

い、培養を継続したものについても標本を作製して解析を行った。

PMA は培養の最終 2 日間に 5ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL の最終濃度で添加した。また一部の細胞においては 10 から 11 日間骨細胞への誘導処理を行った。

解析分子 : phospho-ATM, phospho-p53, phospho-chk2, ATR, phospho-chk1, AID

3. テロメア長の解析

Telomere 長については、Telomere PNA kit/FITC for Flow Cytometry (DAKO)を用いて検討した。この系ではコントロール 4 倍体細胞より得られた蛍光強度と検体での蛍光強度を比較することにより、検体の平均テロメア長を求めることができ、また培養後にテロメア長が保持されているものをスポットとして検出することができる。

4. 高感度多項目生理活性物質測定システムとして、Luminex 法を用いた培養細胞上清のサイトカイン(下記)産生の検討を行った。一部のサイトカインについては、ELISA 法を併用した。

IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-15, IL-13, IL-17, IL-21, G-CSF, GM-CSF, IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma, MCP-1(MCAF), MIP-1beta, TNF-alpha, sRANKL, VEGF, sE-selectin, EGF, FGF basic, IGFBP-2, BMP-2

(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。

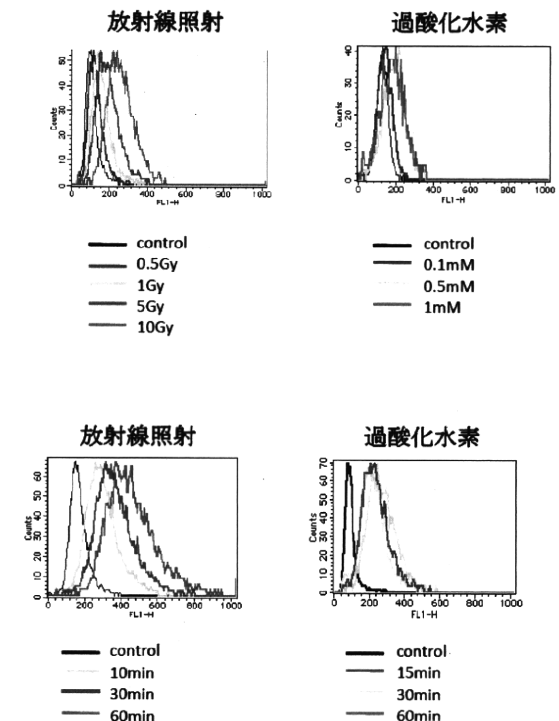
C. 研究結果

1. DNA 損傷反応検出システム

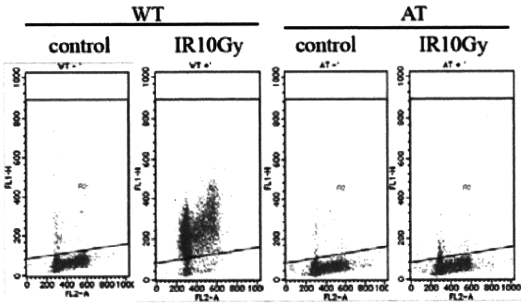
(FACS を用いた方法)の開発と検証

(1)pATM-7-AAD 解析

図に示すごとく、放射線照射後、あるいは過酸化水素処理後に、濃度依存的、かつ、時間依存的な pATM 発現が認められた。

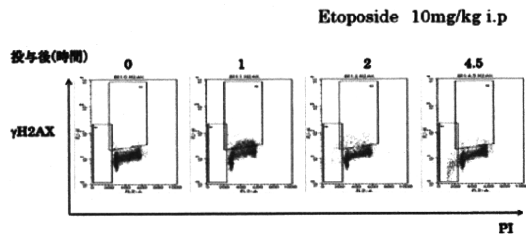


活性化 T 細胞では、無刺激ではほとんど pATM 発現が認められないが、刺激により著しい DNA 損傷反応が検出された。一方図の右では毛細血管拡張性小脳失調症 (ATM 異常症)での解析結果を示している。この結果より、特異的な反応を検出していることが示された。



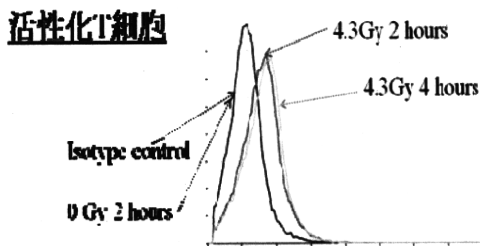
(2).マウス腹腔内へのエトポシド投与後のDNA 損傷修復反応の解析

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



(3)細胞内 phospho-p53 染色

図に示すごとく、放射線照射後に p-p53 発現が認められた。

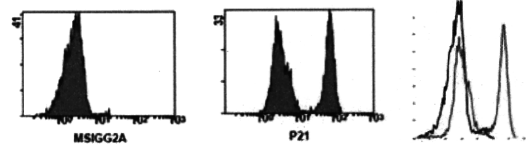


予備的な実験ではまた、培養状態が悪い(増殖停止に至る前の)細胞において、phospho-p53の発現が更新していることが確認された。

(4)細胞内 p21 染色

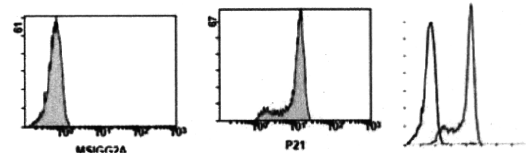
また同様に、EBV-LCL を用いた検討では、細胞周期回転が停止する際に検出されると想定される p21 も検出が可能であった。

EBV LCL



しかし、増殖活性化 T 細胞においては、以下のごとく未刺激状態から細胞質内 p21 の発現が認められ、今後は脱核して検討する必要性がある。

活性化T細胞



(5)実培養細胞を用いての検討

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 種類の異なった検体で解析し、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。

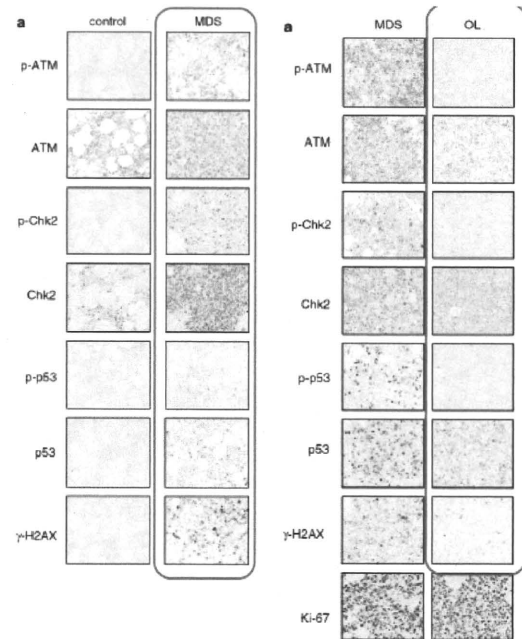
2. DNA 損傷反応検出システム

(免疫染色を用いた方法)の開発と検証(1)染色法の確立

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

図に示すように MDS の状態では、DNA 損

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

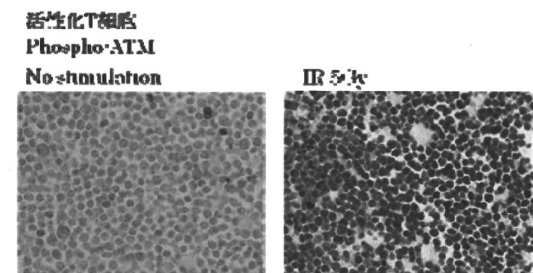


(Leukemia 2009)

(2) 付着細胞系での DNA 損傷応答の検討

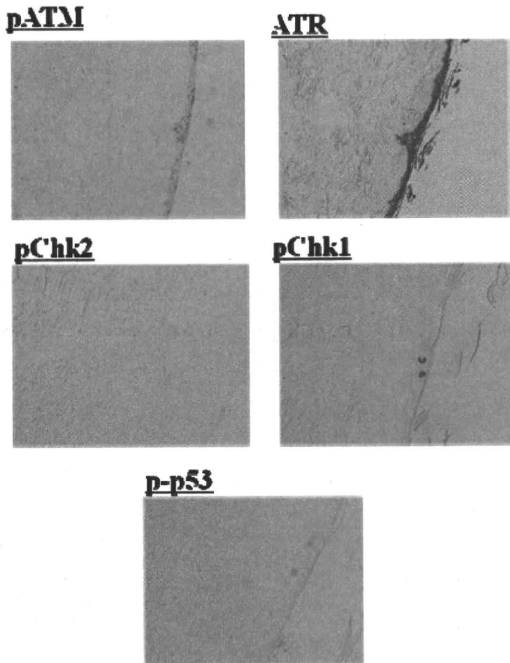
新潟大学にて作成した培養口腔粘膜、培養骨膜細胞標本を用いて、DNA 損傷応答分子の染色を行った。

以下に示すように活性化 T 細胞においてはほとんど p-ATM の発現を認めず、DNA 損傷後に検出された。用量としては、0.5Gy 以下でも十分な検出が得られた。



以下に骨膜細胞における代表的な染色パターンを示す。

骨膜細胞培養(正常増殖)



図に示すように培養の先端部において、phospho-ATM, ATR の発現が確認されたが、一方 Chk2, Chk1, p53 のリン酸化は検出されなかった。口腔粘膜培養細胞においても同様の結果が得られており、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)と考えられる。

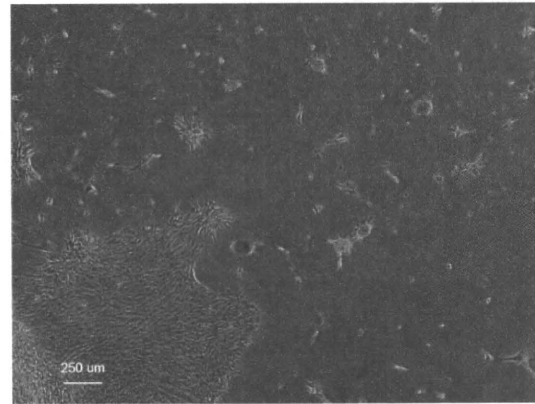
(3) 実培養細胞における発展的解析

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(新潟大学にて培養)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、これに関しては骨膜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、

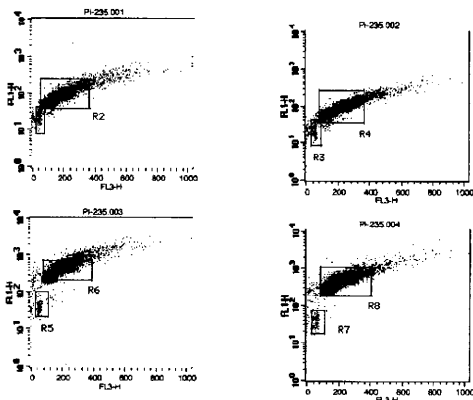
*臍帯血増殖 T 細胞: 10.6±2.0

*末梢血 T 細胞: 8.8±1.8

*末梢血増殖 T 細胞: 8.2±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)

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

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

まず、増殖活性化 T 細胞の培養上清を用いて、検討を行った。検体としては、(1)末梢血から増幅し、増殖良好のもの、(2)同様の増幅で増殖不良のもの、(3)臍帯血から増幅し、増殖良好のもの、(4)臍帯血から増幅し増殖不良のものを用いた。

その結果臍帯血では IL-17 産生が不良であるという以前からのデータに加えて、以下の異同が認められた。

A: 同等の発現が認められるもの

IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF-alpha, G-CSF, GM-CSF, MIP1-beta

B: 増殖不良群で発現が低下するもの

IL-6, IL-8, MCP-1

C: 増殖不良群で発現が更新するもの

IL-17

さらに、付着細胞系での培養上清を測定すべく、骨膜細胞培養での上清を集め、増殖良好群、不良群、PMA 刺激を加えたものでのサンプルを用意した。そして、最終年度には、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				sup51	4.3	8.1	
PO29(1)	0.0			sup52	6.9	0.0	
PO29(2)	0.0			sup53	21.9	3.2	
PO30(5)	0.0	2.4		sup70	0.6	8.9	
PO30(5)	0.0	0.0		sup71	1.5	5.7	
PO30(33)	0.0	0.0		sup72	0.6	7.3	
PO30(19)	0.0	0.0		sup73	0.3	8.9	
PO30(20)	0.0	0.0		sup74	0.0	0.0	
PO31(14)	0.0	0.0		sup75	0.0	3.2	
PO31(14)	0.0			sup76	3.9	9.7	
新潟培地	0.0	0.0		sup77	6.6	4.9	
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					

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	OOB <	8.5	2.9	37.4	43.8	22109.5	16.2	OOB <	206.9	1358.1	3.4
PBL 良好	OOB <	OOB <	8.5	41.0	37.3	8824.2	14.2	41.5	113.1	1340.9	1.2
PBL 良好	OOB <	OOB <	8.4	38.7	39.8	8770.9	13.3	OOB <	92.7	1347.4	0.9
CB 普通	OOB <	2.4	4.4	39.5	42.4	11160.4	11.6	3.5	113.8	1271.1	2.0
CB 増殖ストップ	OOB <	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	OOB <	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	OOB <	2.4	7.1	37.2	36.6	20598.1	11.6	6.4	185.6	1273.3	1.0
CB 普通	OOB <	4.2	5.2	24.8	25.0	10369.8	5.0	14.7	98.9	1203.9	0.1
CB 増殖不良	OOB <	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	OOB <	4.2	7.1	35.9	33.3	15633.7	9.9	6.4	153.7	1125.5	0.3
Medium 増殖	OOB <	4.2	5.8	37.9	36.0	11.0	11.6	1.3	OOB <	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	OOB <	8.5	OOB <	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	45.0	9.9	461.4	102.0	121.1	7.1
PMA50	1.2	9.9	6.5	4.8	4.7	63.4	18.9	416.4	99.7	103.0	6.1
Control(骨髄導)	OOB <	OOB <	2.1	3.0	OOB <	12.2	1.2	34.8	11.2	82.6	7.4
PMA5	1.5	17.1	3.7	5.8	7.8	45.0	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	OOB <	7.5	OOB <	1.4	OOB <	45.0	1.9	140.2	41.7	58.4	6.8
PMA0.5	1.4	10.6	OOB <	5.8	4.7	42.7	8.9	368.7	92.5	112.3	16.0
PMA1	1.9	11.8	5.2	7.8	8.8	42.7	9.9	567.8	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	10.8	OOB <	7.2	8.8	56.5	23.4	357.4	91.7	137.7	7.3
Control(骨髄導)	OOB <	4.2	OOB <	1.4	OOB <	9.8	OOB <	9.0	OOB <	OOB <	7.3
PMA0.5	9.4	7.5	OOB <	4.4	5.8	56.5	11.8	311.6	74.6	129.6	8.6
PMA1	OOB <	13.3	OOB <	4.4	2.2	24.1	1.2	180.4	47.0	58.4	7.0
PMA5	OOB <	7.5	OOB <	3.0	2.2	26.4	2.6	265.2	69.9	93.2	8.7
PMA50	OOB <	10.8	OOB <	2.2	6.8	28.8	3.8	103.9	40.5	58.4	29.9
Medium	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	24.3	4.7
Good	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	21.2	5.4	OOB <	24.3
Good	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	14.6	7.0	165.2	53.5	OOB <	3.4
Detached	OOB <	2.4	OOB <	OOB <	2.2	OOB <	40.1	3.5	OOB <	24.3	5.0
Poor Prolif	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	73.1	OOB <	OOB <	OOB <	4.9
Many floatants	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	2.2	33.5	151.9	108.8	37.5	24.3	4.7
Good	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	8.5	4.5	OOB <	24.3	6.4
Good	OOB <	OOB <	OOB <	OOB <	2.2	19.4	5.0	11.5	6.9	OOB <	6.0

D. 考察

1. DNA 損傷応答解析システムの確立

浮遊細胞系では、リン酸化 ATM, リン酸化 p53, gamma-H2AX, p21 及び細胞周期・死細胞の検討が行えることが判明した。これから悪性腫瘍化するためには、さらなる DNA 損傷反応の乗り越えが必要であるが、今後明らかに反応が更新している培養条件があれば、*in vitro* 長期培養系あるいは移植系において、腫瘍が発生しないかを検討することが可能と思われる。

この方法はまた、DNA 損傷異常症のヘテロ異常者解析にも有用である。文献的には、例えば ATM ヘテロ異常症においては、白血病、ホジキン病、乳癌などのリスクが高いとされており、これらの培養前からの検出が、より DNA 損傷の少ない手法の選択などにつながるものと期待される。

手法が確立したことを受けて、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した。

その結果、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。

リン酸化 Chk2, リン酸化 Chk1 についても検討したが、感度の点ではリン酸化 ATM, リン酸化 p53 が優れている。リン酸化 Chk1 については一本鎖 DNA 切断による ATR 系を検出できるというメリットがあるが、UV 刺激においてもその発現は検出限界ぎりぎりであった。

今後これらの検査データを活かして、浮遊系細胞においては FACS により、phospho-ATM, phospho-p53, gamma-H2AX, p21, 7-AAD, Annexin-V などの多重染色によって複数以上の分子が検討できるシステムが確立できると考えられる。

3 年間の実験において、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における検討も行われている。これらの細胞では、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た。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。

2. テロメア長の測定

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トリー法という、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。

3. 標準細胞規格検証システム

Bio-Plex を用いた浮遊細胞系の検証では、T 細胞では、意外にもいわゆる Th1, Th2, Treg などの産生するサイトカインではなく、IL-6, IL-8, MCP-1 など T 細胞以外が主たる産生細胞であるもの、Th17 が産生する IL-17 などが指標となることが明らかになった。このことは、候補となる分子については最初に体系的にスクリーニングを行うことが重要であることを示唆する。

培養 T 細胞においては 28 種類のサイトカインを測定したが、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。

さらに最終年度には 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。

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た。FACS 法は簡便かつ短時間で行うことができ、免疫染色法も 48 時間以内の検査が可能である。あわせ

て、この系を用いれば、ATM ヘテロ異常症を含め、様々な DNA 損傷修復が十全ではないハイリスク群(人口の 2-3%程度)も抽出できる。

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において、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。測定意義の高いサイトカインだけに絞り込むことにより、比較的安価に解析できる。

また既知の標準的マーカーとの組み合わせにより、製品標準書に記載可能な、定量的な数値をあげることができると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida H, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, **Morio T**, Ozono K. Ex vivo-expanded donor CD4(+) lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient graft-versus-tumor effect. *Pediatr. Blood Cancer*, 2009 [Epub ahead of print]
2. Yamamoto S, Sugita S, Sugamoto Y, Shimizu N, **Morio T**, Mochizuki M. Quantitative PCR for the detection of genomic DNA of Epstein-Barr virus in ocular fluids of patients with uveitis. [Journal Article] *Japanese*

- Journal of Ophthalmology*. 52(6):463-7, 2008.
3. Honda M, Takagi M, Chessa L, **Morio T**, Mizuatni S. Rapid diagnosis of ataxia-telangiectasia by flow cytometric monitoring of DNA damage-dependent ATM phosphorylation. *Leukemia*. 23(2) 409-14, 2009.
4. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyana M, Miyata K, Shimizu N, **Morio T**, Mochizuki M. Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *Br J Ophthalmol*. 92(4):505-8,2008.
5. Suzuki K, Tsugawa K., Oki E, **Morio T**, Ito E, Tanaka H. Vesical varices and telangiectasias in a patient with ataxia telangiectasia. *Ped. Nephrol*. 23: 1005-1008, 2008.
6. **Morio T**, Kim H. Ku, Artemis, and Ataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage. *Int J Biochem Cell Biol*. 40:598-603, 2008.
7. Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, Takai T, Kodama T, **Morio T**, Geha RS, Kitamura D, Kurosaki T, Ellmeier W, Takayanagi H. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell*. 132: 794-806, 2008.
8. Takahashi N, **Morio T**. Common variable immunodeficiency. *Japanese Journal of Clinical Immunology*. 31(1):9-16, 2008.
9. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, **Morio T**, Sugamoto Y, Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol*. 92:928-32, 2008.
10. Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, Nuno H, Ochiai H, **Morio T**, Kosaka Y. Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 87:88-90, 2008.

11. 木戸さやか、杉田 直、二神百合、堀江真太郎、佐々木秀次、望月 學、清水則夫、**森尾友宏**:ステロイド点眼治療中に樹枝状角膜炎を合併したヘルペス性角膜内皮炎の4例、臨床眼科 **62**:1061-1065,2008.
12. Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, hisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, **Morio T**, Mizutani S. Autopsic study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD). *Acta Neuroathologica*. 2010. (in press).
13. Nanki T, Takada K, Komano Y, **Morio T**, Kanegane H, Nakajima A, Lipsky PE, Miyasaka N. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. **11**(5):R149,2009 Oct 5. [Epub ahead of print]
14. Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, **Morio T**, Miyata K, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol*. 2009 Sep 3. [Epub ahead of print]
15. Hasegawa D, Kaji M, Takeda H, Kawasaki K, Takahashi H, Ochiai H, **Morio T**, Omori Y, Yokozaki H, Kosaka Y. Fatal degeneration of specialized cardiac muscle associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Int*. **51**:846-8, 2009.
16. Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, **Morio T**, Shimizu N, Fujimoto J, Fujiw ara 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**:405-419, 2009.
17. Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, **Morio T**, Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okimoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T, Nonoyama S. *J. Pediatr*. **155**: 829-833, 2009.
18. **Morio T**, Takahashi N, Watanabe F, Honda F, Sato M, Takagi M, Imadome KI, Miyawaki T, Delia D, Nakamura K, Gatti RA, Mizutani S. Phenotypic variations between affected siblings with ataxia- telangiectasia: ataxia-telangiectasia in Japan. *Int. J. Hematol*. **90**:455-462, 2009.
19. Isoda T, Ford A, Tomizawa D, van Delft F, De Castro DG, Mitsui N, Score J, Taki T, Takagi M, **Morio T**, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**: 17882-5, 2009.
20. Uchisaka N, Takahashi N, Sato M, Kikuchi A, Mochizuki S, Imai K, Nonoyama S, Ohara O, Watanabe F, Mizutani S, Hanada R, **Morio T**. Two brothers with ataxia-telangiectasia-like disorder with lung adenocarcinoma. *J. Pediatr*. **155**:435-438, 2009.
21. Futagami Y, Sugita S, Fujimaki T, Yokoyama T, **Morio T**, Mochizuki M. Bilateral anterior granulomatous keratouveitis with sunset glow fundus in a patient with autoimmune polyglandular syndrome. *Ocul Immunol Inflamm*. **17**:88-90, 2009.
22. Takahashi N, Matsukoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Azuma M, Lee S-K, Mizutani S, **Morio T**. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T-cell populations in ICOS deficient patients. *Immunol*. **182**:5515-5527, 2009.
23. Yoshida H, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, **Morio T**, Ozono K. *Ex vivo*-expanded donor CD4 T lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient Graft-versus-Tumor effect. *Pediatr Blood Cancer*. **52**:895-897, 2009.
24. 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.
25. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsui 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.

26. 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.

27. 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

28. 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.

29. Okamoto K, Iwai Y, Ohhora M, Yamamoto M, **Morio T**, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. Ikbz regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature*. **464**:1381-1385, 2010.

30. 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, Hoenig 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.

2. 学会発表

1. **Morio T**, Watanabe F, Takahashi N, Sato M, Sato R, Takagi M, Imadome K, Miyawaki T, Domenico Delia, Nakamura K, Richard Gatti, Mizutani S. Ataxia-Telangiectasia in Japan: Phenotypic variations in affected siblings with Ataxia-Telangiectasia. Ataxia

telangiectasia workshop 2008, Ohtsu, April 22-25, 2008.

2. **Morio T**. Ataxia telangiectasia: Involvement of ATM in immunodeficiency and leukemogenesis. Symposium on Recent Advances in Cell Function and Defense Mechanism, Seoul, April 18, 2008.

3. **Morio T**. Immunodeficiencies with impaired DNA damage response. Recent Advances in DNA Damage Response, Seoul, April 18, 2008.

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

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

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

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

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

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

10. **森尾友宏**、大山 敦、峯岸志津子、高木正稔、水谷修紀: 細胞加工過程における DNA 損傷反応の検出、平成 21 年度厚生労働科学研究 再生医療実用化研究推進事業「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 2 回班会議 (研究代表者森尾友宏)、2010 年 3 月 6 日、東京

11. **Tomohiro Morio**: Infusion of Ex-vivo Expanded Donor T-Lymphocytes for Intractable Infections and Leukemia. 第 32 回日本造血細胞移植学会シンポジウム「Cell Therapy for

Intractable Infections and Malignant Diseases」、2010年2月19日～20日、浜松

12. **Tomohiro Morio**: Common variable immunodeficiency (CVID): Molecular basis of immune dysfunction The 2nd Symposium for PID in Asia. February 4-5, 2010, Kazusa Academia Hall

13. **森尾友宏**:分類不能型免疫不全症の全国調査と亜群同定、第3回日本免疫不全症研究会、2010年1月31日、東京

14. **森尾友宏**、渡辺信和、高橋聡、中内啓光:HLA-Flow法による SCID-臍帯血ミニ移植後のキメリズム解析、平成21年度厚生労働省難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」班会議(研究代表者原 寿郎)、2010年1月29日、東京

15. 梶原道子、**森尾友宏**:*ex vivo* 増殖臍帯血 T 細胞 輸注療法臨床試験プロトコール、平成21年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」第二回班会議(研究代表者加藤俊一)、2010年1月30日、東京

16. 清水則夫、**森尾友宏**:造血細胞移植後微生物モニタリングシステムの改良と普及に向けて、平成21年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」班会議(研究代表者谷口修一)、2010年1月31日、東京

17. 清河信敬、恩田恵子、今留謙一、矢島美佐子、中村宏紀、片桐洋子、**森尾友宏**、藤本純一郎、藤原成悦:ドナーリンパ球輸注を目的とした臍帯血由来活性化 CD4 細胞の性状解析、第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月2日～4日、大阪

18. **森尾友宏**、水谷修紀:Basic to Clinical: Artemis/Cernunos/Lig4 deficiency、第51回日本小児血液学会、2009年11月27日～29日、東京

19. 満生紀子、遠藤明史、小野敏明、高木正稔、長澤正之、**森尾友宏**、水谷修紀:当科における原発性免疫不全症に対する骨髄非破壊的前処置による移植の検討、第51回日本

小児血液学会 2009年11月27日～29日、東京

20. 遠藤明史、満生紀子、小野敏明、高木正稔、長澤正之、**森尾友宏**、水谷修紀:RISTにて臍帯血移植後、TMA、血球貪食症候群を発症し死亡した X 連鎖重症複合型免疫不全症の1例、第51回日本小児血液学会、2009年11月27日～29日、東京

21. **森尾友宏**:*ex vivo* 増殖臍帯血 T 細胞輸注療法の臨床研究、政策創薬総合研究事業平成21年度「臍帯血 DLI の実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ」(研究代表者藤原成悦)、2009年10月20日、東京

22. 満生紀子、大川哲平、高橋考治、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、落合央、峯岸志津子、高木正稔、梶原道子、長澤正之、**森尾友宏**、水谷修紀:RISTによる非血縁臍帯血移植を施行した SCID3 例、小児 H-SCT 研究会、2009年10月9日、東京

23. **森尾友宏**、松本耕一郎、落合央、峯岸志津子、清水則夫:891 検体の T 細胞調製におけるウイルス解析、平成21年度厚生労働科学研究 再生医療実用化研究推進事業「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1回班会議(研究代表者森尾友宏)、2009年9月5日、東京

24. **森尾友宏**、大山敦、峯岸志津子:培養細胞における DNA 損傷修復反応の検出、平成21年度厚生労働科学研究 再生医療実用化研究推進事業「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1回班会議(研究代表者 森尾友宏)、2009年9月5日、東京

25. 長澤正之、小野敏明、遠藤明史、青木由貴、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、**森尾友宏**、水谷修紀:当科における同種造血幹細胞移植(1995-2007年)の検討、第112回日本小児科学会学術総会、2009年4月17日～19日、奈良

26. **Morio T.** Btk Controls ROS Production and Apoptosis in Human Neutrophils. XIVth meeting of the European Society for

Immunodeficiencies. Isutanbul, Republic of Turkey, 2010年10月6日-9日

27. 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, Kobe, Japan, 2010年8月22日-27日

28. 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 Kobe, Japan, 2010年8月22日-27日

29. **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

30. 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

31. **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

32. **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

33. **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

34. **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

35. **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

36. **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、平成22年度厚生

労働省科学研究 再生医療実用化研究事業「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(研究代表者 森尾友宏)、第一回班会議、2010年9月4日、東京

37. **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、平成22年度厚生労働省科学研究再生医療実用化研究事業「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

38. **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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. APPLICATION OF SYNOVIUM-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) FOR CARTILAGE OR MENISUCUS REGENERATION (米国国際特許出願中YCT-1301) 出願人: 関矢一郎、発明者: 宗田大、**森尾友宏**、清水則夫、黒岩保幸

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

平成 20～22 年度厚生労働科学研究・再生医療実用化研究事業
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

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。本研究では、ウイルス、細菌とマイコプラズマ同時・迅速検査系の構築を目指し、マルチプレックス PCR 法を応用した 16SrRNA 遺伝子検出による網羅的細菌検査系、12 種類のウイルス検査系と培養系への混入が懸念されるすべてのマイコプラズマ種の検査系を作製した。作製した検査系を組み合わせて使用することにより、様々なタイプの再生医療用細胞製剤の品質管理試験を一度の検査で行う事が可能になる。本検査系を実用化するためには、試薬の標準化とキット化が必須であり、現在開発を継続して進めている。

A. 研究目的

再生医療を実用化するためには、治療に使用する細胞製剤の品質管理システムの構築が極めて重要である。なかでも、生きた細胞を治療に使用するため細胞製剤に滅菌操作を加えることができない再生医療の特質から微生物検査の重要性は非常に高く、高い感度・信頼性と迅速性を兼ね備え、さらに安価に検査できる新しい検査系の確立が必須である。本研究では、これまでの研究開発によりすでに構築した微生物検査法を基に、様々な微生物種の検査を同時・迅速に行える検査系の確立を目的に研究を行った。検査対象微生物としては、12 種類のウイルス(HSV1, 2, VZV, EBV, CMV, HHV6, 7, 8, PVB19, BKV, JCV, XMRV)、細菌、マイコプラズマを選択した。

B. 研究方法

1. 検体からの DNA 抽出

DNA の抽出には核酸抽出機 EZ-1(キアゲン)を使用し、EZ-1 Virus Kit Ver.2.0 Card を使用した。抽出試薬は、ウイルス検出には EZ-1 Virus kit を、細菌の検出には EZ-1 Tissue kit 試薬を使用した。

2. 核酸増幅

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

3. ウイルス遺伝子の増幅

ウイルス検査項目は、HSV1,2,VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, ParvoB19, XMRV の 12 種類とし、インナーコントロールとし

て β -globin を使用した。

PCR 試薬 : AccuPrime Taq DNA Polymerase System、Invitrogen社

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

HSV1,2

F-gctcagtgcgaaaaaacgttc

R-tgcggtgataaacgcgcagt

LCRed640-cttgccccgcagatgacgcc-p
gcgaccagatccacgcccttgatgagc-FITC

VZV

F-tgtcctagaggaggtttatctg

R-catcgtctgtaagacttaaccag

LCRed705-aagttcgggtataattgt-p
gggaaatcgagaaccaccctatccgac-FITC

CMV

F-taccctatcgctgtgttc

R-ataggaggcgccacgtattc

LCRed705-acaccacttatctgctgggcagc-p
cgtttcgtctgtagctacgcttacat-FITC

EBV

F-cgcataatggcggacctag

R-caaacaagcccactcccc

LCRed640-aaccatagaccgcttctctg-p
aaagatagcagcagcgcagc-FITC

HHV6

F-accggagagatgattttgcg

R-gcagaagacagcagcgagat

LCRed640-gggtcatttatgttatagacgtt-p
taagtaaccgttttctccca-FITC

HHV7

F-gaaaaatccgcataatagc

R-atggaacacctattaacggc

LCRed705-ttgtgaaatgtgttgcatagggc-p
gccataagaacaggtacagacattgtca-FITC

HHV8

F-agccgaaaggattccacat

R-tccgtgtgtctacgtccag

LCRed640-tgatctatataccaccaatgtgtcattatg-p
ccggatgatgtaaatatggcggaac-FITC

ParvoB19

F-ccgccaagtacaggaaaaac

R-cagctacactccaagca

LCRed640-caccaggtagatcaaaaaatcggtgga-p
gcaaaagccatttttagcgggca-FITC

BKV、JCV

F-cacttttggggacctagt

R-ctctacagtagcaagggatgc

LCRed705-agtagctgaaattgctgctggagaggctgct-p
tctgaggctgctgctgccacagatttt-FITC

XMRV

F-atgtgactgagacctgcaccg

R-acttccgtgaaatcaactccc

6FAM-tgcgagtacgcggacatcggc-iowaBK

PCR反応 : 95°C2分処理の後、95°C2秒、58°C15秒、72°C15秒の反応を50サイクル行なった。

4. 細菌16SrRNA遺伝子の増幅

プライマー・プローブ配列

Primer: F-aggcagcagtDRggaat

Primer: R-ggactacYVgggtatctaat

Probe: FAM-tgccagcagccgcgtaata

cRDag-iowaBK

反応条件

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

た。

5. マイコプラズマ遺伝子の増幅

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。

陽性コントロール

a) *Mycoplasma hyorhinis*

b) *Mycoplasma orale*

c) *Mycoplasma pneumoniae*

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*

(倫理面の配慮)

本研究では、学内倫理審査委員会あるいは幹細胞を用いる臨床研究審査委員会に承認された培養細胞・加工細胞を用いて、その安全性と品質を検証するための研究を行う。貴重な細胞を用いての研究であり、患者に還元される細胞数に不利のないよう、最小限の細胞数で検討を可能にすると共に、研究について十分に説明し、同意を得る。各種指針を遵守して行うこれらの研究においては、患者氏名は、情報管理者のもと、連結可能匿名化されて管理される。

C. 研究結果

1. ウイルス検査系の検定

ウイルス検査系の感度検定をおこなったところ、全てのウイルス種において 10 copies/reaction の感度を持つ事が示された。検査系が細胞製剤の安全性試験法として有用なことを示す目的で、東京医科歯科大学医学部付属病院細胞治療センターで活性化培養を行った T リンパ球 117 例に対するウイルス検査を行った。その結果、26 例(22%)が陽性反応を示し、その内訳は BKV 3 例、EBV7 例、HHV614 例、

CMV2 例だった。

2. 細菌 16SrRNA 遺伝子による細菌検出系の検定

a. 検査系の感度検定

感度検定用スタンダードを作製し、検査系の感度検定を行った。その結果、作成した検査系は 10 copies/reaction の感度を持ち、さらに実際に6種類の細菌(大腸菌、放線菌、肺炎桿菌、肺炎球菌、緑膿菌、コアグラエゼ陰性ブドウ球菌)を同様の感度で検出可能なことを確認した。

b. 細菌の増幅に使用する酵素の検討

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

4. マイコプラズマ検出系の検定

a. 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、定量性を満たすマルチプレックス PCR の至適反応条件を検討した。その結果、下記のよう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 μ M、

Probe:0.2 μ M

b) Master Mix:

Nuclease free water	16.75 μ l
10X PCR Gold Buffer	5.0
2mM dNTPs	5.0
ROX Reference dye	1.0
25mM MgCl ₂	6.0
Total	33.75 μ l

c) PCR Reaction mixture (1tube)

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

d) PCR Reaction

95°C 10 min

95°C 15 sec 60°C 1 min 45 cycle

b. 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。

1) 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 cpu /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

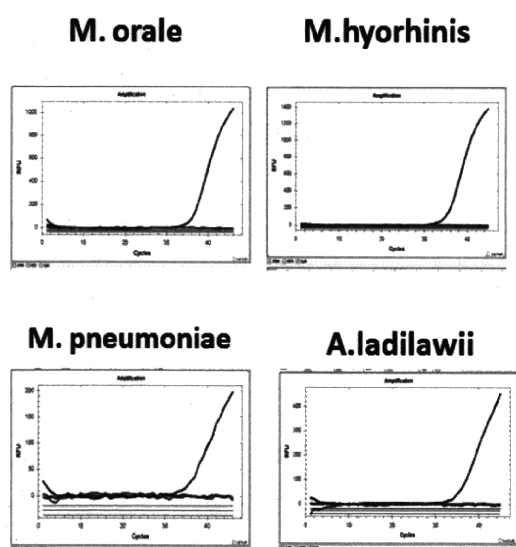
増幅効率 98%

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。



2) 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。

5. 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. orale: 定量限界 5 cfu

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

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

3. 市販の Taq ポリメラーゼは多くの場合組換え体であるため、ホストの大腸菌のゲノム DNA

が混入している。16SrRNA 遺伝子の相同性を利用した検出系では、混入している大腸菌 DNA による擬陽性反応が懸念されるが、今回採用した ABI 社製の AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, LD は大腸菌 DNA のコンタミネーションが最少に抑えるように高度に精製されており(標準使用量 2.5 U 中に含まれる 16SrRNA 遺伝子が 10 コピー未満)、実際の検出操作に於いても擬陽性反応が生じることはなく、問題なく使用できることが確認された。

4. 細菌検査では培養法が繁用されるが、体外で簡単に培養できない細菌や完全に培養不能な菌もあり、細菌を網羅的に検出し増幅産物の配列解析から菌種を特定する方法は魅力的である。

5. 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(ネステイド)PCR 法を採用しているが、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ネステイド PCR 法で懸念される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といえる。今回作製したマイコプラズマ検査法とウイルス検査法は一体化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、最終製品に関する製剤を患者に投与する前に検査データを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

ウイルス、細菌とマイコプラズマ同時・迅速検査系の構築を目指し、マルチプレックス PCR 法を応用した 16SrRNA 遺伝子検出による網羅的細菌検査系、12 種類のウイルス検査系と培養系への混入が懸念されるすべてのマイコプラズマ種の検査系を作製した。作製した検査系を組み合わせる使用することにより、様々なタイプの再生医療用細胞製剤の品質管理試験を行える。本検査系を実用化するためには、試薬の標準化とキット化が必須であり、現在開発を継続して進めている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表