

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約 20 のマーカー遺伝子を同定した。(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。また、新規製法ワクチンの安全性試験法として適応することが可能か検討を行った。

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

WPv と PDv(図 6)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。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 virosome 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購入した。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 5ml をラットの腹腔内に接種後、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 5ml をラットの腹腔内に接種後、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。肺の一部(100mg)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 10µl を含

む 3ml の Homogenizing solution (Panomics) にて破碎し、65°Cで 30 分間処理した。

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)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。

6) QGP 法

ワクチン接種ラットの肺から調整した肺ライセート(40µl)に QuantiGene Plex Reagent System 2.0 (Panomics) の Lysis mixture 33.3µl、Blocking reagent 2 µl、Capture beads 1 µl、Probe set 5µl を加え、全容量が 100µl 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 100µl 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 130µl 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と遺伝子発現変動(HA ワクチン)

各インフルエンザワクチン接種後 1 日目の体重変化を調べた結果、全粒子ワクチン(PDv、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 6)。また、HA ワクチン接種群のうち、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を認めるサンプルがあった(図 6 矢印、 $P = 0.0338$)。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。その

結果、10 遺伝子で発現の亢進が認められ (図 7、矢印)、従来法で見られた動物の生体変化と遺伝子発現変動に相関がある可能性が示唆された。

2) 従来法による安全性試験と遺伝子発現変動(高濃度 HA 原液)

従来法との相関をより詳細に検討するため、様々な活性を持つ検体を用いて解析を行った。毒性参照品、高濃度 HA 原液、およびそれらの段階希釈品をラットの腹腔内に接種し、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 8 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 8 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 8 下段)。

上記ラット個体において、肺における遺伝子の発現パターンを解析した。毒性参照品を接種されたラット肺では、い

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 接種群でも生理食塩水接種群と比較して有意な発現量の差が認められた(図 9 上段)。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 9 下段)。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 10)。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(2~4 倍濃度の一部)接種群、3つ目は高濃度 HA 原液(1 倍濃度と 2~4 倍濃度の一部)と生理食塩水接種群であった。なお、図 9 では遺伝子発現解析法として realtimePCR 法を用いたが、QGP 法でも同等のデータが得られることを確認している(前項 図 3)。

3) 従来法による安全性試験と遺伝子発現変動(培養細胞由来ワクチン、viroso me 型ワクチン)

様々な製法の 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。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の有精鶏卵由来 HA ワクチンと有意差は認められなかった(図 11, 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)。一方、viroso me 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 11, 左, $P<0.01$)。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 ($P=0.09$)。

上記ラット個体において、肺における遺伝子の発現パターンを解析した。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 12, HA (cell))。一方、virosoe 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 12, virosoe, $P<0.05$)。

D. 考察

1) 従来法による安全性試験と遺伝子発現変動(HA ワクチン)

接種後 1 日目の体重減少率について、HA ワクチン接種群間で有意に体重減少を認めるサンプルがあった(図 6、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 7)、従来法と遺伝子発現解析法の高い相関を認めることが示唆された。今回認められた体重減少は、現行の異常毒性否定試験に適應させると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可能性が示唆され、我々の同定したマーカー遺伝子群の発現変動は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。

2) 従来法による安全性試験と遺伝子発現変動(高濃度 HA 原液)

従来法と遺伝子解析法の相関をさらに詳細に解析するため、様々な活性を持つ検体を用いて検討を行った。接種動物の生体反応を指標とした従来の安全性試験を行った場合、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(図 8)。

マーカー遺伝子の発現パターン解析では、毒性参照品を用いた検討から、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(図 8、図 9 上

段)。

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 9 下段: 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(図 10)。これらは、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、遺伝子発現解析は従来法と比較して個体差が小さい傾向が認められ、より安定したデータが取得できる可能性が示唆された。

3) 従来法による安全性試験と遺伝子発現変動(培養細胞由来ワクチン、viroso me 型ワクチン)

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 ワクチンと国産の発育鶏卵由来 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(図 11)。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、抗原の糖鎖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 viroso me

型ワクチンは、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(図 11, 左)。国産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。

マーカー遺伝子の発現パターンでは、国産 HA ワクチンと培養細胞由来 HA ワクチンに有意差は認められず、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た。一方、接種個体に有意な体重減少を示した viroso me 型ワクチンでは、17 遺伝子中 12 遺伝子で有意な発現の亢進が認められ、遺伝子発現上、国産 HA ワクチンとは異なる反応を示した(図 12)。新規製法ワクチンである viroso me 型ワクチンにおいても、従来法と遺伝子解析法の試験結果の一致が認められた。

現在のところ、各マーカー遺伝子が何に反応しているのかは不明である。今後は様々な剤形のワクチンや添加剤等を活用し、各々の遺伝子が応答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ていく努力をすることも重要な課題となるであろう。

E. 結論

遺伝子発現解析法と従来法との試験結果に整合性があることが確認できた。遺伝子発現解析法は従来法より高感度であり、微細な生体変化を感知できることも

明らかとなった。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。さらに遺伝子発現解析は、製法の異なる HA ワクチンに対しても、安全性試験法として適応可能である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Momose H, 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) 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.

3) 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、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)

2) 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

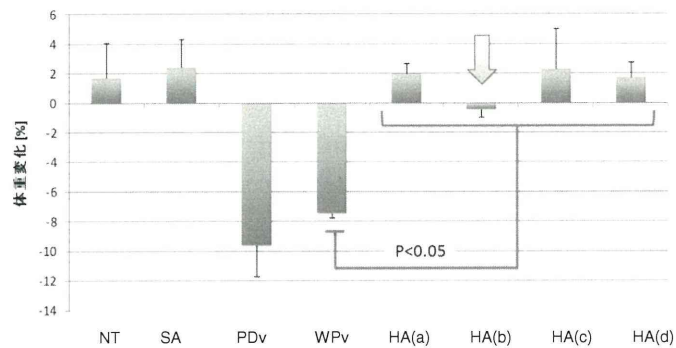


図 6. インフルエンザワクチン接種ラットの体重変化

HA ワクチン接種群(HA(a~d))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、PDv; 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、HA(a~d); HA ワクチン接種群

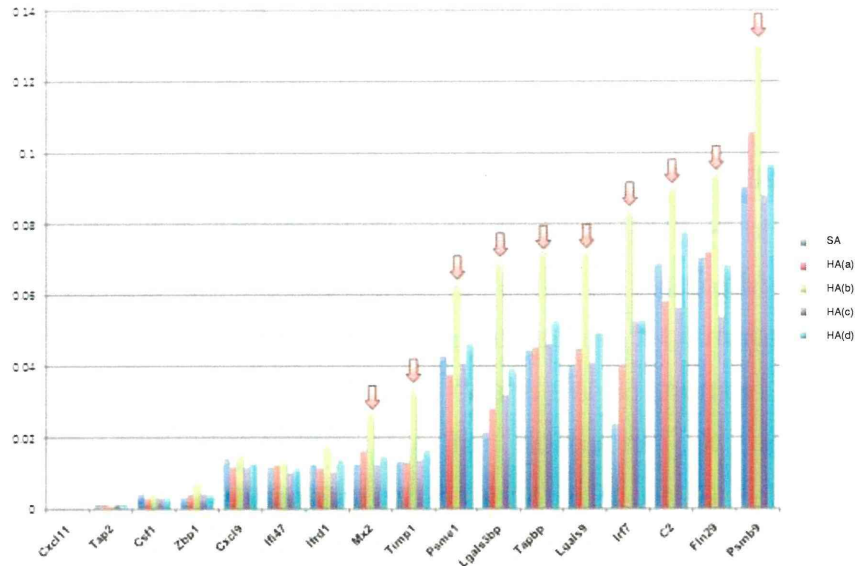


図 7. 従来試験と遺伝子発現解析の相関

HA ワクチン接種ラット肺における遺伝子発現解析の結果を示す。図 6 で他の HA ワクチンと比較して有意な体重減少を示したサンプルは、マーカー遺伝子の発現解析においても有意な発現上昇を示した(矢印)。SA;生理食塩水接種群、HA(a~d); HA ワクチン接種群。グラフ縦軸は β -actin に対する相対発現量

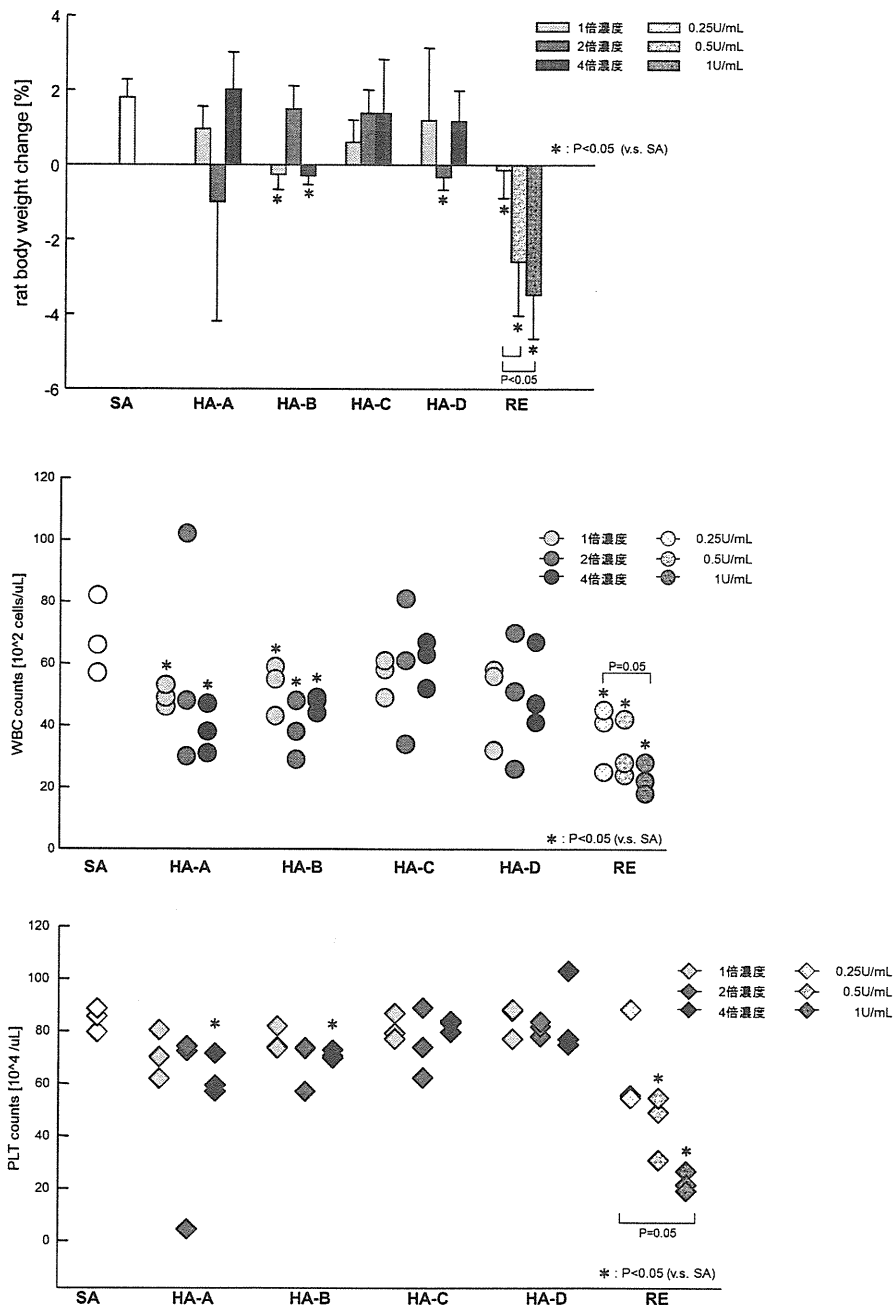


図 8. インフルエンザワクチン接種に伴うラットの生体変化

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、RE; マウス白血球数減少試験用毒性参照品接種群

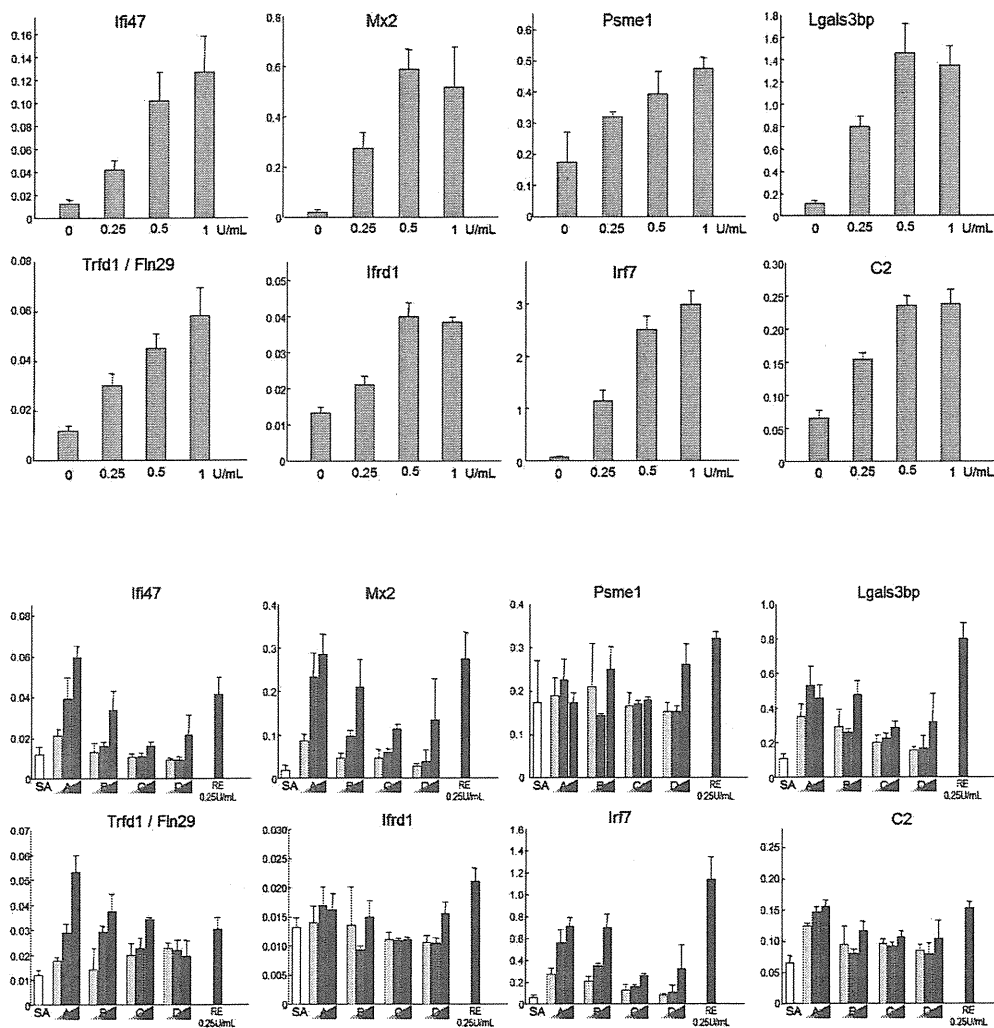


図 9. 毒性参照品、および高濃度 HA 原液接種に伴う
マーカー遺伝子の発現変動

従来試験法との比較検討を行うため、毒性参照品、および高濃度 HA 原液の段階希釈品をラットに接種し、接種後 1 日目の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。8 マーカー遺伝子のデータのみ示す。他 9 遺伝子も同様。

上 2 段：毒性参照品接種群。

下 2 段：高濃度 HA 原液接種群。SA; 生理食塩水接種群、A~D;高濃度 HA 原液接種群。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(上段に同じ)

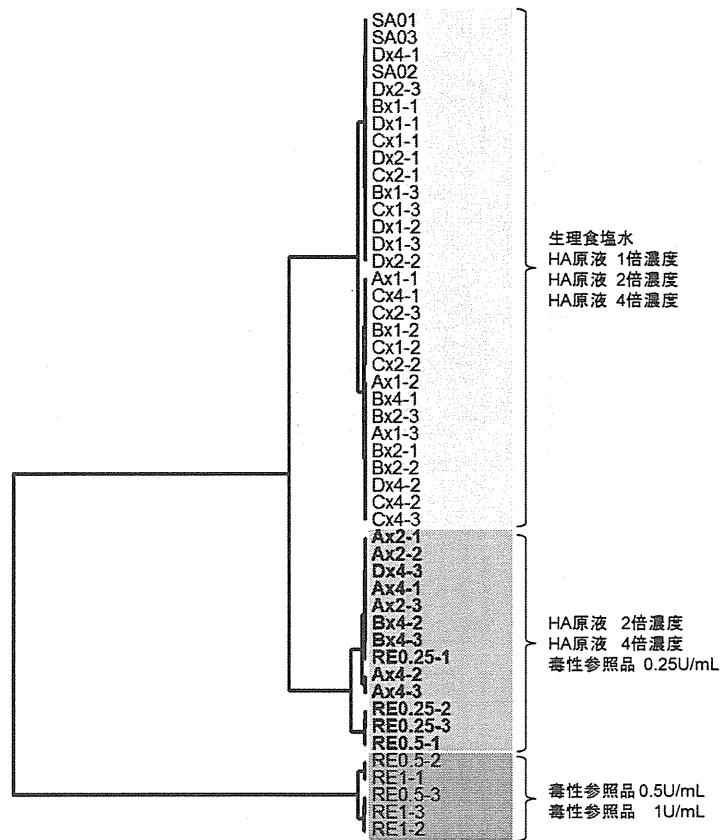


図 10. マーカー遺伝子の発現パターンを基にしたクラスター解析
各検体のマーカー遺伝子発現パターンの類似性(図 9)から、クラスター解析を行った。

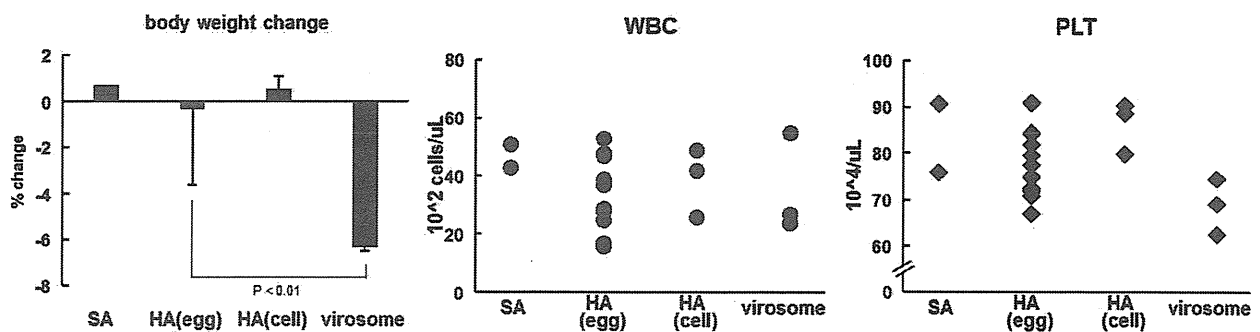


図 11. 新規インフルエンザ HA ワクチン接種に伴う
ラットの生体変化

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 (左)、末梢白血球数(中)、末梢血小板数(右)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

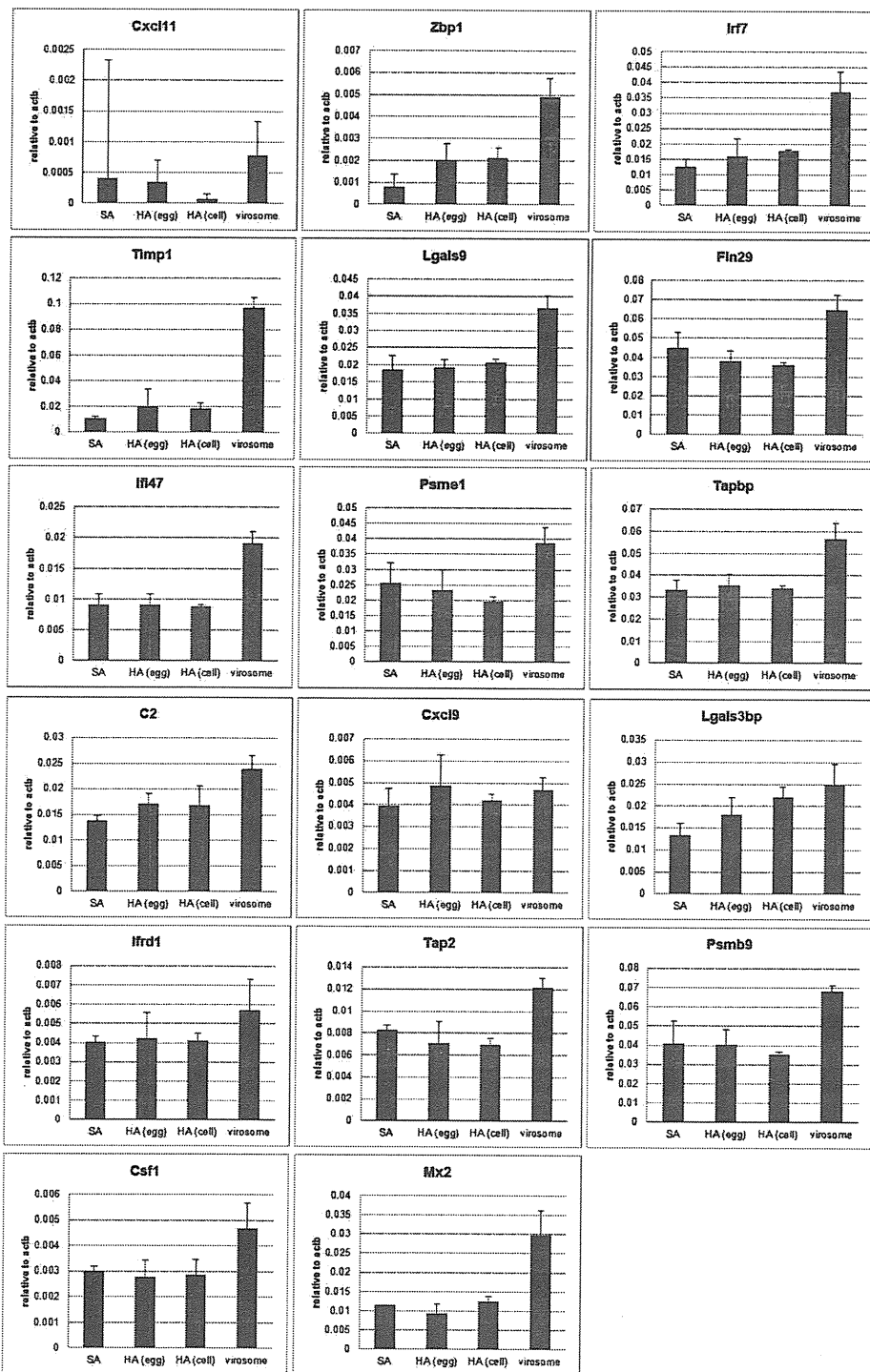


図 12. 新規インフルエンザ HA ワクチン接種に伴う
マーカー遺伝子の発現変動

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、 β -actin に対する相対定量で示した。

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事業)
分担総合研究報告書 (平成 23 年度)

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

研究分担者：水上拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

インフルエンザウイルスは抗原変異により短い周期の小規模流行を引き起こす感染症である。近年、家禽等で高病原性トリインフルエンザ(H5N1)が東南アジアを中心に発生し、世界的パンデミックの発生が懸念されており、本邦では全粒子インフルエンザワクチンにアルミニウムゲルを加えたワクチンが既に認可されているが、主反応に加え副反応の発生が予測されるため、迅速でより科学的な安全性評価法の開発が急務であった。そこで、我々はパンデミックインフルエンザワクチンの安全性評価法を開発する目的でDNAマイクロアレイ法を用いた解析を行い、体重減少や白血球減少と相関して全粒子インフルエンザワクチンやパンデミックインフルエンザワクチンで発現が有意に上昇する肺組織のバイオマーカーを同定する事に成功した。しかしこれらの遺伝子が肺組織に発現しているのか、あるいは肺組織に浸潤しているリンパ球等に発現しているかについては不明であった。そこで本研究では同定したバイオマーカーに関しラット肺組織を用いて発現部位を明らかにする事を研究目的とした。その結果、我々の同定したバイオマーカーの内、IRF-7, LGALS9, NGFR, TIMP1, CXCL9 においては蛋白質レベルでの発現上昇が確認され、細気管支上皮細胞や肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ及び集簇しているリンパ球など、発現細胞が同定された。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは抗原変異により短い周期の小規模流行を引き起こす感染症である。近年、家禽等で高病原性

トリインフルエンザ (H5N1) が東南アジアを中心に発生し、世界的パンデミックの発生が懸念されており、各国ではパンデミックに備えたワクチン開発と臨床試験が行われ、その有効性と安全性が示さ

れている。本邦では全粒子インフルエンザワクチンにアルミニウムゲルを加えたワクチンが既に認可されているが、主反応に加え副反応の発生が予測されるため、迅速でより科学的な安全性評価法の開発が急務であった。そこで、我々はパンデミックインフルエンザワクチンの安全性評価法を開発する目的で DNA マイクロアレイ法を用いた解析を行った。その結果、体重減少や白血球減少と相関して全粒子インフルエンザワクチンやパンデミックインフルエンザワクチンで発現が有意に上昇する肺組織のバイオマーカーを同定する事に成功した (Mizukami et al., Vaccine. 2008; 26: 2270-2283)。現在、これらの遺伝子を用いてワクチン安全性試験を実施することが可能となりつつある (本研究課題)。しかしこれらの遺伝子が肺組織に発現しているのか、あるいは肺組織に浸潤しているリンパ球等に発現しているかについては不明であった。また、遺伝子発現のみなのか、実際に蛋白質として発現しているかについても未検証であった。そこで本研究では同定したバイオマーカーに関し、ラット肺組織を用いて発現部位を明らかにする事を研究目的とした。

B. 研究方法

1) 動物

ウィスターラット (8 週齢オス) を SLC より購入して実験に用いた。

2) ワクチン

ワクチンはマウス白血球数減少試験用の毒性参照品を用いた。またコントロールとして生理食塩水 (日本薬局方) を用いた。

3) 動物実験

試験は、生物学的製剤基準の異常毒性否定試験法に準じて行った。即ち、動物を導入後、1 週間 健康状態を確認し、健康で体重推移が正常であったラットに 5mL の検体を接種した。ワクチン接種後 1 日目に遺伝子発現が有意に上昇することから、接種後 1 日目の肺組織をサンプリングした。肺組織は PBS にて表面を洗浄した後、ブアン固定液に浸し 4°C で 2 時間固定した。その後、攪拌しながら新しいブアン固定液で 4°C 一晩固定し、常法に従いパラフィンブロックを作製した。

動物実験は国立感染症研究所動物実験指針に則り、所内で承認された方法により実施した。

4) 免疫組織化学

作製されたパラフィンブロックをリラトーム REM-710 (大和光機工業 (株)) を用いて 4um の切片を作製した。切片は MAS コートスライドグラス (松浪硝子工業株式会社) に張り付け一晩以上乾燥させ、免疫組織化学に用いた。実験に用いた抗体は表 4 に示す。

染色は常法に従い実施した。即ち、Xylene にて脱パラフィンした組織を 100% EtOH で脱水し、5% BSA にてブロッキングし、一次抗体 (表 4) を 4°C 一晩反応させた。一次抗体を洗浄し、更に

5%BSAにてブロッキングした後、二次抗体を用いて検出した。二次抗体は一次抗体を作製した動物種のIgG抗体を用いた。蛍光染色にはDylight 488標識IgG (Jackson Immuno Research)を用いた。またDAB発色用にはビオチン標識IgG抗体を用いた(Jackson Immuno Research)。DAB発色用には一次抗体ブロッキングの前に内因性ペルオキシダーゼ除去処理を施した。蛍光染色ではHoechst33342で核染色を行った。試験実施前に各抗体を1:50より1:1000までの希釈系列を作製し、至適濃度を設定した(表4)。また、Isotype抗体及び一次抗体(-)のコントロールを用い、非特異反応の有無を確認した。

C. 研究結果

同定されたバイオマーカーの内、ラット抗体が入手可能なIRF-7, LGALS9, NGFR, TIMP1, CXCL9を用いて肺組織における免疫組織化学を実施した。毒性参照品(RE)を投与した肺組織でリンパ球の集簇が一部、気管支周辺に認められた。肺胞上皮組織等の変化はRE接種群及び生理食塩水(SA)投与群では認められなかった。

IRF-7は細気管支上皮細胞において非常に強い発現を認めた。また肺上皮細胞及び肺胞マクロファージにおいても高い発現が認められた(図13-A, B)。また、気管の上皮においても発現が認められた。一方、SA投与群では、細気管支上皮細胞

での発現は認められたものの、肺上皮細胞及び肺胞マクロファージにおいて発現は微弱か、殆ど認められなかった(図14A)。LGALS9も同様に細気管支上皮細胞に強い反応を認めた。また、LGALS9は肺胞上皮細胞、マクロファージではびまん性の反応性を示した(図13C)。SA投与群では、細気管支上皮細胞での発現は認められたものの、肺上皮細胞及び肺胞マクロファージにおいて発現は微弱か、殆ど認められなかった(図14B)。NGFRは細気管支上皮細胞や、肺胞上皮細胞では発現が殆ど認められなかったが、肺胞マクロファージ及び集簇しているリンパ球に反応が認められた。SA投与群では、微弱か、殆ど認められなかった(図13D, 14C)。TIMP1は一部の肺胞マクロファージに反応が微弱ながら認められる。また、血管内皮内のリンパ球にも反応が認められた(図13E)。SA投与群では、発現は殆ど認められなかった。CXCL9は細気管支上皮細胞に強い反応性を認めたが、肺胞上皮細胞ではその発現は非常に弱かった。また、CXCL9は集簇リンパ球に強い発現が認められた(図13F~H)。一方、SA投与群では、細気管支上皮細胞での発現は認められたものの、肺上皮細胞及び肺胞マクロファージにおいて発現は殆ど認められなかった(図14D)。

以上の結果より、今回調べた5つのバイオマーカーの発現に関しては、SA接種群と比較してRE接種群で上昇していた。

D. 考察

本研究課題では、インフルエンザワクチンの安全性試験法の開発で同定されたバイオマーカーの発現細胞の同定を行った。その結果、SA に比べ有意に発現上昇が認められた遺伝子の内、IRF-7, LGALS9, NGFR, TIMP1, CXCL9 においては蛋白質レベルでの発現上昇が確認された。特に、IRF-7, LGALS9 及び CXCL9 は細気管支上皮細胞に強い発現が認められた。よってこれらの遺伝子は肺組織自体がメインの産生場所であることが示唆される。

一方で IRF-7, LGALS9, NGFR は肺胞マクロファージにおいても強い発現が認められた。また IRF-7, NGFR, CXCL9 は集簇リンパ球においても強い発現が認められた。よってこれらの遺伝子は肺組織のみならず、一部のリンパ球やマクロファージにも同様に発現していることが示唆された。NGFR は細気管支上皮細胞には発現しておらずリンパ球のみ発現が認められる事から、NGFR の発現上昇は集簇したリンパ球によるものと考えられる。

IRF-7 は MyD88 と結合し、TLR7,8,9 を介したインターフェロン α 産生に強く関わっている因子として明らかとなっている。今回の研究によって IRF-7 がリンパ球のみならず、細気管支上皮細胞においても強く誘導されていることから、なんらかの免疫反応が起こっていると言える。インフルエンザ感染において、ヒトの細気管支及び 2 型肺胞上皮細胞にはトリ由来のウイルスが認識する SA α

2.3Gal が存在していることが明らかとなっており、インフルエンザ感染における場である細気管支上皮細胞がワクチン接種によっても活性化されていることは興味深い。

一方、LGALS9 は肺組織に発現が認められる分子で、活性化 T 細胞のアポトーシス誘導や好酸球の遊走因子、細胞接着に関わる事が明らかとなっている。本研究においては、過去の報告の通り、肺組織、とりわけ細気管支上皮細胞での発現が認められ、RE 接種群で発現上昇が認められた。今後は、これらの分子の機能と共に、ワクチンのデリバリー経路、気管支上皮における TLR の発現などを比較しながら検討する必要がある。

CXCL9 は細気管支上皮細胞に加えて、リンパ球、マクロファージでの発現が認められたことから、炎症箇所への白血球等のリクルートに関与していることが推測される。

本研究では、ラットで用いる事の可能な抗体が無いなどの技術的な限界より、これらの発現遺伝子が、リンパ球やマクロファージのどのサブセットに発現しているかについては明らかにすることが出来なかった。特に、リンパ球やマクロファージに発現していた分子に関しては、肺組織よりリンパ球を分離し、フローサイトメトリーによって分離することで、より詳細な遺伝子発現解析が実施できるものと推測され、迅速試験法への応用等が可能となると考える。

E. 結論

我々の同定したバイオマーカーの内、IRF-7, LGALS9, NGFR, TIMP1, CXCL9 においては蛋白質レベルでの発現上昇が確認され、発現細胞が同定された。今後は、フローサイトメトリー等によってより詳細なサブセット解析を行い、遺伝子発現細胞の同定を行うことで、迅速試験法への応用を試みる必要がある。また、ラットは抗体等の制限が多いため、可能であればマウスにおいても検討する事が望ましいと考える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T,

Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. Blood. In press

2. 学会発表

1. 水上 拓郎、倉光 球、百瀬 暖佳、滝沢和也、益見 厚子、石井 健、浜口 功. 網羅的遺伝子発現法を用いた経鼻インフルエンザワクチンの安全性試験法の開発. 第15回 日本ワクチン学会 2011 年度

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

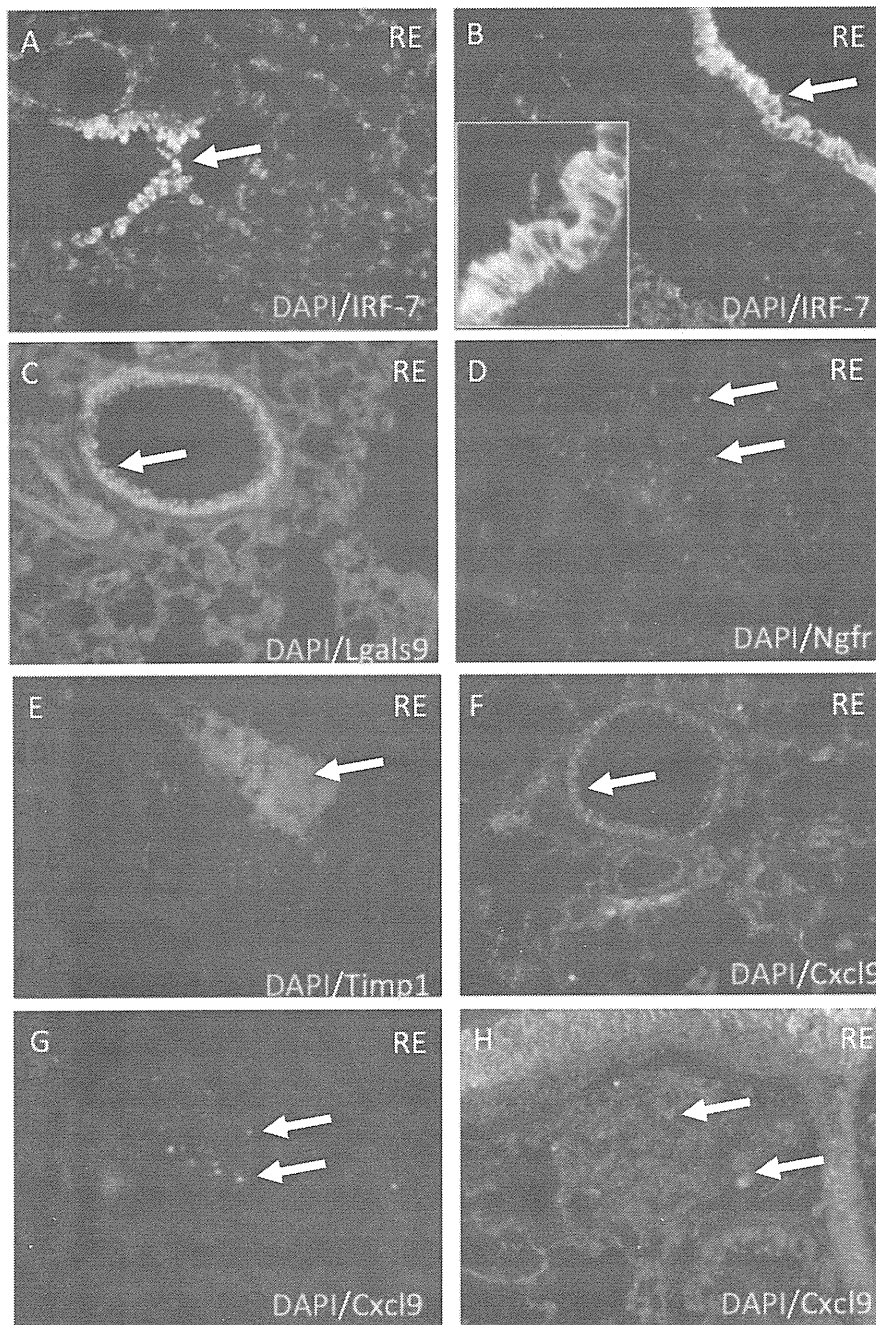
なし

3. その他

なし

表 4 本試験に用いた抗体とその反応性のまとめ

名前	抗体			肺組織			
	製造会社	Cat No	希釈	細気管支上皮	肺胞上皮細胞	肺胞マクロファージ	集簇リンパ球
IRF-7	Abcam	ab62505	1:800	+++	++	+++	++
Lgals9	Abcam	ab69630	1:400	++	++	++	-
NGFR	Chemicon	MAB365	1:200	-	-	++	++
TIMP1	R&D	AF580	1:200	-	-	+	-
CXCL9	BioLegend	515601	1:200	+++	+	+	+++



**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**

A)肺胞上皮細胞における IRF-7 の発現 B) 細気管支上皮細胞における IRF-7 の発現
 C) 細気管支上皮細胞における LGALS9 の発現 D)肺胞マクロファージにおける NGFR
 の発現 E)血管内のリンパ球における Timp1 の発現 F)細気管支上皮細胞における
 CXCL9 の発現 G)マクロファージにおける CXCL9 の発現 H)集簇リンパ球における
 CXCL9 の発現

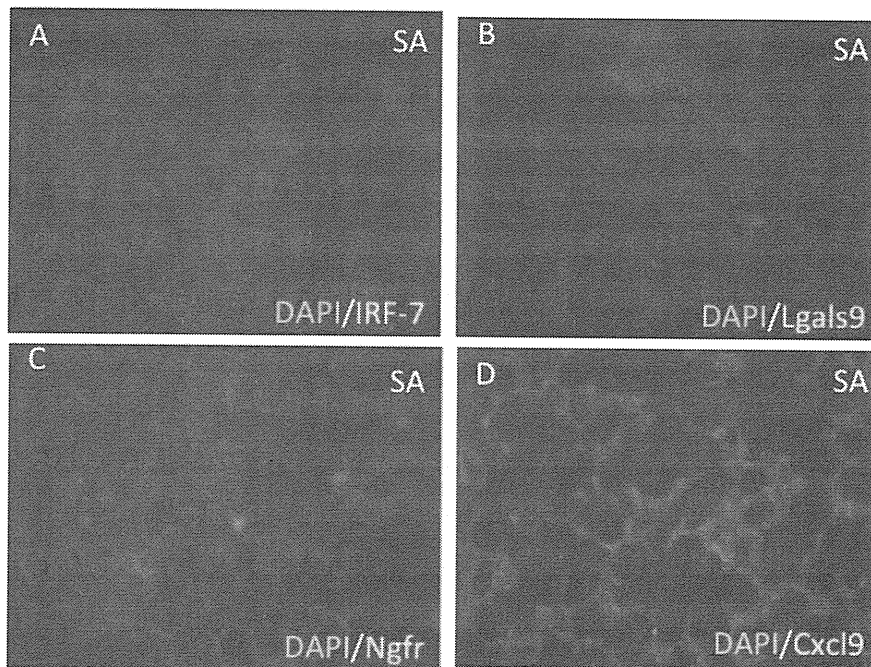


図 14 : 生理食塩水 (SA) 接種後 1 日目の肺組織における
バイオマーカーの免疫組織化学

- A)肺胞上皮細胞における IRF-7 の発現 B) 肺胞上皮細胞における LGALS9 の発現
C)肺胞マクロファージにおける NGFR の発現 D)肺胞上皮細胞における CXCL9 の発現

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 (平成 22 年度)

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

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

研究要旨

生物学的製剤基準におけるインフルエンザワクチンの品質管理試験には、マウスやモルモット、ウサギを用いた様々な動物安全性試験が設定されている。一方、現在われわれが取り組んでいる遺伝子発現解析に基づく新規安全性試験法では、ラットを試験動物として用いている。本研究においては、我々が構築してきた遺伝子発現解析による安全性試験において、試験動物種をラットからマウスへ変更可能か検討を行った。これまでラットで得られている結果と同様の結果が現行の試験動物であるマウスでも得られれば、従来法との相関性がより保たれると考えられる。

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	北里第一三共ワクチン株式会社
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 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。動物を用いた安全性試験としては、原液に対するウサギ発熱試験、マウス白血球数減少試験、小分け製品に対する異常毒性否定試験、

マウス白血球数減少試験、マウス体重減少試験が挙げられる。試験動物としてはウサギ、モルモット、マウスを用いている。一方、これまでに我々は、新規安全性試験法の開発研究を実施するためにラットを試験動物として設定してきた。我々の構築している試験法はマーカ一遺伝子の発現変

動を指標としているため、ゲノム解析が進んでいる動物を選択する必要があったからである。将来、現行の検定試験を遺伝子発現に基づく新規試験法で代替することを考えた場合、ラットを用いた試験法でも問題はないと考えられるが、現行の検定試験と同じ動物種を用いることができればより望ましい。本研究では現行の試験動物のうち、ゲノム解析が最も進んでいるマウスへの変更が可能か検討を行った。

B. 研究方法

1) 動物

4週齢の ddY 系統マウス(メス)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、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 0.5mL マウス腹腔内に接種した。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日目にマウスより肺を採取した。一群3匹とした。

ワクチン接種したマウスから採取した肺は、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。

4) QGP 法

ワクチン接種マウスの肺から精製した total RNA (20 μ l)は、65°Cで 10 分間処理した後、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 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°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。