

DPT, Hib, PCV7 ワクチンの同時接種による死亡例が報告され各ワクチンの単独, 同時刺激によるサイトカイン産生能を検討した。3ヶ月から7歳までを対象に平均値と95%CIを図7に示した。

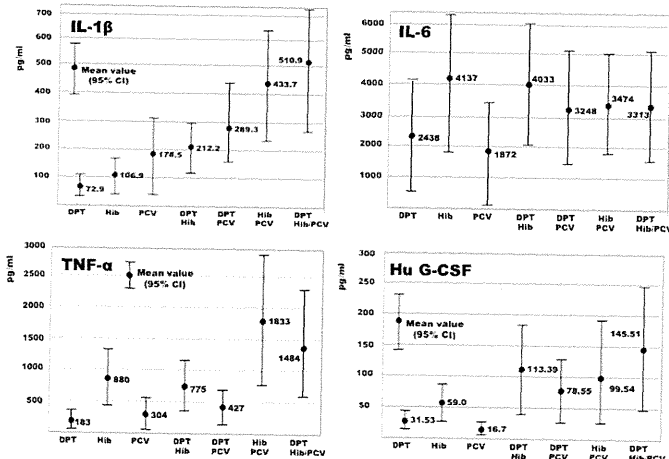


図7. ヒト末梢リンパ球のIL-1β, IL-6, TNF-α, G-CSF産生能

PCV7 単独刺激では DPT, Hib の単独刺激よりも高い IL-1β を誘導し PCV 単独刺激では DPT+Hib 同時刺激と同じレベルのサイトカインを誘導した。PCV を含む同時刺激で IL-1β 産生能は増加した。Hib は高い IL-6 を誘導し同時刺激で産生能は増強する事はなかった。TNF-α, G-CSF 産生に関しては Hib による刺激は DPT, PCV7 よりサイトカイン誘導能が高く、同時刺激, 特に Hib+PCV7, DPT+Hib+PCV7 で産生能は増強した。

### 8) 同時接種後発熱例の血清中サイトカイン

ワクチン接種の当日 24 時間以内に発熱を認め 48 時間以内に得られた血清 52 例と、ワクチン接種後に発熱を認めなかった 20 例を対象として血清中のサイトカインを測定した。得られた血清の背景として接種されたワクチンの組み合わせは DPT/Hib/PCV7 を含んだ同時接種例が 25 例、Hib/PCV7 を含めた組み合わせが 10 例、PCV7 単独接種例が 9 例と PCV7 がらみの接種が 51 例で、残りの 1 例は日本脳炎ワクチンの単独接種例であった。コントロールとして DPT/Hib/PCV7 接種後 5 例、Hib/PCV7 接種後の 6 例を含めて接種後発熱を認めなかった 20 例の血清が接種 48 時間以内に採取された。得られた血清を human cytokine panel 17 plex を用いて測定し IL-1β, IL-6, G-CSF, TNF-α の平均値を表 4 に示した。

表4. ワクチン接種後血清のサイトカイン

	IL-1β	IL-6	G-CSF	TNF-α
	0.84	29.93	67.07	
+	(0.47-1.2)	(18.96-34.91)	(36.08-98.07)	12.89 (4.77-21.00)
--	0.93	23.23	9.01	17.44
	(0.3-1.57)	(7.59-38.86)	(5.11-12.9)	(1.17-33.72)

リンパ球培養では複数のワクチン刺激で IL-1β は高値を示したが、接種後血清では発熱例において 0.84pg/ml と発熱(-)群と有意差は認められなかった。同様に IL-6, TNF-α にも有意差は認めなかった。一方、G-CSF は発熱群で 67.07pg/ml と発熱を認めなかった群 (9.01pg/ml) より高値を示した。

### D. 考察

ワクチン接種による獲得免疫の誘導には自然免疫系への刺激が必須であり自然免疫系への刺激は IFN-α/β 以外に IL-1β, IL-6, TNF-α の炎症性サイトカインが引き金となることが知られている。ヒト末梢リンパ球を H5N1 split, H5N1 WIV, H5N1 WIV+Alum ワクチン抗原で刺激し産生されるサイトカインプロファイルを検討した。Alum 単独でのサイトカイン誘導能はコントロールと同様で炎症性サイトカインの誘導は認めなかった。H5N1 WIV 刺激で IL-1β, IL-6, TNF-α 産生量が増加し、Alum 刺激で IL-1β 産生を増強し他の炎症性サイトカイン産生能は H5WIV 刺激と同じレベルであった。

IL-1β, IL-6 といった炎症性サイトカインは MHC II に提示される抗原と同時に認識される co-stimulatory molecule の発現を高めることで CD4 陽性の helper T 細胞に認識されやすくなり Th2 型の免疫応答を誘導することになる。一方、IFN-α/β は MHC I とともに認識される co-stimulatory molecule の発現を誘導することで CD8 陽性の CTL 活性を誘導することになる。H5N1 全粒子不活化+アラムアジュバントワクチンで小児での高い発熱率と免疫応答は WIV+Alum 製剤が自然免疫系を刺激することで産生された炎症性サイトカインによるものであることが推察された。

マウスにおいては IgG2 subclass 抗体の存在は Th1 応答を示唆するものであり IgG1 は Th2 優位の反応と考えられている。ヒトにおいては厳密には Th1, Th2 応答が区別されてなく IgG1 は Th1, Th2 応答で IgG4 が Th2 応答と考えられている。今回、

解析した H5 パンデミックワクチンの小児臨床試験の結果は成人の結果と比較して良好な中和抗体を誘導しており IgG subclass の解析でも接種後 IgG1 EIA 抗体では 34.7%, IgG4 は 21.8% が 4 倍以上の抗体反応を示した。一方、2009 パンデミックの自然感染時では IgG1 が 79.2%、IgG4 が 45% に検出され、2009 パンデミックワクチンでは IgG1 抗体は 41.8% において 4 倍以上の EIA 抗体反応を認めたが IgG4 EIA 抗体の反応は認めなかった。サイトカイン応答の検討ではスプリットワクチン製剤によるサイトカイン誘導は低く MHC と共に認識される co-stimulatory molecule の発現が低く CD4 helper T 細胞に認識され難いため T 細胞依存性の抗体の産生が認められ難いものと考えられる。H5WIV ではこうした炎症性サイトカインが産生され Th2 応答が誘導され H5N1WIV+Alum のワクチン製剤では更に IFN- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  産生の増加が認められ Th1/Th2 双方への刺激が入り、2009 パンデミック自然感染に近い応答を誘導したものと考えられる。

H5N1WIV+Alum 製剤は自然感染に近い免疫応答を示しているものと考えられサイトカインの産生が免疫応答を誘導すると共に発熱にも関係しているものと考えられる。

IgG subclass 抗体誘導パターンは Th1 と Th2 のバランスを反映しておりサイトカイン産生が免疫応答を調節しておりワクチンの immunogenicity と immunotoxicity としての発熱は表裏一体の反応としてワクチンの成分・アジュバントの自然免疫への刺激が関与している。WIV は粒子内の RNA が TLR7 のリガンドとして働き IFN- $\alpha$  を誘導し Alum は Inflammasome の NOD like receptor を刺激し IL-1 $\beta$  を誘導する。H5N1 WIV+Alum 接種で発熱をきたし良好な免疫応答を示した小児の発熱時の血清サイトカイン profile を調査することが直接的な関連性を証明することになるが、発熱時の血清は採取されてなく関連性を推測するにすぎない。今回のサイトカインの産生と IgG subclass 抗体の解析から H5N1WIV+Alum が IFN- $\alpha$  と共に IL-1 $\beta$  ならびに IL-6, TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを誘導し Th1, Th2 双方の免疫応答を誘導していることが推定された

H5N1 インフルエンザワクチンのサイトカインの研究の結果、ワクチン製剤の剤型の差によりサイトカイン

の誘導能が異なり発熱、免疫応答と関連することが推定された。2010 年から Hib, PCV7 が暫定予算により一時的に定期接種化され 2011 年 3 月には同時接種による死亡例が報告されその是非を巡って大きな問題提起がされた。ワクチン製剤によりサイトカイン産生能が異なり DPT とともに同時接種される Hib, PCV7 の同時刺激によるサイトカイン産生能を検討した。PCV7 は IL-1 $\beta$  誘導能が高く PCV7 を含んだ同時刺激では産生能が高くなり、同様に IL-6, G-CSF, TNF- $\alpha$  の産生能も高値を示した。

リンパ球刺激でサイトカインを誘導することが明らかとなったが、ワクチン接種後発熱例では発熱を認めなかったコントロール群との比較では血清中の炎症性サイトカインの量には差がなく G-CSF が発熱群では有意に高い値を示した。リンパ球刺激でも複数のワクチン刺激で G-CSF が高い値を示しており、ワクチン接種の初期免疫応答に好中球を誘導する働きがあると考えられる。ワクチン接種後の副反応として発熱の出現に関連すると考えられ、重篤な副反応との関連性に関してはサイトカインの過剰反応が想定されワクチン接種後の免疫応答に関連する遺伝的背景を考慮する必要がある。

## E. 結論

小児における H5N1 パンデミックワクチン接種後の高い発熱率と良好な免疫応答は全粒子不活化アラム製剤が自然免疫系に強い刺激をいれ IFN- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6, TNF- $\alpha$  の炎症性サイトカインを誘導することが考えられた。H5N1 パンデミックワクチン接種前後の血清 IgG subclass 抗体の検討では 1 回のワクチン接種で既往歴のない乳幼児にも抗体誘導を示し、自然感染と同様の免疫応答を示した。ワクチンの同時接種の副反応としての発熱にはサイトカインの誘導が強く関連していることが推察され、G-CSF は発熱例で高値を示したことからワクチン接種の初期免疫応答に好中球が関与していることが推測される。

## F. 研究業績

### 1 論文発表

- 1) Okada K, Komiya T, Yamamoto A, Takahashi M, Kamachi K, Nakano T, Nagai T, Okabe N, Kamiya H, Nakayama T. Safe and effective booster immunization using

- DTaP in teenagers. *Vaccine* 28: 7626-7633, 2010
- 2) Sakata M, Nakayama T. Protease and helicase domains are related to the temperature sensitivity of wild-type rubella viruses. *Vaccine* 29: 1107-1113, 2011
- 3) Sawada A, Komase K, Nakayama T. AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats. *Vaccine* 29: 1481-1490, 2011
- 4) Ji Yi-Xin, Ihara T, Komase K, Nakayama T. Amino acid substitutions in Matrix, Fusion, and Hemagglutinin proteins of wild measles virus for adaptation to Vero cells. *Intervirology* 54, 217-228, 2011.
- 5) Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M. The SI strain of measles virus derived from a patient with subacute sclerosing panencephalitis possesses typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate receptor specificity and reduce membrane fusion activity. *J Virol* 85, 11871-11882, 2011.
- 6) Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine* 30, 3885-3890, 2012.
- 7) Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children. *Vaccine* 30, 7662-7666, 2012.
- 8) Matsubara K, Iwata S, Nakayama T. Antibodies against mumps virus component proteins. *J Infect Chemotherapy* 18, 466-471, 2012.
- 9) Sawada A, Yamani Y, Nakayama T. Mumps Hoshino and Torii vaccine strains were distinguished from circulating wild strains. *J Infect Chemother* DOI 10.1007/s10156-012-0515-3

G. 知的財産の出願、登録状況  
なし

課題4：ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索

課題5：ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究

### インフルエンザワクチン接種後のアナフィラキシー原因究明に関する検討

研究分担者：庵原 俊昭（国立病院機構三重病院小児科）

研究協力者：菅 秀、浅田和豊、長尾みづほ、藤澤隆夫（国立病院機構三重病院小児科）

#### 研究要旨

2011/12 シーズン、2PE を安定剤に入れた K 社のインフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーを発症した小児例が増加した。インフルエンザワクチンによるアナフィラキシー発症のメカニズムを検討するために、抗インフルエンザワクチン IgE 抗体測定系およびインフルエンザワクチン刺激による好塩基球活性化試験法を開発した。インフルエンザワクチンを用いた皮膚プリックテスト、開発した 2 種の試験結果から、今までのインフルエンザワクチン接種により抗インフルエンザワクチン IgE 抗体を保有している小児では、抗インフルエンザワクチン IgE 抗体が付着した好塩基球や肥満細胞が血液中存在しており、2PEにより一部重合したインフルエンザワクチン中のHAがIgE抗体の架橋形成を誘導し、その結果好塩基球や肥満細胞が活性化されヒスタミンを放出し、アナフィラキシーを発症させたと推察された。なお、インフルエンザワクチンによるアナフィラキシー発症に鶏卵アレルギーの関与を認めなかった。また、ワクチンの各コンポーネントに対する IgE 抗体測定系および各コンポーネントによる好塩基球活性化試験は、インフルエンザワクチンを含めた各種ワクチン接種によるアナフィラキシーや即時型副反応発症メカニズムの解明および発症予知のための効果的なツールになると推察された。

#### A. 研究目的

ワクチン接種によるアナフィラキシーの診断には、皮膚テストや IgE 抗体測定などが報告されているが、ワクチンのどの成分によるものかについては十分に検討されていない。また、薬剤アレルギーに関しては DLST や好塩基球活性化試験の有用性が示されているが、これらの検査がワクチンについて効果的な検査であるかについては十分に検討されていない。

本研究では、インフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーを来した症例について、その原因を明らかにするとともに、その他のワクチンによるアナフィラキシー発症メカニズムの解明および発症予知のための方法について検討した。

#### B. 研究方法

##### 1) 対象

対象は K 社の 2PE 入りインフルエンザワクチン接種によりアナフィラキシーを発症した 2～9 歳の小児 20 人（65.3±22.7 ヶ月：34～118 ヶ月、インフルエンザワクチン接種歴 7.9±3.1 回：3～13 回）、K 社のインフルエンザワクチン接種後に即時型蕁麻疹を発症した 3 歳児 1 人、4 歳以上になっても耐性獲得が困難かつ食物によるアナフィラキシーの既往がある鶏卵アレルギー児 10 人、アナフィラキシー歴および鶏卵アレルギーがない小児 15 人である。

保護者の同意を得たのち、採血を含めた各種検査を行った。

## 2)皮膚プリック試験

インフルエンザワクチンやそのコンポーネント（インフルエンザワクチン製造前のA(H1N1)、A(H3N2)、B）でプリック試験を行い、紅斑径、膨疹径を測定した。なお、陰性コントロールとして生理食塩水、陽性コントロールとしてヒスタミンを用いた。膨疹が陰性コントロールよりも3 mm以上大きい時、または陽性コントロールの1/2以上大きい時を陽性と判定した。

## 3)インフルエンザワクチンIgE抗体の測定

各メーカーのインフルエンザワクチン、インフルエンザワクチン製造用に混合する前のA(H1N1)、A(H3N2)、B抗原の蛋白量を100 µg/mlに調整後、96穴マイクロプレートに抗原を固相し、その後SuperBlocking Bufferでブロッキングした。標準血清（インフルエンザアナフィラキシー3例から国立病院機構三重病院で作成、1,000単位/mlと設定）および測定する血清（血漿）をマイクロプレートに添加し、抗原と反応させた。その後、ビオチン標識抗ヒトIgE抗体と反応させた後、ストレプトアビジン溶液と反応させ、基質(TMB)を添加後1N塩酸で反応を停止させ、吸光度を測定し、標準曲線から抗体価を求めた。

## 4)好塩基球活性化試験

各メーカーのインフルエンザワクチンやそのコンポーネントを抗原とし、陰性コントロールとしてPBSを、陽性コントロールとして抗IgE抗体を用いた。方法は、Allergenicity kitを使用し、ヘパリン採血した全血に各濃度(1/33、1/100、1/333、

1/1000、1/3333)に希釈した各抗原で、15分、1時間、24時間刺激後、フローサイトメーターにより末梢血好塩基球の3カラー測定を行い、CD203+/CD3-/CD294+（活性化好塩基球のマーカー）細胞分画を定量的に評価した。10%以上の好塩基球の活性化を認めた場合、陽性と判定した。なお、各ワクチンの刺激濃度は、インフルエンザワクチンに含まれる各コンポーネントのHA含量が30 µgHA/mlであるため、各コンポーネントで刺激するときは、コンポーネントが30 µgHA/mlになるように調整してから使用した。

## 5)リンパ球幼若化試験(DLST)

2PE入りインフルエンザワクチンを抗原として用いた。ヘパリン採血した血液に、指摘濃度に希釈したインフルエンザワクチンを添加し、5日間培養したのちH<sup>3</sup>-thymidineを添加し、リンパ球の活性化を測定した。コントロールに比して1.5倍以上活性化された時陽性と判定した。

## C. 研究結果

### 1)インフルエンザワクチンアナフィラキシー児のアレルギー素因の検討

気管支喘息あり・既往または疑い例（素因あり）が10人(50%)、蕁麻疹素因あり5人、鶏卵アレルギー素因あり4人、その他の食物アレルギー素因あり4人、アトピー性皮膚炎素因あり2人、花粉症素因あり1人、通年性アレルギー性鼻炎素因あり1人であり、13名(65%)が何らかのアレルギー性素因を有していた。なお、本邦小児のアレルギー性素因率は70%である。

## 2)皮膚プリック試験

インフルエンザワクチンを用いてプリックテストを行った。インフルエンザワクチンによりアナフィラキシーをおこした児（アナフィラキシー児）3人と蕁麻疹を発症した1人はすべて陽性であったが、コントロール8人はすべて陰性であった（図1）。なお、アナフィラキシー児は2PE入りインフルエンザワクチンにも、2PEが含まれていないインフルエンザワクチンにも陽性を示した。

## 3)抗インフルエンザワクチンIgE抗体の測定

当院が経験した2PE入りインフルエンザワクチン接種後アナフィラキシーを発症した3例から血清を採取し、開発した測定系で抗インフルエンザワクチンIgE抗体を測定したところ、3人とも高い吸光度を示したのに対し、アナフィラキシーを発症しなかった小児では低い吸光度を示した。

この3例から得た血清をもとに標準陽性血清を作成し、1,000U/mlと値付けした。なお、標準陰性血清は3人の臍帯血から採取した血清を用いて作成した。

2PE入りインフルエンザワクチンに対するIgE抗体は、アナフィラキシー児では20人中19人が200U/ml以上を示したのに対し、コントロール児では15人全例が200U/ml未満であった（図2）。この結果から、200U/ml以上を陽性と判定した。なお、アナフィラキシー児では20人中17人は500U/ml以上の高値を示した。

各メーカーのインフルエンザワクチンに対するIgE抗体を測定したところ、アナフィラキシー児はすべてのメーカーのインフルエンザワクチンに対してIgE抗体を保有

していた（図3）。次に発育鶏卵由来および培養細胞由来のAH1N1、AH3N2、B抗原に対するIgE抗体を測定した。アナフィラキシー児により各コンポーネントに対するIgE抗体の陽性パターンは異なっていたが、それぞれのコンポーネントにおいては、発育鶏卵由来に対しても組織培養由来に対してもIgE抗体はほぼ同等であった（図4）。

なお、鶏卵アレルギー児10人の検討では、2人が200~500U/mlを示したが、残りの8人は陰性であった。

## 4)好塩基球活性化試験

食物アレルギーの診断に用いる測定系をもとに、当院で経験した3例のヘパリン血を用いてインフルエンザワクチンによる好塩基球活性化試験を開発した。反応時間の検討では、インフルエンザワクチン添加後の反応時間を15分、1時間、24時間で検討したところ、1時間で効果的な反応が認められ、以降は反応時間を1時間とした。

次に加えるインフルエンザワクチンの濃度を検討した。添加するインフルエンザワクチンの濃度依存性に好塩基球の活性は高くなったが、人により高く反応する濃度が異なることから、各サンプルとも1/3333、1/1000、1/333、1/100、1/33の5種類の濃度で刺激した。

K社のインフルエンザワクチンを1/3333と1/1000の濃度で刺激したとき、アナフィラキシー例では20例中17例が陽性であったのに対し、コントロールでは6例全例が陰性、鶏卵アレルギー児では8例全例が陰性であった（図5）。なお、アナフィラキシー例の陰性例の中に、好塩基球活性化の低反応児（抗IgE抗体活性刺激でも活性しな

い児)が含まれていた。

アナフィラキシーを発症後 130 日以内に好塩基球活性化試験を行った 8 例を対象に、2PE の有無による好塩基球活性化について検討した。1/3333、1/1000 の低い濃度では、2PE が含まれていないインフルエンザワクチンと比べ、2PE 入りインフルエンザワクチンで刺激した方が、有意に好塩基球が活性化された (図 6)。なお、1/333 よりも濃い濃度で刺激した時は、このような現象は認められなかった。

#### 5) リンパ球幼弱試験(DLST)

アナフィラキシー児では 4 人中 4 人が陽性、卵アレルギー児では 8 人中 8 人が陽性、コントロール児では 11 人中 9 人が陽性であり (図 7)、DLST ではインフルエンザワクチンによるアナフィラキシーの予見は困難な結果であった。

#### D. 考察

2011/2012 シーズンにおいて、K 社の 2PE 入りインフルエンザワクチン接種により 3~6 歳児を中心にアナフィラキシー例が例年よりも多数報告された。今回ブライトン委員会のアナフィラキシー基準を満たす症例を対象に、インフルエンザワクチンによるアナフィラキシー発症メカニズムを解明するために、抗インフルエンザワクチン IgE 抗体測定系とインフルエンザワクチン刺激による好塩基球活性化試験を開発した。また、プリック試験、抗 IgE 抗体測定、好塩基球活性化試験、および DLST のアナフィラキシー診断に対する有用性について検討を行った。

先ず、アナフィラキシーをおこした児の

アレルギー素因を検討したところ、50%に気管支喘息の、20%に鶏卵アレルギーの素因を認めたが、幼稚園や小学校での素因率の調査結果と大きな違いを認めなかった。

今回行った 4 種類の試験では、プリック試験の結果、抗インフルエンザワクチン IgE 抗体測定結果および好塩基球活性化試験結果は、アナフィラキシーの発症と深く関係していた。また、好塩基球活性化試験では、刺激するインフルエンザワクチンの濃度が低い濃度では、2PE を含むインフルエンザワクチンの方が 2PE を含まないインフルエンザワクチンよりも強い活性化を示した。

以上の結果から、今までのインフルエンザワクチン接種によりインフルエンザワクチンに対する IgE 抗体を保有している小児では、インフルエンザウイルス IgE 抗体が付着した好塩基球や肥満細胞が血液中に多数存在しており、2PE により一部重合したインフルエンザワクチン中の HA が IgE 抗体の架橋形成を誘導し、その結果活性化した好塩基球および肥満細胞がヒスタミンを放出し、アナフィラキシーを誘発させたと推察された。

以前からインフルエンザワクチンには発育鶏卵由来の成分が含まれており、鶏卵アレルギーとインフルエンザワクチンによるアナフィラキシーとの関連が疑われていた。しかし、今回の鶏卵アレルギー児での検討では、10 人中 2 人は 200~500mIU/ml の低い陽性を示したが、8 人に行った好塩基球活性化試験では全例陰性であり、鶏卵アレルギーは今回のアナフィラキシーに関与していない結果であった。

最後に薬物アレルギーの検査に DLST が

よく使用されている。今回の検査では、アナフィラキシー児も、コントロール児も、鶏卵アレルギー児もほとんどが、インフルエンザワクチンに対する DLST は陽性を示した。この結果から、インフルエンザワクチンに対する DLST はインフルエンザワクチンによるアナフィラキシーを診断する検査としては不適切と判断された。

今回行った 4 種類の検査方法の利点および問題点を表 1 にまとめた。患者への負担や費用等を考えると、アナフィラキシーを予知するスクリーニング検査は血清 IgE 抗体の測定であり、実際にそのワクチンのコンポーネントでアナフィラキシーをおこすかの確認は、プリック試験か好塩基球活性化試験を用いるのが現状では適切な方法と思われた。なお、予防接種ガイドラインではワクチンを用いた皮内テストを推奨しているが、抗生剤や造影剤において皮内テストはアナフィラキシーの予知に結びつかないと明確に記載されていること、検査時にはワクチンの希釈が必要なこと、今回の検討ではプリックテストの有用性が示されたこと等から、ワクチンでも皮内テストよりもプリック試験の方が効果的な試験方法と判断された。

なお K 社は 2012/13 シーズンのインフルエンザワクチンの防腐剤を 2PE からチメロサルに変更した。今シーズンのアナフィラキシー報告頻度は他のメーカーからの報告頻度と同程度であり、疫学的にも 2PE 入りインフルエンザワクチンがアナフィラキシー発症に関与していたことが示唆された。

## E. 結論

K 社の 2PE 入りインフルエンザワクチン

接種後にアナフィラキシーをきたした症例を対象に、インフルエンザワクチンによるアナフィラキシー発症の病態について検討を行った。アナフィラキシー発症の必要条件は、インフルエンザワクチンに対する高い IgE 抗体を保有していることであり、鶏卵アレルギーはインフルエンザワクチンによるアナフィラキシー発症に関与していないことが示された。また、ワクチンによるアナフィラキシーの予知には各コンポーネントに対する IgE 抗体測定がスクリーニング検査として有用であり、実際に発症するかについては、プリック試験や好塩基球活性化試験が有用と判断された。

## F. 研究発表

(著書)

1)庵原俊昭：インフルエンザワクチンは本当に有効か？安本和正、滝澤 始 編．呼吸器感染症における不思議．アトムス、東京、p274-27、2011

2)庵原俊昭：ワクチン接種事業の総括と今後は？鈴木 宏、渡辺 彰編．インフルエンザの最新知識 Q&A2012～パンデミック H1N12009 の終焉を迎えて～．医薬ジャーナル社、東京、p35-39、2012

(論文)

1)庵原俊昭：沈降インフルエンザワクチン H5N1 の開発と今後．インフルエンザ 11:63-68、2010

2)庵原俊昭：プロトタイプインフルエンザワクチンと 2009 インフルエンザ A/H1N1 ワクチンの治験．BIO Clinica 25:44-49、2010

3)庵原俊昭：パンデミックインフルエンザワクチン：プロトタイプワクチンと 2009



- インフルエンザ A/H1N1 ワクチン. 臨床と微生物 37:233-239, 2010
- 4) 庵原俊昭: 沈降インフルエンザワクチンの評価とインフルエンザ A (H1N1) 2009 ワクチンの今後. ウイルス 60:69-78, 2010
- 5) 庵原俊昭: インフルエンザ A(H1N1)2009 ウイルス (新型インフルエンザウイルス) の流行とインフルエンザワクチン. 小児科臨床 63:1855-1863, 2010
- 6) 庵原俊昭: 新型インフルエンザとそのワクチン. 保健の科学 52:533-538, 2010
- 7) 庵原俊昭: インフルエンザワクチンの接種基準と留意点. 日本臨床 68:1690-1694, 2010
- 8) 森岡一朗、野々山恵章、多屋馨子、庵原俊昭、細矢光晃、植田育也、熊谷卓司、岡田賢司、岡部信彦、森島恒雄: オセルタミビル治療を受けた生後3ヶ月未満の乳児・新生児のパンデミックインフルエンザ A(H1N1)2009 症例の調査解析. 日本小児科学会雑誌 114:1294-1297, 2010
- 9) 庵原俊昭: 新型インフルエンザウイルスワクチン(A(H1N1)2009pdm ウイルスワクチン) について. インフルエンザ 11:333-338, 2010
- 10) 庵原俊昭: 新型インフルエンザウイルスとワクチン. 小児科 51:1673-1680, 2010
- 11) 二井立恵、伊佐地真知子、菅谷亜弓、平田 浩、二井 栄、庵原俊昭、前田一洋、奥野良信、高橋裕明: ワクチン歴による妊婦のインフルエンザ赤血球凝集抑制抗体の保有状況と児への移行抗体に関する検討. 小児科臨床 63:2329-2336, 2010
- 12) 庵原俊昭: 新型インフルエンザウイルス発生時におけるワクチンの役割. 医療 64:671-675, 2010
- 13) 庵原俊昭: インフルエンザワクチンの効果. 化学療法の領域 27:2684-2693, 2011
- 14) 庵原俊昭: インフルエンザワクチン—その特徴と効果. 医学のあゆみ 241:95-100, 2012
- 15) Morioka I, Nonoyama S, Tanaka-Taya K, Ihara T, Sugaya N, Ueda I, Kumagai T, Okada K, Hosoya M, Okabe N, and Morishima T: Survey of Japanese infants younger than 3 months who were treated with oseltamivir for influenza: Safety of oseltamivir treatment. San J Infect Dis, 2012; early online: 1-5
- 16) 渡辺正博、伊藤正寛、庵原俊昭: マルチプレックス PCR を用いた呼吸器感染症ウイルスの検討. 日本小児科医会会報 43:175-17, 2012
- 17) Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T: Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine production. Vaccine 30:3885-3890, 2012
- 18) 二井立恵、伊佐地真知子、二井 栄、庵原俊昭: 妊婦におけるインフルエンザワクチンの免疫原性・安全性. 小児科 53:497-503, 2012
- 19) Ito M, Nukuzuma S, Sugie M, Yoshioka M, Kon-no M, Yasutake H, Umegaki Y, Ishikawa Y, Yano T, Ihara T: Detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus RNA by real-time RT-PCR. Pediatr Intern 54:959-962, 2012 (学会発表)
- 1) 庵原俊昭: 新型インフルエンザワクチンの免疫原性と安全性. 第 84 回日本感染症学

会 2010.4.5-6 京都

2)菅 秀、中野貴司、矢野拓弥、庵原俊昭：小児病棟における入院患者から病棟勤務者への 2009 年新型インフルエンザ感染伝播事例の臨床的検討. 第 51 回日本臨床ウイルス学会 2010.6.19-20 高松

3)渡辺正博、奴久妻聡一、伊藤正寛、庵原俊昭：2009-2010 年に流行した pandemic (H1N1) 2009 における、発症早期の鼻腔吸引液中ウイルスコピー数と迅速診断陽性例の検討. 第 51 回日本臨床ウイルス学会 2010.6.19-20 高松

4)伊藤正寛、杉江真理子、吉岡雅澄、近藤真由美、安武 廣、石川和弘、奴久妻聡一、矢野拓弥、庵原俊昭：Real-Time RT-PCR によるパンデミック (H1N1) 2009 サーベイランス検体中ウイルス量の検討. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010.11.7-9 徳島

5)伊藤正寛、足立晋介、木崎善郎、庵原俊昭：Real-time RT-PCR によるインフルエンザ AH1N1 pdm ウイルスの定量的測定. 第 42 回日本小児感染症学会 2010.11.27-28 仙台

6)二井立恵、伊佐地真知子、庵原俊昭：妊婦に対するインフルエンザワクチン接種の安全性の検討. 第 14 回日本ワクチン学会 2010.12.11-12 東京

7)庵原俊昭：インフルエンザワクチン：開発戦略と接種戦略. 第 26 回日本環境感染症学会 2011.2.18-19 横浜

8)渡辺正博、伊藤正寛、庵原俊昭：pandemic (H1N1) 2009 流行期における小児インフルエンザ様患者からマルチプレックス PCR を用いたウイルスの検出. 第 52 回日本臨床ウイルス学会 2011.6.11-12 津

9)菅 秀、長尾みづほ、藤澤隆夫、庵原俊昭、中野貴司：インフルエンザパンデミックデータベースの構築. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011.8.12-14 東京

10)菅 秀、長尾みづほ、庵原俊昭：リアルタイムデータベースを用いた 2010/11 インフルエンザ小児入院症例の解析. 第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2011.10.28-29 岡山

11)二井立恵、伊佐地真知子、菅谷亜弓、二井 栄、庵原俊昭、前田一洋、奥野良信：妊婦におけるインフルエンザワクチンの安全性・免疫原性に関する研究(2010/2011 シーズン). 第 15 回日本ワクチン学会学術集会 2011.12.7-8 東京

12)落合 仁、高橋裕明、庵原俊昭：三重県亀山市におけるインフルエンザの流行とインフルエンザワクチン有効性の検討～2011/2012 シーズン～. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 2012.11.17-18 横浜

13)庵原俊昭、菅 秀、浅田和豊、二井立恵、伊佐地真知子、落合 仁、奥野良信：インフルエンザ HI 抗体とマイクロ中和(MN)抗体の互換性の検討. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 2012.11.17-18 横浜

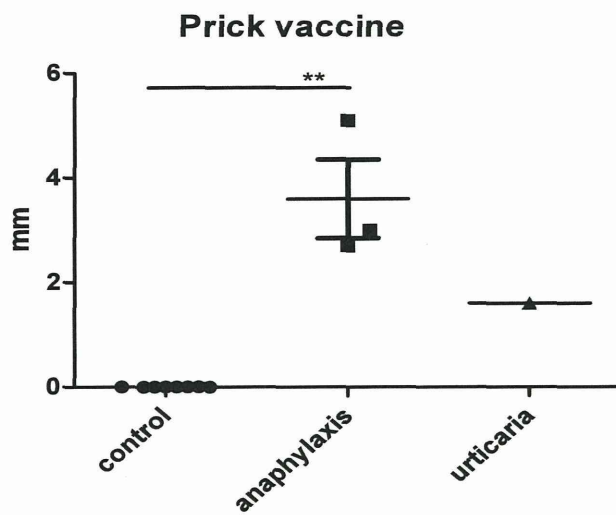
14)二井立恵、伊佐地真知子、菅谷亜弓、二井 栄、庵原俊昭、高橋裕明、前田一洋、奥野良信：妊婦と乳児のインフルエンザ HI 抗体の経時的減衰についての検討. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 2012.11.17-18 横浜

15)長尾みづほ、藤澤隆夫、浅田和豊、菅 秀、庵原俊昭：インフルエンザワクチン接種後アナフィラキシーの原因解析. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 2012.11.17-18 横浜

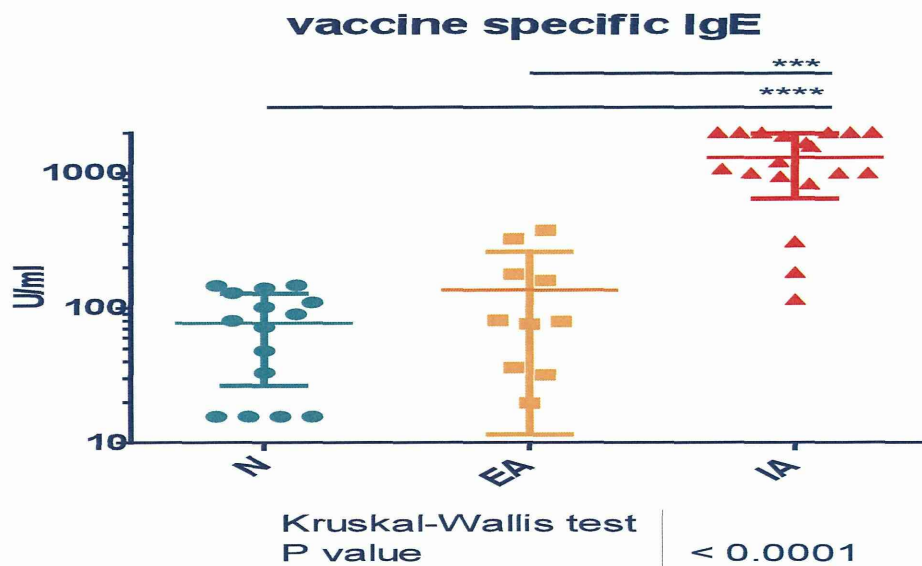
16)長尾みづほ、藤澤隆夫、浅田和豊、菅 秀、  
 庵原俊昭：インフルエンザワクチン接種後  
 のアナフィラキシーと鶏卵アレルギーとの  
 関連について. 第44回日本小児感染症学会  
 2012.11.24-25 北九州

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定  
 を含む）  
 特記事項なし

(図1) プリック試験の結果

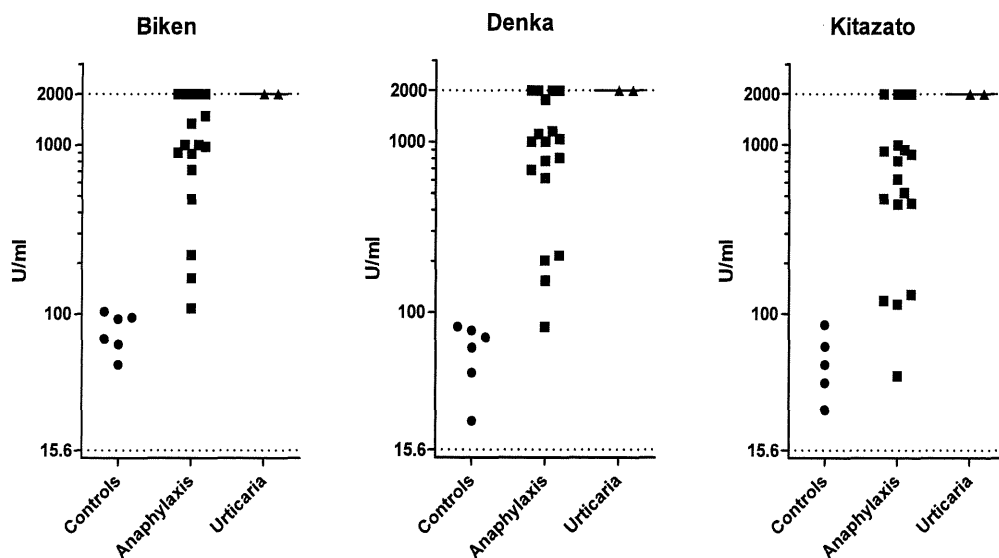


(図2) 疾患による抗インフルエンザワクチン (K社) IgE 抗体

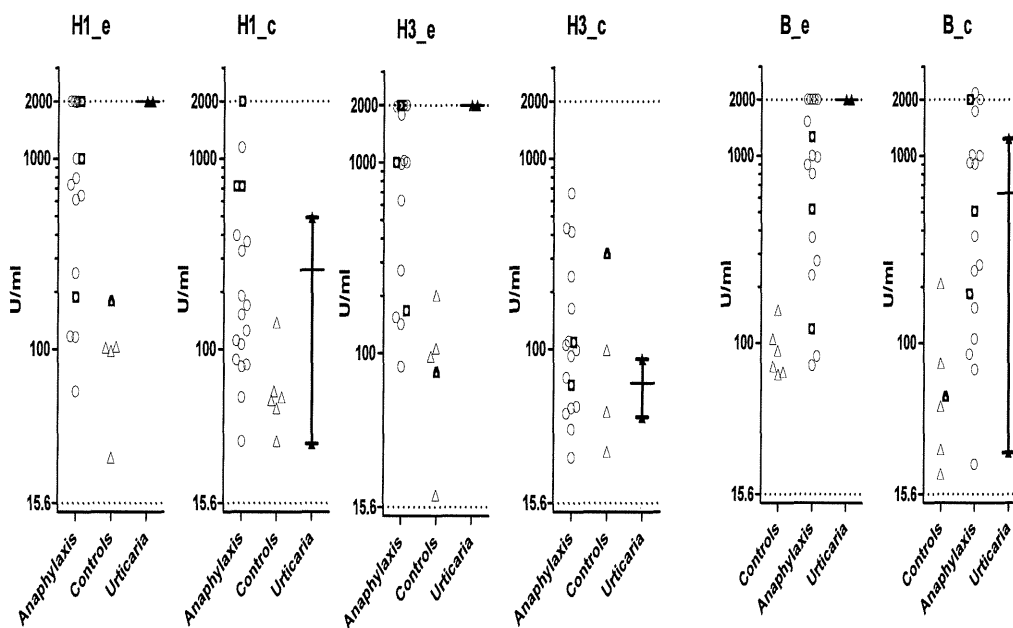


N : インフルエンザワクチンによるアナフィラキシーなし、鶏卵アレルギーなし  
 EA : インフルエンザワクチンによるアナフィラキシーなし、鶏卵アレルギーあり  
 IA : インフルエンザワクチンによりアナフィラキシー発症

(図3) 各メーカーのインフルエンザワクチンに対するIgE抗体

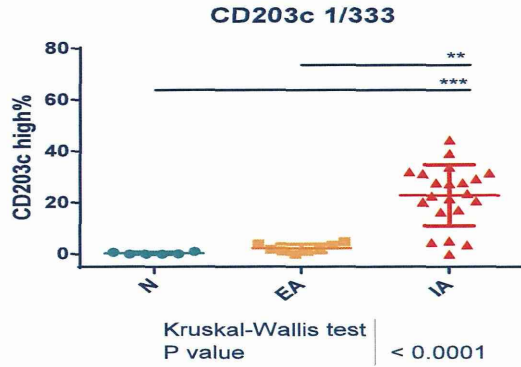


(図4) 発育鶏卵由来および細胞培養由来インフルエンザワクチン各コンポーネントに対するIgE抗体

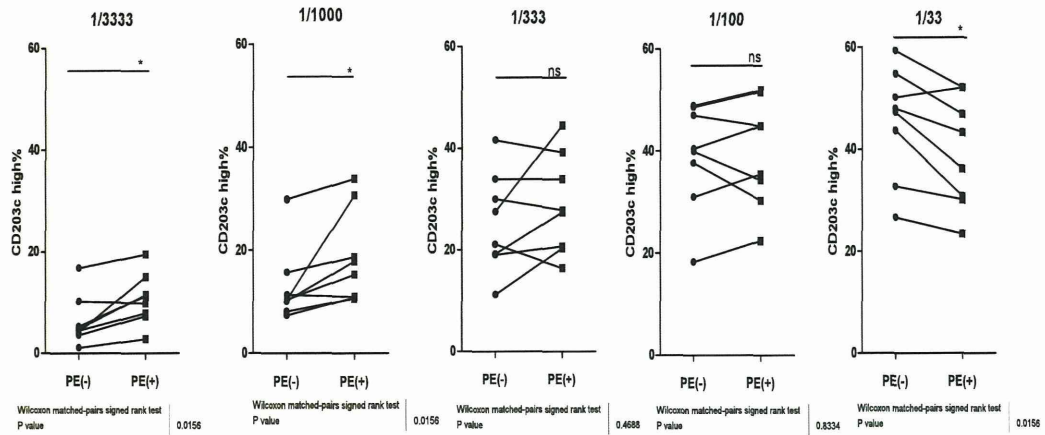


e : 発育鶏卵由来インフルエンザワクチンコンポーネント  
 c : 組織培養由来インフルエンザワクチンコンポーネント

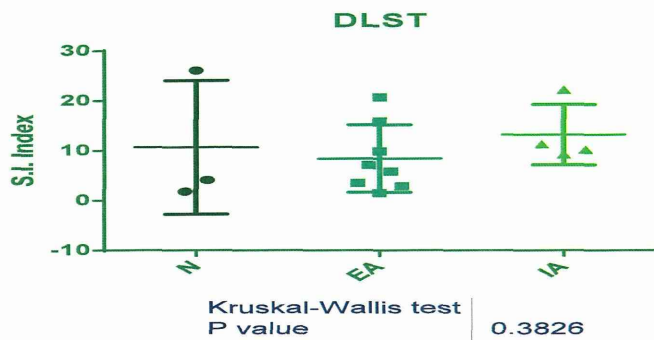
(図5) 好塩基球活性化試験結果



(図6) K社インフルエンザワクチン刺激によるCD203cの発現(2PEありのワクチンとなしのワクチンによる刺激)



(図7) インフルエンザワクチン刺激によるリンパ球活性化試験(DLST)



(表1) ワクチンによるアナフィラキシーの誘因検索および予知のための検査と特徴

試験方法	利点	問題点
ブリック試験	簡単、鋭敏	やや侵襲的
特異的 IgE 抗体	血清を保存できる、 鋭敏	アナフィラキシーをおこさない 人でも若干高値な人がいる
好塩基球活性化試験	高い有用性	ノンレスポnderがいる、高価、 検体の保存ができない
DLST		有用性がない
皮内テスト		アナフィラキシーとは関連しない

課題4：ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索

課題5：ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究

沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1株）治験保存血清を使った、  
microRNA チップ解析臨床研究

(独)医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト 石井健・鉄谷耕平

## 研究要旨

本研究は故神谷齊国立病院機構三重病院名誉院長を研究代表者とする「沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1）保存血清を使った臨床研究」の分担研究として、過去に行われた上記ワクチン臨床治験及びそれに付随する臨床研究において、すでに得られた保存血清を用い、血清中マイクロRNAの解析を行うものである。

2010年12月に独立行政法人医薬基盤研究所倫理審査委員会の承認を得、2010年度および2011年度にそれぞれ15例30検体の解析を行い、発熱などの副作用あるいはワクチンの免疫原性との相関関係を持ち、将来的にバイオマーカーとして利用可能となるような興味深いふるまいを示す複数のmiRNAを検索した。2012年度はこれらの計60検体についてバイオインフォマティクス的手法を用い、複数の視点から解析を加えるとともに、解析対象を大幅に拡大し88症例254検体についてmiRNAの解析を行った。今後バイオインフォマティクス解析手法を様々に適用し、バイオマーカー候補miRNAの有用性の検証を進めていく。

### A. 研究目的

国立感染症研究所より2004年にベトナムで分離されたA/Viet Nam/1194/2004（H5N1）株をリバーシ・ジェネティクスで弱毒したNIBRG-14株の分与を受け、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを添加した沈降新型インフルエンザワクチン（以下、プレパンデミックワクチン）が国内4社により作製され、非臨床試験及び健康成人に対する臨床試験（以下、成人治験）が実施された。そのうち、学校法人北里研究所及び一般財団法人阪大微生物病研究会のワクチンについては、2007年10月に薬事法上の製造販売承認を取得した。

その後、成人治験成績に対する承認審査

で求められた対応として、小児に対する適切な用法及び用量の設定を行うため、学校法人北里研究所及び一般財団法人阪大微生物病研究会のプレパンデミックワクチンについて6ヵ月以上20歳未満の健康小児に対する免疫原性及び安全性を検討するための臨床試験（以下、小児治験）が実施された。

小児治験の結果、抗体価は成人に匹敵する、あるいはそれ以上の上昇が確認されたが、一方で、約半数の被験者に発熱が観察された。そこで、その発熱の原因を探ること、より安全性の高いプレパンデミックワクチンの製造に向けた情報を収集することを目的に、成人治験、成人治験後の抗体価追跡調査及び小児治験で得られ、保存され

ている血清検体を用いた H5N1 血清研究が 2010 年に開始された。H5N1 血清研究には血清サイトカイン濃度の解析などとならび、本研究の miRNA アレイ解析が分担研究として含まれる。

本研究は血清検体中に含まれる微小な RNA 断片を抽出し、その発現を画像及び数値データとして網羅的に検出する手法（血清検体の miRNA アレイ解析）を用いる。miRNA は遺伝情報をコードしない約 20 塩基長の短い RNA で、血液中に安定して存在することが近年知られ、癌や循環器疾患領域などにおいて、臨床診断のマーカーあるいは病勢を反映するバイオマーカーとして研究が精力的に試みられている。miRNA は miRBase (<http://www.mirbase.org/>) に登録されている miRNA リストを基に解析されるが、miRBase における登録 miRNA 数は年々増加し、2010 年度解析では約 1200 の miRNA を解析したが、2012 年度解析では約 2000 にまで増えている。このことは、各年度解析間の比較を行うに当たっての障害となりえた。

本研究では将来的なバイオマーカーとしての確立を念頭に、特にワクチン副作用と考えられる発熱との相関関係を示す miRNA を探索した。

## B. 研究方法

### 1. 血清 miRNA 解析のための症例選択

1.1~1.3 すべてにおいて、小児治験の被験者のうち①臨床試験参加同意が得られた者または血清検体の利用について倫理審査委員会等の承認および組織の代表者などの

許可が得られた者、かつ②血清検体が十分量保存されている者を対象とした。検体は国立病院機構三重病院において凍結保存されている血清である。

#### 1.1 2010 年度 15 症例の選択

小児治験参加者を抗体価上昇の程度および発熱の有無について 4 群に分類し、各群内でそれぞれ 3 ないし 4 名を選択して計 15 例を予備解析対象とした。群内での症例選択については、発熱に関連すると思われる臨床情報（年齢・接種ワクチン・過去のインフルエンザ罹患歴・過去のインフルエンザワクチン接種歴）の群として特性を群間比較で検証し、その群の特性を最もよく反映すると思われる症例 3 ないし 4 例を選択した。

#### 1.2 2011 年度 15 症例の選択

発熱に関連すると思われる臨床情報（年齢・接種ワクチン・過去のインフルエンザ罹患歴・過去のインフルエンザワクチン接種歴）をできる限り統一して交絡因子を排除し、発熱グレードの代表的な症例 15 例を選択した。

#### 1.3 2012 年度 88 症例の選択

残存する血清検体のうち、第 1 回接種前検体・第 2 回接種前検体・第 2 回接種後検体の 3 時点すべての血清が 1 回解析に必要な 500  $\mu$  L 以上残っている症例 88 症例を選択した。

### 2. 血清 miRNA の抽出と測定

各年度の症例由来検体について共通して、検体からの RNA の抽出及び東レ株式会社



の 3D-Gene®miRNA オリゴチップ ([http://www.3d-gene.com/products/pro\\_007.html](http://www.3d-gene.com/products/pro_007.html)) を用いた miRNA の発現測定を同社に委託した。

### 3. 定量的 PCR

2010 年度の解析で得られた RNA をもとに、

- A) 接種によって変動する miRNA2 種
- B) 発熱と相関する miRNA1 種
- C) 抗体価上昇と相関する miRNA2 種
- D) 年齢と相関する miRNA1 種
- E) 内因性コントロールとして miRNA2 種

の計 8 種の miRNA について既存のプライマーを利用して定量的 PCR を行った。

内因性コントロールには、過去の文献で報告のあったものおよび 2010 年度のアレイ解析において平均して高い発現が認められたものを選択した。

### 4. miRNA 測定値の解析

小児治験の実施計画書では発熱のグレードが「Grade0：発熱なし、Grade1：37.5℃以上の発熱、Grade2：38.0℃以上の発熱、Grade3：39.0℃以上の発熱が 1 日以内、Grade4：39.0℃以上の発熱が 2 日以上」と定義されている。また免疫原性については、HI 抗体価あるいは中和抗体価がそれぞれ測定されている。miRNA 測定値の解析においては、各 miRNA の発現量と、発熱グレードあるいは免疫原性との相関を検討した。2 群間比較においては発熱グレード・免疫原性の閾値をいずれに設定するかも検討した。

複数のバイオインフォマティクソンが解

析を行うに当たり使用した主な検定法には以下がある。Student の t 検定、ピアソンの相関係数、welch の t 検定、K 近傍法、二つの異なる miRNA の比を総当たりで検討する方法、ロジスティック回帰。

### 5. 臨床検体使用に関する倫理的側面

本研究計画は 2010 年 12 月に（独）医薬基盤研究所研究倫理審査委員会の承認を得た。2012 年 12 月に、本研究で対象とする被験者数の拡大について同委員会の承認を得た。

## C. 結果

### 1. 2010 年度

H5N1 治験参加者 200 例のうち 15 例における、血清解析を予備的に実施した結果、ワクチン接種前血清中の発現量が、接種後発熱の重症度と相関を示した miRNA、被験者の抗体価上昇度と相関を示した miRNA が複数認められた。特に前者は発熱の副作用を予測するバイオマーカーとしての可能性が示唆されたが、検体数が小さいことと、ヒト血清であることからの被験者の多様性からの発現量のバラつきに起因してか、統計学的な有意性を強く示すことは困難であった。

### 2. 2011 年度

#### 2.1 定量的 PCR

定量的 PCR では、アレイ解析で認められたサンプル間の傾向は、内因性コントロールを除き再現されなかった。他についてはアレイ解析において発現量（global normalization）が平均 5 ないし 20 と低い発現量であったために、アレイ解析と PCR

との結果が整合しなかったと推定される。発熱および抗体価上昇で分割した群間における比較で認められた興味深いふるまいは、特に global normalization の低い miRNA について、再現性に問題があると考えられた。

## 2.2 miRNA アレイ解析

そこで、昨年度 15 症例及び今年度 15 症例に対して実施したアレイ解析においては、群分けを行わず被験者個人の臨床情報と関連する miRNA の選出を行った。選出にあたってはアレイ解析における発現量が 50 前後以上であるものを対象とし、被験者で認められた発熱グレード、治験終了時の HI 抗体価、年齢などの臨床情報と miRNA の発現量との相関を検討したところ、ワクチン接種後血清においては興味深い相関を示す miRNA は認められなかったが、接種前血清中には、1 回目接種発熱グレードと有意な相関を示す miRNA を 2 種認めた。

## 3. 2012 年度

### 3.1 解析手法の拡大

接種前検体における単一 miRNA の探索および複数 miRNA の組み合わせと発熱との相関関係の探索において、有発熱者及び無発熱者の二群間比較で発現差が見られた miRNA のうち、有意差の上位 7 種の miRNA の発現量総和を、発熱の予測バイオマーカーとして利用することを検討した結果、この手法により、大雑把な発熱予測が可能かもしれないと推測された。

次に、接種前及び接種後の miRNA の発現量の比の、2 を呈とする対数 ( $\log_2$  (接種後/接種前)) を指標にして、有発熱者及び

無発熱者での比較を行った結果、発熱者をよく区別できる miRNA が複数見つかリ、その組み合わせは、5~10 種の miRNA で構成されることが推測された。

以上の解析手法の拡大は、有望な見通しをもたらしたが、30 症例と限定された中での見通しであり、更なる検討症例の拡大が望まれた。

### 3.2 解析対象の大幅な拡大

研究者の手元にある小児治験被験者由来血清のうち、88 症例を選定し、第 1 回接種前検体・第 2 回接種前検体・第 2 回接種後検体の 3 時点すべての血清合計 254 検体において、miRNA の発現を検討した結果、これまで実施してきた 15 検体あるいは 30 検体で推定されたバイオマーカー候補の miRNA とは異なる miRNA が、バイオマーカー候補として選定された。このことは、15 症例分 30 検体で検討した 2010 年度、追加 15 症例分を合わせて 60 検体で検討した 2011 年度でそれぞれ見出されたバイオマーカー候補 miRNA が、254 検体での検討に耐えなかったことを意味し、より慎重で総合的な検討が必要であると判断された。

### 3.3 総合的な検討

バイオマーカー候補として選定される miRNA は、いかなる検体群をもとに検討・選定されるかによって大きく異なることが経験された。

本研究は完了した治験で得られた血清検体を対象とする後ろ向き研究であり、現時点で同ワクチンを用いた新たな小児治験の実施が検討されていないことから、厳密な検証行為は現時点で実現不可能である。ま

た一般に検討対象検体数が大きいほど、選定結果に対する信頼度が高まると考えられる。そのため、年度を追って対象検体数を増加させ研究を行ってきたが結論を得るには至っていない。

これらを受けて、まず miRNA 発現量データの表現方法 (global normalization) についての基礎的な検証の必要性についても、東レ担当者を交え検討されている。また現在までに得られている miRNA 発現のデータを基に、バイオインフォマティクスの 4 グループがそれぞれ独自の観点から解析検討を行っている。1で行ったブートストラップを併用する welch の t 検定と K 近傍法に加え、二つの異なる miRNA の比を総当たりで検討する方法、ロジスティック回帰の四手法である。特に発熱との相関の解析においてそれぞれに進捗が見られるが、四手法のうちいずれかの三手法で共通して選定される miRNA は複数存在するが、四手法すべてにおいて共通して選定される miRNA consensus はまだ見出されていない。

#### D.E. 結論及び考察

本ワクチン小児治験における異常に多かった発熱に関連し、血清 miRNA と発熱との相関を主に探索した。研究対象が完了した治験被験者由来の検体であり再検証が不可能であることから、本研究の品質を担保するために、複数のバイオインフォマティシャンが独自の手法で検討し、いずれの手法による検証にも耐えうるバイオマーカー、miRNA consensus の探索を目標とした。

各手法で得られる結果相互の重みづけ・整合性の検討が現在も進行しており、総意

をまとめ本研究で行ってきた検証過程について第一報として論文化し、内外の意見を幅広く聴取して miRNA consensus の確立を究極的に目指す方針である。

#### F. 文献

なし

#### G. 研究発表

なし

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小山正平、石井 健	ウイルス感染予防に用いられるワクチンアジュバント	神谷 齊監修	次世代ワクチンの産業応用技術	シーエムシー出版	東京	2010	112-124
東岸任弘、石井 健、堀井俊宏	マラリアワクチンの実現に向けて	神谷 齊監修	次世代ワクチンの産業応用技術	シーエムシー出版	東京	2010	175-186
小山正平、石井 健	粘膜アジュバント	清野宏編	臨床粘膜免疫学	シナジー社	東京	2010	589-598
青枝大貴、審良静男、石井 健	生体防御機構—Toll-like receptorsノックアウトマウス	秋山徹、奥山隆平、河府和義編	マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック	羊土社	東京	2011	182-199
Koyama S, Akira S and Ishii KJ	Immune recognition of nucleic acids and their metabolites” Extra Nucleic Acids, edited by Kikuchi Y, R yokova ET	Kikuchi Y, R yokova ET	Extra Nucleic Acids	Springer	ニューヨーク	2010	209-227
石井 健、青枝大貴、鉄谷耕平、小檜山康司	各章執筆を担当	石井健、山西弘一 編	アジュバント開発の新展開	CMC出版	東京	2011	
庵原俊昭	インフルエンザワクチンは本当に有効か？	安本和正、滝澤 始 編	呼吸器感染症における不思議	アトムス	東京	2011	274-27
庵原俊昭	ワクチン接種事業の総括と今後は？	鈴木 宏、渡辺 彰編	インフルエンザの最新知識 Q&A 2012 ~パンデミックH1N1 2009の終焉を迎えて~	医薬ジャーナル社	東京	2012	35-39