

このような点から *in vivo* アッセイ法の代替として用いられているプロテイナーゼK耐性プリオンタンパク質のWBによる検出やPMCA法に関してはその感染性を十分にとらえられているのか疑問が残る。特にWBより高感度な検出手法と言われているPMCA法やその類似の試験管内でのプリオンタンパク質のコンバージョンを指標とする手法は検体の特性による最適化が必要である点や感染性検出の十分条件であるのかが課題となっている。このような点からも感染性を定量的に評価できるアッセイの確立が急務と考えられる。上記のような観点からプリオンタンパク質の高発現細胞を用いた *in vitro* 細胞培養系を用いたアッセイ法の開発が急速に進んでいる。これらのアッセイ法は細胞のラフトや細胞内で添加された PrP^{Sc} により正常プリオンが PrP^{Sc} にコンバージョンされるという原理を利用しており、生体での PrP^{Sc} の発生機構に類似した反応と想定できる。現状の課題は培養細胞中でのコンバージョンの条件設定の難しさとそのコンバージョン率が必ずしも十分でない点である。ただこれらはプリオンタンパク質高発現細胞株の使用や培養条件で改善が期待できる。また、*in vitro* 培養細胞系で製造した PrP^{Sc} をマウス脳内への投与によりCJDの発症を引き起こすことから *in vitro* 法にて変換された PrP^{Sc} は異常プリオンとしての特性を有していること、さらに異常プリオンとしての生体での存在状況に類似していると想定されることから工程へのスパイク試料としての十分性を備えている可能性が高いことも注目すべき点であると考えられる。今後この *in vitro* 培養法を用いてより高濃度の PrP^{Sc} の調製が可能になればより正確な PrP^{Sc} のクリアランス能の評価が可能になると期待される。

(D-4)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

細胞組織加工製品の特性を踏まえたマイコプラズマ否定試験法に関する考え方を実験も踏まえて考察した。細胞組織加工製品では迅速試験が求められるが、これについては日局の改正によりバリデーションに適合する NAT が利用できるのであれば、迅速な試験が実施可能となった。ただし、目的とする製品である細胞を用いて検出感度の確認を行う必要がある。また、検体の種類や量による考慮事項は以下にまとめた。

1) 細胞組織加工製品の細胞特性に応じたマイコプラズマ試験の適用：細胞組織加工製品は、製品ごとに多様な特性を持っており、臨床適用においても様々なバリエーションが存在する。例えば、培養角膜上皮細胞や角膜内皮細胞では、臨床適用されるのは非常に少量の細胞であり、培養角膜シートで重層化した角膜細胞が 10^7 cells/0.2mL 程度とされている。試験に用いることが出来る検体も同様に少量である場合も多い。また、培養角膜上皮シートや培養心筋シートなどでは最終製品の形態がシート状であり、これらの最終製品を対象に試験を実施する場合、その一部を剥ぎ取って被検液とするのか、あるいは試験のために別途パイロット培養した被検細胞を調製し、最終製品の試験に用いることも想定される。この場合には、パイロット培養された被検液は患者に投与される培養製品と同様の操作が適用されており、汚染等のリスクが同一とみなせることが十分に説明可能であることが必要である。一方、抗腫瘍活性が期待される活性化リンパ球などは、細胞が懸濁液の状態で培養されており、最終製品も容易に懸濁状態にすることが可能であり、NAT法を適用するためのDNAの抽出操作も比較的容易であると想定される。一方、接着細胞では通常はトリプシン等により細胞を懸濁状態にする操作が必要となるが、この操作により、細胞に接着しているマイコプラズマが除去されてしまう可能性がある。このような細胞懸濁操作の必要な製品を対象とする場合には、マイコプラズマの添加回収試験を実施することにより十分な感度が担保されることを確認しておく必要がある。さらに細胞組織加工製品の種類によっては、培養軟骨製品や培養骨細胞製品のように医療材料等に包埋して投与される製品もある。このような製品では、最終製品にNAT法を適用することが困難な場合もある。このような場合、包埋後にそれ以上の汚染の可能性がないことを前提に、混合する直前の細胞と医療材料を対象にそれぞれDNA抽出操作を行って各検体でNAT試験を行うことにより、マイコプラズマの存在を否定することも可能であろう。また、特定の医療材料の中で培養され、簡単な洗浄の後にそのまま投与されるような製品の場合には、スキャホールドから直接、NAT検査用のDNA抽出が必要とされる場合もあると考えられる。このような場合には、指標となるマイコプラズマをスキャホールドに添加し、十分な添加・回収ができることを示すことで評価が可能と考えられる。

2) マイコプラズマ否定試験に用いる検体量の考え方：細胞組織加工製品は非常に少量しか培養

しない製品から比較的大量に培養される製品まで、多様な特徴を有する。日局の培養法では、カンテン平板培地で 0.2mL 以上の検体（細胞懸濁液）をプレート 2 枚以上に接種すること、液体培地では 10mL 以上の検体を 1 本以上の培地に接種すること、とされている。試験に用いる検体の量が多いほど感度が高くなると想定されるが、本来、日局で対象としているのは細胞バンクを形成する細胞基材での試験であり、大量培養が可能であり数百 mL の細胞懸濁液が得られるため、そのうちの 10mL を被検液として用いることは合理的と考えられる。しかし、細胞組織加工製品で非常に少量しか培養されない製品の場合、大量の検体を用いてマイコプラズマ試験を実施するのは合理的ではない。BP の無菌試験法では、細胞組織加工製品の被検量は製品量の一定比率を用いるとの考え方が示され、製品量が少ない場合に試験を行わないという考え方を示している。しかし、NAT の被検液量を設定するときには、NAT の特性に応じた考え方を適用するべきであろう。市販のマイコプラズマ測定用 NAT も細胞基材の品質管理を想定して作られており、標準検体量は MycoTOOL で 1mL、MycoSEQ では 10mL を用いて行うこととされるが、特に検体量が少ない場合を想定して 0.1mL を検体として検討を行った。その結果、0.1mL からでも測定は可能であるが、10CFU/mL を測定可能な感度を有するキットを使用しても、検体の容量を標準使用量の 1/10 又は 1/100 の 0.1mL に減らすと当然のことながら感度は低下し、偽陰性となる菌種が認められた。BP では総量が 1mL 未満の製品では試験の適用はなしとしているが、適切な量が確保できるのであれば、どの程度の感度が得られるのかを確認したうえで NAT が適用できる場合に試験の実施を不要とすることはできないと考えられる。また、総量の 1% を試験するという場合には、被検サンプル数を増やすという考え方や、Vero 細胞に接種して検体の容量と検出感度を上げるという方法を取ることも可能と考えられる。

3) 培養上清を検体とする場合の考え方： マイコプラズマは細胞に接着して増幅するため、被検液としては細胞懸濁液を選択するべきとされるが、細胞組織加工製品では必ずしも細胞懸濁液を検体とすることができない場合がある。細胞からマイコプラズマが十分に回収できていることがバリデーションできれば培養上清を検体としてもよいと考えられるが、今回の検討でも示されたように培養上清中のマイコプラズマは細胞培養中のマイコプラズマのごく一部であることが確認されており、培養細胞のマイコプラズマ汚染を検出する

には、大量の培養上清からマイコプラズマを濃縮する等の方法を取る必要があると考えられる。上清からの濃縮法としては、16,000×g で 30 分間の遠心処理により、ある程度濃縮可能であるが、低濃度の試料からの濃縮では細胞などのマイコプラズマを共沈させるものを添加して遠心する方法が培養上清中のマイコプラズマを回収する方法として利用できる。また、Vero 細胞に接種して増幅後に測定する方法は、時間はかかるが、3 日で 105 倍に増幅させることが可能であり、低濃度の試料を高感度に測定するのに有用な方法と考えられる。しかし、特に検出に際して偽陽性や偽陰性を生じることがないことを評価しておくことが重要と考えられる。また、上清を検体として用いる場合には、最終細胞製品への製剤化の過程で汚染が起こらないことを確認しておくことも必要と思われる。製剤化の過程で汚染のリスクが否定されない場合は、投与後の試験も考慮すべきとおもわれる。

4-2) 無菌試験法

欧州で微生物試験の代替法を収載した EP chapter 5.1.69)及び米国で微生物代替試験法の実施に必要なバリデーションを示した USP Chapter <1223>19)は、いずれも日局 16 の参考情報に相当する。日本でも第十七改正日本薬局方（平成 28 年 4 月施行予定）に、参考情報「代替微生物試験法」の新規収載が検討されている。平成 26 年 9 月 1 日に公表された第十七改正日本薬局方収載原案で、参考情報の微生物迅速法について、パブリックコメントが 9 月 30 日まで募集された。新手法の例には、直接検出法として種々の光学検出装置を用いて菌体の発する蛍光を検出する固相サイトメトリーとフローサイトメトリー、間接検出法として核酸を検出する核酸増幅法 (NAT)、ATP 等を検出する生物発光法・蛍光法、増殖能をマイクロコロニーとして検出するマイクロコロニー法、増殖能をガス産生として検出するガス測定法などが紹介されている。機器の適正評価に当たっては、検出対象とする標準試料を用いて実施し、直接検出法においては標準菌株を、間接的検出法においては検出対象となる成分等を用いること、試験方法のバリデーションに当たっては、検出対象が細菌数・細菌量測定の指標となる科学的根拠を明らかにし、従来法と比較して優位な点と共に、利用に当たって考慮すべき点についても明らかとすることが望ましいとしている。新手法の応用分野の例としては、製薬用水の品質管理、製造区域の微生物評価、無菌試験、微生物限度試験、保存効力試験、原材料受入試験などをあげている。

一方、欧州で細胞由来製品の無菌試験法に適用される EP chapter 2.6.276)は、日局 16 の一般試験法に相当する general chapter に記載されている。細胞治療等に用いられる細胞組織加工製品は、ロットを構成せず、製造可能な最終調製品の量に限りがあり、出荷までの期間が短い。「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」の施行に伴い、医薬品や医療機器から独立した再生医療等製品として分類されたことから、EP と同様に、日局の一般試験法にも細胞組織加工製品に特化した無菌試験法の記載が望まれる。「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が施行され、厚生労働大臣は製造をしようとする特定細胞加工物の種類等について認可し、機構が細胞培養加工施設の構造設備について調査を実施する。機構は、細胞組織加工製品に適用する無菌試験及びマイコプラズマ否定試験について、平成 26 年 1 月 17 日時点での考え方を薬事戦略相談に示している。そのひとつとして、組織加工製品では製造可能な最終製品の量に限りがある場合、患者に投与（適用）する量を確保すると、品質試験に使用可能な検体の量はわずかとなることから、製造中間体等を試験検体に用いることにより最終製品での無菌試験及びマイコプラズマ否定試験の実施を省略することについて、次の方策を示した。高度な無菌操作技術を用いて細胞培養から製剤化までのすべての工程操作を適切に管理するとともに、中間工程において無菌試験及びマイコプラズマ否定試験を実施し、その工程以降において汚染されていないことを厳格に保証することができる体制を確保することにより、中間工程における無菌試験等の結果及びすべての工程における汚染を否定する工程管理の結果を以て、最終製品が規格に適合すると判断できる場合は、最終製品での無菌試験及びマイコプラズマ否定試験の実施を省略することは可能とした。細胞組織加工製品はアイソレーター等の高度な無菌操作技術を用いて製造されることから、十分な無菌性保証バリデーションを実施した上で、検体の無菌試験に代えて工程管理での確認による最終調製品の出荷承認が望まれる。日本薬局方一般試験法は医薬品の出荷判定試験法として遵守すべき試験法を、参考情報は製造工程管理などの業務で参考にすべき情報をそれぞれ記載している。参考情報に記載されている蛍光染色による細菌数の迅速測定法を細胞組織加工製品の中間工程において実施すること、最終調製品の出荷判定に無菌試験法として実施することは、現時点で最も合目的と考えられる。次善の方法としては、無菌試験法に適用するバリデーションを行った上で、原理と用いるプライマーの一部が参考情

報に記載されている NAT を利用した迅速測定法の実施が考えられる。その他の Table 3 に例を示した科学的に根拠のある新手法に関しても、蛍光染色による細菌数の迅速測定法との比較を行い、測定原理が異なることから相関は求めないが、従来法と同等以上であることの証明をした上での採用が考えられる。科学技術の進歩は速く、今後もこれら新手法の著しい検出感度の向上や、Table 3 にも示されていない次世代シーケンサーやマイクロアレイ等の新しい原理に基づく検出技術の普及が予想される。既にいくつかの迅速測定法は医薬品の工程管理等で使われており、多くの新手法の採用が期待できる。実際の測定では、蛍光染色法は夾雑物の存在下でシグナルを判断しづらくなること、NAT は外来性 DNA 等の阻害物質存在下で偽陽性を示しやすいことが知られている。その他の新手法についても、各々の測定原理に特有な阻害物質の存在が推測される。いずれの方法においても、正確な測定値が得られるように、試料から夾雑物や阻害物質を除去するなどの前処理に留意する必要がある。細胞組織加工製品の製造初期の培養工程に抗生物質を用いると、簡略化した施設と工程を採用できることから、その使用が不可欠と考えられる場合が想定される。抗生物質は細胞培養系で極力使用しないことが望まれるが、使用した場合には、無菌試験に影響を及ぼさないよう処置することが、技術要件として定められている。中間工程における無菌試験等の結果を以て、最終調製品が規格に適合すると判断する場合には、細胞培養系で使用する抗生物質等の発育阻止物質に留意し、無菌試験に影響を及ぼさないよう処置することが望まれる。最終調製品の無菌性を確保するため、その出荷時点で抗生物質が十分に除去されていること、または存在許容量の妥当性を規定する必要がある。

施行された「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」では、細胞組織加工製品を含めた再生医療等製品の特性を踏まえた規制を構築し、均質でない再生医療等製品について、有効性が推定され、安全性が認められれば、特別に早期に、条件及び期限を付して製造販売承認を与えることを可能とした。同じく施行された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」では、採取等の実施手続き、提供する医療機関の基準、細胞を培養・加工する施設の基準等を規定することにより安全性等を確保し、医療の質及び保健衛生の向上に寄与することを目的としている。本研究で検討した細胞組織加工製品の無菌試験法に迅速測定法を導入することにより、製造

可能な最終調製品の量を確保すること、結果判定までの時間を短縮することを通じて、再生医療等の安全な提供および普及の促進を図られることを期待する。

4-3) エンドトキシン試験法

細胞組織加工製品のエンドトキシン試験の適用について検討を行った。テイラーメイドとしての特徴を有する細胞組織加工製品に対して、公定書である日局への適用を厳格に求めるのは、合理性にかけると考えられる一面があること、特に自己由来製品でロットを構成しない少量の製品を製造する場合に大量の製剤を生産する医薬品での試験を実施することが困難であると考えられる。

日局エンドトキシン試験では、事前に感度や被検液の妨害物質の有無について評価を予試験により実施しておくことが求められる。細胞組織加工製品は生きた細胞がその本質であり、十分な安定性を担保するために様々な添加剤が用いられておりこれらがエンドトキシンの測定を妨害することも考えられる。そのためにもあらかじめ試験法の適用に関して十分な評価が必要と考えられる。一方、個別の試験の実施に際しては、有効成分が生きた細胞のために製剤化後、速やかに被験者に投与されなければならない。従って迅速な測定系が望まれている。また、日局エンドトキシン試験で試験ごとにエンドトキシン標準品を用いた定量を行うことが求められているが、一度に1製品しか製造されない細胞組織加工製品でエンドトキシン標準品を常に使用することは試験の性格からも合理的であるとは考えられない。多くのエンドトキシン試験ではキット化された市販製品が用いられているが、添付されているエンドトキシン標準試薬によりエンドトキシン標準品を代替することが合理的な場合が多いと考えられる。もちろんこのためには、エンドトキシン標準品とエンドトキシン標準試薬との相関性が用いる機器の性能を含めて評価されていることが前提となる。市販のエンドトキシンキットを利用する場合、日局へ適合させるためにはエンドトキシン標準品を用いた検量線作成や反応干渉因子に関する予試験が必要とされるが、自己由来細胞組織加工製品のようなテイラーメイド製品では時間的制約もありエンドトキシン標準品を用いた感度や妨害物質の有無を製品ごとに求めるのは合理的ではない可能性が高いことを考慮する必要がある。以上のような課題に対処するために、あらかじめ標準検量線や干渉試験が実施され、その評価ができている場合には、日局エンドトキシン法以外の方法や異なる原理を利

用した市販キットも使用可能としてよいのではないかと考えられる。そのためにはあらかじめ十分な評価を行っておくことが求められる。特に、細胞組織加工製品に適用する場合に、細胞の培養液や懸濁液にエンドトキシンをスパイクし、干渉がない条件の検討や試験成立の条件等を評価しておくことが求められる。さらに、市販キットではキットメーカーによって実施されたバリデーションデータが添付されている場合もあると想定されるが、少なくとも適用しようとする検体を用いてキットの記載通りの結果が得られることを確認しておく必要がある。さらに日局エンドトキシン法では「カプトガニの血球成分より調製されたライセート試薬を用いる」とされているが、最新のキットでは組換えファクターCやELISA法なども開発されており、迅速あるいは簡便な測定を可能とすることを考慮してもよいのではないかと考えられる。

日局試験法に適合している比色法でのエンドトキシン測定と、日局に適合はしていないが簡便法として市販されている2つの測定キットを用いて測定を行い、その課題を検討した。比色法を用いた場合でも細胞懸濁に用いられる溶液によってはスパイクしたエンドトキシンを正確に測定することが難しい場合もありうることが示された。また、あらかじめどの程度希釈すれば測定に影響が出ないか評価をしておくことにより、適切な測定が可能であることも示された。

(D-5) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

ウイルスクリアランスの評価に用いるモデルウイルスとして、特にCHO細胞を用いる場合は、内在性レトロウイルス粒子の除去/不活化能を評価する観点からX-MLVの選択は妥当であると思われる。また、粒子径が小さいためウイルス除去フィルターによる除去が比較的困難であると共に例えば酸処理のような不活化処理に耐性があること、更に実際のバイオ医薬品の培養工程において汚染事例が多いという点からMVMも有用なモデルウイルスと考えられる。従って、今後提言を予定しているバイオ医薬品のウイルス安全性において、クリアランスの評価に有用なウイルスとしてこれらのウイルスを記載することは妥当と思われる。通常の抗体医薬品の精製プラットフォームは、プロテインAクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーから構成され、必要に応じて疎水性相互作用クロマトグラフィーあるいはハイドロキアパタ

イトクロマトグラフィーが追加される。また、抗体医薬品だけでなく哺乳類の細胞を宿主とするバイオ医薬品の最終の精製工程には通常ウイルス除去フィルターが用いられる。最初の4種類のクロマトグラフィーに限定すると X-MLV 及び MVM のLRVはそれぞれ約16~18及び約11~15であった。従って、これらの精製工程は両ウイルスに対して高いクリアランス能を有していることが示された。バイオ医薬品のウイルス安全性の提言においては、抗体医薬品のプラットホーム精製工程において推奨されるウイルスの LRV の目安を具体的に記載することも可能と思われる。バイオ医薬品の宿主の培養に用いる原材料にウイルスが汚染し生産の中断に至る事件が少なくとも7件起きていることが今回の研究で明らかになった。これ以外にも非公表の汚染事例は起こっているものと推察される。その中には購入した原材料が既に汚染されていたことが疑われる場合、作業者の健康管理・衛生管理の問題等からの汚染が疑われる場合がある。これらの教訓から企業は様々な改善策の実施により汚染を防止すると共に、pH 及び細胞増殖等を指標とした培養工程のモニタリングを行っており、場合によっては Genentech 社のようにルーチンとして培養工程におけるウイルスのモニタリングを行ないウイルス汚染による被害を最小限に防ぐよう対処している企業もある。これらは特にバイオ医薬品の製造に携わっている現場においては極めて有用な情報であり、バイオ医薬品のウイルス安全性の提言において記載する必要があると思われる。一方、培地等の原材料についてウイルス汚染の可能性を否定することは現実的に困難である。したがって、信頼できるベンダーから購入し、場合によっては査察等を実施することが必要である。必要に応じてウイルス検出系を確立して原材料を検査し、ウイルス汚染の無い原材料を使用することも現実的な対処の一つと思われる。なお、ウイルス検出系の標準化は困難であり、測定系の容量、組成、陽性コントロールの種類等により測定値が異なる場合がある点に留意する必要がある。さらに、ウイルスの除去/不活化のための様々な方法とその評価方法を考案・実施する必要もある。しかし、先に述べたように現状の方法には様々な問題点があり、今後改良が必要と思われる。

PCV 等のウイルスのバイオ医薬品迷入事例を基に、WHO は、潜在的な Adventitious Agent のリスクを評価するガイドラインを2011年4月に作成した。このガイドラインの目的は、市販薬に potential extraneous agent が発見された場合のリス

ク評価に関する情報を提供することである。このドラフトガイドラインの中に、リスク評価を行う際のディシジョンツリーが示されており、リスク評価のポイントは、以下の通りである。

- ①ウイルスは、既知か未知か？
- ②核酸は、ウイルス粒子に含まれているか？
- ③核酸は断片か、それとも完全長か？
- ④感染性粒子はあるか？
- ⑤感染性粒子はヒトの細胞に感染するか？
- ⑥感染性粒子はヒトに感染するか？
- ⑦感染性ウイルスは、ヒトに病気を起こすか？
- ⑧ウイルスは、ヒトからヒトへ伝染性があるか？

RotaTeq[®]およびRotarix[®]のPCV迷入事例をディシジョンツリーに当てはめた場合のリスク評価を図5-2に示す。MerckのRotaTeq[®]の場合は、ウイルス粒子に結合したPCV核酸の断片のみしか検出されていないため、ヒトへの感染のリスクは極めて低いと評価された。GSKのRotarix[®]の場合は、感染性の粒子が検出されたが、ヒトの細胞への感染は認められなかったため、ヒトへの感染のリスクは非常に低いと評価された。以上のように、RotaTeq[®] および Rotarix[®]とも健康被害のリスクは低く、FDA, EMA および WHO の判断を支持する結果となった。

E. 結論

(E-1) 細胞組織加工製品等のウイルス安全性評価

1) iPS細胞のRNAウイルス感受性について：非自然宿主でない細胞組織加工製品用細胞にウイルスが感染した場合を想定して、モデルとなるウイルス感染系を用いて、馴化過程を解析検討した。この結果、モデルとしたカリシウイルスは、汚染当初、低い感染性を持っていても、ごく短期間の培養によって、迅速な馴化が起きて、高度の感染性と増殖能を獲得することが明らかになった。細胞組織加工製品用細胞にウイルスが感染した場合を想定して、ウイルスが培養系に迷入した場合にiPS細胞系に何が起きるのかについて調べた。その結果カリシウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルスがiPS細胞に感染複製することが明らかになった。細胞組織加工製品のウイルス安全性を確保するために細胞ストック、フィーダー細胞、中間製品、最終製品等のウイルス感染の有無を高感度、網羅的に検出できるRNA-seqデータ解析のためのパイプラインを作ることができた。

2) iPS 細胞表面ウイルス受容体の網羅的解析：まず、モデル細胞として、遺伝子組換え医薬品の産生細胞として汎用される培養細胞の一つである CHO 細胞 DG44 を用いて、LC/MS を用いたレセプトーム解析技術を開発した。ビオチン化とストレプトアビジンを利用して細胞表面タンパク質の濃縮を行うことで、効率良く細胞表面に分布するウイルス受容体を回収し、ウイルス受容体の検出効率を高めることができることを示した。また、CHO 細胞 DG44 に Icam-1, LDL 受容体などのウイルス受容体が発現していることを見出した。つぎに、本解析技術を用いて、ヒト iPS 細胞のレセプトーム解析を行い、12 種類のウイルス受容体関連分子の同定に成功した。本研究で使用した iPS 細胞は、これらの分子を標的とするウイルスに対する感受性が高いことが示唆された。今後、複数ロットの iPS 細胞のレセプトーム解析を行うことにより、感染性リスクの高いウイルスの予測にも繋がるものと思われる。

3) ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究： HTLV-1 の感染リスクは伝播様式により異なり、HTLV-1 感染細胞を介した細胞-細胞間伝播により効率よく感染が成立するが、感染細胞から遊離した cell-free の HTLV-1 の感染リスクは極めて低いことが明らかとなった。したがってヒト細胞組織加工製品においては、HTLV-1 感染細胞の混入を可能な限り最小限に抑えることが重要と考えられた。一方、細胞の混入がないバイオ医薬品製造に関してその感染リスクは非常に軽微であると結論された。今後は再生医療などで使用されるヒト細胞組織加工製品の製造過程における HTLV-1 を含むヒトレトロウイルス感染細胞の除去とともに、万が一このようなヒトレトロウイルス感染細胞が汚染した場合のリスクを軽減させる手法の開発が重要な課題と考えられた。

4) ウイルス感染リスク評価に関する研究：生体材料を採取する際には必ず血液が混入することから、血液中に存在する持続感染ウイルスに関し、注意すべきウイルス種やその血液中での存在量を予め評価し、リスト化することを目的に研究を行った。本学で開発した網羅的ウイルス検査により 112 名からの 640 検体の検討を行ったところ、EBV, CMV, HHV-6 が高頻度に、頻度は低いが HSV-1, HHV-7, VZV, JCV, BKV, AdV, B19 が検出され、これらのウイルスの検査を検討する必要性が示された。一方、iPS 細胞へのウイルススパイク試験の

結果、iPS 細胞 HSV-1 に感受性を持つことが示された。したがって、厚生労働省通知に記載の、5 種類のウイルス (HIV, HTLV, HBV, HCV, B19) の検査に加えてヒトに持続感染するウイルス(少なくとも HSV-1)の検査が必要と考えられる。

5) 文献及びデータベースを用いたリスクアセスメント：患者が妊娠可能性のある女性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、リスク評価に当たっては、持続感染性等も考慮するべきと考えられた。また、細胞組織加工製品が実用化された場合は、特に患者が免疫抑制状態の場合が多いと考えられるため、免疫抑制剤投与後の各種ウイルス感染症について、JADERを用いてリスク評価を行い、リスク因子も検討した。その結果、HBVのリスクがもっとも高く、ついでEBV, JCVのリスクが高いと考えられた。その他、免疫抑制状態においては、EBV・CMV・VZVについては10代以下、VZV・HBV・BKVについては60代以上、VZVについては女性、BKVについては男性がリスク因子である可能性が示唆された。一方、IASR及びIDWRを用いて検討した場合は、HIV、風疹ウイルス、及び麻疹ウイルスのリスクがもっとも高いと考えられた。

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

(E-2) ウシ等由来原料に係る基準

「生物由来原料基準」(平成 15 年 5 月 20 日厚生労働省告示第 210 号)によって規定されるウシ等由来原料の基準について、世界の BSE 発生状況、欧米を中心とした現行規制を調査・検討した。これに、科学的知見を加味し、我が国における医薬品等原料のリスクに応じた規制のあり方について提言を作成した。生物由来原料基準の一部を改正する件については、平成 26 年 7 月パブリックコメント募集、平成 26 年 11 月 27 日、薬事法等の一部

を改正する法律（平成 25 年法律第 84 号）公布となっている。

(E-3) プリオン安全性評価

1) 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 を用いた WB 評価系は工程評価試験に応用可能であり、15nm 及び 19nm のウイルス除去膜は mo-vCJD を効果的に除去できる事を確認した。また、電気的特性を有する膜もプリオン除去に有効である事がわかった。Cell-based infectivity assay については、実験条件の最適化により、より安定した系になると考えられた。

2) 異常型プリオンの in vivo 検出系の評価： バイオ医薬品や血漿分画製剤の製造工程におけるウイルス除去効果の評価には、BA 法を用いることが重要である。また、評価に用いるプリオンは脳のみならず培養細胞由来の材料も利用可能であることが示された。

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

4) 細胞組織加工製品及びバイオ医薬品の異常型プリオンの検出・リスク評価： PMCA 法は人工的にプリオンタンパク質の変異を引き起こす手法と想定され、迅速性に優れている。in vitro 細胞培養系での感染性の評価は、PMCA に比較しよりインピボでのプリオンタンパク質が変異していく過程を再現している可能性がある。BSE など PrP^{Sc} に対するバイオ医薬品の安全性確保のために PrP^{Sc} の製造工程でのクリアランス能の評価に、プリオンタンパク質を高発現している細胞を用いる培養細胞系の検出系は迅速に感染性を定量できる方法として開発が進められており、PrP^{Sc} の感染性を迅速に評価できる手法として期待される。細胞培養系で得られた PrP^{Sc} は、脳内摂取により感染性が確認されており、PrP^{Sc} のスパイク検体としても有用である。今後細胞培養法が検出手法やクリアランス評価に用いる検体の調製法として

も有用性が高いと考えられる。

(E-4) 無菌試験法、マイコプラズマ否定試験法及びエンドトキシン試験法

1) 核酸増幅法 (NAT) を用いたマイコプラズマの迅速検査法： 細胞組織加工製品の最終製品の出荷試験として実施が求められているマイコプラズマ否定試験について、細胞組織加工製品の特性を踏まえた試験法に関する考え方を整理した。細胞組織加工製品では迅速試験法が求められているが、NAT を細胞組織加工製品に適用する場合に考慮すべき事項を明らかにした。また、検体の種類や検体の採取量など、細胞組織加工製品の特性を考慮した、現実的に適用可能な試験法について考察した。

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

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

(E-5) バイオ医薬品ウイルス安全性評価

バイオ医薬品のウイルスクリアランスの評価に

有用な具体的なウイルス，抗体医薬品の精製プラットフォームにおいて推奨される LRV の具体的な目安，バイオ医薬品の宿主の培養におけるウイルス汚染の実例とその具体的な対処について明らかにした。これらの研究結果は ICHQ5A を補完するものとして今後バイオ医薬品のウイルス安全性の提言を行なう際に記載すべき有用な知見になりうると考えられる。

F. 健康危険情報

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

G. 研究発表

1. 政策への反映

- 1) 生物由来原料基準の一部改正：平成 26 年 7 月パブリックコメント募集，平成 26 年 11 月 27 日，薬事法等の一部を改正する法律（平成 25 年法律第 84 号）
- 2) 日本薬局方の一部改正：2014 年 6 月にマイコプラズマ否定試験 17 局改正案を公表・パブリックコメント募集，2016 年 4 月施行予定

2. 論文発表

- 1) Toda T, Kuwahara K, Kondo N, Matsuda Z, Maeda Y, Maeda K, Sakaguchi N.: Dynamic appearance of antigenic epitopes effective for viral neutralization during membrane fusion initiated by interactions between HIV-1 envelope proteins and CD4/CXCR4. *Immunobiology* 217, 864-872 (2012)
- 2) Ogawa M, Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Nakagawa I, Mochizuki M: Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis. *Jpn J Ophthalmol.* 56(6):529-535 (2012)
- 3) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M: Virological analysis in patients with human herpes virus

6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 12;53(8):4692-4698, (2012)

- 4) Ogawa M, Sugita S, Watanabe K, Shimizu N, Mochizuki M: Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250(12):1877-1883 (2012)
- 5) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M: Detection of *Candida* & *Aspergillus* species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250:391-398 (2012)
- 6) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- 7) Yamaguchi T, Uchida E: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies. *Curr Cancer Drug Targets, in press*
- 8) Yasugi M, Kubota-Koketsu R, Yamashita A, Kawashita N, Du A, Sasaki T, Nishimura M, Misaki R, Kuhara M, Boonsathorn N, Fujiyama K, Okuno Y, Nakaya T, Ikuta K: Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. *PLoS Pathogens, in press.*
- 9) Watanabe Y, Ibrahim MS, Ikuta K: Control of endemic influenza virus H5N1 in view of viral and host diversity. *EMBO Reports, in press*
- 10) Watanabe Y, Ibrahim MS, Suzuki Y, Ikuta K: The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). *Trends Microbiol.* 20: 11-20 (2012)
- 11) Urayama T, Cameron R, Sato T, Yunoki M, Ikuta K: Misinterpretation in virus clearance studies of biological products due to an uncommon discrepancy between cytopathic effects and infectivity of human immunodeficiency virus (HIV). *Biologicals, in press*
- 12) Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Takei M, Hagihara T, Iwamoto S, Murao T, Sawani K, Fukae D, Nakamura M, Nagata E, Kawakami A, Mitsubayashi Y, Ohno M, Uehara Y, Fukukawa T, Kanai Y, Kosaka M, Ikuta K: Reliability of a newly-developed immunochromatography diagnostic kit for pandemic influenza A/H1N1pdm virus: Implications for drug administration. *PLoS One, in press*

- 13) Noda M, Masrinoul P, Pipattanaboon C, Ramasoota P, Setthapramote C, Sasaki T, Sasayama M, Yamashita A, Kurosu T, Ikuta K, Okabayashi T: Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against dengue virus capsid protein among four serotypes. *Biologics* 6, 409-416 (2012)
- 14) Kubota-Koketsu R, Yunoki M, Okuno Y, Ikuta K: Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010. *Biologics* 6, 245-247 (2012)
- 15) Sakudo A, Baba K, Ikuta K: Analysis of Vis-NIR spectra changes to measure the inflammatory response in the nasal mucosal region of influenza A and B virus-infected patients. *J. Clin. Virol.* 55, 334-338 (2012)
- 16) Sakudo A, Baba K, Ikuta K: Discrimination of influenza virus-infected nasal fluids by Vis-NIR spectroscopy. *Clin. Chim. Acta* 414C, 130-134 (2012)
- 17) Tian YS, Verathamjamras C, Kawashita N, Okamoto K, Yasunaga T, Ikuta K, Kameoka M, Takagi T: Discovery of novel low-molecular-weight HIV-1 inhibitors interacting with cyclophilin A using in silico screening and biological evaluations. *J. Mol. Model, in press*
- 18) Li YG, Siripanyaphinyo U, Tumkosit U, Noranate N, A-Nuegoonpipat A, Kurosu T, Ikuta K, Takeda N, Anantapreecha S: Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. *Intervirology.* 56, 6-12 (2013)
- 19) Kubota-Koketsu R, Yunoki M, Okuno Y, Ikuta K: Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010. *Biologics* 6: 245-247 (2012)
- 20) Hirai I, Ebara M, Nakanishi S, Yamamoto C, Sasaki T, Ikuta K, Yamamoto Y: Jurkat cell proliferation is suppressed by Chlamydia (Chlamydophila) pneumonia infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6K. *Immunobiology* 2012 Jun. 26, *in press*
- 21) Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, Kawashita N, Daidoji T, Takagi T, Yasunaga T, Nakaya T, Ikuta K: Antigenic analysis of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 sublineage co-circulating in Egypt. *J. Gen. Virol.* 2012 Jul. 12, *in press*
- 22) Setthapramote C, Sasaki T, Puiprom O, Limkittikul K, Pitaksajjakul P, Pipattanaboon C, Sasayama M, Leuangwutiwong P, Phumratanaprapin W, Chamnachanan S, Kusolsuk T, Jittmittraphap A, Asai A, Arias JF, Hirai I, Kuhara M, Okuno Y, Kurosu T, Ramasoota P, Ikuta K: Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423: 867-872 (2012)
- 23) Li YG, Siripanyaphinyo U, Tumkosit U, Noranate N, A-Nuegoonpipat A, Pan Y, Kameoka M, Takeshi K, Ikuta K, Takeda N, Anantapreecha S: Poly(I:C), an agonist of toll-like receptor-3, inhibits replication of the Chikungunya virus in BEAS-2B cells. *Virol. J.* 9: 114 (2012)
- 24) Sakudo A, Ikuta K: A technique for capturing broad subtypes and circulating recombinant forms of HIV-1 based on anionic polymer-coated magnetic beads. *Int. J. Mol. Med.* 30: 437-442 (2012)
- 25) Matsumoto Y, Hayashi Y, Omori H, Honda T, Horie M, Ikuta K, Fujino K, Nakamura S, Schneider U, Chase G, Yoshimori T, Schwemmle M, Tomonaga K: Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* 11: 492-503 (2012)
- 26) Sakudo A, Kuratsune H, Kato YH, Ikuta K: Visible and near-infrared spectra collected from the thumbs of patients with chronic fatigue syndrome for diagnosis. *Clin. Chim. Acta* 413:1629-1632 (2012)
- 27) Ramadhany R, Yasugi M, Nakamura S, Daidoji T, Watanabe Y, Takahashi K, Ikuta K, Nakaya T: Tropism of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus. *Front. Microbiol.* 3: 128 (2012)
- 28) Nagatani N, Yamanaka K, Ushijima H, Koketsu R, Sasaki T, Ikuta K, Saito M, Miyahara T, Tamiya E: Detection of influenza virus using a lateral flow immunoassay for amplified DNA by a microfluidic RT-PCR chip. *Analyst* 137: 3422-3426 (2012)
- 29) Boonsathorn N, Kanai Y, Punjampa J, Bai G, Chittaganpitch M, Petphuwadee U, Jampangern W, Sawanpanyalert P, Ikuta K, Teerasut C: Neutralization titers against influenza A (H3N2)

- and influenza B viruses among a non-vaccinated population from Thailand. *Southeastern Asian J. Trop. Med. Public Health* 43, 674-679 (2012)
- 30) Kanai Y, Miyasaka S, Uyama S, Kawami S, Kato-Mori Y, Tsujikawa M, Yunoki M, Nishiyama S, Ikuta K, Hagiwara K: Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around pig farm. *BMC Res. Notes* 5: 4 (2012)
 - 31) Yasugi M, Nakamura S, Daidoji T, Ramadhany R, Yang C-S, Yasunaga T, Iida T, Horii T, Ikuta K, Takahashi K, Nakaya T: Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009-2010. *PLoS One* 7, e30946 (2012)
 - 32) Sakudo A, Suganuma Y, Sakima R, Ikuta K: Diagnosis of HIV-1 infection by near-infrared spectroscopy: Analysis using molecular clones of various HIV-1 subtypes. *Clin. Chim. Acta* 413, 467-472 (2012)
 - 33) Sakudo A, Onodera T, Shitani H, Ikuta K: Dengue virus presence and surveillance in Okinawa. *Exp. Ther. Med.* 3, 15-17 (2012)
 - 34) Hagiwara K, Ando T, Koiwa M: The Influence of Borna Disease Viral Infection on Dairy Cow Reproduction. *J Vet Med Sci.* 29; 74(4): 419-421 (2012)
 - 35) Hagiwara K, Kawami S, Kato-Mori Y, Kubota-Koketsu R, Tsujikawa M, Urayama T, Yunoki M, Takahashi K, Ikuta K: Protective Role of Human Intravenous Immunoglobulin from Influenza A Virus Infection in Mice. *The Open Hematology Journal*, 6, 8-11 (2012)
 - 36) Yusa S, Oliveira-Martins JB, Sugita-Konishi Y, Kikuchi Y: Cellular Prion Protein: From Physiology to Pathology, *Viruses* 4, 3109-3131 (2012)
 - 37) Nakano Y, Monde K, Terasawa H, Yuan Y, Yusa K, Harada S, Maeda Y: Preferential recognition of monomeric CCR5 expressed in cultured cells by the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. *Virology, in press*
 - 38) 奥田晴宏, 川崎ナナ: 16.7 その他の医薬品と関連物質. 辰巳敬編, 「第7版化学便覧応用化学編」, 1079-1084, 丸善出版, 東京(2014)
 - 39) 遊佐敬介, 前田洋助, 高林誠, 小林哲, 苑宇哲: CHO細胞が産生するレトロウイルス様粒子とウイルス安全性. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44(10) 852-856 (2013)
 - 40) 小林哲, 遊佐敬介, 川崎ナナ: ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究. 国立衛研報告, 131, 7-15 (2013)
 - 41) 小林哲: 各種インターフェロン製剤における自殺または糖尿病関連の副作用発現期間の比較. 国立衛研報告, 131, 45-49 (2013)
 - 42) 小林哲, 遊佐敬介, 川崎ナナ: 抗体医薬品および免疫抑制作用を有する各種薬剤の投与症例におけるウイルス感染プロファイルの比較並びにこれを利用したウイルス感染のリスク分析. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 45(5): 436-441 (2014)
 - 43) 日本PDA製薬学会バイオウイルス委員会SALLY分科会: 第2章: 生物製品の品質, 安全性の向上に関する検討. 過去の事例に学ぶウイルス汚染の防止対策ー血漿分画製剤の感染事例とその対策. PHARM TECH JAPAN, 29(7):45-50 (2013)
 - 44) 前田洋助: ケモカイン受容体変異とHIV感染抵抗性. 化学療法の領域, 29: 2466-73 (2013)
 - 45) 北條浩彦, 清水則夫(分担執筆): 原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド最強のステップUPシリーズ. 北條浩彦編, 「基本編ー原理と基本知識ーリアルタイムPCRを使った解析の基本10プライマー/プローブの設計手順②マルチプレックスの場合」. 72-74, 羊土社 (2013)
 - 46) 清水則夫, 渡邊健. 外丸靖浩(分担執筆): 原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド最強のステップUPシリーズ. 北條浩彦編, 「実践編ープロトコールを中心にーIV章 遺伝子量解析15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」. 192-202, 羊土社 (2013)
 - 47) 加藤(森)ゆうこ, 柚木幹弘, 生田和良, 萩原克郎: 血液製剤の安全対策ープリオン除去の現状ー. モダンメディア, 59(9), 231-237 (2013)
 - 48) 高橋一恵, 大久保祐士, 古木理恵, 服部眞次, 浦山健, 坂井薫, 柚木幹弘, 萩原克郎, 生田和良: 由来の異なるE型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて. 血液事業, 36(3), 679-685 (2013)
 - 49) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 印刷中
 - 50) 川崎ナナ, 石井明子, 奥田晴弘: バイオ医薬品原薬のクオリティ・バイ・デザイン. ファームテックジャパン, 28(12): 2491-2501 (2012)
 - 51) 原園景, 川崎ナナ: 第7部第1章品質評価

- 試験に関する規制と申請対応. 919~925 世界薬事申請, 技術情報協会 (2012)
- 52) 石井明子, 原園 景, 川崎ナナ: バイオ後続品/バイオシミラーに関する国内外の規制動向と品質評価. ファームテックジャパン, 29, 23-42 (2012)
- 53) 橋井則貴, 原園 景, 栗林亮佑, 川崎ナナ: 液体クロマトグラフィー/質量分析による糖タンパク質医薬品の糖鎖解析. ファームテックジャパン, 28(14), 127(2897)-135(2905) (2012)
- 54) 川崎ナナ, 武田伸一, 渡部一人, 津田重城: わが国における今後のバイオ医薬品の開発について. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 43,(10) 884-896 (2012)
- 55) 橋井則貴, 川崎ナナ: 液体クロマトグラフィー/質量分析によるバイオ医薬品由来不純物の解析. 「バイオ(抗体)医薬品における不純物/凝集の評価・試験と免疫原性, ウイルス安全性への対応」, 150-168, 監修吉森孝, サイエンス&テクノロジー株式会社, 東京 (2012)
- 56) 川崎ナナ, 石井明子: 抗体医薬品のバイオ後続品の将来展望. 臨床と微生物, 39巻5号 459(059)-465(065) (2012)
- 57) 川崎ナナ, 石井明子: バイオ後続品. 日本病院薬剤師誌, 48 (9), 1079-1086 (2012)
- 58) 川崎ナナ: 抗体医薬品における品質評価の視点. 新機能抗体開発ハンドブック ~次世代抗体創製から産業への展開まで~. 監修濱窪隆雄, 553-560, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京 (2012)
- 59) 遊佐敬介, 前田洋助: ヒト感染が疑われたレトロウイルスの起源とウイルス安全性. ファームテックジャパン, 28 (10), 2075-2079 (2012)
- 60) 遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴: バイオ医薬品の外来性感染性物質について. ファームテックジャパン, 28 (5), 941-946 (2012)
- 61) 遊佐敬介: バイオ医薬品のウイルス安全性. (抗体) 医薬品における不純物/凝集の評価・試験と免疫原性, ウイルス安全性への対応, 270-278, サイエンス&テクノロジー (2012)
- 62) 日本 PDA 製薬学会 バイオウイルス委員会 SALLY 分科会: 過去の事例に学ぶウイルス汚染の防止対策 ~血漿分画製剤の感染事例その対策~. ファームテックジャパン, 29 印刷中 (2013)
- 63) 山口照英, 内田恵理子: 核酸医薬品: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保. 「世界の薬事規制対応・承認申請」. 技術情報, 印刷中
- 64) 山口照英: バイオ (抗体) 医薬品・後続品のコンパラビリティ(同等性/同質性)評価方法とバイオ後続品としての抗体医薬品の要件. バイオ抗体医薬品・後続品における CMC 研究・申請と同等性確保, 1-16, サイエンス&テクノロジー出版 (2012)
- 65) 山口照英: バイオシミラーについて. 分子標的薬(日本臨床), 671-677 (2012)
- 66) 山口照英: 第十六局方第一追補に記載された生物製品と関連する試験法について. ファームテックジャパン, 28(14), 39-46 (2012)
- 67) Yuan Y, Yokoyama K, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato Y, Yusa K: Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to maraviroc. *Plos One*, 8: e65115 (2013)
- 68) Suzuki K, Hattori S, Marks K, Ahlenstiel C, Maeda Y, Ishida T, Millington M, Boyd M, Symonds G, Cooper DA, Okada S, Kelleher A: Promoter targeting RNA suppresses HIV-1 infection in vivo through transcriptional gene silencing. *Molecular Therapy Nucleic Acids. in press*
- 69) Maeda Y, Terasawa H, Nakano Y, Monde K, Yusa K, Oka S, Takiguchi M, Harada S. V3-independent competitive resistance of a dual-X4 HIV-1 to the CXCR4 inhibitor AMD3100. *Plos One. in press*
- 70) Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H: Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences*. 324, 190-194 (2013)
- 71) Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q, Chng WJ.: EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *blood*. 121, 4512-4520 (2013)
- 72) Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N: Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiration*, [Epub ahead of print] (2013)

- 73) Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T: Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Internal Medicine*, 52(2), 201-211 (2013)
- 74) Sakai-Kato K, Nanjo K, Yamaguchi T, Okuda H, Kawanishi T: High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods*, 5, 5899-5902 (2013)
- 75) Itoh S, Hiruta Y, Hashii N, Fujita N, Natsuga T, Hattori T, Bando A, Sekimoto Y, Miyata K, Namekawa H, Mabuchi K, Sakai T, Shimahashi H, Kawai K, Yoden H, Koyama S, Odgaard Herr S, Natsuka S, Yamaguchi T, k N: Determination of Galactosamine Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography. *Biologicals, in press*
- 76) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- 77) Inoue Y, Kubota-Koketsu R, Ideno S, Nakamura H, Ono K, Okuno Y, Ikuta K: Induction of anti-influenza immunity by modified GFP carrying hemagglutinin-derived epitope structure. *J. Biol. Chem.*, 288(7), 4981-4990 (2013)
- 78) Yasugi M, Kubota-Koketsu R, Yamashita A, Kawashita N, Du A, Sasaki T, Nishimura M, Misaki R, Kuhara M, Boonsathorn N, Fujiyama K, Okuno Y, Nakaya T, Ikuta K: Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. *PLoS Pathogens*, 8(10), e77892 (2013)
- 79) Watanabe Y, Ibrahim M S, Ikuta K: Evolution and Control of H5N1. *EMBO Reports*, 14(2), 117-122 (2013)
- 80) Urayama T, Cameron R, Sato T, Yunoki M, Ikuta K: Misinterpretation in virus clearance studies of biological products due to an uncommon discrepancy between cytopathic effects and infectivity of human immunodeficiency virus (HIV). *Biologicals*, 41(2), 125-127 (2013)
- 81) Hirai I, Ebara M, Nakanishi S, Yamamoto C, Sasaki T, Ikuta K, Yamamoto Y: Jurkat cell proliferation is suppressed by Chlamydia (Chlamydomphila) pneumonia infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6K. *Immunobiology*, 218(4), 527-532 (2013)
- 82) Tian YS, Verathamjamras C, Kawashita N, Okamoto K, Yasunaga T, Ikuta K, Kameoka M, Takagi T: Discovery of novel low-molecular-weight HIV-1 inhibitors interacting with cyclophilin A using in silico screening and biological evaluations. *J. Mol. Model*, 19 (1), 465-475 (2013)
- 83) Li YG, Siripanyaphinyo U, Tumkosit U, Noranate N, A-Nuegoonpipat A, Kurosu T, Ikuta K, Takeda N, Anantapreecha S: Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. *Intervirology* 56 (1), 6-12 (2013)
- 84) Higuchi H, Gondaira S, Iwano H, Hirose K, Nakajima K, Kawai K, Hagiwara K, Tamura Y, Nagahata H: Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. *Vet Rec.*, 172(21): 557 (2013)
- 85) Kikuchi Y, Ohnishi T, Furusawa H, Kawai T, Fukuda Y, Yokoyama H, Sugita-Konishi Y: ELISA Detection of *Kudoa septempunctata* in Raw Paralichthys olivaceus (Olive Flounder) using a Chicken Anti-Kudoa Antiserum. *Biocontrol Science*, 18, 193-197 (2013)
- 86) Ohnishi T, Kikuchi Y, Furusawa H, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: *Kudoa septempunctata* Invasion Increases the Permeability of Human Intestinal Epithelial Monolayer. *Foodborne Pathog.*, 10: 137-142 (2013)
- 87) Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S: Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl Microbiol Biotechnol.*, Jul 24 published online (2013)
- 88) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, Yusa, K: Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to maraviroc. *PLOS One, in press*
- 89) Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Boonchawalit S, Yusa K, Matsushita S: Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J. Gen. Virol.* 94(5): 933-943 (2013)
- 90) 川崎ナナ: 生物薬品の局方収載の現状と課題. レギュラトリーサイエンス学会誌, vol.4, No.2, 149-154 (2014)
- 91) Hashii N, Harazono A, Kuribayashi R, Takakura D, Kawasaki N: Characterizations of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 30;28(8), 921-932 (2014)
- 92) Maeda Y, Terasawa H, Tanaka Y, Mitsuura C, Nakashima K, Yusa K, Harada S: Separate cellular localizations of human T-tropic virus 1 (HTLV-1) Env and glucose transporter 1 (GLUT1) are required for HTLV-1-mediated fusion and infection. *J Virol.* 89, 502-511 (2015)

- 93) Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, Shimizu N, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows distinctive stem cell-like phenotype. *Luek Lymphoma* 10:1-27 (2014)
- 94) Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A: CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals. *PLoS One* 9:e112564 (2014)
- 95) Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N: Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 87:279-286 (2014)
- 96) Yagasaki H, Shichino H, Shimizu N, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S: Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. *Transpl Infect Dis*. 17(1):160-1 (2015)
- 97) Endo A, Watanabe K, Ohya T, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S: Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin.Infect.Dis*. 59:545-548 (2014)
- 98) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H: Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr.Int*. 56:159-66 (2014)
- 99) 関矢一郎, 清水則夫, 森尾友宏, 宗田 大 : 滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の手順. 日本整形外科学会雑誌, 88:212-215 (2014)
- 100) 木村秀樹, 池 裕明, 岡 正朗, 鈴木弘行, 谷憲三朗, 徳久剛史, 中面哲也, 森尾友宏, 山口佳之, 阿曾沼元博, 河上 裕, 紀ノ岡正博, 澤 芳樹, 清水則夫 : 免疫細胞療法細胞培養ガイドライン. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 45:411-433 (2014)
- 101) 山口照英 : 再生医療の安全性確保法と薬事法改正. レギュラトリーサイエンス学会誌(RSMP), vol.4, No.3, 237-247 (2014)
- 102) Maeda D, Yamaguchi T, Ishiduka K, Takekita T, Sato D : Regulatory Frameworks for Gene and Cell Therapies in Japan. in "Regulatory Aspects of Gene Therapy and Cell Therapy Products in Japan." Springer, Serbian,M. & Galli,M.C. eds., in press
- 103) Kurosu T, Chaichana P, Phanthanawiboon S, Khamlert C, Yamashita A, A-nuegoonpipat A, Ikuta K, Anantapreecha S: Sequence Variation of Dengue Type 2 Virus from clinical cases in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 67(2):132-134 (2014)
- 104) Omokoko MD, Pambudi S, Phanthanawiboon S, Masrinoul P, Setthapramote C, Sasaki T, Kuhara M, Ramasoota P, Yamashita A, Hirai I, Ikuta K, Kurosu T: A Highly Conserved Region between Amino Acids 221-266 of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Is a Major Epitope Region in Infected Patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jul;91(1):146-155. (2014)
- 105) Sasayama M, Benjathummarak S, Kawashita N, Rukmanee P, Sangnukdanun S, Masrinoul P, Pitaksajjakul P, Wuthisen P, Kurosu T, Maneekan P, Ikuta K, Ramasoota P, Okabayashi T, Singhasivanon P, Luplertlop N: Chikungunya virus was isolated in Thailand, 2010. *Virus Genes*. Dec;49 (3):485-489 (2014)
- 106) Phanthanawiboon S, A-nuegoonpipat A, Panngarm N, Limkittikul K, Ikuta K, Anantapreecha S, Kurosu T: Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 expressing stably human DC-SIGN. *J. Virol. Methods*. Dec;209:55-61 (2014)
- 107) Boonsathorn N, Panthong S, Koksunan S, Chittaganpitch M, Phuygun S, Waicharoen S, Prachasupap A, Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Yasugi M, Ono K, Arai Y, Kurosu T, Sawanpanyalert P, Ikuta K: A human monoclonal antibody derived from a vaccinated volunteer recognizes heterosubtypically a novel epitope on the hemagglutinin globular head of H1 and H9 influenza A viruses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Sep 26; 452(3):865-870 (2014)

- 108) Phanthanawiboon S, A-nuegoonpipat A, Panngarm N, Limkittikul K, Ikuta K, Anantapreecha S, Kurosu T: Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 expressing stably human DC-SIGN. *J. Virol. Methods*. 209: 55-61 (2014)
- 109) Okabayashi T, Kurosu T. et. al.: Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test. *J. Clin. Microbiol.* 53(2): 382-8 (2015)
- 110) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池 裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷 梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 45(5): 442-451 (2014)
- 111) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池 裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷 梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験のPCR法改正のための共同研究. *マイコプラズマ学会雑誌* (印刷中)
- 112) Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T: Ultrasensitive detection of PrP(Sc) in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion. *J Gen Virol*. Nov;95(Pt 11): 2576-88 (2014)
- 113) Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S: Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl Microbiol Biotechnol*. Mar;98(5):2113-20 (2014)
2. 学会発表
- 1) 川崎ナナ: バイオ医薬品の新しい品質管理戦略と展望. BMS シンポジウム(2012. 11. 19) 東京
- 2) 川崎ナナ: バイオ医薬品/バイオ後続品開発に関する国内の最新動向. 製剤研究会 (2012. 11. 1) 東京
- 3) 川崎ナナ: バイオ医薬品の FIH 試験の課題. レギュラトリーサイエンス学会第1回学術大会シンポジウム. (2012, 9, 2-3) 東京
- 4) 小林 哲: 各種インターフェロン製剤における自殺または糖尿病関連の副作用発現期間の比較. 日本薬剤疫学会 (2012.11) 東京
- 5) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, Yusa K: Key Structure of the gp120 V3 Loop Responsible for Noncompetitive Resistance to Maraviroc in R5 HIV-1_{JR-FL}. 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (2012.10. 24-26) Aso
- 6) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志: HIV-1 coreceptor の oligomer 形成が HIV-1 感染感受性に与える影響. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012.11.13-15) 大阪
- 7) 前田洋助, 寺沢広美, 中野雄介, 門出和精, 遊佐敬介, 原田信志: RTLV-I エンヴェロープの膜融合におけるウイルス産生細胞内エンドソーム酸性化の関与. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012.11.13-15) 大阪
- 8) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志: CRF01_AE X4 HIV の V3 非依存的 CXCR4 阻害剤逃避. 第 26 回日本エイズ学会学術集会 (2012.11.24-26) 東京
- 9) 日本 PDA バイオウイルス委員会 SALLY 分化会: 過去の事例に学ぶウイルス汚染の防止対策 1.1 バイオ医薬品における事例検討. 第 19 回日本 PDA 製薬学会年会 (2012.12.12) 東京
- 10) 日本 PDA バイオウイルス委員会 SALLY 分化会: 過去の事例に学ぶウイルス汚染の防止対策 1.2 血漿分画製剤の感染事例とその対策. 第 19 回日本 PDA 製薬学会年会 (2012.12.13) 東京
- 11) 吉山裕規, 他3名: EBV遺伝子BNLF2aとBNLF2bは溶解感染初期と潜伏期に発現し, 腫瘍化に関与する. 第60回日本ウイルス学会 (2012. 11) 大阪
- 12) 松田 剛 他15名: ヒト化マウスを用いたEBウイルス関連リンパ増殖性疾患に対する免疫細胞治療のモデル実験. 第60回日本ウイルス学会 (2012. 11) 大阪
- 13) 清水則夫: 網羅的ウイルス検査法の開発と臨床ウイルス学的検査への応用. 第30回日本染色体遺伝子検査学会学術集会. (2012. 11) 東京
- 14) 清水則夫: 移植医療・細胞治療におけるウイルス検査系の開発. 輸血学会関東甲信越支部会 (2012. 9) 東京
- 15) 今留謙一, 清水則夫, 他3名: 細胞表面抗原マーカー解析によるEBV特異的CTL誘導の検討. 第27回ヘルペスウイルス研究会 (2012. 6) 名古屋

- 屋
- 16) 小川 学, 他3名, 清水則夫: 真菌28S rRNA領域定量PCRの真菌性眼内炎診断における有効性の検討. 第116回日本眼科学会総会 (2012. 4) 東京
 - 17) 今留謙一, 他6名, 清水則夫, 他3名: EBウイルス関連血球貧食症候群モデルマウスの作成と解析. 第21回EBウイルス感染症研究会 (2012. 3) 東京
 - 18) 今留謙一, 他4名, 清水則夫, 他3名: EBV関連血球貪食リンパ組織球症モデルマウスの作製と病態発現解析. 第21回EBウイルス感染症研究会 (2012. 3) 東京
 - 19) Yamaguchi T: Current Situation of Japanese Biologics. CMC Forum Japan (2012) Tokyo
 - 20) Yamaguchi T: Japanese Perspective on Regulation of Biosimilar Products. APEC Biosimilar Symposium. (2012) Seoul, Korea
 - 21) 山口照英: 10年後に再生医療はどのようになっているのか? 日本再生医療学会. ワークショップ (2012) 横浜
 - 22) 山口照英: バイオ医薬品のウイルス安全性. 日本ウイルス学会. シンポジウム (2012)
 - 23) 久保 純, 高橋一恵, 古木理恵, 上平 崇, 大久保祐士, 浦山 健, 服部眞次, 坂井 薫, 柚木幹弘: アルブミン製剤の製造工程におけるウイルス・プリオンの不活化/除去効果の評価. 第 36 回血液事業学会 (2012.10.17-19) 仙台
 - 24) 坂井 薫, 服部眞次, 高橋一恵, 古木理恵, 大久保祐士, 上平 崇, 久保 純, 浦山 健, 柚木幹弘: フィブリノゲン製剤の製造工程における各種感染性病原体の不活化/除去の評価. 第 36 回血液事業学会 (2012.10.17-19) 仙台
 - 25) 久保 純, 上平 崇, 坂井 薫, Larisa Cervenakova, 柚木幹弘, 萩原克郎, 生田和良: バイオ医薬品の製造工程におけるマウス馴化型vCJD株とハムスター馴化型Scrapie株の挙動. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012.11.13-15) 大阪
 - 26) 菊池 裕, 遊佐精一, 中島 治, 手島玲子, 小西良子, 山口照英: リン酸化セリンを含むプリオンタンパク質を認識する抗体に関する研究. 第 85 回日本生化学会大会 (2012.12.14-16) 福岡
 - 27) 玉川萌笑, 遊佐精一, 中島 治, 手島玲子, 辻 勉, 小西良子, 菊池 裕: PrP 遺伝子欠損細胞株 HpL3-4 に導入したヒツジプリオンタンパク質の解析. 第 85 回日本生化学会大会 (2012.12.14-16) 福岡
 - 28) 小林 哲, 遊佐敬介, 川崎ナナ: 各種の免疫調節作用を有する薬剤の投与症例におけるウイルス感染プロファイルの比較. 第 3 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2013. 9) 東京
 - 29) 苑 宇哲, 高林 誠, 前田洋助, 原田信志, 遊佐敬介: ネコカリシウイルスの非宿主細胞における馴化について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013.11.10-12) 神戸
 - 30) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志: HIV-1 coreceptor の oligomer 形成が HIV-1 感染感受性に与える影響. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013.11.10-12) 神戸
 - 31) Terasawa H, Maeda Y, Nakano Y, Monde K, Kawano R, Yusa K, Harada S. Competitive resistance of a CXCR4-using HIV-1 lacking amino acid substitutions in the V3 loop of gp120 to a CXCR4 inhibitor. XIV Kumamoto AIDS seminar (2013) Kumamoto, Japan
 - 32) Nakano Y, Maeda Y, Monde K, Terasawa H, Yusa K, Harada S. Preferential recognition of monomeric forms of CCR5 by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. XIV Kumamoto AIDS seminar (2013) Kumamoto, Japan
 - 33) 前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中野雄介, 門出和精, 遊佐敬介, 原田信志: ウイルス産生細胞における GLUT1 発現による HTLV-1 エンベロープタンパク質の膜融合能の減弱. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013.11.10-12) 神戸
 - 34) 寺沢広美, 前田洋助, 中野雄介, 遊佐敬介, 原田信志: CRF01_AE X4 HIV-1 の CXCR4 阻害剤耐性獲得機構の解析. 第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013) 熊本
 - 35) 日本 PDA バイオウイルス委員会 SALLY 分科会: バイオ医薬品の安全性確保 1.1 ウイルス迷入の安全性評価. 第 20 回日本 PDA 製薬学会年会 (2013.12. 3-4) 東京
 - 36) 今留謙一, 松田 剛, 川野布由子, 千葉佑規乃, 新井文子, 中澤温子, 伊藤 守, 清水則夫, 藤原成悦: 難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究. 日本ウイルス学会 (2013.11) 神戸
 - 37) 清水則夫: 再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発 第 14 回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 (2013. 9) 東京
 - 38) Kishioka Y, Sakurai K, Yamaguchi T: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. APEC International Symposium (2013) Soul, Korea
 - 39) Yunoki M. Hagiwara K, Ikuta K: HEV Prevention, Inactivation and Removal Strategies. Pathogen Clean Asia Summit 2013 (2013.

- 5.15-16) Shanghai
- 40) Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K: Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during manufacturing processes of plasma derivatives. Bioplasma World Asia 2013 (2013. 9. 3-4) Bali, Indonesia
- 41) 小林不二夫, 上園昭人, 坂井 薫, 柚木幹弘, 萩原克郎: グロブリン存在下におけるインフルエンザウイルス感染細胞の炎症性因子産生に対する影響. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (2013.11) 神戸
- 42) 鈴木瑞穂, 加藤(森)ゆうこ, 浅川満彦, 柚木幹弘, 生田和良, 萩原克郎: NAT 法の違いによる野外サンプルからの E 型肝炎ウイルスの検出感度の違い. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (2013.11) 神戸
- 43) 菊池 裕, 豊田淑江, 遊佐精一, 窪崎敦隆, 山口照英: 低酸素条件下で誘導されるスプライス変異 GPI アンカー欠損型プリオン蛋白質の発現. 第 1 回低酸素研究会 (2013. 7. 6) 東京
- 44) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池 裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷 梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日局参考情報「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」の PCR 法の見直しに関する共同研究. 日本薬学会第 134 年会 (2014.3) 熊本
- 45) 窪崎敦隆, 菊池 裕, 宮原美知子, 遊佐精一, 島崎愛加, 石橋侑季, 鈴木俊宏, 小原有弘, 大谷 梓, 佐々木裕子, 松山晃文, 大倉華雪, 古田美玲, 内田恵理子, 山口照英: マイコプラズマ否定試験に利用可能な標準菌株及び標準 DNA の調製. 日本薬学会第 134 年会 (2014.3) 熊本
- 46) 川崎ナナ, 中澤志織, 栗林亮佑, 多田 稔, 石井明子, 橋井則貴: バイオ医薬品ヒト初回投与試験のリスク低減に向けて —抗体医薬品作用機序の解析. 日本薬学会第 133 年会 (2013. 3. 27-30) 横浜
- 47) 苑 宇哲, 前田洋助, 川崎ナナ, 原田信志, 遊佐敬介: マウス微小ウイルスの核への侵入にはホスホリパーゼ A2 活性が必要である. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (2014.11.10-12) 横浜
- 48) 前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中島詩織, 門出和精, 田中勇悦, 遊佐敬介, 原田信志: HTLV-1 Env 発現産生細胞における HTLV-1 受容体 GLUT1 の制御機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (2014.11.10-12) 横浜
- 49) 前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中島詩織, 門出和精, 田中勇悦, 遊佐敬介, 原田信志: HTLV-1 Env 発現ウイルス産生細胞における HTLV-1 受容体 GLUT1 の制御機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2014.11.10-12) 横浜
- 50) 門出和精, 小野 陽, 前田洋助, 寺沢広美, 中野雄介, 原田信志: HIV-1 の放出抑制に関与する内在性レトロウイルス Gag のドメイン解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2014.11.10-12) 横浜
- 51) 廣瀬千紘, 坂下千瑞子, 山本正英, 今留謙一, 富田 誠, 藤原成悦, 森尾友宏, 清水則夫, 三浦 修, 新井文子: 成人 EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症に対する同種造血幹細胞移植成績の後方視的解析. 造血幹細胞移植学会 (2015.03) 神戸
- 52) 渡邊 健, 島田ひかり, 湯之前雄太, 外丸靖浩, 関矢一郎, 森尾友宏, 清水則夫, 岸本加恵, 前田忠郎, 澤田昌典: iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を利用した再生医療の安全性確保: ウイルススパイク試験. 日本再生医療学会 (2015.03) 横浜
- 53) 外丸靖浩, 渡邊 健, 太田洋子, 小島尚美, 関矢一郎, 森尾友宏, 清水則夫: 再生医療の微生物安全性検査: ウイルス・マイコプラズマ同時検出系の開発. 日本再生医療学会 (2015.03) 横浜
- 54) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S: Applications of mouse models of EBV- associated diseases for the evaluation of novel therapies. The 16th International symposium on Epstein Barr Virus & Associated Diseases. (2014. 7.16-19) Brisbane
- 55) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S: Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models. The 39th Annual International Herpesvirus Workshop (2014. 7.19-23) Kobe
- 56) 山口照英, 内田恵理子, 小野寺裕史: 「遺伝子治療製品の品質・安全性確保のための指針改定と国際動向」. 東京大学医科学研究所遺伝子・細胞治療センター キックオフ・シンポジウム. (2014. 11) 東京
- 57) Speaker: Mikihiro Yunoki
Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Pathogen inactivation in plasma derivatives. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in

- HAV, HEV and B19 during liquid heating steps of plasma derivatives. IPFA/PEI 21st International Workshop on “Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens”. (2014) Rome
- 58) Speaker: Mikihiro Yunoki
Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Experiences of HEV elimination during the manufacturing process steps and the suitable model viruses. Workshop on Viral safety of plasma-derived medicinal products with respect to hepatitis E virus. 13 October 2014. CHMP/BWP/196177/2014 Biologics Working Party (BWP)). (2014) London
- 59) 加藤(森)ゆうこ, 上平 崇, 坂井 薫, 柚木幹弘, 岡本 実, 萩原克郎: 変異型クロイツフェルトヤコブ病(vCJD)持続発現細胞プリオン蛋白のマウスへの伝達性. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (2014) 横浜
- 60) 上平 崇, 久保 純, 大久保祐士, 坂井 薫, 加藤(森)ゆうこ, 萩原克郎, 柚木幹弘: マウス馴化 vCJD を用いた血漿分画製剤工程のプリオン除去. 第 38 回日本血液事業学会 (2014) 広島
- 61) 菊池 裕, 遊佐精一, 窪崎敦隆, 寺嶋 淳, 豊田淑江, 山口照英: 低酸素条件下で発現する GPI アンカー欠損型プリオン蛋白質に関与する転写因子 BHLHE40 の研究. 第 87 回日本生化学会大会 (2014.10.15-18) 京都
- 62) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池 裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷 梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究. 日本マイコプラズマ学会第 41 回学術集会 (2014.5) 東京
- 63) 内田恵理子: 生物薬品委員会の検討課題—マイコプラズマ否定試験の改正による NAT 法の積極的活用—. 第 13 回日本薬局方に関する研修会 (2014.10) 大阪, 東京
- 64) 内田恵理子: 新しいマイコプラズマ否定試験法. 第 15 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム (2015.2) 東京
- 65) 古田美玲, 内田恵理子, 山口照英: 再生医療製品のマイコプラズマ否定試験としての NAT の適用に関する研究. 第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3) 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

I. その他

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

本研究の一部は一般社団法人日本血液製剤機構との共同研究として実施した。本研究に用いた vCJD 株は米国赤十字社 Dr. Larisa Cervenakova より分与された。また, RK13mo1 株は UMR INRA/ENVT 1225 Interactions Hôtes- Agents Pathogènes Pathologie du bétail の Dr. Didier Vilette より分与された。

3-2) ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究～異常型プリオンの *in vivo* 検出系の評価

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

細胞組織加工製品におけるウイルス安全性確保に向けたリスクマネジメントケーススタディ

目次

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

1. はじめに

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

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

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

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

2.1 感染リスクのあるウイルスの特定例

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

2.2 ウイルス感染リスク分析の例

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

3. リスク低減策の例

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

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

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

4. 参考資料

第十六改正日本薬局方 厚生労働省告示第65号 平成23年3月24日

生物由来原料基準 厚生労働省告示第210号 平成15年5月20日

厚生労働省医薬食品局長通知

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

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

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

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

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

厚生省医薬安全局審査管理課長通知

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

厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知

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