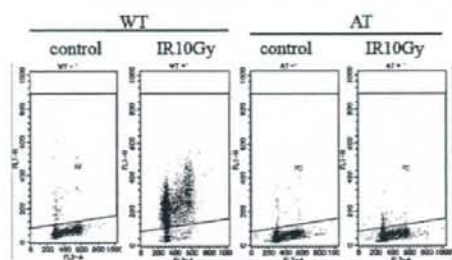
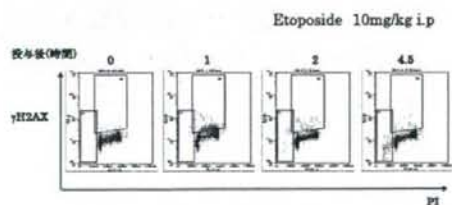


ど pATM 発現が認められないが、刺激により著しい DNA 損傷反応が検出された。一方図の右では毛細血管拡張性小脳失調症 (ATM 異常症) での解析結果を示している。この結果より、特異的な反応を検出していることが示された。



2. マウス腹腔内へのエトポシド投与後の DNA 損傷修復反応の解析

次にマウスに実際に投与した際にも同様に DNA 損傷応答が検出できるかを γ H2AX の発現を指標として、細胞回転と共に解析した。下図に示すように、投与後に陽性細胞群が増加することが観察されたが、そのシグナルは pATM ほどは強くなかった。

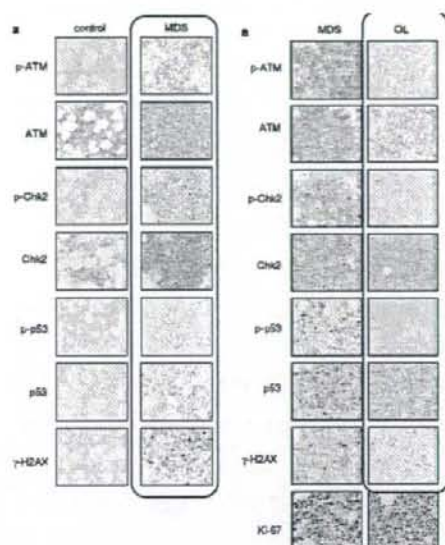


3. 付着細胞系での DNA 損傷応答の検討

Myelodysplastic syndrome (MDS) から白血病に至った患者骨髄の検体を用いて、MDS (DNA 損傷応答の亢進) → 白血病 (反応の低下) → 遺伝子変異という過程を追うことが可能であることが明らかになった。

図に示すように MDS の状態では、DNA

損傷応答に関与するタンパク群のリン酸化が認められ、その後白血病に至った群では、その消失が認められた。染色の条件が明らかになり、今後付着系細胞にての検討が行えることが明らかになった。



(Leukemia 2009)

4. BioPlex による標準細胞規格策定および検証システムの確立

今回はシステムが導入された後に、活性化リンパ球培養上清及び、健康人血清を用いて、17 種類以上のサイトカインを測定した。今後はさらに、軟骨細胞、歯槽骨細胞、骨髄由来細胞培養での解析を行うべく、他の研究分担者 (伊藤、中田、吉江) から、培養上清及び凍結細胞の譲渡について検討し、検体のリストアップを行った。

D. 考察

1. DNA 損傷応答解析システムの確立

本研究で解析するシステムの特徴は、

完成した染色体異常を解析するのではなく、「DNA に傷がつきやすい培養手順を極力避ける手段を検討するシステムである」、という点にある。ヒト細胞において DNA 損傷応答が起きると、細胞はその異常を修復するか、あるいはアポトーシスが誘導されて、細胞が死に至る。

一方この監視システムに異常を認める患者では、培養にあたり細心の注意が必要ということになる。

浮遊系細胞は FACS にて、付着細胞については免疫染色にて解析が可能になり、次年度以降は様々な種類の培養細胞を用いて検証を行う土壌ができたものと考えている。

得られた結果(最終培養産物)はまた、伊藤らによる SKY-FISH 法などでも解析し、微小な染色体変異がないか、検討する予定である。研究分担者間の検体のやりとりと、討論により、実りある成果が得られることが期待できる。

標準細胞規格検証システムについては、今年度は検証が行える試料の収集とカタログ化を中心に行った。一方、解析については既に習熟したため、来年度以降にまとめた解析が可能になるものと考えている。

E. 結論

汎用可能な、高感度迅速 DNA 損傷応答解析システムを開発した。FACS 法は簡便かつ短時間で行うことができ、免疫染色法も 48 時間以内の検査が可能である。これを用いて、培養にあたり注意すべき検体のスクリーニング、より安全な培養条件の選択、異常細胞の危険が高い群の選

別などが行えるようになるものと思われる。標準細胞規格設定システムについても、解析すべき検体が集まり、システムを稼働できる体制が整った。

G. 研究発表

論文発表

1. Yoshida H, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, Morio T, Ozono K. Ex vivo-expanded donor CD4(+) lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient graft-versus-tumor effect. *Pediatr. Blood Cancer*, 2009 [Epub ahead of print]
2. Yamamoto S, Sugita S, Sugamoto Y, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Quantitative PCR for the detection of genomic DNA of Epstein-Barr virus in ocular fluids of patients with uveitis. [Journal Article] *Japanese Journal of Ophthalmology*. 52(6):463-7, 2008
3. Honda M, Takagi M, Chessa L, Morio T, Mizuatni S. Rapid diagnosis of ataxia-telangiectasia by flow cytometric monitoring of DNA damage-dependent ATM phosphorylation. *Leukemia*. 23(2) 409-14, 2009.
4. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *Br J Ophthalmol*. 92(4):505-8, 2008.

5. Suzuki K, Tsugawa K., Oki E, **Morio T**, Ito E, Tanaka H. Vesical varices and telangiectasias in a patient with ataxia telangiectasia. *Ped. Nephrol.* 23: 1005-1008, 2008.

6. **Morio T**, Kim H. Ku, Artemis, and Ataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:598-603, 2008.

7. Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, Takai T, Kodama T, **Morio T**, Geha RS, Kitamura D, Kurosaki T, Ellmeier W, Takayanagi H. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell*, 132: 794-806, 2008.

8. Takahashi N. **Morio T**. Common variable immunodeficiency. *Japanese Journal of Clinical Immunology* 31(1):9-16, 2008

9. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, **Morio T**, Sugamoto Y, Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol.* 92:928-32, 2008.

10. Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, Nunoi H, Ochiai H, **Morio T**, Kosaka Y. Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity

conditioning and unrelated bone marrow transplantation. *Int J Hematol.* 87:88-90, 2008.

11. 木戸さやか、杉田 直、二神百合、堀江真太郎、佐々木秀次、望月 學、清水則夫、森尾友宏 ステロイド点眼治療中に樹枝状角膜炎を合併したヘルペス性角膜内皮炎の4例 臨床眼科 2008, 62:1061-1065.

国内学会発表

1. 森尾友宏、高橋尚美、水谷修紀 ICOS欠損症におけるT細胞機能異常、第2回日本免疫不全症研究会、2009年1月30日、東京

2. **Tomohiro Morio** Ex vivo expansion of CD4 T-cells from cryopreserved cord blood and its application in adaptive immunotherapy post cord blood transplant. 第35回日本低温医学会総会、2008年11月21日、東京

3. 森尾友宏、造血幹細胞移植後の細胞治療の現状と展望、第3回新潟細胞再生療法フォーラム、2008年10月24日、新潟

4. 森尾友宏、造血細胞移植後 ex vivo 増幅 CD4T 細胞輸注療法、第70回日本血液学会総会、2008年10月10日-12日、京都

5. 森尾友宏、増殖リンパ球による細胞療法、第15回ヘルペス感染症フォーラム、2008年8月22日-23日、札幌

- 6.
7. 森尾友宏、梶原道子、清水則夫、伊藤仁也、藤原成悦、大隅一興、関根暉彬、造血幹細胞移植後ウイルス感染症に対する活性化 CD4DLI 療法、第 56 回日本輸血・細胞治療学会、2008 年 4 月 26 日、福岡

国際学会発表

1. **Morio T, Watanabe F, Takahashi N, Sato M, Sato R, Takagi M, Imadome K, Miyawaki T, Domenico Delia, Nakamura K, Richard Gatti, Mizutani S.** Ataxia-Telangiectasia in Japan: Phenotypic variations in affected siblings with Ataxia-Telangiectasia. Ataxia telangiectasia workshop 2008, Ohtsu, April 22-25, 2008.
2. **Morio T** Ataxia telangiectasia: Involvement of ATM in immunodeficiency and leukemogenesis. Symposium on Recent Advances in Cell Function and Defense Mechanism, Seoul, April 18, 2008.
3. **Morio T.** Immunodeficiencies with impaired DNA damage response. Recent Advances in DNA Damage Response, Seoul, April 18, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

APPLICATION OF SYNOVIUM-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) FOR CARTILAGE OR MENISUCUS

REGENERATION (米国国際特許出願中 YCT-1301) 出願人：関矢一郎、発明者：宗田大、森尾友宏、清水則夫、黒岩保幸

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

新規微生物検出システムの開発

清水則夫（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授）

研究要旨：

これまでに作成した多種類のウイルスを同時・高感度・迅速・安価に検出するシステムの有用性を実証するため、東京医科歯科大学医学部付属病院細胞治療センターで培養を行った117例の活性化T細胞のウイルス検査を行った。その結果、26例(22%)が陽性で、その内訳はBKV 3例、EBV7例、HHV614例、CMV2例だった。また、16SrRNAの共通プライマーを利用して細菌の混入を検出し、増幅産物の塩基配列を決定して細菌種を迅速に同定する検査システムの開発を行った。設定したプライマーはデータベースに登録されている細菌の64%以上が検出可能と予想され、代表的な細菌を10コピー/Reactionの感度で検出可能だった。細菌感染が疑われる臨床サンプル53例を測定したところ、12例が陽性で増幅産物をシーケンス解析したところ、*Pseudomonas* sp、*Enterococcus faecalis*、などであることが判明した。現在、本検査系の有効性の確認と改良を継続している。

A. 研究目的

再生医療を実用化するためには、治療に使用する細胞製剤の品質管理システムの構築が極めて重要である。なかでも、生きた細胞を治療に使用するため細胞製剤に滅菌操作を加えることができない再生医療の特質から微生物検査の重要性は非常に高く、高い感度・信頼性と迅速性を兼ね備え、さらに安価に検査できる新しい検査系の確立が必須である。本研究では、これまでの研究開発によりすでに構築したウイルス検査系を基に、その感度と信頼性を高めるとともに他の微生物種の検査も同時に行える検査系の確立を目的に研究を行っている。具体的には、東京医科歯科大学医学部付属病院細胞治療センターで先進医療として認可されている「活性化Tリンパ球移入療法」に使用する活性化培養したTリンパ球に対するウイルス検査を行った。一方、細胞治療センターでは、細菌の検査は血液寒天を使用した培養法により行っているが、結果が出るまでには1日以上必要であり、

最終製品を直接検査し患者に投与する前に結果を得ることは不可能である。また、血液寒天上で増殖しない細菌の混入を見逃すおそれもある。この点を克服するために、多くの細菌に共通配列を持つ16SrRNA遺伝子上にプライマー領域を設定し、定量的PCR法により細菌の混入を検出し、増幅産物の遺伝子配列を解析して細菌種を迅速に同定する検査システムの開発を行うことを目的に研究を行った。

B. 研究方法

1. 検体からのDNA抽出

DNAの抽出には核酸抽出機EZ-1（キアゲン）を使用し、EZ-1 Virus Kit Ver.2.0 Card

を使用した。抽出試薬は、ウイルス検出にはEZ-1 Virus kitを、細菌の検出にはEZ-1 Tissue kit 試薬を使用した。

2. 核酸増幅

ウイルス遺伝子の増幅・検出には

LightCycler (ロッシュ)、細菌の 16SrRNA 遺伝子の増幅・検出はアプライドバイオシステム社の ABI-Prism 7300 を使用した。

3. ウイルス遺伝子の増幅

ウイルス検査項目は、HSV1,2,VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, ParvoB19 の 11 種類とし、インナーコントロールとして β -globin を使用した。

マルチプレックスPCR法により、被検ウイルスを下記 2 つの反応系で検出した。

A: HSV-1,-2, VZV, CMV, HHV-6, ParvoB19, BKV, JCV B: EBV, HHV-7, HHV-8

PCR試薬: AccuPrime Taq DNA Polymerase System, Invitrogen社

プライマー、プローブ (FITC標識プローブとLCRed標識の2種類のハイブリプローブを使用) の配列は下記の通り。

HSV1,2

F-gctcgagtgcgaaaaacgcttc
R-tgcggtgataaacgcgcagt
LCRed640-cttgccccgcagatgacgcc-p
g'gcaccagatccacgccctgatgagc-FITC
VZV

F-tgtcctagaggaggttttctctg
R-catcgtctgtaagacttaaccag
LCRed705-aagttcgcggtataattgt-p
gggaaatcgagaaccacccctatccgac-FITC
CMV

F-tacccctatcgcgtgtgttc
R-ataggaggcggccacgtattc
LCRed705-acaccactatctgctgggcagc-p
cgtttcgctgtagctacgcttacat-FITC
EBV

F-cgcataatggcggacctag
R-caaacaagcccactcccc
LCRed640-aacctagaccgcttcctg-p
aaagatagcagcagcgcagc-FITC
HHV6

F-accgagagatgattttgcg
R-gcagaagacagcagcgagat
LCRed640-gggtcattatgttatagacggt-p
taagtaaccgttttcgcca-FITC
HHV7

F-gaaaaatccgccataatagc
R-atggaacacctattaacggc
LCRed705-ttgtgaaatgtgttcgatagggc-p
gccataagaacaggtacagacattgtca-FITC
HHV8

F-agccgaaaggattccaccat

R-tccgtgtgtctacgtccag
LCRed640-tgatctatataaccaccaatgtgtcattatg-p
ccggatgatgtaaataatggcggaac-FITC
ParvoB19

F-ccgccaagtacagggaaaaac
R-cagctacactccacgca
LCRed640-caccagggtagatcaaaaaatgcgtgga-p
gcaaaagccatttttagcgggca-FITC
BKV, JCV

F-cacttttgggggacctagt
R-ctctacagtagcaagggatgc
LCRed705-agtagctgaaattgctgctggagagctgct-
p tctgaggctgctgctgccacaggatttt-FITC
PCR 反応: 95°C2分処理の後、95°C2
秒,58°C15秒,72°C15秒の反応を50サイクル
行なった。

検出操作: PCR反応終了後、メルティング
解析を行ない、各ウイルスに対応したTm値
のピークの有無からウイルスゲノムの存否
を判定した (Tm 値は以下の通り: A
HSV-1;57°C, HSV-2;70°C, VZV 62°C,
ParvoB19 65°C [LCRed 640 で検出],
CMV;61°C, HHV-6;54°C, BKV66°C, JCV7
0°C[LCRed705で検出] B EBV 63°C
[LCRed 640で検出], HHV-7 58°C, HHV-8
63°C[LCRed 705で検出], β -グロビン 52°C
[LCRed 640で検出]

細菌 16SrRNA 遺伝子の増幅

機器

ABI GeneAmp PCR System r9700

ABI PRISM 7700 Sequence Detector

反応条件

95°C10分 で Denature した後、95°C15秒、
60°C1分の2ステップPCRを50サイク
ル行なった。

プライマー・プローブ配列

Primer: F-aggcagcagtDRggaat

Primer: R-ggactacYVgggtatcta

Probe:

FAM-tgccagcagccgcggtataatRDag-iowaBK

ABI社製 AmpliTaq Gold® DNA Polymerase,
LD(low DNA)を使用。

この試薬は、バクテリア DNA のコンタミ
ネーションが最少に抑えるように精製し
ています。標準使用量 2.5 U 中に含まれる
16S rRNA 遺伝子が 10 コピー未満。

PCR 条件

95°C 10 分 Denature

95°C 15 秒、60°C 1 分の 2 ステップ PCR
を 50 サイクル行った。

(倫理面への配慮)

貴重な患者検体及び投与用細胞を用いて行うものであり、倫理面には十分に配慮し、適切な説明と同意取得を元に各種研究倫理指針を遵守して研究を行う。

C. 研究結果

1. 活性化 T リンパ球のウイルス検査

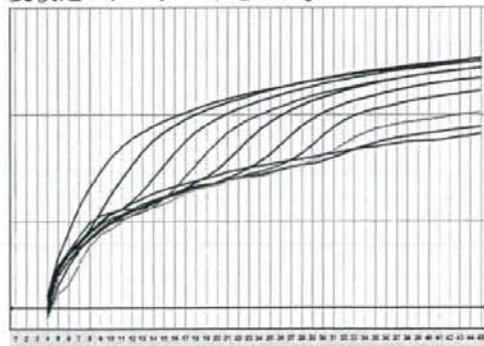
東京医科歯科大学医学部付属病院細胞治療センターで T リンパ球の活性化培養を行った 117 例に対してウイルス検査を行った。

その結果、26 例(22%)が陽性反応を示し、その内訳は BKV 3 例、EBV7 例、HHV614 例、CMV2 例だった。

2. 細菌 16SrRNA 遺伝子による細菌の迅速検出系の作成

a. 感度検定用スタンダードの作成

Staphylococcus aureus の DNA を使用し、PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (プロメガ) にクローニングし、プラスミド精製後シーケンス解析により配列を確認した。確認後制限酵素 *ScaI* で消化後電気泳動法により濃度を確認し、MS2RNA 溶液 (10ng/μl : ロッシュ) に段階希釈し、感度検定スタンダードとした。



(図の説明 感度測定用のスタンダードを 10^9 から 10^1 まで 10 倍階段希釈し感度測定を行った際に得られた測定カーブ)

10 コピー/Reaction の検出感度を持つことが示された)

b. 検査系の感度検定

作成した感度検定用スタンダードを段階希釈し、検査系の感度検定を行った。その結果、作成した検査系は 10 コピー/Reaction の感度を持ち、さらに 6 種類の細菌 (大腸菌、放線菌、肺炎桿菌、肺炎球菌、緑膿菌、コアグラゼ陰性ブドウ球菌) についても 10 コピー/Reaction の感度で検出可能なことを確認した。

3. 細菌の増幅に使用する酵素の検討

通常の Taq ポリメラーゼには精製段階で生成に用いた大腸菌ゲノム DNA が残存している場合が多いことが知られている。残存する細菌の 16SrRNA 遺伝子を PCR 法で増幅する際に懸念される大腸菌由来 DNA による擬陽性反応を回避するため、増幅反応に使用する酵素の検討を行った。その結果、高度に精製することにより製品への大腸菌 DNA の混入を減らしたアプライドバイオシステムズ社の AmpliTaq Gold DNA polymerase LD を使用すれば擬陽性反応を十分に回避できることが明らかとなり、以後の実験にはこの酵素を使用した。

4. 測定の実施例

作成した細菌の網羅的検出法の有用性を示すため、臨床サンプルから抽出した DNA を使用した検討を行った。細菌感染が疑われる臨床サンプル 53 例を測定したところ、12 例が陽性だった。代表例を以下に示す。

① サンプル：硝子体液

16S 定量結果：9.2E+5 copy/ml

シーケンス解析の結果：増幅産物の DNA 配列を決定し、データベースと比較したところ、

Bradyrhizobium elkanii, *radyrhizobium*
spUncultured Methylocella spAfipia
broomeae isolate DB8, *Uncultured alpha*
proteobacterium clone Soil bacterium
Trim-S2T-M1LLSSSL-2

が Genbank の BLAST 解析で 100% 一致した。

② サンプル：硝子体

16S 定量結果：1.9E+6 copy/ml
シーケンス解析の結果：Genbank の BLAST 解析で 100%一致が無く、2 ベース 違いで *Pseudomonas* sp. PR と *Pseudomonas fluorescens* と相同性を持つことが示された。

③サンプル：硝子体

16S 定量結果：1.6E+4 copy/ml
シーケンス解析の結果：Genbank の BLAST 解析で *Enterococcus faecalis* と 100%一致した。また、培養法でも *Enterococcus faecalis* が検出され、結果が一致した。

D. 考察

1. 自施設で T リンパ球の活性化培養を行った 117 例のうち 26 例(22%)がウイルス陽性で、検出されたのは BKV 3 例、EBV7 例、HHV614 例、CMV2 例だった。この中でも特に注意を要するのは HHV6 である。HHV6 は T 細胞指向性を示すウイルスで、活性化 T リンパ球の培養中に完全・増殖が繰り返され、大量のウイルスが産生される場合があることに注意が必要である。活性化 T 細胞を使用したがん治療は多くの医療機関でも行われているが、治療の安全性を確保する観点から HHV6 をはじめとした持続感染ウイルスの動態を検査することは重要である。

2. 様々な細菌の 16S Ribosomal RNA 遺伝子には高い相同性があることを利用し、細菌を網羅的に検出することを目指した定量 PCR 系を構築した。検査に使用するプライマーは、ARB sequence data base の 16S rRNA gene 配列 41,016 種類において 64%完全一致しているものを採用した。実際には 1 塩基程度の違いであれば検出可能と考えられるので、検出できる種類は 64%を大きく上回ると考えられる。

3. 市販の Taq ポリメラーゼは多くの場合組換え体であるため、ホストの大腸菌のゲノム DNA が混入している。16SrRNA 遺伝子の相同性を利用した検出系では、混入している大腸菌 DNA による擬陽性反応が懸念されるが、今回採用した ABI 社製の AmpliTaq Gold® DNA Polymerase,

LD は大腸菌 DNA のコンタミネーションが最少に抑えるように高度に精製されており(標準使用量 2.5 U 中に含まれる 16SrRNA 遺伝子が 10 コピー未満)、実際の検出操作に於いても擬陽性反応が生じることはなく、問題なく使用できることが確認された。

4. 細菌検査に於いては培養法が繁用されるが、体外で簡単に培養できない細菌も多く、細菌を網羅的に検出し増幅産物の配列解析から菌種を特定する方法は魅力的である。今回実験により特定された菌種は、従来病原細菌に分類されていないため病因との関連が不明なものもある。今後培養法との比較や特定された細菌と病気との関連などを詳しく解析することにより、検査系の有用性を示す必要がある。

E. 結論

これまでに作成したウイルスの同時・高感度・迅速検査系は、細胞治療用製剤の安全性検査として実用化可能であることが示された。また、今回作成した 16SrRNA の共通プライマーを利用した細菌の迅速検査系が実際に稼動することが示された。今後、様々なサンプルを使用した検証作業を行う予定である。

G. 研究発表

論文発表

1. Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 52(2):136-138, 2008

2. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami, Morio T, Sugamoto Y and Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *British Journal of Ophthalmology*, 92(7):928-932, 2008.

3. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyayama M,

Miyata K, Shimizu N, Morio T and Mochizuki M. Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *British Journal of Ophthalmology* 92(4):505-8. 2008.

4. Nakamura H, Ishii C, Suehiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K, Yajima M and Fujiwara S. The latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus induces expression of the putative oncogene Bcl-3 through activation of the nuclear factor-kappaB. *Virus research*, 131(2):170-179, 2008.

5. Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *Journal of Infectious Diseases*. 198(5):673-82, 2008.

6. Kanno H, Watabe D, Shimizu N, Sawai T. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clinical Experimental Immunology* 151:519-527, 2008.

7. Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes and Infection* (in press)

8. 木戸さやか、杉田直、二神百合、堀江真太郎、佐々木秀次、望月學、清水則夫、森尾友宏 ステロイド点眼治療中に樹枝状角膜炎を合併したヘルペス性角膜内皮炎の4例 臨床眼科 2008, 62:1061-1065.

9. 鴨居功樹、杉田直、木戸さやか、堀江

真太郎、菅本良治、望月學、森浩士、宮永将、宮田和典、清水則夫 皮膚症状を伴わない水痘帯状 疱疹ウイルス前部ぶどう膜炎の3例 臨床眼科 2008, 62: 1067-1071.

国内学会発表

1. 今留謙一、矢島美彩子、清水則夫、中川温子、川野布由子、藤原成悦、NOGマウスを用いた慢性活動性EBウイルス感染症モデルの作製、第5回EBウイルス研究会、2008年7月18日、鳥取

2. 鴨居功樹、杉田直、菅本良治、高瀬博、望月學、清水則夫、渡邊健、硝子体液の定量PCRで診断できた細菌および真菌混合感染による遅発性眼内炎の1例、第42回日本眼炎症学会、2008年7月4日、福岡市

3. 山本紗也香、杉田直、二神百合、堀江真太郎、望月學、清水則夫、森尾友宏、角膜病変を伴わないHSV-1関連虹彩毛様体炎の3症例、第42回日本眼炎症学会、2008年7月4日、福岡市

4. 宮永将、杉田直、清水則夫、森尾友宏、宮田和典、望月學、サイトメガロウイルスによる虹彩炎と角膜内皮炎の臨床像比較、第62回日本臨床眼科学会 2008年、10月26日、東京

5. 山本紗也香、杉田直、森尾友宏、清水則夫、望月學、帯状疱疹に伴う角結膜炎の涙液中VZV-DNA量および眼所見、第62回日本臨床眼科学会、2008年10月26日、東京

6. 鴨居功樹、高瀬博、杉田直、菅本良治、田中裕一郎、望月學、渡邊健、清水則夫、Broad-range PCRシステムで診断した真菌性眼内炎の1例、第62回日本臨床眼科学会、2008年10月25日、東京

7. 清水則夫、再生医療とウイルス安全性確保、第8回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム、2008年12月12日、東京

国際学会発表

1. Fox CP, Long HM, Lowe C, Shimizu N and Rowe M. LMP2A AS A TARGET FOR T CELL RECOGNITION IN EBV-ASSOCIATED T AND NK CELL TUMOURS EBV Association General meeting, November 2008, Guangzhou, China.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

細胞治療の有効性・毒性検証システムの開発に関する研究

加藤俊一（東海大学医学部・基盤診療学系再生医療科学・教授）

研究協力者：安藤潔（東海大学医学部・内科学系血液内科学・教授）

宮地勇人（東海大学医学部・基盤診療学系臨床検査学・教授）

中村雅登（東海大学医学部・基盤診療学系再生医療科学・教授）

八幡崇（東海大学医学部・基盤診療学系再生医療科学・講師）

中村嘉彦（東海大学医学部付属病院・細胞移植再生医療科・室長補佐）

佐藤忠之（東海大学伊勢原校舎教育・研究支援センター・技師補）

田中進一（東海大学医学部付属病院診療技術部・科長）

研究要旨：

再生医療・細胞医療製剤の安全性と品質管理システムを開発する目的で、東海大学では医学部内に再生医学センター、総合臨床研究センター、医学部付属病院内に細胞移植再生医療科を設置し、基礎的研究から橋渡し研究、そして臨床研究の実施までの一貫的な体制を構築した。また、品質評価システムとしてマウス皮下にヒトの組織を再構築するアッセイ系、安全性管理システムとして各種ウイルスならびにマイコプラズマのリアルタイム PCR アッセイ、発癌性否定試験としてヒト化マウスを用いた少数の細胞による短期間アッセイシステムを開発中である。

A. 研究目的

細胞製剤を用いた再生医療においては体外における細胞の調製や培養のプロセスの安全性と品質管理が大きな課題となっている。

東海大学において細胞製剤の安全性の確保と新しい品質評価システムについての検討を行うために、再生医療の基盤整備を行うことを本分担研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 再生医療の基盤整備

東海大学医学部においては1996年に付属病院の基幹組織として細胞移植再生医療センター（後に細胞移植再生医療科と改称）、2002年に医学部の総合研究部門として再生医学センターとセルプロセッシング室（CPC）、2003年には総合臨床研究センターを設置し、基礎的研究から橋渡し研究、そして臨床研究の実施までの一

貫的な体制を構築して、再生医療実現のための基盤整備を行ってきた。（図1, 2, 3）

2. 新しい品質評価システムの開発

体外で培養あるいは増幅したヒト組織幹細胞や前駆細胞が実際に目的とするヒトの組織構造を構築できるかどうかを検証できるマウスのアッセイ系を開発し、ヒトの皮膚構造、椎間板構造などを再構築できるかどうかを検討した。

3. 安全性の確保

体外培養細胞による感染性因子の否定試験として各種ウイルス（HBV、HCV、HIV、HSV-1、-2、VZV、CMV、EBV、HHV-6、ParvoB19）やマイコプラズマのリアルタイム PCR アッセイ、エンドトキシンアッセイ、細菌ならびにマイコプラズマ培養などの系を確立した。

また、培養細胞の発癌性否定試験としてヒト化マウスを用いて少数の細胞によ

り短期間でアッセイできる系の開発を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究は国の定めるヒト幹細胞の臨床研究に該当することから、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年7月制定)に則り、また動物実験に関しては平成17年改正の動物愛護法に基づき適正な実験を行った。

C. 研究結果

1. 再生医療実現のための基盤整備

平成20年度においては、医学部付属病院の細胞移植再生医療科の1部門として「安全性評価室」(安藤潔室長)を設置し、安全性の評価に特化した学内組織とした。(図4)

2. 新しい品質評価システムの開発

体外で培養したヒト皮膚ならびに椎間板髄核細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、ヒトの皮膚と椎間板髄核の組織構造を再構築できることを証明した。

3. 安全性の確保

東海大学において開発したウイルスPCR法と三菱化学メディエンスから技術移転を受けたウイルスならびにマイコプラズマPCR法のバリデーションを行い、実際に使用可能であることを確認した。

また、細菌ならびにマイコプラズマ培養、エンドトキシンの定量測定方法についても確立した。

D. 結論

東海大学において細胞製剤を用いた再生医療を実施するにあたり必要な組織と設備などの基盤整備を行い、品質評価試験と安全性確認試験についてのバリデーションを実施した。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

著書

1. 加藤俊一. 移植造血幹細胞のソース (骨

髄移植・末梢血幹細胞移植・臍帯血移植について) Annual Review 2009 血液、中外医学社、pp28-35、2009.

論文発表

1. Atsuta Y, Kato S, et al. Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplant compared with unrelated bone marrow transplant in adult patients with acute leukemia. *Blood*, 2009 (in press).
2. Yahata T, Kato S, et al. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells*. 26:3228-36,2008.
3. Yabe M, Kato S, et al. Fatal giant cell myocarditis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 41(1):93-4,2008..
4. Yasuda Y, Kato S, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Int*.50(2):238-40,2008.
5. Narimatsu H, Kato S, et al. Chronic graft-versus-host disease following umbilical cord blood transplantation: retrospective survey involving 1072 patients in Japan. *Blood*.112(6):2579-82,2008.
6. Nagamura-Inoue T, Kato S, et al. Unrelated cord blood transplantation in CML: Japan Cord Blood Bank Network analysis. *Bone Marrow Transplant*. 42(4):241-51,2008.
7. Yoshimi A, Kato S, et al. Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 14(9): 1057-63,2008.
8. Yahata T, Kato S, et al. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells*. 26(12): 3228-36,2008.

9. **Kawase T, Kato S, et al.** HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: Implications for molecular mechanism. *Blood*. 2008.
10. 加藤俊一. 臍帯血移植の今後. 総合臨床、Vol57.No.4、632-638、2008.

国際学会発表

1. Sugauma E, **Kato S, et al.** Bone Mineral Density(BMD) in survivors who underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) during childhood. A long term follow-up and effectiveness of Hormone Replaced Therapy (HRT). Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, May 2008 (Hawaii)
2. **Kato S.** Cord blood banking and cord blood transplantation. ISBT XXXth International Congress, June 2008 (Macao)
3. **Kato S.** Report from Japan and Asia. First Cord blood Transplant 20th Anniversary Netcord bank organization 10th Anniversary. Oct 2008 (Canne)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1. 再生医学センター（医学部）

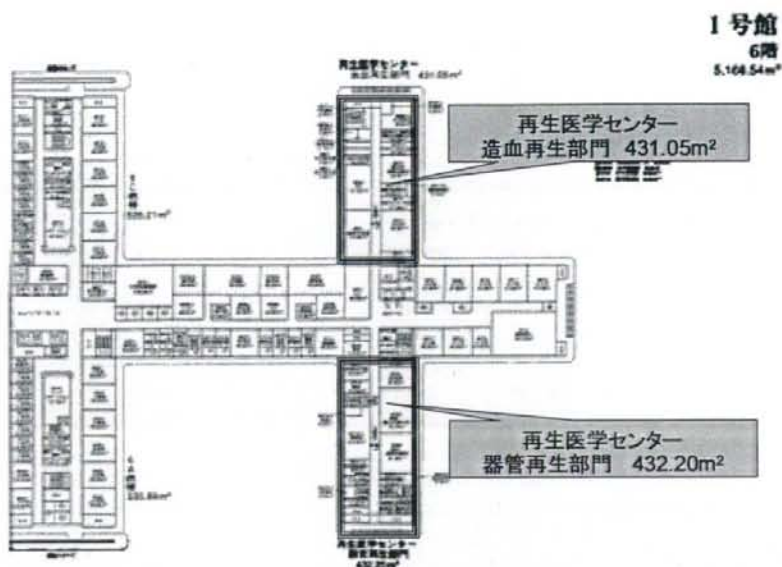


図2. 細胞移植再生医療科（病院）

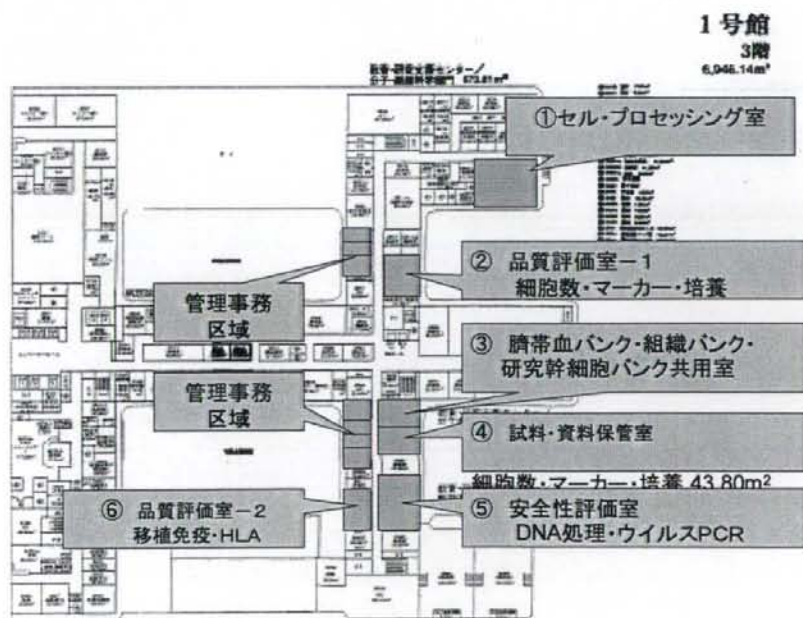
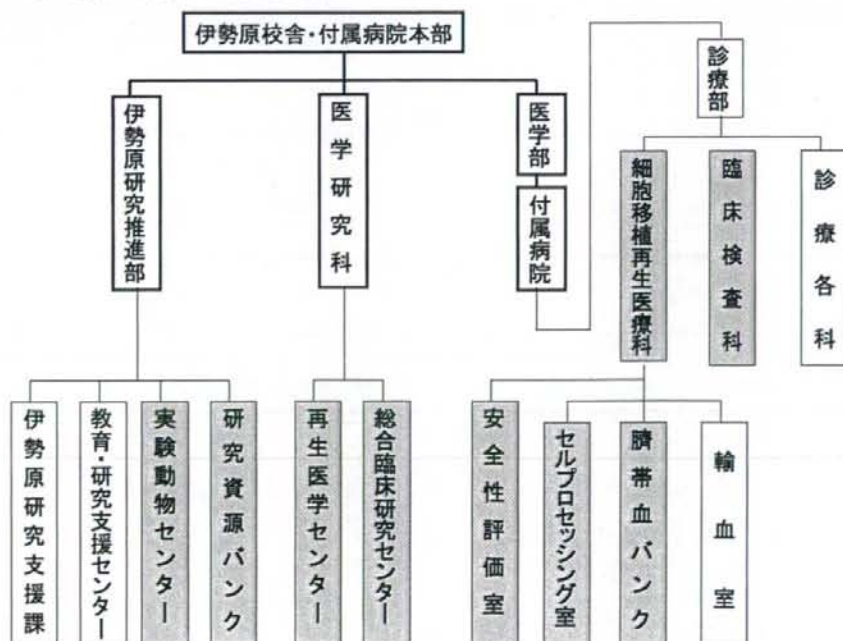


図3. 臨床検査科 (病院)



図4. 医学部・病院内の関連組織



ウイルスの網羅的検出方法の開発

浜口 功 (国立感染症研究・所血液安全性研究部・教授)

研究協力者：水谷哲也 (国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官)

江下優樹 (大分大学・医学部・准教授)

佐藤朝光 (福岡大学・医学部・薬学部・助教)

黒田誠史 (国立感染症研究所・ゲノム解析センター・室長)

関塚剛史 (国立感染症研究所・ゲノム解析センター・研究員)

研究要旨：

遺伝子配列のわからない未知のウイルスの同定のために、Rapid Determination system of RNA/DNA viral sequences (RDV 法)の確立を進めている。これまでに、本方法を応用し、原因不明のサンプルから、新しいアデノウイルス (前田ら、Emerg. Infect. Dis. 2008) および新しいレオウイルスの発見に成功した。本研究課題では、ヒトの血清を対象に未知のウイルスを検出することを最終目的とし、本年度は我々の開発した方法でヒトに限らず新しいウイルスが検出できるかについて検討した。

A. 研究目的

2007年、申請者らは未知のウイルスの核酸を迅速に決定する方法として、Rapid Determination system of RNA/DNA viral sequences (RDV 法)を開発し、発表した(水谷ら、Emerg. Infect. Dis. 2007)。この方法は培養上清や血清を対象として、わずか2日間の作業でウイルスゲノムの一部の塩基配列を決定できる方法である。しかも、新しく開発したダイレクトシーケンス法の採用により、DNAの組換え申請を行わなくてもよいという利点がある。現在、RDV法は6つのバージョンがあり、目的に応じ方法を使い分けている。これまで

にRDV法の鳥類への応用(酒井ら、Arch. Virol. 2007)、蚊への応用(木原ら、J. Virol. Method. 2007)、コウモリの新しいアデノウイルスの発見(前田ら、Emerg. Infect. Dis. 2008)、ダチョウの新しいレオウイルスの発見(酒井ら、Vet. Microbiol. 2009)、RDV法の改良(渡辺ら、J. Clin. Virol. 2008)や総説(水谷、「ウイルス」2007;水谷)などの学術誌に発表してきた。このようにRDV法はウイルス核酸を非特異的に増幅しながらも、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定できるという特徴をもつので、遺伝子配列のわからない未知のウイルスの同定に適している。

近年、ヒトで新しいウイルスの発見が相次いで報告されている。この2-3年に報告されたヒトボカウイルスやカルジオウイルスは新しいウイルスである。このように、ヒトにおいてもまだ未同定のウイルスは多数存在していると考えられる。本研究では、ヒトの血清を対象に未知のウイルスを検出することを目的とし、本年度は我々の開発した方法でヒトに限らず新しいウイルスを検出できるかについて検討した。

B. 研究方法

RDV法 ver4.0は、アルブミン遺伝子のような短いRNAでも効率良く増幅でき、しかも数百分子の遺伝子を検出できる感度の良い方法である(図1)。本方法の特徴は、RNAからcDNAを作成した後にライゲーションにより見掛け上長い遺伝子を作ることにある。短い遺伝子はPhi29の基質になり難いので、この操作により長いcDNAが効率良く増幅することになる。タイ国のデング流行地域であるPhasicharoen、Banghunthian、Bangbon、Jomthongという4つの場所から蚊の幼虫を採集し、4齢幼虫まで育った*Aedes aegypti*を使用した。約50匹の幼虫をプールしてそれぞれナンバリングし、ホモジネートし、低速遠心した。上清を0.22µmのMillipore Millex-GV (Millipore, MA, USA)によりろ過後、C6/36細胞と共に8日間培養し、9日目にCPEを観察した。CPEの最も強く現れたNumber 12をRDV法 ver4.0に適用した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト血清を用いて行うものであるが、患者検体を取り扱う研究であり、倫理面には十分に配慮し、適切な説明と同意取得を元に各種研究倫理指針に準拠して研究を行う。

C. 研究結果

RDV法において、電気泳動による増幅産物の確認を行った結果、100-700bpのcDNAの161個のバンドが検出された。これらバンドのうち、149個の明瞭なバンドを切り出し、ダイレクトシーケンスによって塩基配列の決定を行った。その結果、143個のcDNAの塩基配列を決定した。塩基配列を決定したcDNAはblastxによって相同性検索を行った。4個のcDNAがrice stripe virus (RSV; GenBank accession number EF141327)のRNAポリメラーゼに低い相同性を示した(図2)。RSV様ウイルスは蚊の幼虫を採集した土地の名からPhasicharoen virus 1 (PhaV 1)と名付けた。4つのRSV様配列は37アミノ酸からなり、それぞれが互いに高い相同性を示していた。また、RSVの他にブニヤウイルス科のUukuiemi virus (UUKV) (accession number D10759)やRift Valley fever virus (RVFV) (accession number Z30318)にも相同性を示した。RSV様配列からプライマー(P1-3 and P2-2: 図3)を設計し、Number 12のRNAにRSV様配列(PhaV 1配列)が存在することをPCRで確認した。また、このとき、PhaV 1配列がC6/36細胞のDNAとRNA由来でないことも確認した(図3)。次いで、PhaV 1を継代することによりその感染性を検討した(図4)。C6/36細胞で培養した

Number 12 の上清を新しい Vero 細胞と C6/36 細胞 (2nd passage) に継代した。5 日間の培養後、その上清を RNA 抽出し、プライマー (P1-3 and P2-2) を使って PCR を行った。また、10 日間の培養後の上清に対しても同様の操作を行った。その結果、Vero 細胞では PhaV 1 配列は検出できなかったが、C6/36 細胞で 10 日間培養後 PhaV 1 配列を検出することができた。引き続き、C6/36 細胞への継代と 10 日間の培養を繰り返す (3rd passage; total 20 days and 4th passage; total 30 days)、細胞とその上清を RNA 抽出し、PCR を行った。PhaV 1 の継代を 4 回繰り返した細胞と上清の両方で、PhaV 1 配列が検出された。2 回継代後、培養上清から抽出した RNA から cDNA を作成し、Genomiphi で増幅後、次世代型シーケンサー (ロシュ社の FLX) でシーケンスをおこなった。その結果、約 600 塩基の contig が得られ (図 5)、系統樹を作成した結果、ブニヤウイルス科に属する新しいウイルスであることがわかった (図 6)。

D. 考察

RDV 法 ver4.0 を用いて蚊から新しいウイルスを検出することに成功した。このウイルスは既存のブニヤウイルスの塩基配列をもとにプライマーをデザインし、PCR をおこなっても増幅できない。本法を用いることにより、ヒトの検体においても新しいウイルスを発見できると期待される。

E. 研究報告

論文発表

1. Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi M, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, **Mizutani T**. Isolation of a novel adenovirus from a fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerging Infectious Diseases* 14: 347-349. 2008.

2. Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushi S, Saijo M, Yoshikawa, Y Kurane I, Morikawa S, Akashi H. Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J. Clin. Virol.* 43: 56-59. 2008.

3. Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, **Mizutani T**. Novel virus discovery from field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Arch Virol.* 154. 153-158. 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

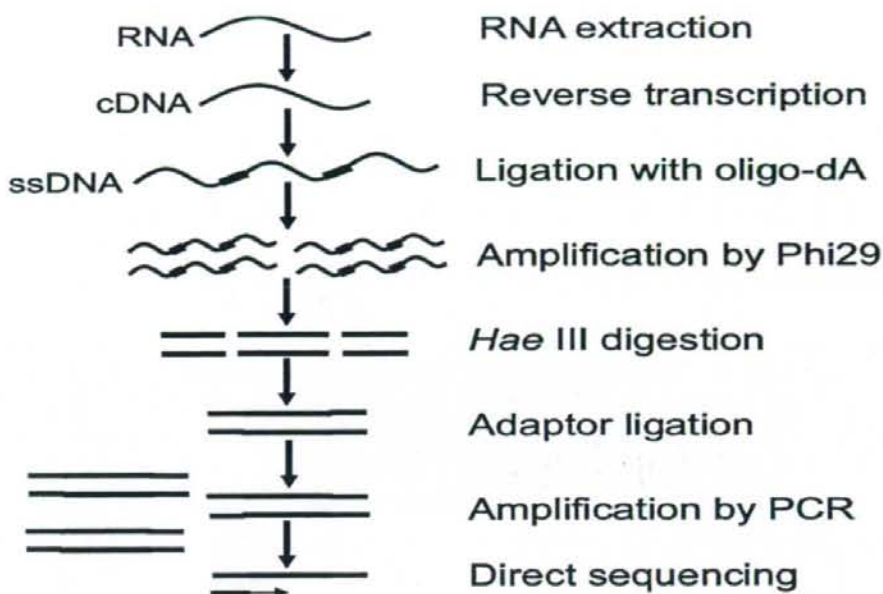
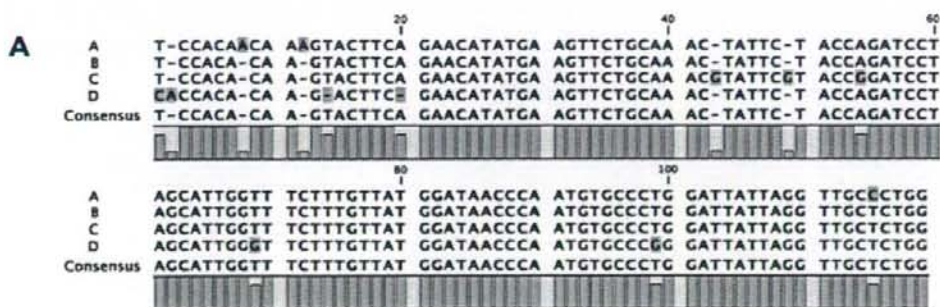


図1. RDV ver4.0の概略図



B

RSV-like fragment	16 YEVLQTLPPDPSIGFFVMDNPMCPGLLG 99
	YE L DP GFF MDNP C GLLG
RSV (EF141327)	5371 YETLLKNSYDPALGFFLLMDNPKCAGLLG 5454
RSV-like fragment	7 FRTYEVLQTLPPDPSIGFFVMDNPMCPGLLG 99
	F Y L DPS GF MD P GL G
UUKV (D10759)	3824 FLEYIKLVSEIKDPSLGYFLMDHPFGSGLSG 3916
RSV-like fragment	43 DPSIGFFVMDNPMCPGLLG 99
	DP GFF DNP GL G
RVFV (Z30318)	8133 DPGLGFFLLDNPYACGLLG 8077

図2. RSV様塩基配列(A)とアミノ酸配列の相同性(B)

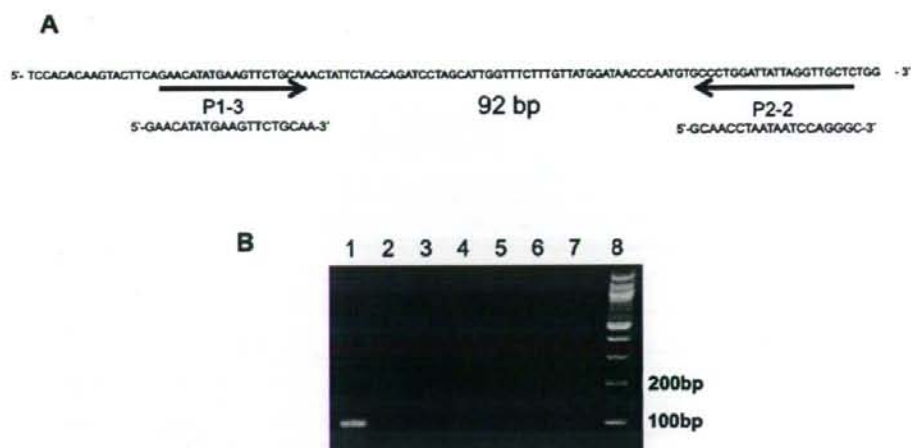


図3. プライマーのデザイン(A)とPCRによるPhaV1の検出(B)
(B)レーン1はNumber12のRNA、レーン2から7はmock infectionの細胞や培養上清から抽出したRNA

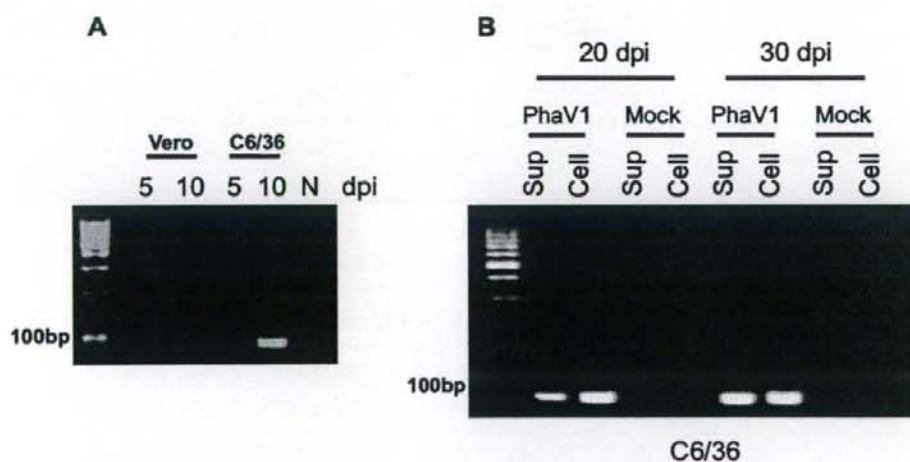


図4. PhaV1の感染性

(A)サル腎臓Vero細胞と蚊のC6/36細胞で最大10日間培養、
(B)C6/36細胞で最大30日間培養して、PCRをおこなった