

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

血液製剤の安全性確保のための技術開発と標準化
及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成21 (2009) 年 4月

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

血液製剤の安全性確保のための技術開発と標準化
及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成21 (2009) 年 4月

目 次

- I. 総合研究報告
 - 血液製剤の安全性確保のための技術開発と標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究 1
 - 山口 照英

- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 26

- III. 研究成果の刊行物・別刷

血液製剤の安全性確保のための技術開発と標準化及び
血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

研究代表者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

研究要旨

血液製剤のウイルス安全性確保のための基盤技術開発を目的とした研究を実施し、以下のような成果が得られた。

1) 各国の血漿分画製剤のウイルス安全性に関する動向調査を行い、製造工程のウイルスクリアランスの要件や非エンベロープウイルスへの対応など、将来の我が国のガイドライン改訂等に向けて有用な情報が得られた。

EU では血液製剤の病原体不活化の導入を積極的に進めている。例えば、ソラレン化合物 (S59/UV 照射処理)、リポフラビン/光増感処理による病原体不活化法がEU地域で販売するための安全マークを取得している。このことは必ずしも EU 域内での全ての製剤への適用に結びつくわけではないが、多くの国で治験が取りまとめられており、輸血用血液製剤のウイルスに関する不活化法として実績を積みつつある。

2) 2価イオンと SO 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法の開発と NAT の高感度化に関する検討を行い、これらの手法を組み合わせることにより、血液製剤の原料血漿の高感度スクリーニング法の開発の基盤となる技術を確認することができた。

3) 効率的なウイルス不活化法やウイルス除去法の開発を目指し、ウイルス不活化法の開発として、ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化を検討した。その結果、エンベロープウイルス (HSV-1、VSV、Sindbis) について最大で6-7オーダーのウイルスクリアランスという有効な効果が認められた。一方、Poliovirus やブタパルボウイルスなどのエンベロープウイルスに対しては不活化効果が認められなかった。PFOA の作用条件を検討したところ、酸性条件で最も強い不活化効果が認められた。しかし、酸性条件下では不安定な生物薬品もあることから、不活化工程として PFOA を用いる場合には、製品の特性に応じた条件を選択する必要があると思われる。

4) E 型肝炎ウイルスおよびパルボウイルス B19(PV-B19)の安全性確保を目的として、HEV 及び PV-B19 参照品作製に関する基盤研究を行った。HEV についてブタ由来4株、培養由来1株、及び陰性コントロールとしてサンプルの希釈に用いた血清の計6種を一組とすることとした。B19 のパネルは、Genotype 1、2 の2株について、それぞれ高タイター (10^{10} IU/mL)、低タイター (10^5 IU/mL) の2種及び陰性コントロールとして希釈に用いた血清の計5種を一組とすることとした。

HEV の参照品作製を目的としてブタ由来ウイルス陽性検体を用いることが可能と考えられた。さらに、HEV 検出の高感度化について PEI 磁気ビーズの有用性が示唆された。

研究協力者

内田恵理子	国立医薬品食品衛生研究所
永田龍二	国立医薬品食品衛生研究所
小木美恵子	金沢工業大学生命情報工学部
村田充弘	JSR 株式会社 筑波研究所
柚木幹弘	株式会社ベネシス 枚方研究所
生田和良	大阪大学 微生物病研究所
萩原 克郎	酪農学園大学獣医学部
安江 博	(独) 農業生物資源研究所

A. 研究目的

血液製剤の安全性は長年にわたる病原ウイルスの同定とその検出法の開発により着実に向上してきている。特に、1990年代後半より、血清学的検査や問診に加えて各国で原料血漿のウイルススクリーニングとして核酸増幅試験 (NAT) が実施される様になり、その安全性は飛躍的に増してきている。しかしながら、NAT のように現在最も感度が良いとされる検出法を用いても、非常にまれな頻度ではあるが、検査をすり抜けたウイルス陽性血液製剤により感染が起こることが報告されてきている。また、ウィンドウ期の HCV や HIV 陽性血漿では、現在最も高感度なウイルス検出手段とされる NAT を用いて個別検体の検査を行っても検出出来ないほど低濃度の混入でも、輸血による感染が成立することも報告されている。

また、Solvent/Detergent 処理やナノフィルトレーションなどいくつかの有効なウイルス不活化・除去法が、血液製剤の製造工程に導入され、その安全性は格段に増してきている。しかし、製品によってはこれらの処理が適さない場合等もあり、より有効なウイルス不活化・除去法が開発できれば、製剤毎の製造工程の選択の幅が広がり、より合理的な安全性確保対策が可能になると考えられる。また、輸血用血液製剤では、血漿分画製剤に適用されているようなウイルス不活化工程を採用することが困難であり、全く異なるア

プローチが必要とされ、これまで、複数のウイルス不活化法が開発されてきている。

HEV に関しては血清学的及び NAT による検出手法が確立しているが、その輸血による感染リスクについては、ここ数年いくつかの報告があるが、これまで十分なデータの蓄積が無かった。従って、HEV 検出試験法の標準化や検出手法の評価には、参照品やセロコンバージョンパネルの作成が望まれている。

本研究では、血液製剤の安全性確保を目的として、①血液製剤のウイルス安全性に関して、各国が求めているプロセスバリデーションに必要な要素や関連する事項について調査研究を実施した。また、輸血用血液製剤のウイルス不活化法の開発動向について文献を始め、様々な角度から検討を行った。②NAT によるウイルスの高感度検出系の開発を目的として 2 価イオンとスルホン酸磁気ビーズを組合わせた濃縮法の有用性を評価した。③新規ウイルス不活化法として、強い界面活性化剤としての作用をもつ PFOA の有用性について、モデルウイルスを用いた検討を行った。④HEV の参照品作成のための基盤研究として、SPF ブタに投与して得た複数の HEV 陽性試料の参照品作製のための基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1. 血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向調査

各国で公開されている血液製剤のウイルス安全性に関する動向について、ガイドラインや公表文献等を用いて調査研究を行った。また、FDA の血液製剤の責任者と直接議論して、得られた情報も含めた。

また、ウイルス不活化に関する文献情報をはじめ、各種公開情報を収集し、調査研究を行った。

2. ウイルスの2価イオン及びスルホン酸磁気ビーズを用いた濃縮法

スルホン酸(SO)磁気ビーズによるウイルスの濃縮実験では、まず種々の濃度の2価イオン($ZnCl_2$ 、 $CuCl_2$ 、 $MnCl_2$)を添加して、10分間、室温にて放置した。次に100 μ L(5mgの磁気ビーズを含む)のSO磁気ビーズ溶液を種々の濃度のウイルス液1mLないしは10mLに添加した。5分後に磁気ビーズを含む懸濁液を磁性スタンドにセットし、10分間静置した。10分後、上清を分取し、磁気ビーズを含む残液100 μ L及び磁気ビーズを添加する前のウイルス液100 μ Lの各液にウイルスゲノム抽出液(EX-R&D、ゲノムサイエンス社)を加え、添付プロトコールに従ってウイルスゲノムを抽出した(図1)。

3. ウイルスの感染価の測定

ウイルス感染価は、それぞれ指向性のある細胞を用いて行った。Herpes Simplex virus、Polio virus、Visicular Stomatitis virus、Sindbis virusはVero細胞を用いて、Porcine Parvo virusはESK細胞を用いて、SV-40 virusはCV-1細胞を用いて感染価を調べた。

4. ペンタデカフルオロオクタノ酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

(1)モデルウイルス：エンベロープのあるDNAウイルスである単純ヘルペスウイルスI型(HSV-1)、エンベロープのあるRNAウイルスであるシンドビスウイルス(Sindbis)及びウシ水疱性口内炎ウイルス(VSV)、エンベロープのないRNAウイルスであるポリオウイルス(Poliiovirus) sabin 1型を用いた。

(2)ウイルス感染試験：各ウイルスをPFOA(濃度の検討時以外は5mM)で処理した。タイムコースを検討する場合は、一定時間後に脱脂BSA 1.5%を含むPBSを添加して反

応を停止した。PFOA処理後、ウイルスは5倍希釈列を作成した。Vero細胞を96 well plateに 8×10^3 細胞/well播種して一晩培養後、ウイルス希釈液100 μ Lを添加して感染させ、2~3日間培養した。培養後、最終濃度0.01%のニュートラルレッドを加えてさらに2,3時間培養染色し、540nmの吸光度測定により細胞変性効果(CPE)を定量化して、TCID₅₀を算出した。

5. RT-PCR

HEVのプライマー/プローブ(表1)を用いる場合には、Qiagen Kitを使用し、反応温度:50 $^{\circ}C$ 30min, 95 $^{\circ}C$ 15minのあと95 $^{\circ}C$ 15sec, 60 $^{\circ}C$ 1minの通常のサイクル反応を行った。HEV-2のプライマー/プローブを用いる場合には、反応温度:50 $^{\circ}C$ 30min, 95 $^{\circ}C$ 15minのあと95 $^{\circ}C$ 15sec, 60 $^{\circ}C$ 1minの通常のサイクル反応を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた細胞はいずれも樹立された継代培養細胞であり、倫理面に関する問題はない。また、ヒト試料を用いた検討は研究倫理委員会の承認を受けた上で行った。また、ヒト正常血漿及びヒト正常血清は市販品を用いた。

C. 研究結果

1. 血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向

血漿分画製剤のウイルス安全性はその安全性の基本骨格であるが、各国では、原料血漿の高感度ウイルス検査を実施すると共に、製造工程で十分なウイルスクリアランスが得られていることを実証することが求められている。また、必要に応じて、原料の受け入れや、製造中間工程製品や最終製品でのウイルス試験が求められている。我が国においても、1999年に「血漿分画製剤のウイルス

に対する安全性確保に関するガイドラインについて」(医薬発第 1047 号)が出された。また、このガイドラインを補完するものとして、血液製剤のウイルス検出を目的とした核酸増幅試験 (NAT) のガイドラインが、平成 16 年 8 月に厚生労働省医薬食品局長通知 (薬食発第 0803002) として出された。しかし、血漿分画製剤のウイルス安全性に関連して、製造工程でどれほどのウイルスクリアランスが必要かについては十分なコンセンサスが得られていないのが現状である。そこで、WHO をはじめとして日米欧のガイドラインや公開情報に基づいて調査した。

その結果、表 2 に示すように、EU や WHO では、エンベロープウイルスに対してウイルスクリアランスに有用な、機序の異なる 2 つ以上の工程を製造にあたって採用するように求めている。また、WHO では、そのうちの少なくとも 1 つの工程はウイルス不活化工程であることが必要とされている。この場合の有用な工程とは、4 log 以上のクリアランスが得られる工程とされている。従って、EU や WHO では少なくとも 8 log 以上のクリアランス工程を採用することが求められていることになる。

これに対して、我が国では遡及調査等でウイルスの混入が疑われた場合の対処として、いわゆる 4 課長通知が出されている。ここでは、ミニプール NAT の試験が完全に実施されていて、非常に低濃度のウイルス混入では、原料血漿がすでに製造工程に投入されている場合に、回収不要とする要件として、ウイルスクリアランス値が 9 log 以上あることを求めている。EU や WHO より高いクリアランス値を求めていることになるが、工程の評価として不活化工程や高いクリアランス値を持つ工程を要求しているわけではない。この点については、今後のガイドラインの改訂において参考にすべき点と考えられる。また、EU や WHO は非エンベロープウイルスのク

リアランス能についても言及しているが、我が国ではその点の言及はない。また、工程評価に用いるウイルスについても EU では具体的な例示がなされている。我が国では、モデルウイルスの記載はあるものの、relevant ウイルスについての記載はない。この点についても明確化しておく必要があるかもしれない。

一方、表 3 に示すように、FDA では、やはりエンベロープウイルスに対して有効な 2 つ以上の工程を採用すること、少なくともその 1 つは非エンベロープウイルスに対して有効であることを求めている。特に、HIV、HBV および HCV のモデルウイルスに対して 10 log 以上のクリアランスを求めている。これは、原料に混入する可能性のあるウイルス量の 3-5 log 以上のクリアランスを求めたものであり、リスクマージンの取り方は日米欧や WHO で異なっているとは考えられない。つまり、これは検査のすり抜けなどによる混入量の推定が日米欧で異なっているために、求めているウイルスクリアランス値が異なってくると考えられる。また、FDA は非エンベロープウイルスのクリアランス能については 6 log を求めるとしている。

2. 輸血用血液製剤のウイルス不活化技術開発に関する国際的動向

血液製剤のウイルス安全性の確保を目的とした基盤技術開発に関して、次のような研究を実施した。

血液製剤のウイルス安全性に関しては、問題となるウイルスの同定と検出法の開発、検出法の高感度化・高精度化を重ね、著しい進歩が見られている。特に、NAT の導入により、検出感度は飛躍的に向上している。また、生物由来原料基準の制定や、血液製剤の安全性に関する指針の発出等を通じて、制度的整備も進んでいる。

しかし、HIV、HCV、HBV、HTLV をは

じめとした既知のウイルスであっても、NAT も含め検出の限界があり、ウインドウ期や低濃度キャリアの検出能に関しては依然として課題が残っている。また、全てのウイルスに対する試験を実施することは費用対効果の観点からも現実的ではない。さらには、近年いつアウトブレイクが起こるか懸念されている高病原性鳥インフルエンザウイルスや海外では既に常在化しているウエストナイルウイルスなど新興感染症の発症を考慮したとき、新たな対応を模索しておく必要がある。

ウイルス検出では、測定上の限界も存在することを考慮した場合に、求めるべきウイルス安全対策の一つの柱は、ウイルス不活化工程を如何に導入していくかであろうと考えられる。血漿分画製剤に関しては、製造に用いられる工程が如何にウイルスを除去、不活化出来るかというウイルスクリアランス能を評価する技術開発が1990年代から本格的に取り組みが行われ、指針にもその考え方が明確に述べられている。

一方、輸血用血液製剤に関しては、必ずしも十分な取り組みが行われてきたわけではない。新鮮凍結血漿を含め、赤血球製剤や血小板製剤では、血漿分画製剤のような効率的な精製工程や、製品の本質に影響しないようなウイルス不活化工程を導入することが非常に困難であったためと考えられる。しかし、古くからウイルスゲノムをターゲットとする不活化法などの開発が進められていた。そこで、現在の輸血用血液製剤の不活化工程に関する世界的動向について調査研究を行った。

2.1. 輸血用血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向

輸血用血液製剤に関しては、新鮮凍結血漿や血小板製剤、赤血球製剤に関して様々な技術開発が行われている。新鮮凍結血漿に関しては、solvent/detergent (S/D) 処理、

Methyleneblue/光増感処理、ソラレン化合物 S59/UV 照射処理、リポフラビン/光増感処理などが行われている。また、血小板製剤に関しては、ソラレン化合物 S59/UV 照射処理、リポフラビン/光増感処理などの不活化技術の開発が試みられている。赤血球製剤に関しては、リポフラビン/光増感処理や Dimethylmethylene blue/光増感処理などの開発が進められている。

Methyleneblue/光増感処理については既に EU の複数の国で承認され臨床にも使われている。これまで開発されてきている多くの方法が、ウイルスの核酸をターゲットとした反応であり、S/D 処理のようにエンベロープの有無には影響されないとされている。むしろ、ウイルスゲノムの長さが大きく影響するとされている。用いる試薬の除去や残存性などを含め、安全性に関する試験も実施されており、一般的な安全性試験では、特に問題となる結果は出ていないとされている。ただ、長期に渡る影響については、それほど長い期間でのデータが得られているわけではないために、今後の重要な検討課題であると思われる。

2.2. Methylene blue/光増感処理

Methylene blue は可視光照射により励起され、そのエネルギーを酸素分子に供与して一重項酸素を生成する Type II 反応と、基質にエネルギーが移動し、プロトンあるいは電子の移動を伴う Type I 反応により、ウイルスを不活化する。主としてウイルスの核酸が標的となり、ウイルス遺伝子に傷害を与えることで感染性を除去するとされている。

新鮮凍結血漿の不活化工程では、Methylene blue を終濃度 $1\mu\text{M}$ になるように添加し、十分に混和した後、白色蛍光灯光を照射し、再度急速凍結した後、保存する。この方法により、HIV ($>2.7 \log_{10}$), vesicular stomatitis virus (VSV) (>5.7

log10), herpes simplex virus (HSV) ($> 3.0 \log_{10}$), influenza virus ($> 5.5 \log_{10}$) の不活化率が得られると報告されている。また懸念される新鮮凍結血漿中の有効成分の活性に関しては、再度融解後の凝固因子活性は第 VIII、IX 因子等、ほぼ 80% 以上保持されていると言われている。

赤血球製剤に関しては、Methylene blue の代わりに、より疎水性の高い Dimethyl methylene blue を用いた不活化法の開発が行われている。Dimethyl methylene blue は、赤色光により活性化される光増感色素であり、DNA に対する親和性は Methylene blue の 10 倍であり、1 重項酸素は発生するための量子収光係数も Methylene blue に比較して大きい。すなわち、Dimethyl methylene blue は DNA への強い親和性と、1 重項酸素を産生させてウイルス核酸障害がその不活化の主たる機序と考えられている。

Dimethyl methylene blue による赤血球製剤の不活化は、ヘモグロビンの吸収波長と重ならない 600nm 以上の光が有効であるとされている。通常の赤血球製剤はヘマトクリットが 60% であるため、いくら長波長の光を照射するとしても、そのままの状態では色素まで光が到達しない。そのため、病原体不活化効果を得るためには、ヘマトクリットを 30% にまで低下させる必要があるとされている。その結果、種々の細胞内、細胞外ウイルスの不活化が可能となり、赤血球に及ぼす影響も、溶血率はコントロール群に比べ若干上昇するものの臨床上許容範囲内であり、形態スコア、カリウムイオン漏出、ATP および 2, 3-DPG レベルは、コントロール群とほぼ同程度であるとされている。また、色素濃度を高くし、光源をエネルギーの大きい赤色発光ダイオードにすることにより、ヘマトクリット 45% においてもウイルス不活化が可能になったとされている。しかし、光エネルギーが大きいと赤血球膜への酸化傷害

もより大きくなるため、カリウムイオンの漏出を防ぐことが出来ないとされ、課題も残されている。

2.3. リボフラビン

リボフラビンをを用いた光増感のウイルス不活化工程では、終濃度は $60 \mu\text{M}$ のリボフラビンを添加し、波長 265~370nm の紫外線を 6.2J mL で約 8 分間照射するとされている。ウイルスや細菌、細胞内の核酸にインターカレートし、光増感作用により核酸に傷害を与え、遺伝子の複製や転写を阻害することにより、ウイルスを不活化することが知られている。

リボフラビンは生体由来成分であり、栄養素の一つであることから、その毒性の懸念はほとんど無いと考えられている。また光照射により分解産物であるルミクロームが生成するが、新生児黄疸の治療に光線療法が用いられてきた経験からしても、ルミクロームの毒性もほとんど無いと考えられている。Ames テストによる遺伝毒性やマウスによる急性毒性試験においても、ルミクロームは何の毒性も示さなかったことから、リボフラビン光処理した製剤からは、薬剤を除く必要が無いと考えられている。

血小板製剤に添加したウイルス不活化能のデータとして、細胞内感染している HIV では $5.9 \log_{10}$ 、PPV では $5.0 \log_{10}$ 、ウエストナイルウイルスでは $5.2 \log_{10}$ 不活化されると報告されている。細菌についても、表皮ブドウ球菌で $> 4.2 \log_{10}$ 、大腸菌で $> 4.4 \log_{10}$ の不活化率が得られると報告されている。パフィーコート由来、アフレーション由来の如何に関わらず処理後 1 日保存、5 日間保存した後の血小板数、pH は減少し、乳酸値、グルコース消費量、形態スコア、P-セレクチン発現量 (活性化マーカー) が有意に上昇したと報告されている。

また、リボフラビン $30 \mu\text{M}$ を含む血漿に

30~60 分間、長波長紫外線を照射することにより、canine parvovirus を $>4.7 \log_{10}$ 、PPV を $>4.6 \log_{10}$ 、HAV を $2.5\sim 3.6 \log_{10}$ と、不活化が困難なノンエンベロープウイルスを不活化することができるという報告されている。

2.4. ソラレン化合物

ソラレンはある種の高等植物に含まれる化合物で、多くの天然誘導体が存在する。ソラレンは RNA あるいは DNA の高次構造の研究に用いられる核酸の架橋剤で、一本鎖及び二本鎖の核酸に可逆的に挟み込まれるように結合する。その状態で長波長紫外線 (320~400 nm) を照射するとソラレンは核酸に共有結合し、ソラレンで修飾されたウイルスあるいは細菌のゲノムは、もはや転写や複製ができなくなり、したがって増殖不能となる。

Cerus 社では、100 種類以上の新たに合成されたソラレン化合物の中から、溶解性が高く、かつ細胞侵入性を持ち、核酸親和性が高い最もウイルス不活化効果の高い化合物として S-59 を見いだして、そのウイルス不活化工程への適用について検討を行っている。S-59 は当初、血小板製剤に対する病原体不活化法として検討されてきた薬剤であるが、血漿への応用も進められている。

血漿に S-59 を添加し長波長紫外線を照射することにより、HIV を $>6.4 \log_{10}$ 、WNV を $>6.7 \log_{10}$ 、マラリア原虫を $>7.4 \log_{10}$ を不活化することができるという報告されている。患者を対象とした血漿交換における治療効果の評価を行う第 III 相臨床試験を含め、155 名の凝固異常患者に対する第 III 相臨床試験とともに、S-59 血漿の治療効果は通常血漿と同等であるという結果が得られているようである。

ソラレン類には発癌性、変異原性があることが分かっており、S-59 もそれらの毒性を

持つことが危惧されていた。これまで出されている報告では、S-59 存在化に長波長紫外線処理を行ったものと、処理をしていない製剤との比較が行われ、急性毒性、反復投与毒性、腎、心臓系への毒性、生殖毒性、遺伝毒性、発癌性、変異原性は認められなかったとされている。しかし、中枢神経系、心電図への影響や光毒性が見られたが、臨床使用の 30,000 倍もの過剰量で見られた現象であることから、毒性に関連する有害な作用は大きく無いと結論されている。

EU で、103 名の血小板減少性患者に対し (テスト群 52 名、対照群 51 名)、S-59 及び長波長紫外線照射処理血小板製剤と標準血小板製剤に有効性及安全性に差異があるかどうか、第 III 相臨床試験が行われた。長期的回帰分析の結果、投与 1 時間および 24 時間後の血小板数増加補正值に両群間で差はなかったが、輸血血小板数、輸血前の血小板保存期間、輸血前患者血小板数、患者体重において、統計的有意差が見られたと報告されている。全ての患者において、S-59 処理血小板に対する抗体産生はみられなかった。血小板輸血に関連する既知の副作用 (発熱、悪寒、発疹等) はみられたが、両群間で有意差は無かったとされている。これらのことから、S-59/長波長紫外線処理血小板はこれまでの血小板と同等であると結論づけられている。

3. 2 価イオンとスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮の検討

これまで、PEI 磁気ビーズがウイルス濃縮に有用であることを報告してきたが、ポリオウイルスなど一部のウイルスは PEI 磁気ビーズで濃縮ができなかった。そこで、2 価イオンとスルホン酸 (SO) 磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮法の検討を行った。図 1 に示すように、Zn イオンと SO ビーズを用いて 1ml あるいは 10ml からポリオウイルスや

PPV を濃縮可能であり、検出感度の大幅な向上が認められた。

また、この SO 磁気ビーズによるウイルス濃縮で、どの 2 価イオンが有用であるかについて検討を行った (図 2)。その結果、ウイルスによって有用な 2 価イオンが異なり、また有効濃度も異なっていた。今後はそれぞれ最適な 2 価イオンの条件を明らかにする。

4. ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

血液製剤のウイルス安全性確保の 1 つとして適切な不活化工程の導入があげられる。製造において適切なウイルスの不活化、除去工程を採用することが重要である。血漿分画製剤では、ウイルス不活化工程のひとつとして S/D (有機溶媒/界面活性剤) 処理がエンベロープウイルスの不活化に効果的な工程として用いられているが、より広範な医薬品に適用可能なウイルス不活法を開発できれば血液製剤の安全性上意義が高い。ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)は様々な基材の耐水性表面加工原料として用いられている界面活性剤で、そのポリマーは耐水性に優れ、界面活性作用が強い。PFOA は S/D 処理で用いられる界面活性剤に代わるウイルス不活化作用を持つ可能性があることから、PFOA のウイルス不活化作用を検討した。

まず、PFOA によるウイルス不活化の濃度依存性を検討した (図 3)。その結果、モデルウイルスのうち、HSV-1、Sindbis virus は 3mM 以上で、また VSV では 5mM でウイルスによる細胞変性の阻害が観察され、PFOA による不活化が認められた。一方、Poliovirus については PFOA による不活化効果は認められなかった。

次に、PFOA による不活化の time course を検討した (図 4)。その結果、HSV-1 は PFOA で 10sec 処理するだけで感染性が完全に消失したが、Sindbis virus や VSV では

PFOA 処理 1min 程度までは感染性の低下がほとんど認められず、処理時間を延長するに従い徐々に感染性が低下するが、完全な不活化には 10min 以上の処理が必要であった。

さらに、PFOA で処理する際の pH について検討した (図 5)。HSV-1 では pH4-8 で同様の強い不活化効果が認められ pH による影響は観察されなかった。一方、VSV の場合、pH4-6 で強い不活化が認められたが、pH7、8 では PFOA の効果は低く、弱酸性条件で不活化効果が高いことが判明した。

一方、血漿分画製剤と異なり、精製工程や分画工程によりウイルスの除去や不活化を行うことは、輸血用血液製剤においては困難が伴う。前述したようにいくつかのウイルス不活化工程が開発中であるが、必ずしも満足できるデータが得られているわけではない。今回検討した PFOA は、血球成分に対しては適用が困難かもしれないが、新鮮凍結血漿には適用可能かもしれない。なぜなら PFOA を除去する工程が必要となると考えられるが、その特性からカラム等での除去も可能と思われる。また、PFOA 関連物質の検討も有用かもしれない。

5. E 型肝炎ウイルス (HEV) NAT 参照品作製のための基盤研究と HEV 濃縮法の開発

HEV の安全性確保を目的として、HEV NAT 参照品を作成するための基盤研究を行った。SPF ブタに感染させた糞便より部分精製した HEV を DMEM 培地で希釈し、リアルタイム RT-PCR により検出したところ、HEV-1 のプライマープローブを用いることにより検出することが可能であった。次に、HEV の PEI 磁気ビーズによる濃縮が可能か検討した。図 6 に示すように、PEI 磁気ビーズを用いることにより 1ml のウイルス液か

ら効率よく HEV が濃縮可能であったが、10ml からではむしろ 1ml より濃縮効率が低下した。さらに、濃縮時の pH の影響についても検討を行ったところ、pH4.0 が最も濃縮効率が高く、pH6 が最も低いという結果になり、他のウイルスと挙動が大きく異なっていた。

HEV 参照品作製に関する基盤研究の一環として、サブタイプの異なる HEV に PEI 磁気ビーズが適用可能か検討を行った。その結果、4 種類の HEV サブタイプ (ジェノタイプ III 3 種類、ジェノタイプ IV 3 種類) は、いずれも PEI 磁気ビーズへ効率よく結合することを見出した (図 7)。

また、複数の細胞株を用いて HEV のインビトロ感染系の確立を目指した。その結果、HuH7 や A549 細胞への感染が認められた。また、PEI 磁気ビーズを用いて強制的に細胞内へ HEV を感染させる系の開発を行った。その結果、A549 細胞や HuH7 細胞で効率的な HEV の感染が認められた。

HEV およびパルボウイルス B19(PV-B19) の安全性確保を目的として、HEV 及び PV-B19 参照品作製に関する基盤研究を行った。HEV についてブタ由来 4 株、培養由来 1 株、及び陰性コントロールとしてサンプルの希釈に用いた血清の計 6 種を一組とすることとした。B19 のパネルは、Genotype 1、2 の 2 株について、それぞれ高タイター (10^{10} IU/mL)、低タイター (10^6 IU/mL) の 2 種及び陰性コントロールとして希釈に用いた血清の計 5 種を一組とすることとした。

以上のようなパネルを作製するために、SPFブタに複数のジェノタイプの HEV を感染させ、感染が成立した後、糞便を集め、さらにろ過等を行い、精製した検体を原料とすることとした。参照品を調製するための HEV ジェノタイプパネルとしての評価を行うために、得られた検体についてその感染価、

コピー数等の解析を行った。得られた検体は、十分なコピー数があることを明らかにし、ジェノタイプパネルとしての有用性を確認した。また、Parvovirus B19 パネルを作成するために、陽性血漿のウイルスコピー数等の解析を行った。

D. 考察

1. 血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向

輸血用血液の安全性を確保するためウイルス不活化が大きな注目を集めている。しかし、現時点で実用化されているのは血漿製剤に対する S/D 法及び MB/光照射法であり、血小板製剤に対しては S-59/長波長紫外線照射があげられる。しかし、赤血球製剤については臨床治験に入っているものもあるが、中止になったり未だ前臨床試験段階であったりと、実用化には今しばらく時間を要するのではと考えられる。特定の製剤のみ不活化が可能であるとしても、それは輸血用の血液製剤のウイルス安全性が担保されたとは言えないであろう。また、現行の方法に代わる技術開発や、現行法のさらなる向上も試みられている。

一方、これらの開発されている手法は、必ずしもウイルスの完全な不活化につながる手法ではないことも注意しなければならない。また、費用対効果についても十分検討を行う必要がある。さらに、一般の毒性試験については、ある程度の担保ができていようではあるが、長期に渡る安全性やヒトでの臨床経験が十分に蓄積しているわけではないことも改めて注視しておく必要がある。

血液製剤のウイルス安全性は長年の課題であり、不活化工程の開発動向に今後とも調査を続けていく必要がある。

2. 2価イオンとスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮の検討

これまで、PEI 磁気ビーズがウイルス濃縮に有用であることを報告してきたが、ポリオウイルスなど一部のウイルスは PEI 磁気ビーズで濃縮ができなかった。2価イオンと SO 磁気ビーズを用いてウイルスの濃縮が可能であることが示されたことより、これまで検討したモデルウイルスやヒトウイルスの濃縮が PEI 磁気ビーズと SO 磁気ビーズを適切に組み合わせることにより可能となり、ウイルスの高感度検出系の確立に向けてさらに検討を続ける予定である。

また、この SO 磁気ビーズによるウイルス濃縮では、ウイルスによって有用な 2 価イオンやその最適濃度が異なっていることが示されたことより、今後はそれぞれ最適な 2 価イオンの条件を明らかにしていく必要がある。また、用いる SO 磁気ビーズについても検討を加える必要がある。

3. ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

生物由来製品のウイルス不活化法の開発として、ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化を検討した。その結果、エンベロープウイルス (HSV-1、VSV、Sindbis) について最大で 6-7 オーダーのウイルスクリアランスという有効な効果が認められた。一方、非エンベロープウイルス (Poliovirus および PPV; データは示さず) に対しては不活化効果が認められなかった。これは PFOA が界面活性剤であり、ウイルスエンベロープを溶解することがその作用機序であることを考えると妥当である。PFOA の作用条件を検討したところ、酸性条件で最も強い不活化効果が認められた。しかし、酸性条件下では不安定な生物薬品もあることから、不活化工程として PFOA を用いる場合には、製品の特性に応じた条件を選択する必要があると思われる。

PFOA によるウイルス不活化のタイムコ

ースはウイルスにより大きく異なり、PFOA の感受性の高い HSV-1 では 10sec の処理で完全に失活したが、VSV や Sindbis virus では有効な不活化には 5min 以上の時間が必要であることが判明した。耐性の高いウイルスを不活化するには処理時間を十分に取る必要があることが示唆された。

ここでは示さなかったが、PFOA は HCV、HBV、HIV に対してもウイルスの不活化効果が認められるという予備的データを得ている。PFOA によるウイルス不活化は生物由来製品のウイルス不活化工程として有用である可能性が考えられる。

また、目的とする血漿分画製剤に対する影響を評価する目的で、複数のサイトカインの活性に及ぼす影響について検討を行い、今回のウイルス不活化に使用した濃度ではその生物活性に対して影響を与えないことを見出している。今後、他のウイルス不活化剤との併用を含め、最適な効果を得るための条件の検討を行う予定である。

4. HEV NAT 参照品作製のための基盤研究と HEV 濃縮法の開発

また、HEV 参照品作製に向けた検討を行い、SPF ブタに感染させた糞便より部分精製した HEV の有用性を明らかにすることができた。また、PEI 磁気ビーズの HEV の濃縮に適用出来る可能性が示された。

E 型肝炎ウイルスの安全性確保を目的として、NAT 等の検出のための HEV 参照品作製に関する基盤研究を行った。すなわち、ブタに HEV を感染させた検体を原料として、参照品を調製するための HEV ジェノタイプパネルについて、その感染価、コピー数等の解析を行い、ジェノタイプパネルとしての有用性を確認した。また、Parvovirus B19 パネルを作成するために、陽性血漿のウイルスコピー数等の解析から、参照パネルとしての有用性が明らかにできた。

E. 結論

①輸血用血液製剤のウイルス不活化法の開発動向について調査を行い、いくつかの製品の有用性が示されていると考えられた。しかし、不活化工程として期待されているウイルス安全性については依然として改良の余地があると思われ、今後の開発動向に注視する必要があると思われる。

②SO 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法の開発と NAT の高感度化に関する検討を行い、これらの手法を組み合わせることにより、血液製剤の原料血漿の高感度スクリーニング法の開発に基盤となる技術を確立することができた。

③効率的なウイルス不活化法やウイルス除去法の開発を目指し、PFOA を用いたウイルス不活化能についてモデルウイルスを用いて検討を行った。PFOA は試みたエンベロープウイルスに対しては効果的な不活可能を持つことが示された。さらに、不活化の最適条件を検討すると共に、PFOA 以外の関連化合物の効果についても今後検討する予定である。

④HEV の NAT 参照品作成を目的としてブタ由来ウイルス陽性検体を用いることが可能と考えられた。さらに、HEV 検出の高感度化について PEI 磁気ビーズの有用性が示唆された。

⑤HEV 及び PV-B19 の安全性確保を目的として、参照パネル作製に関する検討を行った。HEV についてブタ由来 4 株、培養由来 1 株、及び陰性コントロールとしてサンプルの希釈に用いた血清の計 6 種を一組とすることとした。B19 のパネルは、Genotype 1、2 の 2 株について、それぞれ高タイター (10^{10} IU/mL)、低タイター (10^5 IU/mL) の 2 種及び陰性コントロールとして希釈に用いた血清の計 5 種を一組とすることとした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe, K., Hyuga, S., Hyuga, M., Sekiguchi, A., Endo, M., Tsuda, T., Oikawa, T., Yamaguchi, T., and Hanawa, T., Unkeito, a traditional Kampo formula, exhibits a selective estrogen receptor modulator-like activity. - Prevention of osteoporosis in ovariectomized mice -J. Trad. Med., (in press)
2. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. Glycoscience Lab. Manual., Ed. Naoyuki Taniguchi, (in press)
3. Nana Mukai, Taichi Akahori, Motohiro Komaki, Toshie Kanayasu-Toyoda, Akiko, Ishii-Watabe, Akiko Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Mayumi Abe, Teruo Amagasa, Ikuo Morita: A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. Exp. Cell Res. (in press)
4. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: Relative quantification of N-glycans using an isotope tagging method, Immunology, 2008, (in press)
5. 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究(3) 過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品の品質評価. 医薬品研究, (印刷中)
6. 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究(4) 過

- 硫酸化コンドロイチン硫酸標準品の品質評価. 医薬品研究 (印刷中)
7. 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能解析」(Functional GLycomics) 研究成果公開発表シンポジウム「第3の生命鎖: 糖鎖の謎が今, 解る」(監修: 古川鋼一) (印刷中)
 8. 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英: 糖鎖と生物薬品. *Journal Applied Glycoscience*. (印刷中)
 9. 掛樋一晃, 木下充弘, 橋井則貴, 川崎ナナ, 寺尾敏光, 河合健蔵, 余田 光, 山口照英: ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究(第3報)キャピラリー電気泳動法によるヘパリンナトリウム不純物の分析. 医薬品研究 (印刷中)
 10. K. Satoh, A. Iwata-Takakura, A. Yoshikawa, Y. Gotanda, T. Tanaka, T. Yamaguchi & H. Mizoguchi, A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection, *Vox Sanguinis*, 95, 174-180, (2008)
 11. Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Matsuishi-Nakajima, Y., Kawanishi T. and Yamaguchi, T.: Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. B* 869: 20-30 (2008)
 12. Satsuki Itoh, Akiko Hachisuka, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Reiko Teshima, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Glycosylation Analysis of IgLON Family Proteins in Rat Brain by Liquid Chromatography and Multiple-Stage Mass Spectrometry, *Biochemistry*, 47, 10132-10154, (2008)
 13. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* 20, 97-116 (2008)
 14. Takuo Suzuki, Norimasa Tamehiro, Yoji Sato, Tetsu Kobayashi, Akiko Ishii-Watabe, Youichi Shinozaki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Teruhide Yamaguchi, and Toru Kawanishi: The novel compounds that activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression. *J. Pharmacol. Sci.* 107(3), 285-294 (2008)
 15. Mizuho Harashima, Kayo Harada, Yoshimasa Ito, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Teruhide Yamaguchi, Shingo Niimi. Annexin A3 Expression Increases in Hepatocytes and is Regulated by Hepatocyte Growth Factor in Rat Liver Regeneration, *J. Biochem.* 143, 537-545 (2008)
 16. Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T, Yamaguchi T. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem.* 144,399-408, (2008)
 17. 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於ける国際動向. *Drug Delivery System*, 22, 651-659

- (2008)
18. 山口照英, 石井明子: 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言
PHARMASTAGE, 7, 1-6 (2008)
 19. 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 小林 哲, 石川リカ, 高井俊紀, 古賀明子, 岡本寿美子, 山口秀人, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 窪田雅之, 掛樋一晃, 木下充弘, 島 圭介, 山田真希, 山口照英: 質量分析法を用いたペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試験法に関する研究. 医薬品研究 39(10), 627-646 (2008)
 20. 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 糖鎖異常の網羅的解析. 蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性. 53, 1690-1696 (2008)
 21. 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 薮島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 宮田一義, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 木下充弘, 掛樋一晃, 合田幸広, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究 (第1報) $^1\text{H-NMR}$ によるヘパリンナトリウム純度試験に関する研究. 医薬品研究, 39, 651-659 (2008)
 22. 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 福原 潔, 品川麻衣, 榛葉信久, 有村雅敏, 辰巳昌史, 奥田晴宏, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究 (第2報) $^1\text{H-NMR}$ によるヘパリンカルシウム純度試験に関する研究. 医薬品研究, 39, 660-664 (2008).
 23. 新見伸吾, 原島瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫, 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望(その1). 医薬品研究, 39(1), 1-37 (2008)
 24. 新見伸吾, 原島瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫, 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望(その2). 医薬品研究, 39(6), 359-387 (2008)
 25. Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, and Teruhide Yamaguchi: Glycopeptide analysis using LC/MS and LC/MS/MS, in The Protein Protocols Handbook (John Walker, ed.) Humana, Totowa, NJ. (2007)
 26. Uchida E, Kogi M, Oshizawa T, Furuta B, Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Yamaguchi T. 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. J Virol Methods. Jul;143(1):95-103. (2007)
 27. Kanayasu-Toyoda, T, Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi T: Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase $\text{C}\alpha$ in Neutrophilic Differentiation Cells, Journal of Cellular Physiology. 211, 189-196 (2007)
 28. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Yukari Matsuishi, Masashi Toyoda, Yoko Katagiri, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akihiro Umezawa, and Teruhide Yamaguchi: Study on the quality control of cell therapy product: Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. J. Chromatogr. A, , 1160, 263-269 (2007)
 29. Yamaguchi, T. Uchida, E. : Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products. CCDT Journal, 7, 203-208 (2007)
 30. Mizuguchi H., Funakoshi N., Hosono T., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Rapid construction of small interfering RNA-expressing

- adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs. *Hum. Gene Ther.*, 18, 74-80 (2007)
31. Koizumi N., Yamaguchi T., Kawabata K., Sakurai F., Sasaki T., Watanabe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production, *J. Immunol.*, 178, 1767-1773 (2007)
32. Ishii-Watabe, A., Kobayashi, T., Suzuki, T., Yamaguchi, T., Kawanishi, T.: Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture. *Biologicals*, 35, 247-257 (2007)
33. Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, and Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133 positive cells. *J Biol Chem.*, 282, 33507-33514 (2007)
34. Niimi, S., Harashima, Y., Yamaguchi, T.: Study of hepatocytes using RNA interference. *Journal of Organ Dysfunction*, 3, 164-182 (2007)
35. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. *実験医学増刊号*, 25, 1127-1136 (2007)
36. 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 山口照英: 細胞治療薬の品質・安全性評価における糖鎖解析の重要性と LC/MS の応用可能性. *News Letter 糖鎖フラッシュ号*, *Functional Glycomics*, 9, 35-41 (2007)
37. 山口照英: Gene Therapy Discussion Group の動向について. *医薬品研究*, 38, 50-59, (2007)
38. 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. *臨床ウイルス学会誌*, 35, 278-290 (2007)
39. 山口照英, 石井明子: 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験についてー TGN1412 事故が医薬品開発に与えたインパクト. 「谷本学校毒性質問箱」, サイエンティスト社, 東京, 10, 1-34, (2007)
40. 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於ける国際動向. *Drug Delivery System*, 22(6), 651-659 (2007)
41. 山口照英: ICH 遺伝子治療専門家会議ー2006 シカゴ会議報告ー. *医薬品研究*, 38, 277-285, (2007)
42. 山口照英: ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について. *Bio Clinica*, 27, 67-74 (2007)
43. 山口照英, 土屋利江: 細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価. *YAKUGAKUZASSHI*, 127, 839-840 (2007)
44. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 抗体の LC/MS. 「抗体医薬品の最前線」, 105-115, 植田充美監修, シーエムシー, 東京(2007)
45. 石井明子, 鈴木琢雄, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫: 植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保. バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保, 702-718, 早川堯夫監修, 株式会社エル・アイ・シー, 東京 (2007)
46. Minamisawa S, Uemura N, Sato Y, Yokoyama U, Yamaguchi T, Inoue K, Nakagome M, Bai Y, Hori H, Shimizu M, Mochizuki S, Ishikawa Y.: Post-transcriptional downregulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in

the atrial myocardium. FEBS Lett, 580, 2247-2252 (2006)

47. Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H.: Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. Gene Ther., 13, 1118-1126 (2006)
48. 山口照英: ICH 遺伝子治療専門家会議シカゴミーティングと今後の展望. ファルマシア, 42(4), 357-360 (2006)
49. 山口照英: 医薬品各条の改正点-生物薬品. 薬局, 57, 89-95 (2006)

2. 学会発表

1. 山口照英: 先端技術応用医薬品のウイルス等の安全性確保. 第47回日本臨床ウイルス学会、特別講演. (2007.6.3、東京)
2. Kanayasu-Toyoda T., Suzuki T., Oshizawa T., Uchida E., Hayakawa T., and Yamaguchi T: Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase C α in neutrophilic differentiation cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. (2006. 6. 21, Kyoto)
3. 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 山口照英, 早川堯夫, 川西 徹: LC/MS を用いた血清糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析. Pharmacotherapy シンポジウム (2006, 6,30 東京)
4. 日向昌司, 新見伸吾, 野間誠司, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫, 原島 瑞, 高山和子, 原 真由美, 関 泰一郎, 有賀豊彦: トロンボモジュリンはマウス乳癌細胞の浸潤能を亢進する. 第7回ファーマコヘマトロジーシンポジウム (2006, 6, 30 東京)
5. 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 川西 徹, 山口照英: LC/MS/MS を用いたヒト血清グライコプロテオームの解析. 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会 (2006, 7,18-19 東京)
6. 原島 瑞, 新見伸吾, 小柳仁美, 日向昌司, 関泰一郎, 有賀豊彦, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫: 初代培養ラット肝細胞において増殖抑制条件では Annexin A3 の発現が抑制される. 第13回肝細胞研究会 (2006, 7 旭川)
7. 伊藤由真, 渡邊武紀, 長友俊介, 関泰一郎, 新見伸吾, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫, 有賀豊彦: マウス胎児肝の形成過程における Annexin A3 の発現. 第13回肝細胞研究会 (2006, 7 旭川)
8. 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 中島 紫, 山口照英: 細胞治療/再生医療における糖鎖解析の重要性と糖鎖を利用した細胞特性解析への挑戦. 第4回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (2006,10,23-24 東京)
9. 内田恵理子, 山口照英: バイオ医薬品/生物薬品のウイルス安全性に関する国際動向. 第6回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム. (2006.12.1 東京)
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誘導; 第6回日本再生医療学会総会, (2007, 3,13-14 横浜)
11. 豊田淑江, 押澤正, 石井明子, 鈴木孝昌, 山口照英: Thrombopoietin(TPO) による AC133 陽性細胞より分化する血管内皮前駆細胞(EPC)の分化促進作用. 日本薬学会第127年会 (2007. 3. 28, 富山)
12. 山口照英: 先端技術応用医薬品のウイルス等の安全性確保. 第47回日本臨床ウイルス学会、特別講演 (2007.6.3.) 東京
13. 川崎ナナ, 高倉大輔, 中島 紫, 橋井則貴,

- 伊藤さつき, 原園 景, 山口照英: LC/MSn を用いた糖鎖抗原付加タンパク質の同定. 日本ヒトプロテオーム学会第 5 回大会 (2007, 7, 30-31) 東京
14. 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 山口照英: LC/MSn による目的部分糖鎖構造を持つ糖タンパク質の特異的同定. 第 27 回日本糖質学会年会 (2007, 8, 1-3) 福岡
15. 豊田淑江, 石井明子, 鈴木孝昌, 押澤正, 山口照英. トロンボポエチン(TPO)による, *in vitro* での血管内皮前駆細胞(EPC)の増幅作用. 第 28 回日本炎症・再生医学会 (2007.8.3.) 東京
16. 山口照英: バイオ医薬品の新しい潮流. 第 1 回医薬品評価フォーラム (2007.8.10.) 東京
17. 山口照英: 核酸増幅法(NAT)によるウイルス検出とそのバリデーション-HEV 検出への NAT 法開発にあたっての留意点-. 酪農学園大学ハイテクリサーチセンタープロジェクト公開シンポジウム (2007.9.3.) 江別
18. 豊田淑江, 石井明子, 鈴木孝昌, 押澤正, 山口照英. トロンボポエチン(TPO)による, *in vitro* での血管内皮前駆細胞(EPC)の増幅作用. 第 80 回日本生化学大会 (2007.12.) 横浜
19. 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 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム (2007.12.1.) 東京
20. 山口照英: 細胞の品質管理の立場から. 第 30 回日本造血細胞移植学会総会 (2008.2.29-3.1) 大阪
21. 豊田淑江, 石井明子, 山口照英: トロンボポエチン (TPO) の血管内皮前駆細胞 (EPC) 増幅作用における新しい役割. 第 7 回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14) 名古屋
22. 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 (2008.3.26-28) 横浜
23. Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Hiroaki Segawa, Birei Furuta, Eriko Uchida, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, and Mahito Nakanishi : CHARACTERIZATION OF NOVEL DEFECTIVE SENDAI VIRUS VECTORS CAPABLE OF PERSISTENT EXPRESSION OF THERAPEUTIC GENES. American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting (2008.5.31 Boston, USA)
24. Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Hiroaki Segawa, Birei Furuta, Eriko Uchida, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, and Mahito Nakanishi : CHARACTERIZATION OF NOVEL DEFECTIVE SENDAI VIRUS VECTORS CAPABLE OF PERSISTENT EXPRESSION OF THERAPEUTIC GENES. 第 14 回日本遺伝子治療学会総会 (2008.6.13 札幌)
25. Nishimura K, Ohtaka M, Segawa H, Furuta B, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Nakanishi M: Characterization of Novel Defective Sendai Virus Vectors Capable of Persistent Expression of Therapeutic Genes. ASGT 11th annual meeting, Boston (2008年5月)
26. Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Tetsu Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Minoru Tada, Toru Kawanishi and Teruhide Yamaguchi : Affinity of therapeutic monoclonal antibodies and

- fusion proteins to neonatal fc receptor (FcRn) 日本薬物動態学会 第 23 回年会 2008 年 10 月 熊本
27. T. Suzuki, M. Kogi, M. Honma, S. Tanabe, T. Yamaguchi SNP and CGH array analysis on amplification profile of the c-myc gene. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008 年 10 月)
28. 伊藤さつき、川崎ナナ、橋井則貴、篠原 聡、山口照英: ヒト間葉系幹細胞の Thy-1 の糖鎖構造解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会 合同大会 (2008.12.9-12) 神戸
29. 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 細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回大会合同大会 (BMB2008)、(2008 年 12 月 9-12 日、神戸)
30. 菊池 裕、中島 治、山崎 壮、手島玲子、棚元憲一、石黒直隆、山口照英: ウシ角膜細胞株 BCE C/D-1b が発現するスプライス変異型 GPI アンカー欠損プリオンタンパク質 mRNA の解析、2008 年プリオン研究会、(2008.8.29-30、北海道川上郡新得町)
31. 菊池 裕、遊佐精一、中島 治、手島玲子、山口照英: GPI アンカー欠損型プリオンタンパク質産生に關与する低酸素誘導因子の発現解析、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学大会合同大会、(2008, 12, 9-12) 神戸
32. 橋井則貴、川崎ナナ、篠原 聡、秦 艶、黄笑宇、伊藤さつき、山口照英: 糖鎖プロファイルを指標とした細胞治療薬の特性解析、第 8 回日本再生医療学会総会 (2009.3.5・東京)
33. 橋井則貴、川崎ナナ、篠原 聡、秦 艶、黄笑宇、伊藤さつき、山口照英: 糖鎖を指標とした細胞治療薬の特性解析、日本薬学会第 129 年会 (2009.3.京都)
34. 橋井則貴、川崎ナナ、中島 紫、伊藤さつき、山口照英: d5-フェニルヒドラジンを用いた同位体標識法及び液体クロマトグラフィー/質量分析による糖鎖の定量解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会 合同大会 (2008, 12, 9-12) 神戸
35. 原園 景、川崎ナナ、橋井則貴、山口照英: 低分子量ヘパリンの酸加水分解及び HPAEC-PAD を用いた確認試験及び純度試験法の検討、日本薬学会第 129 年会 (2009.3.京都)
36. 原島 瑞、新見伸吾、原田佳呼、日向昌司、関泰一郎、有賀豊彦、山口照英: ラット肝再生モデルにおいて HGF は肝細胞における AnnexinA3 の発現を促進させる。第 15 回肝細胞研究会。(2008.6.27・静岡)
37. 原島 瑞、新見伸吾、長岡陽子、斉藤千恵子、布留川みな子、関泰一郎、有賀豊彦、山口照英: 初代培養ラット肝細胞におけるグルコシルチコイド依存的チロシンアミノトランスフェラーゼおよびトリプトファンオキシゲナーゼ mRNA レベルの増加のプロテアソーム阻害剤による阻害。第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学大会合同大会 BMB2008。(2008 年 12 月 12 日・神戸)
38. 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膜タンパク質のプロテオーム解析、第 8 回日本再生医療学会総会 (2009.3.5・東京)
39. 山口照英、内田 恵理子: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保。第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 (2008 年 6 月)
40. 山口照英: Quality, Safety and Efficacy of Follow-on Biologics. 第 3 回 PMDA 国際バイオロジクスシンポジウム (PMDA 3rd International Symposium) (2009.2.12・東京)
41. 山口照英: バイオ医薬品の品質保証。東京大学セミナー (2008.5.19・東京)