

厚生労働科学研究費補助金  
トキシコゲノミクス研究事業

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

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口一成  
平成19（2007）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

マイクロアレイ解析に基づくワクチンの毒性に関する新しい安全性試験の開発-----	1
--	---

山口一成

図1：研究概要-----	8
図2：肺での遺伝子発現解析-----	9
図3：百日せきワクチンの毒性に関連する遺伝子群-----	10
図4：百日せきワクチンおよび毒素投与ラットの肺の組織像-----	11

### II. 分担研究報告

1. インフルエンザ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-----	12
---	----

浜口 功

図5：インフルエンザワクチンの製造法-----	20
図6：インフルエンザワクチン接種後の体重変化-----	21
図7：インフルエンザワクチン接種後の白血球数の変化-----	22
図8：インフルエンザワクチン接種後16時間の変化-----	23
図9：インフルエンザワクチン接種後の病理変化-----	24

2. DNA マイクロアレイクラスター解析によるインフルエンザワクチンの毒性関連遺伝子の同定-----	25
---	----

渡辺慎哉

野村信夫

図10：ワクチン接種ラットの肺における遺伝子発現様式のクラスター解析-----	30
図11：毒性関連遺伝子による肺の遺伝子発現様式-----	31

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	32
--------------------------	----

### IV. 研究成果の別刷

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）  
（総括・分担）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

研究課題：マイクロアレイ解析に基づくワクチンの毒性に関する新しい安全性  
試験の開発

主任研究者 山口一成 国立感染症研究所 部長

**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。本研究班では研究概要（図1）に従って、前年度に引き続きマイクロアレイに基づくワクチンの毒性に関連する遺伝子群の同定を行なった。今回われわれは新たに、ワクチン接種動物の肺より毒性に関連する遺伝子群の同定に成功した。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毒性物質による生体変化を検出する評価法を開発し、次世代の新しい安全性試験の開発に取り組む。

**分担研究者**

血液・安全性研究部・室長

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。

平成17年度は、百日せきワクチンの毒性に伴う肝臓における遺伝子発現を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に成功した。平成18年度は肺での網羅的遺伝子発現解析を行ない、DNA マイクロアレイで抽出された遺伝子群を用いて、新しい安全性試験の開発を進めることを目的とする。

## 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 mg/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) RNA 抽出

ワクチンおよび毒素が投与されたラットから左肺を接種後 1～4 日に採取した。臓器は即座に液体窒素中で凍結させ、ISOGEN 試薬 (Nippon Gene) 中で溶解させた。Total RNA を抽出し、Ambion 社の Poly(A) RNA Purist kit を用いて Poly(A)+RNA を精製した。

### 4) DNA マイクロアレイ解析

Poly(A)+RNA から逆転写酵素を用いた逆転写反応を行なう際に、共通リファレンスは Cyanine3 を、サンプル接種した RNA は Cyanine5 を取り込ませてサンプルをラベルした。ラベルされたサンプル

をスライドガラス上に固定された 11,464 個の遺伝子特異的配列オリゴ DNA (80 mer) と結合 (ハイブリダイゼーション) させた。各スポットの蛍光強度の比率 (Cyanine3 と Cyanine5 の比率) をスキャナーおよび解析ソフトで数値化することにより、共通リファレンスに対する各遺伝子の発現量比を検出した。

## 5) 組織化学

ラットより肺を速やかに採取し、左葉を採取し、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 4 mm の厚さで切り出し、ガラススライド上にのせ、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-エオジン染色を行なった。

## C. 研究結果

### 1) DNA マイクロアレイ解析

百日せきワクチンの毒性に関して網羅的遺伝子発現解析を行なうために、接種後 1、2、3、4 日目に肺を摘出した。動物実験は繰り返し 2 度行ない、合計 128 臓器から poly(A)+RNA を抽出した。逆転写酵素を用いた逆転写反応を行なう際に、共通リファレンスを Cyanine3 で、サンプル接種した RNA を Cyanine5 でラベルした。その後それらを混合し、スライドガラス上に固定された 11,464 個の遺伝子特異的配列オリゴ DNA (80 mer) と結合 (ハイブリダイゼーション) させた。各スポ

ットの蛍光強度の比率 (Cyanine3 と Cyanine5 の比率) をスキャナーおよび解析ソフトで数値化することにより、共通リファレンスに対する各遺伝子の発現量比を検出した。

### 2) ワクチン毒性に関連したラット肺遺伝子群

百日せきワクチン又は毒素を投与されたラットから摘出した肺の遺伝子のうち、生理食塩水 (SA) 投与群と百日咳毒素 (PT) 投与群との間で大きく発現変動があった 25 遺伝子を用いて、クラスター解析を行なった。その結果、毒性参照用百日せきワクチンまたは百日咳毒素投与群と、精製百日せきワクチンまたは生理食塩水投与群の 2 群に明確に分けられた。すなわち、百日せきワクチンの毒性に特異的に反応して発現が変動する遺伝子群を、肺のサンプルから選別することができた。

図 3 で示すように 1 日目の 25 遺伝子、2 日目の 42 遺伝子、3 日目の 15 遺伝子、4 日目の 54 遺伝子を指標にクラスター解析を行なうことにより、明らかに製剤の違いを毒性に関連する遺伝子で区別できるものと考えられる。

### 3) 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肺への影響を病理組織学的に解析した。生理食塩水、PV、PT を接種した肺では投与 1 ~ 4 日のいずれにおいてもヘマトキシリ

ン-エオジン染色で異常を認めなかった(図4)。

#### D. 考察

平成17年度に報告した肝臓におけるアレイの結果から、少量の百日咳毒素(PT)の混入を検出できる方法を見いだした。AGP、Hpxの2つの遺伝子発現量を用いて動物に接種したPT濃度1mg/mlを鋭敏に検出できた。またPTの濃度依存的にこれら遺伝子の発現量が増加し、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特異性が高いことを示唆している。

平成18年度にはワクチン接種動物の肺でのアレイの結果を解析することにより、PTを含め百日せきワクチンにふくまれる毒性を定性的に検出できるシステムを構築した。マイクロアレイ解析による各臓器間の遺伝子発現パターンを比較したところ、その変動は肝臓よりむしろ肺で顕著であった。またDNAマイクロアレイ解析により肺のサンプルから抽出された遺伝子の発現は、独立した2回の実験でいっちなことから、これらの遺伝子群が百日せきワクチンの毒性発現のメカニズムに強く関与していることが示唆された。

現在図3でリストアップされた遺伝子

群を用いて、製剤の安全性評価法開発を進めている。20~50個の遺伝子発現を同時に測定できる方法として、マルチプレックスPCRや新規のmRNA測定キットを用いて、定量的に発現量を測定する方法を検討している。将来の試験体制充実を目指して、現在実施されている動物を用いた安全性試験に替わる新しい試験法開発を行なう。

今回われわれの行なったワクチンの毒性検出に関するデータは、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と考えられる。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遺伝子群を肺より抽出した。これらの遺伝子の発現量の変化は、肺の組織学的変化よりもさらに鋭敏に毒性変化に反応するという結果が得られた。これらの遺伝子を指標に現行毒性試験に替わる、ワクチ

ンの評価法の開発を進める。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control  
*Vaccine* in press
2. Masumi A, Fukazawa H, Shimazu T, Toshida M, Ozato K, Komuro K, Yamaguchi K: Nucleolin is involved in interferon regulatory factor-2-dependent transcriptional activation. *Oncogene* 25:5113-5124,2006
3. Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, Mizusawa S, Yamaguchi K: Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H. *J Virological methods* 136,254-256,2006
4. Horie R, Watanabe T, Umezawa K, Yamaguchi K: In vitro and in vivo antitumor activity of the NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ in the human T-cell leukemia virus type I transformed cell line, HUT-102.  
*Leuk Res.*, 2006, 30: 90-97.
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. 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.
7. 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- $\kappa$ B inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin in a mouse model of adult T-cell leukemia.  
*Carcinogenesis.*, 2005, 26: 1382-1388.
8. 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- $\kappa$ B, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T cell leukemia.

*Blood*, 2005, 106: 2426-2471.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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. 浜口功、今井順一、百瀬暖佳、河村未佳、水上拓郎、内藤誠之郎、前山順一、加藤博史、益見厚子、倉光球、滝沢和也、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

遺伝子発現解析を用いたワクチンの新しい安全性評価法確立の試み

第10回日本ワクチン学会学術集会・平成18年10月

2. 水上拓郎、今井順一、浜口功、河村未佳、百瀬暖佳、内藤誠之郎、前山順一、益見厚子、倉光球、滝沢和也、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

網羅的遺伝子発現解析によるインフルエンザワクチンの新しい安全性評価法開発の試み

第10回日本ワクチン学会学術集会・平成18年10月

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

百日せきワクチン投与に伴うラット肺での遺伝子発現解析

第10回日本ワクチン学会学術集会・平

成18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. 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

6. 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

7. 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

## 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)

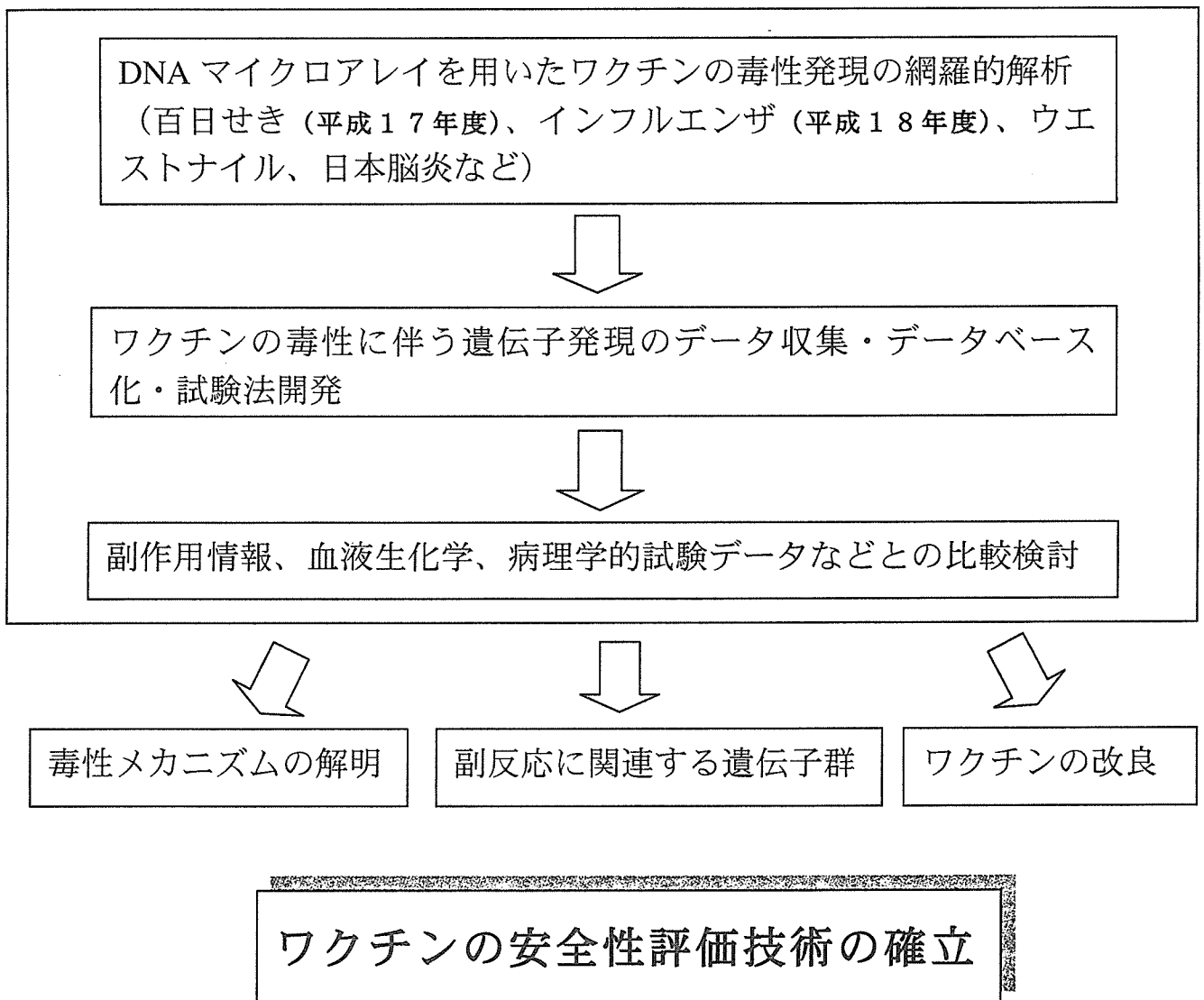


図1. 研究概要

Lung SA1d vs PT1d (25 genes)  
 条件:  $P < 0.01$ , Ave.  $> 0.75$

SA: 生理食塩水  
 RE: 百日咳ワクチン(毒性参照用)  
 PV: 精製百日咳ワクチン(25 mg/head)  
 PT: 百日咳毒素(25 mg/head)

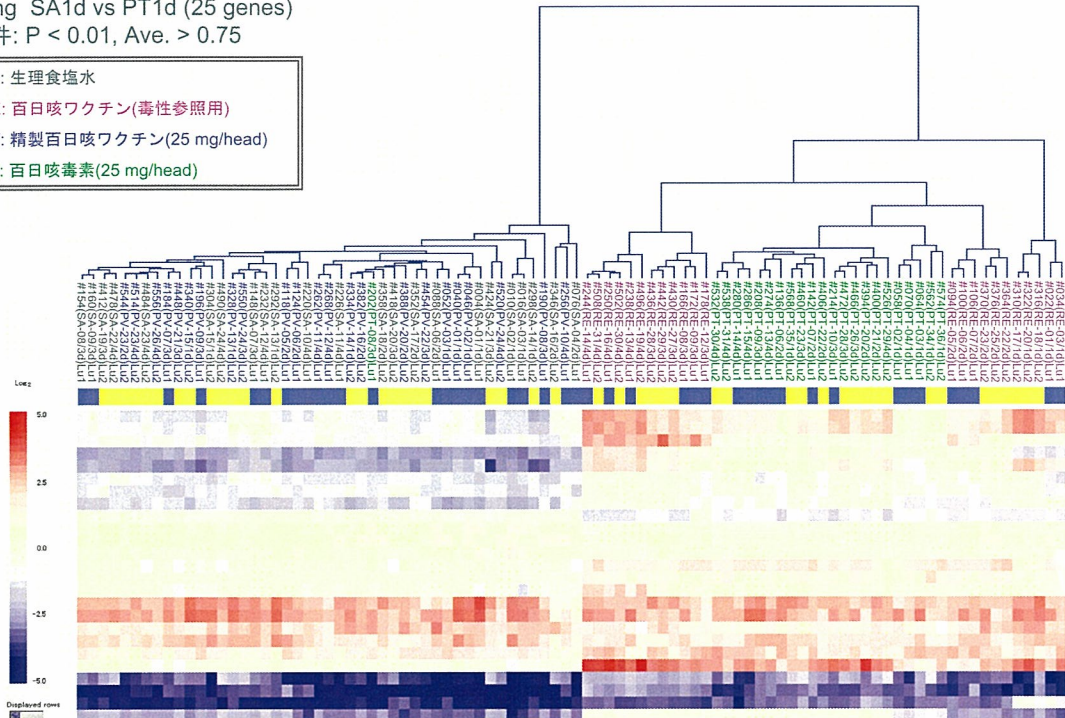
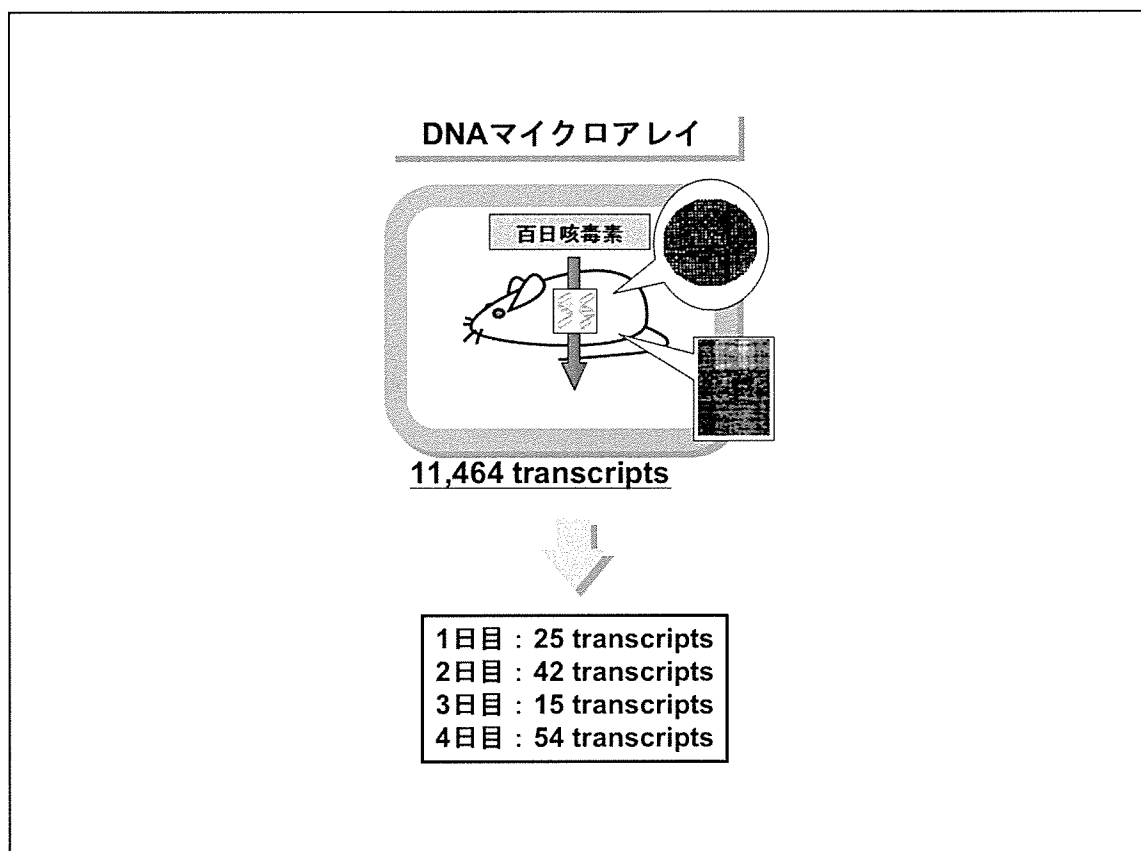


図2. 肺での遺伝子発現解析

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 PT (百日咳毒素) を接種した。1 日目の SA と PT を投与したサンプル間での比較により抽出した 25 遺伝子の発現変動をもとにクラスター解析を行なった。



**図 3. 百日せきワクチンの毒性に関連する遺伝子群**

クラスター解析により明らかに SA、PV、PT、RE の製剤の違いを検出できる遺伝子として 1 日目に 25 遺伝子、2 日目に 42 遺伝子、3 日目に 15 遺伝子、4 日目に 54 遺伝子の同定された。

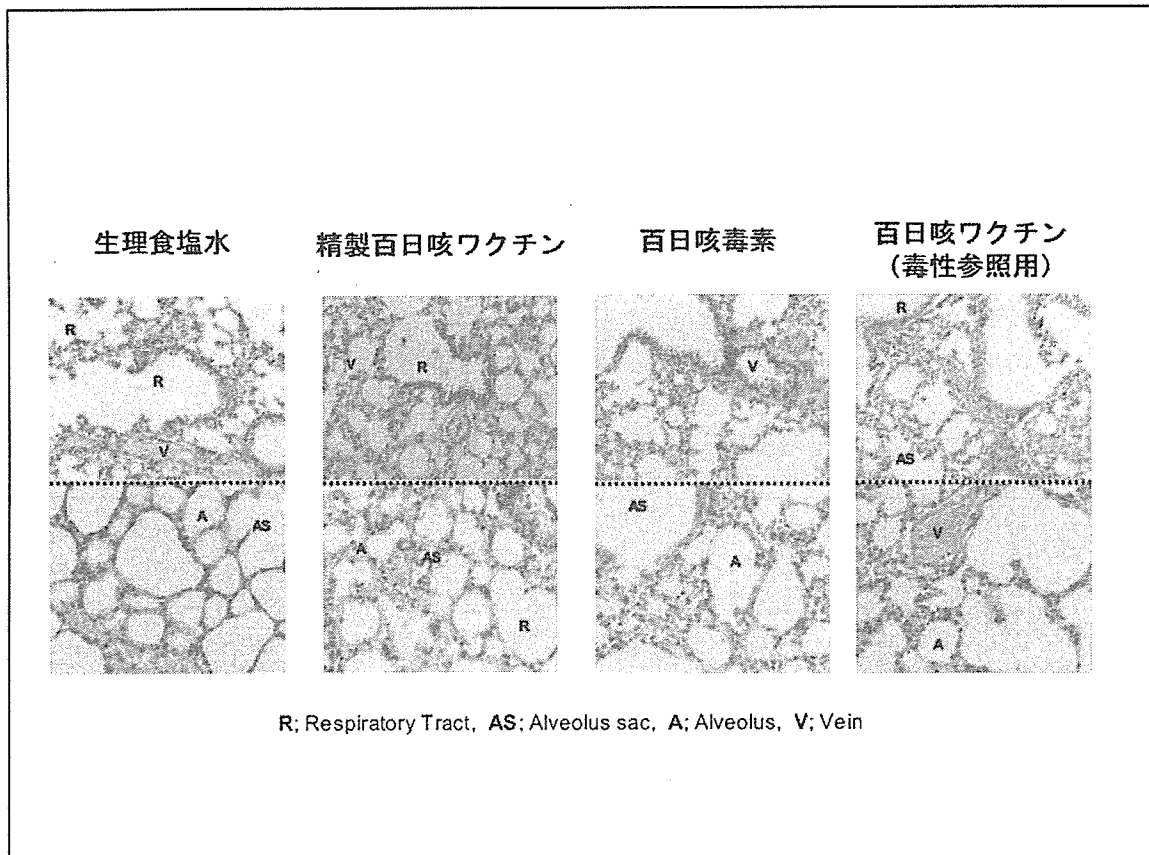


図4. 百日せきワクチンおよび毒素投与ラット肺の組織像

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 PT (百日咳毒素) を接種した。接種後1日目に肺の組織学的解析(HE染色)を行なった。

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）  
（総括・分担）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

研究課題：インフルエンザワクチン接種動物を用いたマイクロアレイ解析のための条件検討

分担研究者 浜口功 国立感染症研究所 室長

### 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。今回ラットにインフルエンザワクチンを投与したところ、モルモットにおける異常毒性否定試験と同様に接種後1日、2日後に有意な体重減少が認められた。これらの体重減少率は、沈降新型インフルエンザワクチン接種で顕著であった。また、白血球数の有為な減少も同様に認められ、これも沈降新型インフルエンザワクチンで顕著であった。しかし接種後組1日、2日後においては、織学的な病理変化及び血液・生化学的な変化は認められなかった。これらの結果は、沈降新型インフルエンザワクチンがこれまでの HA ワクチンとは異なる生体反応を示すことが明らかとなった。

### A. 研究目的

現在、インフルエンザワクチンの品質管理は、主に国家検定という形で行われており、原液に関して染色試験、無菌試験、発熱試験、マウス白血球現象試験、ウイルス含量試験が行われている。また、最終小分製品に関しては、無菌試験、ホ

ルムアルデヒド含量試験、pH 試験、蛋白含量試験、チメロサル含量試験、ウイルス含量試験、力価試験、不活化試験等の試験に加えて、マウス体重減少試験、マウス白血球現象試験、異常毒性否定試験が安全性試験として行われている。そこで我々は現在行われている異常毒性否定試験やマウス白血球減少試験といった

安全性試験に加えて、インフルエンザワクチンの迅速で詳細な安全性評価を可能とする試験法の開発するために、ラットの DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行う事を目的とした。本研究では、HA インフルエンザワクチン(HA)、全粒子ワクチン、沈降新型インフルエンザワクチンを用いて、生物製剤基準に規定されている試験法でのマウス、モルモットにおける結果とラットの結果を比較・検討し、ラットにおいて同様の現象が認められるかを明らかにする。この際にアレイ解析を行なうタイムポイント等の実験条件の検討を行なう。

## B. 方法

### 1) 動物

8週齢の F334/N 系統のラット（オス）を用い、生物学的製剤基準の一般試験法の異常毒性否定試験法に準じて行った。一群は各 5 匹用いた。

### 2) ワクチン

本研究課題に用いたワクチンは、(財団法人) 化学及血清療法研究所より供出して頂いた、HA ワクチン(HAV)、全粒子不活化ワクチン(WPV)、沈降新型インフルエンザワクチン(PDV)を用いた (図 5)。HA ワクチン、全粒子不活化ワクチンは A/New Caledonia/20/99 (H1N1) 株、A/New York/55/2004 ( H3N2 ) 株 及び B/Shanghai/361/2002 株の 3 型を混合し、沈降新型インフルエンザワクチンは

A/VIETNAM/1194/2004(H5N1)株を用いた。ヒトに接種する最終濃度に合わせて調整し、5mL をモルモットに腹腔内投与した。

### 3) 異常毒性否定試験

8週齢の F334/N 系統のラットの体重を測定した後、個体識別を行い、1 週間、馴化期間として観察した。この間、毎日体重を測定し、回帰係数が 5 以上のものを、接種個体として用いた。また、期間中、いずれも異常を示さなかった個体を用いて、沈降新型インフルエンザワクチン、全粒子インフルエンザワクチン、HA ワクチン、及び生理食塩水(SA) (日本薬局方; 大塚生食塩注) をラット腹腔内に 5mL を接種した。一群 5 匹として接種し、4 日間の経過を観察し、体重、白血球数、血液・生化学検査、組織学的解析を行った。

### 4) 血液・生化学検査

ラット血液をジエチルエーテル麻酔下で心臓より採血し、EDTA-2K 入りの採血管 (BD 社) に採取した。血液はよく混和し、4℃で保存し、採決後すぐに日本光電社の MEK-5258 を用いて血球測定を行った。その後、スメア標本を作製し、ギムザ染色を行った。

生化学検査には、富士ドライケム 300G を用いて行った。検査した項目は、肝機能検査を目的として ALT(GPT)、AST(GOT)、ALP(血中アルカリ性フォスファターゼ)及び CRP(C-反応性蛋白)を、膵臓機能の検



査として AMYL(血中アミラーゼ)を、筋肉検査として CPK(血中クレアチンフォスフォキナーゼ)を、腎臓機能検査として BUN(血中尿素窒素)及び CRE-P(血中クレアチニン)を、代謝全般検査として GLU(血中ブドウ糖)、T-CHO(血中総コレステロール)、及び TG(血中中性脂肪)を検査した。

### 5) 病理学的解析

採血後、各組織重量を測定し、組織学的検索用にブアン固定液及び 4%パラホルムアルデヒドで、1晩 4°Cの条件で固定し、再度室温に戻した状態で 2 時間新鮮な固定液で固定した後、常法に従い脱水し、パラフィンに包埋した。4 $\mu$ m の切片をマイクロトーム (YAMATO) で作成し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン(H.E)染色を行った。

### 6) 白血球減少試験

また、血液の動態を短時間内で明らかにする目的で、一群 3 匹でインフルエンザワクチン (沈降新型インフルエンザワクチン(PDV)、全粒子インフルエンザワクチン(WPV)、HA ワクチン(HAV)、及び生理食塩水(SA)を接種し、接種前、接種後 2 時間、接種後 16 時間、接種後 48 時間、接種後 72 時間、接種後 96 時間後の、血液を採取し、白血球数を測定した。白血球等の測定は、日本光電社の MEK-5258 を用いて行った。採血は尾静脈より翼状針を用いて行い、EDTA-2K 入りの採血管 (BD 社) に採取した。血液はよく混和し、

4°Cで保存し、採決後すぐに血球測定を行った。その後、スメア標本を作製した。

## C. 研究結果

### 異常毒性否定試験

F344/N 系のラット (オス) を用いた異常毒性否定試験を行った。本試験では、回帰係数の基準を超えるモルモットは認められず、なおかつ、馴化期間中に以上を示すモルモットは認められなかったため、すべてのラットを接種ラットとした。沈降新型インフルエンザワクチン、全粒子インフルエンザワクチン、HA ワクチン、及び生理食塩水接種後 1 日、2 日、3 日、4 日の体重変化を調べた。

その結果、沈降新型インフルエンザワクチン及び全粒子インフルエンザワクチン接種後 1 日、2 日、3 日、4 日目においてに有意な体重減少が認められ、これらは HA ワクチン接種群、生理食塩水接種群とは異なる事が明らかとなった (図 6)。特に、沈降新型インフルエンザワクチン接種群の体重減少率は高く、観察期間内に接種時の体重に回復しなかった。一方、HA ワクチン接種による有意な体重減少は認められなかった。HA ワクチンの結果は、モルモットを用いた異常毒性否定試験の結果と相関しており、ラットを用いて本研究を行う事は妥当であると考えられた。

### 白血球減少試験

ラットを用いた白血球減少試験を行っ

た。沈降新型インフルエンザワクチン (PDV)、全粒子インフルエンザワクチン (WPV)、HA ワクチン(HAV)、及び生理食塩水(SA)接種後 2 時間、16 時間、48 時間、72 時間、96 時間後の、血液を採取し、白血球数を測定した。その結果、沈降新型インフルエンザワクチン及び全粒子インフルエンザワクチン接種群では、接種後 16 時間に有意な減少を認めた (図 7)。これらの減少は、48 時間後には正常範囲に戻る事が明らかとなり、以後、3 日間、大きな変動は認められなかった。また、HA ワクチンや生理食塩水接種群でも接種後 2 時間では白血球減少が認められたが、16 時間後には正常範囲内に回復した。また、沈降新型インフルエンザワクチン及び全粒子インフルエンザワクチン接種群では、接種後 16 時間に血小板の有意な減少を認めた (図 8)。これらも白血球数と同様に 48 時間後には正常範囲に回復する事が明らかとなった。

#### 血液・生化学検査

全粒子インフルエンザワクチン、HA ワクチンおよび生理食塩水接種における生化学検査を行った。その結果、肝機能検査項目である、ALT, ALP, AST では大きな変動は認められなかった。CRP に関してもすべて 0.3mg/dL 以下を下回っていた。代謝関連である GLU, T-CHO では有意な変動は認められなかったが、TG は 4 日目に WPV 接種群で高値を示した。膵臓機能検査項目である AMYL も、有意な変動は

認められなかった。筋肉機能検査項目である CPK は有意な変動は認められなかった。腎臓機能検査項目である BUN,CRE-P でも有意な変動は認められなかった。

#### 各臓器の病理学的検索

インフルエンザワクチン接種後 1、2、3、4 日目の脳、胸腺、肺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、小腸、大腸、精巣、骨髄の組織学的検索を行った。その結果、肝臓において、全粒子ワクチン接種後 1 日目の肝臓において若干の壊死像が認められたが (図 9 A, B)、2 日目以降は認められなかった。インフルエンザウイルスは上気道を含めた肺に感染するが、ワクチン接種群において顕著な病理像は肺 (図 9 C, D)、腎臓 (図 9 E, F)、精巣等 (図 9 I) では認められなかった。全粒子ワクチン接種群では、16 時間までに白血球数や血小板数が減少するが、骨髄 (図 9 G)、胸腺 (図 9 H) における病理所見及び顕著な骨髄抑制は認められなかった。

#### D. 考察

##### 異常毒性否定試験

F344/N 系のラット (オス) を用いた異常毒性否定試験の結果、沈降新型インフルエンザワクチン及び全粒子インフルエンザワクチン接種後 1 日、2 日、3 日、4 日目においてに有意な体重減少が認められ、これらは HA ワクチン接種群、生理食塩水接種群とは異なる事が明らかとなった (図 6)。よって全粒子ワクチン及

び沈降新型インフルエンザワクチンの体重減少毒性は HA ワクチンに比べ高い事が示唆される。また、アルミニウムゲルを添加し、免疫増強した沈降新型インフルエンザワクチンでは、全粒子ワクチンに加えて有意に体重減少が認められ、観察期間内に接種時の体重に回復しなかった。よってアルミニウムゲルによってより体重減少毒性が増加したと考えられる。しかし、アルミニウムゲルによる肝臓等へのアルミニウムの蓄積は肉眼的にはほとんど認められず、アルミニウムゲル自身の毒性は他の沈降製剤に比べ低い事が予想されるが、観察期間を延長し、今後検討する必要があると言える。一方、HA ワクチン接種による有意な体重減少は認められなかった。HA ワクチンの結果は、モルモットを用いた異常毒性否定試験の結果と相関しており、ラットを用いて本研究を行う事は妥当である事が示唆された。現在これらのモデルを用い、DNA マイクロアレイによる解析を行っている。

#### 白血球減少試験

ラットを用いた白血球減少試験を行った。沈降新型インフルエンザワクチン、全粒子インフルエンザワクチン、HA ワクチン、及び生理食塩水接種後 2 時間、16 時間、48 時間、72 時間、96 時間後の、血液を採取し、白血球数を測定した。その結果、沈降新型インフルエンザワクチン及び全粒子インフルエンザワクチン接種群では、接種後 16 時間に有意な減少を認

めた。この事より、沈降新型インフルエンザワクチン及び全粒子インフルエンザワクチンの白血球減少活性は HA ワクチンに比べ高い事が示唆された。現在、白血球減少のメカニズムはまだ明らかになっていない。骨髄や胸腺、リンパ節等の病理組織検索に於いても、顕著な骨髄抑制像は認められなかった。また、今回、詳細な血液検査を行った結果、沈降新型インフルエンザワクチン及び全粒子インフルエンザワクチン接種群において有意な血小板の減少も認められた。インフルエンザワクチン接種による血液毒性のメカニズムを今後、抹消血の DNA マイクロアレイを行い、明らかにすることが必要であるとする。

さらに生化学的検査、病理検査を行ったが、体重減少のメカニズムは、既存の検査方法では明らかとならなかった。しかし、マウス白血球減少試験及び異常毒性否定試験を包含した形であたらしい安全性試験法を DNA マイクロアレイを用いて明らかにする事が可能であると示唆された。今後、同ワクチンを用い、DNA マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現解析を行いつつ、これらのメカニズムの解明、臨床への応用を試みたいと考えている。

#### E. 結論

沈降新型インフルエンザワクチン及び全粒子インフルエンザワクチン接種後 1 日、2 日、3 日、4 日目においてに有意

な体重減少が認められた。また沈降新型インフルエンザワクチン及び全粒子インフルエンザワクチン接種群では、接種後16時間に有意な減少を認めた。これらのことから、ワクチン投与早期に著明な毒性反応がみられる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control

*Vaccine* in press

2. Nagamatsu G, Ohmura M, Mizukami T, Hamaguchi I, Hirabayashi S, Yoshida S, Hata Y, Suda T, Ohbo K: CTX family cell adhesion molecule, JAM4, expresses in stem cell- and progenitor cell-populations of both male germ cell and hematopoietic cell lineages.

*Mol. Cell. Biol.* 26: 8498-8506, 2006

3. 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.

4. 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. Res. Commun.*, 2005, 338: 1167-1170.

5. 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.

6. 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.

7. 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.