

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26501008

研究課題名(和文)細胞組織加工製品における「ウイルス安全性実現のための基本スキーム」に関する研究

研究課題名(英文)A basic scheme for viral safety in cell-based products

研究代表者

遊佐 敬介 (Yusa, Keisuke)

国立医薬品食品衛生研究所・再生・細胞医療製品部・主任研究官

研究者番号：30200869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞加工製品はバイオ医薬品等の他の製品と異なり、原料、中間体、最終製品共に細胞を含んでいるので、製造工程に低pH処理等によるウイルスの不活化やウイルスフィルター濾過といった除去工程を組み入れることができない。そのため迅速、簡便、高感度にウイルスを検出することが重要である。現行の試験法である核酸増幅検出法(NAT)に加えて網羅的な手法である次世代シーケンサー(NGS)法を組み合わせることによって製品のウイルス安全性が担保される。本研究では原料から最終製品まで、それぞれの試験法の特徴を生かしたウイルス試験について検討し、安全性を担保するためのスキームを樹立した。

研究成果の概要(英文)：Viral safety is a critical issue for cell-based products. Their starting materials (human cells or tissues in most of cases), intermediates, and final products are fragile cells or tissues, meaning that conventional treatments of virus inactivation or removal cannot be applied. NAT (nucleic acid amplification test) is a concise, quick, and highly sensitive method to detect viral nucleotides, but not suitable for comprehensive detection of viruses. Therefore an alternative virus test is needed due to the specific properties of cell-based products. To address this issue, we established a pipeline for detection of adventitious viruses in cell stock/cell bank using next generation sequencing (NGS) method. Combination of virus tests using NGS and NAT will ensure viral safety in cell-based products, although there are still several points to be improved in future.

研究分野：ウイルス学、ウイルス安全性

キーワード：ウイルス 再生医療 細胞加工製品 安全性 核酸増幅法 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

平成26年11月に改正薬事法と再生医療安全性確保法が施行となり、医薬品・医療機器とは別に再生医療製品と遺伝子治療製品からなる「再生医療等製品」という新しい枠組みが出来た。細胞加工物は、難治性疾患治療への期待と同時にiPS細胞等の我が国の基礎研究の優位性を生かした成長産業としての期待も大きい。細胞加工物のさらなる開発と実用化を支える上で製品の安全性の確保は重要な課題である。特に製品へのウイルス混入をどのように防ぐかについては注意深い対応が必要である。

細胞加工物は生物由来原料を使って製造される他の製品と比べて際立った特徴を持っている。それは有効成分が細胞そのものであるため、他の製品には適用可能であるウイルスの不活化・除去といった化学的・物理的処理に馴染まないということである。実際ウイルス除去や不活化の工程を製造工程に組み入れるのは困難である場合が多い。ウイルスの製品への混入は過去の血液製剤のウイルス汚染事例を引くまでもなく重大な事態を引き起こす可能性があり、製品の安全性に対する信頼の失墜に繋がる。本研究では、細胞加工物のウイルス安全性をどのように担保していくべきかについて、生物由来原料であるウシ胎児血清(FBS)を次世代シーケンス法(NGS)によってウイルス核酸を検出し、新規ウイルス試験法の実用化への見通しについて検討した。

2. 研究の目的

細胞加工物は生物由来原料を使って製造される他の製品と比べて際立った特徴を持っている。それは有効成分が細胞そのものであるため、他の製品には適用可能であるウイルスの不活化・除去といった化学的・物理的処理に馴染まない。実際ウイルス除去や不活化の工程を製造工程に組み入れるのは困難である場合が多い。ウイルスの製品への混入は過去の血液製剤のウイルス汚染事例を引くまでもなく重大な事態を引き起こす可能性があり、製品の安全性に対する信頼の失墜に繋がる(図1)。本研究では、細胞加工物のウイルス安全性に重要と思われる、主に他家細胞を用いた場合に細胞加工物のウイルス安全性をどのように担保していくべきかについて、また次世代シーケンス法(NGS)を用いて生物由来原料からウイルス核酸の検出を行った。

3. 研究の方法

国内で販売されているブランド、ロットが異なる6種類のFBSから核酸を抽出し、ウイルス核酸を検出した。FBSを0.22 μm filterで濾過後、50,000 rpm 2時間遠心し、そのpptからRNAの抽出・精製を行なった。

このRNAを用いて次世代シーケンサーで解析を行ない、NCBIのデータベースから構築したウイルス検出用のデータベースviral-y.2.3を作製した。このデータベースを用いてウイルス配列を検索した。

4. 研究成果

(1) ウイルス汚染原としての生物由来原料

細胞加工物の原材料でウイルス混入に関して高いリスクを持ち、かつ汎用される生物由来原料として注意すべき原材料のひとつにウシ胎児血清(FBS)がある。現在国内で承認されている細胞加工物は4品目あるが、そのいずれでも製造工程でFBSが使われている。国内で使われているFBSは米国連邦規則(9CFR113)ないしEMAのガイドラインに基づくウイルス試験済みのものが使われている。この試験法ではウシウイルスに感染感受性をもつ細胞を使ってウイルスを増殖させ、蛍光抗体法を用いて7種類のウイルスの有無を調べる。また赤血球凝集反応や細胞変性によってウイルスを検出する。しかしこれらの試験法でFBSに含まれるウイルスのすべてを検出できるわけではない。EMAのガイドラインでは、線照射等によってウイルスを不活化することでFBSの安全性を確保するように記載されている。しかしパルボウイルスのようにウイルス粒子径が小さく、エンベロープをもたないDNAウイルスは線抵抗性であることが知られている。特に近年ウシから見つかっているパルボウイルスに関しては不明な点も多く注意を要する。

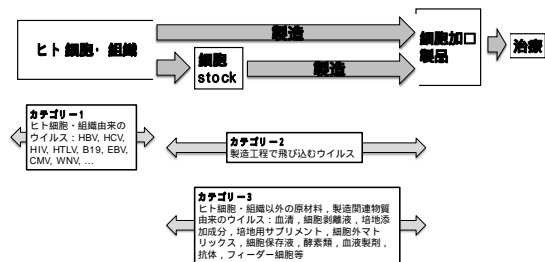


図1 細胞加工物のウイルス汚染を引き起こす要因を3つのカテゴリーに分類

(2) FBSに含まれるウイルス核酸の検出

実際に国内で市販されているFBSに含まれるウイルス核酸をNAT法で調べてみると、産地やブランドの異なるバッチでウシウイルス性下痢ウイルス(BVDV)やウシポリオーマウイルス(BPymV)が高頻度で検出される。FBSは数百頭から千頭単位のウシ胎児の血清をプールして製造されるため、現在使われているFBSバッチは産地を問わずこうしたウイルス核酸で汚染されている可能性が高い。そこでさらに未知のウイルスによる汚染の可能性なども考慮すると、ここでは線照射によるウイルスの不活化処理の重要性を改め

て指摘できる。こうしたウイルス核酸が NAT で検出できたので、NGS でも同様のウイルス核酸が検出できるかどうかを調べた。その結果、同様に BVDV (図2) や BPymV のウイルス核酸が検出された。

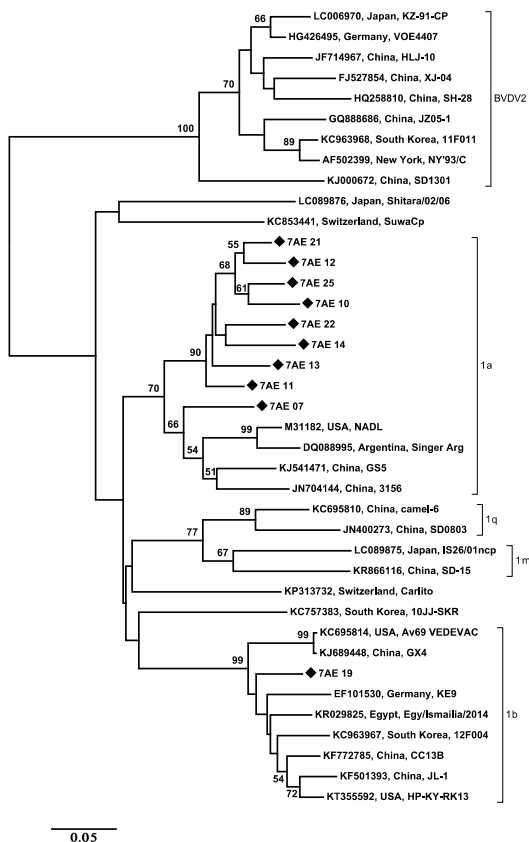


図2 FBS から検出された BVDV の塩基配列の系統樹解析が FBS に含まれていた BVDV の塩基配列

(3) NGS 法によるウイルス検出法の開発

細胞加工物のウイルス安全性は、原料であるヒト細胞・組織やストックされた iPS 細胞等 (必要に応じて中間製品, 最終製品) を迅速性と検出感度に優れたウイルス試験法で調べることによって担保される。現実には ICH Q5A やフィーダー細胞のウイルス安全性のためのガイドライン等に示された既知のウイルス試験に基づく試験法の運用が行われている。しかし細胞加工物の特徴に照らしてこれらのウイルス試験法では対応が難しいケースが予想される。ガイドラインに明示されているウイルス試験法は、ウイルスの感染性の有無を判定することに重点が置かれており、*in vitro*, *in vivo* 試験法ともに結果が出るまでに時間を要する場合が多い。またウイルス試験の多くはウイルスを取り扱う熟練した技術者やバイオセーフティーレベル 2 (BSL 2) の施設が必要であり、ウイルス試験委託会社に試験を委託する必要がある。これらの試験法はフィーダー細胞や細胞ストック等のウイルス試験法として適用可能だが、迅速性を要求される場合には核酸増幅法 (NAT) や次世代シーケンサー法 (NGS

法) が有用である。NAT 法は検出感度は優れており、短時間に特定のウイルス核酸を検出することは可能だが、未知のウイルスに対応できず、検出するウイルス種の数にも限界がある。

(4) NGS 法によるウイルス検出法の利点

NGS 法は感染細胞内で転写されるウイルスの遺伝子転写産物や細胞上清中からウイルスシーケンスを網羅的に検出する方法である。我々は、NGS 法によるウイルス試験法の実用化を目指して生物由来原料として FBS を取り上げ、ウイルス関連配列を検出する試験法について検討した。その結果、生物由来原料からウイルスシーケンスを高感度で検出するためのパイプラインを構築し、効率よくウイルスを検出できることがわかった。この解析を通じて明らかになった点として、

条件や検出する標的ウイルスによって検出感度が上下するが NAT 法で確認できたウイルスは NGS 法でも検出可能である

既知のウイルスゲノムデータとの類似性から近縁の未知のウイルスや多様性に富む RNA ウイルスを広い範囲で検出できる

感染性ウイルスを取り扱う設備やウイルス取り扱い技術者を必要としない

検出に必要なのは数 μg の核酸である

網羅的な解析により、複数のウイルスを同時に検出可能である

既存のウイルス試験法に比較して低コストで実施可能等である。

が挙げられる。

実用可能な試験法とするためには試験結果までの時間をいかに短縮するか、バリデーション等を含めて改善・整備すべき点もあるが、NGS の今後の技術的な進歩を考慮すると網羅的、高感度、低コストで結果が得られるウイルス試験法として実施可能だと考えられる。NAT 法に比べて簡便迅速な解析法とするためには、シーケンサー、試薬等の改善、開発も必要であろうと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 2 件)

遊佐敬介, 苑宇哲 (株)エル・アイ・シー, バイオロジクスの開発と品質・安全性確保 (第 2 章 第 2 節 レトロウイルス試験および内源性ウイルス試験), 2018

遊佐敬介, 苑宇哲 (株)エル・アイ・シー,
バイオロジクスの開発と品質・安全性確保
(第2章 第2節 非内在性ウイルスおよび
外来性ウイルス試験), 2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遊佐 敬介 (YUSA, Keisuke)

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医
療製品部 主任研究官

研究者番号: 30200869

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

苑 宇哲 (YUAN, Yuzhe)

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医
療製品部