

## 細胞加工物のウイルス安全性について

遊佐敬介<sup>#</sup>, 苑宇哲

### Viral safety for cell-based therapeutic products

Keisuke Yusa<sup>#</sup>, Yuzhe Yuan

Viral safety is a critical issue for cell-based therapeutic products. Here, we categorized adventitious viruses into the following three groups according to their route of contamination: (i) viruses derived from human cells or tissues, (ii) contaminating viruses introduced during manipulation of human cells or tissues, and (iii) viruses derived from raw materials such as fetal bovine serum (FBS). For the third group of viruses, we confirmed that commercially available FBS frequently contains bovine viral diarrhea virus (BVDV) and bovine polyomavirus (BPymV) nucleotides; however, the contaminating viruses in FBS are usually inactivated by gamma irradiation. Novel virus detection tests are required because of the specific properties of cell-based therapeutic products. Deep sequencing, as a virus detection assay, will be an alternative and useful technology to ensure product safety.

Keywords: viral safety, cell-based therapeutic product, raw materials

#### 1. はじめに

2014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もっている。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。ここではバイオ医薬品と細胞加工物のウイルス安全性確保に関する製造工程における違いを概観しながら、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) を用いた新規ウイルス試験法の実用化への見通しについて述べる。

#### 2. 細胞加工物への混入ルートによって想定される混入ウイルス

細胞加工物の安全性を考える上で、生物由来原料を使って製造されるバイオ医薬品のウイルス安全性がどのように確保されてきたかを振り返ることも意味をもつだろう。国内ではICH Q5Aガイドライン<sup>1)</sup>に準拠してバイオ医薬品のウイルス安全性が確保されて来た (図1)。この間、15年以上最終製品のウイルス汚染は報告されていない。現行のウイルス試験等のデータや経験はこの間に蓄積され、製品の安全性は十分担保されてきたといえる。しかしバイオ医薬品製造では細胞培養時バイオリア

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:  
Keisuke Yusa; Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext. 313; Fax: +81-3-5787-3831

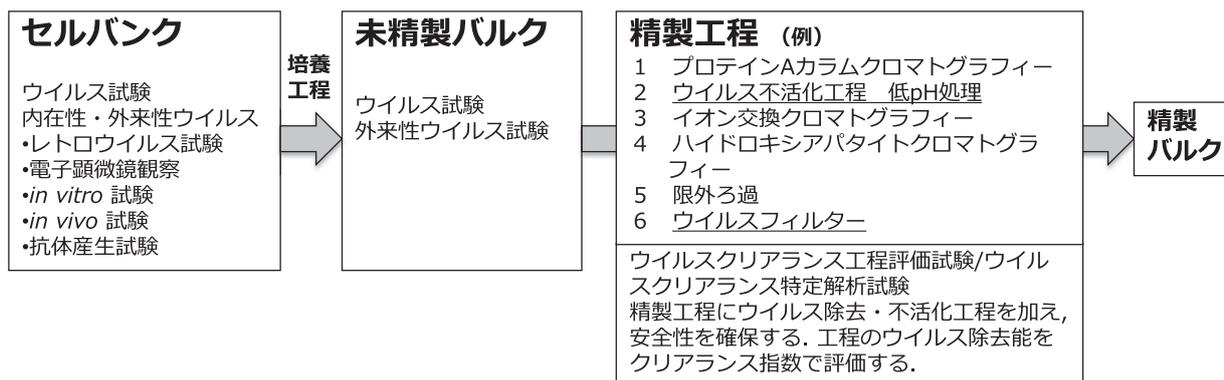


図1 バイオ医薬品製造におけるウイルス試験

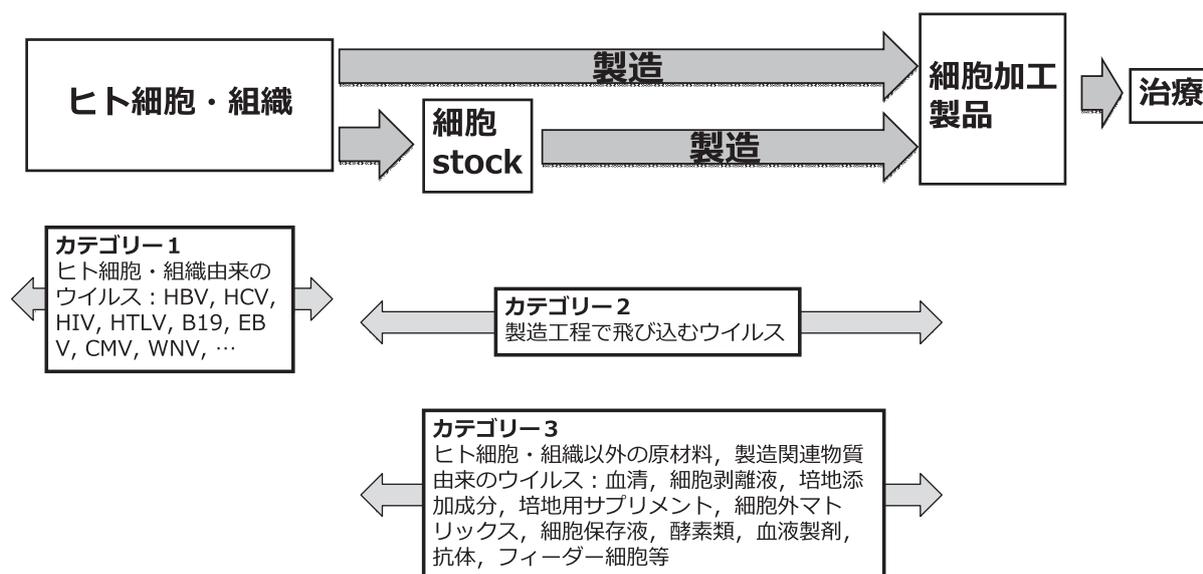


図2 細胞加工物へのウイルス混入ルート

クター内へのウイルスの混入事例があることから細胞加工物に関しても最終製品への混入リスクがあることを念頭に置く必要がある<sup>1,2)</sup>。バイオ医薬品製造において注目すべきは、万が一バルクにウイルスが混入してもその下流の精製工程にはウイルス不活化や除去といった工程が含まれており、いわば安全性のためのセーフティーネットとして機能しているという点である。バルクから最終製品までの精製工程は承認時にモデルウイルス等を用いてウイルスクリアランス評価が行われている。これに対し細胞加工物ではこのようなウイルスクリアランス効果をもつ工程が存在しない。これが両者で大きく異なる点である。

細胞加工物の特徴として次の点が挙げられる。①出発原料は多くの場合ヒト細胞・組織である（ドナーからのウイルス持ち込みの可能性がある）。②バイオ医薬品等他の製品と比較してその製造規模が小さい（ウイルス試験に使う検体量に制限がある）、③原料、中間製品、最

終製品ともに細胞を含んでいる（フィルターを使ったウイルス除去、加熱処理、低pH処理等によるウイルスの不活化が困難である）④最終製品の多くは、長期保存に不適である（ウイルス試験の迅速性が要求される）⑤バイオ医薬品等他の製品と比較して製品の多様性が高い（多様な原材料を使う場合ウイルス混入リスクを評価しにくい）。

以上製品の特徴をふまえて、細胞加工物へのウイルス混入ルートを考えてみたのが図2である。混入の可能性があるウイルスとしてまず挙げられるのは、原料であるヒト細胞にウイルスが感染している場合である。ヒトは生まれてから死ぬまでウイルスに常に暴露されている。多くの場合感染は成立せず、成立したとしてもその多くは免疫系によって排除される。しかし免疫系によって完全に排除されずに、特定の組織や細胞に潜伏するウイルスがいる。代表的なウイルスとしてレトロウイルス、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス等が挙げられる。HTLV

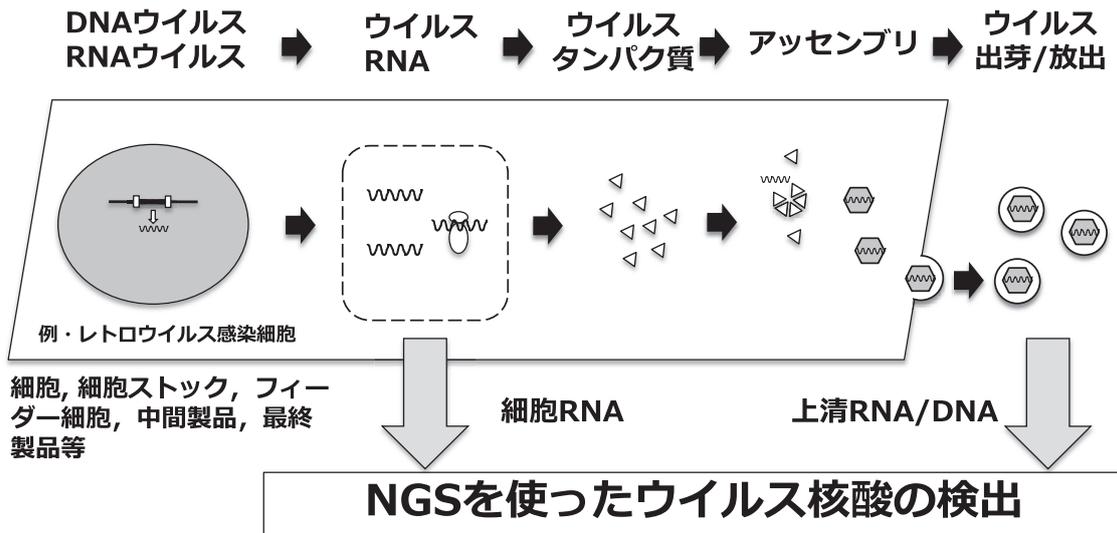


図3 次世代シーケンサー（NGS）を使ったウイルス試験法

（ヒトTリンパ好性ウイルス）やHIVはいずれもレトロウイルスであり、感染するとウイルスゲノムはヒトゲノムに挿入され、宿主のゲノムと一体化するため感染が成立すると排除することは困難になる。またこれらのレトロウイルスとB型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）は致死性疾患を引き起こすことから感染の有無を調べる必要がある。その他ヒトパルボウイルスB19も注意を要する。またEBウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、ウエストナイルウイルス（WNV）等は必要に応じて検査すべきウイルスである。ウインドウピリオドにより検出できない場合もあるが、ヒトウイルスは核酸増幅法（NAT法）によって簡便に感染の有無を判定し、原料としての適格性を判断することができる。

2つめのウイルス混入ルートとして、ヒト細胞を採取する際や製造中に外界や作業員からウイルスが混入するケースがある。ヒト細胞・組織の採取に携わる医療従事者、製造技術者の手技や無菌操作、製造設備もウイルス安全性の重要要件である。しかし、もっとも注意を払うべきは次に述べる生物由来原料を介したウイルスの混入である。

バイオ医薬品製造におけるバイオリクターへのウイルス混入事例のうち最も多いのが、ここでは3つめに分類した原材料・製造関連物質、特に生物由来原料を介したウイルスの混入である。既に述べたように細胞加工物ではウイルスクリアランスの工程がないため、感染性のウイルスが混入し、ヒト細胞に感染が成立すると最終製品までウイルスが持ち込まれてしまう可能性が高い。そのため原材料として使われる生物由来原料の安全性は極めて重要になる。

### 3. 生物由来原料のウイルス安全性

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<sup>3)</sup>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その他の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ことも指摘されている<sup>1)</sup>。EMAのガイドラインでは、 $\gamma$ 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 $\gamma$ 線抵抗性であることが知られている<sup>4)</sup>。特に近年ウシから見つかった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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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。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 $\gamma$ 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しておきたい。

#### 4. 世代シーケンサー (NGS) 法によるウイルス試験法の開発

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<sup>1)</sup>やフィーダー細胞のウイルス安全性のための指針<sup>7)</sup>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 (BSL2) 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。

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細胞RNAからウイルス関連配列を検出する試験法について検討してきた (図3)。その結果ウイルス感染細胞のRNAに含まれているウイルスシーケンスを高感度で検出するパイプライン

を構築し、効率よくウイルスを検出できることを明らかにした<sup>6)</sup>。この解析を通じて明らかになったことは、①条件や検出する標的ウイルスによって検出感度は多少上下するが今回用いたモデルウイルスではNAT法とほぼ同等の検出感度を示した、②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することが可能である、③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、④検出に必要なのは数 $\mu$ gの細胞RNAである、⑤同時に複数のウイルスを検出可能である、⑥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。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比較的簡便で、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。

#### 引用文献

- 1) <http://www.nihs.go.jp/dbcb/guidelines.html>
- 2) Bethencourt, V: *Nature Biotech.* 2009;27:681.
- 3) [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2013/06/WC500143930.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/06/WC500143930.pdf)
- 4) Nims RW, Gauvin G, Plavsic M: *Biologicals.* 2011;39:370-7.
- 5) Lau SK, Woo PC, Tse H, Fu CT, Au WK, Chen, XC, *et al.*: *J Gen Virol.* 2008;89:1840-8.
- 6) Yuan *et al.* unpublished data.
- 7) <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/isyoku2/sisin.html>