

図6 カリシウイルス感染Vero細胞への3MAの影響

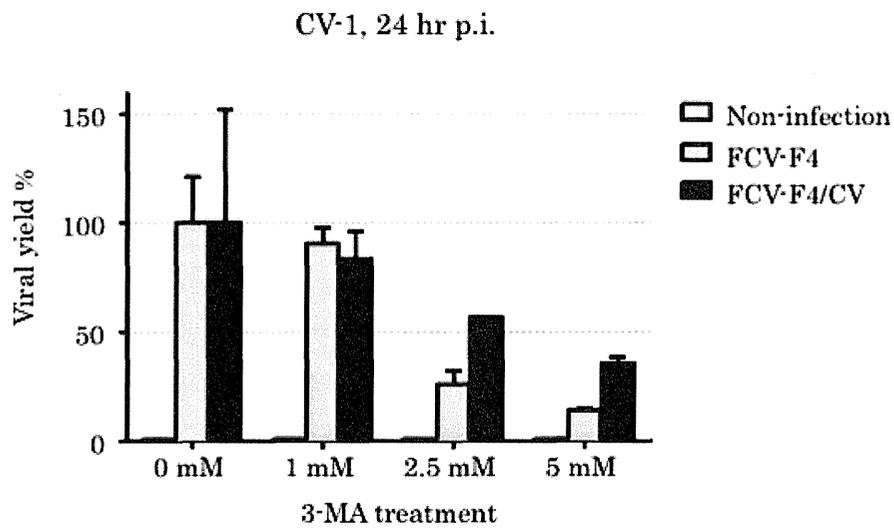
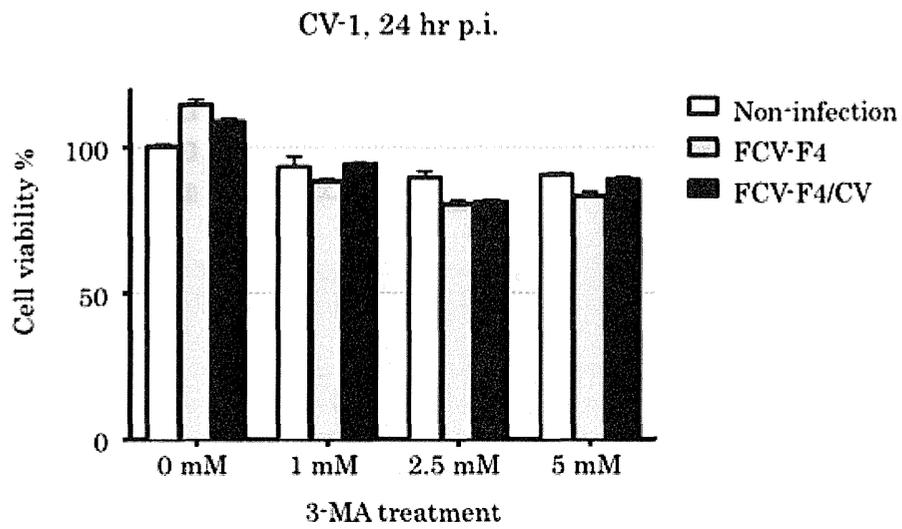
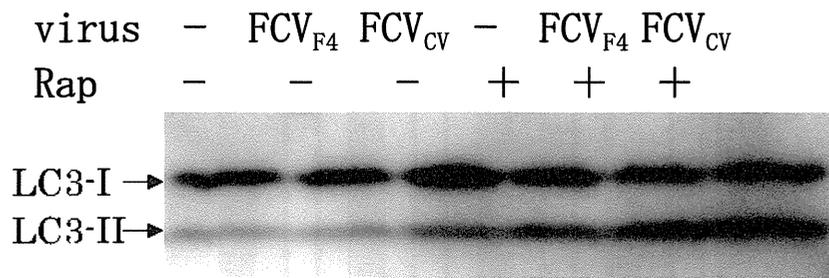


図7 カリシウイルス感染CV-1細胞への3MAの影響

Vero



CV-1

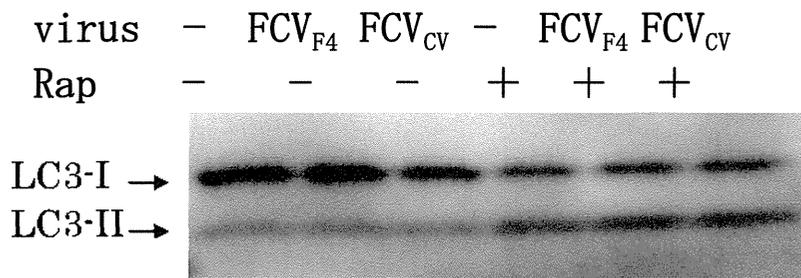


図 8 ラパマイシン (50 nM)によるオートファジーの誘導

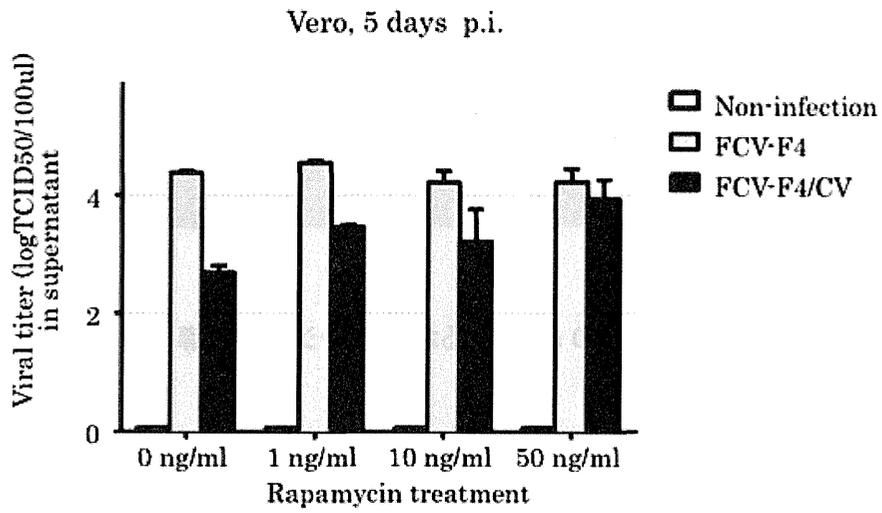
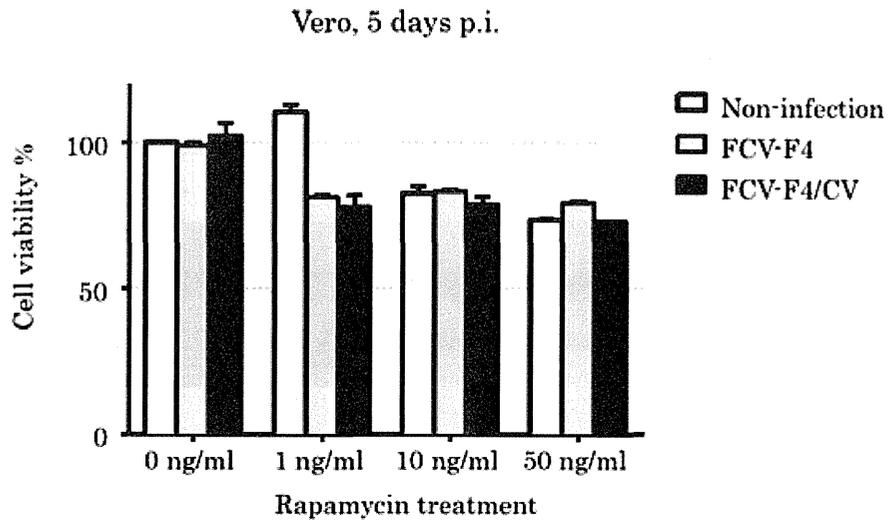


図9ラパマイシンのVero細胞への影響

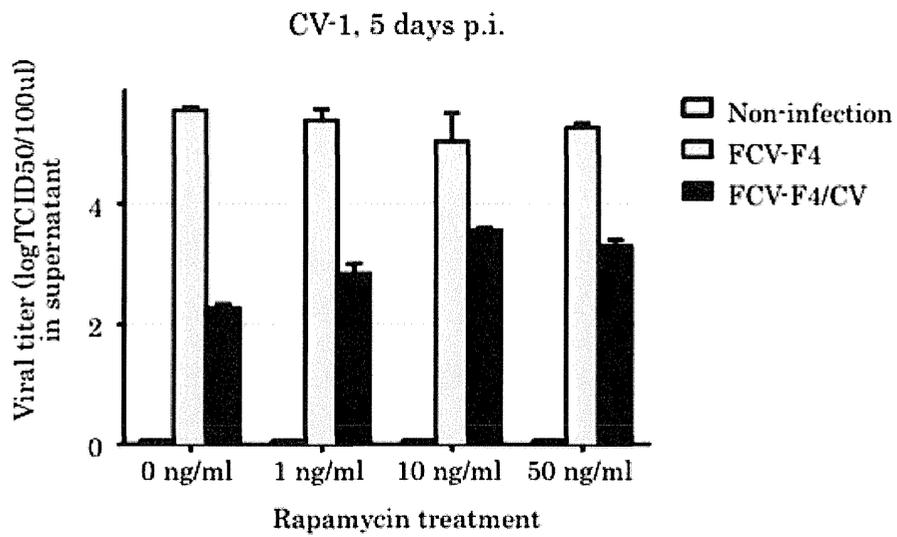
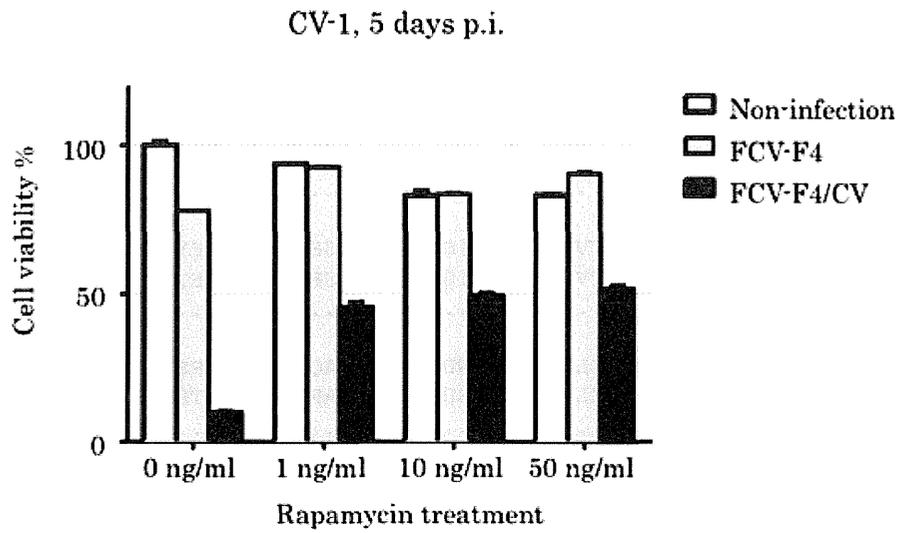


図10ラパマイシンのCV-1細胞への影響

```

feline  MGTEARAGRRLVFT-SVVLSSLALGRGAVYTSEPDVVRVPEDKPAKLSCSYSGFSNPRV
AGM     MGTKAQADRKLLHLFILAILLCPLALGSVTVHSSEPEVRI PENNPFVKLSCAYSGFSSPRV
human   .....VE.....C.....S.....

EWKFAHGDITSLVICYKNKITASYADRVTFSHSGITFHSVTRKDTGTYTCMVSDDGNTYG
EWKFDQGDITKLVICYNNKITASYEDRVTFSLPSGITFKSVTREDTGTYYTCMVSEEGNNYG
.....R.....T.....S..

EVSVQLTVLVPPSKPTVHIPSSATIGSRAVLTCSSEKDGSPPEYYWFKDGVRRMPLEPKGN
EVKVKLIVLVPPSKPTVSIIPSSATIGNRAVLTCSSEKDGSPPEYTWFKDGI VMPNPKST
.....N.....Q.....

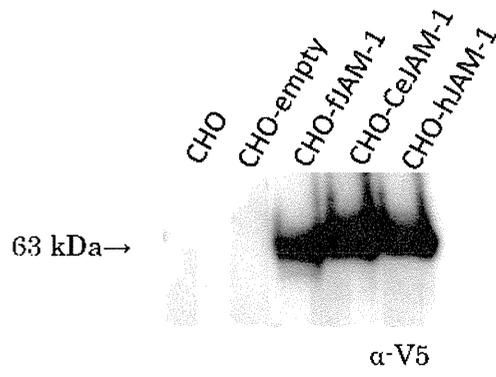
RAFSNSSYSLNEKTGELVFDVPSAWDTGEYTCQAQNGYGMPMRSEAVRMEAAELNVGGIV
RAFSNSSYVLNPTTGELVFDPLSASDTGEYSCEARNGYGTGMTSNAVRMEAVERNVGVIV
.....

AAVLVTLILLGLIILGIWFAYRRGYFDRTKKGTSSKKVIYSQPAARSEGEFRQTSSFL-
AAVLVTLILLGLIFGIWFAYSRRGHFDRTKKGTSSKKVIYSQPSARSEGEFKQTSSFLV
.....V.....S.....

```

図11 ネコ, アフリカミドリザル, ヒトの JAM1 のアミノ酸配列の比較

A



B

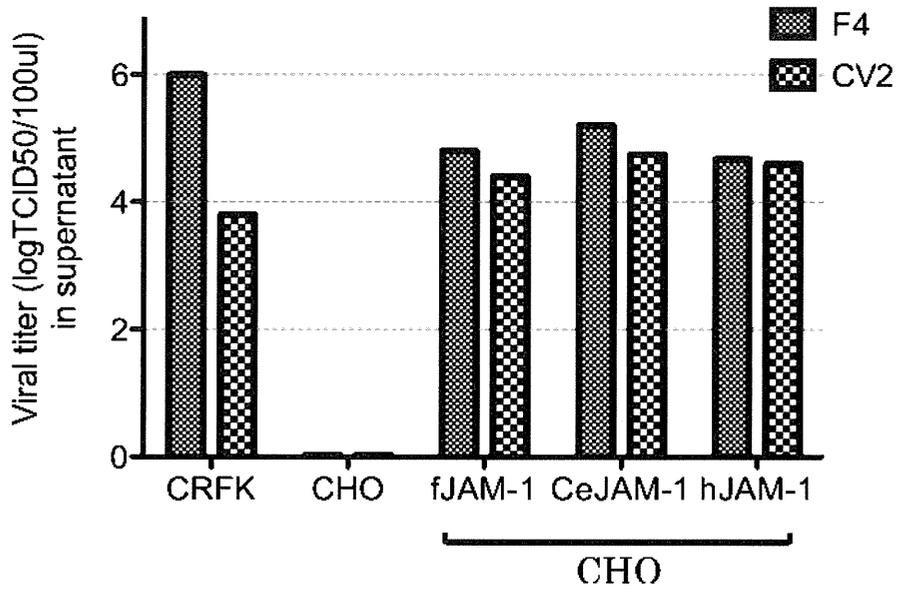


図12 FCV はヒト JAM-1 を介して CHO 細胞に感染し、感染性ウイルス粒子を産生する

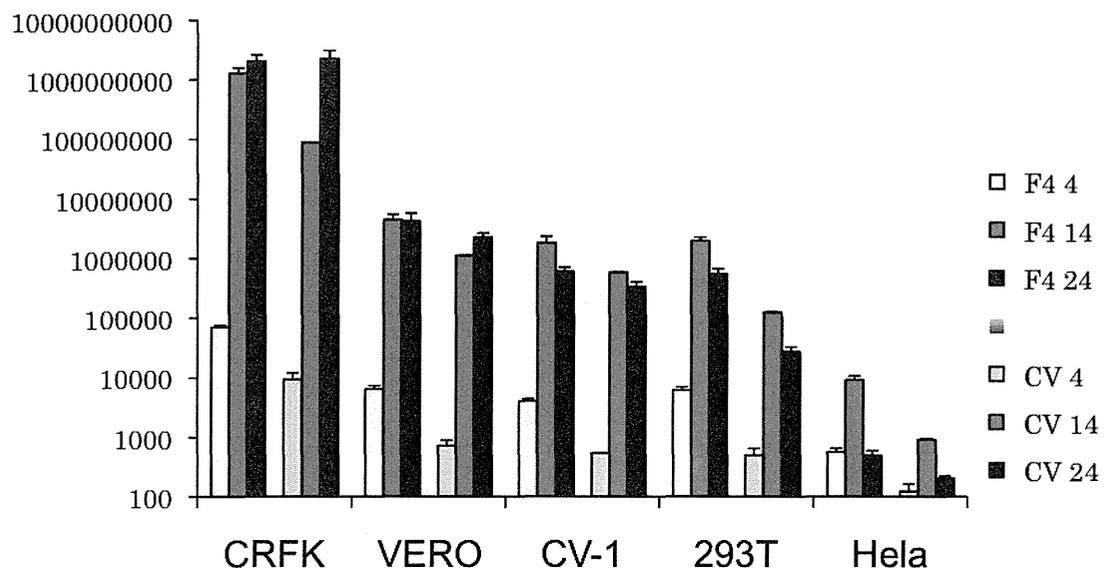


図 13 FCV_{F4} と FCV_{CV} は、ヒト細胞 293T, HeLa 細胞に感染して、Vero, CV-1 細胞と同様に-鎖 RNA ができる。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成 24 年度分担研究報告書

—バイオ医薬品のウイルス安全性評価に関する研究—

分担研究者：新見伸吾（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）

研究要旨

動物細胞培養由来バイオ医薬品のウイルス汚染は患者に重篤な有害作用を及ぼす可能性がある。そこでバイオ医薬品のウイルス安全性評価を目的として研究を行い以下の点を明らかにした。

バイオ医薬品の精製工程におけるウイルスクリアランス試験に用いるモデルウイルスとして、異種指向性マウス白血病ウイルス xenotropic murine leukemia virus (X-MuLV)及びマウス微小ウイルス minute virus of mice (MVM) (別称 murine minute virus (MMV))が通常良く用いられる。この2種類を基本とし、ゲノムの型(DNAあるいはRNA)、エンベロープ(外被)の有無、粒子径等を考慮しその他のウイルスを適宜組み合わせるのが適当である。

抗体医薬品のウイルス除去/不活化に有効な一般的な精製工程は、プロテインAクロマトグラフィーにおける酸による抗体の溶出工程、陰イオン及び陽イオン交換クロマトグラフィーである。

バイオ医薬品の培養工程に用いる細胞におけるウイルス汚染事例においては、培地を含む原材料が特定されるか疑われた。その後の汚染を防ぐ処置として血清等原材料のチェック、培養工程のモニタリング、作業者の健康・衛生管理、作業工程の改善策等が有効である。

キーワード：バイオ医薬品、X-MuLV、MVM、ウイルス

研究協力者	亀井 慎太郎（一般財団法人化学及血清療法研究所）
日本 PDA 製薬学会 バイオウイルス委員会	
SALLY 分科会 委員（以下、19名）	川俣 治（株式会社エスアールエル）
井上 雅晴（旭化成メディカル株式会社）	北野 誠（ディー・エス・エムジャパン株式会社）
大和田 尚（日本赤十字社中央血液研究所）	
岡野 清（株式会社東レリサーチセンター）	洪 苑起（日本製薬株式会社）
小田 昌宏（日本ポール株式会社）	小杉 公彦（日本ミリポア株式会社）

塩見 哲次 (和光純薬工業株式会社)
末永 正人 (武田薬品工業株式会社)
菅谷 真二 (東和薬品株式会社)
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

動物細胞由来バイオ医薬品において留意すべき安全性上の極めて重要な課題の一つにウイルス汚染の可能性がある。ウイルス汚染は、原材料や培養基材に由来して起きる可能性がある。また、製造工程中に外来性因子として混入した結果生じる可能性もある。この問題に対処するために ICHQ5A (医薬審 329 号) が 2000 年に発出され、承認審査にあたっては本ガイドラインに従って審査が行なわれている。本ガイドラインではウイルス試験の具体的方法の提示や工程でのウイルスクリアランスの評価法を具体的に示している。

一方、推奨されるモデルウイルスの組み合わせ、最近承認件数が急速に増加の傾向にある抗体医薬品のプラットフォームと呼ばれる精製工程で推奨されるウイルスクリアランス値、これまでのウイルス汚染事例か

ら明らかになったウイルス汚染を防御する方策に関しては ICHQ5A に記載されていない。

そこで本研究においては、ICHQ5A が発出されてから現在までの 12 年間に蓄積された知識及び経験に基づいて、上記の点についてより具体的なウイルス安全性に関する提言を行なうことを目的として調査を行なった。

B. 研究方法

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。

C. 結果

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 もウイルスクリアランス試験のモデルウイルス

として有用である。表1にこれらのウイルスを含めたウイルスクリアランス試験によく用いられるウイルスを示す。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ることが妥当と思われる。

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5.0~5.8 LRV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と低い。

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に低下する。

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である。

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である。

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、2、>1である。

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 である。

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 も使用が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、作業者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。

D. 考察

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ハイ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とも 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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文

- 1) 遊佐敬介、新見伸吾、橋井則貴 バイオ医薬品の外来性感染物質について ファームテクジャパン Vol. 28 65-70 (2012)

- 2) 日本 PDA 製薬学会 バイオウイルス委員会 SALLY 分科会 過去の事例に学ぶウイルス汚染の防止対策 ～血漿分画製剤の感染事例その対策～ ファームテクジャパン Vol. 29 印刷中 (2013)

2. 講演

- 1) 日本 PDA バイオウイルス委員会 SALLY 分科会 過去の事例に学ぶウイルス汚染の防止対策 1.1 バイオ医薬品における事例検討 第19回日本PDA製薬学会年会 平成24年12月12日 (東京)
- 2) 日本 PDA バイオウイルス委員会 SALLY 分科会 過去の事例に学ぶウイルス汚染の防止対策 1.2 血漿分画製剤の感染事例とその対策 第19回日本PDA製薬学会年会 平成24年12月13日 (東京)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案取得

該当しない

3. その他

該当しない

表1 ウイルスクリアランス試験に用いられるウイルスの例

ウイルス		科	外被	ゲノムの型	粒子径 (nm)	物理的・化学的耐性
日本名	英語 (略名)					
マウス白血病ウイルス	X-MuLV	レトロウイルス	有	RNA	80~110	低
マウス微小ウイルス	MVM (MMV)	バルボウイルス	無	DNA	18~24	高
レオウイルス3型	Reo-3	レオウイルス	無	RNA	60~80	中
仮性狂犬病ウイルス	PRV	ヘルペスウイルス	無	DNA	120~200	中
ウシ下痢症ウイルス	BVDV	フラビウイルス	有	RNA	50~70	低
A型肝炎ウイルス	HAV	ピコルナイウイルス	無	RNA	25~30	高
シミアンウイルス40	SV40	パポーバウイルス	無	DNA	40~50	高

PRV; Pseudorabies Virus BVDV ; Bovine Viral Diarrhea Virus HAV ; Hepatitis A Virus

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

研究分担者：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

研究要旨 細胞表層受容体を指標とした指示細胞のウイルス高感受性株の簡便且つ迅速スクリーニング法を開発する一環として、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)による微量糖タンパク質解析技術の開発を検討した。従来のゲル内消化法において、還元アルキル化の還元剤にグアニジン塩酸を加えることで、ゲル内消化物由来糖ペプチドの LC/MS による検出感度を大幅に改善することを実証した。本手法を用いることで、これまで検出が困難であった細胞表層の微量糖タンパク質受容体の部位特異的な糖鎖構造解析が可能になる飛躍的に進むことから期待される。

A. 研究目的

2010 年 11 月に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（幹細胞指針）が全面改定され、iPS 細胞も含めて、細胞治療の臨床研究は、同指針の要件を満たしつつ調製した細胞を用いて実施することとなっている。我が国では、これまでに 2 品目が承認され、現在、間葉系幹細胞(MSC)を含む 6 品目の臨床試験が行われている。さらに 2013 年 2 月、iPS 細胞を用いた臨床試験が申請され既に審査も開始されている。従って、年内にも世界で初めての iPS 細胞を利用した臨床試験が開始される見込みであり、今後、細胞治療薬の臨床開発は活発化するものと思われる。

幹細胞を用いた細胞治療薬のウイルス安全性確保のための試験は、原材料が自己と同種由来細胞のどちらか、あるいはバンク化を伴うか否かにより異なると考えられる。例えば、自己由来幹細胞の場合は、幹細胞

指針によると「必ずしも提供者のスクリーニングを必要としないが、調製工程中での交差汚染の防止、製造者への安全性対策等の観点から HBV、HCV 又は HIV 等のウイルスに対する検査の実施を考慮すること」と記載されており、血液製剤で実施される NAT 法等によるウイルス安全性試験が主に実施されるものと思われる。一方、MSC や iPS (様) 細胞など同種ヒト幹細胞としての利用が見込まれる幹細胞で、且つバンク化を伴う場合は、バンクでの徹底したウイルス試験と製造工程におけるウイルスの迷入を否定するために、NAT 法等に加えてバイオ医薬品と同様に ICHQ5A 「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオ医薬品のウイルス評価」に関するガイドラインを参考に、ウイルス試験を詳細に実施することが望ましいと考えられる。

ICHQ5A では、バイオ医薬品の製造に用いる細胞株や未加工・未精製バルクに対して

実施すべき外来性ウイルス試験の一つとして、*in vitro*試験（細胞への感染性試験）が挙げられており、複数の指示細胞を用いることにより、これらの細胞で増幅する多様なウイルスが検出可能とされている。同試験では指示細胞として、MRC-5細胞やVero細胞など広範なウイルスが増幅可能な細胞が用いられているが、同一細胞でも株や条件によりウイルスへの感受性が異なることが指摘されている。感受性の低い細胞株を用いると、*in vitro*試験で十分な感度が得られないことから、本試験に使用する細胞株の各種ウイルスに対する高い感受性をもつ細胞株を選択することが重要である。しかし、現在実施されているウイルス感受性評価試験の多くは、複数の指示ウイルスを用いる細胞変性試験等であり、試験を実施できる施設が限定されること、試験に長期間を要するなど課題が多い。従って、簡便且つ迅速にウイルス高感受性指示細胞株をスクリーニングする方法の開発が望まれている。

ウイルス感染は、一般にウイルス表層のリガンドが細胞表層の受容体に結合することが引き金となり起こることから、細胞表層の受容体発現量は細胞株のウイルス感受性評価の指標の一つとして利用できる可能性がある。しかし、それら受容体の発現量は低いこと、また受容体の多くは糖タンパク質、糖脂質及びグリコサミノグリカン等の複合糖質であることから（表1）、微量糖鎖不均一性解析技術が不可欠である。

そこで本研究では、細胞表層受容体を指標として、各種ウイルスの指示細胞として最適な細胞株を簡便且つ迅速にスクリーニングする方法を開発する一環として、ドデ

シル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)及び液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)による微量糖タンパク質解析技術の開発を検討した。

B. 研究方法

1) グアニジン塩酸 (GuHCl) を用いたゲル内消化法

0.5 µg の精製糖タンパク質を SDS-PAGE で分離した後、CBB 染色でバンドを検出した。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・洗浄を行った。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 GuHCl, 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 で一晩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 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。

2) LC/MS を用いた部位特異的糖鎖構造解析 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×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 µl/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スペクトルに対してデータ依存的多段階質量分析 (MSⁿ) 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。

C. 結果及び考察

培養細胞の微量糖タンパク質を解析する手段として、ゲル内消化法、すなわち、糖タンパク質を SDS-PAGE で分離した後、ゲル内で還元アルキル化と酵素消化を行い、回収したペプチドを LC/MS で解析する方法が試みられている。しかし、ペプチドのマススペクトルを取得できても、糖ペプチドのマススペクトルの取得は困難であることが多かった。一般に、糖鎖の付加により疎水性が低下した糖ペプチドのピーク強度はペプチドに比べて著しく低くなるため、微量糖ペプチドのマススペクトルを取得することは容易ではない。さらに、電気泳動において、陰イオン性の界面活性剤である SDS は、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

ン化にしばしば悪影響を及ぼす。検出されにくい糖ペプチドほどその影響を大きく受けると考えられる。従って、SDS と糖ペプチドの混合試料溶液から SDS のみを完全に取り除くことにより、ゲル内糖タンパク質より得られた糖ペプチドのマススペクトルを取得できると考えられる。

GuHCl を添加して、あるいは添加せずに調製したサンプルの LC/MS により検出された $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質由来糖ペプチドの種類とピーク面積を図 1 に示す。 $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質は、主として 3 本鎖、4 本鎖複合型糖鎖を持つ血清タンパク質である。GuHCl を加えた試料では、より多くの糖ペプチドの MS/MS スペクトルを取得することができた。また、ピーク面積は、従来法に比べ、GuHCl を加えた試料で平均約 3 倍上昇した。N72 を含む糖ペプチドが検出された 31-33 分のマススペクトルを図 2 に示す。GuHCl を加えた試料では、従来法に比べ、N72 を含む糖ペプチドの多様なグライコフォームを検出することができた。これらの結果は、N33, N103 を含む糖ペプチドにおいても同様であった。ペプチドについては、ペプチド間で差がみられたものの、検出されたほとんど全てのペプチドについて、従来法に比べ、GuHCl を加えた試料でピーク面積が 1.5~2.5 倍上昇した。

この新たな試料調製法の汎用性を確認するために、抗体の Fc 分融合タンパク質であるエタネルセプトについて同様の解析を行った。エタネルセプトは、分子量約 150-kDa の糖タンパク質であり、抗リウマチ薬として知られている。その結果、 $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質の解析結果と同様に、ペプチド間で差は見られたものの、グアニジン塩酸を用

いることで、1.5~2 倍程度ピーク面積が増加した。この結果は、本研究で開発した手法の効果が、特定のタンパク質試料のみに限定されるものではないことを示唆している。

D. 結論

本研究では、従来のゲル内消化法において、還元アルキル化の還元剤に GuHCl を加えることで、ゲル内消化物由来糖ペプチドの LC/MS による検出感度を大幅に改善することを実証した。本手法を用いることで、これまで検出が困難であった細胞表層の微量糖タンパク質受容体の部位特異的な糖鎖

構造解析が可能になる飛躍的に進むことから期待される。

E. 健康危険情報 該当事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表 該当事項なし

2. 学会発表 該当事項なし

G-1. 実用新案登録 該当事項なし

G-2. その他 該当事項なし