インフルエンザ生ワクチンに関する研究

II. 低温順化株の野外実験成績

水谷 裕迪* 井土 俊郎**

STUDIES ON LIVE INFLUENZA VIRUS VACCINE II. EVALUATION OF COLD-ADAPTED INFLUENZA A2 HONG KONG VIRUS IN VOLUNTEERS

Hiromichi MIZUTANI¹⁾ and Toshiro IZUCHI²⁾

*) Virus Laboratory and Pediatric Clinic, Kanto Teishin
Hospital, Shinagawa-ku, Tokyo

**) Nippon Institute for Biological Science, Tachikawa, Tokyo

[受付: 3月16日, 1973年]

総 括

前報において報告した A 2/香港型インフルエンザウイルスの低温順化株 (Abe 株) を, トリ白血病ウイルス Free SPF 発育鶏卵を用いて増殖させ, 超遠心法によって精製したウイルスを PBS に浮遊した試作生ワクチンを作成し, これを志願者に対して接種し, 生ワクチンとしての有効性を検討した結果, 次の成績を得た.

1. 18~62歳 (平均29歳) の志願者を 3 群に分け, 第1群には市販の不活化ワクチンを皮下注射して基礎免疫を与えた後に生ワクチンを, 耳鼻科用ネブライザーで $3 \times 10^5 \text{EID}_{50}/0.3 \text{ ml}$ を経鼻口接種した. また第2群は, 前群と同様に不活化ワクチンを皮下注射した後に, 偽生ワクチンとして PBS を経鼻口接種し, 第3群は, 初回に不活化ワクチン, 第2回目に生ワクチンを, それぞれ経鼻口接種した群である.

その結果, 血中 HI 抗体価が4倍以上上昇した人は, 第1群 (31名) で45%, 第2群 (15名) で20%, および第3群 (20名) では40%であり, 各群ともに抗体価が64倍未満にとどまった人は1例も認められなかった.

2. 生ワクチン接種に伴う副反応は, 不活化ワクチンの経鼻口接種に際して訴えられた反応に比べて, むしろ軽く, 対照の PBS 接種群とほとんど差がなく, 非常に

軽度であつた.

3. 不活化ワクチンの皮下, 経鼻口接種後に接種した生ワクチンにより, 局所の IgA 抗体の上昇が著明に認められた.

序 文

現行不活化ワクチンの皮下注射では血中抗体は上昇するが, 感染防御に最も重要と考えられる局所抗体の上昇はほとんど期待できないことが最近しだいにわかつてきた. このような状況から注射法にかかわつて不活化ワクチンを経鼻投与する方法も試みられた (Waldman et al. 1969) が, その効果は不十分で局所抗体の産生は生ワクチンより明らかに劣ることが判明したため, 目下世界各国で有効な生ワクチンの開発を目的とした研究が進められている. 生ワクチンを目標とした弱毒株の作成に関する過去の研究を見ると, 発育鶏卵で継代を重ねたもの (Meiklejohn, 1960; Andrews et al., 1966; Okuno & Nakamura, 1966; Zhdanov, 1967), あるいはヒト由来細胞に順化したもの (Fedeyeva et al. 1954) などが試みられ, 野外実験例もかなりの数に達したがなお弱毒化の機序やマーカー, 免疫学的意義などに関して不明の点が多く, また, ソ連の株のように子供に対して十分に弱毒化されていなかったり, 培養細胞の清浄度の検討が不十分であつたりなどの理由も重なつて一般に用いられるまでには至っていない. このような背景のもとで, ポリオワクチンなどで成功した低温順化による弱毒化の例に

* 関東通信病院ウイルス研究室兼小児科

** 日本生物科学研究所: 関東通信病院ウイルス研究室
研究員

ならい最近インフルエンザウイルスでも低温順化により弱毒株を得ようとする動きが Maassab (1967), Boudreault et al. (1968), Medvedeva et al. (1968), Mills et al. (1969) らにより試みられた。著者らも1969年の香港型インフルエンザ流行に際して分離したウイルスを用いて低温順化による弱毒株の作成を試み、その結果前報で報告したように実験動物で安全かつ有効と認める弱毒株を得たので、その後著者ら自身を含めた志願者で小規模の野外実験を試みた。本報ではこの野外実験の成績を報告する。なおこの成績の概要は、第19回日本ウイルス学会総会 (1971) において発表した。

材料と方法

1) ワクチン

生ワクチンは28°Cに低温順化したA₂香港型ウイルス(H₃N₂)のAbe株で、第1図に示した方法によつて精製したウイルスを、10^{6.0} EID₅₀/mlにPBS(1/100 MPB, pH 7.2)に浮遊させたものである。接種実験に際しては、無菌試験、マイコプラズマ・迷入ウイルスの否定試験などを行ない、安全性を十分に検討したものを生ワクチンとして供試した。不活化ワクチンは、同型のウイルスを含む市販ワクチンを使用した。

Figure 1 Method of purification of virus for live influenza vaccine

2) ワクチン接種

生ワクチンの接種には、耳鼻科で治療に使う金属製ネブライザーを用い、1人あたり0.3 mlを両鼻孔および咽喉頭部に分けて噴霧した。不活化ワクチンの皮下注

射は、ディスポーザブル注射器を用いて上腕部に1人あたり0.5 mlを接種し、経鼻口接種は生ワクチンに準じて行なつた。

3) 血清中の HI 抗体の測定法

血清中のインヒビターの除去は、被検血清2容にトリプシン液(0.08 mg/ml クリスタルトリプシン)1容を加え、室温で30分静置した後に56°C 30分の加熱処理を施し、これに1/100M KIO₄ 6容を加え、室温で45分静置した後1%グリセリン加生理食塩水7容を加えて供試した。反応術式はWHOの方法に準じてマイクロタイターを用いて行ない、抗体価は血清の最終希釈倍数で表わした。

4) 局所の IgA の定量

うがい液中の免疫グロブリンA(IgA)の定量は、第2図に示した方法でうがい液を濃縮し、これについて総蛋白量とIgA量の測定を行ない、総蛋白量あたりのIgA量を百分率で表現した。

Figure 2 Method of IgA cocentracion in unheated nasal washing

成 績

Volunteers に応用する前に、著者らを含む Volunteers に対して生ワクチン接種を行なつた結果、接種に伴う副作用は認められず、血中および局所の HI 抗体の上昇とともに局所の IgA 濃度の上昇が認められた。また発育鶏卵を用いて接種したウイルスの再分離を試みたところ、供試した4例ともに、接種10分後から30分後までの間は、うがい液および鼻洗浄液からウイルスが分離されたが、それ以後は分離されなかつた。

第1表に示したプログラムに従つてワクチン接種を行ない、接種に伴う副作用および血中 HI 抗体価、さらに一部のものについて局所 IgA 濃度の変動を観察した。

第1群はいわゆる KL (Killed-Live) 方式に準じるもので、不活化ワクチン注射で基礎免疫をした後にワクチンを吸入した群である。第2群は第1群と同様に不活化ワクチンを皮下注射した後、第2回目には偽生ワクチンとして PBS を吸入したもので、不活化ワクチンの抗原刺激が4週間後にまで影響を及ぼすか否かを見ると同時に、生ワクチンの副作用調査の対照とした群であり、第3群は初回免疫に不活化ワクチンの吸入を行ない、第2回目に生ワクチンの吸入接種を行なった群である。

1) ワクチン接種に伴う副作用

まず各群において認められた、接種に伴う副作用発現状況を第2表に示した。不活化ワクチンの皮下注射に伴う副作用については、他の報告にもみられるように注射局所の疼痛、発赤を主体とするが、頭痛、発熱など全身

症状もかなり認められた。また、不活化ワクチンの吸入によつては、無症状で経過した人が多かったものの全身的な症状については、皮下注射以上に副作用が強く現われたこと、さらに症状の持続も長かつたことが注目される。つぎに生ワクチンを吸入した場合には、頭痛、どの痛み、くしゃみ、鼻汁が主な副作用として認められ、その他、不活化ワクチンの接種に際して現われたものが同程度に認められた。ところで生ワクチンと同時に対照として、PBS を噴霧したグループでも第3表に示したように、かなりの人が症状を訴えており、その程度は生ワクチンあるいは不活化ワクチンの吸入時に認められた症状の程度とほぼ同様であつた。症状の持続を見ると他の3群とは異なり3～4日の短期間で消失しているものの心理的な影響による副作用がこの種の実験ではある程度さけられないことを示している。全体的に見て、不活化ワクチンの皮下注射に際して認められた20～50%に達する局所反応を除いて、いずれも20%以下で、今回の実験の主目的の1つである生ワクチンによる副反応はきわめて軽度と考えられた。

2. 血中 HI 抗体の変動

つぎにワクチン接種に伴う抗体反応について検討した。抗体調査にあつては、ワクチン接種の前後に3回の採血が行なわれた人について実施した。各群における HI 抗体価の変動を第3図に示し、さらに第4表に成績をまとめて示した。第1群では不活化ワクチン皮下注射

Table 1 Vaccination schedule

Day	Group		
	1	2	3
Before	Serum specimens		
0	Killed vac.	Killed vac.	Killed vac.
1 st vac.	sc ↓	sc ↓	in ↓
7 th	Serum specimens		
2 nd vac.	Live vac.	PBS	Live vac.
	in ↓	in ↓	in ↓
28 th	Serum specimens		

Table 2 Side reactions following subcutaneous or intranasal administration with A2/Hong Kong type killed influenza virus vaccine

Symptoms	Killed vaccine, sc, (42)*								Killed vaccine, in, (21)							
	1	2	3	4	5	6	7	8**	1	2	3	4	5	6	7	8
Headache	17***	14	5	5	2		5	2	5	14	10	14			10	5
Chillness	10	5	5	7	2						10	14				
Sore throat		5	5	5					5	14	10	5	5			
Hoarseness				2	2				5	10	5				5	
Arthralgia	5	5	5	5					5	10	10	5	10			
Cough		2		2						14	5	14	13	10	5	
Sneezing	2	7	5	2	2		2	2	5	10	10	5	5	5		5
Rhinorrhea	5	12	10	7	2		2	2	14	14	5	10	10	10		
Sputum									5	5	5	5	5			
Nausea			2	2												
Local pain	50	41	33	14	7											
Swelling	21	29	19	5	2											
None	50	55	65	83	93	100	95	98	86	81	86	81	90	90	86	90

Note. *: Number of persons **: Days after vaccination

***: Percent of persons complained of symptoms

Table 3 Side reactions following intranasal administration with A2/Hong Kong type live influenza virus vaccine or PBS as placebo

Symptoms	Live vaccine, in, (58)*								PBS, in, (17)							
	1	2	3	4	5	6	7	8**	1	2	3	4	5	6	7	8
Headache	7***	14	10	7	7	6	9			12	6	12				
Chillness	7	4	4	5	2				6	12	18					
Sore throat		7	5	5	5	5	4	4	12	12	6					
Hoarseness		4	4	4	2	2	4					6				
Arthralgia		4	4	2												
Cough																
Sneezing	4	10	10	5	7	2	3	2	6	18	12	6				
Rhinorrhea	9	17	17	16	14	5	3	2	18	12	12	12	6			
Sputum	2	2										6	6			
Nausea												6	6			
Local pain																
Swelling																
None	90	83	83	83	85	94	90	94	82	76	72	88	94	100	—	—

Note. *: Number of persons **: Days after vaccination

***: Percent of persons complained of symptoms

Figure 3 Distribution of serum HI antibody titers 7 and 28 days following s.c. or i.n. administration of A2 Hong Kong type live or killed influenza vaccines

○---○ Before vac. ○——○ 7 days,

●——● 28 days following vac.

* Number of persons

Table 4 HI antibody response to A2/Hong Kong type influenza virus

Subjects	Percent of persons in each group		
	1	2	3
4 fold or greater increase in antibody titer at 28 days after vaccination	45.2	20.0	40.0
32 fold or smaller antibody titer at 28 days after vaccination	0	0	0
Geometric mean antibody titer at before vaccination	26.5	26.9	26.5
Geometric mean antibody titer at 7 days after vaccination	27.8*	27.7	26.5
Geometric mean antibody titer at 28 days after vaccination	27.9**	27.6	27.6**

Note. For geometric mean calculations a titer of <1:32 was considered to be 1:16,

*: 0.05 < F **: 0.01 < F

後1週間目で、HI抗体価の上昇が見られ、さらに4週間後には生ワクチンによる追加免疫によると思われる抗体上昇が認められた。第2群では1群同様に不活化ワクチンによる初回免疫によつて抗体価の上昇が認められたが、追加免疫は対照としてPBSを接種したために、当然のことながら抗体の上昇は見られなかつた。第3群においては、初回免疫に不活化ワクチンの噴霧を行なつた。1週間後の抗体価の変動は認められなかつたが、4

週間後には生ワクチンによる追加免疫の効果と思われる抗体価の上昇が認められた。第4表に示したように、4週間後に4倍以上の抗体価の上昇を認めたものは第1群と第3群においてそれぞれ40%以上であった。また、ワクチン接種前 HI 抗体価が64倍未満の人は、4週間後にはすべて64倍以上に上昇した。この成績から生ワクチンの吸入による抗体反応は血中抗体においても十分に認めうる事が確認された。

3. 局所の IgA の変動

ワクチン接種後の局所抗体(IgA)の変動を調べたところ第4図のようになった。これは8人について15日間に出た試料を4期に分けて平均したもので、濃縮したうがい液中の IgA 量を総蛋白量に対する百分率で示したものである。最初の2期では、不活化ワクチン接種による IgA の変動が示され、後半の2期は追加免疫による変動を表わしているが、追加免疫による IgA の増加率が前者を上回っており、生ワクチンの局所抗体産生能が優れていることをうかがわせる。しかし、2週間で、IgA のレベルがやや低下しているものが認められた。なお、第2群では追加免疫による IgA の上昇は認められなかった。

Figure 4 IgA levels in nasal washing of volunteers

----- Group 1 ——— group 3

考 察

インフルエンザ生ワクチンとして有効な株の備えるべき条件としては、まず人に接種した場合に十分に弱毒化されていること、および免疫原性を保持していることがあげられ、さらにウイルスがワクチン被接種者から他人に伝染しないこと、あるいはかりに伝染しても強毒に復帰しないために「弱毒」性が遺伝的に安定した性状であ

ることも要求されるであろう。しかし、インフルエンザウイルスは元来遺伝的に易変異性であることが毎年の流行、あるいは組換え現象として現われ(Burnet & Lind, 1951)、またウイルスの分子生物学的な研究からも、それが裏付けされている(Pons & Hirst, 1968)。今回の実験に使用した低温順化株は、前報で示したように in vitro あるいは動物実験から弱毒株と考えられ、かつ免疫原性も十分に保有していることが認められた株である。またこの株は当初から人体接種用の Vaccine の開発を目的として、健康者が罹患した際に、そのうがい液からトリ白血病毒 free SPF 鶏卵を用いて分離したもので、以後すべて同鶏卵あるいは同鶏卵由来細胞を用いて継代したものである。試作生ワクチンのウイルス浮遊液に PBS を使用したのは、他の物質、とくに抗原性を持った蛋白質を安定剤として加えることによる過敏性を避けるための配慮からである。ところで人に接種する場合のウイルス量に関しては Beare et al. (1968) は種々株で 1 人あたり $10^{4.5} \sim 10^{6.0}$ EID₅₀/ml を用いたが、後になって彼らは低温順化弱毒株を用いての実験から、最低免疫量は $10^{5.0}$ EID₅₀/ml であろうと言っている(Beare et al., 1971)。また Couch et al. (1971) は鼻腔に instillation した場合の 50% Human Infectious Dose (HID₅₀) は 127 TCID₅₀ に相当すると言っており、ワクチンには 8 HID₅₀ を用いている。ウイルスの HID₅₀ はウイルスの弱毒化の程度あるいは感染様式、すなわち鼻孔滴下かあるいは噴霧かによつて左右されるものであるから一概には言えないだろうが、著者らの用いた 3×10^5 EID₅₀/0.3 ml のウイルス量は 5 ~ 10 HID₅₀ に相当すると考えられる。ワクチン接種の方法としては、注射器などによる instillation、あるいはネブライザーによる inhalation が一般的に考えられるが、われわれは野外実験実施の前に少数の Volunteers に対する試験接種から、耳鼻科用のネブライザーによる方法が最も確実に所定量を周囲に飛散させることなく接種できることを確かめて本試験に応用した。

さて、ワクチン接種に伴う臨床症状に関しては、不活化ワクチンの皮下注射では Cromwell et al. (1969) の成績と同様に 50% の人が、また吸入ではほぼ 20% の人が何らかの反応を訴えており、副作用に関しては、後者が軽いことを示しているが、Waldman et al. (1969) は不活化ワクチンの吸入法による副作用は、皮下注射法よりも強いことを報告している。これは不活化ワクチンに含まれる防腐剤やホルマリンの影響によるものかも知れない。ところで自覚症状の訴えの中には非常に個人差があり、調査対象によつてその発現率に差があることが示されている(Cromwell et al., 1969) が、今回の症状調査

にもそのことが現われている。すなわち PBS 投与群および生ワクチン投与群で、症状調査期間中を無反応で経過した人は、前群（男子40%，女子14%）、後群（男子34%，女子10%）ともに女性において低率であつた。また不活化ワクチンの噴霧では4日間は15～20%の人が何らかの症状を訴え、さらに生ワクチン接種群では、ほぼ同様か、あるいはやや軽度な反応が認められたのに対して、プラセボ群においても、PBS 吸入後4日間はワクチン吸入に劣らない程度の症状を訴えている。このプラセボ群では症状の持続期間が短く、内容的には限られた範囲に集中している傾向が伺えるものの、これらの結果を考えると、自覚症状という主観的な事項の調査には心理的な影響が関係してくる弊害を免れ得ず、この種の調査のむつかしさを示しているが、このような心理的影響を考えると今回の生ワクチン接種による副作用はきわめて軽微なものであつたと言えよう。

人に接種されたウイルスの呼吸器での残存性は、通常の実験室継代株を感染させた場合、1～4日間は、うがい液からウイルスが分離される (Alford et al., 1967; Rossen et al., 1970) ようであるが、今回の実験では接種直後のうがい液から分離されたのみで、その後ウイルスが分離できず、局所での増殖がかなり抑制されていることを示唆する成績であつた。

生ワクチン接種による抗体反応は、ウイルスの再分離がほとんどできないにもかかわらず一応予想した水準を示し、不活化ワクチンによる基礎免疫後に生ワクチンの吸入接種によつて、血中 HI 抗体価の有意な ($F_{2,90} 0.01 < F$) 上昇を認めた。抗体価の水準は Maassab et al. (1969) と同程度の $27.0 \sim 27.8$ であり、また接種後の抗体価が64倍未満のものは1例も認められなかつた。

ところで不活化ワクチンの経鼻接種による免疫効果については、それを認める報告がある (Waldman et al., 1969) が、今回の実験では血中 HI 抗体の上昇はほとんど認められなかつた。これは接種抗原量による差とも考えられるが、Gwaltney et al. (1971) も著者らの成績と同様に抗体反応も少なく、感染に対する防御効果もほとんど認められなかつたと言っており、副作用の程度と合わせて考えると、不活化ワクチンの経鼻接種は、少なくとも現状ではすすめられないように思われる。

なお別のグループで生ワクチンと不活化ワクチンを同時に経鼻接種し局所 IgA をみたところ、その上昇率は前者の方が後者より明らかに高かつた (未発表データ)。

以上、この生ワクチン接種による副作用の程度の軽さと抗体反応は、いずれも対照とした不活化ワクチンの成績を上回るものであつたが、諸外国の生ワクチンと同様インフルエンザの生ワクチンには、遺伝的再結合や病原

性の変異などの問題もあるので、私たちは、今後単に、この株の接種例数を増やすのではなしに、同時にこのようないわゆる弱毒株は遺伝的にどう変わり、その構造や機能がどう変わっているのかなどを、さらに検討していきたいと考えている。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究に多大な御協力をいただきました日本生物科学研究所、荒井研理事長、中村稔治所長、田島正典研究部長、竹原孝一研究室長、ウイルス第6研究室員ならびに所社員各位、また関東通信病院、故中村兼次院長、徐慶一郎 第1臨床検査科部長、および、北山徹小児科部長に深謝いたします。

Summary

In their preceding paper the authors reported that an attenuated strain of A2/HK influenza virus had been obtained by the adaptation of virus to growth at 28°C in embryonated eggs. In the present paper, the responses of volunteers administered with this cold-adapted strain of influenza virus were described. A live vaccine was prepared by differential centrifugation from the infected allantoic fluid of leukovirusfree SPF eggs. The volunteers were 18 to 62 years old and divided into three groups. The first group received 0.5 ml of a commercially available inactivated influenza vaccine subcutaneously and, a week later, 0.3 ml of this live vaccine nasopharyngeally. The second group received 0.5 ml of the inactivated vaccine subcutaneously and, a week later, 0.3 ml of placebo vaccine (PBS) nasopharyngeally. The third group received 0.3 ml of the inactivated vaccine nasopharyngeally and, a week later, 0.3 ml of the live vaccine nasopharyngeally.

Sera were collected from all the groups and examined for HI antibody. Antibody response was determined by the percentage showing a fourfold or greater rise in titer and by an increase in geometric mean titer. After the final vaccination, 45% of the sera developed an antibody response (geometric mean titer rising from $2^{6.5}$ to $2^{7.9}$) in the first group, 20% in the second group, and 40% in the third group. The majority of those who had been inoculated with the live vaccine manifested no clinical symptoms. It was also revealed that the live vaccine was effective for stimulating a local IgA response.

文 献

- 1) Alford, R. H., Rossen, R. D., Butler, W. T. and Kasel, J. A. (1967): Neutralizing and hemagglutination inhibiting activity of

- nasal secretion following experimental human infection with A 2 influenza virus. *J. Immunol.*, **98**, 724-731.
- 2) Andrews, B. E., Beare, A. S., McDonald, J. C., Zuckerman, A. J. and Tyrrell, D. A. J. (1966) : Further trials of live influenza vaccine. *Brit. med. J.*, **1**, 637-610.
 - 3) Beare, A. S., Bynoe, M. L. and Tyrrell, D. A. J. (1968) : Investigation into the attenuation of influenza viruses by serial passage. *Brit. med. J.*, **4**, 482-484.
 - 4) Beare, A. S., Maassab, H. F., Tyrrell, D. A. J., Slepouskin, A. N. and Hall, T. S. (1971) : A comparative study of attenuated influenza viruses. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **44**, 593-598.
 - 5) Boudreault, A., Gussir, G. and Pavilanis, V. (1968) : Caractères biologiques de souches du virus de l'influenza adaptées à 29 C et à 41 C. *Canad. J. Microbiol.*, **14**, 867-874.
 - 6) Burnet, F. M. and Lind, P. E. (1951) : A genetic approach to variation in influenza virus. 4. Recombination of character between the influenza virus A strain NWS and strains of different serological subtypes. *J. gen. Microbiol.*, **5**, 67-82.
 - 7) Couch, R. B., Douglas, R. G. Jr., Fedson, D. S. and Kasel, J. A. (1971) : Correlated studies of a recombinant influenza virus vaccine. III. Protective against experimental influenza in man. *J. Inf. Dis.*, **124**, 473-480.
 - 8) Cromwell, H. A., Brandon, F. B., McLean, I. W. Jr. and Sadusk, J. F. (1969) : Influenza immunization. A new vaccine. *J. Amer. Med. Asso.*, **210**, 1438-1442.
 - 9) Fadeyeva, L. L., Ritova, V. V. and Zakst el' skaya, L. Ya. (1954) : Perfection of an influenza tissue vaccine (Russian). *Vop. Virus*, **4**, 393. Hoyle, L. (1968) *Virology monographs No. 4*. Springer-Verlag, New York.
 - 10) Gwaltney, J. M. Jr., Edmondson, W. P. Jr., Rothenberg, R. and White, P. W. (1971) : A comparison of subcutaneous, nasal, and combined influenza vaccination. I. Antigenicity. *Am. J. Epid.*, **93**, 472-479.
 - 11) Maassab, H. F. (1967) : Adaptation and growth with characteristics of influenza virus at 25° C. *Nature*, **213**, 614-614.
 - 12) Maassab, H. F., Francis, T. Jr., Davenport, F. M., Hennessy A. V., Minuse, E. and Anderson, G. (1969) : Laboratory and clinical characteristics of attenuated strains of influenza virus. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **41**, 589-594.
 - 13) Medvedeva, T. E., Alexandrova, G. I. and Smorodintsev, A. A. (1968) : Differentiation of temperature variants of influenza A 2 virus on the basis of plaque formation. *J. Virology*, **2**, 456-460.
 - 14) Meiklejohn, G. (1960) : Observations on live influenza vaccine. *J. Amer. Med. Asso.*, **172**, 1354-1356.
 - 15) Mills, J., VanKirk, J., Hill, D. A. and Charnock, R. M. (1969) : Evaluation of influenza virus mutants for possible use in a live virus vaccine. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **41**, 599-606.
 - 16) 水谷裕迪・井土俊郎(1971) : インフルエンザウイルスの弱毒株の研究. 2. 野外接種成績, 第19回日本ウイルス学会総会演説抄録, **II-11**.
 - 17) Okuno, Y. and Nakamura, K. (1966) : Prophylactic effectiveness of live influenza vaccine in 1965. *Biken J.* **9**, 89-95.
 - 18) Pons, M. W. and Hirst, G. K. (1968) : Polyacrylamide gel electrophoresis of influenza virus RNA. *Virology*, **34**, 385-388.
 - 19) Rossen, R. D., Butler, W. T., Waldman, R. H., Alford, R. H., Hornick, R. B. Togo, Y. and Kasel, J. A. (1970) : The proteins in nasal secretion. II. A longitudinal study of IgA and neutralizing antibody levels in nasal washings from men infected with influenza virus. *J. Amer. Med. Asso.*, **1157-1161**.
 - 20) Waldman, R. H., Mann, J. J. and Small, P. A. Jr. (1969) : Immunization against influenza. Prevention of illness in man by aerosolized inactivated vaccine. *J. Amer. Med. Asso.*, **207**, 520-524.
 - 21) Zhdanov, V. M. (1967) : Present status of live influenza virus vaccines. First international conference on vaccines against viral and rickettsial diseases of man. World Health Organization, Washington.