

の、IL-12、IL-23 を標的とするウステキヌマブは、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 1-62 は、図 1-61 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。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) を用い、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 1-62 は、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 1-63 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 1-63 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。 $x_{1,2,\dots,n}$ 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、

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

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、

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

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 1-63 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。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)ウシ等由来原料に係る基準

1) 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。

2) TSE 検査用エライザキット ニップルがマウス prion (PrPsc) およびプリオンタンパク質への反応性を有することを確認した。

3) 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)。

4) プリオン感受性ヒト細胞株からプリオン蛋白

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蛋白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蛋白質発現を確認できた (図 2-3)。

(C-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

mo-vCJD を用いてアンチトロンビン製剤、フィブリノゲン製剤の製造工程に導入されている平均孔径 15nm, 19nm, 35nm のウイルス除去膜工程における除去能力を WB 法で評価したところ、15nm の除去膜はこれまでに実施したスクレイパー-263K と同様に mo-vCJD (PrP^{res}) を検出限界以下にまで除去する事を確認した (表 3-1, 図 3-2)。また、19nm も同様に検出限界以下にまで除去したが、35nm は一部のプリオン蛋白が膜を通過し、検出限界以下にまでろ過できなかった (表 3-2)。粒子径と膜孔径の差を利用してプリオンをろ過するウイルス除去膜に加え電氣的にプリオンを吸着すると考えられる膜 (QSD) を評価したところ、PBS 及びフィブリノゲン溶液中でもプリオンを除去できる事を確認した (表 3-3)。mo-vCJD 感染マウス sMF の希釈サンプルを RK13mol 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

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: 採取した脳サンプルを WB 法にて感染価を Karber 法で算出したところ、ろ過前液は 5.2 Log ID₅₀/ml, ろ液は <1.0 Log ID₅₀/ml (検出限界以下) であった。更に、病理学的評価 (HE, IHC) も実施し、WB 法と同様の結果を示した (表 3-5)。以上の結果から、本工程における LRV は ≥4.2 と算出された (表 3-6)。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 (表 3-5, 3-6)。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。

2) vCJD 感染細胞を用いた in vivo 評価: 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) を接種された群のうち、細胞抽出画分及び培養液の超遠心沈殿画分に PrP^{res} が WB 解析により検出された。更に、病理学的観察の結果、空胞変性及び異常型プリオン蛋白の蓄積が認められた (図 3-7)。一方、超遠心上清の TCA 沈殿を接種された群では WB、空胞変性、異常型プリオン蛋白は検出されなかった (表 3-7)。

3-3) 異常型プリオンの新規検出法

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, γ2b)だった。次に、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 (Fig. 3-9, Table 3-8)。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)は8.5を示し、pS43を含む配列に対する特異性が最も高かった。pSP289の比率も4.8と比較的高かった。一方、pSP240は高い抗体価を示したが、その比率は1.5で、特異性は低かった。

2) イムノブロット法によるpS43-PrP^{Sc}の検出: 抗体のリン酸化PrPに対する特異性は、正常及びPrP^{Sc}感染マウス脳乳液を用いたイムノブロット法で調べた。脳内にスクレイパー (obihiro株) を接種されたマウスは、その脳内にPrP^{Sc}を蓄積し、4-5か月後に死亡する。本研究ではエンドポイント直前の4か月でマウスを安楽死させ、PrP^{Sc}感染脳及び溶液のみを投与した対照脳(mock)を調製し、イムノブロット法に用いた (Fig. 3-10)。抗プリオン蛋白質抗体6H4を用いたイムノブロット法 (Fig. 3-10A-C., upper panel) は、対照脳 (lane 1) 及びPrP^{Sc}感染脳 (lane 3) とともに、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 mAb のイムノブロット法 (Fig. 3-10A-C., upper panel) では、対照脳の単量体を認識せず、2量体PrPに相当するバンドを認識した (lane 1)。PrP^{Sc}の認識は対照脳より弱く (lane 3), N端側が消化されるPK処理ではバンドが消失した (lanes 2 and 4)。3種類の抗リン酸化プリオンペプチド抗体は、2量体のPrPを同様に認識したことから、以降の実験には、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pSP279を用いて行った。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. 3-11A and C) は、対照脳 (lane 1) 及びPrP^{Sc}感染脳 (lane 3) とともに、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. 3-11B 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. 3-4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. 3-5), 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. 3-8D) でPrPの蛍光強度 (Fig. 3-8B) 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 3-4)。

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

1) PrP^{Sc}の検出手法に関する評価: PrP^{Sc}の検出法としては、感染性を最も反映した方法としてマウス脳内接種法やさらにそれを高感度化した方法としてプリオンタンパク質トランスジェニック (Tg) マウスへの感染系などが用いられてきている。しかし、このような系でも発症まで長期にわたる時間経過が必要であることから、その代替法として

異常プリオンを免疫学的手法で検出する方法やプロテアーゼ K 耐性プリオンタンパク質の検出法（ウエスタンブロット法）などが用いられてきている。このような免疫学的手法は必ずしも異常プリオンの感染性を反映していないという懸念も指摘されてきている。そこで感染性の代替法をかねた方法として、異常プリオン(PrP^{Sc})が正常プリオンをミスフォールディングさせる能力をもつことを利用したタンパク質ミスフォールディング循環増幅法（PMCA）などが用いられるようになってきている。PMCA 法は Castilla らにより開発された方法であり、核酸増幅法である PCR に類似した原理でタンパク質のミスフォールディングを誘導するサイクルを繰り返して行うことにより試験管内で異常プリオンを形成させ、高感度に検出しようとするものである。PMCA 法はいくつかの改良法も提案され、異常プリオンの感染性の推定に用いられている。

a) BSE経口感染牛の臓器や排泄物のBSEリスク：PMCA法を用いて異常プリオンを経口接種させたウシの各臓器における異常プリオンの検出が報告されている。この報告では、従来法のPMCA法プロトコルを用いてBSEを経口接種させた4頭のウシの各臓器を採取し、どの臓器や排出物に異常プリオンが含まれるかを推定している。インビトロ増幅での基質として用いられているのはウシプリオンを遺伝子導入した (Tg) マウス由来のプリオンタンパク質を含む脳由来の均質な液を用いている。BSEを経口投与したウシ脳から採取された臓器の中で、脳、脊髄、神経節、視神経、パイア一斑に異常プリオンが検出されている。さらに、腸間膜リンパ節、副腎に加えて、皺胃（第3胃）、瘤胃（第1胃）、直腸においても検出されている。さらに唾液についてもレベルは低いもののPMCA反応が陽性となったとされた。唾液でのPMCA陽性反応が検出されたこと、さらに唾腺にも陽性反応が検出されたことより、このような体外排出される検体で陽性反応が検出されたことから水平伝播のリスクが高くなるのではとの懸念が指摘されている。唾液の感染性については、BSEを経口接種させたウシを用いてPMCA法により感染前に弱い反応ながらも陽性反応が検出されることが他の研究者によっても示されている。また、慢性消耗病のシカやスクレイピーを感染させたヒツジでもPMCAで陽性反応が認められるとする報告がある。唾液の感染性に関連して、これまで唾液、乳、血液等については異常プリオンの伝達性があるとの疫学的証拠は知られていない。執筆者らは体液や排泄物における潜在的なBSE伝達のリスクを排除できないとしている。

b) プリオン高発現細胞を用いた異常プリオン検出系：in vitro培養細胞を用いて異常プリオンを検出する系の開発は古くから実施されている。神経細胞や非神経細胞など多様な細胞に異常プリオンが感染することが示されている。ただ、殆どのケースで持続感染するのみで細胞傷害性が認められることはまれである。一度細胞に感染すると、細胞の分裂に伴ってプリオン株が持続して増幅することが示されている。また、株化細胞のみならず初代細胞への感染系も開発されており、初代培養細胞を用いた場合、いくつかの感染系では細胞傷害性の効果が見られている。表3-11にこれまで知られているプリオン細胞培養モデルを示している。しかし、様々なプリオン株に対する感染系が試みられてきたが、感染がうまく成立しないことも多い。その原因としては、プリオンタンパク質の種の違いや内在性のプリオンが異常プリオンの感染を阻害するとされている点などと想定される。ヒト由来異常プリオンで感染が認められるのは、ヒト由来異常プリオンをマウスに馴化した場合であるとされている。一方、in vitro細胞内で持続感染している異常プリオンは、細胞の継代に従って元の性質を失っていると報告されている。異常プリオンに感受性のあるin vitro細胞株は、特定の種由来のプリオンに感受性を持ち他の種の異常プリオンの感染に抵抗性を示すことが報告されている。さらに多くの細胞培養系は特定のPcPscに対して感受性を有し、細胞ごとに特定のPcPscストレインに感受性を示し、種差とは異なるプリオン感染性の細胞生物学的特徴があると考えられている。一方で、細胞工学的に他の種のプリオンを発現させることにより幅広いプリオン感受性を付与することが出来ることが知られている。PcPscの細胞培養を利用した感染系での、最も重要な点は、in vitroで増幅したPcPscの検出手法とされる。すなわち、異常プリオンのみを特異的に検出できるような抗体が無いために生成したPcPsc検出のために工夫が必要な点である。ウイルスの感染系のように細胞傷害性（CPE）を示すような感染系を確立することが出来れば、非常に簡便な手法となるが、幅広い異常プリオンに対して感受性があり、細胞傷害性が認められる細胞がない。多くの場合には異常プリオンの物理的抵抗性を利用して、例えばプロテアーゼK耐性のプリオンをウエスタンブロット法や他の免疫学的検出法を用いて検出することが行われている。この場合にも生成した異常プリオンと投与した検体中に含まれる異常プリオンを分別する手段が必要となる。時間経過を追って異常プリオンが量的に変動することを示すことも必要となる。

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

2) PrPScのクリアランス工程に関する調査： 異常プリオン (PrPSc) 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ー工程が挙げられる。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の結果を見ると、スパイクしたPrPSc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PrPSc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に感染性が検出される。このような結果は当初のPrPScの調製法で得られていたクリアランス能は必ずしも生体由来のPrPSc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PrPScは超音波処理したマイクロソーム分画であったり、あるいは界面活性化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PrPSc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PrPSc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3-12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PrPSc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PrPSc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、PrPSc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PrPScの除去能の評価に有用である結果が得られている（図3-13）。表3-11及び表3-12の結果は、ナノフィルトレーションによるPrPScの除去能を評価する場合にはスパイクするPrPSc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PrPSc除去の評価では複数のPrPScの定量法が用いられている。このPrPScのアッセイ法の特徴とその課題を表3-13にまとめてみた。PrPSc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3-13）。ウェ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PrPcからPrPSc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トで検出した結果や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。

(C-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) 細胞組織加工製品の特性とマイコプラズマ迅速試験法：細胞組織加工製品は生きた細胞をそのまま投与するという点で従来の医薬品と大きく異なる特性を有している。そのために、感染性因子が含まれている場合でも不活化・除去などの工程を適用することができず、十分に検査された原材料の使用、原料細胞の試験、中間工程検査、最終製品での試験が重要となる。細胞組織加工製品のマイコプラズマ否定試験は最終製品での試験が求められ、日局試験法が参考とされている。日局にはマイコプラズマ否定試験法として、A.培養法、B.指標細胞を用いたDNA染色法、C.ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法の3つの試験法が提示されているが、日局では原則としてA法及びB法による実施を求めており、C法はあくまでB法を補完する二次的な試験と位置付けられている。しかし、A法やB法は、大量にある被検細胞液を対象として試験をすることを想定しており、また試験期間についても、A法では4週間、B法では4-7日間の培養が必要であるなど、判定までに長期間を必要としている。細胞組織加工製品では多くの場合、培養終了後に迅速に患者に投与する必要があるが、従来の試験法を用いたのでは試験結果が得られるのが患者に投与後になり、場合によってはNATによる迅速試験で投与の可否を判断したうえで、投与後も継続して試験を実施するという方法も取られている。また、日局では検体量が10mL(A法)あるいは1mL (B法) であり、細胞組織加工製品では実施が困難な場合もある。このような現状から、迅速で高感度な核酸増幅法 (NAT) の利用が望まれ、日局C法の位置づけ及び試験内容の見直しが要望された。一方、欧州薬局方(EP)は迅速なマイコプラズマ試験法としてNAT法を適用するためのバリデーション法を示しており、EPのバリデーション法に適合しているとされるNATを用いたマイコプラズマ検出キットが既に市販され、医薬品製造に用いる細胞基材の品質管理に使用されている。日局C法見直しの要望を受け、EPや米国薬局方 (USP)、生物学的製剤基準のマイコプラズマ否定試験等も参考に日局の見直しが行われ、2014年6月にマイコプラズマ否定試験17局改正案が公表された。17局での主な改正点としては、C法が全面改正され、16局では特定のプライマーを用いたPCR法が例示されていたが、17局では核酸増幅法 (NAT) のバリデーション法が提示され、7種の参

照マイコプラズマ (*Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginine*, *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. salivarium*) を用いた適切なバリデーションに適合するNATであればこの方法でも利用が可能となった。また、C法の位置づけも改正され、同等性試験を実施してこれら7種のマイコプラズマ全てについて10CFU/mLを検出可能であればA法を代替可能、100CFU/mLを検出可能であればB法を代替可能とされた。日局の改正は2016年4月施行予定であるが、この改正により、細胞組織加工製品でもバリデーションに適合するNATが利用できれば、迅速にマイコプラズマ否定試験を実施できることとなった。

2) 市販キットによるマイコプラズマ検出～細胞が異なる場合：EPのバリデーションに適合しているとされる市販のNAT法は複数販売されているが、これらはバイオ医薬品製造に用いられる細胞基材の品質管理を目的として開発されたものであり、細胞組織加工製品にそのまま当てはめることが可能か、また細胞数が少ない場合も同様の感度で検出ができるのかは不明である。そこで、まず市販キットの一例としてMycotoOL PCRを取り上げ、細胞組織加工製品の一例としてMesenchymal stem cell (MSC) をモデル細胞としてマイコプラズマの検出感度を検討した。まず、MycotoOLの標準プロトコールとなるCHO細胞と同じ細胞濃度の 5×10^6 cells/mLのMSCを調製し、*M. hyorhinitis*をスパイクしてMycotoOL PCRによる検出頻度を検討した。MSCはCHO細胞に比べて細胞が大きく、培養面積も多く必要であり、 5×10^6 cells/mLからのDNA抽出液は粘性が高く濁ったものとなった。それでも*M. hyorhinitis*のスパイク量が100 CFU/mLであれば4レーン全てで陽性のバンドが検出されたが、スパイク量が10 CFU/mLの場合は2/4のレーンで検出されたにとどまった (Fig. 4-1, Table 4-3)。次に、細胞数を減らして検出頻度を検討した。100 CFU/mLをスパイクした場合には、細胞濃度が 2×10^5 cells/mL以上あれば100%陽性となったが、 5×10^4 cells/mLでは検出率が1/2に低下し、 5×10^3 cells/mL以下では全て陰性であった (Table 4-3)。一方、*M. hyorhinitis*のスパイク量を10 CFU/mLとした場合、どの細胞濃度でも100%陽性とはならず、特に 5×10^4 cells/mL以下では全く検出されなかった。MycotoOLのDNA抽出法は細胞DNAに依存してDNAを回収するものであるため、細胞量が少ないとマイコプラズマDNAの収率が低く、細胞濃度が低い場合にはcarrier DNAを添加してDNAを抽出することが推奨されている。そこで、MSCにcarrier DNAとしてsalmon sperm DNAを添加して抽出を行ったところ、

スパイク量が10 CFU/mLでも、MSCが $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^4$ cells/mLの範囲では確実に検出が可能となった。次に、 2×10^5 cells/mLのMSCにバリデーション用マイコプラズマ参照品7種をスパイクし、salmon sperm DNAを添加した条件でマイコプラズマの検出を検討した。その結果、この条件では参照品7種全てについて、10CFU/mLを100%の確率で検出可能なことが確認された (Table 4-4)。これは 5×10^6 cells/mLのCHO細胞で得られた結果 (Table 4-5) と同等の検出感度である。細胞数が少ないため、細胞あたりの汚染量としての検出感度はCHO細胞の1/25という計算になる。同様の検討を、マイコプラズマの増殖に用いるVero細胞を用いて行ったところ、 5×10^6 cells/mLの細胞濃度でも100 CFU/mLであれば4/4の検出が得られたが、10CFU/mLでは2/4レーンで陽性シグナルが得られなかった (Fig. 4-2)。細胞濃度を1/5に減らすと全て陽性シグナルとなり、MSCと類似した結果となった。今回の検討により、CHO細胞用に開発された市販の検出キットMycoTOOL PCRをCHO細胞以外の細胞で用いる場合には、CHO細胞での検出条件そのままでは十分な検出感度が得られないことがあることが確認された。MSCでは細胞数をCHO細胞の1/10以下に減らす必要があり、またcarrier DNAの添加がマイコプラズマDNAの抽出・検出には必要である。細胞組織加工製品では様々な細胞が利用されており、必ず対象細胞を用いて、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。

3) 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。EPのバリデーションに適合する市販のマイコプラズマ検出キットでの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 (0.9mL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10mLを超える十分な量がある場合には総量の1%、1mL以上10mL未満の場合には0.1mL、総量が1mL未満の場合には適用しないとの考え方を示している (Table 4-6)。しかし、マイコプラズマNATでは適切な検体量が確保でき

れば実施が可能であり、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0.1mL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 0.1mL (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 4-7)。

4) 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、培養角膜シートのように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. hyorhinitis*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. 4-4)。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. hyorhinitis*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 5×10^4 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. 8). 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.

5) 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. 4-5). 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

1) 無菌試験法: 無菌試験は, 検体又は試料を規定の方法で処理し培養することによって, 培地で増殖する検体又は試料に由来する微生物の有無を確認する試験である. 日局16一般試験法は医薬品の出荷判定試験として遵守すべき試験法で, 無菌試験法は無菌であることが求められている原薬又は製剤に適用される. 日局16の無菌試験法は, 液状チオグリコール酸培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用いて, 検体又は試料をメンブランフィルター法又は直接法によって14日間以上培養し, 肉眼的な微生物の増殖があるかどうかを調べると規定されている. また, 本試験法は一定以上の製造量があつてロットを構成する一般的な医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品に適用されることから, 容器の容量に応じた最小試料採取量とロット当たりの製造個数に応じた最小供試個数が規定されている.

2) 細胞組織加工製品に対する無菌試験法: 細胞組織加工製品は, 一般に製造から使用までの期間が短いことから, 試料又は検体を14日間以上培養する無菌試験法を適用することは難しい. EPでは一般的な医薬品を対象とした無菌試験法とは別に, 細胞由来製品の微生物管理が規定され, 自動化された検出法では7日間の培養を, 肉眼での確認には14日間の培養を必要としている. しかし, 細胞由来製品は製造から2日以内に出荷することが多いことから, 緊急の改定が要望されて現在改定作業が進んでいる (Emmanuelle Charton, 私信). FDAは, 細胞由来製品は保管期間が短いことから, 従来の無菌試験法 (21 CFR 610.12 Sterility) より迅速な無菌試験法を開発し, それらの検証が必要と発出している. 一方, 日局には細胞由来製品に特化した微生物管理試験はないことから, 細胞組織加工製品の出荷判定には, 一般的な医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品と同じく, 無菌試験法が科せられる. しかし, ほとんどの細胞組織加工製品はロットを構成せず, その容量も少ないことから, 無菌試験法の現状を維持して実施することには無理がある. 今後の細胞組織加工製品の出荷判定には, 欧米と同様に, 細胞由来製品に特化

した無菌試験法や迅速に結果を得る迅速測定法の適用が望まれる。

3) 迅速測定法： 従来の微生物検出法は結果判定までに時間がかかることから、EPでは迅速に結果を得る代替法が提示されている。最新の手法を追加し、改変した代替法の一覧をTable 4-11に示した。微生物の菌体を直接検出する直接検出法、微生物の脂肪酸や核酸、増殖によって生じる変化を間接的に検出する間接的測定法に分類される。

a) 蛍光染色法： 微生物を蛍光試薬で染色し検出する蛍光染色法が、日局16参考情報 蛍光染色による細菌数の迅速測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、指標細胞を用いたDNA染色法として記載されている (Table 4-12)。蛍光染色法は、蛍光色素で染色した細菌を、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターなど、蛍光シグナルを検出する種々の装置により計数する。直接検出法の蛍光活性染色法は、DNAやRNAに結合する核酸染色剤を用いて染色した死菌を含めた全細菌数、細菌細胞内に普遍的に存在するエステラーゼ活性を carboxyfluorescein diacetate (CFDA) を用いて蛍光活性染色した生菌数、細菌細胞の大きさを含めた形態を、それぞれ蛍光顕微鏡またはフローサイトメーター等を用いて測定する。間接的測定法のマイクロコロニー法は、細菌を捕集したメンブランフィルターを培地上で短時間培養した後、核酸染色剤を用いて染色したマイクロコロニーを蛍光顕微鏡などで計数する方法で、増殖能力を持つ細菌を迅速かつ高精度に計数できる。検体又は試料をメンブランフィルター上に捕集すると、いずれの方法でも捕集前の原液で 10^2 - 10^3 CFU/mlの検出感度を有する。また、蛍光染色法及び蛍光シグナルを検出する種々の装置のバリデーションを行うには、CFUが既知の参照菌種、機器を校正する蛍光ビーズ等の整備が必要となる。

b) 核酸増幅検査 (Nucleic acid amplification test, NAT)： 増幅した微生物の核酸を検出する核酸増殖法が、日局16参考情報 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 C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法として記載されている (Table 4-12)。培養細胞から得たDNAを検体とし、例示されたマイコプラズマの16S-23SリボソームRNA (rRNA) 遺伝子間のスペーサー領域等の塩基配列に特異的なプライマーと市販の耐熱性DNAポリメラーゼを用いて適切な条件下で反応を行い、増幅したDNAはアガロース電気泳動を用いて分離し、エチジウムブロマイドの

染色後、紫外線照射により検出する。参考情報では原則として従来実績のある「A. 培養法」及び「B. 指標細胞を用いたDNA染色法」によるマイコプラズマ否定試験の実施を求めており、PCRによる検出法はあくまでDNA染色法を補完する二次的な試験と位置付けられている。しかし、バイオテクノロジー応用医薬品の工程管理試験に適した迅速測定法が要望されており、日局17に向けてマイコプラズマ否定試験にPCRを含むNATを導入する作業が進んでいる。同様に、例示された細菌の16SrRNA遺伝子又は真菌の18S-5.8SrRNA遺伝子間のスペーサー領域 (ITS1) の塩基配列に特異的なプライマーを用いて増幅したPCR産物の遺伝子配列を解析し、データベースと照合して微生物を同定する方法が、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記載されている。微生物をNATで検出するプライマー等の設計は、ユニバーサルな塩基配列として、rRNAやそのスペーサー領域を対象とすることが多い。参考情報には、本法に示した以外の遺伝子領域も合理性があれば使用可能とされており、完全長16SrRNAの調製や定量PCRに用いるプライマーが報告されている。日局16一般試験法4.06 無菌試験法で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記載された細菌4種及び真菌2種を含む全13菌株 (Table 4-9) から抽出したゲノムDNAを用い、Table 4-10に示したプライマー等で増幅したPCR産物をFig. 4-6に示した。細菌のゲノムDNA増幅では、遺伝子解析による微生物の迅速同定法に記載のプライマーセットを用いた反応で、無菌試験法収載菌株を含むすべての菌株にPCR産物の生成を確認した (Fig. 4-6A-C)。また、ユニバーサルプライマー525Fを用いた反応でもPCR産物の生成を確認した (Fig. 4-6D)。同様に、真菌のゲノムDNA増幅では、ユニバーサルプライマーセットITS5F/D2Rを用いた反応で、無菌試験法収載菌株を含む菌株にPCR産物の生成を確認した (Fig. 4-6E)。プライマー等の選択によっては、定量PCRや逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription, RT)-定量PCRを利用した微生物の検出も可能で、キット化された製品等も市販されている。図には示していないが、525F/800Rユニバーサルプライマーセットは、SYBR Greenを用いた定量PCRでも、無菌試験法収載菌株の検出が可能だった。通常のPCRは生菌と死菌双方のゲノムDNAを増幅するが、RT-定量PCRでは少量のmRNAを増幅した生菌由来PCR産物を定量することから、蛍光活性染色法と同様に、その計測結果はより生菌数に近いと推定される。また、NAT及び測定機器のバリデーションを行うには、増幅する遺伝子のコ

ピー数とCFUが既知の参照菌種、増幅する遺伝子を含むプラスミドDNA等の標準品の整備が必要となる。

c) 迅速測定法の選択： 日局16の一般試験法は医薬品の出荷判定に適用される試験を、参考情報は製品の製造工程管理等に利用される情報を示している。EP chapter 2.6.276)は日局の一般試験法に相当し、EP chapter 5.1.69)は参考情報に相当する。Table 3に示した迅速測定法の一部はEP chapter 5.1.69)に記載されており、それらの一部は測定の実自動化がなされ、簡便な手技で短時間に微生物の計測が可能となっている。「再生医療等の安全性の確保に関する法律」が施行され、再生医療等製品はPMDAが調査を行い、厚生労働大臣の許可を受けた施設で調製されることになった。細胞組織加工製品はアイソレーター等を用いた微生物汚染防止措置がされた工程で調製され、バリデーション等の適切な方法によって工程管理がなされることから、最終調製品は無菌的環境を保持している。加えて、細胞・組織加工製品はロットを構成せず品質が不均一となること、採取可能な検体量が少ないことから、再生医療等を受ける者に対して安全性の確保等の必要な事項について適切な説明と同意がなされた上で、日本でも製造工程管理に準じた出荷判定試験の適用が望まれる。Table 4-11に示した代替法の中で、蛍光染色法は迅速測定法として日局16参考情報に記載されていることから、細胞組織加工製品の出荷判定試験に適用する無菌試験法には最も適している。NATは高い感度と迅速な測定が期待できるが、参考情報ではマイコプラズマ否定試験での適用に限られている。しかし、NATの原理と遺伝子解析による微生物の迅速同定法に用いるプライマー等の一部は参考情報に記載されていることから、十分なバリデーションを行った上で、細胞組織加工製品の無菌試験への適用が望まれる。米国薬局方 (United States Pharmacopeia, USP) には、記載された公的な微生物代替試験法の使用に際して行うバリデーション方法が定められている。日局16参考情報にも分析法バリデーションが記載され、医薬品の試験法に用いる分析法が、分析法を使用する意図に合致していること、すなわち、分析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確立が許容できる範囲であることを科学的に立証することと規定している。参考情報に記載されていないTable 4-11に示された迅速測定法については、既に記載されている蛍光染色法と比較試験を行うなど、無菌試験法に適用可能な科学的根拠を示し、十分な分析法バリデーションを経ての適用が望まれる。

4) 迅速測定法を適用した細胞組織加工製品の無

菌試験法： 細胞組織加工製品の無菌試験は、最終調製品の出荷時点で微生物が陰性であることを保証することを目的とすることから、方法は日局16無菌試験法に準ずるが、細胞組織加工製品に特異的な部位は改変して行う必要がある。細胞・組織加工製品の細胞組織加工製品はロットを構成せず、最終調製品の内容量も少なく、製品を均一にして試験に供するのが困難なものが多い。EPでは、血球系製品の容量が10mL以上の場合には全量の1%を、1mL以上で10mL未満の場合は100 μ Lをそれぞれ試験に供し、1mL未満の場合は試験に適用不可としている。現在改定作業が進んでいるドラフトでは、細胞由来製品の容量が10mL以上の場合には全量の1%を試験に供し、10mL未満の場合は別の方法、最終製品と最後に接触する液体や細胞に対して行うサロゲート試験、が取られるべきとしている。一般社団法人日本再生医療学会は、細胞組織加工製品の最終出荷試験に際しては、「調製品及び原料の試験検査、その記録並びに参考品の保管について、ドナーへの侵襲性が高く採取可能検体が少ない場合や必要な検体採取が困難な場合においては、採取した検体の増殖を行うこと、又は、検体の試験検査に代えて工程管理での確認によることとして差し支えないこと。」との考え方を示している。細胞組織加工製品を無菌試験に供することが困難な場合は、最終調製品に代わる試料の利用や工程管理による無菌性保証などの方策が望まれる。なお、一般的な医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品と同様に、ロットを構成し、十分な検体量の確保が可能で、出荷判定まで14日間以上の猶予がある細胞組織加工製品の場合は、日局16無菌試験法を適用する。以下に、細胞組織加工製品の出荷判定に、日局16無菌試験法を適用する際の望ましい措置を示す。

a) 微生物汚染に対する予防措置： 日局16無菌試験法に準ずる。

b) 培地及び培養温度： 日局16無菌試験法に準じて、培地は液状チオグリコール酸培地とソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用いる。EPでは、細胞由来製品の培養工程を考慮し、培養温度を35-37 $^{\circ}$ Cに規定している。細胞組織加工製品の無菌試験は、環境中に存在する菌ではなく、最終調製品の出荷時点で患者に有害な微生物を対象としていることから、EPと同様に培養温度は35-37 $^{\circ}$ Cが望ましい。

c) 培地の適合性： 日局16無菌試験法に準じて行う。試験菌株は培地性能試験及び手法の適合性に適している試験菌株 (日局16無菌試験法 表4.06-1) を用いるほか、細胞組織加工製品の原料 (細胞・組織) に内在性又は特異的に汚染しやすい微生物

がある場合には試験菌株に加えることが望ましい。

d) 手法の適合性試験：迅速測定法を適用するに当たって必要な変更点を含めて、「製品の無菌試験」に示した方法と、厳密に同じ方法で試験を行う。

e) 製品の無菌試験：無菌試験に供する検体又は試料は、最終調製品から採取しなければならない。最終調製品を含む試験すべき容器の内容物すべてを均一にし、その内容量が10mL以上の場合は少なくとも全量の1%を試験に供する。容量が10mL未満のとき、内容物を均一にできないときには、最終調製品と接していた培地や基材等を代替試料とし、可能な限り多くを試験に供する。得られた試料又は代替試料を培地に接種して24-36時間の培養後、あらかじめ選択した迅速測定法で培養物を判定する。直接検出法の蛍光活性染色法を選択したときは、培養後の試料又は代替試料を蛍光活性染色し、蛍光顕微鏡、蛍光検出器又はフローサイトメーター等で検出する。間接測定法のマイクロコロニー法を選択したときは、試料又は代替試料をろ過したメンブランフィルターを培養後、フィルターに保持された微生物を蛍光活性染色し、蛍光検出器等で検出する。間接測定法のNATを選択したときは、試料又は代替試料を培養後、遠心分離やメンブランフィルター等で濃縮した試料から核酸を抽出してNATを行う。その他、選択した迅速測定法に適した方法で試料又は代替試料を処理後、微生物を検出する。細胞組織加工製品の製造工程で抗生物質などの微生物発育阻止因子を用いた場合には、最終調製品から発育阻止因子の除去を確認したうえで試験を行う。

f) 観察と結果の判定：微生物の増殖が観察されない場合は陰性とし、少なくとも最終調製品の出荷時には無菌試験に適合とする。微生物の増殖が観察された場合は、当該被験製品に無関係な原因により試験が無効であったことを明確に証明できなければ、被験製品は無菌試験に合格しない。

g) 無菌試験への適合が要求される不溶物質を含む最終調製品の試験への適用：試験に供する検体又は試料が不溶物を含む場合は、プレフィルトレーションや遠心分離などにより不溶物を除いた溶液を調製し、以降の試験に用いる。これらの方法は最終調製品の種類や形態に応じて、あらかじめ添加した試験菌株の回収率を確認したうえで実施する。

h) 最小供試個数：細胞組織加工製品はロットを構成しないことから、それぞれの最終調製品について無菌試験を適用する。

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：エンドトキシン

は古くはウサギを用いた発熱性物質試験法により検査されてきたが、インビボ法のために感度が高くなく、時間のかかる方法であり改良が望まれていた。このためカプトガニ血球の抽出物が微量のエンドトキシンによりゲル化することを利用してインビトロ法が開発された。現在はゲル化法以外にも、ゲル化過程での濁度増加を光学的に測定する方法（比濁法）、及び合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法がある。カプトガニの血液凝固系は、複数のセリンプロテアーゼ前駆体と凝固タンパク質の前駆体であるCoagulogenからなり、エンドトキシンはファクターCを活性化し活性化ファクターCの生成を引き起こす。活性化ファクターCが生成されると、凝固カスケードが次々と活性化されゲル化物質の前駆体Coagulogenがゲル化物質Coagulinに変換される。一方、カプトガニの凝固カスケードはファクターGが活性化ファクターGに変換されることでも引き起こされ、この活性化ファクターGの生成は β -1,3-グルカンによっても引き起こされる。ゲル化法と比濁法はCoagulinの生成を測定するものであり、比色法は凝固酵素（Clotting enzyme）の基質（発色基質）を用いる方法である。国内で入手可能なエンドトキシン試験キットの多くはカプトガニ血球抽出物を用いており、生物試料からの抽出物のためロット間差をなくし一定の感度に調整することが非常に困難とされ、キット販売業者のノウハウがあるといわれている。このために製品ごとにカプトガニ血球の凝固系因子の量比や他の因子の混入も異なるとされ、感度や直線性などに差異があるとされる。一方、エンドトキシンは発熱作用の他、補体の活性化や白血球の活性化、細胞に作用し接着分子発現の誘導や抗体産生促進など多様な生理作用を示す。また、マクロファージなどの免疫細胞の細胞表面のToll様受容体(TLR)-4に結合して、NF κ BやMAPキナーゼファミリー等のシグナル伝達系を活性化し、種々の炎症性サイトカインの放出を促進する。このような多様な生理作用を持つことから、エンドトキシンの測定にマクロファージの活性化を測定する方法も提唱されている。

a) 日局エンドトキシン試験法では、ゲル化法、濁度法、比色法の3法があり、3法の適用が可能か評価をした上で、いずれの試験法でも評価可能であればそのうちのいずれかの試験法を実施してよいとされている。また、試験結果に疑義がある場合においてはゲル化法での試験が最終判定とされている。

b) エンドトキシンの試験では多くの物質が試験の妨害や活性化を引き起こすことが知られている。エンドトキシン試験の実施に際しては、エンドト

キシン標準品の希釈系列を作製して被検液に添加した予試験を行い、添加した標準品の十分な回収が得られることを確認することにより、活性化や妨害物質がないことを評価する必要がある。妨害物質や活性化物質が含まれている場合にはエンドトキシンを含まない注射用水等の適切な液を用いて十分な希釈を行う必要がある。

c) エンドトキシン試験の実施に際してはエンドトキシン標準品の希釈系列を作製し、同時に試験を行うことが求められる。

d) 日局参考情報ではエンドトキシンの規格として、静脈注射においては患者の体重あたりの限度値として5EU/Kg以下であることを求めている。エンドトキシンの混入がこれ以下にコントロールされていれば発熱などの副作用は起きないとされる量であり、リスク管理として一応の目安となる。

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>に規定された評価がされている。しかし細胞組織加工製品に適用する場合には後述するようないくつかの課題が存在する。その前に日局で規定されて試験法で細胞組織加工製品に適用する際の課題を整理しておく。まず、<4.01>では、ライセート試薬の表示感度の確認では、エンドトキシン標準品の希釈系列を作製して用いる必要がある。また反応干渉因子試験でもエンドトキシン標準品を用いる必要がある。しかし、多くの製剤が作られる通常の注射用医薬品とは異なり、特に自己由来細胞組織加工製品はテイラーメイド製の特徴を持ち、個別製品ごとにエンドトキシン標準品を用いた感度や妨害物質の有無を求めるのは合理的とはいえない。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することが必要となる。エンドトキシン添加回収試験を行う必要がある場合に、エンドトキシンの細胞への吸着があり、細胞上清にスパイクする必要がある。細胞そのものが、エンドトキシンの測定を妨害する。またヒトに投与するために細胞を懸濁する液に細胞の安定化剤でエンドトキシンの測定を妨害するような場合がある。このためにエンドトキシンの測定では細胞懸濁液から遠心操作により細胞を除去し、上清のみを対象として測定されることになる。この点に関連して、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。また<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。カプトガニ血球成分は生体からの抽出物であるための不確定要素を解決するために改変したファクターCを用い試薬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。以上のような細胞組織加工製品の特性を考慮した場合に、日局への適合を厳密に求めることは合理的と言えない場合が多い。細胞組織加工製品の特性を考慮して、エンドトキシン試験を適用する場合の対応について考察してみた。

a) エンドトキシン標準品の使用;日局エンドトキシンのゲル化法、比濁法、比色法とも試験に際してエンドトキシン標準品を使用することを規定しているが、個別化製品の特性が強く、特に自己由来製品でロットを構成せず1-数本の製品しか製造されない細胞製品では、製造そのものがテイラーメイドの製造であり、製品ごとにエンドトキシン標準品を使用することは合理的ではないと考えられる。

b) このために市販キットを用いてエンドトキシンを測定する場合には、キットに添付されているエンドトキシン標準試料を用いることも可能であろう。その前提としては、エンドトキシン標準品とキットに添付されているエンドトキシン標準試料が同等の値を示すことをあらかじめ評価しておく必要がある。

c) 迅速試験キットの開発も行われており、これらのキット製品ではいわゆる保存検量線が用いられている。保存検量線は1987年にFDAがガイダンスで使用を認めていたものであらかじめ標準品の検量線が添付されたキット製品を認めるもので、試験に当たってエンドトキシン標準品の検量線を新たに作製する必要が無いものである。FDAは2011年にこの保存検量線を使用可能としたガイダンスを取り消している。上記したように細胞組織加工製品はテイラーメイド製品として特徴を持ち、生産が対象患者単位で行われることを考慮するとエンドトキシン試験に際して日局標準品を用いず保存検量線を用いることも合理的であると考えられる。保存検量線がエンドトキシンと同等の値を示すことをあらかじめ評価しておく必要があるであろう。

d) 特殊な細胞組織加工製品を用いる場合:

d-1) 細胞組織加工製品では、細胞をコラーゲンや生分解性の医療材料等に懸濁、あるいは包埋して投与されることも多い。医療材料等との複合製品では通常のエンドトキシン試験の実施が困難とな

る。細胞を包埋した材料を可溶化する操作を行うことも可能であるが、可溶化に用いる酵素等がエンドトキシンの測定を妨害することもあり、またその可溶化試薬からのエンドトキシンの汚染も考慮しなければならない。従ってこのような製品では、最終製品を製造する直前の細胞懸濁液と医療材料を別々に試験することも可能と考えられる。

d-2) 複合製品の場合には、エンドトキシンの測定では2通りの方法が想定される。複合製品についてエンドトキシンを含まない注射用水やあらかじめエンドトキシンが測定された塩溶液等に懸濁し、一定期間の間に溶液に抽出されるエンドトキシンを測定するという方法である。連続投与のエンドトキシンの安全域としては1時間当たりのkg体重当たりのエンドトキシ単位（静脈投与で5 EU/kg/時間）であることを考慮すれば1時間当たりの溶出量を測定することになる。このような抽出操作はヒトに投与した際に、一定期間内に体内に放出されるエンドトキシンを反映していることが求められる。

d-3) もう一つの測定法は、細胞懸濁液と混合する医療材料等について別々にエンドトキシンを測定し、最終製品のエンドトキシンの値を推定する方法である。

3) 市販キット製品のエンドトキシン試験への適用についての評価：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、日局試験法には沿っ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、テイラーメイド製品である細胞組織加工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することができないか検討した。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4-7)。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添加し、さらにエンドトキシンフ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よりも高くなかった。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たことが判明した(図4-8)。最後にEndosafeを用いた保存検量線による測定では、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4-14)。

(C-5) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

1) ウイルスクリアランスの評価に有用なモデルウイルス：Xenotropic murine leukemia virus (X-MLV)は、レトロウイルス科に属する粒子径が80~110nmのエンベロープを有するRNAウイルスである。バイオ医薬品の製造に多く用いられるCHO細胞をはじめげっ歯類由来の動物細胞には、非感染性のC型レトロウイルスが含まれていることから、動物細胞を宿主として用いるバイオ医薬品のウイルススクリアランス試験では、モデルウイルスとして用いられる。Minute virus of mice (MVM)は、パルボウイルス科に属する粒子径が18~24nmの非エンベロープ1本鎖DNAウイルスである。MVMはpHや界面活性剤処理など物理化学的な不活化処理への耐性が高く、後述するようにCHO細胞での汚染が3例報告されており、バイオ医薬品の製造において脅威となっている。従って、MVMもウイルススクリアランス試験のモデルウイルスとして有用である。現実的にはX-MLVとMVMを基本とし、その他のウイルスについてゲノムの型、エンベロープの有無、サイズを考慮して合計3種類程度のモデルウイルスを組み合わせることが妥当と思われる。

2) 抗体医薬品の一般的な精製工程におけるウイルス除去/不活化：LRVとして示されるウイルスの除去/不活化率（ウイルススクリアランス指数）を抗体医薬品の精製プラットホームの各工程で評価した。プロテインAクロマトグラフィーにおけるX-MLV及びMVMのLRVは2.77及び2.39であった。抗体をプロテインAから遊離させる条件であるpH2.5~4では、特にエンベロープを有するウイルスが効率良く不活化される。例えば、CHOあるいはSP2/0細胞の培養上清にウイルスを20v/v%スパイクした場合、pH3.8±0.1、25±0.1℃で30分間X-MLVを処理すると感染価が5.0~5.8 LRV低下し、そのLRVはタンパク質濃度、バッフ

アーの組成及び塩濃度、凝集体により影響を受けない。また、pH3.7で1時間X-MLVを処理するとLRVは3.75であるが、エンベロープを持たないMVMではLRVが1.5と低かった。陰イオン交換クロマトグラフィーであるQ Sepharose Fast Flowでは、X-MLV, MVM, simian virus 40 (SV40)のLRVはそれぞれ約4.2, $\geq 5.12 \pm 0.21$, $\geq 4.28 \pm 0.14$ である。げっ歯類細胞の培養上清から部分精製したモノクローナル抗体にウイルスをスパイクし、Q Sepharose Fast Flowクロマトグラフィーにおいて伝導度がウイルスのLRVに及ぼす作用が調べられている。その結果、伝導度を3 mS/cmから17 mS/cmに増加させると、X-MLVのLRVが5.4から2.4, SV40のLRVが4.2から3.0, MVMのLRVが5.0から3.2に低下した。樹脂の詳細については不明であるが、陽イオン交換クロマトグラフィーによるMVM, X-MLVのLRVはそれぞれ2.0~6.3, 4.5~5.4であった。これも樹脂の詳細については不明であるが、疎水性相互作用クロマトグラフィーによるMVM及びX-MLVのLRVはそれぞれ0~2.4及び0~3.9であった。セラミックハイドロキシアパタイトのCHT type 1の塩化ナトリウム濃度勾配溶出でのabelson murine leukemia virus, X-MLV, MVM, porcine parvovirusのLRVは、それぞれ >4 , >3 , 2 , >1 であった。膜クロマトグラフィーの一種である陰イオン交換膜でウイルスクリアランスに関する検討が行なわれている。4級アミンをリガンドとするQメンブレンによるLRVは、X-MLVで ≥ 5.35 , MVMで ≥ 6.30 , pseudorabies virusで ≥ 5.58 , Reo-3で ≥ 7.00 であり、X-MLVとMVMについては、陰イオン交換クロマトグラフィーに比べて、約1.7~1.9倍LRVが高い。また、3級アミンをリガンドとした中空糸型陰イオン交換膜におけるPPV, MVMのLRVは ≥ 5.0 であった。

3) バイオ医薬品のウイルス汚染事例とその対策：1988年、Bioferon GmbH社においてCHO細胞を宿主とした組換え医薬品の培養工程で、通常の製造が数週間続いた後、突然pHが低下して細胞が死滅した。汚染ウイルスとしてepizootic haemorrhagic disease virus (EHDV) 318が同定され、汚染ルートとしてFBSが疑われた。その後FBS等の原材料のチェックとpH及び細胞増殖を指標とした培養工程のモニタリングが実施された。1993年と1994年の2回Genentech社においてCHO細胞を宿主とした組換え医薬品の培養工程でMVMによる汚染が起こり、両者で株は異なっていた。培地を含む原材料からの汚染が疑われた。1回目の汚染後MVM特異的なアッセイ系としてPCR法及び324K細胞を用いたin vitroの試験が導入された。また、会社の敷地内のペストコントロールプログラムを高度化

すると共に原材料のベンダーに対する同プログラムの強化と監査の実施が行なわれた。2回目の混入後では原材料に対するバリアーの構築として、①培地のHTST (high temperature short time)処理、②熱に安定で小容量の原材料についてはオートクレーブ処理、③熱に不安定で小容量の原材料についてはウイルスろ過処理、④WCBを含む培養プロセスの無血清化が行なわれた。また、MVM特異的なアッセイの小スケール段階での実施及びヒトと設備の分離が行なわれた。汚染の拡大防止策の効果として、2回目の汚染発生時は、PCRで早期に発見でき、当該培養槽のみの廃棄・除染で収拾できた。なお、1994年以降MVMによる汚染は起こっていない。さらに、MVMについてはPCR及び324K細胞を用いた細胞変性アッセイ、kilham rat virus, rat parvovirus H-1については324K細胞を用いた細胞変性アッセイ、詳細は不明であるが非常に広い範囲についてウイルススクリーニングが通常実施されている。2006年Amgen社において組換え動物細胞を用いたバイオ医薬品の培養工程でpHが低下し、続いて細胞が死滅した。同培養液からqPCRによりMVMが検出された。汚染は1ロットのみであり、4基の種培養槽のうち1基のみがMVM陽性であった。全ての原材料と培地及び施設の周りで採取したげっ歯類の糞もMVM陰性であり、ベンダーの敷地内でも特記事項はなかった。汚染の拡大を防ぐために、対象エリアへのアクセスが制限された。疑わしいロットを含めて当該ロットからのサンプルは隔離され、全てのraw materialsも使用が中止され隔離された。進行中の製造が中止されて廃棄され、メンテナンス作業も中止された。高濃度の漂白剤でのクリーニングが1日おきに実施された。再発防止策として、作業服への更衣が採用され、サンプリング/秤量時も更衣の徹底が図られた。また、生産エリアと機械設備エリアで異なる作業服を装着することとされ、作業に従事する職員に対して汚染防止に関する教育の徹底が図られた。2009年Merrimack Pharmaceuticals社においてCHO細胞を宿主とした組換え医薬品の培養工程で、5ロットのうち3ロットでMVMによる汚染がPCR法により検出された。なお、生細胞数などの培養パラメーターに異常は発見されなかった。汚染源として組換え添加物を特定した。汚染の拡大を防止するために、汚染ロットに由来する原薬及び培養液は10% bleachで処理後、廃棄された。当該設備内にストックされていたチューブ、バッグなどの機材も廃棄された。設備については徹底的な除染作業が行なわれた。2003年Boehringer Ingelheim社においてCHO細胞の培養工程で著しい細胞傷害が確認され、複数の製品の製造に支障

が生じた。培養上清中に直径約40 nmのカリシウイルス様粒子が認められた。cDNAの塩基配列を解析した結果、ゲノムの大きさはpolyAを除いて8091bであり、三つの遺伝子をコードしていることが明らかになり、本ウイルス株はvesivirus 2117と命名された。本ウイルスはFBSからの汚染と考えられた。再発防止策として、60mLのFBSに含まれる一つの感染粒子が検出可能な高感度な測定系が確立され、本測定系でvesivirusの汚染が無いことが確認されたFBSを使用することにより再発は防止された。2009年Genzyme社においてマサチューセッツ州Allstonの生産設備で6基の培養槽のうち一つでvesivirus 2117による汚染が起こったため、生産を一時中断するとプレスリリースがなされた。本生産設備は組換えCHO細胞を宿主としてCerezymeとFabrazymeの原薬を製造していた。本ウイルスの汚染源は培地成分と考えられた。本プレスリリースで、2008年にAllstonとGeelの設備で起こった2回の組換えCHO細胞の生産性の低下も本ウイルスが原因であることも報告された。2008年当時の標準的な試験法では、原因を明らかにすることはできなかったが、その後、高感度の試験法を開発し原因ウイルスが検出・同定された。今回検出されたウイルスとBoehringer Ingelheim社で検出されたウイルスの相同性は9割であった。本ウイルスの除染には6～8週間かかり、被害額は1～3億ドルであった。FDAは上記の医薬品生産の中断に伴い患者への供給が不足することを懸念し、英国のBasingstoke社、イスラエルのCarmiel社の製品を認可に先立って使えるようにすることを発表した。再発防止策として原材料のチェックとウイルス除去能の向上が図られ、約6ヵ月後Cerezymeの出荷が再開された。事件の発生年については明らかではないが、Eli Lilly社において組換え293細胞を用いたバイオ医薬品の培養工程で細胞数が著しく減少した。検査の結果、ヒトアデノウイルスの汚染が明らかとなった。本ウイルスは培地に汚染しており、汚染は培地ベンダーでの培地調製時における作業員からの迷入による可能性が高いと考えられた。当該ロットは製造に用いられず、汚染の拡大を防ぐために設備の除染作業が実施された。再発防止策として作業員の健康管理・衛生管理の徹底、作業員からの汚染を防止するための作業工程の改善、培地のウイルスチェックが実施された。

4) 培地等原材料のウイルス不活化・除去方法：熱処理(102℃, 10秒)は各種のウイルス不活化に有効であり、MVMのLRVは>6～8である。本法は使用実績があり大量処理が可能であるが、血清、タンパク質成分等の熱に不安定な成分には不向きである。紫外線照射(254nm・100mJ/cm²)のLRV

はウイルスにより異なり4～8である。本法は血清含有培地で有効との報告もあり、熱及びγ線に比べると成分への影響は少ないが、大量処理には対応が困難である。γ線(25～40kGy)のLRVはウイルスにより異なり>4～6である。本法は血清での使用実績は多いが、アイソトープを使用するため通常の製造現場での実施は困難であり特にタンパク質成分が変性する可能性がある。ウイルス除去フィルター(例えば孔径20nm)のLRVは>4～6である。本法は成分への影響は少ないが、フィルターのコストが高く処理時間が長いため大量の処理には不向きであり、血清は目詰まりを起こしやすいため不向きであると思われる。

5) PCV-1迷入の発見経緯：2010年、カリフォルニア大学のVictoriaらが、次世代シーケンサーとマイクロアレイを用いて、GSK社の経口弱毒生ヒトロタウイルスワクチン(Rotarix[®])より、PCV-1の全長に相当するDNAを検出した。GSK社も社内調査した結果、製品、マスターセルバンク(MCB)、ワーキングセルバンク(WCB)及びウイルスシードよりPCV-1が検出され、3月15日にFDAへ報告された。PCV-1は、サーコウイルス科サーコウイルス属に属するノンエンベープウイルスで、直径は17～22 nmである。

6) PCV迷入否定の考え方：Merck社の弱毒生ヒトロタウイルスワクチン(RotaTeq[®])については、前述したVictoriaらの研究ではPCVの迷入は検出されなかった。しかし、Merck社は、全く迷入が起こっていないことを証明するため、独自で調査を実施することになり、調査に先立ちPCVの迷入を否定するための前提条件を以下のように考えた。

a) PCVが感染性を有するには、欠損の無い全長のPCVゲノムが必要である。

b) 欠損の無い全長のPCVゲノムは、ターゲットシーケンスを増幅させる高感度のPCR法によって検出可能である。

c) PCV DNAの存在否定(非検出)は、感染性のあるPCVの存在を否定することになる。

この前提条件に則り、図5-1に示すディシジョンツリーに従って、RotaTeq[®]におけるPCV迷入の有無を評価することとされた。

7) PCV-1迷入経路の特定と規制当局の対応：GSK社では、1983年にMCBを確立しているが、社内調査の結果、このMCBにすでにPCV-1が迷入していることが判明した。細胞継代に用いられたトリプシンが汚染源であると考えられている。FDAは、GSK社からの報告を受け、米国内でのRotarix[®]の接種を一旦停止したが、その後リスクは低いとして接種再開を決定した。欧州でも同様なリスクアセスメントが行なわれ、米国と同様な結論と

なり助言が行なわれた。最終的に、欧州では多くの国で RotaTeq[®]が販売されていなかったため、Rotarix[®]の継続使用が推奨された。日本においては、Rotarix[®]は2007年6月6日よりロタウイルス感染の既往歴のない健康乳児を対象に臨床試験が実施され、2009年11月27日に承認申請、2011年7月1日に承認された。医薬食品局審査管理課の審議結果報告書には以下のような記載がなされている。

「機構は、PCV-1はヒトにおいて病原性を示さないことから、本剤中の感染性PCV-1粒子が安全性に影響する可能性は非常に低く、これまでの臨床試験成績及び使用実績から示されている本剤接種により得られるベネフィットを考慮し、申請者の回答を了承した。」

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) iPS 細胞の RNA ウイルス感受性について

バイオ医薬品製造におけるウイルス試験法に関してはガイドラインである ICH Q5A「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」に詳しい。バイオ医薬品の精製工程では、低 pH 処理等のウイルスの不活化のための工程やウイルス除去を行うためのウイルスフィルター処理等によってウイルス安全性を確保している。これに加えて製造用細胞や未精製バルクなどでのウイルス試験法、また精製工程のウイルスクリアランス値を評価することでさらに安全性を高めている。これに対して細胞組織加工製品では、最終製品が組み換えタンパク質等ではなく、「細胞」そのものであるため、低 pH やウイルスフィルターといった処理をすることは難しい。従って細胞組織加工製品に使われる生物由来原料に関するウイルス安全性を出来るだけ高めることが必要になってくる。ウシ、ブタ、げっ歯類由来のウイルスに対する細胞組織加工製品の原料となる iPS 細胞の感染性やそれらのウイルスの非宿主細胞に対する馴化能などの知見は、ウイルス安全性確保のための基礎的なデータとなると考えられた。また、それと同時に中間製品、最終製品、フィーダー細胞等について簡便で、高感度、短時間で幅広いウイルスを低コストで行えるウイルス試験法も重要になってくる。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。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。次世代シーケンサーの機能は近年驚く程向上しており、コストの大幅なダウンも期待されるため、新規のウイルス試験法としてまず補助的に利用することを考えるべきだろう。実用化に向けては再現性や検出限界等に関する一層の検討が必要になる。

1-2) iPS 細胞表面ウイルス受容体の網羅的解析

本分析で同定されたウイルス受容体関連タンパク質由来ペプチドを指標とすることで、各ウイルス受容体関連タンパク質の相対定量が可能になると思われる。また、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

今回の研究により、HTLV-1 Env のレトロウイルス粒子内の感染性がその他の 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が減衰することを明らかにした。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不明であった。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り、ウイルス粒子のみでは感染が成立しないことが確認された。したがって再生医療等に用いられる細胞組織加工製品の作製工程における HTLV-1 感染のリスク軽減のためには、持続的に感染性 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意味している。しかしながらウイルス感染細胞を完全に除去することは非常に困難であることから、細胞組織加工製品に汚染し

ているウイルス感染細胞からの感染伝搬を軽減させる方法として、本研究では細胞の処理による感染リスク低減の可能性を示した。本研究で示したようにオルガネラ酸性化阻害剤の添加や GLUT1 を過剰に細胞表面に発現させることにより HTLV-1 Env の感染性が強く抑制されることから、何らかの手法で細胞環境を変えることにより、HTLV-1 感染細胞の感染性を軽減させる可能性があることを示した。

1-4) ウイルス感染リスク評価に関する研究

1) 網羅的ウイルス検査法による検査結果を解析したところ、EBV, CMV, HHV-6, B19が生体材料に混入する危険性が高いことが示された。EBV, CMV, HHV-6はヘルペスウイルス科に属し、初感染後は持続感染状態が成立し、終生ウイルス陽性となることが知られている。これらの成人の陽性率はEBV: 90%程度, CMV: 80%程度, HHV-6: ほぼ100%と非常に高く、しかも血液細胞に持続感染することから細胞組織加工製品の原材料となる生体材料への混入の可能性が非常に高いと考えられる。今回行ったデータ解析でも多くの検体からこれらのウイルスが検出されており、これまでの知見が裏付けられた。また、B19も持続感染するケースが報告されており血液とともに、骨髄液に混入することが多い。骨髄細胞を使用した再生医療は多数計画されており、原材料へのB19混入の有無や培養に与える影響を計画段階で十分に評価する必要がある。

2) 従来、HIV, HTLV, HBV, HCVが混入した原材料を使用しないことで細胞組織医薬品の安全性の担保を図ってきたが、上記4種類のウイルスは陽性率が高く、しかも健康人から採取した原材料にも混入する可能性が高いため、一律に陽性者から原材料を採取することを制限することは不可能である。さらに、オーダーメイド医療である自己の細胞・組織を原材料として使用する再生医療の場合、持続感染していたEBV, CMV, HHV-6, B19が検出されたからといって治療を行わないことは難しい。しかし、培養中にこれらのウイルスが増殖する場合、大量のウイルス・ウイルス感染細胞が混入した製剤を投与することになり、治療の安全性を担保できない。したがって、これらのウイルスに関し事前に培養系での動態を十分に検討しておくことが望ましいと考えられる。

3) 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、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。本研究は細胞組織加工製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、今後他のiPS細胞株を用いて検証する予定である。

4) HSV-1 の細胞への侵入にはウイルス表面に存在する5つのエンベロープ糖タンパク質(gB, gC, gD, gH, gL)が関与す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ー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, PILR α 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し、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。

5) 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、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、すでに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・迅速に検出可能な検査系(HSV-1, 2, CMV, EBV, VZV, HHV-6, 7, 8, JCV, BKV, AdV, B19, HBV)が有用と考えている。今後本検査系を実用化するための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) 患者が妊娠可能性のある女性の場合等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、常に問診及び検査により否定することとされているB19については、初期の小規模ケースコントロール研究において、胎児死亡率がコントロール(水痘)の2倍から3倍であるとされていたが、近年の一般住民を対象にした大規模コホート研究では、胎児死亡率はコントロール(IgM抗体陰性)と変わらないか、有意差があっても2倍以下であることが示されている(表1-9)。ただし有効なワクチンや医薬品が存在しないということには変わりないため、注意が必要と考えられる。また、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1-10)。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分析及びリスク因子の検討: JADERを用いたリスク分析研究の限界としては、医薬品によって適用理由は異なり、ウイルスの種類や医療機関によって検査される頻度も異なると考えられるため、単純に比較はできないことがあげられる。また、症例の詳細が不明なため、複数のウイルスが感染している症例については原因ウイルスを特定できないことや、薬剤の使用理由となった原疾患や合併症・併用薬の影響も十分に考察できないこともあげられる。一方、IASR及びIDWRを用いたリスク分析については、IDWRにおける累積報告数記載の有無だけで重篤度ランクをつけるのは無理があると思われた。網羅的なデータは得られていないが、死亡率等を利用するのも一つの方法かもしれない。リスク因子については、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。

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と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)ウシ等由来原料に係る基準

1) 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。また、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。また、ウシ由来原料に係るリスクに関する科学的知見は、日々集積しており、それらの知見等を踏まえ、医薬品等の医療におけるリスク・ベネフィットを考慮の上、時代にあった原料規制の見直しを今後も進めるべきと考える。

2) 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) 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

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。平均孔径19nm 及び15nm のウイルス除去膜は vCJD を WB レベルで検出限界以下にまで除去できる事を確認した。また、電氣的吸着能を有する膜もこれまでの検討からデブスフィルターが有効である事を示したが、これに加え QSD もプリオンを吸着除去する事を確認した。これらの事から、バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン除去をより堅牢にするにはこれらの機作の異なる膜を組み合わせる事が有効である事が明らかになった。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

バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン除去効果の検討を行う場合 WB 法が一般的であったが、*in vivo* 評価系 (BA) が WB 法よりも高感度であることが改めて示された。

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は感染した動物の脳から調製したマイクロソーム画分を使用するのが一般的である。これは高力価のプリオン材料を得るためには脳組織が最適な部位であることに由来する。一方、実際のバイオ製剤は培養細胞や血漿がその原料であり、そこに混入する性状と同等のプリオン材料を用いるのが現実的である。本研究より細胞由来のプリオン材料 (PrP^{res} 持続産生細胞及びその培養上清) も脳由来材料と同様に感染性の異常プリオン蛋白を有していることが確認できた。以上の結果より、マウス馴化型 vCJD 持続感染細胞は感染脳に代替するプリオン感染試料として使用できる可能性を示唆した。

3-3) 異常型プリオンの新規検出法

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^{Sc} の新規検出法の確立を目的とし、PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体の開発を行った。

PrP^{Sc} 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^C の N 端側43残基の Ser をリン酸化すると、PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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 を用いたイムノブロット法で、PrP^{Sc} 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モノクローナル抗体 6H4 及びポリクローナル抗体 PrP (FL-253) と同様に、PrP^{Sc} 及び PrP^C に特異的なバンドを示した。従来の第2抗体に結合させた HRP による化学発光法で検出する実験系では、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。そこで、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、化学発光法では 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。近赤外蛍光法では、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^{Sc} 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、イムノブロット法で対照脳のPrPを認識したが、PrP^{Sc}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。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^{Sc}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。しかし、本研究ではイムノブロット法で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^{Sc}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

1) PrP^{Sc}の検出手法に関して： 異常プリオンの検出手法として開発が進むPMCAと*in vitro*細胞培養系について最近の動向とその有用性について調査を行うと共に、手法としての限界やリスク評価を行うにあたっての考慮について検討した。異常プリオンの感染性についての判断はマウス脳内へ検体を接種し、海綿状脳症の発症を確認することが最も正確な検査法とされてきた。しかし、この検査法では非常に長期にわたる*in vivo*でのインキュベーションが必要であり、迅速な試験法の開発が望まれていた。

このような背景から、PMCA細胞培養系での感染性評価法は迅速に判定が可能とされ、これらの検体を用いた検討が実施されてきた。特に、PMCA法は簡便性もあり、様々な検体について評価が行われてきている。今回取り上げた、BSE陽性検体を経口投与したウシでの異常プリオンの出現を各種臓器や排出物などについて調査した研究は、異常プリオンの安全性を考える上で重要と考えられた。これまでマウスインビボ感染性を用いて陽性が検出されてきたウシ脳から採取された臓器の中で、脳、脊髄、神経節、視神経、パイアー斑でPMCA法でも陽性結果となることが確認された。その一方で、これまで陽性反応を示すとはされてこなかった検体でもPMCA法で陽性結果が得られている。当然この結果は、従来の検出法は感度が十分でなく、例えば唾液の感染性に関連してTSE伝播の潜在的なリスクが存在すると結論されている。

一方で、PMCA法の処理過程で人工的に生成された陽性反応である可能性も残されている。昨年度に報告したように英国において手術で除去された虫垂や扁桃腺の調査結果からは、英国人のvCJD

の潜在的な感染者数は多いとする推計が出されている。これは、収集された検体を免疫学的な手法により陽性反応を示した結果に基づいている。しかし、この場合にも二つの可能性を考慮する必要があると考えられる。すなわち、実際に多くの英国人のBSEの潜在的な感染は非常に高く、ただ多くの場合に発症にまで至っていないか、あるいは感染暴露量が発症に至るには少ないとするものである。もう一つの可能性は、陽性結果が必ずしも異常プリオンの感染性を示さないとするものである。現時点でこれらの結論に明確な答えはないが、いずれの可能性もあることを念頭に感染性について更なる検討が必要であると思われる。

2) PrP^{Sc}のクリアランス工程に関する調査： バイオ医薬品のPrP^{Sc}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^{Sc}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^{Sc}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^{Sc}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マイ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^{Sc}除去能を再評価する必要が指摘されてきている。特に血中でのPrP^{Sc}の存在状態が不明であることから、ウシ血清由来のPrP^{Sc}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^{Sc}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^{Sc}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。