

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤研究事業

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口一成  
平成20(2008)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

遺伝子発現解析 (QuantiGene Plex 法) を用いたワクチンの新しい安全性評価法確立	4
山口一成	
図 1 : ワクチン接種に伴う体重の変化	10
図 2 : 肺における発現遺伝子のクラスタリング解析	11
表 1 : ワクチンの毒性に関連する遺伝子群の同定	12
図 3 : 毒性関連遺伝子を指標にしたクラスタリング解析	13
図 4 : 毒性関連遺伝子の発現量の検討	13
図 5 : QGP 法を用いた遺伝子発現解析	14
図 6 : QGP 法を用いたワクチン毒性の検出	14

### II. 分担研究報告

1. 網羅的遺伝子発現解析法を用いたインフルエンザワクチン及びパンデミックインフルエンザワクチンの新しい安全性評価法に関する研究	15
浜口 功	
図 7 : インフルエンザワクチンの異常毒性否定試験	26
図 8 : インフルエンザワクチンの白血球減少試験	26
図 9 : インフルエンザワクチン接種後 (16hrs) の血液学的変化	28
図 10 : インフルエンザワクチン接種後の病理変化	29
図 11 : インフルエンザワクチンの網羅的遺伝子発現解析 1	30
図 12 : インフルエンザワクチンの網羅的遺伝子発現解析 2	31
図 13 : 網羅的遺伝子発現解析によって誘導された 18 遺伝子のバリデーション	32
図 14 : インフルエンザワクチン接種後の遺伝子発現変化	33
表 2 : インフルエンザワクチン接種によって誘導される 76 遺伝子	34
2. 網羅的遺伝子発現解析によるマウス脳由来日本脳炎ワクチン、および Vero 細胞由来日本脳炎ワクチンの評価	35

#### 渡辺慎哉

##### 野村信夫

図 15 : 日本脳炎ワクチン接種後の体重変化	40
図 16 : 日本脳炎ワクチン接種後の血液学的解析	41
図 17 : 日本脳炎ワクチン接種後の血液化学的解析	42
図 18 : 日本脳炎ワクチン接種によるラット脳の遺伝子発現プロファイルのクラスタ解析	43
図 19 : 日本脳炎ワクチン接種によるラット肝臓の遺伝子発現プロファイルのクラスタ解析	44

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
---------------------	----

IV. 研究成果の別刷	47
-------------	----

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究総事業）

（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：遺伝子発現解析（QuantiGene Plex 法）を用いたワクチンの新しい安全性評価法確立

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 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生体変化（体重、体温、病理）を指標にワクチンの安全性の評価を行っているが、一方で、ワクチンが生体に与える反応を分子レベルで解明するとともに、ワクチンの安全性評価法の確立を行なう目的で、今回 DNA マイクロアレイの手法を用いてワクチンの毒性に関与する遺伝子群の同定を行ってきた。ワクチン接種 1 日目でラット肺で発現変動が著明な 13 個の遺伝子群を同定した。これらの遺伝子発現量を定量 PCR 法および QuantiGene Plex 法を用いて解析したところ、QuantiGene Plex 法での測定結果は定量 PCR 法と同等の精度の高い定量が可能であり、遺伝子発現量の変化が、百日せきワクチン投与に伴う生物反応を迅速かつ鋭敏感知できることが明らかとなった。今後遺伝子発現量の変化を指標にした、ワクチン安全性評価システムの実現化を大きく前進させるものと考えられる。

## 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・血液・安全性研究部・室長

## A. 研究目的

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生体

変化（体重、体温、病理）を指標にワクチンの安全性の評価を行っているが、一方で、トキシコゲノミクス的手法を用いてワクチンの毒性に関連する遺伝子群の特定を行なってきた。ワクチンが生体を与える反応を分子レベルで解明するとともに、ワクチンの安全性評価法の確立を行なう目的で、今回ワクチンの毒性に関連する遺伝子群の発現量を簡便でかつ高精度に測定する方法を確立し、評価法の実用化を目指す。

## A. 研究方法

### 1) 動物

8週齢のWistar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PV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（80mer）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）をスキヤ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) QuantiGene Plex 法

ワクチン接種ラットの肺から精製したpoly(A)+RNA（50ng/10 $\mu$ l）は、65 $^{\circ}$ Cで10分間処理した後、QuantiGene Plex Reagent System（Panomics）添付のLysis mixture 33.3 $\mu$ l、Capture buffer 40  $\mu$ l、Capture beads 2  $\mu$ l、Probe set 2 $\mu$ lを加えた。ライセートは、100mgの凍結ラット肺を3mlのHomogenizing solution（Panomics）に溶解し、10 $\mu$ lのProteinase K（Panomics）を加えて破碎し65 $^{\circ}$ C30分間処理した後、3,500rpmにて5分間遠心した上清をライセートとした。

ライセート 40 $\mu$ l に 33.3 $\mu$ l の Lysis mixture、0.2 $\mu$ l の Proteinase K、2 $\mu$ l の Capture beads、2 $\mu$ l の Probe set を加えた。これらを Hybridization plate にて 54 $^{\circ}$ C 16 時間インキュベートした後、Filter plate に移し 200 $\mu$ l の Wash buffer で 3 回洗浄した。次に Amplifier を加えて 48 $^{\circ}$ C で 1 時間、Label probe を加えて 48 $^{\circ}$ C で 1 時間、SAPE を加えて室温で 30 分間処理した。最後に 100 $\mu$ l の SAPE wash buffer を加え、Luminex 100 マイクロプレートルミノメーターにより蛍光強度を測定した。

## B. 研究結果

### 1) 百日せきワクチン接種ラットにおける体重推移

毒性参照用百日せきワクチン、精製百日せきワクチン、百日咳毒素、生理食塩水をそれぞれオスの Wistar ラットに接種し接種後 1、2、3、4、7 日目における体重変化を経時的に測定した(図 1)。毒性参照用百日せきワクチン接種群で 1～4 日目に著明な体重減少を認めた。

### 2) 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、肝、腎、脳を摘出した。動物実験は繰り返し 2 度行ない、合計 384 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。4 つの臓器のうち、肺において異なる製剤接種群における明らかな遺伝子発現パターンを検出し、解析を行った 1～4 日目のいずれにおいても、毒性参照用百日せきワクチン接種群及び百日咳毒素接種群は精製百日せきワクチンや生理食塩水を接種した群と明らかに異なる遺伝子発現パターンであった (図 2)。

### 3) 毒性関連遺伝子の同定

DNA マイクロアレイの結果より、ワクチン接種 1 日目のラット肺で発現変動が著明な 13 個の遺伝子群を特定した (表 1)。また、これらの遺伝子群を用いたクラスタリング解析より、遺伝子の発現量の変化が毒性に密接に関連していることが明らかとなった (図 3)。

### 4) 毒性関連遺伝子の定量的測定

13 個の百日せきワクチン毒性関連遺伝子を定量 PCR で測定し、マイクロアレイより得られた発現度と比較検討した。

図4で示すように、毒性関連遺伝子の発現量は両者の測定法においてもほぼ同等に検出できることが明らかであった。またこれらの遺伝子が、毒性参照用百日せきワクチンもしくは百日咳毒素の接種群において、他と大きく異なる発現値をしめすことが明らかとなった。

## 5) QuantiGene Plex 法による試験法開発

13個の遺伝子量を1回の反応系で定量できるQuantiGene Plex法を採用し、定量性を検討した。図5で示すように、QuantiGene Plex法での測定結果は定量PCR法と同等の精度の高い定量が可能であることが明らかとなった。

そこでQuantiGene Plex法を用いて、毒性参照用百日せきワクチンの濃度を調節して接種したラットにおける遺伝子発現量を解析したところ、13個の遺伝子のうち、毒性参照用百日せきワクチンの毒性に関連すると考えられるS100A9、S100A8、MMP9、BEST5、MX2、IRF7、IFI27L、MMP8、CYP2E1で接種濃度の変化を鋭敏に検出できることが明らかとなった(図6)。

## C. 考察

百日せきワクチンの毒性に関与する13遺伝子をラット肺より同定した。これまで、毒性に密接に関係するとされる肝臓における遺伝子発現が薬剤の副作用との関連からも積極的になされてきたが、今

回肝臓よりも肺で特異的な遺伝子発現パターンを示すことを明らかにした。百日せき菌のターゲットが肺であることを考えると、最初に生体に変化を認める場所は肺であり、妥当な結果だといえる。本研究において毒性関連遺伝子として同定した13遺伝子のうち、S100A9、S100A8、CCL2、MMP8、MCPT9の5遺伝子は、解析を行った期間中恒常的に、PT投与によって顕著に発現変動が認められたものである。S100A8とS100A9は食細胞に特徴的なCa結合蛋白質で、細菌感染部位への好中球浸潤を制御している。CCL2もケモカインの一種で、単球の遊走を引き起こす。血清中のA100A8/9やCCL2レベルは、炎症性疾患において亢進することが知られ、炎症反応への関与が示唆される分子である。MMP8は好中球のコラゲナーゼの一つで、好中球および好酸球を遊走させる。炎症反応、抗炎症反応の両者への関与が示唆されている。MCPT9は機能未知の分子であるが、免疫細胞であるマスト細胞に高発現するプロテアーゼと考えられることから、炎症反応を含めた生体の免疫応答との関連が考えられる。

これら5遺伝子も含め、13個の毒性関連遺伝子のうち多くが炎症反応と密接に関連していた。肺炎球菌の病態との関連も考えられ、今後さらに詳しい解析が必要である。

今回これら13遺伝子を用いた安全性試験開発のために、定量性を持って解析を行う方法としてQuanti Gene Plex法を採用した。本方法は96ウェル1穴を用いて、1回の反応系で13遺伝子の発現量を正確に解析することができ、また結果を得るまでの時間もこれまでの動物を用いた試験法に比べて、大幅に短縮できる。

また毒性参照用ワクチンの接種濃度の違いを鋭敏に検出できる。今後遺伝子発現量の変化を指標にした、ワクチン安全性評価システムの実現化を大きく前進させるものと考えられる。

#### D. 結論

百日せきワクチンの毒性を定量的に測定可能な13遺伝子の同定に成功した。今後これらの遺伝子発現量の変化を指標にした、ワクチン安全性評価システムの確立が行われることにより、実現化を大きく前進させるものと考えられる。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 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**, 25: 3355-3364, 2007

2. Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K: Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of

antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant

**Vaccine**, 25: 8762-8770, 2007

3. Mizukami T, Imai J-I, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation

**Vaccine** in press

4. Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Ishida T, Yamaguchi K, Horie R, Watanabe T, Umezawa K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines.

**Cancer letter** 257(2), 206-215, 2007

5. Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, Fukushima T, takatsuka Y, Ikede S, Masuda M, Nagashi H, Ueda R, Tamura K, Sano M, Momita S, Yamaguchi K, Kawano F, Hanada S, Tobinao K, Shimoyama M, Hotta T, Tomonaga M, and LSG Group: VCAP-AMP-VECP



versus biweekly CHOP for adult T-cell leukemia- lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG9801.

*J Clin Oncol in press*

## 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、水谷哲也、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 (QuantiGene Plex 法) を用いたワクチンの新しい安全性評価法確立の試み  
第11回ワクチン学会 (横浜)・2007. 12.

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、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パンデミックインフルエンザワクチン(H5N1)の安全性・有効性評価法開発の試み  
第11回ワクチン学会 (横浜)・2007. 12.

3. 内藤誠之郎、前山順一、水上拓郎、長谷川秀樹、浜口功、山口一成 経皮ワクチンに関する研究-抗原の皮膚送達促進による免疫効果の増強とインフルエンザ HA ワクチンへの応用  
第11回ワクチン学会 (横浜)・2007. 12.

4. Momose H, Imai J, Hamaguchi I, Kawamura M, Watanabe S, Yamaguchi K

Application of quantitative gene expression analysis to Pertussis vaccine safety control

国際ワクチン学会 (Amsterdam, Netherland), 2007. 12.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許

なし

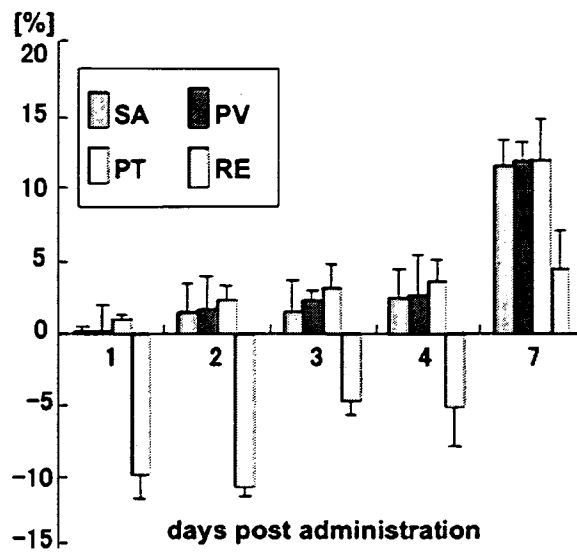


図1. ワクチン接種に伴う体重の変化

ラットにサンプル接種後経時的に体重の変化を測定した。SA:生理食塩水、PV:精製百日せきワクチン PT: 百日咳毒素、RE:毒性参照用百日せきワクチン

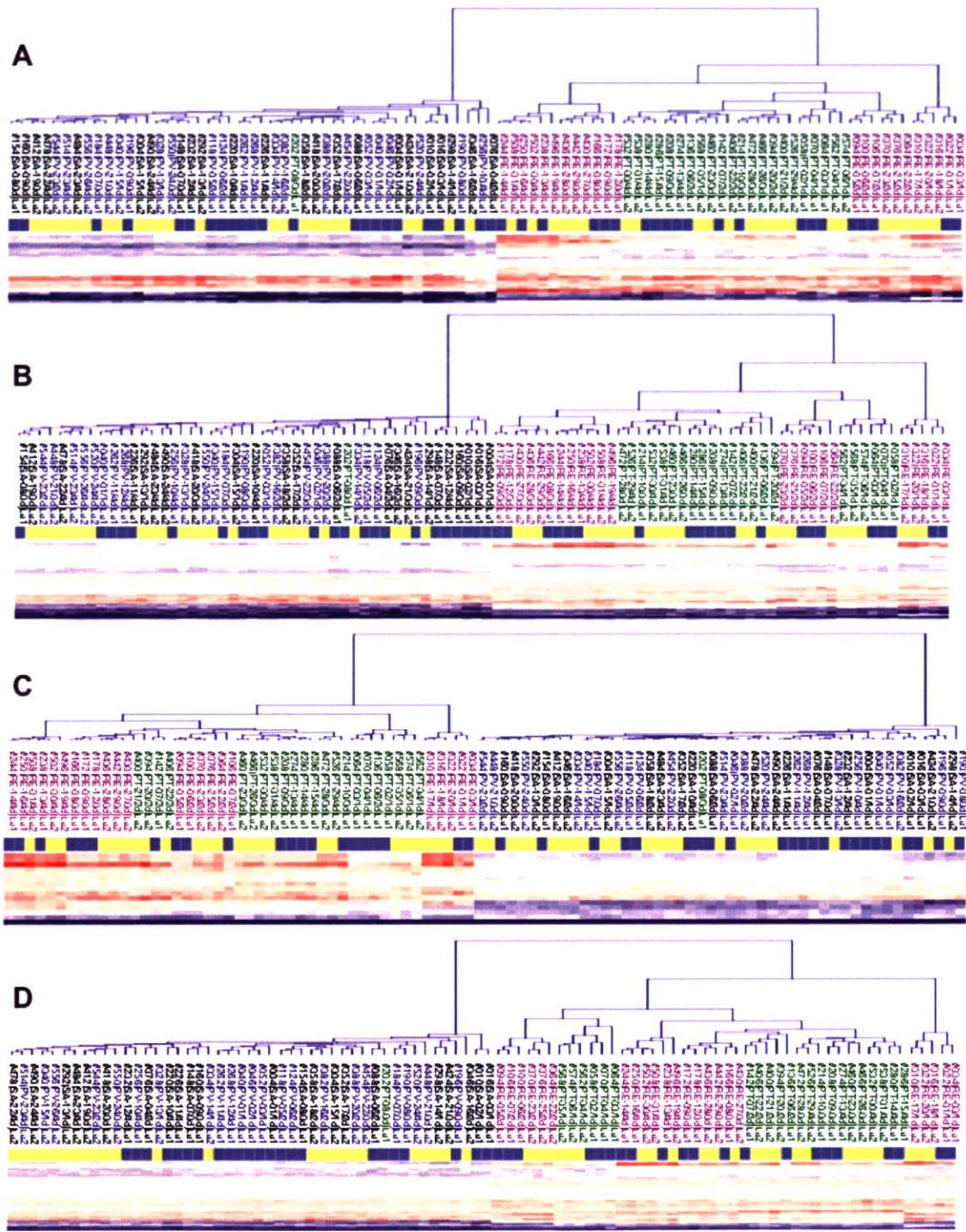


図2. 肺における発現遺伝子のクラスタリング解析

サンプル接種後のラット肺における遺伝子発現について、クラスタリング解析を行った。

A: 一日目、B: 二日目、C: 三日目、D: 四日目

Accession No.	Symbol	Category	Description	SA	PV	PT	RE
NM_053587	<i>S100A9</i>	inflammation	a calcium binding protein that may be associated with acute inflammatory processes, coupled with S100a8	-1.40±0.69	-0.98±0.37	0.58±0.40	2.84±0.41
NM_019323	<i>MCPT9</i>	inflammation	a serine protease expressed in mast cells, but the precise function has not yet determined	-2.72±0.30	-2.48±0.27	0.57±0.35	-1.58±0.25
NM_053822	<i>S100A8</i>	inflammation	may play a role in inflammatory responses such as cell motility, coupled with S100a9	-2.68±0.67	-2.22±0.46	-0.56±0.54	2.14±0.45
NM_031055	<i>MMP9</i>	peptidoglycan metabolism	metalloproteinase involved in extracellular matrix remodeling, bone resorption, and immune responses	-2.21±0.40	-2.25±0.41	-1.30±0.34	-0.35±0.19
Y07704	<i>BEST3</i>	ossification	induced by IFN and involved in bone formation	-0.22±0.36	-0.36±0.35	-1.03±0.12	-1.37±0.10
NM_017028	<i>MX2</i>	immune response	involved in inhibiting vesicular stomatitis virus, but not an anti-influenza molecule	0.77±0.30	0.72±0.27	-0.33±0.14	0.05±0.25
XM_215121	<i>IRF7</i>	-	unknown	0.81±0.11	0.82±0.16	0.04±0.25	0.60±0.21
NM_130743	<i>IFI27L</i>	immune response	induced by steroid hormone, IFN and LPS in endometrium at implantation, dendric cells and macrophases	0.86±0.35	0.36±0.37	-0.02±0.15	0.40±0.23
NM_031530	<i>CCL2</i>	inflammation	a ligand for CCR2 that acts as a chemoattractant of monocytes	-0.09±0.18	0.01±0.10	1.12±0.58	0.54±0.39
XM_220059	<i>IFIT3</i>	immune response	may induced by IFN or virus infection	2.42±0.13	2.35±0.48	1.20±0.66	2.55±0.39
NM_022221	<i>MMP8</i>	peptidoglycan metabolism	may play a role in appositional bone formation and regulation of the extracellular matrix	-0.23±0.67	0.32±0.24	2.04±0.51	3.23±0.45
J02627	<i>CYP2E1</i>	xenobiotic metabolism	protects hepatocytes from stress-induced cell death	-4.03±0.21	-3.93±0.23	-3.25±0.21	-0.71±0.52
XM_236646	<i>NGP_predicted</i>	-	neutrophilic granule protein (predicted)	-3.38±0.61	-3.04±0.50	-1.33±0.48	-3.04±0.45

## 表1. ワクチンの毒性に関連する遺伝子群の同定

ワクチン接種 1 日目のラット肺において著明な発現変動を示した 13 遺伝子

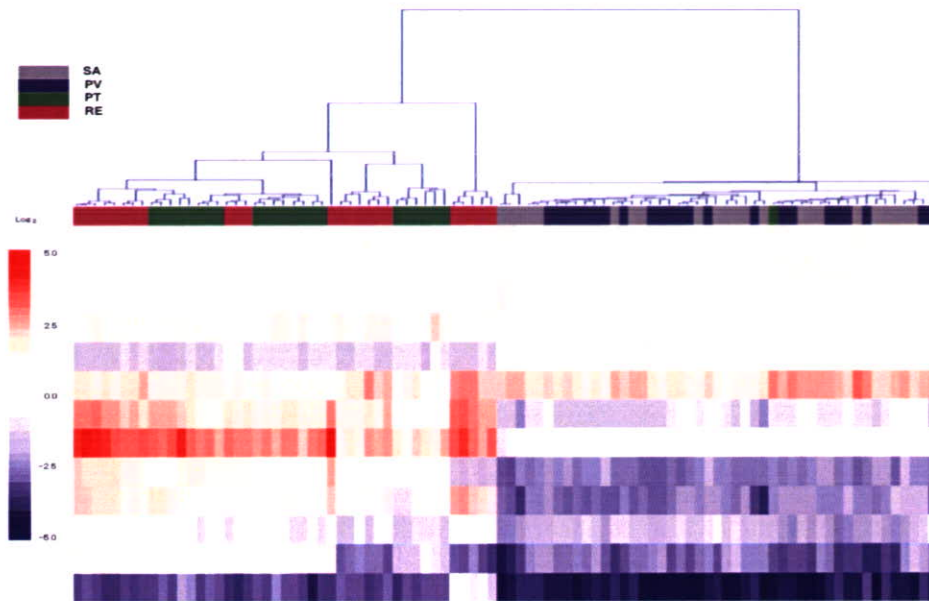


図3. 毒性関連遺伝子を指標としたクラスタリング解析

13個の毒性関連遺伝子を指標にクラスタリング解析を行った。 SA:生理食塩水、 PV: 精製百日せきワクチン、 PT: 百日咳毒素、 RE:毒性参照用百日せきワクチン

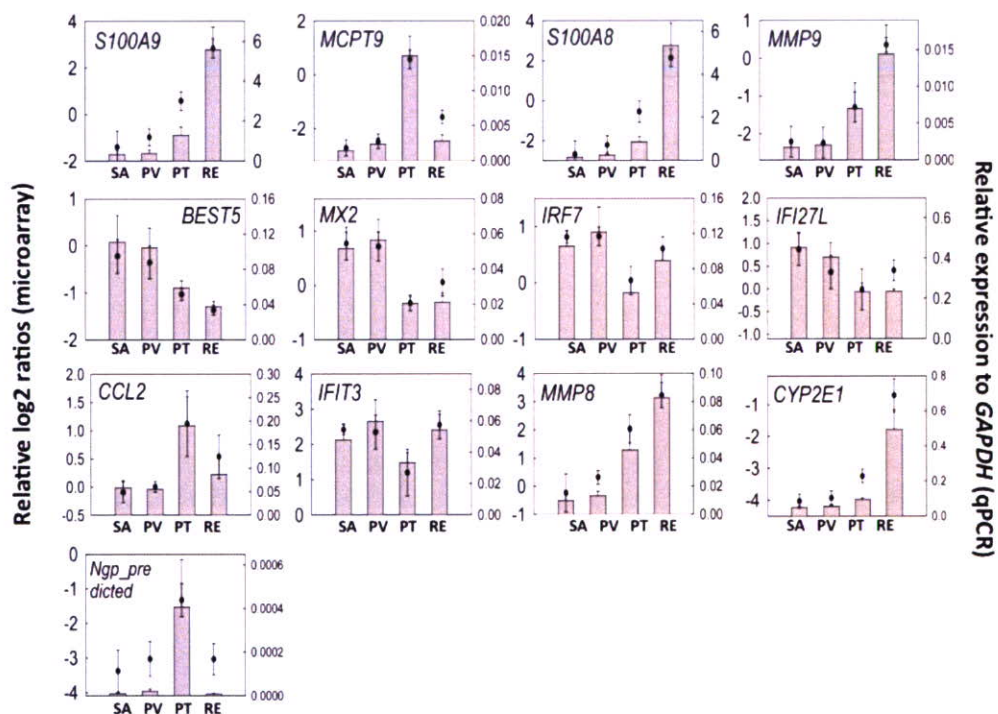


図4. 毒性関連遺伝子の発現量の検討

遺伝子発現量を異なる2種類の方法で解析し、比較検討を行った。

黒ドット: DNAアレイにもとづく発現比、グレーバー: 定量PCRによる発現量

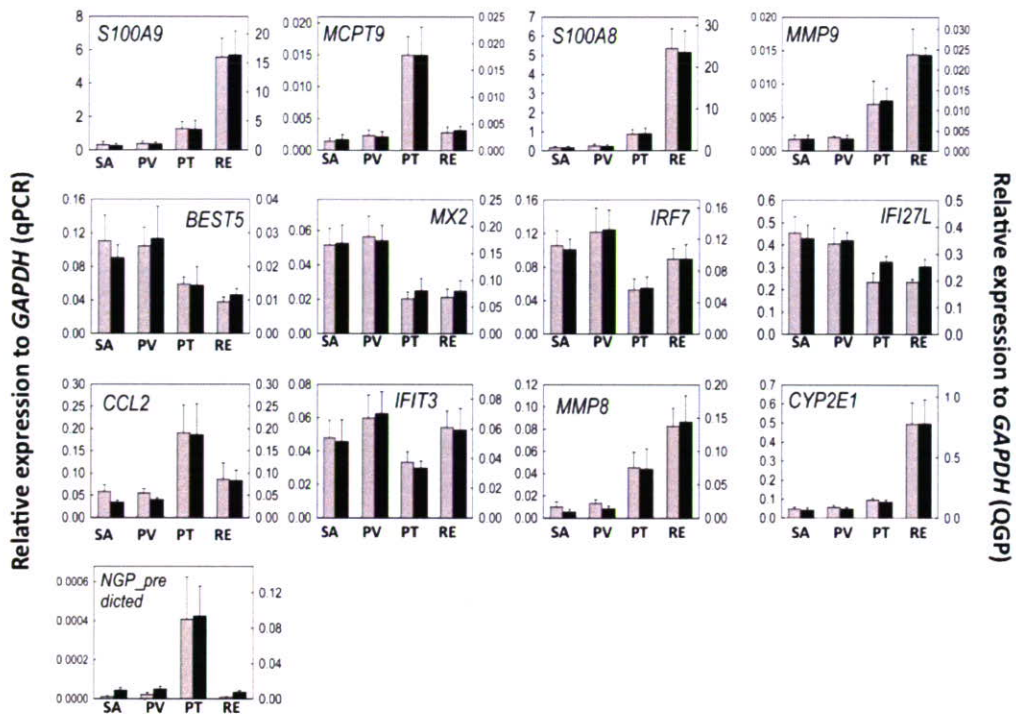


図5. QGP法を用いた遺伝子発現解析

遺伝子発現量を異なる2種類の方法で解析し、比較検討を行った。

グレーバー：定量PCRによる発現量、ブラックバー：QGP法による発現量

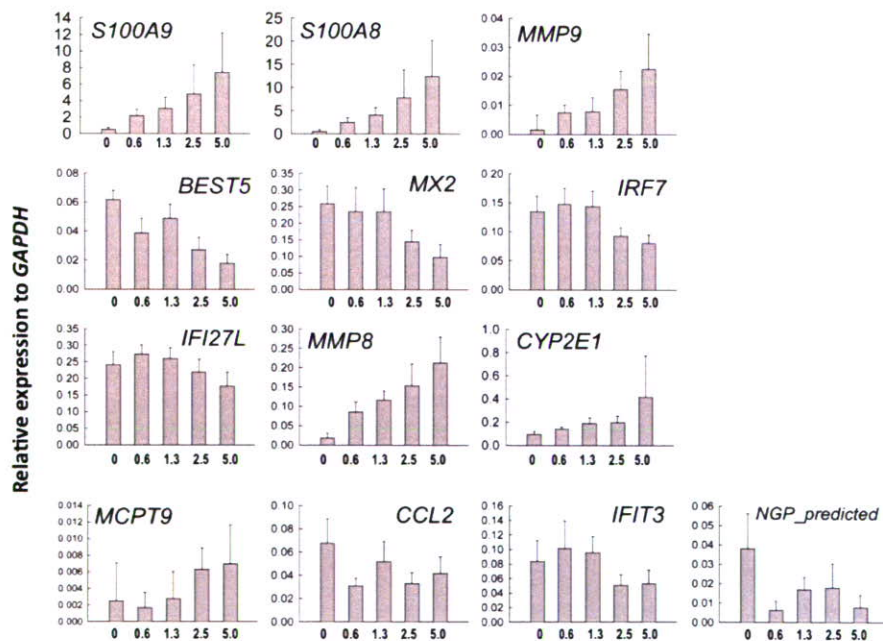


図6. QGP法を用いたワクチン毒性の検出

QGP法により、毒性参照用百日せきワクチン接種による遺伝子発現量測定を行った。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究事業）

（総括・分担）研究報告書

網羅的遺伝子発現解析法を用いたインフルエンザワクチン及び  
パンデミックインフルエンザワクチンの新しい安全性評価法開発に関する研究

分担研究者 浜口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長  
協力研究者 水上拓郎 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・研究員  
百瀬暖佳 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・研究員

**研究要旨**

インフルエンザは発熱、頭痛、関節痛、筋肉痛など全身症状を引き起こす呼吸器の感染症であり、その予防にはインフルエンザワクチンが有効であると考えられている。近年、東南アジアを中心に、世界規模で、高病原性鳥インフルエンザの発生が認められ、パンデミック発生が危惧されている。本邦では、パンデミックの発生に備え、リバーシジェネティックスの手法を用い、全粒子型のワクチンをベースと免疫増強剤であるアルミニウムゲルを加えたワクチンを準備している。既存のインフルエンザワクチンに加え、これらの新しいインフルエンザワクチンの安全性を評価する方法を開発する目的で、網羅的遺伝子発現解析法を応用した。その結果、既存の安全性試験である異常毒性否定試験及び白血球減少試験の結果と一致する76の遺伝子を同定し、更にリアルタイムPCR法によって18の遺伝子発現がアレイの結果と高い相関を示す事を示した。これらの遺伝子の中には、実際のインフルエンザ及び高病原性鳥インフルエンザの感染によって発現誘導される様な遺伝子や、細胞性免疫、抗原提示に関わる遺伝子や毒性関連遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子セットを用いる事で、インフルエンザワクチンの安全性のみならず、有効性も検討する事が可能である事が示唆された。

## A. 研究目的

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属する直径 70-120nm のウイルスで、表面上の赤血球凝集素 (HA: Haemagglutinin) と増殖に必須なノイラミニダーゼ (NA: Neuraminidase) という 2 つの糖タンパク質の抗原性の違いによって分類されている。インフルエンザはこの抗原変異 (連続抗原変異) により短い周期の小規模流行を引き起こし、38 度以上の発熱、頭痛、関節痛、筋肉痛など全身症状を引き起こす。また、HA の大変異によって抗原型が大きく変化すると、パンデミックとなる。20 世紀において H1N1 型 (スペイン風邪)、H2N2 型 (アジア風邪)、H3N2 (ホンコン風邪)、そして再度 H1N1 型 (ロシア風邪) の大流行が発生し、1918 年のスペイン風邪では、2000-5000 万人が死亡した。この発生周期からの推定に加え、東南アジアを中心に世界規模で発生している高病原性鳥インフルエンザの感染がパンデミックの引き金となる可能性が示唆されている。2008 年 3 月現在、371 名の感染が認められ、235 名の死亡例が報告されている。

本邦では、新型インフルエンザの発生に備えて、パンデミックワクチン製造がなされている。このパンデミック用のワクチンは有効性の観点から、過去にわが国で使用されていた全粒子型のワクチンをベースとしており、これに免疫効果を増強するために免疫増強剤であるアルミニウムゲルを加えて製造している。全粒子ワクチン

に関しては、現行の HA ワクチンに比べて副反応の発生頻度が高く、また、リバースジェネティクスという手法を用いて作製されていることもあり、安全性に面で十分な検討が必要である。

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を指標に、新しい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 (WPv)、沈降型インフルエンザワクチン (PDv) を用いて、生物製剤基準に規定されている試験法の結果とラットの網羅的遺伝子発現解析の結果を比較・検討し、網羅的遺伝子発現解析法がインフルエンザワクチンの安全性試験に応用できるかを検討する。

## B. 研究方法



## 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。1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。HA ワクチン及び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型を混合した。沈降新型インフルエンザワクチンは A/ VIETNAM/1194/2004 (H5N1) 株と PR8 株をリバーズジェネティクス法によって作成した NIBRG-14 で作製した。いずれのワクチンも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、PDv、WPv、HAv、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。

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℃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。4μmの切片をマイクローム (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

血液の動態を短時間内で明らかにする目的で、1群3匹で PDv、WPv、HAV、及び 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℃で保存し、採決後すぐに血球測定を行った。

## 7) RNA 抽出

ワクチンおよび毒素が投与されたラットから肝臓左外葉、左肺、左腎臓、脳を接種後 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。

## 8) 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 Cyanine 3 を、サンプル接種した RNA は Cyanine 5 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

5,346 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。

## 9) 倫理面への配慮

本研究課題では、実験計画作成にあたっては、使用動物数を必要最少数とし、実験中の生理的および心理的苦痛を軽減するための最大限の努力をし、目的達成のための方法、実験処置、飼育管理を含めた取扱いの妥当性などについて必要かつ十分な検討を行った。また、国立感染症研究所に設置されている「動物実験委員会」または「動物倫理委員会」でのプロトコルの承認を受けている。

## C. 研究結果

### 1) 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 (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 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日目において有意な体重減少が認められ、これらはHAV接種群、SA接種群とは異なる事が明らかとなった(図1)。特に、PDv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、HAV接種による有意な体重減少は認められなかった。HAV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。

## 2) 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。PDv、WPv、HAV、及び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、PDv及びWPv接種群では、接種後16時間に有意な減少を認めた(図2, 3)。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、HAVやSA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、PDv及びWPv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3)。血小板値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。

## 3) 血液・生化学検査

PDV、WPv、HAV及びSA接種個体の

血清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についてもすべて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。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も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(data not shown)。

## 4) 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、WPv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4)、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、腎臓、精巣等でも認められなかった。PDv及びWPv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、骨髄及び胸腺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。

## 5) 肺組織の網羅的遺伝子発現解析

インフルエンザ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日目に肝臓、肺、脳、

血液を採取し、合計 320 サンプルから poly(A)+RNA を抽出した。その中から肺のサンプルについて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 Cyanine 3 で、サンプル接種した RNA を Cyanine 5 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。

肺のサンプルから取得した遺伝子発現プロファイルを基にして二次元階層クラスタ解析を行なった。その結果、1 日目の WPv と PDv 接種群が他のサンプル (HAV と SA 接種群) と別クラスターを形成しており、他のサンプルとは異なる挙動を示していた (図 5)。

#### 6) インフルエンザワクチンの毒性関連遺伝子の同定とバリデーション

そこで、1 日目の WPv と SA 接種群の間で発現に有意差のある遺伝子群を統計的 ( $P < 0.005$ ) に抽出した後に、その抽出した 78 個の遺伝子を用いて、再度クラスタ解析をなおした (図 6)。その結果、大きく 5 つのクラスター (Cls1, Cls2, Cls3, Cls4, Cls5) に分類する事が可能となった。Cls1 は、WPv と PDv 接種群 (1 日目) を示し、Cls2 は WPv と PDv 接種群 (2 日目)

を示し、Cls3 は更に、HAV 接種群 (1 日目) と、Cls4 は WPv と PDv 接種群 (3 日目) を示し、Cls4 は WPv と PDv 接種群 (4 日目) を示した。これらの結果は、全粒子ワクチン接種後 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目とスプリットワクチン接種後 1 日目及びその他のものが明確に異なる遺伝子発現プロファイルを持つ事を示しており、これら 78 遺伝子を用いる事で、全粒子、スプリットワクチンともに応用する事が可能である事を示唆している。

そこで、78 遺伝子を詳細に調べた結果、オリゴヌクレオチドの重複があり、76 の遺伝子がインフルエンザワクチンの分類に有用である事が明らかとなった (表 1)。この内、発現量が高く、各遺伝子機能を代表する 18 遺伝子を選別し、実際に Realtime-PCR 法を用いても同様の結果が得られるかのバリデーションを試験を行った。その結果、解析した 18 遺伝子全てについてマイクロアレイの結果と高い相関関係を示す事が明らかとなり、これらの遺伝子発現解析によって、インフルエンザワクチンの安全性が検討されうる事が示された。

#### 7) 網羅的遺伝子発現解析を用いたパンデミックワクチンと全粒子ワクチンの分類

網羅的遺伝子発現解析の結果、クラスタ解析上は、PDv と WPv 接種群は分類する事が可能のように見えるが、その差は極めて低い (図 5、6)。以上の点より、肺