

を感染させた細胞 1 ml の培養上清に、100 μ l のスルホン酸磁気ビーズを添加し、さらに 30mM CuSO₄ を添加した後、磁気ビーズ結合分画とその上清に分けた。培養上清 100 μ l 及びスルホン酸結合分画からウイルスゲノム DNA あるいは RNA を抽出し、限界希釈法によりそれぞれのウイルスゲノムの検出を行った。図 6 に示すように、Sindbis virus の培養上清では、10⁻⁴ まで希釈するとウイルスバンドの検出ができなくなるが、スルホン酸磁気ビーズに結合した分画では、10⁻⁴ 希釈してもまだウイルスバンドは検出できた。また、Porcine Parvo virus でも同様に、10⁻⁶ まで希釈するとウイルスバンドの検出ができなくなるが、スルホン酸磁気ビーズに結合した分画では、10⁻⁶ 希釈してもまだウイルスバンドが検出できた。さらに、Polio virus の培養上清では 10⁻⁸ 希釈した場合にほとんどウイルスが検出できないが、スルホン酸磁気ビーズでは 10⁻⁴ 希釈してもウイルスゲノムの検出ができた。

一方、スルホン酸磁気ビーズ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 5 に示す。スルホン酸磁気ビーズ処理を行った Sindbis virus、Porcine Parvo virus、及び Polio 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ることが確認された。

ついで、スルホン酸磁気ビーズによるウイルス濃縮の定量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検討した。図 7 及び表 6 に、Poliovirus 及び PPV の培養上清を 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。Poliovirus は効率よく濃縮されることが示され、また、検出限界の高感度化も認められた。一方、PPV では 10 倍濃縮した場合には理論どおりの濃縮効果が認められたが 100 倍濃縮では目的とする濃縮効率は得られなかった。しかし、100 倍濃縮した場合には、検出限界の顕著な高感度化が認められた。

病原性ウイルスについても検討を行った。ヒトサイトメガロウイルスをポリエチレンイミン及びスルホン酸磁気ビーズを用いて 10 倍濃縮を行った結果を図 8 に示す。培養上清のサイトメガロウイルスは、10⁻⁴ 希釈までしか検出できないが、ポリエチレンイミン磁気ビーズあるいはスルホン酸磁気ビーズを用いた場合にはいずれも 10⁻⁵ 希釈しても検出が可能であった。

3. ポリエチレンイミン結合セファロース 6MB によるウイルス除去

ポリエチレンイミン磁気ビーズが、効率よくウイルスを濃縮可能なことより、ポリエチレンイミンを細胞分離用樹脂に結合させ、ウイルス除去を行うことを試みた。

図 8 に示すように、HSV、SV-40 virus、sindbis virus、PPV を HL-60 細胞懸濁液にスパイクしてポリエチレンイミンセファロース 6 MB カラムにアプライした。その結果、HSV、SV-40 virus、PPV を効率よく除去できることが明らかになった。対照として用いたグリシンセファロース 6 MB カラムではウイルスの除去は認められなかった。一方、細胞の回収率に関しては、ポリエチレンイミン 6 MB

にアプライした細胞の 50~60%が吸着されることが明らかとなった(図9)。すなわち、ポリエチレンイミンセファロース 6 MB は、細胞とウイルスの両方を吸着するが、非常にウイルスを吸着しやすい性質を持つことが明らかになった。

4. HL-60細胞とHL-60RG細胞への各種染色体解析の組合わせの適応

HL-60細胞は急性前骨髄性白血病患者より樹立された株であり、骨髄系細胞への分化能を有し、血球系分化や白血病細胞のモデル細胞として用いられてきている。HL-60細胞は、樹立後、継代数の少ない間は倍加時間が非常に長いが、継代数が多くなると倍加時間が短くなることが知られており、このように倍加時間が非常に短くなった細胞としてHL-60RG細胞が樹立された。細胞治療用医薬品の遺伝的安定性の評価技術開発の一環として、昨年度はGバンド解析、M-FISH及びCGH解析を組合わせることによりモデル細胞として取り上げたHL-60細胞とHL-60RG細胞の染色体変異の違いを的確に判定できることを明らかにした。その結果をまとめると、HL-60細胞では染色体数は45ないしは46であったが、HL-60RG細胞は13番染色体の欠失や18番染色体での過剰が消失するなど、その染色体数は43あるいは44で少なくなる傾向にあった。核型についてもHL-60細胞では非常に多様な変異が検出された。5番染色体長腕の部分欠失、9番染色体短腕の部分欠失、10番染色体短腕と13番染色体長腕の転座に由来する10番派生染色体、14番染色体長腕の部分欠失、16番染色体長腕部の付加、17番

染色体の欠失が認められる他、第6染色体や第18染色体の過剰、X染色体の欠失等が認められた。

特に図10で示すように、HL-60RG細胞で、HL-60細胞と異なる遺伝的差異としてとしては9番染色体q13に由来不明の染色体断片の挿入と、11番染色体長腕と13番染色体長腕の全腕転座に由来する派生染色体があげられる。言い換えれば、HL-60細胞とHL-60RG細胞の増殖性等の大きな差異は、9番染色体と11番染色体のこのような変化によってもたらされている可能性が考えられた。

このようなHL-60細胞とHL-60RG細胞との間で見出された染色体上の差異を明らかにする目的で、c-mycプローブを用いたFISH解析を行った。図11に示すように、c-mycプローブを用いたFISH解析より、HL-60細胞ではdminが多数見出されるが、HL-60RG細胞では殆どdminは見出されない。一方、両細胞の第8染色体末端にはc-mycが存在するがHL-60RG細胞ではこれに加えて第9染色体の動原体近くにc-mycの挿入が認められた。このことをさらに確認するために、Gバンド解析とc-mycプローブを組合わせた解析を行った。図12で示すように、HL-60RG細胞では、c-mycプローブが第9染色体上に見出された。

5. 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解析—培養上清の濃縮法の検討—

モデル細胞としてHL-60RG細胞を用いて細胞由来タンパク質プロファイルのイモビラン2次元電気泳動法による解析を行った。

図13にHL-60RG細胞の培養上清のタンパク質を二次元電気泳動で分離したスポットからトリプシン消化ペプチド混合物を質量分析した質量スペクトルの一例を示している。ここで得た各ペプチドの質量数から、マスショットデータベースを用いてタンパク質の推定を行い、本スポットをStatminと推定した。

同様の解析を行うことにより、図14に示したように、17種類のタンパク質についてPMS法による帰属の推定ができた。また、昨年度ウェスタンブロットにより帰属の推定を行ったタンパク質を丸印で示した。

6. ヒト末梢血幹細胞の培養と血管内皮細胞の分化誘導

近年、血液幹細胞の新規表面抗原としてAC133が有用であることが報告されるようになってきた。また、AC133血管内皮前駆細胞にも発現が認められるとする報告もある。昨年度は、ヒト末梢血よりAC133及びCD34陽性細胞を分離し、フィブロネクチン上に2週間培養し、血管内皮細胞への分化誘導を試みた。その結果AC133陽性細胞のほうが血管内皮細胞様の接着細胞が多く観察されたことを報告した(図15)。これらの接着細胞が血管内皮細胞としての特性を備えているかを同定するために、CD31、Tie2、KDR/flk-1、eNOS免疫染色により解析した。その結果、図16に示すように、多くの接着細胞が、CD31、Tie2、KDR及びeNOSを発現していることが確認された。従って、AC133陽性細胞からVEGF存在下に分化してくる接着細胞は内皮細胞と同定された。

7. AC133細胞の血管内皮細胞への分化

誘導の時間経過

次にヒト末梢血幹細胞としてAC133細胞を用いて血管内皮細胞へと分化誘導した際の、分化指標がどのように発現してくるのかを時間経過を追って解析した。図17に示すように、VEGF存在下に培養すると、1週間目に接着細胞が認められるようになり、2週間目では紡錘型に伸展した細胞と、比較的円形に伸展した細胞が認められるようになった。図17(a)に示すように、CD31は培養1週間後に最も強く発現しており、培養経過とともにむしろその発現は低下する傾向が認められた。一方、KDR/flk-1は培養2週間後に最も強い蛍光が観察された(図17(b))。一方、eNOSは1週から3週まで顕著な変化はみられなかったが、比較的強い発現が2週間目に見られた(図17(c))。マクロファージ・顆粒球系の表面抗原として知られているCD11bの発現は全培養期間を通じて殆ど観察されなかった(図17(d))。

一方、ヒト臍帯血AC133細胞を用いて同様の検討を行った。図18(a)に示すように、CD31の発現は5日から9日に強く発現し、その後は発現が低下していった。KDR/flk-1の発現は図18(b)に示すように、15日目に最も強く発現していた。

8. CD31強陽性細胞の分画と培養

上記の結果より、ヒト末梢血及び臍帯血AC133細胞をVEGF存在下に培養すると、CD31が他のマーカーに先立って発現してくることから、CD31が血管内皮細胞への分化能の指標となるのではないかと想定し、CD31発現と分化能の関連について検討した。ヒト末梢血AC133

陽性細胞をフィブロネクチンあるいはタイプIVコラーゲンプレートを用いて VEGF 存在下、6 日間培養すると、両細胞とも殆どが浮遊細胞のままであり、一部の細胞が接着していた。特に、タイプIVコラーゲンプレートを用いて培養した細胞の方が、フィブロネクチンプレートを用いて培養した細胞より伸展が弱い傾向が認められた(図19-(a))。しかし、接着細胞の CD31 の発現を調べたところ、フィブロネクチンプレートを用いた細胞とタイプIVコラーゲンプレートを用いた細胞で大きな差異は認められなかった(図19-b)。また、6 日目の細胞を回収し、CD31 の発現をフローサイトメーターを用いて解析すると、どちらのプレートを用いて培養した細胞も CD31 の発現強度は同程度であった(図20-a)。経時的な CD31 の発現を調べたところ、培養経過とともに CD31 の発現が増加し、特に強陽性の細胞の比率が増加してくることが明らかになった(図20-b 上)。そこで、容易に細胞が回収できることから、タイプIVコラーゲンコート上で6日間培養した AC133 陽性細胞を選び、CD31 の発現を指標として強陽性、陽性、陰性細胞を分離することにした。図20-b 下に示すように、ヒト末梢血 AC133 陽性細胞をタイプIVコラーゲン上で培養すると、CD31 の発現量の異なる細胞が出現する。これらの細胞をセルソーターで分画し、洗浄後、フィブロネクチンプレートを用いて VEGF 存在下1週間培養した。その結果、図21に示すように、CD31 強陽性細胞からは多くの接着細胞が出現し殆ど浮遊細胞は見られなかったが(図21-a)、逆に

CD31 陽性細胞や陰性細胞では接着細胞が殆ど認められなかった(図21-b)。さらに、CD31 強陽性細胞から出現してくる接着細胞は KDR/flk-1 や eNOS を強く発現していた。

一方、ヒト臍帯血 AC133 陽性細胞を培養した場合も同様の結果が得られ、培養初期に出現してくる CD31 強陽性細胞を分画し VEGF 存在下に培養を続けると KDR/FLK-1 や eNOS を発現する接着細胞の出現が認められた(図22)。以上の結果から AC133 陽性細胞を VEGF 存在下に培養した時に出現してくる CD31 強陽性細胞は血管内皮細胞前駆細胞の性質を持つと考えられた。

D. 考察

現在、ウイルス検出法として最も高感度な方法は PCR 法などの NAT 法である。しかし、ウインドウ期の存在やサンプリング上の問題もあり NAT 法を用いても必ずしもすべてのウイルスを検出するとは限らず、さらなる高感度化が求められている。ウイルスやウイルスゲノムの濃縮には、従来、超遠心法やポリエチレングリコール法あるいはアルコール沈殿法などが用いられているが、超遠心法は HCV や HGV 等のウイルスのようにウイルス粒子の比重が軽い場合などは適用が困難である。また、現在用いられている方法は操作が非常に煩雑であり、NAT 法のような高感度検出系においては目的試料以外からの汚染の可能性も多くなるという大きな欠点がある。さらに、HTLV-I、II のように対象とする細胞のごく一部にしかウイルスが感染していないようなケ

ースにおいてもより適切な濃縮法の開発が望まれている。従って、出来る限り操作が簡便でかつ確実なウイルスあるいはウイルスゲノムの濃縮法は NAT 法の高感度化には必須のテーマである。そこで、本研究では、NAT 法によるウイルス検出の高感度化を目指してウイルス濃縮法の開発を行った。昨年度は、ポリエチレンイミン磁気ビーズやスルホン酸磁気ビーズを用いて、エンベロープウイルスや非エンベロープウイルスを濃縮することができることを明らかにした。本年度は、両磁気ビーズを用いたウイルス濃縮について詳細な検討を行った。定量的 PCR 解析より、ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いると、100 倍から 1000 倍の濃縮が可能であることが示された。特に強調すべき点として、通常の操作では検出限界以下のウイルスしか存在しない場合にも、濃縮を行うことにより検出限界のさらなる高感度化が行えることが示されたことである。一方、ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いて濃縮できない非エンベロープウイルスは 2 価イオン存在下にスルホン酸磁気ビーズを用いることにより濃縮が可能であるが、この場合もポリエチレンイミン磁気ビーズを用いたときほどの濃縮率は得られなかったが、10-100 倍ほどの検出感度の高感度化が可能であった。この検出限界の高感度は、ウイルス検出において最も重要な要素であり、培養上清にわずかにしか含まれないようなウイルスでも、濃縮により確実にウイルスが検出できれば、ウイルス安全性は飛躍的に向上することが期待される。

一方、ポリエチレンイミン磁気ビーズ

によるウイルス濃縮では通常の培養に用いる濃度の血清が存在しても影響を受けなかった。データには示さなかったが、スルホン酸磁気ビーズでも同様の結果が得られている。さらに、複数のウイルスが存在していてもポリエチレンイミン磁気ビーズを用いて同時に複数のウイルスの濃縮が可能であった。ポリエチレンイミン磁気ビーズやスルホン酸磁気ビーズの濃縮機構として図 2-1 のようなモデルが想定される。すなわち、ポリエチレンイミン磁気ビーズでは、ウイルスをコートするリン脂質やウイルスエンベロープタンパク質のシアル酸などに結合し、スルホン酸磁気ビーズも 2 価イオンを介してリン脂質やシアル酸などに結合すると思われる。また、非エンベロープウイルスでは、2 価イオンを介してコートタンパク質に結合するのではないかと想定される。

一方、ポリエチレンイミン磁気ビーズによるウイルス濃縮を応用して、ポリエチレンイミン結合セファロースを用いて細胞懸濁液からウイルスを除去することを試みた。その結果、効率よく細胞懸濁液からウイルスの除去が可能であった。このポリエチレンイミン結合セファロースは、細胞治療において潜在的に存在するウイルスを除去できる技術となる可能性があり、今後その有用性についてさらに検討を重ねていく予定である。

細胞の同一性や純度の試験に際して、あるいは培養等の製造過程において、目的とする細胞の遺伝的性質の変化や望ましくない細胞特性の変化が生じていないかを的確に検出することは、細胞治療の

安全性確保上極めて重要である。細胞の安全性確保のための遺伝的安定性の確認や同一性の確認には、核型分析、さらには多型配列解析が有用とされている。しかし、G-バンド解析、CGH 解析あるいは m-FISH それぞれ単独では特有の欠点が指摘されている。昨年度は、これらの染色体解析法を相互補完的に駆使することにより細胞の遺伝的性質の解析にどの程度有用であるのか、モデル細胞を用いて検討し、これらの手法を組み合わせることにより、より確実に転座等を検出できることを示した。

本年度は、骨髄系細胞の HL-60 細胞とその亜株で高増殖性の HL-60RG 細胞に G-バンド解析、CGH 解析 m-FISH を組み合わせることにより見出した遺伝的差異について c-myc プローブを用いた FISH 解析を行った。HL-60 細胞は白血病由来細胞であり染色体変異も多いことが明らかになったが HL-60RG 細胞との差異は比較的わずかであった。注目すべき差異としては、第 9 染色体への第 8 染色体の一部の挿入、第 11 染色体への第 13 染色体の転座が見出された。前者については、c-myc プローブによる FISH 解析と G-バンド解析を組み合わせることにより、第 9 染色体への第 8 染色体の挿入が、c-myc を含む領域の転座であることが示された。また、FISH 解析で検出される c-myc プローブのシグナル強度が非常に強いことより、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も示された。以上の結果より、G-バンド解析、CGH 解析、M-FISH 解析に加えオンコ遺伝子プローブを組合わせた遺伝的解析手法が、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。

細胞・組織加工医薬品等の特性指標として細胞が産生する種々のサイトカインや増殖因子等のタンパク質プロファイルの解析が考えられる。本研究では、モデル細胞として HL-60RG 細胞を用いて、培養上清中に産生されるタンパク質を高分解能 2 次元電気泳動法で分離し、分離の良好なスポットを選び、各スポットをトリプシン消化して得られたペプチド断片混合物を MALDI-TOF-MS を用いたペプチドマスフィンガープリンティング法によりタンパク質の帰属の決定を行った。その結果 17 種類のタンパク質の帰属を決定することができた。今後さらに、2 次元電気泳動上の他のタンパク質について、その質量分析計による解析を行うことによりできる限り多くの帰属を決定し、ファイリングを行っていく。このような解析を行うことにより、細胞由来タンパク質の帰属をデータライブラリーを用いて決定できる系を確立する予定である。

細胞治療薬・医療用具に用いられる細胞・組織は、幹細胞や前駆細胞を素材として、誘導剤による処理、遺伝子工学的改変、あるいは他の細胞との相互作用などにより目的とする細胞へ分化等をさせ、治療目的に適した細胞・組織へと加工される場合が想定される。このような加工において、目的とした機能が付与されているか、さらには加工の過程において望ましくない細胞特性の変化や機能変化が起きていないかを明らかにすることが、細胞治療を安全に行うために必要となってくる。

本研究では、ヒト末梢血血液幹細胞及び

ヒト臍帯血幹細胞を分離し、その血管内皮細胞への分化誘導系を確立するとともに、その分化過程を詳細に解析することにより、血液幹細胞としての有用性をあらかじめ判定できるような細胞指標の提示を試みようとしている。昨年度開発した、ヒトAC133陽性細胞より血管内皮細胞への誘導系は臍帯血でも適応可能であることが明らかになり、ソースの異なる2つのAC133細胞を用いても分化誘導初期にCD31陽性細胞が出現し、その発現は他の分化指標よりも優先して出現することが明らかになった。さらに、このCD31の発現を指標として、CD31強陽性細胞及び、陽性細胞、陰性細胞をセルソーターを用いて分離し、その血管内皮細胞への分化能を調べたところ、CD31強陽性細胞から多くの接着細胞が出現し、かつ出現する接着細胞は血管内皮細胞の指標であるKDRやeNOSを強く発現する細胞であることが明らかになり、CD31が血管内皮細胞への分化能の指標となることが示された。今後は、このCD31強陽性細胞の管腔形成能やin vivo血管形成能について検討を行う予定である。

一方、主として血管内皮細胞への分化誘導では、フィブロネクチンやタイプIVコラーゲンをコートしたプレートを用いて培養したが、KDR等の多くの分化指標の出現を引き起こすにはフィブロネクチンが最も優れていた。このことは、in vitroでの血管内皮への最終分化にはフィブロネクチンとの結合刺激が重要であることを示している。一方、タイプIVコラーゲンを用いた場合には、CD31などの初期の分化誘導は可能であるが、それ以降の分化誘導は

できなかつた。しかし実際に、血管内皮誘導能を指標として治療を行うことを想定すると、今回示したようにむしろin vitroでは最終分化を抑制でき、細胞の回収が容易なタイプIVコラーゲン上で培養し、CD31強陽性細胞を分取することが合理的であると思われる。

E. 結論

(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、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ていたが、本年度はさらに 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と、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。

F. 研究発表

1) Matsui, S., Adachi, R., Kusui, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Hayakawa, T., and Suzuki, K.: U73122 inhibits the dephosphorylation and translocation of cofilin in activated

macrophage-like U937 cells. *Cell. Signalling* in press (2001)

2) 豊田淑江、山口照英、内田恵理子、押澤正、早川堯夫、好中球機能分化と増殖の制御、炎症、印刷中 (2001)

3) 早川堯夫、真弓忠範、黒澤 努、豊島聰、山口照英、川西 徹 トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保に関する基礎的検討 医薬品研究 (印刷中)

4) K.Kishi, T.Mikawa, M.Seto, Y.Sasaki, T. Kanayasu-Toyoda, T. Yamaguchi et al: Stable transfectant of smooth muscle cell line lacking the expression of myosin light chain kinase and their characterization with respect to the actomyosin system, *J. Biol. Chem.* 275, 1414-1420 (2000)

5) Shun SHIMOHAMA, Hiroko TANINO, Naoko KAWAKAMI, Naoki OKAMURA, Hiroomi KODAMA, Teruhide YAMAGUCHI, Takao HAYAKAWA, Akihiko NONOMURA, Shigeru CHIBA, George PERRY, Mark A. SMITH and Sadaki FUJIMOTO: Activation of NADPH Oxidase in Alzheimer's Disease Brains, *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*, 273, 5-9 (2000)

6) Naoko KAWAKAMI, Kenji KITA, Takao HAYAKAWA, Teruhide YAMAGUCHI and Sadaki FUJIMOTO: Phorbol Myristate Acetate Induces NADPH Oxidase Activity of Cytochalasin B-Primed Neutrophils through the Protein Kinase C-Independent Pathway, *Biol. Pharm. Bull.*, 23(9), 1100-1104 (2000)

1. 学会発表

1. 豊田淑江、山口照英、押澤正、内田恵理子、早川堯夫：HL-60 細胞の好中球分化への機能成熟や増殖における p70 S6 キナーゼ (p70S6K) カスケードの役割についての解析、第 30 回日本免疫学会総会 (2000 年 11 月 14 日、仙台)

2. 豊田淑江、山口照英、押澤正、内田恵理子、早川堯夫：HL-60 細胞の好中球分化への機能成熟や増殖における p70 S6 キナーゼ (p70S6K) カスケードの役割についての解析、第 73 回日本生化学大会 (2000 年 10 月 14 日、横浜)

3. 豊田淑江、山口照英、内田恵理子、早川堯夫：HL-60細胞の好中球分化に存在するトランスフェリン受容体 (T r f - R) 陽性細胞及び陰性細胞の分化・増殖における p 7 0 S 6 キナーゼの役割とその上流の解析、第 21 日本炎症学会 (2000年 5月 11日、東京)

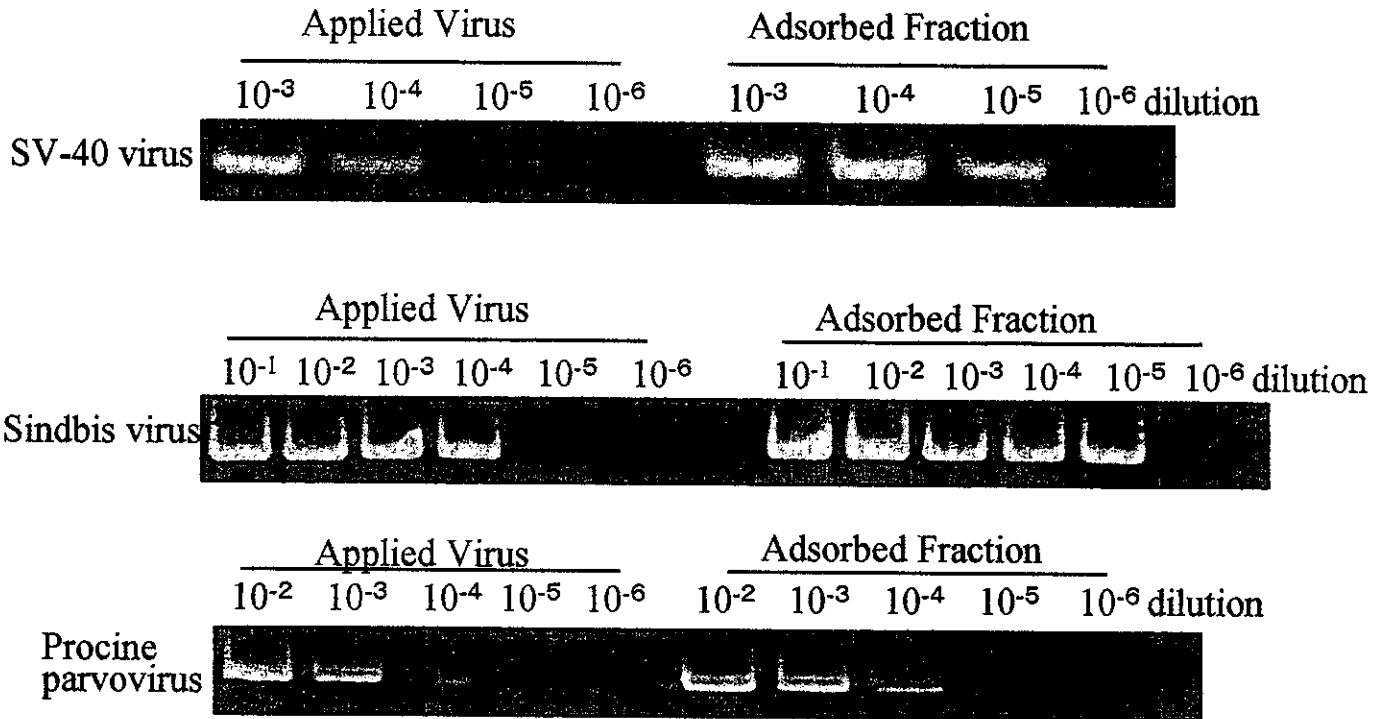


図1. ポリエチレンイミン(PEI)磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮
 ウイルス上清の段階希釈液1mlをPEI磁気ビーズを用いて100 μ lに濃縮し、ウイルスゲノムを抽出した。抽出したウイルスゲノムをPCRあるいはRT-PCRにより増幅した。

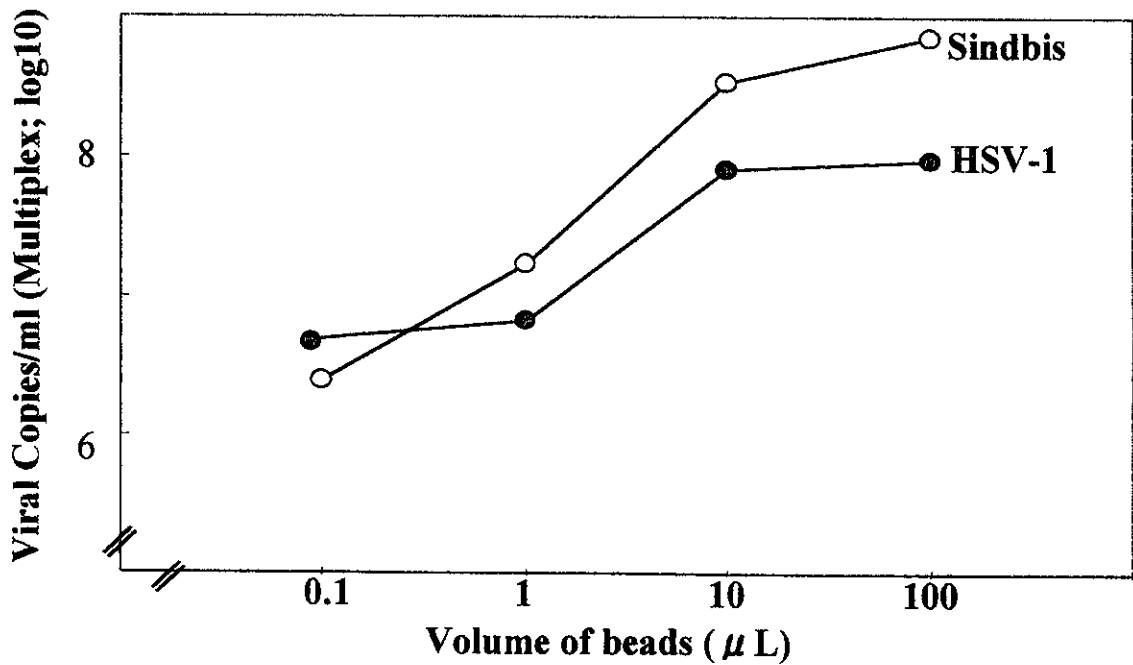


図2. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮の用量依存性

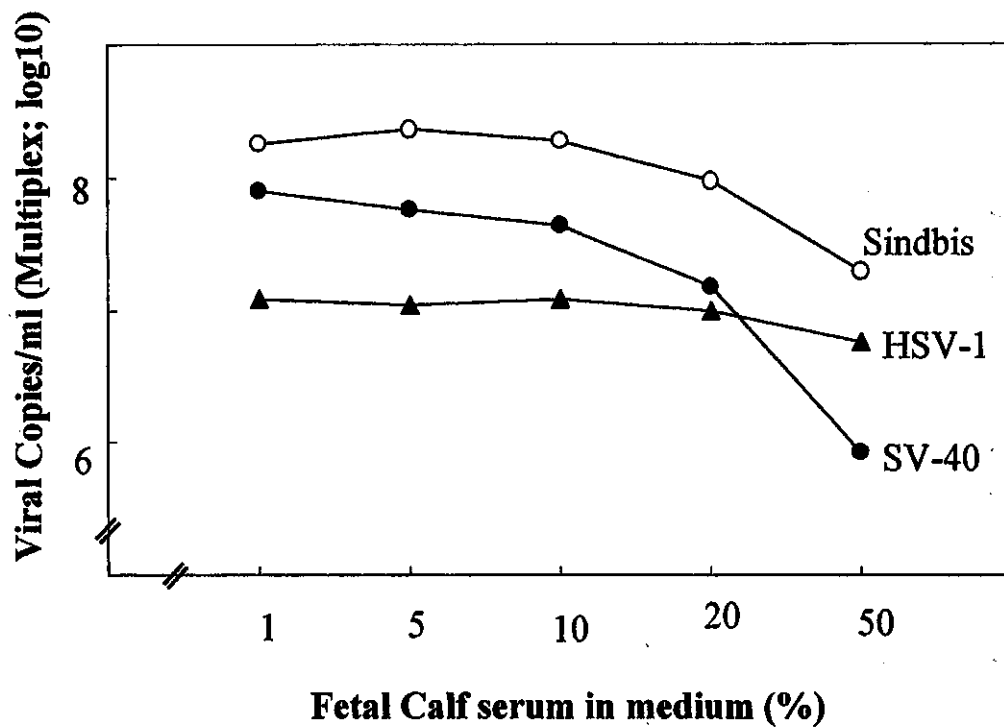


図3. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮に対する血清の影響

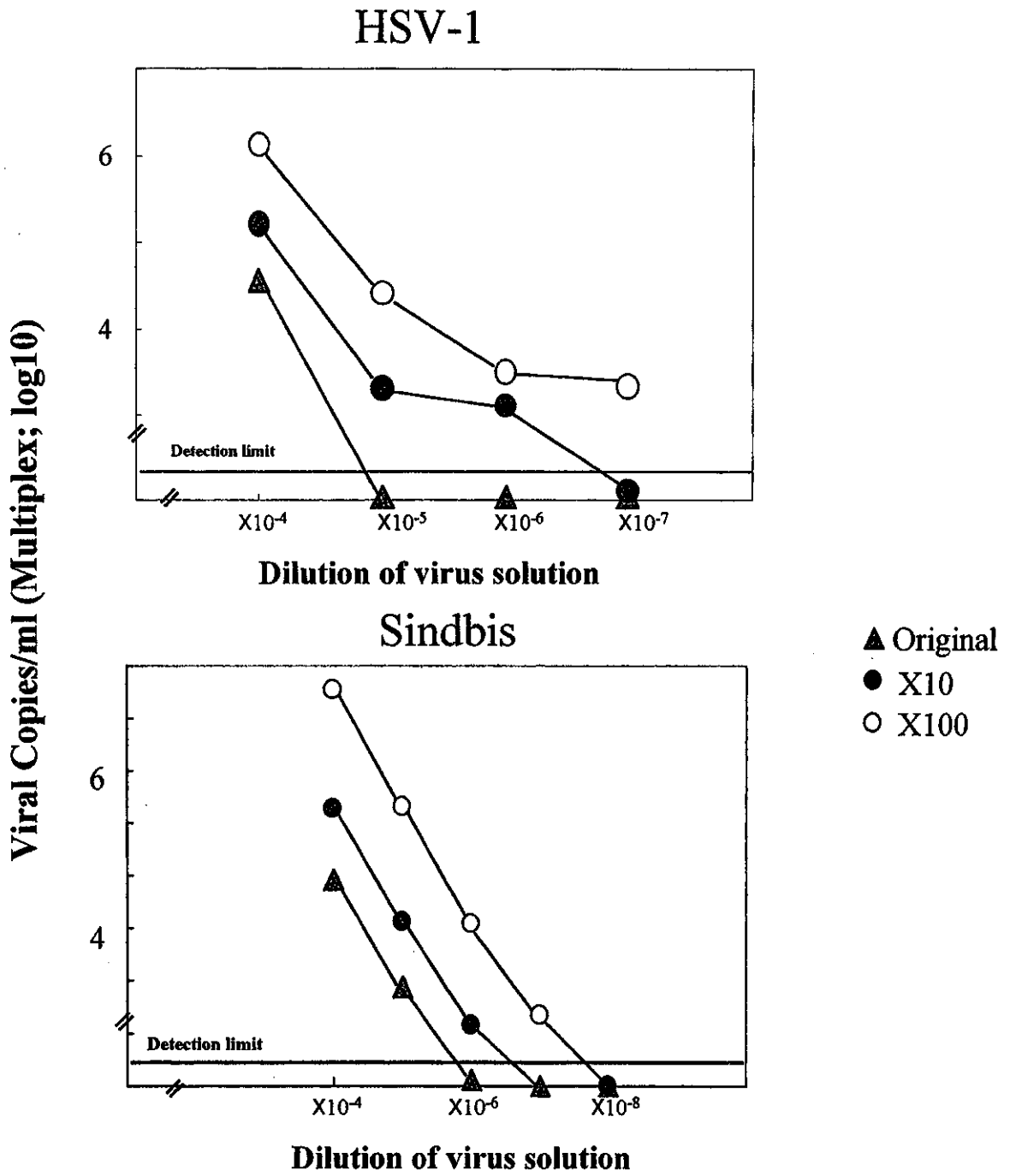


図4. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

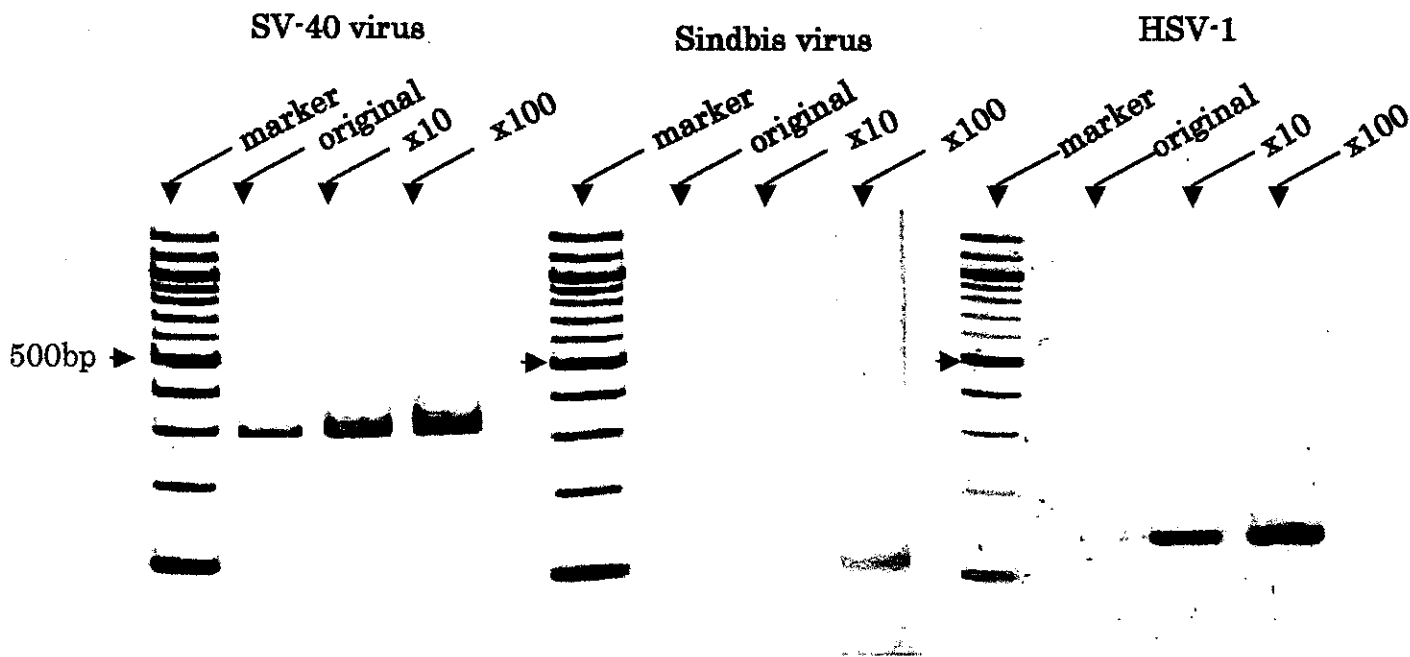


図5. 3種類のウイルスを混合した時のPEI磁気ビーズによるウイルス濃縮

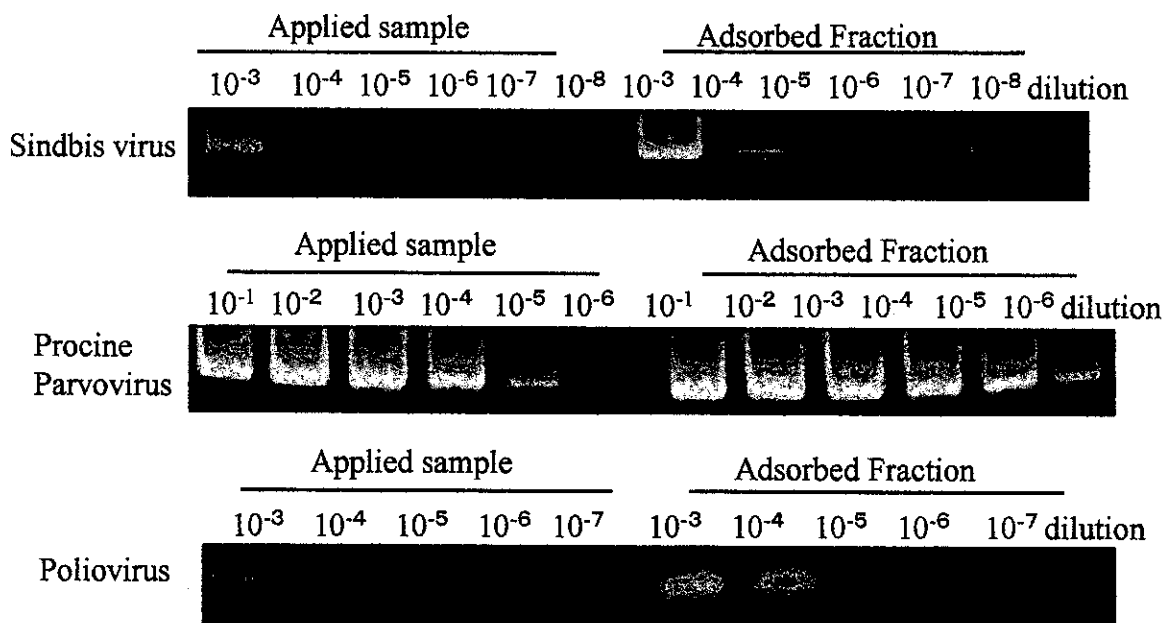


図6. スルホン酸磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

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。

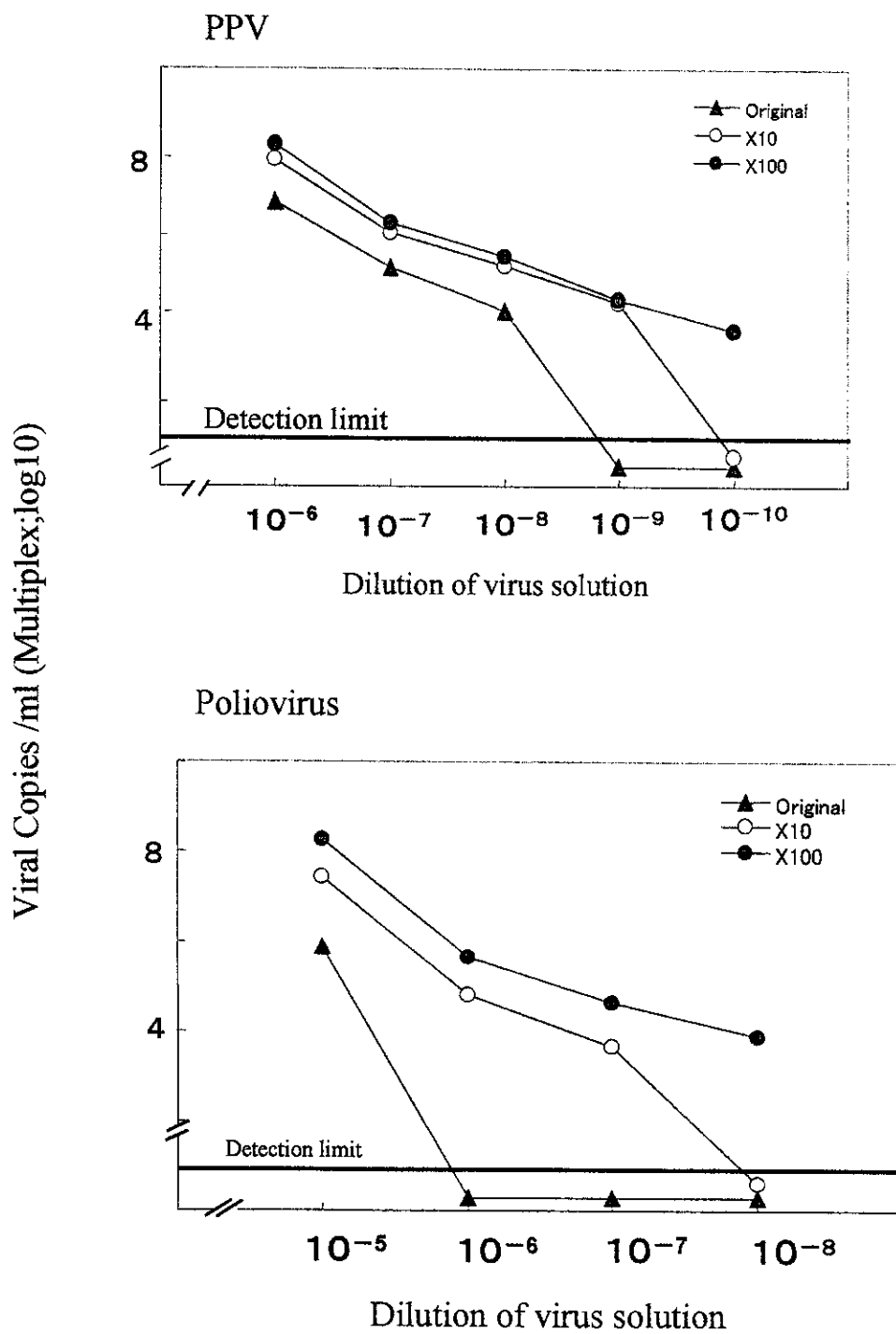


図7. スルホン酸磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

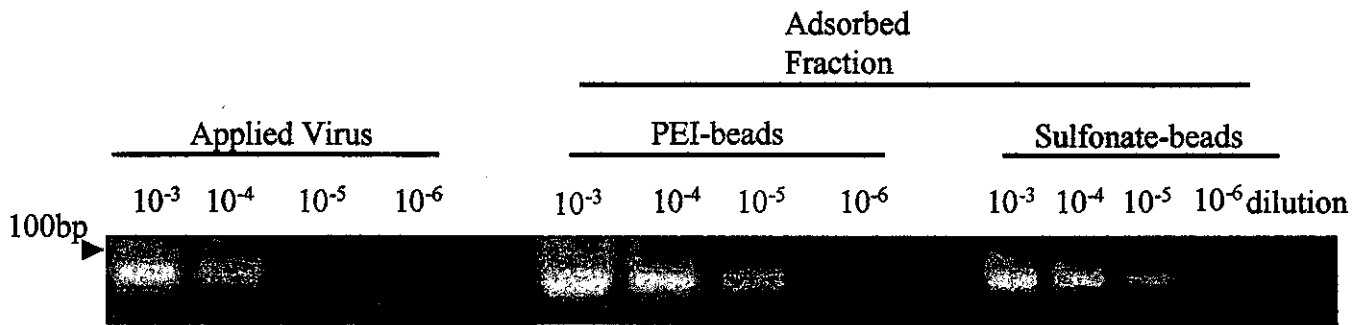


図8. PEI磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたサイトメガロウイルスの濃縮

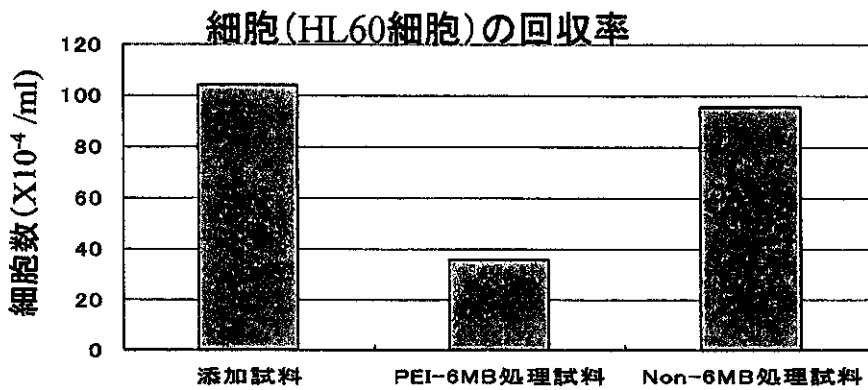
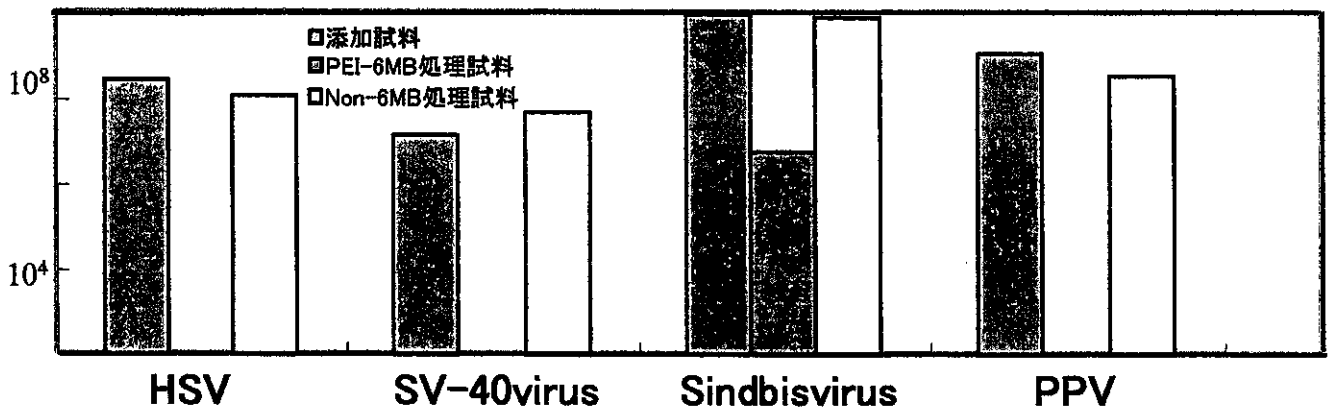


図9. ポリエチレンイミンセファロース6MBを用いたウイルスの除去

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'-TATGTTCTGGTCTTTCCTCGCATC-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

Dilution	0.1ml	1ml	10ml
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

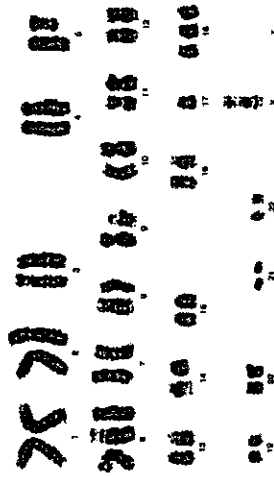
Dilution	0.1ml	1ml	10ml
X10 ⁴	7.8X10 ⁵	2.7X10 ⁷	1.9X10 ⁸
X10 ⁶	<100	6.7X10 ⁴	4.5X10 ⁵
X10 ⁷	<100	4.6X10 ³	4.3X10 ⁴
X10 ⁸	<100	<100	7.8X10 ³
X10 ⁹	<100	<100	<100

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)

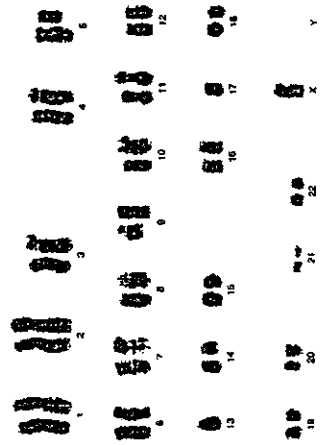
HL-60細胞とHL-60RG細胞の各種染色体分析による細胞特性解析

G-バンド解析

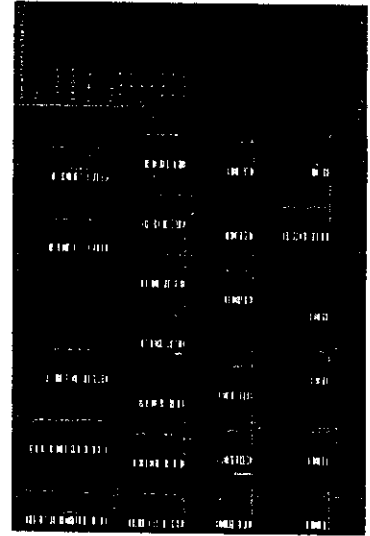
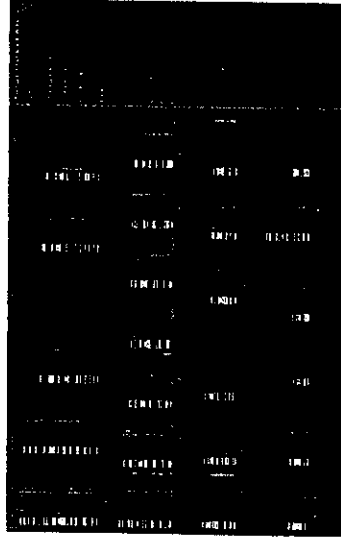
HL-60



HL-60RG



CGH解析



M-FISH解析

