

Fig.23 Arrhenius plot analysis of temperature-dependent loss of the h-TM activity of the Japanese reference standard.

The reaction rate constant (k) at each temperature was calculated from the results shown in Figure 5 by using the equation below. $Y = -kx + \log 100$, where x is the stored period (days) and Y is the logarithm of remaining potency (%).

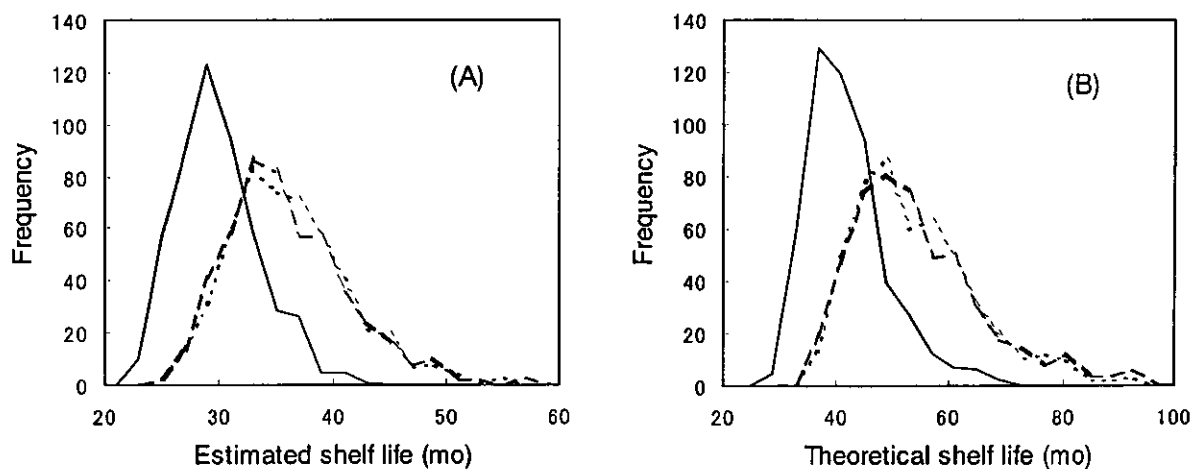


Fig. 24 Distributions of estimated shelf lives (A) and theoretical shelf lives (B) from three batches. The slope of degradation curve was 0.1%/month for batches A and B, and 0.13%/month for batch C. Assay error: 0.5%.

Theoretical shelf life is the time at which mean degradation curve intersects the acceptance criterion (95%).

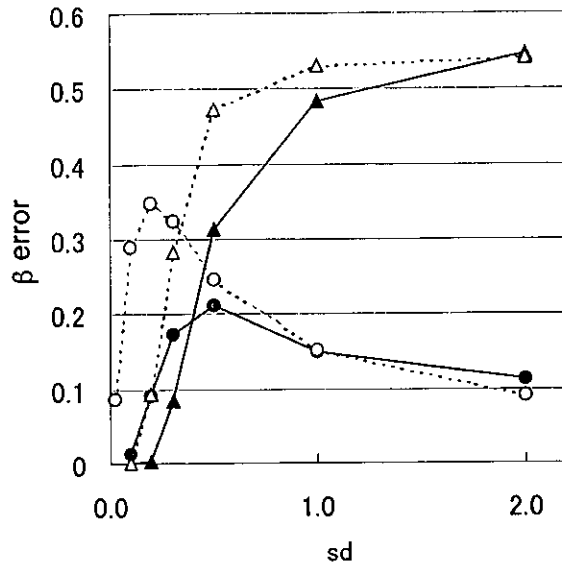


Fig. 25 Effect of assay error on the b error of the ANCOVA approach (△▲) and the Equivalence approach (○●).
Stability difference among batches : 20% (△○) and 30% (▲●)

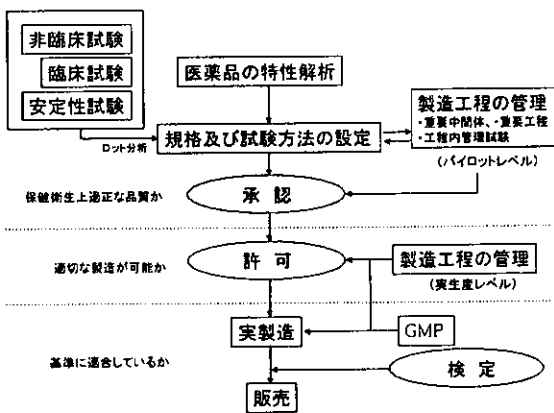


Fig.26 新医薬品の品質確保

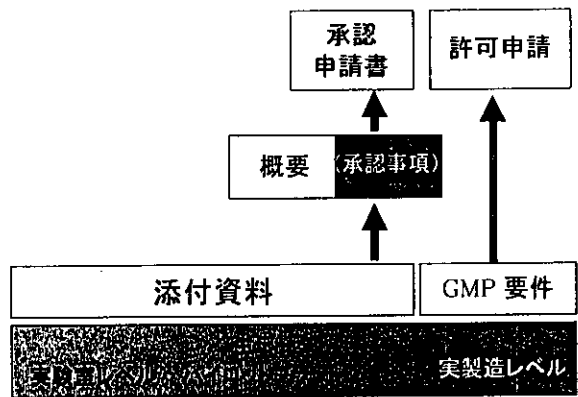


Fig.27 承認/許可と製造スケール

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

細胞・組織加工医薬品の品質や安全性確保のための試験法や基準
についての国際動向の研究

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所

細胞・組織加工医薬品の品質や安全性確保のための試験法や基準の設定、さらには規制のあり方についての国際動向を調査研究した。特に、EUのガイドラインを主な調査の対象とし、ヒト由来細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質や安全性確保のための規制のあり方について、我が国やFDAのガイドラインと比較して調査研究した。その結果、EUは(1)ウイルス等の感染症の伝達の防止、(2)品質の確保を担保するような製品の品質基準の設定、(3)製品の一定性を担保する製造方法の恒常性等をもっとも重視していることが明らかになった。また、細胞・組織加工医薬品を自己由来か非自己の細胞を用いるかによって、その品質や安全性確保の方策を分けて考えるとしている点は各国共通の認識であることが明らかになった。さらに、ウイルスのスクリーニング試験法のあり方等、多くの点で共通することが多いが、いくつか異なる点もあきらかになった。このような差異が、どのような科学的根拠に基くものをかさらに検討することが、細胞・組織加工医薬品等の品質や安全性確保の上で重要と思われる。

A. 目的 近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や幹細胞研究・再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に直接投与する医療（細胞治療）の開発が急速に進展している。このような細胞や組織から構成される医薬品や医療用具（細胞・組織加工医薬品等と呼ぶ）を医療に用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。我が国においても、様々な形での細胞・組織加工医薬品等の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。特に、感染性物質の混入やガン等の望ましくない細胞の出現を的確に検出するためにどのような試験を行う

べきか、またその規制はどうあるべきか検討すべき課題は多い。このような規制は、用いる細胞・組織の危険度に応じた規制を行うことが科学的に妥当な場合も多いと考えられる。すなわち、このような未知・未経験の多い領域の規制については、感染症の伝播などの安全性を以下に担保するが極め重要であるが、一方、過度な規制を行わないことにより革新的な医療開発を促進することも重要である。

本研究では、細胞や組織を加工した細胞・組織加工医薬品等の品質、安全性等を確保するために、どのような規制が行われようとしているのか、またその科学的根拠について、特にEUのガイドラインを中心に日本やFDAの現状等と比較しながら調査研究を行った。

B. 研究方法

本年度は、特に昨年制定されたEUの「ヒト

細胞治療医薬品の品質管理における留意事項」について調査研究を行い、我が国や米国との規制の違いや、共通する重要事項などを明らかにした。

C. 研究結果及び考察

EU の欧州医薬品審査庁ヒト用医薬品評価部門 (EMA) の「ヒト細胞治療医薬品の品質管理における留意事項」に関する調査研究により以下のような特徴が明らかになった。

1. 一般事項 (規制対象範囲を含む)

EU のガイドラインでは、ヒト体細胞を用いる細胞治療用医薬品を対象としており、昨年制定された我が国の「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」と共通している。しかし、EU においては培養皮膚等の細胞治療用製品は医療器具に属し、規制の主体が EMA ではないため我が国のガイドラインの対象となっている範囲とは異なっている。さらに、EMA ガイドラインでは、細胞治療用医薬品の対象となるのは生きている体細胞を投与する場合と規定されており、この点も我が国の規制とは異なっている。一方、我が国では、異種由来細胞を用いた細胞治療についても今後検討することになっており、この点は EU と大きく異なる点である。

次に、日本と欧米の細胞治療の比較表(表1)に示したように、細胞治療用医薬品の規制において、最も重視されている点が明らかにされているが、各国とも共通して感染性因子の伝播の防止を取り上げている。これは、細胞治療用医薬品においては、精製や感染因子の不活化といった操作を行うことが殆ど不可能であることから、その安全性に関して特に注意を払う必要があるためである。言い換えれば、このような革新的な治療推進にあたっては、その安全性確保が細胞治療に対する国民の信頼を得るために必須の事項であるという点である。

さらに、各国とも細胞治療用医薬品の品質の確保がうたわれている。この品質の確保に大きなインパクトを持つのが、製品の品質基準であり、また製法の一定性を担保する方策である。

2. EU における細胞治療用医薬品の開発と評価に関する留意事項

EU のガイドラインでは細胞治療用医薬品としてヒト由来細胞のみを対象としており、さらに自己由来細胞を対象とするか、同種の非自己細胞を対象とするかによって2つに分類して原材料としての細胞の適正を評価するとしている。

非自己からのドナーについては血液製剤の供血者及び移植ドナーと同様の厳格で厳しい基準で評価を行う必要があるとしている。さらにこの評価には、血液型や主要組織適応抗原、場合によってはマイナー抗原などの多型性についても考慮する必要性が述べられている。このような事項に関しては、我が国における規制とも共通する点である。

2.1 非自己からのドナーの適合性

ドナー適正としては、主として感染性因子の伝播をいかに防止するかの観点からガイダンスが行われている。ドナースクリーニングでは、ドナーの年齢、性別、病歴、最近の健康状態に加えて、採取した細胞に危険性があると考えられるような遺伝的疾患に関するすべての家族歴も参照されるべきとしている。また、HIV や肝炎ウイルスあるいはマイコバクテリアやレンチウイルス、海綿状脳症の原因因子などの伝達性因子の存在や存在の可能性についての排除基準を明確にしておく必要があるとされている。

さらに、基本的に、感染因子に暴露された可能性のあるドナーあるいは感染の危険性にさらされたドナーから細胞は採取すべきではないとし、どうしても採取しなければならない場

合には、感染因子の破壊が行われなければならないとしている。

適切なドナーの選択基準やハイリスクあるいは不適切なドナーを排除するための手順を設定するとともに基準を文書化しその妥当性を明らかにしておくべきであるとしている。

特に、ウイルス感染の防止の観点から、どのようなウイルスに着目した検査すべきかについて、具体的なウイルスを例示している。このようなドナースクリーニングに関する事項については、表2に示すように我が国のガイドラインの方がより具体的にクリーニングの内容や、問診の注意事項について触れている。

一方、米国ではドナースクリーニングに関してより詳細なガイダンスが行われている。これは、米国が細胞・組織加工医薬品の規制範囲が非常に広いことや、経験が豊富な血液製剤におけるドナースクリーニング基準を準用しているためと考えられる。また EU もドナー適合性に血液製剤に置ける基準を参照することを求めている。

2.2 自己細胞を用いた治療

自己由来であることを記載した文書やトラッキング手続きにしたがって確実にドナーの確認を行うことを求めている。また、その患者にのみ用いることのできることを示すような、例えば「自己治療用に限定」とのラベルを細胞製品に貼付しておくべきとされている。一方、細胞は自己由来であることから免疫学的には全く同等の性質を持ち、その使用にあたっては、望ましくない免疫反応の惹起や感染性因子等に関する基本的な安全性の試験については省略することができるとしている。

しかし、外来性の感染因子に関して、製品の製造に用いる機器からの相互汚染の問題等に関して注意を払う必要があり、自己由来の細胞治療用医薬品でも、細胞の微生物やウイルス安全性や患者の血清学的性質等に関しては同種由

来の場合と同じ品質基準は適用されるべきとしている。

FDA では、自己の細胞を用いる場合は、外来性因子の試験及びラベリングの追加等を行うように求めている。

日本でも、自己由来の細胞・組織を用いる場合は必ずしもドナースクリーニングを必要としないとされている。

以下に EU における製造工程や細胞培養工程、製剤化、細胞取扱い操作と装置の評価、品質管理プログラム等に関する規制について調査結果を示す。

3. 製造工程に用いる他の原材料や試薬の供給とその性質

3.1 一般的な考慮事項

細胞治療用医薬品の遺伝的あるいは表現形質を改変するために、酵素、抗体、サイトカイン、血清、抗生物質や他の化学物質あるいは培養基材などの様々な材料が必要とされる。しかし、そのような材料は時として最終製品の品質、安全性、薬効に望ましくない影響を与える可能性もある。したがって、製造に用いる各々の試薬や材料等は、十分に特性解析がなされ、その使用の適切性を評価しておく必要がある。細胞を採取し、選別し、加工するための材料や方法は、詳細に記載されている必要がある。添加剤（ancillary product）の無菌性、感染物質の存在の否定あるいはエンドトキシンが許容範囲以下であることが保障されなければならない。細胞の増殖や接着を支持する新規材料の機能や免疫反応を利用した細胞分離装置等が使用目的にかなっていることをバリデートし、有用性を明らかにしておく必要がある。

培養液や増殖因子、サイトカインや抗体等の添加剤の品質について確認試験、純度、無菌性、生物活性あるいは感染因子が含まれないこと

を明らかにしておくこと。過敏症を引き起こす可能性のある試薬の使用はさける事が望ましい。

細胞治療用医薬品の製造工程には高度な精製過程あるいはウイルス除去工程や不活化工程が含まれていない。したがって、全てのヒトあるいは動物由来原材料についての受入れ基準は極めて厳格なものである必要がある。

品質の観点から、組換え DNA 技術を用いた医薬品の製造と品質管理に関するガイドラインやモノクローナル抗体の製造と品質管理に関するガイドラインを必要に応じて参照すべきである。

3.2 ヒト由来材料や試薬に関して特に考慮すべき事項（アルブミン、免疫グロブリン等）

細胞の至適増殖に必要なヒト由来試薬については、CPMP の「血漿分画製剤に関するガイドライン」の対象となる血漿分画製剤と同一の手法によりその適切性が評価されたものでなければならない。海綿状脳症の伝播を防ぐために関連する EC の規制やガイドラインに従った評価を行う必要がある。細胞治療に用いる細胞と同じ自己血清を用いる場合には、同種由来の血清を用いるのとは異なった判断基準を適用することができる。

3.3 製造工程で用いる動物由来原材料や試薬に関して特に考慮すべき事項

動物由来の試薬は、種々の感染因子を含む可能性があり、レシピエントに予期せぬ免疫学的反応を引き起こす可能性もある。動物由来試薬に代えて組成の明らかにされた非動物由来試薬を用いることが望ましい。もう一つの選択肢としては、ドナー細胞と同じ自己血清を用いるか同種のヒト血清を用いることがあげられる。動物由来材料の使用にあたっては、ヒト及び家畜医薬品を介した海綿状脳症の伝播を避ける

ための CPMP と CVMP ガイドライン（EMEA/410/01,rev.1）を遵守する必要がある。また放射線照射を行った血清や合成培地の使用を考慮すべきである。

4. 胞培養工程

細胞培養を行う際には、分離した細胞の最適な増殖が維持され、望ましい加工操作ができるように注意を払う必要がある。各製造工程は、目的とする細胞状態や機能が保持されるよう適切にデザインされたものであるべきである。製造工程での各操作を、工程管理基準に従って正確にモニターし、その詳細を記録しておくこと。微生物汚染の防止は、工程管理と品質評価の最も重要な柱である。全ての細胞治療用医薬品に付随する危険性として伝染性疾患の伝播が挙げられるが、その危険性の程度やその危険性を低減させるための最も有効な方策は、その原材料である細胞や組織の性質によって異なってくる。細胞治療用医薬品のリスク評価は、このような原材料の特性を考慮するとともにその臨床上的使用目的や製造者や試薬からの汚染物質の混入の可能性を考慮する必要がある。

細胞培養工程の幾つかのステージを選び、細菌、イースト、真菌、あるいはマイコプラズマなどの感染物質の存在をモニターし、汚染のないことを確認する必要がある。培養工程での微生物汚染否定試験と細胞の増殖特性についての試験を行う必要がある。予め具体的なウイルス試験要領を作成しておく必要がある。細胞培養工程の恒常性や再現性を記録しておく必要がある。培養工程での細胞の生存率、細胞の密度やコンフルエントの状態、純度、培養期間の長さや最高到達 PDL 数等の重要なパラメータの限度値を明らかにしておく必要がある。

細胞製品中に感染因子が存在すれば水平感染の大きな危険性が生じる。感染症の水平感染

の危険性レベルは以下のような点を考慮して判断すべきである。

- 製品が自己治療に用いるのか同種を対象としているのか
- 製造現場において複数のドナー由来の細胞を加工したり取り扱ったりすることによる相互汚染の危険性
- 細胞をどのように操作するか、またどのような条件で操作するか

自己や同種の細胞治療用医薬品の製造では、細胞加工に用いる機器や液体窒素タンクなどの保存容器などから感染性因子が混入する可能性があり、同一製造現場にて多様な細胞製品が採取され、加工され、保存されている場合は感染の危険性を増加させる可能性が高い。したがって、製造施設については十分な管理体制をとる必要がある。

細胞の採取、保存、移送、加工に際しては、ドナースクリーニング、ドナーや製品の評価を行うとともに、細胞を一定間管理保管を行うことを考慮すべきである。細胞の不適切な取り扱いや加工は、細胞製品の生存性に悪影響を与えたり有害事象を引き起こし、ひいては治療の失敗につながる。細胞製品の相互汚染は、感染症の危険性も増加させることになる。最終製品の出荷の前に、全ての検査と試験が完了していることが望ましい。一方、ある種の細胞治療用医薬品では、そのような品質管理試験を出荷の前に行うことが不可能であったり現実的ではなかったりする。したがって、出荷のために梱包された製品の品質を保証するための一連の試験として、保管されている製造の品質を保証するような方策を定めておく必要があるかもしれない。

4.1 細胞の均一性や不均一なポピュレーションからなる細胞集団の一定性確認

同種細胞を用いる場合には目的とする細胞の表現形や遺伝的性質について、その機能や活性ばかりでなく最終細胞製品の特性としての適切な細胞表面マーカーや生化学マーカーについて解析を行う必要がある。

特定の培養条件で、形質転換した細胞は、正常細胞に比べて増殖能が優れていることがあることから、増殖因子への応答性に着目して、細胞の形質転換が起こっている可能性について考慮を払うべきである。

遺伝子改変された細胞集団については、新たに獲得した性質が再現性よく、また適切に発現されているかことを試験する必要がある。適応可能でかつ実施可能であれば、その発現を定量し、かつその発現量が制御可能であることを明らかにするべきである。この点に関しては、遺伝子治療用ベクターの品質管理、特性解析や前臨床試験の詳細について具体的に記載されている遺伝子治療医薬品の品質、前臨床及び臨床に関する CPMP のガイドラインを参照すること（CPMP/BWP/3088/99）。

4.2 細胞培養期間

初代細胞培養、株化された細胞系、さらにはクローナルな細胞に応じて、遺伝的性質や表現形質を明らかにし、それぞれの培養期間を通じての安定性に関して明らかにしておく必要がある。培養の継続期間は、治療目的に応じた細胞機能が保持されるように設定されている必要がある。

4.3 細胞の保存と細胞バンクシステムの構築

適切な細胞保存管理システムを構築しておくべきである。細胞治療用医薬品の製造において最終製品中の細胞特性に影響を及ぼすことのないような細胞の適切な凍結保存、解凍法及び供給が可能な一連の工程を確立する必要がある。

セルバンク作製が可能であれば、マスターセルバンク及びワーキングセルバンクを樹立するべきである。樹立した細胞バンクに関して、生物学的性質やその機能に関して詳細に解析するとともに、内因性及び外来性の感染因子（細菌、真菌、イースト、ウイルスやマイコプラズマ）に汚染されていないことを明確にすること。細胞は、細胞の生存性、密度、純度、無菌性や機能を保持できるような十分に管理された最適条件で保存されるべきである。細胞の同定は、遺伝的性質や表現形質による確認や、細胞集団のなかに目的とするこれらの指標をもつ細胞の比率を解析することによって確認するべきである。

5. 製剤化

治療用細胞製剤の投与では、幾つかの経路が考えられる；すなわち血管内投与や特定部位への注入、あるいは外科的な移植が考えられるであろう。レシピエントの免疫監視機構を逃れるために生体適合ポリマーに封入された細胞を用いることも可能である。用いられるポリマーは、その物理化学的性質に関して十分に特性解析され、科学的妥当性のある規格によって品質管理されている必要がある。臨床目的に応じたポリマーの適合性については、生物学的同等性や耐久性に関して十分な評価が行われなければならない。構造や生物活性の維持あるいは免疫隔離の目的のために目的細胞に使用されるファイバーやビーズなどの他の補助的な構成成分は、最終製品の一部として捉え、それぞれの目的に応じて評価するべきである。

細胞製品は、機械的構造物あるいは合成化学物質とともに、あるいは他の医薬品や非細胞生物薬品と組み合わせて使用される場合がある。このような他の物質と組み合わせて使用される細胞治療用医薬品では、機能や同等性あるいは持続性に関して特別な配慮が必要である。そ

のような細胞とともに組み合わせて使用される材料については、十分な時間その機能が維持され、回りの組織に副作用を及ぼさずに目的とする機能が保持されることが絶対条件である。

6. 細胞取り扱い操作と装置の評価

細胞を操作する全てのステップは、使用する装置も含め次のような項目について十分にバリデーションしておく必要がある。

- 工程への微生物汚染防止管理
- 細胞の生存率
- 細胞増殖や適応可能であれば細胞分化能
- 細胞の同定
- 細胞の活性や機能
- 必要ならば遺伝子導入効率
- 輸送に用いる容器やその方法

以上のバリデーションは GMP にのっとり定期的に行う必要がある。バリデーションに際しては、細胞操作中の相互汚染や操作終了後に残存する材料からの相互汚染の防止のための洗浄操作に関しても充分考慮することが必要である。

7. 品質管理プログラム

品質管理に関するこの項は、EC 内で出された GMP 関連ガイドラインや ICH ガイドラインを参考にしながら読まれるべきものである。細胞の採取、保存、操作や品質管理さらには最終容器への梱包等を行う施設においては、必ず品質管理プログラムを策定しそれに従った操作を行うこと。治療用細胞の各取扱い工程について品質管理プログラムの作成し、文書化するとともに、取扱説明書を作成し、効果的な品質管理を行うべきである。品質管理プログラムでは、統括責任者を指名しておくこと。責任者は、委員会令 75/319/EEC の条項 21（修正）に記載にしたがって行動すること。

以下のような観点について品質管理プログラムを作成すること。

- (細胞治療用医薬品の) 製造目的にかなう適切な施設・設備；
- 使用目的に応じて採用された機器の保証書とバリデーション；
- 標準操作マニュアルの作成；
- 細胞提供者を追跡するための十分な記録の作成：例えば採取日、採用した品質管理試験とその結果等；
- 製造工程に受け入れる原材料細胞の試験の設定；
- 原料細胞や最終細胞製品のラベル表示、保存、移送における十分な管理；
- 管理検査とその報告書の作成；

8. バッチ確認試験、最終製品、ロット出荷試験

細胞提供者のトレーサビリティを完璧に保障するための十分な製造バッチ確認システムを確立する必要がある。最終容器に適切なラベル表示を行うことにより調製した細胞バッチを確実に確認できるようにするべきである。工程の各ステージの記録を正確に残しておくべきである。自己由来細胞を用いる治療においては、その特性から規格や必要項目の設定をより柔軟に行うことができるよう全製品を一つのバッチとして評価するべきである。最終細胞治療用医薬品とは全ての必要な操作ステップを経て調製されたものと規定できる。必要な操作ステップには細胞を増幅させるまえの細胞の選択、増殖あるいは増殖と分化、薬理的あるいは物理的処理、精製、臨床目的に適応する表現形質をもつ細胞の選択が含まれる。本ガイドラインの対象とするケースでは、細胞は通常適切な凍結保存法を用いて凍結保存されたりバンク化される。

最終細胞治療用製品について、品質試験やロ

ットリリース試験を行うと同時に製品の有効期限を評価できるような生物活性などの試験あるいは検査を行う必要がある。規格とその規格値は製造実績やプロセスバリデーションのデータに基づいて設定すること。将来の解析のために使用した試料を保存することが推薦される。

生物活性を評価できるような適切な力価試験を設定するとともに、製品が目的とする状態を保持していることを担保するための安定性試験を行うべきである。細胞製品には、明瞭な表示をしておくべきである。また、細胞の同定、加工方法、製品のスクリーニング試験の結果を記録に残しておくこと。細胞製品には、十分にバリデートされた有効期限を設定すること。設定された有効期間の間、細胞が目的とする状態を保持していること、あるいは製品としての安定性が維持されていることについての実験データに基づいて、有効期限が決定される必要がある。

製品の受け入れ規格に関する基準を設定するとともに必要に応じて規格を見直すこと。基準には、製品の量やサイズ、保存条件、許容温度範囲、微生物否定試験、製品以外の不純物あるいは工程由来不純物の限度値、生細胞数や機能が含まれる。細胞の凍結、解凍方法、汚染の有無や生細胞率試験の結果を記録しておくこと。もし、細胞治療用医薬品が目的とする状態が保持されていることを担保したり、品質あるいはロットごとの恒常性を解析する必要がある場合には、同時に細胞の生存率の解析を必ず行うこと。この測定を行っておくことにより、医療現場において患者への投与に先立って細胞の生存率を評価することが可能になるであろう。

細胞治療用医薬品の調製にあたっては2つの特殊なケースが想定される。

a) 自己由来の細胞の生物学的性質を改変する

ような工程を経て、その工程が修了した直後に患者に再投与されるような、患者ごとに調製される細胞

b) 原材料の細胞数が非常に限定された数しかない場合や望ましくない形質転換を避けるために採取した細胞の増殖を制限するような加工しか行わない場合で、最終製品の臨床投与への必要量が限定されている場合

これらのケースでは、出荷前に試験を完了することができない場合や出荷判定のためのサンプル量や時間が十分でないケースがしばしばある。

細胞を操作する全工程はバリデートされていなければならない。臨床に用いるのと同様な細胞調製工程に関するバリデーション・スタディを通常 6 ヶ月間隔といった一定期間ごとに行なう必要がある。このバリデーション・スタディには、無菌性、マイコプラズマや外来性ウイルス否定試験、細胞の確認試験、細胞の生物活性、細胞の生存率、細胞増殖能、純度、必要に応じて遺伝子の導入効率があげられる。臨床使用の直前に、予め決められた規格限度値に対応して基本的な一連の試験（例えば、生存性、バクテリア汚染、表現形、投与あたりの細胞数）を細胞製品の臨床使用に先立って必ず行うこと。可能であれば、将来の解析のために、試料の一部を保存しておくべきである。

患者への投与直前に限定的な処理が必要な細胞製品に関しては、製品の添付文書の項にその操作手順が含まれるべきであり、製品のユーザーに必要な操作を文書化して提供する必要がある。この工程は、工程バリデーションプログラムとして評価されるべきであり、その結果は関連情報として提供される必要がある。

付録、補遺

体細胞治療の例

1. 骨髄系細胞減少症（myelodepletion）の治療や血球系の再構築を目的とした自己あるいは HLA の適合した同種血液幹細胞の投与。
2. 養子免疫療法を目的として、体外で精製、増幅、活性化やプライミングを行った活性化リンパ球や活性化樹状細胞の投与
3. 複雑な生物学的機能を持つようにデザインされ、損傷あるいは欠損した組織の原料となる可能性のある組織特異的細胞集団の移植
4. 分離、加工し、体外で生物学的操作や遺伝子改変などを行った自己由来のがん細胞
5. 幹細胞治療：万能性の血液幹細胞は、全ての血球細胞と免疫系の始源細胞集団であり、癌や自己免疫疾患あるいは遺伝病の治療を目的とした *ex vivo* 遺伝子治療の非常に有用なターゲットとなっている。

E. 結論

細胞・組織加工医薬品の品質や安全性確保のための試験法や基準の規制のあり方の国際動向について、欧米のガイドライン等を含めて調査研究の対象とした。今年度は特に EU の「ヒト細胞治療医薬品の品質管理における留意事項」を中心に調査研究した。その結果、EU では、(1) ウイルス等の感染症の伝達の防止、(2) 品質の確保を担保するような製品の品質基準の設定、(3) 製品の一定性を担保する製造方法の恒常性等をもっとも重視していることが明らかになった。また、細胞・組織加工医薬品を自己由来か非自己の細胞を用いるかによって、その品質や安全性確保の方策を分けて考えるとしている点等については、日本における規制と極めて共通していた。しかし、ドナー適合性として検査すべきウイルスの例示等で幾つかの違いが明らかになった。このような差異が、

どのような科学的根拠に基くものかさらに検討することが、細胞・組織加工医薬品等の品質や安全性確保の上で重要と思われる。

参考資料

1. Point-to-consider on the manufacture and quality control of human somatic cell therapy medicinal products. EMEM, CPMP/BWP/41450/98, 2001.5.31
2. Guidance for industry: guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. FDA/CBER, 1998.3.
3. Suitability determination for donars of human cellular and tissue-based products. FDA/CBER, 97N-484S, 1999.9.30
4. 厚生省通知；細胞・組織を利用した医療用具又は医薬品の品質及び安全性確保について。厚生省医薬発第 906 号、1999. 7.30
5. 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方。厚生労働省医薬局長通知 医薬発第 266 号、2001.3.28
6. ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針。厚生労働省医薬局長通知 医薬発第 1314 号、2000.12.26

論文発表

- 1) K. SATOH, A. IWATA, M. MURATA, M. HIKATA, T. HAYAKAWA, T. YAMAGUCHI; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Clin. Microbiol.*, (submitted)
- 2) Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA and Takao HAYAKAWA: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peropheral blood as

ehdothelial-precursor cells, *British. J. Hematol.*, (submitted)

- 3) Sachiko MATSUI, Reiko ADACHI, Kaoru KUSUI, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi KASAHARA, Takao HAYAKAWA and Kazuhiro SUZUKI: U73122 inhibits the dephosphorylation and translocation of cofilin in activated macrophage-like U937 cells, *Cell. Signalling*, **13**, 17-22 (2001)
- 4) Sachiko Matsui, Sachiko Matsumoto, Reiko Adachi, Kaoru Kusui, Akiko Hirayama, Hidemi Watanabe, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Teruhide Yamaguchi, Tadashi Kasahara, and Kazuhiro Suzuki :LIM Kinase 1 Modulates Opsonized Zymosan-triggered Activation of Macrophage-like U937 Cells. POSSIBLE INVOLVEMENT OF PHOSPHORYLATION OF COFILIN AND REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON. *J. Biol. Chem.*, **277**, 544-549 (2002)
- 5) 早川堯夫、山口照英、石井（渡部）明子、押澤 正：核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリティスタディ、*医薬品研究*（印刷中）
- 6) 早川堯夫、山口照英、押澤 正：日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究 —ウイルス安全性確保の基本要件—、*医薬品研究*（印刷中）
- 7) 豊田淑江、山口照英、内田恵理子、押澤 正、早川堯夫：好中球機能分化と増殖の制御、*炎症* **12** 巻, 101-109 (2001)

学会発表

- 1) 山口照英、早川堯夫：バイオテクノロジーを応用した医薬品の品質及び安全性確保の評価科学。PDA 第 9 回年会及び併催シンポジウ

ム、東京、平成13年11月5-6日

2) 山口照英：細胞・組織利用医薬品・医療用具の品質管理手法について. 第6回関西バイオコンファレンス、神戸、平成14年3月12日

3) 豊田淑江、山口照英、押澤正、内田恵理子、早川堯夫：HL-60細胞の好中球への分化・増殖のコミットメントにおけるPI3k-PKC-p70S6キナーゼ(p70S6K)カスケードの役割、第74回日本生化学大会. 京都、平成13年10月25日)

4) 豊田淑江、山口照英、押澤正、内田恵理子、早川堯夫：HL-60細胞の好中球への分化・増殖におけるp70S6キナーゼ(p70S6K)カスケードの役割についての研究. 第22回日本炎症・再生医学会. 東京 平成13年7月3日

表1. ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の各国の規制の比較（1）

	日 本	EU	米 国
細胞治療用医薬品の定義	生物由来医薬品又は生物由来医療用具のうち、ヒト又は動物の細胞・組織から構成されたもの。	自己あるいは同種の細胞から構成されるヒト体細胞	ヒトに投与する自己、同種あるいは異種動物由来の生殖系列以外の生きている体細胞、細胞・組織を利用した医薬品、医療用具の他に、自己由来軟骨細胞、血液幹細胞、精液を含む生殖細胞、腱、骨、心臓弁や角膜等の移植用組織も対象
除外	輸血用血液製剤、血液製剤、骨髄移植、臍帯血移植、移植医療としてのヒトの皮膚や骨、心臓弁等	輸血用血液製剤	輸血用血液製剤、
細胞治療用医薬品等の規制ガイドラインにおけるキーポイント	<ul style="list-style-type: none"> ● 感染性因子の伝達防止、 ● 細胞治療薬の品質及び安全性の確保 ● 細胞・組織の取扱いに関する科学的、倫理的妥当性の確保 	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞治療薬にどのような品質基準を適用するか ● 感染因子の混入防止 	<ul style="list-style-type: none"> ● 感染因子の混入防止 ● プロセスコントロール ● 臨床上の安全性と有効性を担保するか

表2. ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の各国の規制の比較（2）

	日 本	EU	米 国
ドナースクリーニング 試験	<p>試験項目 HIV-1, HIV-2, HBV, HCV, HTLV-1, 2, パルボウイルス B19,</p> <p>必要に応じて サイトメガロウイルス, EB ウイルス,</p>	<p>HIV-1, HIV-2, HBV, HCV</p>	<p>HIV-1, HIV-2, HBV, HCV, トリポネーマ</p> <p>HTLV-1, 2, サイトメガロウイルス</p>
問診等の含めた適格性	<ul style="list-style-type: none"> ● 梅毒トレポネーマ、クラミジア、淋菌、結核菌等の細菌による感染症 ● 敗血症及びその疑い ● 悪性腫瘍 ● 重篤な代謝、内分泌疾患 ● 膠原病、血液疾患 ● 肝疾患 ● 痴呆症（伝達性海綿状脳症及びその疑いのあるもの） 	<ul style="list-style-type: none"> ● 年齢、性別、 ● 病歴、最近の健康状態 ● 遺伝的疾患に関するすべての家族歴 ● マイコバクテリア ● 海綿状脳症の危険性 	<ul style="list-style-type: none"> ● 年齢、性別 ● 血液ドナーの基準に適合すること ● 病歴データ ● 臓器・組織ドナーに関する勧告事項を参照すること
特記事項		<p>複数のドナーからの細胞を混合する場合</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 免疫寛容 ● 予期せぬ細胞相互作用 ● 望ましくない免疫反応等 ● 細胞の産生する因子の変化 ● 感染の危険性はより増加 <p>ついて配慮すること</p>	<p>複数のドナーからの細胞を混合する場合</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 免疫応答による細胞間相互作用の可能性 ● 細胞の能力を変える可能性 ● 複数のドナー細胞を混合したときの特性解析の困難性 <p>ついて配慮すること</p>

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向に関する研究
—レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルス検出法の検討—

分担研究者 内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部遺伝子治療薬研究室長

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向を踏まえた研究として、レトロウイルスベクターの安全性確保上最も重視される、ベクターに混入する増殖性レトロウイルス(RCR)の検出法について検討を行った。RCRに存在するがレトロウイルスベクターでは欠損しているエンベロープ(env)遺伝子配列に対するプライマー、プローブを用いてリアルタイム定量RT-PCRを行うことによりRCRを定量的に測定可能であることを確認した。またポリエチレンイミン(PEI)結合磁気ビーズを用いた新規ウイルス濃縮法によりRCRを濃縮可能であることを見だし、大量の試料に微量に含まれるRCRをPEI-磁気ビーズにより濃縮後にリアルタイム定量RT-PCRで検出することにより感度よく検出できる可能性を示した。さらに、ウイルス感受性細胞に一度感染させることで増殖性を有するRCRのみを増幅し、リアルタイム定量RT-PCRで検出を行うInfectivity RT-PCRという方法と、PEI-磁気ビーズ濃縮とを組み合わせることによって、env遺伝子配列を含む増殖性のない核酸がレトロウイルスベクター試料中に混入している場合でも、従来の指標細胞を用いたRCR検出法と比較してより短時間でより高感度にRCRを定量的測定が可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与する遺伝子治療は、バイオテクノロジーやゲノム科学の進歩を基礎にした革新的な医療技術として期待されている。遺伝子治療は先天性の遺伝性疾患や悪性腫瘍など、現在有効な治療法が確立されていない疾患に対して画期的な治療法となることが期待されるばかりでなく、いわゆる成人病などのより一般的な疾患に対しても応用が検討されている。しかし、遺伝子治療はまだ治療法として確立された方法ではなく、実験的医療の段階である。遺伝子治療に用いられる遺

伝子治療用医薬品は従来の医薬品にはない画期的な作用機序による治療効果が期待される一方で、新技術の利用に起因する安全性に関する危険性も否定できない。遺伝子治療の実用化を推進するためには遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保、使用段階での安全性の確保が重要となる。遺伝子治療のように学問・技術が急速に進歩している分野においては、特にこれらの医薬品の開発、臨床研究の進展が著しい外国での学問・科学の進歩を踏まえ、国際的な水準からみた安全性確保方策の科学的妥当性について絶えず評価・検証する必要がある。

本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝

子治療に関する国際的動向、安全性確保方策の進展を調査し、我が国の遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保に寄与する基礎的研究を行うものである。本年度は昨年度検討したウイルスベクターの品質面での安全性確保の国際的動向を踏まえ、レトロウイルスベクターの品質管理、安全性確保上最も重視されるベクターに混入する増殖性レトロウイルス (Replication-competent retrovirus; RCR) の検出法について検討し、ポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を Infectivity RT-PCR と組み合わせることにより、従来の方法よりも短時間で高感度に検出できる可能性を検討した。

B. 研究方法

1. ウイルス、細胞

増殖性レトロウイルス(RCR)としては、FDAが2000年に公表した「レトロウイルスベクターを用いる遺伝子治療用医薬品の増殖性レトロウイルス試験及びレトロウイルスベクターを用いた臨床試験における患者の追跡調査に関するガイダンス」(Supplemental Guidance on Testing for Replication-Competent Retrovirus in Retroviral Vector-Based Gene Therapy Products and During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors)でRCRアッセイの感度の決定とアッセイのバリデーションに用いる標準ウイルスとして樹立された組換えレトロウイルス Hybrid Moloney/Amphotropic murine leukemia virus (Mo/AMLV, ATCCより入手、VR1450, 感染力価: $6.9 \pm 2.0 \times 10^7$ focus-forming units(ffu)/ml)を用いた。Mo/AMLVはモロニー Maus 白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus; MoMLV)のエンベロップ(env)遺伝子のコード配列を4070A両種指向性 Maus 白血病ウイルス (4070A Amphotropic murine leukemia virus;

AMLV)のenv遺伝子領域に置換した組換えウイルスで、AMLV envのコード配列を組み込んだレトロウイルスパッケージング細胞から製造される典型的な組換えウイルスを代表するものである。

培養細胞としては、RCR増幅用に NIH/3T3細胞(JCRB0615)及び Mus dunni細胞(ATCC, CRL-2017)を、RCRのアッセイ用に PG-4(S+L-)細胞(ATCC, CRL2032)を用いた。またレトロウイルスベクターの作製には MoMLVの gag/pol 遺伝子と 4070Aの env 遺伝子を別々の発現ベクターに組み込んだ高タイトアのレトロウイルスベクター産生用パッケージング細胞株である Ψ CRIP-P131細胞(RIKEN Cell Bank, RCB1088)を用いた。NIH/3T3細胞と Ψ CRIP-P131細胞は10%子牛血清(CS)含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、Mus dunni細胞とPG-4(S+L-)細胞は10%ウシ胎児血清(FCS)含有McCoy's 5A培地で継代培養を行った。

2. ウイルスベクターの調製

レトロウイルスベクターは以下の方法で調製した。まず、改変型緑色蛍光タンパク質(Enhanced Green Fluorescent Protein; EGFP)発現レトロウイルスベクタープラスミド pLEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) 2 μ gを100mm dishに播種した Ψ CRIP-P131細胞(1×10^6 cells)に Effectene Transfection Reagent (Qiagen)を用いてトランスフェクションし、2日後にトリプシン処理を行い1:10, 1:20, 1:40, 1:80に希釈して継代培養した。翌日よりG418 (Geneticin, final 1mg/ml, GIBCO-BRL)を培地に添加して薬剤選択を開始した。約2週間培養後、得られたコロニー18個をクローニングリングを用いてピックアップし、拡大培養を行った。

ベクター産生細胞のスクリーニングは以下の方法で行った。NIH/3T3細胞あるいは Mus

dunni 細胞 2×10^5 個を 6cm dish に播種し、一日培養後培地を新鮮培地 2ml に交換した。さらにポリブレン (final $8 \mu\text{g/ml}$)、レトロウイルスベクター産生細胞クローンの培養上清 1, 10, $100 \mu\text{l}$ を添加して 4 時間培養後、新鮮培地に交換してさらに 2, 3 日間培養した。細胞での EGFP 発現を共焦点顕微鏡 (ZEISS LSM510) を用いて励起波長 488nm 、蛍光波長 $505\text{-}550\text{nm}$ で観察した。また細胞をトリプシン処理後、 1mM EDTA 含有リン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、フローサイトメーター (FACS Calibur, Beckton Dickinson) を用いて励起波長 488nm 、測定波長 514nm (FL1) で得られる GFP 陽性細胞の割合を測定した。得られた細胞クローンのうち培養上清添加により最も多くの GFP 陽性細胞を得た Ψ CRIP-LEGFP1 細胞を高力価レトロウイルスベクター産生細胞株として増幅、保存した。レトロウイルスベクター溶液としては Ψ CRIP-LEGFP1 細胞をサブコンフルエントまで培養後、培地交換を行った翌日の培養上清 (ベクター力価: 約 1×10^6 colony forming units; CFU/ml) を用いた。

3. リアルタイム定量 RT-PCR に用いるプライマー、プローブ

RCR の定量的検出に用いる PCR プライマー及び TaqMan プローブは、Mo/AMLV の env 領域 (4070A Amphotropic env, DDBJ accession No. AF010170 の塩基配列のうち 6368-8332 番目の 1965 base) の塩基配列について Primer Express Ver.1.0 (Applied Biosystems) で最適配列を検索して設計した以下のプライマーセットとプローブを用いた。Forward プライマー (AMLVenv-1018F): $5'\text{-GCG GTC GTG GGC ACT TAT A-}3'$; Reverse プライマー (AMLVenv-1082R): $5'\text{-TGT TGG GAA GTG GCC GTA C-}3'$; TaqMan プローブ (AMLVenv-1040TM): $5'\text{Fam-ATC ATT CCA CCG CTC CGG CCA-Tamra-}3'$ 。

4. ポリエチレンイミン結合磁気ビーズによるウイルス濃縮法

ポリエチレンイミン (PEI) 結合磁気ビーズは表面にカルボキシル基を持つ磁気ビーズ IMMUTEX-MAG (JSR Inc, Japan) を、水溶性カルボジイミド EDC (1-ethylene-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl) 存在下、PEI (MW 70,000) とカップリングして作製したものをを用いた。

PEI-磁気ビーズを用いたウイルス濃縮は通常以下の方法で行った。種々の濃度の RCR を含むウイルス液 (1ml , 5ml または 10ml) に PEI-磁気ビーズ $100 \mu\text{l}$ (10mg の磁気ビーズを含む) を添加混合後、室温で 10 分間静置した。この PEI-磁気ビーズを含む懸濁液を軽く遠心し、磁性スタンド (1ml の場合は Magnetic Trapper, Toyobo Co, Japan; 5ml , 10ml の場合は Dynal MOC-1, Dynal AS, Oslo) を用いて PEI-磁気ビーズ結合画分と磁気ビーズ処理上清画分とに分画した。PEI-磁気ビーズ結合画分は全量を、磁気ビーズ処理上清画分及び磁気ビーズ処理前のウイルス液の場合は $100 \mu\text{l}$ をウイルスゲノム RNA の抽出に用いた。ウイルスゲノムの抽出はスマイテスト EX-R&D 核酸抽出キット (ゲノムサイエンス研究所, 東京) を用い、添付のプロトコールに従って実施し、 $50 \mu\text{l}$ の DNase, RNase 不含蒸留水に溶解した。

5. リアルタイム定量 RT-PCR 及び PCR 反応条件

抽出したウイルスゲノムサンプル $10 \mu\text{l}$ は、Forward プライマー、Reverse プライマー各 $1 \mu\text{M}$ 、TaqMan プローブ $0.2 \mu\text{M}$ 、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems) $25 \mu\text{l}$ 、40x MultiScribe and RNase Inhibitor Mix $1.25 \mu\text{l}$ と混合して $50 \mu\text{l}$ とし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用

いてリアルタイム定量 RT-PCR を行った。反応条件は 48℃、30 分間の逆転写反応、95℃、10 分間の熱処理後、95℃、15 秒、60℃、1 分の反応を 50 サイクル実施した。また、サンプルに含まれるウイルス env 領域をコードする DNA の検出にはウイルスゲノムサンプル 10ul を Forward プライマー、Reverse プライマー各 0.5 μM、TaqMan プローブ 0.1 μM、TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems) 25 μl と混合して 50 μl とし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム定量 PCR を行った。反応条件は 95℃、10 分間の熱処理後、95℃、15 秒、60℃、1 分の反応を 50 サイクル実施した。RT-PCR または PCR 反応による目的バンドの増幅を電気泳動により確認する場合は、5%のアガロースゲルで分離後、Vistra Green (Amersham Pharmacia Biotech) でゲルを染色し、FluorImager 595 (Molecular Dynamics 社) を用いて 488nm のレーザースキャン (蛍光フィルター 530DF30) により蛍光バンドを測定した。

6. RCR の培養細胞による増幅

Mus dunni 細胞 (2 x 10⁵ 個) を 60mm dish に播種し一晩培養後、培地を除去しポリブレン (16 μg/ml) 含有 McCoy's 5A-10% FCS 培地 1ml 及び RCR を通常培地もしくはウイルスベクター溶液 (Ψ CRIP-LEGFP1 培養上清) で希釈したウイルス液 1ml を加えて 37℃ で 4 時間培養した。同一濃度につき dish は 3-6 枚を使用した。感染後、培地を除去し、培地 1ml で 3 回洗浄後、通常培地 5ml を加えて培養し、経日的に培養上清を回収して RCR 濃縮・抽出用試料とした。ウイルスゲノムの抽出まで試料は -80℃ で保存した。

7. PG4(S+L) フォーカスアッセイ

RCR のウイルス学的検出法であるフォーカスアッセイは RCR 感受性細胞であるネコ fibroblast cell line の PG-4(S+L) 細胞を指標細胞に用いた。PG-4(S+L) 細胞 (1 x 10⁵ 個) を 6 穴プレートの各穴に播種し、一晩培養後、培地を除去し 20 μg/ml DEAE デキストラン含有 McCoy's 5A-10% FCS 培地 1ml を添加して 37℃ で 30 分間培養した。RCR を通常培地もしくはウイルスベクター溶液 (Ψ CRIP-LEGFP1 培養上清) で希釈したウイルス液 1ml を加えてさらに 37℃ で 2 時間培養後、培地を除去し、通常培地 2ml を加えて培養した。6-10 日後、フォーカス形成の有無を顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

1. リアルタイム定量 RT-PCR による RCR 測定の定量性

まず、リアルタイム定量 RT-PCR による RCR 定量の条件検討を行った。RCR の 10 倍希釈系列を DMEM 培地を用いて調製し、各 100 μl より EX R&D を用いてウイルスゲノム RNA を抽出し、50 μl の水に溶解した。このうちの 10 μl を用いてリアルタイム定量 RT-PCR を行った。用いた forward プライマー、reverse プライマーおよび TaqMan プローブは RCR ゲノムに含まれるがレトロウイルスベクターには含まれない AMLV 4070A env の配列を認識するように設計したものである。リアルタイム定量 RT-PCR 増幅プロットにおいて TaqMan プローブの蛍光シグナルが一定の閾値を越えたサイクル数 (threshold cycle; Ct) とウイルス希釈列 100 μl に含まれる RCR 量より得られた検量線を Fig.1 に示す。標準曲線はウイルス希釈列 100 μl 中に含まれる RCR が 10⁶ ffu ~ 0.1 ffu の広範囲にわたり極めて良好な直線性を示し、相関係数は 0.998 であった。繰り返し実験を行っても極めて再現性のよい結果が得られた。RCR 量が 0.1 ffu 以下ではリアルタイム定量 RT-PCR で正常な増幅プロットが得られず Ct 値を求められ

なかったことから、この方法による RCR 定量の検出限界は 0.1 ffu であることがわかった。

2. PEI-磁気ビーズによる RCR の濃縮

試料中にごく微量に存在する RCR を定量する場合、RCR の濃縮が可能であれば検出感度を上げられることが予想される。しかしレトロウイルスでは超遠心や PEG 沈殿などでは有効なウイルス濃縮はできない。そこで本研究ではエンベロープウイルスが PEI-磁気ビーズにより濃縮可能であるという知見(Yamaguchi T. et al., J. Clinical Microbiology 投稿中)を参考に、RCR の濃縮にも PEI-磁気ビーズが有効かどうかを検討した。RCR を DMEM 培地で 10^5 希釈したウイルス液 1 ml、10ml を調製し、PEI-磁気ビーズ 100 μ l を用いて PEI-磁気ビーズ吸着画分と磁気ビーズ処理上清画分に分画した。各画分および未処理ウイルス液 100 μ l より抽出したウイルスゲノム RNA について RT-PCR を実施後、アガロースゲル電気泳動で分析したところ、Fig.2 に示すように PEI-磁気ビーズ吸着画分では AMLV 4070A env の増幅により得られる 64bp のウイルスバンドが検出されたが、磁気ビーズ処理上清中からは検出されなかった。また、濃縮するウイルス液の量を 1ml から 10ml にすることにより PEI-磁気ビーズ画分に回収されるウイルスゲノムの量も増加したことから、PEI-磁気ビーズにより RCR が濃縮可能であることが明らかとなった。そこで PEI-磁気ビーズによる RCR 濃縮を定量的に解析するため、RCR を DMEM 培地で 10 倍希釈系列とし、各 1ml、10ml より PEI-磁気ビーズで分画を行った後、リアルタイム定量 RT-PCR を実施した。その結果、RCR の希釈倍率が低く試料中の RCR 量が多い場合には PEI-磁気ビーズに吸着しきれない RCR が磁気ビーズ処理上清画分に検出されたが、RCR の希釈倍率が高く試料中の RCR 含量が少ない場合には RCR は良好に PEI-磁気ビーズに吸着回収されることがわかった (Table 1)。ウイルス液 100 μ l から直接 RCR のゲノム RNA を抽出

した場合と比較して、ウイルス液 1ml、10ml から PEI-磁気ビーズにより RCR を回収することにより RCR はそれぞれ約 10 倍、100 倍に濃縮され、また 1ml 濃縮、10ml 濃縮では RCR 検出感度がそれぞれ約 10 倍、100 倍に上昇した (Table 1, Fig.3)。

3. ウイルスベクターに混入する RCR の測定

RCR の実際の測定においては高濃度のレトロウイルスベクターに微量に混入する RCR を定量的に検出する必要がある。そこで、レトロウイルスベクター試料に RCR を微量スパイクした場合にもリアルタイム定量 RT-PCR による RCR 定量や PEI-磁気ビーズによる RCR の濃縮が可能かどうかを検討した。レトロウイルスベクター試料としては Ψ CRIP-LEGFP1 培養上清(ベクタータイター約 1×10^6 colony forming units/ml)を用いた (Fig.4)。 Ψ CRIP-LEGFP1 培養上清を用いて希釈した RCR の 10 倍希釈列を調製し、各 1ml、10ml を PEI-磁気ビーズで分画後、各画分より抽出した核酸試料を用いてリアルタイム定量 RT-PCR を行った。その結果、RCR を 1000ffu/ml から 0.001 ffu/ml まで希釈しても PEI-磁気ビーズ吸着画分に得られる RCR 量はほとんどかわらず、試料にスパイクした RCR 量よりも多い約 700ffu (試料 1ml) 及び約 10000ffu (試料 10ml) という値が得られた (Fig.5)。さらに RCR をスパイクしていないベクター上清からも同程度の RCR が検出されたことから、今回用いたベクター上清中に RCR 検出用 RT-PCR に反応する核酸が含まれていることが判明した。しかし、RCR の検出に用いた 4070A AMLV env を認識するプライマー、プローブセットは遺伝子組換えが生じない限りベクターとは反応しないものである。また Ψ CRIP-LEGFP1 培養上清についてウイルス学的 RCR 試験法である PG4(S+L)フォーカスアッセイで調べたところ、ベクター培養上清中に RCR は検出されないことが確認された (data not shown)。さらに、 Ψ CRIP-LEGFP1 培養上清及びパッケ

ージング細胞株の Ψ CRIP-P131 培養上清より核酸を抽出し、4070A AMLV env を認識する同一のプライマー、プローブセットを用いて RT-PCR 及び PCR を行い、5%アガロースゲル電気泳動で分析した結果、両試料から同一サイズの RT-PCR 増幅バンド及び PCR 増幅バンドが検出された (Fig.6)。このとき RCR から抽出した核酸試料では RT-PCR 増幅バンドは認められたが PCR 増幅バンドは検出されなかった。以上の結果は、 Ψ CRIP-P131 細胞及び Ψ CRIP-LEGFP1 細胞の培養上清中にベクターをパッケージングするために組み込まれている 4070A AMLV env 領域を含む DNA が RCR に換算して数百 ffu/ml に相当する量混入してきていることを示唆するものであり、これが RT-PCR による RCR 検出の際に高バックグラウンドとして検出されたことが判明した。したがって、このようなレトロウイルスベクター試料中の RCR を直接リアルタイム定量 RT-PCR で測定することはできないことが明らかとなった。

4. RCRのウイルス感受性細胞による増幅と定量

Ψ CRIP-LEGFP1 に由来するレトロウイルスベクター試料を直接リアルタイム定量 RT-PCR による RCR 測定の試料として用いることができないことから、ベクターに混入する RCR を測定するには RCR と非増殖性のレトロウイルスベクター及び混入 AMLV env DNA との分離操作を行う必要がある。そこで、ウイルス感受性細胞に RCR を含むレトロウイルスベクター試料を感染させ、感染性、増殖性を有する RCR のみを増幅させた後に RT-PCR を実施することにより、RCR をベクター及びベクターに混入する AMLV env DNA の影響を抑えて測定できる可能性について検討した。このように、ウイルス感受性細胞でのウイルス増幅後に RT-PCR を行う方法を Infectivity RT-PCR という。

まず、RCR を FCS 含有 DMEM 培地で希釈したウイルス希釈系列各 1ml をポリブレン 8 μ g/ml 存在下 Mus dunni 細胞に感染させた後、経日的

に培養上清を回収し、PEI-磁気ビーズ濃縮後にリアルタイム定量 RT-PCR を行い RCR 増幅の容量反応性を検討した。その結果、Mus dunni 細胞に感染させた RCR 量が 10 及び 100ffu/dish の場合、各濃度 3 枚の dish 全てにおいて感染 2 日目から RCR の増幅が検出され、7 日目までほぼ直線的な増幅が検出された (Fig.7, Table 2)。感染 RCR 量が 1 及び 0.1ffu/dish の場合は 3 日目までは増幅が検出されないが (Fig.7A)、4 日目以降になると dish 間のばらつきが大きいものの増幅が認められた (Fig.7B, table 2)。RCR 量が 0.01ffu では増幅は検出されなかった。したがって感染 4 日目以降に測定することで 0.1 ffu/ml 以上の RCR が検出可能と考えられた。同一サンプルについて従来の RCR 検出法である直接 PG4(S+L-)フォーカスアッセイを行い、7 日目に顕微鏡観察を行ったところ、100ffu では 100%のウェルでフォーカス形成が検出されたが 10ffu では検出されないウェルも認められた (Table 2)。したがって Infectivity RT-PCR と PEI-磁気ビーズ濃縮を組み合わせることにより検出感度は 10 倍以上、場合によっては 100 倍程度まで高めることが可能なこと、PG4(S+L-)フォーカスアッセイよりも短時間で RCR が検出可能なことが判明した。

そこで、RCR をウイルスベクター上清で希釈した試料についても同様の結果が得られるかどうかを検討した (Fig.8, Table 3)。Mus dunni 細胞に感染後 5 日目及び 10 日目に RCR の測定を行ったところ、感染に用いたベクター試料には RCR で約 400ffu/ml に相当する AMLV env DNA が混入していたが、感染後の培養上清からは検出されなかった。一方、ベクターにスパイクした RCR については感染 5 日後の培養上清を直接リアルタイム定量 RT-PCR で測定した場合、3ffu 以上で RCR の増幅が濃度依存的に検出され、培養上清を PEI-磁気ビーズを用いて濃縮すると 1ffu でも増幅が検出された (Fig.8)。さらに感染後 10 日間培養し、PEI-磁気ビーズ濃縮した場合には 0.3ffu でも検出された。同一試料を直接