

201235060A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川崎 ナナ

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

| | |
|---|-----|
| I. 総括研究報告 | |
| ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究 ----- | 1 |
| 川崎 ナナ | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. 細胞組織加工医薬品及びバイオ医薬品のウイルス安全性評価に関する研究 ---- | 31 |
| 川崎 ナナ | |
| 2. 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価に関する研究 ----- | 45 |
| 遊佐 敬介 | |
| 3. バイオ医薬品のウイルス安全性評価に関する研究 ----- | 67 |
| 新見 伸吾 | |
| 4. 細胞組織加工医薬品におけるウイルス検出法に関する研究 ----- | 75 |
| 橋井 則貴 | |
| 5. ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究 ----- | 83 |
| 前田 洋助 | |
| 6. 細胞組織加工医薬品のウイルス感染性リスク評価に関する研究 ----- | 85 |
| 清水 則夫 | |
| 7. 細胞組織加工医薬品及びバイオ医薬品の異常型プリオンの検出・リスク評価に 関する研究 ----- | 91 |
| 山口 照英 | |
| 8. 持続感染細胞クローンを用いた多様な異常型プリオンの検出・評価系の確立---- | 103 |
| 生田 和良 | |
| 9. 異常型プリオンの in vivo 検出系の評価に関する研究 ----- | 109 |
| 萩原 克郎 | |
| 10. 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究 ----- | 115 |
| 菊池 裕 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 121 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- | 127 |

ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究

研究代表者 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

研究要旨

本研究は、細胞組織加工製品やバイオ医薬品開発において、科学とリスクに基づくアプローチによるウイルス・プリオン安全性確保を推進するため、ウイルス・プリオン感染リスクアセスメント、リスク対応方策の例示及び開発、並びに従来のリスク評価の検証を行うものである。初年度は、細胞組織加工製品のウイルス安全性に関して、感染可能性のあるウイルスリストの作成、リスク要因の抽出、科学に基づくリスク評価に向けた臨床検体からのデータ収集、ウイルス汚染が起きた場合に想定されるウイルスの非宿主細胞への馴化の基礎的な解析、及びウイルス受容体のプロテオミクスの実施に向けた高感度分析条件の設定、並びにリスク対応策としての網羅的ウイルス検出方法の開発を行った。バイオ医薬品のウイルス安全性研究では、リスク対応として要求されるウイルスクリアランス試験の具体化に向けたモデルウイルスと除去/不活化率目標値の提案、及び事例を参考とした製造工程におけるリスク要因の考察を行った。プリオン安全性研究においては、過去のリスク評価結果の検証に向けた国際的動向調査、及び再リスク分析を行うためのヒト細胞や抗体を用いた高感度試験法の開発、並びにリスク対応策の一つとしてプリオン除去膜の開発を行った。これらの結果は相互に役立つものであり、また、最終年度のリスクマネジメントプロセスの例示に向けて、計画通りに研究を実施した。

研究分担者

| | | | |
|-------|----------------------------------|-------|---|
| 遊佐 敬介 | 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部ウイルス安全性研究室長 | 大久保祐士 | 一般社団法人 日本血液製剤機構 日本PDA 製薬学会 バイオウイルス委員会 SALLY 分科会 |
| 新見 伸吾 | 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第三室長 | 井上 雅晴 | 旭化成メディカル株式会社 |
| 橋井 則貴 | 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第一室長 | 大和田 尚 | 日本赤十字社中央血液研究所 |
| 前田 洋助 | 熊本大学 医学薬学研究部 感染防御学分野 准教授 | 岡野 清 | 株式会社東レリサーチセンター |
| 清水 則夫 | 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 准教授 | 小田 昌宏 | 日本ポール株式会社 |
| 山口 照英 | 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官 | 亀井慎太郎 | 一般財団法人 化学及血清療法研究所 |
| 生田 和良 | 大阪大学微生物病研究所 教授 | 川俣 治 | 株式会社エスアールエル |
| 萩原 克郎 | 酪農学園大学獣医学群獣医学類教授 | 北野 誠 | ディー・エス・エムジャパン株式会社 |
| 菊池 裕 | 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 第一室長 | 洪 苑起 | 日本製薬株式会社 |
| 協力研究者 | | 小杉 公彦 | 日本ミリポア株式会社 |
| 小林 哲 | 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官 | 塩見 哲次 | 和光純薬工業株式会社 |
| 柚木 幹弘 | 一般社団法人 日本血液製剤機構 | 末永 正人 | 武田薬品工業株式会社 |
| 坂井 薫 | 一般社団法人 日本血液製剤機構 | 菅谷 真二 | 東和薬品株式会社 |
| 久保 純 | 一般社団法人 日本血液製剤機構 | 菅原 敬信 | 一般財団法人 化学及血清療法研究所 |
| | | 龍田 祐治 | 東洋紡バイオロジックス株式会社 |
| | | 築山 美奈 | 日本チャールス・リバー株式会社 |
| | | 新見 伸吾 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| | | 松野 哲巖 | 旭化成ファーマ株式会社 |
| | | 丸山 裕一 | デンカ生研株式会社 |
| | | 村井 活史 | 一般社団法人 日本血液製剤機構 |

A. 研究目的

有効な治療法がない疾患などを対象として、細胞組織加工製品や新規なバイオ医薬品などの開発・臨床研究が進められている。研究成果の早期実用化に向けて、ウイルス等感染性因子の安全性確保は最優先課題である。ウイルス等による感染が、国民の健康を著しく損ねる危険性があることは周知の事実であるが、ウイルス等の特性が十分に解明されていないこと、現在の科学水準では検出に限界があることを理由に、ウイルス等感染性因子を一律厳格に規制することは、国民が新たな治療の機会を失うことにもつながる。ウイルス等感染性因子安全性は、感染リスクの特定、分析、評価、対応、管理、コミュニケーションを適切に実施することにより共有される。

本研究では、細胞組織加工製品及び新規なバイオ医薬品の開発、治験、承認申請・審査、適正使用の環境整備に向けて、(1)細胞組織加工製品のウイルス安全性評価、(2)バイオ医薬品ウイルス安全性評価、(3)プリオン安全性評価を実施する。

(1)では、文献調査及び検査・実験によるウイルス感染リスクアセスメントを行い、リスク評価結果に基づくリスク対応方策の例示を行う。初年度は、リスク特定として、感染性ウイルスのリスト化及びリスク要因の抽出、また、次年度のリスク分析に向けた臨床検体からのウイルス検出系を確立するためのデータの収集、ウイルス汚染が起きた場合に想定されるウイルスの非宿主細胞への馴化の基礎的な解析、及びウイルス受容体のプロテオミクスの実施に向けた高感度分析条件の設定を行った。並行して、リスク対応方策の一として、感染リスクの高いウイルスを簡便にかつ高感度で、しかも短時間で検出する持続感染ウイルスの網羅的検査システムの構築を行った。

(2)では、ICHQ5A (医薬審 329 号)「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について」が発出されてから 12 年が経過し、ウイルス安全性に関する知識及び経験が蓄積されてきたことを踏まえ、ICHQ5A では明確にされていない推奨されるモデルウイルスの組み合わせや目指すべきウイルスクリアランス値について具体的に提言することを目標として研究を行う。初年度は、抗体医薬品の精製工程に関する審査事例、及びウイルス汚染事例から明らかになったウイルス汚染防御方策等を調査した。

(3)では、これまでのプリオン感染リスク評価結

果を検証することを目的として、ヒト細胞や抗体を用いた高感度プリオン検出法の開発と、海外の事例調査等を行った。

B. 研究方法

(1)細胞組織加工製品のウイルス安全性評価

1) ウイルス感染リスク特定

ワクチン生産に関する 2010 年の FDA ガイダンス、日本薬局方の参考情報、その他の資料をもとにして、細胞組織加工製品に混入する可能性のあるウイルスのリストを作成した。また、ウイルス感染リスク要因を抽出し、該当するウイルスを考察した。

2) 症例報告を利用したリスク分析

患者が免疫抑制状態である場合について、ウイルス感染リスク分析を行うため、2013 年 2 月 1 日の時点で医薬品医療機器総合機構 (PMDA) が公開していた副作用データベースの症例報告ラインリストから、一般名にマブ (抗体) またはセプト (受容体) を持つ医薬品、またはシクロスポリン・タクロリムス・プレドニゾロン・ミコフェノール酸 (低分子の免疫抑制剤) を用いたケースで、かつ副作用名にウイルス感染を含む症例を抽出した。その中からウイルス名が明記されている症例を選択して、ISO が定めたリスクアセスメントの手法を参考に、予備危険源分析法 (PHA 法) による各ウイルスのリスク分析を試みた。すなわち、各ウイルスについて症例数を集計して、まず頻度 (Likelihood) ランクを求めた。ついで、転帰が死亡・未回復・後遺症となった症例を重篤症例として、転帰不明の症例を除く全症例に対して重篤症例が占める割合から、重篤度 (Severity) ランクを求めた。なお、副作用名にウイルス感染を含む条件ではパルボウイルス B19 (B19) や水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) については症例が検出されてこなかった。そこで、B19 については副作用名に伝染性紅斑・赤芽球瘡を含む症例、VZV については副作用名に水痘・帯状疱疹を含む症例を別途検索した。得られた重篤度ランクと頻度ランクをかけたものをリスクスコアとして、各ウイルスを比較した。

3) 非宿主細胞への感染と馴化に関する検討

3-1) 細胞とウイルス DNA

293T, Vero, CV-1, 及び CR-FK 細胞は DMEM に 10% のウシ胎児血清を加え、培養に供した。カ

リシウイルスは、自然宿主である CR-FK 細胞で増幅し、その上清を遠心 (2,000 rpm, 15 min) して、0.22 μm フィルターを通して分注し、 -80°C で保存した。ネコカリシウイルス (F4 株) 液の TCID_{50} は、CR-FK 細胞を用いて決定した。イヌカリシウイルス (#48) は、MDCK 細胞、シンドビスウイルス、ポリオウイルス (Sabin 株) は、HeLa 細胞を用いてそれぞれの力価を決定した。

3-2) ウイルス感染感受性の測定

細胞を 3,000 個 96-穴プレートに播種し、一晚培養した後、そこに段階希釈したウイルス液を加え、 37°C 、5% CO_2 存在下で培養を行った。6 日後に細胞変性効果 (CPE) の有無を顕微鏡下で決定した。またネコカリシウイルスの TCID_{50} は CR-FK 細胞を用いて決定した。

3-3) カリシウイルスの継代と馴化ウイルスの分離

カリシウイルス (FCV_{F4}) を 3×10^5 細胞に 400 TCID_{50} で感染させ、3 日培養し、その上清 0.5 ml を使って非感染細胞 (3×10^5) に感染させた。これを繰り返すことでウイルスの継代を繰り返した。継代を 13 回繰り返したものを FCV_{CV} とした。分離した FCV_{CV} は、0.22 μm のフィルターを通して、 -80°C に分注保存した。

3-4) ウイルス感染増殖能、細胞変性効果の比較

細胞 (1×10^5) を 100 TCID_{50} で 2 時間感染させ、その後 PBS で 2 回洗い、培養後、その上清を回収して CR-FK 細胞を用いて上清中に産生されるウイルス量を TCID_{50} によって決定した。細胞変性効果は、MTT 法、トリパンブルー染色法によって、アッセイした。

3-5) ネコ、ヒト、アフリカミドリザル JAM1 発現 CHO 細胞の作製

JAM1 の発現ベクターは、pEF6/V5-His を用いた。ネコ JAM-1、アフリカミドリザル JAM1、ヒト JAM1 はそれぞれ特異的なプライマーを使って PCR で増幅し、それを pEF6/V5-His に連結して作製した。CHO 細胞にそれぞれの JAM1 発現プラスミドをトランスフェクションし、Blasticidin S で選択した。JAM1 発現量はウェスタンブロット法によって確認した。

4) 細胞表面ウイルス受容体のプロテオミクス-高感度検出法の開発

4-1) グアニジン塩酸を用いた改良ゲル内消化法

モデル糖タンパク質として、0.5 μg のエタネル

セプト (TNF 受容体可溶性部分と Fc の融合体糖タンパク質) 及び $\alpha 1$ -酸グリコプロテインを用いた。モデルタンパク質を SDS-PAGE で分離した後、CBB 染色した。バンドを切り出し、洗浄用緩衝液 (25 mM 重炭酸アンモニウム緩衝液, pH8.0, 50% アセトニトリル) を用いて脱色・洗浄した。アセトニトリルで脱水させた後、Speed vac. Concentrator によりゲル片を乾燥させた。乾燥したゲル片に、還元溶液 (10 mM dithiothreitol, 0.2 M グアニジン塩酸, 25 mM 重炭酸アンモニウム緩衝液, pH8.0) を加えて 56°C で 1 時間インキュベートした。アルキル化は 96 mM モノヨード酢酸ナトリウムを用いて室温、暗所で行った。ゲル内から余分な試薬を取り除くために、洗浄用緩衝液を用いて 15 分毎に液を交換しながら 2 時間洗浄した後、トリプシン (Promega) を用いて 37°C で一晚ゲル内消化を行った。ペプチドの抽出は、10~50% のアセトニトリルを用いて、各々 10 分間振盪した後に 5 分間超音波処理を行い、50% アセトニトリルを用いた抽出は 3 回繰り返した。回収したペプチド溶液は speed vac. concentrator で乾燥させた後、0.1% ギ酸溶液に溶解し、LC/MS 解析に供した。

4-2) LC/MS を用いた糖タンパク質の解析

高速液体クロマトグラフィーとして、Paradigm MS4 (Michrome BioResources) を使用した。カラムは、L-column 2 ODS (0.075 mm \times 150 mm, 化学物質評価研究機構) を用いた。溶離液 A 及び B として、2% アセトニトリルを含む 0.1% ギ酸溶液、及び 90% アセトニトリルを含む 0.1% ギ酸溶液を使用した。糖タンパク質のトリプシン消化物は、5-65% (溶離液 B) のリニアグラジェント (50 分) で分離、溶出させた。流速は、0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ に設定した。

質量分析には、ナノスプレーイオン源を搭載した LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific) を用いた。マスペクトルは、 m/z 700-2000 の範囲で、ポジティブイオンモードにより取得した。得られた全てのマスペクトルに対してデータ依存的多段階質量分析 (MS^n) を行い、得られたプロダクトイオンを帰属することにより、糖ペプチドの構造を推定した。

5) 酸性化阻害剤の膜融合能に対する影響

成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV) -1 エンベロープと Luciferase 遺伝子を有するヒト免疫不全ウイルス (HIV) とのシュードタイプウイルスを作成して標的細胞へ感染させ、標的細胞に産生される Luciferase 活性で HTLV-1 エンベロープの膜融合能を評価した。さらにウイルス産生細胞側に

種々の阻害剤を添加し、その膜融合能に関連する細胞側因子を探索した。

6) 持続感染ウイルスの網羅的検査

6-1) 検体からの DNA 抽出

核酸抽出機 EZ-1 (キアゲン) を使用し末梢血から核酸を抽出した。抽出試薬は、EZ-1 Virus kit を使用した。

6-2) 核酸増幅

ウイルス遺伝子の増幅・検出には LightCycler (ロッシュ) を使用した。

6-3) ウイルス検査

ウイルス検査項目は、単純ヘルペスウイルス (HSV) 1 & 2, VZV, サイトメガロウイルス (CMV), エプスタインバーウイルス (EBV), ヒトヘルペスウイルス (HHV) 6, HHV7, HHV8, BK ウイルス (BKV), JC ウイルス (JCV), B19 の 11 種類とし、インナーコントロールとして β -globin を使用した。

マルチプレックス PCR 法により、被検ウイルスを下記に示す A, B 2 つの反応系で検出し、アデノウイルス (ADV) は別途単独で検査を行った。

A: HSV-1, 2, VZV, CMV, HHV-6, B19, BKV, JCV
B: EBV, HHV-7, HHV-8

PCR 試薬: AccuPrime Taq DNA Polymerase System, Invitrogen 社

プライマー, プローブ (FITC 標識プローブと LCRed 標識の 2 種類のハイブリッドプローブを使用) には、それぞれ特異的な配列を使用した。

PCR 反応: 95°C 2 分処理の後, 95°C 2 秒, 58°C 15 秒, 72°C 15 秒の反応を 50 サイクルさせた。

検出操作: PCR 反応終了後, メルティング解析を行ない, 各ウイルスに対応した Tm 値のピークの有無からウイルスゲノムの存否を判定した。

6-4) 固相化試薬の作製

ウイルス検査を簡便・迅速・安定的に進めるため, 13 種類のウイルス検査試薬は遠心エバポレーターを使用して 8 連ストリップに固相化した。

6-5) スパイク試験用ウイルスストックの作製

対象ウイルス: EBV, CMV

ウイルス産生細胞: EBV は B95-8 細胞, CMV はヒト正常胎児肺由来二倍体線維芽細胞株 (HFL-1)

を使用した。

(2) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

文献及び海外のコンファレンスの資料等を基に調査を行った。

(3) プリオン安全性評価

1) 培養細胞からの PrP^{res} 調製法の検討

細胞はこれまでに株化したマウス vCJD (mo-vCJD) の持続感染細胞 MV63 を用いた。また, 対照細胞は正常 PrP を発現した bSP-SC_148 を用いた。細胞を 10% FBS/BLGM 培地にて約 1 週間 Confluent まで培養した。得られた細胞について, 凍結融解及び超音波処理を行ったのち, PBS を用いて 5×10^7 cells/ml 相当となるように調整し, 細胞抽出画分とした。

2) 培養細胞由来 PrP^{res} のマウス脳内接種と発症期間の検討

培養細胞由来 vCJD 感染モデルの作出は, mo-vCJD 感染マウス由来の脳乳剤 (1% 及び 5%) に相当する細胞抽出画分を, 生後 1 日齢の FVB/n mouse に上記乳剤を脳内接種することにより行った。接種後 29 日 (29dpi) に発症前の動物を各群 n=1 で剖検した後, 残りの個体はすべて瀕死状態 (Terminal ill, 以下 TI) まで観察した。

3) Fibrinogen 製剤の vCJD クリアランス

Planova 工程直前液に mo-vCJD 感染マウス脳から調製した supersonicated microsomal fraction (sMF) を添加し, Planova20N でろ過した。WB 法で工程の PrPres 除去効果を評価した。比較対象として Planova 35N を用いた検討を合わせて実施した。PBS に mo-vCJD sMF を添加し, 陰イオン交換体膜でろ過した。ろ過前後の PrP^{res} 量を比較し除去性能を WB 法にて評価した。

4) 抗リン酸化セリンプリオンタンパク質抗体の調製

プリオンタンパク質の 43 番目のリン酸化セリン (pS43) 残基を認識する抗体産生ハイブリドーマ 3 株を BALB/c マウスに移植して得られた腹水を硫酸分画後, プロテイン A カラムで精製し, IgG 画分を得た。

5) vCJD の安全性確保に関する動向調査

EMA や FDA が発出しているガイドラインをベースに、最近の FDA の輸血関連 vCJD 感染リスクモデルや英国健康保護庁の公開情報などを調査した。また、関連する文献やウェブ公開情報も研究対象とした

(倫理面への配慮)

ウイルス及びプリオン感染サンプルは各施設の安全管理委員会の規定に従い取り扱った。動物実験は各施設の動物実験指針の規定に従い実施した。また組換え DNA 技術を用いた検討では各施設の「遺伝子組換え実験安全管理規則」を遵守した。

C. 研究結果

(1)細胞組織加工製品のウイルス安全性評価

1) ウイルス感染リスクの特定

2012年に厚生労働省から、ヒト細胞加工医薬品等に関する通知が発出されている。自己(体性幹細胞, iPS(様)細胞)に関する指針によれば、「採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症を考慮して感染症に関する検査項目を定め、その妥当性を明らかにすること。特に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)感染症, 成人T細胞白血病(HTLV)に留意すること」とされている。また同種(体性幹細胞, iPS(様)細胞)及びES細胞に関する指針によれば、ドナーの選択基準として「特にHBV, HCV, HIV, HTLV, B19感染症については、問診及び検査により否定すること。また、CMV, EBV及びウエストナイルウイルス(WNV)感染については必要に応じて検査により否定すること。」とされている。つまり、同種に関する指針では、HBV, HCV, HIV, HTLV及びB19は最優先の対応が求められるウイルスであることが明示され、その具体的対応策も示されているが、CMV, EBV, WNVについては、どのようなケースでどの程度の対応が必要であるのかは示されていない。また、自己及び同種ともにそれ以外のウイルスに対する対策について具体的には示されていない。そこで、ウイルス感染を考慮すべきケースと対応策の例を整理し、医療従事者及び患者に提示することを目的として、ウイルス感染のリスクアセスメントを実施した。

まず、ヒトへの感染が報告されている、もしくは否定できないウイルス138種を、FDAのガイド

ライン等をもとに抽出し、リスト化した(表1)。

つぎに、患者、ドナー、製品、原材料、及び製造工程の特性・特徴を考慮し、ウェブ公開情報等をもとに、ウイルス感染のリスク要因を検討した。その結果、患者側の要因として、免疫抑制状態、妊娠可能性、ドナー側の要因として、海外渡航歴が考えられた。免疫抑制状態にある患者で特定の症状が現れると考えられるウイルスとしてはアデノウイルス等11種類、妊娠可能性のある女性が患者の場合で胎児や母体に特定の症状が現れると考えられるウイルスとしては風疹ウイルス等7種類が抽出された。WNVなどドナーに海外渡航歴がある場合に感染する可能性のあるウイルスについても16種類が該当すると考えられた(表2-4)。

2) 症例報告を利用したリスク分析

患者が免疫抑制状態にある場合のウイルス感染実態を調べるため、PMDAの副作用情報より、免疫抑制剤等使用患者のウイルス感染事例を抽出した。低分子の免疫抑制剤に加え、免疫系関連分子を標的とする抗体医薬品・受容体医薬品を使用している患者の副作用情報を調べた結果、アダリムマブ、アバタセプト、インフリキシマブ、エタネルセプト、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴリムマブ、セツキシマブ、トシリズマブ、トラストズマブ、バシリキシマブ、パリビズマブ、リツキシマブについては、2例以上のウイルス感染が報告されていた。それ以外の抗体医薬品では1例のみの報告であった。2例以上の報告のある低分子免疫抑制剤及び抗体医薬品等のデータを用いてリスク分析を行った。報告が1例のみの成分・剤形については除外した。

得られた全体の症例数は1721件であった。感染が報告されていたウイルスは多いものから順に、CMV, VZV, EBV, BKV, B19, ADV, HSV, RSウイルス(RSV), JCVの9種類であった。重篤症例の割合はJCV, EBVの順に大きかった。頻度と重篤度の定義と尺度を定めて得られた結果から、EBVのリスクがもっとも高く、ついでCMV, AdV, HSV, JCVのリスクが高いと考えられた(表5)。

3) 非宿主細胞への感染と馴化に関する検討

3-1) ウイルス感受性試験によるモデルウイルスとその感染細胞系の選択

治療用細胞組織やバイオ医薬品の製造細胞への汚染は、いくつかのケースが考えられるが、ヒト細胞へのヒトを宿主とするウイルスの汚染は、よ

く調べられており、汚染が起きた場合に起きることは想定することが比較的容易である。しかし、迷入したウイルスが、ごく低い感染性をもつ非宿主細胞へ感染することで汚染が始まる場合にどんなことが起きるのかについてはよくわかっていない。本研究では、まずごく低い感染性をもつウイルスに汚染された場合に、その過程でなにが起きるのかについて調べるため、モデルとなる細胞とウイルスの感染系を選び出すことにした。最初にヒト細胞焦点を当て、ヒト由来の細胞株 293T, HeLa に低い感染性を示すウイルスを探し出すためにポリオウイルス、シンドビスウイルス、2つのカリシウイルスについてその感染宿主域をウイルスの細胞変性効果を指標に調べた(表6)。しかしヒト細胞に低い感染感受性をもつウイルスはなかった。今回はヒト細胞に感染し、弱い感染増殖性を示すモデルとなるウイルスを特定できなかったが、それに代わるモデル感染系として CV-1 細胞を用いたネコカリシウイルス感染系を使うことにした。

3-2) カリシウイルスの非宿主細胞への馴化と馴化ウイルス分離

カリシウイルスは、直径 30~38 nm の正二十面体構造の粒子で、プラス鎖の一本鎖 RNA をゲノムに持つエンベロープを持たないウイルスである。継代 1 回目の CV-1 細胞のウイルス産生量を、CR-FK 細胞のものと比べると、 $1/10^5$ 程低い(図1)。しかし CV-1 細胞で引き続き継代していくと驚いたことに3回継代しただけで、そのウイルス産生量は103倍程上昇することがわかった。つまり一回の継代に3日要したので、わずか3継代、10日に満たない短い期間に異種の細胞である CV-1 に高度に馴化したことになる。

3-3) 馴化ウイルス FCV_{CV} の強い細胞変性効果

CV-1 細胞に馴化ウイルス FCV_{CV} をそれぞれの細胞に感染させてウイルス増殖比較した(図2)。各細胞に感染させて比較してみると、このウイルスは、CV-1 細胞により馴化していることが確認された。Vero 細胞では継代時、上清に放出されるウイルス量は CR-FK 細胞と同等であったが、同じウイルス力価で感染させた場合には必ずしも高いウイルス量を産生するわけではない。

次にウイルス増殖が細胞に及ぼす影響について調べると、FCV_{F4} は宿主細胞である CR-FK で激しく増殖し、細胞変性を引き起こすが、FCV_{CV} も同様に強い細胞変性効果をもっていた。これに対して CV-1 細胞では FCV_{F4} 感染細胞からのウイルス

産生は見られたが、細胞変性効果は観察されなかった。ところが、FCV_{CV} 感染細胞では形態変化を起こし、細胞は浮き上がり、その殆どが死滅した。

3-4) FCV_{CV} の融合細胞での増殖と細胞変性効果

CV-1 細胞と Vero 細胞ではカリシウイルスの馴化に関わる表現型が異なっている。そこでこの2つの細胞を融合した細胞、C/V#01, C/V#02 細胞を作製して FCV_{CV} 感染に関する表現型を調べた結果、融合細胞では、FCV_{F4} に比べてより多くの FCV_{CV} ウイルスを産生し、かつ FCV_{CV} によって強い細胞変性が引き起こされることがわかった。

3-5) FCV_{CV} カプシドタンパク質 VP-1 のアミノ酸置換

そこで、CV-1 細胞に馴化したカリシウイルスである FCV_{CV} は、馴化前の FCV_{F4} に比べて何が変わったのかを調べるためにウイルス粒子を形成しているウイルスタンパク質 VP1 の構造に変化があるかどうかを調べた(図3)。VP1 は、668 個のアミノ酸残基からなり、N 末から C 末側に向かって N, S, P1, P2, P1 と並ぶ4つのドメインからなっている。FCV_{CV} の VP1 には3つのアミノ酸置換を伴う変異 Y354V, D427S, E519K が見つかった。

3-6) オートファジー誘導、阻害剤の影響

次にオートファジーの阻害剤である 3MA と促進作用のあるラパマイシンを使って、FCV_{CV} の増殖、細胞変性効果に対する影響を調べた。まず Vero 細胞と CV-1 細胞に FCV_{F4} あるいは、FCV_{CV} を感染させ、そこに阻害剤である 3MA を加えてその影響を調べた。3MA をウイルス感染系に加えると、1~5 mM 3MA の濃度依存的に FCV_{F4} 及び FCV_{CV} いずれの場合もウイルス産生量の減少が観察された。この結果は、CV-1 の細胞死が FCV_{CV} によってまだ誘導されず、生細胞数に変化はないことを示唆している。以上から、カリシウイルス産生にオートファジーが関与している可能性が示唆された。

次にオートファジー誘導剤であるラパマイシンによって、実際にオートファジーが誘導されるかどうかを抗 LC3 抗体により調べた。確かに LC3II が薬剤によって誘導されているのが分かった。ラパマイシンをウイルス感染系に加えて、その影響を明らかにするために上清のウイルス量を調べた。その結果、産生ウイルス量も増えていることが分かった。よってオートファジーによる小胞形成の結果、細胞破壊を伴わないウイルス産生経路によ

るウイルス産生能が高まった可能性が高いことが示唆された。

4) 細胞表面ウイルス受容体のプロテオミクス—高感度検出法の開発

ウイルス安全性確保において、原材料の特性に基づくウイルス感染リスクを考慮することは肝要である。しかし、原料細胞である iPS 細胞・ES 細胞、及び材料細胞としてのフィーダー細胞へのウイルス感染の可能性には不確な点が多い。細胞表面のプロテオミクスによりウイルス受容体の発現の有無を確認することは、ウイルス感染のリスク低減に向けて有用と思われる。微量のウイルスタンパク質に対応するため、初年度は、プロテオミクスの高感度化をめざした分析条件の最適化を行った。

ゲル内消化法と LC/MS/MS は、組織や細胞由来する微量のタンパク質の同定や糖タンパク質の糖鎖を解析するための手法として用いられている。しかし、微量試料から、信頼性のあるマススペクトルを得ることは難しい。特に、糖ペプチドの解析においては、その高い不均一性と疎水性の低さから MS/MS スペクトルを入手することは困難である。我々は、その理由として、ゲル中に含まれる SDS がタンパク質と複合体を形成し、微量ペプチドや糖ペプチドのマススペクトルの取得を困難にしていると考えた。そこで、微量ペプチドや糖ペプチドのマススペクトルを取得するために、我々は、ゲル内で形成された SDS-タンパク質複合体から SDS を除去する改良ゲル内消化法を考案した。基本的なプロトコルは、従来と同様で以下のステップより構成される。すなわち、(1)目的とするバンドを切り出し脱色と洗浄を行うステップ、(2)還元・アルキル化を行うステップ、(3)酵素消化およびペプチド回収ステップである。改良点は、ステップ(2)において、還元液にグアニジン塩酸を加える点である。タンパク質の変性剤として知られるグアニジン塩酸は、SDS と複合体を形成して不溶化する。エタネルセプトと α 1-酸性糖タンパク質を用いて本消化法の有用性を検討した結果、従来法に比べ、殆どのペプチドでピーク強度が増加し、ピーク面積が 1.5~2.5 倍上昇した。この結果は、分子量やシステイン残基の数、Grand average of hydrophobicity (GRAVY)値に非依存的であった。また、糖ペプチドについては、従来法に比べてより多様なグリコフォームの MS/MS スペクトルを取得することができた。それは、フコースの有無やシアル酸の数といった糖鎖組成の違いに非依存的であった。本手法を用いることで、微量ペプチ

ドの同定のみならず、これまで困難であった微量糖タンパク質の解析が飛躍的に進むことが期待される。

5) 酸性化阻害剤の膜融合能に対する影響

今回ウイルス産生細胞を細胞内小器官の酸性化阻害剤である BFLA1, NH_4Cl , Chloroquine 等で処理すると HTLV-1 のエンベロープの膜融合能が喪失することが明らかとなった。また Dynamin の GTPase 活性を阻害する Dynasore でもその融合能が阻害されることが判明した。一方 HIV-1 エンベロープではこれらの阻害剤ではその膜融合能は阻害されなかった。以上の結果からウイルス産生細胞側の細胞小器官の酸性化が HTLV-1 の膜融合能活性化に関連していることが示唆された。

6) 持続感染ウイルスの網羅的検査

6-1) 網羅的検査

リアルタイムPCR法によりヒトに持続感染し、且つ血液中にウイルスゲノムが検出されるウイルスの検出頻度を調べた。データは、東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターで行っている研究的ウイルス検査により得られたデータを使用し分析した(主に末梢血のウイルス検査を行ったが、尿や髄液が得られた場合には、そのウイルス検査も行った)。検査対象ウイルスは、HSV-1,2, VZV, CMV, HHV-6, B19, BKV, JCV B: EBV, HHV-7, HHV-8, AdV。検査を行った検体は、末梢血:112名より得られた640検体、尿:37名から得られた90検体、髄液:9名から得られた9検体である。検査結果は、以下の通り。

末梢血:640検体中50検体以上から検出されたウイルスは、EBV, CMV, HHV6だった。

尿:90検体中20検体以上から検出されたウイルスは、BKVとAdVだった。

髄液:9検体中1検体からEBV、2検体からB19が検出されたが、他のウイルスは検出されなかった。

6-2) 作成した固相化試薬の性能評価

13種類のウイルスについて、8連ストリップに試薬を加え、遠心エバポレーターを使用して乾燥し、固相化試薬を作製した。

検量線用のスタンダードを用いて感度検定を行ったところ、液相系の試薬を用いた場合と同等の感度を持つことが示された。さらに固相化試薬保存安定性試験を行ったところ、室温で6か月保存しても感度や特異性に問題が生じないことを確認した。

6-3) 試験用ウイルス液の作製

6-1)で得られた解析結果から、細胞組織医薬品の原材料に混入が懸念され、且つスパイク試験法の作製が可能なウイルス種として、EBV, CMV, HHV6, B19を選定した。現在当該ウイルスのスパイク試験法の実施準備を行っているが、これまでに、EBVとCMVのウイルス液作製を終了した。

a) EBV: B95-8細胞を培地交換後に6日間培養し、その培養上清をフィルター処理した後にバイアルに0.5ml分注し、EBVウイルス液とした (-80°C保存)。

b) CMV: ヒト正常胎児肺由来二倍体線維芽細胞株 (HFL-1) 細胞にCMVの実験株 (TOWN株) を感染し、感染細胞を回収後凍結融解・フィルター処理後にバイアルに0.5ml分注し、CMVウイルス液とした (-80°C保存)。

現在、EBV,CMVウイルス液の感染価測定を実施中である。

(2) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

1) ウイルスクリアランスの評価に有用なモデルウイルス

Xenotropic murine leukemia virus (X-MuLV)は、レトロウイルス科に属する粒子径が80~110nmのエンベロープを有するRNAウイルスである。バイオ医薬品の製造に多く用いられるCHO細胞をはじめ、げっ歯類由来の動物細胞には非感染性のC型レトロウイルスが含まれていることから、動物細胞を宿主として用いるバイオ医薬品のウイルススクリアランス試験では、モデルウイルスとして用いられる。

Minute virus of mice (MVM)は、パルボウイルス科に属する粒子径が18~24nmの非エンベロープ1本鎖DNAウイルスである。MVMはpHや界面活性剤処理など物理化学的な不活化処理への耐性が高く、後述するようにCHO細胞での汚染が3例報告されており、バイオ医薬品の製造において脅威となっている。従って、MVMもウイルススクリアランス試験のモデルウイルスとして有用である。現実的にはX-MuLVとMVMを基本とし、その他のウイルスについてゲノムの型、エンベロープの有無、サイズを考慮して合計3種類程度のモデルウイルスを組み合わせたことが妥当と思われる(表7)。

2) 抗体医薬品の一般的な精製工程におけるウイルス除去/不活化

Log Reduction Value (LRV)として示されるウイルスの除去/不活化率(ウイルススクリアランス指数)を抗体医薬品の精製プラットホームの各工程で評価した。

プロテインAクロマトグラフィーにおけるX-MuLV及びMVMのLRVは2.77及び2.39であった。抗体をプロテインAから遊離させる条件であるpH2.5~4では、特にエンベロープを有するウイルスが効率良く不活化される。例えば、CHOあるいはSP2/0細胞の培養上清にウイルスを20v/v%スパイクした場合、pH3.8±0.1、25±0.1°Cで30分間X-MuLVを処理すると感染価が5.0~5.8LRV低下し、そのLRVはタンパク質濃度、バッファーの組成及び塩濃度、凝集体により影響を受けない。また、pH3.7で1時間X-MuLVを処理するとLRVは3.75であるが、エンベロープを持たないMVMではLRVが1.5と低かった。

陰イオン交換クロマトグラフィーであるQ Sepharose Fast Flowでは、X-MuLV、MVM、simian virus 40 (SV40)のLRVはそれぞれ約4.2、 $\geq 5.12 \pm 0.21$ 、 $\geq 4.28 \pm 0.14$ である。げっ歯類細胞の培養上清から部分精製したモノクローナル抗体にウイルスをスパイクし、Q Sepharose Fast Flowクロマトグラフィーにおいて伝導度がウイルスのLRVに及ぼす作用が調べられている。その結果、伝導度を3 mS/cmから17 mS/cmに増加させると、X-MuLVのLRVが5.4から2.4、SV40のLRVが4.2から3.0、MVMのLRVが5.0から3.2に低下した。

樹脂の詳細については不明であるが、陽イオン交換クロマトグラフィーによるMVM、X-MuLVのLRVはそれぞれ2.0~6.3、4.5~5.4であった。

樹脂の詳細については不明であるが、疎水性相互作用クロマトグラフィーによるMVM及びX-MuLVのLRVはそれぞれ0~2.4及び0~3.9であった。

セラミックハイドロキシアパタイトのCHT type 1の塩化ナトリウム濃度勾配溶出でのabelson murine leukemia virus, X-MuLV, MVM, porcine parvovirusのLRVは、それぞれ >4 、 >3 、 >1 であった。

膜クロマトグラフィーの一種である陰イオン交換膜でウイルススクリアランスに関する検討が行なわれている。4級アミンをリガンドとするQメンブレンによるLRVは、X-MuLVで ≥ 5.35 、MVMで ≥ 6.30 、pseudorabies virusで ≥ 5.58 、Reo-3で ≥ 7.00 であり、X-MuLVとMVMについては、陰イオン

交換クロマトグラフィーに比べて、約 1.7~1.9 倍 LRV が高い。また、3 級アミンをリガンドとした中空糸型陰イオン交換膜における PPV, MVM の LRV は ≥ 5.0 であった。

3) バイオ医薬品のウイルス汚染事例とその対策

1988 年、Bioferon GmbH 社において CHO 細胞を宿主とした組換え医薬品の培養工程で、通常の製造が数週間続いた後、突然 pH が低下して細胞が死滅した。汚染ウイルスとして epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV) 318 が同定され、汚染ルートとして FBS が疑われた。その後 FBS 等の原材料のチェックと pH 及び細胞増殖を指標とした培養工程のモニタリングが実施された。

1993 年と 1994 年の 2 回 Genentech 社において CHO 細胞を宿主とした組換え医薬品の培養工程で MVM による汚染が起り、両者で株は異なっていた。培地を含む原材料からの汚染が疑われた。1 回目の汚染後 MVM 特異的なアッセイ系として PCR 法及び 324K 細胞を用いた *in vitro* の試験が導入された。また、会社の敷地内のペストコントロールプログラムを高度化すると共に原材料のベンダーに対する同プログラムの強化と監査の実施が行なわれた。2 回目の混入後では原材料に対するバリアーの構築として、①培地の HTST (high temperature short time) 処理、②熱に安定で小容量の原材料についてはオートクレーブ処理、③熱に不安定で小容量の原材料についてはウイルスろ過処理、④WCB を含む培養プロセスの無血清化が行なわれた。また、MVM 特異的なアッセイの小スケール段階での実施及びヒトと設備の分離が行なわれた。汚染の拡大防止策の効果として、2 回目の汚染発生時は、PCR で早期に発見でき、当該培養槽のみの廃棄・除染で収拾できた。なお、1994 年以降 MVM による汚染は起こっていない。さらに、MVM については PCR 及び 324K 細胞を用いた細胞変性アッセイ、kilham rat virus, rat parvovirus H-1 については 324K 細胞を用いた細胞変性アッセイ、詳細は不明であるが非常に広い範囲についてウイルススクリーニングが通常実施されている。

2006 年 Amgen 社において組換え動物細胞を用いたバイオ医薬品の培養工程で pH が低下し続いて細胞が死滅した。同培養液から qPCR により MVM が検出された。汚染は 1 ロットのみであり、4 基の種培養槽のうち 1 基のみが MVM 陽性であった。全ての原材料と培地及び施設の周りで採取したげっ歯類の糞も MVM 陰性であり、ベンダーの敷地内でも特記事項はなかった。汚染の拡大を防ぐために、対象エリアへのアクセスが制限され

た。疑わしいロットを含めて当該ロットからのサンプルは隔離され、全ての raw materials も使用中に中止され隔離された。進行中の製造が中止されて廃棄され、メンテナンス作業も中止された。高濃度の漂白剤でのクリーニングが 1 日おきに実施された。再発防止策として、作業服への更衣が採用されサンプリング/秤量時も更衣の徹底が図られた。また、生産エリアと機械設備エリアで異なる作業服を装着することとされ、作業に従事する職員に対して汚染防止に関する教育の徹底が図られた。

2009 年 Merrimack Pharmaceuticals 社において CHO 細胞を宿主とした組換え医薬品の培養工程で、5 ロットのうち 3 ロットで MVM による汚染が PCR 法により検出された。なお、生細胞数などの培養パラメーターに異常は発見されなかった。汚染源として組換え添加物を特定した。汚染の拡大を防止するために、汚染ロットに由来する原薬及び培養液は 10% bleach で処理後、廃棄された。当該設備内にストックされていたチューブ、バッグなどの機材も廃棄された。設備については徹底的な除染作業が行なわれた。

2003 年 Boehringer Ingelheim 社において CHO 細胞の培養工程で著しい細胞傷害が確認され、複数の製品の製造に支障が生じた。培養上清中に直径約 40 nm のカリシウイルス様粒子が認められた。cDNA の塩基配列を解析した結果、ゲノムの大きさは polyA を除いて 8091b であり、三つの遺伝子をコードしていることが明らかになり、本ウイルス株は vesivirus 2117 と命名された。本ウイルスは FBS からの汚染と考えられた。再発防止策として、60mL の FBS に含まれる一つの感染粒子が検出可能な高感度な測定系が確立され、本測定系で vesivirus の汚染が無いことが確認された FBS を使用することにより再発は防止された。

2009 年 Genzyme 社においてマサチューセッツ州 Allston の生産設備で 6 基の培養槽のうち一つで vesivirus 2117 による汚染が起こったため、生産を一時中断するとのプレスリリースがなされた。本生産設備は組換え CHO 細胞を宿主として Cerezyme と Fabrazyme の原薬を製造していた。本ウイルスの汚染源は培地成分と考えられた。本プレスリリースで、2008 年に Allston と Geel の設備で起こった 2 回の組換え CHO 細胞の生産性の低下も本ウイルスが原因であることも報告された。2008 年当時の標準的な試験法では、原因を明らかにすることはできなかったが、その後、高感度の試験法を開発し原因ウイルスが検出・同定された。

今回検出されたウイルスと Boehringer Ingelheim 社で検出されたウイルスの相同性は 9 割であった。本ウイルスの除染には 6~8 週間かかり、被害額は 1~3 億ドルであった。FDA は上記の医薬品生産の中断に伴い患者への供給が不足することを懸念し、英国の Basingstoke 社、イスラエルの Carmiel 社の製品を認可に先立って使えるようにすることを発表した。再発防止策として原材料のチェックとウイルス除去能の向上が図られ、約 6 ヶ月後 Cerezyme の出荷が再開された。

事件の発生年については明らかではないが Eli Lilly 社において組換え 293 細胞を用いたバイオ医薬品の培養工程で細胞数が著しく減少した。検査の結果ヒトアデノウイルスの汚染が明らかとなった。本ウイルスは培地に汚染しており、汚染は培地ベンダーでの培地調製時における作業員からの迷入による可能性が高いと考えられた。当該ロットは製造に用いられず、汚染の拡大を防ぐために設備の除染作業が実施された。再発防止策として作業者の健康管理・衛生管理の徹底、作業員からの汚染を防止するための作業工程の改善、培地のウイルスチェックが実施された。

4) 培地等原材料のウイルス不活化・除去方法

熱処理 (102°C, 10 秒) は各種のウイルス不活化に有効であり、MVM の LRV は >6~8 である。本法は使用実績があり大量処理が可能であるが、血清、タンパク質成分等の熱に不安定な成分には不向きである。紫外線照射 (254nm・100mJ/cm²) の LRV はウイルスにより異なり 4~8 である。本法は血清含有培地で有効との報告もあり熱及び γ 線に比べると成分への影響は少ないが、大量処理には対応が困難である。 γ 線 (25~40kGy) の LRV はウイルスにより異なり >4~6 である。本法は血清での使用実績は多いが、アイソトープを使用するため通常の製造現場での実施は困難であり特にタンパク質成分が変性する可能性がある。ウイルス除去フィルター (例えば孔径 20nm) の LRV は >4~6 である。本法は成分への影響は少ないが、フィルターのコストが高く処理時間が長いため大量の処理には不向きであり、血清は目詰まりを起こしやすいため不向きであると思われる。

(3) プリオン安全性評価

1) 培養細胞由来 PrP^{res} のマウス脳内接種と発症期間の検討

感染実験に用いた細胞抽出画分に含まれる

PrP^{res} 量を半定量的 WB 法で測定した結果、 5×10^7 cell/ml 相当では 1% のマウス脳乳剤 (mo-vCJD) と同等であることが示された。

そこで、1% mo-vCJD 感染マウス由来の脳乳剤及びこれに相当する PrP^{res} を含む細胞抽出画分 (5×10^7 cells/ml) の同量をそれぞれ実験動物に接種し、瀕死状態までの期間 (TI) を測定したところ、それぞれ 173 dpi 及び 191 dpi であった。また、5% 相当の試料を接種した場合の結果はそれぞれ 166 dpi 及び 196 dpi であり、細胞抽出画分を接種された動物の方が TI までの期間が 20~30 日短かった。

細胞抽出画分及び脳乳剤を接種した動物の体重を観察したところ、細胞画分を接種した動物は 140 dpi 付近から体重減少が認められ、脳乳剤を接種した動物は 170 dpi 付近から体重減少が認められた。

感染動物の脳中 PrP^{res} 量を定量したところ、細胞抽出画分を接種した動物においても脳乳剤を接種した動物と同様の PrP^{res} が脳内に蓄積されており、その蓄積量は 大脳 > 中脳・延髄 > 小脳の順であった。

この脳の各部位における空胞変性について観察したところ、異常行動を示した個体は全て脳中から PrP^{res} の検出及び空胞変性が確認された

2) Fibrinogen 製剤の vCJD クリアランス

Fibrinogen 製剤において Planova35N は異常プリオンの除去に効果は少なく (log 減少係数 LRF; 1.2), Planova20N は大きい (LRF; ≥ 3.5) ことが分かった。陰イオン交換体膜はこれまでに検討したデプスフィルターや PEI ビーズと同様に PBS 条件で mo-vCJD を吸着する事を確認した (LRF; 3.5)。Fibrinogen は陰イオン交換体膜に対するアフィニティが低いことから、陰イオン交換体膜に適用可能なタンパク質である事を確認した。Fibrinogen 製剤を用いた陰イオン交換体膜の mo-vCJD 除去能力は効果が大きかった (LRF; >3.5) ことから、実用性が高いデバイスであると考えられた。

3) 抗リン酸化セリンプリオンタンパク質抗体の有用性

先に樹立したハイブリドーマ 3 株から腹水を調製後、プロテイン A カラムで IgG 画分を精製し、pS43 を特異的に認識する抗体 pSP240, pSP279 及び pSP289 を得た。抗体のアイソタイプは、3 株とも IgG (κ , $\gamma 2b$) だった。

つぎに、リン酸化プリオンペプチド [pS43-hPrP

(39-50)-Cys-MBS-BSA] 又はプリオンペプチド [hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA] を固相抗原とした ELISA で、抗体の特異性を調べた。pSP279 の抗体価の比率(リン酸化プリオンペプチドの抗体価/プリオンペプチドの抗体価)は 8.5 を示し、pS43 を含む配列に対する特異性が最も高かった。pSP289 の比率も 4.8 と比較的高かった。一方、pSP240 は高い抗体価を示したが、その比率は 1.5 で、特異性は低かった。

作製した抗体のリン酸化 PrP に対する特異性は、正常及び PrP^{Sc} 感染マウス脳乳液を用いたイムノブロット法で調べた。脳内にスクレイパー(obihiro 株)を接種されたマウスは、その脳内に PrP^{Sc} を蓄積し、4-5 か月後に死亡する。本研究ではエンドポイント直前の 4 か月でマウスを安楽死させ、PrP^{Sc} 感染脳及び溶液のみを投与した対照脳(mock)を調製し、イムノブロット法で解析した。抗プリオンタンパク質抗体 6H4 を用いることにより、対象脳及び PrP^{Sc} 感染脳ともに、二量体及び単量体の PrP^{Sc} に相当するバンドを示した。脳乳液を PK 処理すると、対象脳ではバンドが消失するが、PrP^{Sc} 感染脳では PrP の N 端側が消化された PK 処理耐性の PrP^{Sc} が低分子側にバンドを示した。一方、抗 pS43-hPrP mAb のイムノブロット法では、対象脳の単量体を認識せず、2 量体 PrP に相当するバンドを認識した。PrP^{Sc} の認識は対象脳より弱く、N 端側が消化される PK 処理ではバンドが消失した。

抗プリオンタンパク質抗体 6H4 を用いたイムノブロット法で、対象脳及び PrP^{Sc} 感染脳は二量体及び単量体の PrP^{Sc} に相当するバンドを示し、PNGase F 処理による糖鎖除去で 2 量体及び単量体の PrP は低分子側に移動した(lanes 2 and 4)。同様に、pS279 抗体は対象脳で糖鎖を有する 2 量体 PrP のバンドを認識し、PNGase F 処理によりバンドは低分子側に移動した。

4) vCJD の安全性確保に関する動向調査

医薬品の PrP^{Sc} の混入/迷入リスクを低減するために検出法の開発や、PrP^{Sc} の潜在を前提としたクリアランス工程の設定とその評価、さらには PrP^{Sc} リスクの高い原材料の排除等様々な対策がとられている。特に、輸血用血液製剤は対象とする患者数が多いことから、規制当局よりいくつかのガイドラインや考え方が示されている。また、輸血用血液の安全対策は細胞組織加工製品での評価と類似する点もあり、輸血用血液製剤の PrP^{Sc} に関する安全性情報は細胞製品の安全性確保に通じると考えられる。

そこで本年度は、FDA が最近発表した輸血用赤血球製剤の vCJD の伝播のリスクに関連して、FDA が海綿状脳症委員会に提案したモデルについて調査・検討した。本提案の中で、米国における vCJD の伝播のリスクは英国での潜在的な PrP^{Sc} の感染リスクから導かれるとされている。これは、我が国にも当てはまると考えられる。さらに、英国での vCJD の感染リスクは 2 通りの推定がなされており、低リスクと高リスクであるとする過程がそれぞれ異なるデータを根拠として提案されていることが示されている。

英国集団で潜在的な vCJD 感染の可能性は低いとする推計に基づいて米国での輸血による vCJD の感染リスクを推定した FDA モデルの結果は、米国での赤血球輸血により受血者の vCJD の伝播のリスクは非常に少ないか 0 に近いことを示唆している。このモデルでは、今日まで米国で vCJD に感染していることが明らかになった患者の数と推定値に大きな離反が無いことが示されている。また、英国での vCJD のリスクを低いとする場合も高いとする場合も、vCJD に感染し症状が出るまでに要する時間、発症までの経過時間、感染後異常プリオンタンパク質がリンパ組織や血中に出現してくるまでに要する時間等が明確になっていないことから、赤血球輸血で vCJD 因子に感染した受血者の感染者数の推定には不確かさが残っているとされている。

D. 考察

(1)細胞組織加工製品のウイルス安全性評価

1) ウイルス感染リスクの特定

本年度は初年度でもあり、広範にウイルスリストを作成して、リスク分析・評価につなげることとした。ウイルス感染リスク要因として、患者側の要因と製法側の要因を考察した。特に患者側の要因に関しては、後述するように、リスク分析まで進めることができた。製法特性に由来するリスク要因としては、原材料について考察したが、来年度は、より深い検討を行う予定である。

そもそも、細胞組織加工医薬品が、輸血や骨髄移植と異なり注意を要する点とはなんだろうか。それは細胞組織加工製品製造時には、「細胞・組織の加工」が行われるという点である。「細胞・組織の加工」とは、疾患の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖、細胞の株化、細胞・組織の活性化等を目的とした薬剤

処理, 生物学的特性改変, 非細胞・組織成分との組み合わせ又は遺伝子工学的改変等を施すことをいう。これに加えて「製造」とは, 組織の分離, 組織の細切, 細胞の分離, 特定細胞の単離, 抗生物質による処理, 洗浄, ガンマ線等による滅菌, 冷凍, 解凍等, 当該細胞・組織の本来の性質を改変しない操作を含む行為で, 最終製品である細胞・組織 利用製品を出荷するまでに行う行為をいう。こうした工程が含まれることが, 細胞組織加工医薬品の特徴で, その工程では, 外界や製造従事者からの飛び込みウイルス(adventitious virus)の可能性があり, それに加えて大きな特徴は, 細胞・組織の人為的な増殖, 細胞の株化, 細胞・組織の活性化, 分化等を施すために, フィーダー細胞との共培養や動物由来原材料である培養用ウシ胎児血清, タンパク質性成長因子, ブタ由来トリプシンなどに接触・暴露される工程を含んでいるということである。従ってウシ, ブタ, マウスなどの動物を自然宿主とするウイルスによる汚染も視野に入れる必要がある。バイオ医薬品製造では, 細胞培養技術の進歩に伴い, 血清や増殖因子等の動物由来精製・分画成分を使わない方向で安全性が確保されつつあり, 1990年代後半からは, 動物由来成分は, 遺伝子組み換え, 植物由来成分へと置き換えられている。しかし細胞組織加工医薬品に関しては, その技術が黎明期であることもあり, 動物由来原材料を介してのウイルス汚染の可能性はもっとも注意を要する点のひとつであろうと考えられる。

バイオ医薬品では, 製造用細胞はセル・バンクとして保存され, セル・バンクのウイルス試験, 未精製バルクから最終製品に至る工程における安全性の確保に加えて, 製造工程に含まれるウイルス不活化・除去工程もモデルウイルス等を用いて厳密に評価され, 安全性が確保されている。細胞組織加工製品に関しては, フィーダー細胞であるNIH-3T3については, フィーダー細胞や結成などを通じて汚染の可能性のあるウイルスについての試験法が指針に明示されている。しかしヒト細胞組織加工製品については, 異種血清及び同種の血清に由来する成分に関して可能な限りその使用は避け, 避けられない場合は, ア) 血清等の由来の明確化, イ) ウシ海綿状脳症発生地域の使用を避ける, ウ) ウイルス, マイコプラズマの否定, エ) 可能な不活化処理, 除去処理, オ) 感染モニター用に血清等の一部保存, を求めているが, 動物由来原材料を汚染する可能性のあるウイルスに関する具体的な試験の明示はない。バイオ医薬品と異なり, 細胞組織加工製品では, 最終製品にいた

るまでに十分な不活化・除去工程を経ることが困難なケースが想定される。そのため使用する血清等動物由来原材料に関しては, より厳密なウイルス試験や不活化・除去法を実施して, ウイルスの混入・伝播を防止する必要があると考えられる。

以上, 本年度はリスク要因として患者及びドナー側の要因, 並びにその他の原材料側の要因をいくつか抽出した。来年度はさらに要因を抽出し, リスク分析・リスク評価につなげる予定である。

2) 症例報告を利用したリスク分析

本研究では, PMDA が公開している副作用情報を用いて, 患者が免疫抑制状態にあるときのウイルス感染リスク分析を行った。我が国の通知や海外のガイダンスに掲載されているEBVについては, これらに掲載されていないウイルスよりもリスクが高いという結果が得られ, 分析アプローチは概ね妥当と考えられた。なお, 同様に通知やガイダンスに掲載されているCMVやB19については, ADV・HSV・JCVなどとリスクは同程度かそれ以下という結果が得られたものの, これは免疫抑制状態にある患者のリスクとして得られた結果であり, 患者背景によって, たとえば妊娠可能性のある女性では異なる結果が得られるであろうことを考慮するべきである。また, B19についてはウイルスの粒径が小さいため, 除去が困難とされていることにも注意すべきである。

本研究の限界としては, ウイルスの種類や医療機関によって検査される頻度が異なると考えられることから, 単純に比較はできないことがまずあげられる。また, 症例の詳細が不明なため, 複数のウイルスが感染している症例については原因ウイルスを特定できないことや, 薬剤の使用理由となった原疾患や合併症・併用薬の影響も十分に考察できないこともあげられる。たとえばパリビズマブは抗RSV抗体であるため, RSV感染の2例はむしろ有効性欠如の結果と考えられる。

更に, 本研究では自発報告をもとにしているため, 自発報告では本質的に切り離すことのできない過少報告についても考慮する必要がある。また, バシリキシマブ以外のバイオ医薬は免疫抑制を目的としているものではないため, バシリキシマブや低分子の免疫抑制剤とは別に解析したほうがよいかもしれない。とはいえ, どのようなウイルスが医療現場で問題になることが多いのか, その転帰はどのようなものであるかが, ウイルスごとに客観的な数字として比較できることから, ウイルスのリスク評価にあたっては十分参考になるもの

と考えている。なお、バシリキシマブや低分子の免疫抑制剤では CMV の感染例が多いのに対し、バシリキシマブやリツキシマブ以外のバイオ医薬では VZV の感染例が多かった。とくに例数の多いアダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプトやトシリズマブは腫瘍壊死因子やインターロイキン-6 の抑制剤であり、CMV と VZV との感染メカニズムの違いを反映しているものと思われる。

ところで、本年度はリスクアセスメントの分析手法として、頻度と重篤度を利用する PHA 法を用いたが、このほかに、不確かさ(Uncertainty)と重大性(Impact)を利用するリスクランキング法等がある。これらの定義・尺度としては現在のところ死亡例数・死亡率や受容体の同定・推測状況等を考えている。

3) 非宿主細胞への感染と馴化に関する検討

治療用細胞組織加工医薬品のウイルス安全性を考える際には、バイオ医薬品のウイルス安全性同様のリスクマネジメントが参考になるものと考えられる。というのも動物細胞による組換えタンパク質医薬品の製造過程でも同様に生物由来原材料を用いた培養工程を含むからである。既に述べたが、カリシウイルスは実際に自然宿主でないバイオ医薬品製造細胞である CHO 細胞に感染し、汚染事例を引き起こしたウイルスとしても知られている。そのときもバイオリアクター汚染ウイルスは、当初ごく弱い感染性しかもっておらず、細胞変性も起こさなかったためにバイオリアクター内での汚染に気づくのが遅れたといわれている。汚染が進み、ウイルスの感染細胞への馴化が起きて、製造用細胞増殖が低下することによってウイルス汚染が発覚した。今回の実験でもカリシウイルスは、非宿主細胞への馴化が速やかにおきることが示された。これは今後治療用細胞組織加工医薬品製造過程でも生物由来の材料を使う際にも十分気をつける必要がある点である。また従来までヒト細胞に感染するとは思われていなかったカリシウイルスの一種が、細胞内に侵入し、-鎖 RNA を複製することが示された。ヒト JAM1 が、ウイルス侵入をサポートすることは明らかで、その後ウイルスがなぜヒト細胞内で複製をスムーズに進めることができないのかについては今後の課題である。

4) 細胞表面ウイルス受容体のプロテオミクス-高感度検出法の開発

受容体等、細胞表面の微量タンパク質を解析する手段として、プロテオミクスのアプローチ、す

なわちゲル内消化法、SDS-PAGE、ゲル内還元アルキル化と酵素消化、ペプチド回収、LC/MS 及びデータベース検索からなる一連の作業が利用されている。しかし、分析に必要な加工細胞を確保することは難しいこと、特に糖タンパク質の場合は、高い不均一性と低い疎水性により、同定は困難が予想されることから、分析の高感度化が求められる。我々は、電気泳動において用いられる陰イオン性界面活性剤 SDS が、非共有的にタンパク質と相互作用して SDS-タンパク質複合体を形成し、イオン化を妨げていると考え、グアニジン塩酸により SDS を除去するプロテオミクスアプローチの改良法を開発した。この方法により、原材料細胞表面のプロテオミクスが可能になると期待される。

5) 酸性化阻害剤の膜融合能に対する影響

HTLV-1 エンベロープのエンドソームなどの細胞内小器官への局在が直接的に HTLV-1 エンベロープの膜融合能に関わっている可能性と、何らかの細胞小器官に存在する細胞側因子が間接的に HTLV-1 エンベロープの膜融合能にかかわっている可能性が考えられた。

6) 持続感染ウイルスの網羅的検査

6-1) 網羅的検査

作製した網羅的ウイルス検査法により実施した検査結果を解析したところ、EBV, CMV, HHV6, B19 が生体材料に混入する危険性が高いことが示された。EBV, CMV, HHV6 はヘルペスウイルス科に属し、初感染後は持続感染状態が成立し、終生ウイルス陽性となることが知られている。これらの成人の陽性率は EBV:90%程度, CMV:80%程度, HHV6:ほぼ 100%と非常に高く、しかも血液細胞に持続感染することから細胞組織医薬品の原材料となる生体材料への混入の可能性が非常に高い。今回行ったデータ解析でも多くの検体からこれらのウイルスが検出されており、これまでの知見を裏付けている。また、B19 も持続感染することが知られており血液とともに、骨髄液に混入することが多い。骨髄細胞を使用した再生医療は多数計画されており、原材料への B19 混入の有無や培養に与える影響を計画段階で十分に評価する必要がある。

6-2,3) 作製した固相化試薬の性能評価、及びウイルス液の作製

従来、HIV, HTLV, HBV, HCV が混入した原材料を使用しないことで細胞組織医薬品の安全性を担

保してきたが、上記4種類のウイルスは陽性率が高く、しかも健康人から採取した原材料に混入する可能性が高いため、一律に陽性者から原材料を採取することを制限することは難しい。さらに、オーダーメイド医療である自己の細胞・組織を原材料として使用する再生医療の場合、持続感染していたEBV, CMV, HHV6, B19が検出されたからといって治療を行わないことは不可能である。しかし培養中にこれらのウイルスが増殖する場合、大量のウイルス・ウイルス感染細胞が混入した製剤を投与することになってしまい、安全性が担保できない。したがって、これらのウイルスに関し事前に培養系での動態を十分に検討しておくことが望ましく、そうした意味でウイルススパイク試験法の確立は重要である。現在、ウイルススパイク試験法の作製準備を始めているが、今後この取り組みを加速し、幹細胞に対するウイルススパイク試験の実施を次年度の主要な研究課題としたい。

(2) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

ウイルスクリアランスの評価に用いるモデルウイルスとして、特にCHO細胞を用いる場合は、内在性レトロウイルス粒子の除去/不活化能を評価する観点からX-MuLVの選択は妥当であると思われる。また、粒子径が小さいためウイルス除去フィルターによる除去が比較的困難であると共に例えば酸処理のような不活化処理に耐性があること、更に実際のバイオ医薬品の培養工程において汚染事例が多いという点からMVMも有用なモデルウイルスと考えられる。従って、今後提言を予定しているバイオ医薬品のウイルス安全性において、クリアランスの評価に有用なウイルスとしてこれらのウイルスを記載することは妥当と思われる。

通常の抗体医薬品の精製プラットホームは、プロテインAクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーから構成され、必要に応じて疎水性相互作用クロマトグラフィーあるいはヒドロキアパタイトクロマトグラフィーが追加される。また、抗体医薬品だけでなく哺乳類の細胞を宿主とするバイオ医薬品の最終の精製工程には通常ウイルス除去フィルターが用いられる。最初の4種類のクロマトグラフィーに限定するとX-MuLV及びMVMのLRVはそれぞれ約16~18及び約11~15であった。従って、これらの精製工程は両ウイルスに対して高いクリアランス能を有していることが示された。従って、今後予定しているバイオ医薬品の

ウイルス安全性の提言において、抗体医薬品のプラットホーム精製工程において推奨されるウイルスのLRVの目安を具体的に記載することは可能と思われる。

バイオ医薬品の宿主の培養に用いる原材料にウイルスが汚染し生産の中断に至る事件が少なくても7件起きていることが今回の研究で明らかになった。これ以外にも非公表の汚染事例は起こっているものと推察される。その中には購入した原材料が既に汚染されていたことが疑われる場合、作業者の健康管理・衛生管理の問題等からの汚染が疑われる場合がある。これらの教訓から企業は様々な改善策の実施により汚染を防止すると共に、pH及び細胞増殖等を指標とした培養工程のモニタリングを行い、場合によってはGenentech社のようにルーチンとして培養工程におけるウイルスのモニタリングを行ないウイルス汚染による被害を最小限に防ぐよう対処している企業もある。これらは特にバイオ医薬品の製造に携わっている現場においては極めて有用な情報であり、今後予定しているバイオ医薬品のウイルス安全性の提言において記載する必要があると思われる。

一方、培地等の原材料についてウイルス汚染の可能性を否定することは現実的に困難である。したがって、信頼できるベンダーから購入し、必要に応じて査察等を実施することが必要である。必要に応じてウイルス検出系を確立して原材料を検査し、ウイルス汚染の無い原材料を使用することも現実的な対処の一つと思われる。なお、ウイルス検出系の標準化は困難であり、測定系の容量、組成、陽性コントロールの種類等により測定値が異なる場合がある点に留意する必要がある。さらに、ウイルスの除去/不活化のための様々な方法とその評価方法を考案・実施する必要もある。しかし、先に述べたように現状の方法には様々な問題点があり、今後改良が必要と思われる。

(3) プリオン安全性評価

1) 培養細胞由来 PrP^{res} のマウス脳内接種と発症期間の検討:

バイオ医薬品や血漿分画製剤の製造工程におけるプリオンの安全性評価は、感染した動物の脳から調製したマイクロソーム画分を使用するのが一般的である。これは、高力価のプリオン材料を得るためには脳組織が最適な部位であることに由来する。しかし、これらの製剤は培養細胞や血漿が発発原料であり、そこに混入する可能性のある

特性を有したプリオン材料を用いるのが理想的であろう。本研究では、従来用いられてきたスクレイピー株に代る mo-vCJD 株を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 評価系を検討、確立する。

今年度はこの細胞由来のプリオン材料を用いた *in vivo* 評価手法の確立を試みた。脳乳剤接種と同様に観察しやすい項目として体重減少、剖検後の項目として脳中 PrP^{res} 検出、空胞変性観察を評価指標として従来法と比較したところ、細胞を用いた手法で同様な結果が観察されることを確認した。

2) Fibrinogen 製剤の vCJD クリアランス

工程評価試験の結果から、Planova15N (膜孔径 15 nm)、Planova20N がプリオン除去に有効であることが示された。263K を用いた過去の評価試験では WB 法で PrP^{res} が検出できない場合でも感染性プリオンが確認された事例がある。今後 WB 法で感染性プリオンが検出限界以下であった工程について、*in vivo* 法 (BA 法) による評価を行う予定である。

Planova フィルターはサイズ依存的除去であり、静電相互作用による吸着などによる異なる機作の除去デバイスと組み合わせることができれば、工程の堅牢性は格段に向上する。今回、QSD もプリオン除去に効果を有する事が明らかになったことから、サイズろ過と静電相互作用による吸着除去を組み合わせたプロセスデザインの実用性が高くなった。

3) 抗リン酸化セリンプリオンタンパク質抗体の有用性

本研究では遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、ウシ血清などの動物由来製造原料汚染の可能性のある PrP^{Sc} の新規検出法の確立を目的とし、PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体の開発を行った。

リン酸化 ser43 (pS43) に対して最も高い特異性を示した pSP279 抗体は、イムノブロット法で対象脳の PrP を認識したが、PrP^{Sc} に対する反応性は弱かった。6H4 抗体は PrP^{Sc} 感染脳を対象脳と同様に認識し、PrP^{Sc} 感染脳は PK 処理耐性であること、PNGase F 処理で糖鎖を除去すると抗体が認識するバンドが低分子側に移動することから、pSP279 は二量体の PrP^C を特異的に認識することが示された。先のウサギポリクローナル抗体を用いた研究では、PrP^{Sc} 感染脳では正常脳に比較して pS43 が多いことが報告されている (Giannopoulos, P.N. et al., 2009, J. Neurosci. 29, 8743–8751)。しかし、本

研究ではイムノブロット法で pSP279 抗体が認識する pS43 を含む PrP は対象脳に多く、逆の結果となった。しかし、PrP^{Sc} 感染脳の例数が少ないことから、さらに多くの例数を検証し、pS43 の経時的変化を調べる必要がある。その他、脱リン酸化した PrP^{Sc} 感染脳のイムノブロット法や免疫蛍光法による脳切片の染色による比較等が必要である。

イムノブロット法で pSP289 抗体と pSP279 抗体は異なる反応性を示し、pSP289 抗体は対象脳と PrP^{Sc} 感染脳を認識し、pSP279 抗体は対象脳に高い特異性を示した。これら pS43 近傍のアミノ酸配列に対する反応性が異なる抗体を用いた検出法の構築は、リン酸化又は非リン酸化プリオンタンパク質それぞれの検出に有用と考えられる。

今年度は PrP^{Sc} 感染脳を用い、イムノブロット法でリン酸化プリオンペプチドに対する抗体の特異性を調べた。今後は PrP^{Sc} 感染脳を免疫原として用い、PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体の作製を試みる。また、固相抗原に PrP^{Sc} 感染マウス脳を用い、より効率的な検出法の確立を予定している。

4) vCJD の安全性確保に関する動向調査

本年度は、FDA が最近発表した輸血用赤血球製剤の vCJD の伝播のリスクに関連して、海綿状脳症委員会に提案した FDA モデルについて検討した。発表されたモデルでは、米国での輸血によるリスクの推定には英国の vCJD リスクの推定を低いとするシミュレーションを適用する方が、CDC によって把握されている米国での累積発症者数とよく一致することが示されている。一方で、この推計には英国での潜在リスクの推計に不確かさが残っていることも指摘されている。すなわち、これまでの英国での潜在リスクは十分に把握されていない可能性があるとのことである。

また、英国で実施された手術により除去された虫垂や扁桃腺の調査結果から、英国人の vCJD の潜在的な感染者数は多いとされた推計結果についても評価が行われた。この英国健康保護庁が収集したデータは、必ずしも感度や精度が十分でないことが指摘されている。今後、FDA モデルの精度を向上させていくためには、PrP^{Sc} に対するより精度の高い検出手法の開発が重要であり、特に血液中での PrP^{Sc} の定量手法の開発が求められていると結論している。

この FDA モデルは我が国の医薬品の PrP^{Sc} の安全性を評価していくうえで有用な情報が盛り込まれている。特に PrP^{Sc} の安全性を向上させていくにはどのような研究が今後必要かについても重要

な示唆を与えており、今後の研究に役立てたい。

E. 結論

(1)細胞組織加工製品のウイルス安全性評価

1) ウイルス感染リスクの特定

ウイルスリストを作成した。また、患者、ドナー、及び製法の特性を考慮したリスク要因を抽出した。

2) 症例報告を利用したリスク分析

免疫抑制状態の患者においては、EBV と CMV の感染リスクが高いものの、ADV や HSV, JCV のリスクも比較的高いと考えられた。

3) 非宿主細胞への感染と馴化に関する検討

非自然宿主でない細胞組織加工製品にウイルスが感染した場合の馴化過程を解析した。モデルとしたカリシウイルスは、汚染当初、低い感染性を持っていても、ごく短期間の培養によって、迅速な馴化が起きて、高度の感染性と増殖能を獲得することが明らかになった。またヒトには感染性をもたないと従来考えられていたカリシウイルスが、ヒト細胞にも感染することが、明らかになった。従って原料細胞にカリシウイルス受容体が発現している場合に、感染および馴化が起きる可能性が示唆された。

4) 細胞表面ウイルス受容体のプロテオミクス—高感度検出法の開発

原料細胞や材料細胞のウイルス感染リスクを低減させるためには、ウイルス受容体の有無を確認することが重要である。細胞表面のプロテオミクスの実施に向けて分析条件の最適化を行い、試料調製にグアニジン塩酸を用いる改良法を開発した。

5) 酸性化阻害剤の膜融合能に対する影響

ウイルス産生細胞側細胞小器官の酸性化が HTLV-1 エンベロープの膜融合能を活性化させることが明らかとなった。これを利用した HTLV-1 検出系の開発が期待される。

6) 持続感染ウイルスの網羅的検査

生体材料を採取する際には必ず血液が混入することから、血液中に存在する持続感染ウイルスに関し、注意すべきウイルス種やその血液中での存在量を予め評価し、リスト化することを目的に研究を行った。本学で開発した網羅的ウイルス検査

により 112 名からの 640 検体の検討を行ったところ、EBV, CMV, HHV6 が高頻度に、頻度は低いが HSV1, HHV7, VZV, JCV, BKV, AdV, B19 が検出された。この結果に鑑み、EBV, CMV, HHV6 のウイルススパイク試験法の開発を進め、現在までに 3 種類のウイルスの定量系の確立と EBV, CMV のウイルス液の作製を終了した。

(2)バイオ医薬品ウイルス安全性評価

今回の研究において、バイオ医薬品のウイルスクリアランスの評価に有用な具体的なウイルス、抗体医薬品の精製プラットホームにおいて推奨される LRV の具体的な目安、バイオ医薬品の宿主の培養におけるウイルス汚染の実例とその具体的な対処について明らかにした。これらの研究結果は ICHQ5A を補完するものとして今後バイオ医薬品のウイルス安全性の提言を行なう際に記載すべき有用な知見になりうると考えられる。

(3)プリオン安全性評価

1)マウス馴化型 vCJD 感染細胞由来の PrP^{sc} 材料が、従来の脳乳剤の PrP^{sc} と同様に in vivo 活性を示した。

2) 19nm の口径を有するウイルス除去膜でマウス vCJD が効果的に除去されること見出した。

3) PrP のリン酸化 ser43 を認識するモノクローナル抗体を作製したところ、PrP^{sc} を特異的に認識する抗体の作製につながる可能性が示された。

4)FDA の輸血に伴う vCJD 伝播リスクの評価モデルについて調査し、米国での輸血に伴う vCJD 伝播のリスクが低い推定結果が得られていることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

《原著論文》

- 1) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, Yusa, K: Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to maraviroc. *PLOS One*, *in press*
- 2) Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Boonchawalit S, Yusa K, Matsushita S: Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J. Gen. Virol.* 94(5): 933–943, 2013
- 3) Toda T, Kuwahara K, Kondo N, Matsuda Z, Maeda Y, Maeda K, Sakaguchi N.: Dynamic appearance of antigenic epitopes effective for viral neutralization during membrane fusion initiated by interactions between HIV-1 envelope proteins and CD4/CXCR4. *Immunobiology* 217, 864-872, 2012
- 4) Ogawa M., Sugita S., Shimizu N., Watanabe K., Nakagawa I., Mochizuki M.: Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis. *Jpn J Ophthalmol.* 56(6):529-535, 2012.
- 5) Sugita S., Shimizu N., Watanabe K., Ogawa M., Maruyama K., Usui N., Mochizuki M.: Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 12;53(8):4692-8, 2012.
- 6) Ogawa M., Sugita S., Watanabe K., Shimizu N., Mochizuki M.: Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250(12):1877-1883, 2012.
- 7) Sugita S., Shimizu N., Watanabe K., Ogawa M., Maruyama K., Usui N., Mochizuki M.: Detection of *Candida* & *Aspergillus* species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250:391-398, 2012.
- 8) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- 9) Yamaguchi T, Uchida E: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies. *Curr Cancer Drug Targets*, *in press*
- 10) Yasugi, M., Kubota-Koketsu, R., Yamashita, A., Kawashita, N., Du, A., Sasaki, T., Nishimura, M., Misaki, R., Kuhara, M., Boonsathorn, N., Fujiyama, K., Okuno, Y., Nakaya, T., and Ikuta, K.: Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. *PLoS Pathogens*, *in press*.
- 11) Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., and Ikuta, K.: Control of endemic influenza virus H5N1 in view of viral and host diversity. *EMBO Reports*, *in press*.
- 12) Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Suzuki, Y., and Ikuta, K.: The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). *Trends Microbiol.* 20: 11-20, 2012.
- 13) Urayama, T., Cameron, R., Sato, T., Yunoki, M., and Ikuta, K.: Misinterpretation in virus clearance studies of biological products due to an uncommon discrepancy between cytopathic effects and infectivity of human immunodeficiency virus (HIV). *Biologicals*, *in press*.
- 14) Sasaki, T., Kubota-Koketsu, R., Takei, M., Hagihara, T., Iwamoto, S., Murao, T., Sawani, K., Fukae, D., Nakamura, M., Nagata, E., Kawakami, A., Mitsubayashi, Y., Ohno, M., Uehara, Y., Fukukawa, T., Kanai, Y., Kosaka, M., and Ikuta, K.: Reliability of a newly-developed immunochromatography diagnostic kit for pandemic influenza A/H1N1pdm virus: Implications for drug administration. *PLoS One*, *in press*.
- 15) Noda, M., Masrinoul, P., Pipattanaboon, C., Ramasoota, P., Setthapramote, C., Sasaki, T., Sasayama, M., Yamashita, A., Kurosu, T., Ikuta, K., and Okabayashi, T.: Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against dengue virus capsid protein among four serotypes. *Biologicals* 6, 409-416, 2012.
- 16) Kubota-Koketsu, R., Yunoki, M., Okuno, Y., and Ikuta, K.: Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010. *Biologicals* 6, 245-247, 2012.
- 17) Sakudo, A., Baba, K., and Ikuta, K.: Analysis of Vis-NIR spectra changes to measure the inflammatory response in the nasal mucosal region of influenza A and B virus-infected patients. *J. Clin. Virol.* 55, 334-338, 2012.
- 18) Sakudo, A., Baba, K., and Ikuta, K.: Discrimination of influenza virus-infected nasal fluids by Vis-NIR spectroscopy. *Clin. Chim. Acta* 414C, 130-134, 2012.

- 19) Tian, Y.S., Verathamjamras, C., Kawashita, N., Okamoto, K., Yasunaga, T., Ikuta, K., Kameoka, M., and Takagi, T.: Discovery of novel low-molecular-weight HIV-1 inhibitors interacting with cyclophilin A using in silico screening and biological evaluations. *J. Mol. Model.* in press.
- 20) Li, Y.G., Siripanyaphinyo, U., Tumkosit, U., Noranate, N., A-Nuegoonpipat, A., Kurosu, T., Ikuta, K., Takeda, N., and Anantapreecha, S.: Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. *Intervirology.* 56, 6-12, 2013.
- 21) Kubota-Koketsu, R., Yunoki, M., Okuno, Y., and Ikuta, K.: Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010. *Biologics* 6: 245-247, 2012.
- 22) Hirai, I., Ebara, M., Nakanishi, S., Yamamoto, C., Sasaki, T., Ikuta, K., and Yamamoto, Y.: Jurkat cell proliferation is suppressed by Chlamydia (*Chlamydomydia*) pneumonia infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6K. *Immunobiology* 2012 Jun. 26, in press.
- 23) Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Ellakany, H.F., Kawashita, N., Daidoji, T., Takagi, T., Yasunaga, T., Nakaya, T., and Ikuta, K.: Antigenic analysis of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 sublineage co-circulating in Egypt. *J. Gen. Virol.* 2012 Jul. 12, in press.
- 24) Settaramote, C., Sasaki, T., Puiptom, O., Limkittikul, K., Pitaksajakul, P., Pipattanaboon, C., Sasayama, M., Leuangwutiwong, P., Phumratanaprapin, W., Chamnachanan, S., Kusolsuk, T., Jitmittraphap, A., Asai, A., Arias, J.F., Hirai, I., Kuhara, M., Okuno, Y., Kurosu, T., Ramasoota, P., and Ikuta, K.: Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423: 867-872, 2012.
- 25) Li, Y.G., Siripanyaphinyo, U., Tumkosit, U., Noranate, N., A-Nuegoonpipat, A., Pan, Y., Kameoka, M., Takeshi, K., Ikuta, K., Takeda, N., and Anantapreecha, S.: Poly(I:C), an agonist of toll-like receptor-3, inhibits replication of the Chikungunya virus in BEAS-2B cells. *Virology* 479: 114, 2012.
- 26) Sakudo, A., and Ikuta, K.: A technique for capturing broad subtypes and circulating recombinant forms of HIV-1 based on anionic polymer-coated magnetic beads. *Int. J. Mol. Med.* 30: 437-442, 2012.
- 27) Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Omori, H., Honda, T., Horie, M., Ikuta, K., Fujino, K., Nakamura, S., Schneider, U., Chase, G., Yoshimori, T., Schwemmle, M., and Tomonaga, K.: Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* 11: 492-503, 2012.
- 28) Sakudo, A., Kuratsune, H., Kato, Y.H., and Ikuta, K.: Visible and near-infrared spectra collected from the thumbs of patients with chronic fatigue syndrome for diagnosis. *Clin. Chim. Acta* 413:1629-1632, 2012.
- 29) Ramadhany, R., Yasugi, M., Nakamura, S., Daidoji, T., Watanabe, Y., Takahashi, K., Ikuta, K., and Nakaya, T.: Tropism of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus. *Front. Microbiol.* 3: 128, 2012.
- 30) Nagatani, N., Yamanaka, K., Ushijima, H., Koketsu, R., Sasaki, T., Ikuta, K., Saito, M., Miyahara, T., and Tamiya, E.: Detection of influenza virus using a lateral flow immunoassay for amplified DNA by a microfluidic RT-PCR chip. *Analyst* 137: 3422-3426, 2012.
- 31) Boonsathorn, N., Kanai, Y., Punjumba, J., Bai, G., Chittaganpitch, M., Petphuwadee, U., Jampangern, W., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., and Teerasut, C.: Neutralization titers against influenza A (H3N2) and influenza B viruses among a non-vaccinated population from Thailand. *Southeastern Asian J. Trop. Med. Public Health* 43, 674-679, 2012.
- 32) Kanai, Y., Miyasaka, S., Uyama, S., Kawami, S., Kato-Mori, Y., Tsujikawa, M., Yunoki, M., Nishiyama, S., Ikuta, K., and Hagiwara K.: Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around pig farm. *BMC Res. Notes* 5: 4, 2012.
- 33) Yasugi, M., Nakamura, S., Daidoji, T., Ramadhany R., Yang, C.-S., Yasunaga, T., Iida, T., Horii, T., Ikuta, K., Takahashi, K., and Nakaya, T.: Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009-2010. *PLoS One* 7, e30946, 2012.
- 34) Sakudo, A., Sukanuma, Y., Sakima, R., and Ikuta, K.: Diagnosis of HIV-1 infection by near-infrared