

厚生労働科学研究補助金 再生医療実用化研究事業  
分担研究報告書

培養細胞シートに対する微生物感染の影響に関する研究

研究分担者 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  
大場邦弘 公立昭和病院小児科 医員

**研究要旨：**

再生医療や細胞医療製剤におけるウイルスの混入や活性化の検出・測定は安全性の面から非常に重要である。本研究では、既知のウイルスと未知のウイルスを網羅的に検出する系を確立した。既知のウイルスについては、DNA ウイルス 23 種類、RNA ウイルス 47 種類をコンベンショナル PCR 法で検出できる系を確立し、未知のウイルスについては Rapid determination system of viral RNA/DNA sequences (RDV 法)を採用し、サイトメガロウイルスを用いた場合、20 コピーのウイルスゲノムを検出できた。このシステムを用いて、検査依頼のあった 2 検体からウイルス検出を試みた。

**A. 研究目的**

再生医療や細胞医療製剤においてウイルスの混入や活性化の検出・測定は安全性の面からも非常に重要である。この場合、すでに知られているウイルス（既知のウイルス）とまだ同定されていないウイルス（未知のウイルス）の存在が考えられる。本研究では既知および未知のウイルスを網羅的に検出する方法の確立を目指し、1 年目は Rapid determination system of viral RNA/DNA sequences (RDV 法)を、出発材料として RNA ウイルスとして数百コピーのウイルスが存在していれば未知・既知のウイルスを検出できるように改良した方法をすでに開発していたので、この方法を用いて蚊に感染している新規ブニヤウイルスを検出することに成功し、本法が新しいウイルスを発見す

るための道具になることを証明した。このように RNA ウイルスでは有効であったが、DNA ウイルスについて検討する必要があるので、本年度はまず第 1 に RDV 法の DNA ウイルスに対する検出感度を求めた。次に、RDV 法はどの研究室においても安価に実施可能であるが、網羅的な解析のために 2 日間は終日操作にかかりきりにならない。検体導入時に既知のウイルスだけでも PCR で検査し陽性のバンドが得られた場合には、その検体は再生医療目的に使われないことになるので、既知のウイルスをあらかじめ検査することは非常に重要である。そこで、本年度はコンベンショナル PCR による既知のウイルスの検査する体制を整えることも目的とした。

## B. 研究方法

RDV法: サイトメガロウイルス (NATtrol 社: 50,000 コピー/ml) を材料に検出感度について検討した。ウイルスを希釈し、2,000, 200, 20 コピーを出発材料として RDV法をおこなった。

コンベンショナル PCR 検出系の確立: 既知のウイルスの検出については、2007 年度に川崎病の原因探索の目的で構築した既知のウイルスの PCR システム (川崎病研究センター研究助成金・主任研究者: 水谷哲也) をベースにしたが、この時点で 24 種類のウイルスを検出するシステムであったので、本年度はその 3 倍のウイルスを検出できることを目的とした (DNA ウイルス 23 種類、RNA ウイルス 47 種類)。研究室において使用している PCR プライマーや信頼できる論文に報告されているプライマーなどを用いることにした (表 1)。PCR の反応は、GoTaq PCR システム (プロメガ社) を用い、一部のウイルスを除いて 94 度 30 秒、55 度 30 秒、72 度 30 秒で 40 サイクルおこなった。検体に対して、すべての PCR をおこなうのではなく、症状から考えられるウイルスについての検査をおこなった。

症例: 公立昭和病院からウイルス検査依頼のあった 2 症例。

検体 KS-P: 4 歳女兒の脳症 (MERS) の症例。1 歳までに 2 回痙攣 (発熱の有無は不詳) あったが、脳波検査では異常所見を認めず、1 歳 6 ヶ月時、中国にて有熱時に 6 回痙攣群発し、3 歳まで抗痙攣薬を内服していた既往あり。2009 年 8 月 12 日 38°C 台の発熱あり、近医受診。咽頭発赤を指摘された。嘔吐 1 回あり。8 月 13 日 9 時

頃、痙攣様の動きあり。持続時間は不明。嘔吐痕あり。しばらく傾眠であったが、刺激には反応した。その後、他院を受診した際には意識清明であり、経過観察となった。インフルエンザ迅速検査陰性。同日 18 時頃、1 分間の眼球上転あり、すぐに覚醒した。8 月 14 日 4 時半頃、5 分間眼球上転し、ダイアップを挿肛したところ入眠。9 時頃 4 分程度の痙攣 (不詳)。痙攣が群発するため 10 時頃、他院再診。痙攣はなかったが、ジアゼパム静注。12 時頃、眼球上転、上肢屈曲、下肢伸展、チアノーゼ、不随意的挺舌あり。ジアゼパムおよびミダゾラムを静注された上で、公立昭和病院を紹介受診 (40 分程度の痙攣重積)。来院時うわごとあり、不穏であった。痙攣群発および痙攣重積に対する精査加療目的で入院となった。

[髄液] cell 5/3  $\mu$ L, Pro 14, Glu 75, Cl 124、検鏡陰性、髄液培養陰性。

[頭部 MRI] DWI: 脳梁膨大部に high signal area (+)

[脳波検査] 明らかな異常所見なし。

[入院後経過] 血液、髄液検査および MRI 所見から、何らかの感染 (おそらくウイルス) を契機とした MERS (可逆性脳梁膨大部病変を有する脳炎/脳症) を疑った。Self-limiting な疾患であるため、抗痙攣薬は投与せず経過観察とし、痙攣重積があった事に対しては、二相性脳症予防目的に Vit. B6 を投与した。入院第 2 病日の夕方にはほぼ意識清明となり、その後も一貫して回復の経過をたどった。入院第 6 病日に MRI を再検。脳梁膨大部の異常信号は改善しており、MERS と確定診断した。入院第 9 病日に退院。検体は咽頭・

鼻咽頭分泌物、髄液。

検体 KS-Q：生後 3 ヶ月の児で、1 日目の発熱及び痙攣発作を主訴に来院した症例。2009 年 8 月 21 日から 39°C 台の発熱。8 月 22 日に近医で尿検査して抗生剤処方。8 月 23 日未明も発熱が持続し活気が低下、不穏もあるということで公立昭和病院受診。来院時左方偏視を認め不穏状態が続いていた。持続時間は不明だが痙攣を考慮してミダゾラムを静注し、偏視、不穏は消失。精査加療目的に入院となった。  
[髄液検査](トラウマ血性) 細胞数 145/3  $\mu$  l  $\rightarrow$  補正後 0(好中球 25%、リンパ 75%) 髄液糖 58、蛋白 53、Cl 123、検鏡陰性、髄液培養陰性。  
[頭部 MRI] 明らかな異常所見なし  
[脳波検査] 明らかな異常所見なし。  
[入院後経過] 入院後も痙攣発作が群発。発熱に伴う痙攣を考え、解熱するまで抗痙攣薬を持続静注。30 日に解熱(7 日間の発熱)し、31 日に抗痙攣薬の持続を中止。中止 2 時間後から痙攣が再び群発し、抗痙攣薬の持続静注を再開し、さらなる精査目的で 9 月 3 日に国立精神神経センターに転院となった。熱源がはっきりせず、血液検査や各種培養結果、抗生剤の反応からも、なんらかのウイルス感染症を考えた。この症例は難治性のてんかんが発熱を契機に発症したか、もしくは、ウイルスの直接的な脳へのダメージで後遺症として痙攣が残ってしまったかが考えられる症例。検体は髄液、血清。

### C. 研究結果

RDV 法については、サイトメガロウイル

スを用いた場合に 20 コピーのウイルスでも検出できることを確認した(図 1、2)。多くの DNA ウイルスのゲノムは数十キロ塩基以上なので、DNA ウイルスに比べると短い RNA ウイルスより感度が良いと考えられた。

70 種類のウイルスについてはスクリーニングの目的で specific primer や degenerate primer を合成した。研究室においてすべてのセットについてバリデーションをおこなっているわけではないが、病院から研究室に検査依頼のあった検体 (KS-P、KS-Q) でウイルスの検出を確認できた。

KS-P：検体から RNA を抽出し、エンテロウイルスおよびライノウイルス検出用 PCR でバンドを検出し、両バンドについて塩基配列を決定したところ、コクサッキーウイルス B4 に核酸で 92–96% 相同性のある配列が得られた(アミノ酸では 100% 一致)。その他の RNA ウイルスは陰性。(data not shown)

KS-Q：検体から RNA と DNA を抽出し、RNA について、ルベラ、JEV、ポリオ(2 種類)、ライノ、パレコ、狂犬病、Measles、コロナウイルス(2 種類)、エンテロ、カルジオ、Klassevirus の各ウイルスの PCR をおこなったが、すべて陰性であった。DNA について、JCV、アデノ(2 種類)、TTV、パピローマ、ヘルペス(コンセンサス)の各ウイルスについて PCR をおこなったが、TTV 以外は陰性であった。(data not shown)

これらの検出されたウイルスが疾患の原因になるか否かは今後の更なる解析が必要である。KS-P で検出された TTV は 1

歳までに 80%の小児が感染すると言われて  
いるので、本疾患の原因の可能性は低  
い。

#### D. 考察

本研究においては、RDV 法を用いるとヘル  
ペスウイルスのようにゲノムの長いウ  
イルスを PCR と同程度の感度で検出でき  
ることが証明された。どの検出系を用い  
ても、ウイルスゲノムの長さ、形状、GC  
含有量などにより検出感度は異なる。RDV  
法においても同様であり、今後、さまざ  
まなウイルスを用いて感度を検討する必  
要がある。

一方、既知のウイルス検出については、  
本研究ではコンベンショナル PCR を用い  
た。リアルタイム PCR や LAMP 法の方が、  
迅速、簡便かつ定量的にウイルスを検出  
できることが知られている。しかし、検  
出されたウイルスの塩基配列を知り、変  
異までも検討することが重要である。こ  
の理由から、手間のかかるコンベンショ  
ナル PCR を選び、系を構築した。その一  
方で、やはり迅速性も重要であると考え  
られるので、リアルタイム PCR や LAMP の  
系を確立する必要があるかもしれない。

#### E. 結論

今年度の研究において、再生医療や細  
胞医療製剤のウイルス検出について、ス  
クリーニングおよび既知のウイルスが否  
定された場合に RDV を行うという体制を  
つくった。スクリーニング用の PCR につ  
いては順次バリデーションをおこなって  
いく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究報告

##### 論文発表

1. Kouji Sakai, Yuichi Ueno, Shuhei Ueda, Kaori Yada, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Kenichiro Mutoh, Kazuki Yoshioka, Masayuki Nakamura, Kazuaki Takehara, Shigeru Morikawa, **Tetsuya Mizutani**. Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. *Vet. Microbiol.* **134**. 227-232.2009.  
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)
2. Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi K, Yasunaga T, Ikuta K, **Mizutani T**, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J, Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T, Nakaya T. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. *PLoS ONE*.**4**:e4219.2009.
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.  
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)
4. Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J. Med. Virol.* **81**. 1102-1108. 2009.
  5. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *J. Gen. Virol.* **90**. 2266-2271.2009.
  6. Shumpei Watanabe, Naoya Ueda, Koichiro Iha, Joseph S. Masangkay, Hikaru Fujii, Phillip Alviola, Tetsuya Mizutani, Ken Maeda, Daisuke Yamane, Azab Walid, Kentaro Kato, Shigeru Kyuwa, Yukinobu Tohya, Yasuhiro Yoshikawa, Hiroomi Akashi. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. *Virus Genes.* **39**. 90-93.2009.  
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)
  7. Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romanowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**. 1132-1138.2009.
  8. Tomomitsu Satho, Hamady Dieng, Tetsuya Mizutani, Yuki Eshita, Takeshi Miyata, Parimal Talukder, Nobuhiro Kashige, Abu Hassan Ahmad and Fumio Miake. Fluorescence can be used to trace the fate of exogenous micro-organisms inside the alimentary tract of mosquitoes. *Journal of Parasitology and Vector Biology.* **1**. 013-018. 2009
  9. Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani. Replication, Transcription, and Translation of Coronaviruses. In *Viral Genomes*. (edited by Zhi Freng and Ming Long) Nova Publishers. pp.159-167.2009.  
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)
  10. Tetsuya Mizutani. Signaling pathways of SARS-CoV in vitro and in vivo. In *Molecular Biology of the SARS-Coronavirus* (Edited by Sunil K Lai) (in press)  
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

Mizutani)

p239-244.

11. 水谷哲也 「川崎病ウイルス病因説」  
アクチュアル小児科診療 -Actual  
Series of Clinical Pediatrics. 「川  
崎病のすべて」(総編集:五十嵐隆、  
専門編集:石井正浩) 中山書店  
(2009) pp30-31.
  12. **Tetsuya Mizutani**. Characterization of  
Signaling Pathways in Cells Infected  
with SARS-CoV. In Host Gene  
Responses to RNA Viral Infection.  
Edited by Decheng Yang. World  
Scientific Publishing. 2009. pp321-344.  
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)
  13. 水谷哲也 「大量シーケンスによ  
る川崎病の原因微生物の同定」 in 関  
東川崎病研究会レポート No.23  
[http://www.kawasaki-disease.org/  
tokyoren/pdf/23report\\_2.pdf](http://www.kawasaki-disease.org/tokyoren/pdf/23report_2.pdf)  
2009
  14. 水谷哲也 「網羅的ウイルスゲノム  
検査 [新しいウイルス]」臨床と微生物  
(近代出版) 36 巻 3 号 (2009)
  15. 水谷哲也 「新興ウイルス感染症の  
網羅的検出方法 (RDV 法) の確立と畜  
産分野への応用の可能性」 獣医畜産  
新報 (文永堂出版) 62 巻第 10 号  
(2009) p821-822
  16. 水谷哲也 「レオウイルス」 in 「広  
範囲 血液・尿化学検査、免疫学的  
検査 (3) (第 7 版) -その数値をど  
う読むか-」日本臨床 2010 年増刊(印  
刷中)
- 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.

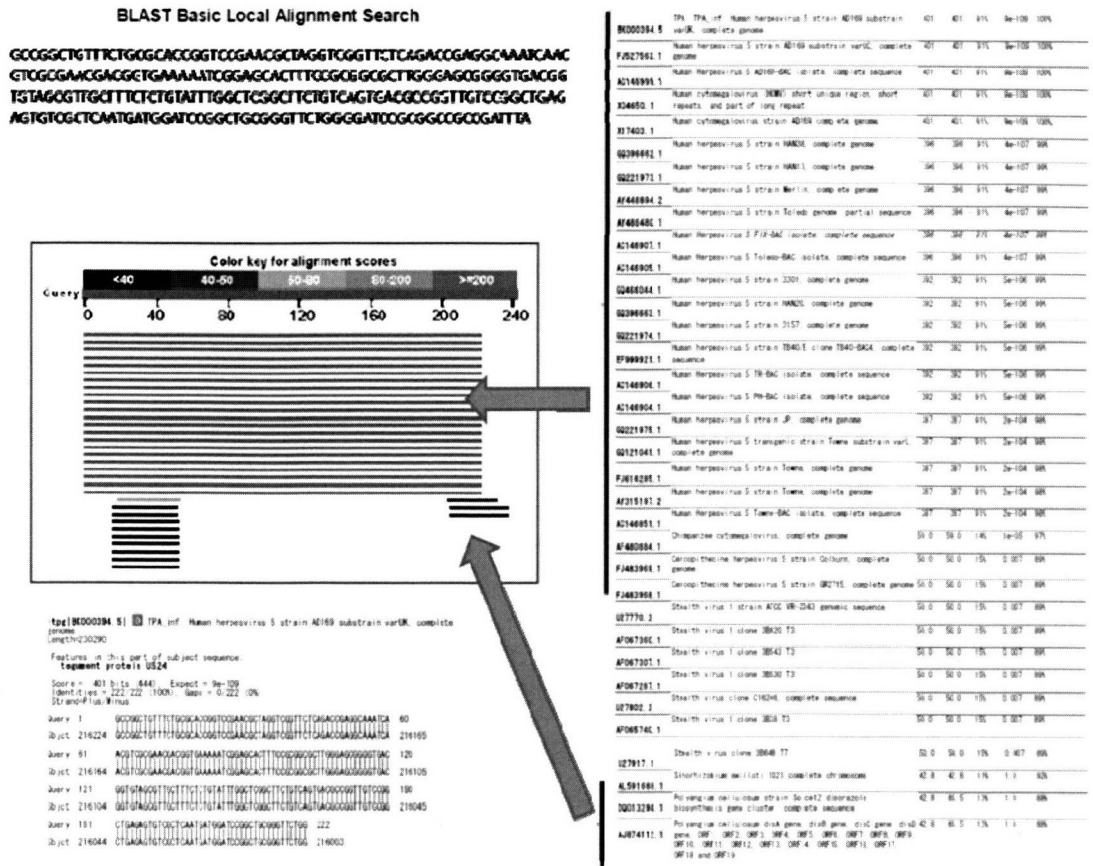


図1. RDV法で得られた遺伝子配列の一例。サイトメガロウイルスをRDV法で解析して得られた遺伝子配列をGenBankのblastを用いて、相同性のあるウイルスを検索した。サイトメガロウイルスが数多くヒットした。

図2.

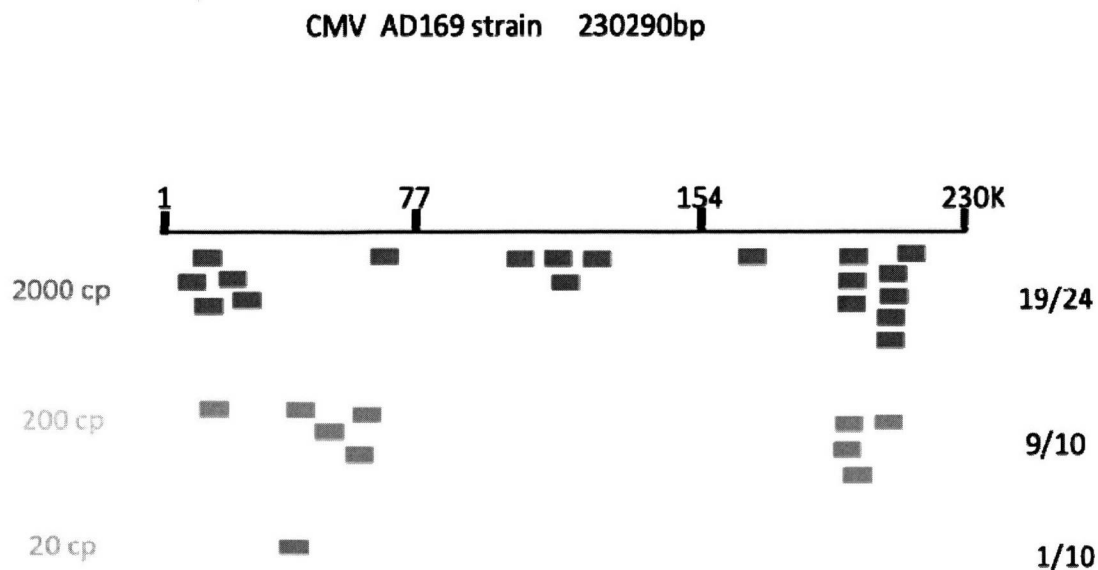


図2. RDV法で得られたサイトメガロウイルスのゲノムへのマップ。それぞれの出発材料のウイルスコピー数で得られた配列をサイトメガロウイルスのゲノムにマップした。20コピーでは1遺伝子だけ得られたが、RDV法の最終段階で解析する遺伝数を増やすと、検出感度は上昇すると考えられる。



厚生労働科学研究補助金 再生医療実用化研究事業  
分担研究報告書

ヒト細胞を受け入れる TM $\beta$ -1 投与マウスの有用性に関する研究

研究分担者 伊藤仁也 先端医療センター細胞管理室 室長

**研究要旨：**

再生医療、細胞治療などの生物製剤の中でも加工した生きた細胞を用いる治療は、ヒト生体内における細胞の動態、寿命、サイトカインや chemical mediator の放出、あるいは、細胞そのものが癌化や変成を起こすなど予測しきれない安全性の問題が生じる可能性がある。

また生体そのものに及ぼす影響も考えられる。これら加工した細胞を in vitro での安全性試験のみで把握することは不可能であろう。

最近ヒト細胞を受け入れる免疫不全マウスの改良が行われ、長期間ヒト細胞が生着し、観察できるようになってきた。

実際昨年度の研究においては、NOD/SCID マウスにサイトカインで増幅した臍帯血を移植し、6ヶ月にわたり、その動態や細胞の変異、染色体異常、癌化などの有無、マウス正常組織に与える病理学的影響の有無について検討し、報告した。しかし、検討にあたり、ヒト細胞を受け入れさせるために全身放射線照射が必要となり、6ヶ月の間に感染や癌化（マウス胸腺腫）で死亡してしまうマウスも少なくない。

今回我々は、これらの問題を解決するため、非照射レジメンでもヒト細胞を受け入れ、長期にわたりヒト造血再構築を維持しうる方法を開発した。NOD/SCID マウスに anti-IL-2R  $\beta$  鎖抗体であるマウス TM $\beta$ -1 抗体を投与する前処置を用いた群は、TBI 2.2Gy+Asialo GM-1 抗体を3週間毎に投与した群よりも高いヒト細胞キメリズムを維持でき、しかも感染などに強く生存率は高かった。

放射線照射の影響も少なくより、ヒト細胞が in vivo で長期間分化していく過程を観察する安全性試験に適していると考えられた。

**A. 研究目的**

我々は、これまで臍帯血由来造血幹細胞（CD34 陽性細胞）から加工した細胞治

療製剤を免疫不全マウスに移植し、マウス体内でのヒト造血再構築能を解析することにより、製剤の安全性、有効性の評

価を行ってきた。これまでの検討で、NOG Mouse (NOD/SCID/ $\gamma C^{-/-}$ ) 及び NOD/SCID Mouse を用いた移植に必要な前処置、移植細胞数、経時的解析等の至適条件を定め実験プロトコルを確立した。しかし、これらの方法では、ヒト細胞輸注時に拒絶を防ぐため全身放射線照射が必要である、immunity deficiency がある上に照射することにより、約半年で半数以上のマウスが感染や癌化により、失われ長期アッセイには不向きである。そこで anti-IL-2R  $\beta$  鎖抗体であるマウス TM  $\beta$  -1 抗体を NOD/SCID マウスに投与する前処置を用いた移植系を開発し、これまで使用してきた抗 AsialoGM-1 抗体に代わり新たに TM  $\beta$  -1 抗体を用いて NOD/SCID Mouse へのヒト造血幹細胞再構築能の検証を行った。

## B. 研究方法

NOD/SCID Mouse を用いた造血幹細胞移植実験における前処置の検討を下表の通りに行った。

Group	照射	抗体
Control	あり	なし
TM $\beta$ - 1 Control	なし	移植当日、1回投与
TM $\beta$ - 1 *1	あり	移植当日、1回投与
TM $\beta$ - 1 *3	あり	移植当日と以後週1回、3回投与
抗 Asialo*3	あり	移植当日と以後週1回、3回投与

投与量：TM  $\beta$  -1 1mg / Mouse, 抗 Asialo GM-1 抗体 0.02mg / Mouse

表 1：TM  $\beta$  -1 抗体の投与方法及び効果の検証

各 Group につき 5 匹の NOD/SCID Mouse に上記の前処置をおこない、臍帯血由来 CD34 陽性細胞 (Lot#H050326A / LONZA Cat#2C-101A) を  $2 \times 10^4$  / Mouse、尾静脈注射で投与した。

移植後 4 週間ごとに末梢血と骨髄を採取し、以下の抗体を用いて表面抗原解析を行い、ヒト血球の再構築を経時的に観察した。

FCM 解析：MouseCD45 / HumanCD45 / HumanCD3 / HumanCD19

## C. 研究結果

移植細胞の 4 週後の骨髄ヒト細胞キメリズムを下のグラフに示した。TM  $\beta$  -1 抗体投与群はこれまで行ってきた抗 Asialo GM-1 抗体を投与する群よりも高いキメリズムが得られ、NOG マウスに匹敵するぐらいのキメリズムであった。

また通常 NOD/SCID マウスに非照射で抗 Asialo GM-1 抗体のみの投与前処置に移植を行うと拒絶されるが、TM  $\beta$  -1 抗体投与単独でヒト細胞が生着した。

また TM  $\beta$  -1 抗体投与例においては、いずれの群も移植後 6 ヶ月にわたりヒト細胞が維持され、拒絶を受けなかった。なお照射のみでいずれの抗体も投与しない Control 群は短期間で拒絶を受けた。

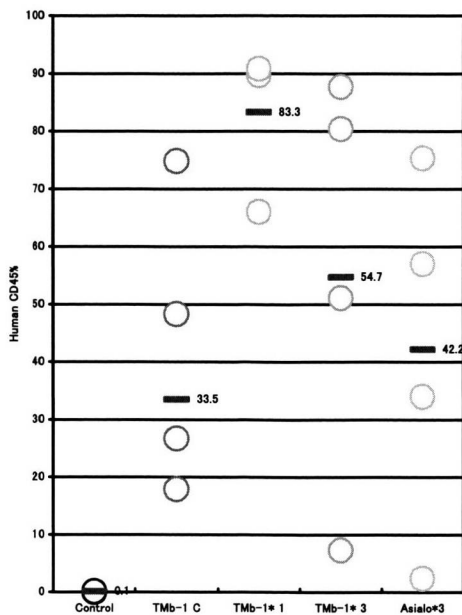


Fig1: 移植後キメリズム (PB)

末梢血におけるヒト血液細胞は移植後 8 週目にピークを迎え、以降、緩やかに減少傾向を示した。生着においては TMβ-1\*1 が最も高い生着を維持した。骨髄におけるヒト血液細胞の割合の経時変化は以下の通りであった。

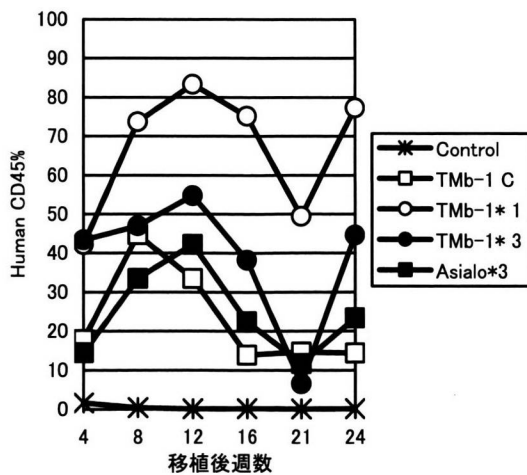


Fig2: 移植後キメリズム (BM)

全体の傾向として、12 週をピークにヒト血液細胞の減少傾向が認められた。生着においては TMβ-1\*1 が最も生着に優れていた。TMβ-1\*3、Asialo\*3、TMβ-1C の生着は同様の傾向を示した。Control の生着は認められなかった。

移植後 12 週目のヒト血液細胞の分化は以下の通りであった。

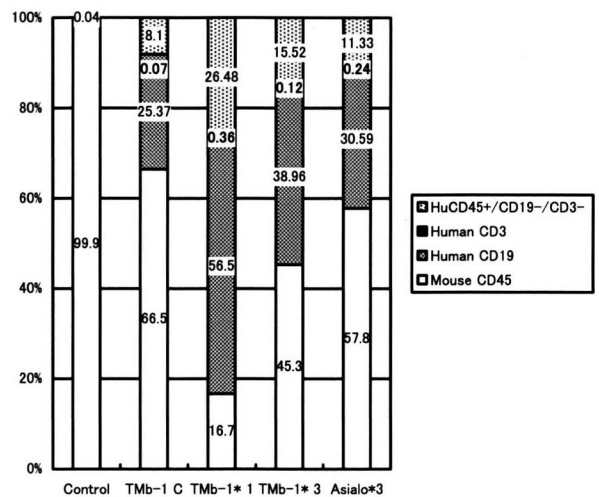


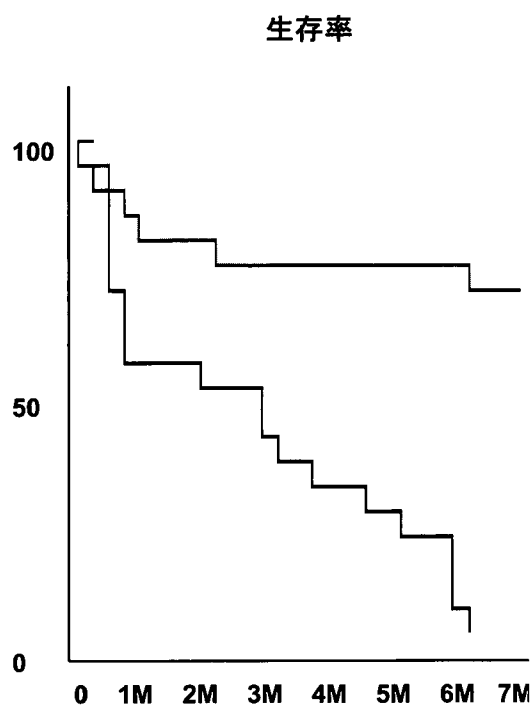
Fig3: 移植後 12 週目における生着細胞の分化

マウス骨髄中に占めるヒト血液細胞の分化は B cell (CD19) が主でヒト血液中の 60%程度を占めていた。T cell (CD3) は 1%以下で、その他の血球が 30-40%を占めていた。

#### D. 考察

下図は同時に行った NOG マウスにおけるヒト細胞移植系での生存曲線である。移植前処置は NOD/SCID マウス群、NOG マ

ウス群とも前処置は全身放射線照射 2.2Gy(1.1Gyx2)に抗 Asialo GM-1 抗体を 3 週毎に投与したものである。



NOG マウスにおいては、短期の観察においては、ヒト細胞キメリズムが非常に高く、少量の移植細胞数でも生着できるが Isolator を利用して Clean な環境を維持しても半年後の生存率は 20%以下であった。感染のほかにも照射後は胸腺腫などの腫瘍の発症が高いことによると思われる。

したがって、ヒト細胞治療による長期体内動態、安全性、造腫瘍性などを観察するには向いていないと考えられた。今回検討を行った抗  $TM\beta-1$  投与マウスは非照射にても安定した早期生着および長

期にわたるヒト細胞の維持が確認され、特別な放射線装置がない施設においても安全性試験が行うことができ、非常に有用な系と考えられた。

#### E. 結論

$TM\beta-1$  抗体による前処置は、本検討において従来の抗 AsialoGM-1 抗体より優れた生着促進効果が認められ、非照射においても長期にわたりヒト細胞を維持した。細胞治療剤の長期 in vivo 安全性試験に適していると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. Tabata S, Shimoji S, Murase K, Takiuchi Y, Inoue D, Kimura T, Nagai Y, Mori M, Togami K, Kurata M, **Ito K**, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Takahashi T. :Successful allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome complicated by severe pulmonary alveolar proteinosis. *Int J Hematol* 90;407-412. 2009.
2. Inoue D, Nagai Y, Kimura T, Shimoji S, Mori M, Togami K, Tabata S, Kurata M, Matsushita A, **Ito K**, Hashimoto H, Maruoka H, Yamashita E, Nagai K, Imai Y, Shirane H, Takahashi T.Refractory de novo myeloid sarcoma.: A case report and

therapeutic strategy based on bone marrow minimal residual disease. *Int J Hematol.* **90**(1);120-3. 2009 Jul.

3. Mori M, Togami K, Fujita H, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Nagai Y, Tabata S, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Kaji S, Takahashi T. Successful allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia complicated by refractory aortitis. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Aug 31. Epub ahead of print.
4. 鹿村真之, 伊藤仁也, 大隈一興, 関根暉彬. リンパ球活性化培養中の細胞表面抗原の経時的変化 *Biotherapy* **23**, 257-262, 2009
5. 伊藤仁也, 中畑龍俊 体外増幅造血細胞移植 医学のあゆみ Vol.229 No.9 786-792, 5, 2009

#### G. 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

#### I. その他

本研究に用いたTM $\beta$ -1抗体は兵庫医療大学の田中稔之教授より供与を受けた。ここに深謝いたします。

厚生労働科学研究補助金 再生医療実用化研究事業  
分担研究報告書

培養細胞シートに対する微生物感染の影響に関する研究

研究分担者 中田 光 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 教授  
研究協力者 梶 昌美 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 技術補佐員  
元井奈都紀 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 特任助教  
小神晴美 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 特任助教  
井上典子 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 技術補佐員  
渡辺真理 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 研究支援者  
布施一郎 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 准教授

研究要旨：

新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センターでは、平成19年より細胞プロセッシング室を稼働し、院内で行われている自家培養骨膜シート、培養口腔粘膜シート移植による再生医療をサポートしている。細胞シートの安全性評価のために、multiplex PCR法により、18種のウイルス・マイコプラズマの検出を行っている。また、特に口腔内の常在菌として知られている*M. salivarium*, *M. orale*などの細胞シートに対する影響を調べるため、培養細胞に対してスパイク試験を実施している。

研究目的：

培養細胞シートに潜在感染している病原体の頻度を明らかにし、特にマイコプラズマについては、細胞の活性化を指標に菌抗原の影響を調べる。

緒言：

現在、再生医療のための細胞プロセッシング設備をもつ施設は全国で55施設あり、うち、実際に稼働させて再生医療のための細胞加工製品を製造しているのは、半数程度である。21年度に始まった「再生医療の制度的枠組み検討会」では、病院間の連携診療により、細胞加工

製品の委託製造が病院間で可能となる。

しかし、他院で製造された細胞加工製品の品質をどのように検査し、どのように保証するかという問題は、これからの課題である。本研究班では、再生医療に汎用可能な品質管理システムを構築するため、微量・低価格で行える、革新的検査法を開発することを目指している。我々は、微生物・変異細胞の検出を担当しているが、今回、新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター細胞プロセッシング室で製造している培養骨膜、培養口腔粘膜に潜在感染している18種のウイル

スとマイコプラズマについて multiplex PCR を用いてハイスループットに検出し、一部定量した。また、口腔内常在菌であるマイコプラズマ菌については、抗原として細胞シートに与える影響を調べるため、Toll like receptor とそのシグナル伝達タンパクの発現を調べた。

**方法：**

生命科学医療センター輸血再生医療部門細胞プロセッシング室に入荷された歯根膜組織、口腔粘膜組織、またそれらを培養して得られた培養細胞シートの一部を凍結、定期的に東京医科歯科大学に送付し、8種類のヘルペス属ウイルス、4種類のレトロウイルス、5種類の肝炎ウイルス、BKV, JCV, パルボウイルス B19, アデノウイルスウイルス、マイコプラズマのDNAを multiplex PCR を用いて 10 コピー/・gDNA の感度で、検出した。また、これらの標本を用いて、腫瘍化への第一段階を拾うため、ATM, Chk2, P53 のリン酸化などを指標に、免疫染色を用いて DDR の亢進を細胞レベルで検証した。口腔内マイコプラズマ常在菌の影響を調べるため、*M. salivarium*, *M. orale*, *M. faucium* 死菌（北海道大学歯学部柴田教授より供与）を用いて、培養口腔粘膜細胞のスパイク試験を行い、細胞の活性化をシグナル蛋白のリン酸化を指標として調べた。

**(倫理面への配慮)**

本研究は新潟大学医学部倫理委員会の承認を受け、登録時に研究参加者に説明し書面での同意をえて施行した。

**結果：**

1. 培養骨膜、培養口腔粘膜細胞から抽出したDNAは、それぞれ 43 検体、16 検体あり、各病原体の検出頻度は下表のとおりであった。

検査項目	結果		備考
	培養前 (53 検体)	培養後 (49 検体)	
HSV1	0	0	
HSV2	0	0	
VZV	1	0	検出限界以下
CMV	1	0	検出限界以下
BK virus	0	0	
JC virus	0	0	
Parvo virus B19	3	1	1)start: 8.9E+02/μ gDNA、 end: 1.9E+02/μ gDNA 2)start: 5.9E+05/μ gDNA 3)start: 2.8E+04/μ gDNA
EBV	2	0	1)5.3× 10copy/ug DNA 2)検出限界

			以下
HHV6	1	1	start : 3.50E+06 copy/ $\mu$ gDNA end : 1.60E +07 copy/ $\mu$ gDNA
HHV7	0	0	
HHV8	0	0	
HBV	1	0	start : 1.8E +02/ $\mu$ gDNA
ADV	0	0	
Mycoplasma	13	0	Mycoplasma 同定結果参 照

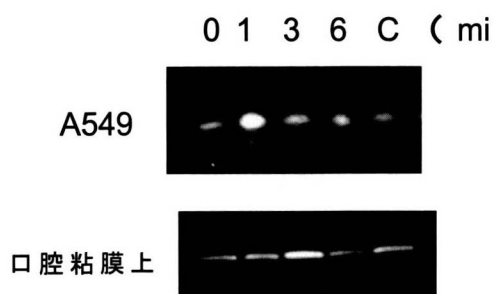
#### Mycoplasma 同定結果

菌種	陽性検体数
<i>M. salivarium</i>	5
<i>M. faucium</i>	7
<i>M. orale</i>	1

## 2. Mycoplasma によるスパイク試験結果

①TLR2 の発現をウェスタンブロッティングで解析した。

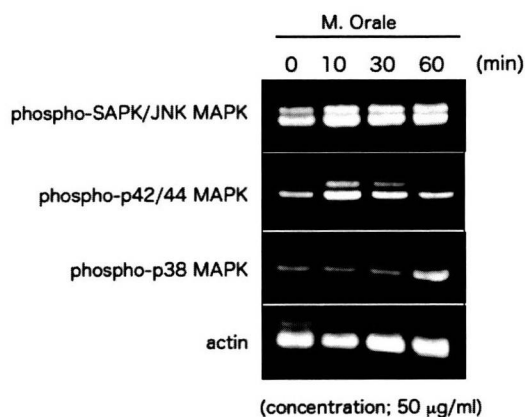
A549 細胞または口腔粘膜上皮細胞を *M. salivarium* 25  $\mu$ g/mL で 0, 15, 30, 60 分間刺激した。control は刺激なしである。



A549 細胞は刺激後 15 分、口腔粘膜上皮細胞は 30 分で最も TLR2 の発現が強くなることを確認した。

②培養ヒト骨膜細胞を *M. orale* で刺激し、MAP kinase のリン酸化をウェスタンブロッティングで解析した。*M. orale* 50  $\mu$ g/mL で 10, 30, 60 分間刺激した。P42/44 MAPK のリン酸化については、刺激後 10 分でピークとなり、p38 のリン酸化については、60 分でピークとなった。

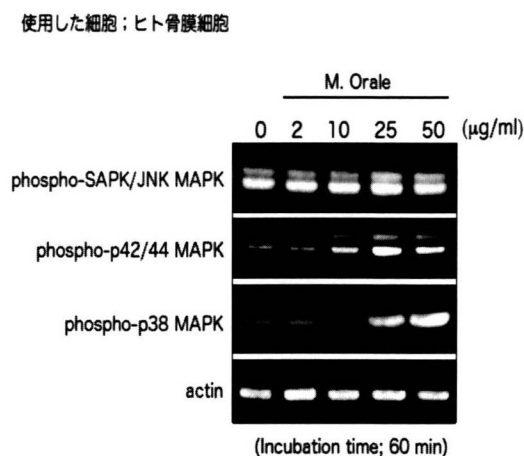
使用した細胞：ヒト骨膜細胞



また、*M. orale* 0-50  $\mu$ g/ml で 60 分刺



激し、リン酸化が増強する threshold を求めたところ、p42/44 MAPK については、10・g/ml、p38 MAPK については、25・g/ml であった。



#### 考察：

ウイルスについては、Parvovirus, HHV6 がそれぞれ培養前に3検体と1検体、培養後にそれぞれ1検体ずつ検出され、症例の追跡調査を行ったが、副作用等の不具合は見られなかった。Mycoplasma については、培養前に検出された13検体全てが平成20年度に採取された検体であり、培養後に陰性化している。その後、リステリンによるうがいや、消毒により、21年度からは、培養前にも検出されなくなった。

*M. orale* を用いた培養骨膜細胞のスパイク試験では、感度のよいMAPK p42/44 のリン酸化を指標としても、10・g/ml という高濃度の閾値を得ており、TLR2シグナル経路で見ると限りは、mycoplasma 抗原の刺激による細胞の影響は無視しうると考えた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, Arai T, Takada T, Nasuhara Y, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ishii H, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Morimoto K, Akira M, Terada M, Otsuka J, Ebina M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Akazawa K, **Nakata K**. Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy of pulmonary alveolar proteinosis. *in press*.
2. Ishii H, Trapnell BC, Tazawa R, Inoue Y, Akira M, Kogure Y, Tomii K, Takada T, Hojo M, Ichihata T, Goto H, **Nakata K** Comparative study of high-resolution CT findings between autoimmune and secondary pulmonary alveolar proteinosis. *Chest*. **136**(5):1348-55.2009.
3. 田澤立之, 中田光：肺胞蛋白症のGM-CSF 吸入治療. 日本胸部臨床. 第67巻(4号)269-274頁, 2008年.
4. 田澤立之, 中田光：肺胞蛋白症 基礎から臨床まで. 呼吸と循環. 第57巻(11号)1147-1154頁, 2009年.
5. **Uchida K, Carey B, Suzuki T, Nakata K, Trapnell B**. Response:

- Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy persons *Blood*. **115**(2):431-3.2010.
6. Hata M, Takahara S, Tsuzaki H, Ishii Y, **Nakata K**, Akagawa KS, Satoh K. Expression of Th2-skewed pathology mediators in monocyte-derived type 2 of dendritic cells (DC2). *Immunol Lett*. **126**(1-2):29-36.2009.
  7. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, **Nakata K**, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. *J Infect Dis*. **199**(11):1707-15.2009.
  8. Uchida K, **Nakata K**, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe Koch D, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey B, Keicho N, Krischer JP, and Trapnell BC. GM-CSF Autoantibodies and Myeloid Cell Immune Functions in Healthy Individuals *Blood*. **113**(11):2547-56.2009.
  9. Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, **Nakata K**, Yoshie H. Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies. *J Tissue Eng Regen Med*. **3**(3):218-29.2009.
  10. Uchiyama M, Nagao T, Hattori A, Fujii T, Ichiwata T, **Nakata K**, Tani K, Hayashi T. Pulmonary alveolar proteinosis in a patient with Behcet's disease. *Respirology*. **14**(2):305-8.2009.
- ## 2. 学会発表
1. Urano, S, Tomita M, Motoi N, Sato A, Trapnell BC, **Nakata K**, A cell-free assay system to estimate GM-CSF neutralizing capacity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Apr 2009;
  2. Nei T, Urano S, Kaneko C, Motoi N, Takizawa J, Tazawa R, Nakagaki K, Akagawa K, Trapnell BC, **Nakata K**. Mechanisms for Excessive Production of GM-CSF Autoantibody in Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Apr 2009.
  3. Tazawa R, Inoue Y, Takada T, Arai T, Nasuhara T, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Oishi K, Terada M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Trapnell BC, **Nakata K**. Aerosolized GM-CSF Therapy of

Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP).  
Am. J. Respir. Crit. Care Med, Apr  
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

厚生労働科学研究補助金 再生医療実用化研究事業  
分担研究報告書

製品の標準化に関する研究

研究分担者 吉江弘正 新潟大学大学院医歯学総合研究科摂食環境制御学講座  
歯周診断・再建学分野 教授

研究協力者 川瀬知之 新潟大学医歯学系歯科基礎移植再生学分野 准教授

A. 研究目的

1) 骨膜シート作製期間の短縮化

- i) 歯周組織再生治療において、われわれは自家培養骨膜シートを多孔質水酸アパタイト顆粒などとともに移植する方法が、その歯槽骨再生能の点ばかりでなく、創傷治癒などの点からも極めて優れた方法であることを報告してきた。しかし、課題のひとつとして、培養皿からの回収時にみられる顕著な収縮性が操作性を低下させていることがあげられる。新規性のある基材開発を通して、特に足場としての骨誘導能という機能性とともにより操作性の向上を目指した。
- ii) 自家培養骨膜シートは特別な足場を必要としなくとも歯周再生治療において歯槽骨の再生に有効であることが示されている。本研究では、培養日数の短縮と移植操作性の向上を目的として、ポリ乳酸カプロラクトン重合体(LCL)製の透明フィルムを試作し、ヒト培養骨膜シートに対する適性を検証した。

2) 培養上清中に放出されるサイトカインによる培養骨膜のプロファイリング

検査のための検体数をできるだけ抑制して、細胞移植治療への使用を促進するためには、検体を犠牲にすることなく細胞状態を把握できる技術が必要である。この目標を達成するために、培養骨膜細胞が産生するサイトカイン種が細胞の分化状態によって大きく変化することに着目し、細胞の形質転換との関係を検証することを目的とした。

B. 研究方法

1) 骨膜シート作製期間の短縮化

- i) 同意を得たボランティアの歯槽骨骨膜から 2-3mm 四方の小片を採取して、サケコラーゲンをコートしたメッシュ (Vecell 3D-insert®) 上に静置した。接着を確認した後、培養液を加え、そのまま培養を継続した。一定期間培養の後、一方は固定し染色 (ALP, alizarin-red 染色) に供したが、他方は 5-7mm 四方に切り出してヌードマウスの