

し、さらに0.45 μm のサイズのフィルターにより細胞を除去してcell-freeのレトロウイルス粒子とした。また細胞から遊離したウイルス量の定量のためHIV-1 Gag抗原であるp24抗原濃度を測定した。このcell-freeレトロウイルス粒子をglioma由来のNP2/CD4/CCR5/CXCR4細胞に感染させ、感染後48時間後の細胞内luciferase活性を測定し、この活性をウイルスEnvの細胞内侵入効率とした。

2. cell-cell感染系の確立

使用するHIV-1レポーターベクターにはintronが*luciferase*遺伝子の途中で逆向きに挿入されており、*luciferase*遺伝子内のintronはsplicing donor (SD)とsplicing acceptor (SA)間がsplicingされ除かれる。しかしながら*luciferase*遺伝子はLTRによる転写とは逆向きに配置されているため、感染細胞内では*luciferase*は発現しない。この細胞と標的細胞として使用するJurkat細胞を混合培養し、Jurkatへの細胞-細胞間感染が成立すると、標的細胞内で感染細胞由来のレポーター遺伝子がJurkat細胞の染色体に組み込まれる。その結果CMVプロモーターからの*luciferase*遺伝子が転写を受け、標的細胞特異的に*luciferase*が発現することによりcell-cell感染の効率を定量的に測定することが可能となる。

C. 研究結果

1. HTLV-1 Envのウイルス感染細胞発現とウイルス粒子内取り込みの確認

293T細胞にHTLV-1 EnvとEnv欠損HIV-1ベクターを発現させ、細胞表面のHTLV-1 Envの発現をgp46のモノクローナル抗体 (LAT27) でフローサイトメトリーを使用して確認した (図1)。また培養上清を遠心してcell-freeのレトロウイルス粒子を回収し、粒子内のEnvの取り込みをWestern blotにより確認した (図1)。またHTLV-1 Envの293T細胞への発現により293T細胞に強い合胞体が形成され (図2)、HTLV-1 Envは強い細胞-細胞融合能を持つことが確認された。

2. HTLV-1 Envのcell-freeとcell-cellの感染リスク評価

HTLV-1 Envによるcell-freeとcell-cellの感染リスクを評価した。cell-freeの感染系においてはレトロウイルスp24抗原10 ngあたりの

*luciferase*活性を測定することにより算定した。対照としてはcell-freeに関してはHIV-1 EnvとVSVGを使用した。cell-cellに関してはHIV-1 Envを対照として使用した。その結果HTLV-1 Envはcell-cellの感染系ではHIV-1 Envと同等ないしそれ以上の感染能を有していたが、cell-freeの感染系ではレトロウイルス粒子あたりの感染性がHIV-1 EnvやVSV-Gと比較して20倍以上低いことが明らかとなった (図3)。

3. HTLV-1 Envのcell-freeウイルスの安定性評価

HTLV-1のEnvを有するレトロウイルス粒子が種々の温度においてどの程度安定であるか評価した。*luciferase*遺伝子を有するenv欠損HIV-1ベクターとHTLV-1 Env発現ベクターを293T細胞にトランスフェクションして回収したレトロウイルス粒子を新鮮状態ですぐに感染、凍結融解後にすぐに感染、新鮮状態から4°C、25°C、37°Cで24時間放置した後感染させて*luciferase*活性を測定した。対照として同様の処理を行ったHIV-1 EnvまたはVSV-Gを取り込んだレトロウイルス粒子を感染させてHTLV-1 Envと比較した。その結果、HTLV-1 Envを有するレトロウイルス粒子は、24時間放置によりどの温度においてもHIV-1 EnvやVSV-Gと比較して感染性がほぼ完全に消失してしまうことが判明した (図4)。また新鮮状態で回収したウイルスに比較すると、凍結融解のみでもその感染性は約半分以下に低下してしまうことも明らかとなり、HTLV-1 Envのcell-freeの感染性はどの温度においても不安定であることが判明した。

さらにHTLV-1 Envのcell-freeレトロウイルスの感染性の時間経過を解析したところ、感染性の半減期は約19分で、さらに約4時間でその感染性は完全に消失し、急速にその感染性が減衰していくことが明らかとなった (図5)。

D. 考察

今回の研究により、HTLV-1 Envのレトロウイルス粒子内の感染性がその他のEnvに比較して非常に不安定であり、感染細胞から遊離したHTLV-1 Envを含むウイルス粒子は急速にその感染性を消失してしまうことが明らかとなった。このことはHTLV-1の感染系では感染細胞から放出直後でのみその感染性が担保されていることを意味している。以前よりHTLV-1の伝搬様式としては細胞間-細胞間が主要な経路であること

は以前より報告されてきたが、その理由についてははっきりとしていなかった。本研究により感染細胞からの持続的なウイルス産生が感染成立に重要であることが明らかとなり、ヒト細胞組織加工品におけるHTLV-1感染のリスク回避には、持続的にHTLV-1粒子を産生する感染細胞の除去が重要であることを示唆している。

E. 結論

HTLV-1の感染リスクは伝播様式により異なり、HTLV-1感染細胞を介した細胞-細胞間伝播により効率よく感染が成立するが、感染細胞から遊離したcell-freeのHTLV-1の感染リスクは極めて低いことが明らかとなった。したがってヒト細胞組織加工医薬品においてはHTLV-1感染細胞の混入を可能な限り最小限に抑えることが重要と考えられた。一方細胞の混入がないバイオ医薬品製造に関してその感染リスクは軽微であると結論された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Maeda Y, Terasawa H, Tanaka Y, Mitsuura C, Nakashima K, Yusa K, Harada S. Separate cellular localizations of human T-tropic virus 1 (HTLV-1) Env and glucose transporter 1 (GLUT1) are required for HTLV-1-mediated fusion and infection. *J Virol* 89, 502-511, 2015

2. 学会発表

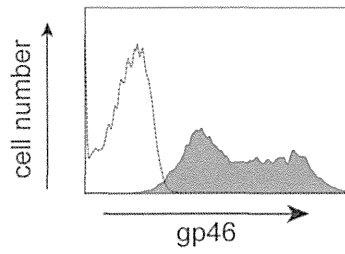
- ① 前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中島詩織, 門出和精, 田中勇悦, 遊佐敬介, 原田信志. HTLV-1 Env発現ウイルス産生細胞におけるHTLV-1受容体GLUT1の制御機構. 第62回日本ウイルス学会学術集会・総会 横浜, 2014年11月
- ② 門出和精, 小野陽, 前田洋助, 寺沢広美, 中野雄介, 原田信志. HIV-1の放出抑制に関与する内在性レトロウイルスGagのドメイン解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会・総会 横浜, 2014年11月

- ③ 苑宇哲, 前田洋助, 川崎ナナ, 原田信志, 遊佐敬介. マウス微小ウイルスの核への侵入にはホスホリパーゼA2活性が必要である. 第62回日本ウイルス学会学術集会・総会 横浜, 2014年11月

H. 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

A. Flow cytometry



B. Western Blot

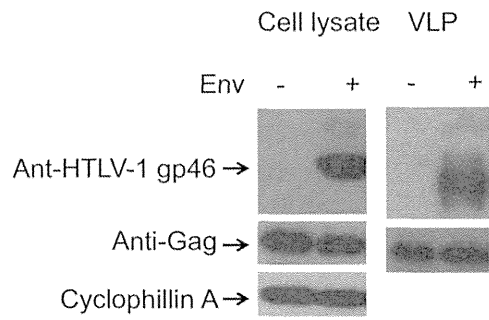
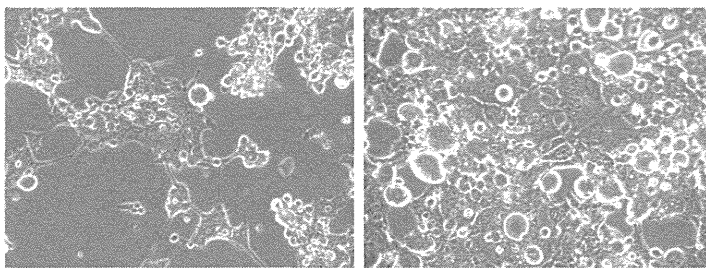


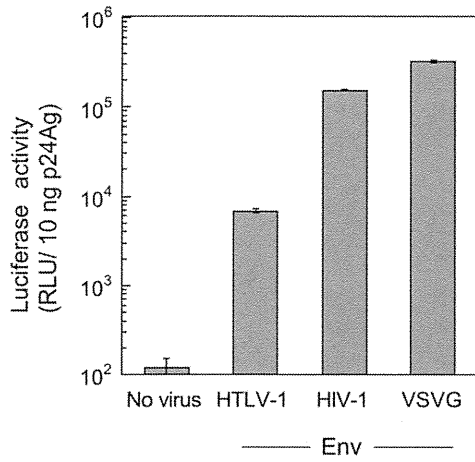
図1 HTLV-1 Envのレトロウイルス感染細胞表面発現とレトロウイルス粒子内取り込み



293T cells

図2 HTLV-1 Envの膜融合能

A. Cell-free 感染



B. Cell-cell 感染

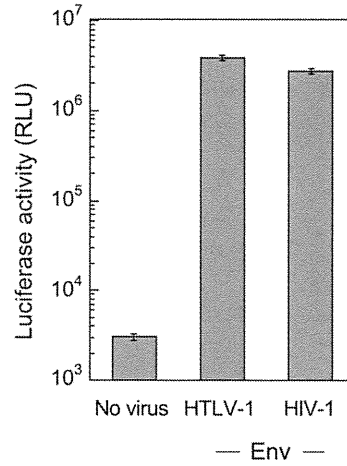


図3 HTLV-1 Envによるcell-freeとcell-cell感染の効率

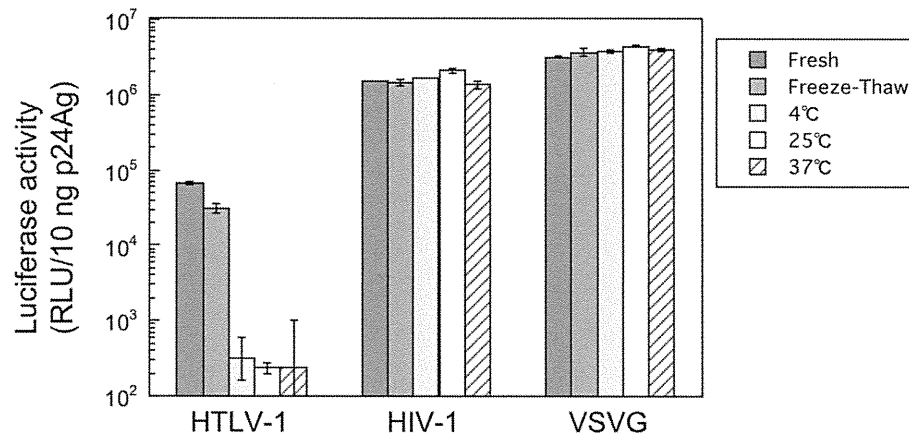


図4 HTLV-1 Envを含むレトロウイルス粒子の温度非依存的不安定性

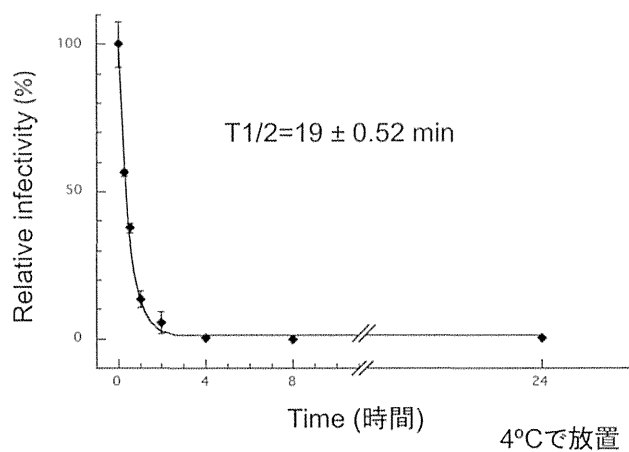


図5 HTLV-1 Envを含むレトロウイルス粒子の不安定性の時間経過

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品等規制調和・評価研究事業)
分担研究報告書

細胞組織加工医薬品のウイルス感染リスク評価に関する研究
分担研究者：清水 則夫 東京医科歯科大学 准教授

研究要旨

すべての成人には複数のウイルスが持続感染しているため細胞組織医薬品原材料へウイルスが混入するリスクは不可避であり、細胞組織医薬品のウイルス感染リスクを正しく評価する必要がある。網羅的ウイルス検査によりヘルペスウイルス科ウイルスが生体材料に混入する危険性が高いことが示されたため、iPS 細胞に対するサイトメガロウイルス (CMV) と単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV1) のスパイク試験を行った。その結果、iPS 細胞は HSV1 に感染し死滅することが示されたが、CMV に対しては感受性を持たないことが明らかとなった。再生医療用 iPS 細胞ストックは末梢血から作製されるが、HSV1 は低頻度ながら末梢血から検出されることがあるため、iPS 細胞のウイルス安全性検査項目として検査実施を考慮すべきである。

A : 研究目的

政府が掲げる日本再興戦略の「第三の矢：新たな成長戦略」の柱の一つに再生医療の産業化の促進が据えられ、ヒト細胞組織医薬品の早期実用化が期待されている。そのような政策実現の環境整備として、再生医療新法や薬事法改正がすでに実施されている。一方、健康人を含めすべての成人には多くのウイルスが持続感染していることが知られているため細胞組織医薬品の原料となる生体材料へのウイルス混入の可能性は不可避であり、再生医療実現化にとって大きな懸念材料となっている。現実問題として、生きた細胞を使用する細胞組織医薬品からウイルスを完全に除去あるいは不活化することは不可能なため、細胞組織医薬品に混入する可能性があるウイルスをリストアップして

その存在量や培養系におけるウイルス動態に関する基礎データを収集し、あらかじめ治療にともなうウイルス感染リスクを適切に評価しておくことが必要である。そのようなデータを蓄積して考察することなしに、治療のメリットとデメリットのバランスを正しく評価することはできないため、再生医療を早期に実用化するためにはデータを蓄積・解析する研究は非常に重要である。我々は、多くのウイルスを網羅的・迅速・高感度に検査することが可能な新検査系を開発し、学内外の医療施設との共同で様々なヒト生体材料に混入する可能性があるウイルス種をリストアップする作業を行ってきた。その結果、サイトメガロウイルス (CMV)、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV1) などのヘル

ペスウイルス科のウイルス群と JC ウイルス (JCV), BK ウイルス (BKV), アデノウイルス (AdV), パルボウイルス B19 型 (B19) が混入する可能性が高いとの結果を得た。これらの結果を基に CMV, HSV1, EB ウイルス (EBV), ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV6), B19 のウイルススパイク試験系の開発を行い、CMV, HSV1, EBV, HHV6 のウイルス液の作製 (B19 は高感染価のウイルス液を調製できないため患者血清を使用) と各ウイルスのウイルスゲノムおよび H ウイルスの mRNA の定量系を作成した。本研究では、iPS 細胞に対する CMV および HSV1 スパイク試験を行い、iPS 細胞への感染性や感染後の細胞とウイルスの相互作用に関するデータを収集するとともに、iPS 細胞および iPS 細胞由来の分化細胞のウイルス安全性に関して考察を行うことを目的として研究を実施した。

B : 研究方法

1. iPS 細胞の培養

細胞株 : 201B7 株 (RBRC-HPS0063)

培地 : AK03 (味の素)

2. ウイルスストックの作成

1) HSV1: Vero 細胞に HSV1 (Strain F) を感染し、37°C で培養した (培養液 ; RPMI1640+2%FCS)。ほとんどの細胞に CPE が広がった時点で培養液を回収し、0.8 μ m のフィルターで細部成分を除去しウイルス液とした。得られたウイルス液を 10^{-1} ~ 10^{-5} まで段階希釈 Vero 細胞に加え、プラークアッセイにより感染価を測定した。

2) CMV: ヒト正常胎児肺由来二倍体線維芽細胞株 HFL-1 細胞に CMV (Towne 株) を感染し、37°C で培養した (培地; Eagle MEM + 2%FCS)。15 日目に培養上清を回収し CMV ウイルス液とした。ウイルス感染価は HFL-1 を用いてプラークアッセイにより測定した。

3. ウイルスゲノム定量系の作成

ウイルス遺伝子の定量 : LightCycler 480 (ロシュ) を用いた qPCR により定量した。

PCR 試薬 : AccuPrime Taq DNA Polymerase System、Invitrogen 社 プライマー、プローブの配列は下記の通り。

HSV1

F Primer : CGCATCAAGACCACCTCCTC

R Primer : GTCAGCTCGTGRTTCTG

Probe: 6FAM-AGTACGACGACGCAGCCGAC-BHQ

CMV

F Primer : TCGCGCCCGAAGAGG

R Primer : CGGCCGGATTGTGGATT

Probe:

6FAM-CACCGACGAGGATTCCGACAACGC-BHQ

4. ウイルス mRNA 検出系の作成

1) mRNA 検出の標的遺伝子

a. HSV1: ICP4, gB

b. CMV: IE1, UL89

2) RNA 抽出 ウイルス感染細胞からの total RNA 抽出は RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて行い、さらに DNase I (TaKaRa) 処理を行った。

3) mRNA の定量 RT 反応 50°C 30 分 PCR 反応 94°C 15 秒、54°C 30 秒、72°C 30 秒 40cycle で RT-PCR 反応を行った。

RT-PCR 試薬は SuperScript III OneStep (Invitrogen) を使用した。

プライマー・プローブ配列以下の通り。

HSV1 (ICP4)

F Primer : CGTGGGGTCCGGATACG

R Primer : ACGACGATGACGGGAC

Probe:

6FAM-AGTACGACGACGCAGCCGAC -BHQ

HSV1 (gB)

F Primer : CGCATCAAGACCACCTCCTC
 R Primer : GTCAGCTCGTGRITTCCTG
 Probe:
 6FAM-AGTACGACGACGCAGCCGAC-BHQ
 CMV1 (IE1)
 F Primer : CCAAGGTGCCACGGCC
 R Primer : TGTTAACCTCCTTCCTCAACATA
 GTCT
 Probe:
 6FAM-TGCCAAGGCCACGACGTTTCCTG -BHQ
 CMV (UL89)
 F Primer : CAGCAGCAARTGGAAGTTTTGT
 R Primer : GGCGCTTTTTGCCAGTTG
 Probe:
 6FAM-CTCGGATGCTGTTGGTGTGTA-BHQ

5. ウイルスタンパク質の検出 (蛍光抗体法)

1) 使用抗体

HSV1 ICP4 抗体 (Santacruz)
 HSV1 glycoprotein B 抗体 (Santacruz)
 CMV pp65 抗体 (Santacruz)
 CMV glycoprotein B 抗体 (Santacruz)
 Anti-mouse Rabbit 抗体 (Dako)

2) 方法

- a) メタノール固定 (-20℃10 分間)
- b) ブロッキング液 (10%ウサギ血清) を加え室温 30 分静置
- c) 1 次抗体液 (1 次抗体, 1%BSA, PBS) を加えて室温 2 時間静置
- d) PBS で 3 回洗浄し、2 次抗体液を適量加えて暗所室温 1 時間静置
- e) 蛍光顕微鏡で観察

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要な研究は行なっていない。

C : 結果

1. ウイルス液の感染価測定結果

HSV1 は Vero 細胞、CMV は HFL-1 細胞に段階希釈したウイルスストックを接種し、CPE を指標にウイルス感染価を測定した。得られたウイルス感染価は以下の通り。

HSV1 の感染価 : 7.8×10^5 pfu/ml

CMV の感染価 : 7.0×10^5 pfu/ml

2. iPS 細胞への CMV スパイク試験

iPS 細胞 (201B7 株) に感染価測定結果をもとに moi=0.1 で CMV を感染した。

感染後 10 日目まで観察したが、細胞増殖への影響も認められず、細胞の形態変化も観察されなかった (図 1)。同様に、ウイルス mRNA (IE1, UL89) とウイルスタンパク質 (pp65, glycoprotein B) 発現も検出されなかった (図 2、3)。

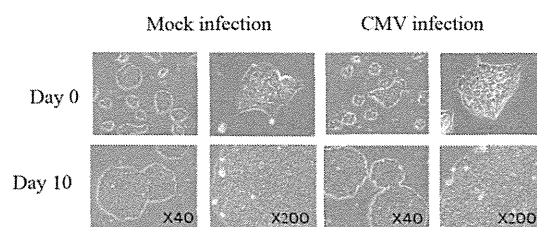


図 1. iPS 細胞への CMV 感染 (細胞形態変化) : 10 日間観察したが CMV 感染による細胞形態への変化は観察されなかった。

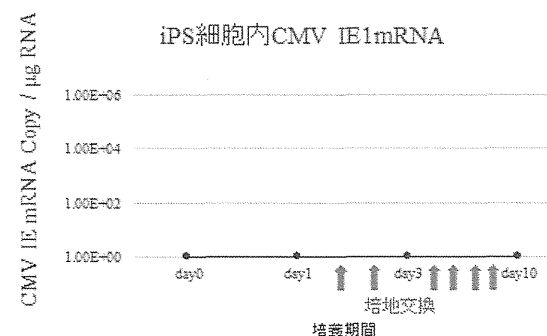


図 2. iPS 細胞への CMV 感染 (ウイルス mRNA 発現) : 10 日間観察したが CMV タンパク質発現は観察されなかった (IE1)。

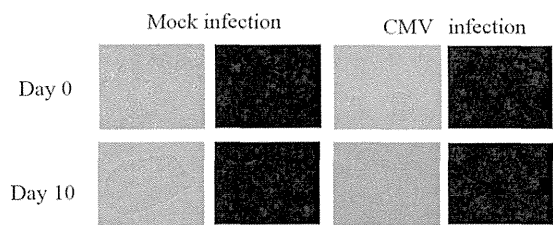


図 3. iPS 細胞への CMV 感染（ウイルスタンパク質発現）：10 日間観察したが CMV タンパク質（pp65）発現は観察されなかった。

3. iPS 細胞への HSV1 スパイク試験

iPS 細胞（201B7 株）に感染価測定結果をもとに $moi=0.1$ で HSV1 を感染した。感染後 3 日後には細胞増殖が著しく阻害され（図 4）、強い CPE により細胞は死滅した（図 5）。また、ウイルス mRNA 発現（図 6）、ウイルスタンパク質発現（図 7）も検出された。

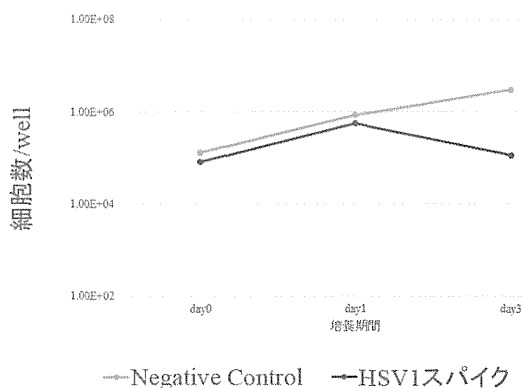


図 4. iPS 細胞への HSV1 感染（細胞増殖に対する影響）：感染 3 日後には顕著な細胞増殖抑制効果が観察された。

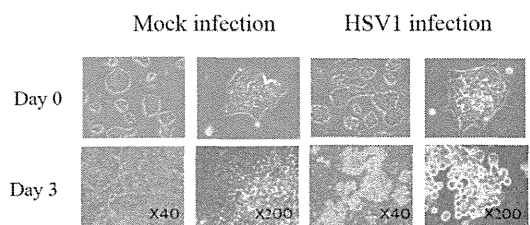


図 5. iPS 細胞への HSV1 感染（細胞形態変化）：感染 3 日後には強い CPE が観察され、細胞は死滅した。

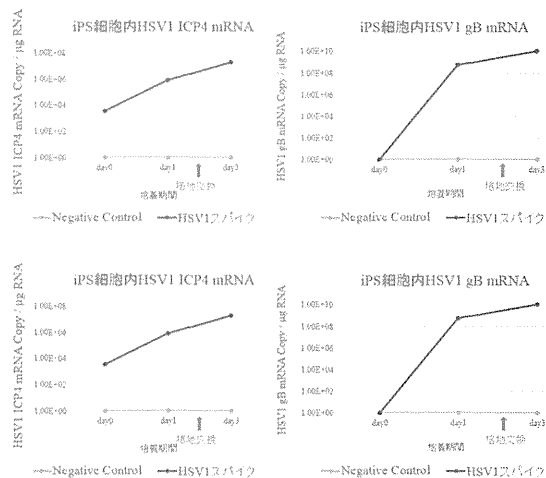


図 6. iPS 細胞への HSV1 感染（ウイルス mRNA 発現）：感染直後に ICP4、感染翌日には gB 遺伝子の mRNA が検出された。

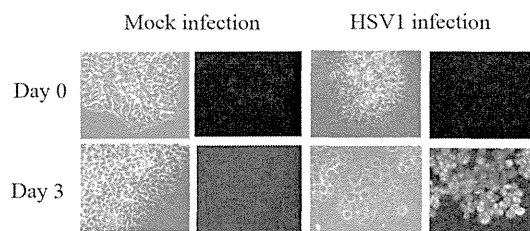


図 7. iPS 細胞への HSV1 感染（ウイルスタンパク質発現）：感染 3 日後の ICP4 発現。

以上の結果より、iPS 細胞は HSV1 には感受性があるが CMV に対する感受性は持たないことが示された。

D：考察

1. 現在、京都大学 iPS 細胞研究所では、医療用 iPS 細胞ストックを作成する「再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクト」が実施されている。このプロジェクトは健康人から HLA (Human Leukocyte Antigen：ヒト白血球型抗原) ホモ接合体のボランティアの末梢血から iPS 細胞を作製・保存するプロジェクトで、予め品質の保証された iPS 細胞を保存し必要に応じて国内外の医療機関や研究機関に迅速に提供可能にすることを目的とするものである。一方、すべての成人には複数

の持続感染ウイルスが持続感染していることが明らかとなっており、その多くは末梢血中に検出されるため、再生医療用 iPS 細胞ストックを作成する際にはそれらのウイルスが混入するリスクが避けられない。本研究は細胞組織医薬品のウイルス感染リスクの評価を目的として具体的なウイルス感染リスクに関するデータ蓄積を目的に iPS 細胞へのウイルススパイク試験を実施した。その結果、少なくとも今回用いた iPS 細胞株(201B7 株)は HSV1 には感受性があるが CMV に対する感受性は持たないことが示された。この結果を一般化できるかどうかを他の iPS 細胞株を用いて今後検証する予定である。

2. HSV 1 の細胞への侵入にはウイルス表面に存在する 5 つのエンベロープ糖タンパク質 (gB, gC, gD, gH, gL) が関与していることが知られている。細胞への吸着には gB と gC が関与し、その後 gB と gD が宿主細胞受容体に結合することによりウイルスエンベロープと宿主細胞膜が融合してウイルスの細胞への侵入が開始される。宿主細胞受容体として、NM-IIA、PILR α および MAG が、gD 受容体として nectin、CD270 (HVEM) およびヘパラン硫酸が同定されている。今後これらの HSV1 に対する宿主細胞受容体の発現の有無を解析する実験を通じ、iPS 細胞への感染機構に特殊性があるか否か検討していきたい。

3. 現在、細胞由来医薬品の製造にあたっては厚生労働省からの通知(「ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」など 5 指針)に従い、5 種類のウイルス(HIV, HTLV, HBV, HCV, ParvoB19)の検査が義務付けられている。今回得られた研究結果は、iPS 細胞を樹立する際に上記 5 ウイルスに加え持続

感染ウイルス(少なくとも HSV1)の検査が必要なことを示しており、我々が開発した代表的な持続感染ウイルス 13 種類を網羅的・迅速に検出できる新しい検査系(HSV1, 2, CMV, EBV, VZV, HHV6, 7, 8, JCV, BKV, AdV, PVB19, HBV)が有用と考えられる。今後この検査系の実用化に向けた取り組みを加速させる予定である。

E: 結論

ボランティアの末梢血を原材料に医療用 iPS 細胞ストックの作成が進んでいる。一方、すべての成人には複数の持続感染ウイルスが持続感染していることが知られているが、本研究の結果から、iPS 細胞は少なくとも HSV1 に感受性を持つことが示された。したがって、厚生労働省通知に記載の、5 種類のウイルス(HIV, HTLV, HBV, HCV, ParvoB19)の検査に加えてヒトに持続感染するウイルス(少なくとも HSV1)の検査が必要と考えられる。

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

論文発表

1. Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, **Shimizu N**, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows distinctive stem cell-like phenotype. *Luek Lymphoma* 10:1-27, 2014
2. Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M,

Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals. *PLoS One* 9:e112564, 2014.

3. Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N. Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 87:279-286, 2014.

4. Yagasaki H, Shichino H, Shimizu N, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S. Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. *Transpl Infect Dis.* 17(1):160-1. 2015.

5. Endo A, Watanabe K, Ohya T, Matsubara T. Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin.Infect.Dis.* 59:545-548, 2014.

6. Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr.Int.* 56:159-66, 2014.

7. 関矢一郎、清水則夫、森尾友宏、宗田大、滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の手順. *日本整形外科学会雑誌* 88:212-215, 2014

8. 木村秀樹、池 裕明、岡正朗、鈴木弘行、谷憲三朗、徳久剛史、中面哲也、森尾友宏、山口佳之、阿曾沼元博、河上裕、紀ノ岡正博、澤芳

樹、清水則夫 免疫細胞療法細胞培養ガイドライン 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45:411-433, 2014

著書
なし

国内学会発表

1. 廣瀬千紘、坂下千瑞子、山本正英、今留謙一、富田誠、藤原成悦、森尾友宏、清水則夫、三浦修、新井文子 成人 EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症に対する同種造血幹細胞移植成績の後方視的解析 造血幹細胞移植学会 平成 27 年 3 月 (神戸市)
2. 渡邊 健、島田ひかり、湯之前雄太、外丸靖浩、関矢一郎、森尾友宏、清水則夫、岸本加恵、前田忠郎、澤田昌典 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を利用した再生医療の安全性確保: ウイルススパイク試験 日本再生医療学会 平成 27 年 3 月 (横浜市)
3. 外丸靖浩、渡邊 健、太田洋子、小島尚美、関矢一郎、森尾友宏、清水則夫 再生医療の微生物安全性検査: ウイルス・マイコプラズマ同時検出系の開発 日本再生医療学会 平成 27 年 3 月 (横浜市)

国際学会発表

1. Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Applications of mouse models of EBV- associated diseases for the evaluation of novel therapies. The 16th International symposium on Epstein Barr Virus & Associated Diseases. 16-19 July, 2014 Brisbane
2. Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models.

The 39th Annual International Herpesvirus
Workshop. 19-23 July, 2014. Kobe

H : 知的財産権の出願・登録状況
なし

細胞組織加工医薬品及びバイオ医薬品の異常型プリオンの
検出・リスク評価に関する研究に関する研究

研究分担者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官

研究要旨 バイオ医薬品等の原料への異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc})の混入/迷入リスクの低減するために PrP^{Sc}の検出手法や製造工程でのクリアランス工程の評価法について最新の状況を調査した。特に製造工程でのクリアランスを定量的に評価するために PrP^{Sc}検出に用いられている現行の手法の問題点と今後の目指すべき方向性について検討した。工程評価に用いる PrP^{Sc}のスパイク検体についても評価を行い以下の結果を得た。

- 1) PrP^{Sc}の感染性の検出にはマウス脳内に摂取する in vivo 法が最も高感度とされているが時間がかかりすぎるという欠点があり、そのために PrP^{Sc}のみを検出するウエスタンブロット(WB)法や試験管内で人工的なストレスを負荷する PrP^{Sc}増幅法(PMCA)などが開発されてきたが、定量性や特異性、増幅条件の最適化などの課題があり、満足のいく方法とはなっていない。
- 2) プリオンタンパク質を高発現している細胞を用いる培養細胞系は生体での PrP^{Sc}のコンバージョンを反映した迅速な感染性の定量法として開発が進められている。
- 3) 細胞培養系で得られた PrP^{Sc}は、脳内摂取により感染性が確認されており、PrP^{Sc}のスパイク検体として有用である。

以上の点から、今後細胞培養法が検出手法やクリアランス評価に用いる検体の調製法としても有用性が高いと考えられる。

A. 研究目的

我が国では、伝達性ウシ海綿状脳症(BSE)を主とする伝達性海綿状脳症(TSE)のリスク評価に関して、ウシ等由来原材料の原産国の地理的なリスク及び原材料部位のリスクを基本に、予防的なBSE対策を進めている。英国等でのBSEの発症は沈静化してきているが、一方で非定型BSE発症がEU、カナダ、米国、日本等で相次いで報告されている。このような非定型BSEの発生

が、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)の増加につながることを懸念されている。非定型BSEの発生は、これまで非発生国として一定の安全性が担保されるとされたオーストラリア等でもvCJDの発生が起こる可能性が指摘されている。従って、BSE発生が沈静化してきているとはいえ、血清等を用いる医薬品製造においてvCJDの原因物質となりうる異常型プリオンタンパク質(PrP^{Sc})の混入/迷入を否定

するための試験の実施は、医薬品の安全性を確保するために不可欠となっている。

一方で、世界中の獣畜・家禽等の疾病の透明性の保証や世界の獣畜・家禽等の疾病の制御に関する国際的協力の促進、動物と動物由来の生産品の国際取引に関しての衛生基準の作成を行っている国際獣疫事務局(OIE)が、昨年度5月の会議で、日本を始め、米国、イスラエル、イタリア、オランダ及びスロベニアをBSEリスクの無視できる国に認定した。これにより、新たに清浄国に指定された国で新たにウシ成分等を用いた医薬品製造を行う場合に、特にウシ血清などに使用が可能となってきた。

海外でもヨーロッパ医薬品長庁が2011年に血液製剤におけるvCJDのリスク評価に関するポジションペーパーを出しており、vCJDのリスク評価において最も重要な点はドナーの特定期間における英国滞在歴であり、ついで滞在歴のあるドナーの排除とPrP^{Sc}のクリアランス能のある製造工程の重要性が指摘されている。

以上のようにBSEをめぐるリスクの推定やウシ由来原材料の使用に関する規制要件は刻一刻と変化しつつある。一方で、万が一新たなBSEの発症（特に非定型プリオン由来など）があった場合に、反芻動物を用いた製造方法を採用している場合に、あらたにPrP^{Sc}リスクがどの程度あり、かつ採用している精製方法等によりどの程度PrP^{Sc}がクリアランスできる能力があるのかを検討しておく必要が出てくる可能性がある。そのためにもPrP^{Sc}のクリアランス能を評価しておくことが有用である。しかし、PrP^{Sc}の検出方法がまだ検出感度や時間、精度等に関してコンセンサスの得られている方

法はないと考えられる。

そこで本年度はPrP^{Sc}の検出手法の全体的な評価を行うと共に、工程でのPrP^{Sc}のクリアランスを評価するためのスパイクに用いられるPrP^{Sc}の要件についても調査検討した。

B. 研究方法

公表文献や海外のガイドライン、国際学会でのPrP^{Sc}の検出系の報告について調査を行うと共に、それぞれ検出手法ごとの有用性や限界について評価を行った。またスパイク検体について文献等より、どのような課題があるのかを調査すると共に、工程評価に用いるスパイク検体についての要件について調査した。

〈倫理面への配慮〉

本研究では、ヒトないしは動物を対象とした実験ではなく、主として国内外のガイドラインや公表文献等を対象として調査研究を行った。したがって倫理的問題は生じていない。

C. 結果

異常プリオン(PrP^{Sc})のクリアランス工程としてはナノフィルトレーションやカラムクロマトグラフィー工程が挙げられる。特にクリアランス能の高い工程としてナノフィルトレーションによる評価が行われている。これまで代表的なナノフィルトレーションでのクリアランス能についてまとめられた表1の結果を見ると、スパイクしたPrP^{Sc}検体により結果が大きく異なることがわかる。初期の検討では脳乳剤や超音波処理したミクロソーム分画を用いた場合には

かなり口径の大きいフィルターを用いても 4-5log の低減率が得られている。しかし、スパイクする PrP^{Sc} を界面活性剤の添加等により粒子を小さくするような調製法を適用すると、そのクリアランス能は低下し、粒子の大きい調製法を適用した検体を用いると 20nm 以下の口径を用いた場合には口液中に感染性が検出されなかったにも関わらず、粒子が細くなる調製法では 10nm の口径のナノフィルトレーションでも口液中に感染性が検出される。このような結果は当初の PrP^{Sc} の調製法で得られていたクリアランス能は必ずしも生体由来の PrP^{Sc} の除去能を反映していない可能性を示唆している。

上記のクリアランス評価においてスパイクした PrP^{Sc} は超音波処理したマイクロソーム分画であったり、あるいは界面活性剤を添加して粒子を小さくした検体であった。一方血中に存在する PrP^{Sc} がどのような形態をしているか未だ明らかにはされていないが、このような脳膜分画を物理的ないしは化学処理によって微粒子化したものが適切なスパイク検体とはいえないかもしれないとされている。このような考え方から、このような物理的処理や化学処理した感染動物の脳膜分画の通常より高速の超遠心の上清（スーパー超遠心上清）を用いて粒子をより微小化した PrP^{Sc} 検体をナノフィルトレーションでの工程にスパイクし、クリアランスがどのように変化するかが検討されている。

表 2 に示すように、通常の膜分画では 15nm や 20nm のナノフィルトレーションにより 4-5LRF が得られるが、「スーパー超遠心の上清」を用いた場合には 2 前後の LRF

しかえられず、しかも口液中に感染性が検出されることが示された。

これらの結果は、「スーパー超遠心の上清」を用いた場合には、マイクロソーム分画と同様の PrP^{Sc} タイターを含有しているにも関わらず、ナノフィルトレーション工程で低い LRF しか得られていない。この結果は、「スーパー超遠心の上清」には非常に微小な粒子のみ PrP^{Sc} が分画されたためにトラップ効率が低下したと考えられる。

この微小化された PrP^{Sc} 分画を用いることにより血中での動態が評価できるのではないかという発想から、この分画を種々の血液検体にスパイクし、PrP^{Sc} の除去に有効とされる除白血球フィルターの評価を実施している。その結果、この分画が除白血球フィルターPrP^{Sc} の除去能の評価に有用である結果が得られている（図 1）。

表 1 及び表 2 の結果は、ナノフィルトレーションによる PrP^{Sc} の除去能を評価する場合にはスパイクする PrP^{Sc} の形状や粒子径がその評価を過剰に推定することにつながることを示唆している。一方、これらの工程での PrP^{Sc} 除去の評価では複数の PrP^{Sc} の定量法が用いられている。この PrP^{Sc} のアッセイ法の特徴とその課題を表 3 にまとめてみた。

PrP^{Sc} の感染性を最も高感度に測定できるのは脳内接種により異常プリオンの発症を評価する in vivo 法である。定量評価においては限界希釈法により感染性が検出できなくなる希釈率からタイターを評価できるが、判定に半年以上の期間を要し、正確に定量するには多くの動物を必要するために代替となる方法が望まれている。

in vivo 法の代替法として、いくつかの方法が実施されている（表3）。ウエスタンブロット法は簡便であるが感度が低く、エンドポイント法で定量する場合にも測定可能範囲が小さい。PMCA 法や同様の試験管内での PrP^c から PrP^{Sc} への変換(コンバージョン)を引き起こすことにより検出する手法が開発されているが、検体ごとに反応条件を最適化する必要があり、また用いるプリオンタンパク質に種の壁があるとされてきている。非常に反応性の高い高いプリオンタンパク質の探索が行われてきており、ヒツジの遺伝子型として 171 番目のアミノ酸がグルタミン酸 (Q171) のプリオンタンパク質を用いて PMCA 法を行うと種々の異常プリオンの検出が可能との報告がある。しかし、別の報告では Q171 プリオンタンパク質であっても PMCA での反応性が良くない遺伝子型 (A136/R154/L158/Q171) も知られており必ずしも十分なデータが得られているわけではない。

さらに英国で患者から摘出された扁桃腺の異常プリオンの検出をウエスタンブロット法で検出した結果や BSE 感染牛の唾液中での異常プリオンを PMCA 法で解析した結果は in vivo 法と必ずしも一致していない。この結果は、PMCA 法が in vivo 法よりも感度が高いことを示しているとも考えられるが、逆に PMCA 法で検出された異常プリオンは試験管内でおきた artifact を含む可能性と考えることができる。

上記の様な異常プリオン検出の迅速法の欠点を改良する目的で、プリオンタンパク質高産生株を用いる in vitro 細胞培養法が開発されている。神経/脳由来細胞株や初代

細胞株を用いた開発が先行していたが、非神経系細胞を用いた開発も行われている（表4）。in vitro 培養細胞を用いた感染系は比較的短時間に異常プリオンのコンバージョンが見られ、その検出にはエリススポット法などが用いられている。また検出のみならず、in vitro 培養細胞で増幅されてきた異常プリオンを用いて工程評価に用いることが検討されている。この細胞培養で得られた異常プリオンは、脳ミクロソーム分画よりもより自然発症した形態を保持していると想定され、今後その濃縮法や調製法が開発されてくることが期待されている。

D. 考察

本年度は、バイオ医薬品の PrP^{Sc} 安全性評価のために精製工程でのクリアランス能の評価における PrP^{Sc} のアッセイ法の最新情報の総括と工程評価においてスパイク試料としての適格性について調査を行った。まず PrP^{Sc} の感染性を評価する基本的なスタンスとしては in vivo アッセイ法が最も高感度であり、感染性の有無や限界希釈法による感染価の評価においてもいわばゴールドスタンダードとなると考えられる。但し、半年に亘る試験期間を要するという in vivo 法の欠点を克服するために様々な手法が開発されてきている。それぞれのアッセイ法の評価においては in vivo 法との相関性を示すことが基本となる。そこで今年度はいくつかの手法の in vivo 法との相関性を含めてその検証を行った。

PrP^{Sc} の工程での除去能を評価するためのスパイク検体としてはスクレイピーや BSE 感染マウス脳由来のミクロソーム分画が用

いられてきたが、粒子サイズが大きすぎるとの観点から超音波処理や界面活性化剤処理などにより粒子の低分子化が試みられ、その結果粒子を小さくすることにより当初はナノフィルトレーションでは感染性が口液に検出されないとされていたのが、20nm や 15nm の口径のフィルターを用いても口液に感染性が検出されることが明らかになり、粒子のサイズによってはこれまで出されていた PrP^{Sc} 除去能を再評価する必要があると指摘されてきている。特に血中での PrP^{Sc} の存在状態が不明であることから、ウシ血清由来の PrP^{Sc} の感染性を前提とする場合には、粒子径を含めてその適切性について十分検討する必要がある。

バイオ医薬品の PrP^{Sc} クリアランス能の評価においては、スパイクした検体及び工程終了後の検体の PrP^{Sc} 感染価ないしはその残存量の定量的評価が重要となる。また、その検出感度やそれに基づく定量可能領域がどの程度あるのかが十分な定量範囲を確保するために必要となる。

このような点から *in vivo* アッセイ法の代替として用いられているプロテイナーゼ K 耐性プリオンタンパク質の WB による検出や PMCA 法に関してはその感染性を十分に取らえられているのか疑問が残る。特に WB より高感度な検出手法とされている PMCA 法やその類似の試験管内でのプリオンタンパク質のコンバージョンを指標とする手法は検体の特性による最適化が必要である点や感染性検出の十分条件であるのが課題となっている。このような点からも感染性を定量的に評価できるアッセイの確立が急務と考えられる。

上記のような観点からプリオンタンパク質の高発現細胞を用いた *in vitro* 細胞培養系を用いたアッセイ法の開発が急速に進んでいる。これらのアッセイ法は細胞のラフトや細胞内で添加された PrP^{Sc} により正常プリオンが PrP^{Sc} にコンバージョンされるという原理(図 2)を利用しており、生体での PrP^{Sc} の発生機構に類似した反応と想定できる。現状の課題は培養細胞中でのコンバージョンの条件設定の難しさとそのコンバージョン率が必ずしも十分でない点である。ただこれらはプリオンタンパク質高発現細胞株の使用や培養条件で改善が期待できる。

また、*in vitro* 培養細胞系で製造した PrP^{Sc} をマウス脳内への投与により CJD の発症を引き起こすことから *in vitro* 法にて変換された PrP^{Sc} は異常プリオンとしての特性を有していること、さらに異常プリオンとしての生体での存在状況に類似していると想定されることから工程へのスパイク試料としての十分性を備えている可能性が高いことも注目すべき点であると考えられる。

今後この *in vitro* 培養法を用いてより高濃度の PrP^{Sc} の調製が可能になればより正確な PrP^{Sc} のクリアランス能の評価がcaのうになると期待される。

E. 結論

BSE など PrP^{Sc} に対するバイオ医薬品の安全性確保のために PrP^{Sc} の製造工程でのクリアランス能の評価に、プリオンタンパク質を高発現している細胞を用いる培養細胞系の検出系は迅速に感染性を定量できる方法として開発が進められており、PrP^{Sc} の感染性を迅速に評価できる手法として期

待される。細胞培養系で得られたPrPScは、脳内摂取により感染性が確認されており、PrPSc のスパイク検体としても有用である。今後細胞培養法が検出手法やクリアランス評価に用いる検体の調製法としても有用性が高いと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

- 1) 山口照英:再生医療の安全性確保法と薬事法改正、レギュラトリーサイエンス学会誌(RSMP)、vol.4, No.3, 237-247(2014)
- 2) Maeda,D., Yamaguchi,T., Ishiduka,K., Takekita,T., Sato,D.: Regulatory Frameworks for Gene and Cell Therapies in Japan. in "Regulatory Aspects of Gene Therapy and Cell Therapy Products in Japan." Springer, Serbian,M. & Galli,M.C. eds., in press
- 3) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子,

小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験のPCR法改正のための共同研究、マイコプラズマ学会雑誌 (印刷中)

- 4) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45 (5), 442-451 (2014)

G-2 学会発表

- 1) 山口照英, 内田恵理子, 小野寺裕史:「遺伝子治療製品の品質・安全性確保のための指針改定と国際動向」東京大学医科学研究所遺伝子・細胞治療センターキックオフ・シンポジウム 2014年11月東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得 なし

H-2 実用新案登録 なし

H-3 その他 なし

表1. ナノフィルターを用いたプリオンタンパク質除去能の評価

Spike		適用フィルター	残存感染価	低減率	アッセイ法	著者
TSE 株	感染株の調製					
スクレイパーME7	脳乳剤/-Detergent	35nm	有	4.9	エンドポイント	Tateishi (2001)
		15nm	無	>5.8		
	脳乳剤/0.5%ザルコシル	35nm	有	1.6		
		15nm	無	>4.2		
		10nm	無	>3.8		
		脳乳剤+超音波処理	220+40+25nm	有	2	エンドポイント
263K スクレイパー	脳乳剤+超音波処理 +detergent	15nm	有	NA	バイオアッセイ	Rohwer UP
		マイクロソーム	75nm	有	3.2	エンドポイント
		15nm	有	4.8		
	超音波マイクロソーム	15nm	有	NA	バイオアッセイ	Yunoki(2008)
	超音波マイクロソーム+リ ゾレシチン	15nm	有	4.7/4.0		Yunoki(2010)
	清澄化脳ホモジナイズ	100+30+20nm	無	>5.4	エンドポイント	Diez (2010)
127S スクレイパー	脳乳剤	15nm	無	>4.6	細胞培養アッセイ	You (2010)
BSE-6PB1	マイクロソーム	15nm	有	5.3	エンドポイント	Flan (2007)
GSS-KFu	脳乳剤/-Detergent	75nm	有	0.7	バイオアッセイ	Tateishi (2001)
		60nm	有	1.1		
		50nm	無	NA		
		40nm	有	2		
		35nm	無	NA		
		75+35nm	無	NA		
		60+35nm	無	NA		
		60+60nm	有	2.6		
	脳乳剤/+ザルコシル	40nm	有	-0.9		
	脳乳剤/-Detergent	10nm	無	NA	バイオアッセイ	Tateishi (2001)
脳乳剤/+ザルコシル	10nm	有	2			

表2. スパイク検体の作製法によってプリオンクリアランスが大きく異なる

	低速遠心上清		スーパー超速遠心上清	
	タイター(log LD50 /g 組織)	LRF	タイター(log LD50 /g 組織)	LRF
フィルター	means+/-SEM	LRF	means+/-SEM	LRF
100nm	6.6 +/- 0	2.3	5.0 +/- 0.1	0.9
75nm	6.4 +/- 0.1	2.5	4.5 +/- 0.2	1.4
35nm	6.3 +/- 0.2	2.6	4.5 +/- 0.3	1.4
ミリポア NFP	4.9 +/- 0.4	4	4.1 +/- 0.3	1.8
アサヒ化成 20nm	4.8 +/- 0.5	4.1	4.2 +/- 0.3	1.7
Pall DV20				
1回目	4.7 +/- 0.3	4.2	4.2 +/- 0.4	1.7
2回目	4.2 +/- 0.3	4.7	4.0 +/- 0.2	1.9
アサヒ化成 15nm				
1回目	4.5 +/- 0.4	4.4	3.8 +/- 0.1	2.1
2回目	3.6 +/- 0.1	5.3	3.6	2.3