

200940047A

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

季節性インフルエンザワクチン及び新規製法による
インフルエンザワクチンに対応した新しい
迅速安全性評価法の開発と標準化への検討

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 百瀬暖佳
平成22（2010）年3月

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

季節性インフルエンザワクチン及び新規製法による
インフルエンザワクチンに対応した新しい
迅速安全性評価法の開発と標準化への検討

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 百瀬暖佳
平成22(2010)年3月

研究組織

研究代表者

百瀬暖佳 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

研究分担者

浜口 功 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

持田恵子 (国立感染症研究所・細菌第二部)

板村繁之 (国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター)

大隈 和 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

研究協力者

水上拓郎 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

福田 靖 (国立感染症研究所・細菌第二部)

齋藤良一 (国立感染症研究所・細菌第二部)

鰐坂裕美 (国立感染症研究所・細菌第二部)

蒲地一成 (国立感染症研究所・細菌第二部)

甲斐 光 (デンカ生研株式会社)

渡辺隆雄 (学校法人 北里研究所)

福家 功 (財団法人 阪大微生物病研究会)

尾堂浩一 (財団法人 化学及血清療法研究所)

目次

I. 総括研究報告

インフルエンザワクチンの安全性試験への新規遺伝子発現定量法(QuantiGene Plex 法)導入に向けた研究	4
--	---

百瀬暖佳

板村繁之

図 1: QuantiGene Plex 法による遺伝子発現量測定の予備検討 1	10
--	----

図 2: QuantiGene Plex 法による遺伝子発現量測定の予備検討 2	11
--	----

図 3: DNA マイクロアレイと QuantiGene Plex 法のバリデーション	12
---	----

II. 分担研究報告

1. インフルエンザ HA ワクチンの品質管理に対する遺伝子発現解析の適応可能性に関する研究	13
--	----

浜口 功

大隈 和

図 4: インフルエンザワクチン接種ラットの体重変化	19
----------------------------	----

図 5: HA ワクチン投与による遺伝子発現変動(Grade1)	20
----------------------------------	----

図 6: HA ワクチン投与による遺伝子発現変動(Grade2)	21
----------------------------------	----

図 7: HA ワクチン投与による遺伝子発現変動(Grade3)	22
----------------------------------	----

図 8: 従来試験(異常毒性否定試験)と遺伝子発現解析の相関	23
--------------------------------	----

2. インフルエンザワクチンのマウス白血球数減少試験の再評価に関する研究	24
--------------------------------------	----

持田恵子

図 9: インフルエンザ全粒子ワクチンのマウス白血球数減少活性に及ぼすマウス系統および週齢の比較	27
--	----

表 1: インフルエンザ全粒子ワクチンおよび生理食塩水投与マウスの白血球数の比較	28
--	----

表 2: 既知の濃度の毒性参照品測定の再現性	28
------------------------	----

表 3: インフルエンザ HA ワクチン高濃度原液および小分け製品相当濃度検体のマウス白血球数減少活性	29
---	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
---------------------	----

IV. 研究成果の別刷	31
-------------	----

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書

インフルエンザワクチンの安全性試験への新規遺伝子発現定量法
(QuantiGene Plex 法)導入に向けた研究

研究代表者 百瀬暖佳 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官
研究分担者 板村繁之 国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・室長
研究協力者 水上拓郎 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究要旨

インフルエンザは発熱、頭痛、関節痛、筋肉痛などの全身症状を引き起こす呼吸器の感染症である。インフルエンザの流行に備え、毎年インフルエンザワクチンが製造される。これまでに我々は、インフルエンザワクチンの安全性評価について、網羅的遺伝子発現解析を用いた新たな安全性試験法に関する検討を行ってきた。そして、安全性評価の指標となりうる約 20 のマーカー遺伝子を同定している。これらの遺伝子セットの発現定量を行うことで、インフルエンザワクチンの安全性を迅速かつ鋭敏に評価しうることが期待される。本研究では、我々が検討してきた遺伝子発現法を用いた新規安全性試験法の構築に向け、複数遺伝子の同時測定を可能にする QuantiGene Plex 法導入のためのバリデーションを行った。QuantiGene Plex 法の導入により、試験法の簡略化と試験期間の短縮化が期待される。

研究分担者

浜口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長
板村繁之 国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・室長
持田恵子 国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官
大隈 和 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長

A. 研究目的

インフルエンザウイルスはオルソミクス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°C以上の発熱、頭痛、関節痛、筋肉痛などの全身症状を引き起こす。

現在、インフルエンザ HA ワクチンの安全性試験として、生物学的製剤基準では異常毒性否定試験、マウス白血球数減少試験、マウス体重減少試験が設定されている。これまでに我々は、国家検定として行われている異常毒性否定試験、マウス白血球数減少試験等の安全性試験の代替として、網羅的遺伝子発現解析を活用した新規安全性評価法の構築を試みてきた。そして、インフルエンザワクチン接種後 1 日目のラット肺において、安全性の指標となりうるマーカー遺伝子を約 20 同定した。これらマーカー遺伝子については realtime PCR 法による定量を行い、DNA マイクロアレイの結果と高い相関を示す事を明らかにしている (Mizukami et al, Vaccine 26, 2270-2283, 2008)。

本研究では、我々が同定した約 20 のマーカー遺伝子の発現量を同時に測定可能な、QuantiGene Plex 法を導入するための

バリデーションを行った。QuantiGene Plex 法は 1 度に複数遺伝子(最大約 30 遺伝子)の発現量を定量可能であると共に、cDNA への逆転写を必要とせず、種々の要因による試験結果のゆらぎを最小限に留めることができる手法である。QuantiGene Plex 法の導入が可能になれば、データの安定性のみならず、操作の簡略化や試験期間の短縮化につながる事が期待される。

B. 研究方法

1) 動物

8 週齢の F344/N 系統ラット(オス)を SLC より購入し、1 週間以上環境に馴化させた。馴化期間中に体重測定と経過観察を行い、異常を認めなかった個体を解析に用いた。

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与された、インフルエンザ HA ワクチン(HAv)、全粒子不活化ワクチン(WPv、および PDv)である。HAv 及び WPv は A/ New Caledonia/ 20/ 99 (H1N1)株、A/ New York/ 55/ 2004 (H3N2)株及び B/ Shanghai/ 361/ 2002 株の 3 型が混合されている。PDv は A/Vietnam/1194/2005(H5N1)株と NIBRG-14 株にアジュバントとしてアルミニウム塩が添加されたワクチンである。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 をラット腹腔内に接種した。対照には生理食塩水(SA)を用いた。

3) 採材と RNA 抽出

ワクチン接種後、1 日目にジエチルエーテル麻酔下にて肺を採取した。一群 5 匹とした。

ワクチン接種したラットから採取した肺は、速やかに液体窒素中で凍結させ、ISOGEN(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) QuantiGene Plex 法

ワクチン接種ラットの肺から精製した Poly(A)+RNA (20 μ l)は、65 $^{\circ}$ Cで 10 分間処理した後、QuantiGene Plex Reagent System 2.0 (Panomics) 添付の Lysis mixture 33.3 μ l、Blocking reagent 2 μ l、Capture beads 1 μ l、Probe set 5 μ l を加えた。これらを Hybridization plate にて 54 $^{\circ}$ C 18 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 Pre-Amplifier を加えて 50 $^{\circ}$ Cで 1 時間、Amplifier を加えて 50 $^{\circ}$ Cで 1 時間、Label probe を加えて 50 $^{\circ}$ Cで 1 時間、SAPE を加えて室温で 30 分間処理した。最後に 130 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。

(倫理面への配慮)

本研究課題の動物実験計画にあたっては、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、国立感染症研究所内に設置されている動物実験委員会でプロトコルの承認を受けている。

C. 研究結果

1) QuantiGene Plex 法導入のための予備検討

1 本のチューブ内で全ての遺伝子の発現量を定量する QuantiGene Plex 法では、試験結果の正確性を担保するため、全ての遺伝子の発現量(蛍光強度)が Luminex100 の検出限界と定量限界の間にある必要がある。すなわち、試験に使用する RNA 量が結果の正確性を左右する重要な要素となる。そこで、まず予備検討として、測定に使用する RNA 量の検討を行った。

サンプルとしてはマーカー遺伝子の発現量が多い WPv 接種サンプルと、発現量が低い SA 接種サンプルを用いた。1 点当たりに使用する Poly(A)+RNA 量を 0.02~20ng の間で検討したところ、0.2ng ではハウスキーピング遺伝子 Gapdh において検出限界以下(蛍光強度 10 以下)になるサンプルがあることが明らかになった(図 1、WPv 0.2ng)。2~20ng ではハウスキ

ーピング遺伝子 Actb、Gapdh に加え、マーカー遺伝子 B2m、C2 に関してもデータの線形性が認められた(図 1)。

その他のマーカー遺伝子に関する結果を図 2 に示す。0.2ng では検出限界以下のものが散見されるが、2~20ng ではほぼ全ての遺伝子についてデータに線形性が認められることから、Poly(A)+RNA 2~20ng が QuantiGene Plex 法による測定の至適量であると考えられた。

2) DNA マイクロアレイデータとのバリデーション

DNA マイクロアレイ法と QuantiGene Plex 法のバリデーションを行うため、DNA マイクロアレイに使用したものと同等の Poly(A)+RNA を、それぞれのサンプルにおいて準備した。1) で定めた量の Poly(A)+RNA を用いて QuantiGene Plex 法による遺伝子の発現量測定を行い、DNA マイクロアレイのデータ(Mizukami et al, Vaccine 26, 2270-2283, 2008)との比較を行った。その結果、B2m、Cdig2、Ngfr に関しては両試験法間の相関関係は認められなかったものの(図 3 右下、Ngfr については data not shown)、それ以外の遺伝子については高い相関を示す事が明らかとなった(図 3)。

D. 考察

1) QuantiGene Plex 法導入のための予備検討

全ての遺伝子の正確な発現定量解析が可能となるような Poly(A)+RNA 量の検討を行ったところ、1 点あたり 2~20ng で試験を実施するのが妥当であると考えられた。遺伝子発現定量に汎用される realtime PCR 法では、1 点当たりの Poly(A)+RNA 量が 10ng 程度であり、感度も従来法である realtime PCR 法と遜色ないと考えられる。

今回の予備検討で Poly(A)+RNA を用いたのは、DNA マイクロアレイデータとのバリデーションのためであるが、実際の試験では total RNA を使用することの方が多し。Poly(A)+RNA 量の存在比率から勘案し、QuantiGene Plex 法に total RNA を使用する場合は、Poly(A)+RNA の 50 倍量(1 点あたり 0.1~1 μ g)が相当ではないかと考えられる。Total RNA 使用時には感度が realtime PCR 法よりやや劣るかもしれないが、1 回でほぼ全ての遺伝子の発現量を定量できることを考えると、必要サンプル量自体は抑えることができ、QuantiGene Plex 法導入のメリットは大きい。

2) DNA マイクロアレイデータとのバリデーション

検討した 19 遺伝子のうち B2m、Cdig2、Ngfr を除く 16 遺伝子については、概ね DNA マイクロアレイデータとの相関が認められた。ただし、発現量の低い SA、及び HAv 接種サンプルにおいては、やや DNA マイクロアレイデータとの乖離傾向

も認めるため、発現量の低い接種サンプルについては更なるバリデーションが必要である。

QuantiGene Plex 法は目的とする複数遺伝子の発現を同時に定量する技術であるので、多くの遺伝子の平均値を中心に測定域を絞る必要がある。今回、幾つかの遺伝子はその測定域を超えていたため、高い相関が認められなかった。抗体遺伝子や MHC 遺伝子(B2m)、その他遺伝子(Cd122、Ngfr)で、DNA マイクロアレイデータとの相関が見られなかったものについては、マーカー遺伝子リストから外しても問題ないか、個別に realtime PCR 法によって定量すべきか、今後の検討課題である。

E. 結論

遺伝子発現解析の簡便化・迅速化を目指し、QuantiGene Plex 法導入のためのバリデーションを行った。まず、測定に用いる Poly(A)+RNA の至適量の予備検討を行い、2~20ng が適当量であることを明らかにした。次に、DNA マイクロアレイ法と QuantiGene Plex 法のバリデーションを行い、我々が同定した約 20 のマーカー遺伝子の発現変動が、両試験間で概ね高い相関を示すことを明らかとした。遺伝子発現解析を活用したインフルエンザワクチンの品質管理へ、QuantiGene Plex 法を導入できる可能性は高いと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Momose H, Imai J-I, Hamaguchi I, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Masumi A, Maeyama J-I, Takizawa K, Kuramitsu M, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Induction of Indistinguishable Gene Expression Patterns in Rats by Vero-Cell Derived and Mouse Brain-Derived Japanese Encephalitis Vaccines.

Japanese Journal of Infectious Diseases 63:25-30, 2010.

2) Ikeno D, Kimachi K, Kudo Y, Goto S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains.

Vaccine 27: 3121-3125, 2009.

2. 学会発表

1) 百瀬暖佳、水上拓郎、内藤誠之郎、前山順一、益見厚子、倉光 球、滝沢和也、浜口 功: 遺伝子発現解析を用いた新たなワクチン安全性評価法構築への試み

第 13 回日本ワクチン学会学術集会
2009 年 9 月 26-27 日 札幌 (プログラム・抄録集 p166)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|--------|
| 1. 特許取得 | なし |
| なし | 3. その他 |
| 2. 実用新案登録 | なし |

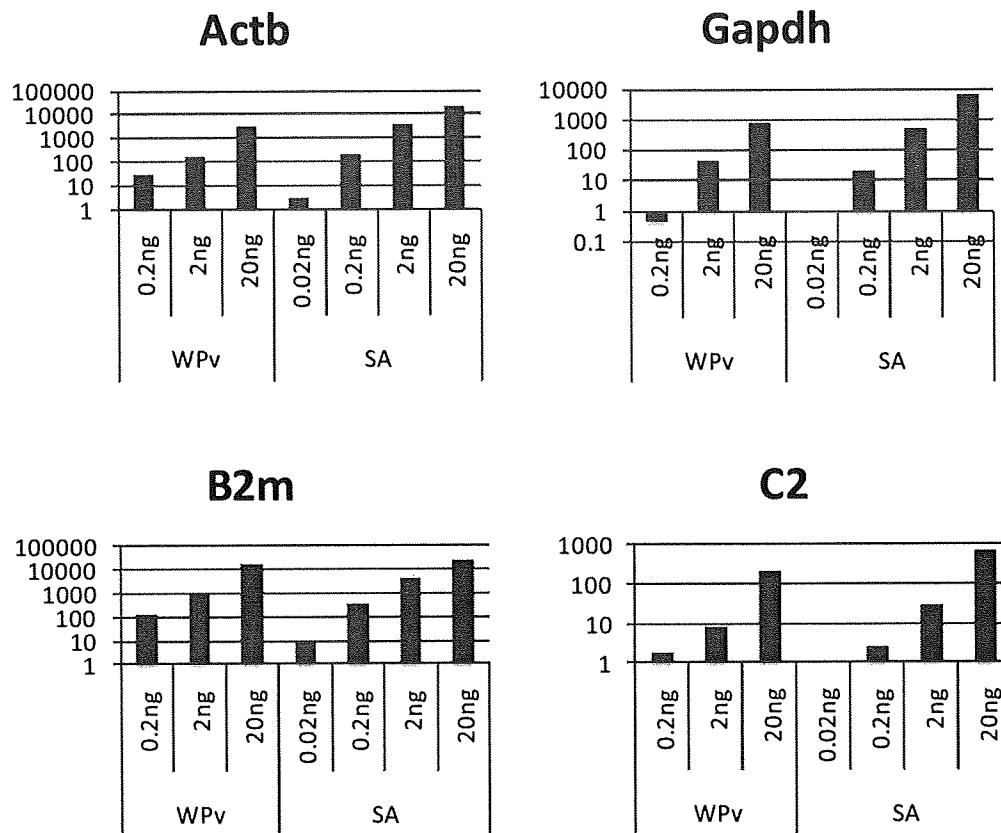


図 1. QuantiGene Plex 法による遺伝子発現量測定の予備検討 1

QuantiGene Plex 法による発現定量の予備検討として、至適な Poly(A)+RNA 量の検討を行った。Gapdh において、WPv 接種サンプルの 0.2ng では検出限界以下であった。2~20ng の poly(A)+RNA を用いた場合にはハウスキーピング遺伝子 Actb、Gapdh に加え、マーカー遺伝子である B2m や C2 も定量可能な範囲内に入り、データの線形性も認められた。

SA;生理食塩水接種群、WPv; 全粒子ワクチン接種群

グラフ縦軸は Luminex100 における蛍光強度(発現量に相当)

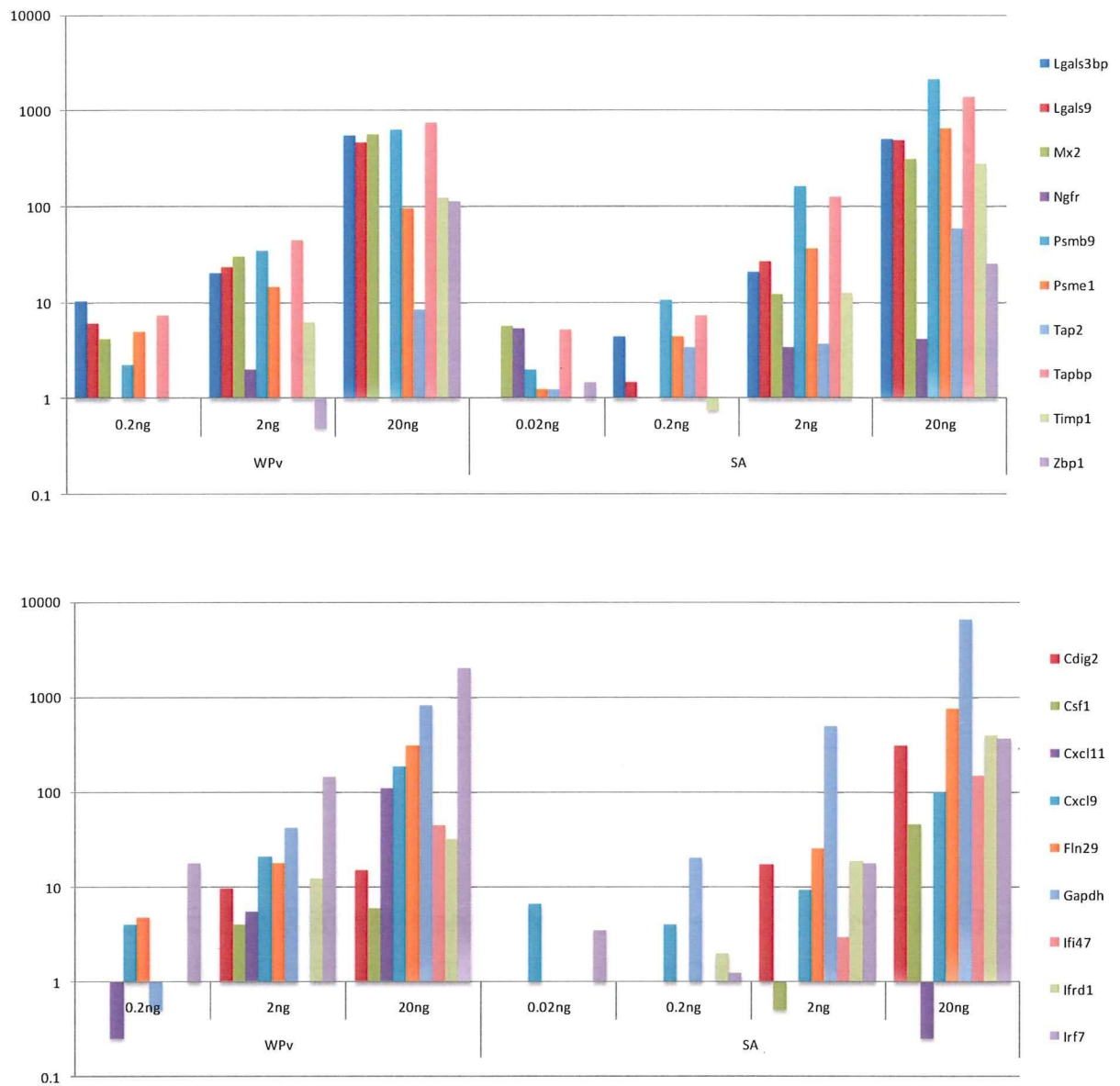


図 2. QuantiGene Plex 法による遺伝子発現量測定の予備検討 2

18 のマーカー遺伝子における Poly(A)+RNA 至適量検討の結果を示す。2~20ng の Poly(A)+RNA を用いて測定した場合に、おおむね Luminex100 の定量可能範囲内(蛍光強度として 10~10,000 程度)に入り、データの線形性も認められることが明らかとなった。

SA;生理食塩水接種群、WPv; 全粒子ワクチン接種群

グラフ縦軸は Luminex100 における蛍光強度(発現量に相当)

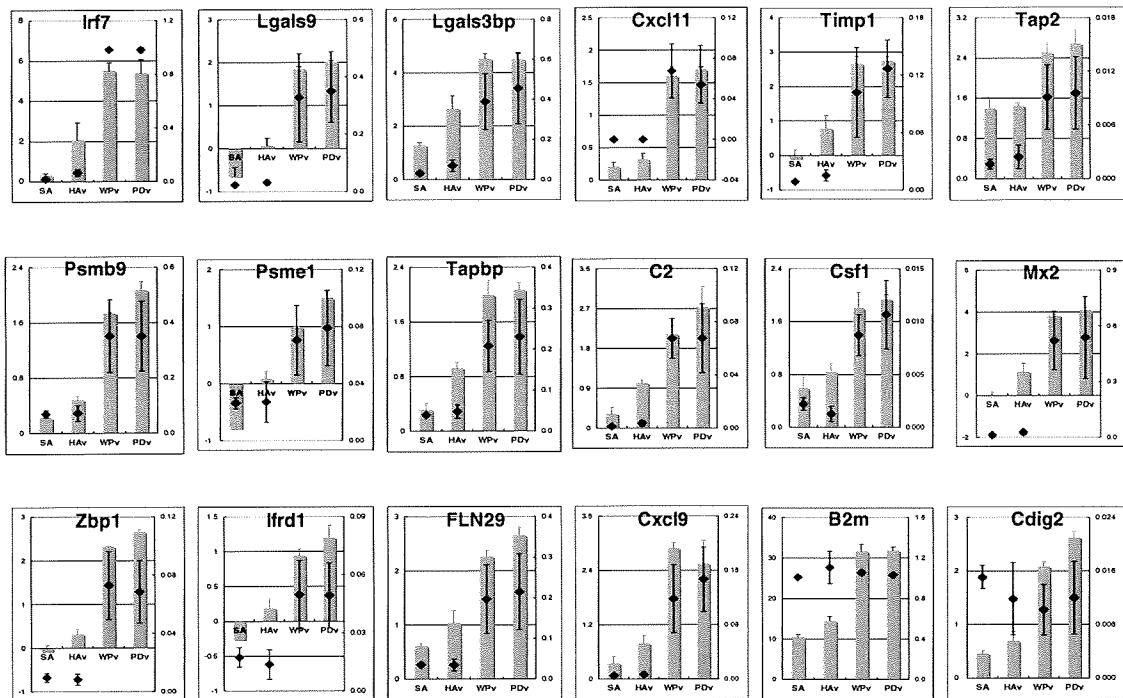


図 3. DNA マイクロアレイと QuantiGene Plex 法のバリデーション

DNA マイクロアレイと QuantiGene Plex 法によって得られたデータの違いがないか検討した。QuantiGene Plex 法による発現定量の結果は、DNA マイクロアレイの結果とおおむね高い相関を認めたが、B2m、Cdig2、Ngfr (data not shown) については相関が見られなかった。

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; アジュバント添加全粒子ワクチン接種群

DNA マイクロアレイ法：シンボル、グラフ左縦軸(relative log₂ ratios)

水上らの報告参照(Vaccine 26, 2270-2283, 2008)

QuantiGene Plex 法：棒グラフ、グラフ右縦軸 (β-actin に対する相対発現量)

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

インフルエンザ HA ワクチンの品質管理に対する
遺伝子発現解析の適応可能性に関する研究

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長
研究分担者 大隈 和 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長
研究協力者 水上拓郎 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究要旨

インフルエンザワクチンは毎年株決定が行われた後、冬シーズンに間に合うように製造が開始される。短期間のうちに製造および品質管理試験を終える必要性から、迅速な安全性試験法の開発が望まれる。これまでに我々は、種々のワクチンの新規安全性試験法の検討を行う中で、網羅的遺伝子発現解析を用いた品質管理について提案してきた。全粒子インフルエンザワクチンについては、その毒性を評価しうる約 20 のマーカー遺伝子の同定にも成功している。本研究では、これらマーカー遺伝子のセットが、インフルエンザ HA ワクチンの品質管理にも適応可能かどうかについて検討を行った。検討の結果、従来試験法である異常毒性否定試験とよく相関し、HA ワクチンの品質管理法として適応できる可能性が高いことが明らかとなった。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは 38°C以上の発熱、頭痛、関節痛、筋肉痛などの全身症状を引き起こすウイルスである。ウイルス表面に発現している赤血球凝集素 (HA: Haemagglutinin) と、増殖に必須なノイラミニダーゼ (NA: Neuraminidase) という 2 つの糖タンパク質が変異することにより、

毎年流行を繰り返す。故に、毎年国際機関によりその年度のワクチン株が決定され、冬シーズンに向けてインフルエンザワクチンが製造されている。

現在、インフルエンザ HA ワクチンの品質管理として、生物学的製剤基準には原液と小分製品に様々な試験が設定されている。国家検定としては、異常毒性否定試験

やマウス白血球数減少試験等の安全性試験を実施している。これまでに我々は、これら安全性試験に代替する試験法として、DNA マイクロアレイを用いたワクチン接種ラット肺の網羅的遺伝子解析を行い、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を試みてきた(Mizukami et al, Vaccine 26, 2270-2283, 2008)。そして、全粒子型のインフルエンザワクチンの毒性に応答するマーカー遺伝子も同定している。しかし DNA マイクロアレイ法では接種してから RNA の精製、cDNA の合成、ハイブリダイゼーション、測定と、標準化を行うにあたって多くの課題があり、検定の高度迅速化には向いていない。そこでわれわれは DNA マイクロアレイ法で同定したマーカー遺伝子について、組織から抽出した RNA のみで複数遺伝子を同時測定する QuantiGene Plex 法を導入し、マーカー遺伝子の同時測定が可能である事を明らかにした(百瀬らの項を参照)。そこで、本研究では、現在広く使用されているインフルエンザ HA ワクチンの品質管理に、このマーカー遺伝子のセットが適応可能かどうかを QuantiGene Plex 法を用いて検討を行った。

B. 研究方法

1) 動物

8 週齢の F344/N 系統ラット(オス)を SLC より購入し、1 週間以上環境に馴化させた。馴化期間中に体重測定と経過観察を

行い、異常を認めなかった個体を解析に用いた。

2) ワクチン

国内メーカー4社が製造したインフルエンザ HA ワクチン(A/ Solomon Islands/ 3/ 2006 (H1N1)株、A/ Hiroshima/ 52/ 2005 (H3N2)株及び B/ Malaysia/ 2506/ 2004 株の 3 型混合)をそれぞれ購入し、本研究課題に用いた。また、(財団法人)化学及血清療法研究所より供与された 2 種類の全粒子不活化ワクチン WPv と PD (WPv; A/New Caledonia/ 20/ 99 (H1N1)株、A/ New York/ 55/ 2004 (H3N2)株及び B/ Shanghai/ 361/ 2002 株の 3 型混合、PD; A/ Vietnam/ 1194/ 2005 (H5N1)株と NIBRG-14 株にアジュバントとしてアルミニウム塩が添加)を毒性参照品として用いた。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 をラット腹腔内に投与した。対照には生理食塩水(SA)を用いた。

3) 体重測定と採材

ワクチン接種前、およびワクチン接種後 1 日目に体重測定を行った。1 日目の体重測定後に、ジエチルエーテル麻酔下にて肺を採取した。一群 2 匹とした。

4) RNA 抽出

ワクチン接種したラットから採取した肺は、速やかに液体窒素中で凍結させ、

ISOGEN(Nippon Gene)中で破碎した。
Total RNA は定法にしたがって抽出した。

5) QuantiGene Plex 法

ワクチン接種ラットの肺から精製した total RNA (20 μ l)は、65 $^{\circ}$ Cで 10 分間処理した後、QuantiGene Plex Reagent System 2.0 (Panomics) 添付の Lysis mixture 33.3 μ l、Blocking reagent 2 μ l、Capture beads 1 μ l、Probe set 5 μ l を加えた。これらを Hybridization plate にて 54 $^{\circ}$ C 18 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 Pre-Amplifier を加えて 50 $^{\circ}$ Cで 1 時間、Amplifier を加えて 50 $^{\circ}$ Cで 1 時間、Label probe を加えて 50 $^{\circ}$ Cで 1 時間、SAPE を加えて室温で 30 分間処理した。最後に 130 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。各々の遺伝子発現量は β -actin に対する相対発現量として算出した。

(倫理面への配慮)

本研究課題の動物実験計画にあたっては、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、国立感染症研究所内に設置されている動物実験委員会

で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ラットは認められず、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。各インフルエンザワクチン、及び SA 接種後 1 日目の体重変化を調べた結果、毒性参照品(PD、WPv)と HA ワクチン接種群は明らかに異なる体重減少率を示した(P<0.05、図 4)。

2) マーカー遺伝子の発現定量解析

遺伝子発現変動によりワクチンの品質管理を行うためには、高品質なワクチンを接種された場合の遺伝子の発現変動を確かめておく必要がある(母集団作製)。そこで、国家検定に合格し、広く市販されているインフルエンザ HA ワクチンを接種したラット肺における遺伝子の発現変動を測定した。毒性参照品 (WPv) を標準品 (Standard) とした時の相対発現量指数 (REP; Relative expression profiles) を算出したところ、マーカー遺伝子の発現パターンは下記の 3 群に分かれることが明らかとなった。すなわち、REP が 10% を超えない Grade1 遺伝子群-Cxcl11、Cxcl9、Zbp1、Mx2、Ifr7、Lgals9(図 5)、REP が 10~20%

の Grade2 遺伝子群-Irf1、Tapbp、Csf1、Timp1、Fln29、Lgals3bp、Psmc9-(図 6)、REP が 20~50%の Grade3 遺伝子群-C2、Tap2、Irf1、Psmc1-(図 7)である。各々の grade の遺伝子群での発現変動率を基に、仮の母集団を作製した。

3) 従来法である異常毒性否定試験と遺伝子発現解析の相関

1)のワクチン接種と体重減少のデータから、B 社ワクチン接種群では、他の HA ワクチン接種群と比較して、体重変動率に有意な差が認められた(図 4、 $P=0.0338$)。そこで、この僅少な体重変動の差が遺伝子発現変動に反映されているか、検討を行った。2)の検討結果(図 5~7)から PD 接種群と WPv 接種群を除外し、グラフを描き直したものが図 8 である。その結果、SA 接種群での発現量がある程度高い遺伝子に関しては、B 社 HA ワクチン接種群において遺伝子の発現亢進が認められ(図 8、矢印)、従来法である異常毒性否定試験と相関があることが示唆された。

D. 考察

1) 異常毒性否定試験

F344/N 系統オスラットを用いた異常毒性否定試験の結果、毒性参照品である全粒子ワクチン(WPv および PD)は接種後 1 日目に有意な体重減少を認め、これらは HA ワクチン接種群とは明らかに異なっていた($P<0.05$)。ただし、WPv 接種群と PD 接

接種群間に有意差はなかった。2)で行った遺伝子発現解析の結果でも、WPv 接種群と PD 接種群間で肺組織を用いた遺伝子発現解析のレベルでは有意差は認められないことから、アジュバントとして PD に添加されているアルミニウム塩は、ラットに対して著明な体重減少毒性、肺組織での遺伝子発現変化を示さない可能性が示唆された。

2) マーカー遺伝子の発現定量解析

国家検定に合格し、広く使用された実績のある HA ワクチンを用い、ラット肺における遺伝子発現解析を行った。そして、高品質なワクチン接種時の遺伝子発現変動率のデータを収集し、仮の母集団データとした。現在の仮の母集団は 4 ロット 8 匹のデータを基にしているが、今後はロット数、匹数ともに増やすことが望ましい。また、株の異なる HA ワクチンについてもデータ収集を行い、統計解析を行う上で信頼性の高い母集団を作製していきたいと考えている。

3) 異常毒性否定試験と遺伝子発現解析の相関

1)の HA ワクチンの異常毒性否定試験では、接種後 1 日目の体重減少率について検討を行った。HA ワクチン接種群間での統計処理の結果、有意に体重減少を認めるサンプルを認めた(図 4、矢印)。この差は、遺伝子発現解析によっても忠実に再現さ

れ(図 8)、従来法と遺伝子発現解析法の高に高い相関を認めることが示唆された。本研究課題で認められた体重減少は、現行の異常毒性否定試験では母集団の範囲内であるため安全上問題はないが、このような微量な変化もマーカー遺伝子の発現変動によって検出できる事が示唆され、我々の同定したマーカー遺伝子群と QuantiGene Plex 法が非常に高感度であることが示された。

インフルエンザHAワクチンについては毎年株が変更されるため、マーカー遺伝子同定の際に使用したワクチンと本研究に用いたHAワクチンでは、株が異なっている。しかしながら、本研究に用いたHAワクチンでも、従来法とよく相関した遺伝子発現変動を示したことから、株変更がなされても試験への影響はあまり大きくない可能性が示唆される。来年度以降は各年度のインフルエンザHAワクチンを用意して同様の検討を行い、試験に対する株変更の影響について、更なる検討を進める予定である。

E. 結論

インフルエンザ HA ワクチンの新規品質管理法としての、遺伝子発現解析法の適応可能性について検討した。その結果、我々が同定したマーカー遺伝子の発現変動は、従来試験法である異常毒性否定試験と同等、あるいはそれ以上の感度を示し、インフルエンザ HA ワクチンの新規

試験法として適応できる可能性が高いことが示された。インフルエンザ HA ワクチンは毎年株が変更されるが、株変更が遺伝子発現解析法に基づく試験に影響を与える可能性はあまり大きくはない可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Momose H, Imai J-I, Hamaguchi I, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Masumi A, Maeyama J-I, Takizawa K, Kuramitsu M, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Induction of Indistinguishable Gene Expression Patterns in Rats by Vero-Cell Derived and Mouse Brain-Derived Japanese Encephalitis Vaccines.

Japanese Journal of Infectious Diseases 63:25-30, 2010.

2. 学会発表

1) 百瀬暖佳、水上拓郎、内藤誠之郎、前山順一、益見厚子、倉光 球、滝沢和也、浜口 功: 遺伝子発現解析を用いた新たなワクチン安全性評価法構築への試み

第 13 回日本ワクチン学会学術集会 2009 年 9 月 26-27 日 札幌 (プログラム・抄録

集 p166)

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

3. その他

なし

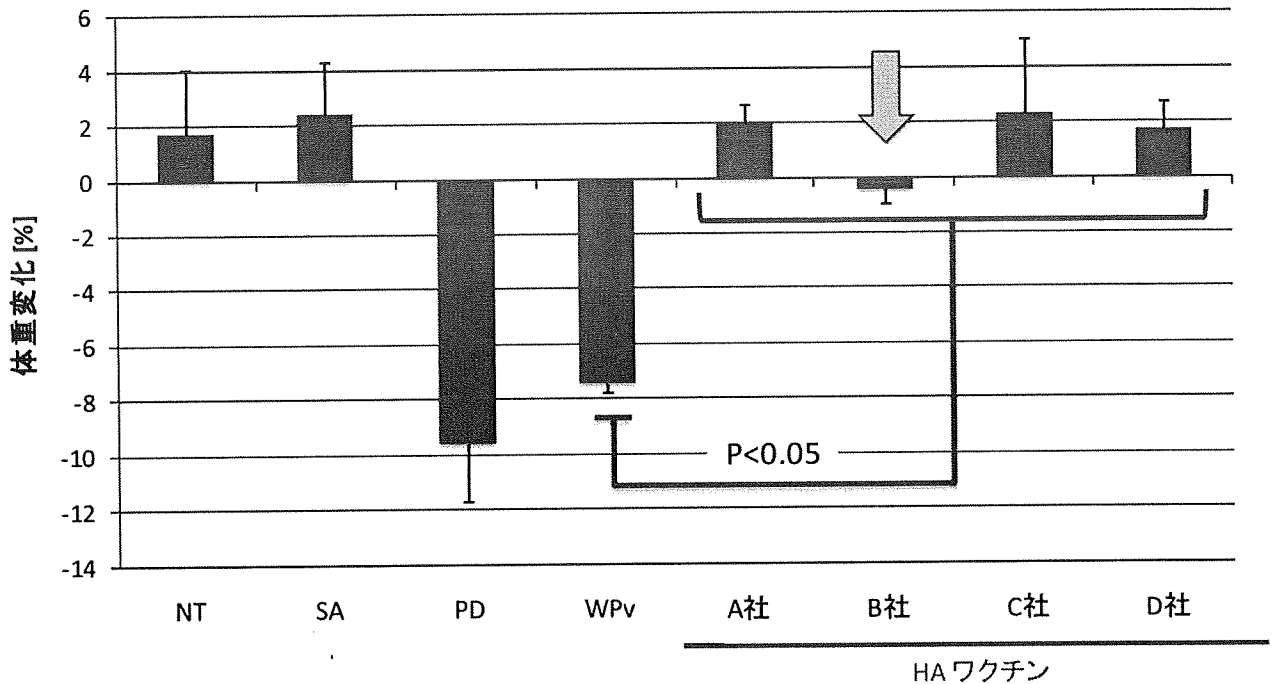


図 4. インフルエンザワクチン接種ラットの体重変化

全粒子ワクチン (WPv、PD) 接種後 1 日目にラットの体重は約 8% 減少した。その体重減少率は HA ワクチン接種群とは明らかに異なっていたが ($P < 0.05$)、WPv 接種群と PD 接種群間に有意差は見出されなかった。また、HA ワクチン接種群内において、体重変化率に有意な差を示すサンプルを認めた (矢印、 $P = 0.0338$)。

NT; 無処置群、SA; 生理食塩水接種群、PD; アジュバント添加全粒子ワクチン接種群、WPv; 全粒子ワクチン接種群