

Fig. 2. Effects of rapamycin and wortmannin on p70/p85 S6K activation and 4E-BP1 phosphorylation. (A) Protein 70/p85 S6K activity in Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells obtained from DMSO-treated cells. After the addition of G-CSF, both cells were disrupted in lysis buffer, and p70 S6K was immunoprecipitated from the cell lysate with the anti-p70 S6K antibody. A kinase assay was performed using the immunocomplexes. (B) Effects of rapamycin and wortmannin on G-CSF-induced p70/p85 S6K activity of HL-60 cells. Two days after culture with DMSO, HL-60 cells were incubated with rapamycin (R) or wortmannin (W) for 30 min, and then stimulated by G-CSF for 60 min. The kinase assay was performed as described in (A). The y-axis of p70/p85 S6K activity represents the radioactivity of the ³³P-S6 peptide as the degree of photon-stimulated luminescence (PSL). Quantitation of p70/p85 S6K was performed using data from three separate experiments. Columns and bars represent the means \pm SD (* P < 0.05; ** P < 0.01). (C) Protein level of 4E-BP1 in Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells and effect of G-CSF on 4E-BP1 and p70/p85 S6K phosphorylation of HL-60 cells. Left, upper is an illustration of the Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells immunoblotted with 4E-BP1. The expression of p85 PI3K protein was analyzed as a loading control (left, lower). 4E-BP1 (right, upper), p85 S6K (right, middle), and p70 S6K (right, lower) phosphorylation was examined by mobility shift on protein immunoblots with each antibody. Two days after differentiation, HL-60 cells were treated with rapamycin (R) and wortmannin (W) before addition of G-CSF (G).

Next, to clarify the role of PI3K in p70 S6K activity, wortmannin, a specific inhibitor of PI3K, was added before the addition of G-CSF. In contrast to rapamycin, wortmannin partially inhibited the activity of p70 S6K in Trf-R⁺ cells (Fig. 2B). As reported previously [5], the same concentration of wortmannin completely inhibited PI3K, suggesting that PI3K may partially regulate p70 S6K.

In order to investigate the role of mTOR, the effects of rapamycin and wortmannin on phosphorylation of 4E-BP1 in DMSO-treated HL-60 cells were determined. 4E-BP1 phosphorylation is regulated by mTOR. Rapamycin binds to FKBP 12 and inhibits p70 S6K binding to a molecule termed mTOR (FRAP or RAFT). Addition of rapamycin inhibits protein synthesis and, more specifically, translation of mRNAs encoding ribosomal proteins, suggesting that p70 S6K and S6 are important in these events. However, rapamycin also inhibits phosphorylation of 4E-BP1, which is another regulatory molecule for mRNA translation.

Rapamycin induces accumulation of the dephosphorylated species of 4E-BP1 that binds to the translation initiation factor eIF-4E and suppresses translation initiation of cap-dependent mRNAs via inhibition of mTOR. The amount of 4E-BP1 proteins in Trf-R⁺ cells was higher than that in Trf-R⁻ cells (Fig. 2C, left, upper), as was the case with p70 S6K. There was no difference in the expression of p85 PI3K, a loading control, in both types of cells, as we previously reported [5] (Fig. 2C, left, lower). On the other hand, there was no difference in the phosphorylation of 4E-BP1 of HL-60 cells 2 days after DMSO-differentiation between the control and the G-CSF-treated cells (Fig. 2C, right); rapamycin and wortmannin inhibited the phosphorylation of 4E-BP1. In contrast, phosphorylation of both p70 S6K (Fig. 2C, right bottom) and p85 isoforms of S6K (Fig. 2C, right middle) were enhanced by G-CSF, inhibited completely by rapamycin, and inhibited partially by wortmannin in accordance with their respective activities (Fig. 2B). These data indicated that G-CSF-induced

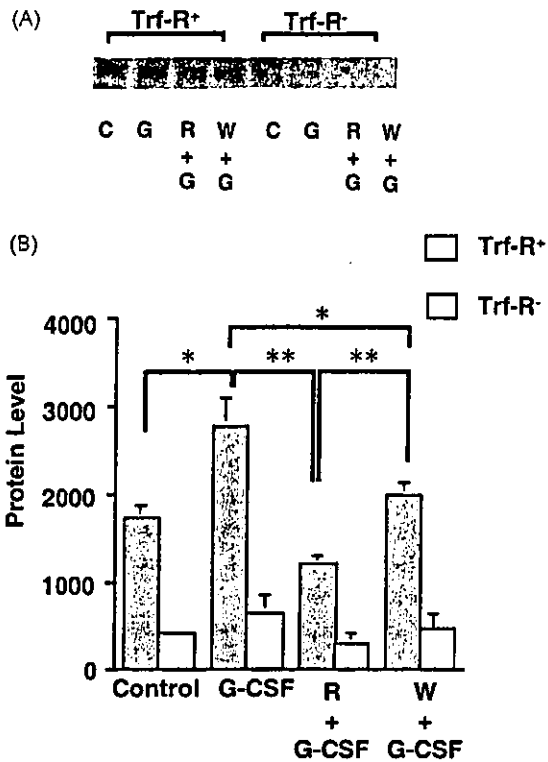


Fig. 3. Effects of rapamycin and wortmannin on G-CSF-induced c-Myc protein expression in Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells. (A) Effects of rapamycin (R) and wortmannin (W) on the expression of c-Myc protein induced by G-CSF (G) for 7 hr was analyzed by immunoblotting with an anti-c-Myc antibody. (B) Quantitation of G-CSF-induced protein was performed using data from three separate experiments. Open columns denote Trf-R⁻ cells and gray columns Trf-R⁺ cells. Columns and bars represent the mean \pm SD (* P < 0.05; ** P < 0.01).

proliferation mainly depends not on mTOR but on p70 S6K (also the p85 isoforms).

3.3. The role of c-Myc in events DownStream from p70 S6K

It has been reported that c-Myc expression is regulated at a position downstream from p70 S6K [19]. Antisense oligonucleotide to c-myc mRNA induced the differentiation of HL-60 cells [13–15]. To clarify the role of c-Myc in the G-CSF-induced enhancement of differentiation and proliferation in DMSO-treated HL-60 cells, the expression of c-Myc was determined by Western blotting. Figure 3A shows a typical pattern of c-Myc expression at 7 hr after the addition of G-CSF, and the density of each band was quantitated by the NIH Image program (Fig. 3B). Under all conditions, the expression of c-Myc in Trf-R⁺ cells was much greater than that in Trf-R⁻ cells. G-CSF significantly induced an enhancement of c-Myc expression in Trf-R⁺ cells (*; P < 0.05). Rapamycin completely inhibited G-CSF-induced expression of c-Myc (**; P < 0.01), while wortmannin only partially inhibited the G-CSF-induced increase in c-Myc expression (*; P < 0.05). These data suggest that the expression of c-Myc is regulated downstream from p70 S6K, but is partially regulated by PI3K.

We next examined the effects of the c-Myc on the proliferation and differentiation of Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells using an antisense nucleotide for c-myc. The sequences of antisense and sense oligodeoxynucleotides have been reported previously by Heikkilä *et al.* [20]. Figure 4A

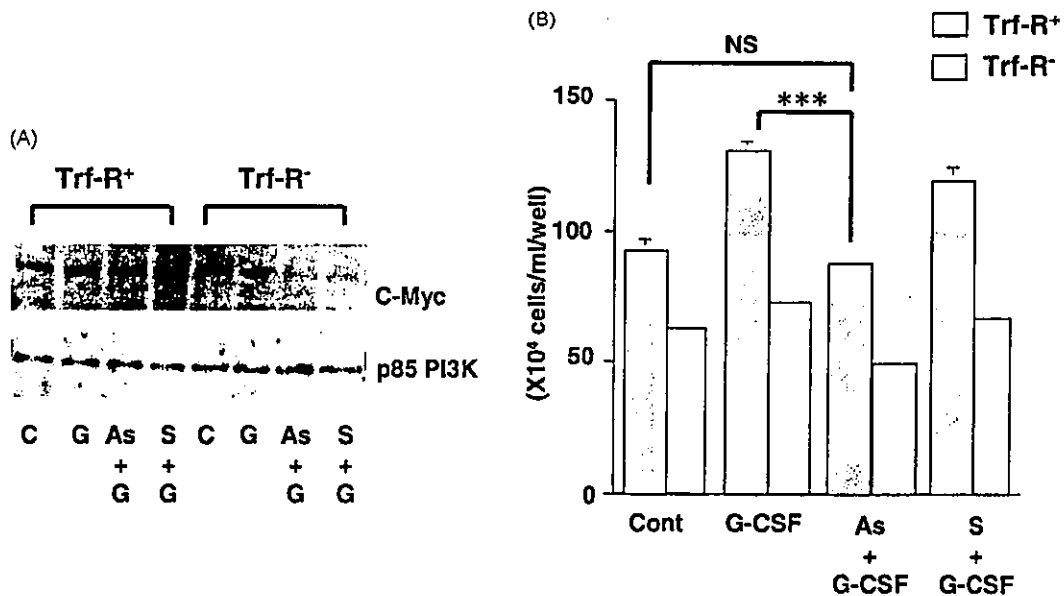


Fig. 4. Effects of c-myc antisense oligonucleotides on G-CSF-induced c-Myc protein expression and proliferation in Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells. (A) Cells were treated with 10 mM c-myc sense (S) or antisense (As) oligonucleotides. Seven hours after the addition of G-CSF (G), the expression of c-Myc protein was determined by Western blotting analysis (upper). The expression of p85 PI3K protein was used as a loading control (lower). (B) The proliferation assay was determined. Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells were treated with 10 mM antisense oligonucleotides (As) or sense oligonucleotides (S), and then subsequently cultured with G-CSF. The cell number after 5 days of culture was examined. Open columns denote Trf-R⁻ cells and gray columns Trf-R⁺ cells. Columns and bars represent the mean \pm SD of triplicate wells (** P < 0.001; NS, not significant).

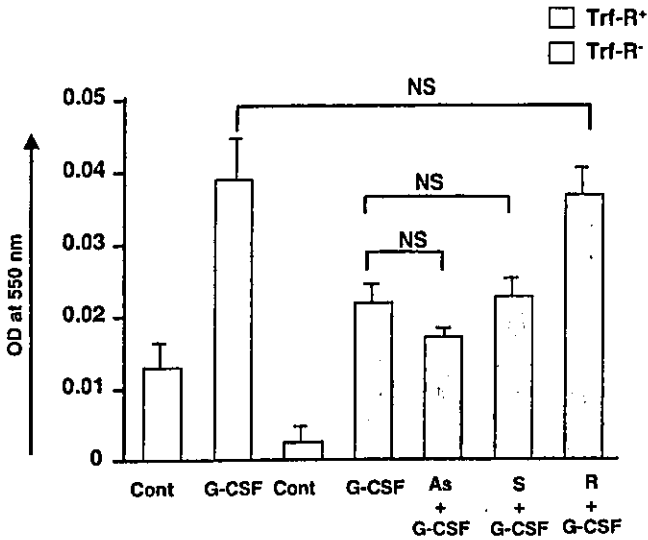


Fig. 5. Comparison of rapamycin or *c-myc* antisense oligonucleotide effects on G-CSF-induced O_2^- production in Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells. Cells were treated with rapamycin (R), sense (S) or antisense (As) oligonucleotides, and were subsequently cultured with G-CSF. O_2^- -generating activity stimulated by opsonized zymosan was examined after 5 days of culture using the ferricytochrome *c* reduction assay. Open columns denote Trf-R⁻ cells and gray columns Trf-R⁺ cells. Columns and bars represent the mean \pm SD of triplicate wells (NS, not significant).

showed the change in *c-Myc* protein level (upper) in Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells using antisense or sense oligonucleotides for *c-myc*, compared with p85 PI3K protein level (lower), which is expressed at the same level in both types

of cells [5], as a loading control. While the G-CSF induced enhancement of *c-Myc* expression in Trf-R⁺ cells was partially inhibited by the addition of the antisense oligonucleotide for *c-myc* (Fig. 4A), the culture with the antisense oligonucleotide completely inhibited the G-CSF-induced proliferation of these cells to the control level (Fig. 4B; ***, $P < 0.001$). In contrast, neither the antisense nor sense oligonucleotide had any effect on the O_2^- -producing ability of Trf-R⁺ cells cultured with G-CSF (Fig. 5). The antisense and sense oligonucleotide also had no effects on the O_2^- -producing ability of Trf-R⁻ cells cultured with G-CSF (data not shown). In contrast, rapamycin enhanced the O_2^- -producing ability of Trf-R⁺ cells cultured with G-CSF to the same level of Trf-R⁻ cells cultured with G-CSF, as reported previously [5]. These data indicate that while the inhibition of p70 S6K promotes neutrophilic differentiation, this enhancement does not depend on the role of *c-Myc*.

The effects of antisense oligonucleotides for *c-myc* on the fMLP-R expression in DMSO-treated HL-60 cells were examined. After 2 days cultivation with DMSO, HL-60 cells were subsequently cultured for 3 days in the presence of G-CSF and antisense oligonucleotides for *c-myc* or rapamycin. Whereas rapamycin promoted the fMLP-R expression of HL-60 cells treated with DMSO (Fig. 6A, upper left), antisense oligonucleotides for *c-myc* did not promote the fMLP-R expression (Fig. 6A, upper right). Culturing with G-CSF enhanced the fMLP-R expression

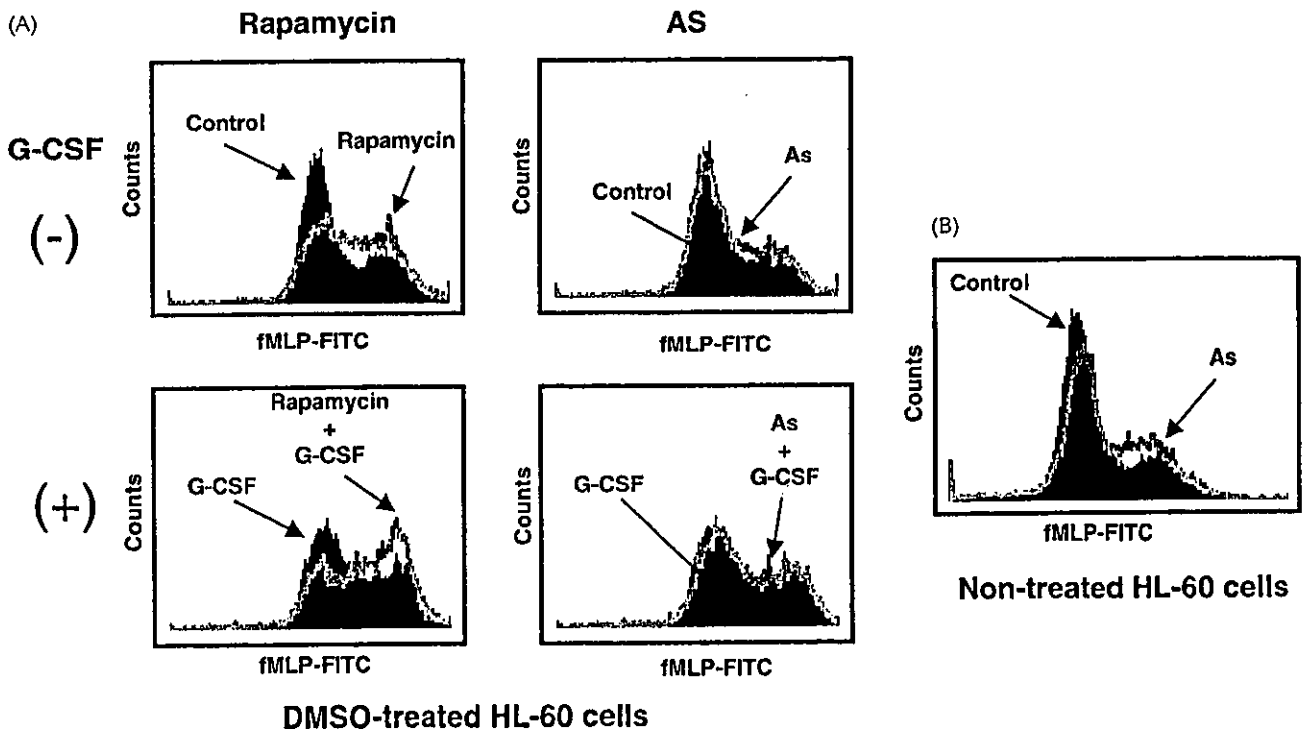


Fig. 6. Effect of antisense oligonucleotides for *c-myc* and rapamycin on fMLP-R expression in DMSO-treated and non-treated HL-60 cells. (A) fMLP-R expression in DMSO-treated HL-60 cells. Two days after addition of DMSO, cells were treated with antisense oligonucleotides for *c-myc* (As) either rapamycin (R), and then cultured for 3 days with or without G-CSF. (B) fMLP-R expression in non-treated HL-60 cells. Cells were treated with antisense oligonucleotides for *c-myc* (As) for 5 days. For the assay of fMLP-R expression, cells were incubated with FITC-conjugated fMLP, and then analyzed by flow cytometry.

on DMSO-treated HL-60 cells, and rapamycin further promoted it (Fig. 6A, lower left). In the presence of G-CSF, antisense oligonucleotides for *c-myc* had no effects (Fig. 6A, lower right). These data corresponded with O_2^- production ability (Fig. 5), indicating that the G-CSF-induced *c-Myc* plays an important role for proliferation but may not be a negative regulator of differentiation.

In contrast, when non-differentiated HL-60 cells were cultured with antisense oligonucleotides, the fMLP-R expression was markedly promoted (Fig. 6B), which result is in agreement with those in previous reports [13–15].

4. Discussion

c-Myc plays an important role in cell growth and differentiation and *c-Myc* is known to inhibit granulocyte/neutrophil differentiation. In myeloid cells, constitutive expression of *v-Myc* blocks phorbol ester-induced differentiation of human U-937 monoblasts [21]. Nakajima and Ihle [22] reported that the induction of C/EBP ϵ , an important transcription factor for promoting differentiation of granulocytes, is completely abrogated in 32Dcl3 cells overexpressing *c-Myc*. Moreover, an oligomer complementary to *c-myc*-mRNA induces differentiation of HL-60 cells [13–15].

In our previous study [4], we reported the appearance of Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells in DMSO-treated HL-60 cells. The Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells were characterized as proliferative- and differentiation-type cells, respectively. Based on an analysis of the G-CSF effect on both cell types, we suggested that p70 S6K plays a negative role in neutrophilic differentiation of HL-60 cells. In this study, we examined the role of *c-Myc* involved in neutrophilic differentiation, focusing specifically on the p70 S6K cascade and/or the G-CSF-dependent signal transduction pathway.

The present and previous results [5] suggest that the PI3K/p70 S6K cascade plays an important role in higher proliferative ability in Trf-R⁺ cells (Figs. 1 and 2). Furthermore, G-CSF-dependent enhancement of proliferation is also dependent on the PI3K/p70 S6K cascade. In this study, the expression of *c-Myc* in Trf-R⁺ cells was greater than that in Trf-R⁻ cells, and G-CSF markedly enhanced the expression of *c-Myc* in Trf-R⁺ cells (Figs. 3A and 4A). Law *et al.* have reported that *c-Myc* expression is regulated at a position downstream from p70 S6K [19]. Because the high proliferation ability of Trf-R⁺ cells coincides with the augmentation of PI3K and p70 S6K activity and *c-Myc* expression, the PI3K/p70 S6K/*c-Myc* cascade plays an important role in the proliferation ability of Trf-R⁺ cells. Since G-CSF did not influence the phosphorylation of 4E-BP1 (Fig. 2C), G-CSF-induced proliferation may not depend on mTOR. However, as we did not measure the activity of mTOR, further investigation is needed.

Many reports suggest a negative correlation between *c-Myc* expression and cellular differentiation, with the *Myc* oncoprotein (*c*-, *L*- and *N*-*Myc*) is down-regulated during differentiation in many cells [23–26]. We also showed that the expression of *c-Myc* in Trf-R⁻ cells is lower than that of Trf-R⁺ cells (Fig. 3). When Trf-R⁺ cells were treated with rapamycin or wortmannin, the G-CSF-induced proliferation in Trf-R⁺ cells was completely inhibited by rapamycin and partially by wortmannin (Fig. 1). The inhibition of p70 S6K in Trf-R⁺ cells by rapamycin or wortmannin showed the same tendency as the proliferation in these cells. We have reported that during the neutrophilic differentiation of HL-60 cells, G-CSF stimulates the activity of p70 S6K, which is located in downstream from PI3K [5]. These data are consistent with previous reports that p70 S6K acts downstream from PI3K [16,27–29]. Furthermore, the G-CSF-induced protein expression of *c-Myc* was found to be completely inhibited by rapamycin and partially by wortmannin. It has also been reported that *c-Myc* expression is regulated downstream from Ras/Raf/MEK/ERK or STAT3 [30,31]. Therefore, the G-CSF-induced *c-Myc* expression may be partially regulated by PI3K/p70 S6K.

Antisense oligodeoxynucleotides of *c-myc* inhibited not only the expression of *c-Myc* protein (Fig. 4A), but also the G-CSF-induced proliferation in Trf-R⁺ cells (Fig. 4B). Heikkilä *et al.* [20] and Holt *et al.* [15] have also successfully inhibited cell growth using antisense oligonucleotides of *c-myc*. On the other hand, as reported previously [4], rapamycin enhanced the differentiation of Trf-R⁺ cells in the absence or presence of G-CSF, and there was no difference in neutrophilic differentiation between Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells. Wortmannin enhanced the differentiation of Trf-R⁺ cells only in the presence of G-CSF [5]. Antisense oligonucleotides for *c-myc*, however, could not stimulate the differentiation in terms of O_2^- -production ability (Fig. 5) or fMLP-R expression in DMSO-treated HL-60 cells (Fig. 6A). Several investigators have reported that antisense oligonucleotides for *c-myc* inhibit the proliferation of HL-60 cells and induce differentiation into neutrophilic cells [13–15]. In those reports, antisense oligonucleotides for *c-myc* were used as a differentiation drug such as DMSO or retinoic acid. In this study, we confirmed that antisense oligonucleotides for *c-myc*, when added to non-differentiated HL-60 cells, also induced the fMLP-R expression (Fig. 6B). These data suggest that the G-CSF-dependent proliferation of Trf-R⁺ cells may occur through the PI3K-p70 S6K-*c-Myc* pathway, but another factor(s) located downstream from PI3K/p70 S6K may contribute to the G-CSF-induced enhancement of differentiation in HL-60 cells.

Acknowledgments

These studies were supported by grants from Ministry of Health and Labour Welfare.

References

- [1] Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R, Komaga T, Link DC. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* 1996;5:491–501.
- [2] Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994;84:1737–46.
- [3] Yamaguchi T, Mukasa T, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Hayakawa T. The role of STAT3 in granulocyte colony-stimulating factor-induced enhancement of neutrophilic differentiation of Me₂SO-treated HL-60 cells. GM-CSF inhibits the nuclear translocation of tyrosine-phosphorylated STAT3. *J Biol Chem* 1999;274:15575–81.
- [4] Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Uchida E, Hayakawa T. Commitment of neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells coincides with expression of transferrin receptor. Effect of granulocyte colony stimulating factor on differentiation and proliferation. *J Biol Chem* 1999;274:25471–80.
- [5] Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Kogi M, Uchida E, Hayakawa T. Role of 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* 2002;405:21–31.
- [6] Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999;19:1–11.
- [7] Pelengaris S, Rudolph B, Littlewood T. Action of Myc *in vivo* proliferation and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:100–5.
- [8] Schmidt EV. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* 1999;18:2988–96.
- [9] Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:575–600.
- [10] Facchini LM, Penn LZ. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J* 1998;12:633–51.
- [11] Kimura S, Maekawa T, Hirakawa K, Murakami A, Abe T. Alterations of c-myc expression by antisense oligodeoxynucleotides enhance the induction of apoptosis in HL-60 cells. *Cancer Res* 1995;55:1379–84.
- [12] Li BD, Budnick RM, Russo CA, Anderson GR, Stewart CC. Quantifying c-myc expression in c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide-treated leukemic and colon cancer cell lines. *J Surg Res* 1995;59:485–92.
- [13] Wickstrom EL, Bacon TA, Gonzalez A, Lyman GH, Wickstrom E. Anti-c-myc DNA increases differentiation and decreases colony formation by HL-60 cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989;25:297–302.
- [14] Bacon TA, Wickstrom E. Daily addition of an anti-c-myc DNA oligomer induces granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells in both serum-containing and serum-free media. *Oncogene Res* 1991;6:21–32.
- [15] Holt JT, Redner RL, Nienhuis AW. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* 1988;8:963–73.
- [16] Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 1994;370:71–5.
- [17] Seva C, Kowalski-Chauvel A, Daulhac L, Barthez C, Vaysse N, Pradayrol L. Wortmannin-sensitive activation of p70S6-kinase and MAP-kinase by the G protein-coupled receptor, G/CCKB. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:202–6.
- [18] Vinals F, Chambard JC, Pouyssegur J. p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 1999;274:26776–82.
- [19] Law BK, Waltner-Law ME, Entingh AJ, Chytil A, Aakre ME, Norgaard P, Moses HL. Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6k and down-regulation of c-Myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 2000;275:38261–7.
- [20] Heikkila R, Schwab G, Wickstrom E, Loke SL, Pluznik DH, Watt R, Neckers LM. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature* 1987;328:445–9.
- [21] Bahram F, Wu S, Oberg F, Luscher B, Larsson LG. Posttranslational regulation of Myc function in response to phorbol ester/interferon-gamma-induced differentiation of v-Myc-transformed U-937 monoblasts. *Blood* 1999;93:3900–12.
- [22] Nakajima H, Ihle JN. Granulocyte colony-stimulating factor regulates myeloid differentiation through CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Blood* 2001;98:897–905.
- [23] Lachman HM, Skoultchi AI. Expression of c-myc changes during differentiation of mouse erythroleukemia cells. *Nature* 1984;310:592–4.
- [24] Westin EH, Wong-Staal F, Gelmann EP, Dalla-Favera R, Papas TS, Lautenberger JA, Eva A, Reddy EP, Tronick SR, Aaronson SA, Gallo RC. Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2490–4.
- [25] de Koning JP, Soede-Bobok AA, Schelen AM, Smith L, van Leeuwen D, Santini V, Burgering BM, Bos JL, Lowenberg B, Touw IP. Proliferation signaling and activation of Shc, p21Ras, and Myc via tyrosine 764 of human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood* 1998;91:1924–33.
- [26] Shimosaki K, Nakajima K, Hirano T, Nagata S. Involvement of STAT3 in the granulocyte colony-stimulating factor-induced differentiation of myeloid cells. *J Biol Chem* 1997;272:25184–9.
- [27] Chou MM, Blenis J. The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell* 1996;85:573–83.
- [28] Kim S, Jung Y, Kim D, Koh H, Chung J. Extracellular zinc activates p70 S6 kinase through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 2000;275:25979–84.
- [29] Peyrollier K, Hajduch E, Blair AS, Hyde R, Hundal HS. L-Leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of System A amino acid transport. *Biochem J* 2000;350:361–8.
- [30] Cheng M, Wang D, Roussel MF. Expression of c-Myc in response to colony-stimulating factor-1 requires mitogen-activated protein kinase kinase-1. *J Biol Chem* 1999;274:6553–8.
- [31] Nakajima K, Yamanaka Y, Nakae K, Kojima H, Ichiba M, Kiuchi N, Kitaoka T, Fukada T, Hibi M, Hirano T. A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J* 1996;15:3651–8.

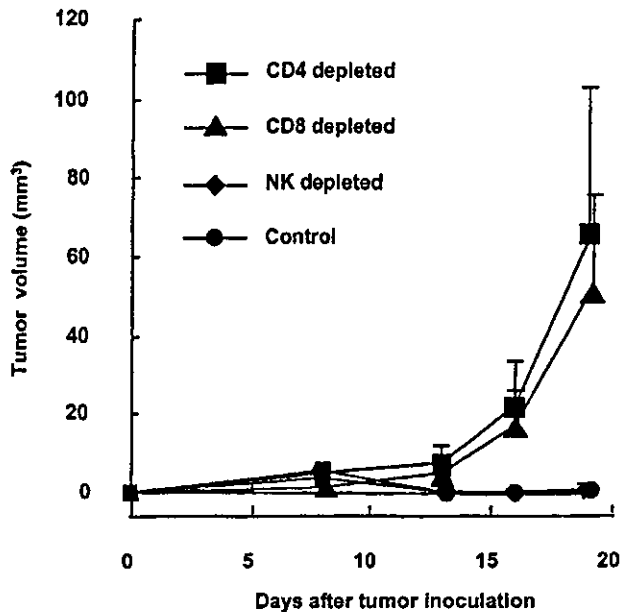


Fig. 7. CD4⁺ and CD8⁺ T cells contribute to lowering tumorigenicity of mILC-expressing OV-HM. CD4⁺ or CD8⁺ T cells were depleted in B6C3F1 mice by i.p. injection of respective anti-CD4 or -CD8 ascitic fluid, 100 μ l each, seven times on days -3, -2, -1, 0, 5, 10, and 15. NK cell depletion was carried out by i.p. injection of asialo GM1 antiserum, 40 μ l/dose, six times on days -2, -1, 0, 5, 10, and 15. OV-HM cells infected at an MOI of 10 with Ad-RGD-mILC were intradermally inoculated on day 0. Tumor sizes were measured at indicated time intervals, and data are expressed as the mean \pm SE of results from at least five mice.

tissue and initiate the antitumor immune response. To test this hypothesis, we developed chemokine-encoding fiber mutant adenovirus vectors, Ad-RGD-mILC and Ad-RGD-mFKN. Efficient production of biologically active mILC and mFKN could be detected in the culture supernatants of cells infected with Ad-RGD-mILC or Ad-RGD-mFKN. The *in vivo* tumor growth experiment further showed that mILC markedly suppressed the growth of the tumor. By contrast, antitumor effect by mFKN was not observed. To exclude the possibility that the growth suppression of the tumor cells by Ad-RGD-mILC was attributable to the cytotoxicity of adenovirus or chemokine, OV-HM cells transfected with Ad-RGD-mILC, Ad-RGD-mFKN, or Ad-RGD-NULC were cultured for 48 h, and the cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. The *in vitro* growth of the cells infected with these vectors was essentially identical to that of control cells (data not shown). The rechallenge experiment also demonstrated that specific immunity was developed, although only at a limited level, after the initial challenge with mILC-expressing OV-HM cells.

Using immunohistochemical staining, we studied how mILC but not mFKN had antitumor activity. Tumor cells infected with Ad-RGD-mILC or Ad-RGD-mFKN attracted a significantly elevated number of CD3⁺ lymphocytes and NK cells. Interestingly, however, lymphocytes accumulated only around the blood vessel in tumors expressing mFKN, whereas lymphocytes infiltrated deep within tissues in mILC-expressing tumors. We also observed abundant blood vessels in the tumor tissue expressing mFKN (Figs. 5 and 6). This is in good agreement with the previous results clearly demonstrating that FKN was angiogenic and enhanced the growth of blood vessels *in vivo*, a necessary step for the development of tumors (30). In that paper, the authors demonstrated that FKN significantly induced migration of human dermal microvascular endothelial cells *in vitro*. *In vivo*, FKN also elicited 2.3-fold more blood vessel growth than control in the Matrigel plug assay, which could be inhibited by immunodepletion of FKN. Some of the CXC family chemokines, such

as IFN-inducible protein-10/CXCL10, monokine induced by IFN γ /CXCL9, or platelet factor-4/CXCL4, have potent angiostatic activity because of the lack of the Glu-Leu-Arg (ELR) motif (10). These have stronger antitumor activity than the others attributable not only to their efficient immune cell attraction but also to suppression of blood vessel growth (31–33). Moreover, IL-8/CXCL8, which is an angiogenic CXC chemokine, facilitated tumor growth by suppressing the antitumor activity of IL-2 (34). These results also suggest that the angiogenic or angiostatic activity of the chemokines may influence their antitumor activity and can be an important parameter for cancer immunotherapy using the chemokines. Thus, in the present study, mFKN might not have efficient antitumor activity, despite the recruitment of lymphocytes and NK cells, partly because of its angiogenic activity. Furthermore, to our knowledge, no other reports described a potential relationship between antitumor activity of a chemokine and distribution of recruited lymphocytes within tumor tissues. However, the present observations need to be verified by additional studies. Another factor that may induce the difference of antitumor effect with mILC or mFKN is the difference of CX₃CR1-expressing immune cells and CCR10-expressing ones. It has been reported that CX₃CR1 only defines peripheral blood cytotoxic effector lymphocytes commonly armed with intracellular perforin and granzyme B, which include NK, $\gamma\delta$ T, and terminally differentiated CD8⁺ T cells (28), whereas CCR10 is preferentially expressed among blood leukocytes by both the subset of memory CD4 and CD8 T cells. CLA⁺/CCR10⁺ memory CD4 T cells from normal donor can secrete tumor necrosis factor and IFN- γ (35). Our results showed both the CD4 and CD8 T cells played important roles in the tumor suppressive effect induced by the infection of ILC. These results can be helpful to explain the different antitumor effect with ILC and FKN.

We found the absolute requirement of T lymphocytes for the antitumor effect of mILC. Using BALB/c nude mice and T or NK cell-depleted mice, the tumor suppressive activity of mILC was found to depend on T cells but not on NK cells. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells play roles in the antitumor effect by mILC. It is known that in many cases, only CD8⁺ T cells were required for antitumor effect by chemokines and/or cytokines against malignant cells lacking MHC class II expression (36). Furthermore, CD4⁺ T cells have also been found to: (a) enhance tumor cell killing by macrophages; (b) stimulate dendritic cells to prime CTLs; (c) activate NK cells via cytokines secreted by CD4⁺ cells; and (d) have direct antitumor activity (37, 38). In the present study, we have failed to detect a role for NK cells in the tumor suppression by ILC but cannot completely rule out the contribution of NK cells. Therapy with mILC failed in BALB/c nude mice with normal NK activity, and NK cell-depleted mice did not show tumor development activity after the inoculation of mILC-expressing OV-HM cells.

Taken together, the transduction of OV-HM cells with the mILC-encoding recombinant adenovirus vector induced the recruitment of lymphocytes and NK cells to the tumor, resulting in T cell-dependent antitumor effect. By contrast, Ad-RGD-mFKN did not show any therapeutic effect despite its chemoattractant activity for T and NK cells. Our present study suggests that ILC, a CC family chemokine, may be a good candidate for cancer gene immunotherapy. Using recombinant adenovirus vectors, we are currently trying combination therapy with ILC and cytokines for cancer.

REFERENCES

- Paillard, F. Cytokine and chemokine: a stimulating couple. *Hum. Gene Ther.* 10: 695–696, 1999.
- Mulc, J. J., Custer, M., Averbook, B., Yang, J. C., Weber, J. S., Goeddel, D. V., Rosenberg, S. A., and Schall, T. J. RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity *in vivo*: role of immune cell subpopulations. *Hum. Gene Ther.* 7: 1545–1553, 1996.

3. Strieter, R. M., Polverini, P. J., Arcuberg, D. A., Walz, A., Opendakker, G., Van Damme, J., and Kunkel, S. L. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J. Leukoc. Biol.*, **57**: 752-762, 1995.
4. Hirose, K., Hakozaki, M., Niyunoya, Y., Kobayashi, Y., Matsushita, K., Takenouchi, T., Mikata, A., Mukaida, N., and Matsushima, K. Chemokine gene transfection into tumor cells reduced tumorigenicity in nude mice association with neutrophilic infiltration. *Br. J. Cancer*, **72**: 708-714, 1995.
5. Huang, S., Xie, K., Singh, R. K., Gutman, M., and Bar-eli, M. Suppression of tumor growth and metastasis of murine renal adenocarcinoma by syngeneic fibroblasts genetically engineered to secrete the JE/MCP-1 cytokine. *J. Interferon Cytokine Res.*, **15**: 655-665, 1996.
6. Laning, J., Kawasaki, H., Tanaka, E., Luo, Y., and Dorf, M. E. Inhibition of *in vivo* tumor growth by the beta chemokine, TCA3. *J. Immunol.*, **153**: 4625-4635, 1994.
7. Marie, M., and Liu, Y. Strong cytotoxic T lymphocyte responses to a macrophage inflammatory protein 1 α -expressing tumor: linkage between inflammation and specific immunity. *Cancer Res.*, **59**: 5549-5553, 1999.
8. Nakashima, E., Oya, A., Kubota, Y., Kanada, N., Matsushita, R., Takeda, K., Ichimura, F., Kuno, K., Mukaida, N., Hirose, K., Nakanishi, I., Ujiie, T., and Matsushima, K. A candidate for cancer gene therapy: MIP-1 alpha gene transfer to an adenocarcinoma cell line reduced tumorigenicity and induced protective immunity in immunocompetent mice. *Pharm. Res.*, **13**: 1896-1901, 1996.
9. Guo, J., Wang, B., Zhang, M., Chen, T., Yu, Y., Regulier, E., Homann, H., Qin, Z., and Ju, D. W. Macrophage-derived chemokine gene transfer results in tumor regression in murine lung carcinoma model through efficient induction of antitumor immunity. *Gene Ther.*, **9**: 793-803, 2002.
10. Yoshie, O., Imai, T., and Nomiya, H. Chemokines in immunity. *Adv. Immunol.*, **78**: 57-110, 2001.
11. Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J., and Butcher, E. C. CC chemokine receptor (CCR) 4 and the CCR 10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J. Exp. Med.*, **194**: 1541-1547, 2001.
12. Morales, J., Homey, B., Vicari, A. P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., McEvoy, L. M., and Zlotnik, A. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 14470-14475, 1999.
13. Bazan, J. F., Bacon, K. B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D. R., Zlotnik, A., and Schall, T. J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX₂C motif. *Nature*, **385**: 640-644, 1997.
14. Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiya, H., Schall, T. J., and Yoshie, O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX₃CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*, **91**: 521-530, 1997.
15. Papadopoulos, E. J., Sasseti, C., Sacki, H., Yamada, N., Kawamura, T., Fitzhugh, D. J., Saraf, M. A., Schall, T., Blauvelt, A., Rosen, S. D., and Hwang, S. T. Fractalkine, a CX₂C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.*, **29**: 2551-2559, 1999.
16. Okada, N., Saito, T., Masunaga, Y., Tsukada, Y., Nakagawa, S., Mizuguchi, H., Mori, K., Okada, Y., Fujita, T., Hayakawa, T., Mayumi, T., and Yamamoto, A. Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate antitumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer Res.*, **61**: 7913-7919, 2001.
17. Okada, Y., Okada, N., Nakagawa, S., Mizuguchi, H., Kanchira, M., Nishino, N., Takahashi, K., Mizuno, N., Hayakawa, T., and Mayumi, T. Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and antitumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors. *Cancer Lett.*, **177**: 57-63, 2002.
18. Hashimoto, M., Niwa, O., Nitta, Y., Takeichi, M., and Yokoro, K. Unstable expression of E-Cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**: 459-463, 1989.
19. Mizuguchi, H., Kay, M. A., and Hayakawa, T. *In vitro* ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 and E1 deletion regions for generation of recombinant adenovirus vectors. *Biotechniques*, **30**: 1112-1114, 2001.
20. Mizuguchi, H., Koizumi, N., Hosono, T., Uoguchi, N., Watanabe, Y., Kay, M. A., and Hayakawa, T. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther.*, **8**: 730-735, 2001.
21. Mizuguchi, H., and Kay, M. A. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method. *Hum. Gene Ther.*, **9**: 2577-2583, 1998.
22. Rosenfeld, M. A., Siegfried, W., Yoshimura, K., Yoneyama, K., Fukayama, M., Stier, L. E., Paakko, P. K., Gilardi, P., Stratford-Perricaudet, I. D., and Perricaudet, M. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium *in vivo*. *Science*, **252**: 431-434, 1991.
23. Crystal, R. G., McElvany, N. G., Rosenfeld, M. A., Chu, C. S., Mastrangeli, A., Hay, J. G., Brody, S. L., Jaffe, H. A., Eissa, N. T., and Dancl, C. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat. Genet.*, **8**: 41-51, 1994.
24. Vicente-Manzanares, M., Montoya, M. C., Mellado, M., Frade, J. M., del Pozo, M. A., Nieto, M., de Landazuri, M. O., Martinez, A. C., and Sanchez-Madrid, F. The chemokine SDF-1 triggers a chemotactic response and induces cell polarization in human B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **28**: 2197-2207, 1998.
25. Kitching, A. R., Topping, P. G., Kurimoto, M., and Holdsworth, S. R. IL-18 has IL-12-independent effects in delayed-type hypersensitivity: studied in cell-mediated crescentic glomerulonephritis. *J. Immunol.*, **165**: 4649-4657, 2000.
26. Di Carlo, E., Comes, A., Basso, S., De Ambrosio, A., Meazza, R., Musiani, P., Moelling, K., Albini, A., and Ferrini, S. The combined action of IL-15 and IL-12 gene transfer can induce tumor cell rejection without T and NK cell involvement. *J. Immunol.*, **165**: 3111-3118, 2000.
27. Homey, B., Alcinus, H., Müller, A., Soto, H., Bowman, E. P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerman, A. I., Assmann, T., Bünnemann, E., Lehto, M., Wolff, H., Yen, D., Marxhausen, H., To, W., Sedgwick, J., Ruzicka, T., Lehmann, P., and Zlotnik, J. ILC-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammatory. *Nat. Med.*, **8**: 157-165, 2002.
28. Nishimura, M., Umehara, H., Nakayama, T., Yoneda, O., Hieshima, K., Kakizaki, M., Dohmae, N., Yoshie, O., and Imai, T. Dual functions of fractalkine/CX₃C ligand 1 in trafficking of perforin⁺/granzyme B⁺ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX₃CR1 expression. *J. Immunol.*, **168**: 6173-6180, 2002.
29. Yoneda, O., Imai, T., Goda, S., Inoue, H., Yamauchi, A., Okazaki, T., Imai, H., Yoshie, O., Bloom, E. T., Dohmae, N., and Umehara, H. Fractalkine-mediated endothelial cells injury by NK cells. *J. Immunol.*, **164**: 4055-4062, 2000.
30. Volin, M. V., Woods, J. M., Amin, M. A., Connors, M. A., Harlow, L. A., and Koch, A. E. Fractalkine: a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.*, **159**: 1521-1530, 2001.
31. Kolber, D. J., Knisely, T. L., and Maione, T. E. Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. *J. Natl. Cancer Inst.* (Bethesda), **87**: 304-309, 1995.
32. Tannenbaum, C. S., Tubbs, R., Armstrong, D., Finke, J. H., Bukowski, R. M., and Hamilton, T. A. The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J. Immunol.*, **161**: 927-932, 1998.
33. Sgadari, C., Farber, J. M., Angiolillo, A. L., Liao, F., Teruya-Feldstein, J., Burd, P. R., Yao, L., Gupta, G., Kanegane, C., and Tosato, G. Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis *in vivo*. *Blood*, **89**: 2635-2643, 1997.
34. Arenberg, D. A., Kunkel, S. L., Polverini, P. J., Glass, M., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J. Clin. Investig.*, **97**: 2792-2802, 1996.
35. Hudak, S., Hagen, M., Liu, Y., Catron, D., Oldham, E., McEvoy, L. M., and Bowman, E. P. Immune surveillance and effector function of CCR10⁺ skin homing T cells. *J. Immunol.*, **169**: 1189-1196, 2002.
36. Mazzolini, G., Qian, C., Xie, X., Sun, Y., Lasarte, J. J., Drozdziak, M., and Prieto, J. Regression of colon cancer and induction of antitumor immunity by intratumoral injection of adenovirus expressing interleukin-12. *Cancer Gene Ther.*, **6**: 514-522, 2000.
37. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. The central role of CD 4⁺ T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.*, **188**: 2357-2368, 1998.
38. Lanzavecchia, A. Immunology: license to kill. *Nature*, **393**: 413-414, 1998.

平成 13 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告**

生物薬品のウイルス安全性確保を目的とした核酸増幅検査
(NAT) のフィージビリティスタディ

山口 照英, 内田恵理子*

医薬品研究 Vol. 34, No. 12 別刷 (2003年)

財団法人 日本公定書協会

平成 13 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告**

 生物薬品のウイルス安全性確保を目的とした核酸増幅検査
 (NAT) のフィージビリティスタディ

山口 照英, 内田恵理子*

生物薬品のウイルス NAT ガイドライン策定に当たって考慮すべき事項や要素について、関連する文献や EU 及び米国の NAT ガイドラインを対象として調査研究を行った。その結果、特異性、感度、再現性等をどの様に担保するか、プライマーやプローブをはじめとして、用いる試薬・試液の選択基準や受け入れ規格の設定、検出感度の設定や頑厳性の確保など NAT の導入に際して求められる基本的要件は共通していることが明らかになった。また、この検出感度や精度の評価、更には日常のランコントロールとして、国際標準品や国内標準品、あるいはこれらの標準品を用いて校正された自社参照品をどの様に適用していくかについても明らかにできた。一方、このような調査研究に基づいて、生物薬品のウイルス安全性に NAT を導入する際に盛り込むべき基本要素について明らかにした。

NAT や NAT に関連する周辺技術の進歩は非常に急速であり、ウイルス検出法として NAT を導入する際は最新の科学に基づいた規格試験法を設定すべきであるのは当然であるが、このように急速に進歩する NAT 関連技術を積極的に取り込むべき努力も求められる。

1. はじめに

バイオテクノロジー応用医薬品をはじめとする生物薬品の開発は、ゲノム科学の急速な進展や、細胞培養技術や種々の製造技術の進歩、更には生命科学における分子レベルでの理解の驚異的な進歩などが相まって急速な発展を続けている。更には、テラメド医療の進歩により、患者一人一人にあわせてより適切な治療が進むと考えられ、国民の大きな期待が寄せられている。一方、生体由来成分を原材料とする生物薬品にはウイルス等の感染因子の混入の危険性が存在することが指摘され、このための安全性確保の方策が長年にわたって議論されてきた。特に血液製剤の HIV による医療事故等は、生物薬品のウイルス安全性を高める必要性を痛感させるものであった。特に、生物製品の中で、細胞培養由来製品について感染因子の混入防止や製造におけるウイルス不活化・除去工程の評価等を含めたウイルス

安全確保のためのガイドライン作成が ICH 活動として取り上げられ、国際調和ガイドラインが策定された。一方、血液製剤や動物由来原料から作られる種々の生物薬品のウイルス安全性確保の施策として生物由来製品への新たな規制が薬事法改正に取り込まれた。この改正では、生物由来製品の原料基準の制定やウイルスリスクに応じて特定生物由来製品や生物由来製品の指定を行うとともにリスクに応じた安全対策を製薬企業や医療機関に求めることにしている。

このような新たな枠組みの中で、生物由来製品のウイルス安全性確保の大きな柱の一つは、製品原料や製造に用いる原材料にウイルスの混入のないものを用いることである。このための一つの方策は、可能な限り高感度・高精度なウイルス検出手法を用いて各原料・原材料を試験し、その存在の否定されたものを製造に用いることである。ウイルス検出法と

* 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

** 本研究は日本公定書協会の「日本薬局方の試験法に関する研究」により行ったものである。

しては、種々の血清学的手法や感染性を指標とした検出法があるが、感染力の強いウイルスの場合、数ゲノムコピーから数十ゲノムコピー相当のウイルス粒子で感染が成立する場合もあることが知られており、高感度・高精度なウイルス検出が求められてきた。PCRをはじめとする NAT 法は、ウイルスゲノムを数コピーから数十コピーの感度で検出できる手法であり、極めて鋭敏にウイルスゲノムの存在を検出することが可能である²⁻⁴⁾。このために、主として血液製剤のウイルススクリーニングに NAT が利用されるようになってきた⁵⁻¹⁰⁾。このような NAT を用いたウイルススクリーニングの導入により、原料の安全性が更に高まってきていることが報告されている^{11,12)}。

本研究では、生物薬品のウイルス安全性確保を目的とした NAT ガイドラインの策定にあたって、各国の動向を調査し、現時点での科学的水準から NAT ガイドラインに取り入れるべき基本的要件を明らかにすることを目的として、欧米の NAT ガイドラインや文献等の調査研究を行った。

2. 研究方法

EU 及び米国のウイルス NAT ガイドラインや、我が国における調査会等の議論を調査の対象とし、更にウイルスの NAT による検出についての論文等も参考にしながら比較検討した。

3. 結果及び考察

3.1 血液製剤の NAT ガイドラインと NAT によるウイルススクリーニング

EU 及び米国の血漿分画製剤のウイルス NAT ガイドラインに記載されている基本的要件を比較したものが Table 1 である¹³⁻¹⁵⁾。血漿分画製剤の原料としては FDA では HCV 及び HIV の NAT による否定を求めているが、CPMP では HCV のみが NAT の対象となっている。これに対して、我が国では、血液製剤原料基準で HCV、HIV 及び HBV の NAT による否定を求めていることと大きく異なっている。この相違点は、FDA 及び EU の NAT ガイドラインが血漿分画製剤のみを対象として策定されていることがその要因と考えられる。すなわち、各国のウイルスの疫学的なバックグラウンドやインベントリホールドやクアランチンなど他の安全対策

と組み合わせることによって HBV に関しては血清学的試験等によってその安全性が確保されるとする考えに基づいていると思われる。

特異性に関しては、FDA 及び CPMP のガイドラインともプライマー/プローブの選択に当たって遺伝的に保存されている領域をターゲットとして設計が行われるべきであり、ターゲットとした保存領域の妥当性を明らかにすることを求めている。一方、CPMP では分析法バリデーションとして、100 個の HCV RNA 陰性血漿プールを用いての非特異的な増幅がないことを確認するように求めている。試験すべき陰性血漿の数として 100 個という数字が妥当であるかどうかは検討が必要であるが、多数の陰性検体を試験し、擬陽性の出現がないことを評価しておくことは当然もとめられることであろう。一方、FDA のガイドラインでは、非特異的な反応や妨害物質による影響について詳細に検討するように求めており、この中にはウイルス陽性検体や陰性検体を種々の条件の試料液に添加して測定系の特異性を確認するように求めている。更に、目的とするウイルス以外の他のウイルス (HTLV-I/II, サイトメガロウイルス, EB ウイルス等) との交差反応性、抗凝固因子や試料処理液等の影響についても評価しておくことが求められている。

NAT によるウイルス検出試験は基本的にはウイルス否定試験であり、どれほどのウイルスゲノムコピーを検出できるかが最も重要である。CPMP では、95%の確率で検出できる検出限界を陽性カットオフ値として段階希釈した陽性血漿を用いて測定し、統計学的手法を用いて明らかにするように求めている。また、CPMP は、HCV RNA 量として血漿プールでの測定に際して、プール前の個別検体で 5000 IU/mL 以上の感度をもとめている。一方、FDA では HCV 及び HIV-1 RNA として個別検体の検出感度としては、100 copies/mL の検出感度を、ミニプール血漿での検出感度としてプール前の個別検体レベルで 5000 copies/mL を確保するように求めている。このように CPMP は検出感度を IU で規定しているが、FDA ではウイルスゲノムコピー数で規定している。例えば、HCV の WHO 標準品の 1 IU は約 3 コピー程度といわれており、このことから、FDA の検出感度規定が若干 CPMP より厳しいといえる。

Table 1 EU 及び米国の血液製剤のウイルス NAT ガイドラインの比較

	FDA	CPMP
対象とするウイルス	HCV 及び HIV	HCV
特異性	<ul style="list-style-type: none"> ● ライマー/プローブの選択 ● 遺伝的に保存されている領域 ● 増幅するウイルス遺伝子の GC 含量と長さ ● 他のウイルスとの交差性や擬陽性反応の評価 	プライマー/プローブの選択 <ul style="list-style-type: none"> ● 遺伝的に保存されている領域 ● 分析法バリデーションのために少なくとも 100 個の HCV RNA 陰性血漿プールを用いて陰性となることの確認を求めている
検出限界	<ul style="list-style-type: none"> ● 検出限界 ● 95% の確率で検出されるウイルスゲノム量 ● (定量的な検出での限界と区別) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 陽性カットオフ値 ● 95% の確率で検出される検体中のウイルスゲノムの最低量 ● 陽性カットオフ値の算定には陽性血漿の希釈系列を用いて試験を行い、統計学的手法を用いて行うこと
試料の調製	<ul style="list-style-type: none"> ● 試料中の抗凝固剤や NAT を阻害する因子の評価 ● 試料からの抽出効率や逆転写反応の効率 ● 試料に既知量のウイルスゲノムをスパイクすることにより確認することも可 	<ul style="list-style-type: none"> ● サンプルング方法 ● ミニプールの調製法 ● 試験までの保存法 ● クロスコンタミネーション防止策 ● ウイルスゲノムの回収率
標準品	<ul style="list-style-type: none"> ● WHO, CBER あるいは AIDS Clinical Trial Group の Virology Quality Assurance の標準パネルあるいはそれを用いて校正されたもの 	<ul style="list-style-type: none"> ● WHO の HCV 国際標準品 (96/790) に対して校正された参照品や標準品を用いることを推奨
分析法の性能確認	<ul style="list-style-type: none"> ● 少なくとも 1000 個の血清学的陽性を用いて更には 10000 個の臨床検体を用いて NAT の特異性を評価すること 	<ul style="list-style-type: none"> ● 少なくとも 20 検体の陰性血漿と少なくとも種々のウイルス濃度の 20 個の陽性血漿プールを用いて試験すること ● 日内、日差変動、試験担当者による変動についても明らかにすること

試料の調製に関しては、CPMP ではサンプリング法、ミニプールの調製法、試験までの保存法、クロスコンタミネーション防止策、ウイルスゲノムの回収率を明らかにするように求めている。FDA は、試料中の抗凝固剤や NAT の阻害因子の混入について評価するように求めており、更には性差、年齢差、人種差等による NAT の結果に及ぼす影響についても評価するように求めている。また、既知量のウイルスをスパイクし抽出操作でのウイルスゲノムの回収率を明らかにするように求めている。

標準品としては、CPMP は WHO の HCV 国際標準品 (96/790) に対して校正された参照品や標準品を用いることが求められている。一方、FDA でも国際標準品を用いることを推奨しているが、それ以外に CBER あるいは AIDS Clinical Trial Group の Virology Quality Assurance の標準品や標準パネルを用いた検討も推奨されている。

分析法としての性能確認として、CPMP では少

なくとも 20 検体の陰性血漿と種々のウイルス濃度の少なくとも 20 個の陽性血漿プールを用いて試験することを求めるとともに、日内、日差変動や試験担当者による変動についても評価しておくことを求めている。一方、FDA では少なくとも 1000 個の血清学的に陽性とされた検体を用いて NAT の評価を行っておくことが求められている。また、10000 の個別採血検体あるいはプールされた血液検体を用いて NAT を評価しておくことも必要とされている。

以上のように EU 及び米国の HIV や HCV 検出の NAT ガイドラインでは、十分な感度、精度、及び再現性に関して評価された NAT を採用する血漿分画製剤製造者に求めている。CPMP のウイルス NAT ガイドラインはコアとなるべき考え方を説明したものとなっているが、FDA のガイドラインでは上記したように、評価に当たって検討すべき事項を非常に詳細に記載している。

欧米のウイルス NAT ガイドラインでは、NAT

による検出のターゲットとしては HIV, HCV が主として取り扱われている。研究論文としても、主として疫学的な背景があり、重篤な感染症を引き起こす HIV, HCV, HBV が NAT の対象として取り上げられてきている。一方最近、パルボウイルス B19, HAV などの NAT による検出に関する報告が相次いで発表されている^{5,16)}。しかしながら、血液製剤の非エンベロープウイルスワークショップの CPMP レポートでは、パルボウイルス B19 や HAV の NAT 導入に関しては否定的な見解が述べられている¹⁷⁾。これは、例えば HAV でウイルス血漿のドナーが非常にまれにしかみられないこと、血漿分画製剤に混入したとしても現在までのところ HAV RNA は検出限界以下でとらえにくいことなどがあげられる。また、パルボウイルス B19 は、感染しても非常に症状が軽く免疫力が低下していない限り重篤な経過をたどらないとされている。

3.2 生物薬品のウイルス安全性確保のための NAT ガイドラインに取り込むべき事項

上記した欧米の NAT ガイドラインや文献等の調査結果に基づいて生物薬品のウイルス検出 NAT ガイドラインに取り込むべき基本事項をまとめたのが Table 2 である。ただし、上記の調査結果は、主として NAT スクリーニングが最も早くから取り上げられた血液製剤に関する資料であり、そのために血漿、あるいは血清、又はそのミニプール検体をターゲットとしている。一方、ヒト臓器、体液を含めた

動物由来製品や細胞培養を用いた製品など多様な原材料から製造される生物薬品のようなケースでは、試験を行うべき検体の処理方法あるいは核酸抽出法も原料ごとに異なる。また、検出しようとするウイルスの種類もそれぞれ原料となる細胞や動物ごとに異なる。したがって、生物薬品のウイルス検出法として NAT を導入する際には、それぞれの製品ごとにケースバイケースの対応が必要となるが、最も重要な点は採用しようとする NAT が、目的とするウイルス検出の精度及び感度が十分に確保されていることを明らかにすることである。

3.2.1 試験の最適化とバリデーション

ウイルス検出法として NAT を導入する際には、ウイルスゲノムの抽出、目的配列の増幅、検出（測定）及び機器の設定と試験の最適化を行うとともに必要な規格を設定しておくことが求められる。

3.2.2 目的とするウイルスゲノムの増幅しようとする領域、長さ

目的とするウイルスゲノムの増幅しようとする領域の妥当性を説明することが求められる。

3.2.3 プライマーとプローブに関して

プライマーとプローブは NAT によるウイルスゲノム検出系の中心的な要素である。その設計や品質が NAT の精度・感度に重要な影響を及ぼす。したがって、プライマーやプローブについての情報を明らかにすべきである。

(1) 選択したプライマーとプローブの科学的合理

Table 2 生物薬品の NAT ガイドラインに取り込むべき項目

1. 一般事項
2. 適応範囲
3. 試験の最適化とバリデーション
3.1. 目的とするウイルスゲノムの増幅しようとする領域、長さ、
3.2. プライマーとプローブに関して
3.3. 試薬と反応液
3.4. 酵素
3.5. 標準検体(標準品, 参照品, ランコントロール)
3.6. 特異性
3.7. 検出感度
3.8. 頑健性(robustness)
3.9. 分析法の性能確認
4. ランコントロール(恒常性の確認)
5. 判定基準の設定
6. 施設・設備
7. 品質管理

性。

(2) 検出しようとするウイルスゲノムを選択した科学的合理性、複数のウイルスサブタイプの配列に基づく説明。

(3) プライマーやプローブの大きさ、GC 含量、 T_m 値や 2 次構造についての情報。

(4) プライマーやプローブの品質に関するデータ。

(5) プライマーやプローブの化学修飾の有無。

(6) プライマーやプローブの純度と規格値。

(7) プライマーやプローブのロット間の一定性。

3.2.4 試薬と反応液

ウイルスゲノム抽出試薬や NAT の反応液に用いる試薬の品質、有効期限、規格の設定。

3.2.5 酵素

NAT に用いるすべての酵素の由来と機能を明らかにするとともに、その規格を設定すべきである。

またプライマーやプローブ、試薬、酵素等については、市販のキットを用いる場合には製造企業による解析結果を添付する必要がある。

3.2.6 標準品及び参照品

NAT の開発過程及び手法変更時には、公的に設定された標準品 (WHO 標準品や国内標準品) やこれらの標準品に対して校正された各施設で作成された参照品を用いて、その精度・感度等を適切に評価する必要がある。日常的な試験の成立、あるいは定期的な NAT の精度や感度を管理するためにも標準品や参照品を用いて評価を行う必要がある。

3.2.7 特異性

NAT の特異性は、プライマーやプローブの設計やその品質、試験条件に依存しているため、用いるプライマーとプローブが目的ウイルスゲノムを特異的に検出できるとする根拠を示す必要がある。特異性に関しては、他のウイルスとの交差反応性の可能性についても十分な検討を行うべきである。また、目的とするウイルスの複数のジェノタイプの検出能について評価しておく必要がある。特異性の評価のために、複数の試験対象となる陰性検体を用いて、擬陽性がみられないことを十分に評価しておく必要がある。

3.2.8 検出感度

NAT によるウイルスゲノム検出試験は通常、陰性か陽性の定性試験である。この場合 95% の確率で検出される検体一定量当たりの標的遺伝子の量が

検出感度として設定される。検出感度の測定に際しては、国際標準品あるいは国内標準品を用いるか、国際標準品あるいは国内標準品に対して校正された参照品や自社標準品の希釈系列を用い、試験を行い、適切な統計学的手法によって算出する必要がある。

3.2.9 頑健性 (robustness)

NAT によるウイルス検出試験を確立する際には、分析条件を小さい範囲で変化させても測定値が影響されないという信頼性を示す必要がある。NAT の頑健性は、塩化マグネシウム、プライマー、dNTP のような試薬の濃度を小さい範囲で変動させて試験することによって示すことができる。頑健性は、例えば 95% の確率で検出されるウイルス検体量の 3 倍量をスパイクした多数の検体試料を用いて、すべての試料が陽性となることによって確認ができる。クロスコンタミネーションが防止できていることを示すために、例えば陰性及び陽性検体 (濃度としては 95% の確率で検出されるウイルス量の 100 倍以上) をランダムに配置し、試験することなどにより確認する必要がある。

3.2.10 分析法の性能確認

日差変動、試験者による結果の一定性を確認する必要がある。また、自動抽出機等の装置を用いる場合には、それぞれの装置による試験結果のばらつきのないことを、標準ウイルス検体を用いて確認しておく必要がある。

3.2.11 ランコントロール (恒常性の確認)

日常的な NAT の実施においては、ウイルス濃縮、ゲノムの抽出、増幅、検出、汚染状況を確認するため、試験ごとに陽性と陰性のランコントロールを同時に試験することによって、試験系の成立をモニターしなければならない。ランコントロールとして、例えば 95% の確率で検出される検出限界の 3 倍量以下のウイルスを含む標準検体を用いることによって試験の成立を確認することが必要であろう。

3.2.12 判定基準の設定

陽性及び陰性の判定基準を明確にしておくとともに再試験を行うときの基準、再試験での判定基準についても文書化しておくべきである。更に、判定基準の設定根拠についての科学的合理性を明らかにする必要がある。

3.2.13 施設・設備

NAT は、数コピーから数十コピーのウイルスゲ

ノムまで検出できる高感度の検査法であるため、増幅産物による汚染等に細心の注意を払う必要がある。このため、試験検体のミニプール等の前処理、核酸抽出、試薬調製等の増幅前の試料を取り扱う器具、装置や部屋と増幅産物を取り扱う器具、装置や部屋を区別することが望まれる。また、NATでは、感染性の標準品や陽性試料を取り扱うことから、試験・検査は、製造施設とは隔離した場所で行うべきである。

3.2.14 品質管理

NATにおいては、数コピーから数十コピーのウイルスゲノム検出が可能とされ高感度であるために操作中の汚染やピペット操作や試験チューブの開閉等を含め従事者の技能がその試験の成否を大きく左右する。NATの恒常性を担保するには検査従事者の教育と技能向上が非常に重要である。NAT従事者に対して教育・訓練を行うとともに必要に応じて定期的にその技能検査を行うことが推奨される。

3.3 NATによるウイルス検出の今後の課題

NATによるウイルス検出では、主にPCR法やRNAウイルスに対してはRT-PCR法が用いられてきている。最初に述べたように、PCR法以外のNATの開発も精力的に行われてきており、ウイルス検出法として認可された手法もある^{6-8,10)}。NATは、目的とする遺伝子を数コピーから数十コピーの感度で検出できる方法であるが、更に低い濃度のウイルスが存在する場合には検出不能である。Rothらは、NATによるウイルス検出の将来的な課題として、ウイルス検出の高感度化等をあげている¹⁶⁾。もちろん高感度化するとしても、操作が煩雑あるいは非常に時間を要する方法であれば実用的な試験法とはいえないであろう。我々は、ポリエチレンイミン磁気ビーズや2価イオンとスルホン酸磁気ビーズを組み合わせるなどして、多くのモデルウイルスが濃縮可能で、NATによるウイルス検出を高感度化できることを報告した^{18,19)}。これらの手法が様々な生物薬品のウイルス検出に応用できるとすれば非常に有用と考えられる。

一方、RothらはNATによるウイルス検出のもう一つの将来的な課題として、ハイスループットな自動化をあげている。既にいくつかのハイスループットな取り組みが行われており²⁰⁻²²⁾、安定した検出感度を維持することに非常に有用であることが示

されている。このようなNATによるウイルス検出手法は周辺技術の進歩も相まって急速に進展している。したがって、生物薬品のウイルス検出にNATを導入するに際しては最新の技術の取り入れ、技術の進歩に即応したより高感度・高精度な改良を加えていくことが望まれる。

文 献

- 1) Guideline IHT. Viral Safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human and animal origin. Proceeding of The Fourth International Conference on Harmonization (Brussels) (Eds. Arcy, P. F. D. and Harron, D. W. G.), The Queen's University of Belfast, 1997, p. 877-914.
- 2) Larzul, D., Guigue, F., Sninsky, J., Mack, D., Brechot, C., Guesdon, J.: Detection of hepatitis B virus sequences in serum by using in vitro enzymatic amplification. *J. Virol. Methods*, **20**, 227-237 (1988).
- 3) Laure, F., Courgnaud, V., Rouzioux, C., Blanche, S., Veber, F., Burgard, M., Jacomet, C., Griscelli, C., Brechot, C.: Detection of HIV1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet*, **2**, 538-541 (1988).
- 4) Kwok, S., Ehrlich, G., Poiesz, B., Kalish, R., Sninsky, J.: Enzymatic amplification of HTLV-I viral sequences from peripheral blood mononuclear cells and infected tissues. *Blood*, **72**, 1117-1123 (1988).
- 5) Willkommen, H., Schmidt, I., Lower, J.: Safety issues for plasma derivatives and benefit from NAT testing. *Biologicals*, **27**, 325-331 (1999).
- 6) Alter, H. J., Sanchez-Pescador, R., Urdea, M. S., Wilber, J. C., Lagier, R. J., Di Bisceglie, A. M., Shih, J. W., Neuwald, P. D.: Evaluation of branched DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA. *J. Viral. Hepat.*, **2**, 121-132 (1995).
- 7) Kamisango, K., Kamogawa, C., Sumi, M., Goto, S., Hirao, A., Gonzales, F., Yasuda, K., Iino, S.: Quantitative detection of hepatitis B virus by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *J. Clin. Microbiol.*, **3**, 310-314 (1999).
- 8) Kern, D., Collins, M., Fultz, T., Detmer, J., Hamren, S., Peterkin, J. J., Sheridan, P.,

- Urdea, M., White, R., Yeghiazarian, T., Todd, J.: An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 3196-3202 (1996).
- 9) Sarrazin, C., Teuber, G., Kokka, R., Rabenau, H., Zeuzem, S.: Detection of residual hepatitis C virus RNA by transcription-mediated amplification in patients with complete virologic response according to polymerase chain reaction-based assays. *Hepatology*, **32**, 818-823 (2000).
- 10) Wiedmann, M., Wilson, W. J., Czajka, J., Luo, J., Barany, F., Batt, C. A.: Ligase chain reaction (LCA)-overview and application. *PCR Methods and Applications* (Cold Spring Harbor Laboratory), **3**, S51-S64 (1994).
- 11) Dodd, R., Notari, E., Stramer, S.: Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion*, **42**, 966-972 (2002).
- 12) Gallarda, J., Dragon, E.: Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. *Mol. Diagn.*, **5**, 11-22 (2000).
- 13) Guideline N. Control authority batch release of blood products-validation of nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in plasma pools. EMEA 89/381/EEC 2001.
- 14) Industry Gf. In the manufacture and clinical evaluation of in vitro tests to detect nucleic acid sequences of human immunodeficiency viruses Type 1 and Type 2. FDA/CBER 1999; (64FR 711147).
- 15) Industry Gf. Use of nucleic acid tests on pooled and individual samples from donors of whole blood and blood components for transfusion to adequately and appropriately reduce the risk of transmission of HIV-1 and HCV. FDA/CBER 2002.
- 16) Roth, W., Seifried, E.: Yield and future issues of nucleic acid testing. *Transfus. Clin. Biol.*, **8**, 282-284 (2001).
- 17) EMEA report. EMEA workshop on viral safety of plasma-derived medicinal products with particular focus on non-enveloped viruses. CPMP/BWP/BPWG/4080/00 2001; 13 September Report. 1-21.
- 18) 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. Meth.*, **114**, 11-19 (2003).
- 19) 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.*, **26**, 1065-1069 (2003).
- 20) Grant, P. R., Sims, C. M., Krieg-Schneider, F., Love, E. M., Eglin, R., Tedder, R. S.: Automated screening of blood donations for hepatitis C virus RNA using the Qiagen BioRobot 9604 and the Roche COBAS HCV Amplicor assay. *Vox. Sang.*, **82**, 169-176 (2002).
- 21) Mison, L., Seed, C. R., Margaritis, A. R., Hyland, C.: Nucleic acid technology screening of Australian blood donors for hepatitis C and human immunodeficiency virus-1 RNA: comparison of two high-throughput testing strategies. *Vox. Sang.*, **84**, 11-19 (2003).
- 22) Minegishi, K., Yoshikawa, A., Kishimoto, S., Yugi, H., Yokoya, N., Sakurada, M., Kiyokawa, H., Nishioka, K.: Superiority of mini-pool nucleic acid amplification technology for hepatitis B virus over chemiluminescence immunoassay for hepatitis B surface antigen screening. *Vox. Sang.*, **84**, 287-291 (2003).