクチンの開発が待たれるが、現行ワクチンの副反応は全年齢層で概ね軽微であり、インフルエンザ特異的な予防手段として有効に活用したい。〔臨床検査 52: 53-56, 2008〕

[KEYWORDS] インフルエンザワクチン、有効率、副反応

はじめに

1. ワクチン有用性の指標

ワクチンの有用性は、その効果と安全度により評価される。ワクチンは病気を予防するための手段であり、接種によりどれくらい発症を予防あるいは重症化を防ぐことができるかが効果を判定する基準である。また、効果が高いことと合わせて、安全性が保証されなければ良いワクチンとはいえない。すなわち接種により生じる副反応の頻度や程度は最小限であることが望ましい。

2. 有効率を計算する方法

ワクチンの発病予防効果(有効率)は、非接種群における発病率 $[p_0]$ と接種群における発病率 $[p_1]$ から、表 1 のような四分表を用いて計算される¹⁾。ワクチン有効率は、計算式 $[(p_0 - p_1) /$

表 1 インフルエンザワクチンによる発病予防効果(ワクチン有効率)を算出するための四分表と計算式

		インフルエンザ ワクチン接種		計
		あり	なし	
インフルエンザ発病	あり	a	b	m_1
	なし	c	d	m_0
計		n_1	n_0	N

ワクチン非接種群における発病率: $p_0 = b/n_0$

ワクチン接種群における発病率: $p_1 = a/n_1$

ワクチン有効率: $(p_0 - p_1) / p_0 = 1 - p_1/p_0$

相対危険: p_1/p_0

$p_0]$ によって求められるが、この式は $[1 - p_1/p_0]$ と変形することができ、 $[p_1/p_0]$ は相対危険 (relative risk; RR) と呼ばれる。すなわち、1 から相対危険を差し引いた値がワクチン有効率となる。

この計算式からわかるように、“有効率 70%” という表現は“100 人に接種すれば 70 人は発病しない”という意味ではなく、“ワクチンを接種せずに発病した人の 70% は、接種をしていれば発病を回避できた”という意味である¹⁾。

接種したワクチンが統計学的有意差をもって有効かどうかを論じる際には、さらに検定・区間推定・95% 信頼区間の計算などを行う必要がある。これら詳細については、文献¹⁾や統計学に関するテキストをご参照いただきたい。

1) NAKANO Takashi 国立病院機構三重病院 臨床研究部国際保健医療研究室・室長

表2 不活化インフルエンザワクチンの有効率—日米の比較

対象者	国名	指標	有効率*
高齢者	日本	死亡回避 罹患予防	80% 以上 34~55%
	米国	死亡回避 入院回避 罹患予防	80% 50~60% 30~40%
65歳未満健康常成人	米国	罹患予防	70~90%
6歳未満小児	日本	罹患予防	22~25%

*文献2, 3, 5)より

インフルエンザワクチンの有効率

1. 高齢者

2001年11月にわが国で高齢者に対するインフルエンザワクチン接種が法制化される根拠となった厚生科学研究の結果²⁾を紹介する。全国の老人福祉施設・病院に入所・入院している65歳以上の高齢者で、インフルエンザワクチン接種群(接種希望者に対して流行シーズン前に1回接種)と非接種群(接種を希望しなかった者)を対象として、インフルエンザ流行期の罹患状況調査を多施設共同研究として実施した。比較的大きなインフルエンザ流行があった1998/99シーズンを解析した結果、65歳以上の施設入所者では、予防接種を受けることにより、死亡のリスクが0.2以下(有効率80%以上)、発病のリスクが0.45~0.66(有効率34~55%)に減少していた(表2)。

海外でも、高齢者に対する不活化インフルエンザワクチンの有効率はほぼ同様の成績である。米国の要約³⁾では、65歳以上の高齢者における罹患予防効果は30~40%、死亡回避は80%で、わが国の結果と一致する。入院回避については50~60%の有効率としている(表2)。これらのデータに基づき、米国では50歳以上の者に対して不活化インフルエンザワクチンの接種が推奨されている。

2. 小児

同一プロトコルを用いた全国の小児科医療機関による多施設共同研究が厚生労働科学研究として実施された^{4,5)}。インフルエンザ流行前に6歳

未満児をワクチン接種群(接種希望者)と非接種群(接種者1名ごとに、以降の連続した受診患児)にエントリーし、接種群には規定量のワクチンを原則4週間間隔で2回接種した。インフルエンザ流行期を通じて、児の症状(発熱、鼻汁、咳など)を調査書式ハガキ返送により毎週調査し、2000(平成12)年度2,337例、2001年度2,612例、2002年度2,913例を解析した。

インフルエンザワクチンによる発病阻止効果を、多変量解析によりオッズ比を計算した結果、ワクチン接種によりインフルエンザ流行期における発熱リスクは0.7台(調整オッズ比0.75~0.78)に減少し、各年度とも統計学的有意差があった。すなわち、ワクチンの有効率は22~25%という結果であった。

3. 有効率をもっと高い?

本稿で紹介した研究^{2,4,5)}では、発病阻止効果(有効率)を解析する結果指標として、インフルエンザ流行期の発熱を用いている。その理由は、すべての調査対象者の発熱機会にウイルス分離や迅速診断を漏れなく実施することは現実的には不可能だからである。インフルエンザは季節・地域流行する傾向が著しい疾患であるから、流行期における発熱者を「インフルエンザ」と定義し解析したわけである。

しかし、インフルエンザが流行する冬季は、RSウイルスなど、他のウイルス感染症の患者も多い。そうすると、評価に用いた「インフルエンザ様疾患」には「冬季の非インフルエンザ性発熱疾患」が相当数含まれているであろう。すなわち、本調査で得られた結果はワクチンによる発病防止効果を過小評価している可能性があり、不活化インフルエンザワクチンの有効率をもっと高いのかもしれない。

4. 現行ワクチンの弱点

現在わが国で使用されているのは、ウイルスの赤血球凝集素(hemagglutinin: HA)蛋白を主成分とする注射用不活化ワクチンである。本ワクチンは、流行するインフルエンザウイルス株の抗原性がワクチン株と合致しない場合は効果が乏しい、注射製剤であるため気道粘膜免疫の誘導が不十分である、など効果の限界がもともと存在することは指摘されている。

表3 不活化インフルエンザワクチンの年齢別1回接種量と接種回数
の規定一日米の比較

国	接種対象者の年齢	1回接種量	接種回数
日本	1歳未満	0.1 ml	2回
	1歳以上6歳未満	0.2 ml	2回
	6歳以上13歳未満	0.3 ml	2回
	13歳以上	0.5 ml	1回または2回
米国	6か月以上3歳未満	0.25 ml	1回または2回*
	3歳以上9歳未満	0.5 ml	1回または2回*
	9歳以上	0.5 ml	1回

*米国では9歳未満小児であっても、過去に接種歴があれば接種回数は1回で可。

また、過去にインフルエンザ罹患歴がなく、免疫機構が未成熟な年少児において、現行の不活化ワクチンで十分な防御免疫を誘導できるのかはしばしば議論され⁶⁾、特に乳児などでは抗体反応が不良という報告もある⁷⁾。

5. 乳児における有効率は低い?

厚生労働科学研究⁵⁾において、1歳以上ではワクチン接種により流行期の発熱リスクが各年度とも有意に減少していたが、1歳未満児では有意差がなかった。登録された1歳未満児が少数であったため最終結論にはいたれないとしているが、注目すべき事実である。年齢階級別に解析した結果⁸⁾でも「2歳以上の小児ではワクチン有効率が33%であったのに対して、1歳未満児や1歳児ではワクチン接種による有効性が検出されなかった」と報告されており、低年齢児での発病予防効果に劣る可能性がある。

ただし、不活化ワクチンの年齢別接種量に関して日米間で大きな差異がある(表3)こともしばしば議論される。1回接種量が少ないために低年齢児での免疫付与が不良であるのかどうかについてさえいまだ定かでないが、今後検討が必要な事項である。

6. 新しいインフルエンザワクチン

注射用不活化ワクチンの弱点を克服するために、新しいワクチンも開発されている。残念ながら国内ではまだ入手できない。

1) 経鼻弱毒生ワクチン

鼻内噴霧用の低温馴化三価弱毒生ワクチン(商品名:FluMist[®])は、2003年に米国で認可された。鼻腔内に限局した感染を起こし、体温の高い下気道には侵入しない。免疫効果については、血

表4 インフルエンザワクチン接種後に観察された有害事象

		65歳以上高齢者*	6歳未満小児**
発熱	37.5℃以上	0.5~1.3%	2.7~4.6%
	38.0℃以上		1.3~2.8%
	39.0℃以上		0.2~1.4%
接種部位	発赤	8.8~17.6%	10.6~18.9%
	疼痛	1.3~3.0%	—
	硬結	—	7.6~12.0%
	腫脹	2.8~6.6%	6.6~11.4%

*文献2)より

**文献5)より

中抗体、気道局所免疫とも上昇が認められる^{9,10)}。流行株とワクチン株の抗原性が一致しなかったシーズンでも80~90%の有効率が報告された¹¹⁻¹³⁾ことは、注目に値する。現状で副反応が強いという報告はないが、米国での接種対象は5歳以上50歳未満の健常者であり、インフルエンザが重症化しやすいハイリスクグループに対しては、従来の不活化ワクチンが推奨されている。

2) 経鼻不活化ワクチン

インフルエンザウイルスの侵入門戸である気道粘膜の免疫を直接高める経鼻不活化ワクチンへの期待は、以前から大きい。アジュバントとして大腸菌易熱性毒素(heat-labile toxin:LT)を添加したワクチンが、2000/01流行シーズンにスイスで導入され、その効果が期待された。しかし、顔面神経麻痺発症のリスクが対照群より19倍高いと報告され、安全性の問題から使用が中止された¹⁴⁾。今後、さらに安全かつ有効な経鼻不活化ワクチンの実用化に期待したい。

副反応

1. 高齢者

厚生科学研究²⁾では、接種後48時間以内の副反応について調査が行われた。その結果、37.5℃以上の発熱0.5~1.3%、発疹0~0.6%、接種局所の発赤8.8~17.6%、疼痛1.3~3.0%、腫脹2.8~6.6%などが観察されたが、頻度や程度とも軽微であり重篤な副反応は認められなかった(表4)。

2. 小児

小児の全国多施設研究⁵⁾でも、接種後48時間以内の全身および局所症状に関して、調査書式ハガキの返送により副反応調査を行った。発熱が観察された例は、37.5℃以上2.7~4.6%、38.0℃以上1.3~2.8%、39.0℃以上0.2~1.4%であった。高齢者より発熱の頻度が高いが、もともと小児は発熱性疾患に罹患する頻度が高いためとも考えられる。接種局所の変化は、発赤10.6~18.9%、硬結7.6~12.0%、腫脹6.6~11.4%で、それぞれの症状はいずれも軽微であった(表4)。

おわりに

現行の不活化インフルエンザワクチンが有意差をもってインフルエンザ罹患を防ぐことは明らかである。ただし年齢による差があり、最も有効率が高いのは働き盛りの健康成人で、高齢者や小児ではそれより劣る。接種後の副反応は全年齢層において軽微であり、安心して使用できるワクチンと考える。有効率の点で今後さらに改良が必要ではあるが、インフルエンザ特異的な予防手段として有効に活用したい。

文 献

1) 廣田良夫：インフルエンザワクチンの有効性一点推

- 定と区間推定。小児感染免疫 18: 283-291, 2006
- 2) 平成9~11年度厚生科学研究(新興、再興感染症研究事業)報告書：インフルエンザワクチンの効果に関する研究(主任研究者：神谷齊)
- 3) CDC: Chapter16: Influenza. In: National Immunization Program Pink Book 9th ed, CDC, Atlanta, pp 233-253, 2006
- 4) 平成11年度厚生科学研究(新興、再興感染症研究事業)報告書：幼児等に対するインフルエンザワクチンの有効性、安全性に関する基礎的研究(主任研究者：廣田良夫)
- 5) 平成12~14年度厚生労働科学研究(新興、再興感染症研究事業)報告書：乳幼児に対するインフルエンザワクチンの効果に関する研究(主任研究者：神谷齊、加地正郎)
- 6) 中野貴司：乳幼児におけるインフルエンザワクチンの免疫効果。小児科 45: 1537-1542, 2004
- 7) 入江伸、藤枝恵、伊藤一弥、他：4歳未満児における不活化インフルエンザワクチンに対する免疫応答。感染症誌 81: 284-290, 2007
- 8) Fujieda M, Maeda A, Kondo K, et al: Inactivated influenza vaccine effectiveness in children under 6 years of age during the 2002-2003 season. Vaccine 24: 957-963, 2006
- 9) Kemble G, Greenbert H: Novel generations of influenza vaccines. Vaccine 21: 1789-1795, 2003
- 10) Harper SA, Fukuda K, Cox NJ, et al: Using live, attenuated influenza vaccine for prevention and control of influenza. MMWR 52(RR13): 1-8, 2003
- 11) Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, et al: The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. N Engl J Med 338: 1405-1412, 1998
- 12) Belshe RB, Gruber WC, Mendelman PM, et al: Efficacy of vaccination with live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine against a variant (A/Sydney) not contained in the vaccine. J Pediatr 136: 168-175, 2000
- 13) Treanor JJ, Kotloff K, Betts RF, et al: Evaluation of trivalent live, cold-adapted (CAIV-T) and inactivated (TIV) influenza vaccines in prevention of virus infection and illness following challenge of adults with wild-type influenza A(H1N1), A(H3N2), and B viruses. Vaccine 18: 899-906, 1999
- 14) Mutsch M, Zhou W, Rhodes PR, et al: Use of the Inactivated Intranasal Influenza vaccine and the Risk of Bell's Palsy in Switzerland. N Engl J Med 350: 896-903, 2004

各論

インフルエンザ

中野 貴司 国立病院機構三重病院小児科
なかの たかし

キーポイント

インフルエンザは誰もが罹患する疾患であるからこそ、院内感染予防のために、手洗いや咳エチケットなど標準的な予防策を日頃から徹底したい。疾患特異的な対策として、流行シーズン前の予防接種が有効である。重症化ハイリスク者が感染源と濃厚に接触した場合は、抗インフルエンザウイルス薬の予防投与も選択肢である。

はじめに

インフルエンザの流行期には、あらゆる世代の人たちが本疾患に罹患する。特に小児では、学校や保育園が流行増幅の集団となることもあり、多くの患者発生をみる。例えば、たまたま虫垂炎や気管支喘息など非感染性の疾患で入院したとしても、その時はインフルエンザ潜伏期であり入院数日後に発熱をきたす場合もある。このような患者が発端者となって、院内での感染が拡大する。

また、ありふれた疾患であるからこそ、面会者や医療従事者がインフルエンザに罹っていることもしばしばあり、周囲の成人から小児患者へ感染伝播が起こる。

そして、インフルエンザは通常の感冒とは異なり重篤な疾患である。熱性けいれんや肺炎の合併、さらにはインフルエンザ脳症、ライ症候群、心筋炎など大きな健康被害につながる可能性もあり、院内感染によってもたらされる影響は甚大である。本稿では、インフルエンザという疾患の特徴を考慮した感染源、感染経路、感受性者対策について概説する。

潜伏期・伝播様式

潜伏期と伝播期間¹⁾

インフルエンザの潜伏期は、通常1~4日で平均2日といわれる。発症の24時間前から他の者に感染させるリスクがある。

患者からのウイルス排出は、発症後3日間がもっとも多く、7日間程度持続する。乳幼児や免疫不全宿主が罹患した場合は、ウイルス排出期間がより長いといわれる。

伝播様式

通常の感染経路は飛沫感染である。気道分泌物や唾液に存在するインフルエンザウイルスの直接飛沫により感染するので、感染源と1m以上の距離が開いていれば伝播リスクは低い。複数病床の病室では、ベッドの距離に注意したい。

ただし、インフルエンザウイルスは環境表面でも一定期間は生き延びるといわれる。したがっ

連絡先：国立病院機構三重病院小児科
〒514-0125 三重県津市大里窪田町 357