

細胞シートの完全性が要求されるものや、培養軟骨製品のように医療材料に包埋して投与する場合もあり、最終製品に NAT の適用は困難な場合もある。このような場合には細胞懸濁液ではなく培養上清を検体とすることも想定される。そこで、マイコプラズマ汚染細胞では、培養上清と細胞画分にどのような比率でマイコプラズマが分布するのかを検討した。

*M. hyorhinis* 感染 Vero 細胞株を作製し、コンフルエントの時点で培養上清と細胞画分それぞれに含まれるマイコプラズマを測定したところ、上清中のマイコプラズマは細胞を汚染するマイコプラズマの 5%未満であり、マイコプラズマの大部分は細胞画分に存在することが明らかになった (Fig. 4-2)。培養細胞を汚染するマイコプラズマが 10~100 CFU/mL 程度の場合でも上清中のマイコプラズマの比率が同程度と仮定すると、培養上清中のマイコプラズマの濃度は 0.5~5 CFU/mL 以下と想定される。この場合、細胞懸濁液を測定すれば NAT の検出限界以上となり検出可能だが、上清のみを測定した場合には検出は困難と予想される。しかし、培養上清中のマイコプラズマ含有量は低濃度でも容量はある程度得られるのであれば、total のマイコプラズマ量は検出限界以上となる可能性がある。そこで、上清中のマイコプラズマを濃縮して測定する方法を検討した。

10 CFU/mL あるいは 1 CFU/mL の *M. hyorhinis* をスパイクした Vero 培養上清 10mL、50 mL について、16,000×g で 30 分遠心したペレット、または培養上清に Vero 細胞  $5 \times 10^4$  個を添加後、16,000×g で 30 分遠心処理を行い得られたペレットから抽出したものを、未処理の上清及び細胞懸濁液 1ml から抽出した場合と比較した (Table 4-4)。その結果、10CFU/mL の場合、細胞懸濁液では 100%の検出感度が得られたが、培養上清 1mL では十分な検出感度が得られず、10mL からの遠心濃縮でも感度は上がらなかった。50mL から遠心濃縮した場合は 100%の頻度で検出できるようになった。また、上清に Vero 細胞を添加後に遠心した場合は、10mLからの濃縮でも 100%検出された。遠心操作によりマイコプラズマ全量が回収できれば 10mL の遠心でも 10 倍濃縮となり 100%の頻度で検出できることを期待したが、今回の条件はマイコプラズマがごく低濃度で菌体量が少ないため、遠心のみでは上清を除去して pellet にする過程で菌体のロスが起こり十分な回収ができなかったものと推測される。一方、細胞を添加した場合は細胞ペレットと共にマイコプラズマが沈殿するため、十分な濃縮が可能になったと思われる。今回は Vero 細胞を共沈剤として使用したが、細胞に限ら

ず、菌体を共沈させるものを添加して菌体の回収率を上げることで十分な濃縮が可能と考えられる。

4) Vero 細胞を用いたマイコプラズマの増幅：マイコプラズマ否定試験 17 局改正案には、Vero 細胞を用いてマイコプラズマを増幅後に NAT で検出する方法も示されている。培養上清中のマイコプラズマは高濃度であれば直接測定可能だが、低濃度の場合、前述の遠心法などを利用して濃縮後に測定する方法の他に、Vero 細胞で増幅することにより高感度に検出する方法もある。また、検体量が少ないため感度が得られない場合でも、Vero 細胞で増幅すれば感度を上げられる可能性がある。そこで、Vero 細胞を用いたマイコプラズマの増幅について検討した。Vero 細胞に 10 CFU/mL となるように *M. hyorhinis* をスパイク後、経時的に dish1 の全細胞 (培養上清を含む)、dish2 の培養上清、及び dish2 の上清を除去した細胞画分に分けてマイコプラズマを定量した。その結果、Vero 細胞を含まない MEM 培地に *M. hyorhinis* をスパイクしても増幅しないが、Vero 細胞に接種した場合、Vero 細胞の増殖に伴って *M. hyorhinis* が増幅し、10CFU/mL が 3 日で  $10^6$  CFU/mL、6 日で  $10^9$  CFU/mL まで急激な増幅が認められた (Fig. 4-3)。この結果から、試験に数日かかるが、検体として低濃度の上清しか得られないような場合でも Vero 細胞で増幅後に測定することにより高感度に検出できる可能性が示唆された。ただし、データは示さないが、最初にスパイクするマイコプラズマを 1CFU/mL とした場合、低濃度のため必ずしも全ての well でマイコプラズマが増殖するわけではないことも経験している。なお、細胞画分と上清中のマイコプラズマを比較したところ、やはりマイコプラズマはほとんどの時点で細胞ペレット中に回収され、培養上清中のマイコプラズマはほとんどの時点で全マイコプラズマの 10%以下であった。

#### 4-2) 無菌試験法

前年度の研究で、細胞組織加工製品など細胞組織加工製品は製造から 2 日以内に出荷すること、ロットを構成せずに最終調製品の容量が少ないこと、多くの製品は製品を均一にして試験に供するのが難しいことから、従来の無菌試験法の適用が困難な現状と、アイソレーター等の高度無菌操作技術で細胞培養から製剤化までの工程を管理していることから、無菌試験法として試料の培養を前提とした微生物迅速法を適用が望まれることを報告した。適用が予想される微生物迅速法としては、第十六改正日本薬局方参考情報に記載されている

蛍光染色による細菌数の迅速測定法を細胞組織加工製品の間工程と、最終調製品の出荷判定に無菌試験法として実施することが、現時点で最も合目的と考えられる。次善の方法としては、無菌試験法に適用するバリデーションを行った上で、原理と用いるプライマーの一部が参考情報の遺伝子解析による微生物の迅速同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に記載されている PCR 法を利用した迅速測定法の実施が考えられる。

平成26年6月1日に公表された第十七改正日本薬局方収載原案で、参考情報の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について、パブリックコメントが6月30日まで募集された。マイコプラズマ参照品を用いたバリデーションに適合すれば、培養法や DNA 染色法の代替法として PCR 法を使用可能としている。PCR 法によるマイコプラズマ否定試験は、細胞組織加工製品の最終出荷判定試験への適用が予想されることから、バリデーションに用いるマイコプラズマ参照品を調製した。

バリデーション用マイコプラズマ参照品の CFU とゲノムコピー (GC) 数の測定結果を Table 4-5 に示した。GC/CFU 比を求めたところ、*A. laidlawii* NBRC 14400 は比較的高い値 85.09 を、その他のマイコプラズマ参照品は3から53を示した。これらの値は、ATCC のマイコプラズマ参照品パネルと同程度に低い GC/CFU 比で、調製した参照品は比較的高い生存率・分散性を示すことが確認された。

メーカーによるバリデーション結果が公表されている MycoTOOL PCR を用いて、バリデーション用マイコプラズマの検出を行った。マイコプラズマ参照品として *M. fermentans* NBRC 14854 を測定した結果を Fig. 4-4 に示した。陽性対象のプラスミド (PC-10 copy) はバンドを検出したが、CHO-DG44 由来の非特異的バンドは検出されず、試料の抽出・検出操作には問題がなかった。*M. fermentans* NBRC 14854 参照品をスパイクした 100CFU/mL と 10CFU/mL では4レーンすべてに、1CFU/mL でも2レーンでバンドを確認した。マイコプラズマ参照品7菌種を MycoTOOL で測定した結果を Table 4-6 に示した。試験に供した菌種の100%検出感度は、*A. laidlawii* NBRC 14400 は100CFU/mL、そのほかは10CFU/mLだった。先に調製したマイコプラズマ参照品では、すべての菌種で10CFU/mLで検出できたが、本研究で調製した参照品では *A. laidlawii* NBRC 14400 のみが検出

できなかった。本研究で *A. laidlawii* NBRC 14400 参照品のは GC/CFU 比は 85.09 で、ATCC のマイコプラズマ参照品パネル *A. laidlawii* ATCC 23206 (PG8) の 72.98 に比較して、若干高い値を示した。先に調製した *A. laidlawii* NBRC 14400 参照品の GC/CFU 比は 18.92 で、10CFU/mL をスパイクした試料の MycoTOOL による検出感度は 17/18 であった。第十七改正日本薬局方収載原案では、C 法 (NAT) を A 法 (培養法) の代替法とする場合にはマイコプラズマ7種全てについて 10CFU/mL を検出可能なことを、B 法 (指標細胞を用いた DNA 染色法) の代替法とする場合には 100CFU/mL を検出可能なことを、どちらの場合も、CFU で適切に値付けされたマイコプラズマ参照品を用いて示す必要があるとしている。本研究で調製した *A. laidlawii* NBRC 14400 参照品は、C 法の代替法としての利用には適応するが、B 法の代替法へは適用できないことになり、培養条件を検討するなどして、新たな参照品の調製が必要と判断した。その他の6菌種については、全て 10CFU/mL を検出可能だったことから、参照品として適用可能と判断した。

#### 4-3) エンドトキシン試験法

1) 日局エンドトキシン試験法: 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、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。一方、日局エンドトキシン法を細胞組織加工製品へ適用するには次のような課題が想定される。まず、市販されているエンドトキシンキットの表示感度の確認では、エンドトキシン標準品の被検液に応じて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日局エンドトキシン標準品を用いることが必要とされる。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

いた干渉作用の有無を製品ごとに求めるのは合理的ではない可能性が高く、また生きた細胞を用いるために出荷判定が急がれる再生医療製品で、その予試験を毎回実施するとかなりハードルが高くなる。細胞組織加工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る可能性が高い。製品をエンドトキシン試験に適用するために製剤から細胞を除去して試験に供することが必要となる。細胞組織加工製品では生きた細胞であることから製造後、短時間の間にヒトに投与される必要がある。例えばゲル化法であれば、前処置に加え、試験の判定に約3時間を要する。出来るだけ迅速な試験法が適用できることが望まれている。細胞を医療材料等に包埋するような製品の場合に、そのままではエンドトキシン試験の実施が困難となる場合が多い。<4.01>では「カプトガニの血球成分より調製されたライセート試薬を用いる」とされているが、最新のキットでは組換えファクターCやELISA法なども開発されているが、このような試薬を用いた試験では日局に適合していないことになる。

2) 日局エンドトキシン試験と細胞組織加工製品：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、日局<4.01>に規定されている評価がされている。しかし細胞組織加工製品に適用する場合には迅速に結果が得られることが望ましいことから保存検量線が使用できるとその目的にかなうことになるが、日局試験法には準拠していないことになる。また、3法以外のライセート試薬を用いない方法を採用する場合にも日局に従っていないことになる。しかし、テイラーメード製品である再生医療製品では日局と同等の結果が得られる場合には、迅速法の使用も可能と考えられ、その適用について検討した。比色法を利用して、0.005から5EU/mlのエンドトキシン標準品を測定するとその相関係数は0.988であった(図4-5)。本比色法を用いて50EU/mlとなるようにエンドトキシン標準品を再生医療で用いられる培地やアルブミン含有塩溶液にスパイクし、さらにエンドトキシンプリー液で希釈して測定したところ、無血清培地に添加した場合には1/10希釈でもばらつきがあまりなく適切にエンドトキシンが測定できることが明らかになった。一方、アルブミン含有培地では希釈率が低い場合には、バラツキが非常に大きくスパイクした量より高めの測定値が得られることが明らかになった。次にELISAによるエンドトキシン測定キットを用いて比色法と同様の解析を行った。標準見料線の相関係数は比色法程高くなかった。一方、無血清培地やアルブミン含有培地にスパイクした測定では希

釈率が低いほどバラツキが大きいことが判明した(図4-6)。最後にEndosafeを用いた保存検量線に測定では、無血清培地にスパイクした場合には、1/10希釈でも1/100希釈でもほぼ適切な値が得られた。一方アルブミン添加塩溶液にスパイクした場合には十分な値が得られないことが明らかになった。保存検量線の回収率はそれほど差異がなかった(表4-7)。

## D. 考察

### (D-1) 細胞組織加工製品等のウイルス安全性評価

#### 1-1) 次世代シーケンサーを用いたウイルス試験法の開発

(1) ICH Q5Aに記載されている試験法や安全性評価法は、生産規模の大きな製品を想定したものである。細胞組織加工製品に応用できるものも少なくないが、必ずしも細胞組織加工製品に最適な試験法とは限らないものがある。特にウイルス試験法は、in vitro試験、in vivo試験ともに試験法に時間がかかる。また最終製品は時間をおかずに治療に使うことが想定される。そのため柔軟性に富んだ安全性の確保が必要になってくる。ウイルス試験法の選択肢も増やしていく必要が出てくるだろう。その意味でも今回検討したNGSを利用したウイルス検出法は、実用化へ向けて重要な選択肢の一つとなるだろう。

(2) フィーダー細胞のウイルス試験法：国内の細胞組織加工製品製造に使われているフィーダー細胞3T3-J2のウイルス試験についてみていくとマスターセルバンクでは、延長S+L-アッセイ、延長XCプラークアッセイ、電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性試験、Vero細胞等を用いた細胞変性誘発試験、赤血球吸着及び施血球凝集反応、モルモット、ニワトリ受精卵等を用いたin vivo試験、マウス抗体産生試験、ウシ鼻甲介細胞等を用いたウシ由来迷入ウイルス試験が実施されている。これに加えて、X線照射法により作製し、フィーダー細胞についてレトロウイルス否定試験が行われている。モルモットなど小動物をつかったin vivo試験では判定に28日を要する。またウシ由来迷入ウイルス試験ではCPEの出現の有無を14日にわたって調べるなど試験には長い時間とコストを要する。本研究で検討したNGS法を用いたウイルス試験法は、ウイルスの感染性を重視したバイオ

アッセイではないため、ウイルスを取り扱う設備を必要としない。そのためウイルス非感染が明らかかなマスターセルバンクがあれば、その細胞と比較することで、ワーキングセルバンクの RNA-seq データの中に外来性のウイルスが含まれているのかを短時間で判定することができるだろう。

(3) 他のウイルス試験法との比較: ウイルス試験法には核酸増幅法があるが、この方法は、感度が高く、ごく短時間で結果が出る反面、結果とウイルス感染性が必ずしも一致しない場合がある。これは核酸増幅法がウイルスの核酸を標的にしているため、鋳型となる一部の核酸断片が存在すると陽性となる場合や不活化しているウイルスも検出してしまうためである。今回検討した NGS 法を使ったウイルス検出法では、その感度が核酸増幅法と比べてどうかという点に関しては、詳細な検討を行わなかった。しかし、核酸増幅法では標的ウイルスを増幅するプライマーは正確でなくてはならず、RNA ウイルスなど多様性をもつウイルスに対して注意が必要である。短所として挙げられるのは、高額なシークエンサーと試薬類であるが、ここ 2、3 年の動向を見ていると、より小型化、よりサンプル数の少ないパーソナルな解析システムが使えるようになってきている。よって試験法を取り巻く環境は将来的には好転していくものと考えられる。

### 1-2) iPS細胞表面ウイルス受容体の網羅的解析

Whole cell lysate の分析により多数のタンパク質が同定されたが、ウイルス受容体関連タンパク質は僅かであり、膜タンパク質を分画する必要があることが示唆された。

### 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

HTLV-1 Env のレトロウイルス粒子内の感染性がある他の Env に比較して非常に不安定であり、感染細胞から遊離した HTLV-1 Env を含むウイルス粒子は急速にその感染性を消失してしまうことが明らかとなった。このことは HTLV-1 の感染系では感染細胞から放出直後でのみその感染性が担保されていることを意味している。HTLV-1 の伝搬様式としては細胞間-細胞間が主要な経路であることは以前より報告されてきたが、その理由についてははっきりとしていなかった。本研究により感染細胞からの持続的なウイルス産生が感染成立に重要であることが明らかとなり、ヒト細胞組織加工品における HTLV-1 感染のリスク回避には、

持続的に HTLV-1 粒子を産生する感染細胞の除去が重要であることを示唆している。

### 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

現在、京都大学iPS細胞研究所では、医療用iPS細胞ストックを作成する「再生医療用iPS細胞ストックプロジェクト」が実施されている。このプロジェクトは健康人からHLA (Human Leukocyte Antigen : ヒト白血球型抗原) ホモ接合体のボランティアの末梢血からiPS細胞を作製・保存するプロジェクトで、予め品質の保証されたiPS細胞を保存し必要に応じて国内外の医療機関や研究機関に迅速に提供可能にすることを目的とするものである。一方、すべての成人には複数の持続感染ウイルスが持続感染していることが明らかとなっており、その多くは末梢血中に検出されるため、再生医療用iPS細胞ストックを作成する際にはそれらのウイルスが混入するリスクが避けられない。本研究は細胞組織医薬品のウイルス感染リスクの評価を目的として具体的なウイルス感染リスクに関するデータ蓄積を目的にiPS細胞へのウイルススパイク試験を実施した。その結果、少なくとも今回用いたiPS細胞株 (201B7株) 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。この結果を一般化できるかどうかを他のiPS細胞株を用いて今後検証する予定である。HSV-1 の細胞への侵入にはウイルス表面に存在する5つのエンベロップ糖タンパク質 (gB, gC, gD, gH, gL) が関与していることが知られている。細胞への吸着にはgB と gC が関与し、その後 gB と gD が宿主細胞受容体に結合することによりウイルスエンベロップと宿主細胞膜が融合してウイルスの細胞への侵入が開始される。宿主細胞受容体として、NM-IIA, PILRαおよびMAGが、gD 受容体として nectin, CD270 (HVEM) およびヘパラン硫酸が同定されている。今後これらのHSV-1に対する宿主細胞受容体の発現の有無を解析する実験を通じ、iPS細胞への感染機構に特殊性があるか否か検討していきたい。現在、細胞由来医薬品の製造にあたっては厚生労働省からの通知 (「ヒト (同種) 由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」など5指針) に従い、5種類のウイルス (HIV, HTLV, HBV, HCV, B19) の検査が義務付けられている。今回得られた研究結果は、iPS細胞を樹立する際に上記5ウイルスに加え持続感染ウイルス (少なくともHSV-1) の検査が必要なことを示しており、我々が開発した代表的な持続感染ウイルス13種類を網羅的・迅速に検出できる新しい検査系 (HSV-1, 2, CMV,

EBV, VZV, HHV-6, 7, 8, JCV, BKV, AdV, B19, HBV) が有用と考えられる。今後この検査系の実用化に向けた取り組みを加速させる予定である。

### 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の調査：ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品に関する通知等において、必要に応じて検査により否定することとされている WNV の死亡率は 4 または 5% であり、特別に高い数字ではなかった（表 1-7）。WNV は IASR に項目があるものの、報告数は 0 である。報告数や死亡率だけでなく、潜伏期間（WNV では 3-15 日）、不顕性感染率（WNV では 80% 程度）、持続感染性等も考慮するべきと思われた。

2) 症例報告等を利用したリスク因子の検討：造血細胞移植学会のガイドラインにおいて、65 歳以上の高齢者・5 歳以下の小児・妊婦・慢性的疾患を有する患者（気管支喘息等の呼吸器疾患・慢性心不全・先天性心疾患等の循環器疾患・糖尿病・腎不全・免疫不全）が、FLU 感染の高危険群として挙げられている。本研究においても、トシリズマブにおいて 10 代以下でリスクが有意に高いものの、60 代以上についてはむしろリスクが低かった。同様な傾向は CMV でも認められており、対照群に 10 代以下を含まない形で粗オッズ比を計算するべきかもしれない。なお、造血細胞移植学会のガイドラインには CMV 感染のリスク因子も列挙されているが、性別や年齢に関するリスク因子の記載はなく、適用理由による交絡も含め、慎重に検討する必要がある。VZV については、欧州白血病感染症学会のガイドラインには 50 歳以上がリスク因子であるとの記載があるものの（Styczynski, 2009）、エビデンスは明確でない。ただし、带状疱疹ワクチンの臨床試験によれば、ワクチン投与群でもプラセボ投与群でも 70 代以上の患者では 60 代の患者よりも带状疱疹にかかる割合が高いことが示されている。特にデータは示さないが、本研究でも複数医薬品の年代別解析において同様な傾向が観察されており、とくに 70 代以上の患者はリスクが高いと考えられた。一方、EBV については、10 代以下はかなり一般的なリスク因子であるといえたが、欧州白血病感染症学会のガイドラインに EBV のリスク因子が列挙されているにもかかわらず、年齢に関するリスク因子の記載はない。欧州白血病感染症学会のガイドラインには HSV のリスク因子が記載されていないものの、このガイドラインが引用している論文

によれば、35 歳以上の患者と女性患者が HSV 感染のリスク因子とされているが、例数は少ない（Chakrabarti et al, 2000）。本研究でもシクロスポリン内用薬において女性のリスクが高い傾向にあり、トシリズマブにおいても全例が女性患者であったが、やはり例数が少なくエビデンスとしてはまだ弱いと考えられる。

### 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

JADER には、身長、体重、生活習慣に関するデータがあまり含まれておらず、これらの影響を考察することが難しい。また、副作用の発生頻度の算出が困難等の限界がある。しかし、網羅的に効率よくデータ解析を行うことで、有用な情報を抽出できる可能性がある。本研究では、JADER 中のバイオ医薬品とウイルス感染症に関する ROR 値を可視化し、決定木分析、ロジスティック回帰分析により、ミコフェノール酸モフェチル併用が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であること、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、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を示すことができた。

### (D-2) ウシ等由来原料の基準に関する研究

OIE による BSE リスク認証の妥当性を確認した。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、国際的なスタンダードとして受け入れられており、本邦における規制に関しても新たなリファレンスのもとで再検討されるべきと考える。L-BSE 由来プリオン感染サルおよびヒト孤発性 CJD 患者脳組織の病理学的特徴に差異は無かった。このことは、ヒトへ L-BSE 由来プリオンが侵入した場合、鑑別が非常に困難なことを示している。本研究では免疫組織学的手法を用いた鑑別診断法の開発には至らなかったが、前処理法、使用抗体の選別を進め、鑑別診断法の確立を目指す。同時に、プリオン感受性ヒト細胞株を用い、非定型 BSE 由来プリオンのヒト細胞への感受性を確認していく。

### (D-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

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おいて、mo-vCJD は従前の 263K を用いた評価試験と同様の結果を示したことから mo-vCJD を用いた WB 評価方法は安全性評価に利用可能であることが確認された。一方、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、安易に利用できない問題があった。そこで、簡便な感染性検出方法として cell based infectivity assay の開発を試みたが、現時点で培養細胞 RK13mol を用いた方法は検出感度が動物実験よりも悪く、安定な結果が得られなかった。これはアッセイ系が不確定な要因の影響下にあるためと考えられ、更に検討が必要である事がわかった。

#### 3-2) 異常型プリオンの in vivo 検出系の評価

これまでに確立した BA 評価系は WB 法よりも高感度であることが改めて示された。さらに、この評価系を用いて、バイオ医薬品の製造工程におけるウイルス除去ステップの効果検討が可能であった。

#### 3-3) 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究

本研究では遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、ウシ血清などの動物由来製造原料を汚染する恐れのある PrP<sup>Sc</sup> の新規検出法の確立を目的とし、PrP<sup>Sc</sup> を特異的に認識する抗体の開発を行った。

PrP<sup>Sc</sup> の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) がヒト PrP<sup>C</sup> の N 端側 43 残基の Ser をリン酸化すると、PrP<sup>Sc</sup> への立体構造変化が促進されることが報告されている (Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743–8751)。ヒト PrP の N 端側 43 残基に位置する Ser 近傍のアミノ酸配列はほ乳類間で高度に保存されており、pS43 を特異的に認識する抗体は、ウシ、ヒツジ、マウス等の PrP<sup>Sc</sup> を認識することが予想される。現在、リン酸化チロシンを特異的に認識する多くの抗体が知られているが、いまだリン酸化セリンを認識する有効な抗体は得られていない。本研究では PrP<sup>Sc</sup> を特異的に認識する抗体の候補として、リン酸化プリオンペプチドを免疫して得られた抗体の解析を行った。

マウスを pS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDD-BCIP で免疫し、3 種類の mAb (pS240, pS279, pSP289) 産生

ハイブリドーマを樹立した。ELISA で pS43 に対する特異性が最も高い pSP279 を用いたイムノプロット法で、PrP<sup>Sc</sup> 感染マウス脳乳液を解析した。pSP279 抗体は pS43 近傍のアミノ酸配列を認識し、市販の抗プリオン蛋白質ポリクローナル抗体 PrP (FL-253) と同様に、PrP<sup>Sc</sup> 及び PrP<sup>C</sup> に特異的なバンドを示した。前年度までの実験系では、pSP279 抗体は二量体の PrP に相当するバンドを示したが、単量体の PrP は認識しなかった。

今年度は、従来の第 2 抗体に結合させた HRP による化学発光法の検出系に加えて、第 2 抗体に結合させた近赤外蛍光色素による近赤外蛍光法の検出系を導入し、感度の向上を図った。また、一般にブロッキング液に含まれるスキムミルクやカゼイン等のミルク系蛋白質は、リン酸化蛋白質を多く含み、リン酸化チロシン、セリン又はスレオニンに対する抗リン酸化抗体の反応を妨げることが多い。pSP279 抗体はリン酸化セリンだけではなく、その近傍のアミノ酸配列を認識することから、昨年度までの研究では PBS 系緩衝液とカゼイン含有のブロッキング液を用いていた。今年度は、TBS 緩衝液系と哺乳動物由来蛋白質を含まないブロッキング液に変更した。これらを改善した結果、単量体 PrP の検出が可能になった。

pSP279 が検出したリン酸化プリオン蛋白質は、すべて糖鎖の無い単量体だった。先の Giannopoulos, P.N. らの報告では、*in vitro* でリン酸化したリン酸化 PrP には糖鎖が無く、*in vivo* での検出では糖鎖には言及していない。市販の抗リン酸化プリオンポリクローナル抗体は、培養細胞を脱リン酸化阻害剤 Calyculin A で処理すると糖鎖を有した PrP が、未処理では糖鎖が無い PrP を主に認識することを報告している。今回樹立した pSP279 は、PrP<sup>Sc</sup> 感染脳及び対照脳で糖鎖の無い PrP を認識しているが、ウサギポリクローナル抗体との比較をするためにも、培養細胞に対する Calyculin A 処理や、リン酸化酵素 Cdk5 処理等を行って特異性を確認する必要がある。

pS43 に対して最も高い特異性を示した pSP279 抗体は、イムノプロット法で対照脳の PrP を認識したが、PrP<sup>Sc</sup> に対する反応性は弱く、pS43-PrP は対照脳に多く含まれている結果が得られた (Fig. 1B, Table 1)。先の論文ではウサギポリクローナル抗体を用いた研究で、PrP<sup>Sc</sup> 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 (Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743–8751)。しかし、本研究ではイムノプロット法で pSP279 抗体が認識する pS43 を含む PrP は対照脳に多く、逆の結果となった。PrP<sup>Sc</sup> 感染脳の例数が少ないことから、さらに多くの例数を検証し、pS43 の経時的変化を調べ

る必要がある。

### 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

本年度は、バイオ医薬品の PrP<sup>Sc</sup> 安全性評価のために精製工程でのクリアランス能の評価における PrP<sup>Sc</sup> のアッセイ法の最新情報の総括と工程評価においてスパイク試料としての適格性について調査を行った。まず PrP<sup>Sc</sup> の感染性を評価する基本的なスタンスとしては in vivo アッセイ法が最も高感度であり、感染性の有無や限界希釈法による感染価の評価においてもいわばゴールドスタンダードとなると考えられる。但し、半年に亘る試験期間を要するという in vivo 法の欠点を克服するために様々な手法が開発されてきている。それぞれのアッセイ法の評価においては in vivo 法との相関性を示すことが基本となる。そこで今年度はいくつかの手法の in vivo 法との相関性を含めてその検証を行った。

PrP<sup>Sc</sup> の工程での除去能を評価するためのスパイク検体としてはスクレイパーや BSE 感染マウス脳由来のミクロソーム分画が用いられてきたが、粒子サイズが大きすぎるとの観点から超音波処理や界面活性化剤処理などにより粒子の低分子化が試みられ、その結果粒子を小さくすることにより当初はナノフィルトレーションでは感染性が口液に検出されないとされていたのが、20nm や 15nm の口径のフィルターを用いても口液に感染性が検出されることが明らかになり、粒子のサイズによってはこれまで出されていた PrP<sup>Sc</sup> 除去能を再評価する必要があると指摘されてきている。特に血中での PrP<sup>Sc</sup> の存在状態が不明であることから、ウシ血清由来の PrP<sup>Sc</sup> の感染性を前提とする場合には、粒子径を含めてその適切性について十分検討する必要がある。

バイオ医薬品の PrP<sup>Sc</sup> クリアランス能の評価においては、スパイクした検体及び工程終了後の検体の PrP<sup>Sc</sup> 感染価ないしはその残存量の定量的評価が重要となる。また、その検出感度やそれに基づく定量可能領域がどの程度あるのかが十分な定量範囲を確保するために必要となる。

このような点から in vivo アッセイ法の代替として用いられているプロテイナーゼ K 耐性プリオンタンパク質の WB による検出や PMCA 法に関してはその感染性を十分にとらえられているのか疑問が残る。特に WB より高感度な検出手法と言われている PMCA 法やその類似の試験管内でのプリオンタンパク質のコンバージョンを指標とする手法は検体の特性による最適化が必要である点や

感染性検出の十分条件であるのかが課題となっている。このような点からも感染性を定量的に評価できるアッセイの確立が急務と考えられる。上記のような観点からプリオンタンパク質の高発現細胞を用いた in vitro 細胞培養系を用いたアッセイ法の開発が急速に進んでいる。これらのアッセイ法は細胞のラフトや細胞内で添加された PrP<sup>Sc</sup> により正常プリオンが PrP<sup>Sc</sup> にコンバージョンされるという原理(図 3-8)を利用しており、生体での PrP<sup>Sc</sup> の発生機構に類似した反応と想定できる。現状の課題は培養細胞中でのコンバージョンの条件設定の難しさとそのコンバージョン率が必ずしも十分でない点である。ただこれらはプリオンタンパク質高発現細胞株の使用や培養条件で改善が期待できる。また、in vitro 培養細胞系で製造した PrP<sup>Sc</sup> をマウス脳内への投与により CJD の発症を引き起こすことから in vitro 法にて変換された PrP<sup>Sc</sup> は異常プリオンとしての特性を有していること、さらに異常プリオンとしての生体での存在状況に類似していると想定されることから工程へのスパイク試料としての十分性を備えている可能性が高いことも注目すべき点であると考えられる。今後この in vitro 培養法を用いてより高濃度の PrP<sup>Sc</sup> の調製が可能になればより正確な PrP<sup>Sc</sup> のクリアランス能の評価が可能になると期待される。

### (D-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) 検体量が少ない場合：細胞組織加工製品は非常に少量しか培養しない製品から比較的大量に培養される製品まで、多様な特徴を有する。日局の培養法では、カンテン平板培地で 0.2mL 以上の検体（細胞懸濁液）をプレート 2 枚以上に接種すること、液体培地では 10mL 以上の検体を 1 本以上の培地に接種すること、とされている。試験に用いる検体の量が多いほど感度が高くなると想定されるが、本来、日局で対象としているのは細胞バンクを形成する細胞基材での試験であり、大量培養が可能であり数百 mL の細胞懸濁液が得られるため、そのうちの 10mL を被検液として用いることは合理的と考えられる。しかし、細胞組織加工製品で非常に少量しか培養されない製品の場合、大量の検体を用いてマイコプラズマ試験を実施するのは合理的ではない。



BPの無菌試験法では、細胞組織加工製品の被検量は製品量の一定比率を用いるとの考え方が示され、製品量が少ない場合に試験を行わないという考え方を示している。しかし、NATの被検液量を設定するときには、NATの特性に応じた考え方を適用するべきであろう。

市販のマイコプラズマ測定用 NAT も細胞基材の品質管理を想定して作られており、標準検体量は MycoTOOL で 1mL、MycoSEQ では 10mL を用いて行うこととされるが、特に検体量が少ない場合を想定して 0.1mL を検体として検討を行った。その結果、0.1mL からでも測定は可能であるが、10CFU/mL を測定可能な感度を有するキットを使用しても、検体の容量を標準使用量の 1/10 又は 1/100 の 0.1mL に減らすと当然のことながら感度は低下し、偽陰性となる菌種が認められた。BP では総量が 1mL 未満の製品では試験の適用はなしとしているが、適切な量が確保できるのであれば、どの程度の感度が得られるのかを確認したうえで NAT が適用できる場合に試験の実施を不要とすることはできないと考えられる。また、総量の 1% を試験するという場合には、被検サンプル数を増やすという考え方や、Vero 細胞に接種して検体の容量と検出感度を上げるという方法を取ることも可能と考えられる。

2) 培養上清を検体とする場合： マイコプラズマは細胞に接着して増幅するため、被検液としては細胞懸濁液を選択するべきとされるが、細胞組織加工製品では必ずしも細胞懸濁液を検体とすることができない場合がある。細胞からマイコプラズマが十分に回収できていることがバリデーションされていれば培養上清を検体としてもよいと考えられるが、今回の検討でも示されたように培養上清中のマイコプラズマは細胞培養中のマイコプラズマのごく一部であることが確認されており、培養細胞のマイコプラズマ汚染を検出するには、大量の培養上清からマイコプラズマを濃縮する等の方法を取る必要があると考えられる。上清からの濃縮法としては、16,000×g で 30 分間の遠心処理により、ある程度濃縮可能であるが、低濃度の試料からの濃縮では細胞などのマイコプラズマを共沈させるものを添加して遠心する方法が培養上清中のマイコプラズマを回収する方法として利用できる。また、Vero 細胞に接種して増幅後に測定する方法は、時間はかかるが、3 日で  $10^5$  倍に増幅させることが可能であり、低濃度の試料を高感度に測定するのに有用な方法と考えられる。しかし、特に検出に際して偽陽性や偽陰性を生じることがないことを評価しておくことが重要と考えられる。また、上清を検体として用いる場合には、最終細

胞製品への製剤化の過程で汚染が起らないことを確認しておくことも必要と思われる。製剤化の過程で汚染のリスクが否定されない場合は、投与後の試験も考慮すべきとおもわれる。

#### 4-2) 無菌試験法

平成 26 年 9 月 1 日に公表された第十七改正日本薬局方収載原案で、参考情報の微生物迅速法について、パブリックコメントが 9 月 30 日まで募集された。新手法の例には、直接検出法として種々の光学検出装置を用いて菌体の発する蛍光を検出する固相サイトメトリーとフローサイトメトリー、間接検出法として核酸を検出する NAT、ATP 等を検出する生物発光法・蛍光法、増殖能をマイクロコロニーとして検出するマイクロコロニー法、増殖能をガス産生として検出するガス測定法などが紹介されている。機器の適正評価に当たっては、検出対象とする標準試料を用いて実施し、直接検出法においては標準菌株を、間接的検出法においては検出対象となる成分等を用いること、試験方法のバリデーションに当たっては、検出対象が細菌数・細菌量測定の指標となる科学的根拠を明らかにし、従来法と比較して優位な点と共に、利用に当たって考慮すべき点についても明らかとすることが望ましいとしている。新手法の応用分野の例としては、製薬用水の品質管理、製造区域の微生物評価、無菌試験、微生物限度試験、保存効力試験、原材料受入試験などをあげている。

微生物の迅速測定法を無菌試験法へ適用するには、細胞組織加工製品を製造する環境の十分な無菌性保証バリデーションを実施した上で、用いる新手法が無菌試験法に適用可能な科学的根拠の提示と、手法と機器のバリデーションが必要となる。

#### 4-3) エンドトキシン試験法

本年度は、昨年度に引き続きエンドトキシン試験を細胞組織加工製品に対して適用する際の考慮事項について調査研究を行うと共に、細胞組織加工製品で用いられる培地やアルブミン添加塩溶液を対象としてエンドトキシンの測定を行い、試験実施における問題について検討を行った。

日局エンドトキシン法を細胞組織加工製品へ適用するには次のような課題として、市販のエンドトキシンキットを利用する場合にエンドトキシン標準品を用いた検量線作成や反応干渉因子試験等でエンドトキシン標準品を用いることが必要とされるが、自己由来細胞組織加工製品のようなテイラーメイド製品で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製品ごとに求めるのは合



理的ではない可能性が高い。

生きた細胞を用いる細胞組織加工製品のエンドトキシン測定では短時間の間にヒトに投与される必要があり、出来るだけ迅速な試験法が適用できることが望まれている。

以上のような課題に対処するために、あらかじめ標準検量線や干渉試験が実施され、その評価ができていない場合には、日局エンドトキシン法以外の方法や異なる原理を利用した市販キットも使用可能としてよいのではないかと考えられる。そのためにはあらかじめ十分な評価を行っておくことが求められる。特に、細胞組織加工製品に適用する場合には、細胞の培養液や懸濁液にエンドトキシンをスパイクし、干渉がない条件の検討や試験成立の条件等の評価しておくことが求められる。さらに、市販キットではキットメーカーによって実施されたバリデーションデータが添付されている場合もあると想定されるが、少なくとも適用しようとする検体を用いてキットに記載通りの結果が得られることを確認しておく必要がある。

一方、日局エンドトキシン法では「カプトガニの血球成分より調製されたライセート試薬を用いる」とされているが、最新のキットでは組換えファクターCやELISA法なども開発されており、迅速あるいは簡便な測定を可能とすることも考慮してよいのではないかと考えられる。

今回日局試験法に適合している比色法でのエンドトキシン測定と、2つの日局に適合はしていないが簡便法として市販されている測定キットを用いた測定を行った。比色法を用いた場合でも細胞懸濁に用いられる溶液によってはスパイクしたエンドトキシンを正確に測定することが難しい場合もあることが示された。あらかじめ測定に影響が出ない希釈処理などに関して評価をしておくことにより、適切な測定が可能であることも示された。

## E. 結論

### (E-1) 細胞組織加工製品等のウイルス安全性評価

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を用いたウイルス試験法の開発：細胞加工製品のウイルス安全性を確保するために細胞ストック、フィーダー細胞、中間製品、最終製品等のウイルス感染の有無を高感度、網羅的に検出できるRNA-seqデータ解析のためのパイプラインを作ることができた。しかし検出限界と検出できるウイルスの範囲を向上させるためにはクリアすべき課題が残っている。

2) iPS細胞表面ウイルス受容体の網羅的解析：昨年度開発したレセプトーム解析技術を用いて、ヒトiPS細胞の膜タンパク質の解析を行い、12種類のウイルス受容体関連分子の同定に成功した。本研究で使用したiPS細胞は、これらの分子を標的とするウイルスに対する感受性が高いことが示唆された。今後、複数ロットのiPS細胞のレセプトーム解析を行うことにより、感染性リスクの高いウイルスの予測にも繋がるものと思われる。

3) ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究：HTLV-1の感染リスクは伝播様式により異なり、HTLV-1感染細胞を介した細胞-細胞間伝播により効率よく感染が成立するが、感染細胞から遊離したcell-freeのHTLV-1の感染リスクは極めて低いことが明らかとなった。したがってヒト細胞組織加工製品においてはHTLV-1感染細胞の混入を可能な限り最小限に抑えることが重要と考えられた。一方、細胞の混入がないバイオ医薬品製造に関してその感染リスクは軽微であると結論された。

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：ボランティアの末梢血を原材料に医療用iPS細胞ストックの作成が進んでいる。一方、すべての成人には複数の持続感染ウイルスが持続感染していることが知られているが、本研究の結果から、iPS細胞は少なくともHSV-1に感受性を持つことが示された。したがって、厚生労働省通知に記載の、5種類のウイルス(HIV, HTLV, HBV, HCV, ParvoB19)の検査に加えてヒトに持続感染するウイルス(少なくともHSV-1)の検査が必要と考えられる。

5) 文献及びデータベースを用いたリスクアセスメント：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感染率や死亡率等を調査した。これまでに検討した妊娠可能性のある女性が患者の場合に注意すべきウイルス等を考えると、リスク評価に当たっては、持続感染性等も考慮するべきと考えられた。一方、細胞組織加工製品が実用化された場合は、特に患者が免疫抑制状態の場合が多いと考えられるため、免疫抑制剤投与後の各種ウイルス感染症について、JADERを用いてリスク因子を検討した。その結果、免疫抑制状態においては、EBV・CMV・VZVについては10代以下、VZV・HBV・BKVについては60代以上、VZVについては女性、BKVについては男性がリスク因子である可能性が示唆された。

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： JADERデータベースを構築するソフトウェアを開発し、効率的に解析を進めることのできるシステムを開発した。ヒートマップを用いた有害シグナルの可視化、決定木を用いたリスク因子推定、ロジスティック回帰により、ミコフェノール酸モフェチルの併用、糖尿病がバシリキシマブ使用時の副作用、サイトメガロウイルス感染のリスク因子である可能性を示した。本有害事象自発報告データの解析システムは、バイオ医薬品のウイルス感染性因子の安全性評価のみならず、すべての医薬品の安全性評価に活用できるものとする。

## (E-2) ウシ等由来原料の基準に関する研究

最新のプリオン研究により得られた知見等を加味し、ウシ等由来原料の基準に対する提言をまとめた。生物由来原料基準の一部を改正する件については、平成26年7月パブリックコメント募集、平成26年11月27日、薬事法等の一部を改正する法律(平成25年法律第84号)公布となっている。

## (E-3) プリオン安全性評価

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を用いたWB評価系は工程評価試験に応用可能であり、15nm及び19nmのウイルス除去膜はmo-vCJDを効果的に除去できる事を確認した。Cell-based infectivity assayについては、実験条件の最適化により、より安定した系になると考えられた。

2) 異常型プリオンのin vivo検出系の評価： バイオ医薬品や血漿分画製剤の製造工程におけるウイルス除去効果の評価には、BA法を用いることが重要である。

3) 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究： PrPScの新規検出法確立を目的とし、それらに資する基礎研究としてヒトpS43-PrPを認識する抗体の特異性を解析した。イムノブロット法でpSP279抗体はPrPSc感染脳を認識するが、pSP279抗体は対照脳により高い特異性を示した。これらの結果は、新たなPrPScバイオアッセイ系の構築、プリオン病のバイオマーカー測定法開発への寄与が期待できる。

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： BSEなどPrPSc

に対するバイオ医薬品の安全性確保のためにPrPScの製造工程でのクリアランス能の評価に、プリオンタンパク質を高発現している細胞を用いる培養細胞系の検出系は迅速に感染性を定量できる方法として開発が進められており、PrPScの感染性を迅速に評価できる手法として期待される。細胞培養系で得られたPrPScは、脳内摂取により感染性が確認されており、PrPScのスパイク検体としても有用である。今後、細胞培養法が検出手法やクリアランス評価に用いる検体の調製法としても有用性が高いと考えられる。

## (E-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

1) 核酸増幅法(NAT)を用いたマイコプラズマの迅速検査法： マイコプラズマ否定試験について、細胞組織加工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ため、検体量が少ない場合及び培養上清を検体とする場合の考慮点をまとめた。

2) 無菌試験法： 平成26年11月25日に再生医療等の安全性の確保等に関する法律が施行され、幹細胞や幹細胞以外の細胞や組織を加工して使用する再生医療は実用化の時代に入った。従来の無菌試験法を細胞組織加工製品の最終出荷判定試験に適用するのは難しいが、高度無菌操作技術で工程を管理していることから、試料の培養を前提とした微生物迅速法の適用が望まれる。細胞組織加工製品製造環境の十分な無菌性保証バリデーションの実施と、微生物迅速法が無菌試験法に適用可能な科学的根拠の提示した上で、用いる手法及び機器のバリデーションが必要となり、それらの方法について考察した。同様に、最終出荷判定試験として求められるマイコプラズマ否定試験のバリデーションに必要な参照品を調製し、それらの適用について検証した。

3) エンドトキシン試験法： 日局エンドトキシン試験法を細胞組織加工製品に適用する際の考慮事項と実際に細胞組織加工製品で使用される被検液等を用いてエンドトキシン試験を実施する場合の課題について検討をおこなった。その結果、日局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の使用や干渉試験などを細胞組織加工製品に求めるのは必ずしも合理的とは言えず、適切な評価ができていればエンドトキシン参照品や保存検量線を使用することも可能であること、また、日局に適合はしなくても十分な評価が実施されて

いれば市販キットの使用も可能であることが考えられた。

## F. 健康危険情報

免疫抑制状態においてリスクが高いと考えられるウイルス感染症について、JADER のデータを利用して、性別・60代以上・10代以下がリスク因子である可能性を検討した。その結果、免疫抑制状態においては、EBV・CMV・VZV については10代以下、VZV・HBV・BKV については60代以上、VZV については女性、BKV については男性がリスク因子である可能性が示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 政策への反映

- 1) 生物由来原料基準の一部改正：平成26年7月パブリックコメント募集，平成26年11月27日，薬事法等の一部を改正する法律（平成25年法律第84号）

### 2. 論文発表

- 1) 川崎ナナ：生物薬品の局方収載の現状と課題。レギュラトリーサイエンス学会誌，vol.4, No.2, 149-154 (2014)
- 2) Hashii N, Harazono A, Kuribayashi R, Takakura D, Kawasaki N: Characterizations of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 30;28(8), 921-932 (2014)
- 3) Maeda Y, Terasawa H, Tanaka Y, Mitsuura C, Nakashima K, Yusa K, Harada S : Separate cellular localizations of human T-tropic virus 1 (HTLV-1) Env and glucose transporter 1 (GLUT1) are required for HTLV-1-mediated fusion and infection. *J Virol.* 89, 502-511 (2015)
- 4) Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, Shimizu N, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows distinctive stem cell-like phenotype. *Luek Lymphoma* 10:1-27 (2014)
- 5) Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A: CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals. *PLoS One* 9:e112564 (2014)
- 6) 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* 87:279-286 (2014)
- 7) Yagasaki H, Shichino H, Shimizu N, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S: Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. *Transpl Infect Dis.* 17(1):160-1 (2015)
- 8) Endo A, Watanabe K, Ohya T, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S: Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin.Infect.Dis.* 59:545-548 (2014)
- 9) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H: Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr.Int.* 56:159-66 (2014)
- 10) 関矢一郎，清水則夫，森尾友宏，宗田大：滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の手順。日本整形外科学会雑誌，88:212-215 (2014)
- 11) 木村秀樹，池裕明，岡正朗，鈴木弘行，谷憲三朗，徳久剛史，中面哲也，森尾友宏，山口佳之，阿曾沼元博，河上裕，紀ノ岡正博，澤芳樹，清水則夫：免疫細胞療法細胞培養ガイドライン。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，45:411-433 (2014)
- 12) 山口照英：再生医療の安全性確保法と薬事法改正。レギュラトリーサイエンス学会誌(RSMP)，vol.4, No.3, 237-247 (2014)
- 13) Maeda D, Yamaguchi T, Ishiduka K, Takekita T, Sato D : Regulatory Frameworks for Gene and Cell Therapies in Japan. in "Regulatory Aspects of Gene Therapy and Cell Therapy Products in Japan." Springer, Serbian,M. & Galli,M.C. eds., in press

- 14) Kurosu T, Chaichana P, Phanthanawiboon S, Khamlert C, Yamashita A, A-nuegoonpipat A, Ikuta K, Anantapreecha S: Sequence Variation of Dengue Type 2 Virus from clinical cases in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 67(2):132-134 (2014)
- 15) Omokoko MD, Pambudi S, Phanthanawiboon S, Masrinoul P, Setthapramote C, Sasaki T, Kuhara M, Ramasoota P, Yamashita A, Hirai I, Ikuta K, Kurosu T: A Highly Conserved Region between Amino Acids 221-266 of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Is a Major Epitope Region in Infected Patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jul;91(1):146-155. (2014)
- 16) Sasayama M, Benjathummarak S, Kawashita N, Rukmanee P, Sangnukdanun S, Masrinoul P, Pitaksajakul P, Wuthisen P, Kurosu T, Maneekan P, Ikuta K, Ramasoota P, Okabayashi T, Singhasivanon P, Luplertlop N: Chikungunya virus was isolated in Thailand, 2010. *Virus Genes*. Dec;49(3):485-489 (2014)
- 17) Phanthanawiboon S, A-nuegoonpipat A, Panngarm N, Limkittikul K, Ikuta K, Anantapreecha S, Kurosu T: Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 expressing stably human DC-SIGN. *J. Virol. Methods*. Dec;209:55-61 (2014)
- 18) Boonsathorn N, Panthong S, Koksunan S, Chittaganpitch M, Phuygun S, Waicharoen S, Prachasupap A, Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Yasugi M, Ono K, Arai Y, Kurosu T, Sawanpanyalert P, Ikuta K: A human monoclonal antibody derived from a vaccinated volunteer recognizes heterosubtypically a novel epitope on the hemagglutinin globular head of H1 and H9 influenza A viruses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Sep 26; 452(3):865-870 (2014)
- 19) Phanthanawiboon S, A-nuegoonpipat A, Panngarm N, Limkittikul K, Ikuta K, Anantapreecha S, Kurosu T: Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 expressing stably human DC-SIGN. *J. Virol. Methods*. 209: 55-61 (2014)
- 20) Okabayashi T, Kurosu T. et. al.: Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test. *J. Clin. Microbiol*. 53(2): 382-8 (2015)
- 21) 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*, 45(5): 442-451 (2014)
- 22) 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: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験のPCR法改正のための共同研究. *マイコプラズマ学会雑誌* (印刷中)
- 23) Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T: Ultrasensitive detection of PrP(Sc) in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion. *J Gen Virol*. Nov;95(Pt 11): 2576-88 (2014)
- 24) 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*. Mar;98(5):2113-20 (2014)
2. 学会発表
- 1) 苑 宇哲, 前田洋助, 川崎ナナ, 原田信志, 遊佐敬介: マウス微小ウイルスの核への侵入にはホスホリパーゼ A2 活性が必要である. 第62回日本ウイルス学会学術集会 (2014.11.10-12) 横浜
- 2) 前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中島詩織, 門出和精, 田中勇悦, 遊佐敬介, 原田信志: HTLV-1 Env 発現産生細胞における HTLV-1 受容体 GLUT1 の制御機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会 (2014.11.10-12) 横浜
- 3) 前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中島詩織, 門出和精, 田中勇悦, 遊佐敬介, 原田信志: HTLV-1 Env 発現ウイルス産生細胞における HTLV-1 受容体 GLUT1 の制御機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2014.11.10-12) 横浜
- 4) 門出和精, 小野 陽, 前田洋助, 寺沢広美, 中野雄介, 原田信志: HIV-1 の放出抑制に関与する内在性レトロウイルス Gag のドメイン解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2014.11.10-12) 横浜
- 5) 廣瀬千紘, 坂下千瑞子, 山本正英, 今留謙一, 富田 誠, 藤原成悦, 森尾友宏, 清水則夫, 三浦 修, 新井文子: 成人 EBV 陽性 T/NK リン

パ増殖症に対する同種造血幹細胞移植成績の後方視的解析. 造血幹細胞移植学会(2015.03) 神戸

- 6) 渡邊 健, 島田ひかり, 湯之前雄太, 外丸靖浩, 関矢一郎, 森尾友宏, 清水則夫, 岸本加恵, 前田忠郎, 澤田昌典: iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を利用した再生医療の安全性確保: ウイルススパイク試験. 日本再生医療学会 (2015.03) 横浜
- 7) 外丸靖浩, 渡邊 健, 太田洋子, 小島尚美, 関矢一郎, 森尾友宏, 清水則夫: 再生医療の微生物安全性検査: ウイルス・マイコプラズマ同時検出系の開発. 日本再生医療学会(2015.03) 横浜
- 8) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S: Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the evaluation of novel therapies. The 16<sup>th</sup> International symposium on Epstein Barr Virus & Associated Diseases. (2014. 7.16-19) Brisbane
- 9) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S: Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models. The 39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop (2014. 7.19-23) Kobe
- 10) 山口照英, 内田恵理子, 小野寺裕史: 「遺伝子治療製品の品質・安全性確保のための指針改定と国際動向」. 東京大学医科学研究所遺伝子・細胞治療センター キックオフ・シンポジウム. (2014. 11) 東京
- 11) Speaker: Mikihiro Yunoki  
Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Pathogen inactivation in plasma derivatives. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during liquid heating steps of plasma derivatives. IPFA/PEI 21<sup>st</sup> International Workshop on “Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens”. (2014) Rome
- 12) Speaker: Mikihiro Yunoki  
Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Experiences of HEV elimination during the manufacturing process steps and the suitable model viruses. Workshop on Viral safety of plasma-derived medicinal products with respect to hepatitis E virus. 13 October 2014. CHMP/BWP/196177/2014 Biologics Working Party (BWP)). (2014) London
- 13) 加藤(森)ゆうこ, 上平 崇, 坂井 薫, 柚木幹

弘, 岡本 実, 萩原克郎: 変異型クロイツフェルトヤコブ病(vCJD)持続発現細胞プリオン蛋白のマウスへの伝達性. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (2014) 横浜

- 14) 上平 崇, 久保 純, 大久保祐士, 坂井 薫, 加藤(森)ゆうこ, 萩原克郎, 柚木幹弘: マウス馴化vCJDを用いた血漿分画製剤工程のプリオン除去. 第 38 回日本血液事業学会 (2014) 広島
- 15) 菊池 裕, 遊佐精一, 窪崎敦隆, 寺嶋 淳, 豊田淑江, 山口照英: 低酸素条件下で発現する GPI アンカー欠損型プリオン蛋白質に関する転写因子 BHLHE40 の研究. 第 87 回日本生化学会大会 (2014.10.15-18) 京都
- 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: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究. 日本マイコプラズマ学会第 41 回学術集会(2014.5) 東京
- 17) 内田恵理子: 生物薬品委員会の検討課題—マイコプラズマ否定試験の改正による NAT 法の積極的活用—. 第 13 回日本薬局方に関する研修会 (2014.10) 大阪, 東京
- 18) 内田恵理子: 新しいマイコプラズマ否定試験法. 第 15 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム (2015.2) 東京
- 19) 古田美玲, 内田恵理子, 山口照英: 再生医療製品のマイコプラズマ否定試験としての NAT の適用に関する研究. 第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3) 横浜

## H. 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
- その他  
なし

## I. その他

### 3-1) ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究～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

本研究の一部は一般社団法人日本血液製剤機構との共同研究として実施した. 本研究に用いた vCJD 株は米国赤十字社 Dr. Larisa Cervenakova よ

り分与された。また，RK13mol 株は UMR INRA/ENVIT 1225 Interactions Hôtes- Agents Pathogènes Pathologie du bétail の Dr. Didier ViletteE より分与された。

### 3-2) ウイルス等感染性因子安全性評価に関する

#### 研究～異常型プリオンの *in vivo* 検出系の評価

本研究の細胞培養に関する一部の研究は一般社団法人日本血液製剤機構との共同研究として実施した。本研究に用いた mo-vCJD 株は米国赤十字社 Dr. Larisa Cervenakova より分与された。

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

目次

1. はじめに
2. リスクアセスメントの例
  - 2.1 リスク特定
  - 2.2 リスク分析
3. リスク低減策の例
4. 参考資料



## 1. はじめに

細胞組織加工製品の製造では、製品のウイルス汚染により重大な感染事象が生じるリスクを考慮する必要がある。ウイルス感染による有害事象の発生を最小限に抑えるためには、健康被害を引き起こすウイルスを特定し、その感染頻度や健康への影響の大きさに基づくリスク分析を行うこと、そのリスクが許容可能か否かのリスク評価を行うこと、さらにはウイルス・製品・患者・治療方法などの特性に応じた感染リスクの低減策を明らかにしておくことが重要である。細胞組織加工製品による安全な治療の実現に向けて、ウイルスに関する科学的知見とリスクマネジメントの考えに基づく、細胞組織加工製品のウイルス安全性確保のための方策についてケーススタディを行った。

このケーススタディでは、ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した製品（細胞組織加工製品）を対象とした。ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した製品についても参考になることがある。

## 2. 細胞組織加工製品におけるウイルス感染リスク対応策のためのリスクアセスメントの例

ウイルス感染リスク対応策を構築するためには、1) ヒトへの感染が知られているウイルスや感染可能性のあるウイルスを特定すること、2) それらのウイルスの感染リスクレベルを感染頻度や健康被害への大きさから分析すること、3) そのリスクレベルをこれまでの知見と比較し、受容可能か否かを評価する必要がある。

### 2.1 感染リスクのあるウイルスの特定例

日本薬局方、FDA ガイダンス、ICH の Q5A その他の資料を参考に、ヒトをドナーとする細胞・組織を原材料とする場合に感染が想定されるウイルスを特定した。主にヒト由来と考えられるウイルスを表1、ウシ由来、ブタ由来、齧歯類由来と考えられるウイルスを表2にまとめた。

### 2.2 ウイルス感染リスク分析の例

リスク分析には、医薬品医療機器総合機構が公開している副作用データベース（JADER）、または国立感染症研究所の感染症週報（IDWR）及び病原微生物検出情報（IASR）を使用した。まず、JADER を検索して得られた症例をもとに、ヒト由来のウイルスが感染したときの健康への影響の大きさ（重篤度ランク）と感染頻度（頻度ランク）を表3のように定義した。得られた頻度ランクと重篤度ランクよりリスクマトリックスを作成し（図1）、感染リスクスコアを算定した（表4）。一方、IDWR 及び IASR を用いたリスク分析では、頻度ランクと重篤度ランクを表5のように定義した。算定した感染リスクスコアを表6にまとめ、リスクマトリックスを図2に示した。

### 3. リスク低減策の例

基本的要件としては、まず再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令（GCTP 省令）を順守する。細胞組織加工製品を含む再生医療等製品の品質及び安全性に関する原則及び手法については、ヒト幹細胞を用いた細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する 5 指針（平成 24 年 9 月）等の関連通知、及び生物由来原料基準（平成 15 年 5 月）が、またフィーダー細胞については「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく 3T3J2 株及び 3T3NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針（平成 16 年 7 月）が参考になる。その上で、リスクレベルに応じて対応が必要と思われる。

ウイルスの検査に当たっては、本研究室の清水が報告している PCR 法が参考になる。PCR 法とは、DNA の一部（標的領域）の前後に 2 種類のプライマーを設定し、DNA 合成酵素によるプライマーからの伸長反応を利用して標的領域を増幅する方法である。1 時間程度で標的領域を 2 の 40 乗倍以上に増幅することができるため、極微量のウイルスを電気泳動法などにより可視化して検出することが可能になる。しかし、増幅した標的領域は次の増幅反応の良いターゲットになるため、増幅産物の混入による偽陽性反応を防止するための適切な処置が必要となる。そのため、電気泳動を行うことなく増幅産物を検出可能な蛍光プローブを利用したリアルタイム PCR 法の使用が推奨される（増幅産物が標的配列か否かの検証も同時にできる）。また、RNA を逆転写酵素で DNA に変換したあとに PCR 反応を行う RT-PCR 法を利用すれば、RNA ウイルスの検出も可能である。

その他、公開されている論文やマニュアルもリスク対応の参考にできると考えられる。

### 4. 参考資料

第十六改正日本薬局方 厚生労働省告示第 65 号 平成 23 年 3 月 24 日

生物由来原料基準 厚生労働省告示第 210 号 平成 15 年 5 月 20 日

厚生労働省医薬食品局長通知

ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について 薬食発 0907 第 2 号 平成 24 年 9 月 7 日

ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について 薬食発 0907 第 3 号 平成 24 年 9 月 7 日

ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について 薬食発 0907 第 4 号 平成 24 年 9 月 7 日

ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について 薬食発 0907 第 5 号 2012 年 9 月 7 日

ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 薬食発 0907 第 6 号 2012 年 9 月 7 日

厚生省医薬安全局審査管理課長通知

「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について (ICH Q5A) 医薬審第 329 号 平成 12 年 2 月 22 日

厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知

生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来、調製及

び特性解析 医薬審第 873 号 平成 12 年 7 月 14 日

厚生労働省医政局研究開発振興課長通知

異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針 医政研発第 0709001 号 平成 14 年 7 月 9 日

「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく 3T3J2 株及び 3T3NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針 医政研発第 0702001 号 平成 16 年 7 月 2 日

Marcus-Sekura C, *et al*, *Biologicals* 2011 39(6) 359-369.

清水則夫, 細胞組織医薬品のウイルス感染リスク評価に関する研究 分担総合研究報告書

表1 細胞組織加工製品に混入する可能性のあるヒト由来のウイルス

(\*はドナーに海外渡航歴がある場合に注意すべきウイルス, \*\*は妊娠可能性のある女性が患者の場合に注意すべきウイルス; それぞれ厚生労働省検疫所 (<http://www.forth.go.jp/>), 国立感染症研究所 (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/>) のホームページを参考にした)

ウイルス名	略称	分類
アストロウイルス		アストロウイルス科アストロウイルス属
ヒトアデノウイルス	HAdV	アデノウイルス科マストアデノウイルス属
ガナリトウイルス*		アレナウイルス科アレナウイルス属
サビアウイルス*		アレナウイルス科アレナウイルス属
フニンウイルス*	JUNV	アレナウイルス科アレナウイルス属
マチュポウイルス*		アレナウイルス科アレナウイルス属
ラッサウイルス*	LASV	アレナウイルス科アレナウイルス属
インフルエンザウイルス	FLU	オルトミクソウイルス科インフルエンザウイルス A, B 属
鳥インフルエンザウイルス*		オルトミクソウイルス科インフルエンザウイルス A, B 属
ノロウイルス		カリシウイルス科カリシウイルス属
サッポロウイルス		カリシウイルス科サポウイルス属
サポウイルス	SaV	カリシウイルス科サポウイルス属
サーズコロナウイルス	SARS-CoV	コロナウイルス科
新型コロナウイルス	MERS-CoV	コロナウイルス科
ヒトコロナウイルス 229E	HCV-229E	コロナウイルス科コロナウイルス属
ヒトコロナウイルス OC43	HCV-OC43	コロナウイルス科コロナウイルス属
西部ウマ脳炎ウイルス*	WEE	トガウイルス科アルファウイルス属
チクングニアウイルス*	CHIKV	トガウイルス科アルファウイルス属
東部ウマ脳炎ウイルス*	EEE	トガウイルス科アルファウイルス属
ベネズエラウマ脳炎ウイルス*	VEE	トガウイルス科アルファウイルス属
ロスリバーウイルス	RRV	トガウイルス科アルファウイルス属
風疹ウイルス**	RUBV	トガウイルス科ルビウイルス属
ヒトパピローマウイルス**	HPV	パピローマウイルス科パピローマウイルス属
ニパウイルス*	NiV	パラミクソウイルス科
ヒトメタニューモウイルス	HMPV	パラミクソウイルス科ニューモウイルス亜科メタニューモウイルス属
ヒト RS ウイルス	HRSV	パラミクソウイルス科ニューモウイルス属
パラインフルエンザウイルス	HPIV	パラミクソウイルス科パラミクソウイルス属
麻疹 (はしか) ウイルス*	MeV	パラミクソウイルス科モービリウイルス属

ヘンドラウイルス*	HeV	パラミクソウイルス科モービリウイルス属
ムンプス（流行性耳下腺炎） ウイルス	MuV	パラミクソウイルス科ルブラウイルス属
パルボウイルス B19 型*	B19	パルボウイルス科エリスロウイルス属
ヒトボカウイルス	HBoV	パルボウイルス科ボカウイルス属
エコーウイルス	EV-3, 6, etc.	ピコルナウイルス科エンテロウイルス属
エンテロウイルス	EV-68, 71	ピコルナウイルス科エンテロウイルス属
コクサッキーウイルス	CAV-2, etc.	ピコルナウイルス科エンテロウイルス属
パレコウイルス	EV-22, 23	ピコルナウイルス科エンテロウイルス属
ポリオウイルス*	PV-1, 2, 3	ピコルナウイルス科エンテロウイルス属
ライノウイルス		ピコルナウイルス科エンテロウイルス属
Saffold ウイルス	SAFV	ピコルナウイルス科カルジオウイルス属
アイチウイルス		ピコルナウイルス科コブウイルス属
A 型肝炎ウイルス	HAV	ピコルナウイルス科ヘパトウイルス属
エボラウイルス*	EBOV	フィロウイルス科フィロウイルス属
マールブルグウイルス*	MBGV	フィロウイルス科フィロウイルス属
クリミア・コンゴ出血熱ウイ ルス*	CCHFV	ブニヤウイルス科ナイロウイルス属
ハンタウイルス		ブニヤウイルス科ハンタウイルス属
重症熱性血小板減少症候群ウ イルス	SFTSV	ブニヤウイルス科フレボウイルス属
リフトバレー熱ウイルス*	RVFV	ブニヤウイルス科フレボウイルス属
G 型肝炎ウイルス	HGV	フラビウイルス科
ウエストナイルウイルス*	WNV	フラビウイルス科フラビウイルス属
ウェッセルズブロンウイルス	WSLV	フラビウイルス科フラビウイルス属
黄熱ウイルス*	YFV	フラビウイルス科フラビウイルス属
中部ヨーロッパ脳炎ウイルス	CEE	フラビウイルス科フラビウイルス属
デングウイルス*	DENV	フラビウイルス科フラビウイルス属
日本脳炎ウイルス	JEV	フラビウイルス科フラビウイルス属
マレーバレー脳炎ウイルス	MVEV	フラビウイルス科フラビウイルス属
ロシア春夏脳炎ウイルス	RSSEV	フラビウイルス科フラビウイルス属
C 型肝炎ウイルス	HCV	フラビウイルス科ヘパシウイルス属
B 型肝炎ウイルス**	HBV	ヘパドナウイルス科オルトヘパドナウイルス 属
E 型肝炎ウイルス**	HEV	ヘペウイルス科ヘペウイルス属
カポジ肉腫関連ヘルペスウイ ルス	KSHV, or HHV-8	ヘルペスウイルス科