

201034015A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 百瀬暖佳
平成23（2011）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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 百瀬暖佳
平成23（2011）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)

阿戸 学 (国立感染症研究所・免疫部)

研究協力者

倉光 球 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

滝澤和也 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

益見厚子 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

荒木久美子 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

古畑啓子 (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)

大塚菜緒 (国立感染症研究所・細菌第二部)

久保田眞由美 (国立感染症研究所・細菌第二部)

鯨坂裕美 (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)

高橋宜聖 (国立感染症研究所・免疫部)

小林和夫 (国立感染症研究所・免疫部)

甲斐 光 (デンカ生研株式会社)

佐藤 靖 (デンカ生研株式会社)

山口 保 (デンカ生研株式会社)

渡辺隆雄 (学校法人 北里研究所)

浦山重信 (学校法人 北里研究所)

福家 功 (一般財団法人 阪大微生物病研究会)

藤田順二 (一般財団法人 阪大微生物病研究会)

尾堂浩一 (一般財団法人 化学及血清療法研究所)

徳永英治 (一般財団法人 化学及血清療法研究所)

目次

I. 総括研究報告

1. インフルエンザワクチンに対する新規安全性試験と従来法との整合性と感度比較に関する研究 ————— 4
百瀬暖佳、板村繁之
- 図 1: インフルエンザワクチン接種に伴うラットの生体変化 ————— 9
- 図 2: 毒性参照品接種に伴うマーカー遺伝子の発現変動 ————— 10
- 図 3: 高濃度 HA 原液接種に伴うマーカー遺伝子の発現変動 ————— 11
- 図 4: マーカー遺伝子の発現パターンを基にしたクラスター解析 ————— 12

II. 分担研究報告

1. インフルエンザワクチンに対する新規安全性試験法のバリデーションに関する研究—13
百瀬暖佳、浜口功
- 図 5: realtimePCR 法と QGP 法のバリデーション ————— 17
- 表 1: 各試験法間の回帰係数 ————— 19
2. マウスを用いたインフルエンザワクチンの新規安全性試験に関する研究 ————— 20
百瀬暖佳
- 図 6: 毒性参照品、および高濃度 HA 原液接種に伴うマーカー遺伝子の発現変動 ————— 24
- 図 7: マーカー遺伝子の発現パターンを基にしたクラスター解析 ————— 25
3. 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 ————— 26
持田恵子
- 表 2: 使用したワクチン株の表記法 ————— 29
- 図 8: ワクチン高濃度原液の LP 活性の感染研と製造所との比較 ————— 30
- 図 9: A 社における 3 回の繰り返し試験成績 ————— 30
- 図 10: B 社における 3 回の繰り返し試験成績 ————— 31
- 図 11: C 社における 3 回の繰り返し試験成績 ————— 31
- 図 12: D 社における 3 回の繰り返し試験成績 ————— 32
- 図 13: 毒性参照品の力価と生理食塩水投与マウスの白血球数の割合(%)との関係 ————— 32
4. インフルエンザワクチンによる白血球減少のメカニズムに関する研究 ————— 33
阿戸 学
- 図 14: 全粒子ワクチンおよび百日咳毒素接種後の C57BL/6 マウス末梢血 10 μ l 中の総白血球数 ————— 37
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 38
- IV. 研究成果の別刷 ————— 39

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に対する新規安全性試験と従来法との整合性と
感度比較に関する研究**

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 17 のマーカー遺伝子を同定している。本研究では、我々が検討してきた遺伝子発現解析を用いた新規安全性試験法の構築に向け、様々な検体を用いて遺伝子発現解析試験法と従来法との整合性の検討を行った。また、遺伝子発現解析試験法の試験感度に関する検討を行った。

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
持田恵子 国立感染症研究所・
細菌第二部・主任研究官
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
阿戸 学 国立感染症研究所・
免疫部・室長

研究協力者

甲斐 光 デンカ生研株式会社
佐藤 靖 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 一般財団法人
阪大微生物病研究会
尾堂浩一 一般財団法人
化学及血清療法研究所

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。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17遺伝子同定した。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、さまざまな検体を接種したラット肺におけるマーカー遺伝子の発現解析を行い、従来試験法との整合性、試験感度について比較検討した。

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、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

本研究課題では、インフルエンザワクチンのマウス白血球数減少試験用の毒性参照品を、全粒子ワクチン相当品として用いた。高濃度 HA 原液は A/Brisbane/59/2007 (H1N1)株、A/Uruguay/716/2007 (H3N2)株及び B/Brisbane/60/2008 株の3型が混合されており、国内メーカー4社より提供されたものである。毒性参照品、高濃度 HA 原液、およびその段階希釈液を、各 5mL 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) 血液学的検査

ワクチン接種後、1日目にジエチルエーテル麻酔下で心臓より採血を行った。採取した血液は速やかに 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-6450 を用い、白血球数と血小板数の計測を行った。

4) 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3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。定法に従って total RNA を抽出した。

5) realtime PCR 法

ワクチン接種ラットの肺から精製した total RNA(5 µg) にオリゴdT 1µlを加え、70°Cで10分処理した後、氷上に10分静置した。その後、First-strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)添付のreaction mixture 5µl、DTT 1µl、RNase inhibitor 1µl、AMV reverse transcriptase 1µlを加えて40°Cで60分処理し、cDNAを合成した。合成したcDNA(1µl)に10µlのFast SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems)と0.8µlのプライマーペアを加え、7500 Fast Realtime PCR system (Applied Biosystems)にてPCR反応を行うと共に蛍光強度を測定した。発現解析はβ-actinに対する相対定量を行った。

(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) 従来法による安全性試験

毒性参照品、および高濃度 HA 原液をラットに接種し、1日目の体重、末梢白血球数、末梢血小板数の測定を行った。

体重推移では、毒性参照品接種に伴い濃度依存的な体重減少活性が認められた。一方、高濃度 HA 原液では、生理食塩水接種群と比較して有意に減少する検体が認められたが(図1 上段、*印)、いずれも濃度依存性はなく、また同濃度の高濃度 HA 原液接種群と比較すると有意差は認められなかった。

末梢白血球数でも、毒性参照品を接種した場合は濃度依存的な白血球数の減少活性が認められた。一方、高濃度 HA 原液では、一部に生理食塩水接種群と比較して有意に減少する検体が認められたが、いずれも濃度依存性はなく、毒性参照品(0.25U/mL)とは有意差がなかった(図1 中段)。末梢血小板数に関しても、白血球数と同様の結果であった(図1 下段)。

2) 遺伝子発現解析法による安全性試験

昨年度研究(百瀬らの項)において、マーカー遺伝子の発現解析における DNA マイクロアレイ法と QuantiGene Plex 法のバリデーションが行われた。QGP 法が導入できる可能性が示唆されたが、発現量や発現変動の低いサンプルに関しては更なるバリデーションが必要と結論づけている。今回解析に用いたサンプルはマーカー遺伝子の発現量、発現変動が低いこ

とが予想されるサンプルが含まれていたため、遺伝子発現解析は realtime PCR 法により行った。

毒性参照品を接種されたラット肺では、いずれのマーカー遺伝子においても濃度依存的な発現の上昇が認められた。さらに、多くの遺伝子において、0.25U/mL 接種の場合でも生理食塩水と比較して有意な発現量の差が認められた(図 2)。

高濃度 HA 原液を接種されたラット肺においては、発現変動を示さない遺伝子も見られたが、おおむね濃度依存的な発現上昇を認めた(図 3)。

全マーカー遺伝子の発現パターンの類似性からクラスター解析を行ったところ、3 つのクラスターが形成された(図 4)。1 つ目は毒性参照品(0.5U/mL, 1U/mL)接種群、2 つ目は毒性参照品(0.25U/mL)と高濃度 HA 原液(2 倍、4 倍濃度の一部)接種群、3 つ目は高濃度 HA 原液(1 倍濃度と、2 倍、4 倍濃度の一部)と生理食塩水接種群であった。

D. 考察

1) 従来法による安全性試験

従来の生体反応を指標とした安全性試験を用いた場合、反応性の強い毒性参照品では比較的個体差も少なく、有意な活性を検出することが可能であった。一方、高濃度 HA 原液では個体差が大きく、最終小分け製品の 4 倍のタンパク質濃度に調整したものでも有意な活性を検出することが困難であった。

近年、ワクチンの品質管理は個々のロットの安全性に加え、トレンド解析が重要視されてきている。今回の結果はラットを用いた解析であり、実際の安全性試験とは動物種が異なるという点はあるが、より信頼性の高いトレンド解析を行うためには従来法の改良が望ましいと考えられた。

2) 遺伝子発現解析法による安全性試験

毒性参照品を用いた解析から、体重減少活性、白血球数減少活性が強いものほどマーカー遺伝子の発現も上昇することが示唆され、従来法と新規試験法との間での整合性が確認された。また、0.25U/mL 接種群でも生理食塩水接種群と比較して有意な発現量の差を認める遺伝子が多かった。1)の従来試験法でも 0.25U/mL 接種群は生理食塩水接種群とは異なる生体反応を示していることから、両試験の相関性ならびに感度のより詳細な検討には、さらに低濃度の毒性参照品を用いて比較検討する必要性も考えられた。

高濃度 HA 原液を用いた解析では、従来法同様に発現変動のない遺伝子も認められた(図 3 : Psme1, Lgals3bp, Ifrd1, C2)。その他の遺伝子では発現変動率や検体による差はあるものの、濃度依存的な発現上昇が認められた。全マーカー遺伝子の発現パターン解析においても、一部の 2 倍濃度、4 倍濃度の高濃度 HA 原液接種群は、1 倍濃度の高濃度 HA 原液、生理食塩水接種群とは異なるクラスターに分類された。これらは、1)で白血球数、および

血小板数を測定した際、有意差はないものの減少傾向が認められた検体であり、従来法では有意な差として捉えきれなかった生体反応を検出できた可能性が考えられる。また、従来法と比較して、遺伝子発現解析はいずれの検体を接種された場合でも個体差が比較的少なく、データが安定していることが示唆された。

E. 結論

遺伝子発現解析試験法は高感度であり、微細な生体変化を感知できる可能性が示唆された。ワクチンの安全性試験に遺伝子発現解析を適応することによって、より信頼性の高いトレンド解析が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Momose H, Mizukami T, Ochiai M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A method for

evaluation of vaccine safety based on comprehensive gene expression analysis.

Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010:361841(7p), 2010.

2. 学会発表

1) 百瀬暖佳、水上拓郎、倉光 球、益見厚子、滝澤和也、前山順一、浜口 功: 遺伝子発現解析を応用したインフルエンザ HA ワクチンの新たな安全性評価法構築へ向けた試み

第 14 回日本ワクチン学会学術集会
2010 年 12 月 11-12 日 東京 (プログラム・抄録集 p117)

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

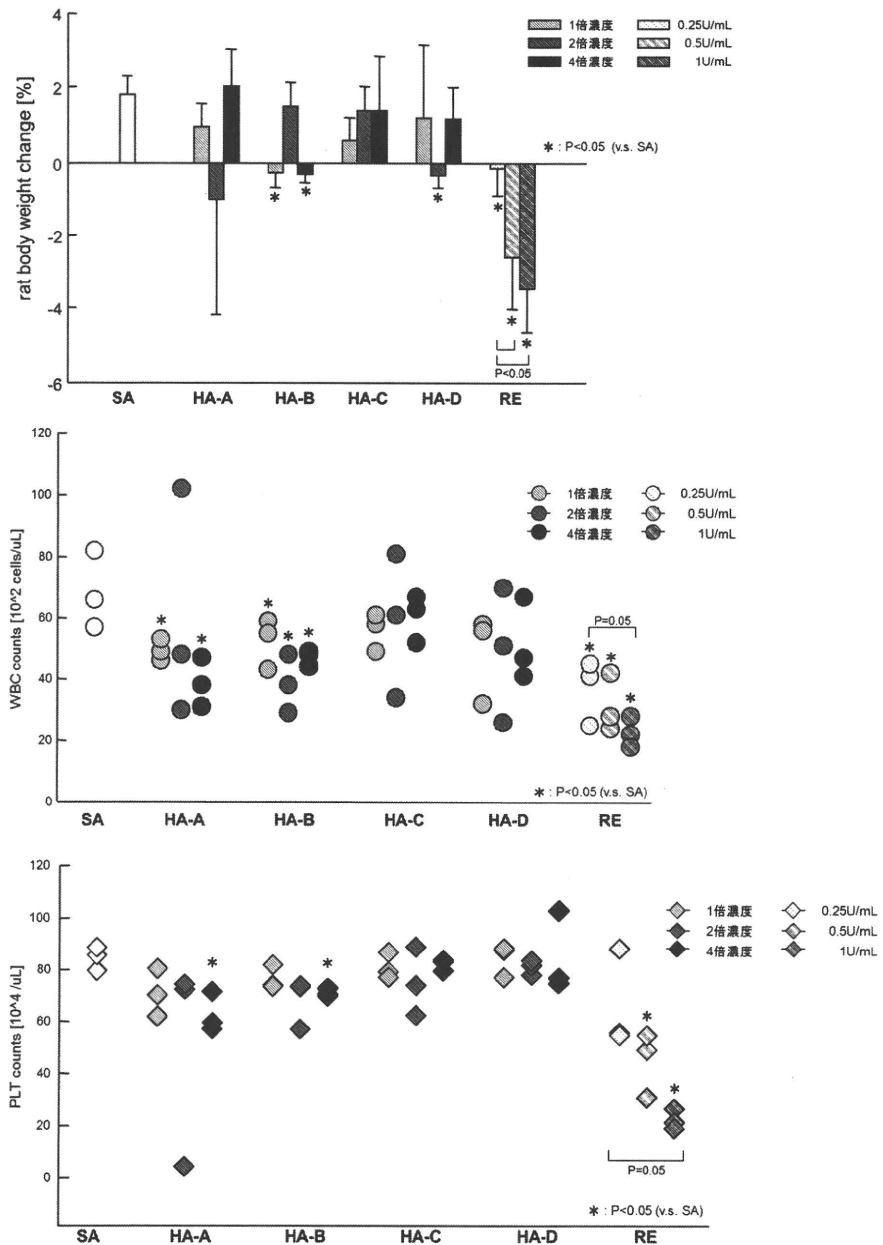


図 1. インフルエンザワクチン接種に伴うラットの生体変化

従来試験法での感度を検討するため、毒性参照品、および高濃度 HA 原液接種ラットの体重変動(上)、末梢白血球数(中)、末梢血小板数(下)を測定した。全ての高濃度 HA 原液接種群において、毒性参照品(0.25U/mL)接種群との有意差は見出されなかった。

SA; 生理食塩水接種群、HA-A~D;高濃度 HA 原液接種群(4 ロット)、RE; マウス白血球数減少試験用毒性参照品接種群

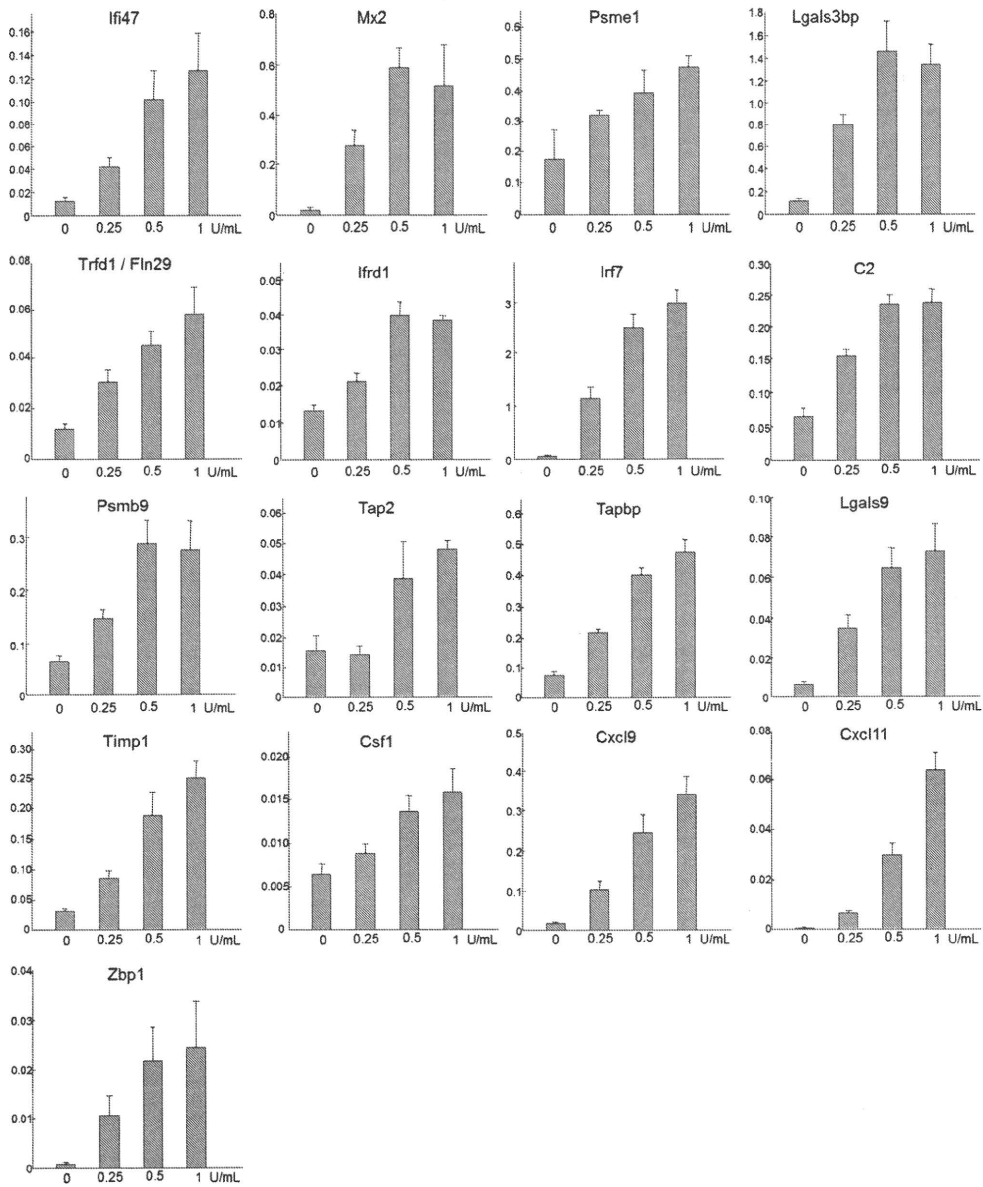


図 2. 毒性参照品接種に伴うマーカー遺伝子の発現変動

従来試験法との比較検討を行うため、毒性参照品の段階希釈品を接種したラット肺におけるマーカー遺伝子の発現量を測定した。各遺伝子の発現量(縦軸)は、 β -actin に対する相対定量で示した。

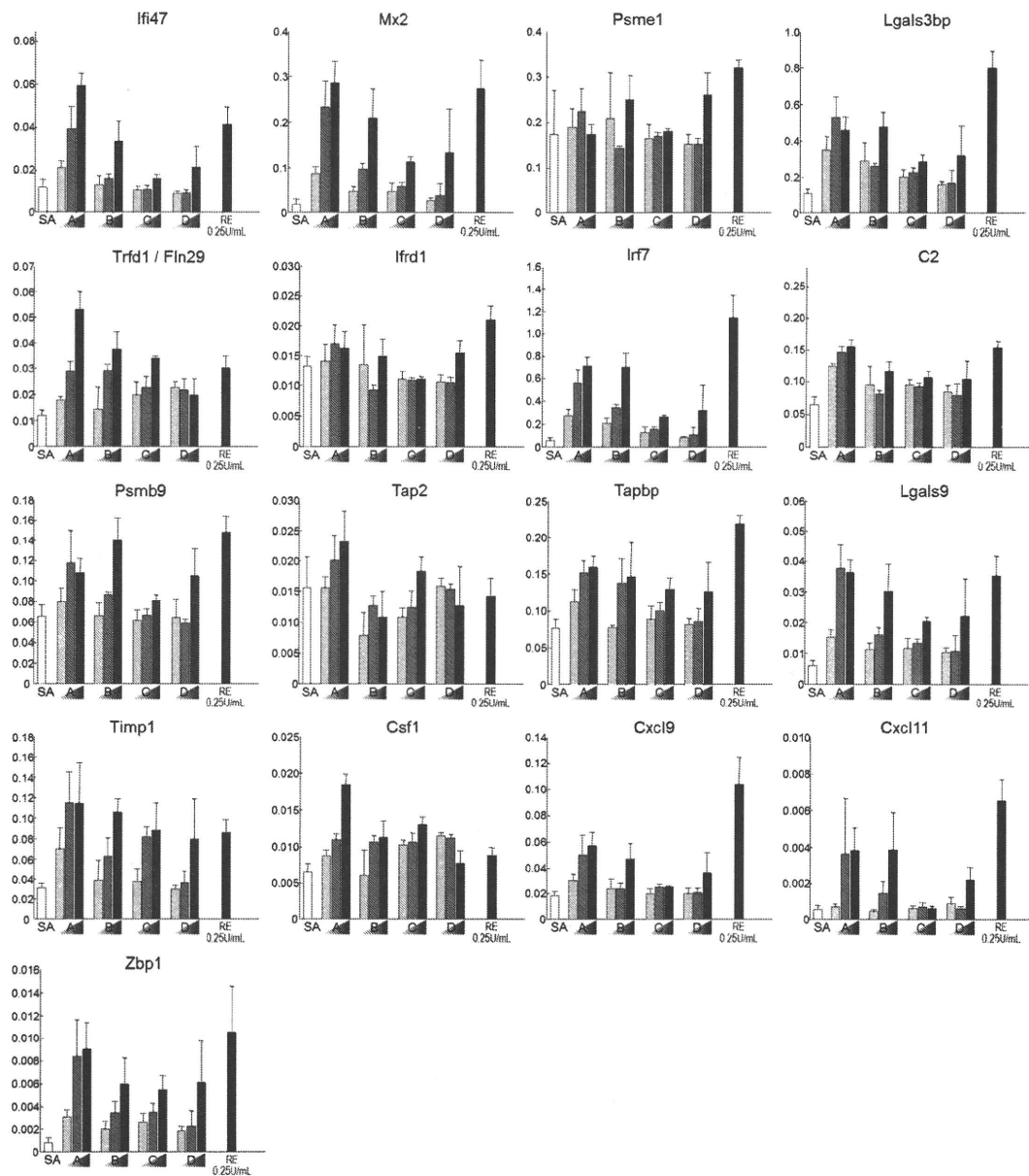


図 3. 高濃度 HA 原液接種に伴うマーカー遺伝子の発現変動

従来試験法との比較検討を行うため、高濃度 HA 原液を最終小分け製品相当の 1, 2, 4 倍濃度となるように調整し、これらを接種したラット肺におけるマーカー遺伝子の発現量を測定した。各遺伝子の発現量(縦軸)は、 β -actin に対する相対定量で示した。

SA; 生理食塩水接種群、A~D;高濃度 HA 原液接種群(4 ロット)。各群 左から最終小分け製品の 1 倍濃度、2 倍濃度、4 倍濃度の検体を接種、RE; マウス白血球数減少試験用毒性参照品(0.25U/mL)接種群

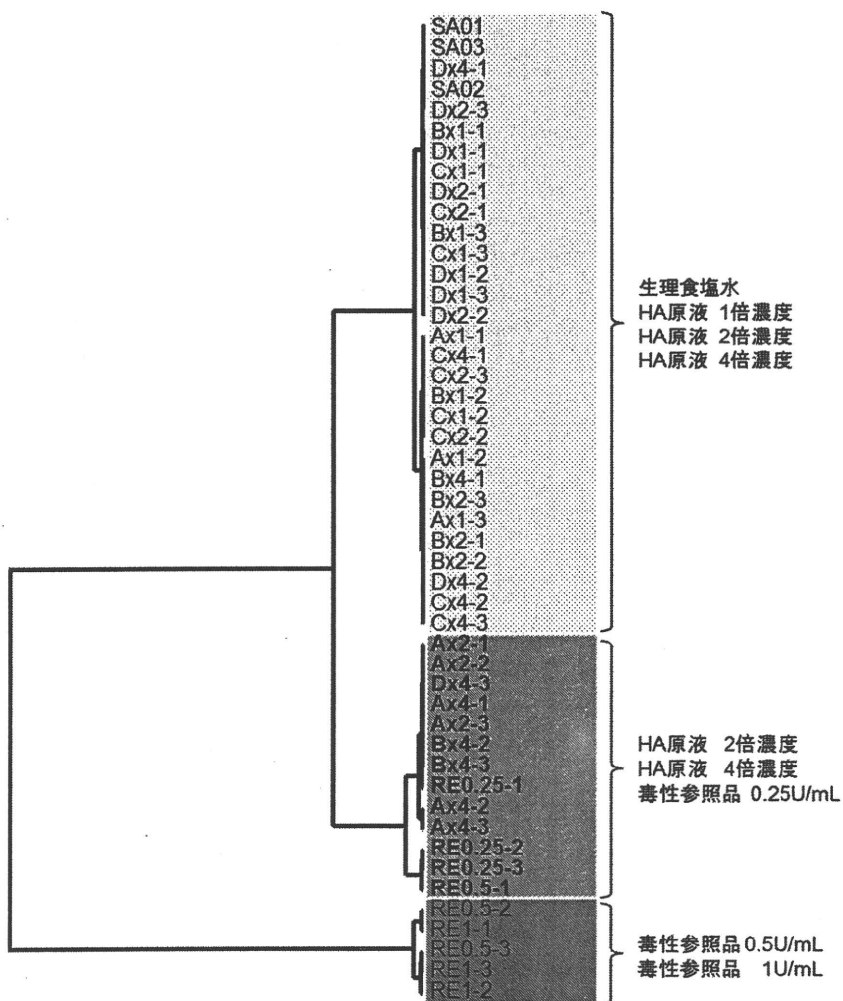


図 4. マーカー遺伝子の発現パターンを基にしたクラスター解析
 各検体における 17 のマーカー遺伝子の発現パターンの類似性から、クラスター解析を行った。

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

**インフルエンザワクチンに対する新規安全性試験法の
バリデーションに関する研究**

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 浜口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長

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、冬シーズンに備えて製造が開始される。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。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。本研究においては、試験期間の短縮化を図るため、一般的な遺伝子発現解析法である realtime PCR 法と、精製 RNA をターゲットとした QuantiGene Plex(QGP)法、臓器ライセートをターゲットとした QGP 法の 3 法間でのバリデーションを行った。

研究協力者

倉光 球	国立感染症研究所	佐藤 靖	デンカ生研株式会社
滝澤和也	国立感染症研究所	渡辺隆雄	学校法人 北里研究所
益見厚子	国立感染症研究所	福家 功	一般財団法人
荒木久美子	国立感染症研究所		阪大微生物病研究会
古畑啓子	国立感染症研究所	尾堂浩一	一般財団法人
甲斐 光	デンカ生研株式会社		化学及血清療法研究所

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは 38℃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。これまでに我々は、インフルエンザワクチンの安全性試験に代替する試験法として、ワクチン接種ラット肺における遺伝子発現解析の導入を試み、指標となるマーカー遺伝子の同定を行った(Mizukami et al, Vaccine 26, 2270-2283, 2008)。そして、マーカー遺伝子の発現解析によるインフルエンザワクチンの安全性評価は、従来法と比較して高感度であることを見出している(百瀬、板村らの項参照)。しかし、realtime PCR 法を用いた遺伝子発現解析では、接種してから RNA の精製、cDNA の合成、個々の遺伝子の発現量測定と、多くのステップがあり、試験期間の短縮化という面で課題が残る。昨年度研究(百瀬らの項)において、我々が構築してきた遺伝子発現解析を用いた新規試験法に QGP 法(RNA)の導入が可能である可能性が示唆されているが、発現量の低いサンプルに関してはバリデーションが不十分であった。本研究では、様々な活性を持つ検体を用い、QGP 法を導入するためのバリデーションを完了させることを目的とした。QGP 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。したがって、QGP 法の導入が可能となれば、試験期間の短縮化だけでなく、データの安定性につながることを期待される。

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、解析に用いた。

2) ワクチン

本研究課題では、インフルエンザワクチンのマウス白血球数減少試験用の毒性参照品を、全粒子ワクチン相当品として用いた。高濃度 HA 原液は A/Brisbane/59/2007 (H1N1)株、A/Uruguay/716/2007(H3N2)株及び B/Brisbane/60/2008 株の 3 型が混合されており、国内メーカー4社より提供されたものである。毒性参照品、高濃度 HA 原液、およびその段階希釈液を、各 5mL 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

ワクチン接種後、1 日目にラットより肺を採取した。一群 3 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。定法に従って total RNA を抽出した。肺の

一部(10mg)はライセートサンプル調整用として、凍結せずに RNAlater (Ambion) 中に保存した後、Proteinase K 1 μ l を含む 300 μ l の Homogenizing solution (Panomics) にて破砕し、65 $^{\circ}$ Cで 30 分間処理した。

4) 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)、または肺ライセート (40 μ l) に 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、全容量が 100 μ l となるように調整した。これを Hybridization plate にて 54 $^{\circ}$ C 18 時間インキュベートした後、96-well plate に移し 100 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、または Bio-plex 200 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。発現解析は β -actin に対する相対定量を行った。

(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

毒性参照品の段階希釈品 (1U/mL, 0.5U/mL, 0.25U/mL) と、高濃度 HA 原液の段階希釈品 (4 倍濃度, 2 倍濃度, 1 倍濃度) を準備してラットに接種し、肺組織におけるマーカー遺伝子の発現変動を realtime PCR 法、QGP 法(RNA)、QGP 法(lysate)の 3 つの異なる解析手法で解析した。遺伝子の発現量は β -actin に対する相対定量で行い、それぞれの手法から得られたデータをプロットしたところ、データが直線状に乗ることが明らかとなった。(図 5)。ただし、両解析法の解析機器のデータレンジの差から遺伝子発現量の実測値が異なるため(考察の項参照)、近似直線の傾きは 1 からは外れている。

realtime PCR 法と QGP 法(RNA)のデータの相関を回帰係数で検討したところ、Csf1 ではやや低い値であったものの (0.449)、その他の遺伝子については概ね 0.8 以上であった(表 1、上段)。realtime PCR 法と QGP 法(lysate)、QGP 法(RNA) と QGP 法(lysate)との比較も同様の結果であった(表 1、中・下段)。

D. 考察

realtime PCR 法と QGP 法の実測値をプロットすると、データは近似直線上に乗り、高い回帰係数が示された。QGP 法の解析に使用するルミノメーターは、直線性のある値の範囲が 3 log 程度であり、複数遺伝子の発現を 3 log のデータレンジ内で同時に測定する必要性から、発現量の低い遺伝子に関しては感度を上げ、発現量の高い遺伝子に関しては感度を下げている。そのために、遺伝子発現量の実測値が realtime PCR 法とは異なり、近似直線の傾きは 1 にはならない。しかし、回帰係数は概ね 0.8 以上であり(表 1)、遺伝子の発現変動率に関しては、3 試験法間で非常に良いデータの相関が認められた。検定試験では一度に数多くのサンプルを扱うため、特に QGP 法(lysate)を導入した場合に、試験実施者の負担軽減が見込まれる。

Csf1 は、他のマーカー遺伝子と比較して検体間の発現変動率が大きくないため、個体差やデータ誤差が反映されて回帰係数が低くなったと考えられる。ただし、realtime PCR 法、QGP 法(RNA)と QGP 法(lysate)との比較では回帰係数がそれぞれ 0.583、0.709 であり、操作の簡便化によってデータのばらつきがある程度改善できる可能性も考えられる。

本研究の結果からは、遺伝子解析の手法として realtime PCR 法、QGP 法(RNA)、QGP 法(lysate)のいずれも選択可能であることも示された。遺伝子の発現解析として

は realtime PCR 法が現状では最も一般的な手法である。また、解析機器の普及率の面から、realtime PCR 法が選択される局面が多いことも予想される。一方で、QGP 法を含む多項目同時測定が可能なキットや解析機器の国内普及も進んでおり、将来的には一般的な解析手法の一つとして QGP 法が選択されることが見込まれる。

E. 結論

我々が構築している遺伝子発現解析による新規安全性試験法において、realtime PCR 法、QGP 法(RNA)、QGP 法(lysate)の 3 つの異なる解析手法間のバリデーションが完了した。QGP 法(lysate)を適応した新規安全性試験法の導入により、試験実施者の負担軽減、試験期間の短縮化、ならびにデータの安定性向上が期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Momose H, Mizukami T, Ochiai M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A method for evaluation of vaccine safety based on comprehensive gene expression analysis.

Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010:361841(7p), 2010.

2. 学会発表

1) 百瀬暖佳、水上拓郎、倉光 球、益見厚子、滝澤和也、前山順一、浜口 功: 遺伝子発現解析を応用したインフルエンザ HA ワクチンの新たな安全性評価法構築へ向けた試み

第 14 回日本ワクチン学会学術集会
2010 年 12 月 11-12 日 東京 (プログラム・抄録集 p117)

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

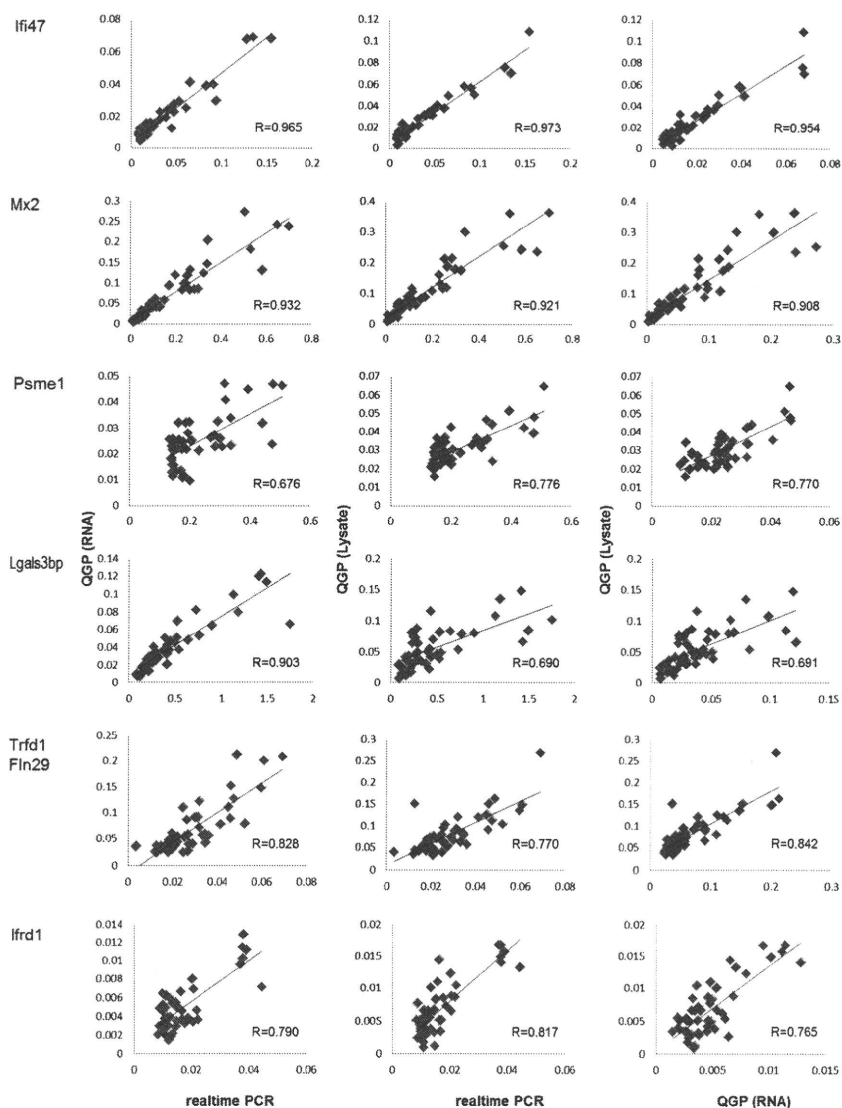


図 5. realtimePCR 法と QGP 法のバリデーション(次頁へ続く)

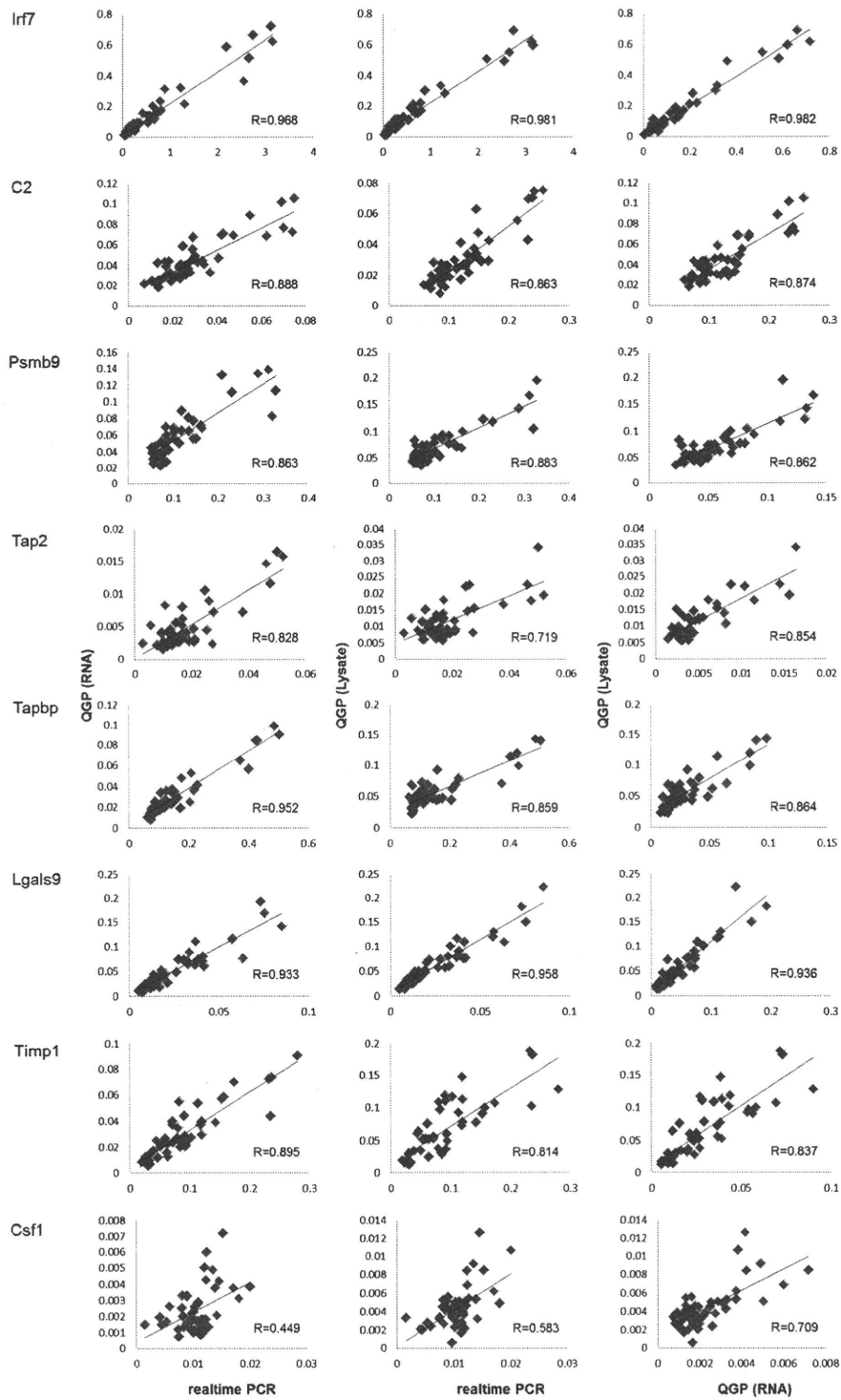


図 5. realtimePCR 法と QGP 法のバリデーション(次頁へ続く)

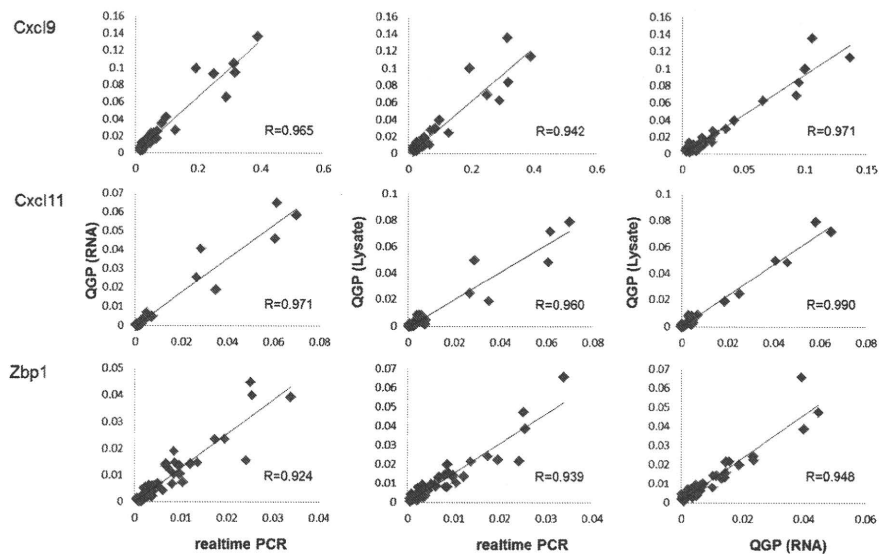


図 5. realtimePCR 法と QGP 法のバリデーション

毒性参照品の段階希釈品、高濃度 HA 原液の段階希釈品、生理食塩水を接種したラット肺におけるマーカー遺伝子の発現量を 3 つの異なる手法を用いて測定した。発現量は β -actin に対する相対定量を行った。それぞれの遺伝子の発現変動について、異なる手法による解析結果の相関を検討した。

realtime PCR 法による解析結果は図 2、図 3 に同じ。R: 回帰係数

左 : realtime PCR 法 v.s. QGP 法 (total RNA)

中 : realtime PCR 法 v.s. QGP 法 (肺ライセート)

右 : QGP 法 (total RNA) v.s. QGP 法 (肺ライセート)

	Ifi47	Mx2	Psme1	Lgals3bp	Trks1/Fn29	Ifrd1	Irf7	C2	Psmb9	Tap2	Tapbp	Lgals9	Timp1	Csf1	Cxcl9	Cxcl11	Zbp1
realtime vs QGP(RNA)	0.965	0.932	0.676	0.903	0.828	0.790	0.968	0.888	0.863	0.828	0.952	0.933	0.895	0.449	0.965	0.971	0.924
realtime vs QGP(Lys)	0.973	0.921	0.776	0.690	0.770	0.817	0.981	0.863	0.883	0.719	0.859	0.958	0.814	0.583	0.942	0.960	0.939
QGP(RNA) vs QGP(Lys)	0.954	0.908	0.770	0.691	0.842	0.765	0.982	0.874	0.862	0.854	0.864	0.936	0.837	0.709	0.971	0.990	0.948

表 1. 各試験法間の回帰係数

図 5 の回帰係数を抜き出し、表にまとめた。