

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：82601
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K16366
研究課題名(和文) マイコプラズマのメタボローム解析を通じた生理活性分子探索と微生物迅速法の開発

研究課題名(英文) Studies for the molecular basis of Mycoplasma infection and contamination, and the development of a novel rapid microbial method by metabolome analysis

研究代表者

林 克彦 (Hayashi, Katsuhiko)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・研究員

研究者番号：60804739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細菌の一種マイコプラズマによる医薬品製造細胞の汚染を検出するため、質量分析機を用いたメタボローム解析を行い、また、この解析を通じて、マイコプラズマ汚染に関するメカニズムの解明を目指した。
抗体医薬品の製造に用いられるCHO-DG44細胞に、マイコプラズマを接種すると、細胞の生存率及び増殖性に影響せずにマイコプラズマが増殖した。医薬品の品質管理で求められる検出基準未満の菌量であっても、細胞培養後には超過する菌数に増殖した。質量分析機LC-MS/MSによって感染細胞及び細胞以外の培地成分を解析し、マイコプラズマ汚染に特異的な脂質分子を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品の製造細胞が、マイコプラズマに汚染されると、医薬品の品質に問題が生じる可能性がある。マイコプラズマ汚染の検出には、多量の細胞が必要であり、細胞を使用しない検出法が求められている。
本研究の成果によって、わずかなマイコプラズマ汚染であっても、細胞培養後には影響のある菌量へと増殖すること、また、細胞培養の培地からマイコプラズマ汚染に特異的な脂質分子が検出されたことから、細胞を使用せずにマイコプラズマ汚染を検出する方法として利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, metabolome analysis was performed to detect mycoplasma contaminants in drug-producing cell culture using a mass spectrometer. Through this analysis, we tried to elucidate the mechanism of mycoplasma contamination.
When CHO-DG44 cells, which is used for antibody production, was infected with mycoplasma, mycoplasma proliferated without affecting the viability and proliferation of the cells. Even if we inoculated the amount of mycoplasma below the detection limit required for quality control of pharmaceuticals, the number of bacteria exceeded the number after cultivation. We analysed mycoplasma infected cell and culture supernatant by mass LC-MS/MS, resulting in the detection of lipid molecules specific for mycoplasma contamination.

研究分野：衛生微生物

キーワード：マイコプラズマ メタボローム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイコプラズマは、細胞培養において培地の汚染原因として知られている(引用文献)。通常の細菌汚染と異なり、マイコプラズマによる汚染では、培養細胞への致死性を示さず持続的に感染し、マイコプラズマによる汚染によって、細胞培養実験の結果が変わってしまうことが知られている(引用文献)。そのようなリスクを低減するため、日本薬局方参考情報「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」(マイコプラズマ否定試験)に従い、細胞がマイコプラズマに感染していないことを確認する必要がある(引用文献)。

マイコプラズマの検出を行うには、培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法、及び核酸増幅法が用いられる(引用文献)。培養法では、14 日間のカンテン培地での培養で検出する。指標細胞を用いた DNA 染色法では、培地から分取したサンプルを Vero 細胞と培養後、Bisbenzimidide によって Vero 細胞及びマイコプラズマの核を染色し、蛍光顕微鏡下で判定する。核酸増幅法では、PCR 反応によってマイコプラズマに特異的な遺伝子配列を増幅して検出する。

近年の細胞工学及び細胞医学の発展によって、医薬品製造工程に細胞培養が関わる機会が急速に増大している。細胞工学関連では、CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞がバイオ医薬品の産生に広く使われており、細胞医療関連では、ヒト ES 細胞、もしくはヒト iPS 細胞を用いたオーガノイド医療が今後発展していくと考えられる(引用文献)。細胞を用いた医薬品等では、医薬品の品質を確保するためにマイコプラズマ否定試験が重要であるが、短寿命製品に相当する細胞を用いた医薬品等に対して、マイコプラズマ否定試験のうち培養法及び指標細胞を用いた DNA 染色法は、長期間が必要であり適していない。核酸増幅法は、少量かつ高感度で実施可能な点で採用が進んでいるが、特に増殖速度の遅いヒト細胞では長期の細胞培養が必要であり、定期的なモニタリングのために試験に必要な細胞量の確保の観点で問題が生じる(引用文献)。治療に使用する前の培養中に多くの細胞を検査に用いることで、治療用の細胞調製に必要な時間を延長させてしまうため、患者の QOL (Quality of Life) 最大化を追求する観点から、短時間で安全な細胞培養を可能とする技術が必要である。

2. 研究の目的

次世代のマイコプラズマ否定試験には、より簡便に、より迅速、より非侵襲的に検出できる手法が求められており、最も非侵襲的な方法は、培地を試験に用いない、または不要となる培養上清を用いることである。本研究では、マイコプラズマ感染が細胞の代謝が変化させることから、培地の臭気成分(揮発成分)又は培養上清を用いて、細胞培養培地の液相と気相のメタボローム解析を行い、感染に伴う代謝変化を総合的にかつ非侵襲的に検出することを試みる。これらの解析を通じて、マイコプラズマが培養細胞の性状を大きく変化させることで、培養細胞に致死性を示さず持続的に感染する感染性・寄生性メカニズムの一端の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) マイコプラズマには、日本薬局方参考情報に記載されたアコレプラズマを含めた 7 菌種 8 菌株を用いた (*Acholeplasma laidlawii* NBRC 14400、*Mycoplasma arginini* ATCC 23838、*M. arginini* NBRC 111899、*Mycoplasma fermentans* NBRC 14854、*Mycoplasma hyorhinae* NBRC 14858、*Mycoplasma orale* NBRC 14477、*Mycoplasma pneumoniae* NBRC 14401、及び *Mycoplasma salivarium* NBRC 14478)。細胞には、バイオ医薬品産生に広く使われる CHO-DG44 細胞を用い、無血清培地で培養した。7 菌種 8 菌株を $10^2 \sim 10^4$ CFU (Colony Forming Unit) /mL で CHO-DG44 細胞に接種し、培養 3 日目までの菌数を測定した。また、同様に、CHO-DG44 細胞を培養していない無血清培地にマイコプラズマ及びアコレプラズマを接種して経時的に菌数を評価した。CHO-DG44 細胞が培養されている無血清培地に接種した場合と、CHO-DG44 細胞を培養していない無血清培地に接種した場合の菌数を比較することで、致死性を示さず持続的にマイコプラズマ感染した細胞の調製法を評価した。マイコプラズマ感染した細胞を用いて、接種菌数を 5、50、500、及び 5,000 CFU/mL の条件で CHO-DG44 細胞に接種して、接種菌数と感染及び増菌を確認した。

(2) 致死性を示さず持続的にマイコプラズマ感染した細胞を培養し、液体培地及び細胞を分取して、LC-MS 解析してマススペクトルを取得した。分取した液体培地及び細胞にアセトニトリルを添加して脱タンパクしたのち、得られた液体を Q Exactive Orbitrap 及び C18 カラムを用いて LC-MS 解析した。また、分取した液体培地から Folch 変法で総脂質を抽出し、Q Exactive Orbitrap 及び C18 カラムによって池田らの方法によって脂質分子のノンターゲット解析を実施した(引用文献)。スペクトルを解析ソフトウェア MS-DIAL を用いて解析し、代謝産物を同定した(引用文献)。マススペクトルの比較においては、マススペクトルを多変量解析及び主成分分析を実施した。

4. 研究成果

(1) CHO-DG44 細胞にマイコプラズマ(アコレプラズマを含む)7 菌種 8 菌株を $10^2 \sim 10^4$ CFU/mL で接種して 4 日目までの菌数を経時的に測定し、また、同様に、CHO-DG44 細胞を培養していない無血清培地に接種して、CHO-DG44 細胞のマイコプラズマ感染を確認した(図1)。 *A. laidlawii* NBRC 14400 及び *M. pneumoniae* NBRC 14401 を除く菌株で、接種時より培養 1 日目で菌数が減少し、その後、培養 2~4 日目で増加した。特に、*M. arginini* NBRC 111899、*M. hyorhinis* NBRC 14858 及び *M. orale* NBRC 14477 の菌数の増加が顕著であった。*M. arginini* NBRC 111899 と起源を同じくする *M. arginini* ATCC 23838 では、菌数の増加は他の増殖が見られたマイコプラズマと同様であった。*A. laidlawii* NBRC 14400 では、培養 2 日目に菌数のピークを迎え、培養 3 日目及び 4 日目で減少した。*M. pneumoniae* NBRC 14401 では、培養 2 日目に検出限界未満となり、それ以降に菌の増殖が見られなかった。及び 3 日目においても菌数の増加が見られず、検出限界以下であった。これらの培養では、細胞の生存率は、培養の全期間において 85%以上であり、未接種の CD-DG44 細胞との間に違いが見られなかった。また、CHO-DG44 細胞を培養していない無血清培地にマイコプラズマ(アコレプラズマを含む)7 菌種を接種すると、*A. laidlawii* NBRC 14400 のみで菌数の増加が見られた。以上から、*A. laidlawii* NBRC 14400 及び *M. pneumoniae* NBRC 14401 を除く接種した 5 菌種において、非致死性の持続的感染状態になったと考えられた。*A. laidlawii* NBRC 14400 では、CHO-DG44 細胞を添加していない培地においても増殖が見られ、また、細胞と共存した際には、菌数の減少が見られることから、細胞に感染せずに増殖した可能性を否定できなかった。*M. pneumoniae* NBRC 14401 では、感染が成立せず、菌が死滅したと考えられた。*A. laidlawii* NBRC 14400 及び *M. pneumoniae* NBRC 14401 の結果からは、細胞とマイコプラズマ間で感染成立に関する何らかの因子が存在することが示唆された。これ以降の実験では、菌の増殖が顕著であった *M. hyorhinis* NBRC 14858 を感染させて実験を実施した。*M. hyorhinis* NBRC 14858 の菌数を 5、50、500、及び 5,000 CFU/mL で CHO-DG44 細胞に接種すると、培養 3 日目には、すべて 50~100 倍の菌数に増殖した。5 CFU/mL は、マイコプラズマ否定試験で求められている検出感度を下回っており、増殖後には検出可能と考えられる菌数に増殖していることから、マイコプラズマの存在を否定する定期的なモニタリングの重要性が確認された。

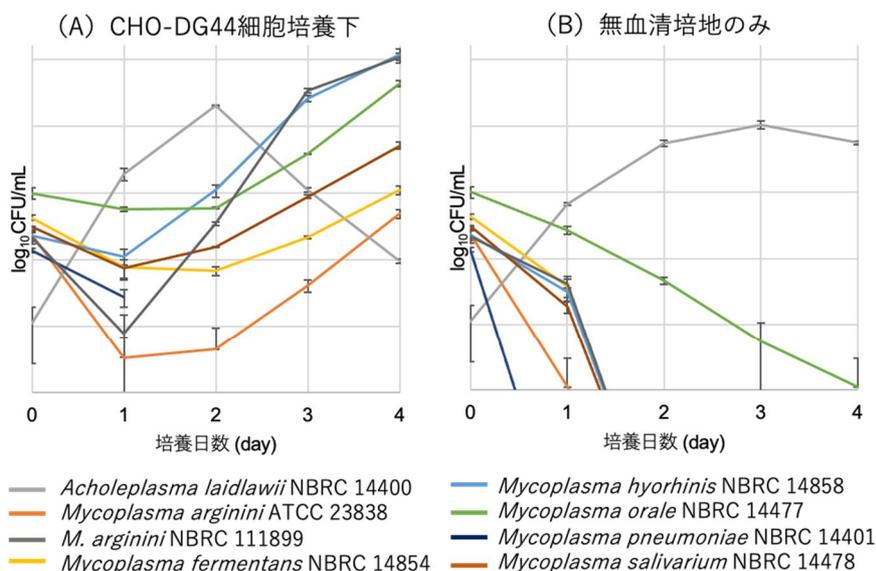


図1 (A) CHO-DG44細胞及び (B) 細胞培養用無血清培地にマイコプラズマ(アコレプラズマを含む)を接種した際の培養日数と菌数の推移

(2) 持続的に *M. hyorhinis* NBRC 14858 に感染した CHO-DG44 細胞を 3 日間培養し、培養上清及び細胞をアセトニトリルによって除タンパクしてから Q Exactive Orbitrap で LC-MS/MS 解析を実施した。その結果、フェニルアラニンと同定されるマススペクトルのピークを検出したが、これ以外の顕著なマススペクトルのピークが検出されなかったことから、検出感度を上げる必要性が示唆された。検出感度を上昇させるためには、目的の代謝産物の濃度を上昇させる必要があったため、代謝産物の種類に合わせた抽出法及び精製法で濃縮することにした。マイコプラズマには、細胞壁がなく特殊な脂質二重膜が存在することから、解析対象を脂質に絞ってリポミクス解析を実施した。*M. hyorhinis* NBRC 14858 を 5,000 CFU/mL 接種した CHO-DG44 細胞を 3 日間培養し、Folch 変法で培養上清及び細胞から総脂質を抽出した。LC-MS/MS 解析で得られた m/z から代謝産物を解析ソフトウェア MS-DIAL によって解析し、脂質分子を特定または推定した。部分的最小二乗回帰 (Partial Least Squares Regression : PLS) によって、特定または推定された脂質分子から、マイコプラズマに感染した際に寄与する分子種を調べると、相関係数の上位 10 位中にリゾ脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質等が存在した。マイコプラズマは、特有のリパーゼによって宿主の脂質をリゾ脂質に変換することが報告されており、PLS 回帰で、リゾ脂質が候補に

上がったことから、メタボローム解析の結果がマイコプラズマ感染状態を反映することが示唆された(引用文献)。また、これらの結果から、メタボローム解析による特徴的な脂質分子の検出が、CHO-DG44 細胞のマイコプラズマ感染状態の判別法として有効であることが示唆された。

<引用文献>

- 小原有弘, 大谷梓, 小澤裕, 塩田節子, 増井徹, 水澤博「培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査」, *組織培養研究* 2007; 26(3):159-163.
- Yu T, Wang Y, Zhang H, Johnson CH, Jiang Y, Li X, Wu Z, Liu T, Krausz KW, Yu A, Gonzalez FJ, Huang M, Bi H. Metabolomics reveals mycoplasma contamination interferes with the metabolism of PANC-1 cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016;408(16):4267-4273.
- 平成 28 年 3 月 7 日厚生労働省告示第 64 号「第十七改正日本薬局方 参考情報」2016 年 p. 2395-2399.
- 大政健史「バイオ医薬品生産におけるプロダクションサイエンス(<特集>実用化に資する医薬品生産培養技術の課題と展開～抗体医薬品から細胞医薬品まで～)」, *生物工学会誌*, 2013 91(9):507-510.
- 小川綾乃, 寺田武史, 蓮沼裕也, 大島利夫, 浅井さとみ, 宮地勇人「再生医療におけるマイコプラズマの迅速検出法の意義 「MycoAlert」を用いたマイコプラズマ検出法の有用性の検討」, *医療と検査機器・試薬* 2009;32(3):393-396
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley G H: *Journal of Biological Chemistry* 1957;226(1):497-509.
- Ikeda K, *Bioactive Lipid Mediators Chapter 25*, 2015:349-365.
- Tsugawa H, Ikeda K, Takahashi M, Satoh A, Mori Y, Uchino H, Okahashi N, Yamada Y, Tada I, Bonini P, Higashi Y, Okazaki Y, Zhou Z, Zhu ZJ, Koelmel J, Cajka T, Fiehn O, Saito K, Arita Masanori, Arita Makoto: A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nature Biotechnology*, 2020;38(10):1159-1163.
- Wagner F, Rottem S, Held HD, Uhlig S, Zähringer U: Ether lipids in the cell membrane of *Mycoplasma fermentans*. *European Journal of Biochemistry* 2000;267(20):6276-6286.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 林克彦, 渡辺愛弓, 門脇成武, 湯之前雄太, 中川香奈子, 豊田淑江, 鈴木俊宏, 清水則夫, 工藤由起子, 菊池裕	4. 巻 50
2. 論文標題 マイコプラズマ否定試験に用いるマイコプラズマ参照品に関する研究(第1報) Mycoplasma arginini NBRC 111899株の核酸増幅法(NAT)への適用と維持管理に関する研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 550-559
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 湯之前雄太, 林克彦, 大谷梓, 松村佳代子, 中尾亮介, 毛利聡里, 古田美玲, 小原有弘, 河合充生, 内田恵理子, 清水則夫, 伊豆津健一, 工藤由起子, 菊池裕	4. 巻 51
2. 論文標題 マイコプラズマ否定試験に用いるマイコプラズマ参照品に関する研究(第2報)第十七改正日本薬局方収載NBRC由来マイコプラズマの核酸増幅法(NAT)による検出感度に関する共同比較研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 224-233
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Katsuhiko, Misawa Takashi, Goto Chihiro, Demizu Yosuke, Hara-Kudo Yukiko, Kikuchi Yutaka	4. 巻 17
2. 論文標題 The effects of magainin 2-derived and rationally designed antimicrobial peptides on Mycoplasma pneumoniae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0261893
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0261893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林克彦, 三澤隆史, 後藤千尋, 出水庸介, 工藤由起子, 菊池裕
2. 発表標題 バイオフィルム測定によるMycoplasma pneumoniaeに対する抗菌成分のスクリーニング系の構築
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第46回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林克彦, 渡辺愛弓, 門脇成武, 湯之前雄太, 中川香奈子, 豊田淑江, 鈴木俊宏, 清水則夫, 工藤由起子, 菊池裕
2. 発表標題 核酸増幅法によるマイコプラズマ否定試験に必要な参照菌種としてのMycoplasma arginini NBRC 111899の応用可能性に関する研究
3. 学会等名 第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林克彦, 湯之前雄太, 大谷梓, 松村佳代子, 中尾亮介, 毛利聡里, 古田美玲, 小原有弘, 河合充生, 内田恵理子, 清水則夫, 伊豆津健一, 工藤由起子, 菊池裕
2. 発表標題 日本薬局方参考情報に収載のマイコプラズマ否定試験・核酸増幅法に使用されるNBRC参照菌種に関する多施設間比較
3. 学会等名 第56回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林克彦, 湯之前雄太, 酒井瑶実, 遠藤晴香, 永嶋玲美, 渡辺愛弓, 門脇成武, 大谷梓, 豊田淑江, 松村佳代子, 中尾亮介, 毛利聡里, 古田美玲, 清水則夫, 鈴木俊宏, 小原有弘, 河合充生, 内田恵理子, 伊豆津健一, 菊池裕, 工藤由起子
2. 発表標題 第十七改正日本薬局方マイコプラズマ否定試験核酸増幅法(NAT)に用いるマイコプラズマ参照品の調製法及び検出感度に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------