

		うち 122 例が死亡している (31%)。
エボラウイルス	感染症研 HP	患者数 1617 例中死亡者数は 1104 例で致命率は 68% となる。
マールブルグウイルス	感染症研 HP	11 例の死亡が報告されている。
サーズコロナウイルス	感染症研 HP	報告症例数は、2002 年 11 月～2003 年 8 月に中国を中心に 8,096 人で、うち 774 人が死亡している (9.6%)。
新型コロナウイルス	感染症研 HP	合計 90 人からウイルスが検出され、うち 45 人が死亡している (50%)。
ラッサウイルス	感染症研 HP	年間 20-30 万人程の感染者があると推定されており、致死率は感染者の 1-2% である。リバビリンを発症直後に用いると致死率は 90% から 10% になる。
サル痘ウイルス	感染症研 HP	致死率は、アフリカでの流行では数～10% と報告されているが、2003 年のアメリカ合衆国での流行では、死亡例は報告されていない。
黄熱ウイルス	感染症研 HP	WHO が発表した 1990 年から 1999 年までの報告数を合計すると、患者数 11274 例中死亡者数は 2648 例で致命率は 23% であった。
ハンタンウイルス	感染症研 HP	米国では 1993 年から 2000 年 3 月までの累積では 238 例で、平均年齢は 37 歳、男性が 144 例、183 例が白人、49 例がアメリカインディアンで、致死率 42% であった。カナダではアルバータを主として、西部で多く発生している。1994 年から 1999 年に 32 例があり、うち 12 例 (38%) 死亡した。これまでに少なくとも、アルゼンチン 191 例、ウルグアイ 15 例、チリ 70 例、パラグアイ 34 例、ブラジル 12 例の報告がある。
HBV	人口動態統計 感染症研 HP	平成 24 年の死亡数は 481 人。 2002 年の世界保健機関(WHO)の推計では、HBV 感染者は世界中で 20 億人、HBV 持続感染者は 3.5 億人、年間 50-70 万人の人々が HBV 関連疾患で死亡していると報告している。米国の場合、80 万人から 140 万人の HBV キャリアが存在すると推定され、年間 2,000 から 3,000 人が HBV 感染に関連する原因で死亡している。
HCV	人口動態統計 感染症研 HP	平成 24 年の死亡数は 4484 人。 2006 年の癌 (悪性新生物) 死亡者数は 329,314 人で、

		そのうち肝臓による死亡者は 33,662 人、全癌死の 10.2%を占めており、その約 8 割が C 型肝炎を伴っている。
HIV	人口動態統計 感染症研 HP	平成 24 年の死亡数は 50 人。 世界の HIV 感染者数は 3530 万と推定される。新たな感染及び死亡者数は減少傾向にあるものの、2012 年の 1 年間に新たに 230 万人が HIV に感染し、160 万人がエイズ関連疾患で死亡した。これはエイズの流行が始まって以来およそ 7500 万人が HIV に感染し 3600 万人がエイズ関連の疾病で死亡したと考えられる。
HTLV	人口動態統計	2000 年以降毎年 1,000 人以上が ATL で亡くなっていることが分かり、1996 年～1997 年の T・B リンパ腫研究グループによる第 9 次 ATL 全国実態調査で報告された年間発症数の 700 例と比較して、患者数が増加していることが示唆された。
狂犬病ウイルス	感染症研 HP	全世界で毎年 3 万 5,000～5 万人が狂犬病によって死亡している。
インフルエンザウイルス	人口動態統計 米国 CDC	平成 24 年の死亡数は 1275 人だったが、23 年と 22 年はそれぞれ 574 人と 161 人だった。 米国全体(約 3 億人)では 2013 年が 164 例、2012 年が 52 例。
E 型肝炎ウイルス	感染症研 HP	E 型肝炎の特徴の一つとして、妊婦で劇症肝炎の割合が高く、致死率が 20%にも達することがある。母子感染に関してははっきり分かっていないが、治癒した妊婦の胎児発育には影響がないとする報告がある。 HEV 感染による致死率は 1～2%であるが、これも HAV に比べ 10 倍の高さである。
ヒトパピローマウイルス	人口動態統計	平成 24 年の子宮頸部癌による死亡数は 6113 人。
ロタウイルス	感染症研 HP	先進国の代表として、米国のデータを示すと、5 歳未満のロタウイルス感染症者での年間の死亡例が 20～60 人、入院が 5.5～7 万人、救急外来受診者が約 20～27 万人、41 万人の外来受診者に上ると推計されている。
東部ウマ脳炎ウイルス	米国 CDC	2012 年に米国では 15 例が発症し、5 例が死亡した (33%)。
ヘンドラウイルス	(Dups, 2012 Marsh, 2013)	これまでに感染した 7 人のうち、4 人が死亡している (57%)。

ニパウイルス	感染症研 HP	155 人がニパウイルス感染，死亡者については，55 人であった（35%）.
--------	---------	--

表6 JADER を使用した PHA 法によるウイルス感染リスク評価

ウイルス名	報告件数	頻度 ランク	重篤例数	重篤例 の割合	重篤度 ランク	スコア
CMV	761	9	110	20%	3	27
VZV	690	9	87	15%	1	9
HBV	372	9	135	43%	5	45
BKV	167	9	13	13%	1	9
EBV	108	7	31	43%	5	35
FLU	91	7	7	10%	1	7
HCV	78	5	23	44%	5	25
HSV	62	5	8	17%	1	5
JCV	52	5	34	79%	7	35
B19	37	3	3	11%	1	3
ADV	32	3	7	24%	3	9
HPV	28	3	3	21%	3	9
HHV-6	24	3	4	24%	3	9
RSV	11	1	2	25%	3	3
HHV-8	9	1	2	n.d.	n.d.	n.d.
HRV	8	1	1	n.d.	n.d.	n.d.
HIV	6	1	1	n.d.	n.d.	n.d.
HHV-7	5	1	0	n.d.	n.d.	n.d.
HEV	2	1	0	n.d.	n.d.	n.d.
HGV	1	1	1	n.d.	n.d.	n.d.
HAV	1	1	0	n.d.	n.d.	n.d.

表7 IASR 及び IDWR を使用した PHA 法によるウイルス感染リスク評価

ウイルス名	IASR 週平均	IDWR 週平均	頻度 ランク	重篤度 ランク	スコア
VZV	1.04	6215	9	1	9
HBV		3.6	3	9	27
FLU	131	12863	9	1	9
HCV		0.72	1	9	9
B19	0.51	206.5	7	1	7
HHV-6	6.72	1304	9	1	9
RSV	23.7	3714	9	1	9
HRV	11.4	25	5	1	5
HIV		29.1	5	9	45
HEV	0.06	1.77	3	9	27
HAV	0.49	3.88	3	9	27
風疹ウイルス	1.78	82.6	5	9	45
麻疹ウイルス	13.9	6.78	3	9	27
デングウイルス	1.14	3.97	3	9	27
日本脳炎ウイルス	0.01	0.12	1	9	9
チクングニアウイルス	0.05	0.21	1	9	9
重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)	0.06	0.92	1	9	9
HSV	3.51	n.d.	3	1	3
CMV	3.32	n.d.	3	1	3
HHV-7	3.72	n.d.	3	1	3
EBV	2.05	n.d.	3	1	3
HPV	0.99	n.d.	1	1	1
コクサッキーウイルス	35.7	n.d.	5	1	5
エコーウイルス	11.3	n.d.	5	1	5
ポリオウイルス	0.05	n.d.	1	1	1
エンテロウイルス	8.64	n.d.	3	1	3
パレコウイルス	1.91	n.d.	3	1	3
ライノウイルス	29.2	n.d.	5	1	5
アイチウイルス	0.03	n.d.	1	1	1
Saffold カーディオウイルス	0.08	n.d.	1	1	1
パラインフルエンザウイルス	12.7	n.d.	5	1	5
メタニューモウイルス	23.7	n.d.	5	1	5
レオウイルス	0.03	n.d.	1	1	1

アストロウイルス	1.73	n.d.	3	1	3
ノロウイルス	61.9	n.d.	5	1	5
サポウイルス	8.18	n.d.	3	1	3
AdV	27.2	n.d.	5	1	5
ガナリトウイルス	n.d.	0	1	9	9
サビアウイルス	n.d.	0	1	9	9
フニンウイルス	n.d.	0	1	9	9
マチュポウイルス	n.d.	0	1	9	9
ラッサウイルス	n.d.	0	1	9	9
鳥インフルエンザウイルス	n.d.	0	1	9	9
西部ウマ脳炎ウイルス	n.d.	0	1	9	9
東部ウマ脳炎ウイルス	n.d.	0	1	9	9
ベネズエラウマ脳炎ウイルス	n.d.	0	1	9	9
ニパウイルス	n.d.	0	1	9	9
ヘンドラウイルス	n.d.	0	1	9	9
ポリオウイルス	n.d.	0	1	9	9
エボラウイルス	n.d.	0	1	9	9
マールブルグウイルス	n.d.	0	1	9	9
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	n.d.	0	1	9	9
リフトバレー熱ウイルス	n.d.	0	1	9	9
ウエストナイルウイルス	n.d.	0	1	9	9
黄熱ウイルス	n.d.	0	1	9	9
サル痘ウイルス	n.d.	0	1	9	9
狂犬病ウイルス	n.d.	0	1	9	9

表8 各種医薬品と各種ウイルス感染症リスク因子の検討

	医薬品一般名	例数	女性 (95%CI)	60代以上	10代以下
CMV	インフリキシマブ	36	1.14 (0.57-2.25)	1.39 (0.72-2.69)	2.00 (0.47-8.49)
	バシリキシマブ	172	0.98 (0.63-1.52)	0.92 (0.52-1.62)	1.09 (0.60-1.97)
	リツキシマブ	36	0.57 (0.28-1.17)	0.85 (0.44-1.66)	n.d.
	抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリン (ATG)	258	1.01 (0.76-1.34)	1.27 (0.95-1.70)	0.75 (0.52-1.08)
	シクロスポリン内用薬	333	1.13 (0.90-1.42)	0.96 (0.74-1.23)	0.66 (0.46-0.95)
	シクロスポリン注射薬	39	1.55 (0.79-3.06)	2.87 (1.16-7.11)	0.57 (0.25-1.29)
	タクロリムス内用薬	214	0.49 (0.37-0.65)	0.41 (0.29-0.57)	1.60 (1.05-2.43)
	タクロリムス注射薬	265	1.53 (1.18-1.99)	0.65 (0.40-1.07)	1.64 (1.24-2.19)
	プレドニゾロン	178	0.86 (0.63-1.16)	1.34 (0.99-1.83)	1.05 (0.57-1.92)
	ミコフェノール酸モフェチル	204	1.16 (0.86-1.57)	0.45 (0.26-0.79)	1.06 (0.70-1.60)
	メトトレキサート	18	3.06 (0.70-13.4)	0.83 (0.30-2.33)	21.8 (2.68-177)
VZV	アダリムマブ	42	0.89 (0.48-1.67)	0.97 (0.52-1.81)	1.30 (0.17-9.85)
	インフリキシマブ	75	1.67 (1.00-2.78)	2.01 (1.24-3.23)	0.92 (0.22-3.82)
	エタネルセプト	66	1.78 (0.93-3.43)	1.15 (0.68-1.94)	n.d.
	トシリズマブ	68	1.57 (0.88-2.80)	1.87 (1.09-3.19)	1.63 (0.77-3.45)
	バシリキシマブ	11	0.67 (0.17-2.56)	0.51 (0.06-4.03)	n.d.
	リツキシマブ	25	1.22 (0.55-2.69)	1.03 (0.46-2.30)	3.18 (0.73-14.0)
	ATG	35	2.44 (1.20-4.95)	0.53 (0.24-1.18)	2.39 (1.19-4.84)
	シクロスポリン内用薬	92	1.04 (0.68-1.58)	0.77 (0.48-1.26)	1.14 (0.65-2.00)
	タクロリムス内用薬	136	1.04 (0.73-1.48)	0.46 (0.31-0.70)	1.59 (0.95-2.66)
	タクロリムス注射薬	45	1.52 (0.84-2.75)	0.20 (0.03-1.45)	1.25 (0.64-2.43)
	プレドニゾロン	69	1.13 (0.70-1.83)	1.17 (0.72-1.90)	0.65 (0.20-2.10)
	ミコフェノール酸モフェチル	64	1.46 (0.88-2.42)	0.77 (0.34-1.72)	1.89 (1.05-3.40)
	メトトレキサート	54	1.34 (0.70-2.56)	1.12 (0.59-2.13)	n.d.
HBV	インフリキシマブ	20	1.50 (0.58-3.92)	0.47 (0.18-1.23)	n.d.
	リツキシマブ	183	0.95 (0.70-1.30)	1.46 (1.05-2.03)	n.d.
	シクロスポリン内用薬	38	0.78 (0.40-1.52)	1.82 (0.95-3.47)	0.16 (0.02-1.14)
	タクロリムス内用薬	16	1.14 (0.41-3.15)	3.59 (1.24-10.4)	n.d.
	タクロリムス注射薬	19	2.38 (0.95-5.96)	3.24 (1.15-9.08)	1.22 (0.44-3.40)
	メトトレキサート	41	0.59 (0.32-1.12)	0.40 (0.22-0.75)	n.d.
BKV	バシリキシマブ	20	0.58 (0.21-1.65)	1.31 (0.42-4.06)	1.51 (0.48-4.70)

BKV	シクロスポリン内用薬	26	0.60 (0.26-1.38)	0.10 (0.01-0.73)	1.76 (0.70-4.40)
	タクロリムス内用薬	33	0.25 (0.12-0.55)	0.51 (0.23-1.14)	1.41 (0.49-4.05)
	タクロリムス注射薬	60	1.07 (0.63-1.82)	2.06 (1.05-4.02)	0.24 (0.09-0.66)
	プレドニゾロン	76	0.70 (0.44-1.11)	1.39 (0.87-2.21)	n.d.
	ミコフェノール酸モフェチル	55	0.47 (0.26-0.88)	2.27 (1.21-4.27)	0.30 (0.09-0.98)
EBV	インフリキシマブ	9	0.80 (0.22-2.99)	3.89 (0.81-18.8)	4.25 (0.53-34.4)
	バシリキシマブ	11	1.03 (0.30-3.59)	n.d.	1.32 (0.28-6.27)
	ATG	89	0.87 (0.56-1.35)	0.69 (0.43-1.12)	2.41 (1.52-3.82)
	シクロスポリン内用薬	15	0.83 (0.51-1.36)	0.70 (0.39-1.24)	2.49 (1.46-4.23)
	タクロリムス内用薬	24	1.14 (0.50-2.62)	0.32 (0.11-0.94)	10.6 (4.72-23.9)
	タクロリムス注射薬	50	1.36 (0.77-2.40)	0.18 (0.02-1.29)	7.06 (3.89-12.8)
	プレドニゾロン	17	0.50 (0.19-1.36)	0.80 (0.31-2.07)	0.91 (0.12-6.86)
	ミコフェノール酸モフェチル	19	0.66 (0.25-1.74)	n.d.	3.25 (1.26-8.37)
	メトトレキサート	30	1.05 (0.47-2.37)	1.60 (0.61-4.19)	n.d.
FLU	トシリズマブ	10	3.96 (0.50-31.3)	0.18 (0.04-0.83)	18.6 (5.19-66.4)
	シクロスポリン内用薬	12	1.89 (0.60-5.97)	0.50 (0.11-2.26)	2.93 (0.88-9.77)
	タクロリムス内用薬	33	2.15 (0.97-4.79)	0.36 (0.15-0.87)	1.41 (0.49-4.05)
HCV	シクロスポリン内用薬	15	1.54 (0.56-4.26)	0.90 (0.29-2.84)	n.d.
	タクロリムス内用薬	14	0.27 (0.09-0.87)	0.44 (0.12-1.58)	n.d.
	タクロリムス注射薬	16	1.03 (0.37-2.85)	7.14 (2.63-19.4)	0.23 (0.03-1.71)
AdV	シクロスポリン注射薬	7	1.04 (0.23-4.72)	1.51 (0.18-13.1)	n.d.
	タクロリムス注射薬	28	1.11 (0.52-2.39)	0.68 (0.16-2.89)	1.14 (0.49-2.69)
	ミコフェノール酸モフェチル	21	0.88 (0.36-2.14)	1.06 (0.31-3.63)	1.72 (0.62-4.74)
HSV	トシリズマブ	6	n.d.	0.14 (0.02-1.22)	n.d.
	シクロスポリン内用薬	7	1.80 (0.40-8.05)	n.d.	n.d.
	タクロリムス外用薬	25	0.78 (0.31-1.94)	n.d.	5.81 (2.20-15.3)
JCV	リツキシマブ	24	1.32 (0.59-2.97)	2.63 (0.98-7.08)	n.d.
	プレドニゾロン	15	0.81 (0.29-2.23)	0.60 (0.21-1.68)	n.d.
HH6	アロプリノール	10	1.15 (0.32-4.08)	0.67 (0.19-2.40)	36.6 (6.88-194)
	カルバマゼピン	26	1.19 (0.55-2.58)	1.40 (0.64-3.07)	0.80 (0.24-2.68)
	シクロスポリン内用薬	9	1.08 (0.29-4.02)	n.d.	2.93 (0.73-11.7)
	ラモトリギン	19	1.08 (0.42-2.74)	1.49 (0.53-4.17)	n.d.
B19	タクロリムス内用薬	8	1.14 (0.27-4.78)	0.23 (0.03-1.88)	n.d.
	タクロリムス注射薬	10	1.72 (0.50-5.97)	n.d.	1.46 (0.38-5.68)

	プレドニゾン	7	0.37 (0.07-1.90)	n.d.	19.7 (4.37-88.5)
	ミコフェノール酸モフェチル	10	3.37 (0.87-13.1)	6.51 (1.86-22.7)	0.60 (0.08-4.77)
	リツキシマブ	6	1.32 (0.27-6.56)	1.37 (0.25-7.49)	n.d.
赤芽球癆	エポエチン α	16	0.26 (0.08-0.83)	4.26 (0.90-20.2)	n.d.
	エポエチン β	31	0.41 (0.17-1.02)	1.68 (0.65-4.35)	0.52 (0.07-4.24)
	ダルベポエチン α	19	0.52 (0.18-1.46)	0.52 (0.18-1.48)	n.d.
	エポエチン β ペゴル	13	0.88 (0.29-2.68)	0.68 (0.22-2.08)	n.d.
	PEG-IFN α -2b	7	0.99 (0.22-4.42)	2.17 (0.42-11.2)	n.d.
	PEG-IFN α -2a	5	1.46 (0.24-8.73)	1.31 (0.22-7.84)	n.d.
	カルバマゼピン	8	0.71 (0.17-2.99)	1.15 (0.27-4.80)	131 (12.7-1349)

分担研究報告書

ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究

研究分担者 前田 洋助 熊本大学生命科学研究部准教授

研究要旨：HTLV-1の感染では細胞-細胞間伝搬が主たる伝播様式と考えられており、感染細胞の非存在下、すなわちウイルス粒子による感染の効率は非常に低いとされている。しかしながら実際にまったく感染リスクが存在しないかどうかは不明である。そこで本研究ではバイオ医薬品で問題となるHTLV-1ウイルス粒子の混入やヒト細胞組織加工医薬品で問題になるHTLV-1感染細胞の混入による感染リスクをそれぞれ定量的に評価する系を確立した。その結果HTLV-1 Envを介したcell-freeによる感染リスクはもう一つのヒトレトロウイルスであるHIV-1に比較して20倍以上低いこと、感染細胞-細胞間の感染効率はHIV-1と同等であることが明らかとなった。さらにHTLV-1 Envのcell-freeのEnvは温度非依存的に非常に不安定であり、感染細胞より遊離後約4時間で感染性が完全に消失してしまうことから、無細胞製剤であるバイオ医薬品においてはHTLV-1粒子の混入による感染リスクは軽微と考えられた。一方ヒト細胞組織加工医薬品においてHTLV-1感染細胞の混入や汚染による感染のリスクは高いことが懸念される。HTLV-1感染細胞が完全に除去できないとすると、感染細胞の制御がこのような細胞由来製品の供給においては重要である。そこでその基礎的研究としてオルガネラ（細胞内小器官）の酸性化阻害剤である塩化アンモニウム、クロロキン、bafilomycin A1の感染阻害効果について検討した。その結果HTLV-1感染細胞をこれらの薬剤で処理すると、HTLV-1感染細胞の感染伝搬能がほぼ完全に消失することが判明した。このことはヒト細胞組織加工医薬品にHTLV-1感染細胞が汚染・混入しても、何らかの細胞環境を変えることによりその感染リスクを低減させる可能性があることを示している。

A. 研究目的

HTLV-1やHIV-1などヒトレトロウイルスはRNAをゲノムとするウイルスであるが、自身のもつ逆転写酵素によりRNAからDNAへ逆転写されたプロウイルスがヒト細胞の染色体に組み込まれて長期の持続感染状態となり、ウイルスの排除は極めて困難である。HTLV-1は主にCD4陽性T細胞に感染し、50年以上の長い潜伏期間を経て成人T細胞白血病 (Adult T cell leukemia, ATL) やHTLV-1関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy/Tropical Spastic paraparesis, HAM/TSP) を、HIV-1ではやはりCD4陽性T細胞やマクロファージに感染し、感染後約10年の無症候期を経て後天性免疫不全症候群 (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) など重篤な疾患を引き起こすことが知られている。これらのウイルス感染は主に血液や体液を介して感染が成立し、感染後長期間無症状であるため、一般に感染に気づかれない可能性が高い。特にHTLV-1はCD4陽性T細胞だけでなく、CD8陽性T細胞、マクロファージ、樹状細胞などの血液・免疫系細胞、astrocyteなどの神経細胞、さらには

血管内皮細胞など上皮系細胞等に幅広く感染していることが報告されている。したがってバイオ医薬品やヒト細胞組織加工医薬品の製造工程においても何らかの不可抗力によりこれらのヒトレトロウイルスが混入・汚染して感染してしまう危険性がある。

HTLV-1の感染は、一般に母乳や血液に存在する感染リンパ球から細胞-細胞間感染により成立すると考えられている。日本では九州を中心に全国で約1%のキャリアが存在しており、再生医療などに用いられるヒト細胞組織加工医薬品の製造工程においてHTLV-1感染細胞の混入や汚染の危険性は比較的高いことが想定される。また、バイオ医薬品製造においては細胞が除去されている状況であるため、細胞-細胞間伝播によって感染するHTLV-1の感染のリスクは低いことが予想されるが、感染細胞が除去されたウイルスによる感染系、すなわちcell-freeのウイルス粒子により、どの程度の感染リスクがあるのかについては詳細な研究がなされていないのが現状である。これはHTLV-1の*in vitro*におけるcell-freeの感染系がこれまで十分に確立できていなかったことが理由として挙げられる。

HTLV-1感染においてはそのエンベロープタンパク質であるEnv (gp46 + gp21)が細胞内侵入、すなわちその感染成立に重要な役割を担っているため、本研究では特にHTLV-1 Envを発現するレトロウイルス感染細胞ないしcell-freeのレトロウイルス粒子による感染リスクを評価する系を確立することを試みた。一般にHTLV-1感染においては組み換えウイルス粒子の作製効率が非常に低いため、これまでは十分に感染性を有するウイルス粒子の産生系が困難であった。これはHTLV-1のgag-pol産生能が低いことが一因として考えられている。そこで本研究では効率の良いGag-Pol産生が期待できるHIV-1の感染系を利用し、HTLV-1 Envを含む種々のEnvとのシールドタイプ HIVとして作製し、HTLV-1 Envのcell-freeならびにcell-cell伝搬様式における感染リスクをHIV-1 Envと比較して評価した。

B. 研究方法

1. cell-free感染系の確立

レトロウイルス粒子産生のためのベクターとしてはHIV-1ベクターであるpNL-Luc ΔBgIIIを用いた。このベクターはHIV-1のenv遺伝子を欠損しnef遺伝子の領域にluciferase遺伝子をレポーターとして有するベクターである。このベクターは同時にHIV-1のGag-Polも発現するため、レトロウイルス粒子を産生させることが可能である。このHIV-1ベクターと種々のウイルスEnv発現ベクターを293T細胞にコトランスフェクションしてレトロウイルス粒子を産生させた。HTLV-1 env遺伝子にはその5'領域にsplicing siteがあり、splicingによりその発現効率が低下することが知られており、splicingを抑制するためにenv領域の下流にHIV-1由来のRRE (rev responsive element)を組み込み、さらにRREに結合しsplicingを抑制することが知られている。HIV-1 Revを同時に発現させることによりHTLV-1 envのsplicingを抑制し、env mRNAの核外輸送を促進させて、その発現効率を増大させた。293T細胞にこれらのベクターをコトランスフェクションして24時間後に培養上清を回収し、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 融合系の確立

レトロウイルス発現細胞としてはcell-free感染系と同様の方法で293T細胞にHIV-1のenv遺伝子欠損ベクターとEnv発現ベクターを293TにトランスフェクションしてEnv発現細胞として使用した。標的細胞として使用するHeLa由来のCD4およびCCR5発現細胞であるTZM-b1細胞の染色体内にはHIVのLTRの下流に連結されたluciferase遺伝子が組み込まれているため、ウイルス産生細胞と標的細胞が細胞融合すると、ウイルス産生細胞内でHIV-1ベクターから産生されるTatが標的細胞内に流入し、標的細胞内のLTRを活性化してluciferase活性が増大することから細胞-細胞融合能を測定することができる。ただしこの系ではEnv発現細胞の融合能は評価できるが、実際に標的細胞への感染が成立しているかどうかまでは判断できない。

3. 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遺伝子の途中に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。

4. 細胞表面、細胞内および粒子内HTLV-1 Env発現の確認

293T細胞におけるHTLV-1 Env gp46の発現ならびにレトロウイルス粒子内への取り込みについてはWestern blotにより解析した。レトロウイルス粒子は培養上清回収後、遠心によりウイルス粒子を濃縮してWestern blotを行った。また細胞表面のgp46の発現はフローサイトメトリーにより解析した。gp46の検出にはラットモノクローナル抗体であるLAT-27 (琉球大学田中勇悦教授より供与)を使用した。

5. HTLV-1 Envのプロセッシング解析

HTLV-1 EnvのC末端にFLAGタグを付加し、293T細胞内に発現させ、細胞を回収後、Western blot

を行いFLAGの抗体で染色した。Envがgp46とgp21に正常に切断されるとgp21のバンドが検出されるが、プロセッシングが阻害されると前駆タンパク質であるgp62のバンドとして検出され、gp21のバンドは検出されない(図14参照)。

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ベクターをコトランスフェクションにより発現させ、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感染に関しては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、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℃、25℃、37℃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明らかとなった(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確認したところ、感染性減弱の半減期は約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)。

4. HTLV-1 Env発現細胞におけるHTLV-1感染制御

HTLV-1感染細胞の感染制御を目的として、HTLV-1 Envおよびレトロウイルス発現293T細胞を種々の薬剤で処理し、HTLV-1 Envのcell-free感染能を解析した。本研究では細胞小器官(オルガネラ)の酸性化阻害剤である塩化アンモニウム、クロロキン、Bafilomycin A1 (BFLA1)、エンドサイトーシス阻害剤であるDynasoreに着目して実験を行った。HTLV-1 Envおよびレトロウイルス発現293T細胞をこれらの薬剤で処理してその感染能を確認した結果、オルガネラ酸性化阻害剤のレトロウイルス感染細胞への添加によりHTLV-1 Envのcell-free感染が完全に阻害された(図6)。一方HIV Envによるcell-cell融合能、cell-free感染に関してはその効果はわずかに認められるだけであった。逆に標的細胞へのこれらの薬剤添加ではやはり十分な効果は確認できなかった(図7)。さらにこれらの薬剤はcell-cell融合能、cell-cell感染も阻害することが確認された(図8)。HeLa細胞においても同様にHTLV-1 Env発現による合胞体形成がオルガネラ酸性化阻害剤により阻害され(図9)、さらにはHTLV-1感染T細胞株であるMT-2とMOLT-4の混合培養による合胞体形成能も阻害することが判明した(図10)。

5. オルガネラ酸性化阻害剤のHTLV-1 Envの感染阻害機序の解析

このようなオルガネラ酸性化阻害剤がどのような機序でウイルス感染細胞の感染性を阻害しているか解析を行った。まず細胞表面gp46の発現をフローサイトメトリーにて解析したが、これらの薬剤添加による発現低下は認められなかった(データ非掲載)。そこでgp46との結合活性を有し、HTLV-1の受容体として同定されているGlucose transporter 1 (GLUT1)の発現に着目した。通常GLUT1の細胞表面の発現は弱く抑えられており、飢餓状態などで細胞表面に移動(translocation)してることが知られている。

BFLA1はGLUT1の細胞内コンパートメントから細胞表面への移動を促進することが報告されており、実際に293T細胞でもGLUT1の発現は低く、BFLA1により細胞表面へのGLUT1の移動が確認された(図11)。またGLUT1を強制的に細胞に過剰発現させるだけでも、その感染性は量依存的に阻害され(図12)、GLUT1の細胞表面への発現がこの感染阻害に関与していることが示された。そこでGLUT1とgp46が細胞内でBFLA処理により会合するかどうか確認したところ、GLUT1とgp46の細胞内での会合はGLUT1の強制発現で確認され、さらにBFLA1処理により促進されることが判明した(図13)。さらにこの会合によりHTLV-1 Envの前駆体タンパク質であるgp62からgp46とgp21へのプロセッシングが阻害されて感染性が消失することが明らかとなった(図14)。その他のオルガネラ酸性化阻害剤もわずかではあるが同様にGLUT1の細胞表面への移動を促進することは示されたが(図11)、同様にHTLV-1 Envの感染性を阻害できるかどうかは不明である。これらの薬剤においてはその他の機序も関与している可能性があり今後の課題と考えられた。

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が減衰することを明らかにした。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。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不明であった。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り、ウイルス粒子のみでは感染が成立しないことが確認された。したがって再生医療等に用いられる細胞組織加工医薬品の作製工程におけるHTLV-1感染のリスク軽減のためには、持続的に感染性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意味している。

しかしながらウイルス感染細胞を完全に除去することは非常に困難であることから、細胞組織加工医薬品に汚染しているウイルス感染細胞からの感染伝搬を軽減させる方法として、本研究では細胞の処理による感染リスク低減の可能性を示した。本研究で示したようにオルガネラ酸性化阻害剤の添加やGLUT1を過剰に細胞表面に発現させることによりHTLV-1 Envの感染性が

強く抑制されることから、何らかの手法で細胞環境を変えることにより、HTLV-1感染細胞の感染性を軽減させる可能性があることを示した。

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非常に軽微であると結論された。今後は再生医療などで使用されるヒト細胞組織加工医薬品の製造過程におけるHTLV-1を含むヒトレトロウイルス感染細胞の除去とともに、万が一このようなヒトレトロウイルス感染細胞が汚染した場合のリスクを軽減させる手法の開発が重要な課題と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Toda T, Kuwahara K, Kondo N, Matsuda Z, Maeda Y, Maeda K, Sakaguchi N. Dynamic appearance of antigenic epitopes effective for viral neutralization during membrane fusion initiated by interactions between HIV-1 envelope proteins and CD4/CXCR4. *Immunobiology* 217: 864-872, 2012
- ② 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. *PHRAM TEC JAPAN* 28: 2075-2079, 2013
- ③ Yuan Y, Yokoyama K, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato Y, Yusa K. Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1JR-FL to maraviroc. *Plos One* 8: e65115, 2013
- ④ Suzuki K, Hattori S, Marks K, Ahlenstiel C, Maeda Y, Ishida T, Millington M, Boyd M, Symonds G, Cooper DA, Okada S, Kelleher A. Promoter targeting RNA suppresses HIV-1 infection in vivo through transcriptional gene silencing. *Molecular Therapy Nucleic Acids* e137, 2013
- ⑤ 遊佐敬介, 前田洋助, 高林誠, 小林哲, 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:
852-856, 2013

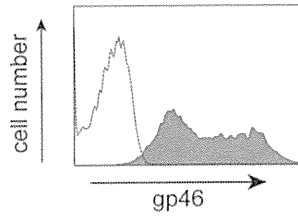
- ⑥ 前田洋助. ケモカイン受容体変異とHIV感染抵抗性. 化学療法の領域 29:
2466-2473, 2013
 - ⑦ Nakano Y, Monde K, Terasawa H, Yuan Y, Yusa K, Harada S, Maeda Y. Preferential recognition of monomeric CCR5 expressed in cultured cells by the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. *Virology* 452-453: 117-124, 2014
 - ⑧ Maeda Y, Terasawa H, Nakano Y, Monde K, Yusa K, Oka S, Takiguchi M, Harada S. V3-independent competitive resistance of a dual-X4 HIV-1 to the CXCR4 inhibitor AMD3100. *Plos One* e89515, 2014
 - ⑨ 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 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・総会大阪, 2012年11月
 - ② 寺沢広美, 前田洋助, 河野里奈, 中野雄介, 門出和精, 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・総会, 横浜, 2012年11月
 - ③ Terasawa H, Maeda Y, Nakano Y, Monde K, Kawano R, Yusa K, Harada S. Competitive resistance of a CXCR4-using HIV-1 lacking amino acid substitutions in the V3 loop of gp120 to a CXCR4 inhibitor. XIV Kumamoto AIDS seminar Kumamoto, Japan, 2013
 - ④ Nakano Y, Maeda Y, Monde K, Terasawa H, Yusa K, Harada S. Preferential recognition of monomeric forms of CCR5 by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. XIV Kumamoto AIDS seminar Kumamoto, Japan, 2013

- ⑤ 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のcoreceptorのoligomer形成がHIV-1の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 神戸, 2013年11月
- ⑥ 前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中野雄介, 門出和精, 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 神戸, 2013年11月
- ⑦ 寺沢広美, 前田洋助, 中野雄介, 遊佐敬介, 原田信志. CRF01_AE X4 HIV-1のCXCR4阻害剤耐性獲得機構の解析. 第27回日本エイズ学会学術集会 熊本, 2013年11月
- ⑧ 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
- ⑨ 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の放出抑制に關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
- ⑩ 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

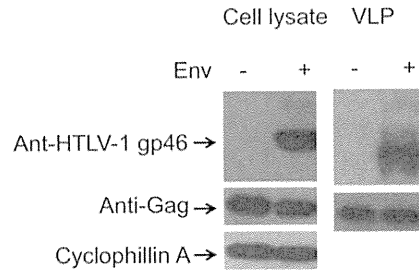
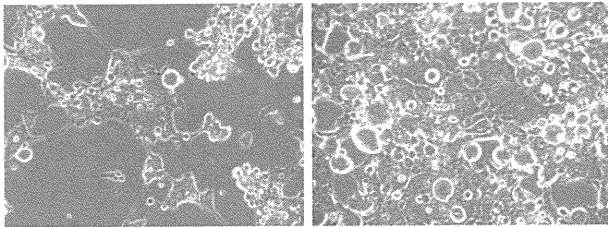


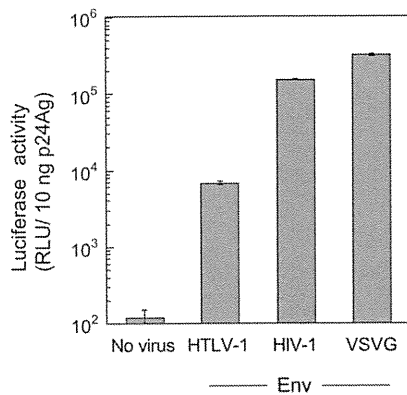
図1 HTLV-1 Envのレトロウイルス感染細胞表面発現とレトロウイルス粒子内取り込み



293T cells

図2 HTLV-1 Envの膜融合能

A. Cell-free 感染



B. Cell-cell 感染

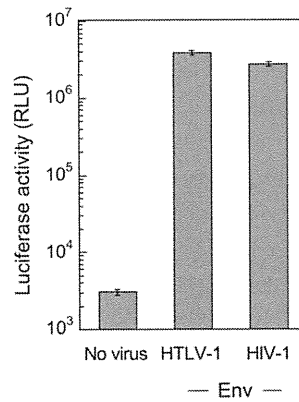


図3 HTLV-1 Envによるcell-freeとcell-cell感染の効率

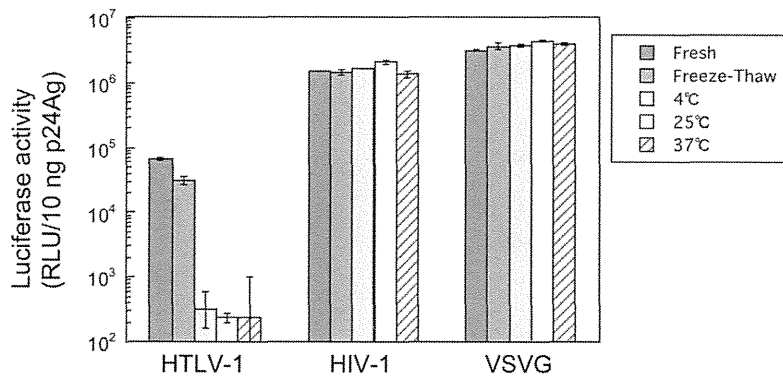


図4 HTLV-1 Envを含むレトロウイルス粒子の温度非依存的不安定性

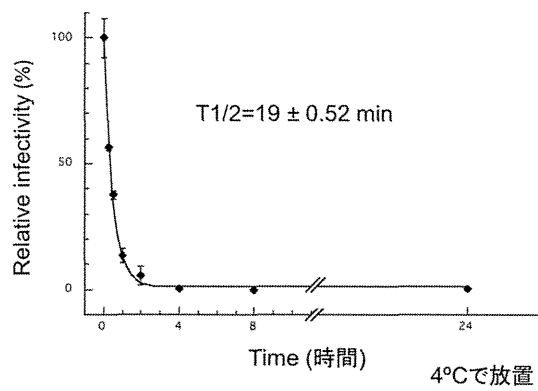


図5 HTLV-1 Envを含むレトロウイルス粒子の不安定性の時間経過

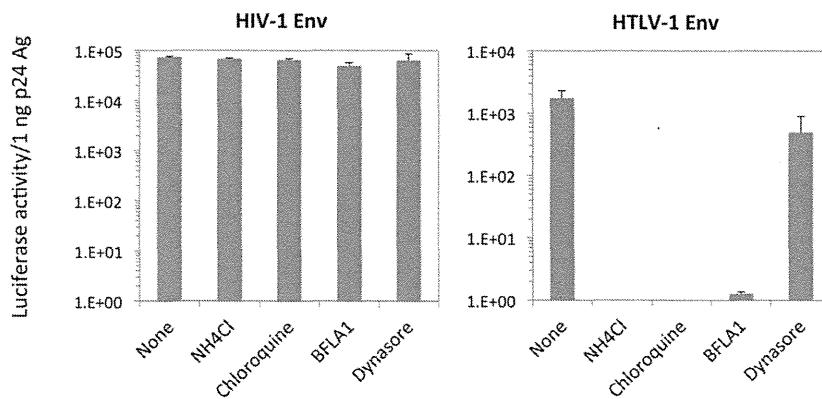


図6 レトロウイルス産生細胞へのオルガネラ酸性化阻害剤とエンドサイトーシス阻害剤処理によるcell-freeウイルスの感染性

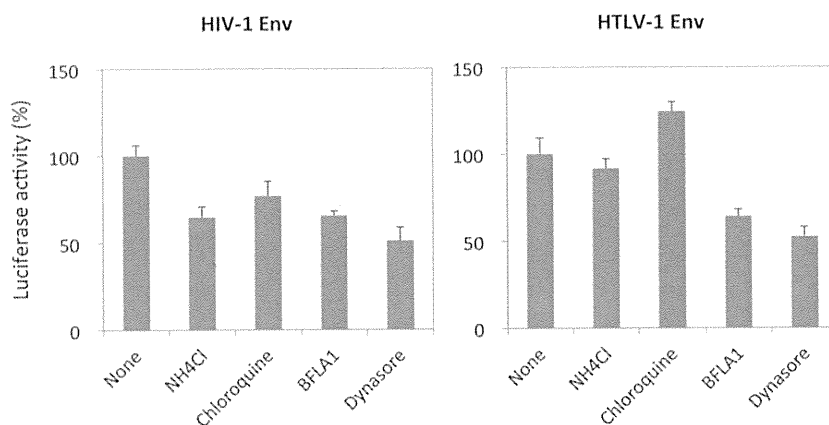


図7 標的細胞へのオルガネラ酸性化阻害剤とエンドサイトーシス阻害剤処理によるcell-freeウイルスの感染性

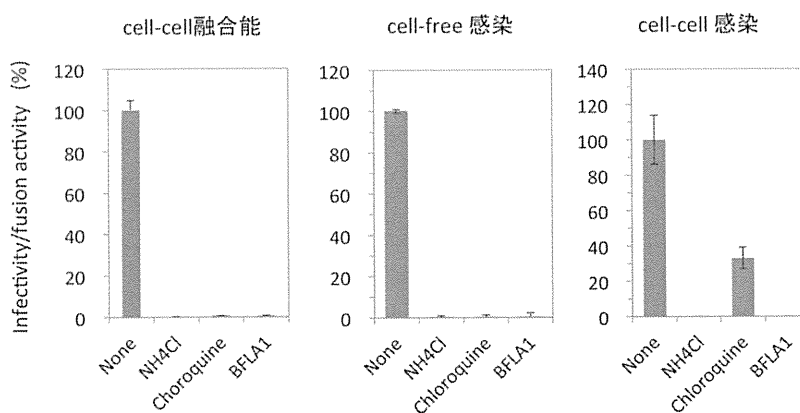


図8 レトロウイルス感染細胞へのオルガネラ酸性化阻害剤処理によるHTLV-1 Envの細胞融合能ならびに感染性の抑制

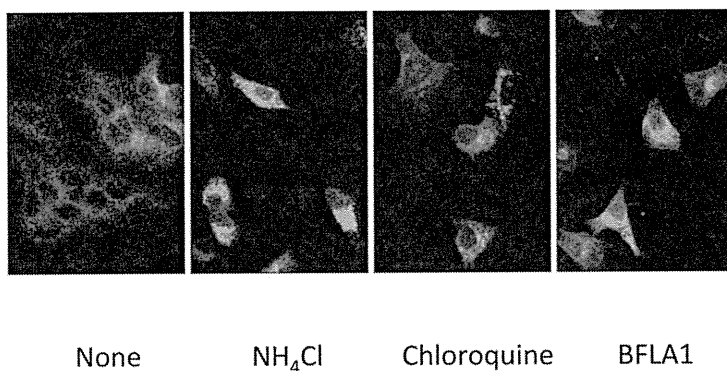


図9 HeLa細胞へのHTLV-1 Env発現により誘導された合胞体形成のオルガネラ酸性化阻害剤による抑制 (LAT-27, gp46 mAbによる染色)

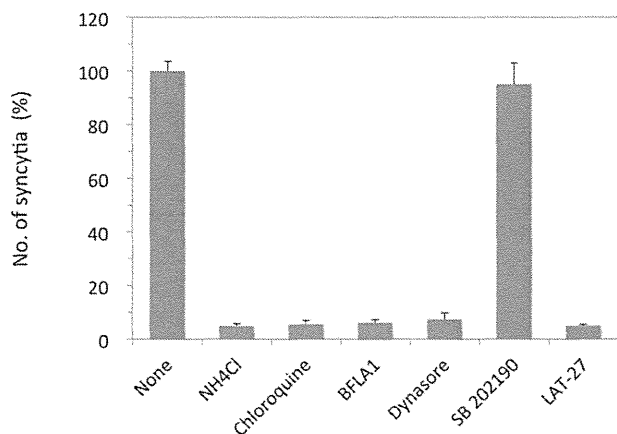


図10 MT-2とMOLT-4細胞株の混合培養による合胞体形成のオルガネラ酸性化阻害剤とエンドサイトーシス阻害剤による抑制効果

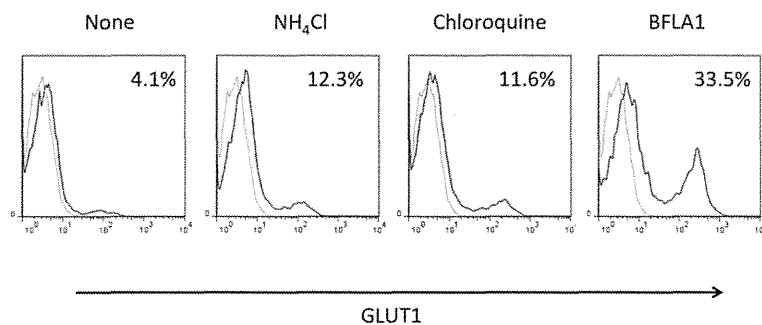


図11 オルガネラ酸性化阻害剤による細胞表面へのGLUT1の移動

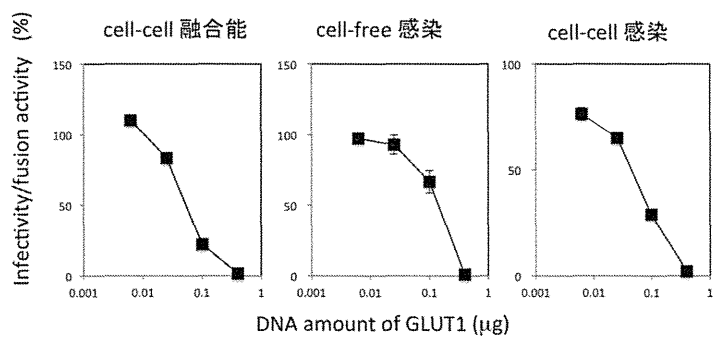


図12 感染細胞へのGLUT1の強制発現によるEnvの細胞融合能の減弱

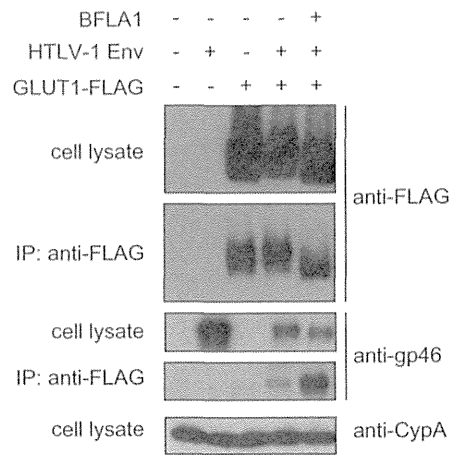


図13 GLUT1とgp46の細胞内会合

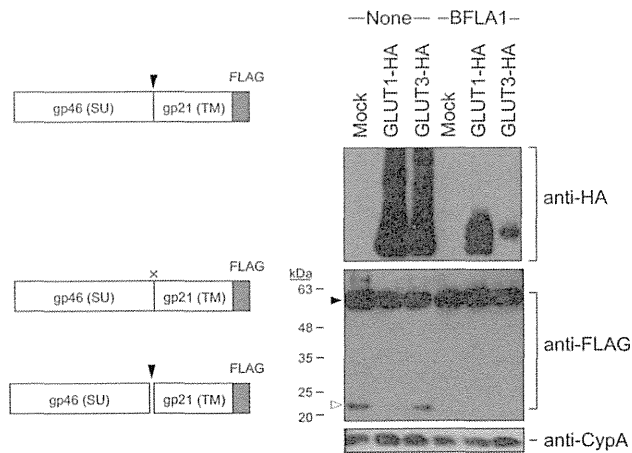


図14 GLUT1過剰発現ないしBFLA1処理によるHTLV-1 Envプロセッシングの阻害

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

すべての成人には多くのウイルスが持続感染しているため、ヒト細胞組織医薬品の原材料にそれらのウイルスが混入する可能性が懸念される。したがって、治療の安全性を担保するためには、注意すべき持続感染ウイルス種やそれらの存在量などを基にリスト化およびリスク評価することが重要である。本研究では、網羅的ウイルス検査系による研究から EBV, CMV, HHV6, HSV1, HHV7, VZV, JCV, BKV, AdV, ParvoB19 が原材料に混入する可能性があることを実証した。また、iPS 細胞のウイルス安全性に関するデータ収集目的で CMV と HSV1 のスパイク試験を行い、iPS 細胞は HSV1 に感染し死滅するが、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否定検査を実施すべきと考えられる。

A. : 研究目的

「日本再興戦略 -JAPAN is BACK-」の中の「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、体性幹細胞や iPS 細胞を用いた再生医療の研究が加速している。その環境整備として再生医療新法や薬事法改正が終了し、今後多くのヒト細胞組織医薬品が実用化されていくものと期待されている。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ため、細胞組織医薬品の原料となる生体材料にウイルスが混入する危険性が高く、再生医療実現化にあたっては不可避の問題である。しかも、生きた細胞を使用す

る再生医療用細胞製剤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での動態に関するデータを取得し、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。そのようなデータの蓄積なしに治療による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、今後の再生医療を実用化するためには非常に重要な取り組みである。当研究室では、多項目を網羅的に検査可能なリアルタイム PCR 法

を応用した新しい検査系を確立し、多くのウイルスを同時・高感度・安価に検出することが可能になった。この検査系を東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターで製造する細胞製剤の安全性検査法として利用され、また院内の研究的ウイルス検査法として公開されている。本研究は、これまでに東京医科歯科大学で得られたデータを分析し、様々なヒト由来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なった。さらに、iPS 細胞に対する CMV および HSV1 のウイルススパイク試験を実施し、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った。

B : 研究方法

過去に東京医科歯科大学医学部附属病院で研究的検査として行ったウイルス検査のデータを解析した(ウイルスの存否や量に関するデータのみを入手)。上記検査を行った際に使用した検査方法を以下に示す。

1. 検体からの DNA 抽出

核酸抽出機 EZ-1 (キアゲン) を使用し末梢血から核酸を抽出した。抽出試薬は、EZ-1 Virus kit を使用した。

2. 核酸増幅

ウイルス遺伝子の増幅・検出には LightCycler (ロッシュ) を使用した。

3. ウイルス検査

ウイルス検査項目は、HSV1, 2, VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, ParvoB19 の 11 種類とし、インナーコントロールとして β -globin を使用した。

マルチプレックス PCR 法により、被検ウイルスを下記に示す A, B 2 つの反応系で検出し、AdV

は別途単独で検査を行った。

A : HSV-1, -2, VZV, CMV, HHV-6, ParvoB19, BKV, JCV B : EBV, HHV-7, HHV-8

PCR 試薬 : AccuPrime Taq DNA Polymerase System, Invitrogen 社

プライマー、プローブ (FITC 標識プローブと LCRed 標識の 2 種類のハイブリッドプローブを使用) の配列を下記に示す。

HSV1,2

F-gctcgaagtgcgaaaaaacgttc

R-tgcggtgataaacgcgcagt

LCRed640-cttccccgcagatgacgcc-p

gcgcaccagatccacgcccttgatgagc-FITC

VZV

F-tgtcctagaggaggtttatctg

R-catcgtctgtaaagacttaaccag

LCRed705-aagttcgcggtataattgt-p

gggaaatcgagaaaccaccctatccgac-FITC

CMV

F-taccctatcgctgtgttc

R-atagaggcgcacgtattc

LCRed705-acaccactatctgctgggcagc-p

cgtttcgtcgtagctacgcttacat-FITC

EBV

F-cgcataatggcggacctag

R-caaacaagcccactcccc

LCRed640-aaccatagaccccgttctctg-p

aaagatagcagcagcgcagc-FITC

HHV6

F-accggagagatgattttgcg

R-gcagaagacagcagcagat

LCRed640-gggtcatttatgttatagacggt-p

taagtaaccgtttctccca-FITC

HHV7

F-gaaaaatccgcataatagc

R-atggaacacctattaacggc

LCRed705-ttgtgaaatgtgttcgatagggc-p