

201420048A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

沈降インフルエンザワクチン (H5N1株) の新規株の有効性、安全性  
ならびに至適接種間隔ならびに異種株に対する交叉免疫性の検討

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 庵原 俊昭

平成27(2015)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

沈降インフルエンザワクチン (H5N1株) の新規株の有効性、安全性ならびに至適接種間隔 ならびに異種株に対する交叉免疫性の検討-----	1
庵原 俊昭	

### II. 分担研究報告

沈降インフルエンザワクチン (H5N1株) の新規株の有効性、安全性ならびに至適接種間隔 ならびに異種株に対する交叉免疫性の検討-----	7
伊藤 澄信	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	117
--------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	119
----------------------	-----

# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

総括研究報告書

### 沈降インフルエンザワクチン（H5N1 株）の新規株の

#### 有効性、安全性ならびに至適接種間隔ならびに異種株に対する交叉免疫性の検討

研究代表者 庵原俊昭 独立行政法人国立病院機構三重病院 院長

研究分担者 伊藤澄信 独立行政法人国立病院機構本部総合研究センター

臨床研究統括部長

#### 研究要旨

2007 年秋に承認された沈降インフルエンザワクチン H5N1（H5N1 ワクチン）は、ベトナム株（クレード 1）を用いて開発された。その後世界各地の H5N1 亜型の流行状況から、国家備蓄ワクチンとしてベトナム株に加えて、インドネシア株（クレード 2.1）、アンフィ株（クレード 2.3）、チンハイ株（クレード 2.2）を用いて製造されてきた。今までの成果では、株が異なっても 3 週間隔で 2 回接種すれば、効果的な基礎免疫は誘導されること、基礎免疫終了後 6 ヶ月以上あけて 1 回追加接種すると、効果的な追加免疫と幅広い交叉免疫が誘導されること、6 ヶ月間隔で 2 回接種すれば、基礎免疫だけではなく幅広い交叉免疫も誘導されることが示されている。

2012 年度には H5N1 亜型の流行状況からクレード 2.2 であるが、チンハイ株と抗原性が異なるエジプト株を用いて H5N1 ワクチンが製造された。本研究では、1) 新たに製造されたエジプト株の免疫原性を確認すること、2) 初期 2 回接種間隔を 60 日、90 日、180 日としたときの免疫原性と交叉免疫性を検討し、至適接種間隔を検討すること、3) エジプト株の安全性を確認すること、を目的とした。

目的 1) では 50 名を対象に 3 週間隔で 2 回接種すると、エジプト株に対する免疫原性が確認された。目的 2) では 90 名（各群 30 名）にワクチンを接種した。90 日、180 日間隔接種では、3 週間隔群に比べエジプト株に対する高い抗体価の誘導と幅広い交叉免疫が認められた。目的 3) では、「新型インフルエンザ等対策ガイドライン」の「予防接種に関するガイドライン」に基づき、トリインフルエンザ A(H5N1) ウイルスを扱う研究者、トリインフルエンザ発生時に防疫業務等に従事する者、医療従事者、積極的疫学調査に従事する者、指定公共機関等で国民生活及び国民経済の安定に寄与する業務に従事する者を対象に、1 回目 436 名、2 回目 411 名に接種した。副反応報告率は他の株の初回接種時と同等であった。

以上の結果から、沈降インフルエンザワクチン(H5N1)株は 1 回の接種で基礎免疫が誘導されること、90 日以上接種間隔ならば効果的な交叉免疫が誘導されること、安全性の面ではエジプト株沈降インフルエンザワクチンは特段問題がないことが示唆された。

## A. 研究目的

2007 年秋に承認された、不活化全粒子ウイルスにアルミニウムをアジュバントとして加えた沈降インフルエンザワクチン H5N1 (H5N1 ワクチン) は、ベトナム株 (クレード 1) を用いて開発された。その後世界各地の H5N 亜型の流行状況から、国家備蓄ワクチンとしてベトナム株に加えて、インドネシア株 (クレード 2.1)、アンフィ株 (クレード 2.3)、チンハイ株 (クレード 2.2) を用いて製造された。今までの成果では、株が異なっても 3 週間隔で 2 回接種すれば、効果的な基礎免疫は誘導されること、基礎免疫終了後 6 ヶ月以上あけて追加接種すると、効果的な追加免疫と幅広い交叉免疫が誘導されること、6 ヶ月間隔で 2 回接種すれば、基礎免疫だけではなく幅広い交叉免疫も誘導される可能性があることが示された。

2012 年度に国家備蓄ワクチンとして製造されたエジプト株 (クレード 2.2) は、チンハイ株と同じクレードであるが、免疫原性が異なっていた。本研究では、1) 新たに製造されたエジプト株の免疫原性を確認すること、2) 初期 2 回接種間隔を 60 日、90 日、180 日としたときの免疫原性と交叉免疫性を検討し、至適接種間隔を検討すること、3) エジプト株の安全性を確認すること、を目的とした。

## B. 研究方法

### (1) エジプト株免疫原性確認試験

H5N1 ワクチンの接種歴がない健常成人 50 名を対象に、3 週間隔で 2 回接種した。初回接種前と 2 回目接種 3 週後に採血し、エジプト株、ベトナム株、インドネシア株、アンフィ株に対する中和抗体価を測定した。また、将来のトリにおける H5N1 ウイルスの変異、および H5N1 由来株のパンデミックに備え、採取した血清を保存した。

### (2) 初期 2 回至適接種間隔検討試験

接種間隔を 60 日、90 日、180 日とし、各グループ 30 名の計 90 名の健常者を対象に、エジプト株ワクチンを 2 回接種した。初回接種前、2 回目接種 3 週後に採血し、エジプト株に加えて、ベトナム株、インドネシア株、アンフィ株の中和抗体価を測定した。本研究でも、将来のパンデミック等に備え、採取した血清を保存した。

### (3) 安全性確認試験

「新型インフルエンザ等対策ガイドライン」の「予防接種に関するガイドライン」に基づき、トリインフルエンザ A(H5N1) ウイルスを扱う研究者、トリインフルエンザ発生時に防疫業務等に従事する者、医療従事者、積極的疫学調査に従事する者、指定公共機関等で国民生活及び国民経済の安定に寄与する業務に従事する者 436 名を対象に、3 週間隔で 2 回接種し、各回接種後の発赤、腫脹、疼痛などの局所反応 (観察期間 1 週間)、発熱、全身倦怠感などの全身反応 (観察期間 1 週間)、脳炎、ギランバレー症候群などの重大な副反応 (観察期間 4 週間) の出現率を調査した。なお、エジプト株免疫原性試験、初期 2 回至適接種間隔検討試験に参加した人も、安全性確認試験と同様の方法で安全性を確認した。

### (倫理)

本試験では薬事法承認外の投与方法による研究が含まれているため、臨床研究に関する倫理指針に従い、補償保険を購入して実施した。十分な安全性を確保するためもあり、ワクチン接種は原則として救急対応が可能な病院内で実施した。また、地域による影響を除外するために多施設 (国立病院機構東京医療センター、国立病院機構三重病院、国立病院機構京都医療センター、国立病院機構九州医療センター) で行った。

## C. 研究結果

### (1) エジプト株免疫原性確認試験

接種前に対する2回目接種後の中和抗体の幾何平均抗体価(GMT)増加倍率は、ホモのエジプト株に対しては16.7倍であったが、ベトナム株、インドネシア株、アンフィ株に対しては、それぞれ2.5倍、1.5倍、1.6倍と低率であった。

### (2) 初期2回至適接種間隔検討試験

初期2回接種間隔を60日、90日、180日とした場合、すべての被験者にエジプト株に対する抗体価の上昇を認めた(エジプト株に対するGMT上昇率; 60日:23.2倍、90日:34.3倍、180日:52.9倍)。各株に対する2回目接種後の抗体価は、接種間隔が長くなるほど上昇し、90日、180日間隔接種では、エジプト株に対する高い抗体価に加え、幅広い交叉免疫性が認められた(ベトナム株、インドネシア株、エジプト株、アンフィ株におけるGMT増加率は、それぞれ90日間隔では4.0倍、2.8倍、34.3倍、3.2倍であり、180日間隔では5.2倍、3.4倍、52.9倍、5.2倍)。

### (3) 安全性確認試験

今までの研究では、用いる株が替わってもH5N1ワクチンの安全性は替わらないとされている。今回行った安全性確認試験における発熱率、全身反応、局所反応の出現率は、1回目接種ではそれぞれ1%、9%、43%であり、2回目接種では1%、5%、34%であった。

2回目の接種間隔が60日、90日、180日に拡大しても、2回目接種後の全身反応はそれぞれ7%、3%、7%(3週間隔5%)、局所反応はそれぞれ50%、30%、40%(3週間隔34%)と、接種間隔による副反応出現率は同等であった。

## D. 考察

3週間隔でH5N1ワクチンを初回接種した

ときの免疫原性の特徴は、株が異なっても接種した株に対する抗体価は高く上昇するが、他のクレードの株に対する抗体価の上昇が低い欠点があった。このため、パンデミック時には、パンデミックを起こした株またはパンデミックを起こした株との抗原性が近い株で接種することが求められている。

一方、初回接種後6ヶ月以上あけて追加接種すると、初回接種や追加接種時に用いた株以外のクレードの異なる株に対しても幅広い、高い抗体価が誘導される(交叉免疫性)。この結果を受け、H5N1亜型が新型インフルエンザウイルスとして出現するリスクが高いならば、指定公共機関等で国民生活及び国民経済の安定に寄与する業務に従事する者に前もって初回接種をしておき、H5N1亜型のパンデミック時に備蓄しているプレパンデミックワクチンを1回接種する方法は、効果的である。

今回、この接種方式に賛同する436名を対象に安全性試験を行った。今回の安全性試験は、皮下接種よりも局所反応の出現率が低い筋肉注射で接種を行ったが、予測される副反応出現率は今までの結果と同等であった。この結果は、株が替わっても製造方法が同じならば副反応が増加しないことを示している。

今回の研究では、2回の接種間隔を3週間隔に加えて、60日、90日、180日間隔でも行ったが、全身および局所の副反応出現率は3週間隔で行ったときと同等であった。この結果は、2回の接種間隔が空いても安全性の面では問題がないことを示唆している。

平成23年度・24年度に行った「沈降インフルエンザワクチンH5N1を用いる対応(異種株連続接種によるパンデミック想定株を含む幅広い交叉免疫性の獲得、1回接種による基礎免疫誘導効果)の研究」では、ベトナム株とインドネシア株を用い、4種

類の組み合わせで3週間隔および6ヶ月間隔でワクチン接種を行った。この結果では、3週間隔でベトナム株とインドネシア株を接種しても、ベトナム株に対する抗体しか誘導しなかったが、インドネシア株を最初に接種し、6ヶ月後にベトナム株またはインドネシア株を接種したところ、両群ともに幅広い交叉免疫性が認められた。この結果は、ある間隔をあけて2回接種することで幅広い抗体が誘導されること、基礎免疫を誘導する抗原性は、ベトナム株よりもインドネシア株の方が優れていることを示している。パンデミック当初は H5N1 ワクチンの不足が心配されているので、この接種方法(2回の接種間隔を6ヶ月に広げる)は国民にとって有益な方法である。また、この結果は、本邦が開発した沈降インフルエンザワクチン H5N1 は1回の接種で基礎免疫を誘導することを示唆している。

今回の研究では、同じ株を用い、どのくらいの間隔をあけて接種すれば、交叉免疫が誘導できるかの検討を行った。今回の検討結果では、6ヶ月よりも短い90日以上接種間隔をあけて2回目を接種すれば交叉免疫が誘導されることが明らかになった。この結果は、H5N1 亜型によるパンデミック時には、取り急ぎプレパンデミックワクチンの1回目接種を行い、パンデミックワクチンが国内パンデミックに間に合えば、2回目をパンデミックワクチンで接種するなどの素早い対応をとることにより、発症リスクが軽減されることを示唆している。なお、今回の検討では、接種間隔をあけた方が、幅広い交叉免疫と高い GMT が誘導されていた。2回の接種で効果的な免疫を誘導するためには、2回の接種間隔を広げた方が適切であると推察された。

#### E. 結論

エジプト株は他の株と同等の免疫原性と安全性が認められた。初回2回至適接種間隔検討試験では、90日以上の間隔で2回接

種すれば効果的な交叉免疫が認められ、更に、2回の接種間隔をあけた方が効果的な交叉免疫が誘導されることが示された。

#### F. 健康危険情報

特記することはない。

#### G. 研究発表

(論文)

- 1) 庵原俊昭：インフルエンザワクチン—最近の動向—。岡部信彦 監修、田辺正樹、大曲貴夫 編集、医療機関における新型インフルエンザ等対策：ミニマム・エッセンシャルズ。Pp93-106、南山堂、東京
- 2) 矢野拓弥、赤地重宏、前田千里、山寺基子、松野由香里、永井佑樹、楠原 一、小林章人、小林隆司、福田美和、奈良谷性子、中川由美子、高橋裕明、山内昭則、天野秀臣、西中隆道、原 有希、植嶋一宗、中山 治、庵原俊昭：介護老人保健施設内で発生した AH3 型インフルエンザウイルスの性状、2014 年 8 月—三重県。病原微生物検出情報、掲載日 2014/09/19
- 3) 庵原俊昭：インフルエンザワクチンの現状と今後。医薬ジャーナル 50:2417-2423, 2014
- 4) Kumagai T, Nakayama T, Okuno Y, Kase T, Nishimura N, Ozaki T, Miyata A, Suzuki E, Okafuji T, Okafuji T, Ochiai H, Nagata N, Tsutsumi H, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Ihara T: Humoral immune response to influenza A(H1N1)pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic. *Viral Immuno* 27:368-374, 2014
- 5) 庵原俊昭：H5N1 プレパンデミックワクチンの臨床試験総括。化学療法の領域 30:2223-2230, 2014

(学会発表)

- 1) 庵原俊昭：インフルエンザへのワクチン接種戦略. 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014.6.18-20 福岡
- 2) 庵原俊昭：インフルエンザワクチンにおけるアナフィラキシーの現状・課題・展望. 第 41 回日本毒性学会学術集会 2014.7.2-7.4 神戸
- 3) 庵原俊昭：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の検討. 第 28 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 2014.7.4-7.6 鳥取
- 4) 長尾みづほ、藤澤隆夫、菅 秀、庵原俊昭：2012/13 シーズンにおける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調査. 第 117 回日本小児科学会 2014.4.11-13 名古屋
- 5) 難波菜穂子、樫山幸彦、菅 秀、島津 章、岸原康浩、滝本久美子、山本由紀、小田垣孝雄、廣瀬千賀子、小嶋 薫、清水祐子、伊藤澄信、庵原俊昭：沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) の新規株の有効性、安全性な

らびに至適接種間隔ならびに異種株に対する交叉免疫性の検討. 第 68 回国立病院総合医学会 2014.11.14-15 横浜

- 6) 中村晴奈、菅 秀、長尾みづほ、庵原俊昭：インフルエンザワクチン接種時における血清サイトカイン動態の解析. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 2014.12.6-7 福岡

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) H5N1 型インフルエンザワクチン及び感染防御キット  
国際公開番号 W02012/164928A1  
(2012/12/6 公開)  
基礎出願番号 特願 2011-120221  
発明者 伊藤澄信、庵原俊昭  
出願人 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団  
ワクチン接種株以外の H5N1 型インフルエンザウイルス感染を充分予防することができる H5N1 型インフルエンザワクチンを提供する。



## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

研究分担報告書

沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) の新規株の

有効性、安全性ならびに至適接種間隔ならびに異種株に対する交叉免疫性の検討

研究分担者 伊藤澄信 独立行政法人国立病院機構本部総合研究センター 臨床研究統括部長

#### 研究要旨

2007年秋に承認された沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) (以下 H5N1 ワクチン) はベトナム株 (Clade1) を用いて開発された。その後世界各地の H5 インフルエンザの流行状況に応じて、国家備蓄ワクチンとしてベトナム株に加えて、インドネシア株 (Clade2.1)、アンフィ株 (Clade2.3)、チンハイ株 (Clade2.2)、エジプト株 (Clade2.2) を用いて製造されてきた。H5N1 ワクチンは新型インフルエンザが発生した際にパンデミックワクチンを製造するための一つの製造方法であるとともに、基礎免疫効果による重篤化予防も期待されている。2008年以降実施された3つの研究班により、健康成人を対象に延べ7,442名に接種され、いずれの株を用いても基礎免疫効果は誘導される、初期2回接種後、半年以上して追加接種すると他の株に対する交叉免疫性がみられる、同種株の初期2回の接種間隔について、3週間よりも6か月にした方が抗体価が高く上昇し、かつ交叉免疫性が出現すること、初期接種が1回では不十分である可能性があること、異種株の接種の順番によって免疫原性が異なることなどが明らかになった。2010年にチンハイ株を接種された被験者の保存血清を2012年に流行したエジプト株とのHI抗体価を感染症研究所で測定したところ、同じClade2.2であっても、株によっては期待された防御抗体は得られていない。本研究ではまず、1) 新たに製造が開始されたエジプト株を承認治験と同様に抗体価の測定を行い免疫原性を確認すること、2) 初期2回接種間隔を2か月、3か月、6か月とした場合の基礎免疫誘導効果を検討し、至適接種間隔に関わる基礎データを得るために2013年度に計140名 (エジプト株免疫原性確認試験50名、初期2回至適接種間隔検討試験各群30名) の健康成人に接種し、接種前、2回接種21日後の血清を採取した。その結果、初期2回接種間隔を60日、90日、180日とした場合、全ての被験者にエジプト株に対する抗体価上昇を認めたが、90日、180日間隔接種での2回目接種後のエジプト株に対する抗体価の上昇は、3週間隔接種と比べて有意に高い抗体価の上昇を認めた。60日、90日、180日の接種間隔に加えて、エジプト株免疫原性確認試験の3週間の接種間隔と併せてエジプト株以外の株への交叉免疫性を検討した結果、90日、180日の接種間隔では全ての測定株への交叉免疫性を認めた。

初期2回接種間隔が3週間隔で2回接種では、接種株に対しては免疫効果を誘導できるが、異なる株に対しては免疫効果を誘導されなかった。初期2回接種間隔を延長した方が、2回目接種後の接種株に対する抗体価が上昇し、幅広い交叉免疫性が誘導される。このことは初期2回接種至適間隔を更に延長することにより、交叉免疫性をより高く誘導できる可能性が考えられる。

本臨床研究では、沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) の安全性は特段の問題はないことが示された。

#### 研究協力者

樺山 幸彦 独立行政法人国立病院機構東京医療センター 循環器科医長・治験管理室長

菅 秀 独立行政法人国立病院機構三重病院 臨床研究部長

島津 章 独立行政法人国立病院機構京都医療センター 臨床研究センター長

岸原 康浩 独立行政法人国立病院機構九州医療センター 総合診療科・科長

濱川 菜穂子 独立行政法人国立病院機構本部総合研究センター治験研究部治験推進室主査

## A. 研究目的

2007 年秋に承認された沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) (以下 H5N1 ワクチン) はベトナム株 (Clade1) を用いて開発された。その後世界各地の H5 インフルエンザの流行状況に応じて、国家備蓄ワクチンとしてベトナム株に加えて、インドネシア株 (Clade2. 1)、アンフィ株 (Clade2. 3)、チンハイ株 (Clade2. 2) を用いて製造されてきた。H5N1 ワクチンは新型インフルエンザが発生した際にパンデミックワクチンを製造するための一つの製造方法であるとともに、発生後、有効性が期待される場合、まず特定接種対象者に接種するためのプレパンデミックワクチンとして備蓄されている。2008 年、2010 年、2011-12 年に実施した「沈降新型インフルエンザワクチンのブースター効果に関する臨床試験」、「沈降インフルエンザワクチン H5N1 新規株による免疫原性・交叉免疫性を含めた追加接種効果に関する研究」、「沈降インフルエンザワクチン H5N1 を用いたパンデミック対応 (異種株連続接種によるパンデミック想定株を含む幅広い交叉免疫性の獲得、1 回接種による基礎免疫誘導効果) の研究」で健康成人を対象に延べ 7, 442 名に接種され、いずれの株を用いても基礎免疫効果は誘導される、初期 2 回接種後、半年以上して追加接種すると他の株に対する交叉免疫性がみられる、同種株の初期 2 回の接種間隔について、3 週間よりも 6 か月にした方が抗体価が高く上昇し、かつ交叉免疫性が出現することがわかっている。初期接種が 1 回では不十分である可能性があること、異種株の接種の順番によって免疫原性が異なることなどが明らかになってきた。2010 年にチンハイ株を接種された被験者の保存血清を 2012 年に流行したエジプト株との HI 抗体価を測定したところ、同じ Clade2. 2 であっても、株によっては期待された防御抗体は得られていない。本研究ではまず、1) 新たに製造が開始されたエジプト株を承認治験と同様に抗体価の測定を行い免疫原性を確認すること、2) 初期 2 回接種間隔を 2 か月、3 か月、6 か月とした場合の基礎免疫誘導効果を検討し、至適接種間隔に関わる基礎データを得る、3) 安全性データの蓄積のために、新たに 1, 000 名の健康人に接種すると同時に、H5N1 インフルエンザが流行した場合にワクチンの有効性を判断するためのコホートを形成する。

## B. 研究方法

本研究では、平成 24 年度に製造し、製剤化した H5N1 ワクチンのエジプト株を用い、過去に H5N1

ワクチン接種していない者を対象とする。なお、エジプト株についてはヒトに対する接種経験はない。

エジプト株免疫原性確認試験は、健常者 50 名を対象とし 3 週間隔で 2 回接種する。初回接種前と 2 回目接種 3 週後に採血を行い、接種株であるエジプト株に対する中和抗体価を測定する。また、将来、野生のトリにおける H5N1 の流行株の変異あるいはパンデミック発現時に流行株などを用いた抗体価の測定を行うためにあらかじめ被験者の同意のもとに保存する。なお、承認治験ならびに 2008 年 H5N1 ワクチン研究で 1 回接種 21 日後 (2 回目接種前) の中和抗体価を測定しているが、EMA の基準を満たすほど抗体価の上昇がないことは確認済みであるので本試験では検討しない。

初期 2 回至適接種間隔検討試験は、接種間隔を 60 日、90 日、180 日として各グループ 30 名の計 90 名の健常者を対象として実施する。初回接種前と 2 回目接種 3 週後に採血を行い、接種株であるエジプト株の中和抗体価を測定する。なお、他の株に対する交叉免疫性も検討するために、被験者の同意を得て血清を保存する。エジプト株免疫原性確認試験の結果をコントロールとして、幾何平均抗体価増加倍率を検討し、至適接種間隔の検討を行う。

本ワクチンは筋肉内接種あるいは皮下接種として承認されており、免疫原性に差はないが、局所反応は筋肉内接種の方が少ないため、2008 年ならびに 2010 年、2011-12 年の H5N1 ワクチン研究と同様、筋肉内接種で実施する。2008 年 H5N1 ワクチン研究ではインドネシア株とアンフィ株それぞれ約 3, 000 人、2011-12 年研究ではベトナム株 438 人、インドネシア株 582 人、計 1020 人の安全性データが集積されている。エジプト株については接種経験がないので 1, 000 人を対象に安全性のデータの集積を行う。安全性確認試験については各接種後の発赤、腫脹、疼痛などの局所反応 (観察期間 1 週間)、発熱、全身倦怠感などの全身反応 (観察期間 1 週間)、ショック、ギラン・バレー症候群などの重大な副反応 (観察期間 4 週間) の出現率を調査する。また、仮に一定期間内にパンデミックが発現した場合には、感染防御あるいは重症化阻止を中心とした有効性の検討が行えるように接種時に同意を取得する。安全性確認試験においては「新型インフルエンザ等対策ガイドライン」の「予防接種に関するガイドライン」に記載のある対象者の範囲内で幅広く被験者を募集するために 2 か年にわたって被験者を募集す

る。

本試験の実施に当たっては薬事法承認外の投与方法となる試験も含まれるが、臨床研究に関する倫理指針に従い、補償保険を購入して実施する。十全な安全性を確保するためもあり、ワクチン接種は原則として救急対応の可能とするため、臨床研究に関する倫理指針の定める倫理審査が実施できる病院内での接種を原則とする。また、地域による影響を除外するために多施設で行い、エジプト株免疫原性確認試験および初期2回至適接種間隔検討試験の3群も合わせた140名をランダム化して実施する。

安全性試験については25、26年度合わせて1,000人を目標に実施する。

#### 各試験の目的の概略

##### 1) エジプト株免疫原性確認試験：

平成24年度に製造し、製剤化した阪大微生物病研究会製のエジプト株(Clade2.2)は、ヒトにおける免疫原性の確認がされていないので、ワクチン接種前と製造販売承認された用法・用量に従って、3週間隔で2回筋肉内接種3週後の免疫原性および安全性を確認する。

##### 2) 初期2回至適接種間隔検討試験：

初期2回接種間隔を60日、90日、180日とした場合の基礎免疫誘導効果を検討し、至適接種間隔に関わる基礎データを取得する。

##### 3) 安全性確認試験：

エジプト株の安全性を検証するとともに将来5年以内にH5N1型インフルエンザが流行した場合、発症率等に基づき有効性を検討する。本研究では「新型インフルエンザ等対策ガイドライン」(平成25年6月26日新型インフルエンザ等及び鳥インフルエンザ等に関する関係省庁対策会議)の「予防接種に関するガイドライン」に基づき、鳥インフルエンザA(H5N1)ウイルスを扱う研究者、鳥インフルエンザ発生時に防疫業務等に従事する者、医療従事者、積極的疫学調査に従事する者、指定公共機関等で国民生活及び国民経済の安定に寄与する業務に従事する者等を接種対象者とし、問題点を検討する。

#### 上記3試験に共通の実実施計画概要

##### 対象被験者

以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない健康成人志願者を対象とする。

##### 【選択基準】

- 1) H5N1を対象とする20歳以上のワクチン未接種者
- 2) 接種後5年間の追跡調査を許諾する者

- 3) 該当する倫理審査委員会において承認を受けた文書による同意が得られ、臨床研究参加中の遵守事項を守り、本臨床研究計画書に定められた診察を受け、症状などの申告ができる者

##### 【除外基準】

- 1) 明らかにH5型インフルエンザの既往のある者(被験者からの聴取による)
- 2) 食物や医薬品等によって、過去にアナフィラキシーを呈したことがあることが明らかな者
- 3) 重篤な心臓・血管系、血液系、呼吸器系、肝臓、腎臓、消化器系、神経精神疾患の現病歴のある者
- 4) 過去にギラン・バレー症候群や急性散在性脳脊髄炎の既往のある者
- 5) 本臨床研究開始前4か月以内(接種日より計算)に、治験や他の臨床研究などに参加し投与を受けた者
- 6) 本臨床研究開始前27日以内に生ワクチン、または6日以内(以上、接種日より計算)に不活化ワクチン・トキシノイドの投与を受けた者
- 7) 本臨床研究開始前3か月以内に輸血又はガンマグロブリン製剤の投与を受けた者、または6か月以内(以上、接種日より計算)にガンマグロブリン製剤の大量療法(200 mg/kg以上)を受けた者
- 8) その他、臨床研究責任/分担医師が本臨床研究の被験者として不適当と判断した者

##### 【接種要注意者(接種の判断を行うに際し、注意を要する者)】

- 1) 本ワクチンの成分によってアナフィラキシーを呈したことがあることが明らかな者及び本ワクチンの成分又は鶏卵、鶏肉、その他鶏由来のもの、ホスホマイシンナトリウム、ゲンタマイシン硫酸塩、ミノサイクリン塩酸塩、ジベカシン硫酸塩に対してアレルギーを呈するおそれのある者
- 2) 心臓血管系疾患、腎臓疾患、肝臓疾患、血液疾患、発育障害等の基礎疾患を有する者
- 3) これまでの予防接種で接種後2日以内に発熱のみられた者及び全身性発疹等のアレルギーを疑う症状を呈したことがある者
- 4) 過去にけいれんの既往のある者
- 5) 過去に免疫不全の診断がなされている者及び近親者に先天性免疫不全症の者がいる者
- 6) 間質性肺炎、気管支喘息等の呼吸器系疾患を有する者
- 7) 妊娠中の接種に関する安全性は確立していないので、妊娠又は妊娠している可能性のある婦人には接種しないことを原則とし、予防接種上の有益性が危険性を上回ると判断される

場合にのみ接種すること。

- 8) 上記に掲げる者のほか、本臨床研究のワクチン接種を行うに際し、注意を要する状態にある者

#### ワクチン

沈降インフルエンザワクチン H5N1 「ビケン」  
1 mL 中に有効成分として、不活化インフルエンザウイルス A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) (IDCDC-RG 29) を HA 含量(相当値)として 30  $\mu$ g 含有し、振り混ぜるとき、均等に白濁する液剤

#### 併用禁止薬剤及び療法

ワクチン接種後から事後観察までは、以下の薬剤及び療法の併用を禁止する。

- 1) 輸血、ガンマグロブリン製剤、免疫抑制剤、免疫抑制療法、抗リウマチ剤、鉄剤を除く造血剤、副腎皮質ホルモン剤（外用剤を除く）
- 2) 他のワクチン  
但し初期 2 回至適間隔検討試験の被験者は以下の期間は併用可とする。
  - ・生ワクチン：初回接種後 7 日後から 2 回目接種予定日の 28 日前まで
  - ・不活化ワクチン：初回接種後 7 日後から 2 回目接種予定日の 14 日前まで
- 3) 治験薬

#### 中止基準

以下のいずれかに該当する被験者は、本臨床研究を中止する。

- 1) 同意取得後に、被験者自身が臨床研究参加の撤回を申し出た場合
- 2) 臨床研究責任/分担医師が、被験者が臨床研究計画を遵守できないと判断した場合
- 3) 除外基準に抵触することが判明した場合
- 4) その他、臨床研究責任/分担医師が臨床研究を中止するべきと判断した場合  
(例：「接種延期基準」に抵触するため、ワクチン接種が不可能など)

#### 評価項目のうち共通部分：

##### 安全性評価項目

ワクチン接種後から最終抗体価測定までに発現した有害事象及び副反応の種類、程度、持続期間及び発現率を検討する。

H5N1 型インフルエンザ流行時の発症率等調査  
将来 5 年以内に H5N1 型インフルエンザが流行した場合、発症率等に基づき有効性を検討する。

##### 健康観察日誌

- 1) 観察期間：各ワクチン接種日からワクチン接種後 28 日目まで
- 2) 観察項目：

- a) 腋下体温；被験者は、ワクチン接種後 7 日目まで、毎日腋下体温を測定し、測定時間と腋下体温を健康観察日誌に記録する。1 日のうち複数回測定した場合は、その日の最高体温と最低体温とを記録する。

ワクチン接種後 7 日目を過ぎても、発熱 (37.5 度以上) が認められた場合には腋下体温測定を継続し、37.5°C 未満に低下した日付と腋下体温を記録する。

- b) 接種部位反応；被験者は、ワクチン接種後 7 日目まで、接種部位の疼痛、発赤、腫脹、硬結、熱感、かゆみについて反応の有無を健康観察日誌に記録する。特にワクチン接種部位の発赤、腫脹、硬結が認められた場合には、長径を測定し健康観察日誌に記録する。
- c) 自覚症状、他覚所見；被験者は、自覚症状、他覚所見が認められた場合には症状が消失するまで観察を行い、健康観察日誌に記録する。  
全身症状：頭痛、倦怠感、鼻水  
その他：悪心、嘔吐、下痢、腹痛、関節痛、筋肉痛、悪寒戦慄、発汗増加等

安全性評価についてはワクチン接種 (Day 0) 後から事後観察日あるいはワクチン最終接種日から 28 日目までに発現した有害事象及び副反応の種類、程度、持続期間及び発現率を検討する。なお、事後観察日が 2 回目接種 28 日以前であった場合でも 2 回目接種後 28 日目までに有害事象が発現した場合にはできる限り捕捉する。2011 年 3 月 31 日に季節性インフルエンザに移行した A/H1N1pdm を対象とした「新型インフルエンザ予防接種後副反応報告書」の別表を参考として用いる。入院等の 1) 重篤な有害事象、2) 副反応基準による報告、3) その他に分けて収集する。なお、1) と 2) の安全性情報については研究者間で共有する (データ入力用 WEB 上)。なお、安全性情報における判断の誤差を最小にするため、調査期間における被験者の入院はすべて重篤な有害事象として報告を求めた。

#### 研究実施期間：

2013 年 9 月～2014 年 12 月

個別試験毎に異なる計画書概要

1) エジプト株免疫原性確認試験

用法・用量：

沈降インフルエンザワクチン（H5N1 株） 0 日目  
および 21 日目にエジプト株 15 μg を筋肉内接種  
（計 2 回）

評価項目：

免疫原性評価項目：H5N1 型インフルエンザウイルス  
に対する中和抗体価

安全性評価項目ならびに H5N1 型インフルエンザ  
流行時の発症率等調査は共通事項に記載済み

実施医療機関：

- 国立病院機構東京医療センター
- 国立病院機構三重病院
- 国立病院機構京都医療センター
- 国立病院九州医療センター

目標症例数：50 名

エジプト株免疫原性確認試験 スケジュール

Visit		①		②		③	
		1回目接種	事後観察	2回目接種	事後観察	抗体価測定	パンデミック後調査
経過日 (Day) *1		0	1~7 8~	21	22~28 29~	42	H5N1型インフルエンザ大流行後
許容範囲(日)		—		±7		2回目接種 21日後+7日	
		前 接種 後		前 接種 後			
医療機関	文書同意取得	○*2					郵送・電話にて罹患を確認
	診察	○ ○*3		○ ○*3		○	
	体温測定	○		○			
	採血（抗体価測定）	○				○	
	ワクチン接種		○		○		
自宅	健康観察日誌*4 （腋窩体温測定、 有害事象観察）		○ ○ △		○ ○ △	△	

○：必須、△：有害事象が生じた場合、網掛け：被験者来院日

\*1：ワクチン初回接種日（Visit①）を Day0 とする。

\*2：文書同意はワクチン接種-7 日~1 回目接種前までに取得する。

\*3：ワクチン接種約 30 分後に実施する。

\*4：1 回目接種時の健康観察日誌は Visit②で回収する。

2 回目接種時の健康観察日誌は Visit③で回収する。ただし、2 回目接種後 28 日目までに有害事象が発現した場合にはできる限り捕捉する。

2) 初期2回至適接種間隔検討試験

用法・用量：

初期2回接種間隔を60日、90日、180日とした場合の基礎免疫誘導効果を検討し、至適接種間隔に関わる基礎データを得ること。

評価項目：

免疫原性評価項目：H5N1型インフルエンザウイルスに対する中和抗体価

安全性評価項目ならびに H5N1 型インフルエンザ流行時の発症率等調査は共通事項に記載済み

実施医療機関：

国立病院機構東京医療センター

国立病院機構三重病院

国立病院機構京都医療センター

国立病院九州医療センター

目標症例数：接種間隔60日、90日、180日の各群30名ずつ、計90名

初期2回至適接種間隔検討試験 スケジュール

Visit	①		②		③	
	1回目接種	事後観察	2回目接種	事後観察	抗体価測定	パンデミック後調査
経過日 (Day) *1	0	1~7 8~	60 or 90 or 180	61~67 or 91~97 or 181~187	68~ or 98~ or 188~	81 or 111 or 201
許容範囲(日)	—		±14			2回目接種 21日後+7日
	前接種後		前接種後			
医療機関	文書同意取得	○*2				
	診察	○ ○*3	○ ○*3			○
	体温測定	○		○		
	採血 (抗体価測定)	○				○
	ワクチン接種		○		○	
自宅	健康観察日誌*4 (腋窩体温測定、 有害事象観察)		○ ○ △	○	○	△

○：必須、△：有害事象が生じた場合、網掛け：被験者来院日

\*1：ワクチン初回接種日 (Visit①) を Day0 とする。

\*2：文書同意はワクチン接種-7日~1回目接種前までに取得する。

\*3：ワクチン接種約30分後に実施する。

\*4：1回目接種時の健康観察日誌は Visit② で回収する。

2回目接種時の健康観察日誌は Visit③ で回収する。ただし、2回目接種後28日目までに有害事象が発現した場合にはできる限り捕捉する。

3) 安全性確認試験

用法・用量

沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) エジプト株を 0、21 日目に筋肉内接種 (計 2 回、1 回接種量 15 μg)

評価項目：

安全性評価項目ならびに H5N1 型インフルエンザ流行時の発症率等調査は共通事項に記載済み

実施医療機関：

- 国立病院機構東京医療センター
- 国立病院機構三重病院
- 国立病院機構京都医療センター
- 国立病院九州医療センター

目標症例数：1,000 名 (2 年間)

安全性確認試験 スケジュール

Visit		①		②		③		
		1回目接種	事後観察	2回目接種	事後観察	安全性調査終了		パンデミック後調査
経過日 (Day) *1		0	1~7 8~	21	22~28 29~	49		H5N1型インフルエンザ大流行後
許容範囲 (日)		-		±7				
		前 接種 後		前 接種 後				
医療機関	文書同意取得	○*2						郵送・電話にて罹患を確認
	診察	○ ○*3		○ ○*3		△*5		
	体温測定	○		○				
	ワクチン接種		○		○			
自宅	健康観察日誌*4 (腋窩体温測定、有害事象観察)		○ ○ △		○ ○ △	2回目接種 28日後まで記載		

○：必須、△：有害事象が生じた場合、網掛け：被験者来院日

\*1：ワクチン初回接種日 (Visit①) を Day0 とする。

\*2：文書同意はワクチン接種-7 日~1 回目接種前までに取得する。

\*3：ワクチン接種約 30 分後に実施する。

\*4：1 回目接種時の健康観察日誌は Visit②で回収する。

2 回目接種時の健康観察日誌は Visit③で回収する。ただし、2 回目接種後 28 日目までに有害事象が発現した場合にはできる限り捕捉する。

\*5：診察が困難な場合は、郵送で健康観察日誌を回収する。



【結果】

1) エジプト株免疫原性確認試験

試験期間 平成 25 年 9 月～平成 26 年 12 月  
 ワクチン接種は平成 25 年 11 月中に終了し、  
 抗体価用採血も 12 月までに終了した。

2) 初期 2 回至適接種間隔検討試験

試験期間 平成 25 年 9 月～平成 26 年 12 月  
 ワクチン接種は平成 25 年 9 月に開始した。  
 エジプト株免疫原性確認試験と初期 2 回至適接種  
 間隔検討試験は添付文書の用法・用量と接種間隔  
 が異なるだけであるため、エジプト株免疫原性確  
 認試験を 1 群として全体 140 名の被験者を免疫原  
 性確認試験 50 名、初期 2 回至適接種間隔検討試  
 験 60 日群 30 名、90 日群 30 名、180 日群 30 名の  
 4 群に無作為に群分けを行った。そのため、被験  
 者背景は両試験の合計として記載した。

被験者背景

1 回目接種被験者数					
	3 週 間 後	60 日 後	90 日 後	180 日 後	計
東京医療センター	10	10	10	10	40
京都医療センター	10	10	10	10	40
九州医療センター	10	10	10	10	40
三重病院	20	0	0	0	20
計	50	30	30	30	140

年齢分布

	女性		男性	
	人数	割合	人数	割合
29 歳以下	32	39.5%	24	40.7%
30 歳代	22	27.2%	15	25.4%
40 歳代	19	23.5%	12	20.3%
50 歳代	8	9.9%	8	13.6%
60 歳以上	0	0.0%	0	0.0%
合計	81	100.0%	59	100.0%
女性	81	57.9%	平均 年齢	35.0 歳
男性	59	42.1%	平均 年齢	34.9 歳

被験者の合併症

	人数	(割合)
治療中疾患あり	16	11.4%
高血圧	4	2.9%
脂質異常症	2	1.4%
糖尿病	3	2.1%
喘息などの呼吸器 疾患	1	0.7%
その他	12	8.6%
その他の疾患数は 13 (1 人に 2 件以上の合併もあり)		

気管支喘息がある人 1

同意取得後ワクチン未接種者数 4  
 同意取得後に被験者自身が臨床研究参加を撤回 3  
 除外基準に抵触することが判明 1

2 回目ワクチン未接種者数  
 該当なし

2 回目抗体価採血未実施者数  
 異動の為、抗体価採血ができなかった。 1

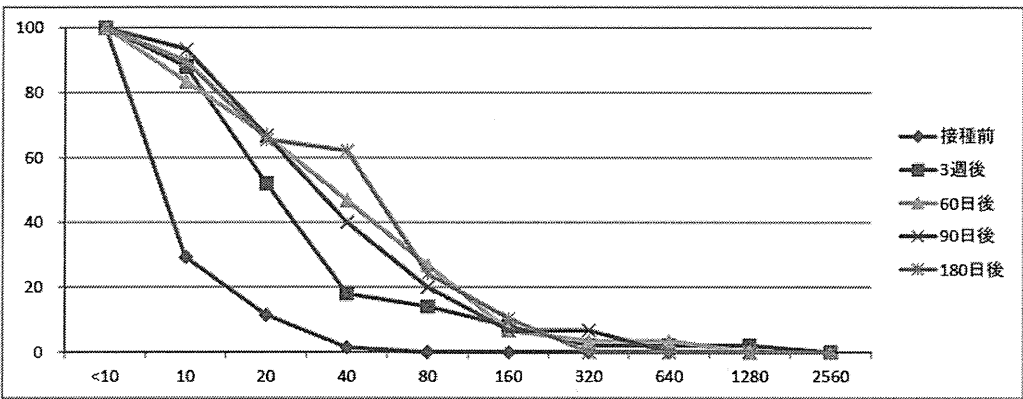
併用禁止薬使用のための逸脱 2

# 有効性評価

H5N1型インフルエンザウイルスに対する中和抗体価の頻度分布と逆累積度数分布図  
エジプト株接種

1): ( )内は対数変換値(Log10)

項目	回数	例数	抗体価												
			<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560			
NT抗体価	接種前	140	99	25	14	2									
	3週後	50	6	18	17	2	3	3	0	0					
	60日後	30	5	5	6	6	6	1	0	1					
	90日後	30	2	8	8	6	4	0	2						
	180日後	29	3	7	1	11	4	3							
			抗体価 <sup>1)</sup>												
			<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560			
			(0.70)	(1.00)	(1.30)	(1.60)	(1.90)	(2.20)	(2.51)	(2.81)	(3.11)				
NT抗体価	接種前		100	29	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3週後		100	88	52	18	14	8	2	2	2	0	0	0	
	60日後		100	83	67	47	27	7	3	3	0	0	0	0	
	90日後		100	93	67	40	20	7	7	0	0	0	0	0	
	180日後		100	90	66	62	24	10	0	0	0	0	0	0	



幾何平均抗体価倍<sup>1)</sup>

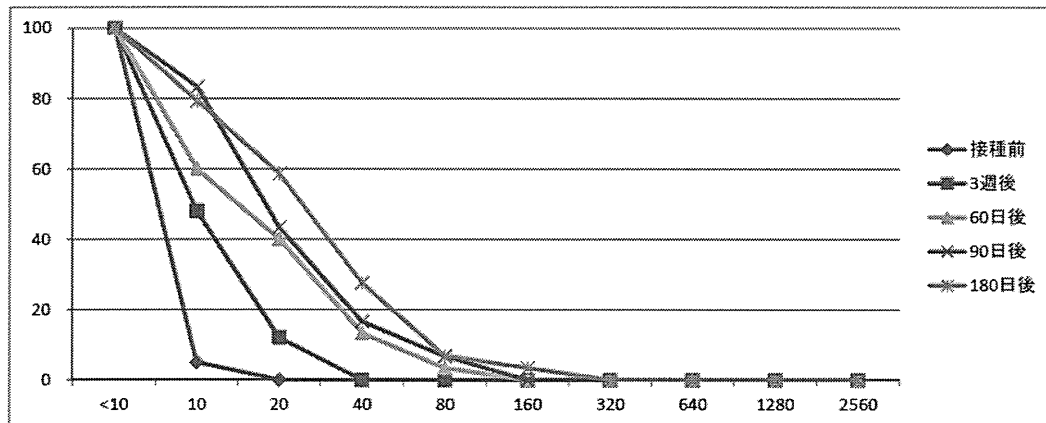
3週後	25	( 1.9 3.4 )	( )内は95%信頼区間の上下端
60日後	3.9	( 2.7 5.6 )	
90日後	4.0	( 2.8 5.8 )	
180日後	5.2	( 3.6 7.6 )	

エジプト株接種

1): ( )内は対数変換値(Log10)

項目	回数	例数	抗体価												
			<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560			
NT抗体価	接種前	140	133	7											
	3週後	50	26	18	6										
	60日後	30	12	6	8	3	1								
	90日後	30	5	12	8	3	2								
	180日後	29	6	6	9	6	1	1							
			抗体価 <sup>1)</sup>												
			<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560			
			(0.70)	(1.00)	(1.30)	(1.60)	(1.90)	(2.20)	(2.51)	(2.81)	(3.11)				
NT抗体価	接種前		100	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	3週後		100	48	12	0	0	0	0	0	0	0	0		
	60日後		100	60	40	13	3	0	0	0	0	0	0		
	90日後		100	83	43	17	7	0	0	0	0	0	0		
	180日後		100	79	59	28	7	3	0	0	0	0	0		

インドネシア株



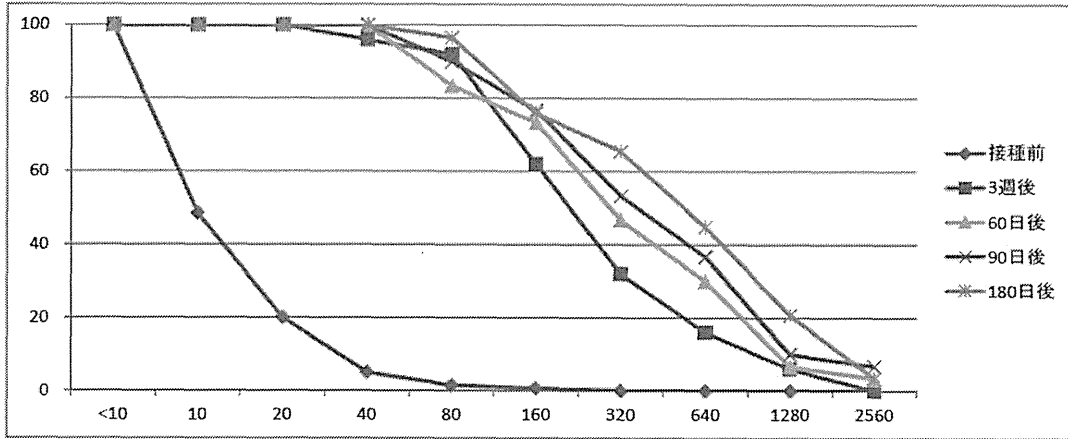
幾何平均抗体価倍<sup>1)</sup>

3週後	1.5	( 1.3 1.7 )	( )内は95%信頼区間の上下端
60日後	2.2	( 1.6 2.9 )	
90日後	2.8	( 2.1 3.6 )	
180日後	3.4	( 2.4 4.8 )	

エジプト株接種

1): ( )内は対数変換値(Log10)

項目	回数	例数	抗体価											
			<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560		
NT抗体価	接種前	140	72	40	21	5	1	1						
	3週後	50			2	15	15	8	5	3				
	60日後	30				3	8	5	7	1	1			
	90日後	30				3	4	7	5	8	1	2		
	180日後	29				1	6	3	6	7	5	1		
			抗体価 <sup>1)</sup>											
			<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560		
			(0.70)	(1.00)	(1.30)	(1.60)	(1.90)	(2.20)	(2.51)	(2.81)	(3.11)			
NT抗体価	接種前		100	49	20	5	1	1	0	0	0	0	0	
	3週後		100	100	100	96	92	62	32	16	6	0	0	
	60日後		100	100	100	100	83	73	47	30	7	3	0	
	90日後		100	100	100	100	90	77	53	37	10	7	0	
	180日後		100	100	100	100	97	76	66	45	21	3	0	
エジプト株														



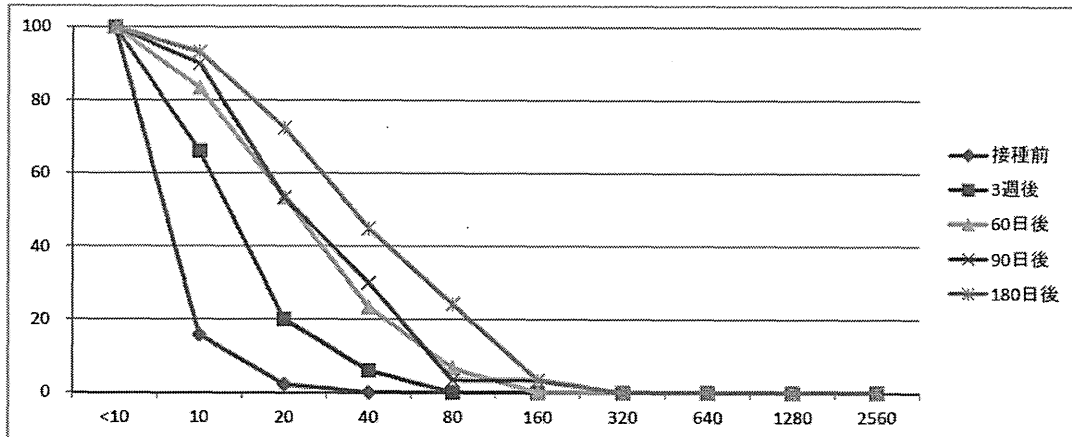
幾何平均抗体価倍率

3週後	16.7	( 12.4 22.4 )	( )内は95%信頼区間の上下端
60日後	23.2	( 14.5 37.0 )	
90日後	34.3	( 21.4 55.0 )	
180日後	52.9	( 35.3 79.2 )	

H5N1型インフルエンザウイルスに対する中和抗体価の頻度分布と逆累積度数分布図  
エジプト株接種

1): ( )内は対数変換値(Log10)

項目	回数	例数	抗体価											
			<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560		
NT抗体価	接種前	140	118	19	3									
	3週後	50	17	23	7	3								
	60日後	30	5	9	9	5	2							
	90日後	30	3	11	7	8	0	1						
	180日後	29	2	6	8	6	6	1						
			抗体価 <sup>1)</sup>											
			<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560		
			(0.70)	(1.00)	(1.30)	(1.60)	(1.90)	(2.20)	(2.51)	(2.81)	(3.11)			
NT抗体価	接種前		100	16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3週後		100	66	20	6	0	0	0	0	0	0	0	
	60日後		100	83	53	23	7	0	0	0	0	0	0	
	90日後		100	90	53	30	3	3	0	0	0	0	0	
	180日後		100	93	72	45	24	3	0	0	0	0	0	
アンフィ株														



幾何平均抗体価倍率

3週後	1.6	( 1.4 2.0 )	( )内は95%信頼区間の上下端
60日後	3.0	( 2.3 4.1 )	
90日後	3.2	( 2.4 4.5 )	
180日後	5.2	( 3.7 7.4 )	

幾何平均抗体価（GMT）増加倍率

		ベトナム クレード 1.0	インドネシア クレード 2.1	エジプト クレード 2.2	アンフィ クレード 2.3
3 週後	50	2.5 (1.9-3.4)	1.5 (1.3-1.7)	16.7 (12.4-22.4)	1.6 (1.4-2.0)
60 日後	30	3.9 (2.7-5.6)	2.2 (1.6-2.9)	23.2 (14.5-37.0)	3 (2.3-4.1)
90 日後	30	4 (2.8-5.8)	2.8 (2.1-3.6)	34.3 (21.4-55.0)	3.2 (2.4-4.5)
180 日後	29	5.2 (3.6-7.6)	3.4 (2.4-4.8)	52.9 (35.3-79.2)	5.2 (3.7-7.4)

1) エジプト株免疫原性確認試験

3 週間隔の初期 2 回接種により、接種株であるエジプト株に対しての有意な抗体価上昇を認めた。

2) 初期 2 回至適接種間隔検討試験

初期 2 回接種間隔を 60 日、90 日、180 日とした場合、全ての被験者にエジプト株に対する抗体価上昇を認めた。90 日、180 日間隔接種での 2 回目接種後のエジプト株に対する抗体価の上昇は、3 週間隔接種と比べて有意に高い抗体価の上昇を認めた。60 日、90 日、180 日の接種間隔に加えて、エジプト株免疫原性確認試験の 3 週間の接種間隔と併せてエジプト株以外の株への交叉免疫性を検討した結果、90 日、180 日の接種間隔では全ての測定株への交叉免疫性を認めた。

初期 2 回接種間隔が 3 週間隔で 2 回接種では、接種株に対しては免疫効果を誘導できるが、異なる株に対しては免疫効果を誘導されなかった。

初期 2 回接種間隔を延長した方が、2 回目接種後の接種株に対する抗体価が上昇し、幅広い交叉免疫性が誘導される。このことは初期 2 回接種至適間隔を更に延長することにより、交叉免疫性をより高く誘導できる可能性が考えられる。

本臨床研究では、沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) の安全性は特段の問題はないことが示された。