

図

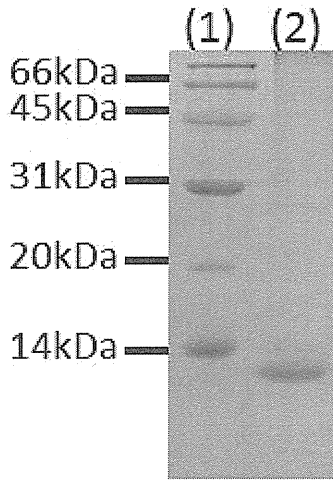


図1 トランスジェニックカイコの繭から抽出、精製した活性型ネスファチンのSDS-PAGEによる分析。

(1);分子量マーカー  
(2);精製組換え活性型ネスファチン

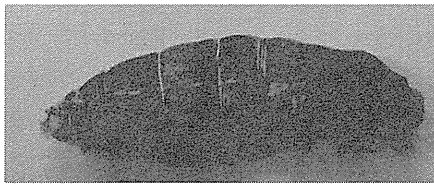


図2 蛹化しなかったMAGE-A4を発現するトランスジェニックカイコ

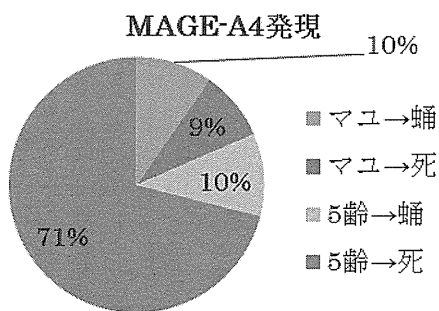


図3 MAGE-A4を発現するトランスジェニックカイコの蛹化する割合

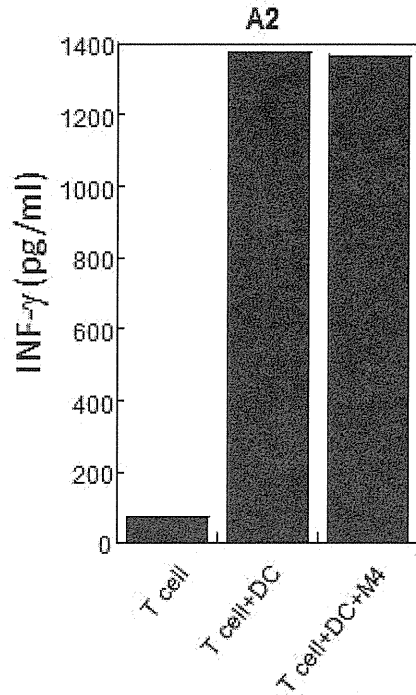


図4 Class I MHC A2 をもつ T 細胞に対する MAGE-A4(M4)の添加による T 細胞からのインターフェロン- $\gamma$ 分泌促進効果

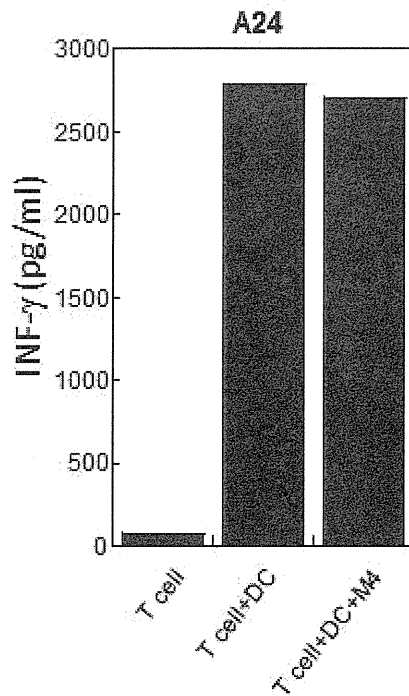


図5 Class I MHC A24 をもつ T 細胞に対する MAGE-A4(M4)の添加による T 細胞からのインターフェロン- $\gamma$ 分泌促進効果

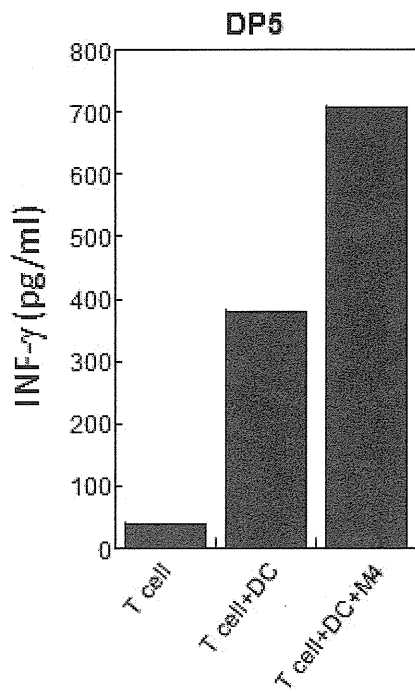


図6 Class II MHC DP5 をもつ T 細胞に対する MAGE-A4(M4)の添加による T 細胞からのインターフェロン- $\gamma$ 分泌促進効果

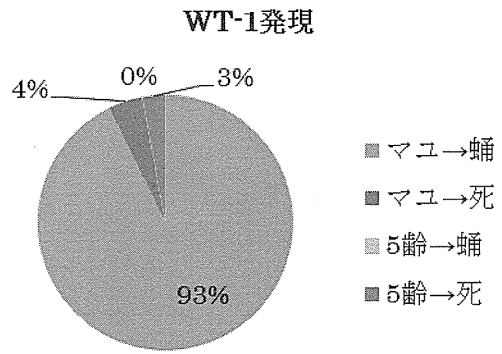


図8 WT-1 を発現するトランスジェニックカイコの蛹化する割合

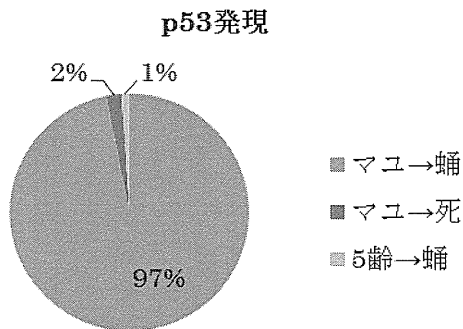


図7 p53 を発現するトランスジェニックカイコの蛹化する割合

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題 バイオ医薬品の新規ウイルス安全性評価系の開発

研究分担者 遊佐敬介

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長

要旨 バイオ医薬品製造用細胞である CHO は、レトロウイルス様粒子を産生していることで知られている。このウイルス様粒子は内在性レトロウイルス遺伝子がコードしていると考えられているが、その遺伝的実体は不明なままであった。その理由は CHO 細胞ゲノムには散在する数多くの内在性レトロウイルス遺伝子コピーがあるため、その中からウイルス様粒子をコードしている内在性レトロウイルス遺伝子を特定することができなかつたからである。本研究では公開されている CHO の RNA-seq とゲノムデータを利用して、ウイルス様粒子を産生可能なクローンを絞り込み、その中からウイルス様粒子をコードしている遺伝子を特定することができた。

#### A. 目的

2013 年の世界の医薬品の売上高上位 10 品目のうちバイオ医薬品と呼ばれる製品は 7 製品に上る。うち製造用細胞として CHO 細胞が使われているのは、ヒュミラ（アダリムマブ）、レミケード（インフリキシマブ）、リツキサンの（リツキシマブ）、エンブレル（エタネレセプト）、アバスチン（ベバシズマブ）、ハーセプチン（トランスツマブ）の 6 製品である。これほど CHO 細胞がバイオ医薬品製造現場で頻用されているのには理由がある。ヒュミラ、レミケード、リツキサンなどは抗体医薬品とよばれる製品で軽鎖 2 本、重鎖 2 本からなるイムノグロビンである。その分子量は約 150,000 ほどあり、複雑な構造を持つため、大腸菌や酵母を使った製造は困難なためである。また特有の糖鎖が付加されないと体内で安定な薬効を期待できない。そのため、ほ乳類細胞である CHO 細胞が使われている。加えて抗体医薬品はサイトカインなどと比較して投与量が数百 mg に達する場合がある（ハーセプチン 400 mg/月/50 kg）。CHO 細胞

は、こうした時代の要請にも報えてきた。実際タンパク質製造技術の向上とともに CHO 細胞上清に産生される組み換えタンパク質量は 2~5 g/L に達するようになった。とりわけ抗体医薬品は、イムノグロブリンタンパク質であるため、可変部分に多様性がある以外は、構造に大きな差はなく、ある抗体医薬品で樹立された精製工程は、他の抗体医薬品に対しても汎用性をもっている。そのため CHO 細胞を使った抗体製造工程は、プラットホーム化され、現在では重要な製造基材となっている。

ほ乳類のゲノムには数百万年前に感染したレトロウイルスが生殖細胞内にも感染し、ゲノムに組み込まれることを繰り返した結果、ヒトでは全ゲノムの 8%、マウスでは 10%が内在性レトロウイルス由来であると考えられている。ヒト細胞の内在性レトロウイルスは比較的厳密にその発現が抑制されているが、げっ歯類細胞ではその抑制が十分ではなく、内在性レトロウイルス遺伝子由来のウイルス様粒子を発現産

生していることが知られている。CHO 細胞も例外ではなく、細胞質中に A 型粒子、細胞外に C 型粒子と呼ばれるウイルス様粒子を産生している。これらの粒子はいずれも感染性をもっていないことがレトロウイルスの感染感受性の高い細胞を使った *in vitro* 試験で確認されている。また医薬品の製造工程には感染性のレトロウイルスを不活化・除去できる工程が含まれているため、最終製品にウイルス様粒子が含まれることはないと考えられている。実際これらのウイルス様粒子に関する解析も行われて来た。しかし CHO 細胞ゲノムには数百に上る内在性ウイルスゲノムが散在するため、ウイルス様粒子をコードしている遺伝子を特定することは未だにできておらず、簡便なウイルス粒子数の測定系も不十分なままである。そこで本研究では、公開されているチャイニーズハムスターの RNA-seq データベースや CHO 細胞ゲノムデータを使って CHO 細胞から産生されるウイルス様粒子をコードしている内在性レトロウイルス遺伝子を特定することにした。

## B. 研究方法

### B.1. 公開データベースを使った解析

チャイニーズハムスターのトランスクリプトームデータは、UCSC Bioinformatics からダウンロードした。また CHO 細胞ゲノムデータは、C\_griseus\_v1.0/crigril (crigril) (UCSD Bioinformatics) からダウンロードした。複製能のあるレトロウイルスの *gag* 遺伝子を比較し、相同性の高い領域約 150 nt を選んでそれを query として CHO 細胞のトランスクリプトームデータベースから相同性の高いもの tFASTax を使って選択した。次にこの中から *gag* 遺伝子の ORF 領域が保持されている、ないし保持されていると推定できる *gag* 遺伝子を絞り込んだ。次に一部の *gag* 遺伝子を使って、チャイ

ニーズハムスターのゲノム遺伝子から *gag* を含む内在性レトロウイルスの全長を BLAT を用いて検索し直した。得られたシーケンスは、ホモロジーの高いレトロウイルスのシーケンスを参照し、各遺伝子の同定を行った。この解析には、Geneious 8 を用いた。また各内在性レトロウイルス全長へのショートリードのマッピングには bowtie2 を用いた。

### B.2. CHO 細胞から産生するレトロウイルス様粒子の解析

CHO 細胞は、基盤研究所細胞バンクより購入した。培養は HamF12 に 10% FBS を加えた培地を使った。ウイルス様粒子の調製は、CHO 細胞上清 1 L を 1,000 rpm 10 分遠心後、0.22  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過し、9,000 rpm で 2 時間遠心した。沈殿物を少量の PBS (-) に再けん濁し、20-60%のショ糖密度勾配遠心を行った。

### <倫理面への配慮>

本研究では倫理面で特別に配慮を必要としなかった。

## C. 結果

公開データベースからの内在性レトロウイルス遺伝子の検索を行った。CHO 細胞のゲノムデータベースから LTR harvest を使って内在性レトロウイルスの数を推定した。その結果、約 550 個ほどの内在性レトロウイルスが存在することが推定された。ウイルス様粒子を産生するためには、構造遺伝子である *gag* の転写・翻訳産物が産生される必要がある。従って、ウイルス様粒子を形成するためには、*gag* ORF (open reading frame) が残っており、転写産物が認められなくてはならない。そこでチャイニーズハムスターの転写産物のデータベースをダウンロードし、感染複製能力のあるレトロウイルスの Gag タンパク質を query としてチャイニーズハムスターの RNA-seq データを検索した。ここ

ではe値  $>10^{-3}$  以上のものを選択したところベータレトロウイルスとガンマレトロウイルスに似ている66個のレトロウイルス様シーケンスがヒットした。66個の *gag* 遺伝子のうちORFが残っている可能性のある *gag* 遺伝子を絞り込むと4つの内在性レトロウイルスが選択された。選択された内在性レトロウイルスのうち *gag* ORFの全長を含む物は、1つしかなかった。各シーケンスを使って、CHO細胞のゲノムデータベースからその配列を含む全長のプロウイルス遺伝子の全長を検索した。その結果それぞれLTRや *pro-pol*, *env* 遺伝子を含むプロウイルス遺伝子の全長を得ることができた(表I, 図1)。ChERV-050801とChERV-047669のみが全長に渡って発現が見られたが、ChERV-47669の発現レベルは、ChERV-050801に比較して低かった。しかしCHO細胞でウイルス様粒子産生に関係していると考えられてきたCHIAP34やMG-2Lは、全く発現していなかった。またChERV-50801の発現を宿主のハウスキーピング遺伝子と比較すると、その発現量は $\beta$ -actinの約8%であった(図1)。

さらにこれを確認するために、CHO細胞上清1Lを超遠心して集め、ショ糖密度勾配遠心法でウイルス様粒子を精製したところChERV-50801のみが検出された(図2A)。またそのウイルス様粒子をGagに反応する抗体で検出したところGag p67が検出された。感染性をもつレトロウイルスは、細胞外に放出されたウイルス粒子はウイルス自身のPro(プロテアーゼ)によって切断される。しかしProによるウイルス粒子の成熟過程は見られず、感染性をもたないという粒子の性質と矛盾しなかった(図2)。

#### D. 考察

げっ歯類細胞では、内在性レトロウイルスを絶えず産生している細胞があることが知られ

ている。抗体製造に使われるハイブリドーマでは、細胞内の小胞にウイルス様粒子が観察され細胞外に $10^6 \sim 10^8$ /mL程度のウイルス様粒子を産生することが知られている。またCHO細胞では、細胞内の小胞ではなく細胞質にウイルス様粒子が観察され、細胞外には $10^3 \sim 10^6$ /mL程度のウイルス様粒子が放出されると考えられている。幸いなことにCHO細胞から放出されるレトロウイルス様粒子は、感染性が認められず、危険視されていない。しかしレトロウイルスは極めて柔軟性に富んだウイルスである。そのため例えばCHO細胞に外来性レトロウイルスが感染した場合、組み換えなどによってヒト細胞に感染性をもつ組換えウイルスが出現することも十分考えられる。内在性レトロウイルスの遺伝子が明らかになれば、このような潜在的な危険性を評価することができるようになる。今回我々は、次世代シーケンサーによって解析された公開RNA-seqやゲノムデータベースを使ってウイルス様粒子をコードしている内在性レトロウイルス遺伝子を特定することに成功した。これによってCHO細胞の産生する内在性レトロウイルスの潜在的なリスクを評価することができるようになると考えられる。また遺伝子が明らかになったことによって簡便なウイルス様粒子のコピー数の測定が定量PCRによって可能となる。これによってCHO細胞から産生されるウイルス粒子数を簡単にモニターできるようになると考えられる。

今回ウイルス様粒子を産生していると考えられる内在性レトロウイルス遺伝子は主としてChERV-050801であった。ChERV-050801はベータレトロウイルスによく似ており、ごく少量の発現を認めたChERV-047669はガンマレトロウイルスに似ていた(図3)高い発現が認められた。ChERV-050801のGagタンパク質は、ウエスタンブロット解析の結果、細胞外に産生されたウイルス様粒子内では、プロテアーゼによるプロセッシングが起きていなかった。そのことから感染性を獲得するための成熟過程が起き

ておらず、感染性をもたないという従来までの報告を確認できた。しかし産生されるレトロウイルス様粒子のすべてが ChERV-050801 だけであるかどうかは不明であり、さらに検討を進める必要がある。

#### E. 結論

本研究では公開されている CHO の RNA-seq とゲノムデータを利用して、ウイルス様粒子を産生可能なクローンを絞り込み、ウイルス様粒子をコードしている新規内在性レトロウイルス遺伝子 ChERV-50801 を特定することができた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表等

未発表

報道発表等

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. チャイニーズハムスターゲノムから検索した内在性レトロウイルス

ERV*	Size (nt)	Genes	ORF** (amino acid residues)	PBS <sup>§</sup>	Primer
<b>ChERV-870801</b>	6086	<i>gag, pro-pol</i>	Gag (506)	nd	—
<b>ChERV-884193</b>	8885	<i>gag, pro-pol, env</i>	Gag (538)	nd	—
<b>ChERV-047669</b>	6726	<i>gag, pro-pol</i>	Gag (520)	nd	—
<b>ChERV-050801</b>	8201	<i>gag, pro-pol, env</i>	Gag (596), Pro-Pol (289), Env (583)	15 (331-345)	tRNA <sup>Pro</sup>
<b>CHIAP34</b>	6404	<i>gag, pro-pol</i>	Gag (567)	11 (309-319)	tRNA <sup>Gly</sup>

\*Provirus sequences were obtained from C\_griseus\_v1.0/crigril, Jul. 2013 using BLAT based search in UCSC (<http://genome.ucsc.edu>).

\*\*In ChERV-870801, ChERV-883193, ChERV-047669 and CHIAP34, ORF of *pro-pol* and *env* genes were disrupted by termination codons.

<sup>§</sup>PBS, primer binding site.

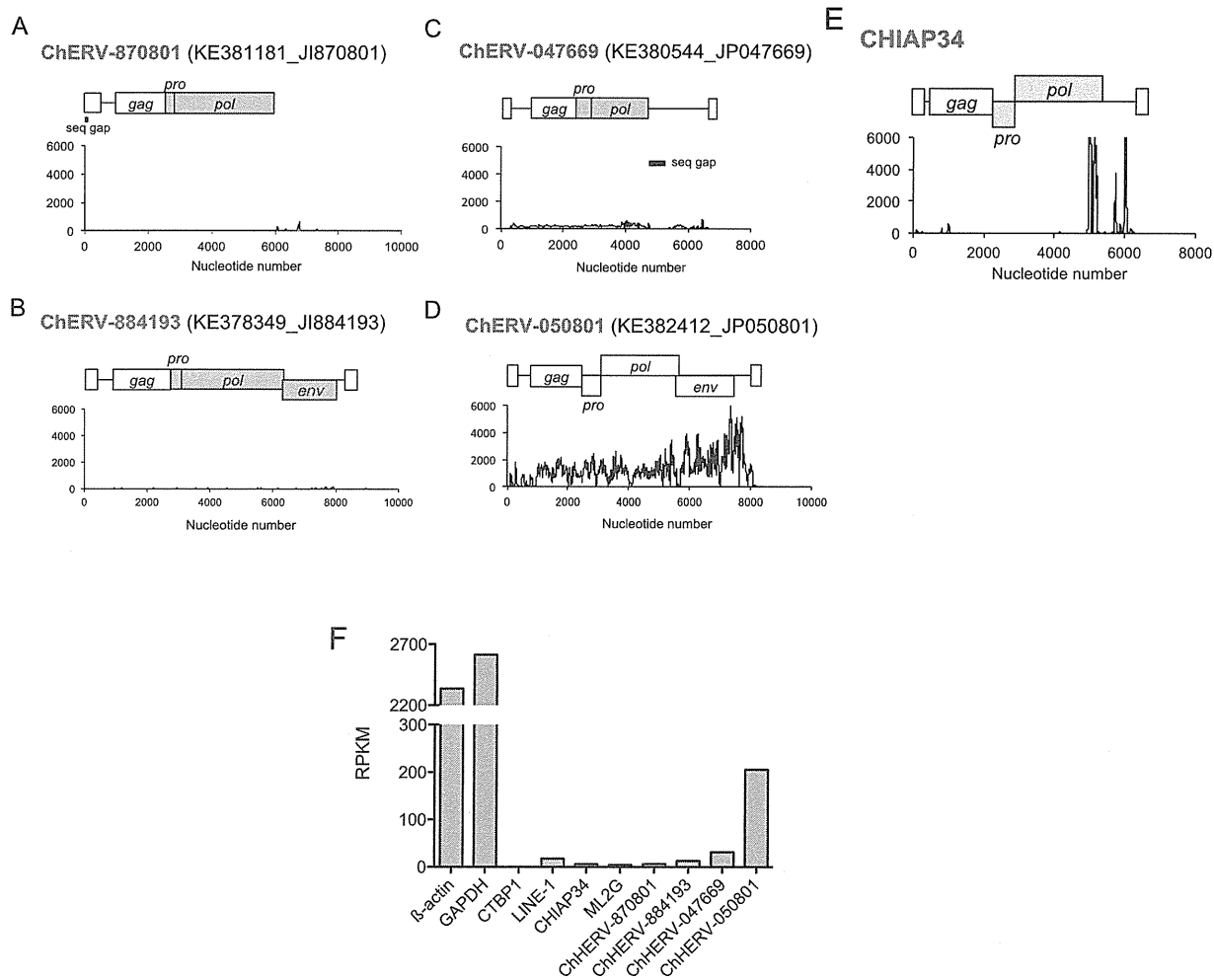


図1 CHO細胞のRNA-seqデータから gag ORF を保持している内在性レトロウイルスを選択し、リードをウイルスゲノムにマッピングした (A-E)。ChERV-050801 の発現レベルは  $\beta$ -actin の約 8% であった。



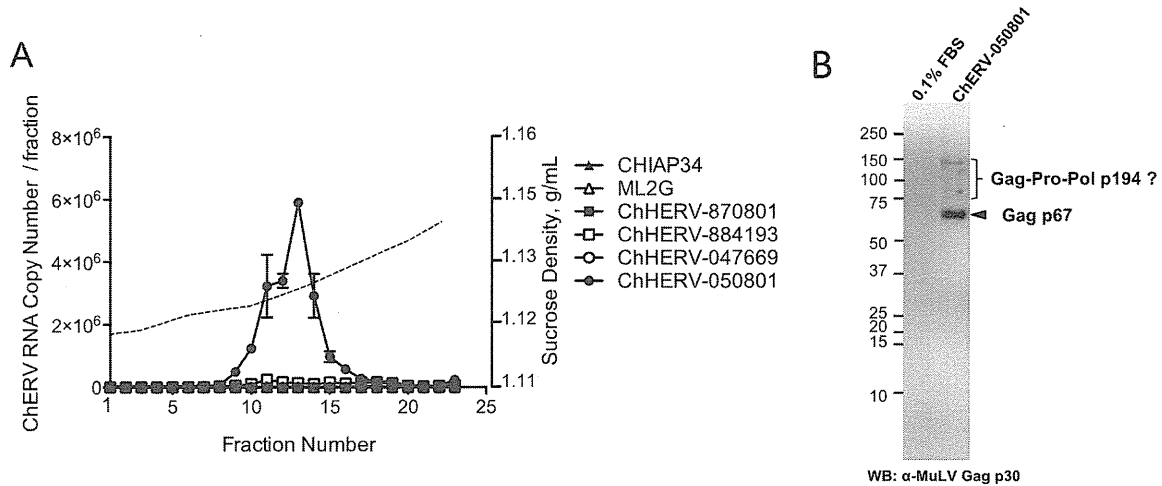


図2 CHO細胞の培養上清中に含まれる内在性レトロウイルス(A)とGag p67 (B)

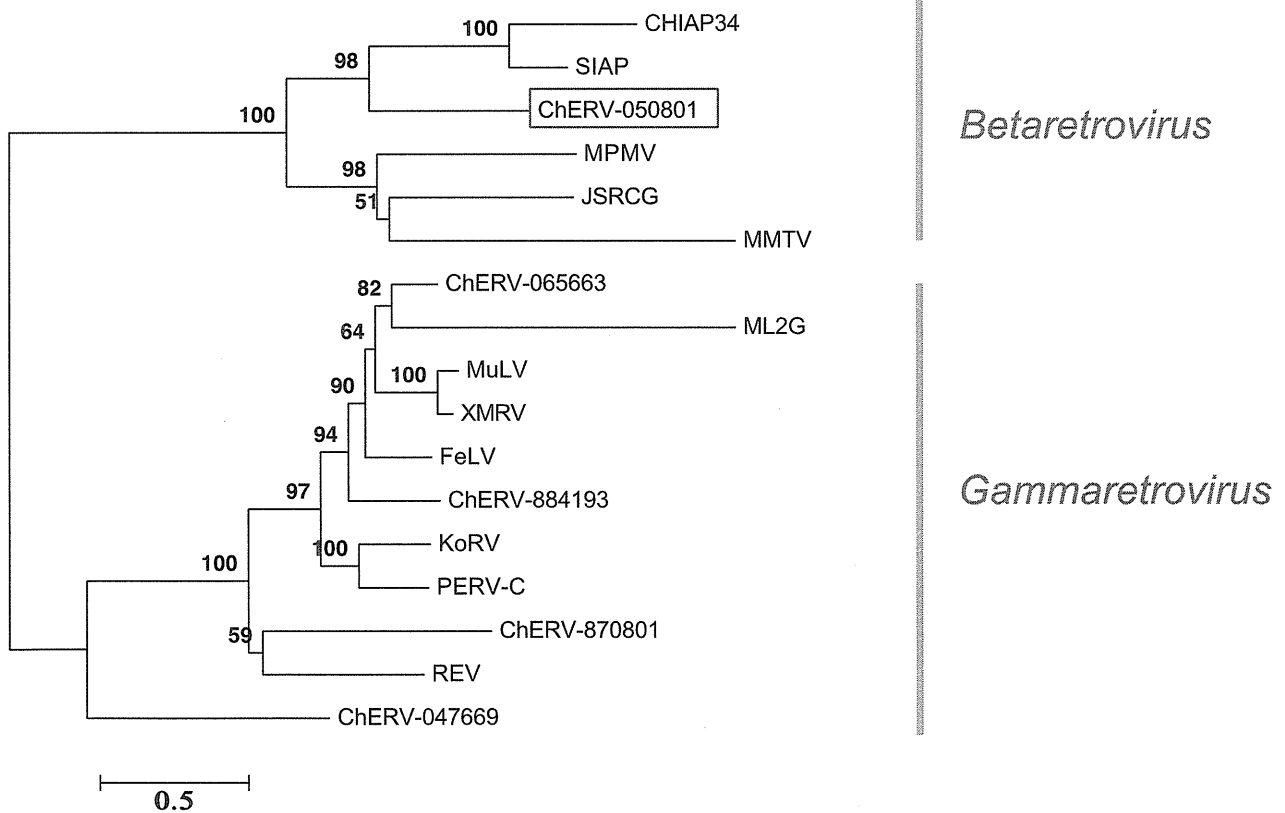


図3 ChERVの系藤樹解析結果

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書  
医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発

分担課題名：バイオ工程評価におけるウイルス・ウイルス様粒子の解析と測定法の開発  
(Nuclease 処理による B19 ウイルス粒子中ゲノム測定法の改良ーウイルス除去膜評価への応用ー)

分担研究者 坂井 薫 所属 日本血液製剤機構 中央研究所 研究三課  
研究協力者 高橋一恵、井手野祥次 所属 日本血液製剤機構 中央研究所 研究三課

[研究要旨] バイオ製剤製造工程のウイルス除去率評価に適した定量 PCR 法(以下 Q-PCR)構築の為、生体由来材料への混入リスクの報告がある A 型肝炎ウイルス、ヒトパルボウイルス B19 (B19) およびヒト免疫不全ウイルス HIV-1 を材料に、ウイルス除去膜処理前後の感染価や Q-PCR でのゲノム量の減少率を調査している。前年度までに、B19 のウイルス除去膜処理後液にはウイルスゲノム断片が多く存在することが明らかにし、それら断片の影響を少なくできる増幅サイズの大きな Q-PCR の確立について報告した。今回これに加え、各種条件でウイルス粒子(ビリオン)中ゲノムが不安定化することが知られている B19 について、遊離したゲノムのみを選択的に Micrococcal Nuclease 消化することで、ゲノム断片の影響を最小化した条件でのビリオン中ゲノムの Q-PCR を確立することができた。

#### A. 研究目的

Q-PCR はウイルスゲノム量を高感度かつ迅速、簡便に測定する手法として優れている。また、最近では培養細胞へのウイルス感染と組み合わせることでウイルス感染価の測定にも応用されている。しかし、ウイルスゲノム断片の残存などが原因となり、感染価と Q-PCR によるウイルスゲノム量の相関性が得られない場合がある。したがって、バイオ医薬品の製造工程におけるウイルス不活化/除去評価への Q-PCR の応用にあたり、その信頼性を十分に確認し、担保した方法を確立する必要がある。

バイオ医薬品の製造工程においてウイルス除去膜は、エンベロープウイルスや不活化に対する抵抗性が高いノンエンベロープウイルスの除去に広く応用されている。

本研究では、生体由来材料に混入リスクが報告されている A 型肝炎ウイルス、ヒトパルボウイルス B19 (B19) およびヒト免疫不全ウイルス HIV-1 を材料に、ウイルス除去膜の工程処理前後における感染価やさまざまな Q-PCR によるゲノム量の変化を解析し、工程のウイルス除去率評価に応用可能な Q-PCR の条件について課題と対応策を明確にすることを目的とする。本年度は B19 を材料としてサンプルの前処理による Q-PCR の最適化について検討した。B19 は様々な条件でビリオン中ゲノムが不安定化し核酸分解酵素によって消化されやすいウイルスであることが知られている。この B19 について遊離したゲノムのみを選択的に DNase I や Micrococcal Nuclease 消化することで、ゲノム断片の影響を最少

化した条件での Q-PCR を検討した。

#### B. 研究方法

##### (1) B19 感染価の測定

B19 はヒト血漿から得た臨床分離株 (genotype 1) を用いた。ヒト白血病細胞株 KU812 に B19 を感染させ、4 日間培養したのち細胞中で増幅した B19 mRNA を Q-PCR により定量することで感染価を測定した。

##### (2) 定量 PCR

Quantitect PCR kit (QIAGEN 社)を用い、TaqMan PCR による増幅サイズ 988 bp の Q-PCR(以下 988 bp Q-PCR)を実施した。リアルタイム PCR 装置は Applied Biosystems 7500 を用いた。

##### (3) B19 ビリオン及び B19 遊離ゲノムの調製

B19 ビリオンは B19 陽性血漿の超遠心分離による沈殿をフィブリノゲン製剤の工程中間品(ウイルス除去膜工程前液)で再懸濁して調製した。B19 遊離ゲノムは B19 陽性血漿から QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (QIAGEN 社)で抽出し調製した。

##### (4) 測定サンプルの DNase I 又は Micrococcal Nuclease 処理条件

B19 ビリオン中ゲノムを分解せず、遊離ゲノムのみ分解する条件を見出す為、フィブリノゲン製剤の工程中間品に懸濁した B19 ビリオン又は遊離ゲノムに対し 50~0.08 U/mL の DNase I 又は 10~0.016

U/mL の Micrococcal Nuclease を 10~60 分間反応させた。反応停止後ゲノム抽出を行い、988 bp Q-PCR により B19 ゲノムを定量した。

#### (5) ウイルス除去膜処理

所定のウイルスを添加したフィブリノゲン製剤の工程中間品を平均孔径  $19 \pm 2$  nm のウイルス除去膜である Planova 20N (旭化成メディカル) に  $24^{\circ}\text{C}$  で通液し、ろ過後液を回収した。ウイルス除去膜処理での B19 除去率を感染価と Micrococcal Nuclease 処理有り又は無し (以下 Nuclease+及び Nuclease- と略す) での 988 bp Q-PCR で測定した ( $n=2$ )。ウイルス除去能は工程前液のウイルス感染価あるいはウイルスゲノム量の値をろ過後液の値で除したもの ( $\text{Log}_{10}$  値) を対数減衰率 (LRV; Log reduction value) として算出した。

(倫理面への配慮)

研究対象としてヒトおよび実験動物を本試験では用いないため、人権擁護上の配慮、動物愛護上の配慮は特に必要がないものと判断した。

### C. 研究結果

#### (1) 測定サンプルの DNase I 又は Micrococcal Nuclease 処理条件

ビリオンでは 50 U/mL の DNase I 及び 10 U/mL の Micrococcal Nuclease 処理でややゲノムの減少傾向が認められたがその他の条件ではゲノム濃度の低下は認められなかった。一方、遊離ゲノムでは酵素の濃度及び反応時間依存的にゲノム濃度の低下が認められた。そこでビリオン中ゲノムが減少せず、遊離ゲノムが検出限界未満となる条件の内、反応時間が最短であった Micrococcal Nuclease 2 U/mL、30 分の反応をサンプル処理条件として設定した (図 1)。

#### (2) 感染価と定量 PCR で評価したウイルス除去膜 (Planova20N) での B19 除去率

感染価で評価した場合、分取したろ過後液 (F1~FE) はいずれも検出限界未満となったが LRV は  $\geq 2.20$ ,  $\geq 2.00$  と低く、またコントロールとしてろ過前サンプルを  $24^{\circ}\text{C}$  又は  $5^{\circ}\text{C}$  で静置したサンプル H1、H2 でも感染価の低下が認められたことから除去と不活化の判別は困難であった。一方 988 bp Q-PCR では Nuclease- では LRV が 2.04~2.56 であったのに対して Nuclease+ ではろ過前サンプルの値は殆ど低下せず、ろ過後サンプルでは大きく低下し検出限界未満となった為、LRV 値は  $\geq 5.03$  (Run1)、 $\geq 5.26$  (Run2) となった (表 1)。988 bp Q-PCR では Nuclease-、+ともにサンプル H1、H2 の値の低下は認められなかった。

### D. 考察

昨年度は、B19 のウイルス除去膜ろ過後液中に多く存在するゲノム断片の影響を少なくする為に 988 bp Q-PCR 法を確立し、これを用いたウイルス除去膜での B19 除去率評価について報告した。その結果、ろ過後液中のゲノム濃度が増幅サイズ 76 bp の Q-PCR (Artus Parvo B19 TM PCR Kit) より減少し、大きな LRV として評価されることを報告した。しかし 988 bp よりも大きなゲノム断片や完全長ゲノムが存在する可能性もあり、これらの影響は増幅サイズの拡大では回避できない。実際、低 pH や加熱による B19 の失活に際しゲノムがカプシドから遊離する現象が報告されており、大きな遊離ゲノム断片が測定サンプルに存在する可能性を考える必要がある。

今回、Micrococcal Nuclease でビリオン中ゲノムを分解せずに遊離ゲノムのみを選択的に分解できる条件を見出し、遊離ゲノムやその断片の影響を最小化することができた。その結果、感染価による評価では、静置のみのコントロールサンプル (H1、H2) でも感染価の低下が認められ B19 のウイルス除去膜による LRV の評価が困難であった条件においても、988bp Q-PCR では Nuclease 処理の有無に関わらず静置のみによる H1、H2 サンプルのゲノム濃度の低下は認められなかった。このことより、Nuclease+条件での 988 bp Q-PCR は感染価の有無に関わらず、ゲノムを含む全てのビリオンを選択的に測定できるものと考えられた。また、本法は感染価よりも測定感度が高いにも関わらず、ウイルス除去膜工程のろ過後液で検出限界未満にまで B19 ゲノムが除去されたことを示すことができた。以上より、988 bp Q-PCR は Nuclease+条件で B19 のウイルス除去膜での LRV を適正に評価でき、ウイルス安全性評価の面からも有用な手法であることが示された。

今回フィブリノゲン組成で遊離ゲノムが選択的に消化可能であったが、他の組成についても応用可能か今後の検討が必要である。

### E. 結論

ウイルス除去膜での B19 除去率評価を Q-PCR で実施するにあたってその最適化を検討している。遊離ゲノム断片の影響を除く為、増幅サイズの拡大に加えて Nuclease による遊離ゲノム分解条件を検討し、ビリオン中ゲノムに影響せず、有効に遊離ゲノムを分解できる条件を定めた。フィブリノゲン製剤の工程中間品にスパイクした B19 のウイルス除去膜ろ過実験から、サンプルの Nuclease 処理が除去率評価に有効であることが確認できた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tsujikawa M, Nishigaki H, Yoshikawa M, Furuki R, Takahashi K, Adan-Kubo J, Shimamura Y, Urayama T, Hattori S, Sakai K, Yunoki M, Ikuta K.: Variability of parvovirus B19 genotype 2 in plasma products with different compositions in the inactivation sensitivity by liquid-heating. Vox Sang. 2012;102(2):93-9
- 2) Tsujikawa M, Ohkubo Y, Masuda M, Tanaka H, Takahashi K, Sasaki Y, Yunoki M, Ikuta K.: Caution in evaluation of removal of virus by filtration: Misinterpretation due to detection of viral genome fragments by PCR.. J Virol Methods. 2011;178(1-2):39-43
- 3) Yunoki M, Tsujikawa M, Urayama T, Sasaki Y, Morita M, Tanaka H, Hattori S, Takechi K, Ikuta K.: Heat sensitivity of human parvovirus B19. Vox Sang. 2003; 84(3):164-9.
- 4) Urayama T, Cameron R, Sato T, Tuniki 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. Biologicals.2013;41(2):125-7

### 2. 学会発表

- 1) 服部 眞次、高橋 一恵、浦山 健、井手野 祥次、古木 理恵、上田 千晶、坂井 薫、柚木 幹弘、生田 和良: A型肝炎ウイルスKRM238株の熱感受性評価における有用性. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012.11.13-15) 大阪
- 2) 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 回日本血液事業学会 (2012.10.17-19) 仙台

## G. 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

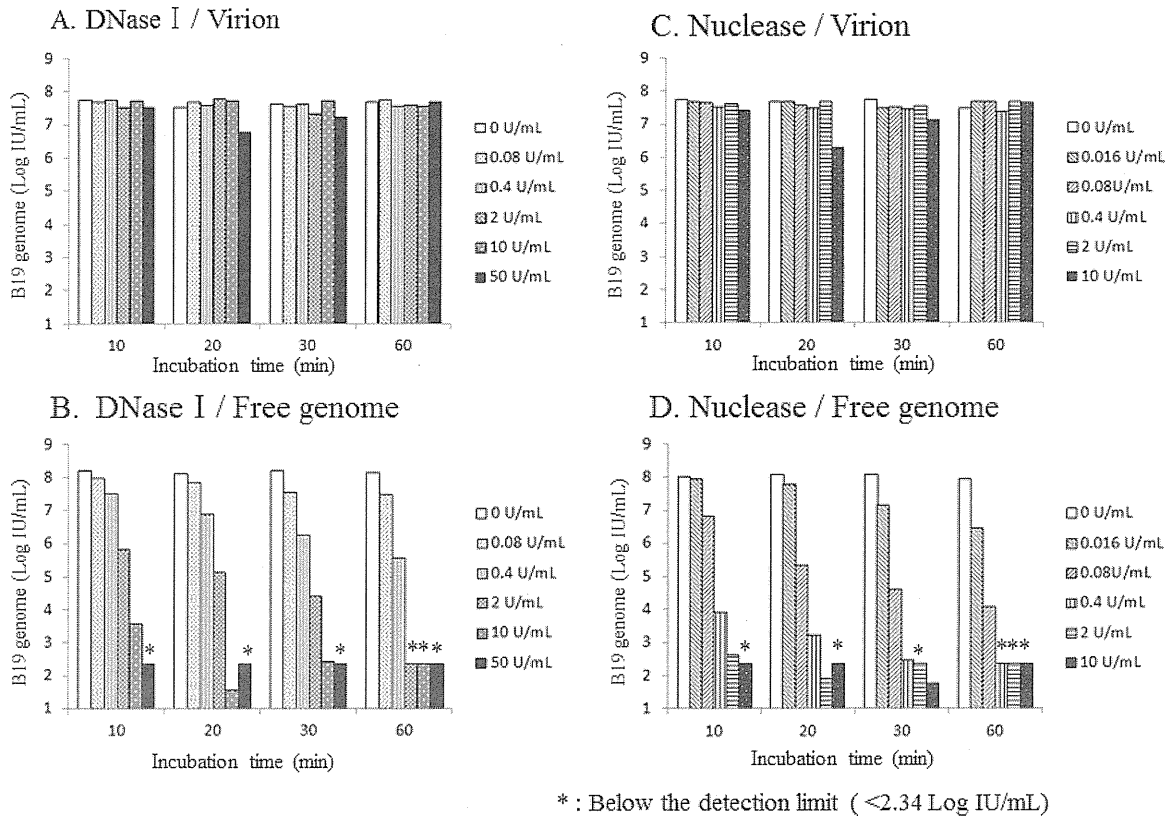


図1 B19 ビリオン中ゲノム及び遊離ゲノムに対する DNase I 又は Micrococcal Nuclease の作用

表1 ウイルス除去膜 (Planova 20N) での B19 除去率評価  
 —Q-PCR での評価における Nuclease 処理の効果と感染価との比較—

Assay	B19 titer [log (total IU)] or Log (total TCID <sub>50</sub> ) (run1 / run2)		LRV	
	Load	Filtrate or holding		
Q-PCR (Nuclease -)	10.25 / 10.25	F1	7.96 / 7.88	2.29 / 2.37
		F2	8.09 / 8.21	2.16 / 2.04
		F3	8.08 / 8.20	2.17 / 2.05
		FE	7.69 / 8.05	2.56 / 2.20
		H1	10.12 / 10.20	0.13 / 0.05
		H2	10.27 / 10.20	-0.02 / 0.05
Q-PCR (Nuclease +)	9.90 / 10.13	F1	<4.87 / <4.87	≥5.03 / ≥5.26
		F2	<4.87 / <4.87	≥5.03 / ≥5.26
		F3	<4.87 / <4.87	≥5.03 / ≥5.26
		FE	<4.87 / <4.87	≥5.03 / ≥5.26
		H1	10.14 / 10.17	-0.24 / -0.04
		H2	10.19 / 10.13	-0.29 / 0.00
Infectivity	7.23 / 7.03	F1	<5.03 / <5.03	≥2.20 / ≥2.00
		F2	<5.03 / <5.03	≥2.20 / ≥2.00
		F3	<5.03 / <5.03	≥2.20 / ≥2.00
		FE	<5.03 / <5.03	≥2.20 / ≥2.00
		H1	<5.03 / 5.23	≥2.20 / 1.80
		H2	5.23 / 5.83	2.00 / 1.20

・ Load : ウイルス除去膜工程前試料      ・ F1, F2, F3, FE : ウイルス除去工程後試料 (溶出順にそれぞれ4分割して回収した)  
 ・ H1 : 無処理で除去膜工程と同時間 24°C で静置した工程対照試料      ・ H2 : 無処理で除去膜工程と同時間 5°C で静置した工程対照試料

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績 (2)

委託業務題目「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発」  
 II. 先端的生物医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発  
 国立衛薬品食品衛生研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Design and the validity test suitable for a therapeutic antibody potency assay using ELISA.	ISHII-WATABE Akiko, SUZUKI Takuo, NISHIMURA Kazuko, MORI Keitaro, YAMAGUCHI Hideto, TORIKAI Masaharu, YANAGIHARA Shigehiro, KOGA Junichi, WATANABE Takayuki, HAMAJI Yoshinori, ISHIDA Masato, MIYAMOTO Tomomi, KAWASAKI Nana	Rockville, USA (USP 6th Bioassay Workshop)	2014. 6. 2-3	国外
高分子 LC/MS バイオアナリシスの現状と課題について。口頭発表	橋井則貴	東京（第 27 回バイオメディカル分析科シンポジウム）	2014. 8	国内
バイオ医薬品の品質評価に関する最新動向。	石井明子	千葉（JASIS 2014 日本薬局方セミナー）	2014. 9. 5	国内
抗体医薬品 さらなる発展への課題：規制の観点から。	石井明子	東京（第 39 回日本薬学会関東支部学術講演会）	2014. 12. 13	国内
Effects of syringe material and silicone coating on the stability of pharmaceutical proteins. ポスター発表	ELENA Krayukhina, Kouhei Tsumoto, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui	横浜（第 14 回蛋白質科学会年会）	2014. 6. 27	国内
Effects of syringe material and silicone coating on the stability of pharmaceutical proteins. ポスター発表	ELENA Krayukhina, Kouhei Tsumoto, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui	Breckenridge, Colorado (Protein aggregation and immunogenicity)	2014. 7. 16	国外
Biophysical factors governing antibody aggregation. 口頭発表	内山 進	Breckenridge, Colorado (Protein aggregation and immunogenicity)	2014. 7. 17	国外
Biophysical studies on antibody aggregation. 口頭発表	内山 進	北九州（JAACT2014）	2014. 11. 12	国内

Size and Quantity Measurement of Subvisible Particles by Laser Diffraction Method. ポスター発表	Sinichiro Totoki, Gaku Yamamoto, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui	Breckenridge, Colorado (Protein aggregation and immunogenicity)	2014. 7. 16	国外
各種の抗体関連バイオ医薬品の投与症例における有害事象初回発現時期の解析. ポスター発表	平山奈保子, 小林 哲, 石井明子, 川崎ナナ, 豊島 聡	東京(第4回レギュラトリーサイエンス学会学術大会)	2014. 9	国内
抗体医薬品によるinfusion reactionの初回発現時期の比較. ポスター発表	小林 哲, 石井明子, 太田悠葵, 村山一茂, 高久明美, 豊島 聡, 川崎ナナ	松山(日本薬剤疫学会第20回学術総会)	2014. 10	国内
新しい昆虫産業を創る！—カイコにおける次世代ゲノム改変技術の開発と異分野融合—. 口頭発表	瀬筒秀樹	東京(H26年度日本農学会シンポジウム「ここまで進んだ! 飛躍する農学」)	2014. 10. 6	国内
トランスジェニックカイコで発現させた組換えタンパク質の解析. ポスター発表	黒岩聡志, 小久保倫文, 元川揺子, 桑原伸夫, 二橋美瑞子, 鈴木誉保, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 武田茂樹	横浜(第37回日本分子生物学会)	2014. 11. 27	国内
“新蚕業”創出に向けた基盤技術の開発と今後の展開方向. 口頭発表	瀬筒秀樹	東京(第7回公開シンポジウム「カイコ産業の未来」)	2015. 1. 16	国内
医薬品の開発・生産を目指した遺伝子組換えカイコの作製と高度化. 口頭発表	立松謙一郎, 笠嶋めぐみ, 坪田拓也, 二橋美瑞子, 鈴木誉保, 小林 功, 内野恵郎, 飯塚哲也, 米村真之, 高須陽子, 田村俊樹, 瀬筒秀樹	神戸(日本薬学会第135年会シンポジウム)	2015. 3. 26	国内
カイコが創る次世代抗体医薬品. 口頭発表	石井明子, 原園 景, 多田 稔, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 川崎ナナ	神戸(日本薬学会第135年会シンポジウム)	2015. 3. 26	国内
トランスジェニックカイコ由来ヒトリソソーム酵素の分子特性解析と化学酵素法に基づく人工糖鎖修飾. ポスター発表	西岡宗一郎, 小林 功, 原園 景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸駿介, 東 哲也, 辻 大輔, 瀬筒秀樹, 町井 博明, 石井明子, 川崎 ナナ, 伊藤孝司	愛媛(第55回日本生化学会 中国・四国支部例会)	2014. 6. 6	国内
組み換えカイコ絹糸腺由来ヒトカテプシンAの分子特性とエンドグリコシダーゼによる糖鎖改変.	西岡宗一郎, 小林 功, 原園 景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸駿介, 東 哲也, 辻 大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司	名古屋(第33回日本糖質学会年会)	2014. 8. 10	国内
トランスジェニックカイ	西岡宗一郎, 小林 功,	京都(第87回日本生	2014. 10. 18	国内

コ由来ヒトリソソーム酵素の分子特性解析とグライコシンターゼによる糖鎖修飾.	原園 景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸駿介, 東 哲也, 辻 大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司	化学学会大会)		
組換えカイコ由来ヒトリソソーム酵素の分子特性とグライコシンターゼによる in vitro 糖鎖修飾.	西岡宗一郎, 小林 功, 原園 景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸駿介, 東 哲也, 辻 大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司	兵庫 (第5回グライコバイオロジクス研究会)	2014. 11. 1	国内
組換えカイコを用いるネオグライコバイオロジクスの創製.	伊藤孝司, 西岡宗一郎, 小林 功, 久保勇樹, 原園 景, 石井明子, 川崎ナナ, 瀬筒秀樹	神戸 (日本薬学会第135年会)	2015. 3. 26	国内
トランスジェニックカイコで発現させたがん抗原の解析.	武田茂樹	東京 (工学フォーラム 2014)	2014. 10. 26	国内
トランスジェニックカイコで発現させた組換えタンパク質の解析. ポスター発表	武田茂樹, 黒岩聡志, 小久保倫文, 元川揺子, 桑原伸夫, 二橋瑞子, 鈴木誉保, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹	横浜 (第37回 日本分子生物学会)	2014. 11	国内
Expression of the recombinant tumor antigen in transgenic silkworm. ポスター発表	Shigeki Takeda, Satoshi Kuroiwa, Michihumi Kokubo, Yoko Motokawa, Nobuo Kuwabara, Mizuko Futahashi, Takao Suzuki, Ken-ichiro Tatematsu, Hideki Sezutsu, Kazuaki Chikamatsu	群馬 (1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering)	2014. 12. 5	国内

## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
生物薬品の局方収載の現状と課題 (Current Status and Issues of Biologicals in Japanese Pharmacopoeia)	川崎ナナ	レギュラトリーサイエンス学会誌. 4(2), 149-154	2014	国内
8. バイオ後続品の品質評価の現状と課題. 特集1 バイオシミラーの今後のあるべき姿~ジェネリック医薬品も視野に~.	川崎ナナ	医薬ジャーナル. 50(5), 91(1375)-96(1380)	2014	国内



Characterizations of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis	Hashii N, Harazono A, Kuribayashi R, Takakura D, Kawasaki N	Rapid Commun. Mass Spectrom. 30:28 (8), 921-932	2014	国外
日本薬局方収載に向けて糖鎖試験法の開発	原園 景, 石井明子, 川崎ナナ	Pharm Tech Japan. 31(1), 81-92	2015	国内
第13章第2節 バイオ医薬品(組換えタンパク質医薬品)の品質関連規制と対応の留意点.	石井明子, 川崎ナナ	動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術. pp. 523-531, 技術情報協会	2014	国内
遺伝子組換えカイコ繭でのタンパク質生産	富田正浩	生物試料分析. 37, 159-168	2014. 6. 30	国内
Analysis of Perception Gap on Alliance Activities between Japanese Biotechnology Venture Companies and Pharmaceutical Companies	Shimokawa M, Kobayashi K, Sekino K, Toyoshima, S	Regulatory Science for Medical Products. 5(1), January, 13-27	2015	国内
遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質生産	立松謙一郎	JATAFF ジャーナル. 2(7), 31-37	2014. 7	国内
医療用有用タンパク質の生産を目指した組換えカイコの作製と展開	瀬筒秀樹, 立松謙一郎	生化学. 86(5), 553-560	2014. 10	国内
カイコの遺伝子組換え技術の新展開	瀬筒秀樹	JATAFF ジャーナル. 2(7), 24-30	2014. 7	国内
<i>In vivo</i> crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology?	Gallat FX, Matsugaki N, Coussens NP, Yagi KJ, Boudes M, Higashi T, Tsuji D, Tatano Y, Suzuki M, Mizohata E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Park J, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nango E, Itoh K, Coulibaly F, Tobe S, Ramaswamy S, Stay B, Iwata S, Chavas LM.	Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 17, 369-370	2014. 7	国外







201433009A(3/4)

厚生労働科学研究委託費

創薬基盤推進研究事業

医薬品等の品質・安全性確保のための  
評価法の戦略的開発

平成26年度 委託業務成果報告書 (第3分冊)

核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発

(H26 - 創薬 - 一般 - 009)

受託者 (研究代表者) 合田 幸広

平成27 (2015) 年3月



本報告書は、厚生労働省の創薬基盤推進研究事業による委託業務として、合田 幸広が実施した平成26年度「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発」の成果を取りまとめたものです。