

なければならない。が、それは今後の課題である。

E. 結論

hTERT を導入した臍帯血由来間葉系幹細胞は 133PDL という長期培養でもカリオタイプに変化は見られず、分化能も保持していた。この結果は再生医療に必要とする細胞の *in vitro* 増幅の一步前進になる。一方、がん遺伝子導入細胞株は 13 番染色体 1 本の特異的欠失を伴うが、間葉系細胞本来の分可能は保持していた。これらのことから、これらの細胞株はがん細胞のような染色体不安定性の解析や脂肪細胞、骨細胞を含めた多組織への分可能の研究には最適の材料である。

今後、細胞治療がますます盛んになるが、ES 細胞だけではなく、組織幹細胞でも移植に必要な細胞量の確保には *in vitro* 増幅が不可欠である。そのためには他細胞のコンタミネーションやマイコプラズマ汚染、ウイルス汚染チェックと同じように、移植された組織の悪性変異を防ぐためにもカリオタイプの検査は品質管理の重要な項目に加えなければならないことをこの研究は警告している。

F. 健康危険情報

適用なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Masao Takeuchi, Kikuko Takeuchi, Arihiro Kohara, Motonobu Satoh, Setsuko Shioda, Yutaka Ozawa, Azusa Ohtani, Keiko Morita, Takashi Hirano, Masanori Terai, Akihiro Umezawa, and Hiroshi Mizusawa
Chromosomal Instability in Human Mesenchymal Stem Cells Immortalized with Human Papilloma

Virus E6, E7 and hTERT Genes.

In Vitro. **43**, 2007 (in press)

2. 学会など口頭発表

- ① 竹内昌男¹⁾、小原有弘¹⁾、竹内喜久子¹⁾、小澤裕¹⁾、塩田節子¹⁾、大谷梓¹⁾、佐藤元信²⁾、梅澤明弘³⁾、水澤博¹⁾ (1 (独) 医薬基盤研究所。生物資源研究部、² (財) ヒューマンサイエンス振興財団・ヒューマンサイエンス研究資源バンク、³ 成育医療センター・生殖医療部：
ヒト間葉系幹細胞のヒトパピローマウイルス E6, E7 遺伝子および hTERT 遺伝子導入による染色体数の変化。日本組織培養学会・第 79 回大会(2006.5.26、東京)
- ② 小野和美¹⁾、佐藤元信¹⁾、吉田東歩¹⁾、小澤 裕²⁾、小原有弘²⁾、竹内昌男²⁾、水澤 博²⁾、澤田秀和¹⁾ (1 ((財) ヒューマンサイエンス振興財団・ヒューマンサイエンス研究資源バンク、² (独) 医薬基盤研究所。生物資源研究部)：
ネステッド PCR を用いた培養細胞の由来動物種検査法
日本組織培養学会・第 79 回大会(2006.5.26、東京)
- ③ 竹内昌男¹⁾、竹内喜久子¹⁾、小原有弘¹⁾、寺井政憲²⁾、梅澤明弘²⁾、水澤博¹⁾ (1 (独) 医薬基盤研究所。生物資源研究部、² 成育医療センター・生殖医療部：
hTERT により不死化したヒト間葉系幹細胞の染色体安定性と形質。
日本再生医療学会・第 6 回総会(2007,3.13, 横浜)

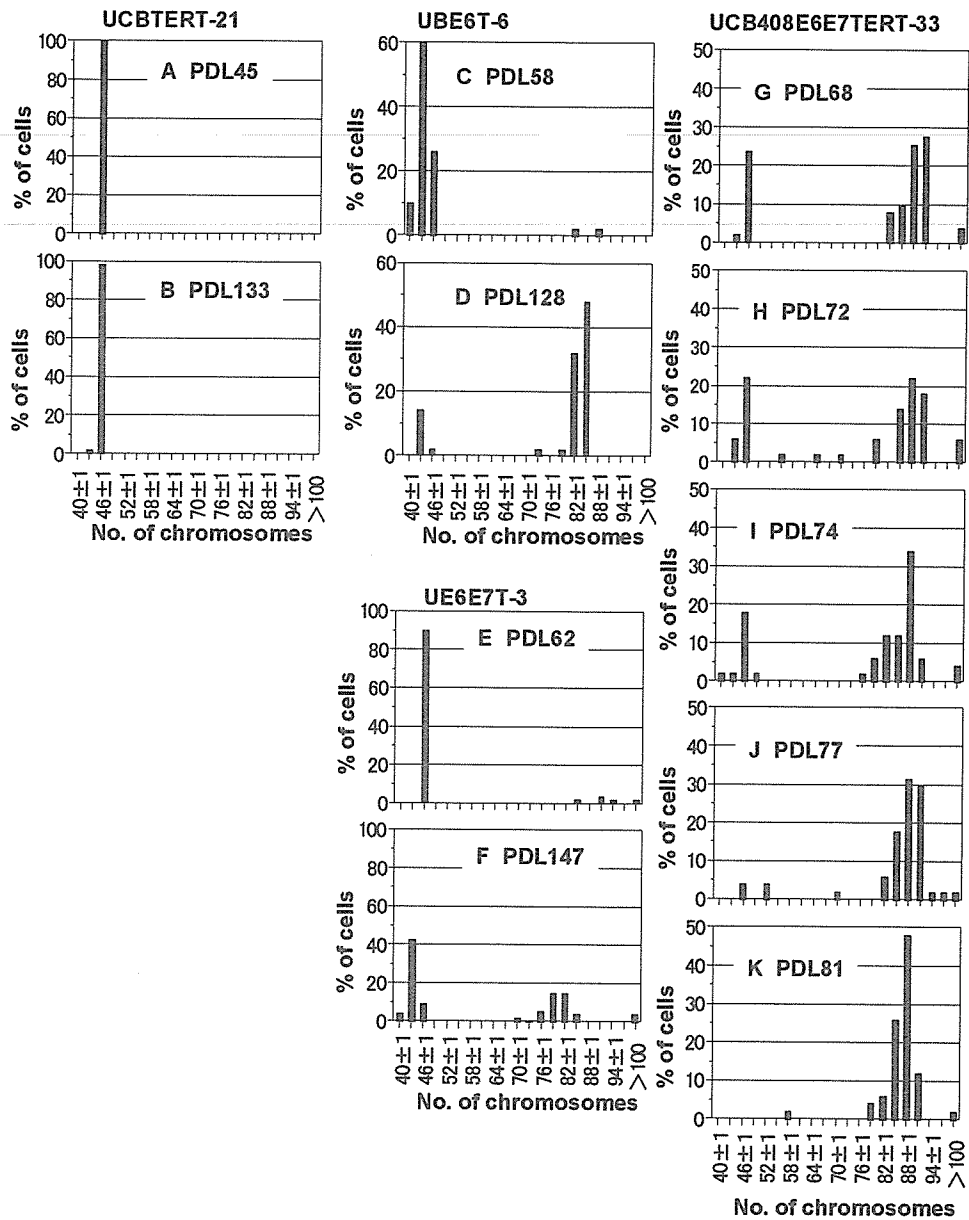


図 1. 長期培養における染色体数の変化

(A-K) 種々の培養ステージにおける分裂中期染色体数を DAPI 染色により測定した。(A, B), (C, D), (E, F), (G-K) はそれぞれ UCBTERT-21, UBE6T-6, UE6E7T-3、UCB408E6E7TERT-33 の染色体数の分布である。各測定は 50~100 細胞の分裂中期の染色体。培養が長期になるにつれ染色体数は $2n$ から $4n$ に変化している。

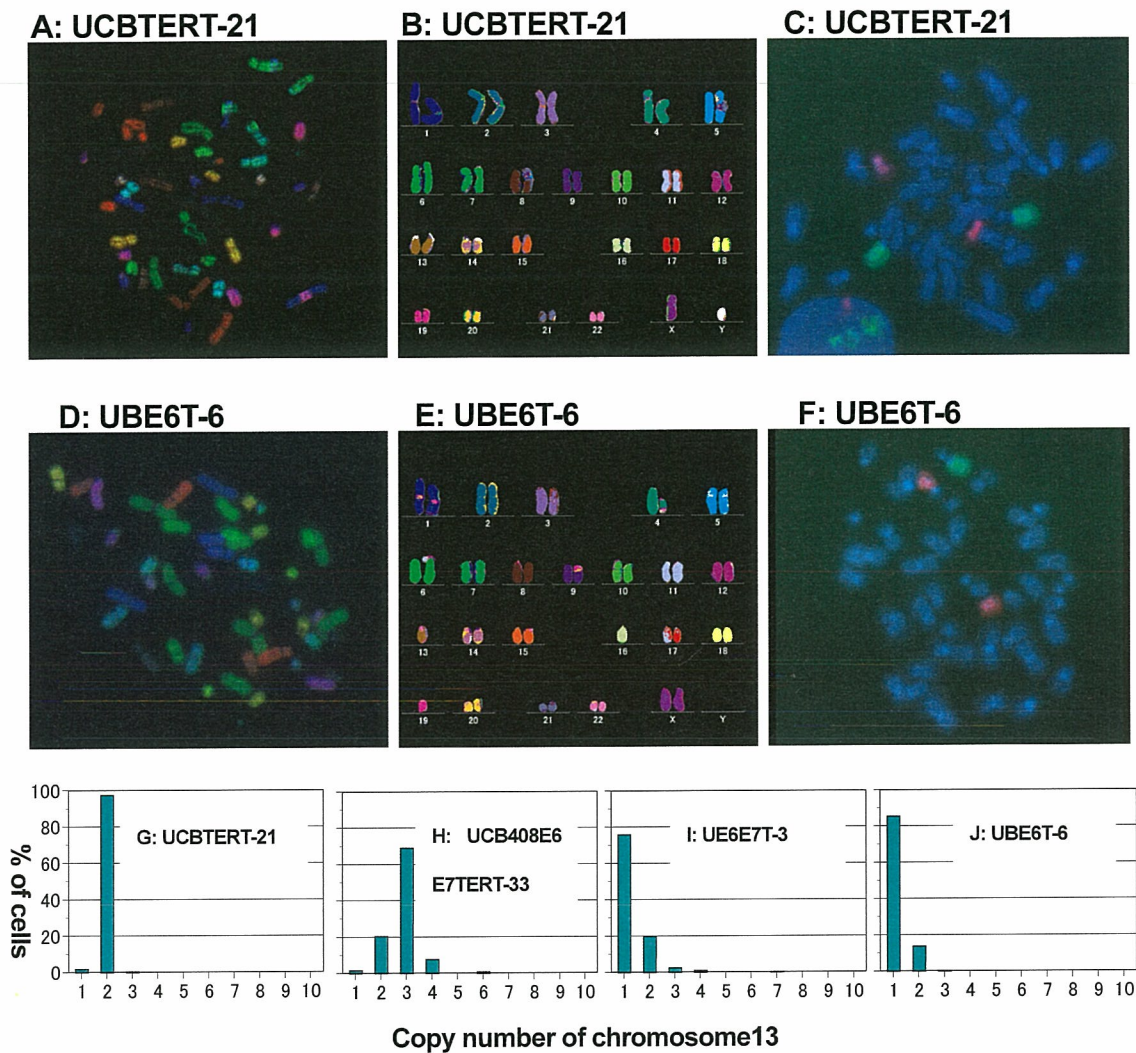


図 2. 遺伝子導入したヒト間葉系幹細胞株の FISH 分析

UCBTERT-21 (A, B, C) と UBE6T-6 (D, E, F) の染色体の mFISH (A, D), カリオタイプ (B, E) および染色体 13 番 (green) および 17 番 (red) (C, F) の pFISH の画像を示した。G-J, 4 種類の細胞株での細胞あたり 13 番染色体のコピー数。FISH シグナルは 120~200 の展開した染色体と間期核中のスポットを測定した。UCBTERT-21 細胞は 2 コピーの 13 番および 17 番染色体を持っている。他の細胞では 13 番染色体の 1 コピーが欠失している。

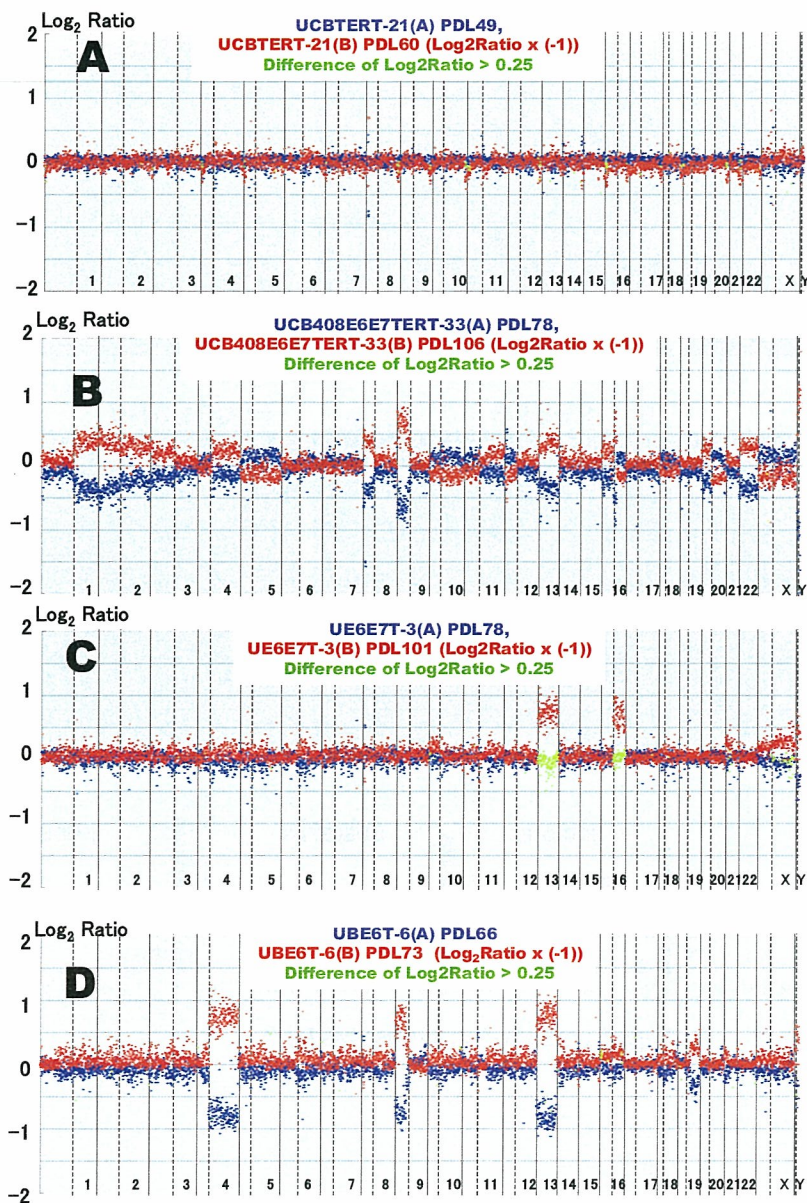


図 3. 培養初期と後期における4種類の遺伝子導入ヒト細胞株のCGHアレイプロファイル

X軸は22組の常染色体、XとY染色体 chromosomes を Y軸は [cy3 (hMSCs) / cy5 (normal cell)] の蛍光強度比を log2 で示した。0より上(red spots) または0より下 (青スポット) はその染色体領域の欠失を示した。青スポットは培養の初期のステージ、赤スポットは後期ステージを示し、それぞれをオーバーレイした。青と赤の差のあるスポットを緑で示した。UE6E7T-3細胞についてはPDL 78と101の間で13番と16番染色体の各1本ずつ欠失が見られた。

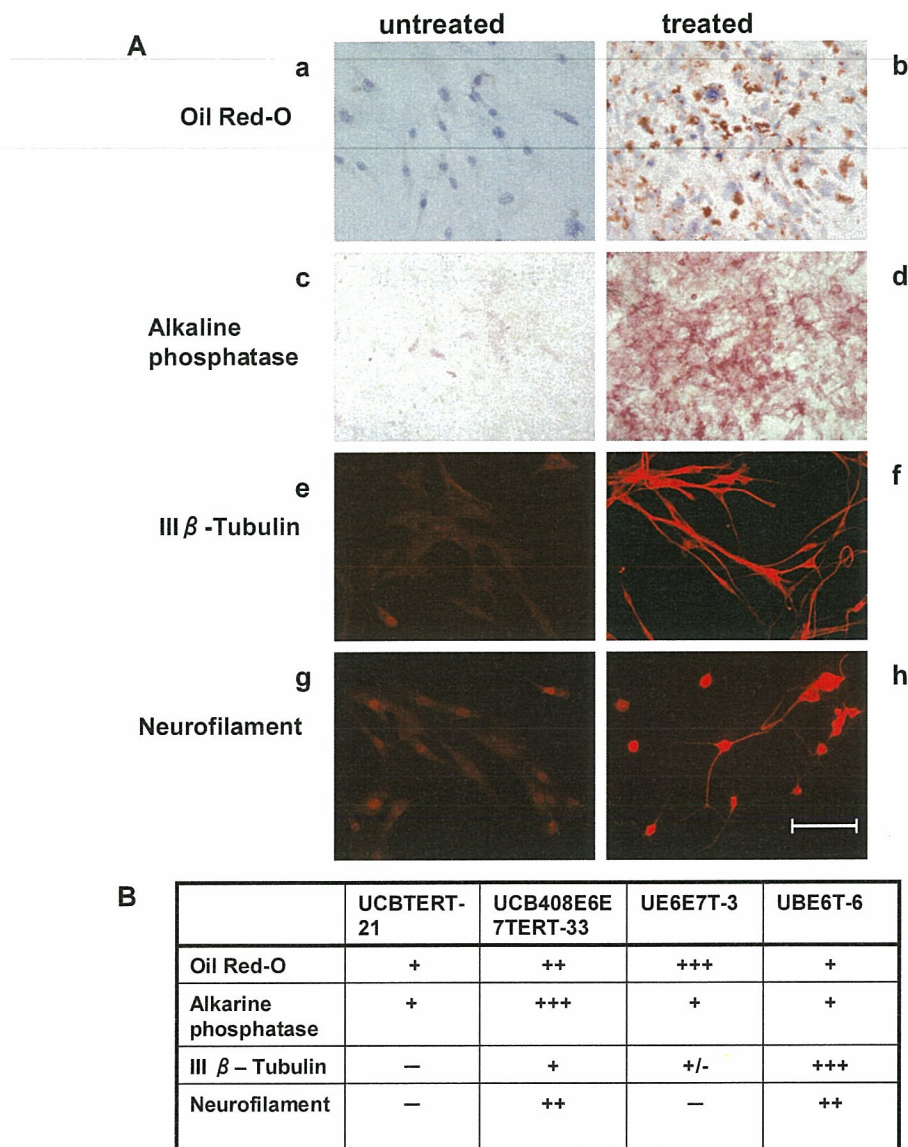


図 4. 遺伝子導入したヒト間葉系幹細胞株の脂肪細胞、骨芽細胞、神経様細胞への分化

A: 分化した脂肪細胞は Oil Red-O 染色による染色顆粒の蓄積が見られる(Aa and Ab, UE6E7T-3 細胞). 骨芽細胞は高い alkaline phosphatase 活性 (赤) (Ac and Ad, UCB408E6E7TERT-33 細胞)を示し、神経細胞はIII β -tubulin と neurofilament の特異的タンパク質の発現 (免疫抗体染色) と細胞の形態変化により示された(Ae - Ah, UBE6T-6 細胞)。

B: 4 種類の細胞株について胞分化能の違いの比較を示した。

- ; 未処理細胞と同等、 + ; 弱い反応性、 +++ ; 高い反応性 (Bar は 20 μ m.)

ヒトゲノム研究の障害となると予想される新たに発見した汚染因子、
ナノバクテリアに関する研究

分担研究者 原澤 亮 岩手大学農学部 教授

研究要旨

細胞培養における微生物汚染の検査を中心にこれまで調査研究を進めてきた。その過程でヒトの急性骨髄性白血病由来の培養細胞である Kasumi-6 細胞系に自己増殖性のナノサイズの微粒子を見出した。この微粒子は、ブラウン運動を呈し、当初、マイコプラズマによる汚染を疑わせたが、一連のマイコプラズマ検査試験によりそれは否定され、その後の検査により、結晶性のハイドロキシアパタイトに覆われ、その表面に培地中の胎児ウシ血清由来フェチュイン (α 2-HS-glycoprotein) を吸着していることが明らかになった。さらに、この自己増殖性ナノ粒子は、海外で「ナノバクテリア」と呼ばれているものに相当することが判明した。そこで、通常の実験室で広く用いられている細胞系について「ナノバクテリア」の存在を調査し、その形態学的特徴を明らかにした。

A. 研究目的

培養細胞は動物個体と異なり感染防御機構を備えていないためさまざまな微生物により汚染することが知られている。最も頻繁にみられる微生物汚染はマイコプラズマによるもので、多くが不顕性の持続感染状態となり、培養細胞に対して外見上の変化を引き起さないため看過されやすい。細胞培養におけるマイコプラズマ汚染が最初に報告されたのは前世紀の中頃であるが、未だにその汚染は尾を引いており、再生医療や遺伝子治療などの高度先端医療において、由々しい問題をもたらすことが危惧されている。その

ため JCRB 細胞バンクでは細胞培養におけるマイコプラズマ汚染の検査を定期的に行っている。ところが、JCRB 細胞バンクへの受け入れ時の検査で、マイコプラズマとは異なると考えられる汚染事例がみられることがある。そのひとつが「ナノバクテリア」と呼ばれる自己増殖性石灰化ナノ粒子によるものである。「ナノバクテリア」はハイドロキシアパタイトの厚い殻で覆われていて、その内部の構造は不明であり、生物か無生物かの結論がでていない。本研究では、通常の実験室で維持されている細胞系における「ナノバクテリア」の汚染を調べるとと

もに、その微細形態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒトの急性骨髄性白血病由来の培養細胞 Kasumi-6 は、2002 年に JCRB 細胞バンクへ寄託された細胞系で、培養中にブラウン運動のような動きを示す微粒子異物が存在することが細胞バンクの職員により確認されていた。この微粒子は、Kasumi-6 細胞を -80°C に一晩保存後、孔径 800 nm のメンブランフィルターにより濾過して培養細胞成分を除去してから新鮮培地 (RPMI 1640 / 10% FCS) を添加して 37°C で培養することで分離できた。培養液中の粒子形態を位相差倒立顕微鏡 U-2000 (ニコン) により観察した。

また、分離した微粒子を、さらに 2 リットルの液体培地を用いて 37°C で 1 週間培養し、培養液から遠心 (10,000xg, 10 分) により自己増殖性微粒子を回収し、ダルベッコのリン酸緩衝液 (マグネシウム、カルシウム不含) で 3 回洗浄した。遠心により得た白色ペレットの一部をデジタル顕微鏡 VHX-100 (キーエンス) および走査電子顕微鏡 VE-8800 (キーエンス) により観察した。

これとは別に、細胞バンクから入手した MDBK-P3 細胞 (JCRB0716) および KYSE-170 細胞について Kasumi-6 細胞において見いだされたものと類似の粒子が存在しないかを調べた。

C. 研究結果

(1) 位相差倒立顕微鏡による観察

対物レンズ 40 倍を光学的に 1.5 倍して観察したところ、培養液中の粒子は緩やかに形態を卵形もしくは球形へ変化させ、ときには長い卵形を呈することもあり、溶液中では可塑性であるように見えた (図 1)。また、運動性については、動画を撮影して詳細に解析した (data not shown)。

(2) デジタル顕微鏡による観察

ズームレンズ VH-Z450 を取り付けて孤立状態の粒子と凝集状態のものをそれぞれ写真撮影した (図 2, 図 3)。

(3) 走査電子顕微鏡による観察

凝集状態の粒子を蒸着処理せずに、ネイティブな状態で直接 VE-8800 顕微鏡により観察した (図 4)。

(4) MDBK-P3 細胞に見いだされた粒子

粒子は球形もしくは卵形で、細胞核の周囲に連鎖状を呈して配列していた。配列状態から、二分裂により増殖することがうかがえた。その配列状況を位相差倒立顕微鏡により観察した (図 5)。

(5) KYSE-170 細胞から分離した粒子

KYSE-170 細胞に見いだされた粒子を分離して、液体培地で増殖させたところ、球形あるいは卵形のものに加えて、十字形のものや垂鈴形のものが位相差倒立顕微鏡により観察された (図 6)。十字形あるいは垂鈴形のは培養の初期に出現するが、培養日数が増すと消失し、やがて球形もしくは卵形のものだけになった。

D. 考察

Kasumi-6, MDBK-P3 および KYSE-170 細胞系由来の微粒子は、いずれも核酸や特異的なタンパク質が検出されないものの、新鮮液体培地を加えて 37°C で培養するとその個数が次第に増加する。これら自己増殖性微粒子の電子顕微鏡観察では厚い殻に覆われた球形もしくは卵形の粒子が観察され、蛍光 X 線分析から、この自己増殖性微粒子の主成分は、ナトリウム以下の軽元素を除けば、カルシウムとリンであることが明らかにされている。また、微粒子のタンパク質分析からは牛血清由来のフェチュインが検出されている。フーリエ変換赤外分光分析により検出された 1640 cm^{-1} 付近のピークの特徴からは、自己増殖性微粒子がヒドロキシアパタイトの可能性が強く示唆されている。このようなヒドロキシアパタイトを成分とする自己増殖性微粒子に類似のものが細胞培養中に存在することはすでに報告されており、「ナノバクテリア」と呼ばれている。

「ナノバクテリア」については、オレゴン州立大学海洋学部の元教授 Richard Y. Morita 博士が低栄養条件下での細菌について 1988 年に「nano-bacteria」と記載したのが嚆矢とされている。その後、テキサス大学名誉教授で地質学者の Robert L. Folk 博士が、1990 年代初めにイタリアの温泉で石灰岩中に大きさ $50\sim 200\text{ nm}$ の球形もしくは卵形の微粒子

を走査電子顕微鏡で発見し、これを“nannobacteria” (two “n”s) と呼び、広く知られるようになった。VBNC (viable but non-culturable) 状態の微生物がかなり多く存在することが明らかになりつつあり、「培養という手続き」の重要性はかつてほど重要視されていないため、「ナノバクテリア」という表現にも大きな反論はなかった。

一方、約 1 万 3 千年前に南極アレン・ヒルズ氷原へ落下したとされる火星からの隕石 (AHL84001) が 1984 年に採取され、これに「ナノバクテリア」と同じ大きさの微生物らしき痕跡を NASA の研究者 David S. McKay 博士らが走査電子顕微鏡により発見し、1996 年にサイエンス誌に発表したところ、科学界は騒然となり激しい論争が起きた。この微生物らしき痕跡にはバクテリアにより生成されたと考えられる磁鉄鉱 Fe_3O_4 (磁石化石) が検出されたため、当初火星の生命の証拠として注目された。しかし、後にその磁鉄鉱は必ずしもバクテリアによらなくても生成されることが判明したので、現在ではこの隕石にまつわる「火星の生命」説は否定的とされ、NASA もこの発表を一旦取り下げた。ところが、隕石中の「ナノバクテリア」に関してはその後もパリ大学理学部の Karim Benzerara 博士らにより類似の報告がなされている。これらの微粒子が生物であるという確証を得ていないが、「ナノバクテリア」を巡る状況はさらに渾沌となり始めている。それは上述

のものとは別の、以下に述べるもう一つの「ナノバクテリア」の出現に大きな理由があった。

フィンランド、クオピオ大学の生化学者 E. Olavi Kajander 博士と Neva Giftoçlu 博士は、長期間培養した細胞培養が死滅する原因を究明する過程で、死にかけた培養細胞内に自己増殖する大きさ 50~200 nm の微小粒子が存在することを発見し、これを“nanobacteria”と名付けて 1998 年に発表した。その後、この「ナノバクテリア」は他の多くの細胞培養や細胞培養に用いられる仔牛血清中にも存在すると報告され、培養細胞を扱う研究者たちに少なからぬ不安を抱かせている。さらに Kajander 博士のグループは「ナノバクテリア」の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が $\alpha 2$ *Proteobacterium* に近縁であるとし、これを独自に“Nanobacterium sanguineum”と命名した。また、彼らは「ナノバクテリア」の表層がアパタイトで覆われているので、異所性石灰化に起因する尿路結石や動脈硬化、乳がんの原因になる微生物であると主張し、それら疾病の診断治療を目的とするベンチャー企業（Nanobac Life Sciences 社）を設立している。

「ナノバクテリア」に関するこれら一連の研究は専ら Kajander 博士のグループによるものであり、その信憑性には少なからぬ疑いがもたれていたところ、米国 NIH の微生物学者 John O. Cisar 博士らは、「ナノバクテリア」が生物ではなく、自

己増殖する無機物であるとの実験成績を 2000 年に提示した。しかも、Kajander 博士らにより報告された 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は PCR の際に環境中からコンタミする *Phyllobacterium myrsinacearum* による可能性が高いことを指摘し、「ナノバクテリア」が微生物であるという根拠は失われてしまった。さらに、フランス、マルセイユ医科大学臨床微生物学教室の Didier A. Raoult 教授らはヒトの上部尿道結石からの、また米国コーネル大学獣医学部の Stephen C. Barr 教授らはウシ、ヤギ、イヌ、ネコなどからの「ナノバクテリア」の検出を試みたものの、いずれも成功しなかったと報告した。ところがこのような状況の中で、Kajander 博士らと共同研究し始めたドイツ、ウルム大学の Andrei P. Sommer 博士は「ナノバクテリア」の増殖には至適な光の波長があると報じ、さらに「火星の隕石」微生物を報告した NASA の McKay 博士らとも共同研究を始め、「ナノバクテリア」が地球の原始状態でも生存できるとする論文を 2003 年に発表した。Sommer 博士はその後も、星間物質の権威で英国カージフ大学の天文学者 Nalin Chandra Wickramasinghe 教授の参画を得て「ナノバクテリア」を生命の起源と結び付けようと試みており、さらに最近では「ナノバクテリア」が雲に乗って移動する説を唱え始めている。しかも、メイヨークリニック医科大学腎臓学分野の John C. Lieske 教授らが動脈硬化症の患者さんの

病変部に「ナノバクテリア」様構造を認めたと 2004 年に報告した。また 2005 年春に、Lieske 教授らは、隕石中の「ナノバクテリア」を調査した。前述の Benzerara 博士を講演のためメイヨークリニックへ招聘している。

Kajander 博士のグループのほかに、「ナノバクテリア」を検出したとするのは、①卵巣がんから特異抗原を検出したウィーン大学付属病院の Roland Sedivy 教授と Walter B. Battistutti 博士、②卵巣がんから特異抗原と mRNA を検出したウィーン医科大学婦人科学の Gernot Hudelist 博士ら、③牛血清中に特異抗原を検出したノースカロライナ大学獣医学部の Edward B. Breitschwerdt 教授ら、④腎臓結石から特異抗原を検出したインドの卒後研修研究所の Madhu Khullar 教授ら、および、⑤健康人の血清中に特異抗原を検出した中国の中南大学医学部の Wang XueJun 博士らの少なくとも 5 つのグループである。最後に挙げた中国の Wang 博士らは現在では Kajander 博士らと共同研究しているようである。「ナノバクテリア」の特異抗原を検出するためのキットは Nanobac Life Sciences 社から発売されている。「ナノバクテリア」はさまざまな疾病に関連すると報じられているが、それらの治療法に関する報告も現れ始め、しかも、「ナノバクテリア」を除去することにより前立腺結石症が快方に向かったという報告まで登場した。ところで、Kajander 博士の当初からの共同

研究者である Giftoçoglu 博士は NASA の McKay 博士らと共に「ナノバクテリア」が微小重力状態で増殖しやすくなるとして、宇宙飛行士にとって腎臓結石形成が潜在的な脅威となると警告している。地質学や天文学までを巻き込んで、「ナノバクテリア」を巡る謎はますます深まっている。

1998 年には、オーストラリア、クイーンズランド大学の Philippa J.R. Uwins 博士らが砂岩中にやはり大きさ 20~150 nm の自己増殖粒子を電顕により検出し、「nanobes」と名付けている。これも生物か無生物かで論争の的になっているが、21 世紀を迎えた現在においてすら、その決着がついていない。

これこそ本当のナノサイズの細菌とされるのが、大きさ約 400 nm のアーキア(古細菌) *Nanoarchaeum equitans* で、同じアーキアの *Ignicoccus* sp. と共生関係にあるという。ドイツ、レーゲンスバーク大学の微生物学者 Karl O. Stetter 教授が温泉から発見し、2002 年に発表した極限環境微生物 (extremophiles) で、マイコプラズマよりもさらに小さなゲノムサイズ (約 500 Mb) を有する。アーキアは地球の原始状態の環境で生育できるような性状を備えていて、オートクレーブ処理でも死滅しないものもある。

今回の走査電子顕微鏡観察によっても「ナノバクテリア」に類似の粒子形態が Kasumi-6, MDBK-P3, KYSE-170 細胞由来の微粒子に認められている。これら細胞系

由来の微粒子がアーキアの仲間である可能性は否定できない。

E. 結論

3種類の細胞系, Kasumi-6, MDBK-P3, KYSE-170 から検出されたナノ粒子はいずれも球形もしくは卵形を呈し、培養ステージによっては十字形もしくは垂鈴形を呈するものも存在した。これらの微粒子はいずれも形態ならびに化学組成からは「ナノバクテリア」と呼ばれるものに類似していた。これらのことから、「ナノバクテリア」と呼ばれる微粒子は細胞培養に比較的頻繁にみられるものであると考えられた。「ナノバクテリア」はヒトの結石症の病因となることが報告されていることから、細胞培養に従事する者はこれに被曝しない注意が必要であろう。液体培地中での増殖の機序ならびに培養細胞に対する細胞毒性あるいは細胞死誘導の有無については今後の研究課題として残された。

F. 研究発表

(1) 論文発表

① Harasawa, R., Tanabe, H., Kurematsu, M., Mizusawa, H., Suzuki, Y. (2006) Self-propagating calciferous particles detected in a human cell line

Kasumi-6 (JCRB 1024). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42: 13-15.

② Giangaspero, M., Harasawa, R., Muschko, K., and Büttner, M. (2006) Characteristics of the 5' untranslated region of wisent (*Bison bonasus*) and reindeer (*Rangifer tarandus*) pestivirus isolates. *Vet. Ital.* 42: 165-172.

③ Harasawa, R., Aoyama, F., Goryo, M., Okada, K., Nishimura, T., Matsubara, K., Tsujimoto, T., and Giangaspero, M. (2006) Evidence for pestivirus infection in free-living Japanese serows, *Capricornis crispus*. *Microbiol. Immunol.* 50: 817-821.

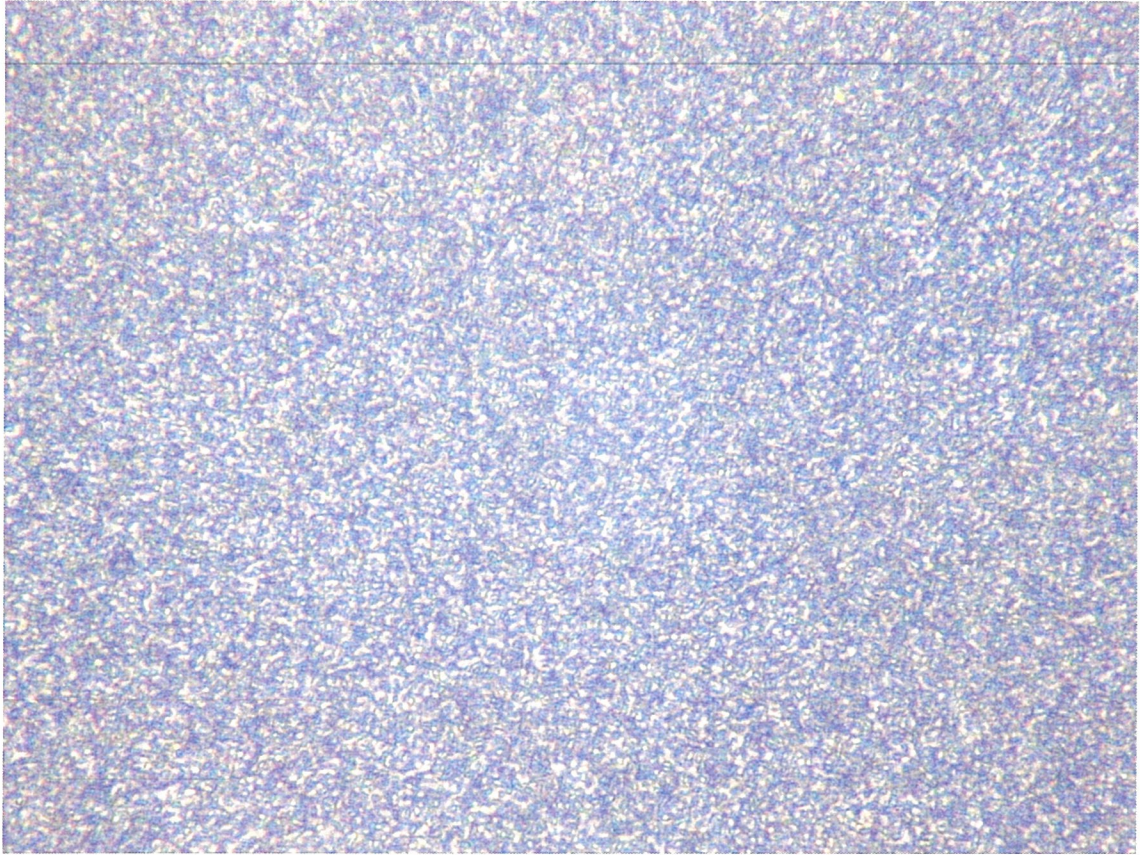
国際会議

(1) 学会発表

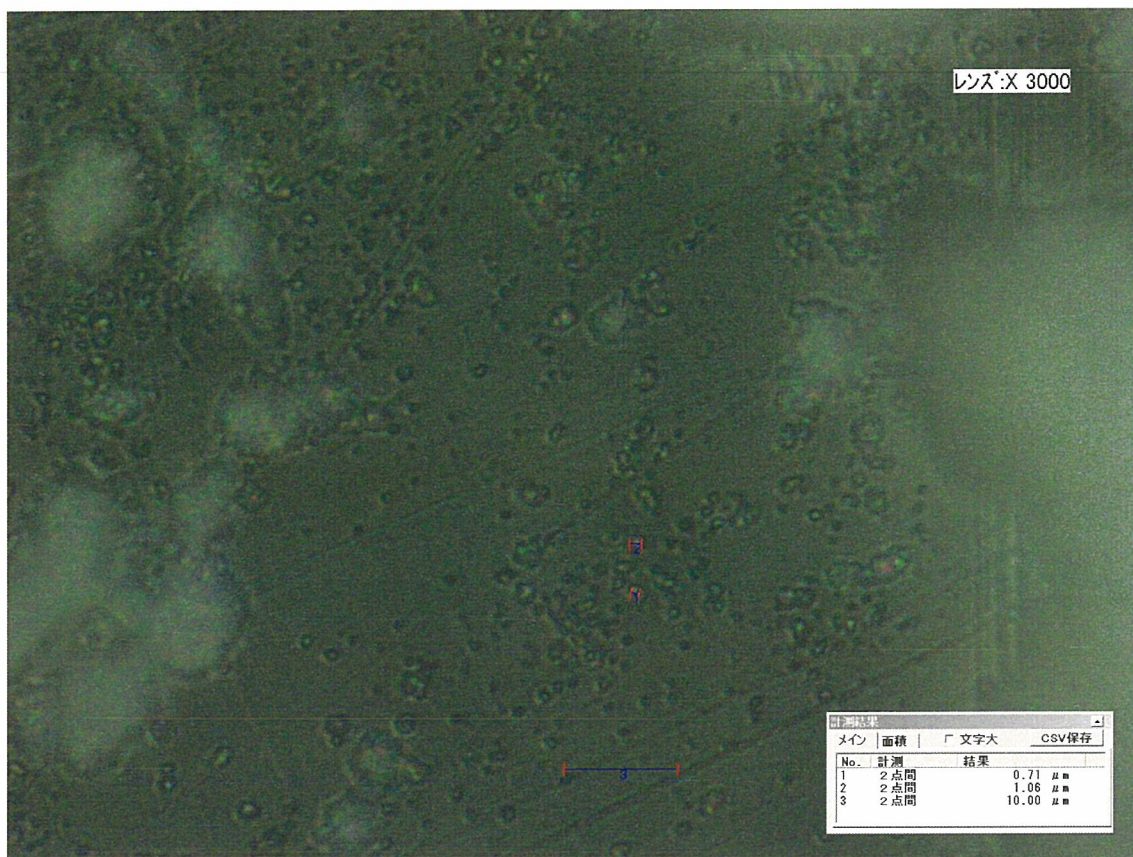
① Harasawa, R., and Mizusawa, H. (2006) identification of mycoplasma contaminants in cell cultures by real-time PCR. 16th International Conference of Mycoplasma, Cambridge, UK.

G. 知的所有権の取得状況

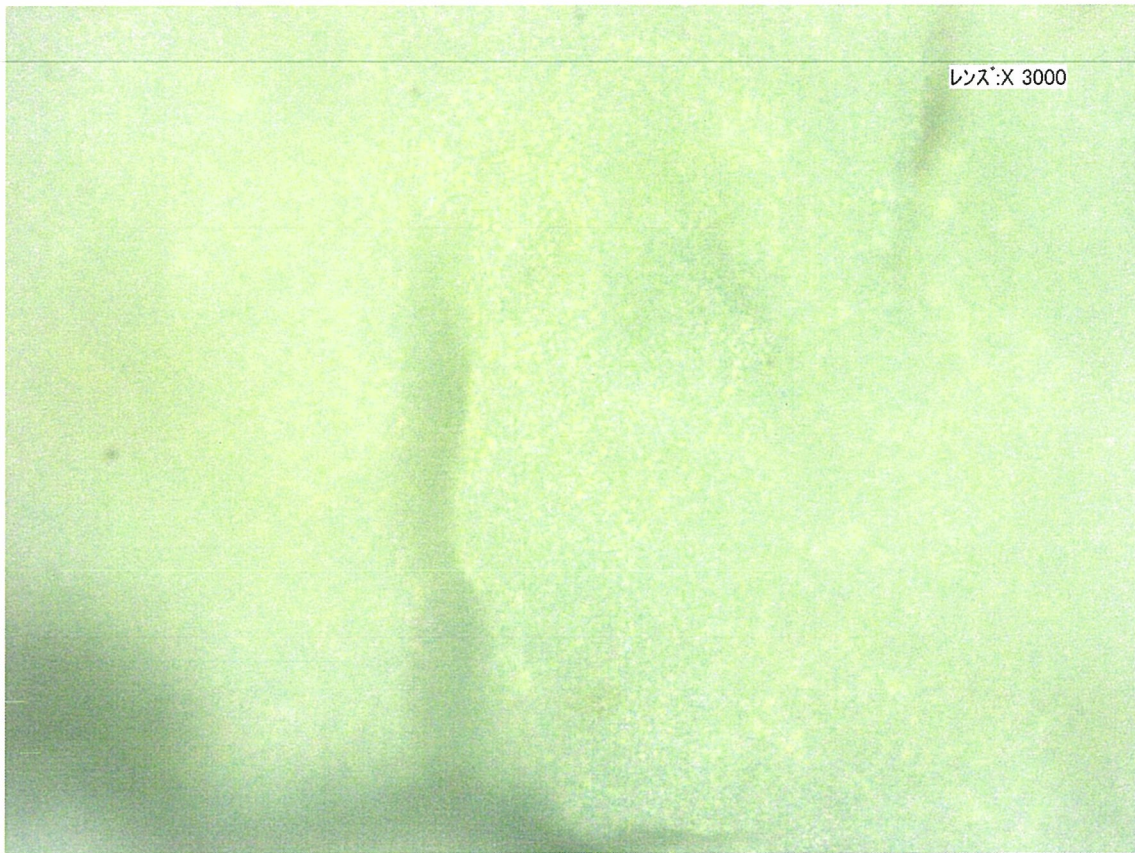
該当なし



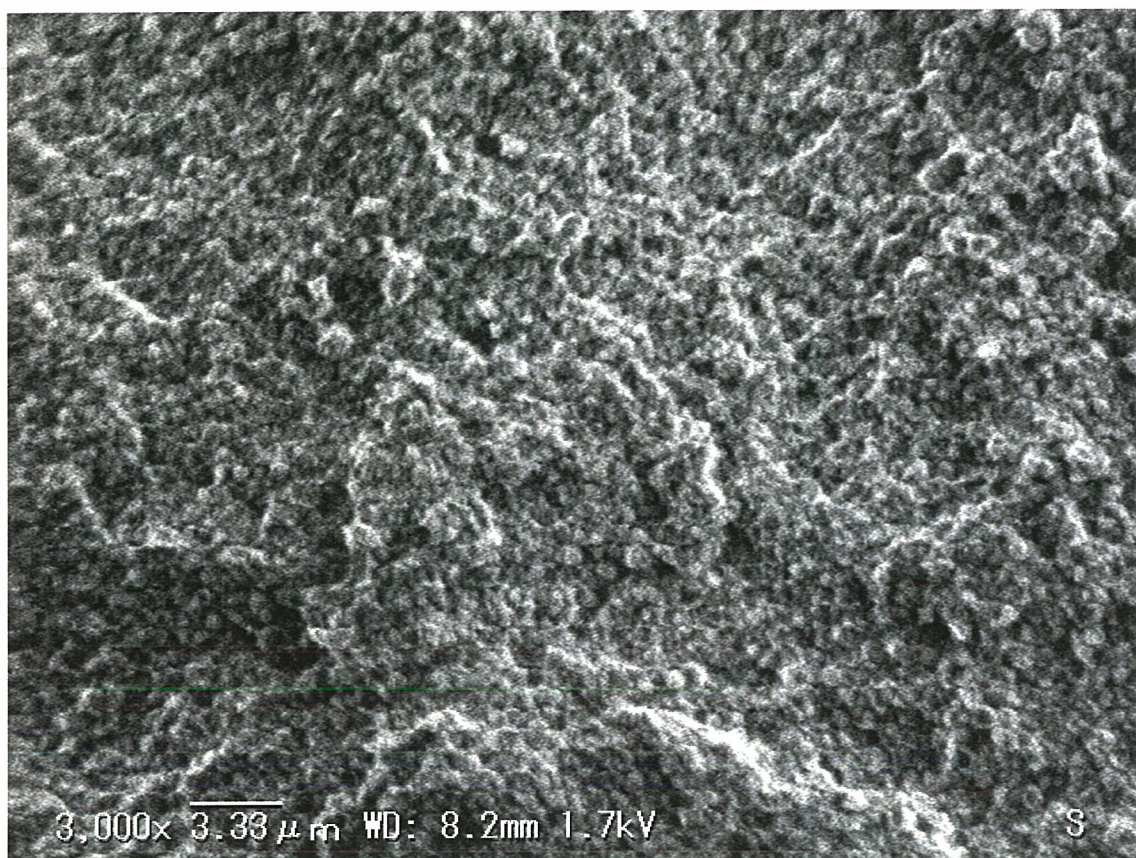
(図1) Kasumi-6由来の微粒子の光学顕微鏡写真。(対物レンズ40倍)



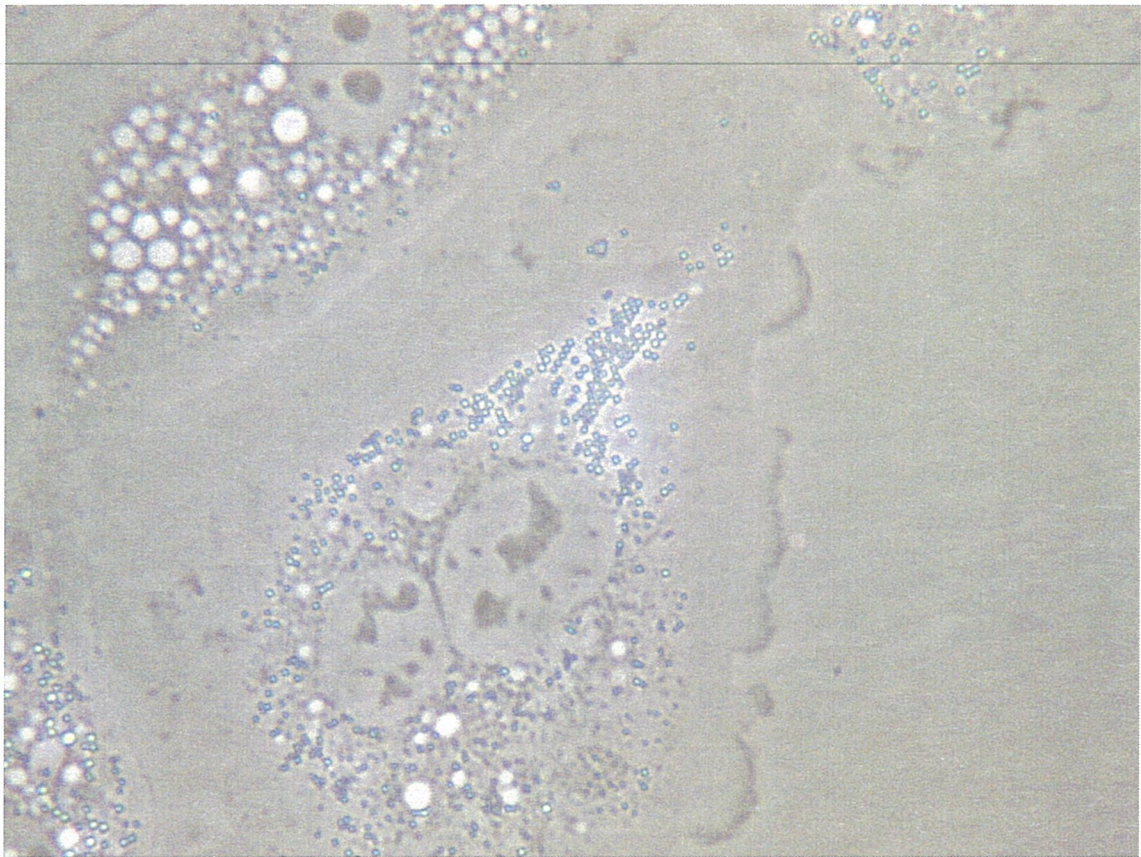
(図2) 孤立した粒子のデジタル顕微鏡による観察。



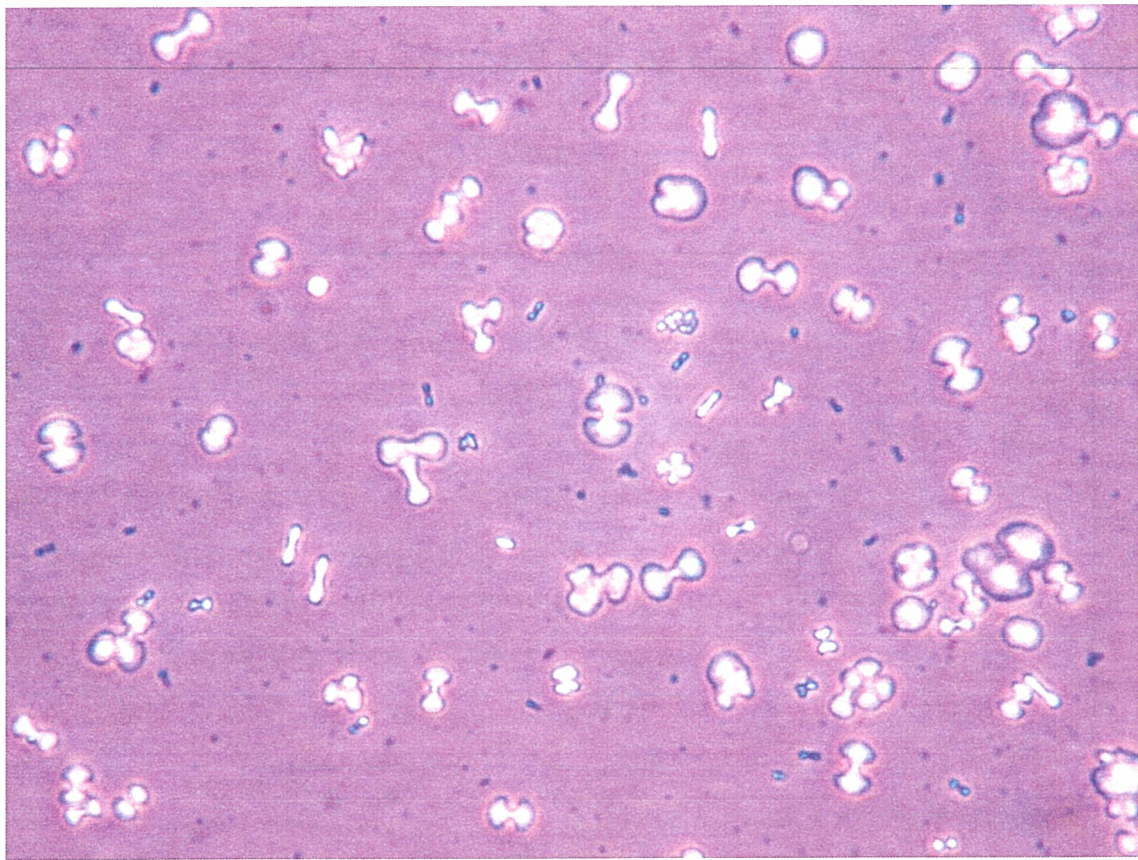
(図3) 凝集した粒子のデジタル顕微鏡による観察。



(図4) 走査電子顕微鏡による観察



(図5) MDBK-P3 細胞にみられたナノ粒子



(図6) KYSE-170 細胞から分離したナノ粒子の成熟型

分担研究報告書

マルチプレックスPCR法を用いたヒトウイルスゲノム検出に関する研究

分担研究者：清水 則夫（東京医科歯科大学助教授）

研究要旨

ヒトゲノム・再生医療研究に必須となるヒト培養細胞研究資源の重要性が増しており、品質管理法の確立が緊急且つ重要な課題となっている。中でもヒト培養細胞研究資源へのウイルス汚染に関する情報は乏しいのが現状である。培養細胞研究資源を使用した研究の質を高めるため、簡便・安価に多種類のウイルスを測定する手法を開発し、ヒト培養細胞研究資源のウイルス汚染の実態を把握し、適切に対処することが必要である。本研究では、マルチプレックス PCR 法を応用した実用的ウイルス検査法を確立し、バンクが保有している培養細胞に対するウイルス検査体制を確立することを目的に研究を行なった。その結果、13 種類のウイルス (CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, BKV, JCV, ADV, HBV, ParvoB19, HTLV-1, -2, HIV1, HIV-2) を 10 コピー/well の感度で同時・半定量測定系を開発に成功した。

現在、実用化を前提に検査系のバリデーション試験を進めている。

A. : 研究目的

ヒトゲノム・再生医療研究に必須となるヒト培養細胞研究資源の重要性が増しており、品質管理法の確立が緊急且つ重要な課題となっている。実際、再生医療の研究にはヒト由来の多分化能を持った培養細胞の使用が欠かせないが、そのような培養細胞の細胞バンクへの寄託も増加傾向にある。研究の質を高めるためには、使用する培養細胞の品質管理を徹底することが求められる。細菌やマイコプラズマ汚染の検出は勿論必要であるが、加えてウイルス汚染状況に関する情報も重要であり、実際外国に細胞出荷する細胞する際には、ウイルス汚染状況

に関する情報の添付を求められる場合があり、今後添付の必要性が増すものと思われる。ウイルスは細菌、真菌、マイコプラズマと違い増殖には生きた細胞が必要であり、培養法により多種類のウイルスの存否を検査することは難しい。したがって、PCR 法などの核酸増幅法によりウイルスゲノムを直接検出することが妥当であるが、その為には多くのウイルスを同時・高感度・安価に検出する方法の確立が求められる。本研究では、バンクが保有するあるいは今後新規に寄託される培養細胞の全数検査を行なうことを目的に、実用的な新規ウイルス検査系を確立するこ

とを目的として研究を行なった。

B:研究方法

1. ウイルスゲノムの増幅

DNA ウイルスのゲノム配列を PCR 法により増幅した。

PCR 装置: Prism7300 (アプライドバイオシステムズジャパン)

PCR 反応: 95°C 10 分処理の後、95°C 15 秒, 60°C 60 秒の反応を 45 サイクル行なった。

PCR 試薬: AmpliTaqGold & Gold Buffer (アプライドバイオシステムズジャパン)

プライマー: 通常のオリゴマーを使用 (配列は別途記載)

プローブ: Taqman Probe を使用 (配列をは別途記載)

2. 検査プレートの作成

ウイルスに対するプライマー、プローブと安定化剤としてトレハロースの混合溶液を作成した。96 ウェルプレートを使用し 5 μ l / well (プライマー、プローブミックス 1.5 μ l, 0.1 M トレハロース二水和物 0.25 μ l, ヌクレアーゼフリー H₂O 3.25 μ l) の割合でマルチピペッターにより混合液を分注した (1 ウェルで1種類のウイルスを測定するため、1 ウェルに1つの検査対象ウイルスに対するプライマー、プローブを加える)。分注後遠心機で 1000 rpm, 1 秒間遠心し、暗所に置いた真空デシケーター内で暗所一晩放置して乾燥させた。なお、PCR 反応が進んでいることを示す陽性コントロールとして細胞遺伝子 GAPDH の測定を行なった。

PCRによる測定方法

反応液組成

	1 本分
DNA	10 μ l
10xbuffer	5 μ l
dNTPs	5 μ l
MgCl ₂	6 μ l
ROX	1 μ l
taq	0.25 μ l
H ₂ O	23 μ l
Total	50.25 μ l

MasterMix 組成

10xbuffer	5 ml
8mM dNTPs	5 ml
25mM MgCl ₂	6 ml
ROX	1 ml
H ₂ O	23 ml
Total	40 ml

- 96 ウェル 2 ml リザーバーに Master Mix を 560 μ l ずつ 8 連の 1 列に分注
- サンプルまたは STD を同じ 8 連の 1 列に 140 μ l それぞれ加える。サンプルは DNA 濃度 0.5 μ g / Well になるように加える。
- マルチピペッターで 3 回ピペッティングした後、8 列分を 11 連に分注する。
- シールをして 1000 rpm, 3 秒間遠心する。プレートを逆さにし 1 分間放置後シェーカーで 1 分振とうしてサンプルとプライマー、プローブを良く混合し、PCR 反応を開始する。
- PCR 反応後、結果を解析して、ウイルスの有無および量 (半定量) を測定する。

3. プライマー、プローブ配列

★GAPDH

F- tgtgctcccactcctgatttc

R- cctagtcccagggtttgatt

P-FAM-aaaagagctaggaaggacaggcaacttgge-iowaBlack

★CMV

F- catgaaggtctttgccagtac

R- ggccaaagtgtaggctacaatag

P- FAM-tggcccgtaggtcatccacactagg-TAMRA

★EBV

F- cggaagccctctggacttc

R- ccctgtttatccgatggaatg

P- FAM-tgtacacgcagagaaatgccc-iowaBlack

★HHV6

F- gacaatcacatgacctggataatg
R- tgtaagcgtgtgtaaatggactaa
P- FAM-agcagctggcgaaaagtgtctgtgc-iowaBlack

★HHV7

F- cggaagtactggagtaaatgacaa
R- ccaatccttcgaaaccgat
P- FAM-ctcgcagattgcttgttffccatg-TAMRA

★BKV、JCV

F- ggaaagtctttagggtcttctaccttt
BKR- gatgaagatttattYtgccatgaRg
JCR- gaagacctgttttgccatgaaga
P- FAM-atcactggcaaacat-MGB

★ADV

F- gacatgacttttgaggtgga
R- tcgatgacgccgcggtg
P-FAM-cccattggaYgagcccaccct-TAMRA

★ParvoB19

F- gggtttcaagcacaagYagtaaaaga
R- cggYaaacttcccttgaaaatg
P- FAM-cagctgccctgtgg-MGB

★HBV

F- gtggtgacttctctcaattttctag
R- ggacaMacgggcaacatacct
P- FAM-tgtctcggcgctttt-MGB

★HTLV-1 & -2

SHTF- ggccacctgtccagagca
R1- ctgagccgataacgcgtcca
R2- ctgagctgacaacgcgtcca
P1- FAM-Mtcacctgggaccccatcgatgga-TAMRA

★HIV-1

F1- ggacatcaagcagcYatgcaaag
F2- ggacaccaRgcagctatgcaaag
R1- tgctatRtcactccccttggttctct
R2- tgctatatcactcccctagttccct
R3- tgctatatcactcccctagtttctct
P- FAM-acHatcaatgaggaagctgcagaa-MGB

★HIV-2

F- gcaggtagagcctgggtgttc

R - cttgcttctaaYtggcagctttatt

P- FAM-tgggcagaYggctccacgc-TAMRA

4. 検査系の感度、特異性の検討

(1) スタンダード作成

各種ウイルスの PCR 産物をクローニングしシーケンスにて配列確認した後、制限酵素 ScaI 消化した後一本鎖にし、フェノールクロロホルム処理・エタノール沈殿後、OD 値を測定した。電気泳動の結果と OD 値から濃度算出してコピー数をもとめ、ロシユ社製 MS2RNA 10ng/ul 溶液にて段階希釈液を作成した。

(2) 感度測定

各種ウイルスが陰性なことを確認した細胞 DNA (0.5 μg/well) に、作成した各種スタンダード 50 Copy を加えたもの感度測定に用いた。

(3) 特異性の確認

各種ウイルスプライマー、プローブ配列の相同性を GenBank にて検索し特異性を確認した。またプライマー、プローブ配列を引用した文献で実験的に特異性が調べられている場合は、文献の結果を採用した。陽性コントロールと特定のウイルスが検出された臨床検体を用いて、お互いの交差反応性の有無の確認をした。

(倫理面への配慮)

ウイルス陽性検体は、匿名化した上で受け取り、患者の個人情報と解析結果との連結が不可能なように配慮した。また、ウイルス検査以外の検査(遺伝子検査など)は一切行わないこととした。

C: 結果

1. 検査対象細胞およびウイルスの選定

バンクにはヒトに加え多くの実験動物由来の細胞も寄託されているが、まずは検査対象をヒト細胞に限定し、ヒトに持続感染することが知られているウイルスの検査系の構築を行なった。検査