

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅰ）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonics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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
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 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉 里 勝 利 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗 …… 449
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 …… 466
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 謙 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 兒 …… 566
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 …… 576

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 PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法の開発、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 NAT の開発、PFOA によるウイルス不活化法の開発及びウイルス不活化・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
生物薬品部 | 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ヒト肝炎ウイルスへの適用と磁性粒子の改良を検討した。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：合成ウイルス RNA の保存安定性を検討した。またパルボ B19 の全てのジェノタイプが検出可能な試験法を開発した。
- (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：パー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：ウシ原料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ヒ

ト肝炎ウイルスへの適用と磁気ビーズの改良

(1) ウイルス

A 型肝炎ウイルス (HAV) は、ATCC (strain HM175/18f) より入手後、FRhK-4 細胞を用いて *in vitro* 培養系で 9~11 日間増幅した培養上清を試料として用いた。B 型肝炎ウイルス (HBV) は、HBV DNA 第 1 次国内標準品 (genotype C, 力価: 4.4×10^6 IU/ml) 及び HBV 国内ジェノタイプパネルを用いた。C 型肝炎ウイルス (HCV) は、第 1 次国内標準品 (ジェノタイプ HCV-1b, 力価: 100,000IU/ml) を用いた。

(2) ウイルスの PEI 磁気ビーズによる濃縮

PEI 磁気ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズ (粒径 $0.8 \mu\text{m}$) に、平均分子量 70,000 の PEI を水溶性カルボジイミド存在下でカップリングして作製した。

ウイルスの濃縮は、ヒト正常血漿またはヒト正常血清で希釈したウイルス液 1ml を用いて行った。ヒト正常血清をフィルターろ過する場合は $0.22 \mu\text{m}$ の PVDF 膜でろ過して使用した。ウイルス液 1ml に PEI 磁気ビーズ溶液 $100 \mu\text{l}$ (5mg の磁気ビーズを含む) を添加混合し、10 分間反応後、PEI ビーズを含む懸濁液を磁性スタンドにセットして 5 分間の磁気分離を行った。上清を除去した PEI 磁気ビーズ画分、もしくは PEI 磁気ビーズ処理をしていないオリジナルのウイルス液 $100 \mu\text{l}$ にウイルスゲノム抽出液 (スマイテスト EX-R&D、㈱医学生物学研究所) を加え、添付プロトコルに従ってウイルス核酸を抽出した。なお、PEI 磁気ビーズは PCR 反応を阻害するため、抽出の途中で遠心ろ過フィルター (孔径 $0.22 \mu\text{m}$) を用いて除去した。

(3) ウイルスゲノムの定量

抽出したウイルス核酸は 10mM Tris/1mM EDTA (TE) $50 \mu\text{L}$ あるいは $100 \mu\text{L}$ に溶解し、そのうちの $10 \mu\text{L}$ を PRISM 7000 (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム定量 PCR/RT-PCR により定量した。HAV, HCV のリアルタイム定量 RT-PCR には Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen) を、HBV のリアルタイム定量 PCR には Platinum Quantitative PCR Super Mix-UDG with ROX (Invitrogen) を用いた。また、HCV の検出感度を検討する際には 2 段階 PCR を行った。

(4) 抗 HBV-IgM 抗体 の 作成

adr サブタイプ及び adw サブタイプの 2 種類 の 組 換 え HBV 表面抗原(HBV_sAg; Advanced Immuno Chemical 社) を 混 合 してウサギに免疫した。IgM タ イ ターが上昇した免疫後 10 日目に採血し、抗 HBV_sAg-ウサギ抗血清を得た。抗血清は等量の PBS で希釈後、PEI セファロース 6MB カラムにアプライ し、20ml の PBS で素通り画分を溶出後、1.4M NaCl/100mM HEPES (pH 7.0)でカラム結合画分を 溶出した。結合画分を回収し、PD-10 カラムで脱塩 後、ImmunoPure IgM purification kit (Pierce 社) を用いて IgM を濃縮し、抗 HBV-IgM 抗体として使 用した。

(5) 磁気応答性の測定

吸光度を 1.0 にあわせた磁性粒子分散液を光学セ ルに入れ、その光学セルを分光光度計のセルホルダ ーにセットした。セルホルダー側面に永久磁石を設 置すると同時に、分光光度計のタイムコース計測を 開始し、吸光度の時間変化を 5 分間測定した。吸光 度が 0.5 になるまでの時間を 50%磁気分離時間、吸 光度が 0.1 になるまでの時間を 90%磁気分離時間と 定義し、測定結果からその値を読み取り磁気応答性 の指標とした。

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)

反応液の組成は以下のとおり。

{	磁気ビーズ 20 μg (結合能 740 fmol)
	(2 μl, 固形分 1%)
	bridging nucleotide (BN) 3 pmol
	20 mM Tris-HCl (pH7.5)
	100 mM NaCl
反応容量 50 μl	

Standard annealing protocol : 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。 反応後、アニールしていない BN を 45°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)
C₂₈AGGCGGTAATACGGTTATCCAC 28 + 22 mer
- BN25 (CCCPET-25)
C₂₈GATTAGCAGAGCGGATATGTAGGC 28 + 25 mer

(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 (pET24a, pRL-TK, pHAT10) 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、プラスミドの一本鎖 DNA への変性は、95°C で 10 分間加熱処理後急冷した。このプラスミド DNA、 20 pg (1 pg = 1.7 x 10⁵ 分子数) と beads-BN (磁 気ビーズとして 20 μg) を 20 mM Tris-HCl (pH7.5)、

0.5 M NaCl の条件下 65°C、2 時間反応させた (反 応容量 50 μl)。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つ 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 μl) で 10 分間加熱後、溶出回収した。

(3) PCR による検出

回収液 (2 μl) に 6.6 μM のプライマーと Takara Ex Taq DNA polymerase を用いてサイクル数 35 または 32 で増幅した。増幅サンプルを 2%アガロース電気 泳動にて検出した。

B.3 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 で HIV-2 RNA を保存 (-80°C) した。

(2) HIV-2 NAT 試験

逆転写及び PCR プライマーとして、HIV2-FB : CTTTCCAGAAGGGGCTGTAAC (5' 末端をビオチ ン修飾したオリゴ DNA) 及び HIV2-R : GGCCAAG TGCTGGTGAGAGT を用い、Super Script III One Step RT-PCR with Platium Taq DNA Polymerase (Invitrogen)により、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 (HIV2-p:TCGTCCCTTGTGGGTCCGAGATGGA CGAT) 固定プレートに加え、95°C、10 分間、次い で 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。さらに、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。

(3) パルボウイルス B19 NAT 試験

パルボウイルス B19 陽性血漿 (オランダ赤十字中 央研究所 (CLB) より入手したウイルス検体) から QIAamp Virus Spin Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。抽出した試料について、PCR プライマ ーとして、P19F1 : AGCAGTGGTGGTGAAGCTC (5' 末端をビオチン修飾したオリゴ DNA) 及び P19R2 : CCGACAAATGATTCTCCTGAA を用い、

Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)により、PCRを行った。PCR終了後、増幅産物をプローブ (P19P1: GTACTAGAGCGCGGGTTTC) 固定プレートに加え、95℃、10分間、次いで55℃、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。さらに、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の有無によりパルボウイルスB19の検出を行った。

B.4 パーフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

(1)モデルウイルス

エンベロープウイルスである単純ヘルペスウイルスI型 (HSV-1)、シンドビスウイルス (Sindbis)、ウシ水疱性口内炎ウイルス (VSV)、及びエンベロープを持たないウイルスであるポリオウイルス (Poliovirus) sabin 1型を用いた。

(2)ウイルス感染試験

各ウイルスをPFOA (濃度の検討時以外は5mM) で処理した。タイムコースを検討する場合は、一定時間後に脱脂BSA 1.5%を含むPBSを添加して反応を停止した。PFOA処理後、ウイルスは5倍希釈液を作成した。Vero細胞を96 well plateに 8×10^3 細胞/well播種して一晚培養後、ウイルス希釈液100 μ lを接種して感染させ、2~3日間培養した。培養後、最終濃度0.01%のニュートラルレッドを添加し、さらに2,3時間培養した。色素を抽出後、540nmの吸光度測定により細胞変性効果(CPE)を定量化して、TCID₅₀を算出した。

B.5 生物薬品のウイルス安全性の評価

(1)モデルウイルスの選択とウイルス力価測定

試験に用いられる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以下の4種のウイルスを選択し、ろ過工程、クロマトグラフィー工程の評価に用いた。Pseudorabies virus (PRV)、Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)、HAV、Porcine Parvovirus (PPV)。

ウイルス力価は感受性細胞に対する感染性で測定した。

(2)ウイルスクリアランス試験

[ろ過工程]

凍結融解した試験試料液45mLにウイルス液5mLを攪拌しながら添加した液を出発物質とした。次に、この液を1mol/L塩酸にてpHを4.2~4.3に調整し、メンブランフィルター(孔径0.2 μ m)でろ過した液を「メンブランフィルターろ過後液」とした。このメンブランフィルターろ過後液をナノフィルター(孔径15nm)によりろ過(操作圧0.6kg/cm²)を行った。ろ過工程終了後、ろ過液のpHを1mol/L水酸化ナトリウム溶液を用いて5.0~5.5に調整したものを「ナノフィルターろ過後液」とし、ろ過液量を測定後、ウ

イルス力価測定に供した。なお、ナノフィルトレーションは実工程の1/1000のスケールダウン、メンブランフィルターによるろ過は、実工程の1/560にスケールダウンして行った。

[クロマトグラフィー工程]

カラムクロマトグラフィーにおける線流速は、被精製物質の樹脂との接触時間を決定するパラメーターであり、分離特性に大きな影響を与える因子であることから、本ウイルスクリアランス試験においては、実工程におけるカラム高(60cm)を維持したまま、カラム口径のみを1/133にスケールダウンし、実工程と同じ線流速にて試験を行った。

(3)希水酸化ナトリウム浸漬によるウイルス不活化効果の確認試験

試験には、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が豚パルボウイルスと同等と考えられる犬パルボウイルス(CPV)をモデルウイルスとして選択した。アルカリ処理は、水酸化ナトリウムをMilliQ水にて溶解し、1/9 mol/L水酸化ナトリウム溶液を調製してアルカリ処理液の原液とした。原液及びこれをMilliQ水で2, 5, 10, 20倍希釈したものを試験に用いた。CPVのウイルスの力価は指標細胞としてCRFK細胞(ネコ腎由来)を用いて測定した。

[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、ヒト試料を用いた検討は研究倫理委員会の承認を受けた上で行った。ヒト正常血漿及びヒト正常血清は市販品を用いた。

C. 研究結果及び考察

C.1 PEI磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒト肝炎ウイルスへの適用と磁気ビーズの改良

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、ポリエチレンイミン(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。これまでに、本法が種々のウイルスの高感度検出に有用であること、平均分子量70,000のPEIを用いて弱酸性条件下濃縮すると高効率で濃縮できること、PEI磁気ビーズ上での免疫複合体の形成により濃縮効率が向上すること、ヒト肝炎ウイルスのHAV, HBV, HCVにも適用可能であることなどを報告した。今年度は、ウイルススクリーニング法や受け入れ試験としての有用性を評価するためにヒト血液試料中のウイルスの濃縮について検討した。また、磁気ビーズの改良について検討した。

C.1.1 ヒト血液試料中のウイルス濃縮の検討

HAVとHCVについて、ヒト正常血漿またはヒト正常血清で希釈し、PEI磁気ビーズによる濃縮を検

討した (図 1)。その結果、どちらのウイルスもヒト正常血漿で希釈した場合はほぼ完全に回収されることが判明した。一方、ヒト正常血清で希釈すると HAV、HCV とともに回収率は 50%前後と血漿試料と比較してやや劣っていた。

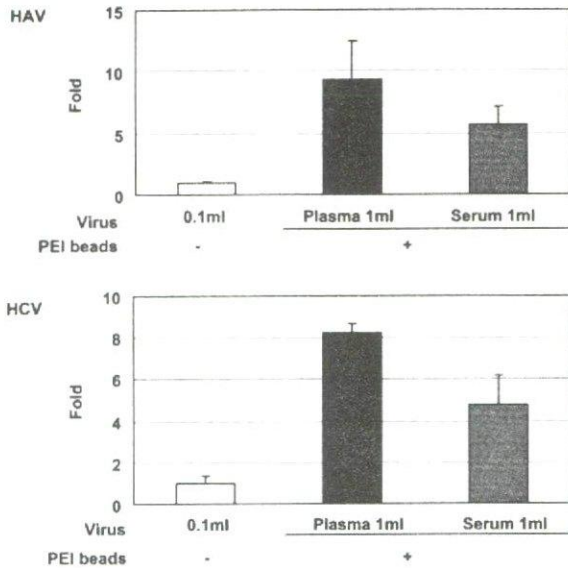


図 1 PEI 磁気ビーズによる HAV, HCV の濃縮に及ぼすヒト正常血漿及び血清の影響

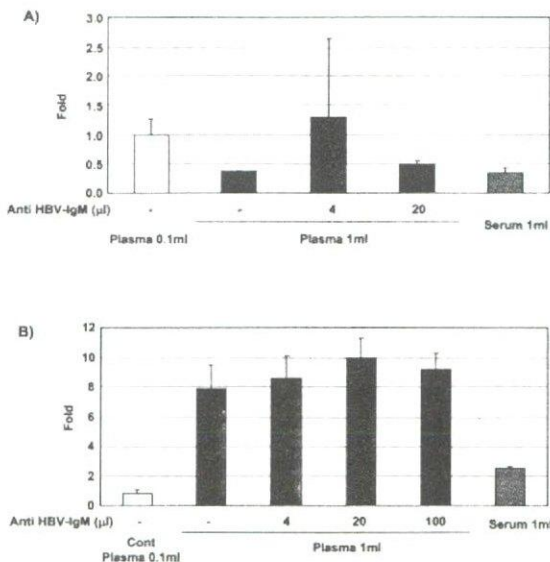


図 2 PEI 磁気ビーズによる HBV の濃縮に及ぼすヒト正常血漿及び血清の影響

A: HBV 標準品; B: HBV ジェノタイプパネル

HBV 国内標準品について同様の検討を行ったところ、ヒト正常血漿、ヒト正常血清で希釈したもののいずれも PEI 磁気ビーズへの HBV の吸着は全く認められなかった (図 2A)。HBV の濃縮は抗 HBV-IgM 抗体を添加しても回収率の向上には至らなかった。HBV 国内標準品は抗体陰性のウィンドウ期から得たものであることから、抗体陽性である

HBV ジェノタイプパネルの 1 種類の試料を用いて同様の検討を行った (図 2B)。その結果、HAV、HCV と同様、ヒト正常血漿で希釈したものは効率よく濃縮され、抗 HBV-IgM 抗体の添加によりさらに濃縮率の向上が認められた。一方、ヒト正常血清で希釈したものはほとんど濃縮されなかった。

C.1.2 磁気ビーズの改良

従来、PEI 磁気ビーズに用いてきた平均粒径 $0.8\mu\text{m}$ の粒径分布を持った不均一磁性粒子である。不均一磁性粒子には粒径分布の再現性や平均粒径以下の小粒径成分の磁気応答性が低く、操作性が悪いという問題があった。そこで、今年度はこれらの問題点の解決を目的に、均一磁性粒子の適用に関して検討した。

均一磁性粒子の製造工程は 3 工程からなり、第一工程では、均一磁性粒子のコアとなる粒径の揃ったポリマー粒子をエマルジョン重合などにより合成する。第二工程は“複合化”と呼ばれ、乾式でポリマー粒子粉と磁性体粉を混合し、ポリマー粒子表面に磁性体膜を形成する。第三工程では、複合化された粒子の表面コーティングのため、複合化粒子にモノマーや開始剤、乳化剤等を加えてコート重合を行う。今回、各種粒径のポリマーコア粒子を用いて、粒径 0.7 、 1.1 、 $2.2\mu\text{m}$ の 3 種の均一磁性粒子を得た。これらの均一磁性粒子を用い、従来の不均一磁性粒子との磁気応答性を比較した。その結果、不均一磁性粒子と比較して均一磁性粒子の磁気応答性は良好であるが、粒径 $0.7\mu\text{m}$ の均一磁性粒子では、現実的な操作性の目安となる 90%磁気分離時間が 300 秒(5分)を超えており、顕著な操作性の向上は得られなかった (図 3)。

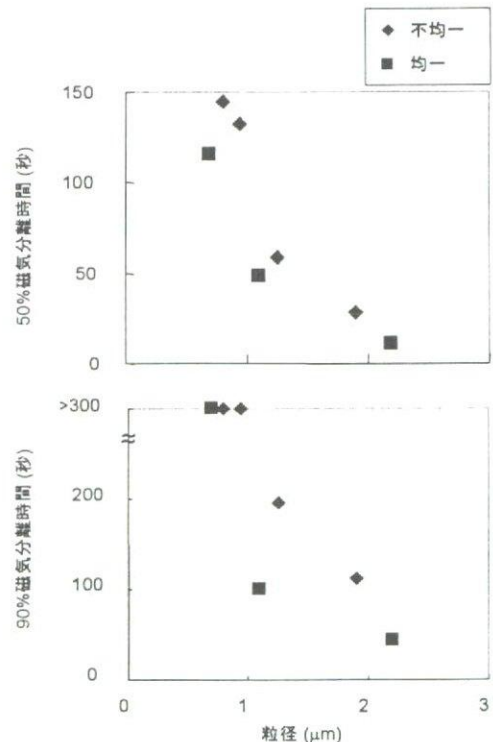


図 3 磁性粒子の粒径と磁気応答性

これらの磁性粒子に PEI を結合し、HBV の濃縮実験を行った(図4)。PEI 結合不均一粒子の場合、平均粒径 0.8 μm の不均一粒子のみがほぼ 100%の HBV 捕捉効率が得られた。一方、PEI 結合均一磁性粒子では、同等粒径の不均一粒子よりもおおむねウイルス濃縮性能が低く、粒径 0.7 μm においても 30%程度の HBV 捕捉率しか得られなかった。

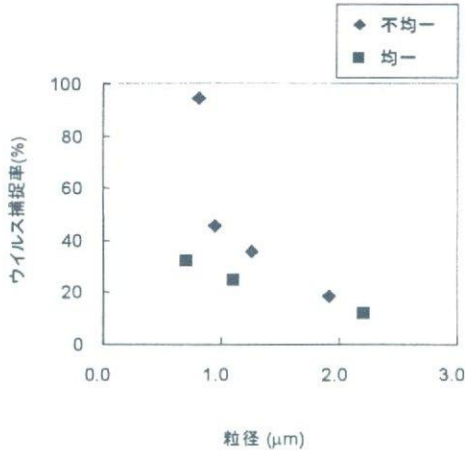


図4 磁性粒子の粒径とウイルス捕捉率

C.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。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。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合することで、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。さらに、ヌクレオチドの塩基対合の原理による濃縮のため、サンプル中の核酸を抽出できれば、エンベロープの有無、DNA、RNA ゲノムの区別なく、どのウイルスも濃縮できる方法である。もちろん RNA ゲノムの場合、分解しやすい RNA の取扱いには注意が必要にはなる。

昨年度は、新プローブキャプチャー法のモデル実験として、扱いが容易な病原性のないプラスミドをウイルスの代わりに用いて、各ステップの条件検討

を行った。今年度は、いろいろなゲノムが混入しているサンプルを想定し、目的のゲノムが定量的に検出できるか試みた。

まず、2nd hybridization 後の溶出液に対して、pET24 を検出するプライマーで PCR を行った場合、別のプラスミド pHAT10 と pRL-TK (複製開始点領域で一部 pET24 の配列と同一であるが、その他は配列が異なる) を混入させると、やや減少傾向は見られるがどれも検出は可能で、他の DNA による障害はあまり見られなかった (図5)。この傾向は、混入する DNA のモル比を 10 倍にしても変化がなかった。しかし、本来結合するはずのない BN の配列と相同性のないプラスミド pRL-TK と pHAT10 が、それぞれのプラスミドを検出するプライマーを用いた PCR で検出された。

これらの DNA がなぜ検出されたかを検討する目的で、2nd hybridization 時に、ここで用いたプラスミドを混ぜることなく単独で反応させて、それぞれを検出するプライマーによる PCR 実験を行った。その結果、2nd hybridization 時に用いる磁気ビーズに一本鎖 DNA が非特異的に吸着することが判明した。そこで、1st hybridization および 2nd hybridization において、非特異的吸着を防ぐような試薬を添加し、その効果を検討した。その結果、1% BSA の添加では非特異的吸着は抑えられなかった。一方、サケ DNA (sonicated, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 2nd hybridization 時に加えて反応を行うと、BN22 を用いた場合には、他のプラスミドの吸着が阻害された(図6)。しかし、長さや配列が異なる BN25 の吸着を阻害することはできなかった。

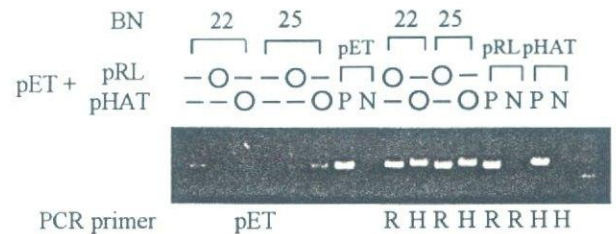


図5 他種 DNA 混在時の非特異的吸着

P: positive control, N: negative control, M: marker, R: pRL, H: pHAT

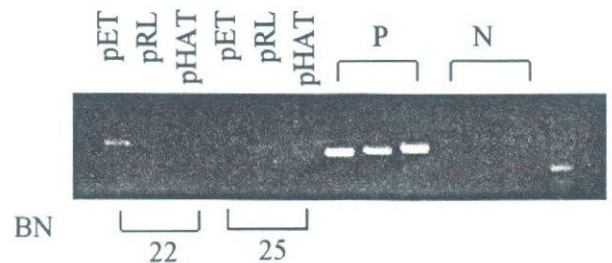


図6 carrier DNA 添加の影響

P: positive control, N: negative control

C.3 ウイルス安全性評価試験としての NAT の確立・評価に関する研究

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が実施されているが、新興ウイルスに対応するNAT試験法の開発の必要性が生じている。また、ウイルスは他の生物に比べ遺伝子配列に変異が生じやすく、変異の生じた場所によってはNATの信頼性に影響を及ぼすことも考えられることから、変異に関する情報も注視する必要がある。NATの実施に当たり、一部のウイルスでは市販のキットを利用する事が可能であるが、①それ以外のウイルスの場合や、②市販のキットがウイルスの変異型に対応していない場合については、試験法を独自に確立する必要がある。①の例としては昨年度、入手が容易でないHIV-2ウイルス検体の代用として、容易に入手可能な材料から調製したウイルス核酸 (RNA) がNATの評価に有用であることを示唆する報告を行った。本年度は、調製したRNAの安定性について評価した。また、②の例として、近年、遺伝子型の異なるジェノタイプ1~3が報告されているパルボウイルスB19について、全てのジェノタイプの検出が可能なNATの開発を行った。

まず、13箇月保存したHIV-2 RNAについてNAT試験により安定性を検討した。その結果、逆転写及びPCRに供したRNA量として5コピーまで、HIV-2 RNAを検出することが可能であった (表1)。この結果は昨年度報告した合成直後の検出感度と同等であった。

表1 HIV-2 RNA の保存安定性

保存期間	RNA量(copy/PCR tube)	
	10	5
13 箇月保存	3/3	3/3
合成直後 (0~2 箇月)	15/15	15/15

表内は検出数/試験回数を表す

(PGF1)

G1: AGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAGCAGCTTTTAACTTCATCACCCAGGCGCTGGAACACT

G2: AGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCGTGAAGCAGCTTTTCAACTTCATCACTTCAGGCGCTGGAACACT

G3: ACCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAGCAGCTTTTCAAGCTTCATCACTTCAGGCGCTGGAACACT

(P19P1) (PGR2)

G1: GAAACCCCGCGCTCTAGTACCCCATCCCCGGGACAGTTTCAGGAGAATCATTGTGGG

G2: GAAACCCCGCGCTCTAGTACCCCGTCCCGGGACCCAGTTCAGGAGAATCATTGTGGG

G3: GAAACCCCGCGCTCTAGTACGCCCGTCCCGGGACCCAGTTCAGGAGAATCATTGTGGG

図7 パルボウイルス B19 のジェノタイプ 1~3 の配列

上段(G1)はジェノタイプ 1 の塩基配列 (Accession No.M13178 1961-2123) を、中段(G2)はジェノタイプ 2 の塩基配列 (Accession No.AY064475 1760-1922) を、下段(G3)はジェノタイプ 3 の塩基配列 (Accession No.AX003421 1853-2015) を示す。また、□内はプライマー (PGF1 及び PGR2) 及びプローブ (P19P1) 領域を、下線はジェノタイプ 1 と異なる塩基配列を示した。

次に、パルボウイルスB19に対するNAT試験についてデータベースよりジェノタイプ1~3の遺伝子配列情報を収集し、ジェノタイプ間の変異の少ない領域についてプライマー並びにプローブを設計した (図7)。これらのプライマー並びにプローブを用いたNAT試験をウイルス量が既知の検体 (ジェノタイプ1) により評価した。その結果、PCRに供したウイルス核酸量として、10コピーまで検出することが可能であった (表2)。

表2 パルボウイルス B19 NAT 試験の検出感度

パルボウイルス B19 量 (copy/PCR tube)		
20	10	0
3/3	6/6	0/6

表内は検出数/試験回数を表す

C.4 パーフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

バイオ医薬品/生物薬品のウイルス安全性確保には、製造において適切なウイルスの不活化、除去工程を採用することが重要である。血漿分画製剤では、ウイルス不活化工程のひとつとして SD (有機溶媒/界面活性剤) 処理がエンベロープウイルスの不活化に効果的な工程として用いられているが、より広範な医薬品に適用可能なウイルス不活化法を開発できれば医薬品の安全性上意義が高い。パー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、界面活性作用が強い。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、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、モデルウイルスのうち、HSV-1、Sindbis は 3mM 以上で、また VSV では 5mM でウイルスによる細胞変性の阻害が観察され、PFOA による不活化が認められた。一方、Poliovirus については PFOA による不活化効果は認められなかった。

次に、PFOA による不活化の time course を検討した (図9)。その結果、HSV-1 は PFOA で 10sec 処理するだけで感染性が完全に消失したが、Sindbis virus や VSV では PFOA 処理 1min 程度までは感染性の低下がほとんど認められず、処理時間を延長するに従い徐々に感染性が低下するが、完全な不活化には 10 分以上の処理が必要であった。

さらに、PFOA で処理する際の pH について検討した。HSV-1 では pH4-8 でいずれも強い不活化効果が認められた。VSV の場合、pH4~6 で強い不活化が認められたが、pH7、8 では PFOA の効果は低く、弱酸性条件で不活化効果が高いことが判明した。

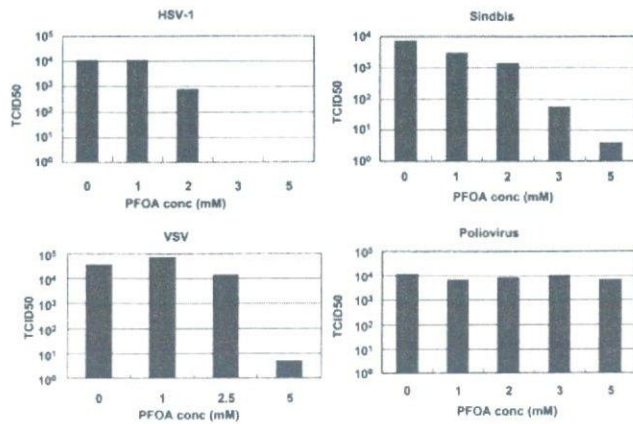


図8 PFOAによるウイルス不活化の濃度依存性

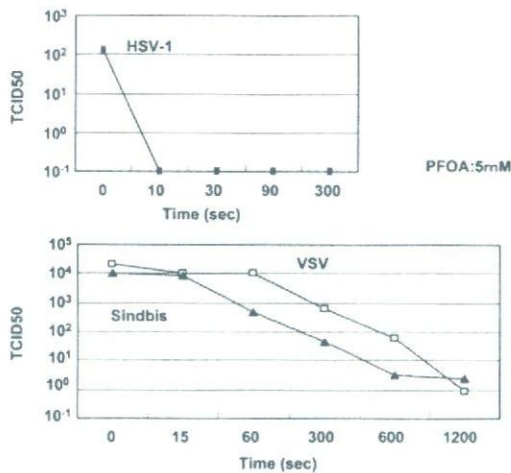


図9 PFOAによるウイルス不活化の時間依存性

C.5 生物薬品のウイルス安全性の評価

生物薬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、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は重要である。そこで、今年度はウシ原料を用いて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ろ過工程（低 pH 処理+メンブランフィルター処理(0.2 μm)+ナノフィルトレーション(15nm)）及び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。また、生物薬品の製造工程で、器具等のウイルス不活化処理の目的で用いた希水酸化ナトリウムへの浸漬のウイルス不活化効果も評価した。

C.5.1 ウシ原料由来生物薬品の製造工程のウイルスクリアランス能

ろ過工程におけるウイルスクリアランス試験結果を表3にまとめた。PRVの2回のクリアランス試験において、ナノフィルトレーションでのLRV(LRV1)は平均>2.1、BVDVでは>3.8、HAVは3.1、PPVにおいては、ナノフィルトレーションでのLRVは4.4と算出された。

各クリアランス試験結果を観察すると、特にPRV及びBVDVにおいて、メンブランフィルターによるろ過でのウイルス力価の減衰、及び操作終了時のhold controlのウイルス力価の低下が顕著に認められた。このことからメンブランフィルターでウイルスの除去が生じていること、及びろ過条件である4.2~4.3の低pHでウイルスの不活化を生じていることが予想された。そこで、メンブランフィルターろ過、ナノフィルタールろ過及び低pH処理からなる一連のろ過工程でのLRV(LRV2)を、Initial virus loadのウイルス力価とナノフィルタール過後の力価から求めた結果、とナノフィルトレーション単独で算出したLRV(LRV1)と比較して大きな値を示した。

PPVにおいては、ナノフィルタールろ過、メンブランフィルターろ過及び低pH処理からなる一連のろ過工程でのLRVは平均4.4であり、ナノフィルトレーション単独時のLRVとほぼ同値で、メンブランフィルターと低pH処理の組み合わせによるLRVの増加効果は認められなかった。

低pH処理におけるウイルス不活化の時間依存性を検討したところ、低pH条件(pH4.2~4.3)において室温保存されたHold Controlのウイルス力価は、ナノフィルトレーションの開始から緩やかに低下傾向が認められた。従って、一連のろ過工程におけるウイルスクリアランス能には、低pHによるウイルス不活化の寄与も含まれるものと考えられた。

次に、クロマトグラフィーにおけるウイルスクリアランス試験結果を表4に示した。いずれのウイルスにおいても、得られたLRVは1.5~2.0であり、本工程はウイルスの種類に関わらず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3 ろ過工程におけるウイルスクリアランス試験結果

ウイルス	LRV1*		LRV2**	
	算出結果	平均	算出結果	平均
PRV	>2.07	>2.1	>5.62	>5.1
	>3.20		>5.05	
BVDV	>3.82	>3.8	>7.40	>7.4
	>5.11		>7.87	
HAV	2.79	3.1	4.04	4.1
	3.37		4.18	
PPV	4.73	4.4	4.58	4.4
	4.13		4.12	

LRV1* : ナノフィルタールのみによるLRV

LRV2** : 低pH処理及びメンブランフィルターによるろ過を含む工程を一括して評価した時のLRV

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

ウイルス	LRV		
	run A	run B	平均
PRV	2.18	1.76	2.0
BVDV	2.24	1.76	2.0
HAV	1.72	1.77	1.7
PPV	1.49	1.57	1.5

C.5.2 アルカリ処理のウイルス不活化効果

試験成績を図10に示す。1/45 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のpHは12.286で、この9容と、ウイルス増殖用培養液1容を加えたときのpH、即ち、試験試料(0.02mol/L 水酸化ナトリウム処理検体)の推定pHは12.191であった。対照試料のウイルス力価の平均値(対数変換後の計算値、以後同じ)は、処理直後では6.6、24時間後では6.3でありほとんど変化は認められなかった。試験試料のウイルス力価の平均値(及びLRV)は、処理直後では6.1(0.5)と対照と同程度であったが、1時間後には6.1(0.5)、3時間後には3.2(3.4)とウイルス力価の漸減及びLRVの漸増が認められ、経時的なウイルス力価の減少を示した。処理6時間後では繰り返し3回のうち2回で、ウイルス力価が検出限界付近まで減少し、24時間後には繰り返し3回の全てで、ウイルス力価は検出限界以下まで減少した。24時間後のLRVは4.8以上であった。

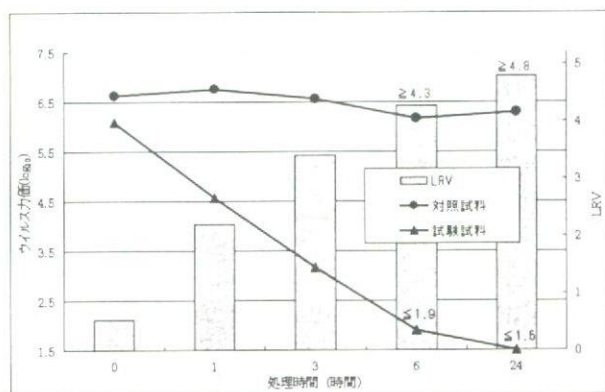


図10 0.02mol/L 水酸化ナトリウム処理によるCPVの経時的不活化

D. 考察

D.1.1 PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒト肝炎ウイルスへの適用

ウイルス検出の感度向上を目的として開発したPEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮のヒト肝炎ウイルスへの適用を検討した。ヒト血液試料中の濃縮について検討したところ、HAV 及び HCV はヒト正常血漿で希釈した場合には高効率での濃縮が可能であったが、ヒト正常血清では濃縮効率が劣っていた。従って、PEI 磁気ビーズ濃縮はヒト血漿試料中の高感度ウイルス検出に適用可能と考えられる。一方、

HBV をヒト正常血漿にスパイクした場合、標準品は濃縮できなかったが、ジェノタイプパネルのHBVは濃縮されるという結果が得られ、試料による違いが認められた。両者の違いのひとつに採血時期があり、標準品はウインドウ期から得たもの抗HBV抗体陰性であるが、ジェノタイプパネルは抗HBV抗体陽性の試料であることから、試料中の抗HBV抗体が濃縮に影響した可能性が示唆された。ウインドウ期のHBVにPEIビーズ濃縮を適用して高感度検出するためには、さらに濃縮条件を検討する必要がある。

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血漿試料に含まれるHAV、HCVの濃縮、高感度検出に有用な方法であることが示唆された。

D.1.2 PEI 磁気ビーズの改良

昨年度の報告のとおり、従来の不均一磁性粒子では、安定的なウイルス濃縮性能の発現のためには、平均粒径は0.8 μ m程度が最適であったが、磁気分離に最低でも5分は必要であり、操作性が低いこと、粒径分布の再現が事実上困難であり、製造ロットごとにある程度の性能差が発生する可能性が課題であった。そこで、今年度は、このような課題の解決を目的として、新たに粒径0.7 μ m、1.1 μ m、2.2 μ mの均一粒径粒子を調製し、その磁気応答性およびPEI結合後のウイルス濃縮性能を評価した。

磁気応答性については、不均一磁性粒子に比較して均一磁性粒子の方が良好な結果が得られた。しかしながら、均一磁性粒子においても0.7 μ mまで粒径が低下すると、90%磁気分離時間は5分を超えた。一方、ウイルス濃縮性能については、0.7 μ m均一磁性粒子を用いても約30%のウイルス捕捉率しか得られなかった。

ウイルス捕捉率を向上するため粒径をさらに小さくすると、磁気応答性がより一層低下し、従来の反応容器や磁気スタンドでの実験操作が困難になることが予想される。操作性は大粒径の均一磁性粒子の混合によりある程度改善できると見られるが、不均一磁性粒子を用いる方法に対するメリットは余り大きくない。別の方法として、粒径を落とさずに粒子表面を凹凸にして単位重量あたりの表面積を増やす方法もある。この方法の有効性は、3 μ mの凹凸表面磁性粒子を用いた免疫測定で確認しているが、凹凸化しても単位重量当たりの面積は、平滑表面粒子の3倍程度であり、粒径3 μ mでは現行0.8 μ mの不均一粒子のウイルス濃縮性能は得られないと予想される。より小粒子での凹凸表面の実現が不可欠である。

D.2 新プローブキャプチャー法の開発

ハイブリダイゼーションを用いてウイルスの検出系を構築するためには、サンプル中のあらゆるウイルスを検出できる必要があるが、そのためには目的のウイルスを検出でき、目的外のものが検出されないことも重要である。そこで、1種類のDNAを検出する系に、多種類のDNAを混ぜたものの中から目的

の DNA を定量的に検出できるかを試みた。その結果、目的の DNA が検出できることは確認されたが、2nd hybridization 後の同じ溶出液から目的外の DNA もかなりの濃度で検出された。目的外の DNA が検出される原因としては BN に結合している pET24 の配列と pRL-TK、pHAT10 との共通配列部分で磁気ビーズに結合した可能性と、磁気ビーズ・BN 部分に非特異的吸着した可能性が考えられた。2nd hybridization 時に pET24 を加えないで pRL-TK や pHAT10 を反応させても、hybridization のあとの溶出液にプラスミド DNA が検出された。このことは pET24 を介した配列特異的結合も否定はできないが、大部分は磁気ビーズ・BN に吸着したものであることを示している。ビーズからの溶出前の洗浄液にも検出されることから、非特異的吸着であることが示唆される。

非特異的吸着を防ぐ試薬として、タンパク質の BSA またはサケ精子 DNA を用いて検討したところ、BSA ではその効果はなく、サケ精子 DNA を用いることで、完全ではないが非特異的吸着を抑えることができた。サケ精子 DNA の用いた濃度はまだ低いため、100 µg/ml に増やせばより吸着を抑制できると期待される。

D.3 ウイルス安全性評価試験としての NAT の確立・評価に関する研究

本研究の方法により作製した核酸 (RNA) は、入手が困難なウイルスに対する NAT の評価に有用であり、エタノール沈殿状態で長期間保存可能であることが示された。このような評価法においては、ウイルスを使用しないため、高度な物理的封じ込めの必要もなく、より簡便に NAT の検証が可能である。また、ウイルス量が既知の検体が入手できるウイルスに関しても、新たに、ジェノタイプが報告された場合には、試験法の妥当性を遺伝子配列により検証する。検証の結果、適当でないと判明した場合にはデータベースの情報を基に、変異のない領域にプライマーを設計し、ウイルス量既知の検体を用いて評価することにより、新たなジェノタイプに対応した試験法を構築可能である。

D.4 生物由来製品のウイルス不活化法の開発

パーフルオロオクタン酸 (PFOA) によるウイルス不活化を検討したところ、エンベロープウイルス (HSV-1、VSV、Sindbis) について最大で 6-7 オーダー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) に対しての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。PFOA の作用条件を検討したところ、酸性条件で最も強い不活化効果が認められた。しかし、酸性条件下では不安定な生物製品もあることから、不活化工程として 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。PFOA によるウイルス不活化のタイムコース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 10sec の処理で完全に失活したが、VSV や Sindbis では有効な不活化には 5 分以上の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。

今後、他のウイルス不活化剤との比較、PFOA 処理が生物由来製品の活性に与える影響、PFOA の除去に関する検討などを行い、生物由来製品のウイルス不活化工程としての有用性を検討する予定である。

D.5 生物製品のウイルス安全性の評価

D.5.1 ウシ原料由来生物製品のウイルス安全性評価

ウシ原料を用いて製造される生物製品について、その製造工程であるろ過工程及び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能を評価した。その結果、ろ過工程においては、特性の異なる 4 種のモデルウイルスのいずれにおいても、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、ここではナノフィルトレーション (15nm) 単独に比べ低 pH 処理、メンブランフィルターろ過を含む工程を一括したクリアランス能が大きかったこと、および、PRV および BVDV を低 pH 処理した Hold Control のウイルス力価がナノフィルトレーションに要する時間の間に低下が認められたことより、本工程はナノフィルターに加え、大きなウイルス粒子を排除する効果のあるメンブランフィルターによるろ過、および、物理化学的耐性の低いウイルスの不活化に寄与すると考えられる低 pH 処理を組み合わせることによりウイルスクリアランス能を効果的に高められていると考えられた。また、クロマトグラフィー工程においても、一定のウイルスクリアランスが認められた。ろ過工程およびクロマトグラフィー工程における LRV は各々 4.1 ~ >5.8 および 1.5 ~ 2.0 という値であり、両工程は原理の異なる分離・精製工程であることから、これらを組み合わせることにより高いウイルス安全性が確保できると考えられた。

今回の検討結果及び本生物製品の原材料が生物由来原料基準に基づき適切に管理されていることを考慮すると、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。

D.5.2 アルカリ処理のウイルス不活化効果

アルカリ処理による CPV 不活化試験のためのアルカリ濃度決定試験の評価結果より、最終濃度が 0.01mol/L より低い濃度の水酸化ナトリウム処理においては 60 分処理後においてもウイルス力価はほとんど変化しなかったことより、ウイルス不活化能は無いと考えられた。

60 分後の LRV が 1.5 を示した最終濃度が 0.02mol/L 水酸化ナトリウム処理においては浸漬時

間に対応して直線的にウイルス力価が減少し、24 時間後には検出限界以下となることが確認された。最終濃度として 0.05 mol/L より高い濃度の水酸化ナトリウム処理については検体のウイルス力価が処理直後から測定限界以下を示したことより、製造工程で一般的に用いられている器具等の 0.2 mol/L の水酸化ナトリウム溶液への浸漬においては CPV は瞬時に不活化されると考えられ、実工程で行われている Overnight での浸漬により、ウイルスの不活化効果は十分であると考えられた。

E. 結論

1. 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肝炎ウイルスへの適用を検討し、ヒト血漿試料中の HAV、HCV の濃縮・高感度検出に有用であることを明らかにした。また、PEI 磁気ビーズの改良を目指して、磁性粒子の製造再現性、操作性の改善のため粒径の均一化を図った。しかし、0.7 μ m の均一磁性粒子は従来の不均一磁性粒子と比べて十分なウイルス濃縮性能は得られなかった。
2. ウイルスゲノムの高感度検出法として、ウイルスゲノムの特定の遺伝子配列のハイブリダイゼーションにより濃縮しようとする新キャプチャープローブ法の開発について検討し、多種ゲノム混入時に目的ゲノムのみを検出できる系をブロッキング試薬添加によって確立した。開発には、さらに詳細な検討が必要である。
3. ウイルス安全性評価試験としての NAT の確立・評価に関する研究として、入手が困難なウイルス検体の代用としてオリゴヌクレオチドを材料に合成したウイルス RNA の保存安定性を示した。また、新たにジェノタイプが報告されたパルボウイルス B19 の全てのジェノタイプが検出可能な NAT 試験法を開発した。
4. 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。
5. ウイルスの不活化・除去能の評価法に関する研究として、ウシ原料由来の生物製品の製造工程であるろ過工程（ナノフィルトレーション、15nm）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た結果、各 LRV は 4.1 \sim 5.8、1.5 \sim 2.0 であり、高いウイルス安全性が確保されていた。また、生物製品の製造工程で器具等のウイルス不活化処理のために行われている、希水酸化ナトリウム溶液のウイルス不活化効果の評価し、終濃度 0.05 mol/L 以上では、処理直後に CPV は検出限界以下まで不活化され、0.02 mol/L においても、24 時間後には検出限界以下となることを明らかにした。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Eriko Uchida, Mieko Kogi, Tadashi Oshizawa, Koei Satoh, Akiko Iwata, Mitsuhiro Murata, Mikio Hikata, Teruhide Yamaguchi: Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses, *Journal of Virological Methods* (in press)
- 2) Yamaguchi, T. Uchida, E.; Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products. *CCDT Journal* 7, 203-208, 2007
- 3) 内田恵理子、石井明子、山口照英：遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保. 臨床とウイルス(印刷中)

2. 学会発表

- 1) 山口照英：先端技術応用医薬品のウイルス等の安全性確保. 第 47 回日本臨床ウイルス学会、特別講演；2006 年 6 月 3 日、東京
- 2) 内田恵理子、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：パーフルオロオクタン酸(PFOA)による新規ウイルス不活化法の開発；第 54 回日本ウイルス学会学術集会；2006 年 11 月 19 日、名古屋
- 3) 内田恵理子、山口照英：バイオ医薬品／生物製品のウイルス安全性に関する国際動向；第 6 回日本医薬品等ウイルス安全性シンポジウム；2006 年 12 月 1 日、東京
- 4) 内田恵理子、小木美恵子、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：生物製品のウイルス安全性確保：生物製品のウイルス除去のためのポリエチレンイミン結合カラムの開発、2007 年 3 月 28 日、富山

F. 知的財産権の出願／登録状況

該当なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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