



SeV Packaging System

V20241202

I. はじめに

センダイウイルス (Sendai virus: SeV) はパラミクソウイルス科に属するウイルスです。一本鎖のマイナス鎖 RNA ゲノムを有しており、細胞質で複製するため、原理的に染色体に組み込まれることはありません。SeV は細胞膜上のシアル酸を介して感染するため、非分裂細胞を含む幅広い細胞種に感染することができます。感染細胞内で SeV ゲノムが自立複製するため、転写産物の高発現が期待できます。ヒトへの病原性の報告はありません。センダイウイルスベクター (SeV ベクター) は、上記の SeV の特徴を利用した遺伝子導入用のベクターです。

SeV の RNA ゲノムには 3' 端から順に、RNA ゲノムに結合するヌクレオカプシドタンパク質 (N)、RNA ポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化タンパク質 (P)、ウイルス粒子の膜構造を維持するマトリックスタンパク質 (M)、細胞への侵入に関わる膜融合タンパク質 (F)、細胞との結合に重要なヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質 (HN)、RNA ポリメラーゼの大サブユニットであるラーゼタンパク質 (L) がコードされています (図 1)。さらに P 遺伝子には P タンパク質とは読み枠が異なる C タンパク質や V タンパク質がコードされています。一般的に伝播性に関与する F 遺伝子をゲノムから欠失させ、F 遺伝子を発現する産生細胞を用いることで二次感染しない非伝播性の SeV ベクターが得られます。

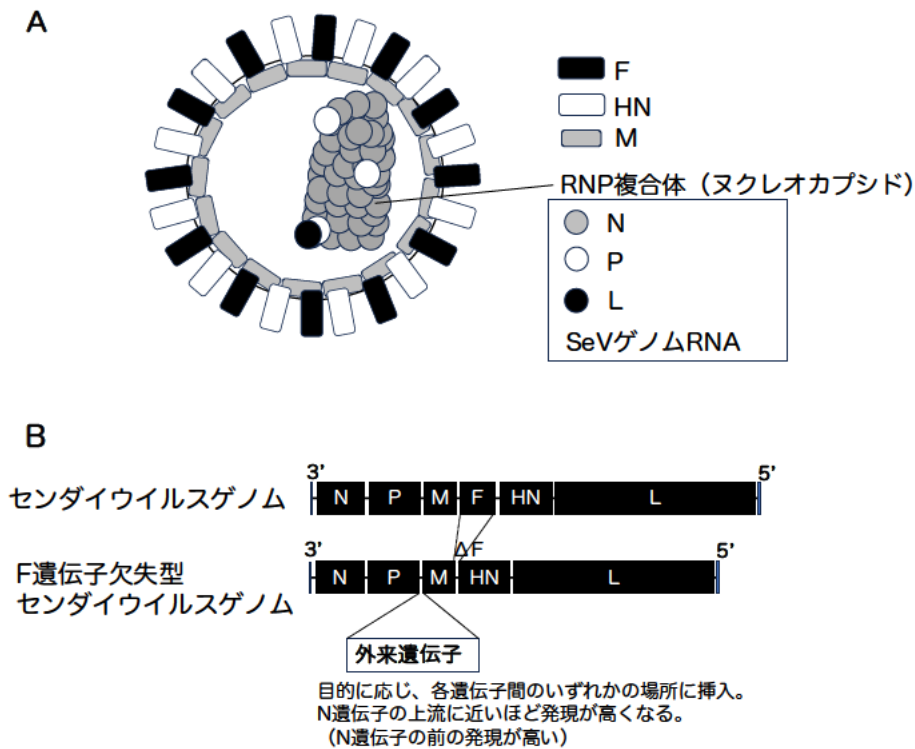


図 1 センダイウイルス粒子とゲノムの構造

A: センダイウイルス粒子の構造

B: センダイウイルスゲノムの構造

SeV Packaging Mix

SeV Packaging Mix は SeV ベクターのパッケージングに必要なコンポーネントの発現を最適化することで、高力価の SeV ベクターを得ることを可能にした製品です。発現させたい遺伝子を搭載した pSeV ベクタープラスミドと Packaging Mix を F 発現細胞 (Vero-F) に遺伝子導入することで、Packaging Mix より T7 ポリメラーゼ、パッケージング促進因子 PEF、SeV 由来の N、P、L が一過性に発現されます。そして pSeV ベクタープラスミドから転写された SeV ゲノムは N、P、L と RNP 複合体を形成し、自己複製と転写が開始され、最終的にウイルス粒子を得ることができます (図 2)。多くの場合、取得した SeV ベクターを濃縮することなく、直接標的細胞の感染に使用できます。

pSeV ベクタープラスミド

pSeV ベクタープラスミド (図 3) は F 遺伝子欠失型の SeV ベクタープラスミドです。pSeV ベクタープラスミド上には T7 プロモーター、ハンマーヘッド (Hh) リボザイム、F 遺伝子欠失型 SeV ゲノム、HDV リボザイムの順で配置されています。T7 ポリメラーゼで転写された RNA は Hh リボザイムと HDV リボザイムにより 6 の倍数の SeV ゲノムとして切り出されます。

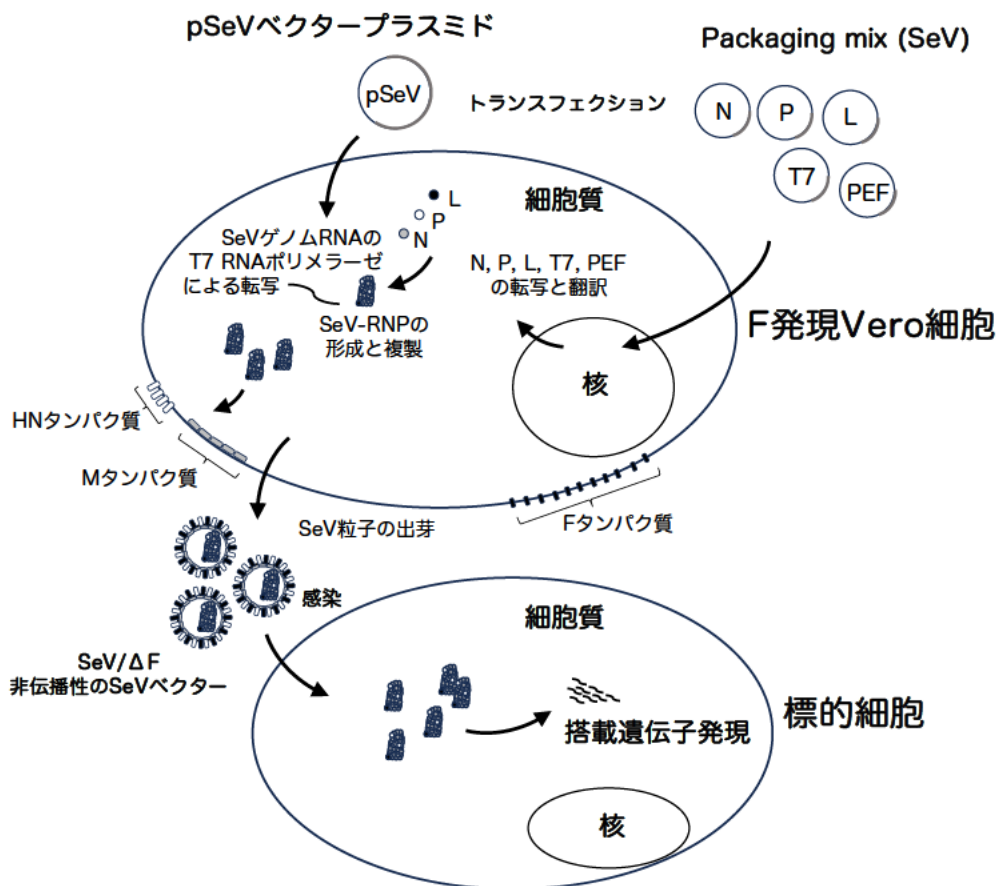


図 2 SeV Packaging Mix と F 発現 Vero 細胞を用いたセンダイウイルスベクターの産生と感染

Vero-F 細胞

センダイウイルス (SeV) の産生に最適化された Vero 細胞由来の F 発現細胞株で、SeV の感染に必要な F タンパク質を供給するための細胞株です。Vero-F 細胞の継代時には終濃度 0.7mg/mL の G418 を添加し、SeV ベクターの産生時には G418 を使用しないでください。高力価の感染性 SeV を得るために SeV Packaging Mix と目的遺伝子を挿入した pSeV ベクタープラスミドを Vero-F 細胞にトランスフェクションし、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養します。トランスフェクション翌日から 32°C に設定した 5%CO₂ インキュベーター内で培養を行い、2.5µg/mL トリプシンを添加した無血清培地 (E-MEM) で毎日培地交換し、SeV を産生します。得られた SeV 上清を Vero-F 細胞に再感染することで SeV の拡大産生が行えます。

II. 製品の内容

SeV Packaging System (Starter Pack 1) (レプリテック：製品コード S-0010)

Vero-F (レプリテック：製品コード C-0001)

SeV Packaging Mix (レプリテック：製品コード M-0001) (12well plate サイズで 1well x5 回分)

pSeV Vector (レプリテック：製品コード G-0010)

のセットです。

SeV Packaging System (Starter Pack 2) (レプリテック：製品コード S-0011)

Vero-F (レプリテック：製品コード C-0001)

SeV Packaging Mix (レプリテック：製品コード M-0001) (12well plate サイズで 1well x5 回分)

pSeV(MHN)mEmerald Vector (レプリテック：製品コード G-0011)

pSeV Vector (レプリテック：製品コード G-0010)

のセットです。

別売品

SeV Packaging Mix (レプリテック：製品コード M-0001-10)

(12well plate サイズで 1well x10 回分)

<ベクターマップ>

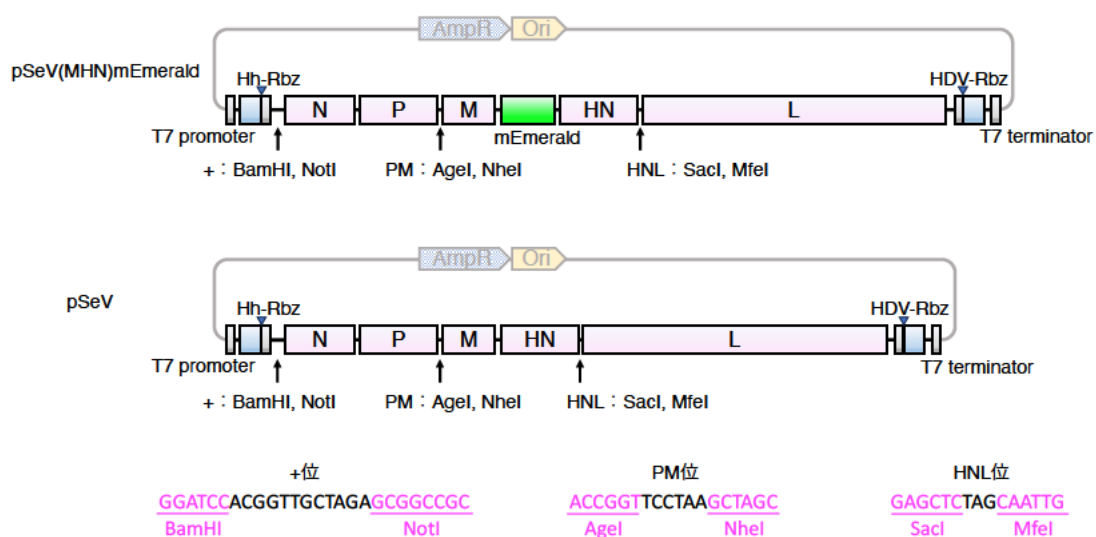


図3 pSeV のベクターマップおよびクローニングサイト
Hh-Rbz の直後から HDV-Rbz の直前までが 6 の倍数。

III. 製品の保存

Vero-F 細胞：液体窒素タンクの気相に保管
SeV Packaging Mix：-20°C保存で6ヶ月以内に使用
pSeV(MHN)mEmerald Vector：-20°C保存で6ヶ月以内に使用
pSeV Vector：-20°C保存で6ヶ月以内に使用

保存期間は手元に届いてからの期間です。

Vero-F 細胞は到着後に速やかに培養を開始してください。直ぐに培養を開始しない場合は、液体窒素タンクの気相に保管してください。-80°Cでの保管は細胞の生存率に悪影響を及ぼす可能性があります。

IV. その他必要な試薬等 (Starter Pack には Vero-F 細胞が含まれています)

A. SeV の力価測定に必要な細胞株

・ Vero 細胞

Vero 細胞 (JCRB 細胞バンク、JCRB0111) は接触障害を起こすため、力価測定に適していません。

B. 試薬類

- ・ トランスフェクション試薬* (下記のいずれか)
ViaFect™ Transfection Reagent (プロメガ：製品コード E4981)
TransIT®-2020 Transfection Reagent (タカラバイオ：製品コード MIR5400)
TransIT®-Lenti Transfection Reagent (タカラバイオ：製品コード MIR6604)

*Vero-F 細胞へのトランスフェクション効率が SeV のパッケージングに影響します。
mEmerald を同時搭載した pSeV ベクタープラスミドを用いることで、力価測定や感染効率の評価が容易になります。

C. 培地類

- ・ FBS
- ・ E-MEM (富士フィルム和光純薬：製品コード 051-07615)
- ・ MEM 非必須アミノ酸溶液 (x100) (富士フィルム和光純薬：製品コード 139-15651)
- ・ ITS-X サプリメント (x100) (富士フィルム和光純薬：製品コード 094-06761)
- ・ 0.25 %トリプシン EDTA 溶液 (富士フィルム和光純薬：製品コード 209-16941)
- ・ Opti-MEM® (サーモフィッシャーサイエンティフィック：製品コード 31985062)
- ・ トリプシン (2.5g/L) (ナカライテスク：製品コード 35555-54)
- ・ トリプシン阻害剤：合成トリプシン中和溶液 (細胞科学研究所：製品コード 1220)
- ・ D-PBS(-) (ナカライテスク：製品コード 14249-95)
- ・ 7.5% BSA 溶液 (富士フィルム和光純薬：製品コード 012-23881)

D. 器具・装置

- ・ 細胞培養プレート (12well)、
- ・ 付着性細胞用フラスコ 25cm², ベントキャップ
- ・ 滅菌チューブ、ウイルス液凍結保存用バイアル
- ・ 細胞培養に必要な一般的設備

V. SeV ベクター作製の手順

1. pSeV ベクタープラスミドへの目的遺伝子のクローニング
↓
2. 1.でクローニングした pSeV ベクタープラスミドの調製
↓
3. Vero-F 細胞の播種 (Vero-F 細胞はトランスフェクション当日にコンフルエントになるように前日に播種*)
*Vero-F 細胞のトランスフェクション効率を高めるためです。
↓
4. pSeV ベクタープラスミド、および SeV Packaging Mix の Vero-F 細胞へのトランスフェクション (37°C培養)
↓
5. トランスフェクション翌日にトリプシン (終濃度 2.5µg/mL) を添加した無血清培地で培地交換 (32°C培養)
(毎日トリプシン添加無血清培地で培地交換)
↓
6. SeV ベクター上清の回収 (トランスフェクションから 3~4 日後)
↓
- <以下は拡大產生の手順>
7. SeV ベクターの拡大產生 (Vero-F 細胞に感染し、トリプシン添加無血清培地で培地交換 (32°C培養)
↓
8. SeV ベクター上清の回収 (種ウイルス*感染から 2~4 日後)
*種ウイルス: SeV ベクターの拡大產生に用いた複製元の SeV ベクターを含む培養上清のことです。

VI. pSeV ベクタープラスミドへの目的配列のクローニング

重要 1: センダイウイルスを含むパラミクソウイルスのゲノムはゲノム塩基の総数が 6 の倍数でなければ複製することができません。このパラミクソウイルスの性質は rule of 6 と呼ばれています。例えば、センダイウイルスの野生株は 15384 塩基 (6 の倍数; 6x2564) ですが、その前後の 15383、15385 塩基や、3 の倍数であっても 6 の倍数でない 15381 塩基では、ゲノムの複製を行えなくなります。下記 mEmerald の例を参考に塩基長を調整してください。塩基長の調整は本来の終止コドンの後ろに終止コドンを加えるなど任意の塩基を追加することで調整可能です。

重要 2: センダイウイルスの転写には RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが用いられ、EIS 配列という独自の制御配列が必要です (EIS: 転写終止配列 (9 塩基)、介在配列 (3 塩基)、転写開始配列 (10 塩基))。搭載遺伝子の下流に 22 塩基からなる EIS 配列 (TAAGAAAACTTAGGGTGAAG) を必ず付加してください。EIS 配列を挟むことで複数遺伝子の同時搭載も可能です。A、B、C の 3 種類の遺伝子を搭載する場合は A-EIS-B-EIS-C-EIS のように配列を準備してください。搭載遺伝子からのタンパク質の翻訳には EIS 配列とは別に開始コドンと終止コドンが必要です。EIS 配列で挟む遺伝子毎に開始コドンと終止コドンがあることを確認してください。これらの遺伝子発現量は A>B>C の順になります。

重要 3: pSeV ベクタープラスミドへのクローニング位置は N 遺伝子の手前の+ (プラス) 位や P 遺伝子と M 遺伝子の間の PM 位、HN 遺伝子と L 遺伝子の間の HNL 位と後ろに搭載するに従って発現量が低下します。+位に搭載することで最も発現量が向上しますが、P 遺伝子の前に長い遺伝子を配置するとセンダイウイルスの複製に影響を与えます。2 千塩基以上を搭載する場合は PM 位に搭載してください。遺伝子発現を抑えたい場合は HNL 位に搭載してください。

補足 1: センダイウイルス搭載遺伝子にもコザック配列 (Kozak sequence) やコドンの最適化が有効です。ポリ A 配列は不要です。

補足 2: 搭載遺伝子の塩基配列内に EIS 配列 (特に転写終止配列) と類似の配列*¹ がある場合やフレームシフトを生じやすい配列*² が存在する場合はサイレント変異を導入してください。例えば搭載遺伝子内にリジンをコードする A の連続 AAA/AAA が存在する場合は AAG/AAA や AAG/AAG などのようにサイレント変異を導入してください。サイレント変異の導入により、SeV ベクターの産生効率や転写効率の低下を避けることができます。

*1) SeV の転写終止配列は TAAGAAAAA ですが、WAHVAAAAA も終止配列として機能する可能性があります (W: A or T, H: A or T or C, V: A or C or G)。

*2) X/XXZ/ZZN のような配列がフレームシフトを生じやすい配列です。フレームシフトを生じる具体的な例として A/AAA/AAG 配列があります。この A/AAA/AAG 配列は SeV の配列中 P 遺伝子のみ存在し、RNA 編集により P タンパク質とは読み枠の異なる V タンパク質が翻訳されます。

目的遺伝子の設計例 (rule of 6 に従った設計) :

- 1) +位に搭載する場合は BamHI 配列から EIS 配列を含んで NotI 配列までの塩基数が $6n+8$ になるように設計してください。
- 2) PM 位に搭載する場合は AgeI 配列から EIS 配列を含んで NheI 配列までの塩基数が $6n$ になるように設計してください。
- 3) HNL 位に搭載する場合は SacI 配列から EIS 配列を含んで MfeI 配列までの塩基数が $6n+3$ になるように設計してください。
- 4) 下記の例の様に 5'側に SacI、AgeI、BamHI を配置し、EIS 配列の後ろ 3'側に NotI、NheI、MfeI を配置することで、+位、PM 位、HNL 位のどの位置にも挿入可能な配列の設計もできます。

※搭載遺伝子の長さが 2 千塩基未満で発現量を優先する場合は+位へ搭載してください。2 千塩基以上の場合は PM 位へ搭載してください。発現量を抑えたい場合は HNL 位に搭載してください。発現量を考慮しない場合は PM 位が推奨搭載位置となります。

SacI	AgeI	BamHI	Kozak配列
<p>GAGCTCACCGGTGGATCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT CACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCC ACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG CTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCA CCCTCGTGACCACCTTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCGCCCCGCTACCCCGA CCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC CAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA CTACAACAGCCACAAGGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC AAGGTGAAGTTCAGACCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCT CGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCT GCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAA CGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGAT CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATGACCCTGACTGCGTAAGAAA AACTTAGGGTGAAGGCGGCCGCTAACGTCAACGCTAGCTGACAATTG</p>			
EIS	NotI	NheI	MfeI

図 4 目的遺伝子の設計例

緑字が搭載遺伝子の配列を ATG と TAA は搭載遺伝子の開始コドンと終始コドンを示す。

上記 ATG から TAA までは 720 塩基と 6 の倍数 ($6n$) であり、目的遺伝子が $6n+3$ の場合は任意の 3 塩基 (例えば終止コドン) を追加することで $6n$ となるように調整する。PM 位に搭載する場合は AgeI から NheI までが $6n$ となるように調整する。

pSeV ベクタープラスミドの構築

標準的なクローニング方法を用いて目的の遺伝子を pSeV ベクタープラスミドに挿入してください。In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (タカラバイオ：製品コード 638947) などのシームレスクローニングキットを用いることができます。コンピテントセルは DH5α など形質転換効率の高いコンピテントセルを使用してください。プラスミドは NucleoSpin® Plasmid Transfection-grade (タカラバイオ：製品コード 740490.50) などトランスフェクショングレードで調製してください。プラスミドにエンドトキシンが混入するとトランスフェクション効率が低下します。

+位の配列： CAAAGTATCCACCCTGAGGAGCAGGTTCCAGACCCTTTGCTTTGCTGCCAAAGTTCACGGATCCACGG
TTGCTAGAGCGGCCGCAGATCGTCACGATGGCCGGGTTGTTGAGCACCTTCGATACATTTAGCTC
NotI →N 遺伝子 BamHI

PM 位の配列： GCATCCTACCATCCTCAGTCATAGAGAGATCCAATCTACCATCAGCATCAGCCAGTAAAGATTAAGAA
AAACTTAGGGTGAAAGGACCGGTCCTAAGCTAGCGCAATGGCAGACATCTATAGATTCCCTAAGTTCTCTTATGAGG
ATAACGGTACTGTGGA AgeI NheI →M 遺伝子

HNL 位の配列： TCTCTCAGTCTCTTACGTCTCTCACAGTATTAAGAAAACCCAGGGTGAATGGAGCTCTAGCAATT
GTGCATGGATGGGCAAGGAGTCCCTCCAAAACCTTCT
→L 遺伝子 SacI MfeI

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 枠：シームレスクローニングに必要なオーバーラップ配列の例

+位に目的遺伝子 (EmGFP) をシームレスクローニングする際に用いるプライマーの例
※目的遺伝子の設計例 (rule of 6 に従った設計) に従いつつ、Rev primer に EIS 配列を含める必要があります。

Fwd primer： TGCCAAAGTTCACGGATCGCCACCATGGTGAGCAAG
Rev primer： TCGTGACGATCTGCGGCCGCCTTTCACCCTAAGTTTTCTTACGTCAGGGTTATCATTACTTGTACAGCTC

PM 位に目的遺伝子 (EmGFP) をシームレスクローニングする際に用いるプライマーの例
Fwd primer： AGGGTGAAAGGACCGGTGCCACCATGGTGAGCAAG
Rev primer： ATGTCTGCCATTGCGCTAGCCTTTCACCCTAAGTTTTCTTACGTCAGGGTTATCATTACTTGTACAGCTC

HNL 位に目的遺伝子 (EmGFP) をシームレスクローニングする際に用いるプライマーの例
Fwd primer： ACCCAGGGTGAATGGAGCTCGCCACCATGGTGAGCAAG
Rev primer： TGCCATCCATGACCAATTGCGCCTTTCACCCTAAGTTTTCTTACGTCAGGGTTATCATTACTTGTACAGCTC

pSeV ベクタープラスミドの配列確認

挿入した配列の確認には以下のプライマーを用います。

+位

Fwd primer : CAAAGTATCCACCCTGAGG

Rev primer : GAGCTAAATGTATCGAAGGTGC

PM 位

Fwd primer : GCATCCTACCATCCTCAGTC

Rev primer : TCCACAGTACCGTTATCCTC

HNL 位

Fwd primer : TCTCTCAGTCTCTTACGTCTC

Rev primer : AGAAGGGTTTTGGGAGGAC

VII. SeV ベクターの産生

VII-1. Vero-F 細胞の播種

Vero-F 細胞にトリプシン EDTA を用いて剥離後、12 ウェルプレートに 3×10^5 cells/well で複数ウェルに播種し、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養する。

(培地には 10%FBS 含有 E-MEM 培地を使用してください。また、Vero-F 細胞のトランスフェクション効率を高めるため、Vero-F 細胞はトランスフェクション当日にコンフルエントになるように前日に播種してください。SeV ベクターの産生時は G418 を使用しないでください。)

VII-2. pSeV ベクタープラスミドおよび Packaging Mix の Vero-F 細胞へのトランスフェクション

細胞播種翌日、pSeV ベクタープラスミドおよび Packaging Mix を VII-1. で播種した細胞にトランスフェクション。

トランスフェクション試薬は ViaFect™、TransIT®-Lenti、TransIT®-2020 が使用可能です。

(上記の 3 つのトランスフェクション試薬を用いて条件を最適化済み)

1. トランスフェクション試薬を室温に戻し、使用前にボルテックスで混合する。
2. 225µL の Opti-MEM® に 1µg (0.2~1µg/µL の濃度) の pSeV ベクタープラスミドおよび 10µL の Packaging Mix を加え、ボルテックスで混合する。
3. 2. に 5µL のトランスフェクション試薬 (上記いずれかの試薬の場合) を添加後、穏やかにピペティングして混合し、トランスフェクション試薬の説明書に従って室温で静置する。
4. 前日に播種した Vero-F 細胞の培地を 500µL の 10%FBS 含有 E-MEM 培地に交換後、3. の混合液を滴下し、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養する。

VII-3. 培地交換

無血清 E-MEM の調製: 無血清 E-MEM には 1 倍量の ITS-X および 1 倍量の非必須アミノ酸を添加する。

2.5µg/mL トリプシン含有の無血清 E-MEM の調製: 2.5g/L トリプシン溶液を終濃度が 2.5µg/mL になるように無血清 E-MEM に添加する (1/1000 希釈)。2.5µg/mL トリプシン含有の無血清 E-MEM は用時調製を行う。

トランスフェクション翌日に、細胞を 700µL の無血清 E-MEM で 2 回洗浄後、700µL の 2.5µg/mL トリプシン含有の無血清 E-MEM で培地交換し、32°C に設定した 5%CO₂ インキュベーターに移し、培養する。

トリプシン含有の無血清 E-MEM の培地交換はウイルス上清を回収する前日まで毎日行う。2 日目以降は無血清 E-MEM での洗浄は不要。

SeV ベクターを回収するまで、32°C に設定した 5%CO₂ インキュベーターで培養を行う。

VII-4. SeV ベクターの回収

1. トランスフェクションから 72 時間~96*時間後に SeV ベクターを含む培養上清を回収する。
2. 回収した培養上清に 1% になるように BSA 溶液を加えて 2380g で 3 分間遠心後、上清を回収し、これを SeV ベクターとする。調製した SeV ベクターは急速凍結後に -80°C で長期間保存することができる。

(回収した SeV ベクターには 2.5µg/mL トリプシンが含まれています。無血清培養の細胞に感染させる場合には合成トリプシン中和溶液 (終濃度 0.1% で添加) か FBS (終濃度 0.01% で添加) を用いて中和してください。)

*搭載遺伝子長が長い場合 (例えば 4 千塩基以上) は SeV の複製に時間がかかるため、96 時間など遅いタイミングでの回収が必要になります。通常は 72 時間程度で回収します。mEmerald を同時搭載している場合はウェル全体に mEmerald 陽性の細胞が広がるタイミングで回収を行っ

てください。mEmerald を同時搭載していない場合は後述の赤血球凝集活性（HAU）陽性のタイミングで回収を行ってください。

VII-5. SeV ベクターの拡大産生

VII-4.で回収した SeV ベクターは細胞培養フラスコに拡大培養した Vero-F 細胞に植え継ぎ感染することで SeV ベクターの回収量を拡大することができます。SeV ベクターの拡大産生は 32°C に設定した 5%CO₂ インキュベーターで行ってください。週末に感染翌日から培地交換が行えない場合は隣のウェルに上清を感染させることで週末を越すか、ウイルス上清を急速凍結することで、任意のタイミングで拡大することができます。週末に隣のウェルの Vero-F 細胞に植え継ぎ感染を行った場合は、週明けに無血清 E-MEM を用いて 2 回洗浄後、2.5µg/mL トリプシン含有の無血清 E-MEM に培地交換し、その翌日に T25 フラスコの Vero-F 細胞への植え継ぎ感染が行えます。SeV ベクターの産生時は G418 を使用しないでください。

1. Vero-F 細胞は SeV ベクターを感染する 3 日前に T-25 フラスコに 3x10⁶ cells/T25 フラスコで播種し、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養する。SeV ベクターを感染する前日に培地交換を行う。SeV ベクターの産生量を増やすため、T-25 フラスコ内の細胞は可能な限り高密度にする。
2. 高密度になるように T25 フラスコで培養した Vero-F 細胞に SeV ベクターを感染させ、32°C で培養する。（SeV 感染から 24 時間後に 100%感染させる。目安として T25 フラスコに 1x10⁷ CIU~2x10⁷ CIU、もしくは後述の赤血球凝集活性（HAU）で 2~4HAU の SeV を感染。）
3. 感染翌日に無血清 E-MEM で洗浄後、2.5µg/mL トリプシン含有の無血清 E-MEM 培地に交換し、32°C で培養する。その後、トリプシン含有の無血清 E-MEM の培地交換をウイルス上清回収まで毎日行う。
4. SeV 感染から 48 時間~96*時間後に SeV ベクターを含む培養上清を回収する。
5. 回収した培養上清に 1%になるように BSA 溶液を加えて 2380g で 3 分間遠心後、上清を回収し、これを SeV ベクターとする。調製した SeV ベクターは-80°C で長期間保存することができる。

培養スケールを拡大することで SeV ベクターの回収量をさらに拡大できます。

*搭載遺伝子長が長い場合（例えば 4 千塩基以上）は SeV の複製に時間がかかるため、96 時間など遅いタイミングでの回収が必要になります。搭載遺伝子長が 3 千塩基未満で、植え継ぎ感染時の SeV 力価が十分に確保されている場合は（後述の赤血球凝集活性（HAU）で 2HAU 以上の種ウイルスを感染する場合）、48~72 時間程度で回収できます。

VIII. SeV ベクターの凍結保存と解凍

SeV ベクターの凍結保存には急速凍結が適しています。液体窒素や超低温槽などで予冷した金属チューブラックを用いることで速やかな凍結が行えます。SeV ベクターに 1%BSA を添加することで、保存安定性が向上します。

SeV ベクターは凍結融解を繰り返すと力価が低下します。

急速凍結を行った SeV ベクターの解凍方法は凍結細胞の解凍方法と同様に急速解凍を行います。凍結チューブを 37°C のウォーターバスに浸し、速やかに解凍、解凍されきる直前でウォーターバスからチューブを取り出し、余熱による解凍後、使用するまで氷上に置きます。

IX. SeV ベクター力価の測定

a. Vero 細胞を用いた mEmerald 陽性細胞を指標とする生物学的力価測定方法（mEmerald 同時搭載ベクターの場合）

力価測定に用いる細胞は Vero-F 細胞ではなく Vero 細胞です。

力価測定に用いる細胞は Vero 細胞（JCRB 細胞バンク、JCRB0111）のように、コンフルエントになった後に分裂しにくい細胞（接触阻害がかかる細胞）が適しています。

1. 96 ウェルプレートにコンフルエントになるように Vero 細胞を準備する。Vero 細胞は SeV ベクターを感染する 3 日前に 2×10^4 cells/well で播種する。
2. 力価測定に用いる SeV ベクターを含んだ培養上清は遠心操作などを行い、細胞の混入を避ける。
3. 0.5% BSA が含まれる EMEM を用いて SeV ベクターを 10 倍毎に段階希釈を行い、100 万倍程度までの希釈系列を調製する。
4. 96 ウェルプレートに準備した Vero 細胞に各 100 μ L の希釈系列を感染させ、感染予定の温度（例えば 37 $^{\circ}$ C）に設定した 5%CO₂ インキュベーター内で培養する。
SeV ベクターの感染予定温度が 32 $^{\circ}$ C の場合は 32 $^{\circ}$ C での力価測定が必要。
5. 3 日後の mEmerald 陽性細胞数を計測し、CIU（cell infectious unit）を算出する。

例えば、1 千倍、1 万倍、10 万倍希釈系列で感染させたウェルを撮影する顕微鏡の撮像素子（対物 4 倍レンズ）で撮影可能な面積がウェル底面積の 43.5%、1 万倍希釈のウイルス上清液 100 μ L を n=3 で感染させたウェルの mEmerald 陽性細胞数の平均が 261 個であった場合、 $261/0.435$ （ウェル全体の mEmerald 陽性細胞数） $\times 10000$ （希釈率）/0.1（100 μ L の単位を mL に換算）

$$261/0.435 \times 10000/0.1 = 6 \times 10^7 \text{ CIU/mL}$$

となる。

ウェルプレートの底面積や顕微鏡カメラの撮影面積はウェルプレートやカメラの機種毎に異なるため計算が必要。

mEmerald 陽性細胞が分離可能でバラツキの少ない希釈倍率での計測が必要。

上記の例では 1 万倍希釈の 1 視野の計測細胞数が 261 個、10 万倍希釈の計測細胞数が凡そ 1/10 になっているなどの手技で計測する（段階希釈したサンプルの結果が希釈濃度に適合する結果であることが望ましい）。

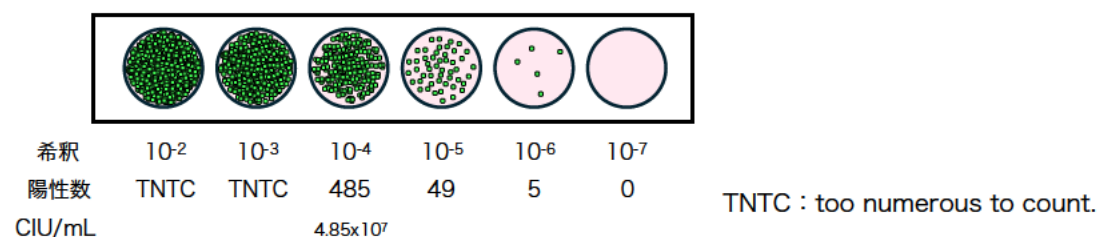


図 5 SeV ベクターの力価測定の場合

b. Vero 細胞を用いた抗 SeV 抗体陽性細胞を指標とする生物学的力価測定方法

一次抗体：Anti-Sendai virus Rabbit pAb IgG（レプリテック：製品コード A-0100）

二次抗体：任意の蛍光色素で標識された抗ウサギ IgG ヤギ抗体（例えば Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) preadsorbed（アブカム：製品コード ab150084））

ブロッキング用血清：ヤギ血清（メルク：製品コード G9023-10ML）

（ブロッキング用の血清は二次抗体のホスト動物種と同種の血清を使用）

1. 96 ウェルプレートにコンフルエントになるように Vero 細胞を準備する。Vero 細胞は SeV ベクターを感染する 3 日前に 2×10^4 cells/well で播種する。
2. 力価測定に用いる SeV ベクターを含んだ培養上清は遠心操作などを行い、細胞の混入を避ける。
3. 0.5% BSA が含まれる EMEM を用いて SeV ベクターを 10 倍毎に段階希釈を行い、100 万倍程度までの希釈系列を調製する。
4. 96 ウェルプレートに準備した Vero 細胞に各 100 μ L の希釈系列を感染させ、感染予定温度*（例えば 37°C）に設定した 5%CO₂ インキュベーター内で培養する。
*SeV ベクターの感染予定温度が 32°C の場合は 32°C での力価測定が必要です。
5. 3 日後の 96 ウェルプレートを 4%PFA やホルムアルデヒドなどの細胞固定試薬を用いて固定する。
6. 抗 SeV 抗体である Anti-Sendai virus Rabbit pAb IgG を用いて免疫染色を行う。一次抗体（Anti-Sendai virus Rabbit pAb IgG）は 5%ヤギ血清、0.1% TritonX-100/PBS で 500 倍希釈し、37°C で 1 時間反応させる。二次抗体は Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) preadsorbed を 5%ヤギ血清、0.1% TritonX-100/PBS で 1000 倍希釈し、遮光後、室温で 1 時間反応させる。
7. mEmerald を用いた方法と同様に抗 SeV 抗体陽性細胞数を指標に CIU を算出する。

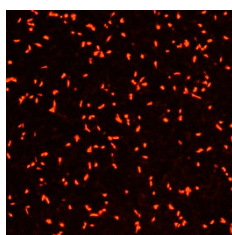


図 6 Anti-Sendai virus Rabbit pAb IgG を用いた SeV 感染細胞の免疫染色の例

c. 固定ニワトリ赤血球液を用いた赤血球凝集活性 (HAU) の測定

赤血球凝集活性 (HAU) の測定は赤血球とウイルスの凝集性を利用した測定方法です。V 底プレートに播種した赤血球は時間とともに沈殿し、目視で観察可能な赤い点となりますが、SeV ベクターが存在するウェルでは赤血球凝集反応により沈殿が抑制され、赤い点の形成が阻害されます。CIU と比べて感度は低くなりますが、SeV ベクター産生の有無を短時間に検出可能なため、レポーター遺伝子を搭載していない SeV ベクターの産生確認に適しています。

(参考文献：WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5-WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance)

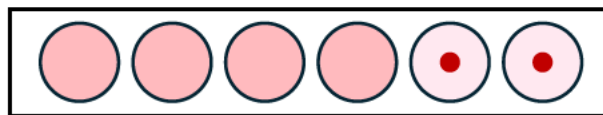
固定ニワトリ赤血球液 (50%) (デンカ：製品コード 320 056)

(固定ニワトリ赤血球液は PBS で 5% に希釈分注し、冷蔵で保存。使用時に PBS で 0.5% に希釈して使用してください。反応時の終濃度は 0.25% となります。)

96 ウェル V 底プレート 340 μ L フタ付 (WATSON：製品コード 196-96VS)

0.5%BSA 含有 E-MEM (SeV 培養上清の希釈に使用)

1. 2 倍毎に 0.5%BSA 含有 E-MEM を用いて段階希釈した SeV ベクター培養上清を 96 ウェル V 底プレートに 50 μ L 添加する。陰性コントロールには 0.5%BSA 含有 E-MEM を用いる。
2. 0.5% に PBS で希釈した固定ニワトリ赤血球を 50 μ L 添加し、軽く攪拌、室温で 30 分間静置する。
3. 赤血球凝集活性を観察する。
4. 赤血球凝集活性が得られた SeV ベクター希釈の最高値の逆数を HAU とする。
(例えば、1/8 希釈まで赤血球凝集活性が得られた SeV ベクターは 8HAU としてください。)



凝集の有無	+	+	+	+	-	-
希釈	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32

図7 赤血球凝集活性 (HAU) の測定の例

d. リアルタイム PCR 用いた SeV ゲノムの測定

SeV 検出用のリアルタイム PCR プローブと SeV Standard を用いることで SeV ゲノムを定量することができます。感染可能な SeV ゲノムコピー数を定量するために Vero 細胞に SeV を感染し、感染 1 時間後の細胞由来の RNA を用いたリアルタイム PCR を行ってください。CIU と比べて感度は低くなりますが、細胞に感染直後の SeV ゲノムコピー数を定量することができます。

(SeV ベクター溶液を直接用いたリアルタイム PCR はレンチウイルスベクターの測定と同様に非感染性粒子も含んだ測定となります。)

SeV Primer/Probe Mix with Standard (レプリテック：製品コード QS-0100-200)

NucleoSpin® RNA Plus XS (タカラバイオ：製品コード 740990.10)

CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (タカラバイオ：製品コード 3732)

One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (タカラバイオ：製品コード RR600A)

1. 96 ウェルプレートにコンフルエントになるように Vero 細胞を準備する。Vero 細胞は SeV ベクターを感染する 3 日前に 2×10^4 cells/well で播種する。
2. SeV ゲノムの測定に用いる SeV ベクターを含んだ培養上清は遠心操作などを行い、細胞の混入を避ける。
3. 0.5% BSA が含まれる EMEM を用いて SeV ベクターを 10 倍毎に段階希釈を行い、1000 倍程度までの希釈系列を調製する。
4. 96 ウェルプレートに準備した Vero 細胞に各 30 μ L の希釈系列を感染させ、32°C に設定した 5%CO₂ インキュベーター内で 1 時間培養する。感染液量を少なくすることで溶液中の SeV 粒子が細胞に接触しやすくする。20 分毎にプレートを軽く揺すり、SeV ベクターと細胞の接触を促進してください。
5. SeV ベクターを感染させた細胞の RNA 抽出：NucleoSpin® RNA Plus XS、あるいは CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR を用いて、SeV ベクターを感染させた細胞の RNA を抽出。操作手順はそれぞれの説明書に従ってください。
6. リアルタイム PCR：One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix の説明書に従い、SeV Primer/Probe Mix with Standard を用いてリアルタイム PCR を行ってください。

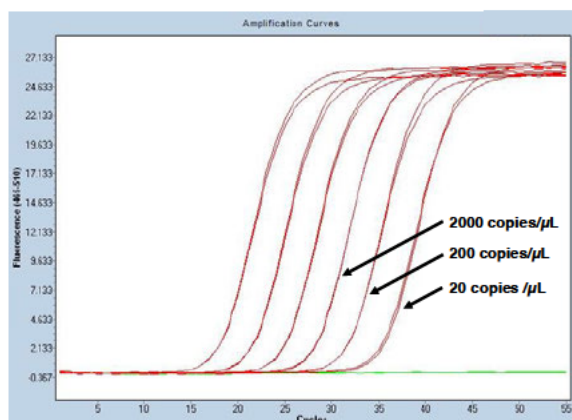


図 8 SeV Primer/Probe Mix with Standard を用いた SeV のリアルタイム PCR の例

X. SeV ベクターの濃縮

SeV ベクターの濃縮方法として限外ろ過濃縮や PEG 濃縮が行えます。

それぞれの説明書に従ってください。濃縮操作を行う前に SeV ベクター培養上清液の遠心操作などを行い、細胞の混入を避けてください。

限外ろ過濃縮：Amicon®ウルトラ-15 50kDa (Millipore：製品コード UFC905024) などの限外ろ過メンブレンを用いて SeV ベクター培養上清の濃縮が行えます。限外ろ過メンブレンにはグリセリンが含まれています。事前に PBS などを用いて予洗いしてください。限外ろ過を行う前に SeV ベクター培養上清に BSA を添加しないでください。

PEG 濃縮：レンチウイルス濃縮用に販売されている Lenti-X™ Concentrator(タカラバイオ：製品コード 631231)や PEG-it™ Virus Precipitation Solution (フナコシ：製品コード LV810A-1)を用いて濃縮が行えます。それぞれの説明書に従って濃縮操作を行ってください。

XI. 参考文献

- 1) Garcin, D. et al. 1995. A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J.* 14:6087-6094.
- 2) Calain, P., and L. Roux. 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J. Virol.* 67:4822-4830.
- 3) Kolakofsky, D. et al. 1998. Paramyxovirus RNA Synthesis and the Requirement for Hexamer Genome Length: the Rule of Six Revisited. *J Virol.* 72: 891-899.
- 4) Sharma, V. et al. 2014. Analysis of tetra- and hepta-nucleotides motifs promoting-1 ribosomal frameshifting in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 42:7210-7225
- 5) WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5-WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance
- 6) Morimoto, S. et al. 2023. Intranasal Sendai virus-based SARS-CoV-2 vaccine using a mouse model. *Genes Cells.* 28:29-41.

XII. 参考データ

SeV ベクター作製の例

1. 12 ウェルに播種した Vero-F 細胞に pSeV(MHN)mEmerald と SeV Packaging Mix をトランスフェクション。トランスフェクション翌日から 32°C に設定した 5%CO₂ インキュベーターで培養、毎日 2.5µg/mL トリプシン含有の無血清 E-MEM で培地交換し、3 日後の mEmerald の蛍光を蛍光顕微鏡下で観察した。

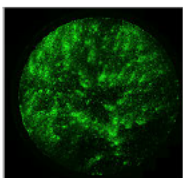


図 9 SeV ベクター作製の例 (pSeV(MHN)mEmerald) (12 ウェルプレート)

Vero-F 細胞に *TransIT[®]-Lenti* を用いてトランスフェクションを行い、3 日後の mEmerald の蛍光を蛍光顕微鏡下で観察した。ウェル全体に mEmerald 陽性細胞が広がり始めている。

2. 12 ウェルに播種した Vero-F 細胞に図 9 の SeV を含む培養上清を全量感染し、32°C に設定した 5%CO₂ インキュベーターで培養、3 日後の mEmerald の蛍光を蛍光顕微鏡下で観察した (トランスフェクションから 6 日目)。週末は培地交換を行わず、週明けに 2.5µg/mL トリプシン含有の無血清 E-MEM で培地交換した。

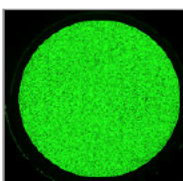


図 10 SeV ベクターの拡大産生例 (pSeV(MHN)mEmerald) (12 ウェルプレート)

図 9 の SeV を含む培養上清 (トランスフェクション 3 日後の培養上清) を Vero-F 細胞に植え継ぎ感染し、感染 3 日後の mEmerald の蛍光を蛍光顕微鏡下で観察した。ウェル全体に mEmerald 陽性細胞が広がっている。

3. T25 フラスコに播種した Vero-F 細胞に図 10 の翌日の SeV を含む培養上清を全量感染し、32°C に設定した 5%CO₂ インキュベーターで培養、毎日 2.5µg/mL トリプシン含有の無血清 E-MEM で培地交換し、3 日後の mEmerald の蛍光を蛍光顕微鏡下で観察した (トランスフェクションから 10 日目)。

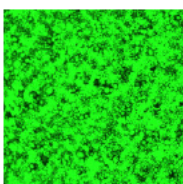


図 11 SeV ベクターの拡大産生例 (pSeV(MHN)mEmerald) (T25 フラスコ)

図 10 の翌日の SeV を含む培養上清を T-25 フラスコの Vero-F 細胞に植え継ぎ感染し、感染 3 日後の mEmerald の蛍光を蛍光顕微鏡下で観察した。T25 フラスコ全体に mEmerald 陽性細胞が広がっている。

SeV ベクターの感染例

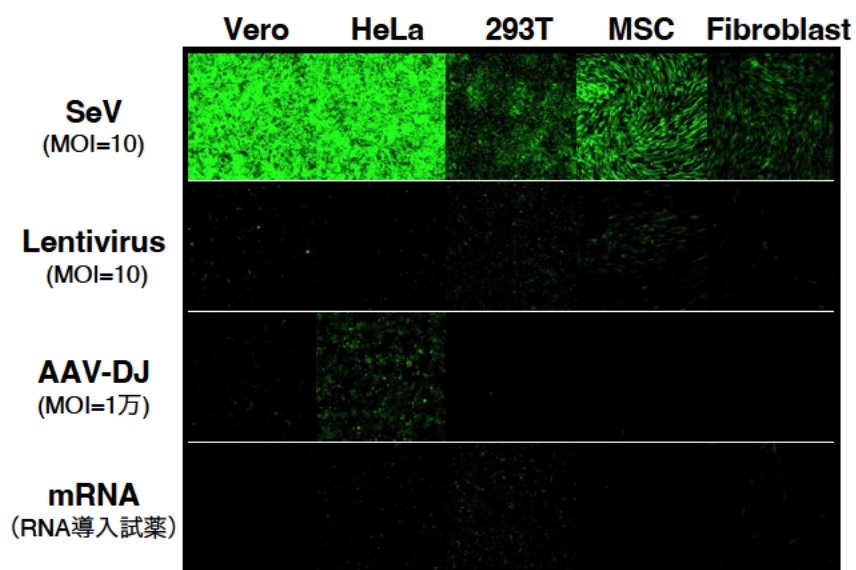


図 12 SeV は他のベクターに比べて遺伝子発現能力が高い

Lenti および AAV のプロモーター：CBh プロモーター

SeV, Lenti, AAV は EmGFP, mRNA は EGFP, 感染 3 日後の評価

XIII. 関連製品

SeV ベクタープラスミド

pSeV Vector (レプリテック：製品コード G-0010)

pSeV(MHN)mEmerald Vector (レプリテック：製品コード G-0011)

SeV ベクターPackaging Mix

SeV Packaging Mix (レプリテック：製品コード M-0001-10)

(12well plate サイズで 1well x10 回分)

SeV ベクターパッケージング細胞

Vero-F (レプリテック：製品コード C-0001)

抗 SeV 抗体

Anti-Sendai virus Rabbit pAb IgG (レプリテック：製品コード A-0100)

SeV のリアルタイム PCR 用製品

SeV Primer/Probe Mix with Standard (レプリテック：製品コード QS-0100-200)

XIV. 使用上の注意

- ・本製品の使用には文部科学省の定める省令(「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の 第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号)にある P2 レベル以上の施設が必要です*。
- ・本製品を使用する際は、法令および所属機関内の組換え DNA 実験の安全委員会の指示に従い、安全に十分注意してください。
- ・必ず安全キャビネットを使用してください。
- ・エアロゾルの発生を最小限にとどめるように心がけて操作を行ってください。
- ・本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねます。
- ・本製品は研究用試薬です。臨床目的、体外診断目的に使用することはできません。
- ・商用利用を希望する場合は個別にライセンス契約が必要です。

*センダイウイルスの実験分類はクラス 2 です。本製品を使用する際は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」、関連法令、および所属機関内の安全委員会の指示に従ってください。組換えウイルスの保管、運搬についても法令を順守してください。研究開発二種省令の詳細は文部科学省研究振興局ライフサイエンス課のホームページを確認してください。

<https://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html#kumikae>

株式会社レプリテック
〒150-0012 東京都渋谷区広尾1-1-39
恵比寿プライムスクエアタワー3 階
<https://repli-tech.co.jp/>
techinfo@repli-tech.co.jp