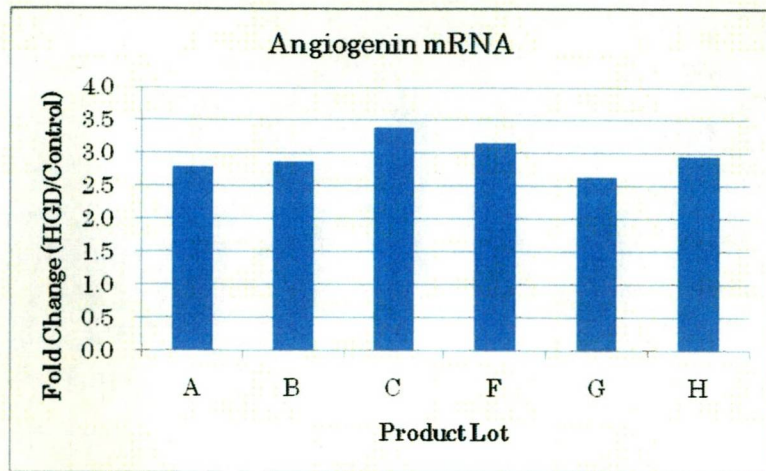
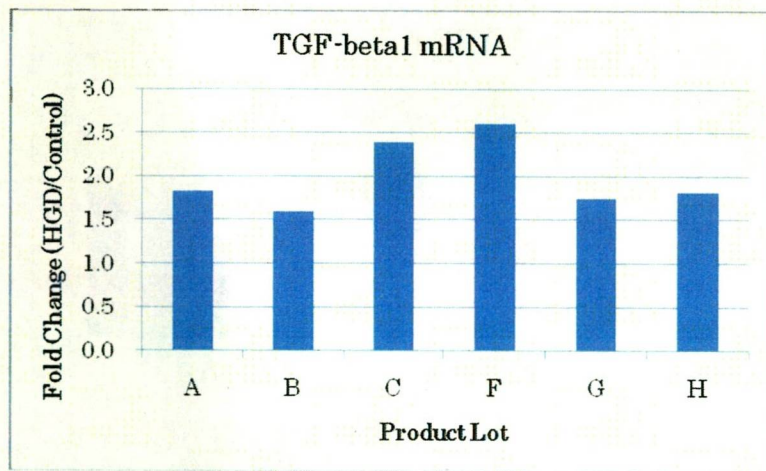


D



E



F

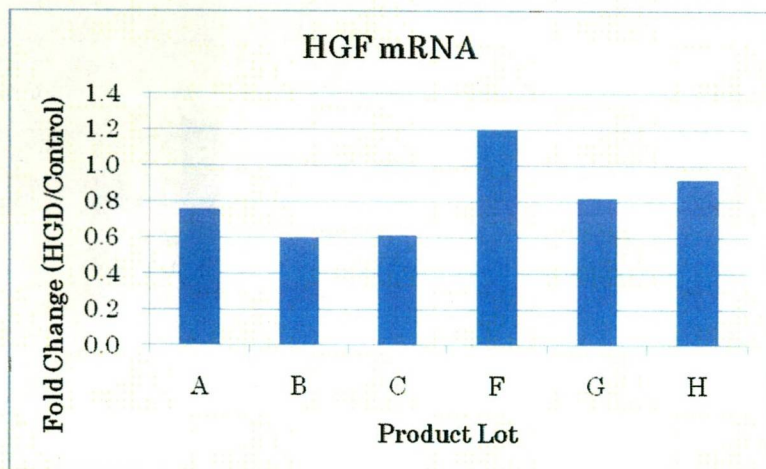


Fig. 37 (続き)

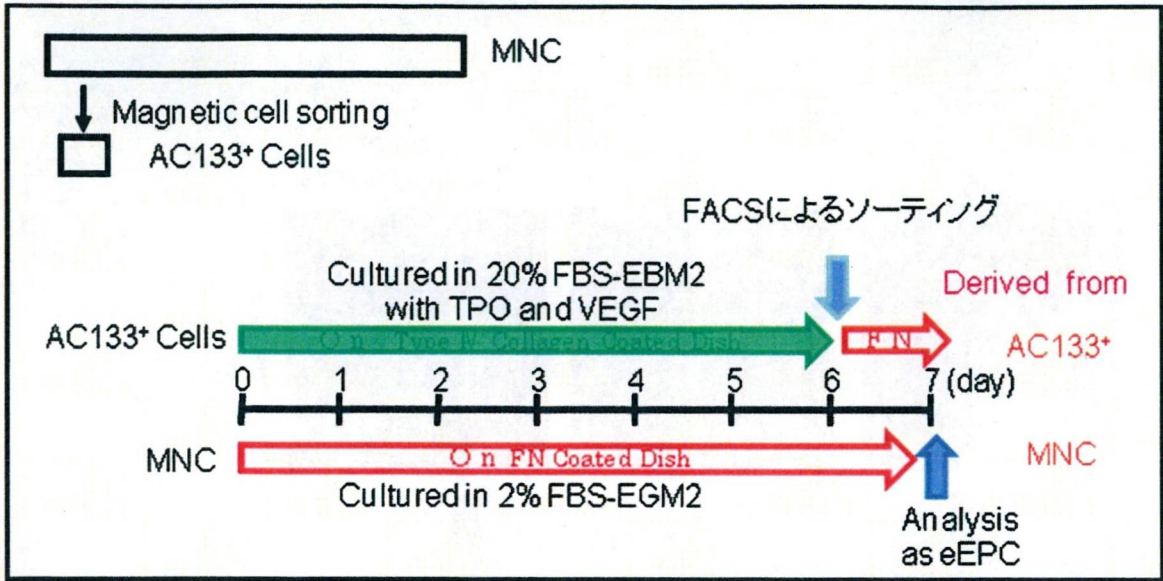
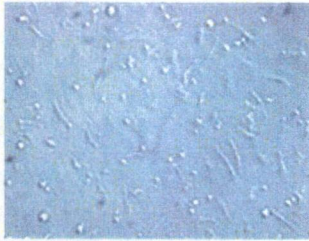


Fig. 38 AC133 由来および単核球由来 early EPC の調製方法

AC133 陽性細胞由来 early EPC



単核球細胞由来 early EPC



Fig. 39 AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC の顕微鏡画像

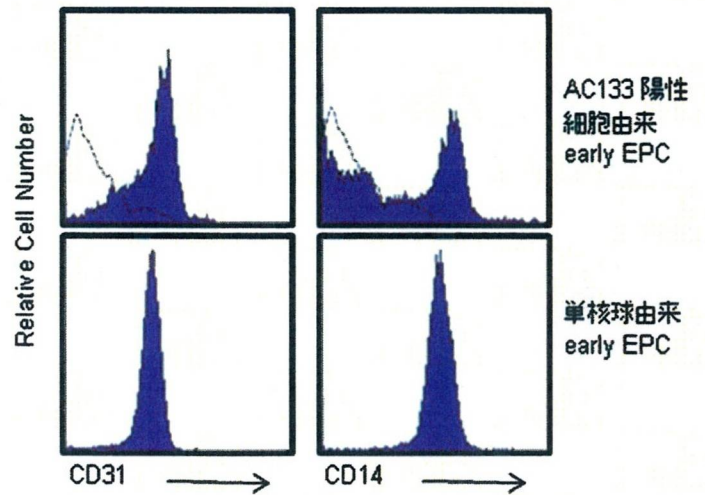
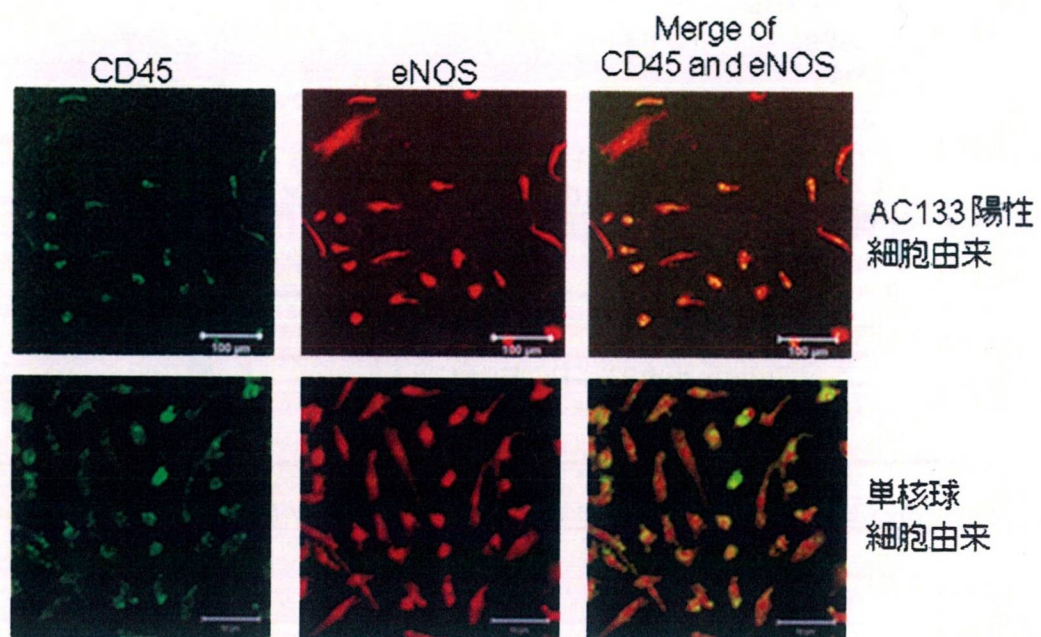


Fig. 40 AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC における細胞表面マーカーの発現解析



**Fig. 41** AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC における白血球共通抗原 (CD45) と血管内皮細胞マーカー (eNOS) の発現

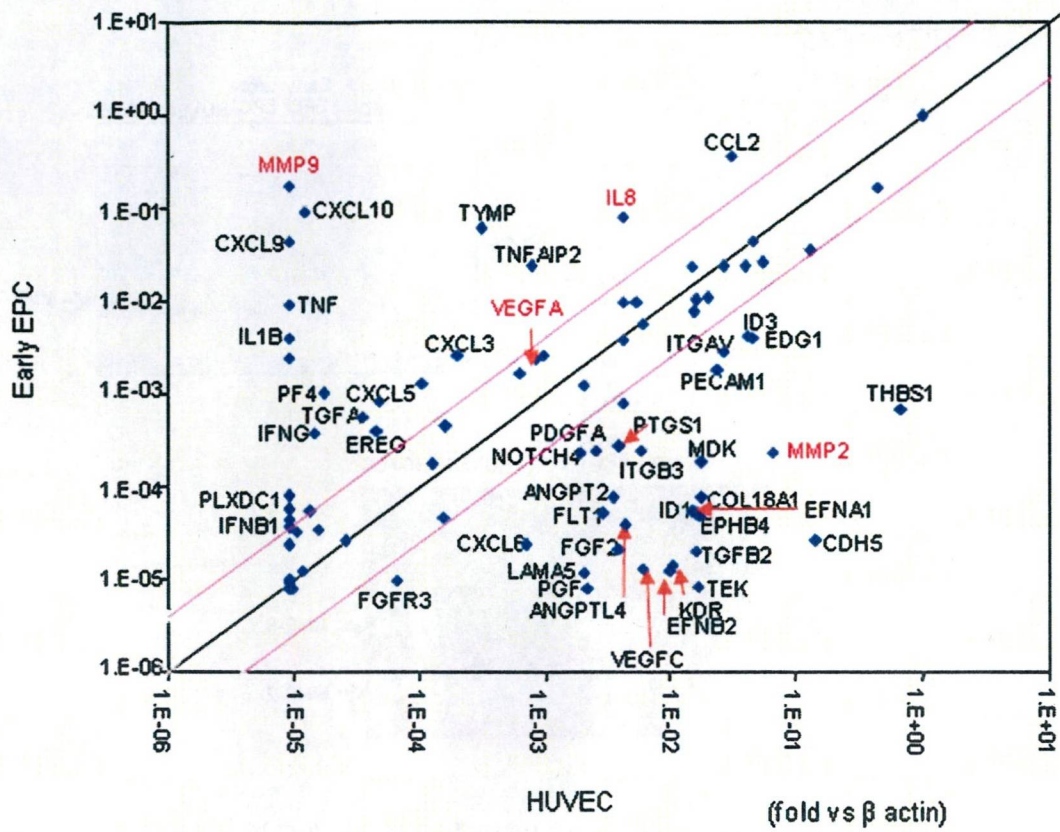
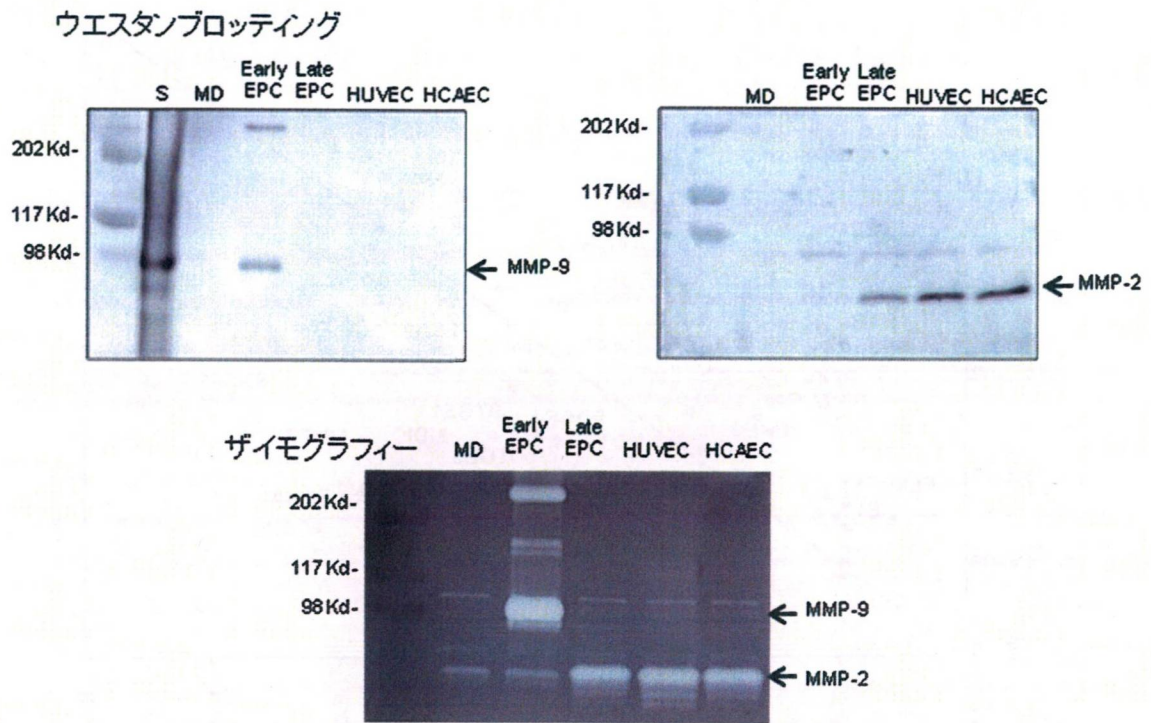
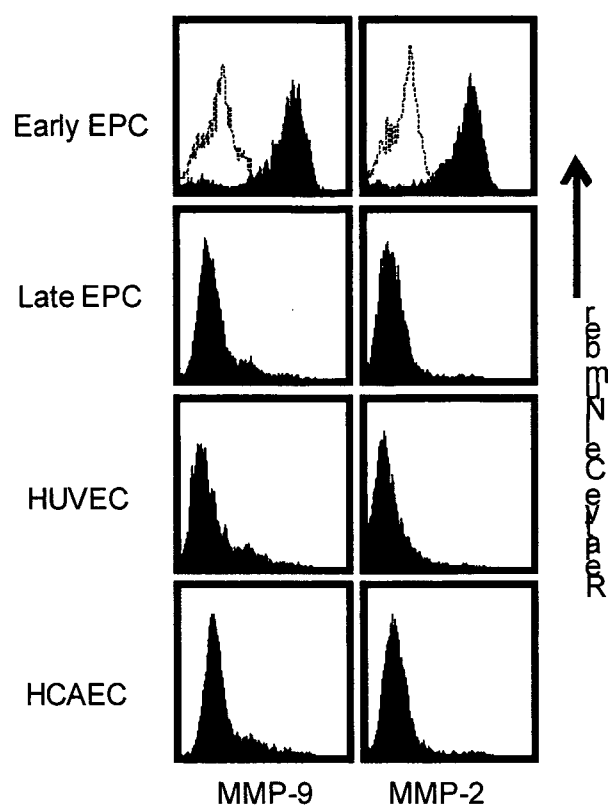


Fig. 42 Early EPC と HUVEC における血管新生関連因子の発現比較



**Fig. 43** 種々の細胞の培養上清における MMP-9/MMP-2 タンパク質および活性の検出



**Fig. 44** フローサイトメトリーによる細胞表面 MMP-9/MMP-2 の検出

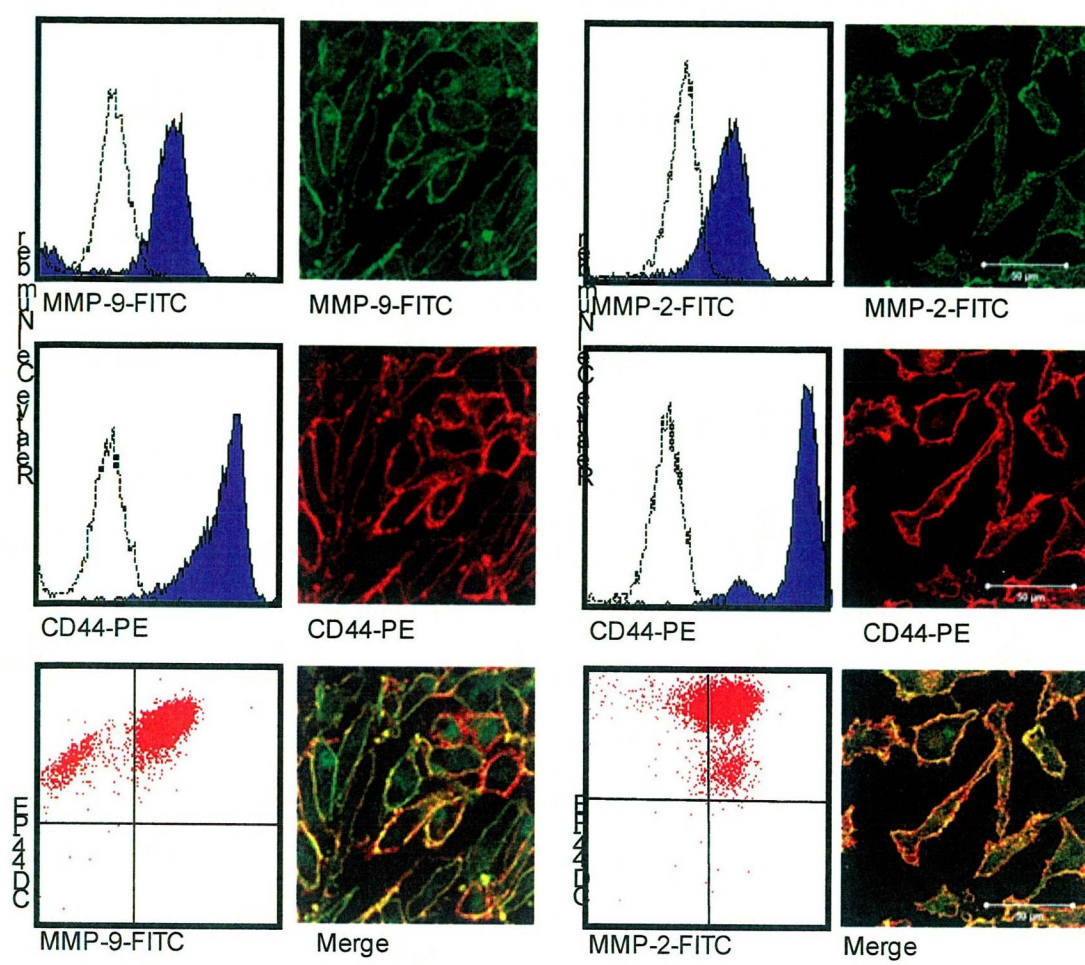


Fig. 45 共焦点レーザー顕微鏡を用いた MMP-9、MMP-2、及び CD44 の蛍光免疫染色

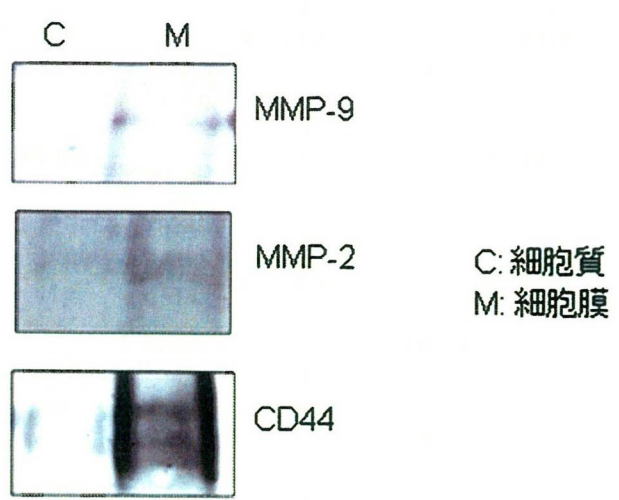
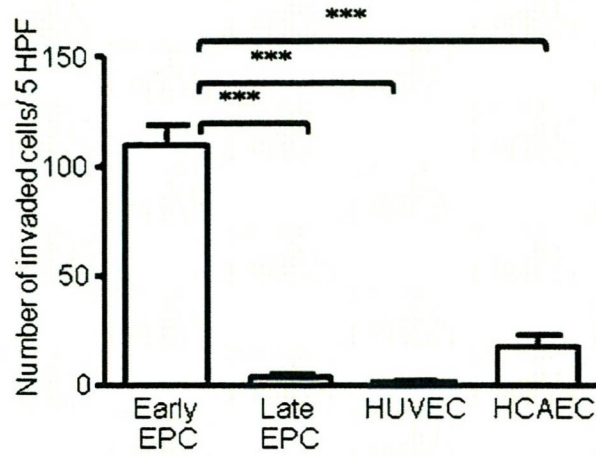
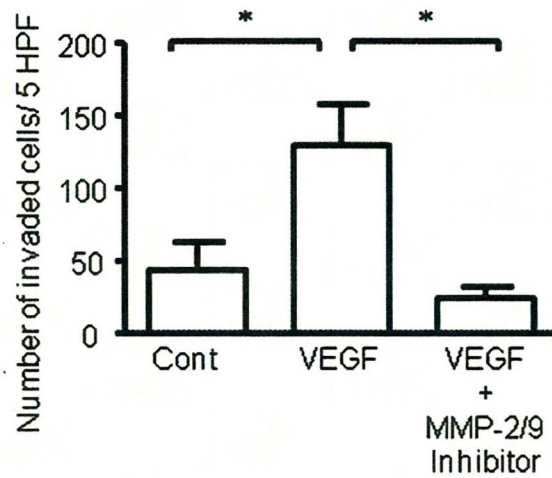


Fig. 46 ウェスタンブロットによる MMP-9、MMP-2、及び CD44 の検出



**Fig. 47** VEGF 刺激に応答した浸潤活性



**Fig. 48** VEGF 刺激による early EPC の浸潤に対する MMP-2/9 阻害剤の効果

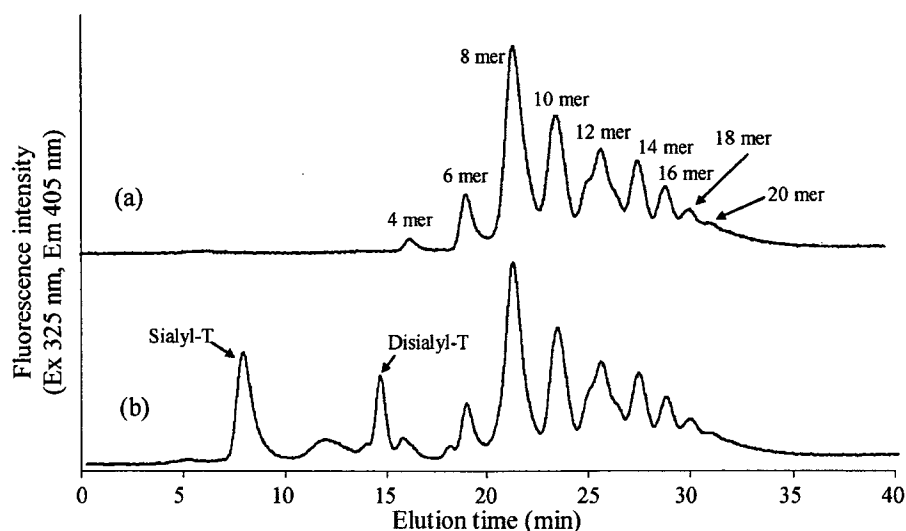


**Fig. 49** AC133 由来 Early EPC における MMP-9 の発現

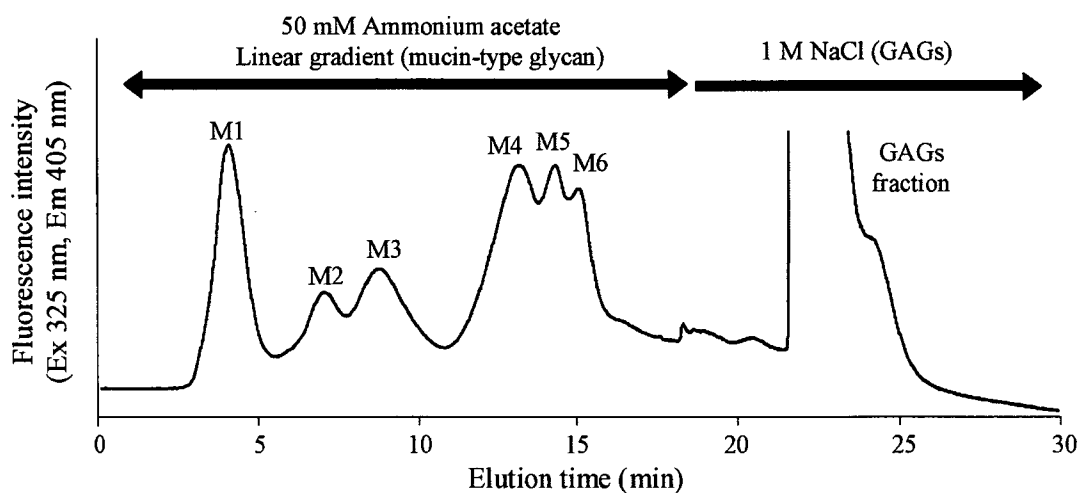


Table 12 Mucin-type O-glycans observed in HCT116 cell.

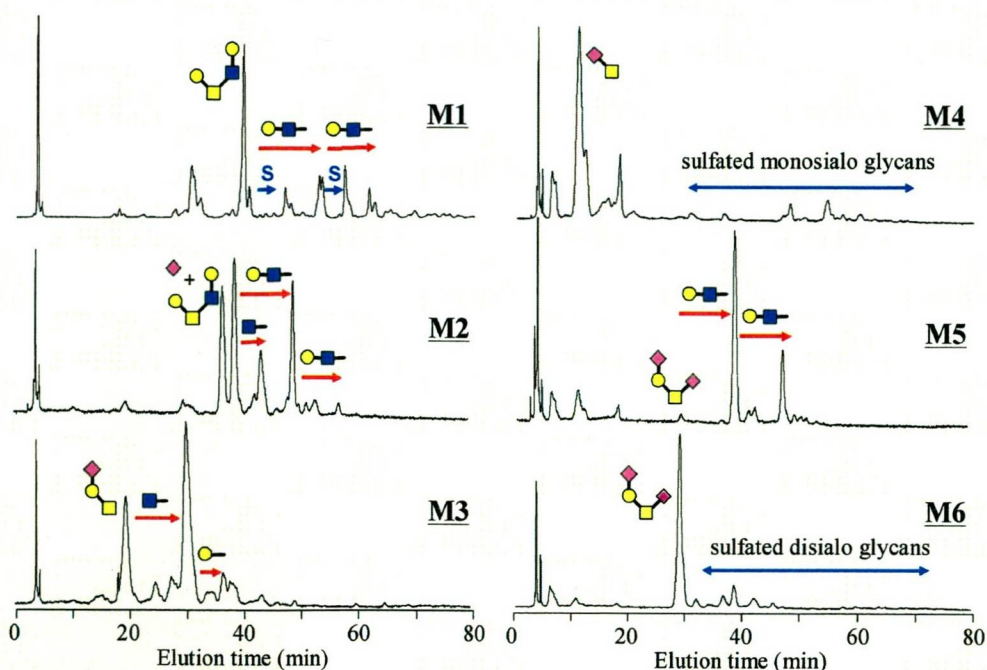
<b>M1</b>		<b>M4</b>	
504	Gal-GalNAc-2AA	1815	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
546	GlcNAc-GalNAc-2AA	1969	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
625	GlcNAc-GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>	2180	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
706	Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	2335	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
786	Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>	2546	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
868	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	<b>M5</b>	
949	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>	1450	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 ( <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA
1234	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA	1815	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
<b>M2</b>		<b>M6</b>	
1158	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1085	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3( <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6)GalNAc-2AA
1361	Gal $\beta$ 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1238	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
1523	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1440	Gal $\beta$ 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
1888	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1450	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 ( <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA
2253	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1604	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>SO<sub>3</sub></b>
2618	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	1684	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>2SO<sub>3</sub></b>
<b>M3</b>		1764	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b> + <b>3SO<sub>3</sub></b>
633	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6GalNAc-2AA	2260	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>
795	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc-2AA	2626	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_4\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>SO<sub>3</sub></b>
998	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	2106	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_2\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>
1160	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>	2471	<b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 { <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + <b>NeuAc</b>



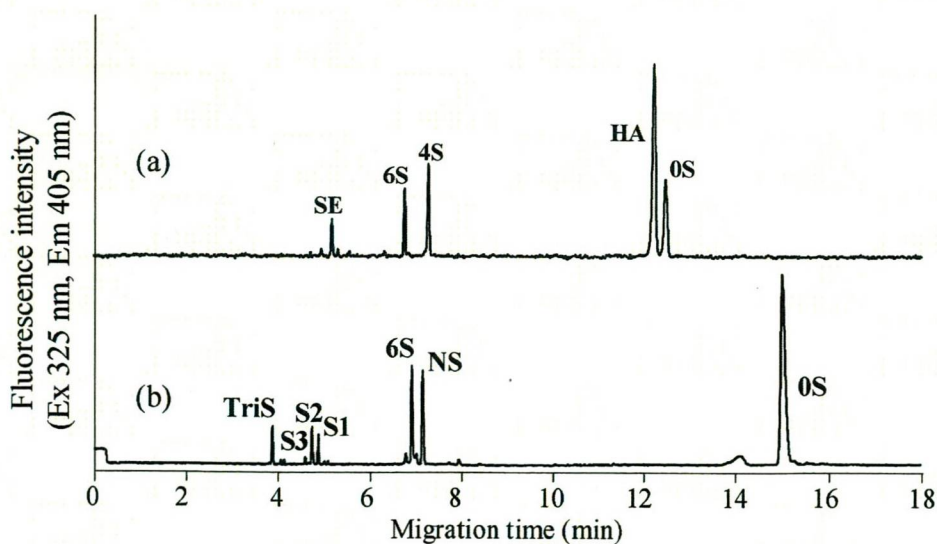
**Fig. 50** Serotonin affinity chromatography of HA oligosaccharides and mucin-type O-glycans. (a) 2AA-labeled HA oligosaccharides (4-20 mer) and (b) a mixture of mucin-type O-glycans from bovine fetuin and HA oligosaccharides. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-75 % solvent B) from 2 to 45 min and 75% solvent B from 37 to 45 min.



**Fig. 51** Serotonin affinity chromatography of O-linked glycans derived from HCT116 cell. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from 2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.

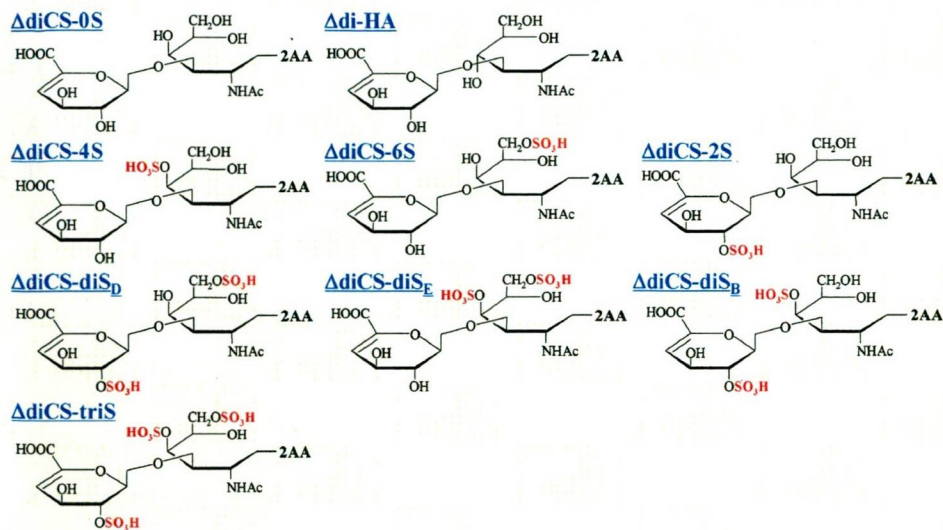


**Fig. 52** NP-HPLC analysis of mucin-type O-glycans from HCT116 cell. Analytical conditions: column, TSK-GEL Amide-80 (4.6 x 250 mm). flow rate, 0.8 mL/min. eluent, solvent A, 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in MeCN. solvent B, 0.2% CH<sub>3</sub>COOH/0.2% triethylamine in water. gradient conditions: a linear gradient (15-50 % solvent B) from 5 to 85 min.



**Fig. 53** CE analysis of unsaturated disaccharides from HCT116 cell. Analytical conditions; Capillary, fused silica (40 cm x 50  $\mu$ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0). Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25 °C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

### CS and HA unsaturated disaccharides



### HS unsaturated disaccharides

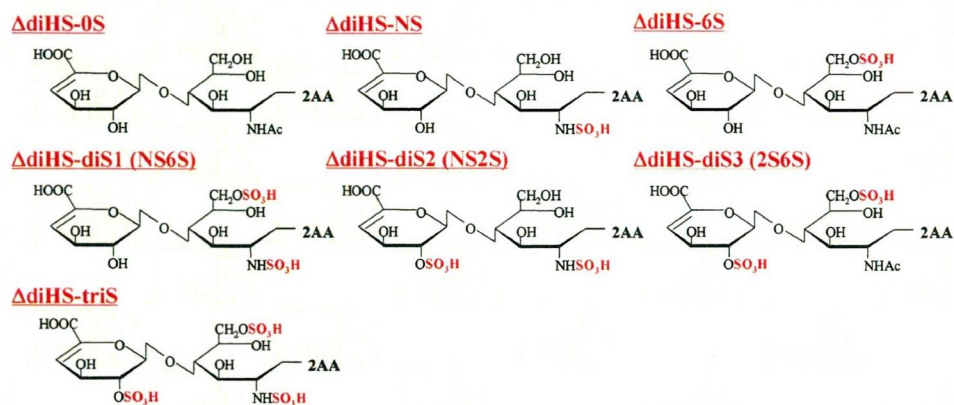


Fig. 54 Structures of unsaturated disaccharides from CS and HS.

## 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発

研究分担者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第1室長

再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質用の確保に関する基盤技術開発研究の一環として、細胞組織加工医薬品のウイルス等の感染因子に関する安全性評価技術の開発を行っている。今年度は、培養細胞の汚染を引き起こすことが知られているマイコプラズマを取り上げ、その迅速検査法の性能評価を実施した。PCR法3種類と酵素活性に基づく方法について比較検討した結果、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法は、PCR法よりもさらに迅速かつ簡便で、生きたマイコプラズマを検出する利点があるが、検出限界はPCR法よりもかなり劣り、ルーチンの検査でマイコプラズマに高度に汚染した細胞を見つけるには有用だが、細胞組織加工医薬品の品質管理試験としては妥当ではないことが明らかになった。一方、PCR法のうち、Nested PCR法とリアルタイムPCR法は十分な感度を持つ可能性が示唆されたが、マイコプラズマ迅速試験法として品質管理に用いるには、複数のマイコプラズマ標準品を使用し、DNAの抽出効率も含めて十分なバリデーションにより妥当性を示す必要がある。

### A. 研究目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞組織加工医薬品・医療用具の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医薬品として用いる治療法はガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。本邦においても、培養皮膚製品が初の細胞組織加工医薬品として承認され、さらに多くの製品の実用化が見込まれてい

る。しかし、細胞組織加工医薬品には未知・未経験の要素が多く、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題はまだ多く、特に重要な課題となるのが細胞組織加工医薬品の品質、安全性の確保である。

細胞組織加工医薬品には原料である細胞、組織に由来するウイルス等の感染性因子や製造工程で用いる血清や添加剤等から迷入する感染性因子による汚染のリスクが存在する。しかし、細胞組織加工医薬品はその性質上、ウイルス等の感染性因子を不活化・除去するための滅菌や高度な精製といった処理を行うことが困難であるため、ウイルス等の感染性因子が混入していると患者や患者の家族等に感染が広がる危険性がある。

従って細胞組織加工医薬品ではドナースクリーニング等の検査を行うことによる原材料の安全性確保、及び製造工程中での生物由来原料に由来する汚染リスクの低減が求められる。

本研究では、細胞組織加工医薬品のウイルスやマイコプラズマなどの感染因子の安全性評価技術の開発に関する研究として、感染性因子の高感度検出技術の開発及び安全性評価技術の開発に関する研究を行うことを目的とする。今年度は、マイコプラズマの迅速検査法について検討を行った。

## B. 研究方法

### (1) マイコプラズマ

マイコプラズマ標品は製品評価技術機構特許微生物寄託センターの佐藤真則先生より供与された。特許微生物寄託センターにおいて、*Mycoplasma fermentans* (MBRC No. 14854) を 267 培地を使用して 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、10 倍希釈列を作成して室温でおいたもの（室温保存品）と冷凍保存したもの（凍結保存品）を用いた。希釈列作成時の原液の力価は  $4.50 \times 10^6$  CFU/ml であった。また、マイコプラズマ DNA 標準品として、0.2 µg/ml の Genomic DNA from *Mycoplasma hyorhinitis* (ATCC17981D; 0.2 µg/ml) 及び Genomic DNA from *Mycoplasma orale* (ATCC23714D; 0.2 µg/ml) を使用した。

### (2) MycoAlert 法

酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法として、MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) を用いた。測定はキット添付のマニュアルに従い、次のように行った。ま

ず、マイコプラズマ希釈列又は陰性対照として滅菌水、陽性対照として MycoAlert assay control のいずれか 100 µl を 96 well opaque plate に duplicate で入れ、MycoAlert Reagent 100 µl を添加して 5 分間静置後、Wallac ARV0sx1420 マルチラベルカウンター (Perkin Elmer) を用いて 1 秒間の発光量を測定した (Reading A)。次に、MycoAlert Substrate を 100 µl 添加して 10 分間静置後、再度 1 秒間の発光量を測定した (Reading B)。Reading B / Reading A の値を算出し、1 未満をマイコプラズマ陰性、1 から 1.3 を偽陽性、1.3 以上をマイコプラズマ陽性と判定した。

### (3) Nested PCR 法

マイコプラズマの Nested PCR 法による検出は日本薬局方参考情報に記載されている方法に準じて行った。マイコプラズマ希釈列又は陰性対照として滅菌水 600 µl より DNA をクロロホルム抽出し、エタノール沈殿により回収した。得られた DNA は 40 µl の蒸留水に溶解し、5 µl を 1st PCR に使用した。PCR 反応の陽性対照 DNA として、*M. orale* 及び *M. fermentans* (100 fg/ µl) を 5 µl 使用した。1st PCR 終了後、1st PCR の反応生成物 2 µl を使用し、2nd PCR を実施した。PCR 反応は 1st PCR、2nd PCR とも局方では 100 µl のところ 50 µl に変更し、次のプライマーを使用した。1st PCR: F1: 5'-ACA CCA TGG GAG YTG GTA AT-3'; R1: 5'-CTT CWT CGA CTT YCA GAC CCA AGG CAT-3'; 2nd PCR: F2: 5'-GTG SGG NTG GAT CAC CTC CT-3'; R2: 5'-GCA TCC ACC AWA WAC YCT T-3'

1st PCR, 2nd PCR の反応条件はいずれも 95°C で 11min 加熱した後、94°C 30sec の変性、55°C で 2min のアニーリング、72°C で 2min の伸長反応を 30 サイクル行い、72°C で 5min 処理を行った。

1st PCR 及び 2nd PCR の反応産物各 10 µl について、2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、バンドの検出の有無で判定した。

#### (4) リアルタイム PCR 法

マイコプラズマのリアルタイム PCR による検出は、MicroSEQ mycoplasma detection assay (Applied Biosystems) を用いて行った。MicroSEQ mycoplasma detection assay は PrepSEQ mycoplasma nucleic acid extraction kit と MicroSEQ Mycoplasma Real-time PCR detection kit から構成されている。DNA の抽出は PrepSEQ mycoplasma nucleic acid extraction kit を使用し、無細胞系からのマイコプラズマ DNA の抽出法に従って以下の通り行った。まず、マイコプラズマ希釈液又は陰性対象の滅菌水 100 µl を取り、10% SDS 1 µl, 0.5M EDTA 1 µl, RNase 5 µl を加えて 56°C, 15min インキュベート後、さらに 2 µl の Proteinase K を添加して 56°C, 5min インキュベートした。これに Lysis buffer 200 µl を混合し、室温で 5分 インキュベートしてライセートを調製した。ライセートに 30 µl の磁気ビーズ溶液と 200 µl の Binding solution を添加混合した。15,000 x g で 15sec 遠心後、マグネティックスタンドで磁気ビーズを磁石に捕集し、上清を除去した。磁気ビーズに 300 µl の 95%エタノールと lysis buffer の 3:2 混合物

を添加し、転倒混和後、同様の操作でマグネティックスタンドに磁気ビーズを回収、上清を除去した。さらに 300 µl の wash solution を添加して 2 回洗浄した後、磁気ビーズを風乾した。100 µl の elution buffer を添加して 70°C で 7 分間 incubate 後、磁気ビーズをマグネティックスタンドに捕集し、マイコプラズマ DNA 溶液を回収した。

リアルタイム PCR は MicroSEQ Mycoplasma Real-time PCR detection kit を使用し、抽出した DNA 溶液 10 µl を Power SYBR Green PCR Master Mix 15 µl, Mycoplasma Real-Time PCR Primer Mix 3 µl と混合し、定量 PCR 反応を行った。測定機器は PRISM7000 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を使用した。反応条件は、95°C, 10 min で酵素活性化後、95°C, 15 sec と 60°C, 1 min の条件で 40 cycle 行った後、95°C, 15 sec, 60°C, 20 sec, 95°C, 15 sec の条件で dissociation を行った。結果の判定は Ct 値 (Threshold Cycle) が 36 未満、dissociation curve の Tm 値が 75~85°C であればマイコプラズマ陽性、それ以外は陰性と判定した。

#### (5) PCR-ELISA 法

PCR-ELISA 法によるマイコプラズマの検出は、Mycoplasma PCR-ELISA kit (Roche Applied Science) を用いてマニュアルに従って行った。但し、DNA の抽出操作についてはマニュアルどおりではなく、Nested PCR 法用にマイコプラズマ希釈液から調製した DNA を使用して、PCR 反応以降を実施した。PCR 反応はマイコプラズマ DNA 10 µl を PCR ready-to-go mix 25 µl と蒸留水 15 µl と混合し、50 µl の反応系で実施した。

反応条件は5 min, 95°Cで熱処理後、94°C、30 sec; 62°C, 30sec; 72°C, 1minのサイクル反応を39回繰り返し、72°C で10 min処理した。PCR反応後、反応産物10 µlを40 µl の Denaturation reagentと混合して10分間反応させた。これにHybridization reagent 450 µl を加え、200 µlをストレプトアビジンコートマイクロプレートの各wellに移して300 rpmで振とうしながら37°Cで3時間反応させた。プレートを洗浄緩衝液で洗浄後、anti-DIG-POD working dilutionを200 µl/well添加し、室温で30分間 反応させた。さらに洗浄後、TMB基質溶液100 µlを添加して20分間反応させた。停止液を100 µl加え、マイクロプレートリーダー (BioRad 680) を用いて450 nmと630 nmの吸光度差を測定し、0.2以上の場合をマイコプラズマ陽性と判定した。

### 倫理面への配慮

本研究では倫理面への配慮が必要となる試料は扱っていない。

### C. 結果

マイコプラズマは無細胞壁の原核生物で、細菌の 1/10 程度の大きさの自己増殖能を持つ最小の微生物である。これまでに 120 種類以上の菌種が報告されている。自然界では種特異性が強く固有のマイコプラズマが感染するが、培養細胞では血清やトリプシン、培養作業従事者等を介して種を超えて感染することが知られている。マイコプラズマが培養細胞に感染しても、多くの場合、細胞膜に付着して細胞と共存して増殖し、ウイルス感染のような細胞変性を伴わず、また一般の細菌感染で認められるような培

養液の混濁も起こらないため、汚染には気づかないことが多い。マイコプラズマは細胞壁を持たないためペニシリン系薬剤は無効であり、可塑性を示すため 0.22 µm のろ過滅菌フィルターを通過する。カナマイシン、ゲンタマイシンなどには耐性を持つものもあるという。これらの特徴から、培養細胞のマイコプラズマ汚染は実験室レベルでは高頻度に認められている。しかし、マイコプラズマに感染した細胞は増殖性や形態の変化、サイトカインの産生など、細胞の本来の機能や性質が様々な影響を受けることが知られており、汚染細胞を用いて医薬品を製造したり、ヒトに投与する細胞が汚染されていると重大な事態を招く可能性がある。このため、細胞を医薬品として用いるヒト自己及び同種由来細胞組織加工医薬品では、医薬品の製造に細胞の培養工程が入ることから、最終製品について、適切なマイコプラズマ否定試験を実施することが指針により求められている。

日本薬局方(局方)の参考情報には、細胞基材のマイコプラズマ否定試験法として現時点で適切と考えられる方法として、培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法が収載されている。各試験法の特徴を Table 1 に示す。局方では、各試験法には長所と短所があり、単独の試験ではマイコプラズマの存在を否定するには十分ではなく、判定には複数の試験を併用することが必要であるとされ、基本的には従来より実績のある培養法と DNA 染色法による実施を求めているが、DNA 染色法はマイコプラズマ以外の DNA も検出するため、DNA 染色法のみ陽性を示した場合には、PCR 法でマイコプラズマの



存在を否定することができるとしている。しかし、培養法は試験に4週間以上、DNA染色法でも1週間程度の時間がかかり、医薬品製造用の細胞基材のように、試験に十分な時間が取れるものであればこれらの試験を実施可能であるが、細胞の調製から投与まで十分な時間がないことが多い細胞組織加工医薬品では、より迅速、高感度で広範なマイコプラズマを検出可能な、試験法の開発が望まれている。

最近、マイコプラズマの迅速測定法として、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法(MycoAlert)が簡易迅速検査法として研究用に市販され、培養細胞汚染の調査等に使用されている。また、研究用あるいは細胞基材の品質管理試験用として、PCR法をベースとした種々のマイコプラズマ検出キットが市販されている。そこで、培養細胞を高頻度に汚染していることが知られる*M. fermentans*培養液をモデルマイコプラズマとして使用し、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法と3種類のPCR法(局方Nested PCR法、リアルタイムPCR法、PCR-ELISA法)について、操作性、迅速性、検出限界等を比較検討した。また、リアルタイムPCR法とPCR-ELISA法については、2種類のマイコプラズマDNA標準品、*M. hyorhinis*及び*M. orale*のgenomic DNAを用い他検討も実施した。

### C.1 *M. fermentans*培養液の測定

#### 1) MycoAlert法

MycoAlertはマイコプラズマに特有の酵素活性を利用したマイコプラズマ測定法である。マイコプラズマの膜を溶解して放出されるマイコプラズマ特有の酵素が特異的

な基質とADPからATPを産生することを利用し、産生されたATP量をルシフェリン・ルシフェラーゼ発光系により測定する。抽出したDNAを測定するPCR法と異なり、酵素活性を測定する方法は生きたマイコプラズマを検出することが可能である。試料は細胞培養上清を用いる。細胞が試料に混入すると結果に影響を与えるため、遠心処理により細胞を除去する必要があるが、測定の前処理はこの遠心のみであり、測定の所要時間は30分程度である。

*M. fermentans*培養液の10倍希釈液(室温保存品及び冷凍保存品)100 µlを用いて、MycoAlertで測定した結果をFig. 1に示す。室温保存品では希釈倍率 $10^3$ 倍まで陽性、凍結保存品では10倍希釈は陽性であったが、 $10^2$ 倍希釈は偽陽性であった。*M. fermentans*原液の力価は $4.5 \times 10^6$  CFU/mlであったことから、検出限界を力価に換算すると $4.5 \times 10^3 \sim 10^4$  CFU/mlと考えられた。

#### 2) 局方Nested PCR法

Nested PCR法はマイコプラズマDNAをマイコプラズマに特異的なアウトプライマーとその内側にあるインナープライマーを用いて2段階でPCR増幅することにより検出する方法である。2段階の増幅により検出の感度と特異性を増すことができる。局方では、比較的多くのマイコプラズマを検出する領域としてrRNAオペロン内の16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から、広範囲のマイコプラズマ種に相同性のある領域を選択したプライマーが例示されている。このプライマーを用いた場合、マイコプラズマの菌種により2nd

PCR で得られる増幅断片のサイズが異なり、さらに制限酵素消化を行うことで細胞を汚染したマイコプラズマ菌種を推定することが可能である。局方では培養上清ではなく細胞懸濁液を試料として DNA を抽出することとされる。所要時間は 1st PCR までで 6 時間程度、Nested PCR を行って検出するにはさらに 4 時間程度必要となる。

*M. fermentans* 培養液の 10 倍希釈列から DNA を抽出後、1st PCR, 2nd PCR を実施した結果を Fig. 2 に示す。2 段階の PCR を実施したが、室温保存品及び冷凍保存品のどちらの場合も 1st PCR の段階で既に *M. fermentans* 培養液の最大希釈倍率である  $10^5$  倍 (力価換算すると 45 CFU/ml) まで PCR の増幅バンドが検出された。陽性対照 DNA として用いた *M. fermentans* DNA は 500 fg/PCR reaction に相当するが、1st PCR のバンドは希釈倍率  $10^5$  倍の培養液から抽出した DNA の増幅により得られたバンドはより明瞭であったことから、希釈倍率  $10^5$  倍の培養液から得られた DNA は 500 fg/reaction 以上と推測された。一方、陽性対照 DNA として用いた *M. orale* も *M. fermentans* と同量を PCR 反応に供したが、1st PCR ではバンドがほとんど検出されず、マイコプラズマの種によって検出感度が異なることが示唆された。

### 3) リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 法によるマイコプラズマの検出は、MicroSEQ mycoplasma detection assay kit を使用した。欧州薬局方 (EP) では 2007 年にマイコプラズマ試験法が改正され、EP 収載のバリデーション試験に適合すれば、PCR 法などの核酸増幅検査

(NAT) を従来のマイコプラズマ否定試験の代替法とすることが可能になったが、本キットは細胞基材の品質管理試験用に開発され、EP のバリデーションに適合しているとされる。

リアルタイム PCR 検出用キットで使用しているプライマーは、マイコプラズマの 16S rRNA 領域に対する複数のプライマーを組み合わせたもので、90 種類以上のマイコプラズマ及び近縁種を特異的に検出可能という。マルチプレックス PCR となるため、SYBR Green で検出を行う。そのため、試料は培養細胞ではなく、細胞培養上清を使用し、ホストセル由来の核酸が混入しないように注意が必要である。リアルタイム PCR では増幅反応後、dissociation 反応を行い、増幅曲線と融解曲線から検出の有無を判定する。所要時間はカタログでは全工程 4 時間とあるが、DNA 抽出に 3 時間程度、リアルタイム PCR も 2~3 時間程度必要であった。

*M. fermentans* 培養液について、リアルタイム PCR で測定した結果について、増幅曲線及び融解曲線を Fig.3 に、判定結果を Table 1 に示す。Negative control は陰性であったが、室温保存品及び冷凍保存品のどちらの場合も最大希釈倍率の  $10^5$  倍 (45 CFU/ml) まで検出は陽性であった。

### 4) PCR-ELISA 法

PCR-ELISA キットは、細胞培養上清を試料とし、マイコプラズマをアルカリで溶解後、中和したものをテンプレートとして用いる。PCR 増幅時に DIG 標識し、PCR 増幅産物をビオチン結合プローブとハイブリダイズさせて、ストレプトアビジンコー

トプレートにトラップする。これを抗DIG-PODとTMB基質によるELISA反応により検出する方法である。今回の検討では、PCR以降の反応のみ実施し、測定の所要時間はPCR反応が3時間程度、ELISA反応が4時間程度であった。全工程としてはDNA抽出にさらに1時間以上の時間が必要である。

*M. fermentans* DNAのPCR-ELISA測定結果をFig.3に示す。凍結保存品のほうが室温保存よりも数値は低い、最大希釈倍率の $10^5$ 倍(45 CFU/ml)までどちらも陽性と判定された。PCR-ELISA法は定性試験であるが、陽性対照DNAとして用いた*M. fermentans* (1 pg/PCR reaction)と室温保存の $10^5$ 倍の吸光度は同程度であったことから、 $10^5$ 倍で使用したDNA溶液には1 pg程度のDNAが含まれていたと考えられる。なお、陽性対照DNAとして用いた*M. orale*も*M. fermentans*と同じく1 pg/PCR reactionを使用した、*M. fermentans*と比較してELISA反応は弱く、陰性と判定された。マイコプラズマの種類によってPCR-ELISAの検出感度には差異があることが示唆された。

以上の4種類のマイコプラズマ試験法による*M. fermentans*培養液の検出結果をTable 3にまとめた。今回検討したPCR法3種類はいずれも最大希釈である $10^5$ 倍(45 CFU/ml)まで検出可能であったが、MycoAlertはPCR法より少なくとも100倍から1000倍以上検出感度が低いことが明らかになった。

C.2 *M. orale* 及び *M. hyorhinis* の genomic

#### DNAの測定

市販のPCR法であるリアルタイムPCR法とPCR-ELISA法について、局方のDNA染色法で陽性対照として用いられる2種類のマイコプラズマ、*M. hyorhinis* 及び *M. orale* の genomic DNAを用いて検出限界を検討した。これらの測定法は、いずれも培養上清を試料とし、DNAの抽出工程からキット化されている。しかし、今回の検討では、精製DNAの希釈列を使用し、PCRの1反応当たりの検出限界として2種類の方法を比較した(Table 4)。その結果、リアルタイムPCR法は*M. hyorhinis* DNA及び*M. orale* DNAともに100 fg/reactionまで検出可能であった。一方、PCR-ELISA法では、*M. hyorhinis* DNAは1 pg/reaction、*M. orale* DNAは10 pg/reactionが検出に必要であった。

#### D. 考察

マイコプラズマの迅速検査法として、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法と3種類のPCR法(局方Nested PCR法、リアルタイムPCR法、PCR-ELISA法)を、*M. fermentans*をモデルに使用して比較検討した。

マイコプラズマの酵素活性に基づくMycoAlert法は、特別な処理を必要とせず生きたマイコプラズマを30分程度で測定可能であり、マイコプラズマ否定試験として局方に収載されている方法の中で最も迅速なPCR法よりもさらに簡便で迅速な検査法である。検出感度は、カタログ値では、20 CFU/mlの*M. hyorhinis* 及び *A. coleplasma laidlawii*を検出可能とあり、培養法、DNA染色法、PCR法と比較して同等以上の感度

があるとされる。しかし、今回の検討の結果、MycoAlert 法による検出には  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml 以上のマイコプラズマが必要であり、他の 3 種類の PCR 法と比較して 100~1000 倍以上検出感度が低いことが明らかになった。MycoAlert 法は酵素活性を発光量として測定しており、ルミノメーターの検出感度が低いとマイコプラズマの検出感度も低くなる。しかし使用したルミノメーターの感度検定を実施したところ、ATP 濃度で  $10^{-17}$  M まで測定可能であったことから、ルミノメーターの性能に問題があるわけではなく、MycoAlert 法そのものの検出感度が低いものと考えられた。

EP のマイコプラズマ試験法には、NAT を培養法又は DNA 染色法の代替法として用いるための条件として、*A. laidlawii*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. pneumoniae* 又は *M. gallisepticum*, *M. arginini* の 6 種類（製造工程で鳥類由来製品の利用、接触がある場合は *M. synoviae*、昆虫または植物由来製品の利用、接触がある場合は *Spiroplasma citri* を加えた 7 種類）をマイコプラズマ標準品に用いて培養法又は DNA 染色法と NAT との比較試験を実施し、培養法の代替法として用いるには、検出限界として 10 CFU/ml、DNA 染色法の代替法として用いるには、100 CFU/ml を検出できることを示す必要があるとしている。今回の結果より、MycoAlert 法は 100 CFU/ml の *M. fermentans* を検出できないことが明らかになり、培養細胞のルーチンのモニタリングとして高度に汚染された細胞を迅速に発見するには有効な方法と思われるが、あくまでも研究用としての用途に限られ、細胞の品質管理試験に用いるには

妥当ではないことが示された。

3 種類の PCR 法は、いずれも 45 CFU/ml の *M. fermentans* を検出可能であったが、今回は 45 CFU/ml 以下の検討を行わなかったため、各試験法の検出限界は明らかにならなかった。しかし、局方 nested PCR 法は、1st PCR の段階で 45 CFU/ml の *M. fermentans* を検出できており、2nd PCR により少なくとも 10 倍以上は感度が上昇すると考えられることから、他のバリデーションにも適合すれば EP の基準でも培養法の代替法として使用できる可能性がある。

一方、リアルタイム PCR 法と PCR-ELISA 法については、精製マイコプラズマ DNA を用いて PCR 反応あたりの検出限界を検討したところ、リアルタイム PCR 法は *M. hyorhinis*, *M. orale* とも 100 fg/reaction まで検出可能であった。しかし、PCR-ELISA 法は、*M. hyorhinis* DNA が 1 pg/reaction, *M. orale* DNA は 10 pg/reaction 必要であり、リアルタイム PCR 法は 10 倍から 100 倍感度が高いことが明らかになった。PCR-ELISA 法は研究用試薬として販売されているが、リアルタイム PCR 法は細胞基材の品質管理試験用に最適化されていることから検出感度にも差が出たものと思われる。リアルタイム PCR 法は、PCR で増幅したものをオープンにすることなく測定可能であり、nested PCR 法のようにキャリーオーバーによる偽陽性の恐れが少なく、電気泳動の手間もなく測定可能で優れた方法と思われるが、SYBR Green で検出するため、試料は細胞由来 DNA の混入のない培養上清しか使えない。多くのマイコプラズマは細胞表面で増殖するが、マイコプラズマの種類によっては細胞表面では