

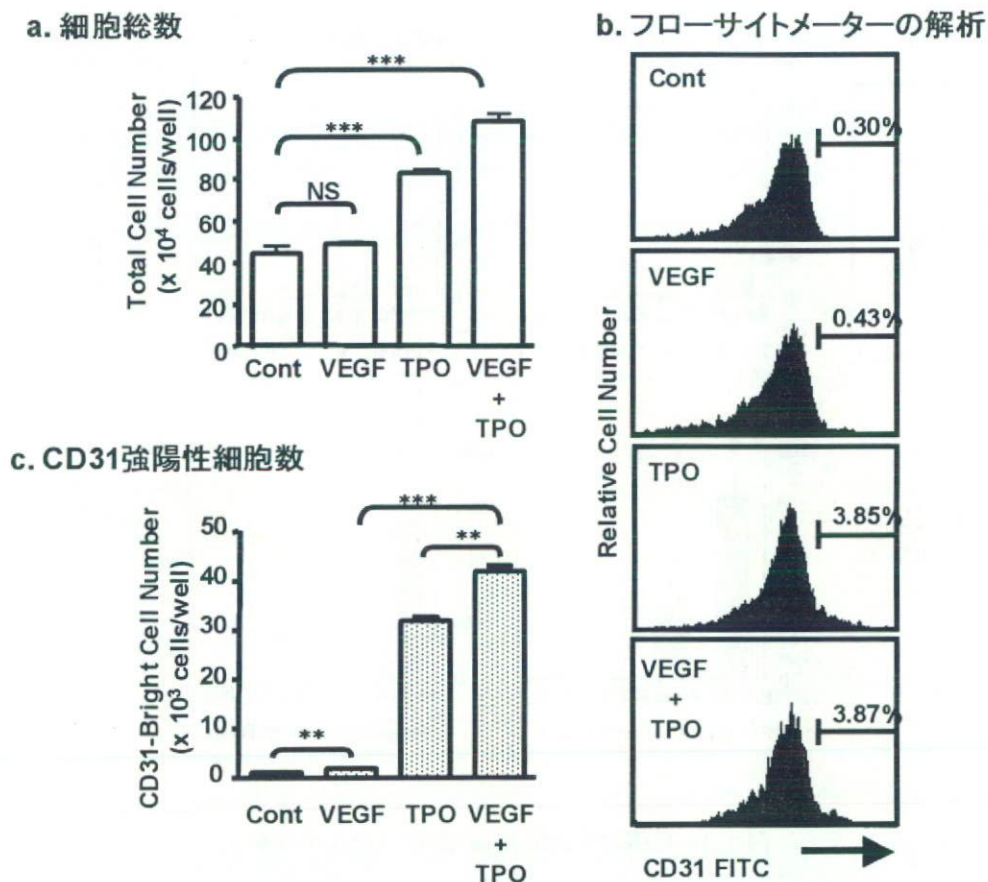


Fig.36 EPC増幅作用におけるTPOとVEGFの比較

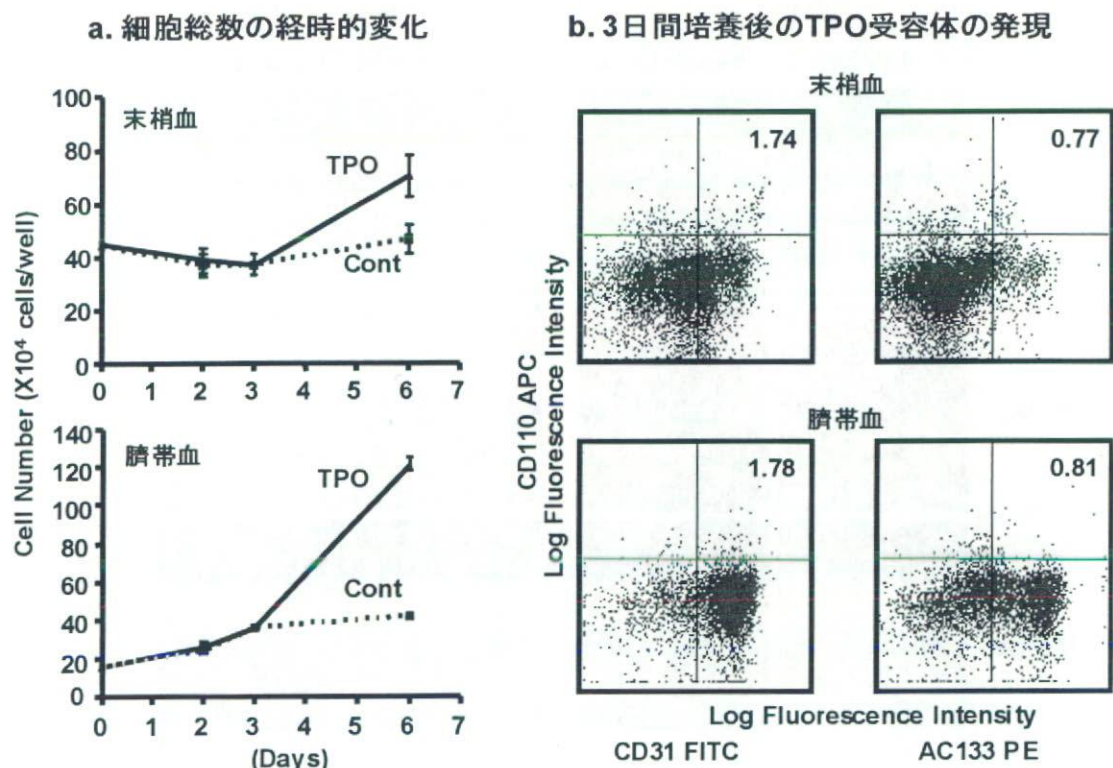
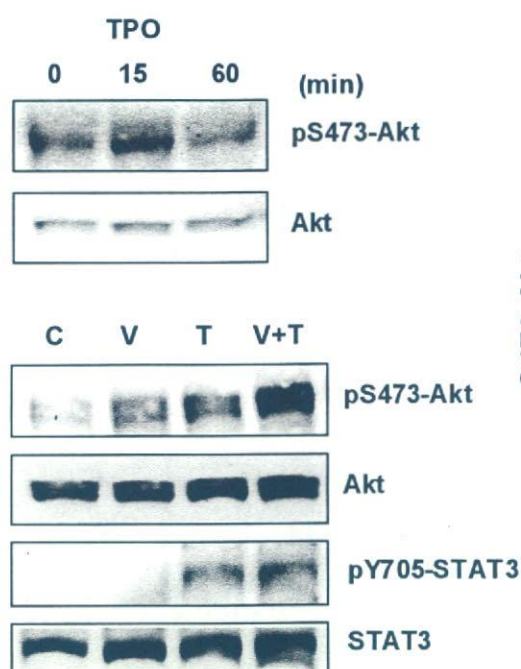


Fig.37 AC133⁺細胞におけるTPO添加によるEPC増幅作用の経時的変化

a. イムノブロットによる解析



b. FACSによるリン酸化AKTの解析

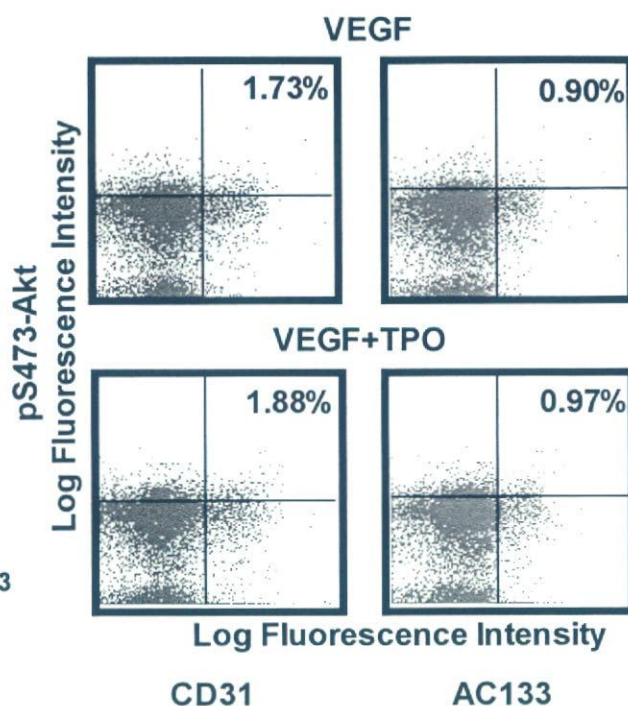


Fig.38 AC133⁺細胞におけるTPO添加によるAKT及びSTAT3のリン酸化

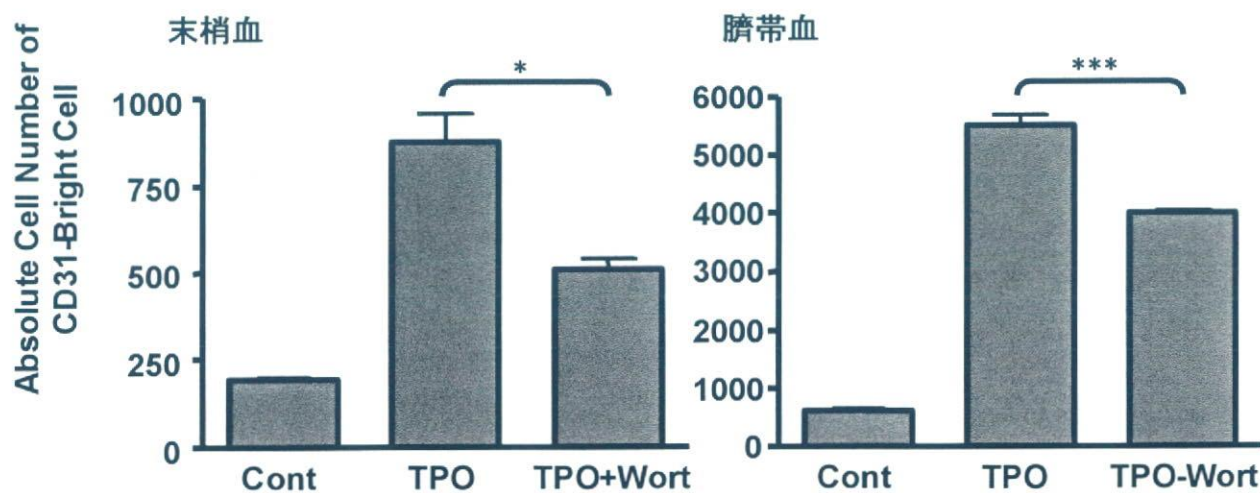


Fig.39 TPOのEPCの分化・増殖作用におけるワートマニンの効果

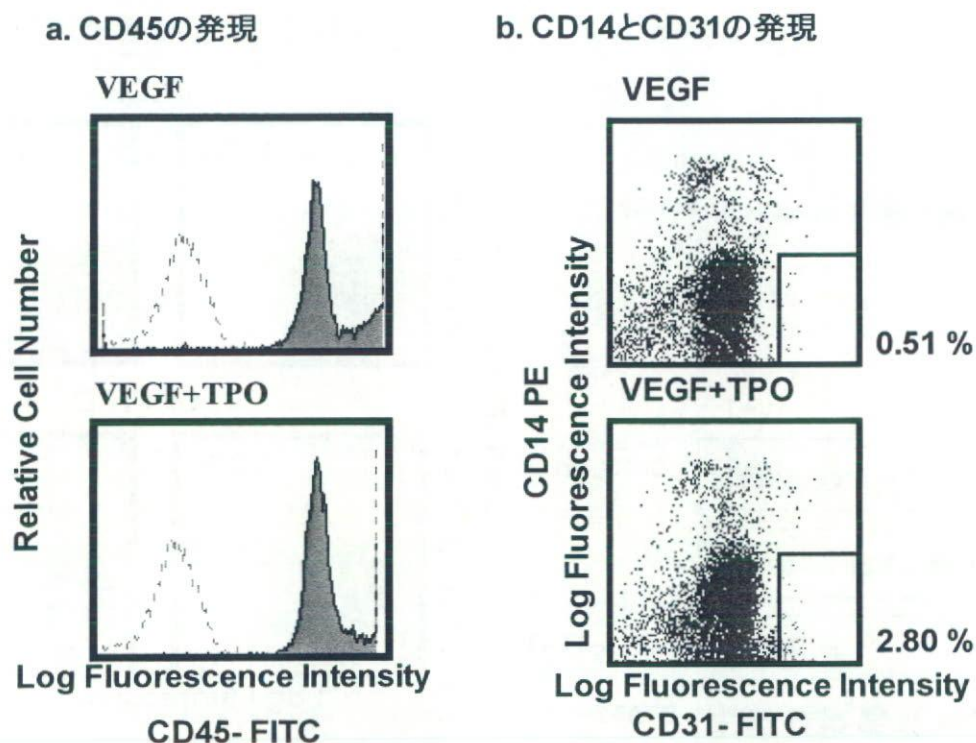


Fig.40 培養AC133陽性細胞におけるCD45とCD14の発現

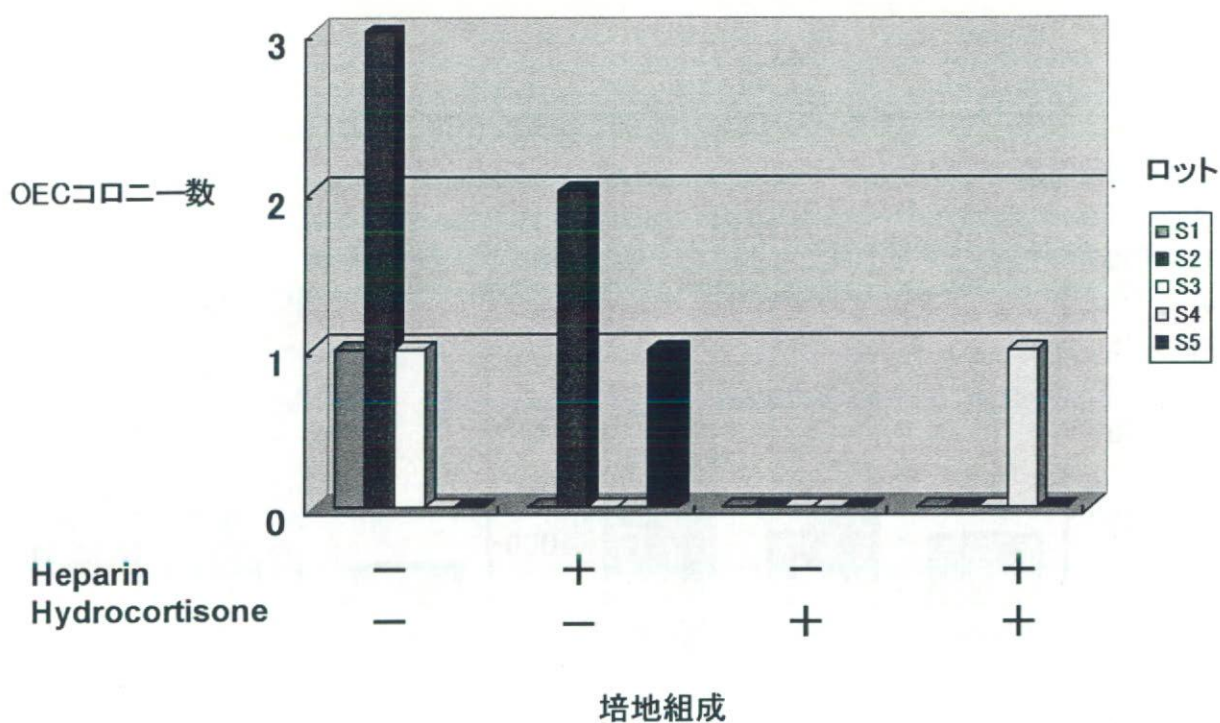


Fig.41 OECコロニー出現に対するhydrocortisoneおよびheparinの影響

Table 6 分画した単核球から誘導されたOECコロニー数

		Exp. 1	Exp. 2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp. 6	Exp. 7
実験条件	Cord Blood	Frozen	Frozen	Frozen	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen
	CD45-回収率	56%	34%	30%		28%	46.40%	30%
	HC添加 (day 7~)	—	—	—	—	+	+	+
OECコロニー数	MNC	1 12.5x10 ⁷	1 9.1x10 ⁷	0 6x10 ⁷	0 10x10 ⁷	63 6x10 ⁷	63 8x10 ⁷	2 6x10 ⁷
	CD45+	0 30x10 ⁷	0 23.9x10 ⁷	0 45x10 ⁷		0 30.6x10 ⁷	10 10x10 ⁷	0 24x10 ⁷
	CD45-		0 3.3x10 ⁷	0 2x10 ⁷		34 6x10 ⁷	127 13x10 ⁷	21 4x10 ⁷
	CD45- /CD34+		0 0.7x10 ⁷	0 0.55x10 ⁷		9 0.8x10 ⁷		5 3.25x10 ⁷
	CD45- /CD34-	0 6x10 ⁷	0 0.7x10 ⁷	5 1.4x10 ⁷		1 1.6x10 ⁷		3 0.84x10 ⁷

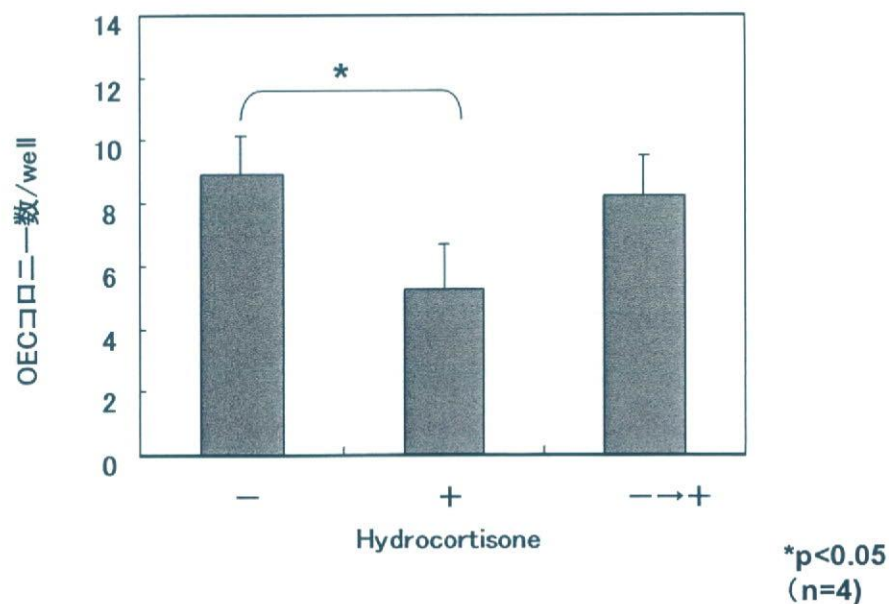


Fig.42 Hydrocortisoneの添加とOECコロニー数の関連(単一ロットでの解析)

a)

2% FCS	拡大した ライン数	6cm dish まで拡大	10cm dishまで まで拡大	10cm dish で継代	60日ぐらいまで さらに継代
		×	△	○	◎
パッチ.1	3	2	1	0	0
パッチ2R	7	2	0	3	2
パッチ2N	5	0	3	2	0
パッチ3	5	4	0	0	1
パッチ4	3	2	1	0	0
パッチ5	2	1	1	0	0
計	25	11	6	5	3
割合	100.0	44.0	24.0	20.0	12.0

FCS濃度を10%に変更

b)

10% FCS	拡大した ライン数	6cm dish まで拡大	10cm dishまで まで拡大	10cm dish で継代	60日ぐらいまで さらに継代
		×	△	○	◎
S1~S5	6	1	0	0	5
割合	100.0	16.7	0.0	0.0	83.3

Fig.43 OEC拡大の成功率

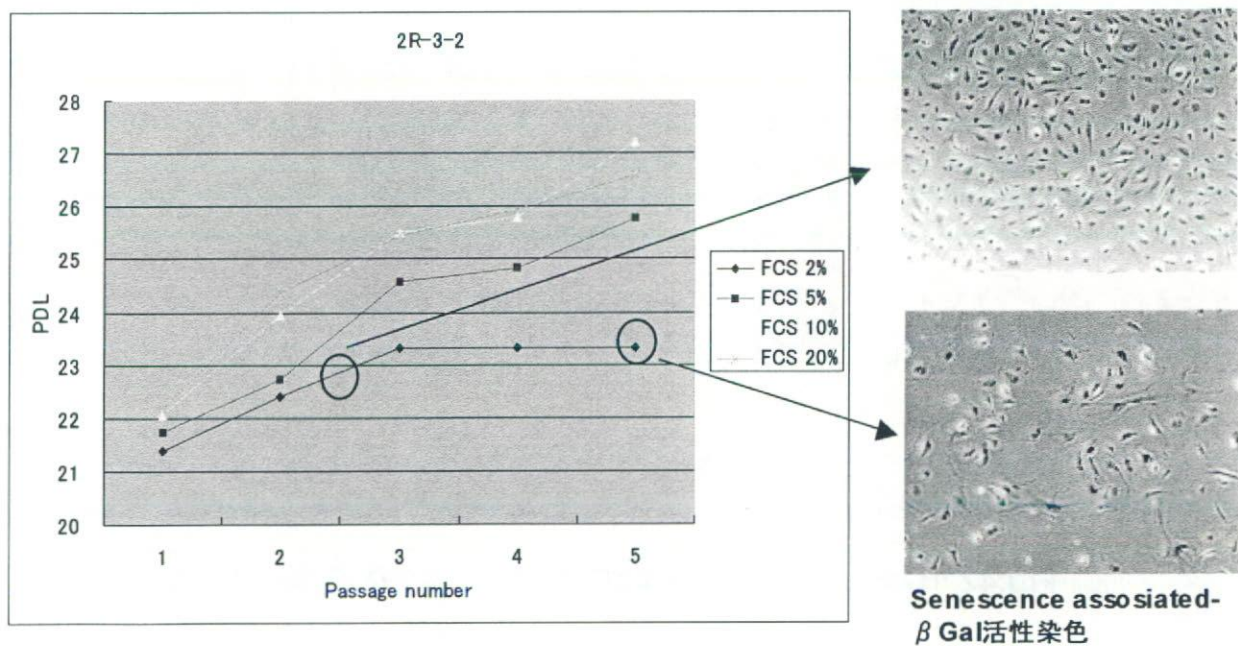
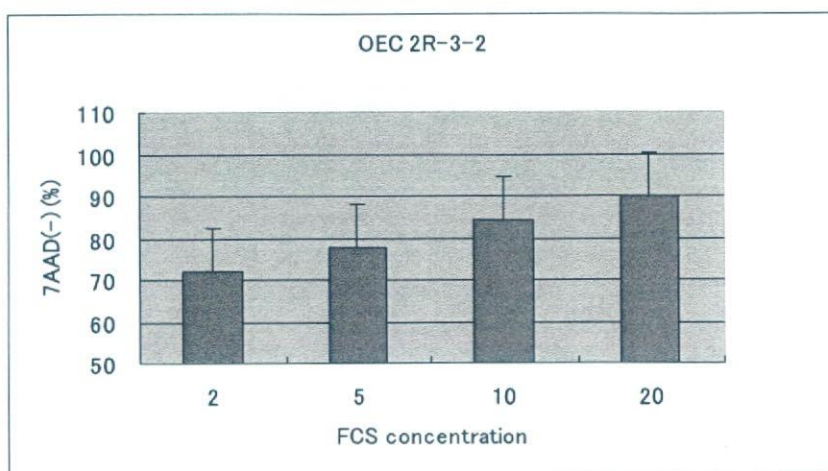
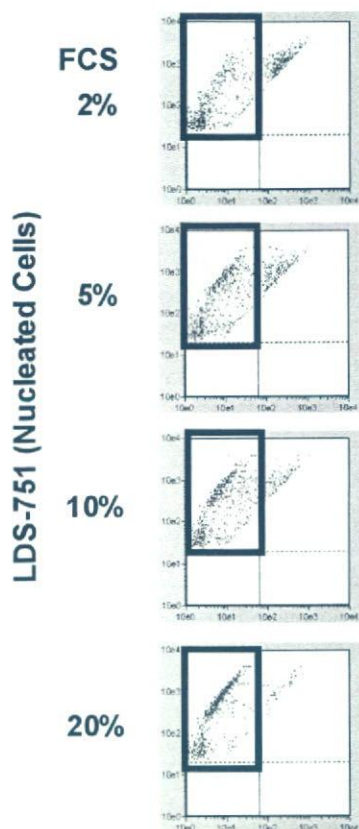


Fig.44 OEC増殖に対する血清濃度の影響



FCS 濃度	P2 **	P3	P4	P5	P6	平均
2%	72	64.8	79.8			72
5%	76	74.7	82.6	80	84	78
10%	80.5	83.6	89.3	91.1	82.2	84
20%	84.7	94.9	90.5	86.5	93.3	90

7-AAD (Apoptotic cell)

* * → Day46のOECストック起眠後の passage number

Fig.45 OECのviabilityに対する血清濃度の影響(7-AAD染色による評価)

維持培養中の
FCS濃度

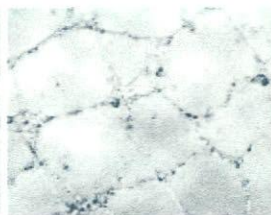
2%

5%

10%

20%

Matrigel



GFR-
Matrigel

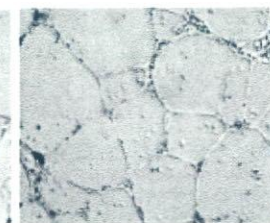
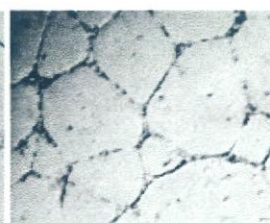
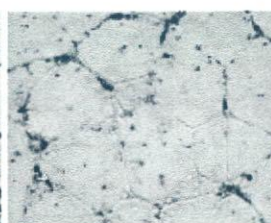


Fig.46 OECの管腔形成能に対する培養中血清濃度の影響

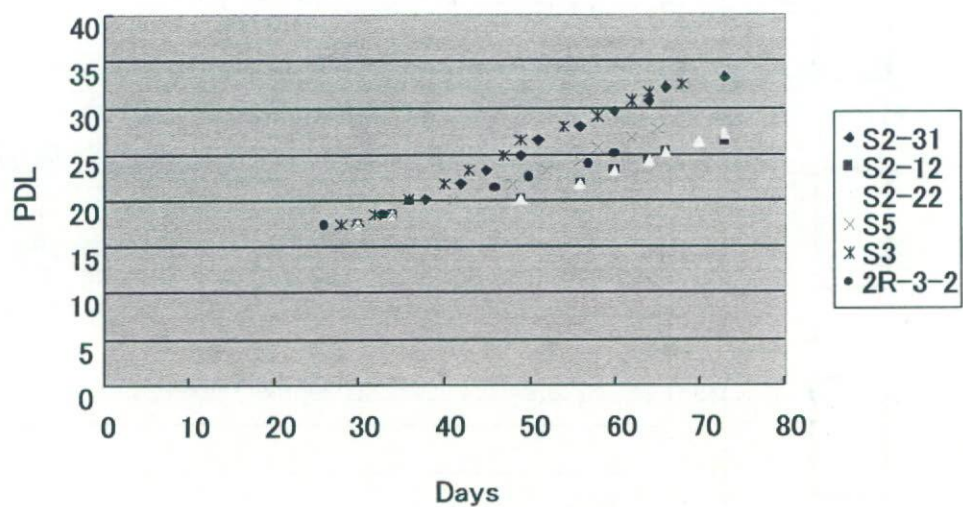


Fig.47 樹立したOEC株の増殖特性

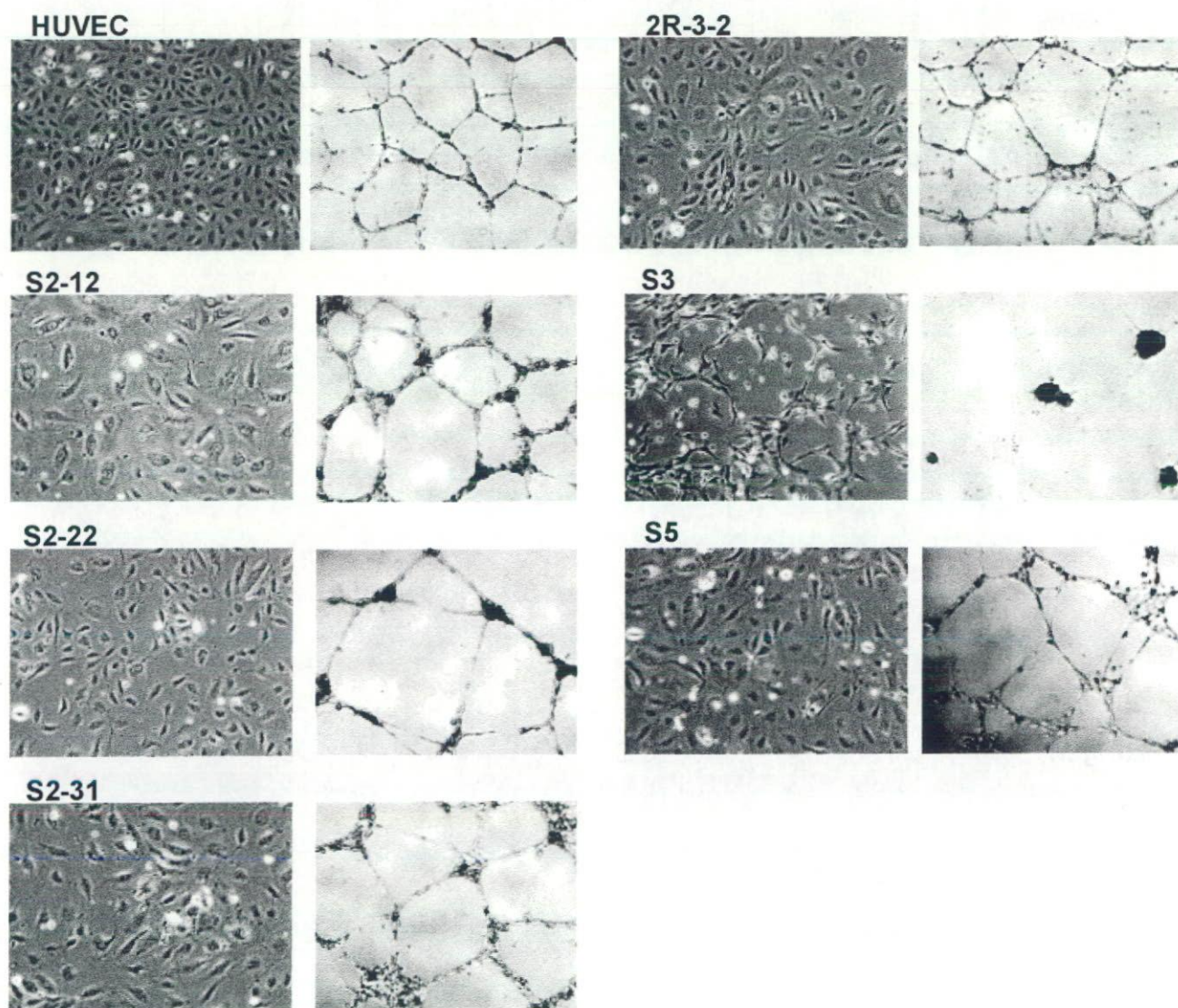


Fig.48 樹立したOEC株の形態とMatrigel上での管腔形成能

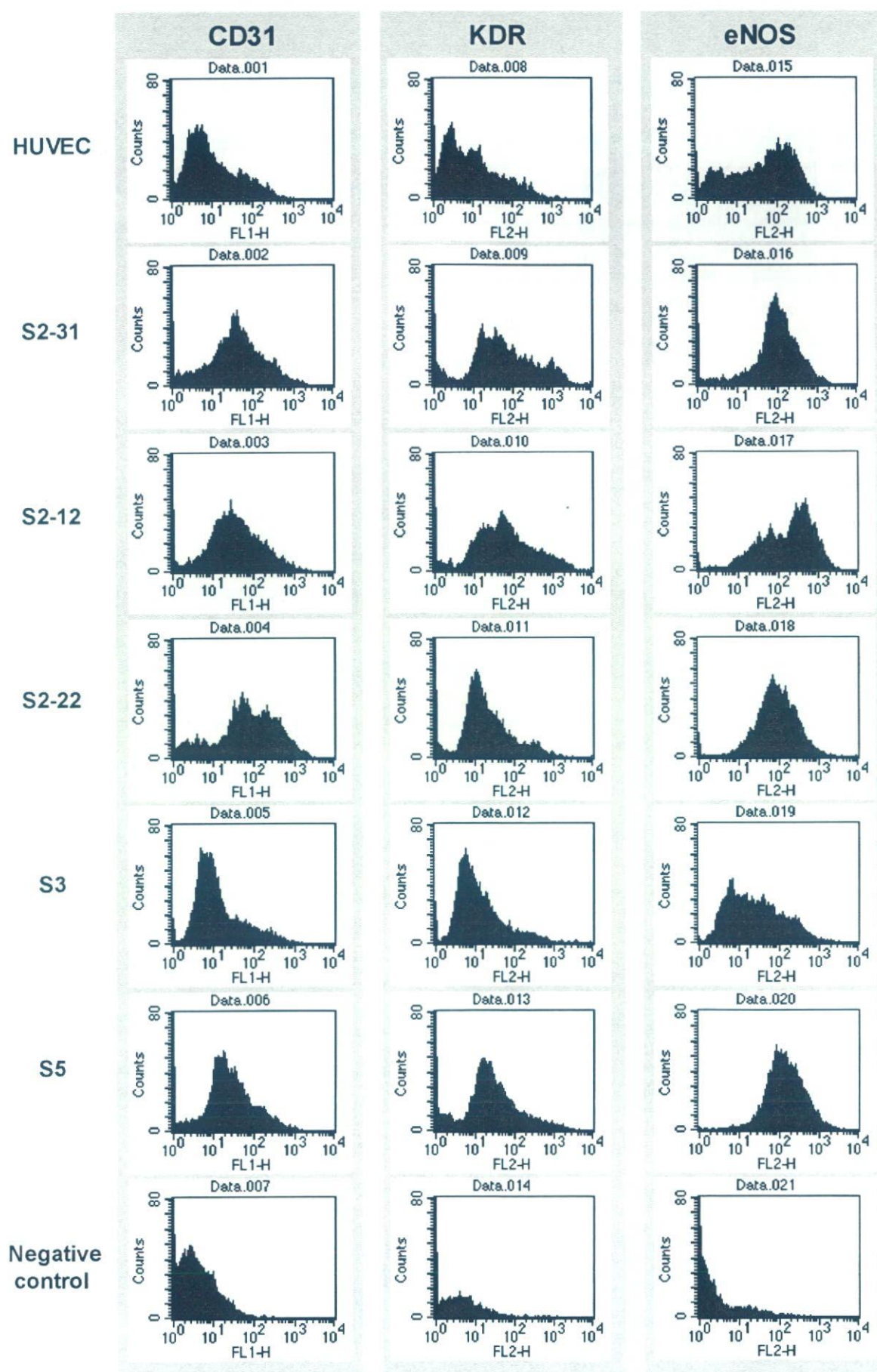


Fig.49 樹立したOEC株におけるCD31, KDR, eNOSの発現

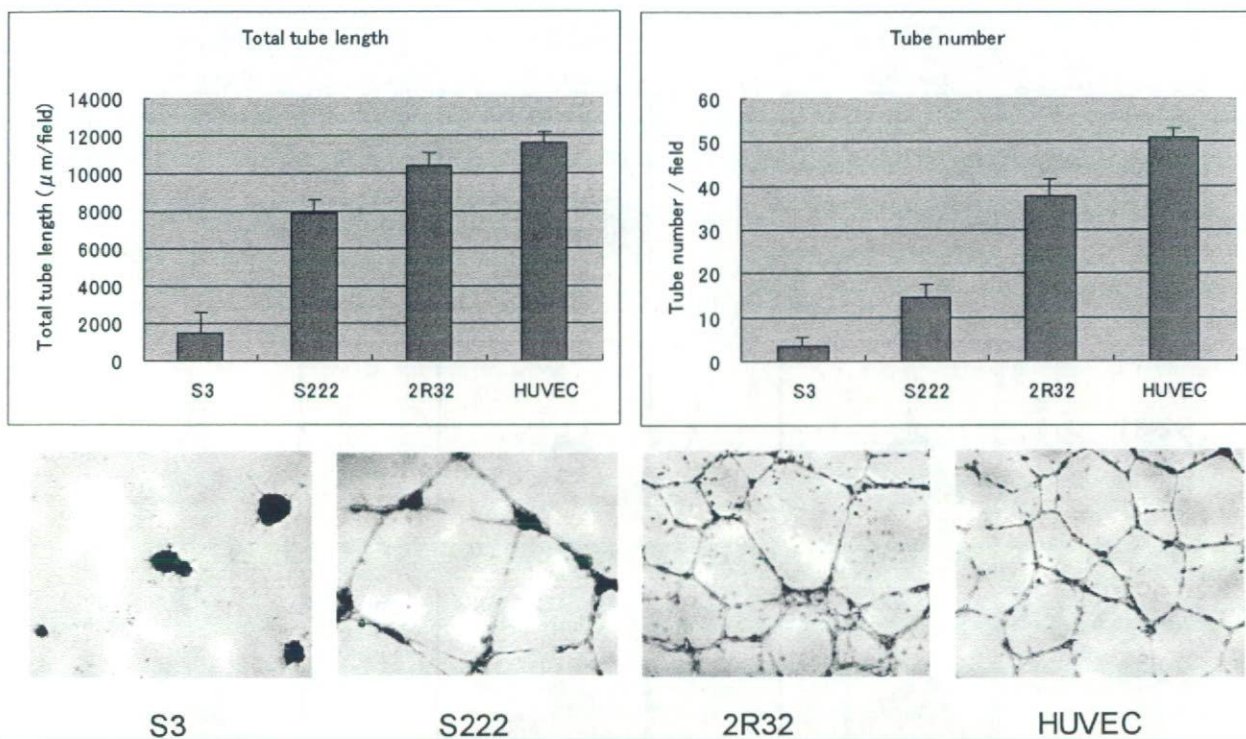


Fig.50 特性指標の探索に用いたOEC3株およびHUVECの管腔形成能の定量評価

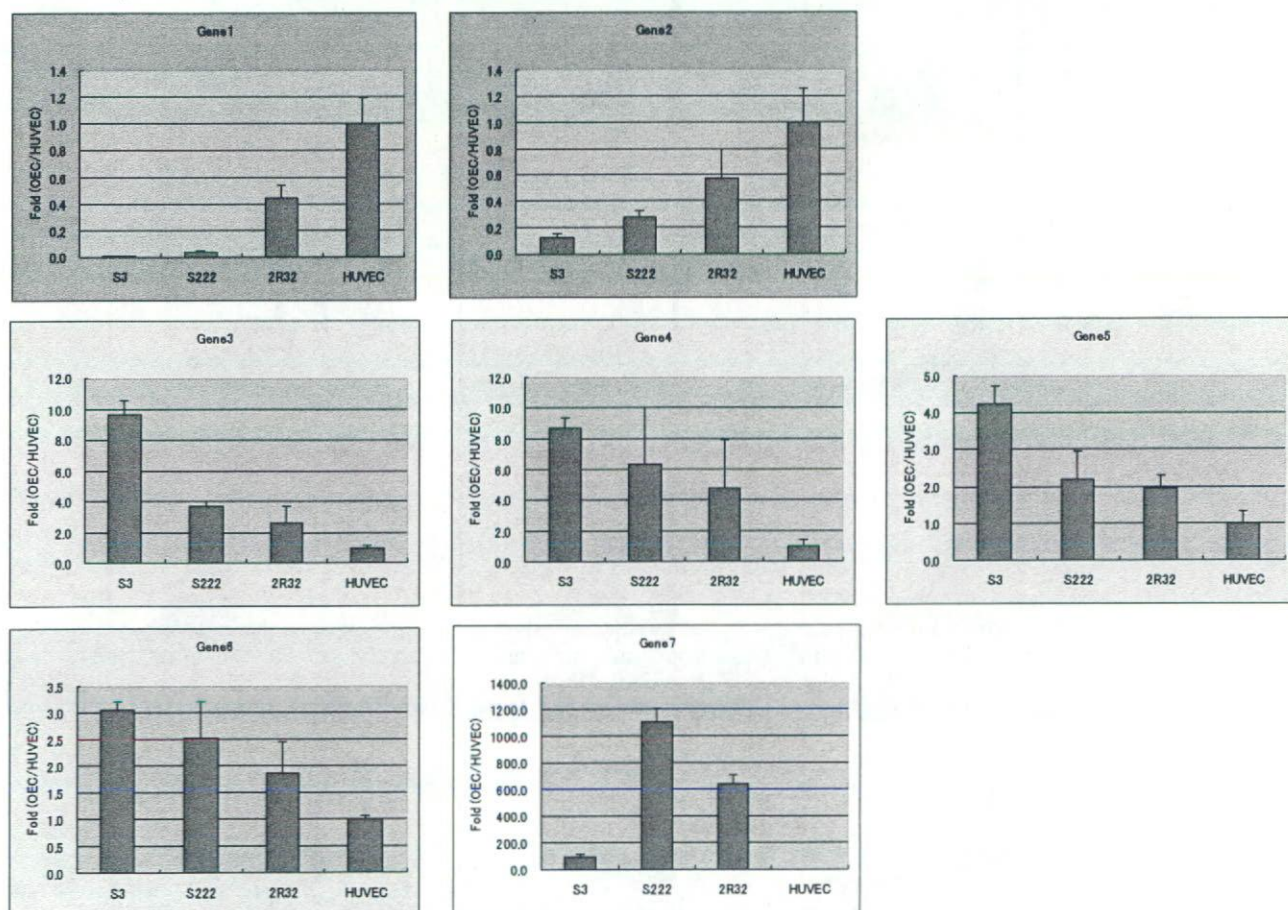


Fig.51 特性指標候補と考えられる遺伝子の発現量の比較

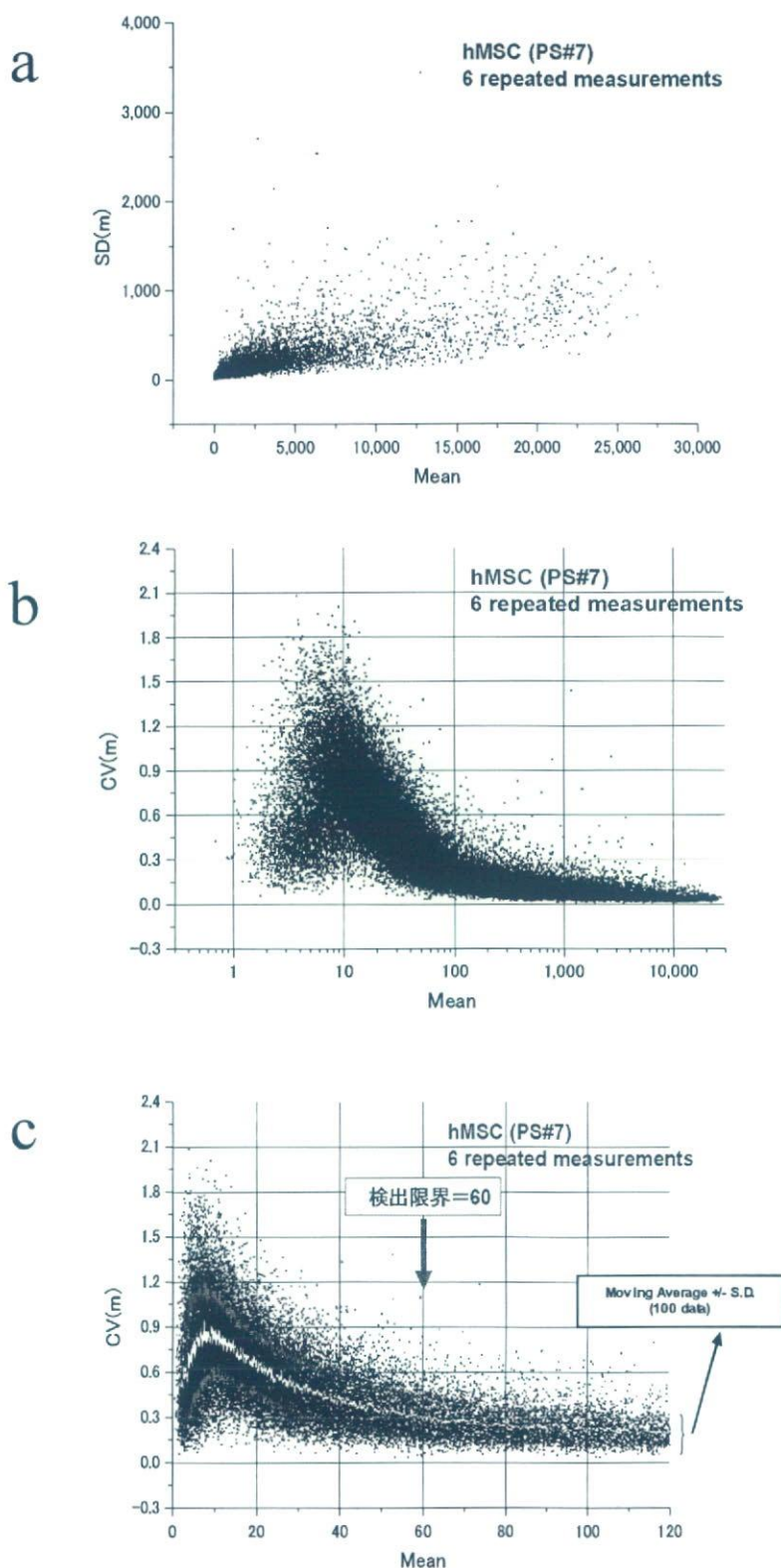


Fig.52 同一cRNAサンプルの繰り返し測定（6回）における測定シグナルの平均値とデータのばらつきの関係 a)平均値と標準偏差（S.D.）の関係。発現シグナルの平均値が高いほどS.D.値が高い。b)平均値と変動係数（CVm）の関係。c) b)のグラフの横軸を線形目盛りとし、平均値の低い部分を拡大したもの。CVm値の移動平均値が0.3を通過するのは測定シグナルの平均値が60のとき。図は継代数7のヒト骨髄間葉系幹細胞のデータ。継代数9の場合も同様であった（データ省略）。

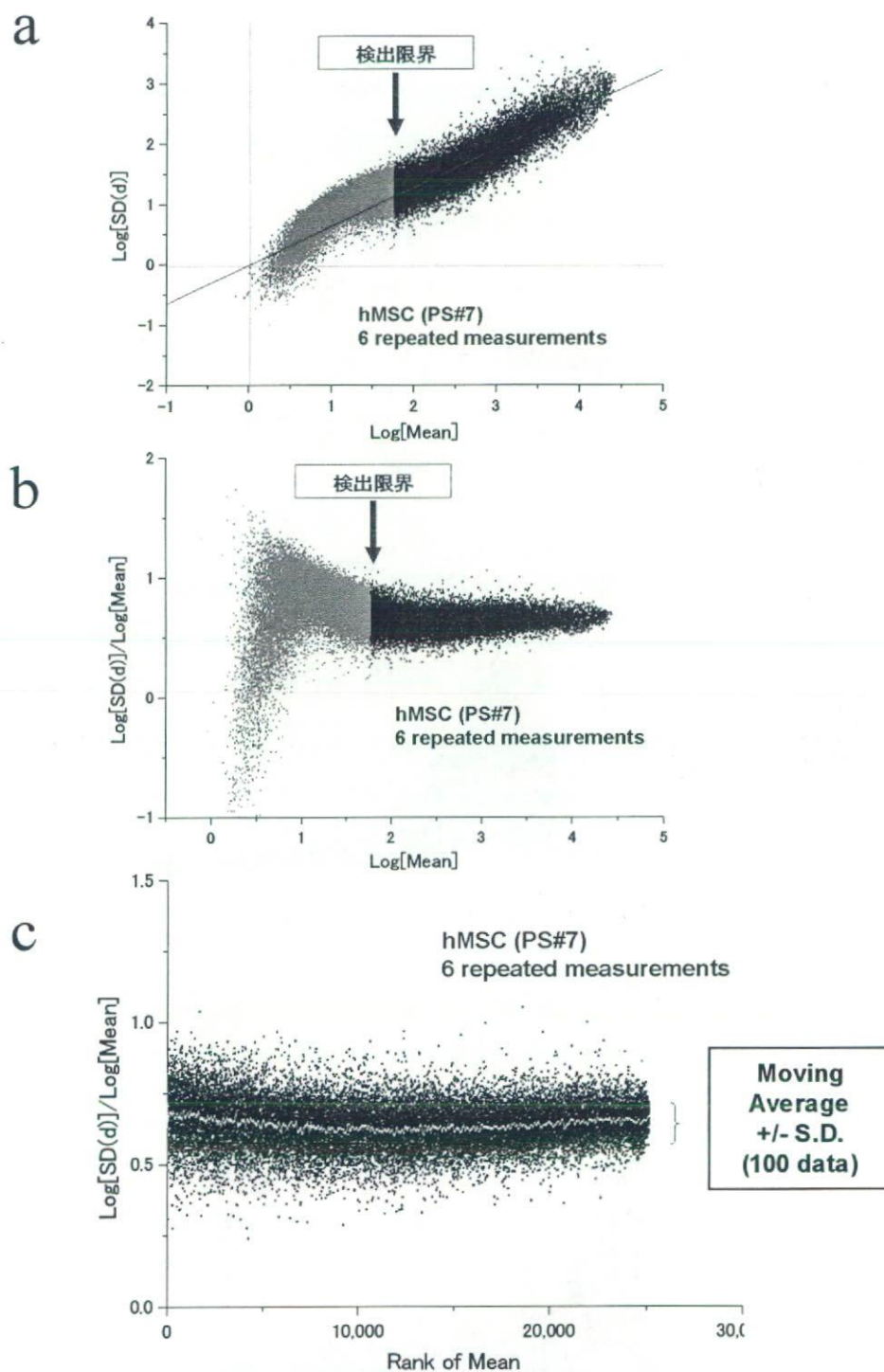
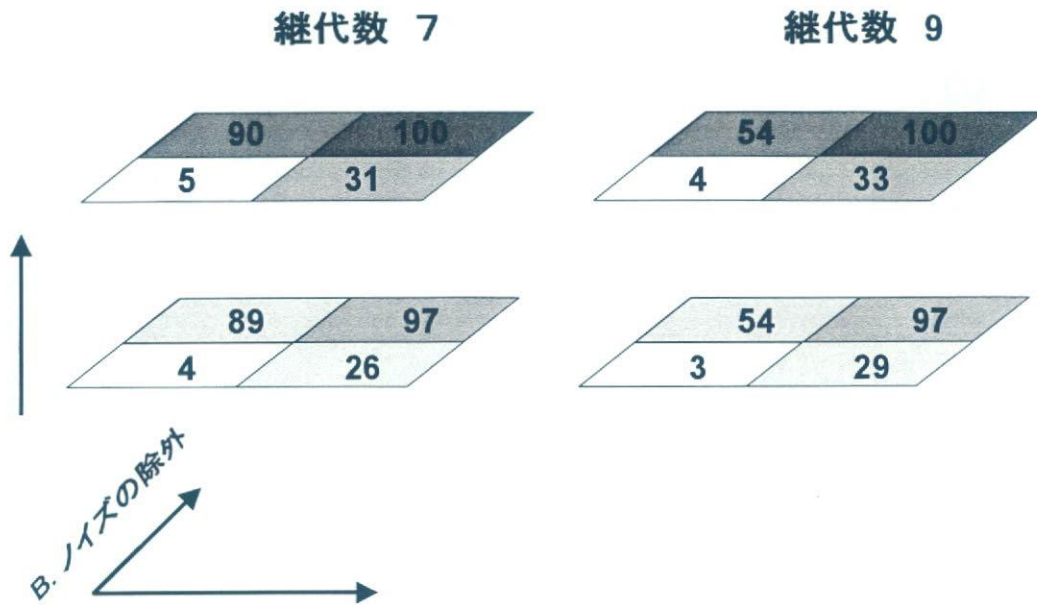


Fig.53 同一cRNAサンプルの繰り返し測定（6回）における測定シグナルの平均値とS.D.の関係 a)検出限界以上のS.D.値の対数（青）には平均値の対数との比例関係があるように見える（赤線）。b)検出限界以上では「S.D.値の対数と平均値の対数の比」が平均値に依存しないように見えることを示す。c)横軸は検出限界以上における測定値の平均値の「順位」を示す。検出限界以上の「S.D.値の対数と平均値の対数の比」は平均値に依存しないことを示す。図は継代数7のヒト骨髓間葉系幹細胞のデータ。継代数9の場合も同様であった（データ省略）。

CV値のtop1000の共通性(%)

C. 観測値のCVでなく、サンプルのCVを使用



A. 非特異的ハイブリダイゼーションに由来するシグナルの除外

Fig.54 複数ロットの遺伝子発現測定におけるCV_m値に対するアーチファクト除去の効果をCV_mの順位のtop 1000の共通性で評価
「非特異的ハイブリダイゼーションによるシグナル」と「検出限界以下のシグナル」の影響が大きい。

Gene Ontology Tree: Biological Process

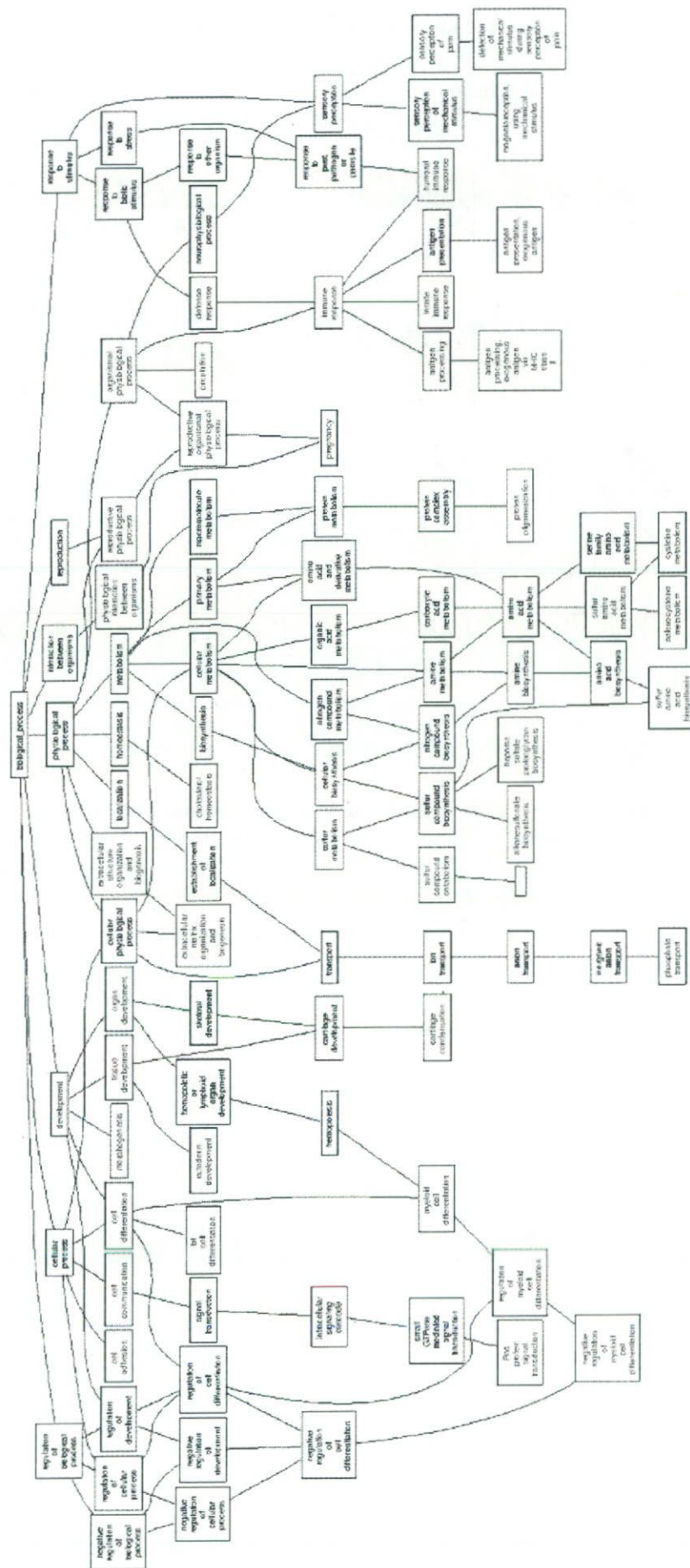


Fig.55a 複数ロットのヒト骨髄由来間葉系幹細胞の間のばらつき (CV値) の大きい遺伝子に関するオントロジー解析 (Biological Process) 6ロット (継代数7または9) のCV値の高い top 1000 Probe Setsを抽出、継代数9の細胞についてもtop 1000を抽出し、継代数7と9のtop 1000に共通して含まれる428 Probe Setsを抽出した。GOTM* (Vanderbilt Univ.)を用い、上記Probe Setの集団に有意(P<0.01)に濃縮される生理機能を探査した。赤:有意(P<0.01)に濃縮されるオントロジークラスター

Gene Ontology Tree: Molecular Function

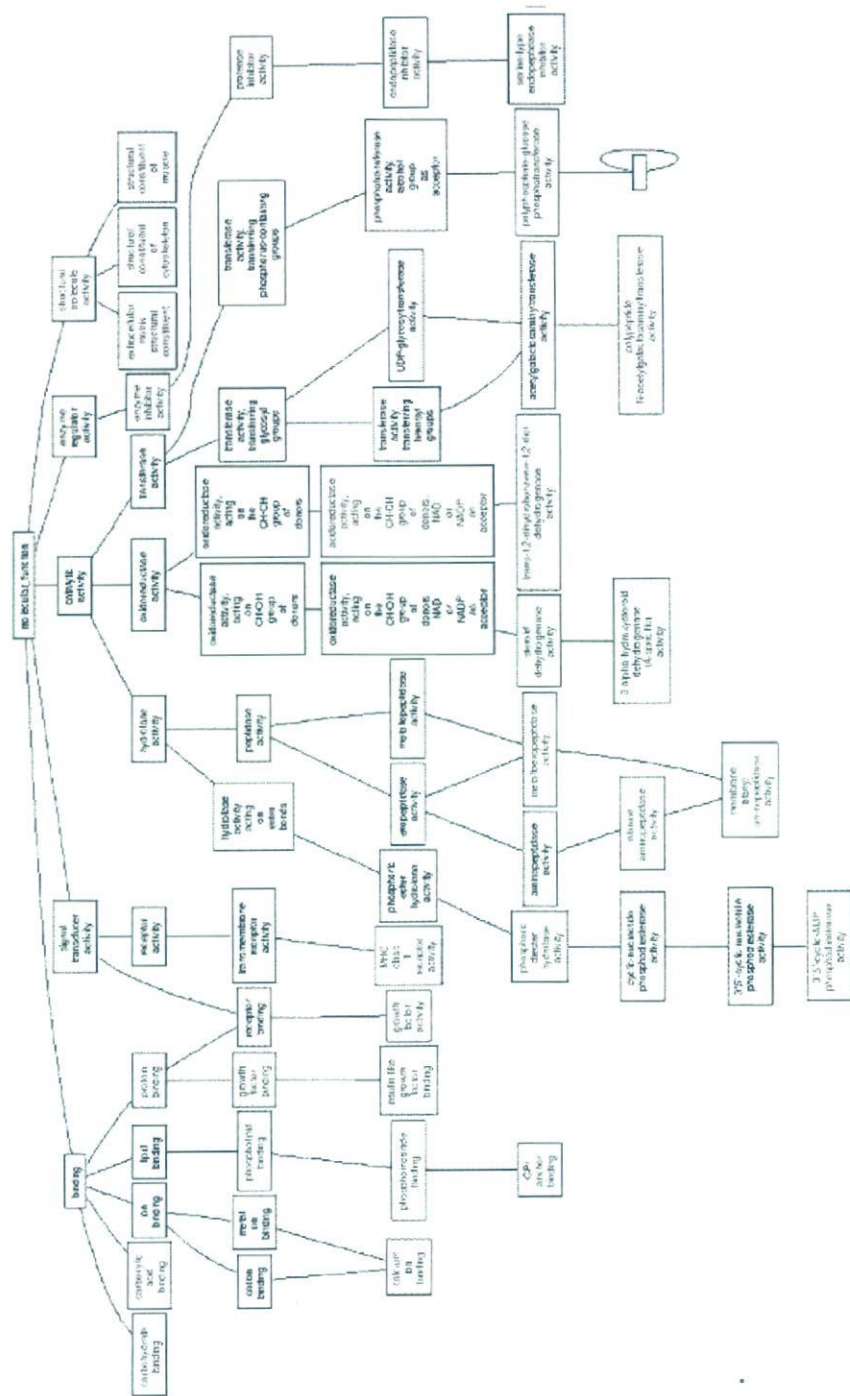


Fig.55b 複数ロットのヒト骨髓由来間葉系幹細胞の間のばらつき (CV値) の大きい遺伝子に関するオントロジー解析 (Molecular Function) 6ロット (継代数7または9) のCV値の高いtop 1000 Probe Setsを抽出、継代数9の細胞についてもtop 1000を抽出し、継代数7と9のtop 1000に共通して含まれる428 Probe Setsを抽出した。GOTM* (Vanderbilt Univ.)を用い、上記Probe Setの集団に有意($P<0.01$)に濃縮される生理機能を探索した。赤: 有意($P<0.01$)に濃縮されるオントロジークラスター

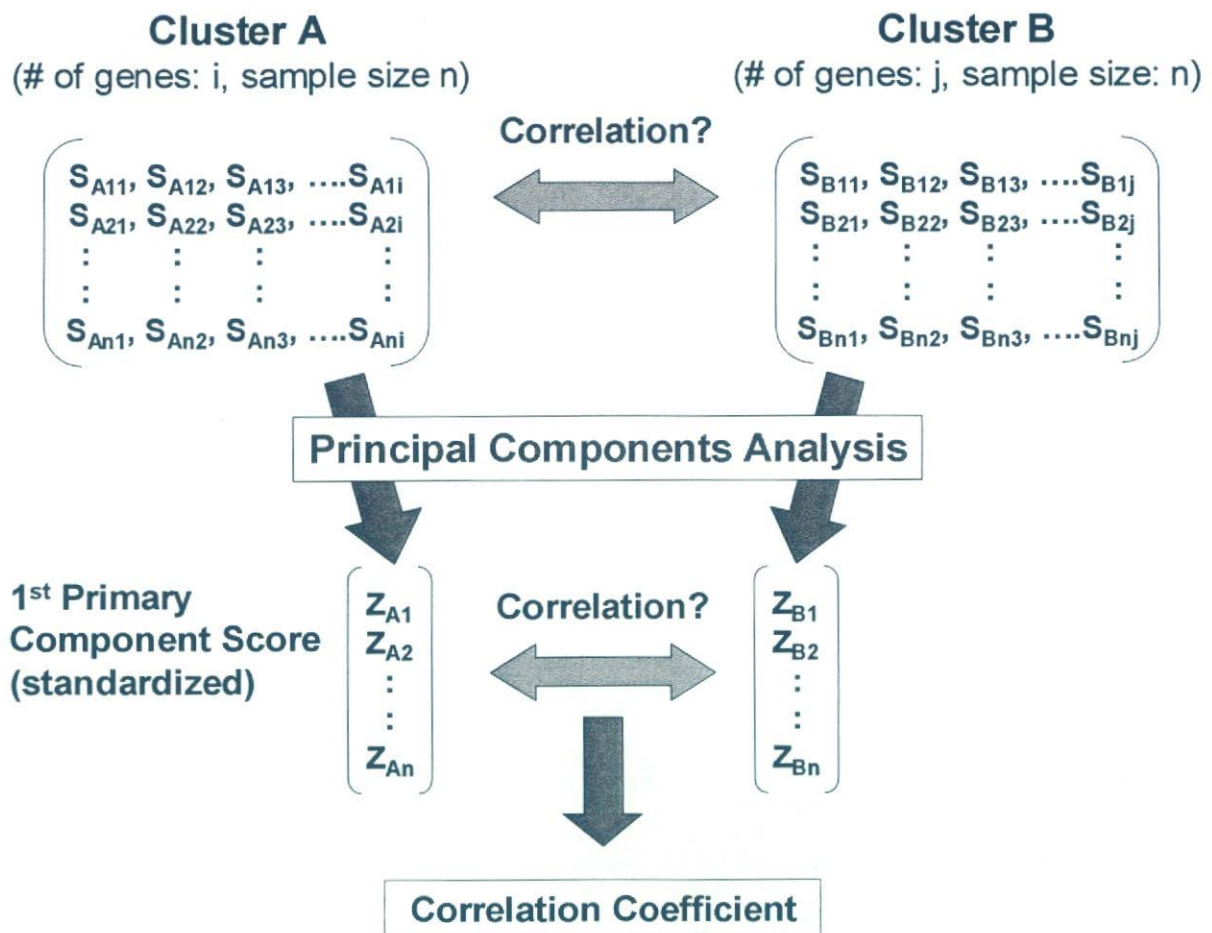


Fig.56 遺伝子オントロジークラスター間の相関関係の検討
 相関係数として、スピアマンの順位相関係数を採用し、 $P < 0.001$ をもって有意な相関係数と判定した。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

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、これまで培養系の細胞に適用した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）によるウイルス濃縮法を、ドナーのスクリーニング法として応用するための検討を行った。このためにまず、HCV、HBV のパネル血漿に適用した。その結果、PEI ビーズ濃縮法は HCV の 10 種類のジェノタイプや由来の異なる検体を全て濃縮可能であった。また HCV のセロコンバージョンパネルに適用すると、通常の PCR 法よりも数日早い段階の検体でウイルス検出が可能となり、ウインドウ期の短縮が可能であることが示された。一方、HBV のジェノタイプパネルに PEI ビーズ濃縮法を適用したが、HBV 抗体陽性のパネル血漿以外は濃縮できなかった。そこで、新たな濃縮法として抗 HBV 抗体と ZnCl_2 による濃縮法を検討したところ、抗体陰性のパネル血漿も効果的に濃縮された。以上の結果より、PEI ビーズ濃縮法及び抗 HBV 抗体と ZnCl_2 によるウイルス濃縮法は、それぞれ HCV、HBV 陽性検体の濃縮・高感度検出に有用であることが示唆された。

研究協力者

山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所
徳田 敬代 国立医薬品食品衛生研究所
古田 美玲 国立医薬品食品衛生研究所
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

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

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

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。初年度は、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) を用いて培養液中のウイルスの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。昨年度は、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検討を行い、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を明らかにした。今年

度は、HCV及びHBVのドナースクリーニング法としての適用について、パネル血漿やセロコンバージョンパネルを用いて検討した。

B. 研究方法

(1) ウイルス

C型肝炎ウイルス (HCV) の標準品としては第1次国内標準品 (genotype HCV-1b, 力価: 100,000IU/ml) を用いた。HCV ジェノタイプパネルは BBI Diagnostics 社から入手した Worldwide HCV Performance Panel (WWHV 302) の中の10種類の検体を用いた。HCVのセロコンバージョンパネルは ZeptMetrix 社より入手した Anti-HCV Seroconversion Panel (HCV 6225, Donor No. 62999)を用いた。

B型肝炎ウイルス (HBV) はHBV DNA 第1次国内標準品 (genotype C, 力価: 4.4×10^5 IU/ml) 及び国内で樹立されたHBV標準パネル血漿の中の15種類の検体を用いた。

(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 $0.8 \mu\text{m}$) 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 PEI ビーズによる濃縮は、ウイルス液 (パネル血漿) 1mL に PEI ビーズ溶液 $100 \mu\text{L}$ (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ウイルス液 (パネル血漿) 0.1ml にウイルスゲノム抽出液 (スマイテスト

EX-R&D、(株)医学生物学研究所)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 $0.22\mu\text{m}$)を用いて除去した。ウイルス液として、HCV ジェノタイプパネルは、パネル血漿 0.1ml をヒト血漿 4ml で希釈したものを使用した。HCV セロコンバージョンパネルは、パネル血漿 0.9ml を PEI ビーズで濃縮し、未濃縮コントロールとしてパネル血漿 0.09ml を使用した。HBV のパネル血漿は、乳糜の影響を除くため、遠心ろ過フィルター(孔径 $0.22\mu\text{m}$)に通したものと通していないものを用い、各 1ml から濃縮し、コントロールとして同じ処理を行ったもの 0.1ml を使用した。ゲノムコピー数定量用のスタンダードとして、HBV または HCV の国内標準品 0.1ml からスマイテスト EX-R&D でウイルスゲノムを抽出したものをを用いた。

(3) HBV の ZnCl_2 による濃縮

HBV パネル血漿 1ml に抗 HBV 抗体 (HBV PreS 抗原をウマに免疫して得た血清よりアフィニティー精製したもの) $4\mu\text{l}$ を添加後、の 1.1M の ZnCl_2 を $20\mu\text{l}$ 加えて $10,000\text{rpm}$ で 10 分間遠心した。得られた沈殿から、スマイテスト EX-R&D を用いてウイルスゲノムを抽出した。

(4) 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) $50\mu\text{L}$ に溶解し、そのうちの $10\mu\text{L}$ 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。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。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以下に示す。

HBV : F-Primer: $5'\text{-GGA CCC CTG CTC GTG TTA CA-3'}$

R-Primer: $5'\text{-GAG AGA AGT CCA CCM CGA GTC TAG A-3'}$

Probe: $5'\text{-FAM-TGT TGA CAA RAA TCC TCA CCA TAC CRC AGA-TAMRA-3'}$;

HCV : F-Primer: $5'\text{-TGC GGA ACC GGT GAG TAC A-3'}$

R-Primer: $5'\text{-CTT AAG GTT TAG GAT TCG TGC TCA T-3'}$

Probe: $5'\text{-FAM-CAC CCT ATC AGG CAG TAC CAC AAG GCC-TAMRA-3'}$

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、人権擁護を含めたインフォームド Consentのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 結果及び考察

(1) PEI ビーズによる HCV ジェノタイプ