

201432011A

厚生労働科学研究委託事業

再生医療実用化研究事業

セル・バンク等を構築する幹細胞等由来製品の
ウイルス否定試験における評価技術要件に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 山口 照 英

平成27年（2015年）3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（再生医療実用化研究事業）による委託業務として、山口照英、松山晃文、内田恵理子が実施した平成26年度「セル・バンク等を構築する幹細胞等由来製品のウイルス否定試験における評価技術要件に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託事業

再生医療実用化研究事業

セル・バンク等を構築する幹細胞等由来製品の
ウイルス否定試験における評価技術要件に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 山口 照 英

平成27年（2015年）3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

- セル・バンク等を構築する幹細胞等由来製品のウイルス否定試験における評価技術要件に関する研究・・・ 1
山口 照英

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. ウイルスクリアランス値を提案するための基礎検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
松山晃文
2. インビトロウイルス試験及び研究・ウイルス検出手法に関する研究・・・・・・・・・・・・ 29
内田恵理子

資料1. EMA ブタトリプシン・ガイドライン

Guideline on the use of porcine trypsin used in the manufacture of human biological medicinal products.

資料2. FDA インビトロ・ウイルスアッセイ

FDA's Approach to Adventitious-Agent Testing of Cell Substrates and Viral Vaccines:
Traditional and Novel Methods.

III. 学会等発表実績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 77

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 79

平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業（再生医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

セル・バンク等を構築する幹細胞等由来製品のウイルス否定試験における評価 技術要件に関する研究

業務主任者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官

再生医療・細胞治療の安全性確保において、ウイルスリスクをできる限り低減化することが重要とされている。特に同種細胞を用いる幹細胞由来製品では、一つのロットの細胞を多くの患者に投与することになり、適切な試験と細胞加工に使用する原料等の安全性を確保することが重要である。本年度は、幹細胞を用いる再生医療等製品のバンク細胞や複数のレシピエントに使用される細胞ストックのウイルス安全性試験としての *in vitro* ウイルス試験に用いられる細胞基材の評価について検討した。

Vero 細胞 (JCRB NIHS0111 株) をクローニングし、ウイルス感受性の高い細胞を分離した。クローン化された Vero 細胞は、HSV-1、Sindbis virus、Poliovirus に高い感受性を示した。次に *in vitro* ウイルス試験条件の検討を行い、ピルビン酸や Insulin/Transferrin/selenium (ITS) を添加することにより TCID50 試験の感度が上昇することが分かった。ただし、全てのウイルスに共通する条件は設定できず、ピルビン酸ないしはピルビン酸/ITS を含む 2 つの条件で培養した細胞を用いることにより感度よくウイルスを検出できると考えられる。

ウイルス検出のための陽性ランコントロールとして Poliovirus の検討を行った。ブタトリプシンのウイルス安全性評価のためにブタサーコウイルス (PCV) 検出のためのプライマーセットの選択と、PCV 標準品として PCV 抗原発現株である GCL33 の評価を行った。

再生医療製品に用いられる幹細胞のウイルス安全性を確保するためには多面的な方策が必要である。外来性ウイルス試験として ICH Q5A ガイドラインが示されているが、具体的な試験法についての提示はない。本研究分担では、原材料の具体例としてブタトリプシンを取り上げ、モジュール方式を含めて利用可能なクリアランス値を提案するための基礎的検討を試みた。

業務分担者

松山 晃文 医薬基盤研究所 難病・疾患資
源研究部 部長
内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 室長

業務協力者

小原 有弘 医薬基盤研究所
古田 美玲 国立医薬品食品衛生研究所
豊田 淑江 国立医薬品食品衛生研究所

A. 目的

医薬品のウイルス安全性確保は単一の方策によって担保されるものではなく、多面的なアプローチを組み合わせることが重要である。しかし幹細胞を用いる再生医療製品は生きている細胞をその本質としており、ウイルスの不活性化工程などを採用することができず、ウイルス検査や安全な原料や原材料の使用に重点が置かざるを得ない。ウイルス検査としては、血清学的検査や核酸増幅検査は特定のウイルスをターゲットとする場合にはよいが、迷入ウイルスなどの場合には、広範なウイルスに対するスペクトルを有する検査法を組み合わせることが有用である。特に同種細胞を用いる場合や自己由来幹細胞でも脳内への投与などのより高度な安全性を担保しなければならない製品では、in vitro ウイルス試験の役割が大きいと考えられる。培養により増幅が可能で多数の患者に投与されるような同種細胞製品の場合には、細胞のバンク化やバンク化に類する保管がなされる可能性があり、その場合にはICH Q5A に沿ったウイルス検査の実施が望ましいとされる。特に迷入ウイルス試験としては in vitro ウイルス試験が推奨されている。

一方で、in vitro ウイルス試験を受託している機関ではウイルス検出のために最適な試験条件を設定しており、多くの企業がこういった受託機関を利用している。最終的なバリデーションデータを取るための試験であればこういった受託機関を利用することが合理的と考えられるが、開発途上では必ずしも全ての条件が固まっ

ているわけではなく、また製品の開発と共に使用する基材等も異なってくる。したがって、開発初期からウイルス安全性を考慮した製造設計や安全対策を立てることが重要であるが、その場合にすべて受託機関に試験を依頼するのは合理的ではない。本研究では、最適化した in vitro 細胞培養条件を設定し、外来性ウイルス否定試験を迅速に実施できる体制を整備する。また試験に用いるウイルス陽性ランコントロールを広く使用できるようにすることにより、幹細胞等を用いた再生医療の推進を図ることを目的とする。さらにインビトロウイルス試験の迅速化を図るための技術を確立することを目的としている。

本年度は in vitro ウイルス試験に用いられる Vero 細胞のクローニングを行い、最適な細胞株を樹立することを試みた。また Vero 細胞等の細胞培養系での外来ウイルス試験の最適化を目指してピルビン酸や ITS 等の添加剤の影響を検討した。さらに In vitro ウイルス試験における陽性ランコントロールの設定を試みた。

細胞培養に汎用されているブタトリプシンのウイルス安全性確保の一つとして、ブタ由来製品で汚染が起こったことが知られているブタサーコウイルス (PCV) の検出系設定の一環として、PCV 抗原を発現している CCL33 細胞を陽性コントロールとして使用するための条件整備についての検討も行った。

さらにブタトリプシンを例にして、ICH Q5A に準じたウイルス試験を原材料や製造工程に適用する際の考え方について検討を行った。特にいくつかの試験データが

得られている場合に、製造工程が類似している場合にどの程度モジュール方式が適用できるかについても評価を行った。

B. 方法

B. 細胞培養

JCRBで維持管理しているVero細胞（JCRB NIHS0111）及び研究室で維持管理しているVero細胞（ATCC由来）を10%ウシ胎児血清含有イーグル最小必須培地（MEME）に、 $3\sim 4 \times 10^5$ /mlとなるように懸濁し37°C、5%CO₂下で培養した。コンフルエントになる直前にトリプシンを用いて細胞を回収し、再び同様の細胞濃度になるように懸濁して培養を継続した。培養開始から3か月以上経過した場合には、再度保存してある細胞ストックを解凍し、培養を開始した。

ATCCより入手したESK細胞ストックを解凍し、10%ウシ胎児血清を含むMEMEに懸濁し、 $3\sim 4 \times 10^5$ /mlの濃度で37°C、5%CO₂下で培養した。コンフルエントになる直前にトリプシンを用いて細胞を回収し、再び同様の細胞濃度になるように懸濁して培養を継続した。2継代後に細胞をトリプシン処理して回収し、セルバンカーに $4\sim 5 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度に懸濁し液体窒素中に凍結保存した。残った細胞は培養を継続して、ウイルス感染性試験に用いたが、3か月以上経過した場合には、凍結した細胞ストックを解凍し新たに培養を開始した。

ヒトMCR-5細胞は、JCRBにから入手した細胞ストックを解凍し、Vero細胞と同様の条件下で培養を開始した。2継代後に細胞をトリプシン処理により回収し、セルバンカーに $4\sim 5 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度に懸濁し液体窒素中に凍結保存した。MRC5細胞の場合は、2か月

以上経過した場合には、新たに凍結してある細胞ストックを解凍し、新たに細胞培養を開始した。

HEK293細胞はATCCより入手し（293 [HEK-293] ATCC® CRL-1573™）、10%ウシ胎児血清を含むMEMEに $3\sim 4 \times 10^5$ /mlとなるように懸濁し、37°C、5%CO₂下で培養した。2継代後、トリプシンを用いて細胞を回収し、セルバンカーに約 5×10^6 細胞/mlとなるように懸濁して液体窒素内で保存した。

培養開始後3か月経過したら凍結ストック細胞を解凍して再度同様の操作にて培養を開始した。

Vero細胞のクローニング：JCRB0111及び我々が維持しているVero細胞の両方を限界希釈法によりクローニングを行った。それぞれの細胞を、x1インスリン／トランスフェリン／亜セレン酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム添加10%ウシ胎児血清MEMEに懸濁し、 10^3 /ml、 10^2 /ml、10/mlとなるように細胞を希釈し、96ウエルマイクロプレートに播種した。10-15日ほど培養を行い、途中のクローンの出現状況から単一クローンと想定されるウエルを選択し、増幅したクローンについてさらに拡大培養を行った。得られたクローン細胞に、HSV-1、Poliovirus、Sindbis virusを感染させ、ウイルスの最も増幅の多いクローンを選択した。

ブタサーコウイルスの陽性コントロールとして、ブタサーコウイルスの安定発現株（Gilles C. Dulac, G. C. AfsharCan, A. : Porcine Circovirus Antigens in PK-15 Cell Line (ATCC CCL-33) and Evidence of Antibodies to Circovirus in Canadian Pigs

J Vet Res 1989; 53: 431-433) であるCCL33細胞をATCCから入手し、10%ウシ胎児血清を含むMEMEで培養した。細胞からスマイテストEX R&Dを用いてDNAを抽出した。得られたDNAを標準検体として用いることが可能かを検討するため、以下の2つのプライマーの組み合わせを用いて、QuantiTect SYBR® Green PCR Kitsを用いた定量的PCRによる測定を行った。PCV1

Primer D1:TTACCGGCGCACTTCGGCAG

Peimer D2:TTCCAAACCTTCCTCTCCGC

PCV2

Primer D1: TTACCGGCGCACTTCGGCAG

Peimer D3:ACTCCGTTGTCCCTGAGAT

なお、定量的PCRの測定は7500 real time PCR systemを用いた。

B. 2. 細胞へのウイルス感染とTCID50の測定

10%ウシ胎児血清を含むMEMEで培養したVero細胞、MRC-5細胞をトリプシンで回収し、 4×10^5 細胞/mlとなるように10%ウシ胎児血清を含むMEMEに懸濁し、96ウエルプレートに播種した。1日目、ないしは2日目に細胞がコンフルエントになっていることを確認したのち培地を除去した。200 μ lのOptiMEMを添加し、すぐに培地を除去後、3倍希釈系列のウイルス液を各ウエルに50 μ lずつ添加した。1時間、37°Cでインキュベート後、上清を除去し、1%ウシ胎児血清を含むMEMEを添加して培養を行い、継時的なウイルスのCPEを解析した。場合によっては、WST-1培地で、一定時間培養後、細胞の残存性を計測した。

培養条件によるCPEの差異を解析するために、96ウエルに播種した後、10%ウシ胎児血清を含むMEMEを基本培地とし、これに1mM ピルビン酸ナトリウムを添加した培地、x1インスリン/トランスフェリン/亜セレン酸ナ

トリウムを添加した培地、1mM ピルビン酸ナトリウム及びx1インスリン/トランスフェリン/亜セレン酸ナトリウムの両方を添加した培地で培養した。

さらにウイルス感染後、1%ウシ胎児血清を含むMEMEを基本培地とし、これに1mM ピルビン酸ナトリウムを添加した培地、x1インスリン/トランスフェリン/亜セレン酸ナトリウムを添加した培地、1mM ピルビン酸ナトリウム及びx1インスリン/トランスフェリン/亜セレン酸ナトリウムの両方を添加した培地で培養を継続しCPEを計測した。

B. 3. ウイルス増幅の定量的PCR/RT-PCRによる解析

クローニングしたVero細胞を約 4×10^5 細胞/mlになるように10%ウシ胎児血清を含むMEME培地に懸濁し、24ウエルマイクロプレートに播種した。1-2日後、細胞がコンフルエントになっていることを確認し、培地を除去した。OptiMEMで細胞を洗浄後、 10^4 コピー/mlウイルス濃度となるようにウイルスを含むOptiMEMを各ウエルに100 μ l添加した。37°Cで1時間培養した後に培地を除去し、1%ウシ胎児血清を含むMEME培地を添加し、培養を継続した。2-3日後にCPEが起こっていることを確認した後、培養液を100 μ l分取すした。

分取したウイルス液からスマイテストEX R&Dにてウイルスゲノムを抽出した。100 μ lのウイルス液に、SDSを含むカオトロピックイオン液を加えて可溶化し、次いでプロテアーゼ液を加えて反応を継続した。その後、イソプロパノール沈殿とアルコール沈殿によりウイルスゲノムを回収した。

得られたウイルスゲノムを40 μ lのDNase/RNaseフリー水に可溶化し、リアルタ

イムPCRでウイルスゲノムの定量を行った。

Polio2419 ATTACACGCTGACACAAAACCAAG

<定量的PCR/RT-PCRに用いるプライマー／プローブ>

定量的PCR/RT-PCRに用いたプライマー／プローブを表1に示す。PCRの増幅は次のような条件で行った。

50°C 2 min
↓
95°C 10min
↓
95°C 15sec
60°C 60sec x50 cycle

RT-PCRによる増幅は次のような条件で行った

50°C 30 min
↓
95°C 15min
↓
94°C 15sec
60°C 60sec X50 cycle

B. 4. Poliovirusの希釈によるウイルス感染価の測定

Poliovirusをin vitroウイルス試験の陽性ランコントロールとして用いるために、その特性解析を行った。定量的RT-PCRによるゲノム量の推定と、希釈法による定量を行った。ウイルスの希釈系列を作製し、検出限界近くの希釈では各濃度を10本ずつ作製した。前述と同様にウイルスゲノムを抽出し、次のプライマーを用いてRT-PCRを行い、発現産物をアガロースゲル電気泳動にて分離し、陽性率を解析した。

Polio2310 ATAGTTTCACCGAAGGCGGA

B-5. ブタトリブシンのウイルス試験のあり方に関する検討

再生医療等製品の原材料にかかるウイルスクリアランス値を提案するため、具体例としてブタ臓由来トリブシンでのウイルスクリアランスにかかる予備検討を行う。

(倫理面への配慮)

1. 非臨床試験（研究）において遺伝子改変動物、プラスミドDNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。

2. 動物操作に当たっては、(独)医薬基盤研究所の動物実験規定に従って行なう。

臨床研究を実施する場合には、計画書（プロトコル）に関して医学倫理委員会での承認を受け、本人の書面によるinformed consent を取得した患者のみを対象とする。

C. 結果

C. 1. Vero細胞のクローニング

Vero細胞は例えばブタ由来ウイルスの60%に感受性を示すが、培養の経過と共にウイルスへの感受性が低下するとされている。Vero細胞はCHO細胞やMDCKと同様に不均一な細胞集団からなっており、培養経過と共に細胞集団の不均一性が大きく異なってくるために、ウイルスに対する感受性が変化してくると考えられる。

そこでJCRBが持っている、樹立からの継代数の経過が比較的少ないVero細胞（JCRB

NIHS0111)と長期にわたって培養を継続してきているVero細胞(NIHS-T)の2種類のVero細胞から、限界希釈によりクローニングを行い、得られた複数のクローンにウイルスを感染させて感受性の高い細胞を検索した。さらに限界希釈を行う際、単一のコロニーを形成しているウエルだけを選択するようにした。

まず研究室で長期にわたって維持されているVero細胞を限界希釈によりクローニングを行い、46個のクローンを選択した。これらの細胞にHSV-1を感染させ、2日目のウイルスの増幅を定量PCRで解析した。その結果、図1に示すように、ウイルス増幅はクローンによってかなりばらつきがあることがわかった。このVero細胞は入手後10数回の継代を行ったあと、凍結した細胞を3か月ごとに解凍して実験に使用しているものである。

次に、JCRBに保存されている樹立後比較的継代数の少ないVero細胞(JCRB NIHS0111)から限界希釈により複数のクローンを分離した。これらのHSV-1の増幅能について比較したところ、増幅能にある程度のばらつきがあるものの、そのバラつきはVero細胞

(NIHS-T)よりはるかに少ないものであった。

同様にSindbis virus及びPoliovirusについても増幅能を解析したところ、これらのウイルスに関しては増幅能に大きな差異が認められた。必ずしもすべてのウイルスに共通してウイルス増幅能の高いクローンはないが、クローン2と13を選択し、複数の条件でのウイルス増幅の差異から最終的にはクローン2を選択した。

C.2. Vero細胞を用いたウイルス試験の最適化

細胞でのCPEや赤血球凝集反応性を指標

とするin vitro ウイルス試験では、用いる細胞によってウイルス検出の感度が異なる。またアッセイ条件によってもウイルス検出感度が異なる。本年度は、ウイルスに感受性の高い細胞の選択と並行して、ウイルス感染試験を行う際の、培養条件の最適化を行うこととした。

Vero細胞(NIHS0111)を用いてHSV-1のTCID50を測定するときの条件を検討した。HuH7細胞を用いた肝炎ウイルスのin vitro感染実験系で、細胞の増殖因子であるInsulin/Transferrin/Selenium (ITS)やピルビン酸を添加することによりウイルスの増幅が促進されることが知られていることから、まずITS存在下でのHSV-1の増幅を検討した。ウイルス感染後、細胞の過剰増殖による細胞変性を避けるために低血清化(1%FCSを含むEagle MEM)での培養条件にITSを添加した。ITS添加の方が2日目ですぐにCPEが起こりやすいと言える程度で殆ど差異は認められなかった(図5)。

一方、MRC-5細胞を用いたin vitro細胞アッセイ系でも同様にHSV-1による感染を検討したが大きな差異は認められなかった(図6)。

次に、ITSやピルビン酸の存在下でのHSV-1のTCID50をVero(JCRB NIHS 0111)細胞を用いて解析した。図7に示すように、ITSやピルビン酸存在下に培養し、HSV-1の感染後も血清濃度を低くしたままこれらの因子を添加してその影響を解析した。その結果、基本培地の時よりもITS存在下やピルビン酸存在下の方がHSV-1のTCID50は高く評価された。

次にクローニングしたVero細胞(Vero(JCRB NIHS 0111)クローン2)を用いて、

Sindbis virusのTCID50を培養の時間経過を追って解析した。

培養1日目ではTCID50は高くないが、ピルビン酸を添加するとTCID50が高く検出された。これはウイルスの増幅がピルビン酸添加により早く起こることを意味している。一方、HSV-1と異なり、ITSを添加してもそれほどTCID50は早く起こらないといえる。いずれの系でも時間経過と共にTCID50が高く検出されてくるようになった。

Poliovirusについても同様に検討を行った。ポリオウイルスは感染初期では基本培地よりこれらの因子を添加する方が早くTCID50が検出できた。

図8と図9のTCID50の結果を継時的に整理すると、図10に示すように、Sindbis virusではピルビン酸を添加した方がTCID50が高く検出され、培養経過と共にそれが顕著になった。一方、PoliovirusではITSとピルビン酸の両方を添加した方がTCID50は高いという結果であった。

C.3. ポリオウイルスのランコントロールとしての設定

Poliovirus (Sabin株)はワクチン株であり、安全性は比較的高いと考えられる。そこでin vitroウイルス試験のランコントロールとしての設定を考え、そのTCID50とコピー数の関係を整理した。図11に示すように、Poliovirusの定量的RT-PCRとTCID50の結果が得られている。さらに次年度デジタルRT-PCRによる結果と合わせてランコントロールとして添加すべきウイルス量を設定する。

C.4. ブタサーコウイルスのランコントロールの設定

再生医療において培養や細胞の加工に用いる材料はウイルス汚染のないものを用いることが安全性確保において重要である。EMAはバイオ医薬品の製造に用いられるブタトリプシンの安全性評価のためのガイドラインを発表している。このガイドラインでは、ブタ由来製品をバイオ医薬品の生産に用いる場合に、ウイルス安全性を中心として感染性因子をどのように排除していくかが述べられている。バイオ医薬品を対象としたガイドラインであるので細胞治療/再生医療に特化したものではないが、再生医療において動物原料を用いる場合のウイルス安全性の考え方としては非常に参考になる。

特にブタ由来原料を用いる場合にどのようなウイルスに注目すべきか、また検討対象とするウイルスやウイルスクリアランスを評価する際に関連ウイルスとして想定すべきウイルスが提案されている(参考資料 1)。

このガイドラインの中で、ワクチンにおいてサーコウイルスの汚染が起きた事例を挙げ、注意すべきウイルスとしてブタパルボウイルス (PPV) とブタサーコウイルス (PCV) を挙げている。ブタ原料に対してPPVを検査することはモデルウイルスとして用いられてきた経緯もあり、比較的検出手法は容易に設定されるであろう。一方、PCVに関してはそれほど検討がされてきておらず、PCVの標準株もない。一方ATCCの細胞ラインであるCCL33細胞はPCV抗原を発現しており、おそらくPCVが感染してそのゲノムが染色体に組込まれていると考えられる。このCCL33をランコントロールとして設定できればPCVウイル

ス試験の設定が容易になると考えられる。

本ガイドラインでブタトリプシンのウイルス安全性に関する記載について以下に示す：

上記のように再生医療等の製造に汎用されるブタトリプシンについてのEMAが指摘するような安全性について検討しておくことが有用と考えられる。特に汚染が起きたことが知られているPCVの評価系としてPCRによる検出が必要になってくる可能性がある。そこで本年度は、2つのプライマーセットを用いてCCL33細胞をPCVのランコントロールとして設定できるか解析した。

図12に示すように、2つのプライマーセットでPCVに由来するシグナルをとらえようとしたが、PCV D1/PCV D2のプライマーセットでは高感度に検出できるものの、そのダイナミックレンジは高濃度のサンプルを用いた時にのみ検出可能であり、非常にわずかな範囲しかシグナルを捉えられないという結果になった。一方、PCV D1/D3のプライマーセットでは4log以上にわたってシグナルが検出できた。したがって、PCV D1/D3プライマーを用いることによりCCL33由来ゲノムを標準ランコントロールとして使用可能と考えられる。

0-5. ブタトリプシンのウイルス試験のあり方に関する検討

ブタトリプシンは、これまで多くのbiologicsの製造工程にて利用され、多くの患者さんを救ってきた。特に遺伝子組み換えインスリンの製造工程でC-peptideを切り出して成熟させるために用いられている。しかしながら、ブタトリプシンに残存していたウ

イルスによる感染事故が発生、医薬品の欠品のリスクが表出した。そのため、インスリンの製造工程では遺伝子組み換えブタトリプシンへの変更か、あるいはウイルスクリアランスの徹底が施行されている。

遺伝子組み換えトリプシンは高コストであるため、医薬費の安価な提供にとってはリスク因子となる。EUでは、ブタ膵臓由来精製トリプシンも活用できるよう、試験開発が進められ、その結果EMAによる、「ブタ膵臓への50kGyでの γ 線照射」の推奨ガイドラインが発出された。牛胎児血清への γ 線照射では概ね25-35kGyが推奨されているため、線量が高い理由は議論すべきであろう。EMAガイドラインの根拠設定において、特に議論されたのがPERVである。マウスにおけるレトロウイルスと同様に内因性ウイルスであるため、動物あるいは製造工程の管理で解決できる問題ではない。加えて、低線量の γ 線照射ではむしろ賦活化される可能性も指摘されている。

一方、たんぱく質は γ 線照射によりその生物学的活性が低下することは広く知られている。牛胎児血清でのウイルスクリアランスに推奨されている25-35kGyの γ 線照射でも、実際は30kGyを超えると細胞培養活性（生物活性）は低下することが知られている。一方、25-30kGyではウイルスクリアランス係数が5に届かない場合も想定されるため、そもそもウイルス感染が否定されている牛胎児血清に γ 線照射によるリスクヘッジをかけているということなのである。

ブタトリプシンにおけるウイルス感染をほぼ否定するため、原材料であるブタ膵臓に50kGyの γ 線照射が求められるが、トリプシン活性の低下が否めない。一方で、トリプシ

ン活性を低減させない条件では γ 線照射の有効性が示せない。

我々は、ブタ腭臓からのトリプシン精製工程でクリアランスが十分である工程へと変更する、あるいはクリアランス係数が5以上（10-5以上の低減）の工程をはさむことで、より安価で安定したウイルスクリアランスが可能でないかと考えた。

ブタ腭臓からのトリプシン精製は、ゲルろ過などでの粗精製ののち、イオン交換クロマトグラフィーによる精製が行われている。イオン交換でpH3.5では乖離せず、pH5で乖離するとのトリプシンのタンパク特性を利用している。一般にイオン交換クロマトグラフィーによるタンパククリアランスは係数3とみなす（プリオンの場合も同様）ため、クリアランス係数5は不十分である。

ブタ腭臓からのトリプシン精製において、ウイルスを滅失とするリスク係数5の低減を目指すのは、①イオン交換クロマトグラフィー工程の改善、あるいは②ウイルスクリアランス工程の追加、のいずれかが研究開発戦略となる。本年度の研究開発では、①での工夫の余地を主体に検討した。

イオン交換クロマトグラフィーの溶媒に工夫をするというのがひとつの戦略である。有機溶媒を加えてカラムに吸着させたトリプシンを溶出・回収するのが、精製の工程である。であれば、このどの段階でウイルスクリアランスが可能であろうか。まず、a. カラムにトリプシンは吸着するが、ウイルスはまったく吸着させない。b. 非特異的に吸着するウイルスを洗浄する。c. 非特異的に吸着したウイルスを破壊させる。のいずれかであろう。多くの特許や公開情報を渉獵したところ、aでの課題解決の試みが多い。ただし、カラム

（交換樹脂）が特殊で、一般化しにくいと想定される。Bは良好な戦略と考えられるが、ウイルスのみを特異的に流出排除する流路液の検討を要する。具体的には、cの考えもいれ、detergentを流路液に加え、capsidの破壊も含めてウイルスクリアランスを試みるという手法である。本年度の検討では、detergentの濃度が高いとカラム消耗が早いという難点を除けば、有効な研究開発方向である可能性が提示されている。精製ブタトリプシンを、再度イオン交換（陰イオン交換樹脂が至適であると思われる）クロマトグラフィーにて精製するという手法である。人畜共通感染ウイルスではなく、かつ感染力が弱ければこの手法は有用であるかもしれない。

D. 考察

in vitroウイルス試験は、迷入する可能性のあるウイルスを広範に検出することを目的としており、血清学的試験やウイルス抗原試験、あるいはPCRを含む核酸増幅試験（NAT）のように迷入するウイルスを想定した試験とは試験の考え方が異なっている。本年度は、比較的広範なウイルスに対応可能であり外来性ウイルス試験として推奨されているインビトロウイルス試験に用いられる細胞の中でも、ヒトウイルスまたはヒトに感染することがよく知られているウイルスに対する広い感受性を示す細胞として、Vero細胞、MRC-5細胞、HEK293細胞、さらに非エンペロープウイルスに対して感受性がある324K細胞等を取り上げ、最適な試験条件やクローニングによる選択を行うことを目指している。

本年度は、Vero細胞のJCRB NIHS0111株をクローニングし、ウイルス感受性の高い細胞

株を選択した。JCRB NIHS0111株は樹立後比較的継代数の少ない株であり、ウイルスの感受性が高いことが予測される。これとは別に、長期にわたって継代しているVero細胞(ATCC由来NIHS-T)についてもクローニングを行い、ウイルスに対する感受性を解析した。ATCC由来Vero細胞(NIHS-T)のクローン細胞ではHSV-1への感受性がクローンごとに大きく異なっていた。一方JCRB NIHS0111株は、HSV-1を用いた際にもクローンごとに感受性が異なっていたがATCC由来Vero細胞クローンほどそのバラつきは大きくなかった。おそらくATCC由来Vero細胞はJCRB NIHS0111株と異なり長期の継代の中で不均一性が拡大しており、そのためにクローンごとの感受性の差異が拡大していると考えられる。また、JCRB NIHS0111株を用いてVero細胞に指向性があるPoliovirusやSindbis virusに対する感受性についても解析してみたところ、感受性の差異が見出された。

この中で2つのクローンを選択して、増殖能などを含めて評価を行い、クローン2を最終的に選択した。今後、本細胞クローンについて、今回検討していないウイルスに関する感受性についても検討を進める予定である。

一方、*in vitro*ウイルス試験では培養条件や感染条件、あるいはウイルス感染後の培養条件などがウイルス検出能に大きく影響すると考えられる。例えばHEVの*in vitro*感染条件では、ピルビン酸(Emerson et al; *J Virol.* 2004, 78(9): 4838-4846)やInsulin/Transferrin/selenium(ITS)(Kanai et al. *BMC Research Notes* 2012, 5:4)の添加が重要との報告がある。本年度は、培養条件に関していくつかの因子の影響を検討し、最適な感染条件を探ることにした。Vero

細胞をピルビン酸やITSを添加・非添加条件で培養し、HSV-1、Sindbis virus、PoliovirusのTCID50を測定した結果、最適なウイルス増幅条件はウイルスの種類によって異なるが、これらの因子を適切に組み合わせることにより、高感度にウイルスの増幅を捉えることができることが明らかになった。ピルビン酸やITSに対する感受性の違いから、ピルビン酸のみを添加した系とピルビン酸/ITSの両方を添加した2つの条件を設定することによりウイルス検出の感度を高感度に捉えることが可能と判断した。

また、培養後にこれらの因子を添加しただけでは、ウイルスの増幅性にはあまり影響を与えないことが分かった。おそらくピルビン酸やITSを添加して培養することによりウイルスに対する感受性が増加するのではないかと考えられる。

MRC-5についても検討を行ったが、ITSに関してはそれほど優位な感度上昇は認められなかった。これはVero細胞と異なり、MRC-5が正常2倍体細胞であることが要因かもしれない。

これ以外にHEK293細胞、324K細胞に関してもVero細胞と同様の検討を開始しており、27年度にかけてその詳細を得る予定である。

一方、外来性ウイルス試験(迷入ウイルス試験)としては*in vitro*細胞培養系が広く用いられているが、試験に際しては用いる細胞がウイルスに対する感受性を有していることを確認するために陽性ランコントロールを同時に試験することが求められる。本研究ではバイオセーフティーの観点から*in vitro*に用いる細胞に指向性のあるワクチン株を用いることを想定している。本年度はVero細

胞で増幅可能なPoliovirus（生ワクチン Sabin株）を陽性コントロールとして用いるための評価を行った。PoliovirusのTCID50と定量的RT-PCRの相関性までを評価した。さらに、デジタルPCRによりコピー数とこれらの関連について検討している。

再生医療／細胞治療では接着細胞の培養にブタトリプシンが汎用されている。このためにブタに検出されるウイルスに対する安全性確保が重要となる。EMAはバイオ医薬品に利用されるブタトリプシンについてガイドラインを発出している。このガイドラインは再生医療／細胞治療のみを目的としたものではないが、汎用されているブタトリプシンのウイルス安全性が重要と考えられていることに他ならない。ガイドラインではブタトリプシンの原材料であるブタ膵臓について、ウイルス試験から製造工程を通じてのウイルスクリアランスの考え方、特にブタに蔓延しているPPVやPCVの検査、不活化工程に対する感受性、除去工程の適用など様々な観点から見解が述べられている。さらに不活化工程としてガンマ線照射、電子線照射、UV-C照射、低pH処理などについて取り上げ、ウイルスの物理的、化学的抵抗性の強さばかりでなくゲノム修復との関連も考慮する必要性が指摘されている。特に2本鎖DNAウイルスはゲノム修復が効きやすいという点を注意する必要があるとされている。このガイドラインは再生医療製品のブタトリプシンに関する有用な情報を提供しているが、さらにガイドラインに示されている事項は再生医療／細胞治療製品の原材料の安全性確保のための考え方にも通じるものがある。

ブタトリプシンなどブタ由来原材料のウ

イルス安全性に関してはブタサーコウイルス（PCV）の考慮する必要があることから、PCVの検査のための陽性コントロールとしてCCL33細胞の評価を行った。CCL33細胞はPCV抗原を発現している細胞であり、PCVゲノムが細胞染色体に組込まれていると想定されている。CCL33細胞をPCVのNAT検出の陽性コントロールとするために2つのプライマーセットの検出能を検討したところ、PCVD1/D3のプライマーセットが有用であることが示された。

幹細胞の培養工程や加工で用いられる添加剤等の原材料のウイルス安全性に関連して、ウイルスクリアランスが期待できる工程として陰イオン交換クロマトグラフィー工程のウイルスクリアランス能を解析することで、共通して使えるLRFを明らかにすることができると考える

E. 結論

Vero細胞（JCRB NIHS0111株）をクローニングしウイルス感受性の高い細胞を分離した。クローン化されたVero細胞は、HSV-1、Sindbis virus、Poliovirusに高い感受性を示した。次に *in vitro* ウイルス試験条件の検討を行い、ピルビン酸や Insulin/Transferrin/selenium（ITS）を添加することによりTCID50試験の感度が上昇することが分かった。ただ全てのウイルスに共通する条件は設定できず、ピルビン酸ないしはピルビン酸／ITSを含む2つの条件で培養した細胞を用いることにより感度よくウイルスを検出できると考えられる。

ウイルス検出のための陽性ランコントロールとして Poliovirus の検討を行っ

た。ブタトリプシンのウイルス安全性評価のため、ブタサーコウイルス (PCV) 検出用のプライマーセットの選択と PCV 抗原発現株である CCL33 の PCV 標準品としての評価を行った。

再生医療等製品の製造工程で用いられることが多いブタトリプシンに関し、そのウイルスクリアランスに関して検討を開始した。具体的には、もっともクリアランス効率が悪いとされる PERV ウイルスのクリアランス手法に関して検索を行った。EMA では 50kGy の X 線で照射したブタ臓臓を原材料として製造したトリプシンは、ATMP で使用が許される。一方わが国では、トリプシン溶液としてしか入手できないため、トリプシン溶液に対しての適切なクリアランス条件を検討するため、陰イオン交換クロマトグラフィーなどを活用できないか、検討を開始した。

G. 研究発表

1. 山口照英、内田恵理子：遺伝子治療の開発に関する我が国の規制と海外動向、Pharma Medica (印刷中)
2. 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掲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)
3. 内田恵理子、五十嵐友香、佐藤陽治：遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発促進のためのレギュラトリーサイエンス共同研究、衛研報告 132, 10-12 (2014)
4. 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)
5. Teruhide Yamaguchi and Eriko Uchida: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies, Current Cancer Drug Targets (in press)
 6. Kono K, Takada N, Yasuda S, Sawada R, Niimi S, Matsuyama A, Sato Y. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. Biologicals. 2014 Dec 16.
 7. Okura H, Soeda M, Morita M, Fujita M, Naba K, Ito C, Ichinose A, Matsuyama A. Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in liver fibrosis. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Dec 6
 8. Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Ozawa T, Matsuyama A, Hayakawa T. Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. Stem Cells Dev. 2014 Sep 15;23(18):2211-24.
 9. Ozasa M, Sawada K, Iwayama T, Yamamoto S, Morimoto C, Okura H, Matsuyama A, Komoda H, Lee CM, Sawa Y, Kitamura M, Hashikawa T, Takedachi M and Murakami S. Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells. Inflammation and Regeneration, 2014, in press
 10. 大倉華雪・松山晃文 細胞医療での申請にあたっての注意点—品質の観点から— 先進医療 NAVIGATOR II 再生医療・がん領域の実用化への TOPICS 2014. pp5-8

G-2 学会発表

1. 内田恵理子、豊田淑江、古田美玲、山口照英、佐藤陽治：パルボウイルス B19 感染系の改良とジェノタイプの違いによる増殖能の比較、日本薬学会第 135 年会 (2015. 3) 神戸
2. 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
3. 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)
4. 内田恵理子：遺伝子治療用製品指針改定の取り組みー品質及び安全性の確保と遺伝子治療製品の開発促進のために、第 5 回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム (2015. 1)
5. 山口照英、内田恵理子、小野寺雅史：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調和、IMSUT-CGCT キックオフシンポジウム 2014, 2014. 11. 21、東京
6. 内田恵理子：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 年 10 月 9 日 (大阪), 15 日 (東京)
7. Eriko Uchida : Current situation of advanced therapy regulation in the world, 第 20 回日本遺伝子治療学会学術

集会 (2014. 8) (東京)

8. Eriko Uchida, Yuka Igarashi, Yoji Sato, Masafumi Onodera, Teruhide Yamaguchi : Study on the biosafety of ex vivo transduced cells with retroviral vectors and Cartagena protocol domestic law, 第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会 (2014. 8) (東京)
9. Yuka Igarashi, Eriko Uchida, Masafumi Onodera: Quality control for the supernatants of retroviral vectors using a next-generation DNA sequencer, 第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会 (2014. 8) (東京)
10. 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掲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 年 5 月 22 日～23 日 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得 なし

H-2 実用新案登録 なし

H-3 その他 なし

表 1. ウイルス検出に用いるプライマー/プローブ

Virus	Primer	Probe
Poliovirus RT-PCR	F:5' -CCCGAGAAATGGGACGACTA-3' R:5' -TGGAGCTGTTCCGTAGGTGTAA-3'	5' -FAM-ACATGGCAAACCTCATCAAATC CATCAATC- MGB-3'
HSV-1 PCR	HSV-1001F: 5' -GCGTCATGGTACTGGCAAG-3' HSV-1002R: 5' -TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3'	HSV-FAM-TAMRA: 5' -FAM-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG- TAMRA-3'
Sindbis RT-PCR	SINV-QF : 5' -CAACTGGGCCGATGAGAAA-3' SINV-QR : 5' -TCCTGCCTTCACTAAGCCTTGTA-3'	SINV-FAM-TAMRA : 5' -FAM-TCCTGGAAGCCCCTAATATAGG ACTG-TAMRA-3'
huCMV PCR	Forward primer: 5' -AACTCAGCCTTC CCTAAGACCA-3' Reverse primer: 5' -GGGAGCACTGAGGCAAGTTC-3'	5' (FAM)-CAATGGCTGCAGTCAGGCCAT GG-(TAMRA) 3'
huCMV PCR	Forward primer: 5' -GACTAGTGTGATGCTGGCCAAG-3' Reverse primer: 5' -GCTACAATAGCCTCTTCCTCATCTG-3'	5' (JOE)-AGCCTGAGGTTATCAGTGTAA TGAAGCGCC-(BHQ1a) 3'

<参考資料 1 に記載された EMA のブタトリプシンのウイルス安全性に関する記載>

6. 感染性因子の試験

ブタに関しては食品安全対策を目指した管理や対策が取られているが、医薬品製造など食品以外に使用する場合には動物由来原料としての感染因子の伝播リスクが存在する。

生物薬品の安全性確保では、原料物質にウイルス等の感染因子がないことを試験で確認することが重要である。しかし、ブタトリプシンの製造工程でウイルス試験を適用するには現実的にはいろいろと傷害がある。これは主として経済的なあるいはブタの処理を行う施設要件によるところが大きく、大量の原料バッチを造る前に個々のブタごとにウイルス試験を実施することは困難であり、プールされたあとでは、1頭のブタがウイルスに汚染されていても、採取したブタ膵臓腺は検査されることはなく大きなプールバッチとされることになる。このために 1 つの汚染臓器が存在してもウイルスは希釈され汚染が拡散してしまい十分な感度での試験が困難になる。一般的なルールとしては、原料プールでの試験は、ウイルスの不活化や除去工程に入る前に実施するべきで最終トリプシン製品で外来性ウイルス試験を実施するのは適切ではない。しかしこのような原則は、凍結した膵臓組織をアルコールを含む溶液で直接ブタトリプシンを抽出する操作を行う製法で適用するのは簡単ではない。加熱や低 pH 処理がこの抽出操作で行われる場合には、エンベロープウイルスのみならずエンベロープを持たないウイルスも一定の不活化が行われることになる。さらに、ブタパルボウイルスやブタサーコウイルスはトリプシンの酵素活性に影響を受けないが、膵臓に含まれるいくつかの酵素類は加熱や低 pH といった抽出条件でいくつかのウイルスの感染性に影響を与える。

ウイルス試験を実施際には試験法を明確にし、その妥当性を示さなければならない。ウイルス試験を実施する中間製品のバッチサイズと同様に、サンプルサイズについてもウイルス試験の有用性を評価する際に考慮しなければならない。

ブタトリプシン製品の安全性に関して、混入する可能性のあるブタ由来ウイルスリスク評価を行っておく必要がある。このようなブタウイルスのヒトに対するリスクについてはすでに公表されている (Marcus-Sekura et al 2011)。この論文の結論として、これまでのヒトへの感染性に関する情報やヒトがウイルスに対する抗体を保有していたり、ヒト細胞への感染性の有無などの情報を元に、ヒトへの感染性がある 17 属、55 種のブタ由来ウイルスが同定されている。この中の 60% のウイルスは Vero 細胞で増幅し、多くのウイルスがブタ細胞で検出可能である。そのために通常のインビトロウイルス試験では 2 つの異なる細胞サインを用いるべきである。すなわち一つの細胞はヒトないしは霊長類由来の細胞 (例えば Vero 細胞) を用い、他の細胞としてはブタ由来の細胞を用いるべきである。用いる細

胞は血球凝集性のあるウイルスないしは細胞変性作用のあるウイルスを検出できるものでなければならない。細胞培養に際してはウイルス増幅を最も効率的に行えるような条件で実施する必要がある。

細胞培養で検出できないブタ由来ウイルスに関しては製品ごとのリスク評価を行った上で、ケースバイケースの判断をするべきである。この評価では2010年に出されたWHOの細胞基材に関するペーパーやヨーロッパ薬局方を参考にすべきである。混入する危険性のある全てのブタ由来ウイルスを考慮すべきである。疫学的に広く蔓延しているウイルスや不活化が困難なウイルス（例えばPPVやブタサーコウイルス）、さらにはE型肝炎ウイルス（HEV）などの人獣共通感染症ウイルスなどを考慮すべきである。リスク評価では全ての製造工程、試験によってどのようなウイルスが検出できるか、さらには医薬品としての使用目的などを考慮すること。例えば、原材料を採取する地域の疫学的な感染症発症状況、製造工程での高いウイルスクリアランス能を示すことなどにより特定のウイルスの検査を不要とすることの妥当性を説明すること。一般的に、感染性ウイルスが混入していることが明らかになった場合には、製造工程で十分にウイルスを除去・不活化できない限りそのトリプシンバッチはヒトバイオ医薬品の製造に用いるべきではない。このようなウイルス汚染があった場合に同様な対処をすべきかに関しては本ガイドラインのスコープから外れる。ガイドラインのスコープからは外れるが、もしウイルス汚染が明らかな原料を製造に用いる場合には製造工程にウイルス汚染を広げたり、他の製品への汚染を引き起こす可能性があることを十分に考慮する必要がある。

ウイルステストがブタトリプシンの製造業者、医薬品製造業者、外部委託機関、あるいは複数の機関によって実施されるかもしれない。しかし、基準に従ったウイルス試験の実施を担保するのは医薬品製造業者の責務となる。

ト細胞培養の試薬として使用されたり、ワクチンのウイルス活性化に用いられるトリプシンはEU局方の無菌試験やマイコプラズマ試験に適合していなければならない（EU局方2.6.7や同等のバリデーションがなされた試験、例えばUSP、JP、連邦法など）。他の目的に用いられるトリプシンはEU局方の0694トリプシン（あるいは同等の試験）に適合した微生物試験に適合していなければならない。

7. 製造

トリプシンは凍結された膵臓腺の原料プールから抽出され、沈殿工程やクロマトグラフィー工程を経て製造される。製造では長期に渡る低pH処理が実施される。Yang等(2013)やLackner等(2014)の論文データによれば、pH1.7の長期に渡るインキュベーションによりPPVやPCVは不活化されるというデータが出されている。しかし、pH1.0での長期に放置（18-24時間、4℃）された市販のトリプシンは活性をもっており、そのまま接着細胞の剥