

致死性神経変性疾患であるプリオン病(伝達性海綿状脳症)を引き起こすと考えられている。また感染性をもつ異常型プリオンは、凝集体のサイズによって感染性が異なるとの報告¹⁾もあるが、詳しいことはよくわかっていない。異常型プリオンが、ひとたび製造工程に混入するとその検出や不活化/除去が困難なため、迷入させないための方策が取られ、無血清培地への切り替えや培地に含まれる反動物由来原材料に関する最大限の注意が払われている^{2~4)}。

ウイルスの基本構造は、粒子の中心にあるウイルス核酸と、それを取り囲むカプシドと呼ばれるタンパク質の殻から構成された粒子である。その大きさは最も小さいものはパルボウイルス(直径20nm)やピコルナウイルス(20~30nm)で、大きいものは最近見つかったミミウイルス(400nm)までその分布範囲は広い(図1)。これに対して比較的大きな分子量をもつイムノグロブリンは、2本のH鎖と2本のL鎖からなり、そのサイズは約10nmである。したがって、イムノグロブリンと最も小さなウイルスとの差はそれほどないことがわかる。またウイルスはサイズが異なるばかりでなく、その核酸の種類も形態(エンベロープの有無など)も多様である。2005年には1,950種のウイルスが記載されているが⁵⁾、ヒトに感染し、病原性をもつウイルスは必ずしも多い訳ではない。ところが、その一方で新しい人獣共通感染症を引き起こすウイルスが次々報告されており、未知のウイルスによる医薬品の汚染が起きる可能性を常に孕んでいる。ウイルスフィルター、培養技術や精製工程の改良に伴いウイルス安全性は向上しているものの、細胞基材のウイルス試験や医薬品の製造工程における不活化工程や除去工程を組

み合わせることによって、さらに安全性を高める工夫がなされている⁶⁾。

2. バイオ医薬品におけるウイルス安全性

日本では1985年に承認されたインスリンやインターフェロンβ以来、約80品目もの組換え・細胞培養医薬品が国内で承認され、臨床現場で使われている⁸⁾。これらの医薬品のうち動物細胞を用いて製造される医薬品は、生体成分を利用して製造されるために生産基材や原材料が感染性物質を含んでいる可能性があり、またその製造工程で感染性物質が混入すると、重大な感染事故を引き起こす懸念がある。そのため、バイオ医薬品の安全性は極めて厳格、かつ合理的なルールに沿って守られてきた。バイオ医薬品のウイルスの汚染を防ぐための基準作りが日米欧で行われ、平成12年にガイドライン「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」(Q5A)が通知され⁹⁾、原材料は「生物由来原料基準」²⁾および細胞基材については「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」(Q5D)⁷⁾などを考慮してウイルス安全性に努めることになっている。ガイドラインに示されている特徴的な考えは、低濃度のウイルス検出感度に限界があるため、ウイルスクリアランス試験というプロセス評価を加えることにより、最終製品のウイルスに対する安全性を担保するという点にある。そのために、適切な工程でのウイルス試験や精製工程でのウイルス不活化/除去能を定量的に

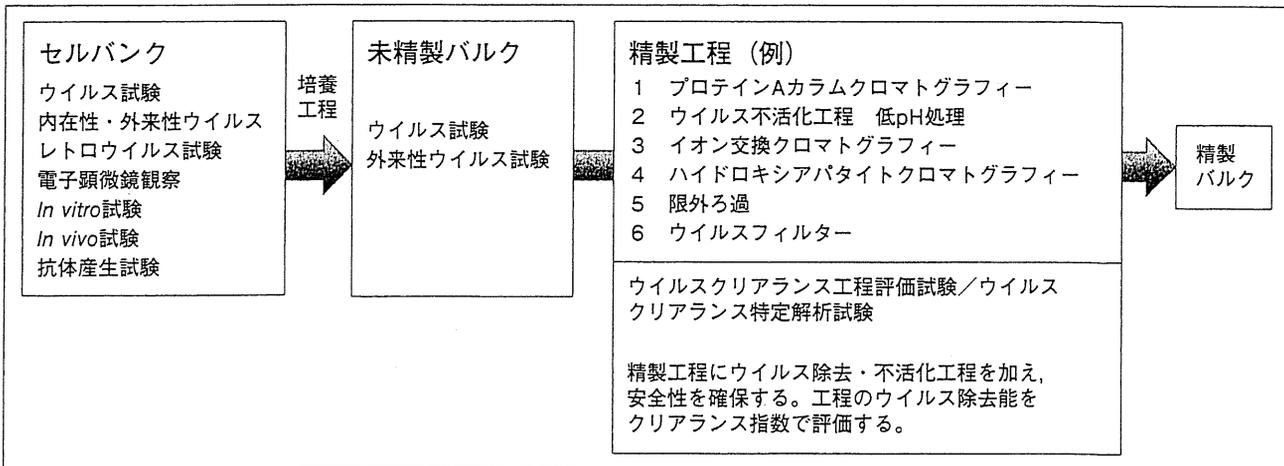


図2 バイオ医薬品の製造工程

示すことによって、工程全体を通じてその妥当性を明らかにする必要がある(図2)。

ウイルスによる汚染の可能性として、①医薬品生産に用いられる細胞が内在性、あるいは外来性ウイルスによって汚染されているケース(例としてレトロウイルスなどの潜伏感染やヘルペスウイルスの持続感染などによるもの)、②細胞培養に用いられる培地、トリプシン等の生物由来原料がウイルスで汚染されているケース、③細胞培養や精製工程における外界からのウイルスが迷入するケース(培養操作時のウイルス迷入や精製カラムの汚染や製剤化での汚染など)がある。したがって、こうした可能性を否定できるような合理的な根拠が提示されなくてはならない。そのためには、製造に用いられる細胞のウイルス安全性を十分調べることで、原材料の生物由来原料の基準に基づいた使用、製造工程でのウイルス不活化除去能の評価、製造工程での適切な段階でのウイルス試験が必要になる。

3. 医薬品製造用細胞のウイルス安全性

医薬品製造に用いられる細胞は、管理の基本となるMCB(マスターセルバンク)とこのMCBを増幅・分注・ストックし、実際の製造の度に用いられるWCB(ワーキングセルバンク)の2種類の細胞バンクとして管理される。MCBの純度試験では、無菌性やマイコプラズマの否定試験に加えて、多様なウイルス検出のためのウイルス試験が必要である。MCBは、バイオ医薬品製造の起点となる細胞なので、厳しい管理が必要になる。MCBのウイルス試験は、電子顕微鏡による直接観察やウイルスに対する感受性の高い細胞による感染性試験、実験小動物を用いたウイルス試験など多岐にわたる。MCBの純度試験に要求されるものには、①レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験、②*In vitro*試験、③*In vivo*試験、④抗体産生試験、④その他細胞種特異ウイルス試験(適宜実施)がある(表1)。これに加えてCAL(医薬品製造のために*In vitro*細胞例の上限までに培養された細胞)についても①~③のウイルス試験が必要となる。

レトロウイルスは、そのライフサイクルに、感染宿主のゲノムに組み込まれる過程がある。そのため、いったん感染が成立して、ゲノムへの組み込みが起きると、ゲノムから取り除かれることなく、宿主細胞に潜み続ける

表1 各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB	CAL ^a
レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験感染性試験			
感染性試験	+	-	+
電子顕微鏡観察	+	-	+
逆転写酵素活性 ^b	+	-	+
その他細胞種特異ウイルス試験 ^c	適宜実施	-	適宜実施
非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験			
<i>In vitro</i> 試験	+	- ^d	+
<i>In vivo</i> 試験	+	- ^d	+
抗体産生試験 ^e	+	-	-
その他細胞種特異ウイルス試験 ^f	+	-	-

- CAL: 医薬品製造のために*In vitro*細胞例の上限までに培養された細胞。
- レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要。
- 細胞株個々の起源・由来から存在が予測されるウイルスを検出するために適した試験。
- 第1回目のWCBについては、CALの段階で実施すること。それ以降のWCBについては、それ自体またはCALの段階で*In vitro*試験および*In vivo*試験をそれぞれ1種類ずつ実施する。
- げっ歯類由来細胞株に対する試験の例として、マウス抗体産生(MAP)試験、ラット抗体産生(RAP)試験、ハムスター抗体産生(HAP)試験がある。
- ヒト由来細胞株、ヒト以外の霊長類由来細胞株あるいはげっ歯類以外の動物由来細胞株である場合は、それぞれの細胞株に適切な試験を適宜実施すること。

表2 レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験

感染性試験	S ⁺ L ⁻ フォーカスアッセイ(異種指向性、両指向性のマウスのレトロウイルスを調べる試験法)XCブランクアッセイ(ラット横紋筋腫由来細胞を使う同種指向性マウスレトロウイルス試験法)
電子顕微鏡観察	透過型電子顕微鏡で、細胞の超薄切片を観察する。げっ歯類の細胞株の多くは、内在性レトロウイルス粒子、レトロウイルス様粒子(A type, R type)が観察されるが、感染性がなく、医薬品製造に使用される。
逆転写酵素活性	レトロウイルスは、RNAを鋳型にしてDNA合成するために逆転写酵素をもっている。この活性は宿主にはないためレトロウイルスの検出に用いられる。
その他の細胞種特異ウイルス試験	その他の内在性ウイルスに関しては、各ウイルスに特異的な検出系がある。NATなどは、高感度であるが、感染性のないウイルスの検出や混入したDNAの非特異的増幅などの可能性を考慮するべきである。

ことができる。実際、ほ乳類のゲノムでは実にその8~10%は、レトロウイルスに由来する構造からなるといわれている。そのほとんどが、すでに進化の途上に複製能を失ったかつてのウイルスゲノムの残骸である。ところ

表3 非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験

In vitro試験	In vitro試験は広範囲のウイルスに感受性の高い培養細胞(MRC-5細胞, Vero細胞等)を使用する。cell lysateを添加するか, 混合培養してCPEの有無や上清での血球凝集反応を観察する。 ①MRC-5細胞(ヒト胎児正常肺組織由来) アデノウイルス, コクサッキーウイルスA, B, エコーウイルス, インフルエンザ, パラインフルエンザ, 単純ヘルペスウイルス, CMV, エンテロウイルス, ポリオウイルス, 麻疹ウイルス, ワクシニアウイルス, 風疹ウイルス, RSウイルス, アルボウイルスなどが検出できる。 ②Vero細胞(アフリカミドリザル腎臓上皮由来) アデノウイルス, コクサッキーウイルスA, B, エコーウイルス, インフルエンザ, パラインフルエンザ, 単純ヘルペスウイルス, CMV, エンテロウイルス, ポリオウイルス, 麻疹ウイルス, ワクシニアウイルス, 風疹ウイルス, RSウイルス, 日本脳炎ウイルス, ポックスウイルス, フラビウイルス, ポリオーマウイルス, ロタウイルス, フィロウイルス, レオウイルス, アレナウイルス, ブンヤウイルス, コロナウイルス, ジステンバーウイルス, アルボウイルスなどが検出できる。
In vivo試験	①発育鶏卵接種試験: インフルエンザ, 麻疹ウイルス, 風疹ウイルス, ヘルペスウイルス, ラブドウイルス, ワクシニアウイルスなどを検出できる。 ②成熟マウス接種試験: ヘルペスウイルス, ラブドウイルス, ワクシニアウイルス, リンパ性脈絡髄膜炎ウイルスなどを検出できる。 ③乳のみマウス接種試験: コクサッキーウイルスA, B, 単純ヘルペスウイルス, ラブドウイルス, ワクシニアウイルス, リンパ性脈絡髄膜炎ウイルスなどを検出できる。 ④モルモット接種試験: パラミクソウイルス, レオウイルス, ワクシニアウイルス, リンパ性脈絡髄膜炎ウイルス等を検出できる。
抗体産生試験	マウス, ハムスター, ラットなどに経口, 経鼻, 腹腔などから接種して4週間後の血清中の抗体産生の有無を調べ, ウイルスの有無を確認する。
その他細胞種特異ウイルス試験	特定のウイルスを標的とした NAT等

が中には, 感染性は失われたものの, ウイルス様の粒子を細胞内に産生しているものや細胞外に放出している細胞がある。例えばバイオ医薬品製造でよく使われるCHO細胞は, このようなウイルス様粒子を絶えず産生しており, 電子顕微鏡観察によって細胞内にウイルス様粒子が認められる。この粒子は, 感染性をもたず, 安全性がすでに明らかになっており, CHO細胞は医薬品製造に最も多く使われている細胞である。ウイルス試験は, 内在性のレトロウイルスのほか, 外来性のレトロウイルスの試験も必要である(表2)。この他にIn vitro試験によって, 多様なウイルスに対してそれぞれ高感受性の細胞を用いてMCBやCALの感染の有無を調べる必要がある(表3)。またIn vivo試験では, 発育鶏卵や小動物を用いてウイルスの感染の有無を同様に調べる。さらにMCBに関しては, 抗体産生試験によっても感染の有無を調べる。

4. 医薬品製造工程におけるウイルスクリアランス試験

ウイルスクリアランス試験は, 未精製バルクから, 精製バルクまでの精製工程でのウイルスの不活化, 除去能を評価することである。出発点となる未精製バルクは培養後の上清であり, ウイルス汚染の有無を検出するのに適した段階であると考えられる。Q5Aでは精製バルクにおける適切なウイルス試験を求めている。ここでは未

精製バルクのウイルス試験では外来性ウイルスが存在しないことを高い感度をもつ検出法によって確認しなくてはならない。細胞や未精製バルクでの外来性ウイルス汚染がわかったものについては, そのウイルスのヒトへの感染の有無にかかわらず, その利用は例外的なケースを除いて通常認められない。ICH Q5Aガイドラインには, 細胞や未精製バルクでウイルスが検出された場合を5段階に分けてウイルスクリアランス工程評価の実施要領が示されている。例えばCHO細胞を用いて得られた未精製バルクには, レトロウイルス様粒子が認められるが, 感染性はなく非病原性であると認められている。ウイルスクリアランス試験では非特異的モデルウイルスを用いたウイルスクリアランス工程特性解析試験とともに特異的モデルウイルスを用いたウイルスクリアランス工程評価試験(例えばマウス白血病ウイルス)が必要になる。つまりウイルスクリアランス工程評価試験ではMCBに存在することが知られている, ないし存在が予想されるウイルスのクリアランスを証明するために行われ, ウイルスクリアランス工程特性解析試験では製造工程中に迷入する可能性がある外来性ウイルスのクリアランスに関して保証を与えるためのものである。

ウイルスクリアランス工程特性解析試験で用いられるのは非特異的モデルウイルスと呼ばれる既知のウイルスである。この試験では, その性質や形態(エンベロープの有無や核酸), サイズが異なるウイルスを選定して実施する。使われるウイルスの例を表4にあげてある。実

表4 ウイルスクリアランス試験に用いられるウイルス

ウイルス	宿主	ゲノム	env	サイズ(nm)	形状	抵抗性
マウス微小ウイルス(MVM) バルボウイルス科	マウス	DNA	有	22-25	球形	高
水痘性口内炎ウイルス(VSV) ラブドウイルス科	ウマウシ	RNA	有	70×150	弾丸	低
マウス白血病ウイルス(MuLV) レトロウイルス科	マウス	RNA	有	80-120	多様/球形	低
シンドビスウイルス(Sindbis Virus) トガウイルス科	ヒト	RNA	有	60-70	球形	低
ウシ下痢症ウイルス(BVDV) フラビウイルス科	ウシ	RNA	有	50-70	多様/球形	低
ポリオウイルスSabin 1型(Poliovirus) ピコルナウイルス科	ヒト	RNA	無	25-30	正20面体	中
ネコカリシウイルス(FCV) カリシウイルス科	ネコ	RNA	無	30-38	正20面体	中
仮性狂犬病ウイルス(PRV) ヘルペスウイルス科	ブタ	DNA	有	120-200	球形	中

際にはこれらのウイルスをスパイクし、医薬品の精製工程の不活化、除去能を評価する。クリアランス試験は、2つ以上の製造工程について、どのようなウイルス不活化、除去能力を有するかを評価することが望ましいとされる。

5. 外来性感染性物質による汚染

実際今日まで、医薬品製造細胞が培養時にウイルスに感染し、出荷が停止した例を始めとするいくつかの事例が海外で報告されている(表5)。最近では2008、2009年にライソゾーム酵素欠損疾患の治療薬を製造していたGenzyme社が、製造に使われていたバイオリクターのウイルス汚染によって、一時操業停止に追い込まれ、CerezymeとFabrazymeの供給不足を招いた⁹⁾。これは

ウイルス感染によって、CHO細胞の増殖性が低下したためにウイルス汚染が見つかった例である。原因となったウイルスは分離され、Vesivirus2117と名づけられた。このウイルスはエンベロープをもたない、正20面体構造(40nm)をもつカリシウイルス科のウイルスで、その塩基配列の解析から同じベジウイルス属に分類されるミンクカリシウイルスやネコカリシウイルスによく似ていることがわかった。幸いこのウイルスはヒト細胞には感染せず、出荷が停止されたため、製品の汚染はなかったが、動物細胞を使ったバイオ医薬品製造のウイルス安全性にとって大きな教訓となった。

おわりに

細胞株由来のバイオテクノロジー応用医薬品製造業者

表5 報告のあるバイオ医薬品製造におけるウイルス汚染事例

ウイルス	細胞	汚染源	会社	文献
EHDV	CHO cells	contaminated FBS	Recombinant protein for phase I clinical trials (Biofen GmbH & Co.)	Burstyn, 1996 (ref 10)
MVM	CHO cells	contaminated raw materials	Pulmozyme® (Genentech)	Garnick, 1996 (ref 11)
Vesivirus 2117	CHO cells	contaminated FBS	(BoehringerIngelheim Pharmaceuticals)	Oehming, et al., 2003 (ref. 12)
Reovirus	Unprocessed bulk harvest (CHO cells)	contaminated FBS	undisclosed	Nims, 2006 (ref. 13)
CVV	CHO cells	contaminated FBS	undisclosed	Nims, 2006 (ref. 13)
Vesivirus 2017	CHO cells	contaminated raw materials	Cerezyme® and Fabrazyme® (Genzyme)	Genzyme Corp, 2008, 2009 (ref. 9)

EHDV, Epizootic hemorrhagic disease virus(伝染性出血熱ウイルス), レオウイルス科; MVM, Minute virus of mice(マウス微小ウイルス), バルボウイルス科; CVV, Cache Valley virus(カシェ渓谷ウイルス), ブニヤウイルス科; Vesivirus 2017(ベジウイルス2017), ベジウイルス科。

は、それぞれの製品や製造工程について、ウイルスに対する安全性を保証するため採用したウイルス安全性のための方策を説明し、その妥当性を示す必要がある。そして承認審査に必要な書類には、詳細なデータに加えて、ウイルス安全性評価に関する総括を記載する必要がある。しかしウイルス試験法やウイルスクリアランス試験を行うには高度の専門性が必要とされ、その上使用するウイルスを扱うための生物学的封じ込め基準を満たした施設が必要となる。そのためウイルス安全試験はその多くが委託機関によって行われている。

■参考文献

- 1) Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F. and Caughey, B.: The most infectious prion protein particles., *Nature*, 437, 257-261, 2005.
- 2) 「生物由来原料基準」平成15年厚生労働省告示第210号, 平成15年5月20日
- 3) 「ウシ等由来原材料を使用した医薬品, 医療用具等の一部変更承認申請におけるリスク評価等の取扱いについて」薬食審査発第801001号 薬食安発第0801001号 平成15年8月1日
- 4) 「生物由来原料基準の規定を満たさないマスターセルバンク又はマスターシードを使用した医薬品等の取扱いについて」事務連絡 平成21年3月27日 厚生労働省医薬食品局審査管理課
- 5) Fauquet, C.M., Fargette, D. International committee on taxonomy of viruses and the 3, 142 unassigned species., *Virology*, 2, 64, 2005.
- 6) 「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス 安全性評価」医薬審第329号通知 平成12年2月22日 (ICH Q5Aガイドライン)
- 7) 「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基材の由来, 調製及び特性解析」医薬審第873号, 平成12年7月14日 (ICH Q5Dガイドライン)
- 8) http://www.nihs.go.jp/dbcb/approved_biologicals.html
- 9) Oehmig, A., Büttner, M., Weiland, F., Werz, W., Bergemann, K., Pfaff E.: Identification of a calicivirus isolate of unknown origin., *J.Gen.Virol.*, 84, 2837-2845, 2003.
- 10) Burstyn, D.G.: Contamination of genetically engineered Chinese hamster ovary cells., *Dev. Biol. Stand.*, 88, 199-203, 1996.
- 11) Garnick, R.L.: Experience with viral contamination in cell culture., *Dev. Biol. Stand.*, 88, 49-56, 1996.
- 12) Oehmig, A., Büttner, M., Weiland, F., Werz, W., Bergemann, K., Pfaff, E.: Identification of a calicivirus isolate of unknown origin., *J. Gen., Virol.*, 84, 2837-2845, 2003.
- 13) Nims, R.W.: Detection of adventitious viruses in biologicals - a rare occurrence., *Dev. Biol.*, 123, 153-64, 2006.



ベルテック社
クリーンルーム用製品
 DEC-AHOL®-WFI 70% (70% IPA)
 STER-AHOL®-WFI 70% (70% 変性エタノール)

特徴

- ・cGMPに基く製造設備
- ・USP 注射用水 (WFI) で希釈
- ・0.2µmフィルター通過
- ・ダブルバッグ包装
- ・γ線照射滅菌済
- ・各種証明書をLot#毎に発行
納品毎に添付
(分析試験・無菌性試験
γ線照射・LAL Test)
- ・豊富なバリデーションデータ



試供品あります。

その他、様々な滅菌・消毒・洗浄剤や器材消耗品、モニタリングシステム等の製品がラインナップ化されています。

カタログのご請求、お問合せは下記までお願いします。

テクノケミカル株式会社

〒113-0021 東京都文京区本駒込 1-27-9 HP: www.technochemical.com
 TEL: 03-3947-7310 FAX: 03-3947-7306 Email: info@technochemical.com

DM資料請求カードNo.63

ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性

遊佐 敬介^{*1.#}, 山口 照英^{*2}, 川崎 ナナ^{*1}

ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性

遊佐 敬介*^{1, #}, 山口 照英*², 川崎 ナナ*¹

(受付:平成23年2月15日, 受理:平成23年3月30日)

Xenotropic Murine Leukemia Virus-related Virus and Viral Safety

Keisuke YUSA*^{1, #}, Teruhide YAMAGUCHI*² and Nana KAWASAKI*¹

1. はじめに

エイズ患者がはじめて報告されたのは1981年である。不幸な血液製剤汚染の例をあげるまでもなく、生物製剤におけるウイルス安全性の問題は常に問われ続けている大きな課題のひとつである。ここ30年を振り返ってもエイズウイルスの他に新規のウイルス感染症が相次いで報告された。SARSウイルス、ニパウイルス、ウェストナイルウイルスなどは大きな社会問題になった。SARS、ニパウイルスは、今後感染者を出す可能はあるものの、幸いなことにこれらはすばやい対応によって局所的な流行で封じ込められてきている。一方感染者の一部に脳炎を発症させるウェストナイルウイルスは、アフリカ北東部から既に北米に侵入し、2010年には全米で981人の感染者が確認されており、メキシコにも広がりがつつある。このウイルスは野鳥に感染して運ばれ、蚊によって感染が広がる。こうした人獣新興感染症は感染が広がると、輸血、臓器移植、血液製剤を含めた生物製剤のウイルス安全性に脅威となるので常に監視をしていく必要がある。

最近ある種のレトロウイルスが前立腺癌¹⁾や慢性疲労症候群^{2,3)}の患者群で高率に感染しているという報告が米国であった。しかも健常人でもその3.7%にウイルス感染が見つかったという報告²⁾があり、議論を呼んでいる。だが、その後ウイルス感染が確認できないとする否定的な報告が相次いだ^{4~8)}。ヒトの疾患とウイルスの因果関係を即断するには、注意深さも必要だ。過去にはウイ

ルスとの関係を疑われるものの、その後確認することができず、結局否定された事例が過去にいくつもあるからである⁹⁾。

2. レトロウイルス感染の報告

2.1 前立腺癌患者でのレトロウイルス感染報告

ことの始まりは、前立腺癌発症に関係する遺伝子を探索する過程で見つかったRNase L遺伝子である^{1,10)}。この遺伝子を調べてみると、興味深いことにRNase Lの462番目のアミノ酸は通常アルギニンだが、これがグルタミンに変わっている変異R462Qをもっている人がいることがわかった。RNase Lというのは、RNAの分解酵素のひとつである。ウイルス感染によってインターフェロン type Iの分泌を介して、RNase Lが活性化され、外界からのRNAを分解し、感染を防ぐ。ちなみにこの抗ウイルスシステムを担うRNase Lの遺伝子をノックアウトしたマウスでは、ピコルナウイルス、コクサッキーウイルスB4などに感染しやすくなることが確かめられている。

常染色体上の遺伝子は通常母方と父方から一つずつ受け継いでいる。R462Qの変異RNase Lを持つ人の前立腺癌の発症率を見ていくと、この変異遺伝子を持つ人(RQ)は前立腺癌の発症率が、1.5倍にあがり、二つ持った人(QQ)では2倍にあがる。実際、この変異のためにRNase Lの活性は本来の1/3にまで低下して

*1 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

*2 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関 3-3-2 (〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda, Tokyo 100-0013, Japan

責任著者 Corresponding author

しまう。そのため変異 RNase L を二つもっている人は、病原体に対する防御機能が低下していると考えられる。そこで QQ の人で、前立腺癌を発症した患者の癌細胞にウイルスが感染しているかどうかを調べたところ、患者の 40% からマウス白血病ウイルスによく似た未知のレトロウイルスが検出された。そのウイルスは、異種指向性マウス白血病ウイルス関連レトロウイルス (XMRV) と名付けられた。その塩基配列は従来までよく知られている XMLV 系統のものとは違うが、極めて近い。もちろん RNase 活性の低下によって感染しやすくなった結果、ウイルスが見つかっただけかもしれない。癌発症との因果関係を議論するには十分ではない。不思議な点は XMRV が癌細胞そのものではなく、周辺のスโตรーマ細胞に感染している点である¹¹。その後別の研究グループが、ウイルスはスโตรーマ細胞よりむしろ末期の前立腺癌細胞に感染しており、RNase L の変異とウイルスの感染率は関係がないと報告している¹⁰。またヨーロッパの他のグループは、前立腺癌を同様に調べたが RNase L の変異の有無に関わらず、ウイルスの感染を検出することはできなかった^{4,11}。XMRV 感染者は北米にのみ存在しているのか、ウイルスはスโตรーマ細胞にのみ感染し、癌細胞には感染していないのか、R462Q 変異は発癌過程と関係しているのかといった点も含め、まだ不明な点が多い。

2.2 慢性疲労症候群患者でのレトロウイルス感染の報告

慢性疲労症候群とは、強度の疲労が長期にわたって続く原因不明の疾患である。Lombardi *et al.*²⁾ は、慢性疲労症候群の患者で 67%、健常人では 3.7% の血液サンプルから XMRV を核酸増幅法によって容易に検出することができたと報告した。おどろいたことに感染細胞からは、ウイルス抗原が容易にみつかり、ウイルスが分離された。ウイルスは血中に比較的高いコピー数で存在し、末梢血中のリンパ球に感染が確認された。感染者のリンパ球を培養すると実際に調べた 5 人の患者すべての細胞でウイルスのエンベロップ抗原が確認されている。もしこれが本当に特異的なウイルス抗原をみているとすると、XMRV はほかのどんなレトロウイルスよりも末梢リンパ球に高い感染率を示していることになる。ところが、この報告に続く複数の独立した研究グループからは、慢性疲労症候群の患者で XMRV 感染の証拠を見つけることはできないという報告が相次いだ⁵⁻⁸⁾。

昨年 12 月に慢性疲労症候群の患者で XMRV とは異なるが同じマウスレトロウイルスの一種である MLV 関連ウイルス (MLV に近縁のウイルス) が高率でみつか

り、感染と発症の間に関係があるのではないかと報告された⁹⁾。従来まで慢性疲労症候群の発症は、ウイルス感染のほか多様な原因で起きるのではないかと考えられていた。そのため患者でのウイルス感染の二つの報告は驚きとともに受け止められた。もし慢性疲労症候群とレトロウイルス感染とのあいだになんらかの関係があることが裏づけられれば、極めて重要な発見となるのはいうまでもない。慢性疲労症候群がレトロウイルス感染によって引き起こされるとするなら、抗ウイルス剤による有効な治療が可能になるからである。

まとめるとこうなる。現在ヒトに感染が疑われているウイルスはマウスのレトロウイルスによく似ており、2 種類が報告されている。一つは、XMRV (異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス) もう一つは MLV 関連ウイルスである。前者の XMRV は、前立腺癌と慢性疲労症候群の発症との関係が疑われている。このウイルスは、マウス白血病ウイルスに似てはいるがマウス細胞にもはや感染できない。おそらく進化の過程で、げっ歯類から異なる宿主に感染したものと考えられる。異種指向性とは、ヒト細胞などの異種の細胞に感染することができるのに、マウスの細胞にはもはや感染できなくなっているウイルスをいう^{12,13)}。テナガザルやコアラで見つかったレトロウイルスは、南東アジアのげっ歯類のウイルスが、進化のある時点でテナガザルやコアラに感染したものと考えられている^{12,14)}。だからといって、今回報告された XMRV がごく最近マウスからヒトに人間に感染したとは考えにくい¹⁵⁾。また後者の MLV 関連ウイルスは、いまのところ慢性疲労症候群患者で高率に感染していると報告されており、マウスゲノムに見いだされる内在性レトロウイルスとごく近縁のウイルスである。

3. ウイルス検出の真偽

3.1 近縁ウイルスによる実験室の汚染

今回問題になっているレトロウイルスは、生命科学系の実験室では非常に身近なマウスのレトロウイルスの近縁種である。あまりに身近なために、実験室で用いられる細胞や試薬は、レトロウイルスの核酸で汚染されているといっただけのことはないのである。そのため核酸増幅検査では、既知のマウスレトロウイルスの核酸の混入に十分注意する必要がある。多くのヒト癌細胞株は、ヌードマウスに移植片として移植されたのちに樹立されたという経緯がある。そのため、マウスに移植されたときにマウス個体内で移植細胞への感染がおきた可能性がある¹⁵⁾。また実験室内で感染細胞株から感染していないヒトの細胞株に、ウイルスが水平感染を起こすことも考えられる。

通常ウイルスを扱わない実験室では厳密にウイルスを封じ込めることはないので、ウイルス感染が知らぬ間にひろがっている可能性は十分ある。

またレトロウイルス汚染 DNA は、実験試薬にも含まれている。モノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマの50%が異種指向性のマウスのレトロウイルスを分泌していたという報告もある¹⁵⁾。しかも核酸増幅試薬のなかには、低温でのポリメラーゼ活性をブロックするためにマウスモノクローナル抗体が、核酸増幅試薬に含まれているものがある¹⁶⁾。つまりウイルス核酸の有無を調べる際に用いられる試薬が、レトロウイルスDNAで汚染されている可能性があることになる。実際こうした核酸増幅試薬を使い、鋳型をいれずに、核酸増幅を行うと、バンドが検出できるという報告もある¹⁶⁾。したがって、マウスレトロウイルス近縁のウイルス検出を実験室で行う場合は細心の注意を払わなくてはならない。

似たようなことが過去に何度も起きている。1972年には、ある小児横紋筋肉腫に由来するヒト細胞株で新規のレトロウイルスが発見され、最初のヒト由来のRNA腫瘍ウイルスとして脚光を浴びた。ところがこのウイルスは、のちにネコ由来の異種指向性のレトロウイルスであることがわかったのである。じつは問題の細胞株は樹立

される前に一時的に猫の脳内で異種移植片として継代されており、ウイルスはこの細胞が移植片として継代されていたときに宿主であるネコから感染したものだ¹³⁾。

3.2 マウスレトロウイルス核酸の混入の可能性

前立腺癌、慢性疲労症候群患者からのレトロウイルスが、マウスレトロウイルスの核酸の混入によるものではないかという疑いが出てきた。その一つは、XMRVの検出には、XMRVでのみ24塩基欠損している gag の leader 配列をターゲットにするプライマーが使われてきたが、この欠損は必ずしも XMRV に特異的ではないことがわかったことだ。Hue ら¹⁷⁾によると、欠損領域を標的としたプライマーを使って一般的に実験室で使用される12種類の野生由来近交系マウス DNA から内在性の MLV を容易に増幅することができた。同様にヒトの411株のがん細胞のうち5株から MLV の配列を増幅することも示された。つまり、もしマウス細胞株やヒト癌細胞株の DNA が検体に混入しているとその検体は擬陽性となる可能性が十分あることがわかったのである。

それでは患者から得られた XMRV の塩基配列は、実験室における近縁ウイルスとどんな関係にあるのだろうか¹⁷⁾。患者由来ウイルスの塩基配列をヒトの前立腺癌由

Table 1 前立腺癌、慢性疲労症候群患者での XMRV の検出

	患者	健常人	結論	文献
	86人中9人が RT-PCR 陽性			Urisman <i>et al.</i> : <i>PLoS Pathog.</i> , 2, e25 (2006) Mar
	87人中1人が RT-PCR 陽性	70人中1人が陽性	否定	Fischer <i>et al.</i> : <i>J. Clin. Virol.</i> , 43, 277-283 (2008) Nov
前立腺がん	233人中14人が PCR 陽性、54人がウイルス抗原陽性	101人中2人が PCR 陽性、4人がウイルス抗原陽性		Schlaberg <i>et al.</i> : <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 106, 16351-16356 (2009) Sep
	589人が PCR, RT-PCR 陰性、146人のウイルス抗原を検査し陰性	5人全員が抗原陰性	否定	Hohn <i>et al.</i> : <i>Retrovirology</i> , 6, 92 (2009) Oct 16
	800人弱中陽性0		否定	Aloia <i>et al.</i> : <i>Cancer Res.</i> , 70, 10028-10033 (2010) Oct
	144人中32人が PCR で陽性			Danielson <i>et al.</i> : <i>J. Infect. Dis.</i> , 202, 1470-1477 (2010) Oct
	101人中68人が PCR 陽性	218人中8人が PCR 陽性		Lombardi <i>et al.</i> : <i>Science</i> , 326, 585-589 (2009) Oct
	136人検査し, PCR 陰性	95人検査し, PCR 陽性	否定	Groom <i>et al.</i> : <i>Retrovirology</i> , 7, 10 (2010) Feb
慢性疲労症候群	32人検査し, RT-PCR で陰性	43人検査し, RT-PCR 陰性	否定	van Kuppeveld <i>et al.</i> : <i>BMJ</i> , 6, c1018 (2010) Feb
	186人検査し, PCR で陰性		否定	Erlwein <i>et al.</i> : <i>PLoS One</i> , 5, e8519 (2010) Mar
	51人検査し, PCR 陰性	56人検査し, PCR 陰性	否定	Switzer <i>et al.</i> : <i>Retrovirology</i> , 7, 57 (2010) Jul
	37人中32人が PCR 陽性	44人中3人が PCR 陽性		Lo <i>et al.</i> : <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 107, 1470-1477 (2010) Sep
	151人検査し, PCR で陰性, 79人を検査し, RT-PCR で陰性	43人検査し, RT-PCR 陰性	否定	Barnes <i>et al.</i> : <i>J. Infect. Dis.</i> , 202, 1482-1485 (2010) Nov
	198人検査, PCR 陰性	95人検査し, PCR 陰性	否定	Henrich <i>et al.</i> : <i>J. Infect. Dis.</i> , 202, 1478-1481 (2010) Nov

文 献

来の22Rv1細胞株に感染しているウイルスの塩基配列を比較してみると、22Rv1細胞株に感染しているウイルスに極めてよく似ていることが分かった。22Rv1細胞株は、細胞株樹立の過程でXMRV近縁ウイルスに感染したものと推定されている。以上から患者由来ウイルスは22Rv1細胞株のプロウイルスと起源を同じくする可能性でできた。その上患者由来のXMRVは、22Rv1細胞由来のウイルスに比べて、多様性に乏しく独立のコホートに属する複数の患者由来のウイルスと考えるには極めて不自然に思える。

国内では慢性疲労症候群の患者に関してXMRV感染の有無を調べた報告があるが、いずれも感染に否定的な発表であった^{18,19)}。既に述べた状況を考慮すると、XMRVやMLV関連ウイルス感染は、前立腺癌、慢性疲労症候群といった疾患とは関係がない可能性が高い。一部には感染ウイルスが分離されているので、すべてが近縁ウイルス核酸の混入が原因だと断言はできないが、これらウイルスの実在を疑うのに十分な証拠が蓄積されている段階であるといつてよい (Table 1)。そのため米国では150人の慢性疲労症候群の患者検体と同数の健康人の検体を使って複数の研究機関で同じ検出法によって調べる大規模な計画が進行中である²⁰⁾。これによってある程度の最終的な結論ができるものと期待されている。

4. 血液製剤の安全性

HIV, HCV, HBV に関しては、採血された血液は核酸増幅検査によって調べられ、ウイルス汚染血液は除去される体制が既に整っている。もし新規ウイルスのヒトへの感染があれば、広範なスクリーニングを行う体制を整備することは技術上問題ないと考えられる。血漿分画製剤は原料を一部海外からの輸入に頼っているが、たとえ原料に新規レトロウイルスが含まれていたとしても、血漿分画製剤製造工程には、ウイルス不活化、除去工程があり、血漿分画製剤の安全性を脅かす可能性は低い。レトロウイルスはエンベロープをもつウイルスなので、製造工程における界面活性剤処理、熱処理などによって容易に感染性を失うことが予想されるからだ。

Table 2 新規ヒト疾患関連ウイルス検出の際の注意点

1. バックグラウンドの少ない特異的な核酸増幅用プライマーを準備する。
2. 検出する新規ウイルスが、MLV, SV40などに近縁である場合はこれら近縁のウイルス核酸による汚染に注意する。
3. 標準となる陽性、陰性核酸増幅用サンプルとプライマーを準備し、研究機関配布してそれらを対照とする。

- 1) Urisman, A., Molinaro, R. J., Fischer, N., Plummer, S. J., Casey, G., Klein, E. A., Malathi, K., Magi-Galluzzi, C., Tubbs, R. R., Ganem, D., Silverman, R. H., DeRisi, J. L.: *PLoS Pathog.*, **2**, e25 (2006).
- 2) Lombardi, V. C., Ruscetti, F. W., Das Gupta, J., Pfost, M. A., Hagen, K. S., Peterson, D. L., Ruscetti, S. K., Bagni, R. K., Petrow-Sadowski, C., Gold, B., Dean, M., Silverman, R. H., Mikovits, J. A.: *Science*, **326**, 585-589 (2009).
- 3) Lo, S. C., Pripuzova, N., Li, B., Komaroff, A. L., Hung, G. C., Wang, R., Alter, H. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 15874-15879 (2010).
- 4) Hohn, O., Krause, H., Barbarotto, P., Niederstadt, L., Beimforde, N., Denner, J., Müller, K., Kurth, R., Bannert, N.: *Retrovirology*, **6**, 92 (2009).
- 5) van Kuppeveld, F. J., de Jong, A. S., Lanke, K. H., Verhaegh, G. W., Melchers, W. J., Swanink, C. M., Bleijenberg, G., Netea, M. G., Galama, J. M., van der Meer, J. W.: *BMJ*, **340**, c1018 (2010).
- 6) Erlwein, O., Kaye, S., McClure, M. O., Weber, J., Wills, G., Collier, D., Wessely, S., Cleare, A.: *PLoS One*, **5**, e8519 (2010).
- 7) Groom, H. C., Boucherit, V. C., Makinson, K., Randal, E., Baptista, S., Hagan, S., Gow, J. W., Mattes, F. M., Breuer, J., Kerr, J. R., Stoye, J. P., Bishop, K. N.: *Retrovirology*, **7**, 10 (2010).
- 8) Switzer, W. M., Jia, H., Hohn, O., Zheng, H., Tang, S., Shankar, A., Bannert, N., Simmons, G., Hendry, R. M., Falkenberg, V. R., Reeves, W. C., Heneine, W.: *Retrovirology*, **7**, 57 (2010).
- 9) Voisset, C., Weiss, R. A., Griffiths, D. J.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 157-196, table of contents (2008).
- 10) Schlaberg, R., Choe, D. J., Brown, K. R., Thaker, H. M., Singh, I. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 16351-16356 (2009).
- 11) Cornelissen, M., Zоргdrager, F., Blom, P., Jurriaans, S., Repping, S., van Leeuwen, E., Bakker, M., Berkhout, B., van der Kuyl, A. C.: *PLoS One*, **5**, e12040 (2010).
- 12) Kurth, R., Bannert, N. *Retroviruses*. Norfolk: Caister Academic Press; 2010.
- 13) Weiss, R., Telch, N., Varmus, H., Coffin, J. *RNA Tumor Viruses: Molecular Biology of Tumor Viruses (2nd Edition)*. New York: Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, NY 1984.
- 14) Voevodin, A. F., Marx, P. A. *Simian Virology*. Ames: Wiley-Blackwell; 2009.
- 15) Weiss, R. A.: *BMC Biol.*, **8**, 124 (2010).
- 16) Sato, E., Furuta, R. A., Miyazawa, T.: *Retrovirology*, **7**, 110 (2010).
- 17) Hue, S., Gray, E. R., Gall, A., Katzourakis, A., Tan, C. P., Houldcroft, C. J., McLaren, S., Pillay, D., Futreal, A., Garson, J. A., Pybus, O. G., Kellam, P., Towers, G. J.: *Retrovirology*, **7**, 111 (2010).
- 18) 佐藤英次, 古田里佳, 倉恒弘彦, 庄嶋貴之, 中富康仁, 保井一太, 宮沢孝幸. 第58回日本ウイルス学会学術総会. 徳島 (2010).
- 19) 古田里佳, 杉山武毅, 宮沢孝幸, 佐藤英次, 倉恒弘彦, 保井一太, 平山文也. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島. 263 (2010).
- 20) Kaiser, J.: *Science*, **331**, 17 (2011).

