

一方、ウイルスを濃縮することによる NAT の高感度化では、ウイルスの感染性についての情報は得られない。ウイルスの感染性の検出には、細胞変性を指標としたり、ウイルスによる細胞のプラーク形成、あるいは感染細胞内で作られるウイルス特異的抗原の検出など様々な手法が開発されている。しかしいずれの手法も、感染価の低いウイルスの検出には、陽性反応がでるまで長期にわたる培養を必要としたり、短時間の培養では十分な感度が得られないという欠点があった。

そこで、ウイルスの感染性を高感度に検出するための手法の開発を行った。このためにまず細胞からウイルスゲノムを迅速・高効率に抽出する技術を開発した。すなわち、磁性球にポリスチレンコートした Gene Ball を用いて、ウイルスに感染させた細胞から核酸を抽出、沈殿させるとともに、核酸のゲル化による粘性の増加を引き起こすことなく核酸を Gene Ball に吸着させる方法を開発した。本法を用いることにより、大量の感染細胞からウイルスゲノムを含む核酸を迅速かつ高い収率で回収することが可能となった。この手法を用いて、指標性細胞にウイルスを感染させ、核酸を抽出後、PCR あるいはリアルタイム PCR を用いてウイルスゲノムを検出することにより、高感度、高精度に細胞内で複製されたウイルスゲノムを検出することが可能になった。本法を用いることにより 0.2 から 2 pfu という非常に少ない感染価のウイルスを検出することが可能であった。また、細胞変性を指標としたウイルス感染性の測定法に比較して、迅速・高感度にウイルスの

感染性を測定できることが明らかになった。本法は、HSV-1、poliovirus、アデノウイルス、ブタパルボウイルスに適応可能であり、感染性ウイルスの検出に極めて有用と考えられる。

一方、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮を応用して、PEI 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 PEI 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。本研究では、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。

本研究では、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 を組合

わせることにより見出した遺伝的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。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 解析に加えがん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 (MFP) 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。さらに、サイトカインや増殖因子がヘパリンに親和性を持つことから培養上清をヘパリンカラムで濃縮し、2 次元電気泳動と MFP 法を組合わせた解析をモデル細胞として HL-60 細胞と HL-60RG 細胞へ適応した。その結果、これら近縁の細胞株間でもそのプロファイルに明らかな差異が認められ、細胞特性の解析法としてのイモビリン 2 次元電気泳動/MFP 解析の有用性が示された。

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、血管内皮前駆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。まずヒト末梢血 AC133 陽性細胞より血管内皮細胞への誘導系を確立し、その経時的な血管内皮細胞の分化指標の解析より、分化初期に CD31 が特異的に発現してくることより、この CD31 が血管内皮前駆細胞の特性指標にな

るのではと想定し、解析を行った。培養6日目のCD31強陽性細胞や陽性細胞を分離し、その血管内皮細胞への分化能を比較したところ、CD31強陽性細胞から非常に多くの接着細胞が出現してくること、この接着細胞がKDRやeNOSなどの血管内皮細胞の指標を強く発現していることなどが明らかになり我々の想定が支持される結果が得られた。CD31強陽性細胞が血管内皮前駆細胞の特性指標となることを示唆した本結果は、初めてのものであり、パージャナー病等、血管内皮細胞の誘導を目的として臨床研究が進められている細胞組織加工医薬品の特性指標として応用が期待される。

一方、臍帯血は末梢血に比べて血液幹細胞が多く含まれていることが明らかにされており、血球系細胞の誘導や血管内皮細胞の誘導の解析にも臍帯血が用いられている。そこで、臍帯血を用いて血管内皮細胞への分化誘導系を確立し、その分化誘導時のマーカー発現の変化等を解析した。その結果、臍帯血は、AC133陽性細胞/CD34陽性細胞の比率が高いことが確認された。そこで臍帯血幹細胞を分離し血管内皮細胞に分化誘導系を確立することを試みた。同時に、より多量の血管内皮前駆細胞を誘導させるために、種々の増殖因子等の効果についても検討した。すなわち、臍帯血と末梢血をSCF、TPO、VEGF存在下で培養したところ、末梢血AC133陽性細胞は殆ど増加しないにもかかわらず、臍帯血AC133陽性細胞をこれらの増殖因子とともに培養すると6日間で5倍ほど細胞を増加させることができた。一方、臍帯血AC133陽性細胞を6日

間培養することにより、CD31強陽性細胞の比率が、0.25%から約10%にまで増加することが明らかになった。臍帯血AC133細胞では培養6日間で全体の細胞数が5倍以上増加することから、このような増殖因子存在下で培養することにより血管内皮前駆細胞と想定しているCD31強陽性細胞数を約250倍にも増加させることができることになる。

臍帯血AC133陽性細胞もVEGF存在下に培養することにより血管内皮細胞が効率よく誘導されることも明らかになった。培養6日目でCD31強陽性細胞の出現が最も高いことは、末梢血AC133細胞を培養したときと同じであるが、末梢血ではその後急激にCD31強陽性細胞の発現が低下するのに対して、臍帯血ではその低下が非常に緩やかであった。これは、臍帯血AC133陽性細胞が上記した増殖因子に反応して幹細胞が増幅するためかあるいは血管内皮前駆細胞そのものが増幅する可能性が考えられた。このCD31強陽性細胞やCD31陽性細胞をソーティングし、フィブロネクチン上で培養して、末梢血と同様の結論が得られるか解析したところ、CD31強陽性細胞から多くの接着細胞が出現し、また血管内皮細胞の指標としてのKDRやeNOSの高い発現が認められた。さらに、このCD31強陽性細胞由来接着細胞をマトリゲル中で培養することにより管腔形成が認められることより、CD31強陽性細胞から、血管内皮としての十分な機能を持つ細胞を誘導できることが明らかになった。

以上のように、臍帯血AC133陽性細胞を種々の増殖因子やVEGF存在下に培養す

ることにより血管内皮前駆細胞と想定している CD31 強陽性細胞の増幅と誘導を行う系を確立することができた。今後は、CD31 強陽性細胞の機能面での解析をさらに進め、血管内皮前駆細胞の特性指標としての有用性を確認していく必要がある。

近年、小型肝細胞が肝幹細胞として細胞治療薬への応用が期待されていることから、小型肝細胞と成熟肝細胞で発現が異なるタンパク質を探索し、その品質評価の指標としての応用を目指した研究が活発に行われている。それらの研究の多くは小型肝細胞を培養し、分化した成熟肝細胞特異的あるいは肝細胞において普遍的に発現する既知のマーカートンパク質の発現を検討しようというものである。その結果、アルブミン、トランスフェリン、サイトケラチン 8、サイトケラチン 18 など肝細胞における普遍的なマーカーは全て小型肝細胞に存在することが明らかになっている。また、分化型肝細胞のマーカーである $\alpha 1$ -アンチトリプシン、コネキシン 32 は培養初期には発現がみられず、培養時間の経過に伴い発現細胞が増加する傾向がみられている。一方、小型肝細胞においてのみ発現がみられるタンパク質はこれまで同定されていない。

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、PEI 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検討を行った。PEI 磁気ビーズは、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 倍の濃縮効果をもたらすと同時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。一方、スルホン酸磁気ビーズは PEI 磁気ビーズで濃縮できなかった非エンベロープウイルス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で、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。さらに、新規ウイルス感染性の迅速・高感度検出法として infectivity PCR の開発を行った。本法は、指向性細胞にウイルスを感染させた後、新たに開発したポリスチレン球を用いた核酸抽出法と PCR を組み合わせることにより細胞内ウイルスゲノムを迅速・高感度に検出しようとするものである。数種のウイルスについて検討した結果、全てのウイルスに関して細胞変性を指標とする方法に比べて非常に高感度に感染性ウイルスを検出できることを明らかにした。

(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見出した。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 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ヘパリンカラムにて濃縮し、イモビリン 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。

F. 研究発表

1. 論文発表及び著書

1) Iwata, A., Satoh, K., Murata, M., Hikata, M., Hayakawa, T., Yamaguchi, T.: Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. *Biol. Pharm.*

Bull., (in press)

2) Satoh, K., Iwata, A., Murata, M., Hikata, M., Hayakawa, T., Yamaguchi, T.: Virus Concentration Using

Polyethyleneimine-conjugated

Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Virol. Method.* (in press)

3) Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Kogi, M., Uchida, E., Hayakawa, T.: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem. Pharm.* (in press)

4) Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Hayakawa, T.: 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)

5) Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Kogi, M., Uchida, E., Hayakawa, T.: Role of the p70 S6 kinase cascade in neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells -A study of transferrin receptor-positive and -negative cells obtained from dimethyl sulfoxide- or retinoic acid-treated HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys.*, 405, 21-31 (2002)

- 6) Matsui, S., Matsumoto, S., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Watanabe, H., Ohashi, K., Mizuno, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Suzuki, K.: LIM kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. Possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, **277**, 544-549 (2002)
- 7) Niimi, S., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Specific expression of annexin III in rat small-hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **300**, 770-774 (2003)
- 8) Sachiko MATSUI, Reiko ADACHI, Kaoru KUSUI, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi KASAHARA, Takao HAYAKAWA and Kazuhiro SUZUKI: U73122 inhibits the dephosphorylation and translocation of cofilin in activated macrophage-like U937 cells, *Cell. Signalling*, **13**, 17-22 (2001)
- 9) S. Shimohama, H. Tanino, N. Kawakami, N. Okamura, H. Kodama, T. Yamaguchi, T. Hayakawa, A. Nonomura, S. Chiba, G. Perry, M. A. Smith and S. Fujimoto: Activation of NADPH Oxidase in Alzheimer's Disease Brains, *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*, **273**, 5-9 (2000)
- 10) N. Kawakami, K. Kita, T. Hayakawa, T. Yamaguchi and S. 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)
- 11) 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)
- 12) Yamamoto, Y., Hashimoto, J., Shimamura, M., Yamaguchi, T., Hazato, T.: Characterization of tynorphin, a potent endogenous inhibitor of dipeptidyl peptidase III. *Peptides*, **21**, 503-508 (2000)
- 13) 早川堯夫, 山口照英, 石井 (渡部) 明子, 押澤正: 核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリテイスタディ. *医薬品研究*, **33**, 275-284 (2002)
- 14) 早川堯夫, 山口照英, 押澤正: 日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究・ウイルス安全性確保の基本要件. *医薬品研究*, **33**, 210-230 (2002)
- 15) 山口照英: ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保について. *ファルマシア*, **38**, 523-525 (2002)

- 16) 早川堯夫, 豊島 聡, 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・安全性評価, *衛研報告*, 119, 1-26 (2001)
- 17) 早川堯夫, 真弓忠範, 黒澤 努, 豊島 聡, 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*, 32(4), 223-246(2001)
- 18) 早川堯夫, 谷本 剛, 山口照英, 川西 徹, 酒井喜代志: 第十四改正日本薬局方の改正点; 医薬品各条の改正点一生物薬品一, *薬局*, 52(5), 1609-1615 (2001)
- 19) 早川堯夫, 水口裕之: 遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて次世代アデノウイルスベクターの開発, *医薬ジャーナル*, 37(5), 1514-1546 (2001)
- 20) 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*, 12 巻, 101-109 (2001)
- 細胞中球分化亢進と増殖促進における PKC α の役割. 第 75 回日本生化学大会, 平成 14 年 10 月, 京都
- 4) 押澤正, 山口照英, 豊田淑江, 内田恵理子, 早川堯夫: HL-60 細胞の好中球様細胞への分化に關与するタンパク質の解析. 第 75 回日本生化学大会, 平成 14 年 10 月, 京都
- 5) 豊田淑江, 押澤正, 鈴木孝昌, 早川堯夫, 山口照英: 臍帯血における AC133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析. 第 2 回再生医療学会, 平成 15 年 3 月, 神戸
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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)
- 9) 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

2.学会発表

- 1) 豊田淑江, 山口照英, 押澤正, 早川堯夫: AC133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析. 第 1 回日本再生医療学会, 平成 14 年 4 月, 京都
- 2) 豊田淑江, 山口照英, 押澤正, 早川堯夫: ヒト末梢血における AC133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析. 第 23 回日本炎症・再生医学会, 平成 14 年 7 月, 東京
- 3) 豊田淑江, 押澤正, 内田恵理子, 早川堯夫, 山口照英: G-CSF による HL-60

F.知的財産権の出願，登録状況		なし
1. 特許取得	2. 実用新案登録	なし
	3. その他	なし

表 1. PCR 及び RT-PCR に用いたプライマーセット.

	Primer set
HSV-1*1	5'-ATCCGAACGCAGCCCCGCTG-3' 5'-TCTCCGTCCAGTCGTTTATCTTC-3'
SV-40 *2	5'-ATAATTTTTTTGTATAGTAGTGCA-3' 5'-GGAAAGTCCTTGGGGTCTTCTTACC-3'
Sindbis virus	5'-GGATTGGSTTYGAYACCACYCAGTTCATGT-3' 5'-TGCCCYATGCGKAGYCCMGAAGAYCC-3'
VSV	5'-AGGATATGTCTACCAAGGCC-3' 5'-GGTTATTTTGCAGAGGTGTCC-3'
PPV *3	5'-TTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGC-3' 5'-TATGTTCTGGTCTTTCCTCGCATC-3'
Poliovirus *4	5'-TGCGAGATACCACACAT-3' 5'-ATCATGCTTCAAGCATCTG-3'

*1-*4: Each primer set was prepared according to the original papers: HSV-1 (Kessler et al., 2000), SV-40 (Fedele, 1999), PPV (Soares, 1999) and Poliovirus (Kilpatrick, 1998).

表 2. リアルタイム PCR に用いたプライマー/プローブセット.

	Primer and probe set
HSV-1	5'-GCGTCATGGTCATGGCAAG-3' 5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3' FAM-labeled 5'-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG-3'
Sindbis virus	5'-CAGGACGTCCTATAACGCTCC-3' 5'-GAGAACATGAACTGGGTGGTGTC-3'
VSV	5'-AGGATATGTFCTACCAAGGCC-3' 5'-GGTTATTTTGCAGAGGTGTCC-3'
SV-40 virus	5'-ATAATTTTTTTGTATAGTAGTGCA-3' 5'-GGAAAGTCCTTGGGGTCTTCTTACC-3'
Poliovirus	

DNA and RNA from Sindbis virus, VSV and SV-40 virus were quantitatively determined using Syber Green PCR Master Mix™ (Applied Biosystems)

図1. Gene Ball法によるウイルスゲノム抽出の原理

- Cells are lysed by anionic surfactant, and proteins are decomposed by enzymes including Proteinase K.
- DNA and polymers are specifically precipitated on Gene ball by changing solution environment from hydrophilic to hydrophobic. Decomposed low molecular proteins are soluble or self-precipitated to form small particles which do not absorb on Gene Ball (s) and are easily to be removed.
- Gene ball is a 6.5mm diameter polymer bead containing a smaller iron core bead, and the surface is special modified to capture DNA and RNA precipitates.

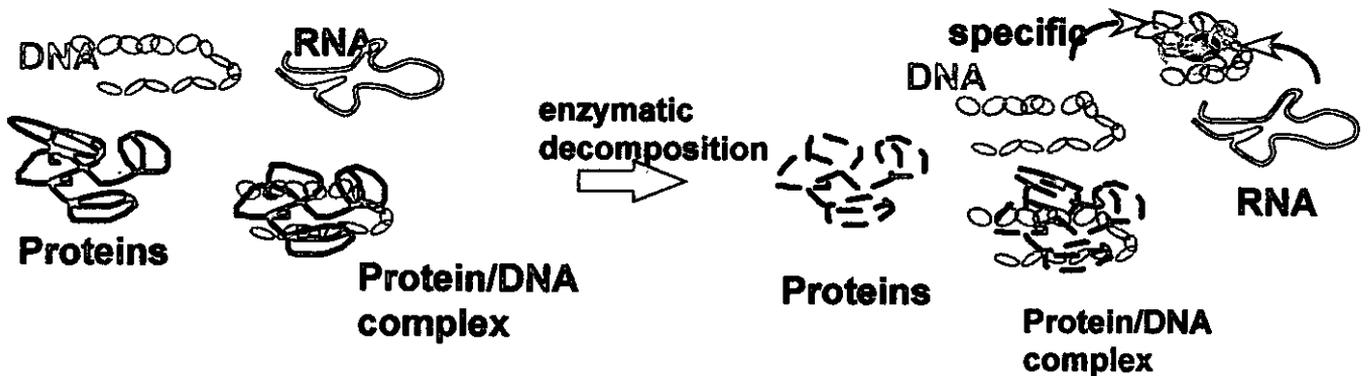
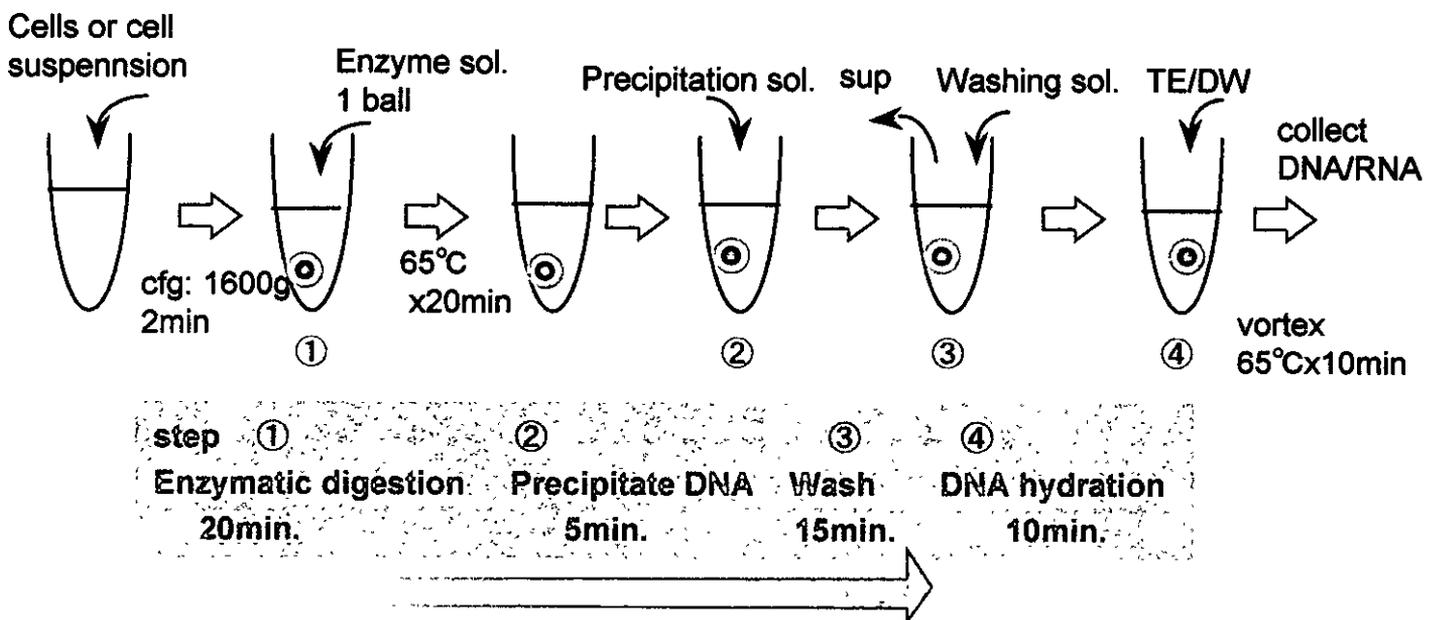


図2 Gene Ball 法のウイルスゲノム抽出操作



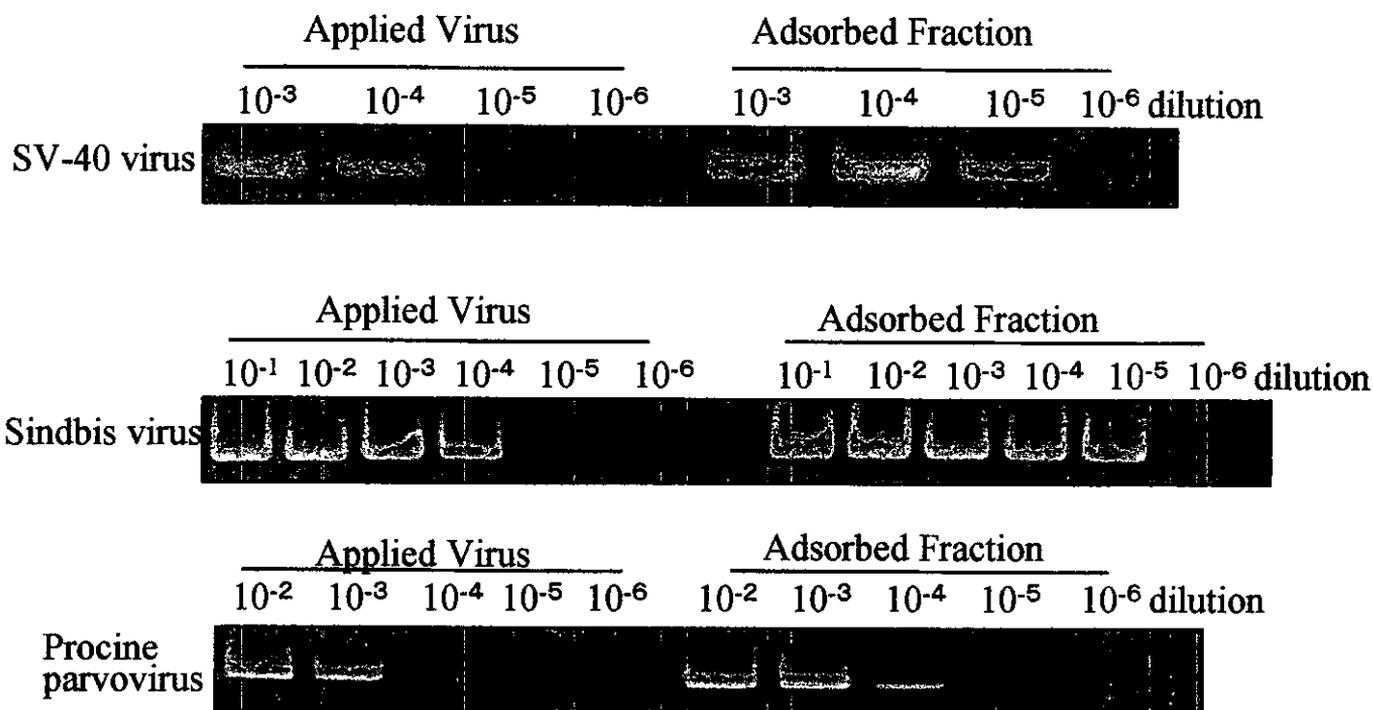


図3. ポリエチレンイミン(PEI)磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

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。

表3. ポリエチレンイミン磁気ビーズ処理による培養上清中のウイルス感染価の低下

		TCID ₅₀ in Virus suspension (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)

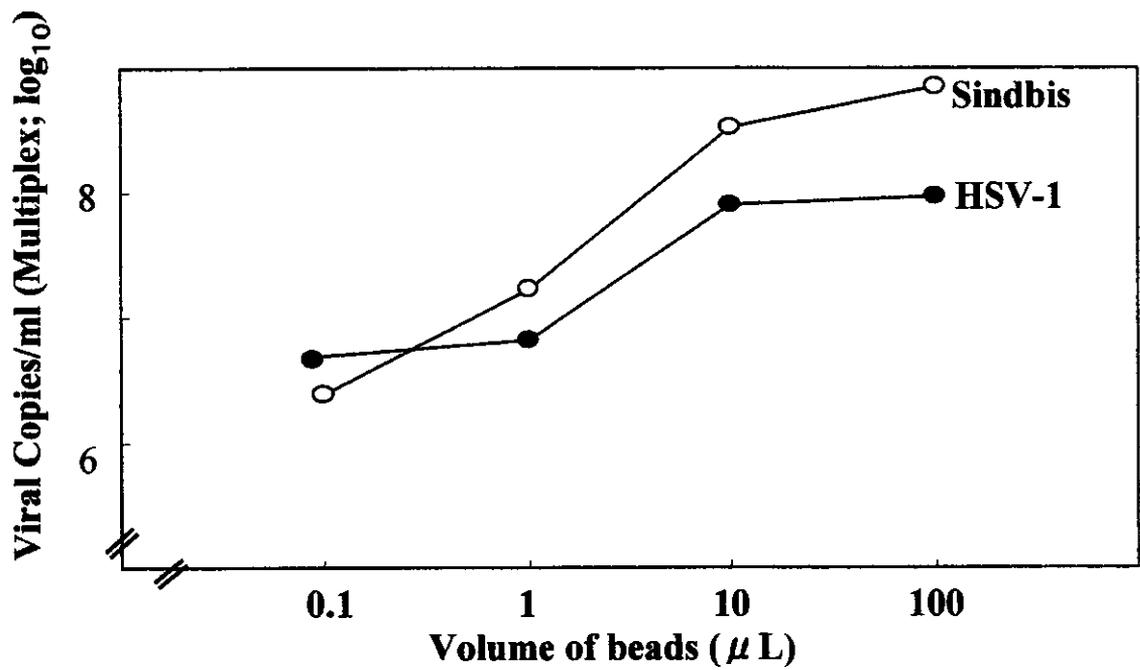


図4. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮の用量依存性

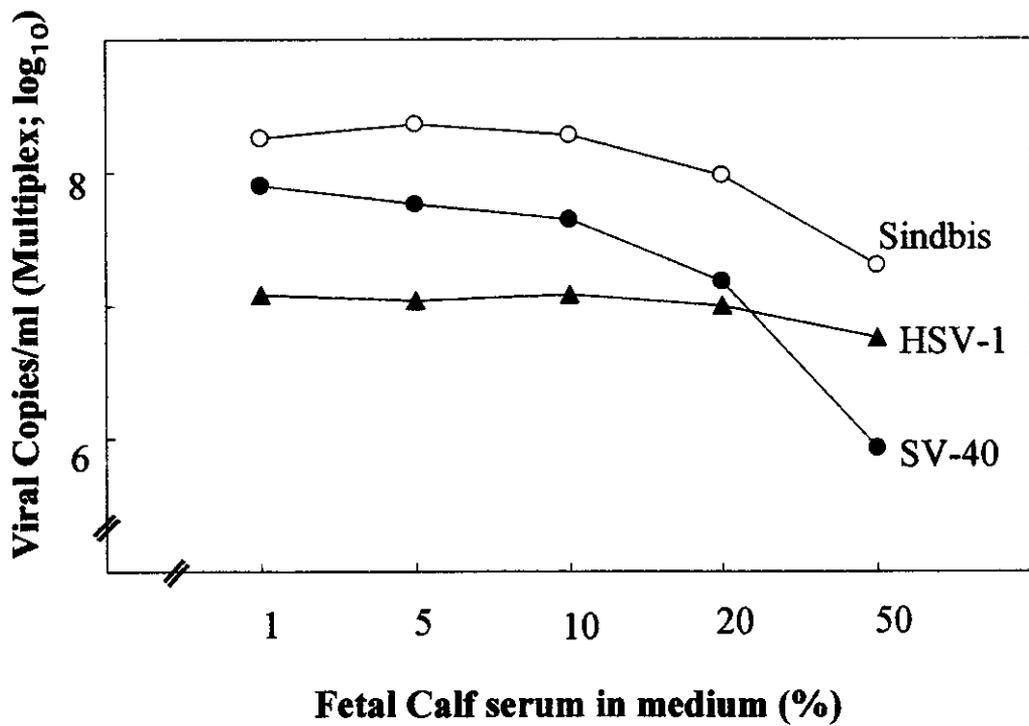


図5. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮に対する血清の影響

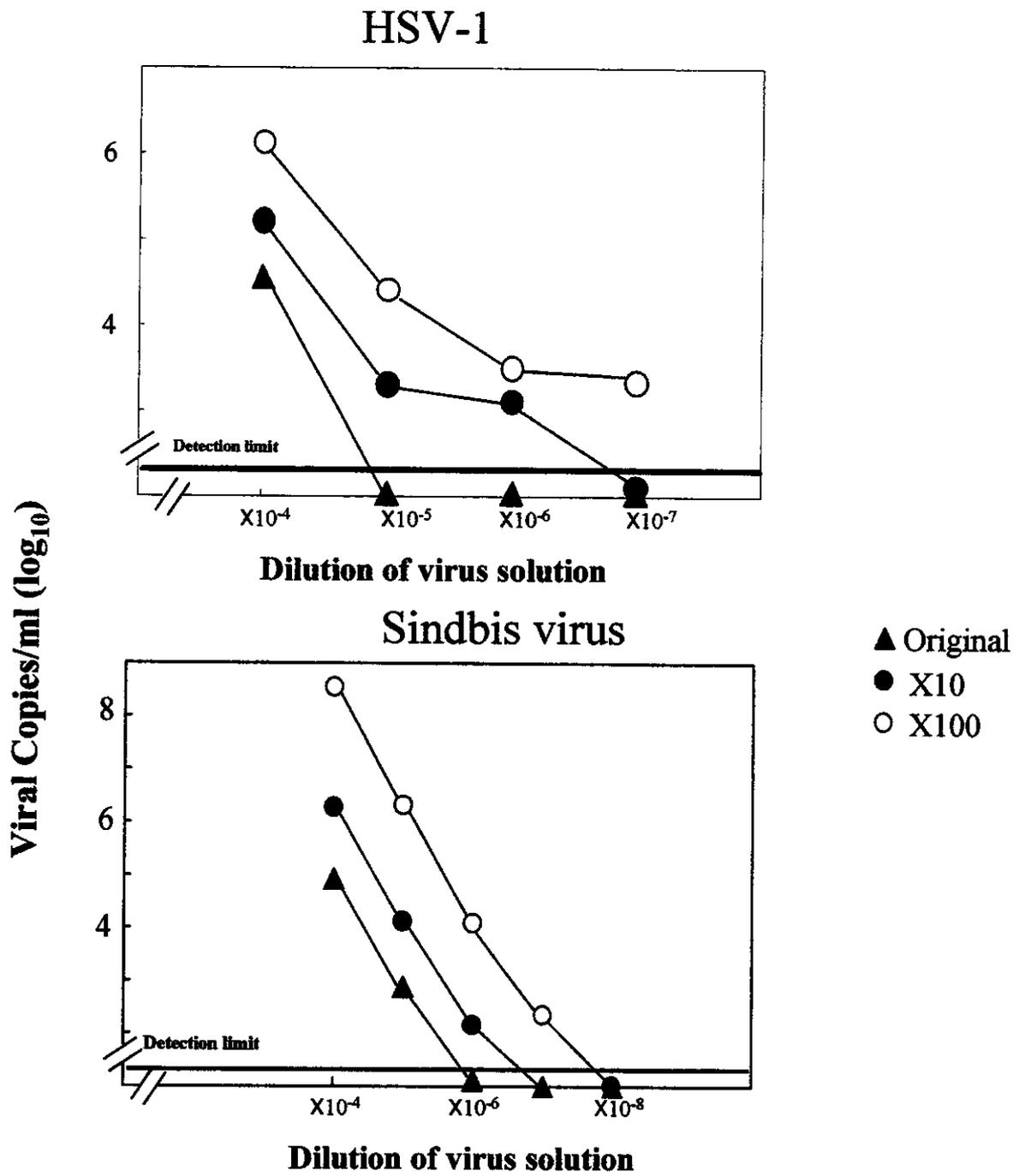


図6. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

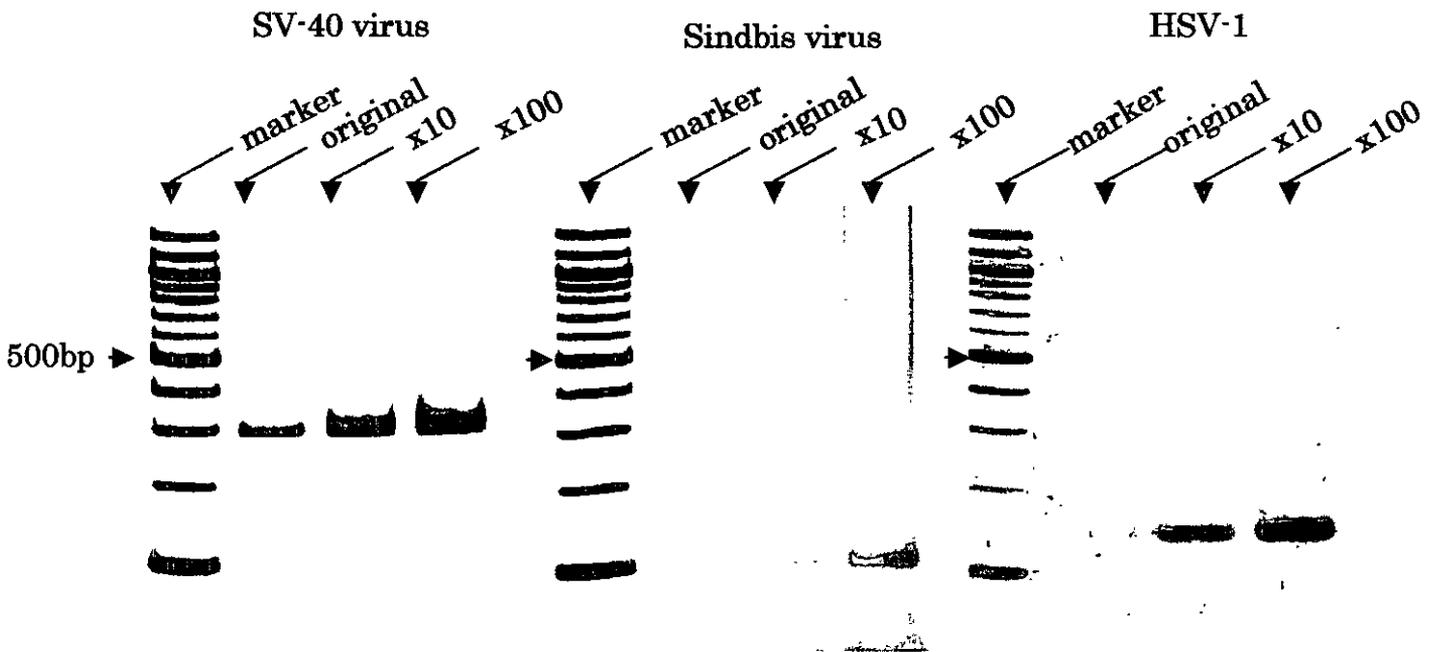


図7. 3種類のウイルスを混合した時のPEI磁気ビーズによるウイルス濃縮

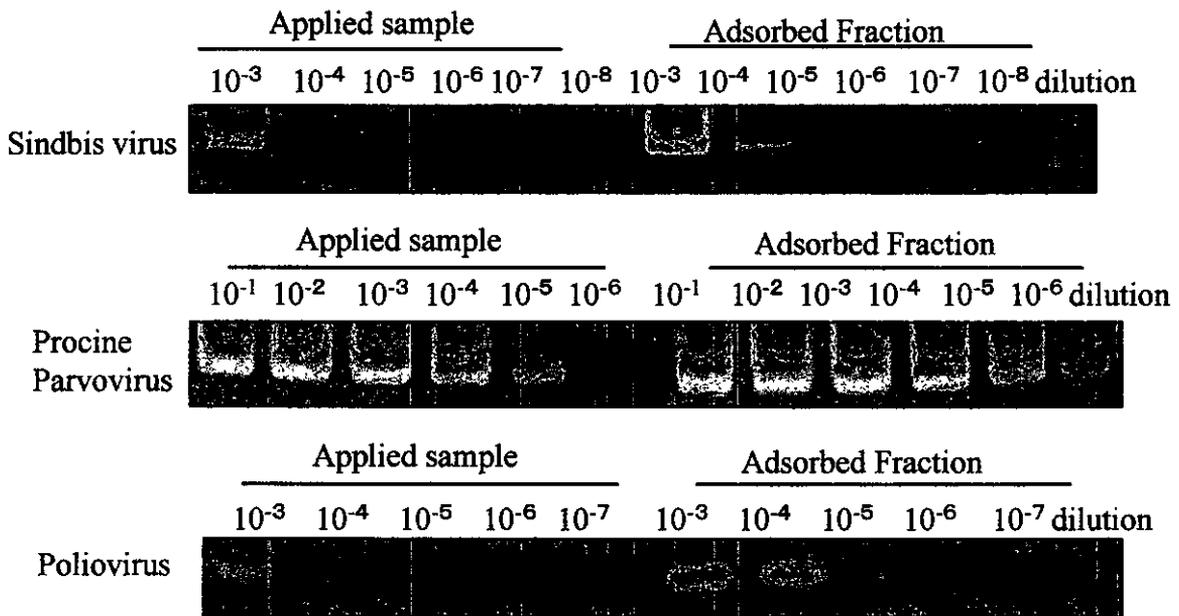


図8. スルホン酸磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

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。

表4. Zn^{2+} イオン存在下にスルホン酸磁気ビーズ処理を行うことによる培養上清中のウイルス感染価の低下.

		Concentration of Infectious Virus ($\times \log_{10}$)
Sindbis virus	Applied Sample	6.5 ± 4.8
	Upper layer treated with PEI-beads	4.3 ± 2.0
PPV	Applied Sample	6.8 ± 5.3
	Upper layer treated with PEI-beads	4.5 ± 2.4
Poliovirus	Applied Sample	7.0 ± 5.7
	Upper layer treated with PEI-beads	3.3 ± 1.5

Means \pm S.D. (n=4)

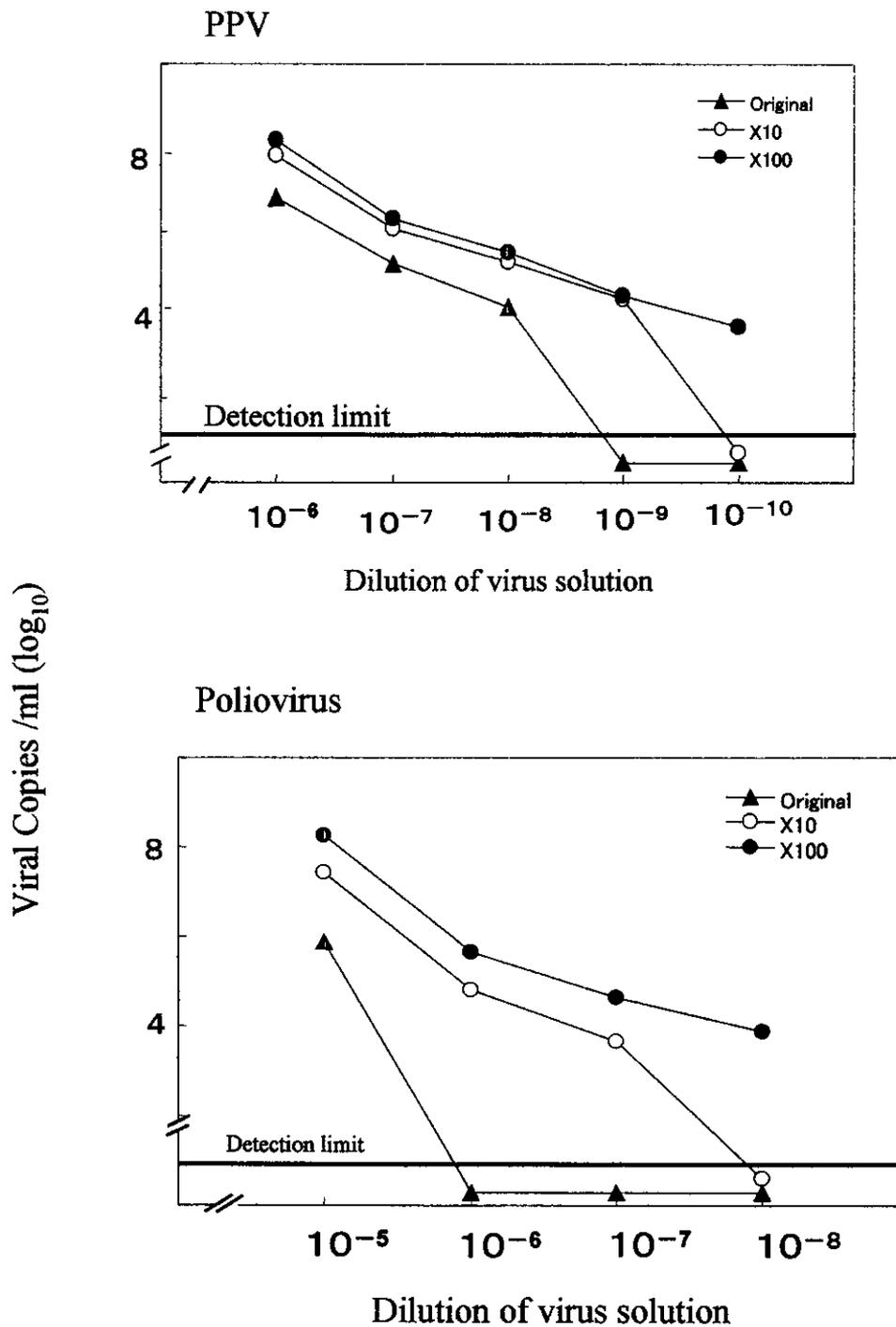


図9. スルホン酸磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

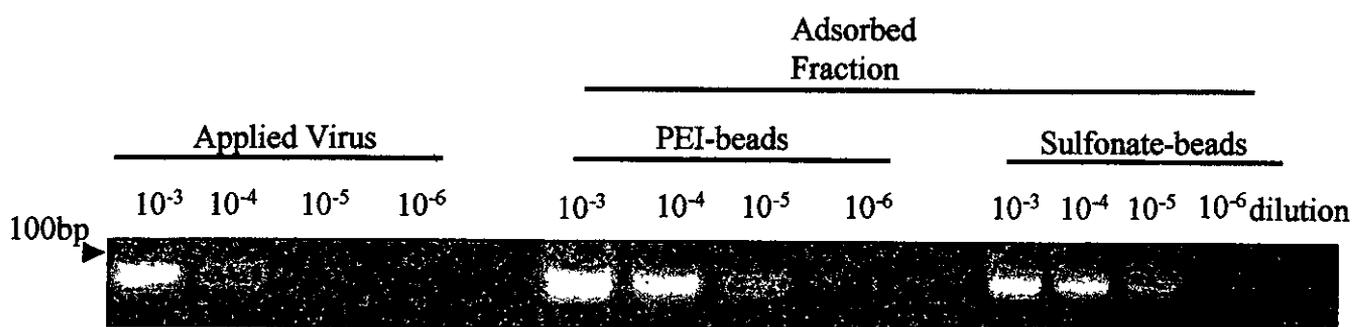


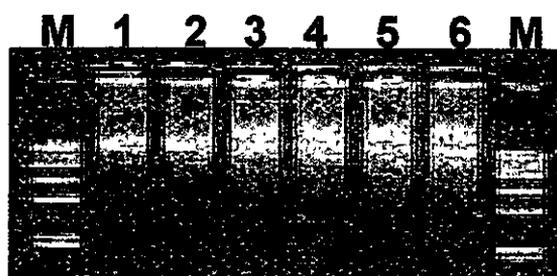
図10. PEI磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたサイトメガロウイルスの濃縮

表5. 白血球からGene Ballを用いて抽出したDNAのイールドと純度

Exp. No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ave.	CV%
DNA (μg)	43	44	43	51	51	50	44	47	45	46	46	6.8
A260/A280	1.98	1.91	1.91	1.92	1.84	1.82	1.94	1.95	1.88	1.80	1.90	3.8
A260/A230	2.00	1.93	1.91	1.82	1.80	1.75	1.87	1.88	1.82	1.88	1.87	3.8

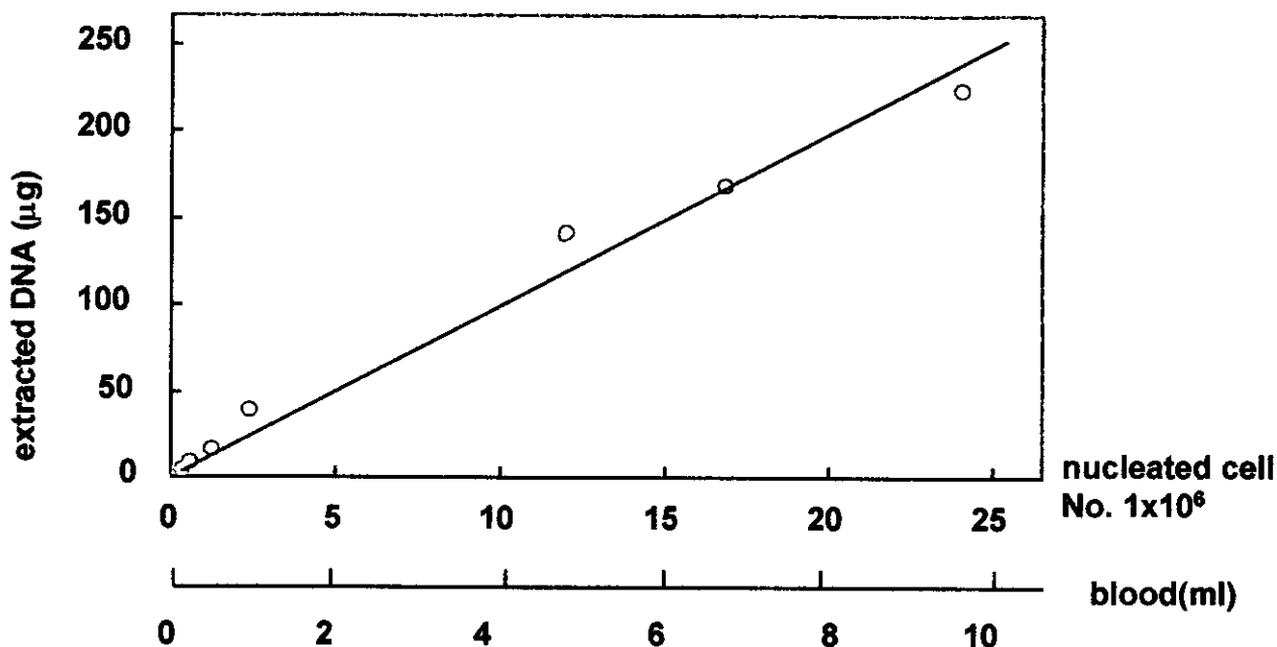
Gene Ball was applied to isolate DNA from 1 ml of human blood from the same individual. 10 tubes were run at the same time.

図11. 白血球からGene Ballを用いて抽出したDNAの1%アガロース電気泳動パターン



M: λ DNA Hind III maker
 1-6: isolated DNA, lane No corresponds to the Run No above.

図12. 白血球数を変えてGene Ballで抽出した時のDNA収量



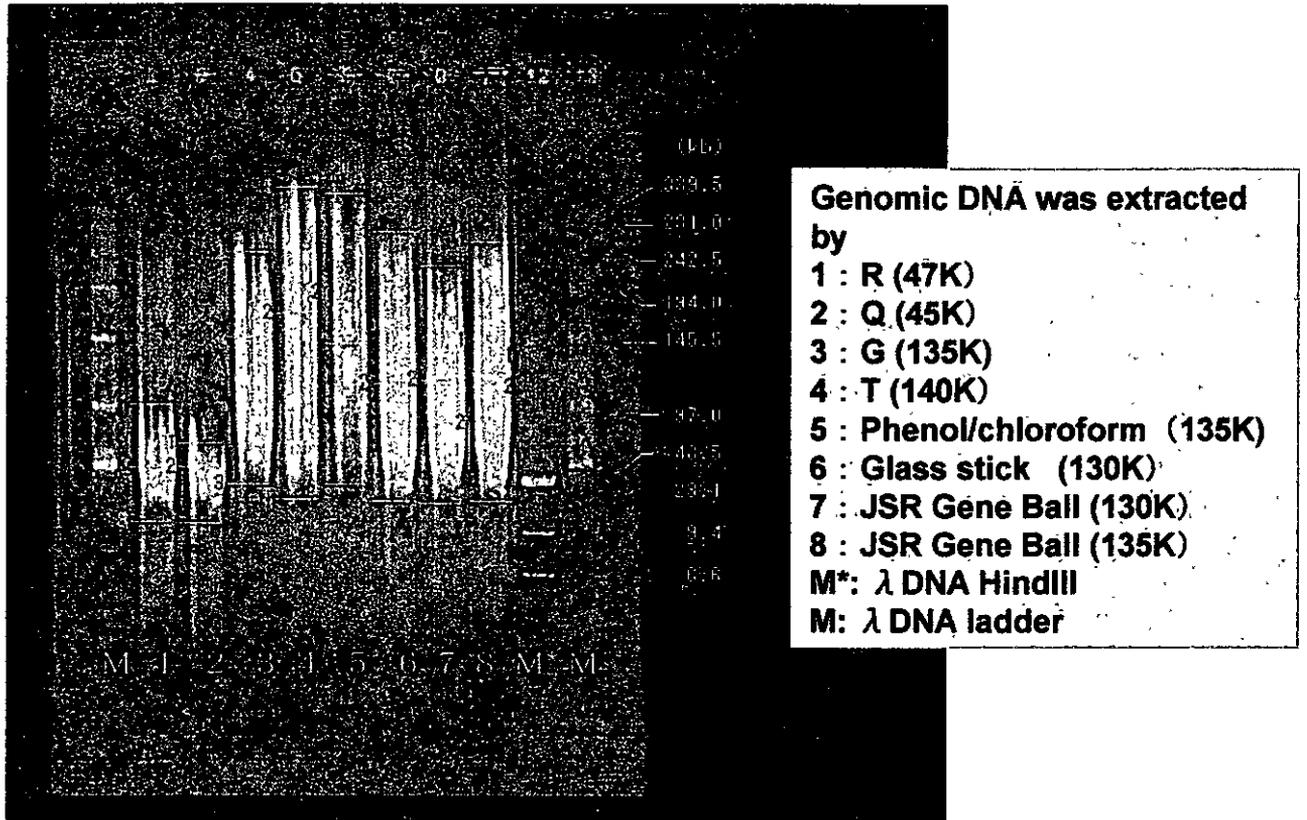
•DNA was isolated from 1ml of whole blood and buffy coat collected from 2-10ml blood by Gene Ball. The OD purity of each point (A260/A280, A260/A230) is larger than 1.8, respectively.

表6. Gene Ball及び市販キットによるDNA抽出の比較

commercial kits	DNA yield(μg)	A260/A280	A260/A230
R	18	1.51	0.61
Q	8	1.92	1.92
T	15	1.56	2.08
G	32	1.68	2.23
Gene Ball	61	2.01	1.99

•DNA was extracted from 1ml of blood of the same individual by using commercial products and Gene Ball.

図13. Gene Ball及び市販キットを用いて抽出したDNAの大きさの比較



• Isolated genomic DNA size was analyzed by pulse field electrophoresis

図14. Poliovirusの感染細胞内での増幅

