

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261



KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640



## 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンス  
に関する研究



## 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 ウイルスの高感度検出のためのウイルス及びウイルスゲノム濃縮法の開発、ウイルス安全性対策としてのHEV及びHIV-2に対するNAT試験法の確立と評価、ウイルスの不活化・除去法の開発及びウイルスの不活化・除去工程のクリアランス能評価を実施した。

### 分担研究者

- |                               |       |
|-------------------------------|-------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所<br>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㈱<br>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濃縮の操作性、安定性の向上の検討及びヒト感染性ウイルスへの適用を検討した。また高感度ウイルスゲノム検出技術としての新プローブキャプチャー法の開発を検討した。
- (2) ウイルス安全性評価試験としての核酸増幅検査 (NAT) の確立・評価に関する研究: E型肝炎ウイルス (HEV) に対して構築した NAT 試験法のバリデーションを実施した。また合成ウイルス核酸を用いた HIV-2 の NAT 試験法の評価と変異型 HIV-2 の検出を検討した。
- (3) 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: PEI のウイルス結合能を利用したウイルス除去カラムの開発及びペンタデカフルオロオクタン酸 (PFOA) のウイルス不活化能の検討を行った。
- (4) ウイルスの不活化・除去能の評価法に関する研

究: 尿由来製品の製造工程におけるウイルスの不活化・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改良とヒト感染性ウイルスへの適用

(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。またヒト感染性ウイルスとして A 型肝炎ウイルス (HAV; FRhk-4 細胞を用いて *in vitro* 培養系で増幅したウイルス)、B 型肝炎ウイルス (HBV; 国内標準品) 及び C 型肝炎ウイルス (HCV; 国内標準品) 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 1ml または 10ml 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) ウイルス濃縮時の pH の影響に関する検討: DMEM + 5%FCS に pH の異なる Good 's buffer を添加し、最終濃度 20mM に調整した。作製した 5 種類の pH の異なる培地で希釈したモデルウイルスを用いて、常法により PEI 磁気ビーズによる濃縮を行い、濃縮効率を比較した。

#### B.2 新プローブキャプチャー法の開発

(1) oligo(dG) 磁気ビーズへの bridging nucleotide (BN) のアニール (1st hybridization) の方法: 反応液の組成は以下のとおり。

磁気ビーズ: 20  $\mu\text{g}$  (結合能 740 fmol) (2  $\mu\text{l}$ 、固形分 1%)、bridging nucleotide (BN): 3 pmol、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、100 mM NaCl、反応容量: 50  $\mu\text{l}$   
Step annealing protocol: 55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$  でこの順番にそれぞれ 1 分間ずつ加熱するサイクルを 50 回繰り返した後、4 $^{\circ}\text{C}$  までゆっくりと冷やした。反応後、アニールしていない BN を 45 $^{\circ}\text{C}$  の緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、100 mM NaCl) で数回洗浄して除いた。



用いた BN :

BN22 (CCCPET-22) : C<sub>28</sub>AGGCGGTAATACGGT  
TATCCAC, 28 + 22 mer

BN25 (CCCPET-25) : C<sub>28</sub>GATTAGCAGAGCGAG  
GTATGTAGGC, 28 + 25 mer

**Standard annealing protocol :** 上記のサイクルをやめて、単独の温度 (通常 65°C) で 1 時間加熱後、4°C までゆっくりと冷やした。その後、同様に洗浄した。定量的解析のため、BN は [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP と polynucleotide kinase で 5' 末端標識を行い、標識量と DNA 量の関係を実験ごとに検量線を用いて調べた。

(2) 検出するゲノムとのハイブリダイゼーション (2nd hybridization) : BN の結合した磁気ビーズ (beads-BN) と検出目的のゲノム、ここでは pET24a とのハイブリダイゼーションは以下のようにして行った。まず、pET24a の一本鎖 DNA への変性は、0.2 N NaOH で 25°C、10 分間処理後、低温下で中和した。このプラスミド DNA、10 pg あるいは 1 pg (1 pg = 1.7 x 10<sup>6</sup> 分子数) と beads-BON (磁気ビーズとして 20  $\mu$ g) を 0.5 M NaCl の塩濃度条件下 62°C、2 時間反応させた (反応容量 50  $\mu$ l)。その後、塩濃度と温度を下げながら 7 回洗浄することでハイブリダイゼーションしなかった pET24a を完全に除いた。最後にハイブリダイゼーションした pET24a を溶出させるため、70°C、0.1 x TE (20  $\mu$ l) で 10 分間加熱後、溶出回収した。

(3) PCR による検出 : 回収液 (2  $\mu$ l) に 6.6  $\mu$ M のプライマーと Takara Ex Taq DNA polymerase を用いてサイクル数 35 で増幅した。増幅サンプルをアガロース電気泳動にて検出した。

### B.3 E 型肝炎ウイルスの NAT 試験法の確立・評価

#### (1) HEV-NAT 測定系の概要

測定原理 : nested-PCR 法

増幅部位 : ORF 1 - ORF2 領域

検出方法 : 電気泳動法

測定試薬 : [抽出試薬] Ex-R&D (G&G サイエンス)、  
[増幅試薬] Super script one-step RT-PCR  
Platinum PCR super mix (インビトロジェン)

(2) 自家標準品の作製 : HEV 精製品 (HEV 感染カニクイサルの糞由来) から得られた RNA 抽出物についてランダムヘキサマーを用いて cDNA としたものをテンプレートとし、T7 プロモーターを付加したプライマーにより、PCR 反応を行い増幅させた。PCR 産物の電気泳動後、目的バンドのゲル切片についてカラム精製を行い、in vitro 転写により人工 HEV RNA を得た。人工 HEV RNA はシークエンスを行い配列を確認した。また吸光度の測定値から濃度及びコピー数を算出した。

### B.4 HIV-2 NAT 試験法の確立・評価

(1) HIV-2 RNA の作製 : HIV-2 の塩基配列 (Accession No.M15390) 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) 変異型 HIV-2 RNA の作製 : 変異型 1 については HIV2-GF 及び HIV2-G1 (図 6 a)、変異型 2 については HIV2-G2 及び HIV2-R (図 6 b) を用い、HIV-2 RNA 調製用プラスミドを鋳型とした PCR を行った。増幅した核酸断片から HIV-2 RNA の作製方法によりプラスミドを作製し、プラスミドから RNA を調製して変異型 1 及び 2 の HIV-2 RNA を得た。

(3) HIV-2 NAT 試験 : 逆転写及び PCR プライマーとして (HIV2-FB) (5' 末端をビオチン修飾したオリゴ DNA) 及び (HIV2-R) を用い、HIV-2 RNA に対し逆転写及び PCR を行った。PCR 終了後、増幅産物をプローブ固定プレートに加え、95°C、10 分間、さらに 55°C、60 分間加熱し、プローブに増幅したビオチン修飾 DNA 断片を結合させた。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンでビオチンを介し核酸断片を酵素修飾し、酵素反応による発色有無により HIV-2 の検出を行った。

### 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

プ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.8 生物薬品のウイルス安全性の評価

試験材料としては尿由来粗原料より製造される生物薬品の液状加熱処理工程加熱前及び加熱後試料、ろ過工程出発物質及び透過液を用いた。ウイルスろ過のモデルウイルスとして HAV、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、ブタパルボウイルス (PPV)、仮性狂犬病ウイルス (PRV) を用いた。クリアランス能の評価は液状加熱処理工程 (60°C、10 時間) およびろ過工程 : ナノフィルトレーション (孔径 15nm) について検討した。PPV はろ過工程の 2 本のナノフィルターを直列に配列したタンデムろ過のクリアランス能を評価した。なお、クリアランス試験に先立ち、各試料について予め細胞毒性およびウイルス干渉作用の有無を評価し、細胞毒性及びウイルス緩衝作用の認められない最小の希釈倍率によりウイルス感染



価の測定を行った。ウイルス感染価は HAV : FRhL-4 細胞の細胞変性効果、BVDV : EBTr 細胞でのプラーク形成能、PPV : PK-13 細胞 (液状加熱処理工程) または ST 細胞 (ろ過工程) の細胞変性効果、PRV : Vero 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、倫理面の問題は無い。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、倫理面での問題は無い。

### 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改良とヒト感染性ウイルスへの適用

生物由来製品のウイルス安全性確保には、高感度・高精度なウイルス検出手法の開発が非常に重要である。我々は、核酸増幅検査 (NAT) によるウイルス検出の高感度化を目的として、ポリエチレンジアミン (PEI) 結合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。昨年度は本法が種々のウイルスの高感度検出に有用であることを示すとともに、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法の最適化条件と濃縮機構について検討し、分子量 70,000 の PEI を結合した磁気ビーズを用いて、pH6 付近で濃縮を行った場合が最も高いウイルス濃縮効率が見られること、PEI 磁気ビーズ上での免疫複合体の形成により濃縮効率の向上が期待されることなどを報告した。今年度は、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法の改良として操作性向上および安定性向上に関する検討を行った。また、得られた最適化条件を用いて本法のヒト感染性ウイルスへの適用を検討した。

まず、ウイルス濃縮効率の粒径依存性について検討を行った。ウイルス捕捉効率に対する粒径の影響を見るため、平均粒径 0.8 $\mu$ m から 1.9 $\mu$ m の磁性粒子に PEI を結合し、ウイルス捕捉率を測定した。その結果、ウイルス濃縮効率は磁気ビーズの粒径に依存し、小粒径ほど濃縮効率が高いことが判明した (図 1)。これまで使用していた平均粒径 0.8 $\mu$ m よりも大粒径の粒子では、ウイルス捕捉効率が大幅に低下し、十分なウイルス捕捉性能が得られなかった。しかし、粒径が小さいと磁気分離に時間がかかり、操作性が低下することから、現在用いている 0.8 $\mu$ m の磁気ビーズが最適であると考えられた。

次に、ウイルス濃縮の安定性について検討した。PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮がビリルビンや乳びにより阻害される可能性があることを昨年度報告した。これらの阻害は、抗ウイルス抗体の添加や血漿のフィルター処理によって解消可能であった。また、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮効率が経時的に低下する現象も認められた。経時劣化後の PEI 磁性粒子は、見かけ上疎水的な状態となってい

た。そこで、経時劣化後の PEI 磁性粒子を再び塩酸処理し、その前後でのウイルス濃縮効率を評価したところ、濃縮効率の回復が認められ、塩酸処理で再生可能であることが判明した。

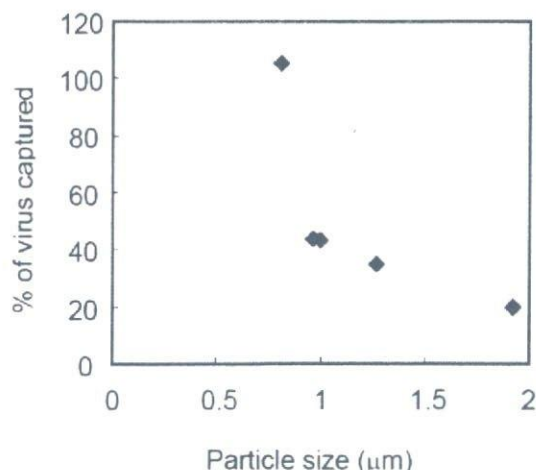


図 1 PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮の粒径依存性

一方、これまで得られた PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮の最適化条件を用いて本法のヒト感染性ウイルスへの適用を検討した (図 2)。その結果、HAV は PEI 磁気ビーズを用いてほぼ理論どおりに濃縮することが可能であり、pH や血清の影響は認められなかった。HBV は国内標準品 (ウインドウ期の血漿より調製したもの) を用いて検討したところ、1ml のウイルス液を用いて 5 倍以上の濃縮が認められたが、血清存在下では濃縮効率は低下した。HCV は国内標準品を用いて検討したところ、PEI 磁気ビーズにより効率よく濃縮できることが明らかになった。以上の結果より、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法はヒト感染性ウイルスである HAV、HBV、HCV にも適用可能であり、医薬品のウイルス安全性確保上問題となるこれらウイルスの高感度検出に有用な方法であることが明らかとなった。

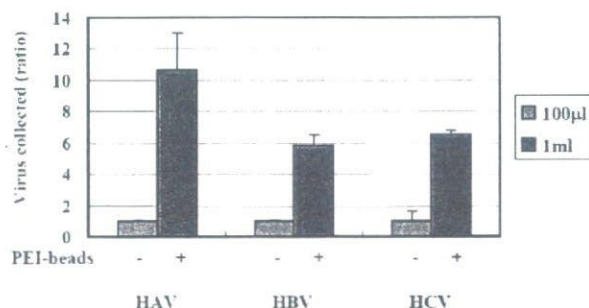


図 2 ヒト感染性ウイルスの PEI 磁気ビーズ濃縮

#### 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障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に加え、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。

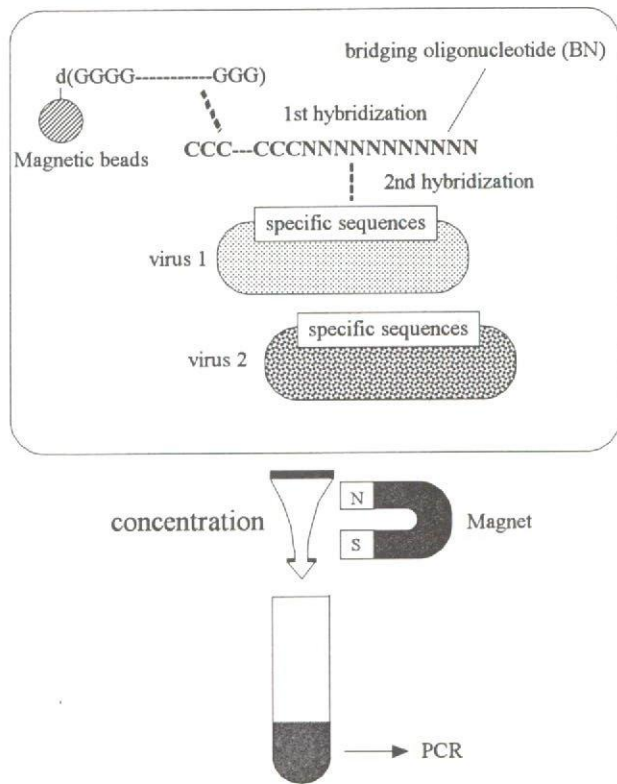


図 3 新プローブキャプチャー法

今年度は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て濃縮効率を定量的に解析し、ウイルスへの適用の基礎的条件検討を行った。

まず磁気ビーズと BN のハイブリダイゼーションについて検討した。磁気ビーズの種類による結合率を粒径が 2.0  $\mu\text{m}$  で磁気ビーズに d(G)<sub>40</sub> が 37 pmol/mg 結合した C370 と、粒径が 2.4  $\mu\text{m}$  と大きい d(G)<sub>40</sub> の結合量が 24 pmol/mg と少ない C378 で比較したところ、磁気ビーズ C370 では、用いた BN 両方で結合率が 1 を越えたが、C378 では、極め

て低い結合率であった。次にアニーリング温度を小刻みに変動させた Step annealing の方法と、温度を一定 (65°C) にした Standard annealing の方法では Standard annealing でやや結合率が低下したが大きな差はなかった。Standard annealing protocol で BN の量を一定にして、磁気ビーズと BN の比を変えたときの結合率および結合絶対量を検討したところ、結合率は、加える磁気ビーズが少ないほど高く、比を 1 にすると (磁気ビーズ 8  $\mu\text{l}$ ) 結合率はほぼ 50% になった。また、CCCPET-22 より CCPET-25 の方が結合率はわずかに良かった。実際に結合している BN の絶対量は、磁気ビーズを多くするにつれて増加した。また、Standard annealing protocol でのアニーリング温度を変えたときの結合率を検討したところ、60°C で結合率が 1 以上になり、70°C でもほぼ同じ結合率であった。55°C 以下では結合量は低下した。以上の結果より、磁気ビーズと BN のハイブリダイゼーションの条件として、磁気ビーズ容量 1  $\mu\text{l}$  (ビーズ:BN = 1:8) で 65°C、1 時間の反応で完全にビーズが BN で飽和して結合することがわかった。BN が量的に制約されているときはビーズ:BN=1:4 でもほぼ良好な結果が得られた。この方法を用いると昨年度行った Step annealing と比較して操作の簡略化、迅速化を図ることができた。

次に、beads-BN と目的ゲノムとのハイブリダイゼーションについて検討した。プラスミド pET24a の量を 1pg 以上としたところ、BN に CCPET-22 と CCPET-25 のいずれを用いた場合もほぼ同量の濃縮されたゲノムが検出された (図 4)。従って、検出するゲノムと相補的な BN の長さは 22 で十分であると思われる。また、用いたプラスミドの量に応じて PCR 産物の増加が認められた。今後、インプットのゲノム数を減らした場合の回収率、ゲノム側の一本鎖 DNA への変性の最適条件、ハイブリダイゼーションの洗浄条件、磁気ビーズへの非特異的吸着の検討、複数のゲノムを実際に正確にそれぞれ濃縮でき、定量的な解析が可能かどうか、などの検討を行う予定である。

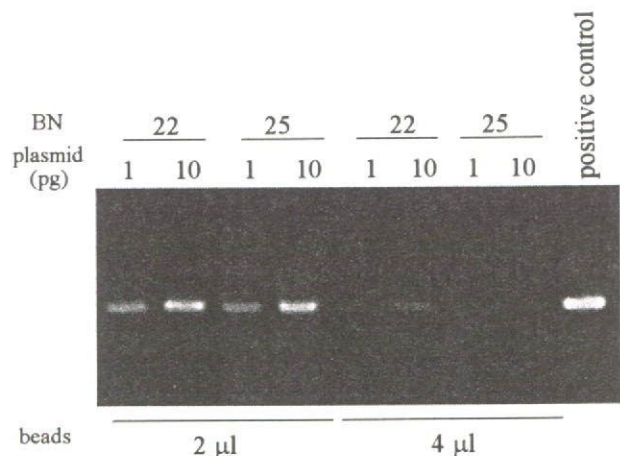


図 4 新プローブキャプチャー法による濃縮ゲノムの検出



## C.2 ウイルス安全性評価試験としての NAT 試験の確立・評価に関する研究

### C.2.1 E 型肝炎ウイルス (HEV) に対する 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最重要課題である。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 法による確認の必要性が生じている。昨年度は一般的にウイルス除去・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 E 型肝炎ウイルス (HEV) を対象に NAT 試験法の構築を行った。今年度は構築した NAT 測定系の妥当性を確認するために、NAT ガイドラインに準じてバリデーションを実施した。HEV はウイルスの標準品が存在しないため、人工 HEV RNA の自家標準品を作成して検討を行った。

3'	TGGAAGAA	ACATTCTGGT	GAGCCCGGCA	CTCTTCTATG	GAATACTGTG	TAGAATATGG	CC
4564	TGGAAGAA	ACACTTCGGT	GAGCCCGGCA	CTCTTCTATG	GAATACTGTG	TAGAATATGG	CC
63'	GTTATTAC	CCACTGTTAT	GACTTCGGCG	ATTTGCAGGT	GGCCTGCCITT	AAAGGTGATG	AT
4624	GTTATTAC	CCACTGTTAT	GACTTCGGCG	ATTTGCAGGT	GGCCTGCCITT	AAAGGTGATG	AT
123'	TCGATAGT	GCTTTGCAGT	GAGTATCGTC	AGAGTCCABG	AGCTGCTGTC	CTGATC8CCG	GC
4684	TCGATAGT	GCTTTGCAGT	GAGTATCGTC	AGAGTCCABG	AGCTGCTGTC	CTGATC8CCG	GC
183'	TGTGGCTT	GAAGTGAAG	GTGGATTTCC	GCCCGATC8G	TTTGTATGCA	GGTGTGTTGG	TG
4744	TGTGGCTT	GAAGTGAAG	GTGGATTTCC	GCCCGATC8G	TTTGTATGCA	GGTGTGTTGG	TG
243'	GCCCCCGG	CCTTGGCGCG	CTCCCTGATG	TTGTGCGCTT	G8CC888CC8G	CTTACC8GAA	AG
4804	GCCCCCGG	CCTTGGCGCG	CTCCCTGATG	TTGTGCGCTT	G8CC888CC8G	CTTACC8GAA	AG
303'	AATTGGGG	CCCTGGCCCT	GAGCG88CGG	AGCAGCTCCG	CCTCGCTGTT	AGT8ATTTCG	TC
4864	AATTGGGG	CCCTGGCCCT	GAGCG88CGG	AGCAGCTCCG	CCTCGCTGTT	AGT8ATTTCG	TC
363'	CGCAAGCT	CACGAATGTA	GCTCAGATGT	GTGTGGATGT	TGTTTCCCGT	GTTTATGGGG	TT
4924	CGCAAGCT	CACGAATGTA	GCTCAGATGT	GTGTGGATGT	TGTTTCCCGT	GTTTATGGGG	TT
423'	TCCCTTGG	GCTT8TTTCA	AACCTAATTG	GTATGCTACA	G8CTGTTGCT	GATGGCAAGG	CA
4984	TCCCTTGG	GCTT8TTTCA	AACCTAATTG	GTATGCTACA	G8CTGTTGCT	GATGGCAAGG	CA
483'	CATTTTCA	TGAGTCA8TA	AAACC88TGC	TGACTT8AC	AAATTC8AATC	TTGTG88CGG	TG
5044	CATTTTCA	TGAGTCA8TA	AAACC88TGC	TGACTT8AC	AAATTC8AATC	TTGTG88CGG	TG
543'	GAATGAAT	AACATGTCTT	TTGCTG8CGC	CAT888TTCG	CG8ACCAT8G8	CCCTCG8CCT	AT
5104	GAATGAAT	AACATGTCTT	TTGCTG8CGC	CAT888TTCG	CG8ACCAT8G8	CCCTCG8CCT	AT
603'	TTT8TTGC	TGCTCCTCAT	GTTTTT8CCT	AT8TT8CC8G	G8CCAC88CC	CG8TCA88CG	TC
5164	TTT8TTGC	TGCTCCTCAT	GTTTTT8CCT	AT8TT8CC8G	G8CCAC88CC	CG8TCA88CG	TC
663'	T88CC8TC	GT8GT888CG	G88CAG88CG	G8TT8888CG	GT88TTTCTG	G88TG888CG	GT
5224	T88CC8TC	GT8GT888CG	G88CAG88CG	G8TT8888CG	GT88TTTCTG	G88TG888CG	GT
723'	TGATTC8C	AG8CC8T8CG	AATCC8CTAT	ATT8AT8CAA	CGA888CCTT	CGC	
5284	TGATTC8C	AG8CC8T8CG	AATCC8CTAT	ATT8AT8CAA	CGA888CCTT	CGC	

【注】 上段：人工 RNA の配列、下段：Accession No.D10330 の配列  
「|」で繋がった部分は配列が一致していることを表す。  
下線付きの太字部分は不一致部分を表す。

図 5 人工 HEV RNA の配列

まず、合成した人工 HEV RNA についてシーケンスを行い、種々のジェノタイプの HEV と配列比較を行うために Blast 検索を実施した。ジェノタイプ I との一致率は 94~98% と高い値を示したが、タイプ II との一致率は 93.4%、タイプ III、タイプ IV との一致率はそれぞれ 81~82%、80% とタイプ I より低い値となった。一致率の最も高かった Accession No.D10330 との配列比較結果を図 5 に示

した。また、吸光度測定より、人工 HEV RNA のコピー数は  $2.73 \times 10^{14}$  copies/mL と算出された。本自家標準品を用いて、NAT ガイドラインに則って、以下のパラメータ取得を行った。

(1) 検出感度 (95% 陽性検出感度) の算出: 人工 RNA を用いて、本測定系の感度算出を行った。まず、予備検討を行い感度算出の希釈範囲を  $2.0 \times 10^8$ 、 $4.0 \times 10^8$ 、 $8.0 \times 10^8$ 、 $1.6 \times 10^9$  copies/mL の 4 系列に決定し、本試験を 5 日間実施した。得られたデータからプロビット法により、95% 陽性検出感度を算出したところ、 $3.65 \times 10^4$  copies/mL と算出された。以降のバリデーションデータ取得時には、NAT ガイドラインに則って、95% 陽性検出感度の 3 倍濃度である  $1.1 \times 10^5$  copies/mL の濃度を人工 RNA の陽性コントロールとして設定して測定を行った。

(2) 特異性確認: NAT 試験系の特異性を確認するために、陰性検体 100 検体を測定した結果、総ての検体が陰性と判定されたことから、本試験系の特異性が確認できた。

(3) クロスコンタミネーション否定: 95% 陽性検出感度の 100 倍濃度の人工 HEV RNA 10 検体と陰性検体 10 検体を交互配置して、測定を行った結果、陽性検体は陽性となり、陰性検体は陰性となったことから、本試験系においてはクロスコンタミネーションが起きていないことが確認できた。

(4) 頑健性確認: 中間製品 (プールプラズマ、クリオプレシピテート) 及び最終製品 (アルブミン、グロブリン、トロンビン、第 VIII 因子、フィブリノゲン) に関する頑健性を確認するために、サンプルに 95% 陽性検出濃度の 3 倍濃度の人工 RNA を添加することにより、添加回収試験を実施した。直接添加での検討ではトロンビンとフィブリノゲン以外の製剤は添加回収試験が成立しなかった。これは、自家標準品が RNA であり、分解を受けていることが主な要因であると考えられた。そこで、検体と最初に混和する抽出試薬に予め必要な自家標準品を添加しておき、間接的に検体に添加する方法により、頑健性予備試験を実施した。その結果、第 VIII 因子、アルブミンについては希釈が必要であるが、その他の製剤については原液での測定が可能であった。この条件で製剤での添加回収試験による頑健性確認を行ったところ、アルブミン、フィブリノゲンについては希釈倍率の変更が必要であったが、総ての製剤についての頑健性が確認できた (表 1)。

表 1 HEV NAT 試験法の頑健性成績一覧

製剤名 (希釈倍率)	検出率 (陽性数 / 測定数)	
	添加	未添加
プールプラズマ	20 / 20	0 / 20
クリオプレシピテート	20 / 20	0 / 20
グロブリン	20 / 20	0 / 20
トロンビン	20 / 20	0 / 20
第 VIII 因子 (×5)	20 / 20	0 / 20
アルブミン (×10)	20 / 20	0 / 20
フィブリノゲン (×5)	20 / 20	0 / 20



以上の結果より、NAT ガイドラインに従って確立した HEV NAT 試験法の NAT パリテーションを実施し、HEV NAT 試験法の妥当性を確認した。

### C.2.2 HIV-2 に対する NAT 試験法の確立・評価

生物由来製剤の原料等においては、安全性確保を目的にウイルス遺伝子の検出法としての NAT 試験が実施されているが、新たなウイルスの発生に対応した NAT 試験実施の必要性が生じている。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が、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 試験の評価をセンス単鎖 RNA を有する HIV-2 ウイルスを対象に実施した。

作製した HIV-2 RNA について NAT 試験を実施し、検出感度を確認したところ、5copy (逆転写及び PCR に供した RNA 量) まで、HIV-2 RNA を検出することが可能であった (表 2)。

表 2 HIV-2 NAT 試験における HIV-2 RNA 及び変異型 HIV-2 RNA の検出感度の比較

RNA	NAT 試験に供した HIV-2 RNA 量		
	10copy	5copy	0copy
HIV-2 RNA	15/15	15/15	0/15
HIV-2 RNA 変異型 1	6/6	6/6	—
HIV-2 RNA 変異型 2	6/6	6/6	—

表内は検出数/試験回数を表す

次に、遺伝子型の異なる変異型 HIV-2 の検出について検討した。NAT 試験でのプライマー及びプロブの設計時には、データベースに報告されている配列を基に遺伝的によく保存されているウイルスゲノムの領域を選択するが、完全に一致した配列にならない場合も多々ある。この場合、遺伝子型についてのパネルが配布されているごく一部のウイルスについては実際に測定することにより、遺伝子型の違いによる NAT 試験への影響を確認することが可能であるが、それ以外については確認が困難である。本検討では、遺伝子型の影響が NAT 試験の検出感度に影響を及ぼすと考えられるプライマー領域に注目し、その部位の変異が認められる遺伝子型においても検出可能であるか否かについて、2種類の変異型 HIV-2 RNA を作製した (図 6)。作成した変異型 HIV-2 について NAT 試験を実施したところ、NAT 試験の検出感度に遺伝子型による違いは認められず、報告されている変異については検出感度に影響を及ぼすものではないことが確認された。(表 2)。従って、今回作

製した核酸は、入手が困難なウイルスに対する NAT 試験の評価 (検出感度及び変異型への特異性) に有用であり、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 試験の検証が可能であった。

(a) HIV-2 NAT 試験のプライマー (HIV-2-R) 部位での変異

HIV-2 RNA	ACTCTCACCAGCACTTGGCC
A05350	ACTCTCACCAGT <u>TT</u> CTTGGCC
AF082339	ACTCTCACCAGT <u>TT</u> CTTGGCC
J03654	ACTCTCACCAGT <u>TT</u> CTTGGCC
J04498	ACTCTCACCAGT <u>TT</u> CTTGGCC
L07625	ACTCTCACCAGCACTTGGCC
L36874	ACTCTCACCAGCACTTGGCC
M30502	ACTCTCACCAGTACTTGGCC
U22047	ACTCTCACCAGTACTTGGCC
U27200	ACTCTCACCAGCACTTGGCC
X05291	ACTCTCACCAGCACTTGGCC
M15390	ACTCTCACCAGCACTTGGCC
HIV-2 RNA 変異型 1	ACTCTCACCAGT <u>TT</u> CTTGGCC
プライマー (HIV-2-G1)	TGACACTCGTCCACCAACCGGCCACC

(b) HIV-2 NAT 試験のプライマー (HIV-2-FB) 部位での変異

HIV-2 RNA	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
A05350	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
AF082339	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
J03654	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
J04498	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
L07625	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
L36874	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
M30502	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
U22047	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
U27200	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
X05291	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
M15390	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
HIV-2 RNA 変異型 1	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC
プライマー (HIV-2-G2)	CTTTCAGAAAGGGGCTGTAAC

図 6 HIV-2 NAT 試験のプライマー部位での変異

HIV-2 NAT 試験のプライマー (HIV-2-R 及び HIV-2-FB) 部位での HIV-2 RNA の配列及び、データベースより入手した Accession No. A05350~M15390 の配列を示す。これらの配列中の HIV-2 RNA と異なる部位を下線部で示した。さらに、HIV-2 RNA 変異型 1 及び 2 の配列、並びに変異型 1, 2 調製用のプライマー (HIV-2-G1 及び HIV-2-G2) の配列も示した。

## 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

### C.4.1 PEI のウイルス結合能を利用したウイルス除去法の開発

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を応用したウイルス除去法の開発について検討を行っている。昨年度は、PEI を結合したセファロース 6MB (PEI-S-6MB) カラムを作製し、モデルウイルスの除去能を検討した結果、効率よいウイルスの除去が可能であることを明らかにした。しかし、生物由来製品の製造工程中にウイルス除去工程として本カラムを用いる場合、製品本体のタンパク質や血清等の添加物中に含まれるタンパク質の吸着が問題となる。そこで今年度は、PEI-S-6MB カラムへのタンパク質の吸着を検討した。まず、血清タンパク質について検討したところ、



BSAやIgM抗体はPEI-S-6MBカラムに結合するが、IgG抗体は結合が認められないことが判明した。また、生物由来製品の例として、ヒト成長ホルモン(hGH)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)の3種類のサイトカイン類についても同様に吸着の有無を検討した。その結果、GM-CSFはPEI-S-6MBカラムに結合が認められたが、hGHはカラムとの相互作用はあるが遅れて溶出されてくること、またG-CSFはPEI-S-6MBカラムには結合しないことが

判明した(図7)。以上の結果より、PEI-S-6MBカラムによりウイルスが効率よく除去可能であるが、血清タンパク質やサイトカイン類のカラムへの吸着を検討したところ、カラムに結合するものとしないうものに分類可能であった。このことは、あらかじめ吸着の有無を検討し、カラムに結合しないものについてはウイルス除去工程としてPEI結合カラムが適用の可能性が考えられる。今後、pH等の条件検討による最適なウイルス除去条件の確立を行う予定である。

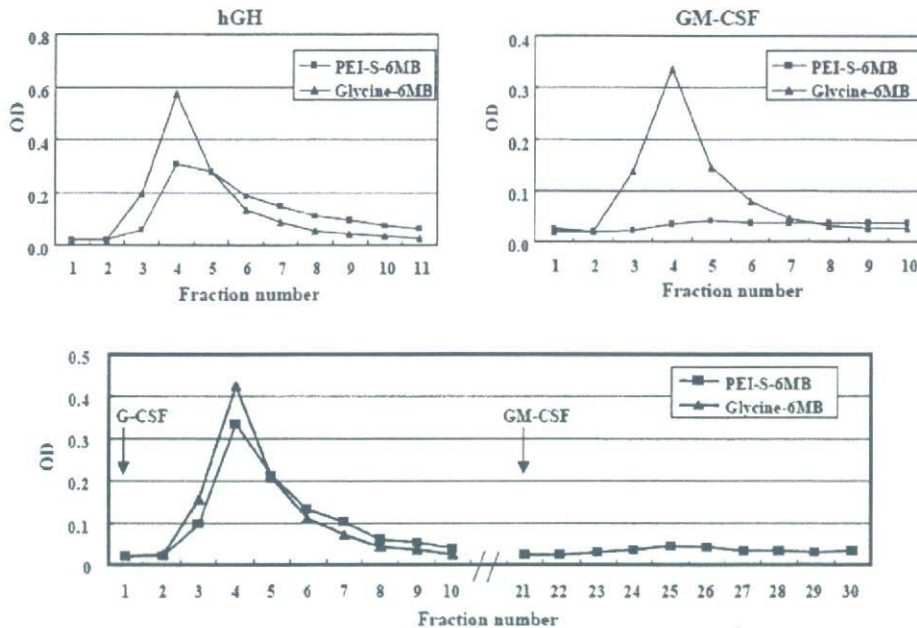


図7 PEI結合セファロースカラムへのサイトカイン類の吸着

#### C.4.2 ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)は様々な基材の耐水性表面加工原料として用いられている界面活性剤で、そのポリマーは耐水性に優れている。ウイルスの不活性化工程のひとつにS.D. (solvent/detergent)処理が用いられているが、PFOAはS.D.処理で用いられる界面活性剤に代わるウイルス不活化作用を持つ可能性があることから、PFOAのウイルス不活化作用を検討した。

まず、ウイルス不活化(ウイルス膜可溶性)のモデル実験として、ヒト赤血球の溶血反応を検討したところ、PFOA 5mMでは30秒以上で溶血が起こること、反応温度は10-20°Cで活性が高いこと、pHは6-8で溶血活性が高いことが明らかとなった。また、界面活性剤を吸着する性質を持つdefatted BSAを1%以上添加するとPFOAの溶血活性は阻害された。PFOAの細胞毒性を検討したところ、5mM以上では細胞は完全に死滅したが、PFOA 1.25mM以下では細胞の生存率に影響が認められなかった。そこで、ウイルス感染試験ではPFOAの最終濃度が1mM以下に希釈して検討した。

次に、PFOAによるウイルスの感染性への影響を

検討した。まず、PFOAによるウイルス不活化の濃度依存性を検討した(図8)。その結果、エンベロープウイルス(HSV-1、VSV、Sindbis)について最大で6-7桁のウイルスクリアランスという有効な効果が認められた。一方、非エンベロープウイルス(PoliovirusおよびPPV; データは示さず)に対してはPFOAによる不活化効果は認められなかった。これはPFOAが界面活性剤であり、ウイルスエンベロープを溶解することがその作用機序であることを考えると妥当である。

次に、ウイルス不活化のtime courseを検討したところ、不活化に必要な時間はウイルスにより大きく異なり、PFOAの感受性の高いHSV-1ではわずか10秒の処理でも感染性が完全に消失したが、Sindbis virusやVSVの不活化には10分以上の処理時間が必要であることが判明した。耐性の高いウイルスを不活化するには処理時間を十分に取る必要があることが示唆された。

また、PFOAで処理する際のpHの影響を検討したところ、HSV-1では特に見られなかったが、VSVでは、溶血反応の結果とは逆に酸性条件で最も強い不活化効果が認められた。(図9)。しかし、酸性条件下では不安定な生物薬品もあることから、不活化

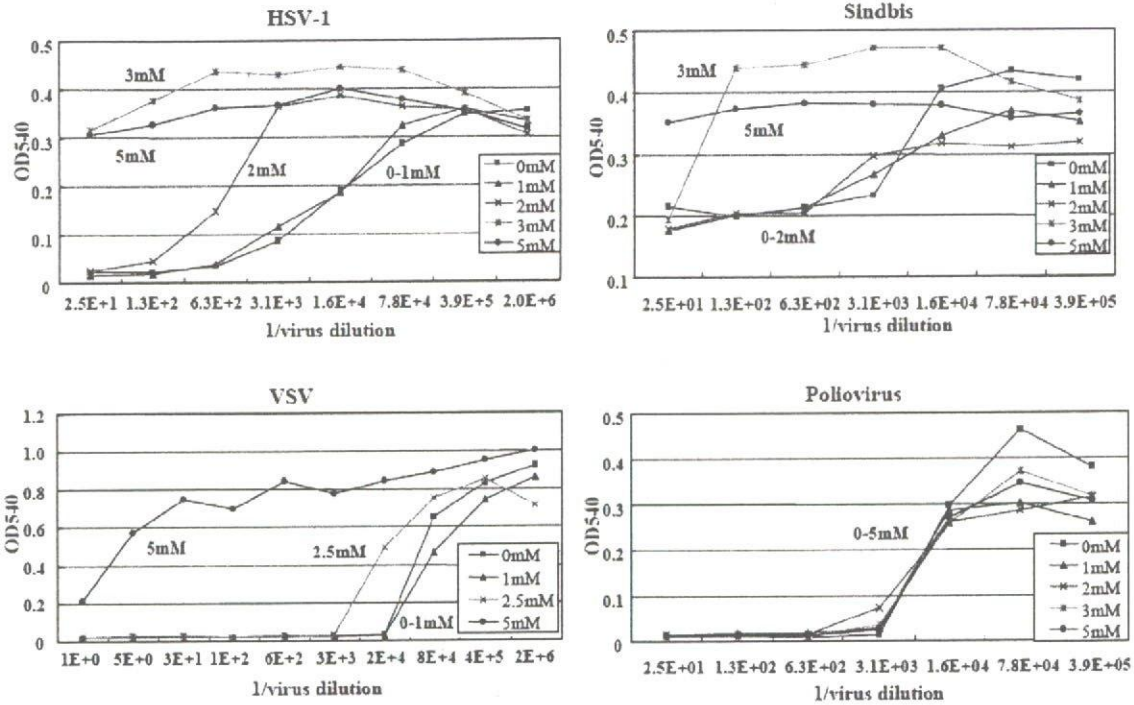


図8 PFOAによるウイルス不活化の濃度依存性

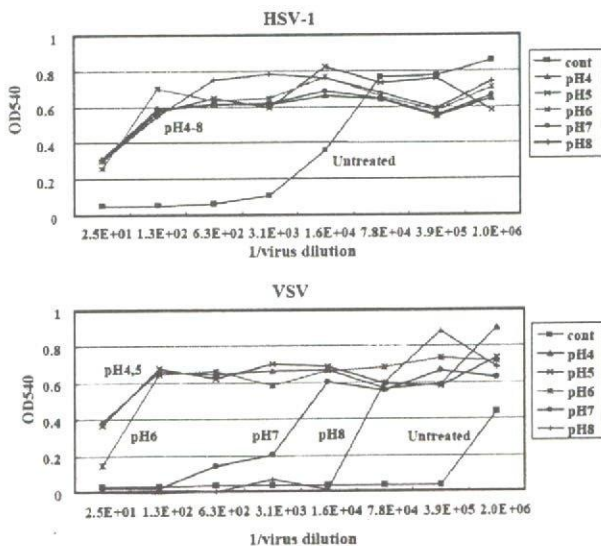


図9 PFOAによるウイルス不活化に対するpHの影響

工程としてPFOAを用いる場合には、製品の特性に応じた条件を選択する必要があると思われる。

以上の結果より、PFOAによるウイルス不活化は生物由来製品のウイルス不活化工程として有用である可能性が示唆された。今後、他の溶剤との併用を含め、さらに検討を行う予定である。

### C.5 生物製品のウイルス安全性の評価

生物製品のウイルス安全性を確保するためには、生物由来原材料の慎重な選択と管理、及び適切な段

階におけるウイルス試験の実施などが必要であるが、ウイルス試験の限界や原材料におけるウイルス潜在・迷入の可能性を考慮に入れると、更に、万が一ウイルスが混入した場合にもそれを除去又は不活化できる工程を導入すること、並びにそれら製造工程のウイルスクリアランス能を評価することが重要である。そこで、尿由来粗原料より製造される生物薬品について、その製造工程に導入されている液状加熱処理工程（60℃、10時間）及びろ過工程（ナノフィльтраーション：孔径15nm）におけるウイルスクリアランス能を評価した。モデルウイルスとして、ウイルスサイズ、ゲノム（核酸）、エンベロップの有無及び耐性の異なる4種のウイルスを選択した（表3）。なお、熱耐性が高くかつ小型粒径のPPVについては両工程で高いクリアランスが期待できないため、ウイルスろ過膜を2段直列に設置したタンデムろ過工程を設定することを想定し、そのウイルスクリアランス能を評価した。

表3 ウイルスクリアランス試験に使用されたウイルスの特性

ウイルス名	種	サイズ (nm)	核酸	エンベロップ	耐性
HAV	Picornia	25-30	RNA	なし	高
BVDV	Flavi	50-70	RNA	あり	低
PPV	Parvo	18-24	DNA	なし	高
PRV	Herpes	120-200	DNA	あり	中

液状加熱処理工程（60℃、10時間）のLog Reduction Value (LRV)はHAV、BVDV、PRVの3



種のウイルスにおいては 5.4 以上と高いウイルスクリアランス能を有していた。しかし、PPV では 2 回の平均値が 1.79 と低いものであった。液状加熱処理工程のウイルス不活化のカイネティクスも検討したところ、最も不活化の速かった PRV では、室温から 60°C に達するまでの昇温の間 (約 45 分間) でウイルスは検出限界以下まで不活化された。次いで不活化速度の速かった BVDV では、60°C に達してから 2 時間後にウイルスは検出限界以下まで不活化された。また、HAV では、60°C に達してから 5 時間後にウイルスは検出限界付近まで不活化されたが、PPV では加熱によるウイルスの不活化は緩やかであった。

一方、ろ過工程は HAV、BVDV、PRV の 3 種のウイルスにおいてはシングルろ過で 4.7 以上と高いウイルスクリアランス能を有していた。PPV については、シングルろ過工程では 4.20 であったがタンデムろ過工程による PPV ウイルスクリアランスは 7.0 を超えるクリアランスが得られ、PPV の液状過熱処理工程の LRV は 1.8 とタンデムろ過工程の組み合わせによる LRV の合計は 8.8 を超える値が得られた。

以上の結果を表 4 にまとめた。原理の異なる製造工程における総ウイルスクリアランス能を算出した結果、すべてのウイルスにおいて高いクリアランス能を得ることができた。また、PPV においてタンデムろ過工程の有用性が明らかとなった。

表 4 尿由来製品の全工程における  
ウイルスクリアランス試験結果

工程	LRV			
	HAV	BVDV	PPV	PRV
液状加熱処理 (60°C、10hours)	5.35	5.36	1.79	6.66
ろ過 (シングル)	6.34	4.67	4.20	6.52
ろ過 (タンデム)	n.d.	n.d.	>7.02	n.d.
全工程 (合計)	11.69	10.03	>8.81	13.18

n.d.: not determined

## 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の操作性向上と安定性向上に関する検討を行い、ウイルス濃縮効率が粒径に依存し、粒径が小さいほど高効率であること、また経時的なウイルス濃縮効率の低下は粒子の塩酸処理で再生可能なことを明らかにした。また PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮の最適化条件をヒト感染性ウイルスに応用し、生物由来製品の安全性確保上問題となる HAV、HBV、HCV がいずれも PEI 磁気ビーズにより効率よく濃縮できることを明らかにした。

2. ウイルスゲノム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検討し、ウイルスゲノムを結合させる磁気ビーズと BN の 1 段階目のハイブリダイゼーションの条件を決定した。また、ゲノム DNA として

プラスミドを用いたモデル基礎実験で低濃度の溶液から回収し、ゲノムの濃縮が検出された。

3. ウイルス安全性評価試験としての NAT 試験法の確立・評価に関する研究として、独自に構築した E 型肝炎ウイルスに対する NAT 試験系について、測定系の感度を始めとした NAT バリデーションを実施し、当該試験系の妥当性が確認できた。また、当該試験系を用いて、血漿分画製剤の中間製品及び最終製剤が HEV 陰性であることを確認することが出来た。

4. ウイルス安全性評価試験としての NAT 試験法の確立・評価に関する研究として、HIV-2 に対する NAT 試験法を確立し、遺伝型が異なっても同等の検出感度で検出可能なことを示した。また、HIV-2 のように入手困難なウイルスに対する NAT 試験法の確立の際、ウイルス検体の代用として合成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。

5. ウイルスの除去法に関する研究として、PEI 結合カラムの特性を検討し、PEI 結合カラムにはウイルスは吸着するが、タンパク質では結合するものではないものに分類可能であり、生物由来製品のウイルス除去カラムとしての適用可能性が示唆された。

6. ウイルスの不活化に関する研究として、PFOA のウイルス不活化効果を検討し、エンベロープウイルスに対して高い不活化効果を示すことを明らかにした。

7. ウイルスの不活化・除去能の評価法に関する研究として、尿由来の生物薬品の製造工程のうち液状加熱処理工程、ろ過工程 (ナノフィルトレーション) 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。また小型非エンベロープウイルスに対するタンデムろ過工程の有用性を明らかにした。

## 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.* 28, 905-907 (2005)
- 2) 水沢左衛子、岡田義昭、堀内善信、田中建志、佐藤功栄、金子健二、佐々木祐子、田中利明、伴野丞計、友水健雄、速水照一、土方美奈子、平子一郎、真弓忠、三上貢一、三代俊治、宮本誠二、牟田健吾、Thomas Weimer、Todd Gierman、小室勝利、山口照英：C 型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製. *輸血学会雑誌* 51, 515-159 (2005)

### 2. 学会発表

- 1) 山口照英：遺伝子治療用ベクターの安全性に関する最近の動向 (ICH 専門家会議), 第 5 回日本



医薬品等ウイルス安全性研究会シンポジウム  
(2005、12、16、東京)

- 2) 内田恵理子、小木美恵子、米須杏子、永田龍二、  
村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、山  
口照英：医薬品のウイルス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法の  
ヒトウイルスへの適用ー；日本薬学会第 126 年  
会 2006 年 3 月（仙台）

G. 知的財産権の出願／登録状況

該当なし

---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社