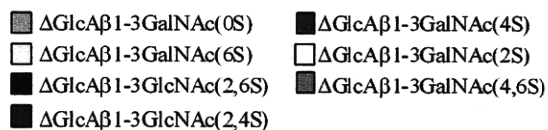
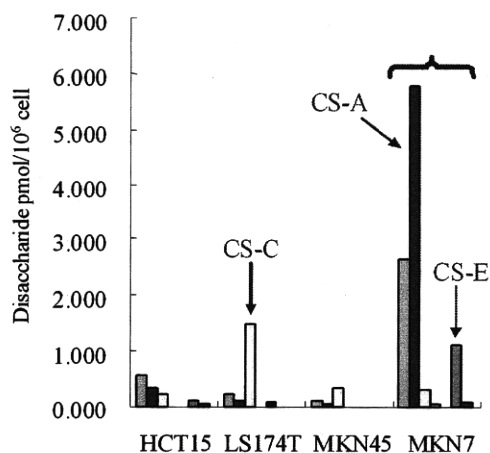


### CS/DS Disaccharides



### HP/HS Disaccharides

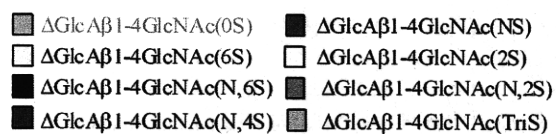
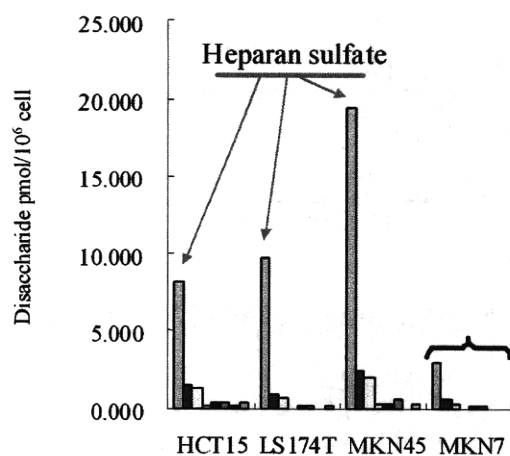


Fig.130 Comparison of the GAGs expressed on cancer cells

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

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

細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発に関する研究の一環として、初年度は、B型肝炎ウイルス(HBV)の濃縮・高感度検出法の開発とパルボウイルス B19 (PVB19)の感染系の確立について検討し、ポリ-L-リジンを表面にコートした磁気ビーズにより、ごく微量のHBVを含む血漿からHBVを濃縮可能でありHBV DNA及びHBsAgを高感度に検出可能であることを示した。また、PVB19については、エリスロポエチン依存性網状赤血球細胞株 Ku812-E2を樹立し、PVB19のin vitro持続感染系を確立した。次年度は、培養細胞を汚染するマイコプラズマの迅速検査法の性能評価を実施し、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法は、PCR法よりも迅速かつ簡便で生きたマイコプラズマを検出できるが、検出限界はPCR法よりもかなり劣ることを明らかにした。最終年度は、E型肝炎ウイルス(HEV)の核酸増幅検査(NAT)による測定の評価に用いる標準パネルの樹立に関する検討を行い、国内で見いだされるHEV遺伝子型の4クラスター(G3jp, G3us, G3sp, G4jp)に属する計5株からなるHEV-NAT評価用標準パネルを樹立した。

研究協力者

山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所
佐藤 功栄	埼玉県赤十字血液センター
岩田 明子	埼玉県赤十字血液センター
岡田 義昭	国立感染症研究所
水澤 左衛子	国立感染症研究所
柚木 幹弘	㈱ベネシス
辻川 宗男	㈱ベネシス
皆木 隆男	㈱ベネシス
稲田 耕一	日本製薬㈱
小西 久郎	日本製薬㈱
五十嵐 正志	日本赤十字社
鈴木 光	日本赤十字社
嘉悦 洋	(財)化学及血清療法研究所
下瀬 克郎	(財)化学及血清療法研究所

A. 研究目的

細胞組織加工医薬品の品質、安全性の確保は細胞組織加工医薬品の本格的実用化への重要な課題のひとつである。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安全性評価技術の開発に関する研究として、ウイルス等の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し、初年度は、HBVの濃縮・高感度検出法の開発とPVB19の感染系の確立について、次年度は、マイコプラズマの迅速検査法について、最終年度はHEVのNAT評価用標準パネルの樹立について検討を行った。

## B. 研究方法

### B.1. HBV の濃縮・高感度検出法の開発

ポリ-L-リジン(PLL)コート磁気ビーズはカルボキシル基を持つ磁気ビーズ(粒径 1  $\mu\text{m}$ )に、PLL を水溶性カルボジイミド存在下でカップリングして作製した。HBV の濃縮は、検体に PLL 磁気ビーズを添加し、これに 1.1M 酢酸亜鉛溶液を混合後、ウイルスと磁性粒子表面の PLL との凝集体を形成させて磁気スタンド上に回収することで行った。

HBV-DNA はスマイテスト EX-R&D 試薬キットを用いて抽出し、定量的 PCR 法により測定した。なお標準曲線から求めた HBV の定量限界は 100 copies/ml 以上で、定性的な 95% 信頼限界は 60 copies/ml であった。HBs 抗原は、AxSYM HBsAg assay (Abbott Laboratories) を用いて測定した。

### B.2. PVB19 感染系の確立

赤芽球系細胞株 Ku812 細胞を 100 ng/ml エリスロポエチン (EPO) 存在下に 96 ウエ

ルプレートを用いて限界希釈して培養を行い、EPO 依存的に増幅する 2 クローン (Ku812-E2 及び Ku812-E4) を選別した。ヒト血漿由来 PVB19 を  $10^2 \sim 10^5$  コピー/ml になるように 2% ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI1640 培地で希釈し、Ku812-E2 及び Ku812-E4 細胞と 1 時間培養した。その後、遠心により細胞を沈殿させ、未感染のウイルスを除去後、10%FCS RPMI1640 培地、ASF104 無血清培地、GIT 無血清培地に再び細胞を懸濁して培養を続けることで感染系を樹立した。

### B.3. マイコプラズマの迅速検査法

マイコプラズマとして、*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(製品評価技術機構特許微生物寄託センター佐藤真則先生より供与)。マイコプラズマ DNA 標準品として、Genomic DNA from *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC17981D; 0.2  $\mu\text{g/ml}$ )及び Genomic DNA from *Mycoplasma orale* (ATCC23714D; 0.2  $\mu\text{g/ml}$ )を使用した。

マイコプラズマの検出は、酵素活性に基づく方法として、MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza)を用いた。Nested PCR 法による検出は、日本薬局方参考情報に収載されている方法に準じた。リアルタイム PCR による検出は、MicroSEQ mycoplasma detection assay (Applied Biosystems)、PCR-ELISA 法による検出は、Mycoplasma PCR-ELISA kit (Roche Applied Science)を用いた。

#### B.4. HEV 標準パネルの樹立

国内で見いだされる 4 種類のクラスターに属する swJR-P5(G3jp) 、 swJB-E10(G3sp) 、 swJB-M8(G3us) 、 swJB-H7(G4jp) の 4 種類の株と、swJB-E10 を A549 細胞に感染させて上清から精製した swJB-E10cul(G3sp)、およびコントロールのヒト陰性血漿の計 6 本のバイアル (各 0.5ml/tube) からなる HEV パネル候補品を用いた (ベネシス社より供与)。HEV の定量は、感度検定用標準 RNA として次の 2 種類を使用した (ベネシスより供与)。①HEV PC RNA (10<sup>7</sup> copies in 70% Ethanol/tube, G3jp, G3sp, G4sp 用) 、 ②HEV G3us PC RNA (10<sup>7</sup> copies in 70% Ethanol/tube, G3us 用)

HEV の核酸抽出は QIAamp viral RNA mini kit を使用し、定量 RT-PCR には以下の機器及び試薬を用いた。

使用機器 : Prism7000 sequence detection systems (Applied Biosystems)

使用キット : QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)

Primer : HE86 及び HE87

Probe : FHE88 (swJB-M8 以外) 又は FHE100 (swJB-M8 用)

#### 倫理面への配慮

動物実験を行う際には、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容

の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

#### C. 結果

##### C.1. HBV の濃縮・高感度検出法の開発

現在、HBV 感染症のスクリーニング検査には HBV 表面抗原 (HBsAg) 検査、HBc 抗体検査を実施し適合を確認した上で、より高感度な NAT によるスクリーニング検査が実施されている。しかし、近年、HBs 抗原陰性にもかかわらず血中や組織中に HBV-DNA が認められる、いわゆるオカルト HBV (潜伏性 HBV) 感染の存在が大きな問題となってきた。従来、HBs 抗原が陰性で、HBs 抗体、HBc 抗体の両者あるいはいずれか一方が陽性である場合は、HBV の一過性感染経過後または HBV キャリアからの離脱後 (HBV 感染の既往) の状態と考えられていた。しかし近年、このような状態にある人の肝臓の中には、ごく微量の HBV が持続感染し、血液中にもごく微量の HBV が存在し続けており、移植により感染する可能性があることが明らかになってきた。今回、このようなごく微量の HBV を検出するための方法として、2 価金属イオン存在下でウイルスと凝集体を形成する PLL 磁気ビーズによりウイルスを濃縮後に検出する方法を検討した。

まず、種々の濃度の HBV を含む溶液を調製し、PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の濃縮効率を検討した (Table 1)。HBV の濃度が 10<sup>3</sup> copies/ml から 10<sup>6</sup> copies/ml において、HBV は PLL 磁気ビーズで濃縮されるが、HBV のコピー数が増加するにつれて、濃縮効率は 0.76 から 0.49 に低下した。

PLL 磁気ビーズによる HBsAg の濃縮を Fig.1 に示す。高濃度の試料、低濃度の試料はいずれも希釈により検出限界以下となったが、この希釈液を PLL 磁気ビーズにより 8 倍濃縮すると HBsAg の検出が陽性となった。さらに、陰性の試料でも濃縮により検出可能となった。濃縮効率は高濃度試料で約 0.64、低濃度試料で約 0.59 であった。

次に、HBV の PLL 磁気ビーズ濃縮に及ぼす HBs 抗体の影響を検討した。PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の 10 倍濃縮の濃縮効率は、抗体の添加により 0.72 倍から 1 倍以上に改善された (Table 2)。しかし、抗 HBs 抗体を添加すると、HBsAg の検出は阻害された (data not shown)。

HBV の PLL 磁気ビーズ濃縮時に他のウイルスが共存する場合の影響を検討したところ、陰性血漿、HCV 陽性血漿、PVB19 陽性血漿で希釈した HBV の濃縮効率に差は認められなかった。(Table 3)。

以上の結果から、PLL 磁気ビーズを用いることにより、ごく微量の HBV を含む血漿から HBV を濃縮して HBV DNA 及び HBsAg を高感度に検出することが可能であること、また濃縮の際、HBV 表面抗原に対する抗体を共存させるとより濃縮効率が向上すること、さらに HCV や PVB19 が共存しても HBV の濃縮が可能であることが示された。

なお本濃縮法については、埼玉県赤十字血液センターにおいて、HBcAb 陽性、HBsAg 陰性の献血血液を用いて実用性を検証した結果、従来の NAT 検査では HBV DNA が陰性とされた 61 検体中 25 検体で、PLL 磁気ビーズ濃縮により HBV-DNA が新たに検出されること、また、HBsAg 陰性の

78 検体中 29 検体で PLL 磁気ビーズ濃縮により HBsAg が新たに検出されることを確認した。以上の結果より、PLL 磁気ビーズ濃縮がごく低濃度の HBV の濃縮・高感度検出に有用であり、オカルト HBV 感染でも検出可能であることが実証された。

## C.2. PVB19 の感染系の確立

PVB19 は網状赤血球細胞でのみ増幅すると言われる。そこで、EPO 存在下に赤芽球系細胞株 Ku812 細胞を限界希釈して培養を行い、EPO 依存的にクローナルに増幅する細胞を選別し、2 つの細胞株 Ku812-E2 及び Ku812-E4 を得た。これらの細胞は、クローニングに 1 ヶ月を要し、さらに 2 ヶ月間の培養を行っても EPO 依存的な増幅能は維持されていた。また、培養後沈殿させた細胞がヘモグロビンを含んでいることから、網状赤血球細胞様の特性を持つことが確認された (Fig.2, 3)。PVB19 を Ku812-E2 細胞及び Ku812-E4 細胞に感染させたところ、両細胞とも細胞変性は起こらなかったが、持続感染の可能性が考えられた。経時的に細胞を含む培養液から DNA を抽出し、PVB19 のコピー数の変化を測定したところ、両細胞とも培養の時間経過と共に PVB19 のコピー数が増加し、Ku812-E2 細胞の方がより高いコピー数の増加が認められたことから、以後の検討では Ku812-E2 細胞を用いた。培養上清と細胞のコピー数を比較したところ、培養初期では培養上清と細胞のウイルス量大きな差はなかった (細胞を除去することによりコピー数は 1/3 ほどに減少した) (Fig.4)。細胞あたりの感染ウイルス量が多いほど上清中のウイルス量は増加するが、細胞との比率はむしろ減少し、上

清に見出されたのは細胞に含まれるウイルス量の約 1/5 量程度であった (Fig.4, Day2 と Day2 sup)。細胞内に含まれる PVB19 の感染性が維持されているか確認するために、PVB19 を感染させた細胞を沈殿させ、低張処理により細胞を破砕し、その上清を再び Ku812-E2 細胞に感染させたところ、それほど高い感染性ではないが、再び持続感染させることが可能であった。

次に、Ku812-E2 細胞での PVB19 の増幅に最も適した条件を検討した。無血清培地と FCS 含有培地ではウイルスの増幅に大きく差が認められた (Fig.5)。ASF104 無血清培地では細胞そのものの増幅が高くないが、GIT 無血清培地では細胞の増幅は血清存在下と同等であったことより、血清培地での PVB19 の高い増幅作用は別の要因が考えられた。以降の検討は 10%FCS 含有培地を用いて行った。

次に、PVB19 感染における抗 PVB19 抗体の影響について検討した (Fig.6)。抗体存在下で感染させた場合、PVB19 の持続感染は殆ど認められなかった。このことから、十分な PVB19 抗体が存在すれば PVB19 の感染性はそれほど高くないことが示唆された。

### C.3 マイコプラズマの迅速測定法

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。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が、ウイルス感染のような細胞変性を伴わず、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。ペニシリン系薬剤は無効であり、0.22  $\mu\text{m}$  のろ過滅菌フィルターを通過し、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ことから、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、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、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。局方では、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 週間程度時間がかかり、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市販され、培養細胞汚染の調査等にも使用されている。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 法をベースとした複数のマイコプラズマ検出キットが市販されている。そこで、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、検出感度等を比較検討した。

### C.3.1 *M. fermentans* 培養液の測定比較

#### 1) MycoAlert 法

MycoAlert は、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方法である。抽出した DNA を測定する PCR 法と異なり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 倍希釈列 (室温保存品及び冷凍保存品) 100  $\mu$ l を用いて、MycoAlert で測定した結果、室温保存品では希釈倍率  $10^3$  倍 ( $4.5 \times 10^3$  CFU/ml) 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 ( $10^4$  CFU/ml) は偽陽性であった (Fig.7)。

#### 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 (45 CFU/ml) まで PCR の増幅バンドが検出された (Fig.8)。陽性対照 DNA の *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、宿主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 で測定したところ、Negative control は陰性であったが、室温保存品及び冷凍保存品のいずれも最大希釈倍率の  $10^5$  倍 (45 CFU/ml) まで検出は陽性であった

(Table 4)。

### 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 を PCR-ELISA で測定したところ、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 (Fig 9)。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 を使用したが、*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 5 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.3.2 *M. orale* 及び *M. hyorhinis* の genomic DNA の測定

リアルタイム PCR 法と PCR-ELISA 法については、局方の DNA 染色法の陽性対照である 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 の抽出キットと PCR 検出キットから構成されている。しかし、今回の検討では、PCR の検出についてのみ比較することとし、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 6)。その結果、リアルタイム PCR 法は *M. hyorhinis* DNA 及び *M. orale* DNA とともに 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。

### C.4 HEV 標準パネルの樹立

再生医療製品を含むヒト由来成分を原料とする医薬品のウイルス安全性確保には、NAT によるウイルスの高感度検出が採用されているが、NAT の実施にはウイルスの標準品や参照パネルを用いた検出法の評価が不可欠である。B 型及び C 型肝炎ウイルスやヒト免疫不全ウイルスについては既に標

準品や参照パネルが国内外で樹立されている。一方、加熱の不十分なブタ等の内臓肉の摂取により感染して肝炎を起こす HEV は、最近、輸血によっても感染するケースがあることが明らかにされた人獣共通感染症であるが、HEV (genotype 3) の標準品の策定が WHO で予定されているものの、参照パネルは作成されていない。そこで、HEV の NAT による検出の評価に用いる標準パネルの樹立を検討した。

HEV パネル候補品として、国内 4 クラスターに属し、実験感染ブタ糞便から得た 4 株と培養細胞で増幅した 1 株の計 5 株をヒト血清で約  $10^5$  copies/ml に希釈したものをを用いた (Table 7, Fig 10)。5 種類のパネルのうち 4 種類はブタの糞便から抽出したものであり、ウイルス凝集の可能性が考えられる。そこで標準パネルの定量を行う前に、低濃度下でもウイルスの分散が均一であるかどうかを確認するため、希釈系列における均一性試験を実施した。HEV パネルのうち、swJB-H7 について、ヒト ACD 血漿を用いて、10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍の希釈液を調製した。HEV 原液及び希釈列からの溶出液について定量 RT-PCR で測定した。また、原液から抽出した 1 本より RNA の 10 倍希釈列を作成し、これを同時に定量 RT-PCR で測定して比較した。その結果、定量 PCR での検量線となる HEV 希釈列と Ct をプロットすると、検量線がほぼ直線にのることが確認された (Fig.11)。予備的検討でも swJR-P5, swJB-E10, swJB-E10cul, swJB-M8 について均一性試験を実施し、ウイルスはほぼ分散していることを確認した。これらの結果より、ウイルスパネルの均一性が確認され、ウイルス希釈列を用いても

定量性に問題はないものと考えられた。

次に、HEV パネル候補品について、共同検定に参加した 6 施設において定量を行い、各パネルのコピー数を算出した。HEV は heterogeneity が高く、参加施設数も少ないことから、共同検定では可能な限り統一したプロトコールに従って行うこととした。ウイルス核酸の抽出は、ブタ糞便由来で RNase 等の RT-PCR を阻害する不純物が多く含まれると想定されるため、カラム法が適していることから、カラム法の同一キットを採用した。また、RT-PCR のキット、検出に用いるプライマー、プローブもすべての機関で統一した。RT-PCR に用いる機器は施設により異なり、ABI 7500 が 2 施設、ABI 7500fast、ABI 7900、ABI 7000、Roche LightCycler が各 1 施設であった。使用機器及び施設により、PCR 反応系の容量やプライマー、テンプレートの量などは適宜変更した。

各施設では、パネル 3 セットについて日を変えて核酸抽出とリアルタイム RT-PCR を行うことにより定量を実施した (Log copies/ml を N=3 で算出)。全 6 施設の平均値を求めたところ、どのパネルメンバーにおいても SD が 0.5 以上と非常にばらつきが大きくなり、特に、6 施設のうち 1 施設のデータが値のばらつきが大きく、また他施設よりも定量値がかなり低い傾向が認められたことから、測定系になんらかの問題があることが考えられた。この 1 施設を除いた 5 施設の平均値は参考値に近い値となり SD も 0.5 以内となった。そこで、この 5 施設平均値をパネルのコピー数として設定した (Table.7)。

HEV 標準パネルの定量に用いた検出法に

よる標準パネルの検出限界について検討を行った。各パネルについてヒト陰性血漿を用いて 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 の 4 段階に希釈後、ウイルス核酸を抽出し、リアルタイム定量 PCR により測定した。各パネルの希釈による計算値と実測値を Table 8 に示す。NAT ガイドラインによると、「95% の確率で検出される検体一定量当たりのウイルス遺伝子の際定量である陽性カットオフ値を検出感度として設定する。」とあり、十分な回数の試験を繰り返して求める必要がある。N=3 で実施した今回のデータからは厳密な検出限界を算出することはできないが、2/3 以上が検出される条件を考慮すると、10~20 copies/reaction 程度まで検出可能と考えられた。

## D. 考察

### D.1. HBV の濃縮・高感度検出法の開発

HBV の濃縮・高感度検出法として、PLL 結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、PLL 磁気ビーズを用いることにより、ごく微量の HBV を含む血漿から HBV を濃縮して HBV DNA 及び HBsAg を高感度に検出することが可能であり、低濃度キャリアの高感度ウイルススクリーニング法としての有用性を確認した。これまで HBV をポリエチレンイミン磁気ビーズで濃縮後、NAT により検出することによる高感度検出法を検討してきたが、ウインドウ期の検体では定量的な濃縮ができないという欠点があった。このようなウインドウ期の検体の HBV の高感度検出を行うために、Zn イオンの添加により濃縮を行う方法も開発したが、Zn イオンによる濃縮は遠心操作が必要であり、迅速性、簡便性の観点から改良が

必要であった。今回、Zn イオン存在下に PLL 磁気ビーズを用いて濃縮する方法を開発し、遠心操作を行わなくても磁気分離により簡便にウイルスを濃縮できることが示された。

## D.2. PVB19 の感染系の確立

EPO 依存性網状赤血球細胞 Ku812-E2 細胞を樹立し、Ku812-E2 細胞を用いた PVB19 感染系を確立した。本感染系では細胞変性作用は認められず、持続感染系であることが明らかとなった。また、細胞の増殖に伴い PVB19 も増幅することから、一部が細胞上清に放出されるものと考えられた。この系では、細胞外へ放出されるウイルスのみならず、細胞内のウイルスも感染性を持っていることが示された。PVB19 の感染・増幅に最適な培地は血清を含む培地であり、血清成分が増幅に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。PVB19 はヒト同種由来細胞組織加工医薬品のガイドラインによりドナースクリーニングを行うように求められているが、PVB19 抗体を持っているレシピエント、あるいはドナーが抗体を持っているときに感染性にどのような影響を与えるのか論議されてきているが、本研究の結果からは、抗体存在下で持続感染が強く抑制されたことより、抗体によりウイルス感染価が中和されることが示唆された。

## D.3. マイコプラズマの迅速検査法の比較

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 法について、*M. fermentans* をモデルに使用して比較検討した。MycoAlert 法は、PCR 法よりもさらに簡便で迅速な検

査法である。しかし、 $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml 以上のマイコプラズマが必要であり、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。EP のマイコプラズマ試験法によると、NAT を培養法の代替法として用いるには、10 CFU/ml、DNA 染色法の代替法とするには、100 CFU/ml を検出できることを示す必要がある。MycoAlert 法は 100 CFU/ml の *M. fermentans* を検出できなかったことから、細胞の品質管理試験に用いるには妥当ではないと考えられた。

一方、局方 Nested PCR 法、リアルタイム PCR 法、PCR-ELISA 法の 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。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、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。また、精製マイコプラズマ DNA を用いた検討により、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が、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 法が 10 倍から 100 倍感度が高いことが明らかになった。リアルタイム PCR 法は、PCR 増幅産物をオープンにすることなく測定可能で 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。しかし、今回用いたリアルタイム PCR 法は 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なく細胞の中で増殖するものもあるとされ、このようなマイコプラズマの検出には向かないおそれがある。リアルタイムPCR法を細胞基材の品質管理試験として用いるには、細胞基材や培養液からの抽出効率も含めて、使用者が厳密なバリデーションを実施して測定感度や測定法としての妥当性を明らかにすることが必要と考えられる。

#### D.4. HEV 標準パネルの樹立

HEV の NAT による測定の評価に用いる標準パネルの樹立に関する検討を行った。国内の HEV の遺伝子型は 3 型又は 4 型で、4 種類のクラスター (G3jp, G3us, G3sp, G4jp) に分類される。HEV パネル候補品は、国内 4 クラスターに属し、実験感染ブタ糞便から得た 4 株と培養細胞で増幅した 1 株の計 5 株をヒト血清で約  $10^5$  copies/ml に希釈し、0.5ml ずつ分注したものであり、均一性試験を実施して確認後、参加 6 施設でリアルタイムPCR定量を実施することにより各パネルの単位を設定した。今回は HEV 標準品が利用できなかったため、合成 RNA を用いてコピー数を設定したが、WHO の HEV 標準品が樹立されれば、今後、WHO の標準品を基に単位を換算できるようにすることが望ましい。今回樹立した HEV-NAT 試験用標準パネルは今後広く公開する予定であり、幅広い活用が期待される。

#### E. 結論

HBV の濃縮・高感度検出法として、PLL 結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を

開発し、低濃度キャリアの高感度ウイルススクリーニング法としての有用性を確認した。また、PVB19 の *in vitro* 持続感染系を確立した。マイコプラズマの迅速検査法のうち、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法は、PCR 法よりも検出感度がかなり劣ること、及び Nested PCR 法とリアルタイム PCR 法は十分な感度を持つ可能性を示した。さらに、HEV-NAT 評価用標準パネルを樹立した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 内田恵理子: “細胞基材のマイコプラズマ試験”、先端バイオ医薬品の評価技術、山口照英監修、シーエムシー出版、東京(2010)、pp151-167
- 2) 内田恵理子: “.バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験”、日本薬局方技術情報 2010 追補(JPTI2010)第 15 改正第一追補/第二追補対応、(財)日本公定書協会編、(株)じほう、東京(2010)、pp85-91
- 3) 内田恵理子、山口照英: 医薬品のウイルス安全性確保: 核酸増幅検査 (NAT) による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発、*YAKUGAKU ZASSHI*, 130 (2), 163-169 (2010)
- 4) Ken Nishimura, Masayuki Sano, Manami Ohtaka, Birei Furuta, Yoko Umemura, Yoshiro Nakajima, Yuzuru Ikehara, Toshihiro Kobayashi, Hiroaki Segawa, Satoko Takayasu, Hideyuki Sato, Kaori Motomura,

Eriko Uchida, Toshie Kanayasu Toyoda, Makoto Asashima, Hiromitsu Nakauchi, Teruhide Yamaguchi and Mahito Nakanishi: Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/ expression system ideal for cell reprogramming, *J. Biol. Chem*, 286, 4760–4771 (2011)

## 2. 学会発表

- 1) Nishimura K, Ohtaka M, Segawa H, Furuta B, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Nakanishi M: Characterization of Novel Defective Sendai Virus Vectors Capable of Persistent Expression of Therapeutic Genes. ASGT 11<sup>th</sup> annual meeting, Boston (2008.5)
- 2) 西村健, 大高真奈美, 瀬川宏知, 内田恵理子, 古田美玲, 豊田淑江, 山口照英, 中西真人: 細胞質持続発現型 RNA ベクターの性質検討と医療応用に向けた研究. 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会合同大会, (BMB2008)、京都 (2008.12)
- 3) 古田美玲, 内田恵理子, 押澤正, 山口照英: 造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質のプロテオーム解析. 第 8 回日本再生医療学会総会, 東京 (2009.3)
- 4) 内田 恵理子: 医薬品のウイルス安全性確保: NAT による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発. 日本薬学会第 129 年会シンポジウム, 京都 (2009.3)
- 5) 古田美玲, 内田恵理子, 押澤正, 山口照英: 造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質のプロテオーム解析による探索. 日本薬学会第 130 年会, 岡山 (2010.3)
- 6) 内田恵理子, 古田美玲, 鈴木和博, 佐藤功栄, 岩田明子, 山口照英: 抗体医薬品のウイルス安全性確保のためのウイルス除去カラムの開発. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 神戸 (2010.12)
- 7) 古田美玲, 内田恵理子, 押澤正, 山口照英: 造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質の機能解析. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京 (2011.3)
- 8) 内田恵理子, 岡田義昭, 水澤左衛子, 柚木幹広, 辻川宗男, 皆木隆男, 稲田耕一, 小西久郎, 五十嵐正志, 鈴木光, 嘉悦洋, 下瀬克郎, 萩原克郎, 安江博, 生田和良, 鈴木和博, 山口照英: E 型肝炎ウイルスの核酸増幅検査 (NAT) 評価用標準パネルの樹立. 日本薬学会第 131 年会, 静岡 (2011.3)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の濃縮

Sample no.	原液 (copies/ml)	10 倍濃縮液 (copies/ml)	濃縮効率*
1	1.6E+06	7.8E+06	0.49
2	4.2E+05	2.1E+06	0.50
3	9.0E+04	5.7E+05	0.63
4	2.2E+04	1.6E+05	0.73
5	4.6E+03	3.5E+04	0.76

\*濃縮効率= 10 倍濃縮液 (copies/ml)/ (原液(copies/ml) x 10)

Table 2 PLL 磁気ビーズによる HBV DNA 濃縮に及ぼす抗 HBs 抗体の影響

原液	10 倍濃縮液		
HBV DNA (copies/ml)	HBsAb (mIU)	HBV DNA (copies/ml)	濃縮効率
120	0	860	0.72
	1024	1400	1.17
	1792	1300	1.08

Table 3 PLL 磁気ビーズによる HBsAg の濃縮に及ぼす HCV 及びパルボウイルス B19 の影響

ウイルス希釈用血漿	AxSYM (s/n <sup>b</sup> )	
	種々の血漿を用いた HBsAg の希釈液	HBsAg 希釈液の 10 倍濃縮
正常血漿	1.39	3.80
HCV 陽性血漿	1.18	3.47
Parvovirus B19 陽性血漿	1.31	3.77

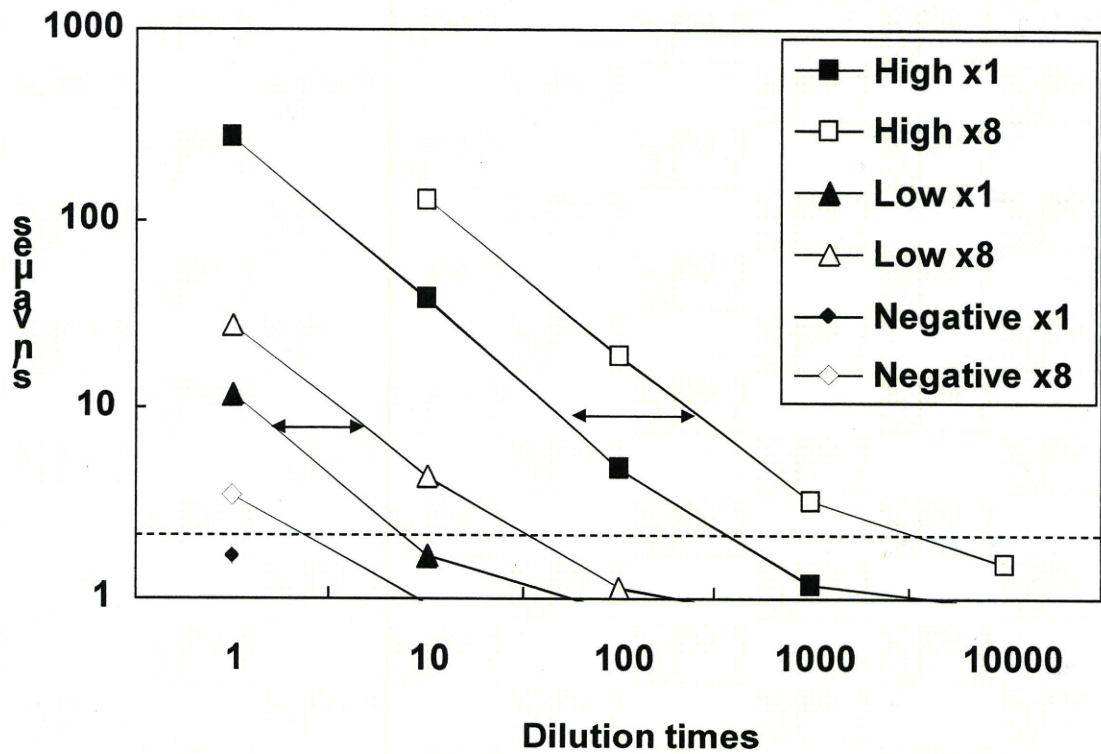


Fig.1 HBVsAg の PLL 磁気ビーズによる濃縮

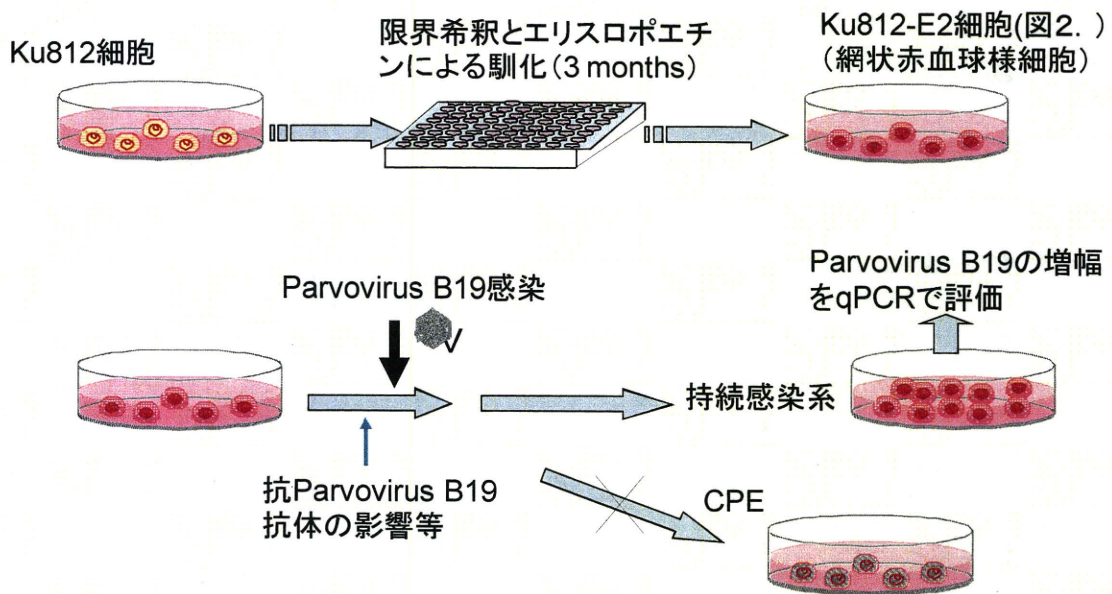
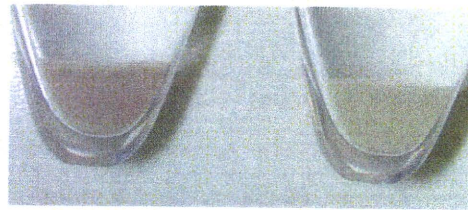


Fig.2 Parvovirus B19 インビトロ感染系の確立



**Ku812-E2 細胞      Ku812 細胞**

Ku812細胞とKu812-E2細胞、それぞれ $10^7$ 細胞を遠心して沈殿させた。Ku812-E2細胞は網状赤血球様にヘモグロビンを産生している。

Fig.3 Ku812 と Ku812-E2 細胞の比較

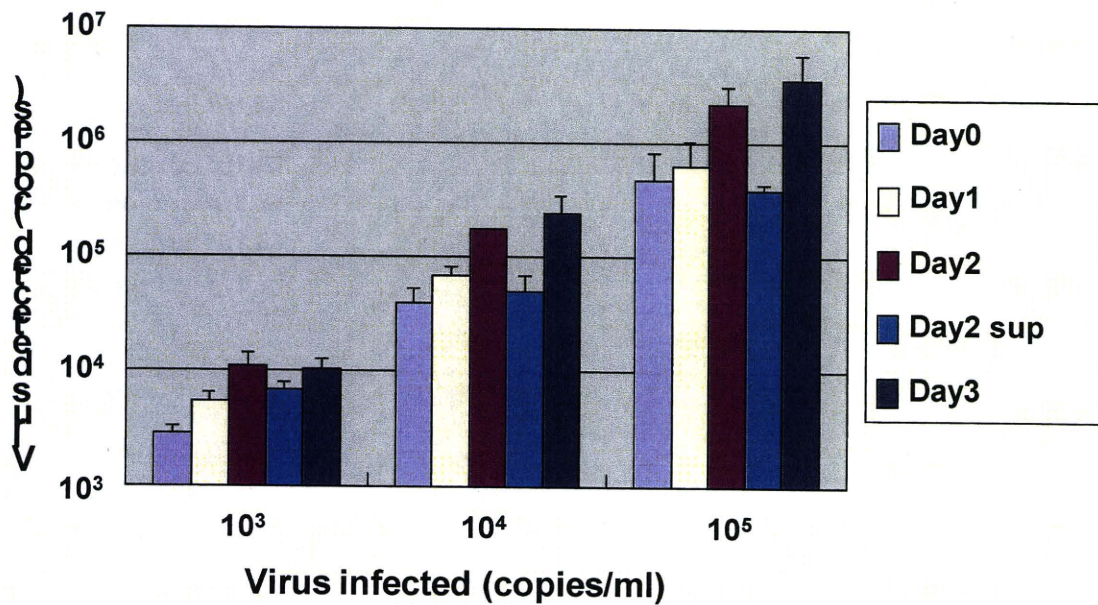


Fig.4 Ku812-E2 細胞への ParvovirusB19 の感染増幅



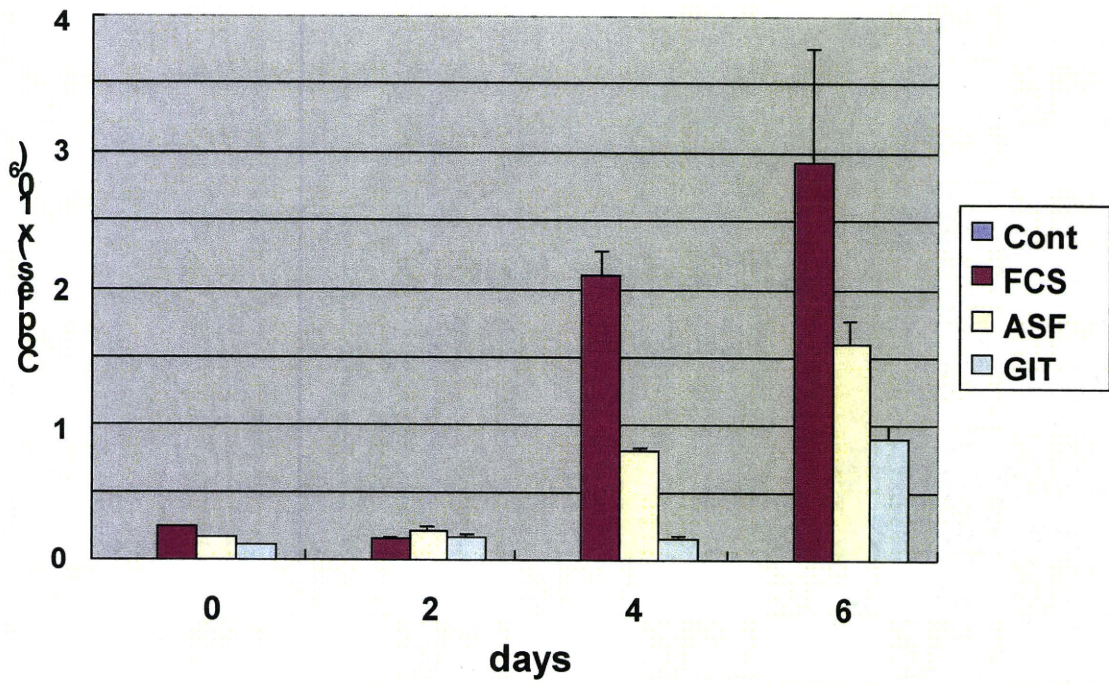


Fig.5 Ku812-E2 細胞での ParvovirusB19 の増幅に及ぼす培地の影響

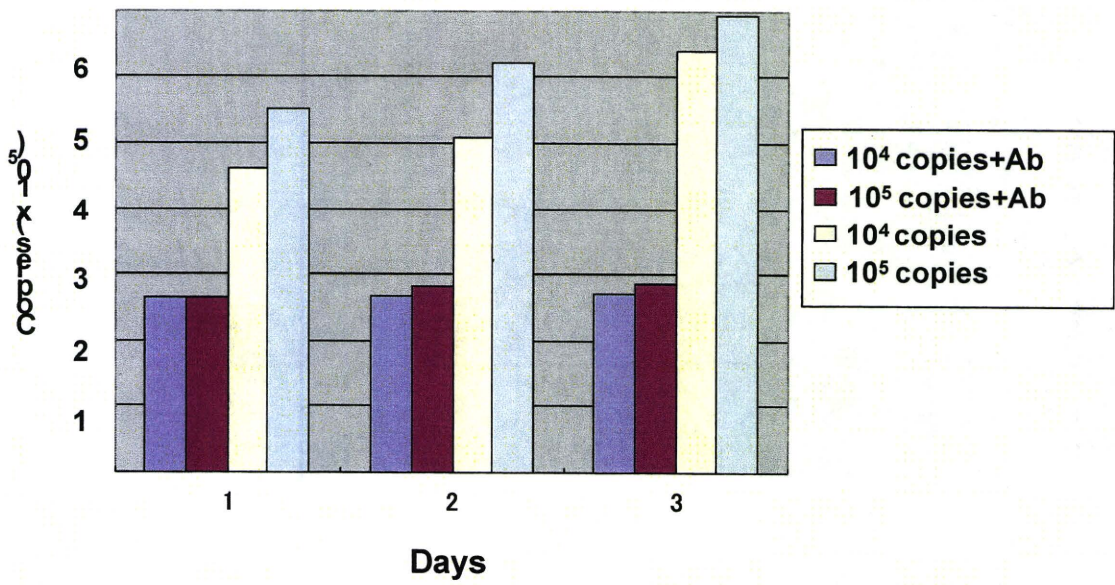


Fig.6 Ku812-E2 細胞での ParvovirusB19 の増幅と抗体の影響

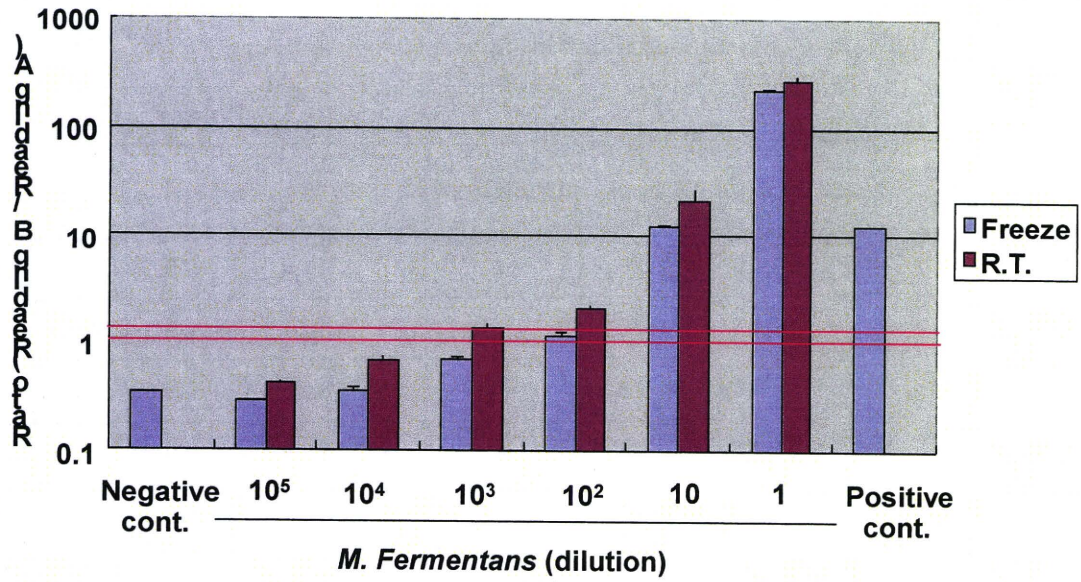


Fig.7 Mycoplasma detection by MycoAlert

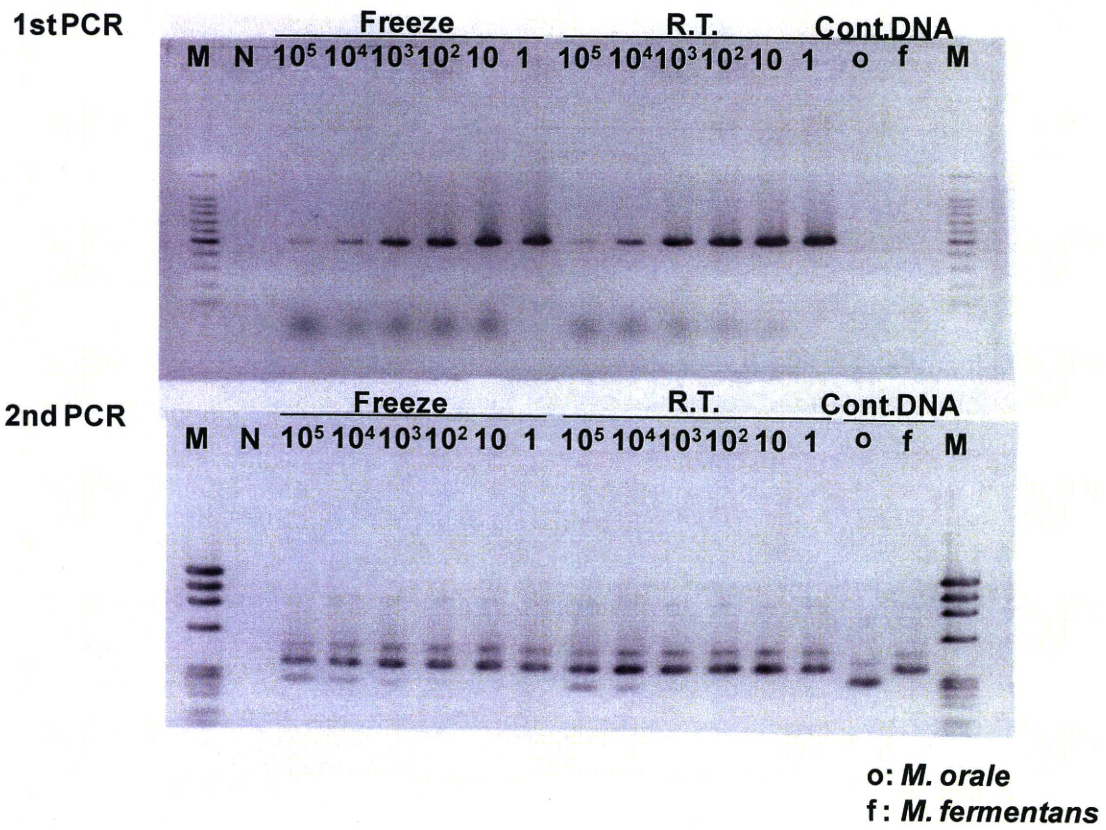


Fig.8 Mycoplasma detection by Nested PCR

Table 4 Mycoplasma detection results by real-time PCR

<i>M.fermentans</i> Dilution	R.T.			Freeze		
	Ct	Tm	Detection	Ct	Tm	Detection
1	14.45	79.1	+	11.4	79.1	+
10	18.25	79.1	+	15.57	79.1	+
10 <sup>2</sup>	19.49	79.1	+	18.63	79.1	+
10 <sup>3</sup>	22.27	79.1	+	22.1	79.1	+
10 <sup>4</sup>	24.77	79.1	+	26.37	79.1	+
10 <sup>5</sup>	28.8	79.1	+	27.95	79.1	+
Positive cont.	29.44	79.7	+			
Negative cont	37	73.5	-			

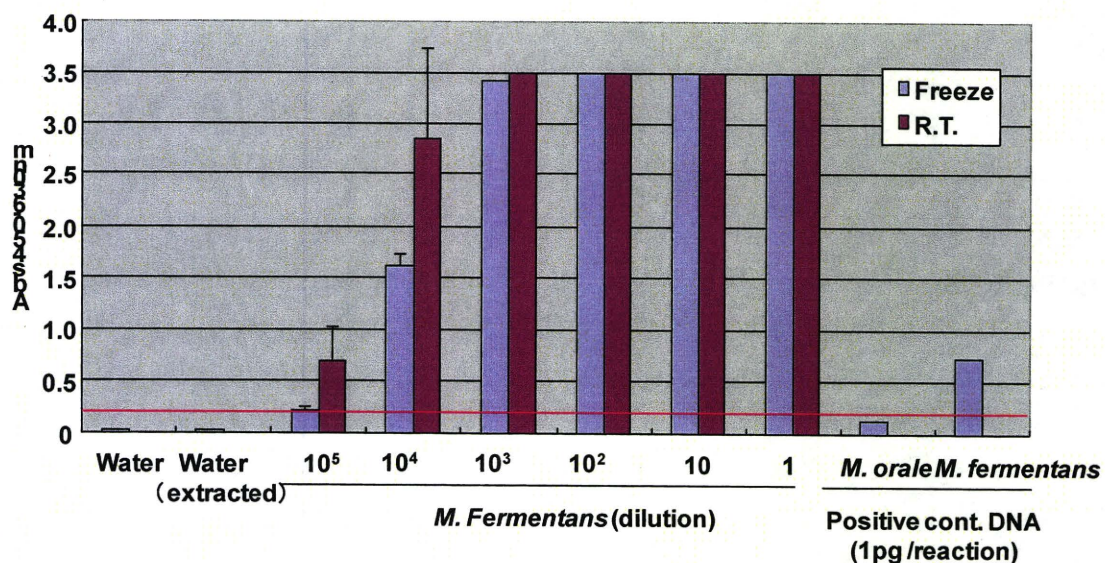


Fig. 9 Mycoplasma detection by PCR ELISA method

Table 5 Comparison of Mycoplasma detection methods

		<i>M.fermentans</i> dilution					
		1 (4.5 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)	10 (4.5 x 10 <sup>5</sup> CFU/ml)	100 (4.5 x 10 <sup>4</sup> CFU/ml)	1000 (4.5 x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	10000 (450 CFU/ml)	100000 (45 CFU/ml)
MycAlert	Freeze	+	+	+/-	-	-	-
	R.T.	+	+	+	+	-	-
PCR (1st PCR)	Freeze	+	+	+	+	+	+
	R.T.	+	+	+	+	+	+
Nested PCR (2nd PCR)	Freeze	+	+	+	+	+	+
	R.T.	+	+	+	+	+	+
Real-time PCR	Freeze	+	+	+	+	+	+
	R.T.	+	+	+	+	+	+
PCR-ELISA	Freeze	+	+	+	+	+	+/-
	R.T.	+	+	+	+	+	+

Table 6 Comparison of detection of Mycoplasma DNA by PCR methods

Mycoplasma DNA / PCR reaction	Real-time PCR		PCR-ELISA	
	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. orale</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. orale</i>
100pg	3/3	3/3	n.d.	5/5
10 pg	3/3	3/3	5/5	5/5
1 pg	3/3	3/3	5/5	0/5
100 fg	3/3	3/3	1/5	0/5
10 fg	1/3	1/3	0/5	0/5
1 fg	0/3	0/3	n.d.	n.d.
0.1fg	0/3	0/3	n.d.	n.d.

n.d.: not determined