

感染のみを解析するためには、共培養されているこれらの細胞へのウイルス感染を考慮する必要がある。

(10) 次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法

次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法の概略を示したのが図 19 である。6 μg RNA を出発材料として次世代シーケンサー用のサンプルを調製し、解析を行い RNA-seq データが得られた。このデータの中からウイルスシーケンスが検出できるかどうかを調べ、細胞のウイルス感染の有無を判定する。通常細胞の RNA 量は 1 $\mu\text{g}/10^5$ 細胞、多い細胞では 3.5 $\mu\text{g}/10^5$ 細胞と言われている。従って細胞数は数十万個あれば十分である。RNA を使って解析を行う理由は、DNA ウィルスも RNA ウィルスともに感染複製する際には、必ず RNA を産生する必要があるためである (図 21)。また検出系を作るにあたって重要な点は、どんな感度でどんな範囲のウィルス種が検出できるのかという点である。

(11) モデル細胞 HEK293 とモデルウィルス FCV_{F4} を使った検討

ここではモデル細胞としてヒト細胞株である HEK293 細胞、モデルウィルスとしてカリシウィルス的一种である FCV を用いた。非感染 HEK293 細胞とウィルス感染 HEK293 細胞の RNA-seq データの解析を行い、両者を比較することで、感染ウィルスのシーケンスを検出できるかどうかを調べた。

非感染 HEK293 細胞とウィルス感染後 12 時間と 24 時間後の HEK293 細胞から RNA を分離し、poly(A)+RNA を精製した後、次世代シーケンサー用試薬を使ってサンプル調製を行い、Illumina 2500 を使って解析を行った。HEK293 細胞の RNA-seq データは 200 nt に満たない短いリードを 23M 本含んでいた。また得られたリードの 88% 以上のデータは比較的良好なクオリティを持っていることがわかる (表 2)。

(12) RNA-seq データの解析

非感染 HEK293 細胞の解析の結果、得られたこのシーケンスを次の 3 つカテゴリに分類した。① host seqs, ② unmapped

seqs, ③ virus-like seqs である。得られたもののうち 98.3% は host seqs であった (図 22)。また unmapped seqs は 1.1% であり、virus-like seqs とされたものは 0.6% であった。非感染細胞には、内在性レトロウィルスや本来は host seqs だが、ウィルスによく似たシーケンスが含まれている可能性がある。そこで virus-like seq に分類された 0.6% の内訳を調べてみると、99.7% アデノウィルス、0.01% ERV であった。残りの 0.29% は host seq 由来ではあるがウィルスのシーケンスに似ているため virus-like seqs として同定された。アデノウィルスシーケンスが高頻度に検出された訳は、HEK293 細胞を樹立する際に、トランスフォームの目的で adenovirus 5 を用いていたためである。HEK293 細胞の 19 番目の染色体には 4 kb ほどのアデノウィルスゲノムが組み込まれていることがわかっており、そのためアデノウィルスシーケンスが RNA-seq データに含まれていたものと考えられた。以上から非感染細胞として用いた HEK293 細胞には、ウィルス検出を難しくする高いバックグラウンドが存在することがわかった。

カリシウィルスに感染させたものでは、同様に virus-like seqs と判別されたものは、全 RNA-seq データの 0.6% であった。その内訳を見ると、感染後 12 時間、24 時間でそれぞれカリシウィルスが 0.21%、0.09% 検出することができた。しかしアデノウィルスに比べて検出頻度が極端に低く、感染後 12 時間では、アデノウィルスに比べて 1/500 程であった (図 23, 図 24)。そこで検出できたカリシウィルスのゲノムに対してマッピングを行ってみると、矢印で示されるようにマッピングできたのは、ゲノムのごく一部であることがわかった (図 25)。カリシウィルスは、RNA ウィルス的一种であり、数多くの株が存在し、多様性が高い。ここで用いたウィルスデータベース viral. 1. 1. にはそのうちの 1 株 Urbana しか含まれていなかった。そのため Urbana 株とホモロジーの高い一部のシーケンスしか検出できなかったことが明らかになった。そのためカリシウィルスの多くの株を含む拡張データベースを作成し、解析に用いたところ、カリシウィルス F4 株のゲノム全長をカバーする多くのリードを検出することができた。この拡張ウィルスデ

ータベースを用いて再度 virus-like seqs フラクションを解析すると、感染細胞から作成した RNA-seq データのみカリシウイルスが、35.8%FCV, 17.9%検出され、満足のいく結果が得られた(図26).改善の余地はあるが、NGSを用いてウイルス検出システムを構築することができた(図27).

(13) 次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法で注意すべき点

以上から、次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法に関して考慮しなければならない点が多くなった。問題点として以下が挙げられる：① NSG によるシーケンシングのサイズと品質，② 適切なデータ解析プログラムの選択，③ ウイルスゲノムデータベースの拡張，④ 宿主細胞 RNA-seq に含まれるウイルス様シーケンクス (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，⑤ 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判別，⑥ 解析にかかる時間とコスト，⑦ 検出感度，検出限界，他の検出法との比較。

「① NSG によるシーケンシングのサイズと品質」について検討を行った。次世代シーケンサーのデータサイズが、検出感度に関わる重要な要因であることを示している。当然リード数が大きくなると、それぞれの転写産物のカバレッジも増加するが、リード数を上げると、それに従って解析コストも増加するからである。この点についてはさらに検討を進める必要があるが、リード数を 5M に下げても、ウイルスゲノムをカバーすることができることがわかった(図28)。

「② 適切なデータ解析プログラムの選択」については表3にまとめた。RNA-seq データからウイルス様シーケンクスを同定するのにかかった時間と得られた結果についてまとめたものである。tophat では解析に 66 時間かかるが、star ではわずか 3 分で解析を終了することができる。このように使用する解析プログラムによって解析にかかる時間に大きな差が出る。今後さらに効率の良い解析プログラムが利用できるようになる可能性があり、システムの改良と共に解析時間を短縮できると考えられた。

「③ ウイルスゲノムデータベースの拡張」については、既に述べたように多様性のある

ウイルスに関しては、解析に使うウイルスデータベースを拡張し、検出できるウイルスの範囲を広げる必要がある。最新のウイルスデータを加えて改訂していく必要がある。

「④ 宿主細胞 RNA-seq に含まれるウイルス様シーケンクス」をいかに除くか、「⑤ 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判別」、「⑦ 検出感度，検出限界，他の検出法との比較」については、ウイルス由来シーケンクスを判別する際の重要な課題であり、今後検討する必要がある。

(14) 次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法のコストについて

「⑥ 解析にかかる時間とコスト」も実用化を睨んで重要な問題である。次世代シーケンクス解析には、高額な機器が必要であり、実用化をにらんで価格面に関しての検討も必要になってくる。試薬のコストについてまとめたのが、表3である。近年の次世代シーケンサーの発達と改良は目を見張るものがある。解析に要する時間も Illumina の製品を例にとると、HiSeq 2500 では 40 時間かかるが、MiSeq 500 では 4 時間程に短縮できる。また価格面でも解析器材さえそろえば、実質 1 サンプルにかかる試薬の費用は、約 3 万円程である。人件費等を併せても、1 サンプル 15 万円程度に抑えることができるのではないかと考えられる。また器材の進歩と共に次世代シーケンサーによる解析の受託サービスは、今後は大きく価格ダウンすると思われる。また解析器材さえあれば、解析を行うのに必要な時間は、最短 2 日程度になると考えられる。そのためには、データ解析に要する時間を数時間程度にする必要があり、virus-like seq と判定するのに間違いがなくなるように判定に必要な知見の集積が今後必要である。

(15) 細胞組織加工製品製造に使われる細胞のウイルス試験

今回樹立したウイルス検出パイプラインを用いて、実際に細胞組織加工製品の製造に使われる細胞のウイルス感染有無を判定できるかどうかについて調べた。ここではまずフィーダー細胞として使われる SNL76/7 細胞を取り上げた。この細胞にウイルス感染させて、それが検出できるかどうかを調べた。次世代シーケンサーによる解析の結果、今

回は 5,000 万本以上の short reads が得られた (表 5)。SNL76/7 細胞は通常放射線照射やマイトマイシン処理をして使うので、 γ 線照射細胞についても実験を行った。得られたリードのうち 99%近くがホストのシーケンスでした。またウイルス様シーケンスと判定されたシーケンスは全体の 0.0018~0.0041%を占めることがわかった (図 29)。ここで得られたごくわずかなウイルス様シーケンスをさらに詳細に調べると、非感染細胞では 88%が内在性レトロウイルスであると判定された (図 31)。またマウスパルボウイルス感染細胞では、パルボウイルスがウイルス様シーケンスと判定された 0.0041%のうち 76.2%がパルボウイルスシーケンスであると判定された。ここで検出されたリードをパルボウイルス遺伝子の全長にマッピングしてみると、全長にわたってマッピングできた (図 30)。このことから、感染細胞からパルボウイルスが間違いなく検出できたことになる。

D. 考察

(1) 非宿主細胞へのウイルス感染

ウイルスが、本来の自然宿主ではない異種細胞にわずかながらも吸着・侵入し、感染・増殖が始まる際には、どんなことが起きるのだろうか。本研究では細胞組織加工医薬品へのウイルス汚染を想定して、カリシウイルスをモデルウイルスとして自然宿主ではない細胞への感染拡大のごく初期に何が起きるのかを調べた。カリシウイルスはエンベロープを持たない RNA ウイルスである。そのため、非常に可塑性に富んでおり、自然界でも極めて広い宿主に見られる。特に海洋生物には、多様なカリシウイルスが感染増殖を繰り返しており、魚類由来とされるカリシウイルスの一種が、米国で家畜 (ブタ) に深刻な疾病を引き起こした例も知られている。またバイオ医薬品製造現場でもウイルス感染抵抗性と見られている CHO 細胞に感染するウイルス汚染事例を引き起こしており、細胞組織加工医薬品製造においても注意すべきウイルスのひとつといえる。今回はネコを自然宿主とするカリシウイルスが、アフリカミドリザルの細胞に感染し、異種細胞の中でどのよう

に馴化していくのかについて調べるため、CV-1 細胞に馴化したウイルスを分離し、そのウイルスの性質を調べることで解析を進めた。ここで使用した FCV_{F4} は、アフリカミドリザル由来細胞である CV-1 細胞は極めて低い感染感受性しか持たない。しかしその低い増殖能しかもたないウイルスを CV-1 細胞で継代するとごく短期間で、CV-1 細胞に適応することが明らかになった。ウイルスの馴化の過程では、ウイルス産生能が野生株に比べて飛躍的に上昇し、強い細胞変性効果を獲得した。このウイルスは、ウイルスカプシドを形成している VP1 タンパク質に 3つのアミノ酸置換を持っており、その 2つは、立体構造の位置からウイルスが細胞膜上のレセプター分子と相互作用すると考えられている領域にある。アフリカミドリザル細胞ではその感染感受性は 10^4 以上低かった。この障壁が、ウイルスのライフサイクルのどの部分に起因しているのかについて現段階で明白な結論を出すことはできない。しかしネコ、アフリカミドリザルのレセプター JAM1 発現 CHO 細胞への感染実験から、ウイルス侵入に関わる段階である可能性は高い。というのも JAM1 発現 CHO 細胞への感染実験では、ごくわずかなネコ JAM1 発現細胞で、アフリカミドリザルやヒト JAM1 発現 CHO 細胞と同等のウイルス産生が観察されたからである。ここでは発現 JAM1 の C 末に V5 エピトープをつないだが、この C 末の修飾は、ウイルス感染には影響しなかった。VP1 タンパク質の 3つのアミノ酸置換がウイルス馴化と深く関係していることを直接示すためには、リバーシジェネティクス法による、組み換えウイルスを作製する必要があるが、これについては今後の課題である。また VP1 以外の領域にも変異がないかどうかについても、今後解析する予定である。

(2) ネコカリシウイルスのヒトへの感染

ネコカリシウイルスがヒトに感染性をもたないことは知られているが、それはレセプターであるヒト JAM1 がカリシウイルスの感

染侵入をサポートしないからではないことが本研究で初めて明らかになった。CHO 細胞にヒト JAM1 を発現させると、カリシウイルスは、アフリカミドリザル JAM1 と同等の感染増殖性を示した。この結果は、宿主域を決定している因子がレセプター以外にあることを明確に示している。その理由としていくつか挙げることができる。そのひとつは、ウイルスの複製に必要な宿主側の因子がヒト細胞に欠けているため増殖できないという可能性である。しかしこれに関しては、ヒト細胞内でウイルス感染後、 $-$ 鎖 RNA とともに $+$ 鎖 RNA の産生が Vero 細胞並みに観察されたことから、可能性は低いものと考えられる。2つ目は、ウイルス複製に必須の宿主側の因子が dominant-negative に作用して、複製不全が起きる可能性だ。CV-1 細胞と Vero 細胞の融合細胞を作製し、その細胞でのウイルスの感染増殖能を調べてみると、その表現型は、CV-1 に酷似していた。もし dominant-negative な因子が関与しているとすると、融合細胞は、Vero 細胞の表現型を取る可能性が高い。従って、この可能性も低いものと考えられる。そして3つ目は、侵入してきたウイルスに対抗してヒト細胞では、インターフェロン I 型を介した自然免疫系が活性化し、ウイルス RNA やタンパク質を分解するという可能性だ。これに対して、ネコ細胞内の自然免疫系は、ネコカリシウイルスによって、巧妙にブロックされているのかもしれない。またアフリカミドリザルでは、そのブロックが不十分なために、ごくわずかな感染・増殖が起きるのかもしれない。しかし、カリシウイルスは、アフリカミドリザル CV-1 細胞内で惹起された一連の自然免疫系による防御障壁を容易に克服して馴化することができるのかもしれない。

治療用細胞組織加工医薬品のウイルス安全性を考える際には、バイオ医薬品のウイルス安全性同様のリスクマネジメントが参考になるものと考えられる。というのも動物細胞による組換えタンパク質医薬品の製造過程でも同様に生物由来原材料を用いた培

養工程を含むからである。既に述べたが、カリシウイルスは実際に自然宿主でないバイオ医薬品製造細胞である CHO 細胞に感染し、汚染事例を引き起こしたウイルスとしても知られている。そのときもバイオリクター汚染ウイルスは、当初ごく弱い感染性しかもっておらず、細胞変性も起こさなかったためにバイオリクター内での汚染に気づくのが遅れたといわれている。汚染が進み、ウイルスの感染細胞への馴化が起きて、製造用細胞増殖が低下することによってウイルス汚染が発覚した。今回の実験でもカリシウイルスは、非宿主細胞への馴化が速やかにおきることが示された。これは今後治療用細胞組織加工医薬品製造過程でも生物由来の材料を使う際にも十分気をつける必要がある点である。また従来までヒト細胞に感染するとは思われていなかったカリシウイルスの一種が、細胞内に侵入し、 $-$ 鎖 RNA を生成することが示された。ヒト JAM1 が、ウイルス侵入をサポートすることは明らかで、その後ウイルスがなぜヒト細胞内で複製をスムーズに進めることができないのかについては今後の課題である。このようにウイルスの感染成立は単にレセプターの有無などだけでなく、細胞侵入後の細胞内イベントも関わってくる。特に近年は乳類の細胞がもっている自然免疫系の関与が感染増殖成立の可否に重要な因子となっていることが分かってきている。例えば、レトロウイルスのひとつであるヒトレンチウイルスでは、感染するとインターフェロンを介する感染防御系が活性化し、ウイルス RNA の修飾酵素である APOBEC3G やウイルス放出をウイルス粒子繫留作用によって抑制する Tetherin などによる抗ウイルス作用が惹起される。CV-1 では、この抑制系がウイルス側の馴化によって容易に突破され、高い増殖性と同時に強い細胞変性効果を獲得することができた。幸いなことにヒト細胞では、感染侵入が起きるが、その後、免疫系が惹起され、新たな感染が起きずに感染拡大はくい止められる。しかし 1000 TCID₅₀ といった極めて高いウイルスに暴露すると、

ヒト細胞でも感染性のあるウイルス粒子が産生されることが観察された (data not shown) . この結果は、ウイルス感染成立とその複製は、感染ウイルス力価と宿主細胞側の自然免疫系のバランスによって左右されていることを示唆している。

(3) 細胞組織治療製品におけるウイルス安全性確保

細胞組織加工製品の製造工程では感染性因子、特にウイルスの混入の可能性を常に孕んでいる。本研究の目的は、細胞組織加工製品におけるウイルス安全性を検討し、臨床に役立つ提言や基礎データを提示することである。細胞組織加工医薬品の特徴としてまず治療用細胞としてヒト細胞組織を使うという点、また細胞や組織の培養に生物由来原材料が多く使われるという点が挙げられる。これらに加えて、細胞組織を採取後、細胞・組織の加工が行われる点が大きな特徴である。細胞・組織の加工には、疾患の治療や組織の修復、再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖、株化、等を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、非細胞・組織成分との組み合わせ又は遺伝子工学的改変等が含まれる。製造工程は、組織の分離、組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等、当該細胞・組織の本来の性質を改変しない操作が行われ、最終製品である細胞・組織 利用製品を出荷するまでを含む。バイオ医薬品製造工程と異なる工程を含む上に、その生産スケースが個々の製品で比較的小さいことも細胞組織加工医薬品の特徴である。また自動化が困難で人が直接製品を扱うケースも多いことが想定されるため、外界や製造従事者から製品への飛び込みウイルス (adventitious virus) の可能性がある。それに加えて、細胞・組織の人為的な増殖、細胞の株化、細胞・組織の活性化、分化等を施すために、フィーダー細胞との共培養や生物由来原材料である培養用ウシ胎児血清、タンパク質性成長因子等に接触・暴露される

工程を含むケースが多い。従ってウシ、ブタ、マウスなどの動物を自然宿主とするウイルスによる汚染も視野に入れる必要がある。ここで想定される汚染は、バイオ医薬品においてすでに起きているウイルスによるものであろう。例えば 2008 年米国では稀少遺伝子疾患であるゴーシュ病やファブリー病治療に使われる医薬品の製造用細胞にウイルス汚染が見つかり、製造がストップしたために、FDA (米国食品医薬品局) によって医薬品が不足する事態を回避する対策が取られた。このときの汚染ウイルスが、ベシウイルス 2117 というカリシウイルス科に属するウイルスである。そしてバイオ医薬品を製造用細胞として使われていたのが CHO 細胞である。汚染がおきた原因は、生物由来の原材料が汚染されていたことだが、もうひとつの大きな要因は、CHO 細胞がベシウイルス 2117 に高い感染感受性を持っていたことによる。仮にバイオリクターにウイルスが持ち込まれても感染性をもたないウイルスなら、ウイルスの感染増殖は起きず、培養液中に持ち込まれたウイルスは、精製工程に含まれている不活化除去工程で除かれていた可能性が高い。しかし細胞組織加工医薬品では、不活化除去工程が含まれないため、持ち込まれたウイルスが製品を汚染する可能性がある。そこで使われる細胞へのウイルス感染性の有無をしらべることは、極めて重要な知見となる。重要な点は、ウイルス安全性をより確かなものにするためには、加工前、加工後の細胞のウイルス感染感受性を正確に把握しておく必要があるということである。本年度は、細胞治療に今後広く使われる可能性のある iPS 細胞のカリシウイルス感受性に焦点を絞って解析を行った。

(4) RNA ウイルスの iPS 細胞への感染

カリシウイルス科の一種であるベシウイルス属のベシウイルス 2117 は、バイオ医薬品の製造用バイオリクターを汚染したことのあるウイルスである。このウイルスと同属のネコカリシウイルスは、ごく近縁に属す

るウイルスである。このウイルスは、ネコの上気道に感染することが知られているが、ヒトには感染が知られていない。しかし、HeLa、HEK293 細胞などに感染すること、アフリカミドリザルなどの細胞にも感染性を示し、かつ短期間でアフリカミドリザルの細胞に馴化し、激しく増殖するようになることが昨年度報告した。ネコカリシウイルスについて iPS 細胞に感染するかどうかを調べたところ、感染後ウイルス RNA コピー数の上昇が認められた。また感染ウイルス粒子の産生も感染 12 時間をピークに観察された (図 5)。その後低下した。同様に感染性ウイルス粒子も感染 2 日目まで認めた (図 6)。またポリオウイルスもシンドビスウイルスも感染し増殖、iPS 細胞に細胞変性効果をもつことが明らかになった。前述したように例えウイルスが細胞培養系を汚染しても原材料である iPS 細胞にも加工分化工程後の製品にも感染性がなく、またヒトにも感染しない場合には、その危険性はごく小さいものになる。ところが感染性を持っていると最終製品の汚染に繋がり、そのリスクは、重大なものとなる。そのリスクの評価は、製品製造に使われる細胞のもつウイルス感染性を評価することによって事前に行う必要がある。今回行った実験では、ネコカリシウイルスは、感染はするもののウイルスの増殖は、ごくわずかしき起きず、ポリオウイルスやシンドビスウイルスのような激しい細胞死は見られなかった。これは iPS 細胞自身もつ自然免疫系といった抗ウイルス 活性が惹起された可能性があり、これらについても今後の課題である。

(5) 細胞組織加工製品のウイルス安全性確保

生物由来原料を使って製造される医薬品としてバイオ医薬品がある。バイオ医薬品製造におけるウイルス試験法に関してはガイドラインである ICH Q5A 「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」に詳しい。バイオ医薬品の製精製工程では、低 pH 処理等のウイルスの不活化のための工程やウイルス除去を行うためのウイルスフィル

ター処理等によってウイルス安全性を確保している。これに加えて製造用細胞や未精製バルクなどでのウイルス試験法、また精製工程のウイルスクリアランス値を評価することでさらに安全性を高めている。これに対して細胞組織加工製品では、最終製品が組み換えタンパク質等ではなく、「細胞」そのものであるため、低 pH やウイルスフィルターといった処理をすることは難しい。従って細胞組織加工製品に使われる生物由来原料に関するウイルス安全性を出来るだけ高めることが必要になってくる。またそれと同時に中間製品、最終製品、またフィーダー細胞等について簡便で、高感度、短時間で幅広いウイルスを低コストで行えるウイルス試験法も重要になってくる。ICH Q5A に記載されている試験法や安全性評価法は、生産規模の大きな製品を想定したものである。細胞組織加工製品に応用できるものも少なくないが、必ずしも細胞組織加工製品に最適な試験法とは限らないものがある。特にウイルス試験法は、*in vitro* 試験、*in vivo* 試験ともに試験法に時間がかかる。また最終製品は時間をおかずに治療に使うことが想定される。そのため柔軟性に富んだ安全性の確保が必要になってくる。ウイルス試験法の選択肢も増やしていく必要が出てくるだろう。その意味でも今回検討した NGS を利用したウイルス検出法は、実用化へ向けて重要な選択肢の一つとなるだろう。

(6) フィーダー細胞のウイルス試験法

国内の細胞組織加工製品製造に使われているフィーダー細胞 3T3-J2 のウイルス試験についてみていくとマスターセルバンクでは、延長 S+L-アッセイ、延長 XC プラークアッセイ、電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性試験、Vero 細胞等を用いた細胞変性誘発試験、赤血球吸着及び施血球凝集反応、モルモット、ニワトリ受精卵等を用いた *in vivo* 試験、マウス抗体産生試験、ウシ鼻甲介細胞等を用いたウシ由来迷入ウイルス試験が実施されている。またワーキングセルバンクもほぼ同様の試験が行われた。これに加えて、X線照射法により作製し、フィーダー細胞についてレトロウイルス否定試験が行われている。モルモットなど小動物をつかった *in vivo* 試験では判定に 28 日を要する。またウシ由来迷入ウイルス試験では CPE の出現の有無を 14 日に

わたって調べるなど試験には長い時間とコストを要する。本研究で検討したNGS法を用いたウイルス試験法は、ウイルスの感染性を重視したバイオアッセイではないため、ウイルスを取り扱う設備を必要としない。そのためウイルス非感染が明らかなマスターセルバンクがあれば、その細胞と比較することで、ワーキングセルバンクのRNA-seqデータの中に外来性のウイルスが含まれているのかを短時間で判定することができるだろう。次世代シーケンサーの機能は近年驚く程向上しており、コストの大幅なダウンも期待されるため、新規のウイルス試験法としてまず補助的に利用することを考えるべきだろう。実用化に向けては再現性や検出限界等に関する一層の検討が必要になる。

(7) 他のウイルス試験法との比較

ICH Q5A「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」に記載されているウイルス試験法のうち、*in vivo*試験法、*in vitro*試験法についても概ね時間がかかる試験法が多い。これはフィーダー細胞のところでも述べたように、ウイルス試験法がウイルスの感染性を重視したバイオアッセイであるためである。ウイルス試験法には核酸増幅法があるが、この方法は、感度が高く、ごく短時間で結果が出る反面、結果とウイルス感染性が必ずしも一致しない場合がある。これは核酸増幅法がウイルスの核酸を標的にしているため、鋳型となる一部の核酸断片が存在すると陽性となる場合やすでに不活化しているウイルスも検出してしまうためである。今回検討したNGS法を使ったウイルス検出法では、その感度が核酸増幅法と比べてどうかという点に関しては、詳細な検討を行わなかった。しかし、核酸増幅法では標的ウイルスを増幅するプライマーは正確でなくてはならず、RNAウイルスなど多様性をもつウイルスに対して注意が必要である。今回の実験では、カリシウイルスを検出したが、特定の株 Urbanaしか含まないウイルスデータベースでもF4株を検出することができた。このことは、知られていない未知のウイルスのシーケンスでもホモロジーが高いドメイン構造から検出できる可能性があることを示している。従って、ウイルスデータベースを一層充実させることで検出できるウイルスの範

囲がさらに広げることができるものと考えられた。加えて大きな特徴は、ウイルス由来シーケンスと判定されたリードをウイルスゲノムにマッピングすると、全ゲノムにわたる転写の確認が出来るばかりでなく、発現レベルを推定することができる。これに対して核酸増幅法では、特定の領域の転写量を知ることができるが、ゲノム全体を見ることができない。

短所として挙げられるのは、高額なシーケンサーと試薬類である。ここ2、3年の動向を見ていると、より小型化、よりサンプル数の少ないパーソナルな解析システムが使えるようになってきている。よって試験法を取り巻く環境は将来的には好転していくものと考えられる。また解析過程に於ける問題点として、宿主由来のシーケンスではあるが、ウイルス様シーケンスに似ていたり、単純な繰り返し配列のためにウイルス由来のシーケンスだと判定されてしまう場合がある。そのため効率よく偽ウイルスリードを除くことができるように改善が今後とも必要である。この過程には、専門知識をもった技術者を必要とするが、解析プログラムの改良によって、効率よく且つ専門知識なしに、ウイルス感染の有無を判断できるようなパイプライン実現が可能であると考えられた。

E. 結論

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

細胞組織加工医薬品用細胞にウイルスが感染した場合を想定して、ウイルスが培養系に迷入した場合に iPS 細胞系に何が起きる

のかについて調べた。その結果カリシウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルスが iPS 細胞に感染複製することが明らかになった。バイオ医薬品異となりその製造過程には効果的な不活化・除去工程を導入することが困難である細胞組織加工医薬品では、汚染が起きた場合に何が起きるのか、事前に把握し、その危険性をあらかじめ評価しておく必要がある。

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 データ解析のためのパイプラインを作ることができた。しかし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っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, Yusa, K: Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to maraviroc. PLOS One, *in press*
- 2) Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Boonchawalit S, Yusa K, Matsushita S: Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. J. Gen. Virol. 94(5): 933-943, 2013
- 3) 遊佐敬介, 前田洋助 ヒト感染が疑われたレトロウイルスの起源とウイルス安全性 ファームテクジャパン28 (10), 2075-2079, 2012
- 4) 遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴 バイオ医薬品の外来性感染性物質について ファームテクジャパン28 (5), 941-946, 2012
- 5) 遊佐敬介 バイオ医薬品のウイルス安全性, (抗体) 医薬品における不純物/凝集の評価・試験と免疫原性, ウイルス安全性への対応, 270-278, サイエンス&テクノロジー, 2012
- 6) Nakano Y, Monde K, Terasawa H, Yuan Y, Yusa K, Harada S, Maeda Y: SPreferential recognition of monomeric CCR5 expressed in cultured cells by the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. Virology, *in press*
- 7) 遊佐敬介, 前田洋助, 高林誠, 苑宇哲 CHO 細胞が産生するレトロウイルス様粒子とウイルス安全性 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44(10) 852-856, 2013

2. 学会発表

- 1) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda, Y, Terasawa, H, Harada, S, Sato, H, Yusa, K. Key Structure of the gp120 V3 Loop Responsible for Noncompetitive Resistance to Maraviroc in R5 HIV-1_{JR-FL} 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (2012.10.24-26) Aso
- 2) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志 HIV-1 coreceptor の oligomer 形成が HIV-1 感染感受性に与える影響: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012.11.13-15) 大阪
- 3) 前田洋助, 寺沢広美, 中野雄介, 門出和精, 遊佐敬介, 原田信志 RTLV-I エンヴェロープの膜融合におけるウイルス産生細胞内エンドソーム酸性化の関与. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012.11.13-15) 大阪
- 4) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志 CRF01_AE X4 HIV の V3 非依存的 CXCR4 阻害剤逃避. 第 26 回日本エイズ学会学術集会 (2012.11.24-26) 東京
- 5) 苑宇哲, 高林誠, 前田洋助, 原田信志, 遊佐敬介 ネコカリシウイルスの非宿主細胞における馴化について第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013.11.10-12) 神戸
- 6) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志 HIV-1

- coreceptor の oligomer 形成が HIV-1 感染感受性に与える影響: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013. 11. 10-12) 神戸
- 7) 前田洋助, 中野雄介, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志 ウイルス産生細胞における GLUT1 発現による HTLV-1 エンベロープタンパク質の膜融合能の減弱: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013. 11. 10-12) 神戸
- 8) 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 (2014. 11. 10-12) 横浜
- 9) 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 発現産生細胞における HTLV-1 受容体 GLUT1 の制御機構の解析: 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (2014. 11. 10-12) 横浜
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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

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

表1 ウイルスの非宿主細胞への感染増殖性

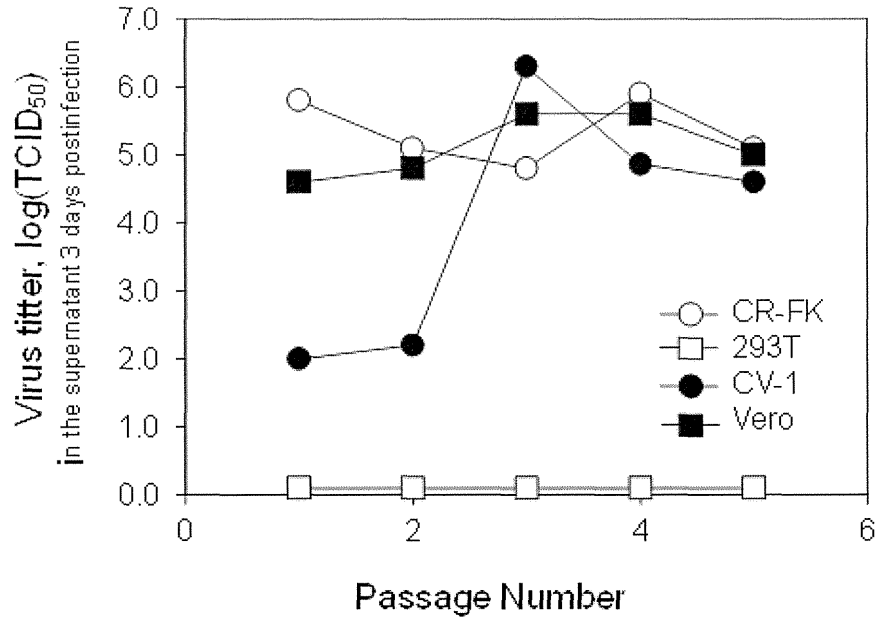


図1 カリシウイルスは非宿主細胞で継代を繰り返すと短時間で継代に使われた細胞に馴化することができる

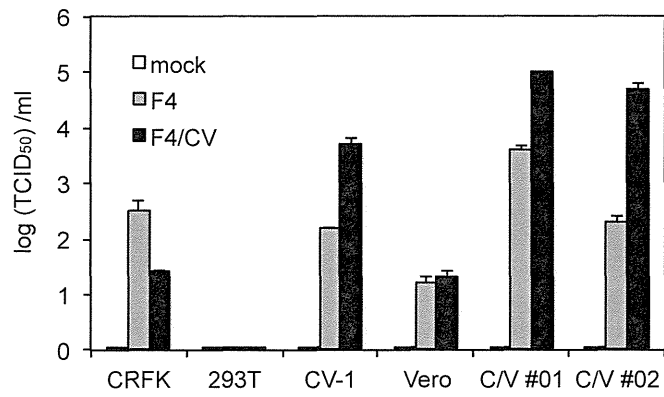


図2 CV-1細胞に適応したFCV_{F4/CV}はCV-1細胞でより多くのウイルスを産生する

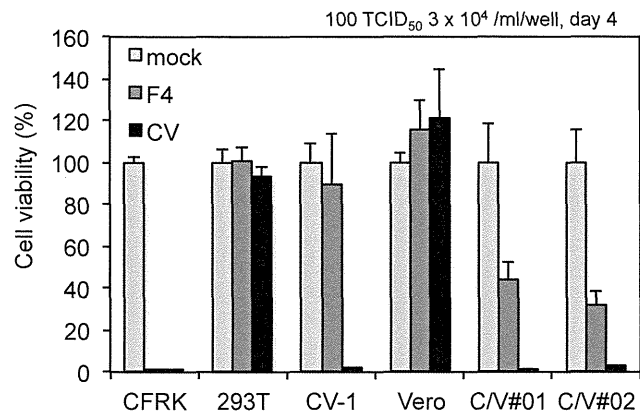


図3 カリシウイルスは馴化した細胞に強いCPE（細胞変性効果）を引き起こす

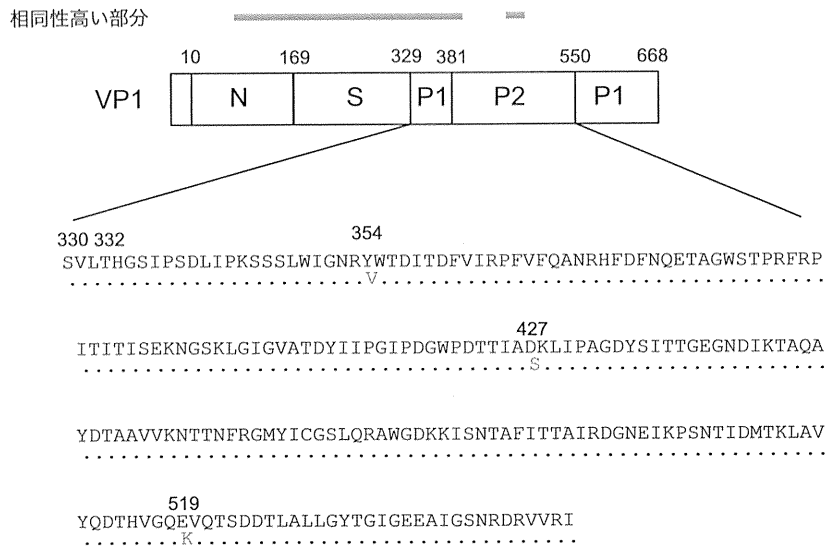


図4 CV-1細胞に馴化したFCVevはVP1にアミノ酸変異をもつ

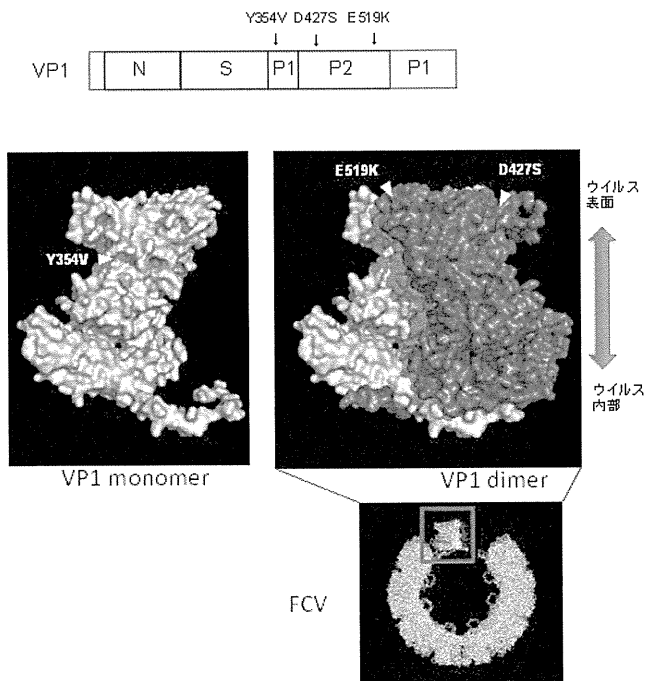


図5 CV-1細胞適応FCV VP1のアミノ酸変異の3D構造上での位置

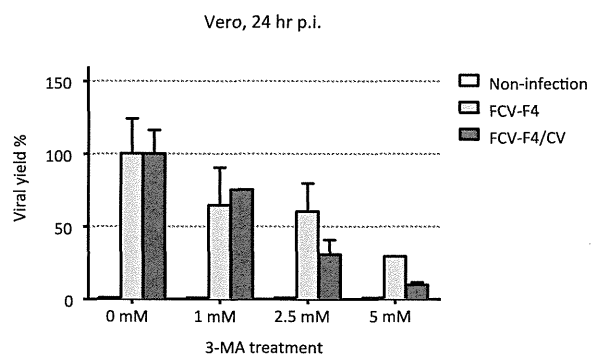
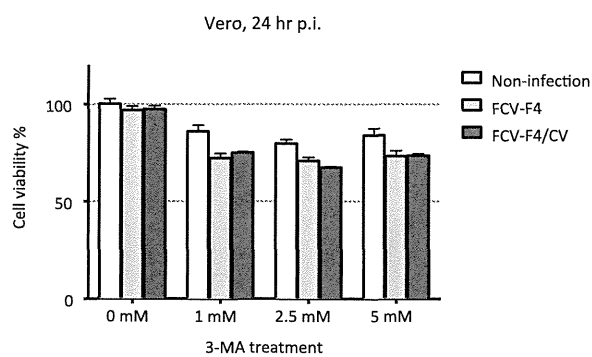


図6 カリシウイルス感染 Vero 細胞への 3MA の影響

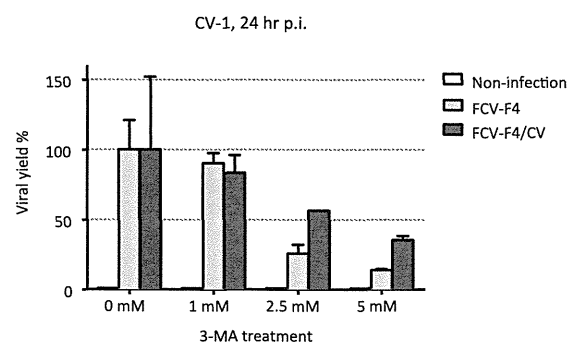
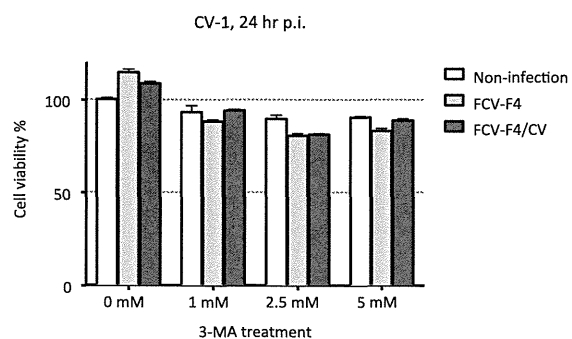


図7 カリシウイルス感染 CV-1 細胞への 3MA の影響

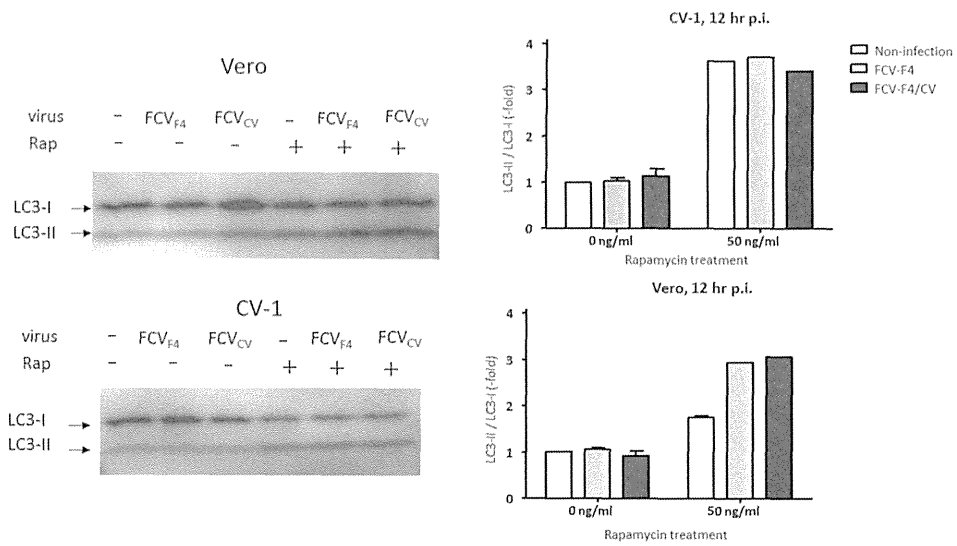


図 8 ラパマイシンによるオートファジーの誘導

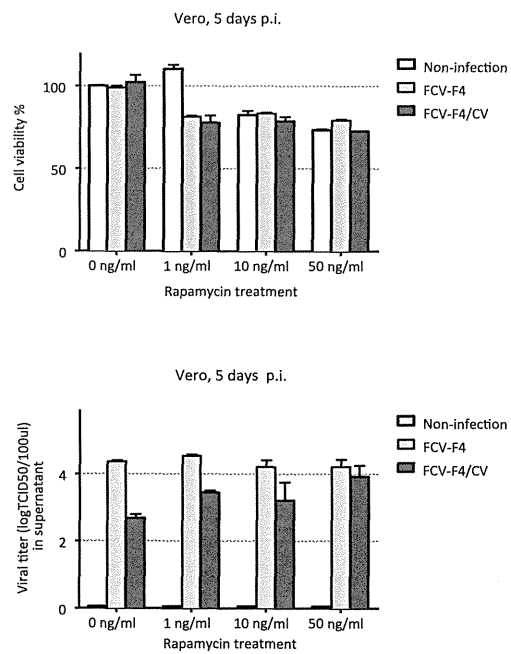


図 9 ラパマイシンの Vero 細胞への影響

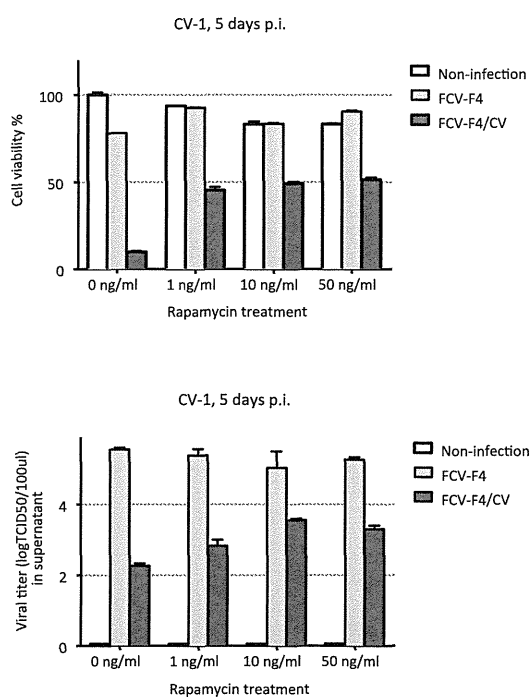


図 10 ラパマイシンの CV-1 細胞への影響

```

feline  NGTEARAGRRQLVFT-HVVLNHLALRGAVYTSEPCVVRVPEDKPAKLECSYDGFENRFRW
AGM    NGTKAQADRRXLIHLHLETTATLLICPLALGSSVTVHSEKPFVRIPEKNPVKLSCAYSGFSSPRV
Human  .....VE...C.....S.....

EMKFAHGDIITSLVCMKNKITASADRVIFPSHSCITFEHVTRKDTGTYTCMVSDDCGNTYC
ENKFDQSGDTTKLVCMYNNKICASYEDRVIFLPSGITFKSVTREDTGTTCMVSEEGGKNYG
.....R.....I.....S..

EVSVQLTVLVPPSKPTVHI1PS2SATICSRAVLTCSEKDCSPPSEYYWFKDGV3RMPLEPKCN
EVKVRILIVLPPSKPTVSI4PS5SATICNRAVLTCSEKDCSPPSEYTWFKDGV6VMPENKST
.....N.....Q.....

RAFSNSSYSLNEKTGELVFD7PVSAWDTGEYTC8EAQNSYGM9PYRSEAVRMEAAELNVGGIV
RAFSNSSYVLNPTTGELVFD10PLSASDTGEYSCEARNGY11GTPXTSNAVRMEZAVERNVGVIV
.....

AAVLVPTLILLCEFLILGIVPAYRRGYFDRCKKGTSSKKVLYSQPARSEGEFRQTSSEFL-
AAVLVPTLILLGTLIFGIVPAYSRGHFCRCKKGTSSKKVLYSQPARSEGEFRQTSSEFLV
.....V.....S.....

```

図 11 ネコ、アフリカミドリザル、ヒトの JAM1 のアミノ酸配列の比較

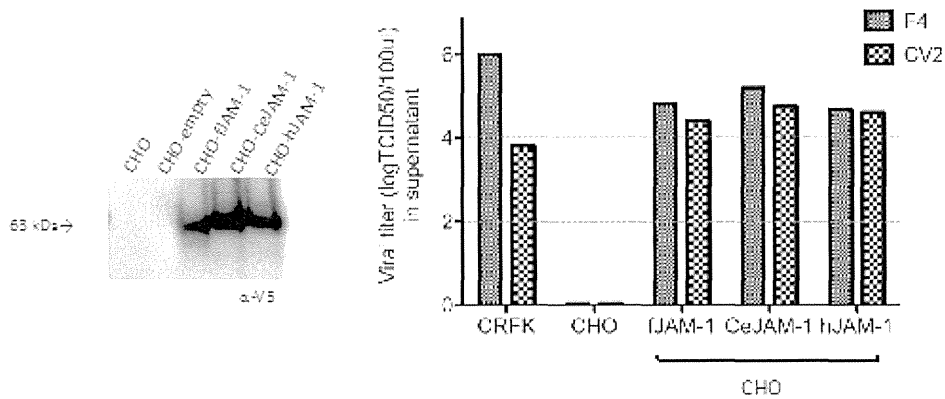


図 12 FCV はヒト JAM-1 を介して CHO 細胞に感染し，感染性ウイルス粒子を産生する

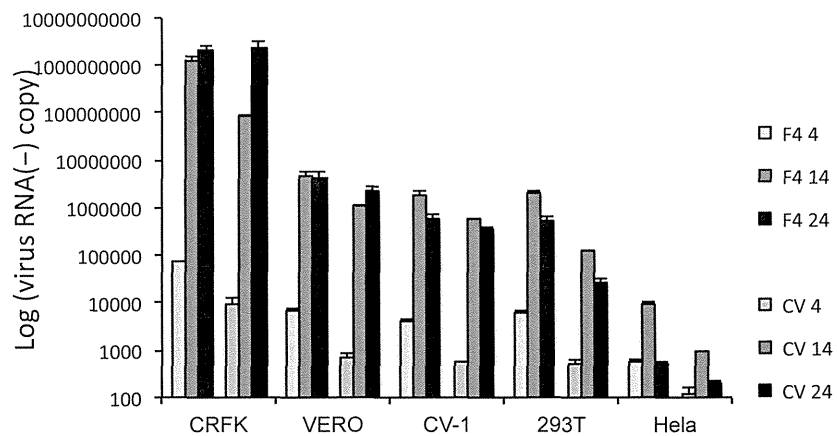


図 13 FCV は，ヒト細胞株 293T, HeLa に感染し，RNA(-)が合成される

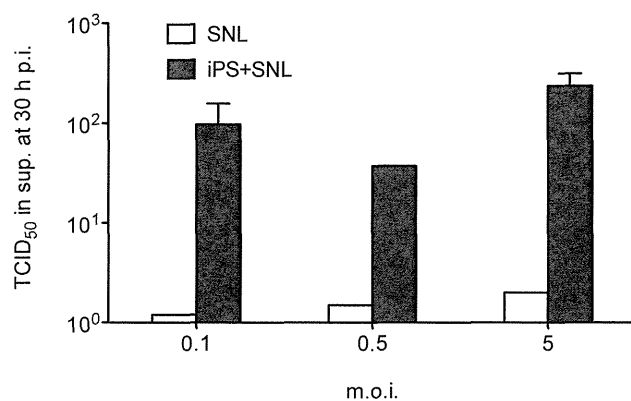


図 14 iPS 細胞-SNL78/7 細胞, SNL76/7 細胞への FCV の感染 : 上清へのウイルス粒子の産生

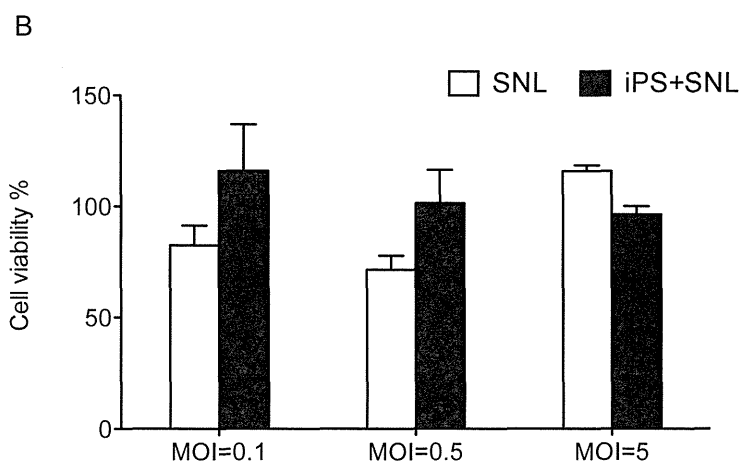


図 15 iPS 細胞-SNL78/7 細胞, SNL76/7 細胞への FCV の感染 : CPE

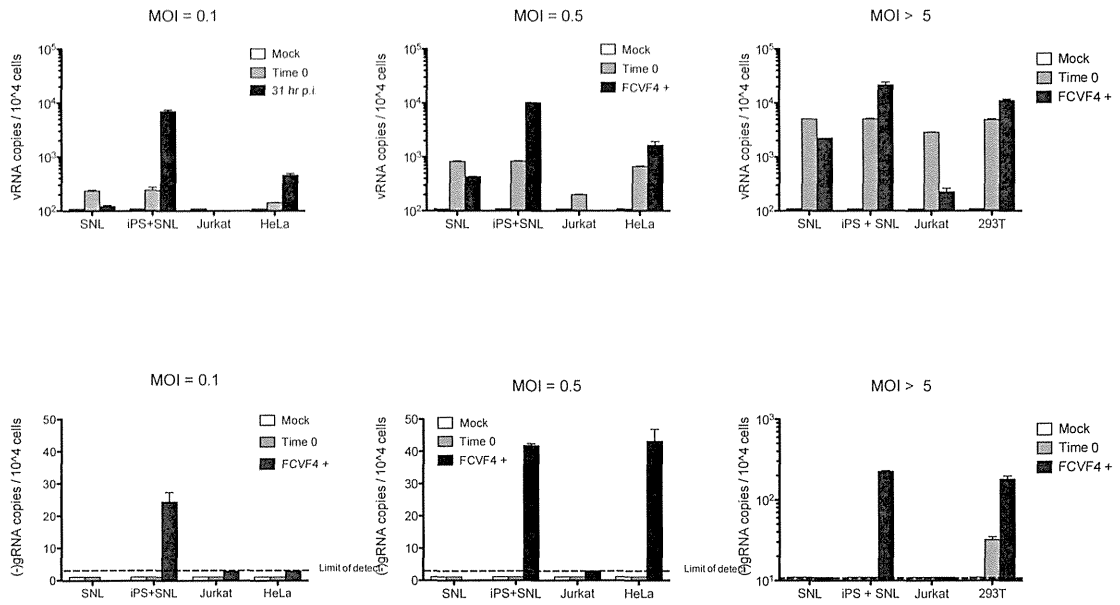


図 16 iPS 細胞-SNL78/7 細胞, SNL76/7 細胞への FCV の感染 : 細胞内のウイルス RNA の産生 (1)

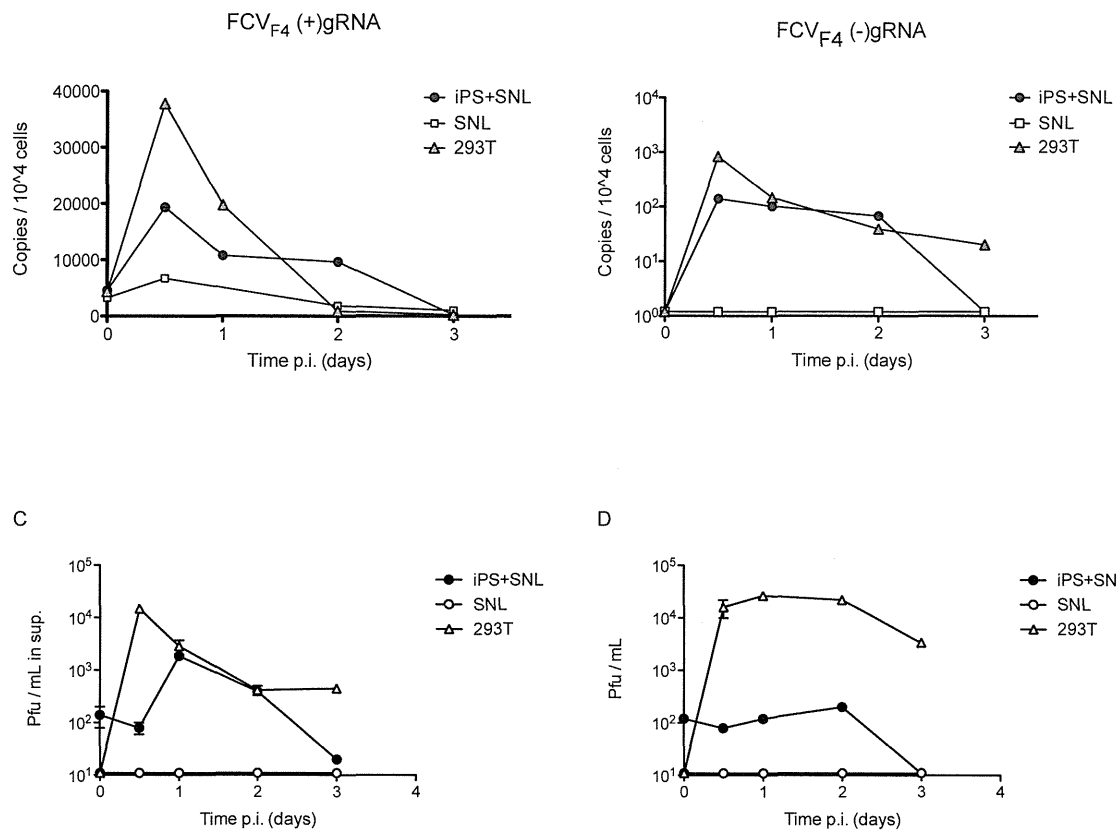


図 17 iPS 細胞-SNL78/7 細胞, SNL76/7 細胞への FCV の感染：細胞内のウイルス RNA の産生 (2)

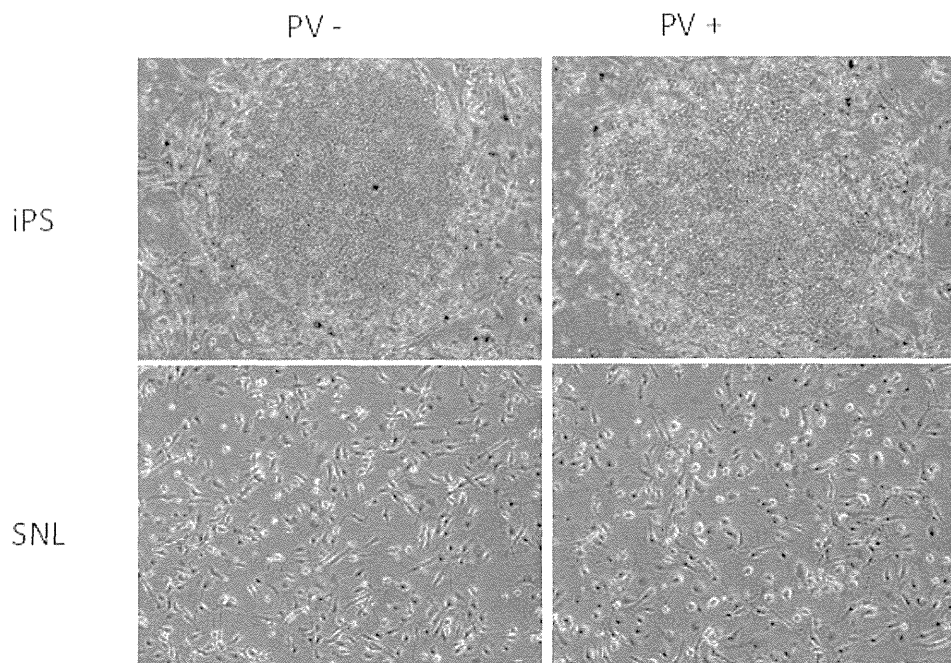


図 18 iPS 細胞-SNL78/7 細胞, SNL76/7 細胞へのポリオウイルスの感染

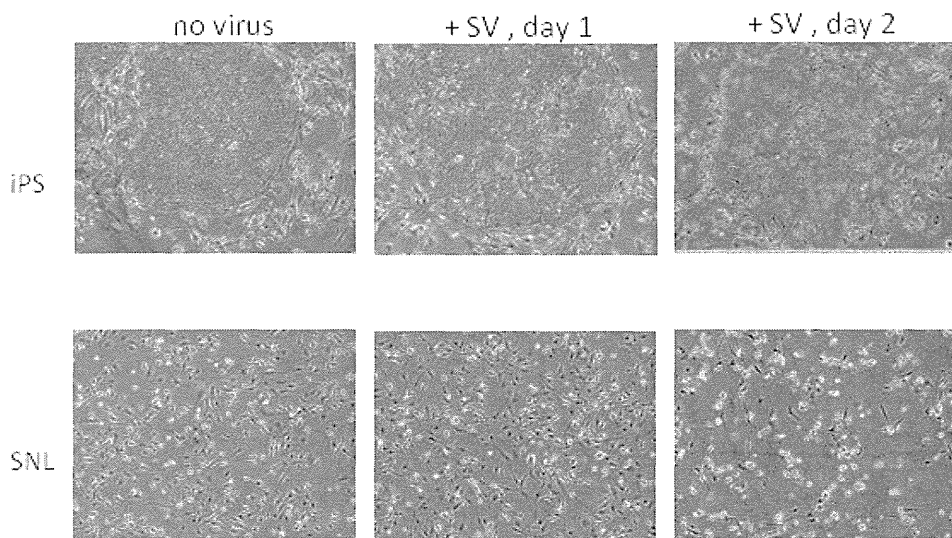


図 19 iPS 細胞-SNL78/7 細胞, SNL76/7 細胞へのシンドビスウイルスの感染