

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17～19年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

1) 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	5
山口一成	
図 1 : 研究概要	15
図 2 : 百日せきワクチン接種に伴う体重の変化	16
図 3 : ラット白血球増加試験	17
図 4 : 肺における発現遺伝子のクラスタリング解析	18
図 5 : AGP、Lbp、Hpx を用いた百日咳毒素の検出	19
表 1 : ワクチンの毒性に関連する遺伝子群の同定	20
図 6 : 毒性関連遺伝子を指標にしたクラスタリング解析	21
図 7 : 毒性関連遺伝子の発現量の検討	21
図 8 : QGP 法を用いた遺伝子発現解析	22
図 9 : QGP 法を用いたワクチン毒性の検出	22
2) 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	23
浜口 功	
図 10 : インフルエンザウイルスの特徴と病態	35
図 11 : パンデミックインフルエンザの発生時のワクチン	36
図 12 : インフルエンザワクチンの種類	37
図 13 : インフルエンザワクチンの安全性評価と品質管理	38
図 14 : インフルエンザワクチンの異常毒性否定試験	39
図 15 : インフルエンザワクチンの白血球減少試験	40
図 16 : インフルエンザワクチン接種後(16hrs)の血液学的変化	41
図 17 : インフルエンザワクチン接種後の病理変化	42
図 18 : インフルエンザワクチンの網羅的遺伝子発現解析 1	43
図 19 : インフルエンザワクチンの網羅的遺伝子発現解析 2	44
図 20 : 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	45
図 21 : インフルエンザワクチン接種後の遺伝子発現変化	46
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	47
3) DNA マイクロアレイ解析によるワクチン毒性関連遺伝子の同定	48
渡辺慎哉	
野村信夫	
図 22 : 百日せきワクチン接種ラットにおける遺伝子発現様式のクラスタ解析	56
図 23 : 百日せきワクチン接種ラット肝臓の遺伝子発現プロファイルのクラスタ解析	57
図 24 : 百日せきワクチンの毒性に関連した遺伝子の同定	58

図 2 5 : インフルエンザワクチン接種によるラット肺の遺伝子発現プロファイルのクラスタ解析	59
図 2 6 : インフルエンザワクチンの毒性関連遺伝子による肺の遺伝子発現様式	60
図 2 7 : 日本脳炎ワクチン接種によるラット脳 of 遺伝子発現プロファイルのクラスタ解析	61
図 2 8 : 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	62
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
III. 研究成果の別刷	65

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究総事業）
（総合）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きたが、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し、安全性評価試験の開発に応用することは重要な課題である。本研究課題で、DNA マイクロアレイの手法を用いて百日せきワクチンの毒性に関与する遺伝子群の同定を行った。ワクチンを接種されたラット肝臓より、百日咳毒素に関連する3つの遺伝子を、また肺よりワクチンの毒性に関連した13個の遺伝子群を同定した。これらの遺伝子発現量の一括測定が可能な QuantiGene Plex 法を用いて解析したところ、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実用化を目指す。

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
オマティクス講座・准教授

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、新しい評価法の開発が望まれている。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い、これら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（図1）。

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 µg/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) QuantiGene Plex 法

ワクチン接種ラットの肺から精製したpoly(A)+RNA（50ng/10µl）は、65℃で10分間処理した後、QuantiGene Plex Reagent System（Panomics）添付のLysis mixture 33.3µl、Capture buffer 40 µl、Capture beads 2 µl、Probe set 2µl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、10µlの

Proteinase K (Panomics)を加えて破碎し65°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 μ lに33.3 μ lのLysis mixture、0.2 μ lのProteinase K、2 μ lのCapture beads、2 μ lのProbe setを加えた。これらをHybridization plateにて54°C16時間インキュベートした後、Filter plateに移し200 μ lのWash bufferで3回洗浄した。次にAmplifierを加えて48°Cで1時間、Label probeを加えて48°Cで1時間、SAPEを加えて室温で30分間処理した。最後に100 μ 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2)。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) 百日せきワクチン接種ラットにおける白血球増加

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/ μ l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3)

3) 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、肝臓及び肺において特異的な遺伝子発現パターンを示した。とくに肺においては、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4）。

4) 百日咳毒素関連遺伝子群の同定

肝臓における DNA マイクロアレイの結果をもとにさらに遺伝子の絞り込みを行い、AGP (alpha 1-acid glycoprotein)、Lbp (lipopolysaccharide binding protein)、Hpx (hemopexin) の 3 遺伝子が毒性参照用百日咳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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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5）

5) 百日咳ワクチン毒性関連遺伝子の同定

肺における 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6）。

6) 百日咳ワクチン毒性関連遺伝子の定量的測定

13 個の百日咳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7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、毒性参照用百日咳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。

7) 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8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、毒性参照用百日咳ワクチンの濃度を調節して接種したラット肺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、毒性参照用百日咳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9)。

C. 考察

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析より、百日咳毒素(PT)および百日咳ワクチンの毒性に関連する遺伝子群の同定に成功した。

PT の検出に従来行なわれてきた白血球増加試験では低濃度のPTの検出は困難であった。また、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。本研究課題で百日咳毒素を鋭敏に検出できる新しい毒素関連遺伝子AGP、Lbp、Hpxを肝臓より同定した。さらにこれらの遺伝子の発現を測定することにより、PT濃度1 μ g/mlによる遺伝子発現量の変化を鋭敏に検出できた。注目すべき点は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る。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咳ワクチンの毒性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咳ワクチンの評価法になりうることを示している。

また肺の解析より、百日咳ワクチンの毒性に関与する13遺伝子を同定した。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、われわれの検討では、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。百日咳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S100A8/9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。

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。

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. 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. 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

6. 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

7. 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

8. 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

9. 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

10. Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, Fukushima T, Takatsuka Y, Ikeda 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*

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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. 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（大阪）・平成18年10月

6. 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（大阪）・平成18年10月

7. 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（大阪）・平成18年10月

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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,
Netherlands), 2007. 12.

G. 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)

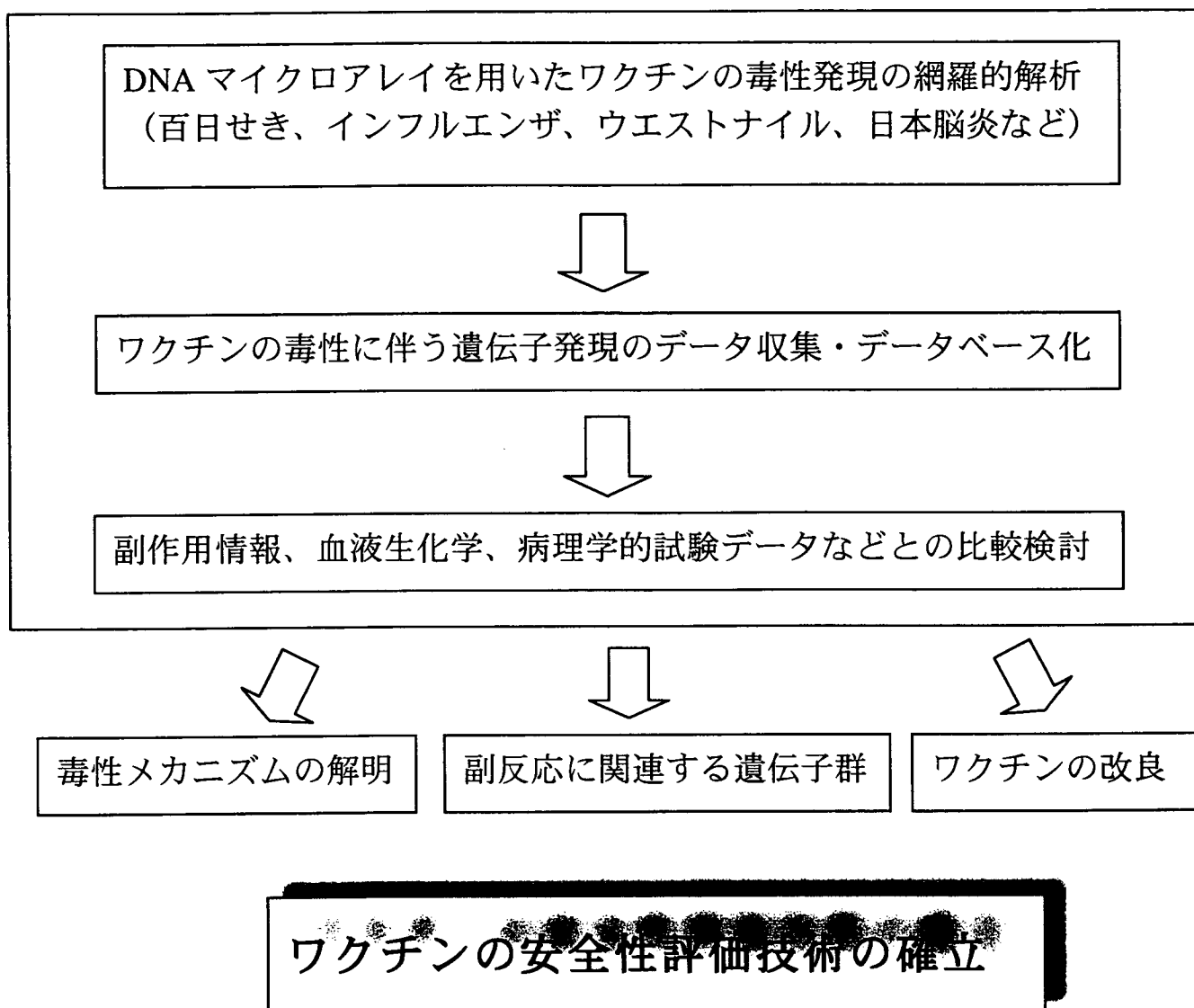


図1. 研究概要

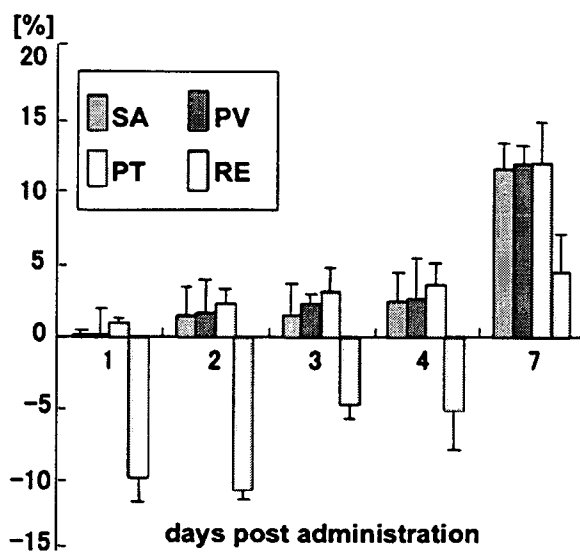


図2. 百日せきワクチン接種に伴う体重の変化

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

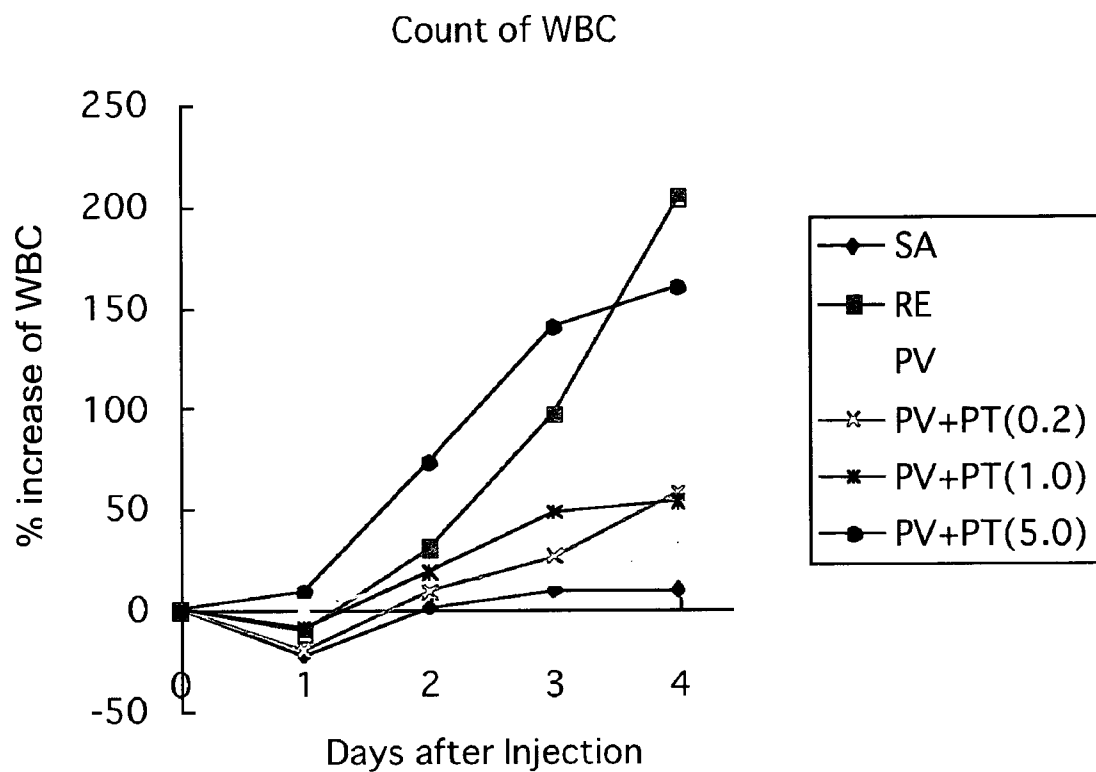


図3. ラット白血球増加試験

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 $\mu\text{g/ml}$)接種群で著明な白血球増加を認めた。

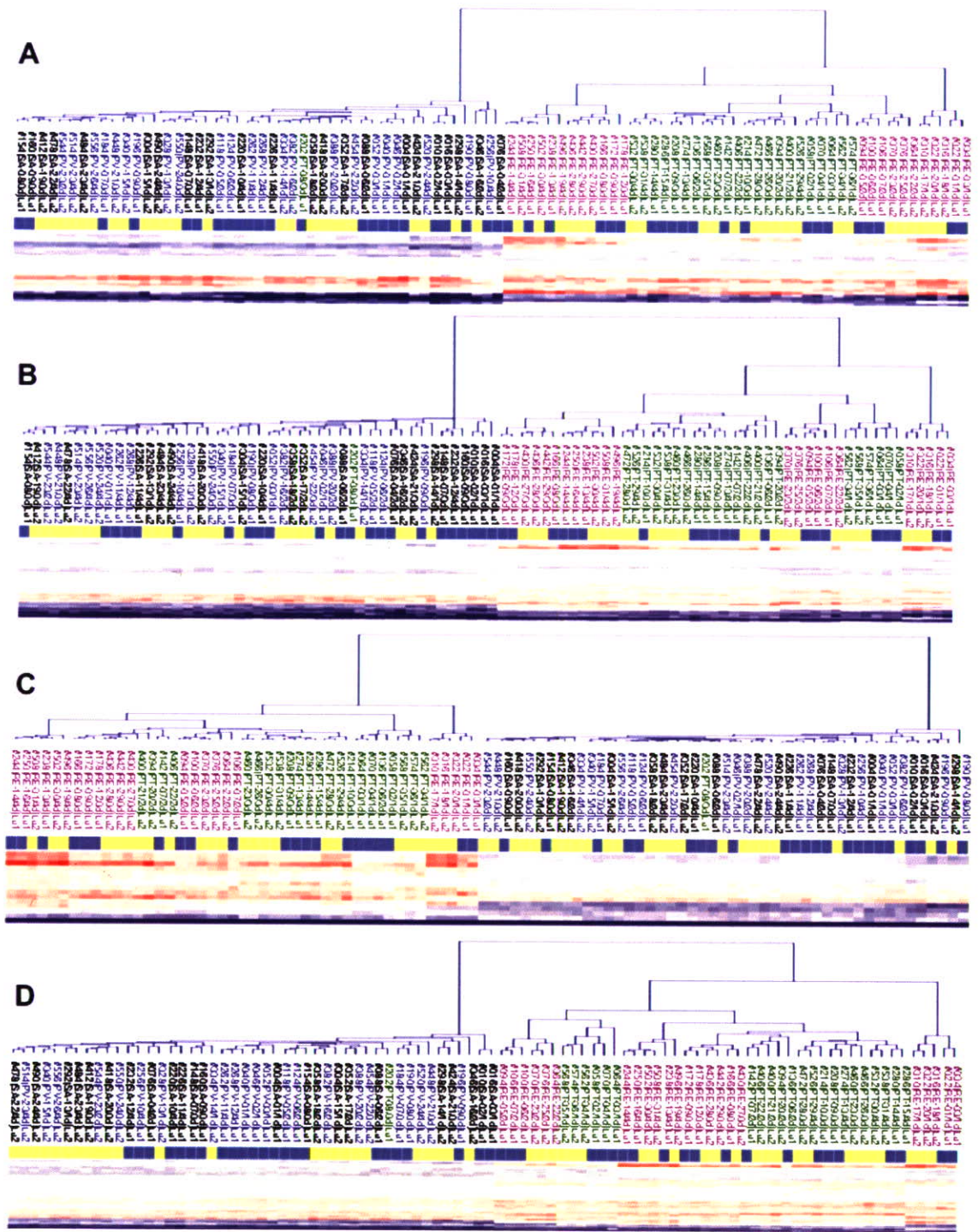


図4. 肺における発現遺伝子のクラスタリング解析

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

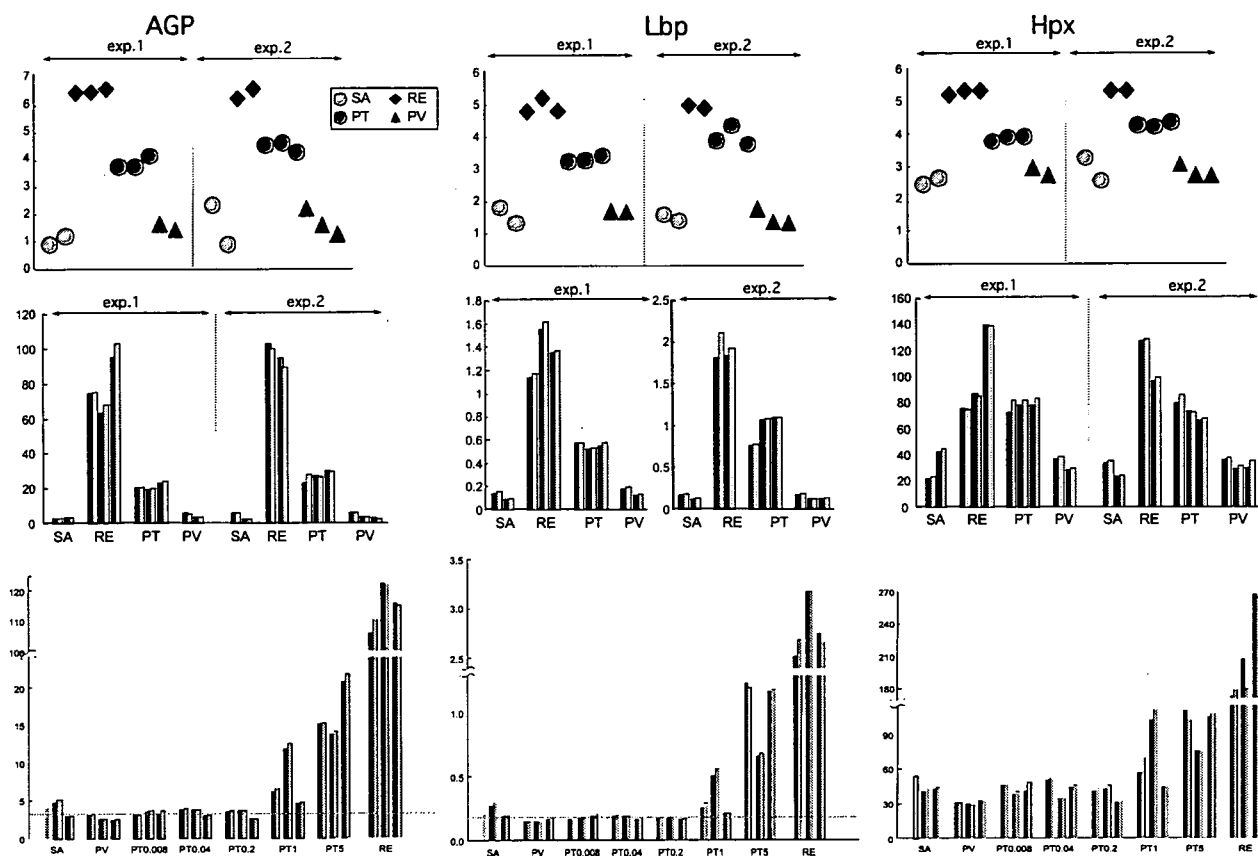


図5. AGP、Lbp、Hpx を用いた百日咳毒素の検出

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。

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>BEST5</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, dendritic cells and macrophages	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