

## 13. 血液・安全性研究部

## 部長 山口一成

## 概要

当部が担当する国家検定は血液製剤とワクチンである。血液製剤については、「輸血医療の安全性向上と血液の完全国内自給」が近い将来の国の目標である。血液製剤も大きく変わろうとしている。やがてリコンビナントアルブミン製剤が市場に登場し、現在は全面的に輸入に頼っている特殊免疫グロブリン（抗HBグロブリン、抗破傷風グロブリンなど）さえも国内自給を目指す方向で模索が始まっている。このような新しい血液製剤も含めて、血液製剤の監視体制の整備が求められており、今後の部の目指すべき方向として、わが国における「ヘモビランス（血液副作用報告体制）」の役割を感染症情報センターのご協力のもとに、確立したいと考えている。厚労省、関連学会、全国の血液・輸血関係者との連携、共同研究をいろいろな角度から進めたい。

ワクチンについては日本もこの20年近い冬の時代からの脱却が求められているが、私達はワクチンの安全性研究の立場から貢献できることを検討している。若い研究者を中心に新しく始めたプロジェクトがようやく実を結びつつあり、DPT ワクチン、新型インフルエンザワクチン、日本脳炎ワクチン等の安全性研究についての成果とその国家検定への応用を数年以内に世界に問いたいと思う。

国家検定については、長い歴史の中で感染研は重要な役割を果たしてきたが、検査法の開発を含めてそのシステムを見直すことが必要な時期になっている。一般の研究は常に学会、論文等で外部の批判に晒されているが、生物学的製剤の国家検定には感染研しか関わっておらず、外からはほとんど見えにくいのが実情である。常に「感染研の私物化」の恐れがあることに私達は留意しなければならない。しかし、私達は専門家集団であり、感染研の外から指摘されて改革するのではなく、自主的に変えていきたいと考えている。幸い現行の国家検定試験法の見直しについての検討が研究所として始まっている。感染研内部から改革が始まったというところを外に向けて発信できたらと思う。それにはスピード感も大事な要素である。

平成18年度は、新しい研究員の採用はなかった。先端の研究はそれまでの伝統に新しい力が加わり、各方面と

の交流が行われて始めて成し遂げることができる。国立の研究機関の、研究者の移動が比較的少ない現在のシステムが今後も機能するとは思わない。感染研のみでは解決しにくいのが、大学や他の研究機関、地方衛生研究所などとの人事交流が早急に必要であろう。

私たちの研究は、厚生労働省研究事業費、文部科学省科学研究費等の援助を受けて行われているが、部員の厚労省研究事業費、文科省科研費等の研究班への参加が今年度は3年前の約5倍になった。今後も一層の努力を続けていきたい。

内藤主任研究官がドイツ、ポール・エールリッヒ研究所に4ヶ月間留学し帰国した。今後の活躍を期待したい。非常勤の秘書として内野百合子さんが11月から採用された。

## 業績

## 調査・研究

## ・血液製剤の安全性に関する研究

プリオンの研究 *in vitro* 感染系の検討

BSE 由来の異常プリオンから血液製剤の安全性を確保するために、人由来細胞株を用いた *in vitro* 感染系を検討した。特異性を高めるために抽出法を改良し、ポリクローナル抗体を用いることによって感度を向上させた。その結果、*in vitro* において感染が成立していることを再確認することができた。また、感染細胞の上清を非感染細胞に添加することによって異常プリオン特異的なバンドが検出でき、培養上清中に感染性のプリオンが存在していることが明らかにできた。さらに、ウイルス除去膜によって除去できることも明らかにした。この系は血液製剤からのプリオン除去の評価に有用な測定系になると考えられた。[岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、山口一成]

## ・血液を介するウイルスの研究

1. 血液製剤の核酸増幅試験(NAT)の精度管理に関する研究

「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査(NAT)の実施に関するガイドライン」及び「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」に基づいて

血漿分画製剤製造販売業者等や民間の衛生検査所で実施している C 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス (HBV) および AIDS ウイルス遺伝子の NAT に関するコントロールサーベイを実施することになり、感染研が検体の作製と配布及び結果の解析を担当した。第一回は HBV NAT を対象とした。血漿分画製剤製造所 7 社 10 施設が実施している試験法は 7 種類で、全ての施設の全ての試験法の感度は目標値の 100 国際単位/ml を達成していた。衛生検査所 7 社が輸血後検査に用いている HBV DNA 定量用体外診断薬キット 2 種類のうちキット A は有意な施設間差はなく、100 国際単位/ml の濃度の検体を測定可能であった。[ 水沢左衛子、水落利明、岡田義昭、種市麻衣子、梅森清子、斎賀菊江、山口一成 ]

## 2. 病原体不活化に関する研究

日本の血液製剤の安全性は格段と向上したが、輸血による感染症は未だ根絶出来ない。新興再興感染症のアウトブレイクや未知の病原体による血液汚染に対し病原体特異的なスクリーニングのみで安全性を担保するには限界があり、広範囲な病原体を不活化出来る不活化法の開発が期待されている。そこで食品の無菌化に応用されている加圧処理に着目し、加圧処理により血液製剤を汚染し得る病原体を不活化することを試みた。

### (1) 血液製剤に混入するウイルスの加圧処理による不活化

エンベロープを有する日本脳炎ウイルス、麻疹ウイルス、マウスレトロウイルス、エンベロープを有さないパルボ B19 ウイルス、A 型肝炎ウイルス (HAV) を用いて、0 ~ 400MPa の加圧処理後の感染価を測定した。その結果、HAV を除くウイルスにおいて 300MPa の加圧処理による有効な不活化効果が認められた。さらに、加圧処理により生理活性の保持を検討した結果、300MPa 処理によりグロブリン製剤の機能が維持されること、また第 8 因子以外の主な凝固因子の活性が維持されることが確認された。[ 梅森清子、岡田義昭、矢野茂生、布施 晃、嶋崎典子、山口一成 ]

### (2) 血液製剤に混入するバクテリアの加圧処理による不活化

大腸菌 ATCC35218 株を濃厚赤血球製剤にスパイクし、0 ~ 300MPa の加圧処理前後の生菌数を比較した結果、200MPa の加圧処理により大腸菌の不活化効果が認められ、その際の赤血球製剤の溶血は 1.0% 以下であった。さらに新鮮凍結血漿製剤に対して 200MPa の加圧処理をし、機能

の維持を検討した結果、調べたすべての凝固因子活性が保たることを確認した。[ 梅森清子、岡田義昭、矢野茂生、布施 晃、山口一成 ]

## 3. B 型肝炎ウイルスに関する研究

### (1) HBs 抗原の解析と組み換え HBs 抗原パネルの作製

昨年度に各 genotype 毎の S 抗原パネルの整備が完了したので、今年度はパネルを充実させるために日本国内に多い genotype B (9 例) と C (10 例) から S 遺伝子をクロ・ニングし、計 38 個の HBs 抗原パネルを作成した。これらの HBs 抗原の a 抗原決定基は保存されていた。組み換え HBs 抗原は、恒常的に全く同一の抗原性を持つ HBs 抗原を作成することができるため診断用キットの評価等に有用だと考えられた。[ 岡田義昭、水落利明、水沢左衛子、梅森清子、山口一成 ]

### (2) 遺伝子組換え技術による変異型 HBs 抗原パネル作製に関する研究

Small HBs 抗原は B 型肝炎ウイルス感染の主要マーカーであるが、共通抗原基 a に変異を起こした HBs 抗原変異株が分離されるようになって、診断薬の評価のために種々の変異型 HBs 抗原を含むパネルの整備が求められている。昨年度の研究において *in vitro* mutagenesis 法を用いて 4 種類の変異型 HBs 抗原を作製した。今年度はこれらの変異型 HBs 抗原を国内で販売されている 5 種類の高感度 HBs 抗原検出キットを用いて測定した。その結果、キットによって測定値に影響を受ける変異が異なることが示された。また、*in vitro* mutagenesis 法を改良した結果、変異型 HBs 抗原の効率的な作成が可能になった。これらの結果は、国内で使用する診断用 HBs 抗原検出試薬の評価系として、国内で報告されている変異や海外から持ち込まれる可能性のある変異を反映した遺伝子組換え HBs 抗原パネルの有用性を示している。[ 水沢左衛子、岡田義昭、水落利明、山口一成 ]

## ・感染症に対する生体反応に関する研究

### 1. 抗原ペプチドとリポソームとの最適結合方法の検討

本研究において使用するリポソーム処方効率が効率よく CTL を誘導することが可能であることは既に報告したが、今年度はリポソームの薬剤送達 (DDS) 能力をさらに向上させることを目的として、リポソーム上にリンパ節指向型のペプチド (homing peptide) を結合させて生体内での動態を追跡した。その結果、homing peptide を表面に結合したリポソームは高効率にリンパ節に集積し、かつリポソーム結合抗原に対する免疫誘導が顕著に増強され

ることが観察された。[ 種市麻衣子、内田哲也 ]

## 2. 脈管新生におけるマクロファージと血管平滑筋細胞の役割とその分子機構についての研究

抗CD3抗体をマウスに投与すると、胸腺細胞にアポトーシスが誘導される。私たちは、これまでに、胸腺に遊走してきたマクロファージがアポトーシス死細胞貪食処理後、胸腺で脈管新生が誘導されることを報告してきた。現在、アポトーシスに伴う脈管形成の機構を明らかにするため、マクロファージと血管平滑筋細胞の解析を進めているが、マクロファージは脈管に直接的に作用する VEGF-C などの脈管新生因子を産生することが明らかとなった。さらに、マクロファージの産生する IGF-1 が血管平滑筋細胞を刺激し、血管平滑筋細胞から angiopoietin-2 が産生され、リンパ管内皮細胞の増殖を誘導することが示唆された。[ 小高千加子 ]

## 3. 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

MHC class II 分子は、細胞外及び細胞膜上のタンパク質に由来するペプチドばかりでなく、オートファジーを経由してリソソーム様コンパートメント内に輸送された細胞質内タンパク質に由来するペプチドとも複合体を形成する。本年度は、ユビキチン化された細胞質内タンパク質の一部がオートファジーを経由してリソソーム様コンパートメント内に輸送されることを蛍光免疫染色法で明らかにした。今後は、どのような免疫学的環境下でオートファジーが誘導されるのかを解明する予定である。[ 笠井道之 ]

## 4. インテグラーゼによるゲノム再構成にかかわる遺伝子

精製レトロウイルスインテグラーゼの存在下に c-mos 遺伝子を線維芽細胞に導入することにより、相同配列部位に高頻度で再構成が起こり、その変化にゲノム上の他のいくつかの配列が関与していることを報告してきた。これらのうちの一つの配列と相同性の高い、ヒトの cDNA クローンを導入したマウス線維芽細胞は、前述の c-mos トランスフェクタントに類似の形態を示し、特に外胚葉性分化マーカーの顕著な発現が観察された。この新規遺伝子の、レトロウイルス感染症発症にはたす役割について検討中である。[ 田中(庄司) 明子 ]

## ・ 動物ウイルスに関する研究

### 1. ウシにおけるウシ白血病ウイルス(BLV)感染

牛白血病発症数は、近年、全国的に増加傾向にあり、その原因ウイルスである BLV と人への感染の可能性について調査を続けている。今回、HA 法、ウイルス分離法および Nested PCR 法を用いて牛 17 頭(大分県)について BLV 感染診断を行った。12 頭が HA 法で抗体陽性と判定された。その 12 頭について Nested PCR 法で BLV のプロウイルスの遺伝子の存在を調べたところ 11 頭で陽性であった。このうち、7 頭で CC81 細胞に多核巨細胞形成する BLV とされるウイルスが分離された。PCR 陽性例について BLV の遺伝子配列を調べたところ、10 頭は日本型に感染していたが、ホルスタイン種と黒毛和牛で遺伝型が異なることが判明した。残りの 1 頭はアルゼンチン型であった。感染経路を解明するためにはウシの生産、育種、流通との関係からの調査が必要となった。[ 原 正幸、布施 晃、山口一成、成松浩志(大分県日田玖珠県民保健福祉センター) ]

### 2. 実験用霊長類における SFV 感染

日本で飼育されている実験用霊長類の Simian Foamy Viruses (SFV) の感染状況を調べるために、抗体調査(IFA)とウイルス分離により実験用マカク属サル類の SFV 感染状況の調査を行った。IFA では約 90% が陽性で、それらのサルの 40% から感染性ウイルスが分離された。SFV はヒトへの感染例も報告されていることから、輸血や血液製剤への影響についても考慮する必要がある。実験用以外の霊長類についても調査するためにニホンザル約 100 頭の血液を採取した。これらを用いて SFV の感染状況を調べる予定である。[ 原 正幸、布施 晃、山口一成 ]

## ・ 生物学的製剤に関する研究 安全な粘膜ワクチン用アジュバントに関する研究

### 1. 経鼻投与コレラ毒素(CT)によるベル麻痺発症の検討

コレラ毒素 B サブユニット(rCTB)粘膜投与後の中枢神経系の影響とベル麻痺の因果関係を明らかにすべく、コレラ毒素(CT)、rCTB の経鼻投与による嗅球および脳への組織学的影響と麻痺の観察を行った。ヘルペスウイルス感染マウスへ CT、rCTB を経鼻投与すると、CT の場合、顔面神経でヘルペスウイルスの特異的バンドが PCR で確認された。rCTB 投与や PBS 投与では、PCR による特異的バンドが検出されなかった。また、ヘルペスウイルス特異的バンドを検出したマウスに麻痺が観察されたが、

rCTB 投与や PBS 投与では、麻痺は現れなかった。以上の結果は、経鼻免疫によるベル麻痺の発症の一因としてヘルペスウイルスが関与し、近年報告された大腸菌易熱性毒素と不活化インフルエンザウイルス HA 抗原の経鼻投与後の麻痺は、潜伏感染しているヘルペスウイルスが再活性化され発症したと推測される。[前山順一、井坂雅徳(名古屋市大・医)、後藤紀久((独)総合機構)]

## 2. CpG-DNA の粘膜アジュバント作用

ジフテリアトキソイド (DT) を用い、CpG-DNA である OligoB の粘膜アジュバント効果を検討した。粘膜ワクチンは感染局所での防御が期待されるが、Oligo B により粘膜での抗原特異的 IgA 抗体の産生増強が認められた。一般に、CpG-DNA は Th 1 型の免疫系を増強するとされるが、Th2 型の IgG1 抗体も十分な産生が認められた。一方、同程度に血清 IgG を誘導するアルミニウムゲルアジュバントの場合と比べ、抗原特異的 IgE 抗体産生はほとんど認められなかった。現在 Oligo B の Th1/Th2 バランスへの影響をサイトカイン産生誘導の観点から検討している。感染防御及び安全性の面から Oligo B は粘膜アジュバントとして有用である。[前山順一、井坂雅徳(名古屋市大・医)、山本三郎(Texas A&M University)、後藤紀久((独)総合機構)]

## ・経皮免疫法に関する研究

### 1. 皮膚前処置による経皮免疫応答の増強

抗原溶液を皮膚の表面に投与する前に、薬剤の経皮吸収を促進することが知られている下記の前処置を施して、その効果を検討した。1)テープストリッピングによる角質層の除去、2)エタノールの塗布、3)オレイン酸の塗布。いずれの処置によっても、経皮免疫による血清中の抗原特異的抗体応答が有意に増強された。このことから、低分子物質について知られている経皮吸収促進処置は、高分子の抗原蛋白に対しても有効であることが示唆された。[内藤誠之郎]

### 2. インフルエンザ HA ワクチンへの応用

インフルエンザ HA ワクチン (A/New Caledonia/20/99) を、マウスの耳にパッチを貼付する方法で経皮免疫し、免疫応答を観察した。免疫したマウスの血清中および糞便中には、ELISA 法により、有意な抗原特異的抗体産生が確認された。ワクチンを投与する前にテープストリッピングを施した場合には、より強い抗体応答が観察された。インフルエンザ PR8 株を致死性チャレンジしたところ、テープストリッピングを併用して経皮免疫した群は、無

免疫コントロールに比べて有意に生残率が高かった。[内藤誠之郎、長谷川秀樹(感染病理部)]

## ・造血幹細胞に関する研究

### 1. 骨髄ニッチにおける造血幹細胞機能分子の解析

造血幹細胞の未分化性維持に必須な分子を同定する目的で、生殖幹細胞と造血幹細胞の両者に共通に発現している遺伝子の特定を行い、これまでに約 50 遺伝子の解析を行い、造血幹細胞に特異的に機能すると思われる分子、*Ctla2*、*Luc7l2*、*Serpina3g*、*Pitpnm1* を同定した。*In situ* hybridization 法による骨髄ニッチでの局在を明らかにし、siRNA を用いた遺伝子欠損造血幹細胞の血液学的解析を行うことにより、これら造血幹細胞に特異的に発現している分子の機能を明らかにする。[水上拓郎、倉光 球、滝澤和也、百瀬暖佳、益見厚子、浜口 功]

### 2. IRF-2 の生物学的機能について

IRF-2 (インターフェロン制御転写因子) の生物学的機能に関連して造血に及ぼす影響について検討している。IRF-2 は特定の配列に結合する転写因子であることから、血液分化誘導に関わる因子のプロモーター領域を検索した。いくつかの因子の ISRE-like 配列に IRF-2 が実際に結合するかを *in vitro* のアッセイで検討すると、CD41 のプロモーターに結合する領域が存在することを見いだした。レポーターアッセイにおいて IRF-2 が CD41 の ISRE-like site を介して転写を活性化することがわかった。マウスの bone marrow から stem cell をセルソーターで分離採取し、レトロウイルス発現系を用いて IRF-2 を高発現させると、対照と比較して巨核球細胞のコロニー増加が確認された。レンチウイルスベクターを用いて IRF-2 をノックダウンさせると、逆にコロニーの減少が認められた。これらのことから IRF-2 は巨核球分化に重要な役割を担っていることが明らかとなった。さらには IRF-2 ノックアウトマウスを用いて野生型と比較し IRF-2 と CD41 の関係について検討するとともに、その他の IRF-2 の造血系に対する影響を検討している。[益見厚子、浜口 功]

### 3. 先天性赤芽球癆原因遺伝子 RPS19 の造血幹細胞における機能解析

先天性赤芽球癆は造血幹細胞からの赤芽球の分化・増殖異常により重症の貧血症をおこす。また原因遺伝子 RPS19 が同定され、RPS19 の血球の分化・増殖における機能解析を行うことにより、病態解明につながると思われる。現在 RPS19 の遺伝子異常に伴う蛋白質発現プロセ

スの異常、RPS19欠損に伴う細胞周期異常(G0/G1期停止)を見だし、これらの異常が赤芽球増殖障害に關与することを明らかにした。今後これまで十分に明らかにされていない赤血球の分化メカニズムを解明するとともに、新しい治療法の開発を目指す。[倉光 球、浜口 功]

#### 4. 骨芽細胞特異分子 *Spp1* の機能解析

骨芽細胞に特異的に発現する *Spp1* が、造血幹細胞を維持している骨髄の造血への関与が示唆されている。*Spp1* の機能解析を行うために *Spp1* 遺伝子欠損マウスを解析したところ、新生時期の骨髄形成および造血ニッチ形成が遅延していることが明らかとなった。また、ニッチ形成が遅延した骨髄では造血幹細胞数が増加している事が明らかとなった。一方、骨髄移植モデルにおいても、*Spp1* が造血再建に先行して一過性に骨髄ニッチに高発現することから、*Spp1* が造血ニッチの初期形成に重要な働きをしているものと考えられた。今後 *Spp1* と他の niche 形成分子との相互作用を解明するとともに、造血幹細胞の体外増幅への応用を検討する。[水上拓郎、浜口 功]

#### 5. チロシンキナーゼ Tie1、Tie2 の機能解析

Tie ファミリーは造血幹細胞に特異的に発現している受容体型チロシンキナーゼである。造血 niche において Tie2 とそのリガンド Ang-1 との相互作用が、造血幹細胞の機能発現に重要であることが示唆されているが、その細胞生物学的なメカニズムは未解明な点が多い。これまでに血液細胞株を用い、Tie2 の過剰発現が Ang-1 の発現を亢進させた結果、Tie2 の活性を増強させることを見出した。このモデルを用いて、造血幹細胞が自身の機能調節を行うメカニズムを解析している。[百瀬暖佳、浜口 功]

#### 6. 悪性腫瘍マーカー HE4 の機能解析

卵巣がんの腫瘍マーカーとして臨床応用が進められている HE4 が急性骨髄性白血病細胞に強発現していることを、30 症例の患者サンプルから見いだした。ヒト造血幹細胞においても HE4 の強発現が認められた。これらのことから、HE4 が造血幹細胞の分化・増殖に極めて重要であることが示唆された。現在造血幹細胞での HE4 遺伝子の発現抑制 (siRNA 法) および強制発現操作を行うことにより、HE4 の機能を解析している。[倉光 球、浜口 功]

### ・ヒトレトロウイルスの研究

#### 1. HTLV-1 感染細胞における遺伝子 Ezrin の機能解析

DNA マイクロアレイ解析により、HTLV-1 感染細胞に

Ezrin 遺伝子が高発現していることが明らかになった。HTLV-1 感染細胞株にウイルスベクターを用いて siRNA を導入し、Ezrin の遺伝子発現を抑制した。その結果、in vitro で細胞の血管内皮細胞間隙の遊走を抑制することが示唆された。今後、SCID マウスを用いて臓器浸潤能への影響を解析する。[土田和歌子、倉光 球、浜口 功]

#### 2. ATL 発症高危険群の長期追跡と発病予防の検討

山口班のプロジェクト(JSPFAD)によるキャリア登録を平成 14 年秋から開始。17 年からは対象を、疾患の有無にかかわらず HTLV-1 感染者としたことで、「HTLV-1 感染者のバイオマテリアルリソースバンク構築」が可能になった。2007.3 までのべ 2,319 検体を登録し、プロウイルスコピー数の定量と、末梢血の感染細胞数が 20% を超えた検体に関してはクローナリティの解析を行った。プロジェクトでは 5 年間、登録を続け、さらに 5 年間フォローする。ATL 及び キャリア末梢血単核球の発現プロファイル解析は、ATL 細胞を特徴づける遺伝子を絞り込み、ATL 細胞の早期検出系の開発を進めている。ATL に対する治療として、新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤による試みも、臨床応用にむけて進んでいる。検体をゲノム解析に提供している。

班員の個別研究も継続している。1) アポトーシス誘発リガンドである TRAIL に対する ATL 細胞の感受性と治療法への可能性の検討。2) キャリアの、家族背景および感染細胞数の解析など。[山口一成]

### ・肝炎ウイルス感染の肝外病変

#### 1. 肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究

C 型肝炎ウイルス(HCV)感染による B 細胞動的变化についての免疫学的解析：HCV は、肝細胞表面の CD81 分子に結合し感染が成立すると考えられている。この CD81 分子は末梢血中の B 細胞にも発現している。HCV 感染と B 細胞の機能異常さらには B リンホーマへの癌化という現象とが關聯しているという報告がある。そこで、HCV 慢性感染者の血液より B 細胞を分離し、様々な免疫学的検討を行なうこととした。今年度は患者血液から B 細胞を高純度に精製する方法を検討し、満足いく結果が得られた。[水落利明、浜口 功、百瀬暖佳、飯野四郎(清川病院)、池淵研二(埼玉医大)、山口一成]

#### 2. HCV 感染による B 細胞リンパ腫発症機序の解析

HCV はヒトに持続感染し、肝細胞癌などの慢性疾患を引き起こす主要因子である。一方、慢性的な HCV 感染患者の末梢血からはクローナルな感染 B リンパ球がしばしば見いだされ、HCV 感染が B 細胞リンパ腫の発症にも關与し

ていることが示唆されているが、その機序は明らかでない。これまでに、B細胞を含むヒト末梢単核球へ、高効率に遺伝子を導入する条件設定が完了した。HCV感染とB細胞リンパ腫の関係を *in vivo* で解析する目的で、HCV関連遺伝子を導入したヒト末梢単核球を免疫不全マウスへ移植する準備を行っている。[百瀬暖佳、浜口 功、益見厚子、水落利明、岡田誠治（熊本大）、山口一成]

## 品質管理に関する業務、研究

### ・包括的遺伝子発現解析によるワクチンの安全性評価

ワクチンの毒性に関連する遺伝子群を DNA マイクロアレイの手法を用いて網羅的に解析し、毒性関連遺伝子を同定し、さらに血液生化学的、病理学的データと多角的に検討し、ワクチンの安全性の評価法を確立することを目標に行なっている。これまでに百日せきワクチンおよびインフルエンザワクチン（沈降新型インフルエンザワクチンを含む）の毒性に関する遺伝子群の同定に成功している。現在、毒性に関連した遺伝子の発現量を簡便かつ精度高く測定する方法を開発中であり、今後、これらの方法を安全性評価法として、実用化することを検討している。[浜口 功、水上拓郎、百瀬暖佳、内藤誠之郎、前山順一、益見厚子、倉光 球、山口一成]

### ・網羅的遺伝子発現解析によるインフルエンザワクチンの安全性評価

インフルエンザワクチンの迅速かつ高精度な安全性評価法を開発する目的で、全粒子ワクチン及びスプリットワクチン接種後のラット肺組織の DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、78 遺伝子を用いてインフルエンザワクチンを分類する事が可能となった。また、これらの遺伝子の中には免疫に関する遺伝子群が認められたため、肺組織を用いたアレイ解析では、安全性のみならず有効性についても検討する事が可能ではないかと推測された。今後はこれらの 78 遺伝子の機能を解明すると共により簡便な検出システムの開発を目指す。[水上拓郎、浜口 功、百瀬暖佳、内藤誠之郎、前山順一、益見厚子、倉光 球、山口一成]

### ・HCV コア抗原検出キットの性能評価に向けた研究

昨年度において作成した Genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a の各 HCV コア抗原を、現在市販中および開発中の HCV コア抗原検出キット（IRMA 法（ラジオイムノアッセイ）および蛍光酵素抗体法（FEIA））にて測定した。その結果、明らかに特定の genotype を持つ HCV コア抗原の検出感度が低いキットがあった。現在その原因の解析を試みてい

る。[水落利明、鈴木哲朗（ウイルス第二部）]

### ・HIV gag 抗原検出キットの性能評価のに向けた研究

これまでに作成を続けてきた様々な subtype（A, B, C, D, G）及び CRF（組換体）（CRF01\_AE, CRF02\_AG）の HIV-1 感染性分子クローンをを用い、ヒト細胞で産生させたウイルス粒子の抗原量を標準化し、これらの抗原を用いて国内で承認を受けて販売されている第四世代 HIV 抗原 / 抗体同時検出キットの性能評価を行なった。その結果キットによっては、国内で検出頻度の高い subtype の HIV-1 p24 抗原の検出感度が低いものがあった。今後、このような抗原パネルを用いて、体外診断用キットの性能評価が行うことが可能になった。[水落利明、巽 正志（エイズ研究センター）]

### ・HBs 抗体測定キットの性能評価

HBs 抗体価の正確な測定は、HB ワクチン投与効果判定において非常に重要である。現在国内で販売されている 8 種類の抗 HBs 抗体測定キットを用いて、抗 HBs 抗体国内標準品希釈系列検体を測定した。6 種類のキットにおいてはほぼ期待される測定値を示したが、1 種類のキットでは期待値に比較して約 1.5 倍、他の 1 種類のキットでは約 0.5 倍の測定値を示した。このような測定値が乖離する原因を検討中である。[小高千加子、水落利明]

### ・平成 18 年医薬品製造業一斉監視指導抜き取り試験検査品の核磁気共鳴(NMR)スペクトル法による確認試験

1. セファドロキシル [シロップ、3 社、3 ロット；カプセル、1 社、1 ロット]

<sup>1</sup>H-スペクトル：カプセルは添加物が微量であったため、妨害シグナルが無視でき、標準スペクトルと同様のスペクトルが得られた。シロップは、3.5ppm 付近の 1 プロトンのみが添加物の強いピークに隠れたが、残りの 7 種のシグナルは完全な分離ピークとして観測され、積分比も標準スペクトルと同様の値が得られた。4 検体の等量混合スペクトルは、分離されたすべてのシグナルが標準スペクトルと完全に一致し、同定確認することができた。

2. 注射用スルバクタムナトリウム - セフォペラゾンナトリウム [注射用、9 社、10 ロット]

<sup>1</sup>H-スペクトル：検体は、2 成分混合標準品とほぼ類似のスペクトルを与え、不純物の含量は微量と考えられた。1.0~7.5ppm で 全 18 種シグナル中、16 シグナルが分離ピークとして観測された。等量混合スペクトルでは、検体は標準品とすべてのピークが完全に一致した。<sup>13</sup>C-ス

ペクトルでは標準品と検体は 31 ピークが分離して観測され、等量混合スペクトルでは、検体と標準品のピークはすべて一致し、同定確認ができた。[ 矢野茂生 ]

#### ・微量たんぱく質定量法の開発

ワクチン等の製剤中の  $\mu\text{g}$  レベルの蛋白質含量を、ケルダール法により正確に定量できる方法は現在まで実現されていない。新しく開発した微量アンモニア定量法をケルダール法に応用した結果、アルブミン濃度で  $0.2 \sim 4.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  で直線性 ( $r=0.998$ ) を示し、ローリー法より一桁感度が良いことが確認された。製剤中の微量の蛋白質量を、多検体、連続定量できる自動分析システムの実現に向けて努力している。[ 矢野茂生 ]

#### ・新型インフルエンザワクチンたんぱく質含量測定法の検討

開発中の新型インフルエンザワクチンは全粒子ワクチンであり、その品質管理に、ローリー法によるたんぱく質含量試験が適用可能かどうかを検討した。4 種類の方法で測定を行ったところ、アルミニウムの影響はほとんどなく、ケルダール法を応用した新規微量定量法も含めて、我々の検討では、すべて同様の測定値が得られた。メーカー4 社の自家試験値との差異は、特に原液で顕著であったが、方法自体の問題とは考えにくく、ローリー法での測定が可能であることが示唆されたが、サンプルの処理方法などに更なる工夫が必要であると考えられる。[ 田中 ( 庄司 ) 明子、笠井道之、矢野茂生 ]

#### ・発熱試験法の見直しに関する研究

##### 1. ウサギへの投与量の見直し

臨床投与量の増加等に対応して、血液製剤の発熱試験法におけるウサギへの投与量を見直す必要が生じている。前年度に引き続き、人血清アルブミン (5%)、静注用免疫グロブリン、乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子、人ハプトグロビン、乾燥人フィブリノゲンについて、投与量の増量の是非を検討した。各製剤とも、投与量の増量により試験感度の増強が期待できるデータが集積された。

##### 2. エンドトキシン試験法の導入

前年度に引き続き、血液製剤の発熱試験法の代替法としてエンドトキシン試験 (BET) 法を導入できるかどうか検討した。

##### (1) 反応干渉因子試験の実施

製剤の BET 反応系への影響を評価するために、反応干渉因子試験を実施した。今年度は、BET 法の導入を検討す

る血液製剤 20 品目のうち 15 品目についてのデータが得られた。その結果、乾燥人アンチトロンピンを除いて、反応干渉作用は弱く、BET 法を導入できる可能性が高いことがわかった。乾燥人アンチトロンピンについては、複数社の製品で一貫してきわめて強い反応干渉作用が認められ、通常の方法では BET 法の適用は困難であると考えられた。

##### (2) 発熱増強活性試験の実施

前年度に引き続き、製剤によるエンドトキシン発熱活性に対する影響を評価するために、発熱増強活性試験を実施した。今年度は、BET 法の導入を検討する血液製剤 20 品目のうち 14 品目についてのデータが得られた。凝固因子系に関連する 4 製剤では、発熱反応を増強する傾向が認められたのに対して、免疫グロブリン系製剤では、逆に、発熱反応を抑制する傾向が認められた。このことから、凝固因子系の血液製剤については、エンドトキシン規格値を低く設定する必要があると考えられた。[ 内藤誠之郎、前山順一、益見厚子、浜口 功、落合雅樹・山本明彦・堀内善信 ( 細菌第二部 )、山口一成 ]

#### ・非エンドトキシン発熱性物質標品の作製

現在、発熱性物質標品として、グラム陰性菌由来のエンドトキシン (リポポリサッカライド) については国際標準品があるが、非エンドトキシン発熱性物質については標準品と呼べるものはない。このような標品は、細胞を用いる *invitro* 発熱試験法を確立する上で必須と思われる。そこで、グラム陽性菌由来の発熱性物質標品を作製するための基礎的な検討を行った。複数のグラム陽性菌の菌体浮遊る液中に、自発的に発熱性物質が放出されることを確認した。菌体を超音波処理することにより発熱性物質の放出は促進された。以上より、これらの菌体浮遊る液をグラム陽性菌由来発熱性物質標品の出発材料として利用できる可能性が示唆された。[ 内藤誠之郎、Ingo Spreitzer、Sven B Nicol、Thomas Montag-Lessing ( Paul-Ehrlich-Institut ) ]

#### 研修業務

1. Seminar on Sexual Transmitted Disease, Control of AIDS and ATL. 10 名の研修生に対しての講義と実習。Aug.1-2. 2006

2. 肝炎の疫学とその予防、治療対策セミナー。10 名の研修生に対しての講義と実習。Sep.8. 2006

3. Improvement of Blood Screening 研修コース 10 名の研修生に対しての講義と実習。January. 2007

## 血液・安全性研究部主催、共催のセミナー、研究会

- 2006年4月28日 第1回感染研細胞生物セミナー  
年森清隆(千葉大学 大学院医学研究院・形態形成学)  
精子形成の制御
- 2006年6月14日 第2回感染研細胞生物セミナー  
江良拓実(理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・幹細胞研究グループ) 発生研究を病気の治療へ
- 2006年7月18日 第3回感染研細胞生物セミナー 遠藤大二(酪農学園大学・獣医学部) 多種ウイルスを同時検出するためのプライマー設計
- 佐竹正博(東京都赤十字血液センター副所長) 血液センターから見た輸血感染症 学友会セミナー 2006年10月10日
- 2006年10月23日 第4回感染研細胞生物セミナー  
岩間厚志(千葉大学大学院医学研究院・細胞分子医学)  
ポリコム遺伝子 Bmi-1 による幹細胞のエピジェネティクス制御
- 2006年10月24日 第5回感染研細胞生物セミナー  
米村雄士(熊本大学医学部・輸血部) 骨髄細胞における肝分化能の検討
- 2007年2月5日 第6回感染研細胞生物セミナー  
大隈和(琉球大学大学院・免疫学分野) HIV感染に対する新規治療法及び改良型感染実験小動物モデルの開発
- 2006年4月 2007年3月(全11回 毎月1回第3土曜日) HTLV-1と疾患 連続公開講座 東京大学医科学研究所にて開催 文科省科研費 がん研究に係わる特定領域研究 ATL 発症高危険群の同定-発症予防を目指して(山口班)  
ワクチン研究会(2005年から不定期に開催している)
- 2006年4月24日 ワクチンなどバイオリジックス考-私見-(独)医薬品医療機器総合機構 生物系審査部長 田中克平
- 2006年6月23日 細胞性免疫誘導能を持つペプチド結合リポソームを応用したウイルスワクチンの創製 血液・安全性研究部 内田哲也
- 2006年8月29日 予防接種法におけるMRワクチン導入の経緯とWHO measles eliminationについて 感染症情報センター 岡部信彦
- 2006年10月17日 痘そうワクチンから学ぶこと-1つのケーススタディーとして- ウイルス第三部 木所 稔
- 2006年12月22日 経鼻接種インフルエンザワクチンの開発 感染病理部 長谷川秀樹
- 平成19年1月9日 サイトメガロウイルス感染症とその

対策 ウイルス1部 井上直樹

- 2007年3月2日 ドイツ研究報告-よもやま話 血液・安全性研究部 内藤誠之郎  
武蔵村山市民公開講座
- 2006年6月24日  
若手研究者による講演会
  - 1) 大槻紀之: ワクチンの検査と獣医師
  - 2) 鈴木里和: 耐性菌と院内感染
  - 3) 水上拓郎: 再生医学の未来と安全性
- 2006年11月11日  
小田切孝人: 鳥インフルエンザと新型インフルエンザ

## 発表業績一覧

### 誌上発表

- 欧文発表
  - 1) Taneichi M, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T: Induction of differential T-cell epitope by plain- and liposome-coupled antigen. *Bioconjugate Chemistry* 17:899-904, 2006.
  - 2) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T: Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8+ T-cells and induce potent antitumor immunity. *J. Immunol* 177:2324-2330, 2006.
  - 3) Kinoshita H, Abe J, Akadegawa K, Yurino H, Uchida T, Ikeda S, Matsushima K, Ishikawa S: Breakdown of mucosal immunity in the gut by 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Env. Health Prevent. Med.* 11:256-263, 2006.
  - 4) Nagata T, Toyota T, Ishigaki H, Ichihashi T, Kajino K, Kashima Y, Itoh Y, Mori M, Oda H, Yamamura H, Taneichi M, Uchida T, Ogasawara K: Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses. *Vaccine* 25:4914-4921, 2007.
  - 5) Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K, Mukai R: Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. *Virus Genes*. 35:281-8, 2007
  - 6) Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control. *Vaccine* 25:3355-3364, 2007



7) Nagamatsu G, Ohmura M, Mizukami T, Hamaguchi I, Hirabayashi S, Yoshida S, Hata Y, Suda T, Ohbo K: CTX family cell adhesion molecule, JAM4, expresses in stem cell- and progenitor cell-populations of both male germ cell and hematopoietic cell lineages. *Mol. Cell. Biol.* 26: 8498-8506, 2006

8) Kinoshita D, Hirota F, Kaisho T, Kasai M, Izumi K, Y. Bando, Y. Mouri Y, Matsushima A, Niki S, Han H, Oshikawa K, Kuroda N, Maegawa M, Irahara M, Takeda K, Akira S, Matsumoto M: Essential role of I $\kappa$ B kinase in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.*, 176: 3995 – 4002, 2006

## 2. 和文発表

1) 水落利明: 輸血後感染症の実態 医学のあゆみ 218(6):619-624, 2006

2) 岩瀬 敏、布施 晃、その他 16 名: ベッドレストによる宇宙飛行コンディションに対する人工重力の有用性: *Space Utiliz Res.* 22:192-195, 2006

3) 内藤誠之郎: 経皮免疫ワクチン . 臨床免疫・アレルギー科 47(2): 226-231, 2007.

4) 山口一成: 輸血医療・医学の新展開 はじめに 医学のあゆみ 第 1 土曜特集 218(6):555, 2006

5) 岡田義昭、梅森清子: 血漿分画製剤の安全性確保の現状 医学の歩み 218(6):625-630, 2006

6) 渡邊俊樹、上平 憲、山口一成編: HTLV-1 と疾患 280 頁 文光堂 2007

7) 山口一成: ATL・HTLV-1 研究の歴史 HTLV-1 と疾患 2-13 文光堂 2007

8) 渡邊俊樹、山口一成: 全国共同研究組織の変遷と JSPFAD の活動 コホート研究とバイオリソースバンク形成の現状 HTLV-1 と疾患 221-224 文光堂 2007

9) 水落利明、岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、山口一成: 国内で販売されている 10 種類の高感度キットを用いた異なる HBV genotype 由来 HBs 抗原の検出 (続報) 臨床検査 51(4):443-446.2007

## ・学会発表

### 1. 国際学会

1. Mizukami T, Hamaguchi I, Kuramitsu M, Momose H, Takizawa K, Okada S, Noce T, Yamaguchi K: Spp1(osteopontin) Is Essential for the Early Niche Formation in the Bone Marrow. 48th Annual meeting of American Society of Hematology, Florida, USA, December, 2006

2. Maeyama J, Isaka M, Yasuda Y, Tochikubo K, Hasegawa T,

Komiya T, Takahashi M, Yamamoto S Goto N: Studies on mucosal adjuvanticity of recombinant Cholera toxin B subunit on humoral and cellular immunity and Its safety evaluation.

The Second International Conference on Modern Vaccines Adjuvants & Delivery Systems 2006.10. London

### 2. 国内学会

1) 山口一成: ATL/HTLV 研究の現状と今後の課題。第 5 回 ATL MRD 研究会 学術講演会 2006.4.22 福岡

2) 岡田義昭: 血漿分画製剤の感染症対策 (シンポジウム) 第 54 回日本輸血学会 2006.6.9-11 大阪

3) 山口一成: 輸血とウイルス感染症 第 54 回日本輸血学会イブニングセミナー 2006.6.9-11 大阪

4) 青木 桜、内丸 薫、宇都宮與、魚住公治、菊池 博、上平 憲、山口一成、渡邊俊樹: HTLV-1 組み込み部位の塩基配列を用いた ATL 細胞検出系の確立と応用 第 46 回日本リンパ網内系学会 2006.6.29-7.1 名古屋

5) 笠井道之: MHC class 分子に拘束する胸腺上皮細胞内抗原の提示における autophagy の関与 第 16 回 Kyoto T Cell Conference 2006.6.2-3 京都

6) 山口一成: 輸血医療の新展開 より安全な輸血を目指してー第 20 回九州免疫血清研究会 特別講演 2006.7.8 沖縄

7) 大杉剛生、熊坂利夫、田中義照、崎尾 昇、石田尚臣、浦野 徹、岡田誠治、渡邊俊樹、山口一成、堀江良一、梅澤一夫: Tax 非発現 HTLV-1 感染細胞株 TL-0ml および MT-1 に対する DHMEQ の in vivo 抗腫瘍効果 第 43 回日本ウイルス学会九州支部会 2006.9.1-2 久留米

8) 倉光 球、濱口 功、水上拓郎、益見厚子、百瀬暖佳、滝澤和也、望月雅代、内藤誠之郎、山口一成: 先天性赤芽球口ウにおけるリボゾームたんぱく質 S19 の遺伝子変異に伴うたんぱく質発現と赤芽球細胞増殖抑制 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会 2006.10.6-8 福岡

9) 益見厚子、濱口 功、倉光 球、水上拓郎、百瀬暖佳、望月雅代、滝澤和也、内藤誠之郎、山口一成: インターフェロン制御転写因子 IRF-2 の血液細胞分化における影響について 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会 2006.10.6-8 福岡

10) 水上拓郎、濱口 功、倉光 球、滝澤和也、百瀬暖佳、内藤誠之郎、益見厚子、野瀬俊明、山口一成: ニッチにおける生殖幹細胞と造血幹細胞の共通の幹細胞システムの解明 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会 2006.10.6-8 福岡

11) 水上拓郎、今井順一、加藤博史、河村未佳、内藤誠

之郎、前山順一、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、浜口功、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：網羅的遺伝子発現解析によるインフルエンザワクチンの新しい安全性評価法開発の試み 第10回日本ワクチン学会総会 2006.10.21-22 大阪

12) 百瀬暖佳、今井順一、浜口 功、河村未佳、水上拓郎、内藤誠之郎、前山順一、加藤博史、益見厚子、倉光球、滝澤和也、望月雅代、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：百日せきワクチン投与に伴うラット肺での遺伝子発現解析 第10回日本ワクチン学会 2006.10.21-22 大阪

13) 浜口 功、今井順一、百瀬暖佳、河村未佳、水上拓郎、内藤誠之郎、前山順一、加藤博史、益見厚子、倉光 球、滝沢和也、望月雅代、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成：遺伝子発現解析を用いたワクチンの新しい安全性評価法確立の試み 第10回日本ワクチン学会学術集会 2006.10.21-22 大阪

14) 前山順一、小宮貴子、高橋元秀、山本三郎、後藤紀久：CpG-DNAであるOligo Bのジフテリアトキソイドに対する粘膜アジュバント作用 第10回日本ワクチン学会 2006.10.21-22 大阪

15) 種市麻衣子、石田英晃、梶野喜一、小笠原一誠、田中ゆり子、笠井道之、水口純一郎、内田哲也：リポソーム表面に化学結合された抗原はCD8陽性T細胞にcross-presentされて腫瘍免疫を誘導する 第36回日本免疫学会総会 2006.12.11-13 大阪

16) M. Kasai: Autophagy involves in the MHC class II restricted presentation of thymic self -antigens. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 2006.12.11-13 大阪

17) 前山順一、山本三郎、後藤紀久：The mucosal adjuvantivity of CpG-DNA on diphtheria toxoid and the Th1/Th2 balance 第36回日本免疫学会総会 2006.12.11-13 大阪

18) 小高千加子：マクロファージのアポトーシス死細胞貪食に伴う脈管新生因子の産生 第36回日本免疫学会総会 2006.12.11-13 大阪

19) Masumi A, Fukazawa H, Shimazu T, Yoshida Y, Yamaguchi K: Nucleolin is involved in IRF-2 dependent transcriptional activation 日本分子生物学会 2006.12.6-8 名古屋

20) 前山順一、井坂雅徳、山本三郎、後藤紀久：液性および粘膜免疫反応からみた CpG-DNA の粘膜アジュバント効果 第80回日本細菌学会総会 2007.3.26-28 大阪

21) 井坂雅徳、前山順一、松井秀之、立野一郎、長谷川

忠男：劇症型A型連鎖球菌分離株の宿主免疫回避機構について 第80回日本細菌学会総会 2007.3.26-28 大阪  
22) 益見厚子、濱口 功、倉光 球、水上拓郎、内藤誠之郎、山口一成：インターフェロン制御転写因子(IRF-2)の血液細胞分化における影響について 第127回日本薬学会 2007.3.28-30 富山

