

- glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. XIV Kumamoto AIDS seminar; 2013; Kumamoto, Japan.
- 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のcoreceptorのoligomer形成がHIV-1の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; 神戸.
 - 4) 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; 神戸.
 - 5) 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.

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

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)
分担研究報告書

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
分担研究者：清水 則夫 東京医科歯科大学 准教授

研究要旨

細胞組織医薬品の安全性を担保するためにはウイルス感染リスクを正しく評価することが必要である。健康人を含めすべての成人には複数のウイルスが持続感染していることが知られており、細胞組織医薬品の原材料へウイルスが混入するリスクは不可避である。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、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 (HHV6)、パルボウイルス B19 (B19) が生体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およ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 (HHV6 の mRNA 検出系の作成を継続中)。今後様々な幹細胞へのスパイク試験を実施する予定である。

A. : 研究目的

「日本再興戦略 -JAPAN is BACK-」の中の「第三の矢：新たな成長戦略」の柱の一つに再生医療の産業化の促進が据えられたこともあり、体性幹細胞や iPS 細胞を用いた再生医療の研究が加速し、多くのヒト細胞組織医薬品が実用化されるものと期待されている。健康人を含めすべての成人には多くのウイルスが持続感染しているため、細胞組織医薬品の原料となる生体材料へウイルスが混入の危険性高く、再生医療実現化にあたっては不可避の問題である。しかも、生きた細胞を使用する再生医療用細胞製剤からウイルスを完全に除去あるいは不活化することは不可能であるため、細胞組織医薬品に混入する可能性があるウイルスをリストア

ップして存在量や培養系でのウイルス動態に関するデータを取得し、あらかじめ治療にともなうウイルス感染リスクを適切に評価しておくことが必要である。そのようなデータの蓄積なしに治療によるメリットとデメリットのバランスを正しく評価することはできないため、今後の再生医療を実用化するためには非常に重要な取り組みである。当研究室では、網羅的ウイルス検査系を確立し多くのウイルスを同時・高感度・安価に検出可能なリアルタイム PCR 法を開発し、東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターで製造する細胞製剤の安全性検査法として利用するとともに、院内の研究的ウイルス検査法として公開している。昨

年度の本研究では、これまでに上記研究的ウイルス検査で得られたデータを分析し、様々なヒト由来生体材料に混入する可能性があるウイルス種をリストアップする作業を行なった。その結果、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 (HHV6) が高頻度に、頻度は低いながら HSV1 (単純ヘルペスウイルス I 型) , HHV7 (ヒトヘルペスウイルス 7 型) , 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) , JC ウイルス (JCV) , BK ウイルス (BKV) , アデノウイルス (AdV) , パルボウイルス B19 型 (B19) が検出されるとの結果を得た。また、再生医療の原材料として使用される骨髄細胞には B19 が混入する可能性が高いことも示されている。これらの結果に鑑み、EBV, CMV, HHV6, B19 のウイルススパイク試験法の開発を目的に研究を行なった。現在までに EBV, CMV, HHV6 のウイルス液の作製 (B19 は高感染価のウイルス液を調製できないため患者血清を使用) と各ウイルスのウイルスゲノムおよび HHV6 を除く 3 種類のウイルスの mRNA の定量系の作成を完了した (HHV6 は現在作成中)。

B : 研究方法

1. ウイルスストックの作成

1) EBV: EBV の産生には B95-8 細胞株を用いた。10%FBS を含む RPMI1640 培地中で 4 日間コンフルエント状態で培養した B95-8 細胞の培養上清を回収し、EBV ウイルス液とした。EBV の感染価 PBMC を用いた LCL アッセイで測定した。ウイルスゲノムの DNA 量はリアルタイム PCR (LightCycler:ロシュ) により以下のプライマー・プローブを使用して定量した。

F-cgcataatggcggacctag

R-caaacaagcccactcccc

LCRed640-aacctagaccgcttcctg-p

aaagatagcagcagcagc-FITC

2) 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。2%FCS を含む Eagle MEM で培養した HFL-1 へウイルス接種し、15 日目に培養上清を回収し CMV ウイルス液とした。ウイルス感染価は HFL-1 を用いて測定し、ウイルスゲノムの DNA 量はリアルタイム PCR により以下のプライマー・プローブを使用して定量した。

F-taccctatcgctgtgttc

R-ataggaggcggccagctattc

LCRed705-acaccacttatctgctgggcagc-p

cgtttcgctgtagctacgcttacat-FITC

3) HHV6: ウイルス株として U1102 と HST 株を使用し、ウイルス増幅およびウイルス感染価の測定には、JJhan と MT4 細胞株を使用した。

ウイルスゲノムの DNA 量はリアルタイム PCR により以下のプライマー・プローブを使用した定量系を作成した。

F-accggagagatgattttgcg

R-gcagaagacagcagcagat

LCRed640-gggtcatttatgttatagcggp-p

taagtaaccgttttcgtccca-FITC

4) 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。ウイルス感染価は KU812Ep6 細胞を用いた Reed-Muench 法で測定した。ウイルスゲノムの DNA 量はリアルタイム PCR により以下のプライマー・プローブを使用して定量した。

F-ccgccaagtacaggaaaaac

R-cagctacacttccacgca

LCRed640-caccaggttagatcaaaaaatgcgtgga-p
gcaaaagccatttttagcgggca-FITC

2. ウイルスゲノム定量系の作成

ウイルス遺伝子の検出： LightCycler 480
(ロシュ)を使用した。

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
ハイブリプローブを使用)の配列は下記の通り。

3. ウイルスmRNA検出系の作成

1) mRNA 検出の標的遺伝子

a. EBV: EBNA1、BZLV1

b. CMV: Multi-Immediate Early1,2
ICP36

c. HHV6: Immediate early protein gene
U66 Late protein gene

d. B19: Multi-spliced mRNA
(VP-1, -2 を含む 8 種類を検出)

2) RNA 抽出 ウイルス感染細胞からの
total RNA 抽出は RNeasy mini kit (QIAGEN)
を用いて行い、さらに DNase I (TaKaRa) 処
理を行った。

3) mRNA の定量 RT 反応 50°C 30 分
PCR 反応 94°C15 秒、54°C30 秒、72°C30 秒
40cycle で RT-PCR 反応を行った。プライマー、
プローブ配列は結果の項に記載した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要な研究は行なっていない。

C: 結果

1. ウイルス液の作成と感染価・ゲノム DNA 量の測定

EBV: B95-8 細胞の培養上清をウイルス液

とした。感染価およ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/ml
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: HFL-1 を用いたプラークアッセイで
測定した結果感染価は 1.15×10^6 pfu/ml だ
った。ゲノム DNA の定量結果は、 $2.88 \times$
 10^7 copies/ml だった。

HHV6: ウイルス株 (U1102、HST) を JJhan
と MT4 細胞株に感染し、培養上清をウイルス
液として -80°C にストックした。感染価とウ
イルスゲノム DNA 量は現在測定中である。

B19: 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、 $5.3 \times$
 10^{11} copies/ml だった。

2. ウイルス mRNA 検出系の作成

EBV: 検出する mRNA の遺伝子 locus として
Latent phase から Lytic phase にかけて発現
している LMP-1、Lytic phase に発現する
BZLF-1 を選び、これらをもとに 1st step と
して RT-PCR 次に 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。

LMP-1

①RT-PCR プライマー配列

LMP-1/F 5' -gatggaacacgaccttga-3'

LMP-1/R 5' -agatccagagacctaagacaag-3'

RT-PCR 条件

RT 50°C30 分

Denature94°C2 分 1 cycle

PCR 94°C15 秒、54°C30 秒、72°C30 秒 40cycle

②nested PCR プライマー配列

2nd/F 5' - ctctccttctctctctcttg-3'

2nd/R 5' - caggagggtgatcatcagta-3'

nested PCR 条件

95°C10分 1 cycle

95°C15秒、56°C30秒、72°C15秒 20cycle

BZLF-1

①RT-PCR プライマー配列

BZLF-1/F

5' -attgcaccttgccgccacctttg-3'

BZLF-1/R

5' -cggcattttctggaagccaccga-3'

RT-PCR 条件

RT 50°C30分

Denature94°C2分 1 cycle

PCR 94°C15秒、61°C30秒、72°C30秒

40cycle

②nested PCR プライマー配列

2nd/F 5' -gaccaagctaccagagtctat-3'

2nd/R 5' -cagaatcgatttctccagcga-3'

nested PCR 条件

95°C10分 1 cycle

95°C15秒、55°C30秒、72°C30秒 20cycle

以上の検査系に関し、感染細胞中に発現する標的mRNAを検出可能であることを確認した。

CMV: 遺伝子 locus として Latent phase から Lytic phase 初期にかけて発現している Immediate early 1 (IE-1) gene、Lytic phase 後期に発現する UL89 gene を選び、RT-PCR および nested PCR プライマーを設計した。

IE-1

①RT-PCR プライマー配列

IE-1/F 5' -gatggagtcctctgccaaga-3'

IE-1/R 5' -aaggcggcagtggaatttct -3'

RT-PCR 条件

RT 50°C30分

Denature94°C2分 1 cycle

PCR 94°C15秒、59°C30秒、72°C20秒 40cycle

②nested PCR プライマー配列

2nd/F

5' -ccaaggccacgacgttctctgcagacta-3'

2nd/R 5' -tgctccttgattctatgccgcacca-3'

nested PCR 条件

95°C10分 1 cycle

95°C15秒、58°C30秒、72°C10秒 20cycle

UL89

①RT-PCR プライマー配列

UL89/F 5' -tgatgaaggtgggcttgtg-3'

UL89/R 5' -cgtgtcgcagtttgtgct-3'

RT-PCR 条件

RT 50°C30分 Denature94°C2分 1 cycle

PCR 94°C15秒、59°C30秒、72°C30秒 40cycle

②nested PCR プライマー配列

2nd/F 5' -tggtggacgatatgaagatg-3'

2nd/R 5' -gtggtcgagaacaaaggaca-3'

nested PCR 条件

95°C10分 1 cycle

95°C15秒、55°C30秒、72°C30秒 20cycle

以上の検査系に関し、感染細胞中に発現する標的mRNAを検出可能であることを確認した。

HHV6: 現在、Immediate early protein gene と U66 Late protein gene を標的とした mRNA の検出系を構築中である。

B19: 遺伝子 locus として Spliced virus capsid2 protein (VP-2) gene を選び、これらをもとに RT-PCR および nested PCR プライマーを設計した。

VP-2

①RT-PCR プライマー配列

VP-2/F 5' -tttctctggacttttcttgetgt-3'

VP-2/R

5' -aactgaagtcgatgcttggtatt-3'

nested PCR プライマー配列

RT-PCR 条件

RT 50°C30分

Denature94°C2分 1 cycle

PCR 94°C15秒、53°C30秒、72°C30秒

40cycle

②nested PCR プライマー配列

2nd/F 5' - agtttctccgaagttgtagc-3'

2nd/R 5' -tctgaggcgttgtaagcg-3'

nested PCR 条件

95°C10分 1 cycle

95°C15秒、55°C30秒、72°C30秒 20cycle

以上の検査系に関し、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。

内部標準として全ての細胞についてβ-actin mRNAの検出を行った。使用したプライマーはβ-actin /F: 5' -cttccttc-ctgggcat-3'、β-actin /R: 5' - tcttca-ttgtgctgggt -3' で、RT-PCR 条件は RT で 50°C30分、Denature で 94°C2分、PCR で 94°C15秒、59°C30秒、72°C30秒を 40cycleで行った。RT-PCR 試薬は SuperScriptIIIOneStep (Invitrogen) を使用した。電気泳動により内部標準検出系として使用可能なことを確認した。

D: 考察

1. 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, HV6,

B19の4種類を選定した。4種類中、EBV, CMV, HHV6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。また、B19も血液や髄液に混入することが多いことが知られている。骨髄由来間葉系幹細胞を用いた再生医療が多数計画されていることもあり、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ことは重要である。

2. これまでに本学で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。

3. EBVレセプターであるCD21は成熟B細胞、末梢血T細胞や胸腺T細胞、脳の神経細胞に発現していることが知られている。また、CMVレセプターのひとつとされているEGFRは多くの上皮組織で発現しており、特に重層又

は偽重層上皮の基底膜及び、扁平上皮で多く発現している。CMV の co-receptor として $\alpha v \beta 3$ integrin が報告されており、CMV の細胞指向性と EGFR 及び $\alpha v \beta 3$ integrin 発現との関係が示唆されている。したがって、これらのウイルスは従来知られていた細胞種以外の細胞に感染する可能性も考えられ、幹細胞やそこから分化させた細胞のウイルス感受性の有無に関するデータを蓄積することは再生医療の実用化にとって重要な情報を提供するだろう。

E: 結論

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 が生体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およ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 (HHV6 の mRNA 検出系の作成を継続中)。今後 HHV6 の検査系を完了し、様々な幹細胞に対するスパイク試験を実施する予定である。

F: 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

論文発表

- 1) 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)

- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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):201-11 (2013)

著書

1. 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」p72-74 羊土
社, 2013

2. 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
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」
p192-202 羊土社, 2013

国内学会発表

1. 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 11月神戸
2. 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 9月
(東京)

国際学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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に関する研究

研究分担者 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

研究要旨 細胞組織加工医薬品及びバイオ医薬品等の原料への異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の混入/迷入リスクを低減するために、PrP^{Sc} の検出法の開発や、PrP^{Sc} の潜在を前提としたクリアランス工程の設定やその評価、さらには PrP^{Sc} リスクの高い原材料の排除といった様々な対策がとられている。特にウシ等の反芻動物を原材料として使用する際に、リスク評価の基礎データとして異常プリオン検出のための方法の開発が進められている。マウス脳内への接種に代わる代替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) とインビトロ細胞培養系での感染性検出法について、その有用性を解析した。1) PMCA 法は人工的にプリオンタンパク質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。2) *in vitro* 細胞培養系での感染性の評価は、PMCA に比べより *in vivo* でのプリオンタンパク質が変異していく過程を再現している可能性がある。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であろう。また PMCA 法と *in vitro* 細胞培養法との相関性についての検討が有用である可能性が高い。また *in vitro* 培養法では増幅した異常プリオンの検出法についての最適化が必要と思われる。

A. 研究目的

我が国では、伝達性ウシ海綿状脳症 (BSE) を主とする伝達性海綿状脳症 (TSE) のリスク評価に関して、ウシ等由来原材料の原産国の地理的なリスク及び原材料部位のリスクを基本に、予防的な BSE 対策を進めている。英国等での BSE の発症は沈静化してきているが、一方で非定型 BSE 発生が EU、カナダ、米国、日本等で相次いで報告されている。このような非定型 BSE の発生が、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の増加につながることを懸念され

ている。非定型 BSE の発生は、これまで非発生国として一定の安全性が担保されているとされたオーストラリ等でも vCJD の発生が起こる可能性が指摘されている。従って、BSE 発生が沈静化してきているとはいえ、血清等を用いる医薬品製造において vCJD の原因物質となりうる異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の混入/迷入を否定するための試験の実施は、医薬品の安全性を確保するために不可欠となっている。

一方で、世界中の獣畜・家禽等の疾病の透明性の保証や世界の獣畜・家禽等の疾病

の制御に関する国際的協力の促進、動物と動物由来の生産品の国際取引に関しての衛生基準の作成を行っている国際獣疫事務局(OIE)が、昨年度5月の会議で、日本を始め、米国、イスラエル、イタリア、オランダ及びスロベニアをBSEリスクの無視できる国に認定した。これにより、新たに清浄国に指定された国で新たにウシ成分等を用いた医薬品製造を行う場合に、特にウシ血清などに使用が可能となってくる。

海外でもヨーロッパ医薬品長庁が2011年に血液製剤におけるvCJDのリスク評価に関するポジションペーパーを出しており、vCJDのリスク評価において最も重要な点はドナーの特定期間における英国滞在歴であり、ついで滞在歴のあるドナーの排除とPrP^{Sc}のクリアランス能のある製造工程の重要性が指摘されている。

一方2013年にはFDAが赤血球輸血のvCJD伝播リスクについて、英国でのvCJDの潜在リスクとをも盛り込んだFDAモデルを作成し、このモデルに基づいて米国での輸血関連vCJDの伝播リスクを推計している。英国での潜在vCJDリスクを推計する2つのモデルを適用しており、低リスクの場合と高リスクを前提とする場合に非常に大きな開きがあるとしているが、潜在リスクが低いとするモデルのほうが米国で捉えられているvCJD発症者数とよく一致することされている。また、英国での潜在リスクを低いとしたモデルから導かれた米国での輸血関連vCJD発症リスクはきわめて低いと結論されている。

以上のようにBSEをめぐるリスクの推定やウシ由来原材料の使用に関する規制要件

は刻一刻と変化しつつある。おそらく今後数年間にわたって、どのようなリスク評価を行い、一定のリスクがある原材料の使用に際してとるべきリスク低減策に関しても最新の情報を把握して科学的に合理的な方策をとることが重要となる。

本年度は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PrP^{Sc}のリスク評価の現状を明らかにした。

B. 研究方法

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。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〉

本研究では、ヒトないしは動物を対象とした実験ではなく、主として国内外のガイドラインや公表文献等を対象として調査研究を行ったことより倫理的問題は生じていない。

C. 結果

異常プリオンの検出法としては、感染性を最も反映した方法として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ことから、その代替法として異常プリオンを免疫学的手法で検出する方法やプロテアー

ゼ K 耐性プリオンタンパク質の検出法（ウエスタンブロット法）などが用いられてきている。このような免疫学的手法は必ずしも異常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、異常プリオン(PrP^{Sc})が正常プリオンをミスフォールディングさせる能力をもつことを利用した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 Castilla らにより開発された方法⁽¹⁾であり、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⁽²⁾も提案され、異常プリオンの感染性の推定に用いられている。

1) BSE 経口感染牛の臓器や排泄物の BSE リスク

PMCA 法を用いて異常プリオンを経口接種させたウシの各臓器における異常プリオンの検出が報告されている⁽³⁾。この報告では、従来法の PMCA 法プロトコルを用いて BSE を経口接種させた 4 頭のウシの各臓器を採取し、どの臓器や排出物に異常プリオンが含まれるかを推定している。インビトロ増幅での基質として用いられているのはウシプリオンを遺伝子導入した (Tg) マウス由来のプリオンタンパク質を含む脳由来の均質な液を用いている。

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、パイアー斑に異常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ーパ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⁽⁴⁾。

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プリオンの伝達性があるとの疫学的証拠は知られていない。本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。

2) プリオン高発現細胞を用いた異常プリオン検出系

in vitro 培養細胞を用いて異常プリオンを検出する系の開発は古くから実施されている。神経細胞や非神経細胞など多様な細胞に異常プリオンが感染することが示されている。ただ、殆どのケースで持続感染するのみで細胞傷害性が認められることはまれである。一度細胞に感染すると、細胞の分裂に伴ってプリオン株が持続して増幅する

ことが示されている。また、株化細胞のみならず初代細胞への感染系も開発されており、初代培養細胞を用いた場合、いくつかの感染系では細胞傷害性の効果が見られている。

表 1 にこれまで知られているプリオン細胞培養モデルを示している⁽⁵⁾。しかし、様々なプリオン株に対する感染系が試みられてきたが、感染がうまく成立しないことも多い。その原因としては内在性のプリオンが異常プリオンの感染を阻害するといわれている。これまでヒト由来の異常プリオンの感染が成立したのは一株だけと報告されている。ヒト由来異常プリオンで感染が認められる多くの場合には、ヒト由来異常プリオンをマウスに馴化した場合であるとされている。

一方 *in vitro* 細胞内で持続感染している異常プリオンは、細胞の継代に従って元の性質を失っていると報告されている。

異常プリオンに感受性のある *in vitro* 細胞株は、特定の種由来のプリオンに感受性を持ち他の種の異常プリオンの感染に抵抗性を示すことが報告されている。さらに多くの細胞培養系は特定の PcP^{Sc} に対して感受性を有し、細胞ごとに特定の PcP^{Sc} ストレインに感受性を示し、種差とは異なるプリオン感染性の細胞生物学的特徴があると考えられている。

一方で、細胞工学的に他の種のプリオンを発現させることにより幅広いプリオン感受性を付与することが出来ることが知られている。

PcP^{Sc} の細胞培養を利用した感染系での、最も重要な点は、*in vitro* で増幅した PcP^{Sc}

の検出手法とされる。すなわち、異常プリオンのみを特異的に検出できるような抗体が無いために生成した PcP^{Sc} 検出のために工夫が必要な点である。ウイルスの感染系のように細胞傷害性 (CPE) を示すような感染系を確立することが出来れば、非常に簡便な手法となるが、幅広い異常プリオンに対して感受性があり、細胞傷害性が認められる細胞がない。多くの場合には異常プリオンの物理的抵抗性を利用して、例えばプロテアーゼ K 耐性のプリオンをウエスタンブロッティングや他の免疫学的検出法を用いて検出することが行われている。この場合にも生成した異常プリオンと投与した検体中に含まれる異常プリオンを分別する手段が必要となる。時間経過を追って異常プリオンが量的に変動することを示すことが必要となる。

以上のような細胞培養系を用いた異常プリオン検出系にはいくつか解決しなければならない課題もあるが、*in vivo* でのプリオン生成過程が *in vitro* で再現される可能性が高いという大きなメリットが存在する。

3) 異常プリオン検出系の評価とマウス感染系の相関性

PMCS 法や細胞培養系で生成された異常プリオンとされる検体では、さらに感染性をマウス脳内接種モデルで確認することが望ましい。特に PMCS 系では従来異常プリオンの感染性がないとされた検体で陽性反応が認められており、従来の検出系との差異の要因を明らかにする必要がある。

D. 考 察

本年度は、異常プリオンの検出系として開発が進むタンパク質ミスフォールディング循環増幅法（PMCA）と *in vitro* 細胞培養系について最近の動向とその有用性について調査を行うと共に、手法としての限界やリスク評価を行うにあたっての考慮について検討した。

異常プリオンの感染性についての判断はマウス脳内へ検体を接種し、海綿状脳症の発症を確認することが最も正確な検査法とされてきた。しかし、この検査法では非常に長期にわたる *in vivo* でのインキュベーションが必要であり、迅速な試験法の開発が望まれていた。

このような背景から、PMCA 細胞培養系での感染性評価法は迅速に判定が可能とされ、これらの検体を用いた検討が実施されてきた。特に、PMCA 法は簡便性もあり、様々な検体について評価が行われてきている。

今回取り上げた、BSE 陽性検体を経口投与したウシでの異常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、異常プリオンの安全性を考える上で重要と考えられた。これまでマウスインビゴ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。

以上のような観点から細胞培養系を用いた異常プリオンの感染性検出系の評価が待たれる。特に細胞培養系での異常プリオンの増幅は生体でのプリオン増幅をミミックしている可能性が高く、その生物学的な類似性が期待される所以である。これまで細胞培養系を用いた異常プリオンの検出系は PMCA のように経口接種させたウシ検体を対象とした感染性の評価に関する総合的な評価はなされていない。

細胞培養系での感染性の検出が有用であることを示すには、マウス脳内接種法と同様の結果が得られるかを確認する必要があると考えられる。

さらに細胞培養系で増幅した異常プリオ

ンが十分な感染性を持つのか *in vivo* 系で検証する必要もある。

昨年、OIE の評価により米国や日本などいくつかの国が BSE 清浄国の指定を受け、オーストラリアやニュージーランド同様にこれらの国由来の血清やウシ原材料が使用可能になっていくことが期待される。このような状況の変化に対して、プリオンリスクを正確に評価可能な試験法の最適化ができれば、より合理的な安全対策が可能となっていくと期待される。

E. 結論

PMCA 法は人工的にプリオンタンパク質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。2) *in vitro* 細胞培養系での感染性の評価は、PMCA に比較しよりインビボでのプリオンタンパク質が変異していく過程を再現している可能性がある。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であろう。また PMCA 法と *in vitro* 細胞培養法との相関性についての検討が有用である可能性が高い。また *in vitro* 培養法では増幅した異常プリオンの検出法についての最適化が必要と思われる。

<参考文献>

- (1) Castilla, J, Saá, P, Hetz, C, Soto, C.: In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*. 121:195-206. (2005)
- (2) Eiden, M. Hoffmann, C.

- Balkema-Buschmann, A. Müller, M. Baumgartner, K. Groschup, M.H.: Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a German captive cheetah. *J Gen Virol*, 91, 2874-2883 (2010)
- (3) Franz, F. Eiden, M. Balkema-Buschmann, A. Greenlee, J. Schatzl, H. Fast, C. Richt, J. Hildebrandt, J.P. Groschup, M.H.: Detection of PrPSc in peripheral tissues of clinically affected cattle after oral challenge with bovine spongiform encephalopathy. *J. Gene. Virol*. 93, 2740-2748 (2012)
 - (4) Okada, H. Maruyama, Y. Shimozaki, N. Yoshioka, M. Masujin, M. Imamura, M. Iwamaru, Y. Matsuura, Y. Miyazawa, K. Fukuda, S. Yokoyama, T. Mohri, S.: Prion in Saliva of Bovine Spongiform Encephalopathy-infected Cattle. *Emerg. Infect. Diseases*. 18, 2091-2093 (2012)
 - (5) Grassmann, A. Wolf, H. Hofmann, J. Graham, J. Vorberg, I. Cellular Aspects of Prion Replication in vitro. *Viruses* 5, 374-405 (2013)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

- 1) K. Sakai-Kato, K. Nanjo, T. Yamaguchi, H. Okuda, and T. Kawanishi, High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods* 5,

- 5899-5902 (2013)
- 2) Itoh,S. Hiruta,Y., ashii,N., Fujita,N., Natsuga,T., Hattori,T., Bandoc,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., Kawasaki,N.: Determination of Galactosamine Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography. *Biologicals*, in press
- 3) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- 4) 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
- G-2 学会発表**
- 1) Kishioka,Y, Sakurai,K, Yamaguchi,T.: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. *APEC International Symposium Soul Korea*, (2013)
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- H-1 特許取得** なし
- H-2 実用新案登録** なし
- H-3 その他** なし

表 1. 伝達海綿状脳症 (TSE)因子に感受性のあるモデル細胞株

細胞名	細胞を分離した組織	細胞種	プリオン株
1. 神経/脳由来細胞株			
N2a	neuroblastoma cell line*	mouse	Chandler, RML, 139A, 22L, C506, Fukuoka-1, FU CJD
GT1	hypothalamic cell line	mouse	Chandler, RML, 139A, 22L, kCJD, FU CJD, M1000
SN56	cholinergic septal cell line	mouse	Chandler, ME7, 22L
HpL3-4	hippocampal PrP-deficient cell line, upon ectopic expression of moPrP*	mouse	22L
CF10	brain derived PrP-deficient cell line, upon ectopic expression of moPrP	mouse	22L
SMB	prion-infected brain cell	mouse	Chandler, 139A, 22F, 79A
CAD	catecholaminergic cell line	mouse	RML, 22L, 22F, 79A, 139A, ME7
MG20	microglial cell line overexpressing PrPC	tg20 mouse	Chandler, ME7, Obihiro, mouse-adapted BSE
PC12	pheochromocytoma cell line	rat	139A, ME7
HaB	brain-derived cell line	hamster	Sc237
SH-SY5Y	neuroblastoma cell line	human	sCJD brain material
MDB	primary brain cells, SV40 transformed	mule deer	CWD
2. 神経/脳由来初代分離細胞			
CGN	cerebellar granule neurons overexpressing ovine PrPC	tgov mouse	mo 127S
CAS	cerebellar astrocytes overexpressing ovine PrPC	tgov mouse	mo 127S
NSC	neural stem cells	mouse	22L, RML
3. 非神経細胞株			
C2C12	skeletal myoblast cell line	mouse	22L
L fibroblasts	fibroblast cell line	mouse	ME7, Chandler
L929	fibroblast cell line	mouse	22L, RML, ME7
NIH/3T3	fibroblast cell line	mouse	22L
MSC-80	Schwann cell line	mouse	Chandler
MovS	Schwann cell-like from dorsal root	tgov	PG127, SSBP/1, scrapie field

	ganglia	mouse	isolates
moRK13	epithelial cell line expressing mouse PrPC	rabbit	Fukuoka-1, 22L, Chandler, M1000, mo sCJD
voRK13	epithelial cell line expressing vole PrPC	rabbit	vo BSE
ovRK13/ RoV9	epithelial cell line expressing ovine PrPC	rabbit	PG127, LA404, SSBP/1, scrapie field isolates
elkRK13	epithelial cell line expressing elk PrPC	rabbit	CWD
4. 非神経由来初代細胞			
BM-derived MSC	bone marrow derived mesenchymal stem cell	mouse	Fukuoka-1
BM-derived MSC-like	bone marrow derived mesenchymal stem cell like	mouse	Fukuoka-1

エンドトキシン試験法の研究

－再生医療製品等のエンドトキシン試験の適用に関する研究－

研究分担者 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

研究要旨 本年度は、再生医療等製品の安全性に関して、エンドトキシン試験の要件について検討を行い、以下のような結論がえられた。

- 1) 局方エンドトキシン試験で求められる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ない。
- 2) 場合によっては、エンドトキシン内部標準線法を用いることも可能と考えられる。
- 3) 1)及び 2)の前提としてあらかじめエンドトキシン標準品との相関性が確認されていることが必要。
- 4) 特殊な再生医療等製品のエンドトキシン試験においては、個別製品の特性を考慮しケースバイケースで試験要件を考えることが必要である。

A. はじめに

iPS 細胞の確立や幹細胞研究の進展、細胞培養や細胞加工技術の進展により再生医療製品等は生きた細胞を治療に用いるために製品の品質が患者ごとに大きく変動すること、通常のバイオ医薬品のように高度な精製や感染因子の不活化工程を適用することが困難である。また自己由来製品の開発にあたっては多くの場合で製品がロットを構成していないテイラーメイド的製品であり、単回投与されるためにしまた製品によってはきわめて少量の細胞で構成される場合があり、安全性に関連する様々な試験に関して通常の公定書に記載された方法が適用できない場合が多い。

日本薬局方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。エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁構成成分の一つで、リポド A とよばれる資質の糖鎖が結合したリポポリサッカライド (LPS) である。エンドトキシンは自然界の中で最も強力な発熱物質であり、血中に直接投与されると微量で発熱を引き起こし、さらに大量に投与されるとショックを引き起こす。グラム陰性菌によって引き起こされる致死的敗血症ショックの本体であることが知られている。またエンドトキシンは耐熱性であり、通常加熱滅菌などでは不活性化されず、完全に失活させるには 250℃で 30 分以上の感熱滅菌処理が必要とされる。

このようにエンドトキシンは発熱のみならず様々な有害な生体応答を引き起こすために注射剤での試験が求められている。一方再生医療等製品では、生きた細胞を用いる点やロットを構成しない特性、非常に少量しか生産されな

い点などの特性からエンドトキシン試験の適用においても従来の医薬品に適用される局方試験法を適用することは必ずしも合理的といえない。また、再生医療製品等は生きたい細胞であり凍結保存される場合を除いて製剤化後、速やかに患者に投与される必要がある。

本研究では、再生医療等製品におけるエンドトキシン試験をどのように適用していくのか、局方エンドトキシンに沿った試験が困難な場合にどのように試験を実施するのが合理的であるのか検討した。また、再生医療等製品は多様な製品が開発中であり、その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べきかについても考察した。

B. 方法

国内で局方<4.01>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(検体量、測定時間、操作性)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も調査した。

C. 結果

C.1.局方エンドトキシン試験法

日本薬局方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。エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁構成成分の一つで、リポド A とよばれる資質の糖鎖が結合したリポポリサッカライド (LPS) である。エンドトキシンは自然界の中で最も強力な発熱物質であり、

血中に直接投与されると微量で発熱を引き起こし、さらに大量に投与されるとショックを引き起こす。グラム陰性菌によって引き起こされる致死性敗血症ショックの本体であることが知られている。またエンドトキシンは耐熱性であり、通常の加熱滅菌などでは不活性化されず、完全に失活させるには 250℃で 30 分以上の感熱滅菌処理が必要とされる。

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、インビボ法のために感度が高くなく、時間のかかる方法であり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。

カプトガニの血液凝固系は、複数のセリンプロテアーゼ前駆体と凝固タンパク質の前駆体である Coagulogen からなり、エンドトキシンはファクターC を活性化し活性化ファクターC の生成を引き起こす。活性化ファクターC が生成されると、凝固カスケードが次々と活性化されゲル化物質の前駆体 Coagulogen がゲル化物質 Coagulin に変換される。一方、カプトガニの凝固カスケードはファクターG が活性化ファクターG に変換されることでも引き起こされ、この活性化ファクターG の生成は β -1,3-グルカンによっても引き起こされる(図 1)。

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されている。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とされる。

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、NF κ B (Nuclear Factor κ B) 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。

1. 局方エンドトキシン試験法では、ゲル化法、濁度法、比色法の3法があり、3法の適用が可能か評価をした上で、いずれの試験法でも評価可能であればそのうちのいずれかの試験法を実施してよいとされている。また、試験結果に疑義がある場合においてはゲル化法での試験を最終判定とするとされている。
2. エンドトキシンの試験では多くの物質が試験の妨害や活性化を引き起こすことが知られている。エンドトキシン試験の実施に際しては、エンドトキシン標準品の希釈系列を作製して被検液に添加した予試験を行い、添加した標準品の十分な回収が得られることを確認することにより、活性化や妨害物質がないことを評価する必要がある。妨害物質や活性化物質が含まれ

ている場合にはエンドトキシンを含まない注射用水等の適切な液を用いて十分な希釈を行う必要がある。

3. エンドトキシン試験の実施に際してはエンドトキシン標準品の希釈系列を作製し、同時に試験を行うことが求められる。
4. 局方参考情報ではエンドトキシンの規格として、静脈注射においては患者の体重あたりの限度値として5 EU/Kg 以下であることを求めている。エンドトキシンの混入がこれ以下にコントロールされていれば発熱などの副作用は起きないとされる量であり、リスク管理として一応の目安となる。

C.2. 局方エンドトキシン試験と再生医療等製品

市販されているエンドトキシン測定キットの殆どは、ゲル化法、比濁法、比色法であり、局方<4.01>に規定されている評価がされている。しかし再生医療等製品に適用する場合には後述するようないくつかの課題が存在する。

その前に局方で規定されて試験法で再生医療等製品に適用する際の課題を整理しておく。まず、<4.01>では、ライセート試薬の表示感度の確認では、エンドトキシン標準品の希釈系列を作製して用いる必要がある。また反応干渉因子試験でもエンドトキシン標準品を用いる必要がある。しかし、多くの製剤が作られる通常の注射用医薬品とは異なり特に自己由来細胞組織加工製品はテイラーメイド製の特徴を持ち、個別製品ごとにエンドトキシン標準品を用いた感度や妨害物質の有無を求めるのは合理的とはいえない。

再生医療等製品は生きた細胞を用いており、細胞そのものがエンドトキシン試験を妨害す