

奨励金No.1637

正確かつ簡便なウイルス定量を実現するシュードプラスチック性を有する流体重層材の開発

廣瀬 亮平
京都府立医科大学 准教授

Development of pseudoplastic fluid overlay material for accurate and easy viral quantification

Ryohei Hirose
Kyoto Prefectural University of Medicine, Associate Professor



ウイルスに関連する研究全般において、ウイルス力価の正確な測定は不可欠である。定量法として広く用いられているプラークアッセイ（PA）は、感染細胞表面に寒天などのゲル状重層材を重ねる必要があり、操作が煩雑で測定難易度が高い。一方、流体重層材を用いた PA は操作性に優れるものの、プラーク形成の制御が難しく、測定精度が低いという課題がある。本研究では、流体重層材の粘度特性とプラーク形成性能との関係を体系的に解明するとともに、静置時には高粘度、操作時には低粘度となるシュードプラスチック性を有する流体重層材を開発することで、従来法よりも正確かつ簡便なウイルス定量法の実現を目指す。

Accurate quantification of viral titers is essential for virtually all areas of virology research. The plaque assay (PA), one of the most widely used quantitative methods, requires infected cell monolayers to be overlaid with gel-based materials such as agar, making the procedure labor-intensive and technically demanding. In contrast, fluid overlay materials offer greater ease of handling but generally suffer from poor control of plaque formation, resulting in reduced measurement accuracy. In this study, we aim to systematically elucidate the relationship between the viscosity characteristics of fluid overlay materials and plaque formation performance. Based on these findings, we will develop a pseudoplastic fluid overlay material that exhibits high viscosity under static conditions and low viscosity during pipetting and aspiration, thereby establishing a plaque assay that is both more accurate and easier to perform than conventional methods.

1. 研究内容

本研究では、プラークアッセイ（PA）に用いる新規流体重層材の開発を目的として、流体重層材の粘弾性特性、プラーク形成性能、細胞適合性および除去性を評価するとともに、流体重層材によるプラーク形成機構の解析を行った。

1. 流体重層材の粘弾性特性とプラーク形成性能の評価

まず、カルボキシメチルセルロース、メチルセ

ルロース、アルギン酸ナトリウム、キサンタンガム、ポリアクリル酸ナトリウムなど複数の高分子材料を用いて流体重層材を作製し、レオメーターによる粘弾性解析を行った。得られた各重層材についてプラークアッセイを実施し、ウイルス力価の測定精度、プラーク形状、プラーク径の均一性、プラークの癒合の有無などを指標として性能を評価した。

その結果、重層材の化学組成にかかわらず、重層材性能は特定の粘度域で最大となることが明らかとなった。例えばカルボキシメチルセルロース

では 1.0～1.25%、アルギン酸ナトリウムでは 0.3～0.5%が最適条件となり、いずれもせん断速度 1 s^{-1} における粘度が約 60～80 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ となる条件で最も高い測定精度が得られた。

さらに、各せん断速度（0.1、1、10、100 s^{-1} ）における粘度と重層材性能との相関解析を行った結果、せん断速度 1 s^{-1} の粘度が最も高い相関（相関係数 0.8 以上）を示した。すなわち、流体重層材の性能は化学組成そのものではなく、低せん断領域における粘度によって規定されることが示され、流体重層材設計の重要な指標が明確となった。

2. 細胞適合性および除去性の評価

次に、各流体重層材について細胞毒性を評価した。細胞に流体重層材を重層し、一定時間培養後に Live/Dead 染色を行い、生細胞率を測定した。

その結果、細胞障害性を示さない濃度（粘度）域は、前述の「最も高いプラーク形成性能を示す粘度域」とほぼ一致することが確認された。このことから、高い測定精度と細胞適合性を同時に満たす流体重層材の設計が可能であることが示された。

現在は、重層材除去性の評価を進めている。重層材中に添加したアルブミンを指標として除去効率を解析した結果、重層材を容易に除去できる粘度域と、高いプラーク形成性能を示す粘度域との間には重複領域が存在することが確認されつつある。これらの解析が完了すれば、「高精度」「低細胞毒性」「高い除去性」を同時に満たす最適粘度条件を定量的に決定できる見込みである。

また、最適粘度の解明と並行して、シュードプラスチック特性を有する流体重層材の開発も進めている。シュードプラスチック流体は静置時には高粘度でウイルス拡散を抑制し、ピペッティングや吸引操作時には低粘度となるため、重層操作と除去操作の双方を容易にできる可能性を有する。さらに、アルギン酸ナトリウムを基材とした流体

重層材については、カルシウムイオン添加による瞬時のゲル化を利用し、重層材を極めて容易に除去できる新たなシステムの開発も進めており、仕様が確立した段階で知的財産化も検討している。

3. 流体重層材によるプラーク形成機構の解析

流体重層材がどのようにプラーク形成を制御しているかを明らかにするため、細胞膜蛍光染色と Z-stack 撮影を組み合わせた三次元観察を実施した。

感染細胞を経時的に観察した結果、感染細胞直上に局所的な間隙が形成されることが確認され、この間隙がウイルスの局所的拡散経路となることが示唆された。従来、重層材は単純にウイルス拡散を抑制する目的で使用されてきたが、本研究により、細胞表面近傍に形成される微細構造がプラーク形成に重要な役割を果たしている可能性が示された。

今後は PFG-NMR を用いて重層材内部の分子拡散挙動を解析し、粘弾性特性とウイルス拡散との関係を定量的に明らかにする予定である。

4. 総括

本研究により、流体重層材の性能は化学組成ではなく低せん断領域における粘度によって規定されることが明らかとなり、PA に最適な流体重層材設計のための基本指針を確立することができた。また、高精度なプラーク形成、細胞適合性、および除去性を満たす粘度域が存在することも確認されつつあり、最適設計条件の実用化に向けた基盤が整備された。

本研究で開発する流体重層材は、従来のゲル状重層材と比較して、①粘度を指標とした標準化により施設間・術者間で高い再現性を実現できること、②温度管理を必要とせず調製・操作が容易であること、③プラーク径を粘度によって制御できるため、正確で再現性の高いウイルス定量が可能となること、④ウイルス定量に加え、感染性・増

殖性評価やウイルス株の回収にも応用できることなど、多くの利点を有する。

当初計画した研究項目は概ね順調に進捗しており、最適流体重層材の仕様決定および知財化・論文化を目指している。今後、シュードプラスチック流体およびゲル化機能を有する新規流体重層材の開発を進めることで、簡便性と測定精度を兼ね備えた新しいプラークアッセイ技術として確立されることが期待される。

2. 発表（研究成果の発表）

現在、論文作成中である。