

201328039A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川崎 ナナ

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
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. 分担研究報告書	
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 ----	47
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 -----	65
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 -----	79
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 -----	85
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 -----	99
前田 洋助	
6. 細胞組織加工医薬品のウイルス感染リスク評価に関する研究 -----	103
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 -----	111
山口 照英	
7-2. エンドトキシン試験法の研究 -----	121
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 ---	129
生田 和良	
9. 異常型プリオンの <i>in vivo</i> 検出系の評価に関する研究 -----	133
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 -----	139
菊池 裕	
10-2. 無菌試験法の研究 -----	143
菊池 裕	
11. マイコプラズマ否定試験法の研究 -----	153
内田 恵理子	
12. ウシ等由来原料の基準の研究 -----	163
吉倉 廣	
13. ウシ等由来原料の基準の研究 -----	201
飛梅 実	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	203
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	207

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

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が公布され、細胞組織加工品等再生医療等製品に関する法的な整備が進んでいる。バイオ医薬品も、臨床現場における重要性が益々高まるとともに、革新的医薬品の一つとして、その開発が急速に進んでいる。細胞組織加工製品やバイオ医薬品開発において、ウイルス・プリオン等感染性因子の安全性確保は、研究成果の早期実用化に向けて整備すべき最重要な課題の一つである。H25年度は、細胞組織加工製品のウイルス安全性に関して、妊娠時感染リスクのあるウイルスリストの作成、リスク要因の抽出、並びにiPS細胞のRNAウイルス感染感受性評価法、高感度な細胞表面ウイルスレセプター検出法、及びヒトDNAウイルスの感染評価系の開発に関して検討を行った。バイオ医薬品のウイルス安全性については、過去のウイルス迷入事例からその対策について検討した。また、プリオン安全性については、RK13mol細胞を用いた感染実験系の感度がウェスタンブロットィングより高く、感染価測定系として有用であることを示した。さらに、再生医療等製品に3試験（無菌試験法、マイコプラズマ否定試験法及びエンドトキシン試験法）を実施する場合の要件に関して検討を進めるとともに、ウシ等由来原材料に係る基準の見直しに必要な要件に関する検討も行った。これらの結果は、ウイルス等感染性因子の安全性確保のための環境整備を相互に補完するものである。いずれの課題に関する最終年度に向けて、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

新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部長

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

前田 洋助 熊本大学大学院
生命科学研究部准教授

清水 則夫 東京医科歯科大学
難治疾患研究所准教授

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

生田 和良 大阪大学微生物病研究所教授

萩原 克郎 酪農学園大学獣医学群獣医学類教授

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

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部第一室長

吉倉 廣 国立感染症研究所
感染症疫学センター客員研究員

飛梅 実 国立感染症研究所
感染病理部主任研究官

協力研究者

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

古田 美玲 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部

井上 雄嗣 大阪大学微生物病研究所

柚木 幹弘 一般社団法人 日本血液製剤機構

坂井 薫 一般社団法人 日本血液製剤機構

上平 崇 一般社団法人 日本血液製剤機構

久保 純 一般社団法人 日本血液製剤機構

小野寺 節 東京大学大学院農学生命科学研究科 特任教授

甲斐智恵子 東京大学医科学研究所教授

北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科教授

四方 靖 株式会社エーザイ

中村 好一 自治医科大学教授

毛利 資郎 東北大学大学院医学系研究科客員
教授

山本 茂貴 東海大学海洋学部教授

以下、日本PDA製薬学会

バイオウイルス委員会 SALLY分科会

岡野 清 株式会社東レリサーチセンター
川俣 治 株式会社エスアールエル
左海 順 大日本住友製薬株式会社
菅原 敬信 一般財団法人化学及血清療法研究所
殿守 俊介 日本チャールスリバー株式会社
藤元 江里 エルエスジー株式会社

A. 研究目的

近年、細胞組織加工製品や革新的バイオ医薬品などの開発・臨床研究が推進されている。再生医療等の安全性の確保等に関する法律が公布され、再生医療等製品に関する法的な整備が進んでいる。しかし、再生医療等製品や革新的バイオ医薬品の研究成果の早期実用化に向けて、さらに整備すべき課題も少なくない。その中でもウイルス等感染性因子の安全性確保は最優先課題の一つである。ウイルス、細菌、マイコプラズマ、真菌、異常型プリオン等の感染因子による細胞組織加工製品やバイオ医薬品汚染が起きると、国民の健康を著しく損ねる危険性がある。ウイルスや異常型プリオン等の特性が十分に解明されていないことや、その検出感度には一定の限界があるが、ウイルス等感染性因子を一律厳格に排除することは、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の安全性は、科学的根拠に基づく感染リスクの特定、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って確保されると考えられる。

本研究では、細胞組織加工製品及び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を目的として次の5つの課題、(1)細胞組織加工製品のウイルス安全性評価、(2)バイオ医薬品のウイルス安全性評価、(3)プリオン安全性評価、及び(4)細胞組織加工製品に適用可能な無菌試験法、マイコプラズマ否定試験法及びエンドトキシン試験法の開発及び標準化、並びに(5)ウシ等由来原料に係る基準の見直し、を行った。

本研究により、細胞組織加工製品の品質・安全性確保に関するガイドラインで謳われているリスクマネジメントとリスクコミュニケーションを実行に移すための手順・ポイント、及び管理方法、バイオ医薬品ウイルス等感染性因子安全性確保のための標準的試験法及び評価基準、並びに、生物由来の原材料基準のあり方が明確になり、革新的医薬品及び細胞組織加工製品の開発における国際

競争力の強化、治験、承認申請・審査の効率化、販売後の適正使用が実現される。課題(1)~(5)について、以下を実施した。

(1)では、H24年度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開始し、感染性ウイルスのリスト化、患者、ドナー及びその他の原材料の特性に関連するリスク要因をいくつか抽出し、頻度や重篤度を考慮したリスク分析を行った。今年度は、妊娠可能性のある女性が患者の場合、胎児等への感染性にリスクが高いとの報告があるウイルスについて、リスク分析を目的とした感染率等を文献調査した。また、昨年度の副作用症例報告を利用したリスク分析の見直し、及び補足として、感染症週報等を利用したリスク分析も実施した。また、すべての成人は多くのウイルスに持続感染しており、ヒト由来細胞組織製品原料へのウイルス混入リスクが高いことを考慮すると、予め治療に伴うウイルス感染リスクを適切に評価しておく必要があることから、そこで、前年度に行った網羅的ウイルス検査結果から、EBウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)、及びパルボウイルスB19(B19)の4種類のウイルスを取り上げ、スパイク試験法の確立を目指した。これに加えて、iPS細胞のRNAウイルスの感染性の検討を行った。また、細胞表面のウイルス受容体の発現量を指標とした細胞組織加工製品の感染感受性評価手法を開発することを目的として、モデル細胞を用いて、細胞表面ウイルス受容体の定量的定量的スクリーニング手法の開発を検討した。

(2)では、バイオ医薬品製造過程におけるウイルス迷入の防止等を考察するため、ワクチンにPCV-1 (porcine circo virus type 1) 及びPCV-2 (porcine circo virus type 2) が迷入した事例における製造業者及び規制当局の対応について調査した。

(3)では、マウス正常型プリオン(PrP^C)を強発現するRK13mo1細胞株を用いて、感染価測定法の確立を試みた。また、FDAのリスクモデルや英国健康保護庁のデータなどを調査し、現時点でのvCJDや異常型プリオンのリスク評価の現状を明らかにした。また、異常型プリオン検出法であるマウス脳内接種の代替法として用いられているタンパク質ミスフォールディング循環増幅法(PMCA)について、その有用性を引き続き検討した。

(4)は、本年度1月より開始した課題である。マイコプラズマ否定試験について、検体量や迅速性

など、再生医療等製品の特性を踏まえた試験法に関する考え方を整理するとともに、再生医療等製品に対して現実的に適用可能な試験法について検討した。無菌試験の適用に際して、再生医療等製品ではその製造量に限界があり、出荷時に適用できる検体量が少ないケースが想定されること、及び製造から使用までの期間が短いことから、結果判定まで長期間を要する無菌試験法の適用が困難であることを考慮して、再生医療等製品の安全性確保のための出荷判定試験として実施可能な無菌試験法について検討した。エンドトキシン試験について、再生医療等製品にエンドトキシン試験をどのように実施していくのか、特に日局第十六改正エンドトキシン試験を適用困難な場合に、どのような試験の実施が合理的であるのかを検討した。また、多様な再生医療等製品が開発中であることも考慮し、製品の特性に応じて、どのようにエンドトキシン試験を実施するべきかについても考察した。

(5)も本年度1月より開始した課題である。国際獣疫事務局(OIE)において、日本・米国等が新たにBSEの「無視できるリスク国」に指定されたことを踏まえ、海外規制状況・国内規制に対する研究者の意見について調査を行い、医薬品等原料規制のあり方を検討した。

B. 研究方法

(1) 細胞組織加工製品等のウイルス安全性評価

1-1) 妊娠可能性のある女性で注意すべきウイルスの調査

妊娠可能性のある女性が患者の場合に検査した方がよいと考えられるウイルスについて、胎児・母体の感染率・垂直伝播率・有病率・死亡率を医学文献やHPで調査した。

1-2) 症例報告等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リスク分析を行うため、PMDAが公開している副作用データベースの症例報告ラインリストについて、医薬品一般名に抗体関連医薬品または低分子の免疫抑制剤を含み、かつ副作用名にウイルス感染等の症状(表1)を含む症例を収集した。ISOがすすめる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、重篤度ランクを求めた。ただし、死亡例には「被疑薬と死亡との因果関係が認められないもの」があり、ここでは除外している。得られた重篤度ランクと頻度ランクをかけあわせたものをリスクスコアとして、各ウイルスを比較した。またこれとは異なるウイルスリスク分析として、感染症週報等、国立感染症研究所のHPで公表されている報告数を利用した方法も検討した。

1-3) iPS細胞のウイルス感染性の検討

iPS細胞株HPS0063(201B7)は、レトロウイルスベクターにより4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入して樹立したもので、バイオリソースセンターから分与を受けた。FCV F4株は、自然宿主であるCRFK細胞で増幅し、その上清を遠心して、分注した。カリシウイルス(F4株)液のTCID₅₀は、CRFK細胞を用いて決定した。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。CRFK細胞を3,000個/90µlずつ96-ウェルプレートに播種し、一晚培養した後、そこに10倍段階希釈したウイルス液10µlを加え、37°C、5% CO₂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。

1-4) 細胞表面ウイルス受容体の高感度検出法の開発

CHO-DG44細胞(1.4×10⁷個)をPBSで3回洗浄し、5mLのPBSで再懸濁したのち、1mLの10mM sulfo-NHS-LC-biotin(Thermo Fisher Scientific)水溶液を加え、4°Cで2時間にわたり転倒混和しながらビオチン化反応を行った。ビオチン化を停止させ、300µLのRIPA bufferを加え、遠心上清をRIPA lysateとして回収した。Streptavidin agarose resin 50% slurry(Thermo Fisher Scientific)10µLをPBSで洗浄したのち、液相を30µLのRIPA lysateに置換し、室温で1時間混和した。還元カルボキシメチル化後、修飾トリプシンを加え37°Cで16時間消化した。消化物をフィルター(Empty Micro Bio-Spin, Bio-Rad)で濾過しレジンを取り除いた。消化物はSpeed vacで乾燥させ25µLの0.1%ギ酸に溶解し、5µL(細胞数約2.8×10⁵個相当)をLC/MS分析に供した。

Proteome Discoverer 1.4.0.288(Thermo Fisher Scientific)を用いデータベース(RefSeq,

NCBI reference sequence database) 中の *Cricetulus griseus* を種とするエントリーに対し、検索エンジンとして Sequest を用いて、タンパク質同定を行った。

1-5) ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究

293T 細胞に Env(-) の HIV-1 と HTLV-1 Env を発現させて HTLV-1 Env を有するレトロウイルス粒子を産生させてウイルス産生細胞とし、Luciferase 遺伝子をレポーターとして保持している TZM-bl 細胞と共培養することにより gp46 を介した cell-cell 間の膜融合能を評価した。また、両分子のウイルス産生細胞表面並びに細胞内コンパートメントへの挙動についてはフローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡、共免疫沈降法により解析した。

1-6) 細胞組織加工製品のウイルス感染リスク評価に関する研究

EBV: EBV の産生には B95-8 細胞株を用いた。EBV の感染価 PBMC を用いた LCL アッセイで測定した。CMV: CMV (Towne 株) の産生にはヒト正常胎児肺由来二倍体線維芽細胞株 HFL-1 細胞を用いた。ウイルス感染価は HFL-1 を用いて測定した。HHV6: ウイルス株として U1102 と HST 株を使用し、ウイルス増幅及びウイルス感染価の測定には、JJhan と MT4 細胞株を使用した。B19: ウイルス液として患者血清(日赤血液センターより分与)を使用した。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。

(2) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

文献・審査報告書等を基に調査した。

(3) プリオン安全性評価

3-1) 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

mo-vCJD 感染マウス脳と Parchi (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholate, 10 mM Tris, pH 7.4) を 10% (w/v) となるように混合し、21G 針付きシリンジでほぐした後、200 x g で 5 分間遠心した上清を 10% 脳乳剤とした。

RK13mo1 株は、10% ウシ血清を含む Opti-MEM GlutaMax 培地で培養した。プリオン接種時は培地に Doxycycline (Dox) を終濃度 1 µg/ml になるように添加して 96 well plate を用い

て 7 日間培養した。次に、mo-vCJD 脳乳剤を含む培地 (Dox を含む) に交換して更に 1 週間培養した。PrP^{res} 検出のために細胞を回収する場合は well 中の細胞を PBS で 2 回洗浄した後、Parchi を用いて細胞を溶解した後 WB に供した。

3-2) 異常型プリオンの *in vivo* 検出系の評価に関する研究

細胞は mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 を用いた。細胞培養は 5%CO₂, 37°C 条件下、10%FBS/BLGM 培地にて培養した。その後、2%FBS/BLGM 培地に置換して更に 2 週間培養した。培養液を遠心し、細胞画分と培養液に分離した。細胞画分は凍結融解を 3 回繰り返し、超音波処理を行ったのち、5 x 10⁷ cells/ml 相当となるように調整し、細胞抽出画分とした。

培養液は、超遠心操作 (150,000g 30 分) により上清画分と沈殿画分に分離した。沈殿画分は細胞抽出画分と同じ容積になるように PBS で懸濁した。上清画分は更に 5% TCA 沈殿及びエタノール沈殿を行った。

3-3) 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究

ヒト PrP 産生細胞株: ヒト膠芽腫細胞株 T98G (JCRB9041) を T75 フラスコで長期間継代後、9-cm 組織培養用シャーレで 4 日ごとに培地を交換しながら 40 日間培養した。

イムノプロット法: 培養細胞からフォスファターゼ阻害剤存在下で総細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE で分離後に PVDF 膜へ転写した。1 次抗体として抗 PrP 抗体 6H4 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)、ウサギ抗リン酸化 PrP ポリクローナル抗体又は抗 p43S-hPrP (39-50)-BCIP 抗体を用いた。

3-4) 細胞組織加工製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

異常型プリオンに関する情報について、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の対象にした。

(4) マイコプラズマ否定試験法、無菌試験法、及びエンドトキシン試験法

4-1) マイコプラズマ参照品及び NAT (核酸増幅検査) による検出

Acholeplasma laidlawii (NBRC 14400) 等は製品評価技術基盤機構 (NBRC) から、*M. arginini*

(ATCC 23838) は American Type Culture Collection (ATCC) からそれぞれ購入した。各菌株の由来等を研究結果 28 ページ下の表に示した。*M. hyorhinis* を溶解後、段階希釈し、最終濃度が 100 CFU/mL または 10 CFU/mL となるように Mesenchymal stem cell (MSC ; Lonza) 細胞懸濁液にスパイクした。C マイコプラズマ参照品 7 種は溶解後、段階希釈し、CHO-DG44 細胞細胞懸濁液に 1/10 量スパイクして最終濃度が 100, 10, 1 CFU/mL となるように調製した。試料から抽出したマイコプラズマ DNA は、MycotoOL PCR Mycoplasma Detection kit を用いて検出した。

4-2) 菌株及び NAT による検出

第十六改正日本薬局方 一般試験法 無菌試験法、培地性能試験及び手法の適合性試験に適している試験用菌株に収載された *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Bacillus subtilis* NBRC 3134, *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275, *Clostridium sporogenes* NBRC 14293, *Candida albicans* NBRC 1594 及び *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9455 を含む 13 菌株を PCR 試験用菌株とした。鋳型 DNA の調製は、第十六改正参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法に準じて行った。PCR は、第十六改正参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法に準じて行った。

4-3) エンドトキシン試験法の検討

国内で第十六改正エンドトキシン試験法に準拠しているキットやその測定に用いる機器のパフォーマンスについて調査し、再生医療等製品への適用に当たってどのような点が課題になるか調査した。また、第十六改正局方への準拠はされていないものの迅速法として市販されている試薬・機器についても、再生医療等製品への適用の可能性について調査した。

(5) ウシ等由来原料に係る基準

海外規制状況、国内規制に対する国内研究者の意見等について調査を行うとともに、研究協力者との意見交換を実施した。また、プリオン検出 ELISA の応用について検討した。

倫理面への配慮 ヒト由来試料 iPS 細胞を用いるにあたり、所内倫理委員会に諮り承認を得た。プリオン感染サンプルは、各施設のバイオセーフティー委員会の規定（共同研究先での実施においてはその施設の委員会の規定）に従い取り扱った。動物実験及び遺伝子組換え実験は、それぞれ動物実験に関する指針（共同研究先での実施において

はその施設の委員会の規定）、及び各遺伝子組換え実験安全管理規則に従い実施した。

C. 研究結果

(1) 細胞組織加工製品等のウイルス安全性評価

1-1) 妊娠可能性のある女性で注意すべきウイルス

ウイルスと妊娠との関連について文献調査で得られた情報を表 2 にまとめた。

風疹ウイルスは、白内障・難聴・心臓と歯の奇形・小頭症等の多様な症状を示す先天性風疹症候群の原因ウイルスとして妊娠時にもっとも注意すべきウイルスのひとつであり、日本国内でもとくに昨年は一昨年の 5 倍以上の件数が報告されている。

ヒトパピローマウイルス (HPV) は子宮頸部癌との関連があり、とくに 16 型はリスクが高いことがわかっている。妊娠に関しては感染率の報告が多く、子宮頸部癌との関連を示唆する報告は認められなかった。新生児の喉頭乳頭腫症は 6 型や 11 型の感染によって引き起こされるものの、これらの型は子宮頸部癌との関連については低リスクに分類された。

B19 については、初期の研究において胎児死亡率がコントロールの 2 倍から 3 倍であるとされていたが、近年の大規模研究では、胎児死亡率はコントロールと変わらないか、有意差があっても 2 倍以下であることが示されている。ただし有効なワクチンや医薬品が存在しないということには変わりないため、注意が必要と考えられた。

その他、E 型肝炎ウイルス (HEV)・CMV・単純ヘルペスウイルス (HSV) についてもまとめたが、B 型肝炎ウイルス (HBV)、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV)、及びヒト免疫不全ウイルス (HIV) については、すでに生物由来原料基準等において検査等の対象に含まれているため、詳細な調査を行わなかった。

1-2) 症例報告等を利用したリスク分析

昨年度行ったウイルス感染のリスク分析について、追加・修正を行った。PMDA 副作用データベースの症例報告ラインリストから得られた全体の症例数は 2539 件であった。報告されていたウイルスは多いものから順に、CMV、水痘帯状疱疹ウイルス、HBV、BK ウイルス、EBV、インフルエンザウイルス、C 型肝炎ウイルス、HSV、JC

ウイルス (JCV), B19, アデノウイルス, HPV, HHV-6, RS ウイルス, ヒトヘルペスウイルス 8 型, ヒトロタウイルス, HIV, HEV, 及び A 型肝炎ウイルスの 19 種類であった. PHA 法においては HBV のリスクがもっとも高く, ついで EBV, JCV のリスクが高いと考えられた. 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.

一方, 感染症週報等で公表されたウイルスは PMDA 症例報告のウイルス 19 種類のうち 11 種類と共通であったほか, 風疹ウイルス・麻疹ウイルス・デングウイルス・日本脳炎ウイルス・チクングニアウイルス及び重症熱性血小板減少症候群ウイルスについて報告があった. しかし, ウエストナイルウイルス等 19 種類については項目があるものの, 1999 年以後に報告はなかった. また, 狂犬病ウイルスについては 2006 年に 2 件だけ報告があった. これらは海外渡航歴がある場合に注意すべきウイルスであるが, 感染症週報では十分な情報が得られず, 文献調査が必要と考えられた. なお, 感染症週報をもとにした PHA 法においては, HIV 及び風疹ウイルスのリスクが高いと考えられた.

1-3) iPS 細胞のウイルス感染性の検討

iPS 細胞にネコカリシウイルスを感染させると, 感染ウイルス量に依存して細胞上清に感染性ウイルスが産生されてくるのが観察された. 一方 SNL 細胞のみにウイルスを感染させた場合にはこのようなウイルスの産生は見られなかった. このことは, ネコカリシウイルスが, iPS 細胞に感染可能であり, 細胞外へ感染性ウイルスを産生することができることを示している (図 1). ポリオウイルスを iPS 細胞と SNL 細胞の共培養系に加えると, ウイルスによる細胞変性効果が観察された (図 2). 一方 SNL 細胞は, ウイルスによって全く影響しなかった. 以上からポリオウイルスは, iPS 細胞に感染し細胞死を誘導することが明らかになった. シンドビスウイルスは, その感染宿主域が広いことで知られている. また, 強い細胞変性効果を示すことから腫瘍溶解性ウイルスとして利用されるケースもある. 調べてみると, iPS 細胞も感染後 2 日目でシンドビスウイルスにより, 死滅するこ

とがわかった (図 3). iPS 細胞はポリオウイルスやシンドビスウイルス等の RNA ウイルスにも感染性を持ち, その強い細胞変性効果により, 死滅することがわかった. 感染性を持っていると最終製品の汚染するリスクが極めて高まる. こうしたリスクの評価は, 製品製造に使われる細胞のもつウイルス感染性を評価することによって事前に行う必要があると考えられた.

1-4) 細胞表面ウイルス受容体の高感度検出法の開発

CHO-DG44 細胞の RIPA lysate を, そのまま還元カルボキシメチル化, 及びトリプシン消化した後, LC/MS を行った. 取得した MS データを用いて, タンパク質同定を行った結果 (図 4), 同定された総タンパク質数 (532 個) に対する膜タンパク質, 及び細胞内タンパク質の割合は, それぞれ 27% 及び 19% であった. 膜タンパク質が最も多く同定されたものの, 細胞内タンパク質が量的に多く, ウイルス受容体 (表 3) はほとんど検出されなかった (表 4).

膜タンパク質の回収方法として, 超遠心分離法があるが, 微量タンパク質の回収には適さない場合がある. また, 近年, さまざまな界面活性剤を用いた膜タンパク質抽出キットが販売されているが, 脱界面活性剤・脱塩操作後に, 回収率が低下することが懸念されている. そこで RIPA lysate から, 細胞表面に存在するタンパク質のみを効率的に回収するために, 細胞膜透過性を持たない分子で標識する過程を追加した. 可溶化前の細胞を Sulfo-NHS-LC-biotin 溶液中で振盪することで細胞表面タンパク質のビオチン化を行い, 可溶化後に固定化ストレプトアビジンでビオチン化タンパク質を精製したのち, 溶出を省き固定化ストレプトアビジンに結合させたままの状態還元カルボキシメチル化と消化を行ってペプチドにすることで, 凝集・沈殿による膜タンパク質の逸失の抑制を図った.

ビオチン化とストレプトアビジンでの細胞表面タンパク質の濃縮を行ったことで, 同定された全タンパク質数は減少したものの (Tris buffer 358 個, guanidine buffer 305 個), 膜タンパク質数の割合は, 27% から 32% (Tris buffer) または 43% (guanidine buffer) に上昇した (図 4). また, ウイルス受容体タンパク質として, intercellular adhesion molecule 1 等及び sulfated glycoprotein 1 (17 種) が同定され, 同定数は 1 個から 9 個に改善された (表 4). 還元カルボキシメチル化に用いる緩衝液については, guanidine

buffer で還元カルボキシメチル化を行ったもので特にウイルス受容体由来ペプチドの検出数が多く、Tris buffer 系では細胞内タンパク質の検出数が多かった(図 4B, C)。このことから、ストレプトアビジン-ビオチン間の結合は guanidine buffer 中で還元カルボキシメチル化を行ってもなお十分に維持されており、むしろ或る程度の変性条件を適用して非特異吸着物や凝集物を除去する方が、効率良く細胞表面のウイルス受容体を回収できるものと推定される。

1-5) ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究

グルコースレセプターである GLUT1 は、HTLV1 (ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型)のレセプターとして知られており、ウイルスの感染に重要な機能を果たしている分子である。GLUT1 のウイルスレセプターとしての機能を解明することは、人から人への感染リスクを評価する際に重要な知見を与える。ここではモデルとなる 293T 細胞を用いて、ウイルス感染における GLUT1 発現量の影響を調べた。GLUT1 の発現が低い 293T を使って gp46 を介した感染性が GLUT1 の強制過剰発現によりどのような影響をうけるか検討したところ、GLUT1 容量依存的にその感染性が減弱することが判明した。また、GLUT1 の相同分子である GLUT3 ではその減弱が観察されなかったことから、この膜融合阻止は GLUT1 特異的であった。

1-6) ウイルス感染リスク評価に関する研究

ウイルス液の作製と感染価・ゲノムDNA量の測定を行った。EBVでは、B95-8細胞の培養上清をウイルス液とした。感染価及びウイルスゲノム量を定量したところ、感染価は $10^{2.15}$ TCID₅₀であった。ABI7300でDNA定量を行ったところ 6.8×10^6 copies/mlだった。CMV (サイトメガロウイルス) は、HFL-1を用いたブランクアッセイの結果、感染価は 1.15×10^6 pfu/ml だった。ゲノムDNAの定量結果は、 2.88×10^7 copies/mlであった。HHV 6 (ヒトヘルペスウイルス6型) は、ウイルス株 (U1102, HST) をJJhanとMT4細胞株に感染させ、培養上清をウイルス液として -80°C にストックした。ヒトパルボウイルスB19は、KU812Ep6細胞を用いて日赤血液センターより供与された血清の感染価を測定した結果、 6.5×10^6 TCID₅₀であった。ウイルスゲノムDNAの定量結果は、 5.3×10^{11} copies/ml だった。

次にウイルスmRNA検出系の作成を行った。

EBVでは、LMP-1, BZLF-1 geneを選び、これらをもとに1st stepとしてRT-PCRを行い、2nd stepとしてnested PCRプライマーを設計し、検出系の作成を試みた。CMVのmRNAの検出では、Immediate early 1 (IE-1) geneとUL89 gene, B19では、Spliced virus capsid2 protein(VP-2) geneを選び、これらをもとにRT-PCR及びnested PCRプライマーを設計した。以上の検査系に関して感染細胞中に発現する標的mRNAを検出可能なことを確認した。

(2) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

2-1) PCV-1 迷入の発見経緯

2010年、カルフォルニア大学のVictoriaらが、次世代シーケンサーとマイクロアレイを用いて、GSK社の経口弱毒生ヒトロタウイルスワクチン (Rotarix[®]) より、PCV-1の全長に相当するDNAを検出した。GSK社も社内調査した結果、製品、マスターセルバンク (MCB)、ワーキングセルバンク (WCB) 及びウイルスシードよりPCV-1が検出され、3月15日にFDAへ報告された。

2-2) PCV 迷入否定の考え方

Merck社の弱毒生ヒトロタウイルスワクチン (RotaTeq[®]) については、前述したVictoriaらの研究ではPCVの迷入は検出されなかった。しかし、Merck社は、全く迷入が起こっていないことを証明するため独自で調査を実施することになり、調査に先立ちPCVの迷入を否定するための前提条件を以下のように考えた。

(i) PCVが感染性を有するには、欠損の無い全長のPCVゲノムが必要である。

(ii) 欠損の無い全長のPCVゲノムは、ターゲットシーケンスを増幅させる高感度のPCR法によって検出可能である。

(iii) PCV DNAの存在否定 (非検出) は、感染性のあるPCVの存在を否定することになる。

この前提条件に則り、図5、図6に示すディジョンツリーに従って、RotaTeq[®]におけるPCV迷入の有無が評価することとされた。

2-3) PCV-1 迷入経路の特定と規制当局の対応

GSK社では、1983年にMCBを確立しているが、社内調査の結果、このMCBにすでにPCV-1が迷入していることが判明した。細胞継代に用いられたトリプシンが汚染源であると考えられている。FDAは、GSK社からの報告を受け、米国内でのRotarix[®]の接種を一旦停止したが、その後

リスクは低いとして接種再開を決定した。欧州でも同様なリスクアセスメントが行なわれ、米国と同様な結論となり助言が行なわれた。最終的に、欧州では多くの国で RotaTeq[®]が販売されていなかったため、Rotarix[®]の継続使用が推奨された。日本において、Rotarix[®]は2007年6月6日よりロタウイルス感染の既往歴のない健康乳児を対象に臨床試験が実施され、2009年11月27日に承認申請、2011年7月1日に承認された。医薬食品局審査管理課の審議結果報告書には以下のような記載がなされている。「機構は、PCV-1はヒトにおいて病原性を示さないことから、本剤中の感染性 PCV-1 粒子が安全性に影響する可能性は非常に低く、これまでの臨床試験成績及び使用実績から示されている本剤接種により得られるベネフィットを考慮し、申請者の回答を了承した」

(3) プリオン安全性評価

3-1) 持続感染細胞クローンを用いた多様な異常型プリオン検出・評価系の確立

細胞培養系を用いた異常型プリオン感染系確立に向けた検討: PrP^C強発現細胞を利用した異常型プリオンの安定した増幅系を確立するために、Dox 依存的に PrP^Cを高発現する RK13mo1 培養細胞を用いることにした。マウス PrP 発現を追跡したところ、遅くとも発現誘導 2 日後には安定した発現が認められ、少なくとも 5 日までは同様の発現量が維持されることが確認された(図 7)。Dox 添加 7 日後の RK13mo1 細胞について抗 PrP^C抗体である 6D11 を用いた蛍光抗体法により染色したところ、殆どの細胞が染色され、またその蛍光シグナルは細胞の輪郭に沿って強く認められた。従って、発現誘導した PrP^Cは細胞表面部分に局在することが示された(図 8)。

mo-vCJD 感染マウス脳乳剤の希釈サンプルを PrP^C 発現誘導した RK13mo1 細胞に接種し、1 週間ごとに細胞を回収して Proteinase K 耐性シグナル (PrP^{Res}) の検出を試みた。0.01%脳乳剤を感染させた典型例では 5 週目に初めて PrP^{Res}が検出された(図 9)。ただし、繰り返し実験をした場合に 3 週目や 4 週目のみに散発的に検出されるという例も見られたため、安定して PrP^{Res}が出現してくる感染系を確立していくには細胞や感染条件の最適化が必要と思われた。

3-2) 異常型プリオンの *in vivo* 検出系の評価

感染実験に用いた MV63 由来 PrP 材料、及び調製途中の画分における総 PrP を WB 法で確認したところ(図 10)、細胞抽出画分、超遠心沈殿画分、TCA 沈殿画分から PrP が検出された(表 5)。対象として実施した bSP-SC_148 由来材料は細胞

抽出画分、と TCA 沈殿画分から PrP が検出されたが、培地から PrP は検出されなかった。PrP 材料(細胞抽出画分、培養液の超遠心沈殿、超遠心上清の TCA 沈殿)を接種された群のうち、細胞抽出画分及び培養液の超遠心沈殿画分に PrP^{Res}が WB 解析により検出された。更に、病理学的観察の結果、空胞変性及び異常型プリオン蛋白の蓄積が認められた(表 6, 図 11)。一方、超遠心上清の TCA 沈殿を接種された群では WB、空胞変性、異常型プリオン蛋白は検出されなかった。

3-3) 異常型プリオンの新規検出法

前年度に樹立した 3 種類の抗 pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP モノクローナル抗体の中で、pS43-hPrP に対する特異性が最も高かった pSP279 を用いて、培養細胞が産生する PrP の検出を行った。長期間継代培養した T98G 細胞では PrP 産生量が増加し、イムノブロット法で抗 PrP 抗体 6H4 が認識するバンドを示した(図 12A)。また、市販のウサギ抗リン酸化 PrP ポリクローナル抗体は、PrP の二量体と単量体に相当するバンドを示した(図 12B)。一方、p43S-hPrP を認識するマウス mAb pSP279 は、単量体を認識せず、二量体に相当するバンドのみに反応性を示した(図 12C)。

次に、プリオンノックアウトマウス(*prnp^{-/-}*)脳由来の PrP 欠損細胞株 HpL3-4 を用いてヒト PrP を安定的に産生する細胞株を構築した(図 13)。導入した hPrP mRNA の発現量は、ハウスキーピング遺伝子 β -actin mRNA の約 2 倍を示し(図 13C)、安定的に hPrP 遺伝子を高発現することを確認した。樹立した細胞を用い、pSP279 の反応性を調べた(図 14C, lanes 1-3)。抗 PrP 抗体の 6H4 抗体を用いたイムノブロット法では、hPrP 遺伝子の ORF を組換えたベクターを導入した細胞のみで PrP の産生を確認した(図 14A, lane 1)。抗 p43S-hPrP 抗体 pSP279 を用いたイムノブロット法では、hPrP 遺伝子導入細胞で PrP の二量体に相当するバンドを示した(図 14B, lane 3)。

3-4) 細胞組織加工製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

異常型プリオンの検出法としては、マウス脳内接種法やさらにそれを高感度化した方法としてプリオンタンパク質トランスジェニック (Tg) マウスへの感染系などが用いられてきている。しかし、このような系でも発症まで長期にわたる時間経過が必要である。またその代替法である異常型プリオンを免疫学的手法で検出する方法やプロテイナーゼ K 耐性 PrP の検出法などは必ずしも異常型プリオンの感染性を反映していないという懸念も

指摘されてきている。そこで感染性の代替法をかねた方法として、タンパク質ミスフォールディング循環増幅法 (PMCA) などが用いられるようになってきている。PMCA 法は核酸増幅法である PCR に類似した原理でタンパク質のミスフォールディングを誘導するサイクルを繰り返して行うことにより試験管内で異常型プリオンを形成させ、高感度に検出しようとするものである。PMCA 法はいくつかの改良法も提案され、異常型プリオンの感染性の推定に用いられている。

BSE を経口投与したウシ脳から採取された臓器の中で、脳、脊髄、神経節、視神経、パイア一班に異常型プリオンが検出されている。さらに、腸間膜リンパ節、副腎に加えて、皺胃 (第3胃)、瘤胃 (第一胃)、直腸においても検出されている。さらに唾液についてもレベルは低いものの PMCA 反応が陽性となったとされた。唾液での PMCA 陽性反応が検出されたこと、さらに唾液腺にも陽性反応が検出されたことより、このような体外排出される検体で陽性反応が検出されたことより水平伝播のリスクが高くなるのではとの懸念が指摘されている。唾液の感染性については、BSE を経口接種させたウシを用いて PMCA 法により感染前に弱い反応ながらも陽性反応が検出されることが他の研究者によっても示されている。また、慢性消耗病のシカやスクレイピーに感染させたヒツジでも PMCA で陽性反応が認められるとする報告がある。唾液の感染性に関連して、これまで唾液、乳、血液等については、異常型プリオンの伝達性があるとの疫学的証拠や感染実験による結果からは得られていない。上記論文の執筆者らは体液や排泄物における潜在的な BSE 伝達のリスクを排除できないとしている。

(4) マイコプラズマ否定試験法、無菌試験法、及びエンドトキシン試験法

4-1) マイコプラズマ否定試験法

再生医療等製品の一例として Mesenchymal stem cell (MSC) をモデルに取りあげ、Mycotool PCR によるマイコプラズマの検出を検討した。まず、Mycotool の標準プロトコールとなる CHO 細胞と同じ細胞濃度の 5×10^6 cells/mL の MSC に *M. hyorhinis* をスパイクして検出頻度を検討した。MSC は CHO DG44 細胞に比べて細胞が大きく、培養面積も多く必要であり、 5×10^6 cells/mL からの DNA 抽出液は粘性が高く濁ったものとなった。それでも *M. hyorhinis* のスパイク量が 100 CFU/mL であれば 4 lane 全てで検出されたが、スパイク量が 10 CFU/mL の場合は 2/4 の lane で検出されたにとどまった (図 15, 表 7)。

次に細胞数を減らして検出頻度を検討した。100 CFU/mL をスパイクした場合には、細胞濃度が 2×10^5 cells/mL 以上で 100% の検出が認められたが、 5×10^4 cells/mL では検出率が 1/2 に低下し、 5×10^3 cells/mL 以下では検出されなかった (表 7)。一方、*M. hyorhinis* のスパイク量を 10 CFU/mL とした場合、どの細胞濃度でも 100% の検出は認められず、特に 5×10^4 cells/mL 以下では全く検出されなかった。Mycotool の DNA 抽出法は細胞 DNA に依存して DNA を回収するものであるため、細胞量が少ないとマイコプラズマ DNA の収率が低く、細胞濃度が低い場合には carrier DNA を添加して DNA を抽出することが推奨されている。そこで、MSC に carrier DNA を添加して抽出を行ったところ、スパイク量が 10 CFU/mL でも、MSC が $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^4$ cells/mL の範囲では確実に検出が可能となった。

そこで、 2×10^5 cells/mL の MSC にバリデーション用マイコプラズマ参照品 7 種 (表 8) をスパイクし、Carrier DNA を添加し他条件でマイコプラズマの検出を検討した。その結果、この条件では参照品 7 種全てについて、10CFU/mL を 100% の確率で検出可能であることが確認された (表 9)。これは 5×10^6 cells/mL の CHO 細胞で得られた結果 (表 10) と同等の検出感度である。細胞数が少ないため、細胞あたりの汚染量としての検出感度は CHO 細胞の 1/25 という計算になる。

今回の検討により、CHO 細胞に特化された市販の検出キットである MycoTOOL PCR は、MSC にはそのまま当てはめることはできないことが確認された。MSC では細胞数を CHO 細胞の 1/10 以下に減らす必要があり、また carrier DNA の添加がマイコプラズマ DNA の抽出・検出には必要である。同じ再生医療等製品でも、MSC と異なる細胞が対象となる場合には、目的細胞を用いて最適化を行うことが必要である。また、今回は検討していないが、Mycotool PCR では抽出効率の確認・false negative を防ぐため、GAPDH の PCR 検出を同時に確認するプロトコールになっている。しかし、Mycotool は CHO 細胞に特化されたキットであり、CHO 細胞の GAPDH は検出できるがヒトの GAPDH は検出されないため、抽出効率の確認には別の手段を講じる必要がある。

4-2) 無菌試験法

従来の微生物検出法は結果判定までに時間がかかることから、欧州薬局方 (European pharmacopoeia, EP) では迅速に結果を得る代替法が提示されている。最新の手法を追加し、及び

改変した代替法の一覧を表 11 に示した。これらは 1) 微生物の菌体を直接検出する直接検出法, 2) 微生物の脂肪酸や核酸を間接的に検出する間接的測定法, 3) 微生物の増殖によって生じる変化を検出する増殖評価法に分類される。

微生物を蛍光試薬で染色し検出する蛍光染色法が、第十六改正参考情報「蛍光染色による細菌数の迅速測定法」及び「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験 B. 指標細胞を用いた DNA 染色法」として記載されている(表 12)。蛍光染色法は、蛍光色素で染色した細菌を、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターなど、蛍光シグナルを検出する種々の装置により計数する。直接検出法として蛍光活性染色法、間接的測定法としてマイクロコロニー法があるが、いずれの方法でも捕集前の原液で 102-103 CFU/ml の検出感度を有する。

一方、NAT が、「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験 C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法」として記載されている(表 12)。参考情報では原則として従来実績のある「A. 培養法」及び「B. 指標細胞を用いた DNA 染色法」によるマイコプラズマ否定試験の実施を求めており、PCR による検出法はあくまで DNA 染色法を補完する二次的な試験と位置付けられている。同様に、例示された細菌の 16S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子または真菌の 18S-5.8SrRNA 遺伝子間のスペーサー領域 (ITS1) の塩基配列に特異的なプライマーを用いて増幅した PCR 産物の遺伝子配列を解析し、データベースと照合して微生物を同定する「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」が、参考情報に記載されている。参考情報には、本法に示した以外の遺伝子領域も合理性があれば使用可能とされており、完全長 16SrRNA の調製や定量 PCR に用いるプライマーが報告されている。

日局の一般試験法は医薬品の出荷判定に遵用される試験を、参考情報は製品の製造工程管理等に利用される情報を示している。EP で規定されている chapter 2.6.27 (Microbiological control of cellular products) は日局の一般試験法に相当し、EP chapter 5.1.6 (Alternative methods for control of microbiological quality) は参考情報に相当する。表 11 に示した迅速試験法の一部は EP chapter 5.1.6 に記載されており、それらの一部は測定の自動化がなされ、簡便な手技で短時間に微

生物の計測が可能となっている。

表 11 に示した迅速試験法の中で、蛍光染色法は第十六改正参考情報に記載されていることから、再生医療等製品等の出荷判定試験に適用する無菌試験法には最も適している。NAT は高い感度と迅速な測定が期待できるが、参考情報ではマイコプラズマ否定試験での適用に限られている。しかし、NAT の原理と遺伝子解析による微生物の迅速同定法に用いるプライマー等の一部は参考情報に記載されていることから、十分なバリデーションを行った上で、再生医療等製品の無菌試験への適用が望まれる。

米国薬局方 (United States Pharmacopeia, USP) には、記載された公的な微生物の迅速試験法の使用に際して行うバリデーション方法が定められている。第十六改正参考情報にも分析法バリデーションが記載され、医薬品の試験法に用いる分析法が、分析法を使用する意図に合致していること、すなわち、分析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確率が許容できる範囲であることを科学的に立証することと規定している。参考情報に記載されていない表 11 に示された迅速試験法については、既に参考情報に記載されている蛍光染色法等と比較を行い、対象とする再生医療等製品の特性に応じた感度や精度が得られることを確認した上で適用することが望まれる。

再生医療等製品の無菌試験は、最終製品の出荷時点で微生物が陰性であることを保証することを目的とすることから、方法は第十六改正無菌試験法に準ずるが、再生医療等製品に特異的な部分は改良して行う必要がある。再生医療等製品はロットを構成せず、最終製品の内容量も少なく、製品を均一にして試験に供するのが困難なものが多い。EP chapter 2.6.27 (Microbiological control of cellular products) では、細胞治療製品等に関して表 13 に示すような考え方を提案している。現在改定作業が進んでいるドラフトでは、細胞由来製品の容量が 10mL 以上の場合は全量の 1%を試験に供し、10mL 未満の場合は別の方法、最終製品と最後に接触する液体や細胞に対して行うサロゲート試験、が取られるべきとしている。再生医療等製品の最終出荷試験に際しては、「調製品及び原料の試験検査、その記録並びに参考品の保管について、ドナーへの侵襲性が高く採取可能検体が少ない場合や必要な検体採取が困難な場合においては、採取した検体の増殖を行うこと、又は、検体の試験検査に代えて工程管理での確認によることとして差し支えないこと」との考え方が示され

ている（一般社団法人日本再生医療学会）。

4-3) エンドトキシン試験法

第十六改正一般試験法エンドトキシン試験法<4.01>の目的は、注射剤中に発熱を惹起する量のエンドトキシンが含まれていないことを確認することにより、注射剤の安全性を確保することを目的としている。エンドトキシンは古くはウサギを用いた発熱性物質試験法により検査されてきたが、改良が望まれていた。このためカプトガニ血球の抽出物が微量のエンドトキシンによりゲル化することを利用してインビトロ法が開発された。現在はゲル化法以外にも、ゲル化過程での濁度増加を光学的に測定する方法（比濁法）、及び合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法がある。

ゲル化法と比濁法は Coagulin の生成を測定するものであり、比色法は凝固酵素（Clotting enzyme）の基質（発色基質）を用いる方法である。国内で入手可能なエンドトキシン試験キットの多くはカプトガニ血球抽出物を用いており、生物試料からの抽出物のためロット間差をなくし一定の感度に調整することが非常に困難とされ、キット販売業者のノウハウがあるといわれている。このために製品ごとにカプトガニ血球の凝固系因子の量比や他の因子の混入も異なるとされ、感度や直線性などに差異がある（表 14）。

一方、エンドトキシンは発熱作用の他、補体の活性化や白血球の活性化、細胞に作用し接着分子発現の誘導や抗体産生促進など多様な生理作用を示す。また、マクロファージなどの免疫細胞の細胞表面の Toll 様受容体（TLR-4）に結合して、NFκB（Nuclear Factor κB）や MAP キナーゼファミリー等のシグナル伝達系を活性化し、種々の炎症性サイトカインの放出を促進する。このような多様な生理作用を持つことから、エンドトキシンの測定にマクロファージの活性化を測定する方法も提唱されている。

(5) ウシ等由来原料に係る基準

海外の規制状況、OIE、欧州食品安全機関（EFSA）等の国際機関のリスク評価情報を収集し、検討を行った。今後は、原則的に OIE の基準に沿って、生物由来原料基準による規制を見直す方向性が確認された。また、使用可能な部位等の見直しについては、現状における問題点の抽出・整理を行った。一方、プリオン検出 ELISA は PK 処理・未処理に関わらずスクレイパー感染マウス脳乳剤に反応した。

D. 考察

(1) 細胞組織加工製品等のウイルス安全性評価

1-1) 妊娠可能性のある女性で注意すべきウイルス

妊娠可能性のある女性で注意すべきウイルスについてこれまでに得られた情報は、ウイルスによってかなり異なっていた。リスクアセスメントを行うためには更なる情報収集が必要であり、次年度も継続する予定である。

1-2) 症例報告等を利用したリスク分析

症例報告を利用したリスク分析においては、免疫抑制剤等を投与した患者に関する症例報告を利用しているため、特に HIV 等については、感染症週報を基にした分析とはかなり異なる結論が得られた。様々な情報源を利用して色々な角度からリスク分析を行うべきであろう。今後は、海外渡航歴がある場合に注意すべきウイルスについて文献調査を進める必要がある。

1-3) iPS 細胞の RNA ウイルス感受性

カリシウイルス科の一種であるベシウイルス属のベシウイルス 2117 は、バイオ医薬品の製造用バイオリクターを汚染したことのあるウイルスである。近縁同属のネコカリシウイルスについて iPS 細胞に感染するかどうかを調べたところ、感染後ウイルス RNA コピー数の上昇が認められた。同様に感染性ウイルス粒子も感染 2 日めまで認めた（図 1）。またポリオウイルスもシンドビスウイルスも感染し増殖、iPS 細胞に細胞変性効果をもつことが明らかになった（図 2, 1-3）。前述したように、例えウイルスが細胞培養系を汚染しても原材料である iPS 細胞にも加工分化工程後の製品にも感染性がなく、またヒトにも感染しない場合には、その感染性上のリスクはごく小さいものになる。ところが感染複製が起きると最終製品の汚染に繋がり、そのリスクは、重大なものとなる。今回行った実験では、ネコカリシウイルスは、感染はするもののウイルスの増殖は、ごくわずかしき起きず、ポリオウイルスやシンドビスウイルスのような激しい細胞死は見られなかった。これは iPS 細胞自身もつ自然免疫系といった抗ウイルス活性が惹起された可能性があり、これらについては今後の課題である。

1-4) 細胞表面ウイルス受容体の高感度検出法

本研究では、モデル細胞として、遺伝子組換え

医薬品の産生細胞として汎用される培養細胞の一つである CHO 細胞 DG44 を用いて、ビオチン化とストレプトアビジンを利用した細胞表面タンパク質の濃縮を行うことで、効率良く細胞表面に分布するウイルス受容体を回収し、ウイルス受容体の検出効率を高められることを示した。また、CHO 細胞 DG44 に Icam-1, LDL 受容体などのウイルス受容体が発現していることを見出した。上述の方法は培養された細胞一般に広く応用可能であると考えられ、本研究で用いた遺伝子組換え医薬品産生細胞に限らず、細胞組織加工製品に発現するウイルス受容体も同様の手法で定性的定量的に解析できると期待される。

1-5) ヒトレトロウイルスの感染リスク分析

本研究から GLUT1 の過剰発現が gp46 の膜融合活性を減弱させることがわかった。しかし通常 GLUT1 は gp46 とは異なる細胞内コンパートメントに限局しており、gp46 は GLUT1 と会合することなく膜融合能を保持した状態でウイルス産生細胞表面に輸送されるものと考えられる。人への感染を考える上で GLUT1 の発現局在を知ることは重要な知見となる。

1-6) ウイルス感染リスク評価

開発した網羅的ウイルス検査系を使用した検査結果から、ウイルススパイク試験を行なうウイルス種として、EBV, CMV, HHV-6, B19 の 4 種類を選定した。4 種類中、EBV, CMV, HHV-6 の 3 種類はヘルペスウイルス科に属するウイルスで、ウイルスは初感染後に持続感染状態となり終生ウイルス陽性となることが知られている。これらのウイルスの成人の陽性率は 80~100% と非常に高く、血液から検出されることも多いため細胞組織加工製品の原材料への混入が懸念される。

これまでに行なった研究的ウイルス検査では、加齢とともに B19 の検出率が高まる傾向を示している。B19 のレセプターである P 抗原は赤血球膜表面抗原とも呼ばれ、赤血球系前駆細胞、巨核球、血小板その他多くの組織に発現している。B19 が自己複製するためには宿主側の活発な有糸分裂を必要とするため、B19 は赤芽球系など非常に狭い範囲の細胞に選択的に感染していることが分かっている。しかし、急性 B19 感染症では血液や扁桃腺由来の単核球より B19 が検出され、貧血のみならず P 抗原を細胞表面に発現しないリンパ球や顆粒球が減少する症例が報告されているため、B19 は P 抗原陽性 erythroid 系細胞以外の non erythroid 系細胞に対しても感染が成立する可能

性もあり、スパイク試験によるデータ蓄積は重要である。

(2) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

WHO は、PCV 等のウイルスのバイオ医薬品迷入事例を基に、潜在的な Adventitious Agent のリスクを評価するガイドライン（ドラフト）“Guidelines on Assessing Risk When a Potential Adventitious Agent Is Found”を 2011 年 4 月に作成した。このガイドラインの目的は、市販薬に potential extraneous agent が発見された場合のリスク評価に関する情報を提供することである。このドラフトガイドラインの中に、リスク評価を行う際のディシジョンツリーが示されており、リスク評価のポイントは、以下の通りである。

- ①ウイルスは、既知か未知か？
- ②核酸は、ウイルス粒子に含まれているか？
- ③核酸は断片か、それとも完全長か？
- ④感染性粒子はあるか？
- ⑤感染性粒子はヒトの細胞に感染するか？
- ⑥感染性粒子はヒトに感染するか？
- ⑦感染性ウイルスは、ヒトに病気を起こすか？
- ⑧ウイルスは、ヒトからヒトへ伝染性があるか？

RotaTeq[®]及びRotarix[®]の PCV 迷入事例をディシジョンツリーに当てはめた場合のリスク評価を図 6 に示す。Merck の RotaTeq[®]の場合は、ウイルス粒子に結合した PCV 核酸の断片のみしか検出されていないため、ヒトへの感染のリスクは極めて低いと評価された。GSK の Rotarix[®]の場合は、感染性の粒子が検出されたが、ヒトの細胞への感染は認められなかったため、ヒトへの感染のリスクは非常に低いと評価された。以上のように、RotaTeq[®] 及び Rotarix[®]とも健康被害のリスクは低く、FDA, EMA 及び WHO の判断を支持する結果となった。

(3) プリオン安全性評価

3-1) 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

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に mo-vCJD が *in vitro* (WB), *in vivo* ともに利用可能であることをこれまでに報告した。プリオンの感染性評価は動物を用いて行うのが一般的であるが、この場合長期にわたる飼育が必要なため、簡便に利用できない問題があった。感染性の評価を簡便にできるように本研究ではマウス PrP^C を強発現するように改変した RK13mo1 細胞を用いて PrP^{Pres} の増幅を

試みたところ、この細胞は感染5週目より細胞内にWB法で検出できるレベルのPrP^{Pres}を有していた。この結果は研究用のPrP^{Pres}産生のみならず、感染価測定法に至適な細胞株になる可能性を示唆している。今後は感染価測定法としての実験条件の最適化を行い、動物を用いた感染実験及びWB法との相関性を評価する予定である。

3-2) 異常型プリオンの *in vivo* 検出系の評価に関する研究

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。一方、実際のバイオ医薬品製剤は培養細胞や血漿が出発原料であり、そこに混入する可能性のある性状を伴ったプリオン材料を用いるのが現実的である。

3-3) 異常型プリオンの新規検出法

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では、発症初期段階でアミロイドβやα-シヌクレインの可溶性オリゴマーが形成されることから、それらの発症と関連が注目されている。プリオン病も、異常型プリオン感染初期にはPrP^Cがオリゴマーを形成し、次いで異常型プリオンに変化すると推定されており、PrPオリゴマーを認識するmAbの作製が積極的に試みられている。ウサギポリクローナル抗体を用いた研究で、異常型プリオン感染脳では正常脳に比較してpS43が多いと報告されている。PrPのN端側43残基のSerリン酸化とオリゴマー形成の関連は不明だが、pSP279抗体は二量体PrPを特異的に認識することから、プリオン病発症初期段階でPrPの動態を調べる研究への利用が期待できる。今後は、これらの抗体と樹立したヒトPrP安定発現細胞株を用い、より効率的なプリオン病検出法の確立を試みる。

3-4) 細胞組織加工製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

BSE陽性検体を経口投与したウシでの異常型プリオンの出現を各種臓器や排出物などについて調査した研究は、異常型プリオンの安全性を考える上で重要と考えられる。これまでマウスを用いた*in vivo*感染性を用いて陽性が検出されてきたウシ脳から採取された臓器の中で、脳、脊髄、神経節、視神経、パイアー斑でPMCA法でも陽性結果となることが確認された。

その一方で、これまで陽性反応を示すとはされ

てこなかった検体でもPMCA法で陽性結果が得られている。当然この結果は、従来の検出法は感度が十分でなく、例えば、唾液の感染性に関連してTSE伝播の潜在的なリスクが存在すると結論されている。一方で、タンパク質ミスフォールディング法の処理過程で人工的に生成された陽性反応である可能性も残されている。昨年度に報告したように、英国において手術で除去された虫垂や扁桃腺の調査結果からは、英国人のvCJDの潜在的な感染者数は多いとする推計が出されている。これは、収集された検体を免疫学的な手法により陽性反応を示した結果に基づいている。しかし、この場合にも二つの可能性を考慮する必要があると考えられる。すなわち、実際に多くの英国人のBSEの潜在的な感染は非常に高く、ただ多くの場合に発症にまで至っていないか、あるいは感染暴露量が発症に至るには少ないとするものである。もう一つの可能性は、陽性結果が必ずしも異常型プリオンの感染性を示さないとするものである。現時点でこれらの結論に明確な答えはないが、いずれの可能性もあることを念頭に感染性について更なる検討が必要であると思われる。

(4) マイコプラズマ否定試験法、無菌試験法、及びエンドトキシン試験法

4-1) 再生医療等製品におけるマイコプラズマ否定試験

マイコプラズマ否定試験の迅速法としては、EPがPCRなどのNATを用いる場合の要件を明らかにしている。その要件としては幅広いマイコプラズマ菌種への検出能を評価するための標準株の提示とそれぞれの標準株に対する感度を規定するというものである。今回の検討ではEPの基準に適合するとされる市販キットを用いて、このようなEP基準への適合性を評価するときの課題について検討した。その結果、マイコプラズマは細胞と接触したり細胞内で増幅したりすることが多く、細胞と共に被検液からゲノムを抽出するために細胞由来のゲノムにより妨害がどの程度あるのかの評価が重要であり、またその評価過程には抽出効率についての評価も含まれること等が課題であると考えられた。

検出感度としては必ずしもキットの標榜されている検出感度が確保できない可能性もあり、フルバリデーションを実施する必要性まではないがキットの性能がどの程度担保できるかを明らかにしておく必要がある。

4-2) 再生医療等製品における無菌試験

迅速法として、短期間の培養と培養により増幅

した細菌を蛍光プローブや、PCR 等の高感度な検出系で解析する試験法が提案されている。増幅した細菌のトラップ方としては、メンブランフィルター法などが採用されており、複数の技術を併用することにより、被検液に戻って 10^2 - 10^3 CFU/ml の検出感度があるとされている。この検出感度が必ずしも十分とはいえないが、従来の無菌試験法による結果では数週間の培養が必要なために結果の判定がヒトの投与後になることを考慮した場合に、ある程度やむを得ない代替法といえるであろう。もちろん、今後技術開発によりさらに高感度な方法が開発されてくる可能性があるが、少なくとも現時点では患者の細菌汚染に関する試験として、このような迅速法を投与前の検体で実施することが有用と思われる。

一方被検液の量についても、培養角膜のように非常に少量しか培養しない製品では日局の基準量を求めることは合理的ではない。これに対応する考え方として、BP が提案している基準があり、製品の製造ボリュームを 3 つのケースに応じて場合分けしており、基本的には少なくとも全ボリュームの 1 % を被検量として確保するという考え方であり、この考え方についても再生医療等製品では合理的と考えられる。

4-3) 再生医療等製品におけるエンドトキシン試験

第十六改正エンドトキシン試験では、事前に感度や被検液の妨害物質の有無について評価を予試験により実施しておくことが求められる。再生医療等製品は生きた細胞がその本質であり、十分な安定性を担保するために様々な添加剤が用いられていて、これらがエンドトキシンの測定を妨害することも考えられる。そのためにも予め十分な評価が必要と考えられる。一方、個別の試験の実施に際しては、有効成分が生きた細胞のために製剤化後、速やかに被験者に投与されなければならない。従って、迅速な測定系が望まれている。また、個々の試験でエンドトキシン標準品を用いた定量を行うことが求められているが、一度に 1 製品しか製造されない再生医療等製品でエンドトキシン標準品を常に使用することは、試験の性格からも合理的であるとは考えられない。多くのエンドトキシン試験ではキット化された市販製品が用いられているが、添付されているエンドトキシン標準試薬によりエンドトキシン標準品を代替することが合理的な場合が多いと考えられる。もちろんこのためには、エンドトキシン標準品とエンドトキシン標準試薬との相関性が、用いる機器の性能を

含めて評価されていることが前提となる。

また、場合によっては内部検量線法を用いることも有用であろう。内部検量線法を用いることは第十六改正では認められていないが、FDA の旧ガイドラインではその使用が認められており、一定の評価が可能と考えられる。このようなキットを使用することにより迅速にエンドトキシンの測定が可能であれば再生医療等製品の特性に合致しているともいえる。もちろん、そのためにはあらかじめ内部検量線法との相関性が評価されている必要がある。

再生医療等では医療材料との併用、場合によっては医療材料に埋め込んだ形でのヒトへの投与が行われる。このような場合、必ずしも最終製品ではなくその直前の細胞と医療材料を個別に試験することも合理的な場合があると考えられる。すなわち、再生医療等製品の特性を考慮し、ケースバイケースの判断を行うべきと考えられる。

(5) ウシ等由来原料に係る基準

平成 15 年に制定された生物由来原料基準では、EFSA 等が用いていた地理的 BSE リスク (GBR) に基づき、個別評価を経て使用可能国が選定された。平成 17 年に CVO/EU 議会は、BSE 分類は、可能な限り OIE ガイドラインに基づく必要があると結論を示した。これを受け、EFSA は、専門家によるパネルを設置し、平成 19 年には、EFSA は、GBR 評価手法は OIE の基準の枠組みに一致させる方針を決めた。現時点では、WTO の SPS 協定のリファレンスとされる OIE 基準が今後国際的なスタンダードとして、受け入れられる方向にあると考えられる。平成 25 年度においては、当該年度に OIE 基準において「無視できるリスク国」に指定された日本及び米国について、両国を生物由来原料基準の使用可能国に加えることを、喫緊の課題として検討することとした。尚、平成 15 年生物由来原料基準において GBR に基づき使用可能国としてきた国々の中には、OIE が評価していない国々がある。これらの国々については、平成 15 年の生物由来原料基準設定以来 BSE 発生リスクが上昇している事実があるか確認することが必要とされた。将来的な検討課題として、今後我が国の生物由来原料基準の使用可能国を OIE 基準に連動させるのが適切か否かについての検討或いは提言が必要であるが、それに先立ち、欧米の OIE の WTO の中での役割を考慮し、規制当局の本件に関する動向を調査することとした。一方、プリオン検出 ELISA がマウス PrP^C への反応性を有することが確認できた。これにより、プリオン

病発症マウスを用いて、異常型プリオン量に対する PrP^C 量の計測が可能となった。

E. 結論

(1) 細胞組織加工製品等のウイルス安全性評価

1-1) 妊娠可能性のある女性で注意すべきウイルス

妊娠可能性のある女性では、HPV, B19, HEV, 及び HSV 等に注意が必要と考えられた。

1-2) 症例報告等を利用したリスク分析

免疫抑制状態の患者においては、HBV, EBV, 及び JCV の感染リスクが高いことが確認された。感染症週報を基にした分析においては、HIV 及び風疹ウイルスのリスクが高いと考えられた。今後、ドナーの海外渡航歴についても考慮しながらリスク分析を進めていきたい。

1-3) iPS 細胞の RNA ウイルス感受性

細胞組織加工製品用細胞にウイルスが感染した場合を想定して、ウイルスが培養系に迷入した場合に iPS 細胞系に何が起きるのかについて調べた。その結果カリシウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルスが iPS 細胞に感染複製することが明らかになった。

1-4) 細胞表面ウイルス受容体の高感度検出法

原材料細胞のウイルス感染性を推定するためには、ウイルス受容体の有無を確認することが有用である。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。ビオチンとストレプトアビジンを利用して効率良く細胞表面に分布するウイルス受容体を回収することで、LC/MS によるウイルス受容体のスクリーニングが可能となった。本手法により、ウイルス受容体の発現量を指標とした細胞組織加工製品のウイルス感受性評価に応用できる可能性が示唆された。

1-5) ヒトレトロウイルスの感染リスク分析

ウイルス産生細胞内においては HTLV-1 Env の gp46 とその受容体分子である GLUT1 は異なる細胞内コンパートメントに局在することによりウイルス産生細胞において HTLV-1 の感染性が保持されている可能性が示唆された。以上から HTLV-1 の人から人への感染時にウイルスレセプターが果たす役割が明らかになった。このような知見は、ヒトレトロウイルス感染リスクの分析に有用であると考えられた。

1-6) ウイルス感染リスク評価

前年度に行った網羅的ウイルス検査系を使用した研究結果から、EBV, CMV, HHV6, B19 が生物由来原材料に混入する危険性が比較的高いことが示されたため、これら 4 種類のウイルスのスパイク試験法の確立を目指した研究を行った。現在までに、スパイク試験に使用するウイルス液及びウイルスゲノム定量系の作成が終了し、HHV6 を除く 3 種類の mRNA 検出系の作成を終了した。

(2) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

バイオ医薬品へのウイルスの迷入を防ぐため、従来より原材料の品質管理が行われてきた。しかし、品質管理が必要である新たな迷入ウイルス検出系及び次世代シーケンサー等による高感度・網羅的なウイルス核酸検出系により、今後、予期せぬ迷入が判明する事例の増加が予測される。その場合の安全性評価において、PCV の迷入における製造業者及び規制当局の対応は参考となる。また、WHO により示されたリスク評価のディシジョンツリーも有用と考えられる。

(3) プリオン安全性評価

mo-vCJD 感染マウス脳サンプルを RK13mo1 株に感染させたところ、感染 5 週目から細胞中に PrP^{Pres} が検出された。この細胞は効率よく PrP^{Pres} を増幅し、研究用 PrP^{Pres} 産生や感染価測定法に適した細胞である可能性が強く示唆された。

マウス馴化型 vCJD 持続感染細胞は細胞抽出画分のみならず、培養液にも感染性 PrP が存在し、これらの材料は少なくとも定性的なバイオ医薬品の *in vivo* 工程評価に使用できることが分かった。

PMCA 法は人工的に PrP の変異を引き起こす手法と想定され、迅速性に優れている。PMCA 法でこれまで、マウス脳内接種等で陽性反応を示さなかった検体でも陽性結果が得られているが、これが高感度化によるものなのかあるいは人工的な系によるものなのかについてさらに検討が必要となる。

(4) マイコプラズマ否定試験法、無菌試験法、及びエンドトキシン試験法

4-1) 再生医療等製品の最終製品の出荷試験の一つとして実施が求められているマイコプラズマ否定試験について、再生医療等製品の特性を踏まえた試験法に関する考え方を整理した。再生医療等製品では迅速試験法が求められているが、NAT を再生医療等製品に適用する場合に考慮すべき事項を明らかにした。また、検体の種類や検

体の採取量など、再生医療等製品の特性を考慮した現実的に適用可能な試験法について考察した。

4-2) 第十六改正参考情報「蛍光染色による細菌数の迅速測定法及び PCR 法を利用した試験法」を再生医療等製品の迅速無菌試験に適用するには、蛍光染色による細菌数の迅速測定法やバリデーションの実施を前提とした NAT を適用していくことが望まれる

4-3) 日局エンドトキシン標準品を個別製品ごとに使用することは必ずしも合理的とはいえ、エンドトキシン標準試薬の使用も許容されるべきと考えられる。また、予めエンドトキシン標準品との相関性が確認されていればエンドトキシン内部検量線法を用いることも可能と考えられる。

(5) ウシ等由来原料に係る基準

ウシ等由来原料の基準に係る提言を行うに当たり、必要な検討事項を一定程度整理した考え方をまとめた。来年度以降は、整理された検討事項についてさらに検討を進める。また、各組織におけるプリオンタンパクの質量計測を行い、プリオンタンパク質量あたりの PrP^C 量の計測も行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

《論文及び総説》

- 1) Nakano Y, Monde K, Terasawa H, Yuan Y, Yusa K, Harada S, Maeda Y: Preferential recognition of monomeric CCR5 expressed in cultured cells by the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. *Virology, in press*
- 2) Yuan Y, Yokoyama K, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato Y, Yusa K: Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to maraviroc. *Plos One*, 8: e65115, 2013
- 3) Suzuki K, Hattori S, Marks K, Ahlenstiel C, Maeda Y, Ishida T, Millington M, Boyd M, Symonds G, Cooper DA, Okada S, Kelleher A: Promoter targeting RNA suppresses HIV-1 infection in vivo through transcriptional gene silencing. *Molecular Therapy Nucleic Acids. in press*
- 4) Maeda Y, Terasawa H, Nakano Y, Monde K, Yusa K, Oka S, Takiguchi M, Harada S. V3-independent competitive resistance of a dual-X4 HIV-1 to the CXCR4 inhibitor AMD3100. *Plos One. in press*
- 5) Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H: Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences*. 324, 190-194, 2013
- 6) Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q, Chng WJ.: EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *blood*. 121, 4512-4520, 2013
- 7) Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N: Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiration*, [Epub ahead of print], 2013
- 8) Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T: Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Internal Medicine*, 52(2), 201-211, 2013
- 9) Sakai-Kato K, Nanjo K, Yamaguchi T, Okuda H, Kawanishi T: High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods*, 5, 5899-5902, 2013
- 10) Itoh S, Hiruta Y, Hashii N, Fujita N, Natsuga T, Hattori T, Bando A, Sekimoto Y, Miyata K, Namekawa H, Mabuchi K, Sakai T, Shimahashi H, Kawai K, Yoden H, Koyama S, Odgaard Herr S, Natsuka S, Yamaguchi T, k N: Determination of Galactosamine Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography. *Biologicals, in press*
- 11) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181, 2013
- 12) Inoue Y, Kubota-Koketsu R, Ideno S, Nakamura H, Ono K, Okuno Y, Ikuta K: Induction of anti-influenza immunity by modified GFP carrying hemagglutinin-derived

- epitope structure. *J. Biol. Chem.*, 288(7), 4981-4990, 2013
- 13) 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, Ikuta K: Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. *PLoS Pathogens*, 8(10), e77892, 2013
- 14) Watanabe Y, Ibrahim M S, Ikuta K: Evolution and Control of H5N1. *EMBO Reports*, 14(2), 117-122, 2013
- 15) Urayama T, Cameron R, Sato T, Yunoki M, 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*, 41(2), 125-127, 2013
- 16) Hirai I, Ebara M, Nakanishi S, Yamamoto C, Sasaki T, Ikuta K, Yamamoto Y: Jurkat cell proliferation is suppressed by Chlamydia (Chlamydophila) pneumonia infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6K. *Immunobiology*, 218(4), 527-532, 2013
- 17) Tian YS, Verathamjamras C, Kawashita N, Okamoto K, Yasunaga T, Ikuta K, Kameoka M, 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*, 19 (1), 465-475, 2013
- 18) Li YG, Siripanyaphinyo U, Tumkosit U, Noranate N, A-Nuegoonpipat A, Kurosu T, Ikuta K, Takeda N, Anantapreecha S: Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. *Intervirology* 56 (1), 6-12 , 2013
- 19) Higuchi H, Gondaira S, Iwano H, Hirose K, Nakajima K, Kawai K, Hagiwara K, Tamura Y, Nagahata H: Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. *Vet Rec.* 2013; 172(21): 557.
- 20) Kikuchi Y, Ohnishi T, Furusawa H, Kawai T, Fukuda Y, Yokoyama H, Sugita-Konishi Y: ELISA Detection of *Kudoa septempunctata* in Raw Paralichthys olivaceus (Olive Flounder) using a Chicken Anti-Kudoa Antiserum. *Biocontrol Science*, 18, 193-197, 2013
- 21) Ohnishi T, Kikuchi Y, Furusawa H, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: *Kudoa septempunctata* Invasion Increases the Permeability of Human Intestinal Epithelial Monolayer. *Foodborne Pathog.*, 10: 137-142, 2013
- 22) Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl Microbiol Biotechnol.*, Jul 24 published online, 2013
- 23) 遊佐敬介, 前田洋助, 高林 誠, 小林 哲, 苑宇哲: CHO 細胞が産生するレトロウイルス様粒子とウイルス安全性. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44(10) 852-856, 2013
- 24) 小林 哲, 遊佐敬介, 川崎ナナ: ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究. 国立衛研報告, 131, 7-15, 2013
- 25) 小林 哲: 各種インターフェロン製剤における自殺または糖尿病関連の副作用発現期間の比較. 国立衛研報告, 131, 45-49, 2013
- 26) 小林 哲, 遊佐敬介, 川崎ナナ: 抗体医薬品および免疫抑制作用を有する各種薬剤の投与症例におけるウイルス感染プロファイルの比較並びにこれを利用したウイルス感染のリスク分析. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス(投稿中)
- 27) 日本 PDA 製薬学会バイオウイルス委員会 SALLY 分科会: 第 2 章: 生物薬品の品質, 安全性の向上に関する検討. 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とその対策. PHARM TECH JAPAN, 29(7):45-50, 2013
- 28) 前田洋助: ケモカイン受容体変異と HIV 感染抵抗性. 化学療法の領域, 29: 2466-73, 2013
- 29) 加藤(森)ゆうこ, 柚木幹弘, 生田和良, 萩原克郎: 血液製剤の安全対策-プリオン除去の現状 - モダンメディア, 59(9), 231-237, 2013
- 30) 高橋一恵, 大久保祐士, 古木理恵, 服部眞次, 浦山 健, 坂井 薫, 柚木幹弘, 萩原克郎, 生田和良: 由来の異なる E 型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて. 血液事業, 36(3), 679-685, 2013
- 31) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池 裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷 梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験の PCR 法の見直しに関する研究: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 印刷中
- 《著書》
- 1) 奥田晴宏, 川崎ナナ: 16.7 その他の医薬品と関連物質. 辰巳 敬 編, 「第 7 版化学便覧応用化学編」, 1079-1084, 丸善出版,
- 2) 北條浩彦, 清水則夫(分担執筆): 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ. 北條浩彦編, 「基本編-原理と基本知識-リアルタイム PCR を使った解析の基本 10 プライマー/プローブの

設計手順②マルチプレックスの場合」, 72-74, 羊土社, 2013

- 3) 清水則夫, 渡邊 健, 外丸靖浩(分担執筆): 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ. 北條浩彦編, 「実践編—プロトコールを中心に—IV章 遺伝子量解析 15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」, 192-202, 羊土社, 2013

2. 学会発表

- 1) 小林 哲, 遊佐敬介, 川崎ナナ: 各種の免疫調節作用を有する薬剤の投与症例におけるウイルス感染プロファイルの比較. 第3回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2013. 9) 東京
- 2) 苑 宇哲, 高林 誠, 前田洋助, 原田信志, 遊佐敬介: ネコカリシウイルスの非宿主細胞における馴化について. 第61回日本ウイルス学会学術集会 (2013.11.10-12) 神戸
- 3) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志: HIV-1 coreceptor の oligomer 形成が HIV-1 感染感受性に与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会 (2013.11.10-12) 神戸
- 4) Terasawa H, Maeda Y, Nakano Y, Monde K, Kawano R, Yusa K, Harada S. Competitive resistance of a CXCR4-using HIV-1 lacking amino acid substitutions in the V3 loop of gp120 to a CXCR4 inhibitor. XIV Kumamoto AIDS seminar (2013) Kumamoto, Japan
- 5) Nakano Y, Maeda Y, Monde K, Terasawa H, Yusa K, Harada S. Preferential recognition of monomeric forms of CCR5 by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. XIV Kumamoto AIDS seminar (2013) Kumamoto, Japan
- 6) 前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中野雄介, 門出和精, 遊佐敬介, 原田信志: ウイルス産生細胞における GLUT1 発現による HTLV-1 エンベロープタンパク質の膜融合能の減弱. 第61回日本ウイルス学会学術集会 (2013.11.10-12) 神戸
- 7) 寺沢広美, 前田洋助, 中野雄介, 遊佐敬介, 原田信志: CRF01_AE X4 HIV-1 の CXCR4 阻害剤耐性獲得機構の解析. 第27回日本エイズ学会学術集会 (2013) 熊本
- 8) 今留謙一, 松田 剛, 川野布由子, 千葉佑規乃, 新井文子, 中澤温子, 伊藤 守, 清水則夫, 藤原成悦: 難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬3剤の評価研究. 日本ウイルス学会 (2013.11) 神戸
- 9) 清水則夫: 再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発 第14回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 (2013. 9) 東京
- 10) Kishioka Y, Sakurai K, Yamaguchi T.: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. APEC International Symposium (2013) Soul, Korea
- 11) Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K: HEV Prevention, Inactivation and Removal Strategies. Pathogen Clean Asia Summit 2013 (2013. 5.15-16) Shanghai
- 12) Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during manufacturing processes of plasma derivatives. Bioplasma World Asia 2013 (2013. 9. 3-4) Bali, Indonesia
- 13) 小林不二夫, 上園昭人, 坂井 薫, 柚木幹弘, 萩原克郎: グロブリン存在下におけるインフルエンザウイルス感染細胞の炎症性因子産生に対する影響. 第61回日本ウイルス学会総会 (2013.11) 神戸
- 14) 鈴木瑞穂, 加藤(森)ゆうこ, 浅川満彦, 柚木幹弘, 生田和良, 萩原克郎: NAT 法の違いによる野外サンプルからの E 型肝炎ウイルスの検出感度の違い. 第61回日本ウイルス学会総会 (2013.11) 神戸
- 15) 菊池 裕, 豊田淑江, 遊佐精一, 窪崎敦隆, 山口照英: 低酸素条件下で誘導されるスプライス変異 GPI アンカー欠損型プリオン蛋白質の発現. 第1回低酸素研究会 (2013. 7. 6) 東京
- 16) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池 裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷 梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日局参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」の PCR 法の見直しに関する共同研究. 日本薬学会第134年会 (2014.3) 熊本
- 17) 窪崎敦隆, 菊池 裕, 宮原美知子, 遊佐精一, 島崎愛加, 石橋侑季, 鈴木俊宏, 小原有弘, 大谷 梓, 佐々木裕子, 松山晃文, 大倉華雪, 古田美玲, 内田恵理子, 山口照英: マイコプラズマ否定試験に利用可能な標準菌株及び標準 DNA の調製. 日本薬学会第134年会 (2014.3) 熊本

《講演》

- 1) 日本PDAバイオウイルス委員会 SALLY 分科会: バイオ医薬品の安全性確保 1.1 ウイルス迷入の安全性評価. 第20回日本PDA製薬学会年会 (2013.12. 3-4) 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし