

れた。

Multiplex PCRによるBKV DNAとJCV DNAの検出では、サザンブロットハイブリダイゼーションで検出されなかった20~25歳の尿からもBKVが10%、JCVが10%の割合で検出された。(解析例を図6に示す。)

#### 7.4 尿からヒトポリオマウイルスの分離

Multiplex PCRでウイルスDNA検出された細胞沈査とウイルス沈査をCOS-7細胞に接種し、ウイルス分離を試みた。Multiplex PCRでウイルスDNAが検出されたサンプル全てから14および21日後の感染細胞DNA抽出サンプルでウイルスDNAが、PCRで検出され、またウイルスV抗原が感染細胞に検出された。またサンプル接種21~35日後に赤血球凝集反応を用いて32~256HA力価を示すBKVまたはJCVが検出された。HA力価が認められたCOS-7細胞にはBKV又はJCV特異的V抗原が検出された。

### 8. IFN製剤のウイルス安全性

#### 8.1 ウイルスクリアランス

スパイクテスト等のウイルススクリアランスについては動物由来製剤の一般的課題と同じであるがHSV-1(Herpes Simplex Virus-1), SV-40(Simian Virus Type40), MuLv(Murine Leukemia Virus), Polio, Sev等でウイルス除去率の成績を出している。

#### 8.2 細胞バンクでの試験

種細胞については製造承認申請時にウイルス陰性確認試験成績を提出している。マスターセル、ワーキングセル等はEBV(Epstein-Barr Virus), 電子顕微鏡での粒子観察、マウス、モルモットでの脳内、

腹腔内接種、Vero細胞/MRC5細胞への接種試験、逆転者酵素測定、感受性細胞への接種試験によるレトロウイルス否定試験、LCM(Lymphocytic Chorimeningitis), PVM(Pneumonia Virus of Mice), RT3(Reovirus Type 3), SeV, SV5(Simian Virus Type 5)等は抗体産生陰性で確認している。英国での事例として、リスザルのレトロウイルスが製造用のナマルバ細胞に混入していたとの論文が報告された。これは、製造承認申請のためにウイルス否定試験を行った種細胞と製造開始後の種細胞が保存管理を間違いからか同一の系統でなかった事によるものと考えられている。

#### 8.3 ハムスター個体レベルでのウイルス安全性

ハムスター個体については、閉鎖系での繁殖管理を行い、餌などを60℃で1晩熱処理している。定期的の実験動物中央研究所に依頼して感染症の陰性確認を行っている。ハムスターのモニタリングとしてはLCM, SeV, MHV(Mouse Hepatitis virus)等の検査を実施している。

#### 8.4 SeVや製造試薬の迷入ウイルス

SeV中のタマゴ由来ウイルスについてはニワトリ白血病ウイルス陰性タマゴを用いてないので、当然AvLv(Avian Leukemia virus)も試験対象になる。

マウスIgGまたはウシIgG抗体カラムを用いる場合はマウス由来ウイルス、ウシ由来ウイルス、特にこの数年はプリオン対策が求められる。

天然型IFN $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 産生用のための細胞培養には牛胎児血清または新生児牛血清を使用している。現在牛血清についてはBSE感染(プリオン)の問題があり、非流

行国から血清を入手して用いている。また牛血清には Bovine Pestivirus(BPV)等の混入が懸念されたがウイルス検査陰性証明書付きの血清を用いている。しかし IFN 製剤に BPV の DNA 断片の存在を PCR 法で検出した報告もある。ワクチン製造ではウシ血清存在下で培養していたのでプリオン対策が急務である。

#### 8. 5 製造原液での試験

以上の製造工程を踏まえて IFN  $\alpha$  製剤原液ではマウス *in vivo* 試験で LCM、タマゴ接種試験で SeV, IEV (Infectious Ectromelia Virus), RT3 の試験をし、PCR で AvLv (Avian Leukemia Virus)、感受性 DBT 細胞で MHV (Mouse Hepatitis virus) 試験を実施している。また Vero 細胞接種による広範な迷入ウイルス否定試験も実施されている。

#### 9. 牛痘ウイルス (RPV) の検出法の開発

牛痘ウイルスのウサギ馴化株である RPV-L 株をウサギに接種し、臨床症状の極期である接種3日後に各種臓器と PBMC を採取して、各臓器の抽出物および PBMC を B95a 細胞と共培養してウイルスの分離を試みた。その結果、リンパ系臓器 (脾臓、腸間膜リンパ節、膝下リンパ節、パイエル板) および PBMC からはウイルスが分離されたが、脳、肺、腎臓などからは分離されなかった。また感染ウサギの腸間膜リンパ節から RNA を抽出し、RT-PCR による検出を試みところ、ウイルスの N 遺伝子内の配列を用いた RT-PCR 法により、感染ウサギの腸間膜リンパ節において効率良く増幅産物を検出できることが明らかとなった。同時に、本 RT-PCR 法が培養細胞中のウイルスの混入の

検出にも極めて有効であることが示された。

#### 10. トリレトロウイルスのリアルタイム PCR による定量的検出

市販の逆転写酵素を  $10^{-2}$  から  $10^{-8}$  まで希釈して鋳型、プライマー及び基質と反応させた。反応後、プローブを加え定量的 PCR を行ったところ、 $10^{-2}$  から  $10^{-7}$  希釈まで酵素の希釈量と定量的 PCR の数値が一致し、この方法が逆転写酵素量の測定に利用できる目処がたった (図7)。次に、明瞭なフォーカス形成をおこさないラウス随伴ウイルス1型を  $10^{-1}$  から  $10^{-4}$  に希釈し、ニワトリ胚細胞に感染させ1週間後の培養上清について PERT 試験を、残った細胞については、従来法による緩衝試験を行った。従来法では  $10^{-2}$  希釈まで緩衝が認められたが、 $10^{-3}$  希釈ではレトロウイルスを検出できなかった。一方、PERT 方法では、その値は  $10^{-1}$  から  $10^{-4}$  希釈に従って低下したが、 $10^{-4}$  希釈でもまだ検出範囲内であった (図8)。次に、緩衝法では検出できない細網内皮症ウイルスを同じように  $10^{-1}$  から  $10^{-4}$  に希釈し、ニワトリ胚細胞に感染させ1週間後の培養上清について PERT 試験を実施した。細網内皮ウイルスの逆転写酵素活性はラウス随伴ウイルス同様に検出され、その値は  $10^{-1}$  から  $10^{-4}$  希釈に従って低下したものの、 $10^{-4}$  希釈でもまだ検出範囲内であった。

#### 11. $\alpha$ -Gal 抗原量の減少とブタレトロウイルスの感染力との関係

まず、ブタ血管内皮細胞 (SEC) と糖転移酵素 GnT-III を導入した SEC に、MuLV の LTR の制御下に、MuLV のパッケージングシグナルを伴った LacZ 遺伝子を導入した。さらに、これらの LacZ 遺伝子を導入

した細胞に PERV-B または FeLV-B を感染させ、SEC(LacZ)/PB 細胞および SEC(LacZ)/FB 細胞を樹立した。これらの細胞から産生された PERV-B および FeLV-B の HEK293 細胞（ヒト胎児腎由来の株化細胞）に対する感染性を、シュードタイプアッセイ法にて測定した。SEC は通常の状態では HEK293 細胞に感染性のウイルスを産生していなかったが、SEC(LacZ)/PB 細胞からは、PERV-B の接種後 25 日目に、およそ  $10^3$  の感染価のウイルス産生が見られた。また、SEC(LacZ)/FB 細胞からは、FeLV-B の接種後 12 日目に、およそ  $10^5$  の感染価のウイルス産生が見られた。

次に、GnT-III 遺伝子を細胞に導入することが、ガンマレトロウイルスのヒト血清に対する感受性にどのように影響を及ぼすのかを調べた（図 9）。GnT-III 遺伝子導入 SEC 細胞に PERV-B および FeLV-B を感染させた細胞（GnT-III(LacZ)/PB 細胞および GnT-III(Lac)/FB 細胞）を樹立した。ウイルス感染から 20 から 30 日後の培養上清を、HEK293 細胞に接種してシュードタイプアッセイ法によってウイルス力価を測定した。

同時に、GnT-III 遺伝子導入による SEC 細胞表面上の  $\alpha$ -Gal 抗原量の変化を、GS1B4 レクチンを用いて FACS により調べた（図 10）。また、細胞表面上の異種抗原性をヒト血清を用いたフローサイトメータ法にて測定した（図 10）。血清を添加したことにより中和されるウイルスの割合を比較すると、糖転移酵素を導入した SEC から放出されたウイルスは、無処置の SEC から放出されたウイルスと比較して、ヒト血清に対する感受性が低下していることが確

認された（図 9）。GnT-III(LacZ)/PB 細胞と GnT-III(LacZ)/FB 細胞では GnT-III を導入したことにより、細胞表面上の  $\alpha$ -Gal 抗原量が GnT-III を導入していない SEC より減少していることが確認された（図 10）。また、細胞表面上の異種抗原性も GnT-III 導入細胞では有意に低下していた（図 11）。

## 12. 国内に生息する野生マウスに感染している LCMV のゲノム解析

国内の港湾で捕獲された野生マウスより OQ 株（28, 32, 38, 48, 49, 52）をそれぞれ分離し、それら OQ 株の S 遺伝子について他の二つのプロトタイプ株である WE 株、Armstrong 株と比較検討した。その結果、核酸およびアミノ酸レベルで相当多くの差異を認めた。すなわちアミノ酸レベルにおいて、Gp では WE 株、Armstrong 株ともに 22 個、Np では WE 株は 14 個、Armstrong 株では 20 個の差異がみられた。また、Tamura Nei の方法により計算し Neighbor joining 法で作図した LCMV の分子系統樹（図 12）によれば（枝の数字は遺伝的距離を表し、分岐部の数字はブートストラップ（1000 回）で計算された確率）、国内分離の OQ 株は、WE、Armstrong のいずれの株からも遺伝的にかなり離れていることが明らかになった。

## 13. 生物由来製品に迷入する可能性のある人獣共通感染ウイルス

動物に感染するウイルスの種類は極めて多く、動物由来材料の汚染に関して可能性のある全てのウイルスについて調べることは不可能である。問題はこれら動物由来材料が仮にウイルスに汚染していたとした場合、製造過程におけるウイルス不活化ある

いはウイルス除去・不活化の工程の評価をどの様に行うかということになる。

### 1 3. 1 動物由来材料のウイルス汚染のルート

動物がウイルスに持続感染も含め感染している場合と、製造工程でウイルスに汚染する場合が考えられる。前者に関してはそのリスクを評価するうえで、動物の地理的由来、動物種、年齢、使用臓器、飼養環境等を考慮する必要がある。例えば、胎児組織は胎盤で守られているため一般に新生仔、若年動物あるいは成熟動物と比較して、感染の危険は低い。一方、新生仔は腸管の吸収性が亢進してことと免疫系が未発達なため感染症に罹患する確率が高い。使用する臓器では中枢神経系は一般にリスクが高い。後者においては材料の採取時あるいは製造工程で使用する添加物等からのコンタミネーションの可能性があげられる。

### 1 3. 2 ウイルス不活化の方法

ウイルスの感染価の低下は様々な物理化学処理により可能であるが、ウイルスの種類によりこれらの処理に対する抵抗性は異なる。

#### ①熱処理

熱処理はウイルスの不活化に有効な方法であるが、製品の有効成分が蛋白である場合にはウイルス同様熱処理に感受性である場合もある。したがって、ウイルスを不活化できるが、有効成分に対する影響を極力低減できる条件を設定する必要がある。Parvovirusは熱処理に抵抗性であることが知られており、未精製の場合80℃、2時間の加熱にも耐える。精製ウイルスでも56℃、1時間の処理には耐えうるといわれている。従って、ウイルス不活化工程のバリデーシ

ョンのためにスパイクするモデルウイルスとしては Parvovirus が推奨される。Parvovirus の場合でも103℃、90秒あるいは65℃、10時間の処理で5.5log10以上の不活化が可能である。電子レンジの原理に基いたマイクロ波による短時間処理を行い、液状製品の連続処理を可能にする機器が実用化されているが、この手法では有効蛋白成分の失活を最小にしつつウイルス不活化ができるといわれている。

#### ②酸・アルカリ処理

ウイルスは酸あるいはアルカリ処理によっても不活化されるが、Parvovirusは他のウイルスに比べて抵抗性でpH 2-11で安定であるので、注意が必要である。

#### ③各種不活化剤処理

この処理は化学物質による不活化であるが、やはり Parvovirus が多くの不活化剤に抵抗性を示す。例えば70%エタノール20分の処理では感染価は1log10低下したのみであるが、エンベロープを有するPseudorabies virus (Herpes virus)およびTGEV (Coronavirus)は5分の処理で6.5あるいは4.5の力価低下を示した。また、Parvovirusはフェノール系、ヨード系の消毒剤にも抵抗性を示す。更に4級アミンにも抵抗性である。

### 1 3. 3 ウイルス除去

ウイルスの除去は限外濾過あるいはメンブランフィルター、イオン交換クロマトグラフィーなどで可能であるが、使用する緩衝液やレジンの影響を受けるので、バリデーションが必要である。しかしこれらの精製法を組み合わせた場合にはプリオンの除去もできる場合のあることが示されており、有効なウイルス除去法といえる。

表4に代表的なウイルスの除去あるいは不活化に必要な条件を示した。

### 13.4 リスクの評価

動物材料を用いた生物由来製品のウイルス安全性を考える上では精度の高いリスク評価が重要である。リスク評価は以下の点について考慮する必要がある。

- ・使用材料中のウイルスの存在：実際にウイルスの混入があるのかそれとも理論上のものか
- ・ウイルスの病原性
- ・製造過程でのウイルスの迷入の可能性とその病原性

### 13.5 リスクの軽減

ウイルスの混入のリスクを低減する対策を講じることが製品の安全性確保上極めて重要である。そのためには

- ・製造に適した健康な動物を用いる。
- ・複数のウイルス除去あるいは不活化工程を設ける。
- ・製造工程におけるウイルス試験等を行うことにより、ウイルス混入の確率を低減できる。

### 13.6 バリデーション

ウイルス除去あるいは不活化工程は関連ウイルスまたはモデルウイルスを用いたスパイク試験にてその有効性が検証されている必要がある。既に記したようにウイルスの様々な不活化、除去に対する感受性は異なっているので、どのようなウイルスをスパイク試験に使用するかはケースバイケースである。ウイルス除去あるいは不活化工程に求められる能力は、原材料に存在すると考えられる最大ウイルス量を上回るウイルス量を減少させられることである。これは材料中に存在する可能性のあるウイルス

量の1000倍から10万倍のウイルス量を不活化あるいは除去できる能力であると考えられている。

### 14. 動物を用いた細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保

異種移植におけるブタ由来ウイルス候補には、Picornaviridae, Caliciviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Bornaviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Retroviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Desoxyviridae と多くのウイルス属のものがある。これらのほとんどは、SPFブタの隔離飼育により排除可能である。

しかし、PERVは染色体に含まれるため、排除不可能で、異種移植の安全性確保における最重要課題となっている。現在、PERV検出の感度は50万個の細胞あたり10コピー程度であり、これをさらに高める努力が求められている。また、臓器移植を行った場合、血液中におけるブタ細胞によるマイクロキメリズムがリスク評価における重要な問題となる。ここでは染色体セントロメア（またはミトコンドリア）のコピー数とPERVコピー数の比率からヒト細胞へのPERV感染の評価が試みられている。

動物工場由来医薬品におけるプリオンの問題については、用いるヒツジ、ヤギ、ウシをBSEおよびスクレイピーの存在しない清浄国から入手すること、スパイクングによるバリデーションの両面から対応が行われている。スパイクングに用いる病原体

は潜伏期の短いスクレイピー・ハムスター順化 263K 株、BSE マウス順化 301V 株が一般に用いられている。

## C. 考察

### 1. 生物由来製品のウイルス安全性に関する調査研究

生物由来製品のウイルスリスク評価においては、原料自体のリスクや製造時の混入のリスク、ドナースクリーニングを含めた製造工程でのリスク低減措置、さらには投与経路、投与量、投与期間に基づくリスクを量的かつ総合的に考慮して行うべきである。また、この様な評価に基づいて生物由来製品を「特定生物由来製品」、「生物由来製品」及びこれに該当しない製品に区分して行政的対応をとることが望ましいと考えられる。

生物由来製品の原料に関して、そのウイルスリスクの高いものと低いものにカテゴリー分けを行い、カテゴリーに応じた原料基準を定めることによりウイルス安全性を確保することが望まれる。さらに、この原料のカテゴリー分類に各製品の製法におけるリスク低減措置や投与経路を考慮して総合的な行政対応を定めることが望ましいと考えられる。

### 2. HAV の RT-PCR による検出

HAV の RT-PCR による検出を検討した結果、5'NCR 領域を標的にすると遺伝子型間の塩基の違いが少ないため増幅が容易であり、10 分子相当のテンプレートの検出が可能であった。また 5'NCR 部位のプライマーセットにより、ほとんどの遺伝子型の HAV 株で cDNA の PCR 増幅が可能と思わ

れる。医薬品のリスク評価の試験等には、ウイルス粒子から RNA の検出をすることになるので、RNA の抽出効率を加えた検討がさらに必要である。

最近 PCR 用の酵素として、高温になって初めて酵素活性を示す酵素が開発された。低温での酵素反応により起きるプライマーダイマーとかミスアニーリング由来の非特異反応を防ぐための hot start PCR の利用や、活性酵素量をターゲットの増幅にあわせて増加させる Time Release PCR の有用性が報告されている。今回開発した HAV PCR の検出感度をさらに上げるために、こうした酵素を使用したり、またタックポリメラーゼ反応液中の Mg 濃度を検討することも、今後検討していく必要があると考えられる。

### 3. HCV の in vitro 感染系の確立

C 型肝炎は、フラビウイルス科の C 型肝炎ウイルス (HCV) によって引き起こされ、感染すると非常に高率に慢性肝炎となり、さらに肝硬変、肝癌へと移行することが明らかとなっている。主に血液を介して感染し、これまでは輸血や針事故、汚染針を用いた集団予防接種などが感染拡大の主原因とされ、WHO の報告では既に抗体陽性者が全世界で 1 億 7 千万人を超えるとされる重大な疾患である。HCV はプラス一本鎖 RNA をゲノムとして持ち宿主細胞 DNA に組み込まれる事なく持続感染するが、有効な試験管内の感染系や実験動物モデルがないためその研究進展に対する大きな障害となっていた。

HCV を効率良く増殖させる培養細胞系は確立されておらず、プラーク形成アッセ

イなどのウイルス力価定量法も開発されていない。さらに、感染後の HCV 由来発現産物の検出に関しても有用な方法がない。そこで、HCV 感染実験を行うにあたり、リアルタイム RT-PCR を利用した高感度の HCV RNA 定量法を確立した。この方法は、PCR サイクルごとの増幅産物をリアルタイムにモニタリングし、鋳型 DNA の初期量を定量するシステムである。PCR 反応中にサンプルチューブを密封したままモニタリングすることができ、またプラトーに達する前の指数関数的増幅期の蛍光シグナルを検出することで、PCR 反応速度論に基づいた精度の高い定量と広い測定範囲が可能といわれている。

感染実験としては、HCV 陽性血漿を細胞に添加後、37℃、2 時間培養を行い、洗浄後速やかに細胞内 HCV 量を測定した。この実験系では、細胞に吸着、侵入したウイルスを定量できるものと想定されるが、実際、図 2 に示した実験では、HCV が感染しうる HepG2 細胞では、感染ウイルス量の濃度依存的に細胞内 HCV レベルの増加を認めたのに対し、HeLa 細胞では感染ウイルス量を増加させても HCV レベルは低値のままであった。

科学的、定量的なウイルスリスク評価法は、生物由来製品の安全性試験に重要であるが、HCV に関しては十分整備されていなかった。HepG2 細胞を用いた本 HCV 感染実験系は、ウイルスリスク評価技術として利用できるものと考えられる。

#### 4. HCV 抗原検出系の開発

次に、HCV に汚染された細胞やヒト由来原料を検出するための実験系の確立を目指

した。本研究では、唯一の感染感受性動物であるチンパンジーへの感染性を示した患者血清から HCV 全長遺伝子をクローニングし、HCV 全ゲノムをスイッチング・持続発現する細胞株を樹立し、HCV が持続的に感染した場合に現れる抗原を特定して汚染検出系を開発する事を試みた。その結果、複数の HCV 持続感染細胞を認識する抗体を得ることができた。さらに、本研究を進めることにより HCV 検出のために実験系が確立できれば、より高感度な HCV の検出が可能になり、また HCV 治療法の *in vitro* モデル系ともなると期待される。

#### 5. 血漿分画製剤や供血者及びレシピエントの血液中の HEV RNA の検出

HEV の血液製剤の原料に混入する可能性についての検討は、現在も進行中であるが、すくなくとも 1 例の輸血後 HEV 感染が確認されたことは本研究の重要性を示している。本症例に関しては、すでに新聞報道もされ、血液対策課を中心に対応が取られている。また、ALT 高値の供血血液から HEV RNA が多く見出されたことは、ALT 高値の血液を血液製剤の製造に用いないというこれまでの対応の正しさを物語るものである。しかしながら、ALT 高値でなくても輸血後 HEV の感染が起こる可能性が示されたことより、我が国の血液及び血液由来製剤の安全性を更に高める目的で、HEV に関する我が国の疫学的実態を早急に解明する必要があると考えられる。また、臨床症例の検討から、HEV viremia が予想以上に長期間持続感染するとの示唆が得られている (Takahashi et al *Virology* 2001; 287: 9-12.)。また、不顕性感染例も数多く存在

すると考えられるので、輸血血液製剤及び分画製剤製造用原料血漿の原料に HEV が混入する危険性は存在すると考えられる。しかし、このような HEV の感染を防ぐためにスクリーニング等の対応を取るべきかについては、ドナー集団に於ける HEV RNA 陽性率について大規模な調査を行って判断する必要があると考えられる。

#### 6. 臍帯血のヘルペスウイルスの安全性

臍帯血移植を受けた患者の血液を用いて、nested PCR によるヘルペスウイルス及びサイトメガロウイルス DNA の検出を行ったところ、複数の患者血液で陽性の反応を認めた。我々の研究室では、これらの感染性ウイルスあるいは遺伝子を全く扱ったことがないので、実験的なコンタミネーションではないと、患者血液にこれらのウイルス DNA が存在していたものと考えられる。

見出されたこれらのウイルスの起源としては、患者自身に潜伏していたウイルスが、移植による免疫抑制状態下で活性化してきたのか、ドナーの臍帯血の中にいたものが患者に感染したのか、あるいは治療に伴い外部から予期せずウイルスが混入した等が考えられるが、現時点では結論は得られていない。

輸血用血液製剤の原材料として用いる血液に対して、例えば B 型、C 型肝炎ウイルス、あるいはヒト免疫不全ウイルスに対するスクリーニング体制は確立している。しかし、ヘルペスウイルスの混入を調べる試験は実施されない。ヘルペスウイルスは“常在”ウイルスであるので、そういった試験は一般には無駄である可能性もある。しかし、臍帯血移植を受けるような患者は免疫

抑制状態にあると考えられ、このような患者に臍帯血由来製品を投与する場合には、ヘルペスウイルスフリーの状態であることが望ましいと考えられる。したがって、移植患者等に関してはウイルススクリーニングの体制に特別な配慮が必要かについて早急な検討が必要である。

#### 7. ヒトポリオーマウイルスの高感度検出法の開発

尿からのヒトポリオーマウイルスを検出するため、ポリオーマウイルス科に見出される共通塩基配列をもとにヒトポリオーマウイルスを検出が出来る、22mer のプライマー CR-1、CR-2 については Flaegstad らが報告している (*Virology* 1991, 180, 553-560)。このプライマーセットは、マウスポリオーマウイルス、サル SV40、ヒトの BKV、JCV の DNA 断片を増幅するが、アニーリング温度が 55°C になると BKV 対照サンプルで BKV のバンドと非特異バンドの 2 つのバンドが出現した (データは示さず)。従って、尿中のポリオーマウイルス DNA の検出には信頼性にかけると思われる。また検出されたウイルス DNA バンドが JCV DNA か BKV DNA であるかを同定するためには、PCR で CR-1、CR-2 セットにより増幅された DNA 断片を制限酵素で処理して遺伝子多型 (RFLP) 解析を行うか、またはそれぞれのウイルスに特異的なプライマーを用いて再度 PCR を行うことによりウイルスを同定するため迅速性に欠けると考えられる。

今回設計したプライマーを用いる尿のウイルス沈査の Multiplex PCR による BKV DNA、JCV DNA の検出は、サザンブロットハイブリダイゼーションより 100 倍感度が高く



(図6)、迅速に JCV DNA と BKV DNA を同時に検出することが可能であった(図4)。通常 Multiplex PCR では反応液中に多くの様々なプライマーセットが存在するため非特異的 PCR 産物やプライマー・ダイマーなどが生じる。これらの非特異的産物の増幅は、目的 PCR 産物の増幅と拮抗し、感度の低下につながる。そこで非特異的産物の増幅を避けるため、アニーリング温度を 65°C から始め、1 サイクルごとに 1°C ずつ下げておこなう Touch down PCR や Multiplex PCR 用の専用反応液キットなどが販売されている。しかし、我々が作製した BKV DNA と JCV DNA 検出のための Multiplex PCR 用プライマーセットを用いると複雑な Multiplex PCR の至適化を行う必要もなく、通常の PCR 反応条件でも非特異的 PCR 産物も出現せず検出感度も 10fg であった(図4)。今回の我々が開発した Multiplex PCR を用いては尿中のヒトポリオマウイルス DNA の定量は出来ないが、ライトサイクラーシステムによる PCR を行えば試料中のウイルス DNA をリアルタイムで即座に定量が可能になると考えられる。今後この点についても検討したいと考えている。

ヒト健康人尿のウイルス沈査を検体として Multiplex PCR を用いてヒトポリオマウイルス DNA の検出を行ったところ、20~25 歳では BKV DNA 及び JCV DNA がそれぞれ 10% の割合で検出された。また 50~60 歳では BKV DNA が 15% および JCV DNA が 40% の割合で検出された。検出されたウイルス DNA が感染性ウイルス由来かどうかを確認するため、ウイルス DNA が検出されたサンプルから COS-7 細胞を用いてウイルスを増殖させて分離を行った。その結果、ウイルス DNA

が検出されたサンプル全てから感染性ウイルスが分離された。これらの結果は、ヒト健康者においては 20~25 歳ではそれぞれ 10% が BKV DNA および JCV DNA、50~60 歳では 15% が感染性 BKV、40% が感染性 JCV を尿中に排泄していることを示唆していると考えられる。

特に 50~60 歳の尿では 40% の割合で JCV の尿中への排泄がみられ、また排泄されるウイルス DNA の量も BKV では 1~5pg であったのに比較し尿中に排泄される JCV DNA は 5~20pg と多い。このウイルス DNA 量は、尿 1ml あたり  $0.3\sim 1.3\times 10^3$  ウイルス粒子に相当する。JCV は、高齢者集団のみだけでなく妊婦集団でも潜在ウイルスの賦活化が認められ、尿中にウイルスが排泄されていることが報告 (J. Infect. Dis. 1980, 142, 1-8) されていることから、50 歳代以降の閉経期女性の尿から製造される下垂体性腺刺激ホルモン、妊婦尿から製造される胎盤性腺刺激ホルモン製剤には、用いた尿原材料中に JCV が高率に迷入している可能性が考えられる。ヒトポリオマウイルスはエンベロープを持つウイルスに比較し物理化学的処理に強い抵抗性を示すため、迷入したウイルスの滅菌方法や除去方法についても検討する必要がある。迷入ウイルスのバリデーション法も含めウイルスの検出法と危険因子の除去法を現在検討中である。

最近 JCV の agno 遺伝子の塩基配列や agno 蛋白がヒトの髄芽腫細胞に検出されたこと (J Natl Cancer Inst 2002, 94, 267-73) から、髄芽腫に存在する JCV 関連ゲノム解析を行う必要もある。また尿中に排泄される JCV ゲノムが神経系細胞でどのような構造変

化を起し維持されるのかを今後解析していく予定である。

## 8. IFN 製剤のウイルス安全性

医薬品のウイルス安全性を確保するためにどの程度までの試験を要求されるかについての判断は難しい。即ち、未知のウイルスの潜在的危険性を完全に排除する事は不可能とも言える。しかし、現在まで収集された情報に基づく安全性確認試験と製造工程におけるウイルスクリアランス試験に基づく安全性確保の推定は充分信頼できると思われる。しかし製造用ナマルバ細胞でのレトロウイルス混入事例が報告されたこともあり、製造工程に複数のウイルス不活性化ないし除去工程を入れる必要がある。

## 9. 牛疫ウイルス (RPV) の検出法の開発

牛疫は反芻動物に伝播力の強い致死性感染症を引き起こす疾病で、OIE のリスト A にランクされているウイルス病である。発生すればその被害は大きく、また生畜と畜産物の嚴重な移動制限も課せられるため国際流通への影響も大きく経済的被害は甚大となる。我が国には現在発生はないが、高速大量輸送時代を迎え、その予防法、診断法の開発は重要な課題である。このためには、流行の伝播様式や病原体の生態を十分に理解し、また宿主と病原体との相互作用を究明することが必須である。牛疫ウイルスは、最近新興感染症を引き起こしたニッパやヘンドラウイルスと同様にパラミクソウイルスに属している。本ウイルス群はモノネガウイルス（マイナス鎖一本鎖 RNA ウイルス）で、リバーシジェネティクス技術の開発が困難であったため、病原ウイル

スのウイルス遺伝子機能もほとんど解明されていなかった。本研究では、我々の確立した優れた動物感染実験系と高感度検出技術を組み合わせることにより、RPV-1 の病原性発現や免疫応答の分子機構を解明することによって、総合的理解に基づく疾病診断法や予防法の開発に役立てることを目的として、動物および細胞からの RPV-1 の分離法を開発し、さらに RT-PCR によるウイルス検出法を確立することができた。

## 10. トリレトロウイルスのリアルタイム PCR による定量的検出

定量的 PERT 法は、従来の緩衝法よりも明らかに少量のレトロウイルスを検出可能であり、今回の評価方法では数十倍検出感度が高かった。また、従来法では判定できないようなウイルスについても逆転写酵素活性を持つかぎり測定することが可能であると考えられた。本方法は、レトロウイルスの迷入を危惧する他の試験に広く応用できるものと期待される。今後は、陽性と陰性の判定基準の設定の仕方などさらに検討を進めていく。

## 11. $\alpha$ -Gal 抗原量の減少とブタレトロウイルスの感染力との関係

GnT-III を導入した SEC は無処置の SEC と比較して、 $\alpha$ -Gal 抗原量ならびに異種抗原性が低下していた。このような GnT-III 遺伝子導入細胞から産生されるガンマレトロウイルス (PERV-B および FeLV-B) のヒト血清に対する感受性は、無処置の SEC から放出されるウイルスと比較して有意に低下することが確認された。異種移植を成立させるために、ブタ細胞表

面上の $\alpha$ -Gal 抗原発現量を減らしたトランスジェニックブタを用いる方法は、そのブタから産生される PERV のヒト血清に対する感受性を低下させ、PERV がヒトに感染する危険性を増長させることが本研究から予想される。

現在、臓器移植において、移植用臓器の供給が逼迫している。世界的なドナー不足を解消するために、動物の臓器を用いる異種移植、特に、ブタからヒトへの臓器移植の可能性が議論されるようになり、その方法が活発に研究されている。異種移植のドナーとして、遺伝的に遠縁なブタが一番の候補に挙がっているのは、以下の理由による。サルの臓器をヒトに移植することを WHO が禁止していること、ブタの臓器の大きさが成人のものと近く、解剖学的、生理学的にも類似していること、遺伝子導入ブタ（トランスジェニックブタ）の作出が可能であり SPF 状態を維持できること、繁殖力が旺盛であること、ブタはペットでないことなどである。

しかしながら、ブタの臓器・細胞をそのままヒトに移植した場合、超急性拒絶反応と呼ばれる免疫反応が、移植後数分のうちに引き起こされてしまうという問題が存在する。この超急性拒絶反応はブタ細胞表面上に発現し、ヒト細胞表面上に発現していない $\alpha$ Gal 抗原を、ヒトの自然抗体が認識し補体が活性化することにより引き起こされる。超急性拒絶反応を抑えるために異種移植では、細胞表面上の $\alpha$ Gal 抗原量を抑える方法をとる。既に、糖転移酵素遺伝子を導入したトランスジェニックブタが開発されている。

これまでの研究から、ブタには少なくとも

も2種類（A および B）のヒトの細胞に感染する内在性レトロウイルス（porcine endogenous retrovirus (PERV)）の存在が明らかとなっている。PERV は、マウス白血病ウイルス (MuLV) やネコ白血病ウイルス (FeLV) に近縁なガンマレトロウイルスに属する。PERV はブタのゲノムに多数存在し、現在の技術では取り除くことは非常に困難であることから、ブタからヒトへの異種間臓器移植において大きな問題となっている。

細胞表面上に $\alpha$ -Gal 抗原が多量に存在する動物の細胞から産生されたレトロウイルスは、ヒト血清存在下でほぼ完全に中和され、細胞への感染性は失われる。しかしながら、細胞表面上の $\alpha$ -Gal 抗原が減弱するように遺伝子改変したトランスジェニックブタの細胞から産生される内在性レトロウイルスは、このようなヒト血清に存在する自然抗体によって中和を受けにくくなることが危惧される。

## 12. 国内に生息する野生マウスに感染している LCMV のゲノム解析

国内の野生齧歯類から分離された OQ 株が海外で分離された WE、Armstrong のいずれの株からも遺伝的に相当離れていることが明らかになった。したがって、生物由来製品の製造に日本国内の齧歯類由来の細胞を用いる場合に、LCMV に感染したか否かを高感度かつ特異的に診断するためには、国内分離の OQ 株を用いた検査・診断用抗原の作製が実際上必要と考えられる。

現在、「国内分離株を用いてウイルスタンパクを発現させ、検査・診断用抗原とする」ことを主目的として研究を続けている。

### 1 3. 生物由来製品に迷入する可能性のある人獣共通感染ウイルス

動物細胞、組織等を原料とする生物由来製品には原料となる動物に由来する病原体あるいは製造段階で使用する添加物等に存在する病原体が混入する可能性がある。製品の安全性を確保するためにはこれらの病原体の混入によるリスクを極力最小限にする必要がある。特にウイルスは持続感染の可能性があるので十分な注意が必要である。ウイルス安全性の確保は原料動物の選択、製造過程へのウイルス除去・不活化工程の設定、GMPの遵守によるウイルス迷入の排除等によって実現できる。このうちウイルスの除去・不活化工程に関しては、その有効性が予めバリデーションされていなければならない。製品の使用形態も含め、その製造工程を鑑みたケースバイケースの対応が必要であると考えられる。

### 1 4. 動物を用いた細胞・組織利用医薬品のウイルス安全性確保

動物を用いた細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保についての調査研究を行った。特に、ブタ由来製品での混入の可能性のあるウイルスの提示を行った。また、これらのウイルスに関してはSPFブタの使用によって排除可能なことを明らかにした。

ブタ由来細胞組織利用医薬品を用いる場合最も懸念されているPERVの検出感度は、50万細胞あたり10コピー程度であること、この検出感度の向上が緊急の課題であることが示された。また、PERVのヒトへの感染性について検討が行われているが、その結論はまだ出されていない。

さらに、BSE対策として原料の原産国を指定することによる安全性確保政策と、スパイクによる工程評価の両面から対応が検討されていることが明らかになった。

## B. 結論

(1) 生物由来製品のウイルスリスク評価においては、原料自体のリスクや製造時の混入のリスク、ドナースクリーニングを含めた製造工程でのリスク低減措置、さらには投与経路、投与量、投与期間に基づくリスクを量的かつ総合的に考慮して行うべきことを明らかにした。また、このような評価に基づいて生物由来製品を「特定生物由来製品」、「生物由来製品」及びこれに該当しない製品に区分して行政的対応をとることが望ましいことを示した。

(2) A型肝炎ウイルス(HAV)のRT-PCRを用いた高感度検出系についての検討を行い、新規プライマーの設計等を行うことにより高感度な検出が可能であることを明らかにした。また、ほとんどの遺伝子型のHAV株由来のcDNAに関して本手法を用いてPCRによる増幅が可能と考えられ、その有用性が示唆された。

(3) C型肝炎ウイルス(HCV)の感染系の確立を目的としてHepG2を用いた検討を行い、HCVのin vitro感染系を確立できる可能性が示された。

(4) 細胞内に感染したHCVの検出を目的として、HCV発現細胞を認識する複数のモノクローナル抗体を樹立した。

(5) 血液製剤のE型肝炎ウイルス(HEV)に関する安全性確保を目的として輸血用血液製剤、血漿分画血液製剤、あるいはその

原料について解析を行い、ALT 高値の血液には高頻度に HEVRNA が検出されることを明らかにし、さらに輸血用製剤によって HEV が伝播することを明らかにした。

(6) 細胞組織利用医薬品の安全性確保を目的として臍帯血のウイルス安全性確保に関する検討を行い、臍帯血移植患者から HHV-6 と HCMV が検出されることがあることを明らかにした。これが治療時に用いた臍帯血から混入した可能性は否定できないことからさらなる検討が必要と考えられた。

(7) 尿由来生物由来製品のウイルス安全性確保を目的としてヒト尿中のヒトポリオーマウイルス (BK ウイルス及び JC ウイルス) の検出法の開発を行った。開発した手法を用いて、ヒト健常者においては 20~25 歳ではそれぞれ 10% が BKV および JCV、50~60 歳では 15% が BKV、40% が JCV を尿中に排泄していることを明らかにした。

(8) 天然型 IFN 製剤のウイルス安全性に関する調査研究を行い、IFN 製剤の製造においてはヒト由来腫瘍細胞をハムスターの *in vivo* での増殖、製造に用いるセンダイウイルス等の様々なウイルス安全性に関する要素を考慮する必要があることを明らかにした。

(9) 動物および細胞からの牛痘ウイルス (RPV-1) の分離法を開発し、さらに RT-PCR による RPV-1 の高感度検出法を確立した。

(10) 定量的 PCR のトリレトロウイルスの迷入評価試験としての適用について検討を行いその有用性を示唆する結果が得られた。

(11) 動物細胞を用いた細胞組織利用医薬品のウイルス安全性の基礎的検討として、

糖転移酵素遺伝子を導入し細胞表面上の  $\alpha$  Gal 抗原量を減らしたブタ血管内皮細胞 (SEC) から産生されたブタ内在性レトロウイルス (PERV) およびネコ白血病ウイルス (FeLV) の、ヒト細胞への感染性の変化について解析を行った。その結果、PERV および FeLV のヒト血清による中和が起こりにくくなることが明らかにした。

(12) 齧歯類細胞を用いる生物由来製品のウイルス安全性に関する基礎的検討として、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) の国内野生株の分子系統樹を作成したところ海外で分離された株から遺伝的に相当離れていることが明らかになった。

(13) 人獣共通感染症に対する安全性確保のための基本的要件について明らかにした。

## F. 業績

### 1. 論文発表

1. Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., and Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor -  $\alpha$  modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35, 937-946, 2002.
2. Aizaki H., Otsuka M., Matsuda M., Li Y.W., Harada T., Kawakami H., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Characteristic gene expression in liver cell lines expressing entire polyprotein of hepatitis C virus. *Hepatology* 36, 1431-1438, 2002.
3. Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K.,

- Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Kimuta S., Koike K., and Miyamura T. Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice with transgene for hepatitis C virus core protein. *Virology* 304, 415-424, 2002.
4. Otsuka M., Aizaki H., Kato N., Suzuki T., Miyamura T., Omata M., and Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 443-447, 2003.
  5. Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Mishiro S. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J Infect Dis* 2002; 185: 1342-1345.
  6. Ito, T., Kobayashi, Y., Morita, T., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. 2002. Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chicken. *Virus Res.* 84:27-35.
  7. 堀本泰介、八田正人、河岡義裕 2002年 香港トリインフルエンザ事情 *インフルエンザ* 3(2):64-67
  8. 堀本泰介、河岡義裕 2002年 インフルエンザ制圧をめざして *臨床とウイルス* 30(3):139-146.
  9. 堀本泰介、五藤秀男、高田礼人、河岡義裕 2002年 ウイルスの病原性発現における糖蛋白質の役割 *Molecular Medicine 臨時増刊号「免疫」* 2003, 39:212-226
  10. 堀本泰介、河岡義裕 2002年 インフルエンザの流行学：新型インフルエンザの襲来はあるか？ *臨床と研究* 79(12):97-102.
  11. Kawana Tachikawa, M. Tomizawa, J. Nunoya, T. Shioda, A. Kato, EE. Nakayama, T. Nakamura, Y. Nagai, and A. Iwamoto A. An efficient and versatile mammalian viral vector system for major histocompatibility complex class I/peptide complexes. *J Virol.* 76:11982-11988 (2002).
  12. T. Bousse, T. Matrosovich, A. Portner, A. Kato, Y. Nagai, and T. Takimoto. The long noncoding region of the human parainfluenza virus type 1 F gene contributes to the read-through transcription at the M-F gene junction. *J Virol.* 76:8244-51 (2002).
  13. T. Hirata, A. Iida, T. Iida, K. Kitazato, A. Kato, Y. Nagai and M. Hasegawa. An improved method for recovery of F-defective Sendai virus expressing foreign genes from cloned cDNA. *J Virol Methods.* 104:125-133 (2002).
  14. Kato, Y. Ohnishi, M. Hishiyama, M. Kohase, S. Saito, M. Tashiro, and Y. Nagai. The amino-terminal half of Sendai virus C protein is not responsible for either counteracting the antiviral action of interferons or down-regulating viral RNA synthesis. *J Virol.* 76:7114-7124 (2002).
  15. T. Tokusumi, A. Iida, T. Hirata, A. Kato, Y. Nagai and M. Hasegawa. Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign

- reporter gene. *Virus Res.* 86:33-38 (2002).
16. M. Kano, T. Matano, A. Kato, H. Nakamura, A. Takeda, Y. Suzaki, Y. Ami, K. Terao and Y. Nagai. Primary replication of a recombinant Sendai virus vector in macaques. *J Gen Virol.* 83:1377-1386 (2002).
  17. S. Saito, T. Ogino, N. Miyajima, A. Kato and M. Kohase. Dephosphorylation failure of tyrosine-phosphorylated STAT1 in IFN-stimulated Sendai virus C protein-expressing cells. *Virology*, 293:205-209 (2002)
  18. Kurihara, T., Miyazawa, T., Miyagawa, S., Tomonaga, K., Hazama, K., Yamada, J., Shirakura, R., and Matsuura Y. (2003) Sensitivity to human serum of gammaretroviruses produced from pig endothelial cells transduced with glycosyltransferase genes. *Xenotransplantation* (in press).
  19. Zhi-Li Xu, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA : Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector, *J. Control Release*, 81, 155-163 (2002)
  20. M., OMORI, H., MIZUGUCHI, K., OHSAWA, S., KOHSAKA, Takao HAYAKAWA, K., ABE, F., SHIBASAKI, Modification of a fiber protein in an adenovirus vector improves in vitro gene transfer efficiency to the microglial cell line. *Neurosci. Lett.* 324, 145-148 (2002)
  21. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes, *Gene*, 285, 69-77 (2002)
  22. Masato TAKAHASHI, Naohiko SEKI, Toshinori OZAKI, Masaki KATO, Tomoko KUNO, Takahito NAKAGAWARA, Ken-ichi WATANABE, Koh MIYAZAKI, Miki OHIRA, Shunji HAYASHI, Mitsuchika HOSODA, Hisashi TOKITA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Satoru TODO, Akira NAKAGAWARA: Identification of the p33ING1-regulated genes which include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NmumG, *Cancer Res.* 62, 2203-2209 (2002)
  23. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : Enhanced Anti-tumor Effect and Reduced Vector Dissemination with Fiber-modified Adenovirus Vectors Expressing Herpes Simplex Virus ThymidineKinase, *Cancer Gene Ther.* 9, 236-242 (2002)
  24. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : The tet-off system is more effective than the tet-on system

- for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. *J. Gene Med.*, 4, 240-247 (2002)
25. Takahito NAKAGAWA, Masato TAKAHASHI, Toshinori OZAKI, Ken-ichi WATANABE, Satoru TODO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, and Akira NAKAGAWA: Autoinhibitory Regulation of p73 by  $\Delta$ Np73 to Modulate Cell Survival and Death Through p73-Specific Target Element Within the  $\Delta$ Np73 Promoter, *Molecular and Cellular Biology*, 22, 2575-2585 (2002)
  26. Yuji NAGAYAMA, Masako Kita-FURUYAMA, Takao ANDO, Kazuhiko NAKAO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Katsumi Eguchi, and Masami NIWA: A Novel Murine Model of Graves' Hyperthyroidism with Intramuscular Injection of Adenovirus Expressing the Thyrotropin Receptor, *J Immunol*, 168, 2789-2794 (2002)
  27. Shingo NIIMI, Mai HORIKAWA, Taiichirou SEKI, Toyohiko ARIGA, Tetsu KOBAYASHI, Takao HAYAKAWA, Effects of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by Epidermal Growth Factor in primary cultured rat hepatocytes, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 437-440(2002)
  28. Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Makiko KANEHIRA, Naoko NISHINO, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takao HAYAKAWA, and Tadanori MAYUMI: Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors, *Cancer Letter*. 2002 Mar 8, 177(1), 57-63(2002)
  29. Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA, and Tadanori MAYUMI: Tumor necrosis factor  $\alpha$ -gene therapy for an established murine melanoma using RGD (Arg-Gly-Asp) fiber-mutant adenovirus vectors, *Jpn., J., Cancer Res.*, 93, 436-444 (2002)
  30. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Improvement of Adenovirus Vectors for Gene Transfer, *Animal Cell Technology : Basic and Applied Aspects*, 12, 1-5 (2002)
  31. Takao HAYAKAWA: Perspective on assessing comparability of biotechnology products- a view from Japan- Biologics 2000 Brown F, Lubiniecki A, Murano G (eds), *Dev Biol Stand.*, Basel, Karger, 109, 27-40



- (2002)
32. Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Sumiko Hyuga, Masashi HYUGA, and Takao HAYAKAWA : Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, 30, 235-244 (2002)
  33. Y. KAWAMATA, Y. NAGAYAMA, K. NAKAO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, T. SATO, N. ISHII, Receptor-independent augmentation of adenovirus-mediated gene transfer with chitosan in vitro. *Biomaterials*, 23, 4573-4579 (2002)
  34. Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: CAR- or  $\alpha v$  integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice, *Gene Ther.*, 9, 769-776 (2002)
  35. Eriko UCHIDA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE and Takao HAYAKAWA: Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells, *Biol.Pharm.Bull.*, 25(7), 891-897 (2002)
  36. Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko Hyuga, and Takao HAYAKAWA: : Usefulness of sugar mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, 30, 113-123 (2002)
  37. Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Masashi HYUGA, Sumiko Hyuga, and Takao HAYAKAWA: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 968, 89-100 (2002)
  38. Shingo NIIMI, Tadashi OSHIZAWA, Masaaki NAOTSUKA, Sumiaki OHBA, Akira YOKOZAWA, Tomoyo MURATA and Takao HAYAKAWA, Establishment of a Standard Assay Method for Human Thrombomodulin and Determination of the Activity of the Japanese Reference Standard, *Biologicals*, 30, 69-76 (2002)
  39. Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, and Takao HAYAKAWA: Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry:

- Application to recombinant human thrombomodulin. *J. Chromatogr. A*, 978, 141-152 (2002)
40. Toshie KANAYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA, Mieko KOGI, Eriko UCHIDA and Takao HAYAKAWA: The Role of p70 S6 Kinase Cascade on Neutrophilic Differentiation and Proliferation of HL-60 Cells –A Study on Transferrin Receptor-Positive and -Negative Cells from Dimethylsulfoxide and Retinoic Acid-Treated HL-60 Cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, 405, 21-31 (2002)
  41. Shingo NIIMI, Masashi HYUGA, Hiromi KAZAMA, Masami INAGAWA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Tetsu KOBAYASHI, and Takao HAYAKAWA: Activins A, AB, and B inhibit Hepatocyte Growth Factor Synthesis by MRC-5 Human Lung Fibroblasts, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1405-1408 (2002)
  42. Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA and Takao HAYAKAWA: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells, *J. Cell Physiol.*, 195, 119-129 (2003)
  43. Teruo AKUTA, Akiko EGUCHI, Hajime OKUYAMA, Takao SENDA, Hachiro INOKUCHI, Yosuke SUZUKI, Emi NAGOSHI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Katsuo TAKEDA, Mamoru HASEGAWA and Mahito NAKANISHI: Enhancement of Phage-Mediated Gene Transfer by Nuclear Localization Signal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 297, 779-786 (2002)
  44. Shingo NIIMI, Tadashi OSHIZAWA, Teruhide YAMAGUCHI, Mizuho HARASHIMA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Specific Expression Of Annexin III In Rat Small Hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 770-774 (2003)
  45. Morioka T., Koyama H., Yamamura H., Tanaka S., Emoto M., Imamura T., Miyazono K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Kojima I., Takahashi K., Nishizawa Y. Expression and its role of calponin in pancreatic AR42J cell differentiation into insulin-producing cells. *Diabetes.*, 52, 760-766 (2003)
  46. Nakano R., Nakagawa T., Imazu S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T. A novel T7 system utilizing mRNA coding for T7 RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 301, 974-978 (2003)
  47. Takao HAYAKAWA: Regulating biotechnology products. -Comparability of

- biotechnology products and cell substrates. *10th International conference of drug regulatory authorities (ICDRA)*, Hong Kong 2002, WHO, pp.65-67 (2002)
48. Kazufumi KATAYAMA, Koichiro WADA, Atsushi NAKAJIMA, Sachiko YOSHIDA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Shinsaku NAKAGAWA, Takashi KADOWAKI, Ryozo NAGAI, Yoshinori KAMISAKI, Richard S. BLUMBERG and Tadanori MAYUMI: A Novel PPAR $\gamma$ -Gene Therapy to Control Inflammation Associated with Inflammatory Bowel Disease, *Gastroenterology* (in press)
  49. Toru KAWANISHI, S. ISHIZAKI, N. KAWASAKI, R. SHIBAYAMA, Hiroshi. KAWAI, H. OHATA, K. MOMOSE, and Takao HAYAKAWA, Abnormal fluorescence spectra of carboxy SNARF-1 acetoxymethyl acetate ester-loaded hepatocytes –Biotransformation of Carboxy SNARF-1, a pH probe- Pflugler *Archiv. Eur. J. Physiol* (in press)
  50. Tetsu KOBAYASHI, Shingo NIIMI and Takao HAYAKAWA: Regulation of Inhibin B Chains and Follistatin mRNA Levels During Rat Hepatocyte Growth Induced by the Peroxisome Proliferator Di-n-butyl Phthalate, *Biol. Pharm. Bull.*, 25(9), (in press)
  51. Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITO and Takao HAYAKAWA: Analysis of glycopeptides and glycoproteins by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Methods Molecular Biology* (in press)
  52. K., SATOH, Akiko IWATA, M., MURATA, M., HIKATA, Takao HAYAKAWA, Teruhide YAMAGUCHI; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Virol. Methods.* , (in press)
  53. Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA: Generation of Fiber-Modified Adenovirus Vectors Containing Heterologous Peptides in both the HI Loop and C-terminus of the Fiber Knob, *J. Gene Med* , (in press)
  54. Yuka Okada, Naoki Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Tadanori Mayumi, and Nobuyasu Mizuno : An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF  $\alpha$ -expressing adenovirus vector into established murine melanoma. *Gene Ther.* (in press)
  55. Yuji Nagayama, Kazuhiko Nakao, Hiroyuki Mizuguchi, Takao

- Hayakawa, Masami Niwa: Enhanced antitumor effect of combined replicative adenovirus and non-replicative adenovirus expressing interleukin-12 in an immunocompetent mouse model, *Gene Ther.*, (in press)
56. Tetsu KOBAYASHI, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, Masamichi FUKUOKA and Takao HAYAKAWA: Changes of Peroxisome Proliferator-activated Receptor-regulated Gene Expression and Inhibin/Activin-follistatin System Gene Expression in Rat Testis After an Administration of Di-n-butyl Phthalate, *Toxicol. Letter*, (in press)
57. Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Miyako OHTA and Takao HAYAKAWA: Microanalysis of N-linked Oligosaccharides in a Glycoprotein by Nanospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, (in press)
58. Yuji NAGAYAMA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Masami NIWA, Sandra M. McLachlan, Basil RAPOPORT: Prevention of Autoantibody-Mediated Graves'-like Hyperthyroidism in Mice with Interleukin-4, a Th2 Cytokine, *J. Immunol.*, (in press)
59. Naoki OKADA, Yasushige MASUNAGA, Sayaka IYAMA, Takashi TSUDA, Naoki MORI, Akinori SASAKI, Yuka OKADA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Shinsaku NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI, Takuya FUJITA, and Akira YAMAMOTO : Murine Dendritic Cells Transduced with Human gp100 Gene by RGD Fiber-mutant Adenovirus Vectors Are Highly Efficacious in Generating Anti-melanoma Immunity, *Cancer Gene Ther.*, (in press)
60. Zhi-Li Xu, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA : Regulated Gene Expression from Adenovirus Vectors: A Systematic Comparison of Various Inducible Systems, *Gene*, (in press)
61. Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA, Eriko Uchida and Takao HAYAKAWA: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochemical Pharmacology*, (in press)
62. Fuminori SAKURAI, Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Efficient gene transfer into human CD 34+ Cells by an Adenovirus type 35 vector, *Gene Ther.*, (in press)
63. 水口裕之、早川堯夫 : in vitro ライゲー ションを利用したアデノウイルスベク