

ギIgM抗体を利用することにした。そこで、マウスIgG抗体をウサギに免疫して抗血清を作成し、マウスIgG抗体結合アフィニティーカラムとPEI・セファロース6MB (PEI-S-6MB)カラムを用いて2段階精製を行った。IgM抗体はPEI-S-6MBカラムに吸着するが、IgG抗体は吸着がみられないことを確認している (Fig.4)。マウスIgG抗体結合アフィニティーカラム結合画分をPEI-S-6MBカラムにアプライし、結合画分を回収して抗マウスIgG・ウサギIgM抗体として使用した (Fig.5)。この抗マウスIgG・ウサギIgM抗体と抗ポリオウイルスモノクローナル抗体 (IgG) をウイルス液に添加した後、PEIビーズによるポリオウイルスの濃縮を行った。その結果、抗ポリオウイルスモノクローナル抗体単独の添加でもウイルスの濃縮が認められたが、抗マウスIgG・ウサギIgM抗体を添加することにより、濃縮効率がさらに向上した (Fig.6)。また、抗ポリオウイルスモノクローナル抗体と補体第1成分 (C1) 及び補体第4成分 (C4) をウイルス液に添加し、室温あるいは37°Cでインキュベート後にPEIビーズによりポリオウイルスの濃縮を行った結果、室温の反応ではポリオウイルスの濃縮効率は抗ポリオウイルスモノクローナル抗体単独とほとんど変わらなかったが、補体系が働く37°Cで反応した場合にはウイルス濃縮効率の向上が認められた (Fig.6)。

## (2) PEIビーズによるHAVの濃縮

PEIビーズによるウイルス濃縮の最適化条件のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討した。まず、*in vitro*培養系で増幅したA型肝炎ウイルス (HAV) を対象に、PEI

ビーズ濃縮に及ぼすpHとFCSの影響を検討した結果、pHの影響、FCSの影響は特に認められず、いずれの条件でも1ml (10倍量) のウイルス液からの濃縮でcontrolの100 $\mu$ lからの抽出と比較して約10倍のコピー数が回収されほぼ完全に濃縮された (Fig.7A)。次に、10ml (100倍量) の大容量からのウイルス液からの濃縮を検討した結果、PEIビーズ画分に74倍と非常に高率でHAVが回収され、上清画分に残存した量は20%以下であった (Fig. 7B)。PEIビーズによるウイルス濃縮をヒト血液試料に適用可能かどうか検討する目的で、ヒト正常血漿またはヒト正常血清でHAVを希釈した場合のPEIビーズによる濃縮を検討した (Fig. 7C)。その結果、ヒト正常血漿で希釈したHAVはほぼ完全に回収されたが、ヒト正常血清で希釈した場合には回収率は50%程度とやや劣っていた。

## (3) PEIビーズによるHBVの濃縮

B型肝炎ウイルス (HBV) のPEIビーズ濃縮について、国内標準品を用いて検討した。まず、PEIビーズ濃縮のpHとFCSの影響を検討した結果、無血清条件では濃縮率は5倍以上であったがHAVほど高効率ではなく、さらに血清含有条件では濃縮率が最大で3倍程度と低いものであった (Fig. 8A)。また、HBVではウイルス濃縮時のpHの影響が大きく、pH5前後の弱酸性条件において濃縮率が6倍程度と最も効率のよい濃縮が得られた。これまでの検討から、IgM抗体を用いて免疫複合性を形成させることによりPEI磁気ビーズの濃縮効率を向上させることができることが判明している。そこで、ウサギを用いて抗HBV-IgM抗体を

作成し、PEI ビーズによる HBV の濃縮時に抗 HBV-IgM 抗体を添加したところ、添加量に依存して濃縮効率の向上が認められた (Fig.8B)。そこで、この条件を用いて大容量からの濃縮を検討したが、10ml(100 倍量)からの濃縮では、抗 HBV-IgM 抗体の有無にかかわらず 1ml (10 倍量) からの濃縮よりもさらに低い量のウイルスしか PEI ビーズには回収されなかった (Fig. 8C)。

HBV のウイルススクリーニングへの適用を考え、ヒト血液試料中の HBV の濃縮を検討した。すなわち、HBV 国内標準品をヒト正常血漿及びヒト正常血清で希釈して PEI ビーズによる濃縮を検討した (Fig. 9A)。その結果、ヒト正常血漿、ヒト正常血清のいずれで希釈した場合も PEI ビーズへの HBV の吸着は全く認められなかった。抗 HBV-IgM 抗体を添加しても回収率の向上には至らなかった。ウイルス濃縮効率はヒト正常血漿のロットにより差があり、ヒト正常血漿に乳糜が認められると濃縮効率が劣ること、乳糜の影響は  $0.22\ \mu\text{m}$  のフィルターろ過で除くことができることが予備実験で確認されている。しかし、フィルターろ過したヒト正常血漿を用いても、濃縮効率は改善されなかった。同様の検討を HBV ジェノタイプパネルの中の 1 種類の HBV 陽性血漿を用いて同様の検討を行った (Fig.9B)。その結果、ヒト正常血漿で希釈すると、HAV と同様に効率よく濃縮され、抗 HBV-IgM 抗体の添加によりさらに濃縮率の向上が認められた。一方、ヒト正常血清で希釈したものはあまり濃縮が認められなかった。

#### (4) PEI ビーズによる HCV の濃縮

C 型肝炎ウイルス (HCV) の PEI ビーズ

濃縮について HCV 国内標準品を用いて検討した。その結果、HCV は 2%FCS 存在下でも PEI ビーズにより非常に効率よく濃縮可能であること、濃縮効率は弱酸性でより高い傾向が認められた (Fig.10A)。しかし、HCV の 10ml(100 倍量)からの濃縮を検討したところ、30 倍程度の濃縮に留まり、1ml (10 倍量) からの濃縮と比較してかなり効率が劣ることが判明した (Fig.10B)。また、ヒト血液試料中の HCV の濃縮について、ヒト正常血漿及びヒト正常血清で希釈して検討したところ、HAV と同様、ヒト正常血漿では高効率で濃縮可能であるが、ヒト血清で希釈したものは濃縮効率が劣るという結果が得られた (Fig. 10C)。

次に、PEI ビーズ濃縮による HCV の検出感度を検討した。HCV をヒト正常血漿で希釈して 1, 10, 100 IU/ml となるように調製し、コントロールの 0.1ml 各 10 本のチューブからの直接抽出と、1ml 各 10 本のチューブからの PEI ビーズ濃縮を行った後、2 段階 PCR によりウイルスを検出したところ、コントロールでは 1 IU/ml で 2/10 の低い確率でしか検出されず、10 IU/ml でも 8/10 の確率に留まるのに対して、PEI ビーズ濃縮では 1 IU/ml で 8/10 の確率で検出され、10 IU/ml では完全に検出が可能という結果が得られた (Fig.11A)。コントロールと 1ml からの PEI ビーズ抽出の試料各 2 本ずつについて、定量 RT-PCR でコピー数を測定した結果、PEI ビーズ濃縮により 1 IU/ml の HCV が検出可能であり、濃縮により検出感度が 5~7 倍向上することが確認された (Fig.11B)。

#### (5) PEI ビーズによる HCV ジェノタイプ

### プパネルの濃縮

HCV の国内標準品はジェノタイプ 1b であるが、ジェノタイプが異なる HCV も PEI ビーズで濃縮可能かどうか、HCV ジェノタイプパネルを用いて検討した。使用した HCV ジェノタイプパネルの詳細を Table 2 に示す。これらのジェノタイプと由来の異なる 10 種類のパネル血漿について、ヒト正常血漿で 40 倍に希釈後、ウイルス濃縮を検討した。その結果、検体のウイルス量が異なるため、検出されるウイルス量も検体により異なるが、検討した全てのパネル血漿が濃縮可能であることが示された (Fig.12A)。濃縮倍率はパネル ID302-07(ジェノタイプ 3a)の約 5 倍から、ID302-04(ジェノタイプ 2a/2c)及び ID302-10(ジェノタイプ 4)の約 20 倍までと種類により差が認められたが、少なくとも 5 倍以上の濃縮が可能であった (Fig.12B)。

### (6) PEI ビーズによる HCV セロコンバージョンパネルの濃縮

次に、HCV のセロコンバージョンパネルについて、PEI ビーズによる濃縮を試みた。使用したセロコンバージョンパネル血漿の詳細は Table 3 に示す。Fig.13 に示すとおり、90 $\mu$ l のパネル血漿からウイルスを直接抽出した場合にはパネル ID12 の 44 日目以降の検体が HCV 陽性と確認された。一方、0.9ml のパネル血漿について、PEI ビーズを用いて HCV を濃縮すると、直接抽出よりも 6 日早いパネル ID11 の 38 日目の検体も HCV 陽性であることが確認され、ウインドウ期の短縮化が可能であることが示唆された。Table 3 に示すとおり、Roche 社の HCV monitor 法では PEI ビーズ濃縮

した場合と同様、パネル ID11 が HCV 陽性であることが確認されているが、Chiron 社の bDNA 法や PCR DNA quantitative results ではパネル ID12 以降のみ陽性と判定されている。今回、PEI ビーズ濃縮法は Roche 社の HCV monitor 法と同等の高感度検出が可能であることが示された。

### (7) PEI ビーズによる HBV ジェノタイプパネルの濃縮

HBV の国内ジェノタイプパネル (標準パネル血漿) の濃縮に PEI ビーズ濃縮法が適用可能かどうかを検討した。使用した HBV 標準パネル血漿の詳細を Table 4 に示す。これらのパネル血漿について、0.1ml から直接ウイルス DNA を抽出したものとパネル血漿 1ml を PEI ビーズで濃縮したもので回収されたウイルス量を比較したところ、パネルの一部を除き、ほとんど濃縮効果が認められなかった (Fig.14A)。濃縮倍率をみると、ID003, 015, 068, 069 では 4 倍以上に濃縮されたが、その他の検体はほとんど濃縮されなかった (Fig.14B)。これらの 4 検体はいずれも抗体陽性血漿あるいは低濃度キャリアである。血漿中の乳糜の影響を除くため、フィルターろ過を行ってみたが、フィルターにより濃縮効率が改善されたのは ID007 と 015 の 2 種類のみで、フィルターろ過しても回収率は変わらないか、かえって回収率が低下した検体も多かった。4 倍以上の濃縮が認められた ID003, 015, 068, 069 は、いずれもジェノタイプ C で、HBsAb または HBcAb が陽性の検体であった (Table 4)。その他の検体は全てウインドウ期のものであり、ジェノタイプの差よりもウインドウ期であることの方が濃縮に

影響している可能性が考えられた。また、抗 HBV 抗体の存在が濃縮の可否に関与している可能性が確認された。ウインドウ期の検体に適用することを考慮すると PEI ビーズ濃縮法は HBV の濃縮にはあまり適していないと考えられる。

#### (8) ZnCl<sub>2</sub>と抗 HBV 抗体による HBV ジェノタイプパネルの濃縮

HBV は PEI ビーズ法で濃縮が難しいことから、他の濃縮法の開発を検討した。我々は、既に ZnCl<sub>2</sub>や MnCl<sub>2</sub>など 2 価イオンとスルホン酸磁気ビーズを組み合わせる方法が多くウイルス濃縮に適用可能であることを報告している (Iwata et al, *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1065, 2003)。これらの方法を準用して、HBV 標準パネル血漿に抗 HBV 抗体を添加後、ZnCl<sub>2</sub>を加え、抗体と結合した HBV を沈殿として回収する方法を試みた。その結果、抗体の有無にかかわらず、14 種類のパネル血漿の中で、12 種類の検体が ZnCl<sub>2</sub>と抗 HBV 抗体により効率よく回収された (Fig.15A)。濃縮倍率を求めると、ID007 と 017 以外は、5 倍から 20 倍に濃縮され、十分に効果があることが確認された (Fig.15B)。ID007 と 017 が沈殿として回収されなかった原因は明らかではないが、007 はウイルス量 10<sup>2</sup> 未満と極めて微量であること、また、017 もウイルス量は 10<sup>2</sup> オーダーと低く、ウイルスサブタイプが 007 は adr mutant、017 は adw mutant であることから、使用した抗 HBV 抗体の反応性が低かったことなどがその要因のひとつかもしれない。

これまでの検討により PEI ビーズで濃縮可能なウイルスを Table 5 にまとめた。

PEI ビーズ濃縮法はで小型の非エンベロープウイルスやヒト感染性ウイルスを含めて、極めて広範なウイルスを効率よく濃縮可能であることが明らかとなった。

#### D. 考察

17 年度は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目的として、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。PEI ビーズを用いたウイルス濃縮法の最適化については、分子量 70,000 の PEI を結合したビーズを用いて、pH6 付近で濃縮を行った場合が最も高いウイルス濃縮効率を得られることが判明した。PEI ビーズはカチオン性ポリマーで正に荷電し、細胞やウイルスは負に荷電しているために、液体中のウイルスは静電的な力により PEI ビーズに吸着されると考えられるが、分子量 70,000 の PEI が最も優れていたのは、分子量が大きいほど側鎖が増え、より静電的な力が大きいと思われる。分子量 70,000 より大きい分子量の PEI を用いてビーズを作製することでさらに濃縮効率が向上する可能性も考えられる。

PEI ビーズにウイルスと同時に濃縮される蛋白質としては、血清中の補体成分の C3、C4、IgM、セルロプラスミン等が同定された。このことから、PEI ビーズによるウイルスの濃縮時に IgM 抗体や補体を加えて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が考えられた。また、濃縮効率の低いウイルスの濃縮効率を改善できる可能性も示唆された。そこで、PEI ビーズ単独では濃縮できないポリオウイルスの濃縮時に抗ポリオウイルスモノクローナル抗体 (IgG) と抗マウス

IgG・ウサギ IgM 抗体の添加、あるいは抗ポリオウイルスモノクローナル抗体と補体 C1、C4 の添加を試みた。その結果、IgM 存在下や補体の酵素反応が起こる条件で濃縮を行うことによりポリオウイルスの回収率が顕著に向上することが明らかになったことから、同様の手法でウイルス免疫複合体を形成させることにより、PEI ビーズを用いて全てのウイルスが濃縮できる可能性が示唆された。

18年度は、17年度に最適化を行った PEI ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討を行った。

HAV の濃縮は pH や FCS に依存せず、10ml の大容量のウイルス液からでも高効率で濃縮可能であった。また、ヒト血液試料中のウイルス濃縮を検討したところ、ヒト正常血漿で HAV を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。

HBV の濃縮は 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。これは 17年度に報告したように、PEI ビーズが IgM 抗体を吸着する性質を持つため、IgM 抗体を介した免疫複合体形成によりウイルス濃縮効率が向上したものと考えられる。HBV をヒト正常血漿で希釈した場合、標準品と HBV 陽性血漿では PEI ビーズによる濃縮に差が認められ、標準品は濃縮できなかったが、HBV 陽性血漿は濃縮された。両者の違いのひとつに採血時期があり、標準品はウインドウ期から得た HBV で抗 HBV 抗体陰性であるが、HBV 陽性血漿は抗 HBV 抗体陽性であったことから、試料中の抗 HBV 抗体が濃縮に影響する可能性が示唆された。

HCV は PEI ビーズにより高効率の濃縮が認められ、大容量からもある程度の濃縮が可能であった。ヒト血液試料中のウイルス濃縮については HAV と同様、ヒト血漿中のウイルスは高効率での濃縮が可能であった。従って、HAV 及び HCV は、ヒト血漿試料を用いることにより PEI ビーズ濃縮で高感度に検出可能であることが示された。さらに、HCV の検出感度を検討したところ、PEI ビーズで濃縮することにより、血漿中の HCV 1IU/ml を確実に検出可能であった。

19年度は、PEI ビーズ濃縮法のドナースクリーニングへの応用を検討するため、HCV と HBV のパネル血漿に適用可能か検討した。HCV のジェノタイプパネルについて検討したところ、濃縮効率に差があるものの、ジェノタイプと由来の異なる 10 種類の HCV パネル血漿がいずれも PEI ビーズにより 1ml(10 倍量)からの濃縮で 5 倍以上に濃縮可能であることを確認した。理論値の 10 倍以上のウイルス濃縮効果が得られる場合は、ウイルス濃縮中に RNase のような阻害物質が試料から除去されるためではないかと推測される。

さらに、HCV のセロコンバージョンパネルについて検討したところ、濃縮を行わない場合に比べ、6 日早い検体で HCV 陽性が確認され、ウインドウ期の短縮化が可能であることが示唆された。この結果は、Roche 社の HCV monitor 法と同等の高感度検出が可能であることを示すものであり、また、Chiron 社の bDNA 法や PCR DNA quantitative results よりもウインドウ期の短縮効果が認められた。Roche 社法は、0.4~0.8ml の非検液から HBV ゲノムを抽出して試験を行っており、これと同等の感

度が得られていることから、より多量の非検液を濃縮することにより、さらに感度を上げられる可能性がある。本研究で用いた HCV 検出用の PCR プライマー、プローブや検出条件は最適化されたものではないことから、条件の最適化を行うことにより、HCV monitor 法より優れた検出が行える可能性も考えられる。

一方、HBV のジェノタイプパネルに PEI ビーズ濃縮法を用いたところ、HBV 抗体陽性のパネル血漿は濃縮されるが、抗体陰性のウインドウ期パネル血漿はほとんど濃縮されないことが明らかになった。抗体陽性の試料は感染後の時間が経過しているものであり、ウインドウ期の試料は抗体陰性であることから、ウインドウ期の HBV を高感度検出するためには、さらに濃縮条件の検討が必要であることが示された。

そこで、 $ZnCl_2$  や  $MnCl_2$  など 2 価イオンとスルホン酸磁気ビーズを組み合わせる方法が多くウイルス濃縮に適用可能であることを準用して、HBV 標準パネル血漿に抗 HBV 抗体を添加後、 $ZnCl_2$  を加え、抗体と結合した HBV を沈殿として回収する方法を試みた。この方法を HBV ジェノタイプパネルに適用したところ、14 種類のパネル血漿の中で 12 種類の検体で 5 倍以上の濃縮が認められ、本法が血液検体中の HBV の濃縮・高感度検出に有用な方法であることが示唆された。今後、本法を HBV のセロコンバージョンパネルに適用し、ウインドウ期の短縮が可能かどうか検討する予定である。

以上の結果より、PEI ビーズによるウイルス濃縮法は広範なウイルスを濃縮可能であり、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ヒト血漿試料中の HAV、HCV の濃縮・高感度検出にも有用な方法であること、一方、ヒト血漿試料中の HBV は抗 HBV 抗体と  $ZnCl_2$  を用いた濃縮法により濃縮・高感度検出が可能であることが示された。

## E. 結論

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。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開発・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ウイルスも濃縮可能であることを明らかにした。本法は、A 型肝炎ウイルス (HAV)、C 型肝炎ウイルス (HCV) も高効率で濃縮可能であり、血漿中の 1 IU/ml の HCV を確実に検出可能であった。HCV ジェノタイプパネルの 10 種類の異なる検体を全て濃縮可能であり、HCV 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、本法では B 型肝炎ウイルス (HBV) は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  $ZnCl_2$  による濃縮法を開発し、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 ウィンドウ期の高感度検出には抗 HBV 抗体と ZnCl<sub>2</sub> によるウイルス濃縮法が有用であることが示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 内田恵理子、川崎ナナ、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 5 回、*Pharm Tech Japan*, 22 (13), 91-99 (2006)
- 2) Eriko Uchida, Mieko Kogi, Tadashi Oshizawa, Koei Satoh, Akiko Iwata, Mitsuhiro Murata, Mikio Hikata, Teruhide Yamaguchi: Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses, *Journal of Virological Methods*, 143, 95-103 (2007)
- 3) Teruhide Yamaguchi, Eriko Uchida: Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products, *Current Cancer Drug Targets*, 7, 203-208 (2007)
- 4) Toshie Kanayasu-Toyoda, Takayoshi Suzuki, Tadashi Oshizawa, Eriko Uchida, Takao Hayakawa, Teruhide Yamaguchi: Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase C<sub>1</sub> in Neutrophilic Differentiation Cells, *Journal of Cellular Physiology*, 211, 189-196 (2007)
- 5) 内田 恵理子: 遺伝子治療薬開発の現状と品質・安全性確保における国際的動向、*Pharmstage*, 7(9), 1-5 (2007)
- 6) 山口照英、内田恵理子: 日米 EU 医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制における国際動向、*Drug Delivery System*, 22-6, 651-659 (2007)
- 7) 内田恵理子、石井 (渡部) 明子、山口照英: 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保, *臨床とウイルス*, 35(4), 278-290 (2007)
- 8) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 7 回、*Pharm Tech Japan*, 23 (2), 81-87 (2007)
- 9) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 9 回、*Pharm Tech Japan*, 23 (4), 101-109 (2007)
- 10) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 12 回、*Pharm Tech Japan*, 23 (8), 85-93 (2007)
- 11) 内田恵理子、川崎ナナ、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 15 回、*Pharm Tech Japan*, 23 (11), 93-100 (2007)
- 12) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 18 回、*Pharm Tech Japan*, 24(1), 101-105 (2008)

##### 2. 学会発表

- 1) 内田恵理子、小木美恵子、米須杏子、永田龍二、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：医薬品の

- ウイルス安全性確保のための高感度ウイルス検出法の開発ーポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒトウイルスへの適用ー；日本薬学会第 126 年会 2006 年 3 月
- 2) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を持つフィーダー細胞の解析について；第 5 回日本再生医療学会総会；2006 年 3 月
  - 3) 内田恵理子、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：パーフルオロオクタン酸 (PFOA) による新規ウイルス不活化法の開発；第 54 回日本ウイルス学会学術集会；2006 年 11 月 19 日、名古屋
  - 4) 内田恵理子、山口照英：バイオ医薬品／生物製品のウイルス安全性に関する国際動向；第 6 回日本医薬品等ウイルス安全性シンポジウム；2006 年 12 月 1 日、東京
  - 5) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：放射照射による Op9 細胞の造血支持能の誘導；第 6 回日本再生医療学会総会、2007 年 3 月 13 日、横浜
  - 6) 内田恵理子、小木美恵子、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：生物製品のウイルス安全性確保：生物製品のウイルス除去のためのポリエチレンイミン結合カラムの開発、日本薬学会第 127 年会、2007 年 3 月 28 日、富山
  - 7) 内田恵理子、小木美恵子、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、鈴木和博、山口照英：ポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いた C 型肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007 年 12 月 14 日、横浜
  - 8) 伊藤さつき、川崎ナナ、橋井則貴、原園 景、中島 紫、高倉大輔、内田恵理子、押澤 正、山口照英：ヒト ミエロペルオキシダーゼの部位特異的糖鎖構造解析、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007 年 12 月 12 日、横浜
  - 9) 押澤 正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英：カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球分化において増殖・分化に重要な働きをする、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007 年 12 月 12 日、横浜
  - 10) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：放射照射による Op9 細胞の造血支持能の増強に関与する分子の探索、第 7 回日本再生医療学会総会、2008 年 3 月 13 日、名古屋
  - 11) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を担うストローマ細胞膜タンパク質の探索、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 27 日、横浜
  - 12) 内田恵理子、小木美恵子、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、鈴木和博、山口照英：医薬品のウイルス安全性確保のためのヒト肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法の開発、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 27 日、横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



Table 1 ウイルス検出に用いたプライマー及びプローブ

ウイルス	プライマー、プローブ
HSV-1	F-Primer: 5'-GCGTCATGGTACTGGCAAG-3' R-Primer: 5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3' Probe: 5'- FAM-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG- TAMRA
Adenovirus	F-Primer: 5'-TCCGGTCCTTCTAACACACCTC-3' R-Primer: 5'-ACGGCAACTGGTTTAAATGGG-3' Probe: 5'- FAM-TGAGATACACCCGGTGGTCCCGC-3'
SV-40	F-Primer: 5'-GACATTCCTAGGCTCACCTCAC-3' R-Primer: 5'-ACCTTGCCAAACTGTCCCTTAAA-3' Probe: 5'- FAM-CTTGAAAGAAGAACCCAAAGA- TAMRA-3'
PPV	F-Primer: 5'-AACAACTACGCAGCAACTCCAATA-3' R-Primer: 5'-ACGGCTCCAAGGCTAAAGC-3' Probe: 5'- FAM-AGGAGGACCTGGATTT- MGB-3'
Poliovirus	F-Primer: 5'-CCCGAGAAATGGGACGACTA-3' R-Primer: 5'-TGGAGCTGTCCGTAGGTGTAA-3' Probe: 5'- FAM-ACATGGCAAACCTCATCAAATCCATCAATC-MGB-3'
HAV	F-Primer: 5'-GGTAGGCTACGGGTGAAAC-3' R-Primer: 5'-AACAACTCACCAATATCCGC-3' Probe: 5'- FAM-CTTAGGCTAATACTTCTATGAAGAGATGC- TAMRA-3'
HBV	F-Primer: 5'-GGACCCCTGCTCGTGTTACA-3' R-Primer: 5'-GAGAGAAGTCCACCMCGAGTCTAGA-3' Probe: 5'- FAM-TGTTGACAARAATCCTCACCATACRCAGA- TAMRA-3'
HCV	F-Primer: 5'-TGC GGA ACC GGT GAG TAC A-3' R-Primer: 5'-CTTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3' Probe: 5'-FAM-CACCCTATCAGGCAGTACCACAAGGCC-TAMRA-3'
HCV 2段階PCR検出	1段目 F-Primer: 5'-CTGTGAGGAACTACTGTCTT-3' R-Primer: 5'-AACACTACTCGGCTAGCAGT-3' 2段目 F-Primer: 5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3' R-Primer: 5'-GTTGATCCAAGAAAAGGACCC-3'

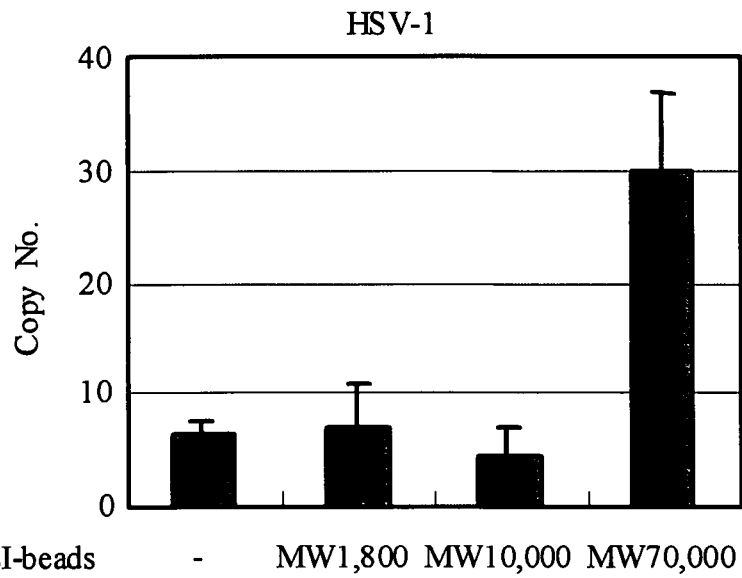


Fig.1 ポリエチレンイミンの分子量とウイルス濃縮効率

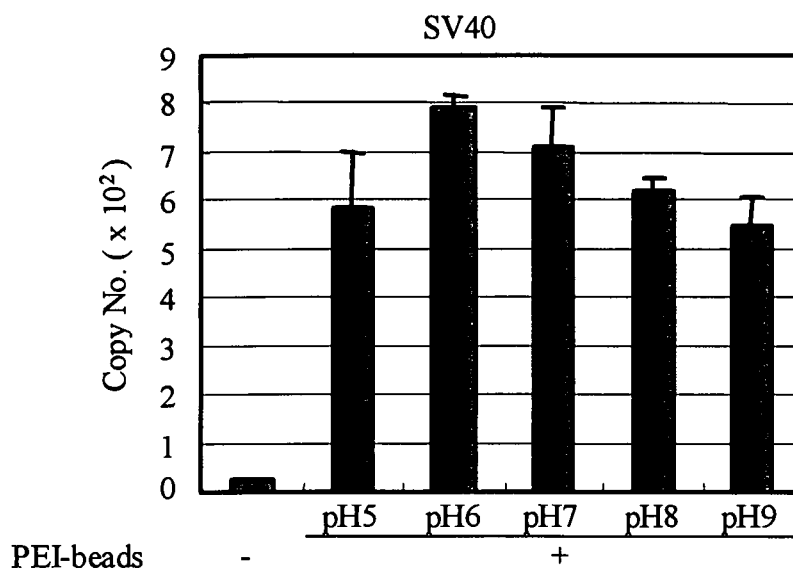
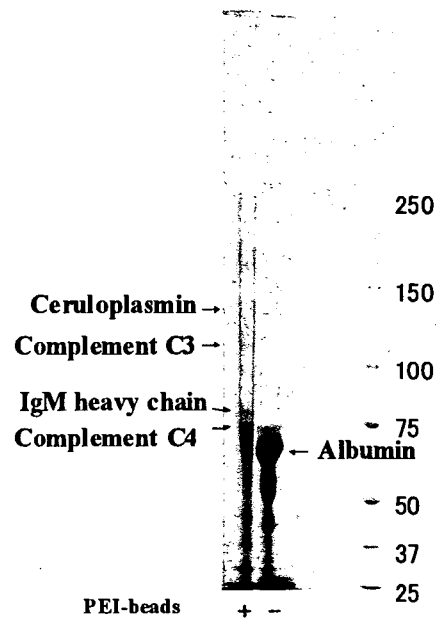
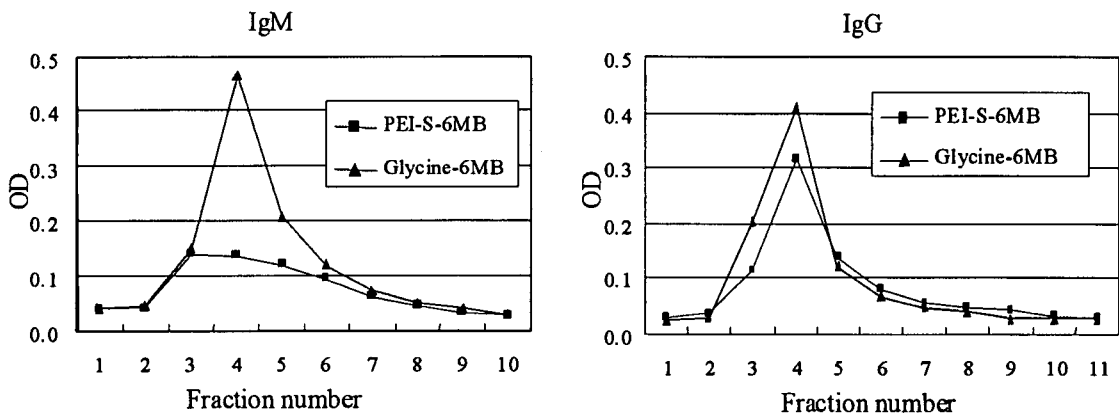


Fig.2 PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮効率のpHによる変化



**Fig.3** PEI磁気ビーズにウイルスと共に濃縮される血清成分中の蛋白質のMS/MSによる同定



**Fig.4** PEI-セファロースカラムへの抗体の吸着

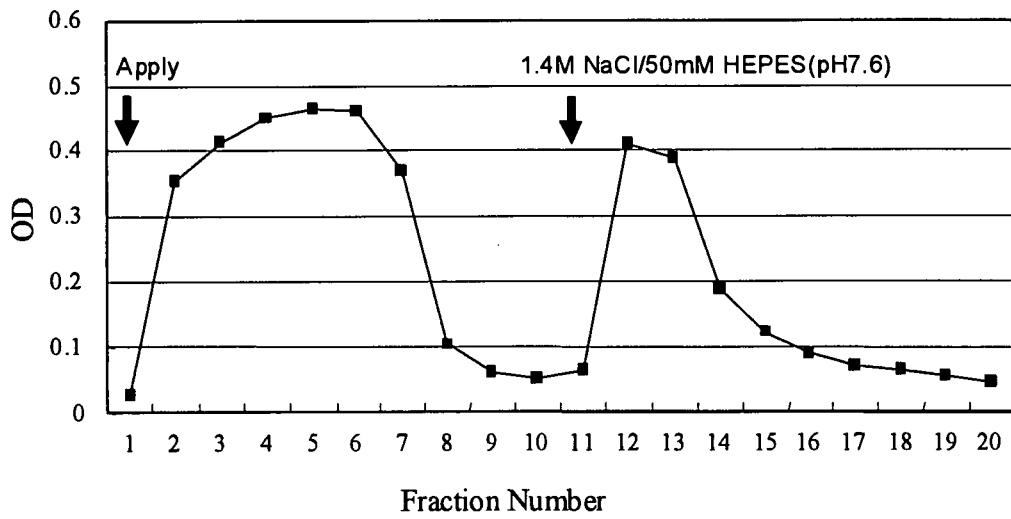


Fig.5 PEI-セファロースカラムによる抗マウスIgG-ウサギIgM抗体の精製

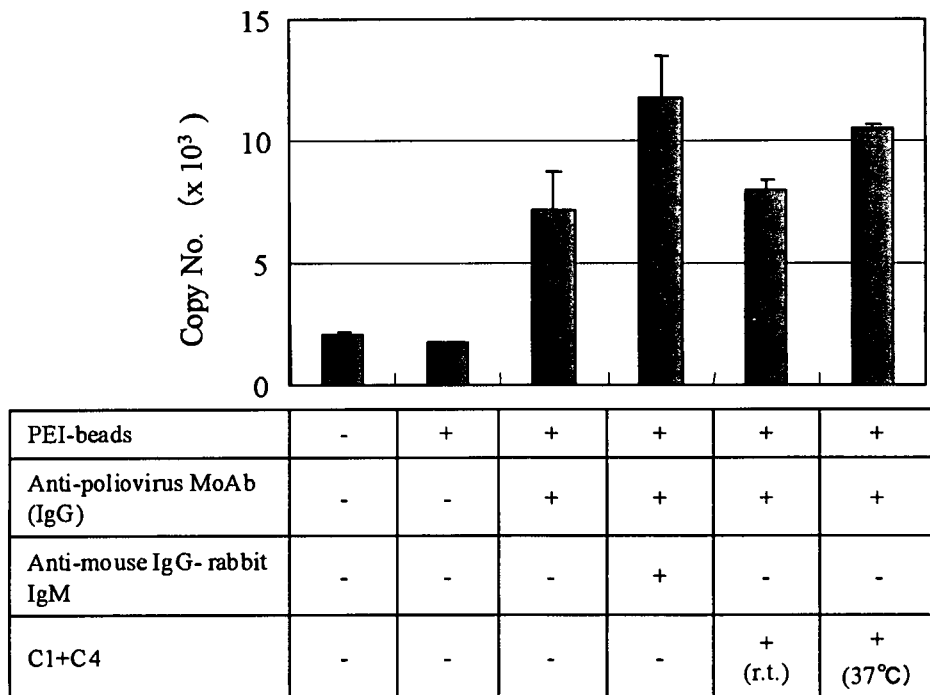
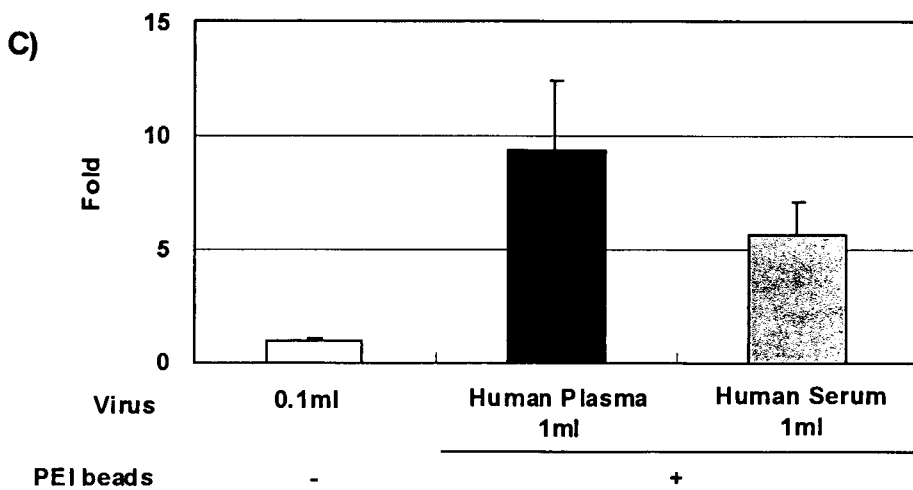
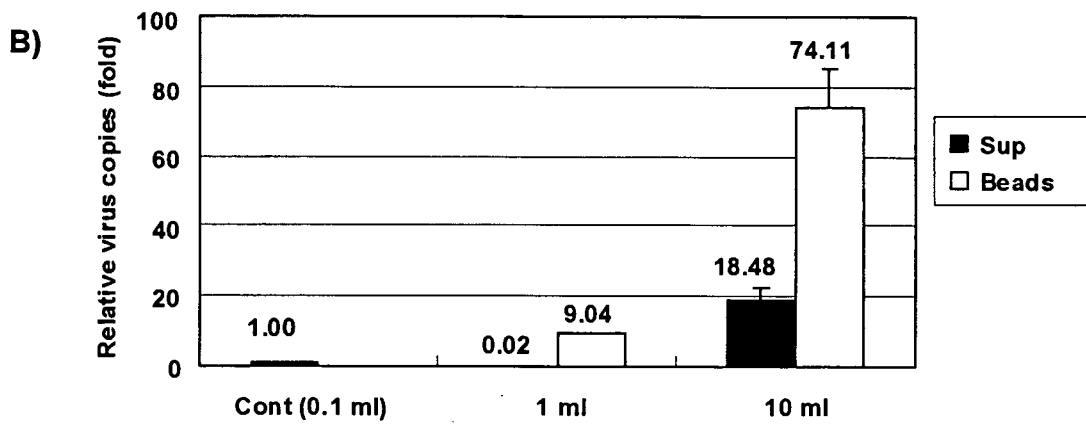
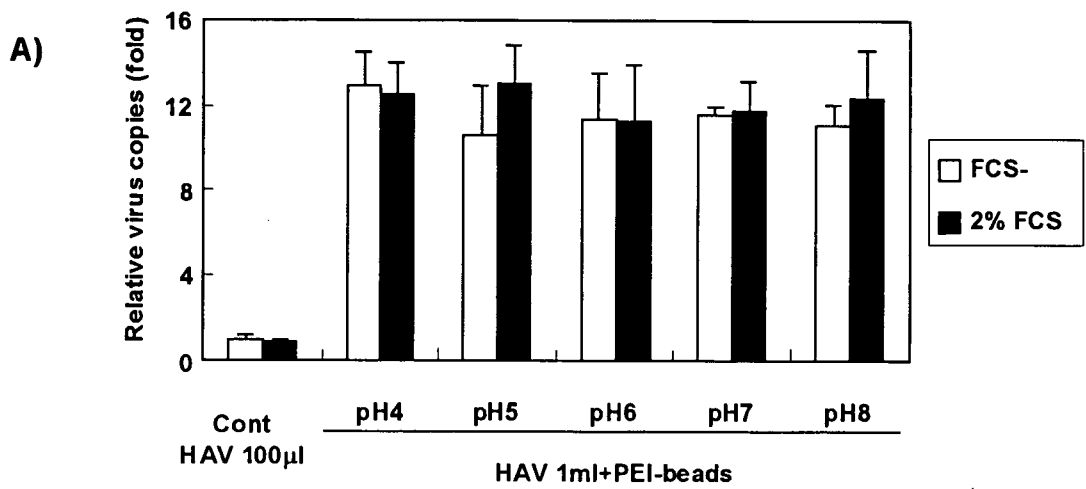
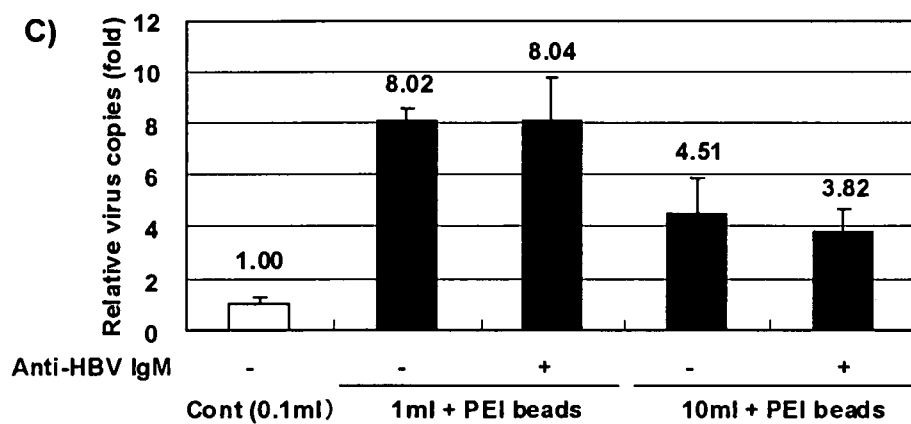
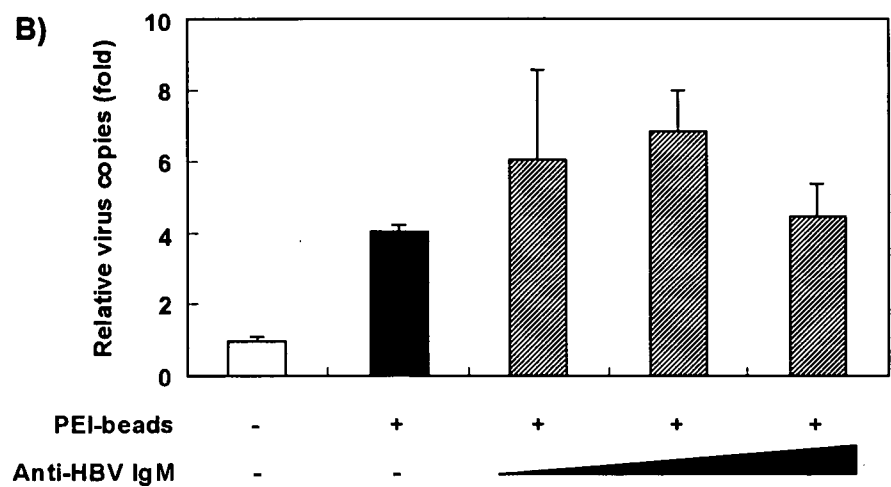
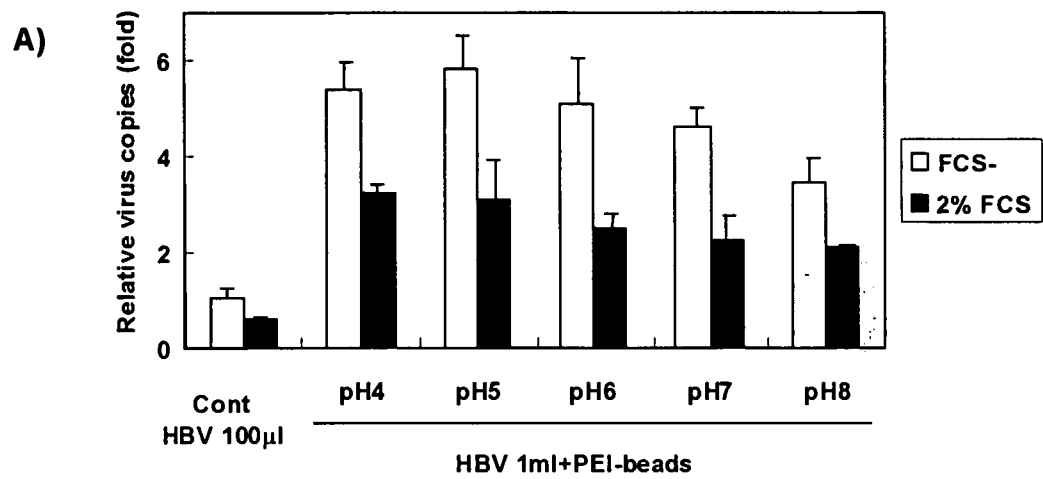


Fig.6 抗体、補体存在下でのPEI磁気ビーズによるポリオウイルスの濃縮



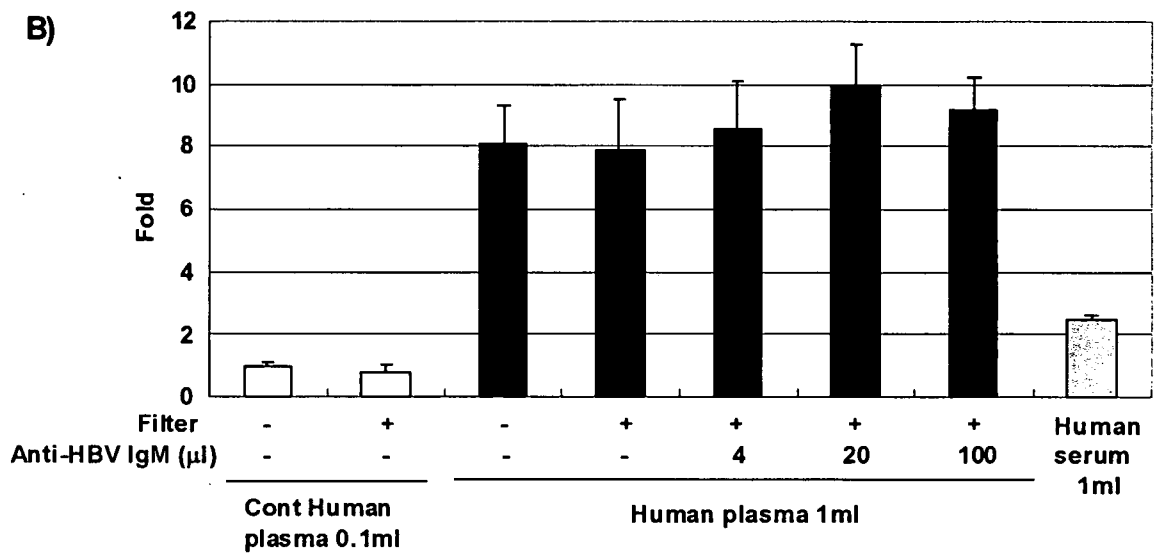
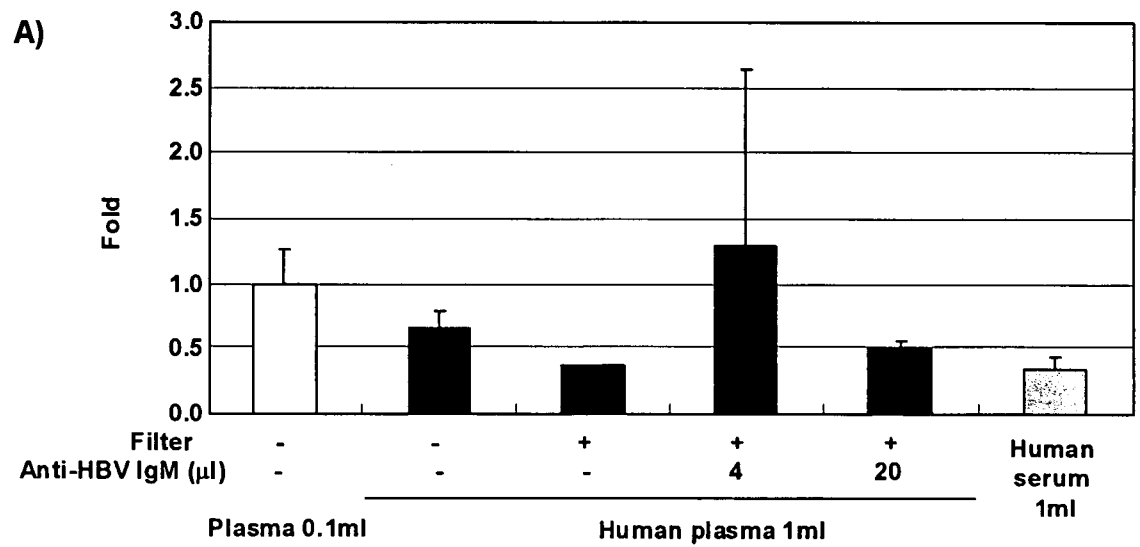
**Fig.7 PEIビーズによるHAVの濃縮**

**A) pH, FCSの影響; B) 大容量からの濃縮; C) ヒト正常血漿、血清の影響**



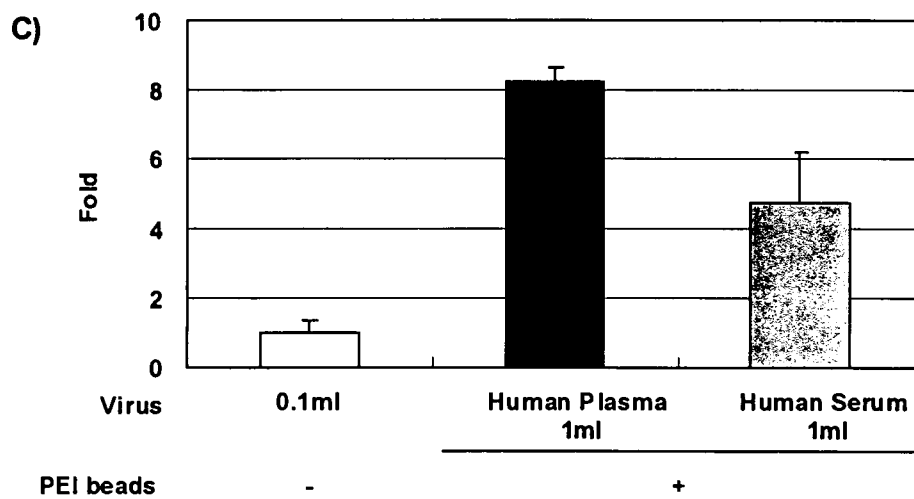
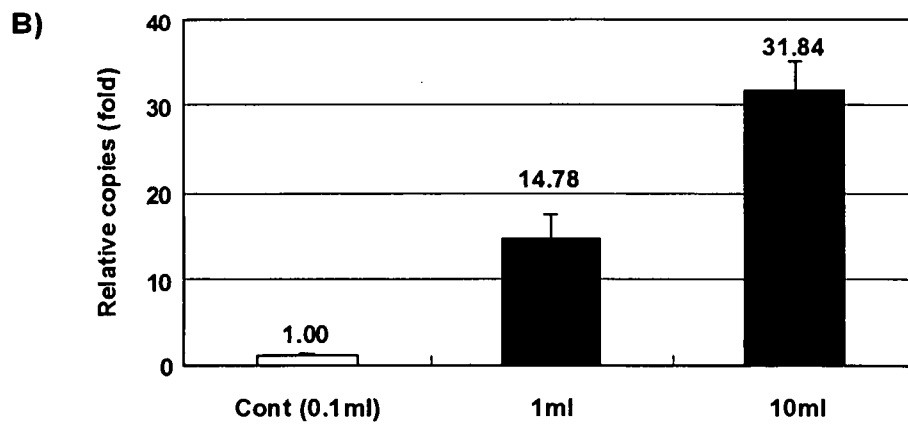
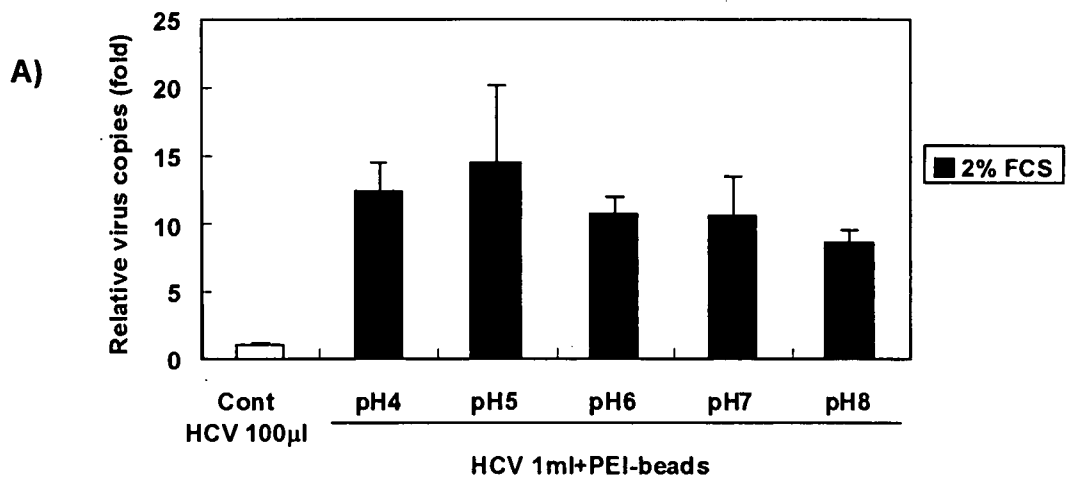
**Fig.8 PEIビーズによるHBVの濃縮**

**A) pH, FCSの影響; B) 抗HBV-IgM抗体の影響; C) 大容量からの濃縮**



**Fig.9 PEIビーズによるHBV濃縮に及ぼすヒト正常血漿、血清の影響**

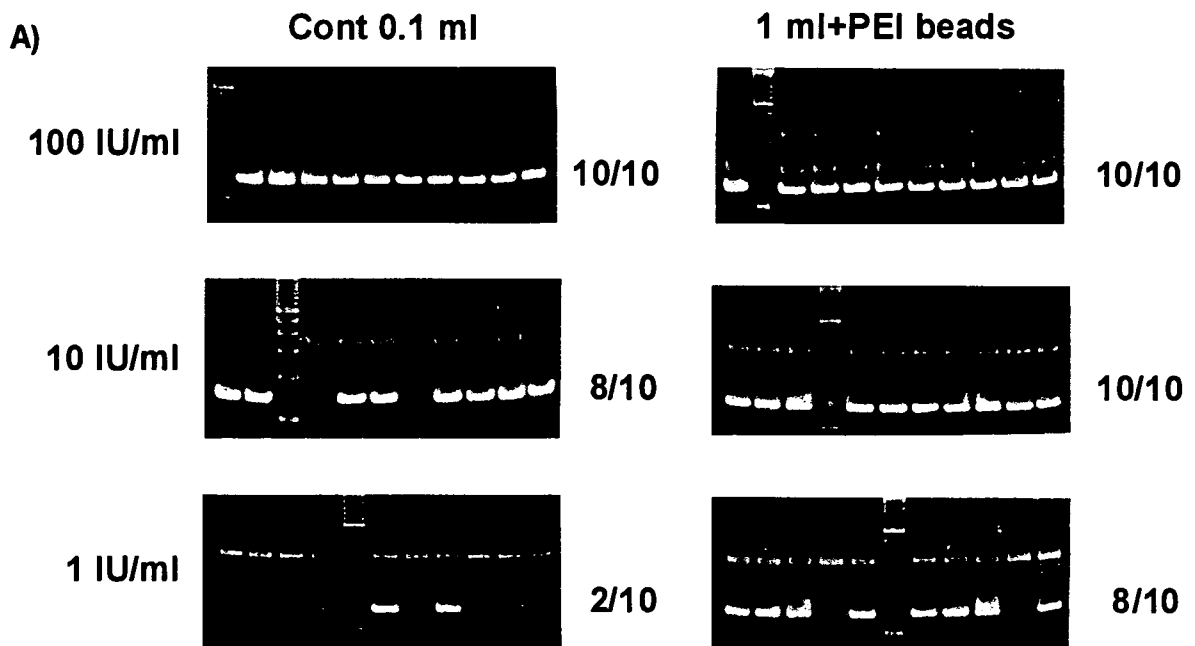
**A) HBV標準品; B) HBV陽性血漿**



**Fig.10 PEIビーズによるHCVの濃縮**

**A) pH, FCSの影響; B) 大容量からの濃縮; C) ヒト正常血漿、血清の影響**





B)

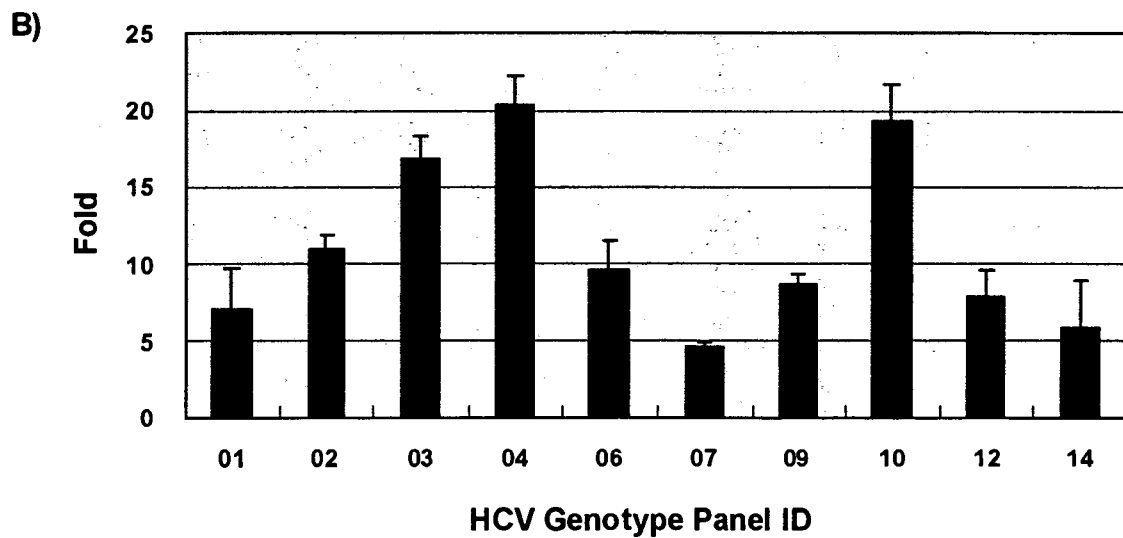
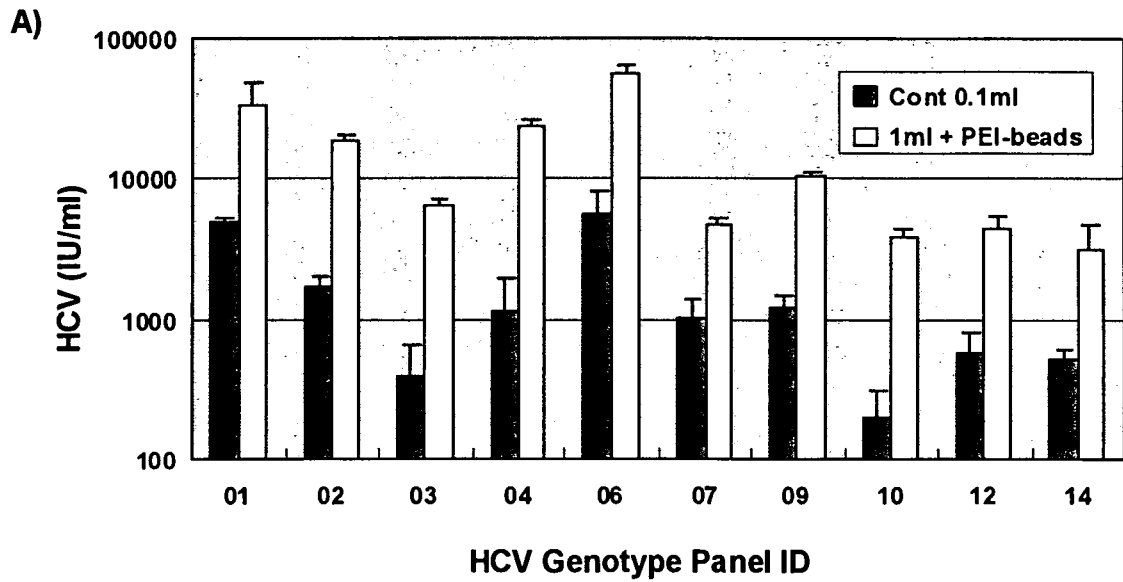
HCV conc. (IU/ml)	Control 0.1ml			1ml + PEI beads		
	#1 (Copies)	#2 (Copies)	Mean (Copies)	#1 (Copies)	#2 (Copies)	Mean (Copies)
100	$7.7 \times 10^1$	$8.6 \times 10^1$	$8.2 \times 10^1$	$5.5 \times 10^2$	$5.9 \times 10^2$	$5.7 \times 10^2$
10	$8.3 \times 10^0$	$2.3 \times 10^1$	$1.6 \times 10^1$	$8.5 \times 10^1$	$7.2 \times 10^1$	$7.9 \times 10^1$
1	-	-	-	-	$6.8 \times 10^0$	$3.4 \times 10^0$

Fig.11 PEIビーズによるHCVの濃縮とHCV検出感度

A) Nested PCR; B) 定量的RT-PCR  
 HCVはヒト正常血漿で希釈して使用。

**Table 2 Worldwide HCV Performance Panel (WWHV 302)**

Panel ID	Genotype		Origin	HCV RNA (copies/ml)	
	Bayer Trugene 5'NC	Innogenetics INNO-LiPA		Roche COBAS PCR	Bayer HCV RNA3.0
302-01	1b	1b	China	3.1 x 10 <sup>6</sup>	6.6 x 10 <sup>6</sup>
302-02	1	1a	Thailand	1.1 x 10 <sup>6</sup>	2.3 x 10 <sup>6</sup>
302-03	1b	1b	South Africa	4.0 x 10 <sup>5</sup>	3.7 x 10 <sup>5</sup>
302-04	2a	2a/2c	China	2.5 x 10 <sup>6</sup>	2.7 x 10 <sup>6</sup>
302-06	3b	3b	China	6.6 x 10 <sup>6</sup>	8.6 x 10 <sup>6</sup>
302-07	3a	3a	USA	8.2 x 10 <sup>5</sup>	4.7 x 10 <sup>5</sup>
302-09	4a	4	Egypt	1.0 x 10 <sup>6</sup>	8.7 x 10 <sup>5</sup>
302-10	4	4	Egypt	8.8 x 10 <sup>4</sup>	1.2x 10 <sup>5</sup>
302-12	5a	5a	Unknown	6.5 x 10 <sup>5</sup>	4.4 x 10 <sup>4</sup>
302-14	6a	6a	Unknown	1.6 x 10 <sup>6</sup>	7.1 x 10 <sup>5</sup>



**Fig. 12 PEIビーズによるHCV ジェノタイプパネルの濃縮**

A) HCVジェノタイプパネル0.1ml, 1mlから得られたウイルス量

B) HCVジェノタイプパネル 1mlのPEI磁気ビーズによる濃縮倍率

**Table 3 Anti-HCV Seroconversion Panel (Donor No. 62999)**

Panel ID	Bleed Date	CHIRON bDNA (Meq/ml)	ROCHE HCV MONITOR (copies/ml)	PCR RNA Quantitative Result Lab #3
6225-01	10/25/96	<0.2	<175	<100
6225-02	10/28/96	<0.2	<179	<100
6225-03	11/01/96	<0.2	<226	<100
6225-04	11/06/96	<0.2	<135	<100
6225-05	11/08/96	<0.2	<149	<100
6225-06	11/13/96	<0.2	<147	<100
6225-07	11/19/96	<0.2	<182	<100
6225-08	11/22/96	<0.2	<154	<100
6225-09	11/26/96	<0.2	<148	<100
6225-10	11/29/96	<0.2	<155	<100
6225-11	12/03/96	<0.2	670	<100
6225-12	12/09/96	27.02	390,000	3,000,000
6225-13	12/11/96	98.84	1,300,000	4,300,000
6225-14	12/16/96	77.79	1,300,000	2,900,000
6225-15	12/20/96	54.71	810,000	3,100,000
6225-16	12/24/96	>120	2,400,000	5,000,000
6225-17	01/06/97	9.373	510,000	4,200,000
6225-18	01/11/97	4.971	460,000	1,700,000
6225-19	01/13/97	3.242	230,000	1,600,000