

N-アセチル-L-システイン	デスオキシコール酸ナトリウム	ラクツロース
N-アセチル-L-システイン	デヒドロコール酸及びその塩類	ラクチボン酸
N-ステアロイル-L-グルタミン酸ナトリウム	トリアセチン	ラクチボン酸エリスロマイシン
N-ヤシ油脂肪酸/硬化牛脂脂肪酸アシル-L-グルタミン酸ナトリウム	トリアムシノロンアセトニド	ラノリン
N-ラウロイル-L-グルタミン酸ジ(コレステリル・オクチルドデシル)	トリオレイン酸ソルビタン	ラノリンアルコール
αモノイソステアリルグリセリルエーテル	トリステアリン酸ソルビタン	ラノリン脂肪酸コレステロールエステル
アセチルしょ糖変性アルコール 95vol%	トリ牛脂脂肪酸グリセリル	リンゴ酸システイン
アマコール CAB	乳糖	リンゴ酸システイン
アルファカルシトール	ハイドロキシアパタイト	リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム
イソステアリン酸	ハードファット	リン酸ベタメタゾン及びその塩類
ウルソデオキシコール酸	パナセート 810	リン酸リボフラビンナトリウム
ウルソデスオキシコール酸	パルミチン酸イソプロピル	レシチン
エタノール・無水エタノール	パルミチン酸セチル	塩酸 L-エチルシステイン
エピデヒドロコレステリン	ヒオデオキシコール酸メチル	塩酸 L-メチルシステイン
オレイルアルコール	ビタミン A+D2 末	還元ラノリン
オレイン酸	ビタミン B12	吉草酸ベタメタゾン
オレイン酸デシル	ビタミン D	吉草酸酢酸プレドニゾロン
カプリル酸、カプリン酸	ビタミン D2	脂肪酸(牛脂由来)
ガラクトース	ビタミン D3	自己乳化型モノステアリン酸グリセリン
カルシトリオール	ヒドロキシステアリン酸コレステリル	親油型モノステアリン酸グリセリン
牛脂	ヒドロコルチゾン	酢酸コナドレリン
牛脂硬化油	ファルネシル酸プレドニゾロン	酢酸テキサメタゾン
グリセリルトリアセチン	フェニルエチルアルコール変性アルコール 95vol%	酢酸パラメタゾン
グリセリン	フランカルボン酸モメタゾン	酢酸ヒドロコルチゾン
グリセリンオレイン酸エステル	フルオシノニド	酢酸ブセリン
グリセリン脂肪酸エステル	フルオシノロンアセトニド	酢酸プレドニゾロン
ケノデオキシコール酸	プレドニゾロン	水素添加卵黄レシチン
ケノ酸	プロチレリン	精製卵黄レシチン

ゲラニオール変性アルコール 95vol%	ベタメタゾン	中鎖脂肪酸トリグリセリド
コール酸	ペンタオレイン酸デカグリセリル	乳酸カルシウム
コハク化ゼラチン	ペンタステアリン酸デカグリセリン	卵黄レシチン

注) 上記のリストに掲載されているものと同等の成分（例えば、アルキル基の異なるエステル、側鎖の長さ等が異なるのみの脂肪酸、界面活性剤、重合度が異なる脂肪酸エステル等）については、客観的に上記のリストに掲載されているものと同様とみなすことができる。

別添 3 製造販売承認申請書の記載例

1 ウシ等由来原料について

(成分名○○○)は、(ウシ等の動物名)(原産国)の(使用部位△△△)に由来する。製造方法は別紙規格○○(又は公定書規格)によるほか、健康な動物に由来する原料を使用し、BSE に感染している動物由来の原料及び生物由来原料基準反芻動物由来原料基準に定める使用してはならない部位が製造工程中で混入しないよう、採取した△△△を原料として製する。(なお、本原料については、同基準の第4項の規定に基づき、平成13年10月2日付け医薬発第1069号医薬局長通知の記の2の(1)の②の条件に適合するものである。)

(成分名○○○)は、(ウシ等の動物名)の(使用部位△△△)に由来し、BSE に感染している動物由来の原料及び生物由来原料基準反芻動物由来原料基準に定める使用してはならない部位が製造工程中で混入しないよう管理された低リスク原料等に該当するものである。

2 ヒト動物等由来原料について

(成分名○○○)は、ヒト(動物の場合は動物名)の(使用部位)に由来する。当該成分は、原材料を提供するヒト(動物の場合は動物名)に対してドナースクリーニング(実施した検査項目、検査方法を記載)を実施して適格性が確認されており、○○○○の方法により病原体の不活化/除去処理を行ったものである。

(成分名○○○)は、ヒト(動物の場合は動物名)の(使用部位)に由来する。当該成分は、健康なヒト(又は動物)に由来し、○○○(原材料又は工程の別を記載)に対して検査(実施した検査項目、検査方法を記載)を行い、○○○○の方法により病原体の不活化/除去処理を行ったものである。

3 血液製剤等について

(成分名○○○)は、(採血国)で採血された血液に由来する。次に掲げる採血国及び採血所で採血された血液は、平成15年5月15日付け医薬発第0515020号医薬局長通知に示す献血の定義に該当するものである。(可能性のある採血国及び採血所名を列記する。)

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

ウシ等由来原料の基準に関する研究
研究分担者 飛梅 実 国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究要旨

国際獣疫事務局 (OIE) により日本を含む複数国が BSE に対して「無視できるリスク国」に認定された。この結果を踏まえ、本研究では海外におけるウシ等由来原料に係る規制状況、国内の研究者等の国内規制に対する意見等について調査を行うとともに、医薬品等に用いる原料の基準について、改めてリスク評価を行い、**原料基準のあり方の検討に資するため整理・検討する**。同時に、原材料への他組織の混入を評価できる系の構築をめざし、生物由来原料を用いる最終製品の安全性確保に資する研究を行う。

A. 研究目的

1 : BSE 罹患牛の発生頻度は減少傾向にある。また近年、国際獣疫事務局(OIE)において、日本、米国を含む複数国が新たに「無視できるリスク国」に指定された。これらを踏まえ、医薬品等に用いる原料の基準について、改めてリスク評価を行い、**原料基準のあり方の検討に資するため整理・検討する**。

2 : 従来知られている定型 BSE (c-BSE) に加え、非定型 BSE に分類される L-BSE や H-BSE が本邦をはじめとした国々より報告されている。C-BSE は vCJD としてヒトへの伝播が確認されているが非定型 BSE についてはヒトへの感染例の報告は無い。しかし、L-BSE 由来プリオンは感染実験においてサルへの伝達性が確認されており、ヒトへの伝播が懸念される。これらのことから、非定型 BSE 由来プリオンのヒトへの伝達性並びにヒトプリオン病との鑑別法の開発は急務である。

B. 研究方法

1 : 2007 年、CVO/EU 議会の勧告に伴い欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority : EFSA) による地理的 BSE リスク評価 (GBR) から国際獣疫事務局 (World Organisation for Animal Health : OIE) でのリスク評価基準へ移行した。これに伴い、従来の GBR 評価では原産国として認定されていたが、OIE 基準での認証を受けていない国の存在が明らかとなった。これらの国に対する本邦での規制の在り方に

ついて、GBR 評価と OIE 基準の評価項目の精査ならびにリスク上昇の有無について精査した。

2 : C-BSE のサルへの感染実験ではヒト非定型クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease : CJD) (vCJD) と同様の臨床症状を示し、その中枢神経系の組織病理像はプラーク型のプリオン沈着を有する特徴的な像を呈した。L-BSE のヒトへの感染例は確認されていないが、サルへの伝播は確認されている。C-BSE、L-BSE 感染サル脳組織標本およびヒトプリオン病脳組織標本を用いて免疫組織化学的に感染プリオン種を鑑別可能か否かについて検討した。また、ヒトへの非定型 BSE 由来プリオンの感染性について不明なことから、プリオン感受性ヒト細胞を用いた *in vitro* 検出系作出について検討した。

(倫理面への配慮)

報告事項なし

C. 研究結果

1 : 従来欧州で用いられてきた GBR 評価は対象国より提供されたデータを基に、ほとんど可能性の無いカテゴリー I から高いレベルで確認されているレベル IV までの 4 段階に分類している。一方、OIE におけるリスク評価では、無視できる BSE リスク、管理された BSE リスクおよび不明な BSE リスクの 3 段階に分類されている。GBR 評価と OIE 基準の調査

項目に大きな乖離は無く、移行による精度変動は無いものと思われる。また、GBR 評価では、カテゴリーⅢに分類された国での BSE 発症例、アクティブサーベイランスでの BSE 症例が報告されており GBR 評価手法の妥当性が確認されている。このことから、OIE 基準により BSE リスク不明となった国々においても、GBR 評価等を参考に規定された平成 15 年 5 月 20 日厚生労働省告示第 210 号・生物由来原料基準において原材料原産国として認められていた国に関しても無視できるリスクに留まると推定される。

非定型 BSE は頻度は低いものの症例の報告がなされており、本邦においても L-BSE 例が報告されている。発生が最も多くみられているフランスでも、30 か月齢以上の牛 100 万頭当たり、H-BSE は、0.41 頭、L-BSE は 0.35 頭と非常にまれである。また、発症例は日本の 23 か月齢のウシを除き 6.3 歳から 18 歳と高齢のウシで報告されており、従来の定型 BSE に対する規制により非定型 BSE のリスクも無視できるレベルまで低減できると考えられる。

2: c-BSE 由来プリオンを原因とするヒト非定型 CJD では、患者脳組織でのプリオン沈着はブラーク型を主とする特徴的な所見を示す。サルへの C-BSE 感染実験においても同様の所見を呈し、サルはヒト感染性プリオン病の動物モデルとして有用なことが示されている。L-BSE 由来プリオンのヒトへの伝播は確認されていないが、サルへの感染性を示すことから、ヒトへの感染の可能性が示唆されている。L-BSE 感染サル脳組織を病理学的に検索した結果、C-BSE 感染サルや vCJD 患者とは異なり、プリオンはシナプスタイプのパターンを示し空胞変性が高度であった。これは、およそ 100 万人に一人程度の発症が認められる孤発性 CJD の組織像と類似しており、臨床症状も似ていた^{図 1-a)}。免疫組織化学的手法を用いた L-BSE 特異的な染色法は見いだせなかったが、染色前処理に NaOH および PK を用いることでシグナルの向上が図れることを明らかにした^{図 1-b)}。

また、L-BSE 由来プリオンのヒトへの感染性および宿主側プリオン蛋白質遺伝子多形の感染性への影響を検討するため、プリオン感受性ヒト細胞株からプリオン蛋白質遺伝子欠損株の作成を試みた。CRISPR/Cas9 の系および細胞の限界希釈法を用いプリオン蛋白質遺伝子欠損株を樹立した。この細胞株に再度プリオン遺伝子発現プラスミドを導入し、

細胞表面へのプリオン蛋白質発現を確認できた^{図 2}。今後、プリオン蛋白質遺伝子欠損株に各種遺伝子多形を有した発現プラスミド導入により、L-BSE 由来プリオンのヒト細胞への感染性並びに遺伝子多形の影響について検討する。

D. 考察および結論

1: OIE による BSE リスク認証の妥当性を確認した。現時点では、WTO の SPS 協定のリファレンスとされる OIE 基準が、国際的なスタンダードとして受け入れられており、本邦における規制に関しても新たなリファレンスのもとで再検討されるべきと考える。また、最新のプリオン研究により得られた知見等を加味し、ウシ等由来原料の基準に対する提言をまとめた。

2: L-BSE 由来プリオン感染サルおよびヒト孤発性 CJD 患者脳組織の病理学的特徴に差異は無かった。このことは、ヒトへ L-BSE 由来プリオンが侵入した場合、鑑別が非常に困難なことを示している。本研究では免疫組織化学的手法を用いた鑑別診断法の開発には至らなかったが、前処理法、使用抗体の選別を進め、鑑別診断法の確立を目指す。同時に、プリオン感受性ヒト細胞株を用い、非定型 BSE 由来プリオンのヒト細胞への感受性を確認していく。

E. 健康危険情報

報告事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T. Ultrasensitive detection of PrP(Sc) in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion. *J Gen Virol.* 2014 Nov;95(Pt 11):2576-88

2) Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S. Proteolysis of abnormal prion protein with a thermally stable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 Mar;98(5):2113-20

2. 学会発表
報告事項なし

2. 実用新案
報告事項なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
報告事項なし

図1-a

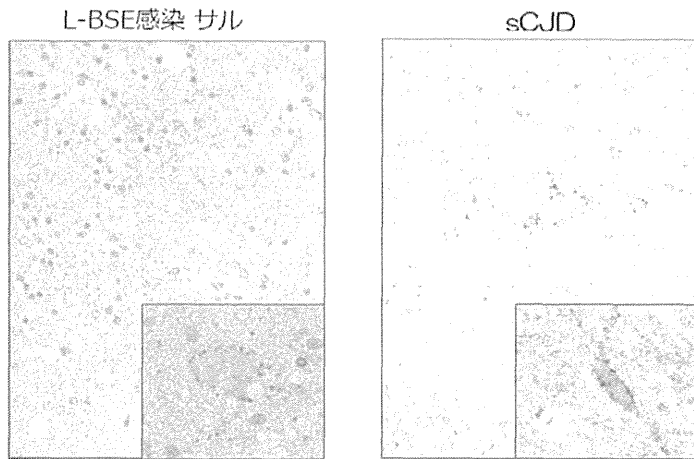


図1-b

前処理法の改良による染色性の向上

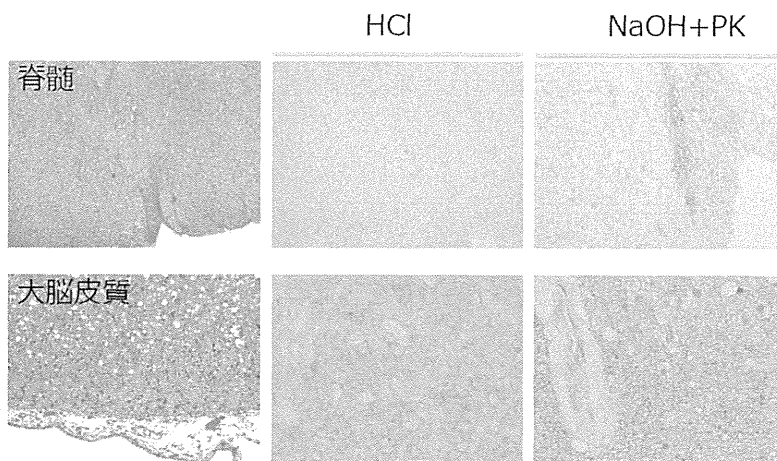
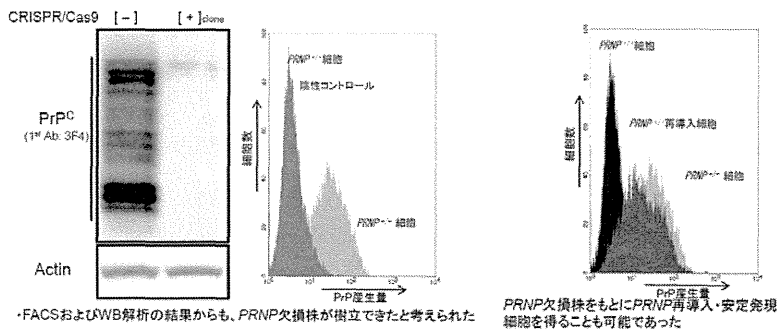
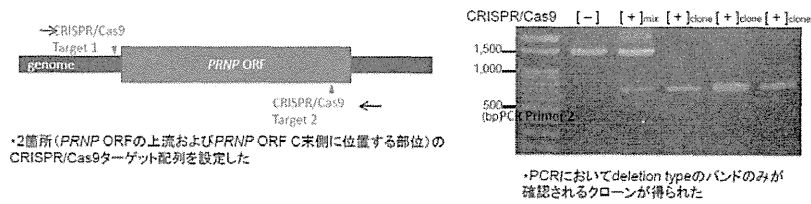


図 2



班會議資料

細胞・組織加工製品の ウイルス安全評価に関する研究

国立衛研
遊佐敬介

フィーダー細胞に関する指針等

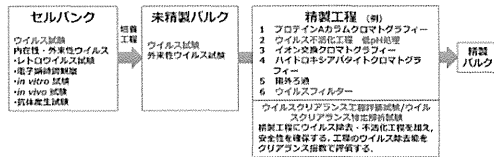
「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞原料の由来、調製及び特性解析」平成12年7月14日付け医薬審第873号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知

「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」平成14年7月9日付け医政研発第0709001号厚生労働省医政局研究開発課課長通知

「『異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針』に基づき3T3J2株及び3T3NIH株をフィーダー細胞として利用する上流系の再生医療への指針」平成16年7月2日付け医政研発第0702001号厚生労働省医政局研究開発課課長通知

製造工程で要求されるウイルス試験の比較

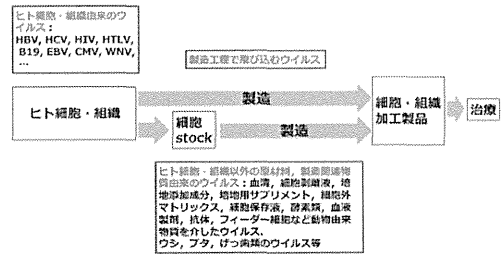
(1) バイオ医薬品製造におけるウイルス試験



(2) 細胞・組織加工製品製造におけるウイルス安全性の確保



細胞・組織加工製品のウイルス安全性 全体の流れ



ヒト幹細胞5指針のウイルス安全性に関する記述

	ドナーの選択基準・選別性	バンク化がなされない場合	発症血清, 同種血清	フィーダー細胞
ヒト(含む)骨髄幹細胞加工製品	HBV, HCV, HIV, HTLVに感染すること			
		検出可能なウイルスは非感染性、検出不能ウイルスは感染性を示さない	禁止	禁止
ヒトES細胞加工製品	禁止	禁止	禁止	禁止

ウイルス安全性確保のためにウイルス検出システムの選択肢を増やしておく必要があるのではないか？

細胞(細胞ストック, フィーダー細胞, 中間製品, 最終製品等)のウイルス感染の有無を調べる必要がある場合、製造スケールが小さく、且つ短時間、高感度にウイルスを検出する必要が出てくる。バイオ医薬品を想定したICH Q5A等にある方法は必ずしも最適とはいえない。



多数のウイルスを短時間で、高感度、簡便に検出するシステムの構築

ウイルス安全性確保のために新規ウイルス検出システムの選択肢として以下の2つの方法を検討している

1. NGSを用いて、細胞（細胞ストック、フィーダー細胞、中間製品、最終製品等）のウイルス感染の有無を高感度、網羅的、短時間に検出できるシステム
2. 多種の動物由来ウイルス感染を短時間で、高感度、簡便に検出する多検体用qPCRシステム

NSGを使ったウイルス検出法で予想される問題点
 <HEK293細胞を使った解析>

非感染 HEK293細胞
 RNA-seq データ

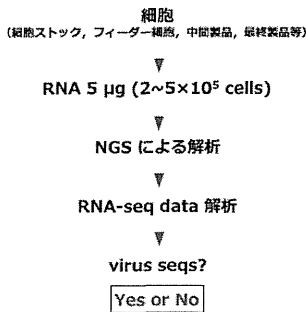
- host seqs
 - unmapped seqs
 - virus-like seqs
- virus-like seqs (host seqs)
 ERV-associated seqs

ウイルス感染 HEK293細胞
 RNA-seq データ

- host seqs
 - unmapped seqs
 - virus-like seqs
- virus-like seqs (host seqs)
 ERV-associated seqs
 virus seqs

- RNA-seqデータからバックグラウンドとなるvirus-like seqsを差し引けるか?
- 内在性レトロウイルス由来のseqsと外来性レトロウイルスを区別できるか?
- 感染ウイルスをどんな感度で検出できるか?

次世代シーケンサー(NGS)を使った
 ウイルス検出法



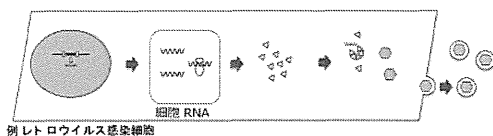
RNA-seq data using Illumina HiSeq 2500

Samples	No. of reads	length/read (nt)	Bases (%>=30)
HEK293	23M	194	2.310G (88.47)
HEK293 + FCV 12 h	33M	195	3.316G (88.72)
HEK293 + FCV 24 h	31M	194	30.96G (88.35)

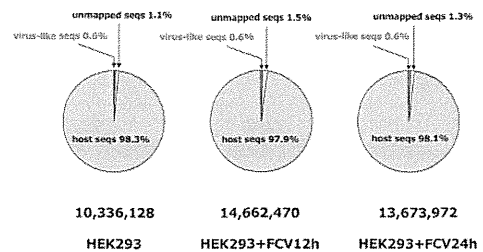
細胞RNAをstarting materialsとして
 ウイルス感染の有無を検出する

- DNAウイルス, RNAウイルスの両者を検出法する。細胞RNAの中に含まれるウイルスシーケンスを検出できる。
- その限界（検出感度）と検出できるウイルス範囲を明確に示せるか、安全性を確保できるだけのシステムを構築できるか。

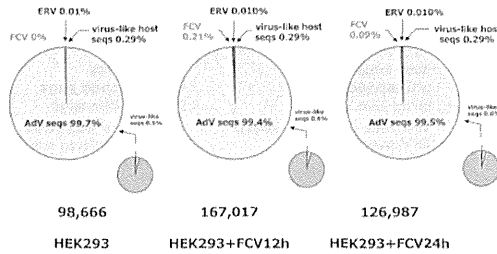
原材料となる細胞 (iPS 細胞ストック) フィーダー細胞 ⇒ ウイルス RNA ⇒ ウイルス タンパク質 ⇒ アッセンブリ ⇒ 出芽 & 放出



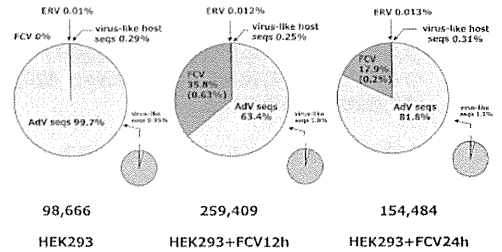
HEK293細胞 RNA-seq に含まれるウイルス様
 シーケンス



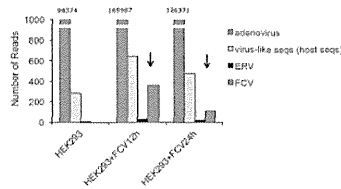
HEK293細胞 RNA-seq に含まれる ウイルス様シーケンスの内訳 (1)



拡張ウイルスデータベースを使ったウイルス様 シーケンスの内訳 (3)



HEK293細胞 RNA-seq に含まれる ウイルス様シーケンスの内訳 (2)



(1) HEK293細胞のRNA-seq dataが AdV seqsを含む理由

HEK293 cells: Although an earlier report suggested that the cells contained Adenovirus 5 DNA from both the right and left ends of the viral genome [832264], it is now clear that only left and sequences are present. The Ad5 insert was cloned and sequenced, and it was determined that a cellular segment from 114,116-63,846 is integrated into chromosome 19 (19q13.2).

(2) なぜ FCV の検出感度が低いのか
全RNA-seq data の 0.054-0.13%

NGSを用いて細胞のウイルス感染を 検出するための pipeline

NGS raw data fro RNA-seq

- trimmomatic-0.2.32
- mapping, star (or bowtie, bowtie2, tophat2) with hg38
- mapping, star with viral.1.1
- counting seq frequency, samtools

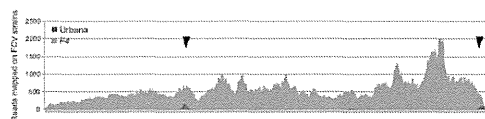
virus-like seqs

- identification of back ground seqs
- mapping of short reads on virus genome
- confirmation with extended virus database
- de novo assembly

virus seqs

Q. なぜウイルスの検出感度が低いのか

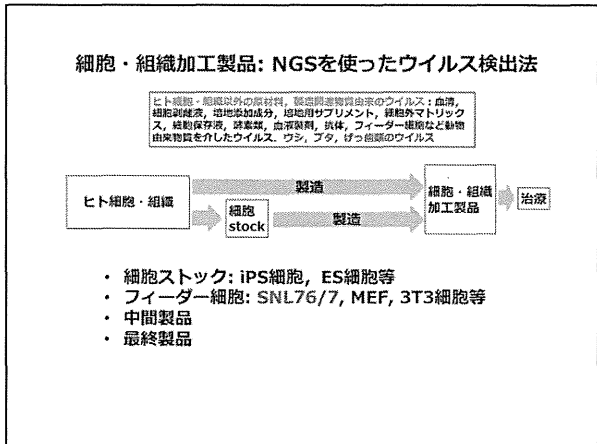
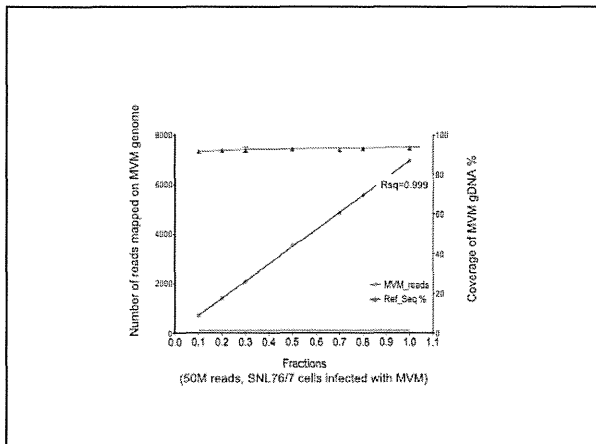
RNAウイルスは多様なシーケンスバリエーションから構成されているので
検出に使うウイルスデータベースによって検出感度が変わる



バーできるようにした

NSGを使ったウイルス検出法に関して考慮すべきこと

- NSG によるシーケンシングのsizeとquality
- 適切なデータ解析プログラムの選択
- ウイルスゲノムデータベースの拡張 (NCBI, ...)
- 宿主細胞 RNA-seq に含まれるウイルス様配列 (tandem repeat, poly (A)などウイルス由来と判定される配列をいかに除くか)
- 内在性レトロウイルス由来 seqs を外来性レトロウイルスと区別できるか
- 解析にかかる時間とコスト
- 検出感度, 検出限界, 他の検出法との比較



Analysis of RNA-seq to detect infected viurs seqs

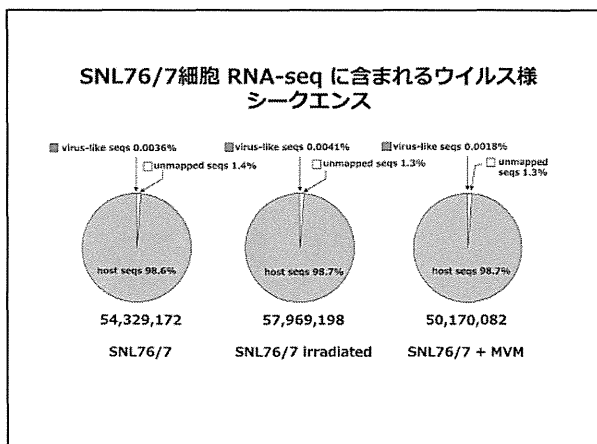
	Number of virus reads	Time for analysis
bowtie1	472	8 min
bowtie2	6819	10 min
Bwa	6928	15 min
tophat2	6636	66 h
star	6952	3 min

SNL76/7細胞の RNA-seq data (Illumina HiSeq 2500)

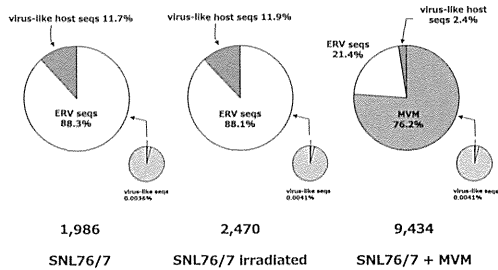
	Number of reads	length/read (nt)	Bases (%>=30)
SNL76/7	54M	125	6.791G (93.6/90.2)
SNL76/7 Irradiated	58M	125	7.246G (93.6/90.5)
SNL76/7 + MVM	50M	125	6.271G (93.7/90.9)

NGSを使ったウイルス検出法のコストと検出時間について (例: HiSeq 2500, Illumina)

試薬・解析	価格	1サンプル	時間
RNA 精製 (RNeasy plus universal mini kit)	44,500円 (50 sample/箱)	890円	2 時間
読取頭端用キット (TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 - Set A)	628,000円 (48 sample/箱)	1,3083円 (=628,000/48)	2 日 (サンプル調製)
フローセル (TruSeq SR Cluster Kit v3 - cBot - HS)	666,000円/ラン (RNA-seq, 20M reads: 約 8 サンプル/1ラン, 8 サンプル/8 x 8 = 7.2 サンプル/ラン)	9,250円 (=666,000/72)	3 日 (シーケンシング)
反応試薬 (TruSeq SBS Kit v3 - HS, 50 Cycle)	391,000円/ラン	5,430円 (=391,000/72)	
RNA-seq ウィルス検出データ解析		? 円	2 日
合計		(28,653 + a) 円	~ 1 週間



SNL76/7細胞 ウイルス様シーケンス内訳

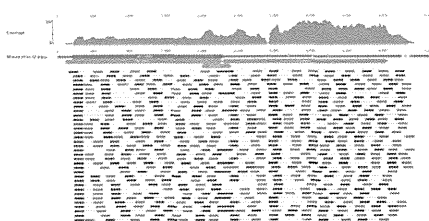


まとめ

細胞・加工製品のウイルス安全性を確保するために細胞ストック、フィーダー細胞、中間製品、最終製品等のウイルス感染の有無を高感度、網羅的に検出できる RNA-seq data 解析のための pipeline を作る事ができた。

検出限界と検出できるウイルスの範囲を向上させるためにはクリアすべき課題が残されている。

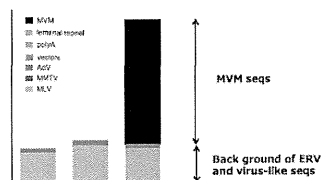
Mapping of Short Reads to MVM Genome



国立衛研
再生・細胞医療製品部 第4室
遊佐敬介
苑 宇哲

<研究協力>
熊本大学大学院 生命科学研究所 感染防御学分野
原田信志
前田洋助

SNL76/7細胞 RNA-seq から検出されたウイルス様シーケンスとMVM



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)
研究課題名: ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究
平成26年度研究班会議(平成27年1月14日)

細胞組織加工医薬品における ウイルス検出法に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部
橋井 則貴

ウイルス受容体分子と、それらを利用することが知られているウイルス1

Receptor	Viruses	Page
CD4 (T-cell surface glycoprotein CD4)	HIV	1
Transferrin receptor 1 (CD71)	Human herpesvirus 6 Human herpesvirus 7	1
Int-1 (CD64, integrin-like adhesion molecule 1)	Major group betacoronaviruses (229E, HKU-1, NL63, etc.)	1
MHC-I	Adenovirus type 5 (subgroup C)	1
MHC-II	Influenza A and B viruses	1
Alpha-5 beta-1 integrin receptor (alpha 5 beta 1, tumor necrosis factor receptor superfamily member 16)	Epstein-Barr virus	1
DAF (Decay-accelerating factor, CD55)	Group 1 coxsackieviruses (Coxsackievirus B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B11, B13, B15, B19, B21, B24, B25, B26, B28)	1
SGLT1 (Solute carrier family 1, Na/glucose cotransporter member 1, glucose transporter type 1, Na-dependent, high-affinity glucose transporter)	Poliovirus	1
NCAM-1 (Neural cell adhesion molecule 1, CD115, sialic acid-binding glycoprotein)	Poliovirus	1
Amphiphotic receptor (Mannose 6-phosphate receptor 1, CD203a, sialic acid-binding glycoprotein)	Poliovirus	1
Poliovirus receptor (PVR, HSP70, CD155)	Poliovirus	1
CD45 (membrane sialic acid protein, tyrosinophos- tyrosinase common antigen, TCR)	Poliovirus	1
ICAM-1 (Mucular cell adhesion protein 1, INCMAM-100, CD106)	Poliovirus	1
CD135 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1, TNFRSF1)	Poliovirus	1
CD137 (tumor necrosis factor receptor type 2, OX40, TNFRSF4)	Poliovirus	1
CD137L (tumor necrosis factor receptor type 1 ligand, HVEM, TNFRSF137)	Poliovirus	1
CD138 (interleukin-1 type 2 receptor, IL-2R, TNFRSF18)	Poliovirus	1
CD147 (extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMP2, TNFRSF25)	Poliovirus	1
CD161 (leukemia inhibitory factor receptor, VISTA, TNFRSF139)	Poliovirus	1
CD164 (sialic acid-binding glycoprotein 1, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD165 (sialic acid-binding glycoprotein 2, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD170 (sialic acid-binding glycoprotein 3, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD171 (sialic acid-binding glycoprotein 4, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD172 (sialic acid-binding glycoprotein 5, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD173 (sialic acid-binding glycoprotein 6, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD174 (sialic acid-binding glycoprotein 7, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD175 (sialic acid-binding glycoprotein 8, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD176 (sialic acid-binding glycoprotein 9, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD177 (sialic acid-binding glycoprotein 10, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD178 (sialic acid-binding glycoprotein 11, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD179 (sialic acid-binding glycoprotein 12, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD180 (sialic acid-binding glycoprotein 13, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD181 (sialic acid-binding glycoprotein 14, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD182 (sialic acid-binding glycoprotein 15, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD183 (sialic acid-binding glycoprotein 16, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD184 (sialic acid-binding glycoprotein 17, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD185 (sialic acid-binding glycoprotein 18, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD186 (sialic acid-binding glycoprotein 19, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD187 (sialic acid-binding glycoprotein 20, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD188 (sialic acid-binding glycoprotein 21, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD189 (sialic acid-binding glycoprotein 22, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD190 (sialic acid-binding glycoprotein 23, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD191 (sialic acid-binding glycoprotein 24, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD192 (sialic acid-binding glycoprotein 25, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD193 (sialic acid-binding glycoprotein 26, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD194 (sialic acid-binding glycoprotein 27, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD195 (sialic acid-binding glycoprotein 28, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD196 (sialic acid-binding glycoprotein 29, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD197 (sialic acid-binding glycoprotein 30, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD198 (sialic acid-binding glycoprotein 31, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD199 (sialic acid-binding glycoprotein 32, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD200 (sialic acid-binding glycoprotein 33, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD201 (sialic acid-binding glycoprotein 34, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD202 (sialic acid-binding glycoprotein 35, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD203 (sialic acid-binding glycoprotein 36, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD204 (sialic acid-binding glycoprotein 37, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD205 (sialic acid-binding glycoprotein 38, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD206 (sialic acid-binding glycoprotein 39, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD207 (sialic acid-binding glycoprotein 40, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD208 (sialic acid-binding glycoprotein 41, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD209 (sialic acid-binding glycoprotein 42, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD210 (sialic acid-binding glycoprotein 43, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD211 (sialic acid-binding glycoprotein 44, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD212 (sialic acid-binding glycoprotein 45, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD213 (sialic acid-binding glycoprotein 46, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD214 (sialic acid-binding glycoprotein 47, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD215 (sialic acid-binding glycoprotein 48, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD216 (sialic acid-binding glycoprotein 49, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD217 (sialic acid-binding glycoprotein 50, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD218 (sialic acid-binding glycoprotein 51, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD219 (sialic acid-binding glycoprotein 52, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD220 (sialic acid-binding glycoprotein 53, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD221 (sialic acid-binding glycoprotein 54, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD222 (sialic acid-binding glycoprotein 55, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD223 (sialic acid-binding glycoprotein 56, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD224 (sialic acid-binding glycoprotein 57, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD225 (sialic acid-binding glycoprotein 58, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD226 (sialic acid-binding glycoprotein 59, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD227 (sialic acid-binding glycoprotein 60, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD228 (sialic acid-binding glycoprotein 61, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD229 (sialic acid-binding glycoprotein 62, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD230 (sialic acid-binding glycoprotein 63, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD231 (sialic acid-binding glycoprotein 64, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD232 (sialic acid-binding glycoprotein 65, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD233 (sialic acid-binding glycoprotein 66, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD234 (sialic acid-binding glycoprotein 67, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD235 (sialic acid-binding glycoprotein 68, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD236 (sialic acid-binding glycoprotein 69, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD237 (sialic acid-binding glycoprotein 70, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD238 (sialic acid-binding glycoprotein 71, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD239 (sialic acid-binding glycoprotein 72, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD240 (sialic acid-binding glycoprotein 73, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD241 (sialic acid-binding glycoprotein 74, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD242 (sialic acid-binding glycoprotein 75, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD243 (sialic acid-binding glycoprotein 76, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD244 (sialic acid-binding glycoprotein 77, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD245 (sialic acid-binding glycoprotein 78, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD246 (sialic acid-binding glycoprotein 79, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD247 (sialic acid-binding glycoprotein 80, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD248 (sialic acid-binding glycoprotein 81, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD249 (sialic acid-binding glycoprotein 82, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD250 (sialic acid-binding glycoprotein 83, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD251 (sialic acid-binding glycoprotein 84, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD252 (sialic acid-binding glycoprotein 85, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD253 (sialic acid-binding glycoprotein 86, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD254 (sialic acid-binding glycoprotein 87, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD255 (sialic acid-binding glycoprotein 88, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD256 (sialic acid-binding glycoprotein 89, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD257 (sialic acid-binding glycoprotein 90, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD258 (sialic acid-binding glycoprotein 91, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD259 (sialic acid-binding glycoprotein 92, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD260 (sialic acid-binding glycoprotein 93, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD261 (sialic acid-binding glycoprotein 94, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD262 (sialic acid-binding glycoprotein 95, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD263 (sialic acid-binding glycoprotein 96, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD264 (sialic acid-binding glycoprotein 97, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD265 (sialic acid-binding glycoprotein 98, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD266 (sialic acid-binding glycoprotein 99, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD267 (sialic acid-binding glycoprotein 100, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1

研究背景

一細胞組織加工医薬品のウイルス安全性確保

- 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」
- 「ヒト(自己・同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及びのウイルス安全性の確保に関する指針」
- 「ヒト(自己・同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及びのウイルス安全性の確保に関する指針」
- 「ヒト(自己・同種)iPS(様)細胞加工医薬品の品質及びのウイルス安全性の確保に関する指針」

原材料、製造工程、及び最終製品の各段階における、適切なウイルス検査・試験の実施

適切なウイルス試験を設定するためには、その細胞の内在性ウイルスに加えて、どのような外来性ウイルスの混入があるか、あるいは感染リスクが高いかを把握することが重要

一ウイルス安全性評価に関する課題

- 専門のウイルス検査機関への委託
- どのようなウイルスを調査すべきかの基準や検出系が確立されていない。

コスト、試験期間を要する

高リスクの複数のウイルスに対する迅速且つ高感度な検出・評価手法の確立が重要

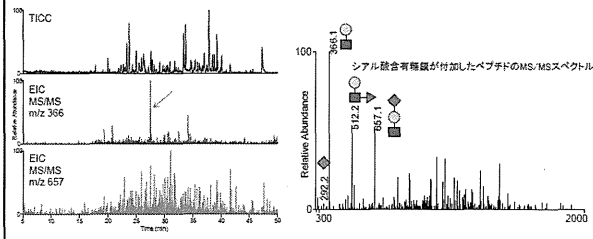
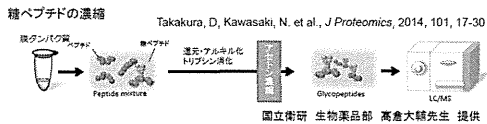
ウイルス受容体分子と、それらを利用することが知られているウイルス2

Receptor	Viruses	Page
CD44 (CD44 chemokine receptor type 4)	Human immunodeficiency virus 1 Feline immunodeficiency virus Adenovirus 5	15 1 1
DAR (dendritic arborization receptor)	Coxsackievirus A 9, B 1, F Adenovirus 5	1 1
ICP1 (interleukin-1 receptor type 1)	Influenza A virus Poliovirus	1 1
ICP2 (interleukin-1 receptor type 2)	Poliovirus	1
Pdcd1 (programmed cell death 1)	Herpesvirus thymus Herpesvirus murine leukemia virus Measles virus	1 1 10
STAM (stimulatory transmembrane domain receptor, STAM2)	Enterovirus 71	10
CD45 (membrane sialic acid protein, tyrosinophos- tyrosinase common antigen, TCR)	Distemper virus Oidiotypic virus Adenovirus 5 Echinovirus 11 Enterovirus 71 Herpes simplex virus 1 Herpes simplex virus 2	1 1 3 3 10 10
ICAM-1 (Mucular cell adhesion protein 1, INCMAM-100, CD106)	Poliovirus	1
CD135 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1, TNFRSF1)	Poliovirus	1
CD137 (tumor necrosis factor receptor type 2, OX40, TNFRSF4)	Poliovirus	1
CD137L (tumor necrosis factor receptor type 1 ligand, HVEM, TNFRSF137)	Poliovirus	1
CD138 (interleukin-1 type 2 receptor, IL-2R, TNFRSF18)	Poliovirus	1
CD147 (extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMP2, TNFRSF25)	Poliovirus	1
CD161 (leukemia inhibitory factor receptor, VISTA, TNFRSF139)	Poliovirus	1
CD164 (sialic acid-binding glycoprotein 1, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD165 (sialic acid-binding glycoprotein 2, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD170 (sialic acid-binding glycoprotein 3, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD171 (sialic acid-binding glycoprotein 4, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD172 (sialic acid-binding glycoprotein 5, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD173 (sialic acid-binding glycoprotein 6, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD174 (sialic acid-binding glycoprotein 7, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD175 (sialic acid-binding glycoprotein 8, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD176 (sialic acid-binding glycoprotein 9, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD177 (sialic acid-binding glycoprotein 10, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD178 (sialic acid-binding glycoprotein 11, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD179 (sialic acid-binding glycoprotein 12, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD180 (sialic acid-binding glycoprotein 13, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD181 (sialic acid-binding glycoprotein 14, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD182 (sialic acid-binding glycoprotein 15, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD183 (sialic acid-binding glycoprotein 16, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD184 (sialic acid-binding glycoprotein 17, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD185 (sialic acid-binding glycoprotein 18, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD186 (sialic acid-binding glycoprotein 19, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD187 (sialic acid-binding glycoprotein 20, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD188 (sialic acid-binding glycoprotein 21, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD189 (sialic acid-binding glycoprotein 22, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD190 (sialic acid-binding glycoprotein 23, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD191 (sialic acid-binding glycoprotein 24, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD192 (sialic acid-binding glycoprotein 25, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD193 (sialic acid-binding glycoprotein 26, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD194 (sialic acid-binding glycoprotein 27, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD195 (sialic acid-binding glycoprotein 28, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD196 (sialic acid-binding glycoprotein 29, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD197 (sialic acid-binding glycoprotein 30, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD198 (sialic acid-binding glycoprotein 31, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD199 (sialic acid-binding glycoprotein 32, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD200 (sialic acid-binding glycoprotein 33, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD201 (sialic acid-binding glycoprotein 34, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD202 (sialic acid-binding glycoprotein 35, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD203 (sialic acid-binding glycoprotein 36, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD204 (sialic acid-binding glycoprotein 37, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD205 (sialic acid-binding glycoprotein 38, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD206 (sialic acid-binding glycoprotein 39, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD207 (sialic acid-binding glycoprotein 40, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD208 (sialic acid-binding glycoprotein 41, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD209 (sialic acid-binding glycoprotein 42, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD210 (sialic acid-binding glycoprotein 43, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD211 (sialic acid-binding glycoprotein 44, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD212 (sialic acid-binding glycoprotein 45, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD213 (sialic acid-binding glycoprotein 46, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD214 (sialic acid-binding glycoprotein 47, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD215 (sialic acid-binding glycoprotein 48, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD216 (sialic acid-binding glycoprotein 49, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD217 (sialic acid-binding glycoprotein 50, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD218 (sialic acid-binding glycoprotein 51, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD219 (sialic acid-binding glycoprotein 52, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD220 (sialic acid-binding glycoprotein 53, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD221 (sialic acid-binding glycoprotein 54, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD222 (sialic acid-binding glycoprotein 55, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD223 (sialic acid-binding glycoprotein 56, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD224 (sialic acid-binding glycoprotein 57, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD225 (sialic acid-binding glycoprotein 58, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD226 (sialic acid-binding glycoprotein 59, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD227 (sialic acid-binding glycoprotein 60, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD228 (sialic acid-binding glycoprotein 61, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD229 (sialic acid-binding glycoprotein 62, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD230 (sialic acid-binding glycoprotein 63, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD231 (sialic acid-binding glycoprotein 64, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD232 (sialic acid-binding glycoprotein 65, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD233 (sialic acid-binding glycoprotein 66, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD234 (sialic acid-binding glycoprotein 67, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD235 (sialic acid-binding glycoprotein 68, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD236 (sialic acid-binding glycoprotein 69, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD237 (sialic acid-binding glycoprotein 70, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD238 (sialic acid-binding glycoprotein 71, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD239 (sialic acid-binding glycoprotein 72, SIGIRR, TNFRSF138)	Poliovirus	1
CD240 (

同定されたウイルス受容体関連タンパク質2

Accession	Description	Score	Category	# AA	Mass (kDa)	Charge	Hydrophobicity	LC/MS
P34922	Heat shock 70 kDa protein 4 (Ogishima zaprenin) OSHSZ4 (En1) (En1) (HUMAN)	234.39	#1.19	540	64.3			Japanese encephalitis virus
	Sequence	#PSM	Modifications	520	5207	Charge	Hydrophobicity	LC/MS
	Protein	1	0.0000	4.95	2	1693.02376	-0.42	
	IPV:PIV1/PIV2/PIV3/PIV4	1	0.0000	1.95	2	2050.22649	0.30	
	NS3:GSDME/VE/CDON/ADAM10	1	0.0000	2.75	1	1453.77917	2.81	
	En1	2	0.0000	5.13	8	1355.37552	0.50	
P03354	Integrin beta-1 (Ogishima zaprenin) SVA2 (ITB1_HUMAN)	4.92	2.51	798	86.4			Echovirus 1 and 8 Human herpesvirus 8
	Sequence	#PSM	Modifications	426	4267	Charge	Hydrophobicity	LC/MS
	Protein	1	0.0000	2.29	2	1026.57350	-5.70	
	IPV:PIV1/PIV2	1	0.0000	2.69	2	1362.52543	-1.19	
G0P244	Functional adhesion molecule 4 (Ogishima zaprenin) FAM4 (FAM4_HUMAN)	22.84	11.07	299	32.4			Racovirus Orthorhovevirus
	Sequence	#PSM	Modifications	425	4207	Charge	Hydrophobicity	LC/MS
	Protein	1	0.0000	3.09	3	1173.22330	-1.55	
	IPV:PIV1/PIV2/PIV3/PIV4	1	0.0000	2.75	2	1152.02716	-0.56	
	NS3:GSDME	1	0.0000	2.65	2	1193.22424	-1.97	
	VE	1	0.0000	2.17	2	1044.69337	-1.71	
	CDON	1	0.0000	1.87	2	1020.54442	-2.76	
	ADAM10	1	0.0000	1.96	2	1052.45033	-2.35	
Q14108	Lysosome membrane protein 2 (Ogishima zaprenin) LAMP2 (LAMP2_HUMAN)	0.00	6.32	478	54.3			Enterovirus 71
	Sequence	#PSM	Modifications	426	4267	Charge	Hydrophobicity	LC/MS
	Protein	1	0.0000	2.33	4	1366.87655	-2.15	
P19393	Nucleic acid-binding protein 2 (Ogishima zaprenin) NAB2 (NAB2_HUMAN)	14.79	6.72	719	78.4			RSV (respiratory syncytial virus)
	Sequence	#PSM	Modifications	426	4267	Charge	Hydrophobicity	LC/MS
	Protein	1	0.0000	4.33	2	1484.74242	0.50	
	CDON	1	0.0000	2.99	2	1612.69556	-1.39	
	VE	1	0.0000	2.51	3	1293.34792	0.83	
	ADAM10	1	0.0000	2.09	2	1044.69337	-2.56	
	PIV:PIV1/PIV2	1	0.0000	1.05	2	1448.70168	10.39	
P13146	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 (Ogishima zaprenin) SLC2A1 (SGLT1) (HUMAN)	11.24	6.15	491	54.0			Human T cell leukemia virus 1
	Sequence	#PSM	Modifications	426	4267	Charge	Hydrophobicity	LC/MS
	Protein	1	0.0000	1.82	2	1639.75773	1.50	
	PIV:PIV1/PIV2	1	0.0000	1.66	2	1442.64466	-1.52	
	VE	1	0.0000	1.62	3	1436.17740	-0.96	
	CDON/CDON/PIV:PIV1/PIV2	1	0.0000	1.94	2	1779.48105	-1.61	

シアル酸付加糖鎖の確認



まとめ

- ▶ ピオチン化とストレプトアビジンを利用した細胞表面タンパク質の濃縮を行うことで、効率良く細胞表面に分布するウイルス受容体を回収することができた。
- ▶ IPSのレセプターチーム解析を行った結果、11種類のタンパク質が同定された。また、シアル酸付加糖鎖の存在が確認された。
- ▶ 本研究で使用したIPS細胞は、以下に示すウイルスに対する感受性が高い可能性が示唆された。

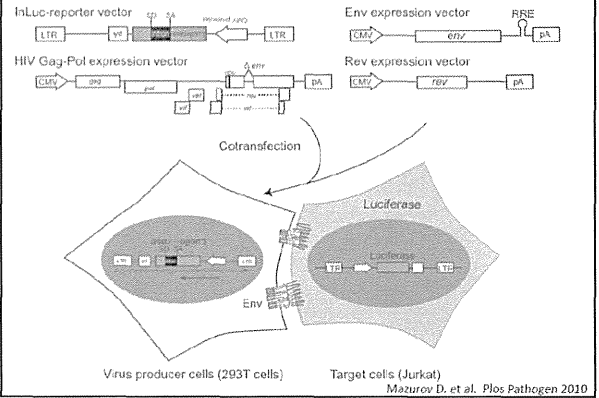
ウイルス受容体タンパク質	ウイルス
40S ribosomal protein S4	Sindbis virus
CD81 antigen	HCV
Claudin-6	HCV
Coxsackievirus and adenovirus receptor	Adenovirus 2 Adenovirus subgroup A, C, D, E, F Coxsackievirus B1 to B6
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B Heat shock 70 kDa protein 4	Japanese encephalitis virus
Integrin beta-1	Echovirus 1 and 8 Human rotavirus Human herpesvirus 8
Functional adhesion molecule	Racovirus Orthorhovevirus
Lysosome membrane protein 2	Enterovirus 71
Nucleolin	RSV (respiratory syncytial virus)
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 (GLUT1)	Human T cell leukemia virus 1
Sialic acid	Adenovirus RhinovirusB7 Rotavirus Influenza A virus

赤字: 下記論文で報告されたウイルス (導入する可能性の低いウイルス) リストに含まれるウイルス
Kobayashi T, Yusa K, Kawasaki N. *Bulletin of National Institute of Health Sciences*, 2013;(131):7-15

レトロウイルス感染細胞の 感染リスク評価法の開発

熊本大学大学院生命科学研究部
前田洋助

HTLV-1 Envによるcell-cell 感染のアッセイ系

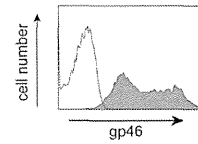


HTLV-1の感染リスクの評価系の確立

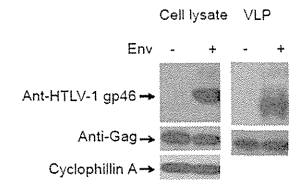
- 細胞組織加工製品やバイオ医薬品へのHTLV-1混入による感染の危険性がどの程度あるのかを明らかにする。
- HTLV-1の感染においてはその伝播様式別感染性の差異についての定量的解析が十分になされていない。
- HTLV-1の侵入に関与するEnvの伝播様式別感染性の評価法の開発
 - Cell-free 感染
 - Cell-cell 感染

HTLV-1 Envの細胞表面発現と レトロウイルス粒子内取り込み

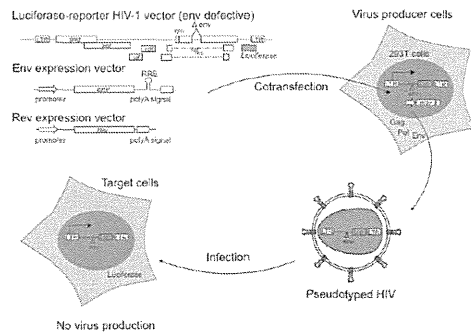
A. Flow cytometry



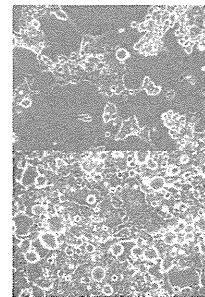
B. Western Blot



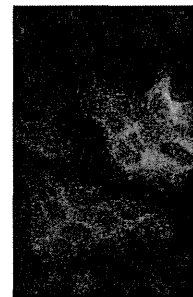
HTLV-1 Envによるcell-free感染のアッセイ系



HTLV-1 Envの膜融合能



293T cells

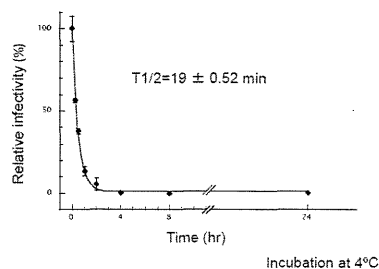


HeLa cells green: anti-gp46
Blue: DAPI

HTLV-1 Envの感染性および安定性の評価

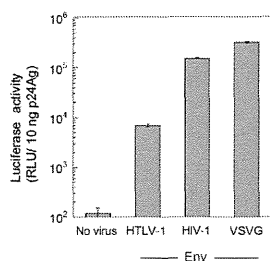
- HTLV-1 Envの感染性の評価
 - Cell-freeとcell-cell 感染の比較
 - HIV-1 Envの感染性との比較
- HTLV-1 Envのレトロウイルス粒子内安定性
 - 種々の温度処理による感染性の評価

Kinetics of HTLV-1 Env stability

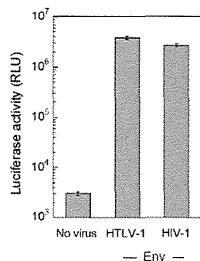


Infectivity of human retrovirus Envs

A. Cell-free infection



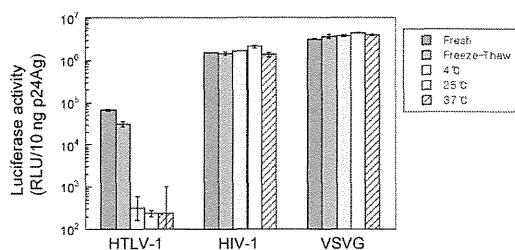
B. Cell-cell infection



まとめ

- HTLV-1 Envによるcell-cell およびcell-free 感染の定量的感染リスク評価法を確立した。
- レトロウイルス粒子内のHTLV-1 EnvはHIV-1 Envに比較して20倍以上感染性が低いことが判明した。
- レトロウイルス粒子内のHTLV-1 Envの感染性は温度に依存せず非常に不安定である。

Instability of HTLV-1 Env at any temperatures

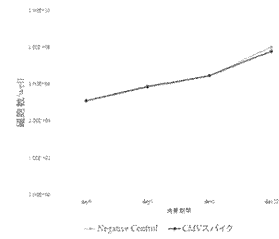


ウイルス安全性の基礎データ収集
(スパイク試験法の開発と実施)

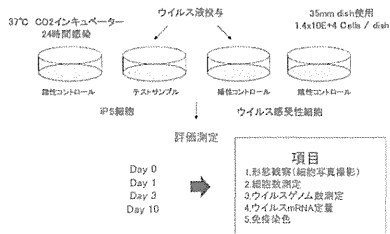
東京医科歯科大学 再生医療研究センター

清水 則夫

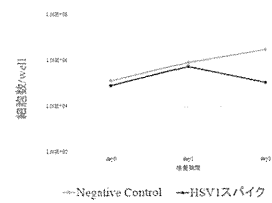
CMV感染 iPS 細胞の増殖



ウイルススパイク試験



HSV1感染 iPS 細胞の増殖



ウイルス液

	ウイルス株	感染価
CMV	Tenns株	7.0x1.0E+5 PFU / ml
HSV1	Strain F	7.8x1.0E+5 PFU / ml

ウイルス感受性細胞株

	細胞名	細胞株由来
CMV	IFL-1	正常二倍体線維芽細胞, ヒト胎児筋由来
HSV1	Vero	アフリカミドリザル 腎臓由来

iPS cells

CMV

