

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。パターンニ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 8th annual meeting, San Francisco, CA USA. 18th 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, 1st-4th Sep, 2010.
- 4) H Akutsu. “Development of xeno-free culture systems of human embryonic stem cells for cell therapy”, JST/CIRM Workshop “Early translational research on stem cells”, Kobe, 16th May, 2011.
- 5) 阿久津英憲：「特別講演 再生医療を見すえたヒト ES 細胞の樹立」日本組織培養学会第 84 回大会，東京，5 月 28 日，2011 年
- 6) H Akutsu. “Human ES cell and iPS cell derivation: Clinical application and biological characterization”, 16th World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, 13th Sep, 2011.
- 7) 阿久津英憲：「臨床グレード ES 細胞の作製を目指して」理化学研究所筑波研究所，つくば，11 月 7 日，2011 年
- 8) 岡崎拓矢，町田正和，細田明広，黒川れいこ，田中寛子，大河内則彦，田中裕一，横山尚毅，阿久津英憲，梅澤明弘：「パターン培養によるヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の分化制御」

第 34 回分子生物学会年会，横浜，12 月 13 日，2012 年

- 9) 阿久津英憲：「新たなヒト胚作製技術の報告 (米国) について」第 64 回生命倫理専門調査会，中央合同庁舎第 4 号館第 2 特別会議室，1 月 17 日，2012 年
- 10) 阿久津英憲：「臨床応用を目指すヒト ES 細胞研究の現状」第 15 回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会，厚生労働省 17 階 専用第 18-20 会議室，1 月 25 日，2012 年
- 11) 阿久津英憲：「新たなヒト胚作成技術について～SCNT 法による 3 倍体 ES 細胞論文の背景～」科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会 特定胚及びヒト ES 細胞等研究専門委員会 (第 80 回)，文部科学省 16 階 特別会議室，1 月 25 日，2012 年
- 12) 阿久津英憲：「ヒト ES 細胞の臨床応用へ向けた取り組み」バイオリジクスフォーラム第 9 回学術集会，東京 タワーホール船堀，2 月 22 日，2012 年

2. 論文発表

英文

- 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.

- 6) Egli D, Akutsu H. Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 118-125.
- 7) Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A. Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports* 2011; Article number: 68.
- 8) Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Reprogram*. 2011;13(4):361-370.
- 9) Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem*. 2011; 286(23):20345-20353.
- 10) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. 2011; 7(5):e1002085.
- 11) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*. 2011;11:22.
- 12) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*. 2011; 286(13):11593-11603.
- 13) Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012 Mar 8;3(2):8.

邦文

- 1) 阿久津英憲, 草川森士, 梅澤明弘:「ヒト ES 細胞を用いた臨床試験」感染・炎症・免疫, 41(4):68-72, 2011.
- 2) 阿久津英憲, 佐藤星子:「ヒト ES 細胞, iPS 細胞」生命の誕生に向けて(第二版)編集; 日本

哺乳類動物卵子学会: 268-272, 2011.

3) 三浦巧, 阿久津英憲:「目で見る生殖と再生 iPS 細胞(図説)」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 18(3):232-236, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他
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・医療研究部幹細胞・生殖学術研究室
研究代表者 阿久津英憲

研究要旨 マイクロファブリケーション技術の基盤研究をヒト iPS 細胞へ応用し、汎用性のあるスケーラブルな培養デバイスと開発し、液性細胞外基質としての生体適合性ポリマーを用いた新規的培養システムを構築し、iPS 細胞等多能幹細胞の有用的な培養空間創出ができた。

研究分担者

分担研究者

- (1) (財) 癌研究会 癌研究所
- (2) 横浜市立大学医学部
- (3) 慶應大学医学部
- (4) 大日本印刷(株) 研究開発センター
- (5) 日油(株) 筑波研究所
- (6) (株) DNA チップ研究所
- (7) ライフテクノロジーズジャパン(株)
- (8) (株) セルシード
- (9) ユニーテック(株)

原 英二
梁 明秀
浜谷敏生
土屋勝則
山田 智
的場 亮
小柳智義
渡邊広也
新井貴博

A. 研究目的

本研究では、独自のマイクロファブリケーション技術を用いて iPS 細胞研究へ応用しスケー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の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。

【厚生科学研究における必要性・重要性】

本研究に係る研究者らがこれまで進めて来た系幹細胞に関するゲノム安定性や細胞の規格化等は指針策定に関して重要なエビデンスを供給し、政策医療の一躍を担ってきた。

【国内・国外における研究状況及び研究計画の新規性・独創性】

マイクロファブリケーション技術の基盤研究をヒト iPS 細胞へ応用し、汎用性のあるスケーラブルな培養デバイスと開発し、液性細胞外基質としての生体適合性ポリマーを用いた新規的培養システムを構築し、iPS 細胞等多能性幹細胞研究の医薬研究基盤底上げと促進に貢献する。

【明らかにすること】

細胞を活かす・保護する・増やす・(機能を)保つための体外培養環境での評価と改善は次世代医薬研究の基盤となる。細胞の足場の観点から新規的培養空間の創出と足場がポイントとなる疾患の病因メカニズム解明を行う。そのために必要なステップとして、1)

安全性の高いヒト iPS 細胞創出、2) iPS 細胞間応答の明確化、3) ゲノム安定化を維持する培養環境の開発、4) 細胞が主体となるマイクロファブリケーション技術の展開と生体適合性ポリマーによる細胞培養空間の開発、を行い医薬研究の底上げをする。

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バキュロウイルスベクターを使用することを iPS 細胞樹立に検討してきた。動物由来成分を排除した条件 (ゼノフリー) 条件で、iPS 細胞樹立を達成するために、下記の lipofectamine2000, Neon, Baculovirus (以上、life technologie) を用いた。ゼノフリー培養条件は、StemPro MSC XF(life technologies) を用いてヒト初代培養細胞株(Yub1896)を培養した。リプログラミング因子である 4 つの転写因子、Klf4、Oct4、Sox2、c-Myc を組み込んだベクターを構築し Oct4-Klf4-Sox2-cMyc となるシステムで細胞への導入実験を行う。(成育、ライフテクノロジーズ、癌研究所)

幹細胞性質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

ト iPS 細胞の細胞応答性を解明する。2D デバイスのパターンニング開発をから新規的な足場を創成する。(成育、大日本印刷、日油) 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。(成育、日油、大日本印刷)

iPS 細胞のゲノム安定性の解析

ヒト iPS 細胞培養環境が in vivo 分化動態に与える影響の検討

ヒト iPS 細胞培養の要素が免疫不全マウスへ移植した後の分化動態に与える影響を解析する。これまでの前実験的にゼノフリー培養により分化効率が上がることを見出してきた。本研究では、移植前の培養環境が in vivo での分化動態に及ぼす影響を検討する。移植後継時的に観察しサンプル回収後、組織化学的解析により分化状態を解析する。酵素なしでも継代可能となるナノインテリジェント表面をもつ培養ディッシュでヒト iPS 細胞の培養維持性を検討する。ヒト iPS 細胞をナノインテリジェント器材で少なくとも 5 継代培養維持を試み、培養細胞の性質評価を行う。(成育、ユニーテック、セルシード、癌研究所、横浜市立大学、DNA チップ研、慶應大学)

分化誘導に優れた足場の開発

分化誘導を制御するテンプレート開発を行う。分化制御の質は、構築できる分化細胞がどれだけ均一なものかを遺伝子発現やタンパク質レベルの特異的マーカー解析により行う。均一性に関しては、70%以上の効率で目的分化細胞が獲得できることを目指す。(成育、日油、大日本印刷)

(実験動物に対する動物愛護上の配慮)

各参画機関の動物実験の指針を遵守し、動物倫理委員会の承認を得て、動物愛護の精神のもとに実施する。と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。

国立成育医療センター研究所動物実験規程

<http://www.nch.go.jp/anim/animalkitei.htm>

国立成育医療センター動物実験に関する指針

<http://www.nch.go.jp/anim/animalshishin.htm>

(倫理面への配慮)

ヒト細胞に対する倫理面への配慮-iPS 細胞の

樹立に用いるヒト細胞

国立成育医療研究センター研究所においては、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。また、それぞれの組織については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、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。

国立成育医療研究センター倫理審査委員会

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

C. 研究結果及び考察

安全性の高いヒト iPS 細胞の創出

検討したほぼ全ての導入方法に関して、ゼノフリー環境下での遺伝子導入は極めて困難であった。Lentiviral system と Baculovirus が遺伝子導入が可能であった。しかし、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いことから、今後様々な応用性が検討されることから、遺伝子導入ベクター並びに装置に関しても、そのプロトコールも含め検討する必要がある。

幹細胞性質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結果、極めて良好に未分化性が維持できる条件を見出した。さらに、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。パターン化培養器材を応用することにより、特定の分化誘導に対して指向性を誘導できることを見出してきた。リピジュー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。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。

iPS 細胞のゲノム安定性の解析

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、免疫不全マウス皮下へ移植し 8 週間後に腫瘍発生を確認後組織解析を行った。外胚葉・内胚葉・中胚葉の各組織へ分化していることが細胞形態のおよび免疫組織染色により確認ができた。今後の課題としては、移植後奇形腫形成過程において時間軸でみて未熟組織成分の割合がどの程度低下していくのか、その割合には三胚葉間で指向性があるのかを検討する必要がある。種々のナノインテリジェントディッシュの継代酵素フリー培養を検討した結果、良好に培養出来ることを見出した。細胞株間による若干の反応性の差があることも判明し、グローバルな培養方法を開発していくリード的な要素を見出すことができた。

分化誘導に優れた足場の開発

細胞が主体となる生体適合性ポリマーによる細胞培養空間の開発特に、分化移行環境では、液性細胞外基質としての生体適合性ポリマーを用いた底面加工非接着系培養プレートにより、これまで胚様体形成分化誘導が不安定であったヒト iPS 細胞が安定的に効率よく胚様体形成が可能となり、網

膜色素上皮や消化管組織等へ再現性をもって分化組織を構築することができた。

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、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 (H22 年度報告)。ゼノフリー下の今度進展する培養技術に対応する遺伝子導入法の開発を進める必要がある。

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として、複数因子の塩基配列を組み込んだエピソーマル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の開発の必要性がある。

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。パターンニ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することが示唆され、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. "Development of xeno-free culture systems of human embryonic stem cells for cell therapy", JST/CIRM Workshop "Early translational research on stem cells", Kobe, 16th May, 2011.
- 2) 阿久津英憲:「特別講演 再生医療を見すえたヒト ES 細胞の樹立」日本組織培養学会 第 84 回大会, 東京, 5 月 28 日, 2011 年

- 3) H Akutsu. "Human ES cell and iPS cell derivation: Clinical application and biological characterization", 16th World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, 13th Sep, 2011.
- 4) 阿久津英憲:「臨床グレード ES 細胞の作製を目指して」理化学研究所筑波研究所, つくば, 11月7日, 2011年
- 5) 岡崎拓矢, 町田正和, 細田明広, 黒川れいこ, 田中寛子, 大河内則彦, 田中裕一, 横山尚毅, 阿久津英憲, 梅澤明弘:「パターン培養によるヒト人工多能性幹(iPS)細胞の分化制御」第34回分子生物学会年会, 横浜, 12月13日, 2012年
- 6) 阿久津英憲:「新たなヒト胚作製技術の報告(米国)について」第64回生命倫理専門調査会, 中央合同庁舎第4号館第2特別会議室, 1月17日, 2012年
- 7) 阿久津英憲:「臨床応用を目指すヒト ES 細胞研究の現状」第15回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会, 厚生労働省 17階 専用第18-20会議室, 1月25日, 2012年
- 8) 阿久津英憲:「新たなヒト胚作成技術について~SCNT法による3倍体 ES 細胞論文の背景~」科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会 特定胚及びヒト ES 細胞等研究専門委員会(第80回), 文部科学省 16階 特別会議室, 1月25日, 2012年
- 9) 阿久津英憲:「ヒト ES 細胞の臨床応用へ向けた取り組み」バイオリジクスフォーラム第9回学術集会, 東京 タワーホール船堀, 2月22日, 2012年

2. 論文発表

英文

- 1) Egli D, **Akutsu H**. Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 118-125.
- 2) Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, **Akutsu H**, Umezawa A. Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports* 2011; Article number: 68.
- 3) Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, **Akutsu H**, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Rerogram*. 2011;13(4):361-370.
- 4) Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y,

Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, **Akutsu H**, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem*. 2011; 286(23):20345-20353.

5) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, **Akutsu H**, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. 2011; 7(5):e1002085.

6) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, **Akutsu H**, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*. 2011;11:22.

7) Nishi M, **Akutsu H**, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*. 2011; 286(13):11593-11603.

8) Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, **Akutsu H**. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012 Mar 8;3(2):8.

邦文

阿久津英憲, 草川森士, 梅澤明弘:「ヒト ES 細胞を用いた臨床試験」感染・炎症・免疫, 41(4):68-72, 2011.

阿久津英憲, 佐藤星子:「ヒト ES 細胞, iPS 細胞」生命の誕生に向けて(第二版)編集;日本哺乳類動物卵子学会: 268-272, 2011.

三浦巧, 阿久津英憲:「目で見る生殖と再生 iPS 細胞(図説)」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 18(3):232-236, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他
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 衛生微生物部
研究代表者 鎌田 洋一
研究期間 平成22年4月～平成24年3月

研究要旨：抗体を用いての検査薬開発の対象として、食品危害微生物の1種のセレウス菌とその毒素、および、日常環境に広く分布する真菌、とくにアレルギー性真菌が学術的に重要で、かつ、産業的には魅力があることを明らかにした。セレウス菌について網羅的に抗体を作製したが、同菌の分泌性タンパク質の性状特性が原因で効率よく抗体は作製できず、抗体の利用範囲は限定されていた。セレウス菌嘔吐毒素への抗体として、ウサギ IgG ポリクローナル、ニワトリ IgY ポリクローナル、IgM モノクローナル抗体、および IgM からサブクラスを IgG に改変した人工モノクローナル抗体の反応性を検討したが、IgG および IgY ポリクローナル抗体が、高力価で嘔吐毒素に反応した。僅かに非特異反応があったものの、同抗体を用いて、毒素検出系の開発が可能と推察された。嘔吐毒素性セレウス菌を検出するイムノクロマトキットが市販されているが、同キットの妥当性を検証した。食中毒検査時に分離された毒素合成酵素遺伝子保有セレウス菌はキットに陽性で、毒素合成酵素遺伝子を持たないセレウス菌はキット陰性だった。加工食品から分離されたセレウス菌も同様で、同イムノクロマトキットの科学的妥当性が証明された。真菌アレルギー検査薬開発の難易を判断するため、真菌アレルギーの組換えタンパク質の作製を試みた。同アレルギーについて人工遺伝子を作製し、組換えタンパク質作製のプラスミドに挿入、大腸菌で発現させた。同タンパク質の精製まで約2週間で完了し、真菌アレルギーの検査システム開発は容易かつ発展性があると判断された。

研究分担者

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| (1) 株式会社 ACTGen 事業開発部
杉浦 雅仁 | (3) キューピー株式会社 研究所 食品安
全技術センター 宮下 隆 |
| (2) デンカ生研株式会社 試験研究開発部
権平 文夫 | (4) 花王株式会社 安全性評価研究所
中山 素一 |

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。文献を調査して情報を収集し、その問題点を整理した。

上記の問題点に立脚し、効率よいセレウス菌検査薬を開発するため、セレウス菌に対して網羅的に抗体を作製、その有用性をスクリーニングした。網羅的抗体は、セレウス菌が分泌するタンパク質に対して作製した。また、セレウス菌が産生する嘔吐毒素についても、抗体作製を試みた。同毒素は疎水性が非常に高く、抗原性がないとされていた物質であるが、特殊な方法で抗体を作製した。抗体の力価や特異性を向上させるため、遺伝子工学的手法を用いて人工抗体を作製し、その反応性を検証した。

人が生活する環境に常在する微生物種として真菌がある。屋外屋内を問わず、真菌胞子は浮遊し、そのなかにはアレルギーを引き起こす病原性真菌がある。アレルギー誘発性真菌について情報収集し、真菌アレルゲンの検査法開発の学術的重要性と産業的有用性を検証した。さらに、真菌アレルギーの診断や環境中の真菌アレルゲンを検査する方法の開発に必須の標準アレルゲンの調製を試みた。具体的には組換え真菌アレルゲンを作製し、作製に必要な日時等、検証した。

B. 方法

1 セレウス菌に関する文献の抽出、情報整理

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 (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 セレウス菌嘔吐毒素に対する抗体作製

1) 抗体産生ハイブリドーマ、ウサギ IgG 抗体およびニワトリ 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、ウサギ、およ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) 抗セレウス菌嘔吐毒素モノクローナル抗体のサブクラス改変

IgM クラスのモノクローナル抗体がセレウス菌嘔吐毒素と反応するものの、非特異反応が強かったため、抗体のクラスを IgG に変更することにより、毒素への反応性が向上するか検討した。

抗体産生細胞から RNA を抽出し、cDNA とした。抗体遺伝子の可変部をクローニングし、pcDNA3.1myc/His プラスミドと、pcpuro キメラ化ベクター内にクローニングした。293T 細胞に同ベクターを取らんスフェクションし、抗体遺伝子を導入した。(図 2)。培養後上清中の IgG 抗体産生を確認した。培養上清中の抗体と嘔吐毒素との反応性

を、ELISAを用いて検証した。

3 抗セレウス菌嘔吐毒素抗体の抗原特異性の検討

1) 抗体の力価測定

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、上記の各種抗体、抗マウスIgG、抗マウスIgM、抗ウサギIgG抗体、あるいは抗ニワトリIgY抗体を添加し、洗浄後、発色剤を加え、430 nmの吸光値を読み取った。

2) 作製した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。

4 嘔吐毒素産生性セレウス菌検出イムノクロマトキットの妥当性試験

最近、病原性セレウス菌を検出するイムノクロマトキットが発売された。同キットの妥当性を検証した。食中毒検査現場において、原因食品から分離されたセレウス菌を用いた。また加工食品から分離したセレウス菌も用いた。

嘔吐毒素合成酵素遺伝子を標的としたPCRを行い、毒素産生株、非産生株を選別した。

イムノクロマトキットはシングルパス・エメティックトキシンマーカー（メルク社製）を用いた。分離菌株をグルコース入りCGY培地に接種し、37℃で一晩培養した。室温まで冷却した培養液を、キットに滴下し、30分後の反応線の有無を、キット陽性陰性の判断とした。

5 真菌アレルゲンに関する調査

文献検索により、アレルゲンの原因となる真菌について、もっとも詳細かつ広範な記載のある文献を探索した。同文献から、アレルギーを直接引き起こすアレルゲンタンパク質について、データベースを作製した。真菌アレルゲン遺伝子の解析の状態を分析した。また、アレルゲンリストを集積している公共データベースについても検索し、その利便性を検証した。

真菌アレルゲンの供給会社、および真菌アレルギーの診断を受託している企業の情報を収集、整理した。真菌アレルゲンに関する学術的かつ産業的な価値を検証した。

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 セレウス菌の分類と性状

B. cereus、*B. thuringiensis*、*B. mycoides*、*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。

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。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。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。

嘔吐毒素は酸やアルカリにも安定で、かつ熱にも安定で126°C90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。セレウリドは低分子化合物であるにもかかわらず、有機合成されたという報告がない。標準物としての毒素の供給がなく、毒性学的検討がまったくなされていない。

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いない。

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。

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。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。

2) 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 セレウス菌嘔吐毒素に関する種々の検

出法

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。ブタの精子を用いて、嘔吐毒素の毒性が検出される。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。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。

3) 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。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。

第 2 項: セレウス菌に対する網羅的抗体作製と作製した各種抗体の嘔吐毒素との反応性

1 網羅的抗体作製

セレウス菌の分泌性タンパク質群に対する網羅的抗体作製を実施した。その結果 17 のターゲットタンパク質について抗体が作製されていた。抗体産生細胞が自律的に増殖して来たのは 12 種で、のべ 24 回のクローニング作業を行った。細胞の増殖が悪く、確

立できた細胞クローンは、2 抗原、各 3 クローンだった。

同抗体のセレウス菌 vegetative cells と芽胞への反応性をウェスタンブロット法で検定した。1 クローンがセレウス菌芽胞と vegetative cells の両方に反応した。データベースの検索から、同抗原は他の生物種でニ保有されているものであり、今後セレウス菌に特化できるかどうか、さらなる検証が必要と考えられた。

2 抗セレウス菌嘔吐毒素モノクローナルおよびポリクローナル抗体の反応性

IgM サブクラスから IgG1 および IgG2a に改変した。重鎖定常領域を含む抗体および含まない抗体の計 4 種を作製し、ELISA で、嘔吐毒素との反応性を検討した。同時に、ウサギ IgG ポリクローナル抗体、および、ニワトリ IgY 抗体と比較した。4 種類の改変抗体は、卵黄レシチン、 Tween-80、 Triton-X114 への非特異反応はなくなったが、同時に嘔吐毒素への反応性も消失した。IgG 抗体および IgY 抗体は、若干の非特異反応はあるものの、嘔吐毒素への反応性が強く、相対的な比較からは、非特異反応は無視できる可能性があることが示唆された。

3 サブクラス改変抗セレウス菌嘔吐毒素モノクローナル抗体の反応性

IgM サブクラスから IgG1 および IgG2a に改変した。重鎖定常領域を含む抗体および含まない抗体の計 4 種を作製し、ELISA で、嘔吐毒素との反応性を検討した。同時に、ウサギ IgG ポリクローナル抗体、および、ニワトリ IgY 抗体と比較した。4 種類の改変抗

体は、卵黄レシチン、 Tween-80、 Triton-X114 への非特異反応はなくなったが、同時に嘔吐毒素への反応性も消失した。

IgG 抗体および IgY 抗体は、若干の非特異反応はあるものの、嘔吐毒素への反応性が強く、相対的な比較からは、非特異反応は無視できる可能性があることが示唆された。

第3項:嘔吐毒素産生性セレウス菌検出イムノクロマトキットの妥当性評価

食中毒検査時に分離され、かつ、嘔吐毒素合成酵素遺伝子陽性セレウス菌株では、58株すべてがイムノクロマト陽性となった。毒素合成酵素遺伝子を持たない27菌株のうち、25株はイムノクロマト陰性だったが、残り2株はイムノクロマト陽性となり、擬陽性となった。食品から分離した21株のうち20株はイムノクロマト陰性だったが、残り1株は擬陰性を示した。

妥当性を試験したイムノクロマトキットは、高い感度と特異性を示し、食品の嘔吐毒素汚染の有無を検査できるとともに、食中毒検査現場においても、同キットの使用が有効であることが示唆された。

第4項:真菌アレルゲンに関するリスクプロファイルと組換え真菌アレルゲンの作製

1) 真菌アレルゲンを検査薬開発対象とするか検証するための情報解析

アレルゲン情報をもっとも充実した真菌アレルギーは、Simon-Nobbe らの総説だった(Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R., Breitenvach, M. (2008) The spectrum of fungal allergy, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145:58-86)。それによると、IgE

抗体が関与する I 型アレルギーに関する真菌は、80 の属に分布しており、そのなかで、アレルゲンタンパク質が同定されているのは 23 の属に及ぶとされていた。

データベースでは、International Union of Immunological Society の Allergen Nomenclature(<http://www.allergen.org/index.php>)が充実していた。それによると糸状菌では 9 属 16 種の、酵母では 3 属 5 種の真菌にアレルゲン遺伝子が同定されていた。同定されているアレルゲンタンパク質は、糸状菌では 78 種、酵母では 21 種が登録されていた。

我が国で容易に入手できる真菌アレルゲンを供給しているのは 1 社のみだった。同社では 5 種類の真菌アレルゲンが提供されていた。同社のアレルゲンは、真菌を液体培地で培養後、菌糸体を取り除いた培養液を凍結乾燥した標品で、含まれているアレルゲンの質的量的検査は行われていない。

IgE 抗体価を調べる受託検査を請け負っている企業では、真菌アレルギーについては 10 種についての成績を提供している。ただし、その際の抗原は、培養上清を材料としており、不純物を含んでいる。同企業では、診断率の向上のため、オプションとして組換え真菌アレルゲンを作製、検査を行っている。ただし、その数は 3 菌種 8 タンパク質に留まっている。登録されている真菌アレルゲンは 100 種に近い。組換えタンパク質を作製し、抗体を供給できれば、大きな販売市場があるだけでなく、真菌アレルゲンの比較や交差性等、学術的にも大きく貢献できる可能性が示唆された。

2) 組換えアレルゲン性真菌 (マラセチア)

アレルギーの作製

組換え真菌アレルギー作製にかかる作業量や技術的困難さを測るため、酵母アレルギーの1種 Mala f 2 アレルギーの組換えタンパク質作製を試みた。同アレルギー遺伝子は塩基配列が公開されており、人工遺伝子の合成、プラスミド挿入、大腸菌の形質転換、組換えタンパク質の発現まで、約1週間で終了した。カラムを用いての精製を行ったところ、高度に精製されていた(図4)。1Lの大腸菌培養から、精製標品を得るのは3日で終了し、塩基配列の登録さえあれば、短期日で組換え真菌アレルギーが調製できることが明らかになった。

D. 結論

病原性微生物としてセレウス菌と、人の生活環境に普遍的に分布する真菌、とくにアレルギー誘発性真菌を取り上げ、その危害性と、検査方法の詳細について情報収集し、現状を把握した。セレウス菌は毒素を産生することにより食中毒を誘発するが、嘔吐毒素については、抗体が作製されていない。

セレウス菌に対して網羅的抗体作製を行い、抗体をスクリーニングしたが、菌の特性により本法の適応は限定され、有効な抗体は作製できなかった。一方、サルモネラ吸着法で作製した抗嘔吐毒素ポリクローナル抗体や、遺伝子工学的手法で改変した人工抗体と嘔吐毒素との反応性を検討したところ、ウサ

ギ IgG あるいはニワトリ IgY ポリクローナル抗体が有効で、今後の検査法開発に応用可能であると判断された。

市販の嘔吐毒素産生性セレウス菌を検出するイムノクロマトキットは、その妥当性が証明された。ただし、検出の対象はあくまで菌体であるので、セレウス菌の危害をすべて検査できているわけではない。

真菌アレルギーが検査薬開発の対象となるか、学術的産業的検証した。多数の真菌アレルギーが同定されているにもかかわらず、不純物を含んだアレルギーエキスで検査されていた。組換え真菌アレルギーの作製を試みたところ容易であった。精製標準真菌アレルギーの調製と抗体作製を通しての検査法開発は、学術的にも産業的にも重要、かつ、魅力的で、今後大きく発展させうると予想された。

F. 知的所有権の取得状況

1 特許

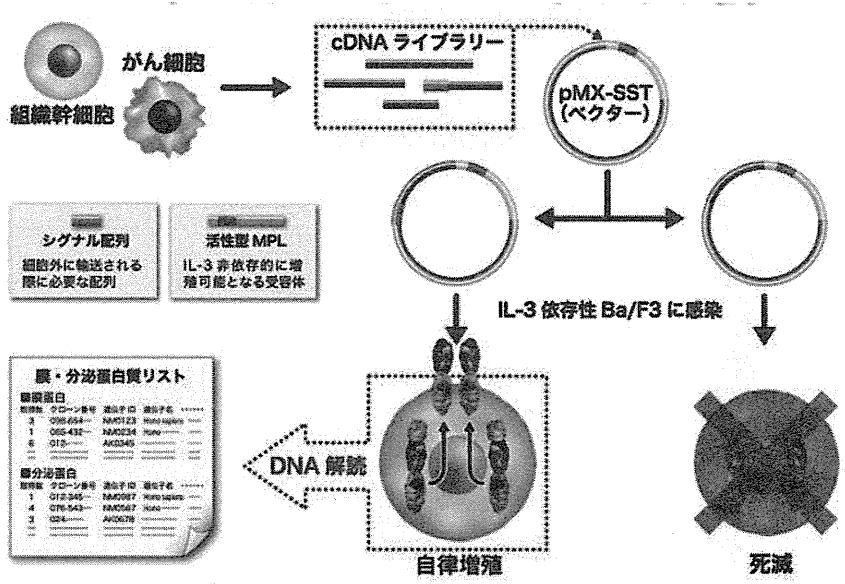
無し。

2 実用新案

無し。

3 その他

無し。



種々の細胞を材料に、レトロウイルスベクター(pMX-SSTベクター)を使用して、膜タンパク質・分泌タンパク質に特化した解析・同定が可能である。

図1シグナルシーケンストラップ法(SST-REX法)の原理

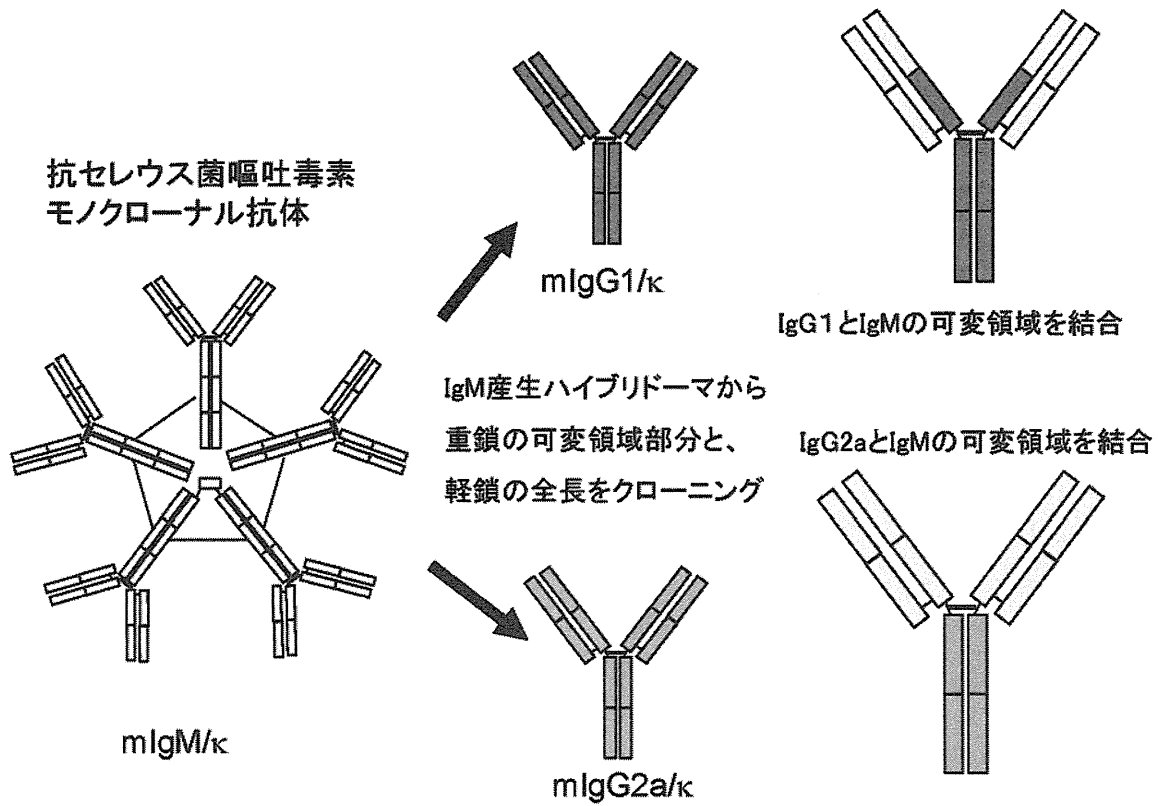


図2 抗セレウス菌嘔吐毒素モノクローナル抗体のクラス スイッチ

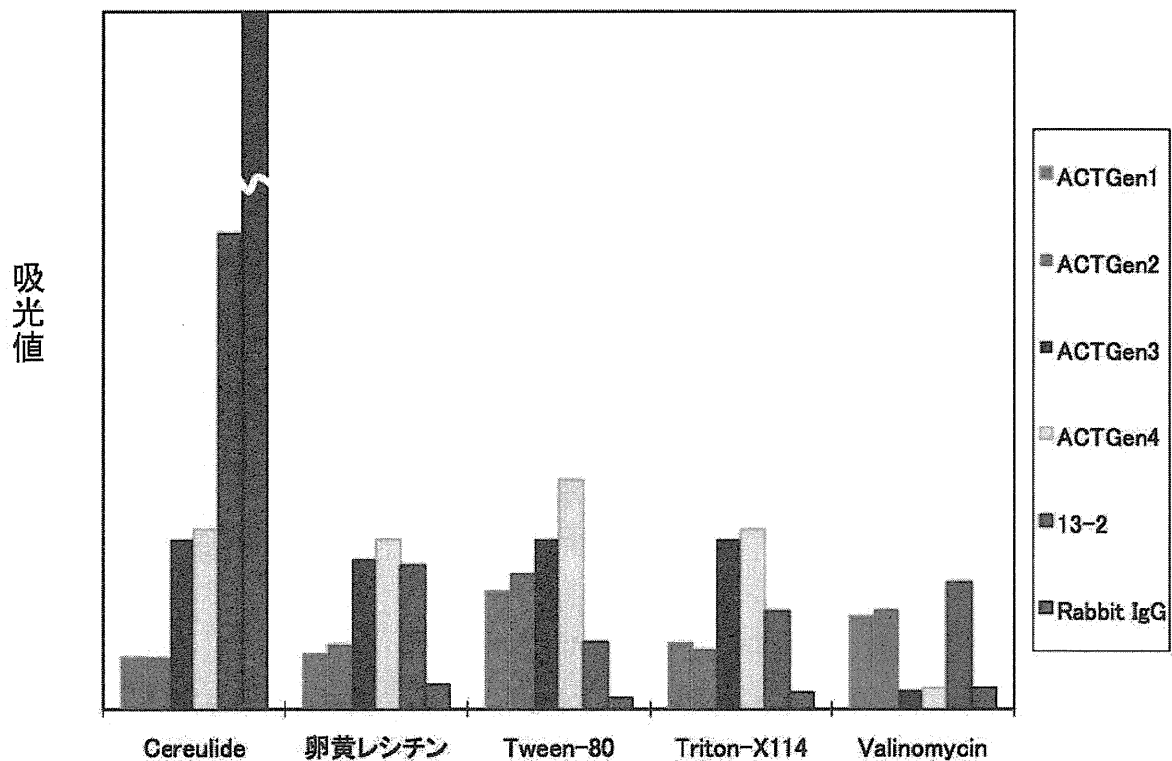


図3 セレウス菌嘔吐毒素への各種抗体の反応性

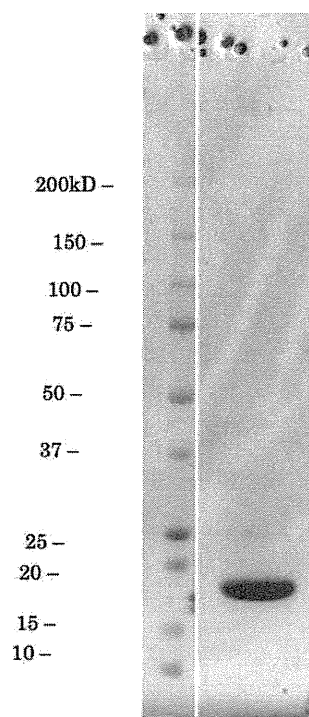


図4 アレルギー性酵母(マラセチア)アレルゲンの組換えタンパク質

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 衛生微生物部
研究代表者 鎌田 洋一

研究要旨：病原性を有する微生物として毒素産生性セレウス菌、その嘔吐毒素を選抜し、抗体を作製した。セレウス菌の分泌性タンパク質群すべてに対して、抗体の作製を試みたが、分泌性タンパク質が少なく、2種類の抗体を作製したに留まった。同抗体はセレウス菌一般を認識した。セレウス菌が産生する嘔吐毒素に対するモノクローナル抗体の、毒素認識の特異性をあげるために、人工抗体を作出した。嘔吐毒素が疎水性のため、非特異反応を起すが、人工抗体では非特異反応は無くなるものの、毒素への反応性も低下し、さらなる抗体の改変が必要だった。一方、IgY抗体およびポリクローナルIgG抗体は非特異反応があるものの、毒素への結合力は強く、ポリクローナル抗体の修飾によって毒素を検査する試薬開発を行うことが有効であるとの結論を得た。毒素産生セレウス菌を検出する免疫クロマトキットが市販されている。同キットの科学的妥当性を検証した。食中毒検査現場および食品安全検査現場において、同キットの有効性が証明された。新規の検査薬対象として、真菌を調査した。真菌アレルゲンはヒトに気管支喘息や鼻炎等を引き起こすが、研究が進んでおらず、市販のアレルゲンもその数が少なく、不純物を含む、一方、アレルゲン遺伝子は次々に同定されており、純度の高い真菌アレルゲンが容易に作製できることを明らかにした。アレルギー患者の多さと、真菌の種類が多さから、おおきな市場があり、かつ、種々の応用研究が展開できる対象物として、真菌アレルゲンは魅力的なものと判ぜられた。

研究分担者

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| (1) 株式会社 ACTGen 事業開発部
杉浦 雅仁 | (3) キューピー株式会社 研究所 食品安
全技術センター 宮下 隆 |
| (2) デンカ生研株式会社 試験研究開発部
権平 文夫 | (4) 花王株式会社 安全性評価研究所
中山 素一 |

A. 研究目的

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。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。

病原性微生物と同微生物が産生する毒素は、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。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。

昨年度は、セレウス菌について情報収集し、問題点を掘り下げ、嘔吐毒素の「未知」の不安と、有用な抗体が作製されていないため、検査法に未成熟な点があることを明らかにした。同同時に、網羅的抗体作製をセレウス菌について実施した。本年度は同法で作出した抗体の反応性を検証した。また、別法で開発していた、嘔吐毒素に対するモノクローナル抗体の特異性および反応性を、遺伝子工学的技術を用いて抗体を修飾することにより、改良することを試みた。

本研究事業の最終目的は迅速高感度な検査試薬を開発し、世の中に輩出してその利用を促し、検査することによって、我が国国民

の健康の維持増進、疾病予防に貢献することにある。この観点から考えるに、新規に開発され世に出た直後の製品の、科学的妥当性を検証することも意義がある。嘔吐毒素産生性セレウス菌を食品や、分離株から検出するイムノクロマトキットが市販された。本年度の事業の一環として、同キットの妥当性評価を行った。

人が生活する環境に常在する微生物種として真菌がある。屋外屋内を問わず、真菌胞子は浮遊し、そのなかにはアレルギーを引き起こす病原性真菌がある。アレルギー誘発性真菌について情報収集し、それらについての検査薬開発の有効性を推察した。

B. 方法

1 セレウス菌に対して網羅的抗体作製

セレウス菌の分泌性タンパク質群に対する網羅的抗体作製を実施した。自律的に増殖してきたハイブリドーマを培養し、培養上清を得、反応性を検討する材料とした。

2 セレウス菌抗原の調製と抗体の反応性検証

嘔吐毒素産生性3株、非産生性2株のセレウス菌をそれぞれ培養し、増殖相の *vegetative cells* と、*spore* をそれぞれ調製し、抗原とした。

上記、抗体を含んだハイブリドーマ培養液とセレウス菌抗原は、ウェスタンブロット法でその反応性を検証した。

3 抗セレウス菌嘔吐毒素モノクローナル抗体のサブクラス改変

昨年度の検討から、IgM クラスのモノク

ローナル抗体が、セレウス菌嘔吐毒素と反応するものの非特異反応が強かったことを明らかにした。クラスを IgG に変更することにより、毒素への反応性が向上するか検討した。

抗体産生細胞から RNA を抽出し、cDNA とした。抗体遺伝子の可変部をクローニングし、pcDNA3.1myc/His プラスミドと、pcpuro キメラ化ベクター内にクローニングした。293T 細胞に同ベクターを取らんスフェクションし、抗体遺伝子を導入した。培養後、上清中の IgG 抗体産生を確認した。培養上清は、分担研究を担当しているデンカ正研に送付し、ELISA を用いて、嘔吐毒素との反応性を検証した。

4 嘔吐毒素産生性セレウス菌検出イムノクロマトキットの妥当性試験

食中毒検査現場において、原因食品から分離されたセレウス菌を用いた。また加工食品から分離したセレウス菌も用いた。

嘔吐毒素合成酵素遺伝子を標的とした PCR を行い、毒素産生株、非産生株を選別した。

イムノクロマトキットはシングルパス・エメティックトキシンマーカー（メルク社製）を用いた。分離菌株をグルコース入り CGY 培地に接種し、37°C で一晚培養した。室温まで冷却した培養液を、キットに滴下し、30 分後の反応線の有無を、キット陽性陰性の判断とした。

5 真菌アレルゲンに関する調査

文献検索により、アレルゲンの原因となる真菌について、もっとも詳細かつ広範な記載

のある文献を探索した。同文献から、アレルギーを直接引き起こすアレルゲンタンパク質について、データベースを作製した。真菌アレルゲン遺伝子の解析の状態を分析した。また、アレルゲンリストを集積している公共データベースについても検索し、その利便性を検証した。

真菌アレルゲンの供給会社、および真菌アレルギーの診断を受託している企業の情報を収集、整理した。真菌アレルゲンに関する学術的かつ産業的な価値を検証した。

6 組換え真菌アレルゲンタンパク質の作製

Malassezia furfur の産生するアレルゲンタンパク質である Mala f 2 について、大腸菌を用いての組換えタンパク質作製系を開発した。データベースにある Mala f 2 遺伝子の塩基配列情報を利用し、人工遺伝子を作製、組換えタンパク質作製用プラスミドに組み込んだ。同プラスミドで大腸菌 BL21 株を形質転換した。LB 培地を用いて同大腸菌を培養、Iopropyl- β -thiogalactopyranoside でアレルゲンタンパク質の発現を誘導した。

Gultathione 結合 Sepharose ゲルを用いて、組換え Mala f 2 を精製した。

C. 結果および考察

1 セレウス菌への網羅的抗体作製と同抗体の反応性

セレウス菌の分泌性タンパク質群に対する網羅的抗体作製を実施した。その結果 17 のターゲットタンパク質について抗体が作製されていた。抗体産生細胞が自律的に増殖して来たのは 12 種で、のべ 24 回のクロー

ニング作業を行った。細胞の増殖が悪く、確立できた細胞クローンは、2抗原、各3クローンだった。

同抗体のセレウス菌 *vegetative cells* と芽胞への反応性をウェスタンブロット法で検定した。1クローンがセレウス菌芽胞と *vegetative cells* の両方に反応した。データベースの検索から、同抗原は他の生物種でニ保有されているものであり、今後セレウス菌に特化できるかどうか、さらなる検証が必要と考えられた。

2 サブクラス改変抗セレウス菌嘔吐毒素モノクローナル抗体の反応性

IgM サブクラスから IgG1 および IgG2a に改変した。重鎖定常領域を含む抗体および含まない抗体の計4種を作製し、ELISAで、嘔吐毒素との反応性を検討した。同時に、ウサギ IgG ポリクローナル抗体、および、ニワトリ IgY 抗体と比較した。4種類の改変抗体は、卵黄レシチン、 Tween-80、 Triton-X114 への非特異反応はなくなったが、同時に嘔吐毒素への反応性も消失した。IgG 抗体および IgY 抗体は、若干の非特異反応はあるものの、嘔吐毒素への反応性が強く、相対的な比較からは、非特異反応は無視できる可能性があることが示唆された。

3 嘔吐毒素産生性セレウス菌検出イムノクロマトキットの妥当性評価

食中毒検査時に分離され、かつ、嘔吐毒素合成酵素遺伝子陽性セレウス菌株では、58株すべてがイムノクロマト陽性となった。毒素合成酵素遺伝子を持たない27菌株のうち、25株はイムノクロマト陰性だったが、残り2

株はイムノクロマト陽性となり、擬陰性となった。

食品から分離した21株のうち20株はイムノクロマト陰性だったが、残り1株は擬陰性を示した。

妥当性を試験したイムノクロマトキットは、高い感度と特異性を示し、食品の嘔吐毒素汚染の有無を検査できるとともに、食中毒検査現場においても、同キットの使用が有効であることが示唆された。

4 真菌アレルゲンに関するリスクプロファイル

アレルゲン情報をもっとも充実した真菌アレルギーは、Simon-Nobbe らの総説だった¹⁾。それによると、IgE 抗体が関与するI型アレルギーに関する真菌は、80の属に分布しており、そのなかで、アレルゲンタンパク質が同定されているのは23の属に及ぶとされていた。

データベースでは、International Union of Immunological Society の Allergen Nomenclature²⁾が充実していた。それによると糸状菌では9属16種の、酵母では3属5種の真菌にアレルゲン遺伝子が同定されていた。同定されているアレルゲンタンパク質は、糸状菌では78種、酵母では21種が登録されていた。

我が国で容易に入手できる真菌アレルゲンを供給しているのは1社のみだった。同社では5種類の真菌アレルゲンが提供されていた。同社のアレルゲンは、真菌を液体培地で培養後、菌糸体を取り除いた培養液を凍結乾燥した標品で、含まれているアレルゲンの質的量的検査は行われていない。