

Fig. 19 Saccharin Specific Absorption

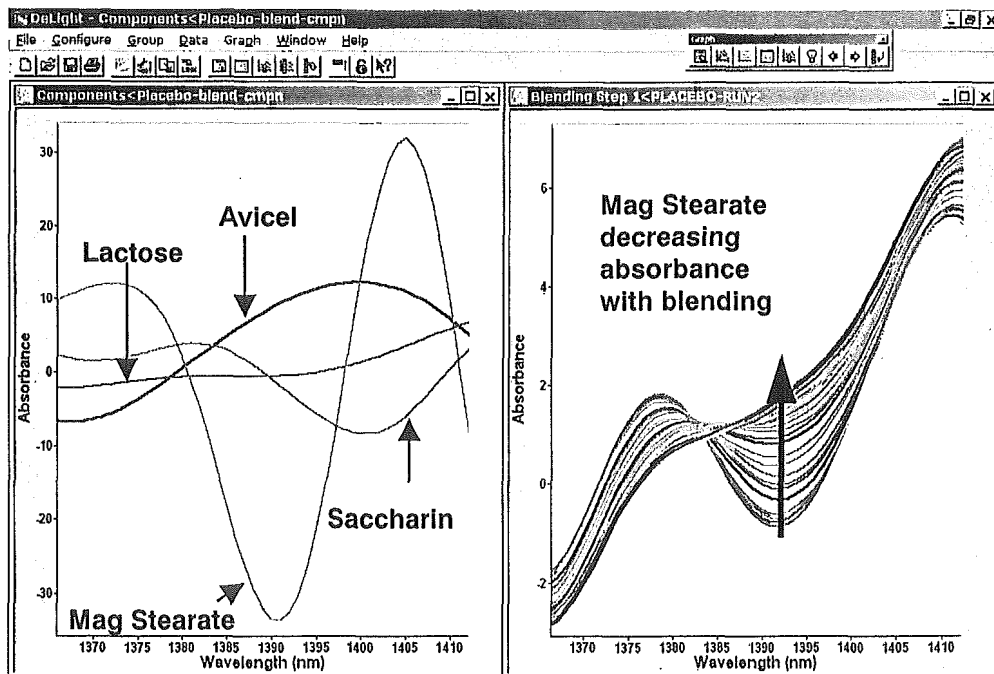


Fig. 20 Magnesium Stearate Specific Absorption

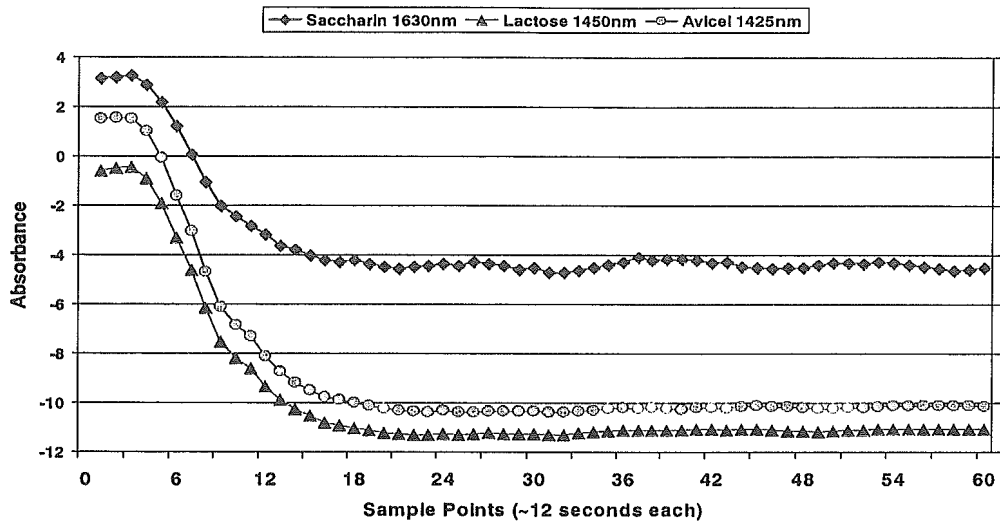


Fig. 21 Absorbance of Blend Components (Step 1)

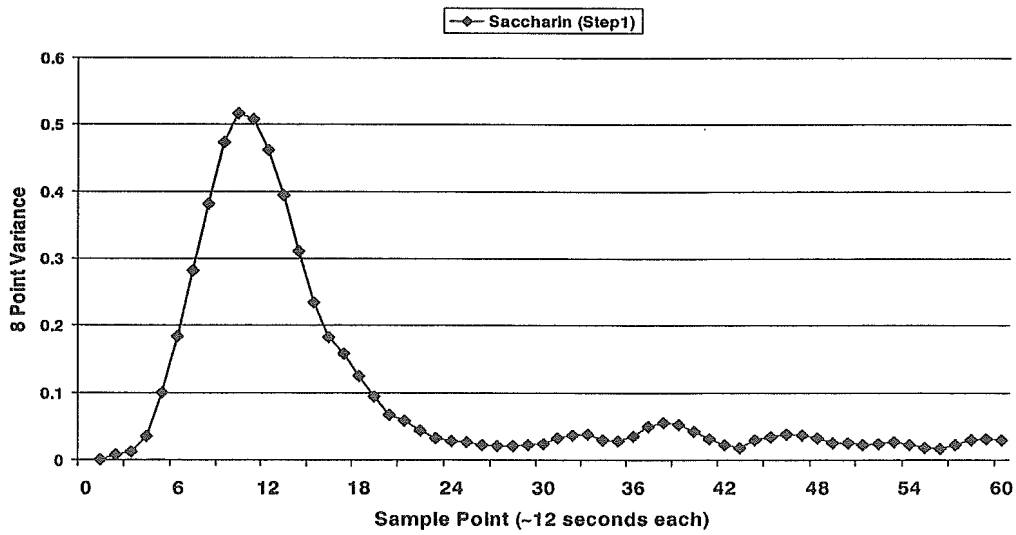


Fig. 22 Saccharin Uniformity (Step 1)

Table 14 試料粉体と配合割合

試料粉体	会社名	配合割合 [%]
主薬	プロベネシド	メルクジャパン 30.0
	アスコルビン酸	武田薬品工業 30.0
乳糖(200M)	DMV	46.5
コーンスターチ	松谷化学	20.0
HPC-L	日本曹達	3.5

Table 15 操作条件 (MP-01)

給気温度	353 K
排気温度	302 K
品温	303 K
スプレー圧	0.15 MPa
加液速度	$2.5 \times 10^{-4}$ kg/s
風量	混合時 $5.56 \times 10^{-4}$ m <sup>3</sup> /s
	造粒時 $1.25 \times 10^{-2}$ m <sup>3</sup> /s
	乾燥時 $1.67 \times 10^{-2}$ m <sup>3</sup> /s
ロータの回転数	混合時 6.67 rps
	造粒時 5.0 rps
	乾燥時 0.83 rps

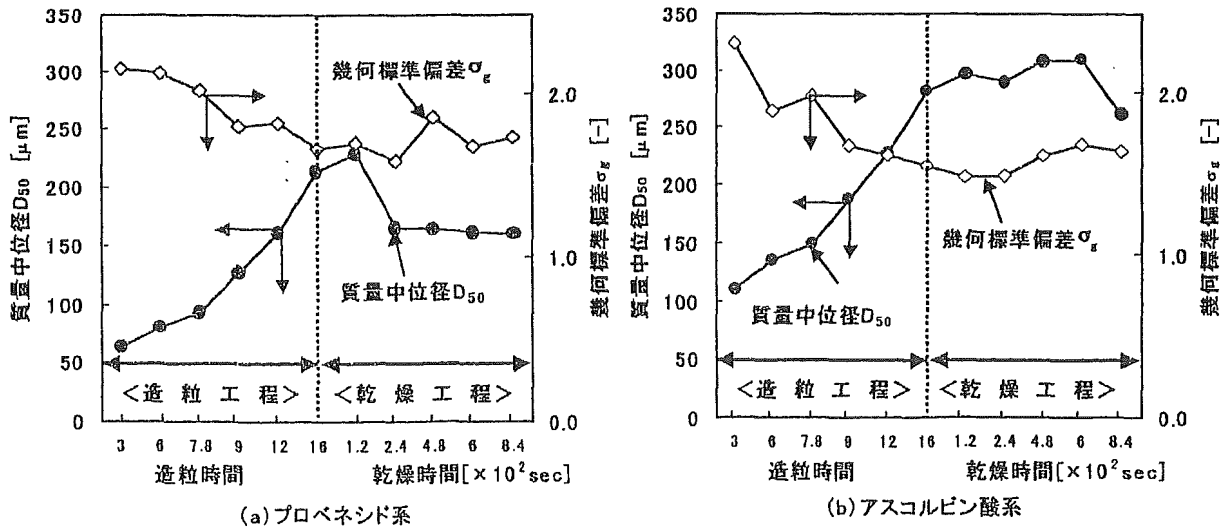


Fig. 23 造粒および乾燥プロセスにおける質量中位径と幾何標準偏差

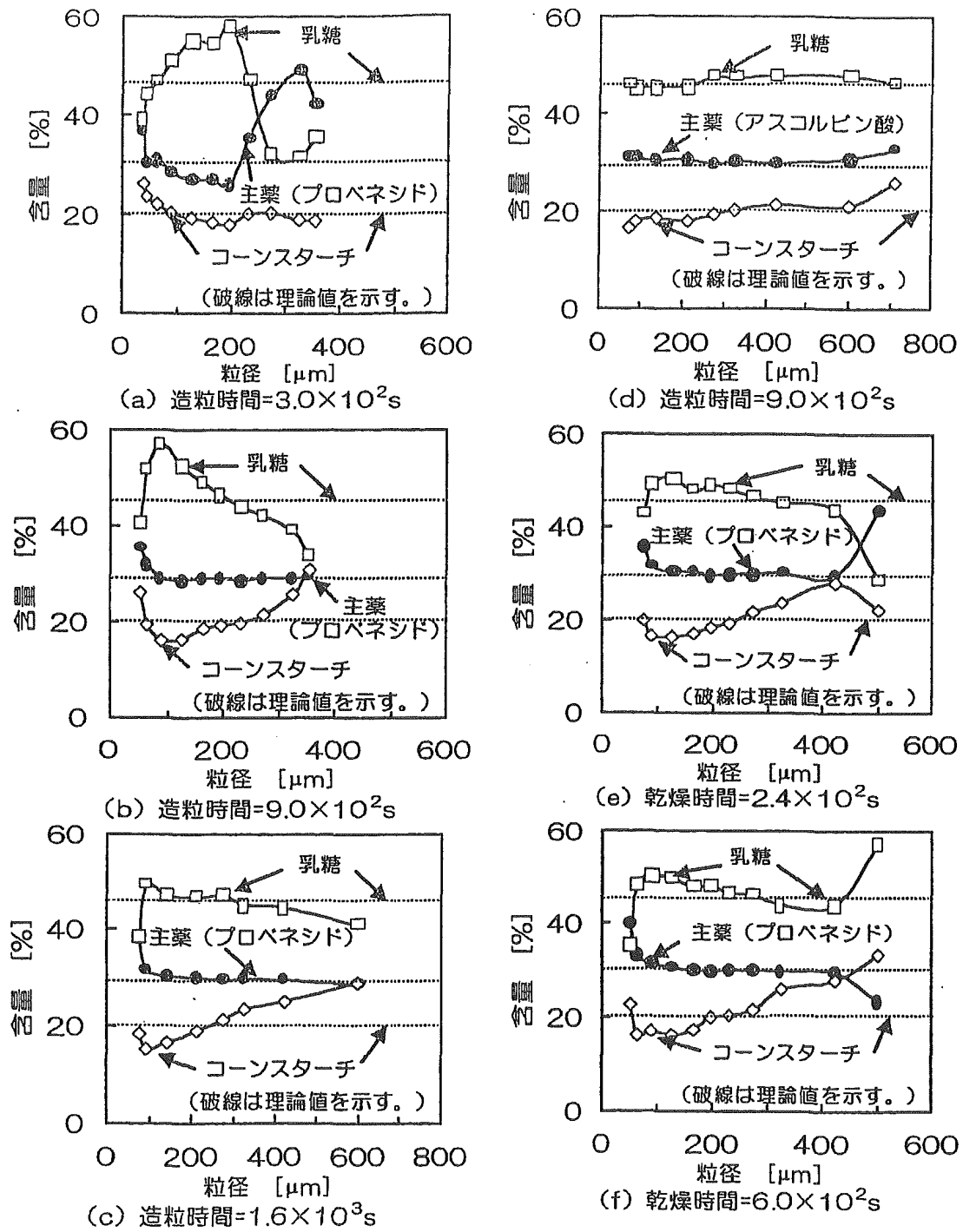
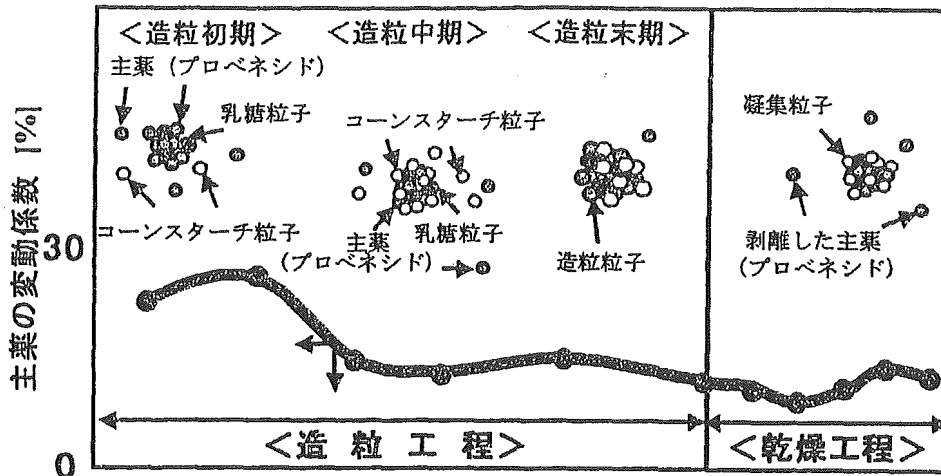
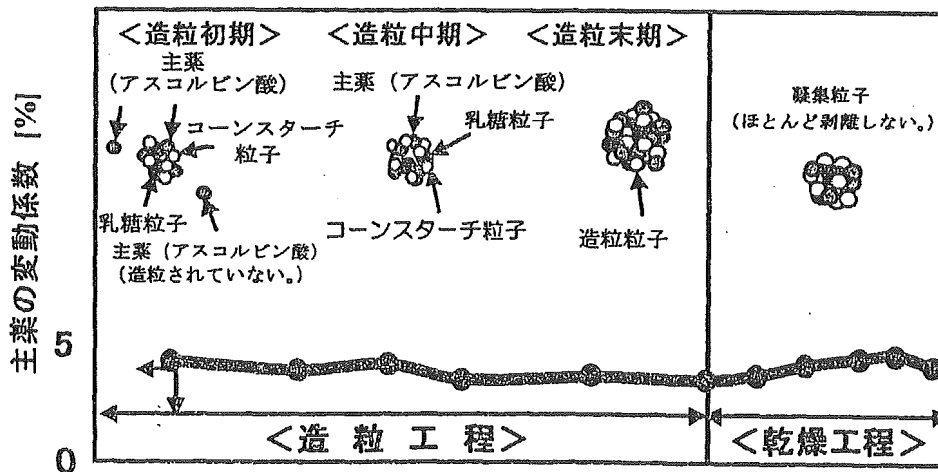


Fig. 24 造粒物の含量と粒径の関係



(a) プロベネシド系



(b) アスコルビン酸系

Fig. 25 粒子の付着・凝集モデル

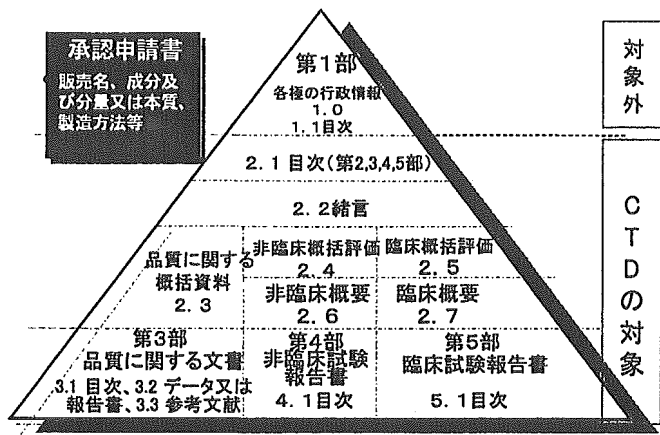
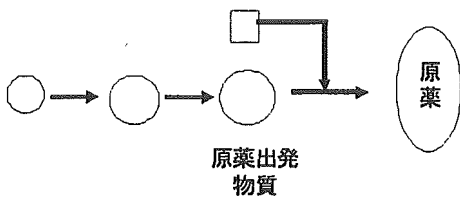


Fig. 26 CTDによる承認申請書および添付すべき資料の構成

Table 16 Q6AおよびQ6Bの適用範囲

ICH/通知	通知名	対象	除外
Q6A/ 平成13年5月1日医薬審発第568号	新医薬品の規格及び試験方法について	化学合成により製造される新有効成分含有医薬品	高分子量のペプチド、ポリペプチド
Q6B/ 平成13年5月1日医薬審発第571号	生物薬品(バイオテクノロジー-応用医薬品/生物起源由来医薬品)	タンパク質発現系から培養により産生され高度に精製され、特性解析可能なタンパク質、ポリペプチド、それらの誘導体 組織及び体液から分離されるタンパク質、ポリペプチドにも適用可能な場合あり	抗生物質、合成ペプチド、ヘパリン、ビタミン、細胞の代謝物、DNAを成分とする医薬品、アレルギー抽出物、従来型ワクチン、細胞、並びに全血および細胞性血液成分



ICH原薬GMPによる原薬出発物質の定義

- ・原薬の製造に使用される
- ・原薬の構造中の重要な構成成分として組み込まれる原料、中間体又は原薬
- ・市販品、委託又は販売契約の下で供給者より購入、自社製造
- ・化学的性質及び構造が明確

Fig. 27 原薬出発物質の考え方

Table 17 第3部に記載すべき事項の項目と配列

3.1 目次

3.2.S 原薬【原薬名、製造業者名】	3.2.P 製剤【製剤名】
3.2.S.1 一般情報	3.2.P.1 製剤及び処方
3.2.S.2 製造	3.2.P.2 製剤開発の経緯
3.2.S.3 特性	3.2.P.3 製造
3.2.S.4 原薬の管理	3.2.P.4 添加剤の管理
3.2.S.5 標準品又は標準物質	3.2.P.5 製剤の管理
3.2.S.6 容器及び施設系	3.2.P.6 標準品又は標準物質
3.2.S.7 安定性	3.2.P.7 容器及び施設系
	3.2.P.8 安定性

3.2A その他

- 3.2A.1 製造施設及び設備
- 3.2A.2 外来性感染性物質の安全性評価
- 3.2A.3 新規添加剤

3.2R 各欄の要求資料 (記載する必要はない)

3.3 参考文献

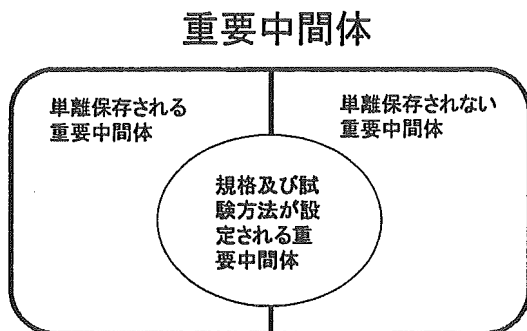


Fig. 28 重要中間体の考え方

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

細胞・組織加工医薬品の品質や安全性確保のための試験法や基準  
についての国際動向の研究

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所  
研究協力者 宮沢 宏 国立医薬品食品衛生研究所  
研究協力者 鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所  
研究協力者 永田龍二 国立医薬品食品衛生研究所  
研究協力者 佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所

細胞・組織加工医薬品の品質や安全性に関する最新の試験法について国際動向を調査研究した。調査研究した試験項目としては、(1)細胞の同一性、純度に関する試験法、(2)細胞のがん化の検出に関する試験法、(3)細胞特性解析法としてのアイソザイム分析、HLA の判定に関する最新の試験法を取り上げた。遺伝的な細胞の同一性、純度に関する試験としては G-バンド分染法や Q-バンド法、R-バンド法、mFISH 法などが有用と考えられるが、精度や感度ばかりでなく、操作性、時間的な制約等を勘案した場合に現時点では最適な試験法というものはないが、製造に要する時間といった製品ごとの制約に応じて試験法を選択すべきと考えられること、また複数の試験法を組み合わせることによりさらに高感度・高精度の試験が可能であることが明らかになった。また、細胞の同一性の確認に関しては、short-tandem-repeat (str) に着目した試験法が非常に有用であると考えられる。がん化細胞の検出法に関しては現時点で十分な感度を持ったものはなく、試験法を組み合わせたり染色体検査等との組み合わせも考慮して試験を行う必要があることが明らかになった。HLA 解析については、血清学試験よりも PCR 法などを利用した様々な有用な DNA 解析法が開発されつつあることが明らかになったがそれぞれの試験法を熟知した上で細胞治療薬に適応することが必要と考えられた。

#### A. 目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や幹細胞研究・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直接投与する医療（細胞治療）の開発が急速に進展している。このような細胞や組織から構成される医薬品や医療用具（細胞・組織加工医薬品等と呼ぶ）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。我が国においても、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は多い。特に、感染性物質の混入やガン等の望ましくない細胞の出現あるいは染色体異常の惹起等を的確に検出するためにどのような試験を行うべきか、またその規制はどうあ

るべきか検討すべき課題は多い。

本年度は、細胞や組織を加工した細胞・組織加工医薬品等の品質、安全性等を確保のための試験法についての最新の技術等を調査研究するとともに、細胞・組織加工医薬品に適応する際の要件について解析した。

## B. 研究方法

本年度は、細胞・組織加工医薬品の品質や安全性に関する試験法について、種々の公表論文等を中心に世界の動向を調査した。特に各試験法の特徴、感度、精度、操作性について詳細に調査し、細胞加工医薬品に適応する際の問題点や今後の課題についても解析した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 細胞組織利用医薬品等の遺伝的同一性、純度試験

細胞の遺伝的同一性、純度試験としては主として染色体解析が行われており、製造を通じて染色体に変化がないが、あるいは細胞集団中に染色体異常を起こした細胞が出現していないことの確認が行われることになる。細胞の染色体解析では、染色体数の計数（分布とモード数）および分染法（G/Q-band 法）等による核型分析が行われており、種々の染色体解析の調査を行った。

#### 1.1 G-バンド分析法(1)

現在最も一般的に用いられている分染法として挙げられるのが G-バンド分染法（GTG法：G-bands by trypsin using Giemsa）である。細胞をコルセミド等を用いて分裂中期で停止させ、酢酸・アルコール固定（カルノア固定）、風乾、そして蛋白分解酵素、塩、熱、洗浄剤、あるいは尿素により緩和に染色体を変性させた後、最後にギムザ染色を施している。得られるバンドパターンは基本的には後述する Q バンド法のパターンとほとんど同様であるが、G-バンド染色法は光

学顕微鏡で観察でき、ギムザ液による染色のため染色後乾燥してもその分染パターンが維持でき濃淡が明瞭であり、より高解像度の染色体バンドが得られる。用いられる蛋白分解酵素としてはトリプシンが一般的である。しかし、染色後のエイジングに長時間を要することやトリプシン濃度、処理温度により、得られる分染パターンに大きな差ができ、また手技者の経験等により大きな差がでるとされている。対象となる細胞は、一般組織・血液・羊水細胞・絨毛細胞・骨髄由来細胞などである。得られた標本を光学顕微鏡で観察するとともに、各染色体バンドの並べ替えもコンピュータ処理により自動化されてきている。染色体解析では、分裂中期の細胞を染色することから、分裂可能な細胞にのみ適応可能であり、分裂をしていない細胞あるいは増殖をほとんどしていない細胞では適応外あるいは適応が困難となる。以上のような点から、現時点では細胞組織加工医薬品等の遺伝的同一性、純度試験としては G-バンド分染法が最初の選択されることが多い。ただし、判定に時間を要することから、短時間での培養工程を経て製造される細胞組織利用医薬品では、出荷前の判定が難しいことから他の短時間で判定可能な手法の採用も考慮すべきであろう。

#### 1.2. Q-バンド解析(2)

DNA と結合する蛍光色素を用いて、細胞を染色すると、各染色体特有に染色体長軸に沿った蛍光の強弱のバンドが見られる。このとき染め出される蛍光バンドを Q バンドという。用いられる蛍光色素としては、アクリジン系の蛍光色素であるキナクリンマスタードやキナクリン 2 塩化水素あるいはヘキスト 3 3 2 5 8 などが用いられている。Q バンド解析では、G-バンド分染法と同様に、コルセミド等の存在下で培養した後、細胞をカルノア固定し、その後適当な蛍光染色を行うことにより観察が可能であり、非常に短時間に解析ができる。Q-バンド解析では、蛍光色素により A-T 対を多く含む DNA 領域が強い蛍光を



発することが知られている。Q-バンド解析は、他の分染法と違い、染色前に熱、薬剤などによる経験を要する前処理が必要ないため、手技者の技能に依存しないで安定した標本ができる。また、Q-バンドの特徴として染色体の特定の部位に特に強い蛍光がみられる。このような強い蛍光が認められる部位は、異型性を示すことが知られている。異型性とは、疾患とは関連がない個人の変異であり、染色のされ方の差異により親子鑑定や、過剰染色体の起源の同定マーカーとして利用できるように、細胞組織加工医薬品等の同一性の判定に利用できると考えられる。異型性は、Y染色体長腕端部、3番4番染色体の着糸点付近、端部着糸点型染色体の短腕と付随体部位で見られる。G-バンド分染法は手技者の経験、天候（梅雨時や乾燥期）によってもその標本でのきは左右され、また時にエイジングに1週間から10日間要し、結果が出るまでに時間がかかりすぎる欠点がある。これに対し、Q-band分染法はエイジングがいらす、標本作成後、直ちにキナクリンマスタード染色をすれば観察が可能であるという簡便さかさから、以前は、かなり一般的にQ-バンド分染法が染色体異常の検査に用いられていた。しかし、解像度はG-バン分染法より劣るため、通常染色体検査としては現在はG-バンド分染法に取って代わられている。しかし、短時間に判定を行う必要がある場合には、現在もQ-バンド分染法も選択肢の一つと考えられる。

### 1.3. R-バンド法(3)

染色体標本を塩類溶液中で加熱後、ギムザ染色するとGバンドにおける濃淡が、ちょうど反転した形のバンドとして検出される。特に、DNA合成後期にBrdU処理した後、コルセミド処理をし、ヘキスト33258染色後、UV照射によりBrdU取り込み部分を破壊する方法は再現性のよいRバンドが得られる。R-バンド法では、fluorescence in-situ hybridization (FISH)法と

組み合わせた遺伝子のマッピングではアクリジンオレンジのような蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡下で目的遺伝子と同時に観察することも行われているが、核型分析としての染色はG-バンド分染法と同様にギムザ染色も行なわれている。ギムザ染色を用いたR-バンド法では、観察は通常の光学顕微鏡で観察でき、また、標本の長期間保存が可能である。最近ではR-バンド分染を行った試料を対象とした画像解析ソフトも開発中である。特にG-バンドと濃淡のパターンが逆になるので、G-バンドで確定できなかった切断点に対して有用であり、また、染色体の端部が濃染されることにより、G-バンドに比べて個々の染色体の大きさの違いをつかみ易いという利点がある。G-バンドでは21番・22番染色体は小さく、時に判別が困難な場合があるが、R-バンドで21番・22番は比較的容易に判別することができる。従って、細胞組織加工医薬品等の同一性の判定に、前述のG-バンド分染法とR-バンド法を組み合わせれることにより、より詳細な細胞遺伝学的同一性の確認が可能と考えられる。

### 1.4. SKY法とM-FISH法(4-8)

様々な蛍光染色試薬の開発や画像解析技術の進歩に基づいてヒト染色体の24種類(22n+XY)を同時に染め分けるSKY法(Spectral karyotyping)やM-FISH法(Multiplex-FISH)が開発されている。これらの方法は由来不明の染色体断片やマーカー染色体の同定などに汎用されている。両者はいずれも、5種類の波長の異なる蛍光色素を利用して各染色体に特異的なプローブを作製する際に5種類の蛍光色素を組み合わせることにより24種類の染色体を分別できるようにすることが特徴である。種々のプローブが市販されているが、蛍光色素を組み合わせるプローブを標識し24種類の染色体を分別するというコンセプトは同じである。しかし、そのパターンの識別の方法や検出法は全く異なっている。

SKY法では、各々の染色体からの蛍光をトリ

プルバンドパスフィルタ - 及び干渉計を通過させ、干渉波として CCD カメラに受光し、デジタル化されて取り込まれる。さらに、デジタル化された干渉波の情報は、フーリエ変換され、縦軸に強度、横軸に波長をとった 2 次元上に展開することにより、各染色体由来の蛍光スペクトルがスペクトルイメージを描くことになる。このイメージの違いによって 24 種類の染色体を識別している。

M-FISH 法では、各々の染色体からの蛍光は、5 種類の蛍光色素と対比染色の DAPI を加えた 6 種類の蛍光色素を別々に区別できるフィルタ - を通過後、6 種類の蛍光色素由来の蛍光をそれぞれ別々にコンピュータ - に取り込み、さらにそれぞれの蛍光ごとに染色体像を重ね合わせ再構築し、再構築された色素の組み合わせパターンから染色体を識別している。以上の両方法とも由来不明のマーカ - 染色体の確定や、転座相手の簡便な確定に、大変有効な手段であるが、同一染色体内の欠失や重複は検出できないという欠点がある。サブテロメア付近の転座も全てが検出できるわけではない。従ってこのような点を改良した手法の開発が望まれている。

以上のように、染色体解析法としては、Q-バンド解析、G-バンド分染法、R-バンド法等染色体を部位特異的な染色パターンから転座、欠失、逆位等を検出する様々な手法が開発されてきている。これらの手法の、解像度に関する欠点や高度な技術を要する点を克服するために、SKY 法や m-FISH 法といったより簡便に染色体の解析を行う方法として開発されてきている。しかし、SKY 法や m-FISH 法により操作の簡便性、迅速性は格段に向上しつつあるが、これらの手法も十分な解像度や精度を持っているわけではなく、より高精度かつ簡便な手法の開発が望まれている。また、細胞組織加工医薬品等への適応に際しては、各種法の特徴を熟知するとともに、適切な手法の選択が必要と考えられる。

#### 1.4. STR マーカ - を用いた細胞の同一性試験

細胞の同一性を確認する手法として近年多用されているのが Short Tandem Repeat (STR) の多型に注目した個別識別技術である (Multi Plex PCR method using Short Tandem Repeat [STR]) (9)。人細胞に適応する場合には、多型が顕著に見られる複数のローカスを選びその領域を増幅する PCR プライマ - を利用して該当する領域を増幅し、各ローカスごとの増幅された 1 ないし 2 本のバンドの長さに基づき同一性の判定を行う。通常、プライマ - セットによって PCR で増幅される DNA の分子長が重ならないようにデザインされており、かつ各プライマ - セットを異なる蛍光色によってラベルされているため増幅産物を混合したままで DNA シークエンサ - を用いたフラグメント解析を行い、増幅した各バンドの長さの組み合わせから同一性を判定することが可能となる。本法を用いることにより、細胞の同一性を精度良く判定することが可能であり、また、他の細胞の混入があった場合にも検出が可能である。通常、9 つのローカスに対するプライマ - セットでの PCR 増幅産物を組み合わせで解析することにより同一性や混入の判定を行うが、さらにターゲットとするローカスを増やすことにより、より詳細な解析が可能となると期待される。

## 2. がん化予測 (あるいはがん細胞検出) 試験 (10-12)

細胞ががん化すると、正常の細胞にない特性を示すようになる。このような以上細胞の特性を解析することにより、細胞のがん化あるいは形質転換を試験する方法として、①無限増殖能の獲得についての試験、②トランスホーム・フォーカス試験、③軟寒天培養試験、④造腫瘍試験が挙げられる。正常細胞は一定の期間しか培養できないが、がん細胞及びトランスフォーム (形質転換) 細胞

は一般に無限増殖能をもっている。いわば細胞の不死化しているというが、細胞組織加工医薬品等の試験に適應するには非常に時間を要するために、あまり適切な試験法とは言えないであろう。

### 2.1. トランスフォーム・フォーカス試験

トランスフォーム・フォーカス試験では、正常細胞は一般に細胞同士が接触する、コンタクトインヒビションと言われる増殖阻害現象が認められ、細胞ががん化あるいはトランスフォームするとこのような接触阻害現象が認められなくなることを原理としている。通常培養を続けて confluent になる正常細胞は一層の細胞シートとなって増殖が停止するが、培養した細胞集団にトランスフォームした細胞が存在すると、接触阻害が起こらずその部位だけが細胞が層状にパイルアップして増えてくるとともに、形態も変化する。このような細胞を、ギムザ染色をするとがん化あるいはトランスフォームした細胞の存在する部分だけがフォーカスを形成して見える。このフォーカスの形成を指標として、細胞のがん化、トランスフォームを評価するのがトランスフォーム・フォーカス試験である。接触阻止現象は、繊維芽細胞の研究から生まれたものであり、必ずしも上皮系の細胞には当てはまらないことを留意しておく必要がある。

### 2.2. 軟カンテン内コロニー形成試験

軟カンテン内コロニー形成能は、繊維芽細胞と上皮細胞に共通してトランスフォームした細胞に認められる現象と考えられている。基質に接着して増殖する多くの細胞は軟カンテンないでは足場がないために増殖できない。細胞のがん化やトランスフォームに伴う現象として、この軟カンテン内での増殖能の獲得がある。このような現象を足場非依存性 (Anchorage-independent growth) という。本法はコロニー形成をさせるまで長期の培養を必要とするために、短期間での

培養しか行わないような細胞組織加工医薬品では適応が難しいこともある。また、軟カンテン内コロニーの形成能と、後述するヌードマウスでの造腫瘍性とは相関しないことも多く、軟カンテン内コロニー形成能を持たないからといってヌードマウスでの造腫瘍性がないとは言えないこともある (13)。造腫瘍性を正確に判定するには他の手法との併用を行うなどの考慮が望ましいと考えられる。

### 2.3. ヌードマウス腫瘍形成試験

軟カンテン内コロニー形成より、より正確にがん化の判定をおこなうとするのがヌードマウスでの腫瘍形成を見る試験である (14)。これは、ヌードマウスに移植した際に、腫瘍を作るかどうかにより、比較的絶対的な判定をすることができるが、結果が出るまで時間がかかること、特にがん化した細胞が非常にわずかのポピュレーションしか含まれないような場合には正確な判定が下せるかという問題もある。

### 2.4. がん遺伝子異常検出試験

がん特異遺伝子の発現を指標とする試験法としては、白血病原因遺伝子としてよく知られているフィラデルフィア染色体やその他のがん遺伝子を検出する手法が適應できる場合もあるかもしれない。フィラデルフィア染色体 (15) など特定の染色体転座が起こっていれば、FISH (クロモソームペインティング) または転座産物特異的 RT-PCR 法にて比較的簡便に検出できる。RT-PCR 法では、細胞集団にごくわずかにがん細胞の混入がある場合にも比較的感度良く検出できる利点がある。これらの検出法は、あらかじめ限られた遺伝子変異が想定される場合のみ適應可能である。また、p53、Ras など癌遺伝子、癌抑制遺伝子などがん関連遺伝子 (16-18) の変異を解析することにより、造腫瘍性を予測できる場

合もあるかもしれない。p53 遺伝子の場合、酵母を用いたアッセイや、抗体を使った検出も可能である(変異型p53蛋白は安定化され蓄積する)。SSCP 法や変異アレル特異的 PCR 法なども、このようながん関連遺伝子の変異の検出に有効であるが、適応範囲が制限される。また、すべてのがん関連遺伝子の変異を調べることは、現実的ではないと思われる。染色体異常を、とらえる場合には G-バンド解析や multicolor-fluorescence in-situ hybridization (m-FISH (SKY)) 法の利用が有用であるが、染色体異常が起こっていることが必ずしもがん化を意味しているわけではないことを念頭においておく必要がある。

細胞集団全体ががん化しているようなケースでは、それぞれの手法の簡便性や迅速性等に問題があるものの、がん化をかなりの確に判定することが可能であるが、細胞組織加工医薬品等の中になぜかにかん化した細胞が出現することを想定した場合、このようながん化細胞を高感度に検出する手法としては、現時点で十分な精度・感度を持った手法は確立されているとは考えられない。従って、現時点では細胞の染色体変異等も含めた解析を行うことが望ましいと考えられる。

### 3. アイソザイム分析(19-20)

アイソザイム分析は主として由来動物種の同定手法として用いられる方法であり、他細胞の混入および取り違えの有無を確認するために行われる分析法である。同一種内の個別の個体由来の細胞を区別したいときは short tandem repeat (str) による多型解析法他の手法を用いる必要がある。一般的に G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase), LDH (lactate dehydrogenase), NP (nucleotide phosphorylase) などの複数の酵素を選び非変性電気泳動とゲル内酵素反応による染色パターンから動物種の特定が行われている。解析に際して、細胞より酵素を失活させないように低温で抽出し、さらに非変性条件下でゲル

電気泳動を行いアイソザイムを分離する。泳動したゲルを用いて発色性の基質を用いてゲル内酵素反応を行うことにより、目的とするバンドの位置を染色して確認する。反応に用いる基質液やゲル等についてはキット化されたものが用いられており、簡便、短時間に細胞の由来動物種を同定することが可能である。ただし特定の細胞株において特異的に発現していることが既知のアイソザイムに関しては、その細胞株の同一動物種由来細胞への混入をアイソザイム分析によって判定することが可能であるが、このようなケースは非常にまれであり通常の細胞組織化行為薬品等の製造ではあまり想定されないと考えられる。

### 4. HLA タイピング

HLA 抗原は免疫機構によって自己・非自己を識別するための細胞の持つ標識の主な構成要素である。従って、輸血および移植時のドナーとレシピエントの組織適合性を検討する場合には HLA 抗原のタイピングを行い HLA の一致したドナー・レシピエント間で移植が行われている。細胞組織加工医薬品等を用いた治療においても、同種由来からの製品を体内に投与し生着を目指す場合には HLA の判定が原則的に必要になると考えられる。生着を目的としない皮膚移植等においては HLA の一致は必要としないとされている。また、角膜上皮幹細胞を増幅させた角膜移植治療などにおいては兄弟間での移植も可能とされていることから、厳密な HLA の一致は必要がない場合もあると考えられている。さらに、臍帯血由来の造血幹細胞の移植治療では大人の造血幹細胞と異なり HLA の一致はそれほど厳密でなくても移植が成立することもあるとされており、HLA をどの程度一致させればいいのか重要な要素となる。しかし、一般に HLA 抗原の適合度の高いほど移植成績が良好である。成人での骨髄移植等の造血幹細胞移植の場合は HLA が完全に一致する必要があるため厳密なタイピ

ングが求められる。特に、成人造血幹細胞移植の際、レシピエントのHLA抗原の片方をドナーがホモ接合体で有している場合、レシピエントはドナー細胞を排除できないが、ドナー細胞はレシピエント組織を非自己と認識し、いわゆるGVHD (Graft versus host disease) が発症するケースが多い。重篤なGVHDは致死的な疾患であり、GVHDの発症を防ぐことが成人での造血幹細胞移植の正否と決定する重要なポイントである。

HLAタイピングの方法としては、大きく分けて従来からの血清学的タイピングと遺伝子解析に基づいたDNAタイピングとがある。血清学的タイピングは生きたリンパ球が必要でありまた等解析が煩雑である等の理由から、近年はDNAタイピングが主流となってきている。DNAタイピングではPCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)、PCR-SSO (sequence-specific oligonucleotide)やPCR-SSP (sequence-specific primers)のように塩基配列のみに依存した方法が使用されてきたが、多数のアリルが存在する上にnon-classicalなHLA遺伝子の存在および偽遺伝子の障害もあり、プライマーの選択が容易ではなく、比較的解析度の低いものとされてきた。近年は塩基配列のみならず核酸のコンフォメーションも指標にした方法やハイスループットな装置による直接塩基配列決定法 (direct sequencing) といった高い解析度のものが開発され、その精度が向上してきている。

#### 4.1. 血清学的タイピング

従来からのHLAのタイピング法として用いられてきたのは、リンパ球を分離後、各HLA特異的な血清(抗体)および補体の添加による細胞溶解反応を指標とする血清学的手法である。細胞障害活性を指標とするために、生存率の高いリンパ球を分離することが重要である。リンパ球の分離法としては、比重の違いによりリンパ球を分離するFicoll-Conray比重遠心法(21)や、抗体を結合させた磁気ビーズを用いてリンパ球を分離する

方法も良く用いられている(22)。後者は、比較的簡単な操作で短時間にリンパ球を分離できることから近年よく用いられている方法である。また、Bリンパ球がナイロンカラムに特異的に吸着することを利用するナイロンカラム法も用いられている(23-24)。

分離したリンパ球に対してHLAに対する各種特異的抗血清(抗体)および補体を処理し、補体の細胞傷害性をエオジン染色もしくは蛍光染色により評価する(リンパ球細胞障害試験(25))。リンパ球の細胞障害を引き起こしたHLA特異的抗体の種類からタイピングを行なう。リンパ球分離によく用いられる磁気ビーズ法では分離したリンパ球に巨大な磁気ビーズをつけているためのエオジン法による光学顕微鏡での判定が行えない。磁気ビーズで分離したリンパ球を用いる場合には蛍光法を用いている。HLA-A、B、C型の判定にはTリンパ球、HLA-DR、DP、DQ型の判定にはBリンパ球を用いる。HLA-D型はドナーのリンパ球とレシピエントのリンパ球を混合培養したのちに決められるため、リンパ球混合反応(mixed lymphocyte reaction)ともいう。混合培養して抗原反応でリンパ球が増殖する場合はHLA-Dが異なるとする。以上のようにHLAの血清学的手法による操作は非常に煩雑であり、また多量の血液を必要とするなどの理由から適応が可能である場合には後述するDNAタイピングが望ましいと考えられる。

#### 4.2. DNAタイピング

DNAシーケンシングが迅速に行えるようになったことや多様PCR関連技術の開発により、近年、DNA配列に基づいた迅速な解析法が用いられるようになってきている。特に、良質な抗血清を入手することが困難なclass II抗原に関してはDNA配列でタイピングを行なうことが多い。

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)法(26)は特定のHLAサブタイプ

において特定の制限酵素が認識する固有の遺伝子変異部が存在する場合、その変異部位をはさむようにプライマーを設計し、増幅した PCR 産物を変異配列を認識する制限酵素で消化して、電気泳動によって切断されてパターンから HLA サブタイプを判定しようとする方法である。変異部を持たない他の HLA サブタイプ由来の PCR 産物は切断されないため DNA の長さを比較することにより目的とする HLA を持つかどうかを簡単に判定できる。ヘテロ接合体では、切断された断片と切断されない断片が観察されることになる。HLA サブタイプごとに異なる制限酵素認識部位が存在する場合は、複数の酵素を用いて切断を行ない、HLA サブタイプの判定を行っている。

PCR-SSP (sequence specific primers) 法(27-28)は、HLA のサブタイプごとに異なる配列を選択し、各サブタイプ特異的なプライマーを用いて PCR 法で増幅する方法である。PCR による増幅の有無によって HLA サブタイプを確認することができる。プライマーの設計に当たっては、プライマーの 3'末端部位に HLA サブタイプ固有の配列がくるようにする。これにより、3'末端が鋳型と相同性のあるプライマーについては PCR 増幅が行われるが、3'末端と鋳型の相同性がない場合には PCR が進行しないようにする。何れのプライマーで増幅されたかをゲル電気泳動で検出することで簡単にタイプが判定できる利点があるが、PCR 産物のサイズのみでの判定では非特異的 PCR 産物による誤判定の可能性も否定できないという欠点がある。厳密な解析を行うには増幅産物のシーケンス等が必要になる場合も考えられる。

PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide) 法(29-33)は HLA サブタイプ特異的な塩基配列に対する合成プローブ (oligonucleotide probe) をフィルターもしくはマイクロプレートにドットされた PCR 産物とハイブリダイズさせ、プロ

ーブと PCR 産物との結合を指標に HLA サブタイプを検出する方法である。また、逆にプローブをドットして、PCR 産物をハイブリダイズするリバースドットブロット (reverse dot blot) 法もある。従来この方法の検出は、放射性同位元素を使用することが欠点であったが、最近では化学発光や発色などによって検出することも可能になってきている。

PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism)法(34)では、PCR 産物の 2 本鎖 DNA を熱やアルカリで処理して変性させた後、得られた 1 本鎖 DNA を変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、泳動度の違いにより HLA の判定を行うとする手法である。1 本鎖 DNA は分子内相互作用によって折り畳まれた立体構造を形成し、その構造の特異性に依存してゲル電気泳動の移動度が変化することを原理としている。エチジウムブロマイドは、2 本鎖 DNA を染色するが、1 本鎖 DNA をほとんど染色しないため、泳動バンドの検出には銀染色が使用される。蛍光色素でプライマーを標識しておくと、DNA 自動シーケンサーが利用できるためハイスループットな解析が可能といわれている。ただし正確な立体構造を解析するには一本鎖 DNA の塩基数が 200~300 でなくてはならない点、電気泳動中の正確な温度制御が必要な点、および同一条件下でも一本鎖 DNA は複数のコンフォメーションを取ることがあり泳動パターンが複雑になる可能性がある点などが欠点として挙げられる。

PCR-RSCA (reference strand conformation analysis)(35-37)は SSCP 法に類似した方法で、HLA の各ローカス特異的なプライマーを用いて PCR により増幅した産物を加熱変性させ、Cy5 などで蛍光標識したリファレンス DNA プローブとアニールさせることによりリファレンス DNA プローブとの相同性の高さによって電気泳動での移動度が異なることを原理としている。

PCR 産物とリファレンス DNA との相同性が高いほどアニーリングの効率がよいが、ミスマッチした塩基対が存在した場合には 2 本鎖 DNA のコンフォメーションが変化する。コンフォメーション変化はミスマッチ塩基対の数と位置によって決定される。リファレンス DNA とアニールした状態の PCR 産物を非変性条件下、DNA 自動シーケンサーを用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離する。電気泳動において 2 本鎖 DNA はコンフォメーションの差によって特有の移動度を示すため、DNA 自動シーケンサーの蛍光検出により測定された移動度により PCR 産物とリファレンス DNA の塩基配列の差異を判定する。PCR-SSCP 等における泳動パターンが非常に複雑になるという欠点があるが、本法をもちいることによりその問題を軽減することができる。

PCR-RFLP 法や PCR-SSP 法は非常に短時間にかつサーマルサイクラー程度の機器があれば解析可能であるが、得られた PCR 増幅産物あるいはその酵素切断断片の大きさでのみ判定するため非特異なバンドの出現を排除できないと言った欠点がある。Nested PCR あるいは他の特異性を高める手法を組み合わせることにより、より精度の高い手法となる可能せいがある。一方、他の手法はプローブを用いることなどにより特異性を高める工夫がされているが、かなり手法が煩雑と言った欠点がある。従って、細胞・組織加工医薬品に適応する際には、対象とする細胞等での非特異反応の有無をあらかじめ検討し、試験法を選択することが望ましいと考えられる。

#### 4.3. マイナー抗原 (38-40)

マイナー抗原は HLA 同様に同種多様性をもち、HLA 分子上に多型抗原ペプチドとして提示される。マイナー抗原の機能は HLA 拘束性を持ち (通常は HLA class I 拘束性)、その発現は臓器または組織特異性を示す。マイナー抗原は数十

から数百個あると想定されているが、現時点では数個程度しか確認されていない。このため、マイナー抗原を含めて完全に一致したドナー細胞を探すことは不可能と考えられる。しかし、マイナー抗原の一種 HA-1 のミスマッチは HLA の適合したドナーからの骨髄移植においても T 細胞レセプターにより認識され、GVHD (Graft versus host disease) を引き起こす要因として知られている。したがって、増幅した造血肝細胞を用いた細胞組織加工医薬品等の適応において HA-1 のタイピングを行うことがその安全性を高めるために必要かもしれない。

#### 結論

細胞・組織加工医薬品の品質や安全性に関して、(1)細胞の同一性、純度に関する試験法、(2)細胞のがん化の検出に関する試験法、(3)細胞特性解析法としてのアイソザイム分析、HLA の判定に関する最新の試験法を取り上げて調査研究を行った。遺伝的な細胞の同一性、純度に関する試験としては G-バンド分染法や Q-バンド法、R-バンド法、mFISH 法などが有用と考えられるが、精度や感度ばかりでなく、操作性、時間的な制約等を勘案した場合に現時点では最適な試験法というものはないが、製造に要する時間といった製品ごとの制約に応じて試験法を選択すべきと考えられること、また複数の試験法を組み合わせることによりさらに高感度・高精度の試験が可能であることが明らかになった。また、細胞の同一性の確認に関しては、str に着目した試験法が非常に有用であると考えられる。がん化細胞の検出法に関しては現時点で十分な感度を持ったものはなく、試験法を組み合わせたり染色体検査等との組み合わせも考慮して試験を行う必要があることが明らかになった。HLA 解析については、血清学試験よりも PCR 法などを利用した様々な有用な DNA 解析法が開発されつつあることが

明らかになったがそれぞれの試験法を熟知した上で細胞治療薬に適應することが必要と考えられた。

#### 参考文献

- 1) Wang, HC.: Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biol*, 235, 1972
- 2) Caspersson, T., et al.: The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes distinguishing characters and variability. *Hereditas*, 67: 89-102, 1971
- 3) Sahar, E., Latt, S.A.: Enhancement of banding patterns in human metaphase chromosomes by energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5650-5654, 1978
- 4) Speicher MR, Ballard SG, Ward DC.: Karyotyping human chromosomes by combinational multi-fluor FISH. *Nature Genet*, 12, 368-375, 1996
- 5) Eils R, Uhrig S, Saracoglu K, Satzler K, Bolzer A, Peterson I, Chasery JM, Gancer M, Speicher MR.: An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosome rearrangements by Multiplex-FISH(M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* 82: 160-171, 1998
- 6) Schrock E et al.: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273, 494-497, 1996
- 7) Seabright M.: A rapid technique for human chromosomes. *Lancet* 2, 971-972, 1971
- 8) Schrock, E. et al.: Multicolor spectral karyotyping of human chromosome. *Science* 273, 494-497 (1996)
- 9) Tanabe, H., Takada, Y., Minegishi, D., Kurematsu, M., Masui, T., and Mizusawa, H.: Cell line individualization by STR multiplex system in the cell bank found cross contamination between. *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 18: 329-338, 1999.
- (10) Transformation assay of established cell lines: mechanisms and application. Proceedings of a workshop organized by IARC in collaboration with the US National Cancer Institute and the US Environmental Protection Agency. Lyon, 15-17 February 1984.
- (11) *IARC Sci Publ.* 1985, 67: 1-225.
- (12) Klein JC. How selective are agar cultures for malignant transformation? *Arch Geschwulstforsch.* 1981, 51: 58-62.
- (13) Kurokio, T.: *Method in Cell Biology*, vol. IX., Academic Press Inc., 157-178 (1975)
- (14) Smith GJ, Bell WN, Grisham JW. Clonal analysis of the expression of multiple transformation phenotypes and tumorigenicity by morphologically transformed 10T1/2 cells. *Cancer Res.* 1993, 53: 500-8.
- (15) Barnes DJ, Melo JV.: Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol.* 2002, 108: 180-202.
- (16) Pearson PL, Van der Luit RB.: The genetic analysis of cancer. *J Intern Med.* 1998, 243: 413-7.
- (17) Ishioka C, Frebourg T, Yan YX, Vidal M, Friend SH, Schmidt S, Iggo R: Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat Genet.* 1993, 5: 124-129.
- (18) Hammel P, Leroy-Viard K, Chaumette MT, Villaudy J, Falzone MC, Rouillard D, Hamelin R, Boissier B, Remvikos Y.: Correlations between p53-protein accumulation, serum antibodies and gene



- mutation in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 1999, 81: 712-8. (19) O'Brien SJ, Shannon JE, Gail MH. :A molecular approach to the identification and individualization of human and animal cells in culture: isozyme and allozyme genetic signatures. *In Vitro*. 1980 16, 119-135.
- (20) Nelson-Rees WA, Daniels DW, Flandermeyer RR.: Cross-contamination of cells in culture. *Science*. 1981 212, 446-452. .
- (21) Clouse K, Adams P, Sheridan J, Orosz C. :Rapid method for purification of human T lymphocytes for further functional studies. *J Immunol Methods*. 1987 Dec 24;105(2):253-62.
- (22) Vartdal F, Gaudernack G, Funderud S, Bratlie A, Lea T, Ugelstad J, Thorsby E. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation--a fast and reliable technique. *Tissue Antigens*. 1986 Nov;28(5):301-12.
- (23) Eisen SA, Wedner HJ, Parker CW. : Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunol Commun*. 1972;1(6):571-7. .
- (24) Lowry RP, Person AE, Goguen JE, Carpenter CB, Garovoy MR. : Technical modifications for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity versus separated T and B lymphocytes: T- and B-cell separation by nylon wool columns. *Transplant Proc*. 1978 Dec;10(4):833-7. .
- (25) Dyer PA, Martin S. : Techniques used to define human MHC antigens: serology. *Immunol Lett*. 1991 Jul;29(1-2):15-21. . (26) Nomura N, Inoko H, Kato S, Arimori S, Ota M, Tsuji K. : PCR-RFLP: a new HLA-DNA typing method tested in bone marrow transplantation. *Transplant Proc*. 1991 23:431-433. .
- (27) Olerup O, Zetterquist H. : DR "low-resolution" PCR-SSP typing--a correction and an up-date. *Tissue Antigens*. 1993 41:55-56. .
- (28) Olerup O, Zetterquist H. : HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992 39:225-235.
- (29) Wordsworth P.: PCR-SSO typing in HLA-disease association studies. :*Eur J Immunogenet*. 1991 18:139-46.
- (30) Clay TM, Howard MR, Bidwell JL, Bidwell EA, Raymond PA, Evans JE, Bradley BA. : PCR-SSO typing for DR4-Dw subtypes: application to unrelated bone marrow transplant donor selection. *Eur J Immunogenet*. 1991 18:97-104.
- (31) Howell WM, Sage DA, Haegert DG, Evans PR, Smith JL.: PCR-SSO typing for HLA-DPB alleles. *Eur J Immunogenet*. 1991 18:81-95. .
- (32) Vaughan RW. : PCR-SSO typing for HLA-DRB alleles. *Eur J Immunogenet*. 1991 18:69-80.
- (33) Doherty DG, Donaldson PT.: HLA-DRB and DQB typing by a combination of serology, restriction fragment length polymorphism analysis and oligonucleotide probing. *Eur J Immunogenet*. 1991 18:111-24.
- (34) Hoshino S, Kimura A, Fukuda Y, Dohi K, Sasazuki T.:Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: a simple, economical, and rapid method

for histocompatibility testing. *Hum Immunol.* 1992 33:98-107.

(35) Ramon DS, Arguello JR, Cox ST, McWhinnie A, Little AM, Marsh SG, Madrigal JA. :Application of RSCA for the typing of HLA-DPB1. *Hum Immunol.* 1998 59(11):734-47.

(36) Arguello JR, Little AM, Bohan E, Gallardo D, O'Shea J, Dodi IA, Goldman JM, Madrigal JA. :A high resolution HLA class I and class II matching method for bone marrow donor selection. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Sep;22(6):527-34.

(37) Arguello JR, Little AM, Bohan E, Goldman JM, Marsh SG, Madrigal JA. : High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA). *Tissue Antigens.* 1998 Jul;52(1):57-66.

(38) Wilke M, Pool J, den Haan JM, Goulmy E. Genomic identification of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus by allele-specific PCR. *Tissue Antigens.* 1998 52:312-7.

(39) den Haan JM, Meadows LM, Wang W, Pool J, Blokland E, Bishop TL, Reinhardus C, Shabanowitz J, Offringa R, Hunt DF, Engelhard VH, Goulmy E. The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science.* 1998 279:1054-1057.

(40) Tseng LH, Lin MT, Martin PJ, Pei J, Smith AG, Hansen JA. : Definition of the gene encoding the minor histocompatibility antigen HA-1 and typing for HA-1 from genomic DNA. *Tissue Antigens.* 1998 52:305-11.

#### 論文発表

1) K. SATOH, A. IWATA, M. MURATA, M. HIKATA,

T. HAYAKAWA, T. YAMAGUCHI; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Virol. Method.* , (in press)

2) 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 *Biochem. Pharm.* (in press)

3) 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)

4) Sachiko Matsui, Sachiko Matsumoto, Reiko Adachi, Kaoru Kusui, Akiko Hirayama, Hidemi Watanabe, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Teruhide Yamaguchi, Tadashi Kasahara, and Kazuhiro Suzuki : 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)

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) 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ィスタディ、**医薬品研究**、33、275-284 (2002)
- 7) 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**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— 33、210-230 (2002)
- 8) 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)

#### 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、京都、平成14年4月18日
- 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。東京、平成14年7月3日
- 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細胞中球分化亢進と増殖促進におけるPKC $\epsilon$ の役割。第75回日本生化学大会。京都、平成14年10月15日
- 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参与するタンパク質の解析。第75回日本生化学大会。京都、平成14年10月15日
- 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

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向に関する研究  
—アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスの迅速高感度検出法の開発—

分担研究者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部第一室長  
協力研究者 石井(渡部)明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向を踏まえた研究として、アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルス (RCA) の迅速高感度検出法について検討した。RCA を一度細胞に感染増幅させた後、リアルタイム定量 PCR で検出を行う Infectivity PCR 法と、ガラスビーズを用いた細胞からの DNA 抽出法を組み合わせることによって、従来の細胞変性効果を指標とした RCA 検出法と比較して、より短時間でより高感度に RCA の定量的測定が可能であることを明らかにした。

#### A. 研究目的

疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与する遺伝子治療は、バイオテクノロジーやゲノム科学の進歩を基礎にした革新的な医療技術として期待されている。遺伝子治療は先天性の遺伝性疾患や悪性腫瘍など、現在有効な治療法が確立されていない疾患に対して画期的な治療法となることが期待されるばかりでなく、いわゆる成人病などのより一般的な疾患に対しても応用が検討されている。しかし、遺伝子治療はまだ治療法として確立されていない実験的医療の段階である。遺伝子治療に用いられる遺伝子治療用医薬品は従来の医薬品にはない画期的な作用機序による治療効果が期待される一方で、新技術の利用に起因する安全性に関する危険性も否定できない。遺伝子治療の実用化を推進するためには遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保、使用段階での安全性の確保が重要となる。遺伝子治療のように学問・技術が急速に進歩している分野においては、特にこれらの医

薬品の開発、臨床研究の進展が著しい外国での学問・科学の進歩を踏まえ、国際的な水準からみた安全性確保方策の科学的妥当性について絶えず評価・検証する必要がある。

本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝子治療に関する国際的動向、安全性確保方策の進展を調査し、我が国の遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保に寄与する基礎的研究を行うものである。本年度はアデノウイルスベクターの品質管理、安全性確保上重視される、ベクターに混入する増殖性アデノウイルス (Replication-competent adenovirus; RCR) の検出法について検討し、Infectivity PCR 法と、ガラスビーズによる細胞からの DNA 抽出法を組み合わせることによって、従来の細胞変性効果を指標とした RCA 検出法と比較してより短時間でより高感度に RCA の定量的測定が可能であることを明らかにした。

#### B. 研究方法

##### 1. ウイルス、細胞