

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

iPS 細胞を含め、細胞を活用した医薬品開発や再生医療実用化にはヒト培養細胞研究資源の品質管理の徹底が極めて重要である。治療用細胞製剤の安全性確保の必要性は論を待たないが、研究用培養細胞資源への微生物汚染により間違った実験結果が導かれた事例も多数報告されている。したがって、研究用培養細胞資源の微生物汚染検査は緊急かつ重要な課題であり、その現実には微生物汚染の有無を簡便・安価にチェックできる検査系を確立する必要がある。我々は、網羅的ウイルス検査系を開発し、培養細胞資源の検査に応用する研究として、検査項目をマイコプラズマ・細菌・真菌に拡大する取組を進めてきた。今回、開発したマイコプラズマ検査とウイルス検査を同時に行うための技術開発を行った。その結果、使用する酵素・反応条件・反応時間などを選択・調整することにより2つの検査を同時に実施することが可能になり、検査の利便性が向上した。

A： 研究目的

従来の主に腫瘍組織から樹立した培養細胞株を使用した研究に加え、体性幹細胞や iPS 細胞を用いた再生医療研究・医薬品開発が導入され一般化されつつある。したがって、これらの培養細胞研究資源の重要性に対する認識は従来に増して顕著となっている。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し続けており、今後それらの細胞を使用した研究の進展が期待されている。そのような研究の質を確保するためには、培養細胞研究資源の品質管理法を確立し培養細胞研究資源の品質管理を徹底することが求められる。培養細胞が微生物に汚染され、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が大きく影響されたとの事例は多数報告されている。したがって、細菌・真菌・マイコプラズマ・ウイルスなどの微生物に汚染されていない培養細胞資源を確保・維持することは極めて重要である。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ため、国際的ハーモナイゼーションの観点からも細胞の微生物検査法の確立とその実施は避けては通れない課題である。多くの場合、培養系に細菌や真菌が混入すれば顕微鏡観察や細胞の状態変化により異変が察知されるため検出は容易であるが、ウイルスやマイコプラズマに

よる汚染は培養液が濁らず細胞の状態も大きく変化しないことも多いため、定期的に検査できるような簡便・迅速な検査法の確立が求められる。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やマイコプラズマ検出法を作成し、培養細胞資源のウイルス・マイコプラズマ検査に応用し成果をあげてきた。本研究では、ウイルス・マイコプラズマの迅速検査の開発にフォーカスをあて、ウイルスおよびマイコプラズマを同時に検査することを目標に研究開発を実施した。具体的にはリアルタイムPCR機の96wellフォーマットに適合した8wellストリップに、反応に使用する試薬をすべて乾燥・固化し、必要なときに随時ウイルスとマイコプラズマの同時検査が可能になるような検査試薬の開発を目指して研究開発を実施した。そのような必要試薬をすべてセットアップした検査ストリップが使用可能になれば、培養細胞研究資源および再生医療に使用する細胞製剤の検査の手間が非常に少なくなり手軽に検査できるようになるとともに、作業者による試薬の取り違い・試薬の入れ忘れ・ペッチ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だろう。さらに、検査の自動化が非常に容易になると考えられる。

B: 研究方法

1. 検査対象微生物

今回検査対象に選んだ微生物は以下の通り。
マイコプラズマ、HSV1, 2, VZV, EBV, CMV, HHV6, 7, 8, BKV, JCV, ADV, EBV, PVB19

2. プライマー・プローブ配列

マイコプラズマ

1 well にプライマー11種類とプローブ6種類

を同時に投入する(現在特許出願中のため配列情報は非開示)

GAPDH

F-tgtgctcccactcctgatttc

R-cctagtcccagggtttgatt

6FAM-aaaagagctaggaaggacaggcaactggc-iowaBlack

HSV1/2

HSVF-cgcatcaagaccacctctc

HSVR2-GTCAGCTCGTGRTTCTG

HSV1-Cy5-tggcaacgcgcccaac-iowaBK

HSV2-6FAM-cggcgatgcgccccag-iowaBK

VZV

VZVF-tcactaccagtcatttctatccatctg

VZVR-gaaaacccaaaccgttctcgag

HEX-tgtctttcacggaggcaaacagct-iowaBK

CMV

CMV4F-tcgcgccgaagagg

CMV4R-cggccggattgtggatt

Cy5-caccgacgaggattccgacaacg-iowaBK

EBV (BMRF1 gene)

EBVF-ctgggcaaggagctgtttg

EBVR-ggccgcttgtaaaattgca

6FAM-ctcggctgtggagcaggctt-iowaBK

HHV6

HHV62F-gaagcagcaatcgcaacaca

HHV62R-acaacatgtaactcggtgtacggt

Cy5-aaccctgtgcgccgtccc-iowaBK

HHV7

HHV7F-cggaagtactggagtaatgacaa

HHV7R-ccaatccttcgaaaccgat

HEX-ctcgcagattgctgttgccatg-iowaBK

HHV8

HHV82F-cctgtcctctgtgtcccat

HHV82R-atcgttgccatttctttttgccc

HEX-ccggcgtcagacattctcacaacc-iowaBK

ADV

ADVF-gacatgacttttgaggtgga
 ADVR-tc gatgacgccggtg
 6FAM-ccc atggaygagcccacct-BHQ
 PVB19
 B19F-gggtttcaagcacaagYagtaaaaga
 B19R-cggYaaacttcttgaatg
 6FAM-cagctgccctgtgg-MGB
 BKV・JCV
 F-ggaaagtcttaggtcttctacatt
 BKVR-gatgaagatttatttgcctgarg
 JCVR-gaagacctgtttgcatgaaga
 6FAM-atcactggcaaacat-MGB
 HBV
 F- gtggtggacttctctcaatttctag
 R- ggacaMacgggcaacatacct
 6FAM- tgtctgcggcgtttt -MGB

3 . 固相化試薬の作成

Primer.probe mix 2.7 μl
 Trehalose 3.0 μl
 100mM dNTP 0.17 μl
 増幅酵素 (1.5U) 0.6 μl

上記試薬を各 well の検査項目に則して作成し、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. マイコプラズマ

固相化試薬の保存安定性におよぼす Trehalose の影響は過去の実験から最適と思われる量を添加した。

作成した固相化試薬 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陽性コントロール、ある

いは検査対象検査項目陰性が確認されている培養細胞 DNA 300ng に各検査項目に対する陽性コントロールを添加した模擬検体を作成し、固相化試薬 (8 well strip) の各 well に添加した。ピペッティングを 10 回行って試薬を完全に溶解し、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

すべての検査項目を感度良く検出できる条件を探すため種々の PCR 反応条件を試したが、最終的に決定した条件は下記の通り。

Denature	95	10 sec
PCR	95	5 sec
	56	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. マイコプラズマ検査系の固相化と性能評価

作成したマルチプレックス PCR 法を応用したマイコプラズマ検査系は第一六改正日本薬局方参考情報に記載の 3 種類のマイコプラズマ (*M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. hyohinis*) に対し、10cfu/ml の検出感度を持つことが確認されている。検出に使用するプライマー・プローブおよび核酸増幅酵素をトレハロースと共に固相化した検査試薬を作成し、上記 3 種類のマイコプラズマの参照品をマイコプラズマ陰性が確認されている培養細胞株に添加し感度測定したところ、液相試薬を用いた時と同様の検出感度を持つことが示され、試薬を固相化することに問題ないことが示された。また、作成し

た固相化試薬は冷暗所で保存すれば 3 か月以上性能を保持したまま保存することが可能だった。

2. 固相化ウイルス検査薬の性能評価

ウイルス検査系はこれまでの実験により 10 copies/reaction の検出感度を持つことが示されている。マイコプラズマと同様にプライマー・プローブ・増幅酵素を固相化した試薬を作成し、一定期間冷暗所で保存した後検出感度の検討を行った。実験は、各ウイルスに対する陽性コントロール（50copies/reaction）を対象の全てのウイルス陰性が確認されている細胞株に添加したサンプルを用いて実施した。その結果、安定化剤としてトレハロースを用いて作成した固相化試薬は液相試薬と同等の検出感度を持つこと、冷暗書で保存すれば 6 か月以上安定に保存できることが確認された。

3. 固相化試薬を用いたウイルス・マイコプラズマ同時測定

ウイルス 13 種類とマイコプラズマの検査試薬を同じ 8 well strip に加え、乾燥固化した固相化試薬を作成した。上記マイコプラズマおよびウイルスの陽性コントロールを細胞株に添加したサンプルを用い、感度検定を行った。その結果、ウイルス検出に最適な PCR 条件で反応した場合とマイコプラズマ検出に最適な PCR 条件で反応した場合の両方ともウイルスとマイコプラズマを感度良く検出することが出来なかった。そこで、反応温度や反応時間を様々に変化させ最適な条件を検討したところ、Denature: 95 10 sec, PCR: 95 5 sec, 56 30 sec の温度・時間条件で 45 サイクル反応させることにより、ウイルスは 50 copies/reaction, マイコプラズマは 10 cfu/ml の感度で検出可能なことが示された（図 1）。

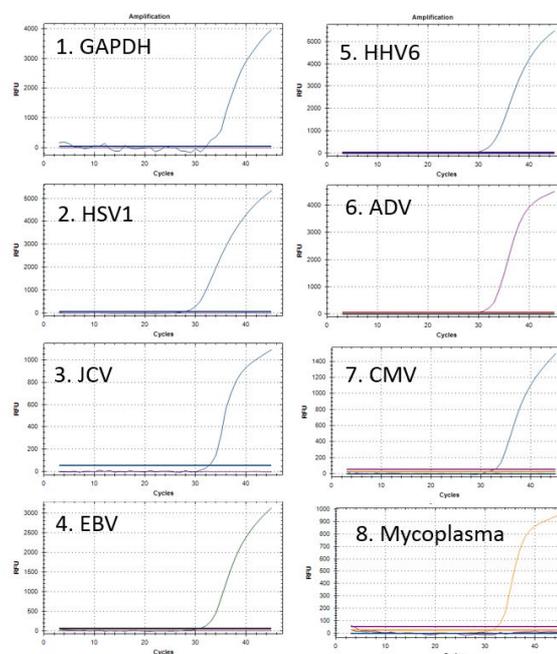


図 1: 1-8 の各 well の検査項目に対する陽性コントロール（ウイルスは 50 copies/reaction, マイコプラズマは 10 cfu/ml）を用いた実験結果。すべての well の検査項目が感度良く検出されていることが分かる。

D: 考察

1. 以前の研究から、トレハロースの使用によりプライマー・プローブに加え核酸増幅酵素も固相化し長期保存できることが示されていたが、今回の実験によりプライマー・プローブの合計が 16 種類もあるマイコプラズマ検査系の固相化にも適用できることが明らかになった。したがって、本技術は汎用性があり他の多くのマルチプレックス PCR 系にも応用可能と考えている。

2. 結果は示さなかったが、RNA ウイルスの検出に使用する RT-PCR 関連試薬をすべて固相化する実験にも取り組んでいる。トレハロースや核酸増幅酵素を増量することにより短期間の室温には成功したが、月単位の長期保存にはいまだ成功していない。今後、固相化法の再検討や使用する RT-PCR 関連酵素の種類を変えて検討を続ける予定である。

3. 本研究によりウイルス 13 種類とマイコプラズマの同時検査が可能なが示された。多種類のプライマー・プローブを含むすべての試薬の分注の手間が不必要となるため、試薬のセットアップを含めた実質的な検査時間は 1 時間程度ですむ。このため、今後培養細胞研究資源の微生物汚染の検査として有用であるばかりでなく、迅速に再生医療に使用する細胞製剤の微生物安全性検査としての応用が期待されるが、そのためにも 2 で示した RT-PCR 法への適用が必要であり、研究を加速したい。

E: 結論

培養細胞資源の微生物検査を簡便・迅速化する研究を行ってきたが、特に検査項目をウイルスに加えマイコプラズマ・細菌・真菌に拡大する取組に重点を置いている。今回、すでに開発したマイコプラズマ検査をウイルス検査と同時に行うための技術開発を行った。その結果、使用する酵素・反応条件・反応時間などを選択・調整することにより 2 つの検査を同時に実施することが可能になり、また使用する固相化酵素は長期保存可能なことが示され、検査の利便性が向上した。

F: 健康危険情報

事例無し

G: 研究発表

論文発表

1. Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, Shimizu N, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows

distinctive stem cell-like phenotype. *Luek*

Lymphoma 10:1-27, 2014

2. Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals. *PLoS One* 9:e112564, 2014.

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* 87:279-286, 2014.

4. Yagasaki H, Shichino H, Shimizu N, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S. Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. *Transpl Infect Dis.* 17(1):160-1. 2015.

5. Endo A, Watanabe K, Ohya T, Matsubara T. Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin.Infect.Dis.* 59:545-548, 2014.

6. Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr.Int.* 56:159-66, 2014.

7. 関矢一郎、清水則夫、森尾友宏、宗田大、

滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の
手順. 日本整形外科学会雑誌 88:212-215,
2014

8. 木村秀樹、池 裕明、岡正朗、鈴木弘行、
谷憲三朗、徳久剛史、中面哲也、森尾友宏、
山口佳之、阿曾沼元博、河上裕、紀ノ岡正博、
澤芳樹、清水則夫 免疫細胞療法細胞培養ガ
イドライン 医薬品医療機器レギュラトリー
サイエンス 45:411-433,2014

著書

清水則夫、渡邊 健、高橋秀行、外丸靖浩、
森尾友宏 再生医療等細胞製剤の品質評価
法：ウイルス・マイコプラズマ試験 紀ノ岡
正博監修 再生医療の細胞培養技術と産業
展開 シーエムシー出版 p51-62、2014

国内学会発表

1. 廣瀬千紘、坂下千瑞子、山本正英、今留
謙一、富田誠、藤原成悦、森尾友宏、清水則
夫、三浦修、新井文子 成人 EBV 陽性 T/NK
リンパ増殖症に対する同種造血幹細胞移植
成績の後方視的解析 造血幹細胞移植学会
平成 27 年 3 月 (神戸市)
2. 渡邊 健、島田ひかり、湯之前雄太、外丸
靖浩、関矢一郎、森尾友宏、清水則夫、岸本
加恵、前田忠郎、澤田昌典 iPS 細胞由来網
膜色素上皮細胞を利用した再生医療の安全
性確保：ウイルススパイク試験 日本再生医
療学会 平成 27 年 3 月 (横浜市)
3. 外丸靖浩、渡邊 健、太田洋子、小島尚美、
関矢一郎、森尾友宏、清水則夫 再生医療の
微生物安全性検査：ウイルス・マイコプラズ
マ同時検出系の開発 日本再生医療学会
平成 27 年 3 月 (横浜市)

国際学会発表

1. Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama
E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S.
Applications of mouse models of EBV-
associated diseases for the evaluation of novel
therapies. The 16th International symposium on
Epstein Barr Virus & Associated Diseases. 16-19
July, 2014 Brisbane
2. Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama
E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Preclinical
studies of novel therapies for Epstein-Barr
virus-associated diseases in humanized mouse
models.
The 39th Annual International Herpesvirus
Workshop. 19-23 July, 2014. Kobe

H： 知的財産権の出願・登録状況

本研究により得た知的財産権はない