

201427032A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等規制調和・評価研究事業

ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川崎 ナナ

平成 27 (2015) 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 ----	143
川崎 ナナ	
2. 細胞組織加工医薬品のウイルス安全評価に関する研究 -----	157
遊佐 敬介	
3. 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 -----	179
橋井 則貴	
4. 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-----	193
小林 哲	
5. ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究 -----	207
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 -----	213
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 -----	221
山口 照英	
7-2. エンドトキシン試験法の研究 -----	235
山口 照英	
8. 持続感染細胞クローンをを用いた多様な異常型プリオンの検出・評価系の確立----	243
黒須 剛	
9. 異常型プリオンの in vivo 検出系の評価に関する研究 -----	247
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 -----	251
菊池 裕	
10-2. 無菌試験法の研究 -----	255
菊池 裕	
11. マイコプラズマ否定試験法の研究 -----	261
内田 恵理子	
12. ウシ等由来原料の基準の研究 -----	273
吉倉 廣	
13. ウシ等由来原料の基準の研究 -----	321
飛梅 実	
III. 班会議資料 -----	325
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	367
V. 研究成果の刊行物・別刷 -----	371

ウイルス等感染性因子評価に関する研究

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

2014年11月より改正薬事法と再生医療安全性確保法が施行となり、難治性疾患の治療の切り札として、また、成長戦略の担い手として、細胞組織加工製品に強い期待が寄せられている。更に、バイオ医薬品も癌やリウマチ等治療現場でその重要性が認識され、革新的な製品開発が急速に進んでいる。このような背景のもと、製品のウイルス等感染性因子の安全性をいかに担保していくかは重要な課題である。本年度は、細胞組織加工製品のウイルス安全性に関して、次世代シーケンサーを利用した新規のウイルス検出法の開発、免疫抑制状態におけるウイルスのリスク評価、iPS細胞等を使ったウイルススパイク試験、iPS細胞の細胞表面ウイルスレセプトーム解析、並びにPMDA医薬品副作用データベース解析ソフトウェアの開発と、ウイルス感染リスク要因の検討を行った。また、「細胞組織加工製品におけるウイルス安全性確保に向けたリスクマネジメントケーススタディ」を行った。プリオン安全性については、ウイルス除去膜によって異常型プリオンを効率よく除去できることを明らかにすると共に(LRV \geq 4.2)、異常型プリオンの検出法の評価を行った。細胞組織加工製品に無菌試験法、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をまとめた。また、国際獣疫事務局(OIE)によって日本、米国を含む複数国が新たに「無視できるリスク国」に指定されたことを踏まえて原料基準のあり方を検討し、医薬品等のウシ由来原料のBSEリスク評価についての提言としてまとめた。

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

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

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

前田 洋助 熊本大学大学院
生命科学部准教授

清水 則夫 東京医科歯科大学
難治疾患研究所

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

黒須 剛 大阪大学微生物病研究所助教

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

苑 宇哲 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

古田 美玲 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

太田 悠葵 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

加藤(森)ゆうこ 酪農学園大学獣医学群獣医学類

岡本 実 酪農学園大学獣医学群獣医学類

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

小野寺 節 東京大学大学院

甲斐智恵子 東京大学医科学研究所

北本 哲之 東北大学大学院

四方 靖 株式会社エーザイ

中村 好一 自治医科大学

毛利 資郎 東北大学

山本 茂貴 東海大学

萩原 健一 国立感染症研究所細胞化学部

中村(桶本)優子 国立感染症研究所細胞化学部

A. 研究目的

昨年、改正薬事法と再生医療安全性確保法が施行となり、難治性疾患治療等を対象とした細胞組織加工製品に強い国民の期待が寄せられている。同時に iPS 細胞研究等の基礎研究の優位性を生かした成長産業としての期待も大きい。一方、バイオ医薬品も、癌やリウマチ治療等における重要性が認識され、革新的で多様な製品の開発が進んでいる。本研究班では、細胞組織加工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、整備すべき課題としてウイルス等感染性因子の安全性に関して平成 24 年度より検討を行ってきた。特に期待が寄せられている細胞組織加工製品に関しては、品質、有効性と共に安全性の確保、特にウイルス、細菌、マイコプラズマ、異常型プリオン等の感染性因子に関する安全性をいかに担保していくかが最優先課題となっている。本研究班では、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以下の 4 つの課題に対して研究を進めて来た。

- (1)細胞組織加工製品のウイルス安全性確保
- (2)ウシ等由来原料に係る基準の見直し
- (3)プリオン安全性確保
- (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

本研究では、細胞組織加工製品のウイルス安全性確保に関する考え方や、バイオ医薬品の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料基準のあり方を明らかにした。本研究結果は、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、販売後の適正使用の実現に繋がっていくものと考えられる。

課題(1)～(4)について、以下を実施した。

(1)では、細胞組織加工製品製造の原材料の新規のウイルス検出系として次世代シーケンサーを使った網羅的なウイルス検出のためのパイプラインを構築し、新規ウイルス検出法として実用化が可能かどうかの検討を行った。次に H24-25 年度まで文献調査及び検査・実験によるウイルス感染リスクアセスメントを実施してきた。ヒト成人では EB ウイルス (EBV) などの例を挙げるまでもなく多くの場合ウイルスが持続感染しているので、細胞組織加工製品の原料となる生体材料へ

ウイルスが混入する危険性がある。そのため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。本年度は、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)、パルボウイルス B19 (B19) のスパイク実験とそれぞれの検出系を樹立し、iPS 細胞作製のウイルス安全性検査項目として考慮すべき要件を明らかにしたことに加えて、iPS 細胞が単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) に感受性を持つことも示した。これに並行して、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、iPS 細胞表面ウイルス受容体の解析を行った。加えてヒトレトロウイルスとしてヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) を取り上げ、感染リスクの分析を行った。また、ドナーに海外渡航歴がある場合に注意すべきウイルスについて、死亡率等を調査した。更に、副作用症例報告のデータベースを解析するソフトウェアを開発し、リスク因子の分析を試みた。また、別添資料 1 のとおり、「細胞組織加工製品におけるウイルス安全性確保に向けたリスクマネジメントケーススタディ」を行った。

(2)では、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、OIE による指定の妥当性、原産国規制、原材料のリスク、高度精製品、非定型 BSE 等を検討した。そして、これらに基づいて、提言を「医薬品等のウシ等由来原料の BSE リスク評価について」(別添資料 2) にまとめた。

(3)では、バイオ医薬品等の原料への異常型プリオン (PrP^{Sc}) の混入/迷入リスクを低減するために、クリアランス工程の評価法について最新の状況を調査した。また、工程評価法としてマウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株を用いて、Western Blotting (WB)法によりウイルス除去膜工程を評価検討し、プリオン除去能を算出した。加えて異常型プリオンを特異的に検出する抗体の作製を行った。

(4)では、出荷時に適用される日局無菌試験が細胞組織加工製品に最適化されていないことから、現実実施可能な無菌試験法について検討した。また、最終製品の出荷試験として、マイコプラズマ否定試験の実施が求められているが、日局参考情報による試験法は必ずしも細胞組織加工製品の特性を考慮すると最適とはいえない。そこで、本研究ではマイコプラズマの迅速検査法として核酸増幅法を細胞組織加工製品に適用する場合の評価

法を整理した。同様に細胞組織加工製品に適用するエンドトキシン試験に関しては、日局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、整理した。

本年度に実施した研究班の班会議資料は、別添資料3として示した。

B. 研究方法

(B-1) 細胞組織加工製品等のウイルス安全性評価

1-1) 細胞組織加工製品のウイルス安全性評価に関する研究～次世代シーケンサー(NGS)を用いたウイルス試験法の開発

ネコカリシウイルス (FCV) は、m.o.i. 0.1 で CRFK 細胞に感染後、2 日めの上清を 0.22 μm のフィルターでろ過したものを -80°C で保存した。マウス微小ウイルスは、m.o.i. 0.1 で A9 細胞に感染後、2 日めの上清を 0.22 μm のフィルターでろ過したものを -80°C で保存した。非感染 HEK293 細胞 (1×10^6)、FCV を m.o.i.1 で感染させ、12 時間、24 時間後に RNeasy mini kit (Quiagen)を用いて RNA を分離精製し、6 μg RNA を出発材料として、HiSeq 2000 で 2×100 bp, 50M リードサイズの解析を行った (受託サービス Eurofin Genomics)。

1-2) 細胞組織加工製品におけるウイルス検出法に関する研究～iPS 細胞表面ウイルス受容体の網羅的解析

ヒト iPS 細胞として、253G1 株を用いた。凍結ストックを解凍後、hES 培地 (bFGF (R&D Systems) を含む Primate ES 培地(ReproCELL)) を用いて細胞懸濁液を調製した後、feeder 細胞 (マイトマイシン C 処理 SNL 細胞) を播種した dish に播き、hES 培地で培養した。Feeder 細胞上で 4～6 日毎に継代を行い、コロニーが十分に成長し、且つ dish 面積に対して十分な細胞密度となった時に、matrigel (BD Biosciences) でコーティングした dish に継代した。Matrigel 上での培養には mTeSR1 培地 (STEMCELL) を使用した。Matrigel コーティング dish を用いた培養の継代は feederless single cell passage 法に従って行った。Accumax (Innovative Cell Technologies) を添加して細胞を分離して、継代の際の培地は Y-27632 (Wako) を含む mTeSR1 培地で細胞懸濁液を調製し、 0.25×10^5

cells/60mm dish となるように播種し、7 日間培養した。

回収したヒト iPS 細胞 (3.0×10^6 個) を PBS で 3 回洗浄し、5 mL の PBS で再懸濁したのち、1 mL の 10 mM 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。PBS で 3 回洗浄した後、100 mM glycine/PBS でビオチン化を停止させ、300 μL の RIPA buffer (0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 使用前に 1 μL の Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) を添加) を加え、 4°C で約 1 時間転倒混和し、15,000 rpm で 10 分間遠心した遠心上清を RIPA lysate として回収した。

Streptavidin agarose resin 50% slurry (Thermo Fisher Scientific) 10 μL (レジンを 5 μL に相当)を PBS で洗浄したのち、液相を 30 μL の RIPA lysate に置換し、室温で 1 時間混和した。レジンを 100 μL の RIPA buffer で 1 回、純水で 3 回洗浄し、液相を 100 μL の guanidine buffer (8 M guanidine-0.5 M EDTA (pH 8.6)) または Tris buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.5)) に置換し、2 μL の 1 M DTT を加え 65°C で 20 分間、続けて 4.8 μL の 1 M モノヨード酢酸ナトリウムを加え遮光しながら室温で 40 分間反応させ、還元カルボキシメチル化を行った。反応後、0.5 mL の純水でレジンを 3 回洗浄し、液相を 100 μL の 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) で置換し、終濃度 5 ng/ μL の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。また、whole cell lysate として、RIPA lysate 30 μL に 70 μL の guanidine buffer を加え、同様の条件で還元カルボキシメチル化を行い、PD minitrap G-25 (GE Healthcare, 28-9180-07) で脱塩、凍結乾燥の後、100 μL の Tris buffer で溶解し、終濃度 5 ng/ μL の修飾トリプシンを加え 37°C で 16 時間消化した。いずれも消化物は Speed vac で乾燥させ 25 μL の 0.1%ギ酸に溶解し、5 μL (細胞数約 2.8×10^5 個相当)を LC/MS 分析に供した。

1) LC 装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResources)

分析カラム: L- column2 C18 column (0.075 mm \times 150 mm, ϕ 3 μm , CERI)

バッファー A 及び B として、2%及び 90%のアセトニトリルを含む 0.1%ギ酸溶液を使用し、流速 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, B 溶媒 5-65%のリニアグラディエントで分離を行った。

2) MS 装置: LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific)

分析条件は以下のとおりであった。

キャピラリー電圧: 2.0 kV

マススペクトルの範囲: m/z 450-2000

タンデム MS (MS/MS) コリジョンエネルギー: 30%

3) タンパク質同定: Proteome Discoverer ソフトウェア (1.4., Thermo Fisher Scientific) の Sequest HT 検索エンジンにより, タンパク質同定を行った. データベースとして UniProtKB 中のヒトのエントリーに対するファイル (HUMAN.fasta) を用いた. 修飾としてシステイン残基のカルボキシメチル化(+ 58.005 Da, static), およびメチオニン残基の酸化(+ 15.995 Da, dynamic)を指定した. ビオチン化ペプチドは, 固相化ストレプトアビジンに残留し, 測定試料中にはほぼ無いと推測されるので, LC-ビオチン化 (+ 339.162) は考慮しなかった.

1-3) ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究

レトロウイルス粒子産生のためのベクターとしてはヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) ベクターである pNL-Luc Δ BglIII を用いた. この HIV-1 ベクターと種々のウイルス Env 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションしてレトロウイルス粒子を産生させた. HTLV-1 の splicing を抑制するために *env* 領域の下流に HIV-1 由来の RRE (rev responsive element) を組み込み, *env* mRNA の核外輸送を促進させて, その発現効率を増大させた. 293T 細胞にこれらのベクターをコトランスフェクションして 24 時間後に培養上清を回収し, さらに 0.45 μ m のサイズのフィルターにより細胞を除去して cell-free のレトロウイルス粒子とした. また細胞から遊離したウイルス量の定量のため HIV-1 Gag 抗原である p24 抗原濃度を測定した.

この cell-free レトロウイルス粒子を glioma 由来の NP2/CD4/CCR5/ CXCR4 細胞に感染させ, 感染後 48 時間後の細胞内 luciferase 活性を測定し, この活性をウイルス Env の細胞内侵入効率とした. 使用する HIV-1 レポーターベクターには intron が luciferase 遺伝子の途中に逆向きに挿入されており, luciferase 遺伝子内の intron は splicing donor (SD) と splicing acceptor (SA) 間が splicing され除かれる. しかしながら luciferase 遺伝子は LTR による転写とは逆向きに配置されているため, 感染細胞内では luciferase は発現しない. この細胞と標的細胞として使用する Jurkat 細胞を混合培養し, Jurkat への細胞-細胞間感染が成立すると, 標的細胞内で感染細胞由来のレポーター遺伝子が Jurkat 細胞の染色体に組み込まれる. その結果 CMV プロモーターからの luciferase 遺伝子が転写をうけ,

標的細胞特異的に luciferase が発現することにより cell-cell 感染の効率を定量的に測定することが可能となる.

1-4) 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

1) iPS 細胞の培養.

細胞株: 201B7 株 (RBRC-HPS0063)

培地: AK03 (味の素);

2) ウイルスストックの作成.

HSV-1: Vero 細胞に HSV-1 (Strain F) を感染し, 37°C で培養した (培養液: RPMI1640 +2% FCS). ほとんどの細胞に CPE が広がった時点で培養液を回収し, 0.8 μ m のフィルターで細部成分を除去しウイルス液とした. 得られたウイルス液を 10^{-1} ~ 10^{-5} まで段階希釈 Vero 細胞に加え, プラークアッセイにより感染価を測定した.

CMV: ヒト正常胎児肺由来二倍体線維芽細胞株 HFL-1 細胞に CMV (Towne 株) を感染し, 37°C で培養した (培地; Eagle MEM +2% FCS). 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 を用いてプラークアッセイにより測定した.

3) ウイルス遺伝子は LightCycler 480 (ロシュ) を用いた qPCR により定量した.

PCR 試薬: AccuPrime Taq DNA Polymerase System, Invitrogen 社

a) mRNA 検出の標的遺伝子

HSV-1: ICP4, gB

CMV: IE1, UL89

b) 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.

c) mRNA の定量 RT 反応 50°C 30 分 PCR 反応 94°C 15 秒, 54°C 30 秒, 72°C 30 秒 40 cycle で RT-PCR 反応を行った. RT-PCR 試薬は SuperScript III OneStep (Invitrogen) を使用した.

4) ウイルスタンパク質の検出 (蛍光抗体法).

a) 使用抗体

HSV-1 ICP4 抗体 (Santacruz)

HSV-1 glycoprotein B 抗体 (Santacruz)

CMV pp65 抗体 (Santacruz)

CMV glycoprotein B 抗体 (Santacruz)

Anti-mouse Rabbit 抗体 (Dako)

b) 方法

メタノール固定 (-20°C 10 分間) 後, ブロッキング

グ液（10%ウサギ血清）を加え室温 30 分静置．1 次抗体液（1 次抗体，1%BSA，PBS）を加えて室温 2 時間静置．PBS で 3 回洗浄し，2 次抗体液を適量加えて暗所室温 1 時間静置．蛍光顕微鏡で観察．

1-5) 細胞組織加工製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～文献及びデータベースを用いたリスクアセスメント

1) ドナーに海外渡航歴がある場合に注意すべきウイルスの調査： ドナーに海外渡航歴がある場合に検査したほうがよいと考えられるウイルスについて，公表文献の他，厚生労働省の人口動態統計・国立感染症研究所や米国疾病予防管理センター（CDC）のホームページ等をもとにして，死亡例数や死亡率等を調査した．

2) 症例報告等を利用したリスク因子の検討： 2014 年 11 月の時点で，副作用名にウイルス感染を含む症例について JADER を用いて検索した．報告されている医薬品が 10 以下の場合にはすべての医薬品について，10 より多い場合は医薬品名にマブ・セプト・グロブリンを含むもの（抗体関連のバイオ医薬）またはシクロスポリン・タクロリムス・プレドニゾロン・ミコフェノール酸・メトトレキサート（低分子の免疫抑制剤）について，当該ウイルス感染症と全有害事象とを検索して，これらを性別・年代別に集計した．各医薬品のウイルス感染症におけるリスク因子の検討にあたっては，当該医薬品を第一被疑薬としたすべての症例を母集団として，有害シグナル検出手法のひとつである報告オッズ比（ROR）の計算を応用し，性別・60 代以上・10 代以下における粗オッズ比と 95%信頼区間を算出した．

1-6) JADERデータベース解析ソフトウェアの開発とそれを用いたウイルス感染リスクの抽出

医薬品副作用報告データセットは，PMDA のホームページよりダウンロードした（2014年11月）．ダウンロードしたデータセットはカンマ区切りのテキストデータであった．このテキストデータをリレーショナルデータベース管理システムである MySQL 5.6（Oracle Corporation, CA）にデータをインポートし，PMDA のホームページの説明に従い主キー，外部キーを設定した．ICH の医学用語集である MedDRA に日本語を付加した，ICH 国際医薬用語集日本語版（MedDRA/J）ver 16.1 を医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団（Tokyo,

Japan）より購入した．MedDRA/J に付属の説明書に従いデータを MySQL にインポートし，適切に主キー，外部キー，インデックスを構築した．日本医薬品一般名称データベース（JAN）は国立医薬品食品衛生研究所（NIHS; Tokyo, Japan）の JAN ホームページからダウンロード，加工した後，MySQL にインポートした．JAN に掲載されていない配合剤，生物学的製剤，漢方等の名称は可能な限り第十六改正日本薬局方，国立感染症研究所（NIID; Tokyo, Japan）を参照して JAN データベースと共に MySQL 内に保存した．JADER 中の日本語は，ICH E2B-M2 個別症例安全性報告標準の日本語版，およびその英語版を参照して翻訳した．MySQL からのデータ取り出しは SQL を利用し，データの整形にはプログラミング言語である Python 3.4.2 及び Python の数値計算ライブラリである NumPy，データ解析ライブラリである pandas を使用した．統計処理は，統計処理言語である R-3.1.3 を利用した．ROR の算出には，統計言語 R の薬剤監視，有害シグナル検出パッケージである PhViD をダウンロードして使用した．

(B-2) ウシ等由来原料の基準に関する研究

2007 年，CVO/EU 議会の勧告に伴い欧州食品安全機関（European Food Safety Authority : EFSA）による地理的 BSE リスク評価（GBR）から国際獣疫事務局（World Organisation for Animal Health : OIE）でのリスク評価基準へ移行した．これに伴い，従来の GBR 評価では原産国として認定されていたが，OIE 基準での認証を受けていない国の存在が明らかとなった．これらの国に対する本邦での規制の在り方について，GBR 評価と OIE 基準の評価項目の精査ならびにリスク上昇の有無について精査した．

定型 BSE（C-BSE）のサルへの感染実験では，ヒト非定型クロイツフェルトヤコブ病（Creutzfeldt-Jakob disease : CJD）（vCJD）と同様の臨床症状を示し，その中枢神経系の組織病理像はプラーク型のプリオン沈着を有する特徴的な像を呈した．非定型 BSE の一つである L-BSE のヒトへの感染例は確認されていないが，サルへの伝播は確認されている．C-BSE，L-BSE 感染サル脳組織標本およびヒトプリオン病脳組織標本を用いて免疫組織化学的に感染プリオン種を鑑別可能か否かについて検討した．また，ヒトへの非定型 BSE 由来プリオンの感染性について不明なことから，プリオン感受性ヒト細胞を用いた in vitro 検出系作出に

について検討した。

(B-3)プリオン安全性評価

3-1) WB 法を用いたウイルス除去膜（平均孔径 15nm）による vCJD 除去評価

mo-vCJD 感染マウス脳を PBS に 10% (w/v) となるよう混合し、シャフトジェネレータを用いて脳乳剤を調製した。脳乳剤を超遠心分離 (150,000 x g, 1 時間) を行い、沈殿を元液量の二倍量の PBS にて再懸濁し、Microsomal Fraction (MF) とした。次に MF を高出力超音波処理 (200 W, 1 分×10 回) 後、0.22 μm のシリンジフィルターでろ過し、super sonicated microsomal fraction (sMF) とした。アンチトロンビン製剤のウイルス除去膜（平均孔径 15nm）工程直前液に sMF を加え、ろ過前後の PrP^{res} 総量（総 WB-titer = non-detectable end point dilution titer に液量を乗じたもの）を求め、前後の総量の差を除去係数 (Log Reduction Value, LRV) として求めた (図 3-1)。サンプルに Proteinase K (PK) をあらかじめ決定していた濃度になるように添加し、37°C で 30 分間消化した。AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) を最終濃度 10 mM になるように添加して反応を停止し、1/5 量の 5 x Sample buffer (含 βME) を加えて 100°C で 3 分間処理した。さらに総量に対して 1/5 量の 8 M urea を混合した。これを Nu-PAGE 4-12% Bis-Tris ゲル (Invitrogen) を用いて電気泳動し、iBlot (Invitrogen) を用いてニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンは 5% スキムミルクを含む TBS-T (0.1% Tween 20) で 1 時間ブロッキングし、抗体反応も同組成の溶液中でおこなった。一次抗体反応は 0.1 μg/ml の 6D11 抗 PrP 抗体 (Covance) で 1 時間、二次抗体反応は 0.25 μg/ml の HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (KPL) で 45 分間おこない、反応後に TBS-T を用いて 10 分間の洗浄をそれぞれ 3 回および 5 回おこなった。ブロッキングを含む一連の抗体反応は BenchPro4100 (Invitrogen) を用いて自動でおこなった。メンブレンを Super Signal West Pico あるいは、Super Signal West Femto 発光基質 (Thermo) に浸し、5 分間振盪後、X 線フィルムあるいは、Amersham Imager 600 にて露光・検出した。RK13mol 株を 5% ウシ血清を含む Opti-MEM GlutaMax 培地で培養した。プリオン接種前の継代時に Doxycycline を終濃度 1 μg/ml になるように培地に添加して、3 日後に 12 well plate に播種した。翌日、sMF を接種し、そのまま更に 1 週間培養した。また細胞への導入効率を上げることを目的に、sMF と磁気ビーズ (ViroMag) を混合し、磁石板を下に敷いたプレートに 20 分置くことにより細胞へ導入した。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 lysis buffer を用いて細胞を溶解し、WB に供した。残りの well は培地を同様に交換して培養を継続し、4 週間目まで週毎に上記同様に細胞溶解液を回収し、WB に供した。

3-2) 異常型プリオンの in vivo 検出系の評価

vCJD 材料として、mo-vCJD 株感染マウス脳由来 sMF を用いた。アンチトロンビン製剤 (ATIII) のウイルス除去膜工程直前液にそれを添加した (ろ過直前液)。その添加溶液をウイルス除去膜にて処理した (ATIII ろ過液) (図 3-4)。ろ過液は、さらにその一部を超遠心分離 (150,000 x g 1 時間) し、上清と沈殿 (PBS で再懸濁) に分取した。ろ過直前液及びろ過液は、PBS で希釈した後、マウス接種材料とした (表 3-2)。Western blotting (WB) 法による、ろ過直前液の総 WB titer (non-detectable end point dilution titer に液量を乗じたもの) は 2.5 log であるのに対してろ過液の総 WB-titer は < -0.3 log (検出限界以下) であり、除去係数 (Log Reduction Value, LRV) は ≥ 2.8 であった (表 3-3)。前述により調製したろ過直前液、ろ過液、超遠心上清ならびに沈殿の感染性を確認するため、生後 4 週齢の FVB/n マウスに脳内接種し、瀕死状態 (Terminal ill, 以下 TI) 又は接種後約 200 日をエンドポイントとして観察した。脳サンプルは、TI 又はエンドポイントで採取し、採取した右脳から PrP^{res} を WB 法で検出した。左脳は、組織解析用にホルマリン固定し、定法に従い組織切片を作成し、病理学的評価を実施した。ろ過前後の試料における各希釈群の WB 感染陽性数と陰性数を用いて Karber 法にて ID₅₀ 値を算出した。感染が認められなかった試料については、階段希釈群の直近希釈群が全て感染陽性と仮定して ID₅₀ 値を算出した。また、ろ過直前液とろ過液の感染価の差を LRV とした。

3-3) 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究

プリオンタンパク質の 43 残基リン酸化セリン (pS43) を認識する抗体産生ハイブリドーマ 3 株を BALB/c マウスに移植して得られた腹水を硫酸分画後、プロテイン A カラムで精製し、IgG 画分を得た。スクレイピー (obihiro 株) 感染マウス凍結脳は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 プリオン病研究センター 横山隆チーム長から御供与いただいた。マウスへの PrP^{Sc} 感染実験は、広島大学広島大学大学院 生物圏科学研究科 免疫生物学研究室 松田治男教授に御教授いただいた。ICR

マウスの脳にスクレイパー(obihiro株)10%脳乳液を投与し、4か月後に安楽死させた。得られたスクレイパー感染脳を左右に二分割し、それぞれを0.32 Mシヨ糖溶液を用いて10%脳乳液を調製し、以降の実験に用いた。脳乳液(タンパク質50 µg相当)に4倍量のメタノールを加えて-20°C下に保存し、遠心分離で得られた画分を溶解後、Proteinase K (PK)で消化(50 µg/ml, 37°C, 30分間)した。試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体にウサギ抗PrPポリクローナル抗体PrP (FL-253) (Santa Cruz Biotechnology)又はマウス抗p43S-hPrP (39-50)-BCIP抗体を、第2抗体にIRDye 680RD標識抗ウサギIgG又はIRDye 800CW標識抗マウスIgG抗体を用いたイムノブロットングを行い、近赤外蛍光法で検出した。また、発現解析のコントロールとして、第1抗体にマウス抗β-アクチン抗体AC-15 (Sigma)を、第2抗体にHRP標識抗IgG抗体を用いたイムノブロットングを行い、化学発光法で検出した。

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

公表文献や海外のガイドライン、国際学会でのPrP^{Sc}の検出系の報告について調査を行うと共に、それぞれ検出手法ごとの有用性や限界について評価を行った。またスパイク検体について文献等より、どのような課題があるのかを調査すると共に、工程評価に用いるスパイク検体についての要件について調査した。

(B-4) 細胞組織加工製品における無菌試験法、マイコプラズマ否定試験法及びエンドトキシン試験法

4-1) 核酸増幅法 (NAT) を用いたマイコプラズマの迅速検査法

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、自然界の宿主、及び post preservation titer (CFU)を表 4-1 に示した。Vero 細胞 (JCRB 細胞バンク JCRB0111) は Eagle's minimal essential medium (Sigma-Aldrich) に 5%ウシ胎児血清を用いて培養した。マイコプラズマの検出には主に MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit (Roche Diagnostics) 又は MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit (Roche

Diagnostics)を用いて行った。通常、1 検体 1mL を 0.45mL ずつマイクロチューブに 2 本ずつ分注後、MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Prep Kit

(Roche Diagnostics)のマニュアルに従いマイコプラズマ DNA を抽出した。培養上清や細胞数が少ない検体を測定する場合は carrier DNA 溶液 (Roche Diagnostics 社、 1×10^7 個の CHO 細胞ゲノムを含有、DNA 濃度は非公開)を終濃度 80µL/mL 検体となるようにマイクロチューブに添加後、DNA 抽出を行った。得られた DNA について、各チューブ 2 反応の PCR 又は real-time PCR を行った。MycoTOOL PCR の場合、増幅はキットのマニュアルに従いタッチダウン PCR とし、反応後の検出はマイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いて行った。450bp のバンドを測定した場合は陽性と判定した。PCR 反応をモニターするキットに添付された positive control (PC)は増幅バンドの部分配列を含むプラスミドであり、増幅断片のサイズは 300bp である。PC-Mh は *M. hyorhinitis* のゲノム DNA、PC-Mo は *M. orale* のゲノム DNA、いずれも ATCC から購入した標準品であり、1 pg/reaction を使用した。MycoTOOL real-time PCR で測定する場合は、キットに添付された PC のほか、 1×10^7 CFU/mL の *M. hyorhinitis* 菌液から抽出したゲノムの希釈列をスタンダードに用い、CFU に換算してマイコプラズマを定量した。検体量の検討は MycoTOOL PCR の他に MycoSEQ (Life Technologies)を用いて行った。MycoTOOL PCR で検出する場合、 5×10^6 cells/mL の Vero 細胞懸濁液 0.9ml に carrier DNA 溶液 (Roche Diagnostics 社、 1×10^7 個の CHO 細胞ゲノムを含有、DNA 濃度は非公開)を終濃度 80µL/mL 検体となるようにマイクロチューブに添加後、マイコプラズマ参照品 7 種を最終濃度が 10 CFU/mL となるように 1/10 量スパイクした。この細胞懸濁液及び陰性対照となるマイコプラズマ非感染細胞懸濁液 0.1mL をそれぞれ 2 本ずつマイクロチューブに分注し、MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Prep Kit (Roche Diagnostics) のマニュアルに従ってゲノム DNA の抽出、PCR 検出を行った。MycoSEQ で検出する場合、Vero 細胞 5×10^6 cells/mL に最終濃度が 10 CFU/mL となるようにマイコプラズマ参照品を添加した細胞懸濁液 0.1mL を MycoSEQ Mycoplasma Detection Kit (Life Technologies)のマニュアルに従い抽出、検出を行った。マイコプラズマ参照品 *M. hyorhinitis* は無血清 MEM 培地を用いて希釈し、最終濃度が 10 CFU/mL となるように 1×10^4 cells/mL に調製した Vero 細胞懸濁液に接種した。その後、抗生物質を添加しない培地で繰り返し継代を行い、*M. hyorhinitis* 感染 Vero 細胞株を樹立した。100 mm dish

で培養した継代3日目のコンフルエントに増殖した *M. hyorhinis* 感染 Vero 細胞から培養上清を回収し(上清画分), 10 mL の PBS を dish に添加してスクレイパーにより細胞を回収した(細胞ペレット画分). 各画分のサンプル量を 11ml に揃えて, それぞれ 1 mL を検体とし, carrier DNA 溶液を添加後, MycoTOOL PCR キットのマニュアルに準じてマイコプラズマ DNA の抽出を行い, MycoTOOL real-time PCR で定量した. 10 CFU/mL あるいは 1 CFU/mL の *M. hyorhinis* をスパイクし, キャリア DNA 溶液を添加した Vero 細胞培養上清 (50mL, 10 mL) について(1)遠心: 16,000×g で 30 分間の遠心, または(2) 細胞添加後遠心: 終濃度 5×10^4 cells/mL となるように Vero 細胞を添加後に 16,000×g で 30 分間の遠心を行った. 遠心後, 上清を除去し, 得られた菌体ペレットを 0.45mL の PBS に懸濁し, キャリア DNA 溶液を添加後に MycoTOOL のマニュアルに従い DNA を抽出し, PCR で検出した. 対照として, 細胞懸濁液に *M. hyorhinis* をスパイクしたサンプル未処理(細胞懸濁液), 及び未処理の細胞培養上清に *M. hyorhinis* をスパイクしたサンプル 0.45mL にキャリア DNA を添加してから菌体のゲノムを抽出し, PCR 測定を行い検出の有無を判定した. マイコプラズマ参照品 *M. hyorhinis* は無血清 MEM 培地を用いて希釈し, 最終濃度が 10 CFU/mL となるように 1×10^4 cells/mL に調製した Vero 細胞懸濁液に接種した. その後 6 well dish に 3mL ずつ播き, 培養を行った. 培養開始日 0 から 6 日まで, 毎日, 2 well の細胞をスクレイパーで細胞を培地ごと回収し全細胞画分とした. また, 別の 2 well について培養上清を回収し(培養上清画分), well に残った細胞は 1mL の PBS を添加してスクレイパーで回収した(細胞ペレット画分). 全てのサンプルは 16,000×g で 30 分遠心し, 上清を除去後のマイコプラズマ及び細胞を含むペレットを再び PBS 0.45mL に懸濁し, carrier DNA 溶液を添加後にマイコプラズマ DNA の抽出を行った. 対照として, Vero を含まない MEM 培地に 10 CFU/mL となるようにマイコプラズマを添加したのも同様に培養し, 培地画分とした. 各画分について MycoTOOL real-time PCR によりマイコプラズマ量を定量した. 同時に, 同じ条件で培養した非感染 Vero 細胞を培養開始日 0 から 6 日まで連日ハーベストし, 細胞数をカウントした.

4-2) 無菌試験法

マイコプラズマ参照品として, *Acholeplasma*

laidlawii NBRC 14400 等を使用した. 25%新鮮酵母エキスは, 乾燥酵母(ニッテンドライイースト, 日本甜菜株式会社) 250g を超純水 750mL に加えた三角フラスコを 20 分間湯せんして熱水抽出し, 水で急冷後に遠心分離 (4°C, 8,000×g, 20 分間) を 2 回繰り返す, 得られた上清に 1mol/L HCl 又は 1mol/L NaOH を加えて pH7.6 に調整し, 前ろ過後に 0.2 µm フィルターで滅菌したものをを用いた. マイコプラズマの培養には, Hayflick の変法培地を用いた. Difco PPLO broth (日本 BD, 商品番号 255420) 21g, グルコース (和光純薬工業) 又はアルギニン塩酸塩 (ナカライテスク) 3g, フェノールレッド 20mg を超純水 800mL に溶解し, 1mol/L HCl 又は 1mol/L NaOH を加えてグルコース添加 Hayflic の変法培地は pH7.6-7.8 に, アルギニン添加 Hayflic の変法培地は pH7.0-7.2 にそれぞれ pH を調整し, 高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分間) した. 室温まで冷却後, 非働化ウマ血清 (Biowest) 100mL, 25%新鮮酵母エキス 100mL, ペニシリン G カリウム (Meiji Seika ファルマ) 50 万単位を加えて 1L とした. CFU の測定には, Hayflick の寒天平板培地を用いた. Difco PPLO Agar (日本 BD, 商品番号 241210) 35g を超純水 800mL に溶解し, 高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分間) した. 60°C に冷却後, 非働化ウマ血清 100mL, 25%新鮮酵母エキス 100mL, ペニシリン G カリウム 50 万単位を加えて 1L とし, 9cm シャーレに 25mL ずつ分注した. *A. laidlawii* NBRC 14400, *M. hyorhinis* NBRC 14858 及び *M. pneumoniae* NBRC 14401 の培養にはグルコース添加 Hayflic の変法培地を, *M. arginini* ATCC 23838, *M. fermentans* NBRC 14854, *M. orale* NBRC 14477 及び *M. salivarium* NBRC 14478 の培養にはアルギニン添加 Hayflic の変法培地を用いた. 前培養した F1 から F4 の各菌種 1mL を, 液体培地 200mL を含む 150cm² 組織培養用フラスコに接種後, 密栓してインキュベーターで培養 (36°C) した. 陰性対象培地に対する色調変化を 1 日に 2 回観察し, 菌の増殖で pH が下がってグルコース添加 Hayflic の変法培地が黄色に, pH が上がってアルギニン添加 Hayflic の変法培地がピンク色にそれぞれ変化した直後に培養を終了した. *M. pneumoniae* NBRC 14401 はセルスクレーパーで回収して 20G 注射針シリンジに通して剪断した菌体を含む培養液を, それ以外は直接フラスコから回収した菌体を含む培養液をクライオチューブ (Corning, 430658) に 1mL ずつ分注し, 超低温槽に凍結保存 (-80°C) してマイコプラズマ参照品 (アコレプラズマを含む) とした.

超低温槽で -80°C 下に保存しているマイコプラズマ参照品を含むクライオチューブをヒートプロ

ック (38°C) で解凍し, *M. pneumoniae* NBRC 14401 は 27G 注射針シリンジに 10 回通して剪断した菌液を, それ以外は直接クライオチューブから回収した菌液を用い, 滅菌生理食塩水で原液から 10^{-7} まで 10 倍希釈系列を調製した. 各希釈系列菌液 5 μ L を 2 スポット Hayflick の寒天平板培地に滴下し, シャーレにフタをした状態で乾燥させた後, 上下転倒させたシャーレを CO₂ インキュベーターで培養 (5% CO₂, 36°C) した. 培養 4 日目と 7 日目に 100 倍の実体顕微鏡下で寒天平板上のコロニー数を計測し, CFU を算出した. 凍結融解後のマイコプラズマを遠心分離 (14,000 \times g, 4°C, 30 分間) し, 回収したペレット状の菌体を洗浄せずに PBS に懸濁した. 得られた菌体全量から PureLink Genomic DNA mini kit (Life Technologies) を用いてゲノム DNA を抽出した. DNA 含量を 260nm の吸光度測定により求め, 以下の計算式を用いてゲノムコピー数を算出した.

$$\text{Copies/mL} = [\text{DNA contents } (\mu\text{g/mL})] \times 10^6 \times (0.978 \times 10^9) / [\text{genome size}]$$

市販の CHO-DG44 細胞を CD DG44 培地 (GIBCO) を用いて 5×10^6 cells/mL の細胞懸濁液として調製し, マイクロチューブに 900 μ L ずつ分注した. マイコプラズマ参照品 7 種を溶解後, 無血清 MEM 培地を用いて段階希釈し, 細胞懸濁液に 1/10 量スパイクした. マイコプラズマの最終濃度が 100, 10, 1CFU/mL となるようにスパイクした細胞懸濁液及び陰性対照となるマイコプラズマ非感染細胞懸濁液 450 μ L をそれぞれ 2 本ずつマイクロチューブに分注し, MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Prep Kit (Roche Diagnostics) を用いて, 添付文書にしたがってマイコプラズマ DNA を抽出し, DNA 溶液各 200 μ L を得た. PCR は MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit (Roche Diagnostics) を用い, 添付文書のプロトコールにしたがって実施した. PCR 一反応につき DNA 抽出液 20 μ L を使用した. プライマーは添付のユニバーサルマイコプラズマプライマーを使用した. 反応条件はタッチダウン PCR とし, 94°C で 10 分間の変性後, 94°C で 30 秒の変性, 70°C で 30 秒のアニーリング, 72°C で 45 秒の伸長のサイクルを 2 回, 以後アニーリング温度のみ 69°C から 61°C まで 2 サイクルごとに 1°C ずつ下げて変性, アニーリング, 伸長反応を行った後, アニーリング温度 60°C で 25 サイクル, 最後に 72°C で 4 分間の伸長反応を行った. 反応後の検出は MultiNA (島津製作所) を用いて行い, 目的とするサイズのマイコプラズマ特異的なバンドが検出された場合に陽性と判定した.

4-3) エンドトキシン試験法

細胞組織加工製品の培養液やヒトへの投与に用いられるアルブミンを含む塩緩衝液にエンドトキシン標準品をスパイクし, 日局<4.01>に準拠しているキットを用いた測定と日局には準拠していない他の迅速測定キットでの結果を比較した. 特に添加回収実験やばらつきなどを測定し, <4.01>に適合しないキットを用いる場合にどのような問題点があるのかについて検討した.

1) 分光法: 分光法での測定には, LAL Pyrochrome™ を用いた. 標準品検量線として 50EU/ml, 5EU/ml, 0.5EU/ml, 0.05 EU/ml, 0.005 EU/ml のエンドトキシン標準品を測定した. また, 細胞培養に用いた無血清培地上清及びヒトアルブミン添加塩溶液にエンドトキシンを添加し, 10 倍希釈, 及び 100 倍希釈を作製して検量線からエンドトキシン量を測定した.

2) ELISA キットによるエンドトキシン測定: 抗エンドトキシン抗体を利用したエンドトキシン測定法である EndoLisa™ を用いて, 1 と同様の希釈系列に対して測定を行った.

3) 保存検量線を用いた市販キットでの測定: エンドトキシン標準品をあらかじめキットにセットし, 検体中のエンドトキシン測定に及ぼす緩衝作用を同時に測定する Endosafe™ が市販されている. Endosafe を用いて上記の培地及びアルブミン緩衝液の希釈検体を対象として保存検量線を利用したエンドトキシンの測定を行った.

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(C-1) 細胞組織加工製品等のウイルス安全性評価

1-1) 次世代シークエンサーを用いたウイルス試験法の開発

1) 次世代シークエンサーによる新規ウイルス検出法: 次世代シークエンサーを使ったウイルス検出法の概略を示したのが図 1-1 である. 6 μ g

RNA を出発材料としてサンプルを調製し、これを次世代シーケンサーによって解析を行い RNA-seq データを得た。このデータの中からウイルスシーケンスが検出できるかどうかによって、細胞のウイルス感染の有無を判定した。この検出系 (図 1-2) を作る際に重要な点は、どんな感度でどんな範囲のウイルス種が検出できるのかという点である。

2) モデル細胞 HEK293 とモデルウイルス FCV_{F4} を使った検討: ここではモデル細胞としてヒト細胞株である HEK293 細胞, モデルウイルスとしてカリシウイルスの一種である FCV を用いた。非感染 HEK293 細胞とウイルス感染 HEK293 細胞の RNA-seq データの解析を行い、両者を比較することで、感染ウイルスのシーケンスを検出できるかどうかを調べた (表 1-1)。

3) RNA-seq データの解析: 非感染 HEK293 細胞の解析の結果、得られたこのシーケンスを次の 3 つカテゴリーに分類した。① host seqs, ② unmapped seqs, ③ virus-like seqs である。得られたもののうち 98.3% は host seqs であった (図 1-3)。また unmapped seqs は 1.1% であり, virus-like seqs とされたものは 0.6% であった。非感染細胞には、内在性レトロウイルスや本来は host seqs だが、ウイルスによく似たシーケンスが含まれている可能性がある。そこで、virus-like seq に分類された 0.6% の内訳を調べてみると、99.7% アデノウイルス, 0.01% ERV であった。残りの 0.29% は host seq 由来ではあるがウイルスのシーケンスに似ているため virus-like seqs として同定された。

カリシウイルスを感染細胞の RNA-seq データで virus-like seqs と判別されたものは、非感染のものと同様に全 RNA-seq データの 0.6% を占めた。その内訳を見ると、感染後 12 時間, 24 時間でそれぞれカリシウイルスが 0.21%, 0.09% 検出することができた。しかしアデノウイルスに比べて検出頻度が極端に低く、感染後 12 時間では、アデノウイルスに比べて 1/500 程であった (図 1-4, 図 1-5)。そこで検出できたカリシウイルスのゲノムに対してマッピングを行ってみると、矢印で示されるようにマッピングできたのは、ゲノムのごく一部であることがわかった (図 1-6)。拡張ウイルスデータベースを用いて再度 virus-like seqs フラクションを解析すると、感染細胞から作成した RNA-seq データのみカリシウイルスが 35.8%, 17.9% 検出された (図 1-7)。改善の余地はあるが、NGS を用いてウイルス検出システムを構築することができるものと考えられた (図 1-8)。

4) 次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法で注意すべき点: 以上から、次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法に関して考慮しなければならない点が明らかになった。問題点として以下が挙げられた: ① NGS によるシーケンシングのサイズと品質 (図 1-9), ② 適切なデータ解析プログラムの選択表 1-2, ③ ウイルスゲノムデータベースの拡張, ④ 宿主細胞 RNA-seq に含まれるウイルス様配列 (tandem repeat, poly (A) などウイルス由来と判定される配列) をいかに除くか, ⑤ 内在性レトロウイルス由来 seqs を外来性レトロウイルスと判別, ⑥ 解析にかかる時間とコスト, ⑦ 検出感度, 検出限界, 他の検出法との比較。

5) 次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法のコストについて: ⑥ 解析にかかる時間とコストも実用化を睨んで重要な問題である。次世代シーケンス解析には、高額な機器が必要であり、実用化をにらんで価格面に関しての検討も必要になってくる。試薬のコストについてまとめたのが、表 1-3 である。

6) 細胞組織加工製品製造に使われる細胞のウイルス試験: 今回樹立したウイルス検出パイプラインを用いて、実際に細胞組織加工製品製造に使われる細胞のウイルス感染有無を判定できるかどうかについて調べた。ここではまずフィーダー細胞として使われる SNL76/7 細胞を取り上げた。この細胞にウイルス感染させて、それが検出できるかどうかを調べた。次世代シーケンサーによる解析の結果、今回は 5,000 万本以上の short reads が得られた (表 1-4) SNL 細胞は通常放射線照射やマイトマイシン処理をして使うので、 γ 線照射細胞についても実験を行った。得られたリードのうち 99% 近くがホストのシーケンスであった。またウイルス様シーケンスと判定されたシーケンスは全体の 0.0018~0.0041% を占めることがわかった (図 1-10)。ここで得られたごくわずかなウイルス様シーケンスをさらに詳細に調べると、非感染細胞では 88% が内在性レトロウイルスであると判定された (図 1-11)。またマウスパルボウイルス感染細胞では、パルボウイルスがウイルス様シーケンスと判定された 0.0041% のうち 76.2% がパルボウイルスシーケンスであると判定された。

1-2) iPS 細胞表面ウイルス受容体の網羅的解析

ヒト iPS 細胞由来の whole cell lysate を還元カルボキシメチル化, トリプシン消化した後、細胞数に換算して 1×10^5 個相当のタンパク質を LC/MS で

分析した (グラディエント条件: 5-65%B 溶媒, 720 分間). 約 50 分~600 分にかけて, 多数のピークが検出された(図 1-12A). 取得された MS/MS データを用いて, タンパク質同定を行った結果, 同定された総タンパク質数は 740 であった. 細胞内タンパク質, 核タンパク質, 及び膜タンパク質の割合は, 総タンパク質数に対して, それぞれ 20.0%, 19.4%, 及び 16.4% であり, 細胞内タンパク質の存在比率が最も高率であった(図 1-13A). タンパク質の機能に基づいて同定されたタンパク質を分類した結果, protein binding, RNA binding 及び catalytic activity に関連したタンパク質の順で, 存在比率が高かった(図 1-14A). 次に, 表 1-5 に示したリストを用いて, 同定されたタンパク質中のウイルス受容体関連タンパク質を探索した結果, claudin-6 (HCV), heat shock 70 kDa protein 1A/1B 等の存在が明らかとなった.

次に, 昨年度開発したビオチン標識化及び LC/MS を用いるレセプトーム解析技術により, ヒト iPS 細胞由来膜タンパク質の濃縮・精製を行った. 図 1-12B は, 濃縮・精製したヒト iPS 細胞由来膜タンパク質の LC/MS 分析 (グラディエント条件: 5-65%B 溶媒, 360 分間) により得られたベースピーククロマトグラムである. MS/MS データを用いたデータベース検索により, 631 種類のタンパク質が同定された. Whole cell lysate と比較して同定数は減少したが, 細胞内タンパク質, 核タンパク質, 及び膜タンパク質の割合は, 総タンパク質数に対して, それぞれ 19.1%, 16.3%, 及び 19.2% であり, 膜タンパク質の存在比率が最も高率となった(図 1-13B). タンパク質の機能に基づくタンパク質の分類では, protein binding, catalytic activity, 及び RNA binding に関連したタンパク質の順で存在比率が高く, whole cell lysate とは異なっていた(図 1-14B). また, ウイルス受容体関連タンパク質として, 40S ribosomal protein SA (Sindbis virus), CD81 antigen (HCV) 等 11 種類が同定された(表 1-6).

タンパク質とは異なるが, 表 1-5 のリストには, ウイルス受容体関連分子の一つとしてシアル酸が挙げられている. そこで, 以前に報告された手法により糖ペプチドを濃縮した後, LC/MS 分析によりシアロ糖鎖付加糖ペプチドの有無を確認した. 図 1-15A は濃縮した糖ペプチドのベースピーククロマトグラムである. 図 1-15B 及び 1-15C は, それぞれ, 糖鎖関連フラグメントイオンである m/z 366 及び m/z 657 の抽出イオンクロマトグラムである. 両クロマトグラムで同一時間にフラグメントイオンが検出された時間に, シアロ糖鎖結合糖ペプチドが溶出されている可能性が高い. 図 1-15D にはピーク A の位置で取得された MS/MS

スペクトルを示した. フラグメントイオン m/z 292, 及び 657 は, いずれもシアロ酸関連糖鎖フラグメントイオンであり, iPS 細胞の細胞表面には, シアロ糖鎖付加糖タンパク質が存在することが明らかとなった.

1-3) 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 HTLV-1 Env と Env 欠損 HIV-1 ベクターを発現させ, 細胞表面の HTLV-1 Env の発現を gp46 のモノクローナル抗体 (LAT27) でフローサイトメトリーを使用して確認した (図 1-16). また培養上清を遠心して cell-free のレトロウイルス粒子を回収し, 粒子内の Env の取り込みを Western blot により確認した (図 1-16). また HTLV-1 Env の 293T 細胞への発現により 293T 細胞に強い合胞体が形成され (図 1-17), HTLV-1 Env は強い細胞-細胞融合能を持つことが確認された.

HTLV-1 Env による cell-free と cell-cell の感染リスクを評価した. cell-free の感染系においてはレトロウイルス p24 抗原 10 ng あたりの luciferase 活性を測定することにより算定した. 対照としては cell-free に関しては HIV-1 Env と VSVG を使用した. cell-cell に関しては HIV-1 Env を対照として使用した. その結果 HTLV-1 Env は cell-cell の感染系では HIV-1 Env と同等ないしそれ以上の感染能を有していたが, cell-free の感染系ではレトロウイルス粒子あたりの感染性が HIV-1 Env や VSV-G と比較して 20 倍以上低いことが明らかとなった(図 1-18).

HTLV-1 の Env を有するレトロウイルス粒子が種々の温度においてどの程度安定であるか評価した. Luciferase 遺伝子を有する env 欠損 HIV-1 ベクターと HTLV-1 Env 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションして回収したレトロウイルス粒子を新鮮状態ですぐに感染, 凍結融解後にすぐに感染, 新鮮状態から 4°C, 25°C, 37°C で 24 時間放置した後感染させて luciferase 活性を測定した. 対照として同様の処理を行った HIV-1 Env または VSV-G を取り込んだレトロウイルス粒子を感染させて HTLV-1 Env と比較した. その結果, HTLV-1 Env を有するレトロウイルス粒子は, 24 時間放置によりどの温度においても HIV-1 Env や VSV-G と比較して感染性がほぼ完全に消失してしまうことが判明した (図 1-19). また, 新鮮状態で回収したウイルスに比較すると, 凍結融解のみでもその感染性は約半分以下に低下してしまうことも明らかとなり, HTLV-1 Env の cell-free の感

染性はどの温度においても不安定であることが判明した。さらに HTLV-1 Env の cell-free レトロウイルスの感染性の時間経過を解析したところ、感染性の半減期は約 19 分で、さらに約 4 時間でその感染性は完全に消失し、急速にその感染性が減衰していくことが明らかとなった (図 1-20)。

1-4) 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

HSV-1 は Vero 細胞, CMV は HFL-1 細胞に段階希釈したウイルスストックを接種し, CPE を指標にウイルス感染価を測定した。得られたウイルス感染価は以下の通り。

HSV-1 の感染価: 7.8×10^5 pfu/ml

CMV の感染価: 7.0×10^5 pfu/ml

iPS 細胞 (201B7 株) に感染価測定結果をもとに $\text{moi}=0.1$ で CMV を感染した。感染後 10 日目まで観察したが、細胞増殖への影響も認められず、細胞の形態変化も観察されなかった (図 1-21)。同様に、ウイルス mRNA (IE1, UL89) とウイルスタンパク質 (pp65, glycoprotein B) 発現も検出されなかった (図 1-22, 23)。一方, iPS 細胞 (201B7 株) に感染価測定結果をもとに $\text{moi}=0.1$ で HSV-1 を感染した場合は、感染後 3 日後には細胞増殖が著しく阻害され (図 1-24)、強い CPE により細胞は死滅した (図 1-25)。また、ウイルス mRNA 発現 (図 1-26)、ウイルスタンパク質発現 (図 1-27) も検出された。以上の結果より、iPS 細胞は HSV-1 には感受性があるが CMV に対する感受性は持たないことが示された。

1-5) 文献及びデータベースを用いたリスクアセスメント

1) ドナーに海外渡航歴がある場合に注意すべきウイルスについては、概要のリストを表 1-7 に示した。

2) ウイルス感染症のリスク因子分析結果は、表 1-8 にまとめた。CMV については、シクロスポリン内用薬を投与された患者において 10 代以下でリスクが低いという結果であったが、タクロリムス内用薬・タクロリムス注射薬・メトトレキサートにおいては 10 代以下でリスクが有意に高かった。必ずしも一般的ではないものの、特に 10 代以下では CMV に注意すべきと考えられる。なお、シクロスポリン注射薬では 60 代以上、タクロリムス注射薬では女性でリスクが高いものの、医薬品によっては逆の結果が出ており、いずれも一般的なリスク因子とは言えなかった。VZV (水痘・帯

状疱疹) については、タクロリムス内用薬において 60 代以上でリスクが低いものの、インフリキシマブ・トシリズマブにおいては 60 代以上でリスクが有意に高かった。その他、インフリキシマブ・抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリン (ATG) では女性、ATG・ミコフェノール酸モフェチルでは 10 代以下でリスクが高かった。HBV (B 型肝炎) に関しては、メトトレキサートにおいて 60 代以上でリスクが低いものの、リツキシマブ・タクロリムス内用薬・タクロリムス注射薬においては 60 代以上でリスクが有意に高かった。BKV については、シクロスポリン内用薬において 60 代以上でリスクが低いという結果であったが、タクロリムス注射薬・ミコフェノール酸モフェチルにおいては 60 代以上でリスクが有意に高かった。また、タクロリムス内用薬・ミコフェノール酸モフェチルにおいて女性で有意にリスクが低い、すなわち男性でリスクが高かった。EBV については、ATG・シクロスポリン内用薬・タクロリムス内用薬・タクロリムス注射薬・ミコフェノール酸モフェチルにおいて 10 代以下でリスクが有意に高く、逆の傾向を示す医薬品もなかったことから、かなり一般的なリスク因子であるといえた。FLU (インフルエンザ) については、トシリズマブにおいて 10 代以下でリスクが有意に高く、他の医薬品においても同様な傾向が認められた。その他、HCV (C 型肝炎) に関しては、タクロリムス注射薬において 60 代以上でリスクが有意に高いものの、一般的な結果とはいえなかった。AdV (アデノウイルス感染) と JCV については、とくに有意な結果は得られなかった。HSV (カポジ水痘様発疹) については、タクロリムス外用薬において 10 代以下でリスクが有意に高かった。HHV-6 (突発性発疹) については、アロプリノールにおいて 10 代以下でリスクが有意に高いものの、カルバマゼピンやラモトリギン同様免疫抑制剤ではないため、ウイルス感染症とは関連しない可能性もある。B19 (伝染性紅斑・赤芽球瘡) については、プレドニゾロン・カルバマゼピンにおいて 10 代以下、ミコフェノール酸モフェチルにおいて 60 代以上でリスクが高く、エポエチン α においては女性で有意にリスクが低い、すなわち男性でリスクが高いものの、いずれも一般的ではなかった。なお、各種のエリスロポエチン製剤やカルバマゼピンでは伝染性紅斑の報告がなく、免疫抑制剤でもないため、ウイルス感染症とは関連しない可能性が強い。

1-6) JADERデータベース解析ソフトウェアの開発とそれを用いたウイルス感染リスクの抽出

有害事象自発報告データは市販後の安全性を評価する上で最も重要な情報源の一つであることは間違いない。しかし、どれだけの医薬品が患者に使用されたかという"分母"が有害事象自発報告データからは分からないことが最大の欠点である。本研究では主に PMDA で採用されている ROR を軸に有害事象発生のパターンを解析することとした。ROR は関心のある医薬品 X と関心のある有害事象 Y について表 1-9 のような 2x2 クロス集計表を作成し、そのオッズ比を求めることで算出される。

$$ROR = \frac{a/b}{c/d} \quad \text{式 1}$$

そして、ROR の 95%信頼区間は次の式で求めることができる。

$$\begin{aligned} CI_{95\%} &= ROR \\ &\times \exp\left(\pm 1.96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}\right) \end{aligned} \quad \text{式 2}$$

データ解析を行うにあたり、データの統計情報、特性を知ることは非常に重要なことである。図 1-28 に JADER の統計情報を示した。図 1-28-1 は JADER に含まれる全ケースレポートの年齢の分布を示している。60 歳代、70 歳代の患者のケースレポートが非常に多い傾向があった。図 1-28-2, 3 に身長、体重の分布を示した。体重、BMI といった情報は、医薬品の有害事象を考察する上で有用な情報となりうるが、残念ながら JADER では身長、体重が不明なケースレポートが多く、身長、体重と有害事象の関連を調べるには不向きである。図 1-28-4 は性別の分布を示しており、こちらは男女比がおおよそ 1:1 で、欠損値も少ない。図 1-28-5 は報告の種類であり、JADER のケースレポートの多くは自発報告であり、一部臨床試験のケースレポートが含まれる。ここには示さないが、これら自発報告は医師からの報告が大半を占めていた。図 1-28-6 は JADER の報告数の推移を示しており、2004 年から微増の傾向にあり、2014 年現在では四半期に約 10,000 ケースレポートずつそのケースレポート数が増加していることが分かる。JADER に記載の被疑薬、併用薬としては、プレドニゾロン、ファモチジン等の低分子医薬品が大半を占め、バイオ医薬品はまだその記載数はそれほど多くはない。原疾患の分布は、高血圧、糖尿病といった原疾患が多いことに留意しなければならない。また、喫煙、飲酒等の生活習慣に関する記述がほとんど

ないことにも留意しなければならない。一方で、著名な有害事象自発報告データベースである、アメリカ食品医薬品局 (FDA) の有害事象自発報告 (FAERS) と比較すると、医薬品名、有害事象名の入力ミスが極端に少なく、目視の確認でも重複報告率が FAERS よりも少ない等、データの質が高いことが特徴である。その他、図 1-29 でサイトメガロウイルス感染リスクが他のバイオ医薬品と比較して高い可能性が示唆された。

バイオ医薬品とウイルス感染症: 図 1-30 にバイオ医薬品を被疑薬とするウイルス感染症に関する有害事象のヒートマップを示す。ヒートマップ上でのデータは、有害事象と各医薬品の ROR 値を以下で示す z 値 (多機関共同検定等の外れ値の検出等にも用いられる) で正規化し、各有害事象で、どの医薬品に注目すべきかを可視化した。

$$z = \frac{x - \mu}{SE} \quad \text{式 3}$$

ここで、SE は標準誤差、 μ は平均を示す。

RS ウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス等の有害事象を考えると、注意すべきバイオ医薬品が赤で表示されている。RS ウイルスでは、抗 RS ウイルスヒト化モノクローナル製剤であるパリビズマブが赤で表示されているが、パリビズマブにより RS ウイルス感染が起こったというよりは、RS ウイルス感染にパリビズマブが使用されていると考えるのが妥当である。ポリオーマウイルス、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス感染では、免疫抑制剤のバシリキシマブが赤で表示されており、他のバイオ医薬品と比較して ROR 値が高いことが分かる。同様に、ヘルペスウイルスではセルトリズマブ ペゴル、ウイルス感染その他ではバシリキシマブ、インフルエンザ感染ではアバタセプト、肝炎ウイルス感染ではリツキシマブ、パルボウイルス感染ではウステクニマブが他の薬剤と比較して ROR 値が高いことが分かる。上部のデンドログラムは、最遠隣法による階層的クラスタリングの結果を示している。パリビズマブは他のバイオ医薬品とウイルス感染関連の有害事象の ROR 値のパターンが大きく異なっている。サイトカインである TNF- α 、IL-6 の阻害薬であるゴリムマブ、アダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト、トシリズマブはその ROR 値のパターンが似ていることが分かる。抗 TNF- α 抗体であるセルトリズマブ ペゴルは、他の抗 TNF- α 抗体と比較して異なるパターンを示している。しかし、セルトリズマブ ペゴルの有害事象報告数はまだ少数 (ケースレポート数 157) であるため、今後も注意して観察を続けることが必要であると思われる。ウステ

キヌマブもセルトリズマブ ペゴルと同様に有害事象報告数（ケースレポート数 158）がまだ少ないものの、IL-12, IL-23 を標的とするウステキマブは、パルボウイルス感染の ROR 値が高く、他のバイオ医薬品とまったく異なるパターンを示していた。

図 1-31 は、図 1-30 が有害事象方向に各バイオ医薬品の ROR 値を z 値で正規化したのに対し、医薬品方向に各有害事象の ROR 値を z 値で正規化し、各医薬品で、どの有害事象に着目すべきか可視化したものである。ウイルス感染の重篤度も考慮すべきであるが、単純に ROR 値で考えると多くのバイオ医薬品でヘルペスウイルスの ROR 値が高い傾向にあることが分かる。

バイオ医薬品とウイルス感染症のリスク因子の推定： 医薬品と副作用の発現にはリスク因子が存在する可能性がある。リスク因子の推定は決定木を用いて行った。決定木の作成には CART (Classification And Regression Trees) を使い、分岐点の計算には以下のジニ係数 (GI; 分布の不純度の尺度) を用いた。

$$GI = 1 - \sum_{i=1}^c [p(i|t)]^2 \quad \text{式 4}$$

ここで、 t はノード、 i はクラス、 p は分割されたケースレポートがクラスに属する比率である。この GI が 0 に近づくようにケースレポートを分類した。図 1-31 は、図 1-29 でサイトメガロウイルス感染リスクについて高い可能性が示唆された、バシリキシマブ使用時のサイトメガロウイルス感染のリスク因子に関する決定木分析例である。2014年12月時点での JADER 中のバシリキシマブが被疑薬となっているレポート 596 件に対し、最も多い有害事象はウイルス感染症である。その中でもサイトメガロウイルス感染に関する報告は最も多く、バシリキシマブの有害事象報告数の約 45%、267 件がサイトメガロウイルス感染に関する報告である。バシリキシマブとサイトメガロウイルス感染の ROR 値は 81.6, ROR 値の 95%信頼区間の下限值は 68.3 であった。決定木の根から葉に向かって図 1-32 を観察すると、ガンシクロビルが併用されているとサイトメガロウイルス感染のリスクが高いと判断されている。ガンシクロビルは、言うまでもなくサイトメガロウイルス感染の治療薬であり、サイトメガロウイルス感染のリスク因子というよりは、サイトメガロウイルス感染後にガンシクロビルが投与されたと考えるのが妥当であると考えられる。機序不明ではあるが、スルファメトキサゾール・トリメトプリム併用 42 例中 25 例（約 60%）とサイトメガロウイルス感染の割

合が高くなっている。スルファメトキサゾール・トリメトプリムの併用によってサイトメガロウイルス感染率が高まるか、本剤を使用している患者が他の感染症にすでに罹患していて、サイトメガロウイルス感染のリスクが高かった可能性が考えられる。免疫抑制剤であるミコフェノール酸モフェチルとの併用では、34 症例中 23 症例でサイトメガロウイルス感染が認められ、免疫抑制剤であるバシリキシマブとミコフェノール酸モフェチルを併用することで、サイトメガロウイルス感染のリスクが高まる可能性があることが分かる。

ロジスティック回帰分析による医薬品と有害事象の関係のモデル化： 図 1-32 で、バシリキシマブ投与によるサイトメガロウイルス感染のリスク因子と推定された、併用薬：ミコフェノール酸モフェチル、原疾患：糖尿病についてロジスティック回帰分析でさらに詳細な考察を行った（ケースレポート数、320106）。医薬品と有害事象の関係は以下のようにモデル化した。

$$\text{logit}(y) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \quad \text{式 5}$$

ここで、 y は注目する有害事象の時に 1、それ以外の際に 0 を取る応答変数。 $x_{1,3,\dots,n}$ は注目する医薬品、事象の時に 1、それ以外の際に 0 を取る説明変数、 $\beta_{1,2,\dots,n}$ はモデルのパラメーターとした。

ミコフェノール酸モフェチル併用時は、

$$\text{logit}(y_{\text{CMV}}) = -5.27697 + 1.63176x_{\text{Basiliximab}} + 3.25054x_{\text{Mycophenolate mofetil}}$$

となり、 $\beta_{\text{Basiliximab}}, \beta_{\text{Mycophenolate mofetil}}$ は共に有意に 0 より大きかった (95% Wald 信頼区間が 0 を含まない確率 $2e-16$ 以下)。ミコフェノール酸モフェチル、バシリキシマブは共に免疫抑制剤であり、併用時はサイトメガロウイルス感染のリスクが高まることを示しており、バシリキシマブ（推定オッズ比 $\exp(1.63176) = 5.1$ ）よりもミコフェノール酸モフェチル（推定オッズ比 $\exp(3.25054) = 25.8$ ）によるサイトメガロウイルス感染のリスクが大きいと推定された。

糖尿病を原疾患に持つ場合、

$$\text{logit}(y_{\text{CMV}}) = -5.08885 + 4.56326x_{\text{Basiliximab}} - 0.29009x_{\text{Diabetes}}$$

となり、 $\beta_{\text{Basiliximab}}$ は有意に 0 より大きかった (95% Wald 信頼区間が 0 を含まない確率 $2e-16$ 以下)。一方で、 β_{Diabetes} はわずかではあるが有意に 0 より小さかった (推定オッズ比 $\exp(-0.29009) = 0.75$)。これは、図 1-32 で糖尿病がバシリキシマブによるサイトメガロウイルス感染のリスク因子であるとする推定と矛盾する。式 5 が、糖尿病を原疾患とする患者における、バシリキシマブ使用によるサイトメガロウイルス感染を十分にモデル

化できていない可能性が考えられたため、原疾患：糖尿病とバシリキシマブ投与が何らかの相互的な作用を起こしている可能性を考えて次の考察を行った。

ロジスティック回帰分析医薬品相互作用の検討：医薬品と有害事象の関係を医薬品と医薬品、医薬品と疾患等の相互作用を想定したモデルでさらに詳細に解析した。

$\text{logit}(y)$

式5同様、 y は注目する有害事象の時に1、それ以外のときに0を取る応答変数。 $x_{1,3,\dots,n}$ は注目する医薬品、事象の時に1、それ以外の時に0を取る説明変数、 $\beta_{1,2,\dots,n}$ はモデルのパラメーターとした。 $\beta_{12}x_1x_2$ 項は相互作用項である。

ミコフェノール酸モフェチル併用時は、

$$\begin{aligned} \text{logit}(y_{CMV}) &= -5.29939 + 4.33798x_{\text{Basiliximab}} \\ &+ 3.39607x_{\text{Mycophenolate mofetil}} \\ &- 2.93630x_{\text{Baxililimab}}x_{\text{Mycophenolate mofetil}} \end{aligned}$$

となり、 $\beta_{\text{Baxililimab} \times \text{Mycophenolate mofetil}}$ は-2.93530 (<0) となり、バシリキシマブとミコフェノール酸モフェチルの相互作用は観察されなかった。一方、糖尿病を原疾患に持つ場合、

$$\begin{aligned} \text{logit}(y_{CMV}) &= -5.07909 + 4.50097x_{\text{Basiliximab}} \\ &- 0.47945x_{\text{Diabetes}} \\ &+ 1.10410x_{\text{Baxililimab}}x_{\text{Diabetes}} \end{aligned}$$

となり、 $\beta_{\text{Baxililimab} \times \text{Diabetes}}$ は1.10410と有意に0より大きかった(95% Wald 信頼区間が0を含まない確率 8.14e-06)で、バシリキシマブと原疾患：糖尿病の相互作用の推定オッズ比は $\exp(1.10410) = 3.02$ となった。糖尿病を原疾患に持つ患者では、式5よりも、相互作用を考慮した式6のモデルの方がデータをうまく説明できる。バシリキシマブにおけるサイトメガロウイルス感染に、糖尿病の治療に使用している医薬品がリスク因子となっている可能性も否定できないが、ロジスティック回帰でも糖尿病がバシリキシマブにおけるサイトメガロウイルス感染のリスク因子の一つである可能性が示唆された。

(C-2)ウシ等由来原料の基準に関する研究

従来欧州で用いられてきた GBR 評価は対象国より提供されたデータを基に、ほとんど可能性の無いカテゴリー I から高いレベルで確認されているレベルIVまでの4段階に分類している。一方、OIEにおけるリスク評価では、無視できる BSE リスク、管理された BSE リスクおよび不明な BSE リスクの3段階に分類されている。GBR 評価と

OIE 基準の調査項目に大きな乖離は無く、移行による精度変動は無いものと思われる。また、GBR 評価では、カテゴリーIIIに分類された国での BSE 発症例、アクティブサーベイランスでの BSE 症例が報告されており GBR 評価手法の妥当性が確認されている。このことから、OIE 基準により BSE リスク不明となった国々においても、GBR 評価等を参考に規定された平成15年5月20日厚生労働省告示第210号・生物由来原料基準において原材料原産国として認められていた国に関しても無視できるリスクに留まると推定される。

非定型 BSE については、頻度は低いものの症例の報告がなされており、本邦においても L-BSE 例が報告されている。発生が最も多くみられているフランスでも、30か月齢以上の牛100万頭当たり、H-BSE は、0.41 頭、L-BSE は0.35 頭と非常にまれである。また、発症例は日本の23か月齢のウシを除き6.3歳から18歳と高齢のウシで報告されており、従来の定型 BSE に対する規制により非定型 BSE のリスクも無視できるレベルまで低減できると考えられる。

c-BSE 由来プリオンを原因とするヒト非定型 CJD では、患者脳組織でのプリオン沈着はプラーク型を主とする特徴的な所見を示す。サルへの C-BSE 感染実験においても同様の所見を呈し、サルはヒト感染性プリオン病の動物モデルとして有用なことが示されている。L-BSE 由来プリオンのヒトへの伝播は確認されていないが、サルへの感染性を示すことから、ヒトへの感染の可能性が示唆されている。L-BSE 感染サル脳組織を病理学的に検索した結果、C-BSE 感染サルや vCJD 患者とは異なり、プリオンはシナプスタイプのパターンを示し空胞変性が高度であった。これは、およそ100万人に一人程度の発症が認められる孤発性 CJD の組織像と類似しており、臨床症状も似ていた(図2-1)。免疫組織化学的手法を用いた L-BSE 特異的な染色法は見いだせなかったが、染色前処理に NaOH および PK を用いることでシグナルの向上が図れることを明らかにした(図2-2)。また、L-BSE 由来プリオンのヒトへの感染性および宿主側プリオンタンパク質遺伝子多形の感染性への影響を検討するため、プリオン感受性ヒト細胞株からプリオンタンパク質遺伝子欠損株の作成を試みた。CRISPR/Cas9 の系および細胞の限界希釈法を用いプリオンタンパク質遺伝子欠損株を樹立した。この細胞株に再度プリオン遺伝子発現発現プラスミドを導入し、細胞表面へのプリオンタンパク質発現を確認できた(図2-3)。今後、プリオンタンパク質遺伝子欠損株に各種遺伝子多形を有した発

現プラスミド導入により、L-BSE 由来プリオンのヒト細胞への感染性並びに遺伝子多形の影響について検討する。

(C-3)プリオン安全性評価

3-1) WB 法を用いたウイルス除去膜（平均孔径 15nm）による vCJD 除去評価

mo-vCJD を用いてアンチトロンビン製剤の製造工程に導入されている平均孔径 15nm のウイルス除去膜工程における除去能力を評価したところ、mo-vCJD (PrP^{res}) はこれまでに実施した 263K と同様に検出限界以下にまで除去される事を確認できた (表 3-1, 図 3-2)。mo-vCJD 感染マウス sMF の希釈サンプルを RK13mo1 細胞に接種し、1 週間ごとに細胞を回収して PrP^{res} の検出を試みた。sMF を感染させた典型例では 3 週目に初めて PrP^{res} が検出されたが、安定した結果は得られなかった (図 3-3)。また、感染効率を上げるために磁気ビーズを用いて検討したが、検出効率の増強には至らなかった。Cell based infectivity assay の確立には実験条件の更なる最適化検討が必要である。

3-2) 異常型プリオンの in vivo 検出系の評価

WB 法解析により、ろ過直前液を接種したマウスの脳において、 10^4 接種群まで PrP^{res} が検出されたが、 10^5 接種群で検出されなかった (表 3-4)。更に、病理学的評価においても、空砲変性及び異常型プリオン蛋白の蓄積が 10^4 接種群まで確認されたが、 10^5 接種群においては確認されなかった。WB 解析の結果から感染価を Karber 法で算出したところ、5.2 Log ID₅₀/ml であった。

ろ過液を接種したマウスにおいては、原液接種群を含む全ての接種群において、WB 法および病理学的評価ともに、異常型プリオンの存在および脳組織変性所見は確認されなかった (図 3-5・表 3-4)。また、超遠心上清および超遠心沈殿を接種した群においても、同様に異常型プリオンの存在および脳組織変性所見は確認されなかった。WB 解析の結果から感染価を Karber 法で算出したところ、 <1.0 Log ID₅₀/ml であった。

以上の結果から、ろ過直前液の感染価は 5.2 Log, ろ過液の感染価は <1.0 Log であった。本工程における LRV は ≥ 4.2 と算出された。また、ろ過液を 100 倍濃縮した検体も感染性が認められず、LRV を単純に算出すると ≥ 6.2 であった。このことから、平均孔径 15nm のウイルス除去膜は効果的に mo-vCJD を除去することが示された (表 3-3)。

3-3)異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究

1. 抗pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPモノクローナル抗体の比較

先に樹立したハイブリドーマ3株から腹水を調製後、プロテインAカラムでIgG画分を精製し、pS43を特異的に認識する抗体pSP240, pSP279及びpSP289を得た。抗体のアイソタイプは、3株ともIgG (κ , $\gamma 2b$)だった。リン酸化プリオンペプチド [pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA]又はプリオンペプチド[hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA]を固相抗原としたELISAで、抗体の特異性を調べた結果、pSP279の抗体価の比率(リン酸化プリオンペプチドの抗体価/プリオンペプチドの抗体価)が最も高かったことから、以降の実験にはpSP279を用いた。

昨年度までの研究で、抗リン酸化プリオン抗体は、PrP^{Sc}感染脳及びマウス対照脳で二量体のPrPを認識するが、単量体には反応性を示さなかった。pSP279抗体は、ELISAでは固相抗原のリン酸化プリオンペプチドとプリオンペプチドを見分けたことから、43残基のリン酸化セリン周辺の配列を特異的に認識はしていると推定した。一般に、リン酸化チロシンやリン酸化セリン残基を認識する抗体に対するイムノブロット法では、用いる緩衝液系やブロッキング蛋白質の違いが、抗体の反応性に著しく影響する。これらの知見を踏まえて、緩衝液系をPBSからTBSに変更し、抗体の反応系をすべて哺乳動物由来蛋白質を含まない抗リン酸化蛋白質用ブロッキング試薬を用いた。ウサギ抗ヒトPrPポリクローナル抗体を用いたイムノブロット法では(Fig. 3-6A and C)は、対照脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(lane 3)ともに、二量体及び単量体のPrP^{Sc}に相当するバンドを示した。脳乳液をPK処理すると、対照脳ではバンドが消失するが(lane 2)、PrP^{Sc}感染脳ではPrPのN端側が消化されたPK処理耐性のPrP^{Sc}が低分子側にバンドを示した(lane 3)。一方、抗pS43-hPrP (39-50)を認識するマウスモノクローナル抗体pSP279のイムノブロット法(Fig. 3-6B and C)では、対照脳の糖鎖の無い単量体と、2量体PrPに相当するバンドを認識した(lane 1)。PrPのN端側が消化されるPK処理では、対照脳及びPrP^{Sc}感染脳ともにPrPのバンドは消失した(lanes 2 and 4)。Panel AとPanel Bを重ねると、pSP279が認識したバンドはPrP (FL253)が認識した糖鎖が無いPrPのバンドと重なり、同じ分子量を示した(Panel C)。ウサギ抗PrPポリクローナル抗体はPrP (FL-253)は、ウサギ脳乳液のPK処理でバンドを検出したが、PK未処理のバンドを含めて、反応性は

弱かった。ヒト膠芽腫細胞株T98Gの総細胞抽出液を用いたイムノブロット法で、PrP (FL-253) 抗体はFig. 3-6のマウスと同じ50 µg/laneで糖鎖2本、1本、0本のバンドを示しており(Fig. 3-7)、ヒトPrP全長の蛋白質を免疫原としていることから、マウスPrPに対しては若干反応性が弱かったと推定している。

対照脳とPrP^{Sc}感染脳を比較すると、その蛍光強度は対照脳がPrP^{Sc}感染脳より強く、β-actinの化学発光強度(Fig. 3-6D)でPrPの蛍光強度(Fig. 3-6B)を正規化すると、PrPの蛍光強度は1.5倍程度の値を示した(Table 3-5)。

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

異常プリオン (PrP^{Sc}) のクリアランス工程としてはナノフィルトレーションやカラムクロマトグラフィック工程が挙げられる。特にクリアランス能の高い工程としてナノフィルトレーションによる評価が行われている。これまで代表的なナノフィルトレーションでのクリアランス能についてまとめられた表 3-6 の結果を見ると、スパイクしたPrP^{Sc} 検体により結果が大きく異なることがわかる。初期の検討では脳乳剤や超音波処理したマイクロソーム分画を用いた場合にはかなり口径の大きいフィルターを用いても4-5logの低減率が得られている。しかし、スパイクするPrP^{Sc}を界面活性剤の添加等により粒子を小さくするような調製法を適用すると、そのクリアランス能は低下し、粒子の大きい調製法を適用した検体を用いると20nm以下の口径を用いた場合には口液中に感染性が検出されなかったにも関わらず、粒子が細くなる調製法では10nmの口径のナノフィルトレーションでも口液中に感染性が検出される。このような結果は、当初のPrP^{Sc}の調製法で得られていたクリアランス能では必ずしも生体由来のPrP^{Sc}の除去能を反映していない可能性を示唆している。

上記のクリアランス評価においてスパイクしたPrP^{Sc}は超音波処理したマイクロソーム分画であったり、あるいは界面活性剤を添加して粒子を小さくした検体であったりした。一方血中に存在するPrP^{Sc}がどのような形態をしているか未だ明らかにはされていないが、このような脳膜分画を物理的ないしは化学処理によって微粒子化したものが適切なスパイク検体とはいえないかもしれないとされている。このような考え方から、このような物理的処理や化学処理した感染動物の脳膜分画の通常より高速の超遠心の上清(スーパー超遠心

上清)を用いて粒子をより微小化したPrP^{Sc}検体をナノフィルトレーションでの工程にスパイクし、クリアランスがどのように変化するかが検討されている。表 3-7 に示すように、通常の膜分画では15nmや20nmのナノフィルトレーションにより4-5LRFが得られるが、「スーパー超遠心の上清」を用いた場合には2前後のLRFしかえられず、しかも口液中に感染性が検出されることが示された。この結果は、「スーパー超遠心の上清」には非常に微小な粒子のみPrP^{Sc}が分画されたためにトラップ効率が低下したものと考えられる。

この微小化されたPrP^{Sc}分画を用いることにより血中での動態が評価できるのではないかという発想から、この分画を種々の血液検体にスパイクし、PrP^{Sc}の除去に有効とされる除白血球フィルターの評価を実施している。その結果、この分画が除白血球フィルターPrP^{Sc}の除去能の評価に有用である結果が得られている(図 3-7)。表 3-6 及び表 3-7 の結果は、ナノフィルトレーションによるPrP^{Sc}の除去能を評価する場合にはスパイクするPrP^{Sc}の形状や粒子径がその評価を過剰に推定することにつながることを示唆している。一方、これらの工程でのPrP^{Sc}除去の評価では複数のPrP^{Sc}の定量法が用いられている。このPrP^{Sc}のアッセイ法の特徴とその課題を表 3-8 にまとめてみた。PrP^{Sc}の感染性を最も高感度に測定できるのは脳内接種により異常プリオンの発症を評価するin vivo法である。定量評価においては限界希釈法により感染性が検出できなくなる希釈率からタイターを評価できるが、判定に半年以上の期間を要し、正確に定量するには多くの動物を必要するために代替となる方法が望まれている。in vivo法の代替法として、いくつかの方法が実施されている(表 3-8)。ウエスタンブロット法は簡便であるが感度が低く、エンドポイント法で定量する場合にも測定可能範囲が小さい。PMCA法や同様の試験管内でのPrP^CからPrP^{Sc}への変換(コンバージョン)を引き起こすことにより検出する手法が開発されているが、検体ごとに反応条件を最適化する必要があり、また用いるプリオンタンパク質に種の壁があるとされてきている。非常に反応性の高い高いプリオンタンパク質の探索が行われてきており、ヒツジの遺伝子型として171番目のアミノ酸がグルタミン酸(Q171)のプリオンタンパク質を用いてPMCA法を行うと種々の異常プリオンの検出が可能との報告がある。しかし、別の報告ではQ171プリオンタンパク質であってもPMCAでの反応性が良くない遺伝子型も知られており、必ずしも十分なデータが得られているわけではない。さらに英国で患者から摘出された扁桃腺の異常プリオ

ンの検出をウェスタンブロッティングで検出した結果や BSE 感染牛の唾液中での異常プリオンを PMCA 法で解析した結果は in vivo 法と必ずしも一致していない。この結果は、PMCA 法が in vivo 法よりも感度が高いことを示しているとも考えられるが、逆に PMCA 法で検出された異常プリオンは試験管内でおきた artifact を含む可能性と考えることもできる。上記の様な異常プリオン検出の迅速法の欠点を改良する目的で、プリオンタンパク質高産生株を用いる in vitro 細胞培養法が開発されている。神経/脳由来細胞株や初代細胞株を用いた開発が先行していたが、非神経系細胞を用いた開発も行われている(表 3-9)。in vitro 培養細胞を用いた感染系は比較的短時間に異常プリオンのコンバージョンが見られ、その検出にはエリスポット法などが用いられている。また、検出のみならず、in vitro 培養細胞で増幅されてきた異常プリオンを用いて工程評価に用いることが検討されている。この細胞培養で得られた異常プリオンは、脳ミクロソーム分画よりもより自然発症した形態を保持していると想定され、今後その濃縮法や調製法が開発されてくることが期待されている。

(C-4) 細胞組織加工製品における無菌試験法、マイコプラズマ否定試験法及びエンドトキシン試験法

4-1) 核酸増幅法 (NAT) を用いたマイコプラズマの迅速検査法

1) MycoTOOL PCR を用いたマイコプラズマ検出の Vero 細胞での再現性： MycoTOOL はバイオ医薬品の製造に繁用されている CHO 細胞を用いてバリデーションされたマイコプラズマ汚染検出キットである。そこで予備検討として、Vero 細胞でも CHO 細胞と同様の条件でマイコプラズマの検出が可能か検討した。MycoTOOL の推奨する細胞濃度である 5×10^6 cells/mL の Vero 細胞懸濁液、及びその 1/5 (1×10^6 cells/mL), 1/10 (5×10^5 cells/mL) の細胞濃度の Vero 細胞懸濁液を調製し、*M. hyorhinis* をスパイクして検討した (Fig.4-1)。その結果、*M. hyorhinis* を 100 CFU/mL の濃度でスパイクした場合はすべての細胞濃度で 4 反応中 4 回の陽性反応が得られた。しかし、マイコプラズマのスパイク量が 10 CFU/mL の場合、細胞濃度が 5×10^6 cells/mL ではシグナルを 4 回中 2 回測定できず、細胞濃度を 1/5 に減らすと 4 反応全て検出された。MycoTOOL 推奨の細胞濃度(総細胞数)では検出感度が劣り、細胞数を減らす必要があるという事は昨年度報告したヒト MSC 細胞でも確認

されており、CHO 細胞以外の細胞を対象にマイコプラズマ汚染を検出する場合、対象細胞を用いて、予め十分な検出感度が得られる最適条件を検討することが必要と考えられる。

2) 検体量が少ない場合のマイコプラズマの検出感度： 再生医療では、治療の目的に応じて使用する細胞の種類は多様であり、また、オーダーメイドで作成されることが多いため培養規模が小さく、充分量の検体を試験に用いることが困難な場合もある。マイコプラズマの検出に用いることが可能な EP のバリデーションに適合するマイコプラズマ検出キットは複数市販されているが、推奨検体量は各キットにより異なっている (Table 4-2)。例えば、MycoTOOL の標準検体量は、細胞懸濁液を検体とする場合は 1 mL (0.9 mL を使用) であるが、MycoSEQ では従来の培養法と同じ 10 mL の使用が推奨されている。細胞組織加工製品の最終製品は培養規模が小さいものも多く、マイコプラズマ否定試験の推奨検体量に満たない可能性もある。英国薬局方 (BP) では、細胞治療製品に無菌試験を適用する際の総製品量と検体採取量に関する考え方として、細胞懸濁液が 10 mL を超える十分な量がある場合には総量の 1%、1 mL 以上 10 mL 未満の場合には 0.1 mL、総量が 1 mL 未満の場合には適用しないとの考え方が示されている。しかし、マイコプラズマ NAT では適切な検体量が確保できれば適用しないという考え方は必ずしも適切ではないと考えられる。そこで被検液が 0.1 mL しか得られない場合でも NAT によるマイコプラズマ否定試験が実施可能かどうかについて検討した。

Vero 細胞懸濁液 0.1 mL (5×10^5 cells) に 10 CFU/mL となるようにマイコプラズマ標準株 7 種をそれぞれスパイクした試料について、MycoTOOL PCR と MycoSEQ の 2 製品を用いてマイコプラズマの検出を検討した。その結果、MycoTOOL PCR では *A. laidlawii*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. salivarium* の 4 菌種についてはこの試験条件でも 100% の検出感度が得られたが、残りの 3 菌種については検出できない場合が認められた。また、MycoSEQ を用いた場合、今回の測定条件ではどの菌種も 100% の検出はできず、3 菌種は全く検出されなかった。両キットともに推奨検体量での検出限界は 10 CFU/mL 以下と公表されているが、検体量の低下により検出感度の低下が確認された (Table 4-3)。

3) 培養上清を検体とする場合： マイコプラズマは細胞に付着して増殖するものが多く、基本的に、細胞のマイコプラズマ汚染は細胞懸濁液を検体とすることが求められる。しかし、細胞組織加工製品の最終製品には、培養角膜炎シートのように