

Fig. 4-2 MSC にスパイクした *M.hyorhinis* の MycoTOOL PCR 検出に与える細胞数と Carrier DNA の影響

Table 4-4 MSC にスパイクしたマイコプラズマ参照株の MycoTOOL PCR による検出 (2×10^5 cells/mL, Carrier DNA+)

Strain	100cfu/ml	10cfu/ml	1cfu/ml
<i>A. laidlawii</i>	4/4*	4/4	0/4
<i>M. fermentans</i>	4/4	4/4	1/4
<i>M. hyorhinis</i>	4/4	4/4	2/4
<i>M. orale</i>	4/4	4/4	2/4
<i>M. pneumoniae</i>	4/4	4/4	4/4
<i>M. salivarium</i>	4/4	4/4	2/4
<i>M. arginini</i>	4/4	4/4	0/4

*: 検出数/試験数

Table 4-5 CHO 細胞にスパイクしたマイコプラズマ参照株の MycoTOOL PCR による検出 (5×10^6 cells/mL)

Strain	100cfu/ml	10cfu/ml	1cfu/ml
<i>A. laidlawii</i>	2/2*	6/6	0/6
<i>M. fermentans</i>	2/2	2/2	2/2
<i>M. hyorhinis</i>	2/2	6/6	0/6
<i>M. orale</i>	2/2	6/6	2/6
<i>M. pneumoniae</i>	2/2	6/6	2/6
<i>M. salivarium</i>	2/2	6/6	2/6
<i>M. arginini</i>	2/2	6/6	1/6

*: 検出数/試験数

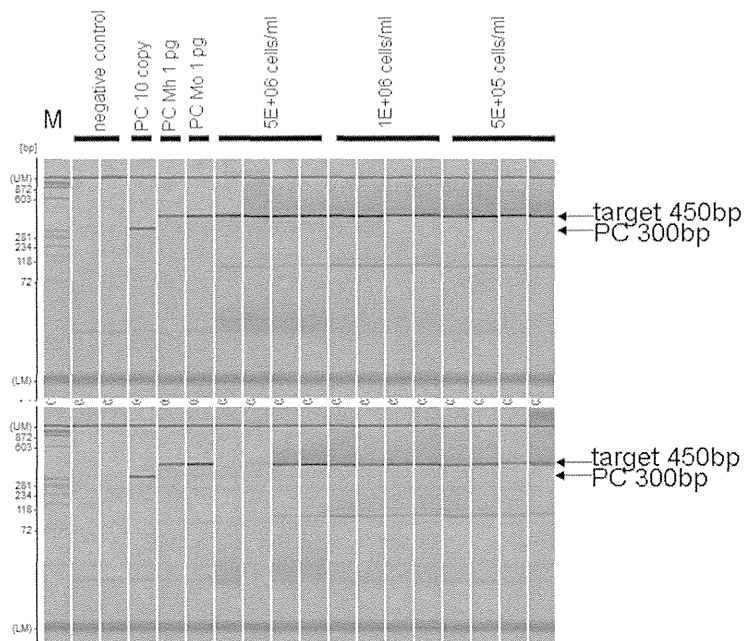


Fig. 4-3 Vero 細胞にスパイクした *M.hyorhinis* の MycoTOOL PCR による検出
上 : 100CFU/mL, 下 : 10CFU/mL

Table 4-6 細胞治療製品の総製品量と検体の採取量の考え方(BP)

総製品量	検体量
総量 ≥ 10 mL	総量の 1%
1 mL \leq 総量 < 10 mL	100 μ L
総量 < 1 mL	適用しない

Table 4-7 検体量 0.1mL でのマイコプラズマ検出の陽性頻度

菌 種	MycoSEQ	MycoTOOL PCR
<i>A. laidlawii</i>	1/4	4/4
<i>M. arginini</i>	1/4	1/4
<i>M. fermentans</i>	2/4	4/4
<i>M. hyorhinis</i>	0/4	1/4
<i>M. orale</i>	0/4	0/4
<i>M. pneumoniae</i>	2/4	4/4
<i>M. salivarium</i>	0/4	4/4

細胞懸濁液 : VERO 細胞, 5×10^6 cells

マイコプラズマ : 10CFU/mL; 検体量 : 0.1mL

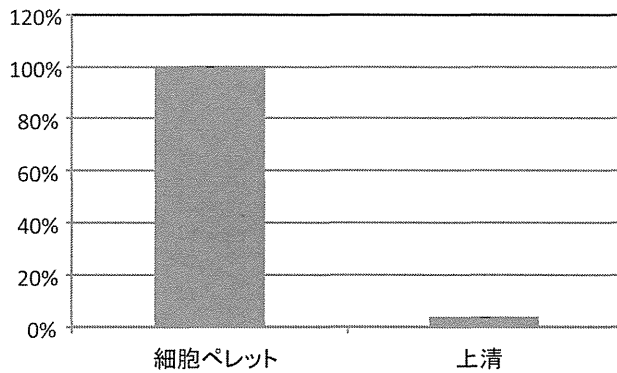


Fig. 4-4 マイコプラズマ汚染細胞での細胞と上清のマイコプラズマの比率
M. hyorhinis 感染 Vero 細胞の MycoTOOL real-time PCR による測定

Table 4-8 培養上清からのマイコプラズマの濃縮 (検出: MycoTOOL PCR)

処 理	10 CFU/ml	1 CFU/ml
未処理(細胞懸濁液) 1ml	4/4	1/4
未処理(培養上清) 1ml	9/12	4/12
上清 10 ml, 遠心 pellet	2/6	1/6
上清 50 ml, 遠心 pellet	6/6	1/6
上清 10 ml, 細胞添加, 遠心 pellet	6/6	0/6
上清 50 ml, 細胞添加, 遠心 pellet	6/6	5/6

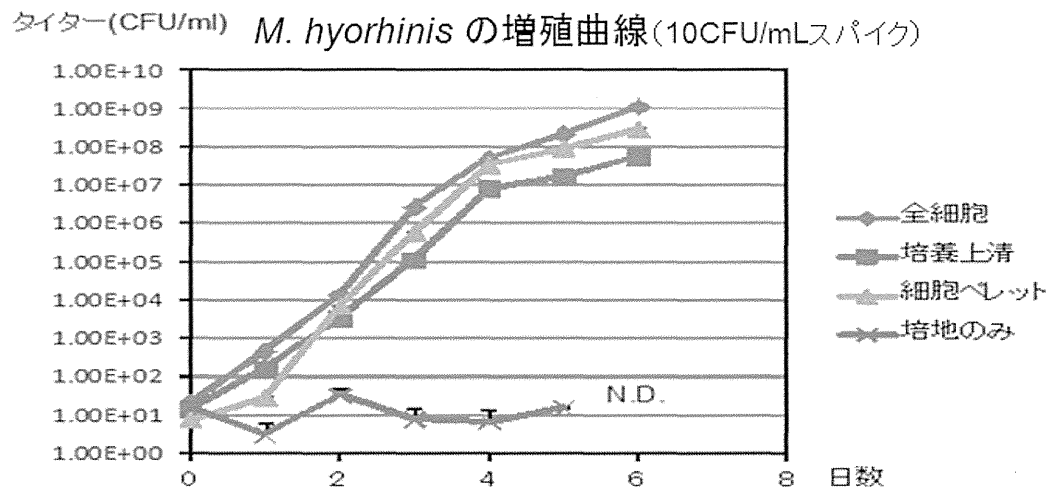
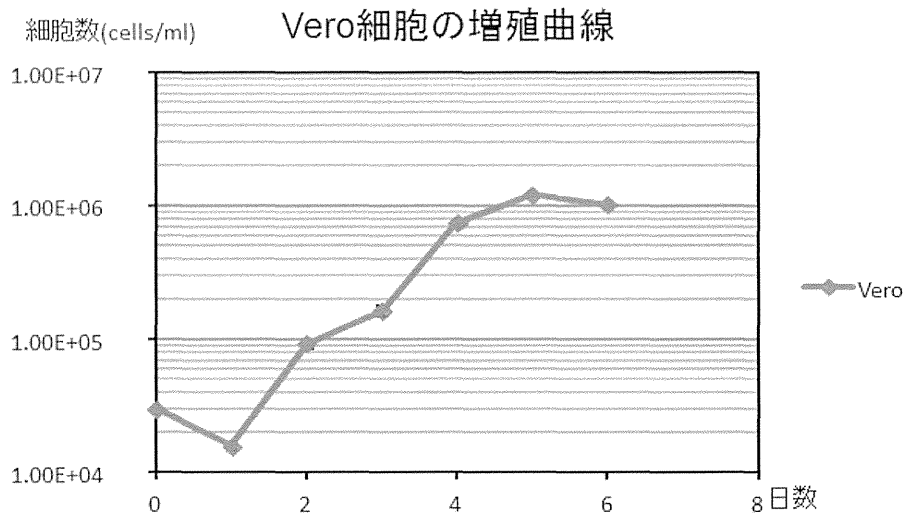


Fig. 4-5 Vero 細胞によるマイコプラズマの増幅 (検出: MycoTOOL real-time PCR)

Table 4-9. PCR 試験用菌株

No.	菌種	株
細菌		
1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	NBRC 100797
2	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	NBRC 102204
3	<i>Kocuria rhizophila</i>	NBRC 12708
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NBRC 12993
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NBRC 13275*
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	NBRC 13276*
7	<i>Proteus mirabilis</i>	NBRC 13300
8	<i>Clostridium sporogenes</i>	NBRC 14293*
9	<i>Bacillus subtilis</i>	NBRC 3134*
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NBRC 3512
11	<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3972
真菌		
12	<i>Candida albicans</i>	NBRC 1594*
13	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	NBRC 9455*

*日局 16 一般試験法 無菌試験法 表 4.06-1 収載菌株

Table 4-10. PCR 試験用プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌		
	10F ^{2)*}	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	525F ³⁾	5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTA-3'
	800F ^{2)*}	5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'
	800R ^{2)*}	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
	1500R ^{2)*}	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'
真菌		
	ITS5F ⁴⁾	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
	D2R ⁵⁾	5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACG-3'

*日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法 収載プライマー

Table 4-11. 新手法の一覧*

分類と名称	検出対象	原理・特徴	検出・測定装置
1) 直接検出法			
蛍光顕微鏡法	菌体	微生物をフィルター上に捕集し、蛍光染色後、蛍光顕微鏡下で検出・計数する。	蛍光顕微鏡
レーザーキャニングサイトメトリー	菌体	微生物をフィルター上に捕集し、蛍光染色後、レーザーでフィルター全面をスキャンし、シグナルを検出する。精度が高い。	レーザーキャニングサイトメーター
フローサイトメトリー	菌体	蛍光染色した微生物を浮遊状態にし、高速でフローセル内を流しながらシグナルを検出する。迅速な解析が可能。	フローサイトメーター
On-chipフローサイトメトリー	菌体	フローサイトメトリーはマイクロ流路を刻んだデバイス（マイクロ流路デバイス）上で行う。前処理や染色を1枚のデバイス上で行うことも可能。	蛍光検出器
蛍光ファージアッセイ	菌体	蛍光標識したファージを細菌に感染させ、特定属細菌を検出する。	蛍光顕微鏡等
2) 間接的測定法			
抗原検出法	抗原	微生物が持つ抗原に特異的な抗体を反応させ、発色反応や蛍光をもとに検出する。一部の微生物に対してキットが販売されている。	免疫クロマトグラフィ、マイクロプレートリーダー等

ファージアッセイ法	ファージの感染	検出対象とする細菌に特異的なファージを感染させ、溶菌により生じたプラークや菌体成分を検出する。	カンテン平板培地等
脂肪酸分析法	脂肪酸	微生物の種類によって脂肪酸組成が異なることを利用し、同定する。	ガスクロマトグラフィ等
フーリエ変換赤外分光法	菌体	菌体に赤外線を照射し、その赤外吸収スペクトルパターンから同定する。	フーリエ変換型赤外分光光度計
質量分析法	菌体成分	抽出した菌体成分の組成を質量分析により分析し、その組成から同定する。	質量分析計
核酸増殖法	核酸	対象とする微生物のDNAやRNAをPCR法、RT-PCR法やNASBA法、MAT法等で増幅し、検出する。定量的PCRを用いれば定量も可能である。	電気泳動装置、マイクロチップ電気泳動装置
フィンガープリント法	DNA	微生物から抽出したDNAを制限酵素で切断し、そのパターンをもとに同定する。	電気泳動装置、キャピラリー電気泳動装置、マイクロチップ電気泳動装置
マイクロコロニー法	増殖能	コロニー形成初期のマイクロコロニーを検出・計数する。	蛍光顕微鏡等
インピーダンス法	増殖能	微生物が増殖の際に培地成分を利用して産生する代謝産物の増加により生じる電気抵抗や電気伝導度の変化を検出する。	電気計測器
ガス測定法	増殖能	微生物の増殖に伴う二酸化炭素の産生や酸素の消費等のガス量の変化を検出する。	ガス測定器
生物発光法	ATP	微生物細胞内のATPを酵素反応による発光現象をもとに検出する。	発光測定器
マイクロカロリメトリー	熱	微生物が産生する微弱な熱を測定する。	マイクロカロリメーター

*表20.1 新手法の一覧を改変

Table 4-12. 日局16 参考情報に記載された迅速測定法の一覧

分類と名称	検出対象	原理・特徴	検出・測定装置
1) 直接検出法			
蛍光染色による細菌数の迅速測定法	菌体	死菌を含めた全細菌は核酸染色剤で、生菌はエステラーゼなどを指標とした活性でそれぞれ染色し、蛍光を検出して菌数を計数する。	蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置
マイコプラズマ否定試験* B. 指標細胞を用いたDNA染色法	菌体	指標細胞に付着した菌体を核酸染色剤で染色し、蛍光を検出して菌数を計数する。	蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置
2) 間接的測定法			
遺伝子解析による微生物の迅速同定法	核酸	細菌の16SrRNA遺伝子又は真菌の18S-5.8SrRNA遺伝子間のスペーサー領域 (ITS1) の塩基配列を解析し、データベースと照合して微生物を同定する。	DNA自動解析装置、DNA増幅装置
マイコプラズマ否定試験* C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法	核酸	16S-23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域等の塩基配列に特異的なプライマーを用いて酵素的に増幅し、増幅産物を種々の方法により検出する。	DNA増幅装置、アガロース電気泳動装置

*バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験

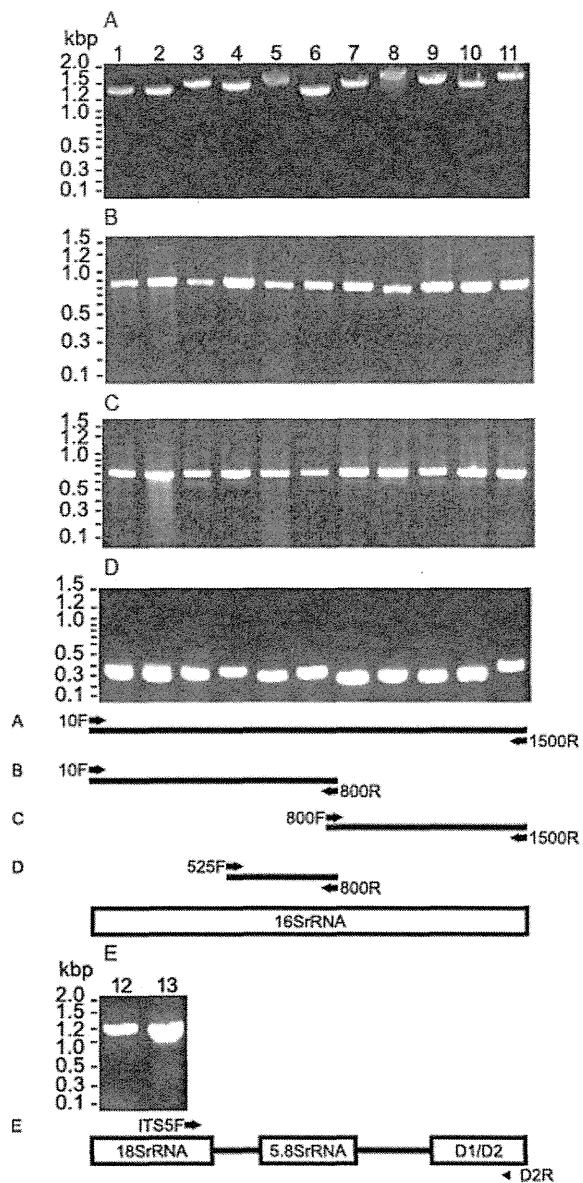


Fig. 4-6. PCR による細菌 16SrRNA 遺伝子と真菌 18SrRNA-D2 領域遺伝子の検出

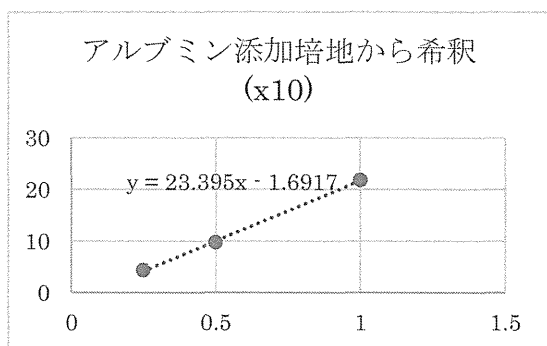
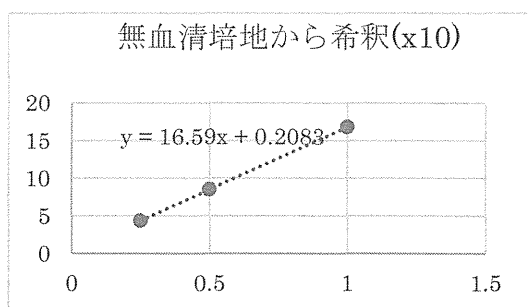
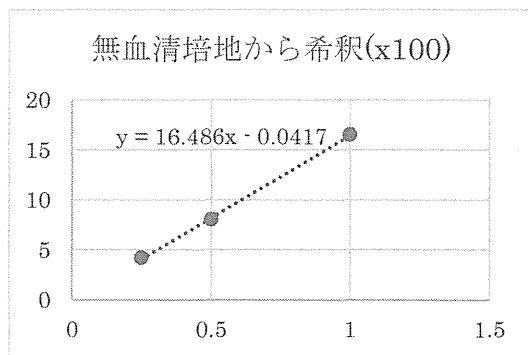
Table 1 の細菌又は真菌から鋳型 DNA を調製し、パネル A. 10F/1500R, B. 10F/800R, C. 800F/1500R, D. 525F/800R 又は E. ITS5F/D2R プライマーセットを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の生成を確認した。各レーンの番号は Table 1 の菌株番号を、パネル下部の模式図はプライマーが結合する位置の概略を示す。

表 4-13. 国内で市販されている主なエンドトキシン測定試薬

ゲル化法 (試験管法)	比濁法 (キネティック法)	比色法	
		エンドポイント法	キネティック法
パイロテル (0.06EU/mL, ca.130min)	パイロテル-T (試験管法/プレート法)	PYROCHROME (プレート法) エンドスペシ-ES-50M (プレート法) エンドスペシ-ES-50M (試験管法) トキシカラー-LS-50M (プレート法)	PYROCHROME (プレート法) エンドスペシ-ES-50M (プレート法) エンドスペシ-ES-50M (試験管法) トキシカラー-LS-50M (プレート法)

PYROGENT (0.06EU/mL, ca.130min)	PYROGENT-5000 (プレート法) (0.01 ~ 100EU)	QCL-1000 (試験管法/プレート法) (0.1 ~ 1EU)	Kinetic-QCL (プレート法) (0.005 ~ 50EU)
リムルス ES-II (0.015 EU/mL) PYROSTAR ES-F (0.03 EU/mL) リムルス HS-J/F J/F (0.03 EU/mL) リムルス HS-T リムルス HS-J/F, J (0.03 EU/mL)	リムルス ES-II (試験管法) (0.015EU/ml) PYROSTAR ES-F (試験管法) (0.03EU/ml) リムルス HS-T (試験管法) (0.015EU/ml) リムルス HS-J/F, J (試験管法) (0.03EU/ml) リムルス ES-III (試験管法) (0.015EU/ml)		リムルスカラー (試験管法/プレート法) Endchrome-K (試験管法/プレート法)

1. ここであげたプレート法は全て複数の検体を同時に測定するものであり、個別化医療製品のように患者一人ひとりの測定を行うには適していない
2. 試験管法は単一検体を測定することの出来る場合と複数検体を同時に測定する試薬キットに分類される



	1/100希釈	1/10希釈
無血清培地の希釈	62 ± 4	63 ± 13
アルブミン添加培地	69 ± 8	101 ± 47

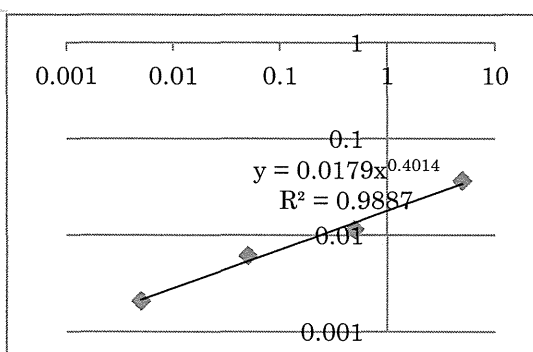
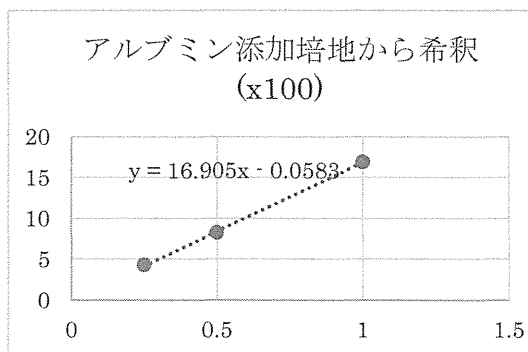
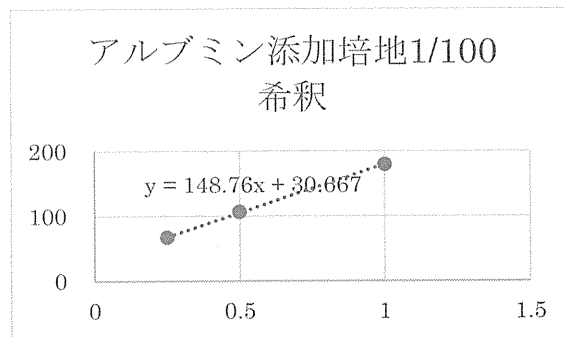
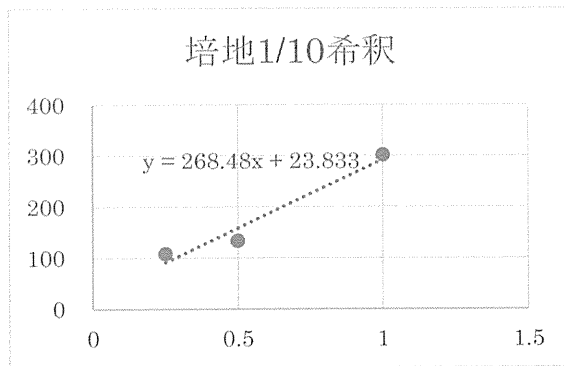
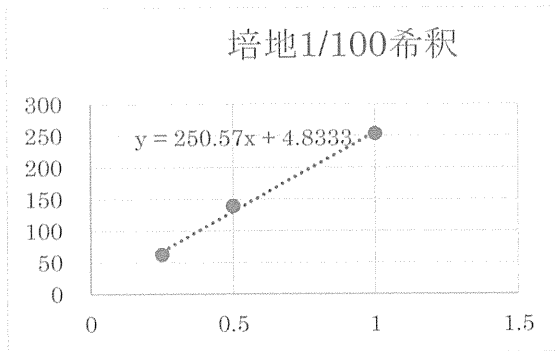


図 4-7. LAL Pyrochrome™ によるエンドトキシン測定



	1/100希釈	1/10希釈
無血清培地の希釈	39±10	31±7
アルブミン添加培地	53±24	31±21

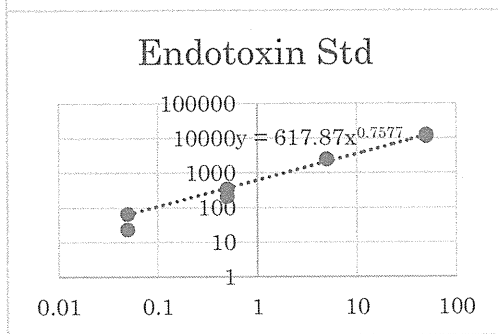
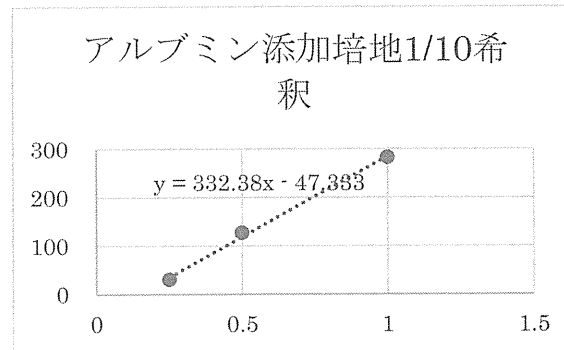
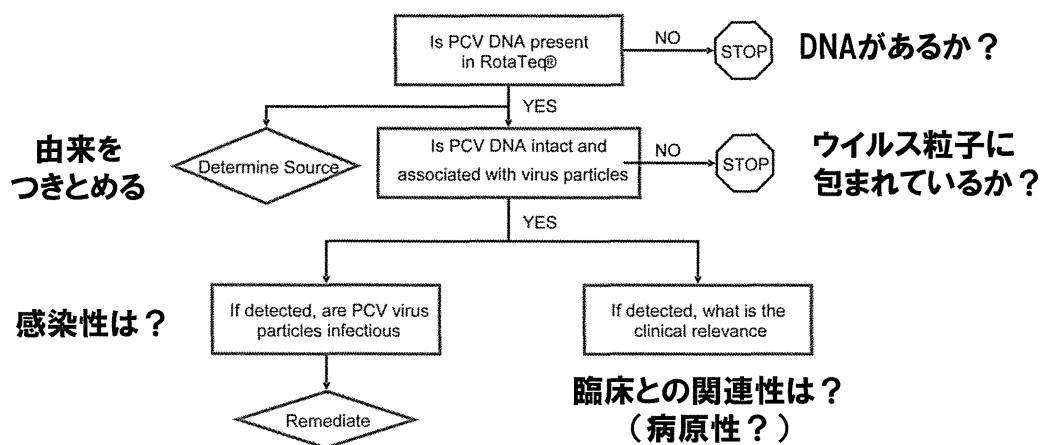


図 4-8. EndoLisa を用いたエンドトキシン測定
表 4-14 Endosafe を用いたエンドトキシン測定

無血清培地 1/100 希釈	無血清培地 1/10 希釈
51.2 EU/ml RT-CV 2.6% Spike 1.78EU/ml Recovery 123%	57.9 EU/ml RT-CV 2.6% Spike 2.11EU/ml Recovery 157%
無アルブミン添加培地 1/100 希釈	無アルブミン添加培地 1/10 希釈
<10.1 EU/ml RT-CV 0.5% Spike 2.04 EU/ml Recovery 151%	25.8 EU/ml RT-CV 0.9% Spike 1.6 EU/ml Recovery 120%



- ▶ qPCRでのPCV DNAフラグメントの検出
- ▶ ある程度の長さのフラグメントが検出された場合は、Porcine kidney (PK-15) cellを利用した*in vitro*感染性試験を実施

図 5-1 RotaTeq[®]における PCV 評価のディシジョンツリー

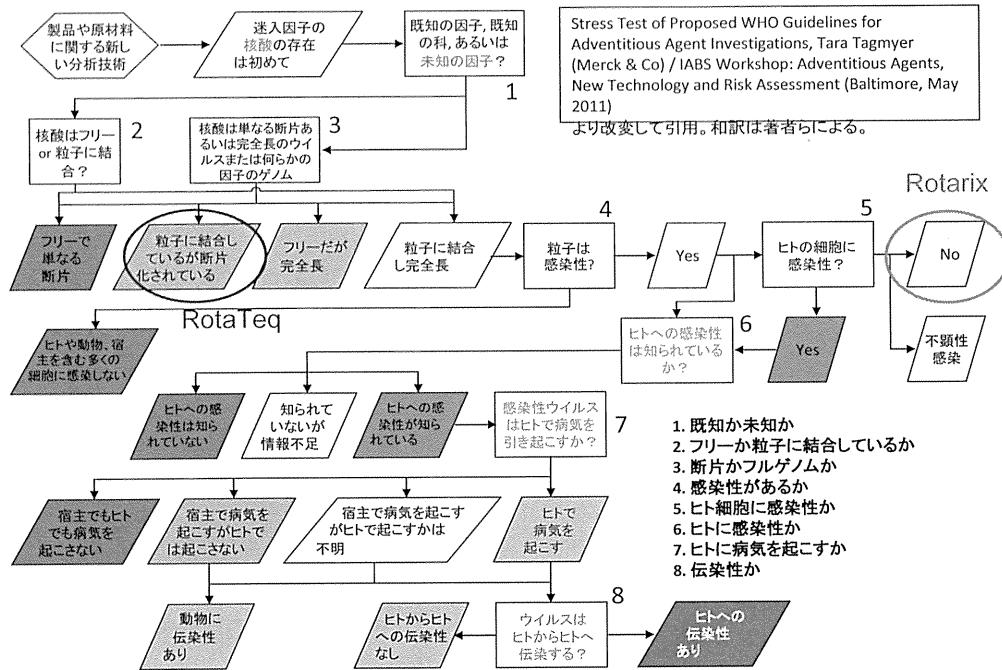


図 5-2 RotaTaq[®]および Rotarix[®]の PCV 迷入事例をディシジョンツリーに当てはめた場合のリスク評価

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業(医薬品等規制調和・評価研究事業))
分担総合研究報告書

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

研究要旨： 細胞組織加工製品のウイルス安全性の確保は、製品の安全性の重要な課題のひとつである。本研究では、細胞組織加工製品のウイルス安全性評価に関する検討を進めて来た。H24年度は、ウイルスが本来自然宿主でない細胞組織加工製品製造用細胞に感染した場合にウイルスの非宿主細胞への馴化が起きることが想定できることから、モデルとなるウイルス-非宿主細胞感染系を用いて、非宿主細胞への馴化過程を解析した。H25年度は、製品の製造過程でウイルス汚染が起きる可能性のうち、フィーダー細胞や生物由来原材料を介してウイルスが持ち込まれ、感染するケースを想定して iPS 細胞のウイルス感受性について調べた。また H26年度は、少量の検体を使って短時間、高感度に網羅的にウイルスを検出するシステムの開発を行った。ここでは次世代シーケンサーによる RNA-seq データを用いて細胞のウイルス感染の有無を判定するためのパイプラインを樹立した。この手法にさらに改良を行うことで、細胞組織加工製品の製造に用いられる細胞ストック (iPS, ES 細胞等)、フィーダー細胞、中間製品、最終製品の迅速で高感度なウイルス試験として実用化に結びつけることができると考えられる。

研究協力者

苑 宇哲 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

A. 研究目的

ドナーからの細胞組織や生物由来原料を使って製造される細胞組織加工製品のウイルス安全性をどのように確保するかは、製品の安全性における重要な課題の一つである。遺伝子組み換え技術を利用したバイオ医薬品が 1980 年代後半に実用化されて以来、最終製品のウイルス汚染は報告されていない。それは生物由来原料などからのウイルス汚染を防ぐ方策が厳格に採られてきたからである。バイオ医薬品製造におけるウイルス試験を概観してみると、製造用細胞についてはレトロウイルス試験、電子顕微鏡観察、in vitro 試験、in vivo 試験、未精製バルクのウイルス試験、精製工程でのウイルス不活化・除去工程、加えてウイルスクリアランス試験による工程評価等多岐にわたる (表 1)。一方、細胞組織加工製品では、原料となるヒト細胞組織についてのウイルス試験は、指針などに明記されているが、中間製品や最終製品などのウイルス管理をどうするかについての詳細は明示されていない。というのも細胞組織加工製品ではウイルス不活化・除去工

程を組み込むことは容易ではないため、製造に使われる生物由来の原材料を管理することによって、ウイルス安全性を確保していかざるを得ないからである。細胞組織加工製品には、ドナーの適格性、あるいは製造に携わる医療従事者や製造業者の安全のために原材料となる細胞組織のウイルス試験を行った後、以降の工程でどんなウイルス試験を行うことで製品を一層安全なものにしていけるかという課題が残されているといえる。

細胞組織加工製品を汚染する可能性のあるウイルスは、そのウイルス侵入経路の違いから、3つに分類して考えることができる。1つめは、原材料となるヒト細胞・組織からのウイルスの迷入である。これはドナーの適格性の観点から、HBV, HCV, HIV, HTLV 等をはじめとしていずれもヒト感染ウイルスが対象である。2つめは、製造工程全般を通じたウイルスの製品への”飛び込み”である。3つめは、生物由来原料を介して汚染されるケースである。バイオ医薬品の製造工程でのウイルス汚染の事例では、汚染は動物由来成分を含む原材料を介してバイオリクター

が汚染されるケースがいくつか報告されている。従って細胞組織加工製品でも、3つめの経路をどう防ぐかについての方策を立てることが重要となる。従って3つめに分類されたウイルスは動物由来成分由来のウイルスで、本来宿主としないヒト細胞に感染するケースを想定できる。この問題に関しては、H24年度の検討課題とした。また細胞組織加工製品の原料となる細胞のウイルス感染性も安全性に関わる重要な問題である。これに関しては、H25年度にiPS細胞を取り上げ、いくつかのウイルスに対する感受性を調べた。またH26年度ではフィーダー細胞、製造工程以降の細胞ストックや中間製品、最終製品に適用できるウイルス試験法として感度が高く、信頼性に富んだ新規の検出系の開発を行った。ウイルス検出法として感度が優れ、短時間で多数のウイルスを検出できる方法に核酸増幅法がある。しかしこの手法は検出すべきウイルス個々に特異的なプライマー設定が必要なため、検出できるウイルスの種類が限定されてしまうという欠点がある。また少量のサンプルで迅速、簡便、高感度にウイルスを検出法の選択肢を増やしておく必要から新規のウイルス検出システムの検討をしておくことは、将来の多様な細胞組織加工製品のウイルス安全性をより確かなものとする。そこでH26年度は次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法について検討した。

B. 研究方法

(1) 細胞

293T, Vero, CV-1, CR-FK, HeLa, CRFK, SNL76/7細胞細胞はDMEMに10%のウシ胎児血清を加え、培養に供した。ヒト人工多能性幹(iPS)細胞株HPS0063(201B7)は、レトロウイルスベクターにより4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入して樹立したもので、バイオリソースセンターから分与を受けた。iPS細胞の培養は、国立衛研遺伝子細胞医薬部で行い安田、黒田博士より教示を受けた。

(3) ウイルス

FCV(F4株)は野田博士(衛研)から分与を受けた。またMVMは山口博士(衛研)から

分与を受けた。カリシウイルスは、自然宿主であるCR-FK細胞で増幅し、その上清を遠心(2,000 rpm, 15 min)して、0.22 µm フィルターを通して分注し、-80°Cで保存した。ネコカリシウイルス(F4株)液のTCID₅₀は、CR-FK細胞を用いて決定した。イヌカリシウイルス(#48)は、MDCK細胞、シンドビスウイルス、ポリオウイルス(Sabin株)は、HeLa細胞を用いてそれぞれの力価を決定した。MVMは、m. o. i. 0.1でA9細胞に感染後、2日めの上清を0.22 µmのフィルターでろ過したものを-80°Cで保存した。ウイルス保存液の感染感受性の測定は、MVMはA9細胞を使って行った。

(4) ウイルス感染感受性TCID₅₀の測定

CRFK細胞を3,000個/90 µlずつ96-ウェルプレートに播種し、一晚培養した後、そこに10倍段階希釈したウイルス液10 µlを加え、37°C, 5% CO₂存在下で培養を行った。6日後に細胞変性効果(CPE)の有無を顕微鏡下で決定した。

(5) カリシウイルスの継代と馴化ウイルスの分離

カリシウイルス(FCV_{F4})を3×10⁵細胞に400 TCID₅₀で感染させ、3日培養し、その上清0.5 mlを使って非感染細胞(3×10⁵)に感染させた。これを繰り返すことでウイルスの継代を繰り返した。継代を13回繰り返したものをFCV_{CV}とした。分離したFCV_{CV}は、0.22 µmのフィルターを通して、-80°Cに分注保存した。

(6) ウイルス感染増殖能、細胞変性効果の比較

細胞(1×10⁵)を100 TCID₅₀で2時間感染させ、その後PBS(-)で2回洗い、培養後、その上清を回収してCR-FK細胞を用いて上清中に産生されるウイルス量をTCID₅₀によって決定した。細胞変性効果は、MTT法、トリパンブルー染色法によって、アッセイした。融合細胞は、Vero, CV-1細胞にそれぞれneo,

bsr 遺伝子を常法によりトランスフェクションして、G418, blasticidin S を含む培地で薬剤耐性細胞を選択した。その後、PEG1500 を用いて常法により細胞融合を行った。その後、G418/blasticidin S を含む培地で融合細胞を選択した。この操作を同様に2回行い、C/V#1, C/V#2 を選択した。

(7) ネコ, ヒト, アフリカミドリザル JAM1 発現 CHO 細胞の作製
JAM1 の発現ベクターは、pEF6/V5-His を用いた。ネコ JAM-1 は、
forward primer,
GTCGGGGTCCGGATCGCCATGGGG, reverse primer,
CACCAGGAATGACGAGGTCTGCCTG
アフリカミドリザル JAM1 はそれぞれ、
forward primer,
AGCGGGAGCCTGATCGCGATGGGGACAA
reverse primer,
CACCAGGAATGACGAGGTCTGTTTG
ヒト JAM1,
forward,
GTCGGGGAGCCTGATCGCGATGGGGACAA
reverse primer,
CACCAGGAATGACGAGGTCTGTTTGAATTC
を使って PCR で増幅し、それを pEF6/V5-His に連結して作製した。CHO 細胞にそれぞれの JAM1 発現プラスミドをトランスフェクションし、Blasticidin S で選択した。JAM1 発現量はウェスタンブロット法によって確認した。

(8) 次世代シーケンサーによる解析及び RNA-seq データの解析
非感染 HEK293 細胞 (1×10^6), FCV を m. o. i. 1 で感染させ、12 時間、24 時間後に RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を分離精製し、6 μ g RNA を出発材料として、HiSeq 2500 で 2×100 bp, 50M リードサイズの解析を行った (受託サービス Eurofin Genomics)。解析データを使って、先ずヒト遺伝子転写物を同定し、続いて NCBI のウイルスデータベース viral. 1. 1. を用いてウイルス様シーケンスの検索を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料は使わないので倫理面の配慮は必要ない。

C. 研究結果

(1) ウイルス感受性試験によるモデルウイルスとその感染細胞系の選択

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

2種類のカリシウイルスのうちイヌカリシウイルスは、自然宿主のイヌ細胞である MDCK では激しく増殖するが、そのほかの細胞で感染による細胞変性効果は見られなかった。ネコ由来のカリシウイルス FCV は、自然宿主であるネコ腎臓由来細胞 CR-FK 細胞に強い感染増殖能を示した。CR-FK 細胞にネコカリシウイルスを 100 TCID₅₀ で感染させる

とウイルスの激しい増殖のために、感染2日後にはほぼ100%の細胞が死滅した。しかしヒト細胞にはまったく形態変化や細胞死を引き起こさなかった。ところがアフリカミドリザルの腎臓細胞由来のVero細胞とCV-1細胞ではTCID₅₀で10000倍以上低いながらも感染し、時間はかかるものの細胞変性を誘導することがわかった。今回はヒト細胞に感染し、弱い感染増殖性を示すモデルとなるウイルスを特定できなかったが、それに代わるモデル感染系としてCV-1細胞-ネコカリシウイルス感染系を使うことにした。

(2) カリシウイルスの非宿主細胞への馴化と馴化ウイルス分離

カリシウイルスは、直径30~38nmの正二十面体構造の粒子で、プラス鎖の一本鎖RNAをゲノムに持ち、エンベロープを持たないウイルスである。この系ではCV-1細胞にカリシウイルスを感染させ、培養後上清中のウイルス量をCR-FK細胞を使って調べることができる。継代1回目のCV-1細胞のウイルス産生量を、CR-FK細胞のもの比べると、確かに1/10⁵程低いことがわかる(図1)。しかしCV-1細胞で引き続き継代していくと驚いたことに3回継代しただけで、そのウイルス産生量は10³倍程上昇することがわかった。これに対して293T細胞では全くウイルスの産生は見られなかった。またVero細胞では、ウイルス感染による細胞変性効果は殆ど見られないものの、継代ごとの培養上清へのウイルス産生はCR-FK細胞と同等であった。以上からカリシウイルスは、CV-1細胞では当初低い感染増殖性を示したが、わずか3回の継代で、その増殖性が急速に高まることがわかった。つまり一回の継代に3日要したので、わずか3継代、10日に満たない短い期間に異種の細胞であるCV-1に高度に馴化したことになる。

(3) 馴化ウイルスFCV_{CV}の強い細胞変性効果

ウイルスのCV-1細胞への馴化をさらに確

実なものにするために、ウイルス継代をさらに10回繰り返して、合計13回継代したものをFCV_{CV}とした。FCV_{CV}をそれぞれの細胞に感染させてウイルス増殖を比較したのが図2である。各細胞に感染させて比較してみると、自然宿主由来の細胞であるCR-FK細胞では、野生株FCV_{F4}に比べてFCV_{CV}は10倍程増殖性が減少していることがわかる。これに対してCV-1細胞では、逆に野生株に比べてFCV_{CV}ではその増殖性が10倍以上上昇していることがわかった。これとは対照的にVero細胞では両者の増殖性に差はなかった。以上からカリシウイルスは、CV-1細胞により馴化していることが確認された。Vero細胞では継代時、上清に放出されるウイルス量はCR-FK細胞と同等であったが、同じウイルス力価で感染させた場合には必ずしも高いウイルス量を産生するわけではない。これはウイルスの継代実験ではウイルスを継代する際にウイルス量を一定にせず、ひとつ前の継代上清を使って比較的高いウイルス力価で植えつぐために、本来ウイルス増殖に時間がかかるVero細胞でも十分な感染が起きる。そのため短時間でウイルスが大量に上清に放出されたからだと考えられた。

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

とになる。

(4) FCV_{CV} の融合細胞での増殖と細胞変性効果

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

(5) FCV_{CV} カプシドタンパク質 VP-1 のアミノ酸置換

それでは CV-1 細胞に馴化したカリシウイルスである FCV_{CV} は、馴化前の FCV_{F4} に比べて何が変わったのだろうか。それを調べるためにウイルス粒子を形成しているウイルスタンパク質 VP1 の構造に変化があるかどうかを調べた (図 4)。VP1 は、668 個のアミノ酸残基からなり、N 末から C 末側に向かって N、S、P1、P2、P1 と並ぶ 4 つのドメインからなっている (P1 は P2 を挟んで 2 つに分かれている)。N 末側はよりウイルス中心部に近く、C 末に近づくほどウイルス粒子の表面に近い。ウイルス表面は P2 で再び、粒子内部に向かって折り返しているため、ウイルス粒子の表面を形成しているのは P2 ドメイ

ンである。また VP1 は、2 量体がユニットとなって、正十二面体であるウイルスカプシドを形作っている。FCV_{CV} の VP1 には 3 つのアミノ酸置換を伴う変異 Y354V、D427S、E519K が見つかった。354 番目のアミノ酸残基は、P1 ドメインに位置しており、2 つの VP1 が 2 量体を形成する際の接触面にある。427 番目と 519 番目のアミノ酸残基は、VP1 の 2 量体において、ウイルス粒子の表面ではなく、その側面上部に位置している (図 5)。ここは、ウイルスレセプターと相互作用すると考えられている部分である。従ってこの 2 つのアミノ酸置換によって馴化ウイルスである FCV_{CV} では CV-1 細胞上のレセプターとの相互作用に変化が起きた可能性を示唆している。

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

た宿主側の小胞形成が関与する場合がある。もしこうした過程が関与しているとする、例えば、CV-1にFCV_{F4}が感染した場合は、細胞破壊を伴わずにウイルス粒子を細胞外に放出可能だが、FCV_{CV}ではその増殖性が高いため、その経路では間に合わず、ウイルス粒子の細胞内蓄積が進み、最終的に細胞破壊が起きるという可能性である。そこで次にオートファジーの阻害剤である3MAと促進作用のあるラパマイシンを使って、FCV_{CV}の増殖、細胞変性効果に対する影響を調べた(図6, 7)。まずVero細胞とCV-1細胞にFCV_{F4}あるいは、FCV_{CV}を感染させ、そこに阻害剤である3MAを加えてその影響を調べた。1~5 mM 3MAをVero細胞-ウイルス感染系に加えると、最大30%程度の細胞毒性はあるものの濃度依存的ではないことが分かった。これに対してウイルス産生量は、FCV_{F4}及びFCV_{CV}いずれの場合も3MAの濃度依存的に減少することがわかった。同様にCV-1細胞でも細胞毒性が顕著に見られない3MAの濃度範囲(1~5 mM)で、濃度依存的にウイルス産生の阻害が起きることが分かった。この結果からオートファジー阻害が、カリシウイルス産生の減少を引き起こしている可能性が示された。

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

って引き起こされる細胞破壊を抑制する効果をもっていることになる。この効果は次の2つの可能性を示唆する。①FCV_{CV}によるCV-1細胞の強い細胞変性効果が、オートファジーを誘導することによって、分解系にまわり、細胞死をまぬがれた、②オートファジーによる小胞形成の結果、ウイルスが細胞内に蓄積せず、効率よく細胞外に運ばれ放出されたため、細胞破壊による細胞死が抑制された。これを明らかにするために細胞培養上清のウイルス量を調べた(図10)。その結果、CV-1細胞ではラパマイシンによりFCV_{CV}産生量も増えていることが分かった。よってラパマイシンの効果は、後者の可能性が高いと考えられる。

(7) ヒト細胞へのカリシウイルスの感染

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

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

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

以上からヒトの JAM1 はカリシウイルスの細胞への侵入をサポートできることがわかった。それでは、何故ヒト細胞では感染性をもつウイルス粒子の産生がないのだろうか。このことを明らかにするために、最初にカリシウイルスの侵入をリアルタイム PCR で測定した (図 13)。カリシウイルスはウイルス粒子内に +鎖 RNA を 1 本持っている。この RNA は細胞内に侵入後そのまま翻訳され、-鎖 RNA が合成され、つぎにそれが鋳型となって +鎖 RNA が転写され、今度は +鎖 RNA が翻訳され、ウイルスタンパク質が生合成される。この後ウイルスタンパク質のアッセンブリーが進んで、ウイルス粒子が形成され、細胞外に放出される。ここでは -鎖 RNA の生成を 0, 4, 14, 24 時間後に調べた。驚いたことにヒト細胞でも -鎖 RNA が転写されることがわかった。しかも 293T 細胞においては、Vero 細胞とほぼ同量の -鎖 RNA が作られる。経時変化を見ると、ヒト細胞内では感染後 24 時間後、わずかではあるが -鎖 RNA 量が減少に転じていることがわかる。特に HeLa 細胞で

この減少が著しい。即ちウイルスが複製可能な細胞である CR-FK 細胞や CR-FK 細胞に比較するとそれほどウイルス産生量は多くないが、増殖可能であるアフリカミドリザルの細胞ばかりでなく、ヒトの細胞内にもウイルスの -鎖を合成するのに必要な宿主因子のすべてが含まれていることを意味している。次に +鎖 RNA についてみると、同様にヒト細胞内でも +鎖 RNA が合成されるのがわかった (data not shown)。ウイルスタンパク質の合成に関しては、検討してはいないが、以上から推定されることは、ウイルス侵入後、±鎖 RNA が共に合成されるが、ヒト細胞ではウイルス RNA が安定に存在できなくなる、即ち自然免疫系といった細胞内の感染防御システムが活性化してウイルス RNA 分解が進むのではないかと推定された。

(8) カリシウイルスの iPS 細胞への感染

ベシウイルス 2117 は、バイオ医薬品の製造用 CHO 細胞に感染事例を引き起こしたウイルスである。自然宿主が明らかになっていないため、汚染経路ははっきりしないが、生物由来原材料である添加物が疑われている。生物由来原材料に汚染を引き起こしたウイルスは細胞組織加工製品のウイルス安全性にとっても注意を要するウイルスのひとつである。このウイルスは、カリシウイルス科ベシウイルス属に属しており、近縁種にはネコカリシウイルスがいる。前年度に我々は近縁種のネコカリシウイルスが、ヒト細胞にも感染することを見いだした。しかも例え感染増殖生が低いケースでも非宿主細胞に容易に馴化する能力を備えていることも明らかになった。そこで本年度は、まずネコカリシウイルスがヒト iPS 細胞に感染するかどうかについて検討を行った。

幹細胞を未分化状態に保持するために、一般的には MEF (マウス胎児由来初代培養線維芽細胞) との共培養が必要なことが多い。調製される MEF は、必ずしも純度が高い線維芽細胞の集団ではなく、実際には多くの細胞の混合物となっている。MEF はマウスから調製

するので、その品質が必ずしも一定せず、マウス管理などウイルス安全性上問題が多い。特にマウスの細胞組織では内在性レトロウイルスを産生しているケースが有り、ヒト細胞との共培養時にマウス細胞からウイルスが持ち込まれる可能性を否定できない。そのためMEFではなく樹立されたマウス線維芽細胞株を使用する場合もある。iPS細胞では、G418抵抗性発現ベクターおよびLIF 発現ベクターを組み込んだSNL76/7細胞 (SNL76/7STO 細胞, ECACC 07032801) が、ヒトiPS細胞培養に使用されている。そのためここではマイトマイシンC処理済みのSNL76/7細胞との共培養下でウイルス感染実験を行った(図14)。その結果m. o. i. を変えてiPS細胞にネコカリシウイルスを感染させると、感染ウイルス量に依存して細胞上清に感染性ウイルスが産生されてくるのが観察された。一方SNL76/7細胞のみにウイルスを感染させた場合にはこのようなウイルスの産生は見られなかった。このことは、ネコカリシウイルスが、iPS細胞に感染可能であり、細胞外へ感染性ウイルスを産生することができることを示している。ウイルス感染では、ウイルス増殖に伴う細胞変性効果が観察される場合がある。そこで次に感染後2日目の細胞数を調べた(図14)。その結果ウイルス感染に伴う細胞変性効果は観察されなかった。感染をさらに確認するために、感染後細胞内のウイルスRNAコピー数をRT-qPCR法によって調べた(図15)。カリシウイルスのRNAは、genomic RNA(+)鎖, genomic RNA(-)鎖, subgenomic RNA(-)鎖, subgenomic RNA(+)鎖と4種類ある。この4種類すべてを含むRNAを測定した。m. o. i. を挙げていくに従って細胞内のウイルスRNAコピー数が上昇することがわかる。しかしSNL76/7細胞は、ウイルスコピー数の上昇は見られなかった。カリシウイルス粒子には、genomic RNA(+)鎖がパッケージングされており、感染成立後genomic RNA(+)鎖を鋳型にしてgenomic RNA(-)鎖が合成され、それがgenomic RNA(+)鎖の鋳型として使われる。したがってgenomic RNA(-)鎖の合成が観察

されるかどうか、感染成立の証拠となる。調べてみると、SNL76/7細胞では全く見られず、iPS細胞/SNL76/7細胞では、明らかなコピー数の上昇が見られた。またHeLa細胞に比べて、低いm. o. i. 0.1でもiPS細胞/SNL76/7細胞では、genomic RNA(-)鎖が確認され、ウイルスの感染侵入効率に関しては、HeLa細胞を上回る感受性を示した。

さらに時間経過にしたがって急速にウイルスコピー数は上昇するが、12時間後には減少し始める(図16)。これは感染が成立した後、急速にウイルス複製が抑制されることを示唆している。こうした傾向は293T細胞でも同様に確認できた。またこうしたウイルス産生は、その感染性をコロニー形成実験でも裏づけられた。

(9) ポリオウイルス、シンドビスウイルスのiPS細胞への感染

ポリオウイルスをiPS細胞とSNL76/7細胞の共培養系に加えると、ウイルスによる細胞変性効果が観察された(図17)。一方SNL76/7細胞は、ウイルスによって全く影響しなかった。以上からポリオウイルスは、iPS細胞に感染し細胞死を誘導することが明らかになった。

シンドビスウイルスは、その感染宿主域が広いことで知られている。また強い細胞変性効果を示すことから腫瘍溶解性ウイルスとして利用されるケースもある。調べてみると、iPS細胞も感染後2日目でシンドビスウイルスにより、死滅することがわかった(図18)。

以上からiPS細胞は、ポリオウイルスやシンドビスウイルス等のRNAウイルスにも感染性を持ち、その強い細胞変性効果により、死滅することがわかった。またポリオウイルスは、マウス由来の細胞には、感染が知られていないが、シンドビスウイルスでは感染する可能性が高い。iPS細胞培養系には、細胞を未分化状態に保持するために、MEFやG418抵抗性発現ベクターおよびLIF 発現ベクターを組み込んだSNL76/7細胞がフィーダー細胞として使用されている。iPS細胞へのウイルス