

C. 研究結果

個々のマーカー遺伝子の発現解析を行ったところ、多くの遺伝子で毒性参照品の濃度依存的な発現上昇を認めた。しかし、その変動率はラットと比較すると非常に緩やかなものであった(図 15、図 9 参照)。一方、いずれの検体でも全く発現が変動しない遺伝子(Csf1)や、毒性参照品での濃度依存性が認められない遺伝子(lfi47, Tap2, Cxcl9, Cxcl11, Zbp1)があった。高濃度 HA 原液接種群(3 倍濃度)では、一部の検体接種群において、有意な発現量の増加を認めるマーカー遺伝子があった(Mx2, Psme1, Irf7, Cxcl9, Cxcl11)。

次に、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。その結果、ラットの場合と同様に 3 個のクラスターに分類することができた。1 個目のクラスターは毒性参照品(1U/mL、0.25U/mL)接種群、2 個目のクラスターは毒性参照品(0.5U/mL、0.12U/mL)と HA 原液(3 倍濃度の一部)接種群、3 個目のクラスターは HA 原液(3 倍濃度の一部、1 倍濃度)と生理食塩水接種群であった(図 16)。毒性参照品の 0.5U/mL と 0.25U/mL 接種群は分類されるべきクラスターが逆転し、ラットのデータと相違が見られた。

D. 考察

マウスにおけるマーカー遺伝子の発現変動は、ラットの場合と同様の傾向を示し、マウスとラットで共通のマーカー遺伝子が活用できる可能性が示唆された。ただし、

マウスにおけるマーカー遺伝子の発現変動は個体差があり、データのばらつきが比較的大きかった。また、毒性参照品を用いた解析において、マーカー遺伝子の発現変動はラットほど鋭敏ではなく、濃度依存的な変動が認められない遺伝子も散見された(図 15: lfi47, Tap2, Csf1, Cxcl9, Cxcl11, Zbp1 等)。図 16 のクラスター解析で毒性参照品の 0.5U/mL と 0.25U/mL の分類クラスターが逆転したのは、これら濃度依存的な発現変動を認めないマーカー遺伝子の存在に起因するものと考えられた。したがって、データの信頼性、安定性、試験感度の観点からは、マウスよりラットの方が試験動物として適していると考えられた。

本研究においてはラットでの解析に倣い、ワクチン接種後 24 時間目の肺における遺伝子発現解析を行った。一方、従来法であるマウス白血球数減少試験ではワクチン接種後 12-18 時間目の末梢白血球数、マウス体重減少試験ではワクチン接種後 24 時間目の体重を測定することを考えると、より早い時間での採材が必要である可能性もある。また、マウス系統、週齢等を検討することでマウスでも感度向上が図れる可能性がある。

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で、ラットからマウスへの試験動物の変更が可能か検討を行った。ラットとマウスで共通のマーカー遺伝子が活用できる可能性が示唆され

たが、データの安定性や試験感度の観点から、マウスよりもラットのほうが試験動物として適していると考えられた。

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

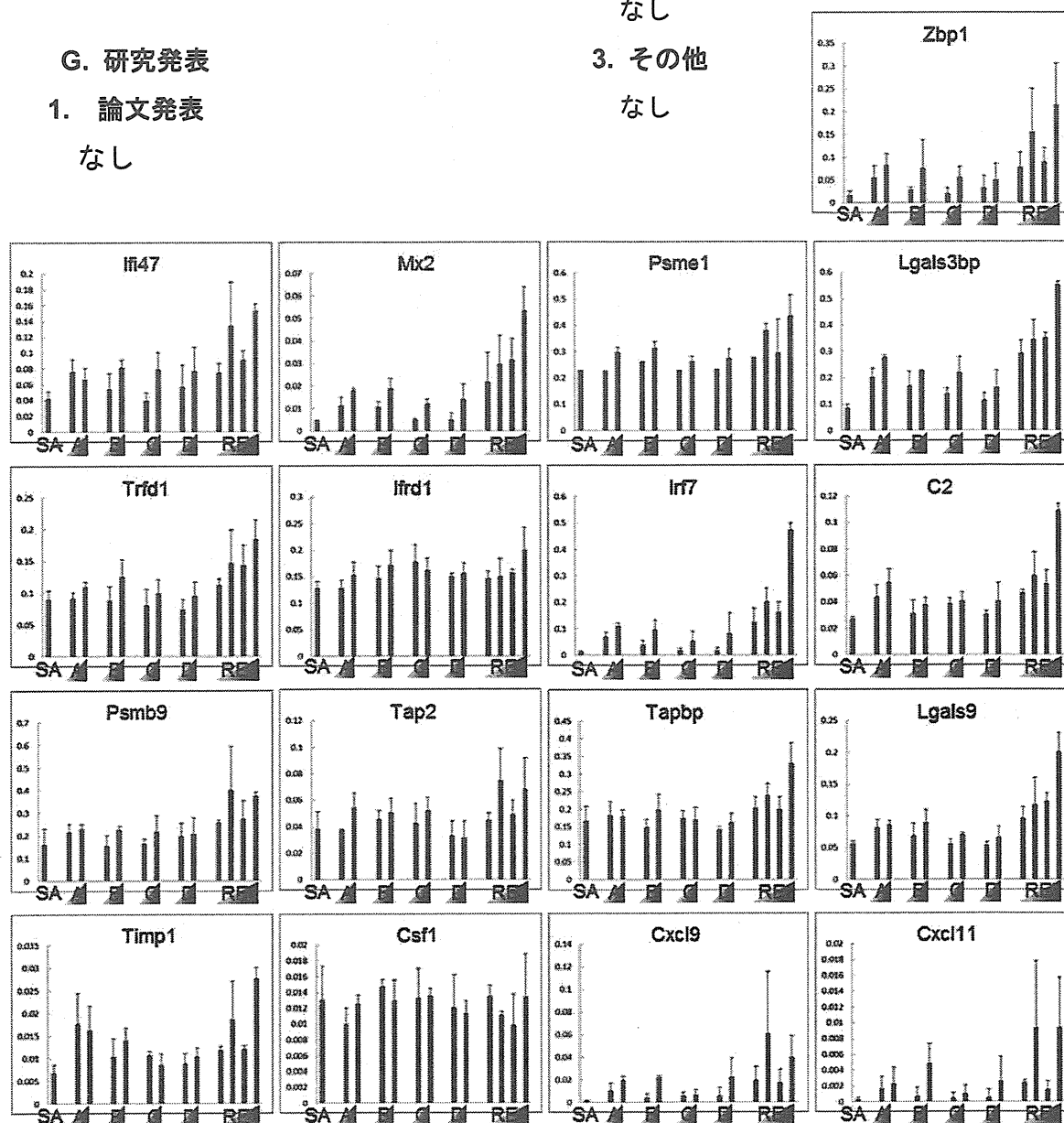


図 15. 毒性参照品、高濃度 HA 原液接種に伴うマーカー遺伝子の発現変動(マウス) (説明文は次頁下)

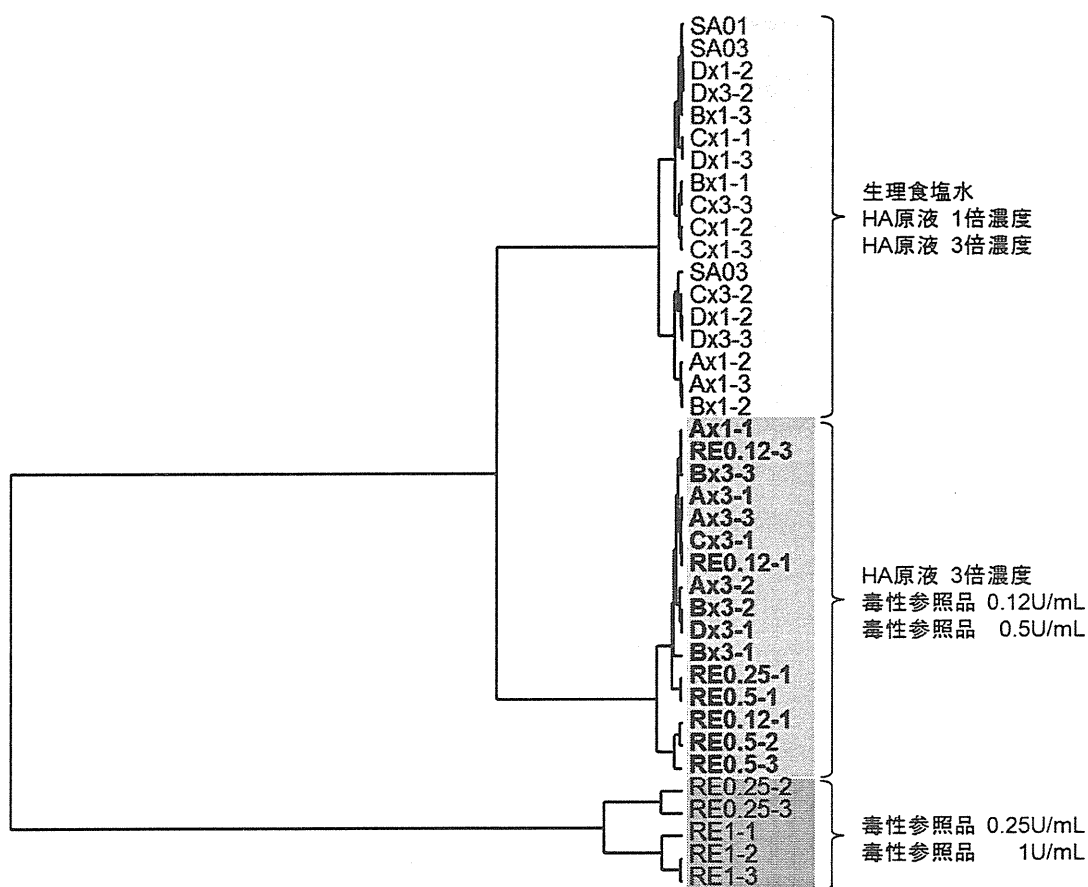


図 16. マーカー遺伝子の発現パターンを基にした
クラスター解析(マウス)

図 15 で測定した相対発現量を基に、各サンプルにおける 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。

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)

毒性参照品、および高濃度 HA 原液を段階希釈し、これらを接種したマウス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、3 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接種群。左から 0.12U/mL、0.25U/mL、0.5U/mL、1U/mL の検体を接種。

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 21-22 年度)

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

研究分担者 持田恵子 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

研究要旨

インフルエンザ HA ワクチンのマウス白血球数減少試験 (LP 試験) の精度向上を目的に、マウス系統および週齢が試験精度に与える影響とワクチン高濃度原液での試験管理について検討した。マウス系統および週齢間では大きな差は認められず、これまで検定に用いてきた ddY 4 週齢マウスで試験を実施することが適当であると確認された。高濃度 (600 µg/mL) ならびに小分け製品相当のワクチン液 (200 µg/mL) の白血球数減少活性の用量依存性を検討した。その結果、用量に依存したマウス白血球数減少活性 (LP 活性) は認められず、現行の HA ワクチンには白血球数減少を引き起こす生理活性物質はほとんど存在しないものと推察された。高濃度ワクチン液による LP 試験を感染研および 4 製造所において実施し、試験の再現性と施設間差を比較した。いずれの施設においても有意な LP 活性は認められず、現行の小分け製品に適用される 0.2 U/mL の基準値を下回ったことから、試験の再現性および施設間差が無いことが確認された。このことから、インフルエンザ HA ワクチンには有意な LP 活性は含まれないものと結論づけられ、LP 試験は現行の小分け製品に代わり高濃度ワクチン原液で品質管理することが妥当であり、基準値についても検討が必要であると考察された。

研究協力者

福田 靖 (国立感染症研究所 細菌第二部)

大塚菜緒 (同上)

久保田真由美 (同上)

鯉坂裕美 (同上)

蒲地一成 (同上)

甲斐 光 (デンカ生研株式会社)

山口 保 (同上)

佐藤 靖 (同上)

浦山重信 (北里第一三共ワクチン株式会社)

渡辺隆雄 (同上)

藤田順二 (阪大微生物病研究会)

福家 功 (同上)

尾堂浩一 (化学及血清療法研究所)

徳永英治 (同上)

A. 研究目的

インフルエンザワクチンの安全性を確認するための試験として実施されているマウス白血球数減少試験 (以下 LP 試験と略す) については、これまでも測定精度および再現性に問題のあることが指摘されてきた。そこで、当該研究事業では、試験精度の向上を目的に試験動物のマウス系統やマウス週齢について検討を加え、さらに HA ワクチン高濃度原液での試験管理の可能性についても検討を加えた。

さらに、多施設間での試験の再現性を

明らかにするためワクチン製造所との共同研究を実施した。製造所においては、高濃度ワクチン原液を用いて同一検体の測定を3回繰り返し、同一施設内での再現性評価も同時に実施した。また、動物愛護の観点から使用動物数を減らした試験管理についても考察を加えた。

B. 研究方法

(1) 検体および参照品

標準品としてインフルエンザ全粒子ワクチンを凍結乾燥したマウス白血球数減少試験用毒性参照品(L-4)を用いた。検体として4製造所から供与された3種類のウイルス株(A/California/7/2009、A/Victoria/210/2009、B/Brisbane/60/2008)由来ワクチン高濃度原液の各3ロットを用いた。ワクチン原液の濃度依存性試験の際は小分け製品と同等の割合で各ウイルス株を混合したものを扱い、製造所との共同研究の際はウイルス株毎に試験を実施した。検体の表記は表8に示すように、製造所名(A~D)と1から9までの通し番号で示した。最終タンパク濃度を生理食塩水で600 µg/mLに調製し、600 µg/mLに満たない検体は希釈せずに用いた。

(2) マウス白血球数減少(LP)試験

マウスはddY、C57BL/6、BALB/cの4、6および8週齢(雌)を用いた。毒性参照品は生理食塩水により2倍間隔で5段階に希釈した。毒性参照品および濃度を調製した検体(0.5 mL)を、1群10匹のマウス腹腔内に投与した。投与12~18時間後にマウスの尾静脈より採血し、コールターカウンターで白血球数を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て実施した。なお、ヒト材料を研究対象としないため、倫理上の問

題は発生しない。

C. 結果

1. マウスの系統および週齢の検討

マウス系統ならびに週齢が試験精度に与える影響を検討するためddYの他に近交系マウスであるC57BL/6およびBALB/cマウスの4、6および8週齢を用いてLP試験を行った。図17に示すように、すべての系統のマウスで全粒子ワクチンを投与したマウスの白血球数は週齢とともに減少傾向を示した。これに対し、生理食塩水投与マウスの白血球数はそれぞれの系統ごとに異なる傾向を示した。表5にマウス白血球数の平均値と標準偏差、ワクチンおよび生理食塩水投与群間の有意差検定の結果を示した。p値はすべて有意差有りの結果を示したが、特にddYの4週齢とBALB/cの6週齢に高い有意差が認められた。ddYマウスは非近交系マウスであるため個体差が大きいと考えられてきたが、今回C57BL/6やBALB/cなどの近交系マウスと比較したところ、ddYマウスでも近交系マウスと同等な精度を与えることが示された。

2. LP試験の精度および再現性

ddY 4週齢マウスを用いて、本試験の精度を評価した。通常の実験で実施されるように毒性参照品を2倍間隔で4~5段階希釈した検量線に対し、既知濃度の2検体(0.2および0.6 U/mL)を試験品として測定を行った。3回繰り返し行った測定結果を表6に示した。1回毎の測定値のバラつきは大きく期待値からのズレも大きかったが、3回の測定値を平均するとほぼ期待値通りの値となった。このことから、試験を繰り返すことによりLP活性を検出することは可能であるものの、1回の試験では十分な試験精度が得られないことが示唆された。

3. インフルエンザ HA ワクチンの高濃度原液を用いた測定

ワクチン製造所 4 施設から分与された 2009-2010 年シーズン用インフルエンザ HA ワクチン原液を用いて、より精度の高い測定が可能となるか否かを検討した。小分け製品と同等になるように 3 種のワクチン株を混合し、最終タンパク濃度を 600 および 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した。これらの検体の LP 活性を 3 回繰り返し測定した結果を表 7 に示した。現行の判定基準を基に小分け製品相当の判定基準を <0.2 U/mL、高濃度原液を <0.6 U/mL とした場合、C 社の小分け製品相当が 3 試験中 1 回で基準値を上回った。毒性参照品の回帰係数は 3 回の試験でそれぞれ、 -0.361 、 -0.272 、 -0.202 であったが、HA ワクチンの 2 濃度から求めた回帰係数は $-0.268 \sim 0.163$ と大きくバラつき、毒性参照品の検量線に対し同等の回帰係数を示すものはなかった。

4. 感染研と製造所における試験成績の比較

図 18 に感染研と製造所における LP 試験成績の相関を示した。感染研は 1 回の試験成績、製造所は 3 試験の平均値を示し、本試験の検出限界は両施設ともに 0.0625 U/mL であった。感染研と製造所の両施設で LP 活性が検出されたものは 36 検体中 12 検体 (33.3%) であったが、いずれも現行の小分け製品に適用される 0.2 U/mL の基準値を下回った。一方、両施設で検出限界以下を示したものは 9 検体 (25%) であった。

5. 高濃度原液を用いた LP 試験の再現性

4 製造所 (A~D) における 3 回の繰り返し試験成績を図 19~図 22 に示した。3 製造所 (A, B, C) の高濃度原液 27 検体は繰り返し試験においてすべて小分け製品に適用される基準値 (0.2 U/mL 以下) を下回った。一方、D 製造所の 2 回目の試

験において検体 D5 が 0.2 U/mL を超えたが、その他はすべて 0.2 U/mL 未満であった。 0.2 U/mL を試験再現性の指標とした場合、繰り返し試験には高い再現性が認められた。

6. 毒性参照品と白血球減少率の相関

図 23 に毒性参照品と白血球減少率との関係を示した。毒性参照品の LP 活性 (対数値) と白血球減少率の間には相関が認められ、白血球数の減少率 40 から 80% までの間には良好な直線性を認めた。高濃度原液の LP 活性が製品のタンパク濃度に依存すると仮定した場合、高濃度原液 ($600 \mu\text{g}/\text{mL}$) の基準値は 0.6 U/mL と設定され、 0.6 U/mL に相当する生理食塩水に対する白血球数減少率は 45% と算出された。

D. 考察

過去にインフルエンザ HA ワクチンの LP 試験で多くの再試験が実施され、試験法の精度および再現性に問題のあることが指摘されてきた。原因として、ワクチンの総タンパク量が増加したため基準値を上回るロット数が多くなった、本試験の低い精度により再試験が一定の頻度で発生した、等の可能性が挙げられる。本研究では後者の可能性を検証するためマウス系統差を検討したが、近交系・非近交系にかかわらず末梢白血球数はバラつきが大きいことが判明した。このことから、LP 試験の精度はマウス系統ならびに週齢よりも、マウス個体差に強く影響されるものと考察された。

本研究により、LP 試験は LP 活性を検出することは可能であるものの、低い測定精度のため本来の活性を 1 回の試験では評価出来ないことが示された。マウス系統ならびに週齢の変更を行っても精度の向上は期待できず、試験毎のバラつきの大きさは本試験の性質上避けることの

できない問題であると指摘された。表 7 で示した 3 回の試験における毒性参照品の回帰係数はそれぞれ-0.361、-0.272、-0.202 であったが、HA ワクチンの 2 濃度から求めた回帰係数は-0.268~0.163 と大きくバラつき、毒性参照品の検量線に対し同等の回帰係数を示すものはなかった。このことは、今回試験を行った HA ワクチンには LP 活性がほとんど含まれていないことを強く示唆する。事実、4 製造所から提供された高濃度ワクチン液の 3 試験の平均活性はいずれも 0.2 U/mL を下回った。

さらに、ワクチン製造所とともに高濃度原液を用いた多施設間での試験成績の比較ならびに再現性について検討を加えた。その結果、ワクチン高濃度原液には有意な LP 活性は検出されず、4 製造所における 3 回の繰り返し試験においても、ほぼすべての検体が現行の小分け製品に適用される 0.2 U/mL を下回ることが判明した。このことから、インフルエンザ HA ワクチンには有意な LP 活性が含まれないものと結論づけられた。

今回の研究において、ワクチン高濃度原液に LP 活性がほとんど検出されなかったことから、現行の小分け製品を対象とする LP 試験によりわずかに混入する LP 活性を正しく評価することは困難である。そのため、現行の小分け製品に対する試験管理に代え、高濃度原液を用いた LP 試験の実施が必要である。LP 活性が製剤のタンパク濃度に依存すると仮定した場合は、600 µg/mL の高濃度原液に対し 0.6 U/mL の基準値が適用可能と考えられる。しかし、今回得られた成績だけでは、濃度依存性があるかは不明である。

今後、規格値設定については十分な検討が必要である。

近年、動物愛護の観点から実験に供試する動物数の削減が求められるとともに、*in vitro* 試験法への代替が推奨されている。当該試験は LP 活性を引き起こす物質がまだ同定されていないため *in vitro* 試験法への移行は難しい状況にあるが、マウス数の削減は参照品を除くことにより実施の可能性が残されている。すなわち、毒性参照品に代わり生理食塩水を用いて白血球数減少率を規格値とすることにより、動物数の削減が可能となる。今後、規格値と同様に検討が必要と思われる。

E. 結論

インフルエンザ HA ワクチンの安全性試験である LP 試験は、マウス系統ならびに週齢の変更による精度向上は見込めないことが判明した。白血球数減少を引き起こす生理活性物質はインフルエンザ HA ワクチンにはほとんど存在しないことが示唆され、本試験は現行の小分け製品に代わり、高濃度ワクチン液で品質管理する妥当性についてのさらなる検討が必要であると考察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願・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

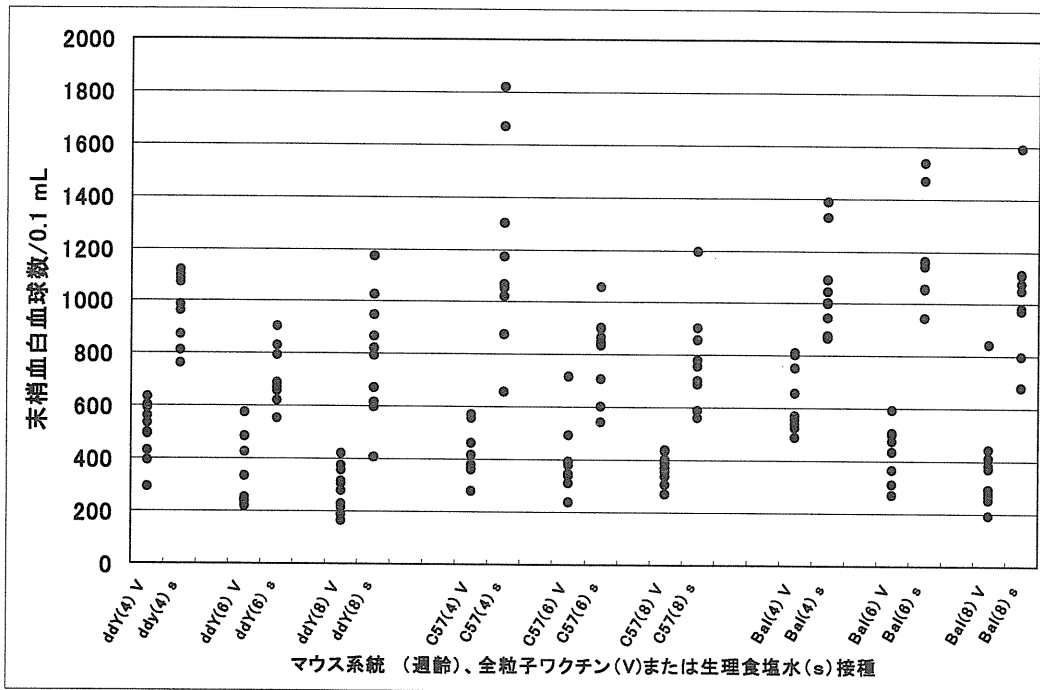


図 17 インフルエンザ全粒子ワクチンのマウス白血球数減少活性に及ぼす
マウス系統および週齢の比較

ddY(4) V : 4 週齢の ddY マウスに全粒子ワクチンを投与。

ddY(4) s : 4 週齢の ddY マウスに生理食塩水を投与。

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

系統	週齢	末梢白血球数/ μ l		p 値
		全粒子ワクチン投与群	生理食塩水投与群	
ddY	4	5020 \pm 1063	9840 \pm 1303	5.5×10^{-8}
	6	3341 \pm 1297	7184 \pm 1075	3.5×10^{-6}
	8	2836 \pm 851	7914 \pm 2263	3.0×10^{-5}
C57BL/6	4	4256 \pm 896	11794 \pm 3469	5.2×10^{-5}
	6	3889 \pm 1313	8097 \pm 1521	3.6×10^{-6}
	8	3658 \pm 558	7714 \pm 1826	3.7×10^{-5}
BALB/c	4	6329 \pm 1264	10396 \pm 1847	3.7×10^{-5}
	6	4442 \pm 1009	11828 \pm 1832	2.3×10^{-8}
	8	3729 \pm 1832	10331 \pm 2397	2.6×10^{-6}

各群 10 匹のマウスにインフルエンザ全粒子ワクチン (0.5 U/mL) または生理食塩水を各 0.5 mL 投与し、17 時間後の末梢白血球数を測定した。t-検定で両群間の有意差を求めた。

表 6 既知の濃度の毒性参照品測定再現性

既知濃度検体	実験（回数）			平均値 ± SD
	1回目	2回目	3回目	
0.2 U/mL	0.226	0.241	0.177	0.218 ± 0.038
0.6 U/mL	1.019	0.444	0.245	0.569 ± 0.402

3回の試験の回帰係数は、それぞれ-0.243、-0.287、-0.346であった。

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

製造所	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	マウス白血球数減少活性 (U/mL)		
		1回目	2回目	3回目
A社	600	0.116	0.258	0.019
	200	0.092	0.188	0.017
B社	600	0.076	0.364	0.014
	200	0.049	0.197	0.008
C社	600	0.067	0.289	0.008
	200	0.099	0.212	0.019
D社	600	0.201	0.324	0.012
	200	0.089	0.184	0.006

生理食塩水投与群の80%に相当する活性は、1回目：0.139 U/mL、2回目：0.197 U/mL、3回目：0.120 U/mLであった。

回帰係数は、1回目：-0.361、2回目：-0.272、3回目：-0.202であった。

表 8 使用したワクチン株の表記法

ワクチン株の表記

表記	製造所	ウイルス株	ロット
A1	A社	A/California/7/2009	1
A2	同上	同上	2
A3	同上	同上	3
A4	同上	A/Victoria/210/2009	1
A5	同上	同上	2
A6	同上	同上	3
A7	同上	B/Brisbane/60/2008	1
A8	同上	同上	2
A9	同上	同上	3

B、C、D社においても同様に1から9までの通し番号で表記した。

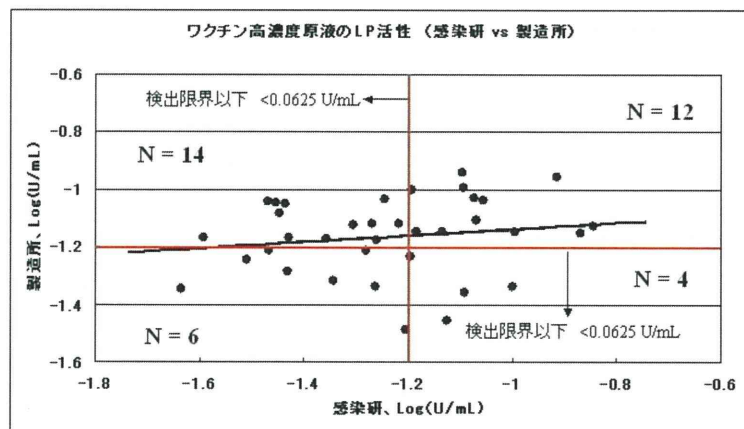


図 18 ワクチン高濃度原液の LP 活性の感染研と製造所との比較

本試験の検出限界 (0.0625 U/mL) を図中に示した。

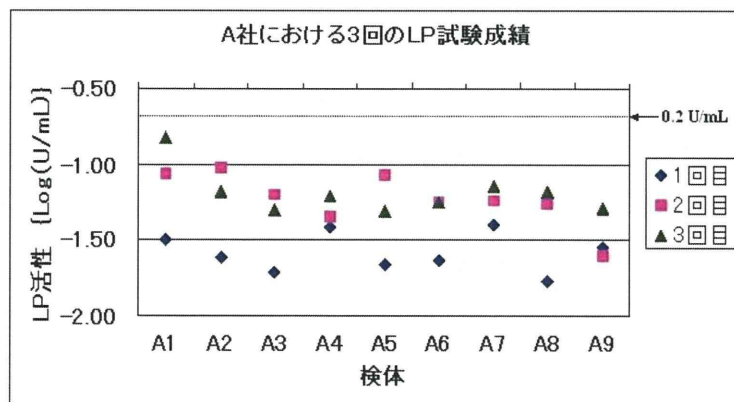


図 19 A社における3回の繰り返し試験成績

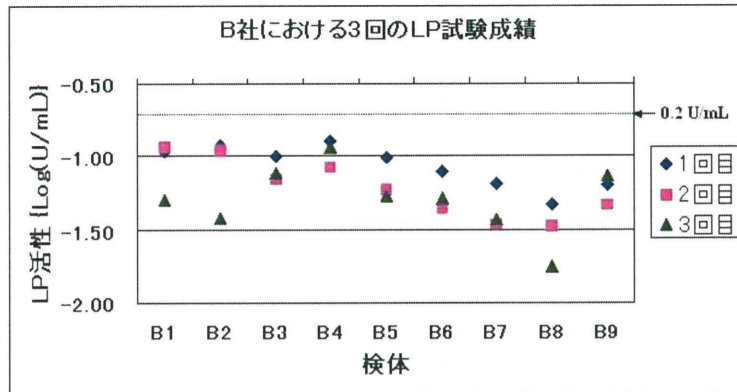


図 20 B社における3回の繰り返し試験成績

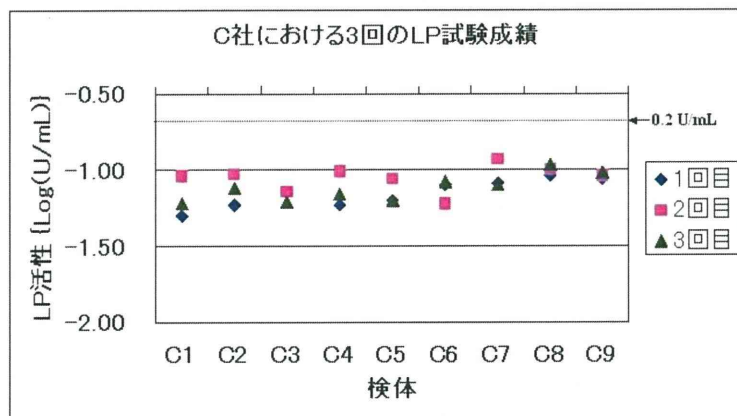


図 21 C社における3回の繰り返し試験成績

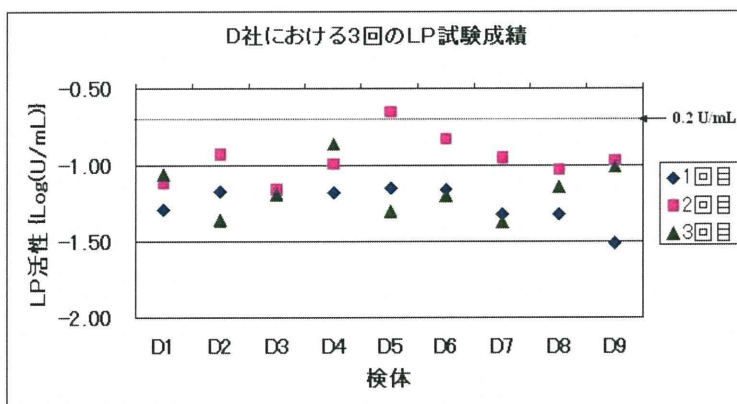


図 22 D社における3回の繰り返し試験成績

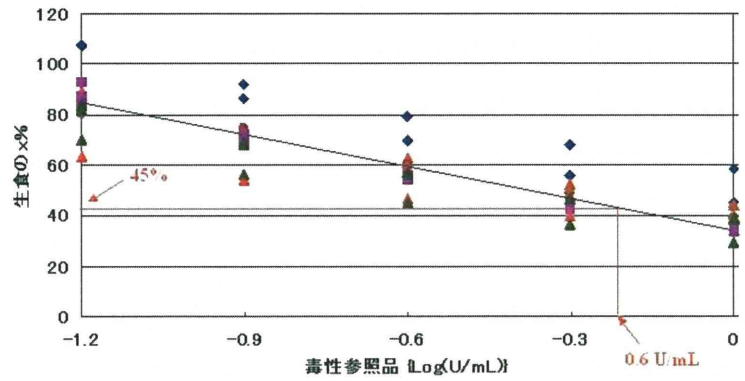


図 23 毒性参照品の力価と生理食塩水投与マウスの白血球数の割合（％）との関係
 14 回の試験において、毒性参照品の各希釈段階液を投与したマウスの白血球数が生理食塩水投与マウスの白血球数の何パーセントに相当するかを計算し、プロットした。毒性参照品の 0.6 U/mL に相当する値として「生理食塩水投与マウスの白血球数の 45%」を求めた。

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)
分担総合研究報告書 (平成 22-23 年度)

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

研究分担者 阿戸 学 国立感染症研究所・免疫部・第二室長

研究協力者 高橋宜聖 国立感染症研究所・免疫部・第四室長

研究協力者 小林和夫 国立感染症研究所・免疫部・部長

研究要旨

インフルエンザワクチンの安全性試験としてのマウス白血球減少試験における白血球減少が、走化活性因子の影響による末梢血から臓器への移動に起因するか、循環白血球自体の変動に起因するかについて解析を行った。白血球減少を引き起こすインフルエンザ全粒子ワクチンとともに、ケモカインレセプターからの細胞内シグナルを阻害する百日咳毒素(PTX)を C57BL/6 マウスに投与したところ、PTX 投与群は末梢白血球の減少に変化を示さないことが明らかとなった。また、インフルエンザ全粒子ワクチン投与により、末梢血白血球に高頻度のアポトーシスが誘導されることが判明した。以上のことから、インフルエンザワクチン投与後の白血球減少は、細胞死が原因であることが示された。

A. 研究目的

インフルエンザワクチンは近年接種者の増加と、接種対象者が学童から高齢者を中心としたハイリスク者に変化したことから、ワクチンの安全性の確保と安定供給が、国民の健康を守るため、厚生労働政策上重要な課題となってきた。我が国でのワクチン安全性試験の一つとして、マウスに HA ワクチン接種後 16 時間で対照群の 80%を下回る白血球減少を起こしてはならないとする、マウス白血球減少試験が行なわれているが、海外で

はこの試験は行われておらず、その意義に関しては議論がある。一方、アメリカでは我が国ではみられないワクチン接種後の副反応によるとも考えうる死亡例が報告され、我が国ではマウス白血球減少活性を管理して現在まで副反応の低いワクチン供給を続けて来た現状を考え、この試験の有用性を慎重に検討する必要がある。しかし、この白血球減少活性の実体についてはほとんど明らかにされていない。このため我々は、ワクチンの安全性に関係すると考えられているマウス白

血球減少試験について免疫学的に検証し、より精度の高いマウス白血球減少試験の方法を確立するとともに、白血球減少活性を誘導する要因について明らかにする目的で解析を行なった。本研究の遂行は、本活性とワクチン本体との関係を明らかにし、ワクチンの安全性向上のための品質管理の技術を向上させる。

B. 研究方法

(1) インフルエンザワクチンの調整

白血球減少試験参照品不活化全粒子ワクチン A1/PR8 (H1N1) は、現行ワクチンと同様に HA 濃度が 90 μ g/ml となるよう生理食塩水で希釈し、接種した。

(2) マウス白血球減少

国家検定に準じて、C57BL/6 マウスまたは I 型インターフェロン(IFN) α/β 細胞内シグナルが欠損する IFN α/β レセプター欠損(IFN α/β PKO)マウス(メス、4 週齢)の腹腔内に、500 μ l のワクチン溶液または生理食塩水を投与し、5 時間後に尾静脈より 10 μ l 採血して末梢血細胞を蛍光標識された抗 B220, 抗 CD3, 抗 Gr-1 のそれぞれの抗体、および細胞死を検出する Annexin-V と Propidium iodine を用いて染色し、フローサイトメトリー(FACS Calibur、ベクトンディッキンソン社)を用いて総細胞数および各細胞分画の実数を測定した。一部の実験では、ワクチン溶液または生理食塩水を投与と同時に、尾静脈より百日咳毒素(pertussis toxin: PTX)500 ng または、コントロールとして

百日咳毒素 B-オリゴマー500 ng を静脈投与し、16 時間後に尾静脈より 10 μ l 採血して末梢血細胞を同様に解析した。動物実験については、国立感染症研究所が定めた動物実験指針を遵守し、実験動物の愛護に十分考慮して苦痛を与えないように配慮しながら行なわれた。

C. 研究結果

マウスに白血球減少を引き起こすことがわかっているインフルエンザ全粒子ワクチン、もしくは生理食塩水を接種し、接種後に末梢血の各細胞分画の実数を測定した。その結果、核数の計測による現行検定と同様に、HA ワクチン全粒子ワクチン投与群で 16 時間後に末梢血細胞の有意な減少を認めた。また、FACS による解析から、減少する細胞の分画は、主として T 細胞と B 細胞であることが示唆された。末梢血白血球の減少が多臓器への移動によるかどうかを検索する目的で、白血球の生体内移動に必要なケモカイン受容体等の細胞内シグナル伝達を阻害することが知られている PTX を全粒子ワクチン、または生理食塩水と同時にマウスに投与した。その結果、全粒子ワクチンの投与後の末梢血白血球数減少は、PTX 投与群と B オリゴマー投与群で有意差を認めなかった(図 24)。以上のことから、ワクチン接種後の末梢血減少機序は遊走因子による生体内移動に依存しない可能性が判明した。

次に、末梢血白血球の減少が細胞死

によるか否かを検索する目的で、白血球減少の誘導に必須な IFN α/β 細胞内シグナル伝達を欠損する IFN α/β RKO マウスと野生型マウスにワクチンを接種し、5時間後に末梢血より細胞を調整し、FACS を用いた蛍光染色により T リンパ球、B リンパ球および顆粒球の細胞数を計測した。その結果、野生型マウスでは、生理食塩水を投与した群に比べて、ワクチン接種群で末梢血白血球数の有為な低下とアポトーシス細胞の増加が認められた(図 25)。一方、IFN α/β RKO マウスにおいては、ワクチン投与群においても白血球減少は認められず、アポトーシス細胞の割合も生理食塩水投与群と差が認められなかった。また、各細胞分画におけるアポトーシスを解析した結果、アポトーシス細胞の割合は、主として T 細胞と B 細胞であることが判明した。これにより、全粒子ワクチン投与によって、IFN α/β 依存的に末梢血白血球にアポトーシスが起これ、白血球減少をきたすことが示唆された。

D. 考察

インフルエンザワクチン投与後の白血球減少の機序を明らかにすることは、白血球減少試験の改善もしくはこの試験に代替可能な新規安全性試験の開発に重要である。白血球減少の機序として、1)インフルエンザワクチンの成分によって誘導される白血球走化因子の濃度勾配に従い、臓器内に移動する。2)インフルエンザワクチンによって誘導されるサイトカ

インなどが、末梢血白血球に作用して、細胞死を誘導する。という2つの可能性が考えられる。我々は、1)の可能性について、末梢血白血球の走化因子受容体シグナルの阻害によっても、白血球減少が認められることから、当試験で認められる末梢白血球の減少は、走化因子による白血球の移動によるものではないことを明らかにした。一方、全粒子ワクチン投与によって誘導される I 型 IFN が末梢白血球自体に作用して、アポトーシスが誘導されることが明らかとなった。アポトーシスに陥った細胞はマクロファージなどにより、速やかに循環から排除され、これが白血球減少の主要な機序であると考えられる。しかし、I 型 IFN がどのような機序により、末梢血白血球にアポトーシスを誘導するかは不明である。今後、インフルエンザワクチンによる白血球減少の詳細な分子機構を明らかにして、白血球減少試験に変わるより精度の高い分子マーカーを同定し、新規迅速安全評価法を開発することが必要とされる。

E. 結論

インフルエンザワクチンの安全性試験としてのマウス白血球減少試験における、接種後の白血球減少活性の実体について解析した。その結果、白血球減少は白血球の移動ではなく、I 型 IFN シグナルによって誘導されるアポトーシスによって起こることが考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

原著論文

1. Onodera T, Takahashi Y, Yokoi Y, Ato M, Kodama Y, Hachimura S, Kurosaki T, Kobayashi K. 2012. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 109(7):2485-90.

2. Matsumura T, Ato M, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K. 2012. Interferon- γ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A Streptococcus infections. **Nat Commun**. 3, 678.

3. Ohnishi K, Takahashi Y, Kono N, Nakajima N, Mizukoshi F, Misawa S, Yamamoto T, Mitsuki YY, Fu S, Hirayama N, Ohshima M, Ato M, Kageyama T, Odagiri T, Tashiro M, Kobayashi K, Itamura S, Tsunetsugu-Yokota Y. 2012. Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus. **Jpn J Infect Dis**. 65(1):19-27.

4. Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto S, Kaji T, Tsunetsugu-Yokota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, Takemori T. HIV-1 Nef impairs multiple

T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. 2011. **Int Immunol**. 23(7):433-41.

5. Murase Y, Konnai S, Hidano A, Githaka W.N, Ito T, Takano A, Kawabata H, Ato M, Tajima T, Tajima M, Onuma M, Murata S and Ohashi K. Molecular detection of Anaplasma phagocytophilum in cattle and Ixodes persulcatus ticks. **Vet. Microbiol.**, 149(3-4):504-7.

6. Ikebe T, Ato M, Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K, Watanabe H. 2010. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. **PLoS Pathog**. 6:e1000832.

学会発表

1) Matsumura, T., Ikebe, T. Watanabe, H., Kobayashi, K. and Ato. M. The defensive role of interferon- γ produced by myeloid cells in invasive group A Streptococcus infection. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (熊本、2010年5月).

2) Matsumura, T., Ikebe, T. Watanabe, H., Kobayashi, K. and Ato. M. Identification of IFN-gamma producing cells in severe invasive group A streptococcal infection. 14th International Congress of Immunology (神戸、2010年8月)

3) Ato, M. Neutrophil dysfunctions by pathogenic bacteria. Symposium on High Throughput Approaches in Infection & Immunity (Hua Hin, タイ王国、2010年12月)

4) 松村隆之、池辺忠義、大西真、渡邊治雄、小林和夫、阿戸学. 2011. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における環状核骨髄系細胞の保護的役割. 第9回感染症沖縄フォーラム(沖縄、2011年2月).

5) Onodera, T., R. Aizawa,, A. Koyabashi, M. Ato, A. Hosono, S. Kaminiogawa, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2010. T-cell independent

activation of virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling. 4th International conference on “B cells and autoimmunity” (奈良、8月)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案
なし
3. その他
なし

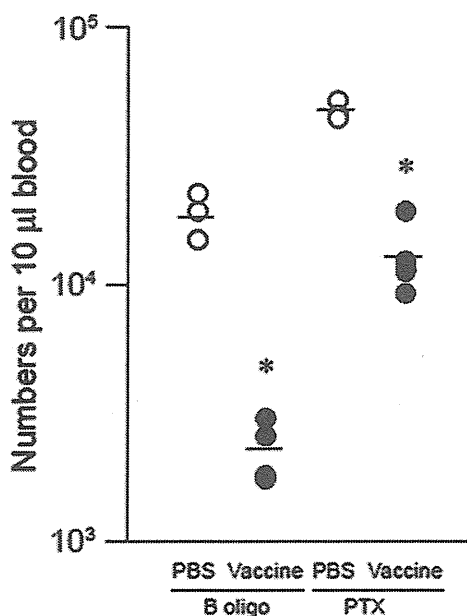


図 24 全粒子ワクチンおよび百日咳毒素接種後の C57BL/6 マウス末梢血 10μl 中の総白血球数

C57BL/6 マウスに、リン酸バッファーまたは不活化全粒子ワクチンとともにコントロール B オリゴマー (○) または百日咳毒素 (●) 500ng を投与し、16 時間後の末梢血中白血球数をフローサイトメトリーを用いて解析した。*P<0.05

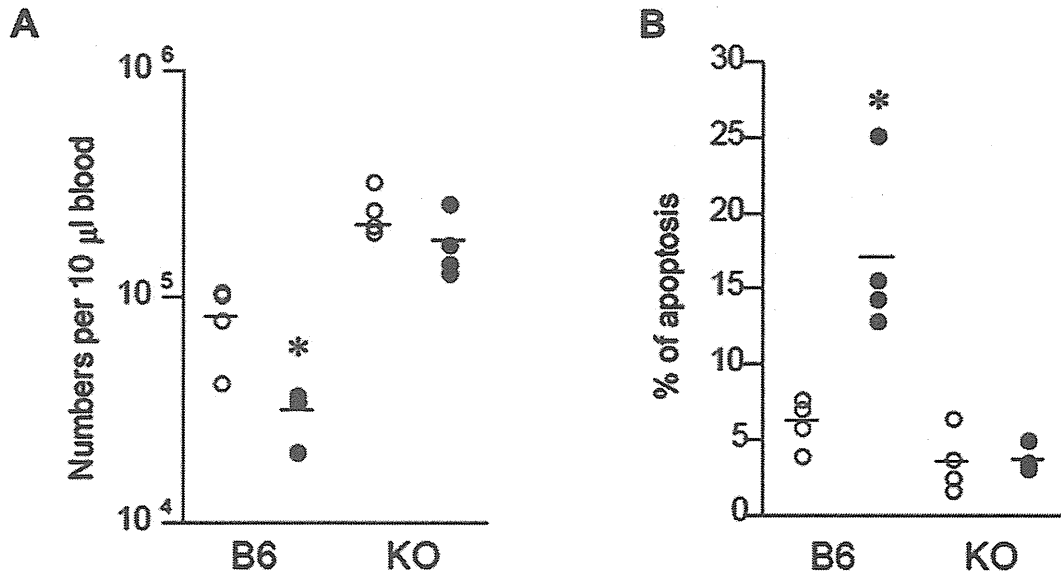


図 25 インフルエンザワクチンによる末梢血白血球減少とアポトーシスの相関

野生型(B6)マウスまたはI型インターフェロンレセプター欠損(KO)マウスに、生理食塩水(○)または不活化全粒子ワクチン(●)を投与し、5時間後の末梢血中白血球数A. 白血球にしめるアポトーシス細胞の割合 B.をフローサイトメトリーを用いて解析した。* $P < 0.05$

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
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
Momose H, Mizukami T, Ochiai M, Hamaguchi I, Yamaguchi K	A new method for evaluation of vaccine safety based on comprehensive gene expression analysis.	Journal of Biomedicine and Biotechnology	2010	ID: 3618 41 (7p)	2010
Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto S, Kaji T, Tsunetsugu-Yokota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, Takemori T	HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice.	International Immunology	23 (7)	433- 441	2011

Ohnishi K, Takahashi Y, Kono N, Nakajima N, Mizukoshi F, Misawa S, Yamamoto T, Mitsuki YY, Fu S, Hirayama N, Ohshima M, Ato M, Kageyama T, Odagiri T, Tashiro M, Kobayashi K, Itamura S, Tsunetsugu-Yo kota Y	Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus.	Japanese Journal of Infectious Diseases	65 (1)	19-27	2012
Matsumura T, Ato M, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K.	Interferon- γ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A Streptococcus infections.	Nature communications	3	678	2012
Onodera T, Takahashi Y, Yokoi Y, Ato M, Kodama Y, Hachimura S, Kurosaki T, Kobayashi K.	Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection.	Proceedings of the National Academy of Sciences	109 (7)	2485- 2490	2012