

學術研究報告編

[技術資料]

動物医薬品検査所標準製剤等配布規程に基づき配布する抗豚熱ウイルス GPE⁻モノクローナル抗体のリコンビナント抗体の作製の検討

木田萌子、山下麻依子、落合絢子、榊基¹、曳地七星¹、山崎雅人、一戸夏美、野口真由子、山本欣也

(令和6年9月3日受付、令和6年10月30日受理)

[TECHNICAL REPORT]

Preparation of recombinant anti-classical swine fever virus GPE⁻ monoclonal antibody according to the National Veterinary Assay Laboratory regulation for the distribution of standard products

Moeko KIDA, Maiko YAMASHITA, Mariko OCHIAI, Hajime SAKAKI, Nanase HIKICHI,
Masato YAMAZAKI, Natsumi Ichinohe, Mayuko NOGUUCHI, Kinya YAMAMOTO

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-15-1

Tokura, Kokubunji-shi, Tokyo 185-8511, Japan

(Received: 3rd Sep 2024, Accepted: 30th Oct 2024)

Abstract

The monoclonal antibody 3D11 (3D11 MAb), which is reactive with the classical swine fever virus (CSFV) strain GPE⁻ is used as part of the indirect immunoperoxidase (IIP) method for virus content testing of classical swine fever (CSF) live vaccines. In this study, we investigated whether the recombinant monoclonal antibody 3D11 (recombinant 3D11 MAb) could be used for the IIP method instead of 3D11 MAb. The gene analysis of 3D11 MAb and recombinant 3D11 MAb preparation were outsourced. The potency of the recombinant 3D11 MAb (Lot. cAb8588-1.1) to detect cells infected with the CSFV strain GPE⁻ decreased progressively from x8,000 dilution, although it remained detectable at x64,000 dilution. Dilutions up to x24,000 did not affect the IIP method-based virus content test results, and the absorbency of the infected cells with CSFV diluted from 10⁻¹ to 10⁻³ decreased as the recombinant 3D11 MAb dilution decreased from x8,000 to x64,000. Therefore, we suggest that the recombinant 3D11 MAb could be used for the virus content testing of CSF live vaccines such as 3D11 MAb (Lot. 2021.09.30).

要旨

抗豚熱ウイルス GPE⁻モノクローナル抗体 (3D11 抗体) は、豚熱ウイルス GPE⁻株に反応し、豚熱生ワクチンのウイルス含有量試験の間接イムノペルオキシダーゼ法 (IIP 法) に使用する。今回、3D11 抗体の代替品として、リコンビナントモノクローナル抗体 (リコンビナント 3D11 抗体) が IIP 法に使用可能かを検討した。3D11 抗体の遺伝子解析及びリコンビナント 3D11 抗体の作製は外部委託した。作製したリコンビナント 3D11 抗体 (Lot. cAb8588-1.1) は 2,000 ~ 64,000 倍希釈まで豚熱ウイルス

¹ 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

Animal Products Safety Division, Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

GPE⁻株感染細胞を検出できたが、8,000倍希釈からは徐々に結合する抗体量が減少した。24,000倍希釈まではIIP法によるウイルス含有量試験に影響を与えなかった。また、本リコンビナント3D11抗体の8,000倍～64,000倍希釈において、ウイルス感染細胞の吸光度値は、ウイルスの希釈倍率に相関して低下した。これらの成績から、今回作製したリコンビナント3D11抗体は3D11抗体（Lot. 2021.09.30）と同等の性状を示し、この代替として豚熱生ワクチンのウイルス含有量試験に使用可能であることが示唆された。

緒言

動物医薬品検査所では動物医薬品検査所標準製剤等配布規程（昭和45年農林省告示第637号）に基づき、動物用医薬品の品質検査の精度管理等のために使用する標準製剤等を確保し、動物用医薬品メーカー等に配布している。抗豚熱ウイルスGPE⁻モノクローナル抗体は、動物用生物学的製剤基準（平成14年農林水産省告示第1567号。動生剤基準）の医薬品各条ワクチン（シードロット製剤）の部の豚熱生ワクチン（シード）のウイルス含有量試験（間接免疫ペルオキシダーゼ（IIP）法）に用いる標準製剤等の一つである。モノクローナル抗体を用いたIIP法は陣山ら（1993）によって確立された。IIP法に用いるモノクローナル抗体は、筒井ら（1994）がGPE⁻株の親株である豚熱ウイルスALD株を抗原として作出した抗豚熱ウイルスGPE⁻モノクローナル抗体（3D11抗体）を配布している。

豚熱生ワクチンは平成18年3月に接種が完全中止となり、備蓄用ワクチンとして年間1ロット程度が製造されるのみとなった。そのため、豚熱生ワクチン製造メーカーにおける品質管理及び検定に使用される3D11抗体は、平成18年から配布している3D11抗体ロット（Lot. 2006.03.30）（青木ら2006）から更新されていない。しかし、平成30年9月に我が国で26年ぶりに豚熱が発生したことにより、令和元年10月より豚熱生ワクチンの接種が開始され、年間の豚熱生ワクチン製造ロット数が増加した。このような状況を受け、当所における3D11抗体の調製技術を維持し、豚熱生ワクチン製造メーカーへ3D11抗体の安定供給を図るため、新たにロット（Lot. 2021.09.30）を調製した（木田ら2023）。

3D11抗体は、ハイブリドーマ細胞をマウスに接種し、腹水を採取することで作製し、配布しているが、保管する冷凍機器の故障といった事故等によりハイブリドーマ細胞が死滅してしまった場合、作製及び配布が不可能となる。また、動物福祉の観点から、実験動物の使用を削減するためにも、代替となり得る作製方法を検討する必要がある。リコンビナント抗体は、抗体の遺伝子を発現ベクターの使用により宿主細胞へ導入することで産生される抗体である。この方法では実験動物を使用することなく抗体を産生でき、近年急速に普及が進んでいる。そこで、今回3D11抗体のリコンビナントモノクローナル抗体（リコンビナント3D11抗体）を作製し、IIP法に使用可能であるか検討したので、その成績について報告する。

材料及び方法

1. ハイブリドーマ細胞の遺伝子解析及びリコンビナント3D11抗体の作製

-80℃で保存していた抗体産生ハイブリドーマ細胞（3D11抗体産生ハイブリドーマ細胞）（筒井ら1994）を、青木らの方法（2006）を参考にして、牛ウイルス性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性の牛胎児血清（株式会社ジャパン・バイオシーラム）を10%添加したS-Clone SF-O3培地（Iwai North America Inc.）で培養し、増殖した細胞数の上限を 1.5×10^6 cells/mLとして2～3日間隔で $1.5 \sim 3.0 \times 10^5$ cells/mLとなるように希釈して継代した。増殖した3D11抗体産生ハイブリドーマ細胞を 1.0×10^6 cells/mL以上となるようにRNA保存液に溶解し、funakoshi株式会社に送付し、Absolute Antibody株式会社に3D11抗体の遺伝子解析（ハイブリドーマからの抗体可変領域cDNAのシーケンシング

受託サービス <https://www.funakoshi.co.jp/contents/64307>) 及びリコンビナント 3D11 抗体の作製 (HEXpress 組換え抗体発現受託サービス <https://www.funakoshi.co.jp/contents/67292>) を依頼した。得られた 3D11 抗体の遺伝子情報から遺伝子合成を実施し、発現ベクターへのクローニング、それを HEK293 細胞にトランスフェクトすることで発現、さらに精製し、リコンビナント 3D11 抗体 (Lot. cAb8588-1.1) が作製された。この方法ではアルブミンやウシ IgG が混入せず、動物成分が含まれないため、高品質な抗体が得られるとされている。

2. リコンビナント 3D11 抗体の豚熱ウイルス GPE⁻株抗原検出限界

作製したリコンビナント 3D11 抗体について、IIP 法による豚熱ウイルス GPE⁻株検出限界を評価した。IIP 法に用いるスクリーニング用抗原プレートは以下のように作製した。抗原には 3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) を使用した IIP 法で $10^{3.1}$ TCID₅₀/mL を示した豚熱ウイルス GPE⁻株を 10 倍希釈して用いた。PK15 細胞は細胞増殖用培養液 (0.295% Tryptose Phosphate Broth (TPB) (Difco Laboratories) を含有するイーグル MEM 培地「ニッスイ」(日水製薬株式会社) に、10% 牛ウイルス性下痢ウイルス中和抗体陰性牛胎子血清 (株式会社ジャパン・バイオシーラム)、0.105% 炭酸水素ナトリウム、0.002mol/L L-グルタミン、100 単位/mL 結晶ペニシリン G カリウム、0.1mg/mL 硫酸ストレプトマイシンを含むもの) で 1.0×10^6 cells/mL に調整して用いた。96 穴プレート (住友ベークライト株式会社、MS-8096F) の 1 穴につき、豚熱ウイルス GPE⁻株 0.1mL と PK15 細胞 0.1mL を同時接種して抗原陽性穴とした。抗原陰性穴には、細胞増殖用培養液 0.1mL と PK15 細胞 0.1mL を接種した。37°C、5%CO₂ 下で 6 日間培養後、プレートを PBS(+) で洗浄し、-30°C に冷却した 80vol% アセトン加 PBS(+) (アセトン (富士フイルム和光純薬株式会社)) で固定した。

リコンビナント 3D11 抗体を 1.0w/v% 牛血清アルブミン (BSA) 加ハンクス液 (ハンクス液「ニッスイ」(1) (日水製薬株式会社) に、1.0w/v% BSA・フラクシオン V pH7.0 (和光純薬工業株式会社)、0.105w/v% 炭酸水素ナトリウムを含むもの) で 2,000 倍から 64,000 倍まで希釈し、希釈毎の試料を抗原プレートの抗原陽性穴 5 穴と抗原陰性穴 5 穴に 0.05mL ずつ加えた。37°C で 60 分間反応後、PBS(+) で洗浄し 0.55w/v% BSA 加ハンクス液 (1.0w/v% BSA 加ハンクス液の BSA 濃度を 0.55w/v% に減じたもの) で希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスヤギ免疫グロブリン (CAPPEL#55563) を全ての穴に 0.05mL ずつ加え、37°C で 60 分間反応させた。PBS(+) で洗浄後、基質液 (0.2mol/L リン酸-0.1mol/L クエン酸緩衝液 (pH5.0) 20mL に *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩 (Sigma-aldrich, Merck) 10mg 及び過酸化水素水 (富士フイルム和光純薬株式会社) 0.004mL を加えたもの) を 0.1mL 加え、遮光して室温で 30 分反応させ、2.5mol/L 硫酸 0.05mL を加えて反応を停止させた。492nm 及び 630nm で吸光度を測定し、492nm の吸光度から 630nm の吸光度を減じた値を算出し吸光度値とした。以下本稿における IIP 法は、特に記載がない条件についてはこの方法に従った。動生剤基準のウイルス含有量試験において、豚熱ウイルス GPE⁻株陽性の判定は抗原陽性穴の吸光度値が抗原陰性穴の平均吸光度値の 2 倍以上の吸光度値を示すことが条件であるため、抗原陽性穴の平均吸光度値が抗原陰性穴の平均吸光度値の 2 倍より大きい値となった場合、その希釈倍率において、リコンビナント 3D11 抗体は豚熱ウイルス GPE⁻株を検出可能であると判断した。

3. リコンビナント 3D11 抗体の特異性

リコンビナント 3D11 抗体の特異性を確認するため、豚熱ウイルス GPE⁻株、日本脳炎ウイルス、豚パルボウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス、オーエスキー病ウイルス、豚流行性下痢ウイルス、豚繁殖・呼吸器障害症候群ウイルス、豚口ウイルス、豚サーコウイルス 1 型、豚サーコウイルス 2 型及び豚サ

イトメガロウイルスの感染細胞を用いて、1,500倍希釈したリコンビナント 3D11 抗体を一次抗体とし、二次抗体に Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG(H+L)抗体 (invitrogen, A11001) を使用した間接蛍光抗体法 (IFA 法) を実施した。

4. リコンビナント 3D11 抗体を用いた豚熱ウイルス GPE⁻株ウイルス含有量試験

リコンビナント 3D11 抗体が豚熱ウイルス GPE⁻株抗原を検出できる希釈の範囲内について、動生剤基準の豚熱生ワクチン (シード) のウイルス含有量試験に準じた IIP 法を実施し、リコンビナント 3D11 抗体の各希釈におけるウイルス含有量の結果を比較した。試験結果については一元配置分散分析及び Tukey 法による多重比較検定を用いて統計解析を行った。ウイルスは 3D11 抗体 (Lot. 2006.03.30) を使用した IIP 法で $10^{3.1}$ TCID₅₀/mL を示した豚熱ウイルス GPE⁻株を用いた。

実験成績

1. 3D11 抗体の遺伝子情報及びリコンビナント 3D11 抗体

3D11 抗体産生ハイブリドーマ細胞の遺伝子解析から得られた 3D11 抗体の遺伝子情報を Fig.1 に示した。得られた 3D11 抗体の重鎖及び軽鎖の定常領域の遺伝子配列に基づき、3D11 抗体のサブクラスは、陣山ら (1993) の報告と同じく IgG1(κ)であることが同定された。作製されたりコンビナント 3D11 抗体は IgG 量を 1mg/mL に調整されていた。

2. リコンビナント 3D11 抗体の豚熱ウイルス GPE⁻株抗原検出限界

豚熱ウイルス GPE⁻株陽性の判定は抗原陽性穴の吸光度値が抗原陰性穴の平均吸光度値の 2 倍以上の

1. Heavy chain

Signal peptide of heavy chain (57bp)

ATG GGA TGG AGC TGG ATC TCT CTC TTT CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGT GTC CTC TCT

Variabe region of heavy chain (360bp)

GAG GTC CAG CTG CAA CAG TCT GGA CCT GAG TTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AGG GCT TCT GGT TAC TCA TTC ACT GGC TAC TAC ATG CAC TGG GTG AAA CAA AGC CAT GTA AAG AGC CTT GAG TGG ATT GGA CGT ATT AAT CCT TAT GAT GGT GCT ATT TAC GAC AAC CAG AAT TTC AAG GAC AAG GCC AGC TTG ACT GTA GAT AAG TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTC CAC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT TCA ATC TAT TAC TGT GTA AGA AGC GGG GGT ATT AGG ATG CGT TCT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA

Constant region of heavy chain (972bp)

GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGA TCT GCT GCC CAA ACT AAC TCC ATG GTG ACC CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC TAT TTC CCT GAG CCA GTG ACA GTG ACC TGG AAC TCT GGA TCC CTG TCC AGC GGT GTG CAC ACC TTC CCA GCT GTC CTG CAG TCT GAC CTC TAC ACT CTG AGC AGC TCA GTG ACT GTC CCC TCC AGC ACC TGG CCC AGC GAG ACC GTC ACC TGC AAC GTT GCC CAC CCG GCC AGC AGC ACC AAG GTG GAC AAG AAA ATT GTG CCC AGG GAT TGT GGT TGT AAG CCT TGC ATA TGT ACA GTC CCA GAA GTA TCA TCT GTC TTC ATC TTC CCC CCA AAG CCC AAG GAT GTG CTC ACC ATT ACT CTG ACT CCT AAG GTC ACG TGT GTT GTG GTA GAC ATC AGC AAG GAT GAT CCC GAG GTC CAG TTC AGC TGG TTT GTA GAT GAT GTG GAG GTG CAC ACA GCT CAG ACG CAA CCC CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACT TTC CGC TCA GTC AGT GAA CTT CCC ATC ATG CAC CAG GAC TGG CTC AAT GGC AAG GAG TTC AAA TGC AGG GTC AAC AGT GCA GCT TTC CCT GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA ACC AAA GGC AGA CCG AAG GCT CCA CAG GTG TAC ACC ATT CCA CCT CCC AAG GAG CAG ATG GCC AAG GAT AAA GTC AGT CTG ACC TGC ATG ATA ACA GAC TTC TTC CCT GAA GAC ATT ACT GTG GAG TGG CAG TGG AAT GGG CAG CCA GCG GAG AAC TAC AAG AAC ACT CAG CCC ATC ATG GAC ACA GAT GGC TCT TAC TTC GTC TAC AGC AAG CTC AAT GTG CAG AAG AGC AAC TGG GAG GCA GGA AAT ACT TTC ACC TGC TCT GTG TTA CAT GAG GGC CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG AAG AGC CTC TCC CAC TCT CCT GGT AAA

2. Light chain

Signal peptide of light chain (57bp)

ATG AGT CCT GCC CAG TTC CTG TTT CTG TTA GTG CTC TGG ATT CGG GAA ACC AAC GGT

Variabe region of light chain (336bp)

GAT GTT GTG ATG ACC CAG ACT CCA CTC ACT TTG TCG GTT ACC ATT GGA CAG CCA GCC TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA GAT AGT GAT GGA AAG ACA TAT TTG AAT TGG TTC TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC AAT CTG GTG TCT AGA CTG GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTG AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA ATT TAT TAT TGC TGG CAA GGT ACA CAT TTT CCT CAG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA

Constant region of light chain (321bp)

CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT GAG CAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC TTC TTG AAC AAC TTC TAC CCC AAA GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT GAT GGC AGT GAA CGA CAA AAT GGC GTC CTG AAC AGT TGG ACT GAT CAG GAC AGC AAA GAC AGC ACC TAC AGC ATG AGC AGC ACC CTC ACG TTG ACC AAG GAC GAG TAT GAA CGA CAT AAC AGC TAT ACC TGT GAG GCC ACT CAC AAG ACA TCA ACT TCA CCC ATT GTC AAG AGC TTC AAC AGG AAT GAG TGT

Fig. 1 DNA sequences of 3D11 MAb.

Total mRNA was extracted from 3D11 hybridoma and single stranded cDNA was synthesized. Sequencing data was obtained by NGS (Next Generation Sequencing).

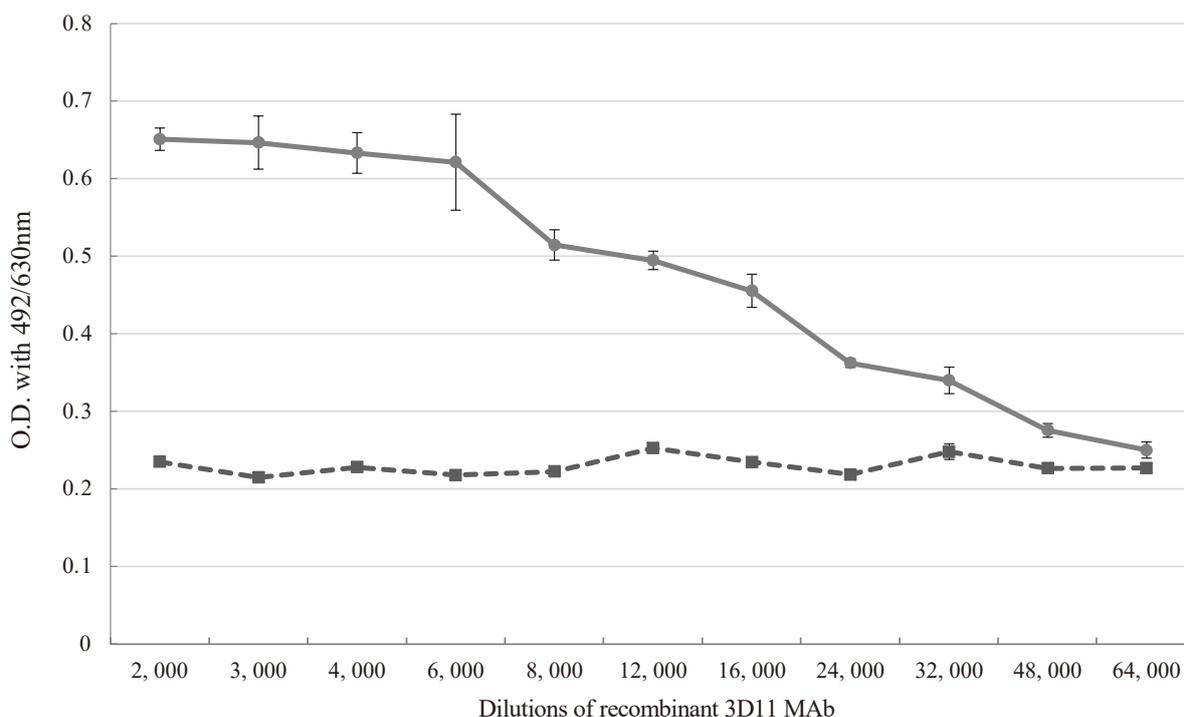


Fig. 2 Assessment of Mab titer in recombinant 3D11 MAb (Lot. cAb8588-1.1) using the IIP assay. Absorbance values of recombinant 3D11 MAb diluted from x2, 000 to x64, 000 were plotted. The solid line represents the absorbance of PK15 cells infected with CSF virus strain GPE⁻ (mean of 5 wells). The dashed line represents the criterion for the antigen-positive value, which is the double absorbance value of the mock-infected PK15 cells (mean of 5 wells).

吸光度値を示すことが条件であるため、抗原陽性穴の吸光度値及び抗原陰性穴の吸光度値の2倍値のそれぞれの平均値の推移を Fig.2 に示した。抗原陽性穴の吸光度値について、リコンビナント 3D11 抗体の希釈倍率が 2,000 ～ 6,000 倍まででは明らかな吸光度値の低下は見られなかったが、8,000 ～ 64,000 倍までの希釈では相関係数が -0.95 を示し、希釈倍率と吸光度値に負の相関が認められた。すべての希釈において、抗原陰性穴の吸光度値の2倍を超える吸光度値を示したことから、リコンビナント 3D11 抗体は少なくとも 64,000 倍までの希釈で豚熱ウイルス GPE⁻ 株の検出が可能であることが確認できた。

3. リコンビナント 3D11 抗体の特異性

一次抗体にリコンビナント 3D11 抗体を用いた IFA 法の結果、豚熱ウイルス GPE⁻ 株感染細胞では特異的蛍光が認められたが、GPE⁻ 株以外のウイルス感染細胞において特異的蛍光は観察されず、リコンビナント 3D11 抗体は豚熱ウイルス GPE⁻ 株に対して特異的に反応することが確認された。

4. リコンビナント 3D11 抗体を用いた豚熱ウイルス GPE⁻ 株ウイルス含有量試験

リコンビナント 3D11 抗体の各希釈倍率における豚熱ウイルス GPE⁻ 株のウイルス含有量の測定結果を Fig.3 に示した。リコンビナント 3D11 抗体の希釈倍率を 64,000 倍とした際の測定値は、2,000 ～ 4,000 倍、12,000 ～ 24,000 倍希釈での測定値と比較して有意に低い値となった。また、32,000 倍希釈での測定値は、12,000 倍希釈での測定値と比較して有意に低い値となった。以上の成果から、IIP 法においてリコンビナント 3D11 抗体を 24,000 倍までの希釈で使用した場合、ウイルス含有量試験の結果に影響を与えないことが示された。

次に、ウイルスの希釈倍率とリコンビナント 3D11 抗体の希釈倍率の関係について、ウイルス含有量

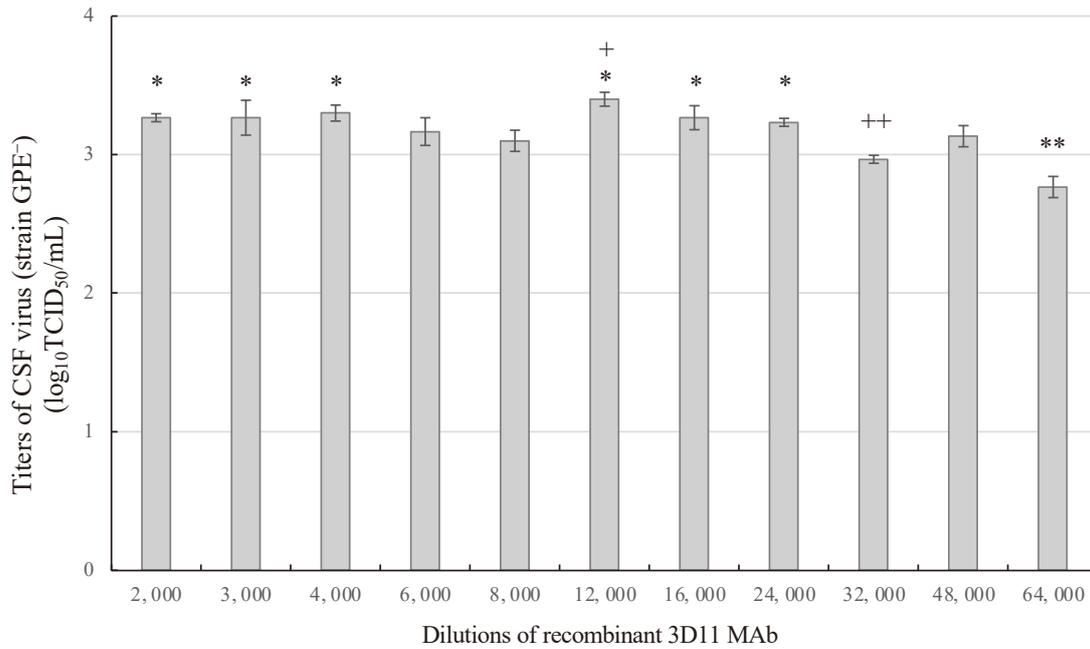


Fig. 3 Assessment of virus content test with recombinant 3D11 MAb.

The titer of the CSF virus strain GPE⁻ stock was determined by using the IIP assay with the recombinant 3D11 MAb at different dilutions. Virus-infected wells were identified by the antigen-positive value criterion (described in Fig.1), and then TCID₅₀ was calculated. The data shows the mean with a standard deviation of the IIP assay, which was carried out three times independently. The titer of CSF virus strain GPE⁻ is 3.1 log₁₀TCID₅₀/mL as determined by the IIP assay using 3D11 MAb (Lot. 2006.03.30). *-**, +---: *p* < 0.05

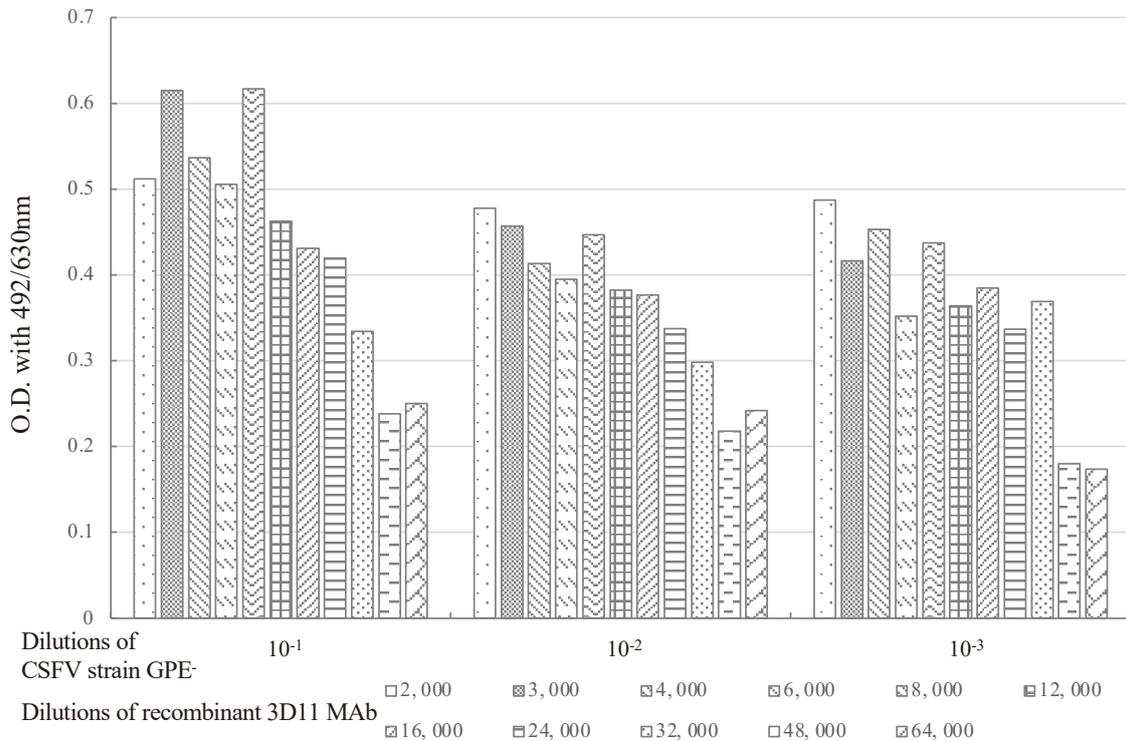


Fig. 4 Relationship of the absorbance value of recombinant 3D11 MAb dilution and PK15 cells infected with various amounts of CSF virus strain GPE⁻.

The absorbance value data was obtained from the assay carried out in Fig.2. The graph shows the mean absorbance value of positive wells in PK15 cells infected with the same amount of the virus. The titer of CSF virus strain GPE⁻ is 3.1 log₁₀TCID₅₀/mL as determined by the IIP assay using 3D11 MAb (Lot. 2006.03.30).

試験で得られた吸光度値を調べた。Fig.4は、各ウイルス希釈倍率において陽性となったウェルの吸光度値について平均値を算出し、リコンビナント 3D11 抗体の希釈倍率の間で比較した結果を示す。ウイルス希釈倍率が $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 及びリコンビナント 3D11 抗体の希釈倍率が8,000～64,000倍までの希釈において、同じウイルス希釈倍率における吸光度値がリコンビナント 3D11 抗体の希釈倍率に相関して低下した。このことから、同じリコンビナント 3D11 抗体の希釈倍率における吸光度値はウイルスの希釈倍率に相関して低下することが示された。

考察

今回作製したリコンビナント 3D11 抗体 (Lot. cAb8588-1.1) は、少なくとも 64,000 倍までの希釈倍率であれば豚熱ウイルス GPE⁻株の検出が可能であり、豚熱ウイルス GPE⁻株に特異的に反応し、また、24,000 倍希釈までの希釈倍率であれば IIP 法による豚熱ウイルス GPE⁻株のウイルス含有量試験の結果に影響を与えないことが確認できた。これらの結果から、3D11 抗体 (Lot. 2021.09.30) と同様の性状が認められたことから、豚熱生ワクチンの含有量試験に 3D11 抗体の代替として使用が可能であると考えられた。現在の 3D11 抗体の作製方法は、培養した 3D11 抗体産生ハイブリドーマ細胞をマウス腹腔内に接種することで抗体を作製しているが、動物へ与える苦痛の軽減や、実験動物の使用削減など、動物実験の実施における課題がある。また、ハイブリドーマ細胞についても、定期的に細胞のメンテナンスが必要な他、保管する冷凍機器の故障などのリスクがあり、管理方法に課題がある。一方、リコンビナント抗体は、抗体の遺伝子情報を得ることができれば作製が可能のため、今回の検討により、これらの課題が解決できる可能性が示唆された。現在リコンビナント抗体の作製は比較的高額であるが、今後より一層普及が進み、安価になれば 3D11 抗体の代替品として、標準製剤等としての実用化が可能になると考えられた。

引用文献

青木博史、関口秀人、小佐々隆志、中村成幸 (2006) 動物医薬品検査所が配布する豚コレラウイルス単クローン抗体の新規ロットの調整. 動物医薬品検査所年報 43, pp. 57-61

陣山真理子、杉山誠、井上剛光、田口邦史、石川清康、齋藤明人、伊藤治、村松昌武 (1993) 単クローン抗体を用いた間接イムノペルオキシダーゼ法による豚コレラワクチンウイルスの定量法. 動物医薬品検査所年報 30, pp. 1-6.

木田萌子、山下麻依子、落合絢子、榊基、曳地七星、山崎雅人、森崎一葉、野口真由子、福田明子、山本欣也 (2023) 動物医薬品検査所標準製剤等配布規程に基づき配布する抗豚熱ウイルス GPE⁻モノクローナル抗体の新規ロットの調製. 動物医薬品検査所年報 60, pp. 103-110

農林省 (1970) 動物医薬品検査所製剤等配布規程. 農林省告示第 637 号. 昭和 45 年 5 月 1 日.

農林水産省 (2002) 動物用生物学的製剤基準. 農林水産省告示第 1567 号. 平成 14 年 10 月 3 日.

筒井真理子、石川清康、齋藤明人、村松昌武、杉山誠、伊藤治、井上剛光、田口邦史 (1994) 豚コレラウイルスに対する単クローン抗体の作製と PK15 細胞を用いた定量への応用. 動物医薬品検査所年報 31, pp. 37-39

[プロジェクト研究終了報告]

リアルタイム PCR 法を応用したマイコプラズマ否定試験法の検討

松本幸子、一色ゆかり、小島明美、小澤真名緒、岩本聖子、能田健¹、永井英貴²

(令和6年9月27日受付、令和7年2月3日受理)

[FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY]

Study on testing mycoplasma contamination detection using applied PCR techniques

Sachiko MATSUMOTO, Yukari ISSIKI, Akemi KOJIMA, Manao OZAWA,
Shoko IWAMOTO, Ken NODA, Hidetaka NAGAI

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-15-1
Tokura, Kokubunji-Shi, Tokyo, 185-8511 Japan*

(Received: 27th Sep 2024, Accepted: 3rd Feb 2025)

Abstract

Testing for the detection of mycoplasma contamination is stipulated in the General Rules in the Minimum Requirements for Veterinary Biological Products. In addition, the formulation of the testing method has been in process to prepare the guidelines based on the International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Veterinary Medicinal Products (VICH). Moreover, the testing method has taken a very important role in ensuring live vaccine quality and safety. Currently, combined preculture in selective liquid medium and identification on agar medium have been adopted for live mycoplasma detection. Since identification on an agar medium is time-consuming, we have been studying a new method that replaces this identification step in the current method with a PCR-based approach. Furthermore, we established a comparison between the new and current methods in various aspects (e.g., specificity, sensitivity, examination length, and labor load). In this study, we used 7 mycoplasma species. In confirming primer specificity, we performed high-resolution melting curve analysis, which demonstrated that the primers were indeed *Mycoplasma* genus-specific. Furthermore, to confirm the quantitative PCR (qPCR)-related detection limit, we described that this method could detect the genus *Mycoplasma* at 10 CFU/0.1 mL, and the correlation between the qPCR and agar plate culture methods could be observed at the DNA amount by qPCR and at the bacterial number by plate culture. In a comparison with the changes in DNA amounts and culture time-associated bacterial numbers, the culture method could not detect *Mycoplasma* contamination after the logarithmic growth phase, whereas qPCR could. We concluded that our new approach could shorten the test period compared to the current method while yielding equivalent specificity and sensitivity. Therefore, qPCR could be introduced as an official test method for mycoplasma contamination detection in Veterinary Biological Products.

¹一般財団法人生物化学安全研究所

Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology

²株式会社ゴトー養殖研究所

Goto Aquaculture Institute, Co., Ltd.

要旨

マイコプラズマ否定試験法は、動物用生物学的製剤基準に一般試験法として定められている。また、動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力（VICH）に基づき作成するガイドラインにおいても当該試験法の策定が進んでおり、生ワクチンの品質及び安全性確保のための試験として極めて重要な位置づけにある試験法である。現行法では、検体又は試験品を液体選択培地で増菌させた後に、平板培地によるコロニーの形態学的同定を組み合わせた方法が採用されている。形態学的同定は判定までに日数がかかることから、我々は、現行法の同定試験工程を定量PCR法（以下「qPCR法」という。）に置き換えた生菌検出法（以下「改良法」という。）を検討し、特異性、感度、試験日数及び労力等の観点から、現行法との比較を行った。本検討では7菌種のマイコプラズマを用い、融解曲線分析によりプライマーがマイコプラズマ属に特異的であること、qPCR法では検出限界が10 CFU/0.1mLであること、qPCR法と寒天平板培地培養法を比較したところqPCR法によるDNA量と平板培地培養法による菌数に相関が認められたこと、DNA量と菌数を経時的に確認したところ、培養法では対数増殖期を過ぎると検出できないのに対してqPCR法では対数増殖期以降も検出が可能であることが確認できた。これらのことから、改良法は現行法と比較して試験日数が短縮でき、同等以上の特異性及び感度を有しており、公定法として採用可能な性能を有すると結論づけられた。

背景

マイコプラズマ否定試験法は、動物用生物学的製剤（以下「動生剤」という。）にマイコプラズマが混入していないことを確認するための試験法であり、動生剤の品質及び安全性を担保する重要な役割を有している。本試験法は、我が国においては動物用生物学的製剤基準（以下「動生剤基準」という。）に一般試験法として規定されており、動生剤の製造工程及び最終製品の試験法として設定されている。現行の動生剤基準では、本試験法に、液体培地による増菌及び寒天平板培地による菌同定の試験工程が採用されている。

現行法は、試験終了までに24日間以上を要するほか、培地中の新鮮酵母抽出液等の品質により培養の成否が影響を受けるため、試験期間の短縮及び労力の削減の観点から改善のための課題が多い。マイコプラズマ否定試験法の対象となる検体等には、生ウイルス、製造資材等のPCR反応に阻害作用を示すおそれがある物質が大量に含まれている。これらの物質からの影響を防ぐために、前培養と定量PCR（以下「qPCR」という。）を組み合わせた改良法が検討され、改良法が特異性、検出感度等の観点において現行法と同等以上であり、培養日数に伴う菌数及びDNA量の変化から生菌の検出が可能であることが確認された（松本ら2007。以下「既検討」という。）。

目的

マイコプラズマ否定試験法の改良を目的とした既検討から既に10年以上が経過し、定量PCRに係る技術が大きく進歩していることから、本検討ではqPCR法の試験条件について精査するとともに、試験条件の見直しの基礎となるデータを収集・蓄積し、改良法が現行法と同等以上の性能を有することを確認する。

研究成果

1. 材料及び方法

1.1 マイコプラズマ株

本研究では7菌種のマイコプラズマ株を供試した (Table 1)。その内、*Mycoplasma fermentans*、*Mycoplasma hyorhinis*、*Mycoplasma orale*、*Mycoplasma synoviae* 及び *Acholeplasma laidlawii* は VICH GL34 作成時に日米欧各極が試験法を確認した際の参照株であり、欧州薬局方委員会 (EDQM : European Directorate of the Quality of Medicine) から供給されたマイコプラズマ株である。その他、動生剤基準に基づいたマイコプラズマ否定試験に用いる培地の培地性能試験において対照となる菌種である *Mycoplasma hyopneumoniae* 及び *Mycoplasma gallisepticum* を供試した。

Table 1 *Mycoplasma* strains used in this study

Strains	Origin
<i>Mycoplasma fermentans</i> BRP (Y0000692)	Cultured cell
<i>Mycoplasma hyothinis</i> BRP (Y0000690)	A fattening pig with arthritis
<i>Mycoplasma orale</i> BRP (Y0000691)	Vero cell
<i>Mycoplasma synoviae</i> BRP (Y0000689)	Trachea swab of a broiler chicken
<i>Acholeplasma laidlawii</i> RFS (Y0000693)	Keratin cultured cell
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> J (NCTC10110)	ATCC
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> C5PT	Livestock Hygiene Microbial Strains
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> KP-13	Livestock Hygiene Microbial Strains

1.2 マイコプラズマ用培地

マイコプラズマ用寒天平板培地とマイコプラズマ用液体培地は、動生剤基準の一般試験法のマイコプラズマ否定試験法に規定されたものを使用した。

1.3 液体培地増菌培養法

マイコプラズマ用液体培地 1 mL あたり 10CFU 以下に調整したマイコプラズマ浮遊液を 100 mL のマイコプラズマ用液体培地に接種した。37°C で 14 日間密栓培養し、培養 0、3、7、10 及び 14 日後に、培地の一部を回収した。回収した培地は、qPCR 法用サンプルとして -80°C で凍結保存する一方、現行法に用いるため、各サンプルの凍結保存前にその一部を適宜希釈し、各希釈液を寒天平板培地に 0.1 mL 接種して 37°C、5% CO₂ 湿潤下で 10 日間培養後、形成されたコロニー数を生菌数として計測した。

1.4 マイコプラズマ DNA の定量

1) DNA 抽出

100 µL の菌液から QIAamp UCP DNA Micro Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行った。

2) 定量 PCR 反応

Wong-Lee JG and Lovett (1993) により報告されたプライマーを用いた。

Forward Primer : GGCGAATGGGTGAGTAACACG

Reverse Primer : CGGATAACGCTTGCGACCTATG

qPCR 反応液 22.5 μ L と DNA 抽出液 2.5 μ L を混合し、Step One Plus (Applied Biosystems) で qPCR を行った。qPCR 反応液には QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN) を用いた。反応条件は、95 $^{\circ}$ C 15 分の反応後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 1 サイクルとし、40 サイクルに設定した。PCR 装置は Step One Plus (ThermoFisher Scientific) を用いた。

3) 特異性の確認

7 菌種のマイコプラズマ株について qPCR 反応及び融解曲線分析を行い、検出の可否を確認した。

4) 検出限界の測定

7 菌種のマイコプラズマ株について Table 1 に示した濃度の菌液を 10CFU まで 10 倍階段希釈し、各希釈について DNA の定量を行い、検出限界を測定した。

5) 寒天平板培地培養法と rPCR 法との相関

動生剤基準の一般試験法の部のマイコプラズマ否定試験において陽性対照として用いられる *M. synoviae* について寒天平板培地培養法で求められた CFU の対数と rPCR 法で求められた相対 DNA 量により回帰直線を引き、両者の相関関係を調べた。

6) 培養に伴う DNA 量の経時的变化の測定

1.3 に記載した方法により培養し回収したマイコプラズマ 7 菌種の各サンプルから CFU を算出するとともに、各サンプルの qPCR を行い、培養に伴う DNA 量の経時的变化を測定した。

2. 成績

2.1 プライマーの特異性の確認

プライマーの特異性を 7 菌種のマイコプラズマを用いて確認した。

Step One Plus を用いた融解曲線分析による融解温度 (T_m 値) は、それぞれ *M. fermentans* が 83.3 ~ 84.2 $^{\circ}$ C、*M. hyorhinitis* が 82.9 ~ 83.5 $^{\circ}$ C、*M. orale* が 82.8 ~ 83.8 $^{\circ}$ C、*M. synoviae* が 82.5 ~ 83.3 $^{\circ}$ C、*A. laidlawii* が 84.0 ~ 84.5 $^{\circ}$ C、*M. hyopneumoniae* が 81.5 ~ 82.4 $^{\circ}$ C、*M. gallisepticum* が 81.3 ~ 82.0 $^{\circ}$ C であり、7 菌種のマイコプラズマの T_m 値は、マイコプラズマ属に特有な値を示した。以上の結果から、実験に用いたプライマーはマイコプラズマに特異的であることが確認された。

2.2 qPCR 法による検出限界

qPCR により 7 菌種のマイコプラズマを用いて検出限界を検討した。qPCR 法では、10 CFU/0.1mL まで増幅が認められた (Fig. 1)。qPCR 法の検出限界は、10 CFU/0.1mL であり、現行の寒天平板培地培養法において培地の性能として求められる 100CFU 未満 /0.1mL と同等であった。

2.3 rPCR 法と寒天平板培地培養法の相関

M. synoviae について、qPCR 法と寒天平板培地培養法の相関を 1.4 の 5) に従い調べたところ、強い相関が認められた (相関係数 = 0.9973) (Fig. 2)。qPCR 法では、寒天平板培地培養法による菌数と相関する DNA 量が検出可能であることが確認された。

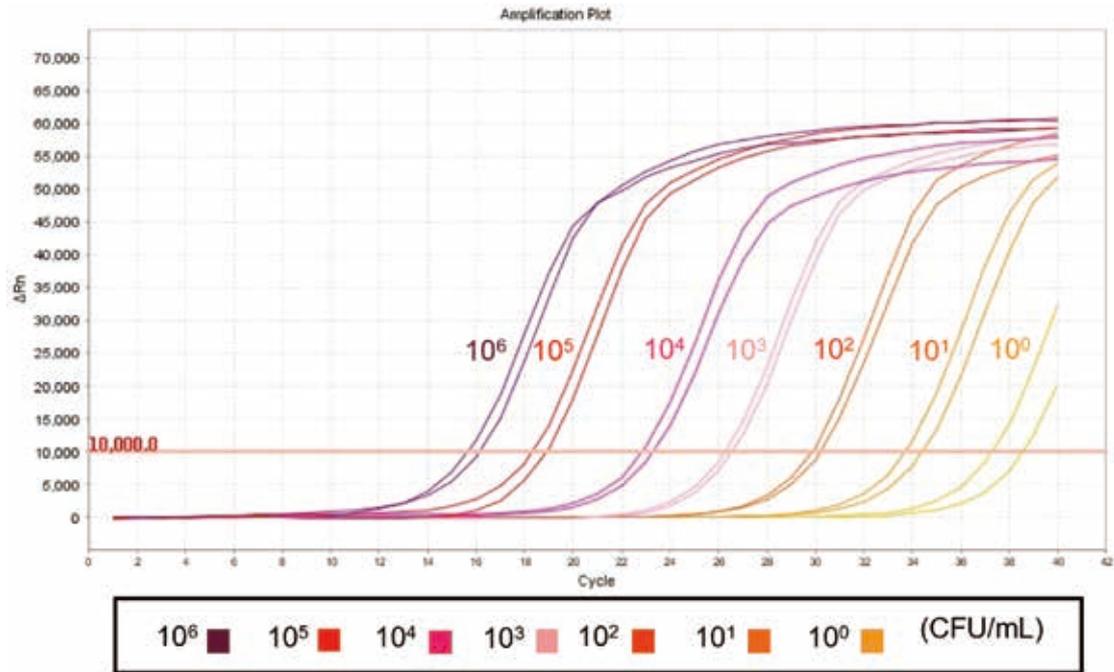


Fig. 1 The amplification plot of real time-PCR analysis for *Mycoplasma synoviae*. Preparation containing 10^6 CFU / mL was serially diluted by tenfold (10^6 to 10^0 CFU / mL, respectively), and the extracted DNA from each diluent was analyzed by real time-PCR method. A dotted line in the figure represents the threshold.

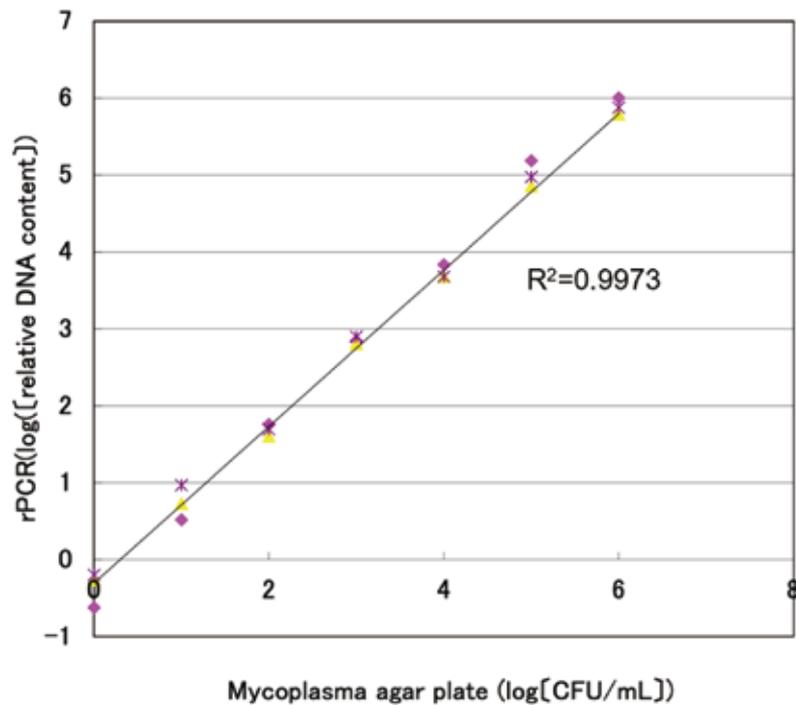


Fig. 2 Regression analysis: *Mycoplasma* forming unit measured by agar plate method and relative DNA content revealed by realtime-PCR method.

2.4 培養に伴う DNA 量と菌数の経時的変化

接種0日では不検出であったが、接種3日後から14日後までは、増殖に伴いマイコプラズマ特有のコロニーが検出された。しかし、対数増殖期を過ぎると検出できないか、検出数が減少した。一方、DNA量は接種0日から7日後又は接種10日後にかけて増加し、14日後まで減少しなかった (Fig.3)。

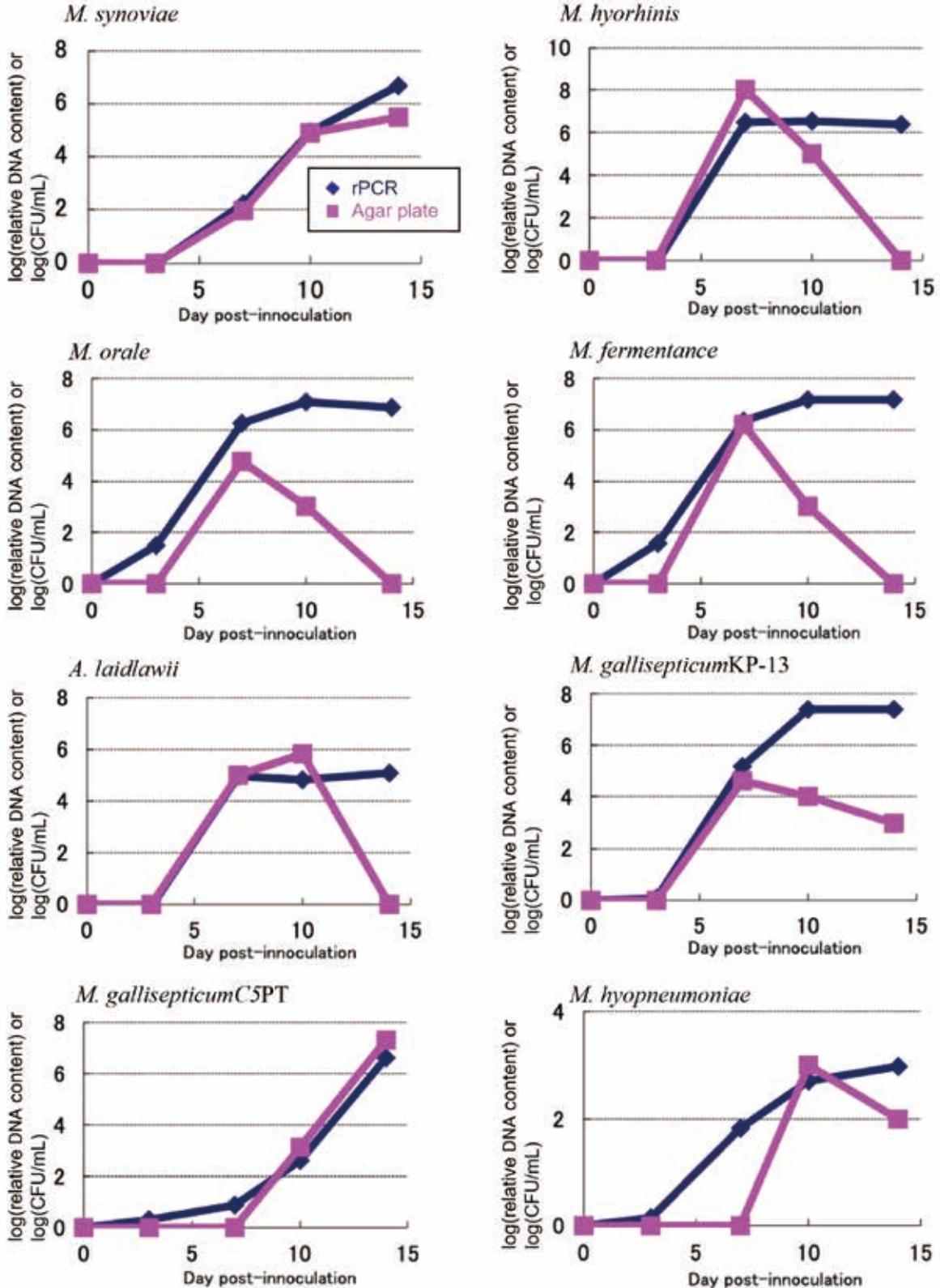


Fig. 3 Fluctuation of DNA content of Mycoplasma measured by real time-PCR and a number of Mycoplasma colony grown on an agar plate after the inoculation in pre-culture liquid media for Mycoplasmas.

3. 考察

現行法の培養法は、動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力（VICH：International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Regulation of Veterinary Medicinal Products）において、日本、米国及びEUの三極で統一化されているマイコプラズマ否定試験法のガイドライン（GL34：2013）における主たる試験法である。GL34においては、補助的にDNA染色法も規定されている。

また、培養法及びDNA染色法は第十七改正日本薬局方（平成28年3月7日厚生労働省告示第64号。以下「17局」という。）の参考情報において、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の方法として記載されている。17局においては、新たに核酸増幅法（NAT）が記載され、バリデーションを実施した上で、培養法又はDNA染色法の代替法として単独で用いることが可能となった。欧州薬局方第10版の2.6.7 MYCOPLASMASにおいてもNATが記載されており、17局と同様の内容になっている。

NATの代表的な方法はPCR法であるが、PCR法による陽性判定は、検出対象の塩基配列の存在を示すものであり、必ずしも生きたマイコプラズマの存在を意味するものではない。一方、本検討においては前培養を行い、培養開始時と終了時のDNA量の比較を行うことで生菌の検出を可能としている。本検討では、既検討とは異なるプライマー、DNA抽出キット、qPCR反応液及びqPCR装置を用いて試験条件を検討した上で、既検討よりも多くの種類のマイコプラズマを用いて、既検討と同様に改良法が現行法と同等の特異性及び感度であることを確認した。このことから、適切なバリデーションを実施すれば異なるプライマー、DNA抽出キット、qPCR反応液及びqPCR装置で実施しても同等の結果を得られることが示唆された。また、現行の培養法では、対数増殖期を過ぎるとマイコプラズマの検出ができなかったが、qPCR法では対数増殖期以降も死滅したマイコプラズマのDNAを安定的に検出することが可能であることが判明した。現行法は、対数増殖期を逃さないために液体培地による培養期間中に複数回培養液を平板培地に接種する必要がある上、平板培地の培養に10日間費やさなければならぬが、改良法では、液体培地培養開始時と終了時の2点のDNA量を比較すればよく、平板培地の培養が不要となることでその分の培養期間が短縮される。よって、マイコプラズマ否定試験を改良法で実施することにより、現行法の実施期間である24日間に比べて14日間に試験期間が短縮され、労力の削減にもつながることが結論づけられた。

今後は、動製剤基準の改正に向けて、製剤等への添加試験を実施し、製造用材料を用いることによっても現行法と同等に改良法でマイコプラズマを検出できることを確認する必要がある。

引用文献

松本幸子、永田知史、岩中麻里、能田健（2007）前培養とPCR法を組み合わせたマイコプラズマ生菌の検出～PCR法を導入したマイコプラズマ否定試験法の検討～. 動物医薬品検査所年報, 44, pp.13-20

Wong-Lee JG, Lovett M (1993). Rapid and sensitive PCR method for identification of Mycoplasma species in tissue culture. *Diagnostic Molecular Microbiology*, pp.257-260

農林水産省（2002）動物用生物学的製剤基準（平成14年10月3日農林水産省告示第1567号）

VICH GL34（2013）TESTING FOR THE DETECTION OF MYCOPLASMA CONTAMINATION

厚生労働省（2016）第十七改正日本薬局方（平成28年3月7日厚生労働省告示第285号）

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.0（2019）general chapter 2.6.7.

2019年に日本で分離された遺伝子型 2.1 豚熱ウイルスの豚における病原性

(Pathogenicity of genotype 2.1 classical swine fever virus isolated from Japan in 2019 in pigs)

山下麻依子^{1,4}、岩本聖子¹、落合絢子¹、山本 篤¹、須藤加澄^{1,3}、成嶋理恵¹、長坂孝雄¹、
齋藤明人^{1,2}、大場真己⁴、大松 勉⁴、水谷哲也⁴、山本欣也¹

2018年、日本で26年ぶりに豚熱が発生し、再流行している。本流行は、過去に発生が認められた高病原性ウイルスによるものではなく、中程度病原性ウイルスによって引き起こされることが判明しているが、その病態生理は不明のままである。本研究では、当所で分離したウイルス株を用いて、SPF豚に観察期間2週間、4週間、6週間の実験的感染試験を行った。観察期間中、臨床観察、ウイルス検出及び病理学的剖検を実施し、ウイルス攻撃後の各期間における病理学的変化、病原体及びウイルス特異的抗体の分布を明らかにした。これらの結果を総合的に解析した結果、ウイルス攻撃後4週間及び6週間観察群では約70%の豚が回復した。本研究は、今後の豚熱対策に有用な情報である中程度病原性の遺伝子型 2.1 ウイルスのワクチン未接種豚における病原性の発現を明らかにした。

(Microbiology and Immunology: Volume 68, Issue 8, August 2024 Page 267-280. DOI: 10.1111/1348-0421.1316. 英文)

¹ 農林水産省動物医薬品検査所

² 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平海外病研究拠点

³ 農林水産省畜産局

⁴ 国立大学法人東京農工大学農学部附属感染症未来疫学研究センター

2019年に国内で分離された豚熱ウイルスに対する GPE⁻株弱毒生ワクチン及び CP7_E2alf 株組換え生ワクチン（マーカーワクチン）の有効性とマーカーワクチンの DIVA 識別能

(Efficacy of GPE⁻ strain live attenuated vaccine and CP7_E2alf strain recombinant live vaccine (marker vaccine) against Japanese epidemic classical swine fever virus isolated in 2019 and DIVA discrimination ability of the marker vaccine)

山下麻依子^{1,5}、岩本聖子¹、落合絢子¹、須藤加澄^{1,3}、長坂孝雄¹、齋藤明人^{1,2}、小佐々隆志⁴、大松 勉⁵、水谷哲也⁵、山本 欣也¹

2018年以降、国内で流行している豚熱（Classical swine fever：CSF）は、流行ウイルスが強毒株よりも病原性が低く、早期摘発が困難な中等度毒性である遺伝子型 2.1 と同定された。国内飼養豚には防疫対策として、GPE⁻株弱毒生ワクチン（GPE⁻ワクチン）が投与されているが、ワクチン接種豚と野外株ウイルス感染豚の識別（DIVA）能を有する CP7_E2alf 株組換え生ワクチン（マーカーワクチン）は、WOAH（国際獣疫事務局）の CSF 清浄国認証取得のための選択肢となると考えられる。本研究では、豚への実験感染により流行株に対する両ワクチンの有効性を評価するとともに、2種類の抗体検出 ELISA キットを用いてマーカーワクチンの DIVA 能力を評価することを目的とした。その結果、GPE⁻ワクチンとマーカーワクチンの両方が流行株に対して有効であることが示されたが、抗体検出 ELISA キットによるマーカーワクチンの DIVA 能力には限界があった。したがって、DIVA 能を有するマーカーワクチンを用いて CSF 清浄国認証を取得するためには、代替検出法の開発又は抗体検出 ELISA キットの感度と特異性の向上が必要である。

(Research in Veterinary Science: Volume 182, November 2024 105484. DOI: 10.1016/j.rvsc.2024.105484. 英文)

¹ 農林水産省動物医薬品検査所

² 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平海外病研究拠点

³ 農林水産省畜産局

⁴ 農林水産省消費・安全局

⁵ 国立大学法人東京農工大学農学部附属感染症未来疫学研究センター