

**厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書**

細胞製剤の品質・安全保証に関する研究

分担研究者

清水 則夫 東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学 准教授

研究要旨

本学で開発したマイコプラズマ検査系の実用化とウイルス検査系の自動化に関する取り組みを行った。マイコプラズマ検査系(遺伝子配列から 142 種類のマイコプラズマ属を検出可能と推測される：TMDU 法)は日本・欧州・米国の 3 極薬局方記載の 9 種類を含む 17 種類のマイコプラズマを 5 cfu/ reaction の感度で検出可能なことが示された。また、現在汎用されているリアルタイム PCR 法を応用したマイコプラズマ検出キット (Mycoseq: Lifetechnologies) との比較試験を行った結果、TMDU 法は結果の解釈がより簡便であり、感度・直線性・特異性などは同等であるため、実用化すべき十分な性能を持つことが示された。また、QIAGEN 社の QIA Symphony を使用したウイルス・マイコプラズマの自動検査の構築を目指し研究開発を進め、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることを、模擬サンプルを使用した実験により確認した。

A. 研究目的

再生医療に使用する細胞製剤は、生体材料から得た組織・細胞を培養することにより調製し、生きた状態で投与されるため、原材料あるいは最終製品を滅菌処理することにより安全性を確保することは事実上不可能である。したがって、再生医療を実用化するためには、微生物汚染の問題を克服し、安全な治療用細胞製剤を供給する体制を整えることが極めて重要である。生体には細菌・真菌・ウイ

ルスなど多くの微生物が持続感染しているため、培養工程中の外来微生物の混入の防止を徹底するだけでは微生物汚染の問題を回避するには不十分であり、患者に投与する最終製品を全数検査して治療の安全性を担保することが必要と考えている。本分担研究では、1. ヒトに持続感染することが知られているウイルスを主とした検査対象ウイルスのリストアップ 2. それらを網羅的に検出可能な検出系の作成 3. 関節関連組織及び滑

膜由来間葉幹細胞の微生物検査データの蓄積、4. 検査系の自動化 5. 滑膜由来間葉幹細胞を使用した軟骨再生医の微生物安全検査法の確立を目的に研究を行っている。本年度は、これまでに開発したマイコプラズマ検査系(遺伝子配列から142種類のマイコプラズマ属を検出可能と推測される:TMDU法)のバリデーション試験(今回は感度検定試験)と、現在汎用されているリアルタイムPCR法を応用したマイコプラズマ検出キット(MycoSEQ:Lifetechnologies)との比較試験、およびキアゲン社のQIASymphonyを用いたウイルス・検査系の自動化を目指した研究開発を実施した。

B. 研究方法

1. TMDU法によるマイコプラズマの検出

核酸の抽出は、使用したQIAGEN社のキットの説明書に従って実施した。マイコプラズマの検出は、本学で開発した142種類のマイコプラズマ属が検出可能なマルチプレックスPCR検査系により、マイコプラズマ属の16Sリボソーム・23Sリボソームおよびそれらのスペーサー領域に設定したプライマー・プローブ(合計15種類)を使用し、マイコプラズマゲノムの当該領域を増幅した。

・核酸抽出: QIAampMinElute virus spin kit (QIAGEN: 以下QIAGEN法と記載)

・PCR装置: LightCycler480 (ロッシュ)
・PCR反応: 95 10分処理の後、95 15秒, 60 60秒の反応を45サイクル
・PCR試薬: 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: 通常の合成DNAを使用
・プローブ: Taqman Probeを使用
・バリデーションに使用したマイコプラズマ(17種類) Mycoplasma arginine, Mycoplasma buccale, Mycoplasma faucium, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Mycoplasma hyorhinis, Mycoplasma lipophilum, Mycoplasma orale, Mycoplasma pneumonia, Mycoplasma primatum, Mycoplasma salivarium, Mycoplasma synoviae, Ureaplasma urealyticum, Acholeplasma laidlawii, Spiroplasma citri

2. MycoSEQによるマイコプラズマの検出

マイコプラズマ検出キットとして発売されているMycoSEQ (Lifetechnologies) は以下の2つのコンポーネントからなる。

・MycoSEQ Mycoplasma Detection Kit (PCR assay用)
・PrepSEQ Nucleic Acid Extraction Kit (核酸抽出用)

核酸抽出および検出操作はMycoSEQの説明書に従って行った。

3 . 添加回収試験の実施方法

添加回収試験の実施に当たってはマイコプラズマ試験法開発の標準細胞として採用されている CHO 細胞 DG44 株と添加する指標マイコプラズマとして *Mycoplasma orale* (E3329121020)を使用した。

4 . QIASymphony を使用した検査の自動化

使用キット : QIASymphony DSP DNA Minikit192 Version1

qPCR: LightCycler480 (ロッシュ)

・検査対象ウイルス種

HSV1, HSV2, CMV, VZV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, BKV, JCV, HBV, ParvoB19(PVB19), ADV の 13 種類

・PCR 反応 : 95 10 分処理の後、95 15 秒, 60 60 秒の反応を 45 サイクル。

・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・プローブ : 固相化 DNA ウイルス検出ストリップ (日本テクノサービス) を使用

(倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じるような研究は実施しなかった。

C . 研究結果

1 . マイコプラズマ検出の感度検定

方法に記した 17 種類のマイコプラズマ属

の菌種について、5 ~1000 cfu/reaction の範囲で検出感度の検定を行った。その結果、n=3 の実験で、17 種類すべての菌種をいずれの濃度でもれなく検出することが可能だった。したがって、TMDU 法は最低 5 cfu/reaction の検出感度を持つことが示された。

2 . キットとの核酸抽出結果の比較

prepSEQ と QIAGEN 法の 2 種類のマイコプラズマ検出法に関し、標準プロトコルによる核酸抽出効率を比較した。なお、抽出に要した時間・最大細胞数は、Mycoseq:3 時間、 1.0×10^6 細胞、QIAGEN 法 1 時間、 5.0×10^6 細胞だった。 1.0×10^6 cells CHO 細胞 DG44 株 1.0×10^6 細胞に *Mycoplasma orale* 100 cfu を添加し、DNA を抽出したところ、DNA の回収量は prepSEQ では 20 μ g、QIAGEN 法では 12 μ g であり、prepSEQ の方が高い回収率を示した。

3 . MycoSEQ による添加回収試験

QIAGEN 法および prepSEQ によりマイコプラズマ添加 CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、Mycoseq Mycoplasma Detection Kit によりマイコプラズマの検出を行った。その結果、QIAGEN 法で抽出した場合には Cp 値 31.25 で、prepSEQ を使用した場合には Cp 値 31.64 でシグナルの上昇が見られた。シグナル強度は QIAGEN 法で抽出した核酸を使用した方が

3倍以上高く、良好に検出された。

4. TMDU 法による添加回収試験

QIAGEN 法および prepSEQ により指標となるマイコプラズマ (*Mycoplasma orale*) を添加した CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、TMDU 法によりマイコプラズマの検出を行った。その結果、QIAGEN 法で抽出した場合には Cp 値 35.63 で、prepSEQ を使用した場合には Cp 値 34.98 でシグナルの上昇が見られた。シグナル強度は抽出法による差はほとんど観察されなかった。

5. MycoSEQ の擬陽性反応に関する検証

MycoSEQ は SYBR Green のダイシグナル法であるため、Cp 値 36 付近で陰性コントロールからでもシグナルが検出されることがあり、PCR 反応後にメルティング解析 (T_m 値の測定) を行ったうえで陽性が陰性かの判定を行うことになっている。この現象は我々の実験においても図 1 のようなシグナルが観察されている。

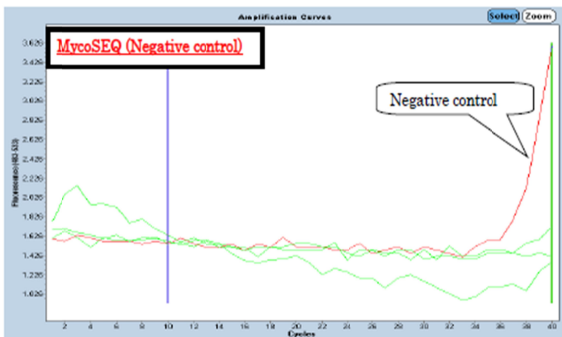


図 1 : MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に陰性コントロールで出現するシグナル

このような擬陽性反応がでるため、MycoSEQ によりマイコプラズマを検出する際には T_m 値解析により真の陽性シグナルか否かを検証することが推奨されている。図 2 に T_m 値解析の結果を示す。

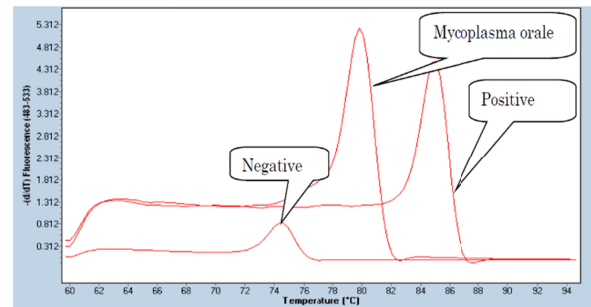


図 2 : MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に出現したシグナルの T_m 値解析結果

この結果のように陽性・陰性結果および陽性コントロールから得られた結果が明確に区別できる場合は良いが、図 3 のようにマイコプラズマ陰性が確認されているサンプルの T_m 値が中間段階になり判定に迷う場合が少なくない。

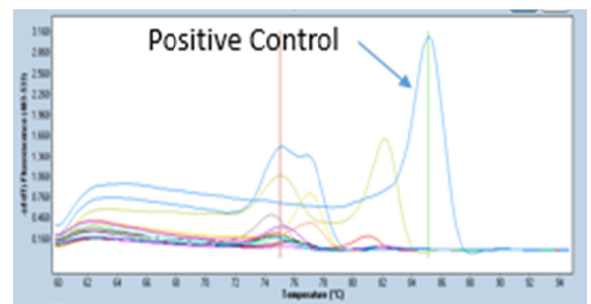


図 3 : MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に陰性サンプルで見られた中間的 T_m 値を示すシグナルの例

6. ウイルス検査系の自動化

ウイルス検査系の自動化を目指し、固

相化ストリップと QIASymphony を使用し、被験ウイルス陰性が確認されている細胞の DNA 0.5 µg に各ウイルスのスタンダードを 10~10000 コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作製し実験を行った。

その結果、検討した 13 種類のウイルスをすべて 10 copies/reaction の検出感度で自動測定が可能なこと、10~10000 コピーまで検量線は直線的で十分に定量的データを得ることが可能であることが示された。

D. 考察

1. TMDU 法によるマイコプラズマ検出の感度検定

TMDU 法によるマイコプラズマ検出においては、遺伝子配列からは 142 種類のマイコプラズマを特異的に検出できることが示されている。この性能を実証するため 17 種類のマイコプラズマ属 (Acholeplasma, Spiroplasma, Ureaplasma を含む) の菌株を使用し、検出可能なことが実証され、またいずれの菌種についても 5 cfu/reaction の感度で検出可能なことが示された。日本・欧州・米国薬局方に記載されているマイコプラズマ属の菌種は合計 9 種類であるが、すべて今回使用した 17 種類の中に含まれるため、TMDU 法は 3 極薬局方の検出要件を満たし

ていると考えられる。

2. マイコプラズマ検出における MycoSEQ と TMDU 法の比較

一般に汎用されているリアルタイム PCR を応用したマイコプラズマ検査キット MycoSEQ と我々が開発した TMDU 法との比較試験を行ったところ、抽出時間が TMDU 法の方が 2 時間早く抽出でき、最終産物を検査する場合には非常に有利であると考えられる。また、MycoSEQ を使用した添加回収試験において、QIAGEN 法で回収した DNA を使用した場合の方が prepSEQ で回収した DNA を使用した場合に比べ、Cp 値は変わらないもののシグナルが 3 倍以上高かったのは、prepSEQ で抽出した DNA 量が QIAGEN 法で抽出した DNA 量よりも多いことが影響している可能性が考えられた。しかし、TMDU 法でマイコプラズマの検出を行った際にはシグナルの高さはほとんど変わらず、TMDU 法の方がサンプルの量の変動に対する許容性が高いためと考えられる。本研究でも確認されたように、MycoSEQ では、陰性サンプルを測定した場合でも 36cycle 以降にシグナルの立ち上がりが見られることがあり、しかも Tm 値解析でもそのシグナルが陽性を示すのか陰性を示すのかを確定できないことが経験される。MycoSEQ では検出に SYBR Green を使用しているためそのような問題を回避することは容易ではないが、その点我々の開発した TMDU 法では検出に蛍光プローブをしているため、MycoSEQ で

観察されるようなシグナルの立ち上がりは全くなく、結果の判定がより正しく行えると考えている。一方、これまでに得られている結果では、MycoSEQ と TMDU 法の間では検出感度・直線性・特異性においてほぼ同様な性能であるとの結果が蓄積されている。どちらの方法も 3 極薬局方の 9 種類のマイコプラズマ種をもれなく検出できることも確認されており、現時点では TMDU 法は実用化するために十分な性能を持つと判断している。今後は、我が国の公的機関からリリースされる予定のマイコプラズマの標準品を使ったバリデーションを行い、実用化するに足る十分な性能を持つことをデータにより明確に示していくことが重要である。

3. ウイルス検査系の自動化

QIAGEN 社と共同研究契約を締結し、QIAsymphony を使用したウイルス・マイコプラズマの自動検査の構築を目指し研究開発を進めている。本研究により、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることが模擬サンプルを使用して確認された。今後は、RNA ウイルスとマイコプラズマ測定可否、プログラムの最適化を進める必要がある。さらに、実用化を目指し実際のサンプルの測定によるデータ取得を進める予定である。

E. 結論

これまでに開発したマイコプラズマ検査系(遺伝子配列から 142 種類のマイコプラズマ属を検出可能と推測される：TMDU 法)は日本・欧州・米国の 3 極薬局方記載の 9 種類を含む 17 種類のマイコプラズマを 5 cfu/reaction の感度で検出可能なことが示された。また、現在汎用されているリアルタイム PCR 法を応用したマイコプラズマ検出キット (MycoSEQ: Lifetechnologies) との比較試験を行った結果、我々の開発した TMDU 法は結果の解釈がより簡便であり、感度・直線性・特異性などは同等であるため、実用化すべき十分な性能を持つことが示された。また、QIAGEN 社の QIAsymphony を使用したウイルス・マイコプラズマの自動検査の構築を目指し研究開発を進め、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることが模擬サンプルを使用した実験により確認した。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G . 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, **Shimizu N**, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.:

Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. Journal of the Neurological Sciences 324, 190–194(2013)

Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, **Shimizu N**, Huang G, Yu Q, Chng WJ.:

EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. Blood 121: 4512-4520(2013)

Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, **Shimizu N**.: Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. Respiration, [Epub ahead of print] (2013)

Ito K, **Shimizu N**, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T.:. Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. Internal Medicine. 52(2):201-11 (2013)

北條浩彦、**清水則夫** :

基本編 - 原理と基本知識 -

リアルタイム PCR を使った解析の基本
10 プライマー/プローブの設計手順 マルチプレックスの場合
原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ : p72-74 2013 発行

清水則夫、渡邊 健、外丸靖浩 :

実践編 - プロトコールを中心に -
章 遺伝子量解析

15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査
原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ : p192-202

2. 学会発表

今留謙一、松田剛、川野布由子、千葉佑規乃、新井文子、中澤温子、伊藤守、

清水則夫、藤原成悦 :

難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究
2013.11 日本ウイルス学会 神戸

清水則夫 :

再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発
2013.9 第 14 回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 東京

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3.その他
該当無し