

日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: キャピラリーLC/MSによる微量糖タンパク質糖鎖の構造解析. 日本薬学会第122年会 (2002, 3)

6) 太田美矢子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: LC/MSを用いた糖ペプチドマッピング法による甲状腺刺激ホルモンの部位特異的な糖鎖の不均一性の解析. 日本薬学会第122年会 (2002, 3)

7) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: LC/MSを用いたタイプの異なるN-結合型糖鎖の一斉分析. 日本薬学会第122年会 (2002, 3)

8) 山口照英, 早川堯夫: バイオテクノロジーを応用した医薬品の品質及び安全性確保の評価科学. PDA第9回年会及び併催シンポジウム, 東京, 平成13年11月5-6日

9) 山口照英: 細胞・組織利用医薬品・医療用具の品質管理手法について. 第6回関西バイオコンファレンス, 神戸, 平成14年3月12日

10) 豊田淑江, 山口照英, 押澤正, 内田恵理子, 早川堯夫: HL-60細胞の好中球への分化・増殖のコミットメントにおけるPI3k-PKC-p70S6キナーゼ(p70S6K)カスケードの役割, 第74回日本生化学大会, 京都, 平成13年10月25日

11) 豊田淑江, 山口照英, 押澤正, 内田恵理子, 早川堯夫: HL-60細胞の好中球への分化・増殖におけるp70S6キナーゼ(p70S6K)カスケードの役割についての研究. 第22回日本炎症・再生医学会, 東京, 平成13年7月3日

12) 土屋利江, 松岡厚子, 市川明: 生分解性高分子ポリ乳酸およびポリウレタン材料上で分離されたBalb/3T3細胞由来形質転換巢のDNAチップを用いる遺伝子発現解析. 日本バイオマテリアル学会, 2001年10月 京都

13) Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya: Studies on the suppression of tumorigenesis induced by biomaterials: Reversion of transformed phenotype of tumor cells induced by biomaterials. International. Gap-junction Conference. Aug. 2001, Hawaii.

14) 市川明, 土屋利江: ポリウレタンの発癌プロモーター作用機構: ポリウレタンのギャップ結合細胞間連絡阻害要因はコネキシンのチロシン磷酸化である. コネキシン研究会, 2001年12月, 宝塚

15) Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya and Akira Ichikawa: Studies on the enhancement of mechanical strength and differentiation of human articular chondrocytes. 日本バイオマテリアル学会, 2001年10月 京都

16) 鈴木寿子, 土屋利江, 吉原なみ子: ヒト皮膚モデルを用いたHIV-1およびHTLV-1感染持続細胞の動態に関する研究(1) 日本バイオマテリアル学会 2001年10月 京都

17) 中岡竜介, 土屋利江: 種々の微粒子状物質によるヒト骨芽細胞の分化への影響と細胞間連絡機能との関連. 日本バイオマテリアル学会 2001年10月 京都

18) Kobayashi, T., Niimi, S., Hyuga, M., Hayakawa, T.: Left lobe-specific

increase of HGF and follistatin mRNA
in relation to the rat liver regeneration

14th International Congress of
Developmental Biology (2001.7)

19) 新見伸吾、堀川麻衣、関泰一郎、有賀
豊彦、小林 哲、早川堯夫 初代培養ラッ
ト肝細胞における EGF による DNA 合成
促進に対するアクチビン AB,B の作用
第 8 回肝細胞研究会 (平成 13 年 6 月)

20) 新見伸吾、風間宏美、稲川雅美、関泰
一郎、有賀豊彦、日向昌司、早川堯夫：
MRC-5 細胞における TPA 依存的な HGF
産生促進に対するアクチビンの作用 第
74 回日本生化学会大会 (平成 13 年 10
月)

21) 後藤洋子、新見伸吾、早川堯夫、宮下
徳治：ラクトース修飾フィブロインの機能
評価—レクチン及び肝細胞との相互作用
第 10 回ポリマー材料フォーラム (平成 13
年 11 月)

G. 知的財産権の出願，登録状況

1. 特許取得

発明の名称：宿主内埋め込み用構
造体および繁殖方法

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

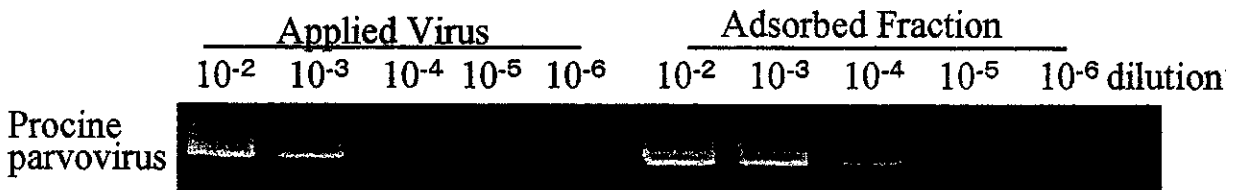
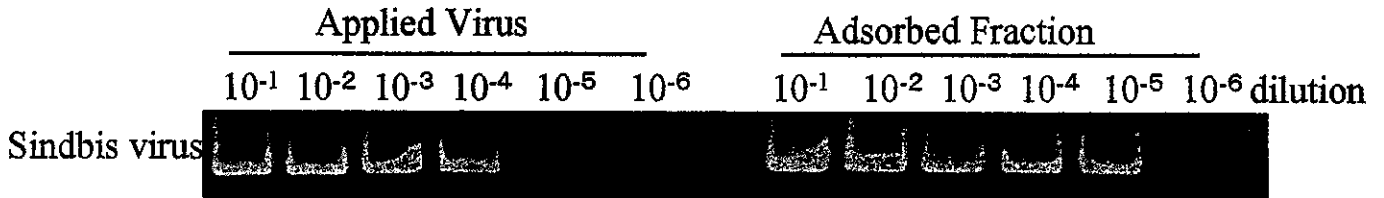
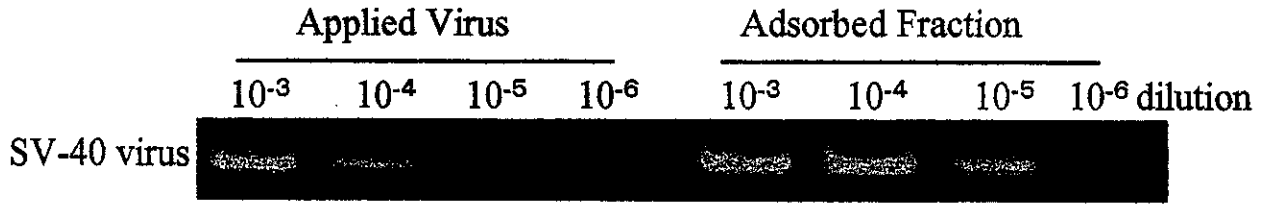


図1. ポリエチレンイミン(PEI)磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮
 ウイルス上清の段階希釈液1mlをPEI磁気ビーズを用いて100 μ lに濃縮し、ウイルスゲノムを抽出した。抽出したウイルスゲノムをPCRあるいはRT-PCRにより増幅した。

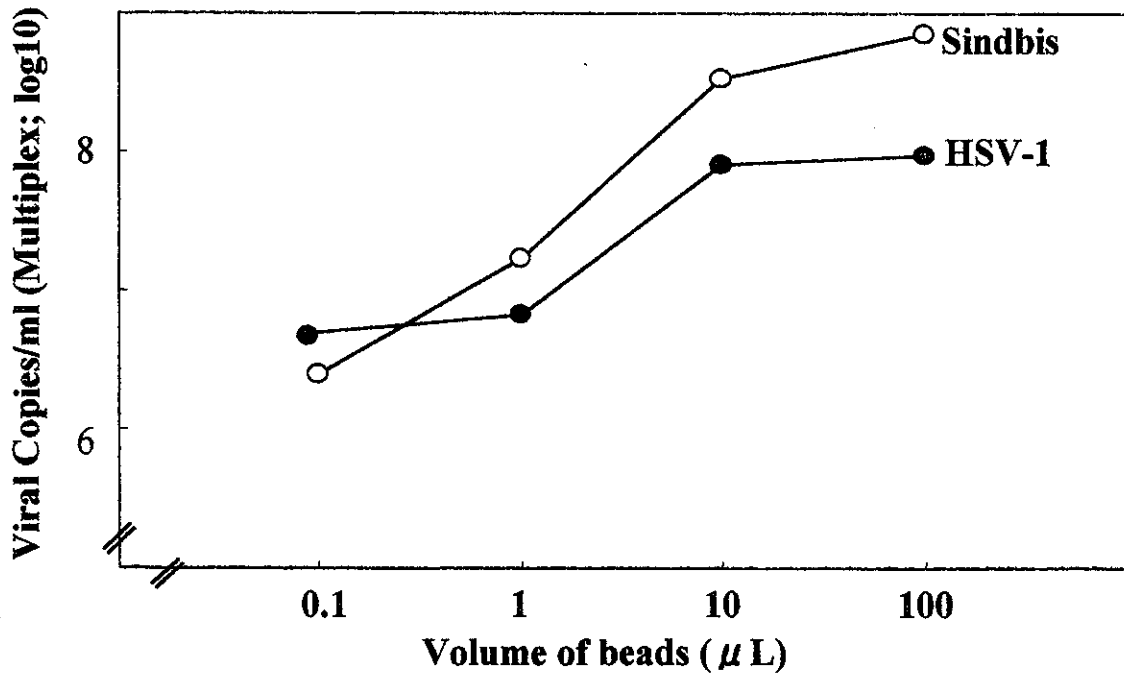


図2. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮の用量依存性

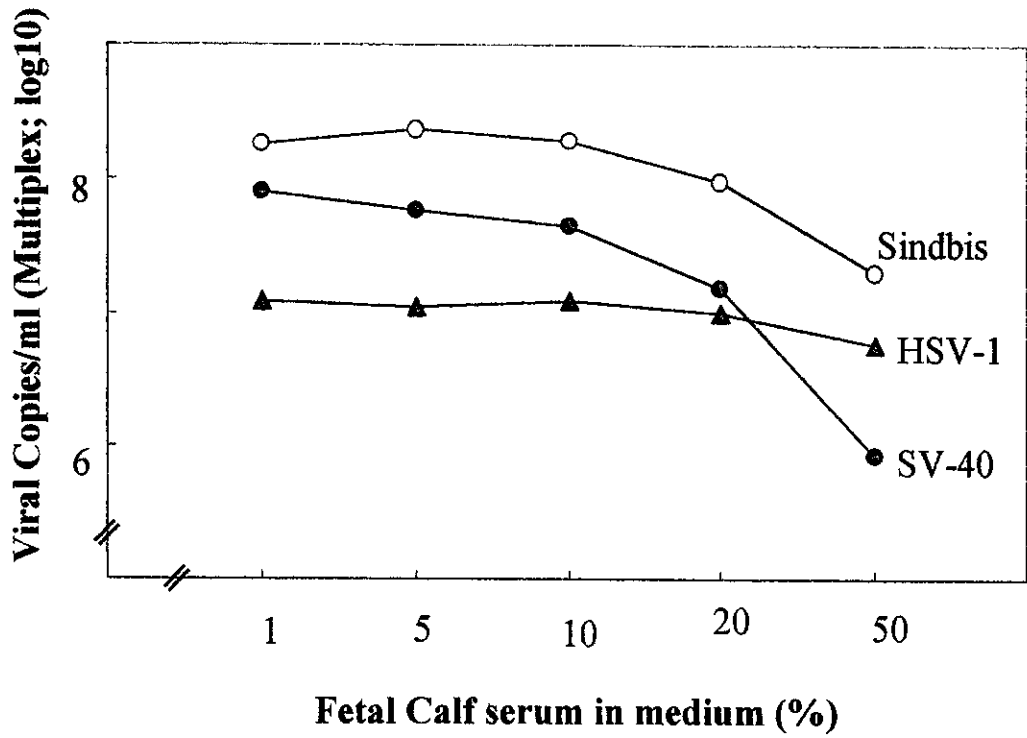


図3. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮に対する血清の影響

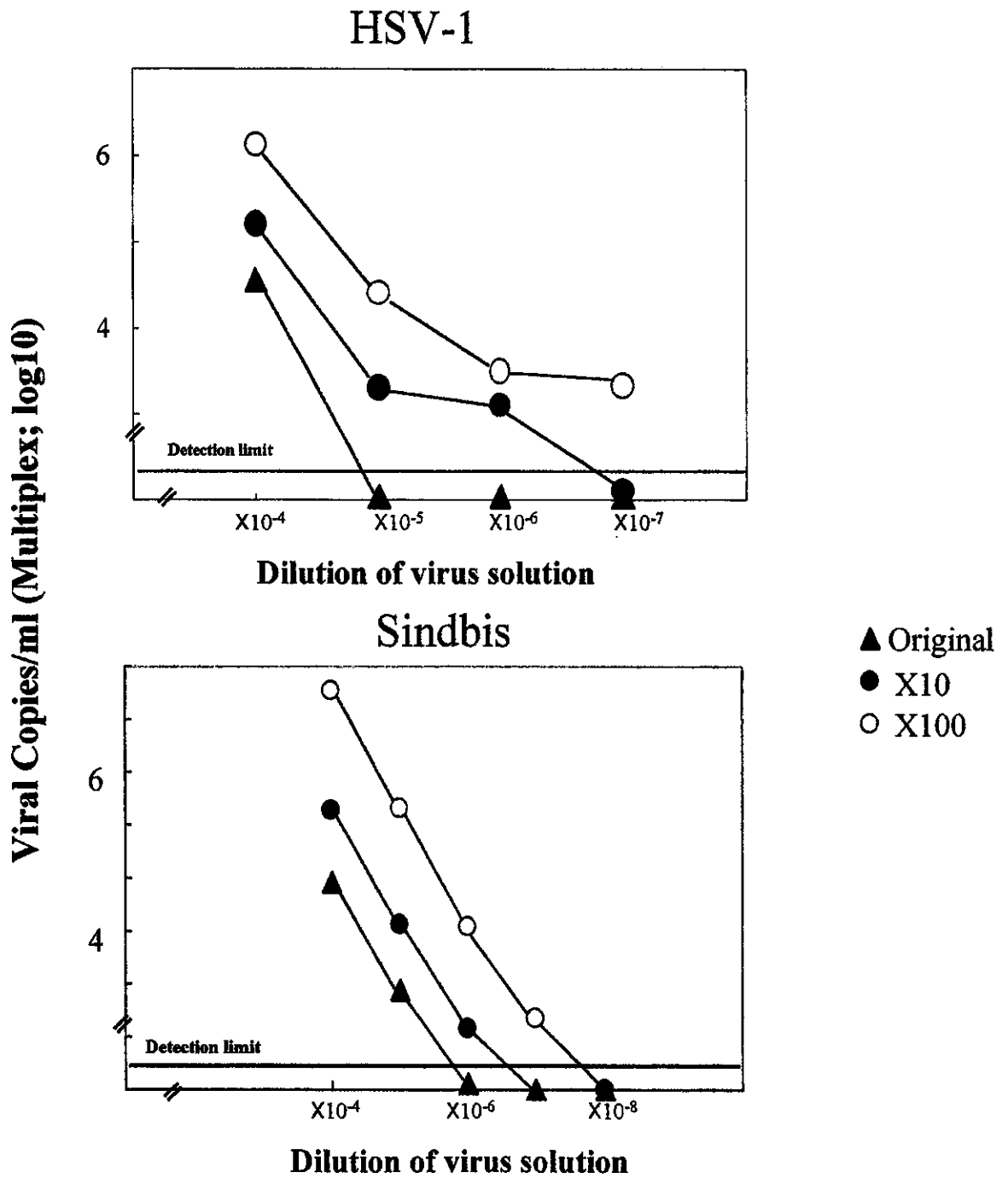


図4. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

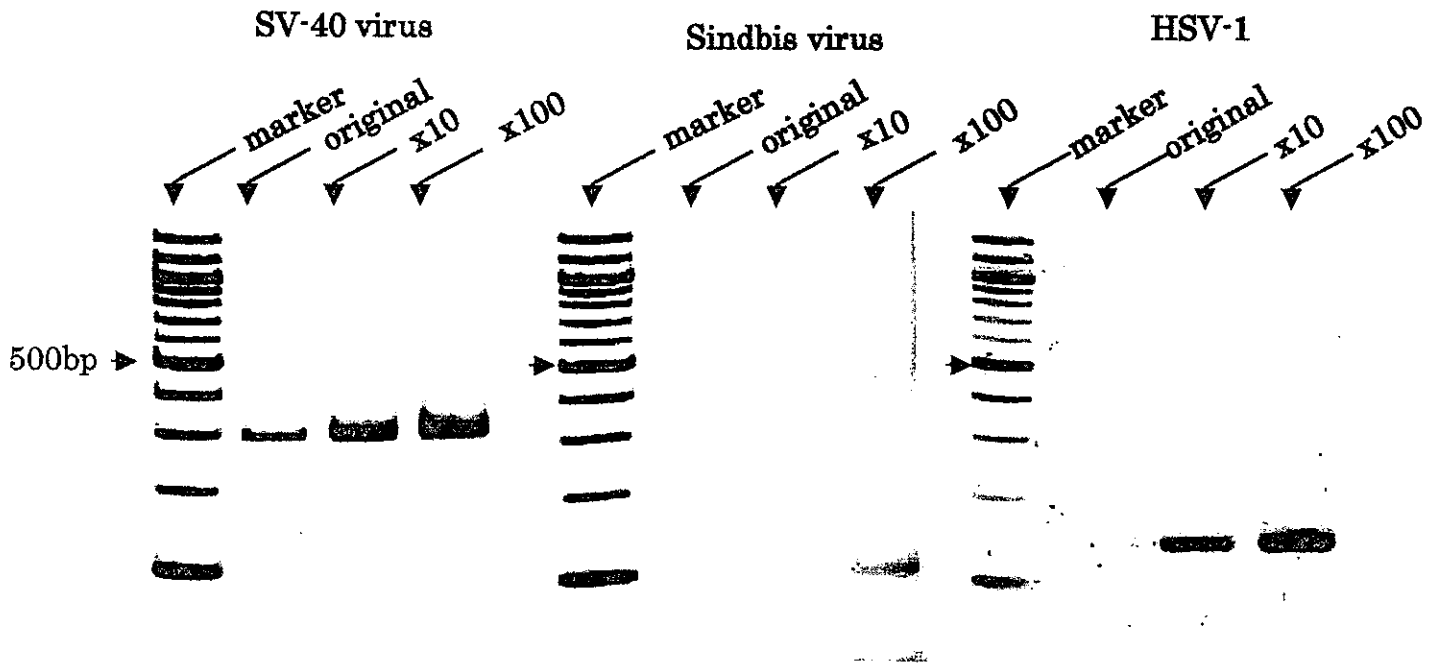


図5. 3種類のウイルスを混合した時のPEI磁気ビーズによるウイルス濃縮

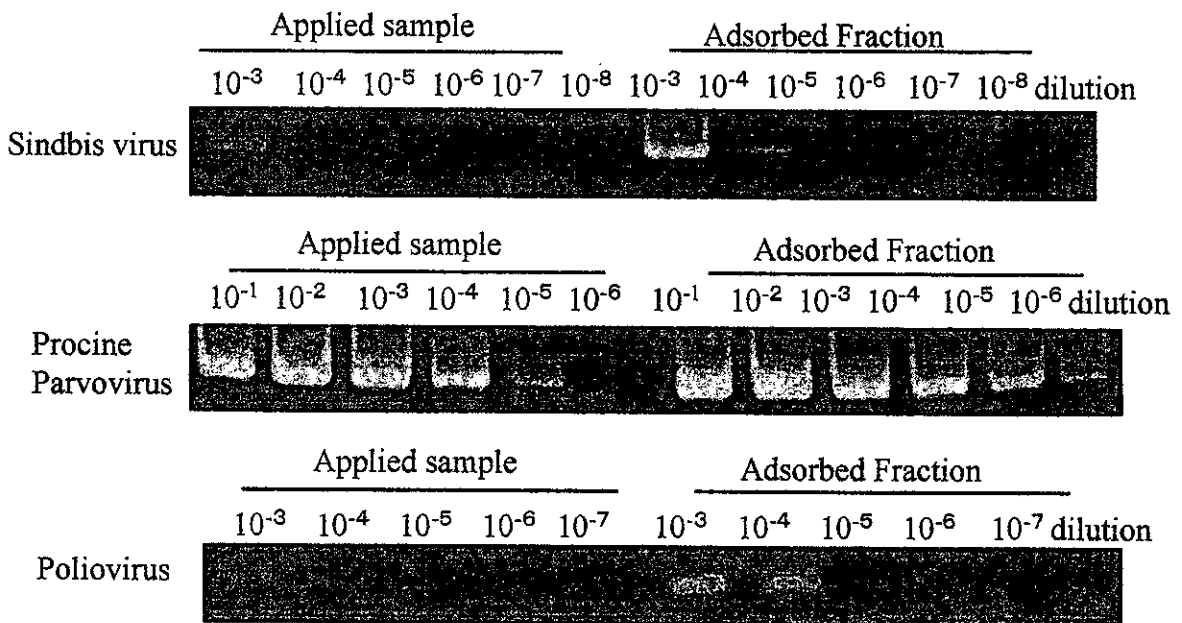


図6. スルホン酸磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

ウイルス上清の段階希釈液1mlをスルホン酸磁気ビーズを用いて100 μ lに濃縮し、ウイルスゲノムを抽出した。抽出したウイルスゲノムをPCRあるいはRT-PCRにより増幅した。

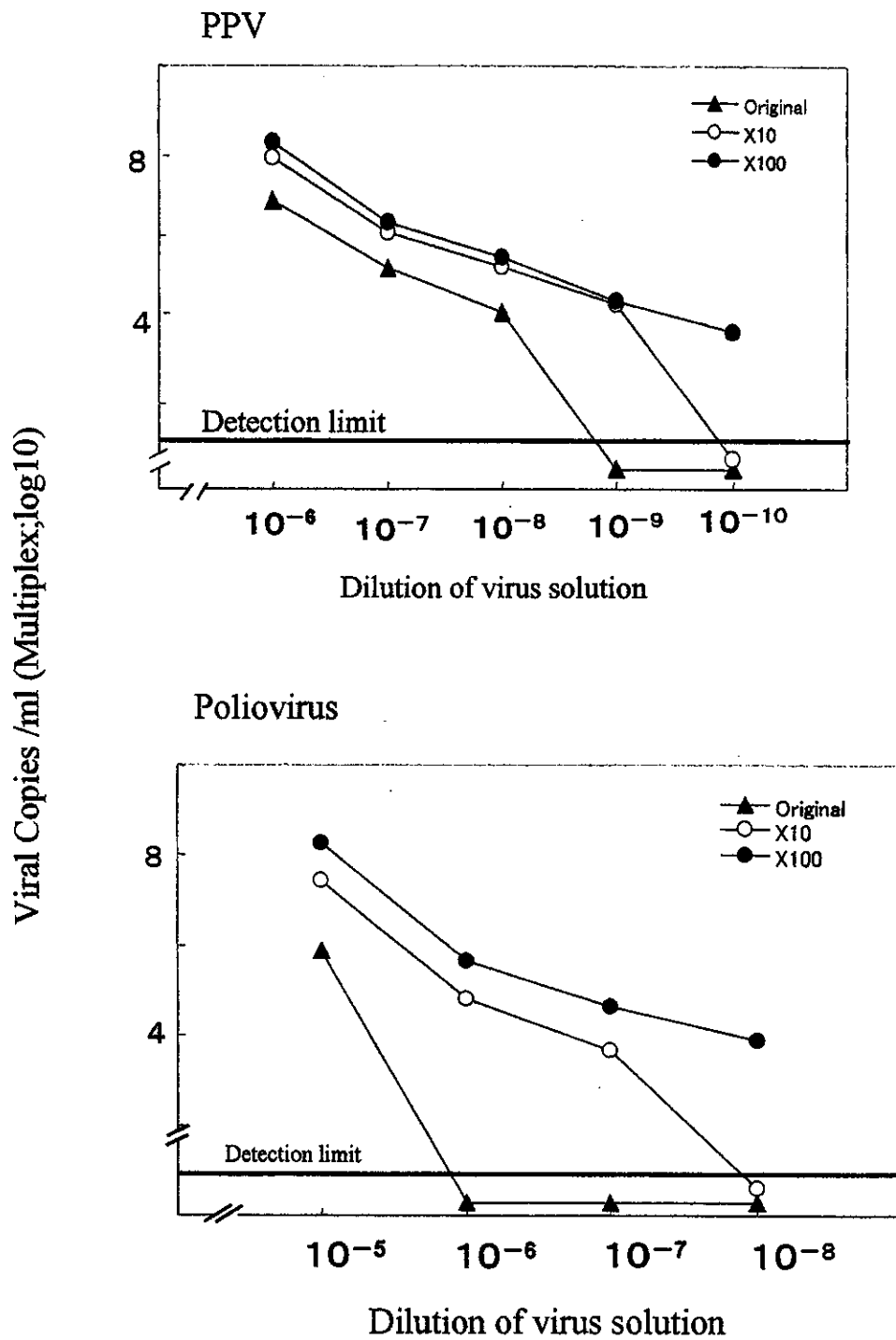


図7. スルホン酸磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

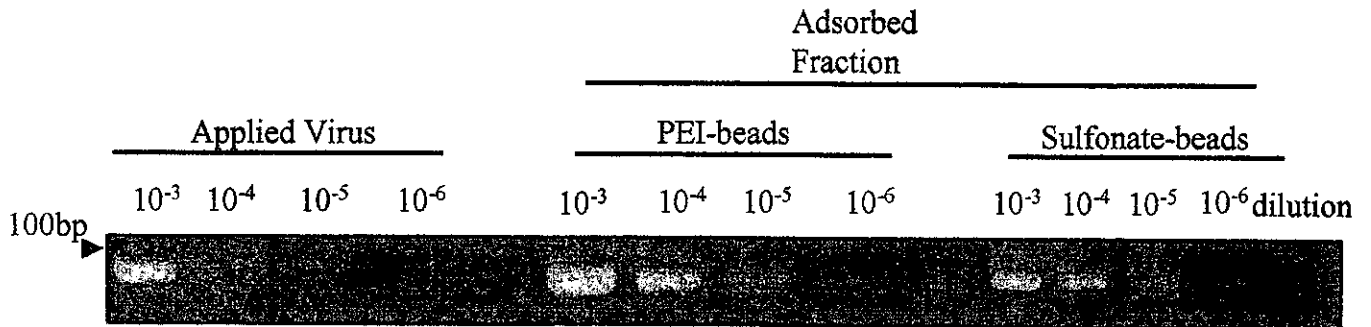


図8. PEI磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたサイトメガロウイルスの濃縮

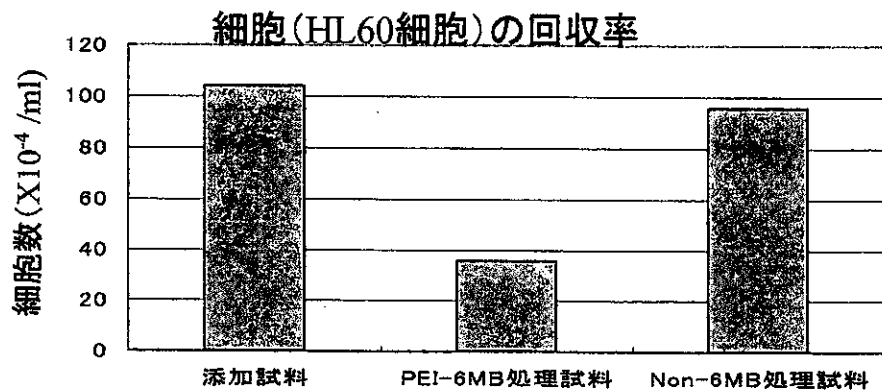
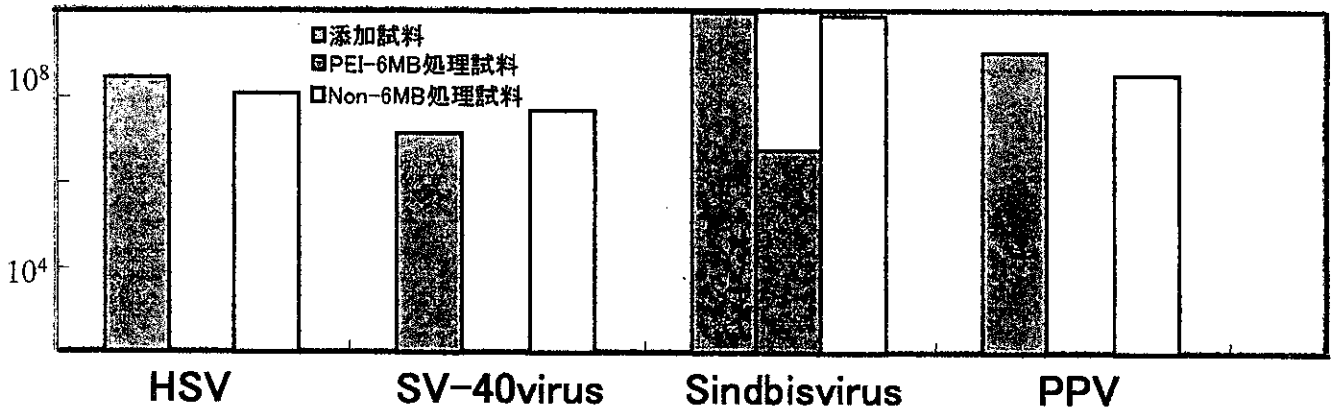


図9. ポリエチレンイミンセファローズ6MBを用いたウイルスの除去

表 1. PCR and RT-PCR によるウイルスゲノム検出に用いるプライマーの組み合わせ

	Primer sets used in the PCR and RT-PCR
HSV-1	5'-ATCCGAACGCAGCCCCGCTG-3' 5'-TCTCCGTCCAGTCGTTTATCTTC-3'
SV-40 virus	5'-ATAATTTTTTTGTATAGTAGTGCA-3' 5'-GGAAAGTCCTTGGGGTCTTCTTACC-3'
Sindbis virus	5'-GGATTGGSTTYGAYACCACYCAGTTCATGT-3' 5'-TGCCCYATGCGKAGYCCMGAAGAYCC-3'
VSV	5'-AGGATATGTCTACCAAGGCC-3' 5'-GGTTATTTTGCAGAGGTGTCC-3'
PPV	5'-TTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGC-3' 5'-TATGTTCTGGTCITTCCTCGCATC-3'
poliovirus	5'-TGCGAGATACCACACAT-3' 5'-ATCATGCTTTCAAGCATCTG-3'

表 2. リアルタイム PCR and RT-PCR によるウイルスゲノム検出に用いるプライマーとプローブの組み合わせ

	Primer and probe sets used in the real-time PCR and RT-PCR
HSV-1	5'-GCGTCATGGTCATGGCAAG-3' 5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3' FAM-labeled 5'-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG-3'
Sindbis virus	5'-CAGGACGTCTATAACGCTCC-3' 5'-GAGAACATGAACTGGGTGGTGTC-3'
SV-40 virus	5'-ATAATTTTTTTGTATAGTAGTGCA-3' 5'-GGAAAGTCCTTGGGGTCTTCTTACC-3'

表 3. PEI 磁気ビーズによる培養上清のウイルス感染価の減少

		Concentration of Infectious Virus (xlog10)
SV-40 virus	Applied Sample	7.8 ± 6.1*
	Upper layer treated with PEI-beads	3.0 ± 2.3
HSV-1	Applied Sample	7.8 ± 6.0
	Upper layer treated with PEI-beads	2.5 ± 1.5
Sindbis virus	Applied Sample	6.5 ± 4.8
	Upper layer treated with PEI-beads	3.3 ± 2.0
VSV	Applied Sample	8.6 ± 6.6
	Upper layer treated with PEI-beads	2.5 ± 1.8
PPV	Applied Sample	6.8 ± 5.3
	Upper layer treated with PEI-beads	6.6 ± 5.1
Poliovirus	Applied Sample	7.0 ± 5.7
	Upper layer treated with PEI-beads	7.0 ± 6.0

*: Means ± S.D. (n=4)

表4 HSV-1 及び Sindbis virus の PEI 磁気ビーズを用いた濃縮法の定量的解析

HSV-1

Dilution	Original solution	x10 concentration	x100 concentration
$\times 10^{-1}$	$1.2 \times 10^7 \pm 9.5 \times 10^5^*$	$6.9 \times 10^7 \pm 3.3 \times 10^7$	$1.0 \times 10^9 \pm 1.7 \times 10^6$
$\times 10^{-4}$	$3.6 \times 10^4 \pm 1.9 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^4$	$1.4 \times 10^6 \pm 3.9 \times 10^5$
$\times 10^{-5}$	<100	$2.1 \times 10^3 \pm 6.6 \times 10^2$	$2.6 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^3$
$\times 10^{-6}$	<100	$1.3 \times 10^3 \pm 4.8 \times 10^2$	$3.2 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$
$\times 10^{-7}$	<100	<100	$2.2 \times 10^3 \pm 1.2 \times 10^3$

Sindbis virus

Dilution	Original solution	x10 concentration	x100 concentration
$\times 10^{-2}$	$8.6 \times 10^{4**}$	1.9×10^6	3.4×10^8
$\times 10^{-4}$	7.4×10^2	1.3×10^4	2.0×10^6
$\times 10^{-5}$	<100	1.4×10^2	1.1×10^4
$\times 10^{-6}$	<100	<100	2.2×10^2

One milliliter (x10 concentration) or 10 ml (x100 concentration) of virus-infected culture medium was incubated with PEI-magnetic beads. After the incubation, the virus copy number was analyzed, as described in Fig. 4. *: means \pm S.D. (n=4). **: means (n=3)

表5. スルホン酸磁気ビーズによる培養上清のウイルス感染価の減少

		Concentration of Infectious Virus (x log10)
Sindbis virus	Applied Sample	6.5
	Upper layer treated with PEI-beads	4.3
Procine parvovirus	Applied Sample	6.8
	Upper layer treated with PEI-beads	4.5
Poliovirus	Applied Sample	7.0
	Upper layer treated with PEI-beads	3.3

表 6. PPV 及び Poliovirus スルホン酸磁気ビーズを用いた濃縮法の定量的解析

PPV

	0.1ml	1ml	10ml
Dilution			
X10 ⁵	6.6X10 ⁶	6.5X10 ⁷	1.5X10 ⁸
X10 ⁷	1.7X10 ⁵	1.2X10 ⁶	2.0X10 ⁶
X10 ⁸	1.6X10 ⁴	1.8X10 ⁵	3.1X10 ⁵
X10 ⁹	<100	2.5X10 ⁴	2.8X10 ⁴
X10 ¹⁰	<100	<100	5.3X10 ³

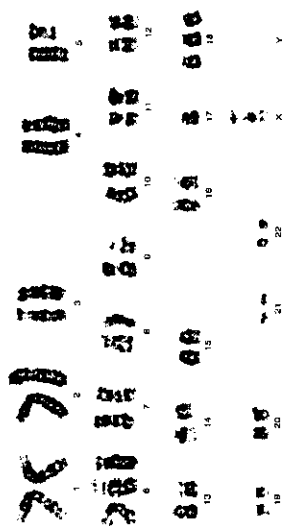
Polio

	0.1ml	1ml	10ml
Dilution			
X10 ⁴	7.8X10 ⁵	2.7X10 ⁷	1.9X10 ⁸
X10 ⁶	<100	6.7X10 ⁴	4.5X10 ⁵
X10 ⁷	<100	4.6X10 ³	4.3X10 ⁴
X10 ⁸	<100	<100	7.8X10 ³
X10 ⁹	<100	<100	<100

One milliliter (x10 concentration) or 10 ml (x100 concentration) of virus-infected culture medium was incubated with sulfonate-magnetic beads. After the incubation, the virus copy number was analyzed, as described in Fig. 7. *: means (n=3)

図10. HL-60細胞とHL-60RG細胞の各種染色体分析による細胞特性解析

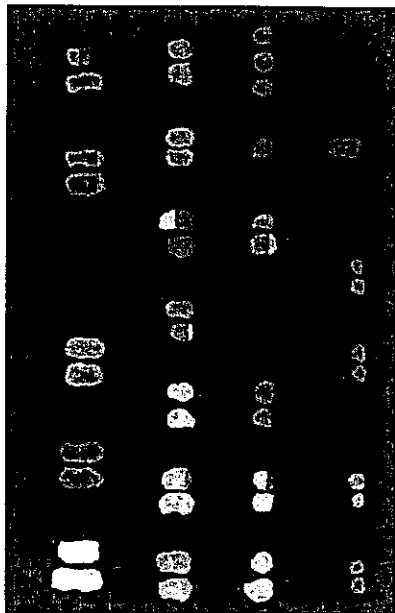
G-バンド解析
HL-60



CGH解析



m-FISH解析



HL-60RG

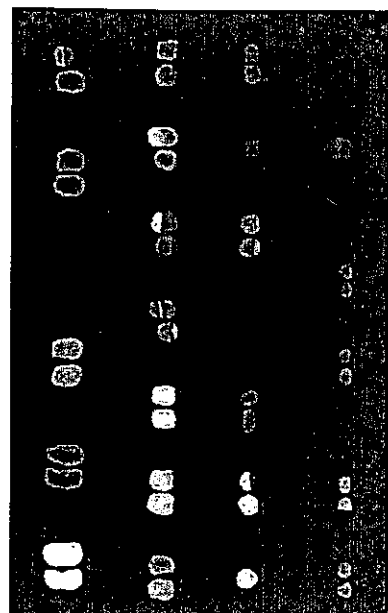
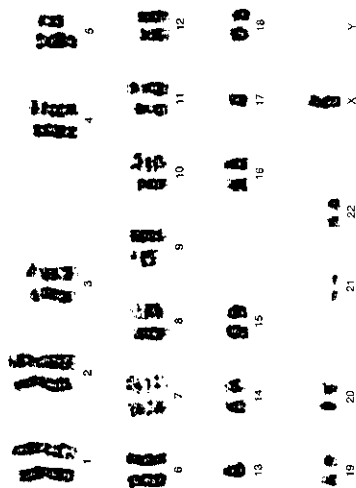
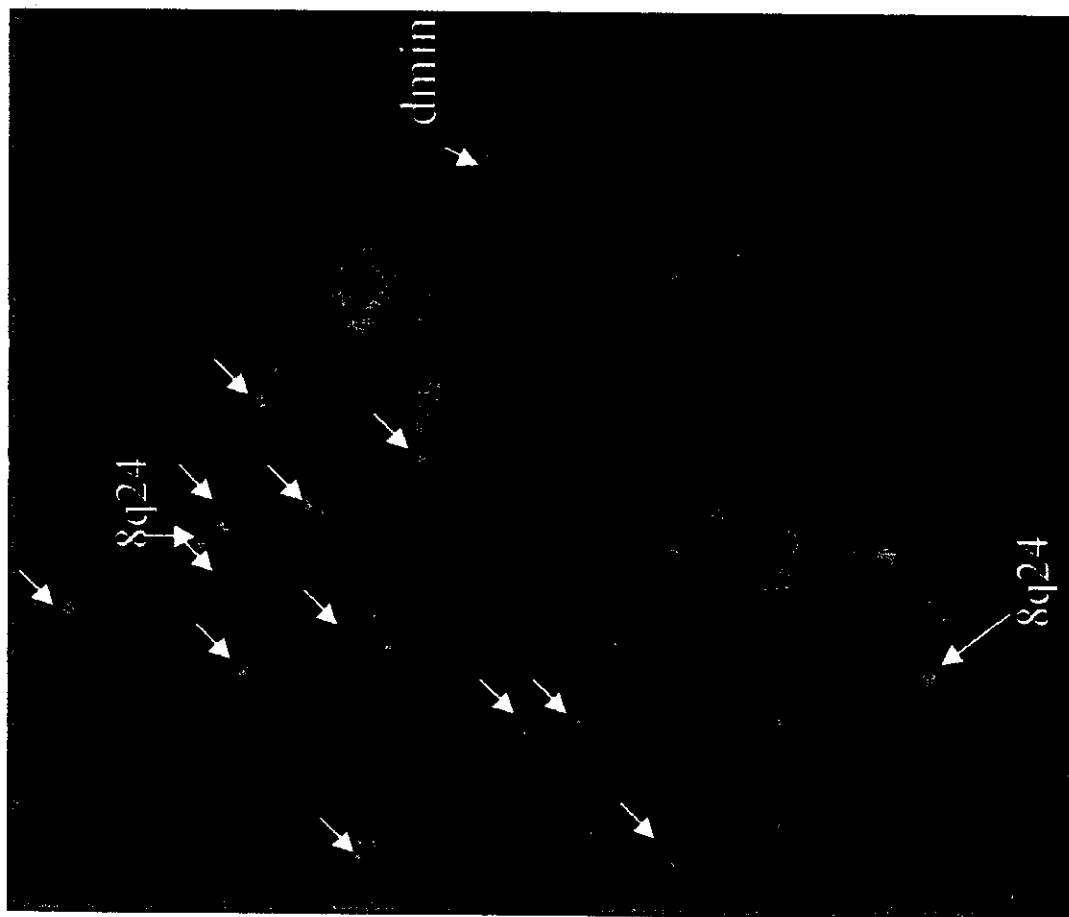


図11. c-mycプローブを用いたFISH解析

HL-60細胞



HL-60RG細胞

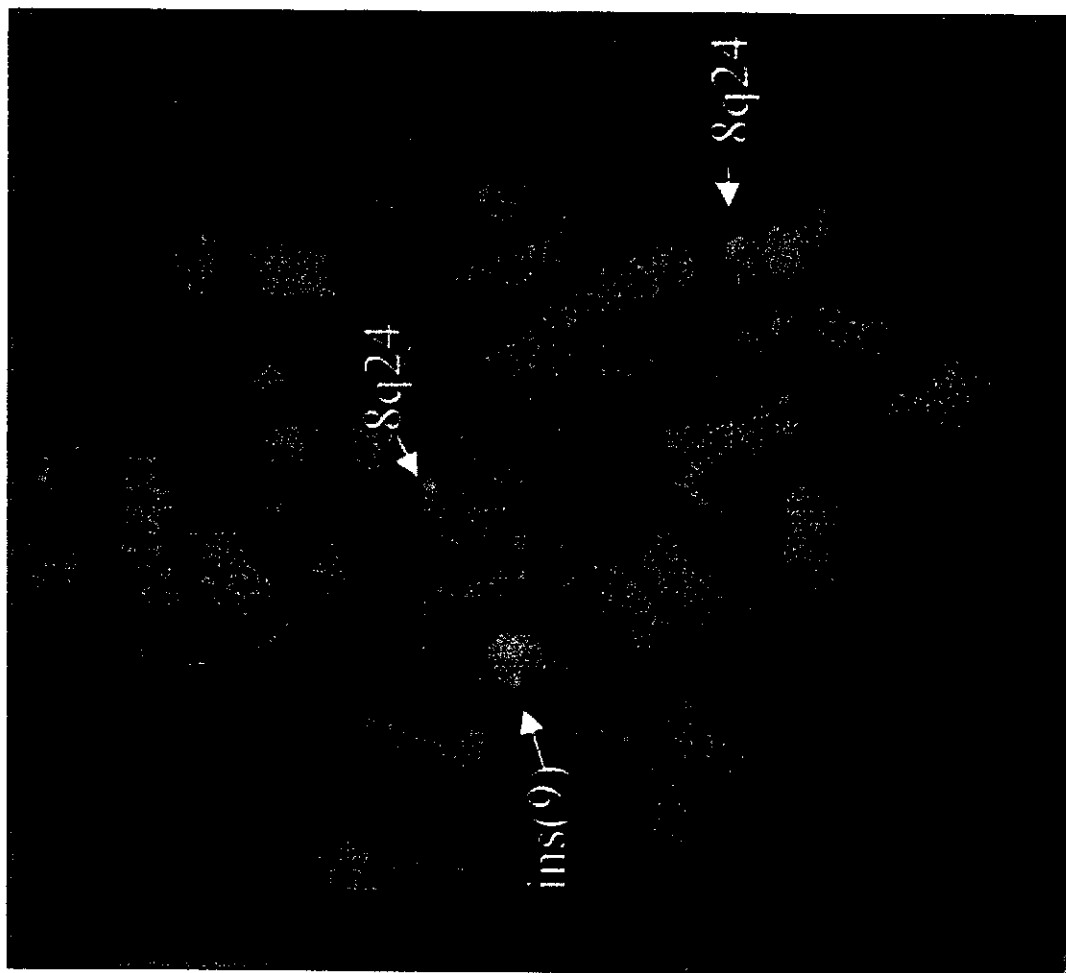


図12. c-mycプローブを用いたFISH解析とG-バンド解析を組み合わせた解析



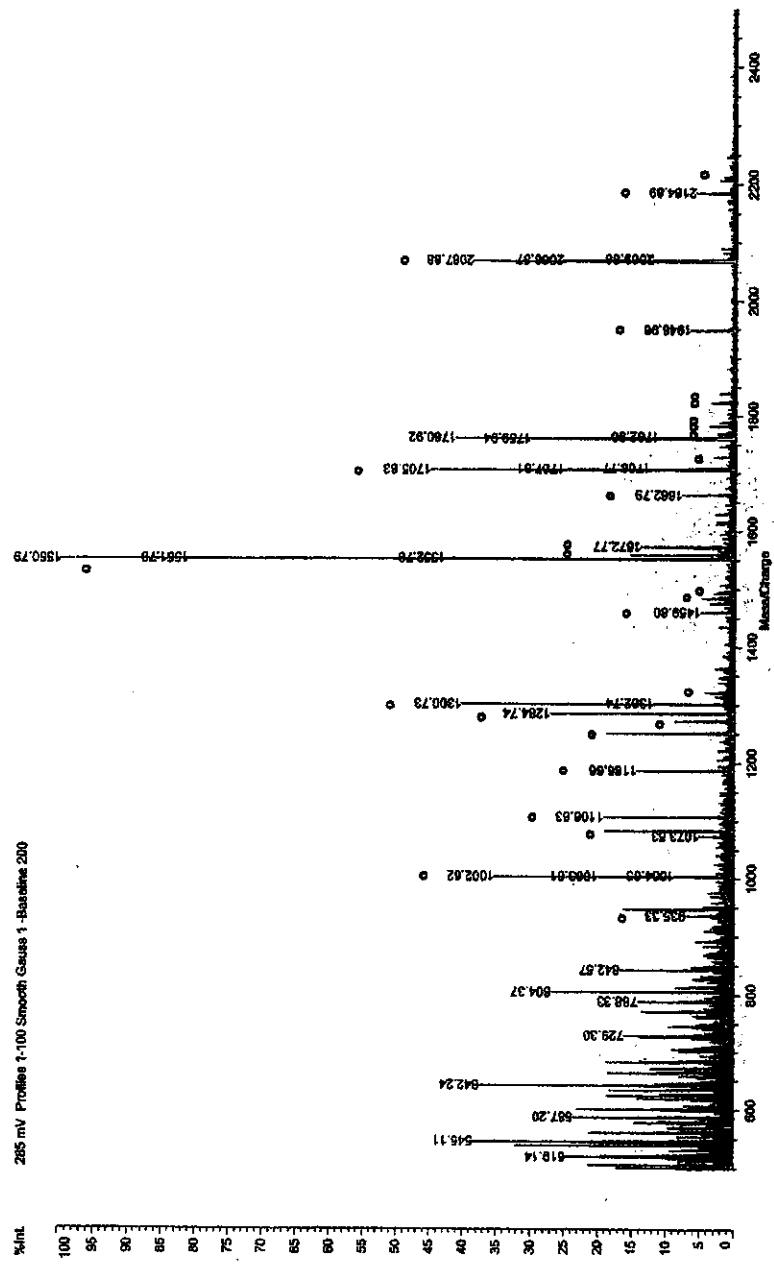


図13. HL-60RGの培養上清の二次元電気泳動のゲルから得たタンパク質をトリプシン消化したペプチドの質量分析スペクトル例
丸印の質量数をMascot検索に用いた。

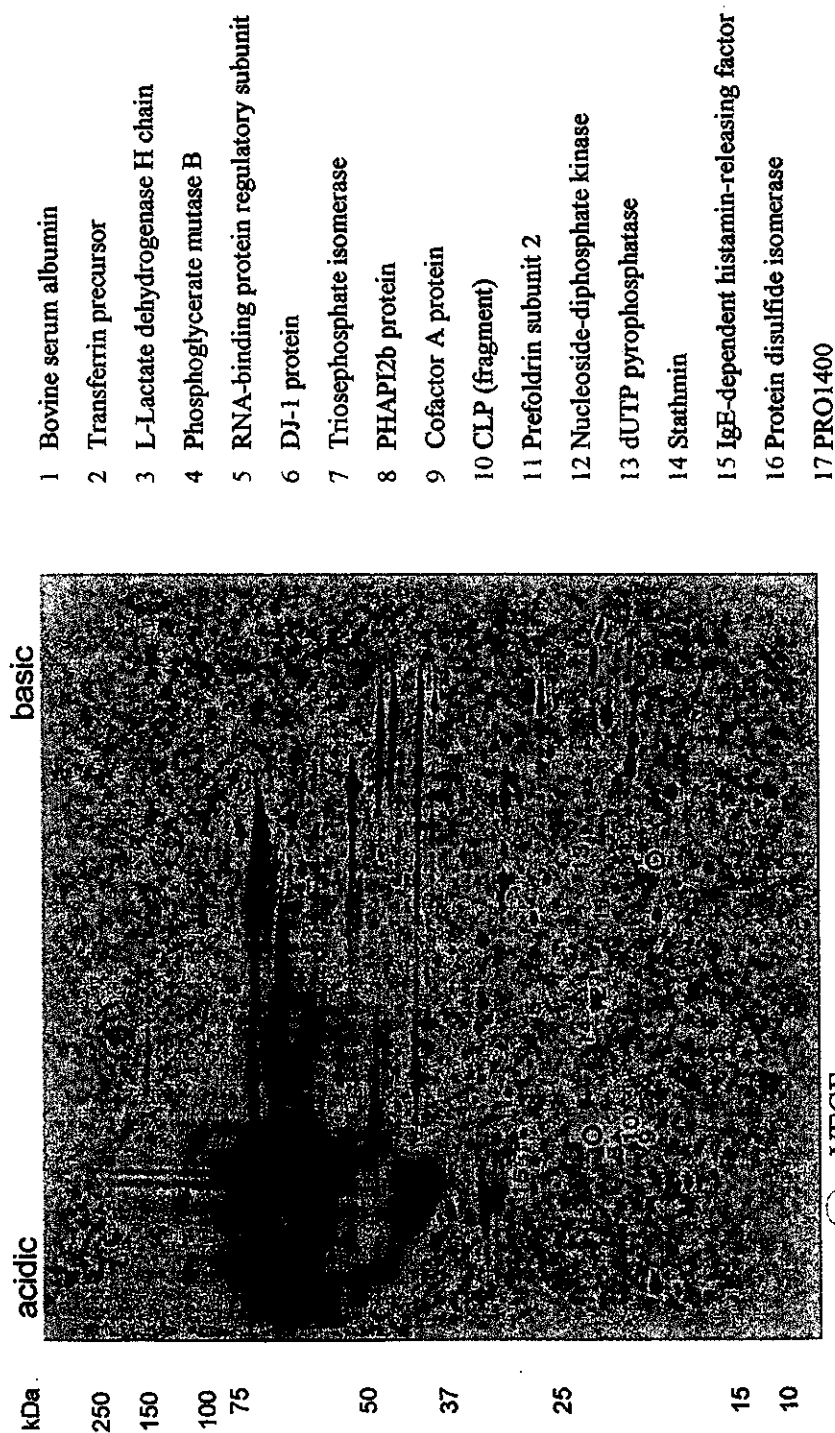


図14.HL-60RG培養上清中のタンパク質プロファイル

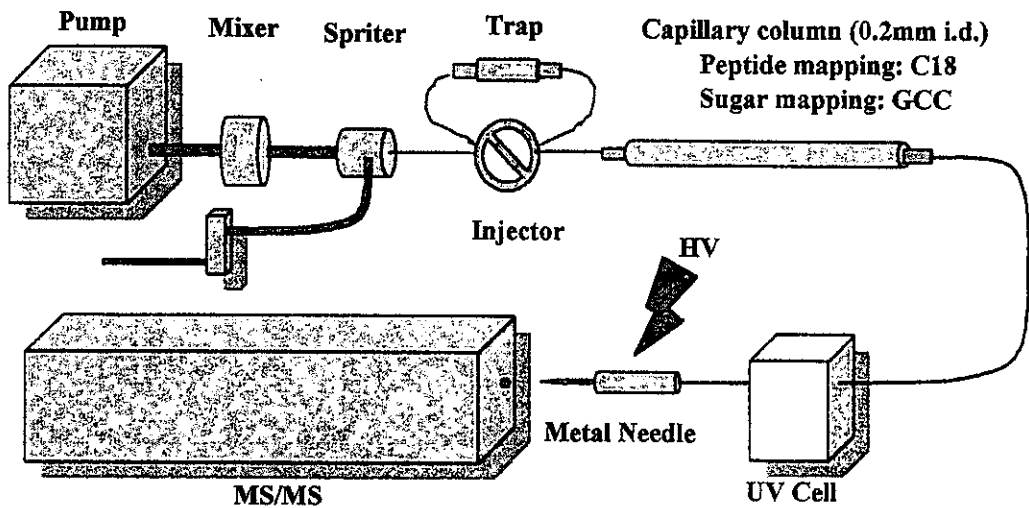


図15 キャピラリーLC/MSの概略

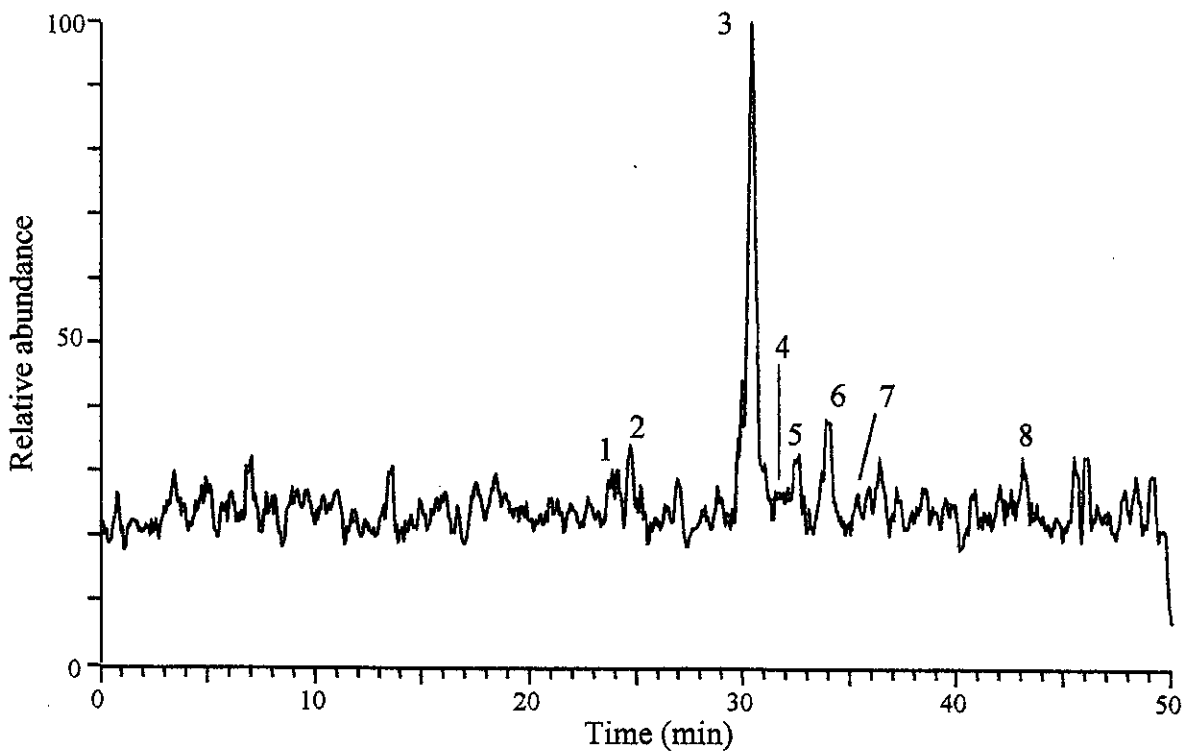


図16 キャピラリーGCC-LC/MSによるrhTMのN結合糖鎖の糖鎖マッピング

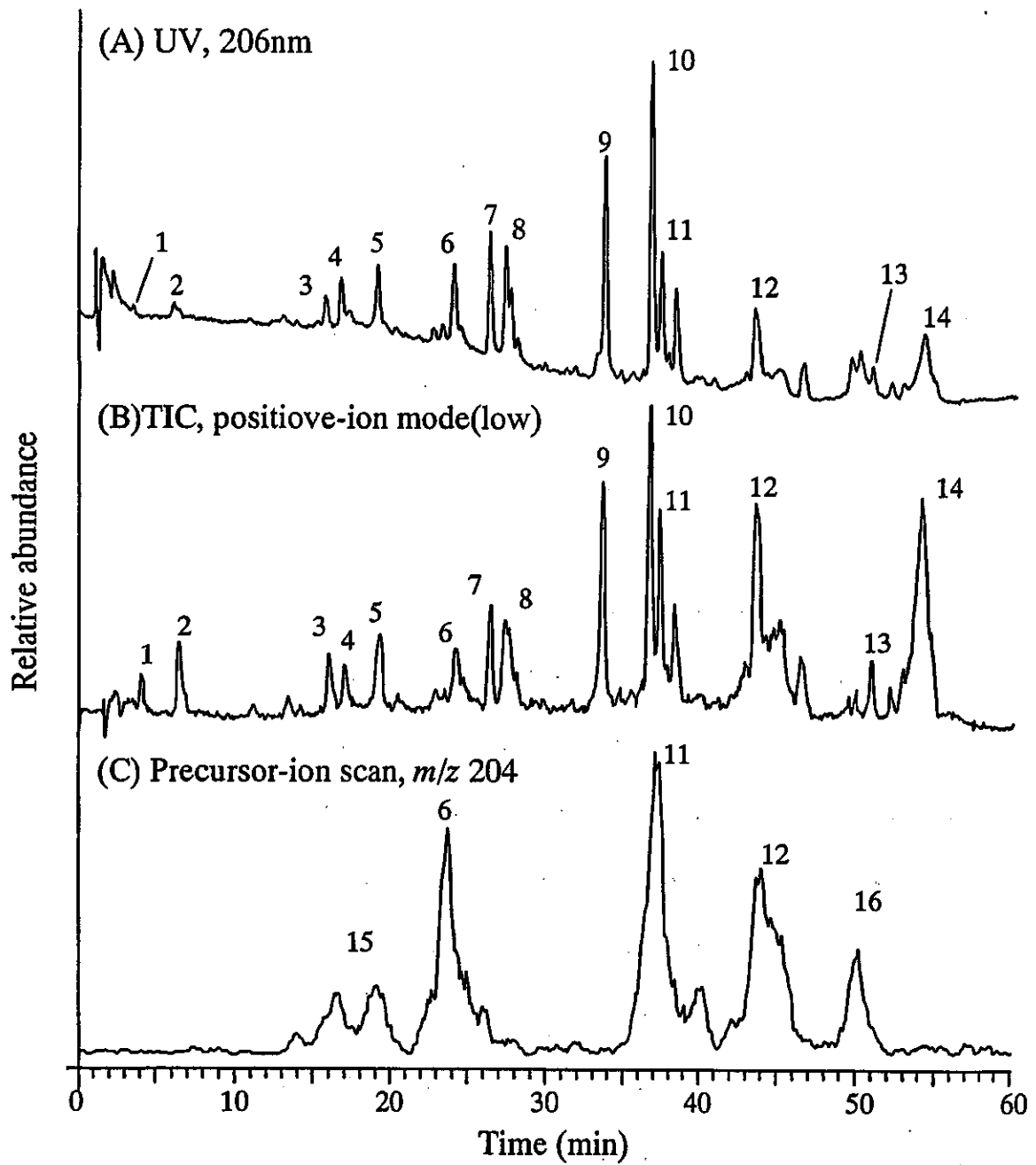


図19 トリプシン消化rhTMのペプチド/糖ペプチドマッピング
 (A) UV; (B), LC/MS; (C), precursor-ion scan (LC/MS/MS)