

201427032B

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  
(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 24 - 26 年度 総合研究報告書

研究代表者 川崎 ナナ

平成 27 (2015) 年 3 月

## 目 次

I. 総合研究報告書	
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. 分担総合研究報告書	
1. 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価に関する研究 .....	199
遊佐 敬介	
2. 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 .....	235
橋井 則貴	
3. 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.....	257
小林 哲	
4. ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究 .....	275
前田 洋助	
5. 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 .....	285
清水 則夫	
6. 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 .....	295
山口 照英	
6-2. エンドトキシン試験法の研究 .....	311
山口 照英	
7. 持続感染細胞クローンを用いた多様な異常型プリオンの検出・評価系の確立.....	321
黒須 剛	
8. 異常型プリオンの in vivo 検出系の評価に関する研究 .....	325
萩原 克郎	
9. 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究 .....	331
菊池 裕	
9-2. 無菌試験法の研究 .....	337
菊池 裕	
10. マイコプラズマ否定試験法の研究 .....	347
内田 恵理子	
11. ウシ等由来原料の基準の研究 .....	363
吉倉 廣	
12. ウシ等由来原料の基準の研究 .....	393
飛梅 実	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	411

## 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年に改正薬事法と再生医療安全性確保法が施行となり、細胞組織加工製品開発への法的な整備が進み、難治性疾患等への治療に有効な手段として期待が高まっている。また、バイオ医薬品も癌やリウマチ等治療現場での有効性が認識され、これらに続く革新的な製品開発が進んでいる。このような背景のもと、本研究班は、平成24-26年度にわたり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に重要な次の5課題について検討を行って来た。(1)「細胞組織加工製品のウイルス安全性評価」では製品の安全性にかかわるウイルスのリスクを評価した。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。(2)「ウシ等由来原料に係る基準の見直し」では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。(3)「プリオン安全性評価」では迅速な異常型プリオン検出法を開発した。(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」では細胞組織加工製品に実施可能な各試験法を明らかにした。加えて(5)「バイオ医薬品のウイルス安全性評価」では、製品のウイルス汚染事例を精査することで製品のウイルス安全性の要件を明らかにした。

### 研究分担者

遊佐 敬介 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部ウイルス安全性研究室長

新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所  
医療機器部長

橋井 則貴 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部第一室長

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  
生命科学研究部准教授

清水 則夫 東京医科歯科大学  
難治疾患研究所

山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部主任研究官

生田 和良 大阪大学微生物病研究所教授

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

井上 雄嗣 大阪大学微生物病研究所

柚木 幹弘 一般社団法人日本血液製剤機構

坂井 薫 一般社団法人日本血液製剤機構

上平 崇 一般社団法人日本血液製剤機構

久保 純 一般社団法人日本血液製剤機構

小野寺 節 東京大学大学院

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

日本PDA 製薬学会 バイオウイルス委員会  
SALLY 分科会

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

## A. 研究目的

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。しかし現在のところ、承認されている細胞組織加工製品は2製品に過ぎず、実用化促進のために整備すべき課題は少なくない。細胞組織加工製品は、製品が細胞であり、製造スケールがバイオ医薬品等に比較して小規模であるといった特徴があるため既存のウイルス試験法や無菌試験法、マイコプラズマ否定試験法、エンドトキシン試験法が必ずしも適しているとはいえない。また近年日本や米国を含む複数の国が、BSEに対して「無視できるリスク国」に認定されたことを受け、医薬品等に用いる原料基準について改めてリスク評価を行う必要が出て来た。加えて迅速で簡便な異常型プリオン検出法は安全性確保の上で極めて重要である。こうした背景に基づいて本研究班では、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5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
- (5)バイオ医薬品のウイルス安全性評価

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。特に、本研究の3年間の結果は、「細胞組織加工製品のウイルス安全性に関する論点」と「医薬品等のウシ等由来原料のBSEリスク評価に

ついて」の提言にまとめることができた。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)～(5)について、以下を実施した。

(1)では、細胞組織加工製品のウイルス安全性に関わるウイルスの異種宿主への馴化過程、バイオ医薬品汚染事例のあるウイルスの性質を明らかにし、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た。細胞表面のウイルス受容体の発現量を指標とした細胞組織加工製品の感染感受性評価手法を開発することを目的として、iPS細胞表面ウイルス受容体の解析を行った。ここでは細胞表面のビオチン化によって細胞表面の検出効率を高めることによって解析が可能となった。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。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、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。また、感染性ウイルスのリスト化、患者、ドナー及びその他の原材料の特性に依存するリスク要因をいくつか抽出し、頻度や重篤度を考慮したリスク分析を行ってきた。妊娠可能性のある女性が患者の場合や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。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て、リスク因子の分析を試みた。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 (別添資料1)。

(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 (PrPSc) 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、現実に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した。

(5)では、ICHQ5A (医薬審 329 号)「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」が発出されてから 12 年が経過し、ウイルス安全性に関する知識及び経験が蓄積されてきたことを踏まえ、ICHQ5A では明確にされていない推奨されるモデルウイルスの組み合わせや目指すべきウイルスクリアランス値について具体的に提言することを目標として研究を行った。初年度は、抗体医薬品の精製工程に関する審査事例、及びウイルス汚染事例から明らかになったウイルス汚染防御方策等を調査した。また、バイオ医薬品においてウイルス迷入が判明した際の安全性評価を行う場合のモデル系として、ワクチンに PCV-1 (porcine circo virus type 1) あるいは PCV-2 が迷入した事例における製造業者及び規制当局の対応について調査した。

## 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～iPS細胞のウイルス感染性の検討

1)細胞: 293T, Vero, CV-1, CR-FK, HeLa, CRFK, SNL76/7 細胞細胞は DMEM に 10%のウシ胎児血清を加え、培養に供した。ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞株 HPS0063 (201B7) は、レトロウイルスベ

クターにより 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入して樹立したもので、バイオリソースセンターから分与を受けた。iPS 細胞の培養は、国立衛研遺伝子細胞医薬部で行い安田、黒田博士より教示を受けた。ネコカリシウイルス (FCV, F4 株) は野田博士 (衛研) から供与を受けた。またマウス微小ウイルス (MVM) は山口博士 (衛研) から供与を受けた。カリシウイルスは、自然宿主である CR-FK 細胞で増幅し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。FCV (F4 株) 液の TCID<sub>50</sub> は、CR-FK 細胞を用いて決定した。

2)次世代シーケンサーによる解析及び RNA-seq データの解析: 非感染 HEK293 細胞 ( $1 \times 10^6$ ), FCV を m.o.i.1 で感染させ、12 時間、24 時間後に RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて RNA を分離精製し、6  $\mu\text{g}$  RNA を出発材料として、Hiseq 2500 で  $2 \times 100$  bp, 50M リードサイズの解析を行った (受託サービス Eurofin Genomics)。解析データを使って、先ずヒト遺伝子転写物を同定し、続いて NCBI のウイルスデータベース viral.1.1.を用いてウイルス様シーケンスの検索を行った。

#### 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

0.1% Pluronic F-68 を添加した DG44 培地 (GE Healthcare) に、 $2.0 \times 10^5$  cells/mL となるように CHO-DG44 細胞を播種し、7 日間、旋回培養 (125 rpm,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 気流下) した。

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、 $0.25 \times 10^5$  cells/60mm dish となるように播種し、7 日間培養した。

回収した CHO-DG44 細胞 ( $1.4 \times 10^7$  個) あるい

はヒト iPS 細胞 ( $3.0 \times 10^6$  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 時間の転倒混和により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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L (レジン 5  $\mu$ L に相当) を PBS で洗浄したのち、液相を 30  $\mu$ L の RIPA lysate に置換し、室温で 1 時間混和した。レジンを 100  $\mu$ L の RIPA buffer で 1 回、純水で 3 回洗浄し、液相を 100  $\mu$ L 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  $\mu$ L の 1 M DTT を加え 65°C で 20 分間、続けて 4.8  $\mu$ L 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  $\mu$ L の 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) で置換し、終濃度 5 ng/ $\mu$ L 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  $\mu$ L に 70  $\mu$ L 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) で脱塩、凍結乾燥の後、100  $\mu$ L の Tris buffer で溶解し、終濃度 5 ng/ $\mu$ L 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  $\mu$ L の 0.1% ギ酸に溶解し、LC/MS 分析に供した。

1) LC 装置: Paradigm MS4 (Michrome BioResources), 分析カラム: L- column2 C18 column (0.075 mm  $\times$  150 mm,  $\phi$  3  $\mu$ m, 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  $\mu$ L/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), 及び Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific)

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 検索エンジンを用いてタンパク質同定を行った。CHO-DG44 細胞由来タンパク質の同定では UniProtKB 中の *Cricetulus griseus* を種とするデータベースを、またヒト iPS 細胞由来タンパク質の同定ではヒトを種とするデータベースを用いた。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

1) cell-free 感染系の確立: 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 $\Delta$ BglIII を用いた。このベクターは HIV-1 の env 遺伝子を欠損し nef 遺伝子の領域に luciferase 遺伝子をレポーターとして有するベクターである。このベクターは同時に HIV-1 の Gag-Pol も発現するため、レトロウイルス粒子を産生させることが可能である。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 env 遺伝子にはその 5' 領域に splicing site があり、splicing によりその発現効率が低下することが知られており、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、さらに RRE に結合し splicing を抑制することが知られている HIV-1 Rev を同時に発現させることにより HTLV-1 env の splicing を抑制し、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  $\mu$ 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。

2) cell-cell 融合系の確立: レトロウイルス発現細胞としては cell-free 感染系と同様の方法で 293T

細胞に HIV-1 の env 遺伝子欠損ベクターと Env 発現ベクターを 293T にトランスフェクションして Env 発現細胞として使用した。標的細胞として使用する HeLa 由来の CD4 および CCR5 発現細胞である TZM-bl 細胞の染色体内には HIV の LTR の下流に連結された luciferase 遺伝子が組み込まれているため、ウイルス産生細胞と標的細胞が細胞融合すると、ウイルス産生細胞内で HIV-1 ベクターから産生される Tat が標的細胞内に流入し、標的細胞内の LTR を活性化して luciferase 活性が増大することから細胞-細胞融合能を測定することができる。ただしこの系では Env 発現細胞の融合能は評価できるが、実際に標的細胞への感染が成立しているかどうかまでは判断できない。

3) cell-cell 感染系の確立: 使用する HIV-1 レポーターベクターには intron が luciferase 遺伝子の途中で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。

4) 細胞表面、細胞内および粒子内 HTLV-1 Env 発現の確認: 293T 細胞における HTLV-1 Env gp46 の発現ならびにレトロウイルス粒子内への取り込みについては Western blot により解析した。レトロウイルス粒子は培養上清回収後、遠心によりウイルス粒子を濃縮して Western blot を行った。また細胞表面の gp46 の発現はフローサイトメトリーにより解析した。gp46 の検出にはラットモノクローナル抗体である LAT-27 (琉球大学田中勇悦教授より供与) を使用した。

5) HTLV-1 Env のプロセッシング解析: HTLV-1 Env の C 末端に FLAG タグを付加し、293T 細胞内に発現させ、細胞を回収後、Western blot を行い FLAG の抗体で染色した。Env が gp46 と gp21 に正常に切断されると gp21 のバンドが検出されるが、プロセッシングが阻害されると前駆タンパク質である gp62 のバンドとして検出され、gp21 のバンドは検出されない。

#### 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

過去に東京医科歯科大学医学部附属病院で研究的検査として行ったウイルス検査のデータを解析した (ウイルスの存否や量に関するデータのみを入手)。上記検査を行った際に使用した検査方法を以下に示す。

1) 検体からの DNA 抽出: 核酸抽出機 EZ-1 (キアゲン) を使用し末梢血から核酸を抽出した。抽出試薬は、EZ-1 Virus kit を使用した。

2) 核酸増幅: ウイルス遺伝子の増幅・検出には LightCycler (ロッシュ) を使用した。

3) ウイルス検査: ウイルス検査項目は、HSV-1, HSV-2, 水痘帯状疱疹ウイルス (VZV), CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, BKV, JCV, B19 の 11 種類とし、インナーコントロールとして  $\beta$ -globin を使用した。マルチプレックス PCR 法により、被検ウイルスを下記に示す A, B 2 つの反応系で検出し、アデノウイルス (AdV) は別途単独で検査を行った。

A: HSV-1,-2, VZV, CMV, HHV-6, B19, BKV, JCV  
B: EBV, HHV-7, HHV-8

PCR 試薬: AccuPrime Taq DNA Polymerase System, Invitrogen 社

PCR 反応: 95°C 2 分処理後、95°C 2 秒, 58°C 15 秒, 72°C 15 秒の反応を 50 サイクル行った。

検出操作: PCR 反応終了後、メルティング解析を行わない、各ウイルスに対応した Tm 値のピークの有無からウイルスゲノムの存否を判定した。Tm 値は以下の通り。

A: HSV-1 57°C, HSV-2 70°C, VZV 62°C, B19 65°C [LCRed 640 で検出], CMV 61°C, HHV-6 54°C, BKV 66°C, JCV 70°C [LCRed 705 で検出]

B: EBV 63°C [LCRed 640 で検出], HHV-7 58°C, HHV-8 63°C [LCRed 705 で検出],  $\beta$ -グロビン 52°C [LCRed 640 で検出]

4) iPS 細胞の培養

細胞株: 201B7 株 (RBRC-HPS0063)

培地: AK03 (味の素)

5) ウイルスストックの作成

a) 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 $\mu$ 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。

b) 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。

ウイルスゲノム定量系の作成: 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。

6) ウイルス mRNA 検出系の作成:

a) mRNA 検出の標的遺伝子

HSV-1: ICP4, gB

CMV: IE1, UL89

b) RNA 抽出 RNeasy mini kit (QIAGEN) によりウイルス感染細胞から total RNA 抽出を行い、その後 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。

7) 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) 患者が妊娠可能性のある女性の場合、及び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

ジ等をもとにして、感染率や垂直伝播率、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分析及びリスク因子の検討: 患者が免疫抑制状態にある場合のウイルス感染リスク分析を行うため、JADER (2013 年 11 月) の症例報告ラインリストについて、医薬品一般名に抗体関連医薬品または低分子の免疫抑制剤を含み、かつ副作用名にウイルス感染等の症状を含む症例を収集した。別紙「細胞組織加工製品におけるウイルス感染リスク低減に関する論点メモ」に示した通り、ISO が定めたリスクアセスメントの手法を参考に、予備危険源分析法 (PHA 法) による各ウイルスのリスク分析を試みた。すなわち、各ウイルスについて症例数を集計して、まず頻度ランクを定義した。ついで、転帰が死亡・未回復・後遺症となった症例を重篤症例として、転帰不明の症例を除く全症例に対して重篤症例が占める割合から、重篤度ランクも定義した。得られた重篤度ランクと頻度ランクをかけあわせたものをリスクスコアとして、各ウイルスを比較した。

これとは別に、IASR (2014 年 3 月) 及び IDWR (2013 年 9 月) に掲載された数字から得られる週平均報告数をもとにして頻度ランクを定義し、重篤度ランクについては便宜上累積報告数が記載されているかどうかで定義して、これも PHA 法によってリスク分析を行った。

その他、リスク因子の検討にあたっては、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 を用いて再度検索した。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た。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



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)ウシ等由来原料に係る基準

1) 欧州での BSE の地理的リスク評価 (GBR) の国際獣疫事務局 (OIE) 評価への移行に伴う欧米各国の現行規制を精査、また、国内規制に対する国内研究者の意見等について調査を行った。

2) 中枢神経系組織の他組織への混入、残量を評価する系として、現在 TSE 検査に用いられているプリオン検出エライザの有用性について検討した。本邦では一社のみ製の製品が供給されており、これを用いた。プリオン検査では正常プリオン蛋白質を除くためプロテアーゼ (PK) 処理を行うが、本検討ではこの工程を省き、正常プリオン量を中枢神経系組織の混入・残留指標として用いることを想定した。

3) 定型 BSE (c-BSE) のヒトへの感染は vCJD と

して知られており、日本人患者も報告されている。非定型 BSE の一つである L-BSE はヒトへの感染は報告されていないが、サルへの感染実験から伝播の可能性が示唆されている。L-BSE 感染サル脳組織を用いて免疫組織化学的手法による検出条件の最適化について検討した。

4) 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* 検出系作出について検討した。

## (B-3)プリオン安全性評価

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

1) 血漿分画製剤の製造工程に導入されているウイルス除去膜 (平均孔径 35nm, 19nm 又は 15nm) の vCJD 除去能力評価 (図 3-1): 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、sMF とした。アンチトロンビン製剤に導入されているウイルス除去膜 (平均孔径 15nm)、フィブリノゲン製剤のウイルス除去膜 (平均孔径 35nm 又は 19nm) の工程直前液に sMF を加え、ろ過前後の PrP<sup>Res</sup> 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。WB 法はサンプルに 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 1/4 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。

2) Qyu Speed D (陰イオン交換体, QSD) 検討: 新規のプリオン除去能力を有する膜の探索として、陰イオン交換能を有する Qyu Speed D を評価した。PBS 又はフィブリノゲン溶液に sMF を添加し、ろ過前後の PrP<sup>res</sup> 総量 (総 WB-titer) を WB 法より求め、前後の総量の差を除去係数 (LRV) として求めた。

3) 細胞を用いた感染実験法: 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<sup>res</sup> 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

1) アンチトロンビン製剤に導入されているウイルス除去膜 (平均孔径 15nm) のプリオン除去能評価: 接種材料の調製: mo-vCJD 株感染マウス脳由来 sMF を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添加した (ろ過直前液)。その溶液の一部をウイルス除去膜により処理した (ATIII ろ過液)。ろ過液は、さらにその一部を超遠心分離 (150,000 x g 1 時間) により、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 により希釈した後、接種材料とした (図 3-4)。Western blotting (WB) 法による、ろ過直前液の総 WB-titer (non-detectable end point dilution titer に液量に乗じたもの) 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  $\geq 2.8$  であった (表 3-4, 図 3-5)。

感染実験: 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 (30 µL/head) 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<sup>res</sup> 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。

施した。

感染実験による感染価及び LRV の算出: ろ過前後の検体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 ID<sub>50</sub> 値を算出した。感染が認められなかった検体については、段階希釈群の直近希釈群が全て感染陽性と仮定して ID<sub>50</sub> 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。

2) vCJD 感染細胞を用いた in vivo 評価: 培養細胞からの PrP<sup>res</sup> 調製法の検討: 細胞はこれまでに株化した mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 を用いた。また、対照細胞は正常 PrP を発現した bSP-SC<sub>148</sub> を用いた。細胞培養は 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 条件下、10% FBS/BLGM 培地 (2 mM L-Glutamine, Antibiotic-antimycotic, 2-mercapto ethanol 含有 IMDM) にて約 1 週間 Confluent まで培養した。得られた細胞について、細胞破碎を目的とした凍結融解を 2 回繰り返し、超音波処理を行ったのち、PBS を用いて  $5 \times 10^7$  cells/ml 相当となるように調整し、細胞抽出画分とした。

vCJD 感染細胞抽出画分、培養上清の超遠心沈殿及び上清の TCA 沈殿を用いた動物接種実験: 培養液を遠心し、細胞画分と培養液に分離した。細胞画分は細胞破碎を目的とした凍結融解を 3 回繰り返し、超音波処理を行ったのち、PBS を用いて  $5 \times 10^7$  cells/ml 相当 (1% mo-vCJD 脳乳剤相当) となるように調整し、細胞抽出画分とした。培養液は 0.22µm フィルターでろ過したのち、超遠心操作 (150,000g 30 分) により上清画分と沈殿画分に分離した。沈殿画分は細胞抽出画分と同じ容積になるように PBS で懸濁した (培養液の超遠心沈殿)。上清画分は更に 5% TCA 沈殿及びエタノール沈殿を行い、細胞抽出画分と同じ容積になるように PBS を用いて懸濁した (超遠心上清の TCA 沈殿) (図 3-6)。

プリオン材料を用いた感染実験: MV63 由来プリオン材料の感染性を確認するため、生後 4 週齢の FVB/n マウスに調製したプリオン材料 (細胞抽出画分、培養液の超遠心沈殿、超遠心上清の TCA 沈殿) を脳内接種 (30 µL/head) し、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<sup>res</sup> 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。

### 3-3) 異常型プリオンの新規検出法

1) 抗リン酸化セリンプリオン蛋白質抗体の調製: プリオン蛋白質の 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 マウスに導入し、抗体産生を促進した。

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。pS43に対する反応性の比較は、ペプチドを架橋剤MBSでウシ血清アルブミン(BSA)に結合させたpS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (Fig. 3-8A)又はhPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (Fig. 3-8B)を固相抗原として用いたELISAで行った。

2) スクレイピー感染脳乳液の調製: 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<sup>Sc</sup>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ピー(obihiro株)10%脳乳液を投与し、4か月後に安楽死させた。得られたスクレイピ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。

3) Proteinase K処理: 脳乳液(蛋白質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。

4) イムノブロット法: 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ティングを行い、近赤外蛍光法で検出した。また、第1抗体に抗PrP抗体6H4 (ロシュ・ダイアグノスティックス)、抗 p43S-hPrP (39-50)-BCIP抗体又は発現解析のコントロールとしてマウス抗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ティングを行い、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<sup>Sc</sup>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を調査した。

### (B-4)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) マイコプラズマ参照品: *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) からそれぞれ購入後、液体培地で増殖し、1mL ずつクライオチューブに分注後、凍結保存 (-80°C) されたバリデーション用マイコプラズマ参照品を用いた。各菌株の由来、自然界の宿主、及び post preservation titer (CFU) を Table 4-1 に示した。

2) 細胞: Mesenchymal stem cell (MSC ; Lonza) は Mesenchymal stem cell growth medium (PromoCell) に Insulin-Transferrin- Selenium-A を添加して培養した。CHO-DG44 細胞 (Life Technologies) は CD DG44 培地 (GIBCO) を用いて培養した。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。

3) MSC の細胞数の検討: 種々の濃度の MSC の細胞懸濁液を調製し、マイクロチューブに 900µl ずつ分注した。*M. hyorhinis* を溶解後、無血清 MEM 培地を用いて段階希釈し、最終濃度が 100 CFU/mL または 10 CFU/mL となるように細胞懸濁液にスパイクした。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 450µL 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) のマニュアルに従いマイコプラズマ DNA を抽出した。なお、carrier DNA の検討では、Salmon sperm DNA を試料に添加後、DNA 抽出を行った。抽出したマイコプラズマ DNA は、MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection kit (Roche Diagnostics)を用いて検出した。PCR 増幅はキットのプロトコールに従いタッチダウン PCR とした。反応後の検出はマイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いて行い、マイコプラズマ特異的な 450bp のバンドが検出された場合に陽性と判定した。なお、positive control (PC)として、キットに添付の増幅バンドの部分配列を含むプラスミド (増幅断片のサイズは 300bp) の他に、PC-Mh (*M. hyorhinis* のゲノム DNA)、PC-Mo (*M. orale* のゲノム DNA) を用いた。これらはいずれも ATCC から購入したもので 1 pg/reaction を使用した。

4) マイコプラズマ参照品の検出: CHO-DG44 細胞は  $5 \times 10^6$  cells/mL の細胞懸濁液、MSC は  $2 \times 10^5$  cells/mL の細胞懸濁液に Salmon sperm DNA を添

加したものを調製し、それぞれマイクロチューブに 900 $\mu$ 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 量スパイクして最終濃度が 100, 10, 1 CFU/mL となるように調製した。各試料について、以後、3)と同様の操作によりマイコプラズマ DNA の抽出、MycoTOOL PCR による検出を行った。

5) 検体量の検討: Vero 細胞を用いた検体量の検討は MycoTOOL PCR と MycoSEQ (Life Technologies) を用いて行った。MycoTOOL PCR で検出する場合、 $5 \times 10^6$  cells/mL の Vero 細胞懸濁液 0.9ml に Roche 社の carrier DNA 溶液 ( $1 \times 10^7$  個の CHO 細胞ゲノムを含有、DNA 濃度は非公開)を終濃度 80 $\mu$ l/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、以後は 3)と同様の操作によりマイコプラズマ DNA の抽出、MycoTOOL PCR による検出を行った。MycoSEQ で検出する場合、Vero 細胞  $5 \times 10^6$  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及び検出を行った。

6) マイコプラズマ感染細胞の作製と培養上清のマイコプラズマ測定: 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  $1 \times 10^4$  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. hyorhinitis* 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 のマニュアルに従い定量を行った。なお、キットに添付された positive control のほか、 $1 \times 10^7$  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。

7) マイコプラズマの遠心濃縮: 10 CFU/mL あるいは 1 CFU/mL の *M. hyorhinitis* 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 $\times$ g で 30 分間の遠心、または(2)細胞添加後遠心: 終濃度  $5 \times 10^4$  cells/mL となるように Vero 細胞を添加後に 16,000 $\times$ 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. hyorhinitis* 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. hyorhinitis* 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。

8) Vero 細胞でのマイコプラズマ増殖曲線: 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  $1 \times 10^4$  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 $\times$ 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ものも同様に培養し、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

第十六改正日本薬局方 一般試験法 無菌試験法 表 4.06-1 培地性能試験及び手法の適合性試験に適している試験用菌株に収載された *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Bacillus subtilis* NBRC 3134, *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275, *Clostridium sporogenes* NBRC 14293, *Candida albicans* NBRC 1594 及び *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9455 を含む 13 菌株を選択し (Table 4-9)、独立行政法人製品評価技術基盤機構 NBRC (Biological Resource Center, NITE) から購入して PCR 試験用菌株とした。鋳型 DNA の調製は、日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法に準じて行った。液体培地で培養した細菌又

は真菌を遠心分離後、菌体を 10 倍容量の滅菌精製水に懸濁して熱処理 (96°C, 5 分間) し、遠心分離して得た上清を測定用テンプレートとした。PCR は、日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法に準じて行った。用いたプライマーを Table 4-10 に示した。PCR 反応液に加熱処理した菌液の DNA 抽出物を加え、細菌の場合は 10F/1500R, 10F/800R, 800F/1500R 又は 525F/800R プライマーセットを、真菌の場合は ITS5F/D2R プライマーセットを添加して以下の条件で PCR を行った。細菌は 94°C, 30 秒→55°C, 60 秒→72°C, 60 秒の反応を 30 サイクル、それぞれ約 1500bp, 800bp, 700bp 又は 250bp の DNA 断片が増幅生成した。真菌は 94°C, 30 秒→52°C, 40 秒→72°C, 70 秒の反応を 35 サイクル、1200bp の DNA 断片が増幅生成した。反応終了後の PCR 液 5µL を 1µL のローディング緩衝液と混合し、アガロースゲルのウェルに添加し、1 倍 TAE 緩衝液を用いて電気泳動した。泳動後、トランスイルミネーターで観察した。

#### 4-3) エンドトキシン試験法

1) 市販キットの調査と細胞組織加工製品への適用における課題: 国内で日局<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、細胞組織加工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。また日局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、細胞組織加工製品への適用の可能性について調査した。

2) 細胞組織加工製品へのエンドトキシン測定キットの適用: 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エンドトキシン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等について解析した。

3) 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、無血清培地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。

4) ELISA 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、3 と同様の希釈系列に対して測定を行った。

5) 保存検量線を用いた測定法: 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。

#### (B-5) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

文献・審査報告書等を基に調査した。

(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) iPS 細胞のウイルス感染性の検討

1)カリシウイルスの非宿主細胞への馴化と馴化ウイルス分離: ヒト細胞に焦点を当て、ヒト由来の細胞株 293T, HeLa に低い感染性を示すウイルスを探し出すためにポリオウイルス, シンドビスウイルス, 2 つのカリシウイルスについて細胞変性効果を指標に調べた (表 1-1)。その結果, ポリオウイルスは、ヒト細胞以外にはまったく感受性を示さなかったが、ヒト細胞に強い細胞変性効果 (CPE, cytopathic effect) をもつことがわかった。CV-1 細胞にカリシウイルスを感染させ、培養後上清中のウイルス量を CR-FK 細胞を使って調べることができる。継代 1 回目の CV-1 細胞のウイルス産生量を、CR-FK 細胞のものと比べると、確かに  $1/10^5$  程低いことがわかる (図 1-1)。しかし CV-1 細胞で引き続き継代していくと 3 回継代しただけで、そのウイルス産生量は  $10^3$  倍程上昇することがわ

かった。

2) 馴化ウイルス FCV<sub>CV</sub> の強い細胞変性効果: ウイルスの CV-1 細胞への馴化をさらに確実なものにするために、ウイルス継代をさらに 10 回繰り返す、合計 13 回継代したものを FCV<sub>CV</sub> とした。FCV<sub>CV</sub> をそれぞれの細胞に感染させてウイルス増殖を比較したのが図 1-2 である。以上からカリシウイルスは、CV-1 細胞により馴化していることが確認された。次にウイルス増殖が細胞に及ぼす影響について調べた (図 1-3)。FCV<sub>F4</sub> は宿主細胞である CR-FK で激しく増殖し、細胞変性を引き起こすが、FCV<sub>CV</sub> も同様に強い細胞変性効果をもっていた。CV-1 細胞では FCV<sub>F4</sub> 感染細胞からのウイルス産生は見られたが、細胞変性効果は観察されなかった。ところが、FCV<sub>CV</sub> 感染細胞では形態変化を起こし、細胞は浮き上がり、その殆どが死滅した。この結果からカリシウイルス FCV<sub>F4</sub> を CV-1 細胞によって短期間継代することで、ウイルス産生能力が 10 倍以上高まり、強い細胞変性効果をもつ FCV<sub>CV</sub> を選択分離することができたことになる。

3) FCV<sub>CV</sub> の融合細胞での増殖と細胞変性効果: 次に CV-1 細胞、Vero 細胞 2 つの細胞を融合した細胞、C/V#01、C/V#02 細胞を作製して FCV<sub>CV</sub> 感染に関する表現型を調べてみた (図 1-2, 1-3)。その結果、融合細胞では、FCV<sub>F4</sub> に比べてより多くの FCV<sub>CV</sub> ウイルスを産生し、かつ FCV<sub>CV</sub> によって強い細胞変性が引き起こされることがわかった。しかも本来ほとんど細胞変性が見られない FCV<sub>F4</sub> 感染細胞でも >50% 以上の細胞が死滅した。

4) FCV<sub>CV</sub> カプシドタンパク質 VP1 のアミノ酸置換: それでは CV-1 細胞に馴化したカリシウイルスである FCV<sub>CV</sub> は、馴化前の FCV<sub>F4</sub> に比べて何が変わったのだろうか。それを調べるためにウイルス粒子を形成しているウイルスタンパク質 VP1 の構造に変化があるかどうかを調べた (図 1-4)。FCV<sub>CV</sub> の VP1 には 3 つのアミノ酸置換を伴う変異 Y354V, D427S, E519K が見つかった。354 番目のアミノ酸残基は、P1 ドメインに位置しており、2 つの VP1 が 2 量体を形成する際の接触面にある。427 番目と 519 番目のアミノ酸残基は、VP1 の 2 量体において、ウイルス粒子の表面ではなく、その側面上部に位置している (図 1-5)。ここは、ウイルスレセプターと相互作用すると考えられている部分である。従ってこの 2 つのアミノ酸置換によって馴化ウイルスである FCV<sub>CV</sub> では CV-1 細胞上のレセプターとの相互作用に変化が起きた可能性を示唆している。

5) オートファジー誘導、阻害剤の影響: オートファジーとは、細胞が異常タンパク質の蓄積など

に晒されたときにこれを分解するために形成される一連の分解反応過程をいう。ウイルス感染増殖過程に、宿主側の小胞形成が関与しているとすると、CV-1 に FCV<sub>F4</sub> が感染した場合は、細胞破壊を伴わずにウイルス粒子を細胞外に放出可能だが、FCV<sub>CV</sub> ではその増殖性が高いため、その経路では間に合わず、ウイルス粒子の細胞内蓄積が進み、最終的に細胞破壊が起きる。そこで次にオートファジーの阻害剤である 3MA と促進作用のあるラパマイシンを使って、FCV<sub>CV</sub> の増殖、細胞変性効果に対する影響を調べた (図 1-6, 1-7)。まず Vero 細胞と CV-1 細胞に FCV<sub>F4</sub> あるいは、FCV<sub>CV</sub> を感染させ、そこに阻害剤である 3MA を加えてその影響を調べた。その結果からオートファジー阻害が、カリシウイルス産生の減少を引き起こしている可能性が示された。それではオートファジーを誘導した場合はどうだろうか。オートファジー誘導作用をもつラパマイシンによって、実際にオートファジーが誘導されるかどうかを抗 LC3 抗体により調べたのが図 1-8 である。確かに LC3II が薬剤によって誘導されているのが分かる。ラパマイシンをウイルス感染系に加えて、その影響を見たのが、図 1-9, 1-10 である。ここにラパマイシンを加えると、CV-1 細胞の細胞変性効果が抑制され、生細胞数が回復することがわかった。この効果は次の 2 つの可能性を示唆する。①FCV<sub>CV</sub> による CV-1 細胞の強い細胞変性効果が、オートファジーを誘導することによって、分解系にまわり、細胞死をまぬがれた、②オートファジーによる小胞形成の結果、ウイルスが細胞内に蓄積せず、効率よく細胞外に運ばれ放出されたため、細胞破壊による細胞死が抑制された。これを明らかにするために細胞培養上清のウイルス量を調べた (図 1-10)。その結果、CV-1 細胞ではラパマイシンにより FCV<sub>CV</sub> 産生量も増えていることがわかった。よってラパマイシンの効果は、後者の可能性が高いと考えられる。

6) ヒト細胞へのカリシウイルスの感染: 表 1-1 でカリシウイルスは本来自然宿主ではない細胞種であるアフリカミドリザルのレセプター JAM1 を使って感染することが示唆された。293T 細胞も HeLa 細胞も JAM1 陽性である。自然宿主のネコの JAM1 とアフリカミドリザルの JAM1 の相同性はアミノ酸配列で比較すると 58% である。ヒトの JAM1 と、アフリカミドリザルの JAM1 の相同性は 98% である (図 1-11)。もしカリシウイルスの宿主域がレセプターの違いによるのだとしたら、ヒトとアフリカミドリザルの JAM1 のごくわずかな違い (2%) が決定的な感染の可否を決めていることになる。次にカリシウイルスに感染しない

CHO 細胞にヒトの JAM1 を発現させ、カリシウイルスが感染するかどうかを検討した (図 1-12).

この実験からヒトの JAM1 はカリシウイルスの細胞への侵入をサポートできることがわかった. それでは、何故ヒト細胞では感染性をもつウイルス粒子の産生がないのだろうか. このことを明らかにするために、最初にかリシウイルスの侵入をリアルタイム PCR で測定した (図 1-13). その結果、ヒト細胞でも-鎖 RNA が転写されることがわかった. しかも 293T 細胞においては、Vero 細胞とほぼ同量の-鎖 RNA が作られる. この結果は、ヒトの細胞内にもウイルスの-鎖を合成するのに必要な宿主因子のすべてが含まれていることを意味している.

7) カリシウイルスの iPS 細胞への感染: iPS 細胞では、G418 抵抗性発現ベクターおよび LIF 発現ベクターを組み込んだ SNL76/7 細胞 (SNL76/7 STO 細胞, ECACC 07032801) が、ヒト iPS 細胞培養に使用されている. そのためここではマイトマイシン C 処理済みの SNL76/7 細胞との共培養下でウイルス感染実験を行った (図 1-14). その結果、ネコカリシウイルスが、iPS 細胞に感染可能であり、細胞外へ感染性ウイルスを産生することができることがわかった. ウイルス感染では、ウイルス増殖に伴う細胞変性効果が観察される場合がある. そこで次に感染後 2 日目の細胞数を調べた (図 1-14). その結果ウイルス感染に伴う細胞変性効果は観察されなかった. 感染をさらに確認するために、感染後細胞内のウイルス RNA コピー数を RT-qPCR 法によって調べた (図 1-15). カリシウイルスの RNA は、genomic RNA(+)鎖、genomic RNA(-)鎖、subgenomic RNA(-)鎖、subgenomic RNA(+)鎖と 4 種類ある genomic RNA(-)鎖の合成は、SNL76/7 細胞では全く見られず、iPS 細胞/SNL76/7 細胞では、明らかなコピー数の上昇が見られた. また HeLa 細胞に比べて、低い m.o.i. 0.1 でも iPS 細胞/SNL76/7 細胞では、genomic RNA(-)鎖が確認され、ウイルスの感染侵入効率に関しては、HeLa 細胞を上回る感受性を示した. さらに時間経過にしたがって急速にウイルスコピー数は上昇するが、12 時間後には減少し始めた (図 1-16).

8) ポリオウイルス、シンドビルウイルスの iPS 細胞への感染: ポリオウイルスを iPS 細胞と SNL76/7 細胞の共培養系に加えると、ウイルスによる細胞変性効果が観察された (図 1-17). 一方 SNL76/7 細胞は、ウイルスによって全く影響しなかった. 以上からポリオウイルスは、iPS 細胞に感染し細胞死を誘導することが明らかになった (図 1-18). また iPS 細胞は感染後 2 日目でシ

ドビスウイルスにより、死滅することがわかった (図 1-19).

9) 次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法: 次世代シーケンサーを使ったウイルス検出法の概略を示したのが図 1-20 である. RNA を使って解析を行う理由は、DNA ウイルスも RNA ウイルスとともに感染複製する際には、必ず RNA を産生する必要があるためである (図 1-21).

10) モデル細胞 HEK293 とモデルウイルス FCV<sub>F4</sub> 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. 非感染 HEK293 細胞とウイルス感染後 12 時間と 24 時間後の HEK293 細胞から RNA を分離し、Illumina 2500 を使って解析を行った. HEK293 細胞の RNA-seq データは 200 nt に満たない短いリードを 23M 本含んでいた. また得られたリードの 88%以上のデータは比較的良好なオリティを持っていることがわかった (表 1-2).

11) RNA-seq データの解析: 非感染 HEK293 細胞の解析の結果、得られたシーケンスを次の 3 つの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 1-22). 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. カリシウイルスを感染させたものでは、同様に virus-like seqs と判別されたものは、全 RNA-seq データの 0.6%であった. 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 1-23, 図 1-24). 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 1-25). カリシウイルスの多くの株を含む拡張データベースを作成し、解析に用いたところ、カリシウイルス F4 株のゲノム全長をカバーする多くのリードを検出することができた. この拡張ウイルスデータベースを用いて解析すると感染細胞からカリシウイルスが 35.8%、17.9%検出され、満足のいく結果が得られた (図 1-26). 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た (図 1-27).

12) 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多岐にわたった。問題点として以下が挙げられる: ① NGS によるシーケンシングのサイズと品質, ② 適切なデータ解析プログラムの選択, 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シーケンシス (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。「① NGS によるシーケンシングのサイズと品質」について検討を行った。次世代シーケンサーのデータサイズが, 検出感度に関わる重要な要因であることを示している。当然リード数が大きくなると, それぞれの転写産物のカバレッジも増加するが, リード数を上げると, それに従って解析コストも増加するからである。この点についてはさらに検討を進める必要があるが, リード数を 5M に下げても, ウイルスゲノムをカバーすることができることがわかった (図 1-28)。「② 適切なデータ解析プログラムの選択」については表 1-3 にまとめた。RNA-seq データからウイルス様シーケンシスを同定するのにかけた時間と得られた結果についてまとめたものである。tophat では解析に 66 時間かかるが, star ではわずか 3 分で解析を終了することができる。このように使用する解析プログラムによって解析にかかる時間に大きな差が出る。今後さらに効率の良い解析プログラムが利用できるようになる可能性があり, システムの改良と共に解析時間を短縮できると考えられた。「③ ウイルスゲノムデータベースの拡張」については, 既に述べたように多様性のあるウイルスに関しては, 解析に使うウイルスデータベースを拡張し, 検出できるウイルスの範囲を広げる必要がある。最新のウイルスデータを加えて改訂していく必要がある。「④ 宿主細胞 RNA-seq に含まれるウイルス様シーケンシス」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」, 「⑦ 検出感度, 検出限界, 他の検出法との比較」については, ウイルス由来シーケンシスを判別する際の重要な課題であり, 今後検討する必要がある。

13) 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。次世代シーケンシス解析には, 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 1-4 である。近年の次世代シーケンサーの発達と改良は目を見張るものがある。解析に要する時間も Illumina の製品を例にとると, HiSeq 2500 では 40 時間かかるが, MiSeq 500 では 4 時間程に短縮できる。また価格面でも解析器材さえそろえば, 実質 1 サンプルにかかる試薬の費用は, 約 3 万円程である。人件費等を併せても, 1 サンプル 15 万円程度に抑えることができるのではないかと考えられる。また器材の進歩と共に次世代シーケンサーによる解析の受託サービスは, 今後は大きく価格ダウンすると思われる。また解析器材さえあれば, 解析を行うのに必要な時間は, 最短 2 日程度なると考えられる。そのためには, データ解析に要する時間を数時間程度にする必要があり, virus-like seq と判定するのに間違いがなくなるように判定に必要な知見の集積が今後必要である。

14) 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の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, それを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 1-5)。SNL76/7 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,  $\gamma$  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シスであった。またウイルス様シーケンシスと判定されたシーケンシスは全体の 0.0018~0.0041% を占めることがわかった (図 1-29)。ここで得られたごくわずかなウイルス様シーケンシ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 1-31)。ここで検出されたリードをパルボウイルス遺伝子の全長にマッピングしてみると, 全長にわたってマッピングできた (図 1-30)。このことから, 感染細胞からパルボウイルスが間違いなく検出できたことになる。

## 1-2) iPS 細胞表面ウイルス受容体の網羅的解析

1) 細胞表面のウイルス受容体解析技術 (ウイルスレセプトーム解析技術) の開発: CHO-DG44 細胞の RIPA lysate を, そのまま還元カルボキシメチル化, 及びトリプシン消化した後, LC/MS 分析を



行った(図 1-31A, whole cell lysate). 取得した MS/MS データを用いて, タンパク質同定を行った結果(図 1-32A), 同定された総タンパク質数 (532 個) に対する膜タンパク質, 及び細胞内タンパク質の割合は, それぞれ 27%及び 19%であった. 膜タンパク質が最も多く同定されたものの, 細胞内タンパク質が量的に多く, ウイルス受容体はほとんど検出されなかった(表 1-7. whole). 膜タンパク質の回収方法として, 超遠心分離法があるが, 微量タンパク質の回収には適さない場合がある. また近年, さまざまな界面活性剤を用いた膜タンパク質抽出キットが販売されているが, 脱界面活性剤・脱塩操作後に, 回収率が低下することが懸念されている. そこで RIPA lysate から, 細胞表面に存在するタンパク質のみを効率的に回収するために, 細胞膜透過性を持たない分子で標識する過程を追加した. 可溶化前の細胞を Sulfo-NHS-LC-biotin 溶液中で振盪することで細胞表面タンパク質のビオチン化を行い, 可溶化後に固定化ストレプトアビジンでビオチン化タンパク質を精製したのち, 溶出を省き固定化ストレプトアビジンに結合させたままの状態還元カルボキシメチル化と消化を行ってペプチドにすることで, 凝集・沈殿による膜タンパク質の逸失の抑制を図った. また, 通常還元カルボキシメチル化には, タンパク質を変性させ反応効率を高めるために, グアニジンなどの変性剤を含む溶媒が用いられるが, グアニジンが固定化ストレプトアビジンを変性させビオチン化タンパク質の流失を起こす危険が想定されたため, 還元カルボキシメチル化時の溶媒として, 8 M のグアニジンを含む guanidine buffer を用いた試料に加え, より穏和な条件として緩衝剤のみを含む Tris buffer を用いた試料を別に用意した. ビオチン化とストレプトアビジンでの細胞表面タンパク質の濃縮を行ったことで, 同定された全タンパク質数は減少したものの(Tris buffer 358 個, guanidine buffer 305 個), 膜タンパク質数の割合は, 27%から 32% (Tris buffer)または 43% (guanidine buffer)に上昇した(図 1-32). また, ウイルス受容体関連タンパク質として, intercellular adhesion molecule 1 (Coxsackievirus A13 等), low-density lipoprotein receptor (Rhinovirus)等 17 種(表 1-6)が同定され, 同定数は 1 個から 9 個に改善された(表 1-7). 還元カルボキシメチル化に用いる緩衝液については, guanidine buffer で還元カルボキシメチル化を行ったもので特にウイルス受容体由来ペプチドの検出数が多く(表 1-7), Tris buffer 系では細胞内タンパク質の検出数が多かった(図 1-32B, C). このことから, ストレプトアビジン-ビオチン間の結合は guanidine buffer 中で還

元カルボキシメチル化を行ってもなお十分に維持されており, むしろ或る程度の変性条件を適用して非特異吸着物や凝集物を除去する方が, 効率良く細胞表面のウイルス受容体を回収できるものと推定される. 表 1-7 に挙げたウイルス受容体関連タンパク質由来ペプチドの MS スペクトルおよびそれらの代表的な MS/MS スペクトルを図 1-33 に示す.

2) ヒト iPS 細胞のウイルスレセプトーム解析: 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  $1 \times 10^5$  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 1-34A). 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. 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 1-36A). 次に, 表 1-6 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)等の存在が明らかとなった. ビオチン標識法を利用した手法により, ヒト iPS 細胞由来膜タンパク質の濃縮・精製を行った. 図 1-34B 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 1-35B). 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 1-36B). 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 1-8). タンパク質とは異なるが, 表 1-6 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 (Takakura, D, Kawasaki, N. et al., J

*Proteomics*, 2014, 101, 17-30.) 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 1-37A 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 1-37B 及び 1-37C 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 1-37D 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、いずれもシアル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

1) HTLV-1 Env のウイルス感染細胞発現とウイルス粒子内取り込みの確認: 293T 細胞に HTLV-1 Env と Env 欠損 HIV-1 ベクターをコトランスフェクションにより発現させ、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 1-38)。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 1-38)。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 1-39), HTLV-1 Env は強い細胞-細胞融合能を持つことが確認された。

2) HTLV-1 Env の cell-free と cell-cell の感染リスク評価: 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 感染に関しては 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 1-40)。

3) HTLV-1 Env の cell-free ウイルスの安定性評価: 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、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明らかとなった (図 1-41)。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確認したところ、感染性減弱の半減期は約 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 1-42)。

4) HTLV-1 Env 発現細胞における HTLV-1 感染制御: HTLV-1 感染細胞の感染制御を目的として、HTLV-1 Env およびレトロウイルス発現 293T 細胞を種々の薬剤で処理し、HTLV-1 Env の cell-free 感染能を解析した。本研究では細胞小器官 (オルガネラ) の酸性化阻害剤である塩化アンモニウム、クロロキン、Bafilomycin A1 (BFLA1), エンドサイトーシス阻害剤である Dynasore に着目して実験を行った。HTLV-1 Env およびレトロウイルス発現 293T 細胞をこれらの薬剤で処理してその感染能を確認した結果、オルガネラ酸性化阻害剤のレトロウイルス感染細胞への添加により HTLV-1 Env の cell-free 感染が完全に阻害された (図 1-43)。一方 HIV Env による cell-cell 融合能、cell-free 感染に関してはその効果はわずかに認められるだけであった。逆に標的細胞へのこれらの薬剤添加ではやはり十分な効果は確認できなかった (図 1-44)。さらにこれらの薬剤は cell-cell 融合能、cell-cell 感染も阻害することが確認された (図 1-45)。HeLa 細胞においても同様に HTLV-1 Env 発現による合胞体形成がオルガネラ酸性化阻害剤により阻害され (図 1-46)、さらには HTLV-1 感染 T 細胞株である MT-2 と MOLT-4 の混合培養による合胞体形成能も阻害することが判明した (図 1-47)。

5) オルガネラ酸性化阻害剤の HTLV-1 Env の感染阻害機序の解析: このようなオルガネラ酸性化阻害剤がどのような機序でウイルス感染細胞の感染性を阻害しているか解析を行った。まず細胞表面 gp46 の発現をフローサイトメトリーにて解析したが、これらの薬剤添加による発現低下は認められなかった (データ非掲載)。そこで gp46 との結合活性を有し、HTLV-1 の受容体として同定されている Glucose transporter 1 (GLUT1) の発現に着目した。通常 GLUT1 の細胞表面の発現は弱く抑えられており、飢餓状態などで細胞表面に移動 (translocation) してくることが知られている。BFLA1 は GLUT1 の細胞内コンパートメントから細胞表面への移動を促進することが報告されており、実際に 293T 細胞でも GLUT1 の発現は低く、BFLA1 により細胞表面への GLUT1 の移動が確認された (図 1-48)。また GLUT1 を強制的に細胞に過剰発現させるだけでも、その感染性は量依存的に阻害され (図 1-49)、GLUT1 の細胞表面への発現がこの感染阻害に関与していることが示された。そこで GLUT1 と gp46 が細胞内で BFLA 処理により会合するかどうか確認したところ、GLUT1 と gp46 の細胞内での会合は GLUT1 の強制発現で確認され、さらに BFLA1 処理により促進されることが判明した (図 1-50)。さらにこの会合により HTLV-1 Env の前駆体タンパク質である gp62 から gp46 と gp21 へのプロセッシングが阻害されて感染性が消失することが明らかとなった (図 1-51)。その他のオルガネラ酸性化阻害剤もわずかながら GLUT1 の細胞表面への移動を促進することは示されたが (図 1-48)、同様に HTLV-1 Env の感染性を阻害できるかどうかは不明である。これらの薬剤においてはその他の機序も関与している可能性があり今後の課題と考えられた。

#### 1-4) ウイルス感染リスク評価に関する研究

1) リアルタイムPCR法によりヒトに持続感染し、且つ血液中にウイルスゲノムが検出されるウイルスの検出頻度を調べた。データは、東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターで行っている研究的ウイルス検査により得られたデータを使用し分析した。検査対象ウイルスは、HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, HHV-6, B19, BKV, JCV, B: EBV, HHV-7, HHV-8, AdV. 検査を行った検体は、末梢血: 112名より得られた640検体である。検査結果を以下に示す。末梢血640検体中50検体以上から検出されたウイルスは、EBV, CMV, HHV-6. 49~10検体から検出されたウイルスは、VZV, JCV, BKV, AdV. 9~1検体から検出されたウイルスはHSV-1, HHV-7, B19. 検

出されなかったウイルスは、HSV-2, HHV-8, HBV だった。

2) ウイルス液の感染価測定結果: HSV-1 は Vero 細胞, CMV は HFL-1 細胞に作成したウイルスストックを段階希釈して接種し、CPE を指標にウイルス感染価を測定したところ、下記の値が得られた。

HSV-1 の感染価:  $7.8 \times 10^5$  pfu/ml

CMV の感染価:  $7.0 \times 10^5$  pfu/ml

3) iPS 細胞への CMV スパイク試験: iPS 細胞 (201B7 株) に感染価測定結果をもとに 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 1-52)。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 1-53, 1-54)。

4) iPS 細胞への HSV-1 スパイク試験: iPS 細胞 (201B7 株) に感染価測定結果をもとに moi=0.1 で HSV-1 を感染した。感染後 3 日後には細胞増殖が著しく阻害され (図 1-55)、強い CPE により細胞は死滅した (図 1-56)。また、ウイルス mRNA 発現 (図 1-57)、ウイルスタンパク質発現 (図 1-58) 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) 妊娠可能性のある女性の場合、及び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、調査結果の概要リストをそれぞれ表 1-9 と 1-10 に示した。

2) 症例報告等を利用したリスク分析及びリスク因子の検討: JADER と IDWR 及び IASR を用いたリスク分析については、別添資料 1 に示した通りであり、それぞれ、HBV (B 型肝炎)、EBV, JCV と、HIV、風疹ウイルス、麻疹ウイルスのリスクが高い結果になった。ウイルス感染症のリスク因子分析結果は、表 1-11 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 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。

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

バイオ医薬品使用時のウイルス感染リスクの可視化とリスク因子の推定：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 1-12 のような 2×2 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。

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

データ解析を行うにあたり、データの統計情報、特性を知ることは重要なことである。図 1-59 に JADER の統計情報を示した。その他、図 1-60 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 1-61 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、 $\mu$  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。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キヌ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 dendrogram 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- $\alpha$ 、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- $\alpha$  抗体であるセルトリズマブ ペゴルは、他の抗 TNF- $\alpha$  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