

表5 ウイルスによる転帰の内訳

ウイルス	死亡	未回復	後遺症	軽快	回復	不明
HBV	125 (7)	17	1	90	91	48
HCV	20 (4)	7	0	16	13	22
FLU	7 (0)	0	0	20	43	21
HPV	2 (0)	1	0	4	7	14
HH6	3 (0)	1	0	3	10	7
HH8	1 (0)	1	0	1	1	5
HRV	1 (0)	0	0	3	3	1
HIV	1 (0)	0	0	1	2	2
HEV	0 (0)	0	0	0	2	0
HAV	0 (0)	0	0	1	0	0
CMV	85 (3)	22	6	197	252	199
VZV	43 (1)	26	19	191	296	115
EBV	31 (3)	3	0	25	16	33
BKV	2 (1)	6	6	49	36	68
B19	1 (0)	2	0	15	10	9
ADV	8 (1)	0	0	8	14	2
HSV	4 (0)	4	0	22	17	15
RSV	1 (0)	1	0	4	2	3
JCV	29 (1)	6	0	6	3	8

表6 ウイルス感染リスク分析の PHA 法における頻度ランクの定義と尺度

頻度ランク	定義
9	報告件数が 160 以上である
7	80 以上 160 未満である
5	40 以上 80 未満である
3	20 以上 40 未満である
1	20 未満である

表7 ウイルス感染リスク分析の PHA 法における重篤度ランクの定義と尺度

重篤度ランク	定義
9	重篤例の割合が 80%以上である
7	60%以上 80%未満である
5	40%以上 60%未満である
3	20%以上 40%未満である
1	20%未満である

表8 報告件数と重篤例の割合をもとにした PHA 法によるウイルス感染リスク評価

ウイルス名	報告件数	頻度 ランク	重篤例数	重篤例 の割合	重篤度 ランク	スコア
CMV	761	9	110	20%	3	27
VZV	690	9	87	15%	1	9
HBV	372	9	135	43%	5	45
BKV	167	9	13	13%	1	9
EBV	108	7	31	43%	5	35
FLU	91	7	7	10%	1	7
HCV	78	5	23	44%	5	25
HSV	62	5	8	17%	1	5
JCV	52	5	34	79%	7	35
B19	37	3	3	11%	1	3
ADV	32	3	7	24%	3	9
HPV	28	3	3	21%	3	9
HH6	24	3	4	24%	3	9
RSV	11	1	2	25%	3	3
HH8	9	1	2	50%	5	5
HRV	8	1	1	14%	1	1
HIV	6	1	1	25%	3	3
HEV	2	1	0			
HAV	1	1	0			

表9 感染症週報に掲載された報告数と累積報告数

ウイルス名	2013年 第52週	2013年 累積	2012年 第52週	2012年 累積	2011年	2010年	週平均
VZV	6151	-	6279	-			6215
HBV					200	174	3.6
FLU	9307	-	16419	-			12863
HCV					36	39	0.72
B19	251	-	162	-			206.5
HH6	1291	-	1317	-			1304
RSV	3623	-	3805	-			3714
HRV	25	-	-	-	-	-	25
HIV	34	1550	17	1406	1535	1553	29.1
HEV	4	126	-	116	61	66	1.77
HAV	1	127	1	158	176	347	3.88
風疹ウイルス	13	14357	46	2353	378	87	82.6
麻疹ウイルス	6	232	2	293	439	447	6.78
デングウイルス	4	249	2	220	113	244	3.97
日本脳炎ウイルス	-	9	-	2	9	4	0.12
チクングニアウイルス	-	9	-	13	10	-	0.21
重症熱性血小板減少症候群ウイルス	-	48	-	-	-	-	0.92

表10 感染症週報をもとにした PHA 法における頻度ランクの定義と尺度

頻度ランク	定義
9	週平均の報告数が 1000 以上である
7	100 以上 1000 未満である
5	10 以上 100 未満である
3	1 以上 10 未満である
1	1 未満である

表 1 1 感染症週報をもとにした PHA 法における重篤度ランクの定義と尺度

重篤度ランク	定義
9	累積報告数が記載されている
1	累積報告数が記載されていない

表 1 2 感染症週報をもとにした PHA 法によるウイルス感染リスク評価

ウイルス名	頻度ランク	重篤度ランク	スコア
VZV	9	1	9
HBV	3	9	27
FLU	9	1	9
HCV	1	9	9
B19	7	1	7
HH6	9	1	9
RSV	9	1	9
HRV	5	1	5
HIV	5	9	45
HEV	3	9	27
HAV	3	9	27
風疹ウイルス	5	9	45
麻疹ウイルス	3	9	27
デングウイルス	3	9	27
日本脳炎ウイルス	1	9	9
チクングニアウイルス	1	9	9
重症熱性血小板減少症候群ウイルス	1	9	9

細胞組織加工医薬品のウイルス安全評価に関する研究
遊佐敬介 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨： 細胞組織加工医薬品の製造過程でウイルス汚染が起きる可能性は、つぎの4つのケースが考えられる。(i)製造加工用に分離された細胞組織がすでにウイルス感染している、(ii)治療用細胞製造加工過程（リプログラミング、分化等）でそれまで抑制されていた内在性ウイルス等が活性化する、(iii)フィーダー細胞や生物由来原材料を介してウイルスが持ち込まれ、治療用細胞に感染する、(iv)製造加工の過程で製品を扱うヒトなどを介して外界から持ち込まれるケースである。本研究では、(iii)や(iv)の問題に焦点を絞ってRNAウイルスの感染性を中心に検討を行った。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は、iPS細胞に感染することがわかった。感染性の有無や細胞内での複製能の高低などの知見はウイルスの危険度に応じた迅速で安全性の高い評価系構築に寄与するものと考えられた。

A. 研究目的

治療用細胞組織加工医薬品は、感染性因子、特にウイルスによって汚染される可能性を常に孕んでいる。細胞組織加工医薬品の製造過程でウイルス汚染が起きる可能性として、つぎの4つを挙げることができる。

まず1つめは製造用に分離された細胞組織がすでにウイルス感染しているケースである。特に注意すべきウイルスは、ドナー体内に存在が想定される慢性感染ウイルスであるHIV(エイズウイルス)、HAV(A型肝炎ウイルス)、HBV(B型肝炎ウイルス)、HCV(C型肝炎ウイルス)、HTLV-I/II(ヒトTリンパ好性ウイルス)、ヒトパルボウイルスB19、CMV(サイトメガロウイルス)等である。これらは、輸血、骨髄移植などの際にも、その感染の有無に特別な注意を払われなければならないウイルスである。細胞組織加工医薬品製造においても重要な検査項目となる。

2つめは、治療用細胞製造加工過程（リプログラミング、分化等）でそれまで抑制されていた内在性ウイルス等が活性化するケースである。特にリプログラミングや分化誘導の過程でヒトゲノムに散在する内在性レトロウイルスが活性化する可能性については、必ずしも十分な解析がなされておらず、今後の課題である。

3つめとして挙げられるケースは、フィーダー細胞や生物由来原材料を介してウイルスが持ち込まれ、治療用細胞に感染するケースである。これには、細胞培養に使われるウシ胎児血清、生物由来の添加物、あるいはトリプシンなど生物由来の原材料を介してウイルスに汚染されるケースがある。生物由来の原材料を介してウイルス汚染が起きるケースは、動物細胞を用いて製造される医薬品製造においてもっとも注意を要する。過去に起きているバイオリアクター内の医薬品製造細胞の汚染事例の多くが、ウシ胎児血清やブタ由来トリプシン、その他生物由来の添加物に起因すると考えられている。従って、細胞組織加工医薬品の製造工程でも、ウシ胎児血清等生物由来原材料を使った培養加工の工程を含む場合は、ウイルスによる汚染が起きる可能性を否定できない。またフィーダー細胞を用いる場合には、フィーダー細胞がウイルスを持ち込むケースも想定できる。特にげっ歯類の細胞は、内在性レトロウイルスを産生している場合が多く、その安全性を十分確保する必要がある。

4つめのケースは、製造加工の過程で製品を扱うヒトなどを介して外界から持ち込まれるケースである。バイオ医薬品におけるウイルス汚染事例では、医薬品製造細胞の取り扱いをし

ている人からアデノウイルスが混入した例が知られており、このようなケースも想定できる。

本研究では、フィーダー細胞や生物由来原材料あるいは製造加工の過程で製品を扱うヒトなどを介して外界から持ち込まれるケースを想定して、細胞組織加工医薬品の製造工程にウイルスが持ち込まれた際にどのようなことが起きるのかについて検討した。昨年度は、バイオ医薬品製造工程で感染事例を起こしたベシウイルス 2117 にと同属のカリシウイルスが高い馴化能力を持っており、感染性の低い細胞である非宿主細胞 CV-1 で驚くほど短期間に高い感染増殖性を獲得する過程を解析した。本年度もまずカリシウイルスについて調べた。また他の RNA ウイルスについても調べた。

B. 研究方法

(1) 細胞

HeLa, CRFK, SNL細胞はDMEMに10%のウシ胎児血清を10%となるように加えて培養に供した。

(2) ヒトiPS細胞

ヒト人工多能性幹 (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。iPS細胞の培養は、国立衛研遺伝子細胞医薬部で行い安田、黒田博士より供与を受けた。

(3) ウイルス

FCV (feline calicivirus) F4株は、自然宿主であるCRFK細胞で増幅し、その上清を遠心 (2,000 r.p.m., 15 min) して、0.22 μ m フィルターを通して分注し、-80°Cで保存した。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。

(2) ウイルス感染感受性 TCID₅₀ の測定
CRFK 細胞を 3,000 個/90 μ l 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 10 μ l 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。

(4) RT-qPCR によるウイルスコピー数の測定

RT-qPCR には、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (Takara)を用いた。ネコカリシウイルスの total RNA コピー数の測定には、forward primer, reverse primer
5' -CACACTAGCGTCAACTGGAGTACA-3' ,
5' -ACACCAGAGCCAGAAATAGAGAAC-3'
RNA (-) 鎖のコピー数測定には、forward primer, reverse primer それぞれ
5' -GTAAAAGAAATTTGAGACAATG-3' ,
5' -AATATACTGAAGATCGCGCCTCCG-3'
を用いた。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料 iPS 細胞を用いたので、所内倫理委員会に諮り承認を得た。

C. 研究結果

(1) ネコカリシウイルスの iPS 細胞への感染
ベシウイルス 2117 は、バイオ医薬品の製造用 CHO 細胞に感染事例を引き起こしたウイルスである。自然宿主が明らかになっていないため、汚染経路ははっきりしないが、生物由来原材料である添加物が疑われている。生物由来原材料に汚染を引き起こしたウイルスは細胞組織加工製品のウイルス安全性にとっても注意を要するウイルスのひとつである。このウイルスは、カリシウイルス科ベシウイルス属に属しており、近縁種にはネコカリシウイルスがいる。前年度に我々は近縁種のネコカリシウイルスが、ヒト細胞にも感染することを見いだした。しかも例え感染増殖性が低いケースでも非宿主細胞に容易に馴化する能力を備えていることも明らかになった。そこで本年度は、まずネコカリシウイルスがヒト iPS 細胞に感染するかどうかについて検討を行った。

幹細胞を未分化状態に保持するために、一般的にはMEF (マウス胎児由来初代培養線維芽細胞) との共培養が必要なことが多い。調製され

るMEFは、必ずしも純度が高い線維芽細胞の集団ではなく、実際には多くの細胞の混合物となっている。MEFはマウスから調製するので、その品質が必ずしも一定せず、マウス管理などウイルス安全性上問題が多い。特にマウスの細胞組織では内在性レトロウイルスを産生しているケースが有り、ヒト細胞との共培養時にマウス細胞からウイルスが持ち込まれる可能性を否定できない。そのためMEFではなく樹立されたマウス線維芽細胞株を使用する場合もある。iPS細胞では、G418抵抗性発現ベクターおよびLIF 発現ベクターを組み込んだSNL細胞 (SNL 76/7 STO 細胞, ECACC 07032801) が、ヒトiPS細胞培養に使用されている。そのためここではマイトマイシンC処理済みのSNL細胞との共培養下でウイルス感染実験を行った (図1)。その結果m. o. i. を変えて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。ウイルス感染では、ウイルス増殖に伴う細胞変性効果が観察される場合がある。そこで次に感染後2日目の細胞数を調べた (図2)。その結果ウイルス感染に伴う細胞変性効果は観察されなかった。感染をさらに確認するために、感染後細胞内のウイルスRNAコピー数をRT-qPCR法によって調べた (図3)。カリシウイルスのRNAは、genomic RNA (+) 鎖, genomic RNA (-) 鎖, subgenomic RNA (-) 鎖, subgenomic RNA (+) 鎖と4種類ある。この4種類すべてを含むRNAを測定した。m. o. i. を挙げていくに従って細胞内のウイルスRNAコピー数が上昇することがわかる。しかしSNL細胞は、ウイルスコピー数の上昇は見られなかった。カリシウイルス粒子には、genomic RNA (+) 鎖がパッケージングされており、感染成立後genomic RNA (+) 鎖を鋳型にしてgenomic RNA (-) 鎖が合成され、それがgenomic RNA (+) 鎖の鋳型として使われる。したがってgenomic RNA (-) 鎖の合成

が観察されるかどうか、感染成立の証拠となる。調べてみると、SNL細胞では全く見られず、iPS細胞/SNL細胞では、明らかなコピー数の上昇が見られた (図4)。またHeLa細胞に比べて、低いm. o. i. 0.1でもiPS細胞/SNL細胞では、genomic RNA (-) 鎖が確認され、ウイルスの感染侵入効率に関しては、HeLa細胞を上回る感受性を示した。

さらに時間経過にしたがって急速にウイルスコピー数は上昇するが、12時間後には減少し始める (図5)。これは感染が成立した後、急速にウイルス複製が抑制されることを示唆している。こうした傾向は293T細胞でも同様に確認できた。またこうしたウイルス産生は、その感染性をコロニー形成実験でも裏づけられた。

(2) ポリオウイルス、シンドビルウイルスのiPS細胞への感染

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6)。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7)。

以上から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。またポリオウイルスは、マウス由来の細胞には、感染が知られていないが、シンドビスウイルスでは感染する可能性が高い。iPS細胞培養系には、細胞を未分化状態に保持するために、MEFやG418抵抗性発現ベクターおよびLIF 発現ベクターを組み込んだSNL細胞がフィーダー細胞として使用されている。iPS細胞へのウイルス感染のみを解析するためには、共培養されているこれらの細胞へのウイルス感染を考慮する必要がある。

D. 考察

(1) 細胞組織治療製品におけるウイルス安全性確保

細胞組織加工製品の製造工程では感染性因子、特にウイルスの混入の可能性を常に孕んでいる。本研究の目的は、細胞組織加工製品におけるウイルス安全性を検討し、臨床に役立つ提言や基礎データを提示することである。細胞組織加工医薬品の特徴としてまず治療用細胞としてヒト細胞組織を使うという点、また細胞や組織の培養に生物由来原材料が多く使われるという点が挙げられる。これらに加えて、細胞組織を採取後、細胞・組織の加工が行われる点が多様な特徴である。細胞・組織の加工には、疾患の治療や組織の修復、再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖、株化、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が含まれる。製造工程は、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が行われ、最終製品である細胞・組織 利用製品を出荷するまでを含む。バイオ医薬品製造工程と異なる工程を含む上に、その生産スペースが個々の製品で比較的小さいことも細胞組織加工医薬品の特徴である。また自動化が困難で人が直接製品を扱うケースも多いことが想定されるため、外界や製造従事者から製品への飛び込みウイルス (adventitious virus) の可能性がある。それに加えて、細胞・組織の人為的な増殖、細胞の株化、細胞・組織の活性化、分化等を施すために、フィーダー細胞との共培養や生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等に接触・暴露される工程を含むケースが多い。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。ここで想定される汚染は、バイオ医薬品においてすでに起きているウイルスによるものであろう。例えば 2008 年米国では稀少遺伝子疾患であるゴーシュ病やファ

ブリー病治療に使われる医薬品の製造用細胞にウイルス汚染が見つかり、製造がストップしたために、FDA (米国食品医薬品局) によって医薬品が不足する事態を回避する対策が取られた。このときの汚染ウイルスが、ベシウイルス 2117 というカリシウイルス科に属するウイルスである。そしてバイオ医薬品を製造用細胞として使われていたのが CHO 細胞である。汚染がおきた原因は、生物由来の原材料が汚染されていたことだが、もうひとつの大きな要因は、CHO 細胞がベシウイルス 2117 に高い感染感受性を持っていたことによる。仮にバイオリクターにウイルスが持ち込まれても感染性をもたないウイルスなら、ウイルスの感染増殖は起きず、培養液中に持ち込まれたウイルスは、精製工程に含まれている不活化除去工程で除かれていた可能性が高い。しかし細胞組織加工医薬品では、不活化除去工程が含まれないため、持ち込まれたウイルスが製品を汚染する可能性がある。そこで使われる細胞へのウイルス感染性の有無をしらべることは、極めて重要な知見となる。重要な点は、ウイルス安全性をより確かなものにするためには、加工前、加工後の細胞のウイルス感染感受性を正確に把握しておく必要があるということである。本年度は、細胞治療に今後広く使われる可能性のある iPS 細胞のカリシウイルス感受性に焦点を絞って解析を行った。

(2) RNA ウイルスの iPS 細胞への感染

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あるウイルスである。このウイルスと同属のネコカリシウイルスは、ごく近縁に属するウイルスである。このウイルスは、ネコの上気道に感染することが知られているが、ヒトには感染が知られていない。しかし、HeLa, HEK293 細胞などに感染すること、アフリカミドリザルなどの細胞にも感染性を示し、かつ短期間でアフリカミドリザルの細胞に馴化し、激しく増殖するようになることが昨年度報告した。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。また感染ウイルス粒子の産生も感染 12 時間をピークに観察された (図 5)。その後低下した。同様に感染性ウイルス粒子も感染 2 日目まで認めた (図 6)。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。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、その危険性はごく小さいものになる。ところが感染性を持ってい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。そのリスクの評価は、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。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、ごくわずかしか起きず、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、これらについても今後の課題である。

E. 結論

細胞組織加工医薬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。バイオ医薬品異となりその製造過程には効果的な不活化・除去工程を導入する事が困難である細胞組織加工医薬品では、汚染が起きた場合に何が起きるのか、事前に把握し、その危険性をあらかじめ評価しておく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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) 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

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 前田洋助, 中野雄介, 門出和精, 寺沢広美, 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 HITLV-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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

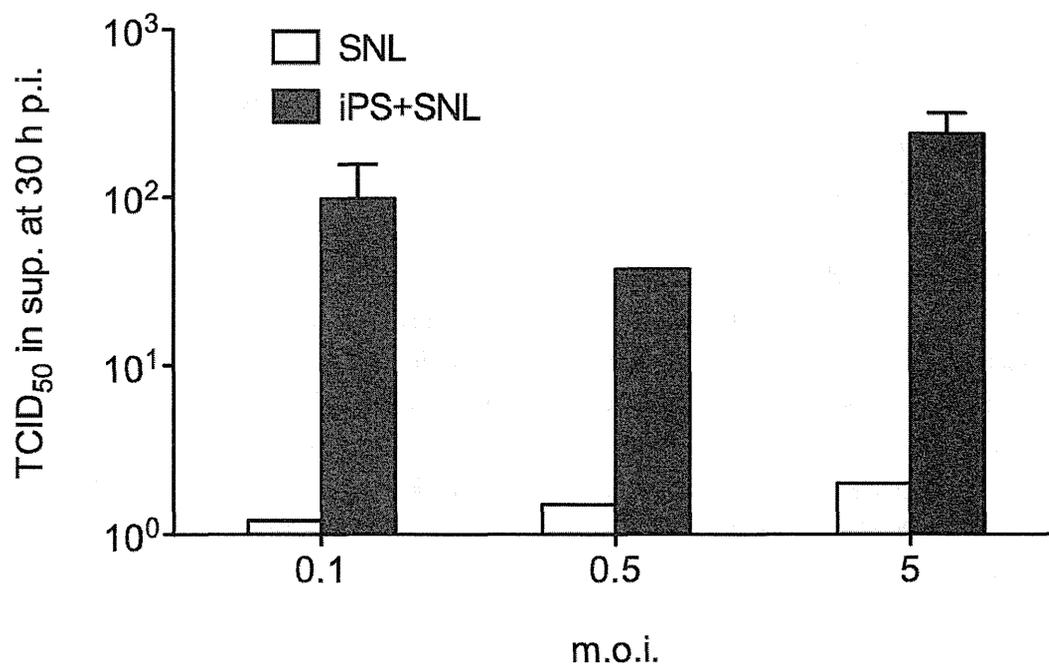


図1 iPS細胞に m. o. i. を変えてネコカリシウイルス (FCV) を感染 (2 h) させた後, 培養. 30 時間後に上清のウイルス感染性を調べた. SNL 細胞のみでは, 感染性が殆ど認められず, iPS 細胞存在下で FCV の産生が認められた.

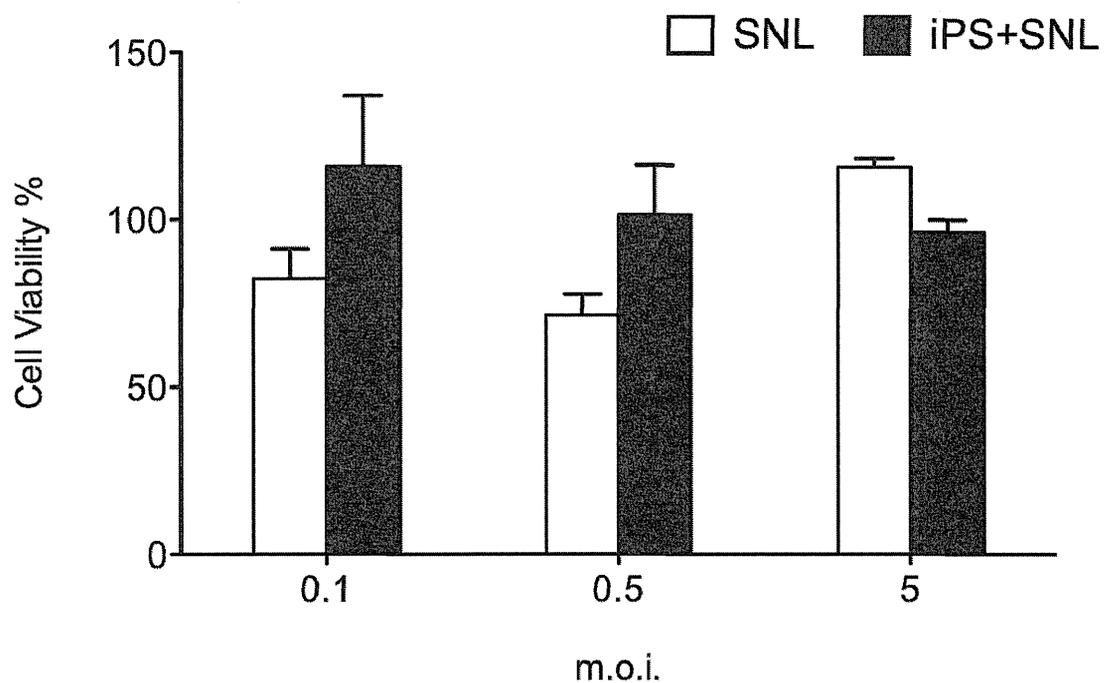


図2 iPS細胞に m. o. i. を変えて FCV を感染 (2 h) させた後、培養. 30 時間後に生細胞数を調べた. SNL 細胞においても, iPS 細胞も生細胞数関係でもウイルスによる生細胞数の減少は見られなかった.

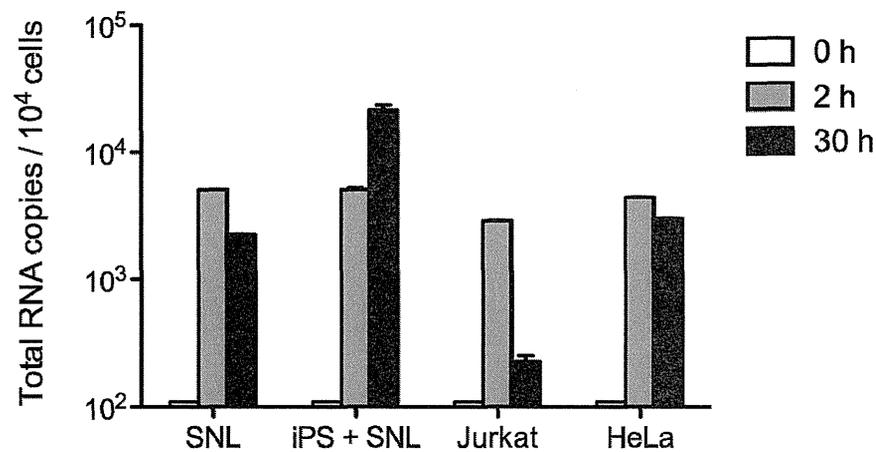
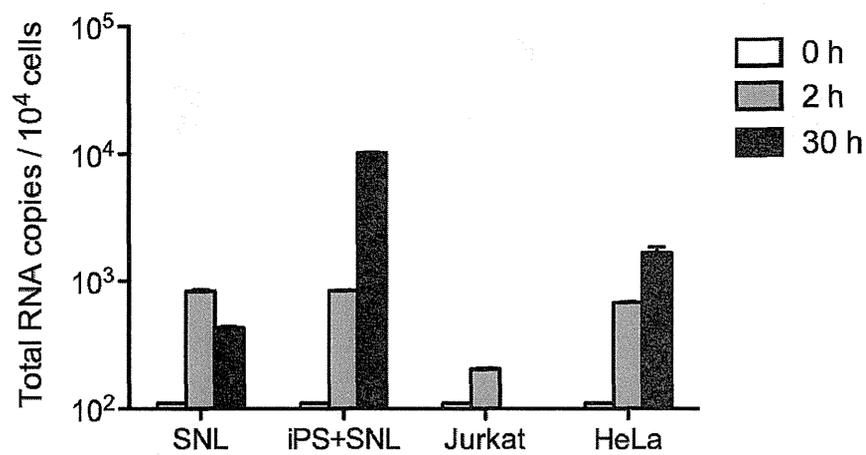
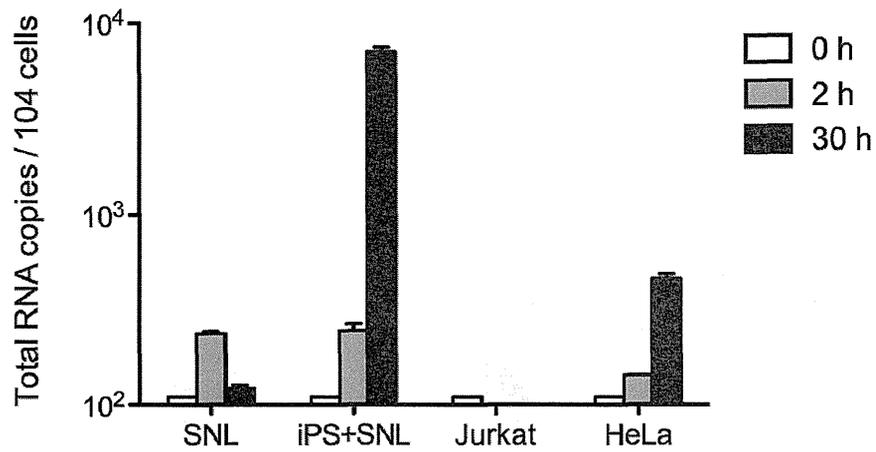


図3 iPS細胞にFCVを感染(2h)させた後、培養。30時間後に細胞内のtotalウイルスRNAのコピー数を調べた。SNL細胞においてはウイルスコピー数の増加は見られなかったが、iPS細胞では、有意な上昇が見られた。

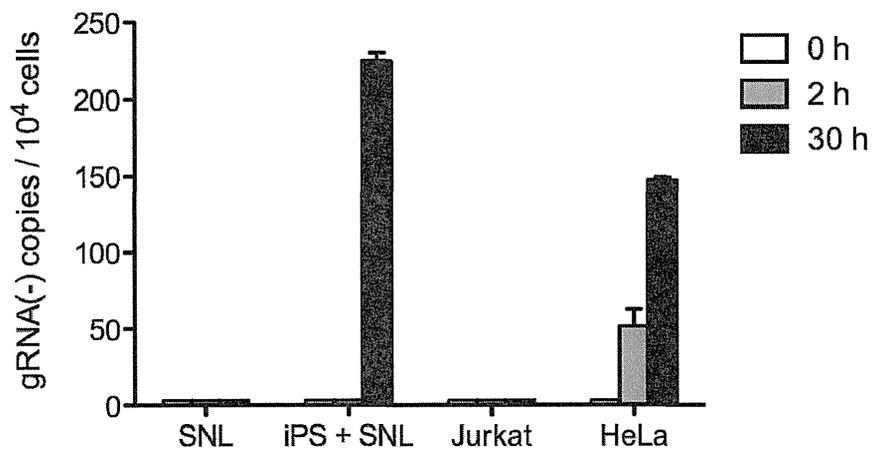
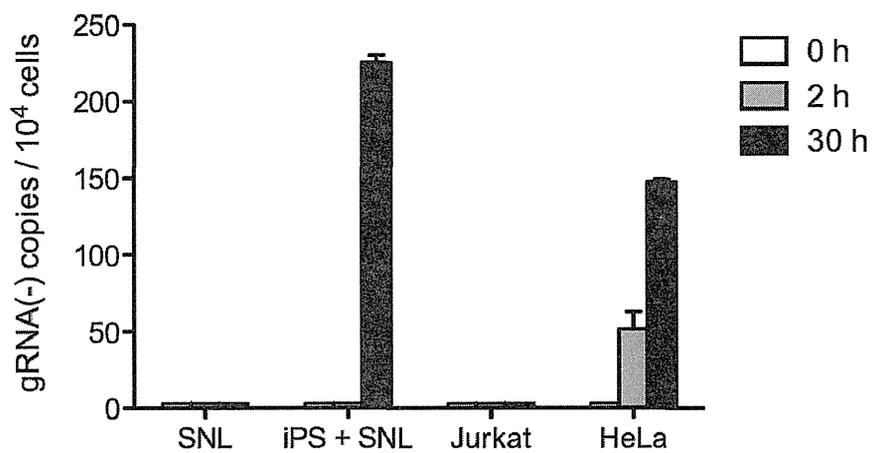
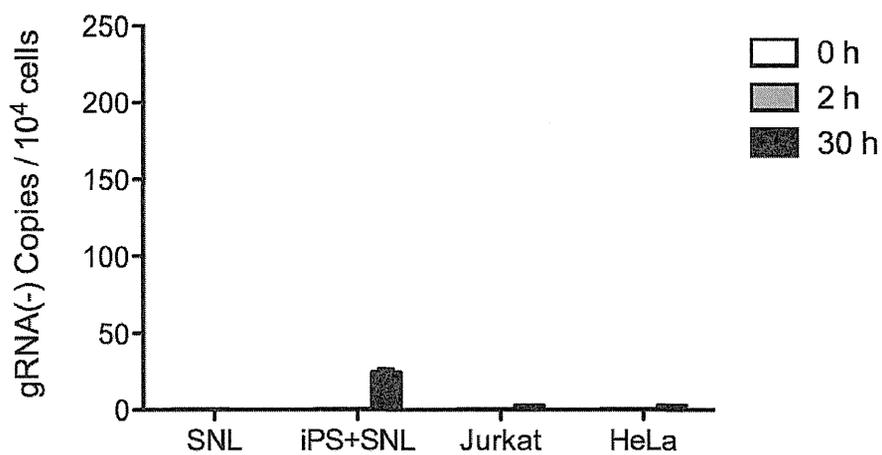


図4 iPS細胞にFCVを感染(2h)させた後、培養。30時間後に細胞内のウイルスRNA(-)鎖のコピー数を調べた。SNL細胞においてはウイルスコピー数の増加は見られなかったが、iPS細胞では、有意な上昇が見られた

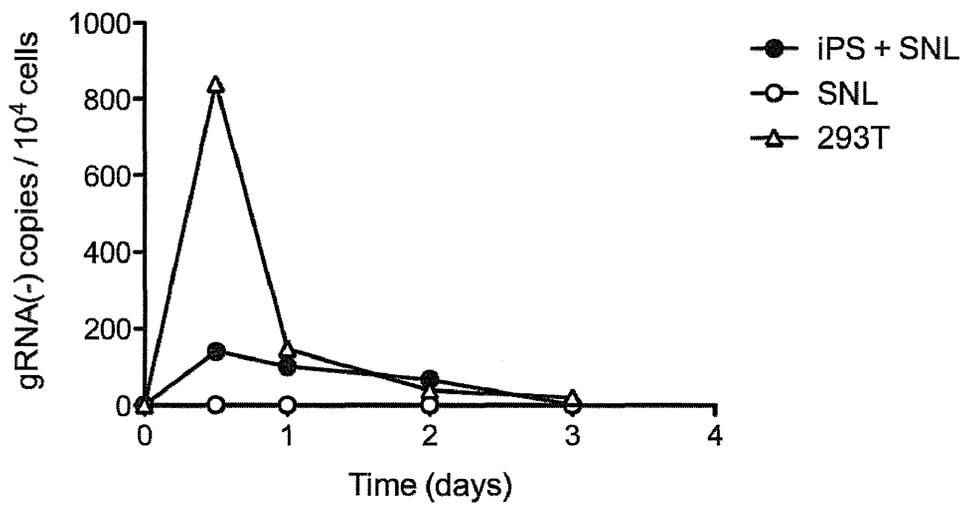
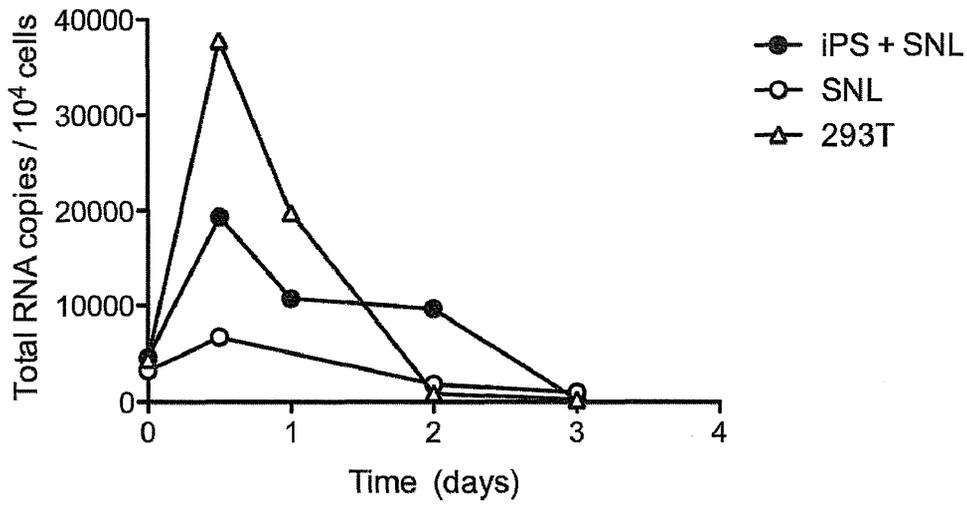


図5 iPS細胞にFCVを感染後の細胞内のtotal RNAコピー数の経時変化を調べた。SNL細胞においてはウイルスコピー数の増加は見られなかったが、iPS細胞では、有意な上昇が見られた

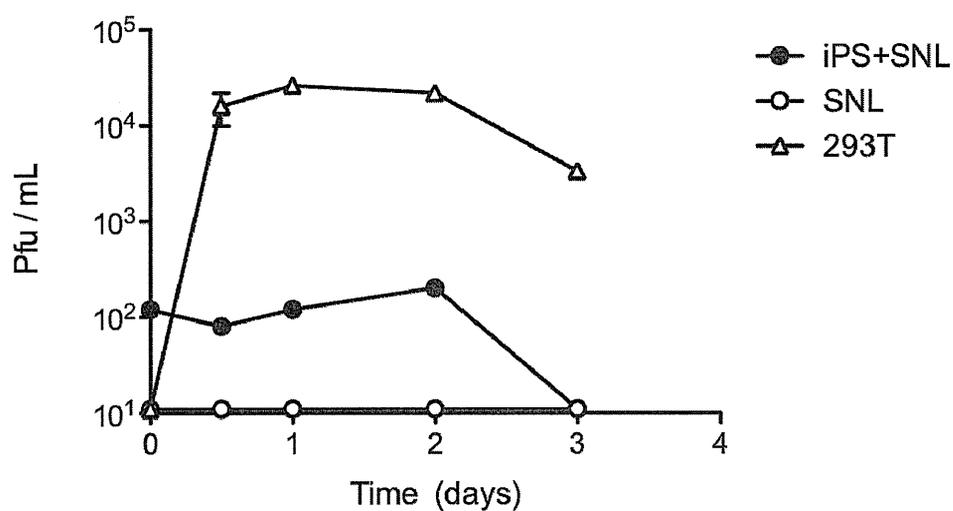
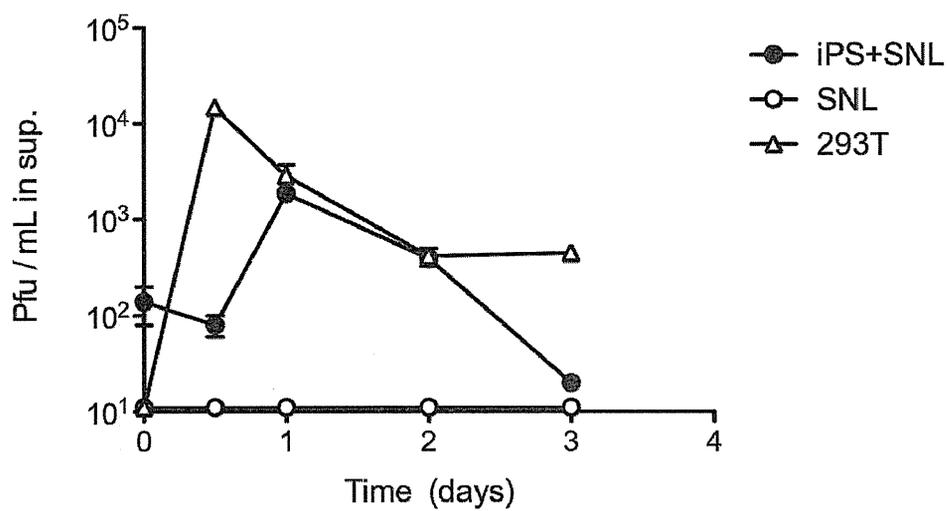


図6 FCV感染 iPS 細胞上清中のウイルスの経時変化をコロニー形成アッセイで調べた. SNL 細胞においてはウイルスコピー数の増加は見られなかったが, iPS 細胞では有意な上昇が見られた.

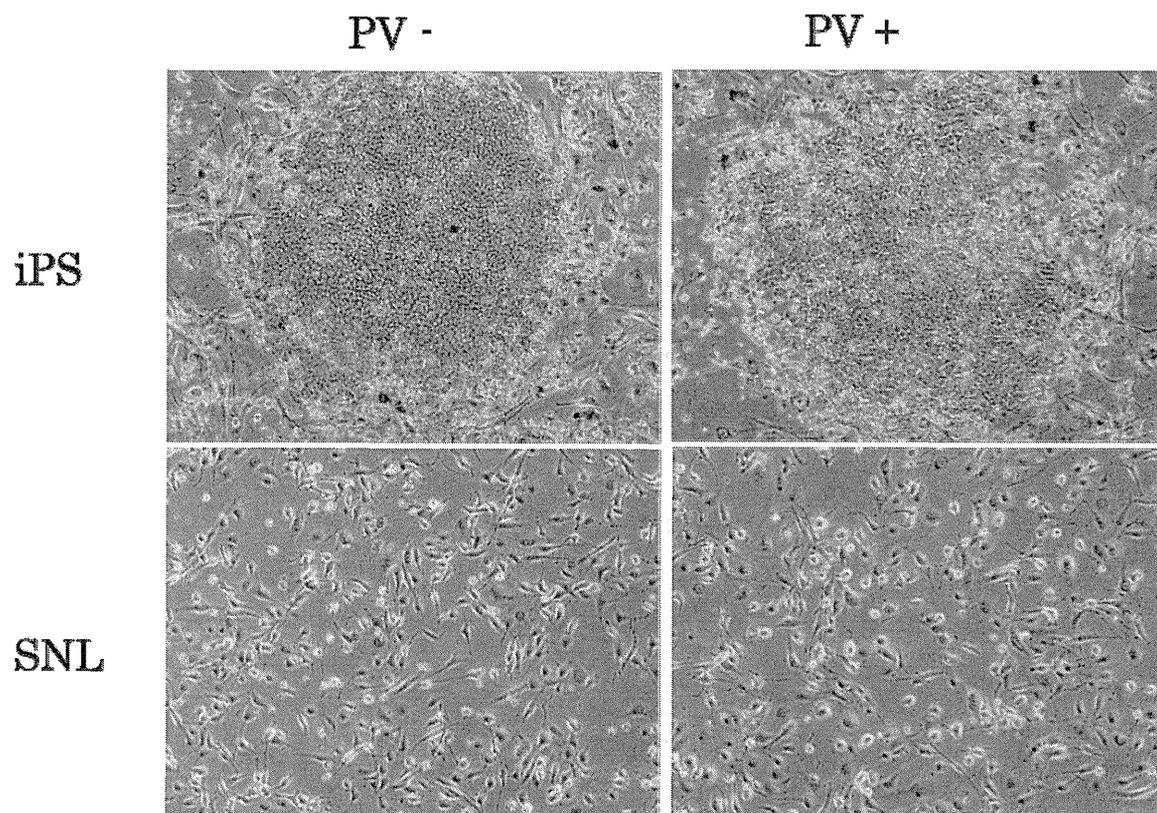


図7 ポリオウイルス感染後48時間後のiPS細胞. ポリオウイルス感染により細胞集団の縁から細胞が死滅し始めていることがわかる. SNL細胞はポリオウイルスに感染せず死滅しない.

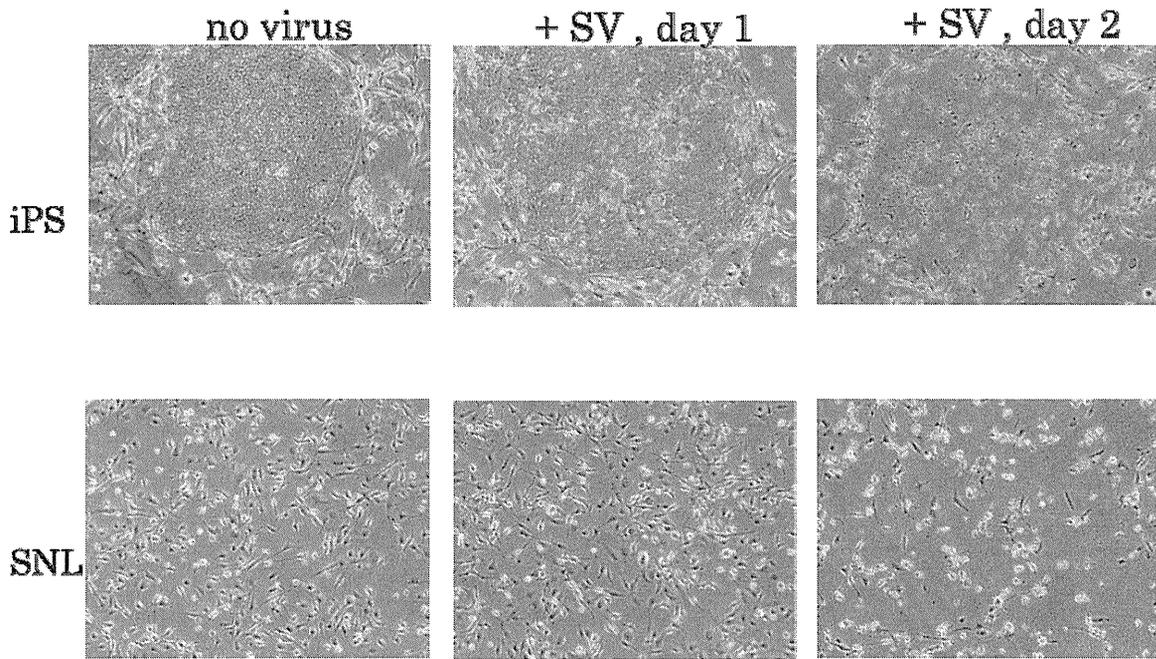


図8 シンドビスウイルス感染後 iPS 細胞. ウイルス感染により day 2 でほぼすべての iPS 細胞は細胞変性効果により死滅した. 同様に SNL 細胞もシンドビスウイルスにより死滅した.

— バイオ医薬品のウイルス安全性評価に関する研究 —

研究分担者：新見伸吾 (国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部)

研究要旨

バイオ医薬品においてウイルス迷入が判明した場合の安全性の評価手法の検討を行った。具体的には、経口弱毒生ヒトロタウイルスワクチンへの PCV (Porcine circovirus) の迷入事例における製造業者及び規制当局の対応等の調査を通して、有用な評価手法の 1 例を見出した。

GSK 社の経口弱毒生ヒトロタウイルスワクチン (Rotarix[®])、マスターセルバンク、ワーキングセルバンク及びウイルスシードに PCV-1 が検出された。本報告を受け FDA は Rotarix[®] の接種を停止したがその後再開された。この再開は、既に接種された乳幼児に健康被害の報告がなかったこと、及び PCV-1 のヒトへの感染の報告がなかったことより「ベネフィットがリスクを上回る」との判断があったと思われる。WHO は規制当局間のコミュニケーションを促進し、慎重に調整及び助言を行った。その結果、他の国においても適切な対処がなされた。Merck 社は弱毒生ヒトロタウイルスワクチン (RotaTeq[®]) の最終製品と bulk に PCV の DNA 断片を検出した。感染性試験を行なった結果、いずれも陰性であったため、感染性を有するウイルス粒子は存在しないと結論された。これら二つのワクチンのウイルス迷入の原因としてトリプシンが疑われた。WHO はこれらの事例を基に、潜在的な Adventitious Agent のリスクを評価するためのガイドラインドラフトを作成し、この中でリスクを系統的に評価するためのディシジョンツリーを示した。二つの事例を本ディシジョンツリーに当てはめてリスク評価を行なった結果、迷入した PCV のヒトへの感染リスクは非常に低いと評価され、上記 FDA 等の判断を支持する結果となった。バイオ医薬品にウイルス迷入が判明した場合の安全性評価において、今回の PCV の迷入に対する製造業者及び規制当局の対応は参考となり、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は有用と考えられた。

キーワード： 経口弱毒生ヒトロタウイルスワクチン、PCV、ウイルス、迷入、安全性評価、バイオ医薬品

研究協力者

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 6 名)
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

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。バイオ医薬品では、特に血清及びトリプシンなど生物由来の原材料を用いる場合が多いため特に懸念される問題である。また、一旦ウイルスが迷入すると、最初はその量

が検出できないほどの極微量であっても、細胞基材がウイルスに感受性があると、培養中に爆発的に増加する可能性がある。このように爆発的に増加したウイルスを何らかの方法で検出できればよいが、場合によっては、細胞増殖や pH, DO といった培養パラメーターに影響が出ないことがあり、その後の精製工程でも完全に除去しきれないことが起こってしまう可能性がある。その場合、最終的に投与者に接種されてしまうリスクがあるため適切な安全性評価が必要となる。さらに、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、予期せぬ迷入が判明する事例が増加することが予測される。

本稿では、バイオ医薬品においてウイルス迷入が判明した場合の安全性評価を行なう場合のモデル系として、ワクチンに PCV-1 (Porcine circovirus type1) あるいは PCV-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等について

て調査した。

B. 研究方法

文献、海外のコンフェレンスの資料、WHO のドラフトガイドライン、審査報告書等を基に調査を行なった。

C. 結果

1. Rotarix[®]/GSK の事例

1.1. 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、市販されている生ワクチンへのウイルス迷入を研究している時、GSK 社の経口弱毒生ヒト rota ウイルスワクチン (Rotarix[®]) より、PCV-1 の全長に相当する DNA を検出したことから、Rotarix[®]への PCV-1 迷入が発見された。本知見を雑誌に投稿した際、雑誌の査読者は編集者に対して、論文の公表前に GSK 社にウイルスの発見について知らせることを著者に勧めた。著者から GSK 社にこの事実が伝えられ、社内調査の結果、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。

なお、PCV-1 は、サーコウイルス科サーコウイルス属に属するノンエンベープウイルスで、直径は 17~22nm である。ゲノムは、環状一本鎖 DNA で長さは 1759b、ゲノムサイズは、哺乳類に感染するウイルスの中で最小である。約 50% のブタがこのウイルスに感染しているというデータがあるが、ブタに対して病原性は無いこと、ヒトへの感染例も報告されていないことにより、特別な予防処置が取られていないため多くのブタがこのウイルスを保有していると考えられる。

1.2. PCV-1 迷入経路の特定

Rotarix[®]は、Vero 細胞にウイルスシードを接種し製造される。GSK 社では、Vero 細胞を 1980年に ATCC から入手し、1983年に MCB を確立しているが、GSK の社内調査の結果、この MCB にすでに PCV-1 が迷入していることが判明した。当然、この MCB から作製された WCB、及び WCB を使って作製されたウイルスシードにも PCV-1 の迷入が認められている。

Vero 細胞を購入してから MCB を確立するまでに用いられた動物由来原料の内、ブタ由来のものは、MCB 確立の過程で細胞継代に用いられたトリプシンのみであり、トリプシンが汚染源である

と考えられている。

GSK 社は、同じ Vero 細胞を使ってポリオワクチン (IPV : Inactivated polio vaccine) も製造しており、IPV のウイルスハーベストでも PCV-1 の DNA が検出された。IPV は不活化ワクチンであり、精製と不活化工程を経て製品となるため、精製後のウイルス溶液においては、PCV-1 の DNA も感染性も検出されなかった。精製工程で PCV-1 DNA が除去されたものと推測される。

2. RotaTeq[®]/Merck の事例

2.1. PCV 迷入否定の考え方

Merck 社の弱毒生ヒト rota 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ったが、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 1 に示すディシ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。

まず、最初のステップとして、サンプルを絞り込むためスループットの高い qPCR (定量的 PCR) で PCV の短い DNA 断片 (<100bp) が存在するかどうかを調べる。この段階で、全てのサンプル中に DNA 断片が検出されなければ調査は終了となるが、検出された場合は、迷入の経路 (由来) を調査するとともに、第 2 段階として endpoint PCR 法により PCV の全長に近い DNA (~800bp) が存在するかどうかを調べる。この段階で陽性となった場合、PK-15 (Porcine kidney cell) を使った *in vitro* 感染性試験及び臨床データとの関連性調査を実施する。

2.2. PCV 迷入の調査

Merck 社は RotaTeq[®]最終製品、rotavirus bulk、clinical bulk について、PCV の迷入の有無を調査した。その結果、pilot bulk において 31 ロット全てで、qPCR により PCV の DNA 断片が検出された。その内、11 ロットは、endpoint PCR でも検出限界をわずかに超える陽性となったため、

PK-15 を用いた感染性試験が実施された。感染性試験結果は、いずれも陰性であったため、感染性を有するウイルス粒子は存在しないと結論された。

2.3. PCV 迷入経路の調査

RotaTeq[®]は Rotarix[®]同様、Vero 細胞にウイルスシードを接種し製造されるが、この中で動物由来原料が用いられているのは、トリプシンだけである。そこで、Vero MCB/WCB、Rotavirus master seeds/ stock seeds、及びトリプシンの 5 サンプルについて、PCR により PCV の迷入の有無を検査した。その結果、トリプシンからのみ、PCV-2 の短い DNA 断片が検出されたしかし、感染性のある完全長の DNA は検出されなかった。

ここで、トリプシンから PCV の短い DNA 断片が検出されているにもかかわらず、全長の DNA が検出されなかったのは、使われているトリプシンはガンマ線滅菌されているため切断されたからと考えられる。実際に Merck 社では、粉末状態 (25-40 kGy) と溶液状態 (30-45 kGy) の 2 回ガンマ線照射を実施していると報告している。

2.4. 臨床への影響調査

前述の PCV 由来 DNA が検出された rotavirus bulk 21 ロットは、臨床試験で使用されたものであったので、ワクチン被接種者の血清を使って PCV に対する抗体の有無を調べた。その結果、被接種者の血清中には、抗 PCV 抗体は全く検出されなかったことから、PCV はヒトに感染性がなかったと結論づけられた。

3. PCV 迷入に対する規制当局の対応

FDA では、GSK 社からの Rotarix[®]への PCV-1 迷入の報告を受け、一旦米国内での Rotarix[®]の接種を停止され、RotaTeq[®]の継続使用が推奨された。FDA は、その 1 月半後、専門家らを招集し、Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting を開催した。本委員会は、5 月 14 日には、リスクは低く、新しいウイルス混入の無いセルバンクやウイルスシードが作られるまでワクチンを継続して使用するよう FDA に助言し、FDA は接種再開を決定した。接種再開の判断には、このワクチンがすでに約 3000 万人の乳幼児に接種されていたが健康被害の報告がないこと、また後述のように市販されているブタ肉にも PCV-1 が存在しているにもかかわらず、これまでにヒトへの感染の報告がないことから、接種することによるベネフィットがウイルス迷入によるリスクを上回るとの判断があっ

たと思われる。

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同様な助言が行なわれた。その内容は公表された。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。」

他の国において当初対応に混乱が見られたが、WHO が規制当局間のコミュニケーションを促進し、慎重に調整および助言を行なった。その結果、意思決定プロセスの透明化が促進され、どちらのワクチンが販売されているかにより、米国及び欧州を参考に適切な対処がなされた。また、多くの国では今回の事件に関する情報をウェブサイトで公開した。どの国でもワクチン製品が少なくても 1 種類存在したため、規制当局の対応により、供給がストップすることはなかった。

4. 企業に課せられた課題

GSK 社及び Merck 社はウイルス汚染の無い原材料の開発が必要となった。本事件をきっかけに、バイオ医薬品及びワクチンにおいて、出発物質、培地、トリプシンの原料が変更され、新しいセルバンクを作るための培地には合成アミノ酸が使われるようになった。また、使用されるトリプシンについては、ガンマ線照射が必須となった。

D. 考察

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