

201132001B

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21～23年度 総合研究報告書

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21～23年度 総合研究報告書

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)

大隈 和 (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)

鱒坂裕美 (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)

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)

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)

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)

渡辺隆雄 (北里第一三共ワクチン株式会社)

浦山重信 (北里第一三共ワクチン株式会社)
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)

目次

I. 総合研究報告

1. インフルエンザワクチンに対する新規安全性試験の導入と標準化に関する研究 —— 6
百瀬暖佳、浜口 功、大隈 和
図 1: QGP 法による遺伝子発現量測定の予備検討 —— 14
図 2: DNA マイクロアレイと QGP 法のバリデーション —— 15
図 3: realtimePCR 法と QGP 法のバリデーション —— 16
図 4: 施設間でのマーカー遺伝子発現変動の相関 —— 17
図 5: アッセイ間におけるデータの安定性 —— 17
表 1: 各試験法間の相関 —— 18
表 2: 施設間でのマーカー遺伝子発現変動の相関 —— 18
表 3: アッセイ間におけるデータの安定性 —— 18

2. インフルエンザワクチンに対する新規安全性試験法と従来法との感度比較と新規製法ワクチンへの適応可能性に関する研究 —— 19
百瀬暖佳、板村繁之
図 6: インフルエンザワクチン接種ラットの体重変化 —— 26
図 7: 従来試験と遺伝子発現解析の相関 —— 26
図 8: インフルエンザワクチン接種に伴うラットの生体変化 —— 27
図 9: 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 —— 28
図 10: 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 —— 29
図 11: 新規インフルエンザ HA ワクチン接種に伴うラットの生体変化 —— 29
図 12: 新規インフルエンザ HA ワクチン接種に伴うマーカー遺伝子の発現変動 —— 30

3. 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 —— 31
水上拓郎
表 4: 本試験に用いた抗体とその反応性のまとめ —— 35
図 13: 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 —— 36
図 14: 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 —— 37

4. 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法に関する研究 —— 38
百瀬暖佳

図 15: 毒性参照品、高濃度 HA 原液接種に伴うマーカー遺伝子の発現変動(マウス) ——	41
図 16: 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(マウス) ——	42
5. 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 ——	43
持田 恵子	
図 17: 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 ——	47
表 5: 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 ——	47
表 6: 既知の濃度の毒性参照品測定の再現性 ——	48
表 7: 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 ——	48
表 8: 使用したワクチン株の表記法 ——	49
図 18: 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 ——	49
図 19: A 社における 3 回の繰り返し試験成績 ——	49
図 20: B 社における 3 回の繰り返し試験成績 ——	50
図 21: C 社における 3 回の繰り返し試験成績 ——	50
図 22: D 社における 3 回の繰り返し試験成績 ——	50
図 23: 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 ——	51
6. 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 ——	52
阿戸 学	
図 24: 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 ——	56
図 25: 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 ——	57
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ——	58
III. 研究成果の別刷 ——	60

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)
総合研究報告書

インフルエンザワクチンに対する新規安全性試験の導入と
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。現在、約 20 の遺伝子をバイオマーカー候補として同定している。本研究では、遺伝子発現解析法を用いた試験での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 試験法間でのバリデーションを実施した。さらに、試験法の標準化を目指した検討を行った。

研究分担者	板村繁之	国立感染症研究所・インフル
浜口 功	国立感染症研究所・	エンザウイルス研究センター
	血液・安全性研究部・部長	・室長
水上拓郎	国立感染症研究所・	阿戸 学
	血液・安全性研究部・室長	国立感染症研究所・免疫部・
		室長
大隈 和	国立感染症研究所・	研究協力者
	血液・安全性研究部・室長	
持田恵子	国立感染症研究所・	倉光 球
	細菌第二部・主任研究官	国立感染症研究所
		滝澤和也
		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
永田伴子 (財) 食品薬品安全センター
立花滋博 (財) 食品薬品安全センター
安藤栄里子 (財) 食品薬品安全センター
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
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 北里第一三共ワクチン株式会社

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。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、安全性の指標となり得るマーカー遺伝子を同定した

(Mizukami et al, Vaccine 26, 2270-2283, 2008)。

一般的に、遺伝子の発現定量は realtime PCR 法を用いて実施される。ただし、個々の遺伝子の発現量を測定するためには、動物個体からの臓器採取、臓器からの RNA 精製、cDNA の合成、PCR 反応と多くのステップがあり、試験期間の短縮化という面でやや課題が残る。近年、複数のターゲット遺伝子を一度のアッセイで同時に定量することが可能な QuantiGene Plex(QGP) が市販された。QGP 法は mRNA を直接のターゲットとするため、cDNA への逆転写は必要ない。さらに、ライセート中の RNA もキャプチャーできるため、RNA 精製のステップが省略でき、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。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。本研究では、インフルエンザワクチンの新規安全性試験としての遺伝子発現解析に、QGP 法を導入するためのバリデーションを行うことを目的とした。

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、解析に用いた。

2) インフルエンザワクチン

WPv と PDv(図 1,2)は、一般財団法人 化

学及血清療法研究所より供与された全粒子不活化ワクチンであり、人に接種する最終濃度に合わせて調整した。その他では、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 原液は国内メーカー4社より提供されたものである。インフルエンザ HA ワクチンは、研究試験用として購入した。対照には生理食塩水(SA)を用いた。

3) 採材

ワクチン各 5ml をラットの腹腔内に接種後、1日目に肺を採取した。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、定法に従って RNA を抽出した。ライセートサンプル調整用としては、肺(100mg)を凍結せずに RNAlater (Ambion) 中に保存した後、Proteinase K 10 μ l を含む 3ml の Homogenizing solution (Panomics) にて破碎し、65°Cで30分間処理した。

4) 遺伝子発現解析

ワクチン接種ラットの肺から精製した RNA (20 μ l)、または肺ライセート(40 μ l)に QuantiGene Plex Reagent System 2.0 (Panomics) 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°C 18~22 時間

インキュベートした後、96-well plate に移して 100 μ 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 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、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

1) QGP 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 QGP 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)が検出機器の検出限界と定量限界の間にある必要がある(概ね 10~10,000 counts)。すなわち、試験に使用する

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。1 反応あたり 0.2~20ng の poly(A)+RNA を用いて検討を行ったところ、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た。従って pPoly(A)+RNA として 1 反応あたり 2~20ng が QGP 法による測定の至適量であると考えられた(図 1)。

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 QGP 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 QGP 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 2 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 2)。

3) QGP 法(lysate)導入のためのバリデーション

臓器ライセートから直接ターゲット遺

伝子を定量できる QGP 法(lysate)の導入をめざし、様々な生体反応を惹起すると想定された検体を用いて検討を行った。毒性参照品と高濃度 HA 原液の段階希釈品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遺伝子発現解析の定法である realtime PCR 法、2) でバリデートした QGP 法(RNA)、および 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、データが直線上に乗ることが明らかとなった(図 3)。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測定値が異なるため(考察の項参照)、近似直線の傾きは 1 からは外れた。

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)。

4) 施設間バリデーション

QGP 法(lysate)による試験結果が他の施設でも再現できるか検討するため、国立感染症研究所と財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所で実施した試験の結果を比較検討した。使用した検体は、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である。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(図4)。両施設間でのデータの相関を検討したところ、1遺伝子を除き0.9を超える回帰係数が得られた(表2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2中段)。同一の肺ライセートを、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5, 表3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3中段)。

D. 考察

1) QGP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反応あたり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反応当たりの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くであろう。poly(A)+RNA量の存在比率から勘案し、QGP法にtotal RNAを使用する

場合は、Poly(A)+RNAの50倍量(1反応あたり0.1~1μg)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、QGP法導入にはメリットがあると考えられた。

2) DNAマイクロアレイデータとのバリデーション

検討した20のマーカー遺伝子のうちB2m、Cdig2、Ngfrを除く17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、発現量の低い生理食塩水、およびHAワクチン接種群においては、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ため、多くの遺伝子の発現量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(Cdig2、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、測定対象としなくても結果に大きく影響はしないと考えられたため、マーカー遺伝子から除外することとした。

3) QGP 法(lysate)法導入のためのバリデーション

realtime PCR 法と QGP 法での測定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よう、プローブがデザインされている。そのため、遺伝子発現量の測定値が 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)、遺伝子の発現変動に関しては 3 試験法間で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、QGP 法(lysate)が導入できれば、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 法と QGP 法(lysate)、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が示された。遺伝子の発現解析としては realtime PCR 法が最も一般的な手法であるが、QGP 法を含む多項目同時解析は今後の普及が見込まれ、将来的には QGP 法も一つの解析手法として選択されうると期待する。現状では、国内における解析機器の普及率は未だ高いとは言えず、本研究の 4)施設間バリデーションでも解析機器は国立感染症研究所のルミノメーターを用いた。なお、ここでの遺伝子発現解析は相対定量であるため、解析機器間の差は無視できると考える。

4) 施設間バリデーション

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、両施設間での測定値が乖離しており、回帰直線の傾きは 1 ± 0.1 には入らなかった。ただし、回帰係数は 0.8 を超える値を示した(表 2)。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。

図 5、表 3 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 ± 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定める、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ライセート原液を 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。ライセート原液の濃度を下げて、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。または、マーカー遺伝子の検出感度を上げて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し、プロトコールに柔軟性を残す事も考えられる。検出感度を上げるには、アッセイ系に添加する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 β -actin の値が振りきれるといった問題が生じる。プローブを再デザインして β -actin の感度を下げるか、内部標準を β -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、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、試験期間の短縮化が期待できる。さらに、施設間、アッセイ間でのバリデーションの結果から、試験法としての安定性が示された。

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) 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、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)

2) 百瀬暖佳、水上拓郎、倉光 球、益見

厚子、滝沢和也、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

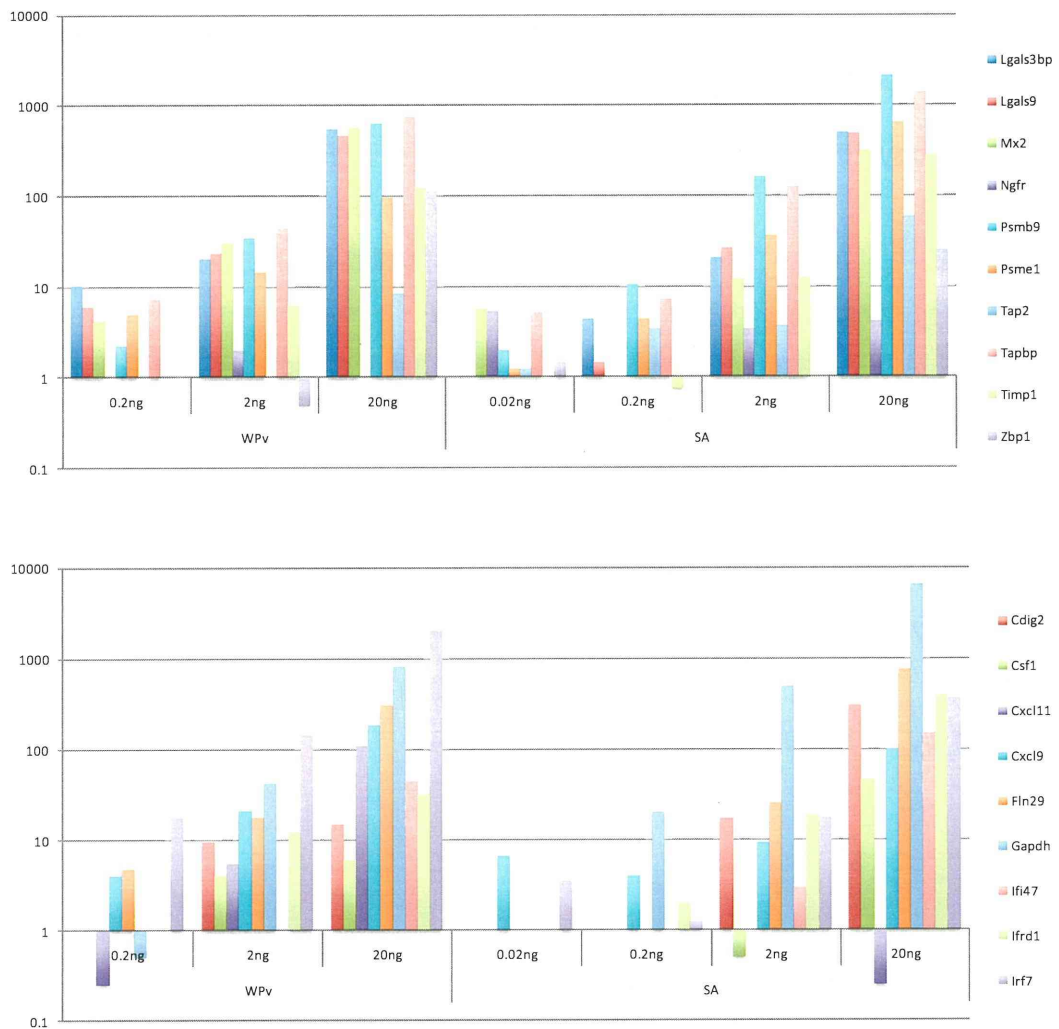


図 1. QGP 法による遺伝子発現量測定の予備検討

各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、おおむね解析機器の定量可能範囲内(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

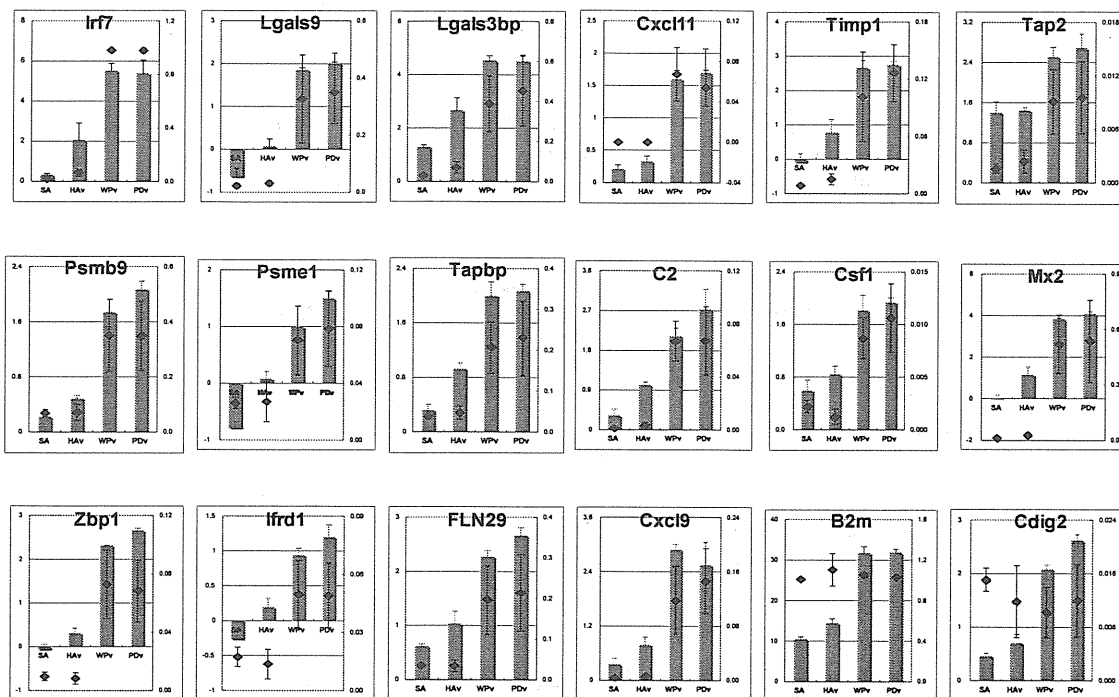


図 2. DNA マイクロアレイと QGP 法のバリデーション

DNA マイクロアレイと QGP 法によって得られたデータの間には相違がないか検討した。QGP 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; アルミニウム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)

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

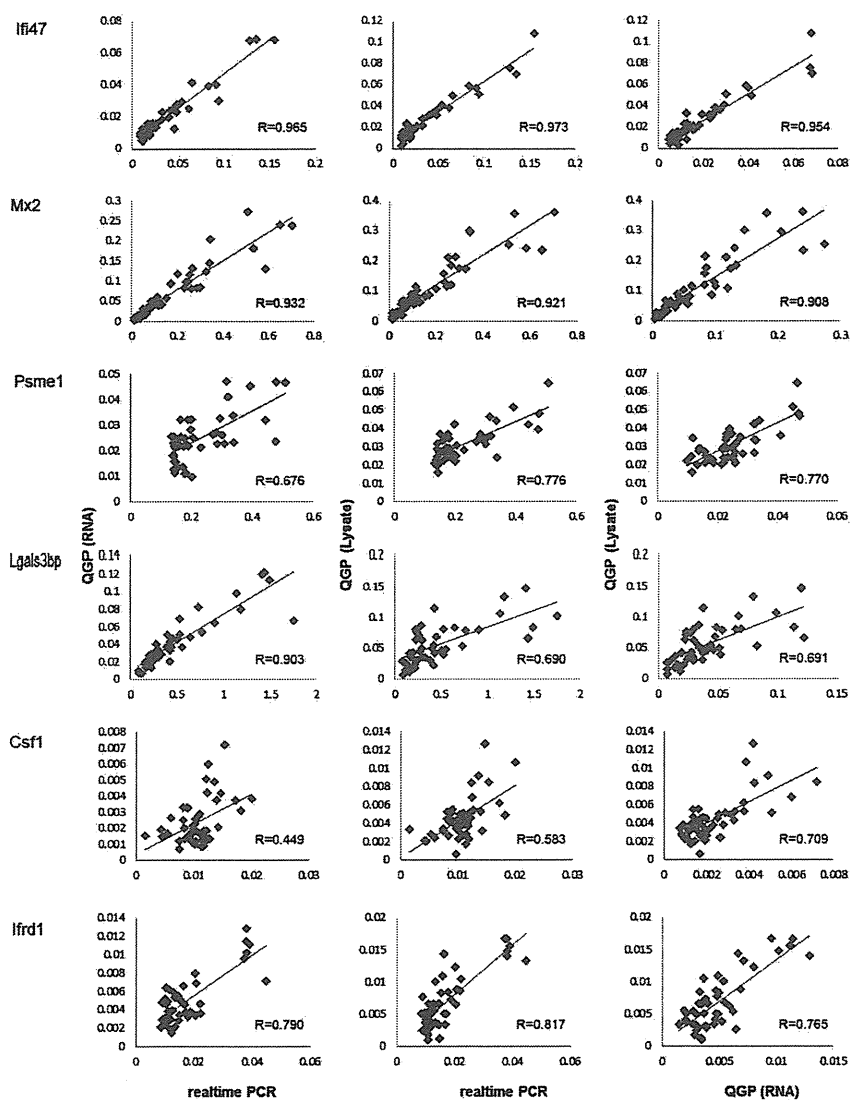


図 3. realtimePCR 法と QGP 法のバリデーション

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。6 遺伝子のみ示す。他 11 遺伝子も同様。

realtime PCR 法による解析結果は図 9 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 (lysate)

右 : QGP 法 (total RNA) v.s. QGP 法 (lysate)

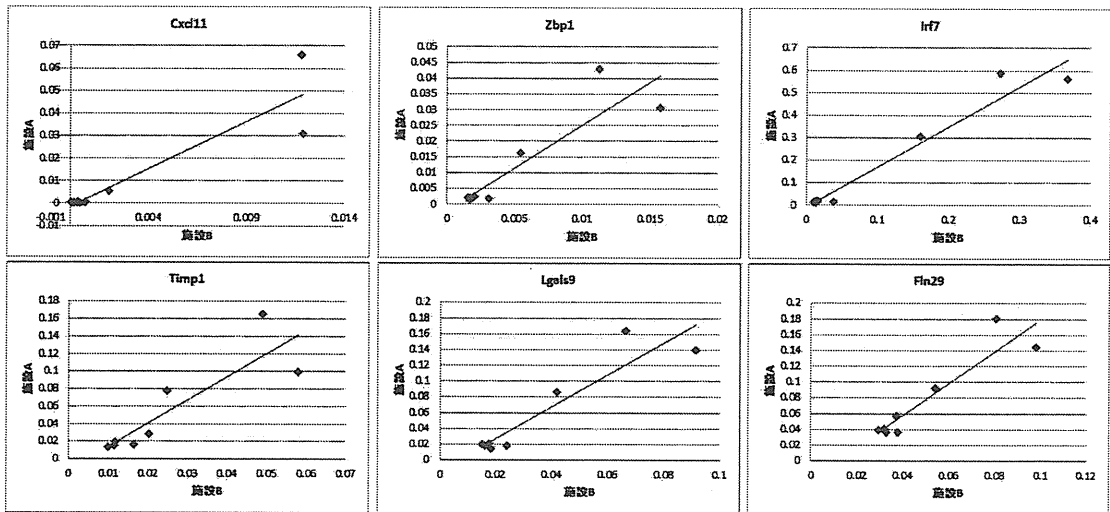


図 4. 施設間でのマーカー遺伝子発現変動の相関

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、QGP 法(lysate)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。6 遺伝子のみ示す。他 11 遺伝子も同様。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。感染研データは図 3、図 12 に同じ。

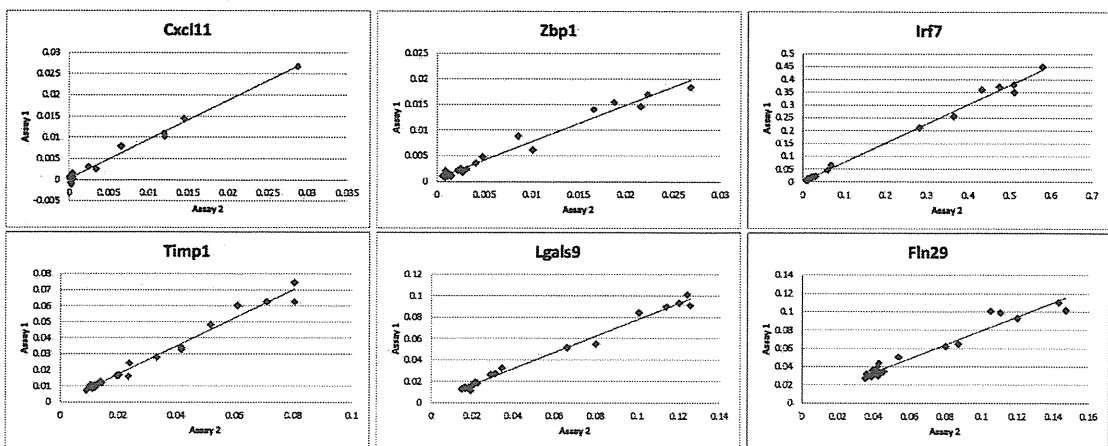


図 5. アッセイ間におけるデータの安定性

図 4 で用いたサンプルを試験実施日、試験実施者を変えて再測定し、アッセイ間のデータの安定性について検討を行った。6 遺伝子のみ示すが、他 11 遺伝子も同様。グラフ上に回帰直線を示す。

	lfi47	Mx2	Psme1	Lgals3bp	Trfd1/Fn29	lfrd1	lrf7	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. 各試験法間の相関

全てのマーカー遺伝子について、異なる手法間での解析結果の回帰係数(R)を示す(図 3 で示したものを含む)。

	Cxcl11	Zbp1	lrf7	Timp1	Lgals9	Fn29	lfi47	Psme1	Tapbp	C2	Cxcl9	Lgals3bp	lfrd1	Tap2	Psmb9	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 2. 施設間でのマーカー遺伝子発現変動の相関

全てのマーカー遺伝子について、異なる施設間での解析結果の回帰係数(R)、回帰直線の傾き、および y 切片を示す(図 4 で示したものを含む)。

	Cxcl11	Zbp1	lrf7	Timp1	Lgals9	Fn29	lfi47	Psme1	Tapbp	C2	Cxcl9	Lgals3bp	lfrd1	Tap2	Psmb9	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 3. アッセイ間におけるデータの安定性

全てのマーカー遺伝子について、異なるアッセイ間での回帰係数(R)、回帰直線の傾き、および y 切片を示す(図 5 で示したものを含む)。

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)
分担総合研究報告書

**インフルエンザワクチンに対する新規安全性試験法と従来法との感度比較と
新規製法ワクチンへ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。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、および試験感度について比較検討を行った。さらに、新規製法によるインフルエンザHAワクチンの安全性試験として、遺伝子発現解析法が適応できるか検討した。

研究協力者
倉光 球 国立感染症研究所
滝澤和也 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
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 北里第一三共ワクチン株式会社
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