

表2 免疫抑制状態にある患者で特定の症状が現れると考えられるウイルス

ウイルス名	関連疾患
ADV	肺炎、腸炎、肝炎
B19	伝染性紅斑・りんご病、赤芽球癆
ヒトパピローマウイルス	子宮頸癌
E型肝炎ウイルス	E型肝炎
CMV	間質性肺炎、腸炎、網膜炎
HSV	口唇ヘルペス、ヘルペス脳炎
ヒトヘルペスウイルス6型	突発性発疹、脳症
VZV	水痘、帯状疱疹
EBV	伝染性単核球症、リンパ腫、胃癌
JCV	出血性膀胱炎、進行性多巣性白質脳症
BKV	腎障害

表3 妊娠可能性のある女性が患者の場合で胎児や母体に特定の症状が現れるウイルス

ウイルス名	概要
風疹ウイルス	白内障・難聴・心臓と歯の奇形・小頭症
B19	子宮内感染による流産・胎児水腫
HBV	母子感染の慢性肝炎への移行は約10%
E型肝炎ウイルス	妊婦への感染はしばしば重症となり、10-20%の高い死亡率
CMV	聴力障害
HSV	産道感染、発熱・痙攣・脳炎等
VZV	低体重出生児・四肢の形成不全等

表4 ドナーに海外渡航歴がある場合に注意すべきウイルス

ウイルス名	渡航先
ラッサウイルス	ナイジェリア・リベリア・ギニア・シエラレオネ
フニンウイルス	アルゼンチン
サビアウイルス	ブラジル
ガナリトウイルス	ベネズエラ
マチュポウイルス	ボリビア
鳥インフルエンザウイルス	東南アジア・中東・ヨーロッパ・アフリカ
東部ウマ脳炎ウイルス	北米・中南米
西部ウマ脳炎ウイルス	北米・中南米
ベネズエラウマ脳炎ウイルス	北米・中南米
チクングニアウイルス	アフリカ・東南アジア・南アジア
ニパウイルス	マレーシア・バングラデシュ
ヘンドラウイルス	オーストラリア
麻疹（はしか）ウイルス	アフリカ・東アジア・南アジア・米国・カナダ・ヨーロッパ諸国・ニュージーランド
ポリオウイルス	アフガニスタン・ナイジェリア・パキスタン・チャド・コンゴ民主共和国・中国新疆ウイグル自治区
エボラウイルス	アフリカ中央部～西部
マールブルグウイルス	サハラ以南のアフリカ
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	中国西部・東南アジア・中央アジア・中東・東ヨーロッパ・アフリカ
リフトバレー熱ウイルス	アフリカ
WNV	アフリカ・欧州南部・中央アジア・西アジア・北米・中南米
デングウイルス	アジア・中南米・アフリカ、とくにインド・フィリピン・インドネシア
黄熱ウイルス	アフリカ・南米
サル痘ウイルス	コンゴ民主共和国・米国
狂犬病ウイルス	世界のほとんどの地域、特にアジア・アフリカ

表5 生物由来原料からのウイルス

由来	ウイルス名
ウシ胎児血清	ウシアデノウイルス
	ウシRSウイルス
	ウシパルボウイルス
	ウシウイルス性下痢症ウイルス
	ウシポリオーマウイルス
	狂犬病ウイルス
	レオウイルス
	ブルータングウイルス
	伝染性出血熱ウイルス
	ブタトリプシン
血球凝集性脳髄膜炎ウイルス	
ブタサーコウイルス	
	ブタパルボウイルス
フィーダー細胞	マウス微小ウイルス
	マウス肝炎ウイルス

表6 医薬品成分・剤型ごとのウイルス感染症例数

医薬品成分・剤型	JCV	RSV	ADV	HSV	B19	BKV	EBV	VZV	CMV	合計
アダリムマブ注射薬	0	0	0	0	0	0	1	37	0	38
アバタセプト注射薬	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5
インフリキシマブ注射薬	0	0	0	3	1	0	6	71	18	99
エタネルセプト注射薬	0	0	0	3	1	0	3	62	2	71
ゲムツズマブオゾガマイ シン注射薬	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
ゴリムマブ注射薬	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
セツキシマブ注射薬	0	0	0	0	0	1	0	6	0	7
トシリズマブ注射薬	0	1	0	2	0	0	3	60	7	73
トラスツズマブ注射薬	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
バシリキシマブ注射薬	2	0	3	3	1	5	10	11	114	149
バリビズマブ注射薬	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
リツキシマブ注射薬	0	0	3	1	6	0	0	21	20	51
シクロスポリン内用薬	4	2	5	4	3	13	4	82	150	267
シクロスポリン注射薬	0	0	3	0	0	1	1	2	15	22
タクロリムス内用薬	1	3	5	4	6	10	5	112	100	246
タクロリムス外用薬	0	0	0	0	5	0	1	24	0	30
タクロリムス注射薬	0	2	7	6	5	13	16	119	137	305
プレドニゾロン内用薬	0	0	0	3	5	4	7	51	63	133
プレドニゾロン注射薬	0	0	0	0	0	0	1	0	3	4
ミコフェノール酸モフェ チル内用薬	0	1	6	0	8	10	10	38	120	193
メチルプレドニゾロンコ ハク酸エステル注射薬	0	0	0	1	0	3	0	3	9	16
合計	7	11	32	30	41	60	68	714	758	1721

表7 ウイルスによる転帰の内訳

転帰	JCV	RSV	ADV	HSV	B19	BKV	EBV	VZV	CMV
死亡	4	1	7	4	1	2	30	6	64
未回復	0	1	0	1	2	3	3	29	22
後遺症	0	0	0	0	0	0	0	0	0
軽快または回復	0	7	23	16	31	39	2	565	473
不明	2	2	2	9	7	16	33	114	199

表8 ウイルス感染リスク分析の PHA 法における頻度ランクの定義と尺度

頻度ランク	定義
9	報告件数が 100 以上である
7	50 以上 100 未満である
5	20 以上 50 未満である
3	10 以上 20 未満である
1	10 未満である

表9 ウイルス感染リスク分析の PHA 法における重篤度ランクの定義と尺度

重篤度ランク	定義
9	重篤例の割合が 50%以上である
7	30%以上 50%未満である
5	20%以上 30%未満である
3	10%以上 20%未満である
1	10%未満である

表 10 報告件数と重篤例の割合をもとにした PHA 法によるウイルス感染リスク評価

ウイルス名	報告件数	頻度 ランク	重篤例数	重篤例 の割合	重篤度 ランク	スコア
CMV	758	9	86	15%	3	27
VZV	714	9	35	6%	1	9
EBV	66	7	33	94%	9	63
BKV	59	7	5	11%	3	21
B19	41	5	3	9%	1	5
ADV	32	5	5	24%	5	25
HSV	30	5	7	23%	5	25
RSV	11	3	2	22%	5	15
JCV	7	3	4	80%	9	27

細胞組織加工医薬品のウイルス安全評価に関する研究
遊佐敬介 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨： 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性を確保するためには、汚染する恐れのあるヒト感染ウイルスの高感度の検出法と同時に治療に用いられる加工前の細胞、加工後の細胞等のウイルス感染感受性などを明らかにしておく必要がある。また細胞組織加工医薬品へのウイルス汚染では、迷入ヒトを宿主としないウイルスが、非宿主細胞であるヒト細胞に感染することになる。一般的に低い感染性を持つウイルスが非宿主細胞へ感染する場合には、非宿主細胞への馴化が起きる。こうした馴化過程で何が起きているのかについては殆ど明らかになっていない。本年度は、ウイルスが、本来自然宿主でない細胞組織加工医薬品用細胞に感染した場合を想定し、モデルとなるウイルス-非宿主細胞感染系を用いて、非宿主細胞への馴化過程を解析した。この結果、モデルとしたカリシウイルスは、汚染当初、低い感染性を持っていても、ごく短期間の培養によって、迅速な馴化が起き、高度の感染性と増殖能を獲得することが明らかになった。またヒトには感染性をもたないと従来考えられていたネコカリシウイルスが、ヒト細胞にも感染することがわかった。従って細胞組織加工医薬品に用いられる細胞にカリシウイルスレセプターが発現している場合には、このようなカリシウイルスの感染および馴化が起きる可能性が示唆された。

A. 研究目的

治療用細胞組織加工医薬品は、感染性因子、特にウイルスによって汚染される可能性を常に孕んでいる。治療用細胞としてヒト細胞組織を使うという点、また細胞や組織の培養に生物由来原材料が多く使われるという点が挙げられる。そのため、まず汚染される可能性の高いウイルスとして挙げられるのは、ドナー体内に存在が想定される慢性感染ウイルスである HIV(エイズウイルス)、HAV (A型肝炎ウイルス)、HBV (B型肝炎ウイルス)、HCV (C型肝炎ウイルス)、HTLV-I/II (ヒトTリンパ好性ウイルス)、ヒトパルボウイルス B19、CMV (サイトメガロウイルス) 等である。これらは、輸血、骨髄移植などの際にも、その感染の有無に特別な注意を払わなければならないウイルスである。細胞組織加工医薬品製造においても重要な検査項目となる。

これらに加えて、細胞組織加工医薬品が、輸血や骨髄移植と異なり注意を要する点とはなんだろうか。それは細胞組織加工医薬品

製造時には、「細胞・組織の加工」が行われるという点である。「細胞・組織の加工」とは、疾患の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖、細胞の株化、細胞・組織の活性化等を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、非細胞・組織成分との組み合わせ又は遺伝子工学的改変等を施すことをいう。これに加えて「製造」とは、組織の分離、組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等、当該細胞・組織の本来の性質を改変しない操作を含む行為で、最終製品である細胞・組織利用製品を出荷するまでに行う行為をいう。こうした工程が含まれることが、細胞組織加工医薬品の特徴で、その工程では、外界や製造従事者からの飛び込みウイルス (adventitious virus) の可能性があり、それに加えて大きな特徴は、細胞・組織の人為的な増殖、細胞の株化、細胞・組織の活性化、分化等を施すために、フィーダー細胞との共培養や生物由来原材料である培養用ウシ胎

児血清，タンパク質性成長因子，ブタトリプシンなどに接触・暴露される工程を含んでいるということである。従ってウシ，ブタ，マウスなどの動物を自然宿主とするウイルスによる汚染も視野に入れる必要がある。

治療用細胞組織加工医薬品のウイルス安全性を担保するためには，まず高感度のウイルス検出システムが不可欠である。ウイルスの種類は報告されているだけでも 1900 種類を超えている。そのすべてをモニターすることは不可能なのでもっとも感染の危険性の高限られたウイルスを簡便にかつ高感度で，しかも短時間で検出する必要がある。次に治療用に分離された各細胞組織と加工後の細胞組織のウイルスに対する感染感受性を明らかにする必要がある。たとえウイルスが迷入してもそのウイルスがヒト細胞に感染性をまったく有していない場合は，そのリスクは低いものになる。従って事前に迷入の可能性のあるウイルスについて細胞組織加工の前後での各ウイルスに対する感染感受性を知っておくことは極めて有用である。感染性を全く持たない場合は，ウイルス増幅の可能性はないが，ごくわずかでも感染性を持っている場合には危険なケースが想定できる。特に RNA ウイルスでは感染効率は低くても高い頻度で多様性の高いウイルスを産生できるため他種細胞への適応能力に優れているからである。こうしたウイルスは，非宿主細胞への馴化がごく短期間に起きる可能性がある。本分担研究では本年度および来年度以降にかけて (i) 他種細胞組織へのウイルス感染とその馴化過程，(ii) 迷入ウイルスの挙動を調べるためのエンベロープを有する人工ウイルス粒子の作製，(iii) 治療用加工細胞組織のウイルス感染感受性，について検討する予定である。本年度は，(i) 他種細胞組織へのウイルス感染とその馴化過程の解析に関して検討を行った。本来なら治療用加工細胞を対象とする必要があるが，ウイルス馴化の過程を解析するためには，他種細胞に低い感染性をもつウイルスを取り上げる必要がある。本年度は，そのモデルウ

イルスとしてカリシウイルスを取り上げ，他種細胞への馴化過程で何が起きるのかについて解析を行った。

B. 研究方法

(1) 細胞とウイルス DNA

293T, Vero, CV-1, CR-FK 細胞は DMEM に 10% のウシ胎児血清を加え，培養に供した。カリシウイルスは，自然宿主である CR-FK 細胞で増幅し，その上清を遠心 (2,000 rpm, 15 min) して，0.22 μm フィルターを通して分注し， -80°C で保存した。ネコカリシウイルス (F4 株) 液の TCID_{50} は，CR-FK 細胞を用いて決定した。イヌカリシウイルス (#48) は，MDCK 細胞，シンドビスウイルス，ポリオウイルス (Sabin 株) は，HeLa 細胞を用いてそれぞれの力価を決定した。

(2) ウイルス感染感受性の測定

細胞を 3,000 個 96-穴プレートに播種し，一晚培養した後，そこに段階希釈したウイルス液を加え， 37°C ，5% CO_2 存在下で培養を行った。6 日後に細胞変性効果 (CPE) の有無を顕微鏡下で決定した。またネコカリシウイルスの TCID_{50} は CR-FK 細胞を用いて決定した。

(3) カリシウイルスの継代と馴化ウイルスの分離

カリシウイルス (FCV_{F4}) を 3×10^5 細胞に 400 TCID_{50} で感染させ，3 日培養し，その上清 0.5 ml を使って非感染細胞 (3×10^5) に感染させた。これを繰り返すことでウイルスの継代を繰り返した。継代を 13 回繰り返したものを FCV_{CV} とした。分離した FCV_{CV} は，0.22 μm のフィルターを通して， -80°C に分注保存した。

(3) ウイルス感染増殖能，細胞変性効果の比較

細胞 (1×10^5) を 100 TCID_{50} で 2 時間感染させ，その後 PBS で 2 回洗い，培養後，その上清を回収して CR-FK 細胞を用いて上清中に

産生されるウイルス量を $TCID_{50}$ によって決定した。細胞変性効果は、MTT 法、トリパンブルー染色法によって、アッセイした。融合細胞は、Vero, CV-1 細胞にそれぞれ neo, bsr 遺伝子を常法によりトランスフェクションして、G418, blasticidin S を含む培地で薬剤耐性細胞を選択した。その後、PEG1500 を用いて常法により細胞融合を行った。その後、G418/blasticidin S を含む培地で融合細胞を選択した。この操作を同様に 2 回行い、C/V#1, C/V#2 を選択した。

(4) ネコ, ヒト, アフリカミドリザル JAM1 発現 CHO 細胞の作製

JAM1 の発現ベクターは、pEF6/V5-His を用いた。ネコ JAM-1 は、

forward primer,
GTCGGGGTCCGGATCGCCATGGGG, reverse primer,

CACCAGGAATGACGAGGTCTGCCTG

アフリカミドリザル JAM1 はそれぞれ、

forward primer,
AGCGGGAGCCTGATCGCGATGGGGACAA
reverse primer,

CACCAGGAATGACGAGGTCTGTTTG

ヒト JAM1,

forward,
GTCGGGGAGCCTGATCGCGATGGGGACAA
reverse primer,

CACCAGGAATGACGAGGTCTGTTTGAATT
C

を使って PCR で増幅し、それを pEF6/V5-His に連結して作製した。CHO 細胞にそれぞれの JAM1 発現プラスミドをトランスフェクションし、Blasticidin S で選択した。JAM1 発現量はウェスタンブロット法によって確認した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料は使わないので倫理面の配慮は必要ない。

C. 研究結果

(1) ウイルス感受性試験によるモデルウイルスとその感染細胞系の選択

治療用細胞組織やバイオ医薬品の製造細胞への汚染は、いくつかのケースが考えられ

るが、ヒト細胞へのヒトを宿主とするウイルスの汚染は、よく調べられており、汚染が起きた場合に起きることは想定することが比較的容易である。しかし、迷入したウイルスが、ごく低い感染性をもつ非宿主細胞へ感染することで汚染が始まる場合にどんなことが起きるのかについてはよくわかっていない。本研究では、まずごく低い感染性をもつウイルスに汚染された場合に、その過程でなにが起きるのかについて調べるため、モデルとなる細胞とウイルスの感染系を選び出すことにした。最初にヒト細胞に焦点を当て、ヒト由来の細胞株 293T, HeLa に低い感染性を示すウイルスを探しだすためにポリオウイルス、シンドビスウイルス、2つのカリシウイルスについてその感染宿主域をウイルスの細胞変性効果を指標に調べた(表1)。その結果、ポリオウイルスは、ヒト細胞以外にはまったく感受性を示さなかったが、ヒト細胞では強い細胞変性効果(CPE, cytopathic effect)をもつことがわかる。またそれとは対照的にシンドビスウイルスは、いろいろな動物種の細胞に強い感染増殖性を示した。ヒト細胞である293T細胞にも感染し、強いCPE能を示した。しかしヒト細胞に低い感染感受性をもつウイルスはなかった。そこでほかの動物種由来の細胞株について調べた。

2種類のカリシウイルスのうちイヌカリシウイルスは、自然宿主のイヌ細胞であるMDCKでは激しく増殖するが、そのほかの細胞で感染による細胞変性効果は見られなかった。ネコ由来のカリシウイルスFCVは、自然宿主であるネコ腎臓由来細胞CR-FK細胞で強い感染増殖能を示した。CR-FK細胞にネコカリシウイルスを100 $TCID_{50}$ で感染させるとウイルスの激しい増殖のために、感染2日後にはほぼ100%の細胞が死滅した。しかしヒト細胞にはまったく形態変化や細胞死を引き起こさなかった。ところがアフリカミドリザルの腎臓細胞由来のVero細胞とCV-1細胞では $TCID_{50}$ で10000倍以上低いながらも感染し、時間はかかるものの細胞変性を誘導す

ることがわかった。今回はヒト細胞に感染し、弱い感染増殖性を示すモデルとなるウイルスを特定できなかったが、それに代わるモデル感染系として CV-1 細胞を用いたネコカリシウイルス感染系を使うことにした。

(2) カリシウイルスの非宿主細胞への馴化と馴化ウイルス分離

カリシウイルスは、直径 30–38 nm の正二十面体構造の粒子で、プラス鎖の一本鎖 RNA をゲノムに持つエンベロープを持たないウイルスである。この系では CV-1 細胞にカリシウイルスを感染させ、培養後上清を段階希釈したものを CR-FK 細胞を使って調べることができる。継代 1 回目の CV-1 細胞のウイルス産生量を、CR-FK 細胞のものと比べると、確かに $1/10^5$ 程低いことがわかる (図 1)。しかし CV-1 細胞で引き続き継代していくと驚いたことに 3 回継代しただけで、そのウイルス産生量は 10^3 倍程上昇することがわかった。これに対して 293T 細胞では全くウイルスの産生は見られなかった。また Vero 細胞では、ウイルス感染による細胞変性効果は殆ど見られないものの、継代ごとの培養上清へのウイルス産生は CR-FK 細胞と同等であった。以上からカリシウイルスは、CV-1 細胞では当初低い感染増殖性を示したが、わずか 3 回の継代で、その増殖性が急速に高まることがわかった。つまり一回の継代に 3 日要したので、わずか 3 継代、10 日に満たない短い期間に異種の細胞である CV-1 に高度に馴化したことになる。

(3) 馴化ウイルス FCV_{CV} の強い細胞変性効果

ウイルスの CV-1 細胞への馴化をさらに確実なものにするために、ウイルス継代をさらに 10 回繰り返す、合計 13 回継代したものを FCV_{CV} とした。FCV_{CV} をそれぞれの細胞に感染させてウイルス増殖を比較したのが図 2 である。各細胞に感染させて比較してみると、自然宿主由来の細胞である CR-FK 細胞では、野生株 FCV_{F4} に比べて FCV_{CV} は 10 倍程増殖性

が減少していることがわかる。これに対して CV-1 細胞では、逆に野生株に比べて FCV_{CV} ではその増殖性が 10 倍以上上昇していることがわかった。これとは対照的に Vero 細胞では両者の増殖性に差はなかった。以上からカリシウイルスは、CV-1 細胞により馴化していることが確認された。Vero 細胞では継代時、上清に放出されるウイルス量は CR-FK 細胞と同等であったが、同じウイルス力価で感染させた場合には必ずしも高いウイルス量を産生するわけではない。これはウイルスの継代実験ではウイルスを継代する際にウイルス量を一定にせず、ひとつ前の継代上清を使って比較的高いウイルス力価で植えつぐために、本来ウイルス増殖に時間がかかる Vero 細胞でも十分な感染が起きる。そのため短時間でウイルスが大量に上清に放出されたからだと考えられた。

次にウイルス増殖が細胞に及ぼす影響について調べた (図 3)。FCV_{F4} は宿主細胞である CR-FK で激しく増殖し、細胞変性を引き起こすが、FCV_{CV} も同様に強い細胞変性効果をもっていた。ヒト胎児腎臓由来の 293T 細胞では、ウイルスに暴露後、その形態にまったく変化がなかった。Vero 細胞では図 2 で見たようにウイルスの増殖が観察されたが、FCV_{F4}、FCV_{CV} 感染細胞ともにその形態に殆ど変化は認められなかった。これに対して CV-1 細胞では FCV_{F4} 感染細胞からのウイルス産生は見られたが、細胞変性効果は観察されなかった。ところが、FCV_{CV} 感染細胞では形態変化を起こし、細胞は浮き上がり、その殆どが死滅した。この結果からカリシウイルス FCV_{F4} を CV-1 細胞によって短期間継代することで、ウイルス産生能力が 10 倍以上高まり、強い細胞変性効果をもつ FCV_{CV} を選択分離することができたことになる。

(4) FCV_{CV} の融合細胞での増殖と細胞変性効果

CV-1 細胞も Vero 細胞もアフリカミドリザルの腎臓由来の細胞である。ところが、ウイルス馴化は CV-1 細胞にのみ特徴的な結果を

示した。FCV_{CV}は、CV-1細胞でより高い増殖性を示し、強い細胞変性効果をもたらした。ところがVero細胞では、FCV_{F4}、FCV_{CV}共に同様の増殖性を示し、細胞変性効果にも両者で差はなかった。つまりこの両者の細胞ではカリシウイルスの馴化に関わる表現型が異なっていると考えられる。そこでこの2つの細胞を融合した細胞、C/V#01、C/V#02細胞を作製してFCV_{CV}感染に関する表現型を調べてみた(図2, 3)。その結果、融合細胞では、FCV_{F4}に比べてより多くのFCV_{CV}ウイルスを産生し、かつFCV_{CV}によって強い細胞変性が引き起こされることがわかった。しかも本来ほとんど細胞変性が見られないFCV_{F4}感染細胞でも>50%以上の細胞が死滅した。以上からCV-1/Vero融合細胞では、FCV_{CV}の馴化に関する表現型はdominantであり、その性質はCV-1細胞とVero細胞の融合によってより強くなったといえる。

(5) FCV_{CV}カプシドタンパク質VP-1のアミノ酸置換

それではCV-1細胞に馴化したカリシウイルスであるFCV_{CV}は、馴化前のFCV_{F4}に比べて何が変わったのだろうか。それを調べるためにウイルス粒子を形成しているウイルスタンパク質VP1の構造に変化があるかどうかを調べた(図4)。VP1は、668個のアミノ酸残基からなり、N末からC末側に向かってN、S、P1、P2、P1と並ぶ4つのドメインからなっている(P1はP2を挟んで2つに分かれている)。N末側はよりウイルス中心部に近く、C末に近づくほどウイルス粒子の表面に近い。ウイルス表面はP2で再び、粒子内部に向かって折り返しているため、ウイルス粒子の表面を形成しているのはP2ドメインである。またVP1は、2量体がユニットとなって、正十二面体であるウイルスカプシドを形作っている。FCV_{CV}のVP1には3つのアミノ酸置換を伴う変異Y354V、D427S、E519Kが見つかった。354番目のアミノ酸残基は、P1ドメインに位置しており、2つのVP1が2量体を形成する際の接触面にある。427番目

と519番目のアミノ酸残基は、VP1の2量体において、ウイルス粒子の表面ではなく、その側面上部に位置している(図5)。ここは、ウイルスレセプターと相互作用すると考えられている部分である。従ってこの2つのアミノ酸置換によって馴化ウイルスであるFCV_{CV}ではCV-1細胞上のレセプターとの相互作用に変化が起きた可能性を示唆している。

(6) オートファジー誘導、阻害剤の影響
非エンベロープウイルスでは細胞外にどのようにして放出されるのか、よくわかっていない。非エンベロープウイルスの放出のシナリオとして一番理解し易いのは、感染細胞内でウイルス粒子が産生され、細胞質に蓄積し、やがて細胞溶解、つまり機械的に細胞が破壊されることで、ウイルス粒子が細胞外に放出されるというものである。この他には、ウイルスが細胞内の小胞内で形成され、その小胞が細胞膜と融合する形で内容物であるウイルスを外界に放出するというシナリオもある。この場合ウイルスは、細胞の破壊を伴わずに細胞外に出ることができるが、オートファジーなどの小胞形成を利用した放出機構が必要になってくる。オートファジーとは、細胞が異常タンパク質の蓄積などに晒されたときにこれを分解するために形成される一連の分解反応過程をいう。過剰に作られたタンパク質や異常タンパク質と共にリン脂質が集まり、分解物を内包したオートファジー小胞と呼ばれる細胞内構造の形成が起きる。やがてこのオートファジー小胞に、細胞内のリソソームが膜融合を起こし、オートリソソームとなり小胞内のタンパク質はリソソーム由来タンパク分解酵素によって分解される。ウイルス感染増殖過程には、こうした宿主側の小胞形成が関与する場合がある。もしこうした過程が関与しているとする、例えば、CV-1にFCV_{F4}が感染した場合は、細胞破壊を伴わずにウイルス粒子を細胞外に放出可能だが、FCV_{CV}ではその増殖性が高いため、その経路では間に合わず、ウイルス粒子の細胞内蓄積が進み、最終的に細胞破壊が起

きるという可能性である。そこで次にオートファジーの阻害剤である3MAと促進作用のあるラパマイシンを使って、FCV_{CV}の増殖、細胞変性効果に対する影響を調べた(図6, 7)。まずVero細胞とCV-1細胞にFCV_{F4}あるいは、FCV_{CV}を感染させ、そこに阻害剤である3MAを加えてその影響を調べた。1~5 mM 3MAをVero細胞-ウイルス感染系に加えると、最大30%程度の細胞毒性はあるものの濃度依存的ではないことが分かった。これに対してウイルス産生量は、FCV_{F4}及びFCV_{CV}いずれの場合も3MAの濃度依存的に減少することがわかった。同様にCV-1細胞でも細胞毒性が顕著に見られない3MAの濃度範囲(1~5 mM)で、濃度依存的にウイルス産生の阻害が起きることが分かった。この結果からオートファジー阻害が、カリシウイルス産生の減少を引き起こしている可能性が示された。

それではオートファジーを誘導した場合はどうだろうか。先ず、オートファジー誘導作用をもつラパマイシンによって、実際にオートファジーが誘導されるかどうかを抗LC3抗体により調べたのが図9である。確かにLC3IIが薬剤によって誘導されているのが分かる。ラパマイシンをウイルス感染系に加えて、その影響を見たのが、図10である。1~50 ng/ml ラパマイシンは、Vero細胞に対して最大27%程度の細胞毒性を示し、ウイルス感染の有無で顕著な差はなかった。またウイルス産生にも大きな影響はなかった。CV-1細胞では、FCV_{F4}感染により、顕著な細胞死は誘導されないが、FCV_{CV}による強い細胞変性効果を持つが、ここにラパマイシンを加えると、CV-1細胞の細胞変性効果が抑制され、生細胞数が回復することがわかった。つまり、細胞内で増殖するウイルス粒子によって引き起こされる細胞破壊を抑制する効果をもっていることになる。この効果は次の2つの可能性を示唆する。①FCV_{CV}によるCV-1細胞の強い細胞変性効果が、オートファジーを誘導することによって、分解系にまわり、細胞死をまぬがれた、②オートファジーによる小胞形成の結果、ウイルスが細胞内

に蓄積せず、効率よく細胞外に運ばれ放出されたため、細胞破壊による細胞死が抑制された。これを明らかにするために細胞培養上清のウイルス量を調べた(図10)。その結果、CV-1細胞ではラパマイシンによりFCV_{CV}産生量も増えていることが分かった。よってラパマイシンの効果は、後者の可能性が高いと考えられる。

(7) ヒト細胞へのカリシウイルスの感染

表1でカリシウイルスは本来自然宿主ではない細胞種であるアフリカミドリザルのレセプターJAM1を使って感染することが示唆された。293T細胞もHeLa細胞もJAM1陽性である。自然宿主のネコのJAM1とアフリカミドリザルのJAM1の相同性はアミノ酸配列で比較すると58%である(図11)。ヒトのJAM1と、アフリカミドリザルのJAM1の相同性は98%である。もしカリシウイルスの宿主域がレセプターの違いによるのだとしたら、ヒトとアフリカミドリザルのJAM1のごくわずかな違い(2%)が決定的な感染の可否を決めていることになる。実際にアフリカミドリザルとネコでは同じアミノ酸残基だが、ヒトとアフリカミドリザルで異なるアミノ酸残基である位置を調べるとAla⁷, Ser¹⁰², Lys¹⁵⁶, Ile¹⁷⁴の4つのアミノ酸残基であることがわかる。ヒトに感染できないのは、このうちのいずれかがウイルス感染に重要な役割を果たすアミノ酸残基である可能性がある。しかしウイルスの細胞指向性を決定しているのは必ずしもレセプターだけではない。細胞内に侵入してもそこで増殖することができないケースも考えられる。その場合想定されるシナリオは、

- ① ウイルスの複製に必要な宿主側の因子が欠けているため増殖できない。
- ② ウイルス複製に必須の宿主側の因子がドミナントネガティブに作用して、複製不全が起きる。
- ③ 侵入してきたウイルスに対抗して自然免疫系が立ち上がり、ウイルスRNAやタンパ

ク質を分解する。

などである。このいずれであるのかを確認するためにまずカリシウイルスに感染しない CHO 細胞にヒトの JAM1 を発現させ、カリシウイルスが感染するかどうかを検討した (図 12)。CHO 細胞にネコの JAM1 を導入したもので、ウイルスの感染増殖が見られ、CPE も観察された。同様にアフリカミドリザルの JAM1 に関しても CHO 細胞に発現させると、ウイルスの増殖が見られた。ヒトの JAM1 を発現すると、ウイルスはネコやアフリカミドリザルのものと同様に感染性ウイルスを放出することができた。

以上からヒトの JAM1 はカリシウイルスの細胞への侵入をサポートできることがわかった。それでは、何故ヒト細胞では感染性をもつウイルス粒子の産生がないのだろうか。このことを明らかにするために、最初にカリシウイルスの侵入をリアルタイム PCR で測定した (図 13)。カリシウイルスはウイルス粒子内に+鎖 RNA を 1 本持っている。この RNA は細胞内に侵入後そのまま翻訳され、-鎖 RNA が合成され、つぎにそれが鋳型となって+鎖 RNA が転写され、今度は+鎖 RNA が翻訳され、ウイルスタンパク質が生合成される。この後ウイルスタンパク質のアッセンブリーが進んで、ウイルス粒子が形成され、細胞外に放出される。ここでは-鎖 RNA の生成を 0, 4, 14, 24 時間後に調べた (図 13)。驚いたことにヒト細胞でも-鎖 RNA が転写されることがわかった。しかも 293T 細胞においては、Vero 細胞とほぼ同量の-鎖 RNA が作られる。経時変化を見ると、ヒト細胞内では感染後 24 時間後、わずかではあるが-鎖 RNA 量が減少に転じていることがわかる。特に HeLa 細胞でこの減少が著しい。即ちウイルスが複製可能な細胞である CR-FK 細胞や CR-FK 細胞に比較するとそれほどウイルス産生量は多くないが、増殖可能であるアフリカミドリザルの細胞ばかりでなく、ヒトの細胞内にもウイルスの-鎖を合成するのに必要な宿主因子のすべてが含まれていることを意味してい

る。次に+鎖 RNA についてみると、同様にヒト細胞内でも +鎖 RNA が合成されるのがわかった (data not shown)。ウイルスタンパク質の合成に関しては、検討してはいないが、以上から推定されることは、ウイルス侵入後、±鎖 RNA が共に合成されるが、ヒト細胞ではウイルス RNA が安定に存在できなくなる、即ち自然免疫系といった細胞内の感染防御システムが活性化してウイルス RNA 分解が進むのではないかと推定された。

D. 考察

ウイルスが、本来の自然宿主ではない異種細胞にわずかながらも吸着・侵入し、感染・増殖が始まる際には、どんなことが起きるのだろうか。本研究では細胞組織加工医薬品へのウイルス汚染を想定して、カリシウイルスをモデルウイルスとして自然宿主ではない細胞への感染拡大のごく初期に何が起きるのかを調べた。カリシウイルスはエンベロープを持たない RNA ウイルスである。そのため、非常に可塑性に富んでおり、自然界でも極めて広い宿主に見られる。特に海洋生物には、多様なカリシウイルスが感染増殖を繰り返しており、魚類由来とされるカリシウイルスの一種が、米国で家畜 (ブタ) に深刻な疾病を引き起こした例も知られている。またバイオ医薬品製造現場でもウイルス感染抵抗性と見られている CHO 細胞に感染するウイルス汚染事例を引き起こしており、細胞組織加工医薬品製造においても注意すべきウイルスのひとつといえる。今回はネコを自然宿主とするカリシウイルスが、アフリカミドリザルの細胞に感染し、異種細胞の中でどのように馴化していくのかについて調べるため、CV-1 細胞に馴化したウイルスを分離し、そのウイルスの性質を調べることで解析を進めた。ここで使用した FCV_{F4} は、アフリカミドリザル由来細胞である CV-1 細胞は極めて低い感染感受性しか持たない。しかしその低い増殖能しかもたないウイルスを CV-1 細胞で継代するとごく短期間で、CV-1 細胞に適応することが明らかになった。ウイルスの馴

化の過程では、ウイルス産生能が野生株に比べて飛躍的に上昇し、強い細胞変性効果を獲得した。このウイルスは、ウイルスカプシドを形成している VP1 タンパク質に3つのアミノ酸置換を持っており、その2つは、立体構造の位置からウイルスが細胞膜上のレセプター分子と相互作用すると考えられている領域にある。アフリカミドリザル細胞ではその感染感受性は 10^4 以上低かった。この障壁が、ウイルスのライフサイクルのどの部分に起因しているのかについて現段階で明白な結論を出すことはできない。しかしネコ、アフリカミドリザルのレセプター JAM1 発現 CHO 細胞への感染実験から、ウイルス侵入に関わる段階である可能性は高い。というのも JAM1 発現 CHO 細胞への感染実験では、ごくわずかなネコ JAM1 発現細胞で、アフリカミドリザルやヒト JAM1 発現 CHO 細胞と同等のウイルス産生が観察されたからである。ここでは発現 JAM1 の C 末に V5 エピトープをつないだが、この C 末の修飾は、ウイルス感染には影響しなかった。VP1 タンパク質の3つのアミノ酸置換がウイルス馴化と深く関係していることを直接示すためには、リバーシジェネティクス法による、組み換えウイルスを作製する必要があるが、これについては今後の課題である。また VP1 以外の領域にも変異がないかどうかについても、今後解析する予定である。

ネコカリシウイルスがヒトに感染性をもたないことは知られているが、それはレセプターであるヒト JAM1 がカリシウイルスの感染侵入をサポートしないからではないことが本研究で初めて明らかになった。CHO 細胞にヒト JAM1 を発現させると、カリシウイルスは、アフリカミドリザル JAM1 と同等の感染増殖性を示した。この結果は、宿主域を決定している因子がレセプター以外にあることを明確に示している。その理由としていくつか挙げることができる。そのひとつは、ウイルスの複製に必要な宿主側の因子がヒト細胞に欠けているため増殖できないという可能性である。しかしこれに関しては、ヒト

細胞内でウイルス感染後、一鎖 RNA とともに + 鎖 RNA の産生が Vero 細胞並みに観察されたことから、可能性は低いものと考えられる。2つ目は、ウイルス複製に必須の宿主側の因子が dominant-negative に作用して、複製不全が起きる可能性だ。CV-1 細胞と Vero 細胞の融合細胞を作製し、その細胞でのウイルスの感染増殖能を調べてみると、その表現型は、CV-1 に酷似していた。もし dominant-negative な因子が関与しているとすると、融合細胞は、Vero 細胞の表現型を取る可能性が高い。従って、この可能性も低いものと考えられる。そして3つ目は、侵入してきたウイルスに対抗してヒト細胞では、インターフェロン I 型を介した自然免疫系が活性化し、ウイルス RNA やタンパク質を分解するという可能性だ。これに対して、ネコ細胞内の自然免疫系は、ネコカリシウイルスによって、巧妙にブロックされているのかもしれない。またアフリカミドリザルでは、そのブロックが不十分なために、ごくわずかな感染・増殖が起きるのかもしれない。しかし、カリシウイルスは、アフリカミドリザル CV-1 細胞内で惹起された一連の自然免疫系による防御障壁を容易に克服して馴化することができるのかもしれない。

治療用細胞組織加工医薬品のウイルス安全性を考える際には、バイオ医薬品のウイルス安全性同様のリスクマネジメントが参考になるものと考えられる。というのも動物細胞による組換えタンパク質医薬品の製造過程でも同様に生物由来原材料を用いた培養工程を含むからである。既に述べたが、カリシウイルスは実際に自然宿主でないバイオ医薬品製造細胞である CHO 細胞に感染し、汚染事例を引き起こしたウイルスとしても知られている。そのときもバイオリクター汚染ウイルスは、当初ごく弱い感染性しかもたず、細胞変性も起こさなかったためにバイオリクター内での汚染に気づくのが遅れたといわれている。汚染が進み、ウイルスの感染細胞への馴化が起きて、製造用細胞増殖が低下することによってウイルス汚

染が発覚した。今回の実験でもカリシウイルスは、非宿主細胞への馴化が速やかにおきることが示された。これは今後治療用細胞組織加工医薬品製造過程でも生物由来の材料を使う際にも十分気をつける必要がある点である。また従来までヒト細胞に感染するとは思われていなかったカリシウイルスの一種が、細胞内に侵入し、-鎖 RNA を生成することが示された。ヒト JAM1 が、ウイルス侵入をサポートすることは明らかで、その後ウイルスがなぜヒト細胞内で複製をスムーズに進めることができないのかについては今後の課題である。このようにウイルスの感染成立は単にレセプターの有無などだけでなく、細胞侵入後の細胞内イベントも関わってくる。特に近年は哺乳類の細胞がもっている自然免疫系の関与が感染増殖成立の可否に重要な因子となっていることが分かってきている。例えば、レトロウイルスのひとつであるヒトレンチウイルスでは、感染するとインターフェロンを介する感染防御系が活性化し、ウイルス RNA の修飾酵素である APOBEC3G やウイルス放出をウイルス粒子繫留作用によって抑制する Tetherin などによる抗ウイルス作用が惹起される。CV-1 では、この抑制系がウイルス側の馴化によって容易に突破され、高い増殖性と同時に強い細胞変性効果を獲得することができた。幸いなことにヒト細胞では、感染侵入が起きるが、その後、免疫系が惹起され、新たな感染が起きずに感染拡大はくい止められる。しかし 1000 TCID₅₀ といった極めて高いウイルスに暴露すると、ヒト細胞でも感染性のあるウイルス粒子が産生されることが観察された (data not shown)。この結果は、ウイルス感染成立とその複製は、感染ウイルス力価と宿主細胞側の自然免疫系のバランスによって左右されていることを示唆している。

E. 結論

非自然宿主でない細胞組織加工医薬品用細胞にウイルスが感染した場合を想定して、モデルとなるウイルス感染系を用いて、馴化

過程を解析検討した。この結果、モデルとしたカリシウイルスは、汚染当初、低い感染性を持っていても、ごく短期間の培養によって、迅速な馴化が起きて、高度の感染性と増殖能を獲得することが明らかになった。またヒトには感染性をもたないと従来考えられていたカリシウイルスが、ヒト細胞にも感染することが、明らかになった。従って細胞組織加工医薬品に用いられる細胞にカリシウイルスレセプターが発現している場合には、感染および馴化が起きる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, Yusa, K: Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to maraviroc. PLOS One, *in press*
- 2) Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Boonchawalit S, Yusa K, Matsushita S: Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. J. Gen. Virol. 94(5): 933-943, 2013
- 3) 遊佐敬介, 前田洋助 ヒト感染が疑われたレトロウイルスの起源とウイルス安全性 ファームテクジャパン28 (10), 2075-2079, 2012
- 4) 遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴 バイオ医薬品の外来性感染性物質について ファームテクジャパン28 (5), 941-946, 2012
- 5) 遊佐敬介 バイオ医薬品のウイルス安全性, (抗体) 医薬品における不純物/凝集の評価・試験と免疫原性, ウイルス安全性への対応, 270-278, サイエンス&テクノロジー, 2012

2. 学会発表

- 1) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda, Y, Terasawa, H, Harada, S, Sato, H, Yusa, K. Key Structure of the gp120 V3 Loop Responsible for Noncompetitive Resistance to Maraviroc in R5 HIV-1_{JR-FL}

13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint
International Symposium (2012.10.
24-26) Aso

- 2) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢
広美, 遊佐敬介, 原田信志 HIV-1
coreceptor の oligomer 形成が HIV-1
感染感受性に与える影響: 第 60 回日本
ウイルス学会学術集会
(2012.11.13-15) 大阪
- 3) 前田洋助, 寺沢広美, 中野雄介, 門出
和精, 遊佐敬介, 原田信志 RTLVI エン
ヴェロープの膜融合におけるウイルス
産生細胞内エンドソーム酸性化の関与.
第 60 回日本ウイルス学会学術集会
(2012.11.13-15) 大阪
- 4) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢
広美, 遊佐敬介, 原田信志 CRF01_AE X4
HIV の V3 非依存的 CXCR4 阻害剤逃避.
第 26 回日本エイズ学会学術集会
(2012.11.24-26) 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 ウイルスの非宿主細胞への感染増殖性

	NIH-3T3	CR-FK	Vero	CV-1	CHO	MDCK	293T
poliovirus	-	-	-	-	-	-	++*
sindbis virus	++	++	++	++	ND	ND	++
feline calicivirus	-	++*	+	+	-	+	-
canine calicivirus	ND	-	-	-	ND	++*	ND

*自然宿主細胞への感染。-, 感染増殖見られない; +, 低い感染性と増殖性を示す; ++, 100 TCID₅₀で感染, 3日後に>90%の細胞がCPEによって死滅.

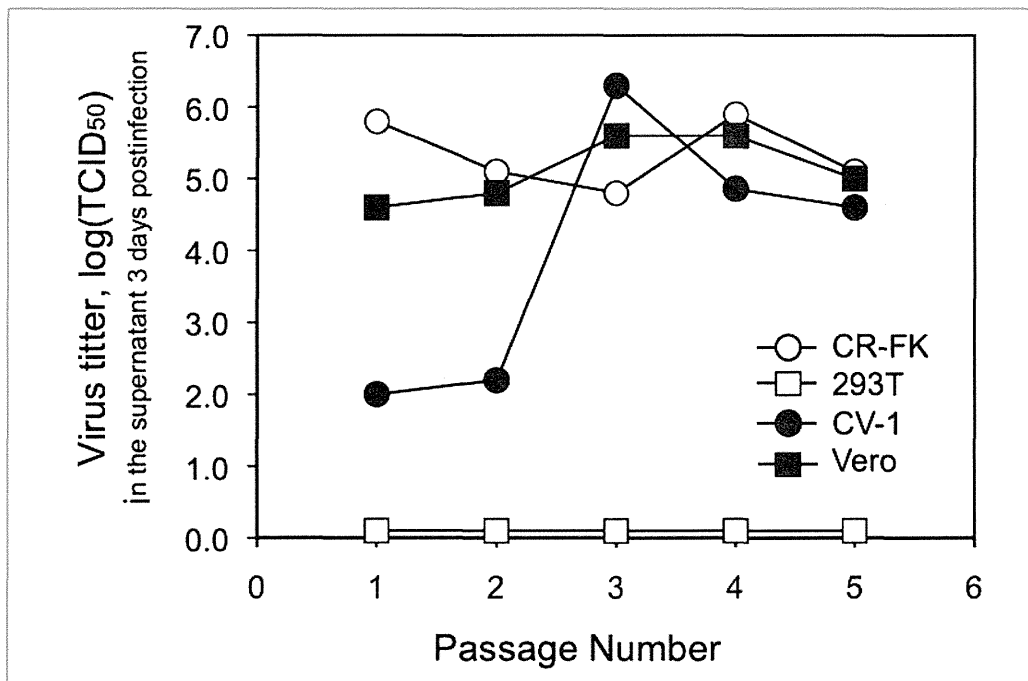


図1 カリシウイルスは非宿主細胞で継代を繰り返すと短時間で継代に使われた細胞に馴化することができる

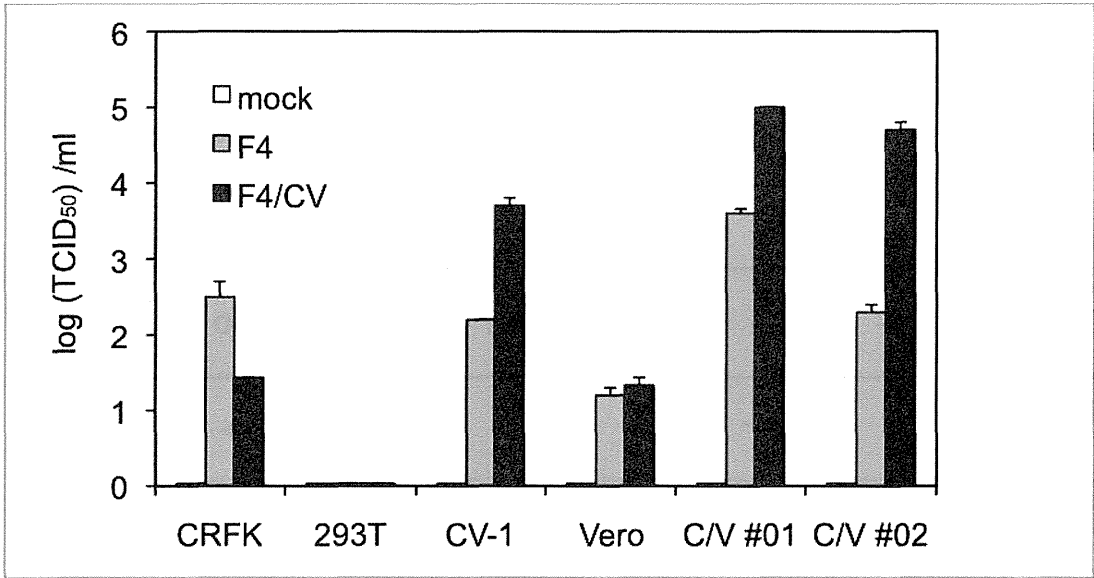


図2 CV-1細胞に適応したFCV_{F4/CV}はCV-1細胞でより多くのウイルスを産生する

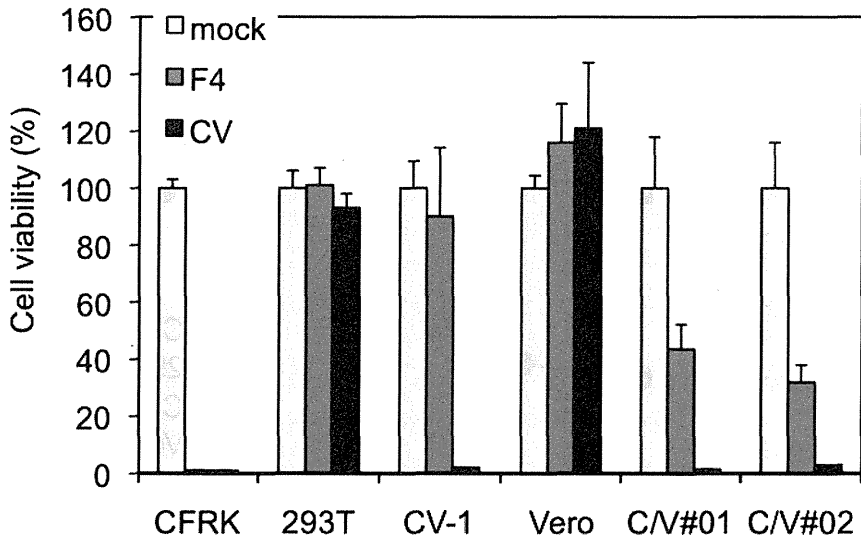


図3 カリシウイルスは馴化した細胞に強いCPE（細胞変性効果）を引き起こす

相同性高い部分

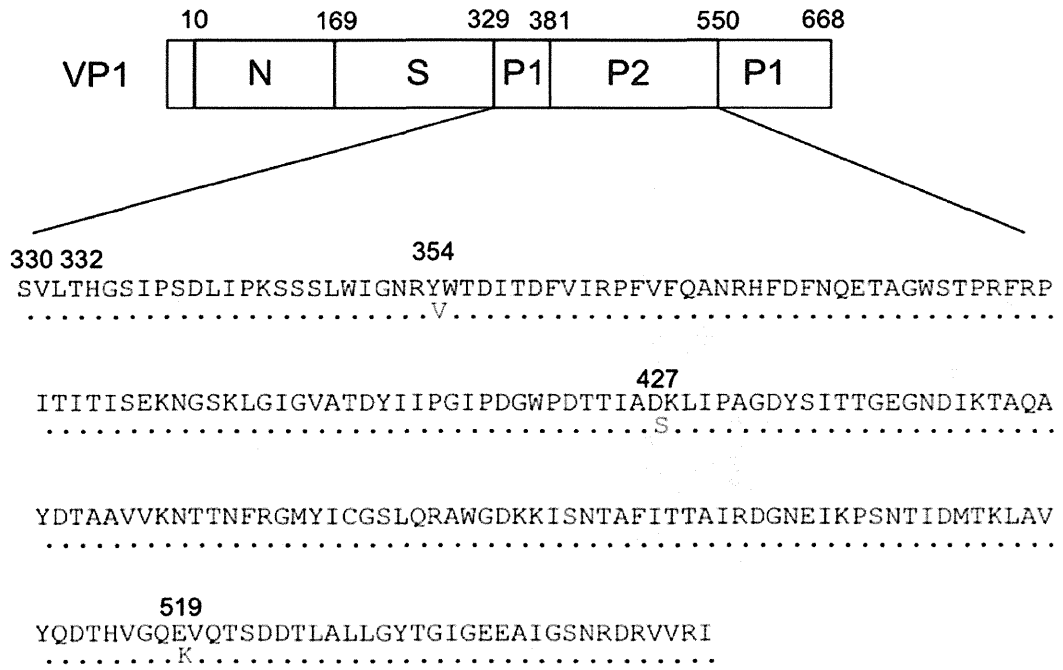
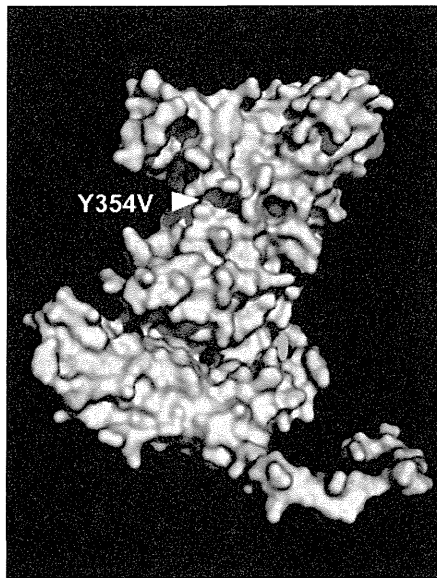
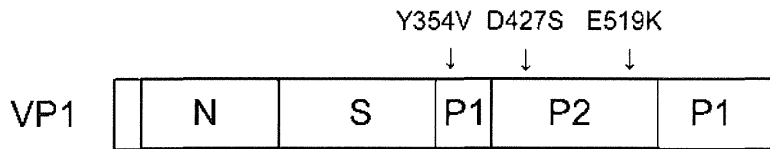
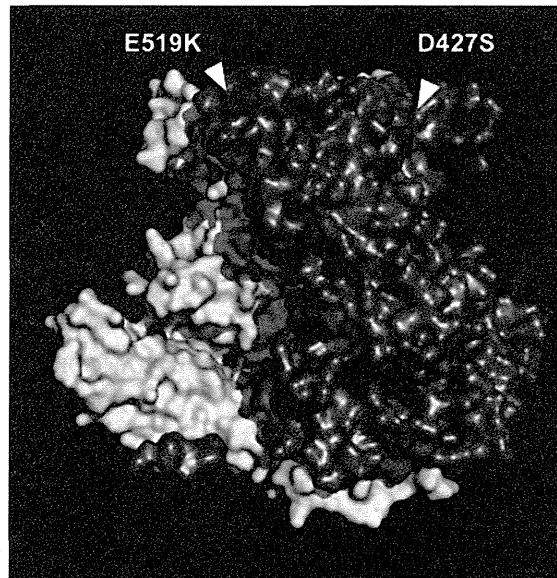


図4 CV-1細胞に馴化した FCVcv はVP1に
アミノ酸変異をもつ



VP1 monomer



VP1 dimer

ウイルス
表面



ウイルス
内部

FCV



図5 CV-1細胞適応 FCV VP1のアミノ酸変異の3D構造上での位置