

**Figure 2** Stable SeV-mediated transgene expression in cynomolgus ES cells. Fluorescent ES cell colonies were plucked under a fluorescent microscope once at 1 month after infection and the cells were further propagated. (a) Phase-contrast (upper) and fluorescence (lower) images of a cynomolgus ES cell colony at day 370 after infection. Bar = 100  $\mu$ m. (b) Flow cytometric analysis of SeV-infected cynomolgus ES cells at day 370 after infection (shown in green). The percentage of GFP-positive cells is indicated. Uninfected, parental cynomolgus ES cells are indicated by another line (white area). (c) The percentage of GFP-positive cells (upper) and mean fluorescence intensity per GFP-positive cell (lower) after infection with the SeV vector at 10 TU/cell are shown as a function of time (days).



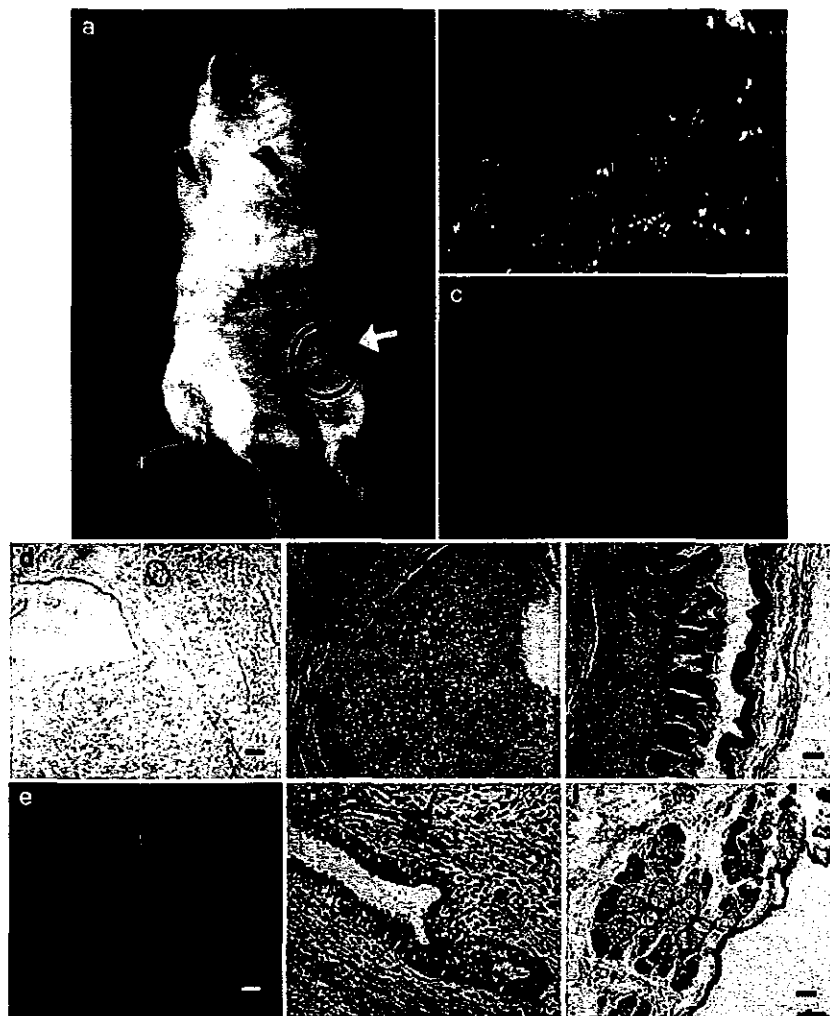
**Figure 3** DNA-independent replication and transcription of SeV vector. Total cellular RNA and DNA were extracted from cynomolgus ES cells at day 284 after infection with the SeV vector. RNA-PCR (a) and DNA-PCR (b) for the SeV RNA genome or GFP sequence were conducted. The cynomolgus  $\beta$ -actin sequence was used as an internal control. In the RNA-PCR (a), negative results obtained without reverse transcriptase (designated RT<sup>-</sup>) confirmed that the amplified products were not derived from cellular DNA. M, 100-kb DNA ladder; cES, naive cynomolgus ES cells; cES/Transfectant, cynomolgus ES cells stably expressing the GFP gene after transfection;<sup>33</sup> cES/SeV, cynomolgus ES cells infected with the SeV vector; wtSeV, wild-type SeV genome; mTransfectant, a GFP-positive mouse cell line after transfection.

diluted out. (iv) The SeV vector is much less unlikely to generate wild-type virus *in vitro* or *in vivo* than oncoretroviral and lentiviral vectors, since homologous recombination between RNA genomes is very rare indeed in negative-strand RNA viruses.<sup>19</sup> (v) The SeV genome is not subject to cellular epigenetic modifications

such as methylation, and thus it is unlikely that methylation-based silencing of transgene expression occurs.

No cytotoxic or differentiating effect on ES cells associated with the SeV infection was observed in our study. However, the wild-type SeV contains immunogenic surface proteins, hemagglutinin-neuraminidase (HN) and F proteins, which potentially induce antibody responses.<sup>20,21</sup> For future clinical applications, it would be desired that as many viral genes as possible are deleted from the vector backbone to permit reapplication, improve the safety, and lessen the possible toxicity of SeV vectors. To this end, we have developed a series of attenuated SeV vectors that are F gene-deleted,<sup>6</sup> F gene-deleted with preferable mutations,<sup>22</sup> M gene-deleted,<sup>23</sup> or have deletions of both F and M genes.<sup>24</sup> The modified vectors would be safer for *in vivo* use.

Ribavirin at high concentrations seems toxic to ES cells; presumably, it directly hampers viability and proliferation potential of ES cells. However, we cannot tell whether the observed toxicity is simply due to its toxicity to ES cells, as feeder cells are more highly sensitive to ribavirin than ES cells. In fact, while feeder cells died at 1 mM of ribavirin, cocultured ES cells were alive at this concentration for some time. Cynomolgus ES cells lose pluripotency and proliferation potential without feeder cells. Thus, the observed toxicity to ES cells may also be a secondary event following the injury of feeder cells. Whether the cytotoxicity is primary or secondary, it will be necessary to find modified compounds of less cytotoxicity.



**Figure 4** Pluripotency of SeV-infected cynomolgus ES cells. Tumors formed in NOD-SCID mice after inoculation of the SeV-infected cynomolgus ES cells (a). The tumor was fluorescing ((b), bright field; (c), dark field). Fluorescence was observed uniformly in the tumor under a fluorescent microscope ((d), bright field; (e), dark field). The tumor contained all three embryonic germ layer cells; cartilage (f), ciliated columnar epithelium (g), skin (h), and sebaceous gland (i) (stained with hematoxylin and eosin). Bar = 100  $\mu$ m.

## Materials and methods

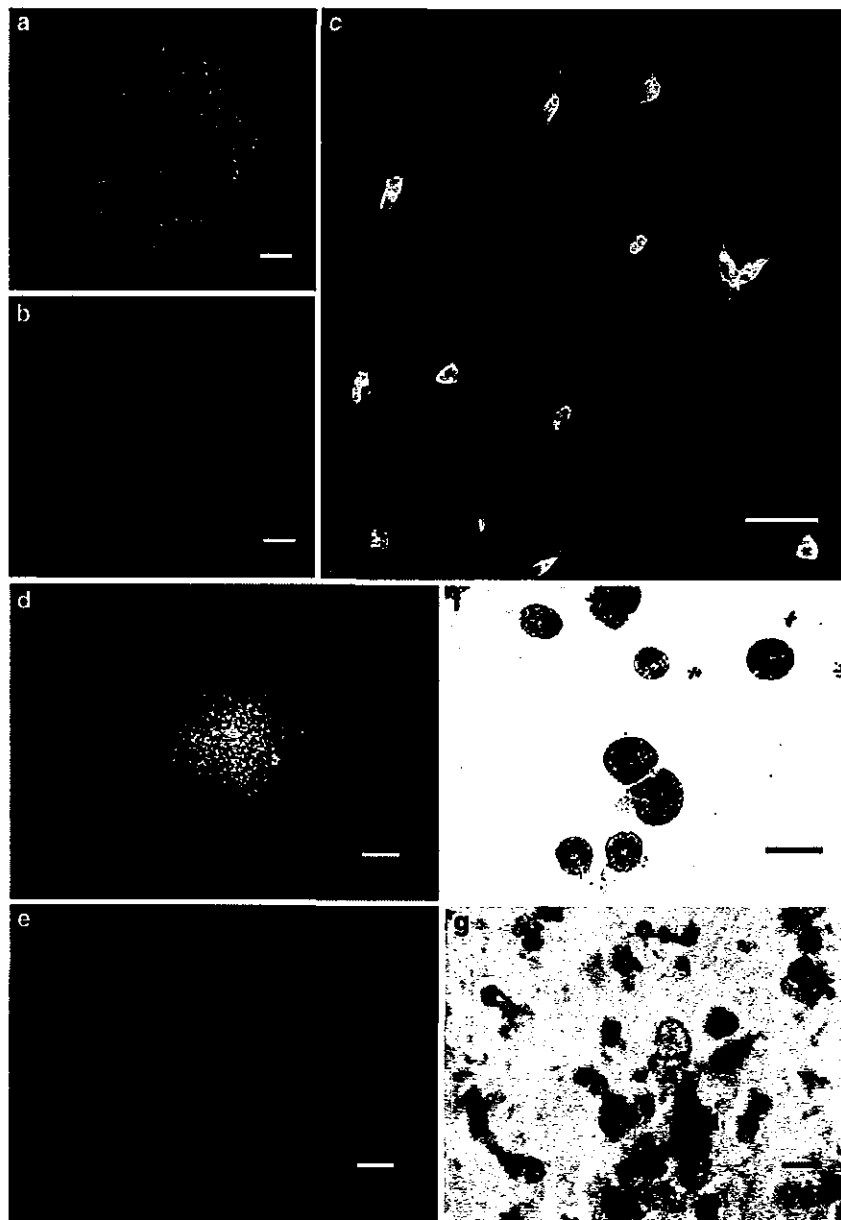
### Cell culture

Cynomolgus ES cells (CMK6) were maintained on a feeder layer of mitomycin C (Kyowa, Tokyo, Japan)-treated mouse (BALB/c) embryonic fibroblasts as described previously.<sup>18</sup> The culture medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 15% ES cell-qualified fetal calf serum (FCS; Invitrogen), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma, St Louis, MO, USA), 2 mM glutamine (Invitrogen), 0.1 mM nonessential amino acids (Invitrogen), and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). The ES cell colonies were routinely passaged every 3–4 days after dissociation with a combined approach of 0.25% trypsin (Invitrogen) digestion and mechanical cutting. Alkaline phosphatase staining was conducted with an Alkaline Phosphatase Chromogen Kit

(Biomeda, Foster City, CA, USA). Embryoid bodies were produced by culturing ES cell aggregates in Petri dishes. LLC-MK2 cells ( $1 \times 10^6$ ) were grown in six-well plates and cultured in Eagle's minimal essential medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS.

### Vectors

The F-defective SeV vector carrying the GFP gene was constructed as previously described.<sup>6</sup> The vector titer was  $1.8 \times 10^8$  TU/ml determined by counting fluorescent cells after the infection of LLC-MK2 cells. Gene transfer was conducted by adding various concentrations of the SeV vector solution to culture media. After 24 h of incubation, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and fresh medium was added. In some experiments, ribavirin (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; Sigma) was added at various concentrations to the culture media after infection. The



**Figure 5** Stable transgene expression during differentiation. A day-20 cystic embryoid body was observed under a fluorescent phase-contrast microscope, confirming that the embryoid body was fluorescing ((a), bright field; (b), dark field). After infection with the SeV vector, fluorescent cynomolgus ES cells differentiated into neural cells. Double immunostaining with anti-GFP (green) and anti-MAP-2 (red) confirmed that differentiated neural cells expressed GFP (c). Yellow cells indicate GFP-expressing neurons. SeV-infected, fluorescent cynomolgus ES cells also differentiated into fluorescent hematopoietic cells. A clonogenic hematopoietic colony was fluorescing ((d) bright field; (e), dark field). A cytospin specimen of hematopoietic colony cells (Wright-Giemsa staining) showed that the cells were mature granulocytes (f). The infected ES cell-derived, fluorescent neutrophils were positive for NBT (stained in black (g)). Bar = 100  $\mu$ m (a, b, g); 50  $\mu$ m (c, f); 500  $\mu$ m (d, e).

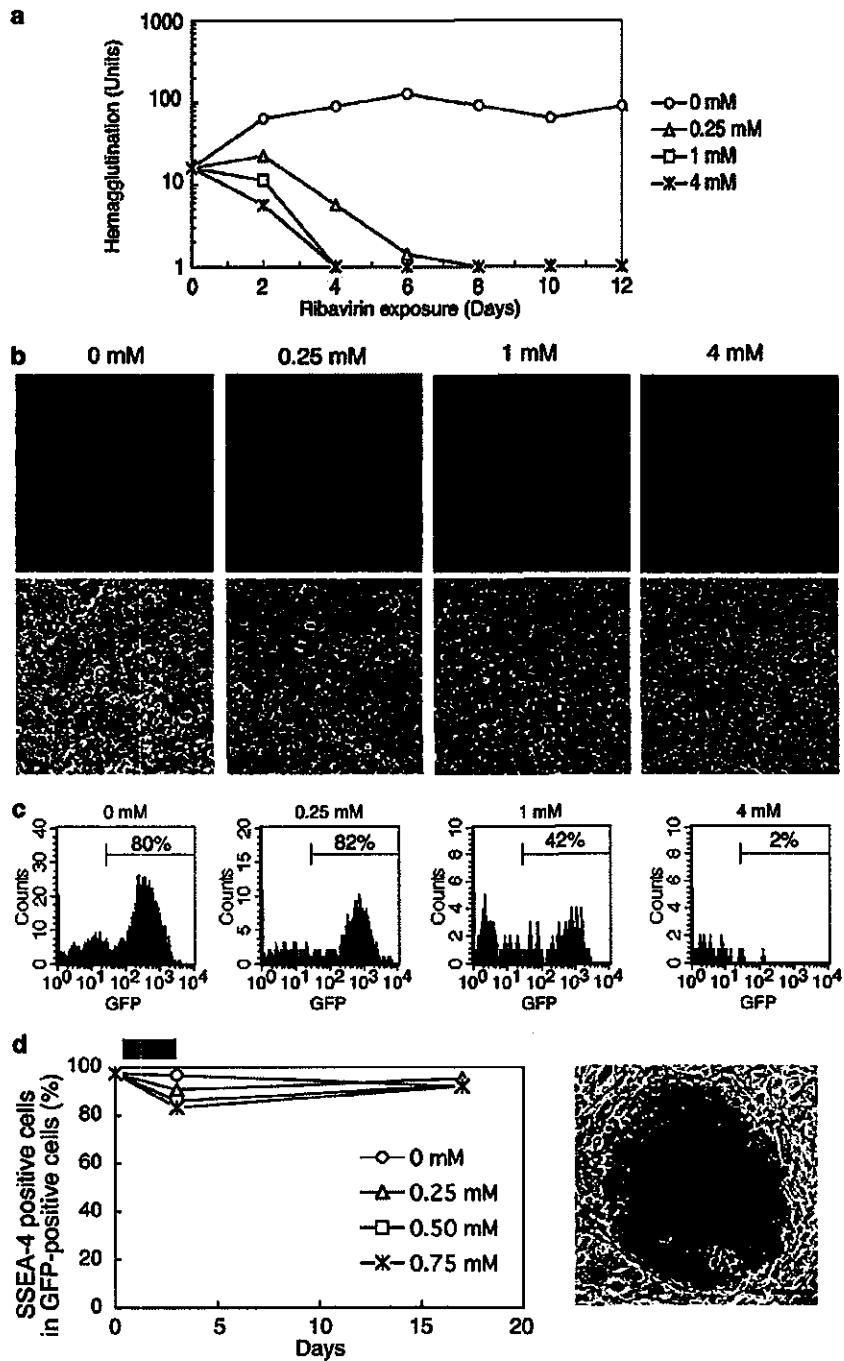
viral particles in infected cells were quantified by a hemagglutination assay as described previously.<sup>25</sup>

An adenovirus serotype 5-based vector carrying the GFP gene was constructed as reported.<sup>26</sup> It contained the cytomegalovirus (CMV) promoter, simian virus (SV)-40 intron, and SV-40 polyadenylation signal. An AAV serotype 2-based vector expressing the GFP gene under the control of the chicken  $\beta$ -actin promoter with the CMV immediate-early enhancer (a gift from Dr J Miyazaki)

was prepared as described previously.<sup>27</sup> Gene transfer experiments were performed using  $3.4 \times 10^2$  genome copies (g.c.)/cell of the adenoviral vector or  $2.4 \times 10^4$  g.c./cell of the AAV vector. The period of exposure was 48 h.

#### Flow cytometry

GFP and SSEA-4 expression was analyzed on a FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using the



**Figure 6** Ribavirin-regulated transgene expression. (a) A rhesus kidney cell line (LLC-MK2) was infected with the SeV vector at 3 TU/cell. Ribavirin was started at various concentrations on day 2 after the infection. The formation of viral particles in the infected LLC-MK2 cells was examined by the hemagglutination assay. (b) The ribavirin-treated LLC-MK2 cells were observed under a fluorescent microscope after an 8-day exposure of ribavirin (upper, dark field; lower, bright field). (c) Ribavirin was added at various concentrations to the SeV-infected, fluorescent cynomolgus ES cells. The GFP expression was assessed by flow cytometry after a 3-day exposure of ribavirin. (d) The fractions of SSEA-4-positive ES cells were assessed by flow cytometry with anti-SSEA-4 before and after a 3-day exposure of ribavirin and are shown as a function of time (days) in the left panel. A gray bar indicates ribavirin treatment. ES cells were stained for alkaline phosphatase (in red) at day 21 after a 3-day exposure of 0.75 mM ribavirin and are shown in the right panel. Bar = 100  $\mu$ m.

CellQuest software (Becton Dickinson). For SSEA-4 staining, cells were incubated with a primary antibody, anti-SSEA-4 (MC-813-70; Chemicon, Temecula, CA, USA), and then a secondary antibody, PE-conjugated

F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit anti-mouse immunoglobulins (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Cocultured BALB/c feeder cells could be distinguished from cynomolgus ES cells by using PE-conjugated anti-mouse

H-2d (SF1-1.1; PharMingen, San Diego, CA, USA), which does not react to cynomolgus cells but does react to BALB/c cells.

#### Teratoma formation

Cynomolgus ES cells (approximately  $10^6$  cells per site) were injected subcutaneously into the hind leg of 6- to 8-week-old nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). The resulting tumors (usually 9–12 weeks after the injection) were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde. For histological analysis, samples from the tumors were embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. To observe GFP fluorescence, samples were embedded in OTC compound (Sakura, Zoeterwoude, Netherlands), frozen, sectioned, and examined under a fluorescence microscope.

#### Hematopoietic differentiation

The mouse bone marrow stromal cell line OP9 was maintained in  $\alpha$ -modified minimum essential medium (Invitrogen) supplemented with 20% FCS as described previously.<sup>28</sup> For induction of hematopoietic differentiation, ES cells were seeded onto a mitomycin C-treated confluent OP9 cell layer in six-well plates. Medium to support the differentiation was described elsewhere.<sup>29</sup> Cells at day 18 were placed in Methocult GF+ media (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) at  $1 \times 10^4$  and  $1 \times 10^5$  cells per plate and clonogenic hematopoietic colonies were produced. After 14 days, individual colonies were removed and spun onto glass slides. Cells were stained with the Wright-Giemsa method. The nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) reduction test was performed on the cells as a granulocyte functional assay according to a previously described method.<sup>30</sup>

#### Neural differentiation

The induction of neural differentiation was carried out as described previously.<sup>31</sup> Day-4 embryoid bodies were plated onto tissue culture dishes and nestin-positive cells were selected in DMEM/F12 medium supplemented with 5  $\mu$ g/ml of insulin (Sigma), 50  $\mu$ g/ml of transferrin (Sigma), 30 nM selenium chloride (Sigma), and 5  $\mu$ g/ml of fibronectin (Sigma) for 5 days. Cells were then trypsinized and plated in polyornithine-coated dishes (15  $\mu$ g/ml) and expanded in N2 medium<sup>22</sup> supplemented with 1  $\mu$ g/ml of laminin (Sigma) and 10  $\mu$ g/ml of basic fibroblast growth factor (bFGF; Roche, Basel, Switzerland) for 6 days. Differentiation was induced by removal of bFGF. To confirm the neural differentiation, cells were stained with anti-human MAP-2. Briefly, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and incubated with anti-human MAP-2 (HM-2; Sigma; diluted 1:4000) and then by Alexa Fluor 594-labeled antibody (diluted 1:500; Molecular Probe, Eugene, OR, USA). The samples were examined under a fluorescence microscope.

#### DNA-PCR

DNA-PCR for the SeV genome and GFP sequences was carried out as follows. DNA was extracted using the QIAamp DNA mini kits (Qiagen, Hilden, Germany) and 250 ng was used for each PCR with ExTaq (Takara, Shiga, Japan). Amplification conditions were 30 cycles of 94°C for 1 min, a variable annealing temperature (noted

below) for 1 min, and 72°C for 1 min. The amplified products were run on 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Primer sequences, annealing temperatures and product sizes were as follows: the SeV vector genome sequence: 5'-AGA GAA CAA GAC TAA GGC TAC C-3' and 5'-ACC TTG ACA ATC CTG ATG TGG-3' (55°C, 580 bp); the GFP sequence: 5'-CGT CCA GGA GCG CAC CAT CTT C-3' and 5'-GGT CTT TGC TCA GGG CGG ACT-3' (60°C, 356 bp). the cynomolgus  $\beta$ -actin sequence: 5'-CAT TGT CAT GGA CTC TGG CGA CCG-3' and 5'-CAT CTC CTG CTC GAA GTC TAG GGC-3' (60°C, 234 bp).

#### RNA-PCR

RNA-PCR for the SeV RNA genomic sequence was carried out as follows. Total RNA was extracted using RNA STAT-60 (Tel-Test, Friendswood, TX, USA). Reverse transcription was conducted by using Taqman reverse transcription reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The product (250 ng) after the reverse transcription was used for the subsequent PCR as described above.

#### Acknowledgements

Cynomolgus ES cells were provided by Norio Nakatsuji (Kyoto University, Kyoto, Japan), Yasushi Kondo (Tanabe Seiyaku Co. Ltd, Osaka, Japan), and Ryuzo Torii (Shiga University of Medical Science, Shiga, Japan). OP9 cells were provided by Toru Nakano (Osaka University, Osaka, Japan). We thank Yujiro Tanaka and Takayuki Asano for cultivating cynomolgus ES cells and Takeshi Hara for conducting NBT tests. We also thank Natsuko Kurosawa for technical assistance.

#### References

- 1 Thomson JA et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145–1147.
- 2 Reubinoff BE et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399–404.
- 3 Asano T et al. Highly Efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector. *Mol Ther* 2002; 6: 162–168.
- 4 Ma Y et al. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells* 2003; 21: 111–117.
- 5 Gropp M et al. Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. *Mol Ther* 2003; 7: 281–287.
- 6 Li HO et al. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J Virol* 2000; 74: 6564–6569.
- 7 Yonemitsu Y et al. Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 970–973.
- 8 Masaki I et al. Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J* 2001; 15: 1294–1296.
- 9 Shiotani A et al. Skeletal muscle regeneration after insulin-like growth factor I gene transfer by recombinant Sendai virus vector. *Gene Therapy* 2001; 8: 1043–1050.
- 10 Yamashita A et al. Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J Immunol* 2002; 168: 450–457.

- 11 Ikeda Y *et al*. Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer into adult rat retinal tissue: efficient gene transfer by brief exposure. *Exp Eye Res* 2002; 75: 39–48.
- 12 Jin CH *et al*. Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hematopoietic stem cells. *Gene Therapy* 2003; 10: 272–277.
- 13 Crotty S *et al*. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 2000; 6: 1375–1379.
- 14 Vo NV, Young KC, Lai MM. Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* 2003; 42: 10462–10471.
- 15 McHutchison JG *et al*. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485–1492.
- 16 Davis GL *et al*. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1493–1499.
- 17 McCormick JB *et al*. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med* 1986; 314: 20–26.
- 18 Suemori H *et al*. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev Dyn* 2001; 222: 273–279.
- 19 Spann KM, Collins PL, Teng MN. Genetic recombination during coinfection of two mutants of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 2003; 77: 11201–11211.
- 20 Tozawa H *et al*. Neutralizing activity of the antibodies against two kinds of envelope glycoproteins of Sendai virus. *Arch Virol* 1986; 91: 145–161.
- 21 Tashiro M, Tobita K, Seto JT, Rott R. Comparison of protective effects of serum antibody on respiratory and systemic infection of Sendai virus in mice. *Arch Virol* 1989; 107: 85–96.
- 22 Inoue M *et al*. Nontransmissible virus-like particle formation by F-deficient Sendai virus is temperature sensitive and reduced by mutations in M and HN proteins. *J Virol* 2003; 77: 3238–3246.
- 23 Inoue M *et al*. A new Sendai virus vector deficient in the matrix gene does not form virus particles and shows extensive cell-to-cell spreading. *J Virol* 2003; 77: 6419–6429.
- 24 Inoue M *et al*. Recombinant Sendai virus vectors deleted in both the matrix and the fusion genes: efficient gene transfer with preferable properties. *J Gene Med*, published online 5 May 2004. doi:10.1002/jgm.597.
- 25 Kato A *et al*. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells* 1996; 1: 569–579.
- 26 Okada T *et al*. Efficient directional cloning of recombinant adenovirus vectors using DNA–protein complex. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1947–1950.
- 27 Okada T *et al*. Adeno-associated viral vector-mediated gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Methods Enzymol* 2002; 346: 378–393.
- 28 Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 1994; 265: 1098–1101.
- 29 Li F *et al*. Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells *in vitro*. *Blood* 2001; 98: 335–342.
- 30 Sekhsaria S *et al*. Peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of p47<sup>phox</sup>-deficient chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7446–7450.
- 31 Lee SH *et al*. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 675–679.
- 32 Johe KK *et al*. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 1996; 10: 3129–3140.
- 33 Takada T *et al*. Monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein. *Cell Transplant* 2002; 11: 631–635.

# 蛍光相関分光法 (FCS) を用いた抗原抗体反応 解析および検体検出

Antigen-Antibody-Reaction Analysis and Analyte Detection with Fluorescence  
Correlation Spectroscopy (FCS)

坂田啓司\*<sup>1</sup> 藤井文彦\*<sup>2</sup> 田村 守\*<sup>3</sup> 金城政孝\*<sup>4</sup>

\* 1 科学技術振興機構 研究成果活用プラザ北海道 生体-分子計測研究室

\* 2 科学技術振興機構 研究成果活用プラザ北海道 生体-分子計測研究室

\* 3 北海道大学 電子科学研究所 教授

\* 4 北海道大学 電子科学研究所 助教授

シーエムシー出版刊『月刊バイオインダストリー2004年4月号』抜刷

# 蛍光相関分光法 (FCS) を用いた抗原抗体反応 解析および検体検出



# 蛍光相関分光法 (FCS) を用いた抗原抗体反応解析および検体検出

Antigen-Antibody-Reaction Analysis and Analyte Detection with Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

坂田啓司\*<sup>1</sup> 藤井文彦\*<sup>2</sup> 田村 守\*<sup>3</sup> 金城政孝\*<sup>4</sup>

## 1. はじめに

蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, 以下 FCS) は, 溶液中の蛍光分子のブラウン運動を利用し, 分子の「大きさ」や「数」といった物理量を得る古くて新しい方法である<sup>1-6)</sup>。

FCS の特徴は, 溶液に含まれる蛍光分子の濃度や分子間相互作用を物理的な分離過程を経ずに

ほぼ実時間でモニタできることである。そのため, FCS を用いた検出系では, これまで主流となっていた生体分子検出系 (例えば ELISA など) で必要であった煩雑な Bound/Free 分離過程を省くことができる。従って, 短時間に多量のサンプルを高感度に, かつ自動的に測定することに向いている。

本稿では, 特に FCS を用いた抗原抗体反応解析について報告する。

\*<sup>1</sup>Hiroshi Sakata 科学技術振興機構 研究成果活用プラザ北海道 生体一分子計測研究室 研究員。筆者略歴: 1999年大阪大学 工学部卒業, 2001年同大学大学院 工学研究科修了。連絡先: 〒060-0819 札幌市北区北19条西11丁目 Tel. 011-708-1614/Fax. 同左 (E-mail) hsakata@sapporo.jst-plaza.jp

\*<sup>2</sup>Fumihiko Fujii 科学技術振興機構 研究成果活用プラザ北海道 生体一分子計測研究室。筆者略歴: 1996年北海道大学 理学部卒業, 1998年同大学大学院 理学研究科修了, 2003年同 博士過程単位取得退学; 連絡先: 同上 (E-mail) ffujii@sapporo.jst-plaza.jp

\*<sup>3</sup>Mamoru Tamura 北海道大学 電子科学研究所 教授。筆者略歴: 1970年北海道大学大学院 理学研究科 化学専攻 博士過程終了, 1970~74年米国ペンシルバニア大学 医学部 博士研究員, 1974年大阪大学 産業科学研究所 放射線高分子部門 助手, 1978年北海道大学 応用電気研究所 生体物理部門 助教授, 1988年同 教授, 1992年同大学 電子科学研究所 超分子分光分野 教授。連絡先: 〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目 Tel. 011-706-2410/Fax. 011-706-4964 (E-mail) mtamura@imd.es.hokudai.ac.jp

\*<sup>4</sup>Masataka Kinjo 北海道大学 電子科学研究所 助教授。筆者略歴: 1981年宇都宮大学 修士, 1985年自治医科大学大学院修了, 1985年北海道大学 応用電気研究所 助手, 1997年同大学 電子科学研究所 助教授。連絡先: 同上 Tel. 011-706-2890 (E-mail) kinjo@imd.es.hokudai.ac.jp

## 2. FCS 測定 の 原理

### 2.1 装 置

FCS 測定では、共焦点光学系を用いることにより、試料溶液の極微小領域（直径約 400nm、軸長約 2 $\mu$ m、体積 $\sim 10^{-16}$ L）からの蛍光を検出している（図 1）。本稿では、FCS 測定に Carl Zeiss 社製の ConfoCor2 とオリンパス社製の MF 20 を用いた。測定は、波長 488nm で 30 秒間の測定を 3 回行った。後述する蛍光相互相関分光法による測定には MF20 を用いた。測定は、波長 488nm と 633nm で 120 秒間の測定を 3 回行った。

### 2.2 観測される蛍光強度の揺らぎ

観測領域は開放系であるため、蛍光分子はブラウン運動にしたがい領域内を出入りする。すると、観測領域中の分子の数はある値を中心に変動し、数の揺らぎが生じる。そして、この数の揺らぎに起因した蛍光強度の揺らぎが観測される<sup>6)</sup>。

### 2.3 揺らぎの解析

揺らぎの信号から情報を引き出すために自己相関関数を用いる。FCS で用いる自己相関関数は式(1)で示される。

$$C(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[ \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \right] \left[ \frac{1}{1 + (1/s)^2 (\tau/\tau_D)} \right]^{1/2} \quad (1)$$

ここで、 $s$  は  $s = z/w$  であり、観測領域の半径

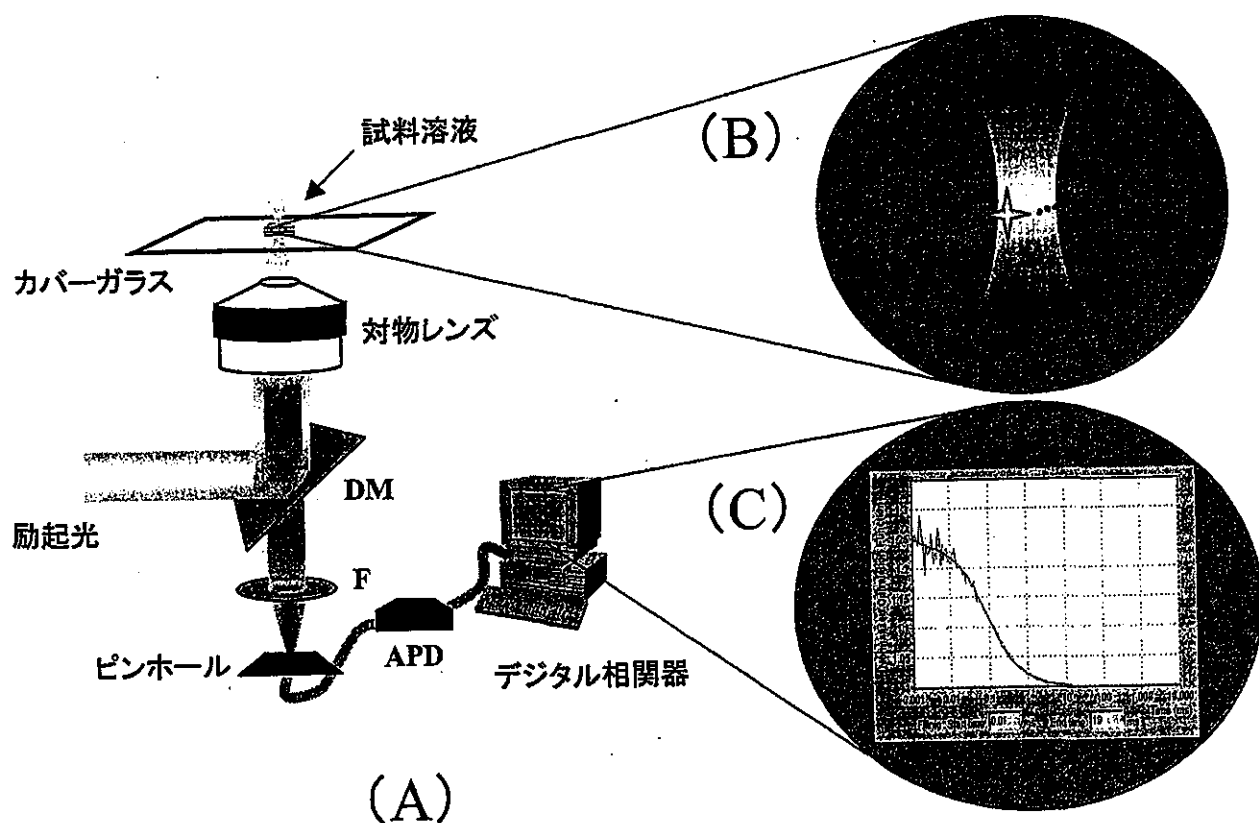


図 1 蛍光相関分光 (FCS) 装置(A)と観測領域の拡大(B)の模式図および蛍光相関解析後の相関曲線(C)  
 (A)レーザーからの励起光はダイクロミックミラー (DM) と対物レンズを経由してカバーガラス上の試料溶液に導かれる。蛍光発光はロングパスフィルター (F) を通り、共焦点上のピンホールで共焦点面以外のバックグラウンド光を取り除き、アバランシェフォトダイオード検出器 (APD) へと導かれ、その信号はさらにデジタル相関器で解析される。  
 (B)対物レンズによって極限まで絞られた共焦点領域を、ブラウン運動している蛍光分子が通過する様子を示す。  
 (C)観測される蛍光強度の揺らぎを式(1)および(4)を用いて解析することで、分子の「数」や「大きさ」といった物理量が得られる。

( $w$ ) と半長軸 ( $z$ ) の比を示す。 $\tau_D$  は拡散時間 (または相関時間) と呼ばれ、蛍光分子が拡散によって観測領域を通過する平均の時間を示す。 $N$  は一定時間内に観測領域内に存在する分子の平均の数を示す。

揺らぎを式(1)により解析すると図1(C)に示すような曲線が得られ、そこから分子の「動き易さ」を示す拡散時間 $\tau_D$ と分子の「数」 $N$ が得られる。相関曲線は、蛍光分子が他の分子と会合するなどして分子のサイズ (大きさ) が大きくなると右にシフトし、反対に解離するなどしてサイズが小さくなると左にシフトする。

式(1)で得られる拡散時間 $\tau_D$ は、拡散定数 $D$ と式(2)の関係にある。

$$\tau_D = w^2 / 4D \quad (2)$$

さらに拡散定数 $D$ は、分子を球と仮定した場合のアインシュタイン-ストークス (Einstein-Stokes) 式により、分子の半径 $r$ と式(3)に示される関係にある。

$$D = \frac{\kappa_D T}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

ここで、 $\kappa_D$ 、 $T$ 、および $\eta$ はそれぞれボルツマン定数、絶対温度、および溶媒の粘性である。

従って、拡散時間 $\tau_D$ は式(2)と(3)より分子の「大きさ」(サイズ)に当たる分子半径 $r$ と式(4)のように関係付けられる。

$$\tau_D \propto 1/D \propto r \quad (4)$$

このように蛍光強度の揺らぎを式(1)および(4)を用いて解析することで、観測領域内に存在する分子の「数」や「大きさ」を得ることができる。揺らぎと自己相関関数についての詳しい説明は解説書があるのでそちらを参考にされたい<sup>7-9)</sup>。

### 3. 抗原抗体反応解析

#### 3.1 分子量に依存した拡散時間の変化

抗原抗体反応系には、改変緑色蛍光タンパク質 (以下、EGFP) と抗 GFP 抗体を用いた。EGFP と抗 GFP 抗体は、溶液中で抗原抗体反応により

EGFP-抗 GFP 抗体複合体 (以下、EGFP-Ab) を形成する。EGFP と EGFP-Ab をそれぞれ ConfoCor2 を用いて測定し、得られた相関関数曲線を図2に示した。EGFP の相関曲線 (×) と比べて、抗 GFP 抗体と会合して分子サイズが大きくなった EGFP-Ab の相関曲線 (○) が右にシフトしているのが見てとれる。

次に分子量と拡散時間との関係を、MF20 を用いて調べた。FCS 測定し、式(1)を用いて算出した EGFP の拡散時間は  $380 \mu\text{s}$  であった。EGFP の分子量と拡散時間から式(5)を用いて予測した EGFP-Ab の拡散時間は  $690 \mu\text{s}$  であった。実際に測定し、式(1)を用いて算出した EGFP-Ab の拡散時間は  $760 \mu\text{s}$  であり、その値はほぼ一致した。なお、拡散時間に 1 割程度のずれが生じているが、これは式(5)が分子の形状を球体と仮定した式であるのに対して、抗体の形状が Y 字型をしているためと考えられる。

$$\tau_D \propto r \propto \sqrt[3]{\text{分子量}} \quad (5)$$

#### 3.2 FCS による抗原抗体反応解析

濃度  $10 \text{ nM}$  の EGFP と濃度  $50 \sim 0.1 \text{ nM}$  の間で希釈した抗 GFP 抗体とを混合し、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた後に FCS の測定を行った。式(1)を用いて解析した拡散時間を図3(A)に示した。抗体の

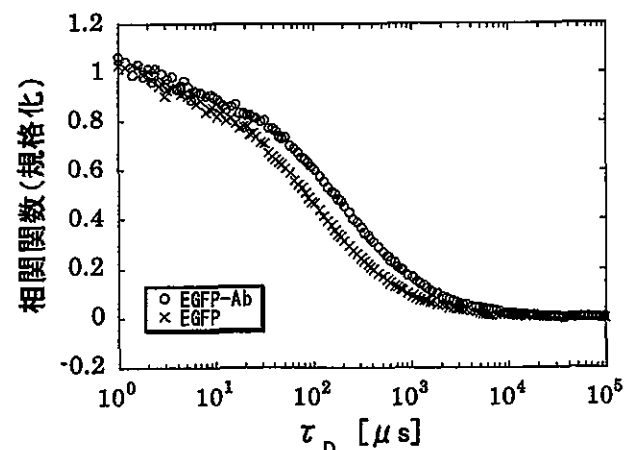


図2 EGFP と EGFP-Ab の相関関数曲線  
測定は ConfoCor2 を用いて 30 秒間測定し、得られた結果を示す。

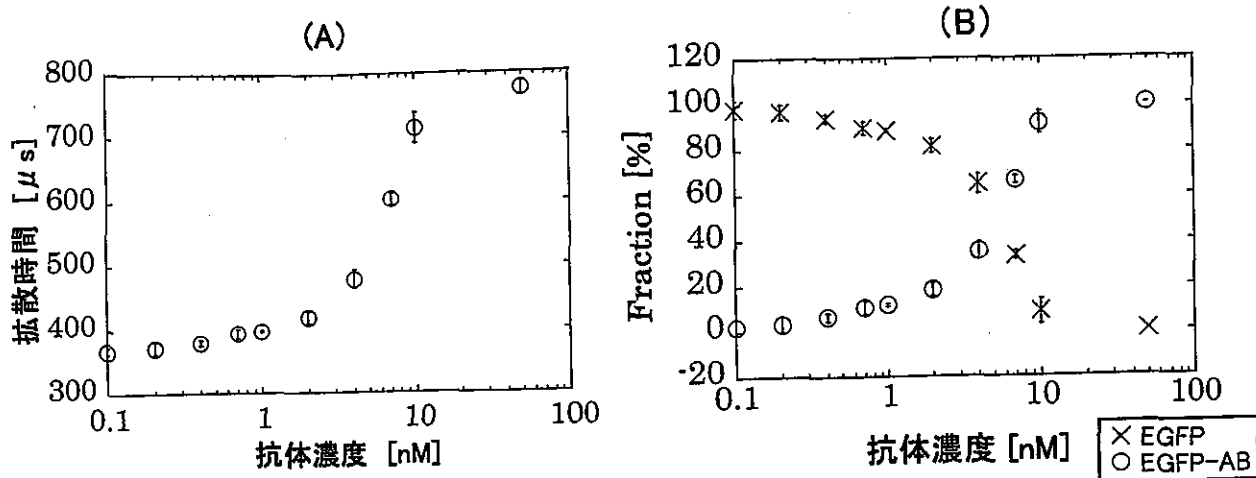


図3 (A)は横軸に投入した抗 GFP 抗体濃度を、縦軸には式(1)から得られた拡散時間を示したグラフおよび(B)は横軸には抗体濃度を、縦軸には2成分モデル式(式(6))で解析して得られた Fraction ( $f$ ) を示したグラフ

濃度が上昇するにしたがい拡散時間が徐々に大きくなっていく様子が分かる。これは、FCS測定によって得られる平均拡散時間が混合溶液中に存在するEGFPとEGFP-Abとの存在比を反映しているためである。

次に、式(1)で示した相関関数の解析式を単純に拡張した2成分モデル式(式(6))を用いて、さらに抗原抗体反応の解析を行った(図3(B))。

$$C(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[ \frac{1-f}{\left[1 + \frac{1}{\tau_{free}}\right] \left[1 + \left(\frac{1}{s}\right)^2 \frac{1}{\tau_{free}}\right]^{1/2}} + \frac{f}{\left[1 + \frac{1}{\tau_{bound}}\right] \left[1 + \left(\frac{1}{s}\right)^2 \frac{1}{\tau_{bound}}\right]^{1/2}} \right] \quad (6)$$

ここで  $\tau_{free} = w^2/4D_{free}$ ,  $\tau_{bound} = w^2/4D_{bound}$ ,  $s = z/w$  である。また  $\tau_{free}$  は単独のEGFPの拡散時間を、 $\tau_{bound}$  は複合体を形成したEGFP-Abの拡散時間を示す。 $f$  は全EGFP分子数に占めるEGFP-Abの割合(Fraction)を示している。

検体の濃度が上昇するにつれてEGFP-Abがより多く形成され、逆に結合していないEGFPが減少していく様子が分かる(図3(B))。

### 3.3 FCSによる解離定数の算出

反応混合液中のEGFPと抗GFP抗体は、それぞれ互いに反応し会合と解離を可逆的に繰り返す平衡状態にある。この反応の平衡定数( $K_d$ )を、FCSを用いて算出した。ここでは、濃度1nMのEGFPと濃度50~0.01nMの抗GFP抗体を混合し、37°Cで1時間反応させた後にFCS測定した。その結果得られたEGFP-Abの割合を図4(A)に示した。

図4(A)中の1つのプロットから式(7)を用いて  $K_d$  を算出できる。

$$K_d = \frac{[EGFP]_{free} [抗EGFP抗体]_{free}}{[EGFP-Ab]} \quad (7)$$

例えば抗体濃度0.7nMの場合(図4(A)\*), その  $K_d$  は0.86nMであった。またFCS測定により得られたFractionを利用して  $K_d$  を求めることもできる<sup>10)</sup>。Fractionは全体のEGFP分子がどれだけの割合でEGFP-Abを形成しているかを示すものである。したがって、Fractionは式(8)のように表すことができる。

$$Fraction = \frac{[EGFP-Ab]}{([EGFP]_{free} + [EGFP-Ab])} \quad (8)$$

ここで、式(7)と(8)から式(9)が導かれる。

$$Fraction = \frac{[抗GFP抗体]}{(K_d + [抗GFP抗体]_{free})} \quad (9)$$

式(9)を用いて得られた抗GFP抗体の  $K_d$  は

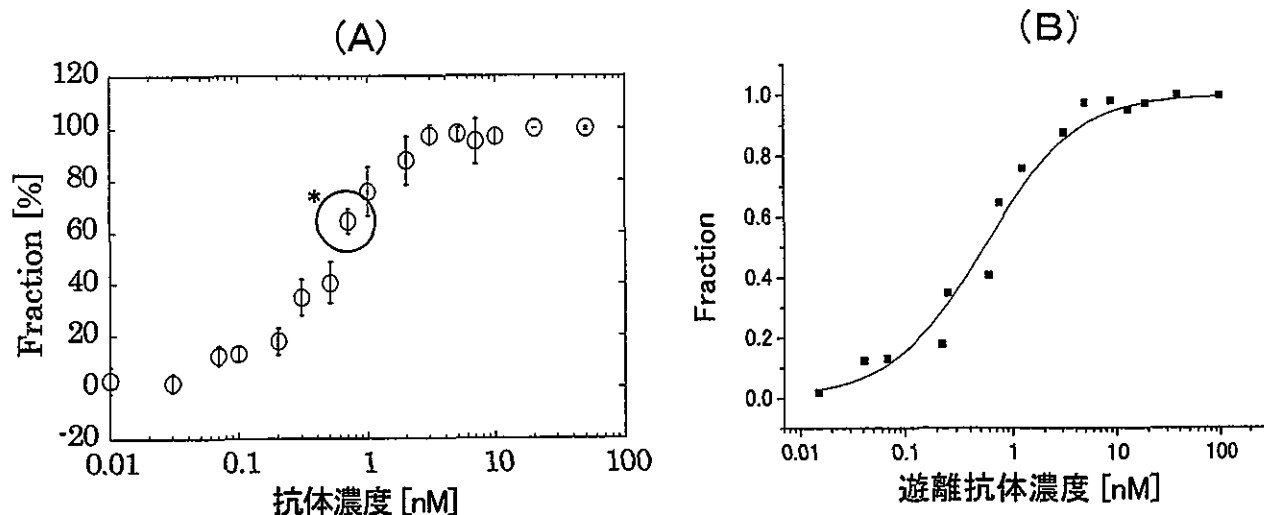


図4 抗体濃度に対して2成分モデルFCS解析(A)および式(9)を用いて図4(A)からの $K_d$ の算出 (B)

(A)グラフ中の\*は本文中で $K_d$ を計算したポイントを示す。

(B)横軸は反応溶液中で単独に存在する抗GFP抗体の濃度を、縦軸にはFCS解析から得られたFractionを示す。各プロットは図4(A)のプロットに対応し、グラフ中の曲線は式(9)を用いてフィッティングした曲線である。

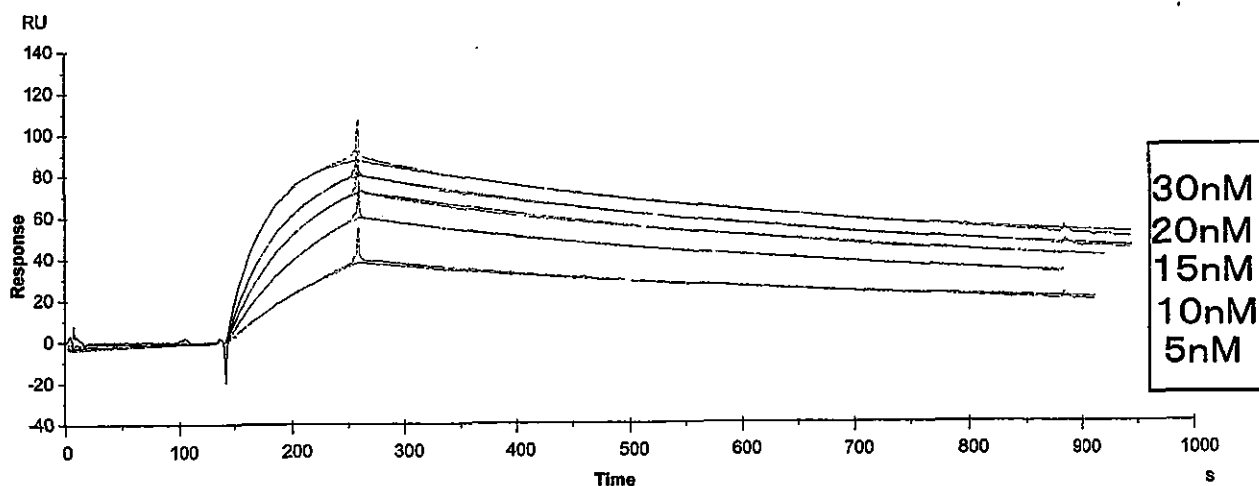


図5 BIAcore 測定 of センサーグラム

BIAcoreによる $K_d$ 算出は、抗体をアミンカップリング法を用いてセンサーチップ表面に固定化し、濃度30~5nMのEGFPを流して行った。曲線はそれぞれの濃度におけるセンサーグラムを表し、上からEGFP濃度30nM, 20nM, 15nM, 10nM, 5nMの場合に得られたセンサーグラムである。解析は1:1(Langmuir) bindingモデル式を用いたグローバルフィッティングを独立に3回行った。

0.54±0.05nMであった(図4(B))。

FCS測定により求めた $K_d$ を、BIAcore測定から得られた $K_d$ と比較した。BIAcore測定により得られた $K_d$ は1.5±0.03nMであった(図5)。同じ抗体であるが、FCS測定から得られた $K_d$ の方がBIAcore測定から得られた $K_d$ よりも小さくなった。これは、FCS測定による $K_d$ 算出は均一な溶液系で行ったのに対して、BIAcore測定で

は抗体をセンサーチップ上に固定化した不均一な系で行ったことによる影響と考えられる。

### 3.4 FCSによる検体検出

抗原抗体反応を利用してFCSによる検体検出を行った。EGFPを検出試薬、抗GFP抗体を検体とみなして、FCSによる検体検出の下限値を検討した。濃度10nM(図6(A))、1nM(図6(B))

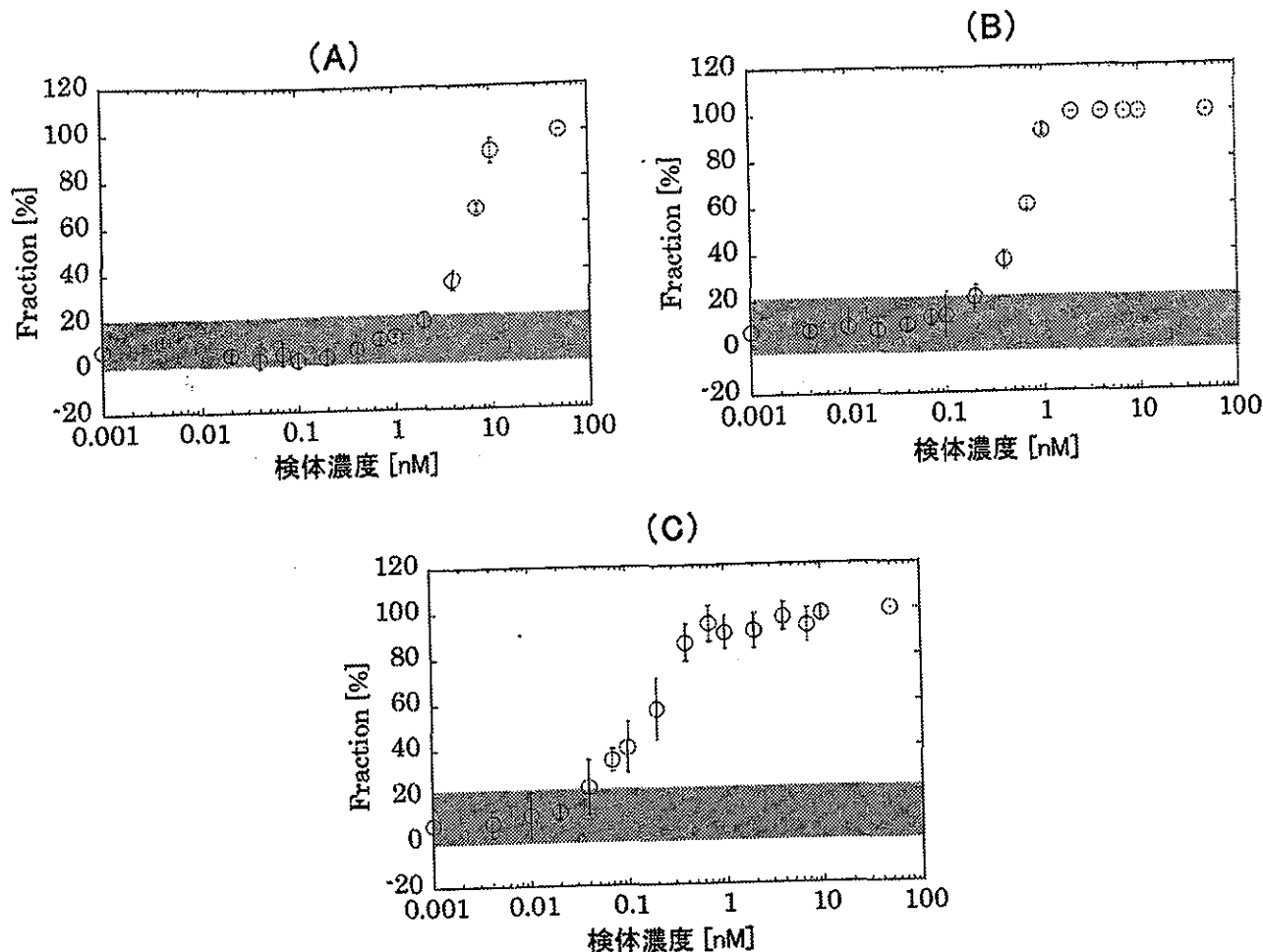


図6 2成分モデル解析を行ったFCSによる検体検出の結果

(A), (B)および(C)はそれぞれ10nM, 1nM および0.1nM のEGFPを用いた場合の検体検出の結果を示す。網掛け部分はEGFPを認識しない抗体とEGFPとを反応させた時に得られた複合体のFraction値(バックグラウンド値)の3倍の領域を示す。この領域よりFraction値が高い場合について検体検出できていると判断した。

および0.1nM(図6(C))のEGFPを用いて濃度50~0.01nMの抗GFP抗体をFCSにより検出した結果を図6に示した。

結果は、EGFP濃度が10, 1および0.1nMの場合に、それぞれ濃度3, 0.3および0.05nMまで検体検出が可能であった。これにより、EGFP濃度を下げることで、より低い濃度の検体を検出できることが分かった。これは、溶液中に存在するEGFP単独体の濃度に対して、EGFP-Abの濃度が相対的に大きくなったためである。つまりFCS測定を用いた検体検出では、検出試薬の濃度を下げることで検出感度を向上させ得ることが分かった。

### 3.5 蛍光相互相関分光法による検体検出

検出試薬の濃度を下げる方法以外に検体を高感度に検出し得る方法として蛍光相互相関分光法(Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy; FCCS)<sup>5, 11, 12)</sup>を用いた検体検出を試みた。FCS測定が1色の蛍光色素を用いるのに対し、FCCS測定では2色の蛍光色素を用いる。詳しい原理はここでは割愛するが、FCS測定の場合は分子の大きさに依存した分子の「動きやすさ」を測定したが、FCCS測定では分子間の相互作用を直接検出する。FCCS測定でも微小な領域を観察して蛍光強度の揺らぎを検出することは同じだが、色の異なる2種類の蛍光分子の揺らぎの「同時性」を解析する点で異なる。2色の蛍光分子が「別々」

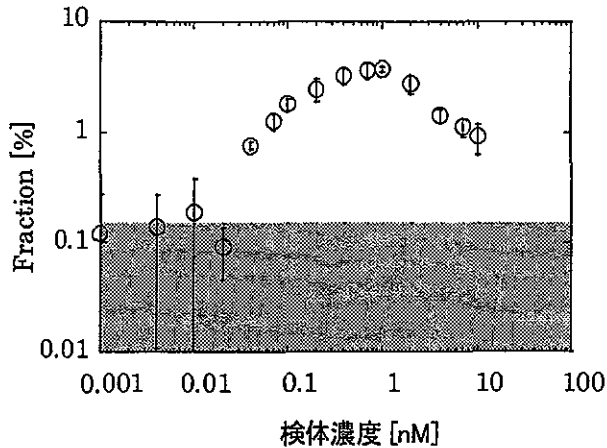


図7 FCCS法による検体検出

横軸には抗 GFP 抗体 (検体) の濃度を、縦軸には全蛍光分子中に占める EGFP-Ab-Fab647 の Fraction を示す。網掛け部分は EGFP を認識しない抗体を用いた時に得られる Fraction の範囲を示す。この領域より Fraction 値が高い場合について検体検出できていると判断した。

に動いている場合は2つの揺らぎに相関はないが、それらの分子が直接的にまたは別の分子を介して間接的に結合して「同時」に動く場合には2つの揺らぎに相関が生じる。FCCS測定では相関のあったシグナルだけを取り出し、得られたシグナルを解析するため、相互作用していない分子からのシグナルを取り除くことができる。

今回行った FCCS 測定による検体検出では、先程まで使用していた EGFP と抗 GFP 抗体 (検体) に加えて、さらに別の色で標識化した抗 GFP 抗体を認識する抗体断片 (Fab647) の3種類を合わせて用いた。FCCS で検出する分子は、EGFP、抗 GFP 抗体および Fab647 の3種類の分子が結合した3重合体 (以下、EGFP-Ab-Fab647) である。濃度 1 nM の EGFP および 1 nM の Fab647 を用いて、濃度 10~0.001 nM の抗 GFP 抗体を検討した結果を図7に示した。

検体濃度が上昇するに従って EGFP-Ab-Fab647 の Fraction が上昇するのがみてとれる。また検体濃度が 1 nM を超えた辺りから EGFP-Ab-Fab647 の割合が減少しているのが分かる。これは、EGFP-Ab-Fab647 の中心に位置する検体 (抗 GFP 抗体) がそれぞれの検出試薬 (EGFP および Fab647) よりも多くなることで、EGFP-

Ab あるいは Ab-Fab647 といった複合体を形成する割合が高くなり、逆に EGFP-Ab-Fab647 を形成する割合が減るためと考えられる。濃度 1 nM の EGFP および 1 nM の Fab647 を用いた場合、検体濃度 40 pM まで検体を検出できている。これは同じ濃度の検出試薬 (1 nM の EGFP) を用いた FCS 法による検体検出の場合 (300 pM, 図6(B)を参照) よりも約 1 オーダー感度が高い。

濃度 0.1 nM の EGFP と 0.1 nM の Fab647 を用いた場合の検体検出限界は 4 pM であった。このことから、FCCS の場合も FCS と同様に検出試薬の濃度を下げることで感度を上げ得ることが分かった。

#### 4. おわりに

本稿では、EGFP と抗 GFP 抗体との抗原抗体反応を用いた FCS 測定による抗原抗体反応解析および検体検出を主に紹介したが、これらの解析は EGFP と抗 GFP 抗体との抗原抗体反応に限定されるものではなく、他の抗原抗体反応を用いても実施可能である<sup>11)</sup>。実際に、FCS とほぼ同じ装置を用いて、1分子あたりの蛍光強度変化から神経変性疾患であるクロイツフェルト・ヤコブ病やアルツハイマー病の原因物質であるプリオンタンパク質やβ-アミロイドタンパク質の凝集状態を解析した報告が既になされている<sup>13, 14)</sup>。筆者らもまた、科学技術振興機構のプロジェクトにおいて FCS 測定を用いて迅速かつ高感度に神経変性疾患の一つ、BSE の原因物質である病原性変異性タンパク質プリオンを自動検出する系、「高感度ハイスループット BSE 検出系」の構築を試みている。

FCS は抗体や抗原を固定せず自然な状態で測定できるため、抗体を用いた薬や治療を行うときの抗体の力価というものを測定する場合にも有用である。加えて、分子の「大きさ」や「数」といった実にシンプルで基本的な物理量を測定する手法であるため、本稿で紹介したような特定の研究目的に限定されず、研究者のアイディア次第で様々な研究に応用可能であろう。しかしながら、FCS

測定する際に注意していただきたいのは蛍光分子の標識化である。今回用いた EGFP はそれ自体が強い蛍光を発するタンパク質であるため蛍光分子の標識化を要しなかったが、通常は抗原、抗体またはその他の分子のいずれかに蛍光分子を標識化しなければならない。このため、分子それ自体の性質が標識化によって変化しないよう注意しなければならない。

今回紹介した研究の一部は、北海道大学大学院薬学研究科・稲垣冬彦教授の研究室で行われたものであることを記すとともに感謝の意を表します。また、同研究科の森岡弘志先生には BIAcore 測定その他につき様々なご指導を頂きました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Ehrenberg, M., Rigler, R., *Chem. Phys.*, **4**, 390-401 (1974)
- 2) Elson, E. L., Magde, D., *Biopolymers*, **13**, 1-27 (1974)
- 3) Koppel, D. E., *Physical Rev. A*, **10**, 1938-1945 (1974)
- 4) Thompson, N., *in Topics in Fluorescence Spectroscopy* (ed. Lakowicz, J. R.), **1**, pp.337-378, Plenum Press, New York and London (1991)
- 5) R. Rigler, E. S. Elson (Eds.), *Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and Applications*, Springer, Berlin (2001)
- 6) 金城政孝, 蛋白質・核酸・酵素, **44**, No.9 (1999)
- 7) 武者利光, ブルーバックスーゆらぎの世界, 講談社 (1980)
- 8) D. アイゼンバーグ, D. クローサーズ著, 西本吉助・影本彰弘訳, 生命科学のための物理化学 (下), pp. 596-600, 培風館 (1988)
- 9) 日野幹雄, スペクトル解析, pp.25-39, 朝倉書店 (1977)
- 10) S. Y. Tetin *et al.*, *Analytical Biochemistry*, **307**, 84-91 (2002)
- 11) Z. Földes-Papp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11509-11514 (2001)
- 12) Takagi, T. *et al.*, *Curr. Pharm. Biotech.*, in press
- 13) M. アイゲン, 日経サイエンス 1月号, pp.68-77 (2002)
- 14) M. Pitschke *et al.*, *Nature Medicine*, **4**, No.7, 832-834 (1998)



# 再生

Regenerative  
Medicine

日本再生医療学会雑誌

# 医療

2004

# 11

Vol.3 No.4

別刷

**メディカルレビュー社**

〒541-0046 大阪市中央区平野町1-7-3 吉田ビル TEL 06-6223-1468

〒113-0034 東京都文京区湯島3-19-11イトーピア湯島ビル TEL 03-3835-3041

## パーキンソン病モデルサルへの ES 細胞由来神経幹細胞の移植

*Transplantation of neural stem cells derived from embryonic stem cells in a primate model of Parkinson's disease*

### Keywords

パーキンソン病  
ES 細胞  
霊長類  
ドパミン→用語解説 158 頁  
PET

村松 慎一

自治医科大学内科学講座神経内科学部門

### Summary

Neural transplantation, as a treatment for advanced Parkinson's disease (PD), has been studied for more than a decade with the aim of replacing degenerated dopamine (DA) neurons. In some open-labeled clinical studies, fetal midbrain cells relieved motor symptoms when implanted in PD patients. However, in double-blind trials, the benefits were small and bothersome off-medication dyskinesias were observed in some patients. Progressive embryonic stem (ES) cell research has raised hopes of creating novel cell replacement therapies for PD. Neuronal stem cells (NSCs) were generated efficiently by cultivating cynomolgus monkey ES cells in astrocyte-conditioned medium under free-floating conditions. Transplantation of these NSCs into the putamen of cynomolgus monkeys treated with MPTP, a selective toxin for midbrain DA neurons, restored striatal DA functions. This may indicate that ES cells are suitable donor cells for humans. Further research is necessary to avoid adverse effects such as teratoma formation and dyskinesias, and to control multisystem degenerations.

### パーキンソン病

パーキンソン病は、動作緩慢、無動・寡動、安静時振戦、筋強剛などの運動障害を主症状とし、高齢者では Alzheimer 病に次いで頻度の高い神経変性疾患である。欧米を中心に、すでに 350 例以上の胎児脳細胞の移植が行われており、再生医学研究において新しい発見や技術開発が報告されるたびに臨床応用の有力な候補としてあげられてきた。

パーキンソン病では、線条体(被殻と尾状核)に投射する中脳黒質緻密部のドパミン神経細胞が進行性に脱落するが、その詳細な機序は明らかではない。一部の家族性パーキンソン病については、 $\alpha$ -synuclein, Parkin, DJ-1, NR4A2 (NURR1), UCH-L1, PINK1<sup>1)</sup> などの遺伝子変異が判明し、精力的に研究が進められている。しかし、大部分を占める散在性のパーキンソン病で

Muramatsu, Shin-ichi

Division of Neurology, Department of Medicine, Jichi Medical School

E-mail: muramats@jichi.ac.jp

は単一遺伝子の異常は見い出されず、発病には環境要因も含めた多因子が関与すると考えられている。そのため、現時点では根本的な治療法はない。

パーキンソン病の運動機能障害は、線条体におけるドパミンの欠乏によると考えられており、線条体のドパミン濃度が正常の20%程度に低下すると症状が発現する。淡蒼球や黒質網様部へ投射する線条体の神経細胞は脱落せず、それらに存在するドパミン受容体の機能は保たれているので、ドパミンを補充することにより運動機能の改善が期待できる。現行の薬物治療の目標は、線条体におけるドパミンの補充である。血液脳関門を通過しにくいドパミンに代わり、その前駆物質であるL-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)の製剤が使用され、少なくとも病初期には著効を示す。しかし、進行したパーキンソン病ではドパミン神経終末の変性脱落が著しく、L-dopaをドパミンに変換する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC)の活性が低下し、ドパミンへの変換が十分行われなくなる。また、ドパミンの貯蔵も困難となる。症状の改善を得るためには高用量のL-dopaを投与する必要が生じ、血中濃度の変動に伴い運動症状の急激な悪化や不随意運動が生じる。さらに、線条体だけでなく前頭葉などのドパミン受容体が刺激されるため精神症状もみられる。L-dopaに代わる薬剤として、経口投与により脳内に移行しドパミン受容体に直接作用するドパミン受容体作

動薬があるが、運動障害の改善効果はL-dopaに比べて弱い。また、高用量ではL-dopaと同様の不随意運動や精神症状を生じる。このように、薬物治療には限界がある。

パーキンソン病では、L-dopaが臨床応用される以前には、線条体の出力を伝える淡蒼球または視床を電気凝固により破壊する脳定位手術が行われてきた。最近では、破壊手術に代わり視床下核の深部脳刺激 (deep brain stimulation : DBS)が行われている。DBSはL-dopaの投与量を減らし、副作用を少なくする効果があるため有力な治療手段であるが、L-dopa治療に置き換わるものではない。

### 胎児脳細胞移植の現状

神経毒により黒質ドパミン神経細胞を脱落させたパーキンソン病モデルラットの線条体へ、ラット胎仔中脳のドパミン神経細胞を移植すると異常運動が改善したという1970年代後半の基礎実験に端を発し、1980年代以降スウェーデンのグループを中心に、人工中絶した胎児の中脳細胞をパーキンソン病患者の線条体に移植する治療が推進されてきた。移植後10年を経ても移植した細胞が生存し、ドパミンの産生と症状の軽減が得られていることなど<sup>2)</sup>、移植の有効性が強調された。しかし、これらの報告のほとんどは対照のないopen studyであった。そこで、米国において対照群の患者の頭蓋骨にも移植患者と同様の穿孔を開けるとい

う侵襲的な二重盲検試験が2つ行われた。いずれの試験でも移植群において、positron emission tomography (PET)によりドパミン合成を反映するF-18 fluorodopaの取り込みの増加が認められ、剖検例で移植したドパミン神経細胞が生着していることが確認されている。しかし、臨床効果については、当初期待されたほどではなかった。最初の試験では、60歳以下の患者でのみプラセボ群と比較して軽度の症状の改善を認めた<sup>3)</sup>。また、二番目の試験では、移植前の運動障害が軽い患者のみ2年後の症状の増悪がプラセボ群より少なかったが、全体としてはプラセボ群と差がなかった<sup>4)</sup>。問題になったのは、移植患者の一部でL-dopaを服薬しない状態においても不随意運動 (off-medication dyskinesiasあるいはrun-away dyskinesias)が出現したことである。その出現機序としては、線条体内のドパミン濃度が不均一になる可能性や移植細胞と宿主細胞との結合が機能的に不完全である可能性などが推察されている。これらの結果から、二番目の試験を行ったOlanowらは、現時点では胎児細胞移植は推奨できないとしている。しかし、一番目の試験を行ったFreedらは、その後も解析を続けた結果、移植群では対照群に比べて平均反応時間と運動時間が短縮したと報告し<sup>5)</sup>、対象患者の選択 (L-dopaによく反応し、不随意運動のない状態が望ましいという)を行えば、よりよい結果が期待できるとしている<sup>6)</sup>。免疫抑制剤の使用法 (Freedらは不必要と

いい、Olanowらはcyclosporineを中絶したために拒絶反応が生じた可能性を指摘している)や移植細胞の培養法(Freedらは移植までに数週間培養している)など、手技上の争点について、今後も引き続き検討が必要である。また、移植後の不随意運動は不可避なものなのか、臨床応用を推進する前に明らかにしなくてはならない。

### ES細胞の応用

胎児脳細胞の移植が世界の限られた施設でしか行われてこなかった理由として、胎児組織の利用に伴う倫理的問題に加え、移植細胞の生着率が5~10%と低いので、1人の患者を治療するために4~5体の中脳組織を必要とするというドナー不足の問題があげられる。そこで、胎児細胞に代わる移植用細胞が探求されてきた。未分化な状態のままほぼ無制限に継代し増殖させることができ、神経細胞を含むあらゆる体細胞に分化する能力をもつES細胞は、以前から遺伝子改変動物の作製をはじめとした基礎研究に使用されてきたが、1998年にヒトのES細胞株が樹立されるに至り、再生医学への応用が現実的な研究テーマとして注目を集めることとなった。

#### 1. 霊長類ES細胞

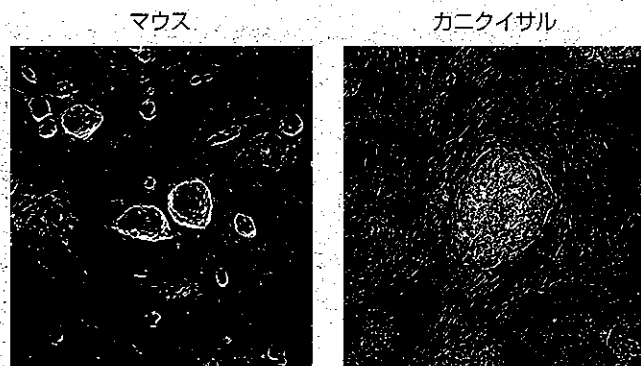
これまでES細胞を使用した移植研究は、マウスのES細胞を使用して行われてきた。しかし、マウスのES細胞と霊長類のES細胞では、形態や表

面抗原の相違だけではなく、いくつかの重要な性質が異なる(図1)。たとえば、マウスのES細胞に対しては、未分化状態を維持するために白血病阻害因子(leukemia inhibitory factor: LIF)が有効であるが、カニクイサルやヒトのES細胞には、無効である。また、電気穿孔法やウイルスベクターによる外来遺伝子の導入もマウスのES細胞のほうが、霊長類のES細胞よりも容易である。今後、ヒトへの臨床応用を目的とした研究には、霊長類のES細胞を使用することが望ましい。

#### 2. ドパミン神経細胞の分化誘導

マウスES細胞を未分化な状態のままパーキンソン病モデルラットの線条

体に移植すると、少なくとも一部はドパミン神経細胞に分化し運動障害が改善することが報告されている<sup>7)</sup>。しかし、未分化なES細胞の移植では奇形腫を生じる危険がある。そこで、ES細胞から効率よくドパミン神経細胞を分化させる方法が模索されている。最も標準的な方法として、未分化なES細胞を非付着性の培養皿で培養することにより浮遊性の胚様体(embryoid body)を形成し、さらにレチノイン酸などを添加することで神経幹細胞を誘導する方法が知られている。こうして得られた神経幹細胞にアスコルビン酸, sonic hedgehog-N (Shh-N), およびfibroblast growth factor 8 (FGF8)を添加して培養すると、全培養細胞のう



細胞周期	12時間	30時間
ALP活性	+	+
SSEA-1	+	-
SSEA-4	-	+
LIF依存性	+	-

マウス線維芽細胞のフィーダー上のES細胞のコロニーを示す。  
ALP: alkaline phosphatase, SSEA: stage specific embryonic antigen, LIF: leukemia inhibitory factor

図1 マウスES細胞とカニクイサルES細胞の相違