

13. 血液・安全性研究部

部長 山口一成

概要

平成 16 年 4 月 1 日に新しく血液・安全性研究部に赴任してまいりました。これまで小室勝利部長の下で研究・業務に携わってこられた皆様に敬意を表したいと存じます。

私の赴任前に第 4 室、後藤紀久室長が退職され独立行政法人医薬品医療機器総合機構に移られ、また第 3 室、青木陽一郎研究員が退職、第 11 Bari 大学分子生物部門に移られました。両先生の今後のご発展、ご活躍を期待しています。

今年度の業績、業務実績は私の赴任前のことですが、多岐にわたっており、充実した研究が行なわれていたことを示していると思います。この伝統の上に、新たな業績を積み重ねることが私に課せられた任務だと思っております。全力を尽くしてまいります。

私自身は 3 月まで内科の医者として、白血病や悪性リンパ腫などの血液の腫瘍、感染症などの研究を専門にしていまいりました。ここでも血液の研究は続けていきますが、安全性の研究という新しい分野にもチャレンジできることを楽しみにしています。安全というキーワードはこれからの時代のキーワードですが、今ある血液製剤、ワクチンなどの安全性のみならず、再生医療、移植医療、遺伝子治療などの分野でも、華々しい話題の一方、その安全性に関して、研究者も、医療側も、それを受ける人たちも立ちすくんでいるというのが現状です。

私は安全性の確認のために、その手段として如何に先端テクノロジーを応用できるかに腐心したいと思っております。

今後とも血液・安全性研究部にご理解とご支援をお願いいたします。

研究業績

I. 生物学的製剤の品質管理に関する研究

1. 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

ア. 肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン(PW)への試み

PS-rCTB 結合ワクチンを、rCTB 存在下と非存在下で、BALB/c マウスに 4 回経鼻免疫した。その結果、PW 特異的血清 IgG、IgA、IgM 抗体価の上昇が認められた。しかし、rCTB を同時接種してもその効果はほとんど見られなかった。それに対して、気管支肺胞洗浄液中の PW 特異的粘膜 IgA 抗体価は、rCTB 添加時に有意に上昇した。[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)]

イ. インフルエンザ HA ワクチンへの試み

インフルエンザ A 型 HA ワクチン[A/ニューカレドニア(NC)/20/99(H1N1)由来、A 型 HA]を rCTB 存在下と非存在下で BALB/c マウスに 4 回経鼻免疫した。最終免疫後 9 日目に赤血球凝集阻止 (HI) 抗体価および中和 (NT) 抗体価測定用に血液を採取、14 日目にマウス馴化ウイルスを経鼻投与して 14 日間体重の増減と生死を観察した。その結果、非免疫マウスは 6 日目までに全て死亡し、4 日目まで生き残ったマウスの平均体重は 27%減少していた。A 型 HA 単独の場合は 4 日目までに 3 匹死亡し、生き残った 5 匹の体重の回復に大きなバラツキが見られた。それに対して、A 型 HA+rCTB で免疫されたマウスは 8 匹全てが生き残り、平均体重の減少は 10%前後に過ぎなかった。最終免疫後 9 日目の HI 抗体価と NT 抗体価は rCTB 存在下で有意に高い値を示した。以上の結果より、発症防御のために rCTB の同時投与が必要であることが分かった。[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)]

ウ. 細胞性免疫反応に対する rCTB の作用

rCTBをアジュバントとして用いた場合のモルモットにおけるBCG経鼻投与の条件を確立した。すなわち、前年度と同様にrCTB+BCG初回免疫後、rCTB単独で頻回投与するとき、投与液容量を変えたところ、皮下接種と同程度のPPDによるDTHが得られ、その値の分散が小さくなった。また、rCTB単独、PPD単独またはrCTB+PPDで経鼻投与し、その後にrCTB単独で頻回投与を行った場合、PPDおよびrCTBによるDTHは認められなかった。DTHを示すためには、初回BCG投与が必要であることがわかった。[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)]

エ. rCTBの*in vitro*での免疫細胞に対する作用

これまでの研究ではマクロファージを用いて検討してきたが、経鼻免疫ということを考え、今年度は鼻粘膜由来の単核球を用いた。これらの細胞を*in vitro*でLPS刺激した時、rCTB同時投与によってIL-1 β とTNF- α の産生が増強した。[前山順一、後藤紀久、井坂雅徳、安田陽子、朽久保邦夫(名古屋市大・医)]

オ. カニクイザルに対するrCTBの効果

ジフテリア・破傷風トキソイド(DT・TT)及びHBsワクチン抗原(HBs)をrCTBと共に経鼻投与したところ、TTでは血清抗毒素価において、HBsでは血清、唾液中の凝集価において、rCTB存在下で高い値が得られた。一方、DTにおいては、供給された全てのサルが高いジフテリア抗毒素価をもち、このため、DTに対する抗毒素価の様相については、明確な結果が得られなかったが、鼻腔、肺、膣洗浄液に関しては、rCTB存在下で高い抗毒素価が得られた。唾液に関しては、Vero細胞を用いた培養細胞法で細胞毒性を示したため明確な結果が得られず、今後の検討課題とした。[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)]

カ. カニクイザルを用いての安全性

rCTB添加群3頭のうち1頭の投与部位の鼻腔内嗅上皮(多列線毛上皮)に好酸球浸潤が認められた。しかし血清IgE抗体の上昇は見られなかった。頻回投与にもかかわらず、他の特記すべき所見はいずれの臓器においても認められなかった。検索対象臓器は、脳、小脳、脳幹、脊髄、視神経、鼻腔を含む上顎、扁桃、咽喉頭、三叉神経節、下顎・腋・鼠径・腸間膜・骨盤腔各リンパ節、胸腺、心、肺、肝、脾、腎、副腎、唾液腺、甲状腺、膵、胃、小腸、大腸、精巣(卵巣)等である。[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)]

キ. カニクイザルを用いての細胞反応

DT・TT・HBsで免疫したサルの扁桃細胞をワクチン抗原

で刺激した時のサイトカイン産生を調べたところ、rCTB添加群ではIFN γ の産生は認められず、非添加群で産生が認められた。また、高い抗体価を示した個体では抗原刺激による細胞増殖が認められた。[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

ア. IFN- β の粘膜アジュバント作用

前年度から引き続き、キトサン溶液を併用することを試み、今回は血清抗毒素価を測定した。その結果、キトサン単独でもDTに対する抗毒素価を示したが、さらにIFN- β により有意に高い抗毒素価を得られることがわかった。また、IFN- β の用量に依存して抗毒素価の上昇が認められた。[前山順一、後藤紀久、蔵田優子、櫻井信豪(東レ)]

イ. 脾臓細胞反応

粘膜免疫したマウスから得た脾臓細胞を*in vitro*で抗原刺激し、培養上清中のサイトカインを定量した結果、IFN- β に1%キトサンを添加した群にIL-5の有意な産生増強が認められた。抗原特異的脾臓細胞増殖反応を検討した結果、高いDT抗毒素価を示したところの、IFN- β に1%キトサンを添加して経鼻投与した群では*in vitro*でのDT刺激による脾臓細胞増殖が顕著であった。[前山順一、後藤紀久、蔵田優子、櫻井信豪(東レ)]

2. 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昨年度は、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レチノイド(Retinoic Acid; RA)の受容体(RXR)とCoreタンパクとの関係を検討してきた。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に比較してRAREの2-3倍高い活性が認められた。また、Core遺伝子(mRNA)を過剰発現させると(20、40、60、80pg) dose-dependentに網膜(retina)の形成不全が認められた。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。昨年まではアフリカツメガエル胚への Tat, mutant-Tat, Gag 等を接種し、その形態学的解析を行った。mutant-Tat, Gag では変化は認められなかったが、Tat では原腸陥入後の胚葉形成不全が認められた。その形成不全は tadpole (stage40) 期まで継続し、Tat 接種を受けた体側は原腸陥入不全のため中、内胚葉が体外へ露出したままであった。また、embryo の生存率は、stage45 までで0%であった。また whole-mount in situ hybridization にて Brachyury (Xbra: 中胚葉形成に必修で、かつ原腸陥入の発生期に特異的に発現する転写因子)をプローブに解析を行ったところ、Tat 接種側では Xbra の発現が特異的に抑制された。また、PCRにても他の中胚葉形成の遺伝子マーカーを含めた解析を行い(Xbra, goosecoid)、Tat 接種により、それらの発現が抑制されていることを示した。以上のことより、我々は Tat が発生初期 embryo における中胚葉形成を特異的に抑制していることを明らかにした。[青木陽一郎、布施 晃、小室勝利]

3. 計算機を活用した HIV の薬剤耐性評価

本研究プロジェクトでは、ジェノタイプ検査やフェノタイプ検査に並ぶ新しい薬剤耐性検査法として、「コンピュータショナル検査」を提案している。これを達成するために、以下の2点の検討をおこなった。(1) 既知データとの整合性確認による方法論の確立。(2) 臨床検体を中心とした実用性信頼性等の検討。

既知のデータについておよそ 30 例について解析し、方法的に分析可能であることが確認された。臨床材料については、敏速にウイルスの遺伝子配列を決定する方法を検討した。今後、臨床サンプルを用いて薬剤耐性を迅速に評価することを実施する。[星野忠次(千葉大学 薬学研究院)佐藤武幸(千葉大学医学部附属病院)杉浦 互(エイズセンター)、布施 晃]

4. 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

昨年引き続き、抗ガン剤の白血病に対する作用を解析するために、白血病細胞株 CMK に抗ガン剤を投与し、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)で解析している。その結果、AraC 処理では細胞死にいたる前に、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。現在、その遺伝子の挙動をタンパクレベルで分析中である。患者のガン細胞の遺伝子およびタンパクの変化の分析により、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ことを目的とする。[佐藤武幸(千葉大研究院)、関 直彦(千葉大研究院)、布施 晃]

5. 微小重力の生体防御に及ぼす影響IV :ストレスとウイルス感染の評価法の開発

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、ヒートショックたんぱく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だしている。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に起こるか検討する予定である。航空機あるいは落下装置での短時間微小重力下での予備実験として、まず、疑似微小重力環境を提供する尾部懸垂法を用いて実験を行った。ヘルペスウイルス感染の重篤化が認められた。本研究はストレス下でのウイルス感染増大の危険性を評価する方法の開発を目的とする。[布施 晃、吉田逸郎(旭川医大)、喜多正和(京都府立医大)]

6. 平成 15 年度抜取試験 市販抗生物質医薬品の核磁気共鳴(NMR)スペクトル法による確認試験

(1) セフメタゾールナトリウム(注射用)、リン酸クリンダマイシン(注射液)、ホスホマイシンカルシウム(経口剤)、及び硫酸ポリミキシンB(注射用、錠)の各製剤のNMR同定確認を試みた。測定装置: Varian UNITY-400/5mm φ 測定管; 400MHz (¹H)、100MHz (¹³C)、160MHz (³¹P); 測定温度: 27°C、30°C、又は室温(温度コントロールなし)。内標準物質としてDSSを 0.04%含んだ重水を標準品と検体に加えて溶解し、同一力価濃度の標準溶液、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を作成した。これらの溶液の 0.6mlを使用して、¹H-、¹³C-、又は³¹P-スペクトルの測定を実施し、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た。各検体の測定濃度と積算数: セフメタゾールナトリウム 30mg(力価)/ml、¹H(16)、¹³C(1024)。リン酸クリンダマイシン 150mg(力価)/ml、¹H(16)、¹³C(1024)。ホスホマイシンカルシウム 2.4mg(力価)/ml、¹H(32)、³¹P(128)。硫酸ポリミキシンB 40万単位/ml、¹³C-スペクトル(8608)。

(2) 結果

ア. セフメタゾールナトリウム: 5 社、10 ロット。¹H-スペクトル: 10 ロット全てについて、検体スペクトルは標準品スペクトルと同一のスペクトルパターンを与え、等量混合物スペクトルは標準品と完全に一致した。検体中の不純物ピークとして 3.85 ppmに弱いsingletが全ての検体に観測されたが、他に強い添加物や不純ピークは認められず、ほぼ表示成分のみの検体であることを確認した。¹³C-スペクトル: 標準

品、検体について、15本のシグナルが完全分離した同一パターンの特異性が観測され、等量混合物スペクトルは完全に一致した。1H-スペクトルの結果から予想される様に表示物質以外の強いピークは全く観測されなかった。

イ. リン酸クリンダマイシン:5社、6ロット。1H-スペクトル:標準品と検体はメチル、メチレンを多く含む 0.8 ppm~4.0 ppmの領域はほぼ同一のスペクトルを与えたが、4.2 ppm~4.8 ppmのシグナルパターンは全く異なっていた。しかし、6検体のスペクトルはいずれも非常に類似したスペクトルを与えた。6検体は、標準品スペクトルとほぼ類似の等量混合物スペクトルを与え、同一物質の確率が高いが、0.8 ppm~4.0 ppmの領域での未分離ピークの不確定部分があるため確実とは断定できなかった。尚、リン酸クリンダマイシン以外に、6検体全てに添加物のベンジルアルコール由来のシグナルが4.64 ppm、7.4 ppmに観測された。さらに5 ppm付近の水の強いシグナルのため、不明な領域が存在した。13C-スペクトル:標準品スペクトルで18本の完全分離ピークが得られた。73.0 ppm、73.4 ppm、80 ppm付近にJcpカップリングを有した3つのシグナルを観測した。検体スペクトルには標準品スペクトルピーク以外に添加物のベンジルアルコールのシグナルが、66.6 ppm、130.2 ppm、130.5 ppm、131.4 ppm付近に観測された。等量混合物スペクトルでは、標準品のピークは完全に検体ピークと一致した。

ウ. ホスホマイシンカルシウム:7社、13ロット(カプセル、錠、シロップ)。ホスホマイシンカルシウムは水に難溶性で、弱酸性水に易溶であるが、分解されやすいため、安定な中性条件で測定を実施した。希薄溶液のため、13C-スペクトル測定は実施しなかった。1H-スペクトル:検体は低分子(C₃H₅O₄PCa)であるため、スペクトルは単純かつ完全分離され、また賦形剤等のシグナルの重複がなかったため、1H-スペクトルのみで同定が完了した。標準品、検体は1.5 ppm(3H)、3.0 ppm(1H)、3.4 ppm(1H)に1次のカップリングによる多重線を与え、いずれもJ_{HP}が観測された。等量混合物スペクトルは全て一致した。添加物等は以下の様に分類できた。

検体	形状	製造者	乳糖	クエン酸	その他
1	シロップ	A	○	○	○
2	シロップ	B	○	○	○
3	カプセル	B	×	○	×
4	シロップ	C	○	○	○
5	カプセル	D	×	×	×
6	シロップ	D	○	○	○
7	カプセル	E	×	○	×
8	錠剤	F	×	×	trace
9	錠剤	F	×	×	trace
10	シロップ	F	○	○	○
11	シロップ	F	○	○	○
12	カプセル	G	×	○	×
13	シロップ	G	○	○	○

カプセルの5は添加物を全く含んでいなかったが、3と12はクエン酸を含んでいた。シロップ(7検体)はすべて3成分を含み、極めて類似したスペクトルを与えたことから、同一成分比の添加物の使用が推測された。31P-スペクトル:標準品と検体は1本のシグナルを与え、等量混合物は完全に一致した。

エ. 硫酸ポリミキシンB :3社、4ロット(注射用、錠)。1H-スペクトル:脂肪族アミノ酸ペプチド構造(C₅₅₋₅₆H₉₆₋₉₈N₁₆O₁₃)であること、多重重複スペクトルを与えるアルキル基が多いことなどから、同定確認に適さないと判断し、測定を実施しなかった。尚、1ロット(錠剤)の13C-スペクトルに強い不純物ピークが観測されたため、詳細に調べるため、この検体の1H-スペクトル測定を実施した。13C-スペクトル:標準品は2成分(ポリミキシンB1:C56, B2:C55)の混合物であり、さらに成分比が不明なため各成分と不純物由来のピークとの区別が困難と予想された。測定の結果、一部に未分離ピークが存在したが、大部分は分離ピークとして観測された。これらは強度が大きい48ピークと弱い17ピークの2つのピーク群に分かれ、主成分と微量成分由来と考えられた。これらを主ピーク、微量ピークと区別した。標準品スペクトルの全65ピークのうち、主ピークをポリミキシンB由来ピークとみなし、検体スペクトルの比較に使用した。4検体から得られた検体スペクトルには該当する48本のピークのすべてが観測された。等量混合物スペクトルでは、これらは主ピークと全て一致した。また微量ピーク17本のうち11本が、4検体の等量混合物スペクトルで完全に一致した。これらの結果から、検体が表示物質であると判断し、同定確認した。錠剤の1ロットは、42 ppm、172 ppmに非常に強いピークが観測された。この検体の1H-スペクトルを測定、検討した結果、この物質はグリシンと同定確認した。60 mg(グリシン)/100万単位/錠の含有が推定された。残りの注射用2ロットと錠剤1ロットには強い不純物ピークは観測されなかった。[矢野茂生]

7. プロテオーム研究—細胞内結合タンパク質のマススペクトルでの同定と解析

(1) インターフェロン転写制御因子の研究

昨年に引き続き IRF-2 のアセチル化の機能を詳細に検討するため、アセチル化 IRF-2 に結合する細胞性タンパク質を LC-MS/MS で同定した。このタンパク質は未修飾の IRF-2 よりアセチル化 IRF-2 に対して結合能力が高いことが確認された。[益見厚子]

(2) HCV タンパク質 NS5A の研究

C型肝炎ウイルスタンパク質 NS5A が IFN 抵抗性に関与しているなどの報告があったことから、NS5A 結合タンパク質の研究は広くなされている。我々も 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。結合タンパク質は Amphiphysin II というリン酸化タンパク質が主であることが確認され、これは 2003 年に他

の研究者が別法で見出したタンパク質と同一であったが細胞内において NS5A との結合性が強いことから、肝臓培養細胞における NS5A と Amohiohysin II の相互作用の生物学的意義を検討している。
[益見厚子]

II. 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

ーリポソーム結合抗原による細胞性免疫の誘導

3種類の脂質組成(飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸-PS 置換)のリポソームを作製し、MHC クラス I を介しての免疫誘導(細胞性免疫誘導)の可否について比較検討した。3種類の脂質組成のうち、不飽和脂肪酸からなるリポソームと OVA との結合物を培養中に添加したときに OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞から最も高値のサイトカインが産生された。また、飽和脂肪酸の PC を PS に置き換えることによって CD8 T 細胞への抗原提供が有意に増強された。[種市麻衣子、内藤誠之郎、加藤博史、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

ーリポソーム結合抗原経口投与の免疫系に及ぼす影響の検討

BALB/c マウスに蛍光標識 OVA あるいはリポソーム結合蛍光標識 OVA を経口投与した後、腸管の凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡下で抗原の局在を検討した。リポソーム結合 OVA はパイエル板 SED 領域以外に粘膜固有層に直接とりこまれることが明らかになった。また、OVA 喘息モデルにおいてリポソーム結合 OVA の経口投与は BAL 中の好酸球浸潤と血中 IgE 抗体産生を顕著に抑制した。[内藤誠之郎、加藤博史、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也]

3. 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

ーリポソーム結合リコンビナント HBs 抗原による免疫応答の誘導

リコンビナントHBs抗原とリポソームとの結合物を3種類の脂質組成(飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸-PS置換)を有するリポソームを用いて作製し、それぞれについてマウスにおけるHBs特異的免疫応答の誘導を検討した。上記3種類の脂質組成のリポソームを用いて作製したリポソーム結合HBsをマウスに免疫すると、抗HBs IgG抗体産生の誘導については3群の間に有意差が見られなかったが、HBs特異的遅延型過敏症反応(DTH)の誘導については不飽和脂肪酸からなるリポソーム群で他の2群と比較して有意に高値となった。また、いずれの場合においても抗HBs IgE

抗体産生は選択的に抑制された。[加藤博史、種市麻衣子、内藤誠之郎、田中ゆり子、内田哲也]

4. インテグラーゼによるDNA再構成

精製したインテグラーゼ存在下に、細胞のゲノムの一部と相同性のあるDNAを細胞に導入すると、ゲノムの当該部位にDNA再構成が高頻度に行われることを見出し、その機構の解明を行ってきた。今年度は、再構成の詳細について検討した。その結果、相同部分は0.5kbで十分であること、相同部分の近傍に繰り返し配列がある時は、その内部で組み替えが生じて、リピートには含まれた配列が欠失すること、数%程度の内部の塩基配列の差は相同性の検索に影響を及ぼさないこと等が明らかになった。[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。

抗原提示細胞の抗原提示能力はT細胞の機能発現の調査と、抗原提示細胞とT細胞との接着面に形成される免疫シナプスのような構造変化の調査で評価される。後者の調査に基づく抗原提示能力の評価法を確立する目的で、GFPを結合したZAP70(GFP-ZAP70)を発現するT細胞を用いて免疫シナプスの構造解析を行った。免疫シナプスのT細胞側において、免疫シナプス形成に関与する F-アクチンの凝集、シグナル伝達に関係するGFP-ZAP70、T細胞受容体epsilon鎖、およびチロシンリン酸化タンパク質の集積、液性メディエーターの放出に関係するMTOCの接近が認められた。さらに、免疫シナプスは時間とともに動的に移動することも確認できた。[笠井道之]

6. マウス胸腺細胞にアポトーシスを誘導した際の胸腺でのマクロファージ挙動

抗CD3抗体をマウスに投与すると CD3+CD4+CD8+胸腺細胞にアポトーシスが誘導されるが、死細胞はマクロファージによって速やかに貪食処理されることを報告してきた。今回、抗CD3投与後、胸腺にリンパ管が多数形成されることを観察した。マウス胸腺細胞のアポトーシスに伴い遊走してきたマクロファージは、死細胞貪食後ケモカインレセプターCCR7を発現していた。そして、マクロファージの多くはリンパ管から産生されるSLCに誘導され、リンパ管を介して胸腺から所属リンパ節へと移行することが示唆された。[小高千加子]

III. 血液製剤に関する研究

1. 検定に関する研究

(1) グロブリン製剤の抗補体性否定試験に用いる、至適ヒツジ赤血球の検討

抗補体性否定試験とは、製剤中に、一定以上の補体を消費する物質が存在しないことを確認するもので、ヒツジ赤血球の溶血により測定する。ヒツジ赤血球は個体差がある故、用いる補体、溶血素の組み合わせにより試験自体が不成立となることが多々あり、試験に適合したヒツジ赤血球を得ることは容易ではない。そこで、合計 20 頭のヒツジ赤血球を用いて、試験に適した血球を検討した。その結果、補体価(CH50)は 200-251 であり、run control 製剤の抗補体価は 17-23(<20 で合格)であり、試験に適合したヒツジは数頭のみであった。よって、試験には同一個体の赤血球を定期的に使用することにより、試験不成立を回避できると考えられる。[梅森清子、岡田義昭、小室勝利]

2. プリオン病の研究

(1) in vitro 感染系の試み

プリオン病の感染性の評価にマウスが多く使用されているが、動物愛護や結果がでるまでに時間を要することなどから in vitro 感染系の確立を目的に研究を実施した。Scrapie 感染マウスとBSE感染牛からの脳乳剤を神経系や肺ガン由来の細胞株に感染させた。約一ヶ月間継代後、プロテナーゼK (PK) 処理しウエスタンブロットにてプリオンを検出した。神経系以外の細胞株からも感染を確認することができた。感受性の検討は継続中である。[岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、小室勝利]

(2) 血球系におけるプリオン感染細胞の解析

プリオン病が血液製剤を介して感染するのか、重要な問題である。Scrapie 感染マウス由来脾臓と骨髄(感染病理部 長谷川博士より供与)からプリオンの検出を行った。脾細胞を Thy-1、CD11b、CD19 に精製しウエスタンブロットを行い、CD11b に強いシグナルを認めた。また、骨髄においてもプリオンを検出することができた。B 細胞以外にも特定の細胞群にプリオンが蓄積している可能性が示された。骨髄細胞からも検出されたことから輸血用血液と同等のドナーの選択が必要であることが示唆された。[岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、小室勝利]

(3) 組換えヒト STII タンパクの発現とヒトプリオンタンパクとの結合に関する研究

STII はco-chaperonin protein のひとつであるが、その約6%は細胞表面に分布し、プリオンタンパクと結合して神経系細胞の細胞死を阻止することが知られている。本研究では異常プリオンタンパクの感染におけるヒトSTII の関与を検討することを目的とし、組み換えヒトSTII-HisTagタンパク発現プラスミドを作製し、COS7 でトランジェントに発現させたヒトSTII とPrP^Cとが結合することを示唆する結果を得た。[水沢左衛子、岡田義昭]

3. 血液を介するウイルスの研究

(1) パルボウイルス B19 感染系を用いた血液製剤の中の

和抗体の解析

パルボウイルス B19 (B19) に対する抗体は成人の 50-60%が陽性のため原料血漿中に常に存在する。グロブリン製剤でのB19抗体を測定したところ通常のグロブリン製剤ではほぼ一定の抗体が存在した。しかし、特殊免疫グロブリン製剤では原料血漿を構成するドナーが少ないためか抗体価が低い製剤が存在した。高濃度の B19 が混入した場合には感染を起こす可能性があるため高濃度の B19 陽性血漿を排除する必要がある。[岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、小室勝利]

(2) ヒトパルボウイルス B19 非構造タンパク NS1 の細胞障害機構に関する研究

B19 ウイルスDNAは、全長 5.6 kb により構成され、C末側半分はウイルスキャプシド蛋白 VP1,VP2を、N末側半分は非構造蛋白 NS1 をコードする。NS 蛋白はウイルスの複製に関与する調整蛋白であると考えられているが、大量に発現されると、細胞障害作用を有すると考えられている。そこで、NS1 による細胞毒性のメカニズムを解析することを目的とし、NS1 の真核細胞内への誘導発現系の確立を試みている。また、大腸菌株 BL21DE3 を用いて、全長 NS1、及びC末 NS1 のリコンビナント蛋白を作製し、抗 NS1 ポリクローナル抗体を作製中である。[梅森清子、岡田義昭、水沢左衛子、小室勝利]

(3) HBV genotype のパネルの作成

HBVではAからHまでのgenotypeが存在するが、genotype間での核酸増幅検査の感度評価やS抗原の抗原性を評価するための検体を充分量確保することは困難である。そこで恒常的に同一の遺伝子を持ち、同一のS抗原を得るために、PCRによって全長のHBVを増幅し、genotype毎のクローンのパネルを整備した。さらに、細胞に遺伝子導入することで培養上清中にS抗原が分泌されるのでS抗原のパネルとしてもAからGまで作成することができた。整備されたパネルを用いることで、日本では入手困難なgenotypeの感度評価等が可能になった。[岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、小室勝利]

IV. 標準感度パネルの作製

1. WHOによる新規HBsAg国際標準品制定のための collaborative studyへの参加

新規 HBs 抗原 WHO 国際標準品の制定に参画し、またそれを基準にして作製した HBs 抗原リファレンスパネルの評価作業を行った。その結果、2003 年 10 月に開かれた WHO の会議において、新規標準品はサブタイプ adw2, genotypea であり、その抗原量は 33IU/vial と決定された。従来の国際標準品との比較を国内で販売されている種々の測定キットを用いて行い、その整合性を確認した。[水落利明]

血液・安全性研究部

2. HBsAg 抗原量表示法の統一に向けた国内標準感度パネルの作製

これまでは ng と IU(International Unit)が混在していた HBs 抗原量の表示法を、traceability の観点からも IU に統一することを提言してきたが、この問題も上記の 2003 年 10 月の WHO 会議で討議され、今後は EU および米国も含めて全て IU 表示に統一されることとなった。これを受けて国内で販売されている HBs 抗原検出用体外診断薬の添付文書に記載されている最小検出感度についても表記法の統一をはかるべく、HBs 抗原国内標準感度パネルの作成に向けた準備を行った。[水落利明]

3. WHO による抗 D 抗体国際標準品制定のための collaborative study への参加

NIBSCより送付された国際標準候補品と国内参照品とを用いて凝集反応を行い、その結果(力価)を報告した。世界各国(13カ国)20カ所の研究施設のデータを集積し、それらをもとにして、今後抗D抗体国際標準品の力価が決定されることになっている。[笠井道之、水落利明]

1. 平成15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Ⅷ因子	53
人免疫グロブリン	7
乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン	3
乾燥スルホ化人免疫グロブリン	69
乾燥pH4処理酸性人免疫グロブリン	4
pH4処理酸性人免疫グロブリン	8
乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン	15
ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	53
乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	41
抗破傷風人免疫グロブリン	4
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	2
乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ	48
人ハプトグロビン	9
計	321
抜取検査	
乾燥人血液凝固第Ⅸ因子複合体	4
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子-原血漿が 50 人分以上の場合	4
ヒスタミン加人免疫グロブリン(乾燥)	2
計	10
一般依頼検査	
遺伝子組換え血液凝固第Ⅷ因子	12
人免疫グロブリン(バルボウイルス検査)	0
計	12
合計	343

2. 平成 15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	3
乾燥抗 HBs 人免疫グロブリン	3
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	3
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	5
抗 B 血液型判定用抗体	5
抗 D 血液型判定用抗体	7
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)	1
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)	2
ビーズ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	30
依頼検査	
HBs 抗原検出用体外診断キット	2
HCV 抗体検出用体外診断キット	2
ゲルカラム遠心凝集法	5
計	9

血液・安全性研究部

標準品の供与	
参照抗 HBs 人免疫グロブリン(1本)	1
HBs 抗原国内標準品(4本)	2
計	3
特別審査	
抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリン 力価試験(#2003401)	1
計	1
合計	53

3. 平成15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	5
含湿度試験	131
たん臼窒素定量試験	208
たん臼質定量試験	102
ホルムアルデヒド定量試験	142
チメロサル定量試験	2
ヒスタミン定量試験	2
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	0
計	603
特審・収去・依頼	
含湿度 水分定量法(KF法)	59
乾燥重量法	32
ガスクロ法	0
水素イオン濃度試験	0
たんぱく窒素定量試験	10
吸光度(紫外吸収)	0
旋光度(特審)	0
赤外吸収(収去)	27
紫外吸収(特審)	0
NMR(収去)	33
残留溶媒(ガスクロ法)	0
HPLC(特審)	3
フェノール定量試験(特審)	1
多糖含量試験(特審)	1
計	166
合計	769

4. 平成15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	10	10	0	0	0
5	4	4	0	0	0
6	14	13	0	1	0
7	3	3	0	0	0
8	7	7	0	0	0
9	51	51	0	0	0
10	22	22	0	0	0
11	9	9	0	0	0
12	12	12	0	0	0
1	2	2	0	0	0
2	13	13	0	0	0
3	23	23	0	0	0
計	170	169	0	1	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	95	95	0	0	0
5	31	30	0	1	0
6	119	118	0	1	0
7	43	43	0	0	0
8	62	62	0	0	0
9	104	102	0	2	0
10	84	81	0	3	0
11	48	48	0	0	0
12	93	91	0	2	0
1	42	37	0	5	0
2	51	51	0	0	0
3	117	115	0	2	0
計	889	873	0	16	0

研究業績一覧

(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	21	21	0	0	0
6	31	31	0	0	0
7	33	33	0	0	0
8	35	35	0	0	0
9	26	26	0	0	0
10	30	30	0	0	0
11	30	28	0	2	0
12	36	35	0	1	0
1	32	32	0	0	0
2	36	36	0	0	0
3	28	28	0	0	0
計	367	364	0	3	0

I. 論文発表

1. 欧文発表

- 1) T. Ikeda, M. Kasai, J. Suzuki, H. Kuroyama, S. Seki, M. Utsuyama, and K. Hirokawa. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 47217-47222, 2003.
- 2) Y. Tanaka, M. Kasai, M. Taneichi, S. Naito, H. Kato, M. Mori, M. Nishida, N. Maekawa, H. Yamamura, K. Komuro, and T. Uchida. Liposomes with differential lipid components exert differential adjuvanticity in antigen-liposome conjugates via differential recognition by macrophages. *Bioconjugate Chem.* 15, 35-40, 2004.
- 3) H. Kuroyama, T. Ikeda, M. Kasai, S. Yamasaki, M. Tatsumi, M. Utsuyama, T. Saito and K. Hirokawa. Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated ZAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 315(4), 935-941, 2004.
- 4) Uchida, T. Stx-liposome conjugates as candidate vaccines. *Drugs of Today* 39:673-693, 2003.
- 5) Torihata H, Ishikawa F, Okada Y, Tanaka Y, Uchida T, Suguro T, Kakiuchi T. Irradiation up-regulates CD80 expression through two different mechanisms in spleen B cells, B lymphoma cells, and dendritic cells. *Immunology* 112:219-227, 2004.
- 6) Sunohara M, Sato T, Sato I, Sato S and Fuse A, Modulation mechanism of *c-mpl* gene expression in human megakaryoblastic CMK cells. *Dentistry in Japan*, in press
- 7) Isaka, M., Yasuda, Y., Taniguchi, T., Kozuka, S., Matano, K., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. & Tochikubo, K. Mucosal and systemic antibody responses against an acellular pertussis vaccine in mice after intranasal co-administration with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine*, 21(11-21), 1165-1173, 2003.
- 8) Yasuda, Y., Isaka, M., Taniguchi, T., Zhao, Y., Matano, K., Matsui, H., Morokuma, K., Maeyama, J., Ohkuma, K., Goto, N. & Tochikubo, K. Frequent nasal administrations of recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) containing tetanus and diphtheria toxoid vaccines induced antigen-specific serum and mucosal immune responses in the presence of anti-rCTB antibodies. *Vaccine*, 21(21-22), 2954-2963, 2003.
- 9) Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Tochikubo, K., Yamamoto, S. & Goto, N. Effects of recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) on cellular immune

responses : Enhancement of delayed-type hypersensitivity following intranasal co-administration of *Mycobacterium bovis*-BCG with rCTB. *Microbiol. Immunol.*, 48(6), 457-463,2004.

- 10) Isaka,M., Komiya,T., Takahashi,M., Yasuda,Y., Taniguchi,T., Zhao,Y., Matano,K., Matsui,H., Maeyama,J., Morokuma,K., Ohkuma,K., Goto,N. & Tochikubo,K. Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine. *Vaccine (in press)*
- 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.* 23, 8295-8305, 2003

2. 和文発表

- 1) 布施 晃: 医薬品等ウイルス安全性試験の具体的対応策. *PDA Journal of GMP and Validation in Japan.* 5 61-64, 2003
- 2) 曲田純二、布施 晃: バイオ医薬品のウイルス安全性に対する最近の欧米の動向. *PDA Journal of GMP and Validation in Japan.* 5 76-80, 2003
- 3) 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 15 年度創薬ヒューマンサイエンス総合研究事業、報告書。
- 4) 益見厚子、インターフェロン制御転写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 15 年度報告書
- 5) 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 13-15 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

監. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Fuse A, Sato T: Modulation of human c-MPL gene expression by thrombopoietin through protein kinase C. The 8th Meeting of European Haematology Association, June12-15, Lyon, France 2003.
- 2) Fuse A: Modulation of human c-MPL gene. REGA International Symposium November 11-12, 2003, Leuven, Belgium 2003.
- 3) Atsuko Masumi, Yoshio Yamakawa, Hidesuke

Fukazawa, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro. Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation. *International Society for Interferon and Cytokine Research.* Cairns, Australia, October 25-30, 2003.

国内学会

- 1) Odaka, C.:Fate of apoptotic cells during phagocytosis by macrophages
(The 16th Naito Conference、平成 15 年 10 月、神奈川県逗子市)
- 2) 小高千加子、水落利明: 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. 第 33 回日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月、福岡市
- 3) 笠井道之、池田通: 抗原提示細胞内H2-DM陽性 lysosomal compartmentの可視化. 第13回 Kyoto T Cell Conference 2003年6月
- 4) 田中ゆり子、種市麻衣子、内藤誠之助、加藤博史、笠井道之、内田哲也: フォスファチジルセリン含有によって増大するリボソームのアジュバント効果.
第 33 回 日本免疫学会総会・学術集会 2003 年 12 月)
- 5) 笠井道之、池田通、水落利明: 抗原提示細胞内H2-DM 陽性lysosomal compartmentの可視化と分離.第33回 日本免疫学会総会・学術集会 2003年12月
- 6) 内田哲也: リボソーム結合抗原によって誘導され T 細胞非依存的 IgE 産生抑制 第 53 回 日本アレルギー学会総会、2003 年
- 7) 加藤博史、内藤誠之助、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也: 修飾抗原と非修飾抗原によって修飾される T-cell epitope の違いについて 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年
- 8) 内藤誠之助、田中ゆり子、加藤博史、種市麻衣子、内田哲也: リボソーム結合 OVA に対する MHC 非依存的、strain 拘束性免疫応答 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年
- 9) 種市麻衣子、加藤博史、田中ゆり子、内藤誠之助、内田哲也: T-cell epitope の異なる CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカインプロファイルの違いについて 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年
- 10) 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. BCG との同時経鼻投与でみた組換えコレラ毒素 B サブユニットの細胞性免疫増強効果. 第 76 回日本細菌学会総会(熊本)、4/1-3, 2003.
- 11) 趙 艶秋、井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、松井秀之、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、後藤紀久、朽久保邦夫. 組換え CTB を粘膜アジュバントとするインフルエンザワクチンの経鼻接種. 第 76 回日本細菌学会総会(熊本)、4/1-3, 2003.
- 12) 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、近田俊文、高橋元秀、後藤紀久、

- 枋久保邦夫. 組換えCTBを粘膜アジュバントとしたDTP混合経鼻投与の有効性評価. 第76回日本細菌学会総会(熊本)、4/1-3, 2003.
- 13) 蔵田優子、櫻井信豪、前山順一、後藤紀久. マウス経鼻投与における IFN- β のアジュバント作用の増強について. 第68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、7/23-24, 2003.
- 14) 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、枋久保邦夫、後藤紀久. 細胞性免疫増強効果からみた鼻粘膜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. 第7回日本ワクチン学会学術集会(名古屋)、10/18-19, 2003.
- 15) 山本三郎、山本十糸子、前山順一、後藤紀久、McMurray, D.N. BCG 経鼻免疫モルモットの抗結核作用と CpG DNA の免疫増強効果. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会(福岡)、12/8-10, 2003.
- 16) 前山順一、井坂雅徳、安田陽子、枋久保邦夫、山本三郎、後藤紀久. *B. brevis* で産生させた組換えコレラ毒素Bサブユニットの粘膜アジュバント効果. 第33回日本免疫学会総会・学術集会(福岡)、12/8-10, 2003.
- 17) 布施 晃: 医薬品等ウイルス安全性試験の具体的対応策. 日本 PDA 第 11 年会特別講演、平成 14 年 10 月、東京
- 18) Atsuko Masumi, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第 68 回日本インターフェロン、サイトカイン学会、北里大学、2003 年 7 月
- 19) Atsuko Masumi, Yoshio Yamakawa, Hidesuke Fukazawa, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro. Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第 76 回日本生化学会、パシフィコ横浜 10 月
- 20) Atsuko Masumi and Katsutoshi Komuro Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第 26 回日本分子生物学会、神戸 12 月
- 21) 岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子: 免疫グロブリン製剤におけるパルボウイルス B19 の解析. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、2003 年 10 月、京都市。
- 22) 岡田義昭、梅森清子: MT-2 細胞の fractalkine に対する遊走性の解析. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月、福岡