

骨髄由来間葉系幹細胞

—癌化と培養条件—

梅澤明弘*¹ 高橋秀和*²

要 旨

ヒト間葉系幹細胞は一定回数分裂した後増殖を停止し、テロメア短縮による絶対寿命が存在し、細胞老化の過程で Rb 経路を活性化する p16^{INK4a} の発現増加が見られ、p16 の発現上昇による Rb 経路の活性化が細胞寿命を規定する。未分化幹細胞性を保持したまま、遺伝子に傷をつけることなく、無血清培地・低血清培地により寿命を延長させる技術は開発可能である。

はじめに

4月下旬に共同通信ワシントンにいる記者より電話を頂戴した。「Cancer Research に、脂肪由来のヒト間葉系幹細胞を長期培養すると癌化するという論文¹⁾が発表される。どう思うか?」という質問であった。内容が分からなければコメントのしようがないので、早速論文内容を送ってもらった。先方は午前3時くらいに電話しており急いでいるようであったので、こちらも出席している委員会の合間に内容を吟味し、返事をした。こちらの返事の要旨は、「ヒト細胞は、培養過程で癌化する可能性は極めて低い。不死化さえ、させることは難しい」である。さらに続けて、「Cancer Research に発表された以上、無視

することはできないし、癌化する可能性を0(ゼロ)ということとはできない。だけど、私はこの論文を信じない」と伝えた。次の日に配信された共同通信の記事は多くの新聞に掲載され、その後幾つかの産業界からこの件に関する問い合わせを頂戴した。「間葉系幹細胞を再生医療の細胞供給源とすることは大丈夫なのか?」

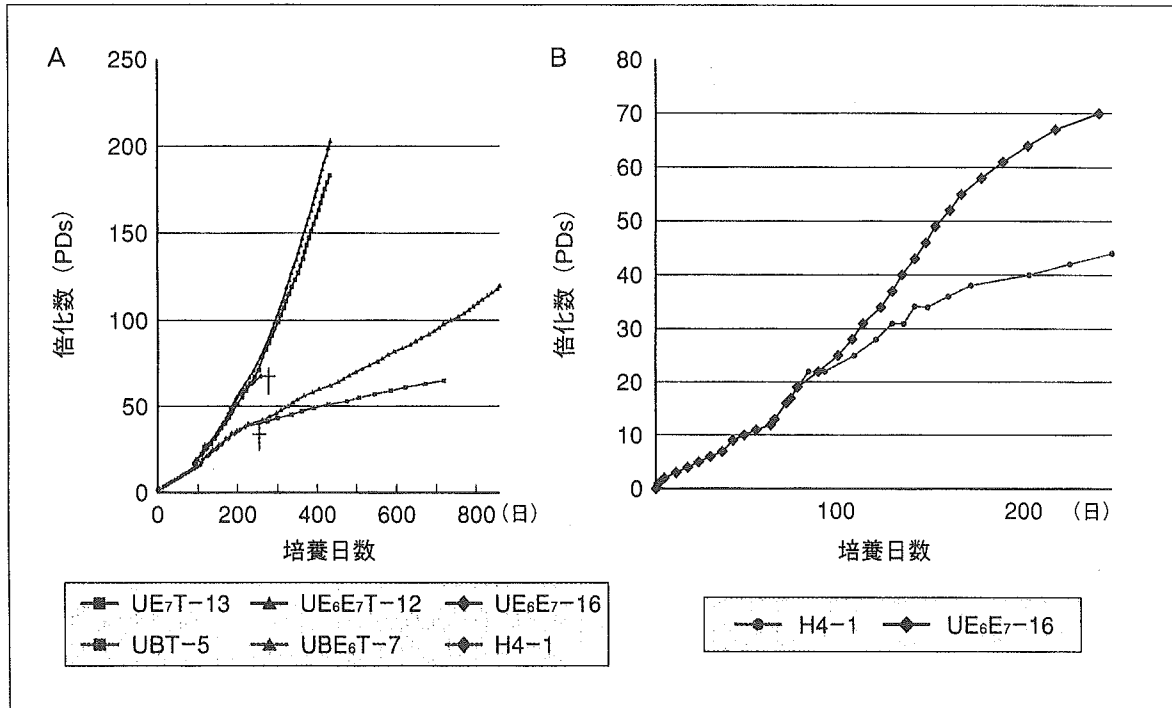
ヒト間葉系幹細胞は、培養過程で癌化するか? 生体内に戻した後に癌化するか?

培養過程でヒト間葉系細胞が自然に不死化した例はない。反論や反証があれば連絡いただきたい。例外と言えるのは、報告された細胞は1例のみであり、HaCaT細胞である。この細胞は上皮細胞であり、培養過程において極めて安定な染色体構造を示す²⁾。ヒト間葉系幹細胞においては、遺伝子などの導入なしでは癌化どころか不死化した例すらない。遺伝子導入によれば、不死化させることは可

*¹ 国立成育医療センター研究所 部長*² 東洋紡株式会社 敦賀事業所

キーワード：間質細胞，造血微小環境，多能性幹細胞，中胚葉，再生医療

図1 骨髄由来間葉系幹細胞の培養過程での寿命 (文献¹²⁾より引用改変)



A: 骨髄由来間葉系幹細胞に、Rb 経路を阻害する Bmi-1 またはヒトパピローマウイルス E₇, および p53 経路を阻害するヒトパピローマウイルス E₆ を導入することで、細胞寿命が延長する。寿命が延長した細胞は 1 年以上増殖を続ける。細胞の名前に B が含まれるときは Bmi-1 が導入されている。E₆, E₇ が導入されているときはその文字が含まれる。テロメラーゼが導入されているときは T の文字が含まれる。また、それらの導入された遺伝子の後に、無作為に細胞に番号がつけられている。

B: 寿命を延長していない細胞 (H4-1) は 40 回くらい分裂した後、老化 (replicative senescence) する。また、E₆, E₇ によって寿命を延長しても、テロメア長によって規定される絶対寿命が存在する。

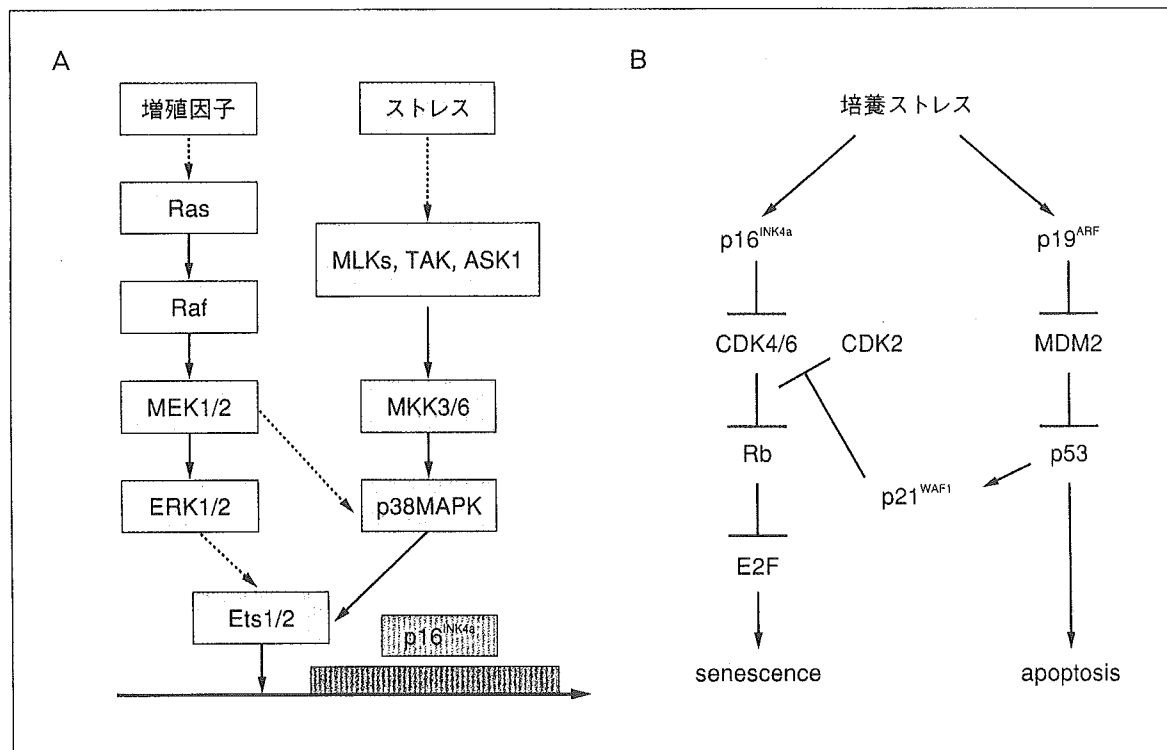
能となる (図1)³⁾。また、初期培養したヒト間葉系細胞が癌化する可能性は完全に否定できないけれども、免疫不全マウスに移植されたヒト細胞がマウスの寿命 (約 2 年) の間に癌化した報告は 1 例もない。理論的に、培養細胞において癌抑制機構に関する経路は、p53 経路と p16/Rb 経路の 2 つであると考えて良い (図 2)。癌抑制機構という表現は、「ヒト体細胞において分裂可能回数があらかじめ決定されている⁴⁾」ことと、ここでは同義としている。

p53
—テロメア・p53 経路—

ヒトの体細胞ではテロメラーゼを発現して

いない。間葉系細胞でも同様である。分裂を繰り返すたびにテロメア長が短くなる。テロメア配列が完全に失われると染色体の安定性が保てなくなるので、テロメア DNA が 5 kb くらいにまで短くなると G₁ チェックポイント機構を働かせて増殖を停止する。ここでも p53 が働いており、これが変異した場合、テロメア短縮の限界まで増殖を続けて死に絶える。この有限分裂寿命 (replicative senescence) を越えた場合は crisis といった状態になり、細胞は染色体末端が融合して死ぬ。ゆえに、培養過程におけるテロメア長の短縮は癌抑制機構と考えられる⁵⁾。ゆえに、繰り返せば、培養過程においてテロメラーゼが発現するような変異が生じる場合のみに癌化の

図2 培養ストレスによるシグナル伝達系



A：ストレスマーカーである p16^{INK4a} の転写調節 (文献¹³⁾より引用改変)．増殖因子のシグナル伝達とストレスにかかわるシグナル伝達経路が最終的に p16^{INK4a} で重なり合うことが興味深い．

B：培養ストレスから細胞老化 (senescence) および細胞死 (apoptosis) に至る分子機序．

略語：巻末の「今月の略語」参照

危険が生じることになる．そして、その頻度は間葉系細胞の場合は極めて低い．ちなみに、例外として前述した HaCaT 細胞では p53 に変異が入っている．

p16/Rb 経路 (図3)

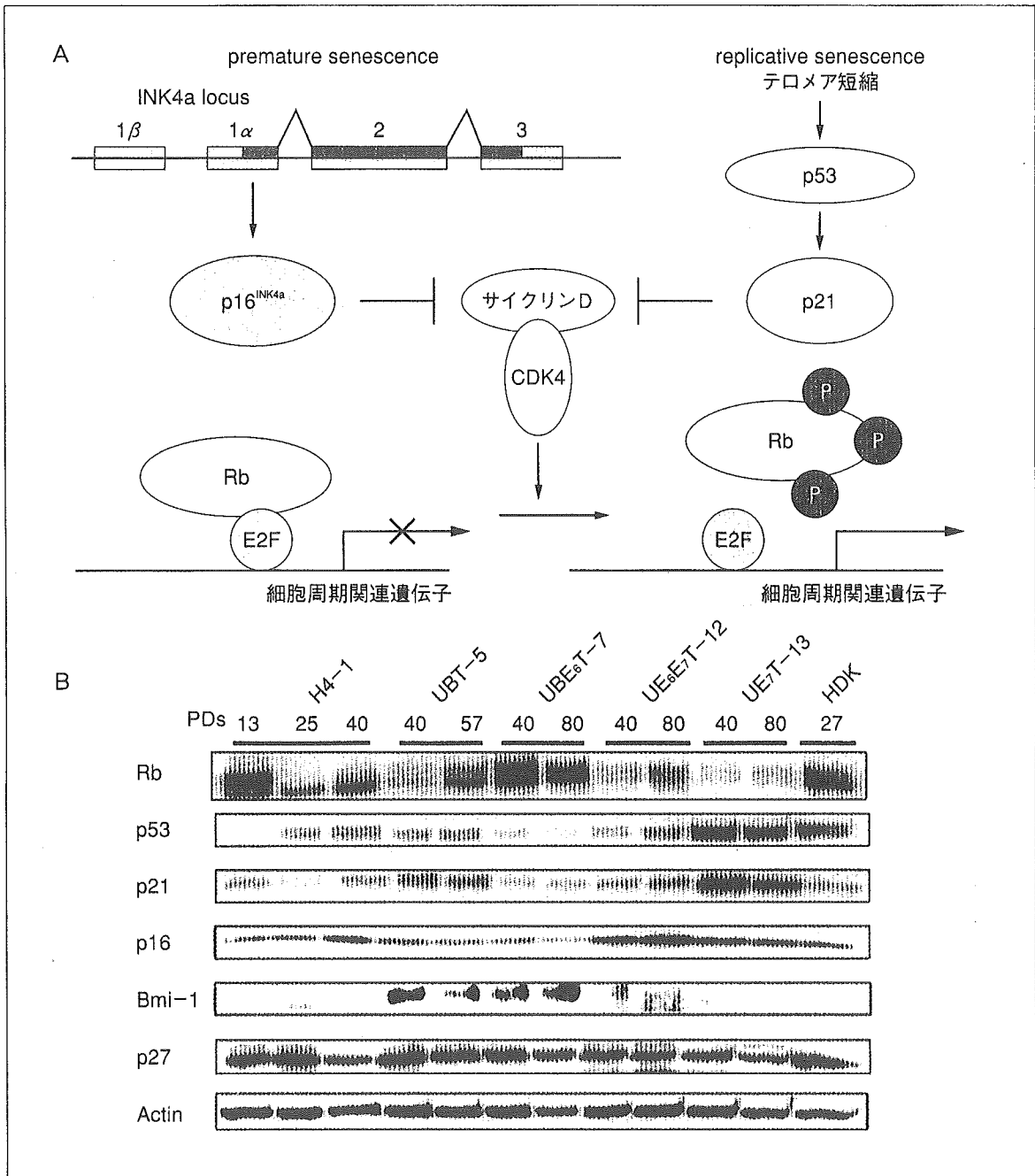
間葉系細胞の場合、p16 が通常の培養条件で発現してこないために、上皮細胞で指摘されている premature senescence (M0: Foster SA, Galloway DA: Oncogene 12: 1773-1779, 1996) を生じない．結果として、有限分裂寿命まで細胞が増殖することになる．この癌抑制機構は、間葉系幹細胞の場合はもともと働いていないと考えていても良い．逆のことを言えば、p16/Rb 経路が働かないこと自体が間葉系細胞の培養が容易であることを意味している．理論的には、培養過程にお

る細胞の不死化は、① p53 遺伝子における変異頻度、②TERT 遺伝子の発現 (de novo 遺伝子発現) するような変異頻度 (エピジェネティックな変化、転写調節領域の変異を含む) に規定される．細胞の不死化だけで癌化するわけではないけれども、この場合のクリティカルなポイントは、この不死化過程によって規定されると言っても過言ではない．その他の変化は、この2点に比較すれば無視可能と考えられる．事実、長期継代後も変異の導入や染色体の異常なども極めて低頻度でしか起きない⁷⁾⁸⁾．

ヒト間葉系幹細胞の培養とは？

細胞培養そのものは、細胞を体外で培養し増殖させることである．細胞を培養するためには、栄養、温度、酸素といった一般的な条

図3 細胞老化にかかわる分子の連関と発現



A：増殖している細胞ではサイクリン CDK によって Rb がリン酸化され、転写因子 E2F を遊離し、細胞周期に必要な遺伝子を発現する。senescence ではこの過程におけるサイクリン CDK の働きを阻害することにより細胞周期を停止する。細胞の増殖を維持するに当たって、細胞周期を抑制的に制御する因子の機能もしくは発現を抑えていた（文献¹³⁾より引用改変）。

B：それぞれの細胞（図1参照）における細胞老化関連タンパク質の発現（ウエスタン解析，文献¹²⁾より引用改変）。HDK：ヒト表皮細胞

略語：巻末の「今月の略語」参照

件のほかに「増殖因子」が必要となる。特定の細胞には特定の増殖因子が働く必要がある。1種類だけの増殖因子で増殖することは少なく、複数の増殖因子によって増殖できるようになる。無血清培地を開発するという事は、この複数の増殖因子の組み合わせを発見することにほかならない。これまで50種類を超える増殖因子が見つかった。しかし、完全な無血清培地がないのは「適切な培養条件が見つからない」ためである。

ヒトの正常細胞で、培養の歴史が一番古く培養が容易であるのは間葉系細胞であると思う。間葉系細胞は結合組織を構成する主要な細胞であり、どの臓器にも必ず結合組織があるために、培養系に移したときに必ず増えてくるのは間葉系細胞である。それは、線維芽細胞がもともと特定の組織あるいは臓器の形を作らない細胞であり、シャーレ表面のような環境でも困らないためであることと、細胞外基質を自分で合成して自分の環境を整える能力も強いためである。

ヒト間葉系幹細胞にとって血清とは？

血清自身は増殖因子を適切に含んでいると考えるべきである。血漿にはその増殖因子を含まない。血液が凝固するときに血小板が壊れ、血小板が持っているPDGFが出てくる。ただPDGFだけではダメで、血清中のEGFやIGFも必要となる。出血で血小板が壊れると、PDGFが出て間葉系細胞が増える。この機構を使っているわけである。

細胞の培養には一般にウシ血清を含む培地が用いられる。しかし、血清の使用は以下の点で問題となる。まず品質の安定性、すなわちロット差の問題である。細胞増殖・分化は血清のロットにより驚くほど変化するので、安定した結果を得るためには血清のロットチェックが必要である。また、血清には特定不能の多種類の成分を含むため、結果の解釈に

不都合が生じる。さらに、血清は細胞の増殖・分化を抑制する場合もある。これらに加えて近年問題として指摘されているのは、感染症などの安全面における危険性である。これは再生医療の実用面で最も深刻な問題である。したがって、血清の使用からくるこのような問題を回避するためには、培地の無血清化が必要となってくる。

無血清培地

無血清培養では、血清に代わって各種の添加剤が基礎培地に添加される。添加剤として重要なものは増殖因子、ホルモン、担体、脂質である。また、無血清下では細胞の接着性が低下するので接着分子によるコーティングが必要となる。以下、無血清培地の構成について概説する⁹⁾。増殖因子は細胞の種類と目的に応じて選択する必要がある。血球系細胞では各種インターロイキン(IL)が、接着系細胞ではFGF, EGF, PDGFなどが用いられる。これらは単独でも用いられるものの、相乗効果を奏することがあるため複数の組み合わせでも用いられる。また、単独では増殖を支持しないものでも、他の増殖因子との組み合わせで増殖効果を奏する場合がある。通常、これら増殖因子は1~10ng/mlの濃度で使用される。過剰量では逆に増殖が低下する。分化においては目的によりTGF β などが使用される。EGFなどの増殖性に作用するものは分化に抑制的に作用するため除かれることが多いが、濃度によっては良好な結果を示す。無血清培地にはリノール酸、オレイン酸、コレステロールなどの脂質が必須である。脂質の要求性は細胞によりかなり異なるので、細胞種ごとに詳細に検討する必要がある。接着細胞は通常、その細胞自身も細胞外マトリックスを産生する。しかし、無血清下では細胞の接着・進展を図るに十分でない。そのため、コラーゲン、フィブロネクチン、

ラミニンなどの細胞外マトリックスであらかじめ基材表面をコートしたものをを用いる。これらは、分離培養直後の初期培養や細胞濃度が少ないときに特に有効である。

培養環境は生体内に比べて酸素濃度が高く、細胞は培地中の活性酸素により細胞ストレスが引き起こされる¹⁰⁾。これは細胞老化の要因になる。血清は抗酸化作用を有し、活性酸素から細胞を保護する作用を有する。よって、無血清下では活性酸素による細胞障害が顕著になる。そこで、無血清培地では代わりにメルカプトエタノールなどの抗酸化剤が添加される。また、セレンは抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼの構成元素として作用するため、無血清培地では必須の微量元素として添加される。なお、3~7%の低酸素下の培養でも良好な結果が得られる¹¹⁾。培地交換では、一般に無血清培地は増殖因子の安定性に劣るので2日に一度の培地交換が勧められる。しかし、細胞によってはオートクリンに増殖因子を産生する。このときは半換えなどの培地交換が有効である。複数のヒト間葉系幹細胞のクローンについて基礎培地、増殖因子、担体、ホルモン、脂質、接着分子、抗酸化剤の各構成（順列組み合わせでは1万とおりは超える！）について数週間の培養実験を行い、最適条件を検討した。これら詳細な検討の結果、血清成分を抑えた新たな間葉系幹細胞増殖培地を開発することに成功した⁹⁾。

おわりに

無血清培地の開発にはこれまで2つの流れがあった。1つは細胞生物学的観点から細胞の増殖・分化制御を解明するという流れ、もう1つはモノクローナル抗体産生のような工業的生産手段を開発するという流れである。再生医療における無血清培地の意義はこれらとは少し異なる。効率の良い分化制御の実現

という観点もあるが、最も大きな意義は安全性の確保である。再生医療用途の培地にどれだけの質が要求されるかは未確定であるが、再生医療の実用化に臨んでは想定しうる危険要素は極力排除する方向になる。とすれば、それに使用する培地も相応の安全基準を設ける必要がある。アミノ酸の原材料や製造工程の安全性にも配慮する必要がある。何をおいてもウシ血清の使用は排除される。患者の自己血清を使用するにしても、その確保には量的にも限界がある。よって、臨床応用に際しては培地の無血清化あるいは低血清化が不可欠である。無血清培地の開発は再生医療研究に比べて地味で手間のかかる作業である。しかし、再生医療の発展を図る基盤としての意義は大きい。再生医療が現実のものとならんとする今日、さらに無血清培地の重要性は増すものと期待される。

謝 辞

執筆させていただいた赤司浩一先生に深謝します。清野 透博士による細胞寿命に関する指導、宇山太郎氏による間葉系幹細胞培地の評価・データに感謝します。

文 献

- 1) Rubio D, et al: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65 (8): 3035-3039, 2005.
- 2) Boukamp P, et al: Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer* 19 (4): 201-214, 1997.
- 3) Kiyono T, et al: Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396: 84-88, 1998.
- 4) 井出利憲, 他: ヒトの老化・癌とテロメラーゼ. *蛋・核・酵* 42: 1351-1374, 1997.
- 5) Ishikawa F: Cellular senescence, an unpopular

- yet trustworthy tumor suppressor mechanism. *Cancer Sci* 94: 944-947, 2003.
- 6) Foster S A, et al: Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. *Oncogene* 12 (8): 1773-1779, 1996.
 - 7) Jiang X R, et al: Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21: 111-114, 1999.
 - 8) Morales C P, et al: Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 21: 115-118, 1999.
 - 9) 高橋秀和: 無血清培地. 遺伝子医学 MOOK, 再生医療へのプレイクスルー, p176-180. (株)メデイカルドウ, 大阪, 2004.
 - 10) Toussaint O, et al: Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35: 927-945, 2000.
 - 11) Itahana K, et al: Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 23: 389-401, 2003.
 - 12) Mori T, et al: Combination of hTERT and Bmi-1, E6 or E7 induce prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol* 25: 5183-5195, 2005.
 - 13) 清野 透: 遺伝子導入によるヒト細胞寿命の延長. 医のあゆみ 209: 931-936, 2004.
-

What is It That Defines a Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell ?

Akihiro Umezawa¹, Hidekazu Takahashi²

¹ National Institute for Child Health and Development

² Tsuruga Institute of Biotechnology, TOYOBO Co., Ltd.

総説

幹細胞・ES細胞—間葉系幹細胞

—ヒト骨髄由来間葉系幹細胞



Stem cells · ES cells—mesenchymal stem cells
Human bone marrow derived mesenchymal stem cells

Keywords

骨髄間葉系幹細胞／再生医療／神経分化／多分化能／細胞寿命

森 泰昌¹⁾ 梅澤 明弘²⁾

1) 慶應義塾大学医学部病理学教室

2) 国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部

Summary

Bone marrow mesenchymal stem cells or bone marrow stromal cells (BMSCs) were discovered by Friedenstein in 1976, who described clonal, plastic adherent cells from bone marrow capable of differentiating into osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes. More recently, investigators have now demonstrated that multi-potent MSCs can be recovered from a variety of other adult tissues and differentiate into numerous tissue lineages including myoblasts, cardiomyocyte, hepatocytes and possibly even neural tissue. Human bone marrow stromal cells are easy to isolate, but it is difficult to study them because of their limited life span. To overcome this problem, we attempted to prolong the life span of bone marrow stromal cells and investigate whether the BMSC modified with Bmi-1, hTERT, E6 and E7 retain their differentiated capability or multipotency. The characteristics of the BMSCs remained unchanged during the prolongation of life span and that the BMSC could be differentiated into neuronal cells *in vitro*.

The BMSCs provide a novel model for further study of cancer and stem cell biology. This review describes the recent advances in understanding of human BMSC biology and further clinical trial.

はじめに

再生医学という名のフィールドが確立されてから現在まで、多くの研究がなされ、急速に多くの知見がもたらされている。しかしながら、骨髄由来間葉系幹細胞

胞とはいかなる細胞であるのか、実態は不明瞭な点も少なくない。本稿では、主に研究対象としてきた骨髄由来間葉系幹(骨髄間質)細胞について、我々を含め、いくつかのグループからの報告をそれぞれ比較したい。ヒト骨髄間質細胞はこれまで、骨芽細胞、軟骨細胞

Mori, Taisuke¹⁾ / Umezawa, Akihiro²⁾

1) Department of Pathology, Keio University School of Medicine

2) Department of Reproductive Biology and Pathology, National Research Institute for Child Health and Development

E-mail : taisuke@sc.itc.keio.ac.jp

胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、心筋細胞への分化誘導が報告され、また神経細胞や肝細胞などの胚葉を超えての分化も報告されている。骨髄間質細胞を用いた再生医療の最大の利点は、自己からの細胞移植が可能であることであり、倫理的な側面、免疫学的な側面から非常に有利な材料となり得ることである。しかしながら、目的とする細胞への分化誘導の現実的な評価や、細胞移植による臓器機能改善に至るために必要な細胞量の不足など、医療としての問題点が残っている。今回我々は、遺伝子導入による細胞の寿命延長、それらの細胞を用いての可塑性の検討の結果から¹⁾、分化誘導による遺伝子発現の意義、幹細胞と癌細胞の相違についても考察する。さらに、これまでの知見から、臨床応用への可能性についても詳述したい。

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞

骨髄由来の間葉系幹細胞は、歴史的には造血幹細胞研究の中で発見された。1970年代、Friedensteinらにより、細胞培養のプラスチックシャーレに付着し容易に分離可能な線維芽細胞様のコロニーを形成する細胞集団から、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞などへの分化誘導が可能であることが報告された。その後1980年代に、造血幹細胞の feeder cell とし

て、サイトカインの分泌だけでなく細胞接着による造血幹細胞の未分化能維持に重要な働きをすることがわかってきた。また、損傷された部位へ遊走、定着し、損傷部位の再生にかかわるといった仮説を、骨髄間葉系幹細胞のもつ驚くべき多分化能が支えている。

ヒト骨髄間葉系幹細胞として報告されているものとして、Deans/Pittengerらのグループで、Osiris Therapeutics社により販売されているMSC (mesenchymal stem cell)²⁾、Minnesota Univ.のVerfaillieらのMAPC (multipotent adult progenitor cell)³⁾、我々のBMSC (bone marrow derived mesenchymal stromal cell)⁴⁾、ProkopらのRS cell (rapidly self-renewing cell)⁵⁾、VacantiらのSL cell (spore-like cell)⁶⁾などが代表例である。これらの細胞の、論文上記載されている細胞のサイズと表面マーカーの相違点について簡単にまとめた(図1)。文献からMAPCは、低密度、フィブロネクチンコート培養、MPC培地[血清なし、または低濃度でEGF (epidermal growth factor)、PDGF (platelet-derived growth factor)などの成長因子を含む培地]にて培養可能な可塑性を有し、テロメラーゼ活性をもち、脳や筋肉にも存在している細胞である。MSCとの相違は、MSCは内皮細胞への分化が起こらないが、MAPCは誘導によりVEGF receptor, Flk-1,

cell name	cell size	
BMSC	15~20μm	
MSC (Osiris)	15~20μm	
MAPCs	10~15μm	
RS1	>15μm	
SL cells	>5μm	

	surface marker(CD)																						
	9	10	13	14	29	31	34	36	44	45	49b	50	54	55	59	90	102	105	117	133	140a	144	166
BMSC			+	-	+	-	-		+	-		+	-	+	+	+		+	-	+	+		+
MSC (Osiris)	+		+	-	+	-	-		+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
MAPCs		+	-		-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+		+	-	+	+		+	
RS1		-	-		-	-/+		+	-							-/+					-		

図1 間葉系幹細胞の比較

代表的な間葉系幹細胞の細胞径(上段)およびCD抗原解析による比較(下段)。空欄は文献上の記載なし。

VE-cadherin, CD34, von Willebrand factor (vWF)などの血管内皮への分化が*in vitro*で起こると報告されている⁷⁾。MSCについて、Gregory, Prockopらは、近年最も primitive な MSC は STRO1陽性、CD133 or p75/LNGFR陽性の細胞群に存在すると報告し、これを MSC like cell と記載している⁸⁾。RS cell, SL cell は、細胞のサイズにより規定された小型の増殖能の高い付着性の細胞として定義される。以前筆者は、Verfaillie 博士に直接質問する機会があり、MSC と MAPC の差異についてうかがったところ、MAPC はより primitive な細胞であり、MSC の上流に存在すると返答されている。我々も含め、いずれにおいても、代表的な表面マーカーのコンセンサスは CD133, CD90, CD105, CD166, CD140a 陽性、かつ CD14, CD45, CD117, CD34 陰性の細胞である。これらの細胞は、いずれも低密度培養により分離された増殖能の高い細胞で、形態学的に 10~15 μ m 程度の細胞であることは一致している。また、細胞の有す分化能にもおおむね違いはない。骨髄間質細胞は、骨髄内の微小環境を離れた段階で分化のプロセスはスタートしている。そのため、未分化な状態を維持し得る方法により、わずかな phenotype の違いを示しているとも考えられる。

骨髄間質細胞は幹細胞であるか？ また骨髄になぜ幹細胞が必要か？

骨髄間質には多分化能を有する間葉系細胞が存在していることはこれまでの研究からも明らかである。その本来の重要な役割として造血幹細胞の維持があり、そのためには多くの蛋白を合成、分泌する必要がある。たとえば、ES細胞のコンベンショナルな feeder cell が胎児由来の fibroblast であることも、同様の理由であろうと考えられる。

次に、創傷部を修復する役割を考えた場合、骨髄の骨リモデリングに重要な働きをする必要がある。長管骨では、骨折などの外傷後の初期の治癒過程において、軟骨から骨への軟骨性骨化のプロセスがあり、骨髄間

質細胞の骨、軟骨への分化はその意義がある。血管を構成する内皮も創傷治癒に重要である。vasculogenesis は、既存の血管が伸展していく現象とされ、angiogenesis は、その部位にある細胞を動員し血管を構成していく現象として説明されている。この二つの現象は同時に起こり、やがて一つの血管網として体循環に含まれていく。体循環から創傷部へ到達した骨髄間質細胞は、この angiogenesis にとって必要な細胞と推測される。

脂肪細胞への分化も必要な働きである。骨髄は加齢とともに脂肪化が進んでいく。これは、osteoporosis といった現象としてとらえられるが、骨芽細胞または骨芽前駆細胞から脂肪細胞への分化現象としてとらえることもできる。あるいは、造血能の低下した状態において造血幹細胞との間の相互的な未分化状態の抑制がなくなり、その骨髄内での物理的な隙間を埋めるために脂肪へと分化した現象としても理解できるのかもしれない。このように骨髄間質細胞は、すなわちデフォルトの段階では、方向性の確定していない多くの遺伝子が発現し得るユートリティーな(ルーズな)存在である必要がある。これらのことが、骨髄に幹細胞が必要な理由であろうと筆者は考えている。

骨髄間質細胞への遺伝子導入による 寿命延長

ヒト骨髄間質細胞は分離培養が容易であるが、その増殖には限界がある。ヒト骨髄由来間葉系細胞は、ES細胞やある種の癌細胞とは異なり、テロメラーゼ活性が存在せず、理論的にテロメア短縮により絶対寿命が存在する。また、テロメラーゼサブユニットである hTERT のみの導入によるテロメラーゼ活性を誘導しても延命できないことが報告されている。我々は、91歳の高齢者から得られたいくつかの骨髄間質細胞から H4-1 と名付けたクローンをその対象とした。これらの骨髄間質細胞も、これまでの報告と同様に、hTERT のみの導入によるテロメラーゼ活性を誘導し

でも延命できなかった。また、この際に p16^{INK4a} の発現増加がみられ、Rb 経路の活性が *in vitro* における細胞周期停止により寿命を規定していることが示された。これらの細胞では、約 20~30PDs (population doublings) で最初の増殖停止期 (M0: mortality stage 0; premature senescence) を迎え、p16 の増加がみられる。このとき、細胞は平坦に拡大した形態を示す (図 2 C)。これを逃れた一部の細胞は、再び増殖に向かい、50~70PDs 程度でテロメアの短縮による増殖停

止期 (M1: mortality stage 1; replicative senescence) を迎える (図 2 B)。Rb/p16 経路に拮抗するために、内因性遺伝子である Bmi-1, HPV の E7 の高発現により細胞は寿命を延長し、さらに p53 経路に拮抗する HPV の E6 の導入により、細胞は長期増殖が可能となった。延命した細胞にあらかじめ hTERT を導入し、テロメラーゼ活性化した細胞は長期間延命が可能となった。また、E6, E7 のみの導入により長期延命した細胞には、テロメラーゼ活性は起きずに、テロメア短縮によ

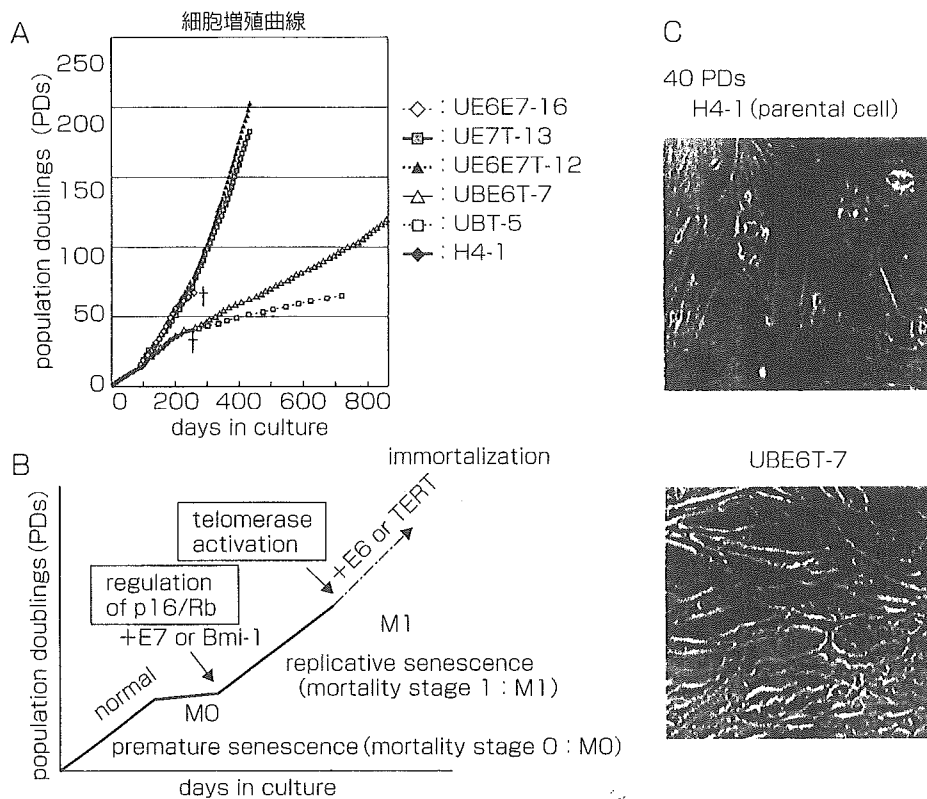


図 2 細胞の寿命延長機構および遺伝子導入細胞の細胞増殖曲線

A: 遺伝子導入の組み合わせにより細胞の増殖は異なる。UBT-5, UBE6T-7, UE6E7T-12, UE7T-13 はいずれも 60PDs (population doublings) 以上に増殖し、400 日以上培養が可能である。一方、H4-1, UE6E7-16 は 200 日以下で増殖停止を起こす (+マークで表示)。H4-1: parental cell, B: Bmi-1, T: hTERT, E6: HPV E6, E7: HPV E7

B: 横軸を日数、縦軸を PDs とし、導入したそれぞれの遺伝子の細胞増殖停止期との関連を示す。M0: mortality stage 0; premature senescence, M1: mortality stage 1; replicative senescence

C: 40PDs での H4-1 と UBE6T-7 の細胞形態を示す。senescence を迎えた H4-1 は、平坦に拡大した形態を示す。一方、UBE6T-7 は小型で紡錘形の細胞形態を示す。

る replicative senescence を迎えることが確認された。Bmi-1, hTERT や、E7, hTERT, そして E6, E7, hTERT の組み合わせ導入した細胞も、800 日以上安定に増殖し、事実上不死化していることが示された (図 2 A)。驚くべきことに、これらの細胞のうち E7, hTERT 導入群では、長期培養にもかかわらず染色体の異常を認めなかった。我々のグループでは、H4-1 以外にも多くの BMSC を有しており、その中には遺伝子導入なしで PD70 まで染色体の異常なしに増殖を示す細胞も存在している。

次に、これらの寿命延長細胞が、遺伝子導入前の骨髄間質細胞の性格を保持できているかの検討を行った。in vitro の系を用いて、神経系への分化誘導プロトコール [DMEM/F12/B-27, BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) 添加培地 + laminin coating dish culture] により神経系への分化誘導を行ったところ、突起の延長など、形態学的に神経細胞様への変化をきたした (図 3)。これらの細胞の

分化誘導前後を、gene chip による遺伝子の発現の網羅的解析による比較検討を行った (図 4 A)。その結果、nurr1, nestin, map2, sox2 を含む多くの重要な神経関連遺伝子の発現がみられた。さらに、これらの神経様細胞が細胞興奮性を有しているかを、カルシウムイメージング法により検討した結果、細胞の興奮性が確認された (図 4 B)。このように、本来の骨髄間質細胞の性質を維持した状態での寿命延長が可能であることが示された。これらの細胞は PD200 を超えて増殖するにもかかわらず、これまで免疫不全マウスへの細胞移植で肉腫様の腫瘍形成は起きていない。また、神経様細胞へ分化誘導された細胞は細胞死を起さずに増殖を停止した。幹細胞と癌細胞は、細胞増殖において、TERT や造血幹細胞、またはリンパ腫細胞において高発現している Bmi-1 のように、共通遺伝子の機構をもつものも少なくない。しかしながら、細胞の分化に伴い増殖が制御される幹細胞と、無秩序に増殖する癌細胞では、明瞭な境界が存在する。今回、遺伝子の網羅的比較解析で、M0 期または M1 期で増殖を停止した

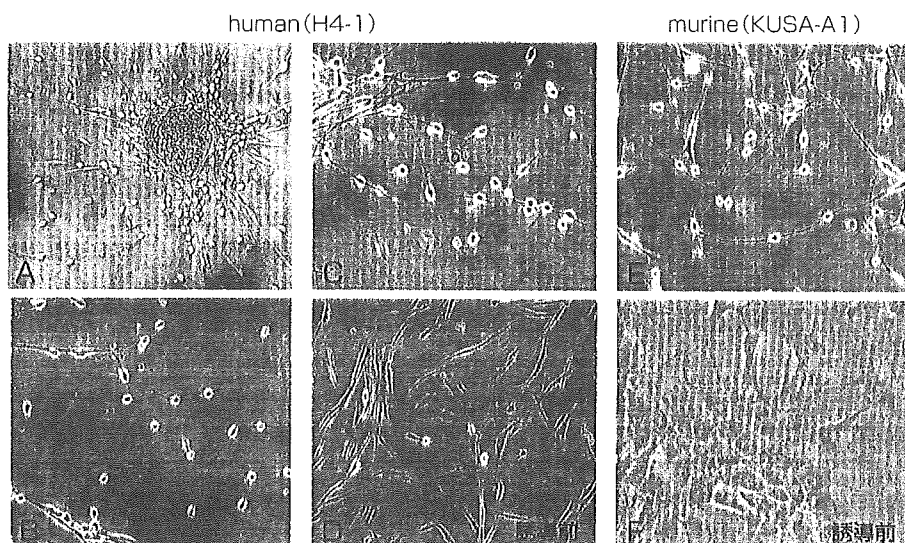


図 3 ヒトおよびマウス骨髄間質細胞の神経分化誘導による細胞形態の変化
A~D: H4-1, E・F: KUSA-A1 (murine cell line)
(A・B・C・E: 分化誘導開始後 14 日の細胞形態, D・F: 分化誘導前の細胞形態)

細胞、分化誘導において増殖を停止した細胞で共通して高発現し、増殖中の細胞や癌細胞で発現がみられない遺伝子について検索したところ、いくつかの興味深い遺伝子の候補を得ることができた。

今後、本研究において得られた遺伝子導入による寿命延長細胞は、細胞の増殖と癌化のメカニズム、そして可塑性を有す未分化機構の解明の有用なツールとなると考えられる。また、将来的な展望として、これらの神経様分化細胞を用いて、中枢神経系の自己細胞移植による治療法開発に貢献する可能性も検討していきたい。

胚葉を超える可塑性の可否

我々の研究グループでは、1992年に牧野らがマウスの骨髄間質細胞に脱メチル化剤である5-azacytidinを応用し、拍動する心筋への分化誘導を⁹⁾、2000年には神山らが骨芽細胞株に5-azacytidinを添加、またはBMP inhibitorであるnogginを添加し、細胞興奮性を有すneuronへの分化誘導が可能であることを報告し

ている¹⁰⁾。これらの現象は、epigenetic regulation として認識される。細胞は、それぞれが有す状態において安定している。その状態では、必要な遺伝子が発現し、不要な遺伝子が抑制されたon/offにより制御されている。受精卵から始まる発生において、幹細胞、前駆細胞、終末の分化細胞へと、細胞は原則として方向性をもっている。その遺伝子の制御機構として知られているものに、ゲノムのメチル化とクロマチン構造がある。ゲノムのメチル化が多くなれば遺伝子の発現は制御され、クロマチン構造が高次になれば遺伝子の発現は制約を受ける。5-azacytidinはゲノムのメチル化を阻害するか、メチルトランスフェラーゼの活性を阻害する。その結果、細胞の状態は初期化され、細胞の分化状態は維持できない、または他の転写因子の発現によりその細胞の状態を変化させる。我々は、このような方法に基づき、一度デフォルトの状態へリセットし、それぞれの分化に有利な環境(マトリックスや成長因子)を構成することにより、胚葉を超えた細胞への分化を可能とした。次に、これらの細胞に起こり得

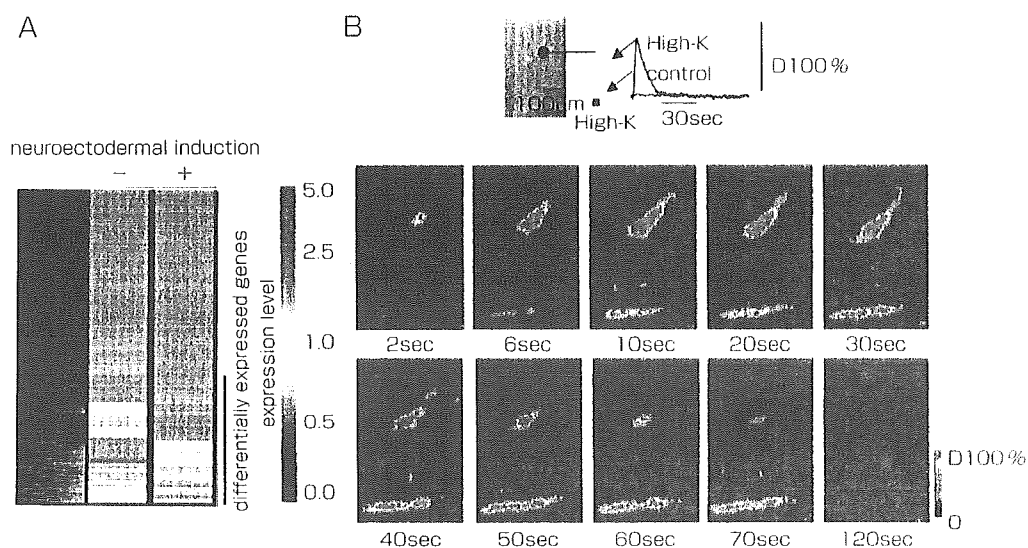


図4 神経分化誘導後の解析(→巻頭Color Gravure 参照)

A: gene chip による遺伝子発現の変化を示す。

B: 高濃度カリウム刺激による細胞内への可逆性カルシウム流入(カルシウムイメージング法)

る変化が脱メチル化剤を用いずに可能であるかを試みた結果、ヒト骨髄由来間質細胞においても可能であることを報告した。心筋への誘導はマウス胎仔心筋細胞を feeder として培養することにより、神経様細胞にはマトリックスや成長因子・接着因子が分化における重要な要因である。これらの分化誘導はどの細胞でもよいというわけではなく、骨髄間質細胞、臍帯血由来間葉系細胞、ES細胞のように、より未分化な存在の細胞において可能であることも示されている。これらの結果は、細胞の有すメチル化も含めた状態が、分化誘導には重要であることを改めて証明している。

臨床応用への期待

骨髄間質細胞を用いた臨床応用への期待は大きい。現在臨床応用が進められつつある分野としては、ASO (閉塞性動脈硬化症) などによる虚血部への骨髄細胞移植による血管網の再構築が、臨床試験まで進んでいる。また、軟骨、骨の再生治癒促進への応用も進められている。我々のグループでも、越智¹¹⁾、植谷ら¹²⁾は、マウス骨髄間質と生体吸収性の足場を用いて、任意の

形態の骨を作製することを可能としている。ヒト骨髄間質細胞では、今林ら¹³⁾が軟骨への分化を、竹田ら¹⁴⁾が拍動能を有す心筋への分化誘導を報告している。また、近年のトピックスとして、MSCが樹状細胞からのTNF (tumor necrosis factor)- α 分泌抑制、IL (interleukin)-10分泌増加などに影響を与え、その結果、免疫反応を抑える効果が報告され¹⁵⁾、Osiris Therapeutics社の申請によりGVHD (移植片対宿主病) の治療として米国FDAの臨床試験が始まっている。

stem cell biology から生殖医療へ

生殖医療への応用としては、角田、加藤らとの共同研究において、ウシ骨髄間質細胞の核を用い、脱核受精卵への核移植からクローン牛を産出している¹⁶⁾ (図5 A)。また、マウス骨髄間質細胞核からES様細胞を作製し、骨髄間質と同様のプロトコルにより神経分化誘導を試みた結果、神経様細胞への分化誘導が確認された(図5 B)。これらが示すように、クローン技術を用いたオーダーメイド細胞治療は技術的には十分な可能性を有している。最近のトピックスとして、韓国

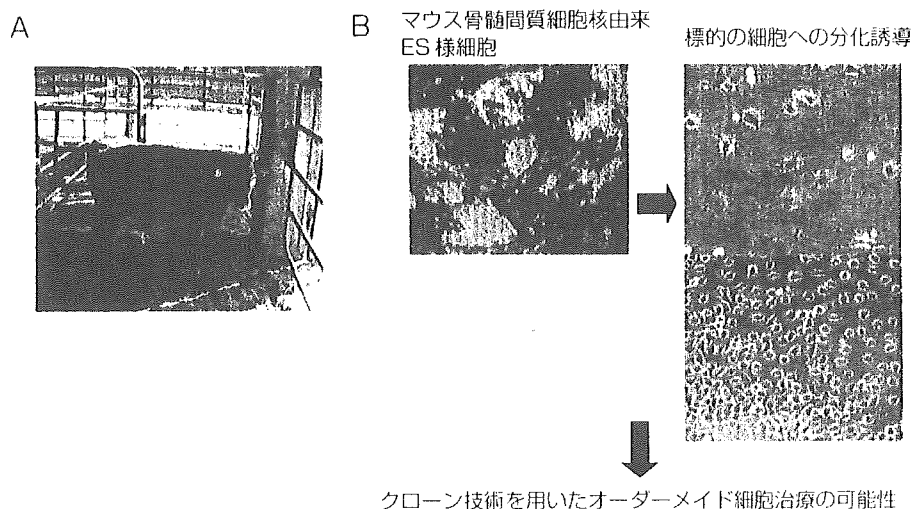


図5 細胞核移植を用いたクローン技術の生殖医療への応用

A: ウシ骨髄間質細胞核からのクローン牛

B: マウス骨髄間質細胞核由来のクローンES様細胞の神経分化誘導

や英国のグループが、ヒトクローン胚からES細胞を樹立したことが報告されている。ヒトクローンの可否については倫理的な観点からも議論は十分なされていない。また、ヒトのES細胞から目的の組織や臓器が作れるか、これらの細胞が機能を有し治療に応用できるかといった問題も存在している。ES細胞そのものを移植すると奇形腫が形成されることは既知の事実である。現状では、分化誘導した段階での細胞の成熟度は完全にはコントロール不能であることから、臨床応用までの道のりは遠く、今後の研究の発展が期待される。

おわりに

ヒト骨髄間質細胞には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在し、それらの細胞を遺伝子導入により寿命延長させることによって、詳細に解析することができた。これらの細胞の寿命延長には、テロメラーゼの活性の誘導に加え、Rb/p16経路の活性阻害が必要であった。今後、この寿命延長の機構を応用し、遺伝子を導入しない寿命延長の方法を模索している。一方、我々は800日以上長期にわたり培養が可能であるにもかかわらず、その染色体に異常をきたさない細胞を得ることができた。また、分化誘導により細胞の増殖が制御可能である点など、癌と幹細胞の類似点と相違点を知るきっかけとなる候補遺伝子を得ることができた。今後の研究として、癌細胞と幹細胞の解析から、cancer biologyとstem cell biologyをつなぐ研究を行いたいと考えている。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、本研究にご理解、ご指導いただいた国立成育医療センター 秦順一総長、慶應義塾大学医学部病理学教室 坂元亨宇教授、国立がんセンター研究所ウイルス部 清野透部長に深謝申し上げます。骨再生の研究は、慶應義塾大学医学部形成外科学教室 矢澤真樹博士、東京大学医学部疾患生命工

学センター 植谷宏平博士との研究であり、カルシウムイメージングは慶應義塾大学医学部循環器内科 三好俊一郎博士との研究によります。核移植技術を用いたクローン研究は、近畿大学農学部畜産学教室 角田幸雄博士、加藤容子博士との研究においてなされた結果であります。また、長期にわたる細胞培養など、実験を担当していただいた中村友紀子氏をはじめ、慶應義塾大学医学部病理学教室、国立成育医療センター研究所生殖医療研究部、国立がんセンター研究所ウイルス部のスタッフ、ともに学んだラボのメンバーにこの場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, et al: Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol* **25**: 5183-5195, 2005
- 2) Deans RJ, Moseley AB: Mesenchymal stem cells; biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **28**: 875-884, 2000
- 3) Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al: Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**: 2615-2625, 2001
- 4) Gojo S, Gojo N, Takeda Y, et al: *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **288**: 51-59, 2003
- 5) Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, et al: Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3213-3218, 2000
- 6) Vacanti MP, Roy A, Cortiella J, et al: Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals. *J Cell Biochem* **80**: 455-460, 2001
- 7) Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, et al: Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci* **996**: 231-234, 2003
- 8) Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL: Non-hematopoietic bone marrow stem cells; Molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* **306**: 330-335, 2005
- 9) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin*

- Invest 103 : 697-705, 1999
- 10) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, et al : Brain from bone ; efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68 : 235-244, 2001
 - 11) Ochi K, Chen G, Ushida T, et al : Use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen sponge. *J Cell Physiol* 194 : 45-53, 2003
 - 12) Tsuchiya K, Mori T, Chen G, et al : Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res* 316 : 141-153, 2004
 - 13) Imabayashi H, Mori T, Gojo S, et al : Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res* 288 : 35-50, 2003
 - 14) Takeda Y, Mori T, Imabayashi H, et al : Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J Gene Med* 6 : 833-845, 2004
 - 15) Aggarwal S, Pittenger MF : Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105 : 1815-1822, 2005
 - 16) Kato Y, Imabayashi H, Mori T, et al : Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells ; developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal. *Biol Reprod* 70 : 415-418, 2004

Retropharyngeal Abscess due to Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Case of Acute Myeloid Leukemia

Kazuya SATO, Tohru IZUMI*, Masaki TOSHIMA, Tadashi NAGAI,
Kazuo MUROI, Norio KOMATSU and Keiya OZAWA

Abstract

We describe a case of acute myeloid leukemia (AML) complicated with retropharyngeal abscess (RPA) due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a 56-year-old man. After administration of vancomycin and lavage of the retropharyngeal space with gentamicin, complete resolution of the RPA was observed. Despite their lower frequency, deep neck infections are associated with high mortality rates. The possibility of RPA should be considered in patients who present with fever, dysphagia and limitation of neck extension. Lavage of the retropharyngeal abscess with gentamicin may be optimal in cases of large RPA.

(Internal Medicine 44: 346–349, 2005)

Key words: retropharyngeal abscess, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, acute myeloid leukemia

Introduction

The incidence of retropharyngeal abscess (RPA) has been decreasing recently because of widespread use of broad-spectrum antibiotics (1–3). Most cases of RPA are of medical or traumatic origin. Non-traumatic RPA has been reported to be a complication due to infection of retropharyngeal lymph nodes mainly in infants and young children (2, 3). Retropharyngeal lymph nodes usually disappear after age 4 or 5 years. Therefore, the incidence of non-traumatic RPA in adults has been reported to be rare and usually secondary to chronic tuberculous cervical spine osteomyelitis (1–3). We present here a case of acute myeloid leukemia (AML) complicated with RPA after resolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sepsis. The patient was successfully treated with intravenous vancomycin

(VCM) and lavage of the retropharyngeal space with gentamicin (GM).

Case Report

A 56-year-old man was diagnosed as having AML with trilineage dysplasia in July 1998. Remission induction chemotherapy with idarubicin and cytosine arabinoside was initiated. After two courses of induction chemotherapy, complete remission (CR) was obtained. However, he relapsed in March 2000 after six courses of maintenance chemotherapy with 32% blast cells in peripheral blood.

Reinduction therapy with mitoxantrone, etoposide and cytosine arabinoside was initiated. On day 14 after the start of therapy, the patient developed high fever, watery diarrhea and intermittent abdominal pain. White blood cell count was only 300/ μ l and C-reactive protein (CRP) had increased to 196 mg/l at that time. MRSA sensitive to VCM, teicoplanin, arbecacin and GM grew in peripheral blood culture. No bacteria were isolated from a removed central venous catheter. After intravenous administration of VCM at a dose of 1,500 mg/day was started, diarrhea and abdominal pain disappeared immediately. His fever gradually subsided, and results of a test of blood culture on the 3rd day of treatment were negative. On day 30, CRP had decreased to 22 mg/l following recovery from myelosuppression, and intravenous VCM was discontinued. A bone marrow aspiration performed on day 40 after the start of reinduction therapy showed complete remission.

Consolidation chemotherapy with mitoxantrone and cytosine arabinoside was initiated in April 2000. The patient became febrile again and presented with non-productive cough, dysphagia and right-sided chest pain during profound myelosuppression. The serum levels of lactate dehydrogenase and CRP were 741 U/l and 261 mg/l on day 14 after the start of consolidation therapy. A chest radiograph and CT scan demonstrated typical multiple nodules with cavitations

From the Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical School and *Department of Hematology, Tochigi Cancer Center, Tochigi
Received for publication August 2, 2004; Accepted for publication October 30, 2004

Reprint requests should be addressed to Dr. Kazuya Sato, the Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498

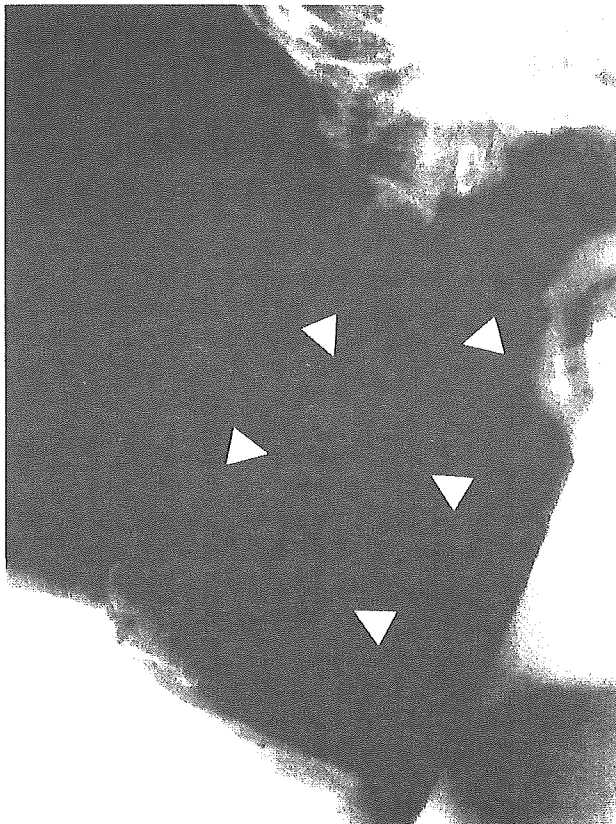


Figure 1. Lateral neck X-ray demonstrated widening of the retropharyngeal space and invasion to lower cervical vertebrae (white arrowheads).

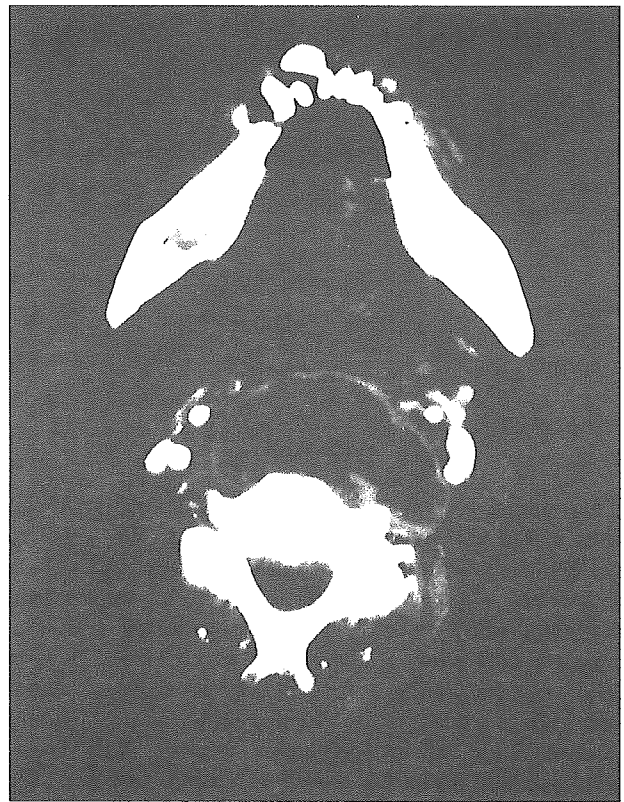


Figure 2. CT of the neck revealed massive abscesses with ringed enhancement in the retropharyngeal space.

of pulmonary aspergillosis in the right upper lobe. After administration of amphotericin B (AMPH) at a dose of 1 mg/kg/day, cough and chest pain disappeared immediately and multiple nodules were reduced on a chest radiograph. CRP had decreased to 88 mg/dl on the 8th day of treatment. However, the patient remained febrile and complained of dysphagia for about one month despite recovery from therapy-induced neutropenia. Results of an otolaryngological examination were unremarkable, and CRP had increased to over 100 mg/l again. Moreover, he developed limitation of neck extension, aphagia and difficulty in swallowing. We were concerned about the possibility of a brain abscess or meningitis, though results of a brain CT scan were unremarkable. Lumbar puncture could not be performed because of prolonged thrombocytopenia. No bacteria were isolated from frequent blood cultures, and central venous catheter removal resulted in no significant response. Fever persisted despite administration of sulbactam/cefoperazone, meropenem and cefepime.

In view of the possible diagnosis of deep neck infection, a lateral X-ray of the neck was obtained on day 45 after the start of consolidation chemotherapy. The X-ray revealed

some thickening anterior to the lower cervical space with invasion to the fourth cervical vertebra (Fig. 1). A contrast-enhanced CT scan demonstrated a ring-enhancing lesion in the retropharyngeal space suggestive of retropharyngeal abscess (RPA) (Fig. 2). Laryngoscopic examination was performed again but revealed little more than mild pharyngeal edema. Ultrasound (US)-guided needle aspiration of the RPA resulted in the release of a large amount of pus, and MRSA was isolated. We started intravenous administration of VCM and lavage of the retropharyngeal space with GM. After these treatments, the patient showed gradual recovery. CRP level decreased, and a CT scan performed after needle aspiration showed complete disappearance of the abscess.

However, he has the complication of progressive renal failure probably due to combination therapy with AMPH and VCM. Ten days after dose attenuation of AMPH, he developed progressive respiratory failure. A chest CT scan demonstrated drastic deterioration of pulmonary aspergillosis with a giant cavity. Moreover, new patchy consolidation in the opposite lung had occurred, and the sputum showed a substantial growth of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). No recurrent neck abscess or mediastinitis was detected. Despite treatment with broad-spectrum antibiotics, he developed septic shock of *P.*

aeruginosa and died.

Discussion

The retropharyngeal space lies between the pharynx and the prevertebral fascia and extends from the base of the skull into the mediastinum. A deep neck abscess may be life threatening because of airway obstruction, involvement of the carotid sheath, spread into the mediastinum, or septic shock. The mortality rate of patients with these life-threatening complications is as high 40–50% (4, 5). RPA has generally been thought to be a disease limited to children younger than 5 years of age, and its incidence has recently been decreasing (1–3). Deep neck abscess usually develops following trauma due to endotracheal intubation, endoscopy or ingestion of a foreign body such as a fish bone. It has recently been found with increasing frequency in adults because of the increasing population of patients with diabetes mellitus, immunodeficiency, human immunodeficiency virus (HIV) infection and patients undergoing maintenance hemodialysis (1–3). *S. aureus* bacteremia has a high incidence of complication with a metastatic abscess. Since the present patient had the previous complication of MRSA sepsis during remission induction therapy, a micro abscess in the retropharyngeal space may have already developed before the start of consolidation chemotherapy.

Complaints of these patients can be nonspecific and include neck, back or shoulder pain that worsens with swallowing. Results of a physical examination might be unremarkable. In severely neutropenic patients, symptoms and signs of inflammation may be minimal or absent (6). Therefore, diagnosis of deep neck abscess may be difficult to make on the basis of histological and physical findings alone, and the exact incidence and prevalence rates are unknown. Various head and neck diseases, including meningitis, encephalitis and cervical vertebral osteomyelitis, are in the differential diagnosis. Although a lateral X-ray is unable to definitively demonstrate the presence of RPA, this is very specific when the air sign is present. Laryngoscopic examination may not always be useful for diagnosis, as in the present case, except for injuries of pharyngeal mucosa. Contrast-enhanced CT has become the imaging modality of choice for the evaluation of patients with RPA (7–9). This imaging modality is also useful for determining the vascular structures of the neck and their potential involvement (9). However, CT scan has been reported to be of limited usefulness for differentiating abscess from lymphadenitis, cellulites, and some complex cervical masses (10). Therefore, the most important aspect is to clinically recognize the possibility of a deep neck infection.

Adequate antibiotic therapy is necessary for successful management of a deep neck abscess. Gram-positive aerobics are isolated in 45–88% of cases of deep neck abscess, and *Staphylococcus* and *Streptococcus* species are common pathogens (11, 12). Reported frequencies of isolation of anaerobic organisms vary (1–3, 11, 12). Har-El et al reported

that about two-thirds of the positive cultures had polymicrobial growth and that 40% of them were anaerobic organisms (11). On the other hand, Craig et al reported that anaerobic organisms were isolated from only one of 17 patients (13). This may reflect trends of antibiotics prior to collection of cultures. Recently, second- or third-generation cephem derivatives and/ or clindamycin have frequently been administered before a diagnosis is made.

Empirical broad-spectrum antibiotics should be administered promptly to all neutropenic patients at the time of onset of fever. Gram-positive organisms now account for 60–70 % of microbiologically documented infections, and MRSA is a common infectious pathogen during profound neutropenia (6). Infections caused by Gram-positive bacteria are generally indolent. The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)—National Cancer Institute of Canada study showed that VCM is not generally a necessary part of initial empirical antibiotic therapy (14). However, a deep neck abscess may be serious and may result in death if not promptly treated (1–3, 12). Lee et al reported that VCM should be included in optimal treatment of deep neck infections in intravenous drug abusers or in patients with infection near vital structures or central nervous system (15). Multi-drug-resistant organisms, including MRSA, should be considered as a cause of RPA, and VCM should be included in the initial antibiotic therapy for high-risk patients such as those with profound neutropenia.

The necessity of external drainage has been controversial. If an obvious large abscess is found by a clinical examination, drainage should be planned. An alternative to open drainage of a neck abscess is the use of imaging-guided aspiration or catheter insertion. Yeow et al described 15 patients with deep neck abscess treated successfully with US-guided aspiration and catheter placement (16). No complications occurred in their study. Although the potential for damage to neurovascular structures exists, it may be useful for patients with thrombocytopenia or those of a poor general condition. The present patient was successfully treated with intravenous administration of VCM and lavage of the retropharyngeal space with GM via a transcutaneously placed catheter. Although the clinical efficiency of local antibiotics lavage for deep neck infections has not been established, this approach is recognized as a safe and effective option for acute pancreatitis, peritonitis and liver abscess. Local lavage is technically easy and GM covers not only MRSA but also mostly Gram-negative anaerobes implicated in deep neck infections. Furthermore, local lavage has the potential to prevent dissemination to the parapharyngeal area and post mediastinum. Local lavage might be considered as combination therapy with systemic antibiotics in cases in which a cavity remains in the retropharyngeal space after drainage of pus.

A recent study, however, has shown that most patients with deep neck infections could be treated successfully with antibiotics alone (17). Craig et al reviewed records of patients with RPA and found that there were no treatment

MRSA Retropharyngeal Abscess

failures in either the antibiotic-only group or antibiotics-plus-surgery group (13). Criteria for external drainage depend on a clinical or radiological suspicion that abscess involves other deep neck compartments.

In conclusion, the possibility of a RPA should be considered in patients who present with limitation of neck extension or dysphasia, and MRSA might be one of the pathogens in immunosuppressed patients, including those who have received intensive chemotherapy. Intravenous administration of VCM should be considered in neutropenic patients with RPA as initial empirical antibiotic therapy, and local antibiotic lavage of the retropharyngeal space may be a good option in cases of large abscess.

References

- 1) Barratt GE, Koopmann CF Jr, Coulthard SW. Retropharyngeal abscess. A ten-year experience. *Laryngoscope* **94**: 455–463, 1984.
- 2) Goldenberg D, Golz A, Joachims HZ. Retropharyngeal abscess: a clinical review. *J Laryngol Otol* **111**: 546–550, 1997.
- 3) Parhiscar A, Har-El G. Deep neck abscess: a retrospective review of 210 cases. *Ann Otol Rhino Laryngol* **110**: 1051–1054, 2001.
- 4) Chen MK, Wen YS, Chang CC, Huang MT, Hsiao HC. Predisposing factors of life-threatening deep neck infection, logistic regression analysis of 214 cases. *J Otolaryngol* **27**: 141–144, 1998.
- 5) Bottin R, Marioni G, Rinfaldi R, Boninsegna M, Salvadori L, Staffieri A. Deep neck infection: a present-day complication. A retrospective review of 83 cases (1998–2001). *Eur Arch Otorhinolaryngol* **260**: 576–579, 2003.
- 6) Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, et al. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* **34**: 730–751, 2002.
- 7) Karkanevatos A, Beasley NJ, Swift AC. Acute non-tuberculous retropharyngeal abscess in an adult. A case report and review of the literature. *J Laryngol Otol* **111**: 169–171, 1997.
- 8) Boucher C, Dorion D, Fisch C. Retropharyngeal abscess: a clinical and radiologic correlation. *J Otolaryngol* **28**: 134–137, 1999.
- 9) Nagy M, Backstrom J. Comparison of the sensitivity of lateral neck radiographs and computed tomography scanning in pediatric deep-neck infections. *Laryngoscope* **109**: 775–779, 1999.
- 10) Elden LM, Grundfast KM, Vezina G. Accuracy and usefulness of radiographic assessment of cervical neck infections in children. *J Otolaryngol* **30**: 82–89, 2001.
- 11) Har-El G, Aroesty JH, Shaha A, Lucente FE. Changing trends in deep neck abscess. A retrospective study of 110 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **77**: 446–450, 1994.
- 12) Wang LF, Kuo WR, Tsai SM, Huang KJ. Characterization of life-threatening deep cervical space infections: a review of one hundred ninety-six cases. *Am J Otolaryngol* **24**: 111–117, 2003.
- 13) Craig FW, Schunk JE. Retropharyngeal abscess in children: clinical presentation, utility of imaging, and current management. *Pediatrics* **111**: 1394–1398, 2003.
- 14) 2001 European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) International Antimicrobial Therapy Cooperative Group, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Vancomycin added to empirical combination antibiotic therapy for fever in granulocytopenic cancer patients. *J Infect Dis* **163**: 951–958, 1991.
- 15) Lee KC, Tami TA, Echavcz M, Wildes TO. Deep neck infections in patients at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Laryngoscope* **100**: 915–919, 1990.
- 16) Yeow KM, Liao CT, Hao SP. US-guided needle aspiration and catheter drainage as an alternative to open surgical drainage for uniloculated neck abscesses. *J Vasc Interv Radiol* **12**: 589–594, 2001.
- 17) McClay JE, Murray AD, Booth T. Intravenous antibiotic therapy for deep neck abscess defined by computed tomography. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **129**: 1207–1212, 2003.