

Fig.121 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

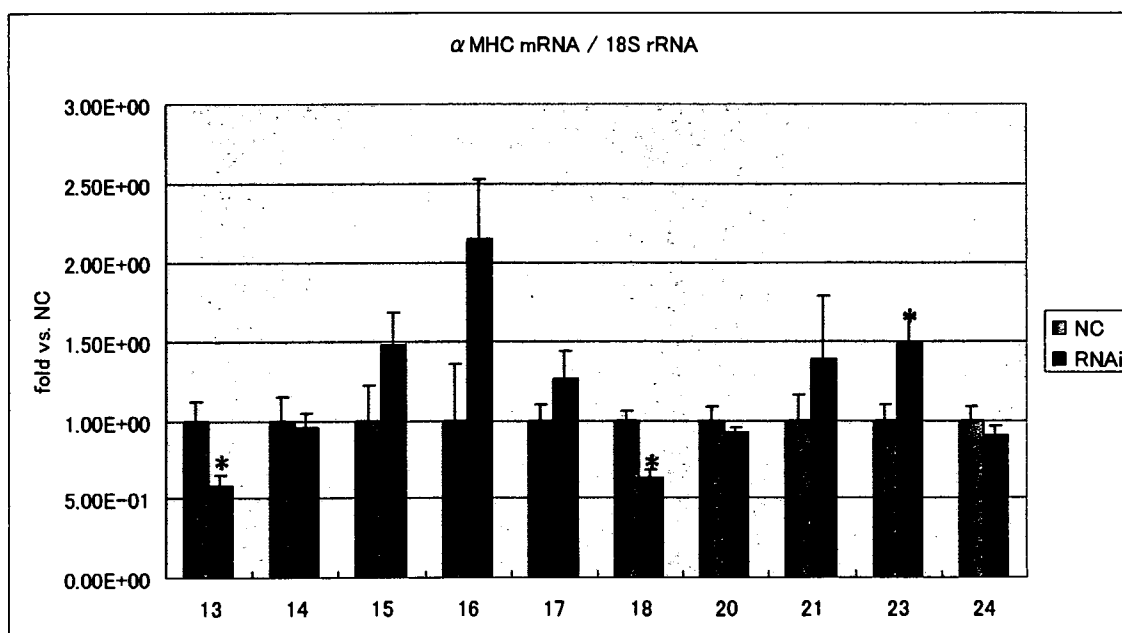
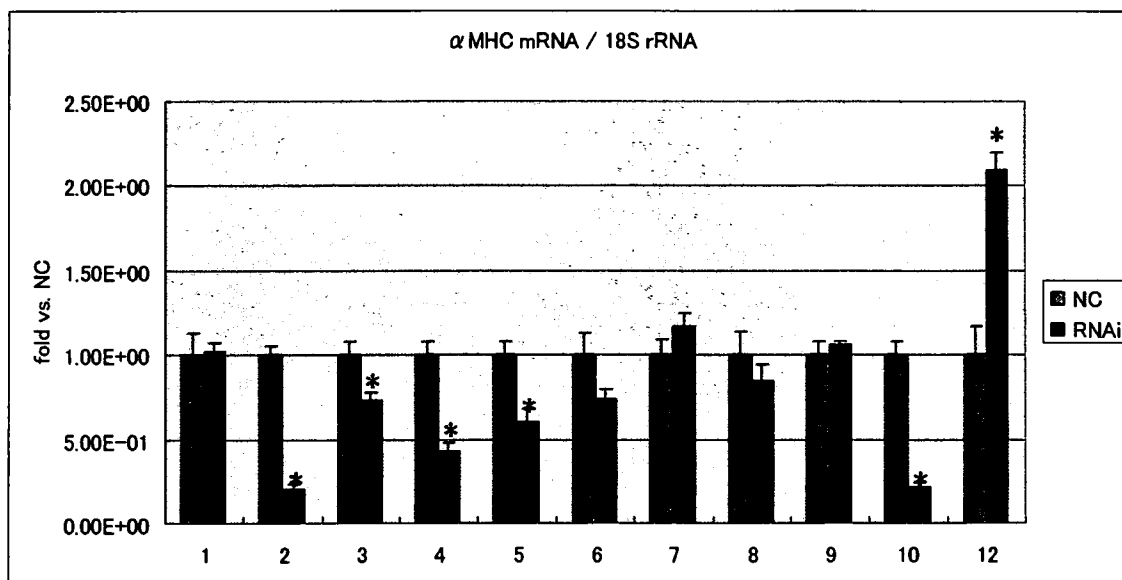


Fig.122 分化誘導後14日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

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

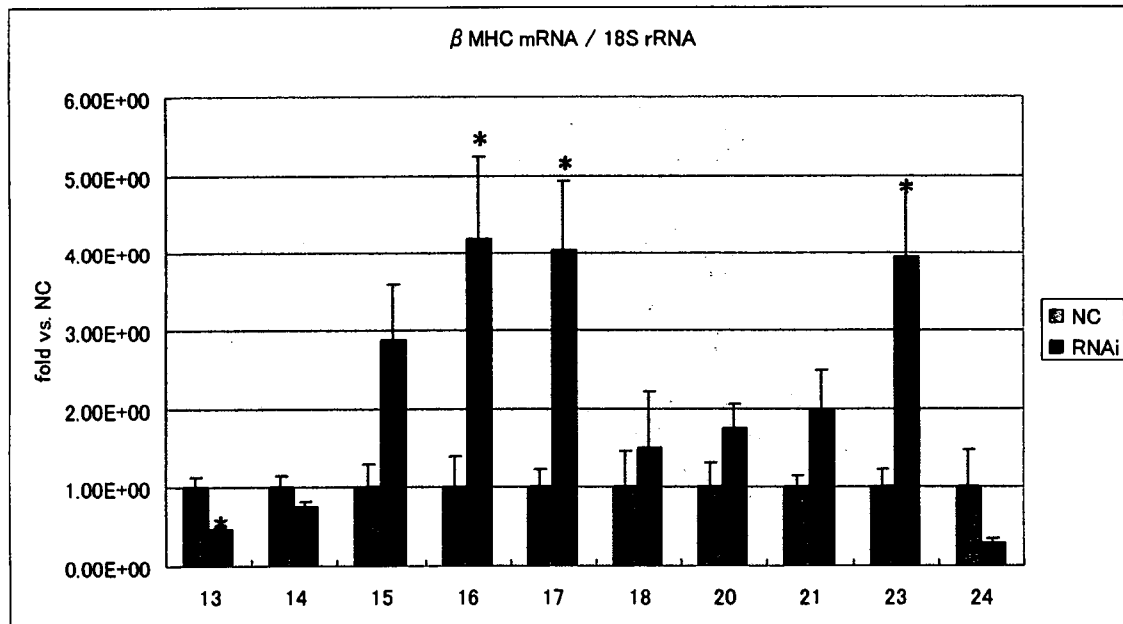
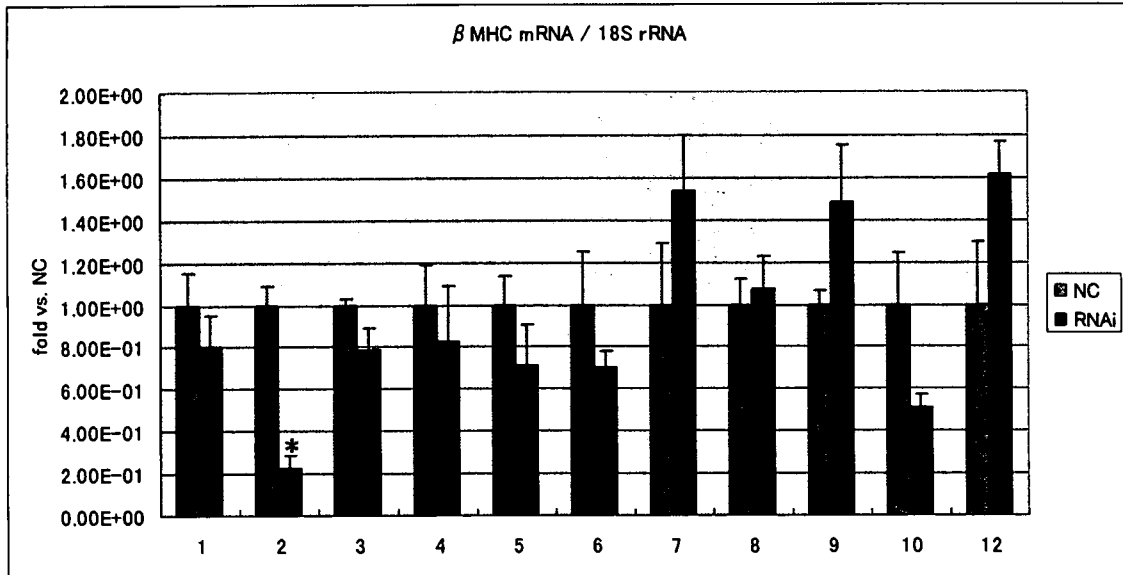


Fig.123 分化誘導後14日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

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

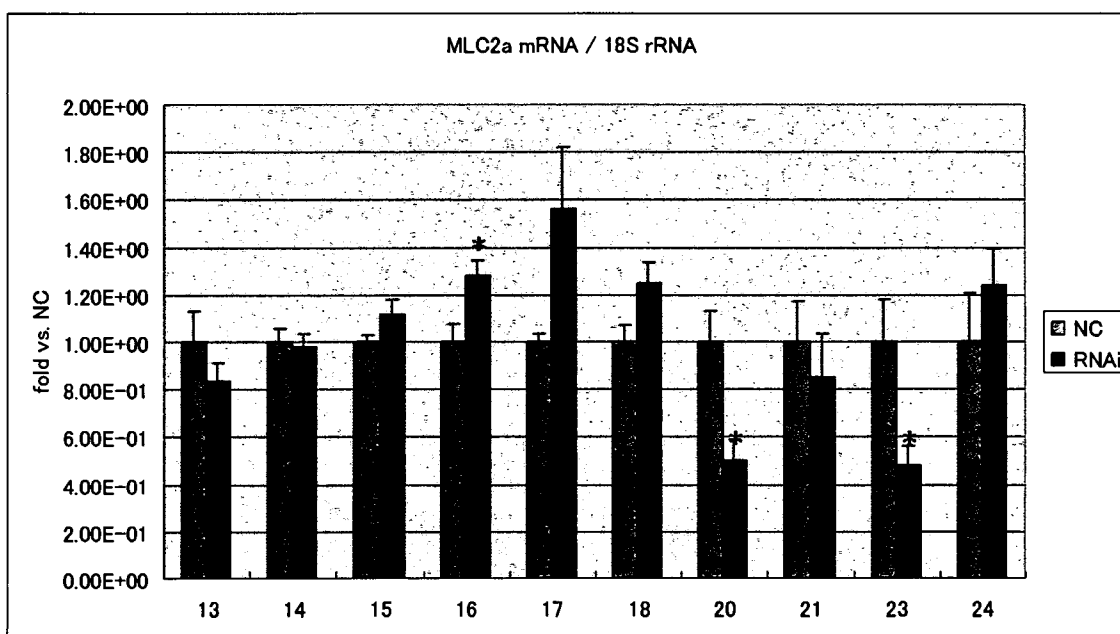
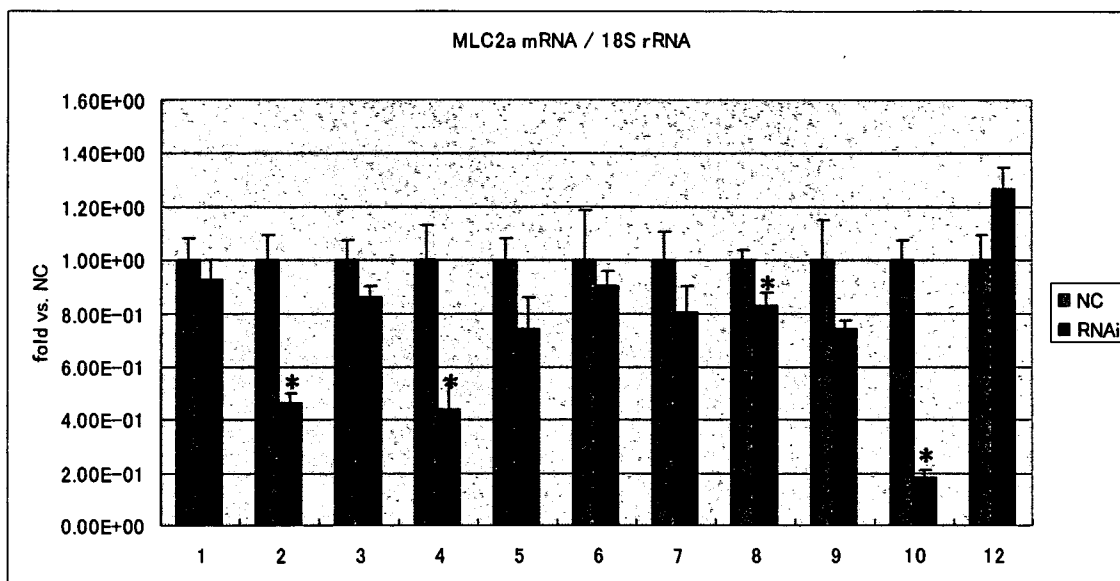


Fig.124 分化誘導後14日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

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

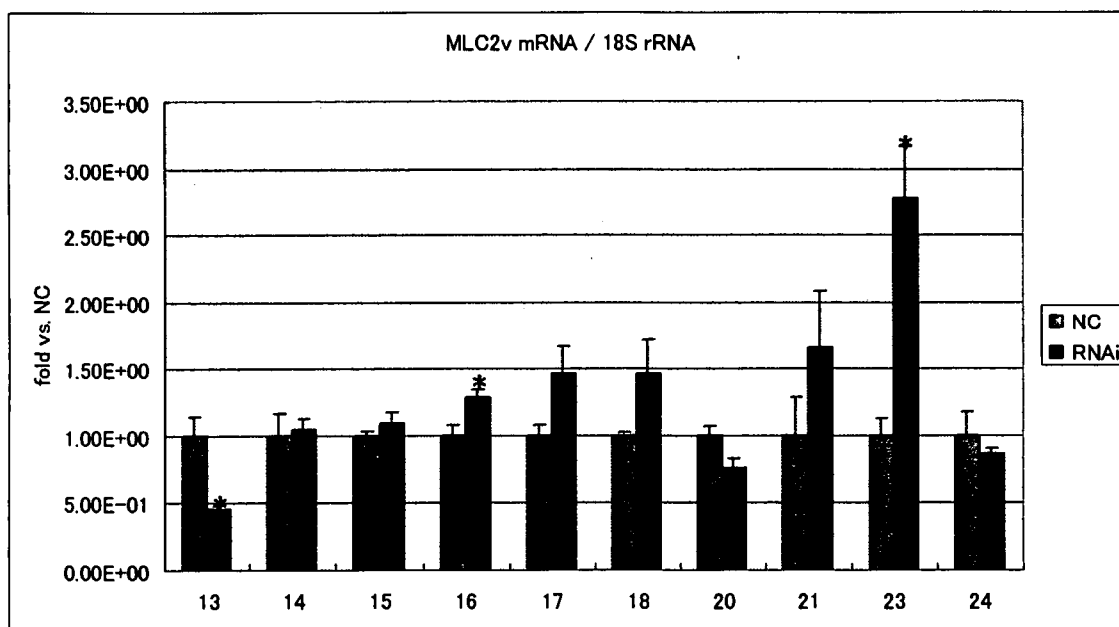
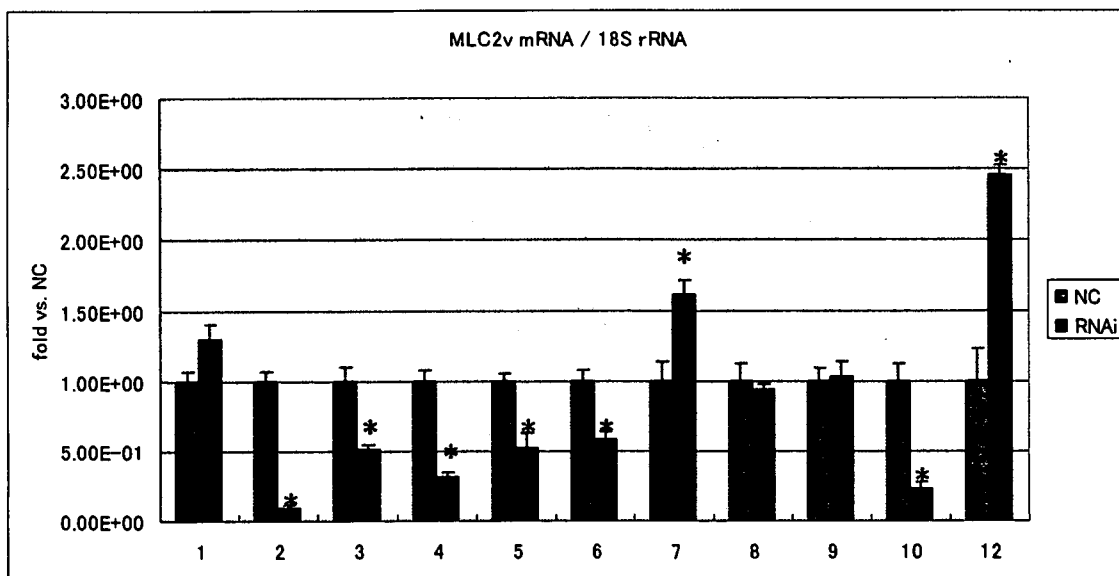


Fig.125 分化誘導後14日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

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 16 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。

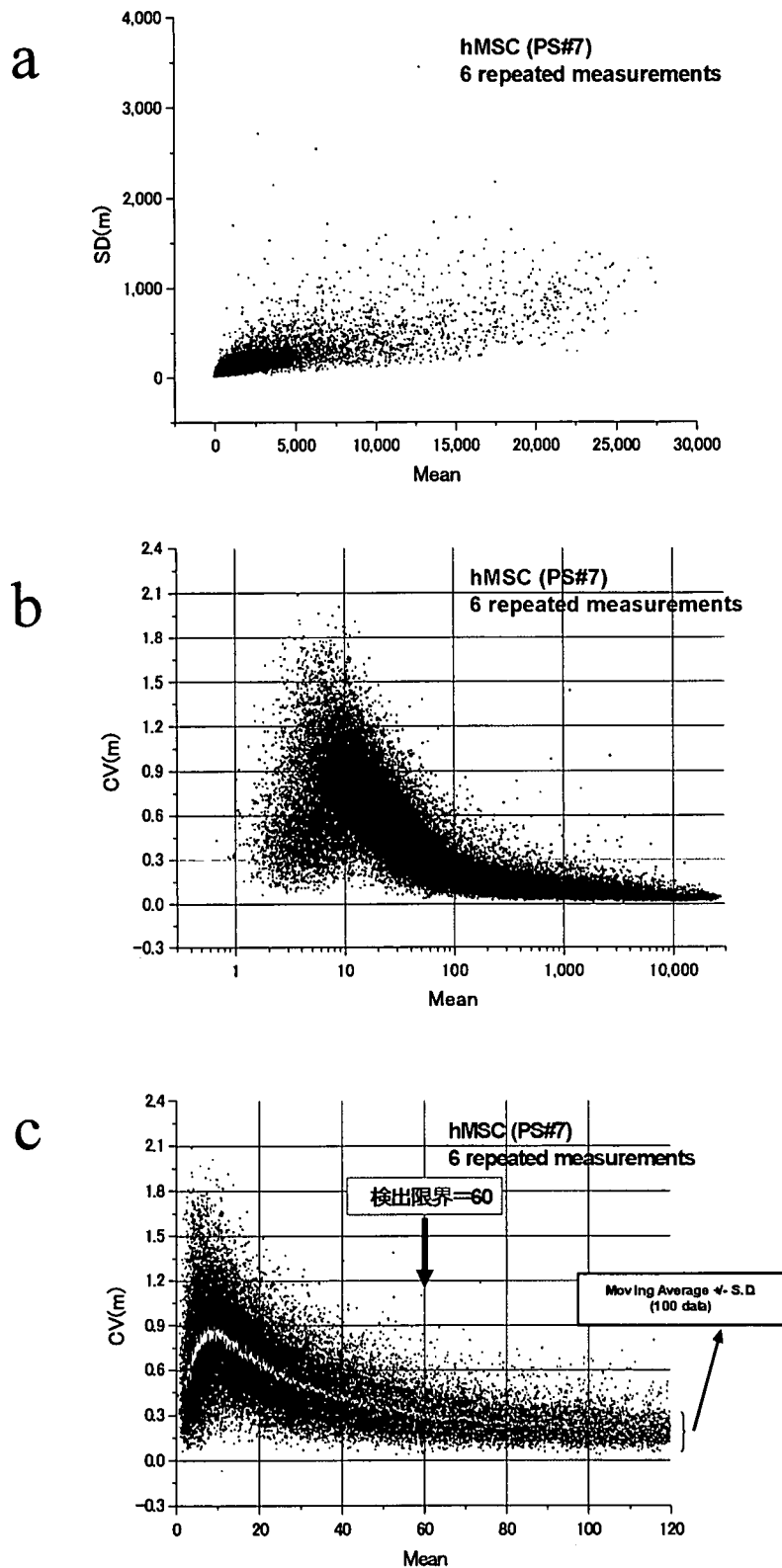


Fig. 126 同一cRNAサンプルの繰り返し測定（6回）における測定シグナルの平均値とデータのばらつき（S.D.）の関係。a)平均値と標準偏差（S.D.）の関係。b)平均値と変動係数（CVm）の関係。c) b)のグラフの横軸を線形目盛りとし、平均値の低い部分を拡大したもの。CVm値の移動平均値が0.3を通過するのは測定シグナルの平均値が60のとき。図は継代数7のヒト骨髄間葉系幹細胞のデータ。継代数9の場合も同様であった（データ省略）。

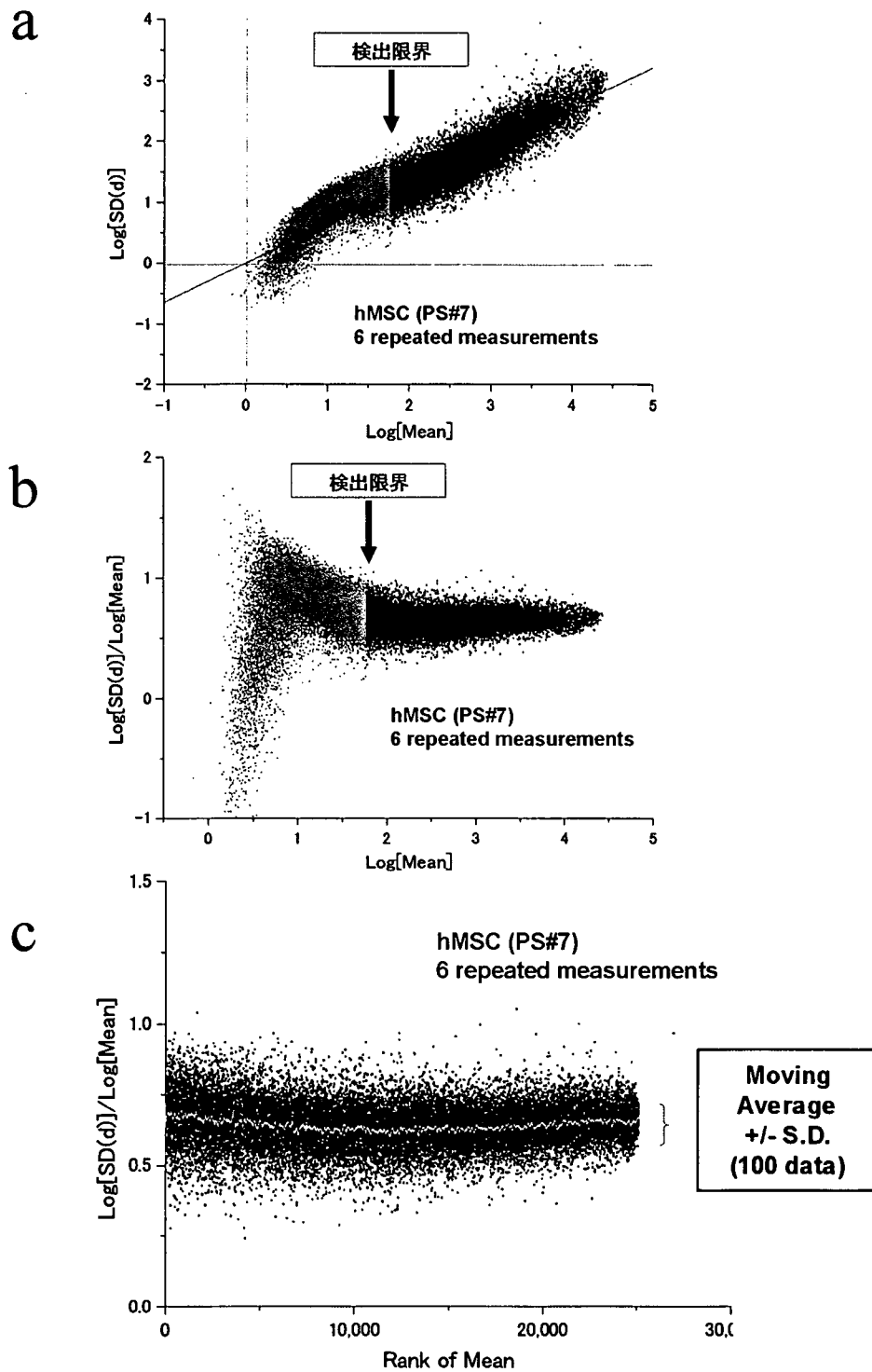


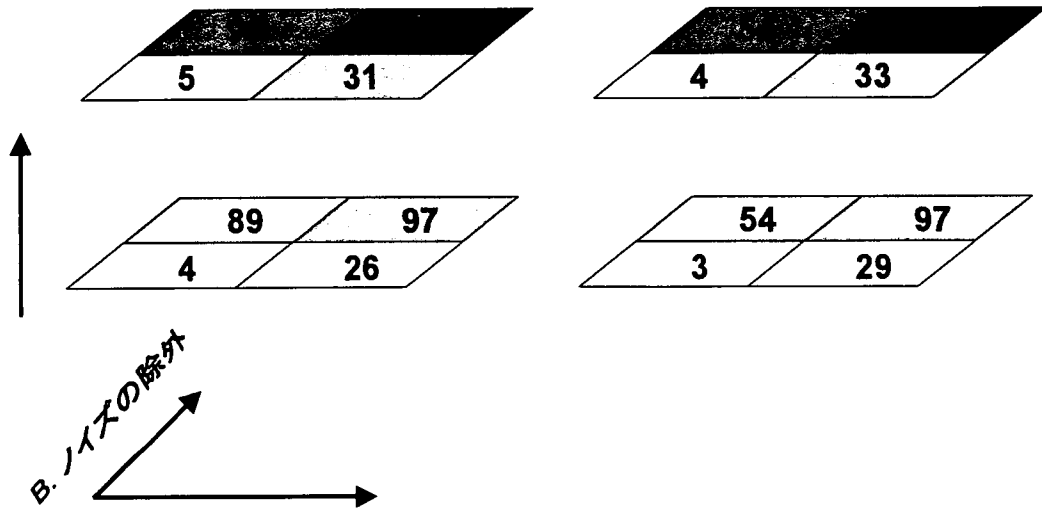
Fig. 127 同一cRNAサンプルの繰り返し測定（6回）における測定シグナルの平均値とS.D.の関係 a)検出限界以上のS.D.値の対数（青）には平均値の対数との比例関係があるように見える（赤線）。b)検出限界以上では「S.D.値の対数と平均値の対数の比」が平均値に依存しないように見えることを示す。c)横軸は検出限界以上における測定値の平均値の「順位」を示す。検出限界以上の「S.D.値の対数と平均値の対数の比」は平均値に依存しないことを示す。図は継代数7のヒト骨髄間葉系幹細胞のデータ。継代数9の場合も同様であった（データ省略）。

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

継代数 7

継代数 9



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. 128 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

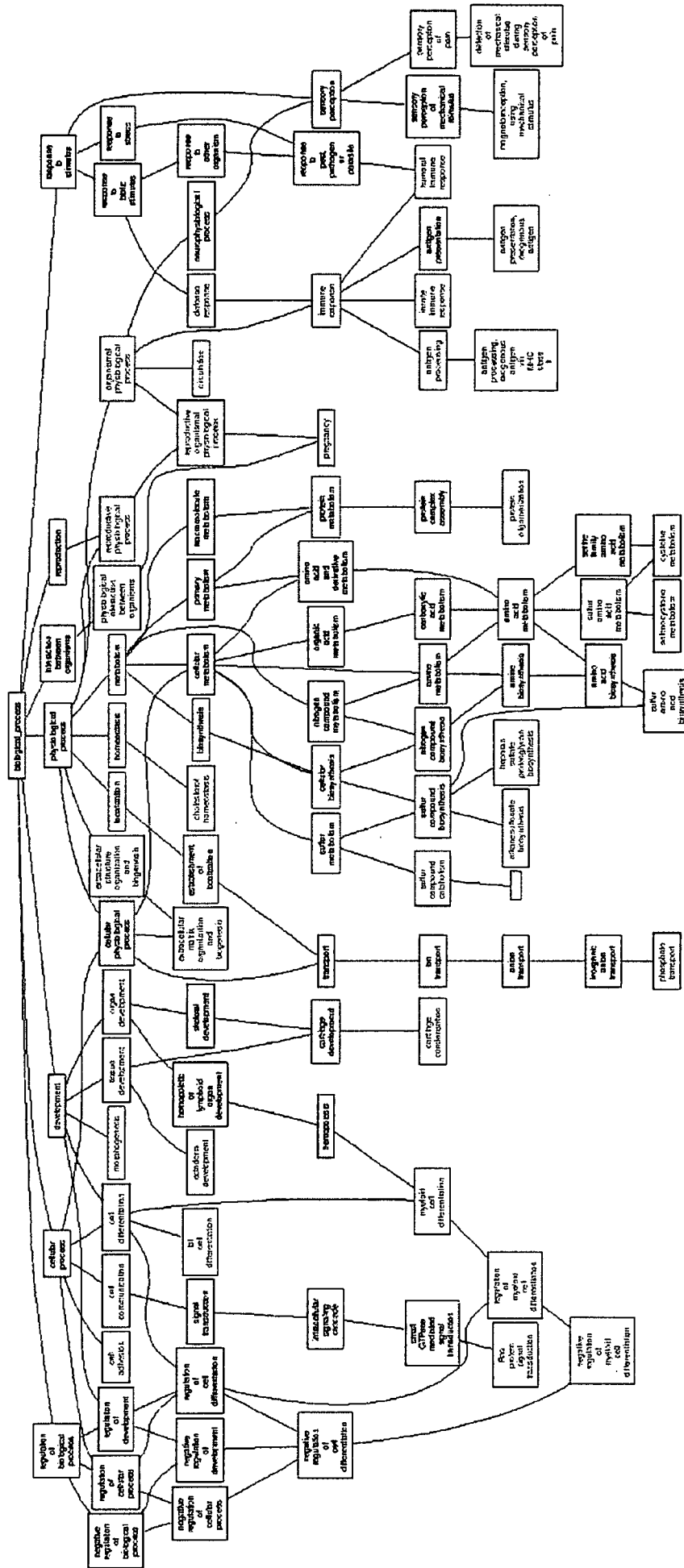


Fig. 129a 複数ロットのヒト骨髄由来間葉系幹細胞の間のばらつき (CV値) の大きい遺伝子に関するオントロジー解析 (Biological Process) 6ロット (継代数7または9) のCV値の高い top 1000 Probe Setsを抽出、継代数9の細胞についても top 1000を抽出し、継代数7と9の top 1000に共通して含まれる428 Probe Setsを抽出した。GOTM* (Vanderbilt Univ.)を用い、上記Probe Setの集団に有意(P<0.01)に濃縮される生理機能を探査した。赤：有意(P<0.01)に濃縮されるオントロジークラスター

Gene Ontology Tree: Molecular Function

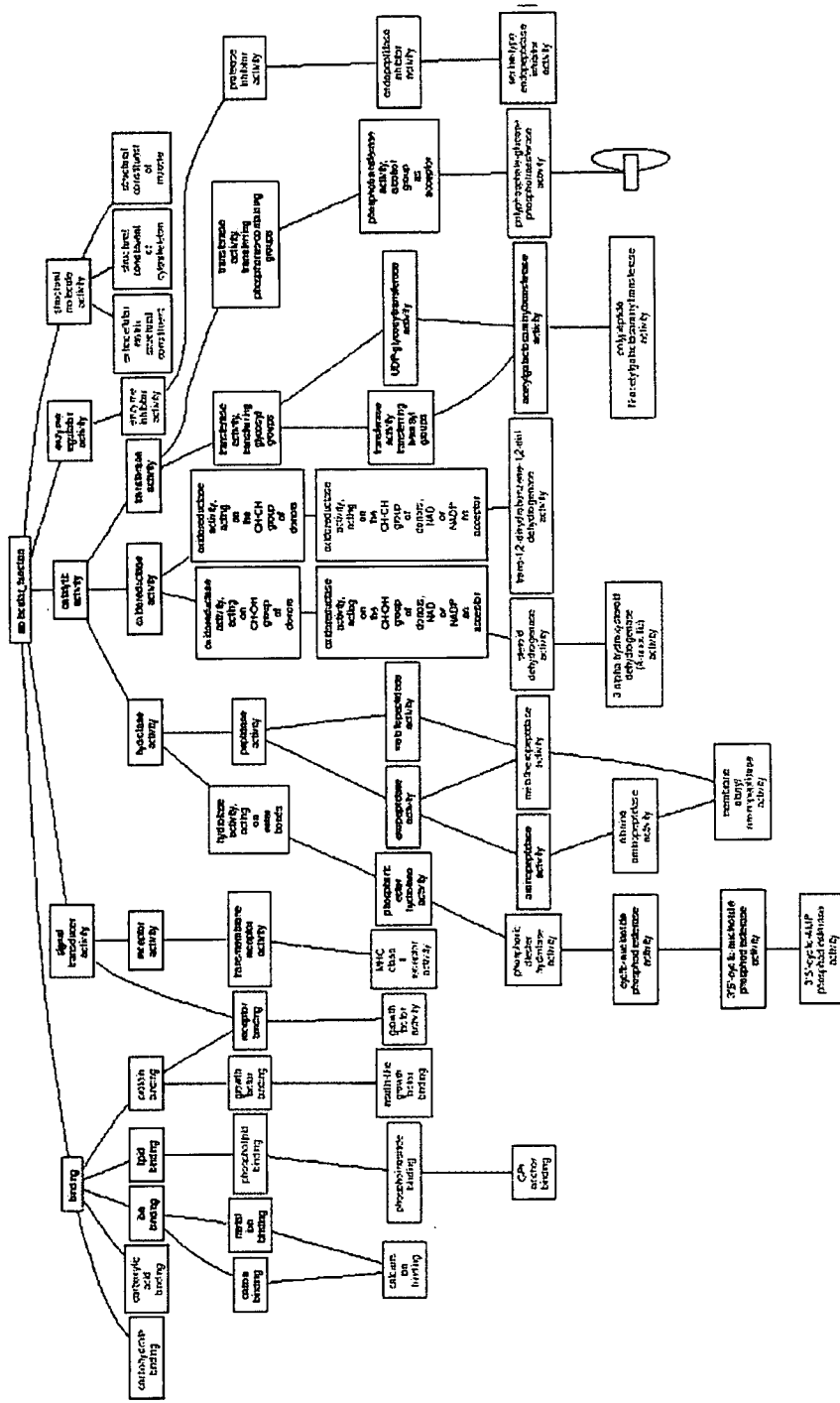


Fig. 129b 複数ロットのヒト骨髄由来間葉系幹細胞の間のばらつき (CV値) の大きい遺伝子に関するオントロジー解析 (Molecular Function) ロット (継代数7または9) のCV値の高いtop 1000 Probe Setsを抽出、継代数9の細胞についてもtop 1000を抽出し、継代数7と9のtop 1000に共通して含まれる428 Probe Setsを抽出した。GOTM* (Vanderbilt Univ.)を用い、上記Probe Setの集団に有意($P < 0.01$)に濃縮される生理機能を探索した。赤: 有意($P < 0.01$)に濃縮されるオントロジークラスター

Gene Ontology Tree: Cellular Component

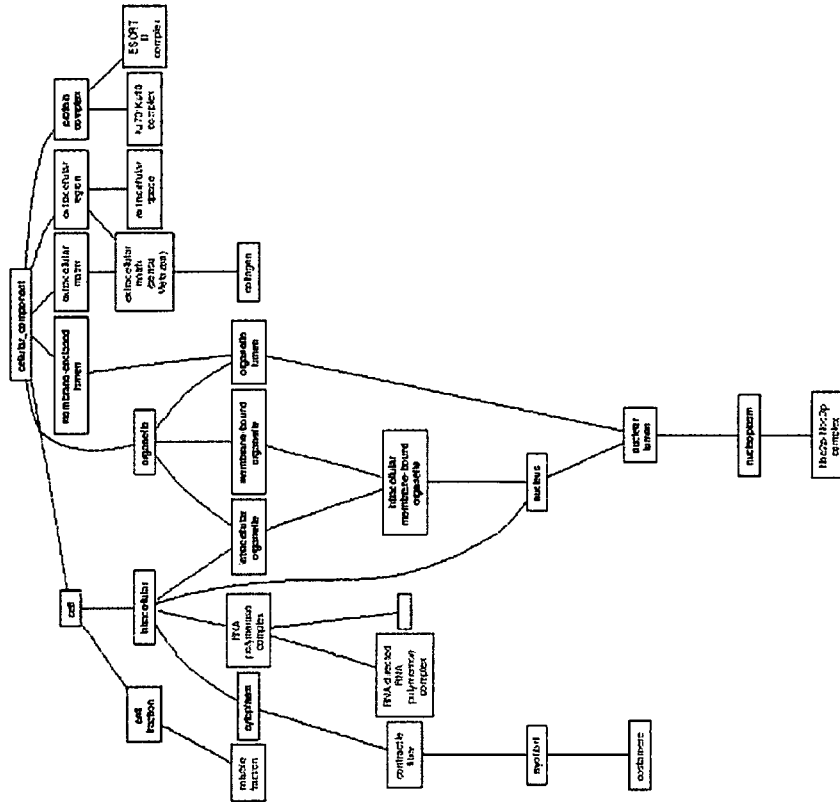


Fig. 129c 複数ロットのヒト骨髄由来間葉系幹細胞の間のばらつき (CV値) の大きい遺伝子に関するオントロジー解析 (Cellular Component) 6ロット (継代数7または9) のCV値の高いtop 1000 Probe Setsを抽出、継代数9の細胞についてもtop 1000を抽出し、継代数7と9のtop 1000に共通して含まれる428 Probe Setsを抽出した。GOTM* (Vanderbilt Univ.)を用い、上記Probe Setの集団に有意(P<0.01)に濃縮される生理機能を探索した。赤:有意(P<0.01)に濃縮されるオントロジークラスター

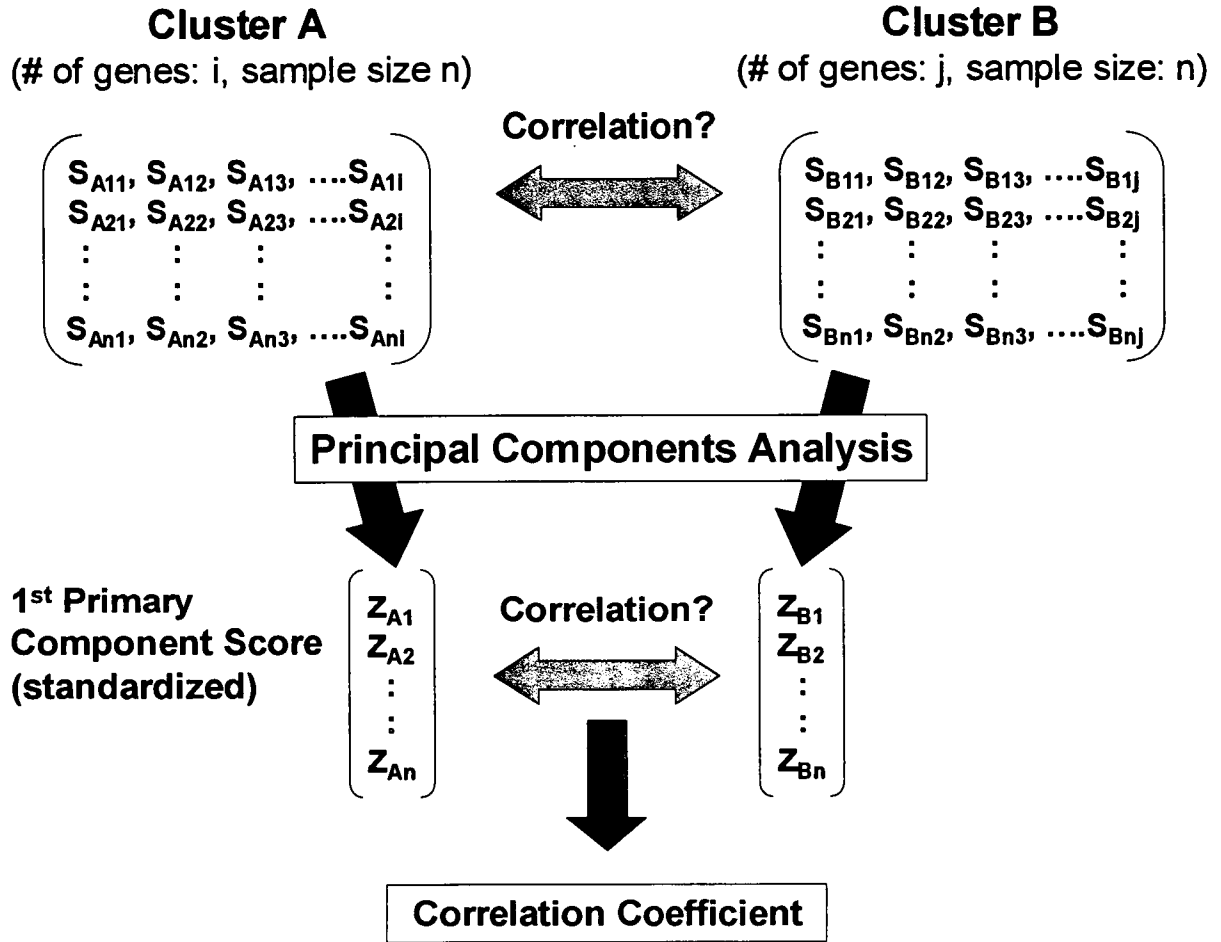


Fig. 130 遺伝子オントロジークラスター間の相関関係の検討
 相関係数として、スピアマンの順位相関係数を採用し、 $P < 0.001$ をもって有意な相関係数と判定した。

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、ウイルスの高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発を検討した。17年度は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濃縮法の最適化の検討を行い、分子量70,000のPEI ビーズを用いて弱酸性条件で濃縮を行うと最もウイルス濃縮効率が高いこと、ウイルス濃縮時にIgM抗体や補体を添加することによりPEI ビーズ単独では濃縮されないポリオウイルスも濃縮可能であることを明らかにした。18年度は本法のヒト肝炎ウイルスへの適用を検討した。A型肝炎ウイルス（HAV）、C型肝炎ウイルス（HCV）はヒト血漿中のウイルスも高効率で濃縮可能であり、血漿中の1IU/mlのHCVが確実に検出可能であった。B型肝炎ウイルス（HBV）は濃縮効率が劣るが、抗HBV-IgM抗体の添加で濃縮効率は改善されること、抗HBV抗体陽性血漿は濃縮されるが、抗体陰性血漿は濃縮が困難であることが示唆された。19年度は本法のHCV、HBVのウイルススクリーニング試験への応用を検討した。このために、HCV、HBVのパネル血漿に適用可能か検討し、HCVは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り、セロコンバージョンパネルに適用すると、通常のPCR法よりもウインドウ期の短縮が可能であった。一方、HBVのジェノタイプパネルは、HBV抗体陽性血漿以外は濃縮されなかった。そこで、新たな濃縮法として抗HBV抗体とZnCl₂による濃縮法を検討し、抗体陰性のHBVパネル血漿も効果的に濃縮可能であることを明らかにした。以上の結果より、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血液中のHAV、HCVの高感度検出やHBVの低濃度キャリアの検出にはPEI ビーズによるウイルス濃縮法が有用であること、HBVのウインドウ期の高感度検出には抗HBV抗体とZnCl₂によるウイルス濃縮法が有用であることが示された。

研究協力者

山口 照英 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
小木美恵子 金沢工業大学
米須 杏子 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

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、ウイルスの高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発を検討した。17年度は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の検討を行った。18年度は前年度確立した最適化条

件を用いて、PEIビーズ濃縮法のヒト肝炎ウイルス、HAV、HBV、HCVに適用可能か検討した。19年度は、PEIビーズによるウイルス濃縮法のウイルススクリーニング試験への適用についてHCV、HBVのパネル血漿を用いて検討した。また、HBVの濃縮法として、新たに抗HBV抗体とZnCl₂による濃縮法の開発を行った。

B. 研究方法

(1) ウイルス

モデルウイルスとして単純ヘルペス I 型 (HSV-1)、SV-40、アデノウイルス 5 型、ブタパルボウイルス (PPV)、ポリオウイルス sabin 1 型を用いた。

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。

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) の標準品としては、HBV DNA 第 1 次国内標準品 (genotype C, 力価: 4.4×10^6 IU/ml) を用いた。また市販の HBV ジェノタイプパネル (BBI Diagnostics; Hepatitis B Virus DNA Genotype Performance Panel PHD201(M)) の 1 種類を HBV 陽性血漿とし

て用いた。さらに HBV ジェノタイプパネルとして、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

ポリエチレンイミン (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) あるいは血清添加培地 (DMEM + 5%FCS) で希釈したウイルス液 1mL もしくは 10mL に PEI 溶液 100 μL (5mg の PEI 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 ビーズ画分または PEI ビーズを添加する前のオリジナルのウイルス液 100 μL の各液にウイルスゲノム抽出液 (スマイテスト EX-R&D、株式会社医学生物学研究所) 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 ビーズは抽出の途中で遠心ろ過フィルター (孔径 0.22 μm) 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 TE 50 μL あるいは 100 μL に溶解し、10 μL 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 の高感度検出を検討する際には 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、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) 磁気ビーズに固相化する PEI の分子量の検討

3 種類の分子量の異なる PEI (分子量 70,000、10,000、1,800) を磁気ビーズに固相化して用いた。各磁気ビーズを用いて常法によりモデルウイルスを濃縮し、濃縮効率を比較した。

(5) 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。

(6) PEI ビーズにウイルスとともに濃縮される血清中のタンパク質の解析

血清添加培地で希釈したウイルス液と PEI ビーズを反応後、PEI ビーズ結合画分を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分画した。PEI ビーズにより濃縮された各バンドを切り出してトリプシンを用いて in gel 加水分解を行った後、抽出したペプチドを MS/MS により解析、同定した。

(7) PEI 結合カラムの作成とカラムへのタンパク質の吸着

ブロムシアン活性化セファロース 6 MB に PEI を結合させて PEI-セファロース 6MB(PEI-S-6MB)カラムを作成した。IgG 抗体及び IgM 抗体について、1~1.5mg/ml の濃度の溶液を調製し、PEI-S-6MB カラム および対照カラムとして PEI を結合していない Glycine-6MB カラムにアプライし、各カラムより得た溶出フラクションの吸光度によりカラムへの吸着の有無を判定した。

(8) 抗マウス IgG ウサギ IgM 抗体の調製
マウス IgG 抗体をウサギに免疫後、IgM タイターが高くなった 11 日目に採血し、抗マウス IgG-ウサギ抗血清を作成した。抗マウス IgG-ウサギ抗血清はマウス IgG 抗体結合アフィニティーカラムで精製後、PEI-S-6MB カラムにアプライした。PBS(-) を用いて素通り画分を溶出後、1.4M NaCl/50mM HEPES (pH 7.6)を用いてカラム結合画分を溶出し、濃縮した。濃縮した溶液を抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体として用いた。

(9) PEI ビーズと IgM 抗体、補体を用いたウイルス濃縮

ポリオウイルスのウイルス液にポリオウイルス Type I に対するマウスモノクローナル抗体 (IgG) を加え、さらに抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体あるいは補体第 1 成分 (C1) と補体第 4 成分 (C4) を添加後、PEI ビーズ溶液 100 μ L を加え、定法に従い濃縮操作を行った。

(10) 抗 HBV-IgM 抗体の作成

adr サブタイプ及び adr 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、ImmunoPure 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。

(11) 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 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、もしくは健康なボランティアから採取したものを用いた。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。

(12) HBV の ZnCl₂ 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た血清よりアフィニティー精製したもの) 4 μ l を添加後、の 1.1M の ZnCl₂ を 20 μ l 加えて 10,000rpm 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。

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コンセント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

(1) PEIビーズによるウイルス濃縮の最適化

細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保には、ウイルス等の感染性因子の高感度検出技術の開発が非常に重要である。我々はこれまでPEIビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、広範なウイルスを濃縮可能であること、濃縮したウイルスゲノムを核酸増幅法 (NAT) で検出することにより、ウイルスゲノムの高感度検出が可能であることを明らかにしてきた。しかし、PEIビーズを用いたウイルス濃縮法は一部の非エンベロープウイルスには有効でないこと、また濃縮効率が低いウイルスも見られることから、PEIビーズによるウイルス濃縮法の最適化による濃縮効率の向上と濃縮できないウイルスを濃縮できる方法の開発について検討した。

最初に、磁性粒子に結合している PEI の分子量の違いがウイルスの濃縮効果に及ぼす影響について検討した。分子量 70,000、10,000、1,800 の 3 種類の PEI を結合させた磁気ビーズをそれぞれ作製し、モデルウイルスとして HSV-1 の濃縮を試みたところ、分子量 70,000 の PEI ビーズでは非常に高い濃縮効率を得られるが、分子量 1,800、10,000 の PEI ビーズでは濃縮がほとんど見

られないことが明らかとなった (Fig.1)。データは示さないが、他のモデルウイルスでも同じ結果が得られた。また、濃縮時の pH がウイルスの濃縮効率に与える影響を検討した。その結果、どのモデルウイルスの場合でも、pH6 付近において最も高い濃縮効率を得られることが明らかとなった (Fig.2 ; 図は SV40 のみ示した)。

次に、PEI ビーズを用いて血清を含む培養液中に存在するウイルスを濃縮する場合に、ウイルスと共に濃縮される分子について検討した。PEI ビーズ結合画分と濃縮前のタンパク質について、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で比較検討した結果、複数のタンパク質が PEI ビーズ上に濃縮されることが見いだされた。そこで、PEI ビーズ上に濃縮された分子を同定するために、濃縮画分を SDS-PAGE により分離後、得られた各バンドを切り出し、トリプシンを用いて加水分解した後、各分解物を抽出精製した。質量分析により各バンドの同定を行ったところ、血清中の補体第 3 成分や補体第 4 成分、セルロプラスミン、IgM 等がウイルスと共に濃縮されることが明らかとなった (Fig.3)。この結果より、PEI ビーズによるウイルスの濃縮時に免疫複合体を形成させることにより、濃縮できないウイルスを濃縮できる可能性や濃縮効率を向上させられる可能性が示された。

そこで PEI ビーズ単独では濃縮できないポリオウイルスについて、補体や IgM 抗体と免疫複合体を形成させることにより濃縮できるかどうか検討した。この際、ポリオウイルスに対する IgM 抗体は入手が困難であるため、抗ポリオウイルス・マウスモノクローナル抗体 (IgG) と抗マウス IgG・ウサ