



図6. 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

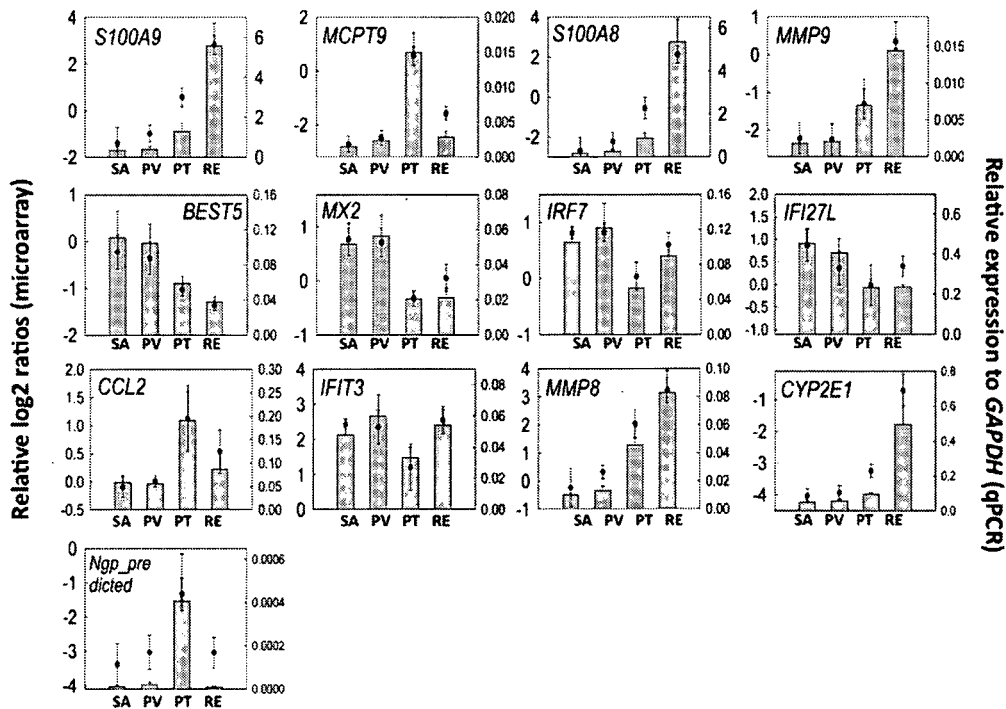


図7. 毒性関連遺伝子の発現量の検討

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

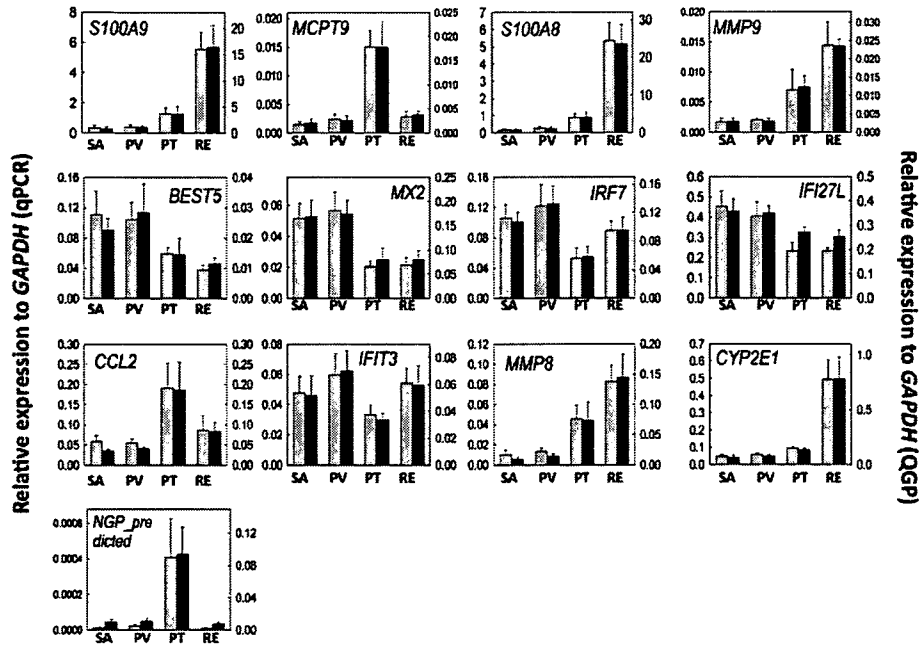


図 8. QGP 法を用いた遺伝子発現解析

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

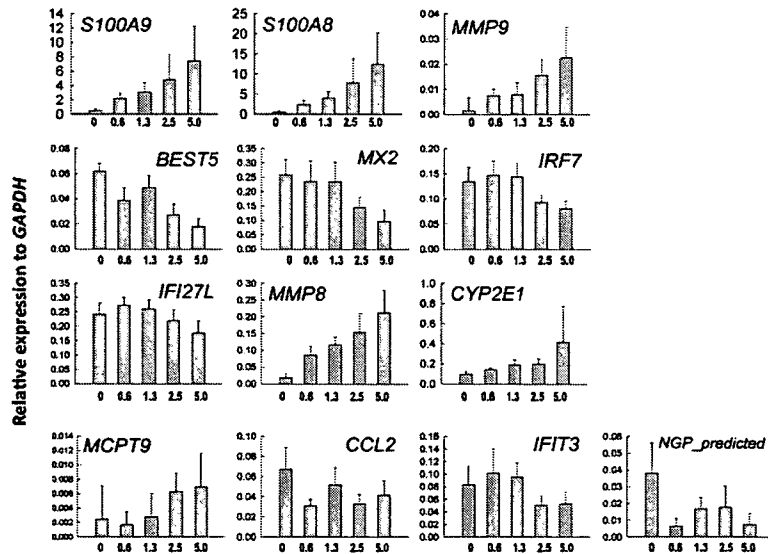


図 9. QGP 法を用いたワクチン毒性の検出

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）

（総合・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(H5N1)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。本邦では、HA成分を精製したスプリットワクチンが用いられている。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、パンデミックの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し、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相関する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遺伝子や、細胞性免疫・抗原提示に関わる遺伝子、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 (図 10)。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。季節性のインフルエンザには HA を精製したインフルエンザ HA ワクチンが用いられ、有効であると考えられている。しかし、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 (図 11)。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。これらの過去のパンデミックの発生動態から推計すると、本邦では入院患者は 53 万人～200 万人、死亡者は 17 万人～64 万人と推定されている。

本邦では、新型インフルエンザの発生に備えて、プレパンデミックワクチン製造

がなされているが、既存のインフルエンザ HA では十分な免疫が誘導できないため、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、これに更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たワクチンが開発・認可され、ワクチンメーカーで製造し、国家備蓄することとなった (図 12)。

全粒子ワクチンに関しては、現行の HA ワクチンに比べて免疫原性が高いものの、副反応の発生頻度も高いことが明らかとなっているが、その安全性は不明である。また、新型インフルエンザは毒性が強いことから、既存の鶏卵を用いた製造が困難であることが推測され、リバーズジェネティクスという新しい手法を用いて作製されることもあり、安全性の面で十分な検討が必要であると考えられる。特に、パンデミックが発生した際は、その株に併せて急速にワクチンが製造されることから、より高い品質管理システムの開発、高度な安全性試験の開発が急務であると言える。

現在、インフルエンザ HA 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、マウス白血球減少試験、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、マウス白血球減少試験、異常毒性否定試験が安全性試験として行われている(図 13)。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高度な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)、沈降新型インフルエンザワクチン(PDv)を用いて、生物学的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 株をリバーシ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

生物学的製剤基準に則り行った。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、採血後すぐに日本光電社の血球計測器(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

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、日本光電社の血球計算機(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、採血後すぐに血球測定を行った。

7) RNA 抽出

ワクチンおよび生理食塩水が投与されたラットから肝臓左外葉、左肺、脳、血液を接種後 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 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。

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小数とし、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、馴化期間中に異常を示すラ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 14）。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 15、16）。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 16）。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。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、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 17)、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。本試験では、肺をターゲットとし、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 18)。

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 19)。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、Cls5 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2)。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(図20)。

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、クラスター解析上は、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18,19)。以上の点より、肺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14)。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17)、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、アルミニウムゲル添加による毒性の増強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)とパンデ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、全粒子ワクチンと生理食塩水接種群で発現量が有意に変化した76遺伝子(表2)を抽出し、再度クラスター解析を行った結果、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、Cls5はWPvとPDv接種群(4日目)を示した。異常毒性否定試験では、全粒子ワクチン(PDv, WPv)接種後1日目に有意な体重減少を示すが、接種後1日目～3日目は体重が回復傾向にあるが統計学的な有意差は認められない。しかし、網羅的遺伝子発現解析法を用いる事で、接種後4日間の変化を有意に分類することが可能となった。また、インフルエンザHAワクチン接種群では、異常毒性否定試験、白血球減法試験を用いたいずれでも、生理食塩水との差は認められなかった。し

かし、網羅的遺伝子発現法を用いる事で、インフルエンザHAワクチン接種後の変化を有意にとらえることができた。以上の結果より、網羅的遺伝子発現解析法は、パンデミックインフルエンザワクチンの安全性のみならず、インフルエンザHAワクチンの安全性も検討できる程、高感度であることが明らかとなった。

以上のことから抽出された76遺伝子はWPvおよびPDv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。加えて、HAワクチン接種後の影響を鋭敏に検出できる遺伝子セットである事が明らかとなった。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(図21)。一般的にインフルエンザ感染によってMx1(myxovirus 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、 Psm1 (proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha)、 Psm2 (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 β 2m (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 β 2m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、 β 2m は、

MHCの安定性に関与していると言われている。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、Timpl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。Timpl (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、Timpl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.

Br 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. (シンポジウム
「危機管理から見た輸血療法」) 第 55 回
日本輸血・細胞治療学会 (名古屋) 2007
年 5 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、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 (横浜) 2007 年 12 月

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 (横
浜) 2007 年 12 月

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 (横浜) 2007 年 10 月

4. Mizukami T, Hamaguchi I, Kuramitsu M,
Momose H, Takizawa K, Noce T, Yamaguchi
K. Spp1 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

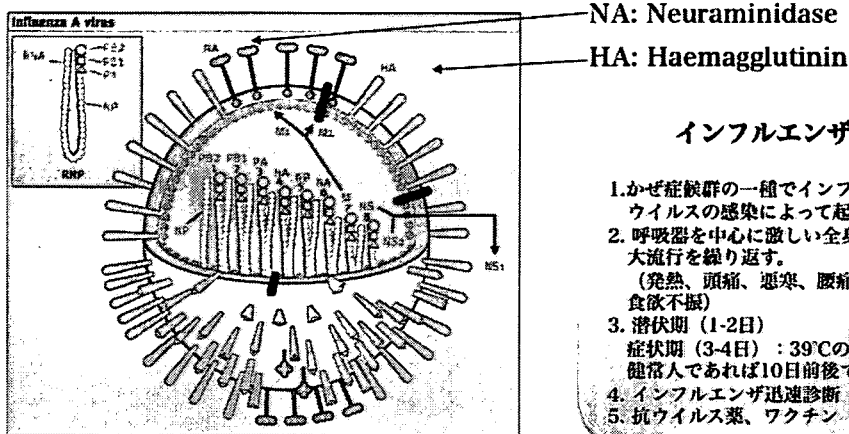
インフルエンザウイルス

オルソミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae) 直径70-120nm--1000nm

A型 インフルエンザ (Genus:A influenza virus) RNA; 13,500bp

B型 インフルエンザ (Genus:B influenza virus) RNA; 16,200bp

C型 インフルエンザ (Genus:C influenza virus)



インフルエンザ

1. かせ症候群の一種でインフルエンザウイルスの感染によって起こる病気。
2. 呼吸器を中心に激しい全身症状を示し、大流行を繰り返す。
(発熱、頭痛、悪寒、腰痛、全身倦怠、食欲不振)
3. 潜伏期 (1-2日)
症状期 (3-4日) : 39°Cの高熱
健康人であれば10日前後で寛解・治癒
4. インフルエンザ迅速診断
5. 抗ウイルス薬、ワクチン

HA→Antigenic Drift (連続抗原変異)

HA→Antigenic Shift (大変異) →パンデミック

図10. インフルエンザウイルスの特徴と病態

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し、直径 70-120nm のウイルスである。

表面抗原の HA と NA によって A, B, C 型に分類されている。

20世紀のインフルエンザの流行と 日本におけるインフルエンザワクチン開発

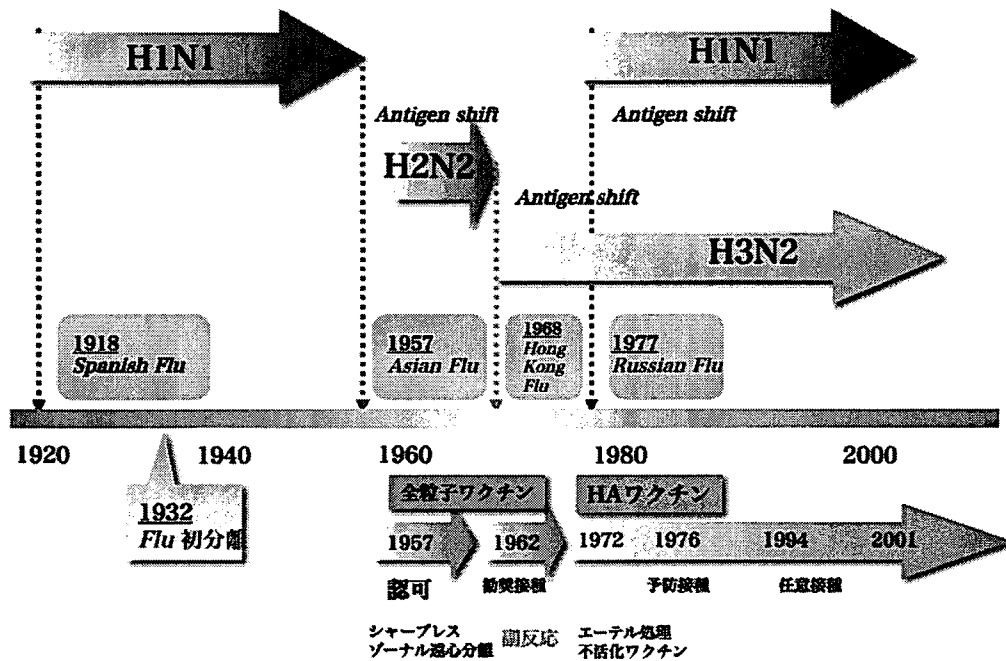


図11. パンデミックインフルエンザの発生のワクチン

1918年にスペイン風邪、1957年にアジア風邪、1968年にホンコン風邪、1977年にロシア風邪がパンデミックとして発生した。この間、インフルエンザはH1N1, H2N2, H3N2と変化した。インフルエンザワクチンは1957年に認可され、全粒子型ワクチンが製造されていたが、副反応等があり、1972年にはエーテル処理により分離されたHAワクチンが主流となった。

インフルエンザワクチン

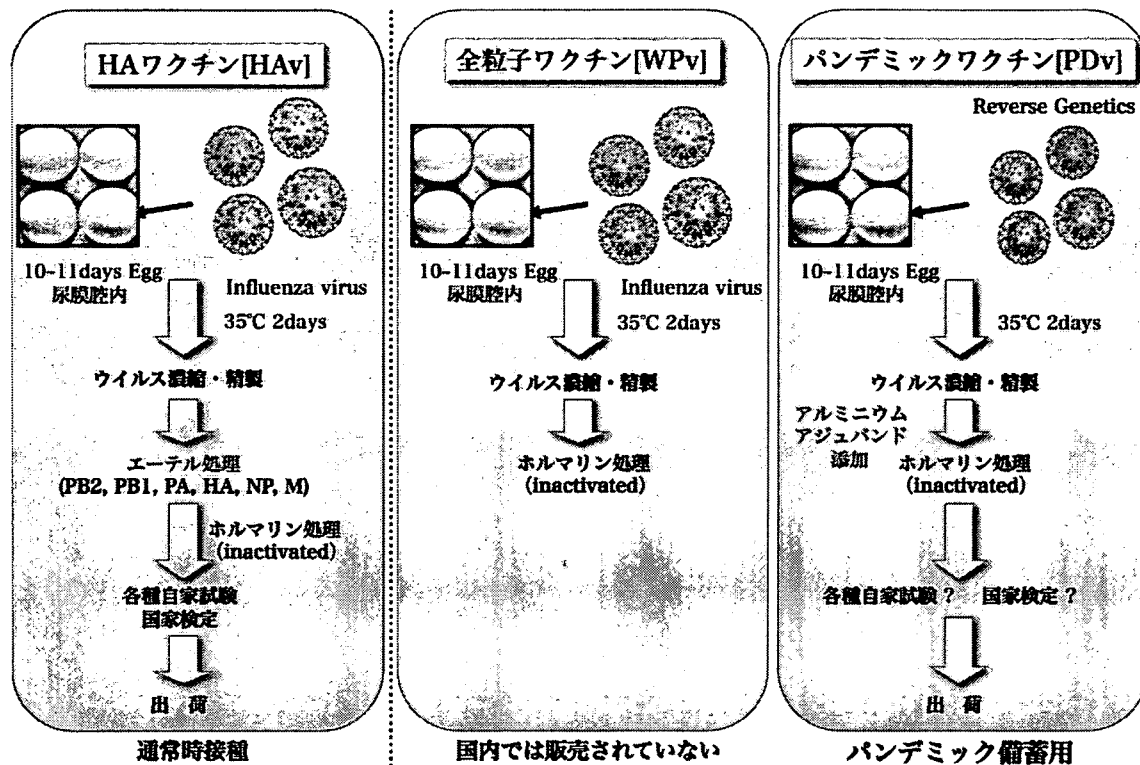


図12. インフルエンザワクチンの種類

通常の HA ワクチンは発育鶏卵を用いて製造される。精製されたウイルスはエーテル処理により分解され、ホルマリンで不活化された後、国家検定を経て市場に供給される。パンデミックワクチンは、かつて本邦で製造されていた全粒子型ワクチンと同様の手法を用いて製造されるが、免疫増強剤としてアルミニウムアジュバントが添加されている。

インフルエンザワクチンの安全性評価と品質管理

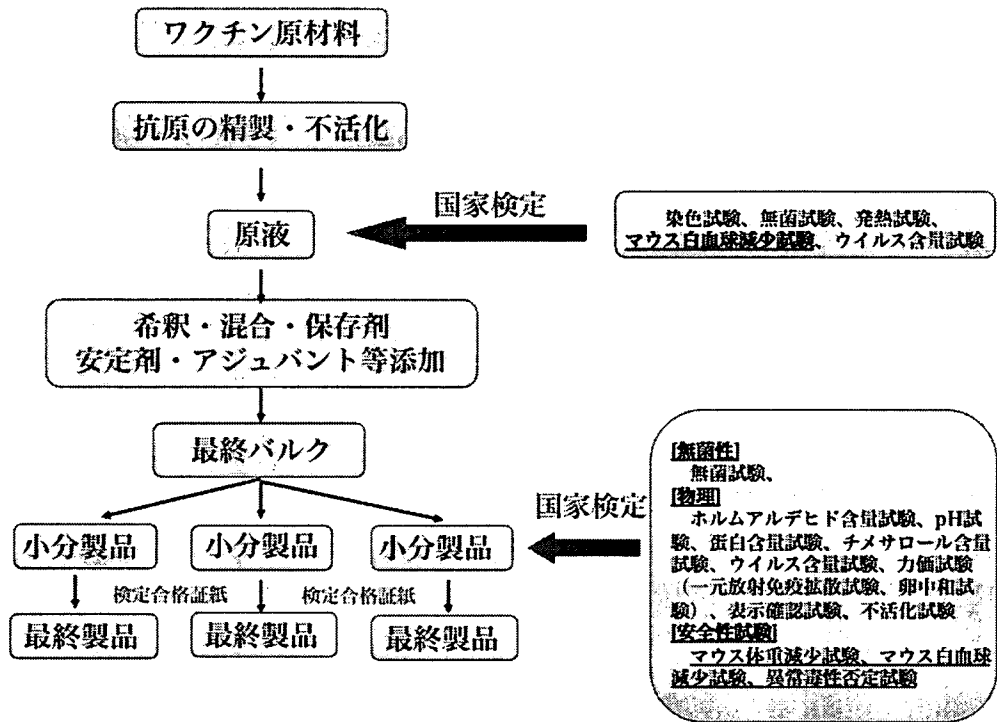


図13. インフルエンザワクチンの安全性評価と品質管理

インフルエンザワクチンは製造中間段階での国家検定、及び最終製品について国家検定がなされている。

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

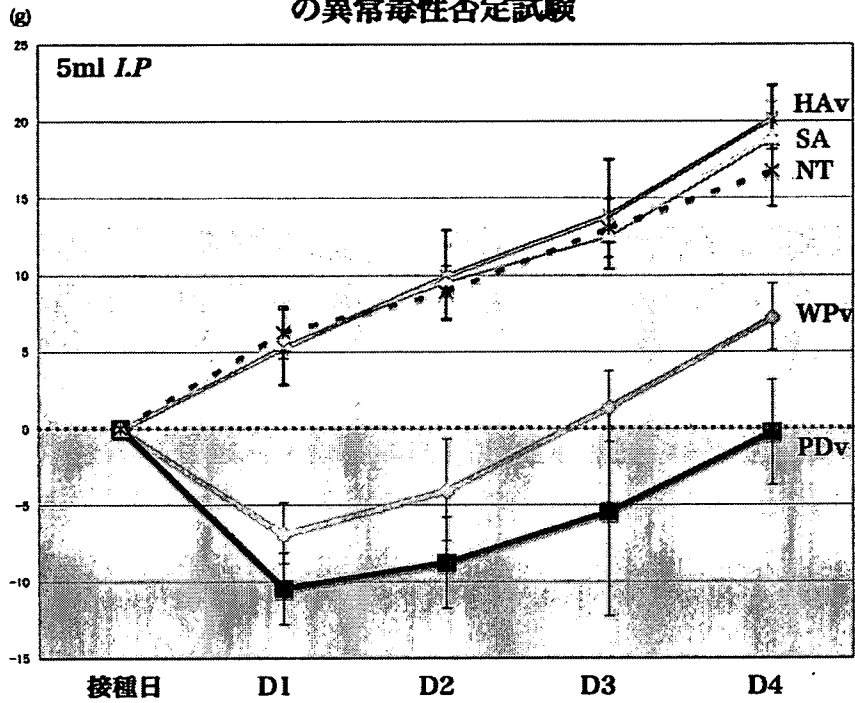


図14. インフルエンザワクチンの異常毒性否定試験

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

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

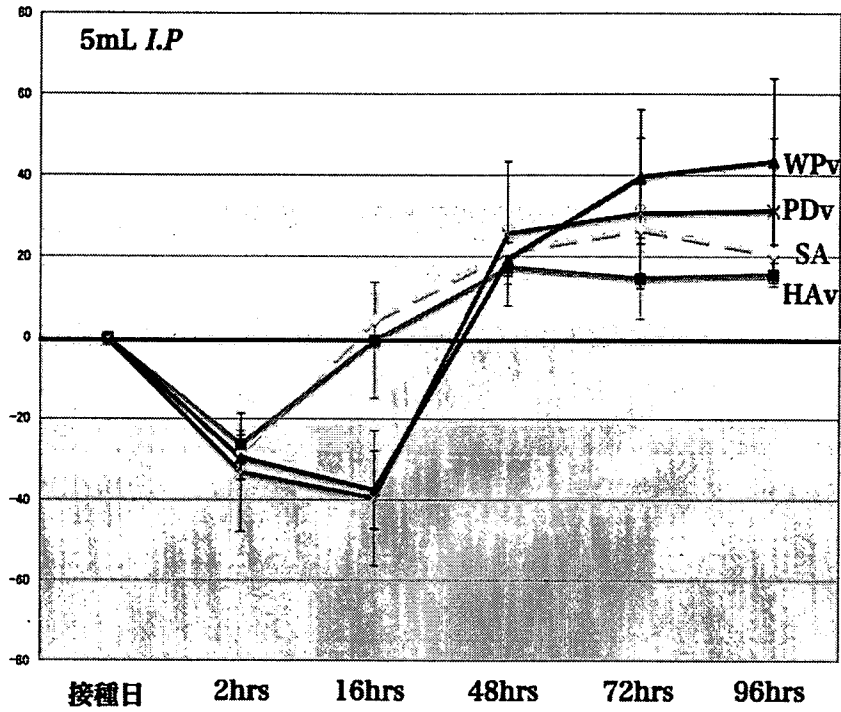


図15. インフルエンザワクチンの白血球減少試験

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