

13. 血液・安全性研究部

部長 小室勝利

概要

本年度から、新しく血液・安全性研究部が組織された。新組織は、血液製剤関連の旧室名、血液製剤室、輸血病態室と旧安全性研究部の物理化学分析室、一般毒性室の4室より構成され各々第1室～第4室と名称を変えて運営されることとなった。

人事の上では、平成14年度末で第1室の奥山堅司主任研究官が定年退職された。

今までの研究、業務に対する努力と多大な貢献に敬意を表すとともに、今後のご活躍を祈っている。15年度からは、梅森清子が研究員として採用され、業務の引き継ぎを行っている。

各室の検定、検査業務も着実に行われた。

品質管理に関連する研究も順調に進行し、さらに新組織に要求される方向を考慮した、長期的視野にたった基礎的研究も進展を見せた。これら研究は、厚生労働省科学研究費、文部科学省科学研究費、HS財団、WHO等の援助を受けて行われた。

当部において行われた研究、行政関連の協力、国際協力、品質管理に関する業績を以下に紹介する。

部長として、概要を記すのも最後となるが、部員全員の今後の活躍、発展を期待している。

公に尽くすことを任とする皆様方に以下の文を捧げる。(鎌倉、建長寺、食事五観文、解説付)

- 一つには功の多少を計り、彼の来処を量る。
(この食物が食膳に運ばれるまでには、幾多の人々の労力と神仏の加護によることを思って感謝いたします)
- 二つには、己が徳行の全欠をはかって供に必ず。
(わたくし共の徳行の足らざるに、この食物を頂くことを過分に思います)
- 三つには、心を防ぎ、過食等を離るるを宗とす。
(この食物にむかって貪る心、厭う心を起こしません)
- 四つには、正に良薬を事とするは形枯を療ぜんが為なり。
(この食物は、転地の生命を宿す良薬と心得て頂き

ます)

- 五つには、道業を成せんが為に、將にこの食をうくべし。
(この食物は道業を成せんが為に頂くことを誓います)

研究業績

・生物学的製剤の品質管理に関する研究

1. 安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究

昨年度に引き続き、安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究の一環として、今年度は、異常毒性否定試験に関してはコブラ(タイ)、狂犬病・ジフテリア(インドネシア)そしてガス壊疽(ブルガリア)の4抗毒素について、発熱試験はコブラ(タイ)、クサリヘビ(インドネシア)、狂犬病・破傷風、ジフテリア(インドネシア)そしてガス壊疽(ブルガリア)の6抗毒素について実施した。その結果、一部の製剤に、我が国の生物学的製剤基準への適合性が疑われる製剤を確認した。

[後藤紀久、内藤誠之郎、加藤博史、前山順一、永田典代(感染病理部)、高橋元秀(細菌第二部)]

2. 核磁気共鳴(NMR)スペクトル法による、市販抗生物質医薬品(セファトリジンプロピレングリコール、硫酸ゲンタマイシン、塩酸バンコマイシン、アムホテリシンB)の確認試験

- (1) スペクトルの種類と測定方法

標準品(4種)と検体(全19検体)に、内標準物質(DSS、TMS)を含んだ測定溶媒(重水、重水-重塩酸、DMSO-d6)を加えて溶解し、力価濃度の等しい標準溶液、検体溶液を作成した。さらに標準溶液と検体溶液の等容量を混合し混合溶液とした。これらの溶液を用いて、¹H(400MHz)、¹³C(100MHz)の各1次元スペクトル測定を室

温(約 26)で実施し、それぞれ、標準スペクトル、検体スペクトル、等量混合物スペクトルとし、各スペクトルの比較から、製剤の同定確認を試みた。

(2)スペクトル測定の結果

(ア)セファトリジンプロピレングリコール[15mg(力価)/DCI-D2O/DSS、カプセル:2 検体(2社); 顆粒:5 検体(4社)]

¹H-スペクトル:カプセルは賦形剤等のピークがほとんど検出されず、標準品と同一のスペクトルを与えた。顆粒は3.2ppm~4.3ppmに賦形剤由来の大きな多重線が存在し、この領域にあるセファトリジンのピークは検出困難であった。等量混合物スペクトルでは、他の領域のピークは完全に一致した。なお、賦形剤のピークは類似しており、5 検体は類似の化合物が使用されていると推定できた。¹³C-スペクトル:標準スペクトルには23ピーク(予想21ピーク)が観測されたが、グリコールのラセミ混合物のためと推測した。検体スペクトルも、ほぼ同様のピーク数と化学シフト値が検出された。これらのピークにはいくつかの重複未分離ピークの存在が認められた。賦形剤のピーク領域では、完全な分離ピークが得られた。等量混合スペクトルでは23ピークは完全に一致した。3 検体で、172ppmにトリアゾール炭素と推測される小ピークが検出されたが、標準品と他の4 検体では全く検出されなかった。¹H-スペクトルの標準、検体、等量混合物の各スペクトルで8.5ppm付近にトリアゾールプロトンの存在が標準品と全検体で確認できた結果、同定確認に至ることができた。同定確認に、¹H-スペクトルと¹³C-スペクトルの測定が共に必要なケースであった。

(イ)硫酸ゲンタマイシン [20mg(力価)/D2O/DSS、注射液:5 検体(3社)]

¹H-スペクトル: 多量の軽水が検体溶液に含まれているため、presaturationの測定条件でスペクトルを観測した。4.5ppm~6ppm以外の領域のピークは高分解でスペクトルが得られた。硫酸ゲンタマイシンは、非常に化学構造の類似した4つの類縁体(C1,C1a,C2,C2a)の混合物から成っており、その組成比は常に一定ではない。このため、多重線の重なり、積分比、ピーク形状の変動が予想され、¹H-スペクトルによる同定確認は困難であった。5.9ppm付近の多重ピークから4つの類縁体のモル組成比が得られた。5 検体全てに、添加剤のベンジルアルコールのピークが4.6ppm(一重線)と7.4ppm(多重線)に観測された。特に、1 検体(10mg力価/ml)で、ゲンタマイシンとの相対含有量が大きかった。¹³C-スペクトル: 標準品スペクトルから全部で42ピーク(重複未分離ピークを含む)が観測され、検体スペクトル、等量混合物スペクトルにも、これらすべてに対応するピークが観測された。等量混合物スペクトルでは、これらのピークは、強度は異なるが、すべて化学シフトが一致し、同定確認された

(ウ)塩酸バンコマイシン [55mg(力価)/DMSO-d6/TMS、注射用:3検体(3社)]

¹H-スペクトル:標準スペクトル、検体スペクトル、等量混合物スペクトルに広幅なピークが1ppm~10ppmに均等に分布し、H-Hカップリング等のパターンが酷似したスペクトルが得られたが、この測定条件では分解能を改善することは

困難であった。分解能が低いスペクトル間の比較は確実性が乏しく、同定確認には不適であった。2 検体において、標準品に検出された5.5ppm付近のピークが検出されないという明らかな相違が見られ、標準品と検体の同一性に否定的な結果が得られた。¹³C-スペクトル:157ppm付近のピーク(ピーク強度から0.5~1モル相当量;¹H-スペクトルでの5.5ppmのピークと関係すると推測された。)が標準品と標準品を提供している同一製造社の1 検体に検出された。このピーク以外の62ピークは、3 検体とも、すべて標準スペクトルのピークと一致した。標準品の純度(1000 µg力価/mg以上)から、157ppmのピークが不純物由来と考え難かったが、別の標準品を用いて標準スペクトルを測定した結果、157ppmのピークは全く検出されなかった。このことから、157ppmのピークは不純物由来と結論した。3 検体は標準品と62ピーク全てが一致し、同定確認が完了した。検体スペクトルには63ピーク以外には不純物らしきピークは検出されなかった。また常用標準品が、必ずしもNMR確認試験の標準品に適さないことが示された。

(エ)アムホテリシン B [エタノール沈殿処理、30mg(力価)/DMSO-d6/TMS、錠:2 検体(2社); シロップ:2 検体(2社)]

¹H-スペクトル:標準スペクトル、検体スペクトル、等量混合物スペクトルのいずれもピークが非常に広幅なスペクトルが得られ、同定確認に至らなかった。¹³C-スペクトル:標準スペクトルでは、全部で40ピークが観測された(予想ピーク数47)。同じ構成単位の繰り返しが多い分子構造上、重複未分離ピークが多数観測された。測定条件上、ピークの定量はできなかったが、125ppm~140ppmの領域にオレフィン炭素が4ピーク分、60ppm~100ppmの領域に2級アルコール炭素が2ピーク分、未分離重複ピークとして存在すると推定された。検体スペクトルには数個の重複ピークが認められたが、標準スペクトルと同一の40ピークが検出された。等量混合物スペクトルでは、ピークは全て一致したことから、同定確認した。

[矢野茂生]

3. WHO国際標準品作成プログラムへの参加

WHO HBsAg Reference Panel および WHO International Standard for anti-Parvovirus B19 の作成プログラムに参加し、日本国内で用いられている検査キットを用いて両者候補品について測定を行い、その結果をNIBSCに報告した。Anti-Parvo B19については国際標準品として既に認められ、HBsAg Reference Panel については今秋開催されるWHOの国際会議で認められる予定になっている。

[水落利明]

血液製剤に関する研究

1. プリオンに関する研究

(1)ヒト血液成分における正常プリオンタンパクの分布に関

する研究

BSEが輸血によって感染することを示唆する動物実験が報告されている。病原性プリオンタンパクの伝播に正常プリオンタンパク(PrP^C)を発現している血球がかかわっているかどうかは不明である。本研究ではヒトの血液の各成分におけるPrP^Cの分布をウエウタンプロット法及びフローサイトメトリーで分析し、以下のことを明らかにした。CD3⁺ T cell, CD19⁺ B cellにおいてPrP^Cは同程度に発現していることを確認した。血液中のPrP^Cは主に血小板画分に分布していた。血漿中のPrP^Cは検出できなかった。Megakaryocyte的な性質を有する白血球由来細胞株5株のうち4株がPrP^Cを発現していた。

[水沢左衛子、岡田義昭 血液・安全性研究部(厚生労働科学研究費補助金、肝炎等克服緊急対策研究事業)]

(2) 血液を介するプリオン感染機構の解析とプリオン除去の研究

体内に侵入したPrP^{Sc}が中枢神経に達する機構として、FDCに注目した。FDCは感染早期にプリオンが検出できることが知られているので、FDCが産生するケモカインであるBLCに対する遊走性を脾細胞や腹腔内に存在するPEC(peritoneal exudative cells)を用いて解析し、PECに高い遊走性が認められた。同様に、SDFに対しても遊走性が確認出来た。PECを介してFDCや神経系にプリオンタンパクが運ばれる可能性が示唆された。また、ウイルス除去工程として実際の製造で導入されているポリエチレングリコール処理がウイルスだけでなく正常プリオンを濃縮することを確認した。これらを来年度に予定されている感染実験で確認したい。

[岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小室勝利]

2. ウイルスに関する研究

(1) 血液からのウエストナイルウイルス検出法の開発

米国においてウエストナイルウイルスが流行し、我国への侵入が心配されている。また、我国で市販されている血漿分画製剤の内、献血以外の製剤の血漿は主に米国において採血されているので輸血を含めた血液製剤の安全性確保のためにウエストナイルウイルスの検出法を検討した。ウエストナイルウイルスは幾つかの genotype が存在し、我国においては日本脳炎ウイルスとの遺伝子上での類似性があることから、日本脳炎ウイルスとクロスしないで、他のウエストナイルウイルスを全て検出する系を目指した。今のところ、米国から分離されるウイルス株を検出しうる系が確立出来た。

[岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小室勝利、高崎智彦(ウイルス一部) 倉根一郎(ウイルス一部)]

(2) 血漿分画製剤からのパルボウイルス B19-DNA 検出

血液の安全性確保のために、ウイルスの核酸増幅法が日本と欧米で導入されている。これまで HBV、HCV、HIV、の3つのウイルスが主な対象だったが、検査体制が整備された(HBVは国によって実施していないが)ことによって次の対象としてB19の規制が検討されている。国内外の製造所では既に自主的に原料血漿におけるスクリーニングを導入しているところもあるが、最終製剤でのB19-DNA陽性率を検討した。市販されている免疫グロブリン製剤やフィブリノーゲン製剤からは検出感度以下であった。スクリーニングを導入する前と考えられる製品からは検出されたことからスクリーニングの導入は安全性確保の上から有用である。

[岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小室勝利]

(3) ヒトパルボウイルス B19 の *in vitro* 感染系の確立

昨年分離した KU812 細胞株のクローンを用いて、パルボウイルス B19 の加熱による不活化効率を評価した。これまで、B19 の適当な感染系がなかったためにモデルウイルスを使ったヴァリデーションが実施されていたが、我々の細胞株でB19での評価が可能になった。60の液状加熱によって10の4乗以上感染価は減少した。一方、PBS、アルブミンに各々添加したB19ウイルス液を乾燥後、60-24時間加熱したところ、PBSでは液状加熱と同等の不活化が認められたが、アルブミン存在下では減少が認められなかった。[岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小

室勝利]

(4) マウスレトロウイルスをモデルとした異性間感染の解析

異性間感染の機序をケモカインの面から解析するために、マウスレトロウイルスをモデルに用いて行った。昨年度はMIP-1alpha に対して感染細胞のケモタキシスが認められたので、今年度は感染マウスから脾細胞を分離しMIP-1alpha、MIP-2に対して遊走する細胞からのウイルス産生を検討した。共に脾細胞の遊走が亢進していたが、MIP-2に遊走した細胞からはウイルスを産生する細胞は認められなかった。一方、MIP-1に遊走した細胞からは高頻度に産生細胞が認められた。正常な周期に一致して生体から産生されるMIP-1を利用して効率良く他の宿主に感染することが示された。

[岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小室勝利]

・ ワクチン添加剤に関する研究

1. 粘膜ワクチン用アジュバントとしての組換えコレラ毒素Bサブユニット(rCTB)に関する研究

(1) 肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン(PW)への試み

CDAPを使用した活性化多糖体とスパーサー導入 rCTBを混合し、4で作用させて架橋した材料をBALB/cマウスに4回経鼻投与し、その後、血液、糞便、鼻腔、肺、小腸、

大腸、膣の各洗浄液及び唾液を採取し、抗体価を調べた。血清中の抗PW IgM抗体価は初回免疫で最高値に達し、抗IgG及び抗IgA抗体価はIgM抗体より低かった。また、粘膜IgA抗体は全ての粘膜部位で検出されなかった。

[後藤紀久、前山順一、井坂雅徳、安田陽子、朽久保邦夫(名古屋市大・医)]

(2) インフルエンザ HA ワクチンへの試み

インフルエンザウイルスA/New Caledonia/20/99 とB/Johannesburg/5/99 の2株のワクチン抗原にrCTBを添加して、BALB/cマウスに4回経鼻投与し、血清中HI抗体価を測定したところ、rCTB存在下で免疫したマウスがA型に対する高いHI抗体価を示した。A・B型共にHA量を1/5(0.2 µg)に減量して投与したところ、A・B型のHAに対する血清IgG抗体価は、rCTBの有無に関係なく、同程度に高い値を示した。血清IgA抗体価はA型ではrCTBの存在に関係なく、B型ではrCTBの存在下の方が高い抗体価を示した。HI価は、rCTB存在下で免疫したマウスの血清ではB型のHAによる赤血球凝集を有意に阻止し、高いHI価を示した。また、rCTB存在下で鼻腔と肺の粘膜IgAも上昇した。

[後藤紀久、前山順一、安田陽子、朽久保邦夫(名古屋市大・医)、諸熊一則、大隈邦夫(化血研)]

(3) 細胞性免疫反応に対する rCTB の作用

BCGを用いて、rCTBの同時経鼻投与による細胞性免疫増強効果を見出したが、精製ツベルクリンに対する皮膚反応(モルモット)によって、更に投与条件等を詳細に検討した。その結果、あらかじめrCTBと共にBCGを 10^5 CFU経鼻投与し、その後、2、3、4週目にrCTBのみを経鼻投与した場合、BCG皮下投与と同程度の強い皮膚反応が得られた。このことから、rCTBは細胞性免疫反応をも増強することがより明確になった。

[前山順一、後藤紀久、山本三郎(細菌第二部)、井坂雅徳、安田陽子、朽久保邦夫(名古屋市大・医)]

(4) カニクイザルに対する安全性と効果

ジフテリア・破傷風トキソイド及びHBs ワクチン抗原をrCTBと共に経鼻投与したところ、破傷風抗毒素価、抗HBs抗体価について、rCTB添加により増強が認められた。しかしながら、ジフテリアについては、高い血清抗毒素価を示すところの、過去に感染があったと考えられるサルの子供を受けたため、明確な結果が得られなかった。また、体重変化、剖検所見、血液生化学的性状には大きな異常は認められなかった。現在、更に病理組織学的所見、各粘膜局所からの粘膜分泌型IgA、各リンパ組織細胞からのサイトカイン産生等の解析を進めている。

[前山順一、古畑啓子、後藤紀久、永田典代、原嶋綾子(感染病理部)、網 康至、須崎百合子(動物管理室)、小宮貴子、高橋元秀(細菌第二部)、井坂雅徳(名古屋市大・医)]

2. IFN-βの粘膜アジュバント作用に関する研究

IFN-βによる抗原特異的抗体産生の増強について報告

してきたが、安定した抗体産生を得られないという点で課題が残されていた。より鼻粘膜滞留性のよい投与剤形を検討する目的で、1%キトサン溶液を用いることを試みた。その結果、IFN-βとキトサンが相乗的なアジュバント作用を示し、キトサン添加群で、IFN-βの量に依存して、抗原特異的血清IgG抗体産生及び局所分泌型IgA産生の有意な増強が認められた。

[前山順一、後藤紀久、蔵田優子、櫻井信豪(東レ)]

・ 感染症に対する生体反応に関する研究

1. IgE抗体産生を惹起しにくいワクチンの創製に関する研究 - 抗原結合リポソームのマクロファージによる認識

これまでの検討の結果、リポソームの脂質組成によってアジュバント効果が顕著に異なることが示されたが、脂質組成の異なるリポソームと蛍光標識OVAとの結合物をマクロファージ培養中に添加してマクロファージによる取り込みおよびOVAの消化を検討したところ、アジュバント効果の高いリポソームと結合したOVAはマクロファージに取り込まれやすく、より消化を受けることがわかった。さらに、OVA特異的T細胞クローンへの抗原提示についてもアジュバント効果の高いリポソームと低いリポソームとの間で顕著な差がみられた。このことから、脂質組成の異なるリポソームの間にみられるアジュバント効果の差は抗原提供細胞による抗原認識の差と関連があることが示唆された。

[内藤誠之郎、加藤博史、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也]

2. IgE抗体産生を惹起しにくいワクチンの創製に関する研究 - フォスファチジルセリン含有リポソームにおけるアジュバント効果の増強

生体内において食細胞がアポトーシス細胞を貪食、消化する機構のひとつとして、アポトーシス細胞の表面に発現したフォスファチジルセリンを食細胞が認識することによるものが知られている。リポソームを構成する脂質にフォスファチジルセリンを加えることでリポソームのアジュバント効果を増強することが可能であるかについて検討を行った。その結果、フォスファチジルセリンを脂質組成に含むリポソームは含まないものと比べて顕著に高い抗原特異的抗体産生をマウスにおいて誘導した。この結果は試験管内でのマクロファージによる貪食を検討した結果とも一致した。フォスファチジルセリン含有リポソームにおいても、抗原結合リポソームによるIgE抗体産生の選択的抑制効果はこれまでと変わらず観察された。これらのことから、フォスファチジルセリンの添加によりリポソームのアジュバント効果を増強することが可能であることが示唆された。

[加藤博史、内藤誠之郎、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也]

3. リポソーム結合抗原のアレルギー治療への応用に関する研究

リボソーム結合抗原をアレルゲン減感作療法に応用する可能性について検討を行った。前年度はスギ花粉抗原として Sugi Basic Protein (SBP)を用いて検討を行ったが、今年度は SBP を構成する Cry J1 を用いて検討を行った。その結果、リボソーム結合 Cry J1 を免疫したマウスでは、Cry J1 特異的 IgG 抗体産生は誘導されたが IgE 抗体産生は誘導されなかった。このことから、リボソーム結合 Cry J1 をアレルゲン減感作療法に応用する可能性が示唆された。

[種市麻衣子、内藤誠之郎、加藤博史、内田哲也]

4. ウイルスゲノムのターゲティングによる遺伝子治療法の開発

レトロウイルス様ターゲティングベクターの開発中に、パッケージ細胞の内部で高頻度の相同組み換えが起こっていることを見出した。これは、細胞内のインテグラーゼの作用によるものと推測され、同蛋白質を発現しているレトロウイルス感染細胞内でも同様の事象が生じることが期待された。そこで、ウイルスゲノムの一部を有するDNAを感染細胞に導入したところ、組み込まれていたウイルスゲノムの一部をターゲティングすることが出来、逆転写酵素活性等が非感染細胞レベルに復帰したトランスフェクタントが高頻度に得られた。

[田中(庄司)明子]

5. 液性免疫賦活化方法とその評価方法の開発を目的とした、MHC class II 拘束性抗原提示の分子メカニズムに関する研究。

液性免疫賦活化方法とその細胞レベルでの評価法の開発を目的として、様々な抗原提示細胞におけるMHC class 拘束性抗原提示の分子メカニズムに関する研究をおこなった。H2-DMb2鎖の細胞質領域に蛍光タンパク質を結合したキメラ分子をコードするベクターをマウス由来抗原提示細胞へ導入した。キメラ分子はクラス II 分子、インバリアント鎖およびCD80分子陽性のlysosome様細胞内小胞に存在した。蛍光顕微鏡観察とwestern blot解析により、キメラ分子陽性小胞内における外来性抗原の消化とクラス II と抗原ペプチド複合体の形成が確認された。

[笠井道之]

6. 胸腺細胞にアポトーシスを誘導した際の胸腺での脈管新生—マクロファージMMP-9の関与

Matrix metalloproteinases-9(MMP-9)は様々な疾患との関連が報告されているが、血管周囲の基底膜を分解することにより血管新生を促進することが知られている。抗CD3抗体をマウス投与に投与すると胸腺細胞にアポトーシスが誘導されるが、死細胞は速やかに胸腺に遊走してきたマクロファージによって貪食処理されることを報告してきた。今回、マウス胸腺細胞のアポトーシスに伴い、胸腺に遊走してきたマクロファージから産生されたMMP-9がIV型コラーゲンを切断し、脈管新生が誘導されることを観察した。そして、多くのマクロファージは形成された脈管を介して胸腺からの移出して行くことが示唆された。

[小高千加子]

7. ウイルス遺伝子と生体内シグナル伝達機構の解析—転写因子を中心に—

ウイルス遺伝子(またはタンパク質)の一部を用いた生体内での解析が進められ、様々な生体反応への影響が解明されてきている。これら一つ一つの遺伝子コンポーネントの生体反応への影響を詳細に解析することが、最終目的である感染メカニズムの解析、ワクチン、特異的な治療法の開発への礎となるものと考えられる。我々は、正常個体であるアフリカツメガエルの胚をモデルにした遺伝子発現系と生体内シグナル伝達系に関する基礎的研究を進めている。

(1) C型肝炎ウイルス、コア(core)タンパク質と細胞内シグナル伝達系の解析

レチノイド(Retinoic Acid ; RA)は及びその受容体(RXR)は、生体の発生、分化、増殖、再生、脂質代謝等に関わる重要なシグナル伝達系の一つである。これまでRXR- Coreタンパク質と特異的に結合すること(ウイルス二部、宮村ら)、及びRA過剰発現、暴露による様々な種の胎児の発生異常等をきたすことが明らかにされている。我々は様々な培養細胞系にトランスフェクションを行い、RARE(RA-responsive element)-Luciferaseのコンストラクションを指標に、CoreとRXRシグナル伝達系との関係を解析したところ、RAの場合に比較してほぼ同様のRAREの活性が認められた。また、正常個体の2細胞期の胚内にCore遺伝子を過剰発現させると、眼、特に網膜(retina)発生が抑制されていることを明らかにした。現在は、様々な眼、神経系の遺伝子マーカーをプローブにしてin situ hybridization等を行い遺伝子発現とその局在を明らかにしているところである。

[青木陽一郎、益見厚子、矢野茂生、布施晃]

(2) HIV 制御遺伝子(Tat)が胎児に与える影響

現在、HIVのワクチン開発が進められているが、近年その調節遺伝子であるTatが注目されてきた。また、HIV感染を受けた母親から生まれたHIV感染を受けていない胎児は、血清学的、免疫学的異常が長期間継続することが報告されている。我々は、胎児に与える影響を短期間に広範囲な現象を解析しうる方法として、アフリカツメガエル胚へのTat, mutant-Tat等を接種し、各発生段階の胚を様々な遺伝子マーカーを持ちいいて解析したところ、胎児の三胚葉形成の基本となる転写因子Brachyury(Xbra)の遺伝子発現が抑制され、原腸陥入後の胚葉形成が不全となった。現在は生化学的な解析を含め、特異的な抑制メカニズムを解析中である。

[青木陽一郎、小室勝利]

8. インターフェロン転写制御因子に関する研究

インターフェロン転写制御因子のうち、IRF-2がヒストンAセチル化酵素によりアセチル化を受けることを見出したことから、NIH3T3細胞を用いて細胞増殖制御との関連で検討した。細胞増殖と関係の深いH4遺伝子がIRF-2にと

って制御をうけ、その際 IRF-2 はアセチル化を受けて機能を発揮していることが明らかとなった。

[益見厚子]

9. HCV タンパク質 NS5A の研究

NS5A を HeLa 細胞に恒常的に発現させた細胞をもちいて、プロテオーム研究を行った。およそ 1L 培養から細胞をアフィニティカラムで NS5A を精製し、結合してきた宿主細胞タンパク質を LC/MS-MS で解析した。結合タンパク質は今のところ 2 種類見い出され、それぞれ、phosphoprotein と phosphatase であった。Phosphoprotein のほうは、2003 年に他の研究者が見い出したタンパク質と同一であった。もうひとつの phosphatase について検討している。

[益見厚子]

10. cDNA マイクロアレイによる分析 II: 抗ガン剤による細胞死の分析と感受性の事前診断

白血病細胞株 CMK に抗ガン剤 Ara-C を投与し、細胞死に至るまでに変化する遺伝子について我々が独自に作成した DNA マイクロアレイ(ヒトの遺伝子 2000 をのせたチップ)で解析した。その結果、細胞死にいたる前に、いくつかのアポトーシス関連および転写関連遺伝子の変化が認められた。患者のガン細胞の遺伝子変化の分析により、患者に効果のある抗ガン剤を事前に選択する方法を開発する。

[布施 晃、佐藤武幸(千葉大研究院)、関 直彦(千葉大研究院)]

11. 微小重力の生体防御に及ぼす影響 III : 微小重力の潜伏ウイルスの再活性化

マウスヘルペスウイルス持続感染系を開発し、熱処理や紫外線処理でウイルスの活性化する系を作成した。これらの系ではストレス刺激によって、ヒートショック蛋白や種々のサイトカインの遺伝子発現が変化することも見いだした。この持続感染系を微小重力下に持ち込み、宇宙空間で持続感染しているウイルスの再活性化がどのように起こるか、今後検討する予定である。

[布施 晃、喜多正和(京都府立医大)]

1. 平成14年度 検定/検査実績(第1室)

試験検査	件数
国家検定	
乾燥人フィブリノゲン	2
乾燥濃縮人血液凝固第 因子	55
人免疫グロブリン	6
乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン	4
乾燥スルホ化人免疫グロブリン	66
pH4処理酸性人免疫グロブリン	5
乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン	5
ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	40
乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	38
抗破傷風人免疫グロブリン	1
乾燥抗破傷風人免疫グロブリン	3
ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリン	3
乾燥濃縮人アンチトロンビン	41
人ハプトグロビン	7
計	276
抜取検査	
乾燥人血液凝固第 因子複合体	4
乾燥濃縮人血液凝固第 因子-原血漿が 50 人分以上の場合	4
ヒスタミン加入免疫グロブリン(乾燥)	2
計	10
一般依頼検査	
遺伝子組換え血液凝固第 因子	16
人免疫グロブリン	2
計	18
合計	304

2. 平成 14年度 検定/検査/標準品等供与の実績(第2室)

試験検査	件数
国家検定	
抗 HBs 人免疫グロブリン	1
乾燥抗 HBs 人免疫グロブリン	4
乾燥ポリエチレングリコール処理抗 HBs 人免疫グロブリン	1
乾燥抗 D(Rho)人免疫グロブリン	4
計	10
国家検査(収去検査)	
抗ヒトグロブリン抗体(多特異性抗体)	9
抗 A 血液型判定用抗体	4
抗 B 血液型判定用抗体	4
抗 D 血液型判定用抗体	6

ゲルカラム遠心凝集法血液型判定用抗体 (抗グロブリン抗体を含む製剤)	2
ゲルカラム遠心凝集法血液型判定用抗体 (混合血液型抗体を含む製剤)	1
計	26
依頼検査	
HBs 抗原検出用体外診断キット	6
HCV 抗体検出用体外診断キット	5
計	11
標準品の供与	
参照抗 HBs 人免疫グロブリン	1(1)
HBs 抗原国内標準品	7(14)
計	8(15)
合計	55(15)

3. 平成14年度 検定/検査実績(第3室)

試験検査	件数
生物製剤・血液製剤	
水素イオン濃度試験	11
含湿度試験	127
蛋白窒素定量試験	216
蛋白質定量試験	94
ホルムアルデヒド定量試験	138
チメロサル定量試験	2
ヒスタミン定量試験	1
ヘモグロビン定量試験	8
クエン酸ナトリウム定量試験	3
フェノール定量試験	1
特審・依頼(抗生物質等)	
吸光度(紫外吸収)	8
旋光度	5
含湿度 水分定量法(KF法)	38
乾燥重量法	33
重金属	6
赤外吸収	21
紫外吸収	2
NMR	18
強熱残分	5
薄層クロマトグラフィー	2
合計	739

4. 平成14年度 検定/検定実績(第4室)

(1) 異常毒性否定試験

(ア) 生物学的製剤

月	試験実施 件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	20	20	0	0	0
5	9	9	0	0	0
6	4	4	0	0	0
7	7	7	0	0	0
8	6	6	0	0	0
9	49	49	0	0	0
10	15	15	0	0	0
11	7	7	0	0	0
12	22	22	0	0	0
1	3	3	0	0	0
2	10	10	0	0	0
3	21	21	0	0	0
計	173	173	0	0	0

(イ) 血液製剤

月	試験実施 件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	106	106	0	0	0
5	36	36	0	0	0
6	49	48	0	1	0
7	100	97	0	3	0

8	40	39	0	1	0
9	89	84	0	5	0
10	46	46	0	0	0
11	81	79	0	2	0
12	81	80	0	1	0
1	42	42	0	0	0
2	48	48	0	0	0
3	124	123	0	1	0
計	842	828	0	14	0

8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
計	2	2	0	0	0

研究業績一覽

(2) 生物学的製剤発熱試験

月	試験実施 件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	29	29	0	0	0
5	32	31	0	1	0
6	30	30	0	0	0
7	29	29	0	0	0
8	31	31	0	0	0
9	32	32	0	0	0
10	18	18	0	0	0
11	26	26	0	0	0
12	19	19	0	0	0
1	27	27	0	0	0
2	28	28	0	0	0
3	29	29	0	0	0
計	330	329	0	1	0

(3) 発熱性物質試験 (抗生物質) 一般依頼検査

月	試験実施 件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	2	2	0	0	0

I. 論文発表

1. 欧文発表

- 1) Collaborative study to calibrate hepatitis C virus genotypes 2-6 against the HCV International Standard, 96/790 (genotype 1). Saldanha J, Heath A; Collaborative Study Group. (Mizusawa, S. as a member of the WHO collaborative Study Group). Vox Sang. 2003 Jan;84(1):20-7.
- 2) Toda, M., M. Kasai, H. Hosokawa, N. Nakano, Y. Taniguchi, S. Inouye, S. Kaminogawa, T. Takemori, and M. Sakaguchi. DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4⁺ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response. Eur. J. Immunol. 32:1631-1639 (2002).
- 3) Utsuyama, M., J. Shiraishi, H. Takahashi, M. Kasai, and K Hirokawa. Glia Maturation factor produced by thymic epithelial cells plays a role in T cell differentiation in the thymic microenvironment. Int. Immunol. 15:557-564 (2003).
- 4) Odaka, C., Mizuochi, T., Yang, J., and Ding, A. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during phagocytosis of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response. J. Immunology 171:1507-1514 (2003).
- 5) Yoshizawa, I., T. Mizuochi, A. Ogata, M. Murakami, H. Yagaita, Y. Takahashi, T. Mizuochi, T. Takemori, and Y. Tsunetsugu-Yokota. Studies on the generation and maintenance of mucosal CTL against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. AIDS Res. and Human Retro. 19:469-479 (2003).
- 6) Aoki Y, Spokony R.F, Magner-Fink E.K. and Saint-Jeanet J-P. (2002). The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in Xenopus. Development 129, 421-432.

- 7) Aoki Y, Saint-Germain N, Gyda M, Magner-Fink E. K, Lee Y-H, Credidio C, and Saint-Jeannet, J-P. (2003). Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Developmental Biology*. 259:19-33.
- 8) Sunohara M, Morikawa Stakeyuki, Sato T, Sato I, Sato S and Fuse A, Modulation of human *C-MPL* gene expression by thrombopoietin through protein kinase C. *Cellular Molecular Biology* 49 OL393-OL-398 (online), 2003
- 9) Caillaud A., Prakash A., Smith E., Masumi A., Hovanessian A.G., Levy D.E. and Marie I. Acetylation of Interferon Regulatory Factor-7 by p300/CREB-binding Protein (CBP)-associated factor (PCAF) Impairs its DNA binding. *J. Biol. Chem.* 277, 49417-49421 (2002)
- 10) Masumi A, Tamaoki S, Wang IM, Ozato K, and Komuro K. IRF-8/ICSBP and IRF-1 cooperatively stimulate mouse IL-12 promoter activity in macrophages. *FEBS Lett.* 531, 348-53 (2002)
- 11) Masumi A., Yamakawa Y., Fukazawa H., Ozato K. and Komuro K. Interferon regulatory factor 2 regulates cell growth through its acetylation. *J. Biol. Chem.* 278, 25401-25407 (2003)
- 12) Nishikawa K., Kobayashi M., Masumi A., Susan E. Lyons, Brant M. Weinstein, P. Paul Liu and Yamamoto M. Self-association of Gata1 Enhances Transcriptional Activity In Vivo in Zebrafish Embryos. *Mol. Cell. Biol.* (2003) In press
- 13) Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Taniguchi, T., Morokuma, K., Ohkuma, K., Tochikubo, K and Goto, N. : Effects of recombinant cholera toxin B subunit on IL-1 β produced by macrophages *in vitro*. *Microbiol. Immunol.*, 46, 593-599, 2002
- 14) Taneichi, M., Naito, S., Kato, H., Komuro, K., Uchida, T. (2002) T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. *J Immunol* 169:4246-4252.
- 15) Tanaka, Y., Ishikawa, F., Osada, H., Ohmi, S, Uchida, T., Kakiuchi, T. (2002) Reveromycin A inhibits antigen receptor-mediated antigen presentation by B lymphoma cells through affecting intracellular trafficking of the antigen. *J Antibiotics* 55:904-913.
- 16) Naito, S., Taneichi, M., Kato, H., Ami, Y., Suzaki, Y., Mori, M., Nakano, Y., Yamamura, H., Morokuma, K., Ohkuma, K., Miyake, H., Kiniwa, M., Komuro, K., Uchida, T. (2002) Selective inhibition of systemic anti-OVA IgE production in response to oral preadministration with OVA-liposome conjugates. *Int Arch Allergy Immunol.* 129:314-319.
- 17) Uchida, T. (2003) Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness in a T-cell independent fashion. (2003) *Current Drug Targets* 3:119-135.
- 18) Arai, C., Ichiji, T., Tanaka, Y., Okada, Y., Umeda, M., Uchida, T., Kiniwa, M., Kakiuchi, T. (2003) Selective enhancement of B cell antigen receptor-mediated antigen presentation by treatment with tumor growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.* 33:1806-1815

2. 和文発表

- 1) 種市麻衣子、内田哲也：完全フロイントアジュバントのIgE産生抑制機構。臨床免疫、科学評論社、東京、2002、第38巻1号、102-106頁。
- 2) 内田哲也：リポソーム表面結合抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究 ヒューマンサイエンス基礎研究事業 平成14年度官民共同プロジェクト研究報告書 2003
- 3) 後藤紀久、朽久保邦夫、大隈邦夫、櫻井信豪：安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究、平成13年度創薬等ヒューマンサイエンス研究、重点研究報告書、第5分野、健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究、66-76、2002。
- 4) 後藤紀久、朽久保邦夫、大隈邦夫、櫻井信豪：安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究、平成14年度創薬等ヒューマンサイエンス研究、重点研究報告書、第5分野、健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究、59-66、2003。
- 5) 後藤紀久：抗毒素の安全に関する研究・異常毒性否定試験・発熱試験、厚生労働科学研究費補助金 平成14年度医薬安全総合研究事業 総括・分担研究報告書、安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究、19-35、2003
- 6) 青木陽一郎、小室勝利：ワクチンの安全性評価。HIV構造遺伝子とHIV制御遺伝子のコンビネーションワクチンの開発に関する研究。平成14年度創薬ヒューマンサイエンス総合研究事業、報告書。
- 7) 益見厚子：インターフェロン転写制御因子の生物学的機能について、日本学術振興会基盤研究(C)平成13-14年度報告書
- 8) 益見厚子：ウイルスタンパク質の宿主因子におけるプロテオーム研究、平成14年度ヒューマンサイエンス振興財団創薬国際グラント事業補助金分担報告書
- 9) 益見厚子：Keystone Symposiaに参加して、臨床薬理の進歩 2003(臨床薬理研究振興財団海外交流補助金報告書)

・学会発表

1. 国際学会

- 1) M. Kasai and T. Ikeda : Study on the molecular mechanism of MHC class II restricted antigen-presenting process in thymic epithelial cell lines. Kyoto T Cell Conference. The 3rd International

Workshop (12th Annual Meeting). 2002.

- 2) Fuse A: Effect of gravity change on the production of cytokines from spleen cells. REGA International Symposium 2002. October 11-12, 2002, Leuven, Belgium
 - 3) Fuse A: Effect of gravity change on viral infection. REGA International Symposium 2002. October 11-12, 2002, Leuven, Belgium
 - 4) Fuse A: Effect of gravity change on thrombopoiesis in mice. REGA International Symposium 2002. October 11-12, 2002, Leuven, Belgium
 - 5) Fuse A: From Minderbroedersstraat to space with cytokines. REGA International Symposium 2002. October 11-12, 2002, Leuven, Belgium
 - 6) Atsuko Masumi, Yoshio Yamakawa, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation International congress of Interferon and Cytokine Research (ISICR) Turin, Italy, Oct, 2002.
 - 7) Atsuko Masumi, Yoshio Yamakawa, Hidesuke Fukazawa, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro. Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation Keystone Symposia, Big Sky, Montana, Jan, 2003.
- 国内学会
- 1) 岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子: パルボウイルス B19 感染系の確立とその応用。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会、2002 年 10 月、札幌市。
 - 2) 岡田義昭、奥山堅司、種市麻衣子: マウスエイズウイルス感染細胞におけるケモカインに対する遊走性の解析。第 32 回日本免疫学会総会・学術集会、2002 年 12 月、東京。
 - 3) 笠井道之、池田 通: マウス胸腺上皮細胞株における H2-DM 陽性細胞内小胞の解析。第 32 回日本免疫学会総会・学術集会、2002 年 12 月
 - 4) 小高千加子、水落利明: アポトーシス死細胞貪食時のマクロファージからの secretory leukocyte protease inhibitor の産生。第 32 回日本免疫学会総会・学術集会、2002 年 12 月
 - 5) 田中(庄司)明子、小室勝利: ウイルスゲノムのターゲティングによるレトロウイルス感染症の遺伝子治療の試み。第 25 回日本分子生物学会年会、2002 年 12 月
 - 6) 山本俊郎、喜多正和、今西二郎、布施 晃: サイトカイン産生に対する微小重力の影響。第 66 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、平成 14 年 6 月、京都
 - 7) 布施 晃、青木陽一郎、佐藤武幸、春原正隆、武岡元: 微小重力によるマウス抹消血中の血小板減少。第 16 回日本宇宙生物学会 平成 14 年 11 月 9-11 日、富山
 - 8) 布施 晃: ウイルス安全性に関する欧米での最近の話題。第 1 回ウイルス安全性研究会シンポジウム。平成 14 年 12 月 20 日、北里大学
 - 9) Yoichiro Aoki, Jean-Pierre Saint-Jeannet. Analysis of Sox10 function during development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. 日本分子生物学会第 25 回年会。平成 14 年 12 月。
 - 10) Atsuko Masumi, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第 75 回日本生化学会、京都 10 月
 - 11) Atsuko Masumi, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第 25 回日本分子生物学会、横浜 12 月
 - 12) 前山順一、山本三郎、安田陽子、井坂雅徳、谷口 暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久: BCG の鼻粘膜投与における組換えコレラ毒素 B サブユニットのアジュバント効果について。第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜
 - 13) 井坂雅徳、小宮貴子、安田陽子、谷口 暢、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、後藤紀久、朽久保邦夫: rCTB をアジュバントとした DPT ワクチン経鼻投与での破傷風、ジフテリア抗毒素価の検討。第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜
 - 14) 朽久保邦夫、井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、亦野恵子、後藤紀久、大隈邦夫: コレラ毒素 B サブユニットの粘膜アジュバント活性。第 49 回毒素シンポジウム、2002 年 7 月、岐阜
 - 15) 前山順一、井坂雅徳、安田陽子、朽久保邦夫、山本三郎、後藤紀久: 組換えコレラ毒素 B サブユニットによるマウスマクロファージの IL-1 β 産生誘導機構の解析。第 67 回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会・学術集会、2002 年 7 月、東京
 - 16) 趙 艶秋、井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、後藤紀久、朽久保邦夫: コレラ毒素 B サブユニットをアジュバントとしたインフルエンザワクチンの経鼻投与に対する免疫応答。第 39 回日本細菌学会中部支部総会、2002 年 10 月、愛知
 - 17) 井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、小宮貴子、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、高橋元秀、後藤紀久、朽久保邦夫: 組換えコレラ毒素 B サブユニットを添加した試作調整 DPT ワクチンの経鼻投与におけるジフテリアと破傷風の毒素中和抗体誘導について。第 6 回日本ワクチン学会学術集会、2002 年 11 月、千葉
 - 18) 前山順一、山本三郎、井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久: 粘膜ワクチン用組換え CTB アジュバントの BCG 経鼻投与に対する効果。第 6 回日本ワクチン学会学術集会、2002 年 11 月、千葉
 - 19) 山本十系子、前山順一、後藤紀久、伊保澄子、McMurray, D.N., 山本三郎: 抗結核免疫における免疫増強性 CpG-DNA の役割。第 32 回日本免疫学会総会・

学術集会、2002年12月、東京

- 20)種市麻衣子、内藤誠之郎、加藤博史、田中ゆり子、内田哲也:リボソーム結合抗原による抗原特異的、IgE 選択的無反応の誘導メカニズム 第32回日本免疫学会総会、2002年
- 21)加藤博史、内藤誠之郎、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也:リボソーム結合抗原経口投与マウスにおける抗体産生 第32回日本免疫学会総会、2002年
- 22)内藤誠之郎、種市麻衣子、加藤博史、田中ゆり子、内田哲也:スギ花粉抗原—リボソーム結合物の花粉症治療への応用可能性 第32回日本免疫学会総会、2002年
- 23)田中ゆり子、笠井道之、内藤誠之郎、種市麻衣子、加藤博史、内田哲也:マクロファージにおけるリボソーム結合抗原の細胞内動態 第32回日本免疫学会総会、2002年