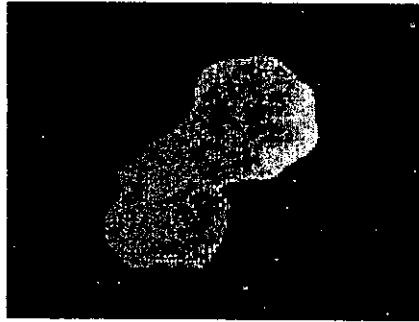
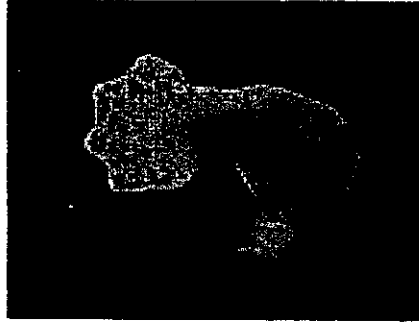


13th



14th



15th



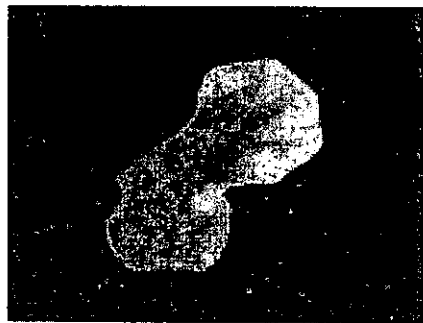
16th



17th

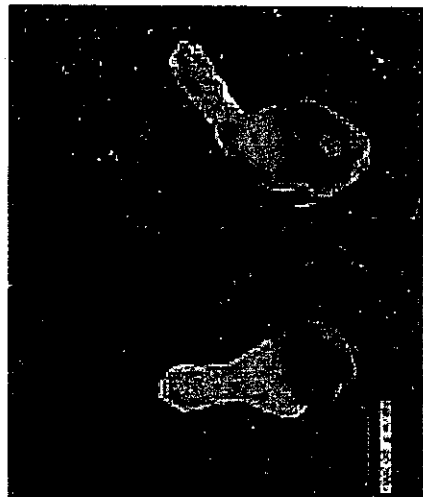
図11 ラット胎児の肢器官のアルシアンブルー染色標本

Control

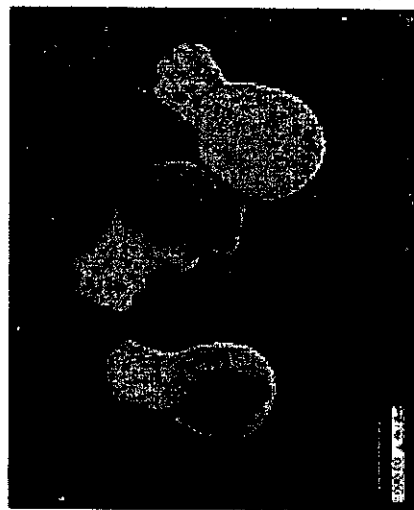


14th

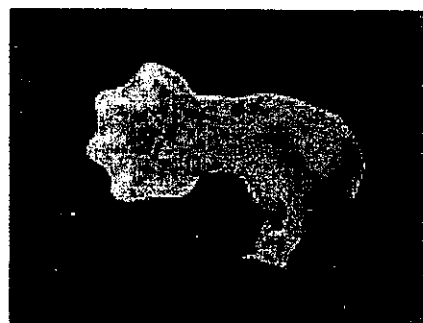
14th 1 week



14th in Bag 1 week



Control



15th

15th 1 week



15th in Bag 1 week

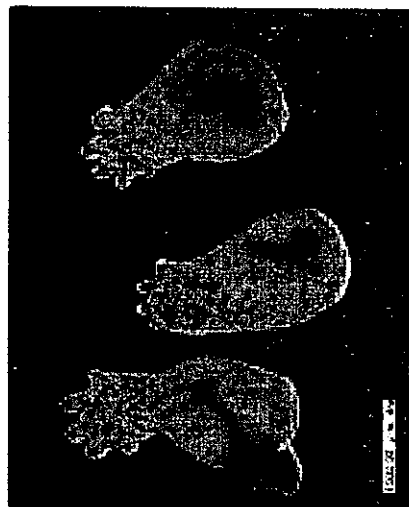


図12 肢芽に動的ストレスを与えて培養した際の形態変化と軟骨分化能

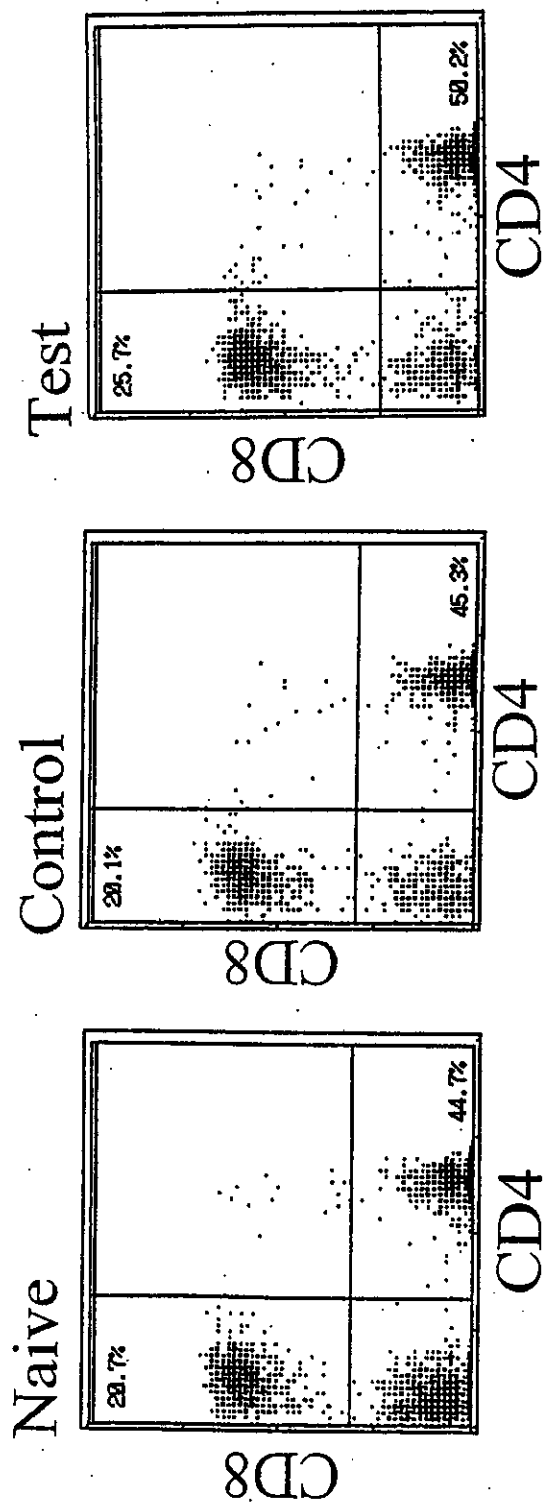
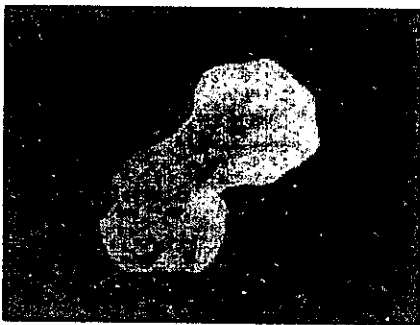
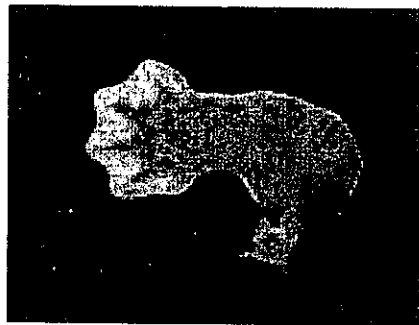


図13 肢芽埋入群とコントロール群の末梢血 T リンパ球のサブセットの割合の比較。



14th



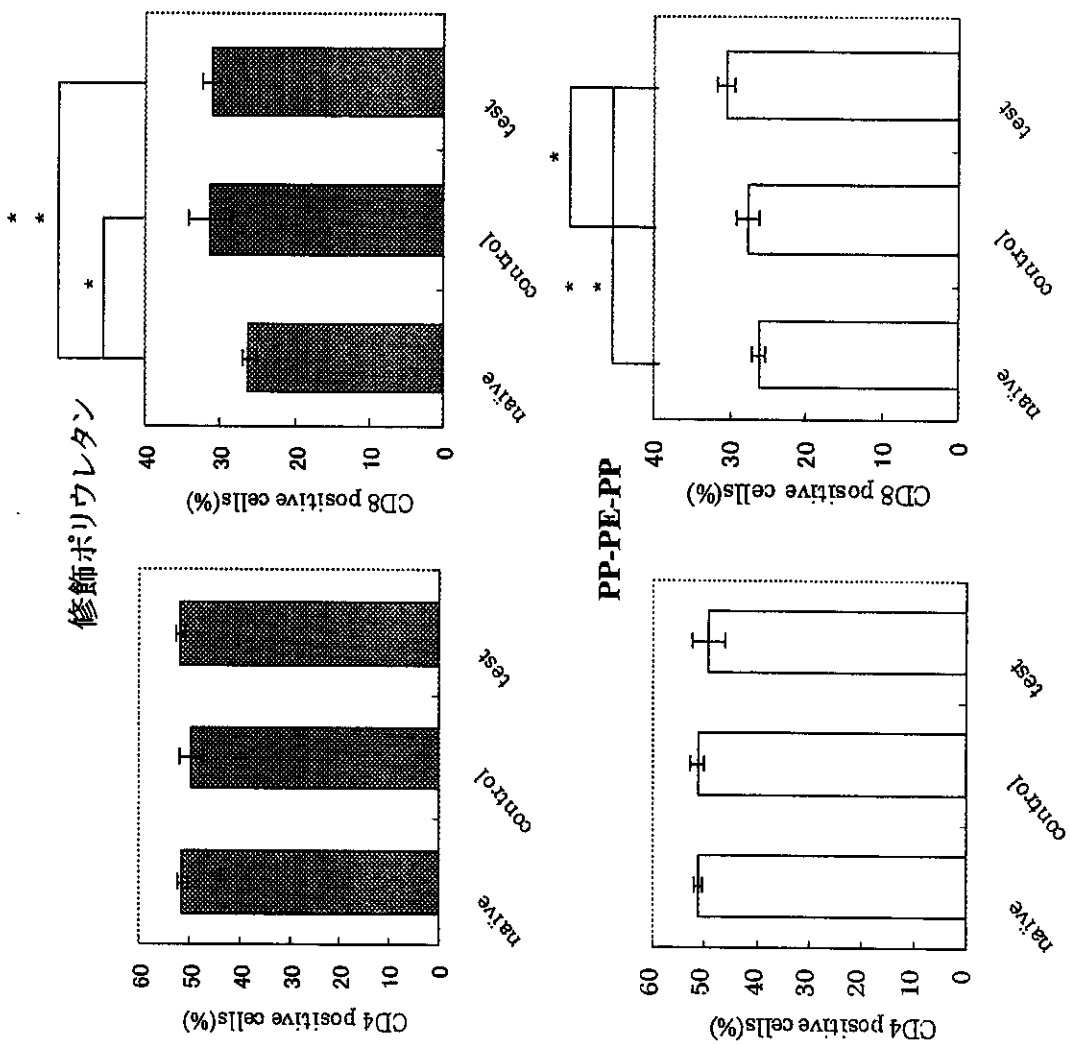
15th



14th Limb buds in bags for 1 week

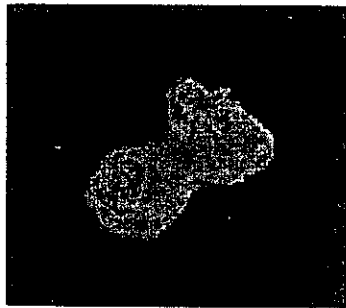


図14 マイクロメソブレイン・バッグに入れ1週間腹腔内培養した肢芽と、胎齡14日及び15日目の肢芽との比較



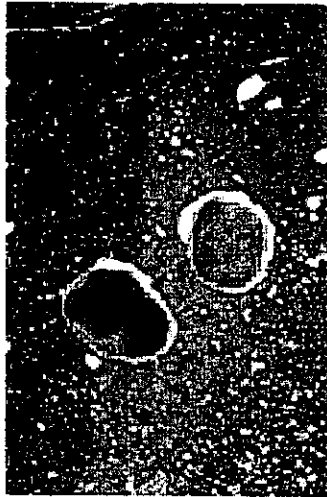
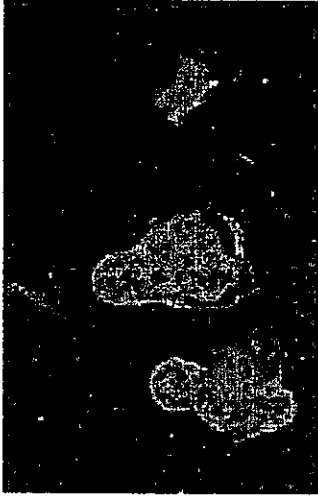
*P<0.05 **P<0.01

図15 異系ラット肢芽埋入群とコントロール群の末梢血Tリンパ球サブセットの割合の比較



14th
Limb bud
BN rat

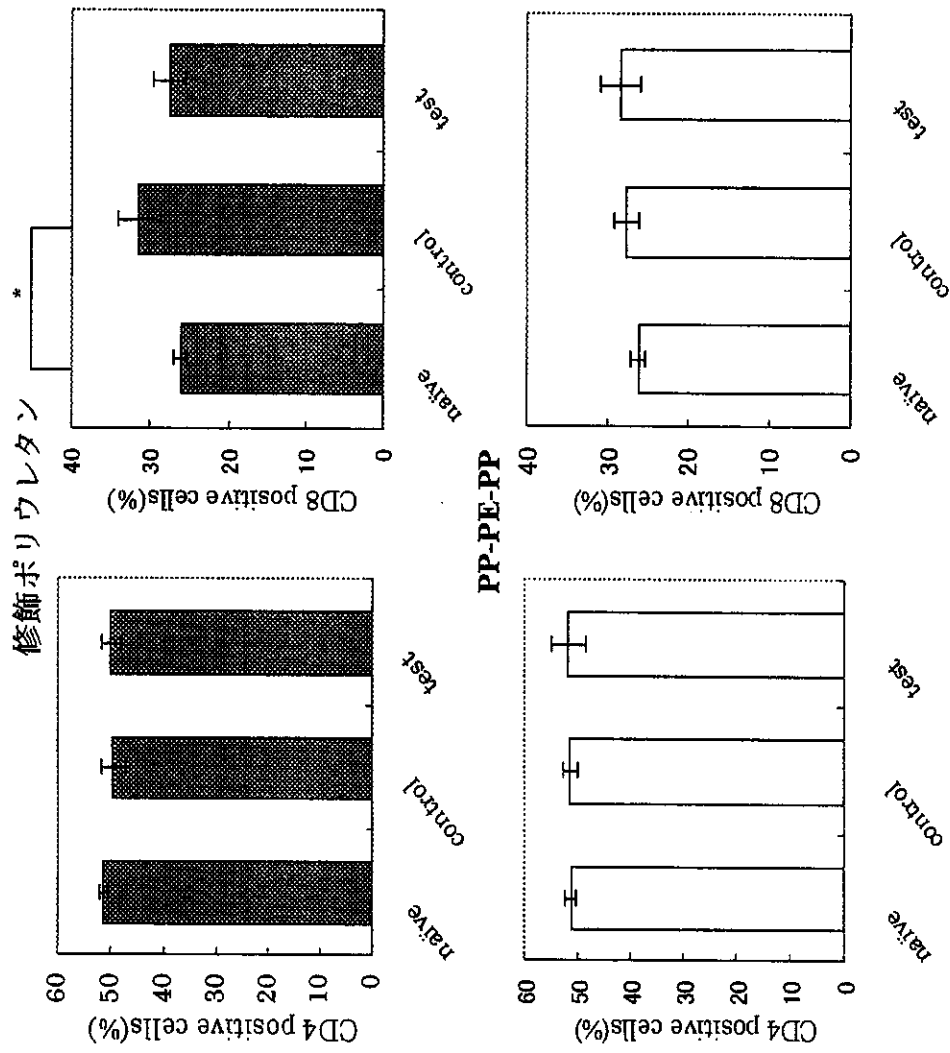
修飾ポリウレタン



PP-PE-PP

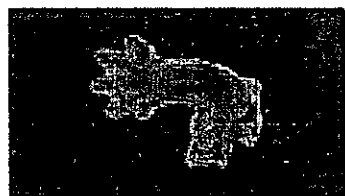
14th Limb buds in bags for 1 week
BN rat

図16 異系ラット肢芽をバッグに入れ1週間腹腔内培養した場合の肢芽と、胎齡14日目の肢芽との比較



*P<0.05

図17 異種であるICRマウスの肢芽埋入群とコントロール群の末梢血Tリンパ球サブセットの割合の比較



修飾ポリウレタン



13th



PP-PE-PP

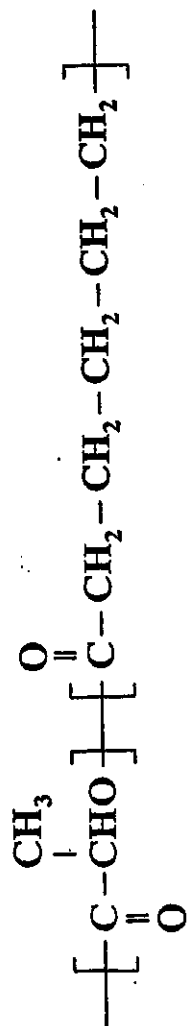


14th

13th Limb buds in bags for 1 week

図18 異種であるマウスの肢芽をバッグに入れ1週間腹腔内培養した場合の肢芽と、胎齡13日目の肢芽との比較

L-乳酸-ε-カプロラクトン共重合体



乳酸
(LA)

ε-カプロラクトン
(CL)

重量比

LA : CL = 75 : 25

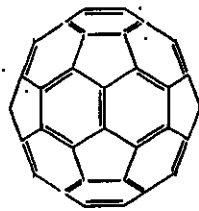
P(LA-CL)₂₅ 10000

LA : CL = 50 : 50

P(LA-CL)₅₀ 18000

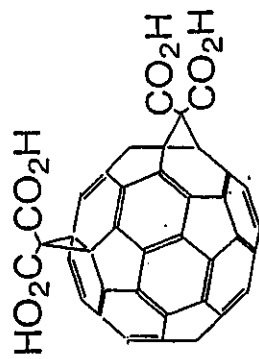
フラレーン

C₆₀

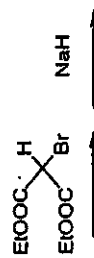


水溶性フラレーン

C₆₀DMA



e-C₆₂(CO₂H)₄-Cs



Synthesis of C₆₀DMA

図 19 試験物質の化学構造

P(LA-CL)₂₅ 10000 (60μg/ml)

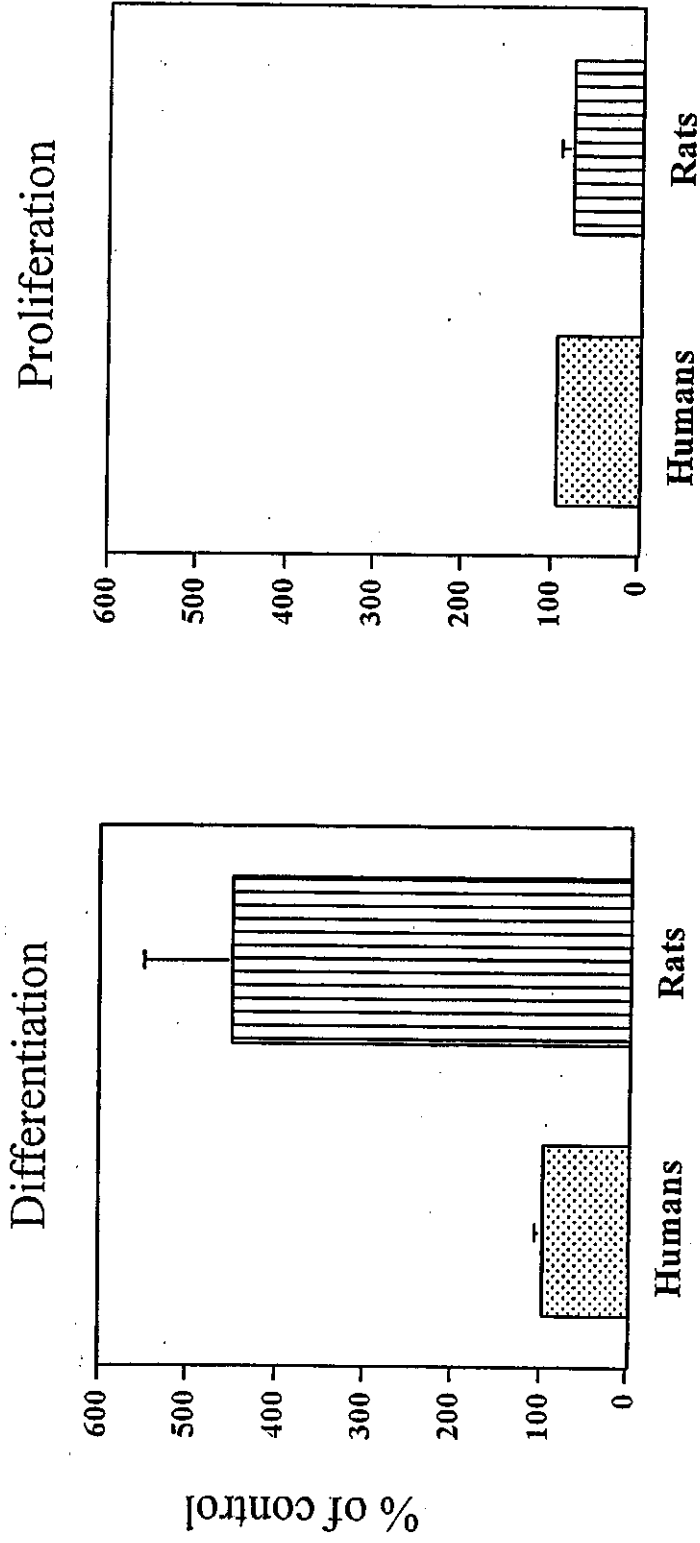


図 20 ヒト細胞およびラット細胞での P(LA-CL)₂₅ 10000 の軟骨分化に及ぼす影響

P(LA-CL)₅₀ 18000 (60 μ g/ml)

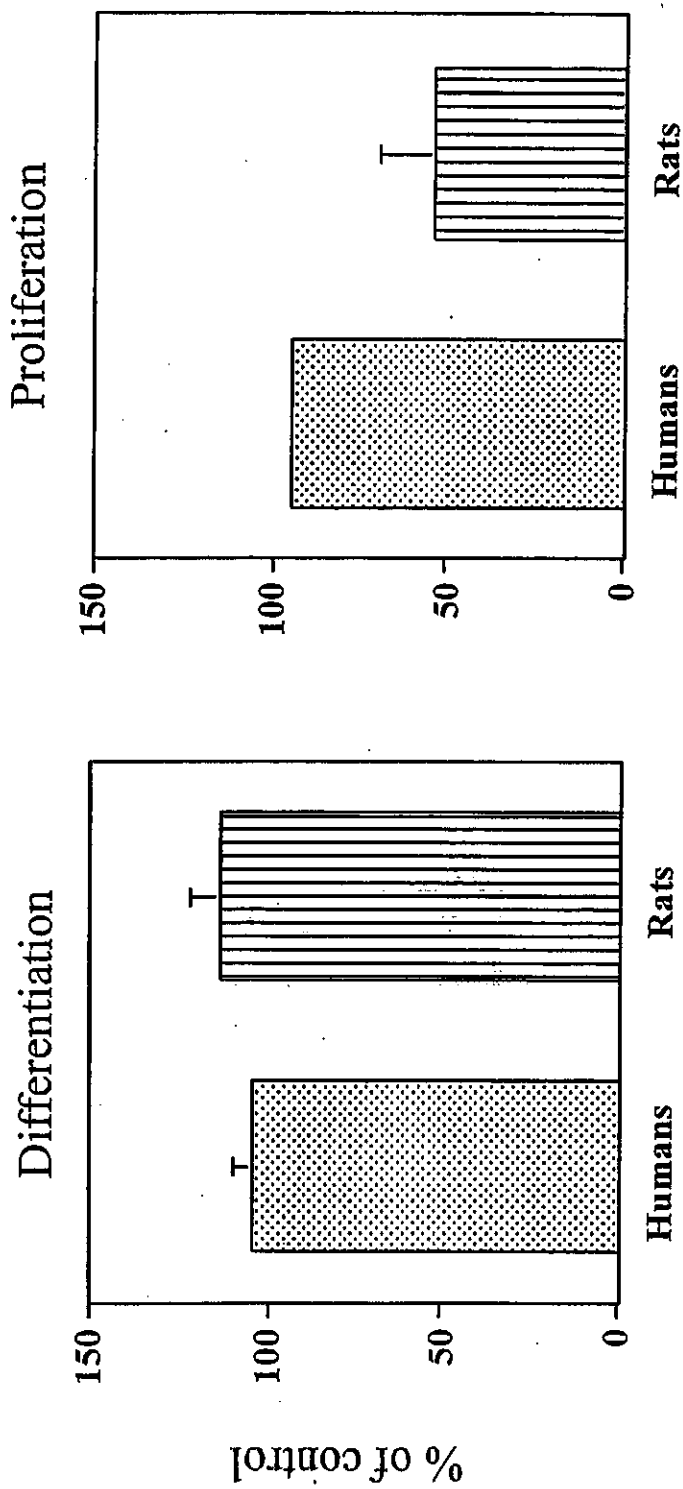


図 21 ヒト細胞およびラット細胞での P(LA-CL)₅₀ 18000 の軟骨分化に及ぼす影響

C₆₀ DMA (60μg/ml)

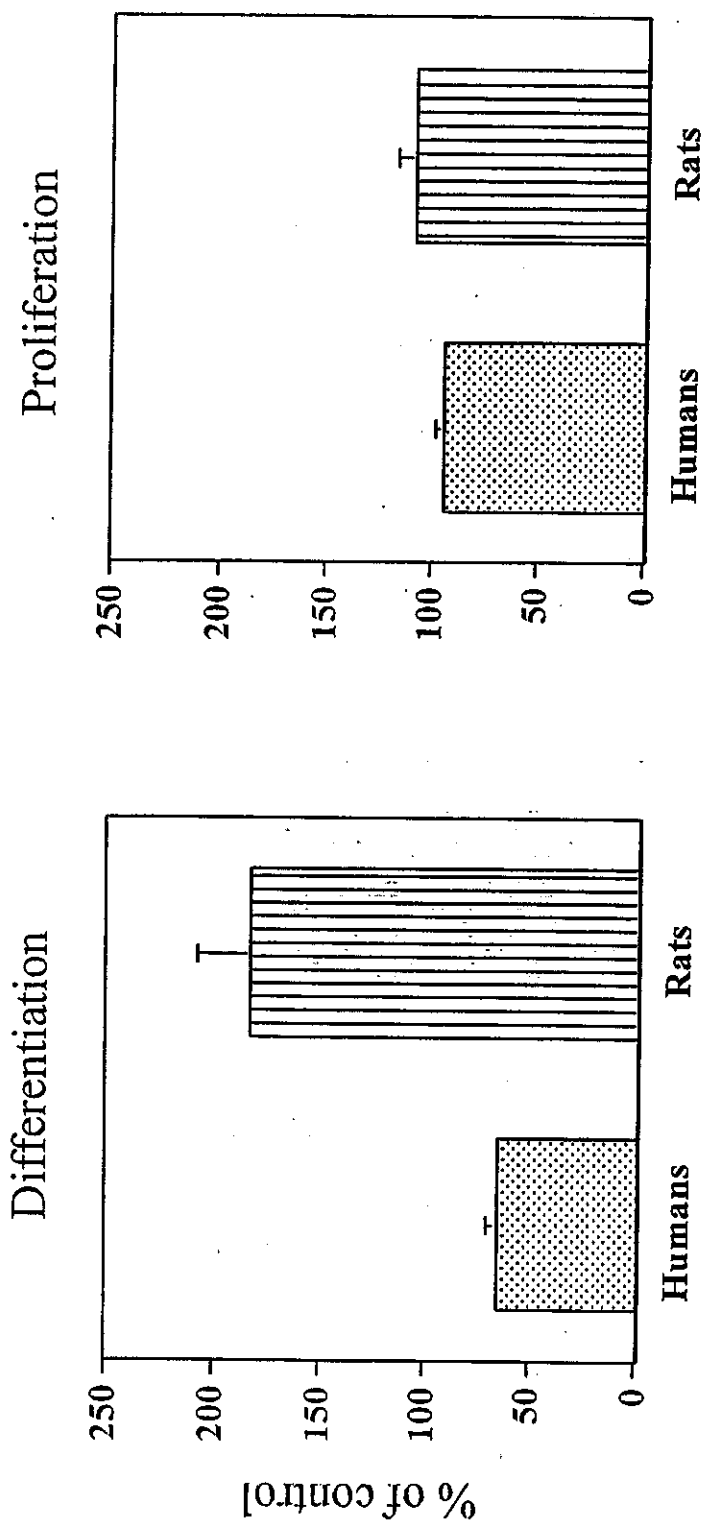


図 22 ヒト細胞軟骨の C₆₀DMA の分化およびラット細胞での影響

表 1 3種 の 物 質 の 軟 骨 分 化 に 及 ぼ す 種 差
 ヒ ト お よ び ラ ッ ト 細 胞 間 で の 種 差

Chondrogenesis

	Humans	Rats	
P(LA-CL) ₂₅ 10000	→	⇧	⇧ : Strong stimulation
P(LA-CL) ₅₀ 18000	→	→	↑ : stimulation
C ₆₀ DMA	↓	↑	↑ : no effect ↓ : inhibition

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

細胞・組織加工医薬品等の安全性に関する研究

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第2室長

細胞・組織加工医薬品等の安全性確保のための基盤技術開発として、以下のような研究を行った。(1)ウイルス等の感染性危険因子の高感度検出のための基盤技術の開発や評価方法に関する研究として、ポリエチレンイミン磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮技術に関する詳細な検討を行った。ポリエチレンイミンは、主としてエンベロープウイルスに対して優れたウイルス濃縮効果を示すこと、また100倍から1000倍の濃縮効果をしめすとともに検出限界の大幅な高感度化が可能であることを見出した。また、複数のウイルスを同時に濃縮可能なことも明らかにした。一方、スルホン酸磁気ビーズは非エンベロープウイルスの濃縮にも適応可能であり、検出限界の高感度化も可能であった。これらのウイルス濃縮法は、遠心操作も必要なく短時間の操作でウイルスを濃縮することができるもので、簡便性・迅速性にも優れており、これらの濃縮法を組み合わせることにより、ウイルス検出のためのNATの高感度化が可能であることが示された。(2)染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発を目指して、モデル細胞としてHL-60細胞及びその亜株である高増殖性HL-60RG細胞を用いて検討した。G-バンド染色、マルチカラーFISH(m-FISH)、CGH法を組み合わせた染色体解析により、HL-60RG細胞では、9番染色体9q13部位に8番染色体の一部が挿入されていることを昨年見出したが、c-mycプローブとG-バンド解析を組み合わせることにより第8染色体のc-mycを含む領域が増幅して第9染色体に挿入されていることを明らかにした。以上の結果より、G-バンド解析、CGH解析、m-FISH解析、オンコ遺伝子プローブFISH解析を組み合わせることにより、細胞の遺伝的変異を検出するのに非常に有用であると考えられた。(3)細胞由来タンパク質プロファイルを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発として、モデル細胞を用い、培養上清に分泌される増殖因子等を濃縮し、イモビラン2次元電気泳動法により、2次元上で分離したスポットを質量分析により解析する方法を確立した。(4)幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究として、ヒト末梢血幹細胞及び臍帯血AC133細胞を用いた血管内皮細胞への分化誘導系を確立し、その分化誘導初期に出現するCD31強陽性細胞が血管内皮への分化能を持つことを見出し、CD31の発現が血管内皮分化能をもつ細胞の優れた特性指標となることを見いだした。

研究協力者

押澤 正 (国立医薬品食品衛生研究所)
主任研究官

岩田明子 (国立医薬品食品衛生研究所)

佐藤功栄 (埼玉県赤十字血液センター)
室長

A. 研究目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞・組織加工医薬品・医療用具(細胞・組織加工医薬品等)の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医療に用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。本邦においても、様々な形での細胞・組織加工医薬品等の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題が多い。

本研究では、細胞や組織を加工した治療薬・医療用具の品質、安全性等を確保するために、1) ウイルス等の感染性危険因子を否定するための基盤技術の開発や評価方法に関する研究、2) 多重標識FISH等を利用した染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発研究、3) 細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発、4) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医

薬品等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究を行うことを目的としている。

本年度は、1) 昨年開発した核酸増幅法(NAT法)によるウイルス検出の高感度化を目指したウイルス濃縮法に関する詳細な検討、2) 多重標識FISH等を利用した染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発の基礎検討として、G-バンド解析、競合的ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)解析、及びm-FISH解析、オンコ遺伝子プローブを用いるFISHを組み合わせた染色体解析の有用性についての検討、3) 細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発の基礎として、イモビラン2次元電気泳動法による細胞培養上清の高解像度分離と質量分析法を用いたペプチド・マス・フィンガープリンティング(PMF)を用いる細胞由来タンパク質プロフィールの解析手法に関する研究、4) 末梢血及び臍帯血の血液幹細胞を分離し、血管内皮細胞への誘導とその特性解析を行った。

B. 研究方法

1. ウイルスのポリエチレンイミン及びスルホン酸磁気ビーズによる濃縮

ポリエチレンイミン磁気ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズを、水溶性カルボジイミド存在下、平均分子量10,000のポリエチレンイミンをカップリングして作製した。同様にスルホン酸基の導入は、デキストラン硫酸を磁気ビーズに結合させて行った。

通常の実験では、100 μ l (5mgの磁気

ビーズを含む)のポリエチレンイミン溶液を種々の濃度のウイルス液 1ml ないしは 10ml に添加した。10 分後に、磁気ビーズを含む懸濁液を磁性スタンドにセットし、10 分間静置した。10 分後、上清を分取し、磁気ビーズを含む残液 100 μ l 及び磁気ビーズを添加する前のウイルス液 100 μ l の各液にウイルスゲノム抽出液 (EX-R&D、ゲノムサイエンス社) を加え、添付プロトコールに従ってウイルスゲノムを抽出した。

2. PCR 及び RT-PCR

抽出した DNA ウイルスゲノムの検出は、表 1 のプライマーの組み合わせを用いて 94°C、30 秒、56°C、45 秒、72°C、60 秒を 35 サイクルする PCR 反応を行った。RNA ウイルスの場合には、抽出したウイルスゲノム全量を TE 液に溶解後、トリウイルス逆転写酵素を用いて 42°C、45 分間の cDNA の合成を行った。合成した cDNA を上記と同様の PCR 反応を行い、増幅した。増幅産物は、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロミドないしはサイバーグリーンによる染色後、目的バンドを確認した。

抽出したウイルスゲノムを定量するためにリアルタイム PCR 及びリアルタイム RT-PCR 反応を行った。用いたプライマーとプローブのセットは表 2 の通りである。プローブの記載されていないウイルスゲノム検出には、サイバーグリーンを用いて定量した。

3. ウイルスの感染価の測定

ウイルス感染価は、それぞれ指向性のある細胞を用いて行った。Herpes Simplex virus、Polio virus、Visicular

Stomatitis virus、Sindbis virus は Vero 細胞を用いて、Porcine Parvo virus は ESK 細胞を用いて、SV-40 virus は CV-1 細胞を用いて感染価を調べた。

4. ポリエチレンイミン 6MB セファロースカラムによるウイルス除去

平均分子量 10,000 のポリエチレンイミンを BrCN 活性化セファロース 6MB に固相化し、細胞懸濁液に各種モデルウイルスをスパイクし、ウイルス除去能の検討を行った。

5. G-バンド染色

HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞を、10 μ g/ml コルセミド存在下に 1.5 時間培養した後、遠心して細胞を集めた。沈殿した細胞を、10ml の 0.075M KCl 低張液に懸濁し、30 分間静置した。カルノア液を 5ml 重層して転倒混和した。遠心して細胞を集め、15ml のカルノア液を添加した。再び遠心し、カルノア液での洗浄を上清が透明になるまで数回繰り返して細胞を固定した。この固定した細胞浮遊液を、スライドガラスの上に滴下し、火焰固定し染色体をスライドガラスの上に展開させた。染色体標本を、70°C、1.3 時間処理した後、キナクリンマスタード染色液に 10 分間浸潤し染色した。染色したスライドを水洗した後、顕微鏡下で、G-バンドの観察を行った。

5. CGH 染色

ヒト正常 2 倍体細胞由来ゲノム DNA と、HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞由来ゲノム DNA 各々 1 μ g を、DNA ポリメラーゼ及び DNase I 存在下、Sepctrum Green-dUTP または Spectrum Red-dUTP によるニックトランスレーシ

ヨンによるゲノム DNA の標識を行った。標識した、ヒト正常 2 倍体細胞由来ゲノム DNA と HL-60 細胞あるいは HL-60RG 細胞由来ゲノム DNA を Cot-I DNA 存在下に混合しプローブ液を作成した。一方、G-バンドの項で記載したのと同じ方法で調製したヒト正常 2 倍体細胞由来染色体標本を、ホルムアルデヒド存在下、染色体 DNA を処理した後、熱変性させた。この熱変性させたスライド標本に、プローブ液を載せ、37°C、3-5 日間恒温槽内でハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、蛍光顕微鏡下で観察した。

7. m-FISH 染色

スライドガラスに展開・固定した HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞の染色体標本を、2%NP-40 を含む 2X SSC 溶液に浸潤し、37°C、30 分間、静置した。スライドを、70%、85%、100%エタノールに段階的に浸潤し、脱水した。70%ホルムアルデヒドを含む 2X SSC 液に浸潤し、75°C、5 分間変性させた。さらに、先ほどと同様のアルコール系列を用いて脱水し、風乾した。マルチカラープローブを重層し、2 分間、45°Cに清置し、ハイブリダイゼーションを行った。

8. 培養上清の調製

HL-60RG 細胞を ASF104 (AJINOMOTO 社)中に 5×10^5 cells/ml に懸濁し、37°Cで 3 日間培養し(終濃度約 2×10^6 cells/ml)、上清を得た。上清 200ml を Sartorius 社製、限外ろ過装置(分画分子量 10,000)を用いて 2ml にまで濃縮した。濃縮液を、Isogen (和光純薬)を用いてたんぱく質を沈殿させ、塩等を除いた。各沈殿たんぱく質を、イモ

ビランの 1 次元電気泳動用溶解液に懸濁し、不溶性物質を 100,000rpm の超遠心により除いた。

9. 2 次元電気泳動による解析

1 次元目の等電点電気泳動には、Immobiline pH3-10NL, (Amersham Pharmacia 社)を用いた。2 次元目の SDS-PAGE には、10-20%のグラジエントゲル(バイオクラフト社)を用いた。タンパク質の染色は Amersham Pharmacia 社の銀染色キットを使用した。質量分析用試料を調製する際は、泳動後、ゲルをクマジーブリリアントブルーで染色して各スポットを同定した。

10. 二次元電気泳動で分離した各スポットのトリプシンによるゲル内消化

ゲルからスポットを切り出し MilliQ 水 500 μ L を加え、室温で 10 分振盪して洗浄した。この操作をさらに 2 回繰り返した後、アセトニトリル 200 μ L を加え、室温で 10 分振盪した。アセトニトリルを除いた後、減圧濃縮遠心器で約 30 分ゲルを乾燥させた。乾燥したゲル片に 25ng/ μ L トリプシン (Promega 社) 溶液 (10mMTris-HCl, pH8.8) を 10 μ l 加え、氷浴下で 45 分間静置ゲルを膨潤させた後、20 μ L の 10mMTris-HCl バッファー (pH8.8) を加え、37°Cで一晩インキュベーションした。pH 試験紙で溶液の pH が変化していないことを確認した後、酵素消化液を回収した。ゲル片に 5%ギ酸、50%アセトニトリル 20 μ L を加え、10 分振盪し、上清を再び回収した。この操作を 2 回繰り返して全ての上清を集め、減圧濃縮遠心器で約 5 μ L まで濃縮した。0.1%トリフルオロ酢酸溶液 20 μ L に可溶し、ピペットチップ型カラム Zip Tip

μC18 (Millipore 社) で脱塩して質量分析用試料とした。

1.1. 質量分析とタンパク質の推定

トリプシン消化を行った質量分析用試料 0.5μl を MALDI target™ にアプライし、マトリックスとしてα-シアノ-3-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) の 0.1% トリフルオロ酢酸・50% アセトニトリル飽和溶液を重層した。試料を、MALDI TOF-MS (AXIMA-CFR, 島津製作所) を用いて質量分析を行い、得られたペプチド断片の質量分析スペクトルより、Mascot データベース解析システム (Matrix Science 社) を用いて各スポットの帰属の推定を行った。

1.2. AC133 陽性細胞の分離

1.2.1 の血液より分離した約 40ml のバッファーコートに 100mM EDTA を終濃度 2 mM となるように添加し、フィコールバック (比重 1.077) に静かに重層した。一方、臍帯血からの単核球を分離する際には、臍帯血を等量の 1mM EDTA を含む PBS と混合後、フィコールバックに静かに重層した。2200 回転、10°C、15 分間遠心後、単核球分画を分離し、0.5% BSA、2mM EDTA を含む PBS (分離バッファー) に浮遊させた。低速で遠心後、沈殿した細胞を再び 200 μl の分離バッファーに再浮遊させた。この単核球分画より AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec) を用いて、キットのプロトコールにしたがって AC133 陽性細胞を分離した。まず、単核球分画に抗 AC133 抗体・マイクロビーズを添加し、4°C、30 min 間反応させた。反応液に、10ml の分離バッファーを添加して遠心を行った後、沈殿した細胞を 2ml の分離バッファーに

再浮遊させた。この細胞浮遊液を、Auto MACS (Milteny Biotec) アプライし、陽性細胞を分離した。分離した AC133 陽性細胞は 20% 牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml 血管内皮細胞成長因子 (VEGF) を含む EBM-2 培地に浮遊させ、フィブロネクチンあるいはタイプ IV コラーゲンをコートした 24 穴あるいは 48 穴のマルチウェルに分注し、37°C、5% CO₂ 気相下にて培養した。

1.3. 免疫組織染色

内皮細胞の特異的表面抗原として、CD31、flk-1、Tie2 を、また細胞内指標として非誘導型 NO 合成酵素 (eNOS) の発現を、またマクロファージの特異的表面抗原として CD11b を選択した。培養した細胞を、細胞を -20°C のエタノールで固定した。固定後、適量の氷冷した PBS を用いて 3 回洗浄した。1% BSA-PBS で 4°C、1 時間ブロッキングを行った後、各種抗体を含む 1% BSA-PBS を添加し、4°C、1 時間反応させた。細胞を 1% BSA-PBS 接着で洗浄した後、抗 IgG 抗体-FITC あるいは抗 IgG 抗体-ローダミン存在下で 4°C、1 時間、反応させた。反応終了後、細胞を 1% BSA-PBS を用いて洗浄し、共焦点顕微鏡にて励起波長 488 nm、蛍光波長 505-550 nm で観察した。

1.4. 分化誘導した AC133 陽性細胞の CD31 発現の免疫染色と細胞分画

AC133 陽性細胞をフィブロネクチンあるいはタイプ IV コラーゲンコートプレートを用いて、VEGF 存在下培養を行った。上清の細胞と接着細胞をラバーボリスマンを用いて回収し、-20°C のエタノールで固定した。固定後、免疫組織染色のため

め細胞を氷上に静置し、PBS で洗った。1%BSA-PBS で 4°C、1 時間ブロッキングを行った後、FITC-標識抗 CD31 抗体 (Pharmingen)を含む 1% BSA-PBS を添加し、4°C、1 時間抗原抗体反応させた。細胞浮遊液を PBS で洗浄し、CD31 の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。一方、CD31 発現陰性、陽性及び強陽性細胞をセルソーターを用いて分取した。分取した各細胞を、ファイブロネクチンコートプレートを用いて VEGF 存在下、さらに 1 週間培養した。

1.5. 倫理面への配慮

ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行った。

C. 結果

1. ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

細胞・組織加工医薬品等の安全性に関する最大の関心事は、ウイルス等の感染性因子の混入をいかに防ぐかである。そのためには、最も感度よくかつ非特異的な反応を抑えてウイルス等の感染因子の検出を行う必要がある。昨年度は、ポリエチレンイミン磁気ビーズが、主としてエンベロープウイルスの濃縮に有効であることを見出した。本年度は、まずポリエチレンイミン磁気ビーズのウイルス濃縮作用について詳細な検討を行った。

Vero 細胞に感染させた Sindbis virus、ESK 細胞に感染させた Porcine Parvo virus、CV-1 細胞に感染させた SV-40 virus の上清を段階希釈し、その 100 μ l よりウイルスゲノムを抽出した。一方、それぞれのウイルス希釈液 1 ml に 10mg/0.1ml のポリエチレン磁気ビーズを添加し、ビーズに結合したウイルスより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 反応により検出した結果を図 1 に示す。SV-40 ウイルスや Sindbis virus の場合は、単なるウイルス培養上清の段階希釈液での検出限界に比較して、磁気ビーズでの検出限界は明らかに上まわっていた。すなわち、磁気ビーズに結合したウイルスから抽出した試料のほうがより薄く希釈した試料からでもウイルスゲノムが検出され、効率良くウイルスが濃縮されていることが示された。

ついでウイルス感染価を指標としてポリエチレンイミン磁気ビーズによる濃縮を検討した。Vero 細胞に感染させた Herpes Simplex virus、Polio virus、Visicular Stomatitis virus、及び Sindbis virus の培養上清、ESK 細胞に感染させた Porcine Parvo virus、CV-1 細胞に感染させた SV-40 virus の各 1 ml の培養上清に、ポリエチレンイミン磁気ビーズを添加して磁気ビーズ結合分画とその上清に分けた。さらに、ポリエチレンイミンの濃縮を行った上清に残存するウイルス力価を培養上清の力価と比較した。その結果を表 3 に示す。ポリエチレンイミン処理を行った SV-40 virus、Herpes Simplex virus、Sindbis virus、及び

Visicular Stomatish virus の上清のウイルス感染価は、もとの培養上清に比べ非常に低下していた。従って、これらのウイルスのほとんどがポリエチレンイミン磁気ビーズに結合したと考えられる。一方、Porcine Parvo virus 及び Polio virus では、PCR による検出同様、ポリエチレンイミンに結合していないことが明らかになった。

ポリエチレンイミン磁気ビーズのウイルス吸着能力を明らかにするために、ビーズの添加量と濃縮できるウイルス量との関係を調べた。 10^8 から 10^9 コピー数の HSV-1 及び Sindbis virus を含む培養液に種々の濃度のビーズを添加し、ビーズに結合したウイルス量をリアルタイム PCR 及び RT-PCR により測定した(図 2)。添加したビーズ量が 0.1~10 μ l までは、用量依存的にビーズに結合するウイルス量は増加するが、10~100 μ l では殆ど変化が認められない。したがって、以下の検討では、100 μ l のビーズを添加することとした。

次に、濃縮に及ぼす血清の影響について検討した。種々の濃度の血清存在下に、HSV-1、SV-40 ウイルス及び Sindbis virus の濃縮を行った。図 3 に示すように、50%血清存在下に濃縮を行うとウイルス濃縮の顕著な低下が認められるものの通常よく用いられる血清範囲(10%以下)では、濃縮効率の低下は認められなかった。

さらに、ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いて定量的なウイルス濃縮の可能性と検出限界近くでのウイルス濃縮の高感度化が可能かについて検討した。図 4

及び表 4 に、HSV-1 や Sindbis virus の培養上清の 1ml 及び 10ml から濃縮(10 倍濃縮及び 100 倍濃縮)を行った場合のウイルス検出の結果を示している。種々の希釈を行ったこれらのウイルスをポリエチレンイミン磁気ビーズで濃縮すると期待通りのウイルス量が検出された。特に、RNA ウイルスである Sindbis virus では、100 倍濃縮を行った場合には 1000 倍以上の濃縮効果が得られ、これはウイルス濃縮中に RNase のような阻害物質が除去されたためではないかと推定された。さらに、検出限界以下になるような希釈を行った場合にも、ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いることにより、検出限界の高感度化が可能であった。

さらに、複数のウイルスが存在した場合にもポリエチレンイミン磁気ビーズによる濃縮が可能であるかを検討した。図 5 に示すように、SV-40 ウイルス、Sindbis ウイルス及び HSV-1 を混合し、ポリエチレンイミン磁気ビーズによる濃縮を行ったところ、それぞれのウイルスが効率よく濃縮されていることが確認された。

2. スルホン酸磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

ポリエチレンイミンを用いてのウイルス濃縮において、結合しなかったウイルスは全て脂質膜を持たない非エンベロープウイルスである。従って、ポリエチレンイミンは主としてエンベロープウイルスを濃縮すると思われる。そこで、昨年度見出したスルホン酸磁気ビーズを用いた非エンベロープウイルスの濃縮作用についての詳細な検討を行った。ポリエチレンイミンの場合と同様に、各ウイルス