

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（業務項目）

ウイルスクリアランス値を提案するための基礎検討

担当責任者（独）医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 松山晃文

研究要旨

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検討を試みた。

A．研究目的

再生医療等製品の原材料のウイルスクリアランスに関し、モジュール方式を含めて利用可能なクリアランスを提案するための基礎検討を試みる。

B．研究方法

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、具体例としてブタ膵臓由来トリプ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。
3. 臨床試研究の実施にあつては、計画書（プロトコール）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．研究結果

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線照射の有効性が示せない。

我々は、ブタ膵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。

ブタ膵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。

ブタ膵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、イオン交換クロマトグラフィー工程の改善、あるいは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、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猟したところ、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

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思われる。

#### E . 結論

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 線で照射したブタ膵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。

#### F . 健康危険情報

該当なし

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

- A) 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.
- B) 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
- C) 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.
- D) 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
- E) 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
- F) 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）
- G) 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

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)

- H) 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

## 2. 学会発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし