

組織を用いた網羅的遺伝子発現解析では PDv と WPv を分類する事は難しいと考えられた。

D. 考察

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の結果、沈降新型インフルエンザワクチン (PDv) 及び全粒子インフルエンザワクチン (WPv) 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 (HAV) 接種群、生理食塩水 (SA) 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は、全粒子ワクチンに比べて有意な差は認められなかった。同様の結果は病理試験によっても認められ (図 4)、一般的な沈降製剤で認められる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。この事より、PDv 及び WPv 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。また、今回、詳細な血液検査を行った結果、PDv 及び WPv 接種群において有意な血小板の減少も認められた。しかし、同試験法によっても、免疫増強した沈降新型インフルエンザワクチンと全粒子ワクチンの間には有意な差は認められなかった。

さらに生化学的検査を行ったが、各ワクチン接種群での有意な差は認められなかった。

3) 網羅的遺伝子発現解析

肺の全サンプルの遺伝子発現変動を指標にしてクラスター解析を行なったところ、1 日目の全粒子ワクチン (WPv) とパンでミックインフルエンザワクチン (PDv) が他のサンプル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遺伝子プロファイルを示していた。この結果はラットの体重変化および白血球数の変化で示している結果と全く一致する事が明らかとなった。また、本試験法では、3 日目、4 日目の WPv 及び PDv 接種群の分類が可能となった。白血球減少試験では、投与後 2 日目にほぼ正常値をとることを考えれば、本試験法はより感度が高いものと考えられる。以上のことから抽出された 78 遺伝子は WPv および PDv インフルエンザワクチンの持つ毒性反

応を鋭敏に検知できる可能性を示している。またバリデーションされた18の遺伝子セットを使用することにより、1日目（および2日目）のWPv、PDv群と、HAワクチン(HAv)、生理食塩水(SA)群を明確に区別できることが判明した。

今回、同定した遺伝子の中には、周年発生するインフルエンザや東名アジアを中心に発生している高病原性鳥インフルエンザ感染によって肺組織で発現誘導される多数の遺伝子が含まれている。一般的にインフルエンザ感染によってMx1 (myovirus influenza virus resistance 1) がIFNの刺激によって誘導される事が明らかとなっている。このような、IFNによって誘導される遺伝子をISG (IFN-stimulated gene)と呼び、全粒子ワクチン接種後に多数、ISGが上昇している事が明らかとなった。Ifi47やIfrd1、FLN29やCxcl9 (chemokine (C-X-C motif) ligand 9)がPDv及びWPv接種群で有意に上昇している事が明らかとなった。Cxcl9は、Cxcr3のリガンドとして機能し、CTL (細胞性免疫)を誘導し、CD8+T細胞を標的組織に誘導させると考えられている。加えて、H5N1が初めて人間に感染した患者の血液中に高濃度のCxcl9が検出されていたことが報告されている。この事から、PDV及びWPv接種によって、炎症性サイトカインの産生が誘導されていることが示唆された。これらのISGはHAv接種群では上昇していない事から、これらの遺伝子はワクチンの安全性のみならず、有

効性も検討できる可能性がある事を示唆していると考えられる。

同定した76遺伝子の中で、抗原提示に関わる分子も多数、WPv接種群で同定された。Ctss (cathepsin S)や、Psmc1 (proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha)、Psmc2 (proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta)、Tap2 (transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP))、Tapbp (TAP (transporter associated with antigen processing)-binding protein)、RT1-Aw2 (RT1 class Ib, locus Aw2)、RT1-N3 (also known as MHC class I) やβ2m (beta2-microglobulin)は、WPv及びPDv接種群で高い発現を認めた。ABCトランスポーターに属するTapbpは、Tap2への高い結合能を示し、細胞内の抗原を小胞体へ移行させ、MHC class Iとβ2mの複合体に結合させ、抗原提示を行う事が分かっている。RT1-Aw2とRT1-N3はMHC複合体を形成し、β2mは、MHCの安定性に関与していると言われる。これらの遺伝子は、いずれもCD8陽性T細胞への抗原提示に深く関わっている。これらの遺伝子発現上昇は、PDV及びWPvが高い免疫原性を有している事を示しており、網羅的遺伝子発現解析が、安全性のみならず、有効性をも示している可能性を示唆し得ていると言える。これらの遺伝子が肺組織で発現している理由と、実際に蛋白として産生されているか、また、どのような細胞がこれ

らの遺伝子を発現しているかなど、今後検証が必要となってくる。

我々が同定した遺伝子の中で、Timp1は全粒子ワクチン接種後に高い発現誘導が見られた遺伝子である。Timp1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) は、MMP (matrix metalloproteinases)の阻害剤であり、呼吸器で産生され、気管組織の炎症や再生に深く関わっていると言われている。さらに近年、インフルエンザ感染において、MMP9とTIMP-1の産生バランスの変化が、脳血液関門に存在するタイトジャンクションを損傷し、熱性痙攣や、脳症の原因となっている可能性が示唆されている。これらの結果は、Timp1がインフルエンザ感染後の脳症や、ワクチン接種後の脳症の発生となんらかの関係を持っている事を示しており、毒性を示す有用なマーカーとなりうることを示唆している。これについても、今後、詳細な検討が必要であると考えられる。

E. 結論

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った。インフルエンザワクチンの持つ毒性反応を鋭敏に検知できる76遺伝子の同定に成功し、さらにリアルタイムPCR法でバリデーションした18の遺伝子を決定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Mizukami T, Imai J, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J, 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.

Vaccine (in press)

2. Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Momose H, Masumi A, Naito S, Iwama A, Ogawa T, Noce T, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of Transcripts Commonly Expressed in Both Hematopoietic and Germline Stem Cells.

Stem Cell and Development 17:67-80, 2008.

3. Mizukami T, Kanai Y, Fujisawa M, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M, Hayashi Y. Five Azacytidine, A DNA Methyltransferase Inhibitor, Specifically Inhibits Testicular Cord Formation and Sertoli Cell Differentiation In Vitro.

Mol Reprod Dev. 2007 Nov 21;

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

Vaccine 25: 3355-3364, 2007

5. 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

6. Kuramitsu M, Hamaguchi I, Mizukami T, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mochizuki M, Naito S, Yamaguchi K.: Deficient RPS19 protein production induces cell cycle arrest in erythroid progenitor cells.

Brt J Haematol; 14: 348-59, 2008.

9. 大坪寛子、浜口功、山口一成、ヘモビジランスシステムと輸血安全管理 臨床検査 52; 157-161, 2008

10. 水上拓郎、浜口功、山口一成、輸血血液における新興・再興感染症対策 臨床検査 52; 215-219, 2008

2) 学会発表

1. 水上拓郎: ウエストナイルウイルス大量発生時の体制整備. 第 55 回日本輸血・細胞治療学会シンポジウム「危機管理から見た輸血療法」2007 年 5 月 31-6 月 2 日 名古屋国際会議場

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 回日本ワクチン学会 12 月 横浜

2. 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 回日本ワクチン学会 12 月 横浜

3. 水上拓郎・浜口功・滝沢和也・倉光球・百瀬暖佳・内藤誠之郎・益見厚子・岡田

誠治・山口一成 髄外造血機構を用いた造血幹細胞ニッチの解析 第 69 回日本血液学会

4. Mizukami T, Hamaguchi I, Kuramitsu M, Momose H, Takizawa K, Noce T, Yamaguchi K. Spp1 (Secreted (研究業績の続き) phosphoprotein 1) is commonly expressed transcript in the hematopoietic, germline, and hair follicle stem cells and essential for the early niche formation in the bone marrow. 5th ISSCR (International Society of Stem Cell Research) Annual meeting, 2007 June, Cairns, Australia

5. Mizukami T, Hamaguchi I, Kuramitsu M, Momose H, Takizawa K, Okada S, Noce T, Yamaguchi K. Spp1(osteopontin) Is Essential for the

Early Niche Formation in the Bone Marrow. 48th Annual meeting of American Society of Hematology, Florida, USA, December, 2006

6. 水上拓郎、浜口功、倉光球、百瀬暖佳、滝沢和也、内藤誠之郎、益見厚子、野瀬俊明、山口一成. 生殖幹細胞と造血幹細胞の分子基盤の解明. 第 143 回 日本獣医学会 2007 年 4 月 つくば国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

ラットを用いたインフルエンザワクチンの異常毒性否定試験

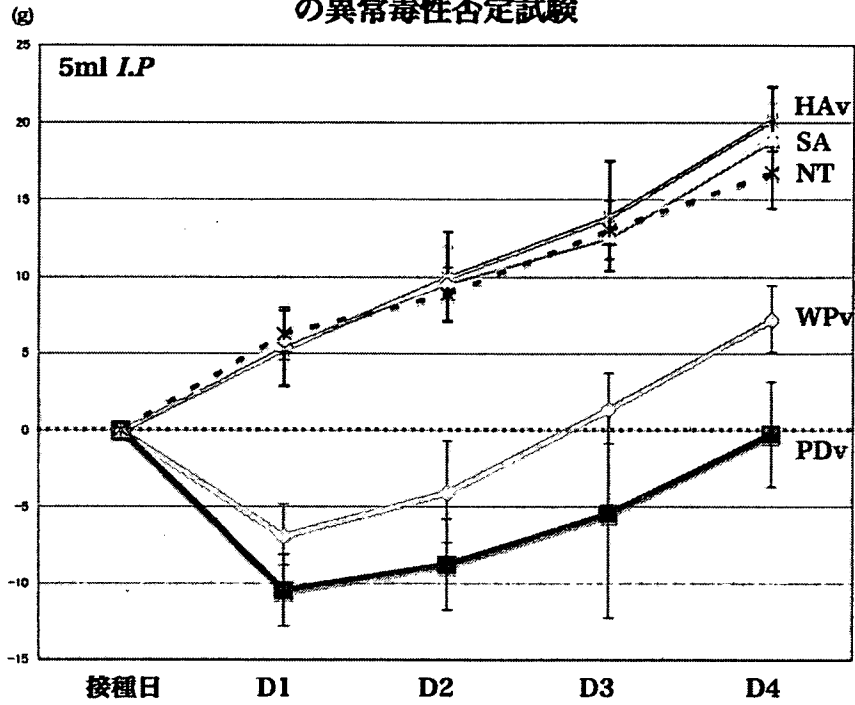


図7. インフルエンザワクチンの異常毒性否定試験

全粒子ワクチン (PDv, WPv) 接種後に有意な体重減少が認められた。SA;生理食塩水接種群、HAv; HA ワクチン接種群、WPv; 全粒子ワクチン接種群、PDv; パンデミックワクチン接種群

ラットを用いたインフルエンザワクチンの白血球減少試験

($\times 10^2/\mu\text{L}$)

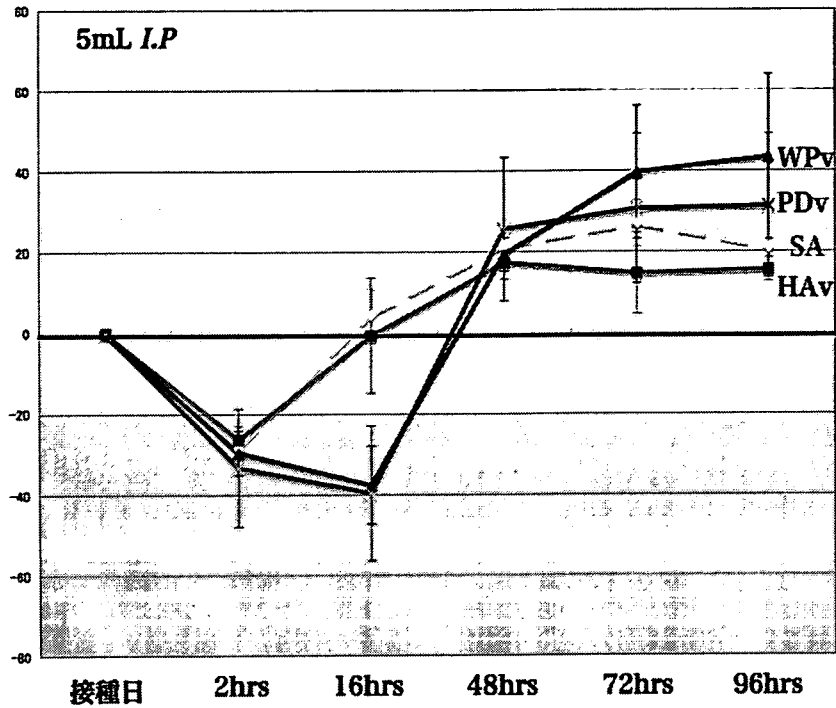


図8. インフルエンザワクチンの白血球減少試験

全粒子ワクチン (PDv, WPv) 接種後に白血球数の減少が認められた。SA; 生理食塩水接種群、HAv; HA ワクチン接種群、WPv; 全粒子ワクチン接種群、PDv; パンデミックワクチン接種群

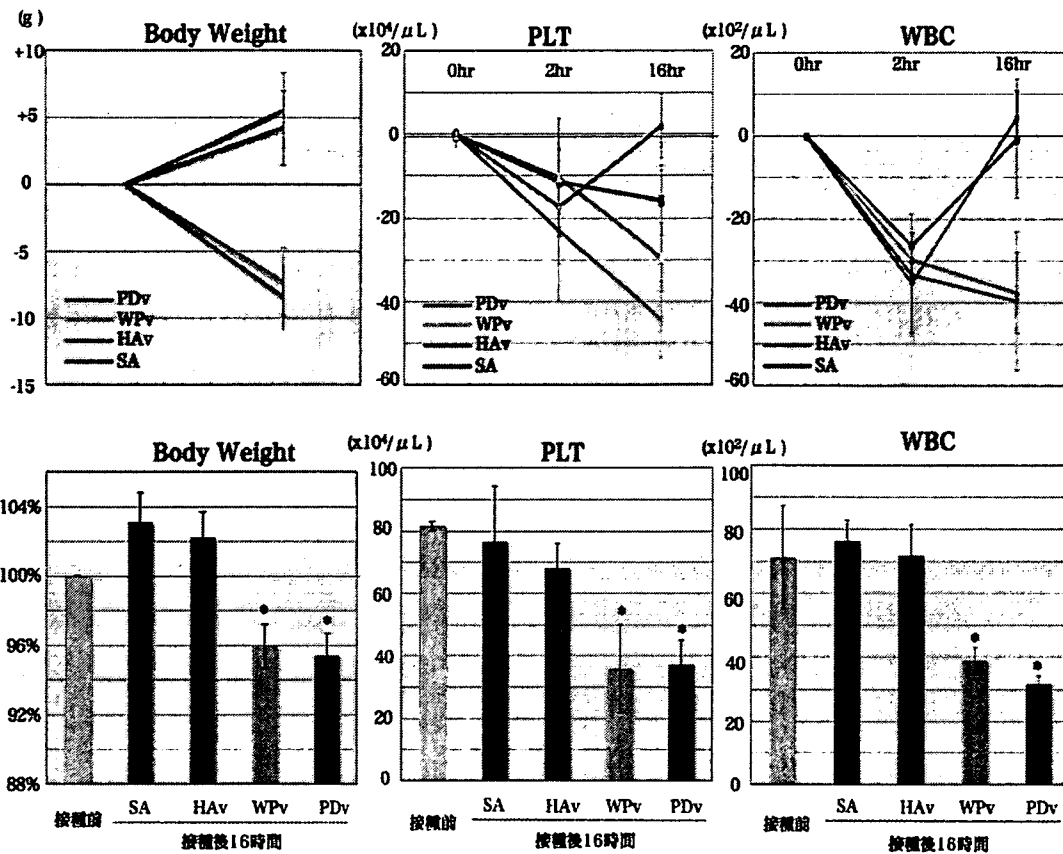


図9. インフルエンザワクチン接種後(16hrs)の血液学的変化

全粒子ワクチン (PDv, WPv) 接種後に体重、血小板、白血球数の減少が認められた。SA; 生理食塩水接種群、HAv; HA ワクチン接種群、WPv; 全粒子ワクチン接種群、PDv; パンデミックワクチン接種群

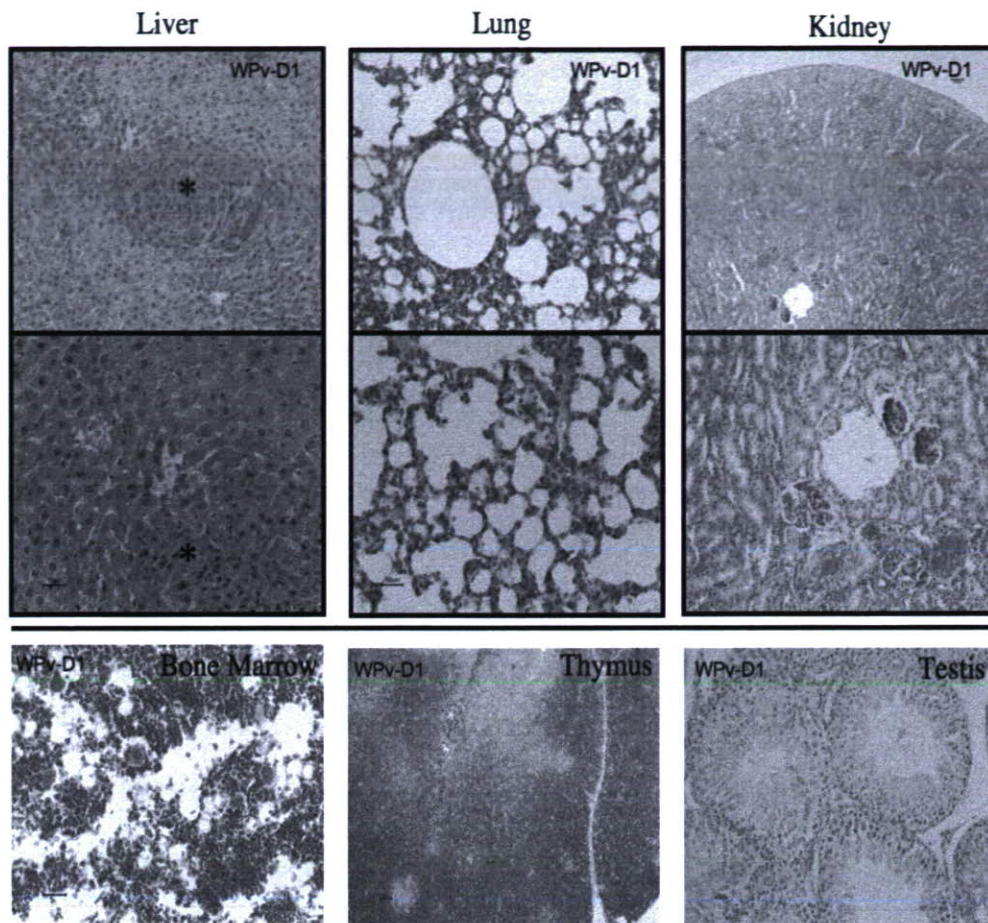


図10. インフルエンザワクチン接種後の病理変化

いずれのインフルエンザワクチン接種によっても、顕著な病理学的変化は認められなかった。WPv; 全粒子ワクチン接種群、Liver; 肝臓、Lung; 肺、Kidney ; 腎臓、Bone marrow; 骨髄、Thymus ; 胸腺、Testis; 精巣

Lung (5346 genes)
条件: Fil: ±1.0, n=1

肺における遺伝子発現プロファイル-1

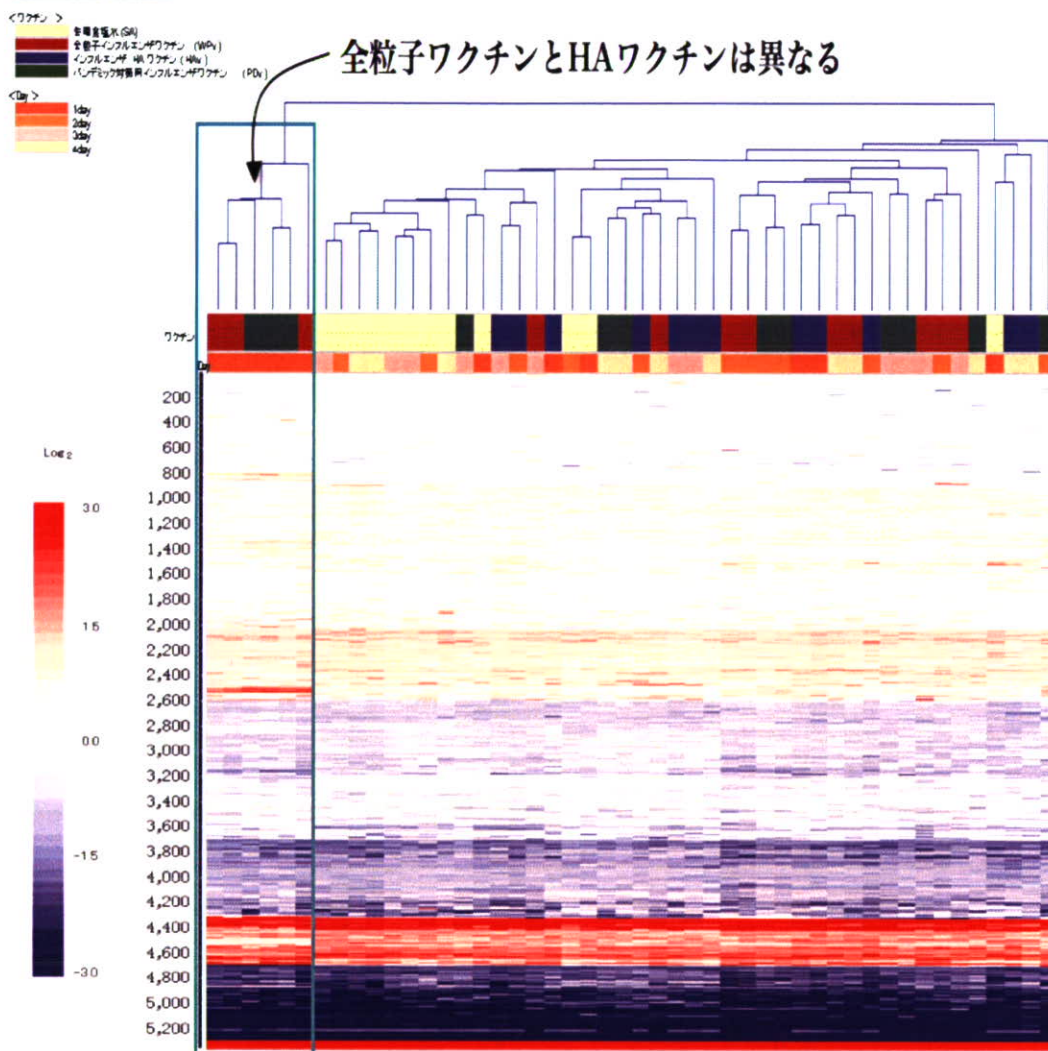


図11. インフルエンザワクチンの網羅的遺伝子発現解析 1

インフルエンザワクチン接種によって発現誘導された遺伝子の中より 5346 遺伝子によってクラスター解析を行った結果、5つのクラスターに分類される事が明らかとなった。SA;生理食塩水接種群、HAv; HA ワクチン接種群、WPv; 全粒子ワクチン接種群、PDv; パンデミックワクチン接種群

肺における遺伝子発現プロファイル-2

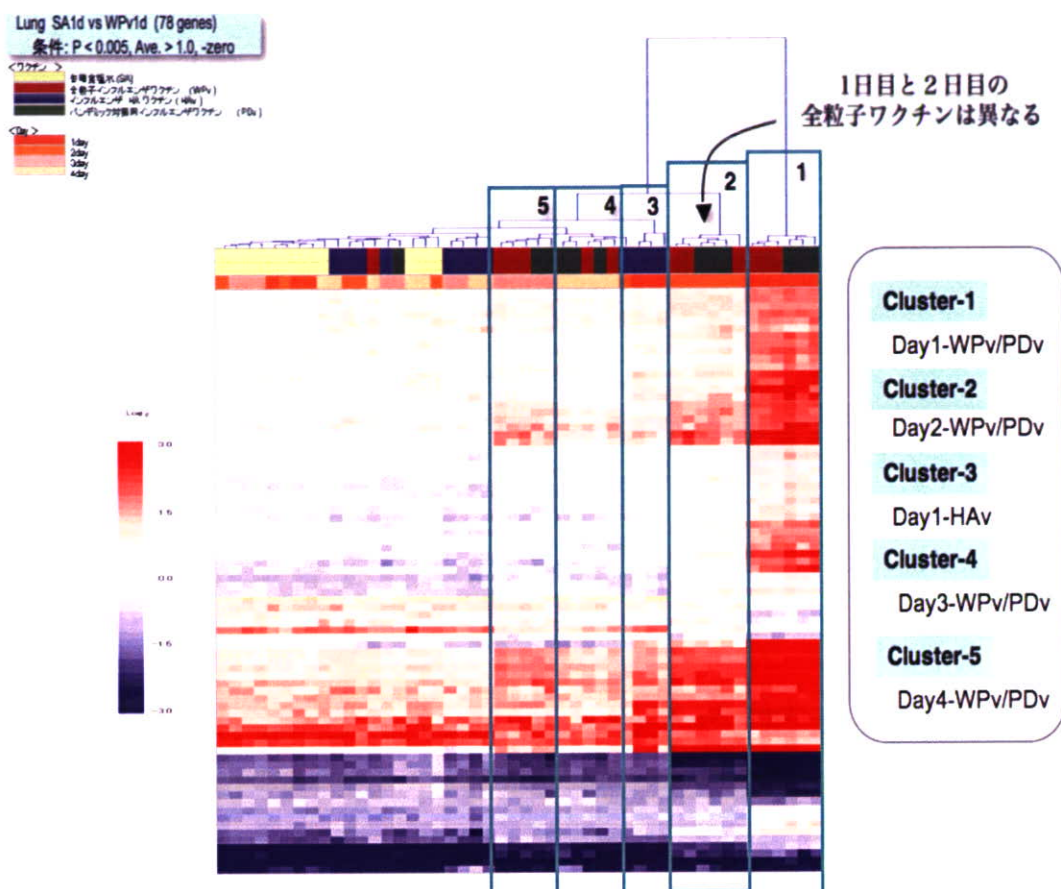


図12. インフルエンザワクチンの網羅的遺伝子発現解析2

インフルエンザワクチン接種によって発現誘導された遺伝子の中より 78 遺伝子によって再度クラスター解析を行った結果、5つのクラスターに分類される事が明らかとなった。SA;生理食塩水接種群、HA; HA ワクチン接種群、WPv; 全粒子ワクチン接種群、PDv; パンデミックワクチン接種群

Validation of cDNA Microarray analysis by Real-time PCR

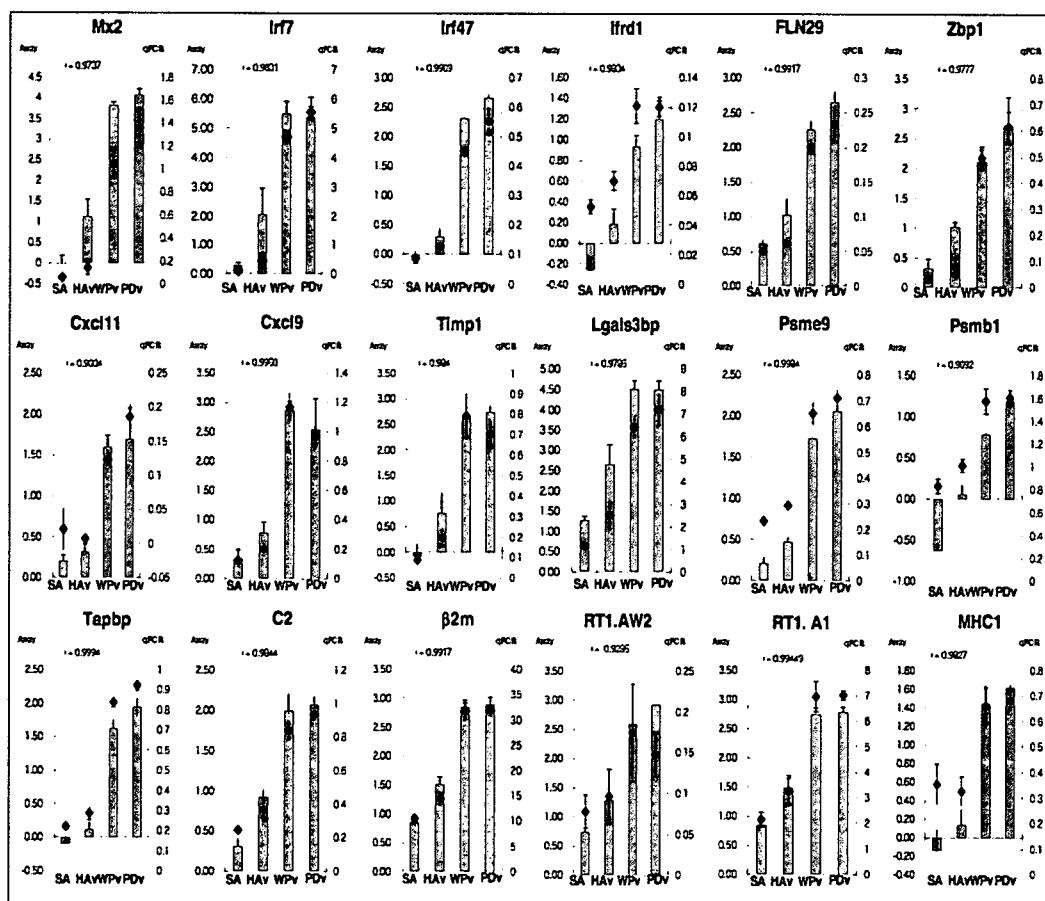


図13. 網羅的遺伝子発現によって誘導された 18 遺伝子のバリデーション

インフルエンザワクチン接種によって発現誘導された遺伝子の中より 18 遺伝子を抽出し、Realtime-PCR によってバリデーションをした。SA;生理食塩水接種群、HAV; HA ワクチン接種群、WPV; 全粒子ワクチン接種群、PDV; パンデミックワクチン接種群

Official Gene Name	Symbol	ID	PDr-D1 Mean ± SD	WPv-D1 Mean ± SD	HAv-D1 Mean ± SD	SA-D1 Mean ± SD
IFN-inducible gene						
myxovirus (influenza virus) resistance 1	Mx1	X52711	6.16 ± 0.29	5.51 ± 0.19	2.20 ± 0.27	0.93 ± 0.12
interferon regulatory factor 7	Irf7	XM_215121	5.39 ± 0.67	5.51 ± 0.39	2.08 ± 0.87	0.32 ± 0.08
myxovirus (influenza virus) resistance 2	Mx2	NM_017028	4.08 ± 0.13	3.83 ± 0.06	1.74 ± 0.41	-0.01 ± 0.19
interferon gamma inducible protein	Irf47	NM_172019	2.68 ± 0.05	2.32 ± 0.01	0.31 ± 0.12	-0.08 ± 0.12
FLN29 gene product	Fln29	AF329825	2.66 ± 0.15	2.25 ± 0.12	1.03 ± 0.23	0.81 ± 0.05
similar to interferon inducible protein	Similar	XM_220060	1.84 ± 0.23	1.74 ± 0.06	0.61 ± 0.15	0.45 ± 0.05
interferon-related developmental regulator 1	Ird1	NM_018242	1.20 ± 0.18	0.84 ± 0.10	0.18 ± 0.14	-0.28 ± 0.12
Chemokine and Cytokine function						
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	Lgals3bp	AF065438	4.50 ± 0.21	4.52 ± 0.19	2.66 ± 0.48	1.28 ± 0.09
tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Timp1	NM_053819	2.75 ± 0.12	2.68 ± 0.22	0.78 ± 0.39	-0.09 ± 0.25
chemokine (C-X-C motif) ligand 8	Cxcl8	NM_145672	2.54 ± 0.52	2.88 ± 0.13	0.78 ± 0.18	0.36 ± 0.15
lectin, galactoside binding, soluble 9	Lgals9	NM_012977	2.01 ± 0.24	1.85 ± 0.08	0.07 ± 0.18	-0.65 ± 0.20
colony stimulating factor 1 (macrophage)	Csf1	NM_023881	1.94 ± 0.07	1.81 ± 0.24	0.84 ± 0.13	0.59 ± 0.16
granulin	Gri	NM_017113	1.84 ± 0.08	1.67 ± 0.07	0.57 ± 0.14	0.43 ± 0.13
chemokine (C-X-C motif) ligand 11	Cxcl11	XM_223236	1.70 ± 0.37	1.60 ± 0.14	0.32 ± 0.09	0.21 ± 0.07
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	Etfp1	D69730	0.28 ± 0.18	-0.05 ± 0.16	0.80 ± 0.18	1.15 ± 0.15
Immune Response						
similar to lymphocyte antigen 6 complex, locus B	Similar	XM_216946	4.83 ± 0.19	4.58 ± 0.11	2.96 ± 0.23	2.25 ± 0.23
Ly6-C antigen	Ly6c	NM_020103	3.75 ± 0.11	3.33 ± 0.26	1.89 ± 0.41	1.44 ± 0.08
similar to histocompatibility 2, complex	Similar	XM_215326	3.87 ± 0.20	3.51 ± 0.05	1.68 ± 0.44	0.74 ± 0.06
RT1 class Ib, locus Aw2	RT1-Aw2	NM_012645	2.93 ± 0.00	2.60 ± 0.06	1.29 ± 0.23	0.74 ± 0.05
beta-2-microglobulin	B2m	NM_012512	2.90 ± 0.12	2.86 ± 0.11	1.52 ± 0.12	0.88 ± 0.09
MHC class Ia protein (RT1.A) gene, comp	RT1-A1	AF025309	2.79 ± 0.07	2.74 ± 0.10	1.49 ± 0.19	0.85 ± 0.06
lymphocyte antigen 6 complex, locus B	Ly6b	NM_139257	2.70 ± 0.20	1.97 ± 0.10	0.80 ± 0.18	0.44 ± 0.16
transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	Tap2	NM_032058	2.69 ± 0.29	2.51 ± 0.20	1.44 ± 0.08	1.40 ± 0.22
complement component 2	C2	NM_172222	2.07 ± 0.10	2.00 ± 0.21	0.93 ± 0.09	0.31 ± 0.09
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9	Psm9b	NM_012708	2.07 ± 0.13	1.73 ± 0.01	0.48 ± 0.05	0.21 ± 0.07
TAP binding protein	Tapbp	NM_033988	1.95 ± 0.13	1.63 ± 0.13	0.12 ± 0.11	-0.10 ± 0.10
RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region (NG)	RT1-NG	L23128	1.82 ± 0.03	1.45 ± 0.20	0.14 ± 0.18	-0.14 ± 0.22
proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha	Psm1a	NM_017264	1.20 ± 0.10	0.79 ± 0.01	0.06 ± 0.11	-0.63 ± 0.09
cathepsin S	Cts5	NM_017320	0.99 ± 0.12	0.59 ± 0.17	0.03 ± 0.08	-0.42 ± 0.06
complement component 1, s subcomponent	C1s	D88250	0.83 ± 0.07	0.82 ± 0.08	-0.93 ± 0.16	-1.90 ± 0.09
proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta	Psm2	NM_017257	0.26 ± 0.03	0.02 ± 0.15	-0.78 ± 0.23	-1.41 ± 0.22
elastin	Eln	J04035	0.01 ± 0.21	0.08 ± 0.26	1.95 ± 0.11	1.83 ± 0.25
fibrinogen, gamma polypeptide	Fgg	NM_012559	-2.70 ± 0.26	-2.78 ± 0.22	-3.68 ± 0.32	-3.60 ± 0.21
Transcription Activity						
Z-DNA binding protein 1	Zbp1	AJ302054	2.73 ± 0.46	2.12 ± 0.19	1.02 ± 0.07	0.32 ± 0.15
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	Cebpd	NM_013154	2.58 ± 0.41	2.20 ± 0.08	1.39 ± 0.15	0.70 ± 0.22
similar to H1 histone family, member 2	Similar	XM_225925	1.67 ± 0.19	1.31 ± 0.06	0.21 ± 0.03	0.08 ± 0.16
activating transcription factor 5	Atf5	NM_172306	0.85 ± 0.08	0.99 ± 0.06	-0.76 ± 0.29	-0.74 ± 0.03
AHNK nucleoprotein (desmoyokin)	Ahnk	AF454371	0.58 ± 0.21	0.36 ± 0.18	0.85 ± 0.11	1.36 ± 0.17
nuclear protein 1	Nup1	AF014503	-0.74 ± 0.11	-1.09 ± 0.04	-2.78 ± 0.28	-2.83 ± 0.07
histone cluster 1, H2b1	H2ath2b1	NM_022647	-0.95 ± 0.07	-0.93 ± 0.13	-1.77 ± 0.08	-1.98 ± 0.15
Apoptosis						
caspase 1 (Casp1), mRNA	Casp1	NM_012762	0.92 ± 0.13	0.91 ± 0.07	0.12 ± 0.05	-0.34 ± 0.17
heat shock protein 27 (Hsp27) mRNA, comp	Hsp27	M86399	0.90 ± 0.14	0.84 ± 0.15	0.09 ± 0.05	-0.20 ± 0.14
Mitochondrial cytochrome oxidase subunits, I, II, III genes, 9	J01435		-3.51 ± 0.27	-3.83 ± 0.10	-1.89 ± 0.16	-2.08 ± 0.12
Protein Modification						
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	Serp1g1	NM_198093	2.20 ± 0.12	2.14 ± 0.03	0.68 ± 0.16	0.08 ± 0.13
Cellular Signaling						
DNA-damage inducible transcript 3	Ddit3	NM_024134	2.07 ± 0.20	1.97 ± 0.21	0.38 ± 0.22	0.30 ± 0.24
HRAS like suppressor 3	Hras3	NM_017060	0.98 ± 0.18	0.46 ± 0.11	-0.84 ± 0.22	-1.23 ± 0.16
similar to signal transducer and activator of transcription 2, intracellular domain	Similar	XM_222301	0.80 ± 0.28	0.94 ± 0.23	-0.15 ± 0.08	-0.28 ± 0.12
retinoic acid receptor, beta	Rarb	AJ002942	-2.73 ± 0.09	-2.81 ± 0.21	-1.86 ± 0.16	-1.81 ± 0.22
Metabolism						
2,3-bisphosphoglycerate synthetase 1, 40/46kDa	Oae1	Z18977	4.27 ± 0.41	4.14 ± 0.30	1.98 ± 0.80	1.38 ± 0.43
similar to 2-5 oligoadenylate synthetase	Similar	XM_222230	1.75 ± 0.35	1.70 ± 0.24	0.43 ± 0.39	0.07 ± 0.08
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	Pfkfb3	NM_057135	1.72 ± 0.38	1.62 ± 0.16	0.89 ± 0.16	0.47 ± 0.19
carbonic anhydrase 4	Ca4	NM_019174	-0.85 ± 0.33	-0.84 ± 0.12	0.66 ± 0.15	0.66 ± 0.15
monoglyceride lipase	Mgl1	NM_138502	-0.90 ± 0.03	-1.16 ± 0.23	-0.43 ± 0.05	-0.08 ± 0.22
GTP cyclohydrolase 1 feedback regulator	Gchfr	U85512	-1.24 ± 0.09	-1.85 ± 0.11	-1.22 ± 0.21	-0.49 ± 0.22
cytochrome b mRNA, complete cds, mitocho	Cyb	AF298545	2.55 ± 0.18	2.65 ± 0.11	-1.17 ± 0.06	-1.30 ± 0.14
Others						
EST1351314 gene index, normalized rat, no	EST	AW920010	2.96 ± 0.48	2.42 ± 0.18	2.02 ± 0.48	1.41 ± 0.23
nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	Ngfr	NM_012810	2.62 ± 0.30	1.85 ± 0.31	-0.25 ± 0.43	-0.59 ± 0.17
Cd1g2 protein	Cd1g2	NM_153624	2.62 ± 0.11	2.08 ± 0.09	0.70 ± 0.17	0.46 ± 0.08
xanthine dehydrogenase	Xdh	NM_017154	2.02 ± 0.11	1.95 ± 0.16	0.77 ± 0.04	0.47 ± 0.26
EST108196 PC-12 cells, untreated cDNA cl	EST	AA685798	1.92 ± 0.11	1.69 ± 0.07	0.54 ± 0.07	0.30 ± 0.10
similar to torsin family 3, member A; AT	Similar	XM_222769	1.76 ± 0.08	1.48 ± 0.35	0.02 ± 0.38	-0.14 ± 0.20
glypican 3	Gpc3	NM_012774	1.61 ± 0.08	1.48 ± 0.23	2.62 ± 0.87	2.71 ± 0.13
similar to ROKEN cDNA Z310008M14 (Mus mu	Similar	XM_217259	1.58 ± 0.02	1.55 ± 0.14	0.58 ± 0.20	0.13 ± 0.04
similar to psanut-like 2 homolog; psanut	Similar	XM_213413	1.38 ± 0.15	1.33 ± 0.07	2.20 ± 0.18	2.33 ± 0.09
solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	Slc3a2	NM_019283	1.21 ± 0.13	0.73 ± 0.07	-0.14 ± 0.28	-0.38 ± 0.06
UI-R-A1- α -4-05-0-UI.st UI-R-A1 cDNA clo	EST	AA925529	1.15 ± 0.13	0.82 ± 0.07	-0.06 ± 0.15	-0.54 ± 0.14
Superoxide dismutase 2, mitochondrial	Sod2	NM_017051	0.88 ± 0.09	0.60 ± 0.11	-0.77 ± 0.35	-1.04 ± 0.04
clusterin	Clu	NM_012679	0.78 ± 0.09	0.74 ± 0.09	-0.21 ± 0.16	-0.37 ± 0.16
Dnaj1 (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	Dnaj1	NM_022934	0.72 ± 0.16	0.66 ± 0.12	-0.26 ± 0.09	-0.42 ± 0.10
similar to growth hormone inducible tran	Similar	XM_214285	0.49 ± 0.08	0.26 ± 0.17	-0.47 ± 0.25	-0.80 ± 0.09
solute carrier family 28	Slc28a2	NM_031864	0.16 ± 0.16	0.01 ± 0.09	-0.71 ± 0.26	-1.15 ± 0.19
sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	Scn7a	Y08164	-0.39 ± 0.25	-0.48 ± 0.14	0.09 ± 0.41	0.54 ± 0.03
EST224035 Normalized spleen, Berto Soare	EST	AF80292	-2.20 ± 0.34	-1.64 ± 0.20	-4.02 ± 0.30	-2.94 ± 0.25
smooth muscle alpha-actin	Acta2	M22757	-2.77 ± 0.24	-2.34 ± 0.09	-1.18 ± 0.25	-1.17 ± 0.05
solute carrier family 3, member 1	Slc3a1	NM_017218	-3.10 ± 0.68	-3.58 ± 0.21	-2.82 ± 0.65	-2.40 ± 0.23
S100 calcium binding protein G	S100g	NM_012921	-3.93 ± 0.29	-3.72 ± 0.22	-2.17 ± 0.16	-2.10 ± 0.18

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

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

研究課題：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

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・
准教授

分担研究者 野村信夫 産業技術総合研究所・生物情報解析センター・
副センター長

研究要旨

平成 17 年 5 月、日本脳炎ワクチン接種者に、ワクチン接種との因果関係が否定できない重症の急性散在性脳脊髄膜炎（ADEM）が発生し、厚生労働省は定期予防接種における日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えを勧告した。日本脳炎ワクチンは、マウス脳で増殖させたウイルスを原料としたものであり、マウス脳由来の蛋白質やウイルスの混入を完全には否定できないとされている。一方、培養細胞で増殖させたウイルスを原料とした次世代ワクチンが開発段階にある。現行のものに比して安価でよりリスクが低いことが期待されており、早期の実用化が待たれている。そこで我々は、開発段階にある培養細胞由来ワクチンと現行のマウス脳由来ワクチンを用い、生化学的解析、および遺伝子発現解析から両者の特性を捉えることを試みた。

A. 研究目的

日本脳炎の原因ウイルスである日本脳炎ウイルスは、フラビウイルス科に属する直径 40-50nm の RNA ウイルスで、5 の遺伝子型に分類される。遺伝子型の分布は国や地域によって異なり、日本では主に遺伝型 3 が分布していた。しかし近年、遺伝子型 1 への置き換わりがおこっていることが示唆されている。

日本脳炎ウイルスは主に蚊-豚間のサイクルで増殖し、ウイルスを保持した蚊に刺されることによって感染する。日本脳炎ウイルス

の常在地域である日本では、1960 年代まで、年間 1000 人を超える患者が報告されていた。1954 年以来予防接種が実施されてきた結果、近年の患者発生数は著しく減少している。

日本脳炎ウイルスに感染した場合、多くは不顕性感染で終わる。しかし日本脳炎を発症すると、根本的な治療法はなく致死率は 30-40%に達し、回復してもその半数に重篤な後遺症を残す。従って、日本脳炎ワクチン接種による日本脳炎の予防は非常に重要である。

現在実用化されている日本脳炎ワクチンは高度に精製された不活化ワクチンであり、一般的にその安全性は高いと考えられている。一方、原料となるウイルス増殖のためにマウス脳を用いていることから、より安全性を高めるため、培養細胞で増殖させたウイルスを原料とする次世代ワクチンが開発されている。本研究では、従来の生化学的解析に加えて DNA マイクロアレイ解析を用いることで、開発段階にある培養細胞由来ワクチンと現行のマウス脳由来ワクチンの特性を詳細に検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 動物

8週齢のWistar系統ラット(オス)をSLCより購入し、10日間環境に馴化させた。馴化期間中に体重測定と経過観察を行い、異常を認められた個体が多かったため、解析にはすべてのラットを用いた。

2) ワクチン

本研究課題に用いたマウス脳由来日本脳炎ワクチン(JE)、およびVero細胞由来日本脳炎ワクチン(TJE)は、(財団法人)阪大微生物病研究会より供与された不活化ワクチンである(共に北京-1株)。対照には生理食塩水(日本薬局法 生理食塩水 大塚生食注)を用い、各々5mLをラット腹腔内に投与した。

3) 体重測定

ワクチン接種後、1-4日間体重を測定し、接種前との変動率を算出した。一群5匹とした。

4) 血液学的検査

ジエチルエーテル麻酔下にラット心臓より採血を行った。採取した血液はすみやかにEDTA-2K入り採血管(BD社)に回収し、よく混和した。日本光電社のMEK-5258を用い、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数の計測を行った。一群5匹とした。

5) 血液化学的検査

ジエチルエーテル麻酔下にラット心臓より採血を行い、キャピジェクト微量採血管(TERUMO)に回収した後、3,000rpmで15分間遠心した上清を用いた。検査項目は肝機能検査; GOT (AST), GPT (ALT), アルカリ性フォスファターゼ(ALP), C-反応性蛋白(CRP)、膵臓機能検査; アミラーゼ(AMYL)、腎機能検査; 尿素窒素(BUN), クレアチニン(CRE-P)、筋肉検査; クレアチンフォスフォキナーゼ(CPK)、代謝検査; 総コレステロール(T-CHO)、中性脂肪(TG), ブドウ糖(GLU)の計11項目である。計測には富士ドライケム300Gを用いた。一群5匹とした。

6) RNA抽出

ワクチン接種後1-4日目に、ラットの脳、および肝臓左葉を摘出した。臓器は速やかに液体窒素中で凍結し、ISOGEN(NipponGene)中で破碎した。定法に従って抽出したtotal RNAから、Poly(A) RNA Purist kit(Ambion社)を用いてpoly(A)+RNAを精製した。一群3匹とした。

7) DNA マイクロアレイ解析

Poly(A)+RNAは逆転写反応を行い、Cyanine5ラベルを行った。同様に、共通リファレンスRNAをCyanine3でラベルした。ラベルされたサンプルとリファレンスを、スライドグラス上に固定した11,468個の遺伝子特異的配列オリゴDNA(80mer)と競合的に結合させた。各スポットの蛍光強度の比率(Cyanine5/Cyanine3)をスキャナー、および解析ソフトで数値化し、各遺伝子の発現量比を検出した。

C. 研究結果

1) ワクチン接種動物の体重変化

JE、TJE、およびSAをラット腹腔内に5ml接種し、接種後1、2、3、4日目の体重変化を調べた。その結果、体重増加率においてJE、TJE接種群ともSA接種群と有意な差は認められず、順調な体重増加を示した(図15)。

2) 血液学的検査

JE、TJE、およびSAをラット腹腔内に5ml接種し、接種後1、2、3、4日目に血液を採取した。血液中の赤血球数、白血球数、血小板数など8項目について検査を行ったが、すべてにおいて、SAとJE、またはTJEとの間に有意差は見られなかった(図16)。

3) 血液化学的検査

JE、TJE、およびSAをラット腹腔内に5ml接種し、接種後1、2、3、4日目に採取した血液から血清を分離した。血清中の酵素活性等を測定し、肝機能、膵臓機能、腎機能、筋肉、代謝についてワクチン接種による影響を検討した。その結果、すべての検査項目につ

いて、SAとJE、またはTJEとの間に有意差は見られなかった(図17)。

4) DNA マイクロアレイ解析

JE、TJE、およびSAをラット腹腔内に5ml接種し、接種後1、2、3、4日目に脳と肝臓を摘出し、計72臓器からpoly(A)+RNAを抽出した。RNAから逆転写反応を行う際、共通リファレンスRNAをCyanine3で、ワクチン接種した臓器RNAをCyanine5でラベルした。その後それらを混合し、スライドグラス上に固定された11,468個の遺伝子特異的配列オリゴDNA(80mer)と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(Cyanine5/Cyanine3)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。

取得した各サンプルの遺伝子発現プロファイルを基にして、脳と肝臓におけるクラスター解析を行ったが、投与群ごとにわかれることはなかった(図18, 19)。

D. 考察

現在実用化されているマウス脳由来日本脳炎ワクチンは高度に精製された不活化ワクチンであり、一般にその安全性は高いと考えられている。故に、次世代ワクチンとして開発されたVero細胞由来日本脳炎ワクチンには、安価であるだけでなく、より高い品質が求められる。本研究課題では生化学的解析、および網羅的遺伝子発現解析の手法を用い、マウス脳由来日本脳炎ワクチン(JE)とVero細胞由来日本脳炎ワクチン(TJE)の比較検討を行った。

ワクチンの安全性試験では、接種個体の体重減少が毒性検出の指標の1つとなりえる。本研究課題において、日本脳炎ワクチン接種ラットの接種後の体重推移を検討したが、JE、TJEとも体重減少を示すことはなく、体重増加率はSA接種群と同等であった。また、血液学的検査、血液化学的検査により、JEとTJEの間の差異を見出すことはできなかった。

さらに、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを基にしたクラスタ解析を行ったが、脳、肝臓共に投与群ごとのクラスタが形成されることはなかった。これはワクチン接種個体の脳、肝臓における遺伝子発現パターンが、接種サンプルによって特徴づけられてはいないことを示している。

これまでの百日せきワクチン、インフルエンザワクチンを用いた解析の実績からも明らかのように、我々のDNAマイクロアレイ解析は遺伝子の発現変動を鋭敏に捉えることのできる系である。この系によってもJEとTJEを区別できなかったことは、JEとTJEの特性が非常に類似したものであることを示唆していると考えられる。

E. 結論

マウス脳由来、およびVero細胞由来日本脳炎ワクチンの特性を検証するため、ワクチン接種後のラットの体重測定、血液学的検査、血液化学的検査、および肝臓と脳における網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、接種後4日目までの時点では両者を区別することはできず、その特性は同等であると評価された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. E. Ito, R. Honma, Y. Yanagisawa, J. Imai, S. Azuma, T. Oyama, S. Ohwada, T. Akiyama, N. Nomura, J. Inoue Novel clusters of highly expressed genes accompany genomic amplification in breast cancers.

FEBS Lett. 581(21):3909-14. 2007

2. 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

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

2) 学会発表

1. H. Momose, J. Imai, I. Hamaguchi, M. Kawamura, S. Watanabe, K. Yamaguchi: Application of Quantitative Gene Expression Analysis to Pertussis Vaccine Safety Control:

Vaccine Congress, Celebrating 25 years of Publication (Amsterdam), December 2007

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回日本ワクチン学会 12月 横浜

3. 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回日本ワクチン学会 12月 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

なし

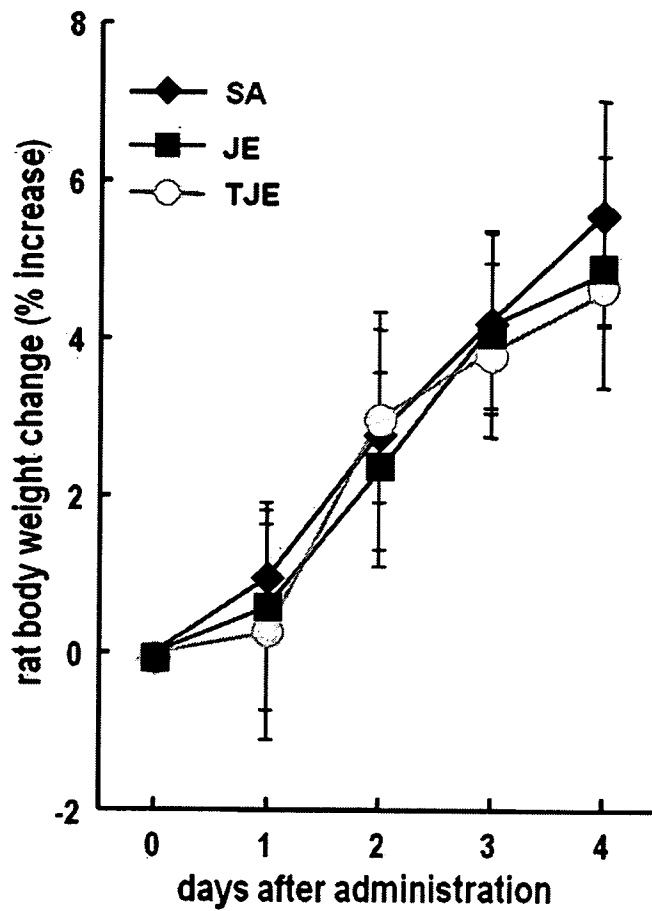


図 15 : 日本脳炎ワクチン接種後の体重変化

ラットの腹腔内に生理食塩水(SA)、マウス脳由来日本脳炎ワクチン(JE)、Vero細胞由来日本脳炎ワクチン(TJE)を接種し、接種後1-4日の体重の変動を測定した。