

厚生労働科学研究費補助金  
厚生労働科学特別研究事業

医薬品の安全確保対策としてのウイルスの  
リスク評価とリスク低減に関する研究

14年度総括・分担研究報告書

主任研究者 早川 堯 夫

平成15(2003)年 4月

## 目次

### I. 総括研究報告書

医薬品の安全確保対策としてのウイルスのリスク評価とリスク低減に関する研究—— 1

早川堯夫

### II. 分担研究報告

1. 医薬品の安全確保対策としてのウイルスのリスク評価に関する研究 —— 5 0

山口照英

2. RT-PCR 法による A 型肝炎ウイルス遺伝子の検出の検討 —— 6 3

宮村達男

3. C 型肝炎ウイルスの感染価評価法の開発とリスク評価 —— 6 6

鈴木哲朗

4. ウイルスのリスク評価に関する研究 —— 7 1

甲斐知恵子

5. 医薬品の安全確保対策としてのウイルスのリスク評価とリスク低減に関する研究 —— 7 4

三代俊治

6. 臍帯血移植時におけるヘルペスウイルス混入の可能性の検討 —— 7 6

堀本泰介

7. 細胞等の培養工程における迷入ウイルスのリスク評価と管理法パポーバウイルスの迷入の高感度検出法の開発 —— 7 8

田口文章

8. IFN 製剤のウイルス制御に関する研究 —— 8 9

小長谷昌功

9. 人畜共通感染症ウイルスのリスク評価研究 —— 9 2

加藤 篤

10. レトロウイルスのリスク評価研究 松浦善治	——94
11. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) の医薬品におけるリスク評価に関する研究 佐藤 浩	——98
12. 生物由来製品に迷入する可能性のあるウイルス性人獣共通感染症に関する調査研究 山田章雄	——100
13. 動物を用いた細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保 山内一也	——105
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	——107
IV. 研究成果の刊行物	

**厚生労働科学研究費補助金  
厚生労働科学特別研究事業  
14年度総括研究報告**

**医薬品の安全確保対策としてのウイルスのリスク評価とリスク低減に関する研究**

**早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所 副所長**

生物由来製品のウイルス安全性確保を目的としてリスク評価やリスク低減に関する試験法あるいはウイルスの感染性に関する定量的な評価法等の開発に関する研究を行うとともに、公表文献、厚生労働省から出されている基準や通知、さらには国際獣疫事務局(OIE)等からの各種統計資料等を検討対象とし、医薬品製造のための原材料のウイルスリスク評価、製造工程におけるウイルス除去・不活化能の評価、さらには製品の投与経路等を考慮した検討を行い以下のような成果を得た。

(1) 生物由来製品のウイルスリスク評価においては、原料自体のリスクや製造時の混入のリスク、ドナースクリーニングを含めた製造工程でのリスク低減措置、さらには投与経路、投与量、投与期間に基づくリスクを量的かつ総合的に考慮して行うべきことを明らかにした。また、この様な評価に基づいて生物由来製品を「特定生物由来製品」、「生物由来製品」及びこれに該当しない製品に区分して行政的対応をとることが望ましいことを示した。

(2) A型肝炎ウイルス(HAV)のRT-PCRを用いた高感度検出系についての検討を行い、新規プライマーの設計等を行うことにより高感度な検出が可能であることを明らかにした。また、ほとんどの遺伝子型のHAV株由来のcDNAに関して本手法を用いてPCRによる増幅が可能と考えられ、その有用性が示唆された。

(3) C型肝炎ウイルス(HCV)の感染系の確立を目的としてHepG2を用いた検討を行い、HCVのin vitro感染系を確立できる可能性が示された。

(4) 細胞内に感染したHCVの検出を目的として、HCV発現細胞を認識する複数のモノクローナル抗体を樹立した。

(5) 血液製剤のE型肝炎ウイルス(HEV)に関する安全性確保を目的として輸血用血液製剤、血漿分画血液製剤、あるいはその原料について解析を行い、ALT高値の血液には高頻度にHEVRNAが検出されることを明らかにし、さらに輸血用製剤によってHEVが伝播することを明らかにした。

(6) 細胞組織利用医薬品の安全性確保を目的として臍帯血のウイルス安全性確保に関する検討を行い、臍帯血移植患者からHHV-6とHCMVが検出されることがあることを明らかにした。これが治療時に用いた臍帯血から混入した可能性は否定できないことからさらなる検討が必要と考えられた。

(7) 尿由来生物由来製品のウイルス安全性確保を目的としてヒト尿中のヒトポリオーマウイ

ルス（BK ウイルス及び JC ウイルス）の検出法の開発を行った。開発した手法を用いて、ヒト健常者においては 20～25 歳ではそれぞれ 10%が BKV および JCV、50～60 歳では 15%が BKV、40%が JCV を尿中に排泄していることを明らかにした。

(8) 天然型 IFN 製剤のウイルス安全性に関する調査研究を行い、IFN 製剤の製造においてはヒト由来腫瘍細胞をハムスターの *in vivo* での増殖、製造に用いるセンダイウイルス等の様々なウイルス安全性に関する要素を考慮する必要があることを明らかにした。

(9) 動物および細胞からの牛痘ウイルス（RPV-1）の分離法を開発し、さらに RT-PCR による RPV-1 の高感度検出法を確立した。

(10) 定量的 PCR のトリレトロウイルスの迷入評価試験としての適用について検討を行いその有用性を示唆する結果が得られた。

(11) 動物細胞を用いた細胞組織利用医薬品のウイルス安全性の基礎的検討として、糖転移酵素遺伝子を導入し細胞表面上の  $\alpha$ Gal 抗原量を減らしたブタ血管内皮細胞（SEC）から産生されたブタ内在性レトロウイルス（PERV）およびネコ白血病ウイルス（FeLV）の、ヒト細胞への感染性の変化について解析を行った。その結果、PERV および FeLV のヒト血清による中和が起こりにくくなることが明らかにした。

(12) 齧歯類細胞を用いる生物由来製品のウイルス安全性に関する基礎的検討として、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）の国内野生株の分子系統樹を作成したところ海外で分離された株から遺伝的に相当離れていることが明らかになった。

(13) 人獣共通感染症に対する安全性確保のための基本的要件について明らかにした。

分担研究者	中野克重	北里大学獣
山口照英	国立医薬品食品衛生研究所	医畜産学部助教授
	遺伝子細胞医薬部部長	田口文章
		北里大学
宮村達夫	国立感染症研究所	医療衛生学部教授
	ウイルス 2 部部長	山田章雄
		国立感染症研究所
松浦善治	大阪大学微生物病研究所	獣医科学部部長
	エマージング感染症研究	三代俊治
	センター教授	東芝病院
		研究部長
鈴木哲朗	国立感染症研究所	堀本泰介
	ウイルス 2 部室長	東京大学医科学研究所
		ウイルス感染講座助教授
加藤 篤	国立感染症研究所	小長谷昌功
	ウイルス 3 部室長	国立感染症研究所
		ウイルス 3 部室長
佐藤 浩	長崎大学	山内一也
	医学部付属動物実験施設	日本生物科学研究所
	教授	主任研究員
		甲斐知恵子
		東京大学医科学研究所

実験動物研究施設教授

研究協力者

宮沢孝幸 大阪大学生物病研究所

エマージング感染症研究

センター助教授

## A. 研究目的

生命科学分野において、20世紀の終盤はゲノムの時代であったといえる。80年代から始まったDNA組換え技術を利用した組換えタンパク質医薬品の開発、細胞培養技術やタンパク質精製技術の飛躍的な進展を背景に数多くのバイオテクノロジー応用医薬品が開発されてきた。これらの技術開発により、それまで非常に微量しか得られなかった生体生理活性物質が大量に生産できるようになり、成長ホルモン、インターフェロン、tPA、エリスロポエチン、G-CSFなど、数多くのバイオ医薬品が医療の現場登場してきた。これらのバイオ医薬品の登場は、患者に多大な恩恵をもたらし、また臨床の質の変化ももたらすことになった。また、ヒト脳下垂体由来成長ホルモンや移植硬膜によるクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の伝播や血液製剤によるヒト免疫不全症ウイルスの伝播など、従来の生体由来生物製品による深刻な社会保健衛生上の苦い経験からこれらのバイオテクノロジー応用医薬品の開発にあたっては、社会保健衛生上もつとも問題となる感染症の伝播の防止に多大な努力が払われてきた。このような取り組みによって、これまで膨大な数のバイオテクノロジー応用医薬品が開発され、市場で使われてきたにもかかわらず特に問題となるような感染性因子の伝播に関する問題は発生していない。一方、

21世紀に入りヒトゲノムの解読に基づいてポストゲノムの時代に突入しており、このポストゲノム時代に入って、細胞組織利用医薬品等を用いる再生医療、遺伝子治療、さらにはトランスジェニック動物を用いた動物工場由来医薬品の開発等、今までにない革新的医薬品の開発が現実味を帯びてくるようになってきた。特に細胞組織利用医薬品等の開発は遺伝子治療薬の開発に遅れて取り組みが始まったにもかかわらず、すでに米国では複数の製品が市場されており、また我が国においても、すでに承認申請も出されている。

21世紀の医療として期待されている細胞組織利用医薬品・医用機器や遺伝子治療薬は今まで治療が困難とされていたがんや再生不良貧血、あるいは先天性免疫不全症などの致死疾患や、糖尿病やパーキンソン病と言った重篤な疾患に対して根本治療を行える可能性のある画期的医療として期待され、またトランスジェニック動物医薬品が開発されれば非常に低コストで有用な医薬品の生産が可能になり治療の選択の幅が大きく変化すると期待されている。しかし、これらの革新的な医薬品の開発はこれまでにないあらたな技術を用いており、その安全性に対しても新たな取り組みが必要とされている。

例えば細胞組織利用医薬品等は、細胞そのもの、あるいは細胞が産生した有効成分を殆どプロセス工程を経ずに患者に投与しようとするものであり、原料である細胞に由来するウイルス等の感染因子や製造工程で用いる血清や添加剤から迷入する感染因子のリスクが存在する。遺伝子治療医薬品の場合には、ベクターを作製するための製

造細胞由来のウイルス等の感染因子やウイルスベクター製造時に組換えが起こり増殖性ウイルスが出現するリスクがある。一方、トランスジェニック動物を用いた医薬品では、培養細胞を用いた医薬品と異なり細胞バンクレベルでの徹底したウイルス等の感染物質の解析が困難であり、動物由来人獣共通感染症の伝播のリスクが存在する。このように、遺伝子治療用医薬品や細胞組織利用医薬品等の新たに開発されてこようとしている医薬品のリスクは、これまでのバイオテクノロジー応用医薬品とは異なるリスクが存在する。しかし、一方でこのような革新的医療を担う医薬品の出現により、今まで治療が困難であった疾患に対して、根治的療法になる可能性があり、国民の期待は極めて高い。

従って、このような革新的医療に用いられる医薬品のリスクを適切に評価するとともに、そのリスクに応じた適切な行政対応を取ることが必要となってきた。また、同時にこれまでの生物由来製品についてもそれぞれの感染症に対するリスクを総合的に評価し、その評価に基づいた行政対応を取るべきと考えられる。この行政対応としては、生物由来製品の原材料から製造、製品に至る総合的なリスク評価を行い、そのリスク要因を制御し、あるいは制御できない場合の影響を可能な限り小さくするようなアクションプランとしてのリスクマネジメントを行うとともに、それぞれの医薬品のリスクに関する正確な情報を行政、企業、患者等のすべての者が共有することを目指すリスクコミュニケーションを図ることが求められている。

本研究では、生物由来製品のウイルス安

全性について、原料に固有の感染症リスク、製造工程中のリスクの低減、リスク低減工程のバリデーションのおのおの段階において、可能なリスク評価、リスク管理法を考案し、科学的な生物由来製品の評価に基づく合理的で効果的な規制を行う上で重要な以下の目標に資する基盤研究を行う。このために、(1)培養細胞を利用した医薬品の、宿主細胞に由来する迷入ウイルスの種類とそのリスクの量的推定、(2)細胞等の培養工程における迷入ウイルスのリスク評価と管理法、(3)動物由来原料の安全性にインパクトを与えるウイルスの種類及びそのリスクの系統的評価、(4)利用できるウイルスの処理方法の能力評価、(5)人原料と動物原料のウイルスリスクのウイルス学的比較、(6)製品の投与経路によるリスク評価に資する基礎的検討を行うことを目的とした。

本年度は特に、(1)生物由来製品のウイルスリスク評価のあり方やそのリスク評価に応じたリスクマネジメントのあり方についての解析、(2)HAVのRT-PCRによる検出法の開発、(3)生物由来製品におけるHCVの除去、不活化処理工程の能力評価に有用な*in vitro*感染系開発の基礎的検討、(4)HCV発現細胞を認識するモノクローナル抗体の樹立、(5)血液製剤やその原料でのHEV-RNAのリアルタイムRT-PCRによる検出、(6)臍帯血のウイルス安全性を目的として、臍帯血輸血を受けたレシピエントにおけるヘルペスウイルス感染に関する研究、(7)ヒト尿におけるポリマウイルスの高感度検出法の開発、(8)IFN製剤におけるウイルス安全性確保のための基本的要件に関する研究、(9)牛痘ウイルスの感染

実験系の確立と RT-PCR による高感度検出法の開発、(10) トリレトロウイルスのリアルタイム RT-PCR による検出法の開発、(11) 動物由来細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究の一環としてブタ内在性レトロウイルスの  $\alpha$ -Gal 抗原量の低下とヒトへの感染性の変化についての研究、(12) 人獣共通感染ウイルスであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) の PCR による高感度検出系を開発に関する基盤的研究、(13) 人獣共通感染症に安全性確保に関する基本的要件についての調査研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. 生物由来製品のウイルス安全性に関する調査研究

公表文献、厚生労働省から出されている基準や通知、さらには国際獣疫事務局(OIE)等からの各種統計資料等を検討対象とし、医薬品製造のための原材料のウイルスリスク評価、製造工程におけるウイルス除去・不活化能の評価、さらには製品の投与経路等を考慮したリスク評価を行った。

### 2. ヒト由来ウイルスの検出法の開発やリスク評価に関する研究

#### 2. 1 HAV の RT-PCR による検出

HAV は血清型としては1種類であるが、遺伝子塩基の相同性が85%以下の7種類の遺伝子型ウイルスが存在する。1型と3型は92.5%の相同性を基準としてAとBの亜型に分類されている。1A型遺伝子のHAVが最も多く報告されている。4、5、6型はサルからのみ検出されており、2、7型の検出例も少ないので、実用上は塩基相同性80%程度の1型と3型HAV遺伝子が共に検出可能なPCRプライマーが必要とされ

る。相同性が高く、各塩基の配列に偏りが少なく、他の部位との相同性が出来る限り少ない個所を検索し、以下のような5'非翻訳領域(5'NCR)のプライマーセット、+300と-516を設計した。

+300: GCTGTAGGAGTCTAAATTGGGG  
AC (24 mer)

-516: ACTCAATGCATCCACTGGATGAG  
(23 mer)

設定したプライマーを用いて Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 を用いて、PCR 条件の検討を行った。耐熱性 DNA ポリメラーゼとしては、Mg<sup>2+</sup>添加反応バッファーと dNTP 添付の Takara Taq (宝酒造) を用いた。反応液 0.1 ml あたり 2.5 単位のポリメラーゼを用い、プライマー濃度は 0.2  $\mu$ M とした。0.2 ml 蓋付き MicroAmp tube に 20  $\mu$ l あて反応液を分注し、氷冷下 1  $\mu$ l のテンプレートを加えた。1 回目の PCR 反応のテンプレートとしては遺伝子型 1B の HM175 株および 3B 型の KRM003 株 HAVRNA より RT-PCR 法で増幅した cDNA 断片 (塩基番号 30-1250) を使用した。この cDNA 断片の OD 値から濃度を算出し、0.1-10000 分子/ $\mu$ l 相当に 10 倍階段希釈して、5'NCR 領域の複製効率の検討に用いた。2 回目の PCR には 1 回目の反応液の 1  $\mu$ l を用いた。PCR 増幅産物は、TBE 液で 2% MetaphorXR agarose (TaKaRa)ゲルプレートを作成し、5  $\mu$ l の DNA marker (BioMarker EXT, BioVentures)と共に 10  $\mu$ l の PCR 反応液を電気泳動した。エチジウムブロマイド染色により、UV イルミネーター下で、238bp を検出した。

#### 2. 2 HCV-RNA のリアルタイム RT-PCR



## による検出

C型肝炎患者血漿あるいは感染細胞から、RNA抽出試薬 (SepaGene-RV) を用いて total RNA を調製した。HCV RNA は TaqMan Chemistry system (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム RT-PCR 法により定量的に測定した。Reverse transcription (RT)-PCR 用試薬は TaqMan EZ RT-PCR Kit を用いた。反応液は、3 mM Manganese acetate を加えた TaqMan EZ buffer 中に 200 nM TaqMan probe, 500 nM forward/reverse primers, 200 μM dNTPs 及び 5U rTh polymerase, 0.5 U Amp Erase UNG が含まれている。測定結果は Sequence Detector version 1.7 によって解析した。

### 2. 3 HCV 抗原検出系の開発

唯一の感染感受性動物であるチンパンジーに感染性を示した患者血清から HCV 全長遺伝子をクローニングし、HCV 全ゲノムをスイッチング・持続発現する細胞株を樹立した。さらに、HCV が持続的に感染した場合に現れる抗原を特定して汚染検出系を開発する事を試みた。このために、Cre/loxP システムで全長 HCV をスイッチング発現後持続発現したまま継代した細胞 ( $5 \times 10^6$ ) をマウスに 8 回免疫し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製した。作成したハイブリドーマを用いて HCV の持続感染モデル細胞での HCV 抗原の検出を試みた。

### 2. 4 血漿分画製剤や供血者及びレシピエントの血液中の HEV RNA の検出

日本赤十字社日赤血漿分画センターと共同して、血漿分画製剤中の HEV RNA の存在の有無の検討を行った。また、日本赤十字社北海道血液センターと共同して、輸血

後 E 型肝炎が疑われた患者及び、その供血者の HEV RNA の RT-PCR による検査を行い、陽性バンドについて塩基配列の解析を行った。さらに、供血血液の内、ALT 高値のドナー血液を対象として HEV RNA の存在の有無を RT-PCR によって解析した。なお、HEV RNA の検出は既報に若干の修正を加えた RT-PCR 法により行った (Takahashi et al J Infect. Dis. 2002; 185, 1342)。

### 2. 5 臍帯血のヘルペスウイルスの安全性

臍帯血移植後の患者より、0 日から 100 日まで 1 週間に 1 度、末梢血を用いてヘルペスウイルスの DNA-directed DNA polymerase コンセンサス領域を nested PCR により検索した (Journal of Clinical Microbiology 34:1666-1671, 1996)。尚、患者さんにはインフォームドコンセントのもと採血の協力をお願いした。

DNA の抽出方法は、末梢血および血清から ISOGEN (ニッポンジーン社) により全 DNA を抽出し、それを鋳型にして、ヘルペスウイルスコンセンサス PCR を実施した。用いたプライマーは 1stPCR 用に、KG1:

GTCTTGCTCA CCAGTNCNACNCCYTT および DFA: GAY TTYGCNAGYYTNTAYCC。

2<sup>nd</sup>nested-PCR 用に、

IYG:CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT および

ILK:TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMT

NAA を用いた。増幅後のサンプルは、2%アガロース電気泳動によりバンドの有無を確認した後、バンドを切り出し、精製後、その direct sequence を行い、PCR 増幅産物ヘルペスウイルス由来であることを確認した。

### 2. 6 ヒトポリオーマウイルスの高感度検

## 出法の開発

### 2. 6. 1 尿検体及び尿検体処理法

インフォームドコンセントに同意した健康人 20~25 歳および 50~60 歳の 2 つのグループに分け、それぞれのグループ 20 人から尿を採取した。採尿後直ちに遠心し、細胞沈査とウイルス沈査に分別した。採取した尿 30ml を 1,000g 10 分間遠心してえた沈殿物を細胞沈査とし、300  $\mu$ l の PBS に溶解した。その上清をさらに 100,000g 180 分間遠心して集めた沈査をウイルス沈査とした。ウイルス沈査は 300  $\mu$ l の PBS に溶解した。

### 2. 6. 2 細胞培養

Gluzman (Cell, 1981, 23, 175-182) によりミドリサル腎臓由来 CV-1 の複製開始点を欠損させた SV40 DNA によりトランスフォームして樹立された COS-7 細胞をウイルスの増殖と分離に用いた。COS-7 は細胞バンクより分与を受けた。COS-7 細胞の増殖用培養培地は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に、カナマイシン (50  $\mu$ l/ml) とファンキゾン (1.5  $\mu$ l/ml) ならびに 10% にウシ胎児血清を加えたものを用いた。

### 2. 6. 3 ウイルス分離

ヒトポリオーマウイルスの分離は、COS-7 細胞細胞を用いた。5  $\times$  10<sup>5</sup> 細胞を 25cm<sup>2</sup> Flask に植え込み 18 時間培養した。PBS で細胞を洗浄後、ウイルス検体を 0.1ml 接種した。37°C で 2 時間ウイルスを吸着させた後、PBS で洗浄し、増殖用培地を加えて 37°C で培養した。ウイルス感染後の細胞は、接種 48 時間後に 1:5 に希釈し継代した。以後 3~4 日の間隔で 1:5 の割合で継代し細胞変性 (CPE) が極限に達するまで続けた。

### 2. 6. 4 ウイルス抗体の作製

ウイルス抗原を検出するためにヒトポリオーマウイルスのウイルス (V) 抗原に対する抗体を作製した。JC ウイルス (JCV) の V 抗体は JCV の VP1 の JCV 特異的領域のアミノ酸の合成ペプチドをウサギに免疫して作製した。BK ウイルス (BKV) の V 抗体は、精製した中空 BKV 粒子をウサギに免疫して作製した。

### 2. 6. 5 間接蛍光抗体法によるウイルス抗原の検出

ウイルス抗原の検出には間接蛍光抗体法を用いた。ウイルスを接種して 7~21 日後に適当な間隔で培養容器より COS-7 細胞をカバースリップ入りの培養に移して更に細胞を付着させるために培養した。カバースリップを取り出す時は、培養液を除き、PBS で洗浄した後、冷アセトンで 10 分固定した。アセトン固定した細胞は、BKV と JCV に対する V 抗体と反応させ後、十分量の PBS で洗浄して V 抗体を除去した。次いで FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体と反応させた。PBS で FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を洗浄し、蛍光用スライドガラスにグリセリン緩衝液 (pH9.5) をのせ、その上にカバースリップをマウントし蛍光顕微鏡で V 抗原陽性細胞を観察した。

### 2. 6. 6 赤血球凝集 (HA) 反応によるヒトポリオーマウイルスの定量

ウイルスを COS-7 細胞に接種した 7、14、21 と 28 日後に細胞を培養容器より集め後、PBS に浮遊させ、超音波 200W で 3 分間の処理により細胞を破碎し、その後 3,000 rpm で 10 分間遠心した。その上清を HA 反応の試料とした。HA 反応はマイクロタイター法を用い、0.5% ヒト O 型赤血球を用いて 4°C

に 90 分間放置し、完全凝集を示す凝集価を HA 価とした。ウイルスの同定は、特異的 V 抗体を用いた蛍光抗体法で行った。

#### 2. 6. 7 COS-7 細胞細胞からのウイルス DNA 抽出

核酸増幅法 (NAT) やササンプロットによるヒトポリオマウイルス DNA 検出のための DNA 抽出キットは、QIA amp DNA Mini Kit を用いた。尿のウイルス及び細胞沈査からの DNA 抽出は、キアゲン社のプロトコールに従った。

#### 2. 6. 8 JCV 及び BKV 検出のための Multiplex PCR 用プライマー

特異的に JCV の DNA を増幅するため、JCV ゲノム (J. Virol. 1984, 51, 458-469) をもとに JCV の複製開始点を含む調節領域 396 塩基対 (bp) を検出する 28 mer プライマー J-1、J-2 を合成した。また、BKV ゲノム (Cell, 1979, 18, 963-977) をもとに BKV の intergenic (IG) 領域 336bp を検出する 28 mer プライマー BIG-1、BIG-2 を合成した。

#### 2. 6. 9 Multiplex PCR によるウイルス DNA の増幅

0.5ml チューブに JCV 及び BKV を特異的に増幅する上流及び下流のプライマーそれぞれ 0.5 $\mu$ l (5 $\mu$ M)、10 倍濃度の PCR 反応液 1.25 $\mu$ l (10mM Tris HCl (pH9.0、室温)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>), 25mM dNTPs 1.25 $\mu$ l、滅菌精製水 7.9 $\mu$ l、Taq DNA Polymerase 0.1 $\mu$ l (0,75U)、鋳型 DNA 1 $\mu$ l を加えた。ミネラルオイル 12.5 $\mu$ l を重層した、チューブを Thermal Sequencer にセットし PCR 反応を開始した。PCR 反応は、最初 94 $^{\circ}$ C で 120 秒、変性させ後、変性 94 $^{\circ}$ C で、60 秒間 アニーリングを 55 $^{\circ}$ C で、60 秒間、伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で、45 秒間で 20

回または 35 回繰り返した後、伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で、180 秒間行った。

#### 2. 6. 10 増幅された DNA 断片の確認

PCR 反応終了後 1~1.3%のアガロースゲルを用いた電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色し、標的とした長さの DNA が増幅されているかを確認した。サイズマーカーはプロメガ社の PCR マーカーを用いた。

#### 2. 6. 11 サザンプロットハイブリダイゼーション

デゴキシゲニン (Dig) - UTP によるウイルス DNA 標識は、ロッシュ社のプロトコールに従った。ウイルス DNA 7 $\mu$ l (約 350ng) に精製水 8 $\mu$ l を加え全量 15 $\mu$ l をチューブに入れ、100 $^{\circ}$ C で、10 分間加熱し変性させ、氷中で急冷し、DNA ポリメラーゼと Dig - UTP を加え、37 $^{\circ}$ C 20 時間ウイルス DNA を標識した。これを標識プローブとし、ハイブリダイゼーションに用いた。

尿細胞沈査およびウイルス沈査から抽出した DNA 溶液 10 $\mu$ l と 10 倍濃度の酵素反応液 2 $\mu$ l と 10%BSA 2 $\mu$ l を加えて、全量 14 $\mu$ l にしたものと、対照として精製水 5 $\mu$ l に BKV 又は JCV DNA を 2 $\mu$ l (0.31 $\mu$ g) と 10 倍濃度酵素反応液 1 $\mu$ l と BSA 1 $\mu$ l と Eco RI 1 $\mu$ l (5U) を加えて、全量 10 $\mu$ l にしたものを準備した。37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、1%アガロース電気泳動を行った。ナイロン膜へ転写した後、プレハイブリダイゼーションを行いラベルした DNA を注入し、42 $^{\circ}$ C でハイブリダイゼーションを行った。20 時間後、0.1%SDS を含む 2 $\times$ SSC 100ml で室温でナイロン膜を 5 分間 2 回洗浄し、0.1%SDS を含む 0.1 $\times$ SSC 100ml に、68 $^{\circ}$ C で 15 分間 2 回洗浄した。次に、アルカリフォスファターゼ標識抗 Dig 抗体 2 $\mu$

1 を加え室温に 30 分間反応させた。その後、未反応のアルカリフォスファターゼ標識抗 Dig 抗体を洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、NTB/BCIP 溶液 100  $\mu$ l を加え、発色させプローブとハイブリダイズしたウイルス DNA を検出した。

## 2. 7 IFN 製剤のウイルス安全性確保に関する調査

IFN 製剤の製造原理、方法および製造工程の詳細な情報を把握し、ウイルス安全性対策をどのように実施しているのか、またどのような方法を導入すべきか等について調査研究した。特に Ball-1 細胞（ヒトリンパ芽球細胞）を出生後 4 8 時間以内に免疫抑制剤投与ハムスターに細胞移植し、*in vivo* で細胞増殖させ、その腫瘍塊を切り出してタンク培養して SeV を感染させて生産する製造過程を含めた製剤の特性を中心に調査研究した。天然型 IFN  $\gamma$  の場合は HBL-38 細胞（ヒトミエロモノサイト）を同様な手順で細胞を増殖させ、LPS で IFN  $\gamma$  を誘導している。 $\alpha$ 、 $\gamma$  の両製剤とも精製工程でマウス由来モノクローナル抗体カラムで精製している。同じく IFN  $\alpha$  生産用ナマルバ細胞の場合は 8 千リットルのタンクで培養し大量の SeV を感染させている。この製剤は抗 IFN  $\alpha$  牛 IgG カラムで精製している。ヒト 2 倍体線維芽細胞を用いる天然型 IFN  $\beta$  の場合はトリプシン等の試薬、培養用の牛血清、ヒト血清アルブミン等が製造に用いられている。従って、細胞バンクや製造に用いる動物（ハムスター）のウイルス安全性に加えて、SeV 及び卵由来ウイルス、抗体カラム由来動物、培養用牛血清、添加剤のヒト血清アルブミン、動物由来試薬（酵素）等におけるウイルス汚染の

防止に考慮した。

## 3. 動物由来原料や動物細胞を用いる場合の人獣共通ウイルス感染症の検出法の開発やリスク評価に関する研究

### 3. 1 RPV の検出法の開発

牛痘ウイルス (RPV) のウサギ馴化株である RPV-L 株をウサギに接種し、臨床症状の極期である接種 3 日後に各種臓器と末梢血細胞 (PBMC) を採取した。採取した各臓器の乳剤および PBMC を B95a 細胞と共培養してウイルスの分離を試みた。また感染ウサギの腸間膜リンパ節から RNA を抽出し、RT-PCR による検出を試みた。

### 3. 2 トリレトロウイルスのリアルタイム PCR による定量的検出

従来、トリレトロウイルス迷入否定試験は、明らかな細胞変性を起こしてフォーカス形成能を持つラウス肉腫ウイルス 1 型及び 2 型のフォーカスが同型の細胞変性を起こさないあるいは起こしにくいレトロウイルスの感染により緩衝されることを利用して行われてきた。このような緩衝法によるバイオアッセイは(1)熟練を要し、(2)フォーカスの有無の判定には主観の入る余地が残されており、また(3)限られた型のレトロウイルスしか検出できない問題点を含んでいた。そこで、レトロウイルスの持つ逆転写酵素に着目し、この酵素活性により外部から加えた鋳型 RNA を cDNA にし、その cDNA をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅して検出する PERT (Product Enhanced RT assay) 方法を検討した。またこの際、定量的な PCR を行うことで、迷入ウイルスの危険度の量的評価を目指した。

### 3. 3 $\alpha$ -Gal 抗原量の減少とブタレトロ

## ウイルスの感染力との関係

ブタ血管内皮細胞 (SEC) と GnT-III 遺伝子導入 SEC クローンに、ガンマレトロウイルスのパッケージングシグナルをもつ LacZ 遺伝子を導入し、さらにブタ内在性レトロウイルス B(PERV-B)またはネコ白血病ウイルスサブグループ B(FeLV-B)を感染させた。それらの細胞の培養上清中に含まれるウイルスの力価を、ヒト血清(10%)を添加あるいは非添加の条件下で、HEK293 細胞で測定した。感染価の判定はウイルス接種から 2 日後に X-gal 染色によって行った。SEC 膜上の  $\alpha$ -Gal 抗原量を、GS I B4 lectin を用い FACS にて測定した。

## 3. 4 国内に生息する野生マウスに感染している LCMV のゲノム解析

LCMV のプロトタイプは米国で分離された WE 株で、他にセントルイスの脳炎患者から分離された Armstrong 株がよく知られている。LCMV のゲノムは、2 つの文節からなる RNA から構成され、長鎖が L 鎖、短鎖を S 鎖と呼ばれている。中間のヘアピン構造部分と、両末端部分の数十種類の塩基が互いに相補的に結合しており、環状のゲノムとして観察されることがある。L 鎖は転写酵素となる L 蛋白と転写調節機能のある Z 蛋白をコードし、S 鎖は糖蛋白である Gp と核蛋白である Np をコードしている。Gp は翻訳後に Gp1 と Gp2 にクレーページされスパイクの主要な構成要素となる。S 鎖でコードされているこれら Gp および Np が主要な構造蛋白である。

国内にある港湾で捕獲した野生マウスより OQ 株 (28, 32, 38, 48, 49, 52) をそれぞれ分離し、それら OQ 株の S 遺伝子について

他の二つのプロトタイプ株である WE 株、Armstrong 株と比較検討した

## 3. 5 生物由来製品に迷入する可能性のある人獣共通感染ウイルス

公表文献や国際獣疫事務局(OIE)等からの各種統計資料等を検討対象とし、生物由来製品に迷入する可能性のある人獣共通感染ウイルスのリスク評価を行った。

## C. 結果

### 1. 生物由来製品の感染症に着目した分類と行政対応の必要性

#### 1. 1 「生物由来製品」及び「特定生物由来製品」の定義について

生物由来製品は、原材料におけるウイルス等の感染症リスクの危険性、製造工程でのウイルス不活化・除去能、製品の投与経路や投与量、さらには過去における感染症発症の事例等を総合的に評価し、その評価された製品のリスクに基づいて、「特定生物由来製品」、「生物由来製品」の指定を行い、想定されるリスクに応じたリスク低減のための様々な措置を講じるとともに、万が一感染症が発症した場合の感染症トレーサビリティを確保し、患者へのインフォームドコンセントを含むリスクコミュニケーションを計ることが必要とされている。このようなリスク評価に基づいて、生物由来製品を「特定生物由来製品」と「生物由来製品」、これらに該当しないものに分類して、適切な行政対応が必要と考えられる。ちなみに、「特定生物由来製品」と「生物由来製品」は、以下のような考え方で指定されるべきものとされる。

(1) 「特定生物由来製品」とは、生物由来製品のうち、市販後において当該製品によ

る保健衛生上の危害の発生又は拡大を防止するための措置を講ずることが必要なものであって、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するものをいう。

(2)「生物由来製品」とは、人その他の生物(植物を除く)に由来するものを原材料として製造される医薬品・医療機器等のうち、保健衛生上特別の注意を要するものとして、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するものをいう。

### 1. 2 「特定生物由来製品」「生物由来製品」の指定分類の基本的な考え方について

上記の特定生物由来製品及び生物由来製品の指定に当たっての製品の感染症のリスクについては、次の考え方に基づいてその評価を行う。またこのリスク評価は現在想定される感染症を基とした対応であり、未知の感染症に対してはその危険性の潜在は考慮しつつリスクの定量的な評価は行うことができないことを認識しておく必要がある。一方で、新しい型の感染症等(新興再興感染症)の発症が起こった場合や、既知の感染症であってもその感染症に関する新たな知見が得られた場合、見直しを行う必要がある。例えば、最近の米国におけるウエストナイルウイルスの発症や日本での輸血後E型肝炎ウイルス(HEV)の発症に対する、献血における問診の強化や採血血液に対する検査などの対応が挙げられる。

さらに理論的リスクの算定方法は、万が一、感染因子を含む原料を使用していた場合、最終製品中での残存量、除去・不活化工程のリスク低減効果、投与経路から理論的に計算されるリスクである。これを、模式的に表したものが図1である。これは、

原材料や製造時のウイルス混入リスクから、除去・不活化工程のリスク低減効果の程度によってそのリスクを差し引き、さらに投与経路によって例えば注射薬よりも経口投与の方がリスクは低く、外用薬にあってはさらに低いと算定される。逆に投与期間が長ければリスクは大きく計算される。図1の、「原料自体のリスク」や「製造時の混入リスク」、「リスク低減措置」、「投与経路安全性」に関しては、以下のような考え方に基づいている。

#### 1. 2. 1 「原料自体のリスク」や「製造時の混入リスク」

この場合の、「原料」とは、製品の有効成分のみならず、製品の製造工程中で使用される生物由来の成分、添加剤として用いられる成分をいい、以下の①又は②のリスクのうち、大きいものを取る。

- ①生物由来原材料自体の感染因子のリスク
- ②製造工程中での生物由来原料に由来する汚染リスク

#### 1. 2. 2 「リスク低減措置」

①ドナースクリーニング等の検査を行うことによるリスクの低減：ドナースクリーニング等の対策においては、一般医薬品・医療機器の安全対策としての製品を恒常的に一定の品質で製造するための手順・管理体制・製造設備等を含めたGMPに加えて、生物由来製品としての特性を踏まえた、上乘せ部分としてドナー選択基準等の原材料の安全確保が含まれるべきである。

②不活化処理、病原体除去工程によるリスクの低減：製造工程にウイルスクリアランスを達成するために工程中にウイルスの除去・不活化に関する効果的な方法を用いるべきである。また、各種の方法を組み合わせ

わせることによるより高いウイルスクリアランスの達成に努めるべきである。

### 1. 2. 3 「投与経路安全性」

①投与経路による安全性への影響を考慮する必要があり、注射の方が、経口よりもリスクが高くなる。

②投与量・使用期間による安全性への影響を考慮する必要がある。疾病によっては一生涯使用するものもあり、こういった場合はリスクが高いと考えられる。

「最終製品のリスク」については、上記の考え方にに基づき、製剤の有効成分、非有効成分（添加剤、製造中に使用される材料）等のあらゆる成分について検討し、製品としてのリスクを評価する必要がある。このような評価を通じて、理論的なリスクが比較的高い物（血液製剤を基準）は、「特定生物由来製品」と指定し、理論的なリスクの蓋然性が比較的低い物（化学合成品レベル）は、指定せず、この2つの区分の間際のリスクに相当する製品を「生物由来製品」に指定すべきと考えられる。

このように、「特定生物由来製品」とは、製品における感染症の発生リスクが理論的にも、かつ、経験的にもより高いものである。具体的には、（1）人・動物から得られた原料を使用する製品であって、不活化処理等の感染症に関する処置に対して限界がある製品であり、例えば輸血用血液製剤が挙げられる。また将来的には、人・動物から得られた原料由来の培養皮膚等の細胞組織利用医薬品・医療機器も想定される。さらには、（2）不特定多数の人から採取された原料を使用する製品であって一定の病原体の不活化・除去等が行われているが、感染因子を内在するリスクがある製品で、例

えば、人血漿分画製剤や臓器抽出医薬品が挙げられる。

「生物由来製品」については、製品における感染症の発生リスクがあるが、その感染症のリスクが「特定生物由来製品」に比較して一段低い製品である。具体的には、

（1）病原性の細菌、ウイルスを原料とし、一定の不活化、弱毒化等の措置が講じられている製品で、例えばワクチンや抗毒素等が挙げられる。また、（2）人又は動物の管理された細胞株又は管理された動物個体（遺伝子組換えを含む）により生産されるタンパク等を用い、かつ一定のウイルス等病原体の存在の否定についての確認、不活化除去が行われている製品であり、例えば培養細胞を用いた遺伝子組換えタンパク医薬品等が上げられる。さらには、（3）健康の確認された不特定多数の動物から得られた原料として、一定の病原体の不活化・除去等が行われている製品であり、例えばヘパリン等の動物抽出成分が挙げられる。

生物由来の原材料を用いているものであっても、現在の科学的知見において、感染症のリスクの蓋然性が極めて低いものは「特定生物由来製品」や「生物由来製品」の指定の対象とならない。具体的には、（1）健康の確認された不特定多数の動物から得られた原料であっても、製造工程による管理の内容（強アルカリ、高温等の過激な処理条件）、又は投与経路（経口・経皮等）からみて、明らかに感染症についてのリスクの蓋然性が低い製品については指定の対象とはならない。例えば、ゼラチン等が該当する。また、（2）病原菌を使用せず、人・動物の血清等を製造工程で使用していないものであり、明らかに感染症についてのリス

クの蓋然性が低い製品であって、例えば乳酸菌を用いて製造される抗生物質や、大腸菌由来の遺伝子組換えインスリン等の製剤があげられる。さらに、(3) 人獣共通感染症の蓋然性の低い動物種を原料とした製品であって、例えばカイコの糸を使用した医療用具や魚類由来の原料から抽出されるコンドロイチン硫酸があげられる。

### 1. 3 反芻動物由来の原料

反芻動物由来の原料については、現在BSE対策により、原産国、使用部位の規制を行っており、BSEに関する製品のリスクは極めて低いと考えられる。従って、反芻動物由来原材料基準の策定にあたっては、以下のような対応が取られるべきと考えられる。

(1) 反芻動物より採取された原材料については、次に掲げる部位に由来するものが使用されたものであつてはならない。ただし、脂肪酸、グリセリン、脂肪酸エステル、アミノ酸、(オリゴ) ペプチドその他高温及びアルカリ処理により製するものを除いている。

脳、脊髄、眼、腸、扁桃、リンパ節、脾臓、松果体、硬膜、胎盤、脳脊髄液、下垂体、胸腺又は副腎

(2) 反芻動物に由来する原材料(乳由来成分及びラノリンを除く。)の原料動物の原産国は次に掲げる国以外の国であつてはならない。ただし、羊毛、ラノリンは除いている。また、乳由来物は、英国、ポルトガル以外の原産国を除いている。

アルゼンチン、オーストラリア、ボツワナ、ブラジル、チリ、コスタリカ、エルサルバドル、ナミビア、ニカラグア、ニュージーランド、パナマ、パラグアイ、シンガ

ポール、スワジランド、ウルグアイ、カナダ、コロンビア、インド、ケニア、モーリシャス、ナイジェリア、パキスタン、米国

(3) 反芻動物に由来する原材料は、安全性確保上必要な情報が確認できるよう、次に掲げる事項に関する記録が整備、保管されていなければならない。

①原産国 ②原材料の採取日又はと畜日 ③原材料について伝達性海綿状脳症を防止するための処理及び作業の経過 ④原材料ロットの製造番号

### 1. 4 「特定生物由来製品」「生物由来製品」の指定に当たって、境界の判断を行うべき場合について

「特定生物由来製品」及び「生物由来製品」の指定に当たっては、明確に区分できない場合が数多く想定される。例えば、細胞培養を利用した製品であっても、製造工程中あるいは製剤の安定化剤として血漿分画製剤が用いられている製品も多くある。遺伝子治療医薬品のように、ベクター中に増殖性ウイルスが出現してくる可能性が否定できなかつたりする場合も想定される。このような事例については、個別の製品の内容に照らし、特定生物由来製品及び生物由来製品の指定の区分について検討を行う必要がある。

(1) 遺伝子組換え製剤の安定剤、遺伝子組換え製剤を産生する細胞の培地などに人血液成分を製造工程中で使用する場合は、次のように製品中の人血液成分の量、使用量・使用期間等について勘案してリスクを推定する。

①人血液成分(アルブミン等の血漿蛋白成分)の製品中での含有量(残留量)を標準的な治療において使用した場合の累積量に



ついて、人アルブミン製剤が標準的な治療に用いられる量（基準量）と比較する。

②使用量・期間は、一般に、使用期間中に暴露される人アルブミンのドナー数にも比例すると考えられる。

③基準量においては未だ感染症発生の知見がないことから、比較した値が、基準量に満たないものは、生物由来製品に指定する。ただし、疾病により一生涯使用する製剤については、累積量が小さいものであっても、未知のリスクに対するより予防的な対応が必要であること、さらには同一成分かつ同効の他の製剤が特定生物由来製品である場合には製品の管理等の観点からの適正使用を促す対応が必要であること理由から、原則として特定生物由来製品に指定すべきである。このような製品には、培地に人アルブミンを用いている遺伝子組み換え第VIII因子製剤等が該当する。

(2) 増殖可能ウイルスが出現するリスクやベクター作成に用いる細胞由来のウイルスのリスクを制御することが困難であることなどから、遺伝子治療用医薬品については製品個別にリスクの評価を行っていく必要がある。

(3) 遺伝子組換え生ワクチンのように、細菌・ウイルスに対する遺伝子組換え操作により、本来の細菌・ウイルスと異なる特性をもつ細菌・ウイルスを用いる製品で開放系で使用される場合の感染伝播のリスクについて未知数であるものについては製品個別にリスクの評価を行っていく必要がある。

## 1. 5 原料自体の感染リスク

生物由来製品は様々な人や動物の細胞・

組織あるいは体液等を原料として、さらには人や動物の細胞を培養して製品を生産する場合もある。さらには、人や動物の細胞そのものを治療の目的で用いる細胞組織利用医薬品も市場に出てくる可能性がある。このような原料自体がもつ感染リスクに関しては、表1に示すように、生物由来製品をいくつかのカテゴリーに分類して考えることができる。このカテゴリー分類の1としては、人又は動物由来細胞組織及び人由来成分を使用した製品である。これは人対人の感染リスクがあり不特定多数のからの原料に由来するリスク、さらには未知の感染症に関するリスクも考えられる。また、カテゴリーの2として培養工程を伴う場合にはウイルスの増幅が起こるリスクも加わることになる。ウイルスワクチンやウイルスベクターによる遺伝子治療薬のようにウイルスあるいはウイルス由来の原料を使用した場合には、原料が病原体そのものであったり、病原体の出現が完全に防止できない可能性もある。カテゴリーの3は病原菌を用いたワクチン製造などで、病原体そのものである原料の相対リスクは高いと考えられる。これらのカテゴリー1から3の原料の相対的なリスクは高いと考えられるが、ワクチンなどは強い不活性化工程が入れられていたりして、その製品でのリスクとは必ずしも相関しないと考えられる。カテゴリー4は、株化した人や動物の細胞を培養し、その産生する成分を原料とする場合で、この場合特性解析された細胞を用いる訳ではあるが、生きている細胞を生産に用いることによる病原体増幅のリスクは想定される。また、このカテゴリーには、トランスジェニック動物などの管理された動物工場由来

の成分を原料とする場合も分類されると考えられる。カテゴリーの5としては、ヘパリン等の動物由来製品の原料が挙げられるが、この場合健康な動物を用いるが不特定多数の動物に由来するリスクが存在する。カテゴリー4と5は、1-3に比較して中程度のリスクがあると考えられる。乳酸菌等の非病原菌を利用した製品の原料は(カテゴリー6)は、リスクが最も低いと考えられるが、製造工程で使用する原料からのリスクは考慮する必要がある。

#### 1.6 生物由来製品のウイルス安全性に関連する基準や指針等のついて

いくつかの生物由来製品に関しては表2に挙げた基準が定められている、またいくつかの製品について関連する指針や参考情報が出されている。「特定生物由来製品」、「生物由来製品」の指定に当たっては、原料のリスク評価から、製造工程でのリスクの低減化、製品の使用に際してのリスク評価を総合的に評価するものであることから、すべての製品の原料について基準を設定することが望まれる。

必要な基準としては表3の様な分類が妥当と考えられる。重大な感染症発症の事例が過去にある血液製剤については、輸血用血液製剤と血漿分画製剤に分類して血液製剤総則を設定することが必要である。それ以外の製品については人由来の原料を用いる場合と動物由来の原料を用いる場合に分類するのが妥当と考えられる。人由来製品にあつては、製品そのものが人細胞を用いる製品と、人由来原料とに分類し、さらに人由来原料に関しては長年のデータの蓄積等を考慮し、人尿由来とそれ以外を原料と

する場合に分類することが妥当である。動物由来原料に関しては、BSEの伝播の防止から反芻動物由来原料基準の設定を行う。さらに、それ以外の製品について動物由来原料と動物細胞を製品とする原料基準を設定することが必要である。

#### 2. HAV の RT-PCR による検出

5'NCR 領域は異なる遺伝子型 HAV 株間でも塩基相同性の高い部位であるが、高次構造が多いこと、ピリミジンリッチの繰り返し配列が多いことなどが PCR プライマー設定の問題点である。HM175 と MBB は 1B 型、LA と GBM は 1A 型、KRM003 は 3B 型、AGM27 は 6 型ウイルスである。今回設計したセンスプライマー +300 (24 mer) 部位塩基配列は、サル HAV である 6 型 AGM27 を含めて完全一致しており、アンチセンスプライマーの-516 (23 mer) は 1 及び 3 型でほぼ完全一致、AGM27 とは 3ヶ所の塩基置換を認めた。一般に PCR 増幅のためにはプライマーの 3'末端の 3 塩基が一致していることとされているので、1、2 型のみならず 6 型 HAVcDNA の増幅も可能と思われた。

PCR 反応は方法の項に記載した条件で行ったが、PCR システムの温度をあらかじめ 96℃ に設定し、チューブを挿入して 1 分後に変性反応：94℃ 15 秒、アニーリング：55 または 58℃ 15 秒、伸長反応：72℃ 30 秒のサイクルを 40 回行い、最後に 4℃ ホールドとした。1 回目 PCR 反応で、55 および 58℃ のアニーリング条件で 1B 型 cDNA、3B 型 cDNA 共に 100 分子相当をテンプレートとして加えたチューブまではっきりした 238bp のバンドを認め、10 分子相当でも

薄いバンドを認めた。同じプライマーセットを用いて1回目 PCR 液 1  $\mu$ l を加えて2回目の PCR を同条件で 30 回さらに PCR を行うと、10 分子相当のテンプレートまで強陽性と判定できた。

### 3. HCV の HepG2 及び HeLa 細胞への感染とリアルタイム PCR による検出

HCV の感染実験に先立ち、TaqMan ケミストリを利用した HCV RNA の高感度定量法を確立した。図 2 に、合成 RNA を用いて作成した検量線と、血漿検体の測定値（赤色のドット）を示した。検量線用の HCV RNA は、T7 プロモーターの下流に HCV 遺伝子の 5'非翻訳領域を組み込んだ発現ベクターを用いて試験管内で合成した。得られた RNA を 10 倍公比で段階希釈し RT-PCR 反応を行ったところ、相関係数 0.999 の検量線を得た。

次に、この定量法を用いて、HCV 濃度が  $10^7$  copies/ml と測定された血漿 (NIHJ1) を用いて感染実験を行った。24-well-plate で培養したヒト肝臓由来細胞 HepG2 及び子宮頸癌細胞 HeLa にそれぞれ NIHJ1 血漿を添加した。37°C で 2 時間インキュベートした後、細胞表面をよく洗浄し、細胞を回収、RNA 抽出を行った。細胞中の HCV RNA 量の測定成績を図 3 に示した。HepG2 細胞では、血漿濃度依存的に 1200~6200 copies/ml の HCV RNA が認められたのに対し、HeLa 細胞では、血漿添加量に係わらず 200~800 copies/ml を示した。

### 4. HCV 抗原検出系の開発

本年度はまず、Cre/loxP システムで全長 HCV をスイッチング発現を行うことにより

持続発現している細胞をマウスに免疫し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製した。また、これらのハイブリドーマのうち HCV 発現継代細胞に反応するクローンをスクリーニングするため、生きた細胞を抗原とした ELISA 系を確立した。この ELISA 系で 1000 クローン以上をスクリーニングしたところ、HCV 発現継代細胞の表面で発現する抗原を認識するクローンを何種か得ることができた。今後は、これらの中から HCV 汚染細胞や汚染ヒト由来組織などに反応するクローンを選択し、HCV 汚染検出系の確立を目指す予定である。

### 5. 血漿分画製剤や供血者及びレシピエントの血液中の HEV RNA の検出

凝固因子製剤及びアルブミン製剤、各々数ロットについて HEV RNA の検出を行ったが、全てのロットで陰性であった。輸血後 E 型肝炎が疑われたレシピエントの血液、及び当該輸血に用いられた血液ロットについて HEV RNA の検出を行い、レシピエント及び 1 人の供血者の保存血液が HEV RNA 陽性となった。その血液の HEV RNA のシーケンスを行ったところ、ドナーとレシピエントの HEV RNA 塩基配列が、二つの異なる領域に於いて完全一致していた。

供血血液において、肝炎ウイルスを排除する目的で ALT 高値の血液は輸血用血液製剤や血漿分画血液製剤の製造に使われることは廃棄される。そこで、このような ALT 値が 500 IU/L を超える 18 人の供血者について、HEV RNA の検出を行ったところ、そのうち 6 人からの供血血液が HEV RNA 陽性であった。

## 6. 臍帯血のヘルペスウイルスの安全性

合計 11 名の患者さんの協力を得て、127 血液検体についてヘルペスウイルスの存在を調べた。その結果、2 検体においてヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) が、同じく別の 2 検体からヒトサイトメガロウイルス (HCMV) が検出された。いずれも発熱時のサンプルであるため、この感染により発熱が起きている可能性が考えられる。前者は 2 名の患者、後者は 1 名の患者に由来していた。

## 7. ヒトポリオーマウイルスの高感度検出法の開発

### 7. 1 BKV DNA 及び JCV DNA の検出用プライマーの特異性と検出感度

JCV 調節領域を検出するための 28 mer のプライマー (J-1 と J-2) を合成した。このプライマーセットは 396bp の JCV DNA 断片を増幅するがアニーリング温度を 55℃以下にさげても BKV DNA の増幅は認められなかった。

一方、BKV の intergenic (IG) 領域を検出するプライマー、BIG-1、BIG-2 を合成した。このプライマーは 336bp の BKV DNA 断片を増幅するがアニーリング温度を 55℃以下にさげても JCV DNA 断片の増幅は認められなかった。これらのプライマーセットのそれぞれのウイルス DNA の増幅に対する特異性は非常に高く、またウイルス DNA 検出感度はそれぞれ 10fg あった。(図 4)

### 7. 2 Multiplex PCR による BKV DNA 及び JCV DNA の検出

BKV と JCV の両ウイルスの DNA を特異的に同時に検出する Multiplex PCR を行うためのプライマーの組み合わせを検討した。

JCVDNA を増幅する J-1、J-2 と BKVDNA を増幅する BIG-1、BIG-2 の 2 種類のプライマーセットを組み合わせた Multiplex PCR を行なったところ 336bp (BKV IG 領域) および 396bp (JCV 調節領域) が同時に検出された。

またこのプライマーの組み合わせを用いて、アニーリング温度を 55℃で行う通常の PCR とアニーリング温度を 65℃から段階的に下げてゆく Touch down PCR と比較検討したところ、両者にウイルス DNA 断片の増幅ならびに検出感度には差がなかった (データは示さず)。また両ウイルスの検出感度はそれぞれ 10fg であった。(図 5)

### 7. 3 尿中に混在するヒトポリオーマウイルスの検出

尿中に排泄されているかも知れないヒトポリオーマウイルスを検出するため、20~25 歳及び 50~60 歳の健常人それぞれ 20 人から採取した尿 30ml を 1,000g、10 分低速遠心した細胞沈査と更に細胞沈査を除いた上清を 100,000 g、180 分間遠心した沈査をウイルス沈査としたサンプルを作製した。ウイルス DNA を検出するため、細胞沈査とウイルス沈査から抽出した DNA をサザンブロットハイブリダイゼーションによりウイルス DNA の検出を検討した。20~25 歳の尿からは、BKVDNA および JCVDNA は検出されなかった。一方、50~60 歳の尿からは JCV DNA が 40%、BKV DNA が 15% の割合で検出された。細胞沈査とウイルス沈査において検出されたウイルス DNA 量を比較すると、細胞沈査の検体がウイルス沈査の検体と比較し約 1.5 倍ウイルス DNA 量が多かった。ウイルス沈査検体におけるウイルス DNA を定量したところ、尿 30 ml あたり JCV では 5~20pg、BKV では 1~5pg の DNA が検出さ