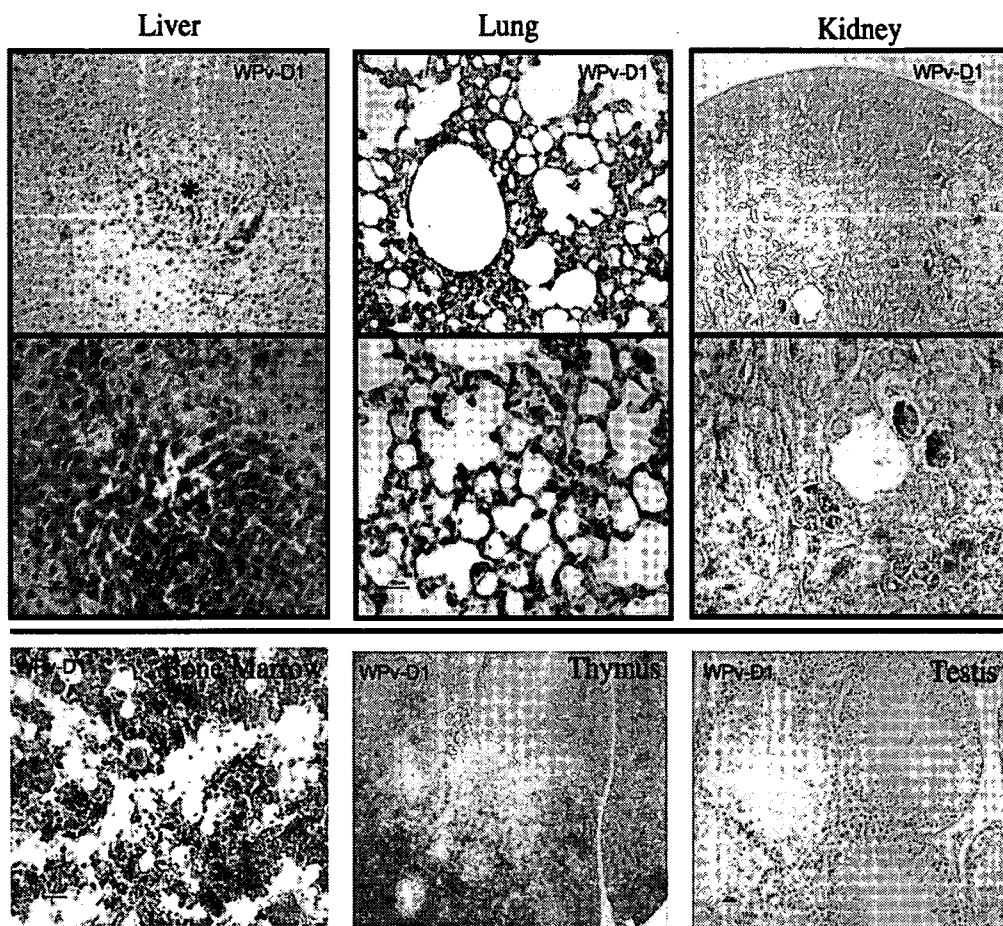


**図16. インフルエンザワクチン接種後(16hrs)の血液学的変化**

全粒子ワクチン (PD<sub>v</sub>, WP<sub>v</sub>) 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、HA<sub>v</sub>; HA ワクチン接種群、WP<sub>v</sub>; 全粒子ワクチン接種群、PD<sub>v</sub>;  
 パンデミックワクチン接種群



### 図17. 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: Filt: ±1.0, n=1

## 肺における遺伝子発現プロファイル-1

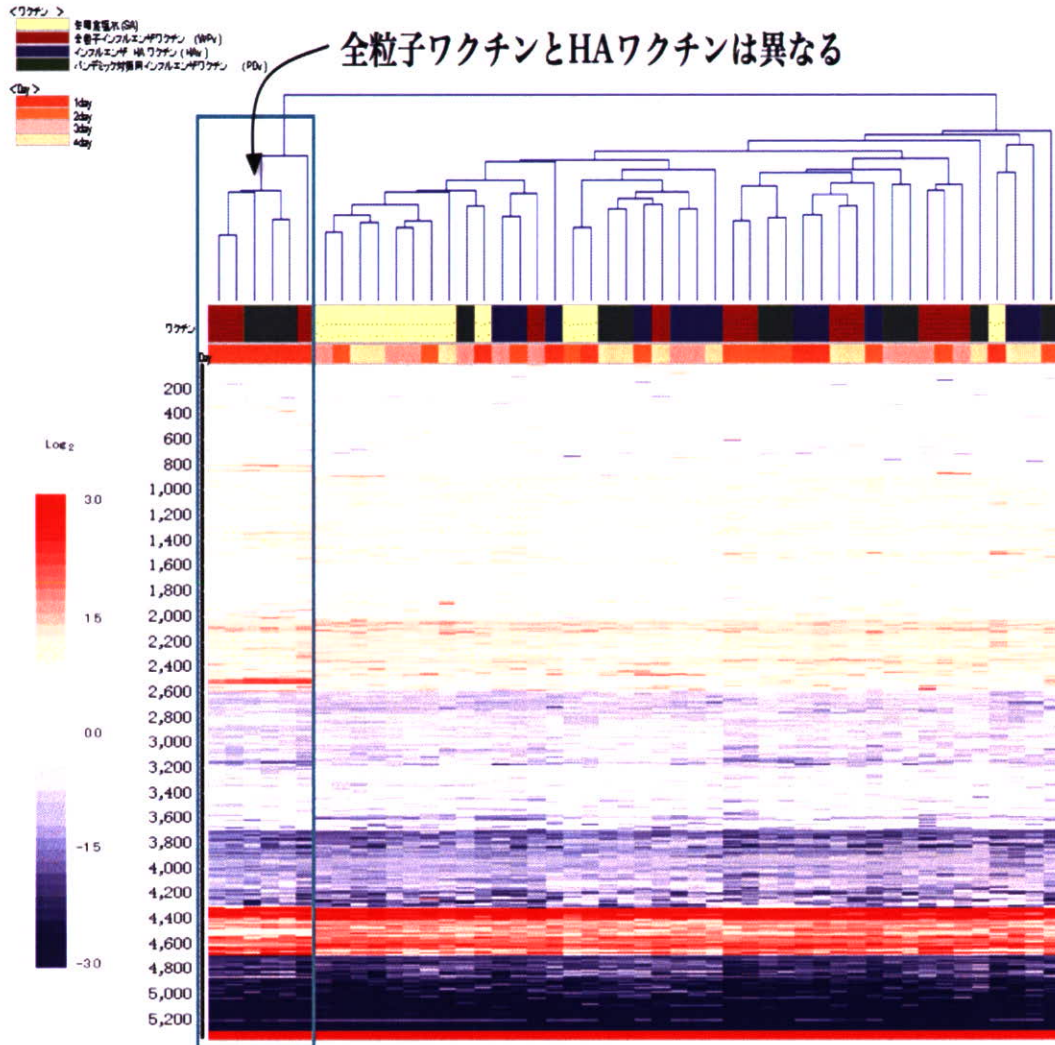


図18. インフルエンザワクチンの網羅的遺伝子発現解析 1

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、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

## 肺における遺伝子発現プロファイル-2

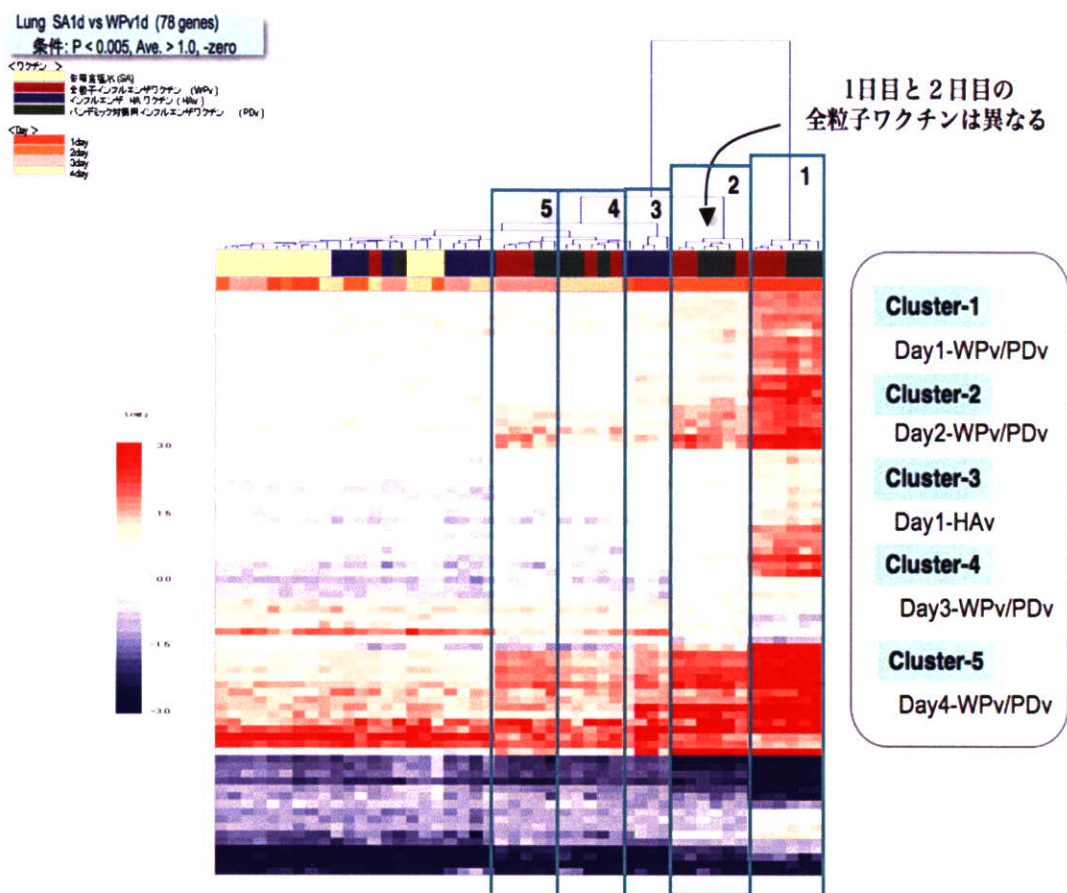


図 19. インフルエンザワクチンの網羅的遺伝子発現解析2

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、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

## Validation of cDNA Microarray analysis by Real-time PCR

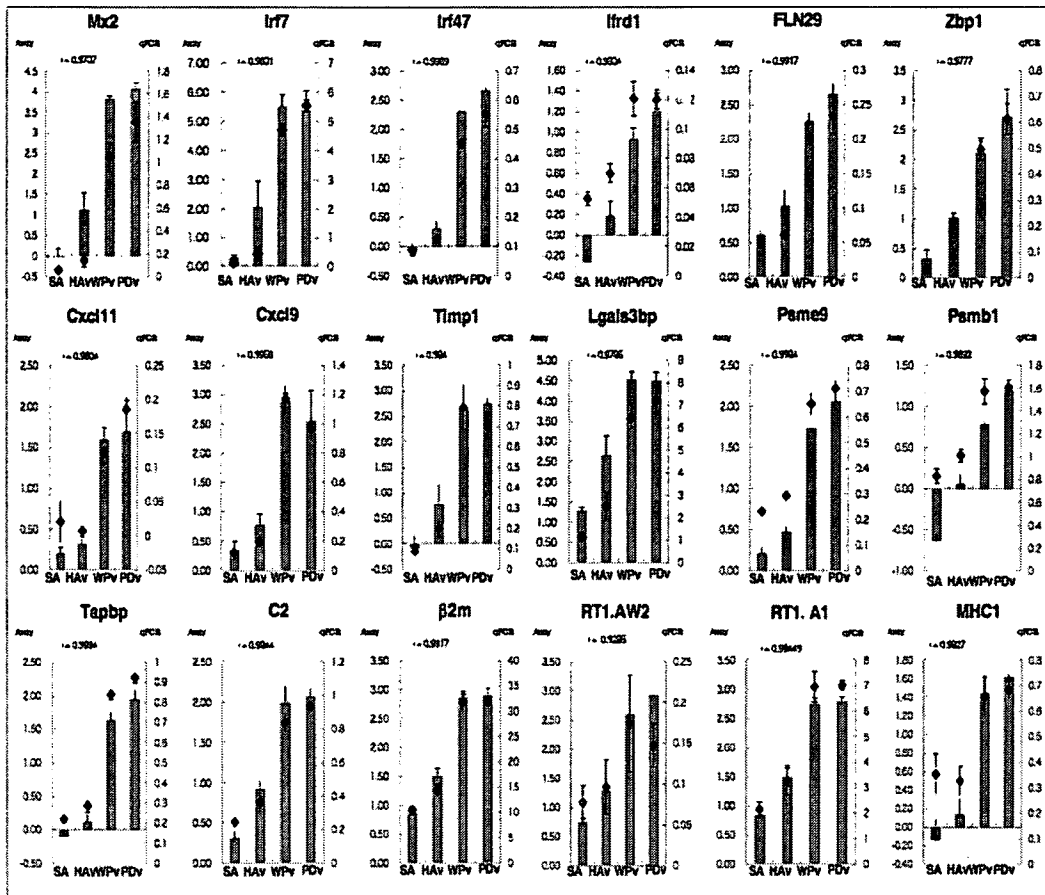


図20. 網羅的遺伝子発現によって誘導された 18 遺伝子のバリデーション

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

## Mechanism of Influenza vaccine

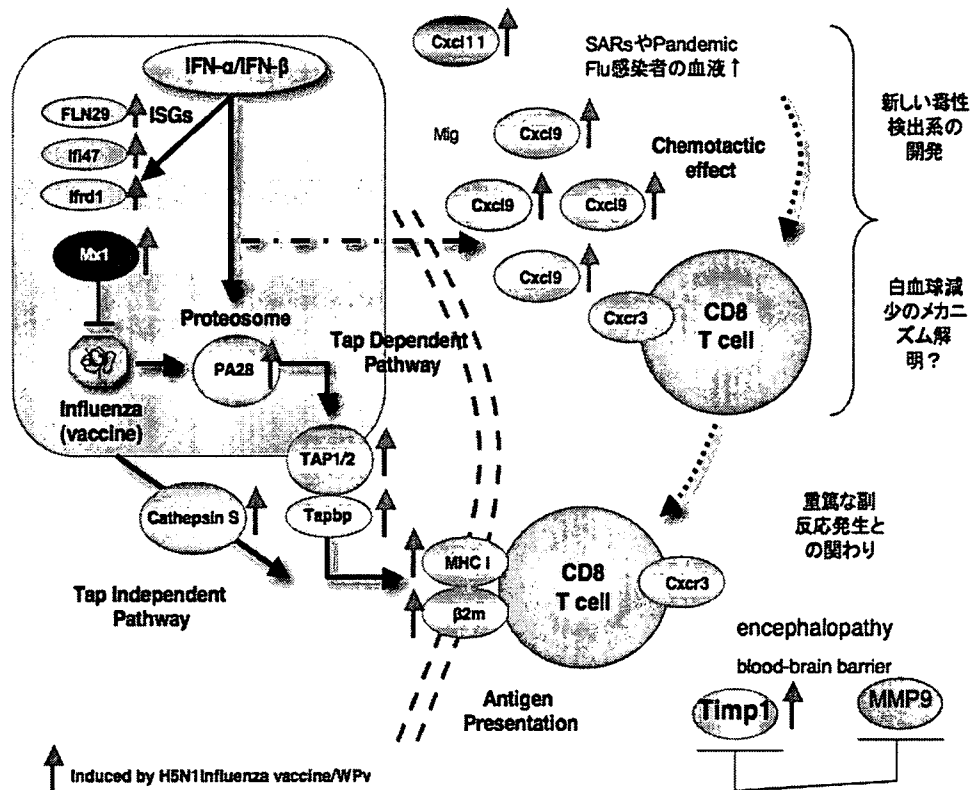


図21. インフルエンザワクチン接種後の遺伝子発現変化

インフルエンザワクチン接種によって、様々な ISG が誘導される。また抗原提示に関わる PA28 や TAP1.2 及び Cts、CD8-T 細胞を誘引する Cxcl9 などの発現も上昇する。

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

Official Gene Name	Symbol	ID	PDV-01		WPV-01		HAV-01		SA-D1	
			Mean ± SD		Mean ± SD		Mean ± SD		Mean ± SD	
<b>IFN-inducible gene</b>										
myxovirus (influenza virus) resistance 1	Mx1	X52711	6.16 ± 0.28		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		2.06 ± 0.87		0.32 ± 0.08	
myxovirus (influenza virus) resistance 2	Mx2	NM_017028	4.08 ± 0.13		3.83 ± 0.06		1.14 ± 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	
<b>FLN29 gene product</b>	Fln29	AF329825	2.68 ± 0.15		2.26 ± 0.12		1.03 ± 0.23		0.81 ± 0.05	
similar to interferon inducible protein	Similar	XM_220360	1.84 ± 0.23		1.74 ± 0.08		0.61 ± 0.15		0.45 ± 0.05	
interferon-related developmental regulator 1	Ird1	NM_018242	1.20 ± 0.18		0.34 ± 0.10		0.19 ± 0.14		-0.26 ± 0.12	
<b>Chemokine and Cytokine function</b>										
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 9	Cxcl9	NM_145672	2.54 ± 0.52		2.88 ± 0.13		0.78 ± 0.18		0.35 ± 0.15	
lectin, galactose binding, soluble 9	Lgals9	NM_012977	2.01 ± 0.24		1.85 ± 0.06		0.07 ± 0.18		-0.65 ± 0.20	
colony stimulating factor 1 (macrophage)	Csf1	NM_023981	1.94 ± 0.07		1.81 ± 0.24		0.84 ± 0.13		0.59 ± 0.16	
granulin	Grn	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	NM_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	Etmf1	D89730	0.28 ± 0.18		-0.05 ± 0.18		0.98 ± 0.18		1.15 ± 0.15	
<b>Immune Response</b>										
similar to lymphocyte antigen 6 complex	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	3.67 ± 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		2.80 ± 0.06		1.29 ± 0.23		0.74 ± 0.05	
beta-2-microglobulin	β2m	NM_012512	2.90 ± 0.12		2.88 ± 0.11		1.52 ± 0.12		0.88 ± 0.09	
MHC class Ia protein (RT1.A1) 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 ± 0.18	
transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	Tap2	NM_032056	2.69 ± 0.29		2.51 ± 0.20		1.44 ± 0.06		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	Psmβ9	NM_012708	2.07 ± 0.13		1.73 ± 0.01		0.48 ± 0.05		0.21 ± 0.07	
TAP binding protein	Tapbp	NM_033098	1.95 ± 0.13		1.63 ± 0.13		0.12 ± 0.11		-0.10 ± 0.10	
RT1 class Ib gene, M2-TL-like, grc region (N3)	RT1-N3	L23128	1.62 ± 0.03		1.45 ± 0.20		0.14 ± 0.16		-0.14 ± 0.22	
proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha	Psmα1	NM_017264	1.20 ± 0.10		0.79 ± 0.01		0.06 ± 0.11		-0.63 ± 0.09	
cathepsin S	CtsS	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 ± 0.18		-1.80 ± 0.09	
proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta	Psmβ2	NM_017257	0.28 ± 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		1.85 ± 0.11		1.83 ± 0.25	
fibrinogen, gamma polypeptide	Fgg	NM_012559	-2.70 ± 0.26		-2.78 ± 0.22		-3.68 ± 0.32		-3.80 ± 0.21	
<b>Transcription Activity</b>										
Z-DNA binding protein 1	Zfp1	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		1.38 ± 0.15		0.70 ± 0.22	
similar to H1 histone family, member 2:	Similar	XM_225325	1.67 ± 0.19		1.31 ± 0.06		0.21 ± 0.03		0.08 ± 0.18	
activating transcription factor 5	Atf5	NM_172336	0.95 ± 0.06		0.99 ± 0.06		-0.76 ± 0.29		-0.74 ± 0.03	
AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	Ahnak	AF454371	0.58 ± 0.21		0.36 ± 0.18		0.85 ± 0.11		1.36 ± 0.17	
nuclear protein 1	Nupr1	AF014503	-0.74 ± 0.11		-1.09 ± 0.04		-2.78 ± 0.28		-2.83 ± 0.07	
histone cluster 1, H2b1	Hist1H2b1	NM_022647	-0.95 ± 0.07		-0.93 ± 0.13		-1.77 ± 0.06		-1.98 ± 0.13	
<b>Apoptosis</b>										
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	M86389	0.90 ± 0.14		0.84 ± 0.15		0.08 ± 0.05		-0.20 ± 0.14	
Mitochondrial cytochrome oxidase subunits, I, II, III genes, 9	J01435		-3.51 ± 0.27		-3.63 ± 0.10		-1.89 ± 0.16		-2.08 ± 0.12	
<b>Protein Modification</b>										
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	Serp1g1	NM_199093	2.20 ± 0.12		2.14 ± 0.03		0.66 ± 0.16		0.08 ± 0.13	
<b>Cellular Signaling</b>										
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	Hrasls3	NM_017060	0.98 ± 0.18		0.48 ± 0.11		-0.84 ± 0.22		-1.23 ± 0.18	
similar to signal transducer and activator	Similar	XM_223301	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	
<b>Metabolism</b>										
2,5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	Oas1	Z16877	4.27 ± 0.41		4.14 ± 0.30		1.96 ± 0.60		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	
β-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	Pfkfb3	NM_057135	1.72 ± 0.36		1.62 ± 0.16		0.99 ± 0.16		0.47 ± 0.19	
carbonic anhydrase 4	Ca4	NM_018174	-0.85 ± 0.33		-0.84 ± 0.12		0.66 ± 0.15		0.66 ± 0.15	
monoglyceride lipase	Mgl1	NM_138502	-0.80 ± 0.03		-1.16 ± 0.23		-0.43 ± 0.05		-0.08 ± 0.22	
GTP cyclohydrolase I feedback regulator	Gchtr	U85512	-1.24 ± 0.09		-1.65 ± 0.11		-1.22 ± 0.21		-0.49 ± 0.22	
cytochrome b mRNA, complete cds; mitocho	cytb	AF285548	-2.35 ± 0.19		-2.65 ± 0.11		-1.17 ± 0.06		1.30 ± 0.14	
<b>Others</b>										
EST351314 gene index, normalized rat. no	EST	AH920010	2.96 ± 0.48		2.42 ± 0.18		2.02 ± 0.48		1.41 ± 0.23	
nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	Ngr	NM_012810	2.82 ± 0.30		1.85 ± 0.31		-0.25 ± 0.43		0.59 ± 0.17	
Cd1g2 protein	Cd1g2	NM_153824	2.62 ± 0.11		2.08 ± 0.09		0.70 ± 0.17		0.48 ± 0.06	
xanthine dehydrogenase	Xdh	NM_017154	2.02 ± 0.11		1.95 ± 0.18		0.77 ± 0.04		0.47 ± 0.28	
EST108198 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	1.78 ± 0.08		1.48 ± 0.35		0.02 ± 0.38		-0.14 ± 0.20	
glypican 3	Gpc3	NM_012774	1.61 ± 0.08		1.46 ± 0.23		2.62 ± 0.67		2.71 ± 0.13	
similar to RIKEN cDNA 231008M14 [Mus mu	Similar	XM_217259	1.58 ± 0.02		1.55 ± 0.14		0.58 ± 0.20		0.13 ± 0.04	
similar to peanut-like 2 homolog; peanut	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		0.75 ± 0.07		-0.14 ± 0.28		-0.38 ± 0.06	
UI-R-A1-qm-F05-0-ULS1 UI-R-A1 cDNA cl	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	0.86 ± 0.09		0.60 ± 0.11		-0.77 ± 0.35		-1.04 ± 0.04	
clustrin	Ciu	NM_012879	0.78 ± 0.09		0.74 ± 0.09		-0.21 ± 0.16		-0.37 ± 0.16	
Dnaj (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_031664	0.16 ± 0.16		0.01 ± 0.09		-0.71 ± 0.26		-1.15 ± 0.19	
sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	Scn7a	Y09164	-0.39 ± 0.25		-0.48 ± 0.14		0.09 ± 0.41		0.54 ± 0.03	
EST224035 Normalized spleen, Bento Soares	EST	A1180292	-2.20 ± 0.34		-1.64 ± 0.20		-4.02 ± 0.30		-2.84 ± 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_017216	-3.10 ± 0.66		-3.56 ± 0.21		-2.92 ± 0.65		-2.40 ± 0.23	
S100 calcium binding protein G	S100g	NM_012521	-3.93 ± 0.29		-3.72 ± 0.22		-2.17 ± 0.15		-2.10 ± 0.18	

萌芽的先端医療技術推進研究総事業（トキシコゲノミクス分野）  
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  
（総合・分担）研究報告書

研究課題：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

分担研究者 渡辺慎哉 東京医科歯科大学・准教授

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

## 研究要旨

従来の動物を用いたワクチンの安全性試験と比較して、より迅速で詳細な試験法を開発し、新しい安全性評価法を確立することを目指した。DNA マイクロアレイ技術を用い、ワクチン接種されたラット臓器における遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析したところ、接種後 1 日目から著名な遺伝子の発現変動を検出することができた。さらに接種後 1 日目の詳細な解析から、ワクチンの毒性に関連するバイオマーカー遺伝子の同定に成功し、新たな試験法確立への強力な足がかりを得た。

### A. 研究目的

DNA マイクロアレイはサンプル中に発現する遺伝子をハイブリダイゼーション法の原理を応用することにより検出するものである。この方法を用いてワクチン接種に伴う遺伝子発現変化を検出することにより、毒性関連遺伝子を網羅的に解析することができると考えられる。今日マイクロアレイは医薬品の副作用解析のために盛んに用いられているが、ワクチンの副反応の原因となる毒性の評価についても、新たな知見を得ることができるとともに理想的な評価法となりうると思われる。ワクチンの安全性評価法の確立を目指して、従来の動物を用いた安全性

試験にかわる、感度が高く、科学的根拠が得られる新しい方法の開発のために、DNA マイクロアレイで取得した遺伝子発現プロファイルを基にしたクラスタ解析より、ワクチンの毒性に関連する遺伝子を同定する。

H17 年度は接種人口が最も多い百日せきワクチンを解析対象とした。H18 年度は接種人口の多さに加えてパンデミックに備えた緊急性が議論されているインフルエンザワクチンを、H19 年度は安全性への関心が高まっている日本脳炎ワクチンを用いて解析を行った。

### B. 研究方法



## 1) 動物

8週齢の Wistar または F334/N 系統雄ラットを SLC より購入し、1週間以上環境馴化させた個体を使用した。

## 2) ワクチン

### 2-1) 百日せきワクチン

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 をラット腹腔内に接種した。

### 2-2) インフルエンザワクチン

HA ワクチン、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) は (財団法人) 化学及血清療法研究所より供与して頂いた。HA ワクチン (HAV)、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 をラット腹腔内に接種した。

### 2-3) 日本脳炎ワクチン

マウス脳由来日本脳炎ワクチン (JE)、および治験薬 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)。ヒトに接種する最終濃度に合わせて調整してあり、各々 5mL をラット腹腔内に接種した。

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、5mL をラット腹腔内に接種した。一群は各 3 匹とした。

## 3) RNA 抽出

ワクチン接種されたラットから肝臓左外葉、左肺、左腎臓、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) 中で破碎した。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 11,468 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。

## C. 研究結果

### 1) 百日せきワクチン

#### 1-1) 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日目に肝臓、肺、脳、腎臓を摘出した。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、DNA マイクロアレイ解析を行った。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二次元階層クラスタ解析を行なったところ、臓器ごとにクラスタを形成することが明らかとなった(図22)。

#### 1-2) 肝臓における遺伝子発現プロファイルのクラスタ解析

肝臓は毒性物質を解毒する最も主要な臓器であり、医薬品だけでなくワクチンの毒性とも密接に関連していることが考えられる。そこで、肝臓での遺伝子発現をさらに詳細に解析した。遺伝子発現量比に基づくクラスタ分類では、RE接種群は明らかに、他のサンプル接種群と大きな違いが認められた(図23)。接種日からの時間経過に伴う発現様式の変化について解析したところ、1日目、2日目にはPT接種群は生理食塩水を接種した群と大差なかったが、3日目、4日目になるとRE接種群の示す遺伝子発現様式に類似してくることが明らかになった。REとPT接種群が類似した結果を得ることは、動

物を用いた白血球増加試験の結果とも一致し、包括的遺伝子発現解析がワクチンの安全性試験の指標になる可能性が示唆された。

#### 1-3) ワクチンの毒性に関連した遺伝子の同定

RE接種群とSA接種群とで著明な発現変動を認める遺伝子を抽出し、その中でとくにワクチンの毒性に関連している可能性のある9遺伝子を特定した。これらの遺伝子はS100a8、Acmsd(2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase)、Sterol-12-alpha hydroxylase、AGP(alpha 1-acid glycoprotein)、Tat(tyrosine aminotransferase)、Lbp(lipopolysaccharide binding protein)、Phyh(Phytanoyl-CoAhydroxylase)、Hpx(hemopexin)、Got1(glutamate oxaloacetate transaminase 1)の9遺伝子である。これらの遺伝子はすべて、RE接種群で強発現し、PT接種群ではRE接種群よりも発現は劣るもののPVやSA接種群よりも有意に発現が亢進しており、ワクチンの毒性に関連した遺伝子と考えられる。

これらの遺伝子のうち半定量的PCR解析で毒性を特異的かつ再現よく検知できる3つの遺伝子AGP、Lbp、Hpxを特定した(図24)。

### 2) インフルエンザワクチン

#### 2-1) DNA マイクロアレイ解析

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、DNAマイクロアレイ解析を行った。このうち、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結果、図25に示す様に、1日目のWPvとPDvが他のサンプルとは別のクラスタを形成しており、他のサンプルとは異なる挙動を示すことを見出した。

## 2-2) ワクチン毒性に関連した遺伝子群

1日目のWPv群とSA群(各3サンプル)の間で発現に有意差のある43個の遺伝子群を統計的に抽出した。この43遺伝子を用いて再度クラスタ解析を行った結果が図5である。解析の結果をみると、1日目のWPvとPDvに対して、残りのサンプルが大きく2つのクラスタにわかれ、さらに、残りのサンプルのクラスタのうち2日目のWPvとPDvが別クラスタを、さらにその隣(下層)に1日目のHAvのクラスタを形成していた。3日以降のすべてのサンプルは1、2日目のWPv、PDvのクラスタからはずれていた。HAワクチンは図26で示す様に、1日目のサンプルにおいて、WPvとPDv投与後、3、4日目のサンプルに近い遺伝子発現様式を示す。また生理食塩水を投与されたサンプルは、毒性が含まれるサンプルとは混在

していないことが明らかとなった。

## 3) 日本脳炎ワクチン

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)、および生理食塩水(SA)をラット腹腔内に5ml接種し、接種後1、2、3、4日目に脳、肝臓、肺を摘出し、計108臓器からpoly(A)+RNAを抽出しDNAマイクロアレイ解析を行った。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解析を行ったが、投与群ごとにクラスタがわかれることはなかった(図27,28)。すなわち、現行ワクチンと開発中のワクチンの特性は非常に類似しており、遺伝子発現プロファイル上は区別されないことが示唆された。

## D. 考察

H17年度に解析した百日せきワクチンでは、肝臓においてRE接種により発現が大きく変化する遺伝子としてS100a8、Acmsd、Sterol-12-alpha hydroxylase、AGP、Tat、Lbp、Phyh、Hpx、Got1を特定した。これらの9遺伝子はすべてワクチンの毒性と関連していると考えられるが、中でもPTの濃度の変化に伴う影響を鋭敏に検出できる、AGP、Lbp、Hpxに注目した。AGPは41-43kDaの糖蛋白で、様々な免疫反応に関連した機能、薬剤結合能などが報告されている。また血中AGPが急性炎症期に5、6倍に上昇することが分かっている。Lbpも急性炎症反応物質で肝臓

から主に産生され、炎症に伴い血中濃度が劇的に上昇する。Hpx は肝臓で産生される糖蛋白でヘムに高い接着能を示す。また急性炎症反応物質である。これら3つの遺伝子はみな急性炎症関連物質でRE、PTに含まれる毒性に特異的なものと考えられる。すなわちこれらの遺伝子は百日せきワクチンの毒性を検知するためのバイオマーカーとなりうると考えられる。

H18年度に解析したインフルエンザワクチンでは、肺における遺伝子発現プロファイルを基にクラスタ解析を行なったところ、1日目のWPv、およびPDv接種群が独立したクラスタを形成しており、他のサンプルとは異なる挙動を示すことを明らかにした。このことは分担研究者浜口らがラットの体重変化および白血球数の変化で示している様に、WPvとPDvインフルエンザワクチンが投与初期に著しい生体変化をきたすことと相関していると考えられる。したがって、WPv接種で発現変動が顕著であるとして抽出した43遺伝子は、インフルエンザワクチンの持つ毒性反応を鋭敏に検知するバイオマーカーとなる可能性を示している。

H19年度は百日せきワクチン、インフルエンザワクチンでの解析実績を踏まえ、日本脳炎ワクチンを接種されたラット臓器での解析を行った。得られた遺伝子発現プロファイルを基に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JEとTJEの特性が非常に類似したものであり、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。現在実用化されているマウス脳由来日本脳炎ワクチン(JE)は高度精製不活化ワクチンであり、その安全性は高い。我々の解析結果は、次世代ワクチンとして開発中のVero細胞由来日本脳炎ワクチン(TJE)がマウス脳由来日本脳炎ワクチン(JE)と同等の品質を持つことを示していると考えられる。

## E. 結論

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を開発するため、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。H17年度には百日せきワクチンを接種したラット肝臓の解析から、AGP、Lbp、Hpxの3遺伝子が毒性に密接に関連していることを明らかにした。H18年度にはインフルエンザワクチンを接種したラット肺の解析から、43の毒性関連遺伝子の同定に成功した。さらに、H19年度には開発中の治験用日本脳炎ワクチン(Vero細胞由来)の特性が現行のマウス脳由来のワクチンと同等と評価されることを示した。

## F.健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Fujita N, Miyamoto T, Imai JI, Hosogane N, Suzuki T, Yagi M, Morita K, Ninomiya K, Miyamoto K, Takaishi H, Matsumoto M, Morioka H, Yabe H, Chiba K, Watanabe S, Toyama Y, Suda T. CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 338: 1890-1896.
2. Sakamoto A, Imai J, Nishikawa A, Honma R, Ito E, Yanagisawa Y, Kawamura M, Ogawa R, Watanabe S. Influence of inhalation anesthesia assessed by comprehensive gene expression profiling. *Gene.*, 2005, 356:39-48.
3. Miura A, Honma R, Togashi T, Yanagisawa Y, Ito E, Imai J, Isogai T, Goshima N, Watanabe S, Nomura N. Differential responses of normal human coronary artery endothelial cells against multiple cytokines comparatively assessed by gene expression profiles. *FEBS Lett.* 2006, 580:6871-6879.
4. Yanagisawa Y, Sato Y, Asahi-Ozaki Y, Ito E, Honma R, Imai J, Kanno T, Kano M, Akiyama H, Sata T, Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Watanabe S, Katano H. Effusion and solid lymphomas have distinctive gene and protein expression

profiles in an animal model of primary effusion lymphoma. *J Pathol.* 2006, 209:464-473.

5. Ito E, Honma R, Yanagisawa Y, Imai J, Azuma S, Oyama T, Ohwada S, Akiyama T, Nomura N, Inoue J. Novel clusters of highly expressed genes accompany genomic amplification in breast cancers. *FEBS Lett.*, 2007, 581(21): 3909-14.

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.*, 2007, 25: 3355-3364.

7. 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

### 3) 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1

2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. 8. 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)平成19年12月

9. 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(QuantiGenePlex)法を用いたワクチンの新しい安全性評価法確立の試み 11回日本ワクチン学会(横

浜)平成19年12月

10. 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許

なし

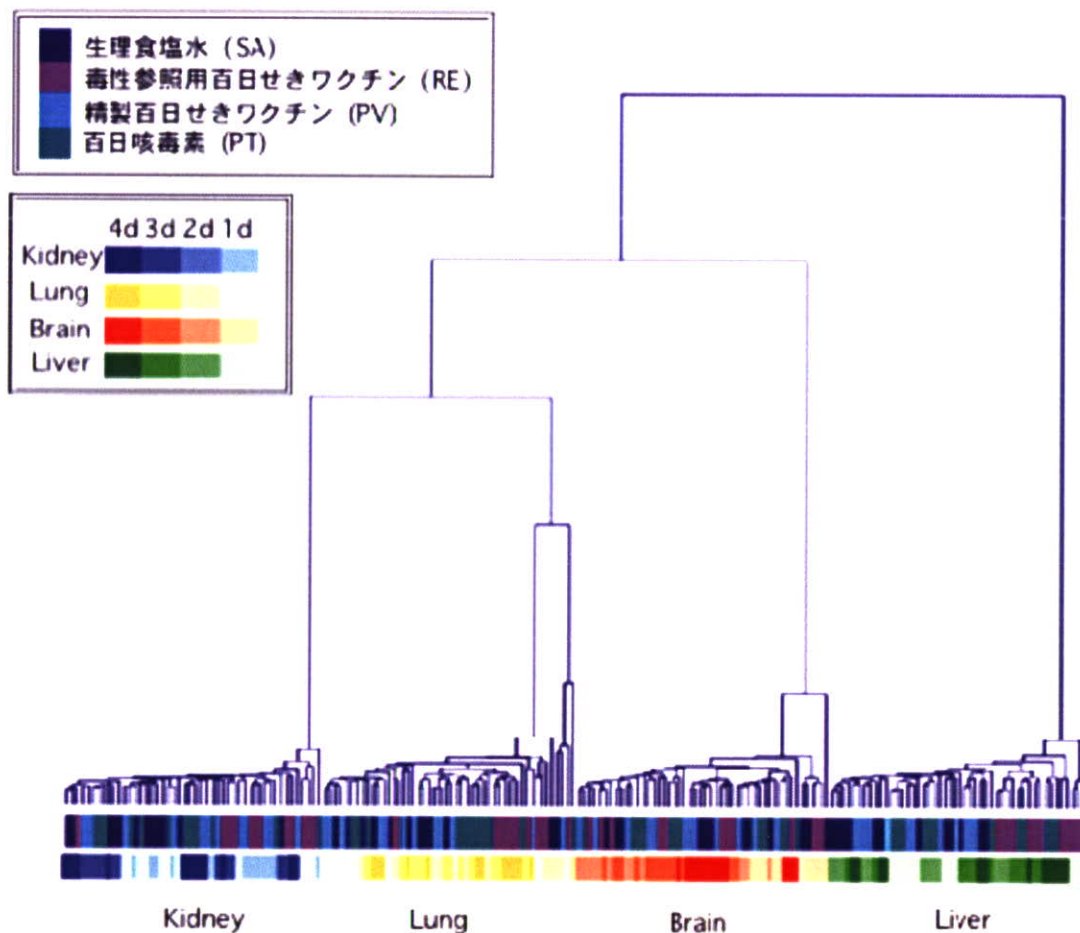


図22. 百日せきワクチン接種ラットにおける遺伝子発現様式のクラスタ解析

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。肝臓、脳、肺、腎臓を 1-4 日目に摘出し、遺伝子発現様式についてクラスタ解析を行なった。



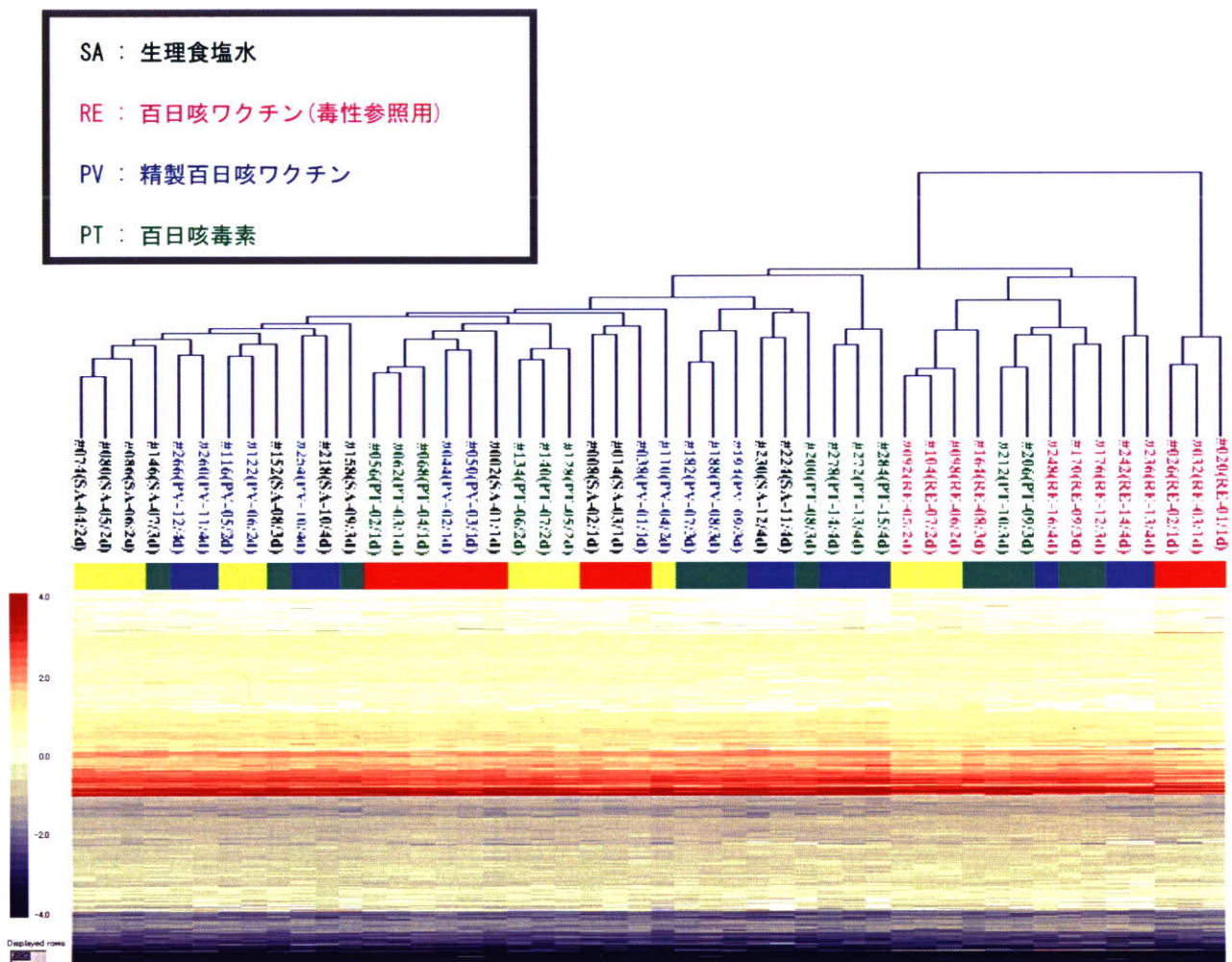


図23. 百日せきワクチン接種によるラット肝臓の遺伝子発現プロファイルのクラスタ解析

ラット腹腔内に 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、接種後 1 日～4 日に肝臓を摘出し、遺伝子発現様式をクラスタ解析した。赤および青の色調の強さでそれぞれ発現の増加及び減少を表す。

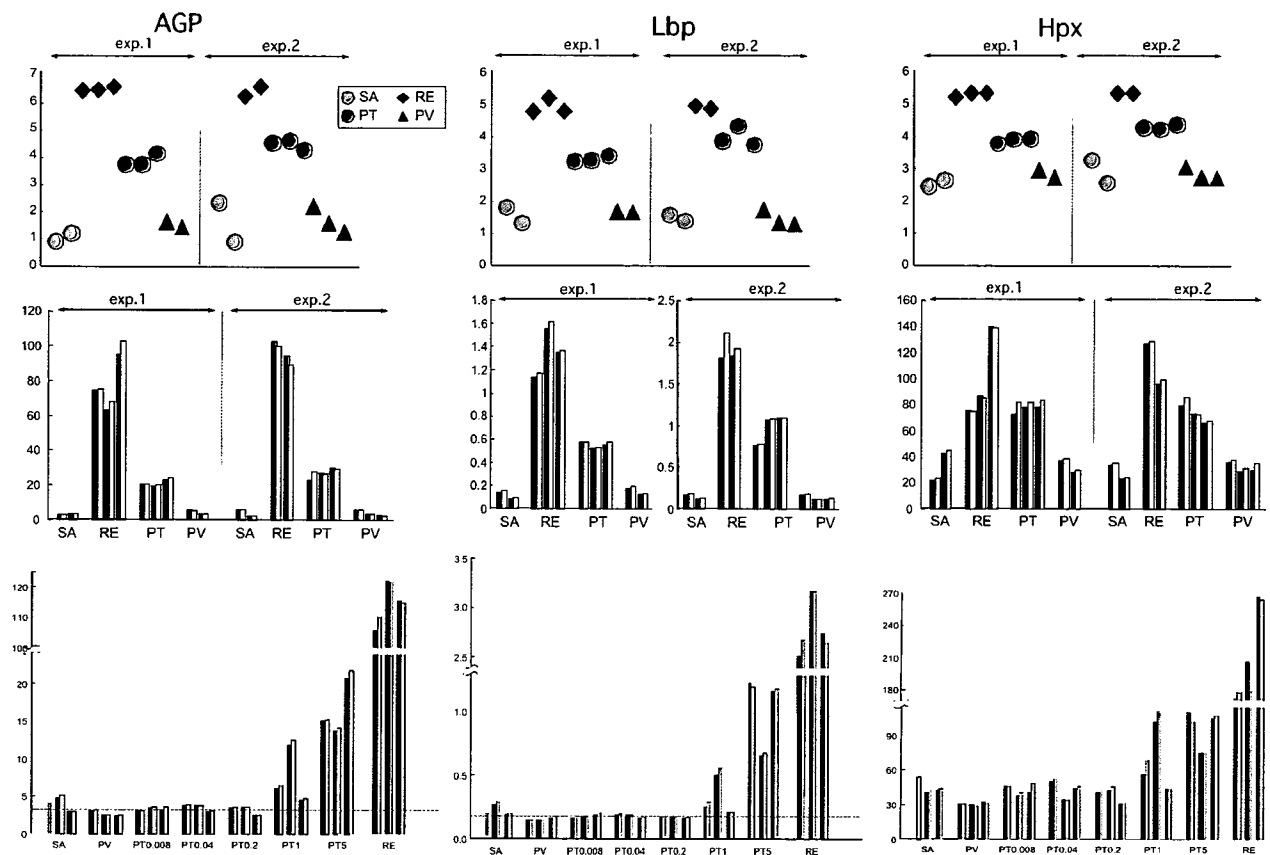


図24. 百日せきワクチンの毒性に関連した遺伝子の同定

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、接種後 1 日目に肝臓を摘出し、AGP、Lbp、Hpx の遺伝子発現をマイクロアレイ解析による相対的遺伝子発現比として解析した。

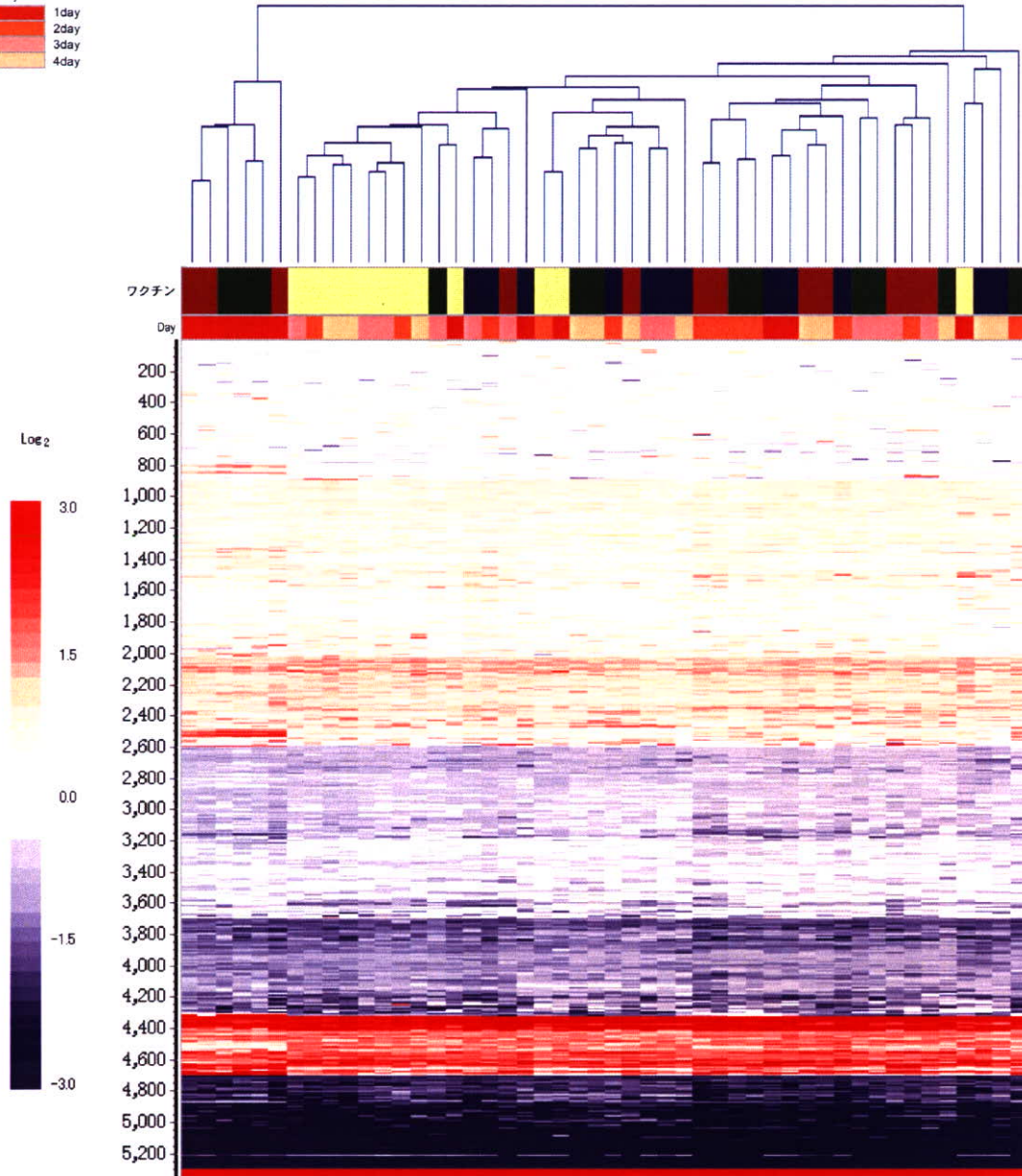
Lung (5346 genes)  
 条件: Filt:  $\pm 1.0$ , n=1

<ワクチン>

- 生理食塩水(SA)
- 全粒子インフルエンザワクチン(WPV)
- インフルエンザHAワクチン(HAV)
- パンデミック対策用インフルエンザワクチン(PDV)

<Day>

- 1day
- 2day
- 3day
- 4day



**図25. 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**

ラット腹腔に SA (生理食塩水)、HAV (HA ワクチン)、WPV (全粒子ワクシン) および PDV (沈降新型インフルエンザワクチン) を投与した。投与ラットより肺を 1~4 日に摘出し、5346 個の遺伝子発現様式についてクラスタ解析を行なった。

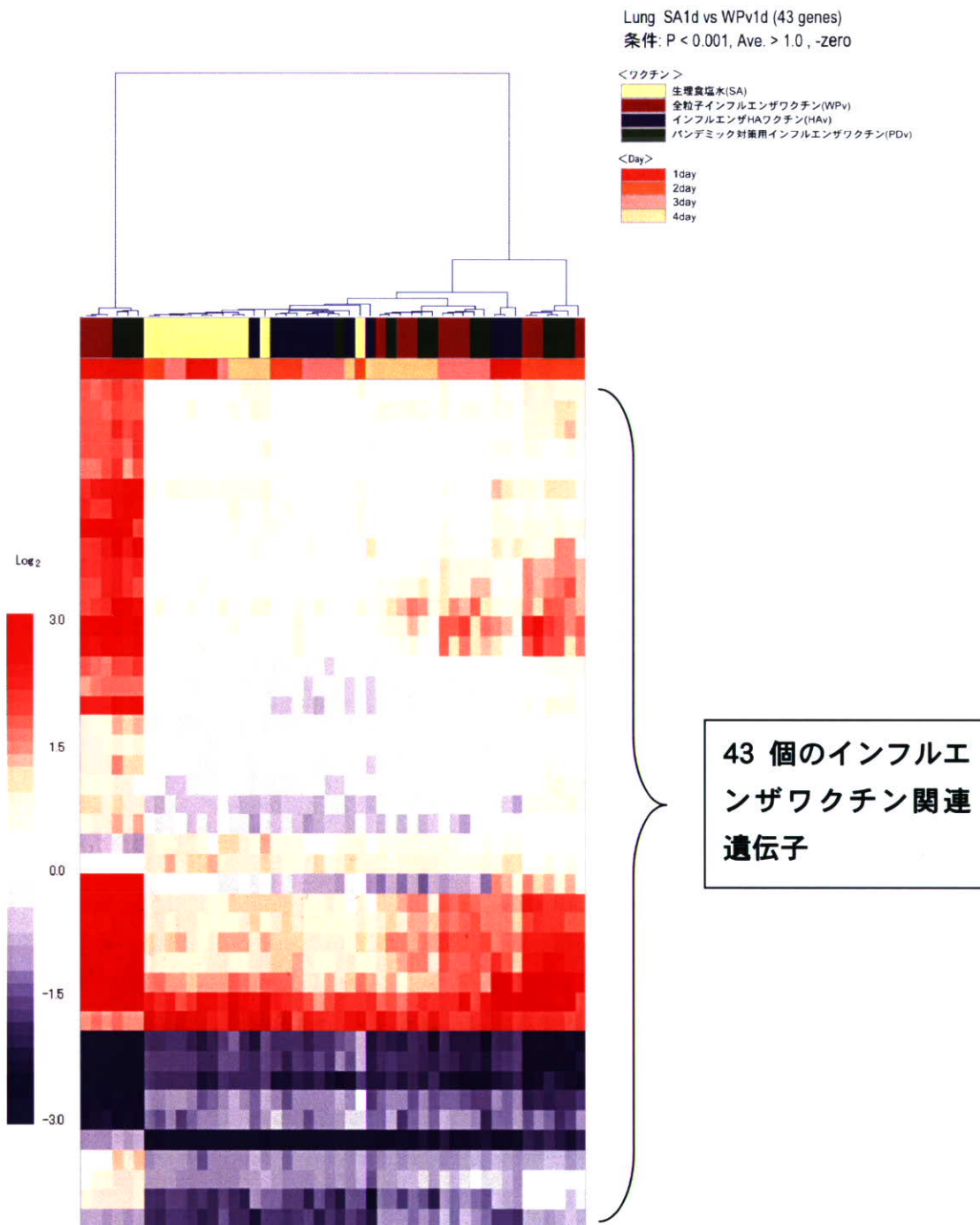


図26. インフルエンザワクチンの毒性関連遺伝子による肺の遺伝子発現様式

1日目のWPV（全粒子ワクチン）群とSA（生理食塩水）群の間で有意差のある遺伝子群を統計学的に43個抽出した後に、これらの遺伝子の発現変動をもとにクラスタ解析を行なった。