

first CCR5 inhibitor (Gulick *et al.*, 2008). One important advantage associated with this drug is the absence of cross-resistance with previously available ARV compounds (Gulick *et al.*, 2008; Steigbigel *et al.*, 2008). However, as is usual with anti-HIV drugs, resistant variants with mutations in the Env, gp120 and gp41 sequences are induced both *in vivo* and *in vitro* (Anastassopoulou *et al.*, 2009; Berro *et al.*, 2009; Tilton *et al.*, 2010; Yoshimura *et al.*, 2009, 2010a). As shown in the present study, distinct Env sequences from each quasi-species might be selected by the different anti-HIV drugs (e.g. length of the V1/2 and/or V4 regions, V3 region depletion and the number of PNGs). Moreover, many of the novel anti-retroviral drugs in pre-clinical trials are viral entry inhibitors (e.g. PRO140, ibalizumab, BMS-663068 and PF-232798; Jacobson *et al.*, 2010; McNicholas *et al.*, 2010; Nettles *et al.*, 2011; Stupple *et al.*, 2011; Toma *et al.*, 2011). Therefore, it is necessary to examine whether such entry inhibitors are effective when used alongside conventional drugs.

In conclusion, we studied the genetic bottleneck in bulk primary HIV-1 isolates from untreated patients and drugs targeting the Env (and other) regions. The results showed, for the first time, the presence of drug-selected Env sequences in these isolates. Although our observations were based on a limited number of HIV-1 isolates and need to be confirmed by independent studies, we believe that they

provide a new paradigm for HIV-1 evolution in the new combination ARV therapy era.

METHODS

Patients and isolates. Primary HIV-1 isolates were isolated from four drug-naïve patients in our laboratory (KP-1–4) and passaged in phytohaemagglutinin-activated PBMCs. Infected PBMCs were then co-cultured for 5 days with PM1/CCR5 cells (a kind gift from Dr Y. Maeda; Maeda *et al.*, 2008; Yusa *et al.*, 2005) and the culture supernatants were stored at -150°C (Hatada *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2006, 2010b).

After isolation of the primary viruses, we checked the sensitivity of each primary isolate to MVC. The KP-1 isolate was relatively MVC-resistant compared with KP-2 and KP-3 (54 vs 5.9 and 8.7 nM, respectively). KP-1 became MVC sensitive after eight passages in PM1/CCR5 cells [IC_{50} , 3.4 nM; Geno2pheno value (see below), 41.2%], whilst under the pressure of MVC, KP-1 became highly resistant to MVC after eight passages (IC_{50} , >1000 nM; Geno2pheno value, 1.7%). These results indicated that the bulk KP-1 isolate used in this study harboured primarily R5 viruses with X4- or dual-tropic viruses as a minor population.

Cells, culture conditions and reagents. PM1/CCR5 cells were maintained in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (HyClone Laboratories), 50 U penicillin ml^{-1} , 50 μg streptomycin ml^{-1} and 0.1 mg G418 (Nacalai Tesque) ml^{-1} . MVC, RAL and SQV were kindly provided by Pfizer, Merck & Co. and Roche Products, respectively. 3TC was purchased from Wako Pure Chemical Industries.

The laboratory-adapted HIV-1 strain 89.6, which was obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, was propagated in phytohaemagglutinin-activated PBMCs. The viral-competent library pJR-FL-V3Lib, which contains 176 bp V3-loop DNA fragments with 0–10 random combinations of amino acid substitutions, was introduced into pJR-FL, as described previously (Yusa *et al.*, 2005).

In vitro selection of HIV-1 variants using anti-HIV drugs. The four primary HIV isolates (KP-1–4), strain 89.6 and JR-FL-V3Lib were treated with various concentrations of RAL and used to infect PM1/CCR5 cells to induce the production of RAL-selected HIV-1 variants, as described previously, with minor modifications (Hatada *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2006, 2010b). Briefly, PM1/CCR5 cells (4×10^4 cells) were exposed to 500 TCID₅₀ HIV-1 isolates and cultured in the presence of RAL. Virus replication in PM1/CCR5 cells was monitored by observing the cytopathic effects. The culture supernatant was harvested on day 7 and used to infect fresh PM1/CCR5 cells for the next round of culture in the presence of increasing concentrations of RAL. When the virus began to propagate in the presence of the drug, the compound concentration was increased further. Proviral DNA was extracted from lysates of infected cells at different passages using a QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen). The proviral DNAs obtained were then subjected to nucleotide sequencing. *In vitro* selection of the KP-1 isolate using SQV, 3TC and MVC was also performed using the procedure described above.

Amplification of proviral DNA and nucleotide sequencing.

Proviral DNA was subjected to PCR amplification using PrimeSTAR GXL DNA polymerase and Ex-*Taq* polymerase (Takara), as described previously (Hatada *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2006, 2010b). The primers used were 1B and H for the gp120 region (Hatada *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2006, 2010b), IN 1F (5'-CAGACTCACAATATGCATTAGG-3') and IN 1R (5'-CCTGTATGCAGACCCCAATATG-3') for the IN region, and IN 1F and H for the IN-gp120 region. The first-round PCR products were used directly in a second round of PCR using primers 2B and F (Hatada *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2006, 2010b) for gp120, IN 2F (5'-CTGGCATGGGTACCAGCACACAA-3') and IN 2R (3'-CCTAGTGGGATGTGTACTTCTGAACCTTA-3') for IN, and IN 2F and F for IN-gp120. The PCR conditions used were as described above. The second-round PCR products were purified and cloned into a pGEM-T Easy Vector (Promega) or pCR-XL-TOPO Vector (Invitrogen), and the *env* and *IN* regions in both the passaged and selected viruses were sequenced using an Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer and a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Phylogenetic reconstructions were generated using the neighbour-joining method embedded in the MEGA software (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et al.*, 2007). Overall, mean distances for viral diversity were also calculated using MEGA software. The number and location of putative PNGs were estimated using N-GlycoSite (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>) from the Los Alamos National Laboratory database.

Susceptibility assay. The sensitivity of the passaged viruses to various drugs was determined as described previously with minor modifications (Hatada *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2006, 2010b). Briefly, PM1/CCR5 cells (2×10^3 cells per well) in 96-well round-bottomed plates were exposed to 100 TCID₅₀ of the viruses in the presence of various concentrations of drugs and incubated at 37 °C for 7 days. The IC₅₀ values were then determined using a Cell Counting Kit-8 assay (Dojindo Laboratories). All assays were performed in duplicate or triplicate.

Predicting co-receptor usage by the V3 sequence. HIV-1 tropism was inferred using Geno2pheno [coreceptor] program, with a false rate positive (FPR) value of 5.0%, which is freely available (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>). This genotyping tool more accurately predicts virological responses to the CCR5 antagonist MVC in ARV-naïve patients than a reference phenotypic tropism test (Sing *et al.*, 2007).

Statistical analyses. Pairwise comparisons of the different parameters between variants in the two groups was calculated using the homoscedastic *t*-test. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr Yosuke Maeda for providing the PM1/CCR5 cells. We also thank Syoko Yamashita, Yoko Kawanami, Noriko Shirai and Akiko Shibata for technical assistance. This study was supported in part by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B-22790163); grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare; the Program of Founding Research Centers for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases; and the Global COE program Global Education and Research Center Aiming at the Control of AIDS.

REFERENCES

- Anastassopoulou, C. G., Ketas, T. J., Klasse, P. J. & Moore, J. P. (2009). Resistance to CCR5 inhibitors caused by sequence changes in the fusion peptide of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5318–5323.
- Berro, R., Sanders, R. W., Lu, M., Klasse, P. J. & Moore, J. P. (2009). Two HIV-1 variants resistant to small molecule CCR5 inhibitors differ in how they use CCR5 for entry. *PLoS Pathog* **5**, e1000548.
- Charpentier, C., Nora, T., Tenailon, O., Clavel, F. & Hance, A. J. (2006). Extensive recombination among human immunodeficiency virus type 1 quasispecies makes an important contribution to viral diversity in individual patients. *J Virol* **80**, 2472–2482.
- Delwart, E. L., Pan, H., Neumann, A. & Markowitz, M. (1998). Rapid, transient changes at the *env* locus of plasma human immunodeficiency virus type 1 populations during the emergence of protease inhibitor resistance. *J Virol* **72**, 2416–2421.
- Eigen, M. (1993). The origin of genetic information: viruses as models. *Gene* **135**, 37–47.
- Gulick, R. M., Lalezari, J., Goodrich, J., Clumeck, N., DeJesus, E., Horban, A., Nadler, J., Clotet, B., Karlsson, A. & other authors (2008). Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* **359**, 1429–1441.
- Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J. & Matsushita, S. (2010). Human immunodeficiency virus type 1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J Gen Virol* **91**, 1335–1345.
- Hombrouck, A., Voet, A., Van Remoortel, B., Desadeleer, C., De Maeyer, M., Debysse, Z. & Witvrouw, M. (2008). Mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase confer resistance to the naphthyridine L-870,810 and cross-resistance to the clinical trial drug GS-9137. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2069–2078.
- Ibáñez, A., Clotet, B. & Martínez, M. A. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 population bottleneck during indinavir therapy causes a genetic drift in the *env* quasispecies. *J Gen Virol* **81**, 85–95.

- Jacobson, J. M., Thompson, M. A., Lalezari, J. P., Saag, M. S., Zingman, B. S., D'Ambrosio, P., Stambler, N., Rotshteyn, Y., Marozsan, A. J. & other authors (2010). Anti-HIV-1 activity of weekly or biweekly treatment with subcutaneous PRO 140, a CCR5 monoclonal antibody. *J Infect Dis* **201**, 1481–1487.
- Kitrinos, K. M., Nelson, J. A., Resch, W. & Swanstrom, R. (2005). Effect of a protease inhibitor-induced genetic bottleneck on human immunodeficiency virus type 1 *env* gene populations. *J Virol* **79**, 10627–10637.
- Kobayashi, M., Nakahara, K., Seki, T., Miki, S., Kawachi, S., Suyama, A., Wakasa-Morimoto, C., Kodama, M., Endoh, T. & Oosugi, E. (2008). Selection of diverse and clinically relevant integrase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants. *Antiviral Res* **80**, 213–222.
- Maeda, Y., Yusa, K. & Harada, S. (2008). Altered sensitivity of an R5X4 HIV-1 strain 89.6 to coreceptor inhibitors by a single amino acid substitution in the V3 region of gp120. *Antiviral Res* **77**, 128–135.
- McNicholas, P., Wei, Y., Whitcomb, J., Greaves, W., Black, T. A., Tremblay, C. L. & Strizki, J. M. (2010). Characterization of emergent HIV resistance in treatment-naïve subjects enrolled in a vicriviroc phase 2 trial. *J Infect Dis* **201**, 1470–1480.
- Nájera, R., Delgado, E., Pérez-Alvarez, L. & Thomson, M. M. (2002). Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS* **16** (Suppl. 4), S3–S16.
- Nettles, R., Schurmann, D., Zhu, L., Stonier, M., Huang, S. P., Chien, C., Krystal, M., Wind-Rotolo, M., Bertz, R. & Grasela, D. (2011). Pharmacodynamics, safety, and pharmacokinetics of BMS-663068: a potentially first-in-class oral HIV attachment inhibitor. In *18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, abstract 49. Boston, MA.
- Nijhuis, M., Boucher, C. A., Schipper, P., Leitner, T., Schuurman, R. & Albert, J. (1998). Stochastic processes strongly influence HIV-1 evolution during suboptimal protease-inhibitor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14441–14446.
- Nora, T., Charpentier, C., Tenaillon, O., Hoede, C., Clavel, F. & Hance, A. J. (2007). Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J Virol* **81**, 7620–7628.
- Rhee, S.-Y., Liu, T. F., Kiuchi, M., Zioni, R., Gifford, R. J., Holmes, S. P. & Shafer, R. W. (2008). Natural variation of HIV-1 group M integrase: implications for a new class of antiretroviral inhibitors. *Retrovirology* **5**, 74.
- Sheehy, N., Desselberger, U., Whitwell, H. & Ball, J. K. (1996). Concurrent evolution of regions of the envelope and polymerase genes of human immunodeficiency virus type 1 observed during zidovudine (AZT) therapy. *J Gen Virol* **77**, 1071–1081.
- Shibata, J., Yoshimura, K., Honda, A., Koito, A., Murakami, T. & Matsushita, S. (2007). Impact of V2 mutations on escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol* **81**, 3757–3768.
- Sing, T., Low, A. J., Beerenwinkel, N., Sander, O., Cheung, P. K., Domingues, F. S., Büch, J., Däumer, M., Kaiser, R. & other authors (2007). Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antivir Ther* **12**, 1097–1106.
- Steigbigel, R. T., Cooper, D. A., Kumar, P. N., Eron, J. E., Schechter, M., Markowitz, M., Loutfy, M. R., Lennox, J. L., Gatell, J. M. & other authors (2008). Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med* **359**, 339–354.
- Stupple, P. A., Batchelor, D. V., Corless, M., Dorr, P. K., Ellis, D., Fenwick, D. R., Galan, S. R., Jones, R. M., Mason, H. J. & other authors (2011). An imidazopiperidine series of CCR5 antagonists for the treatment of HIV: the discovery of N-(1S)-1-(3-fluorophenyl)-3-[(3-endo)-3-(5-isobutyryl-2-methyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-8-yl]propylacetamide (PF-232798). *J Med Chem* **54**, 67–77.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596–1599.
- Tilton, J. C., Wilen, C. B., Didigu, C. A., Sinha, R., Harrison, J. E., Agrawal-Gamse, C., Henning, E. A., Bushman, F. D., Martin, J. N. & other authors (2010). A maraviroc-resistant HIV-1 with narrow cross-resistance to other CCR5 antagonists depends on both N-terminal and extracellular loop domains of drug-bound CCR5. *J Virol* **84**, 10863–10876.
- Toma, J., Weinheimer, S. P., Stawiski, E., Whitcomb, J. M., Lewis, S. T., Petropoulos, C. J. & Huang, W. (2011). Loss of asparagine-linked glycosylation sites in variable region 5 of human immunodeficiency virus type 1 envelope is associated with resistance to CD4 antibody ibalizumab. *J Virol* **85**, 3872–3880.
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**, 344–348.
- Yoshimura, K., Shibata, J., Kimura, T., Honda, A., Maeda, Y., Koito, A., Murakami, T., Mitsuya, H. & Matsushita, S. (2006). Resistance profile of a neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favourable synergism with anti-CCR5 inhibitors. *AIDS* **20**, 2065–2073.
- Yoshimura, K., Harada, S., Hatada, M. & Matsushita, S. (2009). Mutations in V4 and C4 regions of the HIV-1 CRF08-BC envelope induced by the in vitro selection of Maraviroc Confer cross-resistance to other CCR5 inhibitors. In *16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, p. 640. Montreal, Canada.
- Yoshimura, K., Harada, S. & Matsushita, S. (2010a). Two step escape pathway of the HIV-1 subtype C primary isolate induced by the in vitro selection of Maraviroc. In *17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, abstract 535. San Francisco, CA.
- Yoshimura, K., Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H. & Matsushita, S. (2010b). Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J Virol* **84**, 7558–7568.
- Yusa, K., Maeda, Y., Fujioka, A., Monde, K. & Harada, S. (2005). Isolation of TAK-779-resistant HIV-1 from an R5 HIV-1 GP120 V3 loop library. *J Biol Chem* **280**, 30083–30090.
- Zhang, Y. M., Dawson, S. C., Landsman, D., Lane, H. C. & Salzman, N. P. (1994). Persistence of four related human immunodeficiency virus subtypes during the course of zidovudine therapy: relationship between virion RNA and proviral DNA. *J Virol* **68**, 425–432.

Fig. S1

		Env sequence relative to the HXB ₂ reference sequence																																										
KP-1		Integrase				SP	C1					V1					V2		C2	V3	C3					V4			C4	V5														
HXB ₂		K	K	Q	D	G	T	V	N	D	S	K	D	N	S	K	D	N	D	T	ins	S	ins	I	A	N	R	N	INS	S	V	S	N	N	G	D	Q	N	N	N	ins	E	S	I
amino acid positions		7	111	216	278	18	31	87	94	107	128	130	137	139	144	151	185	186	187	189	190	291	324	333	336	340	350	355	365	372	405	406	407	410	412	442	460	462	463	464	464	465	467	
base-line	2/18	R	R	Q	N	G	A	G	D	D	T	N	I	-	N	S	D	M	G	T	NNNSNNTTSNRR	S	I	I	T	N	K	N	V	K	V	N	-	-	S	G	L	D	Q	T	-	G	N	T
	2/18	K	K	Q	D	G	A	E	D	D	T	K	A	E	D	N	D	M	G	T	NNNSNNTT-R	S	I	V	T	N	K	N	V	K	V	N	I	P	P	D	L	G	Q	T	GTN	G	N	T
	2/18	K	R	Q	D	G	A	E	D	D	T	N	I	-	N	S	D	M	G	T	NNNSNNTTSNRR	S	I	I	T	N	K	N	V	K	I	K	-	-	S	G	L	G	Q	T	-	G	N	T
	2/18	R	K	Q	D	D	T	G	N	D	A	N	I	K	N	S	D	M	G	T	NNNSNNTTSNYR	T	V	V	T	N	K	N	A	P	V	N	R	T	P	D	L	G	Q	T	GTN	G	S	I
	1/18	R	K	Q	D	G	A	G	N	D	T	N	I	-	N	S	N	N	N	S	-	S	I	I	T	N	K	N	V	K	V	N	I	P	P	D	L	G	Q	T	GTN	G	N	T
	1/18	R	K	Q	D	G	T	G	N	D	A	N	I	K	N	S	D	M	G	T	NNNSNNTTSNYR	T	V	V	T	N	Q	-	V	K	I	K	-	-	S	G	L	D	Q	T	-	G	N	T
	1/18	R	K	Q	D	G	A	E	D	D	T	N	I	-	N	S	N	N	N	S	-	T	V	V	T	N	Q	-	V	K	I	K	-	-	S	G	L	D	Q	T	-	G	N	T
	1/18	R	K	Q	D	G	A	E	N	D	A	N	I	K	N	S	D	M	S	T	NNNSNNTTSNYR	T	V	V	T	N	Q	-	V	K	I	K	-	-	S	G	H	E	R	R	-	E	N	T
	1/18	R	K	Q	N	G	A	E	D	D	T	K	A	E	D	N	D	M	G	T	NNNSNNTT-R	S	I	I	T	N	K	N	V	K	V	N	-	-	S	G	L	G	Q	T	-	G	N	T
	1/18	K	K	Q	D	G	A	E	N	D	T	N	I	-	N	N	D	M	G	T	NNNSNNTTSN	S	I	I	T	N	K	N	V	K	V	N	-	-	S	G	L	G	Q	T	-	G	N	T
	1/18	R	R	Q	D	G	T	G	N	D	A	N	I	K	N	S	D	M	G	T	NNNSNNTTSNYR	T	V	V	T	N	K	N	A	P	V	N	R	T	P	D	L	G	Q	T	GTN	G	S	I
	1/18	R	R	Q	D	G	A	E	D	D	T	N	I	-	N	S	N	N	N	S	-	S	I	I	T	N	K	N	V	K	V	K	-	-	S	G	L	G	Q	T	-	G	N	T
	1/18	R	R	Q	D	G	A	E	D	D	T	K	A	E	D	N	D	M	G	T	NNNSNNTTSNYR	S	I	I	T	N	K	N	V	K	V	K	-	-	S	G	L	D	Q	T	-	G	N	T
1/18	K	K	H	D	D	T	E	D	D	T	N	I	-	N	S	D	M	G	T	NNNSNNTTSNRR	S	I	I	T	N	K	N	V	K	V	N	-	-	S	G	L	G	Q	T	-	G	N	T	
HAL-selected virus 17p	10/11	K	K	H	D	D	T	G	N	D	A	N	I	K	N	S	D	M	G	T	NNNSNNTTSNYR	S	I	I	S	D	K	N	A	P	V	S	R	T	P	D	L	G	Q	T	GTN	G	S	I
	1/11	K	K	H	D	D	T	G	N	D	A	N	I	K	N	S	D	M	G	T	NNNSNNTTSNYR	S	I	I	S	D	K	N	A	P	V	S	R	T	P	D	L	G	Q	T	GTD	G	S	I
passage control 20p	10/10	R	R	Q	N	G	A	E	D	N	T	K	A	E	D	N	N	N	N	S	-	T	V	V	T	N	Q	-	I	K	I	K	-	-	S	G	H	E	R	R	-	E	N	T

Fig. S2

Env sequence relative to the HXB₁ reference sequence

KP-1	HXB ₁ amino acid positions	C1										V1					V2					C2					V3					C3					V4					C4					V5																			
		K	G	T	E	V	N	D	I	S	K	D	N	T	S	K	I	S	Y	D	N	D	T	ins	S	T	T	A	S	N	T	P	R	T	G	ins	N	R	Q	I	A	N	K	S	R	N	ins	S	V	S	N	N	G	D	I	Q	L	N	N	N	ins	E	S	I		
		4	18	31	47	87	94	107	108	128	130	137	139	140	144	151	161	162	173	185	186	187	189	190	190	194	236	281	291	300	303	313	315	319	321	322	324	325	327	328	333	336	340	343	347	350	355	365	365	372	405	406	407	410	412	414	442	453	460	462	463	464	464	465	467	
base-line	2/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	N	R	E	Q	-	I	K	V	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	2/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	N	V	N	R	-	S	I	T	H	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	R	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	N	R	E	Q	-	I	K	V	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	2/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	N	I	K	A	N	S	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	N	K	E	K	N	V	K	V	N	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/01	R	G	A	E	E	D	D	V	T	N	I	K	A	N	S	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	D	R	K	K	N	V	K	V	N	I	T	P	D	V	L	I	D	O	T	GTN	G	S	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	N	K	E	K	N	V	K	V	N	I	T	P	D	V	L	I	D	O	T	GTN	G	S	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	N	I	-	-	-	N	S	I	T	Y	D	N	N	N	-	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	N	R	E	Q	-	I	K	V	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	H	D	M	S	T	NNNSNNTTS	S	R	T	V	S	I	T	R	T	K	T	I	N	K	K	I	T	N	K	E	K	N	V	K	V	N	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T		
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	N	R	E	Q	-	I	K	V	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	N	K	E	K	N	V	K	V	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	N	R	E	Q	-	I	K	V	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	D	E	K	S	V	K	V	D	I	P	D	V	L	I	D	O	T	GTN	G	S	T			
	1/31	R	G	T	E	E	N	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	E	K	N	A	P	V	N	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	T	N	K	E	K	N	V	K	V	K	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	E	K	N	A	P	V	N	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	E	K	N	A	P	V	N	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	N	I	-	-	-	N	S	I	T	Y	D	N	N	N	-	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	N	R	E	Q	-	V	K	I	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	S	T
	1/31	R	G	T	E	E	N	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	S	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	D	I	E	K	N	V	K	V	N	I	P	D	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T		
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	N	I	-	-	-	N	S	I	T	H	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	N	R	E	Q	-	V	K	I	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	N	I	-	-	-	N	S	I	T	Y	D	N	N	N	-	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	N	R	E	Q	-	V	K	I	K	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	N	I	-	-	-	N	S	I	T	Y	D	N	N	N	-	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	N	R	E	Q	-	V	K	I	K	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	Y	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	R	T	V	S	I	T	R	T	K	T	I	N	K	K	I	T	N	R	E	Q	-	V	K	V	N	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T		
	1/31	R	D	T	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	H	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	R	T	V	S	I	T	R	T	K	T	I	N	K	K	I	T	N	K	E	K	N	V	K	V	N	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	S	T		
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	Y	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	D	I	E	K	N	V	K	V	N	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	Y	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	N	R	E	Q	-	V	K	V	N	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/31	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	Y	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	V	T	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	N	R	E	Q	-	V	K	V	N	-	-	S	G	V	L	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
passage control 8p	8/11	R	G	A	E	E	D	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	Y	N	N	N	S	-	S	I	T	A	T	N	T	P	K	A	G	A	V	D	R	Q	V	T	N	R	E	Q	-	I	K	I	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	2/11	R	G	A	E	E	D	D	V	T	R	A	E	A	D	N	I	T	Y	N	N	N	S	-	S	I	T	A	T	N	T	P	K	A	G	A	V	D	R	Q	V	T	N	R	E	Q	-	I	K	I	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
	1/11	R	G	A	E	E	N	D	V	T	K	A	E	A	D	N	I	T	Y	N	N	N	S	-	S	I	T	A	T	N	T	P	K	A	G	A	V	D	R	Q	V	T	N	R	E	Q	-	I	K	I	K	-	-	S	G	V	H	I	D	O	T	GTN	G	N	T	
ITAL-selected virus 8p	8/10	R	D	T	E	G	N	D	V	A	N	I	K	A	N	S	I	T	Y	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	A	S	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	E	K	N	A	P	V	N	R	T	P	D	V	L	I	D	O	T	GTN	G	S	T	
	1/10	R	D	T	E	G	N	D	V	A	N	I	K	A	N	S	I	T	Y	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	A	S	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	E	K	N	A	P	V	N	R	T	P	D	V	L	I	D	O	T	GTN	G	S	T	
	1/10	R	D	T	E	G	N	D	V	T	N	I	K	A	N	S	I	T	Y	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	A	S	N	T	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	E	K	N	A	P	V	N	R	T	P	D	V	L	I	D	O	T	GTN	G	S	T	
3TC-selected virus 6p	4/12	R	G	A	E	E	D	D	V	A	N	I	K	A	N	S	I	T	Y	D	M	G	T	NNNSNNTTS	S	I	T	A	S	N	T</																																			

Fig. S1. The IN and gp120 sequences of baseline, RAL-selected and control-passaged viruses of KP-1. The IN and gp120 sequences of baseline, RAL-selected and the passage-control viruses were aligned against KP-1. Each amino acid is numbered relative to the HXB₂ reference sequence. Filled cells denote the most dominant amino acids observed in RAL-selected variants at the latest passage, open cells denote the most dominant amino acids observed in the passage-control variants at the latest passage and shaded cells show amino acids deleted by the end of both passages, whilst ‘-’ indicates a deletion mutation.

Fig. S2. Comparison of the gp120 sequences between ARV drug-selected and control-passaged viruses. The gp120 sequences of baseline, ARV drug (RAL, 3TC, SQV and MVC)-selected and the passage-control viruses were aligned against KP-1. Each amino acid is numbered relative to the HXB₂ reference sequence. Filled cells denote the most dominant amino acids observed in RAL-selected variants at the latest passage, open cells denote the most dominant amino acids observed in the passage-control variants at the latest passage, dark grey-shaded cells denote the amino acids observed in anti-retroviral drug (3TC, SQV or MVC)-selected variants and light grey-shaded cells show amino acids deleted by the end of both passages, whilst ‘-’ indicates a deletion mutation.

Shigeyoshi Harada, Kazuhisa Yoshimura, Aki Yamaguchi, Samatchaya Boonchawalit, Keisuke Yusa, and Shuzo Matsushita (2013). Impact of antiretroviral pressure on selection of primary human immunodeficiency virus type 1 envelope sequences *in vitro*. *J Gen Virol* **94**, 933–943.

バイオ医薬製造技術シリーズ

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

XMRV (Xenotropic Murine Leukemia Virus-related Virus) and Viral Safety

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部¹⁾, 熊本大学大学院生命科学研究部 感染防御学分野²⁾

遊佐敬介¹⁾, 前田洋助²⁾

KEISUKE YUSA¹⁾, YOSUKE MAEDA²⁾

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences¹⁾,

Graduate School of Medical Science, Kumamoto University²⁾

はじめに

一時的にせよヒトに感染し、感染によって膀胱がんや慢性疲労症候群などの疾患を引き起こすと考えられたウイルスXMRVが、疑われた疾患とはまったく関係がないことが昨年はっきりした。XMRVが発見され、疾患との関係が否定されるまでに、5年という長い時間を要した。ウイルスの発見から、矛盾する報告が錯綜し、混迷を深め、迷走したあげく、疾患との関係を否定する結論に到達したことになる。この一連の出来事は、どちらかというところ「ウイルス騒動」と表現すべきものかもしれない。実際にこれだけの報告が科学雑誌を賑わし(ここ5年間で、タイトルにこのウイルス名が入った論文や総説だけでも100編を優に超える)、多くの研究者の時間と研究費を費やすことになったのには、ウイルス検出上の難しさやマウス内在性レトロウイルスを含んだマウス細胞のDNAによる試薬や研究室の汚染、マウスゲノムに潜んでいたプロウイルスの組換えによる新規ウイルスの出現など、それ相応の理由があったのも事実である。数年にわたる「騒動」からは、いくつかの重要な教訓が導き出される。ミスリーディングによる「騒動」と片付けるのは簡単だが、そこから貴重な教訓を得るのも意味のあることかもしれない。

1 新しいウイルスの侵入

ヒトに感染し、重大な疾患を引き起こすウイルスは、

*本欄は、バイオロジカルズ(タンパク医薬)製造技術研究会の企画によるものである。

血液製剤をはじめとする生物原材料から製造される生物製剤にとっては重大な脅威となる。エイズウイルスによる血液製剤汚染の不幸な例をあげるまでもなく、生物製剤におけるウイルス安全性の問題は常に最重要課題の1つである。

近年、新規のウイルス感染症が相次いで報告されている。SARSウイルス、ニパウイルス、ウェストナイルウイルスなどが大きな社会問題になっている。SARSウイルス、ニパウイルスは、アジアで起きた感染症である。またレトロウイルスの人間社会への侵入に関しては、気になる報告がある。中央アフリカでは、野生動物の肉を食べる習慣がある。野生のサルやチンパンジーは、レトロウイルス(スプーマウイルスやSIV)に感染していることがあり、こうしたサルや霊長類との濃厚な接触によって、絶えずヒトへのレトロウイルスの暴露が起きている¹⁻³⁾。HIV-1は、本来野生の霊長類からヒトへとその宿主を拡大したものと考えられ、強い感染力をもつ新しいタイプのヒト感染レトロウイルスがこれからも出現しないともかぎらない。

今後問題となる可能性のあるウイルスとして、鳥インフルエンザと並んで懸念されるのが、ウェストナイルウイルスである。感染者の一部に脳炎を発症させるウェストナイルウイルスは、アフリカ北東部からすでに北米に浸淫しており、2011年には全米で713人の感染者が確認され、そのうち43人が死亡している。このウイルスは野鳥によって運ばれ、蚊によって感染が広がるので、ヒトや野鳥を介して日本に侵入してくる可能性がある。また温暖化が進むなか、デング熱の原因ウイルスであるデン

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

グウイルスを媒介するネッタイシマカの侵入にも注意を払う必要がある(国内では過去に、第二次世界大戦中、戦地から持ち込まれたデングウイルスが、日本に生息するヒトシジマカによって媒介され、西日本で流行したことがある)。こうした人獣共通新興感染症は感染が広がると、輸血、臓器移植、血液製剤を含めた生物製剤のウイルス安全性に脅威となるので常に監視していく必要がある。人間社会は多方面から、多様なウイルスの侵入にさらされているといえることができる。

2. ことのはじまり：XMRVと疾患の関係が疑われる

慢性疲労症候群とは、強度の疲労が長期にわたって続く原因不明の疾患である。2006年に、XMRVが前立腺がんの患者群で、高率に見いだされるという報告があった⁴。続いて2009年には、慢性疲労症候群の患者群で同様にXMRVが、高率に検出されるという報告⁵が米国でなされた。後者のMikovitsらの報告で重要なのは、疾患との関係ばかりでなく、北米で健康な人の3.7%でもウイルスが検出されたとしている点である。実際、この報告は驚きとともに受け止められた。北米で健康人の3.7%が、XMRVのキャリアであり、しかもそのウイルスはマウス白血病ウイルスの近縁種なのである。いままで気づけなかったことのほうが不思議といえ不思議である。テナガザルやコアラで見つかったレトロウイルスは、南東アジアのげっ歯類のウイルスが、進化のある時点でテナガザルやコアラに感染したものだと考えられている^{6,7}。だからといって、今回報告されたXMRVがごく最近マウスからヒトに感染したとは考えにくい。しかし、あり得ない話ではない。一方で、このウイルスの真偽に極めて懐疑的な研究者もいた。似たようなことが過去に起きているからである。あるウイルスが発見され、疾患の関係が疑われたが、よく調べてみるとそうではなかったという事例である⁸。

3. ウイルス検出の真偽：近縁ウイルス核酸による実験室の汚染

2009年の報告以降、いくつかの研究室で膀胱がん患者群や慢性疲労症候群の患者群で高率でXMRVが検出さ

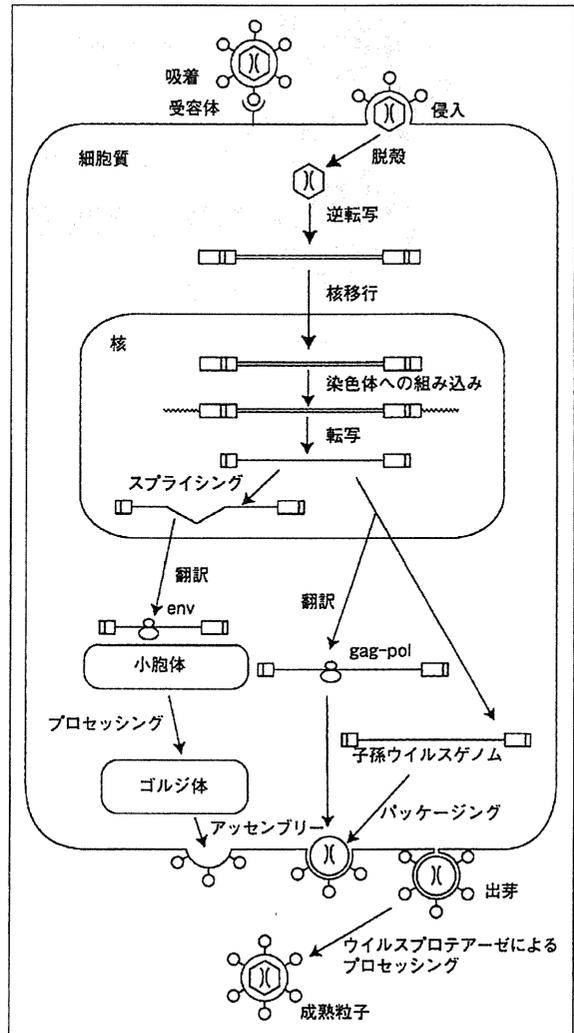


図1 レトロウイルスのライフサイクル

れるという報告が続く一方で、XMRVはまったく検出されないという報告が相次いだ。このウイルスの真偽がこれほどまでに混乱を極めた理由の1つには、このウイルスが、マウスの白血病ウイルス(図1)とごく近縁であるということが関係していた。問題になったレトロウイルスは、生命系の実験室では非常に身近なマウスのレトロウイルスの近縁種である。そのため核酸増幅検査では、レトロウイルスや内在性レトロウイルスを含んだ核酸混入に十分注意する必要がある。実際、ウイルスの検出に用いられる核酸増幅試薬がマウスの核酸で汚染されている場合があることもわかった⁹。核酸増幅試薬のなかには、低温でのポリメラーゼ活性をブロックするためにマウスモノクローナル抗体を、試薬にあらかじめ含むものがある。試薬に添加するための抗体を精製する際にハイ

ブリードマの核酸が混入すると、とりもおさずそれは、マウス内在性レトロウイルスDNAを含むということになり、核酸増幅のためのプライマーによっては、擬陽性となる場合がある。したがって、マウスレトロウイルス近縁のウイルス検出を実験室で行う場合は細心の注意を払わなくてはならない。XMRVを検出したとする複数の報告は、核酸増幅試薬などがマウスの核酸で汚染されていた可能性が高い。昨年、真相を明らかにするために、新たな慢性疲労症候群の患者サンプルと、Mikovitsらが、以前ウイルス陽性と判定した患者サンプルを含んだ試料について、9つの研究室で検討が行われた。以前、ウイルス陽性とされた患者検体を含め、すべて検体は陰性と判定された¹⁰⁾。以上から、Mikovitsらが陽性と判定した⁵⁾のは実験室内でマウスの核酸による汚染によるものではないかと結論づけられている。ところが、MikovitsらはXMRVを検出したばかりか、患者からウイルスを分離することに成功したと述べている。彼らが分離したと主張するウイルスはいったどこからやってきたのだろうか。Mikovitsらの報告以後、ウイルスを分離しようとした研究室は少なくはなかったはずだが、XMRVの分離に成功した研究室はなかった。XMRVは、実在するウイルスなのだろうか、それともMikovitsの研究室だけがウイルス分離に成功したのは、なにかほかの理由があるのだろうか。

4 XMRVはどのようにして出現したのか

XMRVの膀胱がん、慢性疲労症候群とXMRV感染の因果関係が怪しい雲行きになっていく一方で、極めて興味深い事実も明らかになってきた。もしXMRVが高率に膀胱がん組織で検出されるなら、ヒト膀胱がん細胞株でも見つかる可能性がある。そこで、ヒトの膀胱がん由来の細胞株を調べてみたのである。すると、22Rv1と呼ばれる細胞株にもXMRVが感染していることがわかった¹¹⁾。この細胞に感染しているXMRVからいくつかのクローンを探って調べてみると、複数の患者から分離されたウイルス間で多様性に乏しく、22Rv1細胞から得られた複数のウイルスクローン間の多様性に比べて差がないことがわかってきた¹²⁾。通常レトロウイルスは感染を繰り返すと変異が加わり、多様性は増す。実験室で継代されていたウイルスの複数のクローンと異なる地域と場所から分離された患者由来と称するウイルスの多様性に差

がないというのは、極めて奇妙である。

この謎を明らかにするために、Pathakらのグループは、XMRVがどのようにして出現したのか、その道筋を追跡することにした¹³⁾。22Rv1細胞株樹立までの途上で凍結保存されていた細胞にウイルスが感染しているかどうか時間をさかのぼって検証してみた。その結果、驚くべきことがわかった。22Rv1細胞を樹立するために、患者から採取した膀胱がん細胞は、最初ヌードマウスで継代された。ところが、XMRV感染は22Rv1細胞から何代かさかのぼって確認できるものの、ある時点以前の凍結細胞にはウイルス感染が認められなかったのである。つまり、ウイルス感染は患者組織から採取されたあと、マウスでの継代途上で起きたということになる。つまり、ヒト膀胱がん細胞22Rv1細胞には本来XMRVは感染しておらず、細胞株樹立の過程で継代されている間にXMRVが出現したことになる。それでは、XMRVはどのようにして出現したのだろうか。マウスがXMRVに似たウイルスに感染しており、それが、移植されたヒトの細胞に感染したのだろうか。実際に起きたことは、もう少し複雑だった。調べてみると、この細胞の継代に使われたヌードマウスのゲノム中にXMRVと非常によく似た2種類のウイルスが見つかった。しかもその2つのウイルスのゲノムを調べてみると、2つのウイルス間で組換えが複数回起きるとXMRVのゲノムそのものの構造になることがわかった(図2)。相同組換えは同一の細胞に2種類のウイルスが感染すると、ヘテロな2本のRNAをもったウイルスが現れ、そのウイルスが新たな感染細胞内で+鎖RNAから2本鎖DNAに変換する過程で鋳型の乗り換えによって起きると考えられている(図3)。組換えの詳細は、必ずしも明らかではないが、マウスの2つの内在性ウイルスが、パッチワークのようにお互いの領域をツギハギすることで、新しいウイルスが出現したことには間違いがなさそうである。2つのウイルスはわずかに約8 kbのゲノム上で6回組換えを起こしていることがわかった。くだんのウイルスは、ちまたで広く感染が広がっていると当初は思われたのだが、実

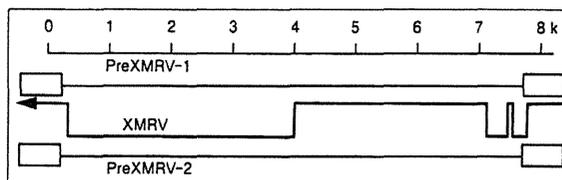


図2 XMRVは2つのマウスレトロウイルスの相同組換えによって新しく生まれた

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

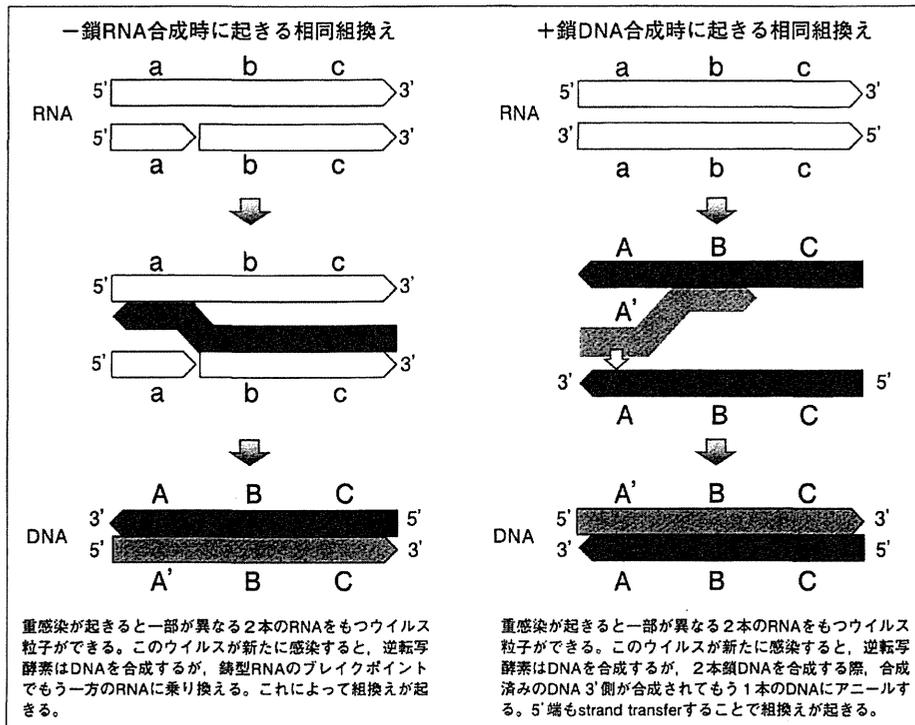


図3 レトロウイルスの相同組換え

はマウスに移植したヒトの膀胱がん細胞の中で、新しく生まれたいわば「日陰者」であることがわかった。

慢性疲労症候群の患者では高率でXMRVに感染しているのではないかという報告を初めて行ったMikovitsは、検体に汚染があったとして、論文³⁾の一部をリトラクションした。その後、昨年9月29日に勤務先の研究所を解雇されている。その表向きの理由は、2009年の論文のせいではなく、同僚に細胞株を分与することを拒否したことが理由であるとしている¹⁾。彼女らが分離したと主張するウイルスは、どのようにして患者の検体に混入したのか、依然としていくつかの疑念は残っている。実際に彼女らのデータに作為的な操作がなされたのではないかと、彼女らの論文を掲載したScience誌の調査が行われた。同誌は、今年になってMikovitsらの論文³⁾すべてをリトラクションする旨の記事を掲載している。現在のところ、XMRV感染と膀胱がん、慢性疲労症候群発症を関係づける証拠は何一つない。

5. バイオ医薬品の ウイルス安全性への教訓

哺乳動物の細胞には、内在性レトロウイルスと呼ばれるレトロウイルス様配列が複数コピー散在している。こうした領域はヒトゲノムで8%に達するともいわれている。しかしそのほとんどのコピーでは、変異や終止コドンが入り、本来のプロウイルスとしての原型をとどめていない。したがって、医薬品製造用の細胞の中で、あるいは外界から飛び込んできたウイルスとの間で組換えが起きて、感染増殖性の強いウイルスが出現し、感染を広げ、バイオリクターを汚染する、こういった可能性は極めて考えにくい。医薬品に使われる細胞は、厳密に管理、調べられ、バイオ医薬品製造の歴史を経てその頑健性が証明されていると考えてよいからである。そして万が一、こうしたウイルスが出現しても、レトロウイルスに感受性の高い細胞を用いたウイルス試験が行われるので、この点に関しても脅威となりにくいと考えられる。たとえ万が一そういったウイルスが出現しても、十分な

ウイルスクリアランス値をもつウイルス不活化、除去工程によって、汚染ウイルスは速やかに除かれるものと期待される。このように、製品の汚染は2重にも3重にも防がれている。今回の「ウイルス騒動」からは、レトロウイルスの危険性についての古くて新しい教訓と警告を読みとることができる。

■参考文献

- 1) Kalish, M. L., Wolfe, N. D., Ndongmo, C. B., McNicholl, J., Robbins, K. E., Aidoo, M., Fonjungo, P. N., Alemnji, G., Zeh, C., Djoko, C. F., Mpoudi-Ngole, E., Burke, D. S., Folks, T. M. : *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1928-1930(2005)
- 2) Wolfe, N. D., Heneine, W., Carr, J. K., Garcia, A. D., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Torimiro, J. N., Prosser, A. T., Lebreton, M., Mpoudi-Ngole, E., McCutchan, F. E., Birx, D. L., Folks, T. M., Burke, D. S., Switzer, W. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7994-7999(2005)
- 3) Wolfe, N. D., Switzer, W. M., Carr, J. K., Bhullar, V. B., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Prosser, A. T., Torimiro, J. N., Wright, A., Mpoudi-Ngole, E., McCutchan, F. E., Birx, D. L., Folks, T. M., Burke, D. S., Heneine, W. : *Lancet*, **363**, 932-937(2004)
- 4) Urisman, A., Molinaro, R. J., Fischer, N., Plummer, S. J., Casey, G., Klein, E. A., Malathi, K., Magi-Galluzzi, C., Tubbs, R. R., Ganem, D., Silverman, R. H., DeRisi, J. L. : *PLoS Pathog.*, **2**, e25(2006)

- 5) Lombardi, V. C., Ruscetti, F. W., Das Gupta, J., Pfost, M. A., Hagen, K. S., Peterson, D. L., Ruscetti, S. K., Bagni, R. K., Petrow-Sadowski, C., Gold, B., Dean, M., Silverman, R. H., Mikovits, J. A. : *Science*, **326**, 585-589(2009)
- 6) Kruth, R., Bannert, N. : *Retroviruses*, Caister Academic Press, Norfolk(2010)
- 7) Voevodin, A. F., Marx, P. A. : *Simian Virology*, Wiley-Blackwell, Ames(2009)
- 8) Weiss, R. A. : *BMC Biol.*, **8**, 124(2010)
- 9) Sato, E., Furuta, R. A., Miyazawa, T. : *Retrovirology*, **7**, 110(2010)
- 10) Simmons, G., Glynn, S. A., Komaroff, A. L., Mikovits, J. A., Tobler, L. H., Hackett, J., Jr., Tang, N., Switzer, W. M., Heneine, W., Hewlett, I. K., Zhao, J., Lo, S. C., Alter, H. J., Linnen, J. M., Gao, K., Coffin, J. M., Kearney, M. F., Ruscetti, F. W., Pfost, M. A., Bethel, J., Kleinman, S., Holmberg, J. A., Busch, M. P. : *Science*, **334**, 814-817(2011)
- 11) Knouf, E. C., Metzger, M. J., Mitchell, P. S., Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Tewari, M., Miller, A. D. : *J. Virol.*, **83**, 7353-7356(2009)
- 12) Hue, S., Gray, E. R., Gall, A., Katzourakis, A., Tan, C. P., Houldcroft, C. J., McLaren, S., Pillay, D., Futreal, A., Garson, J. A., Pybus, O. G., Kellam, P., Towers, G. J. : *Retrovirology*, **7**, 111(2010)
- 13) Paprotka, T., Delviks-Frankenberry, K. A., Cingoz, O., Martinez, A., Kung, H. J., Tepper, C. G., Hu, W. S., Fivash, M. J., Jr., Coffin, J. M., Pathak, V. K. : *Science*, **333**, 97-101(2011)
- 14) Dyer, C. : *BMJ*, **343**, d6541(2011)

25年の実績を誇る

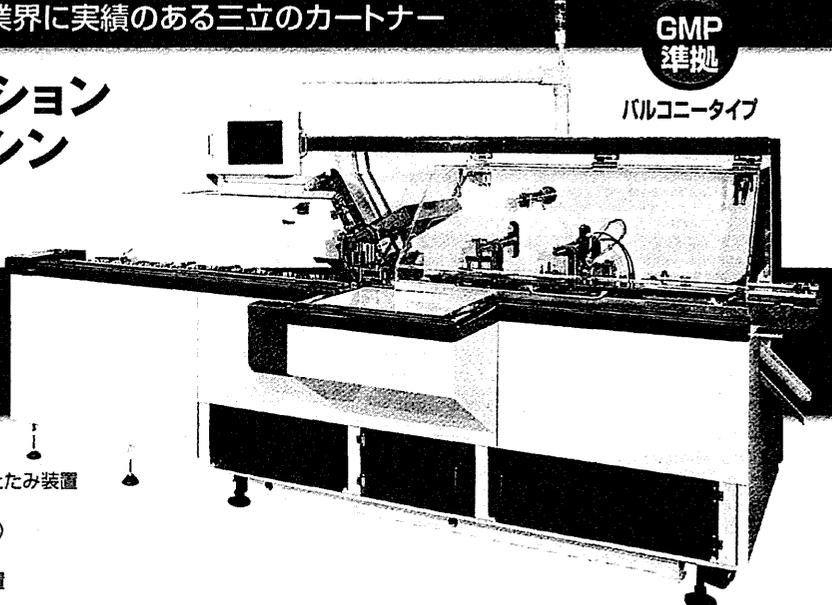
製薬業界に実績のある三立のパートナー

**中速・間欠モーション
カートニングマシン
CSN80**

安全性の向上
異物混入防止
メンテナンス性の向上
が図れます

オプション

- 添付文書供給装置 ●添付文書折りたたみ装置
- 捺印装置(各種対応可能)
- ホットメルト塗布装置(ノードソン社製)
- 前工程からの製品供給装置
- 各種検査装置および各種系外排出装置
- 自動サイズチェンジ機能



GMP 準拠
バルコニータイプ



SANLITU
株式会社 三立工業

本社 〒532-0031 大阪市淀川区加島1丁目37番22号 TEL 06-6886-7585 FAX 06-6886-7586
 東京営業所 〒171-0021 東京都豊島区西池袋5丁目12番7号NGSビル201号 TEL 03-6915-2048 FAX 03-6915-2049
 URL <http://www.sanlitu.com>

DM資料請求カード№58

バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第5回)

バイオ医薬品の外来性感染性物質について

Adventitious agents in Biopharmaceuticals

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴

KEISUKE YUSA, SHINGO NIMI, and NORITAKA HASHII

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

はじめに

バイオ医薬品の品質・安全性確保において、外来性感染性物質の管理は重要な要件の1つである。外来性感染性物質として細菌、真菌、ウイルス、異常プリオンがある。ここでは組換えDNA技術や細胞培養技術を用いて生産される医薬品のウイルス安全性がどのようにして確保されているのかを中心に述べる。

1. 外来性感染性物質

外来性感染性物質には、細菌、真菌、マイコプラズマ、異常型プリオン、ウイルスがある。そのなかでも除去、否定試験が困難なものは、異常型プリオンとウイルスである(図1)。プリオンは、分子量33~35kDaのタンパク質である。正常型プリオンがβ構造リッチな立体構造である異常型プリオンに変換され、凝集体となったものが、

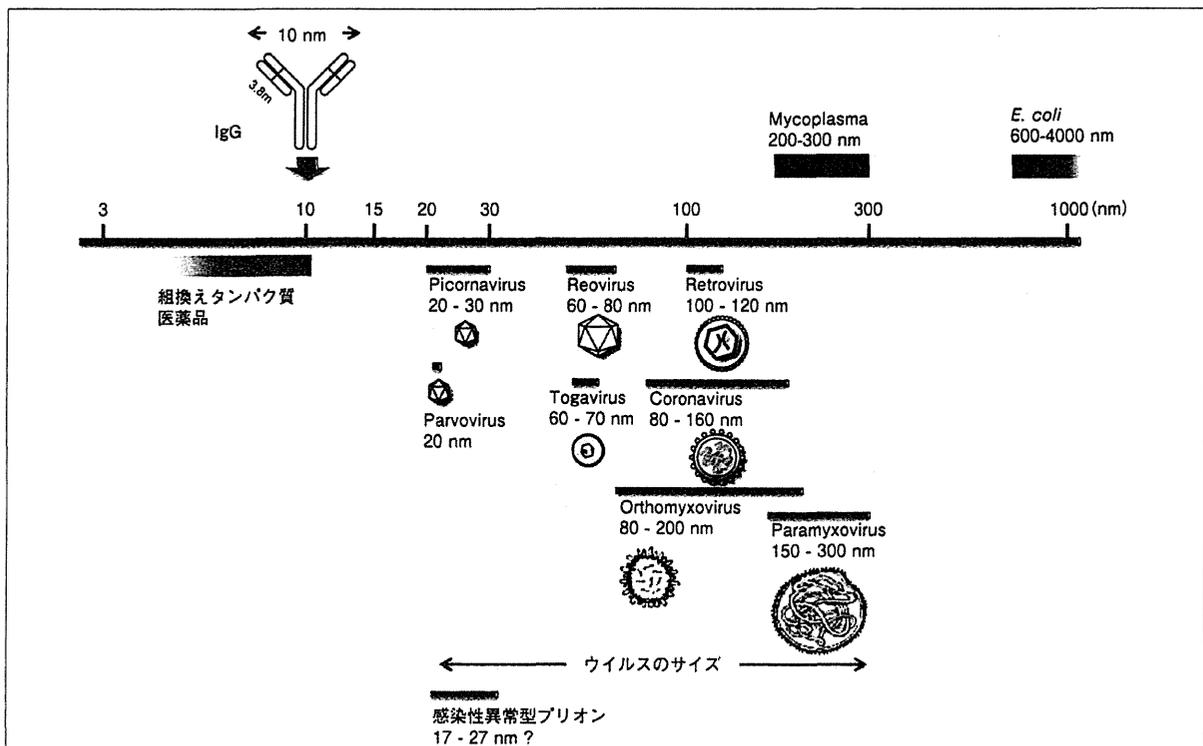


図1 外来性感染性物質

致死性神経変性疾患であるプリオン病(伝達性海綿状脳症)を引き起こすと考えられている。また感染性をもつ異常型プリオンは、凝集体のサイズによって感染性が異なるとの報告¹⁾もあるが、詳しいことはよくわかっていない。異常型プリオンが、ひとたび製造工程に混入するとその検出や不活化/除去が困難なため、迷入させないための方策が取られ、無血清培地への切り替えや培地に含まれる反芻動物由来原材料に関しても最大限の注意が払われている²⁻⁴⁾。

ウイルスの基本構造は、粒子の中心にあるウイルス核酸と、それを取り囲むカプシドと呼ばれるタンパク質の殻から構成された粒子である。その大きさは最も小さいものはパルボウイルス(直径20nm)やピコルナウイルス(20~30nm)で、大きいものは最近見つかったミミウイルス(400nm)までその分布範囲は広い(図1)。これに対して比較的大きな分子量をもつイムノグロブリンは、2本のH鎖と2本のL鎖からなり、そのサイズは約10nmである。したがって、イムノグロブリンと最も小さなウイルスとの差はそれほどないことがわかる。またウイルスはサイズが異なるばかりでなく、その核酸の種類も形態(エンベロープの有無など)も多様である。2005年には1,950種のウイルスが記載されているが⁵⁾、ヒトに感染し、病原性をもつウイルスは必ずしも多い訳ではない。ところが、その一方で新しい人獣共通感染症を引き起こすウイルスが次々報告されており、未知のウイルスによる医薬品の汚染が起きる可能性を常に孕んでいる。ウイルスフィルター、培養技術や精製工程の改良に伴いウイルス安全性は向上しているものの、細胞基材のウイルス試験や医薬品の製造工程における不活化工程や除去工程を組

み合わせることによって、さらに安全性を高める工夫がなされている⁶⁾。

2. バイオ医薬品におけるウイルス安全性

日本では1985年に承認されたインスリンやインターフェロンβ以来、約80品目もの組換え・細胞培養医薬品が国内で承認され、臨床現場で使われている⁸⁾。これらの医薬品のうち動物細胞を用いて製造される医薬品は、生体成分を利用して製造されるために生産基材や原材料が感染性物質を含んでいる可能性があり、またその製造工程で感染性物質が混入すると、重大な感染事故を引き起こす懸念がある。そのため、バイオ医薬品の安全性は極めて厳格、かつ合理的なルールに沿って守られてきた。バイオ医薬品のウイルスの汚染を防ぐための基準作りが日米欧で行われ、平成12年にガイドライン「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」(Q5A)が通知され⁹⁾、原材料は「生物由来原料基準」²⁾および細胞基材については「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」(Q5D)⁷⁾などを考慮してウイルス安全性に努めることになっている。ガイドラインに示されている特徴的な考えは、低濃度のウイルス検出感度に限界があるため、ウイルスクリアランス試験というプロセス評価を加えることにより、最終製品のウイルスに対する安全性を担保するという点にある。そのために、適切な工程でのウイルス試験や精製工程でのウイルス不活化/除去能を定量的に

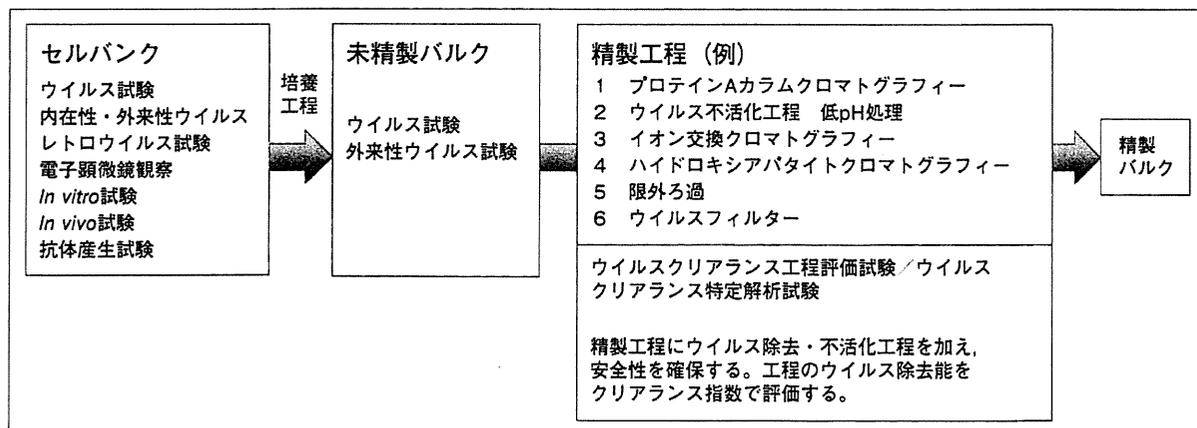


図2 バイオ医薬品の製造工程

示すことによって、工程全体を通じてその妥当性を明らかにする必要がある(図2)。

ウイルスによる汚染の可能性として、①医薬品生産に用いられる細胞が内在性、あるいは外来性ウイルスによって汚染されているケース(例としてレトロウイルスなどの潜伏感染やヘルペスウイルスの持続感染などによるもの)、②細胞培養に用いられる培地、トリプシン等の生物由来原料がウイルスで汚染されているケース、③細胞培養や精製工程における外界からのウイルスが迷入するケース(培養操作時のウイルス迷入や精製カラムの汚染や製剤化での汚染など)がある。したがって、こうした可能性を否定できるような合理的な根拠が提示されなくてはならない。そのためには、製造に用いられる細胞のウイルス安全性を十分調べること、原材料の生物由来原料の基準に基づいた使用、製造工程でのウイルス不活化除去能の評価、製造工程での適切な段階でのウイルス試験が必要になる。

3. 医薬品製造用細胞のウイルス安全性

医薬品製造に用いられる細胞は、管理の基本となるMCB(マスターセルバンク)とこのMCBを増幅・分注・ストックし、実際の製造の度に用いられるWCB(ワーキングセルバンク)の2種類の細胞バンクとして管理される。MCBの純度試験では、無菌性やマイコプラズマの否定試験に加えて、多様なウイルス検出のためのウイルス試験が必要である。MCBは、バイオ医薬品製造の起点となる細胞なので、厳しい管理が必要になる。MCBのウイルス試験は、電子顕微鏡による直接観察やウイルスに対する感受性の高い細胞による感染性試験、実験小動物を用いたウイルス試験など多岐にわたる。MCBの純度試験に要求されるものには、①レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験、②*In vitro*試験、③*In vivo*試験、④抗体産生試験、④その他細胞種特異ウイルス試験(適宜実施)がある(表1)。これに加えてCAL(医薬品製造のために*In vitro*細胞例の上限までに培養された細胞)についても①~③のウイルス試験が必要となる。

レトロウイルスは、そのライフサイクルに、感染宿主のゲノムに組み込まれる過程がある。そのため、いったん感染が成立して、ゲノムへの組み込みが起きると、ゲノムから取り除かれることなく、宿主細胞に潜み続ける

表1 各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB	CAL ^a
レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験感染性試験			
感染性試験	+	-	+
電子顕微鏡観察	+	-	+
逆転写酵素活性 ^b	+	-	+
その他細胞種特異ウイルス試験 ^c	適宜実施	-	適宜実施
非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験			
<i>In vitro</i> 試験	+	- ^d	+
<i>In vivo</i> 試験	+	- ^d	+
抗体産生試験 ^e	+	-	-
その他細胞種特異ウイルス試験 ^f	+	-	-

- a. CAL: 医薬品製造のために*In vitro*細胞例の上限にまで培養された細胞。
 b. レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要。
 c. 細胞株個々の起源・由来から存在が予測されるウイルスを検出するために適した試験。
 d. 第1回目のWCBについては、CALの段階で実施すること。それ以降のWCBについては、それ自体またはCALの段階で*In vitro*試験および*In vivo*試験をそれぞれ1種類ずつ実施する。
 e. げっ歯類由来細胞株に対する試験の例として、マウス抗体産生(MAP)試験、ラット抗体産生(RAP)試験、ハムスター抗体産生(HAP)試験がある。
 f. ヒト由来細胞株、ヒト以外の霊長類由来細胞株あるいはげっ歯類以外の動物由来細胞株である場合は、それぞれの細胞株に適切な試験を適宜実施すること。

表2 レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験

感染性試験	S ^L フォーカスアッセイ(異種指向性、両指向性のマウスのレトロウイルスを調べる試験法) XCブランクアッセイ(ラット横紋筋腫由来細胞を使う同種指向性マウスレトロウイルス試験法)
電子顕微鏡観察	透過型電子顕微鏡で、細胞の超薄切片を観察する。げっ歯類の細胞株の多くは、内在性レトロウイルス粒子、レトロウイルス様粒子(A type, R type)が観察されるが、感染性がなく、医薬品製造に使用される。
逆転写酵素活性	レトロウイルスは、RNAを鋳型にしてDNA合成するために逆転写酵素をもっている。この活性は宿主にはないためレトロウイルスの検出に用いられる。
その他の細胞種特異ウイルス試験	その他の内在性ウイルスに関しては、各ウイルスに特異的な検出系がある。NATなどは、高感度であるが、感染性のないウイルスの検出や混入したDNAの非特異的増幅などの可能性を考慮するべきである。

ことができる。実際、ほ乳類のゲノムでは実にその8~10%は、レトロウイルスに由来する構造からなるといわれている。そのほとんどが、すでに進化の途上に複製能を失ったかつてのウイルスゲノムの残骸である。ところ

表3 非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験

<p>In vitro試験</p>	<p><i>In vitro</i>試験は広範囲のウイルスに感受性の高い培養細胞(MRC-5細胞, Vero細胞等)を使用する。cell lysateを添加するか、混合培養してCPEの有無や上清での血球凝集反応を観察する。 ①MRC-5細胞(ヒト胎児正常肺組織由来) アデノウイルス, コクサッキーウイルスA, B, エコーウイルス, インフルエンザ, パラインフルエンザ, 単純ヘルペスウイルス, CMV, エンテロウイルス, ポリオウイルス, 麻疹ウイルス, ワクシニアウイルス, 風疹ウイルス, RSウイルス, アルボウイルスなどが検出できる。 ②Vero細胞(アフリカミドリザル腎臓上皮由来) アデノウイルス, コクサッキーウイルスA, B, エコーウイルス, インフルエンザ, パラインフルエンザ, 単純ヘルペスウイルス, CMV, エンテロウイルス, ポリオウイルス, 麻疹ウイルス, ワクシニアウイルス, 風疹ウイルス, RSウイルス, 日本脳炎ウイルス, ボックスウイルス, フラビウイルス, ポリオーマウイルス, ロタウイルス, フィロウイルス, レオウイルス, アレナウイルス, ブンヤウイルス, コロナウイルス, ジステンパーウイルス, アルボウイルスなどが検出できる。</p>
<p>In vivo試験</p>	<p>①発育鶏卵接種試験: インフルエンザ, 麻疹ウイルス, 風疹ウイルス, ヘルペスウイルス, ラブドウイルス, ワクシニアウイルスなどを検出できる。 ②成熟マウス接種試験: ヘルペスウイルス, ラブドウイルス, ワクシニアウイルス, リンパ性脈絡髄膜炎ウイルスなどを検出できる。 ③乳のみマウス接種試験: コクサッキーウイルスA, B, 単純ヘルペスウイルス, ラブドウイルス, ワクシニアウイルス, リンパ性脈絡髄膜炎ウイルスなどを検出できる。 ④モルモット接種試験: パラミクソウイルス, レオウイルス, ワクシニアウイルス, リンパ性脈絡髄膜炎ウイルスなどを検出できる。</p>
<p>抗体産生試験</p>	<p>マウス, ハムスター, ラットなどに経口, 経鼻, 腹腔などから接種して4週間後の血清中の抗体産生の有無を調べ, ウイルスの有無を確認する。</p>
<p>その他細胞種特異ウイルス試験</p>	<p>特定のウイルスを標的とした NAT等</p>

が中には、感染性は失われたものの、ウイルス様の粒子を細胞内に産生しているものや細胞外に放出している細胞がある。例えばバイオ医薬品製造でよく使われるCHO細胞は、このようなウイルス様粒子を絶えず産生しており、電子顕微鏡観察によって細胞内にウイルス様粒子が認められる。この粒子は、感染性をもたず、安全性がすでに明らかになっており、CHO細胞は医薬品製造に最も多く使われている細胞である。ウイルス試験は、内在性のレトロウイルスのほか、外来性のレトロウイルスの試験も必要である(表2)。この他に*In vitro*試験によって、多様なウイルスに対してそれぞれ高感受性の細胞を用いてMCBやCALの感染の有無を調べる必要がある(表3)。また*In vivo*試験では、発育鶏卵や小動物を用いてウイルスの感染の有無を同様に調べる。さらにMCBに関しては、抗体産生試験によっても感染の有無を調べる。

4. 医薬品製造工程におけるウイルスクリアランス試験

ウイルスクリアランス試験は、未精製バルクから、精製バルクまでの精製工程でのウイルスの不活化、除去能を評価することである。出発点となる未精製バルクは培養後の上清であり、ウイルス汚染の有無を検出するのに適した段階であると考えられる。Q5Aでは精製バルクにおける適切なウイルス試験を求めている。ここでは未

精製バルクのウイルス試験では外来性ウイルスが存在しないことを高い感度をもつ検出法によって確認しなくてはならない。細胞や未精製バルクでの外来性ウイルス汚染がわかったものについては、そのウイルスのヒトへの感染の有無にかかわらず、その利用は例外的なケースを除いて通常認められない。ICH Q5Aガイドラインには、細胞や未精製バルクでウイルスが検出された場合を5段階に分けてウイルスクリアランス工程評価の実施要領が示されている。例えばCHO細胞を用いて得られた未精製バルクには、レトロウイルス様粒子が認められるが、感染性はなく非病原性であると認められている。ウイルスクリアランス試験では非特異的モデルウイルスを用いたウイルスクリアランス工程特性解析試験とともに特異的モデルウイルスを用いたウイルスクリアランス工程評価試験(例えばマウス白血病ウイルス)が必要になる。つまりウイルスクリアランス工程評価試験ではMCBに存在することが知られている、ないし存在が予想されるウイルスのクリアランスを証明するために行われ、ウイルスクリアランス工程特性解析試験では製造工程中に迷入する可能性がある外来性ウイルスのクリアランスに関して保証を与えるためのものである。

ウイルスクリアランス工程特性解析試験で用いられるのは非特異的モデルウイルスと呼ばれる既知のウイルスである。この試験では、その性質や形態(エンベロープの有無や核酸)、サイズが異なるウイルスを選定して実施する。使われるウイルスの例を表4にあげてある。実

表4 ウイルスクリアランス試験に用いられるウイルス

ウイルス	宿主	ゲノム	env	サイズ(nm)	形状	抵抗性
マウス微小ウイルス(MVM) バルボウイルス科	マウス	DNA	有	22-25	球形	高
水疱性口内炎ウイルス(VSV) ラブドウイルス科	ウマ ウシ	RNA	有	70×150	弾丸	低
マウス白血病ウイルス(MuLV) レトロウイルス科	マウス	RNA	有	80-120	多様/球形	低
シンドビスウイルス(Sindbis Virus) トガウイルス科	ヒト	RNA	有	60-70	球形	低
ウシ下痢症ウイルス(BVDV) フラビウイルス科	ウシ	RNA	有	50-70	多様/球形	低
ポリオウイルスSabin 1型(Poliavirus) ピコルナウイルス科	ヒト	RNA	無	25-30	正20面体	中
ネコカリシウイルス(FCV) カリシウイルス科	ネコ	RNA	無	30-38	正20面体	中
仮性狂犬病ウイルス(PRV) ヘルペスウイルス科	ブタ	DNA	有	120-200	球形	中

際にはこれらのウイルスをスパイクし、医薬品の精製工程の不活化、除去能を評価する。クリアランス試験は、2つ以上の製造工程について、どのようなウイルス不活化、除去能力を有するかを評価することが望ましいとされる。

5. 外来性感染性物質による汚染

実際今日まで、医薬品製造細胞が培養時にウイルスに感染し、出荷が停止した例を始めとするいくつかの事例が海外で報告されている(表5)。最近では2008、2009年にライソゾーム酵素欠損疾患の治療薬を製造していたGenzyme社が、製造に使われていたバイオリアクターのウイルス汚染によって、一時操業停止に追い込まれ、CerezymeとFabrazymeの供給不足を招いた⁹⁾。これは

表5 報告のあるバイオ医薬品製造におけるウイルス汚染事例

ウイルス	細胞	汚染源	会社	文献
EHDV	CHO cells	contaminated FBS	Recombinant protein for phase I clinical trials (Biofen GmbH& Co.)	Burstyn, 1996 (ref 10)
MVM	CHO cells	contaminated raw materials	Pulmozyme* (Genentech)	Garnick, 1996 (ref 11)
Vesivirus 2117	CHO cells	contaminated FBS	(BoehringerIngelheim Pharmaceuticals)	Oehming, et al., 2003 (ref. 12)
Reovirus	Unprocessed bulk harvest (CHO cells)	contaminated FBS	undisclosed	Nims, 2006 (ref. 13)
CVV	CHO cells	contaminated FBS	undisclosed	Nims, 2006 (ref. 13)
Vesivirus 2017	CHO cells	contaminated raw materials	Cerezyme* and Fabrazyme* (Genzyme)	Genzyme Corp, 2008, 2009 (ref. 9)

EHDV, Epizootic hemorrhagic disease virus(伝染性出血熱ウイルス)、レオウイルス科；MVM, Minute virus of mice(マウス微小ウイルス)、バルボウイルス科；CVV, Cache Valley virus(カシエ溪谷ウイルス)、プニヤウイルス科；Vesivirus 2017(ベジウイルス2017)、ベジウイルス科。

ウイルス感染によって、CHO細胞の増殖性が低下したためにウイルス汚染が見つかった例である。原因となったウイルスは分離され、Vesivirus2117と名づけられた。このウイルスはエンベロープをもたない、正20面体構造(40nm)をもつカリシウイルス科のウイルスで、その塩基配列の解析から同じベジウイルス属に分類されるミンタカリシウイルスやネコカリシウイルスによく似ていることがわかった。幸いこのウイルスはヒト細胞には感染せず、出荷が停止されたため、製品の汚染はなかったが、動物細胞を使ったバイオ医薬品製造のウイルス安全性にとって大きな教訓となった。

おわりに

細胞株由来のバイオテクノロジー応用医薬品製造業者

は、それぞれの製品や製造工程について、ウイルスに対する安全性を保証するため採用したウイルス安全性のための方策を説明し、その妥当性を示す必要がある。そして承認審査に必要な書類には、詳細なデータに加えて、ウイルス安全性評価に関する総括を記載する必要がある。しかしウイルス試験法やウイルスクリアランス試験を行うには高度の専門性が必要とされ、その上使用するウイルスを扱うための生物学的封じ込め基準を満たした施設が必要となる。そのためウイルス安全試験はその多くが委託機関によって行われている。

■参考文献

- 1) Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F. and Caughey, B.: The most infectious prion protein particles., *Nature*, **437**, 257-261, 2005.
- 2) 「生物由来原料基準」平成15年厚生労働省告示第210号, 平成15年5月20日
- 3) 「ウシ等由来原材料を使用した医薬品、医療用具等の一部変更承認申請におけるリスク評価等の取扱いについて」薬食審査発第801001号 薬食安発第0801001号 平成15年8月1日
- 4) 「生物由来原料基準の規定を満たさないマスターセルバンク又はマスターシードを使用した医薬品等の取扱いについて」事務連絡 平成21年3月27日 厚生労働省医薬食品局審査管理課
- 5) Fauquet, C.M., Fargette, D. International committee on taxonomy of viruses and the 3, 142 unassigned species., *Virology*, **2**, 64, 2005.
- 6) 「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス 安全性評価」医薬審第329号通知 平成12年2月22日 (ICH Q5Aガイドライン)
- 7) 「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」医薬審第873号, 平成12年7月14日 (ICH Q5Dガイドライン)
- 8) http://www.nih.gov/dbcb/approved_biologicals.html
- 9) Oehmig, A., Büttner, M., Weiland, F., Werz, W., Bergemann, K., Pfaff E.: Identification of a calicivirus isolate of unknown origin., *J.Gen.Virol.*, **84**, 2837-2845, 2003.
- 10) Burstyn, D.G.: Contamination of genetically engineered Chinese hamster ovary cells., *Dev. Biol. Stand.*, **88**, 199-203, 1996.
- 11) Garnick, R.L.: Experience with viral contamination in cell culture., *Dev. Biol. Stand.*, **88**, 49-56, 1996.
- 12) Oehmig, A., Büttner, M., Weiland, F., Werz, W., Bergemann, K., Pfaff, E.: Identification of a calicivirus isolate of unknown origin., *J. Gen., Virol.*, **84**, 2837-2845, 2003.
- 13) Nims, R.W.: Detection of adventitious viruses in biologicals - a rare occurrence., *Dev. Biol.*, **123**, 153-64, 2006.

ベルテック社
クリーンルーム用製品

DEC-AHOL®-WFI 70% (70% IPA)
STER-AHOL®-WFI 70% (70% 変性エタノール)





特徴

- ・cGMPに基く製造設備
- ・USP 注射用水(WFI)で希釈
- ・0.2µmフィルター濾過
- ・ダブルバッグ包装
- ・γ線照射滅菌済
- ・各種証明書をLot#毎に発行
納品毎に添付
(分析試験・無菌性試験
γ線照射・LAL Test)
- ・豊富なバリデーションデータ

試供品あります。

その他、様々な滅菌・消毒・洗浄剤や器材消耗品、モニタリングシステム等の製品がラインナップ化されています。

カタログのご請求、お問合せは下記までお願いします。

テクノケミカル株式会社

〒113-0021 東京都文京区本駒込 1-27-9 HP: www.technochemical.com
TEL: 03-3947-7310 FAX: 03-3947-7306 E-mail: info@technochemical.com

DM資料請求カードNo63



Dynamic appearance of antigenic epitopes effective for viral neutralization during membrane fusion initiated by interactions between HIV-1 envelope proteins and CD4/CXCR4[☆]

Tepei Toda^a, Kazuhiko Kuwahara^a, Naoyuki Kondo^{b,1}, Zene Matsuda^b, Yosuke Maeda^c, Kazuhiko Maeda^a, Nobuo Sakaguchi^{a,*}

^a Department of Immunology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, Japan

^b China–Japan Joint Laboratory of Structural Virology and Immunology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Chaoyang District, Beijing 100101, China

^c Department of Medical Virology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2011

Received in revised form

15 December 2011

Accepted 16 December 2011

Keywords:

CD4

High-affinity antibody

HIV-1

Viral membrane fusion

Virus neutralization

ABSTRACT

HIV-1 entry into cells is mediated by interactions between the envelope (Env) gp120 and gp41 proteins with CD4 and chemokine receptors via an intermediate called the viral fusion complex (vFC). Here, mAbs were used to find the dynamic changes in expression of antigenic epitopes during vFC formation. A CD4-specific mAb (R275) and anti-vFC mAbs, designated F12-1, F13-6 and F18-4 that recognize the epitopes only appeared by the co-culture of env-transfected 293FT and CD4-transfected 293 cells, were developed by immunizing *ganp*-gene transgenic mice with an vFC-like structure formed by the same co-culture. The epitopes recognized by the mAbs appeared at different time points during vFC formation: F18-4 appeared first, followed by F13-6, and finally F12-1. The anti-vFC mAbs had little effect on vFC formation or virus neutralization; however, interestingly F12-1 and F18-4 increased exposure of the OKT4-epitope on the domain 3 in the extracellular region of CD4. R275, which recognizes the epitope closely associated with the OKT4-determinant on the domain 3, showed the marked inhibition of vFC formation and viral neutralization activity. The Ab binding to the epitopes appeared during viral membrane fusion might reinforce the appearance of the target epitopes for effective neutralization activity.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

HIV-1 infection occurs through attachment of the gp160 (gp120 and gp41 complex) trimeric envelope (Env) protein with CD4 and CXCR4/CCR5 molecules expressed on human T cells (Berger et al. 1999; Sattentau and Weiss 1988). The process of viral infection

involves dynamic changes in the structure of this Env trimer (Doms and Moore 2000; Eckert and Kim 2001). Virus attachment is initiated by the binding of gp120 to CD4, which causes changes in the gp120/gp41 trimer structure, pushing gp41 towards the target cells. This creates the viral fusion complex (vFC), which interacts with the cell membrane and promotes viral entry by inserting the viral peptide sequence into CD4 T cells (Chan and Kim 1998; Sattentau et al. 1993).

Human CD4, the primary receptor for HIV-1, has four domains (D1, D2, D3, and D4) in its extracellular region (Ryu et al. 1990; Wang et al. 1990; Wu et al. 1997). The primary binding site for HIV-1 comprises residues 40–60 within the D1 domain (Arthos et al. 1989). Earlier studies using mutant CD4 molecules identified residue 87 within D2 domain as the most crucial region for cell fusion (Camerini and Seed 1990). The D2 domain forms a loop structure in close proximity to the primary gp120 binding site. Extensive studies of CD4 interactions using mAbs against the Env protein show that various epitopes interact with CD4 and may serve as targets of HIV-1 neutralization (Burton et al. 1994; Eda et al. 2006a,b; Muster et al. 1993; Trkola et al. 1995; Zolla-Pazner et al. 1995). Initial binding to CD4 occurs via all components of the vFC: the V3-epitope of gp120, the CD4 binding site (CD4bs), and the

Abbreviations: Env, envelope; RT, room temperature; RL, renilla luciferase; vFC, viral fusion complex; Tg, transgenic; spGFP, split GFP; PH, pleckstrin homology.

[☆] The work was supported in part by a Global COE program (Global Education and Research Center Aiming at the control of AIDS, Kumamoto University) and a Grant-in-Aid for Science Research in a Priority Area (Immunology Community) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), a Contract Research Fund from the MEXT for Program of Founding Research Centers for Emerging and Reemerging Infectious Diseases, a Grant-in-Aid for Scientific Research from Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), and a Research Activity start-up from JSPS. T.T. is a research fellow supported by the Global COE program.

* Corresponding author at: Department of Immunology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1, Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan. Tel.: +81 96 373 5134; fax: +81 96 373 5138.

E-mail address: nobusaka@kumamoto-u.ac.jp (N. Sakaguchi).

¹ Current address: Department of Pediatrics, Emory University School of Medicine, 2015 Uppergate Drive, Atlanta, GA 30322, USA.

0171-2985/\$ – see front matter © 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

doi:10.1016/j.imbio.2011.12.007

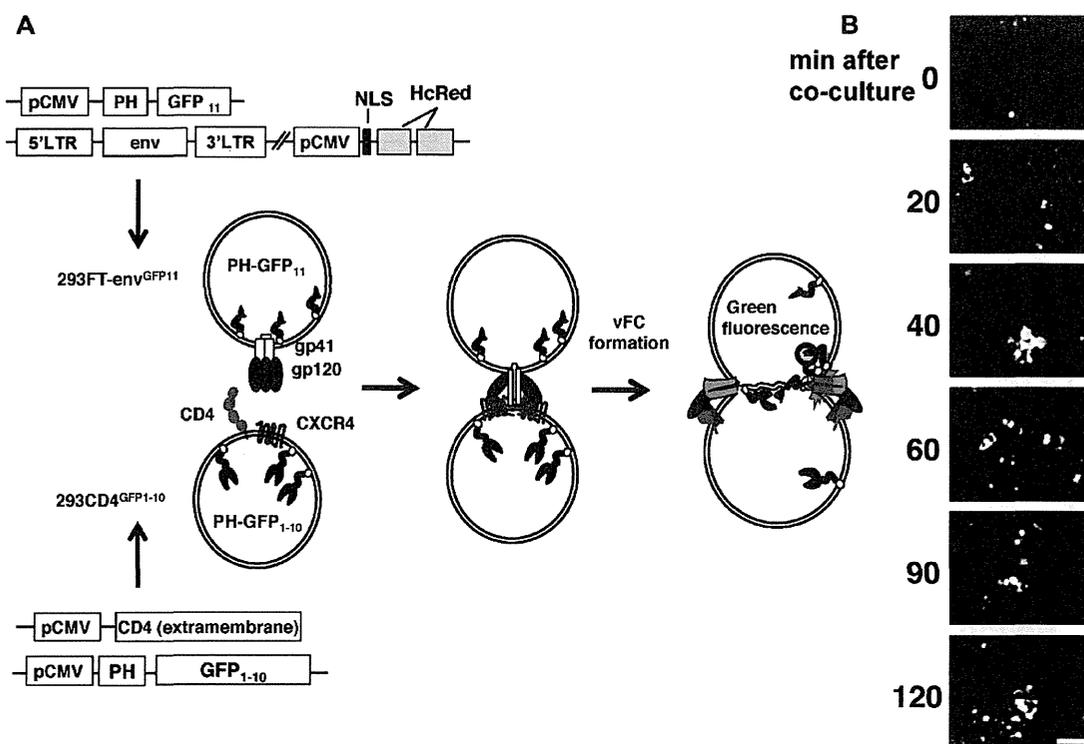


Fig. 1. A model system for monitoring the formation of vFC using spGFP. (A) 293FT- $\text{env}^{\text{GFP11}}$ cells were prepared by transfecting 293FT cells with vectors for Env expression (driven by LTR promoter elements in conjunction with the tandem oriented HcRed protein and the nuclear localization signal (NLS) sequence required to localize the HcRed protein to the nucleus) and a fragment of GFP (GFP₁₁) linked to PH. 293CD4^{GFP1-10} was prepared by transfecting pCMV-human CD4 (extra-membrane region) and pCMV-PH-GFP₁₋₁₀ into 293 cells expressing CXCR4. The schematic diagram shows virus/membrane fusion mediated via the interaction between Env and CD4/chemokine receptors during the viral entry process. (B) Fusion of the transfectants resulted in the expression of the HcRed signal in the nuclei and the appearance of the GFP signal at the membrane. Bars = 50 μm .

gp41 transmembrane proximal epitope. Many mAbs disrupt these interactions and have a substantial neutralizing effect upon HIV-1 infection.

Further studies identified a so-called “hidden epitope” on the membrane of CD4⁺ T cells, which is induced by gp120-CD4 binding (Thali et al. 1993; Wyatt et al. 1995; Xiang et al. 2002), and is recognized by mAbs (possessing broadly neutralizing activity) that inhibit infection by various HIV-1 virus clades (Choe et al. 2003; Decker et al. 2005; Labrijn et al. 2003). Recent studies demonstrate the feasibility of mAbs directed against vFC as neutralizing agents that prevent HIV-1 infection (Finnegan et al. 2001; Haim et al. 2007). Epitopes may be detected by mAbs produced by memory B cells isolated from the peripheral blood lymphocytes of patients showing long-term survival after HIV-1 infection (Diskin et al. 2010).

To further identify target epitopes that appear or alter during the process of viral attachment and entry into cells, we prepared vFCs formed between Env- and CD4/CXCR4-transfectants after optimization of the culture conditions by using a split Green Fluorescent Protein (spGFP) system targeted to the plasma membranes (Wang et al. 2009). The complex of the co-culture containing vFC was immunized to *ganp*-transgenic (GANP^{Tg}) mice (Sakaguchi et al. 2005), which can generate extraordinarily high-affinity mAbs against various kinds of Ags (Ono et al. 2009; Sakaguchi et al. 2009). GANP is a nuclear protein that is upregulated in germinal center B cells after immunization with T cell-dependent Ags (Sakaguchi et al. 2011). Interactions between activation-induced cytidine deaminase (AID) and GANP induce the nuclear localization of cytidine deaminase, increasing its access to IgV-region genes, a process necessary for the generation of high-affinity Abs (Maeda et al. 2010).

In this study, we obtained various kinds of mAbs that recognize vFC, and investigated the changes in appearance of antigenic epitopes during the vFC and the effectiveness of mAbs directed at these epitopes in preventing vFC formation and viral infection *in vitro*.

Materials and methods

Cells

The 293 cells and 293CD4 cells (293 cells constitutively expressing human CD4) (Miyauchi et al., 2005) were maintained separately in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified incubator.

Monitoring membrane fusion with a Split Protein reporter

The engineered spGFP (composed of GFP¹⁻¹⁰ and GFP¹¹) was used in the cell–cell fusion system to enable real-time monitoring of membrane fusion as previously described (Wang et al., 2009; Kondo et al. 2010). 293FT cells (Invitrogen) and 293CD4^{GFP1-10} cells expressing endogenous CXCR4 (Wang et al., 2009) were maintained in G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). 293FT cells were transfected transiently with the Env-expressing vector (pNHcRedEluc HXB2 Env) and the pPH-GFP¹¹ expression vector (Wang et al. 2009) to generate 293FT- $\text{env}^{\text{GFP11}}$ cells.

293CD4^{GFP1-10} cells (5×10^4) were layered over 293FT- $\text{env}^{\text{GFP11}}$ cells (5×10^4 , prepared 35 h prior to co-culture) in Lab-Tek® II Chamber Slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY) at 37 °C

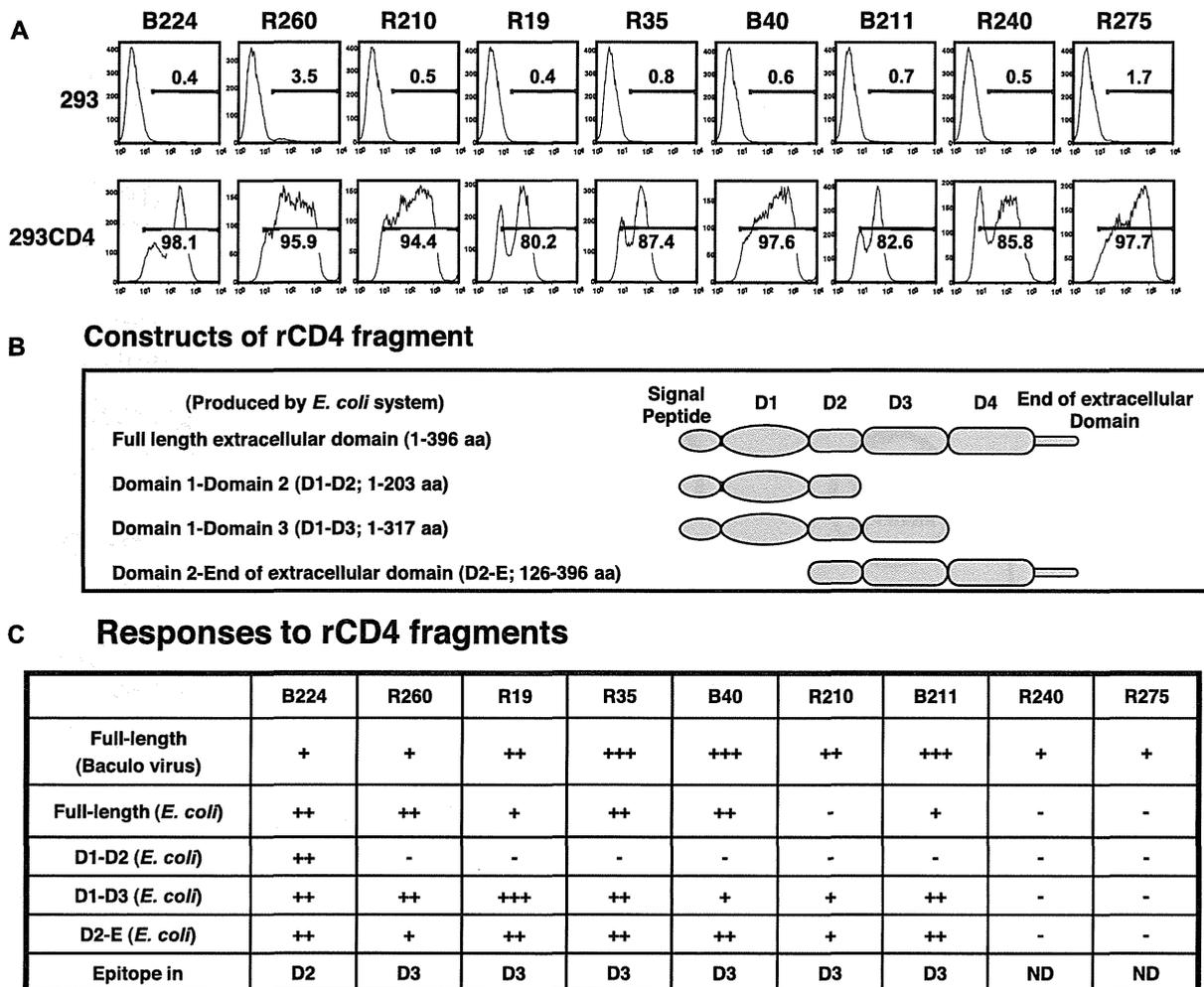


Fig. 2. Generation of mAbs directed against the extracellular region of CD4 expressed on the cells. MAb-producing hybridoma cells were screened by ELISA with soluble human CD4 and re-cloned individually. (A) Specificity for the cell surface CD4 epitope was confirmed by FACS analysis of 293 and 293CD4 cells. (B) Analysis of epitopes expressed on the extracellular portion of CD4. Recombinant (r)CD4 constructs were prepared by RT-PCR of total RNA isolated from CD4⁺ T cells. The extracellular region of CD4 was truncated, and the proteins expressed as fusion proteins with GST (covering D1–D2, D1–D3, and D2–D4). (C) Reactivity with the different mAbs was examined by ELISA. R240 and R275 did not bind to any domains within CD4 produced in *Escherichia coli*, but did bind full-length soluble CD4 produced using a Baculovirus vector, which suggests that these epitopes do not recognize primary amino acid sequences but rather conformation-dependent epitopes. These results are representative of three independent experiments.

with 5% CO₂. After co-culture for specified periods, supernatants were removed and cells were fixed with 4% paraformaldehyde-phosphate buffered saline (PBS) for 15 min, washed gently three times with cold PBS and observed using a BZ-8000 fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan). Data were obtained at identical times and under identical conditions for all groups by observing whole cultures. Env-signal was detected as red HcRed signal in the nucleus and green fused GFP (GFP¹⁻¹⁰ + GFP¹¹) signal was detected on the surface of cells surrounding the Env-positive cells. Purified mAbs (0.5 mg/ml) were used to determine their effect in mAb-dependent inhibition of membrane fusion.

Preparation of hybridomas producing mAbs

vFCs were prepared by co-culturing 293CD4^{GFP1-10} (2.4×10^6 cells) and 293FT-env^{GFP11} (2.4×10^6 cells) in temperature-responsive RepCell 10 cm dishes (CellSeed Inc., Tokyo, Japan) for 15 min at 37°C with 5% CO₂ and fixed overnight with 0.2% formaldehyde-PBS at 4°C. vFCs were washed with

PBS and emulsified with Complete Freund Adjuvant (CFA; DIFCO Laboratories, Detroit) in 1:1 volume ratio to obtain a 1.5×10^7 cells/ml immunogen. 100 μl of vFC immunogen was used to immunize GANP^{Tg}/BALB/c mice ($n=5$) (Sakaguchi et al. 2005). Boosts were given three times using Incomplete FA (DIFCO Laboratories) at three-week intervals. vFCs were freshly prepared for each immunization. Establishment of mAb-producing hybridomas was performed by standard procedures with polyethylene glycol (PEG1500; Roche Applied Science, Mannheim, Germany) using mouse myeloma P3U1 cells. Following hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT; Invitrogen) selection, cells were screened by ELISA to detect secretion of Igs from the hybridoma cells. All positive clones were expanded in 24 well-plates, harvested and stored at -80°C. Culture supernatants from hybridomas were used for screening of the mAbs.

mAbs

More than 630 clones were generated and their supernatants examined for binding to 293CD4^{GFP1-10} or 293FT-env^{GFP11} using