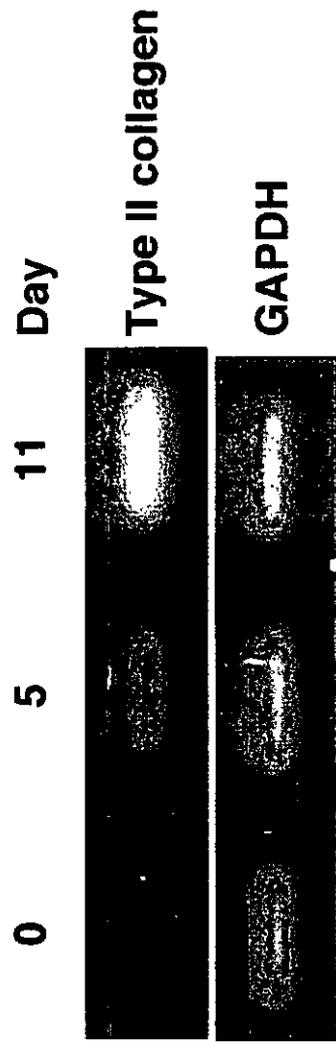


Insulin (10 µg/ml)



PLLA (100 µg/ml)

図38 II型コラーゲン遺伝子発現の経時変化

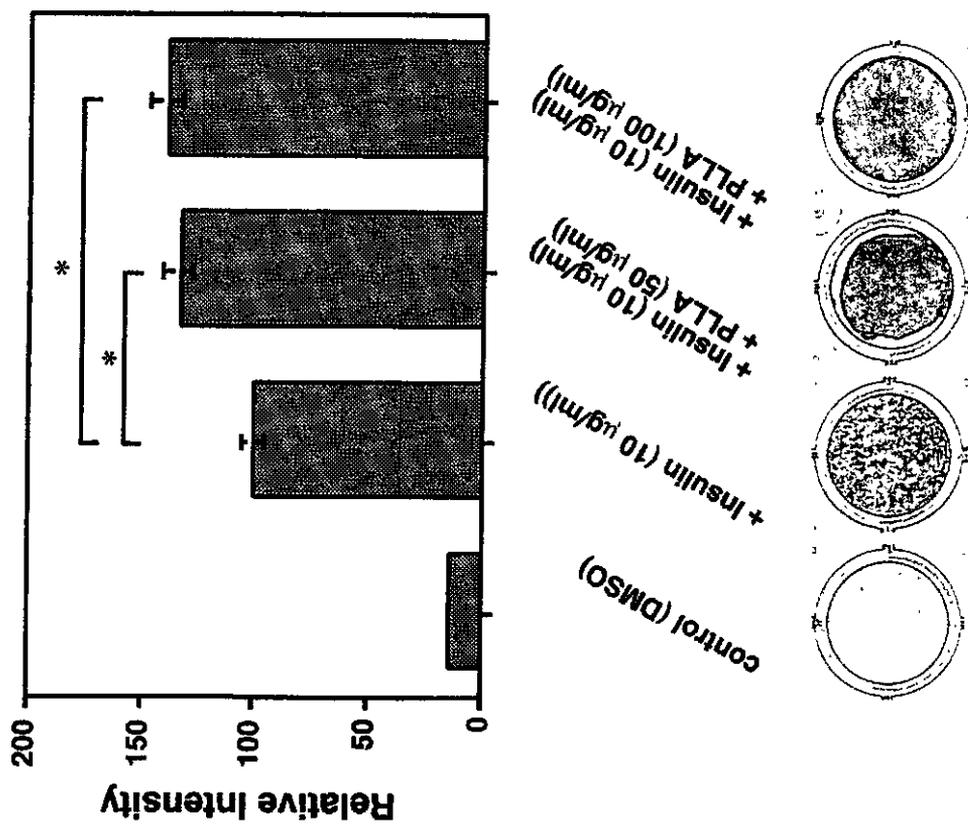


図39 プロテオグリカン発現におけるインスリンとPLLAの相加的促進効果

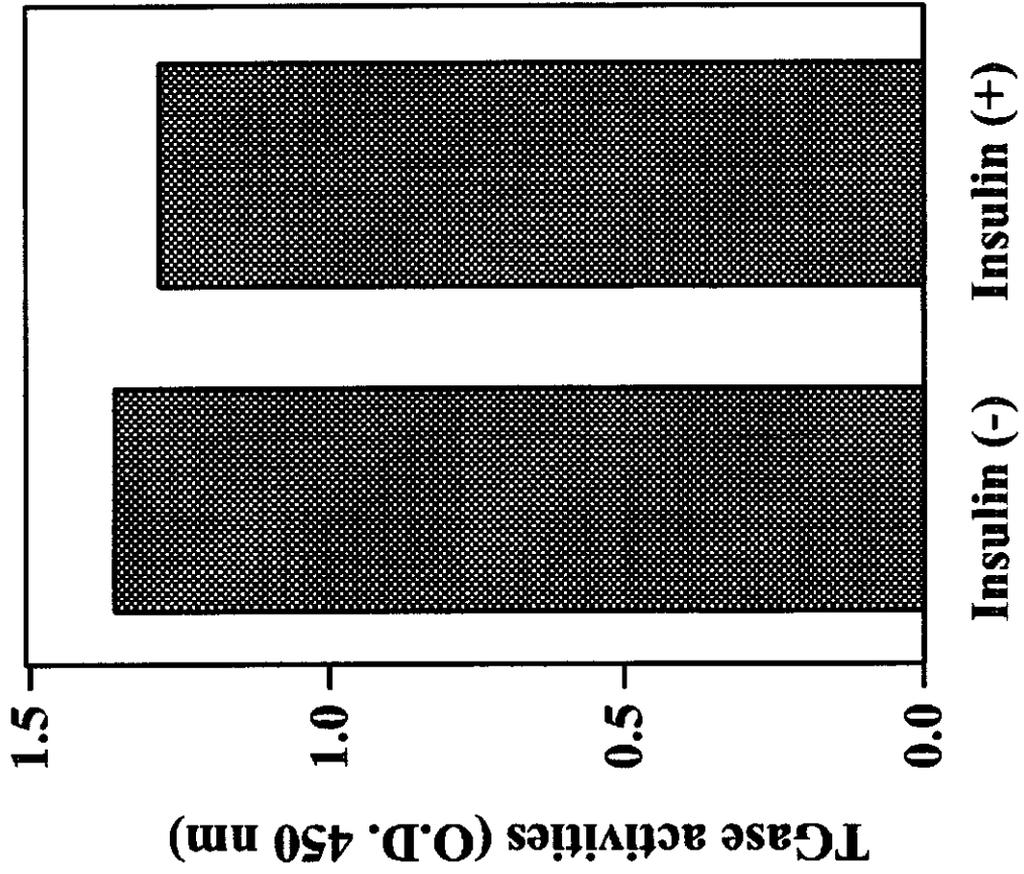


図40 ATDC5細胞のトランスグルタミナーゼ活性測定

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総合・分担研究報告書

細胞・組織加工医薬品等の安全性等に関する研究

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部長

【研究要旨】 細胞・組織加工医薬品等の品質や安全性等の確保のための基盤技術開発を目的として、以下のような研究を行った。(1) ウイルス等の感染性危険因子の高感度検出のための基盤技術の開発や評価方法に関する研究として、ポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮技術に関する検討を行った。PEI 磁気ビーズは、主としてエンベロープウイルスに対して優れたウイルス濃縮効果を示すこと、また 100 倍から 1,000 倍の濃縮効果をもたらすと同時に検出限界の大幅な高感度化が可能であることを見出した。一方、スルホン酸磁気ビーズは PEI 磁気ビーズで濃縮できなかった非エンベロープウイルスにも適応可能であり、検出限界の高感度化も可能であった。これらのウイルス濃縮法は、遠心操作も必要なく短時間の操作でウイルスを濃縮することができるもので、簡便性・迅速性にも優れており、これらの濃縮法を組み合わせることにより、ウイルス検出のための核酸増幅法 (PCR) の高感度化が可能であることが示された。さらに、ウイルス感染性の迅速・高感度検出法 (infectivity PCR) の新規開発を行った。本法は、指向性細胞にウイルスを感染させた後、新たに開発したポリスチレン球を用いた核酸抽出法と PCR を組み合わせることにより細胞内ウイルスゲノムを迅速・高感度に検出しようとするものである。数種のウイルスについて検討した結果、すべてのウイルスに関して細胞変性を指標とする方法に比べて非常に高感度に感染性ウイルスを検出できることを明らかにした。(2) 染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発を目指して、モデル細胞として HL-60 細胞及びその亜株である高増殖性 HL-60RG 細胞を用いて検討を行った。G-バンド染色、マルチカラー-FISH (m-FISH)、CGH 法を組み合わせた染色体解析により、HL-60RG 細胞では 9 番染色体 9q13 部位に 8 番染色体の一部が挿入されていることを見出した。さらに、c-myc プローブと G-バンド解析を組み合わせることで、第 8 染色体の c-myc を含む領域が増幅して第 9 染色体に挿入されていることを明らかにした。以上の結果より、G-バンド解析、CGH 解析、m-FISH 解析、オンコ遺伝子 FISH 解析の組み合わせは、細胞の遺伝的変異を検出するのに非常に有用であると考えられた。(3) 細胞由来タンパク質プロファイルを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発を目指して、モデル細胞を用い、培養上清に分泌される増殖因子等をヘパリンカラムで濃縮し、イモビリン 2 次元電気泳動法により 2 次元上で分離したスポットを質量分析により解析する方法を確立した。(4) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細

胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究として、ヒト末梢血及び臍帯血 AC133 陽性細胞を用いた血管内皮細胞への分化誘導系を確立し、その分化誘導初期に出現する CD31 強陽性細胞が血管内皮細胞への分化能を持つことを見出し、CD31 の発現が血管内皮分化能を持つ細胞の優れた特性指標となることを見出した。

研究協力者

押澤 正 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官
豊田淑江 国立医薬品食品衛生研究所
支援研究員
岩田明子 国立医薬品食品衛生研究所
技術補助員
佐藤功栄 埼玉県赤十字血液センター
室長

A. 研究目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞・組織加工医薬品・医療用具（細胞・組織加工医薬品等）の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医療に用いることができれば、これらはがん、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。本邦においても、様々な形での細胞・組織加工医薬品等の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るために検討すべき課題は多い。

本研究では、細胞・組織加工医薬品等の品質、安全性等を確保するために、1) ウ

イルス等の感染性危険因子を排除するための基盤技術の開発や評価方法に関する研究、2) 多重標識FISH等を利用した染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発研究、3) 細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発に関する研究、4) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究などを行う。

3年間の研究を通じて、1) 核酸増幅法（PCR）によるウイルス検出の高感度化を目指したウイルス濃縮法の開発とウイルス除去技術の開発、さらに、感染性ウイルスの高感度検出法の確立を目指し、指向性細胞にウイルスを感染させた後、新規核酸抽出法と PCR を組み合わせることにより細胞内ウイルスゲノムを高感度・高精度に検出する方法（infectivity PCR）の開発、2) 染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発の基礎検討として、G-バンド解析、c-myc プローブを用いた FISH 解析を組み合わせた染色体解析の有用性についての検討、3) 細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発のための基礎として、イモビリン 2 次元電気泳動法による細胞培養上清の高解像度分離とペプチド・マ

ス・フィンガープリンティング (PMF) を用いる細胞由来タンパク質プロフィールの解析手法に関する研究、4) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質の評価方法に関して、臍帯血や末梢血由来 AC133 陽性細胞の血管内皮細胞への誘導とその特性解析の検討等を行った。

B. 研究方法

1. ウイルスのポリエチレンジイミン及びスルホン酸磁気ビーズによる濃縮

ポリエチレンジイミン (PEI) 磁気ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズに、水溶性カルボジイミド存在下、平均分子量 10,000 の PEI をカップリングして作製した。同様にスルホン酸基の導入は、デキストラン硫酸を磁気ビーズに結合させて行った。

通常の実験では、100 μ L (5mg の磁気ビーズを含む) の PEI 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。10 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。

2. 1 PCR 及び RT-PCR

抽出した DNA ウイルスゲノムの検出は、表 1 のプライマーの組み合わせを用いて 94 $^{\circ}$ C、30 秒 ; 56 $^{\circ}$ C、45 秒 ; 72 $^{\circ}$ C、60 秒を 35 サイクルする PCR 反応で行った。RNA ウイルスの場合には、抽出した

ウイルスゲノム全量を TE 液に溶解後、トリウイルス逆転写酵素を用いて 42 $^{\circ}$ C、45 分間の cDNA 合成を行った。合成した cDNA を鋳型として上記と同様の PCR 反応を行い、増幅した。増幅産物は、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロミドないしはサイバークリーンによる染色後、目的バンドを確認した。

抽出したウイルスゲノムを定量するためにリアルタイム PCR 及びリアルタイム RT-PCR 反応を行った。用いたプライマーとプローブのセットは表 2 の通りである。プローブの記載されていないウイルスゲノムの検出には、サイバークリーンを用いて定量した。

1. 2 ウイルスの感染価の測定

ウイルス感染価は、それぞれのウイルスの指向性細胞に感染させて解析した。単純ヘルペスウイルスタイプ 1 (HSV-1)、ポリオウイルス、水泡性口内炎ウイルス (VSV)、シンドビスウイルスは Vero 細胞を、プタバルボウイルス (PPV) は ESK 細胞を、SV40 ウイルスは CV-1 細胞を用いて TCID₅₀ を求めた。

2. 感染性ウイルス検出のための Infectivity PCR の開発

2. 1 ウイルスゲノムの抽出

感染細胞からのウイルスゲノムの抽出は、ポリスチレンコートした磁性球を用いて行った。その原理は、細胞破碎液中の核酸をポリスチレンコートした磁性球 (Gene Ball) が特異的に吸着することを原理としている (図 1)。Gene Ball による核酸の抽出操作の概略を図 2 に示している。細胞浮遊液あるいは細胞沈査に Gene Ball を添加した後、細胞破碎用の酵

素液を添加して、20 分間反応させる。反応後、非極性溶媒を反応液に添加する。この時沈殿した核酸は Gene Ball に効率よく吸着させることができる。洗浄後、TE 液あるいは蒸留水で核酸を可溶化して PCR あるいは RT-PCR に供する。すべての反応時間は 1 時間ほどで終了し、他の様々な核酸抽出法に比較しても非常に短時間に抽出が可能である。

2. 2 PCR 及び RT-PCR

細胞より抽出した DNA ウイルスゲノムの検出は、方法 2. 1 に従って行った。

2. 3 ウイルスの感染性の測定

ウイルス感染価は、それぞれのウイルスの指向性細胞に感染させて解析した。単純ヘルペスウイルスタイプ 1 (HSV-1)、ポリオウイルスは Vero 細胞を、プタバルボウイルス (PPV) は ESK 細胞を、アデノウイルスは HeLa 細胞を用いて細胞変性を指標として調べた。

3. PEI-6MB セファロースカラムによるウイルス除去

平均分子量 10,000 の PEI を BrCN 活性化セファロース 6MB に固相化し、細胞懸濁液に各種モデルウイルスをスパイクし、ウイルス除去能の検討を行った。

4. 染色体解析

4. 1 G-バンド染色

HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞を、10 μ g/mL コルセミド存在下に 1.5 時間培養した後、遠心して細胞を集めた。沈殿した細胞を、10mL の 0.075M KCl 低張液に懸濁し、30 分間静置した。カルノア液を 5mL 重層して転倒混和した。遠心して細胞を集め、15mL のカルノア液を添

加した。再び遠心し、カルノア液での洗浄を上清が透明になるまで数回繰り返して細胞を固定した。この固定した細胞浮遊液を、スライドガラスの上に滴下し、火焰固定した染色体をスライドガラスの上に展開させた。染色体標本を、70°C、1~3 時間処理した後、キナクリンマスタード染色液に 10 分間浸潤し染色した。染色したスライドを水洗した後、顕微鏡下で G-バンドの観察を行った。

4. 2 CGH 染色

ヒト正常 2 倍体細胞由来ゲノム DNA と HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞由来ゲノム DNA 各々 1 μ g に対して、DNA ポリメラーゼ及び DNase I 存在下、Sepctrum Green-dUTP または Spectrum Red-dUTP を用いたニックトランスレーションによる標識を行った。標識したヒト正常 2 倍体細胞由来ゲノム DNA と HL-60 細胞あるいは HL-60RG 細胞由来ゲノム DNA を、Cot-I DNA 存在下に混合してプローブ液を作製した。一方、G-バンドの項で記載したのと同じ方法で調製したヒト正常 2 倍体細胞由来染色体標本を、ホルムアルデヒド存在下で処理した後、熱変性させた。この熱変性させたスライド標本にプローブ液を載せ、37°C、3~5 日間恒温槽内でハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、蛍光顕微鏡下で観察した。

4. 3 m-FISH 染色

スライドガラスに展開・固定した HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞の染色体標本を、2% NP-40 を含む 2 \times SSC 溶液に浸潤し、37°C、30 分間、静置した。スライドを、70%、85%、100%エタノール

に段階的に浸潤し、脱水した。70%ホルムアルデヒドを含む2×SSC液に浸潤し、75°C、5分間変性させた。さらに、上記のアルコール系列を用いて脱水し、風乾した。マルチカラープローブを重層し、2分間、45°Cに静置し、ハイブリダイゼーションを行った。

4. 細胞由来生理活性タンパク質の解析

4.1 培養上清の調製

HL-60RG細胞をASF104（味の素社）中に 5×10^6 個/mLになるよう懸濁し、37°Cで3日間培養し（細胞終濃度約 2×10^6 個/mL）、培養上清を得た。上清200mLをSartorius社製、限外濾過装置（分画分子量10,000）を用いて2mLにまで濃縮した。濃縮液からIsogen（和光純薬）を用いてタンパク質を沈殿させ、塩等を除いた。各沈殿たんぱく質をイモビリンの1次元電気泳動用溶解液に懸濁し、不溶性物質を100,000rpmの超遠心により除いた。

5.2 培養上清及びヘパリンカラム吸着画分の調製

HL-60細胞及びHL-60RG細胞をASF104（味の素社）中37°Cで2日間培養し（細胞終濃度約 9×10^6 個/mL）、培養上清を得た。上清1LをAmersham社製、HiTrap Heparin HPカラムに添加し、1.5M塩化ナトリウムを含む溶出バッファで吸着画分を回収した。ヘパリンに結合した画分から、Isogen-LS（和光純薬工業）を用いてタンパク質を沈殿させ、塩等を除いた。

5.3 2次元電気泳動による解析

1次元目の等電点電気泳動には、Immobiline pH3 ~ 10 NL、13cm

（Amersham Pharmacia社）を用いた。2次元目のSDS-PAGEには、10~20%のグラジエントゲル（バイオクラフト社）を用いた。タンパク質の染色はAmersham Pharmacia社の銀染色キットを使用した。質量分析用試料を調製する際は、泳動後、ゲルをクマジーブリリアントブルーで染色して各スポットを検出した。

5.4 2次元電気泳動で分離した各スポットのトリプシンによるゲル内消化

ゲルからスポットを切り出しMilli-Q水500 μ Lを加え、室温で10分振盪して洗浄した。この操作をさらに2回繰り返した後、アセトニトリル200 μ Lを加え、室温で10分振盪した。アセトニトリルを除いた後、減圧濃縮遠心器で約30分ゲルを乾燥させた。乾燥したゲル片に25ng/ μ Lトリプシン（Promega社）溶液（10mM Tris-HCl (pH8.8)）を10 μ L加え、水浴下で45分間静置してゲルを膨潤させた後、20 μ Lの10mM Tris-HClバッファ（pH8.8）を加え、37°Cで一晩インキュベートした。pH試験紙で溶液のpHが変化していないことを確認した後、酵素消化液を回収した。ゲル片に5%ギ酸/50%アセトニトリル20 μ Lを加え、10分振盪し、上清を再び回収した。この操作を2回繰り返してすべての上清を集め、減圧濃縮遠心器で約5 μ Lまで濃縮した。0.1%トリフルオロ酢酸溶液20 μ Lで可溶化し、ピペットチップ型カラムZipTip μ C18（Millipore社）で脱塩して質量分析用試料とした。

5.5 質量分析とタンパク質の推定

トリプシン消化を行った質量分析用試

料0.5 μ LをMALDI targetにアプライし、マトリックスとして α -シアノ-3-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) の0.1%トリフルオロ酢酸/50%アセトニトリル飽和溶液を重層した。この試料について、MALDI TOF-MS (AXIMA-CFR、島津製作所)を用いて質量分析を行い、得られたペプチド断片の質量分析スペクトルより、Mascot データベース解析システム (Matrix Science 社) を用いて各スポットの帰属の推定を行った。

7. 血管内皮前駆細胞の特性解析に関する研究

1.3. 1 AC133 と CD34 の二重染色

1.2Lの血液より分離した約40mLのバフィーコートあるいは臍帯血を2mM EDTAを含むPBS(-)で2倍希釈し、リンホブレップチューブを用いて、2,200rpm、18 $^{\circ}$ C、20分で遠心後、単核球分画を単離し、0.5% BSA、2mM EDTAを含むPBS(-) (分離バッファー) に浮遊させた。単核球を分離バッファーで洗浄後、再び200 μ Lの分離バッファーに再浮遊させた。フィコエリスリン標識抗 AC133 抗体 (Milteny Biotec 社) と FITC 標識抗 CD34 抗体 (Milteny Biotec 社) を用いて単核球懸濁液を4 $^{\circ}$ C、30分間二重染色した。細胞を洗浄後、フローサイトメーターで解析した。

7. 2 AC133 及び CD34 陽性細胞の分離

上記のように末梢血あるいは臍帯血の単核球分画を単離し、分離バッファーに浮遊させた。単核球を分離バッファーで洗浄後、再び200 μ Lの分離バッファーに再浮遊させた。AC133 陽性細胞を分離す

る場合は、AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec 社) を用い、抗 AC133 抗体・マイクロビーズと4 $^{\circ}$ C、30分間反応させた。CD34 陽性細胞を分取する場合は、一次抗体(ニチレイ社)と4 $^{\circ}$ C、15分間反応させた後、細胞を洗浄した。ついで、二次抗体である抗 IgG 抗体・マイクロ磁気ビーズと、4 $^{\circ}$ C、15分間反応させた。各陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec 社) を用いて行った。分離した AC133 あるいは CD34 陽性細胞は20%ウシ胎児血清 (FBS)、50ng/mL 血管内皮細胞成長因子 (VEGF) を含む EBM-2 培地に浮遊させ、フィブロネクチンをコートした24穴あるいは48穴のマルチウェルに分注し、培養した。

7. 3 DiI-アセチル LDL の取り込み

AC133 あるいは CD34 陽性細胞を2週間培養後、接着した細胞をPBS(-)で3回洗浄した。10 μ g/mL DiI-アセチル LDL を含む1% BSA-PBS(-)を加え、37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベートし、DiI-アセチル LDL を細胞内に取り込ませた。細胞を洗浄後、4%パラホルムアルデヒドを含むPBS(-)で固定し、共焦点顕微鏡にて励起波長545nm、蛍光波長560nmで観察した。

7. 4 間接蛍光抗体染色

Von Willebrand 因子の観察では AC133 あるいは CD34 陽性細胞を2週間培養後、細胞をPBS(-)で3回洗浄した。1% BSA-PBS(-)で、4 $^{\circ}$ C、1時間ブロッキングし、FITC 標識抗 Von Willebrand 因子抗体を含む1% BSA-PBS(-)を添加し、4 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。細胞浮遊液をPBS(-)で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド・PBS(-)で固定した後、共焦点顕微鏡に

て励起波長 488nm、蛍光波長 505～550nm で観察した。

内皮細胞の特異的表面抗原として CD31、flk-1、Tie2 を、細胞内指標として非誘導型血管内皮 NO 合成酵素 (eNOS) の発現を、また、マクロファージの特異的表面抗原として CD11b を選び、各々発現の解析のために、細胞を -20°C のエタノールで固定し、観察する日まで -20°C で保存した。観察を行う日に、細胞を氷上に静置し、PBS(-)で3回洗浄した。1% BSA-PBS(-)で、 4°C 、1時間ブロッキングし、各種抗体を含む 1% BSA-PBS(-)を添加し、 4°C 、1時間反応させた。細胞浮遊液を PBS(-)で洗浄し、FITC 標識抗 IgG 抗体あるいはローダミン標識抗 IgG 抗体と反応させた。さらに、細胞浮遊液を洗浄後、共焦点顕微鏡にて観察した。得られたそれぞれの画像の蛍光強度はシオンイメージソフトを用いて定量的に解析した。

7. 5 臍帯血と末梢血由来 AC133 陽性細胞の増殖能の比較

臍帯血と末梢血より得た AC133 陽性細胞を、20%ウシ胎児血清 (FBS)、50ng/mL 血管内皮細胞成長因子 (VEGF)、50ng/mL トロンボポエチン (TPO)、50ng/mL 幹細胞成長因子 (SCF) を含む EBM-2 培地に同じ密度になるように浮遊させ、コラーゲンタイプ IV をコートした 24 穴のマルチウェルに分注し、6 日間培養した。細胞数は血球計算盤を用いて計測した。

7. 6 浮遊細胞の CD31 発現の免疫染色と細胞分画

AC133 陽性細胞をコラーゲンタイプ IV

上で、VEGF、TPO、SCF 存在下、培養を行った。細胞を回収して、氷上に静置し、PBS(-)で洗浄した。1% BSA-PBS(-)で、 4°C 、1 時間ブロッキングし、FITC 標識抗 CD31 抗体 (Pharmingen 社) を含む 1% BSA-PBS(-)を添加し、 4°C 、1 時間反応させた。細胞浮遊液を PBS(-)で洗浄し、フローサイトメーターで CD31 の発現を解析した。さらに、セルソーターを用いて、CD31 強陽性細胞、陽性細胞、陰性細胞を分画した。なお、分画した細胞はフィブロネクチンをコートしたディッシュ上で VEGF 存在下、さらに 1 週間培養した。

7. 7 管腔形成

臍帯血 AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性細胞をフィブロネクチンコートしたディッシュで VEGF 存在下 1 週間培養した。接着細胞をトリプシン処理して集め、20%ウシ胎児血清 (FBS)、50ng/mL 血管内皮細胞成長因子 (VEGF) を含む EBM-2 培地に浮遊させた。EBM-2 培地を等量に混合し、 37°C 、4 時間 CO_2 インキュベーター内でゲル化したマトリゲル (BD Pharmingen 社) 上に細胞浮遊液を加えて、VEGF 存在下 2 週間培養した。

8. 倫理面への配慮

動物実験については、各施設の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施し、倫理審査の承認を得て行った。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科

学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行った。

C. 結果

1. ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

細胞・組織加工医薬品等の安全性に関する最大の関心事は、ウイルス等の感染性因子の混入をいかに防ぐかである。そのためには、最も感度よくかつ非特異的な反応を抑えてウイルス等の感染因子の検出を行う必要がある。本研究では、ポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズが、主としてエンペロブウイルスの濃縮に有効であることを見出した。

Vero 細胞に感染させたシンドビスウイルス、ESK 細胞に感染させたブタバルボウイルス (PPV)、CV-1 細胞に感染させた SV40 ウイルスの上清を段階希釈し、その 100 μ L よりウイルスゲノムを抽出した。一方、それぞれのウイルス希釈液 1 mL に 10mg/0.1mL のポリエチレンイミン磁気ビーズを添加し、ビーズに結合したウイルスよりウイルスゲノムを抽出した。抽出したウイルスゲノムを PCR あるいは RT-PCR 反応により検出した結果を図 3 に示す。SV40 ウイルスやシンドビスウイルスの場合、単なるウイルス培養上清の段階希釈液での検出限界に比較して、磁気ビーズでの検出限界は明らかに上回っていた。すなわち、磁気ビーズに結合したウイルスから抽出した試料の方が、より薄く希釈した試料からでもウイルスゲノムが検出され、効率よくウイルスが濃縮されていることが示された。一方、PPV ではこのような磁気ビーズによ

る濃縮効果は認められなかった。

次いで、ウイルス感染価を指標として PEI 磁気ビーズによる濃縮を検討した。Vero 細胞に感染させた単純ヘルペスウイルス (HSV)、ポリオウイルス、シンドビスウイルス及び水泡性口内炎ウイルス (VSV) の培養上清、並びに ESK 細胞に感染させたブタバルボウイルス (PPV)、CV-1 細胞に感染させた SV40 ウイルスの各 1 mL の培養上清に、PEI 磁気ビーズを添加して磁気ビーズ結合分画とその上清に分けた。さらに、PEI の濃縮を行った上清に残存するウイルス力価を培養上清の力価と比較した。その結果を表 3 に示す。PEI 処理を行った SV40 ウイルス、HSV、VSV 及びシンドビスウイルスの上清のウイルス感染価は、元の培養上清に比べ非常に低下していた。従って、これらのウイルスの殆どが PEI 磁気ビーズに結合したと考えられる。一方、PPV 及びポリオウイルスでは、PCR による検出同様、PEI に結合していないことが明らかになった。

PEI 磁気ビーズのウイルス吸着能力を明らかにするために、ビーズの添加量と濃縮できるウイルス量との関係を調べた。10⁸ から 10⁹ コピー数の HSV-1 及びシンドビスウイルスを含む培養液に種々の濃度のビーズを添加し、ビーズに結合したウイルス量をリアルタイム PCR 及び RT-PCR により測定した (図 4)。添加したビーズ量が 0.1~10 μ L までは用量依存的にビーズに結合するウイルス量は増加するが、10~100 μ L では殆ど変化が認められない。したがって、以下の検討では、100 μ L のビーズを添加することとした。

次に、濃縮に及ぼす血清の影響について検討した。種々の濃度の血清存在下に、HSV-1、SV40 ウイルス及びシンドビスウイルスの濃縮を行った。図 5 に示すように、50%血清存在下で濃縮を行うとウイルス濃縮効率の顕著な低下が認められるものの、通常よく用いられる血清範囲（10%以下）では濃縮効率の低下は認められなかった。

さらに、PEI 磁気ビーズを用いて定量的なウイルス濃縮の可能性と検出限界近くでのウイルス濃縮の可能性について検討した。図 6 に、HSV-1 やシンドビスウイルスの培養上清の 1mL 及び 10mL から濃縮（10 倍濃縮及び 100 倍濃縮）を行った場合のウイルス検出の結果を示している。種々の希釈を行ったこれらのウイルスを PEI 磁気ビーズで濃縮すると、期待通りのウイルス量が検出された。特に RNA ウイルスであるシンドビスウイルスでは、100 倍濃縮を行った場合に 1,000 倍以上の濃縮効果が得られ、これはウイルス濃縮中に RNase のような阻害物質が除去されたためではないかと推定された。さらに、検出限界以下になるような希釈を行った場合にも、PEI 磁気ビーズを用いることにより、検出限界の高感度化が可能であった。

一方、複数のウイルスが共存した場合にも PEI 磁気ビーズによる濃縮が可能か検討した。図 7 に示すように、SV40 ウイルス、シンドビスウイルス及び HSV-1 を混合し、PEI 磁気ビーズによる濃縮を行ったところ、それぞれのウイルスが効率よく濃縮されていることが確認された。

2. スルホン酸磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

PEI を用いてのウイルス濃縮において結合しなかったウイルスは、脂質膜を持たない非エンベロープウイルスである。そこで、スルホン酸磁気ビーズを用いた非エンベロープウイルスの濃縮作用について検討を行った。PEI の場合と同様に、各ウイルスを感染させた細胞 1mL の培養上清に 100 μ L のスルホン酸磁気ビーズを添加し、さらに 5mM CuSO₄ を添加した後、磁気ビーズ結合分画とその上清に分けた。培養上清 100 μ L 及びスルホン酸結合分画からウイルスゲノム DNA あるいは RNA を抽出し、限界希釈法によりそれぞれのウイルスゲノムの検出を行った。図 8 に示すように、シンドビスウイルスの培養上清では 10⁻⁴ まで希釈するとウイルスバンドの検出ができなくなるが、スルホン酸磁気ビーズに結合した分画では 10⁻⁴ 希釈してもまだウイルスバンドは検出できた。また、PPV でも同様に、10⁻⁶ まで希釈するとウイルスバンドの検出ができなくなるが、スルホン酸磁気ビーズに結合した分画では 10⁻⁶ 希釈してもまだウイルスバンドが検出できた。さらに、ポリオウイルスの培養上清では 10⁻³ 希釈した場合に殆どウイルスが検出できないが、スルホン酸磁気ビーズでは 10⁻⁴ 希釈してもウイルスゲノムの検出ができた。

一方、スルホン酸磁気ビーズの濃縮を行った上清に残存するウイルス力価を培養上清の力価と比較した。その結果を表 4 に示す。スルホン酸磁気ビーズ処理を行ったシンドビスウイルス、PPV 及びポリオウイルスの上清のウイルス感染価は、

元の培養上清に比べ非常に低下していることが確認された。

次いで、スルホン酸磁気ビーズによるウイルス濃縮の定量性と検出限界近くでのウイルス濃縮の可能性について検討した。図9に、ポリオウイルス及びPPVの培養上清を1mL及び10mLから濃縮(10倍濃縮及び100倍濃縮)を行った場合のウイルス検出の結果を示している。ポリオウイルスは効率よく濃縮されることが示され、また、検出限界の高感度化も認められた。一方、PPVでは10倍濃縮した場合には理論通りの濃縮効果が認められたが、100倍濃縮では目的とする濃縮効率は得られなかった。しかし、100倍濃縮した場合には、検出限界の顕著な高感度化が認められた。

病原性ウイルスについても検討を行った。ヒトサイトメガロウイルスをPEI及びスルホン酸磁気ビーズを用いて10倍濃縮を行った結果を図10に示す。培養上清のサイトメガロウイルスは 10^4 希釈までしか検出できないが、PEI磁気ビーズあるいはスルホン酸磁気ビーズを用いた場合にはいずれも 10^5 希釈しても検出が可能であった。

3. ウイルスの感染性の迅速・高感度検出法の開発

感染性ウイルスを高感度に検出するために、まず指向性細胞へウイルスを感染させた後、細胞内で増幅したウイルスゲノムを迅速かつ効率よく抽出し、抽出したウイルスゲノムをPCRによって増幅し検出する技術開発を目指した。このために、まず細胞に感染させたウイルスゲ

ノムを迅速かつ高効率に抽出する手法を開発した。従来の有機溶媒等を用いる核酸抽出法を細胞からのウイルスゲノム調製に適用しようとしても、タンパク質の妨害、あるいは染色体DNAが抽出の過程でゲル化等を起こし粘性が増加してしまうためなどの理由から大量の細胞を処理することが不可能であった。また、細胞内にわずかにしか存在しないウイルスゲノムに対して従来の核酸抽出法では十分な回収率が得られなかった。そこで、Gene Ballを用いた核酸抽出法を開発した(図1)。本法では、細胞懸濁液ないしは沈殿させた細胞にGene Ballを入れ、酵素液を加えて細胞の破碎を行い、核酸を抽出する。Gene Ball存在下に、抽出したDNA/RNA溶液中に非極性溶媒を添加することによりDNA/RNAを沈殿・不溶化させると同時にGene Ballへの吸着を起こさせるものである(図2)。すなわち、核酸の抽出/沈殿/吸着操作を1つのチューブの中で一連の操作として行うことにより、核酸のゲル化による粘性の増加を起こさず、すばやくDNA/RNAをGene Ballに吸着させるものである。まず、本法の核酸回収法としての有用性について検討を行った。表5は、Gene Ballの吸着能の安定性を示すデータである。白血球からのDNA抽出を10回繰り返したところ、DNAの回収率、OD260nmと280nmの比、OD260nmと230nmの比のいずれの値も非常に安定していた。また、同様にGene Ballを用いて白血球から抽出したDNAを1%アガロース電気泳動で分離したところ、6回の繰り返し実験でも同様の泳動パターンを示し、質的に

も安定した DNA 回収が可能であった(図 11)。さらに、抽出に供した細胞数と回収された DNA 量は非常によく相関しており、また、少量の細胞からでも定量的に DNA を回収できることが明らかになった(図 12)。

次に、他の市販の核酸抽出キットと本法の比較を行った。表 6 に示すように、4 種類の市販キットに比べて DNA の回収率にして 2~8 倍程度高いことが示された。また、それぞれの方法で回収した DNA の純度を OD260nm と 280nm の比から比較したところ、本法を用いて回収された DNA が最も高い値であった。さらに、各市販キット及びフェノール/クロロホルム抽出、あるいはガラス棒を用いる方法等を用いて抽出した DNA をパルスフィールド電気泳動して、そのサイズを比較した(図 13)。その結果、複数の核酸抽出キットでは非常に断片化した DNA のみが回収されていることが明らかになった。これらのキットは抽出操作のなかで機械刺激による細胞破碎等を行っており、これらのキットでは、抽出操作中に DNA の断片化を起こしているものと考えられた。以上の結果より、Gene Ball を用いる核酸抽出法は DNA を断片化することなく純度の高い DNA を高い回収率で得ることができる方法であることが示された。また、RNA の回収についても同様の結果が得られている。最も重要な点は、細胞からの核酸の抽出操作を一連の操作として行うために粘性の増加や DNA のゲル化を起こさず、大量の細胞から一度に核酸を回収することが可能な点である。特に、非常に感染価の低いウ

イルス試料を用いてその感染性を調べる場合には、できるだけ多くの細胞に試料を感染させることが感度を高めることになり、大量の細胞から核酸を抽出できることは非常に重要な要素である。Gene Ball 法では、 1×10^7 細胞からの核酸抽出も全く問題なく行うことが可能であった。

図 14 は、Vero 細胞にポリオウイルスを感染させたときの細胞内ウイルスゲノムの増幅をリアルタイム RT-PCR により時間を追って定量した結果である。細胞内のウイルスゲノムコピー数は、感染直後では比較的低かったが、感染後 3 時間前後から急激に増加し、24 時間後にはプラトーに達した。同様の結果は HSV-1 についても得られている。図 15 は種々の感染価の HSV-1 を感染させた Vero 細胞より核酸を抽出しリアルタイム PCR で定量した結果 (infectivity PCR) と細胞変性を指標とする手法 (CPE) の比較を行った結果である。図 15 左は、種々の力価の HSV-1 を感染させた後、1 日、2 日、4 日目の細胞からウイルスゲノムを抽出しリアルタイム PCR で陽性となった比率を示している。3/3 はすべてが陽性になったことを示し、0/3 は 3 検体すべてが陰性であることを示している。図から明らかかなように、20pfu のウイルスを感染させた場合では、1 日目でもすべての試料でウイルスが検出できた。また、0.2pfu でも 4 日目にはすべてが陽性になった。一方、CPE では感染後 4 日目でも検出限界は 20pfu であった(図 15 右)。以上の結果から、Gene Ball 法を用いた infectivity PCR により HSV-1 の感染性を迅速・高感度に検出できることが示された。一方、

RNA ウイルスであるポリオウイルスについての解析結果を図 16 に示したが、RNA ウイルスの場合にも CPE による測定に比較して、非常に迅速・高感度にウイルス感染価を測定することが可能であった。また、同様の結果は、ブタバルボウイルスやアデノウイルスについても得られており、Gene Ball 法を利用した infectivity PCR によるウイルス感染性の測定法の有用性が示された。

4. ポリエチレンイミン結合セファロース 6MB によるウイルス除去

PEI 磁気ビーズが効率よくウイルスを濃縮可能なことより、PEI を細胞分離用樹脂に結合させ、ウイルス除去を行うことを試みた。

図 17 に示すように、HSV、SV40 ウイルス、シンドビスウイルス、PPV を HL-60 細胞懸濁液にスパイクして PEI セファロース 6MB カラムにアブライした。その結果、本法により HSV、SV40 ウイルス、PPV を効率よく除去できることが明らかになった。対照として用いたグリシンセファロース 6MB カラムではウイルスの除去は認められなかった。一方、細胞の回収率に関しては、PEI セファロース 6MB にアブライした細胞の 50~60% が吸着されることが明らかとなった。すなわち、PEI セファロース 6MB は、細胞とウイルスの両方を吸着するが、非常にウイルスを吸着しやすい性質をもつことが明らかになった。

5. モデル細胞への各種染色体解析の組み合わせの適応

5. 1 細胞の G-バンド解析

HL-60 細胞は急性前骨髄性白血病患者より樹立された株であり、骨髄系細胞への分化能を有し、血球系分化や白血病細胞のモデル細胞として用いられている。HL-60 細胞は、樹立後、継代数の少ない間は倍加時間が非常に長い、継代数が多くなると倍加時間が短くなることが知られており、このように倍加時間が非常に短くなった細胞として HL-60RG 細胞が樹立された。この HL-60 細胞と HL-60RG 細胞の遺伝的性質の差異を明らかにすることは、白血病細胞の増悪化の変化過程を解明することにもつながる可能性があり遺伝的性質の解析モデルとして有用と考えられた。そこで、HL-60 細胞と HL-60RG 細胞の G-バンド染色による染色体解析を行った。図 18 に示すように、HL-60 細胞では染色体数は 45 ないしは 46 であったが、HL-60RG 細胞では 13 番染色体の欠失や 18 番染色体での過剰が消失するなど、染色体数は 43 あるいは 44 と少なくなる傾向にあった。核型についても HL-60 細胞では非常に多様な変異が検出された。5 番染色体長腕の部分欠失、9 番染色体短腕の部分欠失、10 番染色体短腕と 13 番染色体長腕の転座に由来する 10 番派生染色体、14 番染色体長腕の部分欠失、16 番染色体長腕部の付加、17 番染色体の欠失が認められる他、第 6 染色体や第 18 染色体の過剰、X 染色体の欠失等が HL-60 細胞では認められた。一方、HL-60RG 細胞において、HL-60 細胞と異なる特徴的な G-バンド染色結果としては、9 番染色体 q13 に由来不明の染色体断片の挿入、及び 11 番染色体長腕と

13 番染色体長腕の全腕転座に由来する派生染色体が認められた。言い換えれば、この G・バンド解析から、HL-60 細胞と HL-60RG 細胞の増殖性等の大きな差異は 9 番染色体と 11 番染色体のこのような変化によってもたらされている可能性が考えられた。

5. 2 CGH 解析による細胞の染色体解析

CGH 法は、染色体すべての領域についてゲノムコピー数の変化を検出する測定法である。この CGH 法による解析を HL-60 細胞と HL-60RG 細胞に適用したところ、図 19 に示すように、HL-60 細胞では 5 番染色体長腕の部分欠失、8 番染色体末端部の顕著な増幅、9 番及び 10 番染色体短腕の部分欠失、13 番染色体の長腕の増幅、17 番染色体短腕の部分欠失が認められた。G・バンド解析からは 17 番染色体は 1 本しか認められないことから、CGH 解析の結果と併せて考えると、その一部が他の染色体に転座していることが推測された。一方、HL-60RG 細胞の CGH 解析で HL-60 細胞と大きく異なる点は、8 番染色体末端の増幅がきわめて小さくなっていること、及び 9 番染色体の部分欠失幅の増大化と 11 番染色体短腕の部分欠失であった。9 番、11 番染色体の変化は G・バンド染色による結果とよく一致していた。

5. 3 マルチカラー-FISH (m-FISH) 解析による細胞の染色体解析

各染色体のプローブを複数の蛍光色素の組み合わせにより染色し、各染色体を疑似カラーで分別染色する染色体解析法が m-FISH である。HL-60 細胞及び

HL-60RG 細胞の m-FISH 解析を行った。図 20 に示すように、HL-60 細胞の 5 番染色体が部分欠失し、そこに 17 番染色体の一部が転座していることが認められた。9 番染色体、14 番染色体及び 16 番染色体の末端に複数の染色体の転座が認められた。10 番染色体と 13 番染色体の転座に由来する 10 番派生染色体が認められた。また、18 番染色体の過剰が認められることもあった。一方、HL-60RG 細胞において HL-60 細胞と異なる点は、9 番染色体に 8 番染色体の一部が挿入されていること、及び 11 番染色体と 13 番染色体の転座に由来する 11 番派生染色体であった。

このような HL-60 細胞と HL-60RG 細胞との間で見出された染色体上の差異を明らかにする目的で、c-myc プローブを用いた FISH 解析を行った。図 21 に示すように、c-myc プローブを用いた FISH 解析より、HL-60 細胞では dmin (矢印) が多数見出されるが、HL-60RG 細胞では殆ど dmin は見出されない。一方、両細胞の第 8 染色体末端には c-myc が存在するが、HL-60RG 細胞ではこれに加えて第 9 染色体に c-myc の強いシグナルの挿入が認められた。このことをさらに確認するために、G・バンド解析と c-myc プローブを組み合わせた解析を行った。両細胞とも矢印で示す第 8 染色体末端に c-myc が存在するが、これに加えて HL-60RG 細胞では、c-myc プローブとの反応が第 9 染色体 q13 に見出された (図 22)。

6. 細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性解析

モデル細胞として HL-60RG 細胞を用いて、イモビリン 2 次元電気泳動法による細胞由来タンパク質プロファイルの解析を行った。図 23 に HL-60RG 細胞の培養上清のタンパク質を 2 次元電気泳動で分離したスポットから得たトリプシン消化ペプチド混合物を質量分析した質量スペクトルの一例を示している。ここで得られた各ペプチドの質量数から Mascot データベースを用いてタンパク質の推定を行い、本スポットを Statmin と推定した。同様の解析を行うことにより、図 24 に示したように、17 種類のタンパク質について PMS 法による帰属の推定に成功した。

サイトカインや増殖因子はヘパリンに親和性をもつことから、HL-60 細胞とその亜株である HL-60RG 細胞を採り上げ、それぞれの細胞の培養上清中にあるヘパリンへの親和性の高いタンパク質を 2 次元電気泳動で分離することを試みた。その結果、図 25 に示すように、それぞれの泳動パターンに明らかな差異が認められた。また、PMS 法による帰属の推定を行ったタンパク質を図中に丸印で示した。a は HL-60、HL-60RG 共通に認められ、プロテインジスルフィドイソメラーゼと推定された。b は HL-60 の培養上清にはあるが、HL-60RG ではみられないタンパク質である。このタンパク質は PMS 法により補体 D 因子と推定された。c は HL-60RG でのみ認められ、モエシンと推定された。さらに、PMS 法により帰属の推定をした 17 種類のタンパク質は、その位置を図 25 中に数字で示した。また、ウェスタンブロットにより帰属の推定を行

ったタンパク質の位置を星印で示した。

7. ヒト末梢血幹細胞の培養と血管内皮細胞の分化誘導

7. 1 末梢血 AC133 陽性細胞と CD34 陽性細胞の血管内皮細胞への分化能

血液幹細胞の細胞表面抗原としては CD34 陽性、CD38 陰性、 lin^{-1} 、c-kit 陽性など他の表面抗原との組み合わせることにより非常に純度の高い細胞集団として同定・分離されることが知られている。一方、血管内皮細胞前駆細胞は以上のような細胞表面マーカーの組み合わせによる同定・分離法は十分に確立されていないが、少なくとも CD34 陽性細胞集団内に存在すると考えられている。最近、血液幹細胞の新規表面抗原として AC133 が有用であることが報告されるようになってきたが、同時に骨髓 AC133 陽性細胞から血管内皮細胞が出現するとの報告もある。そこで、この AC133 陽性細胞の血管内皮誘導能について検討するために、まず末梢血単核球における AC133 及び CD34 陽性細胞の比率をフローサイトメーターで解析したところ、両陽性細胞は末梢血単核球に約 0.3%それぞれ存在することが明らかになった。ヒト末梢血より AC133 及び CD34 陽性細胞を分離し、フィブロネクチン上に 2 週間培養し、血管内皮細胞への分化誘導を試みた。その結果 AC133 陽性細胞を培養した時の方が血管内皮細胞様の接着細胞を多く観察することができた (図 26)。これらの接着細胞が血管内皮細胞としての特性を備えているかを確認するために、血管内皮細胞機能としての DiI-アセチル LDL の取り

込み活性 (図 27) や von Willebrand factor の発現 (図 28) を間接蛍光抗体法により解析したところ、AC133 陽性細胞のほうが CD34 陽性細胞に比べ、アセチル LDL を取り込む細胞や von Willebrand factor に染色される細胞がより多く出現してきた。さらに、AC133 陽性細胞から分化してきた接着細胞について血管内皮細胞の指標として考えられている CD31、flk-1、Tie2、eNOS の発現について間接蛍光抗体法により解析すると、図 29 に示すように、これらの分化指標の発現が確認され、AC133 陽性細胞から分化した接着細胞は内皮細胞と同定された。

7. 2 AC133 細胞の血管内皮細胞への分化誘導の時間経過

次に末梢血幹細胞として AC133 細胞を用いて血管内皮細胞へと分化誘導した際の、分化指標として考えられている CD31、flk-1 等の発現の経時変化を解析した。図 30 上段は蛍光画像、下段は蛍光高度を定量的に解析した結果を示しているが、CD31 は培養 1 週間後に有意に強い発現を示し ($p < 0.001$)、培養を続けるに従いむしろその発現は低下することが認められた。一方、flk-1 は培養 2 週間後に最も強い蛍光が観察された (図 31, $p < 0.001$)。eNOS の発現は 1 週間目から 3 週間目まで、比較的大きな変動は認められなかった (図 32)。マクロファージ・顆粒球系の表面抗原として知られている CD11b の発現は全培養期間を通じて殆ど観察されなかった (図 33)。従って、血液幹細胞分画と考えられる末梢血 AC133

陽性細胞を用いて VEGF 存在下に血管内皮細胞へと分化する系を確立することができた。

7. 3 CD31 強陽性細胞の分画と培養

上記の結果より、ヒト末梢血及び臍帯血 AC133 細胞を VEGF 存在下に培養すると、CD31 が他のマーカーに先立って発現してくることから、CD31 が血管内皮前駆細胞としての分化能の指標となるのではないかと想定し、CD31 発現と分化能の関連について検討した。ヒト末梢血 AC133 陽性細胞をフィブロネクチンあるいはタイプ IV コラーゲンプレートを用いて VEGF 存在下、6 日間培養すると、両細胞とも殆どが浮遊細胞のままであり、一部の細胞が接着していた。特に、コラーゲンタイプ IV プレートを用いて培養した細胞の方が、フィブロネクチンプレートを用いて培養した細胞より伸展が弱い傾向が認められた (図 34-a)。しかし、接着細胞の CD31 の発現を調べたところ、フィブロネクチンプレートを用いた細胞とコラーゲンタイプ IV プレートを用いた細胞で大きな差異は認められなかった (図 34-b)。また、6 日目の細胞を回収し、CD31 の発現をフローサイトメーターを用いて解析すると、どちらのプレートを用いて培養した細胞も CD31 の発現強度は同程度であった (図 35-a)。培養初期の経時的な CD31 の発現を調べたところ、培養経過とともに CD31 の発現が増加し、特に強陽性の細胞の比率が増加してくることが明らかになった (図 35-b 上)。そこで、容易に細胞が回収できることから、コラーゲンタイプ IV コート上で 6 日間培養し

た AC133 陽性細胞を選び、CD31 の発現を指標として強陽性、陽性、陰性細胞を分離することにした。図 35・b 下に示すように、ヒト末梢血 AC133 陽性細胞をタイプIVコラーゲン上で培養すると、CD31 の発現量の異なる細胞が出現する。これらの細胞をセルソーターで分画し、洗浄後、フィブロネクチンプレートを用いて VEGF 存在下 1 週間培養した。その結果、図 36 に示すように、CD31 強陽性細胞からは多くの接着細胞が出現し殆ど浮遊細胞は見られなかったが(図 36・上段左)、逆に CD31 陽性細胞では接着細胞が殆ど認められなかった(図 36・上段右)。さらに、CD31 強陽性細胞から出現してくる接着細胞は KDR/flk-1 や eNOS を強く発現していた(図 36・中段・下段)。

8. ヒト臍帯血幹細胞の培養と血管内皮細胞の分化誘導

8. 1 臍帯血及び末梢血の AC133 及び CD34 陽性細胞の含有率の比較

臍帯血及び末梢血の単核球中に含まれる AC133 及び CD34 陽性細胞の比率についてフローサイトメーターで比較検討した。その結果、図 37 とその下の表に示すように、AC133⁺/CD34⁺細胞は臍帯血と末梢血でほぼ同程度の比率で存在し、AC133⁺/CD34⁺細胞は臍帯血の方が 3 倍多く存在し、特に幹細胞が多く含まれると考えられる AC133⁺/CD34⁺細胞の比率は 11 倍も臍帯血に多く含まれることが明らかとなった。臍帯血は多能性幹細胞の比率が高く、この多能性幹細胞から血管内皮前駆細胞が多く得られる可能性が考えられた。

8. 2 臍帯血及び末梢血由来 AC133 陽性細胞の増殖の比較

臍帯血と末梢血の AC133 陽性細胞を同じ細胞密度(図 38 中の点線に相当する数)にコラーゲンタイプIV上で VEGF、TPO、SCF 存在下 6 日間培養し、細胞増殖能を比較検討した。その結果、末梢血 AC133 陽性細胞はこれらの増殖因子が存在しても殆ど細胞数が増加しないにもかかわらず、臍帯血 AC133 陽性細胞では顕著な細胞の増加が認められた(図 38、 $p < 0.001$)。

8. 3 臍帯血 AC133 陽性細胞における CD31 及び KDR 発現の経時的変化

臍帯血の AC133 陽性細胞をフィブロネクチン上で培養し、CD31 発現の経時的変化を解析した。その結果、培養 5 日後に末梢血同様強い発現が観察され(図 39、上段及び下段)、その発現はその後徐々に減少したが、末梢血(図 30 下段)のグラフに示すような急激な減少は観察されなかった。このことは増殖能の高い臍帯血由来 AC133 細胞では血管内皮分化誘導と増殖が並行して起こっていることを示唆している。一方、臍帯血由来 AC133 陽性細胞をフィブロネクチン上で培養すると KDR は末梢血 AC133 陽性細胞と同様に 15 日後(末梢血では 2 週間目)に最も強い発現が観察された(図 40)。

8. 4 臍帯血 AC133 陽性細胞における 6 日間培養後の CD31 強陽性細胞の出現と血管内皮細胞への分化

臍帯血 AC133 陽性細胞をコラーゲンタイプIV上で 6 日間培養した時に出現してくる CD31 強陽性細胞の比率と 0 日の臍帯

血 AC133 陽性細胞中の CD31 強陽性細胞の比率とをフローサイトメーターを用いて比較解析した。その結果、図 41 に示すように CD31 強陽性細胞の比率は培養 6 日で、0.25%から 10.79%に増加した。この CD31 強陽性細胞出現の比率は末梢血 AC133 陽性細胞と同様であった。

臍帯血 AC133 陽性細胞由来 CD31 陽性・強陽性細胞を分画し VEGF 存在下フィブロネクチン上で培養した結果、CD31 陽性細胞は殆ど接着する細胞が出現して来なかったのに対し、強陽性細胞では多くの接着細胞が観察され(図 42 上段)、これらの接着細胞が KDR 陽性、eNOS 陽性であった(図 42 下段左)。さらに、この接着細胞をマトリゲル中で培養することにより管腔形成が認められることから接着してきた細胞は血管内皮細胞と考えられた。これらの結果より、臍帯血 CD31 強陽性細胞も末梢血と同様に血管内皮細胞前駆細胞であると考えられた。

D. 考察

現在、ウイルス検出法として最も高感度な方法は PCR 法などの NAT 法である。しかし、ウインドウ期の存在やサンプリング上の問題もあり NAT 法を用いても必ずしもすべてのウイルスを検出できるとは限らず、さらなる高感度化が求められている。ウイルスやウイルスゲノムの濃縮には、従来、超遠心法やポリエチレングリコール法あるいはアルコール沈殿法などが用いられているが、超遠心法は HCV や HGV 等のウイルスのようにウイルス粒子の比重が軽い場合などは適用が困難である。また、現在用いられている

方法は操作が非常に煩雑であり、NAT 法のような高感度検出系においては目的試料以外からの汚染の可能性も多くなるという大きな欠点がある。さらに、HTLV-I、II のように対象とする細胞のごく一部にしかウイルスが感染していないようなケースにおいてもより適切な濃縮法の開発が望まれている。従って、出来る限り操作が簡便でかつ確実なウイルスあるいはウイルスゲノムの濃縮法は NAT 法の高感度化には必須のテーマである。そこで、本研究では、NAT 法によるウイルス検出の高感度化を目指してウイルス濃縮法の開発を行った。その結果、PEI 磁気ビーズやスルホン酸磁気ビーズを用いて、エンベロープウイルスや非エンベロープウイルスを濃縮することができることを明らかにした。さらに、定量的 PCR 解析より、PEI 磁気ビーズを用いると、100 倍から 1000 倍の濃縮が可能であることが示された。特に強調すべき点として、通常の操作では検出限界以下のウイルスしか存在しない場合にも、濃縮を行うことにより検出限界のさらなる高感度化が行えることが示されたことである。一方、PEI 磁気ビーズを用いて濃縮できなかった非エンベロープウイルスを 2 価イオン存在下にスルホン酸磁気ビーズを用いることにより、10-100 倍ほどの検出感度の高感度化が可能であった。この検出限界の高感度化は、ウイルス検出において最も重要な要素であり、培養上清にわずかにしか含まれないようなウイルスでも、濃縮により確実にウイルスが検出できれば、ウイルス安全性は飛躍的に向上することが期待される。