

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 讓 …… 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	網脇 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  
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

**研究要旨** ウイルスの高感度検出のためのウイルス・ウイルスゲノム濃縮法の開発、ウイルス感染性の高感度検出法の開発、ウイルス安全性対策としてのNAT試験法の開発、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>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㈱<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試験や適性評価、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性がある。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。3年間で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感度化・高精度化に関する研究
- (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
- (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
- (4) ウイルスの不活化・除去能の評価法に関する研究

### B. 研究方法

(1) 生物由来製品原料のウイルス検出技術の高感度化・高精度化に関する研究として、①ポリエチレンイミン(PEI)結合磁気ビーズによるウイルス濃

縮・高感度検出法の開発、②新プローブキャプチャー法によるウイルスゲノムの濃縮・高感度検出法の開発、③感染性ウイルスの高感度検出法の開発を、(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・評価に関する研究として、① ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-2に対するNAT試験法の確立と評価、②E型肝炎ウイルス(HEV)に対するNAT試験法の確立と評価を、(3) ウイルス不活化・除去技術の開発として、①パーフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化法の開発、②生物薬品のウイルス除去のためのPEI結合カラムの開発を、(4) ウイルスの不活化・除去工程のクリアランス能の評価に関する研究として、①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、②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、の各研究課題について、分担研究者が分担して実施した。

### (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。

### 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感度化・高精度化に関する研究

##### C.1.1 PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮・高感度検出法の開発

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。そこで、NATによるウイルス検出の高感度化を目的として、PEI磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法の開発を行ってきた。これまでに、本法が広範なモデルウイルスの濃縮・高感度検出に有用であることを明らかにした。しかし、ポリオウイルスのように小型非エンベロープウイルスには一部濃縮されないウイルスも認められた。そこで、より広範

なウイルスを効率よく濃縮するためのウイルス濃縮条件の最適化と、ヒト感染性ウイルスへの適用を検討した。

まず、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮の最適化条件として、磁性粒子に結合している分子の違いがウイルスの濃縮効果に及ぼす影響について検討した。その結果、PEI とポリアリルアミン、ポリリジンでは PEI が最もウイルス濃縮効率が高く、また分子量の異なる PEI (分子量 70,000、10,000、1,800) では、分子量 70,000 の PEI 磁気ビーズが非常に高い濃縮効率を得られることが判明した。一方、濃縮時の pH の影響を検討し、pH6 付近で最も高い濃縮効率を得られた。以上の結果より平均分子量 70,000 の PEI を用いて弱酸性条件下で濃縮することにより高効率で濃縮できることを明らかにした。

次に、磁性粒子の最適化条件を検討した。ウイルス濃縮効率の粒径依存性を不均一磁性粒子と均一磁性粒子について比較した結果、小粒径ほど濃縮効率が高く、平均粒径  $0.8\ \mu\text{m}$  の不均一磁性粒子が最も高いウイルス濃縮性能を示した。

また、PEI 磁気ビーズにより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。質量分析による同定の結果、補体第 4 成分、第 3 成分や IgM 抗体が濃縮されることが判明し、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮時に免疫複合体を形成させることで濃縮効率が向上する可能性が示唆された。このことは PEI 磁気ビーズ単独では濃縮できないポリオウイルスが免疫複合体形成条件下で濃縮可能なことから確認された。

これまでに得られた PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法の最適化条件について、ヒト感染性ウイルスへの適用を検討した。A 型肝炎ウイルス (HAV)、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) について検討した結果、HAV、HCV、HIV は血漿試料から高効率で濃縮可能であることが明らかとなった。また、HBV は濃縮される場合とされない場合が認められ、濃縮効率の再現性が悪いが、抗 HBs 抗体の添加や、血漿中の乳びを  $0.22\ \mu\text{m}$  フィルター処理で除去することで改善される場合も見られた。

以上の結果から、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法は医薬品のウイルス安全性確保上問題となる HAV、HBV、HCV、HIV の濃縮・高感度検出に有用な方法であることが明らかとなった。

### C.1.2 新プローブキャプチャー法によるウイルスゲノムの濃縮・高感度検出法の開発

ウイルスゲノムを濃縮し、高感度に検出する方法として、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。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)<sub>n</sub> 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) を用いた。この方法の利点として、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その他、BN のウイルス特異的遺伝子配列を換えることにより、一種類の磁気ビーズで多種類のウイルスを同時に検出できることがあげられる。

まず、モデル実験として、プラスミド DNA (pET24a) を用い、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を NAT 試験で確認した。次に、定量的検出を目的に、2段階ある各ハイブリダイゼーションの条件を検討した。oligo(dG)<sub>n</sub> が結合した磁気ビーズと BN との 1段階目のハイブリダイゼーションの効率を、標識ヌクレオチドを用いて解析した。その結果、温度、磁気ビーズとの比を最適化することにより磁気ビーズへ結合許容量に匹敵する BN の結合を確認した。検出しようとするゲノムとの 2段階目のハイブリダイゼーションでは、いずれの BN でもインプット DNA 量  $1\ \text{pg}$  ( $1.7 \times 10^5$  分子数) で検出され、ハイブリダイゼーションでの濃縮は 10 倍程度と推定された。さらに、多種類のゲノムの中で、目的のゲノムが検出できるかについて検討したところ、BN とは結合しない他のプラスミドも磁気ビーズに非特異的吸着することが判明した。この非特異的吸着はキャリアー DNA (サケ精子 DNA) を系に加えることで解消された。

今後はハイブリダイゼーションの条件をさらに最適化することで、濃縮効率の上昇が期待される。

### C.1.3 ウイルス感染性の高感度検出法の開発

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法として NAT が多用されているが、NAT 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・高感度検出法の長所を組み合わせた感染性 PCR/RT-PCR 法の開発を行った。

単純ヘルペスウイルス(HSV-1)、ポリオウイルス、マウス白血病ウイルス(MLV)、アデノウイルスの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。その結果、HSV-1では感染性PCR法により感染1日目で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。ポリオウイルスの場合、感染性PCR法では $1 \times 10^3$ コピーまで検出可能であったが、CPE法では検出限界が $1 \times 10^6$ 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、MLV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。以上の結果より、感染性PCR法は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。

## C.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

### C.2.1 HIV-2に対するNAT試験法の確立と評価

血漿分画生物由来製剤の原材料においては、安全性確保を目的にウイルス遺伝子の検出法としてNATが実施されているが、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するNAT試験法開発の必要性が生じている。NAT試験法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不可欠であるが、NAT試験用ウイルス標準品は、多くのウイルスについては入手が容易でない。本研究では、HIV-2に対するNATの確立を行うに当たり、入手が困難な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た人工HIV-2 RNAを作製し、この人工RNAがNAT試験法の評価に有用であることを検証した。

HIV-2の配列よりHIV-2のセンス鎖またはアンチセンス鎖に相当する配列を含む複数のオリゴヌクレオチドを準備し、これらを結合して2本鎖DNA断片を作製した。続いて、このDNA断片を組み込んだプラスミドを大腸菌へ導入し、培養による増幅、精製後、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、HIV-2の配列を有する高純度の人工HIV-2 RNAを得た。このHIV-2 RNAについてNAT試験を実施したところ、10copy程度のHIV-2 RNA

を検出することが可能であった。また、遺伝子型の異なるジェノタイプを有するウイルスに関しても、同様の方法で作製した種々のジェノタイプに対応した人工RNAをNAT試験のジェノタイプ特異性評価に利用可能であることが明らかとなった。また、人工RNAはエタノール沈殿状態で $-80^{\circ}\text{C}$ 、1年程度の保存が可能であることを確認した。さらに長期の安定性について、評価を継続中である。

本研究の方法により作製した人工RNAは、入手が困難なウイルスに対するNAT試験の評価に有用であることが明らかとなった。本法は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る。

### C.2.2 E型肝炎ウイルス(HEV)に対するNAT試験法の確立と評価

血漿分画製剤のウイルス安全性向上のために、ウイルスの除去・不活化が困難な、粒径の小さい非エンベロープウイルスであるHEVを高感度に検出できるNAT試験法を構築し、NATバリデーションを実施した。

核酸抽出方法としては、アルコール沈殿法を用い、特異性を高める観点から、核酸増幅法としてnested-PCRを用いた。また、プライマーは変異の少ない部位を選択し、HEV陽性検体を用いて条件の最適化を行い、作製した人工RNAを標準品として用いてNATバリデーションを実施した。

吸光度測定によりコピー数を算出した人工HEV RNA(ジェノタイプI)を用いて、NATガイドライン(平成16年8月3日付薬食発第0803002号)に従い、測定系の感度を算出したところ、 $3.65 \times 10^4$ copies/mLと算出された。また、測定系の特異性及びクロスコンタミネーション否定が確認できた。添加回収試験にあたっては、自家標準品の添加方法検討を行い、間接添加法により血漿分画製剤の原料、中間製品、最終製品について頑健性を確認することが出来た。

以上の結果より、HEV NAT試験法の妥当性を確認した。また、NATバリデーションを実施した本試験系により、血漿分画製剤の各工程検体が陰性であることが明らかとなった。

## C.3 生物由来製品原料のウイルスの不活化・除去法の開発に関する研究

### C.3.1 PFOAによるウイルス不活化法の開発

生物由来製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不活化・除去工程を採用することが重要である。血液製剤等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)処理が熱に不安定な製剤に用いられているが、より適切

な不活化法を開発できれば医薬品の安全性上意義が高い。そこで、SD 処理で用いられる Tween80 よりも強い界面活性作用を持つ PFOA に着目してウイルス不活化能を検討した。

まずモデル実験として、PFOA によるヒト赤血球の溶血反応を検討した。その結果、PFOA 5mM では30秒以上の処理で溶血が起こり、温度は10℃以上、pHは6~8で高い溶血活性を示した。界面活性剤を吸着することが知られている defatted BSA を1%以上添加すると PFOA の溶血活性は阻害された。次に、モデルウイルスとして HSV-1、ポリオウイルス、シンドビスウイルス (Sindbis)、牛水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用い、PFOA のウイルス不活化効果を検討した。その結果、エンベロープウイルスの HSV-1、Sindbis は PFOA 3mM 以上で、VSV は 5mM で処理すると感染性が消失したが、非エンベロープウイルスのポリオウイルスは 5mM で処理しても感染性に影響は見られなかった。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、感受性の高い HSV-1 では処理時間 10 秒で完全に失活したが、VSV や Sindbis では有効な不活化には5分以上必要であり、耐性の高いウイルスの不活化にはより長い処理時間が必要なが示唆された。PFOA 処理時の pH は酸性条件で最も強い不活化効果が認められた。最適条件下では PFOA はエンベロープウイルスに対して最大 6~7 のウイルスクリアランス指数 (Log Reduction Value; LRV) を示し、有効なウイルス不活化効果を持つことが明らかになった。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。

### C.3.2 生物薬品のウイルス除去のための PEI 結合カラムの開発

生物薬品のウイルス安全性確保には、製造工程に適切なウイルス不活化・除去工程を採用することが重要である。C.1.1 に示したように、PEI は広範なウイルスに対して強いウイルス吸着能を持つことから、PEI のウイルス吸着能を利用したウイルス除去カラムの開発について検討した。

ブロムシアン活性化セファロース 6MB に分子量 70,000 の PEI を反応させて PEI 結合カラムを作成した。対照カラムとして、ブロムシアン活性化セファロース 6MB にグリシンを結合したものをを用いた。

まず、PEI 結合カラムのウイルス除去能を検討した。モデルウイルスとして HSV-1、SV-40、プタパルボウイルス (PPV)、Sindbis のウイルス液をカラムにアプライしたところ、HSV-1、SV-40、PPV は

添加したウイルス ( $10^7$ - $10^9$  copies) が PEI 結合カラムでほぼ完全に除去された。どのウイルスも対照カラムでは除去されず、ウイルスは PEI への結合により効率よく除去されることが示唆された。次に、PEI 結合カラムを生物薬品のウイルス除去工程として用いることを想定し、製品本体のタンパク質(サイトカイン類)や血清等の添加物中のタンパク質のカラムへの吸着を検討した。その結果、IgM や G-CSF は結合するが、IgG や GM-CSF は結合せず、タンパク質は PEI 結合カラムに吸着するものとしいないものに分類可能であった。以上の結果より、PEI 結合カラムは本カラムに吸着しない生物薬品に対するウイルス除去工程として有用である可能性が示唆された。今後、ウイルス除去条件の最適化を検討する予定である。

### C.4 ウイルスの不活化・除去能の評価法に関する研究

#### C.4.1 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

既存のウイルス不活化・除去工程として、①液状加熱、②乾燥加熱、③凍結乾燥、④S/D処理、⑤低 pH 処理、⑥イオン交換クロマトグラフィー、⑦アフィニティークロマトグラフィー、⑧疎水性相互作用クロマトグラフィー、⑨ウイルスろ過(ナノフィルトレーション)、⑩水蒸気加熱、⑪クリオ分離、⑫エタノール分画、⑬サイズ排除クロマトグラフィー、の各工程の種々のウイルスに対するクリアランス能に関して広く文献を調査し評価を行った。

その結果、各工程のウイルスクリアランス特性が明らかになるとともに、例えばイオン交換、アフィニティークロマトグラフィー、膜ろ過の各工程の LRV は最高で約 9、サイズ排除クロマトグラフィーでは最高で約 5 であり、ウイルス安全性確保には、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が確認された。また、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 LRV は小型ウイルス(非エンベロープ型ウイルス)でいずれも低い傾向がみられたことから、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ことが明らかになった。さらに、ウイルス安全性確保に関する欧米及び WHO の規制動向についても調査し、特に原材料におけるリスクが高いと考えられる血液製剤に関して海外での最新の規制状況を明らかにした。

#### C.4.2 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

生物薬品のウイルス安全性確保のため、迷入ウイ

ルス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。本研究においては、細胞培養技術や尿並びにウシ由来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原理の異なる分離・精製工程におけるウイルスクリアランス試験を実施し、当該生物薬品のウイルス安全性を評価した。

ウイルスクリアランス試験は、ウイルスろ過工程、クロマトグラフィー工程および液状加熱処理工程において、実工程の1/1000~1/100にスケールダウンして実施した。試験には6種のモデルウイルス（Pseudorabies Virus, MLV, Encephalomyocarditis Virus, HAV, Bovine Viral Diarrhea Virus および PPV）から、特性（ウイルスのサイズ、核酸、エンベロープの有無及び耐性）の異なる4種のウイルスを適宜選択し、ウイルス力価は指標細胞を用いたアッセイ系により測定した。ウイルスクリアランス能は、各ウイルスを添加した出発物質中のウイルス力価を、工程の各画分中に残存したウイルス力価で除した値の対数をLRVとして算出し求めた。

その結果、細胞培養技術を用いる生物薬品の製造工程では、ウイルスろ過工程のクリアランス能はLRVとして4.9以上、クロマトグラフィー工程においては2.5~4.3の範囲であった。尿由来原料を用いる生物薬品の製造工程では、液状加熱処理工程のクリアランス能はLRVとして1.8~>5.4の範囲であり、ろ過工程においては4.7以上であった。ウシ由来原料を用いる生物薬品の製造工程では、ウイルスろ過工程のクリアランス能はLRVとして4.1~>5.8の範囲であり、クロマトグラフィー工程においては1.5~2.0の範囲であった。

ウイルスろ過工程においては、特性の異なる各モデルウイルスとも高い除去効率が認められ、いずれの生物薬品にとっても、きわめて有用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および液状加熱処理工程においても、一定のクリアランス能が認められたため、これらはウイルス安全性を確保する上で、有用かつ重要な工程であると考えられた。以上より、原理の異なる分離・精製工程を組み合わせるにより高いウイルス安全性を確保することが可能であると考えられた。

## E. 結論

### E.1 生物由来製品原料のウイルス検出技術の高感度化・高精度化に関する研究

①NATによるウイルス検出の高感度化のためのPEI磁気ビーズによるウイルス濃縮法の最適化条件を確立した。本法は生物由来製品のウイルス安全性確保上問題となるHAV, HBV, HCV, HIVの濃縮・高感

度検出にも有用な方法であることを明らかにした。  
②新プローブキャプチャー法によるウイルスゲノムの濃縮・高感度検出法の開発を検討し、多種類のゲノムの中で、目的のゲノムを検出するためのハイブリダイゼーションの条件を確立した。

③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・高感度検出法の長所を組み合わせた感染性PCR/RT-PCR法を開発した。本法は従来法よりも短時間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。

### E.2 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

生物由来製品の原材料の安全性確保を目的として、HIV-2及びHEVに対するNAT試験法を確立した。HIV-2やHEVのように標準品が入手困難なウイルスに対するNAT試験法の評価には人工RNAが有用であることを確認した。

### E.3 生物由来製品原料のウイルスの不活化・除去法の開発に関する研究

①PFOAはエンベロープウイルスに対して有効なウイルス不活化効果を示すことを明らかにした。生物由来製品のウイルス不活化工程としてのPFOA処理の有用性を明らかにした。

②PEIのウイルス吸着能を利用したウイルス除去カラムを開発した。PEI結合カラムは効率よくウイルスを除去可能であり、カラムに吸着しない生物由来製品に対するウイルス除去工程としての有用性を明らかにした。

### E.4 ウイルスの不活化・除去能の評価法に関する研究

①既存のウイルス不活化・除去工程のウイルスクリアランス能を公表資料より評価し、各工程のウイルスクリアランス特性を明らかにするとともに、ウイルス安全性確保には、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。

②細胞培養技術、尿並びにウシ由来原料を用いた生物薬品の実製造工程で採用されているウイルスろ過工程、クロマトグラフィー工程並びに液状加熱処理工程のウイルスクリアランス能を評価し、これらの工程の組合せにより高いウイルス除去・不活化能の達成を確認した。

## F. 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)
- 4) 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)
- 5) 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, 151-159 (2005)

## 2. 学会発表

- 1) 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、2005年3月30日、東京
- 2) 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年12月16日、東京
- 3) 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28日、仙台
- 4) 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

- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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

## G. 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