

201132001A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 百瀬暖佳  
平成24（2012）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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 百瀬暖佳  
平成24（2012）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)

水上拓郎 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

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

永田伴子 (財団法人 食品薬品安全センター  
秦野研究所)

立花滋博 (財団法人 食品薬品安全センター  
秦野研究所)

安藤栄里子 (財団法人 食品薬品安全センター  
秦野研究所)

倉光 球 (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)

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)

## 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法の施設間標準化に関する研究 — 4

百瀬暖佳、浜口功

- 図 1: 施設間でのバイオアッセイデータの相関 ————— 9

- 図 2: 施設間でのマーカー遺伝子発現変動の相関 ————— 10

- 図 3: アッセイ間におけるデータの安定性 ————— 11

- 表 1: 施設間でのマーカー遺伝子発現変動の相関 ————— 12

- 表 2: アッセイ間におけるデータの安定性 ————— 12

### II. 分担研究報告

1. 新規製法インフルエンザワクチンに対する遺伝子発現解析法の適応可能性に関する研究 ————— 13

百瀬暖佳、板村繁之

- 図 4: 各種インフルエンザ HA ワクチン接種に伴うラットの生体変化 ————— 18

- 図 5: 各種インフルエンザ HA ワクチン接種に伴うマーカー遺伝子の発現変動 ————— 19

- 図 6: マーカー遺伝子の発現パターンに基づくクラスター解析 ————— 20

2. インフルエンザワクチン安全性に関するバイオマーカー発現細胞の同定に関する研究  
————— 21

水上拓郎

- 表 3: 本試験に用いた抗体とその反応性のまとめ ————— 25

- 図 7: 毒性参照品(RE) 接種後 1 日目の肺組織におけるバイオマーカーの免疫組織化学—26

- 図 8: 生理食塩水(SA)接種後 1 日目の肺組織におけるバイオマーカーの免疫組織化学— 27

3. 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 ————— 28

阿戸 学

- 図 9: インフルエンザワクチンによる末梢血白血球減少とアポトーシスの相関 ————— 32

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 33

- IV. 研究成果の別刷 ————— 35

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法の  
施設間標準化に関する研究

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の相関が見られ、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、異なる施設において実施した試験結果を比較し、新規試験法の標準化の可能性について検討を行った。

研究分担者	安藤栄里子 (財) 食品薬品安全センター
浜口 功 国立感染症研究所・ 血液・安全性研究部・部長	倉光 球 国立感染症研究所
水上拓郎 国立感染症研究所・ 血液・安全性研究部・室長	益見厚子 国立感染症研究所
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	荒木久美子 国立感染症研究所
阿戸 学 国立感染症研究所・ 免疫部・室長	古畑啓子 国立感染症研究所
研究協力者	A. 研究目的
永田伴子 (財) 食品薬品安全センター	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
立花滋博 (財) 食品薬品安全センター	

つの糖タンパク質が変異することにより、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(2009~2010年度研究)。本研究では、様々な活性を持つ検体を用い、新規試験法の施設間標準化の可能性について検討することを目的とした。異なる施設で実施した試験データに相関が認められれば、遺伝子発現解析の新規試験法としての有用性が高まると考えられる。

## 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、1週間以上環境に馴化させた。

### 2) ワクチン

インフルエンザ HA ワクチンは、研究試験用に購入し、ラット腹腔内に5ml接種し

た。マウス白血球数減少試験用の毒性参照品は2倍の段階希釈を行い、ラット腹腔内に5ml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、またはセボフルラン吸入麻酔液(マイラン製薬)での麻酔下で、心臓より採血を行った。採取した血液は速やかにEDTAとよく混和し、白血球数と血小板数の計測を行った。

### 4) 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(100mg)はRNAlater (Ambion) 中に保存した後、Proteinase K 10 $\mu$ l を含む3mlのHomogenizing solution (Panomics) にて破碎し、65 $^{\circ}$ Cで30分間処理した。15,000rpmで5分間、室温での遠心操作の後に上清を回収し、解析まで-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

### 5) 遺伝子発現解析

希釈した肺ライセート(40 $\mu$ l)にQuantiGene Plex Reagent System 2.0 (Panomics) 添付のLysis mixture 33.3 $\mu$ l、Blocking reagent 2 $\mu$ l、Capture beads 1 $\mu$ l、Probe set 5 $\mu$ lを加え、全容量が100 $\mu$ lとなるように調整した。これをHybridization plateにて54 $^{\circ}$ C 18~22時間インキュベートした後、96-well plateに移し

100 $\mu$ 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 $\mu$ l の SAPE wash buffer を加え、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 $\beta$ -actin に対する相対定量を行った。図 1、2 の国立感染症研究所における解析結果は、2010 年度研究と 2011 年度研究(次項)で取得したデータを活用した。

#### (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、および財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所の動物実験委員会で承認を受けている。

#### C. 研究結果

国立感染症研究所、および財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所において、生理食塩水、インフルエンザ HA ワクチン、および毒性参照品の段階希釈品を準備してラットに接種した。接種後 1 日目に体重測定、血液検査を実施した後、肺ライセートを調整した。希釈ライセー

トにおけるマーカー遺伝子の発現量は QGP 法(lysate)にて解析し、測定は国立感染症研究所のマイクロプレートルミノメーターで行った。1 群 3 匹の平均値を算出し、得られたデータをプロットした。

データの相関を検討したところ、体重変動ではやや相関があったものの、白血球数では相関が見られなかった。一方、血小板数では高い相関が見られた(図 1)。

マーカー遺伝子の発現変動では、1 遺伝子を除き 0.9 を超える回帰係数が得られた(図 2、表 1 上段)。また、回帰直線の傾きは 0.9~1.1 の間の値を取ったものが 2 遺伝子、傾きが 2 を超えたものは 9 遺伝子あった(表 1 中段)。同一の肺ライセート(秦野研究所サンプル)を、試験日および試験実施者を替えて再測定し、アッセイ間のデータの安定性を検討したところ、回帰係数は全てのマーカー遺伝子について 0.9 を超えた(図 3、表 2 上段)。回帰直線の傾きは、5 遺伝子で 0.9~1.1 の間の値が得られた(表 2 中段)。

#### D. 考察

マーカー遺伝子の発現量は、施設間差、試験実施者による誤差に加え、接種動物の個体差も加味されるため、実際の測定値が同等となることは極めて稀と考えられる。本研究においても、両施設間での実測値が乖離しており、回帰直線の傾きは  $1 \pm 0.1$  には入らなかった。ただし、回帰係数は非常に高い値を示した。新規の安全性試験を目指すためには、施設毎に

一定数の同種製剤を用いて遺伝子発現変動のデータを蓄積する必要がある。それを遺伝子発現の母集団として、試験を実施するのが望ましいと考えられる。

表 2 に示すとおり、試験日を変えて、異なる試験実施者が同一サンプルを測定した場合は、相関係数、回帰直線ともに良好なデータが得られ、解析法自体は安定していると考えられた。全ての回帰直線の傾きは  $1 \pm 0.1$  には入っていないが、これは肺ライセートの濃度を下げる、プローブのハイブリダイズ時間を厳密に規定する、またはアッセイ系へ持ち込むライセート量を増やすことで改善できる可能性がある。

解析に用いる肺ライセートは、測定機器の検出域に合わせて 50~200 倍に希釈している。すなわち、ライセート原液は非常に高濃度で粘度も高く、遠心操作で除くのが困難な夾雑物が多い。肺重量に対する Homogenizing solution の量を増やしてライセート原液の濃度を下げ、より夾雑物の少ない均質なライセート原液を調整することにより、試験間誤差を軽減できると期待される。

プローブのハイブリダイズ時間については、ハイブリダイズ時間が長くなると非特異的ハイブリのため、バックグラウンドのカウントが高くなる傾向にある。異なるアッセイ間でデータを比較する場合は、厳密にハイブリダイズ時間を規定することで、回帰直線の傾きを改善できる可能性がある。

プロトコールに柔軟性を残すという観点からは、ハイブリダイズ時間を規定する代わりにマーカー遺伝子の検出感度を上げ、バックグラウンドの振れにデータが左右されないよう工夫する事も考えられる。アッセイ系に持ち込む肺ライセート量を増やすのが最も簡便な方法であるが、肺ライセートの持ち込み量を増やすと内部標準としている  $\beta$ -actin の値が振りきれるという問題が生じる。プローブを再デザインして  $\beta$ -actin の感度を下げるか、内部標準を  $\beta$ -actin よりカウントの低い GAPDH に変更することで、この問題はクリアできるであろう。

## 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、国立感染症研究所と財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所における施設間バリデーションを実施した。両施設のデータからは高い回帰係数が得られ、試験実施場所や試験実施者が異なっても同等のデータが得られることが明らかとなった。ただし実測値には乖離があることから、従来の試験法と同様に、施設毎に対照となる母集団を作製することが重要であると考えられた。

## F. 健康危険情報

該当なし



**G. 研究発表**

**1. 論文発表**

なし

**2. 学会発表**

なし

**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

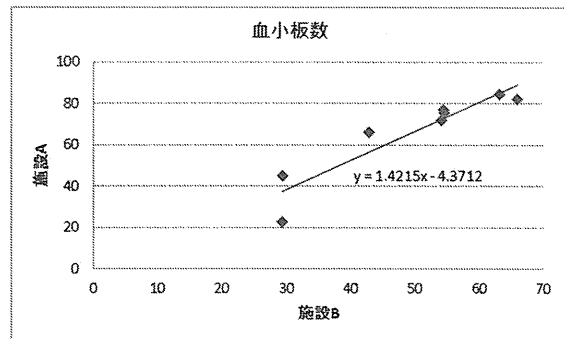
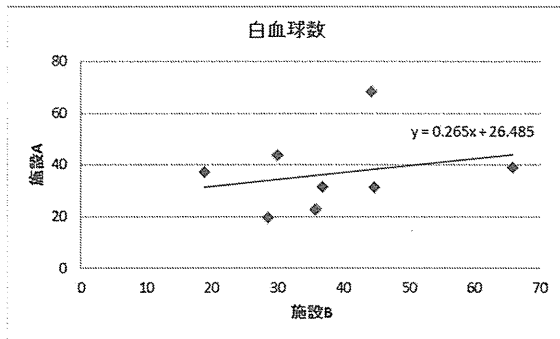
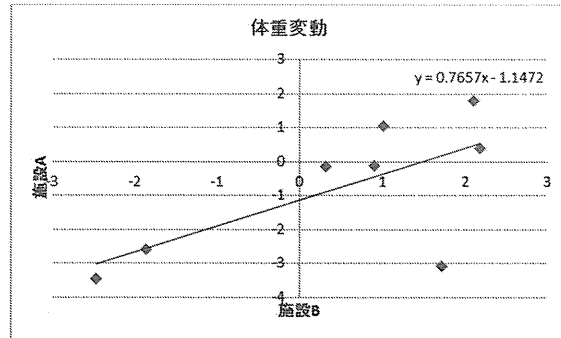


図 1. 施設間でのバイオアッセイデータの相関

生理食塩水、インフルエンザ HA ワクチン、および毒性参照品の段階希釈品を接種後、1日目のラットの体重変動率(%)と白血球数( $10^2/\mu\text{L}$ )、血小板数( $10^4/\mu\text{L}$ )を測定した。1群3匹の平均値を算出してグラフ上にプロットし、両施設における解析結果の相関を検討した。グラフ上に回帰直線を示す。回帰係数(R)は、体重変動：0.67、白血球数：0.25、血小板数：0.93であった。

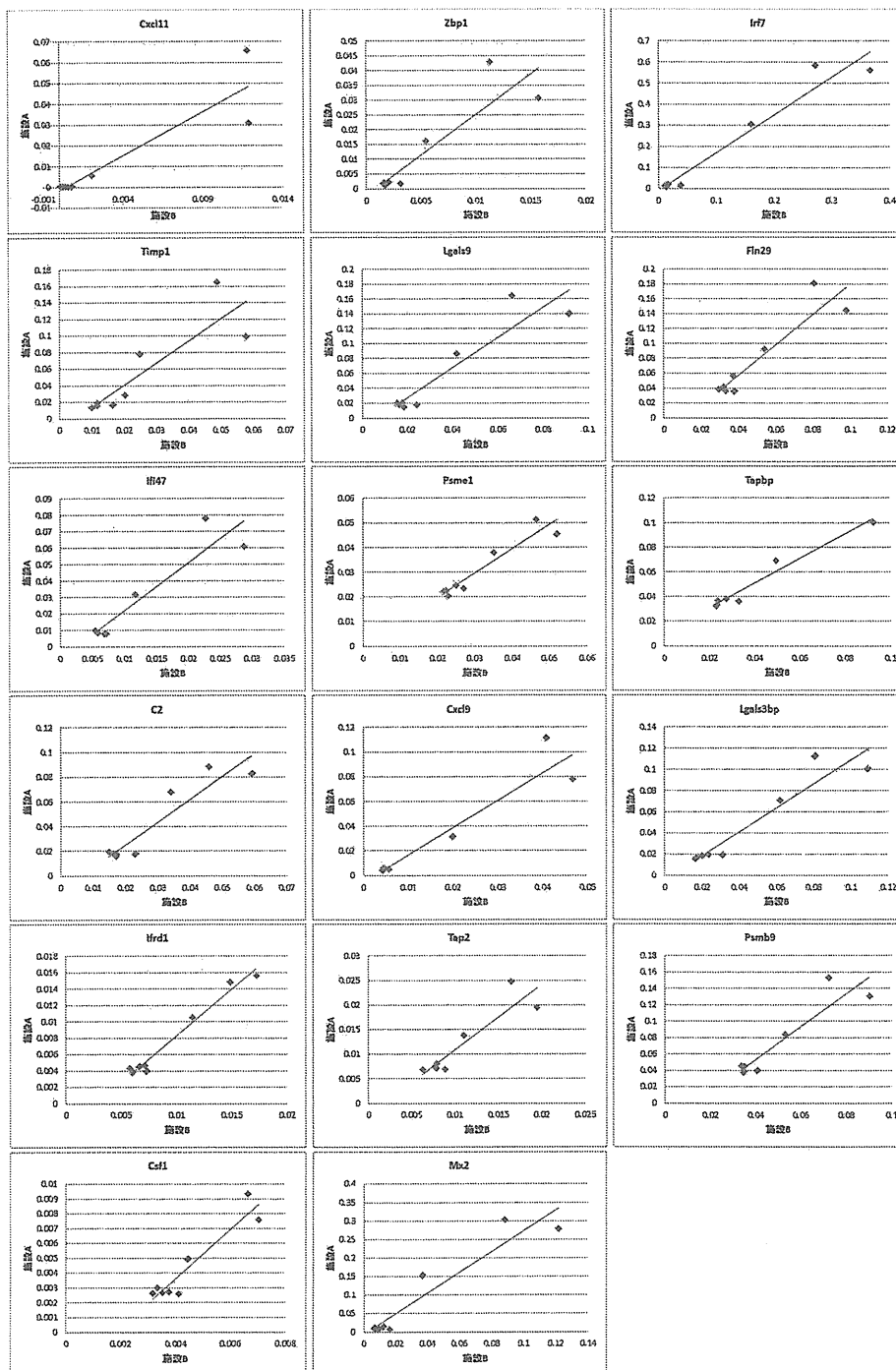


図 2. 施設間でのマーカー遺伝子発現変動の相関

生理食塩水、インフルエンザ HA ワクチン、および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。発現量は $\beta$ -actin に対する相対定量を行った。

1 群 3 匹の平均値を算出してグラフ上にプロットし、それぞれのマーカー遺伝子の発現変動について、両施設における解析結果の相関を検討した。グラフ上に回帰直線を示す。

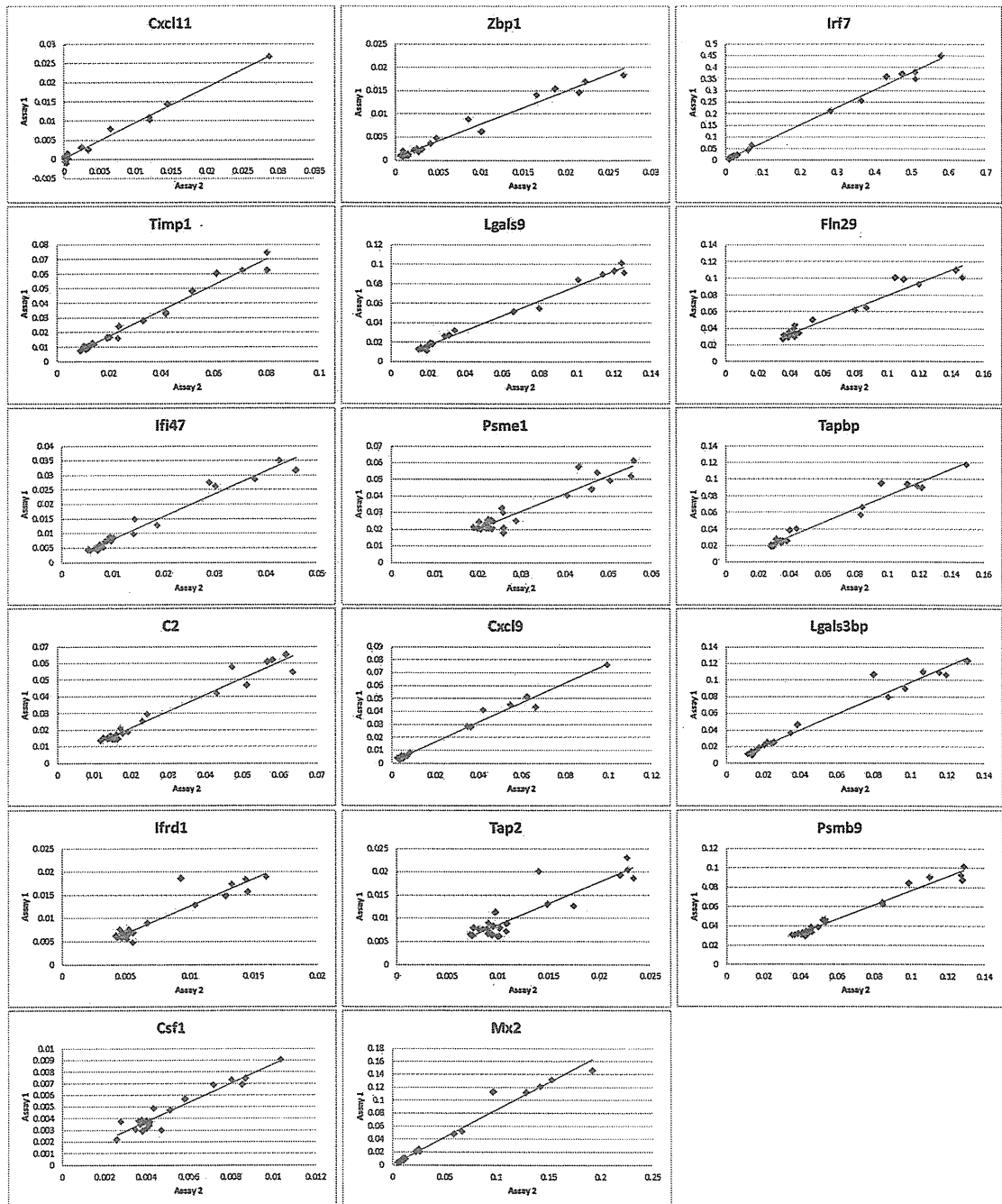


図 3. アッセイ間におけるデータの安定性

図 2 で用いたサンプルを試験実施日、試験実施者を変えて再度測定し、アッセイ間のデータの安定性について検討を行った。グラフ上に回帰直線を示す。

	Cxcl11	Zbp1	lrf7	Timp1	Lgals9	Fln29	lfi47	Psme1	Tapbp	C2	Cxcl9	Lgals3bp	lfrd1	Tap2	Psemb9	Csf1	Mx2
回帰係数	0.917	0.900	0.976	0.875	0.932	0.929	0.934	0.956	0.943	0.935	0.951	0.951	0.987	0.916	0.928	0.943	0.948
回帰直線の傾き	4.201	2.731	1.790	2.658	2.028	2.209	2.910	0.984	1.001	1.850	2.210	1.133	1.134	1.335	2.004	1.650	2.789
回帰直線のy切片	-0.002	-0.002	-0.009	-0.013	-0.013	-0.023	-0.007	0.000	0.011	-0.012	-0.005	-0.004	-0.003	-0.003	-0.027	-0.003	-0.050

**表 1. 施設間でのマーカー遺伝子発現変動の相関**

図 2 の回帰係数(R)、回帰直線の傾き、および y 切片を表にまとめた。

	Cxcl11	Zbp1	lrf7	Timp1	Lgals9	Fln29	lfi47	Psme1	Tapbp	C2	Cxcl9	Lgals3bp	lfrd1	Tap2	Psemb9	Csf1	Mx2
回帰係数	0.994	0.988	0.997	0.990	0.995	0.976	0.983	0.944	0.984	0.982	0.992	0.984	0.936	0.908	0.987	0.958	0.988
回帰直線の傾き	0.925	0.720	0.753	0.881	0.765	0.766	0.783	1.064	0.812	0.990	0.760	0.958	1.176	0.923	0.736	0.820	0.843
回帰直線のy切片	0.000	0.001	0.001	0.000	0.002	0.003	0.000	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.001	0.003	0.000	0.001

**表 2. アッセイ間におけるデータの安定性**

図 3 の回帰係数(R)、回帰直線の傾き、および y 切片を表にまとめた。

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

新規製法インフルエンザワクチンに対する遺伝子発現解析法の  
適応可能性に関する研究

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い、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た。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適応可能性を探るため、国産の発育鶏卵由来インフルエンザ HA ワクチンと、新規製法によるインフルエンザ HA ワクチンを用いてマーカー遺伝子の発現変動を解析し、従来法による試験結果との比較検討を行った。

研究協力者

倉光 球 国立感染症研究所  
益見厚子 国立感染症研究所  
荒木久美子 国立感染症研究所  
古畑啓子 国立感染症研究所

チンの製法は、ウイルスを発育鶏卵で培養し、増殖したウイルスを含む尿膜腔液を蔗糖密度勾配遠心法により濃縮精製後、ウイルス粒子をエーテル処理等で分解、不活化した HA 画分をワクチン原液とする。これに安定化剤等を添加し、規定濃度に混合調整して最終小分け製品が製造される。海外でも発育鶏卵で増殖させたウイルスを用いてワクチンが製造されることが多いが、培養細胞株によりウイルスを増殖させる試みも進められ、近年、培養細胞由来のワ

A. 研究目的

現在国内で市販されている季節性インフルエンザワクチンは、スプリット型であり、アジュバントを含まない HA ワクチンである。基本的なインフルエンザ HA ワク

クチンがヨーロッパで認可された。また、免疫原性を高めるアジュバントが添加されたワクチンも海外では使用実績がある。日本でも新規製法によるワクチンの開発研究が進められており、将来的に国内で流通する可能性が考えられる。

本研究では遺伝子解析を活用したインフルエンザワクチンの安全性試験法の構築を試みているが、将来国内にも流通する可能性のある新規製法ワクチンに対し、遺伝子解析法が適応できるか予め検討しておくことが望ましい。研究試験用として、2種類の新規製法ワクチンが準備できた。一つは、viroso me アジュバント含有ワクチンである。これは発育鶏卵で増やしたウイルスから精製したウイルス蛋白をリポソーム上に配置することにより、免疫原性を高めた不活化ワクチンである。現在40カ国以上で承認され、40,000,000 ドーズ以上の使用実績がある。もう一つは、培養細胞株で増殖させたウイルスを用いた不活化スプリットワクチンである。使用実績は少ないが、将来国内で導入される可能性の高いタイプのワクチンである。これらを接種したラットの体重推移、末梢白血球数、末梢血小板数、および肺におけるマーカー遺伝子の発現解析を行い、従来製法の国産インフルエンザ HA ワクチンによるデータと比較検討した。

## 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後、解析に用いた。

### 2) ワクチン

国産のインフルエンザ HA ワクチン、培養細胞由来インフルエンザ HA ワクチン、および viroso me アジュバント含有インフルエンザ HA ワクチンは研究試験用として入手した。対照には生理食塩水(SA)を用い、各 5ml をラット腹腔内に接種した。

### 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) 採材と肺ライセート調整

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。肺葉(100mg)は生理食塩水で洗浄した後 RNA later (Ambion) 中に保存し、Proteinase K 10 $\mu$ l を含む 3ml の Homogenizing solution (Panomics) にて破碎した。65°Cで30分間処理し、5分間室温で遠心した上清を肺ライセートとした。

### 5) 遺伝子発現解析

ワクチン接種ラットの肺ライセート(40 $\mu$ l, 50~200倍希釈)に QuantiGene Plex Reagent System 2.0 (Panomics) 添付の

Lysis mixture 33.3 $\mu$ l、Blocking reagent 2  $\mu$ l、Capture beads 1  $\mu$ l、Probe set 5 $\mu$ l を加え、全容量が 100 $\mu$ l となるように調整した。これを Hybridization plate にて 54°C 18 時間インキュベートした後、96-well plate に移し 100 $\mu$ l の Wash buffer で 3 回洗浄した。次に Pre-Amplifier を加えて 50°C で 1 時間、Amplifier を加えて 50°C で 1 時間、Label probe を加えて 50°C で 1 時間、SAPE を加えて室温で 30 分間処理した。最後に 130 $\mu$ l の SAPE wash buffer を加え、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 $\beta$ -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

国産の HA ワクチン、培養細胞由来 HA ワクチン、および virosome 型 HA ワクチンをラットに接種し、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。

その結果を図 4 に示す。

培養細胞由来 HA ワクチンでは、体重推移、末梢白血球数に国産 HA ワクチンと有意差は認められなかった(図 4, HA (egg) v.s. HA (cell))。末梢血小板数に関しては、やや高い傾向はあるものの有意差はなかった( $P=0.05$ )。

virosome 型 HA ワクチンでは、国産ワクチンと比較して有意な体重減少を認めた(図 4, 上段,  $P<0.01$ )。末梢白血球数は国産 HA ワクチンと有意差は認められず、末梢血小板数に関しては、やや低い傾向にあるものの有意差はなかった ( $P=0.09$ )。

#### 2) 遺伝子発現解析法による安全性試験

国産 HA ワクチン、培養細胞由来 HA ワクチン、および virosome 型 HA ワクチンをラットに接種し、1 日目の肺組織におけるマーカー遺伝子の発現解析を行った。その結果を図 5 に示す。

培養細胞由来 HA ワクチン接種群では、全てのマーカー遺伝子において、国産 HA のワクチン接種群と比較して有意な発現量の差は認められなかった(図 5, HA (cell))。

一方、virosome 型 HA ワクチンを接種されたラット肺においては、17 のマーカー遺伝子のうち、Zbp1, Irf7, Timp1, Lgals9, Fln29, Ifi47, Psme1, Tapbp, C2, Tap2, Psmb9, Mx2 の 12 遺伝子について発現量の有意な亢進を認めた(図 5, virosome,  $P<0.05$ )。

全マーカー遺伝子の発現パターンをの類



似性からクラスター解析を行ったところ、生理食塩水接種群、国産 HA ワクチン接種群、培養細胞由来 HA ワクチン接種群は同一クラスターに分類され、virosoe 型ワクチン接種群は別個のクラスターを形成した(図 6)。

#### D. 考察

##### 1) 従来法による安全性試験

体重推移、末梢白血球数、末梢血小板数の解析結果より、培養細胞由来 HA ワクチンと国産 HA ワクチンは、同様の生体反応を示すものであることが示唆された。培養細胞株由来のワクチンと発育鶏卵由来のワクチンでは、抗原の翻訳後修飾等が異なる可能性も考えられるが、本研究結果からは、接種動物に与える影響は認められなかった。

一方の virosoe 型ワクチンでは、国産 HA ワクチンとは異なり、接種動物に有意な体重減少を示した。従来型ワクチンと同様に発育鶏卵で増殖させたウイルスを原材料としているが、剤形の違いが生体反応の違いとして反映されたと考えられる。

##### 2) 遺伝子発現解析法による安全性試験

国産 HA ワクチンと培養細胞由来 HA ワクチンでは、全マーカー遺伝子の発現量に有意差はなかった。発現パターンを基にしたクラスター解析でも同一クラスター内にランダムに配置されていることから(図 6)、遺伝子発現解析上も同等の生体反応を示すワクチンであることが示唆さ

れ、従来法の試験結果との一致が認められた。

一方、virosoe 型では 12 のマーカー遺伝子に国産 HA ワクチンと比較して有意な発現亢進が認められ、特に Timp1 の発現亢進が著明であった。本研究に用いた virosoe 型ワクチンは、ロットによらず 1~2EU/mL のエンドトキシンを含むことが報告されている(基準値; 200EU/mL 以下)。また、以前に我々が実施した、百日咳ワクチンの安全性評価のためのマーカー遺伝子の探索では、参照百日せきワクチン(不活化全菌体)接種 1 日目の肺で発現亢進を認める遺伝子群の中に Timp1 が含まれていた。Timp1 はワクチン中のエンドトキシンに反応して発現が亢進している事が、一つの可能性として考えられる。

現在、各マーカー遺伝子が何に反応しているのかは不明であり、Timp1 についても考察の域を出ないが、今後、各々の遺伝子が反応するワクチン中の成分を検討する等、新規安全性評価法としての遺伝子発現解析に対して、科学的信頼性を高める努力をすることも重要な課題であろう。

#### E. 結論

新規の製法で製造された培養細胞由来と virosoe 型の HA ワクチンを用い、従来の安全性試験法と遺伝子解析法を比較検討した。試験結果には相関が見られ、遺伝子解析法が新規製法ワクチンにも適

応できる可能性が示された。今後は各々のマーカー遺伝子について発現メカニズムを含めた詳細な解析を行い、科学的根拠に基づいた試験法として構築していく事が望まれる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

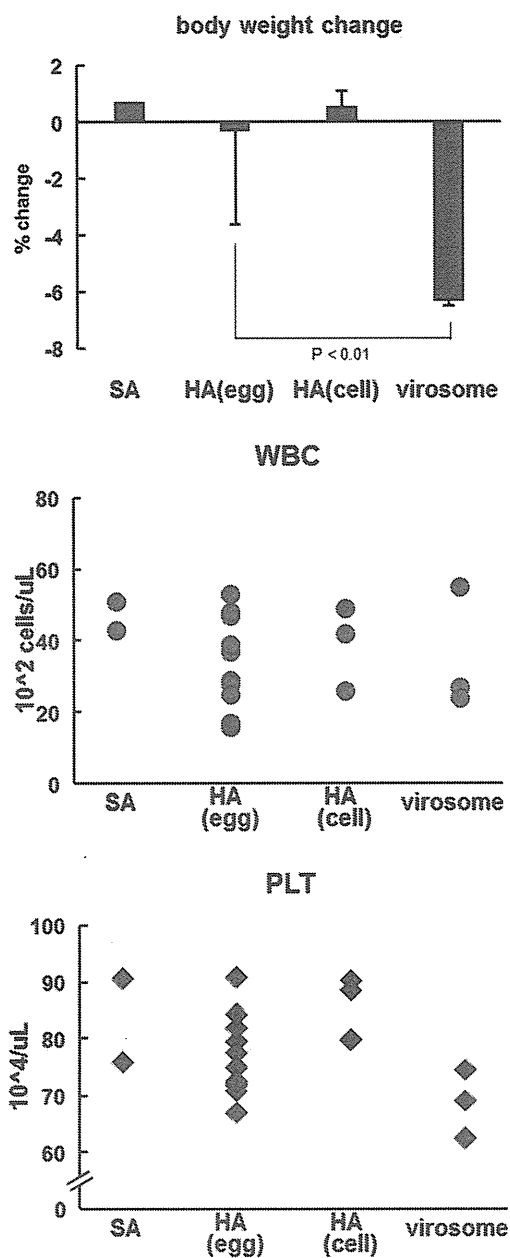


図 4. 各種インフルエンザ HA ワクチン接種に伴うラットの生体変化

各種インフルエンザ HA ワクチンを接種されたラットの体重変動(上)、末梢白血球数(中)、末梢血小板数(下)を測定した。国産 HA ワクチン接種群と比較し、virosome 型 HA ワクチン接種群において有意な体重減少を認めた。

SA; 生理食塩水接種群、HA (egg); 国産 HA ワクチン接種群、HA (cell); 培養細胞由来 HA ワクチン接種群、virosome; virosome 型 HA ワクチン接種群

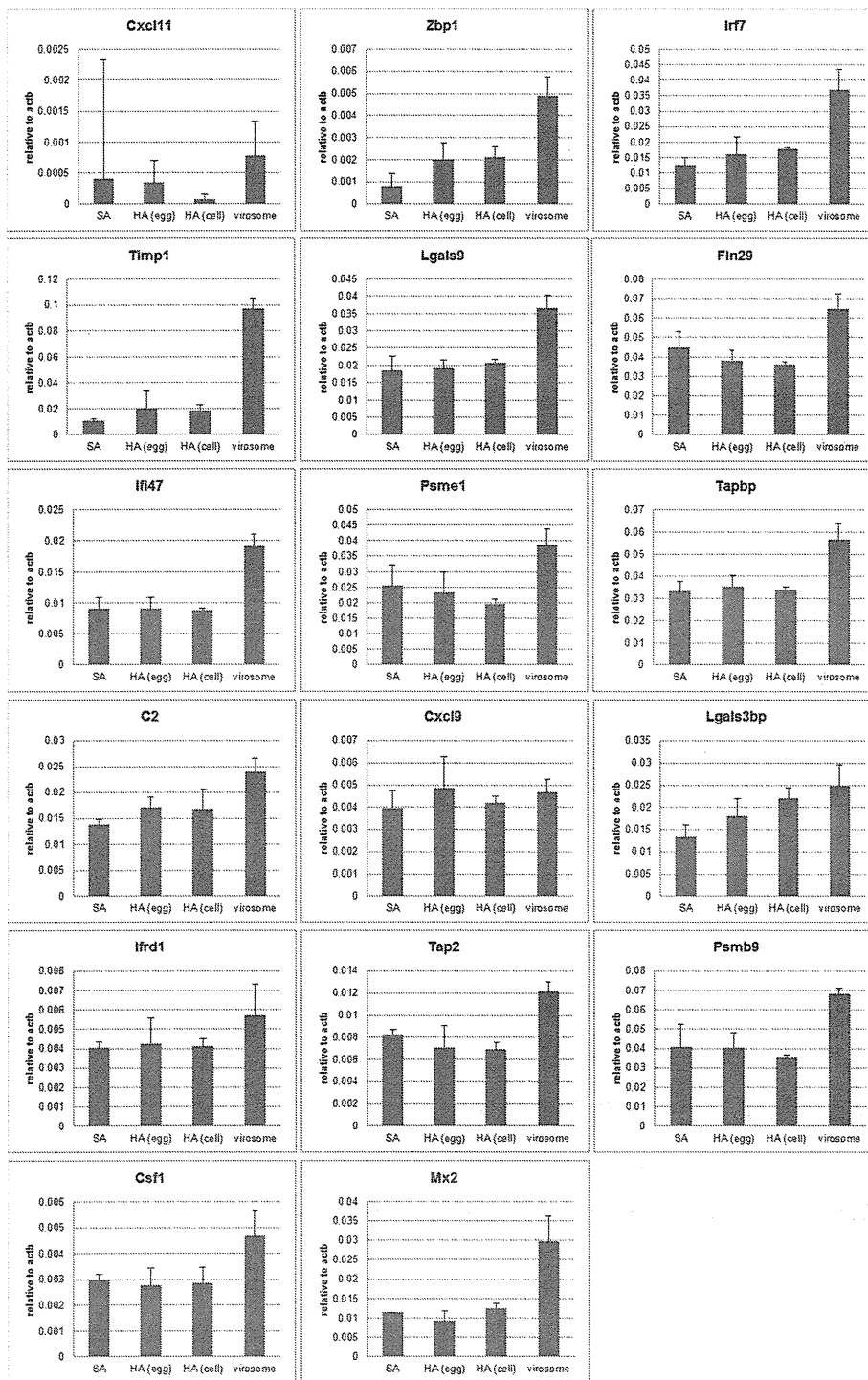


図 5. 各種インフルエンザ HA ワクチン接種に伴う  
マーカー遺伝子の発現変動

国産 HA ワクチン(HA (egg))、培養細胞由来 HA ワクチン(HA (cell))、および virosome 型 HA ワクチン(virosome)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、 $\beta$ -actin に対する相対定量で示した。