

顆粒球が採取されることが確認できた。

健常人に対する G-CSF の投与は、同種末梢血幹細胞移植の末梢血幹細胞採取のための投与にのみ保険適応が認められているものである。末梢血幹細胞採取時の G-CSF 投与量は $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日} \times 5 \sim 6$ 日間で、G-CSF 投与による副作用として腰痛、骨痛、頭痛、全身倦怠感、筋肉痛等が高頻度に認められる。また末梢血白血球数は採取直前には $50,000/\mu\text{l}$ 以上に増加し、欧米においては、脾破裂、あるいは血小板機能亢進によると考えられる心筋梗塞や脳梗塞による死亡例の報告もみられている。

顆粒球採取の目的で投与する G-CSF 量は $5 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 1 回の投与である。今回の対象 61 例の中で、骨痛、腰痛、頭痛等の副作用を訴えたドナーはなく、また、アフェレシス中の副反応もみられず採取は安全に施行できた。

しかし、採取直前の白血球数は $4.25 \times 10^4/\mu\text{l}$ ($2.51 \sim 7.20 \times 10^4/\mu\text{l}$) と著明に増加しており文献にみられる値（およそ $2 \sim 30,000/\mu\text{l}$ に増加との報告が多い）に比し高かった。

また、採取直後には白血球数、血小板数、Hb 値が $4.25 \rightarrow 2.29 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $24.4 \rightarrow 21.3 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $14.8 \rightarrow 12.7 \text{g}/\text{dl}$ と減少していた。白血球、血小板に関しては採取に伴う減少であり、Hb は希釈に起因すると考えられるが血小板、Hb 値はいずれも正常値内の動きであった。白血球数に関しては多くのドナーでその後のフォローができておらず正常値へ戻ったことが確認できていない。

顆粒球輸血ドナーはアフェレシスのみならず G-CSF・ステロイド負荷と負

担が大きい。実施にあたっては、顆粒球輸血療法の有効性の評価とともに、ドナーの安全性確保の体制作りが重要である。特に中長期に亘るドナーの健康状態についての調査を実施すべきである。健常ドナーは顆粒球採取のための説明と同意、検査、採取前日の薬剤投与そして採取と数日に渡り来院せねばならず、そのため、採取終了後 1 週目の検査のための来院には非協力的なことが多い。しかし、検査末梢血血液検査や生化学検査値が正常値に回復することを確認することの必要性を十分に説明し協力をお願いすること、さらには G-CSF 投与の影響を長期間フォローする体制を確立し、長期のフォローへの協力の同意を得ておくことが必要である。われわれの施設では、『同意に関する説明文書』の中にフォローに関する項目を盛り込み同意書作成時に確認を行なうようにしている。

E. まとめ

兵庫医科大学血液内科、輸血部における顆粒球採取の現状を報告した。顆粒球採取は安全に実施でき、十分量の顆粒球が採取可能であった。顆粒球ドナーの長期的な副作用把握のための体制を作り、実現のための説明文書の改訂（ドナーへの説明とその同意）を行った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

著書

1, 甲斐俊朗、三澤真人：IV章、3. 成人臍帯血移植の成績、『臍帯血移植』p100-109, (編著者 原 宏、新興医学出版社、東京、2006.3)

論文発表

1, M. Misawa, S. Kai, M. Okada, T. Nakajima, K. Nomura, T. Wakae, A. Toda, H. Itoi, H. Takatsuka, T. Itsukuma, K. Nishioka, Y. Fujimori, H. Ogawa and H. Hara: Reduced-intensity conditioning followed by unrelated umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies: Rapid engraftment in bone marrow. Int J Hematol. 2006 Jan;83(1):74-9.

学会発表

1, Kokubunji A, Ikemoto J, Murata R, Otani Y, Imoto S, Kai S: Ethylene oxide (EtO) and transfusion-induced adverse reactions in a patient on maintenance hemodialysis, (29th ISBT meeting, CapeTown, 2006. 9. 2-7) (Vox. Saguinis Supple 91; 228, 2006)

2, 池本純子、井上玲子、奥田典子、下野珠実、村田理恵、前田和宏、郡谷哲男、国分寺晃、甲斐俊朗、藤岡龍哉、池亀和博、岡田昌也、小川啓恭：顆粒球採取についての現状報告、日本輸血学会近畿支部総会 2006. 11 (大阪)

『健常人ドナーからの顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) およびデキサメサゾンによる動員顆粒球の採取および顆粒球輸血の効果』に関する研究

● 本研究の目的

健常人に顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) という白血球を増やす薬剤の皮下注射とデキサメサゾン (ステロイド剤) 8mg の内服をしていただき、12～24 時間後に流血中に増加した顆粒球 (白血球) を血液成分分離装置を用いて採取します。健常人に対する G-CSF とデキサメサゾンの 1 回投与は問題ないと考えられていますが、その安全性を確認することと、採取した顆粒球を患者さんに輸血しその臨床効果を見ることを目的としています。

顆粒球とは？

白血球の一成分で、細菌や真菌 (かび) を貪食することによって感染症を治す働きがあります。

顆粒球輸血とは？

抗生物質、抗真菌剤そして顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) など、感染症に対する治療法が進歩したにもかかわらず、著明な顆粒球減少期間における重症の細菌感染症や真菌感染症の合併は患者さんを死に至らしめることがあります。造血幹細胞移植、特に臍帯血移植の後には、造血の回復が遅れ顆粒球が殆どゼロの期間が長引き、このような時期に一旦感染症を併発すると重症化し生命を脅かすこととなります。

このような顆粒球の減少時期に合併し、各種抗生剤や G-CSF 投与にも関わらず感染症が治らない患者さんに対して、顆粒球輸血が行われ、一部の患者さんでその有効性が報告されてきました。しかし、従来の顆粒球の採取法では特に成人の患者さんでは輸血される顆粒球の絶対数が圧倒的に不足しており、そのために十分な治療効果が得られませんでした。そのため 1980 年代後半からは顆粒球輸血に関してはごく限られた一部の患者さんにしか行われなくなっていました

しかし、G-CSF が臨床に導入されて以後、健常人に G-CSF を 5～10 μ g/kg (皮下注射) とデキサメサゾン 8mg (経口投与) を 1 回投与して、12～24 時間後に顆粒球を採取することにより、従来行われていたステロイド剤単独投与による採取の 10 倍以上の顆粒球の採取が可能となりました。そして、このようにして採取した顆粒球を輸血することにより輸血前にはほとんどみられなかった顆粒球が輸血後 1 時間後には 2000/ μ l 以上に、24 時間後でも 1000/ μ l 前後に維持されるようになり、臨床的にも移植後に合併した重症感染症に有効であったとの報告がみられるようになってきました。

健常人に対する G-CSF の投与

健常人に対する G-CSF の投与は、現在我が国においては同種末梢血幹細胞移植時の末梢血幹細胞採取のための投与が行われています (ただし現時点においてはその投与は血縁ドナーに限られており、非血縁ドナーには行われていません)。末梢血の幹細胞を採取する時の G-CSF の投与量は 10 μ g/kg/日 x 5～6 日間ですが、顆粒球採取の目的で投与する G-CSF 量は 10 μ g/kg の 1 回の投与です。

● 本研究の方法

顆粒球の採取

- 1) 患者さんにとって輸血の必要な日が決まり次第できるだけ早く供血者に顆粒球採取の日を連絡させていただきます。
- 2) 顆粒球採取日の前日(顆粒球採取 12~18 時間前)に、デキサメサゾン 8mg の内服、G-CSF (グラン) 10 μ g/kg を健常ドナー(供血者)に皮下注射しますので、病院の方へ来院下さい
- 3) 次の日が採取日です。10号館5階輸血部採血室へ、おいで頂き副作用調査票に記入していただきます。その後、血液成分分離装置によりヘスパン(6% HES)を用いて、末梢静脈より約3時間をかけ10 μ lの血液を処理し顆粒球を採取します。採取に要する時間は約3時間ですが、供血者の方の血管の太さにより所要時間は異なります。
- 4) 採取直前および採取直後に約5mlの採血をさせていただきます。
- 5) 採取1週後に来院いただき約5mlの採血をさせていただきます。

供血者として適しているかどうかを判断するための問診および検査。

一般献血に準じた問診を行います。

検査としては以下の項目をさせていただきます。

HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体、HCV 抗体、HTLV-I 抗体、

HIV-1, 2 抗体、梅毒血清反応、

AST、ALT、LDH、Al-P、FBS、血清 Ca 値、CRN、検尿

ABO 血液型、Rh 血液型

検血(白血球数、赤血球数、Hb 値、Hct 値、血小板数、白血球分類)

● 予想される副作用

G-CSF の副作用

顆粒球採取の目的で投与する G-CSF により、翌日の白血球数はおよそ 2-30000/ μ l に増加するといわれています。米国において一般献血者に顆粒球採取目的で G-CSF を投与した報告では骨痛、腰痛、頭痛等の副作用がかなりの頻度で認められるもののその程度は軽いといわれています。また、これらの副作用の頻度は G-CSF 単独よりもデキサメサゾンを併用した方が低いといわれています。しかし、わが国においては供血者にこのような試みを行い多数例で解析した報告はありません。

上記の自覚症状以外に、臨床検査上の異常が、認められることがあります。

先に記しましたように、健常人への G-CSF の投与は通常は、同種末梢血幹細胞移植のドナーに行われております。この場合1日の投与量はこの研究の投与量と同じですが、投与期間が長いと鎮痛剤投与が必要となるような腰痛、骨痛、頭痛や全身倦怠感、筋肉痛等の副作用や異常検査値の発現頻度が高く、また極めて希ではありますが、欧米においては、脾破裂、あるいは血小板機能亢進によると考えられる心筋梗塞や脳梗塞による死亡例の報告がなされています。幹細胞の採取時には一般に末梢血白血球数は50000/ μ l前後に増加しています。我々の施設における同種末梢血幹細胞移植のドナーへの

G-CSF 投与の経験からいえば、G-CSF の 1 日投与では殆ど副作用は認められていません。

デキサメサゾンによる副作用

内服した日は多少のいらいら感や、体の火照りを感じ不眠になることがあります。この薬で糖尿病が悪化する事がありますので血糖値や尿等をあらかじめ検査させていただきます。

HES による副作用

顆粒球を効率よく分離し採取するにはこの薬剤が必要になってきます。HES は代用血漿として臨床に用いられてきた薬剤で、大量に体内に入ると循環系に負担がかかったり、凝固系に異常をきたしたりすることがあります。

顆粒球採取に伴う副作用

採取中に迷走神経反射による気分不良、徐脈、血圧低下が起こることがあります。また、抗凝固剤の ACD(クエン酸)が体内に入りますので低カルシウム血症がおこりそのために口唇のしびれ感が生じることがあります。採取中にこのような症状が生じた場合には適切な処置を行うとともに状況により直ちに採血を中止します。

●副作用に対する対策および短期・中長期フォローへの協力をお願い

上記の副作用および安全性を確認するために顆粒球採取直前・直後および希望により採取後 1 週間後に各種検査を行いますのでご協力をお願いいたします。

また、兵庫医科大学輸血部では、G-CSF を投与したドナーの方の中・長期のフォローのため顆粒球採取後 5 年間簡単な健康調査のアンケートを送らせて頂きます。アンケートが送付されましたらご回答頂き返送して頂くよう宜しくお願い致します。

●費用負担

供血者は勿論のこと患者さんにも費用の負担はありません。顆粒球輸血や輸血に伴う検査費用などは健康保険内で請求させていただきます。

但し、供血者に数回来院していただくための交通費等は負担できません。

●研究参加を拒否しても何ら不利益を蒙らないこと

この研究への協力をお断りになっても、医療上その他で特に不利益を受けることは一切ありません。

●同意後の撤回も自由であること

一旦承諾をいただいた後でも、治療の開始前であれば、考え直してお断りになるのも自由です。

●プライバシーの保護

データは後日研究として発表することになりますが、あなたの症状はもとより、一切

のプライバシーに関することは外部に漏れることはありません。

●人権保護に関する事項

この顆粒球輸血療法は、兵庫医科大学倫理委員会の審査にて適切と判断されたものです。また、供血者や患者さんの意志を大切にされて行われます。従って何か説明を求めたいことや顆粒球採取に至るまで、あるいは採取後でも何か心配なことが生じましたらいつでも遠慮なく申し出て下さい。以上の内容をご理解いただいた上で、『健常人ドナーからの顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) およびデキサメサゾンによる動員顆粒球の採取および顆粒球輸血の効果』に関する臨床研究に参加・ご協力いただける場合には同意書にご署名・捺印をお願いいたします。

平成 年 月 日

担当医： _____

厚生労働科学研究費補助金
医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業
輸血用血液及び細胞療法の安全性に関する研究
分担研究報告書

研究課題 細胞治療のウイルス安全性確保のための新しい検出システム
の開発

分担研究者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長
協力研究者 水谷哲也 国立感染症研究所 ウイルス1部 主任研究官
遠藤大二 酪農学園大 獣医学部 教授

研究要旨

現在輸血により伝搬しうるウイルスとして、HBV、HCV、HIV-1、HIV-2、HTLV-1、HTLV-2、Parvovirus B19、CMV、EBV、WNV、HAV 等が挙げられる。これらのサンプル中に混入する極微量のウイルスを精度よくしかも多種類同時に検出する検査システムの構築を行なう。これまでに10コピーのウイルス核酸の検出を目的に、核酸増幅法を検討した。この結果、血清中のHBV およびHCV を検出可能なレベルまで増幅させることができた。またマルチプレックスで検出可能なプライマー設計およびPCR 条件を検討している。さらに増幅させた微量のウイルス核酸を特異性高く、しかも多種類同時に検出するために、最大64種類まで検出可能なミニアレイのためのチップ作製を開始している。3mm 角のチップにDNA を高密度かつ高強度に固定し、精度の高い判定が可能となる。尿中のJC ウイルス核酸の検出を試みたところ、増幅されたウイルス核酸がチップ上で特異性高くハイブリダイズされることを確認した。今後多種類の微量のウイルス核酸の検出を目指し、条件の検討を行なう。

研究目的

サンプル中に混入する極微量のウイルスを精度よくしかも多種類同時に検出する検査システムの構築が本研究課題の目的である。10コピーのウイルス核酸の検出を次の3つのステップごとに研究小グループをつくり、検出システムの検討を行なう。

研究プロジェクト

- A. 核酸増幅法
- B. マルチプレックス PCR のためのプライマー設計およびPCR 反応の条件設定
- C. マイクロアレイを用いたウイルス核酸検出

A. RNA ウイルスと DNA ウイルス検出のための核酸増幅法

検体中に含まれる 10 分子程度のウイルス核酸検出目的に核酸を 1000 倍以上増幅させてから、DNA チップへハイブリダイズするという手法を用いる。また、RNA は実験室で容易に混入する可能性のある RNase によって分解されてしまうので、逆転写酵素などにより一旦 DNA に置き換える方法を導入する。このように検体中のすべてのウイルス核酸を DNA にすることにより検出系が安定し、また DNA ウイルスと RNA ウイルスを同時に検出できることになる。

研究方法

RNA ウイルスの核酸を感度良く（10 分子程度）検出するためには、（1）RNA 自体を増幅するか、（2）RNA を逆転写酵素などで DNA に変換してから増幅しなければならない。そこで、現在市販されているこれらの増幅キットを用いて増幅効率の検討を行なった。市販のキットの多くは細胞の mRNA を増幅することを目的にしているため、逆転写反応時に oligo dT を用いる。しかし、今回標的ウイルスの中に HCV のようにゲノムの 3' 末端に poly(A) を含まないものが含まれていることから、このようなキットは使用できない。尚、本研究では、各社キットの増幅効率の判定を簡便化するために、キットによる非特異的な増幅産物を特異的なプライマーを用いて PCR で増幅し、アガ

ロース電気泳動で出現するバンドを可視化して判定した。特異的増幅のための PCR はプロメガ社の GoTaq ポリメラーゼを用いた。これまでに、RNA を Invitrogen 社の SuperscriptIII により逆転写反応をおこない、GoTaq で増幅すると 10000 分子の RNA が検出限界であることは検討済みである（data not shown）、検討する増幅キットが 10 分子の RNA を出発点として、最終的に GoTaq によりバンドとして可視化できることが、我々の目的に合致することになる。さらにこれまで合成 RNA やプラスミドを用いて増幅効率の検討を行ない、RNA の増幅には WTA kit、DNA の増幅には genomiphi を用いることに決定した。次に我々は、実際に HCV や HBV 感染患者の血清から核酸を抽出して、これらのキットを用いた検討を行なった。

研究結果

RNA の増幅：Rubicon 社の Whole Transcriptome Amplification (WTA) kit を検討したところ、10 分子まで増幅可能であった。RNA ウイルスの増幅で実験を進める過程で、DNA の増幅には GE ヘルスケア社の genomiphi が有用であることがわかった。Invitrogen 社のプラスミド (pCR2.1) を用いて、検出限界の検討を行なったところ、10 分子まで増幅可能であることがわかった（図 1）。

そこで HCV ゲノムは 1000 分子/・1、HBV ゲノムは 10000 分子/・1 と混入量がわかっているサンプルについて、核酸の増幅

を行なった。HCV については WTA kit で 10~100 分子まで、HBV では genomiphi で 10 分子まで検出されるという結果が得られ、合成 RNA やプラスミドを用いた結果と同様に高感度の系であることが証明された(図 2, 3)。

考察

以上の検討結果から、RNA を増幅するためには Rubicon 社の WTA kit が最も優れており、検体中の 10 分子の RNA を 1000 倍以上に増幅できることが明らかとなった。WTA kit の増幅メカニズムの詳細は不明であるが、ひとつの RNA 分子に対して複数の箇所から Tag 付きプライマーで逆転写反応を行い、Tag 領域に対するプライマーで PCR を行なっているようである。しかし、現時点で WTA kit は 1 検体あたり約 1 万円のコストがかかってしまうので、検査に導入するためにはメーカー側と価格の交渉を行なうか、このキットに類似した方法を独自に開発しなければならない。

B. マルチプレックス PCR の検討

ウイルス核酸を非特異的に増幅した後、マルチプレックス PCR 法によって複数のウイルス由来のバンドを検出するシステムを構築するために、マルチプレックス PCR のプライマー設計を独自の設計プログラムを用いて試みた。

現在多くのプライマー設計のためのアルゴリズムが公表され、いくつかについては、ウイルス検出のためのプライマー

セットが試みられているが、数十となると、その適応が困難となる。これは報告されている設計手法のうち、長いホモロジー領域を並列してから設計が行われる場合、ゲノム配列の多様性が種内に存在するウイルスでは保存領域が限定されるためである。

一方、CODEHOP および PDA-MS/UniQ は、ウイルス分離株間で保存されている 9-12 塩基の短い領域を設計上の起始点としてプライマーを設計するため、本研究のための設計手法としては利用可能性が高いが、これらの設計アルゴリズムによっても、特定のアミノ酸のコード領域のみが対象であり、かつ Multiple Alignment 上での明らかな保存領域を先に決定する必要があるなどの原因から、設計にはそのたびに熟練した塩基配列分析が必要となり、かつ、設計されるプライマーの数は限定される。その結果として、Multiplex PCR 法のためのプライマーセット群としては十分な候補を挙げる事が出来ない可能性が高い。これらの理由から、本グループとして、独自の設計アルゴリズムを整備することとした。

研究方法と結果

1) Multiplex PCR プライマー設計のためのコンピューター言語の決定

近年、CPU の機能向上とメモリ価格の低下により、コンピューター処理上の資源に配慮する必要が減少してきた。それにとまって、塩基配列の分析には Perl,

Rubyなどのスクリプト言語が用いられている。さらに、塩基配列を分析する分野がバイオインフォマティクスと称されるのと同時期にそれら作業に必要とされる処理をまとめてパッケージ化されたコードがセットとして整備された。この、BioPerlやBioRubyといわれるパッケージを利用することにより、バイオインフォマティクスの利用者は、メモリの配分や処理上の制約にとらわれることなく、塩基配列の分析や処理に集中できる。

特に、スクリプト言語の中でも、Rubyという言語については、言語の開発者とバイオインフォマティクスパッケージの開発グループが日本人であるため、本国では他国にはない支援体制が整っていると見える。

このような国内での開発環境の整備状況から、本研究では、開発のためのコンピューター言語にはRubyを選定した。

2) Consensus Hexamer Tailed Degenerated (CHeTD) Primers

独自の設計手法を開発するに当たって、われわれはCodehop PCRプライマーで用いられるように、プライマーの3' 端の短い配列をプライマーのコアとして設計し、その短い領域にdegenerate配列を連結することにより、設計を自動化しつつ適用分離株のスペクトルを広くとることを可能にすることを目指した。このプライマーの3' 端の短い配列を決定する際に、Codehop PCR Primerでは、コドンの縮重

の少ないアミノ酸配列に注目して配列を決定するが、この方法では、ごく少数の配列のみが候補として上げられるのみであった。そのため、短い配列をコアとしてプライマーを設計するDOP-PCR法を基本的な方法として検討することとした。また、その3' 端のコア配列としては、6塩基長のパターンとすることとした。この方法は、DOP-PCR法とCodehop PCR primer法の長所を取り入れたもので、Consensus Hexamerがプライマーを3' tailに配置し、その5' 領域にdegenerated Primerを配置することから、Consensus Hexamer Tailed Degenerated (CHeTD) PCR Primer法と命名し、このアルゴリズムによって設計されるプライマーをCHeTD primerと呼ぶこととした。

CODEHOPやDOP-PCR法では、プライマーの3' の領域を確実に設定することにより、その5' 領域について株間の変異が大きな場合にも、PCR産物を効率よく得られることが報告されている。本研究では、第一の目標として、プライマー全体にとらわれることなく、効率良くウイルス配列を増幅可能な6塩基のプライマーセットを設計することとした。

6塩基のプライマーを設計した後に、その5' 端にdegeneratedな配列を付加した場合、20塩基のプライマー中では、合計8-9塩基の配列はほぼ全ての変異株でも保存されており、塩基配列特異性を持つ有効なプライマーとして機能すると考えられる。このような9塩基程度のプ

ライマーの有効性は Arbitrary プライマーでも示されている。さらに、本研究では、DOP-PCR の 3' 端の配列を増加させてラムダファージを増幅する実験により有効性を検証した。

ラムダファージを鋳型とした実験では、7mer のプライマー配列では、多数の増幅産物のうち、一部のフラグメントのみが増幅・確認されたが、9mer のプライマー配列の場合は、塩基配列から予測される増幅産物と一致するサイズおよび本数のバンドがアガロースゲル上で確認された。この結果から、9 塩基程度のプライマーにより特異的なフラグメントが増幅されることが示唆された。

3) CHeTD Primers の 6 塩基プライマーの設計アルゴリズム

6 塩基のプライマーを考える場合には、プライマー同士が相補的となる場合を厳密に避ける必要がある。本研究では、相互に相補的でなく、適切な(100-1000 塩基の距離で)相補的な位置にある 6 塩基の組み合わせを 6 塩基プライマーとしてウイルス遺伝子上で探索した。

すなわち、多くの変異株間で保存されている 6 塩基の配列を選択した後、それらの 5' 領域を付加することにより CODEHOP PCR プライマーと類似する有用性を持つプライマーセットを整備することとした。この設計により、PCR プライマーとして適切に働く可能性が高い配列のペアとしての 6 塩基プライマーが増幅の

初期を担当し、その 5' 側に多くのウイルス株に対応する degenerated な配列を付加することにより、増幅の後半では 5' 領域が加わった増幅効率の高い PCR 反応が期待できる。

この設計アルゴリズムを実施するために、HIV-1, HCV および HBV の遺伝子について変異株の公表されている情報をすべて集めて、それぞれの塩基配列テーブルを準備した (図 4)。

まず、対象ウイルス遺伝子を一個の MySQL テーブルに格納した。続けて、遺伝子上のセンス鎖およびその相補鎖に存在するすべての 6 塩基配列を遺伝子上の位置および方向と合わせて記録した。このように選択された 6 塩基配列から AAAAAA などのプライマーとして不適切な配列を除き、さらに、残った 6 塩基配列から対象遺伝子上で相補的な位置に存在する 6 塩基配列の組み合わせを記録した。

上記のデータを元に、対象となった 6 塩基配列が生成する可能性のある 100-1000 塩基の PCR 産物をプログラム上で探索し、6 塩基配列ごとに集計した。この PCR 産物の生成データから各 6 塩基配列ごとに PCR 産物を生成する変異株の数を算出した。

ここで、一旦、PCR プライマー設計上で問題となる相補的な 6 塩基配列の組み合わせの選択に戻り、PCR 産物生成数の少ない 6 塩基配列を 6 塩基プライマーの候補から除いた。残った 6 塩基配列について上記と同じことを相補的な 6 塩基が対

象遺伝子上になくなるまで繰り返した。この工程により、相互に相補的なプライマーの組み合わせが除かれ、断片増幅のために適切なプライマーのセットのみが選択された。

5-10回にわたる相補鎖の除去を繰り返した後、結果として残った6塩基を基本的な6塩基プライマーとした。

従来保存領域におけるプライマーの選定には、clustalwなどのmultiple alignmentソフトが活用されてきた。しかしながら、multiple alignmentを用いて検出される conserved region は50-100塩基の保存領域が必要になり、また、部分的に alignmentを確認しながら手作業によって進める必要が生じる。HIV-1などでは1000以上の変異株が報告されているため、この工程を残した場合、自動的なプライマーの予測が不可能になる。そこで、本研究では、上記で選定された6塩基プライマーが生成するPCR産物を変異株間で比較し、特定の6塩基プライマーが精製する同一サイズのPCR産物がほとんどの株に存在するような6塩基プライマーのセットを探索することにより、6塩基の保存領域を探索した。

4) CHeTD Primers における

5' degenerated 配列の設計

前節で選定された6塩基プライマーについて、その5'領域の配列から自動的に degenerated primer 配列を生成するため、変異株の配列を参照し、6塩基プライ

マーの5'側16塩基を遺伝子上の位置とともに抽出し新たなテーブルに保存した。

続けて、個々の6塩基プライマーを起点として5'方向に1塩基ずつ変異株間での塩基配列を論理演算上で加算し、すべてをカバーするような混合塩基を自動的に生成した。また、同時に各6塩基プライマーセットについて5'側の degenerated primer を記録し、 degeneracy を混合塩基の示す塩基の種類

の累積として算出した(図5)。図5において、YはC/T、SはG/Cを示すためそれぞれ degeneracy は2となり、累積は $2 \times 2 = 4$ となる。すべての6塩基プライマーセットを degeneracy の少ない順に表示し、その順に Multiplex PCR の候補とした。

今後の課題

前述のアルゴリズムにより、プライマーの設計が終了したので、今後設計プライマーによる増幅実験を開始する。この増幅実験における結果は、コンピュータ上での予想とは異なる可能性があるため、その結果をデータの設計へフィードバックする。

これらの作業に続き、複数種のウイルスのCHeTDプライマーを混合し、Multiplex PCRを実施する。この実験についても、実験からのフィードバックにより効率のよい組み合わせの選定方法を決定したい。

C. マイクロアレイを用いたウイルス核酸検出

マルチプレックス PCR により増幅したウイルス核酸をチップ上で特異性高くハイブリダイズさせるシステムの構築を行なう。近年、マイクロアレイを用いた遺伝子検査の研究・開発が急速に進んでいる。例えば感染症に関連した菌に特異的なオリゴヌクレオチドをスライドガラス上に固定化したマイクロアレイを用いることにより、同時に複数の菌の同定をおこなうことができる。現行、マイクロアレイはスライドガラス上に数千～数万点の cDNA やオリゴヌクレオチドを貼り付けたものであり、網羅的でハイスループットな解析方法であるといえるが、基板への DNA の固定化密度や固定化強度が、そのまま検出感度や信頼性（再現性）に反映される。また網羅的な解析という目的から数千～数万の DNA が必要となり、データ解析の煩雑さやコスト面から、安価で高密度・高強度に DNA を固定化可能な基板が望まれる。

そこで、われわれは高密度かつ高強度に固定化できる DLC (diamond like carbon) 表面処理技術を用いるとともに、ターゲットとする DNA を数十個に絞り込むことによって、必要となる基板のサイズを 3mm 角と大幅に小さくしたチップを作製した (ジーンシリコン: 図 6)。

また基板に半導体で使用されるシリコン素材を用いることで、従来の半導体プロセスを利用することができ、チップの

大量生産が可能となったこと、また必要となる試薬の量も低減できコストも抑えられる。

研究方法

ジーンシリコンを用いて血液や尿中の JC ウィルスの同定をおこなった。

試料から DNA を抽出した後、PCR で増幅したサンプルをジーンシリコン上に滴下し特異的プローブと結合した DNA の発光パターンにより判定した。

研究結果

全ての試験間で相関関数 0.99 以上の再現性が得られ、検出感度も従来の方法と同等の結果が得られた。(図 7)

考察

本研究結果より、PCR で増幅したウイルス核酸をジーンシリコン上で特異性高く検出することが可能であると考えられる。

結論

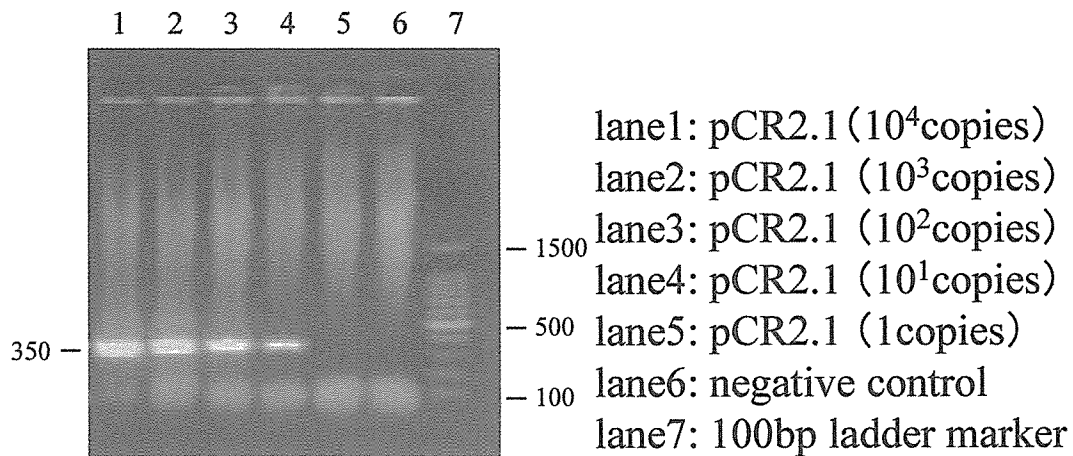
本研究により、RNA ウィルス、DNA ウィルス共に 10 分子程度まで安定して増幅できる方法を得た。また、マルチプレックス PCR 法も更に条件を検討することにより本システムに組み込むことが可能であると考えられる。さらに、DNA チップ自体の検出感度についても検討していきたい

A. 研究発表

1) 論文発表

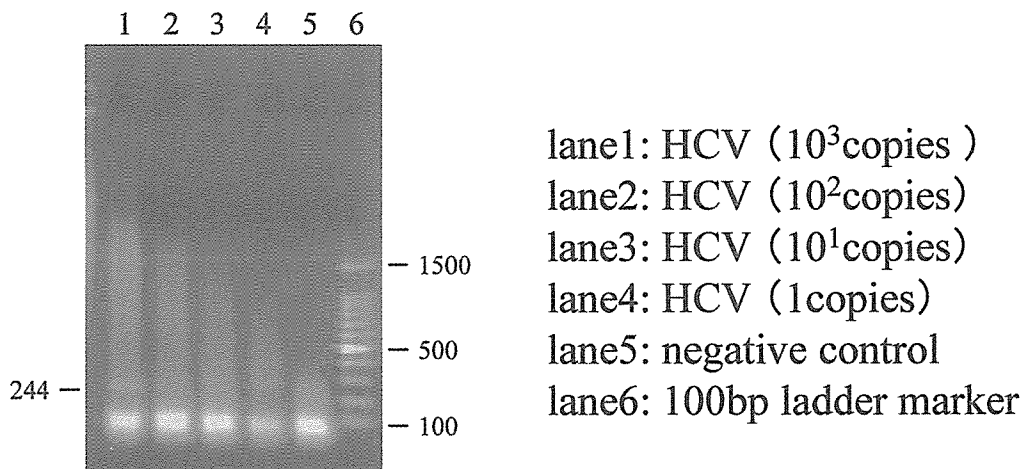
1. Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T: Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival. *Blood*, 107, 1207-1213, 2006
2. Nagamatsu G, Ohmura M, Mizukami T, Hamaguchi I, Hirabayashi S, Yoshida S, Hata Y, Suda T, Ohbo K: CTX family cell adhesion molecule, JAM4, expresses in stem cell- and progenitor cell-populations of both male germ cell and hematopoietic cell lineages. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 8498-8506, 2006
3. Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control, *Vaccine*, *In press*.
4. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S: Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Lett.*, 46, 236-243, 2006
5. Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shirota K, Kurane I, Morikawa S: Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 347: 261-265, 2006
6. Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S and Nishimura H: Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. *Emerging Infectious Diseases.* *Emerging Infectious Diseases.*, 13, 322-324., 2007
7. Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Ishii K, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I and Morikawa S: Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*, *Arch Virol.*, *In press*
8. 浜口功、細胞療法・再生医療の安全性、医学のあゆみ、218、657-662、2006
9. 浜口功、山口一成、輸血・移植と感染症、小児感染症学 *In press*

図1. GenomiPhi



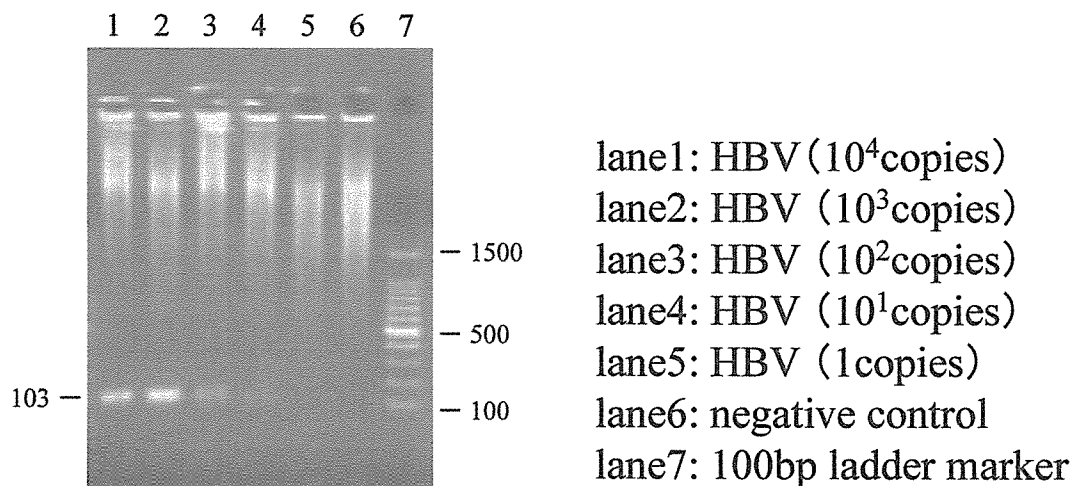
10⁴~1copiesに希釈したpCR2.1vectorをGenomiPhi High Yieldで増幅した後、特異的なprimer対(350bp)によってPCR(GoTaqで35cycles)したものを電気泳動

図2. HCV



血清より抽出し、10³~1copiesに希釈したHCVをWTA法で増幅した後、特異的なprimer対(244bp)によってPCR(GoTaqで35cycles)したものを電気泳動

図3. HBV



血清より抽出し、10⁴~1copiesに希釈したHBVをGenomiPhi High Yieldで増幅した後、特異的なprimer対(103bp)によってPCR (GoTaqで35cycles)したものを電気泳動

図4. 6塩基プライマー配列探索対象遺伝子

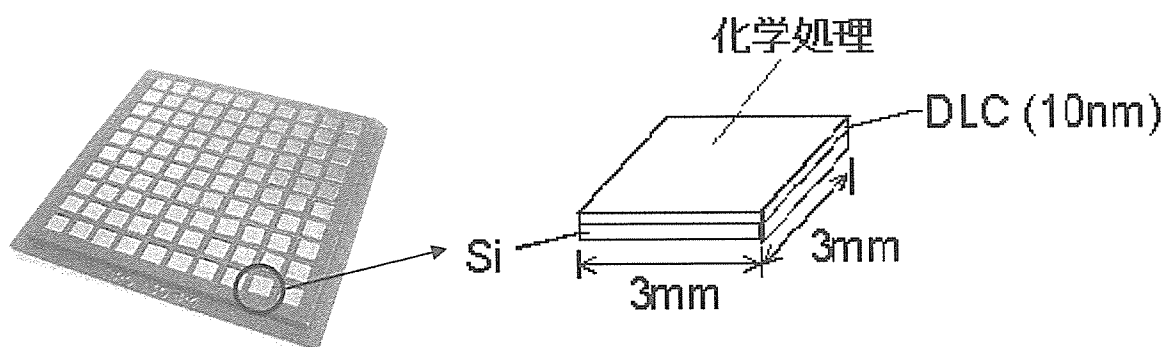
ウイルス	遺伝子	塩基長 (base)	件数
HBV	pol	2500	8
	preS1	1203	211
HCV	polyprotein	9060	125
HIV1	env	1000-2700	757
	gag/gag-pol	1191-4500	927

図5. 6塩基プライマー及び補助配列の設計

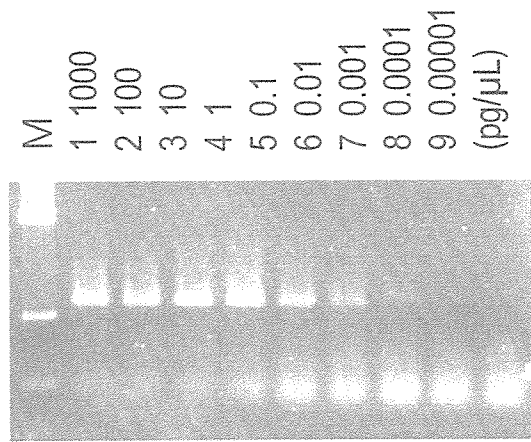
5'-CAAGGGCCACATCGTGGGGCCC-3'
5'-CATGCACAAAATCGTGGGGCCC-3'
5'-CATGGGGAAAATCATAGGGCCC-3'
5'-CATGAGCCAAATCGCGGGGCCC-3'
5'-CATGGGCCAAATCGTGGGGCCC-3'
5'-CATGGGTCAAATCGTGGGGCCC-3'

5'-CAWGVRBMAMATCRYRGGGGCCC-3'

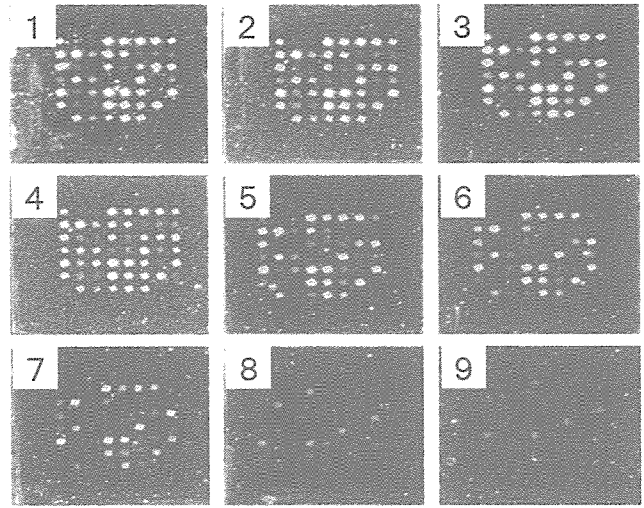
図6. Gene Silicon



☒ 7. Sensitivity



Conventional Method



Gene Silicon

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
「輸血用血液及び細胞療法の安全性に関する研究班」
(H18- 医薬- 一般- 032)

分担研究報告書

探索的臨床試験に求められる GMP 準拠細胞プロセッシング

分担研究者：前川 平
(京都大学輸血細胞治療部 教授)

研究要旨

再生医療等に関する新規細胞治療法の開発に用いるヒト細胞の調整（製造）過程は、通常の錠剤などとは異なった側面を持っている。米国においてもほとんどの細胞治療や再生治療は大学やベンチャー企業で行われており、製薬企業等と同列に、またヒト細胞製剤については錠剤等の医薬品 GMP (Good Manufacturing Practice) と同列に規制していたのでは開発のスピードが上がらないという点が指摘されていた。これに対して、従来から米国 FDA は細胞治療や再生治療開発の指導を行う上で柔軟な対応を示してきたが、その指導方針を文書として示されたものはなかった。2006 年 1 月米国 FDA は、低分子化合物、生物製剤等を問わず、このような探索的 IND 臨床試験（トランスレーショナルリサーチ：TR）を実施する際のガイドラインを最終決定すると同時に、早期第 I 相試験（TR に相当）で用いる IND (Investigational New Drug) の GMP 製造に関するガイドライン草案を公表した。

一方、わが国では平成 18 年 9 月「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」が施行され、これらの調整機関は治験薬 GMP レベルの水準にあることが要求されている。治験薬 GMP の設備構造などハードの基準は、医薬品 GMP に比べ一部の施設については要求事項が緩和されている。これは医薬品と異なり、治験薬の製造においては、製造ロット数が少ないことや、治験の進行に伴い製造施設や設備が異なっ
てゆくことに対する配慮がなされているからである。すなわち、治験薬 GMP では、報告の中で述べる stepwise approach がハード面において考慮されている。我々は、細胞プロセッシングに特化した GMP で、かつ stepwise approach の考え方を取り入れ、ハードのみならずソフトも含めたコンセプトを institutional GMP (iGMP) として提唱してきた。

本研究では、米国 FDA が今回提唱した早期フェーズ 1 の GMP 製造ガイドラインの邦訳を試みた。その結果、本ガイドラインはわれわれが従来から提唱してきた開発段階に応じた GMP、いわゆる iGMP の必要性和相通ずるものと考えられることが明らかとなった。

A. 研究目的

新薬の治験にもちいる薬（治験薬）は、いったいどのようにして製造されているのであろうか。市販され日常の医療に用いられている医薬品には医薬品 GMP (Good Manufacturing Practice: 医薬品の製造管理および品質管理に関する基準) が、治験薬には治験薬 GMP が適応される。現在のわが国の規制の枠組みにおいて、薬事法の範疇外にあるトランスレーショナルリサーチ (Translational Research: TR) や医師主導型の臨床試験研究では「試験薬」としてあたらしい薬物が用いられることになるが、これらの薬物の品質管理は医師の責任とされている。実験的色彩のつよい TR であるからこそ、治験薬と同等の品質が保証された薬物での試験を望むのは、先端医療の被験者である患者の立場からすれば当然の権利である（被験者保護の原則）。この試験薬を細胞と読み替えれば、細胞治療や再生治療など臨床試験にもちいる細胞の加工（細胞プロセッシング）はどのようにして行われるべきか容易に推測されよう。

細胞治療とは、輸血、造血幹細胞移植、細胞免疫療法などのヒト細胞を輸注、移植することにより行う治療法の総称である。再生治療や遺伝子治療の多くも、幹細胞を増幅させたり、分化させ機能を強化したりといった加工を受けた細胞を疾病の治療に用いようとするものである。この意味で、多くの再生治療や遺伝子治療も細胞治療として包括される。こういった細胞治療に関する探索的臨床試験研

究（トランスレーショナル・リサーチ、TR）の多くは、大学などで実施されることが多い。

本研究は、わが国における細胞治療、再生治療などのヒト細胞を治療にもちいる先端医療開発を進めるために整備しなければならないインフラストラクチャーを、わが国でどのように構築すべきかについて、欧米での取り組みも参考にしながら、その道筋を示すことを目的とした。

B. 研究方法

細胞プロセッシングセンターである京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部に隣接して設置された分子細胞治療センター (Center for Cell and Molecular Therapy) での経験をもとに、京都大学探索医療センター、大阪大学未来医療センター、および神戸先端医療センターとの共同作業で、米国 FDA の早期フェーズ I（探索的臨床試験）でもちいる IND の GMP 製造に関するガイドライン草案の邦訳を試みた。

C. 研究結果

1. 細胞プロセッシングに必要な GMP とはどのようなものか

細胞治療や再生治療などヒト細胞を体外で分離培養操作し治療に用いる場合、安全性や臨床試験の信頼性を担保するため、その品質をどのようにして確保すればよいのであろうか。

平成 18 年 9 月 1 日に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が施行され、細胞調製機関は医薬品の臨床試験の実施