

処理による有意な低下が認められ、IgG の酸化が FcγRIIIa を介したエフェクター細胞の活性化を低下させる可能性が明らかとなった。酸化により IgG の FcγRIIIa 活性化能が低下することは、これまでに報告がなく、本研究により初めて明らかになった知見である。

リボフラビン・UV 処理時に生じる IgG の酸化が Fcγ受容体を介した免疫エフェクター細胞の活性化を低下させるという本研究の結果から、IgG の酸化は TRALI の発症の危険性を高めるものではないと考えられた。しかしながら、これらの結果は IgG の酸化が何らかの高次構造変化を引き起こしていることを示唆するものであり、IgG の構造変化に起因する有害事象（新生抗原の出現による免疫原性の増大など）のリスクについてはさらなる検討が必要であると考えられた。図 4 に示すように、ヒト血清に対してリボフラビン・UV 処理を行った際には、血清中の IgG の Fcγ受容体結合能が亢進する可能性があるため、実際の病原体不活化処理時にはタンパク質成分に対して酸化以外の修飾が起こっている可能性も考慮する必要がある。輸血用血液製剤の病原体不活化処理の有用性の評価においては IgG をはじめとするタンパク質成分に及ぼす影響についても引き続き検討が必要であると考えられる。

E. 結論

病原体不活化技術は、検査が実施されていない病原体や、ウインドウ期の病原体の不活化に有用であると考えられるものの、全ての病原体混入のリスクをゼロにできるものではない。一方で、不活化処理に伴う製剤の品質の変化や新たな有害事象の発生というリスクが生じる。病原体不活化技術導入の可否判断には、有効性・安全性、対費用効果等を考慮する必要があるが、最も重要なことは、現在の製剤より安全性が向上することである。有効成分である血小板が活性化されることの安全性への影響や、リボフラビンとその代謝物の安全性、さらには、本研究により見出されたよう

な製剤成分の機能変化も踏まえて、安全性上の問題がないことを、臨床試験を通じて明らかにしていくことが必須である。また、市販後も安全性に関する十分な調査が必要であると考えられる。

F. 参考文献

- 1) Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzger PS, Gregory KR, Dodd RY. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*. 49 Suppl 2, 1S-29S, 2009
- 2) Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, Ruane PH, Goodrich RP. Separation, identification and quantification of riboflavin and its photoproducts in blood products using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: a method to support pathogen reduction technology. *Photochemistry and photobiology*. 80(3), 609-15, 2004
- 3) Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. *Transfusion medicine reviews*. 22(2), 133-53, 2008
- 4) Korycka-Dahl M, Richardson T. Photodegradation of DNA with fluorescent light in the presence of riboflavin, and photoprotection by flavin triplet-state quenchers. *Biochimica et biophysica acta*. 610(2), 229-34, 1980
- 5) Kale H, Harikumar P, Kulkarni SB, Nair PM, Netrawali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. B. Effect of light. *Mutation research*. 298(1), 17-23, 1992
- 6) 平成 21 年 12 月 24 日 血液事業部会 資料 4-6.

- 7) Cardo LJ, Rentas FJ, Ketchum L, Salata J, Harman R, Melvin W, Weina PJ, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani* infantum in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox sanguinis*. 90(2), 85-91, 2006
- 8) Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci*. 35(1), 5-17, 2006
- 9) Goodrich RP, Gilmour D, Hovenga N, Keil SD. A laboratory comparison of pathogen reduction technology treatment and culture of platelet products for addressing bacterial contamination concerns. *Transfusion*. 49(6), 1205-16, 2009
- 10) Tonnetti L, Proctor MC, Reddy HL, Goodrich RP, Leiby DA. Evaluation of the Mirasol platelet reduction technology system against *Babesia microti* in apheresis platelets and plasma. *Transfusion*. 2009
- 11) 平成 20 年 5 月 23 日 血液事業部会 参考資料 4.
- 12) Murphy WG, Foley M, Doherty C, Tierney G, Kinsella A, Salami A, Cadden E, Coakley P. Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to product safety. *Vox sanguinis*. 95(1), 13-9, 2008
- 13) Cardo LJ, Salata J, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apher Sci*. 37(2), 131-7, 2007
- 14) Rentas F, Harman R, Gomez C, Salata J, Childs J, Silva T, Lippert L, Montgomery J, Richards A, Chan C, Jiang J, Reddy H, Li J, Goodrich R. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion*. 47(2), 240-7, 2007
- 15) Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*. 44(6), 877-85, 2004
- 16) Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, Fuste B, Lopez-Vilchez I, Galan AM, Li J, Goodrich R, Escolar G. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*. 45(6), 911-9, 2005
- 17) AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Taylor H, Whitley P, Li J, Edrich R, Goodrich RP. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion*. 45(8), 1335-41, 2005
- 18) Li J, Lockerbie O, de Korte D, Rice J, McLean R, Goodrich RP. Evaluation of platelet mitochondria integrity after treatment with Mirasol pathogen reduction technology. *Transfusion*. 45(6), 920-6, 2005
- 19) Picker SM, Steisel A, Gathof BS. Cell integrity and mitochondrial function after Mirasol-PRT treatment for pathogen reduction of apheresis-derived platelets: Results of a three-arm in vitro study.

Transfus Apher Sci. 40(2), 79-85, 2009

- 20) Li J, Goodrich L, Hansen E, Edrich R, Gampp D, Goodrich RP. Platelet glycolytic flux increases stimulated by ultraviolet-induced stress is not the direct cause of platelet morphology and activation changes: possible implications for the role of glucose in platelet storage. Transfusion. 45(11), 1750-8, 2005
- 21) 平成 15 年 11 月 7 日 薬食審査発第 1107001 号
- 22) Kale H, Harikumar P, Nair PM, Netrawali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. A. Effect of metabolic enzymes. Mutation research. 298(1), 9-16, 1992
- 23) Gilliss BM, Looney MR. Experimental models of transfusion-related acute lung injury. Transfus Med Rev. 25(1), 1-11, 2011
- 24) Ambruso DR, Thurman G, Tran K, Marschner S, Gathof B, Janetzko K, Goodrich RP. Generation of neutrophil priming activity by cell-containing blood components treated with pathogen reduction technology and stored in platelet additive solutions. Transfusion. 2010
- 25) 岡崎仁. 輸血関連急性肺障害. 検査と技術. 33(13), 1536-9, 2005
- 26) 厚生労働省医薬食品局血液対策課. 輸血療法の実施に関する指針 (改訂版) 2005
- 27) Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Yokoi H, Nakamura K, Shitara K. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of FcγRIIIa functional polymorphism. Clin Cancer Res. 10(18 Pt 1), 6248-55, 2004

G. 研究発表

1. 論文発表・総説

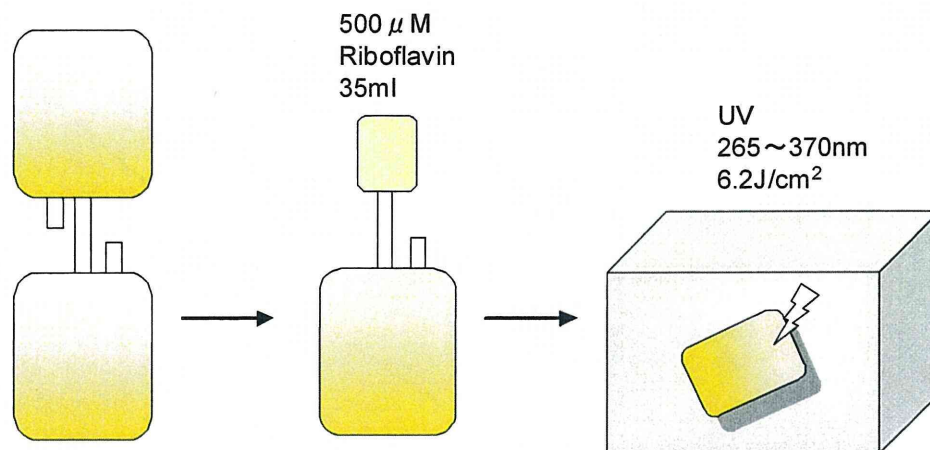
- 1) 山口照英, 石井明子 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保 臨床評価 36, 611-627 (2009)
- 2) Takao Hayakawa, Akiko Ishii-Watabe: Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity. Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals: Practical and Applied Considerations. II-Regulatory requirements, Published by John Wiley & Sons Inc., USA New Jersey, Edited by Michael Tovey. Pp.57-80 (2011)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

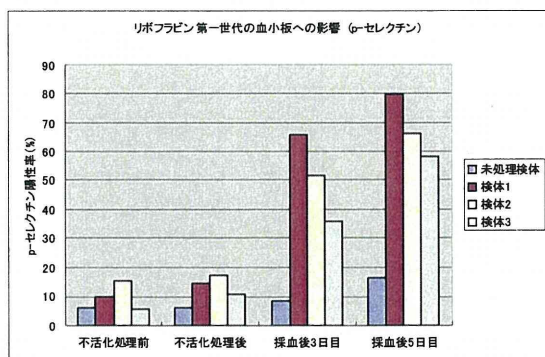
なし



①製剤を照射用バッグに移す ②リボフラビン溶液を添加する ③UV照射する(6~10分)

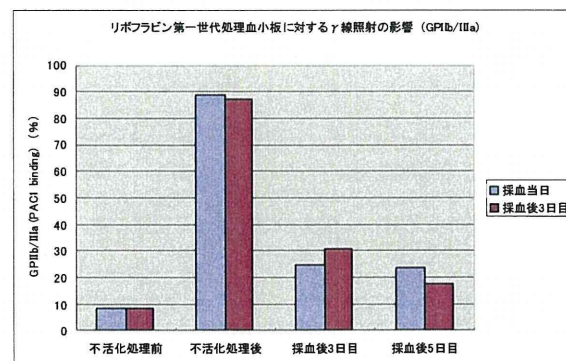
図1 リボフラビンを用いた不活化法の概略

(A)



p-セレクトリン	不活化 処理前	不活化 処理後	採血後 3日目	採血後 5日目
未処理検体	6	6	8.5	16.5
検体1	9.7	14.4	65.7	79.8
検体2	15.3	17	51.5	66.4
検体3	5.2	10.6	36	58.4

(B)



GPIIb/IIIa γ線照射	不活化 処理前	不活化 処理後	採血後 3日目	採血後 5日目
採血当日	8.3	88.8	24.6	23.6
採血後3日目	8.3	86.9	30.9	17.4

(未処理検体のデータはない)

図2 リボフラビンによる不活化処理の血小板への影響

(平成21年12月24日血液事業部会 参考資料4・6)

日本赤十字社からの報告データをグラフ化)

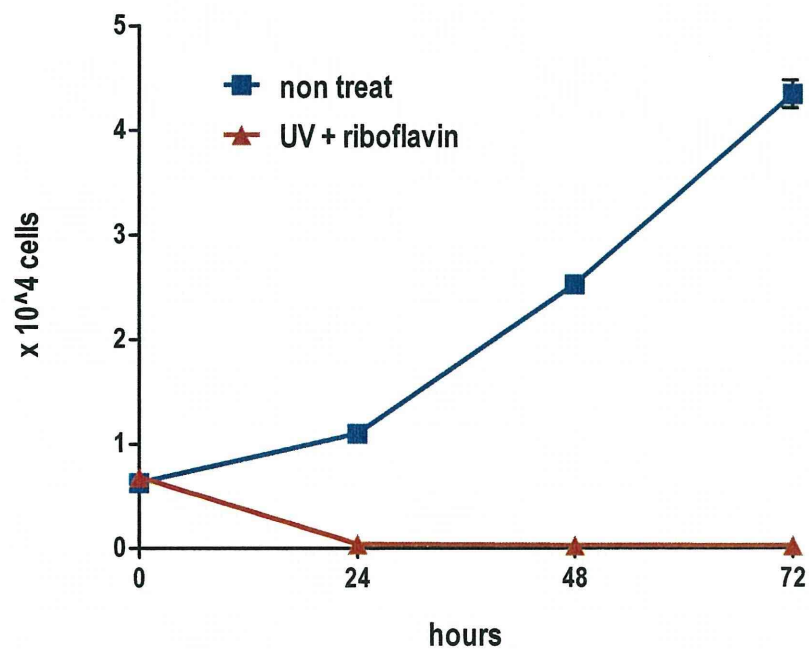


図 3 リボフラビン・UV 処理による白血球増殖抑制の確認

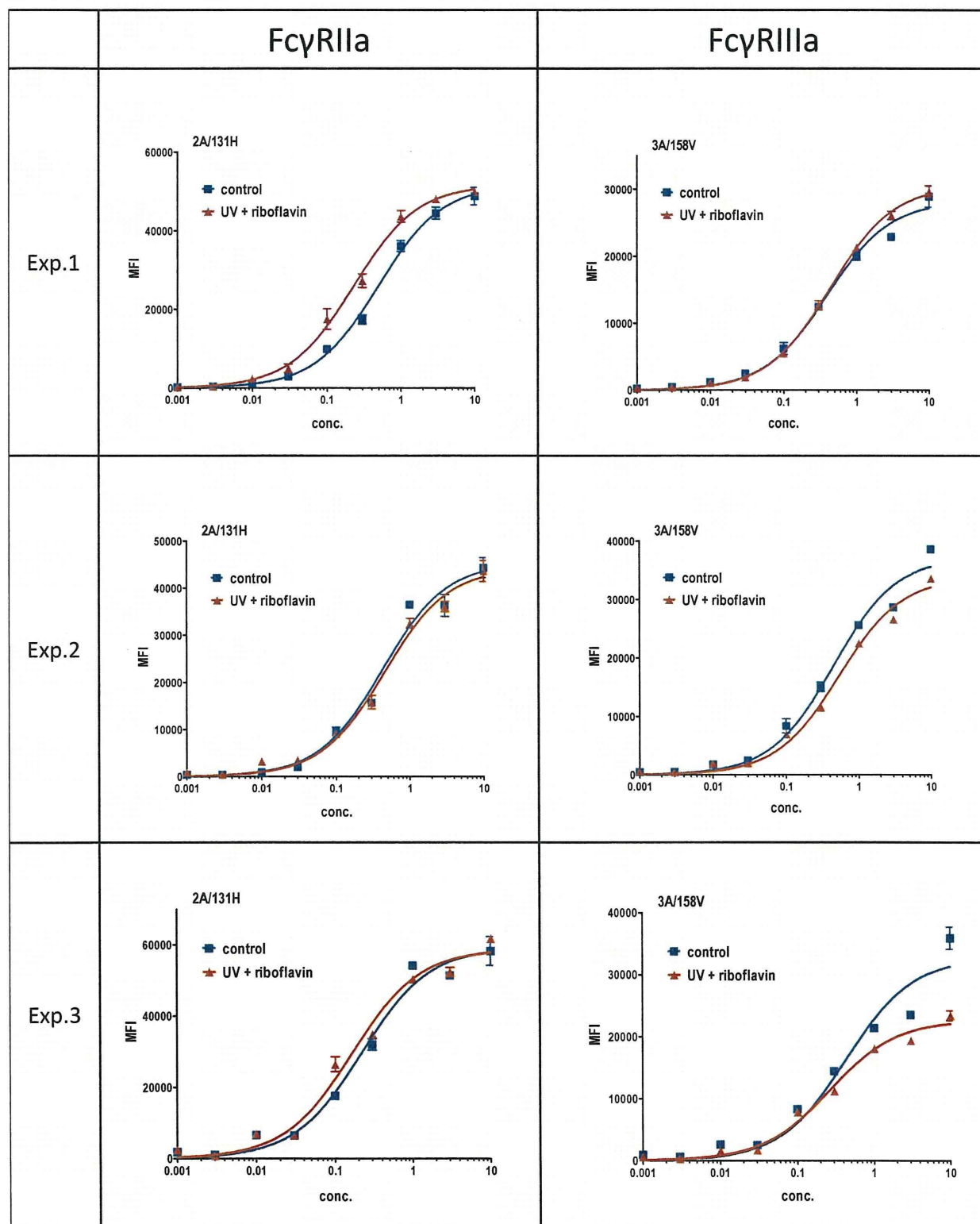


図4 IgGのFcγ受容体結合に対するリボフラビン-UV処理の影響

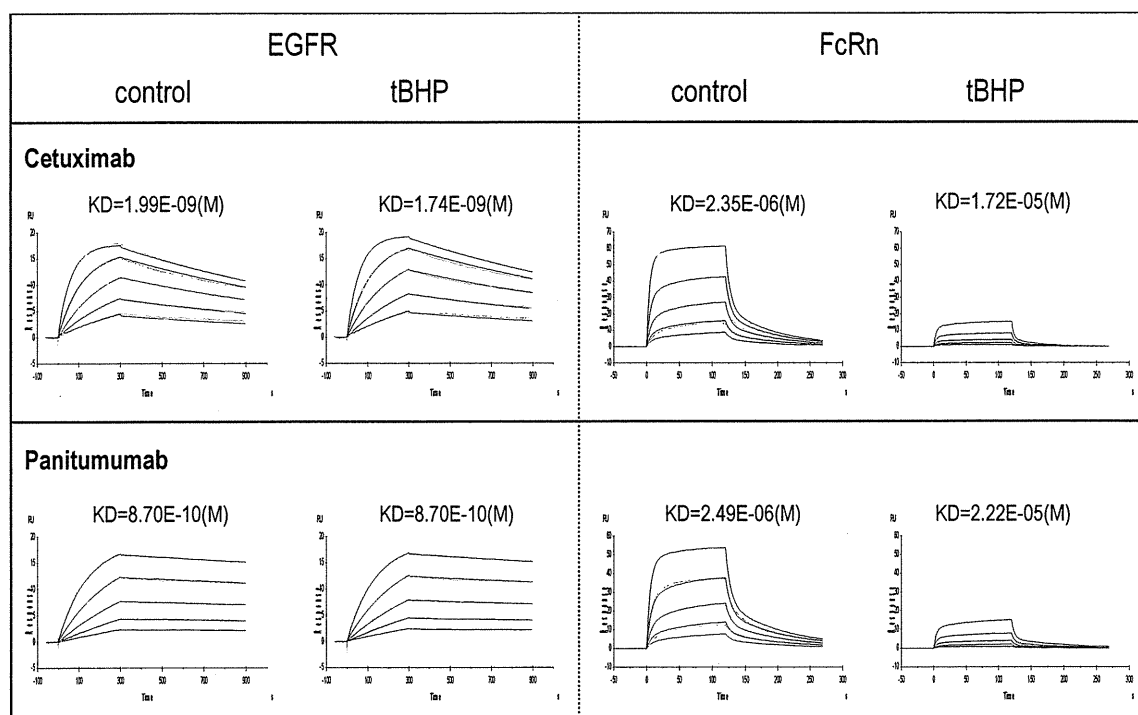


図 5 IgG の酸化が抗原（EGFR）結合、及び、FcRn 結合能に及ぼす影響の検討

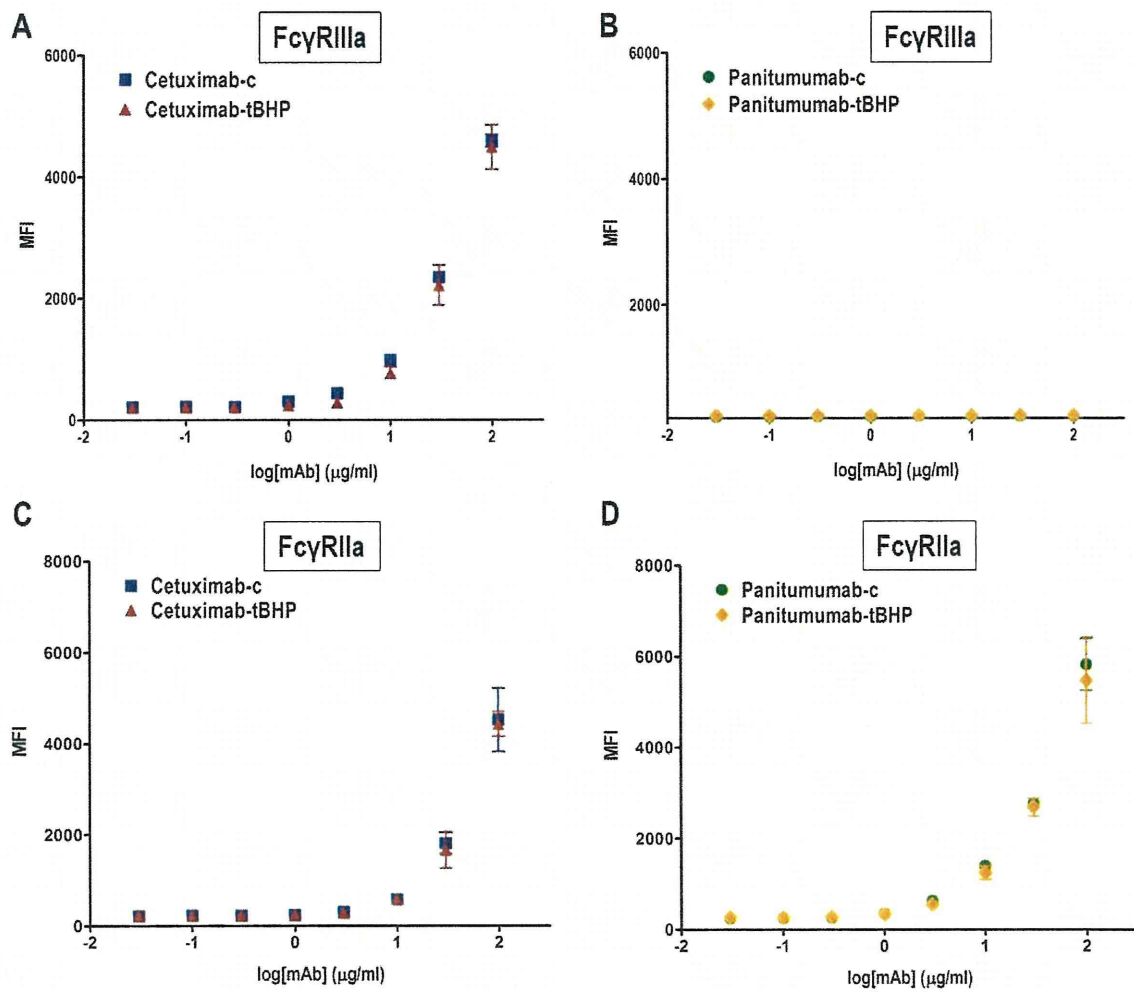


図6 IgGの酸化がFcγ受容体結合能に及ぼす影響の検討

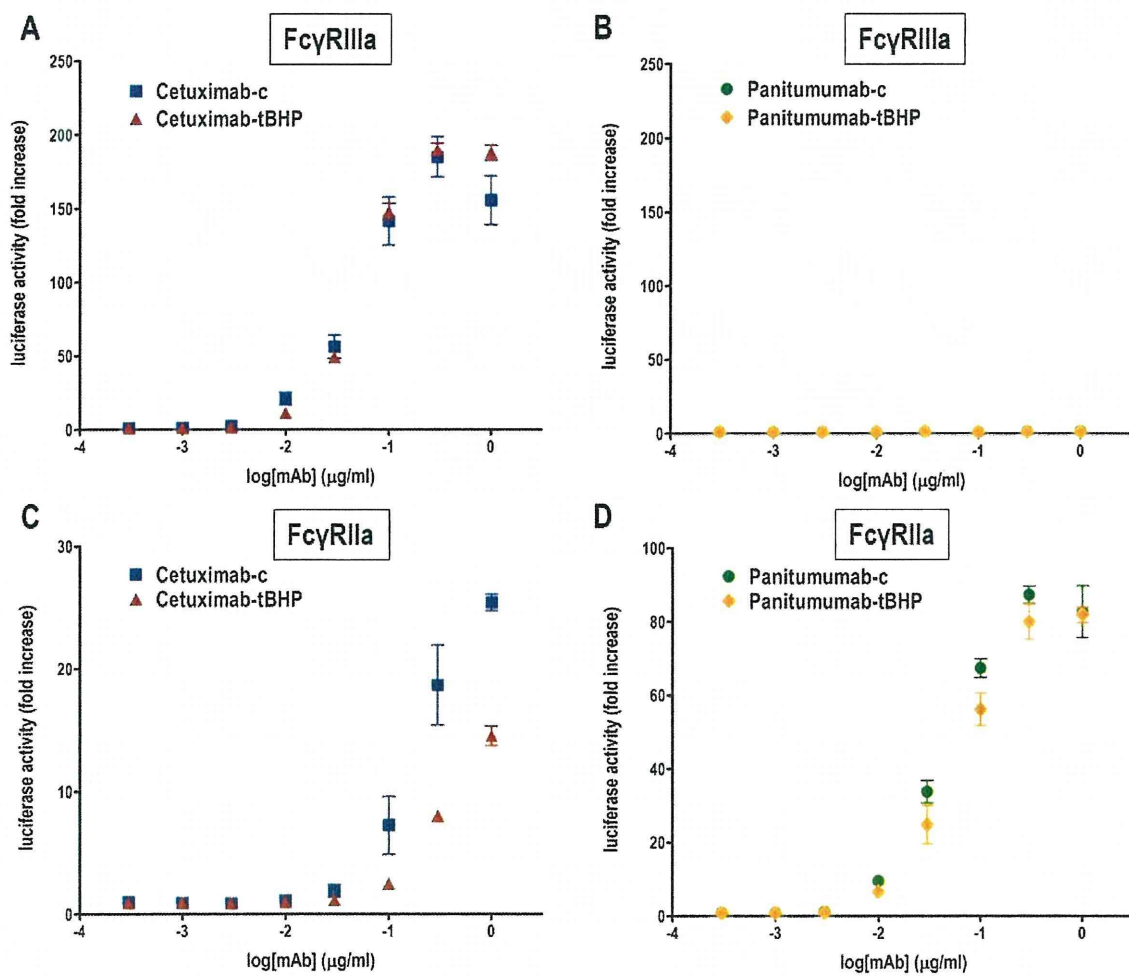


図 7 IgG の酸化が Fcγ 受容体活性化能に及ぼす影響の検討

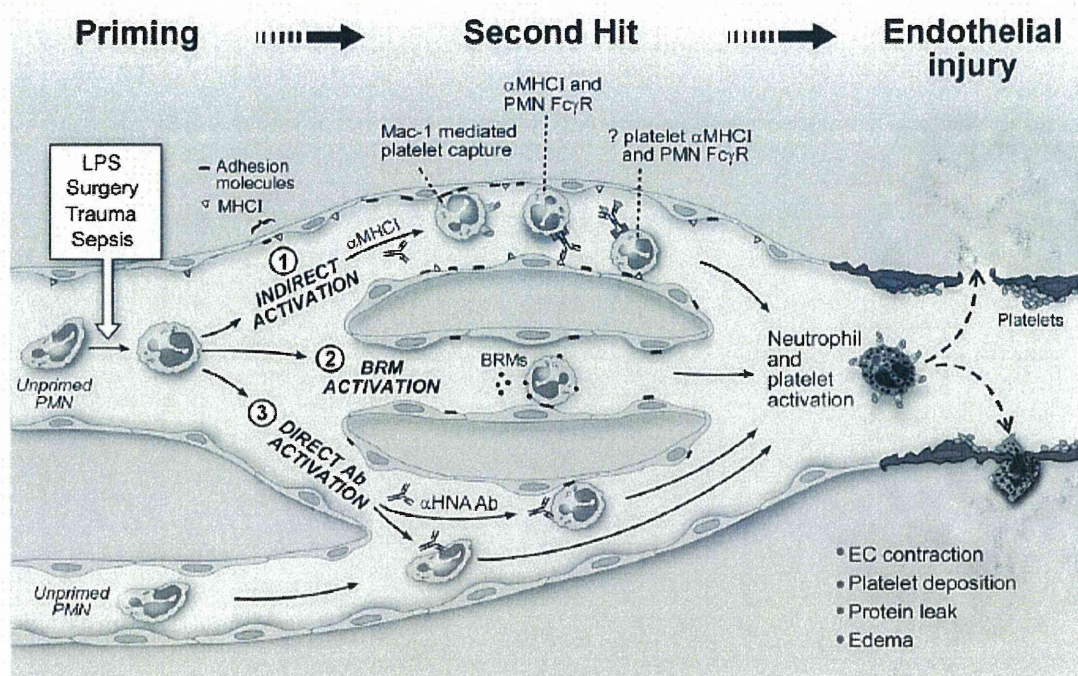


図 8 TRALI 発症機構に関する仮説
(Gilliss BM and Looney MR Transfusion Med. Rev. 25, 1, 2011)

平成24年3月14日
薬事・食品衛生審議会
血液事業部会運営委員会
提出用資料

日本赤十字社

血小板製剤に対する感染性因子低減化（不活化）技術の 導入準備について（追加報告）

1. 欧州における導入状況について

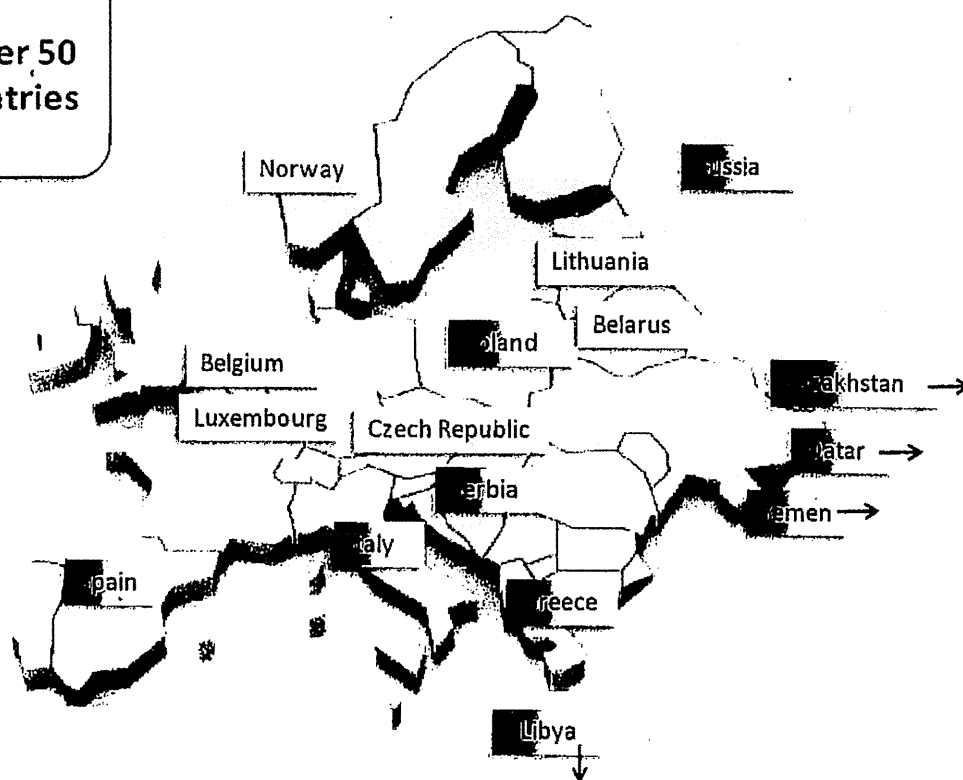
①リボフラビン法(Mirasol)

Growing Adoption of Mirasol in Europe & Middle-East

Routine use in over 50
centers in 16 countries

Platelets

Platelets
Plasma



(TerumoBCT 社提供資料)

現在、欧州を中心に 16 カ国でリボフラビン法処理血小板がルーチンで使用されており、そのうち 10 カ国では血漿も処理されている。なお、ベルギー（アモトサレン法が導入されていない北部地方）では、低減化処理キットの仕様変更のため、現在医療機関への供給は一時中断しているが、本年夏以降に再開される予定である。

このうちの数カ国での低減化処理血小板製剤の市販後調査が実施中であるが（次ページ）、現

時点において低減化処理に起因する重篤な副作用等の報告は受けていない。

Table 6. Clinical evaluations [50, 88-91]

Site	Number of transfusions	24-hour GCI	Adverse event	Neutropeniformation
MIRACLE trial - reference group	160	9,886	3 (severe*)	ND
MIRACLE trial - Mirasol group	175	6,676	2 (severe*)	none
Serbia	87	5,166	none	none
Poland	4,328	ND	12 (grade 1 [†])	none
Spain	44	6,351	none	ND
Mirasol evaluation program	368	ND	none	ND

*The following categories of adverse event severity were used: *Mild*: Awareness of a sign or symptom that does not interfere with the patient's usual activity or is transient; resolves without treatment and with no sequelae. *Moderate*: Interferes with the patient's usual activity and/or requires symptomatic treatment. *Severe*: Symptom(s) causing severe discomfort and significant impact of the patient's usual activity and requires treatment.

[†]Severity of reactions followed the classification suggested by the International Hemovigilance Network. *Grade 1*: The recipient required no more than discontinuation of transfusion and symptomatic management. No long-term morbidity. *Grade 2*: The recipient requires in-patient hospitalization or prolongation of hospitalization due to hypotension, or hypotension led directly to long-term morbidity.

Transfus Med Hemother 2011;38:8-18

②アモトサレン法 (Intercept)

INTERCEPT Routine Centers per Country

1	Austria	1	1	0	0
2	Belgium	5	5	4	4
	France DOM/TOM	4	4	1	1
3	France	10	1	10	1
4	Germany	1	0	1	0
5	Greece	1	1	0	0
6	Italy	14	14	7	7
7	Kazakhstan	11	9	9	7
8	Kuwait	1	1	0	0
9	Norway	2	2	0	0
10	Portugal	2	2	0	0
11	Russia	18	12	12	6
12	Slovenia	1	1	0	0
13	Spain	12	12	2	2
14	Sweden	7	7	0	0
15	Switzerland	13	13	0	0
	Total	103	85	46	28

(Cerus 社提供資料)

15 カ国でアモトサレン法がルーチンで使用されており、そのうち 14 カ国では血小板も処理されている。これらの国のうち、スイスは 2011 年 11 月に全ての血液センターでアモトサレン法で処理した血小板製剤の製造を開始した。また、フランス本土では血小板は 1 センターのみで変化はないが、メチレンブルー処理血漿についてヘモビジランスの結果、アレルギー反応が多いとの理由でフランス保健製品衛生安全庁 (AFSSAPS) が本年度中の使用中止を勧告したため、血漿にアモトサレン法を導入するセンターが増加した。一方、ドイツではアモトサレン法処理血小板製剤が早い段階で承認されているが、現時点で血小板製剤にルーチンで使用しているセンターは無い。

なお、上記表には記載されていないが、本年 2 月 1 日にイスラエルがアモトサレン法処理血小板と血漿を承認したとのプレスリリースが発出されている。

2. 実施中の主な臨床試験について

Ongoing Clinical Studies (2010 to 2013)

Trial Name & Location	Product	Target no. of patients	2009	2010	2011	2012	2013
"PREPARES" Trial – Sanquin, The Netherlands (5 sites + 1 site in Norway, + 4 sites in Canada, 2012)*	PLT in plasma	618					
IPTAS Trial, Italy (6 sites, Government sponsored)*	PLT in PAS	828					

(TerumoBCT 社提供資料)

①PREPARES

オランダのサンキン財団を主体としてオランダ、ノルウェー、カナダで実施されている、全血採血由来のリボフラビン処理血小板製剤と通常の血小板製剤のランダム試験 (患者登録終了予定: 2013 年末)

②IPTAS

イタリア政府が実施している、添加液 (PAS) で置換してリボフラビン法またはアモトサレン法で処理した血小板製剤と、通常の血小板製剤との比較試験 (同: 2014 年末)

PREPARES はメーカー主導ではなく症例数が多いこと、また、IPTAS は同じプロトコールで、リボフラビン法及びアモトサレン法で処理した血小板の臨床試験が実施されることから、これらの試験の動向を注目しているところである。

3. 日本赤十字社における検討状況等について

①リボフラビン法 (Mirasol)

- ・CaridianBCT 社がテルモ社に買収され TerumoBCT 社となったことにより、テルモ社の有する安全性部門や研究開発部門の協力を得ることができるようになった。現在、今後の承認申請に必要な AFSSAPS に提出された安全性に関するデータの整理を依頼している。
- ・日本赤十字社において、製剤としての規格や品質について決定するための試験を実施しているが、平成 22 年 3 月の本委員会に報告した凝集塊の発生という問題については、未だ解決できていない。日本赤十字社の検討ではかなりの確率で凝集塊が発生するのに対し、他の国では類似した凝集塊の発生はないとの報告を受けている。現在、TerumoBCT 社と密接に連絡を取りながら、解決策を探っているところである。
- ・新興再興感染症対策としてウエストナイルウイルス(WNV)の低減化について検討したところ、日本赤十字社のデータと TerumoBCT 社のデータに乖離があることが明らかとなった。乖離の原因を特定するため、種々の WNV 株について低減化率を測定した結果、細菌と同様、使用した株により低減化率に差が生じることが明らかとなり、ヒトから分離された Uganda1937 株に対しては、十分な低減化効果があることが再確認された。

Study Summaries

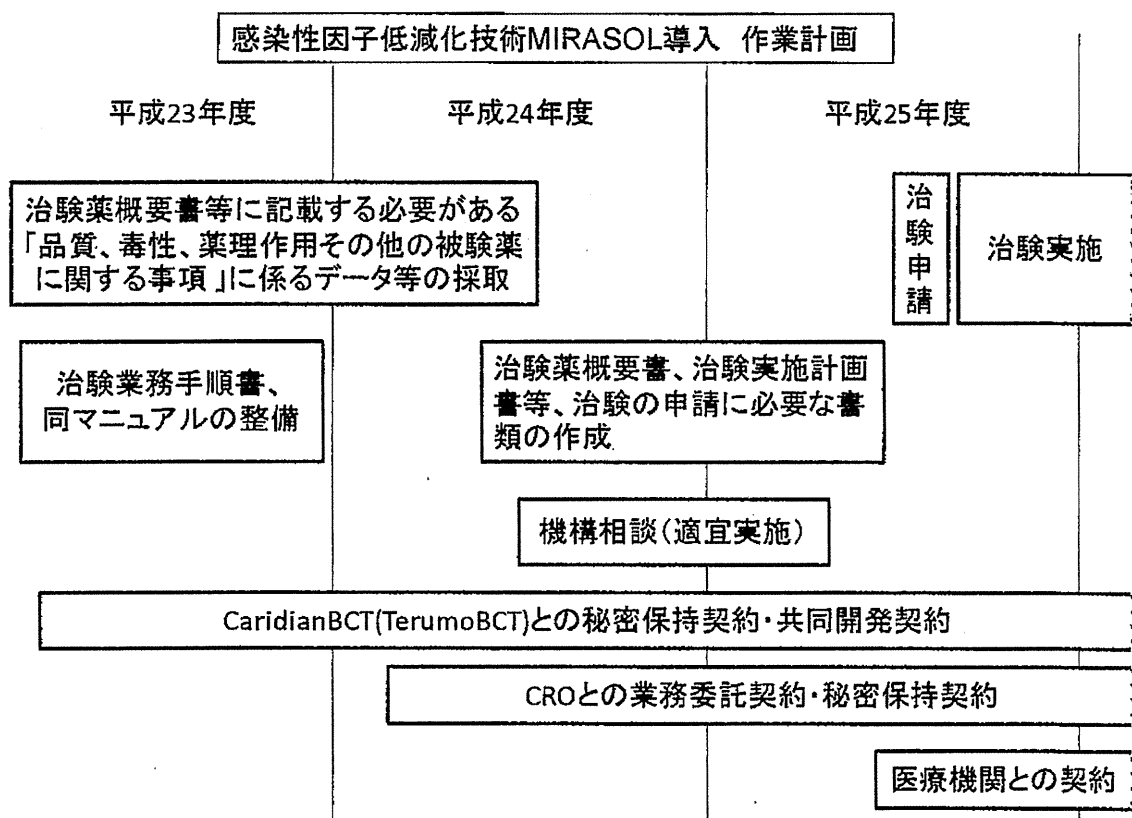
	US Center for Disease Control	L.A.B.S. at Bonfils	Colorado State University
Viral Strain	NY-99 Flamingo	Uganda 1937 ATCC# VR-1510	NY-99 (4122)
Test System	96-well plate TCID ₅₀ /mL	24-well plate TCID ₅₀ /mL	6-well plate PFU/mL
Reporter Cells	Vero	Vero	Vero
Reduction Levels	3.0-4.0 Logs	≥ 5.1 Logs	1.5 Logs

(TerumoBCT 社提供資料)

②アモトサレン法 (Intercept)

- ・BioOne 社が精算されたため、現在、Cerus 社と直接情報交換を行っている。
- ・アモトサレン法の処理キットには、日本における需要の 8 割以上を占める 10 単位製剤の規格に合うものがなく、また、アモトサレンの吸着除去処理に長時間を要することなどから、現状の処理キットを日本に導入することは困難であるが、10 単位製剤に最適化した処理キットの開発について検討したいとの話があった。

4. 今後の予定



厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

(分担) 研究報告

ウイルス不活化・不活化能の評価法の開発

研究分担者 遊佐 敬介 (国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長)

研究要旨

輸血用血液製剤におけるウイルス安全性を確保していくためにはウイルス特異的な不活化技術の開発が必要である。H22年度はヒトレトロウイルスをモデルウイルスとして、その感染侵入に関与するエンベロープタンパク質に多様な変異を導入したウイルスポピュレーションを作製し、ウイルス不活化に必要な条件について検討した。そのために多様な組み合わせのアミノ酸変異をエンベロープタンパク質の特定のアミノ酸部位に導入したウイルスライブラリーを作製した。H23年度は非エンベロープウイルスであるネコカリシウイルスを取り上げ、そのウイルスの感染宿主域について、またヒト細胞に対して感染性を獲得する可能性について調べた。ネコカリシウイルスは、2008年、2009年と欧米で医薬品製造リアクターを汚染し、一時医薬品製造中止の原因となったベシウイルス 2117と同属のウイルスである。本研究によって、ウイルスの不活化・不活化能の評価法の開発につながるウイルスの性状についての検討を終えることができた。

A. 研究目的

輸血用血液製剤のウイルス安全性に影響をおよぼすウイルスとしてHIV, HTLV, HCV, HBV, B19があげられ、採血した際には核酸増幅検査が行われている。最近ではマウスレトロウイルスに近縁の新規ウイルスXMRV (異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス)が、慢性疲労症候群と前立腺癌の患者で高率に見つかったという米国で報告され、こうした新たなレトロウイルスが輸血用血液製剤のウイルス安全性に及ぼ

す影響についても議論されたが、このウイルスはマウスの内在性ウイルスが相同組み換えを起こすことで複製能力を獲得したウイルスであり、疾患とは無関係であることがわかった。しかし、近年次々に新規の人獣共通感染ウイルス(サーズウイルス、ニパウイルス、ウェストナイルウイルスなど)が報告されており、今後もウイルス安全性を確保するためにウイルス不活化・除去法の開発法の開発に向けた努力が必要であることを示している。

血液製剤の原料となる血液へのウイルス混入の可能性を確実に避けることができない以上、HIV、HTLVなどを含むレトロウイルスの不活化には今後も取り組むべき重要な課題のひとつである。本研究においては、ヒトのレトロウイルスの一種であるHIVのエンベロープタンパク質であるgp120を取り上げる。gp120はウイルス感染時に標的細胞のレセプターであるCD4とコレセプターCCR5 (R5ウイルス)ないしCXCR4 (X4ウイルス)と相互作用することが知られており、ウイルス侵入の鍵となる分子である。従って、レトロウイルスの不活化の標的としても重要な候補となる分子のひとつである。gp120には、感染時コレセプターと直接相互作用するV3ドメインがあり、極めて多様性に富んでいることで知られている。本研究の目標は、ウイルスの不活化技術開発のために、多様な変異の組み合わせをもつウイルスを作製する。そして、そのウイルスを用いてウイルス不活化・不活化能の評価法の開発をめざした。

一般にエンベロープをもつウイルスは、有機溶剤/界面活性剤、低pH、加熱処理などによってその感染性を失いやすいことが知られている。それに対して非エンベロープウイルスは、このような物理・化学的な処理に比較的抵抗性である。平成23年度研究では非エンベロープウイルスのモデルウイルスとして*in vitro*培養系のあるネコカリシウイルスを取り上げ、非エンベロープウイルスとして不活化や除去の実験モデルウイル

スとして利用する目的で、その性質、特に今回はその宿主域について調べた。その結果ヒトやマウス細胞には感染しなかったが、アフリカミドリザル細胞がFCVに対する感染感受性を示した。アフリカミドリザルのウイルスレセプターは、ヒトのものとよく似ているため、こうした動物種が介在することでウイルスがヒトにその感染宿主域を広げる可能性がある。そこでその点についても検討した。

B. 研究方法

(1) 細胞とウイルス

PM1/CCR5細胞は、PM1細胞にpGK1neo-CCR5をトランスフェクションして樹立したCCR5高発現細胞である。293T細胞、HeLa細胞、CR-FK細胞、Vero細胞、CV-1細胞は、DMEMに10%ウシ胎児血清を加えたもので培養を行った。またNIH-3T3細胞はMEMに10%ウシ胎児血清、PM1/CCR5細胞、とJurkat細胞はRPMIに10%のウシ胎児血清を加えた培地で培養を行った。HIV-1JRFLは京都大学ウイルス研・小柳教授、FCV F9株は、国立医薬品食品衛生研究所・野田衛博士から分与を受けた。HIV-1の培養および実験は熊本大学大学院・原田教授、前田助教授、中国・輸血研究所・苑哲生博士の協力を得た。

(2) ヒトレトロウイルスのgp120 V3 ライブラリーの作製

gp120 V3 領域 (35アミノ酸残基) に臨床分離株から得られた18種類のアミノ酸変異をランダムに導入した V3 変異ライブラリーを作製した (図1) . その組み合わせは $> 2 \times 10^4$ となる. このウイルスライブラリーから, 45個のクローンを分離して, V3への複数の変異導入により, 感染性を失っているかどうかを検討した.

(3) 侵入阻害剤 maravirocによる薬剤耐性ウイルスの分離

HIV-1 V3 ライブラリーを293T細胞にトランスフェクションし, 30時間後その上清を回収した. そのウイルスをPM1/CCR5細胞でmaraviroc存在下で継代した. 0.003 μM から培養を開始し, 17代まで培養を行い, 最終0.7 μM まで薬剤濃度を上げた. ここで得られたウイルスを maraviroc 耐性ウイルスとした.

(4) FCVの調製とウイルス感受性

ネコカリシウイルス(FCK)株F9, またウイルスストックは, ネコ腎由来のCR-FK細胞株を用いて調製した. FCK F9 をCR-FK細胞に1時間感染させた後, 37°C, 5% CO_2 で培養した. 培養開始後, 36時間後に上清を回収し, 2,400 r.p.m. で遠心した後0.45 μm のフィルターで濾過し, ウイルスストックとして-80°Cで保存した.

TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) は, 96穴プレートに 3×10^3 個ずつ播種した細胞

に10倍希釈系列ウイルス液 (100 μl) を加え, 5日後にCPE(cytopathic effect)の有無を顕微鏡下で判定した. F9株の感染感受性は, HeLa, CV-1, Vero, CR-FK, NIH-3T3細胞を用いて調べた.

(5) FCVのアフリカミドリザル細胞での馴化

アフリカミドリザル細胞に馴化したFCVウイルスの分離は, CV-1, Vero, HeLa細胞を用いた. 25-cm² の培養フラスコに細胞 (2.5×10^6) を播種し, 12時間後, FCV F9を感染させた (100 TCID₅₀). 37°C, 5% CO_2 で3日ないし4日培養後, 感染細胞の上清 1 ml を非感染細胞 (2.5×10^6) に感染させた. 継代をを繰り返し, 複製能が向上した5回継代ウイルスをCV-1細胞馴化ウイルスFCV_{CV} と名付けた.

C. 研究結果

(1) ヒトレトロウイルスにおけるエンベロープタンパク質変異の影響.

ウイルスクローンのうち36%は変異導入によって感染性を失っていた. 野生株と比較すると38%がその90%感染性が低下しており, 18%が50%以上その感染性を失っていることがわかった. 導入した変異はどれも臨床分離株から選択したもののだが, 組み合わせによっては, gp120の機能を失わせるのに十分であることがわかった.

(2) エンベロープタンパク質変異ライブラリーを使った薬剤耐性ウイルスの分離.

このウイルスライブラリーの有用性を調べるために、R5 HIVの侵入阻害剤であるmaravirocを用いてこの薬剤に感受性の低いウイルスの選択をおこなった. 実際にはmaravirocによってウイルス複製が50%抑制がかかる薬剤濃度である0.3 nMから継代とともに薬剤濃度を上げていき、17回継代したところでウイルスの培養を中止した(図2). 最終的にmaravirocの濃度は700 nMとなり、2300倍もの感受性の低いウイルスクローンが選択されたことになる(表1). また選択されたウイルスのV3は5つの変異(I304V/F312W/T314A/E317D/I318V)を含んでおり多様な変異の組み合わせをもつウイルス集団は、薬剤による選択によって単一のクローンに絞られたことになる. またV3領域以外にT199K, T275Mも見つかった.

(3) FCVの宿主域

FCVはエンベロープを持たない(+)鎖のRNAウイルスであり、直径30~38nmの正二十面体構造をもつ(図3). FCVはネコ腎由来CR-FK細胞に感染し、よく複製する. FCV, poliovirus, sindbis virusの宿主域を調べてみたのが表2である. poliovirusはピコルナウ

イルス科のエンテロウイルスに属するRNAウイルスである. poliovirusは、ヒト細胞であるHeLa, 293T細胞によく感染する. またアフリカミドリザル細胞であるVero, CV-1細胞にもよく感染することがわかる. sindbis virusは、トガウイルス科アルファウイルス属に分類される(+)鎖RNAウイルスである. sindbis virusはヒトT細胞由来のJurkat細胞以外のものによく感染することがわかった. これに対し、FCVはヒト由来細胞であるHeLa, 293T細胞、マウス由来細胞であるNIH-3T3細胞には感染しない. ところがアフリカミドリザル腎由来のVero細胞とCV-1細胞には、ネコ腎由来細胞であるCR-FK細胞に比べてわずかであるが、感染することができた.

(4) CV-1細胞馴化株の分離

FCV F9株はわずかではあるが、アフリカミドリザル細胞であるVero細胞とCV-1細胞に感染することができた. そこで次にFCVが、ミドリザル由来の細胞に馴化できるかどうかを検討した(図4). Vero細胞では、感染はするもののウイルスが上清に十分産生されず、ウイルスを継代することはできなかった(data not shown). またヒト由来のHeLa細胞でもFCVは感染せず、そのため継代はできなかった. これに対してCV-1細胞ではFCV F9株を継代することができたが、1-2代目までは、ウイルス複製はするものの上清にはCR-FK細胞で継代した場合に比べて極めて低いウイルス量しか産生されな

かった。ところが3回の継代後は、CR-FK細胞に匹敵するほどのウイルス量を産生するようになった。これは継代1から継代3の間にCV-1細胞へのウイルスの馴化が起きていたことを示している。CV-1細胞でFCV F9株を5回継代したものをCV-1細胞馴化分離株としてFCV_{CV}と名づけた(図4)。

この分離株をそれぞれの細胞に対して同じ感染条件下で感染させ、細胞変性効果(CPE)を比較してみると野生株であるFCV F9はCV-1細胞死を十分誘導できなかった。これに対し、CV-1細胞に馴化したFCV_{CV}はCV-1細胞内で激しく複製し、ほとんどの細胞にCPEを引き起こすことができることが明らかとなった(図5, 図6)。ところがFCV_{CV}は、Vero細胞ではCV-1細胞で見られるような激しいウイルス複製は見られなかった。またヒト細胞であるHeLa, 283T細胞でもCPEは見られなかった。従ってFCV_{CV}は、CV-1細胞で継代することによって、CV-1細胞にのみ馴化したといえることができる。

(5) ヒト細胞への馴化の試み

ウイルスは進化の過程で変異を起こし、宿主域を広げてきた。たとえば、イヌパルボウイルスは、1976年以前に感染の報告はなかったが、その後数年間で全世界に爆発的に広がった。イヌパルボウイルスのゲノムは、以前から知られていたネコパルボウイルスとよく似ていることからネコパルボウイルスの突然変異であると考えられてい

る。カリシウイルスの一種であるFCVはネコのかかる代表的な呼吸器感染症を引き起こすウイルスである。ウイルスの感染力は強く、感染したネコと直接触れ合ったことによる感染、感染したネコのくしゃみ等による空気感染、感染したネコと人間との接触を介しての感染など多岐にわたる。もしアフリカミドリザルのように、容易にウイルス馴化が起きる動物種がネコとヒトに同時に接触する機会が多いと、ネコからヒトへ感染可能なウイルスの出現を仲立ちする可能性がある。そこでCV-1細胞とHeLa細胞を共培養し、そこにFCV_{CV}分離株を感染させ、HeLa細胞に感染可能なウイルスが出現するかどうか調べた。その結果30代まで継代したが、HeLa細胞に感染可能なウイルスは出現しなかった(data not shown)。

D. 考察

(1) ヒトレトロウイルスのエンベロープ変異ウイルス。

導入した変異は、効率よく各クローンに見いだされ、そのサイズも $>10^7$ と変異の組み合わせを十分カバーする大きさであった。このことから実験系においては十分多様性に富んだウイルスポピュレーションを扱うことができるものと考えられた。

またV3に変異をいれることで、薬剤という淘汰圧に対し、耐性をもつウイルスを比較的容易に選択することができるこ