

機能が確認されなかった例は数多く知られているが、HepaRG 細胞は、それらの例に反して、主要な取り込みトランスポーターの発現・機能はある程度維持しており、極めてユニークな性質を有する細胞であるといえる。ただ、ヒト肝臓において重要な役割を果たすトランスポーターの1つであるOATP1B3の発現が見られない点、また、OATP1B1の遺伝子が、\*1a/\*5と、片方のアレルで機能低下を示唆する遺伝型を持っていることには留意しておく必要があると思われる。一方で、OATP1B1の基質を用いた阻害実験の結果、OATP類の阻害剤の阻害定数は、概ね、ヒト肝細胞を用いて求められた値と合致したことから、薬物間相互作用の予測において、本細胞が利用できる可能性が示唆された。

## E. 結論

### 1. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用

AdCYP2C19、AdCYP2D6 および AdCYP3A4 は、MOI に応じた各 CYP 活性を発現させることができた。さらに、AdCYP2C19、AdCYP2D6、AdCYP3A4 および AdCYP5 を任意の MOI で HepG2 細胞に感染させることにより、ヒト肝細胞における CYP2C19、2D6 および 3A4 活性のそれぞれの相対比とほぼ同等の各 CYP 活性を共発現させることができた。更に、ヒト CYP 分子種アデノウイルス発現系を、マイクロスペースプレートと組み合わせて利用することで、これまでより 1 オーダー高い酵素活性を得られる可能性が示された。

OATP1B1 発現 HepG2 細胞株のうち、OATP1B1-1 及び OATP1B1-2 は、OATP1B1 発現細胞としての機能を有しており、OATP1B1/CYP3A4 共発現系の構築に有用であることが示唆された。

薬物性肝障害の段階のうち、障害肝細胞とマクロファージ系/単球系細胞との細胞間相互作用による肝細胞障害性の増悪を捉える系を開発する目的で共培養系の実験を試みた。共培養依存的に肝細胞に対する薬物の障害性が増強する条件については引き続き検討する。更に薬物由来の反応性代謝中間体が生成すると考えられるシトクロム P450 分子種を発現した細胞で共培養を試みることも必要と考えられた。ヒト初代肝非実質細胞の培養については、条件を検討し、良好な培養条件を見出した。

AdCYP 細胞の利便性を高めるための凍結のための条件検討を行い、生存率の高い細胞凍結保存液を選定した。

## II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立

輸送活性を十分に有するヒト肝細胞のロットを複数確保することができ、次年度以降、計画を円滑に進めることができる体制を整えた。

また、本研究では、高い胆汁排泄機能を保持したサンドイッチ培養ヒト肝細胞系確立に向けて、その最適化条件を検討した。全てのトランスポーターに最適な単一の培養条件を設定することは困難であることが示唆された。サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて胆汁クリアランスのヒト予測を行う場合、予め評価化合物のトランスポータープロファイリングを明らかにし、それに応じた培養条件を設定する必要があるかもしれない。血漿(メディウム)中濃度を基準とした見かけの胆汁排泄クリアランスの *in vitro-in vivo* 相関からのヒトにおける胆汁排泄を予測することは困難と考えられた。胆汁排泄の予測には肝臓(肝細胞)中濃度基準とした胆汁中排泄固有クリアランスの評価が適切と考えられる。また、ラットサンドイッチ培養系においては、取り込みトランスポーターの機能低下により、胆汁排泄クリアランスの予測値の過小評価が起きていることを明らかにした。

さらに、HepaRG 細胞には、不死化細胞においては極めてまれに見る、OATP1B1、OATP2B1、NTCP の発現が確認され、さらにこれら基質の取り込みについてもヒト肝細胞の 1/2~1/5 程度には観察された。また、OATP1B1 の輸送阻害剤の阻害定数は、遺伝子発現細胞を用いて求められた値と概ね合致しており、本細胞が、薬物間相互作用の予測に利用できる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) Tamaki Horii, Takashi Kubo, Atsuko Miyajima, Momoko Sunouchi, Ken Nakazawa, Yuko Sekino, Shogo Ozawa, Fabrice Morel, Anne Corlu and Seiichi Ishida  
EFFECTS OF A NEWLY DEVELOPED 3D-CELL CULTURE VESSEL ON DRUG METABOLISM-RELATED GENE EXPRESSIONS IN HepaRG CELLS, 第25回日本薬物動態学会年会 (2010, 10)

### 2) 石田誠一

医薬品の安全性・毒性研究への幹細胞の応用 ― ガイドライン案作成への取り組み、日本動物実験代替法学会、第23回大会 (2010, 12)

3) 前田和哉、小谷直生、吉田健太、渡辺貴夫、渡辺友子、山田哲裕、杉山雄一「ヒト肝臓組織サンプルと遺伝子発現細胞を併用した肝臓での薬物の解毒能力および薬物間相互作用の定量的予測法の開発 ～動物実験の代替法としてのヒト組織の活用～」日本動物実験代替法学会第23回大会、2010年12月3日～5日、東京

## G. 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

## 心不全に対する再生医療と人工心臓の複合戦略 —CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup>骨髄細胞による臨床 研究と基盤研究—

所 属 (独)国立成育医療研究センター  
生殖・細胞医療研究部

研究者 梅澤 明弘

**研究要旨** 先天性心疾患を有する患児の予後は向上したが、術後および合併症による心不全に対する治療法の少なさは著しく、その治療法の開発には薬剤・人工臓器とともに再生医療を集学的に投入することが必要である。本研究では、特に CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に着目し細胞生物学的観点から基盤研究を推進することにより科学的な礎を築き、厚生労働省「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に基づくモデルを提示する。本年度は、研究代表者および分担研究者が相互に協力し、それぞれ基盤技術の検証を行った。

### 分担研究者

- |                             |       |
|-----------------------------|-------|
| (1) 慶應義塾大学医学部               | 三好俊一郎 |
| (2) 東京都健康長寿医療センター           | 五條 理志 |
| (3) 国立成育医療研究センター            | 木村 光利 |
| (4) 大阪大学医学部                 | 斎藤 充弘 |
| (5) 福井大学医学部                 | 宮本 薫  |
| (6) 株式会社カルディオ               | 石田 智咲 |
| (7) 株式会社 GP バイオサイエンス        | 山田 雅雄 |
| (8) 株式会社ジェイ・エム・エス           | 鈴木 康二 |
| (9) 株式会社カネカ                 | 櫻井 裕士 |
| (10) セルテスコメディカルエンジニアリング株式会社 | 藤沢 章  |
| (11) コアフロント株式会社             | 西岡 秀展 |
| (12) 株式会社ミラキュア              | 松崎 正晴 |
| (13) 株式会社アスクレップ             | 梅田 光明 |

### A. 研究目的

新生児の約 1%は何らかの心臓疾患を有している。小児心臓外科の進歩により、適切な時期に適切な手術を行うことで、先天性心疾患を有する患児の予後は著しく向上した。しかし、術後心不全はある一定の確率で生じること、心筋症や慢性呼吸器疾患の合併症としての心不全は、心臓のポンプ失調が心筋の不可逆的な障害に至る場合が少なくない。これらの疾患の終末期には、薬剤・手術を含めた介入は十分な効果を示さない。世界的には小児用補助人工心臓 (DeBakey および Berlin Heart) は 1992 年頃より実用化が始まっているものの、成人よりも更に限られた施設での使用がなされているのみであり、成人の重症心不全に関する治療戦略から考えると、小児における選択可能な治療法の少なさは著しい。本研究では再生医療を薬剤・人工臓器・細胞組織工学とともに集学的

に投入することが必要であると考え、特に、CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に着目し前臨床研究を推進することにより、臨床研究に対する礎を築き上げることを目標に置くものである。多くの子供たちを病から救うことのみならず、子供たちを育む世代の人々に安心を与える。

### B. 研究方法

#### CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞のパリテーション (梅澤、山田、櫻井)

組換え体蛋白質 (キメラ蛋白質) を作用させた CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 細胞の増殖能の増加、寿命の延長、分化誘導を行う。

#### 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略 (梅澤、宮本、三好、石田)

精製した心筋誘導因子により心筋細胞に分化させた骨髄間葉系細胞や、心筋誘導因子の遺伝子導入を行った骨髄間葉系細胞の傷害心筋への *in vivo* 移植実験を行い、心筋細胞治療の基盤を確立する。

#### CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に有効なヒト血清分離技術の開発 (鈴木、梅澤)

ヒト血清分離システムを用いて CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に最適な培養システムの構築を行う。特に血清中の PDGF によって生じる MAPK/p16ink4a を介した細胞周期ブレーキングシステムの解明とその対策を行う。

#### 小動物による有効性・安全性の検討 (梅澤、五條)

免疫不全マウスにて心筋内への直接注入と大動脈基部への選択的経冠状動脈の投与に近い状態の2つを行い、その優劣を比較検討する。病態としては、冠動脈結紮による心筋梗塞モデルでの急性期と慢性期の2つの相における効果を検討する。また、ヒト骨髄細胞を免疫不全動物に移植

し、長期間の経過観察の下、その造腫瘍性、生体内動態を経時的に観察することで安全性試験を行う。

### 大動物による前臨床研究（三好、五條、梅澤、木村、西岡）

小動物での実験結果をふまえて、大動物（ブタ、イヌ）における細胞移植実験を行う。疾患設定も冠動脈結紮による心筋梗塞とし、急性期と慢性期の両方で細胞移植の効果を判定する。ドナー細胞としては骨髄細胞を単離して実験に供する。

### 施設バリデーション項目の検討（齋藤、藤沢、松崎）

施設バリデーションは、世界のトップレベルの品質管理基準に焦点を合わせる。本研究プロジェクトにおいては、心筋再生医療に用いる製造管理・品質管理・衛生管理に合致したSOP（標準作業手順書）の構築と品質管理基準の明確化を行う。

#### （倫理面への配慮）

#### 国立成育医療研究センター

国立成育医療研究センターにおいては、対象となるヒト細胞に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、201、平成 18 年 6 月承認、受付番号 237、238 平成 19 年 11 月承認、受付番号 293、315、平成 20 年 10 月承認、受付番号 350、平成 21 年 12 月承認、受付番号 403、平成 22 年 7 月承認）。

（<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>）

それぞれの組織については、平成 22 年 11 月 1 日施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。さらに、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想されるため、「厚生労働科学研究に関する指針」に準拠する。

本課題では、各分担研究者所属の施設により、ヒト由来細胞ならびに実験動物を用いた研究を行う。ヒト由来組織の採取にあたっては、研究機関における倫理委員会に研究計画を申請し承認を得ている。また動物実験については当該動物実験指針に準拠して研究を行う。すなわち動物実験計画を申請し承認を得ており、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物の使用は目的に合致した最小限にとどめ、苦痛を与えない等の倫理的な配慮を行う。

## C. 結果

### CD29high CD34low c-kit+ CD140a+ 骨髄細胞のバリデーション

ブタの骨髄から骨髄細胞を分離した。結果、全骨髄播種法と比べて、分離デバイスを用いると、骨片等の夾雑物を除去でき、良好な増殖傾向を示した。続いて、同手法を用い、ヒト骨髄から骨髄細胞を分離した。結果、分離の前処理法以外は問題なく、細胞の分離効率も高かった。

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングの有用性と評価を行った。パイオリソスとして成育医療研究センターで樹立した種々の組織由来間葉系細胞を用い、レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングを行った。結果、解析に用いた細胞の特性に基づき、再生医療に必要な簡便かつ高感度の細胞選別技術を開発した。

### 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略

心筋形成因子の同定と、その *in vitro* における解析のため、モデルシステムとして間葉系幹細胞に転写因子 SF-1 を導入して細胞分化を誘導し、標的遺伝子である StAR 遺伝子近傍の染色体構造変化を解析し、分化誘導に伴い、histone eviction やループ構造の形成など様々な染色体構造の変化が生じていることを明らかにした。これらの変化が転写因子導入による幹細胞分化の本質を担っていると推測された。

### CD29high CD34low c-kit+ CD140a+ 骨髄細胞に有効なヒト血清分離技術の開発

ヒト血清調製用閉鎖系分離デバイスを用いて調製したヒト血清の細胞増殖効果は FBS と同等以上であり、ヒト血清は細胞の形態に影響を与えなかった。

### 小動物による有効性・安全性の検討

大動物での実験を念頭に、マウスにおいて冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを作製した。急性期ならび慢性期における心機能の評価は、心エコー検査により行った。その結果、コントロール群（偽手術群）と比較して心機能の低下を認めた。本結果をもとに細胞移植実験プロトコールの構築を作成した。

### 大動物による前臨床研究

イヌ実験より、ピオグリタゾン前処置、骨髄間葉系幹細胞は、心筋誘導効率が極めて高く、さらに移植による心機能改善効果、心筋梗塞縮小効果がある事が判明した。

ブタ 16 頭に対して虚血モデルの作製を行い、細胞移植を想定した 4 週間まで耐術したのは 9 頭であった。心機能は虚血モデル作製前の心機能指標の一つである LVEF が  $69.1 \pm 11.3\%$  から虚血作

製4週間後LVEFが47.1±6.4%と、平均22.0%の低下を認めた。病理組織学的評価では、後下壁を中心に心筋の線維化と壁の菲薄化を認めた。本結果から、ブタの慢性虚血モデルを安定して作製できる基盤を構築できた。

## 施設バリデーション項目の検討

CPC内における、自己血清を用いた細胞分離・調製、培養工程について、施設バリデーションを行い、GMPグレードで行う体制が少しずつではあるが、構築することができた。

## D. 考察

本研究では、再生医療において、薬剤・人工臓器・細胞組織工学とともに集学的に投入することを目的として研究を進めている。研究代表者および分担研究者が相互に協力し、産官学連携のもと、骨髄細胞に注目し、前臨床研究およびその周辺技術について研究を行った。

本年度は、大動物およびヒト骨髄から骨髄細胞を分離するための分離デバイスの開発とその機能の評価した。全骨髄播種法と比較すると、分離デバイスの利用は、夾雑物(骨片、血球等)を簡単に除去することができ、得られた細胞は多少のロスはあるが、初期培養の増殖効率および全細胞数で比較すると、分離デバイスの優位性が確認された。また、再生医療用途のクオリティーが高い培地を作成するために、患者の自己血清の使用を前提とした血清分離技術の開発が必要不可欠である。そこで、我々は、安全性が高く、効率がよいヒト血清調製用閉鎖系分離デバイスを開発することに成功した。

心筋形成因子を用いた細胞治療戦略として、間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導メカニズムを探るため、そのモデルシステムとして転写因子SF-1を導入して細胞分化を誘導し、その際の染色体構造の変化を解析した。特に、分化誘導に伴い、histone evictionやループ構造の形成など様々な染色体構造の変化が生じていることを明らかにした。これらの変化が転写因子導入による幹細胞分化の本質を担っていると推測される。

骨髄細胞の有効性・安全性を検証するために、心筋内への細胞移植実験における投与方法を検討した。直接注入法はすでに臨床で行われているが、最良な方法であるかの客観的なデータは十分とはいえない。投与方法の検討には、適切な実験系の構築は欠かすことはできないが、小動物、大動物を通しての検証はいまだ構築されていない。今回大動物実験を並行して進めることを前提として、マウスモデルによる安定したモデル実験系の構築を進めた。その結果として、冠動脈結紮による急性期ならに慢性期心筋梗塞モデルを構築し、その評価系を確立できた。

また、イヌによる心筋梗塞モデルとして、ピオグリタゾン前処置、骨髄間葉系幹細胞は、心筋誘導効率が極めて高く、さらに移植による心機能改善効果、心筋梗塞縮小効果がある事が判明した。家畜ブタによる慢性心筋虚血モデルの作成では、心機能LVEFにして平均22.0%の低下を認め、慢性心不全モデルとして本モデルが適切であることが示唆された。病理組織学的検討で後下壁の心筋線維化と心室壁の菲薄化を認めており、心機能面だけでなく、病理組織学的にも心筋虚血モデルの有用性が証明された。

施設バリデーション項目の検討および臨床研究における標準作業手順書の作成として、本年度は、骨髄から細胞を採取、自己血清を用いた細胞分離・調製、培養を行うとともに、施設の衛生状態、機器の起動状態、標準作業手順書を作成し、追記、修正および今後の課題を検討した。

## E. 結論

小児重症心不全患者への治療を念頭に置き、細胞医療における基盤研究を推進した。目標として、心機能の指標であるBNPの経時的な変化とSwan-Ganzカテーテルを介したデータを基本とし、プレッシャーワイヤーとコンダクタンスカテーテルによる圧-容量曲線(PV-loop)を描出するシステムを稼働させること、そこからの心機能の指標(E<sub>max</sub>, 圧容積面積等)からの主要項目抽出を行った。CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞のバリデーションとして、組換え体蛋白質(キメラ蛋白質)を作用させたCD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup>細胞の増殖能の増加、寿命の延長、分化誘導を行った。また、間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を糖鎖プロファイラーにより解析した。さらに、高い心筋分化効率を有する間葉系幹細胞株にのみ強発現している遺伝子をMicroArray法により同定した。大動物による前臨床研究において、細胞移植実験を行った。疾患は冠動脈結紮による心筋梗塞とし、急性期と慢性期の両方で細胞移植の効果を判定できるモデル動物を作成した。ドナー細胞としては骨髄細胞を単離して実験に供した。施設バリデーションは、世界のトップレベルの品質管理基準に焦点を合わせ、心筋再生医療に用いうる製造管理・品質管理・衛生管理に合致したSOP(標準作業手順書)の構築と品質管理基準の明確化に着手した。

## F. 研究発表

Sato T, Iso Y, Uyama T, Kawachi K, Wakabayashi K, Omori Y, Soda T, Shoji M, Koba S, Yokoyama SI, Fukuda N, Saito S, Katagiri T, Kobayashi Y, Takeyama Y, Umezawa A, Suzuki H. Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization. **Lab Invest**. doi:10.1038/labinvest.2010.202, 2011.

Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S,

- Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. **Genes Cells**. 16(1):1-11, 2011.
- Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y, Umezawa A. Biomaterials for the Feeder-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. **Chem Rev**. dx.doi.org/10.1021/cr1003612, 2011.
- Shinmura D, Togashi I, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Nakamizo H, Segawa K, Tsukada Y, Ogawa S, Umezawa A. Pretreatment of Human Mesenchymal Stem Cells with Pioglitazone Improved Efficiency of Cardiomyogenic Transdifferentiation and Improved Cardiac Function. **Stem Cells**. DOI: 10.1002/stem.573, 2010.
- Yazawa T, Kawabe S, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. **Mol Cell Endocrinol**. doi:10.1016/j.mce.2010.11.025, 2010.
- Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient Generation of Hepatoblasts From Human ES Cells and iPS Cells by Transient Overexpression of Homeobox Gene HEX. **Mol Ther**, 19(2):400-407, 2011.
- Umezawa A, Gorham JD. Dueling models in head and neck tumor formation. **Lab Invest**. 90(11):1546-1548, 2010.
- Cui CH, Miyoshi S, Tsuji H, Makino H, Kanzaki S, Kami D, Terai M, Suzuki H, Umezawa A. Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy. **Hum Mol Genet**. 20(2):235-244, 2011.
- Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. **PLoS One**. 5(9):e13017, 2010.
- Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 401(3):480-486, 2010.
- Miyagawa Y, Okita H, Hiroshima M, Sakamoto R, Kobayashi M, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation. **Tissue Eng Part A**. 17(3-4):513-521, 2011.
- Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, Fujiyoshi Y, Heike T, Nakahata T, Akutsu H, Umezawa A, Harigae H, Kira J, Dezawa M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. **J Neuropathol Exp Neurol**. 69(9):973-985, 2010.
- Wang S, Kawashima N, Sakamoto K, Katsube K, Umezawa A, Suda H. Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj. **Biochem Biophys Res Commun**. 400(1):39-45, 2010.
- Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling. **Curr Med Chem**. 17(28):3245-3252, 2010.
- Mizutani T, Yazawa T, Ju Y, Imamichi Y, Uesaka M, Inaoka Y, Matsuura K, Kamiki Y, Oki M, Umezawa A, Miyamoto K. Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. **J Biol Chem**. 285(36):28240-28251, 2010.
- Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. **Biotechnol Bioeng**. 106(6):860-870, 2010.
- Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. **Circ Res**. 106(10):1613-1623, 2010.
- Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. **Artif Organs**. 34(4):280-288, 2010.
- Fujino T, Nomura K, Ishikawa Y, Makino H, Umezawa A, Aburatani H, Nagasaki K, Nakamura T. Function of EWS-POU5F1 in sarcomagenesis and tumor cell maintenance. **Am J Pathol**. 176(4):1973-1982, 2010.
- Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. **J Cell Physiol**. 223(3):695-702, 2010.
- Mizutani, T., Yazawa, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Oki, M., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. **J. Biol. Chem**. 285(36), 28240-28251, 2010.

Yazawa, T., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Orisaka, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol. Endocrinol.* 24(3), 485-496, 2010.

Yazawa, T., Kawabe, S., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 127-132, 2011.

上大介、五條理志、梅澤明弘：心筋再生医療の現状 - 細胞移植療法を用いた再生医療-. *Heart view* 14 (6):116-120, 2010.

五條理志、許俊鋭：(シリーズ) 再生医学のいま-基礎研究から臨床への展開に向けて-44- 細胞移植：心臓病における臨床応用への潮流。治療, 92(12): 2793-2799, 2010

五條理志、豊田雅士、梅澤明弘：組織工学と再生医療、人工臓器 39(3), 202-207, 2010

五條理志、上大介：(特集) 臨床工学技士が知っておきたい人工臓器と再生医療の展望：心臓における再生医療, *Clinical Engineering*, 22(1): 9-14, 2011.

#### 学会発表

第10回再生心臓血管外科治療研究会 2011.02.23.  
「ブタ慢性心筋虚血モデルへの同種ブタ羊膜由来細胞移植」

第10回日本再生医療学会 2011,03,01. 「ブタ慢性心筋虚血モデルにおける同種ブタ羊膜由来細胞移植」

Miyamoto, K.: Mechanism of stem cell differentiation into steroidogenic lineage. 14th International Congress of Endocrinology. 2010, 3, 27-30, Kyoto.

Miyamoto, K., Mizutani, T., Yazawa, T.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. XIV Adrenal Cortex Conference and the Keith Parker Memorial Symposium. Adrenal growth and development. 2010, 6, 16-18, San Diego.

水谷哲也、宮本 薫：卵巣における転写制御とエピジェネティクス。第55回日本生殖医学会。卵巣機能に関する基礎研究の進歩。最近の知見から。2010, 11, 11-12, 徳島。

矢澤隆志：卵巣ステロイドホルモン合成に関連する遺伝子発現調節機構の新知見。第15回日本生殖内分泌学会学術集会。卵巣機能調節における新知見。2010, 11, 20-21, 千里。

宮本 薫：卵巣：ステロイド・転写調節など。岡山大学研究開発委員会 第4ワーキング主催シンポジウム

分野・領域を超えた内分泌学・生殖内分泌学の研究ネットワークへ「少子化社会からの脱却をめざした分子内分泌標的制御とその応用」。2010, 12, 11, 岡山。

#### 一般演題 (口頭発表・ポスター発表)

Mizutani, T., Yazawa, T., Uesaka, M., Inaoka, Y., Ju, Y., Okada, R., Matsuura, K., Kamiki, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of a novel enhancer region in the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. 14th International Congress of Endocrinology. 2010, 3, 27-30, Kyoto.

Yazawa, T., Miyamoto, K.: PGC-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. 14th International Congress of Endocrinology. 2010, 3, 27-30, Kyoto.

水谷哲也、矢澤隆志、具 云峰、今道力敬、松村健大、河邊真也、松浦かおる、上木康衣、梅澤明弘、宮本 薫：ヒト StAR 遺伝子の新たな転写調節機構。日本生化学会北陸支部第28回大会。2010, 5, 29, 福井。

Yazawa, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: LRH-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. XIV Adrenal Cortex Conference and the Keith Parker Memorial Symposium 2010, 6, 16-18, San Diego.

Mizutani, T., Yazawa, T., Ju, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Imamichi, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Regulation of SF-1-mediated transcription of the human steroidogenic acute regulatory protein gene by chromatin-loop formation. The 92th Annual Meeting & Expo 2010, 6, 19-22, San Diego.

Yazawa, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. The 92th Annual Meeting & Expo 2010, 6, 19-22, San Diego.

矢澤隆志、稲岡齊彦、岡田令子、水谷哲也、山崎由希子、宇佐美陽子、栗林真悠、梅澤明弘、宮本 薫：卵巣顆粒膜細胞における転写共役因子・PGC-1 $\alpha$ の機能。日本動物学会中部支部大会 2010. 2010, 7, 25, 岐阜。

矢澤隆志、河邊真也、稲岡齊彦、岡田令子、水谷哲也、今道力敬、山崎由希子、宇佐美陽子、栗林真悠、梅澤明弘、宮本 薫：卵巣・顆粒膜細胞におけるアンドロジェンの作用。日本動物学会第81回大会。2010, 9, 23-25, 東京。

水谷哲也、具 云峰、今道力敬、松村健大、矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、松浦かおる、上木康衣、梅澤明弘、尾崎 司、南野直人、宮本 薫：クロマチン構造変換を介した StAR の新たな転写調節メカニズム。第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会 BMB2010. 2010, 12, 7-10, 神戸。

矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, 河邊真也, 水谷哲也,  
今道力敬, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤  
明弘, 宮本 薫 : PGC-1 $\alpha$  は SF-1 と LRH-1 のコアク  
チペーターとしてプロジェステロン産生を促進する.  
第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学  
会年会 BMB2010. 2010, 12, 7-10, 神戸.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 多能性幹細胞の新規的培養空間創出による幹細胞医薬 研究の底上げ

所 属 国立成育医療研究センター研究所  
生殖・医療研究部生殖技術研究室  
研究代表者 阿久津英憲

### 研究要旨

現在、幹細胞による医療応用は体外での培養が主体となっている。さらには、ヒト ES 細胞や iPS 細胞などのヒト多能性幹細胞は、その創出から体外培養系が母体となり、産業応用でも安定的に性質を保持して維持することは基盤技術として重要である。しかし、ES 細胞などの幹細胞研究から、現在標準化されている 2D 培養システムでの限界（ゲノムの不安定性誘因や分化誘導細胞の幼若性による不完全な機能獲得などの問題点）が明白になってきた。そのため細胞培養環境の領域は、次世代医療を確かで安全な品質を付加していくために重要な基盤研究領域である。本研究課題では、新たな細胞培養空間の開発を基盤とするが、マイクロデバイス開発のような高度な先端的ナノテクノロジーからのアプローチではなく、より細胞の生命活動の観点に立ち細胞コミュニケーションと足場の研究を展開する。すなわち、本研究成果を効率的に、時間的にもより早く社会へ還元するために従来の汎用されている細胞培養システムの基盤を応用することで経済的にも技術的にも汎用性を高めたヒト iPS 細胞研究を行う。本研究事業を各委託研究との枠組みから 4 つの項目（1. 安全性の高いヒト iPS 細胞創出、2. 幹細胞性質の保持とゲノム安定化の足場の開発、3. iPS 細胞のゲノム安定性の解析、4. 分化誘導に優れた足場の開発）に分け研究を遂行し、全体としてはシナジスティックに進め成育医療センター（主任研究者：阿久津）がハブとして機能し最終的に統合して研究が加速化できる。

### 研究分担者

1. 西村栄美 東京医科歯科大学
2. 原 英二 (財)癌研究会
3. 服部秀志 大日本印刷株式会社
4. 的場 亮 (株)DNA チップ研究所
5. 山田 智 日油(株)
6. 松岡志帆 ライフテクノロジーズジャパン(株)

### A. 研究目的

国民が近い将来安心して享受できる安全性に優れた医療を供給できる基盤整備を行うために、ヒト iPS 細胞は GMP 基準に準拠した環境で培養維持され、品質維持・安全性に関して長期的影響に対して科学的エビデンスの構築を行うことが我々の責務である。基盤となる分化誘導研究とともに、安全性及び品質を担保したヒト iPS 細胞培養システムを構築していく必要がある。iPS 細胞の未分化維持及び分化は、様々な生理活性因子、マトリックス因子や細胞間応答因子のような無数の微小環境因子により制御されている。本研究では、独自のマイクロファブリケーション技術を iPS 細胞研究へ応用しスケラブル細胞培養デバイス構築を目指す。加えて、液性細胞外基質として生体適合性ポリマーも含めたヒト多能性幹細胞の新規的

培養空間の創出を行う。

### B. 研究方法

#### 安全性の高いヒト iPS 細胞の創出

本研究では、ゲノム導入されず、さらに細胞質内でも増殖しないゲノムインテグレーションフリーのパキキュロウイルスシステムを基盤とした新しい遺伝子導入ベクター（BacMam）を使用することでヒト iPS 細胞樹立開発を行う。既に、ヒト iPS 細胞も当該施設において多数樹立し、未分化性や多分化能性の検定を行ってきており、技術基盤は整備されている。

#### 幹細胞性質の保持とゲノム安定化の足場の開発

マイクロファブリケーション技術を応用して細胞の足場の創成を行い、テンプレートに依存したヒト iPS 細胞の細胞応答性を解明する。前実験段

階において、2D デバイスのパターンニング開発を行っており、それより新規的な足場を創成する。まずは、未分化性の維持が適切に行われなければならない。形態的評価と未分化マーカーの発現の解析を行う。これまで行ってきた生体適合材料として2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) の低吸着性に着目し細胞間応答に基づく液性細胞外基質としての MPC 研究開発からヒト iPS 細胞の性質を制御する培養空間を作成する。

細胞培養系に適した生体適合性ポリマー培養ディッシュの検討として、これまで開発していった生体適合性ポリマー、リピジュアがヒト iPS 細胞培養システムに融合するうえでの基盤となるリピジュア-幹細胞培養系の開発を行う。主任研究者らが構築しているヒト ES/iPS 細胞分化誘導システムの重要培養デバイスである 96 穴丸底細胞培養ディッシュに適したリピジュア-培養系を検討する。加えて、リピジュアがヒト iPS 細胞の性質に与える影響の検討を行う。

#### iPS 細胞のゲノム安定性の解析

ヒト ES 細胞培養の標準化システムを用いた環境下でのヒト iPS 細胞 (スタンダード iPS 細胞) の網羅的遺伝子発現解析を行う。遺伝子発現レベルでのヒト iPS 細胞とヒト ES 細胞との比較検討として、遺伝子発現データを *in silico* 解析を行っていき、遺伝子発現レベルから ES 細胞との類似性あるいは相異性を明らかにしていく。

#### iPS 細胞のゲノム安定性と逸脱機構の解析

ヒト iPS 細胞を用いて、重要な細胞周期チェックポイント機構である RB-経路と p53-経路の制御因子 (p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子や p21<sup>CIP1</sup> 遺伝子など) の発現及びクロマチン修飾状態を解析する。作成した iPS 細胞のクローン間で細胞周期チェックポイント機構の作動状況を検討する。

### C. 研究結果

#### 安全性の高いヒト iPS 細胞の創出

BacMam-EGFP をヒト間葉系細胞へ導入を行った結果、極めて良好に遺伝子導入が可能であった。導入するウイルス量を検討した結果、100ul で約 80%、200ul で 90%以上の導入効率 (GFP 発現率) であった (図 1)。

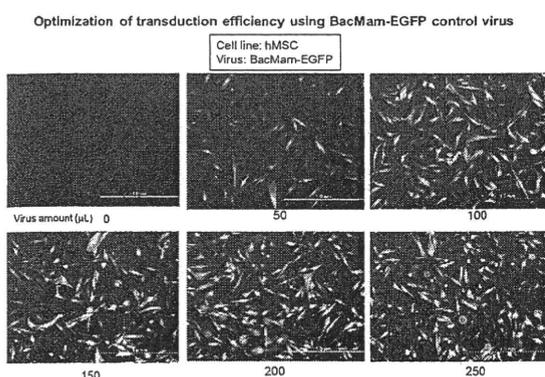


図 1 ヒト細胞への BacMam-EGFP 導入

このバキュロウイルスシステムが極めて効率よく EGFP 遺伝子を導入できることを確認し、次に分化多能性の獲得実験を BacMam-OKSM を用いて行った。1x10<sup>5</sup> 細胞数に対して BacMam-OKSM ウイルス量を 150、250、500、750ul の 4 条件によりヒト間葉系細胞へ 2 日おきで計 7 回の遺伝子導入を行った。BacMam-OKSM では細胞内への遺伝子導入効率が非常に低く、体細胞のリプログラミングを引き起こすことはできなかった。

#### 幹細胞性質の保持とゲノム安定化の足場の開発

ト多能性多能性の未分化性維持には特定のシグナル伝達系の活性化が必須であり、サイトカイン添加及び接着系として細胞外マトリックスからの反応応答が働かなければならない。国立成育医療研究センターで樹立したヒト iPS 細胞を用いて、マイクロファブリケーション技術により作成した丸パッチパターン化培養基板での細胞外マトリックス相互性を解析した。細胞外マトリックスとして、Fibronectin、0.1% Gelatin、CellStart (Invitrogen) の 3 種と細胞外マトリックスなしの計 4 条件を検討した。結果、細胞外マトリックスなし、0.1% Gelatin そして CellStart による培養では未分化性を維持することは困難であった。一方、Fibronectin 併用によりフィーダー細胞フリーの条件でも良好に幹細胞が維持可能であった。更に、異種成分を使用しない培地で ROCK 阻害剤である Y-27632 併用により極めて良好に未分化性が維持できた。幹細胞マーカーである OCT4 と NANOG に対して免疫組織染色法によって確認した。

ヒト iPS 細胞はその由来細胞及び様々な樹立方法から性質に多様性に富む可能性がある。我々の前実験から分化誘導のための胚様体 (EB) 作成で iPS 細胞株によっては EB 作成効率が非常に低いものが存在した。リピジュアを使用することによって、EB 作成が安定的に行うことが可能であった (図 2)。樹立したヒト多能性幹細胞で三胚葉分化を支持する有用なデバイス基盤となることが示された。均一な EB が作成でき、各胚葉組織への分化が再現良く示された

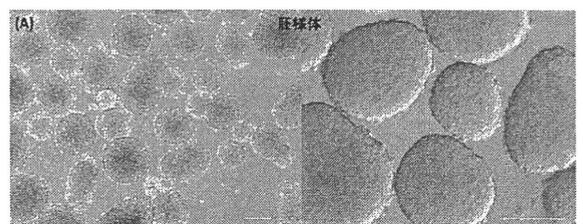


図 2 リピジュアによる EB 作成

## iPS 細胞のゲノム安定性の解析

8 細胞株の iPS 細胞と 3 つのヒト ES 細胞株を対象に網羅的遺伝子発現解析を行った。階層的クラスタリング解析により iPS 細胞と ES 細胞はクラスター化され、さらに iPS 細胞は由来により分けられた。主成分分析では、iPS 細胞群と ES 細胞群が分けられ (図 3)、それぞれのグループを特徴づけることに寄与する遺伝子群を抽出することが可能であった。

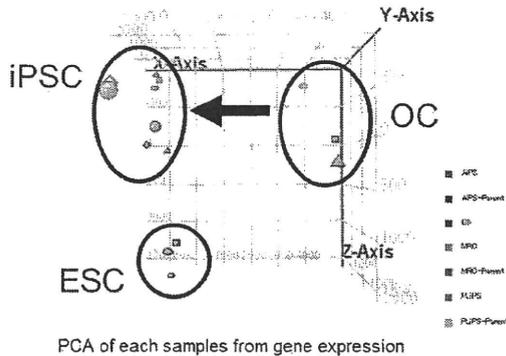


図 3 ヒト ES/iPS 細胞の主成分分析

iPS 細胞と ES 細胞が分けられ、特徴付けられる遺伝子が見出される。

## iPS 細胞のゲノム安定性と逸脱機構の解析

ヒト線維芽細胞株 MRC5 細胞より作成した 3 つの異なる iPS 細胞株について  $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現レベル並びに遺伝子発現を負に調節するクロマチン修飾状態 (H3K9 のトリメチル化及び H3K27 のトリメチル化) を調べた。その結果、MRC5 細胞に比べ、iPS 細胞では  $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現レベルが著しく低下しており、この発現レベルの低下は H3K9 のトリメチル化ではなく H3K27 のトリメチル化と相関があることが分かった。

## D. 考察

広範な哺乳動物細胞にも複製することなく、効率よく外来遺伝子を導入でき、しかもゲノムインテグレーションフリーのバキュロウイルスシステムを基盤とした新しい遺伝子導入ベクター

(BacMam) を開発してきた。BacMam-EGFP によるヒト初代細胞株に対して行った GFP 遺伝子導入実験では、非常に効率に遺伝子を導入することが可能であり、導入された遺伝子は GFP の発色によりタンパク質レベルにおいて機能的に働くことが強く示唆された。一方、ヒト iPS 細胞の樹立に必要なリプログラミングファクター

(Oct4-Klf4-Sox2-cMyc) を組み込んだ

BacMam-OKSM の導入実験では、最大計 7 回もの各日導入を行った条件でもリプログラミング化を引き起こすことは不可能であった。考えられる点としては、GFP は導入されるが

Oct4-Klf4-Sox2-cMyc では導入率が非常に低下することから塩基数に依存し配列が不安定になることが示唆される。4 因子が安定して導入できる BacMam システムを開発していく必要がある。

ヒト iPS 細胞は適切な細胞外マトリックスを選択することによりフィーダー細胞フリーで未分化維持をすることが可能であった。ファブリケーション技術により細胞接着域を制御することで空間への細胞増殖を誘導することが示唆された。多能性幹細胞は、その極めてユニークな性質から基礎生命科学のみならず、再生医療、創薬、薬剤毒性検定等次世代の医療としても大いに期待されている。しかし、現在世界的に標準化されている方法においては改善されるべきポイントが存在する。1) 2D 培養システムでの幹細胞ゲノム不安定性、2) 分化誘導細胞の不完全な機能獲得、3) 異種由来物の因子した培養システム、であり幹細胞の実用化を促進するためには早急に対応しなければならない。本研究は、細胞外マトリックスとしてマイクロファブリケーション技術による上記 1) 及び 2) に対する効果的な scaffolds の開発を行い、より簡便な幹細胞デバイスを提供することにより幹細胞研究の底上げに貢献する。

ヒト ES 細胞と iPS 細胞を区別する遺伝子発現群が存在する。遺伝子発現とヒト多能性幹細胞の性質を比較検討することで、性質を予測する分子マーカー等の開発研究の基盤データとする。さらに、iPS 細胞は由来する細胞毎に遺伝子発現グループが分けられる。iPS 細胞のリプログラミングに由来細胞のエピジェネティック状態を一部残すことが示唆され、今後遺伝子発現に加えエピジェネティック制御と幹細胞性質を関連させることでヒト多能性幹細胞性質を決定付ける分子メカニズムを明らかにしていく。

ヒト iPS 細胞の応用には、長期培養工程が必須であり、造腫瘍性とも密接に関連する細胞のゲノム安定性は品質管理の最重要項目の 1 つである。今回、クローン間で細胞のゲノム・エピゲノム情報の維持に必要な細胞周期チェックポイント機構の作動状態が多少異なることが示された。このことは、iPS 細胞を今後医療応用する際には、作成した iPS 細胞の中から細胞周期チェックポイント機構がより完全な状態で保たれている細胞クローンを選択することが必要であることを強く示唆している。今後より高品質の iPS 細胞を選択する方法の開発が必要になってくると予想される。

## E. 結論

樹立の段階から幹細胞の安全性及び品質を確保することは重要であり、iPS 細胞に関してはゲノム変異を伴わないことは幹細胞の安全性に大きく影響を与える。ゲノムインテグレーションフリー

のバキュロウイルスシステムを基盤とした新しい遺伝子導入ベクター (BacMam) に外来遺伝子を組み込んだ遺伝子導入研究では、BacMam-EGFP によるヒト初代細胞株に対して GFP 遺伝子は効率よく導入できタンパク質レベルで機能することが判明した。しかし、iPS 細胞の獲得に向けたリプログラミング因子 (Oct4-Klf4-Sox2-cMyc) を組み込んだ BacMam-OKSM の導入実験では、ヒト間葉系細胞を iPS 細胞化することは不可能であった。今後は、複数因子の塩基配列を組み込んだエピソームベクターを含めたゲノムインテグレーションフリーの遺伝子導入法を検討していく。

マイクロファブリケーション技術により細胞の足場を造形でき、細胞外マトリックスを選択することで異種成分を使用しない培地でも幹細胞の未分化性が維持できることが示された。安定した scaffolds は多能性幹細胞研究を行う上で必要不可欠であり、未分化維持が安定的に行える技術が整備できた。パターンングがあらゆる形状が可能であり、足場を制御することで空間への増殖性も間接的に制御できることが示唆され、今後分化誘導を行う上で有効になる成果が得られた。

ヒト多能性幹細胞はその性質から細胞治療を含めた再生医療や創薬開発等の幹細胞産業化に期待されている。今回、ヒト ES 細胞と iPS 細胞の網羅的遺伝子発現解析による比較検討から細胞性質を裏付ける分子メカニズム解析の基盤となる重要なデータを得ることができた。今後は、多角的にゲノム及びエピゲノム解析を行い、分子のエビデンスに基づいた幹細胞評価を行っていく。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

- 1) H Akutsu. "Xeno-Free Growth and Expansion of Human Pluripotent Stem Cells", Commercial Tutorial Directory; ISSCR 8<sup>th</sup> annual meeting, San Francisco, CA USA. 18<sup>th</sup> Jun, 2010.
- 2) 阿久津英憲:「臨床グレード幹細胞樹立の試み」第 28 回日本ヒト細胞学会学術集会シンポジウム, つくば市, 8 月 23 日, 2010 年.
- 3) H Akutsu. "xeno-free growth and expansion of human pluripotent stem cells", Symposium 7; The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Sapporo, 1<sup>st</sup>-4<sup>th</sup> Sep, 2010.

### 1. 論文発表

- 1) Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse

embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 401(3):480-486.

- 2) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One.* 2010; 5(9):e13017.

- 3) Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2010; 106(6):860-870.

- 4) Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2010; 465(7295):175-181.

- 5) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(3):480-493.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 病原微生物の抗病原性タンパク質抗体を用いた新規検査薬の開発とその医療・公衆衛生への応用研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所

研究者 鎌田 洋一

研究要旨：病原性を有するあるいは微生物毒素を産生する微生物の中で、現在制御対象として重要な菌種を明確化するため文献検索や専門家からの情報収集による調査を実施した。セレウス菌が耐熱性嘔吐毒素の産生等の理由で、食品への加熱や加工があったとしても、食品を永続的に汚染すること等危害が重篤であり、嘔吐毒素の性状解析も十分でないことが明らかとなった。食品汚染の観点からは、セレウス菌およびその嘔吐毒素を注視しなければならず、これらの検査システムの確立が急がれていることが判った。また、嘔吐毒素はその危害性の解析が十分でなく、さらには毒素検査法に種々の問題点を抱えており、効率でかつ特異性の高い方法論の確立がのぞまれていることが明らかになった。

セレウス菌の分泌性タンパク質および膜タンパク質に対する網羅的抗体作製を、シグナルシーケンストラップ法により実施した。合計 12 種のタンパク質に抗体を作製しつつ有り、それらが、セレウス菌検出に適切かどうかを検証する段階にある。グラム陽性菌であるセレウス菌には本法の適応性が低く、病原性微生物へ網羅的に抗体を行う場合、研究目的に合致した細胞種、すなわち、酵母等の真核性の微生物が適していると推察された。

抗セレウス菌嘔吐毒素抗体の特異性を検討した、セレウリド同様の難溶性物質に対する反応性を ELISA 法調べたところ、マウスモノクローナル抗体の 1 クローン、およびニワトリ卵黄由来抗セレウリド IgY 抗体の特異性が優れていることが判明し、嘔吐毒素の面免疫学的な測定法の開発の可能性が見いだされた。

### 研究分担者

杉浦 雅仁	株式会社 ACTGen	グループリーダー
権平 文夫	デンカ生研株式会社	部長
宮下 隆	キューピー株式会社	主任研究員
中山 素一	花王株式会社	首席主任研究員

## A. 研究目的

我が国国民の健康を守る、とくに病原性微生物から身体を守るには、効率のよい検査法を開発し、常に環境や身体モニタリングを行い、重篤な感染症や慢性疾患に陥らないようにすることが肝要である。微生物はその名の通り目に見えず、人体中で増殖して自らを増やすとともに危害性を人社会に与える。院内感染、日和見感染、突然死などを引き起こす。その産生物すなわち毒素は、下痢や嘔吐といった食中毒症状から、アレルギー症状、発癌、慢性肝・腎疾患などを引き起こす。

病原性微生物は広く環境に分布し、食品中にも多く含まれる。それらは条件が整ったときに食品内で増殖し、また、微生物毒素を産生し、食品とともに人体に取り込まれて毒性を発揮する。食品の元となる農水産物には微生物の汚染や付着が必ずあり、人の口に入るまで食品と行動を共にする微生物もあれば、食品の製造加工段階で殺菌されて消失したり、不適切な流通保存のために食品中で食中毒発生量まで増殖したりする。微生物種によっては、毒素を産生し、食中毒を誘発する。食品衛生に携わる多くの人の努力から、種々の食品について食品中の微生物のリスク情報、検査法、適切な食品の加工・製造・流通・保存法が研究されてきた。その中で、セレウス菌は食品製造産業を悩ませている。セレウス菌が土壌分布細菌で、食品に栄養細胞や芽胞の汚染が避けられないこと、大腸菌や腸炎ビブリオ、サルモネラほどには研究情報が少ないこと、更には、セレウス菌が産生するペプチド性嘔吐毒素のリスクが不明瞭であり、検査法が限定していること、毒素が耐熱性で、細菌検査だけではセレウス菌食中毒をモニ

タリングできないことなど、多くの問題点を抱えている。

本研究では、セレウス菌とセレウス菌が産生する毒素について文献情報を収集し、食品産業の立場から、同菌および同毒素のリスク情報を整理することを目的とする。セレウス菌の検出同定方法に関する情報を整理する。セレウス菌が産生する毒素、とくに嘔吐毒素の検出方法を精査し、その問題点を取り上げる。さらに、セレウス菌の検査・検出に用いるため、セレウス菌が合成し分泌するタンパク質を遺伝子工学的に網羅的に抽出し、抗体作製を試みる。さらには、サルモネラ死菌に吸着させた嘔吐毒素を免疫原として作製したモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の性状を検討した。とくに、抗体の嘔吐毒素に対する特異性を試験した。

## B. 方法

### 1 文献の抽出

セレウス菌、食品、食品汚染、毒素、毒素産生、リスク、嘔吐、下痢をキーワードに用い、文献検索を行った。

収集した文献を、セレウス菌の食品汚染、および、セレウス菌毒素について区分し、情報を収集統括した。それぞれの毒素の危害性、検査法、その問題点について考察した。

### 2 セレウス菌に対する網羅的抗体作製

#### 1) シグナルシーケンストラップ (SST-REX)法<sup>1,2)</sup> (図1)

セレウス菌の標準株から total RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを調製した。pMX-SST ベクターに cDNA を挿入し、大腸菌を同ベクターで形質転換させた。遺伝子導

入直後の大腸菌を抗生物質含有寒天培地に播種し、生じたコロニーからプラスミドを抽出、DNAを精製し、cDNAライブラリーとした。

調整したcDNAライブラリーをパッケージング細胞(PLAT-E)に導入し、SSX作製のウイルスを調整、マウスプロB細胞(Ba/R3細胞)に添加、インターロイキン3依存性に増殖してくる細胞を得た。同細胞は、セレウス菌が産生する、シグナルペプチドを持つ分泌性タンパク質および膜タンパク質をコードする遺伝子を持つ。

## 2) モノクローナル抗体作製のためのハイブリドーマ作製

上記の遺伝子保有Ba/R3細胞を用いてマウスを免疫した。同マウスの脾臓細胞とP3U1ミエローマ細胞をポリエチレングリコールを用いて融合させた。情報通り、HAT選抜を行い、ハイブリドーマを得た。

## 3) スクリーニング法

当該遺伝子保有Ba/R3細胞とハイブリドーマ培養上清を混合し、洗浄、Goat anti-mouse IgG-蛍光色素(PE)を添加した。細胞懸濁液を、フローサイトメータFC500(ベックマン・コールター)を用いて解析し、ハイブリドーマが、細胞が提示するセレウス菌タンパク質に対して抗体を産生しているかをスクリーニングした。

## 3 抗セレウス菌嘔吐毒素抗体の抗原特異性の検討

### 1) 抗体産生ハイブリドーマとニワトリIgY抗体

セレウス菌嘔吐毒素は、バイオコントロール社より購入した。サルモネラ菌の酸加熱

死菌乾燥標品を調製した。メタノールに溶解した嘔吐毒素を、サルモネラ死菌標品に滴下しメタノールを蒸発させ、その後PBSを加えて懸濁させ、抗原を調製した。マウス及びニワトリを免疫し、マウスからはモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。計3種のハイブリドーマを確立した。その培養上清を抗原認識の特異性検討の材料とした。また、免疫ニワトリの卵黄からIgY抗体を精製した。

2) 嘔吐毒素をメタノールに溶解し、ELISA用ウェルに加え、溶媒を蒸発、嘔吐毒素を吸着させた。その後、培養上清、抗マウスIgG、抗マウスIgM、抗ニワトリIgY抗体を添加し、洗浄後、発色剤を加え、430nmの吸光値を読み取った。

### 3) 抗体の疎水性物質への反応性

各抗体の非特異反応を調べるため、卵黄レシチン、TritonX-144、Tween 80をウェルに吸着させ、ELISAを行った。

## C. 結果および考察

### 第1項: セレウス菌および同菌が産生する毒素に関する調査

#### 1 セレウス菌の特徴

##### 1) セレウス菌の分類

*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. anthracis*の4菌種が遺伝学的に近縁のセレウスグループとして大別される。

*B. thuringiensis*は生物農薬製剤と使用されているが、この殺虫効果を有する結晶毒素を産生する以外は*B. cereus*と遺伝的、生化学的にも同じである。*B. mycooides*はコロニーの性状によって、その他のセレウスグループの菌種と区別が可能である。*B. anthracis*は

莢膜を有すること、およびペニシリンに感受性が有することで、他のセレウスグループの菌種と区別が可能である。新しい動きとして4℃で生育可能な低温性のセレウス菌

(*B. mycooides*にも極めて類縁性が高い一群)を、*B. weihenstephanensis*として別種に分類する提案がヨーロッパではなされている。

## 2) セレウス菌の性状

セレウス菌は*Bacillus*属に属するグラム陽性の通性嫌気性菌で、本菌の栄養細胞は*Bacillus*属の中でも大型で1.0~1.2 × 3.5 μmの大きさであった。芽胞は孢子嚢を膨出させず、菌体の中央あるいはやや中央に存在している。芽胞の外側には疎水性の高いタンパク質で構成されたエキソスポリウムが形成されている。また、*Bacillus*属特有のフィラメント状のアペンデジを芽胞表面に形成する。至適生育温度は30~32℃、最低生育温度は大部分の菌が10℃、4℃まで生育する菌もいる。最高生育温度は50~55℃である。上述のように4℃で生育可能な低温性のセレウス菌(*B. mycooides*にも極めて類縁性が高い一群)を*B. weihenstephanensis*として別種に分類する提案がヨーロッパではなされている。水分活性は大部分が0.95以上で生育可能となるが0.92以上でも生育可能な菌株も存在する。最低生育pHは4.3~4.9と菌株により差がある。最高生育pHは9.3である。

## 2 セレウス菌の産生する毒素

嘔吐毒素と下痢毒素の2つに大別される。

### 1) 嘔吐毒素

1988年に嘔吐型食中毒事例由来のセレウス菌が動物細胞に対し空胞化活性を示すことが明らかにされ、この活性を指標にし、単離、精製、化学構造の決定が行われセレウリドと命名された。嘔吐毒素はセレウリドと称される。セレウリドはアミノ酸とオキシ酸からなる環状ペプチドであり、疎水性が高い脂溶性の物質である。セレウリドの合成はリボソーム依存性のペプチド合成系で合成されるのではなく、非リボソーム性ペプチド合成酵素で合成される。セレウリドが低分子であること、疎水性が非常に高いこと、平面構造を取っており、構造に揺らぎが無く免疫原性が無いと予想される。事実これまでに抗体は取得されておらず、HEp-2細胞等の培養動物細胞を用いた空胞化を確認する方法か、アカゲザル、スunks(ジャコウネズミ)といった動物(実際にヒトと同様にセレウリドにより嘔吐を起こす動物)に投与し確認する方法、または質量分析システムのLC/MS/MSで検出する方法及びセレウリド合成酵素遺伝子をPCRにより検出するしかない。サルの実験は困難が伴い、高価でもある。スunksは日本の実験動物会社のほとんどが取り扱っていない。現在のところ、1社のみスunksを生産しているが、製薬会社への独占直納の状態、検査機関が利用できない。したがって、セレウリドの簡便な検出法の確立が求められている。セレウリドの問題点は低分子の環状ペプチドであり酸やアルカリにも安定で、かつ熱にも安定で126℃90分の加熱でも失活せず、一度産生し食品中に混入すると失活させることが極めて困難なことである。

セレウリドの検出にはさらにいろいろな

困難がある。セレウリドの毒性は、分子がカリウムイオンをキレートし、そのカリウムイオンを動物細胞に大量に付与することにあるとされている。このときアンモニウムイオンをキレートすると毒素活性を失うと報告されている。タンパク質を含む食品中ではアンモニウムイオンの発生の可能性がある。HEp-2 細胞への毒性でセレウリドの毒性が評価されている今、産生されたセレウリドのすべてを検出しているかどうか疑問がある。

質量分析でセレウリドを検出定量するシステムがある。質量を小数点以下4桁まで特定でき、物質としてのセレウリドを同定する信頼性は高い。ところが、食品内で万一セレウリドが何らかの修飾を受けていた場合、まったく別の分子種として同定される。食品を加熱する際に起こる、分子付加反応であるメイラード反応の対象物質にセレウリドになる可能性は否定できない。

## 2) 下痢毒素

下痢毒素の生物活性としてウサギ腸管ループ液体貯留因子、血管透過性亢進因子、腸管壊死、皮膚壊死活性も認められたとの報告がある。下痢毒素研究では1970年以降種々の動物実験が行われてきた。研究者によって用いられた菌株、精製方法が異なり、現在でも統一した結果は得られておらず、エンテロトキシン活性をもつ毒素は数種類有ると考えられている。そのいずれも単一もしくは3つのコンポーネントから構成されるタンパク質である。特に、Non-Hemolytic Enterotoxin (非溶血性エンテロトキシン)、HBL (ヘモリシン BL) は食中毒への関与が明確である。その遺伝子はクローニングさ

れており、下痢毒素の中でも研究が進んでいる。これらの下痢毒素はタンパク質であり、また易熱性で55℃5分の加熱により失活する。ペプシン、トリプシン等の酵素により分解される。下痢毒素が易熱性のため、食品内で毒素を産生しても食中毒になるとは考えられていない。生菌として食品中に多量の下痢毒素産生性セレウス菌が含まれていて、食品とともに取り込まれ、胃を通過し、腸内で定着し増殖したセレウス菌によって下痢毒素が産生され、症状を誘発する発生機構が考えられている。セレウス菌の好気状態を好むことから、腸管内で菌の増殖がどの程度起こるのか、疑問が残るが、研究は進んでいない。

## 3 セレウス菌の食品汚染

### 1) セレウス菌の分布

土壌細菌であることから、農産物を中心に乳製品等の加工度の低い食品原料、食品製品に多く分布する。当然のことながら、増菌過程を入れると直接検出に比べ検出率が上がる傾向が認められる。一方、香辛料では増菌過程を入れることによりむしろ検出できなくなる報告があり、香辛料の抗菌作用を受けると推察されている。

### 2) セレウリド産生セレウス菌の分布

セレウス菌には嘔吐毒素、セレウリドを産生する菌株が存在する。嘔吐毒素産生株の割合に関しては環境由来株でも嘔吐毒素産生株の頻度が高いという場合もあるが、多くの論文では環境由来株の中の嘔吐毒素産生株の頻度は数%程度かそれ以下が多い。それに対して食品中ではその頻度が若干高くなる傾向が認められる。

### 3) 下痢毒素産生セレウス菌の分布

調査によって10数~90%という頻度で変動がある。毒素非産生株も当然変動する。下痢毒素に関しては産生を確認するキットがあるが、キットの反応性が異なることから、同じキットを使った場合以外は産生株の比率の値を比較することは出来ない。この論文による各毒素産生株の比率が異なるのが分離源等の違いによるものなのかは興味深い点である。

日本では嘔吐毒素、下痢毒素共に顕著に産生する株はこれまで報告がないが、海外では両毒素共産生する株の存在が報告されている。この日本と海外の結果の違いが地域差なのか、分離源の違いなのか、検出キットの違い、検査感度の差なのかも究明する必要があると思われる。

### 4) とくに食品中のセレウス菌の分布

日本ではセレウス菌食中毒事例は嘔吐毒素産生株による。原因食品は、穀類およびその加工品（米飯、焼き飯、パスタ等）のデンプン主体の食品が90%を占める。また、米国、アジアの他の地域でも嘔吐毒素産生株による食中毒が多数を占める。

一方、下痢毒素産生株による食中毒はヨーロッパで発生が多く、肉類、スープ類、各種スープ、チーズや粉乳を加えた乳製品等種々の食品が原因となっている。

### 4 セレウス菌の嘔吐毒素産生を変動させる条件

米飯等の穀類やその加工品（粥、焼き飯、麺類、パスタ、パン類）は菌の増殖が良く、

毒素産生量も多い傾向を示す。食肉、魚肉製品、牛乳、豆腐等のその他の食品の多くでは、菌の増殖が抑制されたり、増殖したにもかかわらず低い毒素産生量であったとの報告がある。増殖に適した食材を用いながら、食酢、マヨネーズ、ケチャップ等で調理した食品（すし飯、ポテトサラダ、イタリアンスパゲティ）等では、菌の増殖と毒素産生が明らかに抑制される場合がある。酢酸の添加あるいは単にpHを低下させることにより、セレウス菌食中毒が防止できる可能性もある。

牛乳や豆乳等の液体食品では振盪培養で増殖性及び毒素産生量が増加している。酸素供給があるほど菌の増殖と毒素産生が良好であることを示している。液体食品では溶存酸素を減少させるのも1つの方法かもしれない。

### 5 食品製造過程、食品製造施設における汚染について

セレウス菌は土壌菌であるため、食品製造環境には、加工度の低い農産物に付着して混入する。原料乳中にも混入してくる。乳に関しては、敷藁と生乳の孢子数には正の相関があり、牛に経口投与した場合糞及び生乳中の芽胞数が増加したという報告がある。

この様にセレウス菌の製造工程への混入は完全には防止できないことから、工程でいかに菌を増殖させないもしくは毒素を産生させないということが重要となる。そのためには、セレウス菌が好気状態を好むこと、更には毒素産生温度、食材の種類等を考慮し制御を考える必要がある。また、洗浄により芽胞や菌を洗い流すことも積極的に行うべきであろう。

セレウス菌が芽胞の最外層に持つエキソスポリウムは疎水性の高いタンパク質であり、エキソスポリウムを持たない他の *Bacillus* 属に比べ、セレウス菌は疎水性のステンレス板への吸着が圧倒的に高いという報告がある。芽胞の疎水性のため、ライン洗浄後にも芽胞が付着残存し、食品を汚染、食中毒を引き起こしているものと考えられる。また、嘔吐毒素食中毒を起こした菌株においては表層のアペンデジが多く、この構造物も食品加工の工程中での残存に有利なのかもしれない。また、芽胞の耐熱性に関しては嘔吐毒素産生株の方が高いという報告があり、嘔吐毒素産生株に関しては残存だけでなく除去に関しても更なる注意が必要だと思われる。

## 6 セレウス菌制御の条件、対策

嘔吐毒素による食中毒に関しては、毒性の本体であるセレウリドが極めて安定な物質であり、一度食品中に産生されると除去が困難である。毒素産生は菌の増殖に少し遅れて始まり、以後、菌の増殖に比例して毒素産生量が高まる。従って、セレウリドの危害を制御するには食品中で菌を増殖させないことが重要である。

下痢毒素は加熱により失活する。非加熱食品の喫食で下痢毒を摂取したとしても、強酸性である胃を通過する際にやはり失活する。従前より理解されているように、下痢型のセレウス菌食中毒は、菌が食品中で高い菌数レベルまで増殖し、胃を通過しても残存し、腸内で下痢毒を産生した場合に起こると考えられる。

この様にセレウス菌による食中毒を防止

するためには嘔吐毒素、下痢毒素とも食品中で菌を増殖させないことが重要である。そのためには食品を製造した後はすぐに殺菌処理する、嫌気性状態で保存する、速やかに冷却し冷蔵もしくは冷凍保存を行うことが肝要となる。また、セレウス菌の増殖できないような pH や Aw に食品の物性を調整するのも 1 つの手段である。

## 7 セレウス菌の検査法

### 1) 選択培地

セレウス菌を選択的に検出する培地として日本では NGKG 寒天培地が多く用いられているが、海外では MYP 寒天培地が多く用いられている。これらの培地は、硫酸ポリミキシンでグラム陽性菌を選択的にとらえ、これら培地に添加した卵黄で卵黄反応を起こさせてセレウス菌グループのレシチナーゼ活性を識別するものである。NGKG は更にグリシンを添加することでセレウス菌がグリシンを資化してアンモニアを生成し、培地中のフェノールレッドが赤く変化することで判定するものである。MYP は、セレウス菌がマンニットを資化しないことを利用して判定するものである。最近、セレウス菌の酵素基質培地が開発されている。これらに関してはその選択性の強弱を確認して使用することが重要である。

### 2) 確認試験

選択培地だけでは完全にセレウス菌と識別できない(特にセレウスグループの他の菌種との識別が重要) 場合があるため、確認試験を行う必要がある。確認試験としては以下の方法がある。

- ・ 集落形状（棍棒状集落－）
- ・ 運動性（+まれに－）
- ・ 嫌気下生育（+）
- ・ 結晶体毒素の形成（－）
- ・ ヒツジ血球溶血性（+）
- ・

### 3) 血清型による判別

食中毒の事例診断や疫学的調査においては血清型別が良く用いられる。セレウス菌の抗原には O 抗原と芽胞抗原、鞭毛抗原が存在するが、H 血清型別が食中毒の事例診断や疫学的調査に利用できるため多くの研究が報告されている。Taylor & Gilbert が作成した 26 に分類した H 血清群が最も用いられている。

とくに日本での嘔吐毒型食中毒では、H 抗原 1 型の菌によるものが最も多い。

### 4) デンプン分解性による分類

デンプン分解性は食中毒を引き起こす毒素の産生性との関連があるとして注目されている。嘔吐毒産生株はほとんどの株がデンプン分解陰性を示す。日本の食中毒事例のうち嘔吐毒産生株でデンプン分解陽性を示したのは、新潟で起きた豆腐での事例で分離された 1 株のみである。一方、下痢毒産生株はデンプン分解陽性を示すものが多い。このことから、デンプン分解能は産生する毒素の推定が出来るとして重要視されている。しかし、必ずしもデンプン分解陽性株、陰性株が嘔吐毒素や下痢毒素を産生するとは言いきることは出来ないため、留意する必要がある。

## 8 嘔吐毒素に関する種々の検出法

### 1) 嘔吐毒素検出法

上述した HEp-2 細胞で、嘔吐毒素の毒性が検出される。嘔吐毒素は市販されている。毒素の実濃度は不明であるが、合成嘔吐毒素の空胞化誘導が、1 ng/ml 程度で発現するので、これを元に、培養液から精製された嘔吐毒素の濃度が求められている。従って、市販嘔吐毒素を標準物として、検体の希釈率から、陽性反応を示した希釈段階を補正し、検体の嘔吐毒素含有量が求められている。

ブタの精子を用いて、嘔吐毒素の毒性が検出される<sup>3)</sup>。精子の運動は、ミトコンドリアのエネルギーによることが明らかになっていることから、嘔吐毒素のミトコンドリア毒性が、精子の運動性を減弱させ、その程度により、毒素の濃度が求められる。

質量分析によって嘔吐毒素の検出定量が行われている<sup>4)</sup>。嘔吐毒素が低分子であることから、質量分析には適した検出対象である。検査時の、内部標準に相当させる分子に、Valinomycin が用いられる。嘔吐毒素の D-O-Leu が L-O-Ala に、D-Ala が L-Val に変わっているであるが、3 回繰り返しの閉環ペプチドであり、極めて構造の類似した抗生物質が Valinomycin で、LC/MS/MS による嘔吐毒素の分析を可能にしている。

### 2) 嘔吐毒素遺伝子検出法

嘔吐毒素を合成する遺伝子が同定されていて、PCR および定量 PCR 法が開発されている<sup>5,6)</sup>。それらは、分離されたセレウス菌株にたいして適応可能で、食品からのセレウス菌嘔吐毒素合成酵素遺伝子が検出可能かは検討されていない。

## 9 セレウス菌嘔吐毒素および嘔吐毒素産生