

生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部
研究者 内田 恵理子

研究要旨 ポリエチレンイミン結合磁性粒子によるウイルス濃縮法のヒトウイルスへの適用と機構解析、HEV、HIV-2に対する NAT 試験法の評価、感染性ウイルスを高感度に検出する感染性 PCR 法の確立、ウイルスの不活化・除去工程のクリアランス能評価を行った。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部 山口 照英
(2) 徳島文理大学 香川薬学部 宮澤 宏
(3) 日本ケミカルリサーチ㈱
先端医療研究センター 小紫 嘉一
(4) (財)化学及血清療法研究所 宮本 誠二
(5) 持田製薬㈱製剤研究所 猶塚 正明
(6) JSR㈱筑波研究所 村田 充弘

A. 研究目的

生物由来製品のウイルス安全性に関しては、その製造に用いる原材料も含めたウイルス混入のリスク、ウイルススクリーニングや製造工程でのリスク低減措置、投与方法等を含めて総合的にリスク評価を行う必要がある。本研究では、生物由来製品のウイルス安全性確保のためのウイルス検出手法の高感度化・高精度化に関する研究やウイルスの不活化・除去技術などに関する研究を行うと共に、ウイルスリスクの評価を適切に行うための基盤技術開発を行う。また、得られた成果に基づいて各生物由来製品のウイルスリスクの定量法の提示やリスクを可能な限り低くするための基本方策を提示することを目指すものである。今年度は以下の研究を実施した。

- (1) 生物由来製品原料のウイルス検出技術の高精度化・高感度化に関する研究: ウイルス検出の高感度化を目的とするポリエチレンイミン (PEI) を結合した磁性粒子 (PEI 磁気ビーズ) によるウイルス濃縮法の開発とヒトウイルスへの適用、濃縮機構の解析を行った。また高感度ウイルス検出技術としての新プローブキャプチャー法の開発を試みた。
(2) ウイルス安全性評価試験としての NAT 試験法の適用に関する研究: E型肝炎ウイルス (HEV) に対する NAT 試験法の構築と HIV-2 の NAT 試験法の評価のためのウイルス核酸の作製を検討した。
(3) 生物由来製品原料のウイルス感染性の高感度検出手法に関する研究: ウイルスの感染性を迅速・高感度に検出する感染性 PCR 法を確立した。

- (4) 生物由来製品のウイルスの不活化・除去法の開発・改良に関する研究や不活化・除去能の評価法に関する研究: PEI のウイルス結合能を利用したウイルス除去カラムについて検討した。また、ウイルスの不活化・除去工程のクリアランス能を評価した。

B. 研究方法

B.1 PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒトウイルスへの適用と濃縮機構の解析

(1) 磁気ビーズ、ウイルス: PEI 磁気ビーズは、平均粒子径 $0.8\mu\text{m}$ 、表面カルボン酸量 $21\mu\text{mol/g}$ の IMMUTEX-MAG (JSR) に PEI を EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドヒドロクロライド) によりカップリングして作製した。ヒトウイルス試料としては、HBV・HCV・HIV の3種のウイルス陽性血漿を正常ヒト血漿で希釈して用いた。またモデルウイルスとして、単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1)、ブタパルボウイルス (PPV)、SV-40 ウイルス、アデノウイルス 5 型、ポリオウイルス、Sindbis ウイルスを培地 (RPMI1640 + 5%FCS) で希釈したものを用いた。

(2) PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮法: ウイルス試料 1 ml を PEI 磁気ビーズと混合反応後、磁気分離を行い、磁気ビーズ画分からスマイテスト EX R&D を用いてウイルス核酸を抽出した。ウイルスの定量はリアルタイム定量 PCR 法、HIV の場合は Amplicor HIV-1 monitor キットを用いて行った。濃縮前のウイルス量はウイルス液 0.1 ml から直接スマイテスト EX R&D で抽出して求めた。

(3) PEI 磁気ビーズに濃縮される蛋白質の解析: ウイルス液と PEI 磁気ビーズを反応後、PEI 磁気ビーズ結合画分を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。PEI 磁気ビーズで濃縮された各バンドを切り出してトリプシンで in gel 消化後、抽出したペプチドを MALDI-TOF・TOF を用いて分析した。

B.2 新プローブキャプチャー法の開発

プラスミド pET24a (5.3kbp) をモデルとして用

いて新プローブキャプチャー法の検出感度を検討した。oligo(dG)磁気ビーズ (JSR) は粒径の違う 2 種類 (C370: 粒径 2.0 mm、d(G)40: 37 pmol/mg 結合; C378: 粒径 2.4 mm、d(G)40: 24 pmol/mg 結合) を用い、bridging oligonucleotide (BN) には、連続した 28 個の C の後の長さが 22 mer と 25 mer で結合領域も異なる CCCPET-22 と CCCPET-25 を用いた。oligo(dG)磁気ビーズと BN は 100 mM NaCl で 55°C から 70°C の間の温度を 1 分ごとに段階的に変化させるステップを数十回繰り返してアニールさせ、BN が結合した oligo(dG)磁気ビーズを得た (beads-BN)。pET24a を一本鎖 DNA に変性後、beads-BN と 0.5 M NaCl で 62°C、2 時間反応し、ハイブリダイズした pET24a を 70°C で 10 分間加熱後、回収した。回収したプラスミド DNA 量は NAT 試験により評価した。

B.3 E 型肝炎ウイルスの NAT 試験法の構築

(1) 測定方法: 原理: nested-PCR 法; 抽出試薬: Ex-R&D; 増幅試薬: Supper script one-step RT-PCR, Platinum PCR suppermix; プライマー: HE01 (5'-ggg gtt ggt tgg atg aat ata ggg ga-3'), HE02 (5'-gga gtg cga agg gct gag aat c-3'), HE11 (5'-tgg aag aag cag tcc ggt gag cc-3'), HE12 (5'-tgg aat act gtc tgg aaa atg gc-3'); 検出: 電気泳動法; PCR 条件: RT-PCR: STEP1 (1 cycle): 50°C 30:00; 94°C 2:00; STEP2 (35 cycle): 94°C 0:30; 55°C 0:30; 72°C 1:30; STEP3 (1 cycle): 72°C 7:00; 4°C 99:99. 2nd PCR: STEP1 (1 cycle): 94°C 2:00; STEP2 (30 cycle): 94°C 0:30; 55°C 0:30; 72°C 1:00; STEP3 (1 cycle): 72°C 3:00; 4°C 99:99. (2) 検体: 陽性検体として HEV 精製品 (HEV 感染カニクイサルの糞便由来) を用いた。また、実製造検体として、原料血漿: プール血漿 (3 バッチ)、中間原料: クリオプレシピテート (3 バッチ)、最終製剤: トロンビン、アルブミン (各 2 ロット) を試験した。

B.4 HIV-2 NAT 試験法の検討

(1) HIV-2 RNA の作製: まず、HIV-2 の塩基配列 (Accession No.M15390 9388-9626) を基に、HIV-2 のセンス鎖 (S) の配列またはアンチセンス鎖 (AS) の全配列に対応する 10 種類のオリゴヌクレオチドを作製し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼによる 5' リン酸の付加後、ライゲーションを行い、オリゴヌクレオチドが結合した 2 本鎖 DNA 断片を作製した。この DNA 断片を PCR で増幅し、プラスミド (pT7Blue T-vector) に組み込んだ後、大腸菌へ導入して増幅し、精製、回収した。調製したプラスミドを制限酵素で直鎖状 DNA にした後、MEGA

script T7 high yield transcription kit を用いて、T7 プロモーターから制限酵素切断部位までの RNA を合成した。さらに、DNase I による DNA の分解、フェノール抽出、エタノール沈殿による RNA の精製を行った後、希釈・分注し、エタノール沈殿の状態 HIV-2 RNA を保存 (-80°C) した。

(2) HIV-2 NAT 試験: 逆転写ならびに 1st-PCR プライマーとして HIV2-1F (ctt tcc aga agg ggc tgt aac)、HIV2-1R (gcc aag tgc tgg tga gag t)、2nd-PCR プライマーとして HIV2-2F (gga gct ggt gig gaa cgc)、HIV2-2R (gca ggg aac acc cag gct cta) を用い、Tth DNA ポリメラーゼによる、HIV-2 RNA に対する逆転写ならびに nested-PCR を行った。2 度目の PCR 終了後、増幅産物をアガロースゲルにて泳動し、エチジウムブロマイド染色により HIV-2 RNA 由来のバンドの有無を判定した。

B.5 感染性 PCR 法の開発

(1) モデルウイルス: DNA ウイルスとして単純ヘルペスウイルス (HSV-1) とアデノウイルス 5 型、RNA ウイルスとしてポリオウイルス (Polio-1) 及び同種指向性マウス白血病ウイルスを用いた。

(2) 感染性 PCR 法: 各モデルウイルスを培地により希釈して種々の感染価のウイルス液を作製した。ウイルス感受性細胞 (HSV-1, ポリオウイルス: Vero 細胞; アデノウイルス: HeLa 細胞; マウス白血病ウイルス: M.dunni 細胞) をプレートに播種し、翌日、培地をウイルス液に交換して感染させた。経時的に細胞を回収し、ウイルスゲノムを Gene Ball とスマイテスト EX-R&D を組み合わせて抽出し、リアルタイム定量 PCR (RT-PCR) により定量した。(3) 細胞を用いたウイルス感染性試験: ウイルス感受性細胞 (HSV-1, ポリオウイルス: Vero 細胞; アデノウイルス: HeLa 細胞; レトロウイルス: PG4 細胞) をプレートに播種し、翌日、培地をウイルス液に交換して感染させた。経時的に顕微鏡観察を行い、細胞変性効果 (CPE; Vero 細胞、HeLa 細胞) またはフォーカス形成 (PG4 細胞) を判定した。

B.6 PEI のウイルス結合能を利用したウイルス除去カラムの検討

ブロムシアン活性化セファロース 6 MB に PEI を結合させた。PBS(-) で十分に洗浄した後、実験に用いた。モデルウイルスを含む培養上清を PEI-セファロース 6 MB カラムにアプライし、素通りしてきた分画、およびアプライした培養液中のウイルス量をリアルタイム PCR/RT-PCR により測定した。

B.7 既存のウイルスの不活化・除去工程のクリア

ランス能評価

医薬品（バイオテクノロジー応用医薬品、血漿分画製剤）の製造に現在用いられている代表的なウイルス不活化・除去工程について、文献等の公表資料を広く調査し、種々のウイルスに対する各工程のクリアランス能について評価を行った。調査対象として学術論文・総説類44報、学会・シンポジウム発表資料32報、医薬品添付文書・審査報告書類29報、製品パンフレット・医薬品インタビューフォーム類14報、公的ガイドライン類3報の計122報を用いた。

B.8 生物薬品の実製造に用いられているウイルス不活化・除去工程の評価

モデルウイルスとして仮性狂犬病ウイルス:PRV、マウス白血病ウイルス:MuLV、脳心筋炎ウイルス:EMC、ブタパルボウイルス:PPV を用いた。クリアランス能の評価はナノフィルトレーション（孔径15nm、有効膜面積0.001m²）、カラムクロマトグラフィー工程（内径0.7cm、カラム高13cm）について検討した。ウイルス力価はPPV、EMC:Vero細胞でのプラーク形成能、MuLV: S+L-細胞でのフォーカス形成能、PPV: PT-1細胞でのプラーク形成能で評価した。

（倫理面への配慮）

本研究に用いた細胞はいずれも樹立された継代培養細胞であり、倫理面の問題はない。また、本研究に用いたウイルス陽性血漿は、人権擁護上の配慮からその由来が当該研究者には伏せられており、倫理面での問題はない。

C. 研究結果及び考察

C.1 生物由来製品原料のウイルス検出技術の高精度化・高感度化に関する研究

C.1.1 PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法のヒトウイルスへの適用と濃縮機構の解析

NAT 試験によるウイルス検出の感度向上のためのウイルス濃縮技術として PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法の開発を行っている。今年度は、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法のヒトウイルスへの適用について検討した。B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の3種類のウイルス陽性血漿について PEI 磁気ビーズ濃縮を行ったところ、HBV・HCV・HIV とともに 10 倍量の検体を使用した濃縮法で、通常法の約 10 倍の PCR シグナルが得られ、また、通常法で検出できない検体においても本濃縮法ではウイルス核酸の検出が可能であった (図 1)。この検討の過程で、ヒト血漿に含まれるビリルビンや乳びなどによりウイルス濃縮が阻害されることも判

明したが、抗ウイルス抗体の添加やフィルターろ過処理により濃縮阻害を解消することが可能であった。この結果を含めて、これまでに検討したウイルスの PEI 磁気ビーズによる濃縮の可否を表 1 まとめた。PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法は、広範なウイルスを濃縮可能であり、ヒトウイルスにも適用可能であることから、NAT 試験によるウイルスの高感度検出のための非常に有用な方法であることが明らかになった。

一方、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮の分子機構についても検討を行った。まず、分子量 70,000、10,000、1,800 の 3 種類の PEI を結合させた磁気ビーズでモデルウイルスの濃縮効率を比較すると、分子量 70,000 の PEI 磁気ビーズは非常に高い濃縮効率を得られるが、分子量 1,800 では濃縮効率が劣ることが明らかとなった。また、濃縮時の pH の影響については pH6 付近において最も高い濃縮効率を得られることが判明した。さらに、PEI 以外のカチオン性ポリマーとしてポリアリルアミン、ポリ-L-リジンを結合した磁性粒子によるウイルスの濃縮を検討したが、どのモデルウイルスでも PEI による濃縮効率が最も高かった。以上の結果より、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮は陽荷電の密度が高いほど濃縮効率が高いこと、また、カチオン性ポリマーの分岐構造が重要であり、1 級アミンのみならず 2 級あるいは 3 級アミンがウイルスの濃縮に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。次に、PEI 磁気ビーズを用いて血清成分存在下でウイルスを濃縮する際、ウイルスと共に濃縮される分子について検討した。その結果、血清中の補体第 3 成分や第 4 成分、IgM 等がウイルスと共に濃縮されることが明らかとなった (図 2)。PEI 磁気ビーズに IgM、C4 などの免疫因子も結合することから、ウイルス濃縮時にビーズ上に免疫複合体を形成させることでウイルスの濃縮効率をさらに改善できる可能性が示唆された。今後、免疫複合体の形成によるウイルス濃縮を検討する予定である。

C.1.2 新プローブキャプチャー法の開発

ウイルスの高感度検出法として、ウイルスの遺伝情報をもとにウイルスゲノムを特異的にハイブリダイゼーションにより濃縮する新プローブキャプチャー法の確立を検討した。従来のプローブキャプチャー法では磁気ビーズに直接目的配列を組み込んだものが用いられていたが、ビーズとの結合反応等によりプローブの不安定性やビーズによる物理的阻害があるとされていた。そこで新プローブキャプチャー法ではビーズから離れた位置でのハイブリダイゼーションを可能にするため、アダプターとして

oligo(dG)n 磁気ビーズと対合できる部分と目的ウイルスの遺伝子配列を含んだ部分を併せ持つブリッジオリゴヌクレオチド (BN) を用いる方法を採用した (図 3)。この方法の利点は、確実に目的遺伝子とハイブリダイゼーションできることの他に、BN のウイルス特異的遺伝子配列を含んだ部分を換えることで、一種類の oligo(dG)磁気ビーズで目的とするあらゆるウイルス検出に対応できることである。また各ウイルスに対応した磁気ビーズを混ぜることで、一度に複数の目的ウイルスやウイルスサブタイプを同時にトラップすることが可能になると期待できる。今年度はプローブキャプチャー法の基本的条件を検討するモデル実験として、扱いが容易で病原性のないプラスミドをウイルスの代わりに用いた。その結果、新プローブキャプチャー法によりプラスミドが回収可能であることが NAT 試験で確認された。2 種類の oligo(dG)磁気ビーズ C370 と C378 では粒径の大きい C378 の回収率が高かった (図 4)。しかし、回収量はインプット DNA の約 500 分の 1 と低いものであった。今後、条件検討を詳細に行い、NAT 試験と併用することで新しい高感度検出法の開発につながる見通しができた。

C.2 NAT 試験法の確立・評価

生物由来製品において、原材料に由来するウイルス安全性対策は重要課題である。最近の新興・再興感染症の出現など、新たなウイルスの発生に対応した安全対策への対応が求められ、NAT 法による確認必要性が生じている。今年度は E 型肝炎ウイルス (HEV) に対する NAT 試験法の構築と HIV-2 の NAT 試験法の評価のためのウイルス核酸の作製を検討した。

C.2.1 HEV の NAT 試験法の構築

一般的にウイルスの除去・不活化が困難な非エンベロープウイルスで粒径の小さいウイルスに対する安全性を評価するために、その対象ウイルスとして HEV に着目し、当該ウイルスを高感度に検出できる NAT 試験法の構築を検討した。また、核酸増幅法としては PCR を選択し、感度と特異性を高めるために nested-PCR 法の設計を検討した。

プライマーの設計は HEV の ORF1-ORF2 の overlapping sequence を含む領域を選択し、4 種のジェノタイプ全てに反応する部位を用いた。PCR の条件確立のため、RT-PCR 反応、nested-PCR 反応、検出系、抽出試薬、増幅試薬について種々の条件検討を行い、研究方法 B.3 に示す最適な条件を確立した。この条件による HEV の検出を確認したところ、陰性検体の蒸留水、生理食塩水、血漿には増幅されたバンドは認められず、HEV 陽性検体でのみ 10^4

希釈検体まで、期待される位置にバンドが認められた (図 5)。この HEV 陽性検体の濃度は約 4×10^6 コピー/ml であったことから、本試験系の検出感度は約 400 コピー/ml と算出され、NAT 試験法として適当な感度を有していることが示された。構築した HEV-NAT 試験法を用いて、実製造検体の添加回収試験を実施した。血漿分画製剤の原料プール血漿と中間材料のクリオプレシピテート各 3 バッチ、最終製剤 2 種類 2 ロットについて試験を行った。その結果、陽性検体を添加したものに関しては目的の位置にバンドが検出されたが、未添加検体についてはいずれの検体もバンドが認められず、HEV 陰性であることが確認された。

C.2.2 合成ウイルス核酸断片を用いた HIV-2 NAT 試験法の評価

新たなウイルスに対して NAT 試験を独自に確立する必要がある場合、試験法の評価にはウイルス検体の入手が必要である。しかし、NAT 試験用ウイルス標準品はごく一部のウイルスに限られ、その他のウイルスについては、ウイルス量が不明な検体しか入手できない場合や入手自体不可能な場合も多い。そこで、ウイルス検体の代用として、容易に入手可能なオリゴヌクレオチドを材料として作製したウイルス核酸断片を用いた NAT 試験の評価を検討した。今回は、遺伝子としてセンス単鎖 RNA を有する HIV-2 ウイルスを対象とした。

研究方法 B.3 に記載の方法で HIV-2 遺伝子配列を含むプラスミドを作製した。作製したプラスミド DNA の塩基配列を DNA シークエンシングにより調べた結果、目的の配列を有することが確認された (図 6)。次に、このプラスミドより HIV-2 RNA を作製し、その純度を評価した結果、吸光度比 (A260/280) は 1.9520 であり (純粋な RNA では 2.0)、かつ、変性アクリルアミドゲル電気泳動で、300b 付近に単一のバンドが確認 (配列より 322b) され、HIV-2 の配列を有する高純度の RNA が得られたことが確認された。さらに、作製した HIV-2 RNA を用いて NAT 試験を実施したところ、逆転写に供した RNA 量が 10 コピーで 9 回中 8 回、20 コピーでは 9 回全て、HIV-2 RNA を検出することが可能であった。

以上の結果より、オリゴヌクレオチドを材料として作製したウイルス核酸断片は、入手が困難なウイルスに対する NAT 試験の確立に有用であることを明らかにした。また、遺伝子型の異なるジェノタイプを有するウイルスの場合も、同様の方法で作製した種々のジェノタイプに対応した核酸を、NAT 試験のジェノタイプに対する特異性評価に利用可能であると考えられる。さらに、ウイルスを使用しないこ

とから、高度な物理的封じ込めの必要もなく、より簡便に NAT 試験法の検証が可能である。

C.3 生物由来製品原料のウイルス感染性の高感度検出手法に関する研究

ウイルス感染性の検出は、従来、ウイルスを感受性細胞に感染させ、細胞変性効果を顕微鏡で観察するなどの方法により判定するが、判定までに長時間かかること、判定が視覚的なものであり熟練を要し定量性に乏しいことなどの欠点がある。一方、ウイルスの高感度検出手法として NAT 試験が多用されているが、NAT 試験は必ずしも感染性のあるウイルスのみを検出しているとは限らず、試料にウイルス核酸の断片が入っていても検出されてしまう可能性がある。そこで、感染性のあるウイルスを迅速・高感度に検出する方法として、細胞を用いたウイルス感染試験と、PCR によるウイルスの迅速・高感度検出手法の長所を組み合わせた感染性 PCR/RT-PCR 法 (Infectivity PCR) の開発を行った。

4 種類のモデルウイルスについて、各ウイルスを指向性細胞に感染後、細胞中で増幅したウイルスの核酸を抽出してリアルタイム定量 PCR (RT-PCR) で検出し、従来の細胞を用いたウイルス感染性試験法と比較を行った (図 7)。その結果、HSV-1 では感染性 PCR 法により感染 1 日目でも 2pfu、2 日目には 0.2pfu という低用量のウイルスが検出可能であった。しかし、従来の CPE 法では 1 日目では 200pfu という大量のウイルスでも検出が不可能であり、4 日目でも 20pfu までしか検出できなかった。Polio-1 の場合、感染性 PCR 法では 1×10^3 コピーまで検出可能であったが、CPE 法では検出限界が 1×10^6 コピーであり、感染性 PCR 法を用いることで検出感度が 100 倍高くなることが判明した。アデノウイルス、マウス白血病ウイルスの場合も同様の結果が得られた。以上の結果より、いずれのウイルスも感染性 PCR/RT-PCR 法を用いることによって、従来の細胞を用いた感染性試験法と比較して、より短時間の培養で検出可能であり、検出感度は 10-1,000 倍も高感度であることが明らかとなった。

感染性 PCR 法は、遺伝子治療用ウイルスベクターの安全性確保上重要な、ベクターに混入する増殖性ウイルスの高感度検出手法としても確立され、生物由来製品のウイルス安全性確保のための有用な方法と考えられる。感染性 PCR 法では細胞への感染効率が検出感度に大きく影響するため、今後、感染効率の向上による、さらなる検出の高感度化について検討する予定である。

C.4 生物由来製品のウイルスの不活化や除去法の

開発・改良に関する研究や不活化・除去能の評価法に関する研究

C.4.1 ウイルスの除去法の開発

C.1 に示すように PEI 磁気ビーズが各種ウイルスに対して強いウイルス吸着能を持つことが明らかになったことより、これを応用したウイルス除去法の開発について検討した。PEI を結合したセファロース 6MB (PEI-6MB) カラムを作製し、これに各種モデルウイルス液を添加したところ、HSV-1、SV-40、PPV では添加したウイルス ($10^7 \sim 10^9$ copies) の顕著な除去効果が認められた (図 8)。Sindbis ウイルスの場合は除去効率が低かったが、それでも 10^3 程度の除去能が認められた。いずれのウイルスの場合も、PEI を結合していないセファロース 6MB カラムでは除去能は認められなかったことから、ウイルスはカラムの PEI に結合することで除去されたことが示唆された。以上の結果より、PEI を結合したセファロース 6MB カラムにより、ウイルスが効率よく除去可能であることを明らかにした。PEI とウイルスの相互作用を利用したウイルス除去法を開発できれば、医薬品の安全性確保の上で有用な手法となると期待される。今度、最適なウイルス吸着条件等を明らかにする予定である。

C.4.2 既存のウイルス不活化・除去工程のクリアランス能の評価

生物由来製品のウイルス安全性を確保するための重要な方策のひとつに「医薬品製造工程へのウイルス不活化・除去工程の導入」が挙げられる。医薬品製造に現在広く採用されている代表的なウイルス不活化・除去工程を中心に、各工程のウイルスクリアランス能に関して公表資料を基に評価を行った。各工程のウイルスクリアランス能はウイルス力価の減少度の対数であるクリアランス指数 (RF) で示されるが、B.6 に示す文献等よりウイルスごとに RF データを収集、分析した。また、生物由来製品のウイルス安全性に関する国内外の規制動向も検討した。

その結果、①液状加熱工程では、 $60^\circ\text{C} \times 10$ 時間の処理によりエンベロープ型ウイルスでは、15 種のうち 14 種で 4~7 以上の RF が達成され、本工程が有効であることを確認した。一方、非エンベロープ型ウイルスは Polio-1 では例外的に高 RF (5.7~8.5 以上、 $n=16$) を示したが、他の非エンベロープ型 RNA ウイルスではエンベロープ型ウイルスより RF が低く、非エンベロープ型 DNA ウイルスでは RF が 1~2 程度と有効性は低かった。また、②乾燥加熱工程では、 $60^\circ\text{C} \times 10$ 時間、 $65^\circ\text{C} \times 10$ 時間、 $80^\circ\text{C} \times 72$ 時間の 3 条件を比較すると、処理温度を 60°C から 65°C に上げることで一部のウイルスで RF の向上がみられ、さらに

温度を80℃に上げて処理時間を72時間に延長することにより全体的にRFの向上が認められた。ウイルスの種類によるRF値の明確な差異は認められなかった。③凍結乾燥工程は、非エンベロープ型RNAウイルスに比較的有効 (RF 2~5程度) だが、その他のウイルスに対してはRFが0~2程度と低かった。また、④S/D (有機溶媒/界面活性剤) 処理工程については、有機溶媒リン酸トリ-n-ブチル (TNBP) +界面活性剤Triton X-100処理の場合、エンベロープ型ウイルスはRFが4以上と有効であるが、非エンベロープ型RNAウイルスのPolio-1では有効性がやや劣り、非エンベロープ型DNAウイルスの動物パルボウイルスでは有効性に大きなばらつきがみられた (RF 0~5.8)。⑤低pH処理工程は、大~中型のエンベロープ型ウイルスに対してRFが3.55以上と安定して有効であるが、それ以外のウイルスは不活化能にばらつきがみられ、非エンベロープ型ウイルスの不活化能は低いことが示唆された。⑥イオン交換クロマトグラフィー工程、⑦アフィニティークロマトグラフィー工程、⑧疎水性相互作用クロマトグラフィー工程は、いずれも各ウイルスに対するRF値がそれぞれ0~8、0~7以上、0~6以上と大きな幅があり、ウイルスの種類による違いは認められなかった。この理由として、イオン交換クロマトグラフィーでは添加・溶出する際の溶媒組成、担体基材の種類、線流速など種々のパラメータが分離状況に大きく影響すること、精製工程の様々な段階での使用が含まれること、アフィニティークロマトグラフィーでは目的物質を担体に吸着させる以外に、特定の不純物を担体に吸着・除去するための使用も含まれること、などがあげられる。また、⑨ウイルスろ過 (ナノフィルトレーション) 工程 (図9) は、孔径50 nmおよび35 nmのろ過膜を用いた場合、平均サイズが50 nm以上のウイルスに対してRFが3以上の除去が達成されていたが、それ以下のウイルスに対してはRFのばらつきがみられ、ウイルスが小さくなるほどRFが低下する傾向にあった。一方、20 nmおよび15 nmのろ過膜を用いると、小型の動物パルボウイルス (非エンベロープ型DNAウイルス) も含めて3以上のRFが得られ、ウイルス除去に有効であることが確認された。しかし、20~15 nmのろ過膜は分子量10万程度の蛋白質もかなりの割合を捕捉してしまうことから、製造工程への導入の際には注意が必要である。その他、⑩水蒸気加熱工程、⑪クリオ分離工程、⑫エタノール分画工程、⑬サイズ排除クロマトグラフィー工程についても検討した。

以上の結果より、クロマトグラフィー工程以外のウイルス不活化・除去工程では、各ウイルスに対するRFは小型ウイルス (非エンベロープ型ウイルス)

でいずれも小さくなる傾向がみられたことから、ウイルスクリアランス試験においては、非エンベロープ型ウイルス (特に小型のDNAウイルス) を必ずモデルウイルスに含めて評価を行うことが重要である。今回の結果から非エンベロープ型ウイルスの不活化・除去に最も効果的と考えられる工程は、20~15 nm程度のウイルスろ過膜を用いたろ過工程及び100℃×30 minの乾燥加熱工程である。但し、目的蛋白質の性質等によってはこれらの工程を導入できないケースも想定し得ることから、適切なクロマトグラフィー工程を複数組み合わせるなど、非エンベロープ型ウイルスに対する総RFの一層の向上を図る努力が必要である。

エンベロープ型ウイルスに関しては、血漿分画製剤に対するWHO及び欧州のガイドラインの規制において、有効なウイルスクリアランス工程 (RF 4以上) を2工程含めることとされており、結果的には8以上のRFを求めている。また、少なくともその一つは不活化工程でなければならないとされている。日本のガイドラインにおいても、血漿分画製剤の製造工程に不活化・除去の機序の異なる工程を原則2工程以上含めるべきと明示されていること、エンベロープ型ウイルスであるHIV・HBV・HCVの各モデルウイルスに対する総RFは9以上を求めていること、の2点から、実質的に日本における規制は海外と同等の内容と考えられる。しかし、1工程は不活化工程とするという考え方は今後検討していくべき課題と思われる。

血漿分画製剤に比べてバイオテクノロジー応用医薬品では原材料におけるウイルス混入のリスクは極めて低い。血漿分画製剤の製造工程で汎用されている液状加熱工程及びS/D処理工程はエンベロープ型ウイルスの不活化に有効で頑健性も高い方法であることから、目的蛋白質の性質に応じて、これらの工程の導入を検討する価値はあると思われる。

C.4.3 生物薬品の実製造工程におけるウイルス不活化・除去工程のクリアランス能の評価

細胞培養技術を用いたある生物薬品の実際の製造工程に導入されているろ過工程 (ナノフィルトレーション: 孔径15 nm) 及びクロマトグラフィー工程のウイルスクリアランス試験を行うことにより、当該生物薬品のウイルス安全性を評価した。モデルウイルスとして、ウイルスサイズ、ウイルスゲノム (核酸)、エンベロープの有無及び耐性の異なる4種類のウイルス (表2) を用いた。ろ過工程は実工程の1/1000、クロマトグラフィー工程は実工程の1/80にスケールダウンして検討を行った。その結果、ナノフィルターによるウイルスクリアランス試験では

すべてのウイルスにおいて RF 4.6 以上のクリアランス能が得られた (表 3)。特性の異なる 4 種類のウイルスのいずれも高い除去効率と再現性が認められたことから、本工程は当該生物製品のウイルス安全性を確保する上で、極めて有用かつ重要な工程であると考えられた。また、クロマトグラフィー工程のウイルスクリアランス試験では、PPV を除き RF は 3.8 以上、PPV においても RF は 2.5 であり、本工程は一定のウイルスクリアランス能を有することが確認された (表 4)。両工程は原理の異なる分離・精製工程であることから、両者におけるウイルスクリアランス能を加算して製造工程全体のウイルスクリアランス能を推定すると RF として 7.1 以上という高い値が得られた。今回の結果より本品のウイルス安全性は高いレベルで確保されていると考えられた。

E. 結論

1. 生物由来製品のウイルスの高感度検出法に関する研究として、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法のヒトウイルスへの適用を検討し、HBV、HCV、HIV のいずれも効率よく濃縮可能であることを明らかにした。また、濃縮機構の検討により、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮は、陽荷電の密度が高いほど濃縮効率が高く、2 級、3 級アミンの分岐構造が濃縮効率に重要である可能性を示した。さらに PEI 磁気ビーズにはウイルスと共に血清中の補体 C3、C4 や IgM が濃縮されることを明らかにした。
2. ウイルスの高感度検出法として、ウイルスの遺伝子配列情報を利用した新プローブキャプチャー法の開発を試み、モデル実験としてプラスミドの回収、検出が可能であることを示した。
3. ウイルス安全性評価試験としての NAT 試験法の適用に関する研究として、HEV を高感度に検出可能な NAT 試験法を確立した。また、HIV-2 のように入手困難なウイルスに対する NAT 試験法の確立において、ウイルス検体の代用としてオリゴヌクレオチドを材料として作製したウイルス核酸断片が NAT 試験の評価に有用であることを示した。
4. ウイルス感染性の高感度検出法に関する研究として、感染性 PCR 法を確立し、従来法と比べて、より短時間の培養で高感度にウイルスの感染性を検出可能であることを明らかにした。
5. ウイルスの除去法に関する研究として、PEI を結合したセファロース 6MB カラムにより、ウイルスが効率よく除去可能であることを明らかにした。
6. 生物由来製品の製造工程に用いられるウイルスの不活化・除去工程のクリアランス能を公表資料より評価し、医薬品のウイルス安全性を確保するには機序の異なる複数の不活化・除去工程を製造工程に

導入する必要があることを確認した。また、生物製品の 1 例について、製造工程に用いられているろ過工程及びクロマトグラフィー工程のウイルスクリアランス能を評価し、安全性が確保されていることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwata, A., Sato, K., Yamaguchi, T., Yoshiake, N., Tomoda, A.: Suppression of proliferation of poliovirus and porcine parvovirus by novel phenoxazine, 2-amino-4,4a-dihydro-4a-7-dimethyl-3H-phenoxazine and 3-amino-1,4a-dihydro-4a-8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one, *Biol. Pharm. Bull.* (in press)
- 2) Uchida, E., Sato, K., Iwata, A., Ishii-Watabe, A., Mizuguchi, H., Hikata, M., Murata, M., Yamaguchi, T., Hayakawa T.: An improved method for detection of replication competent retrovirus in retrovirus vector products, *Biologicals*, 32, 139-146 (2004)
- 3) Kino, K., Sugasawa, K., Sugiyama, H., Miyazawa, H., Hanaoka, K. The base excision repair reaction of oxazolone with hOGG1. *Photomed. Photobiol.*, 26, 41-42 (2004)
- 4) 板東俊和、喜納克仁、宮澤宏、杉山弘：配列特異的アルキル化剤の医薬品としての可能性、*医薬品研究*, 36, 1-12 (2005)

2. 学会発表

- 1) 喜納 克仁、伊藤 晋敏、水野 武、菅澤 薫、杉山 弘、高尾 雅、安井 明、宮澤 宏、花岡 文雄：グアニン酸化生成物、オキサゾロンの哺乳類における変異誘発能と修復機構 第 27 回日本分子生物学会年会、平成 16 年 12 月、神戸
- 2) 小木 美恵子、押澤 正、内田 恵理子、永田 龍二、早川 堯夫、村田 充弘、日方 幹雄、佐藤 功栄、岩田 明子、山口 照英：医薬品の安全性確保のための高感度ウイルス検出法の開発ー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機構の検討ー、日本薬学会第 125 年会、平成 17 年 3 月、東京
- 3) 宮澤 宏、喜納 克仁、宮澤 薫、佐藤 陽治、山口 照英：幹細胞からの神経分化を左右する因子の探索、日本薬学会第 125 年会、平成 17 年 3 月、東京

G. 知的財産権の出願／登録状況

該当なし

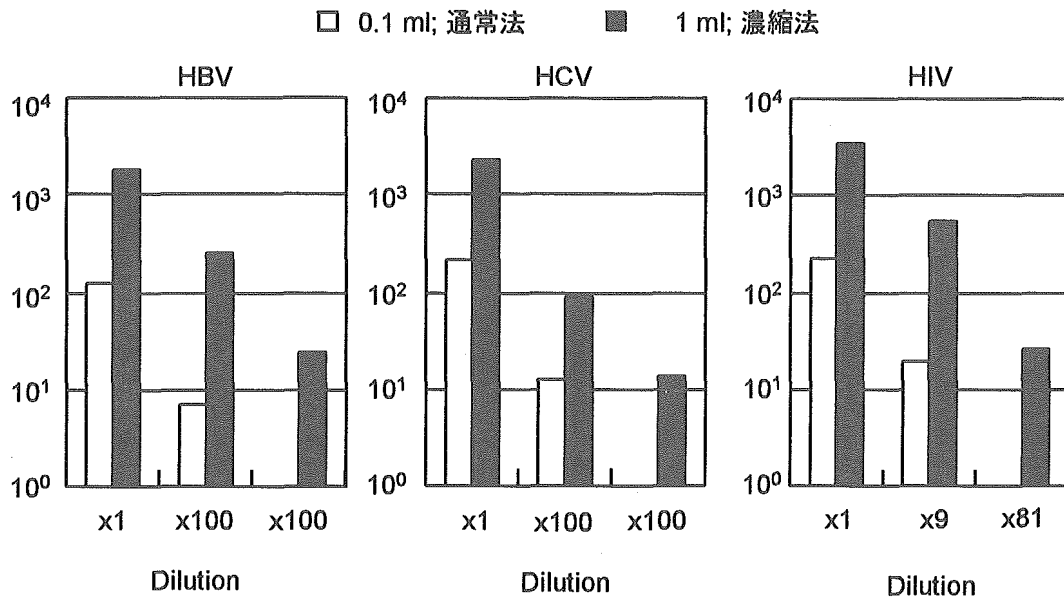


図1 PEI磁気ビーズによるHBV, HCV, HIVの濃縮

表1 PEI磁気ビーズによるウイルスの濃縮結果

ウイルス	宿主	ウイルスゲノム	脂質膜	サイズ (nm)	PEI磁気ビーズ濃縮
ヘルペスウイルスI型 (HSV-1)	ヒト	DNA	+	150-200	+
ポリオウイルス Sabin 1型 (Polio-1)	ヒト	RNA	-	25-30	-
ブタパルボウイルス (PPV)	ブタ	DNA	-	18-24	-
水疱性口内炎ウイルス (VSV)	ウシ	RNA	+	70-150	+
Sindbis ウイルス (Sindbis)	ヒト	RNA	+	60-70	+
SV-40ウイルス (SV-40)	サル	DNA	-	40-50	+
サイトメガロウイルス (CMV)	サル	DNA	+	180-200	+
同種指向性マウス白血病ウイルス (A-MuLV)	マウス	RNA	+	80-110	+
アデノウイルス5型 (Ad-5)	ヒト	DNA	-	70-90	+
B型肝炎ウイルス (HBV)	ヒト	DNA	+	40-45	+
C型肝炎ウイルス (HCV)	ヒト	RNA	+	40-50	+
ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	ヒト	RNA	+	80-100	+
A型肝炎ウイルス (HAV)	ヒト	RNA	-	25-30	-

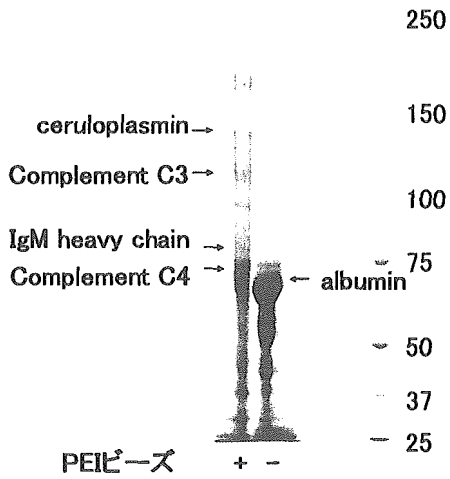


図2 PEI磁気ビーズにウイルスとともに濃縮される血清成分中の蛋白質のMS/MSによる同定

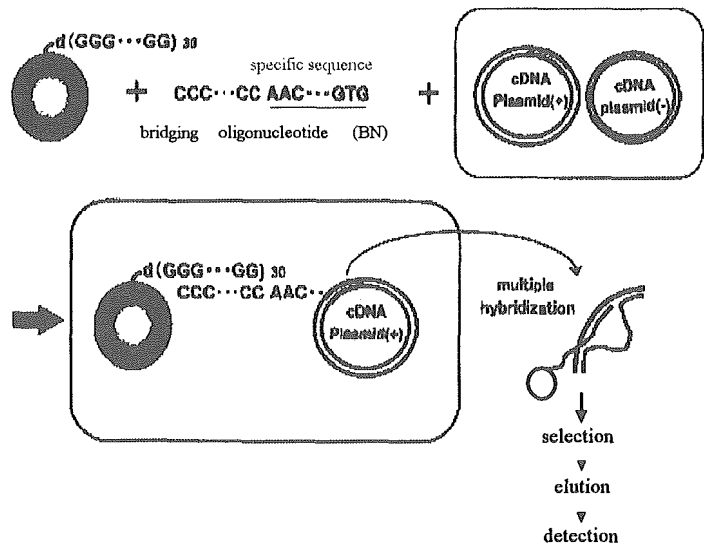


図3 Bridging oligonucleotideを用いるプローブキャプチャー法

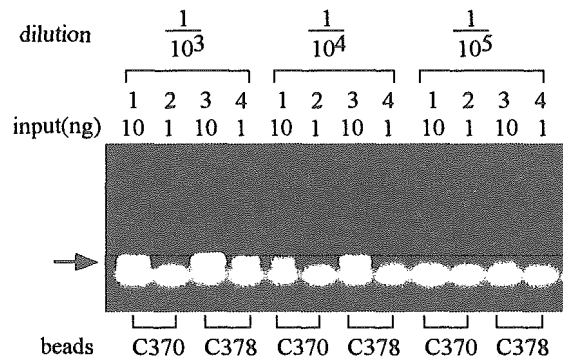


図4 プローブキャプチャー法で回収したプラスミドの検出

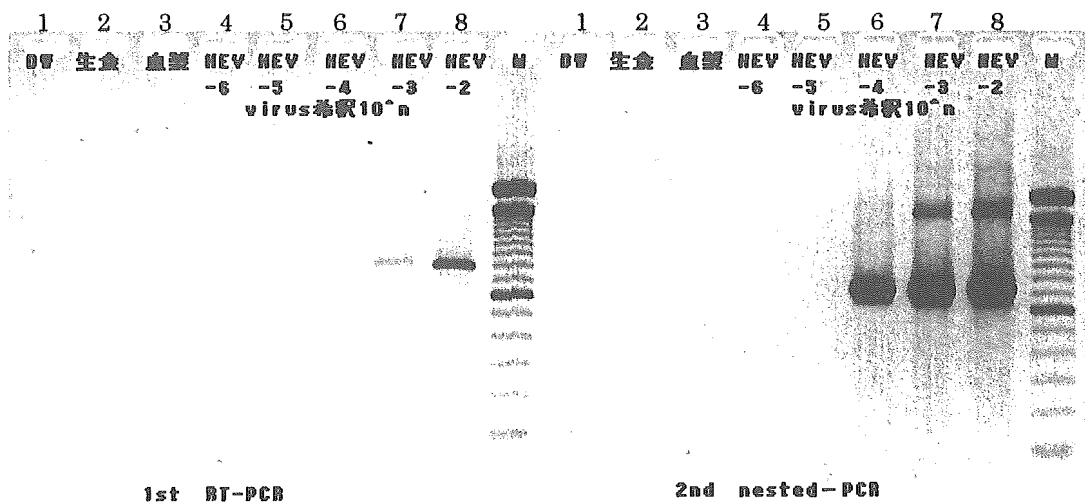


図5 HEV-NAT試験法による陽性HEV検体の測定
 1:DW; 2:生理食塩水; 3:陰性血漿; 4: HEV 10⁶希釈; 5: HEV 10⁵希釈; 6: HEV 10⁴希釈;
 7: HEV 10³希釈; 8: HEV 10²希釈。 HEVの希釈は生理食塩水を用いた。

10 20 30 40 50 60 70 80
 CAGGGACTTT CCAGAAGGGG CTGTAACCAA GGGAGGGACA TGGGAGGAGC TGGTGGGGAA CGCCCTCATA TTCTCTGTAT
 CAGGGACTTT CCAGAAGGGG CTGTAACCAA GGGAGGGACA TGGGAGGAGC TGGTGGGGAA CGCCCTCATA TTCTCTGTAT
 90 *Hind* III 100 110 120 *Pst* I 130 140 150 160
 AAATATAACC GCAAGCTTGC ATTGTACTTC GGTGCTCTG CAGAGAGGCT GGCAGATTGA GCCCTGGGAG GTTCTCTCCA
 AAATATAACC GCTAGCTTGC ATTGTACTTC GGTGCTCTG CAGAGAGGCT GGCAGATTGA GCCCTGGGAG GTTCTCTCCA
 170 180 190 200 210 220 230 239
 GCAGTAGCAG GTAGAGCCTG GGTGTTCCCT GCTAGACTCT CACCAGCACT TGGCCGGTGC TGGGCAGACG GCCCCACG-
 GCAGTAGCAG GTAGAGCCTG GGTGTTCCCT GCTAGACTCT CACCAGCACT TGGCCGGTGC TGGGCAGACG GCCCCACG

図6 作製したHIV-2 DNAの塩基配列

上段は作製したDNAの塩基配列、下段はHIV-2の塩基配列を示す。本遺伝子断片によるNAT試験への汚染の検出を目的として、一部配列（下線部）を置換し、本来存在しない制限酵素部位（*Hind* III ならびに *Pst* I）を入れた。これらの制限酵素部位の導入は、NAT試験実施時に発生した擬陽性結果の原因究明に有効である。なお、シーケンズ結果より、239番目の欠損が認められたが、使用には問題がないため、本DNAをRNAの作製に用いた。

HSV-1 Infectivity PCR

Virus (pfu)	Day 1	Day 3	Day 4
200	3/3	3/3	3/3
20	3/3	3/3	3/3
2	2/3	3/3	3/3
0.2	0/3	1/3	3/3
0.02	0/3	0/3	0/3

HSV-1 CPE Method

Virus (pfu)	Day 1	Day 3	Day 4
200	0/3	3/3	3/3
20	0/3	0/3	3/3
2	0/3	0/3	0/3
0.2	0/3	0/3	0/3
0.02	0/3	0/3	0/3

Polio-1 Infectivity PCR

Virus (copies/ml)	Day 1	Day 2	Day 3
1 x10 ⁵	3/3	3/3	3/3
1 x10 ⁴	3/3	3/3	3/3
1 x10 ³	2/3	3/3	3/3
1 x10 ²	2/3	1/3	0/3
1 x10 ¹	0/3	0/3	0/3

Polio-1 CPE Method

Virus (copies/ml)	Day 1	Day 2	Day 3
1 x10 ⁵	0/3	0/3	3/3
1 x10 ⁴	0/3	0/3	0/3
1 x10 ³	0/3	0/3	0/3
1 x10 ²	0/3	0/3	0/3
1 x10 ¹	0/3	0/3	0/3

図7 感染性PCR法によるHSV-1およびPoliovirusの感染性の高感度検出
 (各カラムの数値は検体数あたりの陽性数を示す)

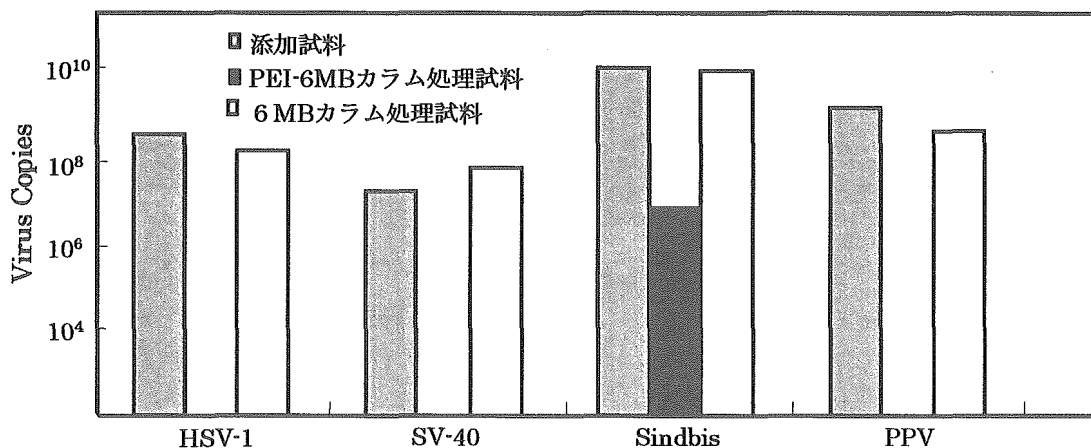


図8 PEI-セファロース6MBカラムを用いたウイルスの除去

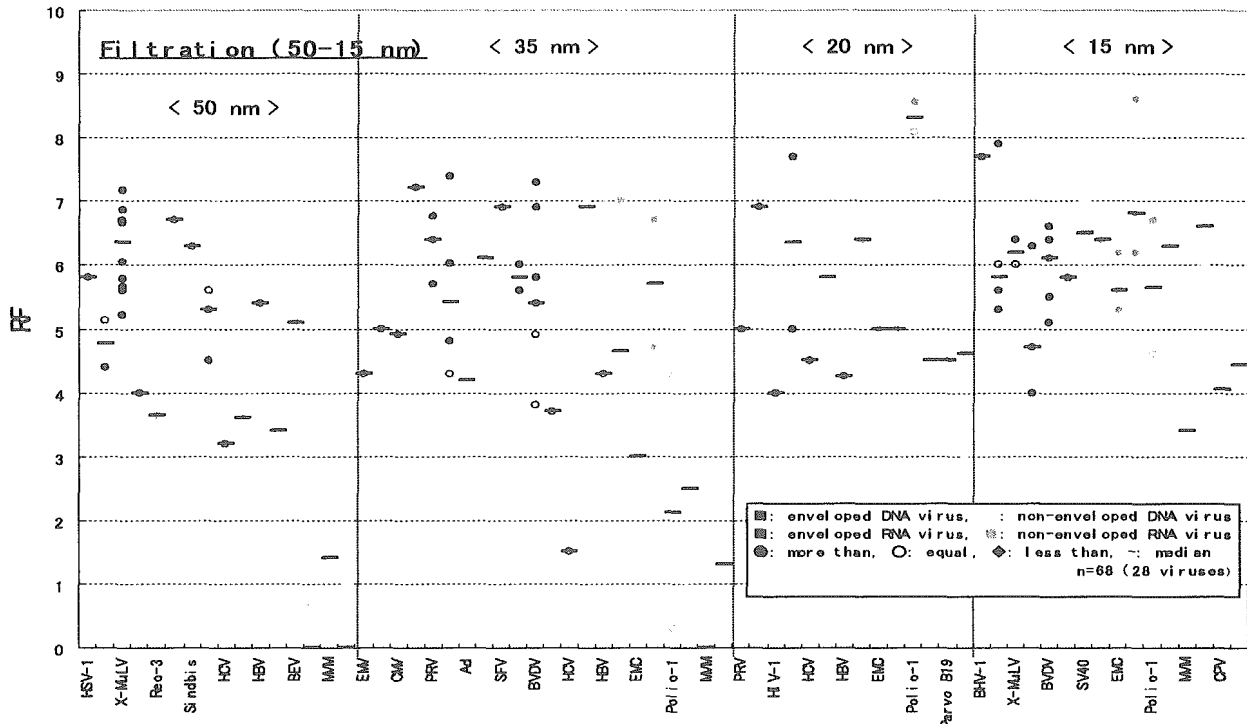


図9 ウイルスろ過工程（ナノフィルトレーション；ろ過膜孔径50～15nm）での各ウイルスに対するクリアランス能
（図中のウイルス名は各カラム毎に左から平均サイズが大きい順に並んでいる）

表2 ウイルスクリアランス試験に使用したウイルスの特性

ウイルス	種	サイズ (nm)	核酸	脂質膜	耐性
PRV	Herpes	120~200	DNA	あり	中
MuLV	Retro	80~110	RNA	あり	低
EMC	Picorna	25~30	RNA	なし	中
PPV	Parvo	18~24	DNA	なし	高

表4 クロマトグラフィー工程におけるウイルスクリアランス試験結果

	RF	
	run 1	run 2
PRV	>4.16	4.31
MuLV	>4.67	3.77
EMC	>5.91	3.81
PPV	3.28	2.49

表3 ナノフィルター（15nm）によるウイルスクリアランス試験結果

ウイルス	PFU/mL or FFU/mL				RF
	Start		Filtrated		
		log		log	
PRV	6.9×10^6	6.8	<10	<1	>5.6
	8.1×10^6	6.9	<10	<1	>5.8
MuLV	3.7×10^6	6.6	<10	<1	>5.5
	2.9×10^6	6.4	<10	<1	>5.4
EMC	7.8×10^6	6.9	<10	<1	>5.8
	6.4×10^6	6.8	<10	<1	>5.7
PPV	2.8×10^7	7.4	1.4×10^2	2.1	5.2
	1.8×10^7	7.2	3.7×10^2	2.6	4.6