

増殖性アデノウイルス(RCA)としては、5型アデノウイルス野性株(ATCC VR-5 感染力価  $5.62 \times 10^6$  pfu/ml)をHeLa細胞に感染させ、CPE (Cytopathic effect)が起こった段階で細胞を回収し、凍結融解後、再度HeLa細胞に感染させて増幅する、というサイクルを繰り返し、150mm dish 5枚分から回収したサンプルを用いて、水口らの方法(水口裕之・早川堯夫: 実験医学 20, 1799, 2001)に従って精製を行った。培養細胞としては、HeLa細胞をRCAの増幅用及びアッセイ用に、A549細胞をRCAアッセイ用に用いた。またアデノウイルスベクターの作製およびRCAの感染タイター測定にはHEK293細胞(Clontech PT3494-2)を用いた。HeLa細胞は10%ウシ胎児血清(FCS)含有Minimum Essential Medium (MEM)、A549細胞は10% FCS含有F12-K培地、HEK293細胞は10% FCS含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で継代培養を行った。

## 2. アデノウイルスベクターの調製

$\beta$ ガラクトシダーゼをコードするLacZ遺伝子を挿入したベクタープラスミドpAdHM10LacZ(水口博士より供与)をPacI消化により線状化して、SuperFect(Qiagen)を用いてHEK293細胞にトランスフェクションした。CPEが起こった細胞を回収し、凍結融解後、再度293細胞に感染させて増幅し、150mm dish 5枚分から回収したサンプルを用いて水口らの方法に従って精製を行った。

## 3. リアルタイム定量PCRに用いるプライマー、プローブおよび反応条件

RCAの定量的検出には、RCAのE1領域の塩基配列についてPrimer Express Ver.1.0(Applied Biosystems)で最適配列を検索して設計された以下のプライマーセットとプローブを用いた。Forwardプライマー(Ad5dE1-1035F): 5'-tcc ggt cct tct aac aca

cct C-3'; Reverseプライマー(Ad5dE1-1105R): 5'-acg gca act ggt tta atg gg-3'; TaqManプローブ(Ad5dE1-1058TM): 5'-Fam-tga gat aca ccc ggt ggt ccc gc-Tamra-3'。抽出したウイルスゲノムサンプル10 $\mu$ lは、Forwardプライマー、Reverseプライマー各0.5 $\mu$ M、TaqManプローブ0.16 $\mu$ M、TaqMan Universal PCR master mix(Applied Biosystems)25 $\mu$ lと混合して50 $\mu$ lとし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems)を用いてリアルタイム定量PCRを行った。反応条件は95 $^{\circ}$ C、10分間の熱処理後、95 $^{\circ}$ C、15秒、60 $^{\circ}$ C、1分の反応を50サイクル実施した。

## 4. Nested PCRに用いるプライマーおよび反応条件

E1領域に対応するプライマーとして、文献(Human Gene Therapy, 10, 113, 1999)を参考に、1<sup>st</sup> PCR用にJzp5(Ad3473F:cgc tga gtt tgg ctc tag cga t)とJzp6(Ad3698R:cat cac att ctg acg cac cc)、2<sup>nd</sup> PCR用にJzp5-2(Ad3483F:ggc tct agc gat gaa gat aca g)とJzp6-2(Ad3668R:ggg cat gcg cgt tgt caa at)を設定した。PCRは、94 $^{\circ}$ C、0.5分、55 $^{\circ}$ C、0.5分、72 $^{\circ}$ C、1分の反応を35サイクル繰り返した後、72 $^{\circ}$ C、7分間の反応を実施した。2<sup>nd</sup> PCRでは1<sup>st</sup> PCRの反応溶液2 $\mu$ lを鋳型に用い、サイクル数を25とした。293細胞由来DNAを検出するため、pregnancy-specific glycoprotein遺伝子のE1 DNAの挿入部位近傍の配列として、PSG3(293-5281F:ctc atg cct gcc tct ttc act)とPSG4(293-5567R:aga gcc atc cac aca atg tgc)を設定した。

## 5. ZnCl<sub>2</sub>によるウイルス濃縮法

ウイルス液に必要量の1M ZnCl<sub>2</sub>を添加し、vortexした後、室温で10分間静置した。液量が1mlの場合は12000rpmで5分、10mlの場合は3000rpmで15分遠心し、沈殿と上清に

分離した。沈殿を EGTA 溶液で溶解後、スマイテスト EX-R&D 核酸抽出キット (ゲノムサイエンス研究所) を用いて沈殿画分に含まれる核酸を抽出した。

#### 6. スマイテスト EX-R&D を用いた細胞からの核酸抽出

細胞をセルスクレイパーで培地ごと回収し、2000rpm で 5 分遠心した。上清を除いて PBS(-) に懸濁し、2ml チューブに移して再度遠心した。細胞を 100ul の PBS(-) に懸濁して凍結し、抽出まで (-70℃) で保存した。凍結融解を 5 回繰り返して細胞を破碎した後、10mg/ml DNase I を 2 $\mu$ l、10mg/ml RNase A を 2 $\mu$ l、1M MgCl<sub>2</sub> を 1 $\mu$ l 添加して、37℃、30 分反応させ、細胞由来の核酸を消化した。反応終了後、スマイテスト EX-R&D により核酸抽出を行った。

#### 7. ガラスビーズを用いた細胞からの核酸抽出

細胞をセルスクレイパーで培地ごと回収し、2000rpm で 5 分遠心した。上清を除いて PBS(-) に懸濁し、新しいチューブに移して再度遠心し、上清を除去後、細胞を -30℃ で保存した。細胞ペレットに、ガラスビーズ 1 個、界面活性剤を含む溶液 (L1) 125 $\mu$ l、プロテナーズ K を含む酵素溶液 (L2) 125 $\mu$ l を添加し、10 秒程度 vortex した。65℃ で 10 分インキュベーションした後、10 秒程度 vortex して、再度 65℃ で 10 分インキュベーションした。抽出液 2ml を添加して室温で 1 分攪拌した。上清を除き、洗浄液 2ml を加えて wash し、再度洗浄液 2ml を用いてビーズを洗浄した後、ビーズを室温で 5 分風乾した。ビーズを 2ml チューブに移して DNA 溶解液 50 $\mu$ l を加え、30 秒 vortex、65℃、5 分インキュベーションを 2 回繰り返す、さらに 30 秒 vortex した後、上清を採取し、20 $\mu$ l を定量的 PCR 反応に用いた。

#### 8. 培養細胞による RCA の増幅

HeLa 細胞 (1 x 10<sup>6</sup> 個) を 100mm dish に播種して一晚培養した。Day0 に、培地を除去し、1% FCS 含有培地に希釈した RCA 液 1ml を加えて 37℃ で 2 時間培養した。(スパイク実験の場合は細胞数を 1.5 x 10<sup>6</sup> 個とし、RCA 感染時にアデノウイルスベクターも同時に添加した。) 同一濃度につき dish は 3 枚を使用した。感染後、培地を除去し、10% FCS 含有培地 10ml を加えて培養し、Day1、3、6、9 に細胞および上清を回収した。細胞はセルスクレイパーではがし、2000rpm で 10 分遠心後、上清を別のチューブに移して、PBS(-) 3ml に懸濁した。細胞懸濁液は分注して遠心し、上清を除去後、ウイルスゲノムの抽出まで -30℃ で保存した。

#### 9. Cytopathic effect (CPE) アッセイ

RCA のウイルス学的検出法である CPE アッセイは、RCA 感受性細胞である HeLa 細胞または A549 細胞を指標細胞に用いた。8 の方法による RCA の感染実験の際に、顕微鏡下で CPE の有無を観察した。

#### C. 研究結果

##### 1. リアルタイム定量 PCR による RCA 測定 の定量性

まず、リアルタイム定量 PCR による RCA 定量の検討を行った。RCA の 10 倍希釈系列を MEM 培地を用いて調製し、各 100 $\mu$ l より EX R&D を用いてウイルスゲノム DNA を抽出し、20 $\mu$ l の水に溶解した。このうちの 10 $\mu$ l を用いてリアルタイム定量 PCR を行った。用いたプライマーおよび TaqMan プロブは RCA ゲノムに含まれるがアデノウイルスベクターには含まれない E1 領域の配列を認識するように設計されたものである。リアルタイム定量 PCR 増幅プロットにおいて TaqMan プロブの蛍光シグナルが一定の閾値を越えたサイクル数 (threshold cycle; Ct) とウイルス希釈列 100 $\mu$ l に含まれる RCA 量より得られた検量線

を Fig. 1 に示す。標準曲線はウイルス希釈列 100  $\mu$ l 中に含まれる RCA が  $10^8$  particles ~  $10^2$  particles の広範囲にわたって良好な直線性を示した。RCA 量が  $10^2$  particles 以下ではリアルタイム定量 PCR で正確な増幅プロットが得られなかったことから、この方法による RCA 定量の検出限界は  $10^2$  particles であることがわかった。

次に、リアルタイム定量 PCR の検出限界以下のサンプルについて、nested PCR による検出を試みた。Nested PCR は、定量性はないものの非常に低いコピー数の DNA も検出できることが知られている。E1 領域に設定したプライマーにより  $10^1$ 、 $10^{0.5}$ 、 $10^0$  particles/tube のサンプル各 10 本について nested PCR を行ったところ、 $10^1$  particles/tube では 10 本のうち 9 本、 $10^{0.5}$  particles/tube では 10 本のうち 5 本、 $10^0$  particle/tube は 10 本のうち 1 本で目的のバンドが検出された。このことから、nested PCR では、リアルタイム定量 PCR の検出限界以下のサンプルでも検出可能であり、十分なサンプル数をとれば、その検出限界は  $10^1$  コピー以下であることが分かった (Fig. 2)。

## 2. ウイルスベクターに混入する RCA の測定

RCA の実際の測定においては高濃度のアデノウイルスベクターに微量に混入する RCA を定量的に検出する必要がある。そこで、アデノウイルスベクター試料に RCA を微量スパイクした場合にもリアルタイム定量 PCR による RCA 定量が可能かどうかを検討した。アデノウイルスベクター試料としては AdHM4LacZ (Lot. 0516) を用いた。0、 $10^1$ 、 $10^4$ 、 $10^7$  particles/sample の Ad ベクターに  $10^1$ 、 $10^3$ 、 $10^5$ 、 $10^7$  particles/sample の RCA をスパイクし、各画分より抽出した核酸試料を用いてリアルタイム定量 PCR による RCA 定量を行った。その結果、RCA が  $10^3$  particles/sample 以上ではベクターの影響を受けることなく RCA の定量が可能であった (Fig. 3)。一方、RCA が

$10^3$  particles/sample 以下の場合には、ベクターの存在によりその量に応じて Ct 値が低下する傾向が認められた。このことから、ベクター中に RCA が存在する場合でも、ベクターの影響を受けることなく定量が可能であるが、この実験に用いたベクターには微量の RCA が混入している可能性があると考えられた。他のロットのベクターについてリアルタイム定量 PCR あるいは nested PCR を用いて検討したところ、 $10^9$  particles のベクターではロットによって E1 DNA が検出されるものとされないものがあったが、 $10^{10}$  particles のベクターでは全てのロットで E1 DNA が検出されることが分かった。Fig.4 には nested PCR の結果を示す。

アデノウイルスベクターは、293 細胞で増幅した後、cell lysate を DNase で処理してから CsCl を用いた超遠心で精製しているため、293 細胞由来の DNA の混入は多くないと考えられるが、ベクター中に検出される E1 DNA が 293 細胞での相同組み換えによって生じた RCA の混入によるものなのか 293 細胞由来の DNA 断片であるのかを、293 細胞の E1 挿入領域近傍に存在する pregnancy specific glycoprotein の配列を検出する PCR によって検討した。その結果、調べた全てのロットにおいて、 $10^{10}$  particles では 293 細胞由来の DNA を検出するプライマーによって強いバンドが検出されたことから、ベクター標品には 293 細胞由来の DNA 断片が混入していると考えられた (Fig. 5)。従って、293 細胞で増幅し精製したアデノウイルスベクター試料を、直接リアルタイム定量 PCR による RCA 測定の試料として用いることができないことが明らかとなり、ベクターに混入する RCA を測定するには RCA と 293 細胞由来 E1 DNA との分離操作を行う必要があることが分かった。そこで、ウイルス感受性細胞に RCA をスパイクしたアデノウイルスベクター試料を感染させ、感染性、増殖性を有する RCA のみを増幅させた後に PCR を実施することにより、ベクターに混入する E1

DNA の影響を抑えて RCA を測定できる可能性について検討した。ウイルス感受性細胞でウイルスを増幅後 PCR を行う Infectivity PCR 法は、先に確立されたレトロウイルスベクターに混入する RCA の検出系においても有効であったものである。

3. RCA の濃縮法の検討 Infectivity PCR を行う際に、試料中にごく微量に存在する RCA を定量する場合、RCA の濃縮が可能であれば検出感度を上げられることが予想される。増殖性レトロウイルス等のエンベロープ型ウイルスの場合、ポリエチレンイミン(PEI)結合磁気ビーズが有効であること、また PEI-磁気ビーズに捕捉されないウイルスでもスルホン化磁気ビーズに 2 価イオンを組み合わせることにより捕捉可能な場合があることが明らかにされているが、アデノウイルスの場合、PEI-磁気ビーズ、スルホン化磁気ビーズともに濃縮効率は最大 50%程度に過ぎなかった(data not shown)。

一方、ウイルスは  $Zn^{2+}$  などの 2 価イオンによって沈殿画分に回収できることが知られている。そこで、 $ZnCl_2$  による RCA 濃縮についても検討した。ウイルス液に  $ZnCl_2$  を添加して沈殿画分を得、そこから DNA を抽出してリアルタイム定量 PCR による RCA 測定を行ったところ、沈殿画分に RCA をほぼ 100% の効率で回収できることが分かった (Table 1)。血清の添加により  $Zn^{2+}$  イオンの濃縮効果は低下したが、 $ZnCl_2$  濃度を上げると血清が存在していても RCA を沈殿させ濃縮することができた。しかし、ウイルス液の量を 1ml から 10ml に増やしたところ、沈殿 (おそらく  $Zn^{2+}$  やタンパク等) の量が増え、核酸抽出により回収したサンプルでは PCR 反応が阻害され、RCA の検出ができなかった。リアルタイム定量 PCR による DNA 増幅反応に及ぼす  $ZnCl_2$  の影響を検討したところ、0.1mM 以下の  $ZnCl_2$  では影響は認められなかったが、反応系に 1 mM  $ZnCl_2$

が存在すると全く反応が進まなかった (data not shown)。沈殿からの核酸抽出の過程にフェノールクロロホルム処理を加えることや、反応系に EGTA を加えることで、 $Zn$  沈殿画分中の RCA の測定が可能になることが分かったが、100% 定量可能な条件を設定するには至らなかった。

#### 4. 細胞画分および培養上清に含まれる RCA 量の比較

アデノウイルスベクターの作製工程では一般に 293 細胞にベクターを感染させて増殖させた後、培養上清を使わずに細胞画分からウイルスを調製する。そこで、細胞画分を用いることで培養上清よりも感度よく RCA を検出できるのではないかと考えた。通常、大量の細胞からの核酸回収は、ゲノム DNA の共存のために粘性などの問題が生じることが多いが、RCA 検出においてはウイルス DNA がカプシドタンパクにコートされているためにヌクレアーゼ耐性であることを利用して、回収した細胞を凍結融解した後、DNase および RNase で処理して細胞由来の核酸を消化することによりサンプルの粘性を下げる工夫をした。この処理を行えば、 $1 \times 10^6$  個を超える量の細胞からでも問題なく DNA を抽出することが可能であった。

HeLa 細胞に RCA を感染させ、上清および細胞から DNA を調製し、E1 DNA をリアルタイム定量 PCR で測定した結果を Fig. 6 に示す。培養上清 100  $\mu$ l から抽出した DNA と、培養 dish 1/3 枚分に相当する細胞から抽出した DNA を用いて RCA 量を比較すると、細胞画分では上清の 100 倍以上の E1 DNA を検出することができた。Dish あたりでは、培養上清全体に含まれる 5~10 倍量の RCA が細胞画分に含まれることが分かった。従って、培養上清中の RCA を 100% の効率で濃縮することができても、細胞画分を利用する方がそれ以上に効率よく RCA を検出できることが分かった。そこで、Infectivity PCR による RCA の検出に

においては、RCR 検出系の場合とは異なり、細胞画分を用いることとした。

一方、細胞からの DNA 抽出の際に、凍結融解・ヌクレアーゼ処理の操作を経ずに簡便に DNA を抽出する方法として、ガラスビーズを用いた抽出法を検討した。この方法は、細胞のゲノム DNA の抽出を目的として開発されたものであるが、ウイルス DNA の抽出にも有効であることが検討されてきている。RCA を感染させた細胞を用いてガラスビーズによる DNA 抽出を行ったところ、従来の方法と同等の効率で、より簡便にウイルス DNA を回収できることが明らかとなり、ガラスビーズを用いた抽出操作を行うことによりアッセイ系の迅速化・簡便化を計ることが可能となった (Table 2)。また、ガラスビーズの他に、抽出操作の自動化のためにビーズ中に鉄球を入れたポリスチレン製のビーズ (Gene Ball:JSR Co.) についても検討したが、ガラスビーズとほぼ同等の抽出効率であった (Table 2)。

## 5. RCA のウイルス感受性細胞による増幅と定量

まず、RCA を 1%FCS 含有 MEM 培地で希釈したウイルス希釈系列各 1ml (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 pfu/ml) を HeLa 細胞に感染させた後、経日的に細胞を回収し、ガラスビーズを用いて DNA を抽出してリアルタイム定量 PCR を行い RCA 増幅の容量反応性を検討した。その結果、HeLa 細胞に感染させた RCA 量が 1 pfu/dish 以上の場合、各濃度 3 枚の dish 全てにおいて感染 3 日目から RCA の増幅が検出された。0.1 pfu/dish では RCA の増幅は検出されなかった (Fig. 7, Table 3B)。したがって感染 3 日目以降に測定することで 1pfu/dish 以上の RCA が検出可能と考えられた。同時に顕微鏡観察を行い、従来の RCA 検出法である CPE アッセイによる評価を行ったところ、Day6 の段階で、10000 pfu/dish でははっきりと CPE が認められ、1000 pfu/dish のサン

ルでわずかに CPE が認められたが、100pfu/dish 以下では CPE が認められなかった (Table 3A)。Day9 では、1000 pfu/dish、10000 pfu/dish でははっきりと CPE が認められ、100 pfu/dish でもわずかに CPE が認められたが、10pfu/dish 以下では認められなかった。したがって Infectivity PCR により検出感度は 100 倍以上、場合によっては 1000 倍以上に高めることが可能なこと、CPE アッセイよりも短時間で RCA が検出可能なことが判明した。HeLa 細胞のかわりに A549 細胞を用いた場合、Day 6 までは HeLa 細胞と同様に CPE の観察をすることができたが、それ以降は細胞の劣化が著しく、Day9 では CPE を判定することが不可能であった。また、リアルタイム定量 PCR により増幅された RCA を定量した結果、HeLa 細胞と比較して A549 細胞では RCA 量がやや少ない傾向が認められた (data not shown)。A549 細胞は、FDA のガイドラインにおいて使用可能な指標細胞の例として挙げられているが、今回用いた実験系では HeLa 細胞の方が適していると考えられた。

## 6. アデノウイルスベクターにスパイクした RCA のウイルス感受性細胞による増幅と定量

次に、RCA をウイルスベクターにスパイクした希釈した試料についても RCA のみの場合と同様に、Infectivity PCR による測定ができるかどうかを検討した (Fig. 8, Table 4)。10cm dish に HeLa 細胞を  $1.5 \times 10^6$  個播種し、翌日、dish あたり 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 pfu の RCA をそれぞれ  $10^9$  particles のアデノウイルスベクター AdHM10-LacZ3 と共に細胞に感染させた。この条件では、ベクターの MOI は約 30 である。1 日目、3 日目、6 日目及び 9 日目に細胞を回収し、ガラスビーズで DNA を抽出して RCA の測定を行ったところ、感染 1 日目以降、1pfu 以上で RCA の増幅が濃度依存的に検出された。0.1 pfu/dish では検出されなかった。従って、この実験での検出限界は 1pfu/dish であり、RCA 単独の場合と同等と考

えられたが、RCA の定量値は RCA 単独の場合と比較して低かった。同時に顕微鏡観察により CPE アッセイを行ったところ、Day9 において 10000pfu/dish のサンプルで 1dish にわずかに CPE の兆候が認められたのみであり、RCA 単独の場合と比較して CPE は起こりにくくなっていた (Table 4)。この結果から、RCA をベクターにスパイクした場合の方が Infectivity PCR による高感度化の程度は大きく、10000 倍の差があると考えられた。したがって、ウイルスベクター中の RCA の検出についても Infectivity PCR によって、従来の RCA 検出法よりも短時間で高感度に RCA を検出可能なことが明らかとなった。

#### D. 考察

ウイルスベクターに混入する増殖性ウイルスに関して FDA は、2000 年に「レトロウイルスベクターを用いる遺伝子治療用医薬品の増殖性レトロウイルス試験及びレトロウイルスベクターを用いた臨床試験における患者の追跡調査に関するガイダンス」を公表し、RCR 試験の実施時期、対象、容量等を具体的に提示し、RCR 暴露の危険性に関しては限られた知見しかないこと、RCR が製造段階のどの時点でも生じる可能性があることから製造の複数の段階で試験することを求めている。しかし、アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスに関しては、FDA ガイドライン中に CPE 法を用いて検出することが適当と思われること、定量的に RCA を検出できる系であることが望ましいことなどが記載されているが、RCR 検出系のような詳細な方法は示されていない。アデノウイルスベクターの安全性確保においては、主としてカプシドタンパク質に起因する免疫原性が問題となっており、RCA の危険性についての評価が未だなされていないことも背景にあると思われる。しかし、RCA はそれ自身の感染性や増殖性の懸念のみならず、ベクターに対するヘルパー機能によっ

てベクター投与を受けたヒトでのベクター増殖を起こす懸念もあることなどから、ベクターへの RCA の混入はできる限り避けるべきである。従来の CPE による RCA 検出法は非常に時間がかかること、指標細胞での測定は熟練を要することなどの問題があり、アデノウイルスベクターの安全性確保に向けて、より有効な検出法の開発が望まれているところである。

アデノウイルスベクターの安全性確保を目指した欧米での動きとして、Adenovirus Reference Material Working Group が組織され、2002 年に標準品が策定されたことが挙げられる。標準品の主たる役割は、ベクターの粒子数および感染力価のスタンダードとしてのものであるが、標準品は野生型アデノウイルスであるため RCA 検出系におけるスタンダードとしての役割も担っている。本研究においても標準品の使用が望ましいと考えられたが、分譲開始時期が遅れ、また入手した標準品の感染力価に問題がある可能性が出てきたため標準品を用いた検討はまだ行っていない。本研究では、代替品として ATCC より購入した 5 型アデノウイルスを HeLa 細胞で増幅し、CsCl を用いた超遠心で精製した後、標準品の力価測定法として公開されている Standard Operating Procedure に準じて particle titer および infectious titer を測定したものを実験に用いた。このサンプルの particle titer と infectious titer (NIU/ml) の比率は 1 : 8.6 で、標準品の値 (1 : 8.28) に近いものであった。

ウイルスゲノムを高感度に検出できる方法として、ウイルススクリーニング試験には PCR が多用されている。さらに最近開発されたリアルタイム定量 PCR 法を用いることにより、従来は半定量的測定しか行えなかった PCR を定量的に実施可能となっている。今回の検討では、E1 領域の配列を認識するように設計したプライマーと TaqMan プローブを用いたリアルタイム定量 PCR により RCA 量が  $10^2 \sim 10^8$  particles の広範囲にわたり定量可

能であることが示された。さらに、nested PCRにより、 $10^1$  particles/sample 以下という低濃度の RCA の検出も可能であった。このような低いコピー数のサンプルを試験する場合は、tube 中の RCA 溶液に RCA が含まれるか含まれないかのばらつきが生じるため、tube により増幅が検出される場合とされない場合が生じることから、検体数を多く取って hit rate によってコピー数を推定する手法が用いられることもある。「PCR の検出限界に関する理論的考察（日本赤十字血漿分画センター 鈴木亨氏 著）」によれば、シングルコピーのウイルスが検出できるほど PCR が最適化されていることを前提に、PCR hit rate と tube あたりの平均コピー数は、hit rate が 1/10 のとき平均コピー数 0.105、2/10 のとき 0.233、3/10 のとき 0.357、4/10 のとき 0.511、5/10 のとき 0.693、6/10 のとき 0.916、7/10 のとき 1.20、8/10 のとき 1.61、9/10 のとき 2.30 とされている。今回の検討では、10 コピーのとき hit rate が 9/10、3.16 コピーのとき 5/10、1 コピーのとき 1/10 であった。理論値と比べて hit rate が若干低い傾向にあるが、実際には核酸抽出の段階でのロスや、PCR 反応の検出限界はシングルコピーより高いであろうことを考えれば妥当な結果と思われる。

PCR による測定は高感度であるという利点がある一方で、感染性を持つ増殖性ウイルスだけでなく、ウイルスゲノムの破片でも検出してしまうという欠点が指摘されている。アデノウイルスベクターに含まれる RCA 検出においても、RCR の場合と同様、ベクターに含まれる DNA 断片の混入が問題となり、Infectivity PCR が有効な手段であると考えられたことから、RCR 検出系に則した系の確立を試みた。まず、RCR 検出系と同様に上清からの RCA 濃縮を行うことを試みたが、よい方法は見出せなかった。アデノウイルスは非エンベロープウイルスであり、凍結融解や超音波処理、超遠心などによる操作にも耐えうることから、ベクタ

ー調製の際には細胞画分が材料として用いられている。この点はレトロウイルスがエンベロープウイルスであり、細胞内では完全なウイルス粒子を形成しておらず、また、超遠心、ポリエチレングリコール沈殿などでは有効なウイルス濃縮が行えないためにベクター産生細胞の培養上清をベクター溶液として用いることと異なる点である。RCR 検出系においては PEI-磁気ビーズを用いた新規ウイルス濃縮法が有効であったが、RCA 検出系においては細胞画分を用いることにより RCR 検出系での濃縮操作に替え、また、ガラスビーズによる抽出を行うことで簡便化を図った。従来の核酸抽出法とガラスビーズによる抽出の比較では、抽出効率の点では大きな差はなく、検出限界は同等であった。

Infectivity PCR では RCA を HeLa 細胞に 1pfu 以上感染させた場合、感染 3 日目以降で RCA の増幅が検出された。従来の CPE を指標としたアッセイでは 6 日間程度の培養期間が必要であり、確実に RCA を検出するには 1000pfu 必要であったことから、試験期間の短縮と 1000 倍ほどの高感度化が達成された。また、実際の RCA 測定を模したアデノウイルスベクター試料中にスパイクした RCA について検討を行ったところ、1pfu 以上の RCA を感染させた場合に、増幅された RCA が検出され、RCA のみの場合と同様の検出限界(1pfu/dish)で測定可能という結果が得られた。ベクターに RCA をスパイクした場合の CPE は RCA のみの場合と比較して著明に抑制されており、培養 9 日目で 10000pfu/dish のサンプルでようやく CPE の兆候が認められたことから、Infectivity PCR による高感度化は 10000 倍以上であると考えられた。レトロウイルスベクターに含まれる RCR の検出においては、従来の方法であるフォーカスアッセイと比較して Infectivity PCR の採用により達成された高感度化は約 3-10 倍であったので、アデノウイルスベクターに含まれる RCA 検出系の方が Infectivity

PCR による高感度化の度合いがはるかに高いという結果となった。また RCA のほうがより早い時期から検出可能であった。これは、RCR では上清中に出てきたウイルスを濃縮しないと測定できないのに対し、RCA では細胞中のウイルスを検出可能であること、RCR 検出に用いられているフォーカスアッセイの感度が高く、RCA 検出に用いられている CPE アッセイの感度が低いことなどに起因すると思われる。今回の検討では、CPE アッセイにおいて細胞を継代せず confluent の状態で培養を続けて CPE を観察したが、従来の CPE アッセイでは途中で継代をしながら RCA を増幅することが一般的である。アデノウイルス受容体の CAR が tight junction に存在する分子であることを考えると、細胞が confluent な状態ではアデノウイルスの感染が起りにくく、繰り返しての感染による増殖が起りにくくなっている可能性も考えられるため、今回の実験方法では CPE アッセイの感度を過小評価している可能性もあるかもしれない。

CPE がベクターの MOI に影響を受けることは FDA ガイドライン中にも記載があり、慎重に MOI を設定することと指示されている。今回の実験ではベクターの MOI を約 30 というやや高い設定で行ったが、これは 10cm dish で 1 サンプルを評価したいという実験スケールの都合があったためである。ベクターが共存することで CPE は見難くなったが、PCR による評価では RCA のみの場合と同様に 1pfu/dish のサンプルでも RCA 検出が可能であった。実際にベクター中の RCA 混入率を評価する場合には、アデノウイルスは高タイターであるため MOI を考えるとアッセイに必要な細胞数もかなり多くなる。Infectivity PCR では CPE アッセイと比較して、培養スケールの縮小も可能であると思われる。

Nested PCR によりリアルタイム定量 PCR の検出限界以下のサンプルでも RCA を検出できたことから、Infectivity PCR による RCA

検出のさらなる高感度化に nested PCR が有効である可能性が期待された。しかし Infectivity PCR においては nested PCR を用いることで検出限界の 1pfu/dish のサンプルでも確実に RCA を検出することが可能になったものの、例えば 0.1pfu/dish のサンプルでも検出できるといった検出感度の向上にはつながらなかった。これは、低 pfu のサンプルでは、RCA の感染、増幅が成立するか否かにハードルがあり、感染・増殖がおこったサンプルではある程度の量の RCA が含まれ、感染・増殖が起こらなかったサンプルでは全く RCA が存在しないためと推定される。このような状況を考えると、RCA 検出系は、Quantal assay (all or none での評価) であり、1pfu の標準品をコントロールとして用いながら、RCA が検出されない上限のベクター粒子数と、RCA が検出される下限のベクター粒子数を測定することで、RCA の混入率を求めることが妥当かもしれない。もちろん、感受性細胞により未知試料の RCA を増幅する際、RCA 標準品の増幅も並行して行うことにより、未知試料に含まれる RCA の量を定量的に評価することも可能であると考えられる。

これまでの検討で我々が調製したベクターに含まれる RCA の混入率は測定できていないが、E1 DNA 混入の少ないロットのベクターでは  $1 \times 10^9$  particles 中には RCA は存在せず、 $1 \times 10^{10}$  particles 中には 293 細胞由来 E1 DNA あるいは RCA 由来 E1 DNA が検出されることが分かった。FDA による RCA 混入の許容値が 1 pfu /  $3 \times 10^{10}$  particles であることを考えると、許容される範囲の RCA 混入率であるかどうか、ぎりぎりのところかもしれない。

以上、Infectivity PCR 法と、ガラスピースによる細胞からの DNA 抽出法を組み合わせることによって、従来の細胞変性効果を指標とした RCA 検出法と比較してより短時間でより高感度に RCA の定量的測定が可能であることを明らかにした。今後、標準品を用いて、これま



で行われてきた CPE アッセイの検出感度を改めて評価すると共に、今回の検討で得られた結果を再評価することにより、アデノウイルスベクターの安全性確保のための RCA 検出系がより確実なものになると考えられる。

#### E. 結論

アデノウイルスベクターの品質・安全性確保上重視される、ベクターに混入する増殖性アデノウイルス (RCA) の検出法について検討を行った。アデノウイルスベクター試料をウイルス感受性細胞に感染後、細胞中で増幅された RCA 由来 DNA をガラスビーズを用いて抽出し、E1 遺伝子配列に対するプライマー、プローブを用いたリアルタイム定量 PCR を行うことにより、従来の指標細胞を用いた RCA 検出法と比較してより短時間でより高感度に混入 RCA の定量的測定が可能であることを明らかにした。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 内田恵理子: 遺伝子治療薬開発を巡る規制。  
*Cancer Frontier* 4, 137-143 (2002/2003)
- 2) Eriko UCHIDA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE and Takao HAYAKAWA: Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 891-897 (2002)
- 3) Zhi-Li XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA: Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector.

*Journal of Controlled Release*, 81, 155-163 (2002).

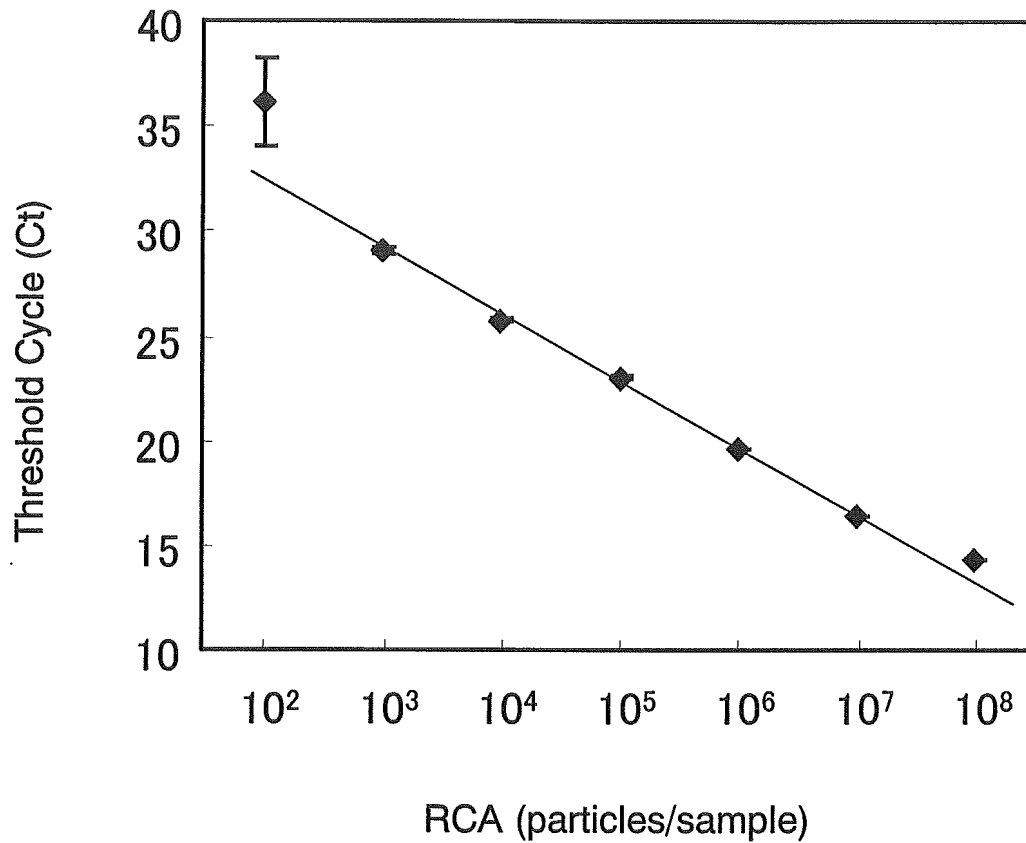
- 4) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: CAR- or  $\alpha v$  integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Therapy*, 9, 769-776 (2002).

#### 2. 学会発表

- 1) 内田恵理子、日方幹男、村田充弘、佐藤功栄、岩田明子、石井 (渡部) 明子、山口照英、早川堯夫: レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルスの高感度検出法の開発。第 75 回日本生化学会 (2002.9)

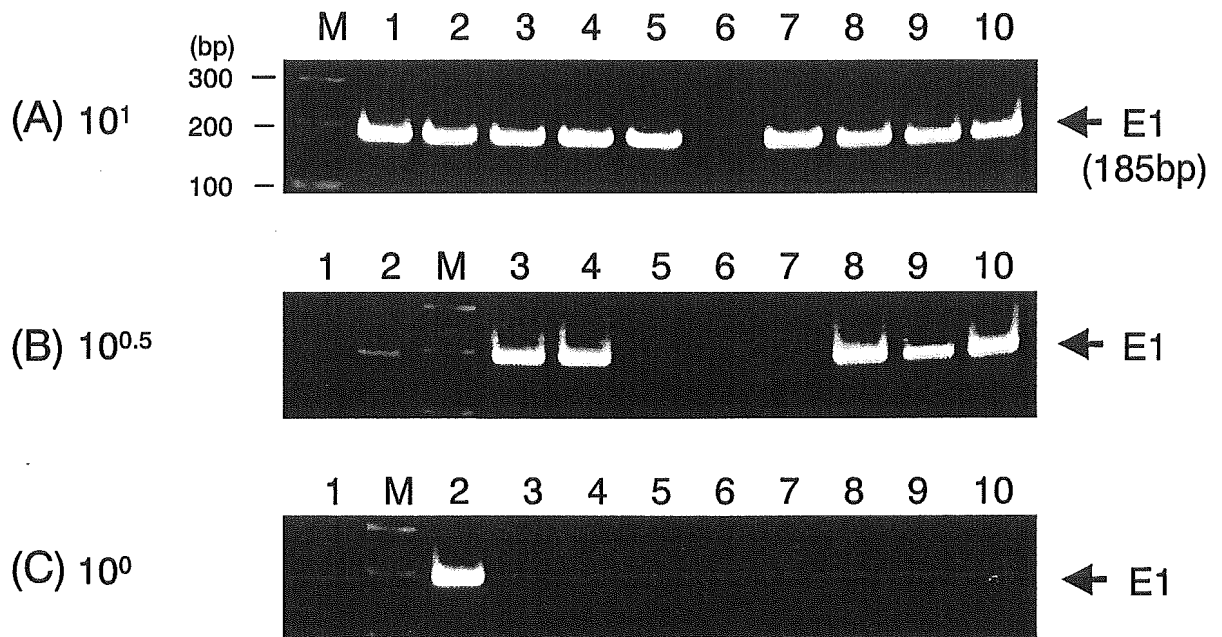
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

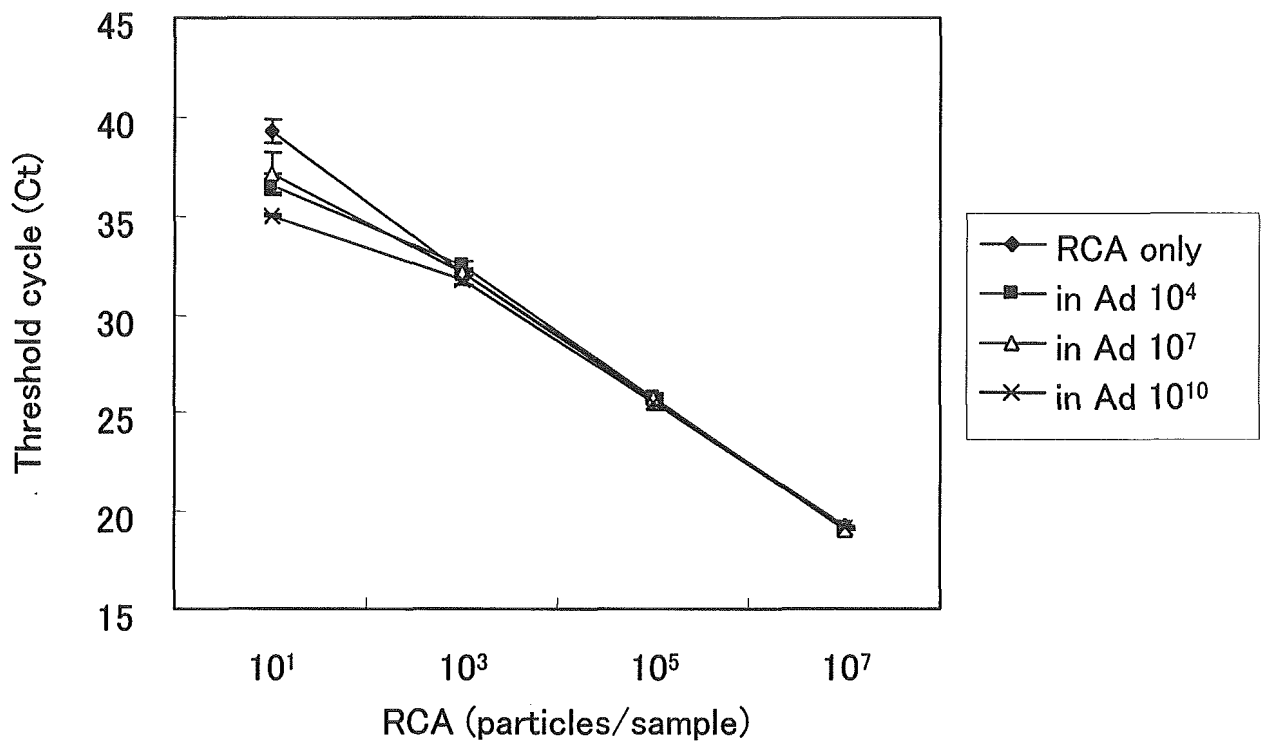


**Fig.1 Standard curve for the determination of RCA quantity generated from amplification plot of real-time quantitative PCR.**

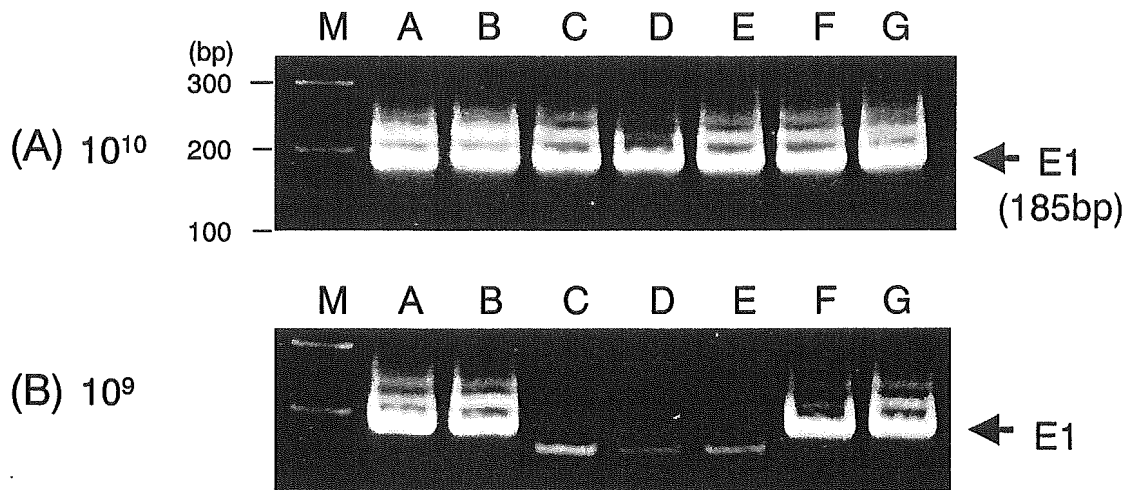
Viral genome DNA were extracted from serial log dilution of RCA, and amplification of each sample were performed by real-time quantitative PCR. Data were the mean  $\pm$  S.D. of triplicate amplification.



**Fig.2 Detection of low copy number of RCA by nested PCR.**  
 Viral genome DNA were extracted from serial log dilution of RCA, and amplification of each sample were performed by nested PCR (n=10). Particle number in each sample was (A)  $10^1$ , (B)  $10^{0.5}$ , (C)  $10^0$ .  
 M: molecular weight marker

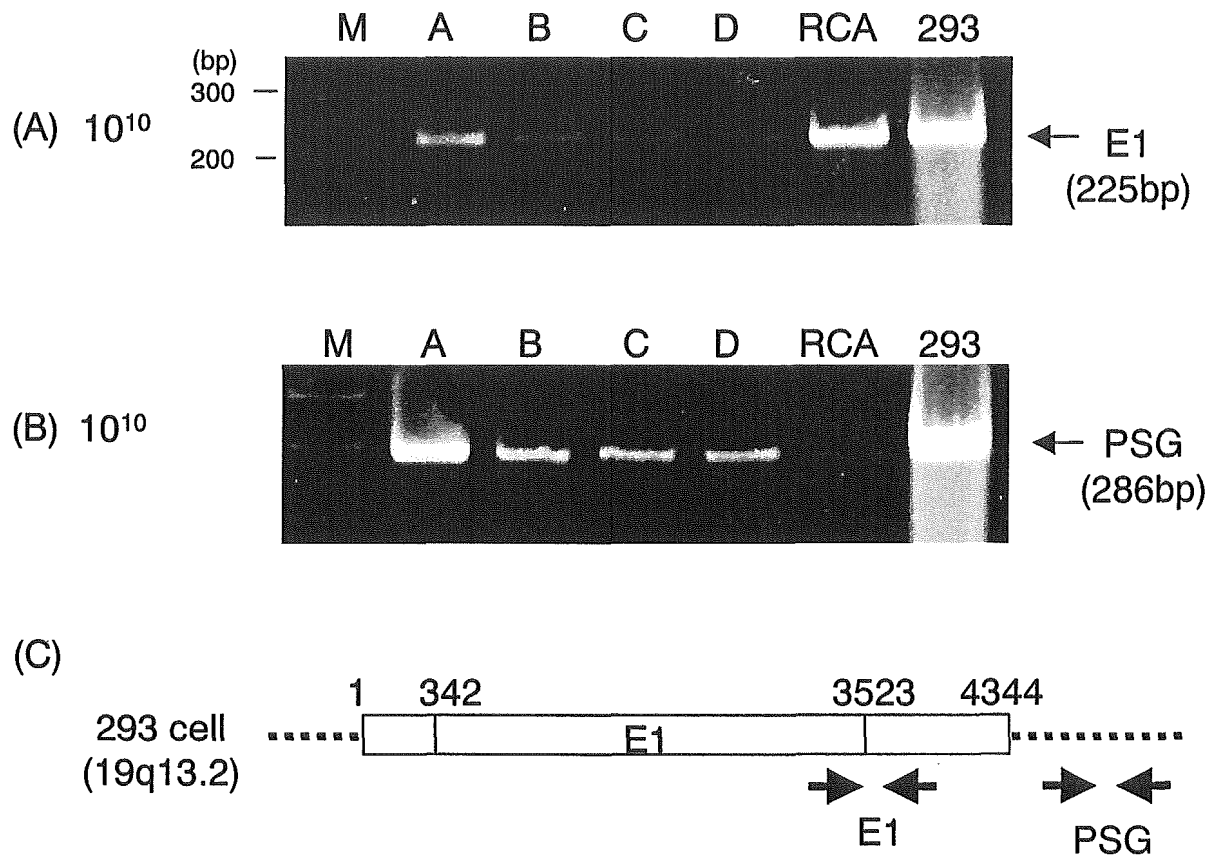


**Fig. 3 Detection of RCA spiked in Ad vectors by real-time quantitative PCR**  
 $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  or  $10^7$  particles of RCA were spiked in 0,  $10^4$ ,  $10^7$  or  $10^{10}$  particles of Adenovirus vectors (AdHM4LacZ). Viral DNA were extracted from each sample, and E1 DNA were detected by real-time quantitative PCR. Data were the mean  $\pm$  S.D. of triplicate amplification.



**Fig. 4 Detection of E1 DNA in Ad vectors by Nested PCR**

Viral DNA were extracted from  $10^{10}$  (A) or  $10^9$  (B) particles of Adenovirus vectors, and E1 DNA were detected by nested PCR. Lane A~G: Ad vectors constructing with in vitro ligation method and purified by CsCl density-gradient centrifugation. Lane A : AdHM4LacZ (Lot 0516), Lane B : AdHM10LacZ-2 (Lot 0529), Lane C : AdHM10LacZ-3 (Lot 0529), Lane D : AdHM10LacZ-4 (Lot 0529), Lane E : AdHM10LacZ-5 (Lot 0529), Lane F : AdHM10LacZ-3 (Lot 0613), Lane G : AdHM10LacZ-4 (Lot 0613), Lane M: Molecular weight marker.



**Fig. 5 Detection of E1 or pregnancy specific glycoprotein (PSG) DNA in Ad vectors by PCR**

Viral DNA were extracted from  $10^{10}$  particles of Adenovirus vectors, and then (A) E1 DNA or (B) 293 cell-derived pregnancy specific glycoprotein DNA were detected by PCR.

DNA from 293 cells were used as positive control for PSG DNA.

Lane A~G: Ad vectors constructing with in vitro ligation method and purified by CsCl density-gradient centrifugation. Lane A : AdHM4LacZ (Lot 0516), Lane B :

AdHM10LacZ-3 (Lot 0529), Lane C: AdHM10LacZ-4 (Lot 0529), Lane D :

AdHM10LacZ-5 (Lot 0529), Lane RCA: Replication competent adenoviruses, Lane 293 :

genomic DNA extracted from 293 cells. Lane M: Molecular weight marker.

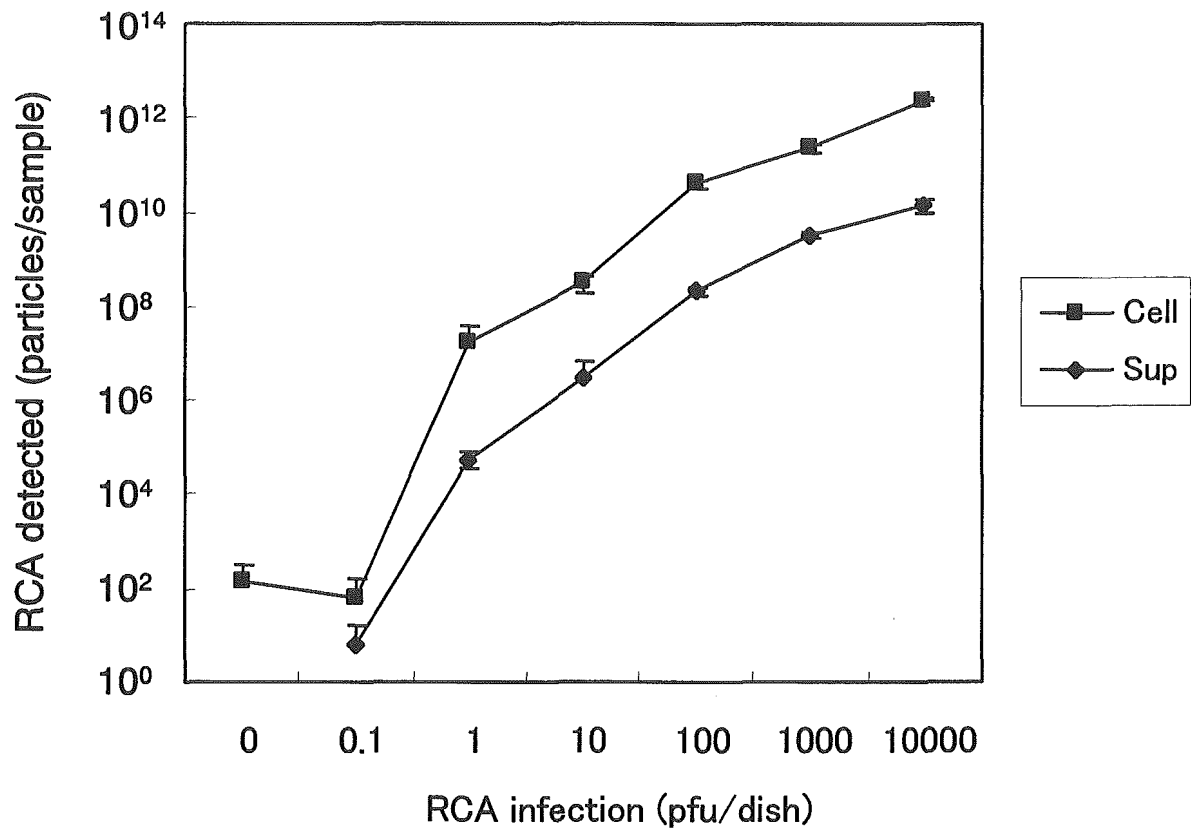
(C) E1 DNA inserted in chromosome of 293 cells and positions of PCR primers used

were shown.

**Table 1 Quantitative analysis of RCA concentration by Zn<sup>2+</sup>.**

ZnCl <sub>2</sub>	FCS	volume	RCA in precipitate(%)
1mM	0%	1ml	161.0
	1%	1ml	15.9
	10%	1ml	0.6
	0%	10ml	14.7
10mM	0%	1ml	102.0
	1%	1ml	113.0
	10%	1ml	116.0
	0%	10ml	0.0

1 x 10<sup>6</sup> particles of RCA in 0, 1 or 10 % FCS-containing medium were precipitated with 1mM or 10mM of ZnCl<sub>2</sub>. Quantity of RCA in each precipitate was determined by real-time quantitative PCR.



**Fig. 6 Comparison of particle number of RCA in cell fraction and culture supernatant grown in HeLa cells.**

Serial dilution of RCA were infected into HeLa cells.

Viral DNA from supernatant (100  $\mu$  l) or cells (one third of each dish) were extracted nine days after infection, and then quantity of RCA in each sample was determined by real-time quantitative PCR.

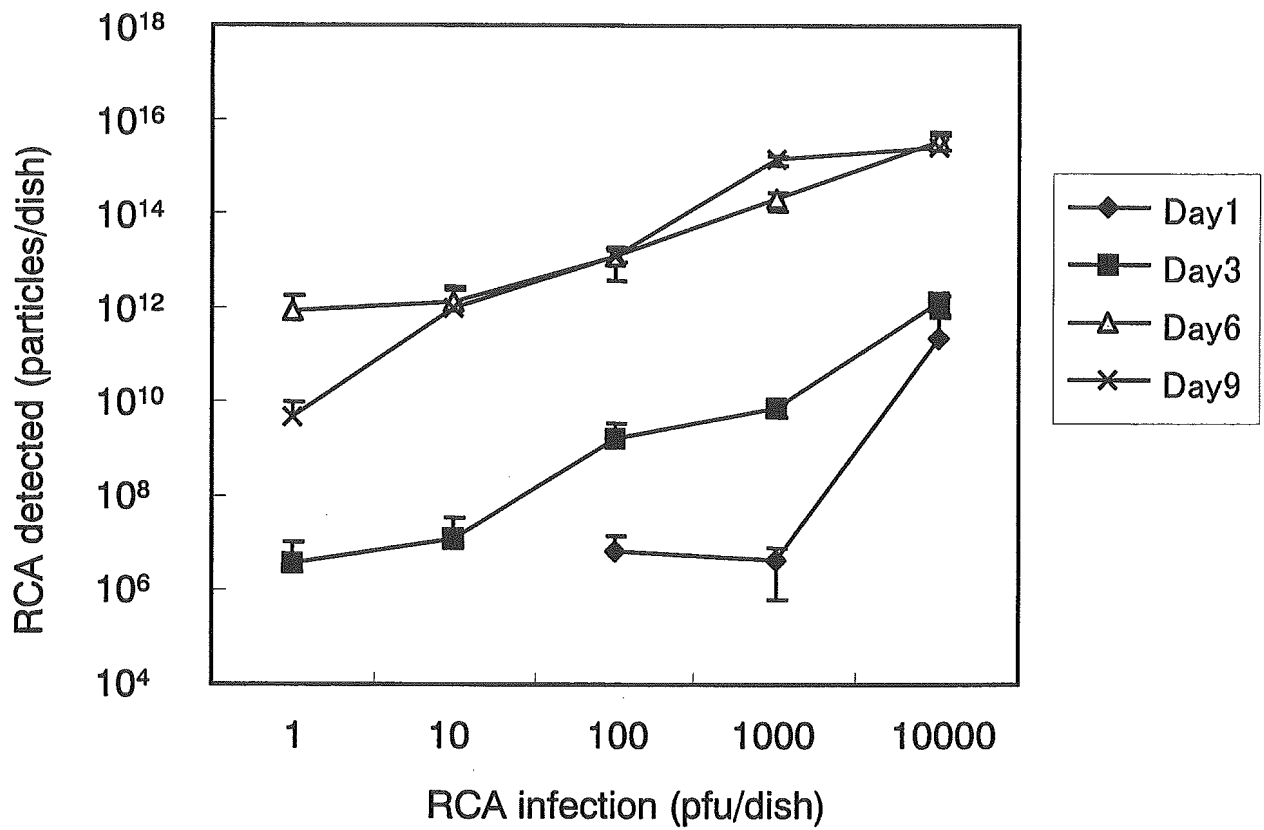
Data were the mean  $\pm$  S.D. (n=3).



**Table 2 Comparison of DNA extraction method from RCA-infected HeLa cells**

EX R&D	Gene Ball	Glass Beads
8.9 x 10 <sup>8</sup>	8.6 x 10 <sup>8</sup>	4.5 x 10 <sup>8</sup>
3.4 x 10 <sup>8</sup>	3.7x 10 <sup>8</sup>	4.9 x 10 <sup>8</sup>

10<sup>5</sup> particles of RCA were infected into HeLa cells, two days later DNA were extracted by EX R&D reagent, Gene Ball, or Glass Beads method. Quantity of E1 DNA in each sample was determined by real-time quantitative PCR.



**Fig. 7 RCA growth curve in HeLa cells.**

HeLa cells were infected with serial log dilution of RCA. Cells were harvested on day 1, 3, 6, and 9, and viral DNA were extracted by glass beads and then amount of RCA were determined by real-time quantitative PCR. Data were the mean  $\pm$  S.D. (n=3).

**Table 3 Comparison of CPE assay and infectivity PCR in detecting RCA**

**A) CPE method**

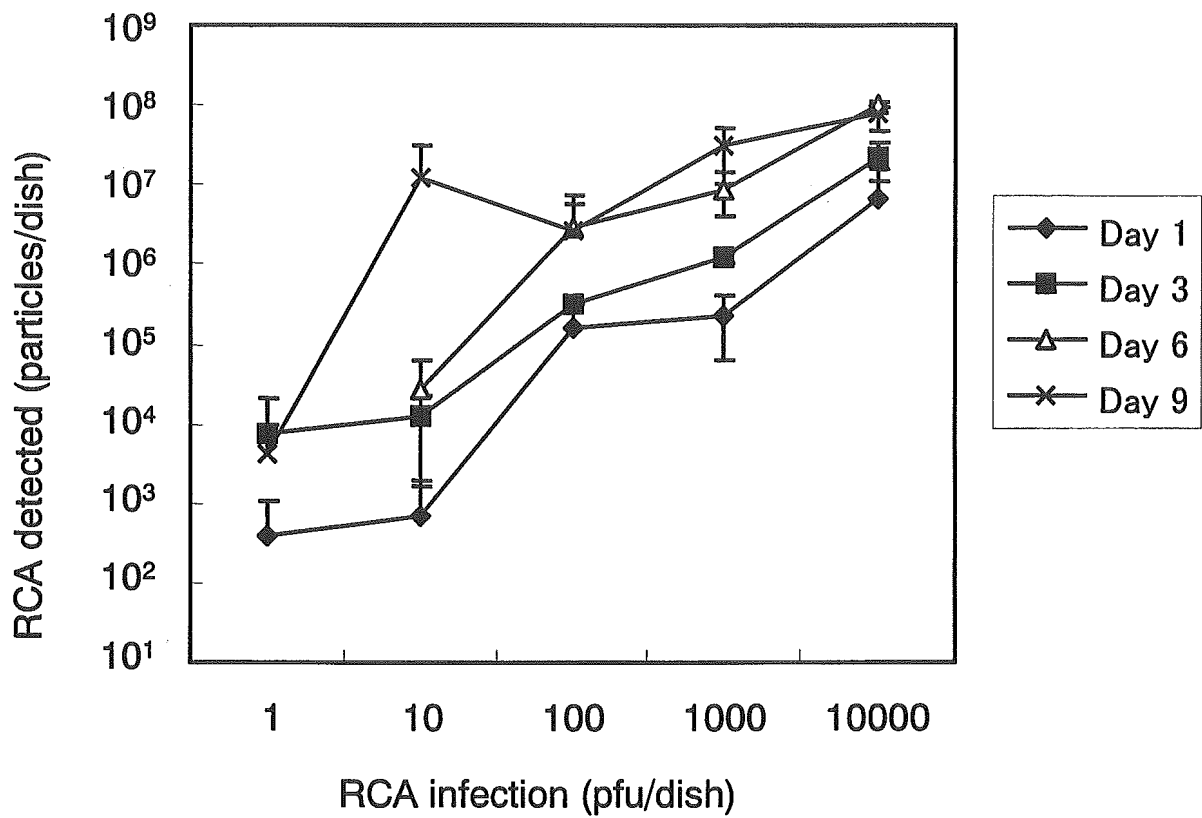
pfu/dish	Day1	Day3	Day6	Day9
10000	0/3	0/3	3/3	3/3
1000	0/3	0/3	3/3	3/3
100	0/3	0/3	0/3	3/3
10	0/3	0/3	0/3	0/3
1	0/3	0/3	0/3	0/3
0.1	0/3	0/3	0/3	0/3
0	0/3	0/3	0/3	0/3

**B) Infectivity PCR**

pfu/dish	Day1	Day3	Day6	Day9
10000	3/3	3/3	3/3	3/3
1000	3/3	3/3	3/3	3/3
100	3/3	3/3	3/3	3/3
10	0/3	2/3	3/3	3/3
1	0/3	1/3	2/3	2/3
0.1	0/3	0/3	0/3	0/3
0	0/3	0/3	0/3	0/3

Serial dilutions of RCA in medium were infected into HeLa cells. (A) CPE was observed under microscopy and (B) E1 DNA in DNA extracted with glass beads was detected by real-time quantitative PCR.

Number of CPE or E1 DNA positive samples were presented. (n=3)



**Fig. 8 Detection of RCA spiked in adenovirus vectors by infectivity PCR and glass beads extraction.**

HeLa cells were infected with serial log dilution of RCA spiked in AdHM10LacZ-3 adenovirus vectors. Cells were harvested on day 1, 3, 6, and 9, and then viral DNA were extracted with glass beads. Amount of RCA of each sample was determined by real-time quantitative PCR.

Data were the mean  $\pm$  S.D. (n=3).