

Fig.48 定量性リアルタイム RT-PCR による心筋細胞特異的マーカー遺伝子測定 Nkx 2.5、GATA4、MEF2C、 α MHC、 β MHC、MLC2a、MLC2v の遺伝子発現の時間変化。細胞株により、心筋細胞分化に違いが認められた。[平均値 \pm SEM (n=6)]

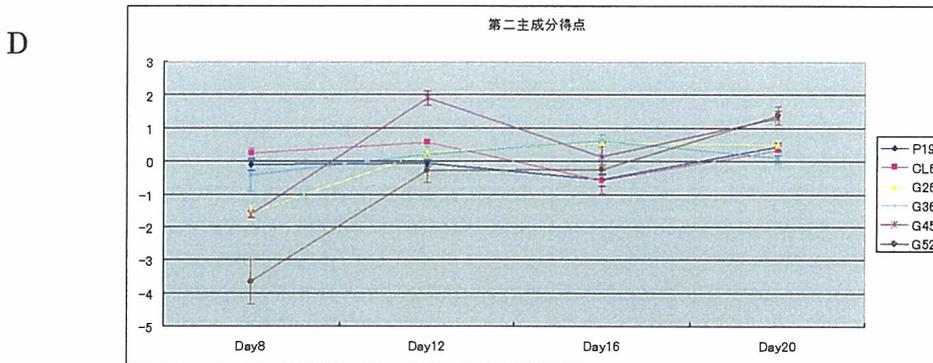
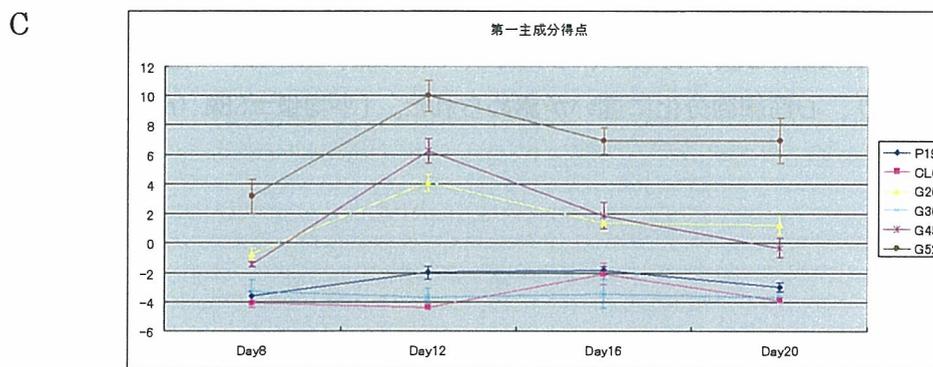
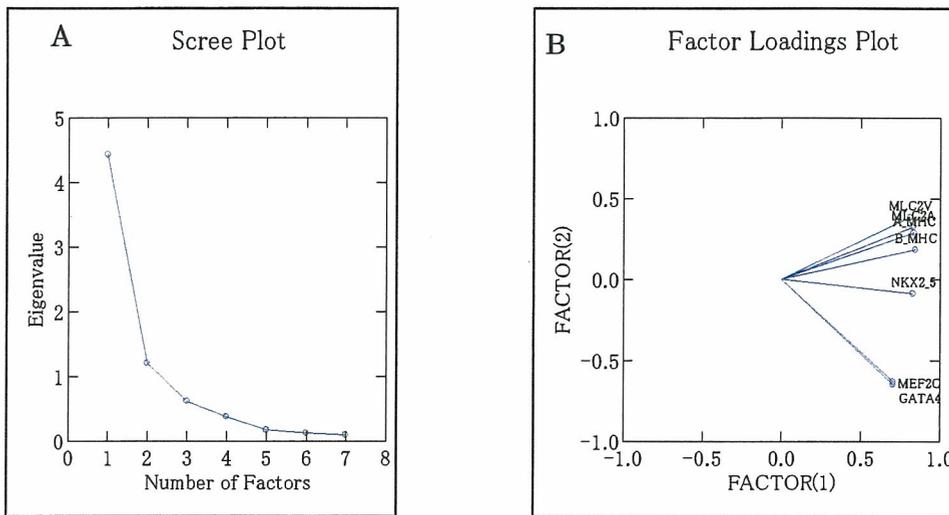


Fig.49 主成分分析

A: 主成分寄与率。第1主成分寄与率は63.2%、第2主成分寄与率は17.1%。

B: 変量プロット。横軸は第1主成分であり、全ての値が正となった。縦軸は第2主成分であり比較的初期に発現が見られるマーカーが負に、比較的後期に見られるマーカーが正の値となった。

C: 第1主成分得点の時間変化。細胞株により心筋細胞への分化能に違いが見られた。
〔平均値±SEM (n=6)〕

D: 第2主成分得点の時間変化。細胞株により心筋細胞への分化能に違いが見られた。
〔平均値±SEM (n=6)〕

Table 3 心筋細胞分化能と CMP 遺伝子発現量の相関

Gene Name	Localization	1st Principal Component		2nd Principal Component		Time for Beating		Nodule Number	
		rs	p	rs	p	rs	p	rs	p
CMP1	Soluble	0.8237	2.2622E-08	0.7368	3.4382E-06	-0.4932	5.6143E-03	0.4384	1.5375E-02
CMP2	Soluble	0.7836	3.0419E-07	0.7464	2.1840E-06	-0.5419	1.9793E-03	0.4153	2.2483E-02
CMP3	Membrane	0.7596	1.1297E-06	0.4397	1.5050E-02	-0.6333	1.7256E-04	0.6455	1.1738E-04
CMP4	Membrane	0.7596	1.1297E-06	0.6386	1.4632E-04	-0.4859	6.4824E-03	0.4202	2.0797E-02
CMP5	Membrane	0.7573	1.2700E-06	0.4660	9.4414E-03	-0.6856	2.8970E-05	0.6881	2.6429E-05
CMP6	Membrane	-0.7196	7.4228E-06	-0.5235	2.9877E-03	0.6771	3.9680E-05	-0.5907	5.8967E-04
CMP7	Membrane	0.6589	7.5150E-05	0.1282	4.9962E-01	-0.4920	5.7517E-03	0.6004	4.5209E-04
CMP2	Soluble	0.6521	9.4584E-05	0.3798	3.8451E-02	-0.8038	8.8491E-08	0.7672	7.5655E-07
CMP8	Membrane	-0.6246	2.2483E-04	-0.4588	1.0760E-02	0.4177	2.1626E-02	-0.3824	3.7023E-02
CMP9	Soluble	-0.5903	5.9552E-04	-0.3103	9.5158E-02	0.5030	4.6124E-03	-0.5164	3.4870E-03
CMP10	Soluble	0.5658	1.1207E-03	0.2336	2.1401E-01	-0.6151	2.9798E-04	0.6455	1.1711E-04
CMP11	Soluble	0.5651	1.1385E-03	0.4277	1.8393E-02	-0.6308	1.8602E-04	0.5858	6.7133E-04
CMP12	Membrane	0.5560	1.4231E-03	0.4157	2.2328E-02	-0.3982	2.9288E-02	0.4165	2.2051E-02
CMP13	Membrane	0.5399	2.0717E-03	0.3055	1.0065E-01	-0.4299	1.7737E-02	0.4323	1.7034E-02
CMP13	Membrane	0.5388	2.1265E-03	0.1761	3.5190E-01	-0.5858	6.7133E-04	0.6820	3.3193E-05
CMP14	Soluble	0.5366	2.2370E-03	0.2432	1.9527E-01	-0.4671	9.2595E-03	0.5012	4.7823E-03
CMP15	Membrane	0.4850	6.5941E-03	0.0012	9.9499E-01	-0.6735	4.5267E-05	0.7806	3.6107E-07
CMP16	Membrane	0.4685	9.0214E-03	-0.1186	5.3243E-01	-0.4744	8.0812E-03	0.6400	1.3958E-04
CMP17	Soluble	-0.4559	1.1339E-02	-0.0503	7.9171E-01	0.7673	7.5311E-07	-0.8313	1.2818E-08
CMP18	Membrane	0.4530	1.1941E-02	-0.0635	7.3888E-01	-0.3690	4.4782E-02	0.5480	1.7182E-03
CMP19	Soluble	-0.4404	1.4860E-02	-0.1066	5.7494E-01	0.6430	1.2695E-04	-0.7124	1.0035E-05
CMP20	Soluble	-0.4256	1.9052E-02	0.0036	9.8496E-01	0.4214	2.0392E-02	-0.5395	2.0930E-03
CMP21	Membrane	0.3970	2.9860E-02	-0.0204	9.1493E-01	-0.5809	7.6275E-04	0.6832	3.1728E-05
CMP22	Soluble	-0.3924	3.1979E-02	-0.2839	1.2836E-01	0.5249	2.9012E-03	-0.4579	1.0943E-02
CMP23	Soluble	-0.3924	3.1979E-02	0.1090	5.6632E-01	0.6978	1.8145E-05	-0.8220	2.5421E-08
CMP24	Soluble	-0.3856	3.5318E-02	0.1414	4.5602E-01	0.4623	1.0104E-02	-0.6030	4.2011E-04

CMP2 および CMP13 は 2 つの Probe Set で検出された。表中に黄色で示したものは、膜タンパクをコードする遺伝子であり、白で示したものは可溶性タンパクをコードする遺伝子である。rs: 順位相関係数、p: 有意確率

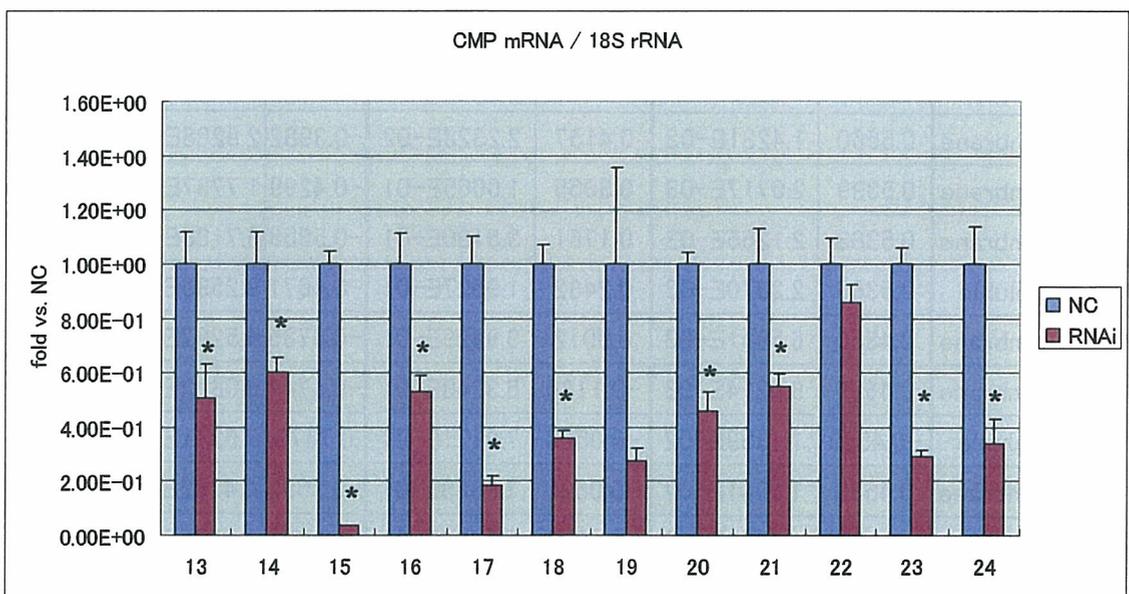
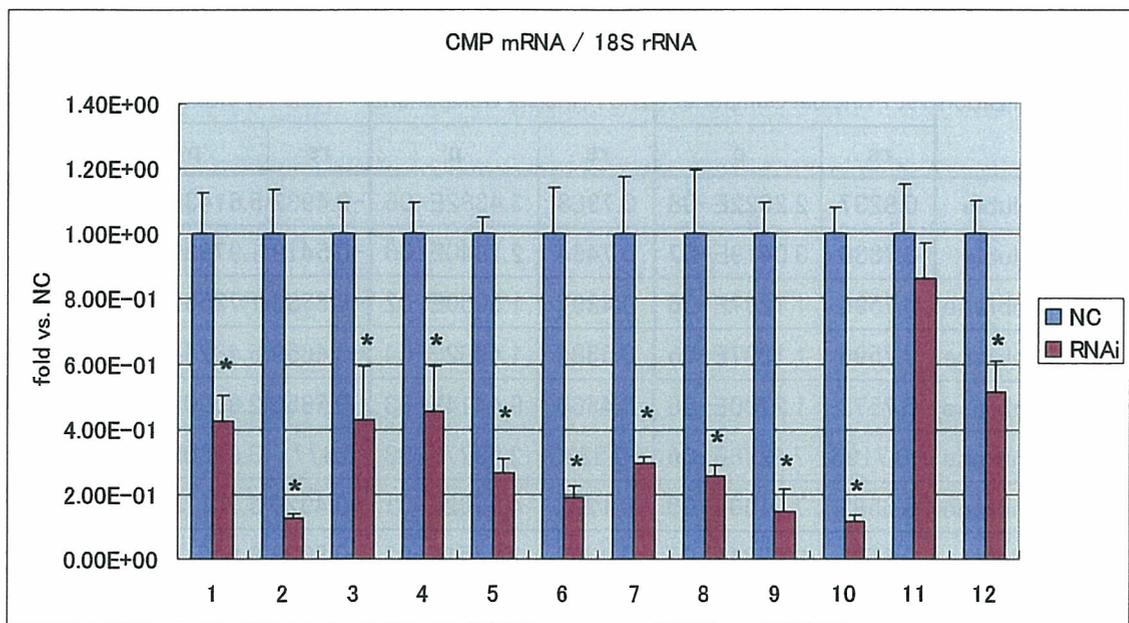
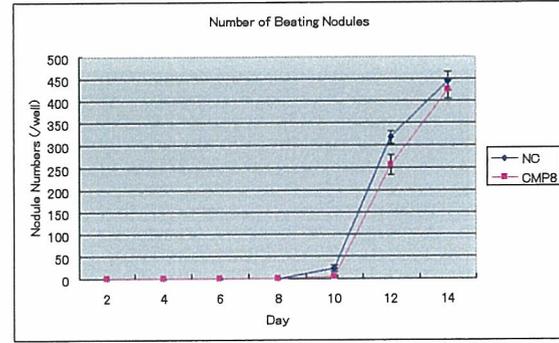
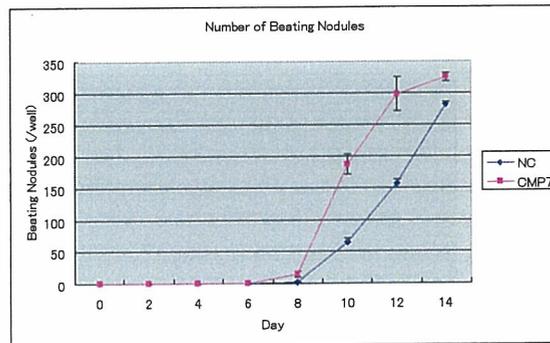
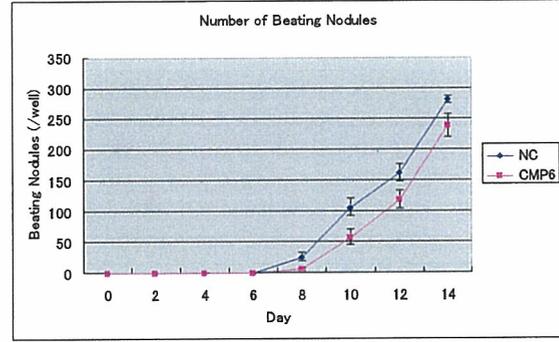
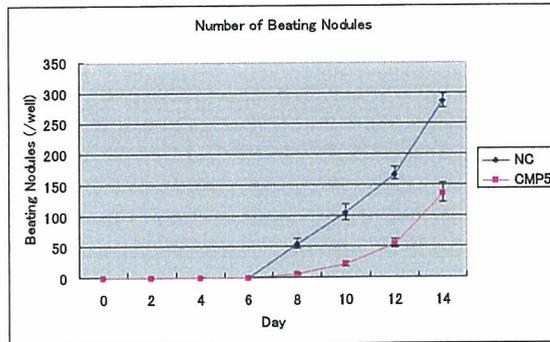
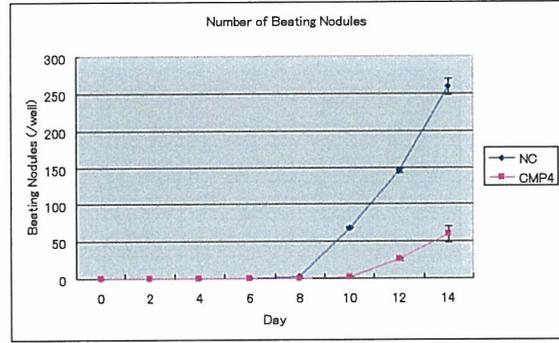
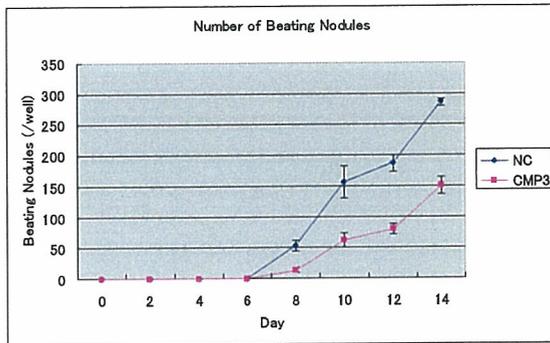
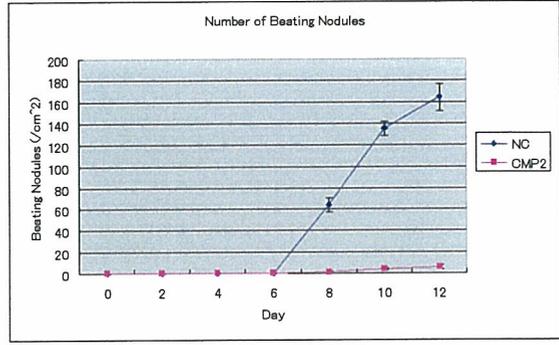
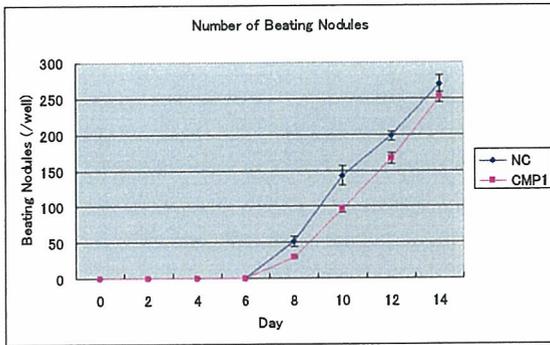
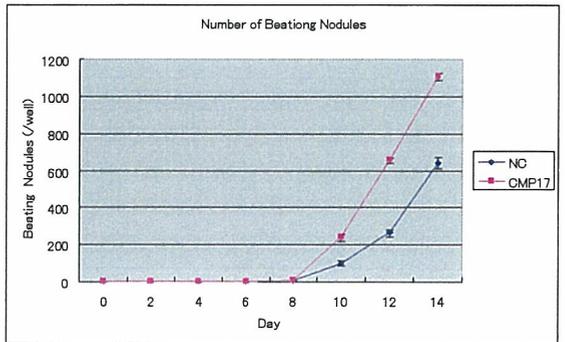
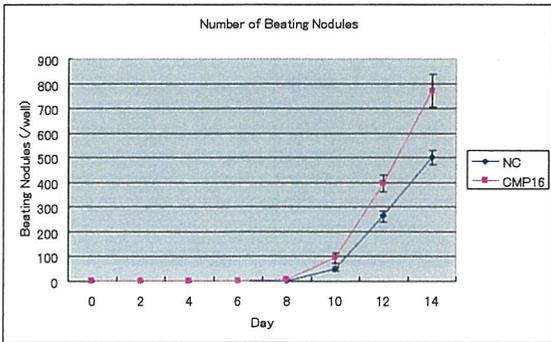
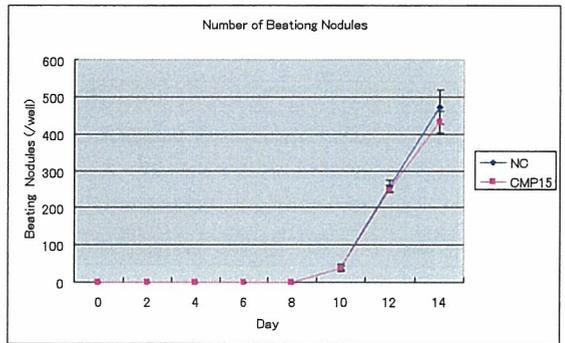
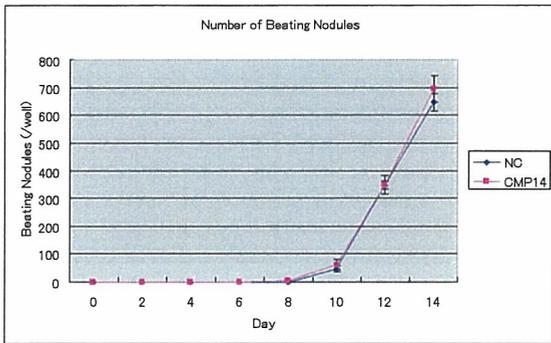
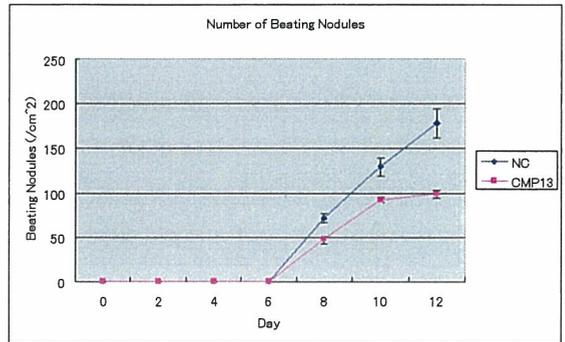
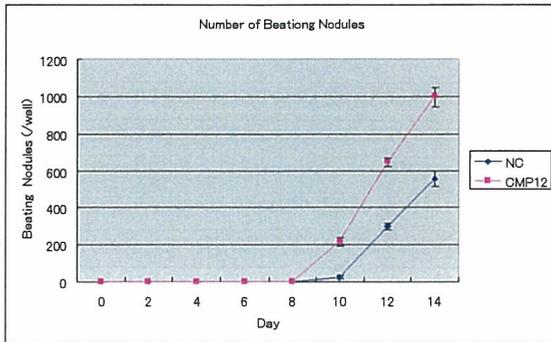
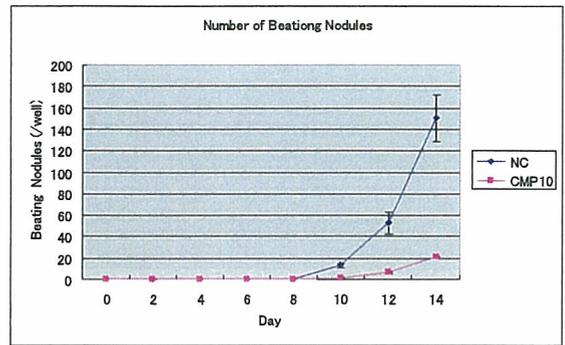
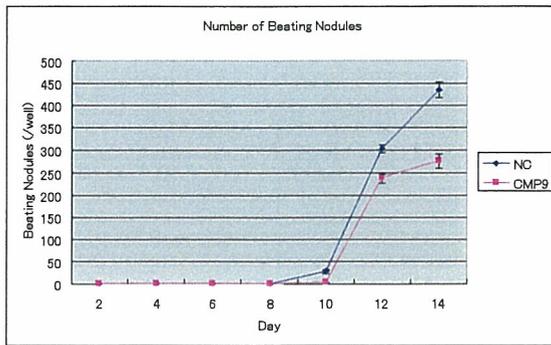


Fig.50 各 CMP 遺伝子のノックダウン効率

RNAi により、各 CMP 遺伝子の発現がどの程度抑制されたかを示している。縦軸は CMP 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示している。11、19、22 を除く 19 個の CMP 遺伝子で有意な発現の抑制が認められた。

[平均値±SEM (n=6)]、*p < 0.05 vs. Negative Control





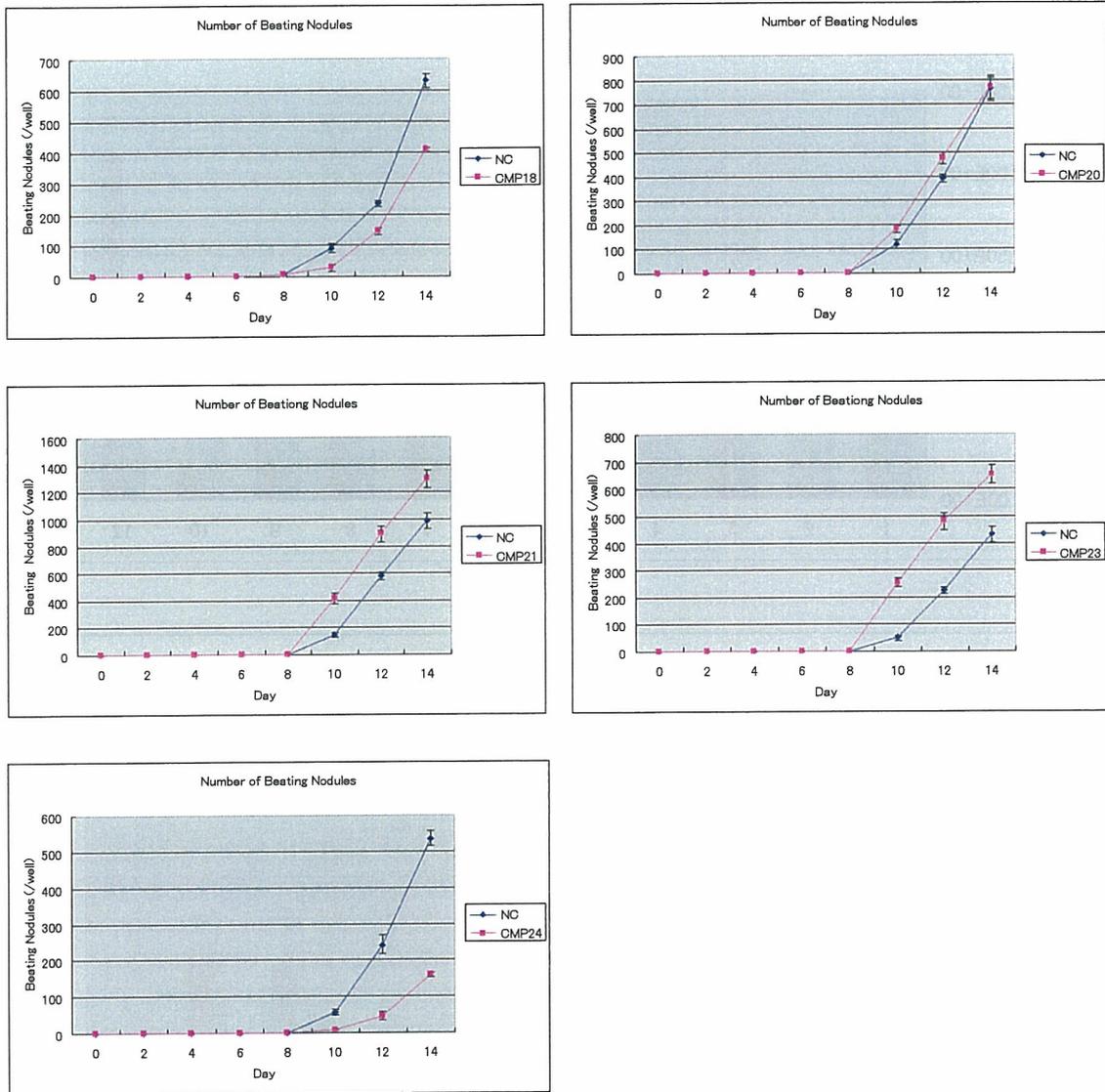


Fig.51 自律拍動する小結節数の時間変化

RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における自律拍動する小結節数を測定した。機能阻害により、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP24 では有意な減少が、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23 では有意な増加が認められた。 $p < 0.05$ vs. Negative Control, $n=4$

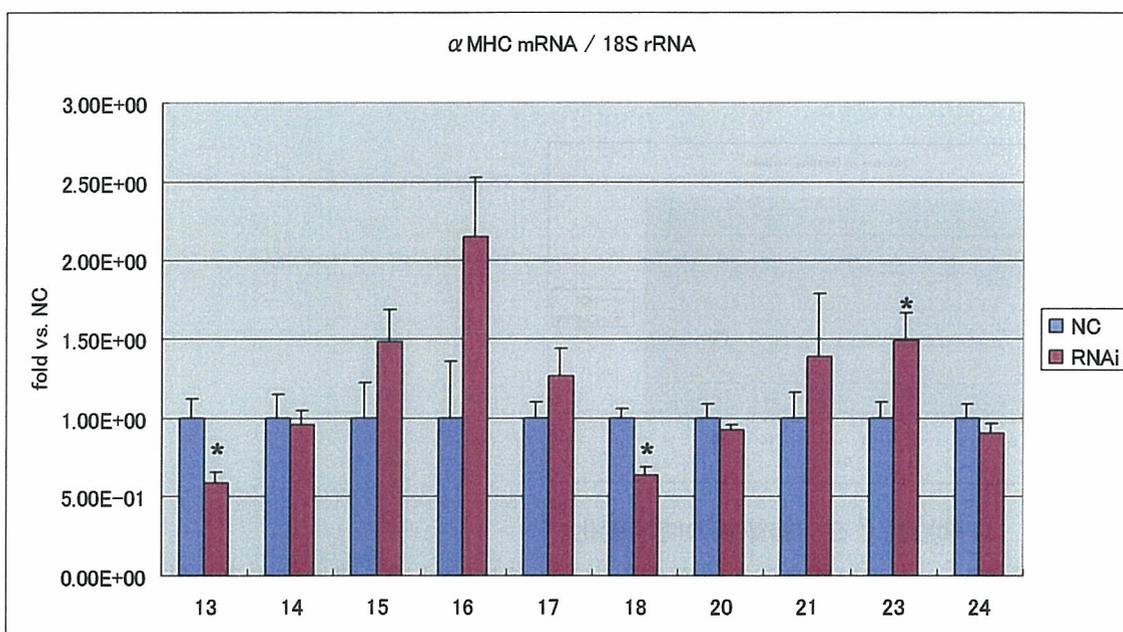
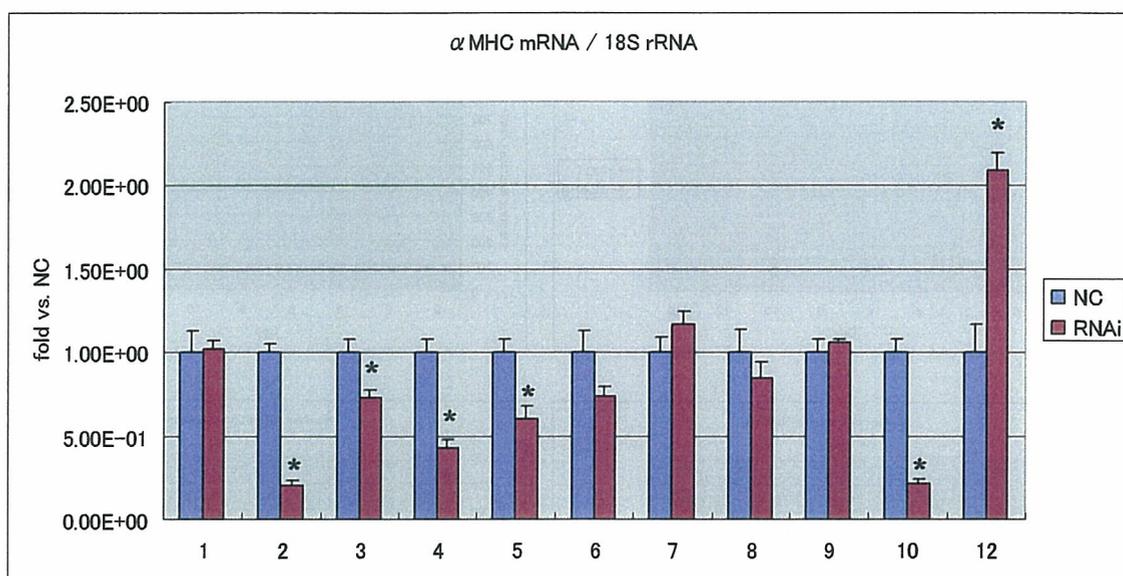


Fig.52 分化誘導後 14 日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における α MHC 発現量を測定した。縦軸は、 α MHC 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示す。[平均値 \pm SEM (n=4)]、*p < 0.05 vs. Negative Control

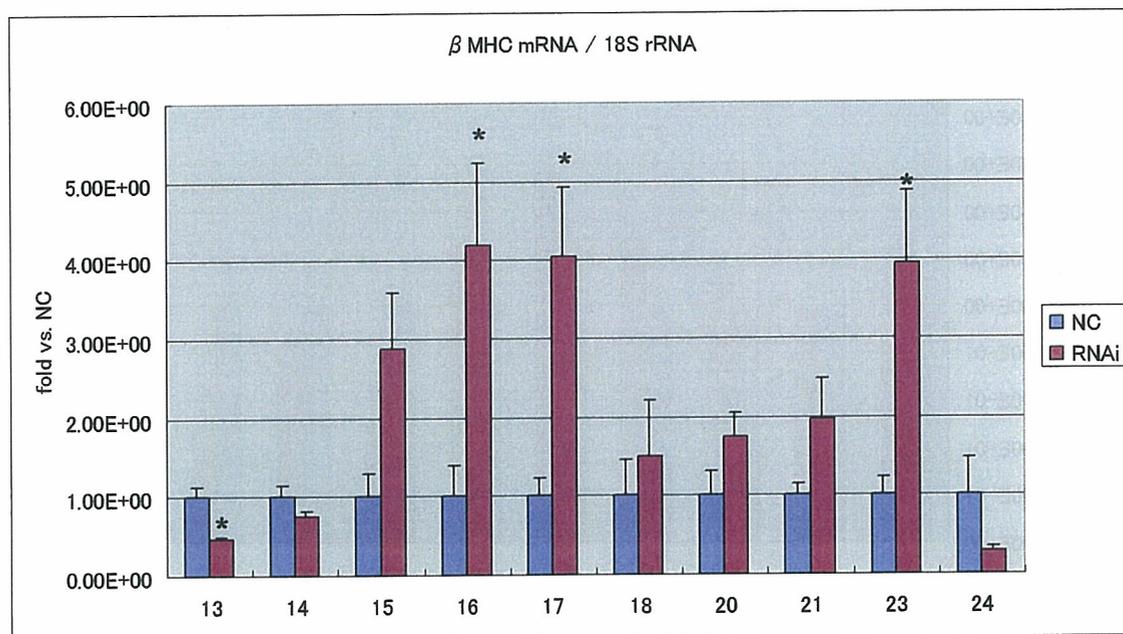
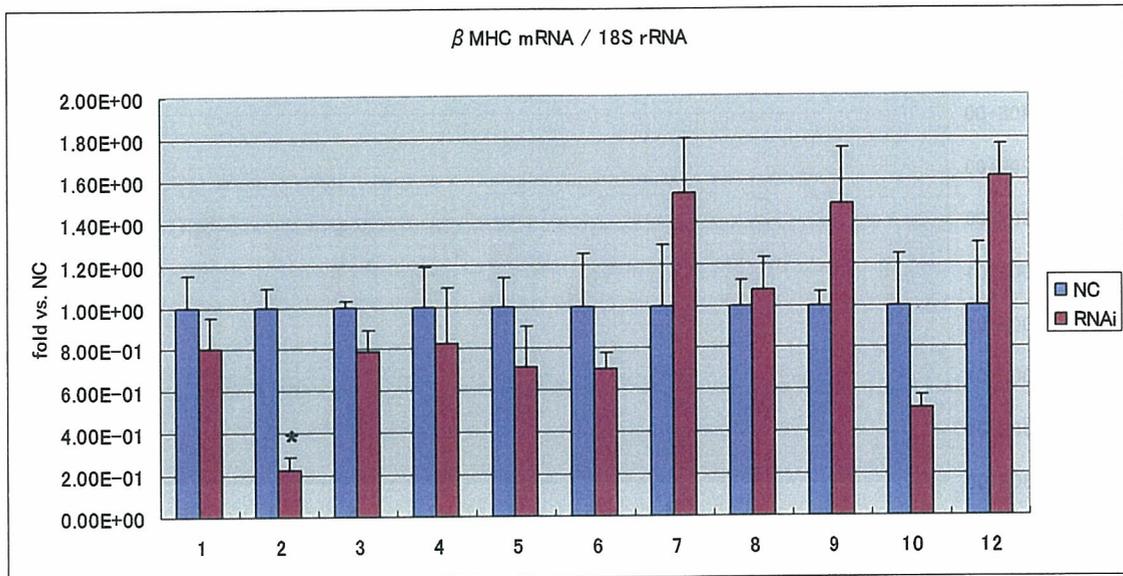


Fig.53 分化誘導後 14 日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定
 RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における β MHC の発現量を測定した。縦軸は、 β MHC 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示す。[平均値 \pm SEM (n=4)]、*p < 0.05 vs. Negative Control

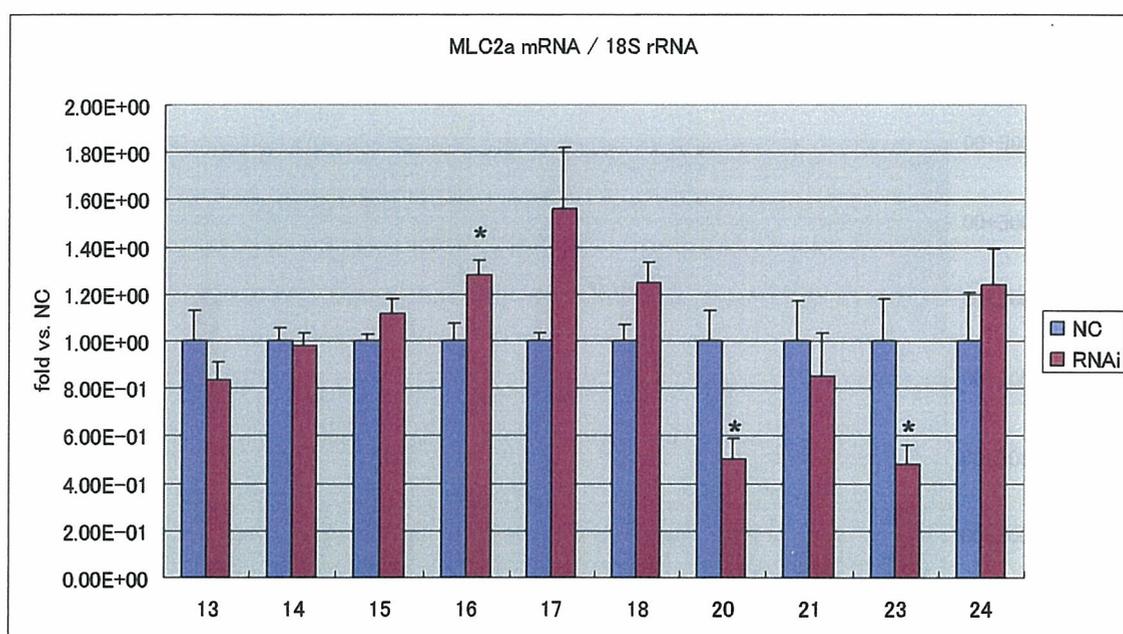
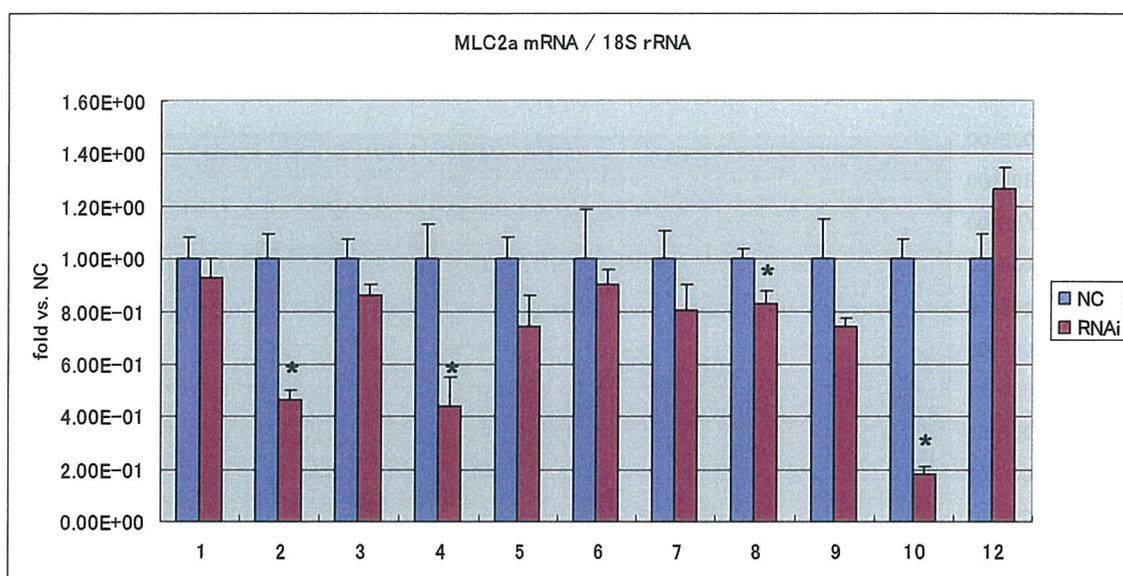


Fig.54 分化誘導後 14 日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定
 RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における MLC2a の発現量を測定した。縦軸は、MLC2a 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示す。[平均値±SEM (n=4)]、*p < 0.05 vs. Negative Control

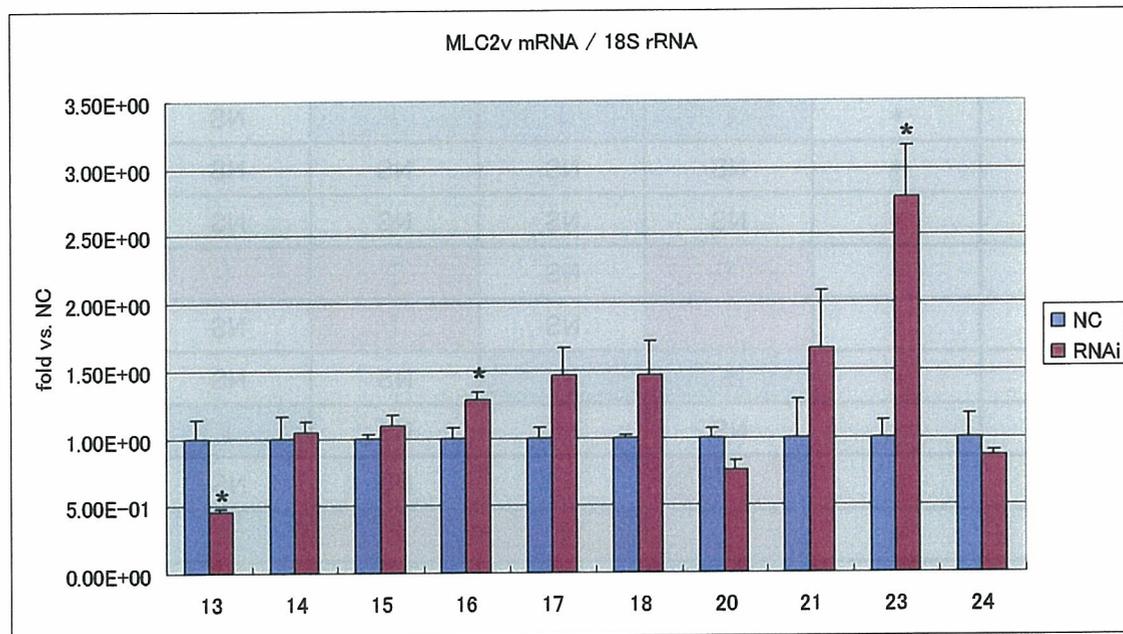
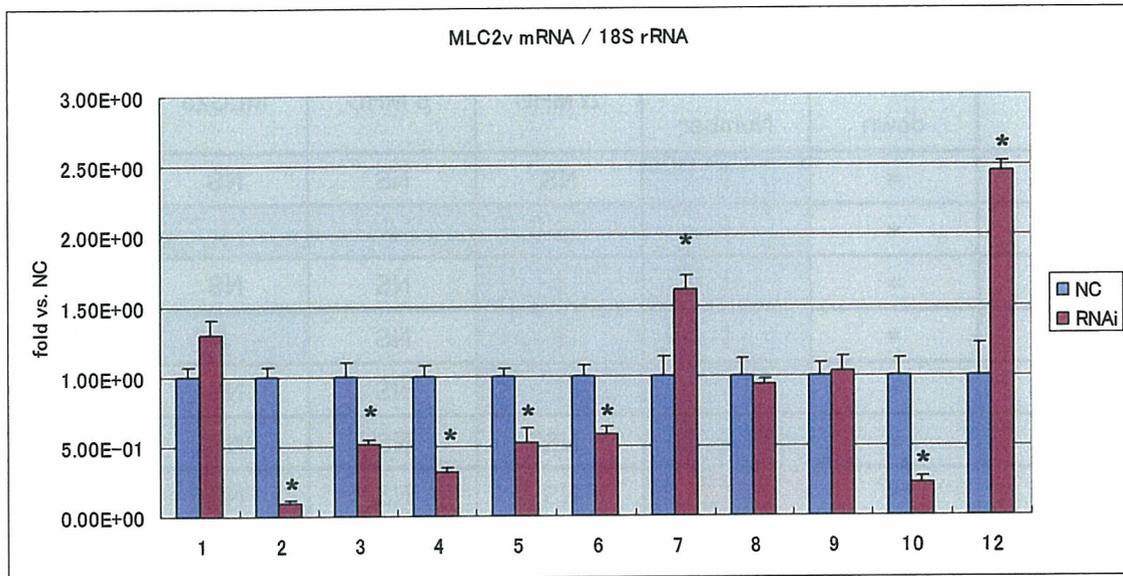


Fig.55 分化誘導後 14 日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における MLC2v の発現量を測定した。縦軸は、MLC2v 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示す。[平均値±SEM (n=4)]、*p < 0.05 vs. Negative Control

Table 4 各 CMP 遺伝子の機能阻害試験

No	knock down	Nodule Number	α MHC	β MHC	MLC2a	MLC2v
1	*	↓	NS	NS	NS	NS
2	*	↓	↓	↓	↓	↓
3	*	↓	↓	NS	NS	↓
4	*	↓	↓	NS	↓	↓
5	*	↓	↓	NS	NS	↓
6	*	↓	NS	NS	NS	↓
7	*	↑	NS	NS	NS	↑
8	*	NS	NS	NS	↓	NS
9	*	↓	NS	NS	NS	NS
10	*	↓	↓	NS	↓	↓
12	*	↑	↑	NS	NS	↑
13	*	↓	↓	↓	NS	↓
14	*	NS	NS	NS	NS	NS
15	*	NS	NS	NS	NS	NS
16	*	↑	NS	↑	↑	↑
17	*	↑	NS	↑	NS	NS
18	*	↓	↓	NS	NS	NS
20	*	NS	NS	NS	↓	NS
21	*	↑	NS	NS	NS	NS
23	*	↑	↑	↑	↓	↑
24	*	↓	NS	NS	NS	NS

各 CMP 遺伝子のノックダウン効率とノックダウン後の心筋細胞分化の変化を示している。
 *: RNAi により有意にノックダウンされた ($p < 0.05$ vs. Negative Control); ↓: ノックダウン後に有意に減少した ($p < 0.05$ vs. Negative Control); ↑: ノックダウン後に有意に増加した ($p < 0.05$ vs. Negative Control); NS: 有意差なし。

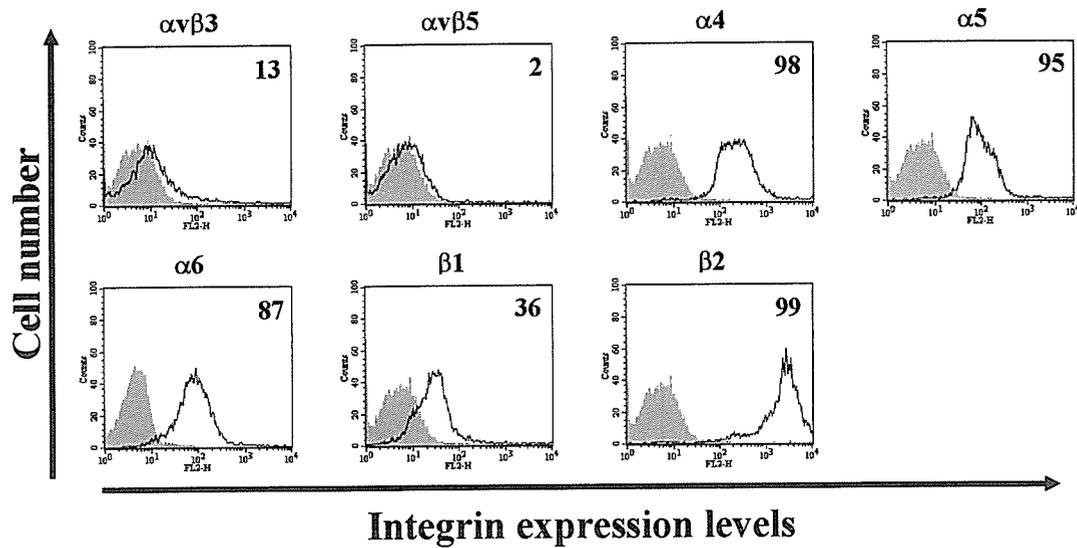


Fig.56 Flow cytometric profiles of integrin expression on human bone marrow-derived CD34⁺ cells. The cells were stained with anti-integrin antibodies, followed by a PE-labeled secondary antibody, and subsequently analyzed by a flow cytometer (thick line). As a negative control, the cells were incubated with isotype control antibody (shaded histogram). Percentage of positive cells is shown by number in upper right-hand corner of each profile.

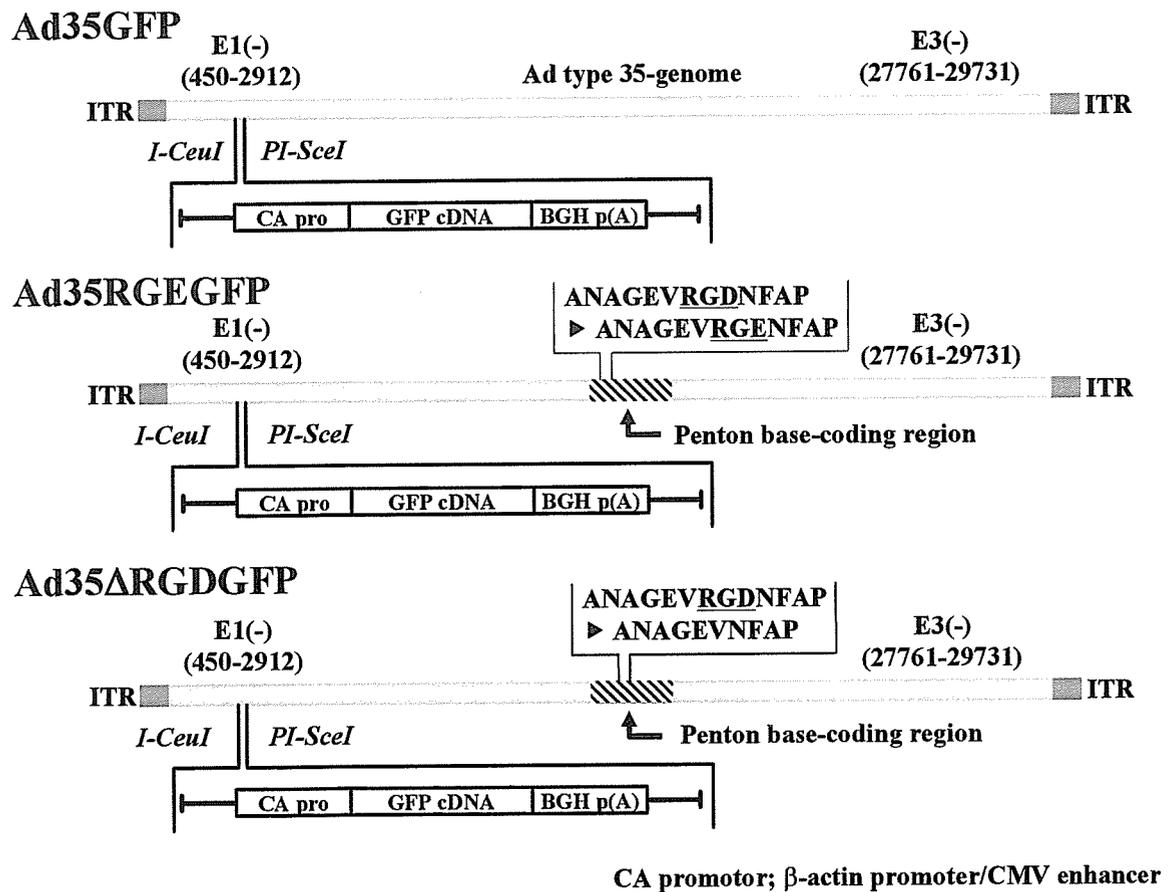


Fig.57 Schematic representation of adenovirus used in this study

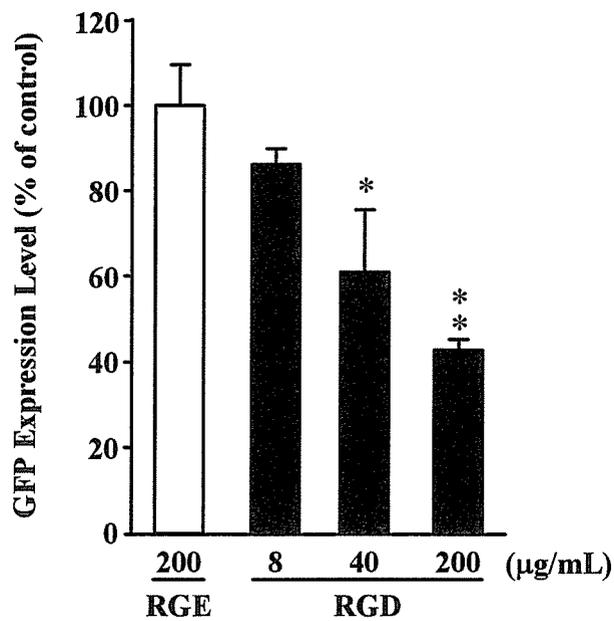


Fig.58 Inhibition of Ad35 vector-mediated transduction by RGD synthetic peptides. Human CD34⁺ cells were incubated with RGD synthetic peptides at the indicated concentrations at 4 °C for 1 h prior to the addition of Ad35GFP, and then left for 3 h at 37 °C. Samples were then washed, resuspended in a fresh medium, and incubated at 37 °C. GFP expression levels were measured 48 h after transduction by flow cytometry. The data were normalized to the GFP expression levels (MFI) in human CD34⁺ cells in the presence of control RGE peptides. The data are expressed as the mean \pm S.D. ($n=3$) * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ for comparison with the cells pretreated with control RGE peptides.

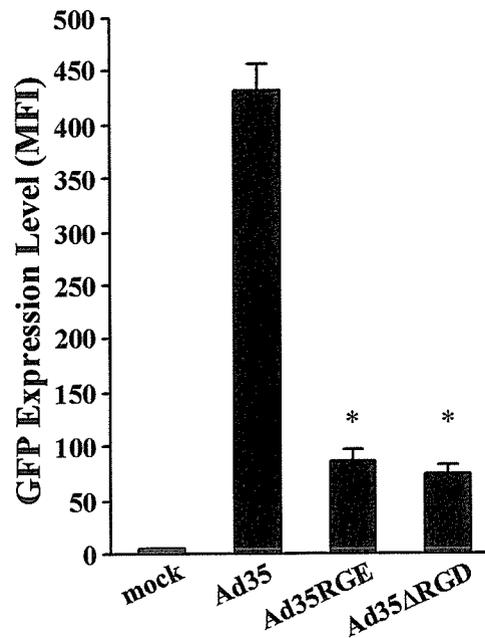


Fig.59 Comparison of GFP expression levels in human CD34⁺ cells transduced with Ad35GFP, Ad35RGEGFP, and Ad35ΔRGDGFP. Human CD34⁺ cells were transduced with 6000 VP/cell of Ad35GFP, Ad35RGEGFP, and Ad35ΔRGDGFP for 6 h at 37 °C. GFP expression levels (MFI) were measured 48 h after transduction using flow cytometry. The data are expressed as the mean ± S.D. (n=3) **P* < 0.001 for comparison with the cells transduced with Ad35GFP.

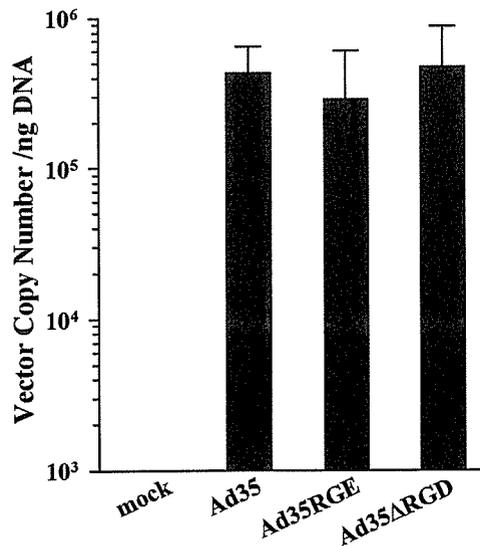


Fig.60 Viral uptake of several Ad35 vectors in human CD34⁺ cells. The cells were transduced with Ad35GFP, Ad35RGEGFP, and Ad35ΔRGDGFP for 3 h at 37 °C. After incubation, the cells were washed five times with ice-cold PBS, and total DNA, including the Ad vector DNA, was extracted. The copy numbers of the Ad vector DNA were quantified by TaqMan PCR. The data are expressed as the mean mean ± S.D. (n=4)

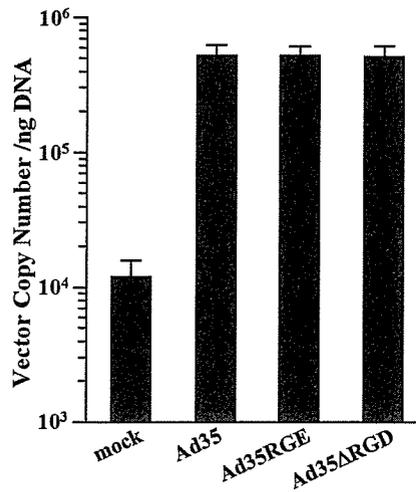


Fig.61 Cellular attachment of Ad35 vectors on human CD34⁺ cells. Human CD34⁺ cells were incubated with Ad35GFP, Ad35RGEGFP, and Ad35ΔRGDGFP for 3 h at 4 °C. After incubation, the cells were washed five times with ice-cold PBS, and total DNA, including the Ad vector DNA, was extracted. The copy numbers of the Ad vector DNA were quantified by TaqMan PCR. The data are expressed as the mean \pm S.D. ($n=4$)

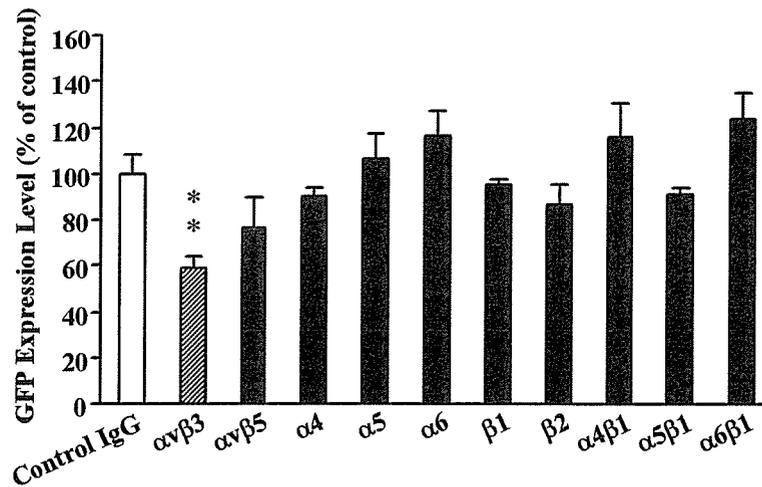


Fig.62 Inhibition of Ad35 vector-mediated transduction by monoclonal anti-integrin antibodies. Human CD34⁺ cells were preincubated with each antibody at 50 μ g/mL for 1 h at 4 °C, and then added 3000 VP/cells of Ad35GFP. The cells were incubated at 3 h at 37 °C, and then cells were washed, and resuspended in a fresh medium and incubated at 37 °C. GFP expression levels were measured 48 h after transduction using flow cytometry. The data were normalized to the GFP expression levels (MFI) in human CD34⁺ cells in the presence of control mouse IgG. The data are expressed as the mean \pm S.D. ($n=3$) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ for comparison with the cells preincubated with control IgG.

Fig.63 HL60 細胞 c-myc 増幅領域のジャンクション配列の特徴

Short homology

6b-4a

```

5'→
ACCTTAATTG TTGCATCTGG ACACGAGATG TTCTTAACTC TAAGGCTCAG GGTCTCTCCA CCTGAACACA CTGATCOCCA CTGGCCTTAG TCAGTGTGAC AGAGTCACAG GCGCCATT 130155424 6
ACTTTAATTG TTGCATCTGG ACACGAGATG TTCTTAACTC TAAGGCTCAG GGTCTCTCCA CCTGAACACA CTGATCOCCA CTGGCCTTAG TCAGTGTGAC AGAGTCACAG GCGCCATT HL60
TGTCCCTGGA ACACTTAAAG CATGCTTCA ACTGAACAGC TTCTGCTCTG GATTTCTGT TCTGAGATA TTTGCTTATG TTTATATGTT ATATGTTTAT AGCCAACTCT CTACACACAG 128758252 4
5'→

```

JOINT部分に2bpのShort Homology。

4b-5a

```

3'←
TCACTGTATGA CATCAGGACT AGAAGGCAC AGAGTCAGG TTGAAAACCA GCGTCTCTGG GTTCATATA TT GTGCTCTTTC CCTTCTGQC TTTTGTAG AGCTTCA GAT GGTCAACATT 130070039 5
TCACTGTATGA CATCAGGACT AGAAGGCAC AGAGTCAGG TTGAAAACCA GCGTCTCTGG GTTCATATA TT GTGCTCTTTC CCTTCTGQC TTTTGTAG AGCTTCA GAT GGTCAACATT HL60
GZACACTCAC ATGZATACAC ATACGGCTTC CCTTAAACTG TCATTCAAG GCGGAAATGT TTAGGAAAG AAGAAAAGAG CAGCAAGGTT GGGTGGGAG CAGGAGAGA AAGGCTCTTC 128841158 4
3'←

```

JOINT部分に3bpのShort Homology。両側にも6bpのShort Homology。

3a-2a

```

3'←
ACCTTTAGCT AGCTTTGCCC AAAGGCTCAA ATGGGATCAT CACAGACCTT GCGCGGTGA CTGGCCTTG TCTTTTAC AGAAGCTGAG CATCCCTGC CACAGAGTAT TTGGACAAGG 126779955 2
ACCTTTAGCT AGCTTTGCCC AAAGGCTCAA ATGGGATCAT CACAGACCTT GCGCGGTGA CTGGCCTTG TCTTTTAC AGAAGCTGAG CATCCCTGC CACAGAGTAT TTGGACAAGG HL60
ATAAAAAGA CAGGATTACA GTTGTGTTG GGAAGAAC CTTGAGTAA TTAATAAGA CAGGCGCACA TTTGGTATGT TTTCRAAATT TCCAGTGGGA GGNATAATG CTTGACTGTG 128137504 3
5'→

```

JOINT部分にあるTATGTTTTは後ろの部分が重複した。

7b-8-1a

```

3'←
CTAAGTCAC CACTCTCTCA GAGTGAACC AGAAAGCTC TATCTGGC TACCAAAAA CAGGTCATAA AATCTTATTG ATACCTTAA ATGAATATGT GTTCCCTTG CTAACAAGT 126293633 1
CTAAGTCAC CACTCTCTCA GAGTGAACC AGAAAGCTC TATCTGGC TACCAAAAA CAGGTCATAA AATCTTATTG ATACCTTAA ATGAATATGT GTTCCCTTG CTAACAAGT 126293633 8
AATCAAGAC CTTACTTTCA GAGTGTGTTA TTCAATGAC CTTCTTCCG CTAATAATCA CTAATATGAT GAAAAAAT GTTTTAAAT CTGTAAAGCT ACTGGAATTT ATTAATATC TAAATGTAAG 5'→
3'←
GTCTTTCTCA AACACATTA AGTTGAQCA AGGCTTGGAG GAGCCTCAGG AAGTCTCTCT TTCTGTGAC TCGCGTCTC GGAACGCTG TTGAAATGCC OCTGCGCCCT GCGTCTCTC 130767297 7
ACAATTTCTG AGGAAAAA CTGATGGAC TAAAATGACA AGAAACATGC AGAATATGC ATTATAAAG GCTGCCAGG APTTAAAGCT GTTAAATGCC OCTGCGCCCT GCGTCTCTC HL60
ACAATTTCTG AGGAAAAA GTGATGGAC TAAAATGACA AGAAACATGC AGAATATGC ATTATAAAG GCTGCCAGG APTTAAAGCT GTTAAATGCC OCTGCGCCCT GCGTCTCTC 136650022 5'→

```

7-3'と1-5'は逆方向の8を挟む。1のBREAKPOINTは回文構造で8とShort Homologyを持つ。8と7のJOINTもGTGTTの5塩基が重なっている。

Complementary Sequence

1b-3b

```

5'→
CCTTCTCA GA TTGCAATCA CTTCTTTCAG TGAATGACC TCTGCTTTC GATCTTCTC TCCCTTACTC ATTCACTCA TTTCATGCA ATGTCTTGG CCAACACAAT GAAAACTGG 128413727 3
CCTTCTCA GA TTGCAATCA CTTCTTTCAG TGAATGACC TCTGCTTTC ATATATTATG GGGTATGAT AATTAGTGC ACATGCTATC TATGCAOCCA GAGAAGACA GCAGAGATA HL60
ACACTGTCT CCTTCAGAAA CAACCTGAAA TATGAATCA CTTTTTAAAG TCAACACATG TGATATGAT AATTAGTGC ACATGCTATC TATGCAOCCA GAGAAGACA GCAGAGATA 126616379 1
3'←

```

3-3'のBREAKPOINTに一つ回文構造。1-3'のBREAKPOINTの下流に8塩基の回文構造がある。挟んだ19塩基の由来は分からないが、両端のCATAとTATGはLOOP構造を作りうる

2b-6a

```

5'→
GCACTCTCTC CTCTGAAAT GTGTAAGATG AAAACAATT GGGAAATAA AACTATCAAG TAGTGTGTA ACCAGCACTA GGATTTATGC TTTCTGAGT ATCCAGACT TTTTAACTAT 127455529 2
GCACTCTCTC CTCTGAAAT GTGTAAGATG AAAACAATT GGGAAATAA AACTATCAAG CTACACAGTT CATTTTTGTG AAGGAAACA CACTATACA CATTATATCA TACACAGCA HL60
AAGGAAATC CAATTTGTA CAGATACTG CCACCTATTG GATGCTGTG TTAGAAAT CTACACAGTT CATTTTTGTG AAGGAAACA CACTATACA CATTATATCA TACACAGCA 130081014 6
5'→

```

JOINT部分の両側に相補配列。

5b-7a

```

5'→
TCAATGCTCA CCGGAAATG TGTAAATG CTTCTTAT CTCTTCTCT CTAAGACTT GTTTCTCTC CTTCTCTAG TACAATAAT GGGCACTCTC TAATTCAAA ATTCAAGTC 130284510 5
TCAATGCTCA CCGGAAATG TGTAAATG CTTCTTAT CTCTTCTCT CTAAGACTT GGAGGCTGG CCTTCTCTAT CTTAATCACT TCTCTCACTG CCTTAGAC CAAATAATA HL60
TTGTTTTAAA TTATTTGTA TGTACTAT CTGCTCTCC ACTAAGATAT AAGTCTAGT AGAGGCTGG CCTTCTCTAT CTTAATCACT TCTCTCACTG CCTTAGAC CAAATAATA 130436264 7
5'→

```

JOINT近傍に7bpのShort Homology。その近傍に回文構造。

7b-8-1a

```

3'←
CTAAGTCAC CACTCTCTCA GAGTGAACC AGAAAGCTC TATCTGGC TACCAAAAA CAGGTCATAA AATCTTATTG ATACCTTAA ATGAATATGT GTTCCCTTG CTAACAAGT 126293633 1
CTAAGTCAC CACTCTCTCA GAGTGAACC AGAAAGCTC TATCTGGC TACCAAAAA CAGGTCATAA AATCTTATTG ATACCTTAA ATGAATATGT GTTCCCTTG CTAACAAGT 126293633 8
AATCAAGAC CTTACTTTCA GAGTGTGTTA TTCAATGAC CTTCTTCCG CTAATAATCA CTAATATGAT GAAAAAAT GTTTTAAAT CTGTAAAGCT ACTGGAATTT ATTAATATC TAAATGTAAG 5'→
3'←
GTCTTTCTCA AACACATTA AGTTGAQCA AGGCTTGGAG GAGCCTCAGG AAGTCTCTCT TTCTGTGAC TCGCGTCTC GGAACGCTG TTGAAATGCC OCTGCGCCCT GCGTCTCTC 130767297 7
ACAATTTCTG AGGAAAAA CTGATGGAC TAAAATGACA AGAAACATGC AGAATATGC ATTATAAAG GCTGCCAGG APTTAAAGCT GTTAAATGCC OCTGCGCCCT GCGTCTCTC HL60
ACAATTTCTG AGGAAAAA GTGATGGAC TAAAATGACA AGAAACATGC AGAATATGC ATTATAAAG GCTGCCAGG APTTAAAGCT GTTATAAAG AAGGCAAAA GAAACTCTGA 136650022 5'→

```

7-3'と1-5'は逆方向の8を挟む。1のBREAKPOINTは回文構造で8とShort Homologyを持つ。8と7のJOINTもGTGTTの5塩基が重なっている。

細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究

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1室長

細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究として、ウイルス等の感染性因子の高感度検出のための基盤技術の開発の検討を行っている。本年度は昨年度に引き続き、ウイルスの高感度検出のためのポリエチレンイミン結合磁気ビーズ（PEI ビーズ）を用いたウイルス濃縮法の開発と本法のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討を行った。その結果、A型肝炎ウイルス（HAV）のPEIビーズによる濃縮はpHやFCSに依存せず、10ml（100倍量）からでも高効率で濃縮可能であること、ヒト血液試料中のウイルス濃縮についてはヒト正常血漿で希釈しても高い濃縮効率が得られるが、ヒト正常血清では濃縮効率が劣ることが明らかになった。B型肝炎ウイルス（HBV）のPEIビーズ濃縮はFCSで阻害され、HAVよりも濃縮効率が劣るが、抗HBV-IgM抗体の添加で濃縮効率は改善された。また、ヒト正常血漿で希釈した場合、抗HBV抗体陽性試料は濃縮されたが、ウインドウ期の試料の濃縮は困難であることが示唆された。C型肝炎ウイルス（HCV）はHAVと同様、ヒト正常血漿中のウイルスをPEIビーズにより高効率で濃縮可能であった。また、PEIビーズ濃縮により、血漿中に含まれる1IU/mlのHCVを確実に検出可能であることが明らかになった。さらに、ジェノタイプと由来の異なる10種類のHCVを全て濃縮可能であることが確認された。以上の結果より、PEIビーズによるウイルス濃縮法は細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保上問題となるHAV、HBV、HCVにも適用可能であること、特にHAV、HCVはヒト血漿試料からも効率よく濃縮可能であることから、これらウイルスの血液試料を用いた高感度スクリーニング検査にも有用な方法であることが示唆された。

研究協力者

小木 美恵子 金沢工業大学
佐藤 功栄 埼玉県赤十字血液センター
研究部
岩田 明子 埼玉県赤十字血液センター
研究部

A. 研究目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や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用いる細胞・組織加工医薬品・医療用具（細胞組織利用医薬品）の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医薬品として用いる治療法はガン、

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。本邦においても、様々な形での細胞組織利用医薬品の開発が進められているが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。なかでも重要な課題となるのが細胞組織利用医薬品の品質、安全性の確保である。細胞組織利用医薬品の安全性面での最重要課題はウイルス等の感染症の伝播をいかに防止するかである。細胞組織利用医薬品には原料である細胞、組織に由来するウイルス等の感染性因子や製造工程で用いる血清や添加剤等から迷入する感染性因子による汚染のリスクが存在する。しかし、細胞組織利用医薬品はその性質上、ウイルス等の感染性因子を不活化・除去するための滅菌や高度な精製といった処理を行うことが困難であるため、ウイルス等の感染性因子が混入していると患者や患者の家族等に感染が広がる危険性がある。従って細胞組織利用医薬品ではドナースクリーニング等の検査を行うことによる原材料の安全性確保、及び製造工程中での生物由来原料に由来する汚染リスクの低減が求められる。

本研究では、細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究として、ウイルス等の感染性因子の高感度検出技術の開発及び安全性評価技術の開発に関する研究を行うことを目的とする。昨年度は、ウイルスゲノムを核酸増幅法（NAT）で高感度検出するためのウイルス濃縮法の開発を目的として、ポリエチレンイミン（PEI）を結合した磁性粒子（PEIビーズ）を用いたウイルス

濃縮法の最適化についてモデルウイルスを用いて検討し、広範なウイルスを濃縮可能な条件を明らかにした。また、ヒト感染性ウイルスへの適用について検討を行った。今年度は、ヒト肝炎ウイルスであるA型肝炎ウイルス（HAV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）への本法の適用についてさらに詳細に検討を行った。

B. 研究方法

(1) ウイルス

A型肝炎ウイルス（HAV）は、ATCC（strain HM175/18f）より入手後、FRhK-4細胞を用いて *in vitro* 培養系で9-11日間増幅した培養上清を試料として用いた。B型肝炎ウイルス（HBV）はHBV DNA 第1次国内標準品（genotype C, 力価：4.4 x 10⁵ IU/ml）及び市販のHBV ジェノタイプパネル（BBI Diagnostics; Hepatitis B Virus DNA Genotype Performance Panel PHD201(M)）を用いた。C型肝炎ウイルス（HCV）は第1次国内標準品（genotype HCV-1b, 力価：10⁵ IU/ml）及び市販のHCV ジェノタイプパネル（BBI Diagnostics; Worldwide HCV Performance Panel WWHV 302）のうちの10種類の試料を用いた。尚使用したHCV ジェノタイプパネルの詳細はFig. 6Bに記載した。

(2) ウイルスのPEIビーズによる濃縮

PEIビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズ（粒径0.8 μm）に、平均分子量70,000のPEIを水溶性カルボジイミド存在下でカップリングして作製した。

ウイルスの濃縮は、通常、無血清培地（DMEM）あるいはウシ胎児血清添加培地

(DMEM + 2% FCS) で希釈したウイルス液 1mL もしくは 10mL を用いて行った。ウイルス液に PEI ビーズ溶液 100 μ L (5mg の磁気ビーズを含む) を添加混合し、10 分間反応後、PEI ビーズを含む懸濁液を磁性スタンドにセットして 5 分間の磁気分離を行った。上清を除去した PEI ビーズ画分あるいは PEI ビーズ処理をしていないオリジナルのウイルス液 100 μ L にウイルスゲノム抽出液 (スマイテスト EX-R&D、(株)医学生物研究所) を加え、添付プロトコールに従ってウイルス核酸を抽出した。なお、PEI ビーズは PCR 反応を阻害するため、抽出の途中で遠心ろ過フィルター(孔径 0.22 μ m)を用いて除去した。

(3) ウイルスゲノムの定量

抽出したウイルス核酸は 10mM Tris/1mM EDTA (TE) 50 μ L あるいは 100 μ L に溶解し、そのうちの 10 μ L を PRISM 7000 (Applied Biosystems)を用いたリアルタイム定量 PCR あるいはリアルタイム定量 RT-PCR により定量した。HAV, HCV のリアルタイム定量 RT-PCR には Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen 社) を、HBV のリアルタイム定量 PCR には Platinum Quantitative PCR Super Mix-UDG with ROX (Invitrogen 社)を用いた。また、HCV の検出感度を検討する際には 2 段階 PCR を行った。各ウイルスの検出に用いたプライマー、プローブの組み合わせを Table 1 に示す。

(4) ウイルス濃縮時の pH の影響

無血清培地 (DMEM) あるいは血清添加培地 (DMEM + 2%FCS) に pH の異なる

Good's buffer を添加し、最終濃度 20mM に調整した。作製した pH4~8 の 5 種類の pH の異なる培地でウイルスを希釈後、常法に従って PEI ビーズによる濃縮を行った。

(5) 抗 HBV-IgM 抗体の作成

adr サブタイプ及び adw サブタイプの 2 種類の組換え HBV 表面抗原 (HBVsAg; Advanced ImmunoChemical より入手) を混合してウサギに免疫した。IgM タイターが上昇した免疫 10 日目に採血し、抗 HBVsAg-ウサギ抗血清を得た。抗血清は等量の PBS で希釈後、PEI セファロース 6MB カラムにアプライし、20ml の PBS で素通り画分を溶出後、1.4M NaCl/100mM HEPES (pH 7.0) でカラム結合画分を溶出した。結合画分を回収し、PD-10 カラムで脱塩後、Immuno Pure IgM purification kit (Pierce 社)を用いて IgM を濃縮し、抗 HBV-IgM 抗体として使用した。

(6) ヒト血液試料からのウイルス濃縮

ヒト正常血漿またはヒト正常血清でウイルスを希釈し、常法に従って PEI 磁気ビーズでの濃縮を行った。ヒト正常血漿及びヒト正常血清は Sigma 社で購入したものを用いた。ヒト正常血清をフィルターろ過する場合は 0.22 μ m の PVDF 膜でろ過して使用した。

倫理面への配慮

動物実験を行う際には、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めた