

平成 14 年度厚生労働科学特別研究補助金
分担研究報告書

細胞等の培養工程における迷入ウイルスのリスク評価と管理法パポーパウイルスの迷入の高感度検出法の開発

田口文章 北里大学医療衛生学部 臨床微生物学研究室

尿等を原材料とした医薬品に迷入する可能性のあると考えられるヒトポリオーマウイルス（BK ウイルスおよび JC ウイルス）の高感度検出法の開発を試み以下の結果を得た。

1. BK ウイルス DNA 検出のため BK ウイルスの intergenic (IG) 領域 336 塩基対を検出する 28 mer プライマー-BIG-1、BIG-2 を合成した。また JC ウイルス DNA を増幅するため、JC ウイルスの複製開始点を含む調節領域 396 塩基対を検出する 28 mer プライマー-J-1、J-2 を合成した。このプライマーセットを用いて Multiplex PCR を行うことにより両ウイルス DNA を同時に検出可能であった。また両ウイルス DNA の検出感度は 10fg で、サザンブロットハイブリダイゼーションの両ウイルス DNA の検出感度 1pg より 100 倍高感度であった。
2. サザンブロットハイブリダイゼーションおよび Multiplex PCR により健常人尿中へのウイルス DNA 排泄状況を調べたところ、20 25 歳では BKV DNA 及び JCV DNA がそれぞれ 10% の割合で検出された。また 50 60 歳では BKV DNA が 15%、JCV DNA が 40% の割合で検出された。
3. Multiplex PCR により検出されたウイルス DNA が感染性ウイルス由来かどうかを確認するため、COS-7 細胞を用いてウイルスの分離を行った。Multiplex PCR によりウイルス DNA が検出されたサンプル全てからウイルスが分離された。

これらの結果は、ヒト健常人においては 20 25 歳ではそれぞれ 10% が BKV および JCV、50 60 歳では 15% が BKV、40% が JCV を尿中に排泄していることを示唆していると考えられる。

研究協力者 原 和矢

ヒトポリオーマウイルスは、多くは幼児期に感染し 90% 程度のヒトが抗体を保有している⁸⁾。またこれらのウイルスは、

A. 緒言

初感染の後、腎臓に潜在し、加齢により尿中に排泄されることが判明している^{1,2)}。ヒトポリオーマウイルスとしては、BKウイルス(BKV)及びJCウイルス(JCV)が分離されている。BKVは出血性膀胱炎を、またJCVはまれに進行性多巣性白質脳症(PML)の病原ウイルスと考えられている。一方、これらのウイルスを齧歯類に接種すると腫瘍を誘発するため、ヒト脳腫瘍との関連性も指摘されている³⁾。更にヒトポリオーマウイルスは、エンベロープを持たず物理化学的因子に対して強い抵抗性を示す。

ところがヒト尿を原材料として、血栓溶解酵素(ウロキナーゼ)、膵炎の治療薬(ウリナスタチン)、不妊症の治療剤(排卵誘発剤の下垂体性腺刺激ホルモン)、流産防止の胎盤性腺刺激ホルモンやエリスロポエチンなどの医薬品が製造されている。従って、これらの医薬品の原材料の尿には、ヒトポリオーマウイルスが迷入する可能性が考えられる。

BKVはヒト胎児腎臓細胞やヒト胎児肺線維芽細胞などでよく増殖するが、JCVは初代ヒト胎児グリア細胞が唯一の感受性細胞であり、JCVの分離や増殖は困難であった。ヒト胎児由来の臓器は、倫理上の理由から入手困難であるため、胎児細胞を用いてのウイルスの分離は実地出来ない。

サル由来SV40は、ヒト由来のBKVやJCVに近縁であるが、Gluzman⁹⁾は、SV40の許容細胞であるミドリザル腎臓由来の培養

細胞CV-1細胞株にDNA複製開始点を欠損させたSV40DNAを導入することにより、SV40のT抗原を発現しているCOS-7細胞を樹立した。COS-7細胞はヒト由来のポリオーマウイルスに感受性を示し、当該ウイルスの増殖と分離が可能になった⁶⁾。しかし、COS-7細胞を用いても当該両ウイルスを分離するには2-4週間の培養期間を必要とする。そこでパポバウイルスのヒト尿への迷入率を把握し、医薬品製造におけるリスク評価法の確立を目的に高感度な検出法を検討した。その結果、迅速にヒトポリオーマウイルスを検出する方法としてMultiplex Polymerase chain reaction(PCR)を用いた核酸増幅法(NAT)が実験目的に沿う結果をしめしたのでここに報告する。

B.材料と方法

尿検体

インフォームドコンセントに同意した健康人20-25歳および50-60歳の2つのグループに分け、それぞれのグループ20人から尿を採取した。採尿後直ちに遠心し細胞沈査とウイルス沈査に分別した。

尿の処理方法

尿30mlを1,000g10分間遠心してえた沈殿物を細胞沈査とし、300 μ lのPBSに溶解した。その上清をさらに100,000g180分間遠心して集めた沈査をウイルス沈査とした。ウイルス沈査は300 μ lの

PBS に溶解した。

培養細胞

Gluzman⁹⁾によりミドリサル腎臓由来 CV-1 の複製開始点を欠損させた SV40 DNA によりトランスフォームして確率された COS-7 細胞をウイルスの増殖と分離に用いた。COS-7 は細胞バンクより分与を受けた。

細胞培養用培地

COS-7 細胞の増殖用培養培地は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に、カナマイシン (50 μ l/ml) とファンキゾン (1.5 μ l/ml) ならびに 10% にウシ胎児血清を加えたものを用いた。

ウイルス分離

ヒトポリオーマウイルスの分離は、COS-7 細胞細胞を用いた。5 \times 10⁵ 細胞を 25cm² Flask に植え込み 18 時間培養した。PBS で細胞を洗浄後、ウイルス検体を 0.1ml 接種した。37°C で 2 時間ウイルスを吸着させた後、PBS で洗浄し、増殖用培地を加えて 37°C で培養した。ウイルス感染後の細胞は、接種 48 時間後に 1 : 5 に希釈し継代した。以後 3 - 4 日の間隔で 1 : 5 の割合で継代し CPE が極限に達するまで続けた。

ウイルス抗体の作製

ウイルス抗原を検出するためにヒトポ

リオーマウイルスのウイルス (V) 抗原に対する抗体を作製した。JCV の V 抗体は JCV の VP1 の JCV 特異的領域のアミノ酸の合成ペプチドをウサギに免疫して作製した。BKV の V 抗体は、精製した中空 BKV 粒子をウサギに免疫して作製した。

間接蛍光抗体法によるウイルス抗原の検出

ウイルス抗原の検出には間接蛍光抗体法を用いた。ウイルスを接種して 7 - 21 日後に適当な間隔で培養容器より COS-7 細胞をカバースリップ入りの培養に移して更に細胞を付着させるために培養した。カバースリップを取り出す時は、培養液を除き、PBS で洗浄した後、冷アセトンで 10 分固定した。アセトン固定した細胞は、BKV と JCV に対する V 抗体と反応させ後、十分量の PBS で洗浄して V 抗体を除去した。次いで FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体と反応させた。PBS で FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を洗浄し、蛍光用スライドグラスにグリセリン緩衝液 (pH9.5) をのせ、その上にカバースリップをマウントし蛍光顕微鏡で V 抗原陽性細胞を観察した。

赤血球凝集 (HA) 反応によるヒトポリオーマウイルスの定量

ウイルスを COS-7 細胞に接種した 7、14、21 と 28 日後に細胞を培養容器より集め後、PBS に浮遊させ、超音波 200W で 3 分間の処理により細胞を破碎し、その後 3,000 rpm で 10 分間遠心した。その上清を HA 反応の試料とした。HA 反応はマイク

ロタイター法を用い、0.5%ヒトO型赤血球を用いて4°Cに90分間放置し、完全凝集を示す凝集価をHA価とした。ウイルスの同定は、特異的V抗体を用いた蛍光抗体法で行った。

COS-7細胞細胞からのウイルスDNA抽出

核酸増幅法(NAT)やササンプロットによるヒトポリオウイルスDNA検出のためのDNA抽出キットは、QIA amp DNA Mini Kitを用いた。尿のウイルス及び細胞沈査からのDNA抽出は、キアゲン社のプロトコールに従った。

JCV及びBKV検出のためのMultiplex PCR用プライマー

特異的にJCVのDNAを増幅するため、JCVゲノム⁵⁾をもとにJCVの複製開始点を含む調節領域396塩基対(bp)を検出する28merプライマーJ-1、J-2を合成した。また、BKVゲノム⁷⁾をもとにBKVのintergenic(IG)領域336bpを検出する28merプライマーBIG-1、BIG-2を合成した。

Multiplex PCRによるウイルスDNAの増幅

0.5mlチューブにJCV及びBKVを特異的に増幅する上流及び下流のプライマーそれぞれ0.5 μ l(5 μ M)、10倍濃度のPCR反応液1.25 μ l(10mM Tris HCl(pH9.0、室温)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂)、25mM

dNTPs 1.25 μ l、滅菌精製水 7.9 μ l、Taq DNA Polymerase 0.1 μ l(0,75U)、鋳型DNA 1 μ lを加えた。ミネラルオイル 12.5 μ lを重層した、チューブをThermal SequencerにセットしPCR反応を開始した。PCR反応は、最初94°Cで120秒、変性させ後、変性94°Cで、60秒間アニーリングを55°Cで、60秒間、伸長反応を72°Cで、45秒間で20回または35回繰り返した後、伸長反応を72°Cで、180秒間行った。

増幅されたDNA断片の確認

PCR反応終了後1.3%のアガロースゲルを用いた電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色し、標的とした長さのDNAが増幅されているかを確認した。サイズマーカーはプロメガ社のPCRマーカーを用いた。

ウイルスDNAプロブの作製

デゴキシゲニン(Dig)-UTPによるウイルスDNA標識は、ロッシュ社のプロトコールに従った。ウイルスDNA7 μ l(約350ng)に精製水8 μ lを加え全量15 μ lをチューブに入れ、100°Cで、10分間加熱し変性させ、氷中で急冷し、DNAポリメラーゼとDig-UTPを加え、37°C 20時間ウイルスDNAを標識した。これを標識プローブとし、ハイブリダイゼーションに用いた。

ササンプロットハイブリダイゼーション

尿細胞沈査およびウイルス沈査から抽

出した DNA 溶液 $10\mu\text{l}$ と 10 倍濃度の酵素反応液 $2\mu\text{l}$ と 10%BSA $2\mu\text{l}$ を加えて、全量 $14\mu\text{l}$ にしたものと、対照として精製水 $5\mu\text{l}$ に BKV 又は JCV DNA を $2\mu\text{l}$ ($0.31\mu\text{g}$) と 10 倍濃度酵素反応液 $1\mu\text{l}$ と BSA $1\mu\text{l}$ と Eco RI $1\mu\text{l}$ (5U) を加えて、全量 $10\mu\text{l}$ にしたものを準備した。37°C で 1 時間反応させた後、1%アガロース電気泳動を行った。ナイロン膜へ転写した後、プレハイブリダイゼーションを行いラベルした DNA を注入し、42°C でハイブリダイゼーションを行った。20 時間後、0.1%SDS を含む $2\times\text{SSC } 100\text{ml}$ で室温でナイロン膜を 5 分間 2 回洗浄し、0.1%SDS を含む $0.1\times\text{SSC } 100\text{ml}$ に、68°C で 15 分間 2 回洗浄した。次に、アルカリフォスファターゼ標識抗 Dig 抗体 $2\mu\text{l}$ を加え室温に 30 分間反応させた。その後、未反応のアルカリフォスファターゼ標識抗 Dig 抗体を洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、NTB/BCIP 溶液 $100\mu\text{l}$ を加え、発色させプローブとハイブリダイズしたウイルス DNA を検出した。

C. 結果

1. BKV DNA 及び JCV DNA の検出用プライマーの特異性と検出感度

JCV 調節領域を検出するための 28 mer のプライマー (J-1 と J-2) を合成した。このプライマーセットは 396bp の JCV DNA 断片を増幅するがアニーリング温度を

55°C以下にさげても BKV DNA の増幅は認められなかった。

一方、BKV の intergenic (IG) 領域を検出するプライマー、BIG-1、BIG-2 を合成した。このプライマーは 336bp の BKV DNA 断片を増幅するがアニーリング温度を 55°C以下にさげても JCV DNA 断片の増幅は認められなかった。これらのプライマーセットのそれぞれのウイルス DNA の増幅に対する特異性は非常に高く、またウイルス DNA 検出感度はそれぞれ 10fg あった。(Fig.1)

2. Multiplex PCR による BKV DNA 及び JCV DNA の検出

BKV と JCV の両ウイルスの DNA を特異的に同時に検出する Multiplex PCR を行うためのプライマーの組み合わせを検討した。

JCV DNA を増幅する J-1、J-2 と BKV DNA を増幅する BIG-1、BIG-2 の 2 種類のプライマーセットを組み合わせた Multiplex PCR を行なったところ 336bp (BKV IG 領域) および 396bp (JCV 調節領域) が同時に検出された。

またこのプライマーの組み合わせを用いて、アニーリング温度を 55°C で行う通常の PCR とアニーリング温度を 65°C から段階的に下げてゆく Touch down PCR と比較検討したところ、両者にウイルス DNA 断片の増幅ならびに検出感度には差がなかった (データは示さず)。また両ウイルスの検出感度はそれぞれ 10fg であった。

(Fig.2)

3. 尿中に混在するヒトポリオーマウイルスの検出

尿中に排泄されているかも知れないヒトポリオーマウイルスを検出するため、20 25 歳及び 50 60 歳の健常人それぞれ 20 人から採取した尿 30ml を 1,000g、10 分低速遠心した細胞沈査と更に細胞沈査を除いた上清を 100,000g、180 分間した遠心した沈査をウイルス沈査としたサンプルを作製した。ウイルス DNA を検出するため、細胞沈査とウイルス沈査から抽出した DNA をサザンブロットハイブリダイゼーションによりウイルス DNA の検出を検討した。20 25 歳の尿からは、BKVDNA および JCVDNA は検出されなかった。一方、50 60 歳の尿からは JCV DNA が 40%、BKV DNA が 15%の割合で検出された。細胞沈査とウイルス沈査において検出されたウイルス DNA 量を比較すると、細胞沈査の検体がウイルス沈査の検体と比較し約 1.5 倍ウイルス DNA 量が多かった。ウイルス沈査検体におけるウイルス DNA を定量したところ、尿 30 ml あたり JCV では 5 20pg、BKV では 1 5pg の DNA が検出された。

Multiplex PCR による BKV DNA と JCV DNA の検出では、サザンブロットハイブリダイゼーションで検出されなかった 20 25 歳の尿からも BKV が 10%、JCV が 10%の割合で検出された。(Fig.3)

4. 尿からヒトポリオーマウイルスの分離

Multiplex PCR でウイルス DNA 検出された細胞沈査とウイルス沈査を COS-7 細胞に接種し、ウイルス分離を試みた。Multiplex PCR でウイルス DNA が検出されたサンプル全てから 14 および 21 日後の感染細胞 DNA 抽出サンプルでウイルス DNA が、PCR で検出され、またウイルス V 抗原が感染細胞に検出された。またサンプル接種 21 35 日後に赤血球凝集反応を用いて 32 256 HA 力価を示す BKV または JCV が検出された。HA 力価が認められた COS-7 細胞には BKV 又は JCV 特異的 V 抗原が検出された。

D. 考察

尿からのヒトポリオーマウイルスを検出するため、ポリオーマウイルス科に見出される共通塩基配列をもとにヒトポリオーマウイルスを検出が出来る、22mer のプライマー CR-1、CR-2 については Flaegstad らが報告している⁴⁾。このプライマーセットは、マウスポリオーマウイルス、サルの SV40、ヒトの BKV、JCV の DNA 断片を増幅するが、アニーリング温度が 55°Cになると BKV 対照サンプルで BKV のバンドと非特異バンドの 2 つのバンドが出現した。(データは示さず) 従って尿中のポリオーマウイルス DNA の検出には信頼性にかけると思われる。また検出されたウイルス DNA バンドが JCV DNA か BKV

DNAであるかを同定するためには、PCRでCR-1、CR-2セットにより増幅されたDNA断片を制限酵素で処理して遺伝子多型(RFLP)解析を行うか、またはそれぞれのウイルスに特異的なプライマーを用いて再度PCRを行うことによりウイルスを同定するため迅速性に欠けると考えられる。

尿のウイルス沈査を用いた Multiplex PCRによるBKV DNA、JCV DNAの検出は、サザンブロットハイブリダイゼーションより100倍感度が高く(Fig.3)、迅速にJCV DNAとBKV DNAを同時に検出することが可能であった。(Fig.1)通常 Multiplex PCRでは反応液中に多くの様々なプライマーセットが存在するため非特異的PCR産物やプライマー・ダイマーなどが生じる。これらの非特異的産物の増幅は、目的PCR産物の増幅と拮抗し、感度の低下につながる。そこで非特異的産物の増幅を避けるため、アニーリング温度を65°Cから始め、1サイクルごとに1°Cづつ下げたおこなうTouch down PCRや Multiplex PCR用の専用反応液キットなどが販売されている。我々が作製したBKV DNAとJCV DNA検出のための Multiplex PCR用プライマーセットを用いると複雑な Multiplex PCRの至適化を行う必要もなく、通常のPCR反応条件でも非特異的PCR産物も出現せず検出感度も10fgであった(Fig.1)。Multiplex PCRを用いてヒトポリオマウイルスDNAの検出は、尿中のウイルスDNAの定量は今

回のシステムでは出来ないが、ライトサイクラーシステムによるPCRを行えば試料中のウイルスDNAをリアルタイムで即座に定量が可能になると考えられる。

ヒト健常人尿のウイルス沈査を検体として Multiplex PCRを用いてヒトポリオマウイルスDNAの検出を行ったところ、20-25歳ではBKV DNA及びJCV DNAがそれぞれ10%の割合で検出された。また50-60歳ではBKV DNAが15%およびJCV DNAが40%の割合で検出された。検出されたウイルスDNAが感染性ウイルス由来かどうかを確認するため、ウイルスDNAが検出されたサンプルからCOS-7細胞を用いてウイルスを増殖させて分離を行った。その結果、ウイルスDNAが検出されたサンプル全てからウイルスが分離された。これらの結果は、ヒト健常人においては20-25歳ではそれぞれ10%がBKV DNAおよびJCV DNA、50-60歳では15%がBKV、40%がJCVを尿中に排泄していることを示唆していると考えられる。

特に50-60歳の尿では40%の割合でJCVを尿中への排泄がみられ、また排泄されるウイルスDNAの量もBKVでは1-5pgであったのに比較し尿中に排泄されるJCV DNAは5-20pgと多い。このウイルスDNA量は、尿1mlあたり0.3-1.3×10³ウイルス粒子に相当する。JCVは、高齢者集団のみだけでなく妊婦集団でも潜在ウイルスの賦活化が認められ、尿中にウイルスが排泄されていることが報告²⁾されていることから、50歳代以降の閉経期女性

の尿から製造される下垂体性腺刺激ホルモン、妊婦尿から製造される胎盤性腺刺激ホルモン製剤には、用いた尿原材料中に JCV が高率に迷入している可能性が考えられる。ヒトポリオーマウイルスはエンベロープを持つウイルスに比較し物理化学的処理に強い抵抗性を示すため、迷入したウイルスの滅菌方法や除去方法を検討する必要がある。迷入ウイルスのバリデーション法も含めウイルスの検出法と危険因子の除去法を現在検討中である。

最近 JCV の agno 遺伝子の塩基配列や agno 蛋白がヒトの髄芽腫細胞に検出されたこと³⁾から、髄芽腫に存在する JCV 関連ゲノム解析を行う必要もある。また尿中に排泄される JCV ゲノムが神経系細胞でどのような構造変化を起こし維持されるのかを今後解析検討したい。

E. 文献

- 1) Arthur RR, Dagostin S, & Shah KV :
Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27:1174-1179(1989)
- 2) Coleman DV , Wolfendale MR, Daniel RA, Dhanjal NK, Gardner SD, Gibson PE, & Field AM : A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J. Infect. Dis.* 142:1-8(1980)
- 3) Del Valle L, Gordon J, Enam S, Delbue S, Croul S, Abraham S, Radhakrishnan S, Assimakopoulou M, Katsetos CD, & Khalili K : Expression of human neurotropic polyomavirus JCV late gene product agnoprotein in human medulloblastoma. *J Natl Cancer Inst* 94:267-73 (2002)
- 4) Flaegstad T, Sundsfjord A, Arthur RR, Pedersen M, Traavik T : Subramani S Amplification and sequencing of the control region of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction. *Virology* 180:553-560(1991)
- 5) Frisque RJ, Bream GL, & Cannella MT : Human polyomavirus JC virus genome *J. Virol.* 51: 458-469 (1984)
- 6) Hara K, Sugimoto C, Kitamura T, Aoki N, Taguchi F, & Yogo Y : Archetype JC virus efficiently replications in COS-7 細胞 cells, Simian cells constitutively expressing simian virus 40 T antigen *J. Virology* 72 5335-5342 (1999)
- 7) Seif I, Khoury G, & Dhar R : The genome of human papovavirus BKV Cell

18: 963-977 (1979)

26:1057-1064(1982)

8) Taguchi F, Kajioka J, & Miyamura T :
Prevalence rate and age of
acquisition of antibodies against JC
virus and BK virus in human sera.
Microbiol. Immunol.

9) Gluzman Y : SV40-transformed simian
cells support the replication of
early SV40 mutants. Cell
23:175-82(1981)

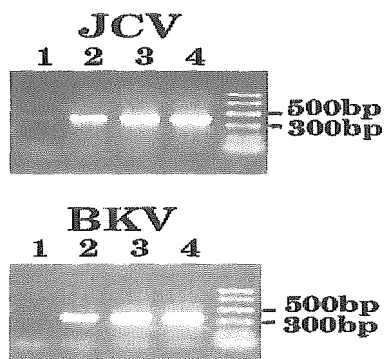


Fig.1 ヒトポリオーマウイルスの検出感度

Fig.1 ヒトポリオーマウイルス PCR による検出感度

ウイルス DNA を希釈し JCV の複製開始点を検出するプライマー (J-1、J-2)、BKV の intergenic (IG) 領域を検出するプライマー (BIG-1、BIG-2) を用いて PCR を行った。

レーン 1; 1fg、レーン 2: 10fg、レーン 3: 100fg レーン 4: 1pg

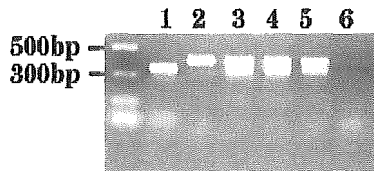


Fig.2 Multiplex PCRによるヒトポリオーマウイルス DNAの検出

Fig.2 Multiplex PCR によるヒトポリオーマウイルス DNA の検出

BKVDNA および JCVDNA を混合したのち希釈し JCV の複製開始点を検出するプライマー (J-1、J-2)、BKV の intergenic (IG) 領域を検出するプライマー (BIG-1、BIG-2) を用いて Multiplex PCR を行った。

レーン 1; BKV DNA 10pg、レーン 2: JCV DNA 10pg、レーン 3: BKV DNA、および JCV DNA, 1pg
 レーン 4: BKV DNA および JCV DNA, 100fg、レーン 5: BKV DNA および JCV DNA, 10fg、
 レーン 6: BKV DNA および JCV DNA 1fg

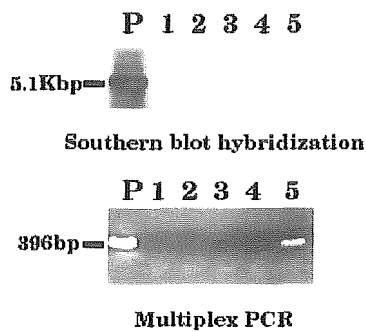


Fig. 3 尿中のJCウイルスDNAの検出感度の比較

Fig.3 尿中の JC ウイルスの検出感度の比較

20 25歳の5名の尿30mlを100,000g、3時間遠心した沈査からDNAを抽出した。サザンブロットハイブリダイゼーションは、制限酵素EcoRIで消化し、1%アガロース電気泳動後ナイロン膜に転写し、デゴキシゲニン-UTP標識JCVDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

Multiplex PCRは、JCV DNAの複製開始点を検出するプライマー(J-1、J-2)、BKV DNAのintergenic (IG) 領域を検出するプライマー(BIG-1、BIG-2)を用いてPCRを行った。サザンブロットハイブリダイゼーション：レーン P: JCVDNA (10pg) レーン:1 5 尿ウイルス沈査 DNA

Multiplex PCR: レーン P: JCV DNA (10ng) レーン:1 5 尿ウイルス沈査 DNA

厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）

（総括・分担）研究報告書

IFN 製剤のウイルス制御に関する研究

分担研究者 小長谷昌功 国立感染症研究所ウイルス第3部室長

研究要旨：インターフェロン（IFN）製剤の生産手段は多様である。

培養有核細胞を用いた場合は生物由来製剤になり製造工程におけるウイルスの安全性確認が不可欠である。種細胞のウイルス否定確認試験、細胞培養に使用した培養液成分、生物由来試薬、IFN 誘導に用いたセンダイウイルス（SeV）、SeV 調製用タマゴ由来ウイルスの排除等、製造工程におけるウイルス除去の確保と確認試験を整理し明らかにする。

A.研究目的

IFN 製剤は世界初のバイテク製剤である。欧米では大腸菌発現組換製剤が主流であるが、我が国においては同様な組換製剤の外に、2種類の天然型 IFN α 製剤と、1種類の天然型 IFN β 、それから天然型 IFN γ 製剤が承認されている。天然型 IFN α の場合はヒト由来腫瘍細胞を大量培養してセンダイウイルス（SeV）を感染させて IFN を誘導し精製したものを製剤として販売している。天然型 IFN γ の場合は同様にヒト由来腫瘍細胞に LPS 処理を行って誘導し精製している。天然型 IFN β はヒト2倍体線維芽細胞に2重鎖 RNA（Poly I:Poly C）と代謝阻害剤を用いて大量生産を実現させている。このような動物（ヒト）由来細胞を用いた場合は動物由来ウイルスの混入が懸念されるので安全性の確認が不可欠である。即ち、天然型 IFN 製剤の製造工程を知ることはバイテク製剤のウイルス安全性の問題点を把握する上で最も適切なモデルと言える。

B.研究方法

1. IFN 製剤のウイルス安全性確保に関する調査

IFN 製剤の製造原理、方法および製造工程の詳細な情報を把握し、ウイルス安全性対策をどのように実施しているのか、またどのような方法を導入すべきか等について調査研究した。特に Ball-1 細胞（ヒトリンパ芽球細胞）を出生後48時間以内に免疫抑制剤投与ハムスターに細胞移植し、*in vivo* で細胞増殖させ、その腫瘍塊を切り出してタンク培養して SeV を感染させて生産する製造過程を含めた製剤の特性を中心に調査研究する。天然型 IFN γ の場合は HBL-38 細胞（ヒトミエロモノサイト）を同様な手順で細胞を増殖させ、LPS で IFN γ を誘導している。 α 、 γ の両製剤とも精製工程でマウス由来モノクローナル抗体カラムで精製している。同じく IFN α 生産用ナマルバ細胞の場合は8千リットルのタンクで培養し大量の SeV を感染させている。この製剤は抗 IFN α 牛 IgG カラムで精製す

る。ヒト2倍体線維芽細胞を用いる天然型IFN β の場合はトリプシン等の試薬、培養用の牛血清、ヒト血清アルブミン等が製造に用いられている。従って、細胞バンクや製造に用いる動物（ハムスター）のウイルス安全性に加えて、SeV及び卵由来ウイルス、抗体カラム由来動物、培養用牛血清、添加剤のヒト血清アルブミン、動物由来試薬（酵素）等におけるウイルス汚染の防止に考慮する必要がある。

C.研究結果

IFN製剤のウイルス安全性

1. ウイルスクリアランス

スパイクテスト等のウイルススクリアランスについては動物由来製剤の一般的課題と同じであるが HSV-1(Herpes Simplex Virus-1), SV-40(Simian Virus Type40), MuLv(Murine Leukemia Virus), Polio, Sev 等でウイルス除去率の成績を出している。

2. 細胞バンクでの試験

種細胞については製造承認申請時にウイルス陰性確認試験成績を提出している。マスターセル、ワーキングセル等はEBV(Epstein-Barr Virus), 電子顕微鏡での粒子観察、マウス、モルモットでの脳内、腹腔内接種、Vero細胞/MRC5細胞への接種試験、逆転者酵素測定、感受性細胞への接種試験によるレトロウイルス否定試験、LCM (Lymphocytic Chorimeningitis), PVM (Pneumonia Virus of Mice), RT3 (Reovirus Type 3), SeV, SV5(Simian Virus Type 5)等は抗体産生陰性で確認している。英国での事例として、リスザルのレトロウイルスがナマルバ細胞に混入して

いたとの論文が報告された。これは、製造承認申請のためにウイルス否定試験を行った種細胞と製造開始後の種細胞が保存管理を間違いからか同一の系統でなかった事によるものと考えられている。

3. ハムスター個体レベルでのウイルス安全性

ハムスター個体については、閉鎖系での繁殖管理を行い、餌などを60℃で1晩熱処理している。定期的に実験動物中央研究所に依頼して感染症の陰性確認を行っている。ハムスターのモニタリングとしてはLCM, SeV, MHV(Mouse Hepatitis virus)等の検査を実施している。

4. SeVや製造試薬の迷入ウイルス

SeV中のタマゴ由来ウイルスについてはニワトリ白血病ウイルス陰性タマゴを用いてないので、当然AvLv(Avian Leukemia virus)も試験対象になる。

マウスIgGまたはウシIgG抗体カラムを用いる場合はマウス由来ウイルス、ウシ由来ウイルス、特にこの数年はプリオン対策が求められる。

天然型IFN α 、 β 、 γ 産生用のための細胞培養には牛胎児血清または新生児牛血清を使用している。現在牛血清についてはBSE感染(プリオン)の問題があり、非流行国から血清を入手して用いている。また牛血清にはBovine Pestivirus(BPV)等の混入が懸念されたがウイルス検査陰性証明書付きの血清を用いている。しかしIFN製剤にBPVのDNA断片の存在をPCR法で検出した報告もある。ワクチン製造ではウシ血清存在下で培養していたのでプリオン対策が急務である。

5. 製造原液での試験

以上の製造工程を踏まえて IFN α 製剤原液ではマウス *in vivo* 試験で LCM、タマゴ接種試験で SeV, IEV (Infectious Ectromelia Virus), RT3 の試験をし、PCR で AvLv (Avian Leukemia Virus), 感受性 DBT 細胞で MHV (Mouse Hepatitis virus) 試験を実施している。また Vero 細胞接種による広範な迷入ウイルス否定試験も実施されている。

D. 考察

IFN 製剤のウイルス安全性

医薬品のウイルス安全性を確保するためにどの程度までの試験を要求されるかについての判断は難しい。即ち、未知のウイルスの潜在的危険性を完全に排除する事は不可能とも言える。しかし、現在までの知り得る情報にもとづく範囲内での安全性確認試験と製造工程におけるウイルスクリアランス試験にもとづく安全性確保の推定は充分信頼できると思われる。しかしナマルバ細胞はのレトロウイルス混入例からも承認審査段階や、GMP 査察でも見落とすことがあり得るので製造工程に複数のウイルス不活化ないし除去工程を入れる必要がある。

E. 結論

動物由来医薬品のウイルス安全性対策を理解する上で天然型 IFN 製剤は極めて理解しやすい参考例と言える。特に、ハムスターの *in vivo* で IFN 産生能を持つヒト由来腫瘍細胞を増殖させ、それをタンク培養に移し、タマゴで増殖した生きたセンダイウイルスを感染させて IFN を誘導することによる IFN 製剤の製造工程を知ることは生物

薬品のウイルス安全性確保の現実的問題点を学ぶ上で教材として格好と言える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(特別研究事業)
(総括・分担)研究報告書
人畜共通感染症ウイルスのリスク評価研究
(主任又は分担研究者) 加藤 篤 国立感染症研究所・室長

研究要旨 初代培養細胞を用いて製造される生ワクチンには常に細胞を採取した動物に由来する感染性因子迷入の危険がつきまとう。トリ胚由来細胞を用いる製剤の場合にはトリレトロウイルス迷入の可能性があるため、この危険性評価のために、PERT (Product Enhanced RT assay)と定量的 PCR 法を併用し検討した。その結果、従来法に比べより高感度でより多種類のレトロウイルスを検出できる等の利点を有しており危険性評価方法として適当であることが判明した。

A. 研究目的

初代培養細胞を用いて製造され、特に動物由来物質の不活化操作を伴わない生ワクチン製剤には如何に製品の製造ラインを無菌化しても常に細胞を採取した動物に由来する感染性因子迷入の危険がつきまとう。麻疹及びおたふくかぜ生ワクチンはニワトリ胚、また一部の風疹生ワクチンはウズラ胚を発育卵から採取し繊維芽細胞を作成してワクチンの製造に用いている。健康なトリ由来の卵を使うのはもちろんのことであるが、ワクチン中にトリ由来ウイルスが混入していない事を確かめる数々の試験が行われていることは言うまでもない。なかでも、レトロウイルスは明らかな変化を伴わずに感染することがあるためレトロウイルス専用の試験が用意されている。しかしながら、その試験方法はかなり煩雑であることから、本研究ではより客観的且つ高感度にトリレトロウイルス迷入の危険性を評価ができる系を作成することを目的とした。

B. 研究方法

トリレトロウイルスのリアルタイム PCR による定量的検出

従来、トリレトロウイルス迷入否定試験は、明らかな細胞変性を起こしてフォーカス形成能を持つラウス肉腫ウイルス 1 型及び 2 型のフォーカスが同型の細胞変性を起こさないあるいは起こしにくいレトロウイルスの感染により緩衝されることを利用して行われてきた。このような緩衝法によるバイオアッセイは(1)熟練を要し、(2)フォーカスの有無の判定には主観の入る余地が残されており、また(3)限られた型のレトロウイルスしか検出できない問題点を含んでいた。そこで、レトロウイルスの持つ逆転写酵素に着目し、この酵素活性により外部から加えた鋳型 RNA を cDNA にし、その cDNA をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅して

検出する PERT (Product Enhanced RT assay)方法を検討した。またこの際、定量的な PCR にすることで、迷入ウイルスの危険度の量的評価を目指した。

C. 研究結果

トリレトロウイルスのリアルタイム PCR による定量的検出

市販の逆転写酵素を 10^2 から 10^8 まで希釈して鋳型、プライマー及び基質と反応させた。反応後、プローブを加え定量的 PCR を行ったところ、 10^2 から 10^7 希釈まで酵素の希釈量と定量的 PCR の数値が一致し、この方法が逆転写酵素量の測定に利用できる目処がたった。次に、明瞭なフォーカス形成をおこさないラウス随伴ウイルス 1 型を 10^1 から 10^4 に希釈し、ニワトリ胚細胞に感染させ 1 週間後の培養上清について PERT 試験を、残った細胞については、従来法による緩衝試験を行った。従来法では 10^2 希釈まで緩衝が認められレトロウイルスの存在が確認された。一方、PERT 方法では、その値は 10^1 から 10^4 希釈に従って低下したが、 10^4 希釈でもまだ検出範囲内であった。次に、緩衝法では検出できない細網内皮症ウイルスを同じように 10^1 から 10^4 に希釈し、ニワトリ胚細胞に感染させ 1 週間後の培養上清について PERT 試験を実施した。細網内皮ウイルスの逆転写酵素活性はこの場合も検出され、その値は 10^1 から 10^4 希釈に従って低下したものの、 10^4 希釈でもまだ検出範囲内であった。

D. 考察

トリレトロウイルスのリアルタイム PCR による定量的検出

定量的 PERT 法は、従来法よりも明らかに少量のレトロウイルスを検出可能であり、今回の評価方法では数十倍検出感度が高かった。また、従来法では判定できないようなウイルスについて

も逆転写酵素活性を持つかぎり測定することが可能であると思われた。本方法は、レトロウイルスの迷入を危惧する他の試験に広く応用できるものと期待される。今後は、陽性と陰性の境界の設定の仕方など検討する必要がある。

E. 結論

(10) 今回検討した定量的 PCR は、トリレトロウイルスの迷入評価試験として利用できるものであった。

F. 健康危害情報

欧米で製造されたワクチン中に類似の方法で逆転写酵素活性が認められたとの論文報告があるが、実際に迷入があったとして、どの程度の危険があるのかの評価はできていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

逆転写酵素活性に基づくトリレトロウイルス検出系の検討 ○大槻紀之、加藤 篤¹、菱山美智子¹、田口邦史、伊藤 治(動薬検、¹感染研) DV19 第 133 回日本獣医学会 平成 14 年 3 月 28 日-30 日, 川崎市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働科学特別研究事業研究費補助金
分担研究報告書

研究課題：レトロウイルスのリスク評価研究

研究分担者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

【目的】Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R(α -Gal) 抗原は旧大陸ザル、類人猿およびヒト以外のほ乳類に発現している。ブタからヒトへの異種間臓器移植の研究において、この抗原が強力な異種抗原となり、補体による超急性拒絶反応(HAR)を引き起こすため、この抗原の発現抑制が考えられている。 α -Gal 抗原発現細胞から産生されるエンベロープウイルスは、エンベロープ上にこの抗原が存在するため、HAR と同様にヒトの自然抗体を介した補体反応により中和されることが報告されている。本研究では α -Gal 抗原の基質を減らし、この抗原の発現が制御されるように β -D-mannoside β 1,4-N-acetylglucosaminyl transferase III(GnT-III)を導入したブタ血管内皮細胞 (SEC) から産生されたガンマレトロウイルスの、ヒト細胞に対する感染性の変化について検討した。

【方法】SEC と GnT-III 遺伝子導入 SEC クローンに、ガンマレトロウイルスのパッケージングシグナルをもつ LacZ 遺伝子を導入し、さらにブタ内在性レトロウイルス B(PERV-B)またはネコ白血病ウイルスサブグループ B(FeLV-B)を感染させた。それらの細胞の培養上清中に含まれるウイルスの力価を、ヒト血清(10%)を添加あるいは非添加の条件下で、HEK293 細胞で測定した。感染価の判定はウイルス接種から2日後に X-gal 染色によって行った。SEC 膜上の α -Gal 抗原量を、GS I B4 lectin を用い FACS にて測定した。

【成績】感染価は感染させたレトロウイルスの違いにより異なり、PERV-B では 10 から 10³、FeLV-B では 10⁵ から 10⁶ のレンジであった。細胞膜上の α -Gal 抗原量の低下の結果、PERV-B および FeLV-B の HEK293 細胞へのヒト血清存在下における感染性は有意に上昇した。

【結論】糖鎖をリモデリングしたブタ細胞から産出されたガンマレトロウイルスは、正常なブタ細胞から産出されたものよりヒト血清に対する感受性が低下し、より容易にヒト細胞に感染可能であることが明らかとなった。現在、異種間臓器移植において、PERV のヒトへの感染が懸念されているが、ブタ細胞膜上の α -Gal 抗原発現抑制により、その危険性がさらに増すことが予想される。

研究協力者 宮沢孝幸

大阪大学微生物病研究所
助教授

現在、臓器移植において、移植用臓器の供給が逼迫している。世界的なドナー不足

を解消するために、動物の臓器を用いる異種移植、特に、ブタからヒトへの臓器移植の可能性が議論されるようになり、その方法が活発に研究されている。異種移植のドナーとして、遺伝的に遠縁なブタが一番の候補に挙げられているのは、以下の理由による。サル臓器をヒトに移植することをWHOが禁止していること、ブタの臓器の大きさが成人のものと近く、解剖学的、生理学的にも類似していること、遺伝子導入ブタ（トランスジェニックブタ）の作出が可能であり SPF 状態を維持できること、繁殖力が旺盛であること、ブタはペットでないことなどである。

しかしながら、ブタの臓器・細胞をそのままヒトに移植した場合、超急性拒絶反応と呼ばれる免疫反応が、移植後数分のうちに引き起こされてしまうという問題が存在する。この超急性拒絶反応はブタ細胞表面上に発現し、ヒト細胞表面上に発現していない α Gal 抗原を、ヒトの自然抗体が認識し補体が活性化することにより引き起こされる。超急性拒絶反応を抑えるために異種移植では、細胞表面上の α Gal 抗原量を抑える方法をとる。既に、糖転移酵素遺伝子を導入したトランスジェニックブタが開発されている。

現在での研究により、ブタには少なくとも2種類（A および B）のヒトの細胞に感染する内在性レトロウイルス（porcine endogenous retrovirus (PERV)）の存在が明らかとなっている。PERV は、マウス白血病ウイルス (MuLV) やネコ白血病ウイルス (FeLV) に近縁なガンマレトロウイルスに属する。PERV はブタのゲノムに多数存在し、現在の技術では取り除くことは非常

に困難であることから、ブタからヒトへの異種間臓器移植において大きな問題となっている。

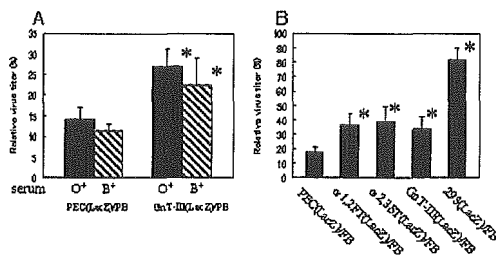
細胞表面上に α -Gal 抗原が多量に存在する動物の細胞から産生されたレトロウイルスは、ヒト血清存在下でほぼ完全に中和され、細胞への感染性は失われる。しかしながら、細胞表面上の α -Gal 抗原が減弱するように遺伝子改変したトランスジェニックブタの細胞から産生される内在性レトロウイルスは、ヒト血清に中和を受けにくくなるのが危惧される。

本研究では、糖転移酵素遺伝子を導入し糖鎖をリモデリングした（すなわち細胞表面上の α Gal 抗原量を減らした）ブタ血管内皮細胞 (SEC) から産生されたガンマレトロウイルス (PERV および FeLV) の、ヒト細胞への感染性の変化を検討した。(Kurihara et al., in press)

まず、SEC と糖転移酵素 GnT-III を導入した SEC に、MuLV の LTR の制御下に、MuLV のパッケージングシグナルを伴った LacZ 遺伝子を導入した。さらに、これらの LacZ 遺伝子を導入した細胞に PERV-B または FeLV-B を感染させ、SEC(LacZ)/PB 細胞および SEC(LacZ)/FB 細胞を樹立した。これらの細胞から産生された PERV-B および FeLV-B の HEK293 細胞（ヒト胎児腎由来の株化細胞）に対する感染性を、シュードタイプアッセイ法にて測定した。SEC は通常の状態では HEK293 細胞に感染性のウイルスを産生していなかったが、SEC(LacZ)/PB 細胞からは、PERV-B の接種後 25 日目に、およそ 10^8 の感染価のウイルス産生が見られた。また、SEC(LacZ)/FB 細胞からは、FeLV-B の接種後 12 日目に、

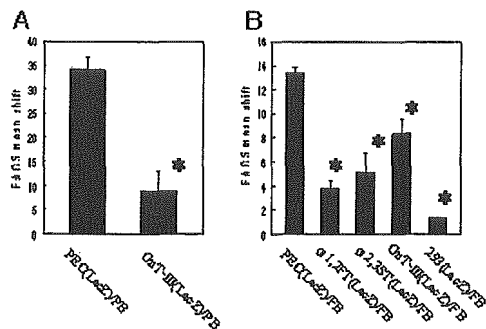
およそ 10^5 の感染価のウイルス産生が見られた。

次に、GnT-III 遺伝子を細胞に導入することが、ガンマレトロウイルスのヒト血清に対する感受性にどのように影響を及ぼすのかを調べた【図1】。GnT-III 遺伝子導入 SEC 細胞に PERV-B および FeLV-B を感染させた細胞 (GnT-III(LacZ)/PB 細胞および GnT-III(Lac)/FB 細胞) を樹立した。ウイルス感染から 20 から 30 日後の培養上清を、HEK293 細胞に接種してシュードタイプアッセイ法によってウイルス力価を測定した。



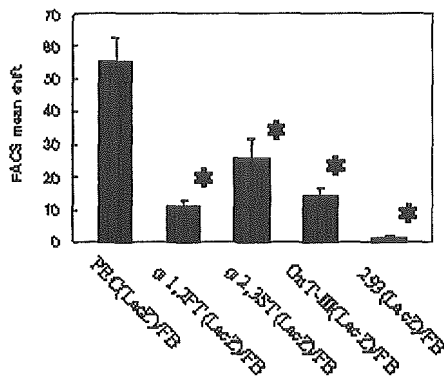
【図1】 (A) Neutralization of PERV-B by HS. Culture supernatants collected from PEC(LacZ)/PB and GnT-III(LacZ)/PB were incubated with blood group O⁺ or B⁺ HS (10%(v/v)), or medium (control). The target HEK293 cells were histochemically stained and lacZ-positive BFU were counted to determine the viral titers. The numbers of BFU relative to the control are shown as percentages. Each value is expressed as the mean \pm SDM for five independent experiments. The ranges of titers for the medium-treated controls were 316-1391 and 69-430 BFU/ml for PEC(LacZ)/PB and GnT-III(LacZ)/PB, respectively. (B) Neutralization of FeLV-B by HS. Culture supernatants collected from PEC(LacZ)/PB, α1,2FT(LacZ)/PB, α2,3ST(LacZ)/PB, GnT-III(LacZ)/PB, and 293(LacZ)/PB, were incubated with pooled HS (10%(v/v)), or medium (control). The numbers of BFU relative to the controls were shown as percentages. Each value is expressed as the mean \pm SDM for four independent experiments. The ranges of titers for the medium-treated controls were 20-50, 40-157, 30-78, 30-80, and 22-221 $\times 10^4$ BFU/ml for PEC(LacZ)/PB, α1,2FT(LacZ)/PB, α2,3ST(LacZ)/PB, GnT-III(LacZ)/PB, and 293(LacZ)/PB, respectively. Significant difference ($P < 0.05$) is indicated by an asterisk (*). 同時に、GnT-III 遺伝子導入による SEC 細胞表面上の α-Gal 抗原量の変化を、GS1B4

レクチンを用いて FACS により調べた【図2】。また、細胞表面上の異種抗原性をヒト血清を用いたフローサイトメータ法にて測定した【図3】。血清を添加したことにより中和されるウイルスの割合を比較すると、糖転移酵素を導入した SEC から放出されたウイルスは、無処置の SEC から放出されたウイルスと比較して、ヒト血清に対する感受性が低下していることが確認された【図1】。GnT-III(LacZ)/PB 細胞と GnT-III(LacZ)/FB 細胞では GnT-III を導入したことにより、細胞表面上の α-Gal 抗原量が GnT-III を導入していない SEC より減少していることが確認された【図2】。また、細胞表面上の異種抗原性も GnT-III 導入細胞では有意に低下していた【図3】。



【図2】 The amount of α-Gal epitope on the cell surface of the PEC(LacZ)/PB and GnT-III(LacZ)/PB (A), and that of the PEC(LacZ)/PB, α1,2FT(LacZ)/PB, α2,3ST(LacZ)/PB, GnT-III(LacZ)/PB, and 293(LacZ)/PB (B). The reduction of the cell surface α-Gal epitope was analyzed by flow cytometry, using the anti-α-Gal epitope, GS1B4 lectin. Each value is expressed as the mean \pm SDM for three (A) or four (B) independent experiments. Significant difference ($P < 0.05$) is indicated by an asterisk (*).

以上の結果から、GnT-III を導入した SEC は無処置の SEC と比較して、α-Gal 抗原量ならびに異種抗原性が低下し、その



【図3】 Level of xenoantigens on the PEG(LacZ)/FB, α1,2FT(LacZ)/FB, α2,3ST(LacZ)/FB, GnT-III(LacZ)/FB, and 293(LacZ)/FB as determined by flowcytometry. Cells were treated with pooled HS (10% (v/v)) as the first antibody and FITC-conjugated anti-human IgG and IgM as the second antibody. Each value is expressed as the mean±SDM for three independent experiments. Significant difference ($P < 0.05$) is indicated by an asterisk (*).

遺伝子導入細胞から産生されるガンマレトロウイルス (PERV-B および FeLV-B) のヒ

ト血清に対する感受性は、無処置の SEC から放出されるウイルスと比較して有意に低下することが確認された。異種移植を成立させるために、ブタ細胞表面上の α-Gal 抗原発現量を減らしたトランスジェニックブタを用いる方法は、そのブタから産生される PERV のヒト血清に対する感受性を低下させ、PERV がヒトに感染する危険性を増長させることが予想される。

発表論文：

Kurihara, T., Miyazawa, T., Miyagawa, S., Tomonaga, K., Hazama, K., Yamada, J., Shirakura, R., and Matsuura Y. (2003) Sensitivity to human serum of gammaretroviruses produced from pig endothelial cells transduced with glycosyltransferase genes. *Xenotransplantation* (in press).