

平成 29 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業
事業報告書

平成 30 年 3 月

動物再生医療推進協議会

平成 29 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業報告書

目 次

平成 29 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業報告書	1
----------------------------------	---

別添 1

動物間葉系幹細胞の CD90 及び CD105 抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等製品の品質試験法の確立（パイロットスタディ）試験報告書	4
--	---

別添 2

再生医療等製品の安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法の確立	28
-------------------------------------	----

平成 29 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業 事業報告書

動物再生医療推進協議会
理事長 小沼 操

1. 事業目的

iPS 細胞等の多能性幹細胞の活用分野は、大きく再生医療分野と創薬応用になるといわれている。動物は人と異なり、試験動物として直接使用できるという利点があり、獣医療における先進的な応用が期待される。その中で、平成 26 年 11 月に施行された医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律では再生医療等製品というジャンルが新たに取り入れられ、その製造販売承認の取得が通常の医薬品より緩和されたことから、再生医療等製品が臨床現場へ提供されやすくなるものと考えられる。動物用再生医療等製品としては、イヌの間葉系幹細胞を用いた細胞医薬品等の実用化が進められており、これらの製品の普及を図るためには、その特性を踏まえた安全性等の新たな基準作りが不可欠である。

そこで、動物用再生医療等製品の安全性等基準の作成に寄与するため、既に本事業で作成されている動物用再生医療等製品の品質及び安全性の確保に関する指針（素案）に基づいて、開発に必要な試験方法が確立されていない項目について試験法プロトコールを検討し、さらに当該試験方法に基づいた実証試験を実施する。それにより、試験実施方法や審査基準を明確にすることが可能となり、当該製品の申請者の負担軽減及び審査の迅速化が図られる。

2. 事業内容

学識経験者や再生医療の専門家から成る検討委員会を組織し、平成 28 年度に実施した実証試験の試験結果を踏まえ、間葉系幹細胞の品質試験法においては新たなモノクローナル抗体の作製、病原体の迅速遺伝子解析法においては対象微生物の範囲拡大のための試験を実施する。

1) 動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会の開催（担当：動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会）

再生医療に係る専門家からなる「動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会」を設置し、事業方針の決定、「動物細胞加工製品（同種由来）の品質及び安全性の確保に関する指針（素案）」に基づく試験法の検討及び実証試験の試験方法に関する検討を行う。

2) 実証試験の実施

ア)動物間葉系幹細胞の CD90 及び CD105 抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等製品の品質試験法の確立 (パイロットスタディ) (担当: DS ファーマアニマルヘルス株、株J-ARM、国立大学法人東京農工大学)

再生医療等製品の品質管理の項目には、「確認試験」、「細胞の純度試験」が含まれる。これらの試験には、細胞を特異的に認識する抗体が必要である。ヒトの間葉系幹細胞の場合には、多くの細胞表面特異抗原に対する抗体が市販され、品質試験に応用できることが実証されているが、イヌを含む多くの動物細胞では、それぞれの動物種の表面抗原を認識する特異抗体が殆どない。本課題では、動物の幹細胞表面抗原を認識する特異抗体を用いて、品質試験法を確立することを目的とする。評価対象とする細胞は、イヌ間葉系幹細胞とする。

イ) 再生医療等製品の安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法の確立 (担当: 国立大学法人東京農工大学及び株ケーナインラボ)

他家または自己由来の血液や組織を原料として製造する再生医療等製品は、原料からの病原体の混入を防ぐことが重要な課題である。再生医療等製品への病原体の混入は、投与された被験動物の健康を害するものであり、原料となる血液や組織、製造工程での混入、および最終製品での検査は、安全な再生医療等製品を製造、供給する上で必須である。

安全性評価が必要と想定される病原体は、投与された動物あるいは製造作業者に感染した場合、甚大な健康被害を及ぼすと想定されるウイルスや細菌等である。また、想定される数種類の病原体を迅速に網羅的に検出することで、検査の効率化を図る。現在、個々の病原体の遺伝子検査法は確立されているが、それぞれに解析条件が異なるため、多種類の病原体の検出には時間とコストが掛かり、検査結果によって製造の可否を判断する場合に、大きな欠点となる。

そこで、再生医療等製品の原料、製造工程及び最終製品において、安全性を評価するため、平成 28 年度事業では、イヌにおいて検査すべき病原体を特定・選定して第一優先と第二優先に分類し、まず、第一優先に分類した病原体の遺伝子を一度に迅速に解析する方法を確立し、実検体を使った実証試験を実施した。平成 29 年度は、さらに第二優先に分類した病原体の解析方法を同様に確立し実証試験を実施、本結果を平成 28 年度実績とあわせて現場への導入を検討する。

3. 事業成果

動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会を開催し、「動物細胞加工製品 (同種由来) の品質及び安全性の確保に関する指針 (素案)」において提示されてい

る試験法のうち、プロトコルの確立がされていない試験法について検討して、さらに実証試験を実施した。具体的には、平成 28 年度に実施した実証試験の試験結果を踏まえ、当会の会員である DS ファーマアニマルヘルス(株)及び(株)J-ARM 並びに協同実施者である国立大学法人東京農工大学が「動物間葉系幹細胞の CD90 及び CD105 抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等製品の品質試験法の確立 (パイロットスタディ)」において新たなモノクローナル抗体の作製、当会会員の(株)ケーナインラボ並びに協同実施者である国立大学法人東京農工大学が「再生医療等製品の安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法の確立」において対象微生物の範囲拡大のための試験を実施した。それらの結果については、それぞれ別添 1、別添 2 のとおり取りまとめた。

1) 検討委員会の開催

大学・研究機関等の学識経験者及び再生医療の専門家等から 6 名を選任し、「動物細胞加工製品 (同種由来) の品質及び安全性の確保に関する指針 (素案)」に基づく試験法の検討及び実証試験の試験方法に関する検討のため、検討委員会を 2 回 (第 1 回:平成 29 年 6 月 21 日、第 2 回:平成 30 年 3 月 14 日)開催した。なお、検討事項並びに検討委員については以下のとおりである。

[検討事項]

・検討委員会

第 1 回:事業方針等の検討、実証試験計画の検討

第 2 回:実証試験結果の報告

[検討委員]

犬丸 茂樹	前 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門
小沼 操	国立大学法人北海道大学 名誉教授
笠嶋 快周	日本中央競馬会 競走馬総合研究所 臨床医学研究室 室長
佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長
竹嶋 伸之輔	国立研究開発法人理化学研究所 創発物性科学研究センター 伊藤ナノ医工学研究室 分子ウイルス学研究分野 研究員
平山 紀夫	麻布大学 客員教授

【試験名】

動物間葉系幹細胞の CD90 及び CD105 抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等製品の品質試験法の確立（パイロットスタディ）

【実施担当者所属・氏名】

1. 東京農工大学農学部附属硬蛋白質利用研究施設 教授 新井 克彦
2. DSファーマアニマルヘルス(株) 開発本部長 中井 正博
(協力者：大日本住友製薬(株) プロセス化学研究所長 佐々木 幹雄)
3. (株)J-ARM 代表取締役 竹根幸生

【試験の目的】

動物細胞加工製品の品質及び安全性確保に関する指針（素案）では、再生医療等製品の最終製品の品質管理法として細胞の確認試験や純度試験が規定されている。しかしながらその具体的な試験法に関しては示されていない。現在、獣医臨床領域で広く使用される動物用再生医療等製品の候補になっているのは、間葉系幹細胞（MSC）やリンパ球である。リンパ球に関しては、細胞表面抗原が同定され、その特異性に関してはコンセンサスが得られており、試験実施が可能である。一方、動物の MSC に関しては、単一の幹細胞特異的な細胞表面抗原が特定されておらず、細胞表面抗原の組み合わせにおいてもコンセンサスが得られておらず、試験法の開発が必要である。そこで、昨年度は、イヌ脂肪組織由来 MSC の細胞表面抗原の候補と考えられている CD90 に着目して品質試験法を確立した。本年度は、同様に細胞表面抗原の候補と考えられている CD105 に着目し、CD105 に対するモノクローナル抗体を用いた品質試験法の確立を目指した。

【試験方法】

本事業では、東京農工大学（農工大）の抗 CD105 モノクローナル抗体クローンの特異性解析と並行して市販モノクローナル抗体を用いて、CD105 のイヌ MSC の細胞表面マーカーとしての有用性評価と品質試験法を検討した。

1. RT-PCR によるイヌ MSC の CD105 発現解析（DSファーマアニマルヘルス(株)）

A72（イヌ腫瘍由来細胞）、MDCK（イヌ腎尿細管上皮細胞）及びイヌ MSC について、それぞれ 1.0×10^6 個より、NucleoSpin RNA Plus（タカラバイオ）を用いて RNA を抽出、PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit（タカラバイオ）を用いて一本鎖 cDNA を合成し、以下の条件で PCR 反応を行った。

①プライマーセット：

CD105_Primer1_Forward; 1438-1457 CCATCGATCCCAGAGCTCAC
CD105_Primer1_Reverse; 1533-1552 GGCTTACACAGCTGCCCTTA
CD105_Primer2_Forward; 525-544 ACCGTCCTTCTGCAATCTGG
CD105_Primer2_Reverse; 647-666 TGGTAGGACCCTCACGATGT

②PCR 酵素：

DNA ポリメラーゼ Pfu-X (JenaBioscience)

③PCR 条件：

31 Cycles/ 60°C Anneal、伸長反応他は製品添付プロトコールどおり

2. 農工大の抗 CD105 モノクローナル抗体クローンの特異性解析

2.1 抗イヌ・ウマ CD105 モノクローナル抗体の作製 (農工大)

以下の 2 種類の抗原ペプチドを TiterMax Gold adjuvant を用いてマウスに免疫し、ハイブリドーマを作製した。クローンは、ELISA 法及びイヌ MSC 細胞免疫染色により選択した。

抗原ペプチド 1 (NO.8) : canine CD105; 38-56 AEVTYITSQVSEGCVAQVP

抗原ペプチド 2 (NO.6) : canine CD105; 201-219 ASVRGCRLEGVPGHKEAHI

2.2 クローンの培養と培養上清の調製 (農工大)

各クローンを 20% FBS/DMEM で培養し、培養上清を集め、硫酸沈殿により濃縮し、PBS で透析を行った。

2.3 大腸菌でのイヌ CD105 タンパク質の発現(農工大)

図 1 の発現ベクター (pRSET) にイヌ CD105 全長 cDNA を組み込んだ後、大腸菌 (BL21(DE3)pLysS) を用いて、1 mM IPTG 存在下でイヌ CD105-His tag 融合タンパク質を発現させ、大腸菌ライセートを調製した。

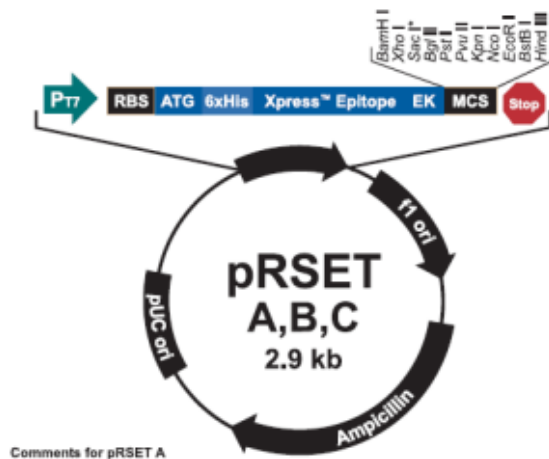


図 1. イヌ CD105 fusion protein 発現ベクター

2.4 哺乳動物細胞でのイヌ CD105 タンパク質の発現 (D S ファーマアニマルヘルス (株))

図 2 の発現ベクター (pcDNA3.1(+)) のクローニングサイトに、1st メチオニン、終始コドンを除くイヌ CD105 の遺伝子配列及び FLAG タグ (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp- Asp-Lys-TAG (stop codon)) の順に組込んだ。CHO 細胞を 6-well プレートに播種し、定法に従いイヌ CD105/pcDNA3.1(+)を導入した。遺伝子導入後 CO₂ インキュベーターで 24 時間培養し、細胞を回収後、1.0×10⁶/mL の濃度に調整し、-80℃で凍結保存した。

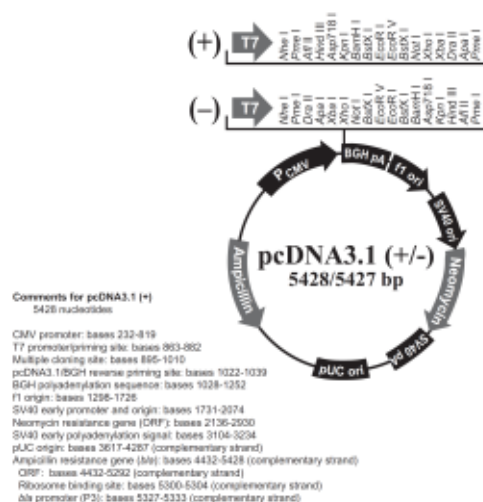


図 2. イヌ CD105 発現ベクター

2.5 ウェスタンブロッティング-1 (農工大)

2.3 で調製した大腸菌ライセートについて SDS-PAGE (分離用ゲル濃度

7.5%) を行い、ニトロセルロース膜にトランスファーし、定法に従いウェスタンブローディングを行った。2次抗体は、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス Ig 抗体を用い、NBT/BCIP による発色法で検出した。

2.6 ウェスタンブローディング-2 (D S ファーマアニマルヘルス (株))

2.4 で調製したイヌ CD105 発現 CHO 細胞、陰性対照 CHO 細胞及び別途樹立したイヌ MSC 細胞を解凍し、PBS で十分に洗浄後、 $5.0 \times 10^5/500\mu\text{L}$ に調整し、シリンジで破碎したものを試料とした。SDS-PAGE (7.5-15% グラジエントゲル、ナカライテスク製) を行い、PVDF 膜 (ミリポア製) にトランスファーし、定法に従いウェスタンブローディングを行った。2次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体または抗ラット IgG 抗体を用い、Chemi-Lumi One Super (ナカライ製) により化学発光反応を行い、LAS-500 にて検出した。

1 次抗体	希釈率
A) 農工大 CD105 (2A4)	1/100 希釈
B) 農工大 CD105 (3C2)	1/100 希釈
C) AbcamCD105	1/500 希釈
D) SantaCruzFLAG タグ抗体	1/2000 希釈

2 次抗体	希釈率
A-C) HRP 標識抗マウス IgG (GE ヘルスケア)	1/1000 希釈
D) HRP 標識抗ラット IgG (GE ヘルスケア)	1/1000 希釈

2.7 細胞免疫染色-1 (農工大)

チャンバースライドに播種した細胞を 4%パラホルムアルデヒド、室温、10 分で固定し、0.5%カゼイン、室温、1 時間でブロッキングした。クローンの培養上清 (x10 濃縮) を 4°C、一晩反応させ、洗浄後、ALP 標識 2 次抗体を室温、1 時間反応させた後、NBT/BCIP による発色法で染色し光学顕微鏡で観察した。

2.8 細胞免疫染色-2 (D S ファーマアニマルヘルス (株))

8 穴スライドチャンバーに播種したイヌ MSC を 80%コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター (37°C) で培養後、細胞をブロッキング液にて処理し、未固定の状態、1 次抗体による反応を 4°C で 30 分間行った。洗浄後、4%パラホルムアルデヒド、4°C、30 分で固定した。2 次抗体反応には、1/500 希釈の Alexa488 標識-抗マウス IgG 抗体を用い、4°C で 30 分間反応させた。洗浄、DAPI による核染色を行い、蛍光顕微鏡 (BZ-X700、KEYENCE) で観察した。2 次抗体のみでバックグラウンドシグナルがギリギリ検出されない程度の露光時間 (1/3 second) を設定した。

なお、抗原ペプチドによる 1 次抗体の吸収試験のために、農工大クローンの培養上清に BSA を添加し (終濃度 1%)、抗体濃度が 25 µg/ml (培養上清の 1/200 希釈に相当) になるように PBS で調整後、DMSO に溶解した抗原ペプチド 1 (NO.8) または抗原ペプチド 2 (NO.6) を抗体の 20 倍量 (モル比) 添加し、4°C で 1 時間反応させた。コントロール群は同量の DMSO を添加した。

2.9 フローサイトメトリー解析 (D S ファーマアニマルヘルス (株))

CHO 細胞、イヌ CD105 発現 CHO 細胞及びイヌ MSC 細胞を用いて農工大クローン (2A4、3C2) を用いた検討を行った。各細胞を培養後、Trypsin/EDTA または Accutase で剥離し、ブロッキング液で処理し、未固定の状態、1 次抗体 (クローン番号 2A4、3C2) による反応を 4°C で 30 分間行った。洗浄後、1/500 希釈の Alexa488 標識-抗マウス IgG 抗体を用いて、4°C で 30 分間反応させたものを試料とした。

なお、抗原ペプチドによる 1 次抗体の吸収試験として、農工大クローンの培養上清に BSA を添加し (終濃度が 1%)、抗体濃度が 25 µg/ml (培養上清の 1/200 希釈に相当) になるように PBS で調整後、DMSO に溶解した抗原ペプチド 1 (NO.8) または抗原ペプチド 2 (NO.6) を抗体の 20 倍量 (モル比) 添加し、4°C で 1 時間、反応させた。コントロール群は同量の DMSO を添加した。

フローサイトメトリーは、以下の条件で実施した。

フローサイトメーター : Attune Nxt Flow Cytometer、サーモフィッシャー製

励起波長 :	440/50 nm
測定波長 :	530/30 nm
測定細胞数 :	10,000 個

3. 脂肪組織由来の MSC の単離、培養方法及び保存方法 ((株) J-ARM)

岸上獣医科病院 (大阪市) において、獣医師法 (昭和二十四年六月一日法律第百八十六号、最終改正:平成二五年一二月一三日法律第一〇三号) 及び動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和四十八年十月一日法律第百五号、最終改正:平成二六年五月三〇日法律第四六号) を順守し、飼い主の同意の下、患犬より脂肪組織の提供を受けた。MSC の分離、培養及び保存は、J-ARM 社幹細胞培養キット (脂肪組織用) を用いた。

8 か月~15 歳齢の患犬よりおもに鼠径部や腹部正中などから、全身麻酔下で脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織から血管や筋等を取り除き、小片化した後、組織片をコラゲナーゼ溶液 (J-ARM 社製) で分散処理 (37°C、60 分間) した。分散された細胞は、遠心により回収、生理食塩水で洗浄を行い、MSC を含む間質血管細胞群 (SVF) を調整した。その後、SVF を 75T フラスコに播種し、J-ARM 社製幹細胞単離培地で約 5 日間 (3~7 日間) 静置培養 (37°C、5%CO₂) し、MSC を単離した (P0)。細胞が 90~100%コンフルエントに達したらトリプシン溶液により細胞を剥離し、J-ARM 社製増殖培地で、約 7 日間 (6~7 日間)、継代培養した (P1)。細胞を剥離、回収し、J-ARM 社製細胞凍結保存液に懸濁し、クライオチューブに分注して常法に従い凍結保存した (1×10⁶ 細胞/mL/クライオチューブ)。

4. 市販抗体を用いた CD105 のイヌ MSC の細胞表面マーカーとしての有用性評価と品質試験法の検討 (D S ファーマアニマルヘルス (株) /大日本住友製薬 (株))

4.1 抗体

検討には、以下の市販抗体を使用した。

1 次抗体	Anti-CD105 (Mouse clone OT18A1, ab156756, Abcam)
2 次抗体	Anti Mouse IgG PE (Goat, ab97024, Abcam)
1 次抗体	Anti-CD105 PE (Mouse clone MEM-229, ab53321, Abcam)
1 次抗体 (陰性対照)	Mouse IgG2b kappa isotype control (ab18428, Abcam)
1 次抗体	Anti-CD105 FITC (Mouse clone SN6, ab11415, Abcam)
1 次抗体 (陰性対照)	Mouse IgG2a isotype control PE (ab91363, Abcam)

4.2 細胞

検討には以下の細胞を使用した。

細胞	入手先
イヌ脂肪組織由来 MSC	D S ファーマアニマルヘルス(株)
HeLa 細胞	S3, ECACC 87110901 D S ファーマバイオメディカル(株)
U937 細胞	iLite Human Interferon Alpha Kit, 51100-1, PBL Interferon Source
Namalwa 細胞	大日本住友製薬(株)愛媛工場

4.3 フローサイトメトリー法-1 (Anti-CD105 (Mouse clone OTI8A1, ab156756, Abcam))

現在、市販抗体で唯一イヌ交差性が表示されているクローン OTI8A1 由来抗 CD105 モノクローナル抗体を用いてイヌ MSC の CD105 が測定できるかどうか検討した。

4.3.1 細胞処理

フローサイトメトリー解析用の細胞処理は、昨年度の報告書 (CD90 の検討) と同様の方法で実施した。抗体反応時の抗体の希釈率は、各抗体の添付文書に従った。昨年度は、未固定の条件で抗原抗体反応を行ったが、Anti-CD105 (Mouse clone OTI8A1, ab156756, Abcam) に関しては、未固定のものと以下の固定化及び透過処理を行ったもので検討した。細胞を 0.2%FBS-DPBS にて 1 回洗浄、4%パラホルムアルデヒド-PBS にて室温 10 分間固定処理、2 回洗浄、0.1% Tween20-PBS にて室温 10 分間透過処理、2 回洗浄、Blocking One (03953-95, nacalai tesque) にて室温 30 分間ブロッキング処理、2 回洗浄、以降、次工程の 1 次抗体反応へ続けた。なお、室温インキュベートの際は、抗体反応時と同様に遮光の下ローテーターにて緩やかにチューブの倒置を繰り返した。

4.3.2 フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、以下の条件で実施した。

フローサイトメーター：CyFlow Space シスメックス製

励起波長： 488 nm

測定波長： 536nm (FITC) / 590nm (PE)

測定細胞数： 1,000~3,000 個

なお昨年度は、GuavaPCA (Ex 532nm, Em 580nm, Merck Millipore 社製) を使用した。

4.4 フローサイトメトリー法-2(Anti-CD105 PE (Mouse clone MEM-229, ab53321, Abcam)、Anti-CD105 FITC (Mouse clone SN6, ab11415, Abcam))

4.3 の測定方法では工程が非常に多く、実施のハードルが高いため、標識済みの抗 CD105 抗体を検索した。イヌとの交差性は不明だが、ブタやウマ等と交差するため、哺乳動物の範囲内で広く交差することが予想された Anti-CD105 PE (Mouse clone MEM-229, ab53321, Abcam)と Anti-CD105 FITC (Mouse clone SN6, ab11415, Abcam)の 2 種類を、固定化・透過処理なしで陽性細胞の検出が可能か検討した。

なお、細胞処理やフローサイトメトリーは、4.3 と同じ方法で行った。

【結果】

1. RT-PCRによるイヌ幹細胞のCD105発現解析 (D S ファーマアニマルヘルス (株))

図3. に示したようにイヌMSCにCD105が発現している (primer1:115bp、primer2:142bp) ことが確認できた (31 Cyclesの反応)。但し、30 Cyclesの反応では、バンドがかなり薄かった (data not shown)。

各細胞の発現量は、MSC \geq A72 \gg MDCK (発現していてもごくわずか) であった。

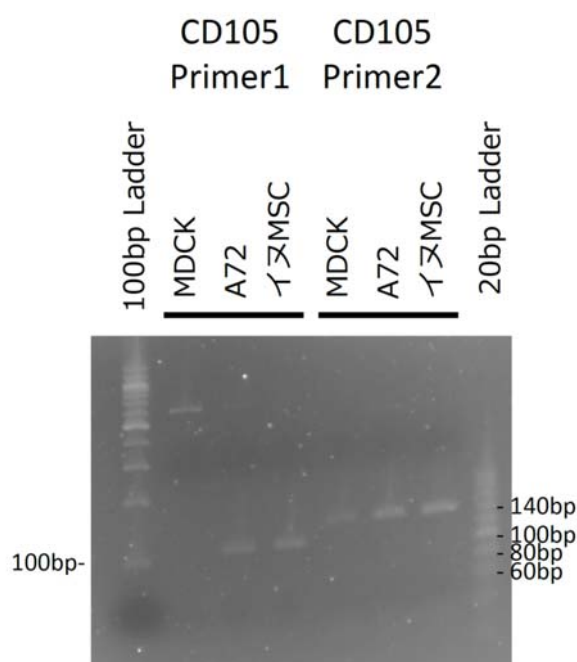


図3. RT-PCRによるイヌCD105の遺伝子発現解析

2. 農工大抗CD105抗体クローンの特異性解析 (農工大)

ペプチドELISAにより選別された4クローン (1A8、2A4、2A11、3C2) について、大腸菌で発現させ anti-His tag 抗体に陽性を示したイヌCD105-His tag 融合タンパク質 (図4) を用いたウェスタンブローディング解析を実施したところ、1A8及び2A11は陽性反応を示したが、2A4及び3C2は反応が見られなかった (図4)。一方、イヌMSCを用いた細胞免疫染色の結果、4クローンとも、陽性反応を示した (図5)。

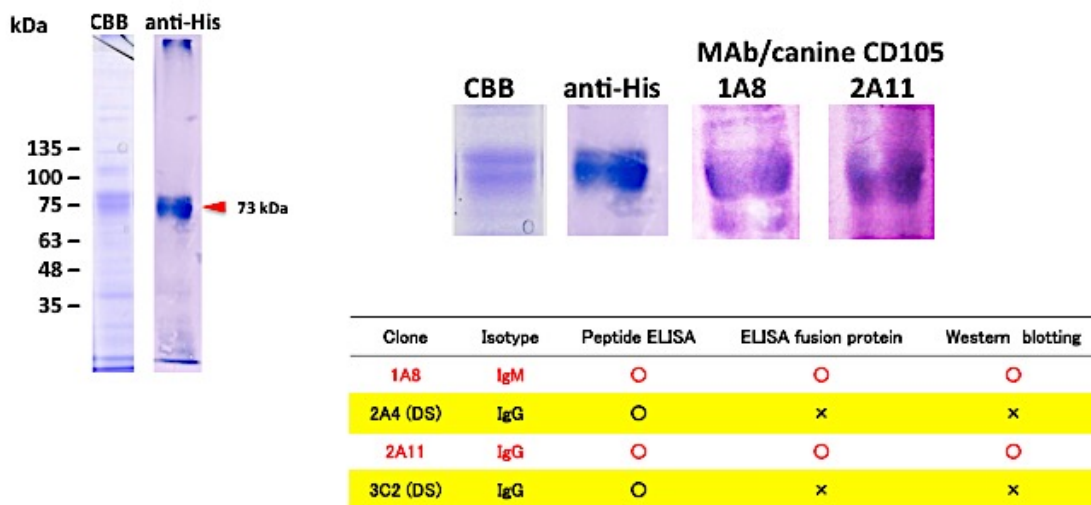


図 4. Western blotting (canine CD105 fusion protein)

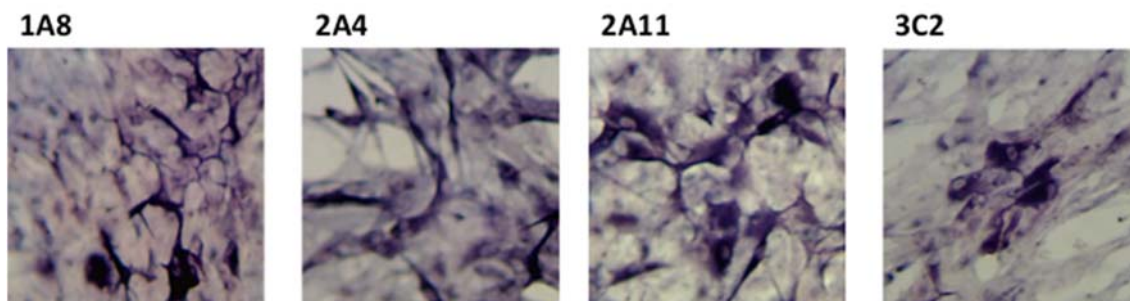


図 5. イヌ MSC 細胞免疫染色 (1A8【抗原ペプチド未検討】/2A4【抗原ペプチド 1】/2A11【抗原ペプチド未検討】/3C2【抗原ペプチド 2】)

3. 農工大抗 CD105 抗体クローンの特異性解析 (D S ファーマアニマルヘルス (株))

3.1 ウェスタンブロット解析

イヌ CD105 発現 CHO 細胞、イヌ MSC を用いた検討により、2つの農工大クローンは、イヌ CD105 と交差しなかった。Abcam 社製の市販抗体に関しても特異的なバンドが検出されなかった (図 6)。なお、CHO に導入したイヌ CD105 が発現していることは、抗 FLAG 抗体により確認された (図 6 矢印 (←))。

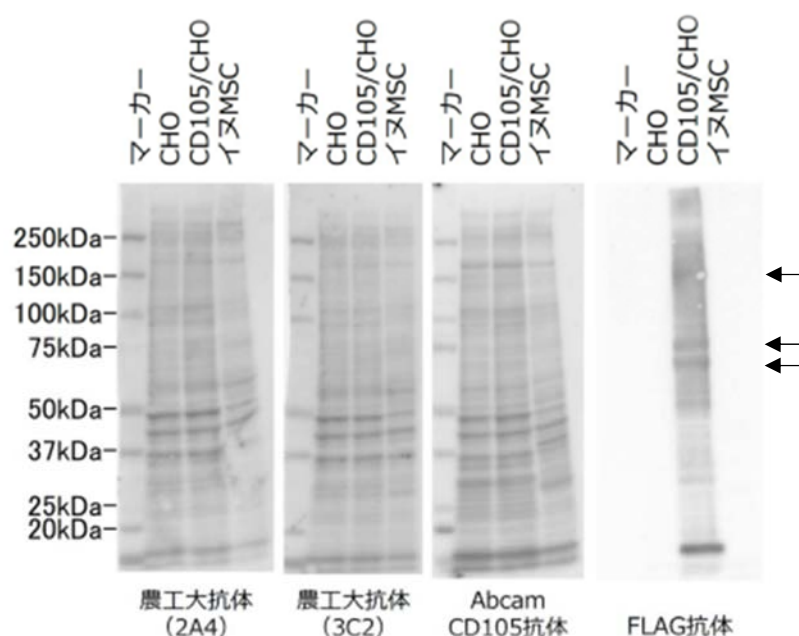


図 6. ウェスタンブロット解析

3.2 細胞免疫染色

図 7 に示したように 2つのクローン (2A4、3C2) とともに 1/200 希釈でシグナルが確認されたが、抗原ペプチド 1 (NO.8) または抗原ペプチド 2 (NO.6) の添加でもシグナルが消失しなかった。1/1000 希釈では、シグナルがほとんど消失していた。



図 7. イヌ MSC を用いた細胞免疫染色

3.3 フローサイトメトリー解析

図 8 に示したように、2つのクローン (2A4、3C2) とともに抗原ペプチド 1 (NO.8) または抗原ペプチド 2 (NO.6) を加えてもピークが左にシフトせず、抗原に特異的な結合は認められなかった。2次抗体を Chicken から Goat に変更しても同様に特異的な結合は認められなかった (data not shown)。

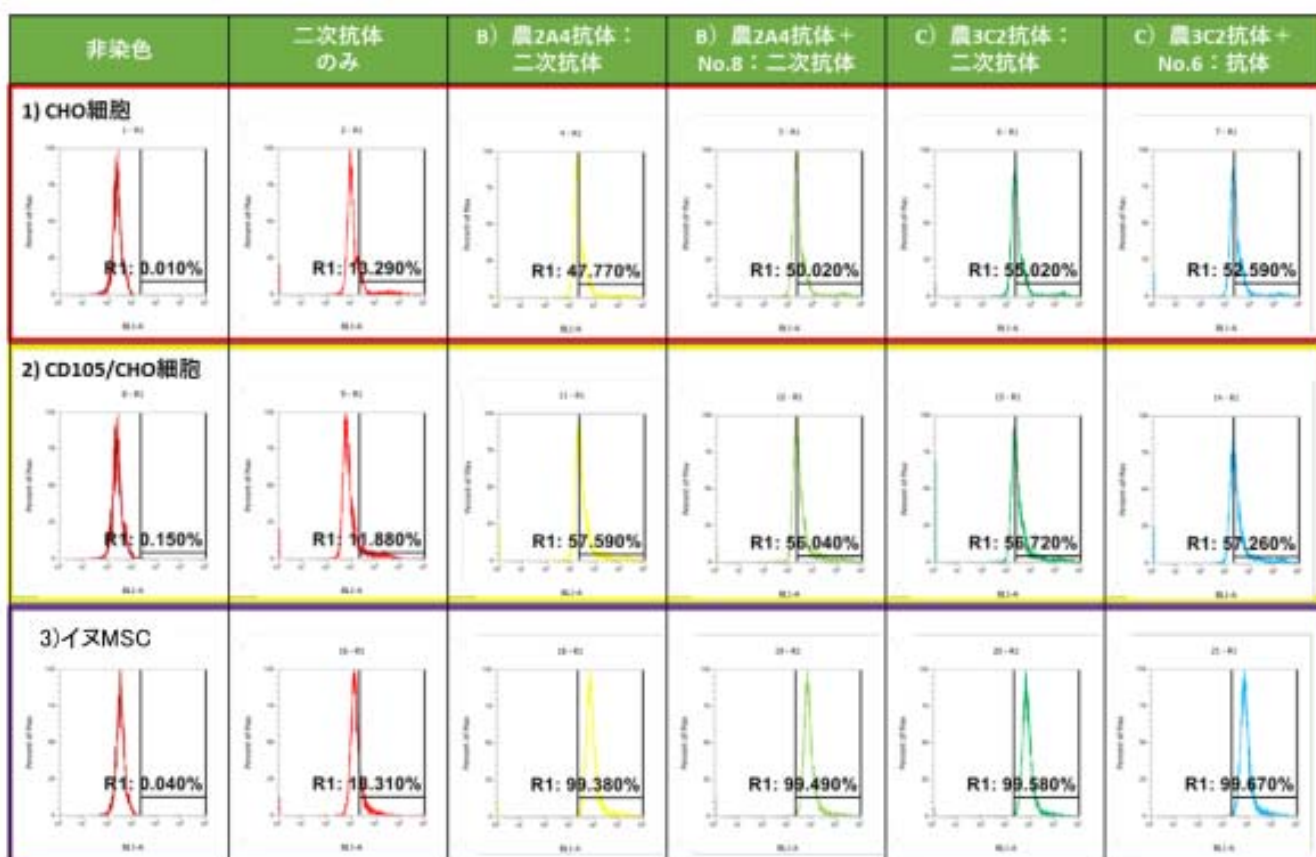


図 8. フローサイトメトリー解析

縦軸：細胞数

横軸：蛍光強度

%数値：陽性細胞率

4. イヌ脂肪由来 MSC の分離培養 ((株) J-ARM)

表 1 に示したように、10 犬種 (雄 3 頭、雌 7 頭) の皮下脂肪組織より 10 種の犬 MSC を樹立した。

表 1. イヌ MSC のリスト

犬種	採取時の年齢	体重	性別	保存細胞数	継代
トイプードル	2 歳 4 か月	1.7kg	雌	1×10 ⁶	P1
TP×マルチーズ	8 か月	2.98kg	雌	1×10 ⁶	P1
チワワ	11 か月	2.1kg	雌	1×10 ⁶	P1
ラブラドル×ゴールデン	6 歳 1 か月	24.9kg	雌	1×10 ⁶	P1
ラブラドル	1 歳	22kg	雌	1×10 ⁶	P1
ビーグル	15 歳 2 か月	9.7kg	雄	1×10 ⁶	P1
シーズ	10 か月	4.4kg	雌	1×10 ⁶	P1
ペキニーズ	2 歳 4 か月	6.4kg	雄	1×10 ⁶	P1
MD	11 歳 7 か月	7kg	雌	1×10 ⁶	P1
ラフコリー	10 歳 8 か月	27.7kg	雄	1×10 ⁶	P1

5. 市販抗体を用いた CD105 のイヌ MSC (CnSASC) の細胞表面マーカーとしての有用性評価と品質試験法の検討 (D S ファーマアニマルヘルス (株) / 大日本住友製薬 (株))

5.1 Anti-CD105 (clone OTI8A1)を用いたイヌ MSC の CD105 測定法の検討

現在、市販抗体で唯一イヌ交差性が表示されているクローン OTI8A1 由来抗 CD105 モノクローナル抗体を用いてイヌ MSC の CD105 が測定できるかどうか検討した。昨年度の報告書 (CD90 の検討) の方法と同様に実施したが、ピークのシフトは観察されなかった (図 9-a)。本抗体はヒト CD105 用であり、CD105 が発現しているヒト細胞株 U937 をポジティブコントロールとして試したが同様に反応は見られなかった (図 9-b)。次いで、メーカーによる本抗体の使用例情報をもとに、細胞に固定化处理及び透過処理を加えたところ、ピークのシフトが観察された (図 9-c)。さらに抗体反応の際の溶液にイムノエンハンサーを使用することによってシフトしたピークを明確にネガティブコントロール (1 次抗体なし 2 次抗体のみ) と分離することが可能であった (図 9-d, e)。ネガティブコントロールに関しては市販のアイソタイプコントロールを使用してもピークが分離していることを確認した (図 9-

f)。

本抗体は細胞を固定化・透過処理することによって反応した。細胞内部分を認識している可能性を考えたが、後に透過処理工程を除いても反応することがわかり (data not shown)、固定化のみが必要と考えられる。本抗体は標識済みのものは市販されておらず、細胞剥離から固定化・透過処理を経てフローサイトメトリー実施まで9時間程度を要し、実用的な試験法とするためには、改良が必要である。

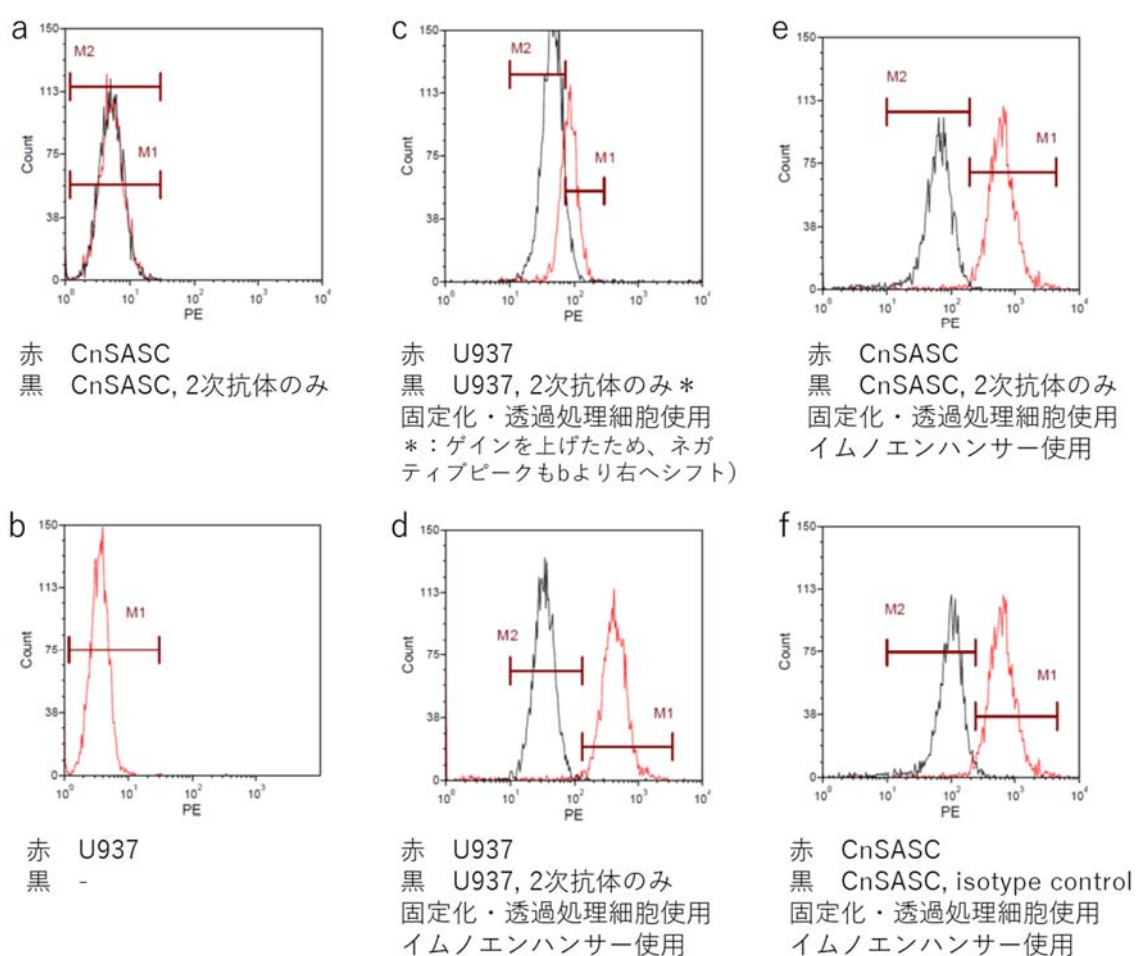


図 9. Anti-CD105 (clone OTI8A1)を用いた CD105 のフローサイトメトリー解析

5.2 イヌ幹細胞 CD105 のフローサイトメトリー解析に適した抗体の検討

5.1 の測定方法では工程が非常に多く、実施のハードルが高いため、標識済みの抗 CD105 抗体を検索した。イヌとの交差性は不明だが、ブタやウマ等と交差するため、哺乳動物の範囲内で広く交差することが予想された Anti-CD105 PE (Mouse clone MEM-229, ab53321, Abcam)と Anti-CD105 FITC

(Mouse clone SN6, ab11415, Abcam)の2種類を、固定化・透過処理なしで陽性細胞の検出が可能か検討した。U937細胞で検出を試みたところ、両抗体ともピークのシフトが観察された(図10-a,b)。さらに、U937と同様にCD105ポジティブとして知られているHeLa細胞で試みたところ、ピークが大きくシフトしネガティブコントロールと完全に分離できることがわかった(図10-a,b)。ここでクローンMEM-229由来抗体とクローンSN-6由来抗体を比較した場合(図10-aとb、cとdの比較)、クローンMEM-229由来の方がピークの分離が良いように考えられたため、以降はクローンMEM-229由来の抗体を使用することとした。

イヌMSC(CnSASC)を用いて検討したところ、明確にピークが分離しており(図10-e)、本抗体を使用することによって固定化・透過処理を経ず、2次抗体反応も不要なCD105検出が可能であることがわかった。さらに凍結細胞を直接用いた場合でも同様に良好な結果が得られ(図10-f)、CD90の検出に成功した簡易法をCD105でも用いることが可能ということがわかった。図10-fではアイソタイプコントロールを用いてもピークが分離していること、Namalwa細胞をネガティブコントロールとして用いた場合さらにピークの分離が大きくなることを示している。

検討した2種の抗体はイヌに関する交差性は明らかとなっていなかったが、交差することが判明した。メーカーが表示するSN6の交差種はHuman、Horse、MEM-229の交差種はHuman、Pigであった。ネガティブコントロールとの差が若干大きいと思われるMEM-299を選択したが標識の種類、標識率などでも変動する可能性がある。なお、マウス細胞株であるL929を用いた場合、SN6は反応し、MEM-229は反応しなかった(data not shown)。SN6はより広い範囲の種でCD105を認識する可能性が高い。一方で細胞を比較すると最も強く反応するのがHeLa(ヒト)で、次いでCnSASC(イヌ)、U937(ヒト)は陽性コントロールとして示されているにも関わらず若干反応が弱かった。Namalwa(ヒト)は非常に反応が弱く、ネガティブコントロールとして有用であると考えられた。

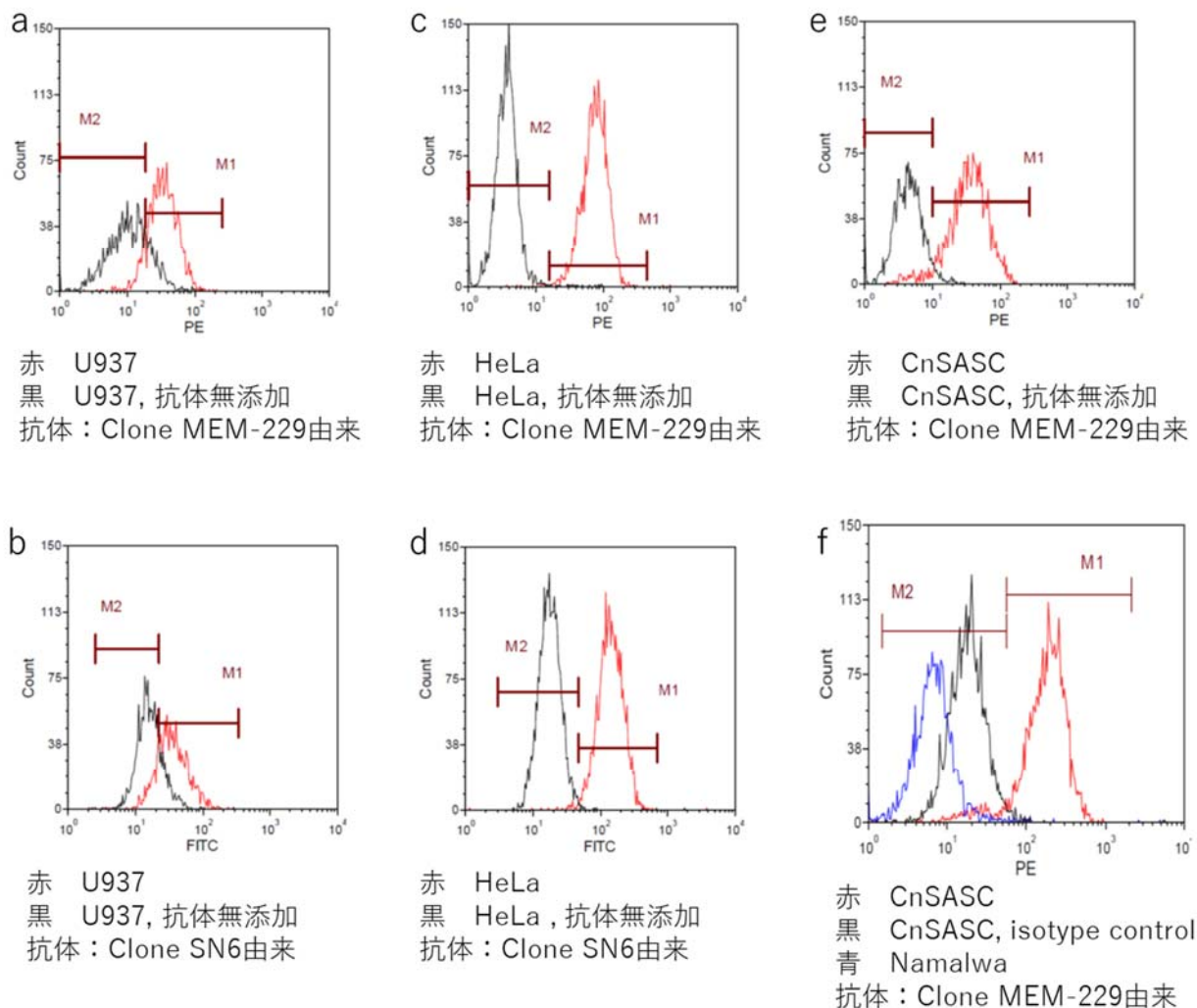


図 10. 2 種類の Anti-CD105 抗体 (clone MEM-229, SN6)に関する評価

5.3 様々なイヌ MSC における CD105 陽性細胞率の測定

昨年度樹立し、CD90 の解析を行った 11 種の MSC に関して、今回確立した CD105 測定法を用いて解析した。細胞サンプルは、前回 CD90 を測定したサンプルの残りを凍結保存していたものを用いた (表 2)。ネガティブコントロールとしてサンプル No.10 をアイソタイプコントロールと反応させた。1 回目の実験結果が赤ライン及び黒ライン (ネガティブコントロール)、2 回目の実験結果が緑ラインと青ライン (ネガティブコントロール) である (図 11)。1 回目の実験では、前回の CD90 を測定する際に凍結保存した P1 または P2 の細胞を解凍後に直接測定した。2 回目の実験では、それを更に数日間培養し、凍結保存した P2 または P3 の細胞を解凍後に直接測定した。1 回目と 2 回目の実験結果はほぼ同じで、本測定法の再現性は高いと考えられた。また、サンプルによって CD90 陽性細胞率は変わらないが (ほぼ 100%)、

CD105 陽性細胞率は約 50%から約 100%と変化に富むことがわかった(表2)。

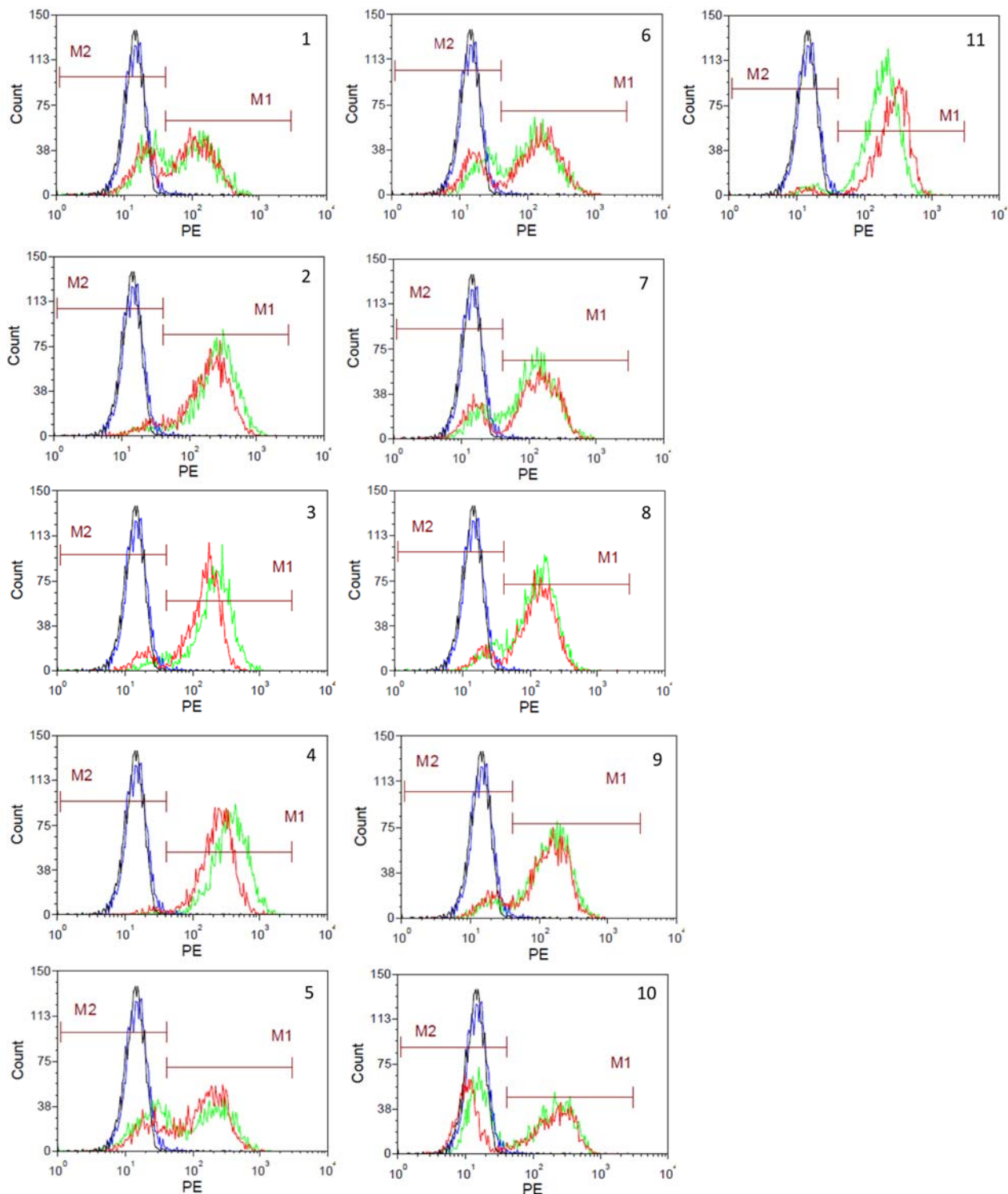


図 11. イヌ MSC を用いた CD105 フローサイトメトリー解析

表 2. イヌ MSC の CD105 陽性細胞率

犬種	由来組織	サンプル No.	CD90陽性細胞率 (%)	継代数	CD105陽性細胞率 (%)*	継代数	CD105陽性細胞率 (%)**	継代数
ミニチュアダックスフンド	脂肪	1	99.8	P3	62.8	P2	53.6	P3
トイプードル	脂肪	2	99.5	P3	89.8	P2	92.2	P3
シーズー	脂肪	3	99.9	P3	87.6	P2	91.1	P3
バーニーズマウンテン	脂肪	4	99.5	P3	96.6	P2	98.5	P3
ジャーマンシェパード	脂肪	5	99.7	P3	73.1	P2	48.6	P3
トイプードル	脂肪	6	99.7	P3	68.7	P2	67.6	P3
トイプードル	脂肪	7	99.7	P3	74.0	P2	82.4	P3
ミニチュアダックスフンド	脂肪	8	99.4	P3	85.4	P2	83.5	P3
ボーダーコリー	脂肪	9	99.4	P3	81.5	P2	87.9	P3
ビーグル	脂肪	11	99.5	P3	95.8	P1	94.8	P2
ビーグル	骨髄	10	99.1	P2	51.7	P1	53.0	P2

* : 図 11 において M1 の区間に入る細胞の割合

** : M1 の下限の緑ラインの 2 ピークの谷間に合わせて再計算した。

【まとめ】

1. イヌ脂肪由来 MSC を用いた RT-PCR の結果、CD105/TGF- β 1 及び β 3 受容体 (エンドグリン) の発現が確認された。ただし、発現量は高くないと予測される。
2. イヌ CD105 を認識するマウス・モノクローナル抗体 (クローン名 ; CD105-1A8, 2A4, 2A11 及び 3C2) を作製した。
3. クローン CD105-1A8 及び 2A11 は大腸菌で発現させたイヌ CD105 とのウェスタンブロッティングにより反応したが、2A4 及び 3C2 は反応しなかった。
4. 本抗体は、イヌ脂肪由来 MSC 上に存在する CD105 を免疫細胞化学的に検出した。但し、特異性に関しては、未検討である。
5. CD105-2A4 及び 3C2 の 2 クローンは、未固定の状態のイヌ脂肪由来 MSC 上に存在する CD105 に関しては、特異的に認識しているとは考えられなかった。CD105-1A8 及び 2A11 のクローンに関しては、未検討である。
6. 2A4 及び 3C2 のクローンは、哺乳動物細胞で発現させた組換えイヌ CD105

タンパク質やイヌ脂肪由来 MSC の CD105 をウェスタンブロッティングでは認識できなかった。CD105-1A8 及び 2A11 のクローンに関しては、未検討である。

7. イヌ脂肪由来 MSC を用いたフローサイトメトリー解析に応用可能な特異性の高いクローンは、まだ見出せていない。
8. 市販抗体を用いた検討により、イヌ間葉系幹細胞に発現している CD105 のフローサイトメトリー解析法を確立することができた。
9. 市販抗体を用いた多犬種由来イヌ MSC のフローサイトメトリー解析の結果、CD105 のイヌ MSC での発現には、陽性細胞率が約 50~100%と多様性があった。いずれの抗体を用いた場合にもイムノエンハンサーによる増幅が必要であり、細胞当たりの発現率は、それほど高くないと考えられる。
10. CD105 は、イヌ MSC のポジティブマーカーとしての可能性はあるが、発現量には多様性があり、細胞当たりの発現量も高くないことから、イヌ MSC を用いた再生医療等製品の品質試験（確認試験、純度試験）に応用するには更なる検討が必要である。

【課題】

CD105 のフローサイトメトリー解析をイヌ MSC のポジティブマーカーとして、イヌ MSC を用いた再生医療等製品の品質試験（確認試験、純度試験）に応用するには、更なる検討を行い学会等でのコンセンサスを得る必要がある。

【追加データ】

追加内容は、追加スクリーニングにて見出されてきた2種類のCD105抗体についての評価結果である。

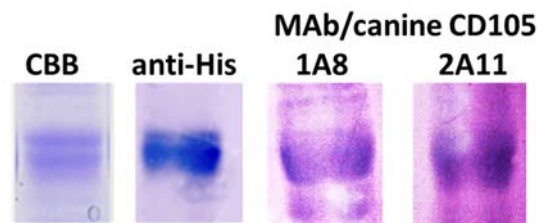
実施担当者所属・氏名、試験の目的、抗体作成、実験手法については報告書本体と同じであるため、そちらを参照のこと。

【試験名】

動物間葉系幹細胞のCD90及びCD105抗原特異的モノクローナル抗体を用いた再生医療等製品の品質試験法の確立（パイロットスタディ）

1. 追加の抗CD105モノクローナル抗体クローンの特性解析（農工大）

ELISA法によって新たにクローン「1A8（マウスIgM）」と「2A11（マウスIgG）」が見出されたため、大腸菌発現イヌCD105組換え体を用いたウェスタンブロットを実施した。



「結果」

クローン「1A8」と「2A11」の抗体はイヌCD105大腸菌組換え体と交差した。

2.1 細胞免疫染色-1（DSファーマアニマルヘルス（株））

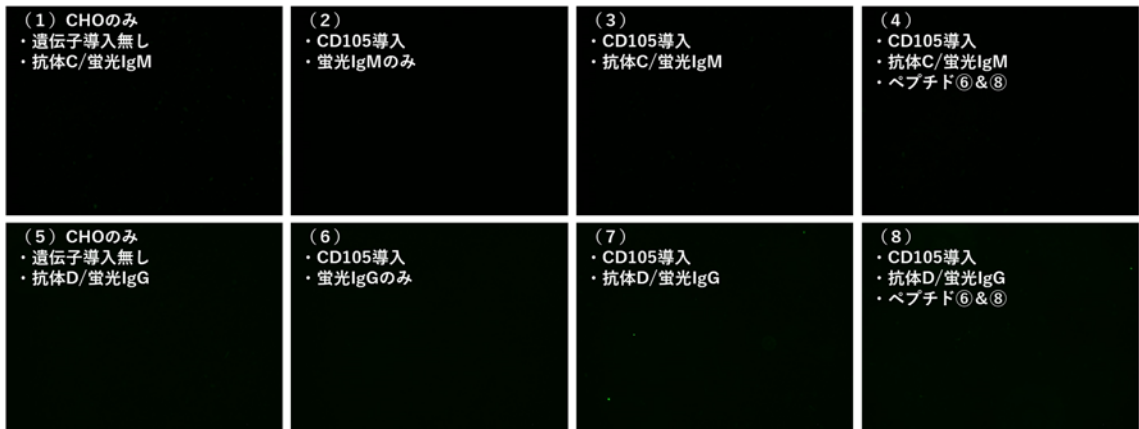
8穴スライドチャンバーに播種したCHO細胞を80%コンフルエントになるまでCO₂インキュベーター（37℃）で培養後、先の報告書記載の方法でイヌCD105遺伝子を導入した。

遺伝子導入後、24時間経過した細胞に対して4%パラホルムアルデヒド、4℃、30分で固定した。固定後の細胞をブロッキング液にて処理し、1次抗体による反応を4℃で30分間行った。洗浄後、2次抗体反応には、1/500希釈のAlexa488標識-抗マウス二次抗体を用い、4℃で30分間反応させた。洗浄、DAPIによる核染色を行い、蛍光顕微鏡（BZ-X700、KEYENCE）で観察した。2次抗体のみでバックグランドシグナルがギリギリ検出されない程度の露光時間（1/3 second）を設定した。

なお、抗原ペプチドによる1次抗体の吸収試験のために、農工大クローンの培養上清原液に、DMSOに溶解した抗原ペプチド1（NO.8）と抗原ペプチド2（NO.6）の2種類を十分量である25 μMとなるように添加し、4℃で1

時間反応させた。コントロール群は同量の DMSO を添加した。

「結果」



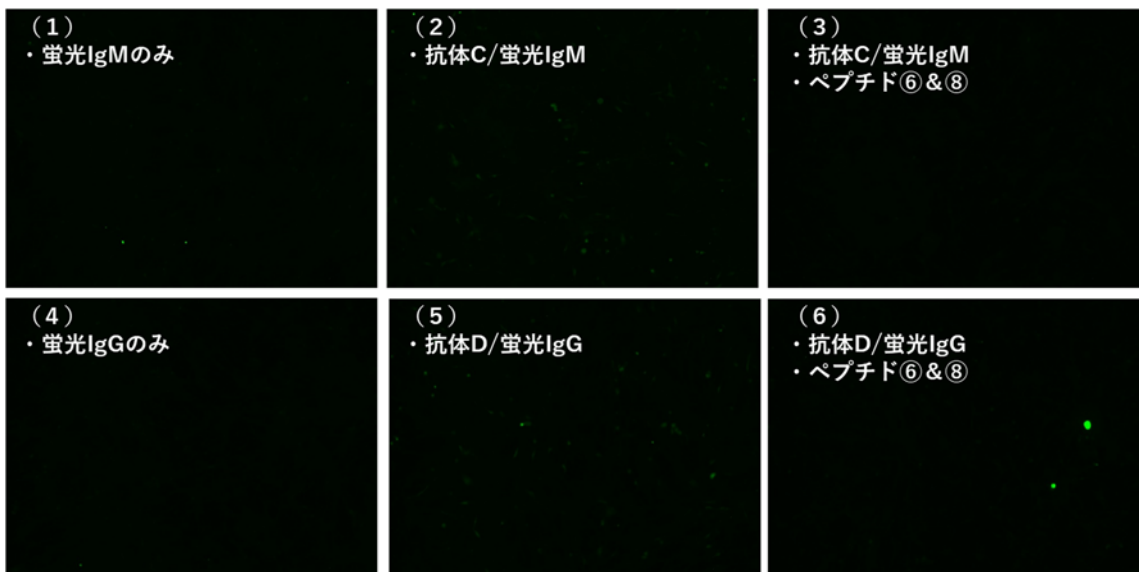
上図のように、イヌ CD105 遺伝子発現 CHO 細胞に対して、クローン「1A8」と「2A11」の抗体を用いた免疫細胞染色での明瞭な交差は確認できなかった。

また抗体抗原反応後に固定した細胞を用いても同様の結果であった (Data not shown)。(注) 上記図中の抗体 C はクローン「1A8」、抗体 D はクローン「2A11」を指す。

2.2 細胞免疫染色-2 (DSファーマアニマルヘルス (株))

8 穴スライドチャンバーに播種したイヌ MSC についても同様に細胞免疫染色を実施した。操作は上記 2.1 と同様であるため、省略する。

「結果」



上図のように、イヌ MSC 細胞に対して、クローン「1A8」と「2A11」の抗体を用いた免疫細胞染色での明瞭な交差は確認できなかった。

抗体抗原反応後に固定した細胞を用いても同様の結果であった (Data not shown)。

(注) 上記図中の抗体 C はクローン「1A8」、抗体 D はクローン「2A11」を指す。

3. フローサイトメトリー解析 (DSファーマアニマルヘルス (株))

CHO 細胞、イヌ CD105 発現 CHO 細胞及びイヌ MSC 細胞を用いて農工大クローン「1A8」と「2A11」を用いた検討を行った。各細胞を培養後、Accutase で剥離し、ブロッキング液で処理し、未固定の状態、1 次抗体 (クローン「1A8」と「2A11」) による反応を 4℃で 30 分間行った。洗浄後、1/500 希釈の Alexa488 標識-抗マウス二次抗体を用いて、4℃で 30 分間反応させたものを試料とした。

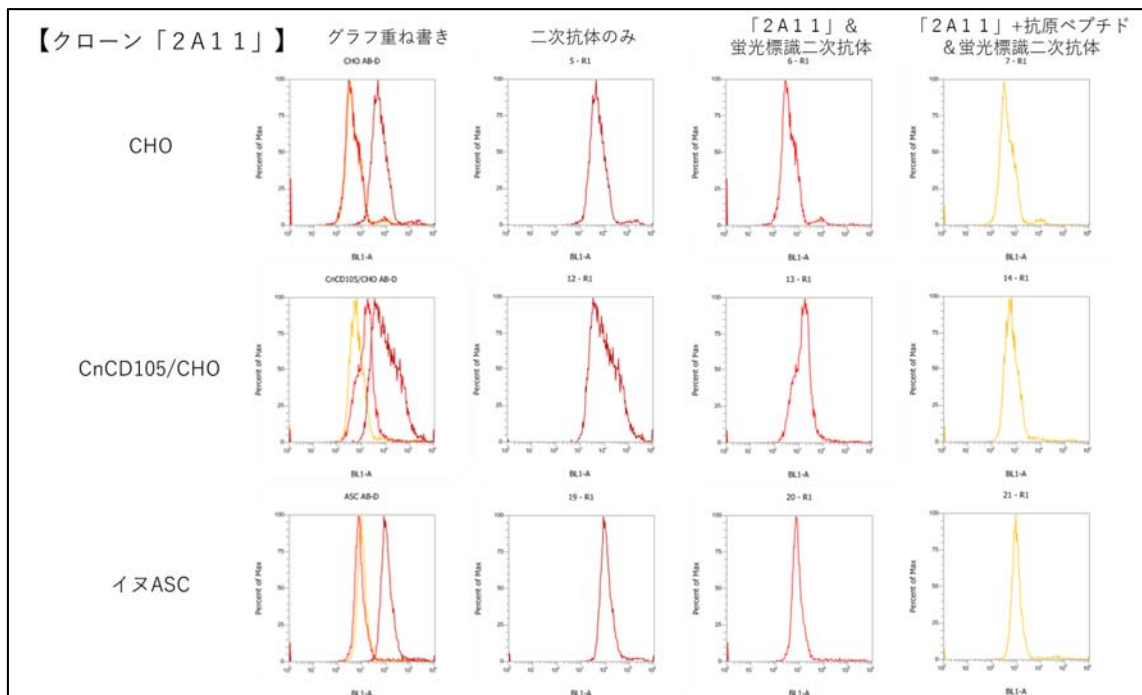
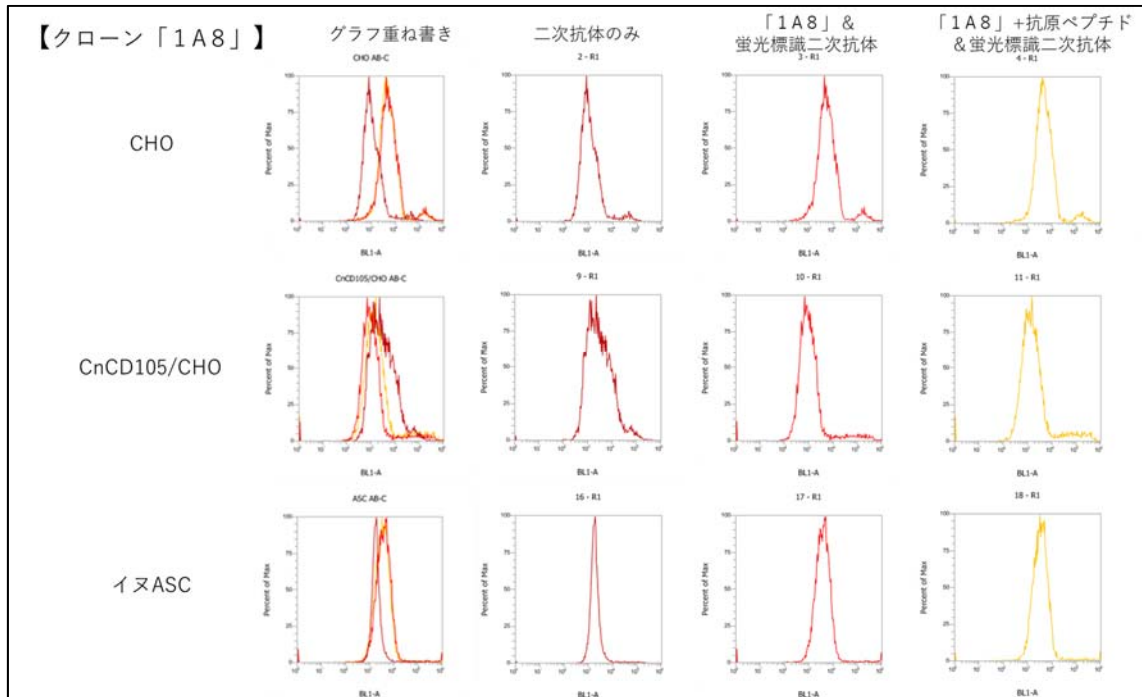
なお、抗原ペプチドによる 1 次抗体の吸収試験のために、農工大クローンの培養上清原液に、DMSO に溶解した抗原ペプチド 1 (NO.8) と抗原ペプチド 2 (NO.6) の 2 種類を十分量である 25µM となるように添加し、4℃で 1 時間反応させた。コントロール群は同量の DMSO を添加した。

フローサイトメトリーは、以下の条件で実施した。

フローサイトメーター：Attune Nxt Flow Cytometer、サーモフィッシャー製

励起波長：	440/50 nm
測定波長：	530/30 nm
測定細胞数：	10,000 個

「結果」



上図のように、イヌ CD105 発現 CHO 細胞及びイヌ MSC 細胞に対して、クローン「1A8」と「2A11」は CD105 への特異的な交差は認められなかった。

【試験名】

再生医療等製品の安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法の確立

【実施担当者所属・氏名】

東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター教授 水谷哲也

研究協力： 感染症センター 坂口翔一

感染症センター 布村由香

株式会社ケーナインラボ代表取締役 山口智宏

【試験の目的】

他家または自己由来の血液や組織を原料として製造する再生医療等製品は、原料からの病原体の混入を防ぐことが重要な課題である。再生医療等製品への病原体の混入は、投与された動物の健康を害するものであり、原料となる血液や組織、製造工程での混入、および最終製品での検査は、安全な再生医療等製品を製造、供給する上で必須である。

安全性評価が必要と想定される病原体は、投与された動物あるいは製造作業者に感染した場合、甚大な健康被害を及ぼすと想定されるウイルスや細菌等である。また、想定される数種類の病原体を迅速に網羅的に検出することで、検査の効率化を図る。

平成28年度事業では、再生医療等製品の原料、製造工程及び最終製品において安全性を評価するため、検査を必要とする病原体を第一優先と第二優先として選定し、第一優先の病原体について個々の病原体の遺伝子検査法を確立、それらの病原体の遺伝子を一度に迅速に解析する方法を確立した。さらに、実検体を使った実証試験を実施した。

本年度は、前年度で選定した第二優先の病原体の遺伝子解析法を確立した。さらに、第一優先と第二優先の病原体の絞込みを行い、新しい解析技術として次世代シーケンサーを用いた解析法の確立も検討した。

【試験方法】

再生医療等製品の製造に係るドナー血液または組織の安全性、製造工程での病原体の混入、最終製品の品質および安全性の評価を目的として、次の手順で試験を実施した。

- ① 薬機法および動物の再生医療等製品安全性評価委員会のガイドラインを参考に、前年度に第二優先として選定した病原体（細菌やウイルス）について実施した。
- ② 前年度と同様に、それぞれの病原体の遺伝子解析系を確立した。具体的には、リアルタイム RT-PCR 用のプライマー及び TaqMan プローブをデザイン、さらに、検出感度を検定し、合成 DNA や分離病原微生物を 10 から 100 コピーまで検出できるシステムを確立した。さらにこれらの病原体を同時に網羅的に解析できる検出系を構築した（主に TaqMan のシステムを採用しているのでひとつのチューブもしくはウェルでひとつの病原体を検出するシステムとした）。具体的には、検体処理および抽出方法、遺伝子増幅、検出方法および高感度（10 から 100 コピーまで一度に検出）のシステムを構築、さらに実検体で実証試験を実施した。
- ③ 第一優先と第二優先で選定した病原体について、次世代シーケンサーでの解析法を検討した。具体的には、MinION システムで、Rapid kit (RAD004) および 1D kit (SQK-LSK108) を用いたシーケンス法を評価した。

試験は下記のように分担し実施した。（実施施設および責任者）

①～③：東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター、教授 水谷哲也 研究協力 布村由香、坂口翔一

*当該施設は、動物における病原性のウイルスや細菌などの病原体を遺伝子レベルで最先端技術を駆使して解析する研究を実施しており、遺伝子解析法を確立するための実績は十分である。

②、③：株式会社ケーナインラボ、代表取締役 山口智宏

*当該施設は、動物の遺伝子検査に特化した臨床検査を受託しており、腫瘍、感染症、遺伝病などの遺伝子検査を日常的に実施している。検査検体は全国の動物病院から集まり、実証検査の施設として実績は十分である。

【結果】

1) 第二優先の病原体での網羅的遺伝子検査系の構築

本事業において選定された第二優先グループの9種類の病原体を図1に示した。各病原体について株間で共通のゲノム塩基配列を検索し、プライマーとプローブを設計した。用いたプローブの種類を図1に示した。設計した領域について合成DNAを作成した(図1)。以下、本システムをDemca-PCR (Detection of microbes from canine samples using realtime-PCR) と呼ぶ。

No.	病原体	核酸	リアルタイムPCR				増幅産物サイズ(bp)
			標的遺伝子	参考文献	プライマー	プローブ(FAM)	
1	<i>Coxiella burnetii</i> コクシエラ	細菌 DNA	IS1111	PMID:24725446 PMID:18489780	GATAGCCCGATAAGCATCAAC GCATTCGTATATCCGGCATC	TCATCAAGGCCACCAATGGTGGCCA	86
2	<i>Babesia gibsoni</i> , <i>B. canis</i> バベシア原虫	原虫 DNA	BgRAP-1	PMID:2287854	GCTCTTGCTCATCATCTTTTC GTTCCATGTAGTCAGCGTATC	AATGCGTGTACTGTACTCCCAA	143
3	<i>Giardia duodenalis</i> ジアルジア	ランブル旗毛虫 DNA	8種の遺伝子型のうち、A, Bはヒトと犬に、C,Dは犬に感染する。これら4つを一度に検出できるプライマー&プローブセットが報告されているが(SSU-rRNA)、この領域はGC含量が非常に高いためテンプレートDNAの合成が難しく、検出に用いることができなかった。そこで不活化シストの核酸を抽出して用いたが、Demca-PCRの反応条件では増幅できなかった。また、他の遺伝子領域ではそれぞれの遺伝子型について検出するセットを複数用意しなければならず、いったん検出は保留とした。				
4a	<i>Mycoplasma haemocanis</i> ヘモプラズマ	細菌 DNA	16S rRNA	PMID:18646827 (医薬部所あり)	GTGCTACAATGGCGAACACA TCCTATCCGAACTGAGACGAA	TGTGTTGCAAAACCAGCGATGGT	80
4b	<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> ヘモプラズマ				GGAGAATAGCAATCCGAAAGG GCATTTACCRACCAACAAC	CTTCGGGAGCCCCGCGC	129
5	<i>Propionibacterium acnes</i> アクネ菌	細菌 DNA	16S rRNA	PMID:24031649	GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA TTCCGACGCGATCAACCA	AGCGTTGCCGGATTATTGGGCG	131
6	<i>Toxoplasma gondii</i> トキソプラズマ	原虫 DNA	P30	Dembo-PCR 共通 発表済み	GCCTCATGGCTGTCATAAA GTCATTGTAGGGGCTCTCC	AGCACTCTGGCTGTCAAGTTGT	98
7	<i>Neospora caninum</i> ネオスポラ	原虫 DNA	NC5		GGGATACGTGTTTGTGGTTAG CACAGAACACTGAACTCTCGATAAG	TCACGTTGAAATCAGCCTGCGTCA	103
8	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> 毒素原性大腸菌	細菌 DNA	K99		GCTATTAGTGGTCATGGCACTGTAG TTTGTGGTCTAGGCGAGTCATTA	ATTTTAAACTAAAACCAGCCCGCGCA	80
9	<i>Listeria monocytogenes</i> リステリア	細菌 DNA	iap		CATGGCACCCAGCATCT ATCCGCGTGTCTTTTCGA	CGCCTGCAAGTCTAAGACGCCA	64

図1. 第2優先グループのDemca-PCRシステム

続いて、各病原体の合成DNAについて検量線を作成し、性能を検定した。

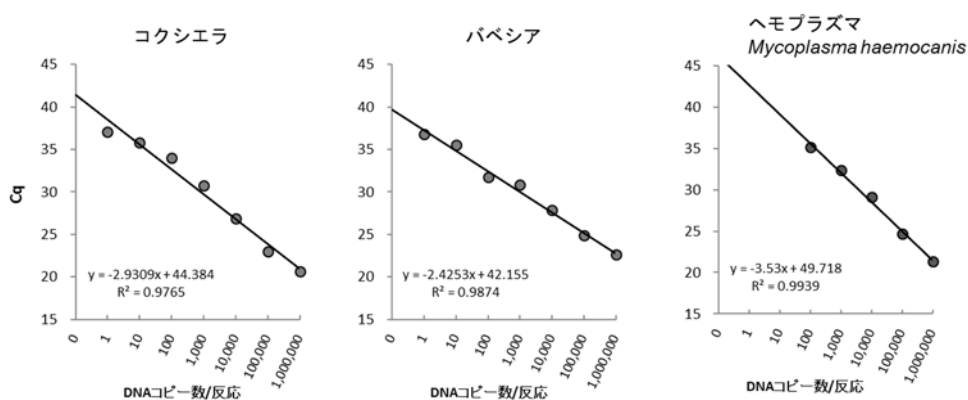


図2-1. 合成DNAを用いた検量線

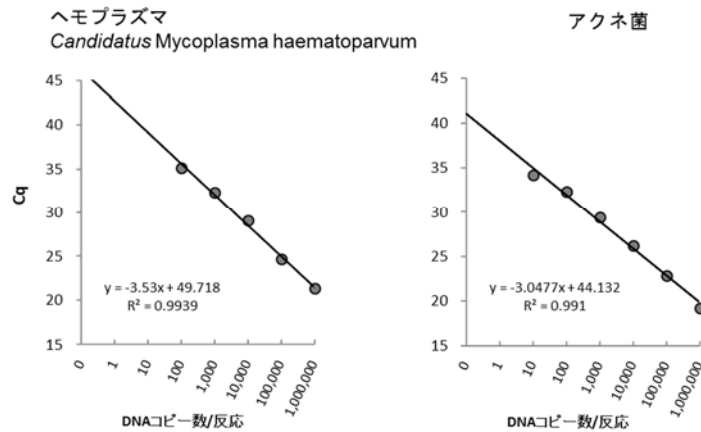


図 2-2. 合成 DNA を用いた検量線（続き）

その結果、各病原体において 1～100 コピーでの検出が可能であった（図 2-1、2-2）。

最後に、生体材料（血液、皮膚、など）に各種病原体の合成 DNA を添加したスパイク試験を実施、性能を検証した。その結果、各病原体において 1～1,000 コピーの感度で検出が可能であった。（図 3）

No.	病原体	スパイクテスト材料	検出感度 (合成DNAコピー数/反応)			
			1000	100	10	1
1	コクシエラ	血液	↔			
2	バベシア原虫	血液	↔			
4a	ヘモプラズマ <i>Mycoplasma haemocanis</i>	血液	↔			
4b	ヘモプラズマ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>	血液	↔			
5	アクネ菌	皮膚・血液	↔ 注1			

注1) 血液、皮膚由来のDNA液のみのCq値:33～35

図 3. 合成 DNA を用いたスパイク試験の結果

2) 第一優先・第二優先で選定した病原体の次世代シーケンサーでの解析法の検討 — ナノポア DNA シーケンサー「MinION」を用いた解析法 —



図4 MinIONのフローセル（上）と本体（下）

MinIONの特徴：MinIONは、物理的にロングリードを取得する解析技術であるOxford社のNanopore技術による小型のシーケンサーである。MinIONは、1フローセルで10kb以上の配列を10万本以上取得できるとされる。配列精度は約90%であり、エラーは塩基の欠損であることが多い（試薬は頻繁にバージョンアップしており、スペックは向上している）。ライブラリ作成は2～3時間で終了し、1回のランは48時間である。また、他のゲノム解析技術と異なり、大型の専用機器を必要とせず、1個500米ドル程度のフローセルを専用アダプターに装着し、USBケーブルでパーソナルコンピュータに接続することでゲノム配列を解析できる。そのため高額な設備投資の必要がないという利点がある。MinIONは、ゲノムDNAの解析だけでなく、ターゲット領域のSNPやSV検出を目的としたPCR増幅産物の配列解析、あるいは病原菌の検出を目的としたLAMP増幅産物の配列解析にも用いられている。持ち運びができるため、例えばマラリアが頻発する発展途上国において現地でサンプルを収集し、マラリア感染の検査を行うことも可能である。また、遺伝子発現解析や変異検出にも利用されている。

対象とする病原体の選定とアンプリコン：対象とした病原体は昨年度の第一優先および本年度の第二優先で選択した病原体の計 28 種類（図 5）で、これらの病原体のアンプリコンを調製した。各病原体のアンプリコンの電気泳動像は図 6 のようになった。

No.	病原体	size (bp)	conc. (ng/μl)
1	Rabies virus	362	9.82
2	Canine distemper virus	426	35.40
3	Canine parvovirus	460	40.20
4	Canine adenovirus type 1	454	21.20
5	Canine adenovirus type 2	445	21.80
6	Canine parainfluenza virus	378	19.30
7	Canine herpesvirus 1	354	9.18
8	Canine coronavirus	457	23.40
9	Canine oral papillomavirus	454	6.82
10	Leptospira	445	8.80
11	Brucella canis	332	26.40
12	Borrelia	311	8.46
13	Campylobacter jejuni	372	13.20
14	Salmonella (Pan-Sal-InvA)	391	16.80
15	Bordetella bronchiseptica	240	15.40
16	Pasteurella multocida	406	9.76
17	Mycobacterium tuberculosis (IS6110)	364	9.28
18	Mycobacterium tuberculosis 16S ribosomal RNA	221	10.30
19	Coxiella burnetii	442	7.34
20	Babesia gibsoni	478	6.00
21	Giardia intestinalis	516	5.96
22	Mycoplasma haemocanis	467	10.10
23	Candidatus Mycoplasma haematoparvum (CMhp)	420	2.18
24	Propionibacterium acnes	469	11.30
25	Toxoplasma gondii	416	14.70
26	Neospora caninum	406	12.20
27	enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)	430	1.63
28	Listeria monocytogenes	463	21.00

図 5. 対象とする病原体

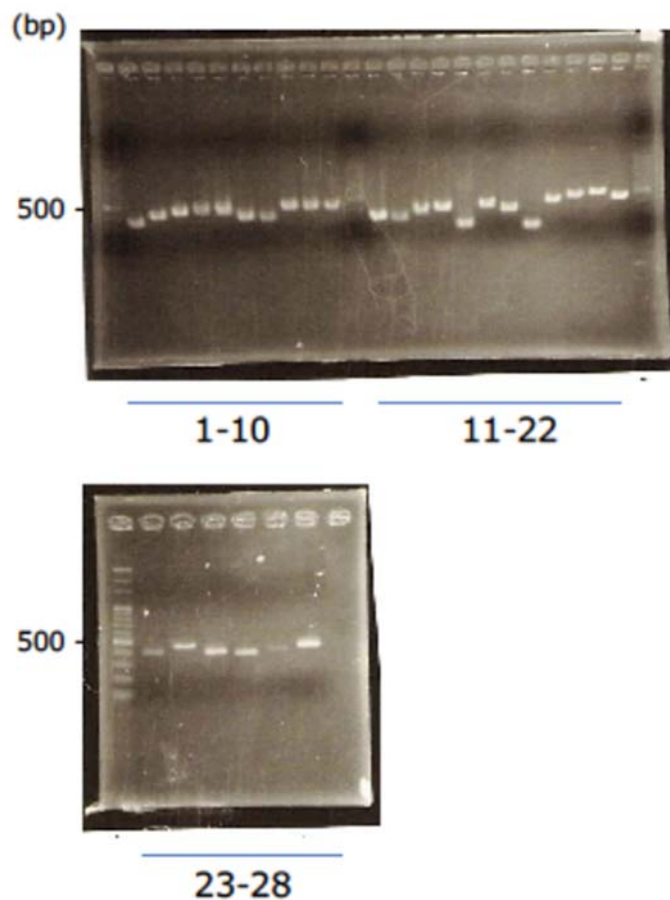


図6 アンプリコンの電気泳動像

Rapid kit (SQK-RAD004)を用いたライブラリ調製とシーケンス解析： まず、全てのアンプリコンを 5 μ L ずつ全て混合して1つのプールにし、濃度を測定したところ、19.1 μ g/ μ L であった。続いて、プールしたアンプリコンを 7.5 μ L (143.25 μ g) 使用し、Rapid Sequencing Kit (SQK-RAD004)のプロトコルに従ってライブラリを調製した。その後、MinION シーケンサーにライブラリを入れ、48 時間シーケンス解析を行った。

その結果、Pass 1,364 リード、Fail 27,857 リード、Total 29,221 リードであり、通常の MinION シーケンスと比べて Fail がかなり多く、原因として、短いアンプリコンサイズが考えられた。アンプリコンサイズが小さいため、正しくシーケンスされていても、Fail と判定されたリードもあると考えられる。

No.	病原体	size (bp)	conc. (ng/μl)	濃度比 (%)	hit* (%)	備考
1	Rabies virus	362	9.82	2.47	0.00	検出されず
2	Canine distemper virus	426	35.40	8.90	2.67	
3	Canine parvovirus	460	40.20	10.10	4.58	
4	Canine adenovirus type 1	454	21.20	5.33	3.05	
5	Canine adenovirus type 2	445	21.80	5.48	5.34	
6	Canine parainfluenza virus	378	19.30	4.85	0.00	検出されず
7	Canine herpesvirus 1	354	9.18	2.31	0.38	
8	Canine coronavirus	457	23.40	5.88	1.15	
9	Canine oral papillomavirus	454	6.82	1.71	0.38	
10	Leptospira	445	8.80	2.21	0.38	
11	Brucella canis	332	26.40	6.63	6.49	
12	Borrelia	311	8.46	2.13	0.00	検出されず
13	Campylobacter jejuni	372	13.20	3.32	6.11	
14	Salmonella (Pan-Sal-InvA)	391	16.80	4.22	13.74	
15	Bordetella bronchiseptica	240	15.40	3.87	9.54	
16	Pasteurella multocida	406	9.76	2.45	0.76	
17	Mycobacterium tuberculosis (IS6110)	364	9.28	2.33	0.00	検出されず
18	Mycobacterium tuberculosis 16S ribosomal RNA	221	10.30	2.59	2.29	
19	Coxiella burnetii	442	7.34	1.84	17.94	
20	Babesia gibsoni	478	6.00	1.51	1.15	
21	Giardia intestinalis	516	5.96	1.50	1.53	
22	Mycoplasma haemocanis	467	10.10	2.54	2.29	
23	Candidatus Mycoplasma haematoparvum (CMhp)	420	2.18	0.55	2.29	
24	Propionibacterium acnes	469	11.30	2.84	1.91	
25	Toxoplasma gondii	416	14.70	3.69	0.38	
26	Neospora caninum	406	12.20	3.07	13.36	
27	enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)	430	1.63	0.41	0.00	他のE.coliにはhitする
28	Listeria monocytogenes	463	21.00	5.28	2.29	

* hitの重複は考慮せず。

図 7. それぞれの病原体に対する BLAST 結果

この結果をもとに、全て (Pass と Fail) のリードをまとめて、tantan (核酸及びアミノ酸配列から、機能が未知のリピート配列を検出するツール。2つの配列間でホモロジー領域を探す場合に、間違っただけの予測を防ぐことを目的にする) でシンプルリピートをマスクし、それぞれの病原体の配列に対して BLAST 解析を行った (図 7)。その結果、28種類の病原体での対象配列のうち 23種で配列の塩基配列を解読することができたが、5種で配列が解読できなかった。また、病原体間の検出リード数の割合が理論値と異なっており、一部の病原体にヒットが集中した (図 8)。

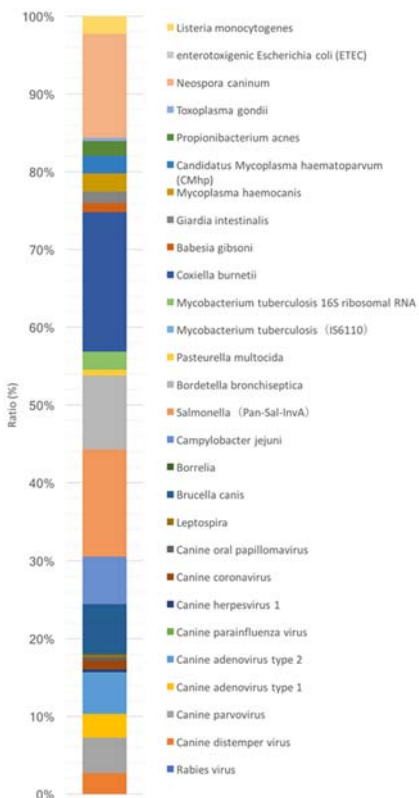


図 8. 検出された病原体の割合

今回の結果から、500 bp に満たない短いアンプレリコンの検出も可能であり、既存の PCR プライマーを用い、PCR と MinION シーケンサーを組み合わせることで、従来法と比べてより正確かつ詳細な配列解析ができる可能性が示された。また、シーケンス解析にかかる総時間は 48 時間だが、MinION シーケンサーはリアルタイムで

配列を書き出すため迅速な配列解析が可能であり、多種類の病原体の網羅的解析には有用な解析法であることが示唆された。

一方、検出量のばらつき、および一部病原体が検出できなかった理由として、今回用いた対象配列が短すぎたため MinION シークエンサーでの解析に適した長さに足りなかった可能性が考えられた。改善策として、ライブラリ調整キットを変更することも考えられるため、続いて Rapid Sequencing Kit (SQK-RAD004) を用いてライブラリを調製し同様に解析した。

具体的には、前の解析と同様に全てのアンプリコンを 5 μ L ずつ全て混合して 1 つのプールし濃度を 19.1 μ g/ μ L に調製した後、混合したアンプリコンを 45 μ L(859.5 μ g) 使用し、Ligation Sequencing Kit 1D (SQK-LSK108)のプロトコルに従ってライブラリを調製した。調製したライブラリを MinION シークエンサーに入れ、9 時間シークエンス解析を行った。

その結果、Pass 103,070 リード、Fail 33,492 リード、Total 136,562 リードであり、先の Rapid kit を用いたシークエンスに比べ、短時間で良好な解析結果が得られた。

Pass したリードをまとめて、tantan でシンプルリピートをマスクし、Primer デザインの際のリファレンス配列に対して BLAST 解析を行った。

その結果、28 種類の対象配列全てを検出し、配列の塩基配列を解読することができた (図 9)。また、用いた DNA の濃度 (図 9 内の右側) と hit (図 9 内の左側) にある程度の相関がみられた (DNA 濃度が濃いと検出されやすく、薄い

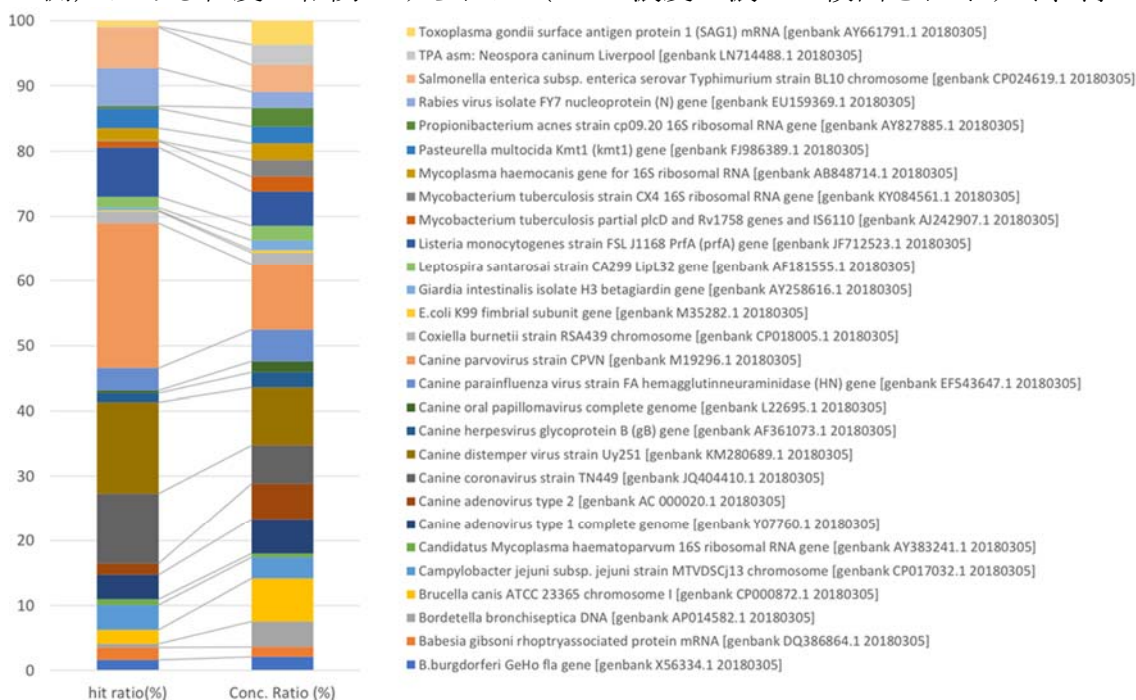


図 9. 検出された病原体の割合

とされにくい)。以上のことから、アンプリコンが短い時は、**Ligation Sequencing Kit 1D** のキットを使用することで良好な結果が得られ、より短時間のシーケンスでも同様の結果が期待できることが示唆された。

【まとめ】

本事業では、平成 28 年度本事業に続いて、犬に感染する 9 種類の病原微生物（ウイルス、細菌）について、リアルタイム PCR 法を用いた網羅的迅速遺伝子検査法を確立した。また、前年度と合わせて 28 種類の病原体について、第 3 世代の次世代シーケンサーである **MinION** シーケンサーを用いた解析法も合わせて評価し、複数の病原体を短時間で解析できる方法も確立した。

両方法とも、それぞれ長所と短所があり、リアルタイム PCR 法では簡便で短時間で結果が得られる反面、プライマーとプローブのセットで決められた以外の変異した病原体などは検出できない。一方、**MinION** シーケンサーでは、コンベンショナル PCR なので変異した病原体検出にもある程度対応でき、さらに塩基配列まで確かめられるので解析結果の信頼性が高くなるが、反面 PCR（増幅）と次世代シーケンサー（シーケンシング）の 2 段階なので操作が 2 段階で時間もある程度必要となる（今回は 9 時間で解析可能）。どちらの方法が適しているかについては、検出する病原体の種類や数、特長によって選択は可能であり、また品質管理におけるの適正も見極める必要がある。

一方、今回は再生医療等製品となる脂肪由来幹細胞など実検体を用いての解析が出来なかった。本検査法を製造または品質管理の現場に導入する場合には、実検体を用いた実証試験が必要であり、今後の課題である。