

Vero細胞の培養ディッシュをそれぞれ5%炭酸ガスを含む空气中、36±1℃で3～6日間培養する。

[改正：日局15-2追]

薬品製造工程中の培養細胞)である。生物学的製剤基準のマイコプラズマ否定試験法⁵⁾とは異なり、ワクチンは対象としない。

技術情報

1. 目的

マイコプラズマは無細胞壁の原核生物で、人工培地に生育可能な最小の微生物である。動植物界に広く分布し、種特異的な感染を示すが、培養細胞では培養作業従事者や培養に用いる血清等を介して種を超えて感染し、細胞膜に付着して増殖する。培養細胞にマイコプラズマ汚染が生じて細胞変性を伴わないことが多く、また細菌感染で認められるような培養液の混濁も起こらないため汚染に気づかないことが多い。実験室レベルでは培養細胞のマイコプラズマ汚染は高頻度に認められる⁶⁾が、マイコプラズマの感染により培養細胞の本来の機能や性質は様々な影響を受けることが知られており、汚染細胞を用いて医薬品が製造されると重大な事態を招く可能性がある^{2,3)}。したがって、医薬品の製造に用いる細胞基材については、適切な方法でマイコプラズマ否定試験を実施する必要がある。

本参考情報は、バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材についてマイコプラズマ汚染を否定するために実施すべきと考えられる試験法として、A. 培養法、B. 指標細胞を用いたDNA染色法、C. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法の3種類の試験法を示したものである。現在まで、日本薬局方(日局)の医薬品各条には本参考情報の対象となる動物細胞基材由来の医薬品は収載されていない。しかし、日局参考情報には、バイオテクノロジー応用医薬品などの新医薬品の開発、品質評価に必要な試験法を積極的に収載することにより有用な医薬品の開発を支援し、また医薬品の安全性や品質を担保するという目的もあることから、日局13第二追補(1999)より参考情報として収載されている。本試験法の収載に至る経緯や試験法の詳細な解説は前書⁴⁾を参照されたい。ここでは、試験法の概要と日局15第二追補での改正点についてのみ示す。なお、参考情報は試験を実施する上で参考になると考えられる情報を例示したものであり、必ずしも記載に従って実施しなければならないというものではない。

2. 適用対象

マイコプラズマ否定試験の適用対象は、バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材で細胞バンクを基にするもの(マスター・セル・バンク、ワーキング・セル・バンク及び医

3. 試験法の概要

A. 培養法

培養法は、マイコプラズマを人工培地で培養・増殖させて検出する方法で、カンテン平板培地と液体培地の両方を使用する。カンテン平板培地は検体(細胞懸濁液)を接種後14日間以上培養する。液体培地は検体(細胞懸濁液)を接種後3、7及び14日間培養後にカンテン平板培地に移植し、更に14日間以上培養する。培養したカンテン平板培地は100倍以上の倍率の顕微鏡で観察し、マイコプラズマの集落(目玉焼き状のコロニー)の有無を判定するというものである。培養法はマイコプラズマの直接検出法であるが、試験に要する日数は28日間以上と非常に時間がかかることまた細胞基材を汚染するマイコプラズマは人工培地では増殖しないものも存在するため、必ずしもすべてのマイコプラズマを検出できるわけではないという欠点がある。

B. 指標細胞を用いたDNA染色法

DNA染色法は、カバーガラス上に培養した指標細胞(Vero細胞)に検体(細胞培養上清)を接種して3～6日間培養後、細胞表面で増殖したマイコプラズマをDNA特異的蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡を用いてマイコプラズマを細胞核外の微小なDNA蛍光斑点として検出する間接検出法である。DNA染色法はマイコプラズマに特異的な検出法ではなく、細胞由来DNAも染色されるため判定には熟練を要するが、細胞基材を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖する特性を有する場合も多いため、培養法では増殖しにくいマイコプラズマでも検出できるという特徴がある。試験には陰性対照と2種類のマイコプラズマ陽性対照を用いて判定を行う。

C. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法

PCRによる検出法は、検体(細胞懸濁液)からDNAを抽出し、マイコプラズマ特異的なプライマーを用いてPCRで増幅することによりマイコプラズマDNAを検出する方法である。プライマーにはマイコプラズマに特異的で、かつ広範囲のマイコプラズマによく保存されている領域を対象にしたものを用いる必要がある。試験の感度と特異性を増すためには2段PCR法(ネステッドPCR法)が望ましく、本参考情報には2段PCR法が使用するプライマーとともに例示されている。PCRによる検出法は、迅速、簡便で検出感度と特異性に優れた試験法であるが、検出は用

いるプライマーに依存し、また不活性菌やマイコプラズマのゲノム断片も検出されるので注意が必要である

以上のように、A法、B法、C法の3つの試験法にはそれぞれ長所と短所があることから、判定には単独の試験ではなく、各試験を組み合わせる必要がある。基本的には従来より実績のあるA法とB法による試験を実施するが、B法はマイコプラズマ以外のDNAも検出するためB法のみ陽性を示した場合には、C法によりマイコプラズマの存在を否定することも考えられる。

4. 改正の経緯及び改正点

マイコプラズマ否定試験が参考情報として収載されてから10年が経過し、この間に収載にあたり参考にされた欧州薬局方(EP)のマイコプラズマ否定試験法が最新のEP 6.0⁹⁾で大きく改正された。また、本参考情報に対して問題点を指摘する論文²⁾が発表され、改正要望も寄せられたことから、試験法の改正が行われることとなった。改正に当たっては、国内外のガイドラインを参照した(表1)。改正案に対する意見公

募でも多数の意見が寄せられたため、更に必要な修正が追加された。以下に、日局15第二追補での改正にあたり検討された点及び改正点を示す。

(1) 培養法の培養条件

培養法におけるマイコプラズマの培養条件は、従来はカンテン平板培地、液体培地とも「5～10%の炭酸ガスを含む空気中(好气的条件)」及び「5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中(嫌气的条件)」で半数ずつ培養を行うというものであった。しかし、今回の改正で、カンテン平板培地は「5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中(微好气的条件)」のみ、また液体培地の培養条件からは気相の条件が削除された。これに伴い検体の接種数も変更となり、1検体当たりの接種はカンテン平板培地では「4枚以上」から「2枚以上」へ、液体培地は「2本」から「1本以上」に修正された。これは、大部分のマイコプラズマ菌種は通性嫌気性であり、嫌気、好気の両方の条件で増殖できるが、カンテン平板培地での発育は微好気培養が好気培養よりも優れていること²⁾、また従来はEPに準じたものであったが、EPの改正により欧米のガイドラインはいずれもカンテン平板培地は微好気

表1 国内外のガイドラインにおけるマイコプラズマ否定試験法の比較(改正点に関連する記載を抜粋)

	EP 6.0 (2008) ⁹⁾	FDA/PTC (1993) ⁸⁾	生物学的製剤基準 (1998) ⁹⁾	JIS (2003) ²⁾	日局 改正前 (1999)	日局 改正後 (2009)
培養法						
カンテン平板培地培養条件	微好気(5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス) 35～38℃	5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス又は水素ガス、酸素0.5%未満 36±1℃	5～10%の炭酸ガスを含む空気又は窒素ガス 35～37℃	密閉容器 37±1℃	好気(5～10%の炭酸ガスを含む空気)と嫌気(5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス)で半数ずつ、36±1℃	微好気(5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス) 36±1℃
液体培地培養条件	密栓培養 35～38℃	36±1℃	35～37℃	寒天液体二層培地 密栓培養 37±1℃	好気と嫌気で半数ずつ 36±1℃	36±1℃
DNA染色法	あり	あり	—	あり	あり	あり
陽性対照	<i>M. hyorhinitis</i> ATCC 29052 (=DBS 1050) <i>M. orale</i> NCTC 10112, CIP 104969, ATCC 23714 (=CH 19299)	<i>M. hyorhinitis</i> DBS 1050 <i>M. orale</i> CH 19299	—	<i>M. hyorhinitis</i> ATCC 29052, IFO 14858 (=BTS 7) <i>M. arginini</i> ATCC 23838, IFO 14476	<i>M. hyorhinitis</i> DBS 1050 <i>M. orale</i> CH 19299	<i>M. hyorhinitis</i> ATCC 29052, ATCC 17981 (=BTS 7) <i>M. orale</i> ATCC 23714
接種量	100 CFU 又は CFU-like micro-organisms 以下	100 CFU 以下又は 100 CCU 以下	—	100 CFU	100 CFU 以下	100 CFU 以下又は 100 CCU 以下
PCR法	NATの概論とバリデーション法について記載	—	—	2段PCR法	2段PCR法(例)	2段PCR法(例)
実施すべき試験法	培養法とDNA染色法(細胞基材の場合) NATは適切なバリデーションを実施すれば培養法又はDNA染色法の代替法となり得る	培養法とDNA染色法	培養法	培養法又はDNA染色法とPCR法	培養法とDNA染色法 DNA染色法でのみ陽性を示した場合、PCR法で否定できる	培養法とDNA染色法 DNA染色法でのみ陽性を示した場合、PCR法で否定できる

培養のみ、液体培地の培養条件は温度のみで気相条件は記載なしとなったため、国際調和も考慮して改正が行われたものである。なお、「微好氣的条件」は従来の「嫌氣的条件」と同一の条件であるが、EPの用語(microaerophilic conditions)に合わせて「微好氣的条件」に変更された。

(2) マイコプラズマ発育阻止因子の測定法

マイコプラズマ否定試験は、検体中に抗生物質などのマイコプラズマ発育阻止因子が含まれると正確な結果が得られない。そこで、マイコプラズマ発育阻止因子の有無をあらかじめ試験し、発育阻止因子を有する場合には、遠心処理や細胞の継代などの適切な方法により発育阻止因子を除去あるいは中和しておく必要がある。これまで、マイコプラズマ発育阻止因子の測定法については特に記載されていなかったが、生物学的製剤基準⁵⁾には記載がある。そこで、参考情報としての利用者の利便性を考慮し、「マイコプラズマ発育阻止因子の測定は、生物学的製剤基準に記載されているマイコプラズマ発育阻止活性の試験を参考にできる」ことが培養法の関連記載中に追記された。

(3) DNA 染色法の指標菌株と接種単位

DNA 染色法で陽性対照として例示された2種類の指標菌株 (*M. hyorhinis* DBS 1050 及び *M. orale* CH 19299) について、陽性対照として適切でないとの指摘があり、指標菌株と接種量の表示単位に関して見直しが行われた。

これら2種類の指標菌株は、いずれもFDAのガイドライン (FDA/PTC)⁶⁾で例示されている。また、EP 6.0⁶⁾では、ATCC等で保存されている同等の菌株が「試験に適していることが確認された菌株 (strain)」として保存機関のコード番号で示されていることから、菌株の選択に問題はないと考えられた。しかし、マイコプラズマは長期間の継代培養により性質が変化するため、同じ菌株でも継代数や保存条件、供給元によっては試験に適さない可能性がある。そこで、日局15第二追補の改正では、EPに準じて指標菌株をATCCコード番号で表示し、「*M. hyorhinis* DBS 1050」を「ATCC 29052」、「*M. orale* CH 19299」を「ATCC 17981」に変更することにより、適切な菌株を入手可能とした。また、公的又は適当と認められた機関より入手後適切に管理された「継代数の低いもの」を使用すべきとの注意喚起を行っている。更に、ATCCから入手したものは単位が設定されていないため、「接種単位をあらかじめ設定した上で使用しなければならない」ことが追記された。

DNA 染色法の指標菌のうち、*M. hyorhinis* DBS 1050 株については、細胞との共存で生育しており、人工培地上でコロニーが形成できないため、「100

CFU 以下」と規定されている「陽性対照としての接種量の設定」が困難であるとの指摘があった。同じ *M. hyorhinis* でも BTS-7 株はカンテン平板培地で増殖しやすいことが知られ、JIS⁷⁾では指標菌として ATCC 29052 (DBS 1050) 又は IFO 14858 (BTS-7) が指定されている。これらの点を考慮して、日局15第二追補の改正では、「ATCC 29052 (DBS 1050)」に加えて「ATCC 17981 (BTS-7)」も指標菌の例示に追加された。また、これらの菌株は必ずこれを使用しなければならないという指定菌株ではなく、あくまで試験に適切と考えられる菌株を例示したものであることをより明確にするために、「同等の種又は株」を用いてもよいことが明記された。

一方、FDA/PTC⁸⁾では、マイコプラズマの接種単位としてカンテン平板培地でのコロニー形成に基づくCFU (コロニー形成単位) の他に、液体培地の色調変化に基づくCCU (色調変化単位) も併記されている。接種単位がCFUではカンテン平板培地でコロニー形成しないマイコプラズマの接種量の設定と使用は困難だが、液体培養で単位が設定できればコロニーを形成しないマイコプラズマでも使用可能となることから、指標菌の接種単位として、従来のCFUに加えて「CCU」が併記された。

なお、ATCCコード番号による指標菌の表示と接種単位のCFUとCCUとの併記に関する改正は、DNA染色法に限るものではなく、培養法及びPCR法についても同様に行われた。

(4) PCR 法

操作法の例として記載されている2段PCR法については、マイコプラズマの種類によっては検出感度が低く反応しない場合があることや、操作法の更新を求める意見などが寄せられた。これらの意見について検討した結果、例示の2段PCR法は感度と特異性に優れた方法であり、プライマーも含めてJISとほぼ同様の方法であること、培養細胞への汚染が知られているマイコプラズマの95%以上を検出できることが確認されていること、公的細胞バンクの試験に現在も使用されている実績のある方法であることが確認された。また、この操作法の例は、本文に記載のとおりプライマーも含めて一例を示したものであり、妥当性が立証されていれば他のプライマーを用いることや、1段PCRを実施することや、反応条件等を変更することも可能であり、例示の方法に限定されたものではないことから、特に例示の記載を修正する必要はないとされた。ただし、現在汎用されているPCRの実施条件を考慮して、操作法から「ミネラルオイルの滴加」は削除された。

また、PCR法は培養法とDNA染色法を補完する方法とされているが、PCR法も第一試験とすべきと

の意見も寄せられた。PCR法は、参考情報に記載された当時は欧米のガイドラインには未記載であり、欧米ではいずれも培養法とDNA染色法の両方の実施が求められていた。日局では培養法とDNA染色法の両方の実施を基本としつつ、これらの試験法を補完するものとして迅速性、簡便性、検出感度に優れたPCR法の例が記載されたものである。EPは最新のEP 6.0⁶⁾で初めて核酸増幅検査(NAT)法が記載され、マイコプラズマ否定試験としては従来と同様、培養法とDNA染色法の実施を求めているが、適切なバリデーションを実施することによりNATを培養法又はDNA染色法の代替法として使用することも可能としている。EPにはNATの具体的な試験法ではなく、NATのバリデーション法に関する詳細なガイドラインが掲載されている。一方、日局のPCR法は例示として記載されており、培養法又はDNA染色法の代替法となるものではない。したがって、PCR法の位置付けについては、事態の推移をみながら今後の検討課題とされた。

◇◇◇ 文 献 ◇◇◇

- 1) 小原有弘, 大谷梓, 小澤裕, 塩田節子, 増井徹, 水澤博: 培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査, *Tiss Cult Res Commun* 26: 159-163, 2007.
- 2) 日本規格協会: マイコプラズマの検出法-第1部: 培養による直接検出法 JIS K 3810-1; 第2部: DNA 蛍光染色による間接検出法 JIS K 3810-2; 第3部: 2段階 PCR による検出法 JIS K 3810-3, 2003.12.20
- 3) 原沢亮, 水澤博, 竹内昌男: 動物細胞・培養における“コンタミ”の簡易検出, *蛋白質核酸酵素* 40(15): 2361-2368, 1995.
- 4) 日本公定書協会: 日本薬局方技術情報 JPTI 2006, 参考情報 20 バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験, pp 298-304, 東京, じほう, 2006.
- 5) 厚生労働省: 生物学的製剤基準, マイコプラズマ否定試験法, pp 14-15, 1998.
- 6) *European Pharmacopoeia* 6.0: 2.6.7. Mycoplasmas, pp 159-164, 2008.
- 7) 佐々木次雄, 岩田浩明, 栃木公太, 久保田真由美: 平成18年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告-医薬品製造用細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験法の問題点, *医薬品研究* 39(5): 299-309, 2008.
- 8) FDA: Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals, Attachment #2: Recommended procedures for detection of mycoplasma contamination in biological products produced in cell substrates, 1993.



Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers

Shihori Tanabe, Yoji Sato and Kazuhiro Suzuki

Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Science, Tokyo, Japan

ABSTRACT

In recent years, the information of stem cells has been accumulated as the research progressed. It is important to understand their characteristics for proper application of stem cells in cellular therapy. The common feature of stem cells can be described as their capacity for self-renewal and differentiation. Stem cells do, however, have different features that characterize each species of stem cells, such as mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, neural stem cells, embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Moreover, cancer stem cells have recently been shown to play an important role in cancer, which suggests the possibility of targeting cancer stem cells for its treatment. This review describes the characteristics of stem cells to provide a better understanding of the unique features

of these cells represented by the term of 'stemness'.

1. INTRODUCTION

Stem cells have the unique capacity for self-renewal and multilineage differentiation (1). Recent research has revealed detailed features of stem cells, which provide us with the key to understanding the origin of the cell. This article reviews recent perspectives in the stem cell research.

2. FEATURES OF STEM CELLS

A. Mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells, a type of somatic stem cells derived from tissues such as bone marrow, can differentiate into osteogenic cells, chondrogenic cells and adipogenic cells (2). In recent years, mesenchymal stem cells have been used in cellular therapy or

Address correspondence to: Shihori Tanabe, Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan., E-mail: stanabe@nihs.go.jp

immunotherapy to reconstitute tissue or to prevent an immune response in transplantation by exploiting their capacity for differentiation or their immunosuppressive feature (3). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell culture is positive for CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a and CD124 and negative for CD34 and CD45 (2). Mesenchymal stem cells are also characterized by the positive expression of Sca1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and CD106 and are found to be negative for CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD19, CD79, CD31 and HLA-DR (4). It has also been reported that mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood and bone marrow are positive for CD29, CD44, CD105, CD73 and HLA-A, -B and -C and negative for CD31, CD34, CD45 and HLA-DR (5). Furthermore, it has been described that bone marrow mesenchymal stem cells express the following phenotype: CD34, CD44, CD45, c-Kit, and major histocompatibility complex class I and II negative; Flk-1, Sca-1 and Thy-1 at low levels and CD13 and stage-specific antigen I (SSEA-I) at high levels (6). On the other hand, flow cytometry analyses of stem cells derived from connective tissue have shown that the cells stain positively for CD34 and CD90 and negatively for CD3, CD4, CD8, CD11c, CD33, CD36, CD38, CD45, CD117, Glycophorin-A and HLA-DR II (7). Overall, mesenchymal stem cells derived from bone marrow may be commonly characterized by positive expression for CD29, CD44, and other molecules.

B. Hematopoietic stem cells

Hematopoietic stem cells differentiate into the blood cell lineage, including T cells, B cells, NK cells, erythrocytes, monocytes and megakaryocytes. The hematopoietic stem cells as well as other types of stem cells have the capability to self-renew. The cells are usually found in the bone marrow, cord blood and peripheral blood. Human hematopoietic stem cell culture is positive for CD34 and CD90 and negative for Lin and CD38 (8,9,10). For mouse hematopoietic stem cells, Kit (c-Kit), Sca1, CD34 and Slamf1 are known as positive markers, whereas Lin and Flt3 (Flk2) are negative markers. The combination or expression of surface markers for hematopoietic stem cells changes as the cells develop and differentiate into the several types of multipotent or oligopotent progenitor cells. It is known that the expression level of Flt3 increases, whereas that of Slamf1 decreases as mouse hematopoietic stem cells differentiate into progenitor cells. In the human hematopoietic cell lineage, the expression of CD38 increases in progenitor cells (8). It is also suggested that the surrounding microenvironment (niche) is important for supporting stem cells including hematopoietic stem cells (11). Myc (c-myc) and Mycn (N-myc) activities are reported as key factors for hematopoietic stem-cell function including proliferation, differentiation, and survival (12).

C. Neural stem cells

Neural stem cells are positive for glial

fibrillary acidic protein (GFAP), Musashi, Nestin, PDGFR α and CD133, and have the ability to differentiate into neurons and oligodendrocytes (13,14). GFAP is also a marker of astrocytes, suggesting that the neural stem cells are somewhat related to astrocytes (15). The cells are isolated from the subventricular zone or the hippocampus in the brain. It was recently reported that Sox2-positive neural stem cells in the adult hippocampus are multipotent and can self-renew, whereas Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis, indicating the physiological significance of Sox2 for the stemness of neural stem cells (14,16). Therefore, Sox2 may be useful as a marker of neural stem cells.

D. Embryonic stem cells

Embryonic stem cells are pluripotent cells derived from the inner cell mass of a blastocyst, an early stage embryo. Wide varieties of embryonic stem cell lines have been characterized (17,18), and the some of the key genes for maintaining the undifferentiated state and pluripotency have been described as *POU5F1 (OCT4)*, *NANOG*, *SOX2*, and others such as *ZFP42 (REX1)*, *UTF1*, *GDF3*, *FOXD3*, *TRET*, *FGF4* (19,20,21,22). The assessment of several human embryonic stem cell lines has established SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, *POU5F1 (OCT4)* and *NANOG* as common markers for human embryonic stem cells (23). It is also suggested that *GJA1* is a marker for the undifferentiated state of human embryonic stem cells (24). A report

on gene expression in human embryonic stem cells and human embryonic carcinoma cells showed that *POU5F1 (OCT4)* is upregulated in both types of cells, as compared to control samples including both somatic cell lines and normal testis (25).

E. Induced pluripotent stem cells

Induced pluripotent stem cells are another type of pluripotent stem cells, which are artificially reprogrammed from non-pluripotent cells and resemble human embryonic stem cells in phenotypic features. The retroviral introduction of *Pou5f1 (Oct3/4)*, *Sox2*, *Myc (c-myc)* and *Klf4* was reported to develop mouse induced pluripotent stem cells (26). The expression of a set of factors, namely *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *KLF4* and *MYC (c-Myc)* or the set of *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *NANOG* and *LIN28* was shown to induce reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells by retroviral transduction (27,28). More recently, valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, was found to enable reprogramming of primary human fibroblasts with only two factors, *Oct4* and *Sox2*, without the need for the oncogenes *c-Myc* or *Klf4* (29). Reprogramming of liver and stomach cells (30) and generation of mouse-induced pluripotent stem cells without viral vectors (31) or retroviral integration (32) have also been reported.

3. PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF STEM CELLS

A. Proliferation of stem cells

It is known that, with increasing passages of mesenchymal stem cells in culture, the proliferation rate and the capacity for differentiation decrease (33). These changes are associated with expression of several genes. For example, the expression of nephroblastoma overexpressed gene and EPH receptor A5 in human bone marrow mesenchymal stem cells is increased in late stage of cultures, whereas the expression of runt-related transcription factor 2 and necdin homolog (mouse) is decreased (34). Genome change in the cells also occurs in some cases; however, it is not well known whether this phenomenon is universal.

Mouse hematopoietic stem cells are known to proliferate in relatively slow cell cycle kinetics compared to multipotent progenitors *in vivo* (35). The gene expression pattern of hematopoietic stem cells also differs in the proliferating state *in vivo* (36). An analysis of *Foxo3a*^{-/-} mice showed that *Foxo3a* is important in maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells, although the proliferation of the cells was not affected by *Foxo3a* deletion (37). Human embryonic stem cells can be usually cultured more than 30 to 50 passages (22). It has been shown that human embryonic stem cells require feeder cells to grow and are negative for SSEA-1. Although mouse embryonic stem cell growth is also feeder-cell dependent, mouse cells do express SSEA-1 (38). LIF (leukemia inhibitory factor) is known to be an important factor for maintaining the self-renewal capacity of mouse embryonic stem cells. The morphology of mouse embryonic stem cells

is relatively diverse, whereas human embryonic stem cells are round with sharp boundaries. The expression of SSEA-4 and vimentin is specific for human embryonic stem cells (39). It has also been reported that a retinoblastoma protein is important for the proliferation of monolayer cultures of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (40).

B. Differentiation of stem cells

The features of stem cells that distinguish them in different species include direction for differentiation and gene expression. In osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, the expression of ID4, CRYAB and SORT1 are altered (41). Embryonic stem cells have the capacity for multilineage differentiation, such as ectoderm, mesoderm and endoderm. The differentiation is induced by transfer of the cells from fibroblast feeder layers, which maintain stemness of embryonic stem cells, to suspension culture (42,43). It was reported that neuronal differentiation is induced with FGF-2 and medium conditioned by HepG2 (44). Furthermore, induced pluripotent stem cells generated from patients with amyotrophic lateral sclerosis are reported to be differentiated into motor neurons (45). Gene expression in human embryonic stem cells is altered during differentiation. NODAL, LEFTY A, LEFTY B and PITX2 are described as marker genes for the differentiation of embryoid bodies, which are multicellular aggregates of differentiated and undifferentiated cells (46). Genes such as *Hex* or *Hnf6/Oc-1* play an important role

during the differentiation of liver and pancreas from their progenitors (47).

4. CANCER STEM CELLS

A. Factors distinguishing cancer stem cells from normal stem cells

Recent research implicates the involvement of cancer stem cells in cancer. Cancer stem cells share features with normal stem cells. The differences in their features, however, are under investigation. Even though the origin of cancer stem cells is not well understood, several suggestions related to their microenvironment (niche) have been proposed: [1] niche around normal stem cells allows cancer stem cells to grow, [2] cancer stem cells arise from normal stem cells that adopt an alternative niche and [3] niche-independent cancer stem cells arise from normal stem cells or [4] cancer stem cells arise from progenitor cells (48). It has been shown that embryonic stem cell-like gene sets including Sox2, c-Myc, Dnmt1, Cbx3, Hdac1 and Yy1 are activated in human epithelial cancers, and c-Myc increases the fraction of tumour-initiating cells in primary human keratinocytes transformed by Ras and IκBα (49).

B. Cancer stem cells in cancer

The population of cancer stem cells in cancer is very rare. Cancer stem cells are defined as cells with stem cell features that have the capacity of tumourigenesis in immunodeficient mice (50,51). Research on human embryonal carcinoma cells, which are the stem cells of teratocarcinomas, has shown that these cells express SSEA-3,

SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81, similar to human embryonic stem cells (38,52,53). To identify cancer stem cells from solid tumours, cells are sorted with surface markers. CD133 and CD44, which are markers for stem cells, are often used as surface markers to identify cancer stem cells from tumours. In one report, the CD133⁺ subpopulation from human brain tumours was shown to be tumourigenic, whereas the CD133⁻ subpopulation did not have tumour-initiation capability (54). Cancer stem cells are also known to exist in the side population fraction (55,56,57). In addition, breast cancer cells with the CD44⁺CD24^{low} phenotype have a higher tumourigenic capacity as compared to other populations of cancer cells, and the gene sets expressed in the CD44⁺CD24^{low} population are related to metastasis-free survival and overall survival (58).

5. CONCLUSION

In conclusion, stem cells, which have the capacity for self-renewal and differentiation, show various profiles in gene expression. Each kind of stem cell has unique aspects, but they also share common features. Recent research advances have added to our knowledge of the role of cancer stem cells in cancer based on the concept of cancer stem cell niche.

REFERENCES

1. Weissman, I. L. *Cell*, **100**, 157-168 (2000)
2. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck,

- S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. Marshak, D. R. *Science*, **284**, 143-147 (1999)
3. Ringdén, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lönnies, H., Marschall, H.-U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., Omazic, B., Aschan, J., Barkholt, L., Le Blanc, K. *Transplantation*, **81**, 1390-1397 (2006)
4. Kumar, S., Chanda, D., Ponnazhagan, S. *Gene Ther.*, **15**, 711-715 (2008)
5. Tsai, M., Hwang, S., Chen, K., Lee, Y., Hsu, L., Chang, Y., Wang, C., Peng, H., Chang, Y., Chao, A., Chang, S., Lee, K., Wang, T., Wang, H., Soong, Y. *Stem Cells*, **25**, 2511-2523 (2007)
6. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., Verfaillie, C. M. *Nature*, **418**, 41-49 (2002)
7. Young, H. E., Steele, T. A., Bray, R. A., Hudson, J., Floyd, J. A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., Duenzl, M., Lucas, P. A., Black, A. C. *Anat. Rec.*, **264**, 51-62 (2001)
8. Bryder, D., Rossi, D.J., Weissman, I.L. *Am. J. Pathol.*, **169**, 338-346 (2006)
9. Majeti, R., Park, C. Y., Weissman, I. L. *Cell Stem Cell*, **1**, 635-645 (2007)
10. Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M., Peault, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 2804-2808 (1992)
11. Walker, M. R., Patel, K. K., Stappenbeck, T. S. *J. Pathol.*, **217**, 169-180 (2009)
12. Laurenti, E., Vamum-Finney, B., Wilson, A., Ferrero, I., Blanco-Bose, W. E., Ehninger, A., Knoepfler, P. S., Cheng, P., MacDonald, H. R., Eisenman, R. N., Bernstein, I. D., Trumpp, A. *Cell Stem Cell*, **3**, 611-624 (2008)
13. Yadirgi, G., Marino, S. *J. Pathol.*, **217**, 242-253 (2009)
14. Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A., Gage, F. H. *Cell Stem Cell*, **1**, 515-528 (2007)
15. Gage, F. H. *Science*, **287**, 1433-1438 (2000)
16. Ferri, A. L. M., Cavallaro, M., Braida, D., Cristofano, A. D., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P. P., Sala, M., DeBiasi, S., Nicolis, S. K. *Development*, **131**, 3805-3819 (2004)
17. The International Stem Cell Initiative *Nat. Biotech.*, **25**, 803-816 (2007)
18. The Steering Committee of the International Stem Cell Initiative *Nat. Biotech.*, **23**, 795-797 (2005)
19. Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A. *Cell*, **95**, 379-391 (1998)
20. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. *Cell*, **113**, 643-655 (2003)
21. Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S. *Cell*, **113**, 631-642 (2003)
22. Brimble, S. N., Zeng, X., Weiler, D. A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I. G., Freed, W. J., Robins, A. J., Rao, M. S., Schulz, T. C. *Stem*

- Cells Dev.*, **13**, 585-596 (2004)
23. Allegrucci, C., Young, L. E. *Hum. Reprod. Update*, **13**, 103-120 (2007)
24. Bhattacharya, B., Miura, T., Brandenberger, R., Mejido, J., Luo, Y., Yang, A. X., Joshi, B. H., Ginis, I., Thies, R. S., Amit, M., Lyons, I., Condie, B. G., Itskovitz-Eldor, J., Rao, M. S., Puri, R. K. *Blood*, **103**, 2956-2964 (2004)
25. Sperger, J. M., Chen, X., Draper, J. S., Antosiewicz, J. E., Chon, C. H., Jones, S. B., Brooks, J. D., Andrews, P. W., Brown, P. O., Thomson, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 13350-13355 (2003)
26. Takahashi, K., Yamanaka, S. *Cell*, **126**, 663-676 (2006)
27. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. *Cell*, **131**, 861-872 (2007)
28. Park, I., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., Daley, G. Q. *Nature*, **451**, 141-147 (2008)
29. Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., Melton, D. A. *Nat. Biotech.*, **26**, 1269-1275 (2008)
30. Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., Yamanaka, S. *Science*, **321**, 699-702 (2008)
31. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S. *Science*, **322**, 949-953 (2008)
32. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K. *Science*, **322**, 945-949 (2008)
33. Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., Nikbin, B. *BMC Cell Biol.*, **7**, 14 (2006)
34. Tanabe, S., Sato, Y., Suzuki, T., Suzuki, K., Nagao, T., Yamaguchi, T. *J. Biochem.*, **144**, 399-408 (2008)
35. Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X., Weissman, I. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 3120-3125 (1999)
36. Nygren, J. M., Bryder, D., *PLoS ONE*, **3**, e3710 (2008)
37. Miyamoto, K., Araki, K. Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., Hirao, A. *Cell Stem Cell*, **1**, 101-112 (2007)
38. Pera, M. F., Reubinoff, B., Trounson, A. *J. Cell Sci.*, **113**, 5-10 (2000)
39. Ginis, I., Luo, Y., Miura, T., Thies, S., Brandenberger, R., Gerecht-Nir, S., Amit, M., Hoke, A., Carpenter, M. K., Itskovitz-Eldor, J., Rao, M. S. *Dev. Biol.*, **269**, 360-380 (2004)
40. Yamanaka, S., Zahanich, I., Wersto, R. P., Boheler, K. R. *PLoS ONE*, **3**, e3896 (2008)
41. Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K.-H., Trajanoski, Z. *BMC Genomics*, **8**, 70 (2007)
42. Odorico, J. S., Kaufman, D. S., Thomson, J. A. *Stem Cells*, **19**, 193-204 (2001)
43. Trounson, A. *Endocr. Rev.*, **27**, 208-219 (2006)
44. Schulz, T. C., Palmarini, G. M., Noggle, S. A., Weiler, D. A., Mitalipova, M. M.,

- Condie, B. G. *BMC Neurosci.*, **4**, 27 (2003)
45. Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., Wichterle, H., Henderson, C. E., Eggan, K. *Science*, **321**, 1218-1221 (2008)
46. Dvash, T., Mayshar, Y., Darr, H., McElhaney, M., Barker, D., Yanuka, O., Kotkow, K. J., Rubin, L. L., Benvenisty, N., Eiges, R. *Hum. Reprod.*, **19**, 2875-2883 (2004)
47. Zaret, K. S., Grompe, M. *Science*, **322**, 1490-1494 (2008)
48. Clarke, M. F., Fuller, M. *Cell*, **124**, 1111-1115 (2006)
49. Wong, D. J., Liu, H., Ridky, T. W., Cassarino, D., Segal, E., Chang, H. Y. *Cell Stem Cell*, **2**, 333-344 (2008)
50. Eaves, C. J. *Nature*, **456**, 581-582 (2008)
51. Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M., Morrison, S. J. *Nature*, **456**, 593-599 (2008)
52. Andrews, P. W. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **357**, 405-417 (2002)
53. Andrews, P. W., Matin, M. M., Bahrami, A. R., Damjanov, I., Gokhale, P., Draper, J. S. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 1526-1530 (2005)
54. Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., Dirks, P. B. *Nature*, **432**, 396-401 (2004)
55. Miki J., Rhim J. S. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **11**, 32-39 (2008)
56. Harris, M. A., Yang, H., Low, B. E., Mukherje, J., Guha, A., Bronson, R. T., Shultz, L. D., Israel, M. A., Yun, K. *Cancer Res.*, **68**, 10051-10059 (2008)
57. Wu C., Alman, B. A. *Cancer Lett.*, **268**, 1-9 (2008)
58. Liu, R., Wang, X., Chen, G. Y., Dalerba, P., Gurney, A., Hoey, T., Sherlock, G., Lewicki, J., Shedden, K., Clarke, M. F. *N. Engl. J. Med.*, **356**, 217-226 (2007)

医薬品のウイルス安全性確保：核酸増幅検査（NAT）による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発

内田恵理子,^{*a} 山口照英^b

Viral Safety of Biologicals: Evaluation of Hepatitis C Virus (HCV) Nucleic Acid Amplification Test (NAT) Assay and Development of Concentration Method of HCV for Sensitive Detection by NAT

Eriko UCHIDA^{*a} and Teruhide YAMAGUCHI^b

^aDivision of Cellular and Gene Therapy Products, and ^bDivision of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received August 28, 2009)

The most important issue for the safety of biological products and blood products derived from human sources is how to prevent transmission of infectious agents. The hepatitis C virus (HCV) is a major public health problem due to its high prevalence. HCV is mainly transmitted by exposure to blood and highly infectious during the early window period with extremely low viral loads. Therefore it is important to develop more sensitive detection methods for HCV. In the case of blood products, both serological test and nucleic acid amplification test (NAT) are required to detect HCV. Since NAT is highly sensitive, establishment of a new standard is required for validation of NAT assay. NAT guideline and establishment of the standard for HCV RNA and HCV genotype panel is introduced in this review. On the other hand, to enhance the sensitivity of virus detection by NAT, a novel viral concentration method using polyethyleneimine (PEI)-conjugated magnetic beads (PEI beads) was developed. PEI beads concentration method is applicable to a wide range of viruses including HCV. Studies using the national standard for HCV RNA, HCV genotype panel and seroconversion panel, suggest that virus concentration method using PEI-beads is useful for improvement of the sensitivity of HCV detection by NAT and applicable to donor screening for HCV.

Key words— hepatitis C virus (HCV); viral safety; nucleic acid amplification test (NAT); standard; polyethyleneimine (PEI); virus concentration

1. はじめに

ヒト由来成分を原料とする医薬品の安全性確保における最重要課題はウイルス等の感染症の伝播をいかに防止するかである。C型肝炎ウイルス(HCV)はわが国では約200万人が感染していると推定されている感染頻度の極めて高いウイルスで、主として血液を介して感染する。輸血によるHCV感染リスクは、1990年初頭に導入された血清学的検査に加えて1999年に核酸増幅検査(NAT)が導入されたことによって極めて低減化された。しかしながら、感染初期のウィンドウ期のHCVは極めて低濃度の

ウイルス量で感染が成立し、チンパンジーを用いた感染実験では50 mlの血漿中に含まれるわずか1-5コピーのHCVウイルスゲノムで感染が認められるとの報告もあり、¹⁾ウィンドウ期によるHCV感染を防ぐには、より高感度・高精度なウイルス検出手法の開発が求められている。PCRを始めとするNAT法は数コピーから数十コピーという微量のウイルスゲノムを検出できる高感度検出法であり、「生物由来原料基準」(平成15年厚生労働省告示第210号2003年5月20日制定、平成17年厚生労働省告示第177号2005年3月31日改正)及び「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて」(平成11年8月30日医薬発第1047号厚生省医薬安全局長通知)により、血液製剤(輸血用血液製剤、血漿分画製剤)では血清学的検査に加えてNATによるHCV検査が義務付け

^a国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部、^b同生物薬品部(〒158-8501東京都世田谷区上用賀1-18-1)
*e-mail: uchida@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムS33で発表したものを中心に記述したものである。

られている。一方で、NATは極めて高感度であるため、その分析法の評価にはこれまでにない基準が必要とされる。

本総説では、医薬品のウイルス安全性確保という観点から、NATによるHCV検出を評価するためのNATガイドラインとNATの評価に必要な標準品やパネル血漿の作製について紹介するとともに、NATの高感度化のためのウイルス濃縮法の開発とHCVの高感度検出への応用に関する筆者らの研究について紹介する。

2. ヒト由来成分を原料とする医薬品の安全性確保とNATによるHCV検出

2-1. 医薬品のウイルス安全性確保に関する基準・指針

ヒト由来成分を原料とする医薬品のウイルス安全性確保に関連する基準や指針としては、前述の「生物由来原料基準」や「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品または医療機器の品質及び安全性の確保について」（平成20年9月12日薬食発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知）などが策定されている。これらの基準や指針により、ヒト由来成分を原料とするヒト尿由来製品、ヒト（同種）由来細胞組織加工医薬品等においてもHCVはB型肝炎ウイルス（HBV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）等と同様、NATによる検査が義務化あるいは強く推奨されている（Table 1）。

2-2. NATの検出感度とウィンドウ期

NATとはNucleic acid Amplification Test（核酸増幅検査）のことで、ウイルスなどの微量の遺伝子（核酸）を人工的に増幅して高感度に検出する方法の総称である。DNAポリメラーゼを用いたサーマルサイクル

反応によりDNAを増幅するPCR法（Polymerase Chain Reaction：ポリメラーゼ連鎖反応）が一般によく知られているが、ほかにも恒温で核酸を増幅するTMA法（Transcription-mediated Amplification：転写媒介増幅法）、LAMP法（Loop-mediated Isothermal Amplification：鎖置換反応法）、ICAN法（Isothermal and Chimeric Primer-initiated Amplification of Nucleic Acid：等温遺伝子増幅法）、NAS-BA法（Nucleic Acid Sequence-Based Amplification：核酸配列増幅法）やDNAリガーゼを用いたサーマルサイクル反応により核酸を増幅するLCR法（Ligase Chain Reaction：リガーゼ連鎖反応法）などの様々な方法が開発され、ウイルス検査に利用されている。各増幅法の原理や特徴については他著に譲る。²⁾

NATはウイルス核酸を増幅して検出するため、抗体を検出する血清学的検査に比べて極めて高感度であり、ウィンドウ期を短縮することが可能である。HCVの場合、抗体検査のウィンドウ期は約82日とされるが、日本赤十字社（日赤）ではNATの実施によりウィンドウ期が約25日と大幅に短縮された³⁾（ただし、これは検査法に依存した数値でありすべてに当てはまるわけではない）。日赤におけるHCVのNATによる検出感度は74 IU/mlとされる。⁴⁾ 一方、「四課長通知」（血漿分画製剤のウイルス安全対策について：平成15年11月7日薬食密査発第1107001号、薬食安発第1107001号、薬食監発第1107001号、薬食血発第1107001号、厚生労働省医薬食品局密査管理課長、安全対策課長、監視指導・麻薬対策課長、血液対策課長通知）によると、HCVのNATによる検出感度としてはHBV、HIVとともに100 IU/mlが求められている。昨年、日赤では新しい検査試薬を導入するとともに、検査に用いる検体の容量を現在の4倍以上に増やすことでNATの検出感度は一段と向上したという。さらに今後、ウイルス濃縮法を含む様々な手法により検出感度を上げることができれば、ウィンドウ期のさらなる短縮が可能と考えられる。

2-3. NATガイドライン

上述の通り、血液製剤やヒト尿由来製品では、数コピーから数十コピーという微量のウイルス遺伝子の検出が要求されるNATがスクリーニング検査として義務付けられているが、この場合、検出感度等の適切な精度管理

Table 1. Requirements for Virus Test in Biological Products

- Blood Products for Transfusion
 - NAT for HBV-DNA, HCV-RNA, and HIV-RNA with individual or mixed blood
- Plasma Derived Medicines
 - NAT for HBV-DNA, HCV-RNA and HIV-RNA with original plasma
- Human Urine Derived Products
 - NAT for HBV-DNA, HCV-RNA, HIV-RNA with pooled urine at appropriate timing
- Cell or Tissue Derived Products
 - Interview or screening for HBV, HCV, HIV, HTLV and parvovirus B19

が極めて重要である。そこで、血液製剤の安全性確保を目的として NAT を行う場合に適切な精度管理が実施されるよう、検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策を示したものが「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドライン」(平成 16 年 8 月 3 日薬食発第 0803002 号厚生労働省医薬食品局長通知) である。本ガイドラインは「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」を補完するものであり、血液製剤のドナースクリーニング検査、原料血漿の製造工程への受入れ時の試験、血漿分画製剤の製造過程における工程内管理試験や最終製品の検査として NAT を行う場合に適用される。HCV, HBV, HIV 及びその他の準用可能なウイルスが対象となる。

ウイルス遺伝子の検出を目的とする定性検出法としての NAT の検証で重要な項目は、①特異性、②検出感度、③頑健性である。NAT における特異性とは、試料中に共存すると考えられる物質の存在下で目的とするウイルス遺伝子のみを確実に検出できる能力であり、類似のウイルスに対する交差反応性(非特異的反応)がないこと、目的とするウイルスの種々の遺伝子型を検出できることを適当な参照パネル(ジェノタイプパネル)を用いて証明することが求められる。

検出感度とは、試料中に含まれる目的ウイルス遺伝子の検出可能な最低の量のことを指し、NAT では 95% の確率で検出される検体一定量当たりのウイルス遺伝子の最低量である陽性カットオフ値を検出感度として設定する。検出感度は一般に標準品の希釈系列を作製して求める必要がある。ランコントロールには、95% の確率で検出される検出感度の 3 倍量のウイルスを含む標準検体を用いることが推奨されている。

頑健性とは、分析条件の小さな変動が結果に影響しないという信頼性を表すものであり、陰性試料及び陽性試料(95% の確率で検出される検出感度の 3 倍量のウイルスをスパイクしたものを、それぞれ少なくとも 20 検体を用いて試験を実施し、すべての陰性試料が陰性となり、すべての陽性試料が陽性となることによって示すことができる。

NAT ガイドラインでは、検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策として、上記の要件の

ほかに、核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出の最適化、従事者の技術の標準化、汚染防止のための施設・設備の整備等に関する要件等も示されている。

2-4. NAT 試験用標準品、参照品について

NAT ガイドラインに従って NAT の検出感度や精度を比較・評価するには、基準となる標準品あるいは標準物質(参照品)が必要となる。標準品としては、①国際標準品、②国際標準品とのデータの互換性が保証された国内標準品、③国際標準品又は国内標準品とのデータの互換性が保証された自社標準物質(参照品)等のいずれかを使用することが求められ、WHO (World Health Organization) や国内において NAT 試験用のウイルス標準品の作製が行われている (Table 2)。WHO の国際標準品は NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) により HCV, HBV, HIV, HAV 及びバルボウイルス B19 について作製されている。国内標準品は厚生労働省薬事分科会血液事業部会安全技術調査会小委員会により HCV, HBV 及び HIV について策定されている。HCV RNA の国際標準品としては、1997 年にジェノタイプ 1a を用いて第一次国際標準品 (96/790) が樹立され、現在は第三次国際標準品 (00/560) が NIBSC より入手可能である。一方、HCV RNA の第一次国内標準品 (JCV-1b No122) は国内に多いジェノタイプ 1b を

Table 2. International and National Standards for Virus DNA/RNA NAT Assays

	WHO International Standard (NIBSC)	National Standard
HCV	06/100 Genotype 1a 154881 IU/ml	JCV-1b No122 Genotype 1b 100000 IU/ml
	97/746 Genotype A, HBsAg subtype adw 5 × 10 ⁵ IU/vial	HBV-129 Genotype C, HBsAg subtype adr 4.4 × 10 ⁵ IU/ml
HIV	97/650 HIV-1, Genotype B 5.56 log ₁₀ IU/vial	HIV-00047 HIV-1, Genotype B 1.4 × 10 ⁵ IU/ml
HAV	00/560 5 × 10 ⁴ IU/vial	
Parvovirus B19	99/800 5 × 10 ⁵ IU/vial	

用いて1999年に作製された。HCV RNA 国内標準品の作製には、日常的にHCV-NATを実施している国内外の7施設が参加し、各施設が任意の核酸抽出・増幅法を用いて第一次WHO国際標準品(96/790)を基準に国内標準品候補品の力価を算出することにより、その平均値から国内標準品の力価が100 000 IU/mlと決定された。⁵⁾ 現在、HCV RNA 国内標準品は感染症研究所から入手可能である。

一方、NATの特異性の評価、ジェノタイプ毎の検出感度の評価に用いる参照パネルの作製状況をTable 3に示す。国際参照パネルはHCVとHIVについて用意されている。国内参照パネルはHCV、HIV、HBVの標準パネル血漿がいずれも厚生労働科学研究費補助金「安全な血液製剤を確保するための技術の標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究」(主任研究者吉澤浩司)⁶⁾により作製されており、今後公開予定とされる。HCV国内標準パネル血漿の詳細をTable 4に示す。この標準パネル血漿は献血された新鮮凍結血漿をもとに作製されたもので、HCV抗体が出現する前のウインドウ期の血漿とキャリア期の血漿に、感染既往期の血漿及び陰性対照血漿を加えた計100本が選定されている。HCVパネルには国内に存在する代表的なジェノタイプである1a、1b、2a、2bの4種類が網羅されている。標準パネル血漿のHCV RNA量(copies/ml)は、報告書⁶⁾にある換算表によりWHOの力価(IU/ml)との相互換算が可能である。

Table 3. International and National Reference Panels

	International Reference Panel (NIBSC)	National Reference Panel ⁶⁾
HCV	02/202 6 samples (6 major genotypes) non WHO reference material	100 samples (5 genotypes and negative controls)
	01/466 11 samples (10 different genotypes and a negative control) WHO international standard	100 samples (subtype A, B, E, negative control)
HBV		100 samples (genotype A, B, C, D, F; subtype adw, adr, adr mutant, ayr, negative)

2-5. 血液製剤等のHCV安全対策 血液製剤等のウイルス安全対策として、製造メーカーには、①国内標準品や適当な参照パネルを用いて、各社で採用しているNATのバリデーションを実施し、当該NATの検出限界が100 IU/mlの精度となるよう精度管理を行うこと、②血漿分画製剤の製造工程には、ウイルスが十分に除去・不活化されていることを確認できる、少なくとも10⁹以上のウイルスクリアランスを示す製造工程を導入することが前述の「四課長通知」により求められている。また、輸血用血液製剤については、医療機関は患者に対して輸血前後のHCV、HBV、HIVの検査を実施することが「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」(平成17年3月10日薬食発第0310012号厚生労働省医薬食品局長通知、平成20年12月26日一部改正)により求められている。

一方、国は血漿分画製剤メーカーや輸血前後のウイルス検査を実施する機関に対して、NATの品質管理に係るコントロールサーベイを実施している。コントロールサーベイとは、HCV、HBV、HIVそれぞれの国内標準品を血漿で希釈した検体を参加各施設にブラインドで配布して試験を実施することにより、各施設で実施しているNATの感度・精度等の状況を把握し、必要な対策を取るための調査試験の性格を持ち、これによりNATの検出感度の向上及び標準化に努めている。

Table 4. HCV RNA National Genotype Panel for Standardization of NAT Assay

Genotype	Classification*	Panel Number	HCV RNA (copies/ml)
1a	carrier period	2	8.1 × 10 ⁵ - 1.0 × 10 ⁶
	window period	12	9.0 × 10 ² - 6.9 × 10 ⁷
1b	carrier period	5	4.5 × 10 ³ - 2.9 × 10 ⁷
	window period	1	4.5 × 10 ⁷
2a	window period	11	1.9 × 10 ⁵ - 6.7 × 10 ⁷
	carrier period	10	3.2 × 10 ⁵ - 5.2 × 10 ⁷
2b	window period	8	4.8 × 10 ⁵ - 8.5 × 10 ⁷
	carrier period	3	3.2 × 10 ⁶ - 2.3 × 10 ⁷
	anamnestic infection	46	Not detected
	negative control	2	Not detected

* window period: HCVAb < 1.0; carrier, anamnestic infection: HCVAb > 1.0. Data were collected from the original report.⁶⁾

3. NAT による HCV 検出の高感度化のためのウイルス濃縮法の開発

NAT は目的とする遺伝子を数コピーから数十コピーという高感度で検出できる方法であるが、検出限界よりさらに低い濃度のウイルスが存在する場合には検出不可能である。最初に述べたように、感染初期のウィンドウ期の HCV は極めて低濃度のウイルス量でも感染が成立すること、また細胞組織加工医薬品のような製品ではウイルスの不活化・除去が行えないことから、可能な限り高感度なウイルス否定試験の開発が望まれている。

NAT によるウイルス検出をより高感度化する方法の 1 つの方法として、ウイルスを濃縮後に検出することで検査にける検体の用量を増加させる方法がある。われわれは新規ウイルス濃縮法として、ポリエチレンイミン結合磁気ビーズ (PEI 磁気ビーズ) を用いた手法を開発し、HCV を始め多くのウイルスが PEI 磁気ビーズに吸着して濃縮可能であり、NAT によるウイルス検出を高感度化できることを報告した (Table 5).^{7,8)} ウイルス濃縮法の原理としては、主として PEI の陽性荷電とウイルス表面分子の陰性荷電との静電的相互作用によりウイルスが PEI に吸着して濃縮されると考えている (Fig. 1).

HCV の濃縮については、細胞組織加工医薬品の試験への適用を想定した培養上清中の HCV、及びドナースクリーニングへの適用を想定した血漿中の HCV のいずれの場合も、PEI 磁気ビーズによりほぼ定量的に濃縮されることが確認された (Fig. 2)。HCV の検出感度を HCV RNA 国内標準品を用いて検討した結果、1 ml のウイルス液から PEI 磁気ビーズで 10 倍濃縮を行うことにより検出感度が向上し、1 IU/ml がほぼ確実に検出可能となった。ま

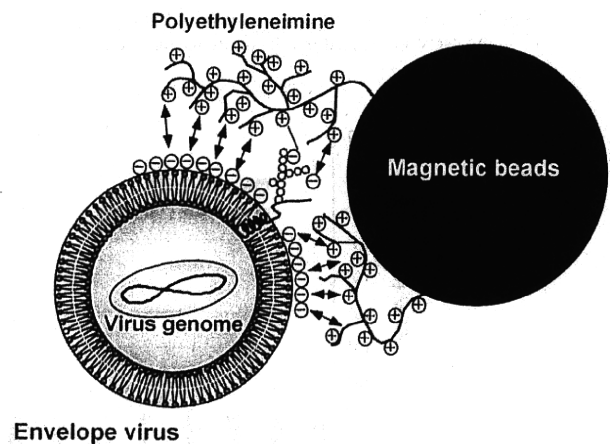


Fig. 1. Mechanism of Virus Concentration by PEI Beads

Table 5. Summary of Concentration of Viruses by PEI beads

Viruses	Natural host	Virus genome	Envelope	Size (nm)	PEI-beads concentration
Model Viruses					
Cytomegalovirus (CMV)	Simian	DNA	+	180-200	+
Herpes Simplex Virus Type-I (HSV-1)	Human	DNA	+	150-200	+
Vesicular Stomatitis Virus (VSV)	Bovine	RNA	+	70-150	+
Amphotropic Murine Leukemia Virus	Murine	RNA	+	80-110	+
Sindbis Virus	Human	RNA	+	60-70	+
Adenovirus Type 5	Human	DNA	-	70-90	+
Simian Virus 40 (SV40)	Simian	DNA	-	40-50	+
Porcine Parvovirus (PPV)	Porcine	DNA	-	18-24	+
Poliovirus Sabin 1	Human	RNA	-	25-30	+*
Human Hepatitis Viruses					
Hepatitis B Virus (HBV)	Human	DNA	+	40-45	+*
Hepatitis C Virus (HCV)	Human	RNA	+	40-50	+
Hepatitis A Virus (HAV)	Human	RNA	-	25-30	+

* Concentrated by the addition of antibodies.

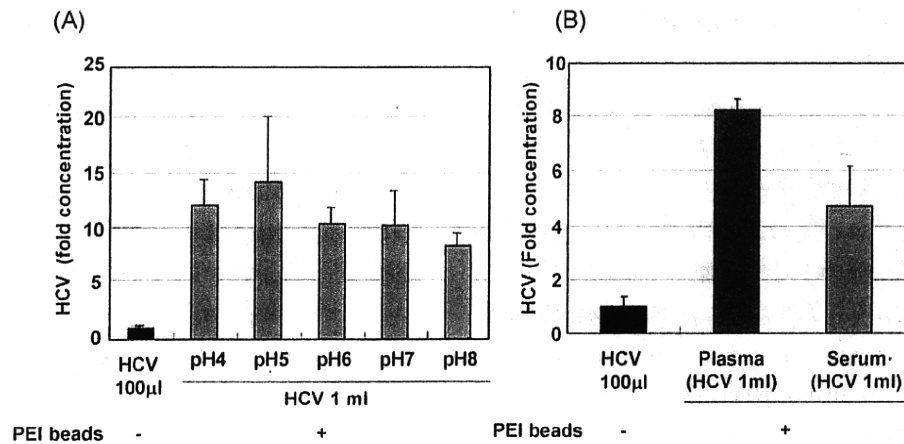


Fig. 2. HCV concentration by PEI beads

(A) HCV was spiked in cell culture medium containing 2% fetal bovine serum. (B) HCV was spiked in human plasma or human serum.

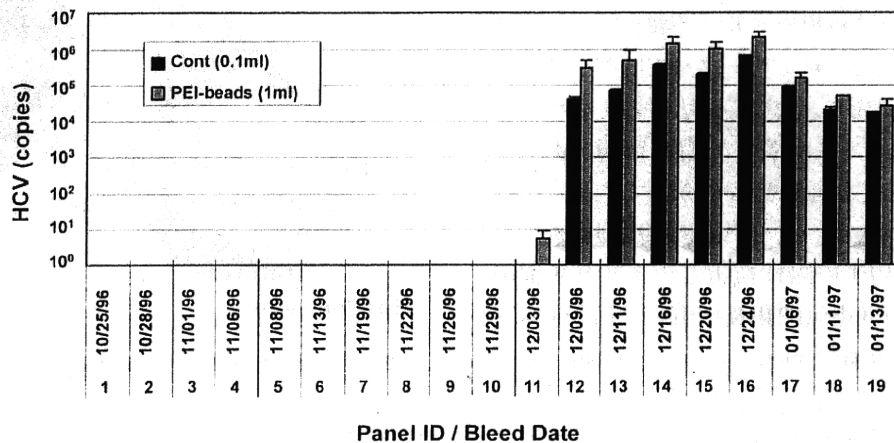


Fig. 3. Application of PEI Beads Concentration Method to HCV Seroconversion Panel

た、HCV濃縮の特異性を検討するため、市販のHCVジェノタイプパネルからジェノタイプや由来する国の異なる10種類のパネル血漿を選んで10倍濃縮を行ったところ、すべて5倍以上の濃縮が得られ、ジェノタイプが異なるものでも適用可能であることが示された。さらに、HCVのセロコンバージョンパネル（HCV感染後のウィンドウ期の初期に短期集中して採血されたシングルドナー血漿）を用いて検出の有効性を検討した結果、PEI磁気ビーズ濃縮を行うことにより、濃縮せずに直接検出した時と比べて6日早く採血された検体についてもHCVが検出可能となり、ウィンドウ期が短縮された（Fig. 3）。これらの結果から、PEI磁気ビーズ濃縮法はNATによるHCV検出の高感度化に有用であり、医薬品のウイルス安全性確保に重要なドナーのスクリーニングにも適用可能と考えられる。

4. おわりに

血液製剤等のウイルス安全性確保を目的としてHCVの検査にNATが導入されたことにより、HCVの検出は高感度化されウィンドウ期は短縮された。しかしなおNATには検出限界があり、ウィンドウ期をなくすことはできないため安全性確保はいまだ十分とは言えない。より一層の安全性を確保するには、現在よりさらに高感度・高精度なウイルス検出手法の開発が望まれる。NATによるウイルス検出技術やその周辺技術は急速に進展しており、ウイルス濃縮法を含め様々な手法の開発が進められている。最新の技術を取り入れ、技術の進歩に即応した医薬品のウイルス安全対策が進められることが望まれる。

謝辞 PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮法の

開発は、日本赤十字中央研究所の佐藤巧榮博士、岩田明子氏及びJSR㈱の日方幹雄博士、村田充宏博士との共同研究の成果であり、この場を借りて感謝申し上げます。本研究の一部は、厚生労働科学研究費及びヒューマンサイエンス振興財団政策創薬総合研究事業の支援を受けて行われたものです。

REFERENCES

- 1) Busch M. P., Hirschhorn D. F., Herring B. L., Delwart E. L., McAuley J., Murthy K. K., Alter H. J., *Transfusion*, **43** (9s), 32A (2003).
- 2) Hayakawa T., Yamaguchi T., Oshizawa T., Ishii-Watabe A., *Iyakuhin Kenkyu*, **33**, 275-284, (2002).
- 3) http://www.tokyo.bc.jrc.or.jp/tmpfile/yougo/yousetsu_aa-oo.htm#uu-3, cited 04 December, 2009.
- 4) Yokoyama S., *Jpn. J. Transfusion Med.*, **48**, 279-285 (2002).
- 5) Mizusawa S., Okada Y., Horiuchi Y., Tanaka T., Sato K., Kaneko K., Sasaki Y., Tanaka T., Tomono T., Tomomizu T., Hayami S., Hijikata M., Hirako I., Mayumi M., Mikami K., Mishihiro S., Miyamoto S., Muta K., Weimer T., Gierman T., Komuro K., Yamaguchi T., *Jpn. J. Transfusion Med.*, **51**, 515-519 (2005).
- 6) Yoshizawa K.: <http://mhlw-grants.niph.go.jp/index.html>, MHLW grants system database No. 200301268A., cited 04 December, 2009.
- 7) Satoh K., Iwata A., Murata M., Hikata M., Hayakawa T., Yamaguchi T., *J. Virol. Methods*, **114**, 11-19 (2003).
- 8) Uchida E., Kogi M., Oshizawa T., Furuta B., Satoh K., Iwata A., Murata M., Hikata M., Yamaguchi T., *J. Virol. Methods*, **143**, 95-103 (2007).



Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/genetox
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Dose-dependent alterations in gene expression in mouse liver induced by diethylnitrosamine and ethylnitrosourea and determined by quantitative real-time PCR[☆]

Takashi Watanabe^a, Gotaro Tanaka^b, Shuichi Hamada^c, Chiaki Namiki^d, Takayoshi Suzuki^e, Madoka Nakajima^f, Chie Furihata^{a,*}

^a Functional Genomics Laboratory, School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, Fuchinobe 5-10-1, Sagami-hara, Kanagawa 229-0006, Japan

^b Tokushima Research Center, Taiho Pharmaceutical Co. Ltd., Hiraishiebisuno 224-2, Kawauchichou, Tokushima, Tokushima 771-0194, Japan

^c Genetic Toxicology Group, Toxicology Division II, Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Sunayama 14, Kamisu-shi, Ibaraki 314-0255, Japan

^d Central Research Laboratory, SSP Co. Ltd., Nanpeidai 1143, Narita, Chiba 286-8511, Japan

^e Division of Cellular & Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1 Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^f Genetic Toxicology Group, Biosafety Research Center, Foods, Drugs, and Pesticides, Shiohinden 582-2, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka 437-1213, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2008

Received in revised form 31 October 2008

Accepted 9 November 2008

Available online 21 November 2008

Keywords:

Genotoxic carcinogens
 Dose-dependent alteration
 Hierarchical clustering
k-means clustering
 IPA

ABSTRACT

We examined the dose-dependency of gene expression changes for 51 genes in mouse liver treated with two *N*-nitroso genotoxic hepatocarcinogens, diethylnitrosamine (DEN) and ethylnitrosourea (ENU) by quantitative real-time PCR (qPCR). DEN (3, 9, 27 and 80 mg/kg bw) or ENU (6, 17, 50 and 150 mg/kg bw) was injected intraperitoneally into groups of five male 9-week-old B6C3F₁ mice and the livers were dissected after 4 h and 28 days. Total RNA from pooled livers was reverse-transcribed to cDNA and the amount of each gene was quantified by qPCR. Results were analyzed by hierarchical and *k*-means clustering and ingenuity pathway analysis (IPA). The most characteristic result was a similar dose-dependency of gene expression changes with DEN and ENU. Twenty-one genes exhibited a distinct dose-dependent increase in expression at 4 h for both carcinogens [*Bax*, *Btg2*, *Ccng1*, *Cdkn1a*, *Cyp4a10*, *Cyp21a1*, *Fos*, *Gadd45b*, *Gdf15*, *Hmox1*, *Hspb1*, *Isg2011*, *Jun*, *Mbd1*, *Mdm2*, *Myc*, *Net1*, *Plk2*, *Ppp1r3c*, *Rcan1* and *Tubb2c*], although the increase in gene expression due to ENU was generally weaker than that due to DEN. Only *Gdf15* showed a dose-dependent increase in expression at 28 days for both carcinogens. The differences between DEN and ENU were in the expression of additional genes (7 for DEN and 8 for ENU). IPA extracted five gene networks: Network-1 included genes related to cancer and cell cycle arrest and associated with *Bax*, *Btg2*, *Ccng1*, *Cdkn1a*, *Gadd45b*, *Gdf15*, *Hspb1*, *Mdm2* and *Plk2* and Network-2 was related to DNA replication, recombination, repair and cell death and associated with *Cyp21a1*, *Gdf15*, *Ppp1r3c*, *Rcan1* and *Tubb2c*. The present results show a distinct dose-dependency of gene expression changes induced by DEN and ENU. These changes were associated with cancer, cell cycle arrest, DNA replication, recombination, repair and cell death and were seen not only at 4 h but also, for some, at 28 days after administration.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diethylnitrosamine (DEN) and ethylnitrosourea (ENU) are potent genotoxic *N*-nitroso carcinogens that induce hepatocellular carcinomas in mouse liver [1,2]. It has been reported that after its metabolic biotransformation, DEN produces the promutagenic adducts O⁶-ethylguanine (O⁶-EtG) and O⁴- and O²-ethylthymine

and that O⁴-ethylthymine may be responsible for the initiation of hepatocellular carcinomas in rats [3]. ENU, which is a direct-ethylating agent, forms several major adducts upon reaction with DNA, of which O⁶-EtG, O⁴- and O²-ethylthymine and N³-ethylthymine have been implicated in mutagenic lesions [4]. Suzuki et al. have reported that mutagenic activity by DEN and ENU was clearly detected with the *lacZ* mutation assay in mouse liver at 7 days [5]. Mientjes et al. have reported that the O⁶-EtG levels increased as early as 1.5 h after treatment, whereas at 3 days more than 90% of the lesions had been removed from the DNA in the livers of DEN- and ENU-treated mice, based on *lacZ* transgenic mice [6]. After this period, however, with the bulk of O⁶-EtG removed, the induction of *lacZ* mutations was observed at 3 days and continued to increase for some weeks.

[☆] This work was a JEMS/MMS/Toxicogenomics group collaborative study.

* Corresponding author at: Department of Chemistry and Biological Science, School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 5-10-1 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8558, Japan. Tel.: +42 759 6233; fax: +42 759 6511.

E-mail address: chiefurihata@gmail.com (C. Furihata).