

200500235A

厚生労働科学研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

平成17年度 総括研究報告書

遺伝子発現の網羅的解析によるワクチンの新しい安全性評価に関する研究

(H17-トキシコ-009)

主任研究者 山口 一成
(国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

平成18(2006)年3月

研究組織

主任研究者

山口一成 (国立感染症研究所・血液・安全性
研究部)

分担研究者

渡辺慎哉 (東京医科歯科大学・大学院・臨床
インフォマティクス講座)

野村信夫 (産業技術総合研究所・生物情報解
析研究センター)

浜口 功 (国立感染症研究所・血液・安全性
研究部)

目次

I. 総括研究報告

百日せきワクチンに関する国家検定試験法とマイクロアレイに基づく 遺伝子発現解析法との毒性検出能についての比較検討-----	1
山口一成	
図1：研究概要-----	7
図2：ラットの白血球増加試験-----	8
図3：AGP、Lbp、Hpxを用いた百日咳毒素の検出-----	9

II. 分担研究報告

1. 百日せきワクチン接種動物を用いたマイクロアレイ解析の条件 検討-----	10
浜口 功	
図4：ラットの体重減少試験-----	15
図5：ワクチン接種ラットの血液生化学-----	16
図6：ワクチン接種ラット肝臓の病理組織-----	17
2. DNA マイクロアレイクラスター解析による百日せきワクチンの 毒性関連遺伝子の同定-----	18
渡辺慎哉	
野村信夫	
図7：ワクチン接種ラットの各臓器における遺伝子発現様式のクラ スター解析-----	22
図8：肝臓における遺伝子発現様式のクラスター解析-----	23
図9：毒性参照用ワクチン(RE)特異的遺伝子とその特徴-----	24
図10：百日せきワクチンの毒性に関連した遺伝子の同定-----	25
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	26
IV. 研究成果の別刷	

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究総事業（トキシコゲノミクス分野）

遺伝子発現の網羅的解析によるワクチンの新しい安全性評価に関する研究

総括研究報告書

研究課題：百日せきワクチンに関する国家検定試験法とマイクロアレイに基づく遺伝子発現解析法との毒性検出能についての比較検討

主任研究者 山口一成

国立感染症研究所

研究要旨

これまでに国立感染症研究所では、動物にワクチン接種した後にみられる毒性変化を指標にワクチンの安全性を評価してきた。こうした方法は、WHOのガイドラインに規定されて世界的に実施されている。しかしながら、ワクチン接種に伴う副反応のメカニズムに関してはこれまで明らかにされていない。近年トキシコゲノミクス分野の進展と共に、毒性に関連する遺伝子群の特定が進められており、特に医薬品の毒性を遺伝子発現により評価する試みが急速に展開している。今回われわれは新たに、ワクチンの毒性に関連する遺伝子群を DNA マイクロアレイの手法を用いて網羅的に解析し、百日せきワクチンの毒性に関連した遺伝子 AGP (alpha 1-acid glycoprotein)、Lbp (lipopolysaccharide binding protein)、Hpx (hemopexin)を同定した。これらの遺伝子発現を指標に、百日せきワクチン中に含まれる微量の毒性物質による生体変化を検出する評価法を開発した（特許出願中、論文準備中）。

血液・安全性研究部・室長

分担研究者

渡辺慎哉 東京医科歯科大学・大学院・
臨床インフォマティクス講
座・助教授

野村信夫 産業技術総合研究所・
生物情報解析研究センター・
副センター長

浜口功 国立感染症研究所・

A. 研究目的

これまで国立感染症研究所ではワクチンの安全性を確認する一つの方法として、モルモットにワクチン接種し、接種後にみられる体重の変化を指標に評価してきた。こうした方法は極めて有効な方法と考えられ、WHO のガイドラインに基づ

き世界的に実施されている。しかしながら、細菌・ウイルスなどヒト由来でない生物材料から製造されるワクチンは多様な生物活性を持つため、接種によって誘導される毒性変化のメカニズムの解析はこれまでほとんどなされていないのが現状である。

一般にワクチンは医薬品とは異なり健康な人を対象に接種されるもので、非常にまれではあるが副反応や副作用による重篤な障害の発生が知られている。また新型インフルエンザの発生とともにインフルエンザパンデミックの危険性が指摘されており、本邦においても流行の危険性が急速に高まり、ワクチンによる予防の必要性が高まっている。こうした状況において、有効性が期待されるワクチンの生体に及ぼす毒性反応のメカニズムを解析することは極めて重要な課題と考えられ、また安全性の担保という意味では、国民の保健の確保に直結した課題といえる。

近年トキシコゲノミクス分野の進展と共に、毒性に関連する遺伝子群の特定が進められており、特に医薬品の毒性を従来の病理学的試験および臨床試験データだけでなく遺伝子発現により評価する試みが急速に展開している。リスク-ベネフィットの観点からも、毒性発現メカニズムを遺伝子レベルで解析する必要性が高まっている。

平成17年度は、百日せきワクチンの毒性に伴う遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法で網羅的に解析し、特定された遺伝子発現を指標に、百日せきワクチン中

に含まれる微量の毒性物質による生体変化を検出する評価法を開発することを目的としており、ワクチンの安全性評価と副作用予測の信頼性向上に大きく寄与するものと思われる。(図1)

B. 研究方法

1) 動物

8週齢の Wister 雄ラットを SLC より購入して使用した。

2) ワクチンおよび毒素

毒性参照用ワクチン (RE) は国立感染症研究所に準備されている標準品を使用した。粉末標準品を 12 ml の生理食塩水で融解し、5 ml を腹腔内接種した。百日咳毒素 (PT) は Wako より購入し、精製百日せきワクチン(PV)は化学及び血清療法研究所より供与された。PT および精製百日せきワクチンは PT 含有量を 5 $\mu\text{g/ml}$ に調整し、5 ml を腹腔内に接種した。生理食塩水 (SA) をコントロールとして 5 ml 腹腔内に接種した。

3) 白血球増加試験

RE および濃度の異なる PT (0.04, 0.2, 1.0, 5.0 $\mu\text{g/ml}$)を調整し、ラット腹腔内に 5 ml 接種した。末梢白血球数はサンプル接種後 4 日まで経時的に尾静脈より血液を採取し、10 μl の血液を用いて Beckman Coulter 社自動血球計算装置で解析した。

4) リアルタイム PCR 解析

マイクロアレイの解析結果により同定

された毒性に関連する遺伝子の発現を定量 PCR によって解析し、特異性、再現性に関して検討した。Total RNA から First-strand cDNA Synthesis kit (Life Science, Inc) を用いて cDNA を作製した。AGP、Lbp、Hpx の発現は Applied Biosystems 社の 7500 Fast Real-time PCR System を用いて解析した。6 倍希釈の cDNA 1 μ l を 10 μ l の SYBER Green PCR Master Mix と各 0.2 μ M のセンスおよびアンチセンスプライマーに加え、PCR を行なった。7500 Fast System は最初 95°C、10 分の酵素活性化を行ない、denature (95°C, 15 秒) extension (60°C, 1 分) のステップを 40 サイクル繰り返した。

用いたプライマーは AGP fwd (5'-GCTGG AGCTGGAGAAGGAGACT-3')、AGP rev (5'-ACAGTCCCCGGAGTTCAGAGA-3')、Lbp fwd (5'-TCACCGCTCCCCAGTCACT A-3')、Lbp rev (5'-GGCCTGATCTGAGAT GGCAAA-3')、Hpx fwd (5'-CTGCCTCAGCCCCAGAAAGT-3')、Hpx rev (5'-GGGTGGGCTGGGCTAATTC-3') である。

C. 研究結果

1) 白血球増加試験

毒性参照用百日せきワクチン(RE)および濃度の異なる百日咳毒素(PT) (0.04, 0.2, 1.0, 5.0 μ g/ml) を用意し、ラット腹腔に接種した。RE 接種群では投与 4 日目に末梢血白血球数が 25,000 cells/ml に増加

した。PT 接種群では 0.04, 0.2, 1.0 μ g/ml では有意な白血球の増加は認められなかったが、5.0 μ g/ml で RE 接種と同じく増加が認められた。(図 2)

2) AGP、Lbp、Hpx を用いた百日咳毒素の検出

分担研究者 渡辺慎也、野村信夫らの研究結果より、AGP (alpha 1-acid glycoprotein)、Lbp (lipopolysaccharide binding protein)、Hpx (hemopexin) の 3 遺伝子が毒性参照用百日せきワクチンおよび百日咳毒素の毒性に密接に関連していることが示された。これらの 3 つの遺伝子を用いて毒性を検知するために、白血球増加試験との比較検討を行った。

0.04, 0.2, 1.0, 5.0 μ g/ml の濃度の PT を接種したラット肝臓での遺伝子発現量を定量 PCR で測定したところ、AGP、Lbp、Hpx の 3 つの遺伝子について PT 濃度依存的に発現量の変化が認められた。またこれらの遺伝子の発現量を指標とした際の PT 混入検出の限界は PT 濃度 1 μ g/ml であった。また RE 接種肝臓でのこれらの遺伝子の発現量は PT 濃度 5 μ g/ml の 2 倍以上であった。これらの結果から AGP、Lbp、Hpx 遺伝子は PT を含めた毒性物質の検出にたいへん有用であると考えられる。(図 3)

D. 考察

これまで白血球増加試験は国家検定試験として PT 混入の検知に用いられてきた

が、ごく少量の混入は検出できない。また RE を接種された肝臓は PAS 染色で染色されるグリコーゲン顆粒の数が激減していたが、PT を接種されたものではほぼ正常であった。これらの結果は、従来行なわれてきた白血球増加試験では低濃度の PT の検出はできないことを示している。もっと重要なこととして、従来の試験では PT 接種の影響を科学的に説明することができない点があった。新しい遺伝子発現定量法では AGP、Lbp、Hpx が PT 濃度 1 μ g/ml を鋭敏に検出でき、また PT の濃度依存的にこれら遺伝子の発現量が増加した。すなわちこれらの遺伝子がワクチンの毒性に密接に関連していることが明らかになった。さらに遺伝子発現量の個体間の格差は非常に小さく、結果は再現性の高いものであった。これらのことは、遺伝子発現解析は従来の動物試験に比べ厳密であることを示唆している。またこのことは百日せきワクチン関連遺伝子が百日咳毒素の低濃度混入を検出できることも示している。PCR を用いた方法が理想的な百日せきワクチンの評価法になりうることを示している。

ワクチン製造メーカーは最新の方法を用いた高品質のワクチンの製造技術を開発している。たとえば動物組織由来のものではなく、培養細胞によるものなどがあげられる。しかしながら、現在においても完全に安全なワクチンは存在しない。ワクチンの品質を科学的に評価するために、新しいワクチンの安全性評価法が望

まれている。マイクロアレイ解析は 10,000 個を超える遺伝子を網羅的に解析するものであり、ワクチンの安全性試験を抜本的に改良することができる。まだワクチンの毒性検出に関して十分なデータがそろっていないが、今後様々なワクチンの安全性に関する情報を収集することにより、安全性に関する情報だけでなく、ワクチンの毒性メカニズムの理解に十分役立てることができる。もう一つの目的として、ワクチン開発に積極的に用いることができると考える。近年インフルエンザパンデミックの危機にさらされており、新しい有効なワクチンの出現が期待されているが、現行の方法では生産許可のためのワクチンの安全性評価に長期間を要する。この様な中、ワクチン開発のスピードアップのためにも遺伝子発現解析方法が強力なツールとなることと思われる。

E. 結論

百日せきワクチンの毒性に関連する AGP、Lbp、Hpx 遺伝子を指標にした遺伝子発現解析法（特許出願中）は従来の国家検定試験法に比べ混入する百日咳毒素の濃度を 5 倍以上鋭敏に測定できることを示し、特異性、再現性において優れていることを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, Mizusawa S, Sato S, Yamaguchi K.: Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial diagnostic kits available in Japan. **Jpn J Infect Dis.**, 2005, 58: 83-87.
2. Ohsugi T, Horie R, Kumasaka T, Ishida A, Ishida T, Yamaguchi K., Watanabe T, Umezawa K, Urano T.: In vivo antitumor activity of the NF- κ B inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin in a mouse model of adult T-cell leukemia. **Carcinogenesis.**, 2005, 26: 1382-1388.
3. Ohsugi T, Kumasaka T, Ishida A, Ishida T, Horie R, Watanabe T, Umezawa K, Yamaguchi K.: In vitro and in vivo antitumor activity of the NF- κ B inhibitor DHMEQ in the human T-cell leukemia virus type I transformed cell line, HUT-102. **Leuk Res.**, 2006, 30: 90-97.
4. Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, Ishida T, Aizawa S, Maruyama-Nagai M, Utsunomiya A, Koga S, Yamada Y, Kamihira S, Okayama A, Kikuchi H, Uozumi K, Yamaguchi K., Higashihara M, Umezawa K, Watanabe T, Horie R.: Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T-cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF- κ B, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T cell leukemia. **Blood**, 2005, 106: 2426-2471.
5. Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K., Oike Y, Dumont DJ, Suda T: Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival. **Blood**, 2006, 107: 1207-1213.
6. 水落利明、岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、佐藤進一郎、山口一成：国内で販売されている10種類の高感度キットを用いた異なるHBV genotype由来HBs抗原の検出。**臨床検査** 2005, 49:1039-1042.
7. 山口一成：ヒトTリンパ向性ウイルスI型(HTLV-I)、HTLV-IプロウイルスDNA 広範囲血液尿化学検査 免疫学的検査—その数値をどう読むか—第6版(3)**日本臨床社** 2005, 430-433.
8. 山口一成：HTLV-Iの遺伝子診断 予防医学事典 松島綱治、酒井敏行、石川昌、稲寺秀邦 **朝倉書店** 2005, 276-277.
9. 浜口功、山口一成、ウイルス抗体価の診断基準と問題点—HIV **Medical Technology** 2005, 33: 581-587.

10. 水上拓郎、浜口功、山口一成、血液製剤における病原体検査の現状

感染症 2005, 35: 155-160,

2) 学会発表

1. 加藤博史、今井順一、浜口功、河村未佳、内藤誠之郎、前山順一、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：遺伝子発現の網羅的解析によるワクチンの新しい安全性評価の開発、第125回日本薬学会総会（東京）平成17年3月

2. 内藤誠之郎、今井順一、加藤博史、河村未佳、浜口功、水上拓郎、前山順一、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：DNA マイクロアレイを応用したワクチンの新しい安全性評価法の開発：第32回日本トキシコロジー学会（東京）平成17年6月

3. 浜口功、今井順一、加藤博史、河村未佳、内藤誠之郎、水上拓郎、前山順一、益見厚子、笠井道之、百瀬暖佳、倉光球、望月雅代、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：百日せきワクチンの新しい安全性評価法の開発、第9回日本ワクチン学会総会（大阪）平成17年10月

4. 水上拓郎、今井順一、加藤博史、河村未佳、内藤誠之郎、前山順一、落合雅

樹、山本明彦、堀内善信、浜口功、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：トランスクリプトーム解析による百日せきワクチンの新しい安全性評価法の開発、第35回日本免疫学会総会（横浜）平成17年12月

II. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

特願 2006-020432: 「百日咳毒素の検出方法」(2006.1.30) (加藤博史、浜口功、山口一成)

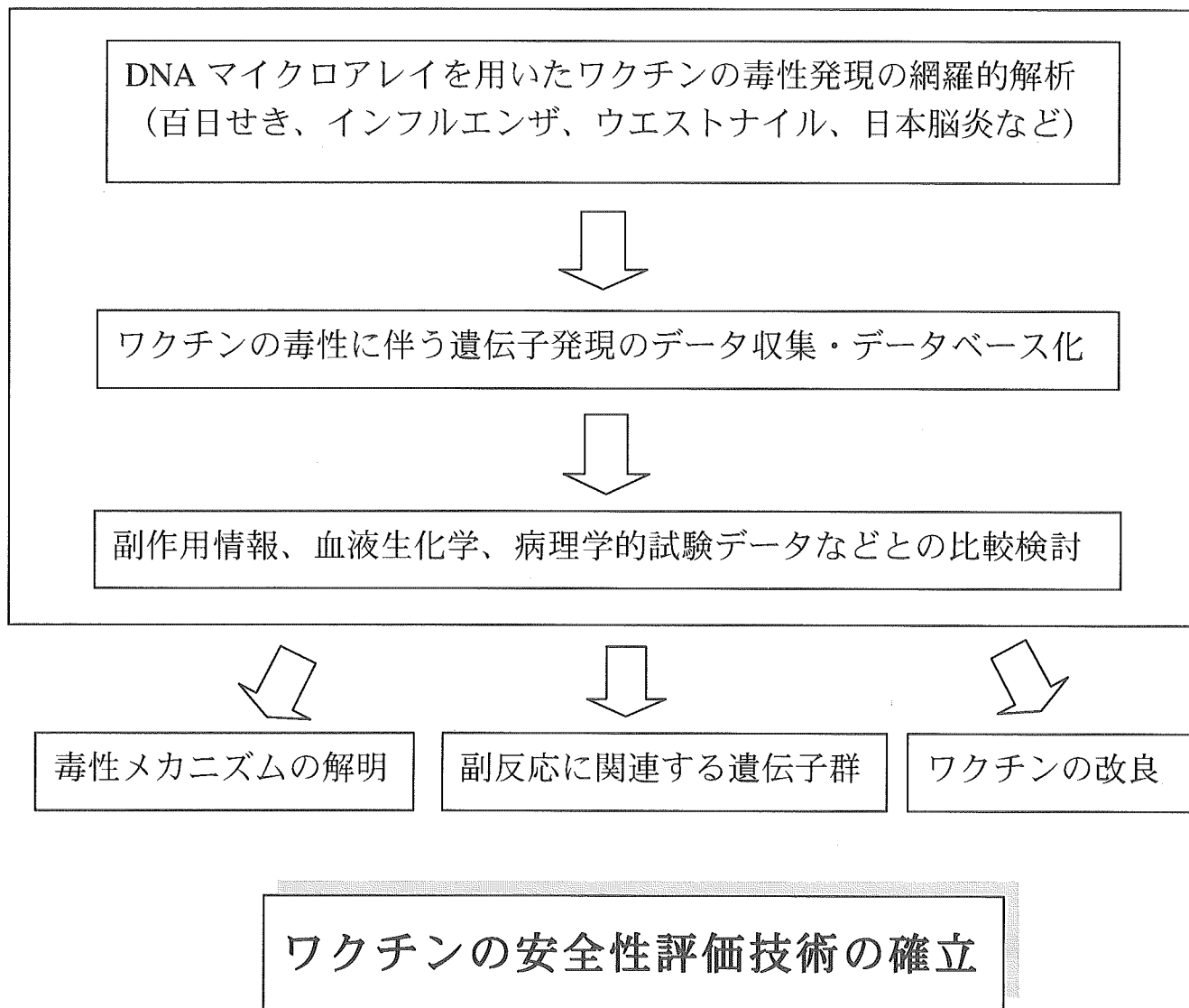


図 1. 研究概要

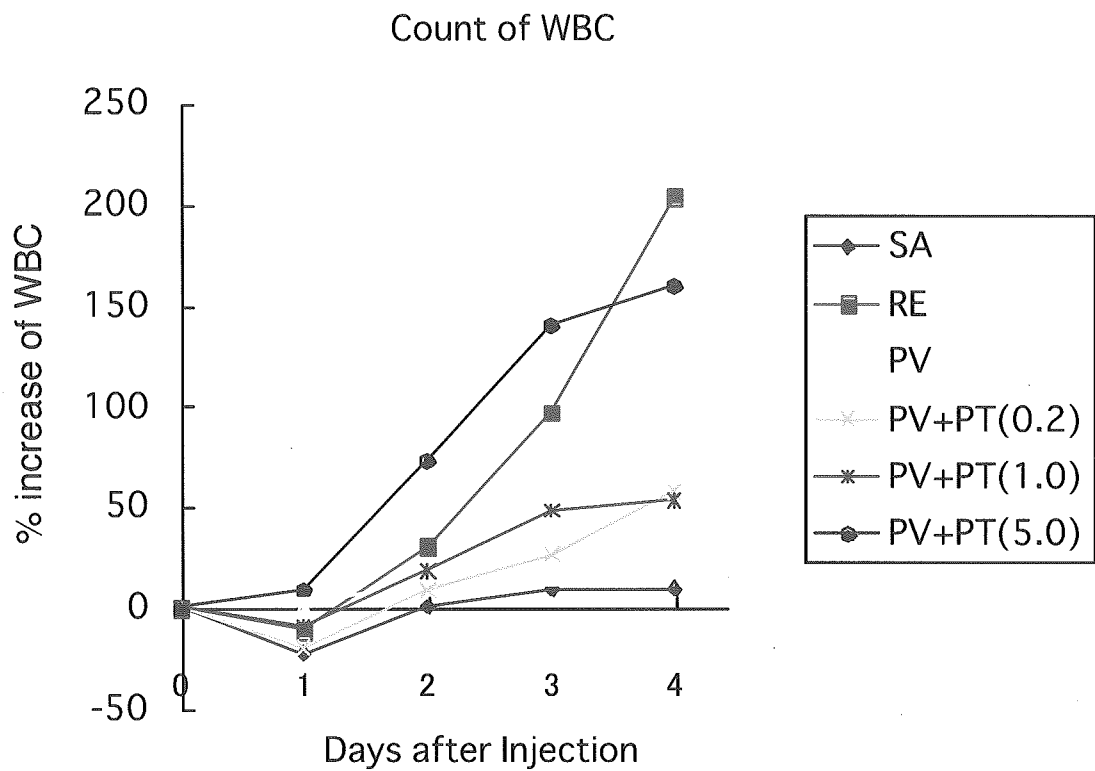


図 2. ラット白血球増加試験

ラット腹腔に SA (生理食塩水)、RE (毒性参照用百日せきワクチン)、PV (精製百日せきワクチン) および PV+PT (百日咳毒素) を接種した。RE および PV+PT(5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)接種群で著明な白血球増加を認めた。

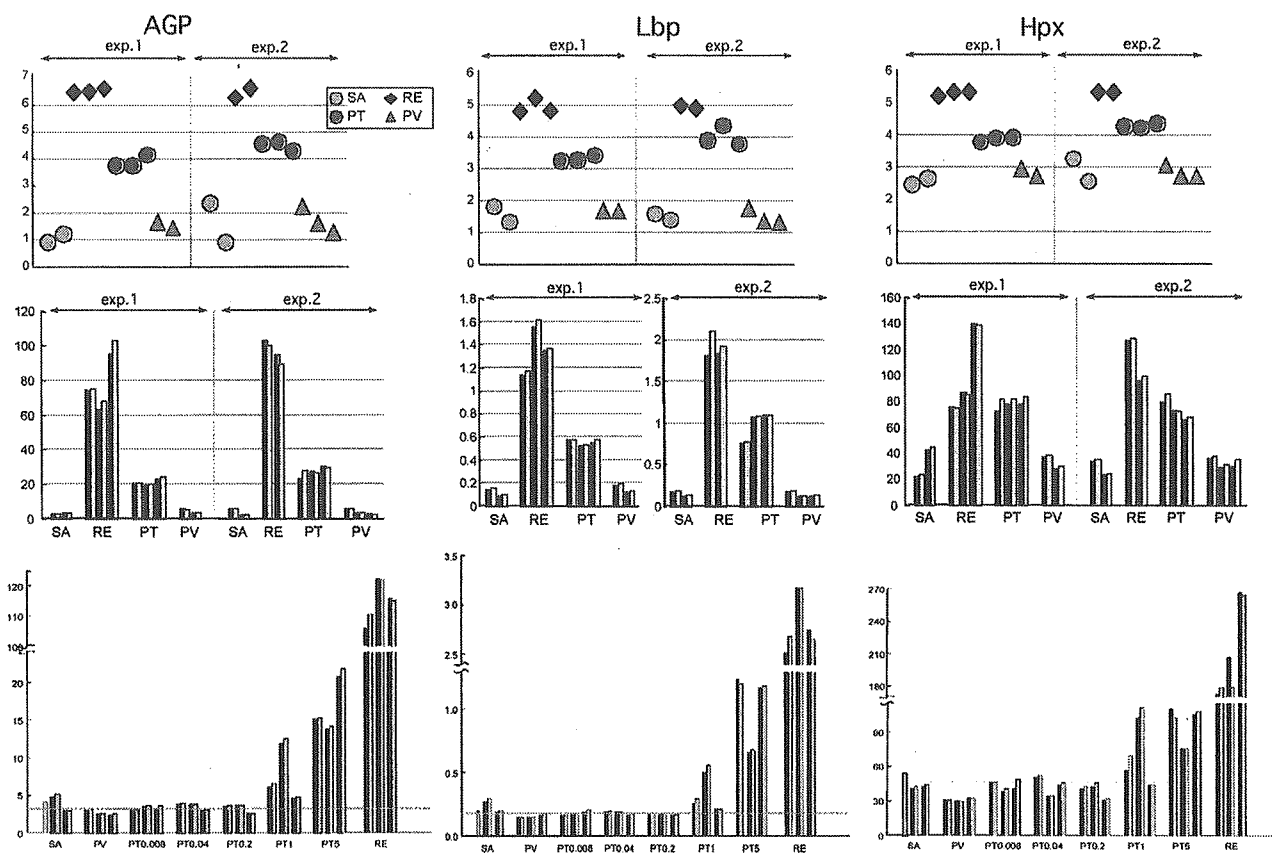


図 3. AGP、Lbp、Hpx を用いた百日咳毒素の検出

上段、DNA マイクロアレイ解析に基づく AGP、Lbp、Hpx の遺伝子発現量 (実験 1、実験 2)。中段、リアルタイム PCR による AGP、Lbp、Hpx の遺伝子発現解析 (実験 1、実験 2)。下段：PT 濃度変化に伴う AGP、Lbp、Hpx の遺伝子発現解析。いずれの遺伝子も PT 濃度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で有意な発現増加が認められた。

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究総事業（トキシコゲノミクス分野）

遺伝子発現の網羅的解析によるワクチンの新しい安全性評価に関する研究

分担研究報告書

研究課題：百日せきワクチン接種動物を用いたマイクロアレイ解析の条件検討

分担研究者 浜口功

国立感染症研究所

研究要旨

これまで国立感染症研究所ではワクチンの安全性を確認する方法として、モルモットにワクチン接種し、接種後にみられる体重の変化やワクチン接種マウスの末梢血白血球数の変化を指標に評価してきた。今回ラットを用いた実験から、①ラットが百日せきワクチン接種に伴い、マウスと同じ毒性反応を示すこと、②肝臓が百日せきワクチンの毒性を評価するのに適した臓器であることを示し、百日せきワクチンの毒性に対する安全性評価法のためにラットを用いたマイクロアレイ解析の妥当性について検討した。

A. 研究目的

これまで国立感染症研究所ではワクチンの安全性を確認する方法として、モルモットにワクチン接種し、接種後にみられる体重の変化やワクチン接種マウスの末梢血白血球数の変化を指標に評価してきた。しかしながら、細菌・ウイルスなどヒト由来でない生物材料から製造されるワクチンは多様な生物活性を持つため、接種によって誘導される毒性変化のメカニズムの解析はこれまでほとんどなされていないのが現状である。

今回安全性評価試験として国家検定で規定されている体重減少試験、白血球増加試験に加え、血液生化学試験、病理学

試験を行ない、毒性発現に関連した情報を収集し、マイクロアレイ解析に必要な標的となる臓器および臓器採取日などの基礎的検討を行なった。

B. 研究方法

1) 動物

8週齢の Wister 雄ラットおよび4週齢 DDA マウスを SLC より購入して使用した。

2) ワクチンおよび毒素

毒性参照用ワクチン（RE）は国立感染症研究所に準備されている標準品を使用した。粉末標準品を 12 ml の生理食塩水で融解し、5 ml を腹腔内接種した。百日

咳毒素 (PT) は Wako より購入し、精製百日せきワクチン(PV)は化学及び血清療法研究所より供与された。PT および精製百日せきワクチンは PT 含有量を 5 $\mu\text{g/ml}$ に調整し、5 ml を腹腔内に接種した。生理食塩水 (SA) をコントロールとして 5 ml 腹腔内に接種した。

マウスには同様に調整した RE、PT、PV、SA を 1 匹あたり 0.5 ml 接種した。

3) 体重減少試験

マウスの体重減少試験は生物学的製剤基準に則して行なった。0.5 ml の上記サンプルをマウスに接種、またラットには 5 ml ずつ接種し、経時的に 7 日まで測定した。

4) 白血球増加試験

末梢白血球数はサンプル接種後 4 日まで経時的に尾静脈より血液を採取し、10 μl の血液を Beckman Coulter 社自動血球計算装置で解析した。

5) 血液生化学

ラット尾静脈より血液を 0.5 ml 採取した。2,500 回転 10 分間遠心し、血清を回収し、測定まで -20°C に保存した。GPT、GOT、CPK、BUN、Amylase、ALP の測定は富士ドライケムスライド (富士フィルム) を用いて富士フィルムメディカル社 Dry chem. 3500 で行なった。

6) 組織化学

ラットより肝臓を速やかに採取し、左葉および右葉から 4 mm の厚さの組織を採取し、10 %ホルマリンで 48 時間固定

した。アルコールとキシレンで脱水し、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックは 6 μm の厚さで切り出し、ガラススライド上へのせ、一晚乾燥させた。これらのサンプルについて、ヘマトキシリン-エオジン、および PAS 染色を行なった。

C. 研究結果

国家検定で行なっている安全性評価試験はモルモットもしくはマウスを用いている。まずラットが百日せきワクチンの毒性試験に用いる動物として妥当であるかを検討するために、ラットを用いて体重減少試験、白血球増多試験を行ない、毒性に対する反応を検討した。

1) ワクチン接種動物の体重変化

ワクチン接種動物の体重変化は生物学的製剤基準にも規定されているように重要なパラメーターである。体重減少試験には 0.5 ml のワクチンをマウス腹腔内に投与し、4 日間体重を計測した。またラットに毒性参照用ワクチン (RE) を接種したところ、1 日目に 10 %以上の劇的な体重減少を認めた。その後体重は回復した。RE とは異なり、百日咳毒素(PT)を接種された群は精製百日せきワクチンや生理食塩水を接種された群と同様に正常な体重増加を認めた。このようにラットを用いた体重減少試験でも、RE 接種においてのみ著明な体重減少を認め、マウス、ラット間でのサンプルに対する反応性はほぼ同じであると考えられた。(図 4)

2) ワクチン接種動物の末梢白血球数変化

生物学的製剤基準に基づき、0.5 ml の百日せきワクチンおよび毒素を腹腔内に接種したマウスについて末梢白血球数をカウントした。RE を接種後2日目のマウスでは異常な白血球増加がみられ、4日目には 30,000 cells/ml を超えた。ラットにも同様な試験を行なったところ、2日目に顕著な白血球増加を認め、4日目には 25,000 cells/ml を超えた。また PT を接種された群は RE を接種された群と同じく白血球増加をきたした。一方 PV や生理食塩水を接種されたマウスやラットはほぼ正常範囲内にあった。

3) ワクチン接種動物の血液生化学解析

百日せきワクチンや毒素をラットに接種し、経日的に血液生化学を解析したところ、RE 接種1日目のラットで ALP とアミラーゼについて激的な減少を認めたが、その後正常範囲に戻った。ALP やアミラーゼの値の推移はサンプル接種群の体重変化に類似した結果となった。BUN や GOT の値は RE 接種ラットで ALP に比して時間的に遅れて2日目に顕著に減少したが4日目までには正常範囲に回復した。GOT や CPK の値はほとんど異常値を示さなかった。(図5)

4) ワクチン接種動物の病理学的解析

百日せきワクチンおよび毒素の肝臓への影響を病理組織学的に解析した。生理

食塩水、PV、PT を接種した肝臓では HE 染色で異常を認めなかったが、RE を接種した群では多核の肝細胞を認めた。さらに PAS 染色を行なったところ、RE 接種群は PAS 陽性の顆粒が欠落していることが明らかとなった。(図6)

D. 考察

体重減少試験や白血球増加試験は百日せきワクチンの品質管理のための試験としてここ40年来実施されてきた。今回の研究においてラットに RE を接種したところ1日目に劇的な体重減少を認めた。また RE および PT (5 µg/ml) 接種群では異常な白血球増加を示した。このように、これまで行なってきた動物試験は、ワクチンの品質評価に関し、一定の有効性が認められ、これまでに膨大な品質の均一性に関する試験結果を得ている。しかし、これらの試験が万全であるとは言えない。まず検出能力が鋭敏でないために、少量の異常物質の混入を検出できない。また動物間のばらつきが大きく、信頼性を高めるためには、多くの動物実験が必要であるなどの問題点が挙げられる。今回の研究では百日せきワクチンの安全性試験を抜本的に改良するために、マイクロアレイを開発する必要性が高いと考える。マイクロアレイは一度に多くの遺伝子を包括的に解析できる点、微量な遺伝子発現量を鋭敏に検量できる点、毒性を解析する場合に、いろいろなバイアスをうける代謝産物でなく、真っ先に変化をきたすと想定される遺伝子をターゲットにし

ている点などから、ワクチンの毒性検査にマイクロアレイによる解析は合目的であると考えられる。

また白血球増加試験および体重減少試験をマウスおよびラットで行ない、ラットが百日せきワクチン接種に伴い、マウスと同じ毒性反応を示すことが明らかとなった。このことはラットを用いたマイクロアレイ解析の結果と従来の試験法の結果とを比較可能であることを示している。

ラットに RE を接種したところ体重が激減したが、肝臓由来酵素の GOT、GPT などには著変はみられなかった。組織学的検査では RE 接種の肝臓で PAS 染色陽性のグリコーゲン顆粒が激減している像が得られた。肝細胞がグリコーゲン顆粒を多く含み、これらの減少は毒物負荷などの大きなストレスが懸かった可能性が考えられる。このように RE の影響は肝臓で顕著に現れた。また肝臓がそもそも毒物の代謝を担っていることを考慮すると、肝臓が百日せきワクチンの生物学的変化を検出するのに適当であると考えられる。さらに薬物毒性に関連した副作用解析の多くのプロジェクトが肝臓のマイクロアレイ解析によってなされており、今後ワクチンの情報を収集することにより、将来広く毒性に関する情報を共有できるようになることが期待される。

E. 結論

百日せきワクチン接種ラットについて、

マイクロアレイ解析の妥当性について条件検討を行なったところ、ラットが百日せきワクチン接種に伴い、マウスと同じ毒性反応を示すことが明らかとなった。またラット肝臓が百日せきワクチンの毒性を評価するのに適した臓器であることを示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T: Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival.

Blood, 2006, 107: 1207-1213.

2. Azuma M, Hirao A, Takubo K, Hamaguchi I, Kitamura T, Suda T: A quantitative matrigel assay for assessing repopulating capacity of prostate stem cells.

Biochem Biophys. Rec. Commun., 2005, 338: 1167-1170.

3. Flygare J, Kiefer T, Miyake K, Utsugisawa T, Hamaguchi I, Da Costa L, Richter J, Davey EJ, Matsson H, Dahl N, Wiznerowicz M, Torono D, Karlsson S: Deficiency of Ribosomal Protein S19 in

CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia.

Blood, 2005, 105: 4627-4634.

4. 浜口功、山口一成、ウイルス抗体価の診断基準と問題点—HIV

Medical Technology, 2005, 33: 581-587.

5. 水上拓郎、浜口功、山口一成、血液製剤における病原体検査の現状

感染症, 2005, 35: 155-160.

2) 学会発表

1. 加藤博史、今井順一、浜口功、河村未佳、内藤誠之郎、前山順一、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：遺伝子発現の網羅的解析によるワクチンの新しい安全性評価の開発、第125回日本薬学会総会（東京）平成17年3月

2. 内藤誠之郎、今井順一、加藤博史、河村未佳、浜口功、水上拓郎、前山順一、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：DNA マイクロアレイを応用したワクチンの新しい安全性評価法の開発：第32回日本トキシコロジー学会（東京）平成17年6月

3. 浜口功、今井順一、加藤博史、河村未佳、内藤誠之郎、水上拓郎、前山順一、益見厚子、笠井道之、百瀬暖佳、倉光球、

望月雅代、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：百日せきワクチンの新しい安全性評価法の開発、第9回日本ワクチン学会総会（大阪）平成17年10月

4. 水上拓郎、今井順一、加藤博史、河村未佳、内藤誠之郎、前山順一、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、浜口功、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：トランスクリプトーム解析による百日せきワクチンの新しい安全性評価法の開発、第35回日本免疫学会総会（横浜）平成17年12月

5. 内藤誠之郎、前山順一、笠井道之、水上拓郎、浜口功：経費免疫法による抗原特異的抗体産生と新しいワクチン投与方法としての可能性、第35回日本免疫学会総会（横浜）平成17年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

特願 2006-020432: 「百日咳毒素の検出方法」(2006.1.30) (加藤博史、浜口功、山口一成)

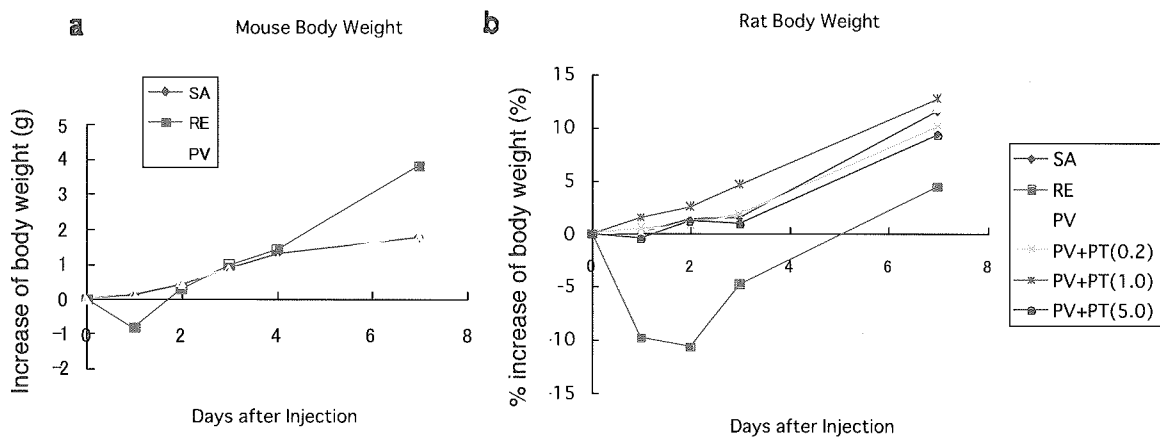


図4. 体重減少試験

マウス(a)およびラット(b)腹腔に SA (生理食塩水)、RE (毒性参照用百日せきワクチン)、PV (精製百日せきワクチン) および PV+PT (百日咳毒素) を接種した。マウス、ラットともに RE 接種群で著明な体重減少を認めた。

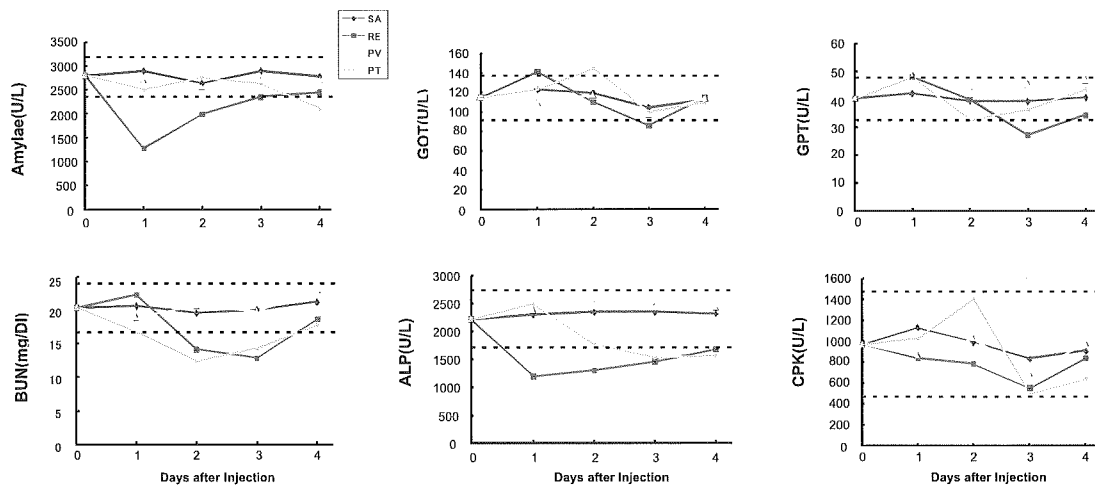


図5. ワクチン接種ラットの血液生化学

ラット腹腔に SA (生理食塩水)、RE (毒性参照用百日せきワクチン)、PV (精製百日せきワクチン) および PV+PT (百日咳毒素) を接種した。経時的に GPT、GOT、CPK、BUN、Amylase、ALP の測定を行なった。

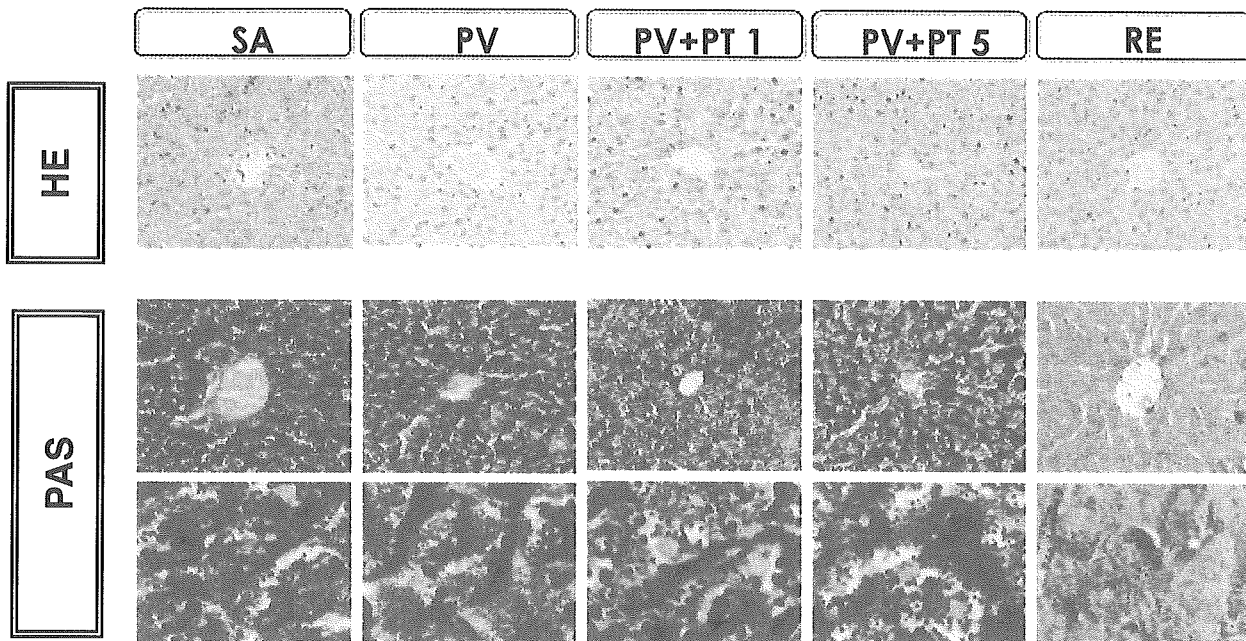


図 6. ワクチン接種ラット肝臓の病理組織

ラット腹腔に SA（生理食塩水）、RE（毒性参照用百日せきワクチン）、PV（精製百日せきワクチン）および PV+PT（百日咳毒素）を接種した。接種後 1 日の肝臓を摘出し、固定後、HE 染色、PAS 染色を行なった。RE 接種群で PAS 陽性グリコーゲン顆粒の著明な減少が認められた。