

**厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）**  
**分担研究報告書**

**細胞資源におけるウイルス検出法開発に関する研究**

**分担研究者：清水 則夫 東京医科歯科大学 准教授**

**研究要旨**

医薬品開発や再生医療研究を効率良く実施するためにはヒト培養細胞研究資源の有効活用が必要であり、培養細胞資源の品質が研究の質に直結するため、その品質管理の徹底が極めて重要である。特に研究用培養細胞資源への微生物汚染は不正確な実験結果を生む主要な原因であり、その対策として微生物汚染の有無を簡便・安価にチェックできる検査系の確立が求められる。本研究では、これまでに開発した網羅的ウイルス検査系を簡便に実施することを目指し、検査に使用する試薬を酵素も含めすべて乾燥・固化することにより作業者に起因する問題の低減と、随時検査を実施できる体制を構築することを目的に研究を行った。その結果、PCR 検査系において、性能を劣化させずに使用するすべての試薬を乾燥・固化する手法の開発に成功した。現在、性能を維持したまま安定に保存できる期間の検討と RT-PCR 検査系への応用を目指した研究を続けている。

**A. : 研究目的**

体性幹細胞や iPS 細胞を用いた再生医療研究・医薬品開発が加速されていることに伴い、ヒト培養細胞研究資源の重要性が著しく増しており、実際、再生医療の研究に用いる多分化能を持ったヒト由来培養細胞のバンクへの寄託は増加傾向にある。今後、再生医療研究の質を高めるためには、ヒト培養細胞研究資源の品質管理法を確立し、研究に使用する培養細胞の品質管理を徹底することが極めて重要である。実際、培養細胞に微生物が持続感染すると、細胞の性質・増殖性、遺伝子発現パターン、動物に接種した際の細胞の挙動や動物の反応などに大きく影響する可能性があるため、細菌・真菌・マイコプラズマ・ウイルスの汚染状況に関

する情報は非常に重要である。さらに、近年、外国に細胞を出荷する際には、ウイルス・マイコプラズマ汚染状況に関する情報の添付を求められる事が多く、今後その必要性が増していくと予想される。

培養細胞に持続的に感染し、検出が難しい微生物として、特にウイルスとマイコプラズマが重要である。我々はこれまでに、マルチプレックス PCR 法を応用した網羅的ウイルス検査法を作成し、培養細胞資源のウイルス検査に応用し成果をあげてきた。本研究では、ウイルスの網羅的検査を簡便・迅速に実施するための研究開発を目的に研究を行い、具体的には使用する検査試薬をすべて乾燥・固化することにより、

必要なときに随時検査できる体制を構築することための研究開発を実施した。そのようなあらかじめセットアップした Ready-to-Use の試薬（以下 RU 試薬と記載）が実用化すれば、随時ウイルス検査を実施できるとともに、作業者による試薬の取り違い・試薬の入れ忘れ・ペーティングミスによる試薬添加量の不安定性などの検査データが変動する可能性を低減し、安定した検査結果を得ることが可能になるとともに検査の自動化が非常に容易になる。なお、予備的な検討では、DNA ウイルスの検出を行う PCR 検査系と RNA ウイルスの検出を行う RT-PCR 検査系では試薬の作成法を変える等の調整が必要なことが示唆されたため、今回は DNA ウイルス検査を RU 試薬を用いて実施するための研究開発を行った。

## B： 研究方法

### 1．検査対象ウイルス

以下の DNA ウイルスを検査対象とした。

HSV1, 2, VZV, EBV, CMV, HHV6, 7, 8, BKV, JCV, ADV, EBV, PVB19

### 2．増幅領域とプライマー・プローブ配列

GAPDH

F-tgtgctcccactcctgatttc

R-cctagtcccagggtttgatt

6FAM-aaaagagctaggaaggacaggcaacttggc-iowaB1  
ack

HSV1/2

HSVF-cgcatcaagaccacctctc

HSVR2-GTCAGCTCGTGRTTCTG

HSV1-Cy5-tggcaacgcggccaac-iowaBK

HSV2-6FAM-cggcgatgcgccccag-iowaBK

VZV

VZVF-tcactaccagtcatttctatccatctg

VZVR-gaaaacccaaaccttctcgag

HEX-tgtctttcacggaggcaaacacgt-iowaBK

CMV

CMV4F-tcgcgcccgaagagg

CMV4R-cggccggattgtggatt

Cy5-caccgacgaggattccgacaacg-iowaBK

EBV (BMRF1 gene)

EBVF-ctgggcaaggagctgtttg

EBVR-ggccgcttgtaaaattgca

6FAM-ctcggctgtggagcaggctt-iowaBK

HHV6

HHV62F-gaagcagcaatcgcaacaca

HHV62R-acaacatgtaactcgtgtacggt

Cy5-aacctgtgcgcccgtccc-iowaBK

HHV7

HHV7F-cggaagtactggagtaatgacaa

HHV7R-ccaatccttccgaaacctg

HEX-ctcgcagattgcttggccatg-iowaBK

HHV8

HHV82F-cctgtcctctgtgccccat

HHV82R-atcgttgccatttcttttggcc

HEX-ccggcgtcagacattctcacaacc-iowaBK

ADV

ADVF-gacatgacttttgaggtgga

ADVR-tc gatgacgccgctggtg

6FAM-cccattggagagcccaccct-BHQ

PVB19

B19F-gggtttcaagcacaagYagtaaaaga

B19R-cggYaaactccttgaaaatg

6FAM-cagctgccctgtgg-MGB

BKV, JCV

F-ggaaagtcttttaggtcttctacctt

BKVR-gatgaagatttatttgccatgarg

JCVR-gaagacctgtttgcccataaga

6FAM-atcactggcaaacat-MGB

HBV

F- gtggtggacttctctcaatttctag

R- ggacaMacgggcaacataacct

6FAM- tgtctgcggcgctttt –MGB

### 3 . RU 試薬の作成

Primer.probe mix	2.7µl
Trehalose	3.0µl
X10 Buffer	1.7µl
100mM dNTP	0.17µl
Taq (1.5U)	0.6µl
Water	0.83µl

( primer.probe mix は、下記の各 well の検査項目に対応した primer と probe の混合物 ) 上記の試薬(合計 20µl)を 8 well strip の各 well に添加し、減圧遠心法により乾燥・固化した。8 well strip の各 well の検査対象項目は以下の通り。

1 . GAPDH, 2. HSV1, HSV2, HHV7, 3. BKV, JCV, 4. EBV, VZV, 5. HHV6, PVB19, HHV8, 6. ADV, 7. CMV, HBV, 8. 予備

RU 試薬の保存安定性におよぼす Trehalose の影響を調べる目的で、Trehalose を上記の分量で添加した RU 試薬 Strip と Trehalose の代わりに水を 3.0µl 添加した RU 試薬 Strip の 2 種類を作成した。

作成した RU 試薬 Strip は、暗所・室温で保存した。

### 4 . 検査実施

各検査項目に対するスタンダード、あるいは検査対象ウイルス陰性が確認されている試験細胞株の DNA300ng に各検査項目に対するスタンダードを添加した試験検体を RU 試薬 ( 8 well strip ) の各 well に添加した。ピペティングを 10 回行って RU 試薬を完全に溶かし、シールを貼った後リアルタイム PCR 機( CFX96 : Bio-rad )にセットし、PCR 反応・結果解析を行った。

### 5 . PCR 反応条件

Denature	95	10 sec
PCR	95	5 sec
	60	30 sec
	(45 cycle)	

( 倫理面への配慮 )

倫理面の配慮が必要な研究は行なわなかった。

### C : 結果

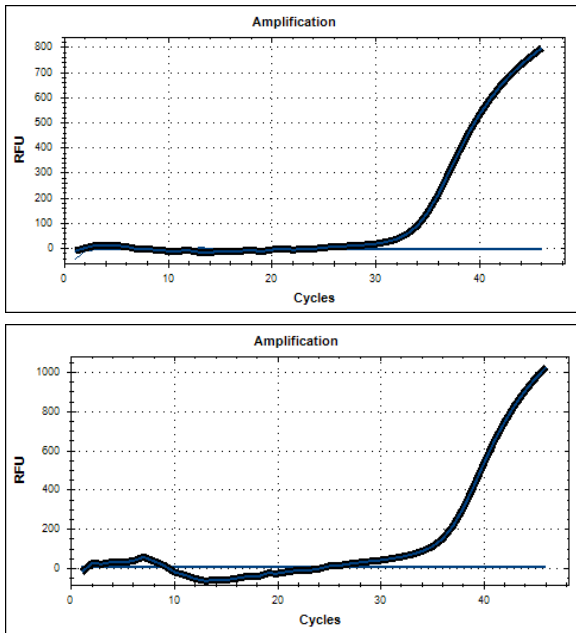
#### 1 . 安定化剤の性能評価

今回使用したウイルス検査系はこれまでの実験により 10 copies/reaction の感度を持つことが確認されている。RU 試薬を作成する際に安定化剤として Trehalose を加えた場合と加えなかった場合の保存安定性を作成後 1 ヶ月の段階で比べた。RU 試薬は暗所・室温で保存した。サンプルには検査項目の合成スタンダード ( 50 copies/reaction ) を使用し各 well に添加したところ、Trehalose を加えなかった場合はすべての検査項目に関し陽性シグナルが検出されなかったが、Trehalose を加えた場合にはすべての検査項目から陽性シグナルが検出され、核酸増幅酵素を含めた試薬の保存に対する Trehalose 添加の効果が確認された。

#### 2 . RU 試薬の保存期間の検討

1 の実験で Trehalose の効果が確認されたため、Trehalose を添加した検査 Strip の保存期間と性能の劣化を検討する目的で実験を行った。実験は RU 試薬を作成後暗所・室温で保存し、1 ヶ月毎に合成スタンダード ( 50 copies/reaction ) を含む試験サンプルを用いた検出操作を行う方法で実施した。その結果、6 ヶ月目の時点で問題なく増幅することが確認され、少なくとも 3 ヶ月間の保存は問題ないこ

とが確認された（下図を参照）。



図の説明：RU 試薬を作成した直後に検出操作を行った場合（上）と作成 6 ヶ月後に検出操作を行った場合（下）の比較検討結果（代表例として GAPDH スタンドの検出を例示）。

### 3 . 保存後の検出感度の検討

2 の実験から 6 ヶ月間 RU 試薬を保存しても安定であるとの結果が得られたため、各検査項目の検出感度の測定を行った。その結果、EBV を除く他の検査項目はすべて 10 copies / reaction の感度で検出できること可能だった。EBV に関しては 10 copies のスタンダードが検出される場合と検出されない場合があった。

### D: 考 察

1 .RU 検査試薬の作成には Trehalose の使用が有効であり、作成した RU 試薬は暗所・室温で保存することが可能であり、検査が必要な際に随時実施することができるとともに、作業者に起因するミスを大幅に低減できるため、検査結果の信頼性が非常に増すと考えられる。

2 .今回 GAPDH と 13 種ウイルスの合計 14

項目の RU 試薬を作成し、6 ヶ月保存後の検出感度を検討したところ、EBV 以外の検査項目に関しては感度低下が認められなかった。EBV に関しては検査結果が不安定だったが、EBV の検査系は用時調製試薬を用いた際にも検出感度付近での安定性に欠ける場合もあるため、今回の実験で示された不安定性が試薬の長期保存に起因するかどうかは今後の検討課題である。

3 .まだ予備的な検討段階だが、RNA ウイルスの検出に使用する RT-PCR 関連試薬をすべて乾燥・固化して長期保存することには成功していない。その理由は明らかではないが、RT 反応に使用する酵素（Reverse Transcriptase）の保存安定性に問題がある可能性がある。解決法として添加する酵素量やトレハロースの増量が有効である可能性を示す予備的検討結果も得られているため、今後 RU 試薬の作成条件を検討してこれらの問題を解決していきたい。この取り組みは、上記の EBV 検出の不安定性解消にもつながる可能性もあると考えている。

### E: 結 論

研究の質を担保するためには、使用する培養細胞資源の品質管理の徹底が極めて重要である。研究用培養細胞資源への微生物汚染は不正確な実験結果を生む主要な原因であり、その対策として微生物汚染の有無を簡便・安価にチェックできる検査系の確立が求められる。本研究では、これまでに開発した網羅的ウイルス検査系を簡便に実施することを目指し、検査に使用する試薬を酵素も含めすべて乾燥・固化することにより、検査の簡便化と作業者に起因する問題の低減することを目的に研究を行った。その結果、性能を劣化させずに PCR 反応に使用するすべての試薬を乾燥・固化する手法の開発に成功した。現在、保存期間の検討と RT-PCR 検

査への応用に関する研究を続けている。

## F: 健康危険情報

事例無し

## G: 研究発表

### 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)

### 著書

1. 北條浩彦、清水則夫(分担執筆) . 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 . 北條浩彦編 「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」p72-74 羊土社 , 2013
2. 清水則夫、渡邊健、外丸靖浩(分担執筆) . 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 . 北條浩彦編 「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」 p192-202 羊土社 , 2013

### 国内学会発表

- 1 . 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 日本ウイルス学会 11 月神戸
- 2 . 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 第 14 回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 9 月 (東京)

## H: 知的財産権の出願・登録状況

なし