

## sRANKL, BMP2

また培養骨膜細胞に PMA 刺激(変異原性刺激)を加え、その影響について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では貴重なヒト培養細胞を用いることになり、細胞提供者には十分な説明を行い、同意を取得した上で検討を行った。本研究は、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認をえて行った。

## C. 研究結果

### 1. 細胞内染色

実際に培養を行った浮遊系細胞のうち、主に活性化培養臍帯血 T 細胞(増殖が良いものと、増殖が悪いもの)について、phospho-ATM, phospho-p53, phospho-chk2, ATR, phospho-chk1, AID 染色の条件決定を行い、また蛍光強度の解析を行った。phospho-ATM については、回転が速く増殖が良い細胞群では、シフトが認められた。5 種類の異なる検体で解析し、初期の増殖期、対数増殖期、対数増殖期を過ぎた時期が含まれていたが、わずかではあるが対数増殖期の細胞で最も ATM のリン酸化が強い傾向にあった。一方増殖不良となったものでは phospho-ATM はほとんど検出されなかった。

一方 phospho-chk2, ATR, phospho-chk1 は酸化ストレスや電離放射線照射後の培養臍帯血 T 細胞では陽性として検出されたものの、通常に培養した細胞群では、陽性群はほとんど存在しないことが明らかになった。

一方細胞内 p21 に関しては、通常に増殖した細胞ではほとんど検出されず、増殖が悪くなった細胞においては陽性となった。

AID は主に B 細胞において IL-4/CD40 シ

グナルによって誘導される分子であるが、近年 H. pylori 感染胃粘膜細胞や HCV 感染肝細胞などでも発現が認められることが明らかになった。AID は異所性発現において mutation を誘導する分子であり、持続的な発現が腫瘍化に繋がるという仮説がある。

今回の浮遊系細胞での検討は、コントロール細胞である EBV 感染リンパ芽球では発現が認められた。一方、培養 T 細胞においては、ほとんど発現が認められなかった。感度の問題である可能性があり、また T 細胞では検出されない可能性も残る。今後の検討課題である。

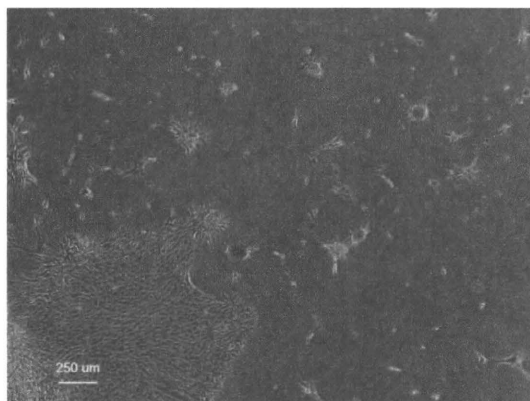
培養造血幹細胞では phospho-ATM の発現は低く、またその他の DDR の指標は陽性とならなかった。またマスト細胞でも同様に DDR が極めて低いことが示された。これらは増殖速度に比例した現象と考えている。

### 2. 付着細胞系での DNA 損傷応答の検討

新潟大学にて作成した培養口腔粘膜、培養骨膜細胞標本、PMA で刺激した培養骨膜細胞標本を用いて、DNA 損傷応答分子の染色を行った。

前年度の検討においては、培養の先端部において、phospho-ATM, ATR の発現が確認され、一方 Chk2, Chk1, p53 のリン酸化は検出されないという結果が得られている。この所見はむしろ正常増殖を示唆するもの(増殖良好を示唆する所見)と結論した。

今回新たに加えた標本は、PMA にて 2 日間刺激をしたものである。



図に示すように、一部の細胞では通常培養あるいは PMA 刺激において、凝集したような変形細胞を認めた。これらの細胞においては、phospho-ATM, phospho-p53 の発現が検出され、一方 Chk2, Chk1 のリン酸化は認められなかった。通常の培養においては辺縁においてのみ phospho-ATM が確認されるという点からは、過剰刺激状態においては、多くの細胞にて ATM がリン酸化され、また p53 のリン酸化にまで繋がっていることが明らかになった。

AID に関しては、染色されていなかったが、これに関しては骨髄細胞での適切な陽性コントロールがないために、今後放射線照射や *H. pylori cag vector* の導入などにより検討する必要があると考えている。

### 3. テロメア長の検索

テロメア長はテロメア配列にハイブリダイズする PNA を FITC ラベルし、細胞内で反応させ、FACS にて検出するシステムを用いて検証した。

その結果、培養臍帯血 T 細胞ではそのテロメア長はほぼ末梢血 T 細胞と同程度であり、相対的テロメア長(relative telomere length: RTL)については、年少者ほど小さいという一般的特性に加えて、臍帯血増殖 T 細胞において、末梢血増殖 T 細胞より RTL が高く、また

培養 T 細胞と末梢血 T 細胞の間では大きな差は認めなかった。

実際の値としては、

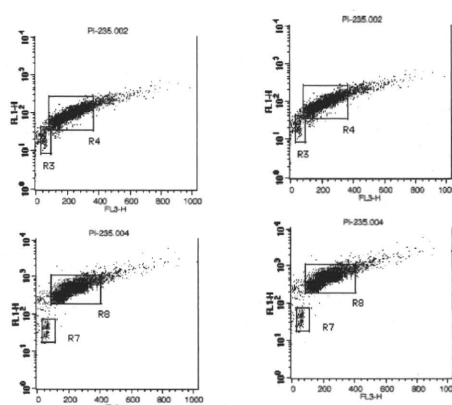
\*臍帯血増殖 T 細胞:  $15.6 \pm 2.0$

\*末梢血 T 細胞:  $8.8 \pm 1.8$

\*末梢血増殖 T 細胞:  $8.2 \pm 1.4$

(末梢血供与者平均年齢 27 歳)

以下に代表的な FACS 解析図を示す。



(縦軸はテロメア長を表す)

$$RTL = 100\% \times [(R5+R7)/2 - (R1+R3)/2] \times 2 / [(R6+R8)/2 - (R2+R4)/2]$$

幹細胞あるいは腫瘍化細胞の 1 つの目安となるテロメア長の長い細胞については、培養 T 細胞では検出されなかった。

一方、培養造血幹細胞においてはテロメア長の長い細胞群が一群として検出された。その蛍光強度(相対的テロメア長)は、HPB-ALL 程度であった。一方その他の T 細胞株である Jurkat や Molt-4 では RTL はより大きな傾向にあった。

### 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

本年度は最終年度として、測定するサイトカ

インの種類を増やし、EGF, Basic FGF, IFN-a, IFN-b, IL-15, MCSF, TGFb, VEGF, IL-21, sE-selectin, sRANKL, BMP2 を測定した。sRANKL については、Bioplex 法と ELISA 法の両方で検討を行った。

下に示すものは ELISA の結果であり、赤字の部分は PMA 刺激を加えたものであり、緑色のものは骨誘導をくわえたもの、青字は通常の誘導である。骨誘導を加えたものでは sRANKL 及び BMP-2 がむしろほとんど検出されていない。

	sRANKL pg/mL	BMP-2 pg/mL	増殖不良
培地のみ			
PO29(1)	0.0		
PO29(2)	0.0		
PO30(5)	0.0	2.4	
PO30(5)	0.0	0.0	
PO30(33)	0.0	0.0	
PO30(19)	0.0	0.0	
PO30(20)	0.0	0.0	
PO31(14)	0.0	0.0	
PO31(14)	0.0		
新潟培地	0.0	0.0	
培養上清			
sup12	5.9	0.0	
sup13	3.2	29.9	
sup14	0.0	3.2	
sup18	0.0	0.0	
sup19	3.9	18.6	
sup20	2.3	26.7	
sup28	0.0	0.0	
sup29	9.1	0.0	*
sup30	7.5	26.7	
sup31	1.8	26.7	*
sup32	0.0	0.0	

sup33	0.0	0.0	*
sup34	19.6	14.6	
sup35	0.0	0.0	
sup44	1.2	0.0	
sup45	16.4	10.5	
sup46	10.0	34.8	
sup47	4.7	31.6	
sup48	0.0	9.7	
sup49	0.0	0.0	
sup50	4.9	11.3	
sup51	4.3	8.1	
sup52	6.9	0.0	
sup53	21.9	3.2	
sup70	0.6	8.9	
sup71	1.5	5.7	
sup72	0.6	7.3	
sup73	0.3	8.9	
sup74	0.0	0.0	
sup75	0.0	3.2	
sup76	3.9	9.7	
sup77	6.6	4.9	

培養骨膜の EGF, Basic FGF, IFN-a, IFN-b, IL-15, MCSF, TGFb, VEGF, IL-21, sE-selectin, sRANKL, BMP2 測定結果では、以下の下段に示すように、PMA 刺激を加えたもの、あるいは増殖不良を示すもので TGF-beta が高値となる傾向があり、一方その他のサイトカインには明らかな差を認めなかった。

培養 T 細胞においては特別な傾向を示さず、末梢血、臍帯血の間でも顕著な差を認めなかった。IL-15 の産生能はほとんどなく、一方

M-CSF や IL-21 は比較的豊富に分泌することが明らかになった。

	細胞状態	EGF	FGF basic	IFN apha	IFN beta	IL-15	MCSF	TGFbeta	VEGF	IL-21	sE-selectin	sRANKL
PBL	良好	OOOR <	6.5	2.9	37.4	43.6	22106.5	16.2	OOOR <	206.9	1358.1	3.4
PBL	良好	OOOR <	OOOR <	6.5	41.0	37.3	8824.2	14.2	41.5	113.1	1340.9	1.2
PBL	良好	OOOR <	OOOR <	8.4	38.7	36.8	8770.9	13.3	OOOR <	92.7	1347.4	0.9
CB	普通	OOOR <	2.4	4.4	39.5	42.4	11190.4	11.6	3.5	113.8	1271.1	2.0
CB	増殖ストップ	OOOR <	4.2	8.4	45.0	44.9	15309.9	12.5	2.4	153.0	1373.1	2.3
CB	増殖ストップ	OOOR <	2.4	7.1	39.0	38.8	19251.3	11.6	42.5	191.7	1244.4	2.2
CB	増殖ストップ	OOOR <	2.4	7.1	37.2	36.8	20598.1	11.6	6.4	185.6	1273.3	1.0
CB	普通	OOOR <	4.2	5.2	24.8	25.0	10368.8	5.0	14.7	98.9	1203.8	0.1
CB	増殖不良	OOOR <	7.5	7.8	39.5	36.0	13848.4	10.3	20.4	135.2	1377.3	1.3
CB	増殖ストップ	OOOR <	4.2	7.1	35.9	33.3	16633.7	9.9	6.4	153.7	1125.5	0.3
Medium	増殖	OOOR <	4.2	5.8	37.9	36.0	11.0	11.6	1.3	OOOR <	1058.8	0.7

	細胞状態	EGF	FGF basic	IFN apha	IFN beta	IL-15	MCSF	TGFbeta	VEGF	IL-21	sE-selectin	sRANKL
	Control	OOOR <	6.5	OOOR <	5.8	4.7	35.8	2.6	192.0	47.8	93.2	7.0
	PMA5	1.9	12.7	5.2	7.8	2.2	46.0	9.9	461.4	102.0	121.1	7.1
	PMA50	1.2	9.9	5.5	4.8	4.7	63.4	18.9	416.4	99.7	103.0	6.1
	Control(骨髄導)	OOOR <	OOOR <	2.1	3.0	OOOR <	12.2	1.2	34.6	11.2	82.8	7.4
	PMA5	1.5	17.1	3.7	5.8	7.8	46.0	10.3	509.2	102.6	137.7	8.3
	PMA50	3.1	52.0	3.7	13.4	6.8	66.8	26.2	1272.1	210.1	213.3	7.5
	Control	OOOR <	7.5	OOOR <	1.4	OOOR <	45.0	1.9	140.2	41.7	58.4	6.8
	PMA0.5	1.4	10.6	OOOR <	5.8	4.7	42.7	8.0	368.7	92.6	112.3	16.0
	PMA1	1.9	11.8	5.2	7.8	6.8	42.7	9.9	557.8	108.7	153.1	9.6
	PMA5	2.4	16.2	5.2	9.1	6.8	70.2	16.2	727.8	138.8	181.4	7.1
	PMA50	0.8	10.6	OOOR <	7.2	8.8	56.5	23.4	357.4	91.7	137.7	7.3
	Control(骨髄導)	OOOR <	4.2	OOOR <	1.4	OOOR <	9.8	OOOR <	9.0	OOOR <	OOOR <	7.3
	PMA0.5	0.4	7.5	OOOR <	4.4	5.8	56.5	11.6	311.6	74.6	129.6	8.8
	PMA1	OOOR <	13.3	OOOR <	4.4	2.2	24.1	1.2	160.4	47.0	58.4	7.0
	PMA5	OOOR <	7.5	OOOR <	3.0	2.2	26.4	2.6	265.2	69.9	93.2	8.7
	PMA50	OOOR <	10.6	OOOR <	2.2	6.8	28.8	3.8	103.9	40.5	58.4	29.9
	Medium	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	24.3	4.7
	Good	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	21.2	5.4	OOOR <	24.3	5.1
	Good	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	14.6	7.0	165.2	53.5	OOOR <	3.4
	Detached	OOOR <	2.4	OOOR <	OOOR <	2.2	OOOR <	40.1	3.5	OOOR <	24.3	5.0
	Poor Prok	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	73.1	OOOR <	OOOR <	OOOR <	4.9
	Many floatants	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	2.2	33.5	151.9	108.8	37.5	24.3	4.7
	Good	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	8.5	4.5	OOOR <	24.3	6.4
	Good	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	2.2	19.4	5.0	11.5	6.9	OOOR <	6.0

## D. 考察

### 1. DNA 損傷応答解析システムの確立

最終年度における検討では、浮遊系細胞及び付着系細胞において、培養条件によって DDR が亢進するかどうかを検証することが第一の課題であった。

浮遊系細胞においては、わずかな差ではあるが増殖が良いもので ATM のリン酸化が強く検出され、しかし p53 のリン酸化は検出されないという結果であった。一方増殖不良となった細胞ではリン酸化 ATM の発現は極度に低い。このことは ATM のリン酸化がむしろ良好な増殖を示す指標であることを示唆している。

一方付着系細胞においてはリン酸化 ATM は増殖が盛んな細胞に認めるのみであったが、刺激を加えると形態の変化を認める細胞群において、ATM のリン酸化に加えて、p53 のリン酸化が検出された。

このことは付着系細胞においては、リン酸化 ATM の中心部での検出、およびリン酸化 p53 の検出は、過剰なシグナルであることを示唆している。一方増殖が悪い骨膜細胞においては、p21 のみが検出された。

浮遊系細胞は、T 細胞を主体とした検討であったが、造血幹細胞やマスト細胞では細胞回転が速くないために、DDR も低値であることが明らかになっている。増殖が盛んになり多くの細胞が得られることは重要ではあるが、逆に DDR が検出されることは、変異を誘導する可能性があり、新しい培養系が確立した際には比較検討する価値があると考えている。

一方本年度新しく測定に当たったテロメア長の検出では、培養 T 細胞においてはほぼ均一な細胞集団として検出されたが、培養造血幹細胞においては、テロメア長が長い細胞が散見された。この細胞群は、真の幹細胞である

可能性があり、また一方で腫瘍化細胞である危険性も否定はできない。今後 sorting にて単離し、遺伝子解析を行う予定である。

今回のデータには示していないが、テロメア長が長いことが判っている T 細胞性白血病由来細胞を、正常増殖 T 細胞に加えて、テロメア FLOW を行うと、その群が明らかにテロメアが長い群として数個のレベルでも検出可能である。従って、将来的に腫瘍細胞を識別する方法として使える可能性がある。

一方この検出法は、細胞を染色し、固定するため、選別法には向いていない。その点で、次世代の手法として、私たちは誘電サイトメリー法という、細胞内の電気特性を計測する手法を確立し、腫瘍細胞検出への応用を模索している。本システムは真の非侵襲的モニタリング系であり、細胞選別も可能である。

腫瘍化細胞の検出と選別という重要なテーマの中で、さらに研究を進展させていきたい。

### 2. 標準細胞規格検証システム

本年度は Bio-Plex を用いて付着系細胞の検証も実施した。その結果、培養状態が良好であることを明確に示す指標は得られなかったものの、一方 TGF-beta の上昇は増殖の不良あるいは過剰な刺激のいずれかを示唆するものであることが明らかになった。

培養 T 細胞においては現時点までの 17 種類のサイトカインに加えて 11 種類の生理活性物質を測定したが、臍帯血・末梢血間、及び増殖良好、増殖不良検体の間で大きな差を認めなかった。

今まで検証してきたシステムは、多種類同時高感度測定系であり、また細胞培養上清を用いているという特徴がある。浮遊系細胞の場合には、一部の細胞を代表として採取することは容易であるが、付着系細胞の場合には、採

取可能ではあるものの侵襲的であり、形態あるいは培養上清でできるだけ情報を集めることが望ましい。今回の検討では状態が悪いことを示す指標が得られたが、今後研究分担者の吉江弘正教授が実施したように、**proteomics approach** にて、**marker** を特定し、それを **BioPlex** システムに導入するという事も考えられる。

標準細胞規格という点からは、生化学的マーカーを明らかにすることが望ましく、今後は細胞種の焦点を絞って検討を行うことが必要と考えられる。

また軟骨細胞、骨細胞の培養経験からは、一部の幹細胞を純化して培養すれば、100% 純粋な細胞が得られ、それが生体内で整然と組織修復するというものではなく、いわゆる支持細胞が必要であることも明らかになっている。その点で、基盤となる幹細胞とそれを支える細胞の特性や、分泌するサイトカインなどをできるだけ明らかにするという基礎研究に加えて、実臨床では、製品標準書を構成できるような、現実的な規格を組み立てる必要があると考えている。

## E. 結論

汎用可能かつ安価な高感度迅速 DNA 損傷応答解析システムを開発し、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。

この検査系を用いて各種幹細胞や分化誘導細胞、増殖良好・不良細胞を調べたところ、Phospho-ATM, phospho-p53, p21 を検査することによって、細胞へのストレスが感度良く検出できることが明らかになった。より安全かつ適切な培養条件の選択に有用な手法が確立したものと考えている。また腫瘍化の 1 つの指標

として、テロメア長を測定した。いわゆる幹細胞でもテロメア長が長いことが想定されるが、長期培養→分化誘導における明らかなテロメア維持は、腫瘍化と関連する可能性がある。

標準細胞規格設定システムについては **Bio-Plex** 系が稼働し、培養 T 細胞及び培養骨膜細胞を用いて体系的な解析を行った。その結果、増殖不良群あるいは過剰刺激群で培養上清中で上昇するサイトカインを同定することができた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Imai K, Nonoyama S, **Morio T**, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patient. *Clin. Immunol.* **138**: 172-7, 2011.
2. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, **Morio T**, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation. *Blood.* **117**:2887-90, 2011.
3. Shin MJ, Shim JH, Lee JY, Chae WJ, Lee HK, **Morio T**, Park JH, Chang EJ, Lee SK. Qualitative and quantitative differences in the intensity of Fas-mediated intracellular signals determine life and death in T cells. *Int J. Hematol.* **92**:262-70, 2010.
4. Seki M, Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Agematsu K, **Morio T**, Yachie A, Kato M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr. Int.* **52**:e196-9, 2010.

5. Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, **Morio T**, Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur. J. Paediatr.* **169**:839-44, 2010.
6. Okamoto K, Iwai Y, Ohhora M, Yamamoto M, **Morio T**, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I $\kappa$ B regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* **464**: 1381–1385, 2010.
7. Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, **Morio T**, Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoening M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood.* **115**:3231-3238, 2010.
6. **森尾友宏**:"免疫不全症・免疫異常症の多様な姿-診療の ABC から今後の展望まで", 山梨血液感染症セミナー、2010年9月30日、山梨
7. **森尾友宏**:原発性免疫不全症の診断と治療-その ABC と今後の展望、三重免疫不全・感染症講演会、2010年9月16日、三重
8. **森尾友宏**:細胞加工製品におけるDNA損傷及び変異細胞の検出、厚生労働省科学研究(再生医療実用化研究事業)研究、「再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」班、第一回班会議、2010年9月4日、東京
9. **森尾友宏**:品質管理・安全性検証・規格化における技術開発の動向、厚生労働省科学研究(再生医療実用化研究事業)研究、「再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」班、第一回班会議、2010年9月4日、東京

## 2. 学会発表

### 国内学会発表

1. **森尾友宏**:細胞移植・細胞治療に関する国・学会の指針と基盤整備、第33回日本造血細胞移植学会総会、2011年3月9日、愛媛
2. 清水則夫、渡邊 健、**森尾友宏**、吉江弘正、中田 光:再生医療をサポートする網羅的微生物汚染検出システムの開発と応用、第10回日本再生医療学会、2011年3月2日、東京
3. **森尾友宏**:造血細胞移植後の体系的免疫能評価法、第55回三重大学造血細胞移植カンファレンス、2011年2月4日、三重
4. **森尾友宏**:血球系の減少を伴う免疫不全症、第4回21世紀血液免疫研究会、2010年11月18日、東京
5. **森尾友宏**:造血細胞移植後のウイルスモニタリングと感染制御、第11回血液細胞療法フォーラム、2010年10月16日、大阪

10. **森尾友宏**:移植医療におけるウイルス感染症対策:迅速検出法と治療戦略の現状と展望、第35回群馬移植研究会、2010年5月26日、群馬

### 国際学会発表

1. **Morio T**. Btk Controls ROS Production and Apoptosis in Human Neutrophils. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 6-9, 2010, Istanbul, Republic of Turkey.
2. Shin M J, Shim J, Lee J, Chae W, Lee H, **Morio T**, Park J H, Chang E, Lee S. Functional analysis of Fas-mediated activation signaling pathways in T cells. 14th International Congress of Immunology 2010. Aug 22-27, 2010, Kobe, Japan.
3. Honda F, Ikeda Y, Takahashi N, Lee S, Mizutani S, **Morio T**. Btk controls ROS production and apoptosis in human neutrophil. 14th International Congress of Immunology 2010. Aug 22-27, 2010, Kobe, Japan.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
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

新規微生物検出システムの開発

研究分担者 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**

ヒト幹細胞指針では、原材料の段階で無菌性を担保できず持続感染病原体混入の危険性が高い再生医療用細胞製剤の品質管理法として、最終製品に対するマイコプラズマとウイルス検査を義務付けている。一方、日本薬局方参考情報に記載のマイコプラズマ検査法は迅速性・簡便性・安定性の面で問題があり、実用的な検査法の開発が求められているため、細胞製剤の最終検査に応用可能な新しいマイコプラズマ検査系の開発を目的に研究を行った。その結果、マルチプレックス PCR と蛍光プローブ検出による新しい検査系の開発に成功した。本検査系は、細胞製剤への混入が懸念されるマイコプラズマ種すべてを 2 時間以内・高感度に検出することが可能である。現在、本検査系の実用化に向けた取り組みを行っている。

**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。

一方、ヒト幹細胞を用いる臨床研究指針では、最終製品に対し「マイコプラズマ汚染を否定すること」と規定されているが、日本薬局法の参考情報には 3 種類のマイコプラズマ検査法が記載されている(培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法、核酸検査法)。しかし、培養法・DNA 染色法は迅速性・簡便性に欠けるためロットを形成しない細胞製剤の検査法として

は不适当である(結果がでるのが細胞の投与後になる)。また、ネステイド PCR 法は増幅産物のキャリーオーバーによる擬陽性反応により安定性に欠ける懸念があり、且つ定性検査法であるため、特にマイコプラズマ汚染が問題となる口腔材料を用いた再生医療の最終製品に対する検査法としては不适当である。さらに、日本薬局方に例示されているプライマーセットでは培養系に混入する可能性があるマイコプラズマすべてを検出することができず(データベース解析の結果)、上記のように擬陽性反応の懸念も大きいこともあり、再生医療の安全性試験として用いるには問題がある。

我々はこれらの問題を解決するため、リアルタイム PCR 装置を使用した 1 段階 PCR による新しいマイコプラズマの PCR 検出法の開発が必要と考え、これまでの研究により構築したマル

チプレックスPCRを活用したウイルス検査系を  
基に、実用的なマイコプラズマ検査法の確立  
を目指した研究開発を行った。

## 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)を使用した。抽出試薬は、EZ-1 Tissue kit  
試薬を使用した。

### 2. 核酸増幅

遺伝子の増幅・検出には LightCycler (ロッ  
シュ)、および ABI-Prism 7300(アプライドバイ  
オシステム)を使用した。

### 3. コントロール

検査系の開発に当たり、下記を微生物をコ  
ントロールとして使用した。

陽性コントロール

- a) *Mycoplasma hyorhinis*
- b) *Mycoplasma orale*
- c) *Mycoplasma pneumonia*
- d) *Acholeplasma laidlawii*

陰性コントロール

- a) *Candida albicans*
- b) *Clostridium perfringens*
- c) *Clostridium sporogenes clone*
- d) *Escherichia coli BL21(DE3)*
- e) *Klebsiella pneumoniae*
- f) *Moraxella lacunata*
- g) *Nocardia carnea*
- h) *Pseudomonas aeruginosa*
- i) *Staphylococcus aureus*
- j) *Streptococcus pneumoniae*
- k) *Treponema denticola*

### l) *Treponema pallidum*

## C. 研究結果

### 1. PCR プライマー・プローブの設計

培養細胞およびヒトからの分離報告がある  
マイコプラズマ、ウレアプラズマ、アコレプラズ  
マ属をすべて検出できる検査系を構築するの  
は難しいと判断し、3 種類の Forward Primer  
(M1,4, 19)、4 種類の Reverse Primer  
(M6,9,13,18)および 2 種類の蛍光標識プロ  
ーブ(M5,17)の 9 種類のオリゴマーを 1 つの検  
査系に投入するマルチプレックス PCR 法を開  
発することとした。各 PCR 系とデータ情報から  
推定した検出可能菌種は下記の通りである。

M1(F)+M18(R)+M17(P): *M. orale* 他 93 種類

M1(F)+M6(R)+M17(P): *M. alvi* 他 2 種類

M4(F)+M6(R)+M5(P): *M. pneumoniae* 他 1 種  
類

M1(F)+M9(R)+M17(P): *U. urealyticum* 他 3 種  
類

M1(F)+M6(R)+M17(P): *U. canigenitalium*

M19(F)+M13(R)+M17(P): *A. laidlawii* 他 1  
種類

Forward , Reverse Primer, Probe の配列情報  
は特許出願のため割愛。

### 2. PCR 条件の検討

上記の 4 種類の陽性コントロールと 12 種類  
の陰性コントロールを使用し、感度、特異性、  
定量性を満足するマルチプレックス PCR  
の至適反応条件を検討した。その結果、下記  
の様な反応条件を見出し、以後の実験はこの  
反応条件で行った。

a) Primer/Probe 濃度 : Primer : 0.5 $\mu$ M、

Probe:0.2μM

b) Master Mix:

Nuclease free water	16.75μl
10X PCR Gold Buffer	5.0
2mM dNTPs	5.0
ROX Reference dye	1.0
25mM MgCl <sub>2</sub>	6.0
Total	33.75μl

c) PCR Reaction mixture (1tube)

Master Mix	33.75μl
Primer/Probe Mix	6.0
2mM dNTPs	5.0
Amplitaq Gold	0.25
Template DNA	10.0
Total	50.0μl

d) PCR Reaction

95°C 10 min

95°C 15 sec 60°C 1 min 45 cycle

3. 検査系の定性的性能評価

上記 PCR 条件によるマルチプレックス法によるマイコプラズマ検出系の性能評価を行った。結果を以下に示す。

a) 陽性コントロールの検出

陽性コントロールとして用いた 4 種類のマイコプラズマはすべて検出可能で、すべて 10 cfu /reaction の検出感度を持ち、増幅効率も満足いくものだった。

*M. orale*

検出限界 5 cfu

増幅効率 98%

*M. hyorhinis*

検出限界 10 cfu

増幅効率 102%

*M. pneumoniae*

検出限界 5 cfu

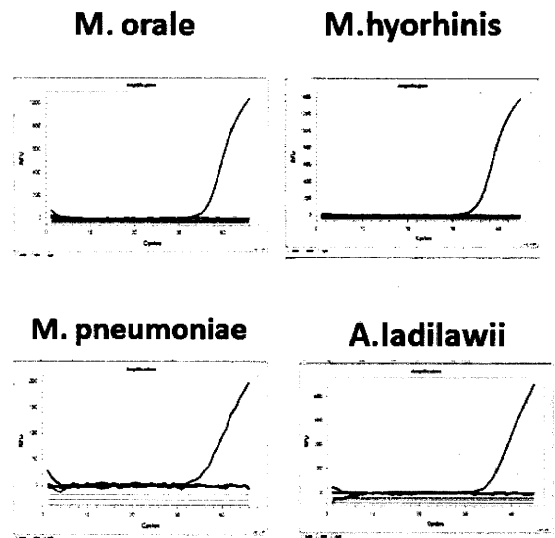
増幅効率 98%

*A. laidlawii*

検出限界 5 cfu

増幅効率 92%

下図は、陽性コントロール 4 種類の実際の測定結果である。4 種類すべてにおいて 10 cfu /reaction に相当するマイコプラズマ DNA を良好に検出できることがわかる。



b) 陰性コントロールの検出

研究方法に記載した 12 種類の真菌・細菌に対する交差反応性の有無を検討したところ、12 種類すべてが陰性となり、マイコプラズマを特異的に検出できることが示された。

4. 検査系の定量的性能評価

作製した新規マイコプラズマ検査系の定量性を評価した。各陽性コントロールを 1,000, 100, 100, 50, 10, 5 cfu 含む定量用サンプルを作製し、リアルタイム PCR 機で定量作業を行

った。その結果、検量線は良好な直線性を示し、本検査系は十分な定量性を持つ事が確認された。

M.oralis: 定量限界 5 cfu

M.hydrophilus: 定量限界 10 cfu

M.pneumoniae: 定量限界 5 cfu

A.laidlawii: 定量限界 5 cfu

#### D. 考察

1. 本研究により、今回作成した新規マイコプラズマ検査系は感度、特異性、定量性の面で満足する性能を持っていることが確認できた。今後実用化を目指すためには、日本薬局法の参考情報に記載されているマイコプラズマ試験と同等以上の性能を持つことを検証していく必要がある。そのためには、代表的菌種を用いた添加回収試験により、感度・特異性などを検証する必要があり、今後実験を行っていく予定である。

2. 新規マイコプラズマ検査系はデータベースレベルでは遺伝子情報が登録されている 106 種類のマイコプラズマが検出可能である。このようなブロードバンド検出は 1 組のプライマーによる通常の PCR 法で実現する事は困難であり、本検査系のようにマルチプレックス法を用いる事で実現可能になる。一般にマルチプレックスPCRは十分な感度を得ることが出来ない欠点があるが、互いに干渉し合わない配列のプライマーを使用する、各プライマーの濃度を微妙に調整するなどの工夫により十分な感度を実現できた。今回作製した検査系は 5~10cfu のマイコプラズマを検出、定量出来る感度を持っている事が示された。データベース

解析から日本薬局方参考情報に記載の核酸増幅検査法に例示されているプライマーよりもはるかに広いマイコプラズマ種をカバーできる予想され、今後実サンプルを用いた検討により実証していきたい。また、参考情報では 2 段階(ネステッド)PCR 法を採用しているが、ネステッド PCR と電気泳動により検出する方法は感度的に優れている反面、何度も検査しているうちにキャリーオーバーによる擬陽性反応が頻発し使用できなくなる事態が予想され、再生医療を行っている現場でこの方法を長期・安定的に運用することは極めて難しいだろう。今回開発した 1 段 PCR 法でしかも電気泳動を行わない方法を使用すれば、キャリーオーバーによる擬陽性反応を十分に抑制できるため、より実用的な検査法である。

3. 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」では、最終製品に対するマイコプラズマおよびウイルス検査を義務付けている。我々はすでに網羅的ウイルス検査系を完成し、細胞治療用細胞製剤の安全性検査や院内の研究臨床検査に活用している。このウイルス検査法もマルチプレックス PCR 法を応用した検査法であり、今回作製したマイコプラズマ検査法と一体化し、ウイルスとマイコプラズマを同時検査する事が原理的に可能であり、現在、同時検査系の開発を進めている。このような迅速検査系が完成すれば、最終製品に関する検査データを製剤を患者に投与する前に入手することが可能になり、治療の安全性を著しく高めることにつながると期待される。

## E. 結論

ヒト幹細胞指針では最終製品に対するマイコプラズマ検査を義務付けているが、日本薬局方参考情報に記載のマイコプラズマ検査法は、迅速性・簡便性・安定性の面で実用性に問題がある。本研究ではこれらの欠点を改善するために、リアルタイム PCR を利用した迅速検査系の開発を行った。その結果、細胞製剤に混入の可能性があるマイコプラズマ種をすべてカバーし、2 時間以内・高感度に検出可能な検査系を完成し、実用化に向けた取り組みを継続している。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Haematol*. Jul 31, 2010 [Epub ahead of print].
2. Nagasawa M, Ogawa K, Nagata K, Shimizu N. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm. *Br J Haematol*. **148**(5):812-814, 2010.
3. Zhang Y, Ohyashiki JH, Shimizu N, Ohyashiki K. Aberrant expression of NK cell receptors in Epstein-Barr virus-positive gammadelta T-cell lymphoproliferative disorders. *Hematology*. **15**(1):43-47, 2010.
4. Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J. Dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral

genome. *Cancer Sci*. **101**(4):876-881, 2010.

5. Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol*. **91**(Pt1):42-50, 2010.
  6. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo Y-M, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, Shimizu N, Ichinohasama R, Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood*. **114**(15):3265-75, 2010.
  7. Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri Y, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J. and Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology*. **128**(3):405-419, 2010.
  8. Chan KK, Shen L, Au WY, Yuen HF, Wong KY, Guo T, Wong ML, Shimizu N, Tsuchiyama J, Kwong YL, Liang RH, Srivastava G. Interleukin-2 induces NF-kappaB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells. *J Pathol*. **221**(2):164-74, 2010.
- ### 2. 学会発表
- #### 国内学会発表
1. 小川学、杉田直、井上静、望月學、片山未来、渡邊健、清水則夫、森尾友宏：ヘルペスウイルスの関与が疑われるぶどう膜炎に対する眼内液 PCR 検査の有用性の検討、第 114 回日本眼科学会、2010 年 4 月 15 日～18 日、名古屋
  2. 小川学、杉田直、井上静、清水則夫、赤尾信明、望月學：PCR 法を用いたアcant・アムバ角膜炎の補助診断、第 21 回臨床寄生虫学会、2010 年 6 月 19 日、東京

3. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、市川紗弓、**清水則夫**、中村浩幸、伊藤守、山本直樹、藤原成悦:EB ウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日～9 日、徳島
4. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、市川紗弓、**清水則夫**、中村浩幸、伊藤守、山本直樹、藤原成悦:EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と解析、第 7 回 EB ウイルス研究会、2010 年 7 月、札幌
5. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、中川温子、新井文子、市川紗弓、森尾友宏、大賀正一、大石勉、**清水則夫**、山本直樹、藤原成悦:EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの政策と病態発現解析、第 20 回 EB ウイルス感染症研究会、2010 年 3 月 19 日、東京
6. 満生紀子、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、高木正稔、梶原道子、長澤正之、峯岸志津子、落合 央、**清水則夫**、森尾友宏、水谷修紀:当科で施行した造血幹細胞移植患者における網羅的 PCR 法による経時的ウイルス、第 32 回日本造血細胞移植学会総会、2010 年 2 月 19 日-20 日、浜松
1. Ogawa M, S. Sugita S, **Shimizu N**, Morio T, Mochizuki M. Use of Human Herpes Virus (HHV) PCR Assays to Detect Viral DNA in Ocular Fluids of Patients with Herpetic Eye Diseases. ARVO 2010. May 2-6, 2010, Fort Lauderdale, Florida.
2. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakagawa A, Kawano F, Ichikawa S, Miura O, Ito M, **Shimizu N**, Yamamoto N and Fujiwara S. A xenotransplant model of chronic active EB virus infection by use of NOG mice. The 14<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases, Sep. 4-7, 2010, Birmingham, UK.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

#### 国際学会発表

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

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

研究分担者 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 持田讓治 東海大学医学部外科学系整形外科学 教授  
佐藤正人 東海大学医学部外科学系整形外科学 准教授  
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  
小林広幸 東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学 教授

**研究要旨**

東海大学においては医学部と付属病院を橋渡しする形で再生医療の実施体制を構築している。基礎的研究は再生学センター、臨床応用のための細胞処理と品質評価は細胞移植再生医療科セルプロセッシング室、細胞の安全性は細胞移植再生医療科安全性評価室、臨床研究の進捗管理は総合臨床研究センターが担当する形で有機的な連携を図っている。

本年度は現在進行中の2つの臨床研究(椎間板再生プロジェクト、軟骨再生プロジェクト)において実施した品質評価、安全性評価のうち感染症関係の評価結果について報告する。

検査対象となった試料は、①患者から採取された組織や細胞(受け入れ時)、②培養途中、③採用終了後患者投与サンプル、などであった。

検査項目は①エンドトキシン、②リアルタイム PCR による各種ウイルスの定量的アッセイ、③リアルタイム PCR 法ならびに細胞培養法によるマイコプラズマ検出、④好気性ならびに嫌気性培養による細菌検出、などであった。

椎間板再生プロジェクトの9例、軟骨再生プロジェクトのシミュレーション2例のいずれにおいても、培養用試料、受け入れ時試料、培養途中、培養後のいずれの検体からもこれらの感染性因子は検出されなかった。

以上より、GMP 基準に準拠して行われている東海大学の2つの再生医療臨床研究における安全性が確認された。

**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。

本年度は具体的な臨床研究として椎間板再生プロジェクトと軟骨再生プロジェクトにおける安全性評価検査の結果を報告する。

## B. 研究方法

### 1. 再生医療臨床研究

#### (1) 椎間板再生プロジェクト

2009年2月から2010年12月までの期間に整形外科の持田譲治教授らのグループにより9例の椎間板変性疾患患者において、髓核細胞を自己骨髓間葉系細胞(MSC)と隔膜接触共培養を行い、活性化された髓核細胞を自家移植する臨床研究が行われた。

検査対象となった試料は以下のとおりであった。

- ① 患者から採取された髓核細胞と骨髓細胞(受入時)
- ② 培養髓核細胞上清(中間管理試験)
- ③ 培養骨髓上清(中間管理試験)
- ④ 投与前日の髓核・骨髓共培養上清(前日試験)
- ⑤ 投与时髓核・骨髓共培養上清(最終産物)
- ⑥ 投与髓核細胞洗浄液(最終産物)

#### (2) 軟骨再生プロジェクト

2010年12月から2011年1月の期間に整形外科の佐藤正人准教授らのグループにより2例の変形性関節症患者において、自己培養軟骨細胞によるシート作成のシミュレーションが行われた。

検査対象となった試料は以下のとおりであった。

- ① 患者から採取された関節軟骨細胞と滑膜細胞(受入時)
- ② 初回培地交換時上清(中間管理試験)
- ③ シート積層時軟骨細胞(中間管理試験)
- ④ 投与前日積層化軟骨細胞(前日試験)
- ⑤ 投与时積層化軟骨細胞(最終産物)

### 2. 感染性因子否定試験

#### (1) エンドトキシン測定

比濁法(日本薬局方)によりエンドトキシンの定量的測定を行った。

#### (2) 無菌検査

好気性ならびに嫌気性培養により細菌汚染否定を行った。

#### (3) マイコプラズマ否定検査

リアルタイムPCR法と培養法(日本薬局方)によりマイコプラズマの否定試験を行った。

#### (4) ウイルス否定試験

リアルタイムPCR法により、HBV、HCV、HIV、HTLV-1、HSV-1、-2、VZV、CMV、EBV、HHV-6、ParvoB19を定量的に測定した。

なお、軟骨再生プロジェクトにおいては国の指針の変更に伴い、HBV、HCV、HIV、HTLV-1についてのみ測定を行った。

### 3. 書類管理

このような安全性評価の業務については綿密な研究計画とSOP(作業手順書)に基づいて実施し、その記録は詳細に記述して厳格に保管している。

また、作業工程毎に定められた試料の保存も厳重に行われている。

### 4. 倫理的事項



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研究を行った。

## C. 研究結果

### 1. エンドトキシン測定

受入時、培養途中ならびに投与時のいずれのサンプルにおいてもエンドトキシンは検出限界以下であった。

### 2. 無菌検査

受入時、培養途中ならびに投与時のいずれのサンプルにおいても細菌が培養されることはなかった。

### 3. マイコプラズマ否定試験

受入時、培養途中ならびに投与時のいずれのサンプルにおいてもマイコプラズマは陰性であった。

### 4. ウイルス否定試験

受入時、培養途中ならびに投与時のいずれのサンプルにおいてもウイルスは検出されなかった。

### 4. 資料と試料の保管

一連の作業工程の資料についてはそれぞれの担当者により作業記録が作成され、作業工程毎に定められた試料の保存も実施されたが、このようなGMP準拠の作業と管理には膨大な時間と労力が必要であった。

## E. 結論

東海大学でGMP基準に準じて実施されている椎間板再生医療プロジェクトと軟骨再生医

療プロジェクトにおける安全性評価のうち感染性因子否定試験について報告した。

GMPに準拠した細胞処理を実施するために作成し、国の承認を受けたSOPを守りながら作業を行った結果、作業過程における感染性因子の混入や汚染はまったく検出されなかった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, **Kato S**. Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood*. **115**(13):2723-4, 2010.
2. Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, **Kato S**, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood*. **116**(8):1369-76, 2010.
3. Tomita Y, Yasuda Y, Hyodo H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Kojima S, Minemura T, **Kato S**. High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Jun 21 [Epub ahead of print]
4. Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, Kodo H, Kai S, Sato H, Kohsaki M, Azuma H, Tanaka H, Ogawa A, Nakajima K, **Kato S**. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations.

*Blood*. 116(15):2839-46, 2010. [Epub ahead of print]

5. Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Arakawa S, **Kato S**, Yabe H. Therapy-related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient 17 years after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Sep 27. [Epub ahead of print]
6. Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Sugauma E, Sugiyama N, **Kato S**, Yabe H. Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Oct 18. [Epub ahead of print]
7. 渡辺修大、足立壮一、堀部敬三、永利義久、加藤剛二、田渕 健、吉見礼美、**加藤俊一**、矢部普正. 日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)SCT 委員会 小児急性骨髄性白血病第一寛解期での HLA 一致同胞間骨髄移植における GVHD 予防(MTX 単独 vs. CyA 群)の比較 日本小児血液学会雑誌 24(1): 32-36,2010.
8. 加藤俊一. よくわかる造血細胞移植コーディネート. 医薬ジャーナル社 pp1-2.2010年(編集)
9. 加藤俊一 よくわかる小児の造血細胞移植 医薬ジャーナル社 2010年(監修および共著)

## 2. 学会発表

### 国内学会発表

1. Yabe H, Yabe M, **Kato S**, Koike T, Takakura H, Hyodo H, Tomita Y, Ishiguro H, Shimizu T, Morimoto T, Akiba T. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for aplastic anemia. 第 72 回日本血液学会総会、2010 年 9 月 24 日-27 日、横浜

### 国際学会発表

1. Kamiya S, Yonezawa H, Woo T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, **Kato S**, Osaki T.

Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its pathogenesis. 33<sup>rd</sup> International Congress on Microbial Ecology and Disease. Sep. 6-10, 2010, Athen, Greece.

2. **Kato S**. Cord blood banking and cord blood transplantation in children in Japan. 22<sup>nd</sup> International Congress of Pediatrics. Oct.14-18, 2010, Tehran, Iran.
3. Koike T, Yanagimachi N, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Ishiguro H, Takakura H, **Kato S**. High incidence of radiation induced cavernous hemangioma in long term survivors who underwent BMT with radiation therapy during childhood or adolescence. 2011 BMT Tandem Meeting. Feb. 17-21, 2011, Honolulu, USA.
4. Koike T, Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, **Kato S**, Yabe M. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for Fanconi anemia. 22<sup>nd</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct. 21-24, 2010, Minneapolis, USA.
5. Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, **Kato S**, Yabe M. Long-term follow-up after unrelated bone marrow transplantation in a patient with dyskeratosis congenita. 22<sup>nd</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct.21-24, 2010, Minneapolis, USA.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
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

再生医療に応用できるウイルスの網羅的検出法の確立

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所血液安全性研究部 部長  
研究協力者 水谷哲也 国立感染症研究所ウイルス一部 主任検査官  
野島清子 国立感染症研究所血液安全性研究部 研究員

**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。昨年までに我々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ので、本年度は再生医療に即した検体を用いて、既知・未知のウイルスの検出を試みた。本研究では、ウイルス特異的なプライマーを用いた PCR、次世代型シーケンサーを用いた網羅的解析をおこなった。

**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。また、我々は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ている。そこで、最終年度は、こ

れらの方法により臨床検体を解析することを試みた。

さらに、近年、シーケンステクノロジーの発展により次世代型シーケンサーによる遺伝子の網羅的解析が盛んになってきた。そこで、本研究においても、ロシュ社の FLX を用いた解析をおこなった。

**B. 研究方法**

コンベンショナル PCR 検出系: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)や、昨年度の本研究において追加したウイルスをベースにした解析をおこなった。本研究では、貴重な検体のため、一度 DNA をランダム増幅してからコンベンショナル PCR を実施した。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た。

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。一部は、nested PCR による解析をおこなった。

HHV-6 と HHV-7 の PCR: 上記のコンベンショナル PCR に加えて、HHV6 および HHV7 については、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに準じて nested PCR による詳しい解析をおこなった。PCR 反応は、TakaRa Ex-Taq を用いて 1st PCR, 2nd PCR とも、94 度 10 秒、55 度 30 秒、72 度 60 秒で 32 サイクルおこなった。

次世代型シーケンサーによる解析: DNA をタカラバイオに送付し、ロシュ社の Genome Sequencer FLX System による受託解析を実施した。

### C. 研究成果

本研究では、東京医科歯科大学および国立感染症研究所において倫理委員会で承認された研究計画に従って実施した。検体は、東京医科歯科大学医学部付属病院・細胞治療センターにおいて膵臓癌(#1)および移植ドナー(#2)の血球を培養して得られた DNA を出発材料とした。

コンベンショナル PCR では、CMV, HSV1/2, EBV, VZV, HHV6, HHV7, HHV8, アデノ随伴ウイルス 2, 同 5, 同 13, WU ポリオーマウイルス, パルボウイルス B19, パピローマウイルス 16, 同 18, 同 31, 同 52, TTV, JCV, HBV, ポカウイルス, アデノウイルス, 他に、広くヘルペスウイルス, アデノウイルス, ポリオーマウイルスを検出できるプライマーセットを用いた PCR を実施したが、すべて陰性であった。

一方、次世代型シーケンサーによる解析

については、#1 と #2 で、解析総リード数が 40,430 および 39,756、また、解析総塩基数がそれぞれ 13,392,476 および 13,164,201 であり良好に解析された。それぞれのリードは、NCBI の GenBank において相同性検索をおこない、トップヒットしてくる遺伝子を表示した。その結果、内在性のレトロウイルスについては両検体ともに検出されていたが、その他のウイルスは陰性であった。しかしながら、この解析においては、GenBank に登録されている遺伝子と相同性をもたない、いわゆる unknown と表示される遺伝子が約 200 ほどあり、この中に未知の病原微生物の遺伝子断片が含まれている可能性を否定できない。

RDV 法については、現在実施中である。

### D. 考察

本研究では、これまでに研究班では確立してきたウイルスの網羅的検出法を用いて、臨床検体を培養した後に抽出した DNA についての解析を実施した。

RDV 法は現在解析中であり、この報告書に記載することはできなかったが、コンベンショナル PCR や次世代型シーケンサーを用いた解析をおこなうことができた。今回の 2 検体については、どちらからもウイルスの遺伝子は検出できなかった。しかし、内在性レトロウイルスの遺伝子断片は多数検出されていた。一方、どの遺伝子とも相同性を持たない遺伝子断片も多数見つかったので、今後はこれらについて Genome walking などをおこない、更なる核酸情報を得て、微生物のゲノムの一部であるかについて検討を加えていきたい。

### E. 結論

今年度の研究において、再生医療や細胞